

原 著

活動性肺結核症での末梢血リンパ球表面抗原の解析

四十坊 典 晴・中西 文 雄・平 澤 路 生
重 原 克 則・佐々木 拓 子
浅 川 三 男・鈴 木 明

札幌医科大学第3内科

受付 平成4年2月10日

PHENOTYPIC ANALYSIS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Noriharu SHIJUBO*, Fumio NAKANISHI, Michio HIRASAWA,
Katsunori SIGEHARA, Hiroko SASAKI,
Mitsuo ASAKAWA and Akira SUZUKI

(Received for publication February 10, 1992)

In order to clarify the immunological aspects of tuberculosis, phenotype of peripheral blood lymphocytes was analyzed in 96 patients with pulmonary tuberculosis and 43 normal controls. In tuberculosis, CD8 positive T cells were significantly decreased in comparison with normal controls and regarding expression of CD3, CD4, CD19, CD16 and $\gamma\delta$ T cell receptor (TCR), there was no significant difference between tuberculosis and normal controls, though in tuberculosis CD4 positive T cells tended to be high as compared to normal controls. With respect to previous therapeutic condition, the group with previous chemotherapy had significantly high CD4 positive cells, low CD8 positive cells and low $\gamma\delta$ TCR positive cells as compared to the group without previous chemotherapy. Between groups divided by Type or Expansion of pulmonary tuberculosis without previous chemotherapy, there was no significant difference regarding any surface markers. Regarding pulmonary tuberculosis with previous chemotherapy, the group of Type II had significantly high CD4 positive cells and low CD8 positive cells as compared to Type III, and in the group of Expansion 3, CD19 positive cells were significantly high as compared to Expansion 2. Characteristic of phenotype in peripheral blood lymphocytes of patients with pulmonary tuberculosis is predominant CD4 positive cells in a corresponding decrease in the proportion of CD8 positive cells and is no elevation of $\gamma\delta$ TCR positive T cells.

Key word : Pulmonary tuberculosis, Lymphocyte marker, $\gamma\delta$ T cell receptor

キーワード : 肺結核, リンパ球マーカー, $\gamma\delta$ 型T細胞受容体

* From the Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College, S-1, W-16, Chuo-Ku, Sapporo 060 Japan.

緒言

肺結核症は *Macobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) を病原菌とし、その病変の成立およびその治癒過程において、主にT細胞とマクロファージが関与するIV型アレルギー反応が重要な役割を担っていることが知られている。また、最近T細胞受容体 (TCR) には $\alpha\beta$ 型および $\gamma\delta$ 型の2種類のヘテロ二量体が存在することが明らかとなり¹⁾、そのうちの $\gamma\delta$ 型は動物実験で *M. tuberculosis* や 65 kDa の熱ショックタンパク質に反応して増殖することが知られるようになった^{2)~6)}。そこで、われわれは活動性肺結核症における $\gamma\delta$ TCR の発現も含め、末梢血リンパ球表面抗原の解析を行ったので報告する。

研究対象および方法

1. 対象患者

肺結核症患者は北海道立北野病院に入院した96例であり、喀痰中より培養で結核菌が証明されている。年齢は16歳から69歳で、96例のうち16例は抗結核剤により以前に治療がなされていた症例であった。結核病学会病型分類に従って、初回治療例および再治療例別に病巣の性状をI型(広汎空洞型)、II型(非広汎空洞型)、III型(不安定非空洞型)に分け、病巣の拡がりを1, 2, 3に分類した (Table 1)。今回、検討した末梢血は、いずれも治療開始前に採取されたものである。

健常対照は呼吸器疾患の既往がなく、胸部X線像上異常所見を認めない43例であり、年齢は12歳から69歳である。

2. 単核球の分離

患者よりヘパリン加で20ml採血し、PBSで2から3倍に希釈後、Ficoll-Hypaque (ファルマシア社製) に重層し、400Gで30分間遠心後、中間層より単核球を採取し、その後、3回洗浄した。

3. リンパ球表面抗原の解析

一次抗体として、抗CD3抗体 (Leu 4)、抗CD4抗体 (Leu 3a)、抗CD8抗体 (Leu 2a)、抗CD19抗体

(B4) および抗CD16抗体 (Leu 11) を使用した。Leuシリーズの抗体はBecton Dickinson社より、B4はCoulter社よりそれぞれ購入した。

分離した単核球を 2×10^6 /mlに調整し、その0.1mlの細胞浮遊液に各種単クローン抗体を4℃で暗所にて30分間反応させ、その後、PBSで2回洗浄し、さらにFITC標識山羊抗マウスIgG抗体を二次抗体として4℃で暗所にて30分間反応させた後、PBSで2回洗浄し、最終的に1.0mlのPBSに浮遊した。また、T細胞上の $\gamma\delta$ TCRの発現を検討するためにFITC標識TCR δ 1抗体 (T cell science社製) およびPE標識Leu 4を同時に4℃で暗所にて30分間反応させた後、1.0mlに浮遊させ、2カラー分析を行った。

