

# 肺結核症例における気管支肺胞洗浄細胞成分，特にモノクローナル抗体を用いた細胞サブセットに関する検討

国立京都病院 呼吸器科

澤 野 哲 重

(昭和61年4月4日受付)

## はじめに

結核症の病変形成においては，細胞性免疫反応が重要な役割を担っていることが古くより認められており，病巣部に見られる現象を免疫細胞反応とのかかわりから解明しようとする試みがなされて来たが，その詳細は長く推測の域を脱することはできなかつた<sup>1,2)</sup>。

結核症は，マクロファージ由来の類上皮細胞が主軸となる類上皮細胞肉芽腫病変の形成と乾酪性変化を主徴とする疾患であるが，結核症の減少に伴って結核症以外の類上皮細胞肉芽腫形成症患が注目され，その解明の為の検討が多数行われる様になって来ている。なかでもサルコイドーシスは，肺にびまん性に類上皮細胞肉芽腫病変を来たす疾患として広く注目され，その形成機序に関する検討が行われて来た。1974年 Reynolds らにより開発された気管支肺胞洗浄法(Bronchoalveolar lavage: BAL)は，下部気道の病変部より直接細胞成分，液性成分を採取でき病態機序解明の手段として画期的な進歩を与える技法であった<sup>3)</sup>。一方，Kohler, Milstein らによって開発されたモノクローナル抗体作製の技法を用いてのヒトリンパ球，単球に対するモノクローナル抗体が多数開発され<sup>4,5)</sup>，これらのモノクローナル抗体を用いての細胞マーカーの研究は急速な進展を来たす様になった<sup>6)</sup>。サルコイドーシスに認められる BALF(BAL-fluid) 中細胞サブセットの主なる所見として，マクロファージ・サブセットレベルでは，OKM<sub>1</sub><sup>+</sup> マクロファージの増加が，リンパ球・サブセットレベルでは，活性化Tリンパ球 (E

37°C<sup>+</sup> 細胞) の増加と，OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> 比の増大を主徴とする変化であることが示されている<sup>7,8,9)</sup>。

今回著者は，サルコイドーシスと同様に類上皮細胞肉芽腫病変の形成を主徴とする肺結核症例において，結核菌検索を目的として施行した BAL 検査時に，併せて BALF 細胞についてモノクローナル抗体による検索を行い，肺結核症の病変部における細胞サブセットの動態とその意義についてサルコイドーシス症例と比較検討したのでその成績について報告する。

## 対 象

BAL 施行対象：1984年1月から8月までの間に京都大学結核胸部疾患研究所附属病院を受診した患者の中で，胸部X線写真上片側肺に限局性浸潤影を認め，ツベルクリン反応陽性で，肺結核症が疑われたが，喀痰結核菌陰性であった症例のみを対象とした。これらの対象例に対して結核菌検出を目的として BAL を施行したが，この際に患者に説明了解を得て対側健常肺についても BAL を施行した。

検討対象：両側肺 BAL 施行対象症例13例中で，結核菌を証明し得たのは8例であった。検討にあたっては，さらに臨床所見等より，浸出性の病変が著明なものや線維増殖が著明なものを除外した。すなわち，主訴，赤沈値，結核治療開始3ヶ月後の胸部X線写真の変化等の臨床所見より，類上皮細胞肉芽腫が形成される時期と考えられるいわゆる浸潤乾酪型の病期に相当すると推定された症例5例のみを検討対象とし

た。これらの症例について肺病変部および対側健常肺の BALF 細胞成分および、同時に採取した末梢血中の白血球所見と併せて、以下の対照例と比較検討を行った。

比較検討対象：対照とする肉芽腫性疾患症例として活動期サルコイドーシス患者6例、および対照健常人10例についても同様の検討を行い成績を比較した。尚、サルコイドーシスの活動期と判定した症例は、いずれも発症または発見より6カ月以内で、この間に胸部X線写真所見で消退傾向を認めず、さらに血清 ACE 値が高値を示した症例であった。

尚、喫煙が BALF 細胞所見に影響を与えることが明らかにされているが、今回の対象症例数が少数であるため喫煙の有無を考慮のなかに含めていない。

## 方 法

BAL：4%リドカインによる表面麻酔下にオリンパス BF4B3R 気管支ファイバースコープを用い、病変部の亜～亜々区域枝と、その反対側健常肺の中葉もしくは舌区の亜～亜々区域枝にウエッジし、原則として温滅菌生理食塩水 50 ml を1回ずつ注入し BALF を回収、単層ガーゼで濾過して粘液等を除去した。50 ml プラスチック試験管 (Falcon 2070) 中の BALF を 250×G, 10分間遠沈し、その沈渣を BALF 細胞として回収、さらに Eagle's minimum essential medium (MEM) を用いて2回浮遊、遠沈して洗浄した。

BALF 細胞収量：25  $\mu$ l の BALF を等量のトリパン・ブルー液と混合し、生存細胞数を算定し、BALF 回収量より BALF 細胞収量を算定した。

BAL 細胞分画：MEM 浮遊 BALF 細胞の一部 (5×10<sup>6</sup>/ml) 200  $\mu$ l を用い cytocentrifuge 法で標本作製し、May-Giemsa 染色、non-specific esterase 染色を行い、細胞分画を算定した。

活性化Tリンパ球 (E 37°C) の算定：MEM 浮遊 BAL 細胞 5×10<sup>6</sup>/ml, 100  $\mu$ l と neuraminidase 非処理ヒツジ赤血球 (sheep red blood cell: SRBC) 100  $\mu$ l を混和し、37°C, 15分間の

振盪 incubate 後、室温で、250×G, 5分間遠沈し、再び 37°C, 15分間静置 incubate した後、静に再攪拌し、光学顕微鏡下にリンパ球中のロゼット形成細胞の比率を算定した。また、BALF 細胞分画で得られたリンパ球%を用いて、算定した結果を補正した。この neuraminidase 非処理 SRBC と 37°C, fetal calf serum (FCS) 非存在下でロゼット形成するリンパ球を、活性化Tリンパ球の指標とした<sup>8,10)</sup>。

活性化Bリンパ球数の算定：MEM 浮遊 BAL 細胞 1×10<sup>6</sup>/ml, 100  $\mu$ l に、25%Protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 処理 SRBC 浮遊液 50  $\mu$ l と、抗ヒト Ig ヤギ抗血清(富士臓器) 25  $\mu$ l, 補体(モルモット血清) 25  $\mu$ l, を混和し、Cunningham chamber に封入し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> で12時間静置した後、プラークを測定し、BAL 細胞分画で得られたリンパ球%で補正したリンパ球 1×10<sup>6</sup> 個に対する数を算定し、spontaneous immunoglobulin secreting cells (IgSC) を活性化Bリンパ球数の指標値とした<sup>8,11,12)</sup>。尚、ヒト Ig ヤギ抗血清は、抗 IgM, 抗 IgG, 抗 IgA の各クラスを用いた。

