

## 第70回総会特別講演

## 結核の局所免疫をめぐる諸問題

下方 薫

名古屋大学医学部第1内科

受付 平成7年7月17日

The 70th Annual Meeting Special Lecture

SOME PROBLEMS CONCERNING LOCAL CELLULAR  
IMMUNITY IN TUBERCULOSIS

Kaoru SHIMOKATA \*

(Received 17 July 1995)

Tuberculous pleurisy is restricted to the pleural cavity and profuse pleural fluid, which contains numerous immunocompetent cells, is easily obtained. Therefore, tuberculous pleurisy is a good model for the study of local cellular immunity.

The characteristics and function of lymphocytes in both pleural exudate and peripheral blood were studied. The pleural fluid had more T-lymphocytes than the peripheral blood. To evaluate predominant T-lymphocyte function in tuberculous pleural exudate, we studied the reactions of the lymphocytes to the specific antigen. When lymphocytes in pleural effusion were cocultured with purified protein derivative (PPD), they reacted to PPD and produced far more interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) than did peripheral blood lymphocytes. Thus, exudative-sensitized lymphocytes in morbid sites reacted to the specific antigen more strongly. These observations indicate the presence of local cellular immunity in tuberculous pleurisy at the morbid site.

It would be very interesting to know which T-cell subset produces IFN- $\gamma$ . When pleural fluid T lymphocytes were treated with OKT4 monoclonal antibody and complement, a significant decrease in IFN- $\gamma$  production was observed in all patients examined, whereas no definite decrease in IFN- $\gamma$  production was found after treatment with OKT8 monoclonal antibody and complement. These results suggest that at least the OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>-</sup> T-cell subset is responsible for the antigen-specific IFN- $\gamma$  production in pleural fluid T lymphocytes.

With the cooperation of macrophages or monocytes, pleural fluid T lymphocytes produced a significant level of interleukin 2 (IL-2) in the presence of PPD. Tuberculous pleural fluid macrophages promoted greater IL-2 production than blood monocytes from either tuberculous pleural fluid or blood T lymphocytes. Combination of tuberculous pleural fluid macrophages and pleural fluid T lymphocytes was the most effective for producing

---

\* From the First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466 Japan.

IL-2 when compared with other combinations. From these findings tuberculous pleural fluid macrophages and T lymphocytes may contribute to active local cellular immunity at the morbid site.

It would be expected that tuberculous pleural fluid itself contains a variety of immunologically important cytokines because of the accumulation of immunocompetent cells in the pleural cavity. Tuberculous pleural fluid had higher levels of IL-1, IL-2, and IFN- $\gamma$  than malignant pleural fluid. Although the difference of IL-1 level between tuberculous and malignant pleural fluid was modest, that of IL-2 and IFN- $\gamma$  was dominant. Therefore, it is indicated that activated T lymphocytes in tuberculous pleural fluid concern the production of lymphokines at the morbid site and they effectively exert local cellular immunity through the action of such lymphokines.

Treatment with IFN- $\gamma$  resulted in an increased percentage of human alveolar macrophages ingesting BCG and an increased number of ingested BCG in individual alveolar macrophage in patient with pulmonary tuberculosis. The IFN- $\gamma$  treatment also showed increased killing activity of alveolar macrophages. Through these studies, IFN- $\gamma$  is an essential cytokine which activates human alveolar macrophages and induces anti-mycobacterial activity.

In conclusion, we could elucidate from the study of tuberculous pleurisy that exudative sensitized pleural fluid T-lymphocytes play a major role in the defence of tuberculosis at the morbid site.

