

原 著

健康成人におけるツベルクリン皮膚反応, リンパ球増殖反応,
および $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の検討

橋 川 桂 三 ・ 仲 本 敦 ・ 斎 藤 厚

琉球大学医学部第1内科

受付 平成4年1月20日

CORRELATION OF TUBERCULIN SKIN REACTION WITH LYMPHOCYTE
PROLIFERATION, INTERFERON- γ PRODUCTION AND TUMOR
NECROSIS FACTOR- α PRODUCTION AFTER *IN VITRO*
STIMULATION WITH PPD AND KILLED *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS USING PERIPHERAL
BLOOD OF HEALTHY DONERS

Keizo KITSUKAWA*, Atsushi NAKAMOTO and Atsushi SAITO

(Received for publication January 20, 1992)

The quantitative relationships among the *in vitro* lymphocyte proliferation in peripheral blood in 19 healthy donors to purified protein derivative (PPD) and the killed *Mycobacterium tuberculosis*, interferon- γ ($IFN\gamma$) and tumor necrosis factor- α ($TNF\alpha$) production in these culture supernatants, and the *in vivo* skin reaction to PPD which were simultaneously measured were studied. Statistical analysis was performed with *t*-test and multiple regression analysis.

The results obtained were as follows ;

- 1) The magnitude of the *in vitro* lymphocyte proliferation by PPD and the killed *M. tuberculosis* failed to correlate with the erythema and the induration of the *in vivo* skin reaction to PPD.
- 2) The erythema of skin test correlates with $TNF\alpha$ production in the culture supernatants that the lymphocytes in peripheral blood were cocultured with these antigens for 7 days. ($R=0.566062$, $0.01 < p < 0.02$)
- 3) There is a correlation between the erythema and the induration of skin test. ($R=0.526662$, $0.02 < p < 0.05$)
- 4) Though the magnitude of the lymphocyte proliferation to PPD correlates $IFN\gamma$ production in the culture supernatants ($R=0.525915$, $0.02 < p < 0.05$), these response to the killed *M. tuberculosis* correlates both $IFN\gamma$ production ($R=0.55049$, $0.01 < p < 0.02$) and $TNF\alpha$ production ($R=0.51283$, $0.02 < p < 0.05$) in the culture supernatants.
- 5) There is a correlation between $IFN\gamma$ production and $TNF\alpha$ production in the culture supernatants which were cocultured with both PPD ($R=0.465874$, $0.02 < p < 0.05$) and

*From the First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-01 Japan.

killed *M. tuberculosis* ($R=0.666333$, $0.001 < p < 0.01$).

- 6) With multiple regression analysis, the production of $IFN\gamma$ and $TNF\alpha$ in the culture supernatants which the lymphocytes were stimulated with PPD correlates the erythema rather than the induration of test.

Key words : Lymphocyte proliferation, Tuberculin skin reaction, Interferon- γ , Tumor necrosis factor- α

キーワード : リンパ球増殖, ツベルクリン皮膚反応, インターフェロン γ , 腫瘍壊死因子

はじめに

1963年に Pearmain らは、結核患者やツベルクリン陽性正常者のリンパ球がツベルクリンによりプラスト化 (blastoid transformation) することを報告した¹⁾。それ以来、ツベルクリンによる *in vitro* のリンパ球増殖反応は、ツベルクリン皮膚反応で示される遅延型過敏反応とよく相関すると考えられている²⁾⁻⁶⁾⁸⁾⁹⁾。また、*in vitro* において結核患者のリンパ球は Purified protein derivative-tuberculin (PPD) による刺激で $IFN\gamma$ を産生することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。

本文では、健常者より得た末梢白血球 (PBL) を用い、PPD およびヒト結核死菌刺激によるリンパ球増殖反応、その培養上清中の gamma-interferon ($IFN\gamma$) と tumor necrosis factor- α ($TNF\alpha$) の産生、採血と同時にを行ったツベルクリン皮膚反応の関連性を検討したので報告する。