モノクローナル抗体によるマクロファージ・サブセット及び、リンパ球・サブセットの同定：マクロファージ・サブセットの同定には、MEM 浮遊 BAL 細胞をそのまま用いた。リンパ球・サブセットの同定には、次の方法で精製したEロゼット形成細胞を用いた。MEM 浮遊 BAL 細胞 5×10<sup>6</sup>/ml に、FCS, neuraminidase 処理 1%SRBC を、容積比 1:1:2 で混和し、37°C, 15分間振盪 incubate し、250×G, 10分間遠沈して、4°C で1時間静置した。反応後の細胞を静かに再攪拌した後、Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 比重遠沈法を用いて管底部のEロゼット形成細胞を回収した。次いで、Gey's solution を用いて低張性溶血を行い SRBC を除去してEロゼット形成細胞 (E<sup>+</sup> 細胞) を得た。

BAL 細胞 MEM 浮遊液、及び E<sup>+</sup> 細胞 MEM 浮遊液 0.8~2.0×10<sup>6</sup>/ml 濃度で、各々

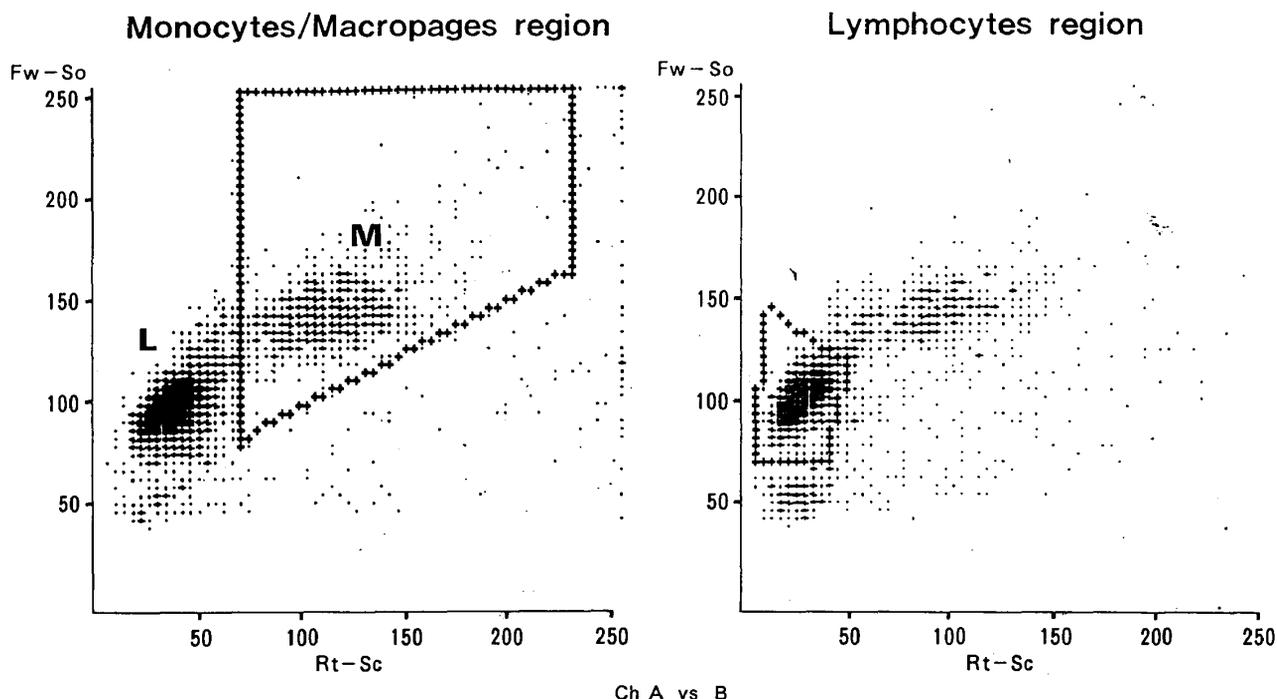


図1. Ortho Spectrum Type III における単球/マクロファージおよびリンパ球領域

100  $\mu$ l に, 10%FCS 加 MEM 50  $\mu$ l, 1%BSA (bovine serum albumin) 加 PBS (phosphate buffered saline) 混和200倍希釈 OK シリーズ・モノクローナル抗体 (Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, NJ) 及び2000倍希釈 Tac 抗体 (京都大学第1内科内山卓博士提供) 各々 50  $\mu$ l を混和し, 4°C, 30分間反応させた。5 mM NaN<sub>3</sub> 加10% FCS-PBS で, 3回洗滌後, 160倍希釈 FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識ヤギ抗マウス IgG 血清 (Tago Inc., Burlingame, CA) 各 100  $\mu$ l を加え, 4°C, 30分間反応させた。各モノクローナル抗体に反応した陽性細胞の比率は, Ortho Spectrum III (Laser cytoflowmetry) を用い図1に示すトリガー領域を設定し測定した。測定値は, 細胞非存在下 FITC 混入対照液の測定値で補正した。さらに, リンパ球・サブセットにおいては, 各陽性細胞の OKT3<sup>+</sup> 細胞 (ヒトTリンパ球) に対する比率を算定し補正した。

末梢血: 末梢血は, ヘパリン加採血後, MEM で2倍に希釈し, Ficoll-Paque 比重遠沈法にて PMC (peripheral blood mononuclear cell) に分離した。PMC を用いて BALF と同

様の操作を行い E37°C, IgSC, 及び各モノクローナル抗体による単球・サブセットの算定をした。さらに, PMC を BALF と同様に E<sup>+</sup> 細胞に精製し, この細胞を用いて各モノクローナル抗体による末梢血リンパ球・サブセットの算定をした。

成績は, 平均値  $\pm$  S. D. にて示し, 各群間の統計学的有意差検定には, Student's t-test (paired or unpaired) を用い危険率5%以下の場合を有意差ありとした。

### 成 績

肺結核症5例の検討成績, 対照として活動期肺サルコイドーシス症6例及び健常人10例のBALF 及び末梢血の検討成績を, 表1, 2, 3に示した。

#### 1. BALF 細胞収量

表1, 図2に示したように肺結核症においては, いずれの症例も患側肺は健側肺に比較してより多数の細胞が回収された (患側肺  $2.41 \pm 1.92 \times 10^5$ /ml, 健側肺  $1.07 \pm 1.11 \times 10^5$ /ml:  $p < 0.05$ )。また, 対照健常人値 ( $1.31 \pm 1.23 \times 10^5$ /ml) と比較しても, 肺結核症患者の患側肺

