

第 69 回総会シンポジウム

II. 壊死性肉芽腫の成立機転とその機能をめぐって

座長 河 端 美 則 (結核研究所病理学研究科)
赤 川 清 子 (国立予防衛生研究所免疫部)

受付 平成 6 年 7 月 28 日

The 69th Annual Meeting Symposium

II. MECHANISM OF NECROTIZING GRANULOMA FORMATION
AND ITS FUNCTION

Chairmen : Yoshinori KAWABATA *
Kiyoko AKAGAWA **

Presenters :

1. Differentiation of human macrophages and cytokines : Kiyoko AKAGAWA (Department of Immunology, National Institute of Health)
2. Human Langerhans cell granulomatosis : Yuu FUKUDA (Department of First Pathology, Nippon Medical School)
3. Epithelioid cell granuloma formation : Yasutaka INA (Department of Second Internal Medicine, School of Medicine, Nagoya City University) et al.
4. Necrotizing granuloma formation in tuberculosis : Shouichi SAKAMOTO (Division of Pathology, the Research Institute of Tuberculosis)
5. Leprosy—review and pathogenesis of leprous neuritis : Masamichi GOTO (Division of Laboratory Medicine, National Leprosarium Hoshizuka-Keiaien)
6. Research of granuloma formation in parasitic disease—Mechanism of *Schistosoma mansoni* Egg—induced granuloma formation : Tamotu KANAZAWA (Department of Parasitology, National Institute of Health)

(Received 28 July 1994)

Histological features of tuberculosis are caseation necrosis and epithelioid cell granuloma formation. Both phenomena are interpreted as expression of cellular immunity. Caseation necrosis is thought to be immunopathology and epithelioid cell granuloma formation is considered to be expression of protective immunity. Recently roles of cytokines for granuloma formation are gradually elucidated.

In this symposium, mechanisms and functions of necrosis and granuloma formation

* From the Division of pathology, the Research Institute of Tuberculosis, Kiyose, Tokyo 204 Japan.

** From the Department of immunology, National Institute of Health, Shinjuku, Tokyo 162 Japan.

were discussed from various points of views.

Dr. Akagawa reported differentiation of two types of phenotypically different macrophages from human monocytes by GM (granulocyte-macrophage)-CSF or M (macrophage)-CSF. Interestingly such a basic differentiation induced by CSF was affected by IL-4 (interleukin-4). Langerhans-like dendritic cells were generated by cooperation of GM-CSF and IL-4, and multinucleated cells were generated by cooperation of IL-4 and M-CSF.

Dr. Fukuda reported human Langerhans cell granulomatosis (LCG) from the pathological and immunohistochemical standpoints. In situ proliferation of LCs in the LCG was demonstrated by immunohistochemistry using antibody to PCNA (proliferating cell nuclear antigen) which is used to detect proliferating cells. In the course of granuloma formation, damage and disruption of lung structure such as alveolar basement membrane and elastic tissue framework, and reactive intraluminal fibrosis was observed. Mechanism of cystic dilation was also reported. Cytokines might play important roles in these events.

Dr. Ina demonstrated experimental epithelioid cell granuloma formation. Extract (granuloma inducing factor, GIF) from *Schistosoma mansoni* Egg-induced granuloma, TNF- α , or IL-1 β were coated, individually on the surface of beads, then these beads were inoculated to rat's skins or cultured with rat's monocytes. Four weeks later, epithelioid cell granuloma was demonstrated histologically and electronmicroscopically around beads *in vitro* and *in vivo*. GIF-induced granuloma was more organized than cytokine-induced ones. *In vitro* using human monocytes, activated macrophages accumulated around beads of which cytokines or GIF were coated. It was suspected that many cytokines or other factors are needed to make epithelioid cell granuloma.

Dr. Sakamoto showed the presence of acid fast bacilli and various inflammatory cells including lymphocytes and macrophages in the tuberculous caseous necrosis after exudative reaction (E-necrosis) by immunohistochemistry. But no acid fast bacilli or inflammatory cells were found in the caseous necrosis after productive reaction (P-necrosis). TNF- α (tumor necrosis factor- α) and IL-4 were stained in the E-necrosis and IL-4 and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) were positively stained in the cytoplasm of epithelioid cells by immunohistochemistry. It was suspected that many cells and cytokines were involved in epithelioid cell granuloma formation and caseous necrosis formation.

Dr. Goto showed risk of disease, entry of bacilli, reason of neurotropism, and clinico-pathological spectrum of leprosy. Tuberculoid leprosy and lepromatous leprosy are two opposite poles in the spectrum of leprosy. In tuberculoid leprosy, epithelioid cell granulomas surrounded by many lymphocytes were formed in the lesion, but in lepromatous one just accumulation of foamy cells in which large numbers of bacilli were seen. From the standpoint of protective immunity complete destruction of bacilli without granuloma formation is the best way and tuberculoid one has the superior pattern than lepromatous one. If drug therapy begins early, lepromatous one is easy to cure and there was no structural destruction.

Dr. Kanazawa reported the results of experimental *Schistosoma mansoni* egg induced granuloma in mouse. Two different strains of mice (C57BL/6, C3HeB/Fe) were infected with *Schistosoma mansoni* egg followed by injection of anti-IL-2 antibody or anti-IL-4 antibody four weeks later (2/week) and the size of hepatic granulomas were analyzed 7 weeks after infection. When either antibody was introduced, size of granuloma was found to decrease. These results demonstrated that both Th-1 (IL-2) and Th-2 (IL-4) were deeply

involved in granuloma formation. But as for protective immunity to parasitic infection, another factors such as activation of macrophages also have to be considered.

According to these reports and later discussion, it became clear that many cytokines and lymphocytes (including Th1 and Th2) were involved in granuloma formation. But precise role of each cytokines and cells have to be investigated further. In tuberculosis and leprosy, epithelioid cell granuloma formation are expressions of protective immunity, but in schistosomiasis, granuloma formation is not directly related to protective immunity.

Key words : Epithelioid cell granuloma, Necrotizing granuloma, Langerhans cell granulomatosis, Tuberculosis, Leprosy, Schistosomiasis

キーワード: 類上皮細胞肉芽腫, 壊死性肉芽腫, ランゲルハンス細胞肉芽腫症, 結核症, レブラ, 住血吸虫症

シンポジスト

1. ヒトマクロファージの分化とサイトカイン
赤川 清子 (国立予防衛生研究所免疫部)
2. 肺ランゲルハンス細胞肉芽腫症
福田 悠 (日本医科大学第1病理)
3. 類上皮細胞
伊奈 康孝 (名古屋市立大学第2内科), 他
4. 結核症
坂本 祥一 (結核予防会結核研究所病理科)
5. らい
後藤 正道 (国立療養所星塚敬愛園研究検査科)
6. 寄生虫学領域での肉芽腫の研究—マンソン住血吸虫虫卵肉芽腫の成立機転—
金沢 保 (国立予防衛生研究所寄生動物部)

1. ヒトマクロファージの分化とサイトカイン

国立予防衛生研究所免疫部 赤川 清子

はじめに

マクロファージ (Mφ) は, 肉芽腫を構成する主要な細胞であるが, 病気の種類および時期などにより Mφ とは形態的に異なる特徴を有した, 類上皮細胞, 巨細胞および多核巨細胞などと呼ばれる細胞に分化したものも出現してくる。しかし, 肉芽腫形成および Mφ の上記細胞への分化機構に関しては不明な点が多い。一般に各組織 Mφ は, 血中単球に由来すると考えられていることより, ヒト血中単球を用いその Mφ や多核巨細胞への分化機構を解明することは, 肉芽腫形成における Mφ の分機構を解明する上で有用であろう。

先にわれわれは, M-CSF や GM-CSF などの CSF

がマウス肺胞 Mφ の増殖を促すのみならず, それぞれ性質の異なる2種類の Mφ へと分化させることを報告し, Mφ の多様性由来の原因の一つは, 少なくとも Mφ 形成に関与する CSF の違いであることを示唆してきた¹⁾²⁾。ヒト単球を用い, その Mφ への分化および増殖に対する M-CSF および GM-CSF の影響を検討し, ヒト単球の場合も Mφ への分化, 増殖はこれらの CSF により誘導されること, その場合, 形態, 機能, 表面抗原の発現などで性質の異なる2種類の Mφ が異なる CSF で誘導されること, また, IL-4 や IFN-γ が CSF によるヒト単球の増殖, 分化を modulate することを見いだしたので報告する。

ヒト単球の増殖および Mφ への 分化に対する CSF の影響

一般に組織 Mφ は血中単球が組織に入り、そこで成熟、分化したものと考えられている。われわれは、ヒト単球を GM-CSF や M-CSF の存在下に培養すると、細胞数の増加とともに細胞の大きさ、プラスチック面への粘着性が増し、形態的にも明らかに Mφ への分化が誘導されることを見つけた³⁾。培地のみでは、増殖も Mφ への分化も認められないことより、骨髓前駆細胞からの Mφ への分化に関わるコロニー刺激因子が、血中単球から Mφ への分化にも必須であることが知られた。

ヒト単球より GM-CSF と M-CSF で誘導された Mφ は、形態のみならず細胞表面抗原の発現においても異なる (図 1)。CD14 は、LPS が血中の LPS 結合蛋白 LBP を介して結合するレセプターであり⁴⁾、また、活性化された血管内皮に単球が接着するとき使用される分子でもある⁵⁾。GM-CSF で誘導した Mφ は、CD

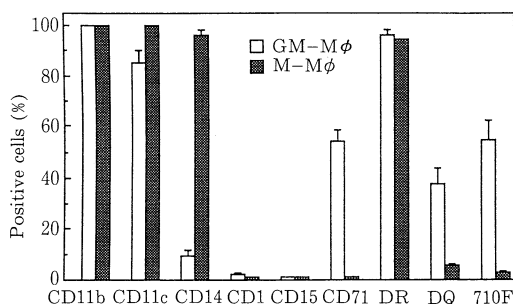


図 1 ヒト単球由来マクロファージの細胞表面抗原の発現

14 の発現が弱いこと、CD71, 710F など発現していること、また形態からヒト肺胞 Mφ に似ている。

この点に関し、先にわれわれは、ヒト肺胞 Mφ の増殖が GM-CSF で誘導されること、GM-CSF 刺激により肺胞 Mφ の形態、細胞表面マーカーの発現は変化しないことを示した⁶⁾。これらの結果は、マウス肺胞 Mφ の場合同様ヒト肺胞 Mφ の形質発現に GM-CSF が重要な役割を果たすことを示している。

