

第61回総会シンポジウム

結核および周辺疾患の免疫学的背景  
モノクローナル抗体によるリンパ球，単球サブセットの解析

座長 安藤正幸 (熊本大学医学部第1内科)

受付 昭和61年8月4日

The 61th Annual Meeting Symposium

IMMUNOLOGIC ASPECTS OF TUBERCULOSIS AND ALLIED DISEASES :  
ANALYSIS OF THE SUBSETS OF LYMPHOCYTES AND MONOCYTES WITH  
MONOCLONAL ANTIBODIES

Chairman : Masayuki ANDO \*

Symposists :

1. Studies of the Peripheral Blood Lymphocyte Subset on Pulmonary Tuberculosis and Allied Pulmonary Diseases : Dr. Masahiro TAKAMOTO, Omuta National Hospital.
2. Peripheral T-lymphocyte Subset Profiles and Their Modification in Pulmonary Tuberculosis : Dr. Nobuko KUMANO, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University.
3. Subsets Analysis of Pleural Lymphocytes : Dr. Katsutoshi TAKADA, 2nd Department of Internal Medicine, Nagoya City University School.
4. Evaluation of the Disease Activity and the Pathophysiological Analysis in Sarcoidosis with Monoclonal Antibodies : Dr. Sonoko NAGAI, 2nd Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University.
5. Changes of Macrophage Subsets in Granulomatous Lung Diseases : Dr. Mineharu SUGIMOTO, First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School.

(Received for publication August 4, 1986)

In tuberculosis and allied diseases such as sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis, cellular and humoral immunities may participate in the evolution of the diseases. Recently, using monoclonal antibody, we can detect the subpopulation of lymphocytes and monocytes (macrophages) which involve in the immunologic reaction. In this symposium we have studied the subset profiles of lymphocytes, monocytes, and pulmonary alveolar macrophages in peripheral blood, pleural effusion, bronchoalveolar lavage fluids (BALF) or lung tissues of pulmonary tuberculosis and allied pulmonary diseases, and discussion was made on the

\* From the First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School, Kumamoto City, Kumamoto 860 Japan.

clinical usefulness.

In the studies of lymphocyte subsets in peripheral blood, Dr. Takamoto reported that in healthy subjects T cell subsets decreased in the population of 70 years or older, but natural killer (NK) cell increased with the advance of age. This suggests the importance of consideration to aging factor in the evaluation of T cell subset profiles. He also reported the decreased T cell subsets in patients with pulmonary infections caused by *Mycobacterium tuberculosis*, atypical mycobacteria, and *aspergillus*, suggesting cell translation from peripheral blood to pulmonary lesions. Dr. Kumano reported that an imbalance of immunoregulatory T cell subsets was observed in some patients with pulmonary tuberculosis, and it normalized 3 to 6 months after chemotherapy with anti-tuberculous drugs. From these results she stressed that the assay of peripheral T cell subsets could be useful as an immunologic parameter.

In the studies of lymphocyte subsets in pleural fluids, Dr. Takada reported that helper/inducer T cell in tuberculous effusion was found to be strikingly higher than that of peripheral blood. There was, however, no significant difference between tuberculous effusion and carcinomatous effusion with respect to T cell subsets. He also reported the modulation of T cell subsets in pleural fluids by the therapy with anti-tuberculous drugs or an immunopotentiator drug of nocardia CWS.

Lymphocyte subsets in BALE were studied extensively by Dr. Nagai. In active stage of sarcoidosis, she observed significant increases of helper/inducer T cell, and the ratio of helper/inducer T cell to suppressor/killer T cell. On the contrary, the T cell population with interleukin-2 receptor was increased in healing stage, but not in active stage. In sarcoid granuloma helper/inducer T cell distributed diffusely all over the lesions, but suppressor/killer T cell was found only in the peripheral area of the granuloma. On the basis of these observations, she presented a hypothesis on the T lymphocyte alveolitis in the development of sarcoid lesion.

Using monoclonal antibody to monocytes, Dr. Sugimoto indicated the striking difference between surface marker of monocytes and that of alveolar macrophages. He also pointed out that surface marker in the alveolar macrophages of smokers were at least in part different from that of nonsmokers. Alveolar macrophages in summer-type hypersensitivity pneumonitis differed from those in pulmonary sarcoidosis not only in their surface marker but also in their function. From these results, he stressed that changes of surface marker in monocytes or alveolar macrophages result from the cell differentiation and maturation under the influence of local environment.

As a result of this symposium we conclude that studies on the subset profiles of lymphocytes and monocytes (macrophages) in pulmonary tuberculosis and allied pulmonary diseases such as sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis are useful to better understand the immunopathologic mechanisms of the diseases. To use as a clinical parameter for diagnosis and disease activity, however, further studies on the correlation of cell subset with cell function is needed.

#### はじめに

結核および周辺疾患（サルコイドーシス、過敏性肺炎など）においては、その発症や臨床経過に細胞性免疫および体液性免疫が関与している。最近、我々はモノクロー

ナル抗体を用いて、これら免疫反応に関与しているリンパ球や単球の亜集団を検出することが出来るようになった。そこで本シンポジウムでは、肺結核および周辺疾患における末梢血、胸水、気管支肺胞洗浄液および肺病変中に存在するリンパ球、単球、肺胞マクロファージの亜

集団像について研究し、その臨床的有用性について検討することにした。

末梢血中のリンパ球亜集団の研究において、高本（敬称略、以下同じ）は健康成人におけるT細胞亜集団は70歳以上になると低下するが、ナチュラル・キラー（NK）細胞は年齢と共に増加することを報告し、T細胞亜集団を評価する際には年齢因子を考慮することが大切であることを示唆した。また、結核菌や非定型抗酸菌あるいはアスペルギルスによる肺感染症のある人では、T細胞亜集団が低下していることを報告し、その理由として末梢血から肺病変へのT細胞の移行を示唆した。熊野は、肺結核患者のなかには免疫調節に関与するT細胞集団の不均衡がみられるものがあり、これらの症例は化学療法3～6カ月後に正常化したことから、末梢血T細胞亜集団の測定が免疫学的パラメーターの一つとして使用し得ることを報告した。

胸水中のリンパ球亜集団について、高田は、結核性胸膜炎の胸水中には、末梢中リンパ球にくらべて、ヘルパー/インデューサーT細胞がきわめて多くみられると報告した。しかし、T細胞亜集団像に関して、結核性胸水と癌性胸水の間に有意な差異は認めなかった。また、抗結核剤や免疫増強剤の使用により、胸水中のT細胞亜集団像を修飾できることが報告された。

気管支肺泡洗浄液中のリンパ球について、長井は精力的な研究を行い、活動期のサルコイドーシスにおいてはヘルパー/インデューサーT細胞の増加、およびヘルパー/インデューサーT細胞とサブプレッサー/キラーT細胞の比の

増加が認められたと報告した。これと対照的に、インター・ロイキン2レセプター保有T細胞は治癒期に増加し、活動期には増加しないことを報告した。また、サルコイドーシス肉芽腫においてはヘルパー/インデューサーT細胞は病変全体に分布しているが、サブプレッサー/キラーT細胞は肉芽腫の周辺部のみ認められるとした。そして、これらの知見に基づいて、長井はサルコイドーシス病変の形成におけるTリンパ球性胞隔炎に関する仮説を提唱した。

杉本は、単球に対するモノクローナル抗体を用いて、単球と肺泡マクロファージの表面マーカーに著しい差異があること、また喫煙者と非喫煙者の肺泡マクロファージ間にも一部表面マーカーに差異があること、そして更に、夏型過敏性肺炎の肺泡マクロファージはその表面マーカーのみならずその機能においてもサルコイドーシスの肺泡マクロファージとは異っていることを報告した。これらの結果から、単球や肺泡マクロファージの表面マーカーの変化は、局所環境の影響による細胞の分化と成熟の結果であることを強調した。

本シンポジウムの一つの成果として、肺結核および周辺疾患（サルコイドーシス、過敏性肺炎など）におけるリンパ球と単球（マクロファージ）の亜集団像の研究は、これら疾患の免疫学的病因機序をよく理解する上では有用であるが、しかし、これらを疾患の診断や疾患活動性の臨床的パラメーターとして使用するためには、今後更に、細胞亜集団とその機能との関連性が研究されねばならないとの結論を得た。

## 1. 肺結核症ならびにそれに続発する慢性呼吸器感染症におけるリンパ球サブセットの解析

国立療養所大牟田病院 高本正祇

### 1. はじめに

リンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体が作成され、それぞれの表面マーカーがリンパ球の機能を表現していることが判り、モノクローナル抗体によるリンパ球サブセットの研究は短期間のうちに長足の進歩をとげ臨床免疫の一検査法となった。

一方肺結核症はその発病は減少しているが老人結核や続発する呼吸器感染症等、現在でもなお多くの問題をかかえており、その背景には免疫学的異常が示唆される場合もある。

そこでこれら疾患の免疫学的背景を検討する目的で肺結核症ならびにそれに続発する呼吸器感染症に対してリンパ球サブセット値の解析を行った。

まず89名の正常健康人について測定を行い年齢による

変動、パーセント表示と実数表示について検討を加えた。

ついで呼吸器疾患では最も病巣局所を反映している胸水のリンパ球サブセットを肺結核症と肺癌で測定し、同時に測定された末梢血のそれと比較検討し、日常行われる末梢血リンパ球サブセット値はどこまで病巣、病状を反映しているかを考察した。

また肺結核症及びそれに続発する呼吸器感染症の代表として非定型抗酸菌症とアスペルギルス症について肺癌と対比させながら、リンパ球サブセットの動きを観察した。

最後に肺結核症の病期による変動及び治療経過による推移について検討を加えたので以下に報告する。

### 2. リンパ球サブセット測定法

モノクローナル抗体を蛍光色素と結合させ暗視野で蛍

光顕微鏡を用いて陽性細胞を算定する用手法と細胞自動解析装置による方法があるが最近は緑色蛍光色素 (FITC) と赤色蛍光色素 (PE) で同時に二重染色を行い、それぞれの色素に染まる群と染まらない群の4群に細区分しそれぞれの群に属するリンパ球の機能が研究されている。今回は可能なかぎり二重染色によった。

ヘパリン加採取した末梢血または胸水を溶血させた後にモノクローナル抗体を加え一定時間 incubate し洗浄後に Facs analyser にて測定した。陽性細胞の判定は抗体を添加していない細胞を流し自家蛍光の最も強い部

表1 モノクローナル抗体とリンパ球サブセット

Leu 4	: Pan T cells
Leu 3	: Helper/Inducer T cells
Leu3 <sup>+</sup> Leu8 <sup>-</sup>	: Helper T cells
Leu3 <sup>+</sup> Leu8 <sup>+</sup>	: Inducer T cells
Leu 2	: Suppressor/Cytotoxic T cells
Leu2 <sup>+</sup> Leu15 <sup>+</sup>	: Suppressor T cells
Leu2 <sup>+</sup> Leu15 <sup>-</sup>	: Cytotoxic T cells
OKDR	: B cells
Leu4 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	: Activated T cells ?
Leu 7	: Natural Killer cells
Leu 11	
	Leu11 <sup>+</sup> Leu7 <sup>-</sup>
	Leu11 <sup>+</sup> Leu7 <sup>+</sup>
	Leu11 <sup>-</sup> Leu7 <sup>+</sup>
	Leu7 <sup>+</sup> Leu2 <sup>+</sup>

