

原 著

肺結核患者における抗原提示細胞活性

伊 奈 康 孝 ・ 佐 道 理 文 ・ 高 田 勝 利
山 本 正 彦 ・ 荒 川 啓 基 ・ 野 田 正 治
柿 原 秀 敏 ・ 宮 地 厚 雄

名古屋市立大学第2内科

森 下 宗 彦

愛知医科大学第2内科

吉 川 公 章

大同病院呼吸器科

受付 昭和63年7月15日

ANTIGEN PRESENTATION IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Yasutaka INA *, Satofumi SADO, Katsutoshi TAKADA,
Masahiko YAMAMOTO, Keiki ARAKAWA, Masaharu NODA,
Hidetoshi KAKIHARA, Atsuo MIYACHI, Munehiko MORISHITA
and Kimiaki YOSHIKAWA

(Received for publication July 15, 1988)

Antigen presenting capacity (APCC) by monocytes (Mono) and alveolar macrophages (AM), using PPD as the antigen, was determined in 15 patients with pulmonary tuberculosis and 9 healthy controls who all showed positive PPD skin tests.

Results were as follows :

- 1) Mono from both healthy controls and tuberculosis showed APCC to autologous peripheral T lymphocytes, and no significant difference was observed between the two groups.
- 2) AM from tuberculosis showed APCC to autologous peripheral T lymphocytes, however AM from healthy controls did not.
- 3) APCC by autologous Mono or AM to lung T-lymphocytes was lower than that to peripheral T-lymphocytes, but the difference was not significant.
- 4) In tuberculosis, APCC, observed before chemotherapy, was remarkably weakened during the first two months of therapy, and almost recovered to the previous level thereafter.
- 5) The mechanism which enhances APCC by AM in tuberculosis is uncertain. But neither increased DR antigen expression on AM nor release of IL-1 from AM suggested to be

* From the Second Department of Medicine, Nagoya City Univ. Medical School, Mizuho-ku, Nagoya 467 Japan.

responsible for the enhanced APCC in tuberculosis.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Antigen presentation, HLA class II antigen, IL-1, Chemotherapy

キーワード : 肺結核症, 抗原提示細胞活性, HLA クラスII抗原, IL-1, 化学療法

はじめに

結核免疫では、T細胞、マクロファージにより担われる細胞性免疫が重要な役割を担っていることが知られている^{1)~3)}。

今回われわれは、細胞性免疫成立に深く関与している抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) 活性を、purified protein derivatives (PPD) を抗原として用い、肺結核患者において検討した。

対象

肺結核患者 15 例 (男性 12 例, 女性 3 例, 平均年齢 49.8 ± 16.8 歳) を対象とした。その内訳は、抗結核剤投与前の症例 3 例 (男性 2 例, 女性 1 例) と、抗結核剤投与中の症例 12 例 (男性 10 例, 女性 2 例) である。後者のうち 5 例 (全例男性) は治療開始後 2 カ月未満の症例であり、残る 7 例 (男性 5 例, 女性 2 例) は治療開始後 2 カ月以上経った症例である。正常者 9 例 (男性 5 例, 女性 4 例, 平均年齢 50.2 ± 14.2 歳) を対照として用いた。なお、被検者は全例ツ反陽性者であり、他に糖尿病など全身性疾患を有するものやステロイド治療中のものは対象から外した。

方法

気管支肺胞洗浄 (BAL) を右中葉または、左舌区の亜区域枝で型どおり行い、得られた BAL 液 (BALF) およびヘパリン加末梢血から Ficoll-Conray 比重遠心法により単核細胞を分離した。これを 10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊後、Petri dish (Falcon #1005, Oxnard, CA) に注入し、 37°C 、90 分インキュベートすることによりプラスチック付着細胞 [単球 (Mono) または、肺胞マクロファージ (AM)] と非付着細胞に分離した。回収されたプラスチック付着細胞はベルオキソゲンゼ陽性細胞が 95% 以上を占め、viability は 98% 以上であった。なお、BAL を施行した肺結核症例は 3 例であり、全例 BAL は病巣側で行った。

この付着細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、PPD ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, CIP), マイトマイシン C (MMC, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, Kyowa Hakko) と共に 37°C 、60 分インキュベートし、その後 PBS にて 3 回洗浄して、