CSF で誘導したヒト単球由来 Mφ の機能について

M-CSF および GM-CSF で誘導した Mφ は、表に示すように機能においても異なることが知られた。GM-CSF 誘導 Mφ の EA 貪食率が低いのは Fcγ レセプターに EA が結合したあとの Mφ 内への取り込みが阻害されたためと考えられる。Fcγ レセプターは、チロシンキナーゼの一つである fgr が介合し、これによるレセプターのリン酸化が貪食機能の発現に重要なことが報告されている⁷⁾。それゆえ GM-CSF 誘導 Mφ の EA 貪食能の低い理由は、チロシンキナーゼの介合やその活性化における欠陥に関連する可能性が高い。また、Mφ の殺菌作用や細胞障害活性のエフェクター分子の一つである H₂O₂ の産生は、M-CSF で誘導した Mφ の方が高いことが知られた。

このように、M-CSF と GM-CSF により誘導された Mφ は、機能においてもその性質を異にすることが明らかになった。

ヒト単球よりの樹状細胞の分化

ヒト単球を GM-CSF の存在下、種々の濃度の IL-4 を加え培養すると、IL-4 の濃度依存的に Mφ の分化が阻害され非粘着細胞が回収された。この細胞は、貪食能を有せず、非特異的エステラーゼ活性を示さず、枝状ま

表 ヒト単球由来マクロファージの機能

	GM-CSF-Mφ	M-CSF-Mφ
Phagocytosis (%+S.D.)		
latex	100	100
EA	34.2 ± 2.3	94.7 ± 3.1
acetylated LDL	90.0 ± 3.5	100
Rosette formation (%)		
EA	100	100
H ₂ O ₂ production (nM/10 ⁵ cells)		
PMA	0.9 ± 0.08	0.3 ± 0.01
zymosan	0.1 ± 0.02	0.8 ± 0.06
<i>S. aureus</i>	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.04

たはペール状の細胞突起を有したいわゆる樹状細胞 (DC) の形態をしている。この細胞は、ランゲルハンス細胞のマーカーである CD1 抗原を強く発現し、免疫応答に必要な MHC クラス II 抗原をはじめ、ICAM-1 や LFA-1, B7, B70 などの costimulatory 分子を発現し、DC の機能的特徴の同系および異系リンパ球混合培養 (MLR) における T 細胞刺激活性を有し、スーパー抗原 SEB の提示活性も強い。

最近、マウスおよびヒト末梢血や骨髓細胞の非粘着性未熟細胞より GM-CSF 単独および GM-CSF と TNF α でそれぞれ DC が誘導されることが示された⁸⁾⁻¹¹⁾。われわれの結果と併せ、DC は、異なる刺激により分化段階の異なる種々の M ϕ 系列の細胞から分化誘導される可能性が示唆される。

ヒト単球よりの多核巨細胞の分化

ヒト単球を M-CSF の存在下種々の濃度の IL-4 を

くわえ 14 日間培養すると、2 個以上の核よりなる多核巨細胞 (MGC) が形成されることが知られた (図 2)。M-CSF 単独または IL-4 単独の場合には、いずれの濃度でも MGC の形成は認められなかった。

一方、IL-4 以外のサイトカインの MGC 形成能を検討したところ、IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α は、いずれも単独および M-CSF 存在下でも MGC の形成を誘導しなかった (図 3)。また、これらのサイトカインの IL-4 および M-CSF による MGC 形成への影響を検討したところ、IFN- γ , GM-CSF, TNF α には抑制作用が認められたが、IL-1, IL-6 では若干の増強作用が見られた。

また M-CSF と IL-4 による MGC 形成は、抗 IL-1 α 抗体、抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-6 抗体により抑制されたことより、IL-1 と IL-6 が重要な役割を果たしていることが知られた。しかし、M-CSF と IL-1 あるいは IL-6、または両者を共存させても MGC の形成は認め

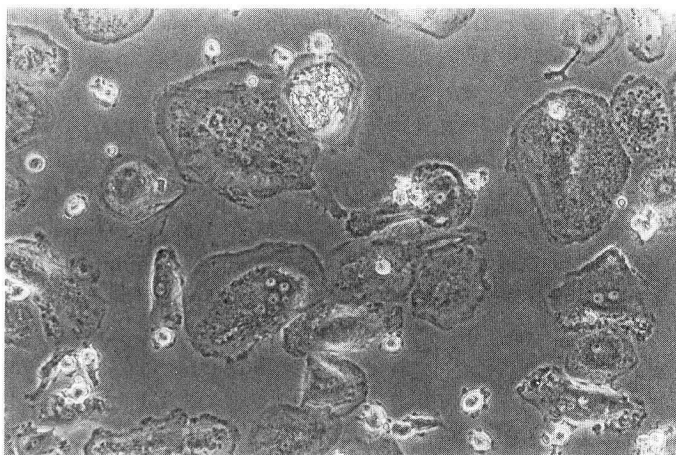


図 2 ヒト単球より M-CSF と IL-4 により誘導された多核巨細胞

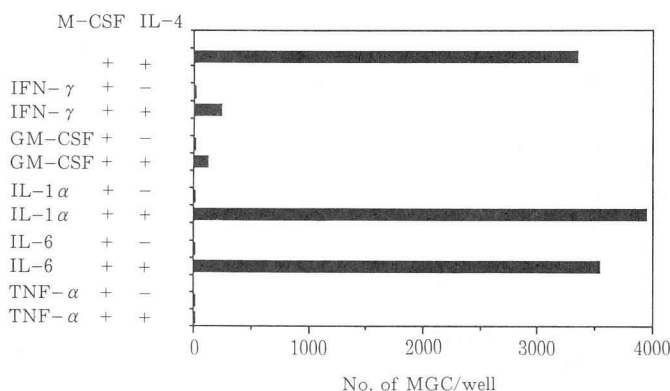


図 3 ヒト単球よりの多核巨細胞形成に対する種々のサイトカインの影響

られないことより、これらのサイトカイン以外の他の因子が関与する可能性が示唆された。この点については、現在検討中である。

多核巨細胞は、種々の感染、異物反応、癌、サルコイドーシスそしてリュウマチなどの場において見られる。また、骨の生理的吸収や形成に重要な役割を果たしている破骨細胞も MGC である。これらの MGC は、単核の単球、マクロファージが融合して形成されると考えられている。

今回のわれわれの実験結果より、MGC がヒト単球より確かに形成されることが明らかになった。われわれの実験から、MGC の形成には M-CSF と IL-4 が必須ことが明らかにされ、M-CSF と同様マクロファージ形成を促す GM-CSF にはそのような作用がないことが知られた。M-CSF が MGC 形成に重要な役割を果たすことは、op/op マウスの破骨細胞の形成実験からも明らかである。

M-CSF と IL-4 によりヒト単球より形成された MGC は Mφ と異なり CD14, C3 レセプター, Fc レセプター、非特異的エステラーゼ活性が弱いほとんど発現していないが、酒石酸抵抗性の酸フォスファターゼ活性が陽性であった。酒石酸抵抗性の酸フォスファターゼ活性は破骨細胞のマーカーであり、また、破骨細胞はマクロファージと異なり CD14, C3 レセプター, Fc レセプター、非特異的エステラーゼ活性が陰性なことより、ヒト単球より M-CSF と IL-4 により誘導された MGC が破骨細胞の機能を有しているか否か、今後検討をする予定である。

ま と め

ヒト単球を M-CSF または GM-CSF 存在下に培

養すると性質の異なる 2 種類の Mφ に分化すること、また、IL-4 は CSF による単球の分化、増殖を modulate し、GM-CSF と共同して、DC への分化を、また M-CSF と共同して MGC への分化を誘導することが知られた。

文 献

- 1) Akagawa KS, Kamosita K and Tokunaga T : J Immunol. 141, 3383 (1988).
- 2) Akagawa KS, Maruyama Y, Takano M and Tokunaga T : Microbiol. Immunol., 25, 1215 (1981)
- 3) 赤川清子 : 造血因子, 3, 365 (1992)
- 4) Ulevitch RJ : Adv Immunol. 53, 267 (1993)
- 5) Beekhuizen H, Blokland I, Corsel-van Tilburg AJ, et al. : J Immunol. 147, 3761 (1991)
- 6) Nakata K, Akagawa KS, Fukayama M, et al. : J Immunol. 147, 1266 (1991)
- 7) Hamada F, Aoki M, Akiyama T, et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6305 (1993)
- 8) Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, et al. : Nature 360, 258 (1993)
- 9) Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. : J Exp Med. 176, 1693 (1992)
- 10) Inaba K, Steinman RM, Pack MW, et al. : J Exp Med. 175, 1157 (1992)
- 11) Reid CDL, Stackpool A, Meager A, et al. : J Immunol. 149, 2681 (1993)

2. 肺ランゲルハンス細胞肉芽腫症

日本医科大学第1病理 福田 悠

はじめに

ランゲルハンス細胞肉芽腫症 (LCG) は、ランゲルハンス細胞 (LC) と好酸球の浸潤を主とする比較的良好性の肉芽腫性疾患である。以前は、“ヒスチオサイトーシス・X (HX)” もしくは“好酸球性肉芽腫症”などと呼ばれてきたが、ランゲルハンス細胞の重要性が認識されるようになり、LCG が一般的となりつつある¹⁾²⁾。肺 LCG は、多発性ではあるが成人例では肺以外に病変をつくることはまれである。肺 LCG では、肉芽腫形成

部を中心に線維性病変、気腫性病変が形成され、進行したものでは蜂窩肺を来す。ここでは、肺 LCG の病理について述べるが、特に不可逆的な肺胞構造の改築機序について、われわれのデータを中心に考察する³⁾。

材料および方法

開胸肺生検 (フランス INSERM, Unit 82 の Dr. Basset および結核研究所の河端先生のご好意による)

により得られた肺 LCG 組織である。光顕的一般染色および免疫組織化学的に以下の抗原に対する抗体を用いて検索した。I・III・IV・VI型コラーゲン、フィブロネクチン (Fn), エラスチン, LC のマーカーである CD1a (OKT6)・S100 蛋白, マクロファージのマーカーである CD68・リゾチーム, 平滑筋のマーカーである α 平滑筋アクチン (α SMA), 造血細胞の分化・炎症に重要なサイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF), 腫瘍壊死因子 α (TNF- α), インターロイキン 1 α (IL-1 α), 細胞外基質を破壊するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1, -2, -9, そのインヒビターである TIMP-2, セリンプロテアーゼのインヒビターである α 1-アンチトリプシン (α 1AT), 増殖細胞のマーカーである PCNA に対する抗体である。MMP, TIMP に対する抗体は富士薬品工業より供与を受けた。また, 透過電顕による観察を行った。

結果および考察

(1) 肺 LCG における線維化病変

肺 LCG には, 新旧の肉芽腫病変が同一切片上に認められることが多い。新しい肉芽腫部では基底膜は断裂し, マクロファージ, 好酸球, PCNA 陽性すなわち局所で増生する LC が, 肺胞道, 肺胞壁, 肺胞腔内に認められる (図 1)。肉芽腫の辺縁部に特に目立つが, α SMA 陽性の筋線維芽細胞が肺胞腔内に入り込み, Fn, I, III, IV, VI型コラーゲンの沈着による肺胞腔内線維化を形成する。時間のたった肉芽腫部には, LC などの細胞成分