リンパ球表面抗原の解析はflowcytometry (EPI CS C, Coulter社製) を用いて、forward scatter およびside scatterによりリンパ球集団にgateを設定し、 1×10^4 細胞群の蛍光強度を計測し、陽性細胞のパーセントを算出した。また、CD3陽性でTCR δ 1陽性細胞を $\gamma\delta$ TCR陽性T細胞とし、リンパ球に対する比率で表した。各種単クローン抗体に対する陽性細胞比率は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。統計学的検討はStudent's t検定を使用し、0.05を有意水準とした。

成 績

活動性肺結核症と健常対照の末梢血リンパ球抗原の比較においては (Fig. 1)、CD3陽性細胞について、結核症は $67.0\pm 8.9\%$ で、健常者は $66.2\pm 6.8\%$ であり、2群間で有意差は認められなかった。CD4陽性細胞については結核症は $44.1\pm 9.2\%$ で、健常者は $41.2\pm 6.0\%$ であり、CD8陽性細胞について結核症は $25.3\pm 8.2\%$ で、健常者は $30.3\pm 6.2\%$ であり、結核症患者においてCD4陽性細胞が増加傾向にあり、CD8陽性細胞は有意に低下していた。CD19陽性細胞に関しては結核症は $13.7\pm 5.9\%$ であり、健常者は $14.2\pm 4.0\%$ であり、CD16陽性細胞について、結核症は $11.0\pm 5.2\%$ で、健常者は $11.0\pm 7.8\%$ であり、有意差は認められなかった。 $\gamma\delta$ TCR陽性細胞に関しては結核症は $2.3\pm 2.6\%$ で

Table 1 Profiles of Patients with Pulmonary Tuberculosis

Previous chemotherapy (-) Previous chemotherapy (+)		
Type I	1	1
II	47	7
III	32	8
Expansion 1	28	1
2	51	12
3	1	3
Total number	80	16

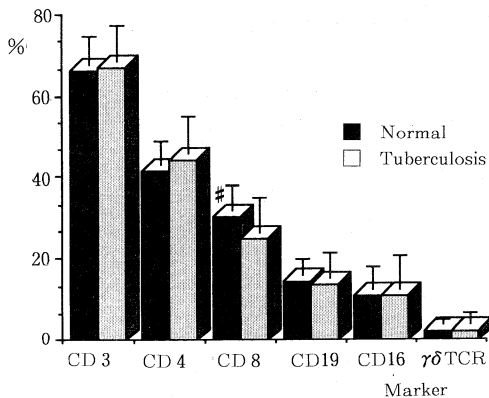


Fig. 1 Phenotypic Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes of Active Pulmonary Tuberculosis and Normal Controls. Bars Express Standard Deviation. # : $p < 0.05$

あり、健常者 ($2.2 \pm 1.3\%$) に比較し有意差は認められなかった。

経過の長さの違いによる影響を検討するために初回治療と既治療例別に末梢血リンパ球表面抗原の発現を検討した (Fig. 2)。CD3 陽性細胞に関して初回治療例では $67.3 \pm 8.5\%$ で、再治療例では $65.4 \pm 8.5\%$ であり、有意差を認めなかった。CD4 陽性細胞は初回治療例では $43.2 \pm 8.9\%$ で再治療例では $48.7 \pm 9.4\%$ であり、CD8 陽性細胞は初回治療例では $26.4 \pm 7.8\%$ で、再治療例では $21.6 \pm 9.4\%$ であった。再治療例では CD4 陽性細胞が初回治療例に比し有意に増加し、CD8 陽性細胞が有意に低下していた。CD19 陽性細胞に関しては初回治療例では $13.8 \pm 5.9\%$ で、再治療例では $13.6 \pm 6.0\%$ であり、CD16 陽性細胞は初回治療例では $11.0 \pm 8.2\%$ で、再治療例では $11.2 \pm 5.8\%$ であり、両群間に有意差はな

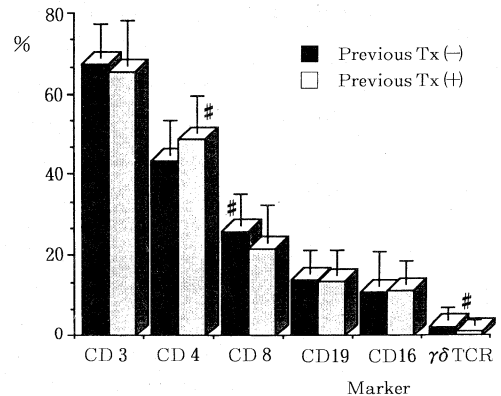


Fig. 2 Phenotypic Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes of Active Pulmonary Tuberculosis with or without Previous Chemotherapy. Bars Express Standard Deviation. # : $p < 0.05$

