

## 喫煙の気管支肺胞洗浄液(BALF)細胞, 末梢血細胞 に及ぼす影響に関する検討

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第二

渡 辺 和 彦

(昭和62年4月10日受付)

### 緒 言

喫煙が生体に種々の影響を及ぼすこと、特に煙の直接の侵入部位である肺に大きな影響を及ぼしていることは、例えば喫煙者においては、咳、痰の多いことや、肺癌、肺気腫のように喫煙と関係の深い疾患があることなどからも推測されることである<sup>1)</sup>。また、最近では肺癌、肺気腫<sup>2)</sup>の他に特発性間質性肺炎、肺好酸球性肉芽腫症のような tobacco related disease のあること、また、一方では過敏性肺臓炎<sup>3)</sup>サルコイドーシス<sup>4)</sup>のように喫煙者には少ない疾患のあることなどが明らかになって来ている。

喫煙の肺に及ぼす影響については、モルモットを用いての Rylander (1971) の報告<sup>5)</sup>以来、実験動物を用いての細胞レベルでの研究、あるいはヒトの病理組織標本を用いての検討がすすめられて来たが、この面での研究に一大進歩をもたらしたのは、Reynolds, Newball による気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL) 術の開発 (1974)<sup>6)</sup>であった。この方法によって、肺の下気道領域、肺胞領域の洗浄液を採取し、直接その領域の細胞成分、液性成分についての検討が可能になった。以来、BAL は、びまん性肺疾患の病態生理学的検討の他に、喫煙の肺に及ぼす影響の検討手段<sup>7)</sup>としても有用であることが認識されて来た。すでに Reynolds らの第一報においても喫煙者では非喫煙者に比

較して、マクロファージの増加、リンパ球の減少がみられることが記載されて居り、Warr ら (1976) は、喫煙歴の有無は疾患例における BALF 所見を検討するに当たっての必須の情報であることを指摘している<sup>8)</sup>。

著者は、各種呼吸器疾患における BALF 細胞を用いての病態生理的研究を行なうための基礎資料となる健常人の BALF 細胞所見に及ぼす喫煙の影響について検討することを目的として、非喫煙者、喫煙者、喫煙中止者の BALF 細胞所見について、特に細胞サブセットのレベルから検討を行ったのでその成績について報告する。

### 対 象

何らの愁訴なく、胸部X線所見正常で、かつ肺機能上も異常が認められない健常人 ( $\%VC \geq 80$ ,  $FEV_1.0\% \geq 70$ ) を対象とした。非喫煙者 (non smokers: NS) は、喫煙歴の全くない46例 (男25, 女21) で平均年齢  $36.1 \pm 13.9$  歳 (mean  $\pm$  SD) であった。喫煙者 (smoker: S) は検査当日まで喫煙を継続していた31例 (男29, 女2) で平均年齢は  $38.2 \pm 12.0$  歳であった。なお、1日の平均喫煙本数は  $26.1 \pm 11.5$  本、平均喫煙期間は  $19.5 \pm 16.6$  年、Brinkman 指数は、 $421.1 \pm 295.6$  であった。喫煙中止者 (exsmoker: EX) は、中止後少なくとも3カ月以上喫煙していない16例 (男16例、喫煙中止後の期間は平均  $5.2 \pm 4.6$  年) で、平均年齢は  $45.2 \pm 11.4$

歳であった。

## 方 法

BAL の施行方法および BALF 細胞数, 細胞分画, 細胞サブセットの測定, 算出は, 既報の方法<sup>9,10)</sup> に準じて行った。

### 1. BAL : 気管支 ファイバースコープ

(Olympus BF-B3R) を原則として右中葉に楔入し, 温生理食塩水 50 ml ずつ 6 回, 計 300 ml にて洗浄, BALF を得た。

### 2. BALF 細胞の分離。

i) BALF 総細胞数, 細胞濃度 : BALF を遠沈 (250×G, 10分間, 4°C) し, 沈渣を BALF 細胞として回収した。

BALF 回収総細胞数 = BALF 細胞再浮遊液の濃度 × 液量 (×10<sup>7</sup>個)

BALF 細胞濃度 = BALF 回収総細胞数 / 回収 BALF 量 (×10<sup>5</sup>/ml)

として算出した。

ii) 細胞分画 : BALF 細胞浮遊液を cyto-centrifuge (Tomy-Seiko, 東京) を用いて遠沈 (120×G 10分間 4°C) し, BALF 細胞標本を作成し, May-Giemsa 染色を行い, 約1,000個の細胞をカウントし, 細胞分画を算定した。

3. 末梢血単核細胞の分離 : 末梢血は, ヘパリン加採血後, Eagle's minimum essential medium (MEM, 日水製薬, 東京) で 2 倍に希釈し, Ficoll-Paque 比重遠沈法<sup>11)</sup> にて, 末梢血単核細胞を分離した。