は少なく, 線維化をみる。線維化に埋没した上皮基底膜は消失しており, 新しい肉芽腫部に比較して III型コラーゲンの増加が特徴である。このように LCG にともなう線維化は肺胞腔内に形成されるのである。

特発性肺線維症⁴⁾をはじめとする肺線維症, プレオマイシシ⁵⁾, パラコート⁶⁾などの実験的肺線維症においても, 線維化の場合は肺胞腔内であることが明らかにされている。肺胞腔内線維化形成には, 肺胞上皮細胞障害・上皮基底膜の断裂が必要で, 基底膜の断裂部位から間質細胞が LC とともに肺胞腔内に入り込み, 局所で増殖, 細胞外基質を産生し肺胞腔内線維化が完成する (図 2)。

(2) 肺 LCG における拡張性病変

肉芽腫辺縁には, 肺気腫様の拡張性病変が目立ち, 一部では肉芽腫内に嚢胞様病変が認められる。抗エラスチン抗体による免疫組織化学および電顕的検索により, 拡張部周囲の弾性線維には障害像・断裂像が認められる (図 3), 肺気腫^{7,8)}, ブラ・ブレブ⁹⁾, 過誤腫性肺脈管筋腫症¹⁰⁾の拡張病変部の壁にも同様の弾性線維の障害像が認められる。しかし, LCG 以外のこれら拡張性病変には, エラスチンの異常集簇したエラストーシスが認められ, α 1AT が異常弾性線維に陽性である⁸⁾⁻¹⁰⁾。これらの病態で α 1AT が異常弾性線維に陽性である理由は, 局所でエラスターゼ・ α 1AT 複合体を形成しているためと考えられる⁸⁾⁻¹⁰⁾。すなわち, エラスターゼ・ α 1AT のアンバランスにより弾性線維が障害され, 拡張性病変を形成したものと考えられる⁸⁾⁻¹¹⁾。

一方 LCG では, 局所にエラストーシスもみられず,

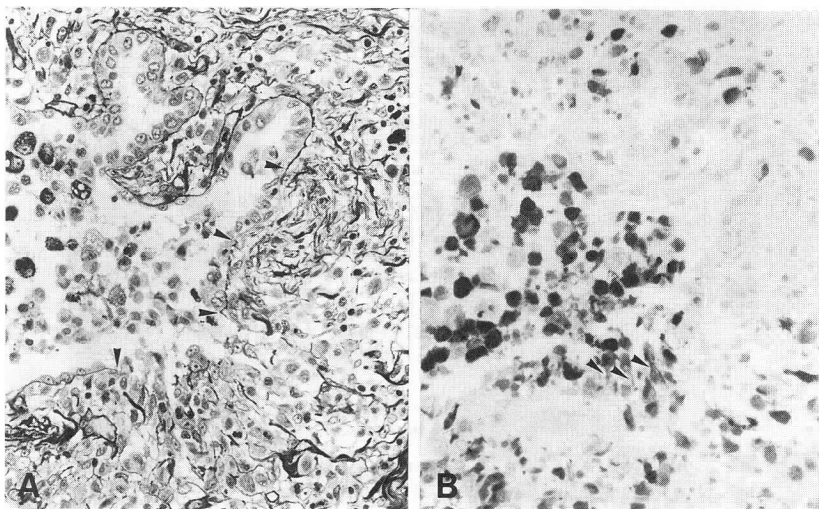


図 1 肺 LCG の肉芽腫部 (A) とその連切部 (B)³⁾

A : PAM 陽性の上皮基底膜は, 断裂 (矢頭) している。B : S100 蛋白陽性のランゲルハンス細胞が, 腔内・肺胞壁に認められ, 矢頭の部位では, 上皮細胞間を通過している。(x175)

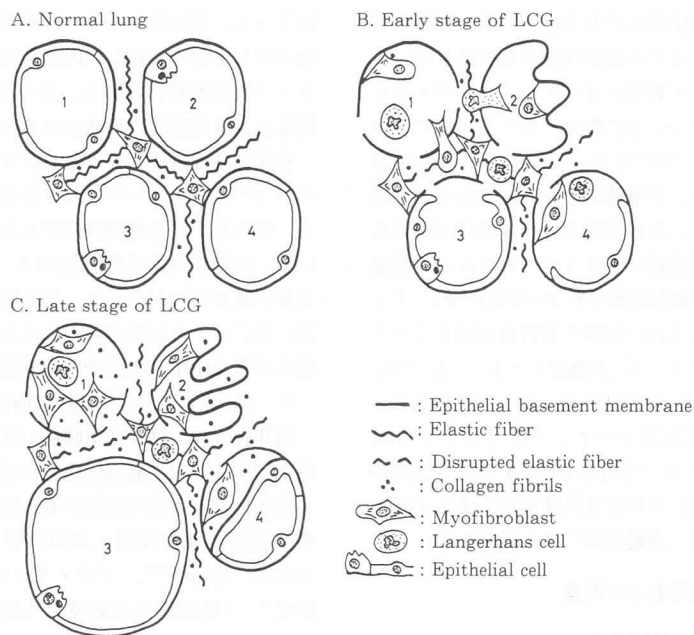


図2 肺 LCG における肺胞構造改築³⁾

A : 正常肺。B : 早期病変で、肺胞 1, 2 では障害が高度で、肺胞 3, 4 では軽度である。肺胞 1, 2, 4 ではランゲルハンス細胞とともに線維芽細胞が肺胞腔内に侵入している。C : 後期では、肺胞 1, 2, 4 では種々の程度の肺胞腔内線維化を示す。肺胞 3 では、壁の弾性線維障害を伴い拡張している。

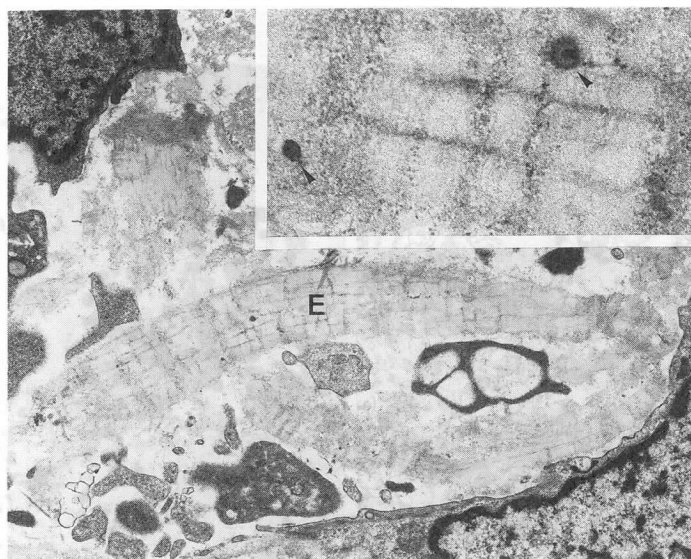


図3 肺 LCG の電顕像³⁾

肉芽腫内の弾性線維 (E) は断裂を示す。(x 10,000) 右上はその拡大で、石灰沈着 (矢頭) を示す。(x 70,000)

また $\alpha 1$ ATの沈着も認められない。LCGでは、肺気腫などとは異なる肺胞拡張機序が存在するものと考えられる。これについては、後程また触れるが、いずれにしても肉芽腫形成にともない、一方で線維化、一方で間質の細胞外基質の破壊により拡張性病変が起こるものと考えられる(図2)。

(3) 肺LCGにおけるサイトカインと肺胞構造の改築
新しい肉芽腫辺縁の集簇マクロファージおよび再生上皮にGM-CSF, TNF- α , IL-1 α , MMP-1, TIMP-2を認める。肉芽腫内のLCに混在したマクロファージには、これらサイトカインは陰性である。また線維化の進んだ肉芽腫部では、サイトカインの反応は全体に弱い。新しい病変の肉芽腫中央部はほぼ陰性であるので、これらのサイトカインを介した病態が内部では進行していないことが示唆される。辺縁では線維化が強くみられることと関係ある可能性がある。

肉芽腫内のマクロファージにサイトカインが陰性であることの意味は不明である。マクロファージの前駆細胞にGM-CSFなどのサイトカインが働いてLCの分化が起こることが*in vitro*の研究から明らかにされている¹²⁾¹³⁾。肉芽腫内のマクロファージと考えたものが、実はマクロファージのマーカーが陽性ではあるが、すでに性格が変わった細胞を見ているのか、またはサイトカインを放出しきったマクロファージの姿を見ているのか、興味ある点である。

LCは以上のサイトカイン・MMPを持たないが、MMP9は肉芽腫周囲の上皮細胞、内皮細胞、マクロファージに軽度陽性である他に、LCに強い反応を認める。MMP9は、IV型コラーゲンの他にエラスチンを基質にすることが知られており、肺LCGにおける基底膜障害・弾性線維障害の原因になっている可能性がある。

おわりに

LCGの原因はいまだ不明であるが、何らかの未知の原因によるサイトカインの活性化、それによるLCの病的な肉芽腫性増生がLCGの本態である可能性がある。LCGにおける肺胞構造の改築、すなわち線維化病変・細胞外基質の破壊による拡張性病変形成にもこれらサイトカインが深く関与しているものと考えられる。

文 献

- 1) Groopman JE : Langerhans cell (eosinophilic) granulomatosis. In Cecil Textbook of Medicine, 19th ed. (edited by Wyngaarden, J. B. et al.), 1992, p963-965.
- 2) Wolff K : Langerhans cell, Curr Prob Dermatol. 1972 ; 4 : 79-145.
- 3) Fukuda Y, Basset F, Soler P, et al. : Intraluminal fibrosis and elastic fiber degradation lead to lung remodeling in pulmonary Langerhans cell granulomatosis (histiocytosis X). Am J Pathol. 1990 ; 137 : 415-424.
- 4) Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, et al. : Significance of early intraalveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsies from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Human Pathol, in press.
- 5) Kawamoto M, Fukuda Y : Cell proliferation during the process of bleomycin-induced lung fibrosis in rats. Acta Pathol Jpn. 1990 ; 40 : 227-238.
- 6) Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenberger CI, et al. : Patterns of pulmonary structural remodeling following experimental paraquat toxicity : The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. Am J Pathol. 1985 ; 118 : 452-475.
- 7) Fukuda Y, Masuda Y, Ishizaki M, et al. : Morphogenesis of abnormal elastic fibers in panacinar and centriacinar emphysema. Human Pathol. 1989 ; 20 : 652-659.
- 8) Fukuda Y, Ishizaki M, Masugi Y : Distribution of elastin and alpha-1 antitrypsin in emphysematous lungs. Connective Tissue (Tokyo). 1990 ; 21 : 27-28.
- 9) Haraguchi S, Fukuda Y : Histogenesis of abnormal elastic fibers in blebs and bullae of patients with spontaneous pneumothorax : Ultrastructural and immunohistochemical studies. Acta Pathol Jpn. 1993 ; 43 : 709-722.
- 10) Fukuda Y, Kawamoto M, Yamamoto A, et al. : Role of elastic fiber degradation in emphysema-like lesions of pulmonary lymphangiomyomatosis. Human Pathol. 1990 ; 21 : 1252-1261.
- 11) Gadek JE, Hunninghake GW, Fells GA, et al. : Evaluation of the protease-antiprotease theory of human destructive lung disease. Bull Eur Physiopathol Res. 1980 ; 16 : 27-40.
- 12) Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, et al. : GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.