分までを陰性とした。

表1は今回使用したモノクローナル抗体とそれぞれが表現する機能を示したものである。

(+), (-)を肩字してあるものが二重染色によるものである。7, 11, 及び2aによるNK cellの亜画分は現在では, 11<sup>+</sup>7<sup>-</sup>, 11<sup>+</sup>7<sup>+</sup>, 11<sup>-</sup>7<sup>+</sup>の順にNK活性が強く, 7<sup>+</sup>2a<sup>+</sup>は幼若型と言われている。

### 3. 年齢別正常値

リンパ球サブセット値の正常値の報告は少なく特に二重染色によるものはまだみあたらない。そこで我々はまず正常値の検討を行った。

病院勤務者及び老人ホーム入居中の者で胸部レ線所見, 検血, 血液生化学検査に異常を認めなかった24歳より91歳までの89名について全項目について測定した(図1)。

リンパ球数 Leu4, Leu3, Leu2等のT cell系は20歳代及び70歳以上で低下が目につくほか Leu4は年齢と共に低下していることが判った。30歳代より50歳代では比較的安定している。T4/T8比は60歳以上で上昇の傾向が見られる。これは Leu2の低下に起因するものと思われる。

図2は Leu3を3<sup>+</sup>8<sup>-</sup>の helper, 3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>の inducer, Leu2を2<sup>+</sup>15<sup>+</sup>の suppressor, 2<sup>+</sup>15<sup>-</sup>の cytotoxic に細区分したものである。inducerの20歳代の低値はみられるほかは年齢による変動は見られない。

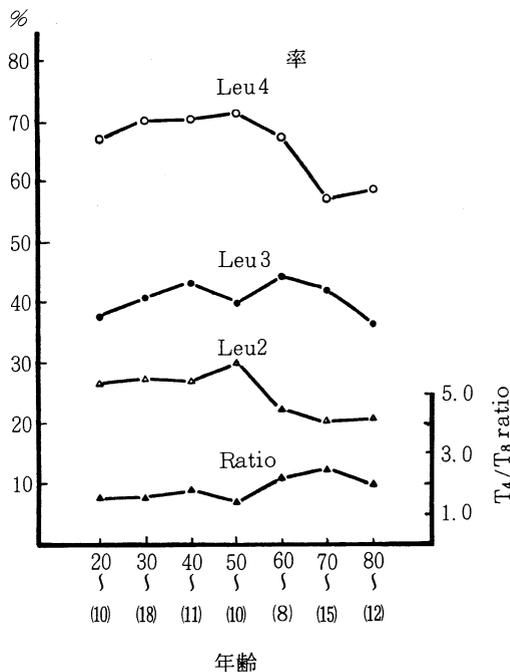
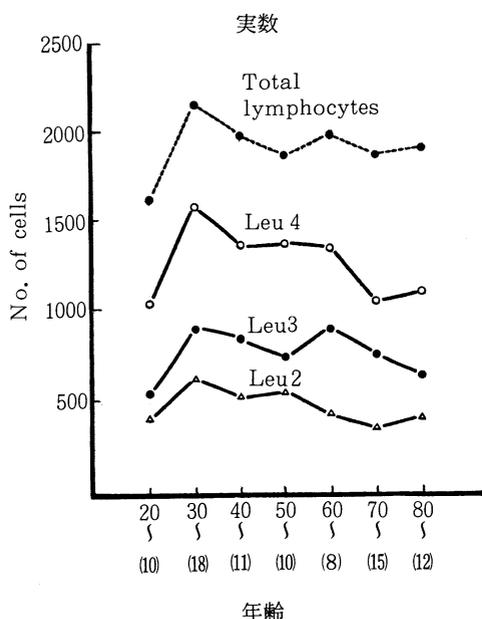


図1 年齢別リンパ球サブセット

OKDRはB cellを4<sup>+</sup> DR<sup>+</sup>はactivated T cellを表現するものであるがいずれも年齢による動きはない。

いわゆるNK活性細胞と言われているLeu7, Leu11についてみると(図3) Leu7の60歳代での低下は見られるが、全体的に年齢とともに上昇しているのが判る。報告でもLeu7は加齢と共に上昇すると言われている。

4. 末梢血と胸水

呼吸器疾患における胸水は病巣局所を表現しているものと思われる。肺結核症9例, 肺癌9例について胸水及び末梢血を同時に測定した。

図4上段が肺結核症, 下段が肺癌で末梢血と胸水を対比させたものである。肺結核症の場合, リンパ球数, Leu4, Leu3, Leu2, OKDRとT cell系, B cell系ともに非常によく胸水へ移行するが, 肺癌の場合移行が悪いことが判った。特に肺癌ではLeu2の移行は悪く結果として胸水中のT4/T8比は上昇した。

次にいわゆるNK cellと言われるLeu7, Leu11は両疾患ともにほとんど胸水へ移行しないことが判った。

肺結核症の場合, リンパ球の病巣への動員が考えられ, これを念頭において末梢血の成績を評価すべきであろう。

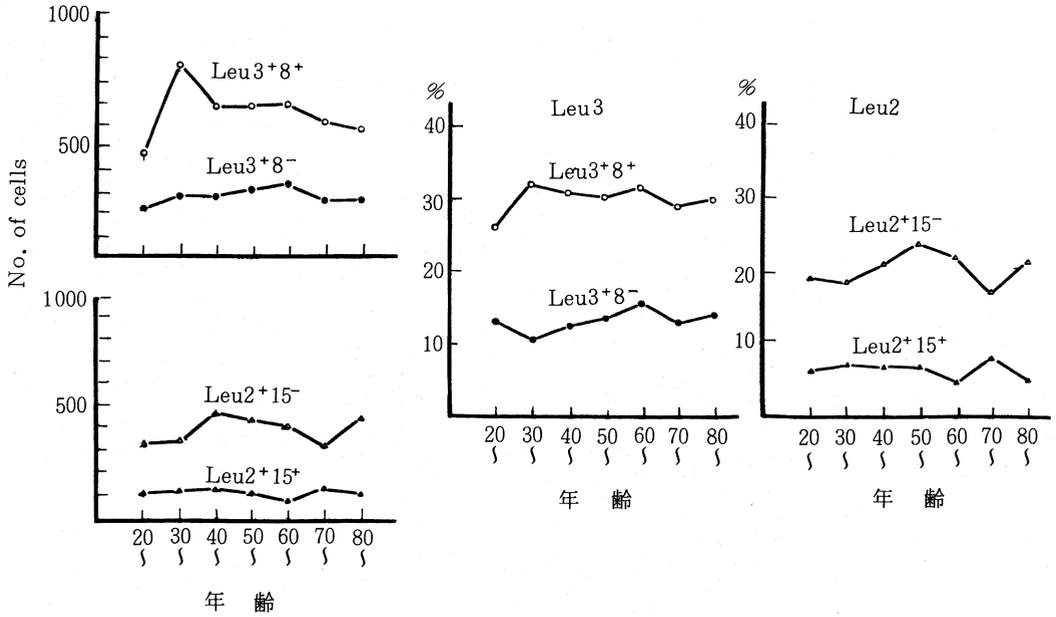


図2 年齢別リンパ球サブセット

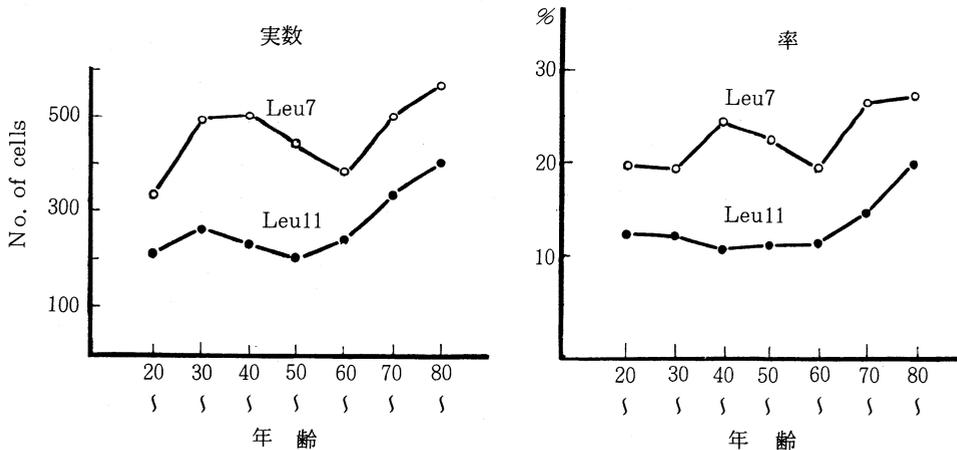


図3 年齢別リンパ球サブセット

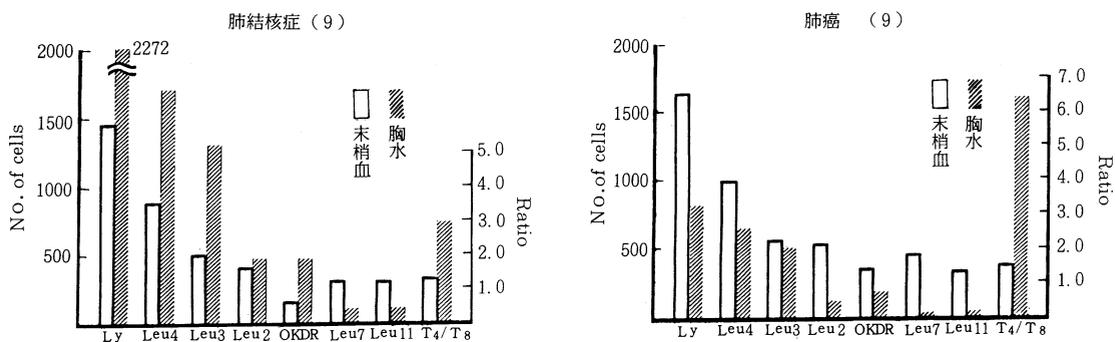


図 4 末梢血と胸水との対比

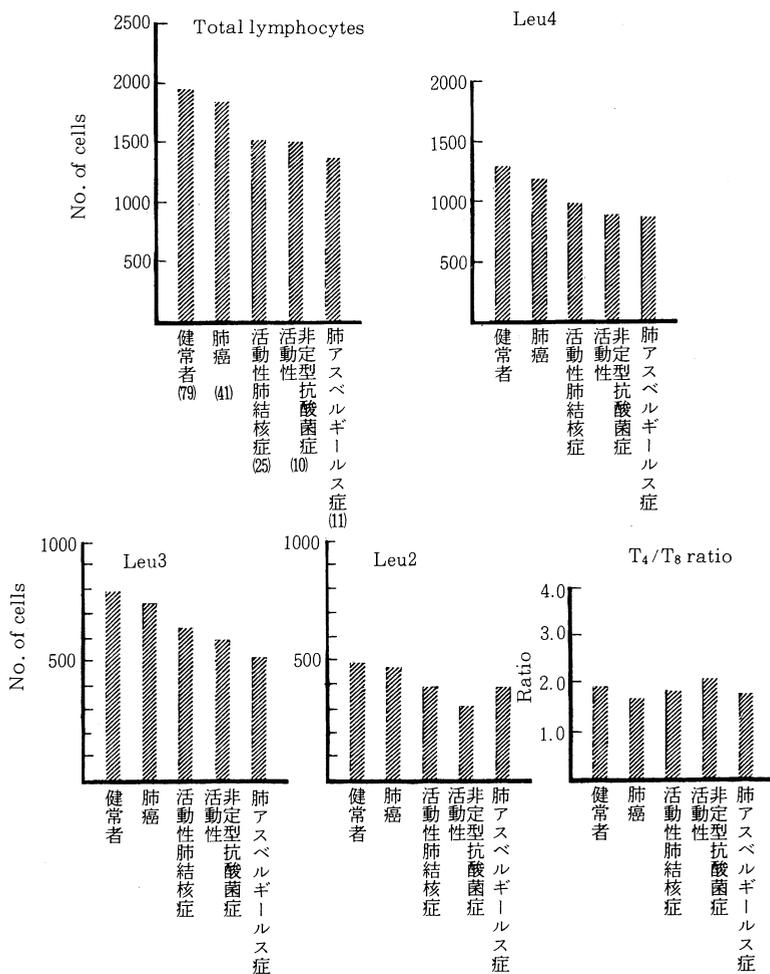


図 5 疾患別リンパ球サブセット

5. 疾患別リンパ球サブセット (図5)

