

原 著

ミコバクテリア感染症における
末梢血Tリンパ球の分析

和田 雅子

結核予防会結核研究所
受付 平成3年10月4日

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF PERIPHERAL T LYMPHOCYTES
FROM PATIENTS WITH MYCOBACTERIAL DISEASES

Masako WADA *

(Received for publication October 4, 1991)

Flow cytometric analysis was carried out on peripheral blood cells from patients with tuberculosis (TB) (n=84) and with mycobacteriosis other than tuberculosis (MOTT) (n=38). A whole blood-staining-hemolysis procedure was used for the preparation of samples being analyzed, and the cells were double-stained with various combinations of fluorescein isothiocyanate (FITC)- and phycoerythrin (PE)- labeled monoclonal antibodies. These procedures enabled us to obtain quite reproducible results. As patients of more than 70 years old showed apparently distinct T lymphocyte profiles compared with those less than 70 years of age, this investigation was carried out only on patients of less than 70 years old.

1) The proportion of total lymphocytes to total leukocytes was significantly low in TB- and MOTT- groups, when compared with that in the healthy control group, although the total peripheral leukocyte number was not significantly different from each other. Thus, absolute numbers of lymphocytes were decreased significantly in TB- and MOTT- patients.

2) The numbers of both T and B lymphocytes in peripheral blood decreased in patients of both groups, leaving the ratio of T/B relatively constant.

3) Both $CD4^+/CD8^-$ and $CD4^-/CD8^+$ subsets of T lymphocytes decreased in TB- as well as MOTT- groups. However, the decrease in $CD4^+/CD8^-$ subset was more manifest than that in $CD4^-/CD8^+$ subset. Among $CD4^+/CD8^-$ subset the proportion of the $Leu8^+$ subpopulation was slightly lower and among $CD4^-/CD8^+$ subset $CD11b^-$ subpopulation was slightly higher in both TB- and MOTT- groups than in healthy control group.

4) There was no significant difference in proportions of IL-2-receptor (p55 α chain) positive as well as HLA-DR positive T-lymphocytes between patient groups and healthy control group.

5) Both TB- and MOTT- groups were subdivided according to the extent of pulmonary lesion. Patients with the larger lesion showed remarkable decreases in the ratio of T lymphocytes to total peripheral leukocytes, the number of T lymphocytes, and the numbers of

*From the Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁻/CD8⁺ subsets, when compared with those with the smaller lesion.

6) Although the averages of absolute numbers of T lymphocytes, CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁻/CD8⁺ subsets were lower in patient groups than in the control group and the ratios of these to total lymphocyte counts and the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ subsets were not significantly different between patient groups and control group, the distributions of each value of individual person were far broad in patient groups.

From the above results, it was concluded that immune state of TB and MOTT patients was distributed along an "immunological spectrum" which far extended over both high and low extremes of the normal range.

In order to grasp clinical state and to predict the prognosis of the disease in an individual patient, it may be important to judge at which point on the spectrum immune state of the patient is located and to which direction on the spectrum it is moving along.

Key words : Tuberculosis, Mycobacteriosis other than tuberculosis, Cellular immunity, T-lymphocytes, Flow cytometry

キーワード : 結核症, 非定型抗酸菌症, 細胞性免疫, Tリンパ球, フローサイトメトリー

はじめに

結核症はヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の感染によって惹起される感染症であるが、*M. tuberculosis* の感染を受けたすべてのヒトが臨床的な疾患としての結核症になるわけではない。大部分のヒトでは結核菌感染は、潜在性 (dormant) のままにとどまり、一部のヒトでのみ臨床的な結核症が発病する¹⁾。どのようなヒトが、いつ、どのような条件下で、潜在的な感染から臨床的な発病へと進展するかの問題は、結核の臨床にとっても結核対策のうえからも、最も重要な問題であるにもかかわらずほとんど不明のままに残されている。潜在的な感染から顕在的な発病への進展を規定する要因としては、毒力や感染菌量・感染頻度などの結核菌側の要因や栄養状態・過労・精神的ストレス・他疾患の合併などの宿主側の非特異的要因も考慮しなければならないが、最も重要な要因は、宿主の結核菌に対する特異的免疫応答能であろう。宿主の非特異的要因の多くも、恐らくは免疫応答能への影響を介して間接的に効果を発揮すると考えられる²⁾。

リファンピシン (RFP) とイソニアジド (INH) を中心とする強力な抗結核剤治療によって臨床的に治癒したと考えられる結核症の再燃についても、*M. tuberculosis* よりも病原性が弱く多分に日和見感染的な性格をもつその他のミコバクテリア (MOTT) によるいわゆる「非定型抗酸菌症 (MOTT 症)」の発病についても基本的に同様のことがいえよう。これらの場合は、残存病巣の性状や既往治療・合併疾患に由来する病変などの局所的要因、例えば遺残空洞・手術後変形・気管支拡張

症などについても考慮しなければならないが、決定的な要因は宿主の全身的な免疫状態であると考えられる。

ミコバクテリア感染症における免疫応答は、防御免疫および遅延型過敏性反応のいずれも細胞性免疫機構によるものであり、Tリンパ球の種々のサブセットが中心的な役割を演じている^{3)~9)}。最近の後天性免疫不全症候群 (AIDS) の流行と関連して、AIDS 患者には高率に結核症や MOTT 症が合併することが報告されている⁶⁾¹⁰⁾。これはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染によって、Tリンパ球、特に、CD4⁺ Tリンパ球の減少と機能低下が起こり、その結果として、それまで潜在的な感染にとどまっていた *M. tuberculosis* の感染が発病にまで進展し、あるいは、*M. avium* complex を始めとする MOTT によって感染を受け発病すると考えられている。このことは *M. tuberculosis* による潜在的な感染が臨床的な発病にいたるメカニズムおよび MOTT 症の感染・発病のメカニズムにおける Tリンパ球の中心的な役割をあらためて強く示唆している。

結核症および MOTT 症における末梢血リンパ球、特に、Tリンパ球の動態については、すでに幾つかの報告^{11)~27)} があるが、著者も上述のような一般的な考察を背景に、*M. tuberculosis* の潜在的な感染から発病への進展・治療終了後の再燃・MOTT 症の成立・ミコバクテリア感染症の難治化 (慢性持続排菌化) などを規定している宿主側リスク・ファクターの特定を究極の目標として、結核症および MOTT 症患者の末梢血リンパ球の分析を行ってきた。興味ある知見が得られたので報告する。

材料と方法

1) 対象：財団法人結核予防会複十字病院に入院または通院中の結核症および MOTT 症の患者を対象とした。予備的検討の結果、70歳以上の高齢者では70歳未満の者と末梢血リンパ球の様相が明らかに違っており、一方、70歳未満の各年齢層では年齢による明らかな差はみられなかったため、本報では70歳未満の患者を分析の対象とし、70歳以上の高齢者については別報で報告する。

結核予防会結核研究所、同複十字病院および某衣料関係会社の従業員で、職場の定期健康診断で異常がなく、正常勤務に従事している70歳未満の者を健康正常対照群とした。これらの各群の人数、男女比、年齢を Table 1 に示した。

2) フローサイトメトリー：末梢静脈血約1mlをEDTA加採血管にとり、十分に混和、検査材料とした。分析は原則として採血当日に行ったが、少数例では室温保存して翌日午前中に分析した。フローサイトメトリーの操作手順を Fig. 1 に示した。すなわち、蛍光標識単クローン抗体5 μ lに全血50 μ lを加え、穏やかに混和した後、4°C冷暗所に30分間静置して細胞を染色、Lysing Solution[®] (Becton-Dickinson社) 10倍希釈液(原液を使用の際に蒸留水で10倍に希釈したもの) 1.0mlを加え、Vortex mixerで攪拌後4°C冷暗所にさらに30分間放置して赤血球を溶血、室温で1,300 rpm 5分間遠沈して上澄を捨て、細胞ペレットをPBS (pH 7.3) で2回遠沈洗浄、最終ペレットを0.3mlのPBSに浮遊させ、フローサイトメトリーの分析試料と