**Key words :** Tuberculosis, Cellular immunity, Interferon- $\gamma$ , Cytokine, Macrophage

**キーワード :** 結核, 細胞性免疫, インターフェロン $\gamma$ , サイトカイン, マクロファージ

## はじめに

ヒトの疾患の病態を解析するためには、病変局所に直接到達することが望ましい。しかし実質臓器の疾患では病変の場に至ることが難しく、その本態を明らかにするのに当惑を感じる事が多い。呼吸器疾患の重要な場である肺を考えた場合、気管支ファイバースコープを用いることにより、病変部の病態の解析がかなり進んだのは事実である。びまん性肺疾患での気管支肺泡洗浄による情報は、その代表的なものの一つと言える (Fig. 1)。

一方、胸腔は臓側胸膜と壁側胸膜に囲まれた腔であり、ここでの病変は胸水を採取することにより多くの情報を

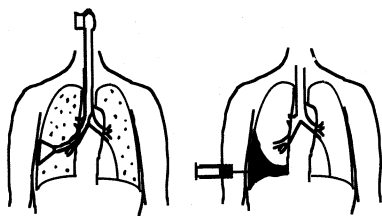


Fig. 1 Approach to the Morbid Site

得ることができる。とりわけ結核性胸膜炎は日本でもしばしば遭遇する疾患であり、胸水中にはリンパ球を中心として多数の免疫担当細胞が存在する。しかも原因は結核菌感染によることが明らかであり、特異抗原に対する生体の免疫応答も解析しやすい利点がある。これらのことから結核性胸膜炎はヒトにおける病変局所の細胞性免疫の解析に格好の対象と考えられる (Fig. 1)。

## 結核と細胞性免疫

細胞内寄生体としてのウイルスや真菌、原虫、また細菌に対し、細胞性免疫は重要な生体防御の一翼を担っている。結核菌はマクロファージ内で増殖する微生物の代表的なものの一つである。細胞性免疫に関わる細胞間相互作用を Fig. 2 に簡単に示した。細胞性免疫の中心的存在であるT細胞がある抗原に対し反応するためには、マクロファージにより処理され提示される抗原が主要組織適合抗原であるMHCとともにT細胞に働きかける必要がある。抗原を取り込むことによりマクロファージは活性化されインターロイキン1 (IL-1) を産生する。IL-1はT細胞が増殖するのに必要なインターロイキン2 (IL-2) のレセプターを発現させる。T細胞はIL-

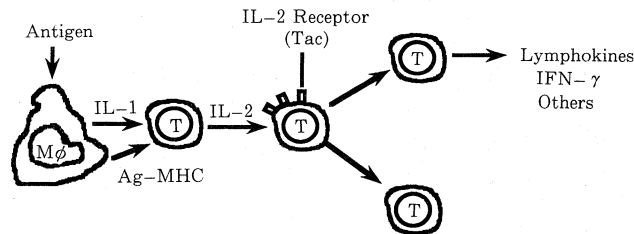


Fig. 2 Cellular Interactions in Lymphocyte Response to Antigen

2 レセプターを発現するとともに、IL-2を産生するようになる。

いったん、T細胞がIL-2に対するレセプターを獲得すると、IL-2によりT細胞のクローナルな増殖が起こる。試験管内である抗原に特異的なT細胞クローンを増殖させれば、T細胞から産生される可溶性物質、すなわちリンホカインの解析を行うことができる。また免疫担当細胞の相互作用についても詳細に検討することが可能となる。こうした細胞性免疫の解析に結核は最もよいモデルの一つと考えられる。

16例の結核性胸膜炎症例で胸水と末梢血の単核球を分離し、インターフェロン $\gamma$ と関わりの深い単核球中のT細胞比率を比べてみると、胸水中で $68.5 \pm 3.8\%$ 、末梢血中で $58.9 \pm 1.9\%$ と胸水中で有意に高いことが明らかになった。このことはT細胞が病変部である胸腔中に集積していることを示している<sup>1)</sup>。

#### 結核性胸膜炎とインターフェロン $\gamma$

結核性胸膜炎症例の末梢血と胸水からリンパ球分画を調整し、種々の濃度の精製ツベルクリン(PPD)を添加し培養した後に、培養上清を経時的に採取し、上清中のインターフェロン活性を測定した。

結核性胸膜炎症例の末梢血リンパ球にPPDを添加し培養すると、一部の症例でインターフェロン産性が認められるが、その活性は低いものであった。同様に結核性胸膜炎症例の胸水リンパ球にPPDを添加し培養すると、ほとんどすべての症例で培養上清中に高値のインターフェロン産生がみられた。胸水中のリンパ球によって産生されたインターフェロン活性は末梢血リンパ球により産生されたインターフェロン活性よりもはるかに高いものであった。