肺癌を対照として肺結核症, 非定型抗酸菌症, アスペルギルス症についてリンパ球サブセットを測定した。三疾患とも排菌陽性の初期活動期のもののみとした。

健常者, 肺癌と比較してリンパ球数, Leu4ともに低値を示し特に非定型抗酸菌症, アスペルギルス症で著明であった。

次に Leu3, Leu2は同様に低値を示す傾向にある。しかし T4/T8比は疾患によって特に大きな変化はみられなかった。

6. 年齢別比較

図6上段は50歳より69歳まで, 下段は70歳以上と年齢別に肺結核症と肺癌を比較すると, 肺結核症では年齢に関係なく T cell 系の低値がみられる。

一方肺癌では50歳から69歳では T cell 系は高値を, 70歳以上では低値を示し, 高齢になるにしたがって免疫反応性が低下することが示唆された。

7. 肺結核症リンパ球サブセット (図7)

次に肺結核症を初期活動性の時期, 治療中, 安定, 治癒期及び慢性排菌例にわけて検討した。

リンパ球数, Leu4, Leu3, Leu2の T cell 系はすべて初期に低値を示し治療中及び安定期には正常化する傾向を示した。また慢性排菌例はすべてに高値を示した。

OKDRで示される B cell 系は慢性排菌例を除きいずれも低値を示すが, activated T cell と考えられる 4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>

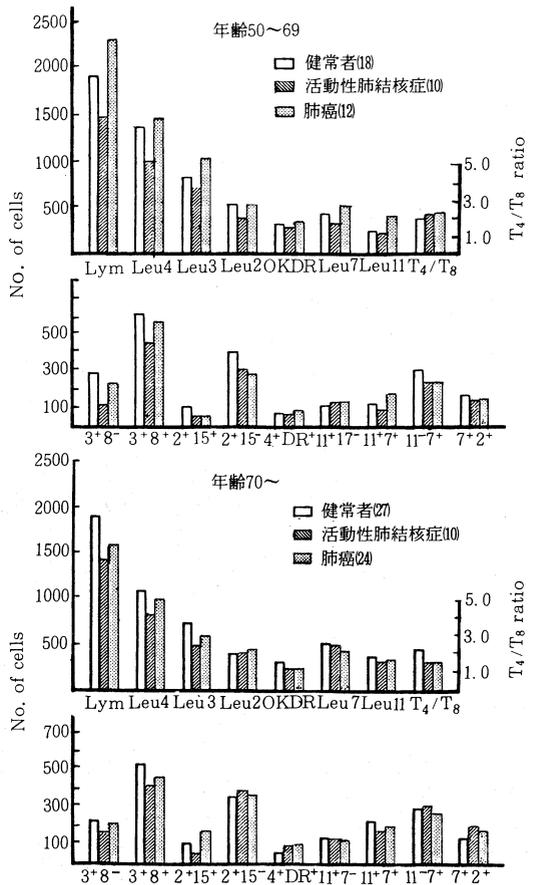


図6 年齢別比較 (肺結核症と肺癌)

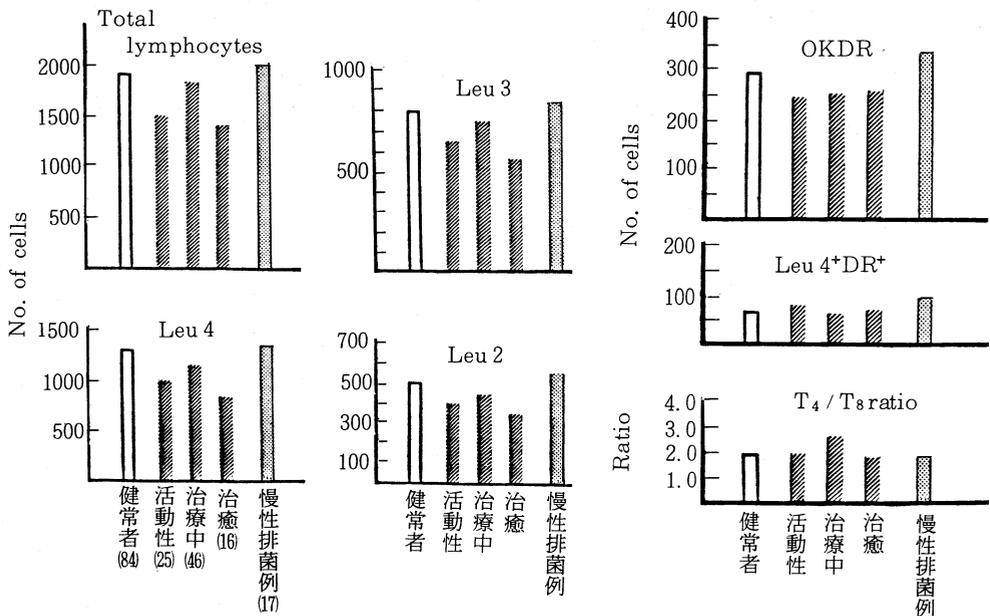


図7 肺結核症の病期による推移

は病期による大きな変動は見られなかった。またT4/T8比は治療中で2.60とやや高値を示した。

Leu7は初期でやや低値、Leu11は大きな変動は見られなかった。

すべてのリンパ球サブセット値で慢性排菌例は高値を示した。

8. ま と め

正常健康人及び各種呼吸器疾患についてリンパ球サブセットを測定し以下の成績を得た。

1) 実数とパーセント表示ではほぼ同様の動きを示した。

2) T cell系は20歳代と70歳以上に低値を示し、NK cellは年齢と共に高値を示した。リンパ球サブセット値は年齢を考慮に入れて評価すべきである。

3) 非定型抗酸菌症はT cell系, suppressor T cellの減少が特徴的であり、アスペルギルス症ではT cell系の減少が著明であった。

4) T4/T8比は疾患による変動は見られなかった。

5) 年齢別に肺結核症と肺癌を比較すると、肺結核症はすべてに低下、肺癌はT cell系で50歳より69歳で増加、70歳以上で低下を示した。

6) 肺結核症におけるリンパ球の低下は細胞の病巣への移行によることが示唆された。

2. 肺結核における末梢血Tリンパ球サブセット像とその修飾

東北大抗酸研内科 熊野伸子

はじめに

肺結核症におけるTリンパ球の二大機能別サブセット像を末梢血の場で解析することが私どもの分担課題であった。関連した知見は、既に第58, 59回本総会でも三上, 露口から報告されている。たまたま私どもは、膜表面に作用点を持つ低分子免疫修飾剤 Bestatin, Forphenicol の phase 1 studyの一環としてこの種解析に着手し、肺癌を主として若干の知見を持ち合わせていた<sup>1) 2)</sup>。そこで本稿ではまず、表面マーカー像のあるがままを肺癌との対比において眺め、次に免疫修飾剤投与による動きをモニターし、最後にこれらを総括して、サブセット解析の臨床的意義と限界について考察を試みる。

対象と方法

肺結核症70例、肺癌49例（その他7例を含む）、健康

人対照36例の計155例を対象とした。一定時間帯に得た静脈血より比重遠心法にて分離した単核細胞について、間接蛍光抗体法によりOKT3, 4, 8との反応性を蛍光顕微鏡下に判定し（単球, 顆粒球は除外）、各陽性細胞の百分比と実数を算定した（詳細については前報<sup>1)</sup>参照）。

成 績

I. 表面マーカーのプロフィール

1. 健康人における年齢層別正常値の検討

異常値を論じる前提として重要な正常値の設定に当て考慮すべき要因は少なくない（Burton et al. 1983 ; Lifson et al. 1983）。今回は、その一つ年齢との関係を健康人36例について確かめた（表1）。加齢に伴うT8<sup>+</sup>の低下とT4<sup>+</sup>/T8<sup>+</sup>比の上昇は文献的事実とも一致するが、T4<sup>+</sup>にも上昇傾向を認めた。一連の変化は20~40代にかけて著明であり、以後は緩慢となることか

表1 健康人における年齢別Tサブセット像

年齢群 (平均年齢)	n	T 4 <sup>+</sup> (%)	T 8 <sup>+</sup> (%)	T 4 <sup>+</sup> / T 8 <sup>+</sup> 比
16-25 (22.7)	3	33.5	32.8	1.10
26-35 (30.6)	10	44.7	30.0	1.54
A (28.8)	13	42.1 ± 9.6* (30~55)	30.6 ± 5.3 <sup>+</sup> (25~40)	1.44 ± 0.49 <sup>§</sup> (1.0 ~ 2.0)
36-45 (40.4)	10	52.7	26.2	2.05
46-55 (50.6)	10	54.1	26.1	2.10
56-65 (59.7)	3	53.7	20.8	2.65
B (47.3)	23	53.4 ± 3.9* (40~65)	25.4 ± 3.9 <sup>+</sup> (20~35)	2.15 ± 0.42 <sup>§</sup> (1.4 ~ 3.0)

\* , + , § いずれもA, B間に有意差 (p < 0.01)。

A, Bの各平平均値の下 ( ) 内に設定した正常域を示す。

ら、仮に35歳を境界線とすると(実測値の分布から)、有意差をもって2段階の平均値を得た。実際にはSD値よりさらに幅広い正常域を設定して、明白な偏倚のみを異常値と見做すことにした。なお、35歳以下の症例は肺結核症の14例であった。

2. 肺癌群と肺結核群における全体像の比較

実測値の分布は余りにも多様であるが、 $T8^+$ について結核で低く癌で高いという傾向が百分比で見出される。しかし、実数では差がない。これはリンパ球の著減例が結核よりも癌で多いためと考えられる。こうした理解から、以下には百分比に限って述べる。なお、 $T9^+$ としてのT細胞レベルには両群間に有意差を認めなかった。

次に平均値の群間比較では、 $T8^+$ は癌で高く( $p < 0.01$ )、結核では正常域の下限、相対比は結核で正常域の上限を超える( $p < 0.01$ )一方、癌では下限で、両群間に有意差を認める。しかし換言すれば、結核では $T4^+ / T8^+$ 比が高いというほかすべて正常域ということになる。果たして、平均値とバラツキという単純な理解に尽きるものであろうか。

私どもは先に、肺癌で $T8^+$ の高値を過半数に認めるものの、その最も典型的な扁平上皮癌と、低値、高値が相半ばする腺癌を両極端として、異常値には組織型別のspectrumが見出されることを報告した(熊野他1985)。事実、肺結核でも臨床病型との関連において、免疫異常のspectrumの存在が実証されている(Bhatnagar et al. 1977; Lenzini et al. 1977)。以下はこうした見地からの検討結果である。