Nature. 1992 ; 360 : 258-261.

1992 ; 3 : 365-371.

13) 赤川清子: ヒト単球の分化と造血因子. 造血因子.

3. 類上皮細胞

名古屋市立大学第2内科

伊奈康孝・高田勝利

伊藤伸介・佐藤滋樹

杉浦芳樹・河口治彦

長谷川由美

山本正彦

名古屋簡易保健総合検診センター

University of California, San Francisco

WL Epstein, K Fukuyama

はじめに

肉芽腫とは、類上皮細胞を含む単核細胞の集簇が organize された状態と定義されている¹⁾。したがって、ここで広く肉芽腫形成に関わる因子について検討する。肉芽腫形成はヒトにおいてはサルコイドーシス、結核症、ベリリウム症などにおいてみられるが、その形成過程の詳細は依然不明である。最近、各種サイトカインの肉芽腫形成への関与が示唆されている²⁾。リンホカインでは Th1 リンパ球由来の IL-2, IFN- γ , Th2 リンパ球由来の IL-4, IL-5 が注目され、モノカインでは IL-1 β , TNF α などの肉芽腫形成への関与が示唆されている。

ところでわれわれは、*Shistosoma mansoni* 皮下接種によりマウス (C57BL/6) 肝に形成された肉芽腫を別のマウスに皮下接種すると接種部位に肉芽腫が形成されることから、肉芽腫内に肉芽腫形成誘導因子 (gra-

nuloma initiation factor, GIF) の存在することを報告し、この因子が MW20kD 前後であることを確認している³⁾。

今回われわれは、マウスにおいて、1) 各種サイトカイン (特にモノカイン) の *in vivo* での肉芽腫形成能の検討 (特に GIF との差異について)、2) *in vitro* の系を用い各種サイトカインおよび GIF の肉芽腫形成能を比較検討した。さらに、ヒト末梢単核細胞、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中細胞を用いて *in vitro* の系で各種サイトカインの肉芽腫形成能を検討した。

方 法

C57BL/6 マウスに *Schistosoma mansoni* を皮下接種し、肝に肉芽腫を作製した。この肉芽腫を取り出し、その抽出液を超遠心後、上清を Sephacryl S300 カラム

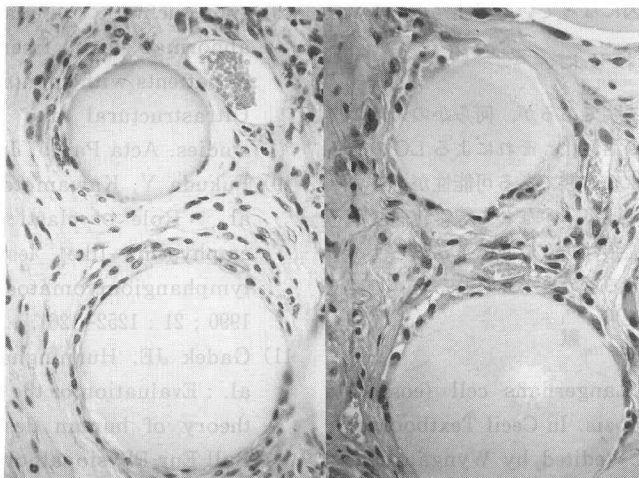


図1 マウスにおける *in vivo* 肉芽腫形成
GIF (左) および IL-1 β (右) 付着ビーズ (マウス皮下に接種5週後の LM 像)

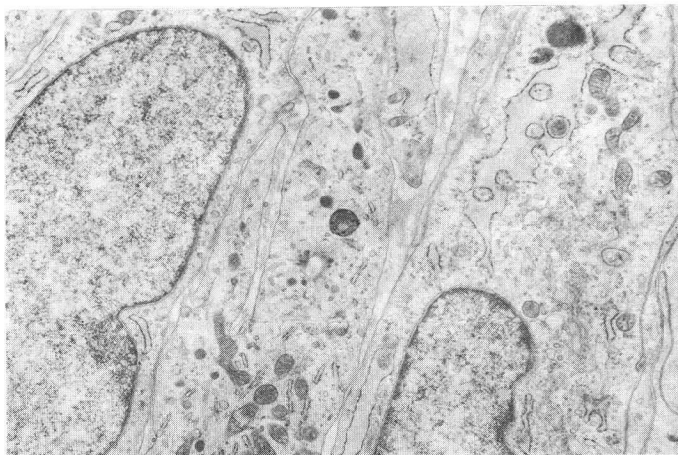


図2 マウスにおける *in vitro* 肉芽腫形成
GIF 付着ビーズに集簇した細胞 (培養5週目の EM 像)

にかけ、得られた MW 約 20 kD 以下の fraction を GIF として用いた。recombinant (r) ヒト IL-1 β 1 $\times 10^4$ U, r マウス TNF α 10 ng および GIF 100 μ g をそれぞれアガロースビーズ 5 $\times 10^4$ 個/ml とともに 4°C, 16 時間インキュベートすることにより IL-1 β , TNF α および GIF 付着ビーズを作製した。この方法により用いたサイトカインおよび GIF の約 50 % がビーズに付着した。

作製したビーズをマウス (C57BL/6) 皮下に接種し、5 週後に組織を採取し光顕的に観察して *in vivo* での肉芽腫形成能を検討した。同様に、これらのビーズ 500 個をそれぞれチオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージ 1 $\times 10^6$ 個とともに 24 穴プレートに注入し、5 % CO₂ 下 5 週間培養した。コントロールとして非付着ビーズを用いた。*in vitro* での肉芽腫形成能の判定は、倒立顕微鏡による細胞ビーズ間反応の経時的観察に加えて、培養5週目にプレートを *in situ* で固定し、光顕および電子顕微鏡にて観察することにより行った。

細胞ビーズ間の反応は、1~4 の 4 つのクラスに分類し検討した。すなわち、クラス 1: ビーズに細胞の付着なし、クラス 2: ビーズに 20 個以下の細胞が付着、クラス 3: ビーズに 20 個以上の細胞が付着するがビーズ全面は覆わない、クラス 4: ビーズ全面に 1 層以上の細胞が付着する、に分け、それぞれの培養系について 100 個のビーズと細胞間の反応を観察し、肉芽腫形成能を評価した。

次に、ヒトの細胞を用いて *in vitro* で肉芽腫形成能を検討した。r ヒト IL-1 β , r ヒト TNF α , MDP (muramyl dipeptide) をマウスの系と同様の方法でア

表 ACE Activity in Experimental Granulomas

Beads coupled to	n	ACE (mU/mg protein)	
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
none	5	12.92 $\pm$ 1.92 *	undetectable
GIF	5	57.26 $\pm$ 7.33	undetectable
IL-1 β	4	46.81 $\pm$ 7.07	undetectable
TNF α	4	42.53 $\pm$ 6.86	undetectable

n : number of mice

* mean $\pm$ S.D.

ガロースビーズに付着させ、それぞれをヒト末梢単核細胞または BALF 細胞とともに培養し、肉芽腫形成能について検討した。用いた細胞は、血痰を主訴に来院し、理学的所見、胸部 X 線所見および気管支鏡検査等より異常なしと判定された非喫煙者より型通りの方法で採取した。

結 果

マウスの系では、*in vivo* で IL-1 β , TNF α 付着ビーズのまわりには GIF 付着ビーズと同様、類上皮細胞様形態を示す細胞の集簇を認めた。GIF 付着ビーズのまわりには organize された 3-5 層の細胞集団を認めたが、IL-1 β , TNF α では細胞間の結合はルーズであった (図 1)。

in vitro の系では IL-1 β , TNF α , GIF 付着ビーズと細胞の反応は培養 3 週目でピークとなり以後漸減した。

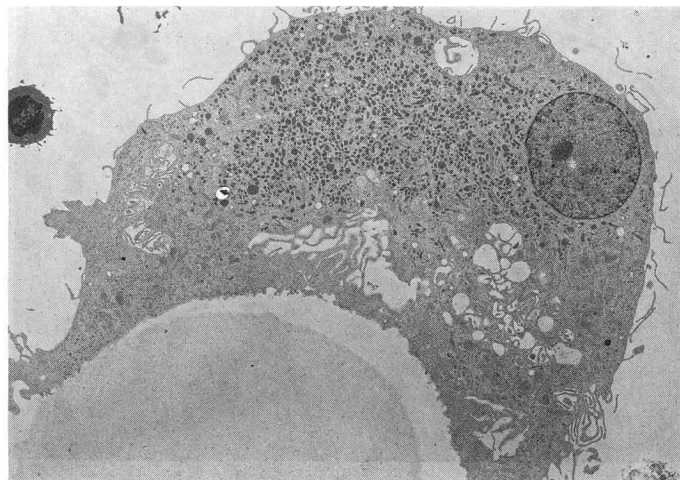


図3 ヒトにおける *in vitro* 肉芽腫形成
ヒト末梢単核球と IL-1 β 付着ビーズの反応 (培養3週目の EM 像)

GIF 付着ビーズでは培養3週目に40%以上のビーズに、IL-1 β , TNF α 付着ビーズではそれぞれ17%, 29%に、ビーズ全面に1層以上の細胞付着を認めた。一方、コントロールビーズと細胞間の反応はわずかであった。

培養5週目に培養系を *in situ* で固定し、ビーズ付着細胞を観察してみると、光顕で IL-1 β , TNF α , GIF 付着ビーズに結合したマクロファージの一部は類上皮細胞様形態を示した。しかし、GIF と異なり organization 像は認めなかった。電顕では IL-1 β , TNF α , GIF 付着ビーズに付着した細胞に類上皮細胞の存在が確認され、GIF 付着ビーズに付着した細胞にのみ interdigitation 像を認めた (図2)。

肉芽腫形成に密接に関連していることが認められている ACE (angiotensin-converting enzyme) 活性を検討してみると、*in vivo* では GIF 誘導肉芽腫内に IL-1 β , TNF α で誘導した場合にくらべて高い活性を認めた。しかし、統計学的に有意差はなかった。*in vitro* ではどの系でも培養上清中に ACE 活性は証明されなかった (表)。

ヒトの系における検討では IL-1 β , TNF α または MDP 付着ビーズのまわりには末梢単核細胞の集族を培養2週目をピークに認めたが、コントロールビーズのまわりには認めなかった。培養3週目でマウスの系と同様に、*in situ* で培養系を固定し検討してみると、IL-1 β , TNF α および MDP ビーズに付着した細胞は、胞体内小器官が発達し microvilli を細胞表面に認め、類上皮細胞への分化途上の活性化マクロファージの形態像を示

していた (図3)。また多核細胞も存在していた。一方、BALF 細胞は培養中、サイトカインおよび MDP 付着ビーズのまわりにほとんど集族しなかった。

考案・結論

マウスの系で肉芽腫形成能を検討してみると、IL-1 β , TNF α にはマウス腹腔マクロファージの類上皮細胞への分化誘導能は認めるが、ビーズのまわりに集族した細胞を organize させる効果は認めなかった。GIF にはマウスマクロファージを類上皮細胞へ分化させるとともに、細胞同士の interdigitation を誘導し、organize された肉芽腫を形成させる作用を認めた。ヒトの系では、IL-1 β , TNF α および MDP 付着ビーズのまわりに集族した末梢単核細胞の一部が活性化マクロファージ、多核細胞に分化している像を認めた。

以上より、サイトカイン (IL-1 β , TNF α) はそのみでは肉芽腫形成作用はなく、肉芽腫形成にはサイトカイン同士の相互作用あるいはさらに別の因子の関与が必要と考えられた。

文 献

- 1) Adams DO : Am J Pathol. 1976 ; 84 : 164.
- 2) Kasahara K, et al. : Am J Pathol. 1988 ; 130 : 629.
- 3) Fung MA, et al. : Am J Pathol. 1992 ; 141 : 1445.