対象と方法

対象 : 当内科の医局員および学生 19 名 (男性 17 名, 女性 2 名) であり、年齢は 23~38 歳である。

ツベルクリン皮膚反応 : 末梢血をヘパリン採血した後、PPD (一般診断用精製ツベルクリン, 日本ビーシージー) の $0.05\mu\text{g}$ を皮内注射し 48 時間後に紅斑および硬結の長径と短径を測定した。紅斑および硬結の面積は楕円の面積 ($0.25\pi \times \text{長径} \times \text{短径}$) で計算した。また、紅斑および硬結の径は長径と短径の平均とした。

培養液 : Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に HEPES (20mmol), 重炭酸ナトリウム (2g/l), 硫酸カナマイシン (100mg/l) を加え、pH 7.0 に調整した。使用前に最終濃度 10% となるように非働化 A B 型血清を加えた。

抗原 : PPD (日本ビーシージー, 東京) と結核菌固体成分をリンパ球増殖反応の抗原として用いた。PPD は $100\mu\text{g/ml}$ を倍数希釈して用いた。結核菌体成分は結核患者の喀痰より分離培養した結核菌を 10% ホルマリンで 2 日間殺菌した後、 120°C , 15 分間オートク

レーブにて処理し、蒸留水で、 $10,000\text{g}$, 30 分間遠心洗浄を 5 回くり返し、凍結乾燥し保存した。使用にのぞみ生食水で $400\mu\text{g/ml}$ に調整し、 120°C , 15 分間オートクレーブで滅菌した後、倍数希釈して用いた。

リンパ球増殖反応 : ヘパリン加末梢血を Ficoll-Hypaque リンパ球分離液に重層し、室温、2100 rpm, 10 分間遠心した。リンパ球層を取り、これをさらに 2 回、DMEM にて 1600 rpm, 5 分間遠心洗浄し、その後、生食水にて PBL を $1 \times 10^6\text{ cell/ml}$ の濃度に調整した。

0.1ml の抗原液と 0.1ml の PBL を 96 ウェル平底マイクロプレート (Falcon 3072, Becton Dickinson, New Jersey, USA) に分注し、 CO_2 インキュベーター (37°C , 5% CO_2) 中で 7 日間、混合培養後、 ^3H -thymidine 37 kBq/well を加え、16 時間後に回収した。これを乾燥後、液体シンチレーションカウンターで ^3H -thymidine の取り込みを測定した。

リンパ球増殖反応は、 ^3H -thymidine の最大の取り込み (maximal apm) を値とした。maximal stimulation index (maximal S. I.) は抗原で刺激したリンパ球の ^3H -thymidine の最大取り込みと無刺激のリンパ球の ^3H -thymidine の取り込みの比率で示した。

培養上清中の $IFN\gamma$ と $TNF\alpha$ の測定 : リンパ球増殖反応 7 日後、培養上清を回収し、 $0.2\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過した後、 -80°C で保存した。後日溶解し、 $IFN\gamma$ と $TNF\alpha$ を Centocor RIA kit (Malvern, USA) にて測定した。 $IFN\gamma$ 測定は、反応トレイの各ホールに抗ヒト $IFN\gamma$ 抗体をコーティングしたビーズをいれた。標準液、陽性コントロールおよび培養上清を 0.2ml を加え室温で 2 時間インキュベートした。インキュベートした後、蒸留水で 6 回吸引洗浄した。 0.2ml の ^{125}I 標識抗ヒト $IFN\gamma$ 抗体を加え室温で 2 時間インキュベートした。蒸留水で 6 回吸引洗浄した後、ガンマシンチレーションカウンターで測定した。