表1. 肺結核，サルコイドーシス症例における臨床所見および気管支肺胞洗浄液細胞所見  
(1) 細胞収量・細胞分画

| 疾患          | 症例       | 性, 年齢 | 発見動機 | 胸部X線所見 | 赤沈 (1時間値)    | ツベルクリン反応径 (mm) | 患側/健側 | 細胞収量 (10 <sup>6</sup> /ml) | 細胞分画 (%) |       |       |
|-------------|----------|-------|------|--------|--------------|----------------|-------|----------------------------|----------|-------|-------|
|             |          |       |      |        |              |                |       |                            | マクロファージ  | リンパ球  | 好中球   |
| 肺結核         | 1. T. U. | F35   | 検診   | rⅢl    | 19           | 100×60         | 右     | 1.23                       | 91.0     | 9.0   | 0.0   |
|             |          |       |      |        |              |                | 左     | 0.69                       | 96.5     | 3.5   | 0.0   |
|             | 2. T. E. | F37   | 咳    | rⅢl    | 22           | 40×31          | 左     | 3.26                       | 86.0     | 10.8  | 5.2   |
|             |          |       |      |        |              |                | 右     | 0.94                       | 95.5     | 4.5   | 0.0   |
|             | 3. Y. C. | F19   | 検診   | rⅢl    | 34           | 68×42          | 右     | 0.69                       | 84.4     | 14.8  | 0.8   |
|             |          |       |      |        |              |                | 左     | 0.29                       | 95.8     | 3.7   | 0.5   |
|             | 4. N. H. | F22   | 検診   | lⅢl    | 34           | 48×37          | 左     | 1.50                       | 50.0     | 22.3  | 27.7  |
|             |          |       |      |        |              | 右              | 0.42  | 87.1                       | 12.4     | 0.5   |       |
|             | 5. C. H. | M47   | 検診   | rⅢl    | 15           | 48×37          | 右     | 5.39                       | 71.9     | 28.1  | 0.0   |
|             |          |       |      |        |              | 左              | 3.00  | 92.8                       | 6.0      | 0.0   |       |
|             | 平均       |       |      |        | 25           |                | 患側    | 2.41                       | 76.7     | 17.0  | 6.7   |
|             | ±S.D.    |       |      |        | ±9           |                |       | ±1.92                      | ±16.5    | ±8.0  | ±11.9 |
|             |          |       |      |        |              |                | 健側    | 1.07                       | 93.5     | 6.0   | 0.2   |
|             |          |       |      |        |              |                |       | ±1.11                      | ±3.9     | ±3.7  | ±0.3  |
| サルコイドーシス    | 症例       | 性, 年齢 | 発見動機 | 胸部X線所見 | S-ACE (U/ml) | 組織診断           |       |                            |          |       |       |
|             | 1. T. K. | M39   | 検診   | Ⅲ      | 32.7         | (+)            |       | 1.75                       | 72.5     | 27.5  | 0.0   |
|             | 2. Y. H. | M30   | 検診   | I      | 31.8         | (+)            |       | 0.29                       | 37.7     | 62.3  | 0.0   |
|             | 3. M. K. | M24   | 発熱   | I      | 38.0         | (+)            |       | 2.24                       | 77.4     | 22.2  | 0.4   |
|             | 4. T. S. | M24   | 検診   | I      | 27.5         | (-)            |       | 0.88                       | 89.9     | 10.1  | 0.0   |
|             | 5. N. M. | M35   | 検診   | I      | 26.6         | (-)            |       | 0.46                       | 60.9     | 37.3  | 1.1   |
|             | 6. T. M. | M35   | 皮膚病変 | Ⅱ      | 19.2         | (+)            |       | 0.78                       | 86.3     | 12.8  | 0.8   |
|             | 平均       |       |      |        | 29.3         |                |       | 1.07                       | 70.8     | 28.7  | 0.4   |
|             | ±S.D.    |       |      |        | ±6.4         |                |       | ±0.77                      | ±19.2    | ±19.2 | ±0.5  |
| 対照健康人 (10例) |          |       |      |        |              |                | 平均    | 1.31                       | 90.2     | 9.3   | 0.3   |
|             |          |       |      |        |              |                | ±S.D. | ±1.23                      | ±10.4    | ±10.0 | ±0.5  |

\*1 日本結核病学会病型分類

\*2 I. BHL  
 II. BHL+Mottling  
 III. Mottling only

表2. 肺結核, サルコイドーシス症例における気管支肺胞洗浄液細胞所見  
(2) 細胞サブセット

| 疾患          | 症例       | 患側/健側           | マクロファージ・サブセット (%) |               | E37°C (%)     | リンパ球サブセット         |                 |             |               |
|-------------|----------|-----------------|-------------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------|---------------|
|             |          |                 | OKM1+             | OKIa1+        |               | IgSC              | OKT4+/OKT8+     | Tac+ (%)    | OKIa1+ (%)    |
| 肺結核         | 1. T. U. | 右<br>左          | —                 | —             | 3.6           | 1,333             | 2.7             | 3.9         | 19.7          |
|             |          |                 | —                 | —             | 3.1           | 1,715             | 2.0             | 6.7         | 8.6           |
|             | 2. T. E. | 左<br>右          | 64.1              | 61.7          | 30.4          | 556               | 2.0             | 5.6         | 26.8          |
|             |          |                 | 84.1              | 34.4          | 30.2          | 37,333            | 1.7             | 9.3         | 38.4          |
|             | 3. Y. C. | 右<br>左          | 60.6              | 60.0          | 22.5          | 5,067             | 1.2             | 5.3         | 3.8           |
|             |          |                 | 21.4              | 71.6          | 20.0          | 31,621            | 1.0             | 3.2         | 7.7           |
|             | 4. N. H. | 左<br>右          | 64.5              | 48.0          | 28.0          | 4,709             | 3.2             | 9.0         | 41.2          |
|             |          |                 | 24.2              | 49.5          | 33.5          | 11,371            | 3.6             | 9.0         | 37.9          |
|             | 5. C. H. | 右<br>左          | 8.2               | 24.0          | 6.4           | 0                 | 2.6             | 8.0         | 42.7          |
|             |          |                 | 4.5               | 23.1          | 11.5          | 0                 | 3.7             | 9.5         | 31.6          |
|             |          | 患側<br>(平均±S.D.) | 49.4<br>±27.5     | 48.4<br>±17.4 | 19.2<br>±13.5 | 2,333<br>±2,383   | 2.3<br>±0.8     | 6.4<br>±2.1 | 26.8<br>±16.1 |
|             |          | 健側<br>(平均±S.D.) | 33.6<br>±34.8     | 44.7<br>±21.0 | 18.7<br>±11.5 | 16,408<br>±17,173 | 2.4<br>±1.2     | 7.5<br>±2.7 | 24.8<br>±15.5 |
| サルコイドーシス    | 1. T. K. |                 | 56.4              | 77.1          | 2.7           | 0                 | 5.2             | 2.4         | 46.5          |
|             | 2. Y. H. |                 | 54.0              | 75.3          | 47.0          | 60                | 5.9             | 7.7         | 22.4          |
|             | 3. M. K. |                 | 42.8              | 49.0          | 12.0          | 16,980            | 2.6             | 2.8         | 40.1          |
|             | 4. T. S. |                 | 45.4              | 55.7          | 6.1           | 590               | 2.3             | 5.3         | 18.7          |
|             | 5. N. H. |                 | 27.4              | 34.2          | 17.6          | 0                 | 2.5             | 4.1         | 12.7          |
|             | 6. T. M. |                 | 70.3              | 87.9          | —             | —                 | 2.0             | —           | 9.5           |
|             |          |                 | 平均<br>±S.D.       | 4.94<br>±14.5 | 63.2<br>±20.2 | 17.1<br>±17.7     | 3,526<br>±7,525 | 3.4<br>±1.7 | 4.5<br>±2.1   |
| 対照健常人 (例10) |          | 平均<br>±S.D.     | 35.7<br>±18.5     | 53.6<br>±17.0 | 4.5<br>±4.1   | 2574<br>±425      | 1.7<br>±1.3     | 6.0<br>±4.0 | 17.2<br>±14.3 |