4. 結 核 症

結核予防会結核研究所病理科 坂 本 祥 一

1. はじめに

結核症はその発症、進展に細胞性免疫が深く関与している¹⁾²⁾。すなわち、Tリンパ球は、結核菌を貪食したマクロファージより提示された抗原を認識することでさまざまなサイトカインを産生し、マクロファージを活性化させその殺菌能を高め、さらにリンパ球自身も活性化されることで特異的免疫が発現し³⁾、病理組織学的には乾酪壊死とそれを取り囲む類上皮細胞肉芽腫⁴⁾といった特徴的な病態が形成されると考えられている。しかし、近年の細胞間ネットワークに由来するリンパ球、サイトカイン、接着分子などの *in vitro* におけるさまざまな知見があるにも関わらず、結核病巣形成における詳細はいまだ不明な点が多い。

今回は病理の立場からヒト肺結核症手術例および剖検例を用い、結核病巣を免疫組織化学的に検索し、結核病巣の成立機転とその機能の推測を試みた。

2. 対象と方法

1991年から93年に結核予防会複十字病院で肺結核症と診断され、排菌持続などの理由で手術が施行された13例と肺結核症剖検3例(平均年齢46.3歳、男10例、女6例)の肺を対象とした。

組織の固定は10%ホルマリン液とPeriodate-Lysine-Paraformaldehyde (PLP) 液で行い、それぞれパラフィン包埋標本と凍結標本を作製した。染色は通常のH.E.染色、鍍銀染色、チールネールゼン染色と、ABC法による免疫染色を行った。免疫染色にはUCHL-1 (T-cell), L-26 (B-cell), CD68 (Mφ), CD4, CD25 (IL-2R), HLA-DR, EG2 (分泌型 eosinophil cationic protein), Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Interleukin-4

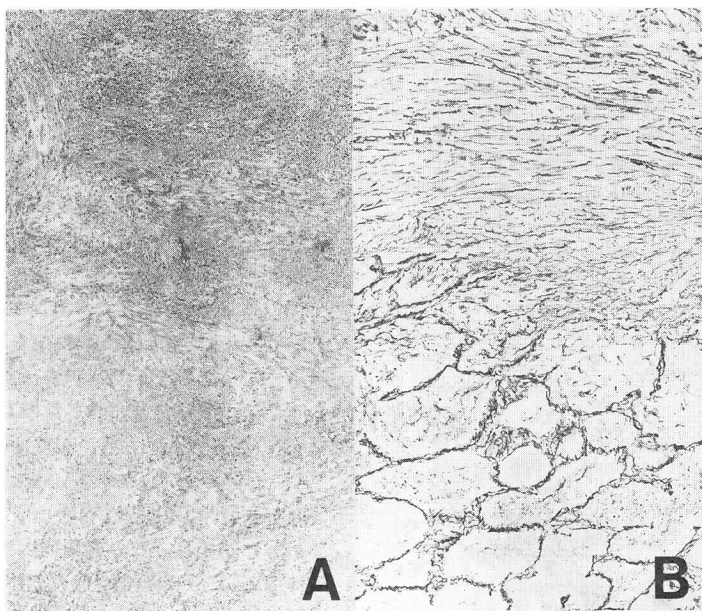


図1 A: H.E. 染色, B: 鍍銀染色 (A, B: x150)

A, B連続切片による同一病巣乾酪壊死部を示す。下方は肺胞構造が保持されている滲出性反応後の壊死(E壊死)で、上方は肺胞構造は見られず、嗜銀線維の新生から成る増殖性反応後の壊死(P壊死)を示す。H.E.染色ではP壊死内に多量の核片を認めるが、壊死の形式および細胞の同定は困難である。

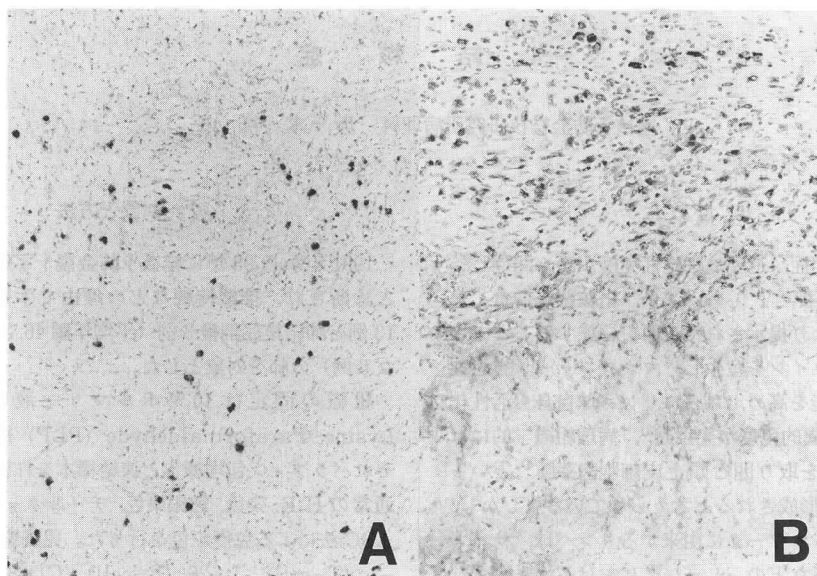


図2 A : UCHL-1 免疫染色, B : CD68 免疫染色 (A : x250, B : x200)
A, B いずれも壊死内に多数の UCHL-1 および CD68 陽性細胞 (T細胞およびマクロファージ) を認める。B 上方は類上皮細胞層で, 類上皮細胞に一致して CD68 陽性像を認める。

(IL-4), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) と BCG に対する各抗体を一次抗体として用いた。

3. 結 果

1) 乾酪壊死巣

H.E. 染色では壊死の内部の状態は同定不能であるが (図 1-A), 鍍銀染色で見ると, 乾酪壊死の形態には肺胞構造が保たれている滲出性反応後の壊死 (E壊死) と, 線維増生の著しい増殖性反応後の壊死 (P壊死) があることがわかる (図 1-B)。チールネールゼン染色では一部の E壊死部にわずかに陽性像を認め, 抗 BCG 抗体染色では大部分に広範な陽性像を示すが, P壊死部では両染色とも陰性である (結果は大友ら⁵⁾ が発表済み)。さらにこの E壊死部には多数の UCHL-1 (図 2-A) および CD68 (図 2-B) の陽性像が認められ, 多数の Tリンパ球およびマクロファージの存在が示唆された。Bリンパ球 (L26 陽性細胞) はごく少数認めるにすぎなかった。また, この E壊死内には広範な HLA-DR 陽性像 (図 3) と, 散在性に CD4 および CD25 陽性小円形細胞を認めた。さらに, EG2 を好酸球のマーカーとしてみると, H.E. 染色では同定困難であった好酸球が特に E壊死部に一致して多数認められた (図 4)。これらの好酸球は脱顆粒像が著明であり, 一部には好酸球特異顆粒のみがびまん性に存在する部位も認められた。

次に, 壊死巣内に存在するサイトカインの同定を行っ

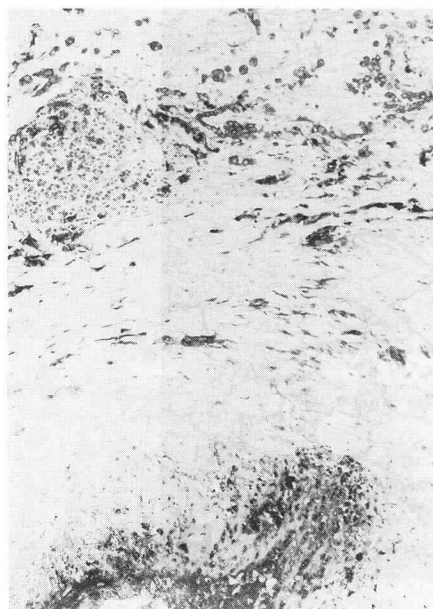


図3 HLA-DR 免疫染色 (x100)
上方より肺胞, 類上皮細胞層, 乾酪壊死層で, 肺胞マクロファージ, 類上皮細胞および壊死内に広範な HLA-DR 陽性像を認める。

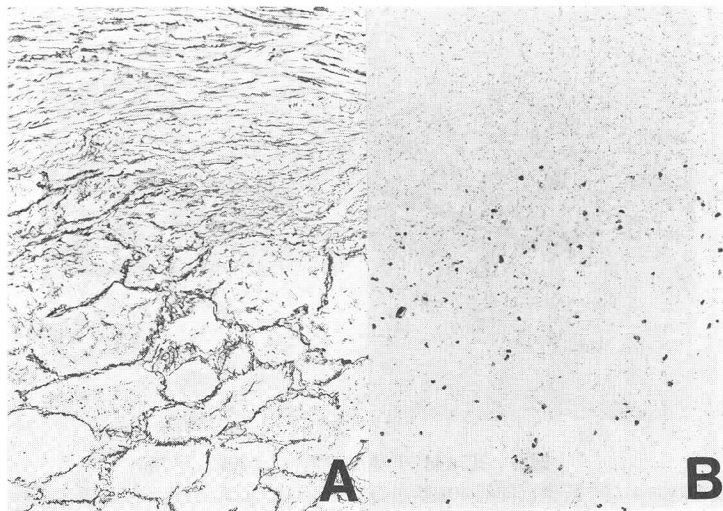


図4 A : 鍍銀染色, B : EG 2 免疫染色 (A, B : x150)
E壊死内に一致して多数の EG 2 陽性細胞 (好酸球) が認められる。

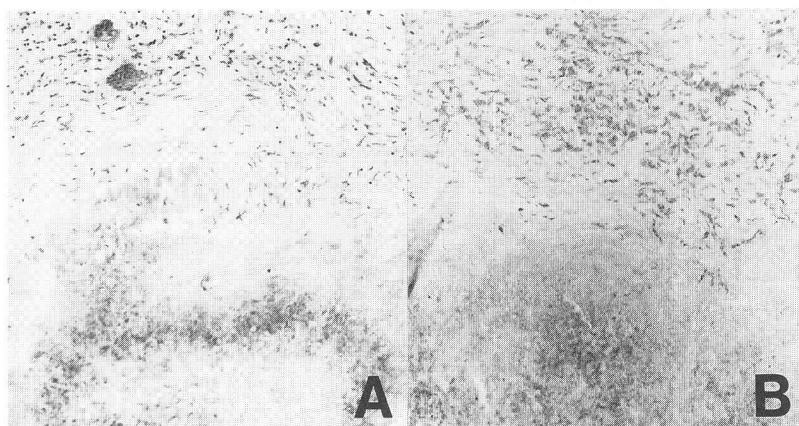


図5 A : TNF- α 免疫染色, B : IL-4 免疫染色 (A, B : x150)
E壊死巣内に一致して TNF- α および IL-4 の広範な陽性像を認める。
特に IL-4 は類上皮細胞やラ氏型巨細胞にも陽性像が認められた。