抗 $TNF\alpha$ 抗体をコーティングしたチューブと 2 本のトータルカウント用としての抗体をコーティングしてい

表1 健康成人の末梢白血球のPPDと結核死菌に対するリンパ球増殖反応, IFN γ とTNF α 産生, および皮内反応

volunteer	Proliferation(cpm)		S. I. (T)	Proliferation(cpm)		S. I. (P)	Skin test with PPD(mm ²)		γ -IFN(U/ml)		α -TNF(pg/ml)		
	Tbc(-)	Tbc(+)		PPD(-)	PPD(+)		Induration (mean of diameter)	Erythema	Tbc	PPD	-	Tbc	PPD
No. 1	1098	263934	240.4	1232.3	340559	276.4	240.2 (17.5)	1475.8 (43.4)	95.7	65.9	112	6694.4	2114
2	1828.8	2558.1	1.4	2290.6	1742.9	0.8	0 (0)	3.1 (2)	0	0	204.1	765.2	81.8
3	1605.3	179915	112.1	1463.3	171896	117.5	254.3 (18)	3122.7 (63.1)	41.6	40.8	60.3	9800.7	7131.7
4	1578.9	289411	183.3	1533.7	275132	179.4	103.6 (11.5)	379.2 (6.9)	142.6	192.8	357.6	10000 \uparrow	5315.7
5	2724.2	245958	90.3	2724	156329	57.4	0 (0)	667.3 (29.2)	205.7	77.2	439.7	10000 \uparrow	5315.7
6	2455.9	120613	49.1	2199.3	42116	19.2	0 (0)	276.3 (18.8)	71.9	11.5	150.6	10000 \uparrow	1880.4
7	1361.6	388247	285.1	1361	141484	104.0	212.0 (16.4)	824.3 (32.4)	92.4	27.4	321.3	5330.4	3177.7
8	2046.4	199793	97.6	1704.5	253904	149.0	0 (0)	56.5 (8.5)	31	58.5	90.8	5126.3	4342.7
9	1684.9	221491	131.5	1660.3	302959	182.5	440.0 (23.7)	879.2 (33.5)	80.7	80.1	120.3	4843.4	1416.3
10	2973.1	5057.4	1.7	2973	4440.1	1.5	23.6 (5.5)	94.2 (11)	12.7	0.2	106.4	1676.3	1177.9
11	1102.7	16842.8	152.7	1354.9	34701.2	25.6	0 (0)	19.6 (5)	68.6	43.5	133.1	3623.1	2478.3
12	908.2	125457	138.1	690.8	179474	259.8	18.8 (4.9)	193.9 (15.7)	56.7	42.1	261.9	2338.0	1431.4
13	1404.8	60821.5	43.3	1073.1	64191.6	59.8	86.4 (10.5)	164.9 (14.5)	18.7	8.0	124.7	1951.4	935.7
14	1263.2	68854.2	54.5	793.2	146317	184.4	142.9 (13.5)	240 (17.5)	20.4	49.8	71.0	1977.6	4628.4
15	812.9	159031	195.6	754.5	199220	264.0	86.4 (10.5)	153.1 (14)	88.0	37.6	423.2	4175.7	1172.5
16	3265.9	206622	63.3	1186.9	213824	180.2	132.7 (13)	226.1 (17)	100.6	97.6	119.0	3349.9	2648.9
17	1119	129616	115.8	918.6	227356	247.5	78.5 (10)	226.1 (17)	23.9	11.8	100.0	2775.4	2163.8
18	567	261378	461.0	515.9	263908	511.6	38.5 (7)	92.2 (10.8)	54	39.1	38.1	3077.6	2417.2
19	940.4	50999.1	54.2	801.2	100429	125.4	471 (24.5)	706.5 (30)	112.7	104.9	347.0	5170.6	2701.4

ないチューブを用意した。標準液および培養上清を0.2 ml 加え ¹²⁵I 標識抗 TNF α 抗体を0.05 ml ずつ加えた。室温で20時間インキュベートした後、トータルカウント以外の各チューブの溶液を吸引した。トータルカウント以外のチューブを2 ml の20% Tween 20 で洗浄吸引した。ガンマカウンターで測定した。