3. 肺結核症例にみる個別像の多様性

対象とした肺結核70症例を、臨床経過別の4群と病巣の広がり(学会分類)別の3群に分けて比較検討した。前者は、1) 初回診断未治療の10例、2) 治療初期で排菌陽性の9例、3) 菌陰転化後なお治療中の30例、及び4) 難治群の21例、後者は広がり1, 2, 3である。両者の関係では、難治群で過半数を占める広がり3は、その他3群では例外的に散見されるのみであった。なお、病型ではII型が8割以上、 $p1$ は1例のみ(胸水を伴うものは6例)で比較に至らなかった。

まず平均値としての群間比較では、 $T4^+$ について初

発未治療群での高値と難治群での比較的low値の間に有意差、 $T8^+$ では逆に難治群で高くその他3群で低い傾向を認めた。また、広がり3では難治群の傾向が再現されていた。しかし、ここで注目したいのは、難治群での $T4^+ / T8^+$ 比が平均値としては全く正常域で、上下に幅広いSD値を伴うという結果である。

そこで次に異常値の頻度で比較してみると(表2)、難治群とその他3群とでは対照的な異常値の分布が一見して明らかとなる。即ち、難治群では $T8^+$ の高値と $T4^+$ の低値による相対比のlow値を50%近くで認める一方、逆に $T8^+$ のlow値と相対比の高値も30%前後の症例に見られる。これに対しその他3群での異常は、約半数例に見られる $T8^+$ のlow値と相対比の高値に限られていることである。広がり別では2と3が難治群に、1がその他に類似した分布であった。

なお、抗結核剤特にRifampicinの影響についてはその可能性を予測して検討したが、本薬剤の有無による差異は見出しえなかった。

以上第1の項目のまとめとして、疾患群間の比較においては、それぞれに特徴的な全体像が把握される一方、同一疾患については個別像の多様性が指摘される。私ど

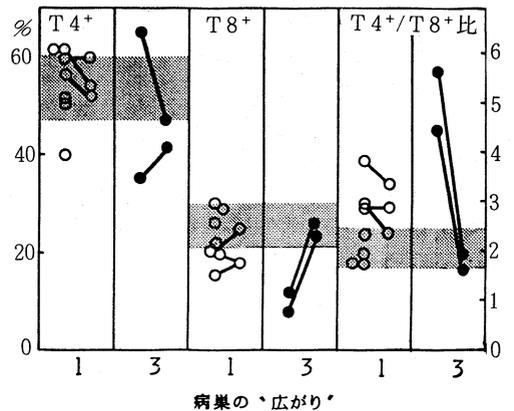


図1 初発・未治療肺結核症例における病巣の「広がり」との相関加療による臨床像の改善に伴うマーカー像の正常化傾向

表2 臨床経過とTサブセット異常値の分布

臨床経過	$T4^+$		$T8^+$		$T4^+ / T8^+$	
	高	低	高	低	高	低
難治性 (n = 21)	2 / 21 (10)	8 / 21 (38)	9 / 21 (43)	6 / 21 (29)	7 / 21 (33)	10 / 21 (48)
その他 (n = 49)	11 / 48 (23)	6 / 48 (13)	0 / 49 (0)	24 / 49 (49)	23 / 48 (48)	2 / 48 (4)

( ) は%

も臨床の立場からは、平均値としての群間比較というよりは、多様な個別像の意味するものをこそ大切にしたいと考える。

## II. BRM 投与による修飾の実態

肺結核症末梢血で観察されたTリンパ球サブセットの種々像の中、少なくとも難治群に見る異常像は、宿主免疫系に現存する異常を反映するものと理解されよう。とすれば、例えば免疫修飾剤により正常化に方向づけることが可能であろうか。先に末梢血 T, B 細胞の動きから、免疫系に対する修復作用が推測された Forphenicicol (FPL, 微化研 梅沢浜夫先生, 岡捨己先生のご好意により萬有製薬より恵与された) を難治症例に投与し、Tサブセットの動きを臨床所見との対比においてモニターし、修飾の実態とパラメーターとしての実用的意義を検討した。

対象は上記難治群中の10例で、いずれも長期にわたり持続的に排菌を認めるものである。FPL 1 日量50mg/body は抗結核剤に上のせする形で連日経口投与、1年余を経過してなお継続観察中である。ここには2症例について経過の概要を示すとどめる。

症例1 (K. A., 54 M) : 膿胸を伴った1例で排菌持続4年1カ月で投与開始。まず  $T4^+ / T8^+$  比は投与前の逆転 (0.86) から徐々に1以上まで回復、これと併行して PPD 皮内反応の増強、血清IgA, IAP 値にも低下を認めた。臨床的には、喀痰中結核菌(培養陽性)が7カ月目より陰転化して5カ月以上経過(途中1回1コ検出)、赤沈値も安定、レ線像では液面の低下を認める。

症例2 (K. O., 67 F) : 排菌持続4年5カ月で投与開始。無気肺の陰影は不変であるが、同じく7カ月目より菌陰転化したまま5カ月以上経過、ツ反も増強、殊に赤沈値は90<から20代へと著明な改善を示した。一方、サブセット比は投与前の逆転 (0.65) から一旦1以上まで回復したが、最近再び逆転に至り、臨床所見とは目下矛盾するかに見える。背景因子による修飾の可能性も含めて今後の追跡を要する課題である。

以上、FPL 投与によるTサブセット像の改善は9例中6例に見られ、これらの多くでは臨床像、その他パラメーターにも何らかの改善傾向を認めた。一方不変の3例では、概して見るべき動きがなかった。このように、修飾の実態は症例により一様ではなく、他パラメーターとの相関傾向からも、Tサブセット像の免疫学的パラメ

ーターとしての有用性が示唆された。

## III. 臨床的意義を示唆する二、三の事象

本研究を通じて得られた成績の中から、サブセット解析の臨床的意義を裏付けられると思われる事象を以下に拾ってみる。

その一つは、初回診断末治療症例に見られた病巣の広がりとの相関、及び加療による臨床像の改善に伴う正常化傾向である(図1)。即ち、極端な異常値は広がり3に限って見られ、その後(3~6カ月)の回復傾向もこれらの症例で特に顕著であった。なお、広がり3の1例では、極度に減少していたリンパ球の絶対数にも回復を認めた。抗結核剤投与により順調な経過でやがて治癒に至るであろうこれら多くの症例の場合、治療前に見られる異常像は、むしろ結核菌感染宿主における抗菌免疫機能の有効な発現の結果と理解すべきものであろう。それなら、初発から難治に至る経過はどうであろうか、残された課題として関心が寄せられる。

今一つは、FPL 投与症例の monitoring に関してである。即ち、長期にわたる観察を通じて拾うことの出来る何がしかの臨床的改善傾向は、いずれもTサブセット像の改善例に限って認められたという事実である(表3)。

なお、phase 1 study における免疫学的パラメーターとしての有用性については、先に肺癌症例で経験したところである<sup>1)2)</sup>。

## 考察と結語

以上を総括して、末梢血レベルでTリンパ球サブセット像を解析することの意義は、何よりも臨床の場での monitoring における実用的なパラメーターとして認めたい。事実、最少限のモノクローナル抗体と蛍光顕微鏡という原初的なアプローチにおいてさえ、疾患群に特徴的な全体像の中にも多様な個別像を見出し、更に臨床像との関わりについても二、三の事象を観察し得た。

しかし、そこには自ずと限界がある。まず方法論的には、表面マーカーによって識別されるサブセットは機能的に単一でないということ、この点 Flow cytometry によるデータの集積も待たれようが、当面の課題としては機能的な面からの解析を併行させたいと考える。また、末梢血という場からは病変局所における生体の反応を直接窺うことは出来ない。更に、リンパ球分化抗原の表現型は、年齢、ウイルス感染、日内周期等の背景因子によ

表3 Tサブセット像と臨床所見および他パラメーターとの相関

Tサブセット像	排菌陰転化	赤沈値改善	レ線像改善	皮内反応↑		IgA↓
				PPD	PHA	
改善例(6/9)	2/6	4/6	2/6	6/6	3/6	4/6
不変例(3/9)	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3

て修飾されるという事実も無視出来ない。

それでもなお、これら諸点を熟慮した上での周到な解釈を前提とすれば、末梢血Tリンパ球の二大サブセット像、その均衡は、宿主免疫機能の集約された一側面という限りにおいて、免疫学的パラメーターの言わば“minimum essential”として、今日の肺結核の臨床の場でも活用に値するものと考ええる。

終りに、当内科 今野淳教授はじめ本宮雅吉、大泉耕太郎、佐藤博、小犬丸貞裕、鈴木修治の各先生には、臨床面から多くの貴重なご教示を賜ったことを申し添え

て謝辞に代えたい。

文 献

- 1) Kumano, N. et al. :Tohoku J exp Med, 147 : 125, 1985.
- 2) Kumano, N. et al. : Recent Advances in Chemotherapy (Proc. 14th Int. Congr. Chemother., Kyoto, 1985), Univ. Tokyo Press, Tokyo, p. 943, 1985.

3. モノクローナル抗体による胸水中リンパ球の検討

名古屋市立大学第2内科 高田 勝利  
森下 宗彦  
山本 正彦

目 的

胸水中のリンパ球は胸膜炎の免疫学的病態に深く関与していると考えられる。今回、モノクローナル抗体を用いてリンパ球を表面形質から細分類し、胸水中リンパ球病態との関連、及び治療経過にともなうリンパ球サブセットの変化を検討した。

方 法

対象症例は細胞診で確診された癌性胸水31例（平均年齢59歳）と、胸膜生検で確診された未治療結核性胸膜炎28例（平均年齢49歳）である。癌性胸水例の内訳は原発性24例、転移性は7例、腺癌16例、扁平上皮癌3例、小細胞癌2例、大細胞癌3例であった。

結核性胸膜炎は抗結核剤治療、癌性胸膜炎ではnocardia CWS (N-CWS) を胸腔内に200 $\mu$ g注入後、経時的に胸水リンパ球の分析を行った。

リンパ球の表面形質の検討は、ヘパリン加胸水及び末梢血を比重遠沈法にて単核細胞を分離し、FITC及びPE (phycoerythrin) 標識モノクローナル抗体とを使い、スペクトラムⅢ及びFACSアナライザーを用いて検討した。

結 果

I. 胸水中の細胞成分 (表1)

総細胞数では、癌性例は高値から低値までさまざまであった。リンパ球比率では結核性が癌性より高値を示したが、癌性では高値から低値例まで認めた。また癌性では好中球、単球、マクロファージ、中皮細胞が高値を呈した。

II. 胸水と末梢血におけるリンパ球サブセットの比較 (表2)

両疾患とも胸水中で高値を示す細胞は、OKT3, OKT11, OKT4<sup>+</sup> 細胞であり、末梢血中で高値を示す細胞は、B1, OKM1, Leu7, Leu11<sup>+</sup> 細胞であり、胸水と末梢血とはほぼ変わらない比率を示すものはOKT8<sup>+</sup> 細胞であった。

III. 癌性胸水と結核性胸水との比較

1) 癌性胸水例と結核性胸水例との比較 (表2, 表3)  
癌性は結核性と比べてOKT3, OKT11, OKT4, OKT8<sup>+</sup> 細胞は低値であり、OKIa1, B1, OKM1, Leu7, Leu11<sup>+</sup> 細胞では高値を示した。二重染色による検討では、T細胞を示すLeu4<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> 細胞では結核性、またB細胞を示すLeu4<sup>-</sup> DR<sup>+</sup> 細胞では癌性で高値を示した。