Table 1. Background of the Subject

Group	Number	Sex	Age
		Male : Female	Mean \pm S.D. (Range)
Healthy Control	44	22 : 22	44.3 \pm 12.5 (23~68)
Tuberculosis	84	69 : 15	44.0 \pm 14.4 (14~69)
MOTT	38	16 : 22	56.4 \pm 10.5 (28~69)

Fig. 1. Procedures for FACS Analysis

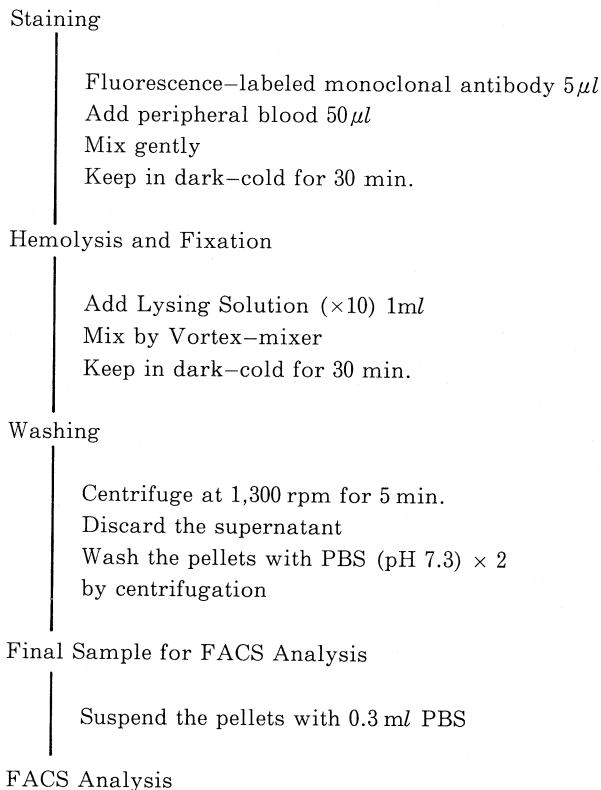


Table 2. Combination of Monoclonal Antibodies for Two-Color Staining

Tube No.	FITC-labeled	PE-labeled
1 *	HLe-1 (CD45)	Leu M3 (CD14)
2 *	IgG ₁	IgG ₂
3 *	Leu 4 (CD3)	Leu 12 (CD19)
4 *	Leu 3 (CD4)	Leu 2 (CD8)
5 *	Leu 4 (CD3)	HLA-DR
6 *	Leu 3 (CD4)	Leu 8
7	Leu 4 (CD3)	IL-2-R (CD25)
8	Leu 2a (CD8)	Leu 15 (CD11b)

* Commercially available precombined reagents (Simultest : Becton-Dickinson) were used

Table 3. Total Leukocytes, Total Lymphocytes, T- and B-Lymphocytes

Group	Total Leukocytes	Total Lymphocytes		T-Lymphocytes		B-Lymphocytes	
	No. *	% **	NO. *	% ***	No. *	% ***	NO. *
Healthy Control	6638±2018	28.1± 8.2	1830± 498	69.3± 9.2	1254± 344	14.0± 7.1	251± 123
TB	6646±2001	20.6± 8.1 ⁺	1304± 526 ⁺	67.4± 8.7	871± 362 ⁺	12.2± 6.3	158± 111 ⁺
MOTT	5929±1780	19.4± 7.1 ⁺	1106± 442 ⁺	67.8±10.7	761± 409 ⁺	12.0± 6.0	132± 85 ⁺

* Numbers per mm³

** Percentage to total leukocytes

*** Percentage to total lymphocytes

+ Statistically significant (p<0.01)

した。

フローサイトメトリーには、FACScan™ (Becton-Dickinson 社) を用いた。データは Simul Set® ソフトウェアを用いてフロッピーディスクに収集し、Simul Set のほか必要に応じて Consort 30®, Paint-a-Gate® などのソフトウェアを用いて解析した。

3) 蛍光標識単クローン抗体: Fluorescein isothiocyanate (FITC) および Phycoerythrin (PE) で標識した 2 種類の単クローン抗体を Table 2 に示したように組合せて二重染色を行った。これら抗体は Becton-Dickinson-藤沢より購入した。

4) 総白血球数: フローサイトメトリーを行ったのと同じの EDTA 加末梢静脈血について自動血球計算器 (Sysmex E-4000: 東亜医用電子) を用いて総白血球数を算定した。

5) 統計処理: それぞれの群の算術平均と標準偏差を計算し、Student の t テストによって差の有意性を検定した。

実験結果

1) 総白血球, 総リンパ球, T および B リンパ球
肺結核症, MOTT 症患者と正常対照者の末梢血総白血球数, 総リンパ球の総白血球に対する比率と実数, T および B リンパ球の総リンパ球に対する比率と実数を Table 3 に示した。

Table 3 に示したように TB および MOTT 群では, 総リンパ球の総白血球数に対する比率が正常対照群と比較して有意に低く, 一方, 末梢血中の総白血球数には両患者群と正常対照群とで有意の差がなかったため, 総リンパ球の実数は, 両患者群ともに正常対照群よりも著しく低下していた。T リンパ球および B リンパ球の実数は, 両患者群のいずれも正常対照群よりも有意に低下していた。

一方, T および B リンパ球の総リンパ球数に対する比率は両患者群で軽度低下していたが, T/B 比は比較的正常に維持されていた。

Table 4. Comparison of T-Lymphocytes Subsets

Group	CD4 ⁺		CD4 ⁺ Leu8 ⁺	CD4 ⁺ Leu8 ⁻	CD8 ⁺		CD8 ⁺ CD11b ⁺	CD8 ⁺ CD11b ⁻	CD4/CD8
	%	NO.	%	%	%	NO.	%	%	
Healthy Control	45.8±7.1	818±219	37.8±8.0	8.6±3.3	37.0±8.2	692±253	12.5±5.3	20.3±6.4	1.31±0.42
TB	44.6±9.7	568±236 ⁺	36.2±9.5	8.5±3.8	38.2±9.0	506±252 ⁺	13.2±6.8	22.7±8.8	1.29±0.58
MOTT	44.3±10.3	500±253 ⁺	36.6±10.0	8.6±4.6	38.1±10.0	414±177 ⁺	12.6±5.8	25.4±13.2 ⁺⁺	1.28±0.54

% show the proportion to total lymphocytes
 + Statistically significant (p<0.01)
 ++ Statistically significant (0.01<p<0.05)

Table 5. Rates of Cases Exceeded the Normal Range

Group	CD4 (%) *		CD8 (%) *		CD4/CD8		CD4 (No.)		CD8 (No.)	
	Above	Below	Above	Below	Above	Below	Above	Below	Above	Below
Healthy Control (44)	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	0	2.9	0	2.9	0
T B (84)	8.3	6.0	7.1	0	7.1	1.2	1.2	25.0	0	9.5
MOTT (38)	7.9	10.5	7.9	0	7.9	2.6	0	26.3	0	5.3

Figures show % of the cases who showed values below or above the normal range to total number in the respective group.
 * Percentage to total lymphocytes

Table 6. IL-2-R Positive and HLA-DR Positive T-Lymphocytes

	IL-2-R (+)		HLA-DR (+)	
	% to Total Lymphocytes	% to T Lymphocytes	% to Total Lymphocytes	% to T Lymphocytes
Healthy Control	15.9±7.2	23.4±11.4	22.9±7.7	33.2±10.5
TB	14.2±7.1	21.2±10.1	21.2±10.0	31.4±13.4
MOTT	13.6±5.3	19.9±7.0	22.5±12.3	32.7±16.4

