

今村賞受賞記念講演

ヒトにおける結核免疫の解析  
— 結核性胸膜炎とサイトカインを中心として —

下方 薫

名古屋大学医学部第一内科

受付 平成8年7月8日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

ANALYSIS OF CELLULAR IMMUNITY AGAINST TUBERCULOSIS IN MAN  
WITH SPECIAL REFERENCE TO TUBERCULOUS PLEURISY AND  
CYTOKINES

Kaoru SHIMOKATA \*

(Received 8 July 1996)

Because of containing of numerous immunocompetent cells, tuberculous pleurisy is a good model for analysis of local cellular immunity.

When lymphocytes in pleural effusion were cocultured with purified protein derivative (PPD), they reacted to PPD and produced far more interleukin 2 (IL-2) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) than did peripheral blood lymphocytes. Analysis using monoclonal antibody and complement revealed 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.

Tuberculous pleural fluid itself had far higher levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  than malignant pleural fluid. Therefore, it is indicated that activated T lymphocytes in tuberculous pleural fluid concern the production of lymphokines at the morbid site.

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 antimycobacterial 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

キーワードズ : 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

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

## はじめに

疾患の本態を明らかにする上で、病変部位に直接到達し、その病態を究明することは極めて重要である。しかし内科疾患では直接病巣に到達することは困難なことが多い。結核症はT細胞を中心とした細胞性免疫を解析するのに最もよい対象であり、特に結核性胸膜炎では病変部位である胸腔の滲出性胸水中に多数の免疫担当細胞が存在し、検体を雑菌の混入なく採取し解析できる利点がある。結核性胸膜炎における胸水中のT細胞の機能を動的に捉え、末梢血中のT細胞の機能と比較し、病変部における細胞性免疫の意義を検討した。

## 結核免疫とT細胞

結核性胸膜炎の16症例で胸水と末梢血の単核球を分離し、単核球中のT細胞比率を比較してみると、胸水中で $68.5 \pm 3.8\%$ 、末梢血中で $58.9 \pm 1.9\%$ とT細胞比率は胸水中で有意に高かった<sup>1)</sup>。このことは結核菌抗原に特異的なT細胞クローンが病変部である胸腔中に集積し、胸腔内で増殖していることを示唆している。

結核性胸膜炎症例の胸水中の精製ツベルクリン(PPD)に反応するT細胞数は、同一症例あるいはツベルクリン陽性健康者の末梢血中のPPD反応性T細胞数よりも多数存在することが限界希釈法を用いた方法によって実証されている<sup>2)</sup>。こうした報告からも上記の結果は妥当なものと考えられる。

病変局所由来のT細胞とインターフェロン $\gamma$ 

T細胞は各種のリンホカインを産生するが、なかでも結核免疫に重要な役割をもつのはインターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ )であるとされている。そこで結核性胸膜炎症例の末梢血と胸水からリンパ球分画を取り出し、結核菌の抗原成分であるPPDを加えて培養し上清中に産生されたIFN活性を測定した。

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IFN産生がみられた。しかし結核性胸膜炎症例の末梢血リンパ球にPPDを添加し賠償しても、ほとんどの症例でIFN産生が認められなかった。たとえ認められても、その活性は低いものであった(Fig. 1)<sup>1)</sup>。さらに個々の結核性胸膜炎症例における一定の濃度のPPDによるIFN産生を、胸水中と末梢血中のリンパ球で比較検討してみると、胸水中のリンパ球が末梢血中のリンパ球より高いIFN産生を行っていることが明らかとなった(Fig. 2)。これらの成績は、結核性胸膜炎の病変部である胸腔に結核菌抗原に強く感作されたT細胞が集積しクローナルに増殖した結果、結核免疫と関わりが深いとされているIFN $\gamma$ を産生していることを示している。

IFN $\gamma$ 産生にいかなるT細胞サブセットが関わっているのだろうか。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