これらの事実は、結核性胸膜炎において病変部である胸腔にリンパ球とくにT細胞が集積し、結核菌抗原に強く感作され、結核免疫と関わりが深いとされているインターフェロン $\gamma$ を産生していることを示している<sup>1)</sup>。

どのようなT細胞サブセットがインターフェロン $\gamma$ 産生に関わっているのかを明らかにするために、結核性胸

水中のT細胞を抗CD4単クローン抗体と補体、または抗CD8単クローン抗体と補体で処理した後に、PPDを添加してインターフェロン産生能を検討した。抗CD4単クローン抗体と補体での処理によりインターフェロン産生能は有意に低下するが、抗CD8単クローン抗体と補体の処理ではインターフェロン産生能の有意な低下はみられなかった。これらの事実はCD4陽性T細胞がインターフェロン $\gamma$ の産生に関与していることを示唆している<sup>2)</sup>。

#### 結核性胸膜炎とインターロイキン

肺マクロファージについては多くの研究がされているが、胸腔中のマクロファージについてはほとんど知られていないのが現状である。結核性胸膜炎症例の胸水中のマクロファージと末梢血中の単球をPPDで刺激したときのIL-1産生能はほぼ同等であった。しかし、健康者の末梢血単球をPPDで刺激したときよりは有意に高いIL-1産生がみられた。精製ツベルクリンにリポポリサッカライド(LPS)の混入があると、LPSがIL-1を産生させている可能性がある。使用したPPDにLPSの混入があるかどうかを検討してみたが、LPSの量は無視しうるものであった。したがってPPDそのものがマクロファージや単球にIL-1を産生させる能力があると考えられる<sup>3)</sup>。

胸水または末梢血から得たT細胞を、マクロファージ単球系の細胞の表面抗原であるOKM1に対する抗体と補体で処理し、少数ながら存在する可能性のあるマクロファージや単球を極力除去し調整した精度の高いT細胞に、種々の量のマクロファージあるいは単球を加えてT細胞とマクロファージ・単球系細胞の再構成を行った。すなわち組合せとしては、胸水T細胞とマクロファージ、胸水T細胞と単球、末梢血T細胞とマクロファージ、末梢血T細胞と単球の四つがあげられる。それぞれの再構成細胞培養液中にPPDを加えてIL-2産生をみると、最も高いIL-2産生は胸水T細胞と胸水マクロファージの組合せでみられた。ついて胸水T細胞と単球、末梢血T細胞とマクロファージという順序で、最も低かった

のは末梢血T細胞と単球という組合せであった。結核での末梢血単球には免疫抑制作用があると言われているが<sup>45)</sup>、ここで注目したいのは抗原提示細胞であるマクロファージや単球の数を増すにつれてIL-2産生が増強したことである。結核性胸膜炎は結核としては比較的早い時期にあり、この段階では単球の免疫抑制作用はまだ強くないのかもしれない。

これらの結果は結核性胸膜炎の病変部でマクロファージの存在下にT細胞は効率よくIL-2を産生し、結核菌抗原(PPD)に反応するT細胞クローンが増殖していることを示唆している。結核性胸膜炎での胸水中のマクロファージと末梢血中の単球とのIL-1産生能に差がないにもかかわらず、T細胞のIL-2産生にaccessory細胞としての差があったのは、IL-1以外の因子の関与があるのかもしれない。

### 結核性胸水とサイトカイン

結核性胸膜炎では胸腔中に多数の免疫担当細胞が集積しているので、胸水中にはこれらの免疫担当細胞から産生される種々のサイトカインが含有されている可能性がある。結核性胸膜炎の胸水中のインターロイキン1、インターロイキン2、インターフェロン $\gamma$ を測定し、癌性胸膜炎の胸水を対照として比較してみた。