表1 癌性および結核性胸膜炎の胸水中の細胞成分の比較

例 数	総細胞数 ( $\times 10^6$ )	リンパ球(%)	好中球(%)	好酸球(%)	単 球 マクロファ ージ (%)	中皮細胞
癌 性 31	4.7 $\pm$ 7.6	47.3 $\pm$ 37.1	23.1 $\pm$ 28.8	0.6 $\pm$ 1.5	16.2 $\pm$ 26.2	9.8 $\pm$ 21.7
結核性 28	4.3 $\pm$ 2.4	86.5 $\pm$ 15.1	4.0 $\pm$ 4.3	0.3 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 6.1	2.2 $\pm$ 9.8

\* p < 0.001

表2 胸水と末梢血リンパ球サブポピュレーションの比較

	OKT3	OKT11	OKT4	OKT8	T4/8	OKIa1	B1	OKM1	Leu7	Leu11	
癌性 (n=25)	末梢血 41.8±10.2	75.4±5.1	32.0±10.8	22.8±7.6	1.8±1.3	18.0±5.7	14.8±5.2	30.4±18.8	32.2	12.6	18.2±8.7
	胸水 71.2±14.2	82.0±9.6	54.9±16.4	21.1±15.1	3.9±2.5	25.4±15.2	12.7±10.6	17.1±17.1	8.6±6.2	8.9±7.1	
結核性 (n=28)	末梢血 61.7±9.8	74.7±7.1	39.2±10.8	25.9±6.1	1.7±0.8	28.8±5.2	16.5±2.5	19.9±7.1	24.4±8.6	16.7±10.2	
	胸水 80.8±8.1	90.3±6.5	56.6±10.8	24.1±6.7	2.6±1.0	22.3±14.5	7.2±4.5	8.8±5.4	7.3±5.4	6.7±3.8	

表3 二重染色による胸水リンパ球サブポピュレーションの検討

	Leu 4 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup>	Leu 4 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	Leu 4 <sup>-</sup> DR <sup>+</sup>	Leu3 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup>	Leu3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	Leu 2 <sup>+</sup> 15 <sup>+</sup>	Leu 2 <sup>+</sup> 15 <sup>-</sup>	Leu 7 <sup>-</sup> 11 <sup>+</sup>	Leu 7 <sup>+</sup> 11 <sup>+</sup>	Leu 7 <sup>+</sup> 11 <sup>-</sup>
癌性 (n=6)	69.3±5.7	6.9±1.3	7.8±3.3	17.9±4.9	31.9±9.0	3.0±2.5	20.1±10.3	2.8±1.3	0.7±0.2	9.2±11.3
結核性 (n=6)	75.2±6.2	8.5±2.3	4.9±2.1	12.5±4.3	33.3±9.7	2.2±0.9	29.8±1.5	6.0±3.9	0.6±0.2	2.9±1.0

表4 癌性胸水におけるリンパ球の比率

低値群 (リンパ球<50%)						高値群 (リンパ球≥50%)					
症例	性	年齢	組織型	リンパ球比率	初回胸水穿刺後の生存期間	症例	性	年齢	組織型	リンパ球比率	初回胸水穿刺後の生存期間
■	F	54	肺癌adeno	2%	3.5ヶ月	■	M	67	転移癌	57%	1ヶ月
■	M	77	肺癌adeno	2%	1ヶ月	■	M	68	肺癌	58%	3ヶ月
■	M	48	肺癌large	3%	1ヶ月	■	M	61	肺癌 adeno	60%	1ヶ月
■	F	50	肺癌adeno	4%	1ヶ月	■	F	72	転移癌	77%	4ヶ月
■	M	61	肺癌sq	6%	5ヶ月	■	M	74	肺癌	87%	2ヶ月
■	M	39	肺癌adeno	10%	1ヶ月	■	M	69	肺癌 adeno	89%	3ヶ月生存
■	M	58	転移癌	13%	2ヶ月	■	M	70	肺癌 small	90%	3ヶ月
■	M	87	転移癌	14%	4日	■	F	52	転移癌	91%	3ヶ月生存
■	F	44	転移癌	20%	7ヶ月	■	F	40	肺癌 adeno	92%	4ヶ月
■	F	65	肺癌adeno	21%	5ヶ月	■	M	60	肺癌 adeno	93%	5ヶ月
■	M	74	肺癌large	24%	2ヶ月	■	M	67	肺癌 large	96%	2ヶ月
■	M	69	肺癌	28%	2ヶ月	■	M	73	肺癌 adeno	99%	2ヶ月
■	M	66	肺癌 adeno	46%	7ヶ月						

cytotoxic Tを示す Leu2<sup>+</sup>15<sup>-</sup>, inducer Tを示す Leu3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>細胞は結核性で高値を示し, suppressor Tを示す Leu2<sup>+</sup>15<sup>+</sup>, helper Tを示す Leu3<sup>+</sup>8<sup>-</sup>細胞では癌性で高値を示した。NK活性が高い Leu7<sup>-</sup>11<sup>+</sup>細胞では結核性で高値となり, Leu7<sup>+</sup>11<sup>+</sup>細胞では差を認めず, 活性が弱い Leu7<sup>+</sup>11<sup>-</sup>細胞では癌性で高値を示した。活性化T細胞の Leu4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>は結核性で高値を示した。

#### 2) リンパ球比率高値癌性胸水と低値癌性胸水及び結核性胸水との比較 (表4)

今回取り扱った癌性胸水例のリンパ球比率は平均47.3%であり, これをリンパ球比率が50%未満の低値群と50%以上の高値群とに分けて検討した。両者に年齢, 性差及び50%生存期間に差を認めなかった (表5)。しかしリンパ球サブセットでは高値群は低値群と比較し

て OKT3, 4, B1<sup>+</sup>細胞で高値を, また OKT8, Ia1, OKM1, Leu7, 11<sup>+</sup>細胞で低値を示した。また高値群を結核性胸水例と比較すると, OKT3, OKT11, OKT8<sup>+</sup>細胞で低値を示し, OKT4, OKT4/8 ( $p < 0.05$ ), B1<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ )細胞では高値を示した。しかし細胞実数での比較では両者に著明な差は認めなかった。

#### IV. 癌性胸水と結核性胸水におけるリンパ球比率と各サブセットとの関係 (表6)

癌性胸水例では, 胸水中のリンパ球比率と OKT4<sup>+</sup>細胞とは正相関を示し, OKIa1, OKM1, Leu7, Leu11<sup>+</sup>細胞とは逆相関を示した。また実数は, OKT3, OKT4<sup>+</sup>細胞比率と相関を示し, OKM1, Leu7, Leu11<sup>+</sup>細胞比率とは逆相関を示した。結核性胸水例では, 胸水中のリンパ球比率と OKT3, OKT4<sup>+</sup>細胞比率と相関し, OKM1<sup>+</sup>細胞で逆相関を示した。また実数は, OKT3,

表5 リンパ球高値癌性胸水例と低値癌性胸水例および結核性胸水との比較

	OKT3	OKT11	OKT4	OKT8	T4/8	OKIa1	B1	OKM1	Leu7	Leu11
低値群(n=13)	68.4±16.6	82.4±10.1	48.6±21.0	24.7±19.9	3.4±2.8	31.5±17.7	9.2±7.8	26.2±22.0	12.7±6.5	12.9±8.5
高値群(n=12)	75.3±12.9	81.7±11.1	59.9±10.2	18.9±10.3	4.2±2.4	21.7±11.8	15.6±12.7	10.5±5.0	5.0±2.9	5.6±4.3
結核胸水(n=28)	80.8±8.1	90.3±6.5	56.6±10.8	24.1±6.7	2.6±1.0	22.3±14.5	7.2±4.5	8.8±5.4	7.3±5.4	6.7±3.8

\*p<0.05

表6 胸水リンパ球と各サブセットとの相関係数

	OKT3	OKT11	OKT4	OKT8	T4/8	OKIa1	B1	OKM1	Leu7	Leu11
癌性										
リンパ球比率	0.254	0.040	0.434*	-0.286	0.215	-0.378*	0.328	-0.538*	-0.683*	-0.680*
リンパ球実数	0.363*	0.214	0.369*	-0.170	0.079	-0.280	-0.021	-0.505*	-0.379*	-0.679*
結核性										
リンパ球比率	0.359*	0.039	0.358*	-0.196	0.208	0.147	-0.043	-0.387*	0.063	0.332
リンパ球実数	0.580*	0.294	0.644*	-0.569*	0.724*	-0.077	0.271	-0.393*	-0.054	0.169

\*p<0.05

図1 治療経過にともなう胸水中リンパ球サブセットの変化 (●癌性 ○結核性)

		Lymph	T3	T11	L4 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup>	L4 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	B1	L4 <sup>-</sup> DR <sup>+</sup>	Ia1
増加	実数	●●●●	●●	●	●○	●●	○○○	○○	
	比率	●○○	●●	●●●	●●	●	○○○○	○	○○○
不変	実数	●	●	●○	●●	●		●	○
	比率	●●●	●	●	●		●●●	○	○
低下	実数	○○○○	○○○	○○○	○	○○	●	●	●●●○
	比率	●				●●○○	●●●	●	●●●

		T4	L3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	L3 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup>	T8	L2 <sup>+</sup> 15 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup> 15 <sup>-</sup>	Leu7	Leu11	Leu7 <sup>-</sup> 11 <sup>+</sup>	Leu7 <sup>+</sup> 11 <sup>+</sup>
増加	実数	●	●●	●			●○	●●	●●	●●	●●
	比率	●●	●	●●	●●○	●		●●○○○	●●○	●●○	●●
不変	実数	○	●○	●●○○○	●●	●●○○	●●	●○○○○	●○	●○	●○○
	比率	●○○	●●○	●○	●○○○		●○○		○	●	●○○
低下	実数	○○	○		●○○○	●	○		○○	○	
	比率	○○	○			●●○○	●●	●○	●○○○	○	

OKT4<sup>+</sup>細胞, OKT4/8比と相関を示し, OKT8, OKM1<sup>+</sup>細胞とは逆相関を示した。

V. 胸水リンパ球の動態 (図1)

経過を観察した癌性胸水例4例と結核性胸水5例について, リンパ球サブセットの実数, 比率の変化を示した。リンパ球及びOKT3, OKT11, Leu4<sup>+</sup>DR<sup>-</sup>細胞のT細胞系は, 癌性では増加が不変であったが, 結核性では実数で低下, 比率で不変であった。またLeu4<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>細胞の活性化T細胞では癌性では増加が不変であり, 結核性では実数, 比率とも低下した。B1, Leu4<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>, OKIa1<sup>+</sup>細胞のB細胞系では, 結核性では実数, 比率とも増加を示し, 癌性では低下を示した。OKT4, Leu3<sup>+</sup>8<sup>-</sup>, Leu3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>細胞では, 癌性で増加または不変であ

り, 結核性では低下または不変であった。Leu7, Leu11のNK細胞は, 癌性では一時的にも増加するものも多く, 結核性では比率の上では増加するものも認められたが, 実数では不変, 減少のものも多く認められた。

考案

今回検討した癌性と結核性胸水貯留例とも, 胸水と末梢血リンパ球との関係では基本的に似ており, 胸水中ではT細胞特に helper細胞が多く出現し, OKT4/8比が高値, NK, B細胞は低値となり, 胸水と末梢血とはリンパ球サブセットが異なっているものと思われる。胸水中でリンパ球増多を示す理由には, 胸水中に存在するリンパ球遊走促進因子<sup>1)2)</sup>によることが考えられる。しか