表3. 肺結核, サルコイドーシス症例における末梢血単核細胞サブセット

| 疾患          | 症例       | 単球サブセット (%)   |               | リンパ球サブセット     |               |                 |             |             |              |
|-------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|
|             |          | OKM1+         | OKIa1+        | E37°C (%)     | IgSC          | OKT4+/OKT8+     | Tac+ (%)    | OKIa1+ (%)  |              |
| 肺結核         | 1. T. U. | —             | —             | 25.4          | 800           | 1.2             | 0.6         | 3.5         |              |
|             | 2. T. E. | 40.3          | 48.4          | 14.4          | 210           | 1.2             | 1.7         | 6.0         |              |
|             | 3. Y. C. | 94.1          | 74.4          | 34.4          | 450           | 0.9             | 4.0         | 3.7         |              |
|             | 4. N. H. | 94.0          | 96.6          | 10.0          | 1,350         | 3.4             | 9.1         | 28.0        |              |
|             | 5. C. H. | 93.5          | 42.6          | 32.9          | 110           | 0.7             | 1.4         | 10.2        |              |
|             |          |               | 平均<br>±S.D.   | 80.5<br>±26.8 | 65.5<br>±24.9 | 23.4<br>±10.9   | 584<br>±504 | 1.5<br>±1.1 | 3.4<br>±3.4  |
| サルコイドーシス    | 1. T. K. | 93.6          | 20.6          | 26.0          | 1,490         | 1.6             | 3.1         | 24.1        |              |
|             | 2. Y. H. | 98.9          | 66.5          | 25.0          | 130           | 1.6             | 3.4         | 11.8        |              |
|             | 3. M. K. | 86.0          | 73.5          | 11.5          | 4,550         | 0.9             | 2.3         | 17.7        |              |
|             | 4. T. S. | 91.5          | 63.8          | 1.5           | 6,140         | 0.4             | 0.6         | 25.0        |              |
|             | 5. N. H. | 83.8          | 22.5          | 6.5           | 0             | 1.1             | 3.4         | 12.3        |              |
|             | 6. T. M. | 91.8          | 84.1          | —             | —             | 1.1             | —           | 20.6        |              |
|             |          | 平均<br>±S.D.   | 90.9<br>±5.4  | 55.7<br>±27.0 | 14.1<br>±11.0 | 2,462<br>±2,754 | 1.1<br>±0.5 | 2.6<br>±1.2 | 18.6<br>±5.7 |
| 対照健常人 (例10) |          | 85.4<br>±16.8 | 41.0<br>±22.5 | 22.3<br>±9.3  | 87<br>±144    | 1.4<br>±0.5     | 1.2<br>±1.2 | 9.0<br>±8.5 |              |

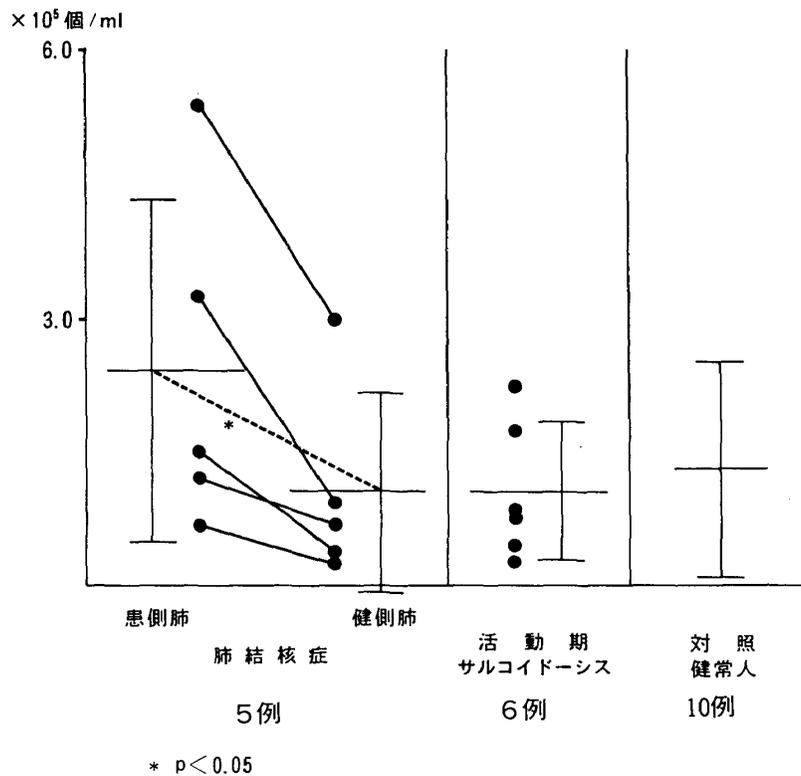


図2. BALF 細胞収量の比較

からは多数の細胞が回収される傾向にあった。

一方、活動期サルコイドーシス症例における細胞収量は、 $1.07 \pm 0.77 \times 10^5/\text{ml}$  であり、従来報告されている様なBALF細胞数の増加<sup>7,8,9,13,14)</sup>は認められなかった。

## 2. BALF 細胞分画

表1、図3に示したように肺結核患者の患側肺より回収したBALFは、健側肺と比較して、マクロファージ%が減少し(患側肺 $76.7 \pm 16.5\%$ 、健側肺 $93.5 \pm 3.9\%$  :  $p < 0.05$ )、相対的にリンパ球%が増加(患側肺 $17.0 \pm 8.0\%$ 、健側肺 $6.0 \pm 3.7\%$  :  $p < 0.05$ )していた。患側肺におけるマクロファージ%の減少は、対照健常人肺( $90.2 \pm 10.4\%$  :  $p < 0.05$ )との比較でも確認された。

活動期サルコイドーシス症例においてはこれまでの報告<sup>7,8,9,13,14)</sup>と同様に、健常人と比較してより著明にマクロファージ%の減少( $70.8 \pm 19.2\%$  :  $p < 0.01$ )、リンパ球%の増加( $28.7 \pm 19.2\%$  :  $p < 0.01$ )が認められた。

すなわち、肺結核病巣よりのBALF中では、活動期サルコイドーシス症例と同様にリンパ球

数が増加しており、相対的なマクロファージ比率の低下が認められた。好中球%は、患側肺( $6.7 \pm 11.9\%$ )に多い傾向が認められたが有意の所見ではなかった。

## 3. BALF マクロファージ・サブセット

OKM<sub>1</sub><sup>+</sup>細胞比率、OKIa1<sup>+</sup>細胞比率について検討した成績は表2に示した。

OKM<sub>1</sub><sup>+</sup>細胞(ヒト単球, null cell 及び顆粒球のマーカー)は、肺結核患者患側肺( $49.4 \pm 27.5\%$ )と健側肺( $33.6 \pm 34.8\%$ )との間には有意差は認めなかったが、一例(症例2)を除いた他の全例で患側肺での比率の増加を認めた。対照健常人値( $35.7 \pm 18.5\%$ )と比較しても、症例2, 3, 4では、患側肺値が2倍近くの高値を示したが、平均値では有意差を認めなかった。今回検討の活動期サルコイドーシス症例においても同様に、OKM<sub>1</sub><sup>+</sup>細胞比率( $49.4 \pm 14.5\%$ )は増加傾向にあったが有意の所見ではなかった。