かった。γδ TCR の発現に関しては初回治療例では $2.5 \pm 2.8\%$ で再治療例では $1.1 \pm 1.1\%$ であり、再治療例で初回治療例に比較し有意に低下していた。

病巣の性状に関しては初回治療例および再治療例ともに I 型が 1 症例しかないため、II 型と III 型での末梢血リンパ球表面抗原の発現を比較検討した (Table 2)。その結果、初回治療例では II 型と III 型の間で表面抗原の発現には有意差は認められなかったが、再治療例では II 型の末梢血では III 型に比較し、CD4 陽性細胞が有意に増加し、CD8 陽性細胞が有意に低下していた。

病巣の拡がりに関しては、初回治療例では拡がり 3 が 1 例しかないため、拡がり 1 と拡がり 2 を比較検討し、再治療例では拡がり 1 が 1 例しかないため、拡がり 2 と拡がり 3 を比較検討した (Table 3)。その結果、初回治療例では有意差は認められず、再治療例では拡がり 3

Table 2 Comparison of Phenotypic Markers Regarding Type of Pulmonary Tuberculosis

Marker	Previous chemotherapy (-)		Previous chemotherapy (+)	
	Type II	Type III	Type II	Type III
CD3	67.2 ± 8.3	67.5 ± 8.1	66.2 ± 11.6	64.8 ± 11.2
CD4	43.5 ± 9.7	42.8 ± 7.5	53.9 ± 9.6*	44.6 ± 7.4
CD8	25.8 ± 9.0	26.5 ± 5.9	19.0 ± 9.2*	23.7 ± 9.6
CD19	13.6 ± 6.0	13.9 ± 6.0	11.7 ± 3.2	15.1 ± 7.3
CD16	12.4 ± 9.9	9.1 ± 4.4	10.8 ± 3.8	11.5 ± 7.1
γδ TCR	2.2 ± 2.9	3.0 ± 2.6	1.3 ± 1.4	1.0 ± 1.0

* $p < 0.05$ in comparison with the percentage value of different type of the same therapeutic condition

Table 3 Comparison of Phenotypic Markers Regarding Expansion of Pulmonary Tuberculosis

Marker	Previous chemotherapy (-)		Previous chemotherapy (+)	
	Expansion 1	Expansion 2	Expansion 2	Expansion 3
CD3	66.2± 9.1	67.9± 7.8	65.6±11.1	64.7±12.8
CD4	42.0± 8.2	43.8± 9.2	49.7± 9.7	44.4± 4.3
CD8	25.4± 5.8	26.4± 8.8	20.9± 9.3	24.8±10.8
CD19	14.3± 7.0	13.4± 5.3	12.2± 3.4	19.9±11.4*
CD16	11.1± 7.0	11.0± 8.9	11.5± 6.1	9.8± 4.2
γδ TCR	3.1± 2.8	2.3± 2.7	0.8± 0.7	1.3± 1.5

* p<0.05 in comparison with the percentage value of different expansion of the same therapeutic condition

の CD19 陽性細胞の比率が拡がり 2 に比較し、有意に高かった。

考 察

ヒト結核症は *M. tuberculosis* を病原菌とし、その病変の成立および治癒過程に、CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージが重要な役割を果たすことが知られている。その反映として肺結核症患者の末梢血においても CD4 陽性細胞が増加することが報告され⁷⁾、さらに CD16 陽性細胞も増加することが中田ら⁸⁾ により報告されている。われわれの検討した結果では、健常者に比較し、肺結核症では CD4 陽性細胞は増加傾向があり、CD8 陽性細胞は有意に低下しており、さらに、再治療例では初回治療例に比較し、CD4 陽性細胞の増加および CD8 陽性細胞の減少は著しい。このことは初回治療例に比較し、再治療例の場合には再増悪から症状が発現し発見されるまでの期間が長いこと、肺結核症の末梢血でのリンパ球表面抗原の発現の特徴である CD4 陽性細胞の増加および CD8 陽性細胞の低下が顕著になったものと考えられる。

また、初回治療例では肺結核症の病巣の性状および病巣の拡がりについての検討では表面抗原の発現に差は認められないが、再治療例で病巣の性状に関し、Ⅲ型に比較し、Ⅱ型の症例で CD4 陽性細胞優位であり、空洞を有する場合により CD4 陽性細胞が優位となると考えられる。