た。結核患者の血中において上昇するとされる TNF- α 、IFN- γ ⁶⁾ と抗体産生やアレルギー反応の中心的役割を果たすと考えられている IL-4 に対する各抗体を用い凍結切片上で免疫染色を行った。乾酪壊死巣内 (特に E壊死部) に一致して、TNF- α (図 5-A) と IL-4 (図 5-B) のびまん性高度な陽性像を認めた。一方、IFN- γ は E壊死巣内の小円形細胞に一致して陽性像が認められた。

2) 類上皮細胞肉芽腫層

類上皮細胞肉芽腫層を H.E. 染色で見ると、類上皮細胞の密な重層形成が認められ、所々にランゲハンス型巨細胞 (以下ラ氏型巨細胞) が散見される。この類上皮細胞およびラ氏型巨細胞はマクロファージのマーカーである CD68 に陽性像を示し (図 2-B)、さらに HLA-DR にも陽性像を示した (図 3)。また、サイトカインと接着分子の関与を調べてみると、類上皮細胞およびラ氏型巨細胞は IL-4 (図 5-B) および接着分子の一つである ICAM-1 の陽性像を認めた (図 6) が、TNF- α 、IFN- γ および接着分子である ELAM-1、VCAM

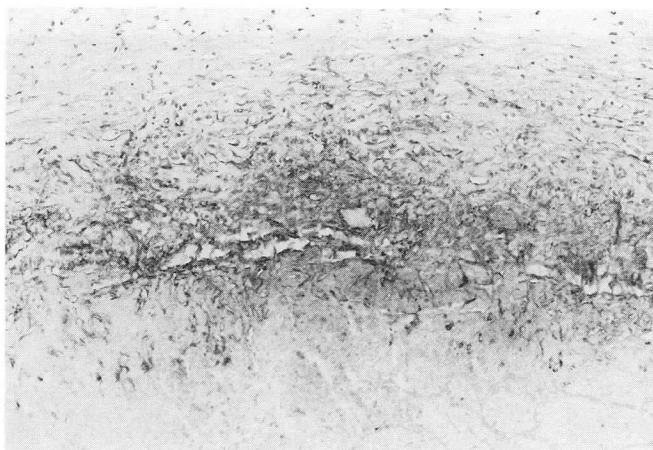


図6 ICAM-1 免疫染色 (x 200)

類上皮細胞およびラ氏型巨細胞の細胞表面に一致して ICAM-1 の陽性像を認める。

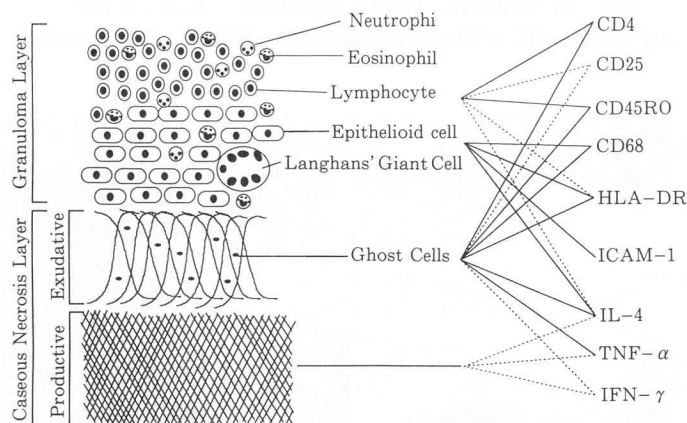


Fig. 7 Expression of Surface/Adhesion Molecules and Cytokines

-1 は陰性であった。

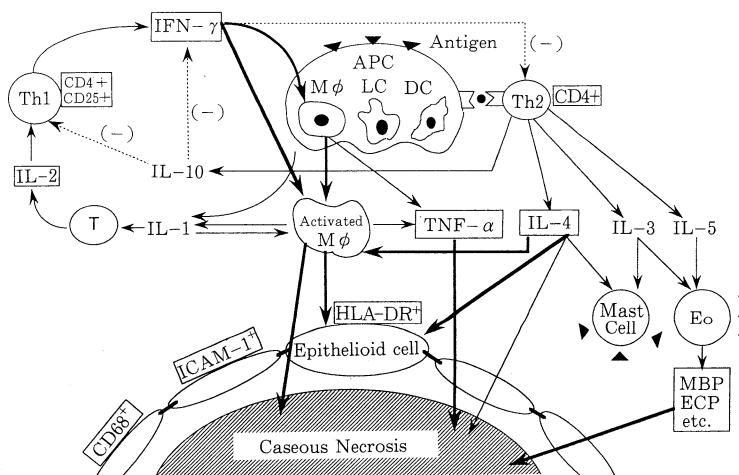
3) 結果のまとめを Fig. 7 に示す。

4. 考 案

ヒト結核症の病態形成には CD4+ヘルパーT(Th) 細胞およびマクロファージが重要な役割をはたすことが知られている。Mosmann & Coffman⁷⁾ は Th 細胞が IFN- γ , IL-2 等を産生する Th1 細胞と, IL-3, IL-4, IL-5 等を産生する Th2 細胞から成ることをマウスの系で明らかにしている。Th1 細胞は遅延型過敏反応に関与し, 特に結核症においては重要であると考えられている⁸⁾⁹⁾。今回の検討で, ヒト乾酪壊死巣内には多数の CD4+ T 細胞と IFN- γ の存在が確認されたが, 同時に多数の好酸球と IL-4 陽性細胞の存在を認めた。好酸球の局所への遊走および活性化には IL-3, IL-5 等

のサイトカインが重要であることが示唆されており¹⁰⁾¹¹⁾, 乾酪壊死形成には Th1 様細胞のみならず IL-3, IL-4, IL-5 を産生する Th2 様細胞も重要である可能性が示唆された。また, 好酸球特異顆粒内蛋白の組織障害性が近年クローズアップされており¹²⁾, 乾酪壊死巣内に好酸球が多数存在したことは, 好酸球特異顆粒内蛋白が乾酪壊死形成にも関与している可能性があり興味深い点である。

TNF- α は主に活性化マクロファージより産生されることが知られており, 結核菌を貪食したマクロファージからも多量に産生され, 壊死形成に関与することが報告されている¹³⁾。さらに, TNF- α は濃度依存性に肉芽腫形成にも関与するとの報告もある¹⁴⁾。今回の検討で TNF- α は乾酪壊死層に広範に認められたが, 類上皮細胞肉芽腫層には認められなかった。今回用いた肺結核組織はほぼ肉芽腫の完成された時期のものであり, 肉芽腫形成初期における TNF- α の関与については今後の検討課



APC : antigen presenting cell, LC : Langerhans cell, DC : dendritic cell,
Eo : eosinophil, MBP : major basic protein, ECP : eosinophil cationic protein.

Fig. 8 The Possible Regulation of Surface/Adhesion Molecules and Cytokines in the Pathogenesis of TB

題と思われる。また、 $\text{TNF-}\alpha$ は ICAM-1 の発現を増強することが報告されている¹⁵⁾。今回検討した類上皮細胞およびラ氏型巨細胞にはいずれも膜表面に高度の ICAM-1 の発現が認められた。

類上皮細胞層が病巣の進展を防ぐ砦の役割をはたすと考え、ICAM-1 は protective immunity においても重要であることが示唆された。

今回の検討と現在までの文献的知見より、結核症病態形成における各種細胞の表面抗原、接着分子およびサイトカインの相互関係を Fig. 8 に示した。

Fig. 8 に示すごとく、ヒト結核症の病態形成には Antigen presenting cells (APC) を prime とし、Th1 様細胞のみならず Th2 様細胞が関与し、それらの細胞から産生されるさまざまなサイトカインが細胞の活性化や各種抗原の発現あるいは接着分子の発現を通じて直接あるいは間接的に関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Tsuyuguchi I, Kohmo T : Local, passive transfer of purified protein derivative-delayed tuberculin hypersensitivity by guinea pig thymus-dependent lymphocytes. *Am Rev Resp Dis*. 1975 ; 112 : 535-539.
- 2) 露口泉夫 : 人の結核症の免疫. *結核*. 1990 ; 65 : 591-601.
- 3) 徳永 徹 : 結核の免疫学. *結核*. 1982 ; 57 : 455-465.
- 4) 岩井和郎 : 類上皮細胞肉芽腫の形成をめぐる一他肉芽腫性疾患との関連の下に. *結核*. 1976 ; 51 : 293-301.
- 5) 大友幸二, 坂本祥一, 海野 剛, 他 : 結核結節乾酪壊死巣内での抗酸菌の免疫組織化学的検討. *結核*. 1994 ; 69 : 295-300.
- 6) 四十坊典晴, 中西文雄, 阿部庄作, 他 : 結核症における血液循環 ICAM-1 抗原の定量. *結核*. 1993 ; 68 : 260.
- 7) Mosmann TR & Coffman RL : TH1 and TH2 ; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989 ; 7 : 154.
- 8) Barnes PF, Fong S-J, Brennan PJ, et al. : Local production of tumor necrosis factor and IFN- γ in tuberculous pleuritis. *J Immunol*. 1990 ; 145 : 149-154.
- 9) Orme I, Miller E, Roberts A, et al. : T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 1992 ; 148 : 189-196.
- 10) Wsrren DJ & Moore MAS : Synergism among interleukin-1, interleukin-3 and interleukin-5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 1988 ; 140 : 94-99.
- 11) Sanderson CJ, Campbell MD & Young IG :

- Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin-5) and its effect on human and mouse B cell. Immunol Res. 1988 ; 102 : 29-50.
- 12) Frigas E & Gleich GJ : The eosinophil and the pathophysiology of asthma. J Allergy Clin Immunol. 1986 ; 77 : 527-537.
- 13) Rook GAW, Attiyah RA & Filley E : New insights into the immunopathology of tuberculosis. Pathobiology. 1991 ; 59 : 148-152.
- 14) Joseph AL & Boros DL : Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. J Immunol. 1993 ; 151 : 5461-5471.
- 15) Pober JS, Gimbrone Jr. MA, Lapierre LA, et al. : Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol. 1986 ; 137 : 1893-1896.