結核性胸水と癌性胸水におけるIL-1 $\beta$ 濃度をみると、結核性胸水中のIL-1 $\beta$ 濃度は癌性胸水におけるIL-1 $\beta$ 濃度よりも若干高値を示したが、その差は著明ではなかった。T細胞のIL-2産生にはIL-1以外の因子も関与している可能性があげられる。また分泌されたIL-1の存在は必ずしも必要なく、マクロファージの細胞膜に結合したIL-1でも十分にT細胞に働きかけることができるとの報告もあり<sup>6)</sup>、胸水中のIL-1値に結核と癌で大差はなくてもIL-2産生には影響が少ないのかもしれない。

結核性胸水中と癌性胸水中のIL-2値を比較してみると前者で明らかに高かった。結核性胸膜炎症例の胸水中のPPDに反応するT細胞の頻度は、同一症例の末梢血中のPPD反応性T細胞やツベルクリン陽性健康者の末梢血中のPPD反応性T細胞の頻度よりも高いことが報告されている<sup>7)</sup>。こうした事実からも、結核性胸水中ではIL-2が高値を示すことは十分に妥当なことで考えられる。

結核性胸水中と癌性胸水中のインターフェロン $\gamma$ 値を比較してみると、その差はIL-2に比べても一層顕著であった。IL-2によるT細胞のクローナルな増殖はIL-2の濃度に依存することから、結核性胸水中のIL-2値とインターフェロン $\gamma$ 値の間には強い相関関係があることが推測されたが、予想どおりの結果であった<sup>8)</sup>。

### 肺泡マクロファージとインターフェロン $\gamma$

結核性胸膜炎の胸水中のT細胞がPPD刺激によりインターフェロン $\gamma$ を効率よく産生することが明らかになった。このように産生されたインターフェロン $\gamma$ が、結核症においてどのような役割を果たしているのかは興味のあるところである。

結核性胸膜炎では胸水中に少量しかマクロファージが存在せず、十分な量のマクロファージを得ることが難しいので、肺泡マクロファージを対象とした。結核菌の排菌停止後の気管支病変の検討時に承諾を得て気管支肺泡洗浄を施行した。得られた気管支肺泡洗浄液中のマクロファージにインターフェロン $\gamma$ を添加し、その後にBCG菌を貪食させた。100ないし1,000 U/mlのインターフェロン $\gamma$ 添加によりBCG菌を取り込むマクロファージの割合が有意に増加するとともに、取り込まれたBCG菌数も有意に増加した。100 U/mlのインターフェロン $\gamma$ をあらかじめ24時間肺泡マクロファージに作用させた後にBCG菌を取り込ませ、その殺菌能を検討した。インターフェロン $\gamma$ 非添加の肺泡マクロファージに比べ、インターフェロン $\gamma$ を作用させた肺泡マクロファージのBCG菌に対する殺菌能は有意に亢進していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。

### 肺泡マクロファージと一酸化窒素(NO)

結核症は、リーシュマニア症、トキソプラズマ症などと同様に、マクロファージ内での殺菌作用が生体防御の上で重視される感染症である。細胞内殺菌活性を持つものとして、近年注目されているものに一酸化窒素(NO)がある。NOはガスであるために、細胞膜や組織中を自由に拡散できるが、生体内では非常に不安定で数秒の半減期で分解もしくはヘモグロビンと結合してその場から消去されてしまう。このようにNOは空間的な作用範囲は狭いが、応答性が非常に速いという特徴を持つ。

インターフェロン $\gamma$ などにより活性化されたマクロファージで産生されたNOは、鉄元素を中心に持つアコニターゼ活性を低下させることによりミトコンドリアの電子伝達系を阻害したり、活性化酸素中間反応体と相互作用をもつことなどにより、非特異的に殺菌作用を発揮すると考えられている(Fig. 3)。さまざまな生体作用を持つNOは、同じくラジカルである活性化酸素とは異なり、尿素サイクルの中間代謝物であるL-アルギニンを基質としてNO合成酵素(NOS)により合成される。NOの合成はN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)によって阻害される。