データの統計解析: メディカルプラン2-プログラム (メディカルソフト, 京都, 日本) を用いて, t-検定および多変量解析を行った。

結 果

健康成人19人の末梢白血球のPPDおよび結核死

表2 ヒト末梢血白血球の PPD と結核死菌に対するリンパ球増殖反応, TNF α と IFN γ の産生量, およびツベルクリン皮内反応の t -検定

Y	X	R	R ²	p
Ly alone (without Tbc)	Ly alone (without PPD)	0.761728	0.58023	0 < p < 0.001
Ly stimulated with Tbc	S. I. (Tbc)	0.669477	0.44820	0.001 < p < 0.01
Ly stimulated with Tbc	Ly stimulated with PPD	0.71538	0.51177	0 < p < 0.001
Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)	0.51283	0.26300	0.02 < p < 0.05
Ly stimulated with Tbc	IFN (Tbc)	0.55049	0.30304	0.01 < p < 0.02
Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	0.509845	0.25994	0.02 < p < 0.05
Ly stimulated with Tbc	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.55049	0.30304	0.01 < p < 0.02
S. I. (Tbc)	S. I. (PPD)	0.765001	0.58523	0 < p < 0.001
Ly stimulated with PPD	S. I. (PPD)	0.743532	0.55284	0 < p < 0.001
Ly stimulated with PPD	IFN (PPD)	0.525915	0.27659	0.02 < p < 0.05
Ly stimulated with PPD	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.525915	0.27659	0.02 < p < 0.05
S. I. (PPD)	Ly stimulated with PPD-Ly alone (without PPD)	0.746202	0.55682	0 < p < 0.001
Induration	Erythema	0.526662	0.27737	0.02 < p < 0.05
Induration	Diameter of induration	0.941239	0.88593	0 < p < 0.001
Induration	Diameter of erythema	0.658111	0.43311	0.001 < p < 0.01
Erythema	TNF (Tbc)	0.548432	0.30078	0.01 < p < 0.02
Erythema	TNF (PPD)	0.566062	0.32043	0.01 < p < 0.02
Erythema	TNF (Tbc)-TNF(unstimulated)	0.560029	0.31363	0.01 < p < 0.02
Erythema	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	0.574802	0.33040	0.01 < p < 0.02
Erythema	Diameter of erythema	0.93519	0.87458	0 < p < 0.001
TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)	0.694092	0.48176	0 < p < 0.001
TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.694092	0.48176	0 < p < 0.001
TNF (Tbc)	TNF (PPD)	0.641983	0.41214	0.001 < p < 0.01
TNF (Tbc)	IFN (Tbc)	0.666333	0.44400	0.001 < p < 0.01
TNF (Tbc)	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	0.619407	0.38367	0.001 < p < 0.01
TNF (Tbc)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.666333	0.44400	0.001 < p < 0.01
TNF (PPD)	IFN (PPD)	0.465874	0.21704	0.02 < p < 0.05
TNF (PPD)	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	0.647777	0.41962	0.001 < p < 0.01
TNF (PPD)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.465874	0.21704	0.02 < p < 0.05
TNF (PPD)	Diameter of erythema	0.457821	0.20960	0.02 < p < 0.05
IFN (Tbc)	IFN (PPD)	0.674158	0.45449	0.001 < p < 0.01
IFN (Tbc)	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	0.645488	0.41665	0.001 < p < 0.01
IFN (Tbc)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.674158	0.45449	0.001 < p < 0.01
IFN (PPD)	Ly stimulated with PPD-Ly alone (without PPD)	0.525357	0.27600	0.02 < p < 0.05
IFN (PPD)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.674158	0.45449	0.001 < p < 0.01
Ly stimulated with PPD-Ly alone (without PPD)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.525357	0.27600	0.02 < p < 0.05
TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	0.628008	0.39439	0.001 < p < 0.01
TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.645488	0.41665	0.001 < p < 0.01
TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.468515	0.21951	0.02 < p < 0.05
TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	Diameter of erythema	0.461142	0.21265	0.02 < p < 0.05
IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.674158	0.45449	0.001 < p < 0.01
Diameter of induration	Diameter of erythema	0.661698	0.43784	0.001 < p < 0.01

