

間質性肺疾患における肺胞マクロファージに関する研究

第 1 編

肺胞マクロファージの機能, 胞体内ライソゾーム酵素活性, 膜表面抗原の検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

細 谷 茂 衛

(平成 3 年 7 月 8 日受稿)

Key words : alveolar macrophage, chemotaxis, phagocytosis,
lysosomal enzyme, interstitial lung disease

緒 言

肺胞マクロファージは経気道的に吸入された細菌等の病原体や異物を食食し, ライソゾーム酵素を用いて分解, 消化する. 更にリンパ球への抗原提示を行い, 種々のサイトカインの分泌によりリンパ球を始めとする免疫担当細胞を局所に動員し, 分化増殖させ, 細胞免疫反応を進める¹⁾. 近年 Reynolds H. Y. 等²⁾による気管支肺胞洗浄法の開発により, 肺局所のマクロファージを直接的に採取することが可能となり, 肺胞マクロファージの形態や機能に関する多くの知見が集積されてきた^{3,4)}. しかしサルコイドーシス等の間質性肺疾患の病態への関与については, この細胞の持つ多様な性質から未だ十分に解明されていない⁵⁾. 著者らは, サルコイドーシスを中心とした間質性肺疾患の病変形成におけるマクロファージの関与を明らかにするため, 肺胞マクロファージの機能および動態について検討した.

対象と方法

対象はサルコイドーシス18例, 特発性間質性肺炎6例, 膠原病性間質性肺炎5例, 過敏性肺臓炎7例, 肺癌6例と健常人8例であり, いずれもステロイドの投与は受けていない.

気管支肺胞洗浄法は, 右中葉気管支 (B₄ また

は B₅) に気管支ファイバーを楔入し生理食塩水 50ml にて 4 回洗浄し洗浄液 (BALF) を得た. BALF 中の有核細胞分類を行った後, 肺胞マクロファージを RPMI 1640 培養液に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させた.

走性指数測定⁶⁾: Boyden chamber と pore size が $8 \mu\text{m}$ の Millipore filter を用い, 上室に 5×10^5 個の肺胞マクロファージを, 下室に化学走性物質として zymosan 活性化ヒト血清を入れた. 37°C 90 分間遊走させた後 filter を取り出し Giemsa 染色し, 脱水, 包埋した. 光顕 400 倍で膜表面より $20 \mu\text{m}$ の距離にまで遊走してきたマクロファージの数を 10 視野数え, 1 視野当りの数を走性指数とした.

貪食指数測定⁷⁾: Lab-Tek chamber に 1 well 当り 5×10^4 個のマクロファージを入れて付着させ, オブソニン化 zymosan を加えて 37°C 30 分間反応させた後, 浮遊 zymosan を洗浄除去し, Giemsa 染色を行った. zymosan 粒子を食食したマクロファージの百分率を算出して貪食指数とした.

胞体内ライソゾーム酵素活性測定^{8,9)}: プラスチックシャーレ付着により回収したマクロファージ 1×10^6 個を TritonX-100 溶液で溶解した後, 基質溶液を加え反応させた. 基質として, acid phosphatase 活性測定には p-nitrophenyl phosphate⁸⁾ を, β -galactosidase 活性測定には

p-nitrophenyl- β -D-galactoside⁷⁾を用いた。反応時間はそれぞれ30分, 120分とし, 波長405nmでの吸光度を測定し, 検量線を用いて活性を求めた。

細胞表面マーカーの測定⁷⁾: 一次抗体として抗LeuM 3 (CD 14), 抗 LeuM 1 (CD 15), 抗HLA-DR (Beckton Dickinson 社) の3種類の単クローン抗体を用いた。Biotin 結合抗マウス免疫グロブリンと, alkaline phosphatase 結合streptoavidin を用いた免疫組織化学染色を行い, CD 14, CD 15, HLA-DR 抗原を発現しているマクロファージの百分率を求めた。

有意差検定は, 正規分布をとるものは Student t test により, 他はノンパラメトリック法によって行った。

結 果

1. 喫煙の影響 (表 1)