### 4. 各種細胞サブセットの測定方法。

i) 活性化 T リンパ球 (E37°C)<sup>12)</sup> の算定 : MEM 浮遊 BALF 細胞および末梢血単核細胞 (5×10<sup>6</sup>/ml) 100 μl と, 生理食塩水で 3 回洗浄したヒツジ赤血球 (sheep red blood cell : SRBC) 100 μl を混和し, 37°C, 15分間の振盪反応後, 室温で遠沈 (250×G) 15分間静置 incubate した後, 静かに再攪拌し, 光学顕微鏡下にて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 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。

ii) 活性化 B リンパ球の算定<sup>13)</sup> : MEM 浮遊 BALF 細胞, 及び末梢血単核細胞 (1×10<sup>6</sup>/ml) 100 μl に 25% Protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 処理 SRBC 浮遊液 50 μl と, 抗ヒト Ig ヤギ抗血清 (医学生物学研究所, 名古屋) 25 μl, 補体 (SRBC にて吸収済モルモット血清) 25 μl 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, 形成されたプラーク数を算定し, BALF 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 spontaneous immunoglobulin secreting cells (Ig SC) の数を活性化 B リンパ球の指標とした。なお, 抗ヒト Ig ヤギ血清は, 抗 IgM, 抗 IgG, 抗 IgA の各クラスを用い, その総数を集計した。

iii) モノクローナル抗体によるマクロファージサブセット<sup>14)</sup> および, リンパ球サブセットの同定<sup>15,16)</sup> : MEM 浮遊 BALF 細胞および末梢血単核細胞 0.8~2.0×10<sup>6</sup>/ml 濃度で, 各々 100 μl に, 10%FCS 加 MEM 50 μl, 1%BSA (bovine serum albumin) 加 PBS (phosphate buffered saline) 混和 200 倍希釈の表 1 に示した OK シリーズ・モノクローナル抗体 (OKT3, T4, T8, M1, Ia1, T6, T9, OKB 7, M5 : Ortho Diagnostic System Inc., Raritan, N. J., U.S.A.) および50倍希釈の, Leu-7, Leu-11 抗体 (Becton Dickinson Monoclonal Center, Inc., Mountain View, Ca., U.S.A.) および 2,000 倍希釈 Tac 抗体 (京都大学医学部第 1 内科内山卓博士より供与) 各々 50 μl 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 回洗浄後, 160 倍希釈 FITC (fluorescein isothiocyanate)

表1 細胞マーカー

## 単球/マクロファージ・マーカー

OKM1: C3b レセプターに反応する抗体で null細胞, 顆粒球とも反応する。

OKM5: 性状不明。血小板とも反応する。

OKIa1: 抗ヒト DR フレームワーク抗原に対する抗体。Bリンパ球, 活性化Tリンパ球とも反応する。

OKT6: 本来はヒト胸腺細胞と反応する抗体。

OKT9: トランスフェリン・レセプターに対する抗体。活性化, 増殖中の細胞と反応する。

Leu10: HLA-DC/DS 分子と反応する。抗原呈示能と関連する。

## リンパ球マーカー

OKT3: 末梢血Tリンパ球と反応する。

OKB7: Bリンパ球と反応する。

OKT4: inducer/helper Tリンパ球と反応する。

OKT8: suppressor/cytotoxic Tリンパ球と反応する。

E37°C: hot rosette cell

Tac: IL-2 レセプターと反応する。活性化Tリンパ球と反応する。

early activation antigen, 活性化Bリンパ球でも発現される。

Leu-7: NK/K細胞。

large granular lymphocyte と反応する。

Leu-11: 活性の高いNK細胞と反応する。

標識ヤギ抗マウス IgG 血清 (Tago Inc, Burlingham, Ca, U.S.A.) 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。

5. 統計処理: 成績は, 平均値  $\pm$  SD. にて示し, 各群間の統計学的有意差検定には, Students' t-test (paired or unpaired) を行ない危険率 5% 以下の場合を有意差ありとした。

## 成 績

1. 喫煙の BALF 細胞所見に及ぼす影響に関する検討:

NS: 46例, S: 31例, EX: 16例の BALF 細胞所見を表2に示した。回収率, 回収細胞数および細胞分画の算定は全例について行なったが, マクロファージサブセット, リンパ球サブセットについては検討数を表中に示した。