最後に 10% ヒト AB 血清加 RPMI 1640 を用いて $2 \times 10^5/\text{ml}$ に細胞調整し、PPD pulsed APC として用いた。PPD nonpulsed APC は、MMC のみを用いて同様に準備した。一方、プラスチック非付着細胞は 10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊後ナイロンウールカラムに注入、 37°C 、45 分静置後ナイロンウール非付着細胞 (T 細胞) を回収し、10% ヒト AB 血清加 RPMI 1640 にて $1 \times 10^6/\text{ml}$ に細胞調整し responder cell とした。

APC $100 \mu\text{l}$ (2×10^4 個) と T 細胞 $100 \mu\text{l}$ (1×10^5 個) を 96 穴底プレート (Corning #25850, New York) の各ウェルに Triplicate で注入し、 37°C 、5 日間培養した。培養終了前に $^3\text{H-TdR}$ $0.2 \mu\text{Ci}$ を各ウェルに加え、さらに 16~18 時間培養後セルハーベスターを用いてハーベストし、T 細胞への $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを liquid scintillation counter にて測定し、APC 活性とした。

特に述べない限り APC 活性は、responder cell として自己の末梢血 T 細胞を用いて検討した値を意味している。したがって、本論文では、APC 活性は APC による真の抗原提示能と、responder cell としての PPD 特異的 T 細胞の数および機能を総合したものをあらわしている。

APC 上の HLA クラス II 抗原 (DR 抗原) 量は、抗 DR 単クローン抗体 (Coulter Immunology, Florida) を用い間接蛍光抗体法で検討し FACS を用いて解析した。なお、APC 上 Fc レセプターへの一次抗体の非特異的結合をブロックするため⁴⁾ 一次抗体使用時に過量のヒト IgG を同時に加えた。HLA クラス II 抗原量は、mean fluorescence intensity (MFI) により表した。なお、肺結核患者における AM による APC 活性は、全例抗結核剤使用前の成績である。

結果

APC 活性に対する APC と T 細胞の至適細胞比を検討したところ、APC : T 細胞 = 1 : 5 のときに APC 活性は最大となった (Table 1)。したがって以下の検討は、APC : T 細胞 = 1 : 5 で行った (Table 1)。

Mono を用いた APC 活性 (cpm) は、正常者では 4005 ± 3276 (mean \pm SD) であり、肺結核患者の値 (4578 ± 4509) と有意差はなかった (Table 2)。BALF

Table 1. Effect of Numbers of APC on Antigen Presentation

APC*	n	cpm**
1×10^3	3	1401 \pm 577
5×10^3	3	2315 \pm 589
1×10^4	3	2961 \pm 566
2×10^4	3	3443 \pm 65
5×10^4	3	3078 \pm 222
1×10^5	3	1019 \pm 694

* number of APC added into the well

** mean \pm SD

Indicated serial number of PPD-pulsed APC (monocytes) were co-cultured with 1×10^5 T cells at 37°C for 5 days, and antigen presenting capacity (APCC) was determined. When the APC to T cell ratio was 1 : 5, the APCC was optimal.

中 AM を用いた APC 活性は、正常者ではこれまでの報告どおりほとんど認められなかったが、肺結核患者では 7785 ± 1677 と認められた (Table 2)。

次に、肺結核患者において responder cell として BALF 中 T 細胞を用いて同様の検討をした。Mono による APC 活性は 3198 ± 931 、AM による APC 活性は 4572 ± 1236 と共に認められたが、末梢血 T 細胞を responder cell とした場合に比べて低値であった (Table 3)。

次に、抗結核剤治療の APC 活性に及ぼす影響について検討した。なお、抗結核剤投与例は全例 RFP を含む治療をされていた。Table 4 に示したように化療前の症例では認められた APC 活性が、化療開始 2 カ月未満の症例で著明に低下し、化療 2 カ月以上の症例では再び認められた。

T 細胞は、APC 上の HLA クラス II (DR) 抗原と PPD 抗原を同時に認識して活性化されるので、肺結核患者 AM の APC 活性亢進が AM 上 HLA クラス II 抗原量の増加に起因している可能性が考えられる。そこで、正常者および肺結核患者の Mono、AM 上の DR 抗原量についてそれぞれ検討してみたが、両者間で有意差は認められなかった (Table 5)。

さらに、肺結核患者 AM の APC 活性亢進の理由として、肺結核患者では正常者に比べて AM からの IL-1 産生が亢進しているためという可能性が考えられるので、正常者 AM の APC 活性測定時に、種々の濃度の recombinant IL-1 を培養系に添加してその影響を検討した。しかし、IL-1 を添加しても APC 活性は誘導されず (Table 6)、この可能性も少ないと考えられた。