気管支肺泡洗浄液から回収した肺泡マクロファージ内でのBCG殺菌能を検討してみた。L-NAMEによる

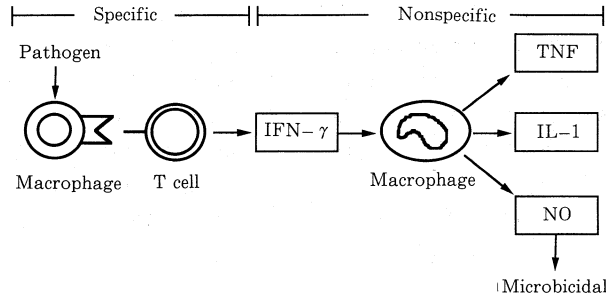


Fig. 3 Possible Relationship between Nonspecific Defence and NO

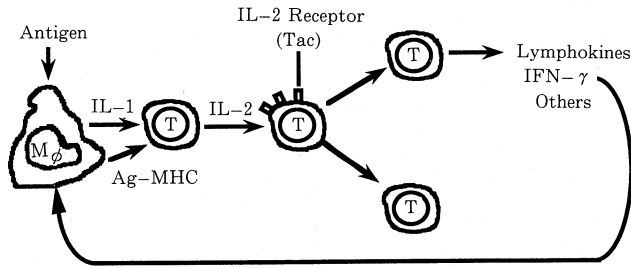


Fig. 4 Cellular Interactions in Lymphocyte Response to Antigen

NO 産生抑制によりマクロファージの BCG 殺菌能の低下がみられた。したがって、肺胞マクロファージ内での BCG 殺菌に NO が関与していることが示唆された。

おわりに

インターフェロン $\gamma$ は活性化T細胞から産生される代表的なリンホカインの一つである。結核性胸膜炎をモデルに病巣部に集積しているT細胞の機能をみると、確かにインターフェロン $\gamma$ 産生能が亢進していた。T細胞を増殖させているインターロイキン2はどうかとみると、同様に著明にその産生は亢進していた。最終的にマクロファージ内での結核菌に対する殺菌能も、インターフェロン $\gamma$ の影響のもとに亢進していることが明らかになった。結核性胸膜炎をモデルにサイトカインの役割をある程度明らかにすることができた。最初に示した Fig. 2 にインターフェロン $\gamma$ からマクロファージに向かってもう一つの矢印をつけることができたことになる (Fig. 4)。さらにヒトの肺胞マクロファージ内での BCG 菌の殺菌に NO が関与している可能性を指摘したが、ヒトではマウスなどげっ歯類に比べてマクロファージの NO 産生に対するインターフェロン $\gamma$ の作用は強くないのも事実である。

結核症は細胞性免疫の解明にもっとも適した対象の一つであり、ヒトの結核性胸膜炎を中心にその病態の解析

を行った私たちの成績を中心に紹介した。

文 献

- 1) Shimokata K, Kawachi H, Kishimoto H, et al. : Local cellular immunity in tuberculous pleurisy. *Am Rev Respir Dis.* 1982 ; 126 : 822-824.
- 2) Shimokata K, Kishimoto H, Takagi E, et al. : Determination of the T-cell subset producing  $\gamma$ -interferon in tuberculous pleural effusion. *Microbiol Immunol.* 1986 ; 30 : 353-361.
- 3) Kurasawa T, Shimokata K : Cooperation between accessory cells and T lymphocytes in patients with tuberculous pleurisy. *Chest.* 1991 ; 100 : 1046-1052.
- 4) Ellner JJ : Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. *Ann Intern Med.* 1978 ; 89 : 932-933.
- 5) Ellner JJ : Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol.* 1978 ; 121 : 2573-2579.
- 6) Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, et al. : Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl*

- Acad Sci USA. 1985 ; 82 : 1204-1208.
- 7) Fujiwara H, Tsuyuguchi I : Frequency of tuberculin-reactive T-lymphocytes in pleural fluid and blood from patients with tuberculous pleurisy. Chest, 1986 ; 89 : 530-532.
- 8) Shimokata K, Saka H, Murate T, et al. : Cytokine content in pleural effusion. Chest. 1991 ; 99 : 1103-1107.
- 9) Kawatsu H, Hasegawa Y, Takagi E, et al. : Human alveolar macrophages of anergic patients with lung cancer lack the responsiveness to recombinant interferon gamma. Chest. 1991 ; 100 : 1277-1280.