し胸腔内のリンパ球すべてが末梢血より集積したもばかりでなく、結核性胸膜炎では PPD 反応性 T 細胞の増殖<sup>3)</sup>も考えられている。Shiratsuchi ら<sup>4)</sup>も胸水中リンパ球を *in vitro* で培養し、PPD により誘導されるリンパ球は OKT4 細胞であるとし、この推測を支持するものである。

癌性胸水のリンパ球増多例と減少例とでは、臨床所見に差を認めなかった。しかしリンパ球分画では高値群で T 細胞、特に helper 細胞の高値が認められ、細胞性免疫反応が生じていることが示唆される。しかし低値例では末梢血リンパ球分画所見と類似しており、胸膜細胞浸潤ともなう出血が考えられた。

癌性胸水増多例と結核性胸水例とを比較すると、OKT4/8 比と B1 が癌性で高値を示したが、その他のリンパ球比率では類似した所見を呈し、リンパ球比率の上では両者の鑑別は困難と思われた。

今回癌性胸水例には免疫賦活剤の N-CWS の注入後、また結核性胸膜炎では抗結核剤投与後のリンパ球動態を検討した結果、癌性症例では suppressor, cytotoxic T 細胞には一定の傾向が得られなかったが、helper T 細胞、活性化 T 細胞は増加を示した。NK 細胞も増加を示したが、病期進行とともに低下した。免疫賦活剤注入後の胸水細胞の動態は、4～5 日までは好中球が主体であり、7～10 日後にはリンパ球が多数出現し、それ以降はリンパ球優位が続く<sup>5)6)</sup>。この免疫賦活剤の作用機序は、初期の炎症細胞浸潤後はマクロファージが中心となり、細胞性免疫機能、即ち T リンパ球機能を高めるものと思われる。これにともない γ-インターフェロンを介して NK, K 細胞活性が増強<sup>7)</sup>しているものと考えられる。またこれらの免疫賦活剤にはマクロファージの抗腫瘍活性の亢進<sup>8)9)</sup>も生じており、局所抗腫瘍活性にはリンパ球のみならずマクロファージ、リンパ球相互関係によって増強しているものと考えられる。

結核性胸水では、胸膜の結核病変が修復されるに従い PPD 刺激 T 細胞を含む helper 細胞は減少を示すものと考えられる。しかし suppressor, cytotoxic 細胞は症例によりさまざまであり、これらの機能を持つ細胞の動態については、今後の検討が必要である。また活性化 T 細胞は、活動期では PPD によって誘導され<sup>4)</sup>高値を示し、治癒期には低下していくものと考えられる。また NK 細胞については活動期の NK 活性は亢進し<sup>10)</sup>、治癒期には正常化を示す。しかし細胞数では癌性と比べて量的変化は生じないものと考えられる。

## ま と め

- 1) 胸水中リンパ球は末梢血と比べて、T 細胞が増加し、B, NK 細胞は減少する。
- 2) リンパ球高値癌性胸水と低値癌性胸水とに年齢、性差、組織型、予後に差を認めなかった。またリンパ球高値癌性胸水は結核性胸水と比較して T4/8 比、B 細胞が高値を示す。他の分画には差を認めなかった。
- 3) 免疫賦活剤を注入した癌性胸水例では T 細胞、NK 細胞数の増加を認めたが、病期進行とともに低下した。結核性胸水例では治療経過とともに T 細胞数は減少し、B 細胞数は増加したが、NK 細胞数は不変であった。

## 文 献

- 1) 田ノ上雅彦他：結核性ならびに癌性胸水の性状—とくに chemotactic factor について—, 日胸, 22: 292, 1984.
- 2) 大塚盛男他：ヒトリンパ球遊走因子に関する研究—結核性胸膜炎の胸水中にみられるリンパ球遊走因子について—, 日胸, 23: 244, 1985.
- 3) 藤原 寛：結核性胸膜炎における免疫細胞学的研究, 大阪大学医学誌, 33: 199, 1983.
- 4) Shiratsuchi, H. et al.: Analysis of T cell Subsets by Monoclonal Antibodies in Patients with Tuberculosis after *in vitro* stimulation with purified Protein Derivative of Tuberculin Clin exp Immunol, 57: 271, 1984.
- 5) 松田 実他：癌性胸膜炎に対する BCG-CWS 単独投与後の細胞所見, 癌の臨床, 29: 955, 1983.
- 6) 三上理一郎他：肺癌に対する臨床病理的アプローチ, 臨床病理, 32: 1047, 1984.
- 7) Uchida, A. and Micksche, M.: Lysis of fresh human tumor cells by autologous peripheral blood lymphocytes and pleural effusion lymphocytes activated by OK432, J Natl Cancer Inst, 71: 673, 1983.
- 8) 小倉 剛他：癌性胸膜炎に対する N-CWS の治療投与の効果の解析, Biomedical Sciences, 16: 80, 1986.
- 9) 坂谷光明他：癌性胸膜炎に対する N-CWS の局所投与の効果—作用機作の解析—, 日胸, 23: 383, 1985.
- 10) 大久保喜雄他：結核性胸膜炎, 癌性胸膜炎における NK 活性及び NK 活性増強因子の解析, 日胸, 23: 243, 1985.

#### 4. サルコイドーシスの活動度の評価および病態生理検討方法としてのモノクローナル抗体の応用

京大胸部研内科第2 長井苑子

##### はじめに

原因不明の類上皮細胞肉芽腫形成性疾患であるサルコイドーシスは、臨床的には胸部X線所見、血清 angiotensin converting enzyme (ACE) 値、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 所見、Ga シンチなどから診断および活動度の評価がなされ、病理組織学的に確定診断される疾患である。本シンポジウムのテーマであるモノクローナル抗体の応用とは、現在ではこれらの過程の中でも特に BALF 細胞の解析を指すといつてよい。しかし、今後は、組織レベルでの免疫組織学的検討がより重要な課題となるであろう。そして、組織レベルでの所見と、BALF 細胞所見とを対比検討することの中から、BALF 細胞が本当に間質における病変を含めたいわゆる肺病領域の変化をどのように反映しているかという BAL をめぐる基本的な課題に対する解答が与えられるであろうし、サルコイドーシスの病態生理を考える上で、より重要な情報が与えられることが期待される。

ここでは、サルコイドーシスの BALF 細胞所見、特にモノクローナル抗体を用いて得られた検討成績から、サルコイドーシスの活動度の評価及び病態生理学的検討がどこまで可能かについて集約して報告することとしたい。

対象・方法：BAL を実施した149例のサルコイドーシス症例について胸部X線所見と血清 ACE 値とから活動期、非活動期、治癒期に区分し健常対照例との比較検討を行った。なお、ステロイド剤投与例は除外した。

モノクローナル抗体陽性細胞の測定は間接免疫蛍光抗体法により各種の細胞の染色を行い cytoflowmetry (Orthospectrum III) を用いて行った。モノクローナル抗体を用いての組織の染色は immunoperoxidase 法にて行った。

##### 1. サルコイドーシスにみられる BALF 細胞所見

サルコイドーシスに見られる BALF 細胞所見の概略を表1に示した。活動期非喫煙例で特徴的なことは、細胞数の増加、Tリンパ球増加、Tリンパ球分画中 OKT4<sup>+</sup> cell 増加、OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> 比高値所見である。

開胸肺生検例の肉芽腫病変部の染色では、OKT4<sup>+</sup> cell は肉芽腫内外にびまん性に分布するが、OKT8<sup>+</sup> cell は主に肉芽腫周辺部で認められた。T cell 分画所見では、OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> 比高値に加えて、BALF-Ia1<sup>+</sup> cell 増加が活動期に有意に認められる所見であった。

活動期症例に見られる BALF-T cell 増加に関して、T cell の増殖に関与する IL-2 レセプター保有細胞であ

表1 サルコイドーシスにおける BALF 細胞所見

細胞数 (S>NS)	↑(↑)	IL-1 産生 spontaneous	↑(→)
Tリンパ球 (NS>S)	↑(↑)	LPS 刺激	↑(→)
Tリンパ球活性化		IL-2 産生 spontaneous	↑(→)
E37 <sup>+</sup> cell	↑(↑)	PHA 刺激	↑(→)
OKIa1 <sup>+</sup> cell	↑(↑)	γ-I FN 産生	↑
OKT9 <sup>+</sup> cell	↑(→)	ACE 産生	↑
Tac <sup>+</sup> cell	↑(→)	MCF 産生	↑
OKT4 <sup>+</sup> cell (NS>S)	↑(↑)	MIF 産生	↑
OKT4 <sup>+</sup> /OKT8 <sup>+</sup> 比 (NS>S)	↑(↑)	CSF 産生	↑
Bリンパ球	→(→)		
Bリンパ球活性化	→~↑(→)		
マクロファージサブセット			
OKM1 <sup>+</sup>	↑(↑)		
OKT9 <sup>+</sup>	↑(→~↑)		
OKIa1 <sup>+</sup>	↑~→(→)		
Leu10 <sup>+</sup>	↑~→(→)		

S : Smoker NS : Non-smoker

( ) 自験成績

る Tac<sup>+</sup> cell は、活動期では増加しておらず、むしろ治癒期で高値傾向を示すとの所見が得られた。更に、two color analysis によって BALF-OKT4<sup>+</sup> Tac<sup>+</sup> cell の出現状況を検討したが、活動期に高いとの所見は得られなかった。末梢血についても同様であった。

2. サルコイドーシスの病変成立過程としての macrophage-T lymphocyte alveolitis

サルコイドーシスの病変成立過程は、初期病変としての macrophage-T lymphocyte alveolitis から類上皮細胞肉芽腫形成、更にはその一部の線維化、大多数の

自然寛解の過程に大別されることが病理組織所見から示唆されている。

T lymphocyte alveolitis の成立機序に関しては、macrophage の活性化と T cell の活性化・増加が関与していると考えられる(表2)。T cell の肺内増加の機序に関しては T cell 増殖あるいは末梢血からの移行の2つが考えられそれらを示唆する成績も報告されている。自験成績では、Tac<sup>+</sup> cell 増加, spontaneous IL-2 産生, IL-2 に対する T cell の反応性など T cell の肺内増殖を示唆する成績は得られなかった。この理由としては、肺内 T cell 増殖過程を示す指標が何らかの機

表2 T Lymphocyte Alveolitis の成立機序

Etiological agents	Macrophage の活性化	T cell の活性化と増加
外因性	Ig-G Fc receptor ↑ (↑) 抗原提示能 ↑	活性化 E <sub>37</sub> <sup>+</sup> cell ↑ (↑)
内因性	Tetanus toxoid SK-SD Munps antigen Angiotensine II ? IL-1 産生 spontaneous ↑ (→) LPS-stimulated ↑ (→) γ-IFN 産生 ↑	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">                     OKIa1<sup>+</sup> cell ↑ (↑)                      OKT 9<sup>+</sup> cell ↑ (→)                      Tac<sup>+</sup> cell ↑ (→)                 </div> Lymphokine 産生 ↑ 増加 (1) 肺内増殖 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;">                         Tac<sup>+</sup> cell ↑ (→)                     </div> IL-2 産生 ↑ (→) sp. replication ↑ 選択的増加 ? <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;">                         OKT 4<sup>+</sup> &gt; OKT 8<sup>+</sup> </div>
		(2) 血中より肺への移行 IL-1, IL-2 にリンパ球に対する走化活性がある。 末梢血中リンパ球減少 血管内皮細胞の活性化