考 案

結核免疫では、T 細胞、マクロファージにより担われる細胞性免疫が重要な役割を果たしている^{1)~3)}。

細胞性免疫成立に際して、APC の役割は重要であり、T 細胞は APC により提示された外来抗原と APC 上の HLA クラス II 抗原を同時に認識することによりはじめて活性化される⁵⁾。このような APC としての機能を持った細胞として生体内では皮膚 Langerhans 細胞、脾細胞、末梢単球など種々の細胞が知られている^{6)~8)}。PPD を抗原として用いた今回のわれわれの検討でも正常者および肺結核患者で Mono に APC 活性が認められ、両者間に差を認めなかった。ところで本論文では、responder cell として自己末梢 T 細胞を使用しているので、ここでの APC 活性は APC による真の抗原提示能と、PPD 特異的 T 細胞の数および機能を総合したものとして理解される。したがって、正常人と肺結核患者の間の APC による真の抗原提示能の比較には allogeneic APC 活性の検討や PPD 特異的 T 細胞クローンをを用い

Table 2. Antigen Presentation by Monocytes and Alveolar Macrophages *

Culture condition	control		tuberculosis	
	n	cpm	n	cpm
T cells alone	9	264 \pm 130	15	500 \pm 441
+ nonpulsed Mono	9	315 \pm 186	15	590 \pm 635
+ PPD pulsed Mono	9	4005 \pm 3276	15	4578 \pm 4509
T cells alone	6	269 \pm 114	3	271 \pm 170
+ nonpulsed AM	6	296 \pm 191	3	473 \pm 277
+ PPD pulsed AM	6	597 \pm 281	3	7785 \pm 1677

* Results are expressed as mean \pm SD (cpm).

PPD pulsed or nonpulsed APC (2×10^4 cells) was co-cultured with autologous blood T cells (1×10^5 cells) at 37°C for 5 days, and APCC was determined.

Table 3. Comparison of Antigen Presentation to Lung versus Blood T cells

Culture condition	n	cpm*
BT alone	3	271 ± 170
+nonpulsed Mono	3	601 ± 291
+PPD pulsed Mono	3	10046 ± 4100
+nonpulsed AM	3	473 ± 277
+PPD pulsed AM	3	7785 ± 1677
LT alone	3	264 ± 151
+nonpulsed Mono	3	470 ± 171
+PPD pulsed Mono	3	3198 ± 931
+nonpulsed AM	3	137 ± 21
+PPD pulsed AM	3	4572 ± 1236

BT; blood T cell LT; lung T cell

* mean ± SD

PPD pulsed or nonpulsed APC (2×10^4 cells) was co-cultured with BT or LT (1×10^5 cells) at 37°C for 5 days, and then APCC was determined.

Table 4. Antigen presentation in comparison with duration of therapy

Duration of therapy*	n	cpm**
before	3	7279 ± 3914
< 2 months	5	944 ± 479
2 months ≤	7	6017 ± 4713

* RFP was administrated in all patients.

** mean ± SD

Table 5. HLA Class II Antigens on Mono and AM

	DR Antigen (MFI*)			
	n	Mono	n	AM
Control	8	57 ± 16	4	142 ± 56
Tuberculosis	9	69 ± 15	2	191 ± 78

* MFI: mean fluorescence intensity

The density of DR antigen expression on Mono or AM was assessed by the indirect immunofluorescence method, using anti-DR monoclonal antibody. The results are expressed as mean fluorescence intensity.

での検討が必要である。一方、正常者AMはAPCとしての機能をほとんど示さないと報告されているが⁽⁹⁾¹⁰⁾、今回のわれわれの検討でも同様であった。肺結核患者では、正常者と異なりAMによるAPC活性が認められた。これはAPCによる真の抗原提示能を示しており、肺結核症において局所免疫の亢進を示すものと考えられ

Table 6. Effect of IL-1 on Antigen Presentation

IL-1	T cell only	Mono+T cell	AM+T cell
(-)	319 ± 99*	3010 ± 810	404 ± 94
(+)	338 ± 166	2847 ± 167	684 ± 40

* mean ± SD

To assess the effect of IL-1 on APCC, PPD-pulsed APC was co-cultured with T cells in the presence of serial concentrations of IL-1 (ranging from 0.1 to 1 U/ml), and APCC was determined. The representative data is shown, using 0.5 U/ml of IL-1.