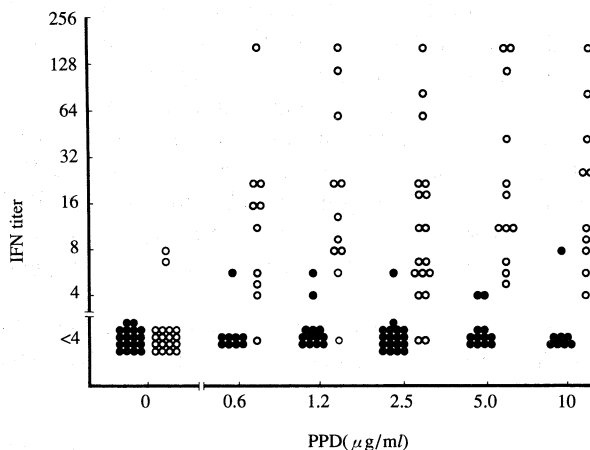


Fig. 1 Closed circles indicate interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) titers produced by  $1 \times 10^6$  peripheral blood lymphocytes cocultured with various concentrations of PPD for 5 days. There was no significant difference between the group with and the group without PPD added. Open circles indicate IFN $\gamma$  titers produced by  $1 \times 10^6$  exudative lymphocytes in pleural cavity cocultured with various concentrations of PPD for 5 days. There was a significant difference between the group with and the group without PPD added ( $p < 0.005$ ).

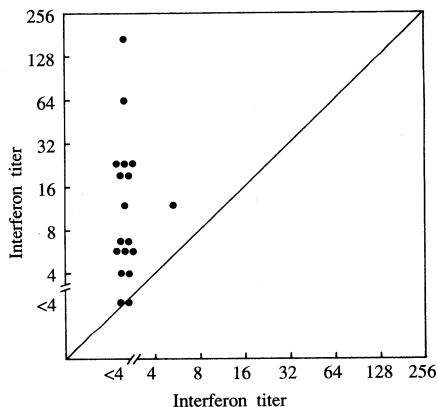


Fig. 2 IFN- $\gamma$  titers in patients with tuberculous pleurisy. Closed circle indicates IFN- $\gamma$  titer of each patient. Vertical line; IFN- $\gamma$  titers produced by lymphocytes in pleural effusions. Horizontal line; IFN- $\gamma$  titers produced by lymphocytes in peripheral blood.

と補体で処理した後に、PPDを添加してIFN- $\gamma$ 産生能を検討した。抗CD4単クローン抗体と補体の処理によりIFN産生能は有意に低下した。抗CD8単クローン抗体と補体の処理ではIFN産生能に変化はみられなかった<sup>3)</sup>。これらの事実はCD4陽性T細胞がIFN- $\gamma$ の産生に関与していることを示唆している。

結核性胸膜炎とインターロイキン

胸腔中のマクロファージの役割は、肺胞マクロファージや腹腔マクロファージに比べほとんど知られていない。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で刺激したときのインターロイキン-1(IL-1)産生能はほぼ同等であった。しかし、健常者の末梢血単球を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(Fig. 3)<sup>4)</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すると、精度の高いT細胞が得られる。このT細胞に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4つがあげられる。

それぞれの再構成細胞培養液中にPPDを加えてインターロイキン-2(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。最も低かったのは、末梢血T細胞と単球と

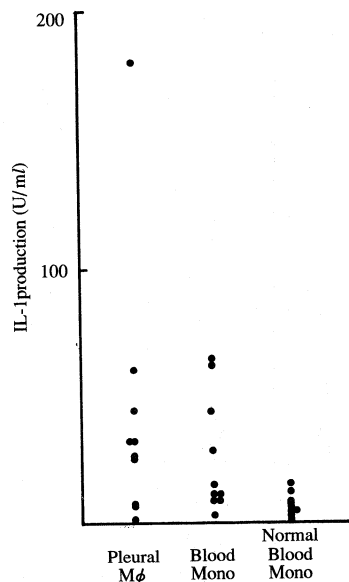


Fig. 3 PPD-induced interleukin-1 (IL-1) activities of pleural fluid macrophages and blood monocytes in patients with tuberculous pleurisy. IL-1 activities of blood monocytes from PPD-positive control subjects were also studied. Pleural fluid macrophages and peripheral blood monocytes in patients with tuberculous pleurisy showed significantly more IL-1 activity than normal monocytes ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the IL-1 activities of pleural fluid macrophages and monocytes in patients with tuberculous pleurisy.