OKIa1は、ヒトHLA-DRフレームワーク及び同種異型抗原決定部位に対するモノクローナル抗体であり、この抗体が認識する抗原はマクロファージ、Bリンパ球及びTリンパ球に認

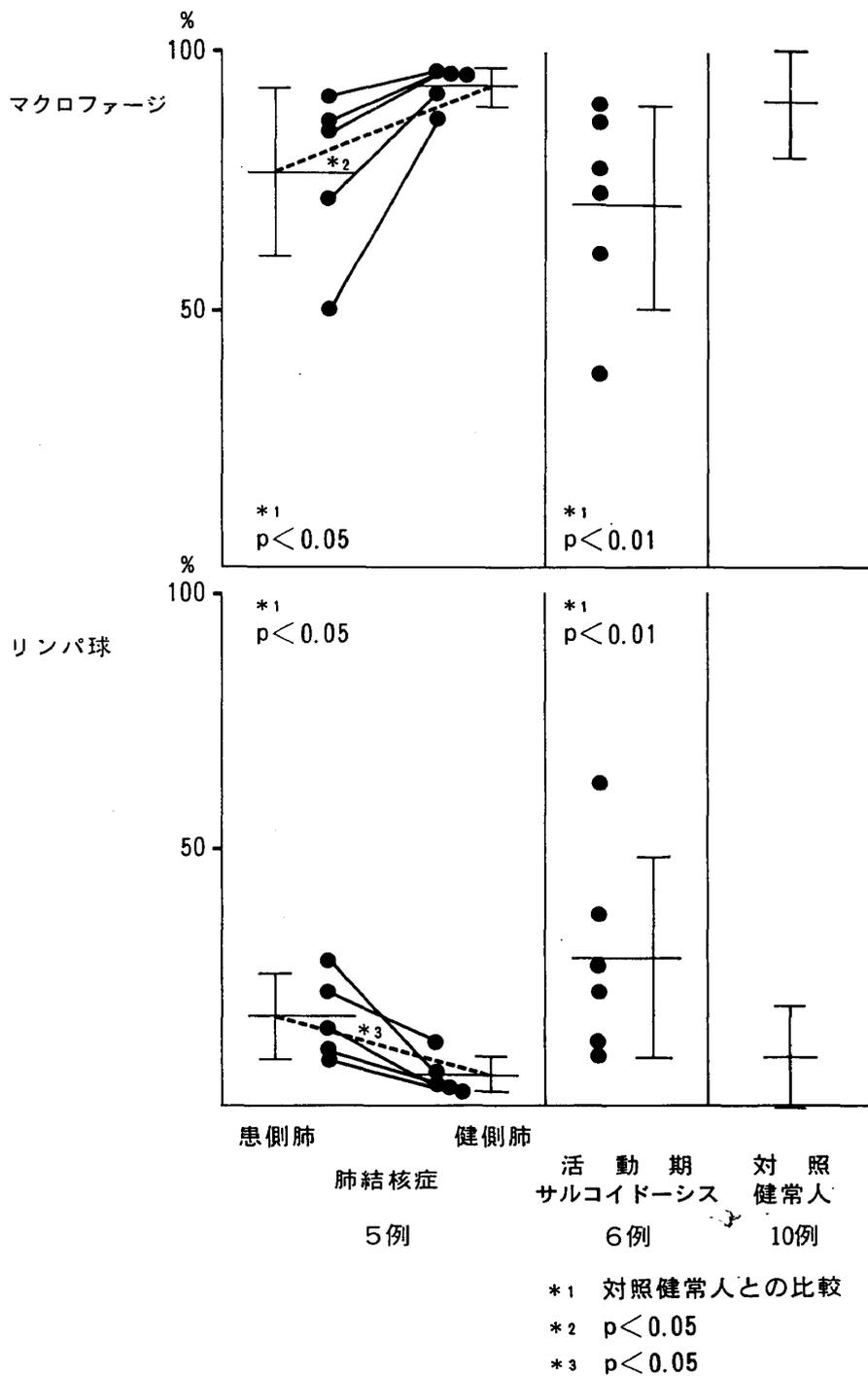


図3. BALF 細胞分画の比較

められている。さらにTリンパ球においては、DNA合成後に出現する late activation antigen に対するマーカーであると考えられている<sup>15)</sup>。肺結核症患者 BALF 中のマクロファージにおける OKIa1<sup>+</sup> 細胞比率では、患側肺 (48.4 ± 17.4%) と健側肺 (44.7 ± 21.0%) 及び、対照健康人値 (53.6 ± 17.0%) の間に有意差は認められなかった。活動期サルコイドーシス患者 (63.2

±20.2%) においても、健康人との間に有意差を認めなかった。

マクロファージ・サブセットについてみると、モノクローナル抗体 OKM1, OKIa1 に関する限り、肺結核症患者の患側肺と健側肺とでは、細胞収量や細胞分画において認められた様な明らかな差異を見出すことはできなかった。

4. BAL リンパ球サブセット

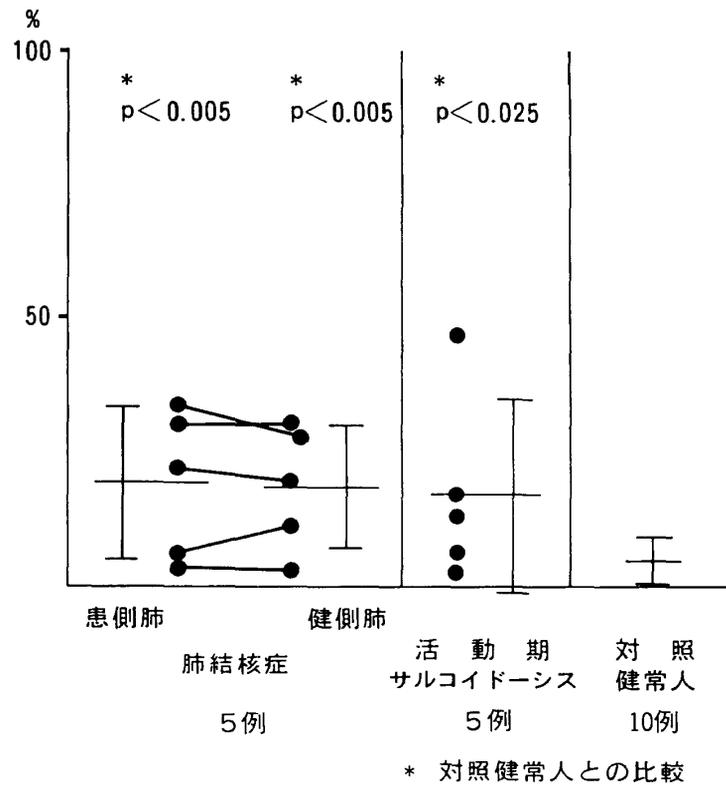


図4. BALF リンパ球サブセットにおける E37°C 細胞比率の比較

活性化Tリンパ球の指標として、E37°C 細胞%を用いて検討し、その結果を表2および図4に示した。肺結核症患者においては、患側肺 (19.2±13.5%) と健側肺 (18.7±11.5%) との間には全く差異が認められなかったが、対照健常人値 (4.5±4.1%) と比較すると、患側肺 (p<0.05) 及び健側肺 (p<0.005) 共に有意に増加していた。サルコイドーシス患者におけるBALF 中には E37°C 細胞が増加している事が報告されているが<sup>7,8)</sup>、著者の検討でも活動期サルコイドーシス症例では、健常人に比較してE37°C 細胞の有意の増加 (17.1±17.7% : p<0.025) が認められた。