菌に対するリンパ球増殖反応, maximum S. I., リンパ球混合培養 7 日後の培養上清中の IFN γ と TNF α 産生, およびツベルクリン皮膚反応の硬結と紅斑を表 1 に示した。PPD および結核死菌で刺激していないリンパ球の培養上清は表 1 には示さなかったが 0 であった。

表 2 には, 上記の項目について, t -検定での危険率 (p) 5% 以下の結果を示した。PPD と結核死菌のリンパ球増殖反応および maximum S. I. の相関係数 (R) は, 0.71538, 0.765001, 決定係数 (R^2) は, 0.51177, 0.58523 であり, 相関関係が決定できたが, PPD と結

表3 ヒト末梢白血球のPPDと結核死菌に対するリンパ球増殖反応, TNF α とIFN γ の産生量, およびツベルクリン反応の多変量解析

Y	X(1)	X(2)	X(3)	R
Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)		0.584284
Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)		0.586485
Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)	IFN (PPD)		0.526106
Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)		0.527048
Induration	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)		0.198334
Induration	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)		0.198855
Erythema	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)		0.621369
Erythema	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)		0.626127
Induration	TNF (PPD)	IFN (PPD)		0.369783
Induration	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)		0.367931
Erythema	TNF (PPD)	IFN (PPD)		0.590917
Erythema	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)		0.595209
Diameter of erythema	TNF (PPD)	IFN (PPD)		0.475424
Diameter of erythema	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)		0.475095
Diameter of induration	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)		0.137847
Diameter of induration	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)		0.137066
Diameter of erythema	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)		0.44519
Diameter of erythema	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)		0.451082
Diameter of induration	TNF (PPD)	IFN (PPD)		0.361167
Diameter of induration	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)		0.359121
Diameter of erythema	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)	0.496641
Diameter of erythema	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.500054
Diameter of erythema	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)	IFN (PPD)	0.582656
Diameter of induration	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)	0.294906
Diameter of induration	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.29396
Diameter of induration	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)	IFN (PPD)	0.452928
Diameter of induration	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.452129
Induration	Ly stimulated with PPD	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)	0.22397
Induration	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.223892
Induration	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)	IFN (PPD)	0.403745
Induration	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.40278
Erythema	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)	IFN (Tbc)	0.637863
Erythema	Ly stimulated with Tbc	TNF (Tbc)-TNF (unstimulated)	IFN (Tbc)-IFN (unstimulated)	0.641231
Erythema	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)	IFN (PPD)	0.633589
Erythema	Ly stimulated with PPD	TNF (PPD)-TNF (unstimulated)	IFN (PPD)-IFN (unstimulated)	0.632754

核死菌との混合培養上清中のIFN γ およびTNF α 産生のRは, 0.674158, 0.641983, R²は, 0.45449, 0.41214であり, 相関は認められるが, IFN γ およびTNF α 産生は同一でないため, PPDに対するリンパ球の反応と結核菌に対するリンパ球の反応は, 同一であると決定できなかった。

結核死菌のリンパ球増殖反応とIFN γ 産生のRは0.55049, TNF α 産生の際のRは0.51283であり, PPDのリンパ球増殖反応とIFN α 産生のRは0.525915であった。PPDのリンパ球増殖反応とTNF α 産生の間には $p < 5\%$ では相関は認められなかった。

硬結と紅斑の径および面積の間のRは, 0.661698, 0.526662と相関が認められた。紅斑とTNF α の間のRは0.566062の相関が認められたが, 紅斑とIFN γ 産生, 硬結とIFN γ およびTNF α 産生の間には $p < 5\%$ での相関はみられなかった。

結核死菌によるTNF α とIFN γ 産生のRは0.666333, PPDによるTNF α とIFN γ 産生のRは0.465874の相関がみられ, 結核死菌により高い相関が認められた。リンパ球増殖反応と硬結および紅斑の間には $p < 5\%$ での相関は認められなかった。