の組合せであった。結核性胸膜炎胸水中のマクロファージは末梢血単球よりも抗原提示能が有意に高く、また胸水中のT細胞は末梢血中のT細胞よりも有意に高いIL-2産生能を示した(Fig. 4)<sup>4)</sup>。

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産生に抗原提示細胞としての差がみられたのは、IL-1以外に他の因子も関与している可能性がある。

結核性胸水中のサイトカイン

結核性胸膜炎では胸腔中に多数の免疫担当細胞が存在していることから、胸水中にはこれらの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。

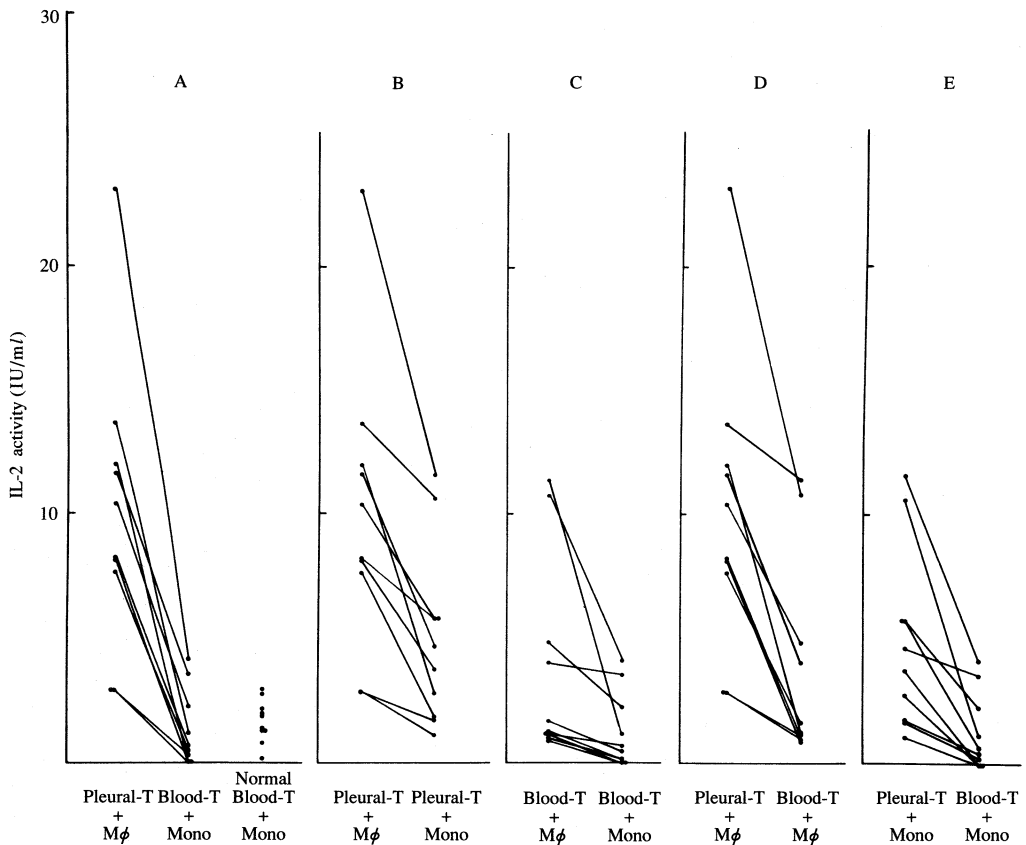


Fig. 4 PPD-induced interleukin-2 (IL-2) activity in combination of T lymphocytes and autologous accessory cells obtained from patients with tuberculous pleurisy. The combination of tuberculous pleural fluid T lymphocytes and 10 percent pleural fluid macrophages was more effective than that of autologous blood T lymphocytes and 10 percent monocytes ( $p < 0.01$ ) (A). Pleural fluid macrophages appeared to be more effective than monocytes as accessory cells in IL-2 activity ( $p < 0.01$ ) (B) and ( $p < 0.05$ ) (C). Tuberculous pleural fluid T lymphocytes were more effective in IL-2 activity than autologous blood T lymphocytes ( $p < 0.01$ ) (D and E).

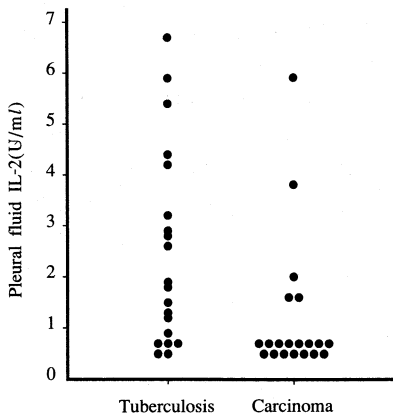


Fig. 5 IL-2 levels in tuberculous and carcinomatous pleural effusions. Significant difference between the two groups ( $p < 0.01$ ).