5. ら い

国立療養所星塚敬愛園研究検査科 後 藤 正 道

らいの現状と最近の知見

らいは、らい菌 (*Mycobacterium leprae*) による慢性の感染症である。らい菌は毒性は弱いものの、細胞内で増殖することによって直接に組織破壊をきたしたり(獅子様顔貌など)、あるいは菌に対する生体の免疫の発動によって二次的に組織破壊をきたすことがある(神経麻痺による顔面・四肢の変形など)。感染経路としては、鼻粘膜からの塗抹感染が重要と考えられている。未治療のらい腫らい患者と濃厚に接触した乳幼児では発症しやすいが、成人では感染しても発症することはまずない。

世界中には毎年 50 万人の新患があり、総計 500 万人近くの高い患者が推定されている。一方、日本では新患は毎年 20~30 人だが、らい療養所にはまだ約 6,000 名のらい後遺症を持った入園者がいる。強い神経炎やらい反応の場合のみ入院が必要で、通常は RFP, DDS (レクチゾール), clofazimine 等の併用で 6 カ月から 2 年間外来治療を行う。

らい菌の感染した個体は、多くの場合に発症することなく自然治癒を示し、ツベルクリン反応に相当するレプロミン反応が陽転する。一部は白斑の Indeterminate lesion を示した後に自然治癒するが、数年以上たってから典型的皮疹を発症することもある。一方、少数の個体はらい菌を有効に処理できずに発症する。この発症にはマウスの Bcg gene に相当する、HLA とは独立した第 2 染色体上の遺伝子が関与していると考えられている¹⁾。

個体の免疫監視を逃れるため、らい菌はマクロファージの機能を障害する菌体成分を持つことが知られている。らい菌特異抗原である Phenolic-Glycolipid (PGL-I) は、マクロファージ内でのらい菌の分解にとって必

要な phagolysosome の形成を阻害することによって、らい菌の分解を阻止する。また、らい菌の lipoarabinomannan (LAM) はマクロファージからの TNF α の産生を抑制することで、免疫応答を抑えるようである²⁾。らい菌の多い病巣では、免疫組織化学によって、PGL, LAM, 抗 BCG 抗体反応性抗原は多量に見いだされる。

生体の監視を逃れてらいが発症すると、その中でも細胞性免疫が正常人に近い場合は類上皮細胞肉芽腫である類結核型らい (Tuberculoid, T 型)、細胞性免疫が全く機能しない場合には組織球性のらい腫らい (Lepromatous, L 型) になる。T 型になるか L 型になるかは HLA の関与が考えられている。各々の特徴を図 1 に示す。

らいの病型とサイトカイン

らい病巣内のサイトカイン mRNA の発現パターンは、T 型では γ インターフェロンや IL-2 などの産生で特徴的な Th1 型の CD4 陽性 T 細胞と活性化したマクロファージが優位で、L 型では抗体産生を誘導する IL-4 などを産生する Th2 型の CD4 陽性細胞が優位であることが、山村, Modlin らによって報告されている³⁾。一方、われわれの調査した血中抗 PGL 抗体価の病型による比較⁴⁾では、健康人群と比べて、L 型患者は高い抗体価を示すが、逆に T 型患者は健康人よりもむしろ抗体産生は抑制されており、山村らのデータと良く一致した。

そこで、病変内におけるサイトカインの分布を、種々のサイトカインに対するポリクローナル抗体免疫組織化学で検討してみた。L 型らいではらい菌抗原との交差反応が強く、有意の結果が得られなかった。一方、T 型らいではらい菌抗原はほとんど残っておらず、L 型のよう

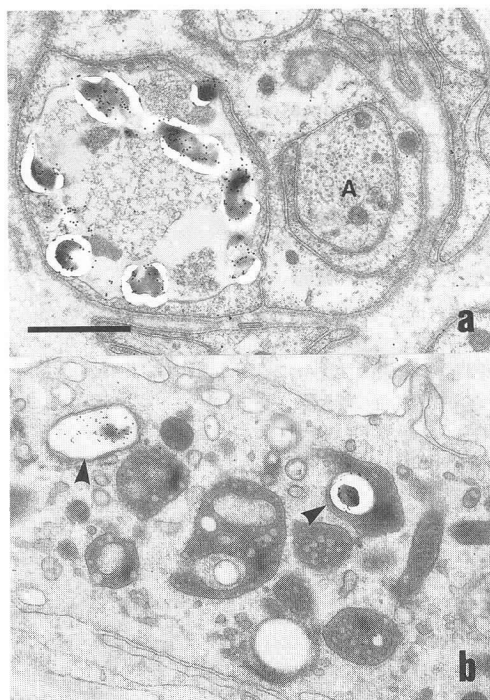


図1 らい末梢神経の抗 BCG 抗体による免疫電顕（金コロイド法）

a. 無髄神経線維を取り巻くシュワン細胞の胞体内に抗 BCG 陽性のらい菌が認められるが、その周囲にライソゾームは認められない（A：軸索 Scale bar=1 μ m）。

b. マクロファージ内の抗 BCG 陽性らい菌（矢印）は、ライソゾームによって処理されている。

な交差反応はなかった。T型では、期待に反して IL-4 のほうが IL-2 よりも明瞭な染色を示した。なお、結核病巣において坂本が示した好酸球の関与は、らいの病巣では病型に関わらず認められなかった。

らい性神経障害の発症機序

ここまでは、感染から発症までの、他の抗酸菌感染症と共通する点を見てきたが、らいの場合、結核などとは著しく異なった特徴、すなわちらい菌の神経親和性がある。らいにおける手足の変形は、末梢神経の炎症の結果としての麻痺による二次的なものである。血流に乗って末梢神経に到達したらい菌はどのような細胞に入って増殖し、どのような経過で末梢神経炎をきたすのかは、まだ不明の点が多く残っている。そこで、インドでの新鮮ならいの生検と、敬愛園におけるらいの剖検例から得られたわれわれのデータを示す。

まず、らいの初期病変の皮膚内神経を検索すると、一

見正常に見える小さな神経束の中に抗酸菌の集合が見られ、LAM と BCG 免疫染色でも陽性である。電顕では、有髄神経線維のシュワン細胞と無髄神経線維のシュワン細胞の両方の中に、らい菌と思われる円形から楕円形でオスミウム好性の構造物が見られる。しかし、これらがらい菌であるという確実な同定方法はなかった。

最近になってわれわれは抗 BCG 抗体の金コロイド法による免疫電顕を確立し、この方法で検索してみると、図1-aに示すように、金コロイド陽性のらい菌の多くは軸索を取り巻く無髄のシュワン細胞の胞体内にあること、有髄シュワン細胞内の構造物はほとんど染まらないことが判明した。注目すべきことに、シュワン細胞内のらい菌は、ライソゾームには全く取り囲まれていない。一方、末梢神経内のマクロファージの胞体内にも、抗 BCG 染色陽性のらい菌は見いだされるが、図1-bに示すようにその一部はライソゾームと fusion を示し、分解されつつある菌も見られる。無髄神経はそのほとんどが知覚神経であることを考えると、今回の検索結果は、らいの末梢神経障害が知覚神経優位の障害であること、L型では病期が進行してから手袋靴下状に知覚麻痺がくることなどを合理的に説明できる。

培養シュワン細胞は外来性の蛋白をクラス II 抗原として抗原提示出来ることがわかっているが、*in vivo* でシュワン細胞に HLA-DR の発現を示す報告はなく、今回検索した電顕でもシュワン細胞内でらい菌の分解は見られないことから、図2に示すように、少なくともL型の初期病変においては、無髄のシュワン細胞の中にライソゾームによる分解を全く受けずに増殖する多数のらい菌があり、免疫系の監視から逃れていると考えられる。増殖の結果、シュワン細胞を破壊して出ていってマクロファージに取り込まれて、初めて抗原処理・提示が可能になる可能性がある。すなわち、マクロファージに直接取り込まれる普通の抗酸菌とは異なり、らい菌は途中でシュワン細胞という隠れ蓑があることが、免疫系の発動を難しくしていると考えられる。

ところで、入園者の 90 % 以上が臨床的には治癒していると思われるらい療養所においても、毎年数例ながら、らいの再発が見られる。10 年以上無症状のL型らい治癒症例 6 例の剖検時の末梢神経の PGL 免疫染色で、一見正常で炎症のない神経にもらい菌抗原は見いだされた⁵⁾。これらの PGL 陽性細胞の免疫電顕による解析は今後行う予定である。

らいにおける肉芽腫の意味

最後に、らいにおいて、肉芽腫の形成は生体防御にとってどのような意味を持った現象なのかを考察する。Bcg 遺伝子などの研究から推測されることは、多くの個体で

表 らいの症状・免疫・病理の、病型による比較

	類結核型 Tuberculoid	らい腫型 Lepromatous
皮疹の形・数	少数の境界明瞭な大斑紋	多数の隆起性結節
神経肥厚・知覚麻痺	++ 単発・早期から	早期では軽度 末期に手袋靴下状
らい菌に対する細胞性免疫	正常に近い	微弱
光田（レプロミン）反応	+	-
血清抗 PGL-1 抗体	-	+
組織所見（皮膚・神経）	類上皮肉芽腫	泡沫状マクロファージ
組織内のリンパ球	多数	少数
病巣内 T リンパ球の種類	CD4 > CD8	CD8 > CD4
組織内のらい菌の数（BI）	- ~ 1+	5+ ~ 6+
HLA との相関	DR2/DR3	DQ1

は、らい菌は肉芽腫の形成なしに生体から排除されるようであるが、これは敵を水際で排撃することにとえらる。

ところが敵が自国の中に侵入してある程度拠点を築いた場合には、犠牲を払いながら排除することになる。T 型の場合には、田舎の一軒家にたてこもった敵を爆撃するようなもので、B 型で神経炎が強い場合には、密集した市街地での戦闘に似ている。戦闘を続けると巻き添えに遭う住民が増えるので、ステロイドで休戦協定を結び

つつ、ゆっくりと化学療法で攻めていく必要がある。いずれの場合も、肉芽腫性炎症の一般的特徴である、組織破壊と機能障害を伴う。

一方、L 型の場合には無血入城を許したようなもので、放っておくと敵の天下だが、上手に化学療法を行うと、戦闘による破壊がないだけに手足の変形を来さず治すことができる。すなわち、らいの化学療法が確立した今日では、神経障害に直結する肉芽腫の形成は、ある意味では治療の障壁になることもあるといえよう。