表3には, ヒト末梢白血球のPPDと結核死菌に対

するリンパ球増殖反応, $TNF\alpha$ と $IFN\gamma$ の産生量, およびツベルクリン反応の多変量解析を示した。結核死菌および PPD に対するリンパ球増殖反応と $TNF\alpha$ と $IFN\gamma$ 産生の間は, R は 0.584284, 0.526106, R^2 は 0.341388, 0.276788 であり相関は認められたが, 決定できなかった。

硬結と結核死菌および PPD による $TNF\alpha$ と $IFN\gamma$ 産生の間は R は 0.1988334, 0.369783 であり, 相関係数は低いがツベルクリン皮膚反応に用いた PPD の方がやや高かった。

紅斑と結核死菌および PPD による $TNF\alpha$ および $IFN\gamma$ 産生の R は 0.621369, 0.590917 で, 紅斑の径と結核死菌および PPD による $TNF\alpha$ および $IFN\gamma$ 産生の間は R の 0.44519, 0.475424 より高い相関係数であった。

硬結と結核死菌および PPD によるリンパ球増殖反応, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の間は R は 0.22397, 0.403745 であり, 紅斑と結核死菌および PPD によるリンパ球増殖反応, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の間は R は 0.637863, 0.633589 であった。

硬結の径と結核死菌および PPD によるリンパ球増殖反応, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の間は R は 0.294906, 0.452928 で上記の硬結の面積よりやや高かったが, 紅斑の径と結核死菌および PPD によるリンパ球増殖反応, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の間は R は 0.496641, 0.582656 であり上記の紅斑の面積がやや高い相関係数であった。

考 案

ツベルクリン皮膚反応は, 結核菌に対する細胞性免疫の一つの指標とされ, また *in vitro* の PPD 刺激によるリンパ球の分裂幼若化反応は, *in vivo* の皮膚反応と相関すると考えられている²⁾⁻⁶⁾。また, PPD により増殖するリンパ球は T 細胞であり¹²⁾, そのサブセットが CD4 陽性細胞であることが示されている⁷⁾¹³⁾⁻¹⁵⁾。さらにリンパ球増殖反応と $IFN\gamma$ 産生の相関も報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。私たちも CD4 陽性 T 細胞が $IFN\gamma$ を産生することを報告した¹⁶⁾。

PPD 刺激によるリンパ球増殖反応と皮膚反応の相関性に関する報告は, 幼若化細胞の比率と PPD の抗原量の相関性, あるいは PPD による皮内反応の強弱によりグループを分け, グループ間での幼若化反応または 3H -thymidine の取り込みとの相関性, または患者と健常人のツベルクリン皮膚反応と幼若化細胞の比率の相関性についてされている。

Kerby⁴⁾ の報告のみが, 52 名の健常者と 62 名の結核患者個々の皮膚反応の硬結の径とラジオオートグラフによる幼若化細胞の比率の間の相関性について報告している。その中で健常人の PPD に対する皮膚反応と幼若

化反応の間には $R = 0.82$, 結核患者の PPD に対する皮膚反応の間には $R = 0.72$ と高い相関を認めたが, PPD 皮膚反応陰性による「anchoring effect」を除くと, それぞれ $R = 0.59$, $R = 0.63$ の相関が認められたと報告している。しかし, p については記載されていない。

Gump³⁾ らは, ツベルクリン陽性の健常人および患者 16 名のツベルクリン皮膚反応と幼若化細胞の比率との間に相関性は認められなかったと報告している。このように, 個々人のツベルクリン皮膚反応の強弱と細胞増殖反応の相関に関しては, 報告が少ないため, 私たちは, 19 名の健常人のツベルクリン皮膚反応, リンパ球増殖反応, $IFN\gamma$ および $TNF\alpha$ 産生の間関係について検討した。