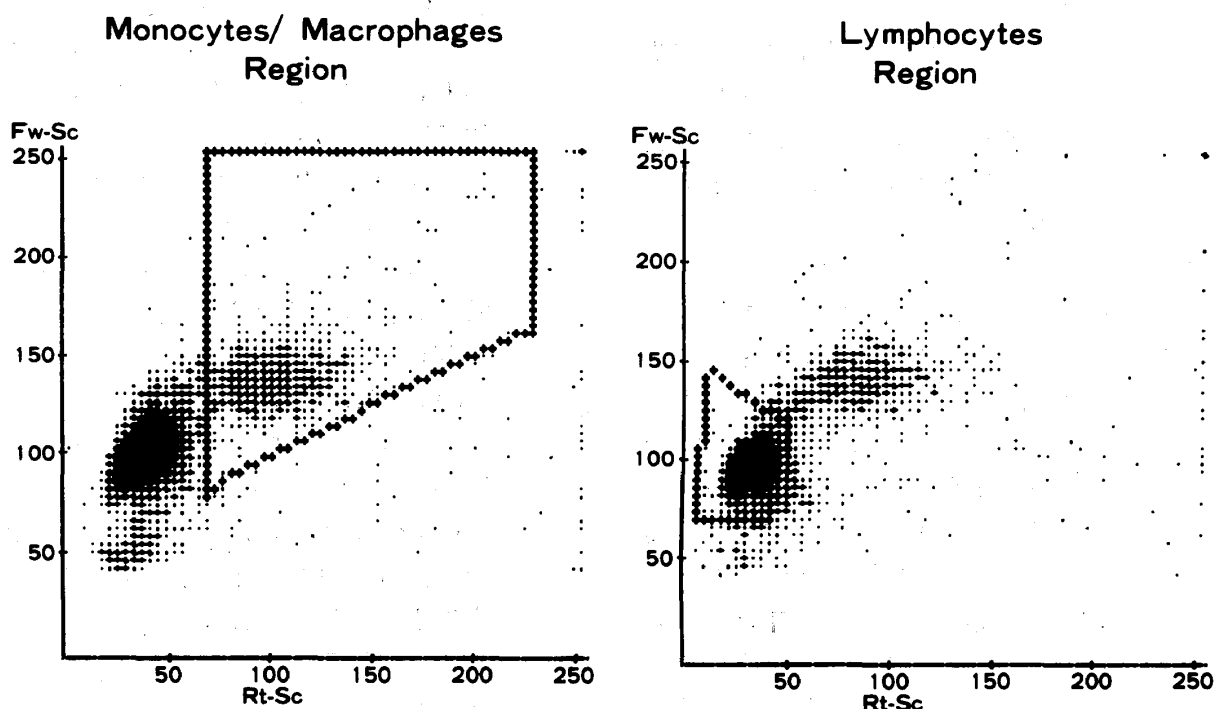


図1 Ortho Spectrum Type III における単球/マクロファージおよびリンパ球の領域

表2 非喫煙者群, 喫煙者群, 喫煙中止者群における BALF 細胞所見

|                              | 非喫煙者 (46例)        | 喫煙者 (31例)                  | 喫煙中止者 (16例)              |
|------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|
| 回収率 (%)                      | 73.8±7.4*         | 67.6±11.8 (P<0.05)         | 71.8±8.0                 |
| 回収細胞数 (×10 <sup>3</sup> /ml) | 67.9±39.0         | 276.4±192.9** (P<0.001)    | 78.9±45.2                |
| 細胞分画                         |                   |                            |                          |
| マクロファージ %                    | 86.5±10.0         | 95.7±2.9** (P<0.001)       | 83.6±12.5                |
| 10 <sup>3</sup> /ml          | 59.4±37.4         | 364.9±187.4** (P<0.001)    | 63.1±33.5                |
| リンパ球 %                       | 12.5±9.6          | 3.5±2.1** (P<0.001)        | 15.8±12.4                |
| 10 <sup>3</sup> /ml          | 8.0±7.2           | 8.6±6.7                    | 14.8±17.7** (P<0.05)     |
| 好中球 %                        | 0.8±1.0           | 0.6±1.7                    | 0.5±0.8                  |
| 10 <sup>3</sup> /ml          | 0.4±0.6           | 2.3±6.7                    | 0.4±0.6                  |
| 好酸球 %                        | 0.3±0.7           | 0.2±0.3                    | 0.2±0.3                  |
| 10 <sup>3</sup> /ml          | 0.2±0.5           | 0.6±1.1** (P<0.02)         | 0.2±1.3                  |
| マクロファージサブセット (%)             |                   |                            |                          |
| OKM1+                        | 51.9±20.4 (25)*** | 65.9±21.7 (21)** (P<0.05)  | 54.0±19.7 (7)            |
| OKM5+                        | 14.0±8.1 (17)     | 40.2±24.2 (19)** (P<0.001) | 18.8±7.3 (6)             |
| OKIa+                        | 68.5±16.1 (25)    | 73.9±4.6 (21)              | 82.4±10.6 (7)** (P<0.05) |
| OKT6+                        | 27.7±14.8 (14)    | 46.7±4.6 (15)** (P<0.005)  | 18.8±3.2 (5)             |
| OKT9+                        | 23.5±11.7 (25)    | 16.8±12.0 (19)             | 29.3±14.1 (6)            |
| Leu10+                       | 62.9±16.5 (14)    | 62.1±24.5 (13)             | 68.7±12.9 (7)            |
| リンパ球サブセット (%)                |                   |                            |                          |
| OKT3+                        | 69.8±15.1         | 72.3±12.3                  | 70.0±9.7                 |
| OKT4+                        | 47.2±13.9         | 30.5±7.7** (P<0.001)       | 46.4±10.8                |
| OKT8+                        | 22.5±7.8          | 40.4±13.1** (P<0.001)      | 23.5±8.2                 |
| OKT4+/OKT8+                  | 2.44±1.42         | 0.87±0.741** (P<0.001)     | 2.31±1.14                |
| E37. °C                      | 6.8±7.8 (10)      | 4.1±4.4 (7)                | 2.9±1.5 (2)              |
| Tac+                         | 4.1±2.8 (15)      | 9.5±6.7 (20)** (P<0.005)   | 4.5±1.9 (5)              |
| OKIa1+                       | 17.6±8.1 (29)     | 19.2±10.2 (28)             | 21.6±7.8 (12)            |
| OKM1+                        | 3.8±5.9 (12)      | 5.1±3.9 (8)                | 15.3±18.6 (4)            |
| Leu 7+                       | 7.8±4.7 (15)      | 12.4±11.3 (9)              | 5.9±3.8 (2)              |
| Leu 11+                      | 2.4±2.6 (15)      | 1.1±1.6 (9)                | 0.9±0.3 (2)              |
| OKB7+                        | 1.5±1.7 (19)      | 1.3±1.7 (15)               | 2.6±1.3 (3)              |
| IgSC (/10 <sup>6</sup> )     | 3,180±5,176 (12)  | 4,280±5,300 (8)            | 5,580±4,970 (2)          |

\* 平均±SD.