文 献

- 1) Schurr E, Morgan K, Gros P, et al. : Genetics of leprosy. *Am Trop J Med Hyg.* 1991 ; 44 suppl 4-11.
- 2) Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL : Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degree of virulence. *Infect Immun.* 1993 ; 61 : 4173-81.
- 3) Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. : Defining protective responses to pathogens : Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991 ; 254 : 277-279.
- 4) 平澤 博, 後藤正道, 他 : 入園者, 職員, 近隣住民の血中抗 PGL 抗体価の分析. *日本らい学会雑誌.* 1990 ; 59 : 56.
- 5) Goto M, Munauchi Y, Nobuhara Y, et al. : Immunohistochemical demonstration of mycobacterium leprae in the nervous system

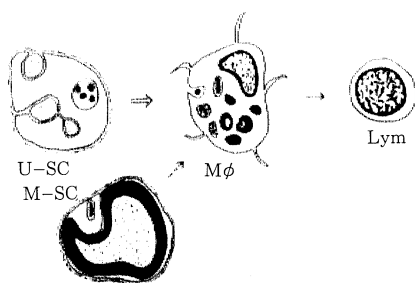


図2 末梢神経内のらい菌の増殖

主として無髄のシュワン細胞（U-SC）、一部は有髄のシュワン細胞（M-SC）の中のらい菌は、ライソゾームによる分解を受けずに増殖する。増殖の結果、シュワン細胞から出てマクロファージ（Mφ）に取り込まれて、初めてリンパ球（Lym）に対して抗原処理・提示される可能性が高い。マクロファージに直接取り込まれる普通の抗酸菌とは異なり、らい菌はシュワン細胞という隠れ蓑があることが、免疫系の発動を難しくしていると考えられる。

of long-term cured leprosy patients using a *M. leprae* specific anti-PGL antibody. Jpn J

Trop Med Hyg. 1993; 117-121.

6. 寄生虫学領域での肉芽腫の研究

—— マンソン住血吸虫虫卵肉芽腫の成立機転 ——

国立予防衛生研究所寄生動物部 金 沢 保

はじめに

寄生虫学の領域においても、「肉芽腫の成立機転とその機能」は興味ある研究対象である。ことにマンソン住血吸虫症、日本住血吸虫症においては肝臓に形成される虫卵肉芽腫が病態の中心であり、世界中で住血吸虫に感染している人々が約3億人いると推定されていることを考えると、成立機転の解明は単に学問的な興味にとどまらず、社会的に要請されている研究テーマといえることができるであろう。

住血吸虫は哺乳類、鳥類の血管内に寄生する多細胞生物で、人体に寄生するものとしてはマンソン住血吸虫、日本住血吸虫、ビルハルツ住血吸虫の3種類が知られている。前2者は終宿主であるヒト、マウスなどの哺乳動物に経皮的に感染し、感染後約4週で門脈や腸間膜静脈内に侵入し、6週目頃より産卵を開始するようになる。産卵された虫卵の一部は血流によって肝臓に運ばれ塞栓（虫卵塞栓）を起こす。この虫卵塞栓の周囲に肉芽腫が形成されるのである。このようにして感染後8週目頃（急性期）には比較的大きな肉芽腫が形成される。しかし、感染後15週目頃（慢性期）になると小さな肉芽腫が形成されるようになる。この現象はdownregulation, immunomodulationと呼ばれており、このメカニズムも精力的に研究がなされている。さらに病期が進むと肝線維化から肝硬変へと進展する疾患である。臨床的には虫卵肉芽腫によって引き起こされる肝臓障害は、日本住血吸虫による場合が最も重篤である。研究材料としては実験室内で維持の容易なマンソン住血吸虫がよく用いられている。以下に示す内容は主にマンソン住血吸虫とマウスを用いた実験から得られた知見である。

虫卵肉芽腫の意義

急性期のマンソン住血吸虫虫卵肉芽腫を構成している細胞はおおよそ好酸球40%、マクロファージ40%、リンパ球10%である¹⁾。これらの細胞で囲まれた虫卵は数週間生存できるといわれているが、この期間は肉芽腫反応の強弱とは関係ないようである。すなわち、虫卵を殺

滅するという観点からながめてみると肉芽腫は機能していないと考えられる。しかし、虫卵からは肝組織に直接ダメージを与えるようなさまざまな物質が分泌されており、虫卵肉芽腫はこれらの物質を局所にとどめておくという機能を果たしているものと考えられている。このことは肉芽腫が形成されないヌードマウスでは、虫卵より放出される物質による肝細胞の壊死が虫卵周囲に著明に認められることから明らかであろう。虫卵肉芽腫の意義はこのように理解されている。

虫卵肉芽腫の成立機序

では、この肉芽腫はどのようにして形成されてくるのであろうか。肉芽腫形成に免疫学的機序が関与していることは古くから指摘されていた。さらに、肉芽腫形成にはT細胞、なかでもCD4陽性細胞が重要であることが明らかにされている。1980年代中頃から後半にかけてMosmannらによってマウスCD4細胞がサイトカインの分泌パターンによってTh1, Th2の二型に分けられることが報告されて以来、このうちのどちらが肉芽腫形成に重要であるかの検討が加えられるようになった。

筆者が米国タフツ大学Stadecker博士の研究室にいたときに以下のような実験に参加する機会を得た。マンソン住血吸虫虫卵抗原に特異的なT細胞クローンを作成し、これらのクローンを移入した正常マウスの尾静脈からマンソン住血吸虫虫卵を注入し、肺に虫卵塞栓を形成させ、その周囲の反応を調べた。この実験結果から、抗原特異的Th1細胞を移入したマウスにおいて、肺に形成された虫卵塞栓周囲に肉芽腫類似の反応を惹起することが観察された²⁾。しかしながら、その後、他のグループから抗原特異的なTh2細胞の関与が示唆される論文が発表されている^{3,4)}。Th1あるいはTh2細胞のいずれか一方のみが関与しているという簡単なものではないようである。

Th1, Th2の関与を明らかにする目的で以下の実験をおこなった。マウスはC57BL/6, C3HeB/Feの2つの系統を用いた。前者は住血吸虫感染に対し抵抗性のマウス(low responder)として知られており、後者は住

Table 1 Effects of anti-IL-2 and anti-IL-4 in C3HeB/Fe mice on granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*

	No. of mice	treatment	Granuloma area ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)
Exp. 1	5	normal IgG	115 $\pm$ 13.1
	5	anti-IL-2	86.5 $\pm$ 12.4
	5	anti-IL-4	86.5 $\pm$ 15.6
Exp. 2	5	normal IgG	100 $\pm$ 14.7
	5	anti-IL-2	80.3 $\pm$ 8.9
	5	anti-IL-4	72.7 $\pm$ 10.9
	4	both	59.0 $\pm$ 10.6

Table 2 Effects of anti-IL-2 and anti-IL-4 in C57BL/6 mice on granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*

No. of mice	treatment	granuloma area ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)
5	normal IgG	81 $\pm$ 8.0
5	anti-IL-2	79 $\pm$ 6.2
5	anti-IL-4	91.7 $\pm$ 7.2
5	both	80.3 $\pm$ 8.0

血吸虫感染に対し感受性を有するマウス (high responder) として知られている。それぞれのマウスに感染後 4 週目から週 2 回、抗 IL-2 抗体 (S4B6)、抗 IL-4 抗体 (11B11) を投与し、感染 7 週目に肝臓を取り出し虫卵肉芽腫の大きさを画像解析装置を用いて測定した。コントロールとしてラット IgG を投与した。結果を Table 1, 2 に示す。C3H 系を用いた実験では抗 IL-2 抗体、抗 IL-4 抗体を投与した群、両方を共に投与した群、いずれにおいても肉芽腫の大きさが縮小することが観察された。一方、C57BL を用いた群では肉芽腫の大きさには変化がみられなかった。C3H を用いた実験結果からは IL-2, IL-4 共に虫卵肉芽腫の形成になんらかの関与をしていることが推論される。IL-2 は Th1 由来であり、IL-4 は Th2 由来であることから、この実験によっても Th1, あるいは Th2 単独で肉芽腫が形成されるものではないことが示唆される。C57BL ではなぜ同様の結果を得られなかったかは今後さらに検討を加えなければいけない問題であるが、いずれにしても C57BL は無処理でも C3H に比較して小さな虫卵肉芽腫しか形成されない事実から、肉芽腫の大きさを指標としているこの実験系では明確な結果が得られにくい可能性がある。

現時点では、Th2 細胞が虫卵肉芽腫の形成に重要な

役割を果たしていることは疑いのないことと考えられている。また、TNF 単独で虫卵肉芽腫を形成するという報告もなされている。肉芽腫を形成する初期と、それを維持するのに関わっている機序が異なる可能性もあって問題の解決を複雑にしているようである。

おわりに

ここで、もう一度感染防御の観点から Th1, Th2 の関与を考えてみたい。寄生虫感染では好酸球数の増加と IgE 産生の増加がみられることが古くから指摘されている。これらは Th2 由来のサイトカインによって産生が調節されている。含目的的に考えるならば、好酸球、IgE が感染防御に役立っていると考えたい。教科書にもそのように書かれているが、それははたして正しいのであろうか。今まで、自明のことと考えられていたこの説に再検討が加えられ始めている。住血吸虫感染防御のエフェクター細胞として考えられているものの一つにマクロファージがある⁵⁰⁾。マクロファージは IFN- γ によって活性化されることはよく知られていることであり、Th1 が活性化に関わっていると考えられている。住血吸虫はマクロファージの活性化を抑えるように宿主の免疫系を Th1 から Th2 優位に動かし、結果として寄生しやすい環境をつくっているというのである。今後の研

究の成果が待たれるところである。

文 献

- 1) Stadecker MJ, Wyler DJ, Wright JA : Ia antigen expression and antigen-presenting function by macrophages isolated from hypersensitivity granulomas. *J Immunol.* 1982 ; 128 : 2739-2744.
- 2) Chikunguwo SM, Kanazawa T, Dayal Y, et al. : The cell-mediated response to schistosomal antigens at the clonal level. *In vivo* functions of cloned murine egg antigen-specific CD4 positive T helper type 1 lymphocytes. *J Immunol.* 1991 ; 147 : 3921-3925.
- 3) Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, et al. : Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Shistosoma mansoni*. *J Exp Med.* 1991 ; 173 : 159-166.
- 4) Wynn TA, Eltoun I, Cheever AW, et al. : Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1993 ; 151 : 1430-1440.
- 5) James SL, Glaven JA : Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol.* 1989 ; 143 : 4208-4212.
- 6) Kanazawa T, Harris TS, Chikunguwo SM, et al. : Larvicidal properties of macrophages induced by cloned murine schistosomal egg antigen-specific CD4 positive T-helper lymphocytes. 1992 ; 14 : 279-293.