健康人 8 例と肺癌患者 6 例の健常側肺の計 14 例について喫煙の影響を検討した。非喫煙者は 7 例, 喫煙者は 7 例であった。走性指数, 胞体内ライソゾーム酵素活性は喫煙者に, そして食食指数, 細胞表面マーカーは非喫煙者においてやや高値を示したが有意差は認められなかった。そこで以下の対象疾患における検討は非喫煙者と喫煙者を分けずに行った。

2. 気管支肺胞洗浄液中細胞分類 (表 2)

サルコイドーシスのリンパ球は $25.3 \pm 16.2\%$ (平均値 \pm 標準偏差値) と健康人の $6.0 \pm 6.0\%$

に比して有意に増加しており ($p < 0.01$), マクロファージは $72.5 \pm 15.7\%$ と健康人の $93.0 \pm 5.6\%$ に比して有意に減少していた ($p < 0.01$)。過敏性肺臓炎においてもリンパ球は $68.9 \pm 20.0\%$ と健康人に比して有意に増加し ($p < 0.01$), マクロファージは $22.2 \pm 12.6\%$ と有意に減少していた ($p < 0.01$)。一方特発性間質性肺炎ではリンパ球, 好中球の増加傾向が見られたが, 有意差は認められなかった。

3. 走性指数 (表 3)

サルコイドーシスの走性指数は 15.2 ± 15.3 と, 健康人の 4.4 ± 1.9 に比して有意の亢進が認められた ($p < 0.01$)。また特発性間質性肺炎は 27.1 ± 21.8 , 過敏性肺臓炎は 145.3 ± 124.1 といずれも健康人に比して有意の亢進が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.05$)。しかし膠原病性間質性肺炎は 9.0 ± 5.1 と健康人と差がなかった。

表 1 喫煙が肺胞マクロファージ機能に与える影響

	非喫煙者	喫煙者
症例数	7	7
走性指数	4.6 ± 1.9	5.6 ± 6.3
食食指数 (%)	29.3 ± 7.3	23.8 ± 7.1
Acid phosphatase ($\mu\text{U}/10^6$)	1721 ± 651	1895 ± 993
β -galactosidase ($\mu\text{U}/10^6$)	345 ± 172	572 ± 310
CD 14陽性率 (%)	1.8 ± 1.8	0.6 ± 0.4
CD 15陽性率 (%)	4.2 ± 2.9	3.9 ± 1.8
HLA-DR 陽性率 (%)	85.1 ± 4.8	78.8 ± 8.8

平均値 \pm 標準偏差値

表 2 対象症例の気管支肺胞洗浄液中細胞組成

症例数	総細胞数 ($\times 10^6$)	細胞分類 (%)					
		マク ロ フ ァ ー ジ	リン パ 球	好 中 球	好 酸 球	好 塩 基 球	
健 常 者	8	15.8 ± 15.1	93.0 ± 5.6	6.0 ± 6.0	1.0 ± 1.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
サ ル コ イ ド ー シ ス	18	22.7 ± 13.2	$72.5 \pm 15.7^a)$	$25.3 \pm 16.2^a)$	1.6 ± 4.0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0
特 発 性 間 質 性 肺 炎	6	28.4 ± 23.8	62.6 ± 34.0	16.0 ± 23.0	20.2 ± 35.4	0.7 ± 0.8	0.5 ± 0.8
膠 原 病 性 間 質 性 肺 炎	5	20.2 ± 15.2	86.4 ± 7.8	9.9 ± 5.4	2.3 ± 2.7	1.2 ± 1.4	0.3 ± 0.4
過 敏 性 肺 臓 炎	7	37.8 ± 29.9	$22.2 \pm 12.6^a)$	$68.9 \pm 20.0^a)$	7.3 ± 12.1	0.9 ± 0.6	0.9 ± 0.9