( ) 自験成績

表3 類上皮細胞肉芽腫の成立過程

Macrophage の活性化	Antigen-dependent Lymphokine-dependent
Macrophage の増加	血中よりの移行 MCF, <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MIF</span> 肺内での増殖 CSF, <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">γ-IFN</span>
Macrophage から類上皮細胞への分化	MAF, <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MIF</span> , <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">γ-IFN</span>
類上皮細胞肉芽腫の成立と維持	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MIF</span> , MAF, CSF, <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ACE</span> active metabolite of 25-OH V. D <sub>3</sub>

序で急速に制御されてしまうのが、self-limitingでnon-malignantな炎症性疾患の特徴ではないとも想像される。

類上皮細胞肉芽腫形成過程については種々の液性因子と細胞間の複雑な相互作用が考えられる(表3)。その

いくつかは、活性化 macrophage, 類上皮細胞自身により産生され autostimulatory に炎症を増幅する可能性が示唆されている。しかし、個々の細胞レベルにおいて成熟, 肉芽腫への移行を示す特徴的なモノクローナル抗体は現在のところ開発されていない。

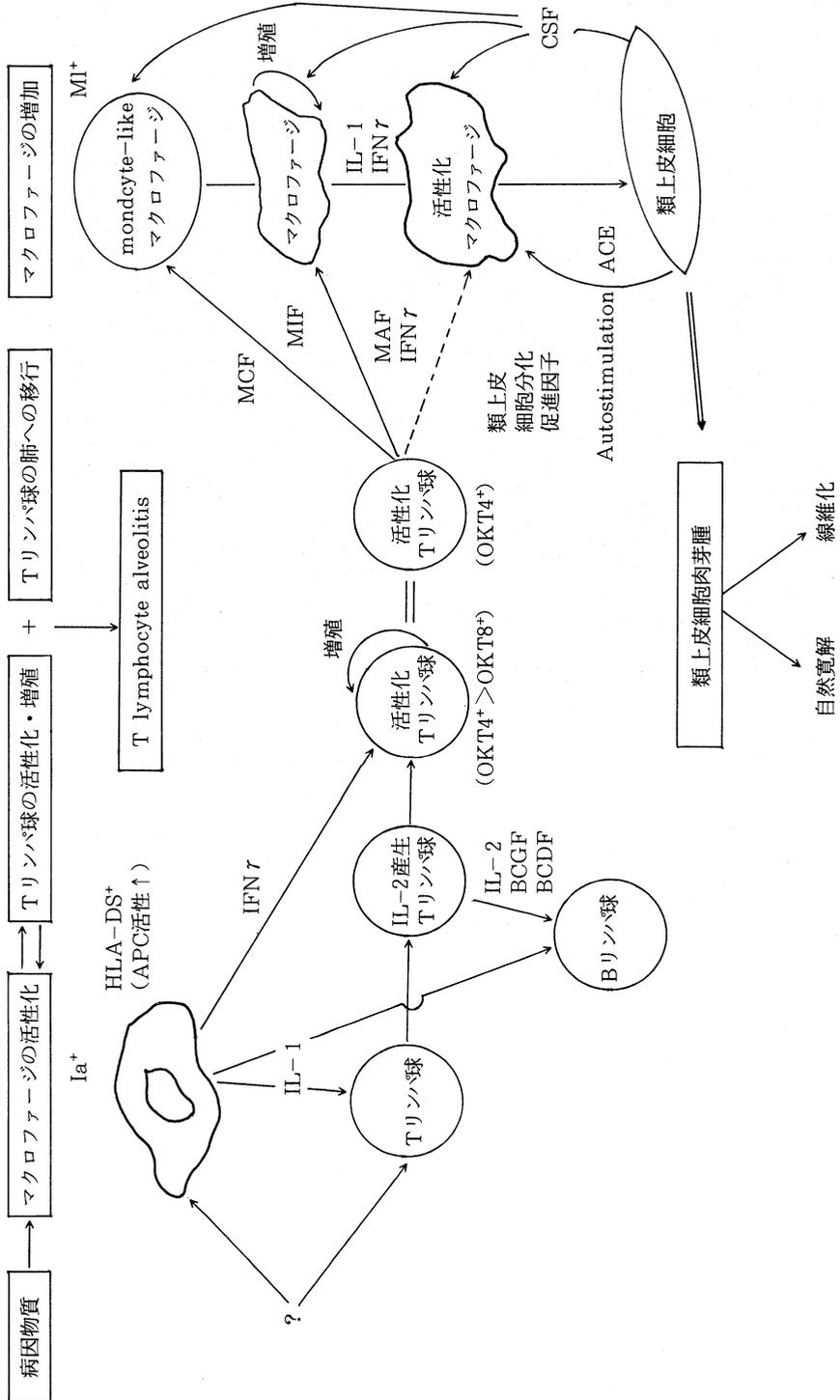


図1 肺サルコイドーシス病変の形成機序

以上の病変成立過程を示したのが図1である。

### 3. macrophage 所見から見た病変形成機序

BALF マクロファージは定常状態では組織で増殖せずに末梢血単球からの流入分化成熟によって肺胞領域に分布していると考えられる。炎症状態ではこの平衡が破れて多量の末梢血単球が MCF などの chemotactic lymphokine により肺に流入して来るのではないかと考えられる。サルコイドーシス活動期症例では、BALF OKM1<sup>+</sup> cell 増加、末梢血 Ia1<sup>+</sup> cell 増加が認められた。OKM1<sup>+</sup> cell は末梢血単球の90%以上に陽性であり、BALF cell での高値所見は末梢血単球の病変部への流入を示唆するものと考えられる。

Ia 抗原 (HLA-DR 抗原) は抗原提示能 (antigen presentation capacity : APC) に関連して出現する膜抗原であるが、BALF レベルでは、末梢血レベルに比べてその発現 (OKIa1<sup>+</sup> cell) は高値であるが、健康、疾患による差異は認められなかった。APC の指標としては Ia 抗原以外に、HLA-DS 抗原発現率 (Leu 10<sup>+</sup> cell), OKT6<sup>+</sup> cell についても検討したが、OKIa1<sup>+</sup> cell と同様の所見であった。これらの自験成績からは、BALF マクロファージあるいは末梢血単球レベルにおいてサルコイドーシスで未知の病因物質についてのマクロファージの APC 亢進は疾患特異的に示唆されていないことが結論された。加えて、サルコイドーシス活動期 BALF マクロファージの spontaneous IL-1 産生のレベルでも有意な高値所見は認められなかった。これらの自験成績からは、BALF マクロファージの APC を亢進させ得る可能性の一つとして、サルコイドーシスでは、T cell が primary に活性化されていることが pathogenesis 上重要な点ではないかとの考え方も検討されねばならない。

### 4. T cell の活性化所見からみた病変成立機序

T cell の活性化と肺への集積過程に関しては以下のような可能性が考えられる。

第1に、肺内 T cell の活性化は肺内の種々の low dose の刺激によって常に認められているとの報告に関

わる考え方である。しかし、この所見は健康肺で認められるもので、サルコイドーシス病変成立における積極的な役割については不明である。

第2に、肺では肺以外の部位での感作により肺に高率に effector T cell が集積するとの報告に関わる考え方である。サルコイドーシスで、肺外の感作状態の把握 (auto-immune state など) と、BALF リンパ球の変動についての検討が必要とされる。

第3には、抗 T cell 抗体の関与による T cell の選択的な活性化あるいは抑制に関する可能性である。サルコイドーシス患者血清中の抗 T cell 抗体は以前から報告されてきたが、これが抗 OKT8<sup>+</sup> cell 抗体でありこれによって OKT8<sup>+</sup> cell が選択的に抑制され結果として OKT4<sup>+</sup> cell が増加するとの仮説が検討されてはいるが実証されなかった。一方、肺で産生された抗ウイルス抗体に対する抗 idiotypic 抗体が cross reactive に T cell に作用してこれを活性化させる可能性も考えられる。

第4には、外来性感作なく既存している internal activated T cell clone が、肺のように恒常的に活性化されている accessory cell がある部位では、expansion しやすいつの可能性も考えられる。この internal activated T cell clone の存在は、サルコイドーシスに特異的な host factor としてでもとらえるべきものであろう。

### まとめ

モノクローナル抗体によるサルコイドーシスの病態生理学的検討に関してはまず、T cell, 単球, マクロファージの機能、活性化を詳細に検討できるような抗体の開発、末梢血から肺への、あるいは肺から末梢血への移行をとらえる指標の開発が待たれるものである。また、臨床的には病変の遷延化、線維化への移行や自然寛解を示唆し得る所見の検討にモノクローナル抗体が有用な情報を提供する可能性も残されている。

有用なモノクローナル抗体の開発には詳細な病態生理学的検討がなされるべきであり、またこの検討のためには、特異的なモノクローナル抗体が望まれるというジレンマに直面しているのがサルコイドーシス研究の現状と言えるのかもしれない。

## 5. 肉芽腫性肺疾患におけるマクロファージサブセットとその動態

熊本大学医学部第一内科 杉本 峯 晴  
安藤 正 幸  
荒木 淑 郎

### はじめに

肉芽腫性肺疾患の免疫学的背景を明らかにするには、

肺病巣に集積して肉芽腫病変の形成に関与する細胞の動態を知ることが必要である。

最近、気管支ファイバースコープを用いた気管支肺胞

洗浄 (BAL) の臨床応用により、肺局所から細胞を採取し、それらの細胞をモノクローナル抗体を用いて解析することが可能となった。しかし、これまでの研究は主にリンパ球に関するものであり、マクロファージに関する研究は少ない。そこで今回、我々は病巣マクロファージの動態から見た肉芽腫性肺疾患の病態解析を目的として、サルコイドーシス (サ症) 及び過敏性肺炎を中心に、末梢血単球、肺病巣マクロファージ及びBAL液中の肺胞マクロファージ (PAM) における細胞表面マーカーの変化を単球に対するモノクローナル抗体を用いて検討したので報告する。

対象及び方法

対象はサ症12例 (男7例, 女5例) で病期は stage 0 が2例, stage 1 が6例, stage 2 が4例であった。対照疾患には過敏性肺炎7例 (男2例, 女5例), 正常対照には健康非喫煙者11例及び健康喫煙者10例 (全例男) を用いた。

BAL は気管支ファイバースコープを用いて、生食水 50ml を3回、総量150ml で右 S<sup>8</sup> で行った<sup>1)</sup>。

細胞表面マーカーの測定は、オルソ社のモノクローナル抗体を用いて間接法にて行った。用いたモノクローナル抗体は単球 C3bリセプターを認識する OKM1, 単球抗原提示細胞を認識する OKM5, 及びヒトトランスフェリンリセプターを認識する OKT9 で、ヘパリン加

末梢血及びBAL液について、スペクトラムⅢによるフローサイトメトリーで陽性細胞の比率を測定した。

BAL細胞の塗抹標本及び経気管支肺生検で得られた肺組織の凍結標本については、アビジン・ビオチン法で免疫組織化学的にPAM, 病巣マクロファージ及び類上皮細胞を染色した<sup>2)</sup>。