\*\* 非喫煙者群と比較しての有意差

\*\*\* 検討対象数, 記載なきは全例について検討した

## i) BALF 回収率, 回収細胞数

BALF 回収率において, S 群では NS 群と比較して有意 (p<0.05) の低下が認められた。BALF 細胞数, 回収液 1 ml 当たりの細胞数は S 群は NS 群と比較して4倍以上と著明 (p<0.001) に増加していたが, EX 群は NS 群とほぼ同様の数であった。

## ii) 細胞分画

マクロファージは S 群では NS 群に比し, 比率において約10%, 実数は4.4倍以上と, 有意 (p<0.001) の増加が認められた。リンパ球は, NS 群では12.5%に対して S 群では3.5%と有意に低下していたが実数では差が認められなかった。EX 群は, NS 群と比較すると, %では差は認められなかったが, 実数においては, 1.8倍以上に増加していた。

表3 軽喫煙者群と重喫煙者群における BALF 細胞所見

|                                      | 軽喫煙者 (18例)      | 重喫煙者 (13例)               |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 回収率 (%)                              | 70.0±11.3       | 64.3±11.2                |
| 回収細胞数 (×10 <sup>3</sup> /ml)         | 176.9±127.8     | 414.1±183.0* (P<0.001)   |
| 細胞分画                                 |                 |                          |
| マクロファージ %                            | 96.0±2.3        | 95.1±3.4                 |
| ×10 <sup>3</sup> /ml                 | 170.2±124.3     | 395.5±182.0* (P<0.001)   |
| リンパ球 %                               | 3.6±2.0         | 3.4±2.1                  |
| ×10 <sup>3</sup> /ml                 | 5.8±4.8         | 12.4±7.1* (P<0.01)       |
| 好中球 %                                | 0.2±0.3         | 1.2±2.4                  |
| ×10 <sup>3</sup> /ml                 | 0.2±0.4         | 5.2±9.6* (P<0.05)        |
| 好酸球 %                                | 0.1±0.3         | 0.3±0.3                  |
| ×10 <sup>3</sup> /ml                 | 0.2±0.4         | 1.1±1.5* (P<0.02)        |
| マクロファージ・サブセット (%)                    |                 |                          |
| OKM1 <sup>+</sup>                    | 57.7±23.1 (13)  | 79.3±9.0 (8)* (P<0.05)   |
| OKM5 <sup>+</sup>                    | 29.2±21.1 (11)  | 5.2±19.6 (8)* (P<0.02)   |
| OKIa <sup>+</sup>                    | 70.8±21.8 (13)  | 79.0±17.2 (8)* (P<0.001) |
| OKT6 <sup>+</sup>                    | 52.3±17.7 (9)   | 38.4±10.4 (6)            |
| OKT9 <sup>+</sup>                    | 18.9±14.3 (12)  | 14.1±3.5 (7)             |
| Leu10 <sup>+</sup>                   | 55.2±27.8 (7)   | 70.1±13.4 (6)            |
| リンパ球サブセット (%)                        |                 |                          |
| OKT3 <sup>+</sup>                    | 72.0±12.1       | 72.8±12.5                |
| OKT4 <sup>+</sup>                    | 31.0±7.8        | 29.7±7.6                 |
| OKT8 <sup>+</sup>                    | 39.5±10.7       | 41.8±15.8                |
| OKT4 <sup>+</sup> /OKT8 <sup>+</sup> | 0.85±0.28       | 0.90±0.55                |
| E37°C                                | 4.7±5.0 (5)     | 2.4±0.5 (2)              |
| Tac <sup>+</sup>                     | 0.2±5.1 (10)    | 12.8±6.5 (10)* (P<0.05)  |
| OKIa <sup>+</sup>                    | 17.2±10.5 (18)  | 22.0±9.0 (10)            |
| OKM1 <sup>+</sup>                    | 2.7±1.6 (5)     | 9.0±3.3 (3)* (P<0.02)    |
| Leu7 <sup>+</sup>                    | 6.4±2.5 (5)     | 19.8±13.5 (4)            |
| Leu11 <sup>+</sup>                   | 0.4±0.2 (7)     | 2.0±2.0 (2)              |
| OKB7 <sup>+</sup>                    | 0.7±0.8 (9)     | 2.3±2.2 (6)              |
| IgSC                                 | 4,620±6,672 (4) | 3,934±3,387 (4)          |

\* 軽喫煙者群に比べて有意差あり。

好中球, 好酸球についてみると NS 群, S 群, EX 群の間において差が認められたのは, 好酸球数において, S 群が NS 群に比し有意の高値を示した所見のみであった。