平均値 \pm 標準偏差値
対健康者 a): $p < 0.01$

表3 対象症例の肺胞マクロファージの機能

	症例数	走性指数	貪食指数(%)	Acid phosphatase ($\mu\text{U}/10^4$)	β -galactosidase ($\mu\text{U}/10^6$)
健常者	8	4.4 ± 1.9	26.4 ± 9.1	1897 ± 971	450 ± 225
サルコイドーシス	18	15.2 ± 15.3 ^{a)}	37.7 ± 9.5 ^{a)}	1377 ± 1457	281 ± 246 ^{b)}
特発性 間質性肺炎	6	27.1 ± 21.8 ^{b)}	50.4 ± 11.7 ^{a)}	872 ± 510 ^{b)}	471 ± 294
膠原病性 間質性肺炎	5	9.0 ± 5.1	20.1 ± 2.1 ^{b)}	968 ± 668 ^{b)}	148 ± 78 ^{b)}
過敏性肺臓炎	7	145.3 ± 124.1 ^{b)}	45.2 ± 9.8 ^{a)}	632 ± 343 ^{a)}	292 ± 205

平均値±標準偏差値
対健常者 a) : p < 0.01 b) : p < 0.05

4. 貪食指数 (表3)

サルコイドーシスの貪食指数は37.7 ± 9.5と健常人の26.4 ± 9.1に比して有意の亢進が認められた (p < 0.01)。また特発性間質性肺炎は50.4 ± 11.7、過敏性肺臓炎は45.2 ± 9.8といずれも健常人に比して有意の亢進が認められた (p < 0.01, p < 0.01)。しかし膠原病性間質性肺炎は20.1 ± 2.1と健常人に比して有意に低下していた (p < 0.05)。

5. 胞体内 acid phosphatase 活性 (表3)

特発性間質性肺炎の acid phosphatase 活性は872 ± 510 μU 、膠原病性間質性肺炎は968 ± 668 μU 、過敏性肺臓炎は632 ± 343 μU と、いずれも健常人の1897 ± 971 μU に比して有意に低下していた (p < 0.05, p < 0.05, p < 0.05)。またサルコイドーシスにおいても1377 ± 1457 μU と低下の傾向が見られたが、有意差は認められなかった。

6. 胞体内 β -galactosidase 活性 (表3)

サルコイドーシスの β -galactosidase 活性は281 ± 246 μU と健常人の450 ± 225 μU に比して有意に低下していた (p < 0.05)。また膠原病性間質性肺炎でも148 ± 78 μU と健常人に比して有意に低下していた (p < 0.05)、しかし特発性間質性肺炎は471 ± 294 μU 、過敏性肺臓炎は292 ± 205 μU といずれも健常人と差がなかった。

7. 細胞表面マーカー陽性率 (表4)

CD 14陽性細胞は過敏性肺臓炎で3.7 ± 1.4%

表4 肺胞マクロファージの細胞表面マーカー陽性率

	症例数	CD14(%)	CD15(%)	HLA-DR (%)
健常者	6	1.6 ± 1.6	4.6 ± 2.1	82.4 ± 10.2
サルコイドーシス	17	1.8 ± 2.0	10.8 ± 7.9 ^{a)}	84.7 ± 6.3
特発性 間質性肺炎	3	2.1 ± 1.5	17.9 ± 6.9 ^{b)}	83.8 ± 12.7
膠原病性 間質性肺炎	3	0.8 ± 0.5	3.9 ± 1.9	85.8 ± 5.2
過敏性肺臓炎	6	3.7 ± 1.4 ^{b)}	18.0 ± 6.8 ^{a)}	87.5 ± 7.2

平均値±標準偏差値
対健常者 a) : p < 0.01 b) : p < 0.05

と健常人の1.6 ± 1.6%に比して有意に増加していたが (p < 0.05)、サルコイドーシスは1.8 ± 2.0%、特発性間質性肺炎は2.1 ± 1.5%、膠原病性間質性肺炎は0.8 ± 0.5%といずれも健常人と差がなかった。CD 15陽性細胞はサルコイドーシスで10.8 ± 7.9%、特発性間質性肺炎で17.9 ± 6.9%、過敏性肺臓炎で18.0 ± 6.8%といずれも健常人の4.6 ± 2.1%に比して有意に増加していたが (p < 0.01, p < 0.05, p < 0.01)、膠原病性間質性肺炎は3.9 ± 1.9%と健常人と差がなかった。HLA-DR 陽性細胞はサルコイドーシス84.7 ± 6.3%、特発性間質性肺炎83.8 ± 12.7%、膠原病性間質性肺炎85.8 ± 5.2%、過敏性肺臓炎87.5 ± 7.2%といずれの疾患でも健常人の82.4 ± 10.2%に比して差がなかった。