2) CD4⁺ および CD8⁺ Tリンパ球とそのサブセット
 CD4⁺ Tリンパ球はクラスII主要組織適合性抗原 (MHC) とともに提示された抗原を認識し、主として helper/inducer 機能を示すが、さらに抗 Leu 8 単クローン抗体によって CD4⁺ Leu 8⁺ の suppressor-inducer Tリンパ球と CD4⁺ Leu 8⁻ の helper Tリンパ球に分類される。一方、CD8⁺ Tリンパ球はクラスI MHC とともに提示された抗原を認識し、主として suppressor/cytotoxic 機能を示すが、さらに抗 CD11b (Leu 15) 単クローン抗体によって、CD8⁺ CD11b⁺ の suppressor Tリンパ球と CD8⁺ CD11b⁻ の cytotoxic Tリンパ球とに分類される。これらTリンパ球サブセットの総リンパ球に対する比率と実数を Table 4 に示した。

Table 4 に示したように TB 群および MOTT 群では、Tリンパ球の CD4⁺/CD8⁻ および CD4⁻/CD8⁺ 両

サブセットの実数はともに、正常対照群と比較して有意に低下しており、CD4⁺/CD8⁻ サブセットの減少のほうが CD4⁻/CD8⁺ サブセットの減少よりも著明であった。

なお、CD4⁺ Tリンパ球では、Leu 8⁺ のサブセットが両患者群で正常対照群に比しやや低下していたが有意ではなく、Leu 8⁻ サブセットには差がなかった。CD8⁺ Tリンパ球では、CD11b⁺ のサブセットの比率には両患者群と正常対照群の間に有意の差はなく、CD11b⁻ のサブセットは両患者群で上昇がみられ、このうち MOTT 群では正常対照群に対して有意の上昇であった。

Fig. 2 には、各症例における CD4⁺/CD8⁻ および CD4⁻/CD8⁺ Tリンパ球の実数の分布を示した。正常対照群の平均値±2×標準偏差を正常範囲としたとき、正常範囲を下回って低い値を示す例が、CD4⁺ Tリンパ球では結核群で 25.0%、MOTT 群で 26.3% と高い割合

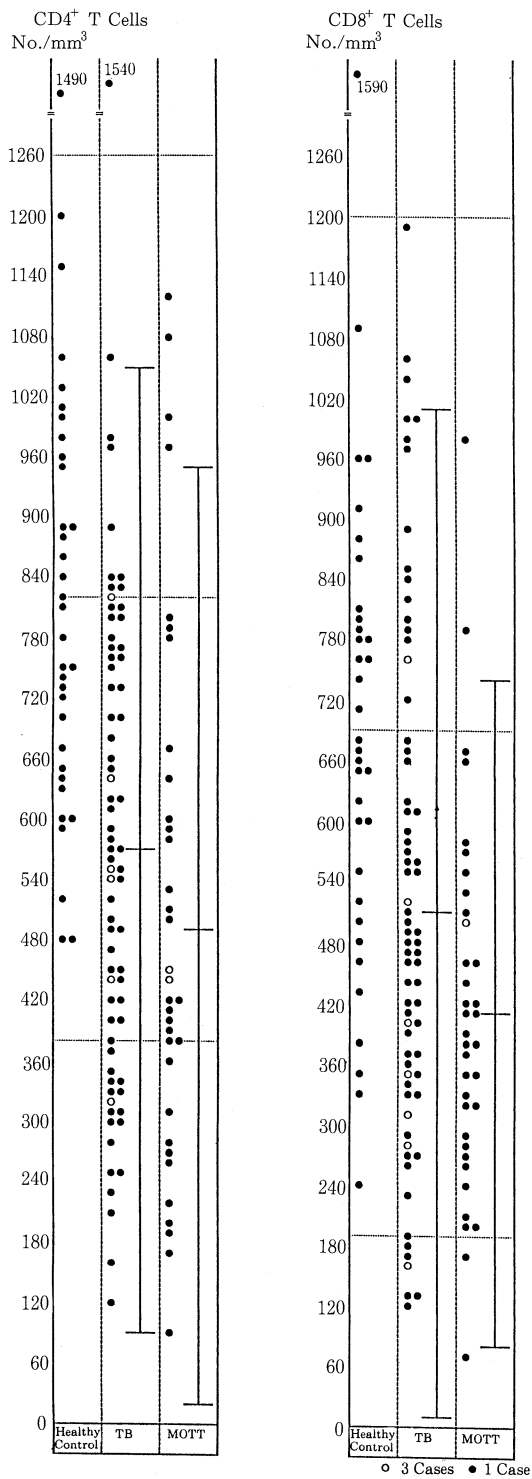


Fig. 2. Distribution of Numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells

合にみられ、CD8⁺ Tリンパ球では正常範囲を下回る例はそれぞれ9.5%、5.3%であった (Table 5)。HIV

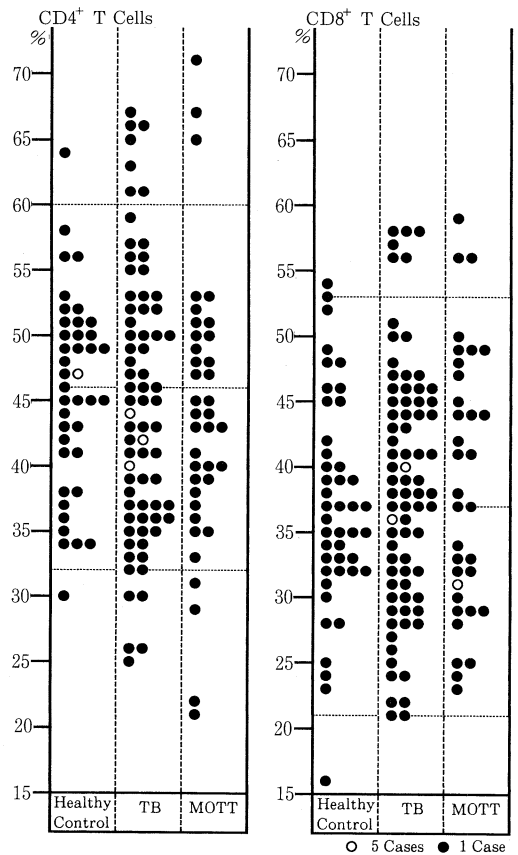


Fig. 3. Distribution of Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells to Total Lymphocytes

感染者において日和見感染が合併して AIDS に進展する危険指標として「CD4⁺ Tリンパ球の実数が 250/mm³ 以下」^{28) 29)} が重視されているが、結核群で 6 例 (7.1%)、MOTT 群で 5 例 (13.2%) で CD4⁺ Tリンパ球の実数が 250/mm³ を下回っていたことは注目に値する。

Tリンパ球各サブセットの総リンパ球に対する比率でみた場合、Table 4 に示したように CD4⁺ および CD8⁺ Tリンパ球の総リンパ球に対する比率はいずれも、結核群・MOTT 群ともに、群として比較したときには正常対照群との間に大きい差はみられなかった。また、CD4⁺/CD8⁺ 比も両患者群ともに正常対照群と著しい差はなかった。しかし Fig. 3 および Fig. 4 に示すように、各症例についての CD4⁺ および CD8⁺ Tリンパ球数の総リンパ球数に対する比率および CD4⁺/CD8⁺ 比は、結核群および MOTT 群にあっては、正常対照群の平均値 ± 2 × 標準偏差で示される正常範囲を上下の両方向に超えてはるかに広い分布を示した。Table 5 にまとめたように、CD4⁺ Tリンパ球の比率が正常範囲を超

