

氏名	永 井 淳
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博 乙 第 2738 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)
学位論文題目	歯周病細菌によって活性化される $\gamma\delta$ T 細胞の性状
論文審査委員	教授 村山 洋二 教授 谷口 茂彦 教授 福井 一博

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【研究目的】

T細胞レセプター $\gamma$ 鎖および $\delta$ 鎖のV領域がそれぞれV $\gamma$ 9およびV $\delta$ 2-遺伝子セグメントによってコードされている $\gamma\delta$ T細胞(V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞)は、末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の大半をしめる亜群である。同細胞は、細胞内寄生微生物感染に際して、65-kDa heat shock protein (hsp65)を標的抗原とする細胞傷害活性を示す。Hsp65は、原核および真核生物の間でも相同性が高く、細菌hsp65で活性化されたV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞は、宿主hsp65をも認識する。そこで、V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞は、自己免疫疾患の成立機序を説明できるユニークな細胞亜群として注目されている。

歯周ポケットに存在する細菌が、宿主組織に侵入してマクロファージに貪食される場合には、V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞が活性化され、自己hsp65とも交差反応するような免疫応答を起こすことが想像される。本研究は、各種歯周病細菌に対する $\gamma\delta$ T細胞の応答の免疫生物学的な性状、とりわけV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞によって歯周病細菌のhsp65が認識されるかどうか、また、そのような細胞が宿主hsp65を認識するかどうかを $\gamma\delta$ T細胞の増殖活性ならびに細胞傷害活性の面から調べたものである。

#### 【研究方法】

1. 被検細胞：歯周疾患ならびに全身疾患を持たない被験者から得た末梢血単核球を、プラスチック表面への付着性の有無によって分画し、非付着性細胞画分(リンパ球)および付着性細胞画分(単球)を得た。それぞれの細胞は、同一ヒト血清を20%の割合に含むRPMI1640培地に浮遊し、実験に供した。

2. 被検細胞の刺激：リンパ球の刺激は、あらかじめ細菌を貪食させた単球と混合培養することで行った。なお、細菌にはActinobacillus actinomycetemcomitans Y4(Aa), Porphyromonas gingivalis 381(Pg), Fusobacterium nucleatum ATCC 25586(Fn), およびTreponema denticola ATCC 35405(Td)の生菌, ならびにオートクレーブ滅菌した死菌を用いた。また、陽性対照の系には、Streptococcus pyogenes Su(Sp)を用い、陰性対照の系には細菌を加えなかった。
3.  $\gamma \delta$  T細胞の増殖活性：上述の刺激を行って一定時間培養した後、刺激した系と陰性対照の系の $\gamma \delta$  T細胞数の差をもって増殖活性とした。なお、系の $\gamma \delta$  T細胞数は、生細胞数、および、免疫蛍光法を用いて調べた生細胞中の $\gamma \delta$  T細胞の割合から計算した。
4.  $\gamma \delta$  T細胞の細胞傷害活性：上述の培養細胞と混合培養した $^{51}\text{Cr}$ 標識標的細胞から培養液中に放出された $^{51}\text{Cr}$ の放射活性をもって細胞傷害活性を表わした。なお、標的細胞として、NK細胞にもHLAclass I 拘束性の細胞障害性T細胞にも非感受性で、かつV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞感受性のBurkitt's lymphoma B細胞株Daudi, ならびに、NK細胞感受性の赤白血病細胞株K-562を用いた。

#### 【研究結果】

1.  $\gamma \delta$  T細胞の増殖活性：V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞の増殖活性は、Aa生菌ならびに陽性対照菌による刺激で強く、またPg生菌による刺激でわずかに誘導された。しかし、Pg, Fn およびTd生菌, あるいはいずれの死菌による刺激も、V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞増殖を誘導しなかった。
2.  $\gamma \delta$  T細胞の細胞傷害活性：Aa生菌で刺激した $\gamma \delta$  T細胞のDaudi細胞に対する細胞傷害活性は陰性対照および陽性対照刺激での $\gamma \delta$  T細胞のそれより3倍高かった。なお、K-562に対する細胞傷害活性は陰性対照のそれと同一であった。

#### 【考察と結論】

本研究の想定を裏付ける結果を得た。すなわち、末梢血V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞は、生きたAaあるいはPgを貪食した単球の刺激によって増殖活性および細胞傷害活性を誘導された。V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞が、これらの細菌のhsp65を抗原認識した結果と考えられる。TdもAa, Pgと相同性の高いhsp65を持つが、Tdの刺激ではV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞活性の誘導は起こらなかった。しかも、AaおよびPgでも死菌にはV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞の活性化を誘導する能力がなかった。この菌種間、ならびに菌の生死の別による誘導能の違いは、さらに細菌との単球との相互作用、とりわけ細菌による単球のV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞に対する二次的刺激の修飾の異なりの面から、検討されねばならないと考えられた。

またこのようにして増殖したV $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞は、同種細胞に対して細胞傷害活性を示した。

歯周組織では、条件さえ調べば、歯周病細菌が生菌としてマクロファージに貪食され、V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞の活性化を誘導して自己反応性の歯周組織破壊に関わる可能性がある

と結論した。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病細菌を貪食した末梢血単球の刺激によって $\gamma\delta$ T細胞のサブセット（V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞）が活性化され増殖することを示唆する結果を得たものであり、V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2細胞の関わる細胞性免疫応答が歯周病の発症と進行とに果たす役割を確立するための研究として位置付けられた。この知見は、自己応答性の免疫反応の介在した歯周組織破壊ならびに細胞内寄生性歯周病細菌の排除に新たなモデルを提起する価値ある業績と認められた。

本申請者は博士（歯学）の学位を得る資格を有するものと認める。