活性化Bリンパ球の指標としてIgSC細胞数 (/10<sup>6</sup>リンパ球)を用いた。表2に示したように肺結核症患者で見ると、患側肺(2,333±2,383)と健側肺 (16,408±17,173) には有意差は認めなかったが、全例で健側肺での増加を認められた。対照健常人値 (2,574±425) との比較でも、肺結核患者の対側常肺では、IgSC細胞の増加を認めた (p<0.025)。サルコイドーシス症例においては、末梢血及びBALFでのIgSC細胞

の増加が報告されているが<sup>8)</sup>、今回の著者の成績では有意差が得られなかった (3,526±7,525個/10<sup>6</sup>リンパ球)。

OKT4<sup>+</sup> (helper/inducer Tリンパ球)/OKT8<sup>+</sup> (suppressor/cytotoxic Tリンパ球)比を見ると、表2に示すように肺結核症患者の患側肺 (2.3±0.8)、健側肺 (2.4±1.2) には明らかな違いは認められなかったが、対照健常人値(1.7±1.3)よりはいずれも高値を示す傾向にあった。サルコイドーシス症のBALFにおいては、OKT4<sup>+</sup>細胞の増加とOKT8<sup>+</sup>細胞の減少が報告されており<sup>7,8,9,13,14,16)</sup>、今回の検討でもOKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup>細胞比は、健常人と比較して有意に高値を示した (3.4±1.7 : p<0.025)。

Tac<sup>+</sup> はDNA合成前に出現するearly activation antigenであり、この抗原の発現とinterleukin-2リセプターの発現には解離が認められないとされており、活性化Tリンパ球や活性化Bリンパ球に発現することが明らかになっている<sup>17)</sup>。表2に示したように肺結核症患者におけるBALFリンパ球サブセットのTac<sup>+</sup>細胞%については、患側肺(6.4±2.1%)、健側肺

( $7.5 \pm 2.7\%$ ), 及び対照健常人値 ( $6.0 \pm 4.0\%$ ) の間に差を指摘することはできなかった。サルコイドーシス症例 ( $4.5 \pm 2.1\%$ ) においても、同様に健常人との間には有意差を示さなかった。

OKIa1<sup>+</sup> 細胞は、表2に示したように肺結核症患者の患側肺 ( $26.8 \pm 16.1\%$ ), 健側肺 ( $24.8 \pm 15.5\%$ ) といずれも対照健常人値 ( $17.2 \pm 14.3\%$ ) に比較して増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。サルコイドーシス症例においても、健常人と比較して同様の増加傾向 ( $25.0 \pm 15.0\%$ ) を認めたが有意差は認めなかった。

#### 5. 末梢血

BALF と同様に、末梢血中の単球サブセット、リンパ球サブセットについて検討した成績を表3に示した。

単球サブセットでは、肺結核症患者血中の OKIa1<sup>+</sup> 細胞 ( $65.5 \pm 24.9\%$ ) が対照健常人値 ( $41.0 \pm 22.5\%$ ) と比較して増加していた ( $p < 0.05$ )。活動期サルコイドーシス症例患者においても、OKIa1<sup>+</sup> 細胞 ( $55.7 \pm 27.0\%$ ) は増加傾向を示したが有意の所見は認められなかった。

リンパ球サブセットにおいては、肺結核症患者血中の IgSC 細胞 ( $548 \pm 504$ 個/ $10^6$  リンパ球) は対照健常人値 ( $87 \pm 144$ ) よりも増加しており ( $p < 0.01$ ), Tac<sup>+</sup> 細胞 ( $3.4 \pm 3.4\%$ ) も対照健常人 ( $1.2 \pm 1.2\%$ ) より増加していた ( $p < 0.05$ )。活動期サルコイドーシス症例患者血中でも同じ様に、IgSC 細胞の増加 ( $2462 \pm 2754$  個/ $10^6$  リンパ球:  $p < 0.01$ ), Tac<sup>+</sup> 細胞比率の増加 ( $2.6 \pm 1.2\%$ :  $p < 0.05$ ) を認め、さらにこのサブセットでは OKIa1<sup>+</sup> 細胞%の有意の増加 ( $18.6 \pm 5.7$ :  $p < 0.025$ ) を認めた。

以上の成績を要約すると、浸潤乾酪型病期と推定される肺結核症患者の病変部においては、リンパ球数の増加、好中球数の増加傾向が認められ、相対的なマクロファージ比率の減少が認められた。病巣部のマクロファージ、リンパ球のサブセットについて検討すると、OKM1<sup>+</sup> マクロファージの増加傾向を認めたが、リンパ球サブセットには、一定の傾向を認めず、病巣部における OKM1<sup>+</sup> マクロファージの集積又は増

加を示唆する成績であった。これらの結核菌による抗原刺激による局所的な反応と考えられる所見に対して、循環系を介しての全身的な反応の結果を示唆する所見、すなわち BALF における両側肺での E37°C 細胞の増加、末梢血中における単球サブセットでの OKIa1<sup>+</sup> 細胞の増加、及びリンパ球・サブセットで IgSC 細胞, Tac<sup>+</sup> 細胞の増加が認められた。以上のマクロファージ、単球、Tリンパ球の動態は、サルコイドーシスにおいて認められるものと同じであった。即ち胸部X線写真上浸潤状の陰影を認め、結核菌を証明できた症例、すなわち肺結核の浸潤乾酪型病期にある症例においては、サルコイドーシスですでに認められつつある炎症細胞の集積より肉芽腫形成に到る病巣形成過程での変化と類似した細胞動態を認める傾向にあった。

#### 考案

類上皮細胞肉芽腫病変の存在は各種の肺疾患で認められるが<sup>19)</sup>、肺結核症では浸出期病変に引き続いて生じる増殖期病変において特徴的な所見として認められ、その成立機序については多くの研究成果が報告されている。結核菌の菌体成分中の肉芽種形成物質であるN-acetyl-muramyl-dipeptide (MDP) は抗原性が認められておらず、免疫アレルギー反応を介さないで類上皮細胞肉芽腫が形成される事実も報告されているが<sup>18)</sup>、肺結核症における肉芽種病巣の成立機序に関しては、従来より免疫学的な増幅機構が重要な役割を担う事が強調されており、細胞性免疫反応・IV型アレルギー反応が関与して形成される過敏性類上皮細胞肉芽腫症とする考え方が一般的である<sup>1,2,8,19)</sup>。しかしながら、このような病巣部に見られる現象を細胞性免疫反応とのかかわりから解明しようとする試みは未だ不明な点が少なくない。近年著しい発展がみられる免疫学的研究法による細胞レベルでの研究、すなわちどの様な細胞が活性化され、どの様な物質が産生され、どの様な反応が起こるのかという点についての解明は未だに推測の域を脱していない。