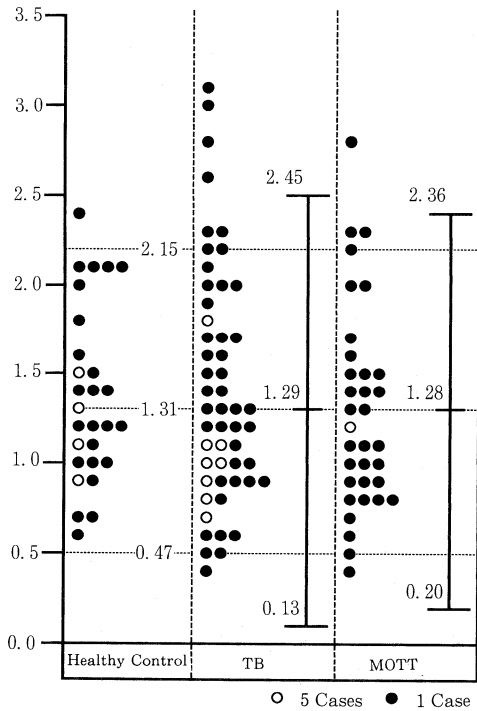


Fig. 4. Distribution of C4/CD8 Ratio

えて高い例が結核群で8.3%、MOTT群で7.9%あり、正常範囲を下回る低い例がそれぞれ6.0%、10.5%であった。CD8⁺の比率では高い例が結核群で7.1%、MOTT群で7.9%であり、低値例は両群ともなかった。CD4⁺/CD8⁺比については、結核群では正常範囲を超えて高い例が7.1%、低い例が1.2%あり、MOTT群ではそれぞれ7.9%、2.6%あった。

3) 活性化Tリンパ球

Tリンパ球は抗原やマイトジェンの刺激によって活性化すると、インターロイキン-2 (IL-2)を分泌する

とともに、細胞膜表面にIL-2レセプター (IL-2-R)を発現し、さらにクラスII MHCであるHLA-DRを発現するようになる。Table 6に患者と正常対照群との末梢血リンパ球について、これらが発現しているTリンパ球の比率を示した。総リンパ球に対する比率でみても、Tリンパ球に対する比率でみても、IL-2-R陽性Tリンパ球、HLA-DR陽性Tリンパ球の比率には両患者群ともに正常対照群との間に有意の差はみられなかった。Tableには示さなかったが、総Tリンパ球数の減少を反映して、これら活性化Tリンパ球の実数は、両患者群で減少していた。

4) 臨床所見との関連

患者群について臨床所見と末梢血Tリンパ球プロフィールとの関連を検討した。学会分類別、空洞有無別、病巣の拡がり別、化学療法による排菌状況別 (持続排菌か菌陰性化か)などの観点から各患者群を亜群に分けて比較したところ、病巣の拡がりによって分けた場合に、拡がり3の亜群と拡がり1の亜群との間でTable 7に示したような明らかな差が認められた。

データは示さなかったが、病巣の拡がり2を片側肺の半分を越えるかどうかで2aと2bに分けて、拡がり3と2a、拡がり2bと1に分けた場合も同様の差が認められたが、差の程度は拡がり3と拡がり1との間の違いよりもやや小さかった。

すなわち、病巣の拡がりの大きい亜群では、拡がりの小さい亜群と比較して総リンパ球の総白血球に対する比率は有意に低く、総リンパ球の実数、Tリンパ球の実数、CD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球の実数は、拡がりの大きい亜群で拡がりの小さい亜群と比較して有意に少なかった。正常対照群と患者群全体との間でみられた差が病巣の拡がりの大きい亜群ではより顕著に現れているといえる。(Table 3: 参照)。

またCD4⁺Tリンパ球の総リンパ球に対する比率は、患者群全体では正常対照群よりわずかながら低かったが、

Table 7. Extent of Lesion and T-Lymphocytes

Disease	Extent of Lesions	Total Leukocytes	Total Lymphocytes		T-Lymphocytes		CD4 ⁺ T		CD8 ⁺ T		C4/CD8
			% *	NO.	% **	NO.	% **	NO.	% **	NO.	
TB	3 (13)***	7023±2060	12.9±4.9*	916±492*	71.4±8.2	649±352**	49.1±7.9**	437±215**	38.0±9.8	351±234**	1.4±0.5
	1 (23)	5830±1735	25.2±6.3*	1449±510*	67.9±8.2	996±403**	43.3±7.1**	635±270**	38.6±8.3	549±198**	1.2±0.4
MOTT	3 (11)	6582±1204	17.8±6.0	1155±435	69.0±9.9	809±356	48.8±10.8	569±259	35.5±10.0	394±136	1.5±0.7
	1 (7)	6271±1819	23.1±9.8	1467±906	72.7±8.7	1084±722	43.3±4.5	635±384	40.7±9.8	622±486	1.1±0.4

* Percentage to total leukocytes
 ** Percentage to total lymphocytes
 *** Figures in brackets indicate number of cases
 + Statistically significant (p<0.01)
 ++ Statistically significant (0.01<p<0.05)

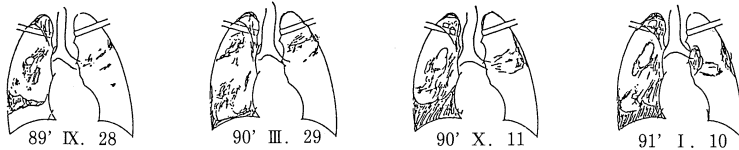
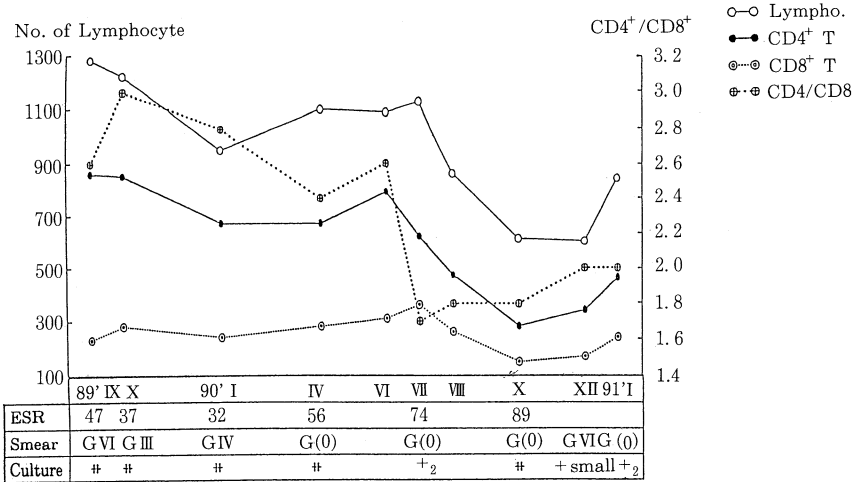


Fig. 5. Case 1 : K.K.

病巣の拡がりの大きい亜群では正常対照群よりも有意ではないが高い値を示した (TB: 49.1±7.9, MOTT: 48.8±10.8 vs 正常対照群: 45.8±7.1)。病巣の拡がり別による T リンパ球プロファイルの違いは結核症患者でも MOTT 症患者でも同様にみられたが、MOTT 症の場合は例数が少ないために統計学的に有意とはならなかった。

一方、結核症患者で診断時喀痰中結核菌陽性であったが化学療法によって菌陰性化したがお治療中のもの 33 例と化学療法中にもかかわらず排菌が持続している者 8 例との間では、末梢血リンパ球プロフィールにほとんど差がみられなかった。

次に経過を追って FACS 分析を行った症例 2 例について臨床経過と FACS 測定の推移を示す。

症例 K. K. : 1928 年生まれ。男性。1977 年 7 月 “非定型抗酸菌症” の診断を受けた。起因菌は、*M. avium* complex と同定され、後に DNA プローブ法で *M. avium* であることが確認された。発見時胸部 X 線学会病型は r II₁ であった。

1977 年 7 月から 80 年 7 月まで、1980 年 9 月から 82 年 8 月まで、1984 年 10 月から 87 年 7 月まで計 3 回、種々の抗結核薬の組合せで治療が行われた。初回治療時には一時排菌停止し、1981 年 8 月以降は大量排菌が続いたが 87 年 8 月に治療終了し、以後定期的に経過観察