考 察

サルコイドーシスの肺における病態は、今まで主にリンパ球を中心に解析が行われ、helper/inducer T細胞の肺への集簇と、活性化、Interleukin-2の産生、分泌の亢進を伴う alveolitis の存在が明らかにされてきた¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。これらの事実からサルコイドーシス肺においてマクロファージによる T-cell への抗原提示能の亢進が窺われる。一方本症の特異的病態である類上皮細胞肉芽腫を構成している類上皮細胞や多核巨細胞の前駆細胞は単球・マクロファージ系細胞であると考えられている。そこでこれら肺マクロファージの機能異常を解析することは本症の病態と、さらに予後を考える上で重要であると考えられる。

我々の成績では、サルコイドーシスの肺マクロファージにおいては走性能、食食能とも亢進が見られた。肺に吸入された病因物質の処理のために流血中より肺局所に単球が動員されるために遊走能は亢進しており、病因物質の処理のために食食能の亢進が見られるものと考えられる。肺マクロファージの胞体内ライソゾーム酵素である β -galactosidase 活性の低下が認められ、acid phosphatase 活性についても低下の傾向が認められた。その原因としては末梢血単球の有するライソゾーム酵素活性は肺マクロファージのそれに比して明かに低いことから⁷⁾¹³⁾、サルコイドーシスにおける単球の肺への動員増加によるものと考えられる。更にサルコイドーシスの肺内には、正常肺マクロファージはほとんど有していないが末梢血単球の約80~90%が有する CD 15抗原を有するマクロファージの増加が認められ、末梢血単球の肺局所への動員増加を示唆するものとも考えられる。我々の成績と同様に、サルコイドーシス肺マクロファージの細胞表面マーカーの解析から末梢血単球に近い性格を有するとの報告¹⁴⁾は多い。またマクロファージの胞体内ライソゾーム酵素活性の低下については、活性化リンパ球の培養上清はマクロファージにおける胞体内ライソゾーム酵素活性を低下させるとの報告¹⁵⁾もあり、本症肺リンパ球の活性化を反映しているのかもしれない。

Helper T-cell への抗原提示を行う HLA-DR 陽性マクロファージは、サルコイドーシスにおいて増加は認められなかった。しかし本症の肺マクロファージ細胞1個当りの HLA Class II 抗原の発現量は増加しているとの報告¹⁶⁾もあり、一方では発現されている HLA-DR 抗原量が必ずしも抗原提示能を反映するものではなく¹⁷⁾ヒトにおける抗原提示には HLA-DR よりも HLA-DQ が優先する¹⁸⁾との報告もあり、HLA-DR 陽性細胞率をもって肺病巣における抗原提示活性状態を判断することは難しい。

特発性間質性肺炎では肺マクロファージによるフィブロネクチン等の線維芽細胞増殖因子や、スーパーオキシド、過酸化水素等のオキシダントの産生、分泌の亢進が認められ、このことが肺の線維性変化を進展させていることが示されている¹⁹⁾²⁰⁾。特発性間質性肺炎の肺マクロファージはサルコイドーシスと同様に走性能、食食能の亢進とライソゾーム酵素活性の低下傾向がみられた。これらの所見と CD 15陽性マクロファージの増加所見を併せて考えると、末梢血単球の肺への動員を示していると考えられた。