#### iii) マクロファージ・サブセット

OKM1, OKM5, OKIa1, OKT6, OKT9, Leu-10 モノクローナル抗体を用いてマクロファージ・サブセット%を測定した。OKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>, OKT6<sup>+</sup> 細胞は, S 群では, NS 群

に比し有意 (p<0.05, P<0.001, P<0.005) に増加していた。しかし, EX 群では NS 群とほぼ同様の値であった, OKIa1<sup>+</sup>, OKT9<sup>+</sup>, Leu-10<sup>+</sup> 細胞については, EX 群が NS 群より有意 (P<0.05) に高値の OKIa1<sup>+</sup> を示した他は, NS 群, S 群, EX 群の間において差は認められなかった。

iv) リンパ球サブセット: OKT3<sup>+</sup> は, NS 群, S 群, EX 群において, 差は認められな

かった。NS 群は S 群に比して有意の ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ) OKT4<sup>+</sup> 高値, OKT8<sup>+</sup> 低値所見が認められた。EX 群は NS 群と同様の所見であり, OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> をみると, S 群では, NS 群に比し有意 ( $P < 0.001$ ) に低く, 喫煙を中止した EX 群では NS 群と同様の値になることが認められた。Tac<sup>+</sup>% において S 群は NS 群より有意 ( $P < 0.005$ ) の高値所見が認められたが, E37°C, OKIa1<sup>+</sup> においては NS 群, S 群, EX 群間において有意の変動は認められなかった。

Natural killer 細胞: OKM1<sup>+</sup>, Leu7<sup>+</sup>, Leu11<sup>+</sup> においては, NS 群, S 群, EX 群間において変動は認められなかった。

B リンパ球: OKB7<sup>+</sup> および 活性化 B リンパ球の指標とされる IgSC 数においても NS 群, S 群, EX 群間において変動は認められなかった。

## 2. 喫煙状況と BALF 細胞所見の比較:

喫煙者を 1 日の喫煙本数, 20 本以下か, 21

本以上かによって, 軽喫煙者, 重喫煙者の 2 群に分け, BALF 細胞所見を比較検討した成績を表 3 に示した。1 日の平均喫煙本数は軽喫煙者群  $17.8 \pm 5.2$  本, 重喫煙者群  $37.7 \pm 7.3$  本であった。回収率において両群間に有意差は認められなかったが, 回収細胞数は, 重喫煙者群の方が, 軽喫煙者群の 2 ~ 3 倍以上と有意 ( $p < 0.001$ ) に高値であった。細胞分画では, マクロファージ, リンパ球, 好中球, 好酸球いずれも % においては, 重喫煙者群と軽喫煙者群の間に差は認められなかったが, 実数においては, いずれの細胞においても重喫煙者群の方が有意 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.02$ ) に軽喫煙者群より高値を示した。

マクロファージ・サブセットにおいては, OKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>, OKIa1<sup>+</sup>, は, 重喫煙者群は軽喫煙者群に比し, 有意 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.02$ ,  $P < 0.001$ ) の高値を示した。

リンパ球サブセットについてみると,

表 4 非喫煙者群, 喫煙者群, 喫煙中止者群における末梢血細胞サブセット

|                                      | 非喫煙者 (46例)           | 喫煙者 (31例)                           | 喫煙中止者 (16例)                         |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 単球サブセット                              |                      |                                     |                                     |
| OKM1 <sup>+</sup>                    | $87.9 \pm 12.7$ (25) | $93.0 \pm 6.2$ (21)                 | $88.9 \pm 5.0$ (7)                  |
| OKM5 <sup>+</sup>                    | $91.4 \pm 8.1$ (21)  | $92.7 \pm 5.7$ (19)                 | $92.3 \pm 7.4$ (5)                  |
| OKIa1 <sup>+</sup>                   | $52.7 \pm 23.3$ (25) | $63.0 \pm 17.3$ (21)                | $61.1 \pm 15.4$ (7)                 |
| OKT6 <sup>+</sup>                    | $2.6 \pm 4.5$ (14)   | $6.7 \pm 7.6$ (16)                  | $2.5 \pm 3.5$ (5)                   |
| OKT9 <sup>+</sup>                    | $1.7 \pm 1.7$ (25)   | $2.9 \pm 1.9$ (19)                  | $2.2 \pm 2.0$ (6)                   |
| Leu10 <sup>+</sup>                   | $9.9 \pm 4.8$ (14)   | $16.5 \pm 8.1$ (13)* ( $P < 0.02$ ) | $8.6 \pm 6.5$ (7)                   |
| リンパ球サブセット                            |                      |                                     |                                     |
| OKT3 <sup>+</sup>                    | $66.2 \pm 11.1$      | $69.2 \pm 8.5$                      | $60.6 \pm 9.0$                      |
| OKT4 <sup>+</sup>                    | $39.6 \pm 9.6$       | $42.8 \pm 8.8$                      | $37.7 \pm 10.3$                     |
| OKT8 <sup>+</sup>                    | $27.3 \pm 6.8$       | $25.9 \pm 7.5$                      | $27.0 \pm 0.02$                     |
| OKT4 <sup>+</sup> /OKT8 <sup>+</sup> | $1.65 \pm 1.15$      | $1.88 \pm 0.94$                     | $1.63 \pm 0.90$                     |
| E37°C                                | $20.7 \pm 8.7$ (4)   | $19.9 \pm 11.1$ (7)                 | $19.5 \pm 7.3$ (2)                  |
| Tac <sup>+</sup>                     | $1.9 \pm 2.2$ (15)   | $2.6 \pm 2.4$ (20)                  | $2.5 \pm 1.3$ (5)                   |
| OKIa1 <sup>+</sup>                   | $13.9 \pm 6.0$ (29)  | $16.8 \pm 6.5$ (28)                 | $17.7 \pm 5.1$ (12)                 |
| OKM1 <sup>+</sup>                    | $17.5 \pm 10.9$ (12) | $13.5 \pm 6.6$ (8)                  | $42.4 \pm 30.5$ (4)* ( $P < 0.05$ ) |
| Leu7 <sup>+</sup>                    | $21.5 \pm 10.2$ (15) | $18.3 \pm 9.1$ (10)                 | $19.9 \pm 5.5$ (2)                  |
| Leu11 <sup>+</sup>                   | $12.4 \pm 8.8$ (15)  | $8.6 \pm 5.2$ (10)                  | $16.1 \pm 4.4$ (2)                  |
| OKB7 <sup>+</sup>                    | $8.0 \pm 4.0$ (19)   | $12.1 \pm 5.4$ (16)                 | $13.6 \pm 9.5$ (3)                  |
| Ig-SC                                | $530 \pm 997$ (12)   | $950 \pm 1548$ (7)                  | $1320 \pm 900$ (2)                  |