を行ってきた。

1989 年 9 月以後の経過を Fig. 5 に示した。第 1 回の FACS では CD4/CD8 比が 2.6 と正常限界を越えて高かったほかは正常範囲にあった。1989 年 10 月と 90 年 1 月には総リンパ球数、T リンパ球数、CD4⁺ T リンパ球数はしだいに減少し、1990 年 3 月には胸部 X 線上右下肺野に浸潤陰影の増加を認めた。1990 年 6 月から 10 月の間に、総リンパ球数、T リンパ球数、CD4⁺ T リンパ球数は急速に減少を続け 90 年 10 月の測定ではいずれも正常範囲を下回る低い値となった。その時期の胸部 XP は、右肺の空洞影の著明な拡大と浸潤陰影の増加が認められた。1991 年の測定では、やや回復の傾向が認められるとはいえこれらの値は依然として正常限界以下にとどまり、1991 年 5 月 5 日呼吸不全のために死亡した。

この症例では、1990 年 10 月の胸部 XP 上の重大な悪化は、T リンパ球の急速な減少による免疫機能の低下を背景として惹起されたと考えられ、1990 年 3 月の悪化についても同様の可能性が考えられる。この間 CD4/CD8 比はつねに高い値を示していた。

症例 H. T. : 1932 年生まれ。男性。1984 年 11 月肺結核症の診断を受けた。発見時排菌は認められなかった。1984 年 11 月より INH, RFP で治療開始されたが、5 カ月後交通事故で入院し、治療が中断された。1986 年

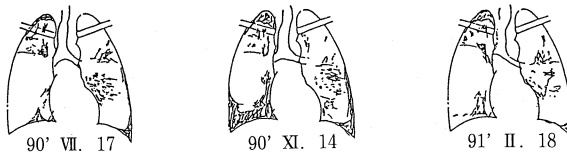
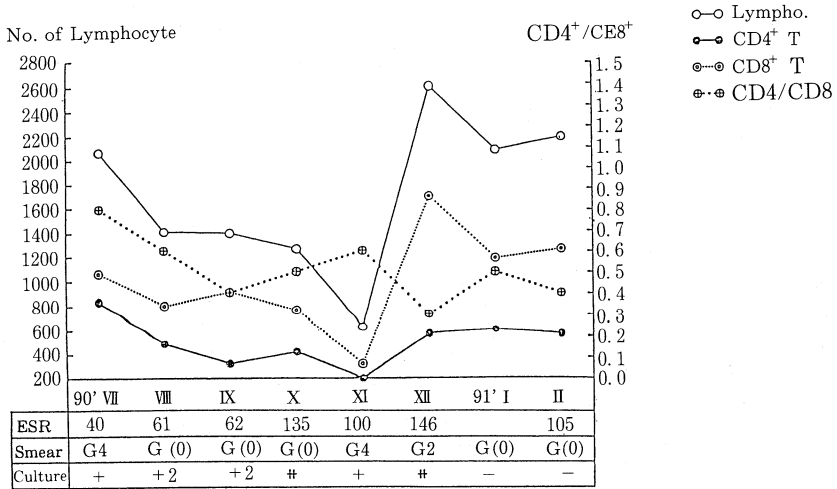


Fig. 6. Case 2 : H. T.

2月咳痰出現，排菌陽性となり，再治療が開始された。再治療開始時の胸部X線病型は，bII₂であった。多剤耐性の結核菌感染のために種々の抗結核薬を使用されたが排菌停止せず，1989年2月16日に複十字病院へ転院となった。

1990年7月以降の経過を Fig. 6 に示した。初回検査時では CD8⁺ Tリンパ球数が CD4⁺ Tリンパ球数を上回り，CD4/CD8比が0.8とやや低かったほかは，測定値は正常範囲にあったが，1990年8月から11月までに総リンパ球数，CD4⁺ Tリンパ球数が急速に減少し，9，11月の測定では CD4⁺ Tリンパ球数は正常限界以下の低値となり，11月にはほぼ 200/mm³ までに低下した。この時点での胸部 XP では肺内浸潤陰影の増加と胸水浸出を伴う悪化が認められた。また，喀痰の塗抹，培養とも持続的に結核菌陽性であった。

その後1990年12月の測定では，総リンパ球数の急速な回復がみられ，CD4⁺ Tリンパ球も 574/mm³ まで増加した。この時の CD8⁺ Tリンパ球は正常限界をはるかに上回って 1,697/mm³ となり，CD4/CD8比は0.3にまで低下した。1991年2月の胸部 XP では，肺内浸潤陰影も改善し胸水も減少した。

1991年1月以降は喀痰中の結核菌は塗抹，培養とも陰性化した。この症例でも1990年11月のX線上の陰影悪化に先行して総リンパ球数，CD4⁺ および CD8⁺ T

リンパ球数の著明な減少があり，免疫機能の低下と CD4/CD8 比の低値で示される免疫調節の変調とが悪化の原因と推定される。

考 察

最近の免疫学の進歩によって，結核における感染防御免疫の基本的な仕組みは，ほぼ明らかになった。すなわち結核菌はまずマクロファージによって貪食され，個々の菌体成分にまで分解される。これら菌体成分のうち蛋白質，多糖体，リン脂質，糖脂質などの抗原物質は，マクロファージを介してリンパ球に提示され，リンパ球はそれぞれの結核菌抗原に対して感作される。

感作リンパ球は再び特異抗原と遭遇すると，活発に DNA 合成を行って増殖し，種々のリンホカインを産生・分泌する。これらリンホカインの作用によってマクロファージは活性化され，結核菌に対する食菌，殺菌活性は著しく高められる。Tリンパ球には機能を異にする種々のサブセットがあり，相互の協調的な働きによって，結核の免疫現象の中心的な役割を担っている³⁾⁵⁾⁹⁾。

最近の AIDS の流行に伴い，HIV 感染の比較的早い時期に結核症を発病する例の多いことが報告されている⁶⁾¹⁰⁾。この理由として，すでに結核菌の感染を受けていたが，もし HIV 感染がなければそのまま潜在的な感染にとどまって臨床的な発病に至らずにすんだヒトが，

HIV 感染に伴う T リンパ球, 特に CD4⁺ T リンパ球の減少・機能低下によって, 結核に対する免疫機構が破綻して発病に至ったのであると説明されている。

また, すでに CD4⁺ T リンパ球の減少が進行した AIDS の後期にあっては, 他の日和見感染とならんで MOTT 症が高率に合併してくる。これらの事実は, ミコプラズマ感染における T リンパ球の重要性をあらためて強く示唆している。このような結核の免疫におけるリンパ球の重要性と関連して, 結核症におけるリンパ球, 特に T リンパ球の研究は, 早くから末梢血・胸膜滲出液・気管支肺胞洗浄液 (BAL) などの試料を用いて行われてきた。

しかし, 初期の研究はヒツジ赤血球とのロゼット形成能にもとづいた T リンパ球と B リンパ球の分別や蛍光顕微鏡による蛍光染色細胞の算定などの方法によるものであって^{11)13)~16)19)21)}, 取り扱える細胞数, 感度, 客観性, 再現性などに一定の限界があった。フローサイトメトリーと細胞表面マーカーに対する単クローン抗体との開発・導入によって, これらの方法上の限界が克服され, 多数の細胞を細胞分離などの前処理を必要としないで高い感度と客観性をもって短時間で各サブセットごとに分析することが可能となった^{30)~33)}。

著者はフローサイトメトリーによって, Table 2 に示したような蛍光標識単クローン抗体の組合せによる二重染色法で, 肺結核症, MOTT 症患者の末梢血リンパ球, 特に, T リンパ球サブセットの分析を行った。末梢血リンパ球のフローサイトメトリー分析のための試料調製法としては, 全血から密度遠心分離法で単核細胞を分離する方法, 全血をまず溶血し白血球を遠沈で集める方法などもあるが, これらの方法では前処理による白血球のロスが避けられず, このさい特定のリンパ球サブセットの選択的ロスの危険が常に伴うので, 血液量も少なくても, 操作も最も単純で, サブセット構成に影響の最も少ない方法として Fig. 1 に示した全血-染色-溶血法を採用した^{34)~39)}。

さらにフローサイトメトリーでのデータの収集と一次解析は Simul Set[®] ソフトウェアによって行った。この方法の利点は, FITC-HLe-1 と PE-LeuM3 で二重染色した第 1 チューブによってオートマチックにリンパ球にゲートがかけられ, FITC-抗マウス IgG₁ と PE-抗マウス IgG₂ とで二重染色した第 2 チューブによって非特異的染色領域がオートマチックに分画されることである。