一方特発性間質性肺炎と臨床所見が類似する膠原病性間質性肺炎では、肺マクロファージ機能において多くの点で異なっていた。つまり膠原病性間質性肺炎では食食能の低下、ライソゾーム酵素活性の低下がみられ、走性能、細胞表面マーカーに異常はなかった。すなわち膠原病性間質性肺炎においては肺マクロファージの全体的な機能低下が考えられた。その原因として膠原病にみられる種々の自己抗体が、マクロファージ表面のレセプターを阻害することが考えられる²¹⁾。今回は症例数も少なく、今後疾患別、病期別に詳細な検討が必要であろう。

過敏性肺臓炎はサルコイドーシスと同じく肺に肉芽腫を形成する疾患であるが、肺マクロファージ機能においても概ね類似した傾向がみられた。しかし走性能の亢進と胞内体 acid phosphatase 活性の低下は、過敏性肺臓炎においてより顕著に認められた。更に CD 14および CD 15陽性マクロファージ百分率の増加もより顕著であったことを合わせて考えると、過敏性肺臓炎の病巣内におけるマクロファージのターンオ

一バーはサルコイドーシスに比較してより速いものと思われた。このことは本症が抗原暴露によりサルコイドーシスよりもはるかに急速で強い炎症症状を伴って発症することや、また抗原隔離による速やかな回復などの臨床的経過からも窺われる。しかし両疾患の間には、リンパ球の機能的サブセットに見られるような顕著な差異は認められなかった。このことは、サルコイドーシスの病因物質が過敏性肺臓炎と同様に経気道的に吸入されている可能性を示唆するものと考えられた。

結 論

サルコイドーシス、特発性間質性肺炎、膠原病性間質性肺炎、過敏性肺臓炎の肺胞マクロファージの機能、細胞表面マーカー、胞体内ライ

ソゾーム酵素活性を比較検討した。サルコイドーシス、特発性間質性肺炎、過敏性肺臓炎において走性能、食食能の亢進、胞体内ライソゾーム酵素活性の低下、CD 15陽性マクロファージの増加が認められ、末梢血単球の肺への動員亢進が示唆された。また膠原病性間質性肺炎において食食能、胞体内ライソゾーム酵素活性の低下が認められ、肺胞マクロファージの機能低下が窺われた。また肺胞マクロファージは間質性肺疾患の病変形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

稿を終えるに臨みご指導ならびに御校閲頂きました恩師木村郁郎教授に謝意を捧げますと共に、研究に際して御指導頂きました中田安成講師ならびに片岡幹男博士に深謝致します。

文 献

- 1) 片岡幹男, 中田安成: 間質性肺疾患の単球・マクロファージの動態と活性化. 日臨免会誌 (1989) 12, 537—543.
- 2) Reynolds HY and Newball HH: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. J Lab Clin Med (1974) 84, 559—573.
- 3) Hocking WG and Golde DW: The pulmonary alveolar macrophage. N Engl J Med (1979) 301, 580—645.
- 4) Adams DO and Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. Ann Rev Immunol (1984) 4, 283—318.
- 5) Thomas PD and Hunninghake GW: Current concepts on the pathogenesis of sarcoidosis. Am Rev Respir Dis (1987) 135, 747—760.
- 6) 片岡幹男: ヒト末梢血単球の走性に関する研究. 第1編. 単球走性測定法の検討. 岡山医誌(1981) 93, 489—498.
- 7) 細谷茂衛, 西崎 浩, 前田 剛, 飛岡 徹, 森 由弘, 江尻東伍, 片岡幹男, 多田慎也, 中田安成, 犬塚泰亮, 木村郁郎: 間質性肺疾患における肺胞マクロファージの機能に関する検討. 日胸疾会誌 (1989) 27 (増刊号), 188.
- 8) 細谷茂衛, 西崎 浩, 前田 剛, 飛岡 徹, 森 由弘, 江尻東伍, 片岡幹男, 多田慎也, 中田安成, 犬塚泰亮, 木村郁郎: 間質性肺疾患における肺胞マクロファージのライソゾーム酵素活性. 第17回日本臨床免疫学会総会抄録集, 広島 (1989) pp 251.
- 9) 佐々木淳子, 立脇 紀, 能勢真人, 京極方久: マクロファージ胞体内酵素活性の微量定量法・免疫学実験法, 日本免疫学会編, 金沢 (1984) pp 4369—4375.
- 10) Semenzato G: Recent advances on sarcoid immunology. Sarcoidosis (1988) 5, 5—7.
- 11) Hunninghake GW and Crystal RG: Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. N Engl J Med (1981) 305, 429—434.