成績

BAL細胞所見：サ症、過敏性肺炎、健康喫煙者及び健康非喫煙者におけるBAL液中細胞数はそれぞれ、 $18.9 \pm 12.2$ ,  $33.7 \pm 18.6$ ,  $24.2 \pm 11.5$ ,  $8.8 \pm 2.5 \times 10^4$  cells/ml であった。細胞分画ではサ症及び過敏性肺炎でリンパ球の比率が上昇しており、PAMの比率は減少していた。一方、PAMの絶対数は、サ症 $10.7 \pm 9.9$ , 過敏性肺炎 $5.5 \pm 2.9$ , 健康喫煙者 $22.5 \pm 11.1$ , 健康非喫煙者 $7.5 \pm 2.0 \times 10^4$  cells/ml で、喫煙者ではBAL液中のPAM数が増加していたが、サ症及び過敏性肺炎ではPAM数の増加は認められなかった。

喫煙の影響：喫煙は肺におけるPAM数を増加させることから、次にPAMの表面マーカーに及ぼす喫煙の影響を検討した。健康喫煙者と健康非喫煙者の比較では、OKM1及びOKM5陽性細胞の比率には有意差は認められなかったが、OKT9陽性細胞の比率は喫煙者において明らかに低下していた ( $p < 0.005$ )。サ症においても喫煙者では非喫煙者に比べ、OKT9陽性細胞

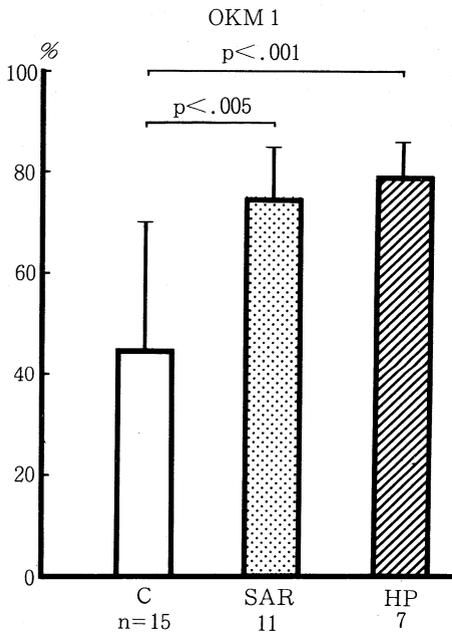


図1 サルコイドーシスおよび過敏性肺炎における肺胞マクロファージの表面マーカー

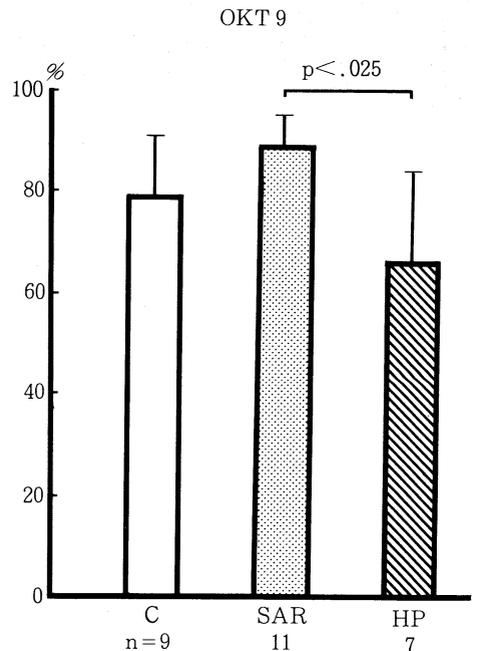


図2 サルコイドーシスおよび過敏性肺炎における肺胞マクロファージの表面マーカー

比率の低下が認められた。

以上の成績から、PAMの表面マーカーを検討する際には常に喫煙の影響を考慮することが必要である。そこで我々は、以下の検討は非喫煙症例を対象として行った。

サ症及び過敏性肺炎におけるPAMの表面マーカー図1に示す如く、BAL液中のOKM1陽性細胞の比率は、健常非喫煙者に比べ、サ症及び過敏性肺炎で有意に上昇していた(それぞれ、 $p < 0.005$ ,  $p < 0.001$ )。しかし、サ症と過敏性肺炎の間では差は認められなかった。一方、図2に示す如く、OKT9陽性細胞の比率は健常非喫煙者でも高い値を示したが、サ症ではより増加する傾向にあり、過敏性肺炎では逆に低下する傾向にあった。サ症と過敏性肺炎の比較では、後者において有意に低率であった( $p < 0.025$ )。BAL液中のOKM5陽性細胞の比率は健常者、疾患群ともに低率であったが、過敏性肺炎で $16.4 \pm 7.5\%$ と上昇していた( $p < 0.005$ )。

以上の如く、サ症と過敏性肺炎ではPAMの表面マーカーに差が認められ、過敏性肺炎において、より単球に近い細胞が増加していると考えられた。そこで、次に両疾患におけるPAMの相違を機能面から検討した。

ライソゾーム酵素活性：サ症及び過敏性肺炎におけるPAMの $\beta$ -galactosidase活性は図3の如く、サ症では有意に上昇していた( $p < 0.001$ )が、過敏性肺炎では健常非喫煙者と同様に酵素活性の上昇は認められなかった。

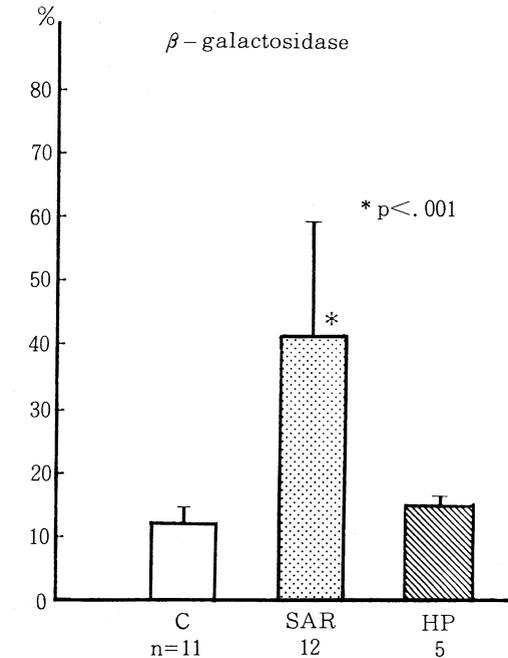


図3 肺泡マクロファージのライソゾーム酵素活性 サルコイドーシスと過敏性肺炎の比較

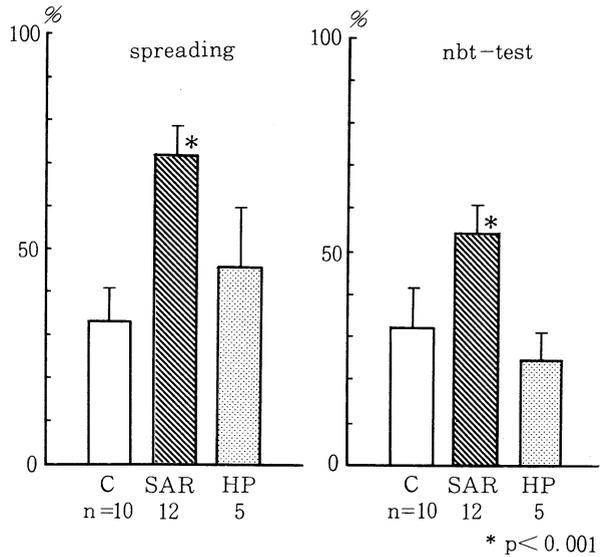


図4 サルコイドーシスおよび過敏性肺炎における肺泡マクロファージの機能

伸展能及びNBT還元能：サ症では伸展能、NBT還元能ともに亢進していたが、過敏性肺炎では軽度伸展能の亢進が認められるものの、NBT還元能は健常非喫煙者と同様であった(図4)。

肺組織におけるマクロファージ表面マーカー：サ症肺組織においては、肉芽腫内のマクロファージはBAL液中のPAMと同様にOKM1とOKT9に陽性、OKM5は陰性であった。即ち、OKM5は組織マクロファージのレベルで消失する表面マーカーと考えられた。

単球における表面マーカー：末梢血単球におけるOKM1、OKM5およびOKT9陽性細胞の比率は、サ症ではそれぞれ、 $91.0 \pm 3.0$ ,  $90.2 \pm 3.5$ ,  $16.0 \pm 10.2\%$ 、過敏性肺炎ではそれぞれ、 $89.1 \pm 11.4$ ,  $94.1 \pm 3.9$ ,  $17.1 \pm 11.9\%$ 、健常非喫煙者では、それぞれ $91.7 \pm 3.9$ ,  $93.4 \pm 3.4$ ,  $3.3 \pm 1.6\%$ 、健常喫煙者ではそれぞれ $88.4 \pm 9.0$ ,  $89.4 \pm 4.3$ ,  $7.9 \pm 7.0\%$ で、4群間に差は認められなかった。即ち、単球レベルから肺病変における病態を推測することは、これらの表面マーカーからは困難であると考えられた。

考案

サルコイドーシスにおいては、肺病巣に集積した肺泡マクロファージが形態的にも機能的にも活性化されていることは既に明らかにされている<sup>3)~5)</sup>。

今回、モノクローナル抗体OKM1、OKM5、OKT9を用いて細胞の動態を検討した結果、末梢血単球由来で肺局所において活性化されたマクロファージ及び肉芽腫を形成している類上皮細胞はOKM1陽性、OKM5陰性、OKT9陽性を示した。これらの抗体は、マクロファ-

ジから類上皮細胞への分化を示す特異的な表面マーカーを認識するモノクローナル抗体ではないが、肺病変部で活性化されたマクロファージが類上皮細胞肉芽腫形成へと進むことを表面マーカーの面からも示唆する成績である。しかし、肉芽腫形成に至る過程を表面マーカーの面から詳細に解析するには、これらのモノクローナル抗体では限界があり、今後の問題として、マクロファージから類上皮細胞への特異的な分化マーカーを明らかにすることが必要であろう。

過敏性肺炎では PAM の OKM5 陽性率の増加、OKT9 陽性率の減少を認め、サ症における PAM の表面マーカーの発現とは異なっていた。このような違いは PAM のライソゾーム酵素活性、伸展能及び NBT 還元能にも認められ、過敏性肺炎ではサ症に比べ、より単球に近い幼弱なマクロファージが肺病変部に集積しているものと推測することができる。

### 結 語

肉芽腫性肺疾患における単球・マクロファージの表面マーカーの変化を末梢血単球、肺組織及び BAL 細胞レベルで検討した今回の成績から、その表面マーカーは肺局所における病態に応じて変化し、その変化が細胞の活性化あるいは分化と関連していると考えられた。

### 文 献

1) 杉本峯晴・西 隆二・安藤正幸・堀尾 直・興梠博

次・島津和泰・菅 守隆・中嶋博徳・荒木淑郎：気管支肺胞洗滌法により採取した喫煙者肺胞マクロファージの形態と機能の検討，気管支学，6：25-33，1984。

- 2) 杉本峯晴・中嶋博徳・安藤正幸・西 隆二・興梠博次・島津和泰・菅 守隆・荒木淑郎：正常胸部X線写真を示すブドウ膜炎症例における肺サルコイドーシスの診断；気管支肺胞洗滌による検討，日胸，23：59-64，1985。
- 3) 杉本峯晴・安藤正幸・西 隆二・堀尾 直・興梠博次・菅 守隆・島津和泰・中嶋博徳・荒木淑郎：サルコイドーシスにおける肺胞マクロファージの形態と機能，呼吸，3：259-264，1984。
- 4) Hunninghake, G.W.: Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis, *Am Rev Respir Dis* 129: 569, 1984.
- 5) Sugimoto, M., Nishi, R., Ando, M., Nakashima, H. and Araki, S.: Activation of alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis: Lack of correlation with serum angiotensin-converting enzyme activity, *Jap J Med*, 25: 135-143, 1986.