さらに第 1 チューブによって試料中の顆粒球, 単球, リンパ球の比率が示されるとともに, ゲート内に取り込まれて分析対象となるリンパ球の総リンパ球に対する比率, ゲート内のリンパ球以外の細胞 (単球, 顆粒球, 赤血球デブリ) の混入率が示される。これらの値が分析目

的に不適切な場合, 例えばゲート内に取り込まれたリンパ球の総リンパ球に対する比率が低い, または他の細胞の混入が多いなどの場合は, マニュアル操作でゲートをかけ直すことができる。

著者は, ゲート内への単球の混入が 1% 以下であることを第 1 条件とし, 総リンパ球の 95% 以上がゲート内に取り込まれていることを第 2 条件としてゲートを設定した。このようにして特定サブセットの選択的ロスを伴うことなく, 他の細胞, 特に単球の混入による影響を無視しうる条件下で客観的な分析を行うことができる。

データはフロッピーディスクに保存し, 必要に応じて Consort 30[®], Paint-a-Gate[®] などの他のソフトウェアをも用いて解析した。血液と蛍光標識単クローン抗体との量比, 所要血液量, 各ステップの所要時間などはあらかじめ予備実験によって至適条件を設定した。

結核症および MOTT 症患者では, 総リンパ球の総白血球に対する比率が有意に低下しており, さらに T および B リンパ球の総リンパ球に対する比率も軽度に低下していた。また, MOTT 症患者群で, 総白血球数も正常対照群よりもやや少なかった。この結果, T リンパ球の実数は正常対照群の $1,254 \pm 344/\text{mm}^3$ に対して結核症患者群では $871 \pm 362/\text{mm}^3$, MOTT 患者群で $761 \pm 409/\text{mm}^3$ と有意に少なかった。結核症患者で総リンパ球および T リンパ球が減少していることは, 北沢ら¹¹⁾, Vidhidharm ら¹⁵⁾, Beck ら¹⁶⁾, 高本¹⁸⁾, Onwubalili ら²²⁾, 原田ら²³⁾, Singhal ら²⁷⁾ も報告しており, MOTT 症患者についても原田ら²⁴⁾ の同様の報告があり, 著者の成績と一致した。

T リンパ球の主要サブセットである CD4⁺/CD8⁻ および CD4⁺/CD8⁺ T リンパ球については, 総リンパ球に対する比率でみた場合, 両患者群で軽度ながら CD4⁺ の低下, CD8⁺ の上昇の傾向がみられ, この結果 CD4/CD8 比は患者群でわずかながら低下を示した。

西川ら¹²⁾, 三上²⁾, 高田ら¹⁷⁾, 高本 (慢性排菌例で)¹⁸⁾, 原田ら²³⁾ は, 結核症患者群で CD4/CD8 比の上昇を報告しており, 一方, 北沢ら¹¹⁾, Shiratsuchi ら (高度進展例で)¹³⁾, Vidhidharm ら¹⁵⁾, Beck ら¹⁶⁾, 原田ら (慢性排菌例で)²⁴⁾, Singhal ら²⁷⁾ は CD4/CD8 比が結核症患者群 (または特定の結核患者) で正常対照群よりも低いことを報告している。また, 原田ら²⁴⁾ の報告では, MOTT 患者群の CD4/CD8 比も正常対照群より低い。

このようなくいちがいの理由としては, 対象にした患者の病態の違いが最も大きい要因と考えられるが, 一部は試料調製法の違い (単核球分離法か全血法か), フローサイトメトリー分析法の違い (単染色法か二重染色法か) などの技術上の理由によると思われる。

この点と関連して著者は, 抗 CD4 単クローン抗体と抗 CD8 単クローン抗体とで二重染色を行った場合,

Fig. 7に例示したように、抗CD8単クローン抗体に対して強い陽性を示す細胞集団の一部が、抗CD4単クローン抗体に弱い陽性 (dull positive) に染まり、 $CD4^+ CD8^+$ double positive の領域にはみだすことがあるのをしばしば経験した。測定にあたっては FITC と PE の蛍光波長の compensation は十分に行っており、測定技術上の artefact の可能性は否定できる。このような例は両患者群でのみ見られており、正常対照群では1例も経験しなかった。

単染色法では、このような現象は見逃されて $CD4^+$ Tリンパ球として算定され、 $CD4/CD8$ 比を高く算定する結果になる。この場合、著者は第2チューブでオートマチックに設定された4分画線 (quadrant lines) を修正し、 $CD8^+ CD4^-$ 細胞として算定した。また、一部のNK細胞は抗CD8単クローン抗体に dull positive を示すことが知られており、著者が $CD8^+$ Tリンパ球とした中には、このようなNK細胞が算入されている可能性がある。

Tリンパ球サブセットのうち $CD4^+ / CD8^-$ Tリンパ球の実数も、正常群の $818 \pm 219 / mm^3$ と比較して結核患者群で $568 \pm 236 / mm^3$ 、MOTT患者群で $500 \pm 253 / mm^3$ と有意の低下を示していた。さらに、正常限界を下回って低い値を示す例が結核患者群で6.0%、MOTT患者群で10.5%にみられた。 $CD4^+$ Tリンパ球は感染防御免疫の中心的な担当細胞であり、最近のHIV感染者の追跡調査でも、 $CD4^+$ Tリンパ球数が一定レベル以下に低下すると、*Pneumocystis carinii* 肺炎をはじめとする種々の日和見感染が発症することが明らかにされている²⁸⁾²⁹⁾。

本研究のような臨床的研究では、発病、重症化が原因となって結果的にリンパ球系の異常が引き起こされたのか、リンパ球系の異常による免疫能の低下が原因となって発病、重症化が起こったのかを一義的に決定するのはかならずしも容易ではないが、例として示した2症例では、Tリンパ球、特に、 $CD4^+$ Tリンパ球数の減少が先行し、このような免疫能低下を背景として悪化が起こったと考えるのが妥当であり、全例ではないにしても大多数の例では $CD4^+$ Tリンパ球数の減少を始めとする免疫能の低下、変調がミコバクテリア感染症の発病、重症化の背景にあることが強く示唆される。

$CD4^- / CD8^+$ Tリンパ球の実数も正常対照群の $692 \pm 253 / mm^3$ に対し、結核患者群で $506 \pm 252 / mm^3$ 、MOTT患者群で $414 \pm 177 / mm^3$ と有意に低下していた。 $CD8^+$ Tリンパ球については、従来 suppressor Tリンパ球として細菌感染防御免疫においてはむしろネガティブな役割を果たすものとして考えられていたが、最近 Kaufmann らのグループ⁵⁾⁴⁰⁾ はミコバクテリアのような細胞内寄生性細菌の感染の場合は、すでに感染を受け

FL1 : Leu 3

FL2 : Leu 2

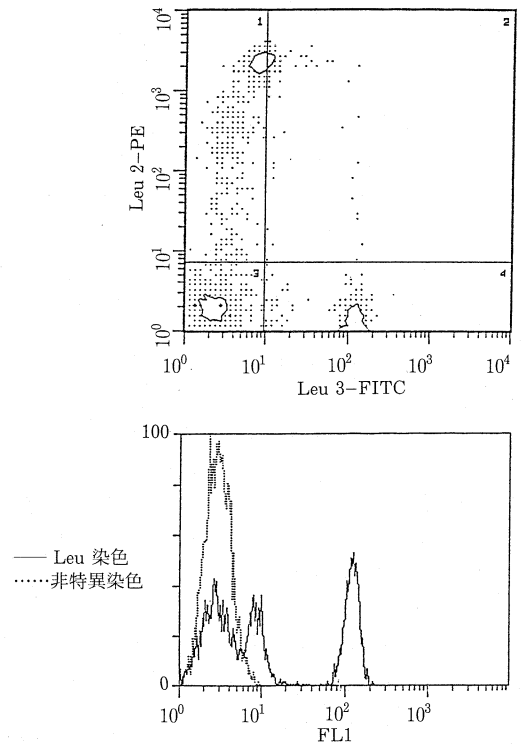


Fig. 7. An Example of False Double Positive Subset

た食細胞に対して細胞傷害性に作用することによって、 $CD8^+$ Tリンパ球も感染の制御に一定の positive な役割を担うと主張している。

ミコバクテリア感染症患者の末梢血リンパ球のプロファイルは、発病にいたる基盤になった何らかの免疫能の低下、体内のミコバクテリアからの持続的な抗原刺激、各個体について遺伝的に決定されている抗原刺激に対する免疫応答能、免疫応答能に影響する栄養条件・性・年齢などの非特異的要因などの多くの要因の複合効果の表現であるといえる。