病巣の拡がりに関しても再治療例で CD19 陽性細胞が有意に増加しており、病巣の拡がり大きいほど B 細胞が末梢血中で増加するものと考えられる。

また、CD16 陽性細胞の発現に関しては今回の検討では加齢の影響を考慮し、69 歳以下を対象としたため、健常者との間で有意差は認められず、活動性肺結核症においては CD16 陽性細胞は変動しないものと考えられた。

TCR は T 細胞の抗原認識を担う構造であり、一般的

に抗原と主要組織適合抗原複合体遺伝子産物を同時に認識し、自己と変異細胞、ウイルス感染細胞、同種細胞などの非自己との鑑別に重要な役割を果たしている。TCR は CD3 分子と複合体を形成し、その活性化シグナルは CD3 分子を通じて T 細胞に伝えられる。TCR には少なくとも 2 つの型が知られており、 $\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型と呼称されている。末梢血中の T 細胞はほとんどが $\alpha\beta$ 型 (95 % 以上) であり、 $\gamma\delta$ 型は 5 % 以下である¹⁾。

最近、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞が *Mycobacterium* 属^{2) 3)}、Tetanus toxoid^{5) 9)} や熱ショックタンパク質^{4) 5)} 等を認識し、それらの抗原刺激で増殖するとの報告がなされ、Haregewoin ら¹⁰⁾ は BCG を接種されたことのある健常成人末梢血の T 細胞を PPD とともに培養すると $\gamma\delta$ 型 CD4 陰性 CD8 陰性細胞が 5 % から 10 % に増加することを見いだした。ヒト結核症においても $\gamma\delta$ 型 T 細胞が病変形成および結核の感染防御に関与していることが想定された。そこでわれわれは活動性肺結核症例で末梢リンパ球の $\gamma\delta$ TCR の発現を検討した。その結果、活動性肺結核症における末梢血リンパ球の $\gamma\delta$ TCR の発現は健常者と同程度であり、むしろ、再治療例では有意に低下していた。

中野ら¹¹⁾ はヒト肺結核症を対象とし免疫組織学的に検討し、増殖期の肉芽腫の類上皮細胞層の外層に $\gamma\delta$ TCR を有する細胞が増加していること、陳旧化病巣にはほとんど認めないことを報告している。肺結核症が発病した段階では肺病変局所では $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増生していると想定されるが、われわれの検討では末梢血には $\gamma\delta$ 型 T 細胞は増加しておらず、肺局所の変化を反映しないと考えられる。また、Janis ら²⁾ はマウスに *M. tuberculosis* を再感染させても $\gamma\delta$ 型 T 細胞は増加しないことを報告しており、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は $\alpha\beta$ 型 T 細胞より早期の感染防御に重要な役割を担っていると考えられている。また、結核症では CD4 陽性細胞が病変形成に重要な役割を果たし、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の Phenotype は CD4 陰性・CD8 陰性または CD4 陰性・CD8 陽性し

か知られていないこと、今回の検討で結核初回治療例に比較し再治療例がより低値を示したことを考え合わせると、ヒト肺結核においては $\gamma\delta$ 型T細胞が早期の感染防御のみに関連することを示し、発病し肺病変が形成される段階では、 $\gamma\delta$ 型T細胞は末梢血中では増加していないものと考えられる。

文 献

- 1) Brenner MB, Strominger JL, Krangel MS. The $\gamma\delta$ T cell receptor. Adv Immunol. 1988 ; 43 : 133.
- 2) Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, et al. Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1989 ; 244 : 713.
- 3) Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the $\gamma\delta$ T cell receptor. Nature. 1989 ; 340 : 239.
- 4) Born W, Hall L, Dallas A, et al. Recognition of a peptide antigen by heat shock-reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes. Science. 1990 ; 249 : 67.
- 5) Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today. 1990 ; 11 : 129.
- 6) O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, et al. Stimulation of a major subset of lymphocyte expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. Cell. 1989 ; 57 : 667.
- 7) 大久保喜雄, 中田真佐雄, 北沢邦彦, 他 : 結核性胸膜炎, 肺結核におけるリンパ球表面抗原の解析とリンパ球増殖反応, 信州医誌. 1986 ; 34 : 155.
- 8) 中田真佐雄 : 癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎における末梢血および胸水の免疫学的検討 : NK 細胞の表面抗原および機能的解析, 信州医誌. 1987 ; 35 : 309.
- 9) Kozbor D, Trinchieri G, Monos DS, et al. Human TCR- γ^+/δ^+ , CD8⁺ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. J Exp Med. 1989, 169 : 1847.
- 10) Haregewoin A, Soman G, Hom R, et al. Human $\gamma\delta^+$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. Nature. 1989 ; 340 : 309.
- 11) 中野裕康, 中田 光 : ヒト正常肺及び肺結核症における $\gamma\delta$ 型T細胞の分布とその phenotype について : 免疫組織学的検討. 日本免疫学会総会・学術集会記録. 1990 ; 20 : 126.