るが、いかなる機序でAPC活性が亢進しているのかは不明である。しかし、AM上のDR抗原が増加しているためにAPC活性が亢進する可能性が考えられるため、正常者、肺結核患者のAM上のDR抗原量を検討してみたが両者間に差はなくこの可能性はまずないと考えられた。ところで、正常者においてAMからのIL-1産生能はMonoに比べて低いとする報告¹¹⁾¹²⁾がみられるので、正常者においてAPC活性が認められないのはAMからのIL-1産生が少ないため、逆に肺結核患者ではIL-1産生が充分であるためにAPC活性が認められた可能性が考えられるが、今回のわれわれの検討では、正常者AMにIL-1を加えてもAPC活性を誘導できなかったことにより、この可能性も否定的である。

他の可能性としてAM上にあるlymphocyte function associated antigen (LFA)の関与、DR抗原の構造の違い、Monoの肺局所へのrecruitmentの増加による可能性等が考えられる。

LFAは、AM上にありkiller cellがtarget cellに働きかけるfirst stepに関与すると考えられている抗原¹³⁾であり、最近、正常者AMにAPC活性が認められないのはAM上LFAが少ないためとする報告がなされた¹⁴⁾。今回は、LFAに関しての検討はしていないが、肺結核症のAPC活性亢進に関与している可能性は考えられる。

ところで、今回のわれわれの検討では、AM上のDR抗原量の違いは正常者と肺結核患者の間で認められなかったが、DR抗原に構造上の違いがあり、これが両者のAPC活性の差として表現されている可能性が考えられる。マウスにおいてクラスII分子のglycosialilationの違いがAPC活性の強弱に関連すること、すなわちシアル化の少ないクラスII分子を表面上にもつAPCの方が、APC活性が強いとの報告がみられる¹⁵⁾。一方、正常人MonoとAM上のDR抗原のcarbohydrateを比較した報告¹⁶⁾では、MonoとAMでは、DR抗原上のneural, N-linked carbohydratesの量に差がみられ、これが両者のAPC活性の差の原因である可能性を

指摘している。このようなDR抗原の構造上の差異が、結果として正常人AMと肺結核患者AMのAPC活性の差として表れた可能性は考えられる。

肺結核患者と同じく肉芽腫性肺疾患の1つであるサルコイドーシス（以下、サ症）においてMono, AMのAPC活性を同様に検討してみると、これまでの2, 3の報告¹⁷⁾¹⁸⁾にみられるようにサ症AMにAPC活性が認められた¹⁹⁾。一方、サ症においてAMのphenotypeの検討から、末梢Monoの肺へのrecruitmentの増加が示されている²⁰⁾。このことは、サ症AMのAPC活性亢進は末梢Monoの肺へのrecruitmentの増加に起因している可能性を示している。肺結核患者においてAMのphenotypeに関する検討がなされていないので末梢Monoの肺へのrecruitment増加の有無に関しては不明であるが、このrecruitmentが肺結核におけるAMのAPC活性亢進に関与していることは否定できない。

肺結核患者のBALF中T細胞をresponder cellとしてもちいると、末梢血T細胞をresponder cellとした場合に比べてAPC活性は低値となったが、この場合真のAPCによる抗原提示能のほかに、PPD特異的T細胞の数や機能の違いの関与も考えられる。肺結核患者MonoのAPC活性は、化療前には認められたが、化療開始2カ月以内の症例ではほとんど認められなく、2カ月以上たった症例では再び認められた。化療は、すべてRFPを含んでおり、一方、RFPには免疫抑制作用のあることが知られている²¹⁾ため、RFPによるAPC活性への影響の可能性も否定できない。化療に伴うAPC活性の低下機序については今後さらに検討を要する。

ま と め

肺結核患者において、PPDを抗原としてAPC活性を測定して以下の結果を得た。

- 1) 肺結核患者Monoは、正常者Mono同様APC活性を示した。
- 2) 肺結核患者AMは、APC活性を示したが、正常者AMには認められなかった。
- 3) 肺結核患者では、肺内T細胞をresponder cellとしても、Mono, AMのAPC活性は共に認められた。しかし、末梢T細胞を使用した場合に比べてその値は低かった。
- 4) APC活性は、化療(RFPを含む)前の症例には認められたが、化療開始2カ月以内の症例では低下しており、化療2カ月以上経過した症例には再び認められた。
- 5) 肺結核患者AMのAPC活性亢進の理由是不明であるが、AM上のDR抗原量やAMからのIL-1分泌の増加に起因するものではないと考えられた。