一般的に感作リンパ球は抗原刺激によって増殖し数を増やすが、Kato ら⁴¹⁾ が示したように、過剰の抗原刺激はかえって免疫抑制的に働く。ミコバクテリアのように多種多様な抗原物質から構成されている細菌感染の場合は、刺激的作用から抑制的作用に移行する境界濃度は抗原ごとに違っているであろう。さらに、*M. leprae* の phenolic glycolipid 抗原のように強く抑制的に作用する抗原が *M. tuberculosis* や *M. avium* complex にも存在していると考えられる。また、同一個体でも、リンパ球のサブセットごとに同一抗原に対する応答の様相は同じではないであろう。

また一方、宿主の免疫応答能は基本的に遺伝子によって規定されている。例えば Yamamoto ら⁴²⁾, Kakinuma ら⁴³⁾⁴⁴⁾ はマウスに BCG 細胞壁ワクチンを静注したとき、C57BL/6 系などのマウスでは肺に高度の肉芽腫が形成されるのに対し、C3H/He 系などの近交系では肉芽腫形成が弱いことを報告し、このような免疫応答の系統差の遺伝子支配を明らかにしている。彼らはまた、BCG 細胞壁ワクチン皮下注射後の PPD 足趾反応にもマウス系統差がみられることを報告している⁴²⁾。Nakamura ら⁴⁵⁾⁴⁶⁾ も BCG 感染後のツベルクリン反応のマウス系統差の遺伝子支配について解析している。

これらの要因が相互に複雑に影響しあって、ある患者のある時点における免疫状態が規定され、それが末梢血リンパ球のプロファイルとして表現されている。このようにしてミコバクテリア感染症の患者では、リンパ球各サブセットの比率にしても CD4/CD8 比にしても、正常対照群と比較して一律に高いまたは低い値を示すのではなく、正常範囲を越えて高い値を示すものから正常範囲をずっと下回る低い値を示すものまで一連のスペクトルを形づくるのであろう。ミコバクテリア感染症の一つであるレプラの場合には、典型的な tuberculoid leprosy と典型的な lepromatous leprosy を両極とする immunological spectrum の存在がよく知られているが⁴⁷⁾, Lenzini ら⁴⁸⁾, Ridley⁴⁹⁾, 米田ら²¹⁾ は、結核症や MOTT 症でもこのような spectrum の存在を主張している。

著者の成績でも CD4⁺ および CD8⁺ T リンパ球の総リンパ球に対する比率、CD4/CD8 比は、群としての平均値と比較した場合正常対照群と患者群とでそれほど大きい差はみられなかったが、Fig. 3, 4, Table 5 で示したように、患者群では正常範囲をはずれて高値または低値を示すものが高い頻度でみられ、細胞性免疫を担う T リンパ球の動態面からこのような spectrum の存在を支持している。同様のことは熊野¹⁹⁾ も指摘している。

個々の症例が、このような spectrum 上のどのような位置を占めているか、経過に伴ってこの spectrum 上をどの方向に動いていくかを知ることによって、症例ごとの経過予測や予後判定に役立つと期待できる。

ま と め

結核患者群 (TB) 84 例および“非定型抗酸菌症”患者 (MOTT) 38 例について、フローサイトメトリーによる末梢血 T リンパ球の分析を行った。分析は全血-染色-溶血方式により行い、細胞の染色は Fluorescein-isothiocyanate 標識および Phycoerythrin 標識単クローン抗体の種々の組合せによる二重染色を行った。

その結果以下のような成績が得られた。

1) TB 群, MOTT 群では総リンパ球の総白血球に対する比率が有意に低く、総リンパ球の実数も有意に少なかった。

2) 両患者群では T および B リンパ球の総リンパ球に対する比率もやや低下しており、T および B リンパ球の実数は有意に少なかった。

3) 両患者群では CD4⁺ T リンパ球の総リンパ球に対する比率はわずかに低下、CD8⁺ T リンパ球の比率はわずかに上昇しており、その結果 CD4/CD8 比はわずかに低下していた。

CD4⁺ サブセットでは CD4⁺Leu8⁺ サブセットの比率がやや低下、CD8⁺ サブセットでは CD8⁺CD11b⁻ サブセットの比率が上昇 (MOTT 群では有意の上昇) を示した。

4) IL-2-レセプター陽性および HLA-DR 陽性 T リンパ球は、総リンパ球に対する比率でも、T リンパ球に対する比率でも、両患者群ともに正常対照群と差がなかった。

5) 患者群を“病巣の拡がり”によって拡がりの大きい亜群と小さい亜群とに分けたとき、拡がり大の亜群で総リンパ球の総白血球に対する比率、総リンパ球数、T リンパ球数、CD4⁺ T リンパ球数の低下は拡がり小の亜群よりもはるかに顕著であった。

6) TB 群, MOTT 群の末梢血リンパ球サブセットの総リンパ球に対する比率および CD4/CD8 比は、群としての平均値では正常対照群とそれほど大きい差がなかったが、患者群では正常範囲をみだした高い値または低い値の両極端を示す例が高い頻度でみられた。

以上のようにミコバクテリア感染症にあっては、総リンパ球および T リンパ球の各サブセットの実数は正常対照群よりも有意に低かった。さらに、各サブセットの比率については、個々の症例は正常範囲を両方向に大きくはみだして拡がる“immunological spectrum”を形成して分布していることが明らかになった。T リンパ球サブセット、特に CD4⁺ T リンパ球の実数を知り、さらに、この spectrum 上のどこに位置していてどちらの方向に動いていくかを知ること、個々の症例の経過予測や予後判定を行ううえで非常に重要であると考えられる。

謝 辞

この研究にあたり御指導と、原稿の御校閲を頂きました北海道大学免疫科学研究所教授柿沼光明先生に敬意と感謝を表します。また、測定に御協力頂いた結核予防会結核研究所生化学研究科山本節子、日本 BCG 研究所戸井田一郎両氏に御礼申し上げます。なお本研究の一部は日米医学協力計画結核部会からの研究費によった。