Hinz⁵⁾ らは, PPD 刺激による幼若化細胞の比率と 3H -thymidine の取り込みの間には高い相関がみられたと報告している。それで私たちは, Kerby と異なり幼若化反応の比率ではなく, 3H -thymidine の取り込みとツベルクリン皮膚反応との相関性を検討したが, 3H -thymidine の取り込みによる PPD 刺激リンパ球増殖反応 (cpm) と皮膚反応の硬結および紅斑の面積と径の間の相関性は危険率 5% 以下の t -検定では認められなかった。

硬結, 紅斑, リンパ球増殖反応, $IFN\gamma$ と $TNF\alpha$ 産生の間相関性に関しては, 硬結と紅斑の面積と径には, $R = 0.526662$, 0.661698 の相関があったが, 硬結および紅斑と $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ 産生の間には, 紅斑と $TNF\alpha$ 産生の間には $R = 0.566062$ の相関がみられるのみであった。

PPD 刺激リンパ球増殖反応と $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ 産生の間には, $IFN\gamma$ 産生と $R = 0.525915$ の相関がみられた。結核死菌刺激リンパ球増殖反応と $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ 産生の間には, $R = 0.55049$, 0.51283 の相関がみられた。PPD および結核死菌刺激によるリンパ球増殖反応の培養上清中の $TNF\alpha$ と $IFN\gamma$ の間には, $R = 0.465874$, 0.666333 の相関がみられた。

多変量解析による硬結および紅斑の面積と PPD 刺激リンパ球増殖反応の培養上清中の $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生には, $R = 0.369783$, 0.590917 の相関が認められたが, 紅斑とより高い相関がみられた。紅斑の面積が径に比べ $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生との間に高い相関がみられた。

以上のように, 硬結および紅斑とリンパ球増殖反応の間に相関は認めなかったが, 硬結および紅斑とリンパ球増殖反応の培養上清中の $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ 産生の間には相関がみられ, 紅斑により高い相関がみられた。また, リンパ球増殖反応とその上清中の $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ の間にも相関がみられた。上記の相関性は, 決定係数が 0.5 以下で, 同一の反応と決定できず, リンパ球増殖反応, および紅斑, 硬結には, $TNF\alpha$ や $IFN\gamma$ だけでなく他

の種々のサイトカインの産生および関与も推測された。

また、「*in vitro* の PPD 刺激によるリンパ球の分裂幼若化反応は、*in vivo* の皮膚反応と相関する」は、確立された事実と考えられているが、私たちの結果では相関が認められなかった。これは幼若化細胞の比率ではなく、 ^3H -thymidine の取り込みによる細胞増殖反応とツベルクリン皮膚反応との検討を行ったためと思われるが、私たちが本文のなかで述べたいことは PPD によるリンパ球増殖反応と $\text{IFN}\gamma$ 産生との間に相関がみられ、 $\text{IFN}\gamma$ 産生と $\text{TNF}\alpha$ 産生の間にも相関がみられ、 $\text{TNF}\alpha$ 産生とツベルクリン皮膚反応の紅斑との間にも相関がみられたことである。このことから、ツベルクリン皮膚反応には、抗原を貪食したマクロファージが直接産生する $\text{TNF}\alpha$ だけでなく、リンパ球から産生された $\text{IFN}\gamma$ を prime したマクロファージから産生される $\text{TNF}\alpha$ も関与している可能性が示唆された。

ま と め

健常成人の末梢血リンパ球を用い、*in vitro* で PPD および結核死菌刺激によるリンパ球増殖反応を行い、その培養上清中の $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$ の産生量、ツベルクリン皮膚反応の硬結と紅斑の関係について *t*-検定（危険率 5%以下）と多変量解析を行った。