本論文の要旨は第62回日本結核病学会総会（昭和62年4月、東京）において発表した。

文 献

- 1) 志摩 清, 岳中耐夫, 安藤正幸他: 肺結核患者におけるT, B Cell subpopulation, 結核, 51: 363~368, 1976.
- 2) 藤井昌史, 林 和雄, 大森 誠他: 肺結核患者の遅延型皮膚反応, 結核, 54: 281~284, 1979.
- 3) 吉田 彪: 結核における肉芽腫病変発生の機序, 結核, 61: 611~619, 1986.
- 4) Guyre, P. M., Crabtree, G. R., Bodwell, J. E. et al. : Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on human macrophages, J Immunol, 126: 666-668, 1983.
- 5) Koide, Y., Awashima, F., Yoshida, T. O. et al. : The role of three distinct Ia-antigen molecules in human T cell proliferative responses: Effect of monoclonal anti-Ia-like antibodies, J Immunol, 129: 1061-1069, 1982.
- 6) Aberer, W., Kruiskeek, A. M., Shimada, S. et al. : *In vivo* treatment with anti-I-A antibodies: Differential effects on Ia antigens and antigen-presenting cell function of spleen cells and epidermal Langerhans cells, J Immunol, 136: 830-836, 1986.
- 7) Stringl, G. : Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells, J Immunol, 121: 2005-2013, 1978.
- 8) Fierz, W., Endler, B., Reske, K. et al. : Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation, J Immunol, 134: 3785-3793, 1985.
- 9) Mayernik, D. G., Ul-Hag, A., Rinehart, J. J. : Differentiation-associated alteration in human monocyte-macrophage accessory cell function, J Immunol, 130: 2156-2160, 1983.
- 10) Toews, G. B., Vial, W. C., Dunn, M. M. et al. : The accessory cell function of human alveolar macrophages in specific T cell proliferation, J Immunol, 132: 181-186, 1984.
- 11) Eden, E., Turino, G. M. : Interleukin-1 secretion by human alveolar macrophages

- stimulated with endotoxin is augmented by recombinant immune (Gamma) interferon, *Am Rev Respir Dis*, 133 : 455-460, 1986.
- 12) Wewers, M. D., Rennard, S. I., Hance, A. J. et al. : Normal human alveolar macrophages obtained by broncho-alveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1, *J Clin Invest*, 74 : 2208-2218, 1984.
 - 13) Klensky, L. M., Sanchez-Madrid, F., Robbins, E. et al. : The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, LFA-3 : Cell surface antigens associated with CTL-target interactions, *J Immunol*, 131 : 611-616, 1983.
 - 14) Lyons, C. R., Ball, E. J., Toews, G. B. et al. : Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T cell-macrophage binding, *J Immunol*, 137 : 1173-1180, 1986.
 - 15) Cowing, C., Chapdelaine, J. M. : T cells discriminate between Ia antigens expressed on allogeneic accessory cells and B cells : a potential function for carbohydrate side chains on Ia molecules, *Pro Natl Acad Sci USA*, 80 : 6000-6004, 1983.
 - 16) Ferro, T. J., Monos, D. S., Spear, B. T. et al. : Carbohydrate differences in HLA-DR molecules synthesized by alveolar macrophages and blood monocytes, *Am Rev Respir Dis*, 135 : 1340-1344, 1987.
 - 17) Lem, V. M., Lipscomb, M. F., Weissler, J. C. et al. : Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation, *J Immunol*, 135 : 1766-1771, 1985.
 - 18) Venet, A., Hance, A. J., Saltini, C. et al. : Enhanced alveolar macrophage-mediated antigen-induced T-lymphocyte proliferation in sarcoidosis, *J Clin Invest*, 75 : 293-301, 1985.
 - 19) Ina, Y., Yamamoto, M., Takada, K. et al. : Antigen-presenting capacity in sarcoidosis, *Am Rev Respir Dis*, 137 : 341, 1988.
 - 20) Hance, A. J., Douches, S., Winchester, R. J. et al. : Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies : Changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis, *J Immunol*, 134 : 284-292, 1985.
 - 21) 志摩 清, 岳中耐夫, 安藤正幸他 : Rifampicin の免疫抑制作用に関する臨床的検討 (第3報), *結核*, 51 : 214-215, 1976.