結核性胸膜炎の胸水中の IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  を測定し、癌性胸膜炎の胸水を対照として比較した。

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>5)</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 値を比較すると、前者で明らかに高かった (Fig. 5)。結核性胸水中と癌性胸水中の IFN- $\gamma$  値を比較してみると、その差は IL-2 より顕著であった (Fig. 6)<sup>6)</sup>。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

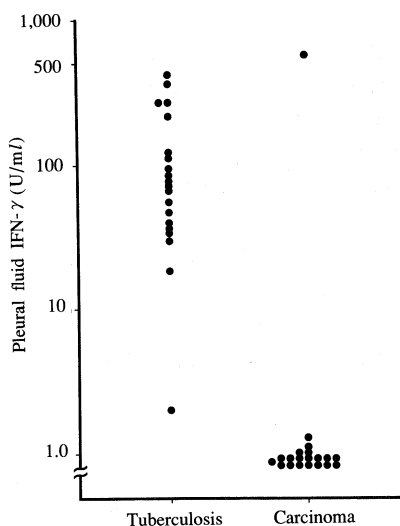


Fig. 6 IFN- $\gamma$  levels in tuberculous and carcinomatous pleural effusions. Significant difference between the two groups ( $p < 0.01$ ).

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>6)</sup>。

#### インターフェロン $\gamma$ による肺胞マクロファージの活性化

ここまでの成績から、結核性胸膜炎の胸水中のT細胞がマクロファージの協力を得て、PPD刺激によりIFN- $\gamma$ 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IFN- $\gamma$ は、結核症においてどのような役割を果たしているのであろうか。

結核性胸膜炎では、胸水中のマクロファージが少量しか存在しないので、十分量のマクロファージを得ることが難しい。そこで標的マクロファージを肺胞マクロファージとした。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胞洗浄を施行した。得られた気管支肺胞洗浄液中のマクロファージにIFN- $\gamma$ を添加し、その後にBCG菌を貪食させた。100ないし1000U/mlのIFN- $\gamma$ 添加により、BCG菌を取り込むマクロファージの割合と、取り込まれたBCG菌数が有意に増加した。100U/mlのIFN- $\gamma$ をあらかじめ24時間肺胞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。IFN- $\gamma$ 非添加の肺胞マクロファージに比べ、IFN- $\gamma$ を作用させた肺胞マクロファージのBCG菌に対する殺菌能は有意に亢進した<sup>7)</sup>。

#### 肺胞マクロファージ内での結核菌の殺菌機構

結核症はマクロファージ内での結核菌の殺菌が生体防衛の上で重視される感染症の1つである。細胞内での殺菌活性をもつものとしてはこれまで活性化酸素が注目されていた。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。

活性化マクロファージで産生されたNOは、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殺菌作用を発揮すると考えられている。NOは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。肺胞マクロファージ内でのBCG殺菌能を検討したところ、NO産生抑制により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

細胞性免疫の成立過程では液性免疫の場合と同様に厳密な抗原認識が存在するが、細胞性免疫が成立しマクロファージが活性化されると細胞内寄生体は非特異的に殺菌される。IFN- $\gamma$ 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1つであり、マクロファージを活性化する。結核性胸膜炎をモデルに病巣部に集積しているT細胞の機能をみてみると、確かにIFN- $\gamma$ 産生能やIL-2産生能は亢進していた。最終的にマクロファージ内での結核菌に対する殺菌能にIFN- $\gamma$ の関与を示唆する結果を得た。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。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。しかし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IFN- $\gamma$ の作用は強くないとの報告もあり、この点についてはさらに解明する必要がある。

結核症は細胞性免疫の解析に最も適した対象の1つである。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、結核病変部の細胞性免疫の動態について考察した。

#### 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) 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.
  - 3) 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.
  - 4) Kurasawa T, Shimokata K: Cooperation between accessory cells and T lymphocytes in patients with tuberculous pleurisy. *Chest*. 1991; 100: 1046-1052.
  - 5) 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.
  - 6) Shimokata K, Saka H, Murate T, et al.: Cytokine content in pleural effusion. *Chest*. 1991; 99: 1103-1107.
  - 7) 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.