文 献

- 1) Murray, J. F. : The white plague. Down and out or up and coming? *Am Rev Respir Dis*, 140 : 1788-1795, 1989.
- 2) 三上理一郎 : 臨床免疫学的にみた結核発病の要因 (第58回結核病学会総会特別講演), *結核*, 59 : 39~63, 1984.
- 3) 戸井田一郎 : 結核の免疫, 岩井和郎 (編) : 結核病学 I, 基礎・臨床編 (第3版) : 57~99, 1989, 結核予防会 (東京).
- 4) Edwards, D. and Kirkpatrick, C. H. : The immunology of mycobacterial diseases, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 1062-1071, 1986.
- 5) Kaufmann, S. H. E. : Immunity against intracellular bacteria. Biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes, *Current Topics in Microbiol Immunol*, 138 : 141-176, 1988.
- 6) Collins, F. M. : Mycobacterial disease, immunosuppression and acquired immunodeficiency syndrome, *Clin Microbiol Rev*, 2 : 360-377, 1989.
- 7) Bovarnkitti, S., Leelarasamee, A., Pushpakom, R. et al. : Tuberculosis and immunology, *Asian Pacific J Allergy Immunol*, 7 : 133-139, 1989.
- 8) 徳永 徹 : 結核の免疫学 (第63回結核病学会総会教育講演), *結核*, 64 : 121~133, 1989.
- 9) 露口泉夫 : 人の結核症の免疫 (第65回結核病学会総会特別講演), *結核*, 65 : 591~601, 1990.
- 10) 戸井田一郎 : AIDS とミコバクテリア感染, *結核*, 64 : 487~490, 1989.
- 11) 北沢邦彦, 大久保喜雄, 和田茂比古他 : 肺結核患者におけるモノクローナル抗体を用いた免疫担当細胞の検討 (抄録), *結核*, 58 : 204~205, 1983.
- 12) 西川 潔, 坂口泰弘, 米田尚弘他 : FACS による肺結核発病患者の末梢T細胞サブセットの解析 (抄録), *結核*, 58 : 205~206, 1983.
- 13) Shiratsuchi, H. and Tsuyuguchi, I. : 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 : 271-278, 1984.
- 14) Kochman, S., Bernard, J., Lavaud, F. et al. : T-lymphocyte subsets in pleural fluids : discrimination according to traditional and monoclonal antibody-defined markers, *Eur J Respir Dis*, 65 : 586-591, 1984.
- 15) Vidhidharm, A., Matangkasombut, P. and Bovornkitti, S. : T-cell subpopulations in tuberculosis and the effects of rifampicin, *Asian Pacific J Allergy Immunol*, 3 : 165-173, 1985.
- 16) Beck, J. S., Potts, R. C., Kardjito, T. et al. : T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis, *Clin Exp Immunol*, 60 : 49-54, 1985.
- 17) 高田勝利, 橋上 裕, 森下宗彦他 : モノクローナル抗体による肺結核症の末梢血および胸水中リンパ球分画の検討, *結核*, 61 : 253~256, 1986.
- 18) 高本正祇 : 肺結核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, *結核*, 61, 469~474, 1986.
- 19) 熊野伸子 : 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, *結核*, 61 : 474~477, 1986.
- 20) 高田勝利, 森下宗彦, 山本正彦, モノクローナル抗体による胸水中リンパ球の検討, *結核*, 61 : 477~480, 1986.
- 21) 米田尚弘, 成田亘啓, 三上理一郎他 : 慢性難治性肺結核症の臨床免疫学的研究—免疫学的スペクトルについて, *結核*, 62 : 489~495, 1987.
- 22) Onwubalili, J. K., Edwards, A. J. and Palmer, L. : T4 Lymphopenia in human tuberculosis, *Tubercle*, 68 : 195-200, 1987.
- 23) 原田泰子, 高本正祇, 原田 進他 : 肺結核症における末梢血リンパ球サブセットの動態, *結核*, 63 : 133~142, 1988.
- 24) 原田泰子, 原田 進, 高本正祇他 : 非定型抗酸菌症の免疫学的検討, I. 末梢血リンパ球サブセット値について, *結核*, 63 : 555~561, 1988.
- 25) 原田 進, 高本正祇, 原田泰子他 : 高齢者肺結核の臨床免疫学的検討, *結核*, 64 : 529~536, 1989.
- 26) Berthier, A., Bernard, J., Bartal, M. et al. : T lymphocytes du sang circulant et du liquide pleural chez des patients atteints de tuberculose évolutive ou de cancer, *Rev Mal Respir*, 6 : 343-347, 1989.
- 27) Singhal, M., Banavalikar, J. N., Sharma, S. et al. : Peripheral blood T lymphocyte subpopulations in patients with tuberculosis and the effect of chemotherapy, *Tubercle*, 70 : 171-178, 1989.
- 28) Masur, H., Ognibene, F. P., Yarchoan, R. et al. : CD4 counts as predictors of oppor-

- tunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Ann Intern Med*, 111 : 223-231, 1989.
- 29) Phillips, A. N., Lee, C. A., Elford, J. et al. : Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS, *Lancet*, 337 : 389-392, 1991.
- 30) Shapiro, H. M. (Ed.) : *Practical Flow Cytometry* (2nd Edition), 1988, Alan R Liss Inc. (New York).
- 31) Becton-Dickinson Immunocytometry System Europe : *Progress in Cytometry-Flow and Image. Reports from the Third European Cytometry Users Meeting, June 5-7, 1989, Ghent, Belgium.*
- 32) Keren, D. F. (Ed.) : *Flow Cytometry in Clinical Diagnosis*, 1989, ASCP Press (Chicago).
- 33) 太田和雄, 野村和弘, 高本 滋 (編) : フローサイトメトリー, 手技と実際 (改訂第2版), 1988, 蟹書房 (東京).
- 34) Hoffman, R. A., Kung, P. C., Hansen, W. P. et al. : Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 77 : 4914-4917, 1980.
- 35) Ashmore, L. M., Shopp, G. M. and Edwards, B. S. : Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage, *J Immunol Methods*, 118 : 209-215, 1989.
- 36) Terstappen, L. W. M. M., Meiners, H. and Loken, M. R. : A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations, *J Immunol Methods*, 123 : 103-112, 1989.
- 37) Mansour, I., Bourin, P., Rouger, P. et al. : A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. Comparison with density gradient separation, *J Immunol Methods*, 127 : 61-70, 1990.
- 38) Kotylo, P. K., Sample, B., Redmond, N. L. et al. : Reference ranges for lymphocyte subsets. A comparison of standard vs rapid whole-blood lysis techniques, *Arch Pathol Lab Med*, 115 : 181-184, 1991.
- 39) 藍田仁史, 平野千恵子, 浅見暁子他 : リンパ球サブセット解析法の比較. 試料の違いによる測定値への影響及び健常値の対比, *医学検査*, 40 : 821-826, 1991.
- 40) Kaufmann, S. H. E. : Possible role of helper and cytolytic T lymphocytes in antibacterial defence : Conclusion based on a murine model of listeriosis, *Rev Infect Dis*, 9 : suppl. 650-659, 1987.
- 41) Kato, K., Yamamoto, K., Kimura, T. et al. : Suppression of BCG cell wall-induced delayed-type hypersensitivity by pretreatment with killed BCG : Induction of non-specific suppressor T cells by the adjuvant portion (MDP) and of specific suppressor T cells by the antigen portion (TAP), *J Immunol*, 132 : 2790-2795, 1984.
- 42) Yamamoto, K. and Kakinuma, M. : Genetic control of granuloma response to oil-associated BCG cell wall vaccine in mice, *Microbiol Immunol*, 22 : 335-348, 1978.
- 43) Kakinuma, M., Onoe, K., Okada, M. et al. : Failure of C3H mice to develop lung granuloma after intravenous injection of BCG cell wall vaccine, Demonstration of a defect in lymphoid cells, *Immunology*, 43 : 1-9, 1981.
- 44) Kakinuma, M. and Yamamoto, K. : Strain differences in lung granuloma formation in response to a BCG cell-wall vaccine in mice, Demonstration of two types of low responders, *Immunology*, 55 : 91-95, 1985.
- 45) Nakamura, R. M. and Tokunaga, T. : Strain difference of delayed-type hypersensitivity to BCG and its genetic control in mice, *Infect Immun*, 22 : 657-664, 1978.
- 46) Nakamura, R. M. and Tokunaga, T. : Induction of suppressor T cells in delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium bovis* BCG in low-responder mice, *Infect Immun*, 28 : 331-335, 1980.
- 47) Ridley, D. S. and Jopling, W. H. : Classification of leprosy according to immunity. A five group system, *International J Leprosy*, 34 : 255-273, 1966.
- 48) Lenzini, L., Rottoli, P. and Rottoli, L. : The spectrum of human tuberculosis, *Clin Exp*

- Immunol, 27 : 230-237, 1977.
- 49) Ridley, D. S. : The histopathological spectrum of the mycobacterioses, *in* The Biology of the Mycobacteria, Vol 2. Immunological and Environmental Aspects, (Ed. Ratledge, C. and Stanford, J.) 129-171, 1983. Academic Press, (London, New York, Paris, San Diego, San Francisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toront)