\* 非喫煙者に比べて有意差あり。

Tac<sup>+</sup>, OKM1<sup>+</sup>において、重喫煙者群は軽喫煙者群より有意 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.02$ ) の高値が認められた。しかし、他のリンパ球サブセットにおいては、軽喫煙者と重喫煙者群の間に差は認められなかった。

### 3. 喫煙の末梢血細胞サブセットに及ぼす影響に関する検討:

NS 群, S 群および EX 群の末梢血単球およびリンパ球サブセットの測定成績を表4に示した。BALF 細胞の場合と異なり, Leu 10<sup>+</sup> 単球においてS群がNS群より有意 ( $P < 0.02$ ) の, また OKM1<sup>+</sup> リンパ球においてEX群がNS群より有意 ( $P < 0.05$ ) の高値を示していた他には, NS 群, S 群, EX 群間において有意の差を認めなかった。

## 考 按

喫煙が肺の機能に何らかの影響を及ぼしていることは、煙草の煙が直接肺内に侵入して、肺組織や気道内に存在する細胞に接触しうることから当然予想されることである。また、喫煙が肺疾患の発症機序と関わりあいをもつことは、喫煙刺激が正常な肺の免疫・アレルギー機能を含めた防御機構に乱れをおこす起炎因子であることから充分推測されることである。したがって、喫煙者と対照健常者のそれぞれについて、BALF から得られたマクロファージやリンパ球を、モノクローナル抗体を用いた表面マーカーによりサブセットに分離し比較検討することは、喫煙が肺内に存在する免疫担当細胞の機能に与える影響について研究する上に極めて重要な意義があるものと思われる。著者の研究によって得られた成績の概要を表5に示した。S 群においては、BALF 回収率はNS群, EX群に比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低下していた。対象としたS群はすべて肺活量、1秒率は正常値以内であったが、この所見と肺気腫症例におけるBALF回収率は5%以下ときわめて悪いことを考えると、S群においては末梢気道の狭小化が起こりやすいことを示すものと理解されよう。

BALF 細胞数は、S群ではNS群, EX群に比較して有意に増加していたことは、従来の

報告<sup>5,6,7,8)</sup>と同様であった。マクロファージ・サブセットをみるとOKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>, OKIa1<sup>+</sup>, OKT6<sup>+</sup>がS群では増加していた。OKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>は末梢血中では、それぞれ93.0%, 92.7%前後を占めており、BALF 中のOKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>の増加は、幼若マクロファージの増加であると説明されているが、この増加もS群におけるOKIa1<sup>+</sup>の増加とともに、喫煙によるマクロファージ活性化の反映として説明することが出来るであろう。事実、サルコイドーシスあるいは特発性間質性肺炎症例においては、OKM1<sup>+</sup><sup>17)</sup>あるいはOKIa1<sup>+</sup><sup>18,19)</sup>マクロファージの増加が報告されている。興味ある所見は、OKT6<sup>+</sup>マクロファージのS群における増加である。本来、抗OKT6抗体は胸腺細胞に対するマーカーとして開発された抗体<sup>20)</sup>であり、NS群の末梢血単球では5%以下の少数である。しかしBALFマクロファージでは平均20%以上にみとめられ、更にS群で有意に増加していることは、単球—マクロファージ系の分化の一つの指標<sup>21,22)</sup>として用いられる可能性を示しているものと考えられる。疾患における増加としては肺好酸球性肉芽腫症例のBALFマクロファージに高率に出現するとの報告があり、抗原提示細胞としてのランゲルハンス細胞系列の細胞で陽性を示すことが知られている<sup>23)</sup>。