近年、BAL 法の開発によって病変部から直

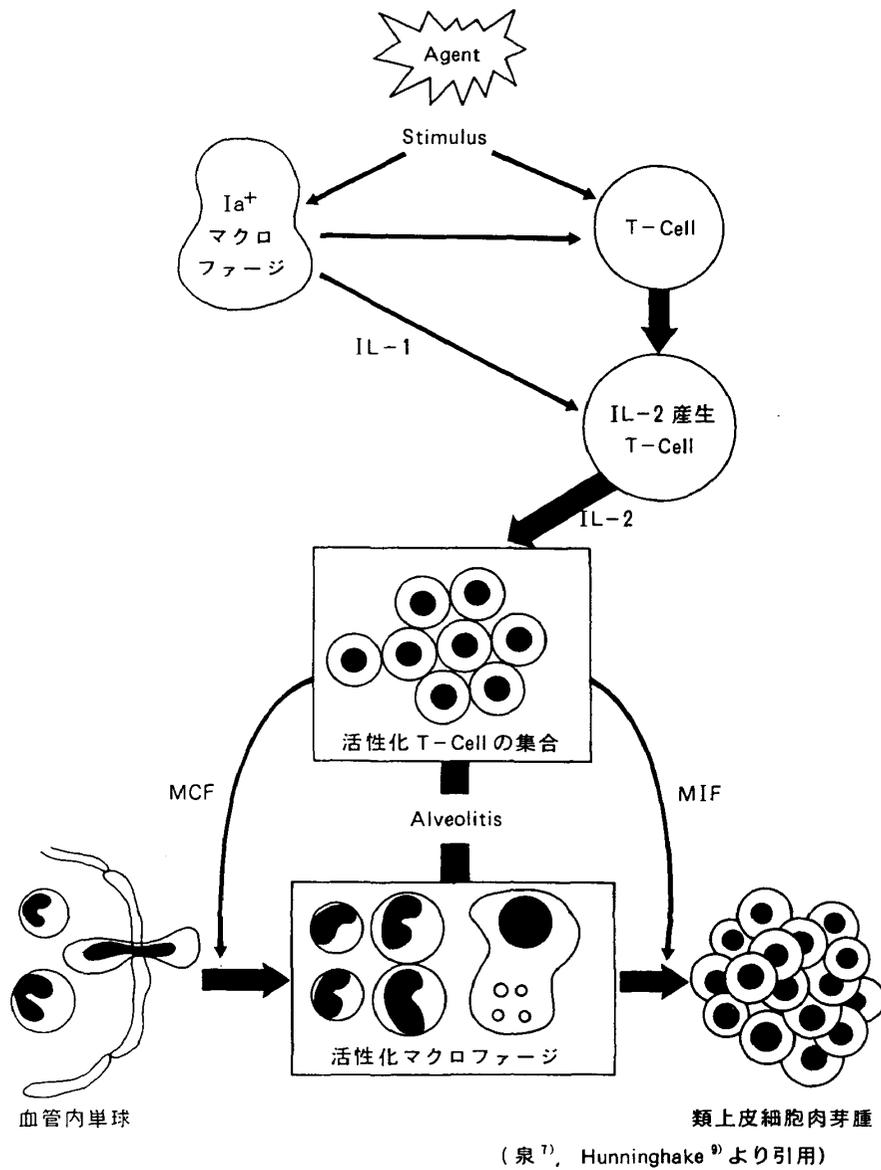


図5. 類上皮細胞肉芽腫病変の形成機序

接細胞成分，液性成分の採取が可能となり，呼吸器疾患の病態生理学的研究に飛躍的な進歩がもたらされた<sup>3,20,21,22)</sup> 肺結核症と同様に過敏性肉芽腫形成を主徴とするサルコイドーシスはBALを用いての広範な検討<sup>7,8,9,13,14,16)</sup> がなされて来た疾患であり，その病態形成は図5に示す様に推定されるに到っている。まず，何らかの抗原刺激により炎症細胞の集合が生じること，これはしばしば alveolitis に移行する。この alveolitis を構成する細胞群の中でも特に著明な働きをするのがTリンパ球とマクロファージであり，病巣部ではこれらは共に増加するがTリンパ球の増加がマクロファージの増加に比

して著明であるため，両者の比率をとると結果的にはマクロファージの比率は減少した事となる。また，マクロファージは数が増加するのみならず，さらに活性化され interleukin-1，インターフェロン等の mediator を産生，同時に自身の細胞表面に Ia 抗原を発現しTリンパ球に抗原を提示する。Tリンパ球も同様に活性化され，interleukin-2 等の種々の mediator を産生し，これらの一部は結果的に活性化Tリンパ球を病変部に集合させて，肉芽腫病巣の最初の過程である alveolitis を形成する。さらに，活性化Tリンパ球は MCF (monocyte chemotactic factor) の release により，血中の単球を病変部

に引きよせ、種々のマクロファージ活性化因子、MIF (macrophage migration inhibitory factor) といったリンホカインを release し、活性化マクロファージを経て、肉芽種が形成される事が観察されている<sup>7,9)</sup>。

今回著者は、胸部X線写真や他の臨床所見により肺結核症が疑われながら、喀痰中に結核菌を検出できない症例に対して確定診断を目的として BAL 検査を施行し、これらの中で結核菌が証明され、さらに類上皮細胞肉芽腫が形成されつつある時期に相当する症例のみを検討の対象とした。すなわち、主訴、赤沈値、結核治療開始3ヶ月後の胸部X線写真の変化等の臨床所見より、浸出性の病変が著明と思われるものや線維増殖が著明と思われる症例は除外した。これらの対象例における BALF 細胞成分を用いて、サルコイドーシスにおいて認められていることと同様の病態が肺結核症にも認められるか否かについて検討した。

結果として肺結核症の病変部では、結核菌及びその抗原刺激による反応と推定される、リンパ球の増殖・集積所見を認められた。マクロファージは、比率においては減少していたが、絶対数では増加しており、この中でも OKM1<sup>+</sup> マクロファージの集積傾向を認めた。藤村らは肺結核患者の BALF に関する同様の検討で、排菌患者の BALF には炎症反応を反映する好中球の増加が認められた事を報告しているが<sup>23)</sup>、著者の検討では好中球の増加傾向は認めたが有意差を指摘するまでには到らなかった。その理由は、恐らく検討対象症例の病期に違い、BALF 細胞の算定方法の違いによるものと考えられた。一方、E37°C リンパ球、リンパ球 OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> 比率、Tac<sup>+</sup> リンパ球、OKIa1<sup>+</sup> リンパ球の増加傾向は、患側肺のみならず健側肺でも認められ、末梢血中でも、OKIa1<sup>+</sup> 単球、E37°C リンパ球、Tac<sup>+</sup> リンパ球の増加が認められた。これらの所見は、血液循環系を介した活性化細胞の全身性散布を示唆していると考えられる。この成績は、結核によって全身性に感作された為とも考えられるが、一方、対側肺にも胸部X線写真で指摘し得ない程微小の結核散布病巣が存在し