1) ツベルクリン皮膚反応の紅斑および硬結の面積と径とリンパ球増殖反応の間に相関は認められなかった。

2) ツベルクリン皮膚反応の紅斑と $\text{TNF}\alpha$ 産生の間には相関が認められた。

3) ツベルクリン皮膚反応の硬結と紅斑の間には相関が認められた。

4) PPD 刺激リンパ球増殖反応と $\text{IFN}\gamma$ 産生の間には相関がみられ、結核死菌刺激リンパ球増殖反応は、 $\text{IFN}\gamma$ 産生だけでなく $\text{TNF}\alpha$ 産生とも相関がみられた。

5) $\text{TNF}\alpha$ 産生と $\text{IFN}\gamma$ 産生の間には相関がみられなかった。

6) ツベルクリン皮膚反応の硬結および紅斑と PPD 刺激リンパ球増殖反応の培養上清中の $\text{TNF}\alpha$ と $\text{IFN}\gamma$ 産生の間には相関がみられたが、紅斑とより高い相関がみられた。

文 献

- 1) Pearmain, G., Lycette, R. R. and Fitzgerald, P. H. : Tuberculin-induced mitosis peripheral blood leucocytes, *Lancet*, 1 : 637-638, 1963.
- 2) McFarland, W. and Heilman, D. H. : Comparison of lymphocyte transformation and intradermal reactions to tuberculins, *Am Rev Respir Dis*, 93 : 742-748, 1966.
- 3) Gump, D. W., Fekety, F. R., Jr. Urbanetti, J. and Nosenzo, C. : Studies of human leukocyte culture as *in vitro* test of delayed hypersensitivity, *Am Rev Respir Dis*, 95 : 470-476, 1967.
- 4) Kerby, G. R. : Correlation of tuberculin skin reaction with *in vitro* lymphocyte transformation, *Am Rev Respir Dis*, 97 : 904-908, 1968.
- 5) Hinz Jr., C. F., Daniel, T. M. and Baum, G. L. : Quantitative aspects of the stimulation of lymphocytes by tuberculin purified protein derivative, *Int Arch Allergy*, 38 : 119-129, 1970.
- 6) McMurray, D. N. and Echeverri, A. : Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 118 : 827-834, 1978.
- 7) 原田泰子, 石橋凡雄, 原田 進他 : フローサイトメトリーによる PPD 活性化リンパ球の解析, *結核*, 64 : 79-84, 1989.
- 8) Fujiwara, H., Okuda, Y., Fukukawa, T. and Tsuyuguchi, I. : *In vitro* tuberculin reactivity of lymphocytes from patients with tuberculous pleurisy, *Infect Immun*, 35 : 402-409, 1982.
- 9) Ellner, J. J. : Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis, *Ann Intern Med*, 89 : 932-933, 1978.
- 10) Shimokata, K., Kawachi, H., Kishimoto, H. et al. : Local cellular immunity in tuberculous pleurisy, *Am Rev Respir Dis*, 126 : 822-824, 1982.
- 11) Ribera, E., Espanol, T., Martinez-Vazquez, M. et al. : Lymphocyte proliferation and gamma interferon production after "*in vitro*" stimulation with PPD, *Chest*, 97 : 1381-1385, 1990.
- 12) Chess, L., MacDermott, R. P. and Schlossman, S. F. : Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations, II. Antigen triggering of T and B cells *in vitro*, *J Immunol*, 113 : 1122-1127, 1974.
- 13) Okubo, Y., Kusama, S. and Yano, A. : PPD-specific proliferative response in humans. I. Analysis of PPD-specific proliferative cells from tuberculous pleurisy patients and healthy controls with monoclonal antibodies

- specific for human T subsets, *Microbiol Immunol*, 26 : 511-521, 1982.
- 14) Bach, M. A., Wallach, D., Flageul, B. et al. : *In vitro* proliferative response to *M. leprae* and PPD of isolated T cell subsets from leprosy patients, *Clin Exp Immunol*, 52 : 107-114, 1983.
- 15) 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.
- 16) 橋川桂三, 比嘉 太, 澤岷安教他 : 多剤耐性肺結核に対する感作自己リンパ球による養子免疫療法, *結核*, 66 : 563-575, 1991.