リンパ球サブセットにおける最も著明な変化は喫煙によるOKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup>比の変化<sup>24)</sup>である。このOKT4<sup>+</sup>の相対的減少、OKT8<sup>+</sup>の相対的増加が重喫煙者以外でも認められている。この機序に関しては、全く不明であるが、喫煙者における感染抵抗力低下の一因になっているのかも知れない。

好中球の有意の増加が重喫煙者では認められた。S群におけるBALF好中球の増加とその機序については、Hunninghake (1983)の報告<sup>25)</sup>があり、喫煙によってマクロファージより産生された好中球遊走因子の作用による好中球の肺への集積により同細胞に由来する蛋白分解酵素による肺組織の破壊が起こり、この機序を通じて肺気腫病変が形成されるのであらうと説明されている。S群における好酸球の増加も、おそ

表5 喫煙のBALF細胞所見に及ぼす影響に関する検討成績の概要

1. BALF 回収率の低下。
2. BALF 細胞数：増加。
3. マクロファージ：増加。  
OKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>, OKIa1<sup>+</sup>, OKT6<sup>+</sup> の増加。
4. リンパ球：%は低下するが数としては不変が多い。但し、重喫煙者では増加。  
OKT4<sup>+</sup> 減少。OKT8<sup>+</sup> 増加。OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> は低下。Tac<sup>+</sup> 増加。
5. 好中球：重喫煙者では増加。
6. 好酸球：増加。

らく好中球におけると同様の機序によってもたらされた現象であろう。

喫煙の末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響に関しては、S群ではOKT4<sup>+</sup>の減少、OKT8<sup>+</sup>の増加がみられると言う Miller (1982) の報告<sup>26)</sup>、あるいは、NK細胞の低下がみられるとする Tollenurd (1986)<sup>27)</sup> の報告などがあるが、自験成績ではこのような所見は認められなかった。この差は喫煙量の差によるものかも知れないが、前述のように、自験成績では重喫煙者群においてもこのような差は認められていない。

## 結 語

喫煙のヒト肺に及ぼす影響を検討する研究の一つとして、非喫煙者、喫煙者および喫煙中止者について気管支肺胞洗浄を行ない、細胞数、細胞分画、モノクロナール抗体を中心にBALF細胞および末梢血単核細胞サブセットについて検討し以下の結果を得た。

1. S群では、NS群に比較しBALF回収率の有意な低下が認められ、またBALF細胞数の著明な増加が認められた。
2. BALF細胞分画において、S群ではNS群に比較し、肺胞マクロファージの有意な増加が認められたが、リンパ球には差が認められなかった。
3. BALFマクロファージ・サブセットにおいては、S群ではNS群に比較しOKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup>, OKT6<sup>+</sup>細胞の有意な増加を認めた。

4. BALFリンパ球サブセットに関しては、S群ではNS群に比較し、有意のOKT8<sup>+</sup>細胞の増加、OKT4<sup>+</sup>細胞の低下が認められ、OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup>比の有意な低下が認められた。

このようなBALF細胞成分の変動成績は、喫煙の肺に及ぼす影響の一つを示しているものであるが、肺癌、肺気腫、特発性間質性肺炎など発症に喫煙の関与が指摘されている肺疾患の成立機序の考察に当たって重要な所見である。またBALF成分を用いて各種呼吸器疾患の病態生理の考察に当たって健常例との差異を論ずる場合には、常に前提となる条件として考慮されねばならないものである。

本研究の一部は喫煙科学研究財団研究助成金によった。

## 謝 辞

本研究について御指導、御校閲を賜りました京都大学結核胸部疾患研究所内科学第二部門大島駿作教授および直接御指導を賜りました泉孝英助教授に深謝致します。実験遂行にご協力いただきました長井苑子先生、竹内実先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Selikoff, I., Hammond, E. C., Chung, J.: Asbestos exposure, smoking and neoplasia. J. A. M. A. 204: 106~112, 1968
- 2) Raza, A. G., Lunch, III J. P., Wilson, B. S., Ward, P. A., Kunkel, S. L.: Human Alveolar macrophage activation and DR antigen expression in cigarette smokers: Chest 85: 41~43. 1984
- 3) Davis, W. B., Crystal, R. G.: Chronic interstitial lung disease, Current Pulmonology 5: 255~473, 1984
- 4) Douglas, J. G., Middleton, W. G., Gaddy, J., Petrie, G. R., Choo-Kang, Y. F. J., Prescott, R. J., Crompton, G. K.: Sarcoidosis: a disorder commoner in non smoker?: Thorax 41: 781~791, 1986
- 5) Rylander, R.: Pulmonary cell response to inhaled cigarette smoke: Arch. Environ. Health. 29: 329~333, 1974
- 6) Reynolds, H. Y., Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. J. Lab. Clin. Med. 84: 559~573, 1974
- 7) Daniele, R. P., Dauber, J. H., Altose, M. D., Rowlands, D. T. JR., and Gorenberg, D. J.: Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette



- smokers : *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 997~1005, 1977
- 8) Warr, G. A., Martin, R. R., Holleman, C. L., Criswell, B. S.: Classification of bronchial lymphocytes from smokers and non smokers ; *Am. Rev. Respir. Dis.* 113 : 96~110, 1976
  - 9) 藤村直樹：びまん性肺疾患における気管支肺胞洗浄液細胞成分に関する検討：京大胸部研紀要 16 : 35~48, 1983
  - 10) 泉 孝英, 長井苑子, 竹内 実：リンパ球サブセットの分画法—末梢血および気管支肺胞洗浄液からの分離方法—：呼吸 4 : 803~807, 1985
  - 11) Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood : *Scand. J. Clin. Lab Invest.*, 21 (Suppl. 97) : 77~89. 1968
  - 12) Wybran J, Fundenberg H, H : Rosette formation, a test for cellular immunity. *Trans. Assoc. Am. Physicians* : 84 : 239~247, 1971
  - 13) Eby, W. C. Chong, C. A., Dray, S., Molinaro, G. A.: Enumerating immunoglobulin-secreting cells among peripheral human lymphocytes. A haemolytic plaque assay for a B-cell function. *J. Immunol.* 115 : 1700~1703, 1975
  - 14) Izumi, T., Nagai, S., Kitaichi, M.; Fujimura, N.: Clinical value of the measurement of bronchoalveolar lavage fluid cell subsets in interstitial lung disease. *Chest* 89 : 137S~138S, 1986
  - 15) Ohta, Y., Fujiwara, K., Nishii, T., Oka, H.: Normal values of peripheral lymphocyte populations and T cell subsets at a fixed time of day : a flow cytometric analysis with monoclonal antibodies in 210 healthy adults : *Clin. Exp. Immunol.* 64 : 146~149, 1986
  - 16) 泉 孝英, 藤村直樹, 平田健雄, 長井苑子, 田村久, 沢野哲重, 橋本圭司, 荒谷信一：気管支肺胞洗浄液のリンパ球亜群. 免疫と疾患 7 : 641~650, 1984
  - 17) Hance, A. J., Douches, S., Winchester, R. J., Ferrans, V. J., Crystal, R. G.: Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies : changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol* 134 : 284~292. 1985
  - 18) Campbell, D. A., DuBois, R. M., Butcher, R. G., Poulter, L. W.: The density of HLR-DR antigen expression on alveolar macrophages is increased in pulmonary sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.* 65 : 165~171. 1986
  - 19) Campbell, D. A., Poulter, L. W., Janossy, G., Du Bois, R. M.: Immunohistological analysis of lung tissue from patient with cryptogenic fibrosing alveolitis suggesting local expression of immune hypersensitivity. *Thorax* 40 : 405~411. 1985
  - 20) Terhorst, C. Van Aghoven, A., Leclair, K., Snow, P., Reinherz, E., and Schlossman, S.: Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9, and T10. *Cell* 23 : 771~780. 1980
  - 21) Zwadlo, G., Schlegel, R., Sorg, C.: A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissue. *J. Immunol.* 137 : 512~517, 1986
  - 22) Talle, M. A., Westberg, P. E., Allegar, N., Makowski, M., Mittler, R. S., Goldstein, G.: Pattern of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies : *Cell. Immunol.* 78 : 83~99, 1983
  - 23) Fithian, E., Lung, P., Goldstein, G., Rubinfeld, M. Fenoglio, C, Edelson, R. : Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody : *Proc Natl Acad Sci(USA)* 78 : 2541~2544, 1981
  - 24) 泉 孝英, 長井苑子, 竹内 実, 渡辺和彦, 北市正則：アレルギー性肺疾患の診断. 気管支肺胞洗浄. *Medicina* 23 : 1165~1172. 1986
  - 25) Hunninghake, G. W., Crystal, R. G.: Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128 : 833~838, 1983
  - 26) Miller, L. G., Goldstein, G., Murphy, M., Ginns, L.: Reversible alternation in immunoregulatory T-cells in smoking : *Chest* 82: 526-529, 1982
  - 27) Tollenurd, D. J., Clark, J. W., Brown, L. M., Pottern, L., Mann, D. L., Neuland, C. Y., Blattner, W. A., Hoover, R. N.: Natural killer cells and T-cell subsets in exsmokers compared to current smokers and never smokers. *Am Rev. Respir. Dis.* 133 : A53, 1986

## EFFECTS OF SMOKING ON BALF CELLS AND PERIPHERAL BLOOD CELLS IN HEALTHY INDIVIDUALS

**Kazuhiko WATANBE, M.D.**

2nd Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

It has been reported that smoking causes various pulmonary disorders including lung cancer, pulmonary emphysema and some interstitial lung diseases.

To evaluate the influence of smoking on the human lung, we compared BALF cells findings of non-smokers, smokers and ex-smokers. The results are as follows :

1. A significant decrease of BALF recovery and an increase in the number of BALF cell in smokers were found compared to those in non-smokers.
2. Among the BALF cell populations, a significant increase of BALF macrophages were found in smokers compared to non-smokers. No such a difference could be found as to lymphocytes.
3. As to the subsets of BALF macrophages, a significant increase of OKM1<sup>+</sup>, OKM5<sup>+</sup> and OKT6<sup>+</sup> cells in smokers were found compared to those in non-smokers.
4. As to the subset of BALF lymphocytes, a significant increase of OKT8<sup>+</sup> cells and decrease of OKT4<sup>+</sup> cells in smokers resulted in a significant decrease of OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> ratio.

The above results contribute to an understanding of the mechanism of lung injuries attributable to smoking and also the understanding of the pathogenesis of tobacco-related lung diseases.