- 12) 森 由弘, 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 飛岡 徹, 前田 剛, 細谷茂衛, 大熨泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の *Propionibacterium acnes* 刺激による Interleukin-2産生及び Interleukin-2 receptor 発現の検討. 日胸疾会誌 (1989) **27**, 42—49.
- 13) Barth J, Kreipe H, Kiemle-Kallee J, Razdum HJ, Parwaresch MR and Petermann W: Diminished activity of tartrate resident acid phosphatase in alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis. *Thorax* (1988) **43**, 901—904.
- 14) Hans AJ, Douches S, Winchester AJ, Ferrans VJ and Crystal RG: Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in human lung by using monoclonal antibodies: changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* (1985) **134**, 284—292.
- 15) Karnovsky ML and Lazdins JK: Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol* (1978) **121**, 809—813.
- 16) Spurzem JR, Saltini C, Kirby M, Konishi K and Crystal RG: Expression of HLA class II genes in alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* (1989) **140**, 89—94.
- 17) Rossi GA, Zocchi E, Sacco O, Balbi B, Ravazzoni C and Damiani G: Alveolar Macrophages stimulation of T-cell proliferation in autologous mixed lymphocyte reactions. *Am Rev Respir Dis* (1986) **133**, 78—82.
- 18) Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Iuchi M, Ohta N and Sasazuki T: HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigens in humans. *Nature* (1987) **327**, 426—430.
- 19) Hunninghake GW, Garrett KC, Richerson HB, Fantone JC, Wand PA, Rennard SI, Bitterman PB and Crystal RG: Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. *Am Rev Respir Dis* (1984) **130**, 476—496.
- 20) Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB and Crystal RG: Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanisms for the recruitment of fibroblast to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci* (1981) **78**, 7147—7151.
- 21) Katayama S, Chia D, Knutson DW and Barnett EV: Decreased Fc receptor avidity and degradative function of monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* (1983) **131**, 217.

Studies on alveolar macrophage function in interstitial lung disease**Part 1. Abnormalities of alveolar macrophage functions****Shigee HOSOYA****Second Department of Internal Medicine,****Okayama University Medical School,****Okayama 700, Japan****(Director : Prof. I. Kimura)**

Interstitial lung diseases comprise a heterogeneous group of disorders that are characterized by the chronic accumulation of inflammatory and immune effector cells within the alveoli, where they produce alveolitis, granulomas, or fibrosis. To investigate the pathogenesis of these diseases, the functions of alveolar macrophages recovered from bronchoalveolar lavage were evaluated in patients with interstitial lung disease in comparison to healthy controls. Thirty six patients were investigated : 18 with sarcoidosis, 6 with idiopathic interstitial pneumonia (IIP), 5 with interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease (IP-CVD), and 7 with hypersensitivity pneumonitis (HP). Both the chemotactic and phagocytic indices were significantly higher in the patients with sarcoidosis, IIP, and HP than in the healthy subjects. However, the patients with IP-CVD had a lower phagocytic index than the normal subjects. Acid phosphatase activity was lower in patients with IIP, IP-CVD, and HP compared with the healthy subjects, while beta-galactosidase activity was lower in patients with sarcoidosis and IP-CVD compared with the normal controls. Analysis of surface markers showed that CD15-positive macrophages were increased in patients with sarcoidosis, IIP, and HP, but there were no differences in CD14- and HLA-DR-positive macrophages in these patients when compared to the healthy subjects.

These findings indicate that the recruitment of peripheral blood monocytes to the lungs is increased in patients with sarcoidosis, IIP, and HP. Alveolar macrophages may play an important role in the pathogenesis of interstitial lung disease.