ていた可能性も否定できず、今後さらに検討する必要があるところである。以上の肺結核における検討結果は、サルコイドーシスですでに認められている単球/マクロファージ及びTリンパ球の動態と比べると程度は弱い、傾向としてはほぼ同様の成績であった。肺結核症は、通常多くの局所病変より成り立っており、しばしば互いに独立して各病巣ごとに進展度が異なっているとされている<sup>1)</sup>。類上皮細胞肉芽腫の形成される時期を主勢とする症例を検討の対象に選んだにもかかわらず、各個の病巣については種々の病期における細胞動態が混在していた可能性も否定できず、この様な肺結核症に特有の病態が、サルコイドーシスに認められた程明瞭な差異として表現されなかった原因の1つであると推察している。今回の検討では、肺結核症における類上皮細胞肉芽腫症の形成には、サルコイドーシスと同様の免疫細胞動態による病巣の形成機序が進行している事が強く示唆される成績を得たが、その肉芽腫形成に主要な役割を担う単球/マクロファージ、リンパ球の動態、及びその mediator の解析は今後さらに検討の必要があると思われた。

## ま と め

片側肺にのみ浸潤乾酪型の病巣を有する肺結核症患者の患側肺及び健側肺より回収した BALF 細胞成分、末梢血細胞成分について、サルコイドーシス症例及び健常人を対照として比較検討し以下の成績を得た。

1. 肺結核症の病変部では、リンパ球の増殖・集積所見を認めたが、そのサブセットには一定の傾向を認める事はできなかった。一方、マクロファージも絶対数では増加しており、そのサブセットでは OKM1<sup>+</sup> マクロファージの集積傾向が認められた。
2. 血液循環系を介しての活性化細胞の散布を示唆する両側肺 BALF 中の E37°C リンパ球、OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> 比率、Tac<sup>+</sup> リンパ球、OKIa1<sup>+</sup> リンパ球の増加傾向を認めた。同時に末梢血中でも、OKIa1<sup>+</sup> 単球、E37°C リンパ球、Tac<sup>+</sup> リンパ球の増加を認めた。

3. 対照として検討した活動期サルコイドーシス症例においても、同様の傾向を認めた。

これらの所見は、肺結核においてもサルコイドーシスと同様の機序に従って類上皮細胞肉芽腫形成が進展することを強く示唆する所見であると考えられた。

### 謝 辞

御指導御校閲賜りました京都大学結核胸部疾患研究所内科第2部門、大島駿作教授に深謝致します。御指導御教授賜りました泉孝英助教授に深甚なる謝意を捧げます。共同研究者の長井苑子、竹内 実、橋本圭司(京都市立病院呼吸器科)、田村久(勤医協札幌病院)の諸先生方に心より感謝致します。本研究遂行上御援助と貴重な時間をお与え頂きました国立京都病院呼吸器科、前医長川上一郎先生、浅本 仁医長に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Dannenberg, A. M. Jr.: Pathogenesis of pulmonary tuberculosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 125 3-2: 25-29, 1982.
- 2) Bates, J. H.: Tuberculosis: Susceptibility and Resistance, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 125 (3-2): 20-24, 1982.
- 3) Reynolds, H. Y. and Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage, *J. Lab. Clin. Med.*, 84: 559-573, 1974.
- 4) Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256: 495-497, 1975.
- 5) Reinherz, E. L. et al.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1588-1592, 1980.
- 6) Reinherz, E. L. and Schlossman, S. F.: The differentiation and function of human T lymphocytes, *Cell*, 19: 821-827, 1980.
- 7) 泉 孝英, 長井苑子: サルコイドーシスにおける免疫不全, *医学のあゆみ*, 135: 805-810, 1985.
- 8) 藤村直樹: びまん性肺疾患における気管支肺胞洗浄液リンパ球とその性状: 特に活性化所見に関する検討, *日本胸部疾患学会誌*, 22: 552-561, 1984.
- 9) Hunninghake, G. W. et al.: Pathogenesis of the granulomatous lung diseases, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130: 476-496, 1984.
- 10) Wybran, J. and Fudenberg, H. H.: Rosette formation, a test for cellular immunity, *Tras. Assoc. Am. Physicians*, 84: 239-247, 1971.
- 11) Eby, W. C., et al.: Enumerating immunoglobulin-secreting cells among peripheral human lymphocytes. A hemolytic plaque assay for a B cell function, *J. Immunol.*, 115: 1700-1703, 1975.
- 12) 西川伸一他: Protein A 結合ヒツジ赤血球を標的にしたヒト免疫グロブリン産生細胞のプラーク法による検出, *免疫実験操作法C*(日本免疫学会編), p. 1999-2002, 1981.
- 13) Hunninghake, G. W. and Crystal, R. G.: Pulmonary sarcoidosis: A disorder mediated by excess heper T-lymphocyte activity at sites of disease activity, *N. Engl. J. Med.*, 305: 429-434, 1981.
- 14) Ceuppens, J. L., et al.: Alveolar T-cell subsets in pulmonary sarcoidosis: Correlation with disease activity and effect of steroid treatment, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129: 563-568, 1984.
- 15) Cotner, T., et al.: Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content, *J. Exp. Med.*, 157: 461-472, 1983.
- 16) Ginns, L. C., et al: T-lymphocyte subsets in peripheral blood and lung lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis: Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 25: 11-20, 1982.
- 17) 馬止 裕, 内山 卓: モノクローナル抗体を用いたヒトリンパ球表面抗原の解析—正常および病的状態における意義, *臨床免疫*, 16: 846-857, 1984.
- 18) 岡部實裕他: 類上皮細胞肉芽腫, *結核*, 55: 435-442, 1980.
- 19) Boros, D. L.: Granulomatous inflammations, *Prog. Allergy*, 24: 183-267, 1978.
- 20) Hunninghake, G. W., et al.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage, *Amer. J. Pathol.*, 97: 149-206, 1979.
- 21) Haslam, P. L. et al.: Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: Comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features, *Thorax*, 35: 9-18, 1980.
- 22) Rudd, R. M. et al.: Cryptogenic fibrosing alveolitis: Relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124: 1-8, 1981.
- 23) 藤村政樹他: 肺結核の活動性を評価するための気管支肺胞洗浄液(BAL)によるアプローチ, *医療*, 38: 577-581, 1984.

CELLULAR COMPONENTS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUIDS (BALF)  
OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS: CELL  
SUBSETS STUDIES BY MONOCLONAL ANTIBODIES

**Tetsuo Sawano**

*Pulmonary Disease Division, National Kyoto Hospital*

Cellular components of BALF obtained from affected and normal lungs with pulmonary tuberculosis showing a unilateral infiltrative caseous lesion were compared with those of patients with sarcoidosis and normal subjects.

1. In the BALF from affected lungs with the lesion of pulmonary tuberculosis, findings suggesting proliferation and accumulation of lymphocytes were observed, but no particular tendency was found in subsets. Macrophages also increased in number, particularly OKM1<sup>+</sup> macrophages.

2. The number of E37<sup>°</sup>C lymphocytes, Tac<sup>+</sup> lymphocytes, and OKIa1<sup>+</sup> lymphocytes and the OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> ratio in the BALF from the bilateral lung, which are considered as associated with dissemination of activated cells via blood circulation, showed a tendency to increase. In the peripheral blood also, increases in OKIa1<sup>+</sup> monocytes, E37<sup>°</sup>C lymphocytes, and Tac<sup>+</sup> lymphocytes were observed.

4. Similar findings were obtained in the patients with sarcoidosis in the active stage.

These results suggest that the formation epithelioid of granuloma in pulmonary tuberculosis occurs by a mechanism similar to that in sarcoidosis.