

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 2 編

サルコイドーシスにおける肺胞マクロファージ活性と 疾患活動性との比較について

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, sarcoidosis, *Propionibacterium acnes*,
lymphocyte blastogenesis

緒 言

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。その病態についてはリンパ球の面から多くの研究が行われ、これら肺胞リンパ球異常と臨床検査所見との関連が報告されてきた¹⁾²⁾³⁾。しかし、抗原提示細胞あるいは類上皮細胞肉芽種の構成細胞としてサルコイドーシス病巣形成に重要な役割を演じている単球・マクロファージの機能的異常の臨床所見への関与についての検討は、未だ少ない。著者⁴⁾は先にサルコイドーシスにおける肺胞マクロファージの機能異常を指摘したが、今回はその機能異常と臨床検査によるその活動性との関係を検討した。更に、本症病巣より高濃度、高頻度に分離される⁵⁾ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) の本症肺胞リンパ球の増殖亢進⁶⁾⁷⁾への関与についても併せ検討した。

対象と方法

対象は未治療サルコイドーシス18例で男性5例、女性13例、年齢は19歳~68歳、中央値は50歳である。喫煙者6例、非喫煙者12例で、組織診断確定例は15例、他3例は臨床成績によった。胸部X線病期分類では、I期(両側肺門リンパ節腫大のみ)5例、II期(両側肺門リンパ節腫大と肺野異常陰影)11例、IV期(肺野線維症)

1例、0期(異常なし)1例であった。

気管支肺胞洗浄(BAL)は気管支ファイバースコープを使用して、型通り右中葉の気管支を生食50mlにて4回洗浄し、得られた有核細胞をMay-Giemsa染色にて分類し、洗浄液(BALF)1ml当りのリンパ球数を算出した。リンパ球subsetはFITC標識モノクローナル抗体OKT-3, OKT-4, OKT-8(Ortho社製)を氷中にて60分間反応させた後、スペクトラムⅢにて陽性細胞率を測定した。肺胞マクロファージの走性能はBoyden chamberを用い、zymosan活性化ヒト血清を走性物質として測定した。貪食能はオプソニン化zymosan粒子を貪食したマクロファージの百分率として求めた。ライソゾーム酵素であるacid phosphatase, β -galactosidase活性は付着細胞をTritonX-100溶液に懸濁し、各々p-nitrophenyl phosphate, p-nitrophenyl- β -D-galactosideを基質液として加えて反応後、炭酸ナトリウム溶液を加えて発色させ吸光度を測定した。マクロファージの細胞表面マーカーは、モノクローナル抗体を使用した免疫組織化学染色によって、CD15, CD14, HLA-DR抗原の発現細胞率を求めた⁴⁾。

P. acnes 刺激リンパ球幼若化反応は、BALF中リンパ球 1×10^5 個に *P. acnes* の pyridine extract residue (*P. acnes* PER) を5.0 μ g/ml 加え、6日間培養後、³H-thymidine を加え更に

表1 サルコイドーシス患者における肺胞マクロファージ機能と各種臨床検査成績との相関係数

マクロファージ機能	血清 ACE 活 性	血 清 リゾチム 活 性	%肺活量	拡散能	Spleen index	BALF 所見		
						リンパ球数	CD4(+) 細胞数	CD4/CD8 比
走性指数	-0.17	-0.11	0.01	-0.07	0.49	-0.09	-0.09	0.01
貪食指数	-0.04	0.18	-0.06	-0.21	0.52*	-0.07	-0.07	-0.11
酸性ホスファターゼ 活性	-0.01	0.04	0.04	0.19	0.06	-0.33	-0.29	-0.05
β ガラクトシダーゼ 活性	-0.20	-0.22	-0.01	0.15	0.03	-0.40	-0.41	-0.05
CD14陽性 マクロファージ百分率	0.01	-0.34	-0.16	-0.11	0.57	-0.16	-0.12	-0.18
CD15陽性 マクロファージ百分率	-0.12	-0.34	-0.03	0.38	0.11	-0.15	-0.13	0.06
HLA-DR 陽性 マクロファージ百分率	0.13	0.29	-0.39	-0.06	0.08	-0.19	-0.18	-0.25

* p < 0.05

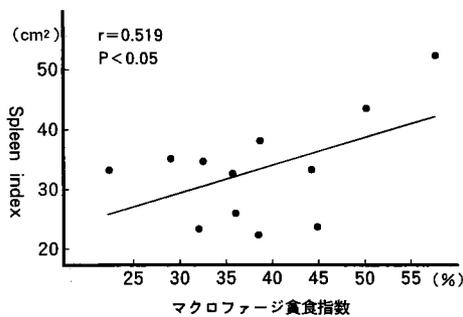


図1 サルコイドーシス患者の Spleen Index と肺胞マクロファージ貪食指数との相関

7時間培養し、リンパ球に取り込まれた ^3H -thymidine の dpm を測定した。リンパ球幼若化率は *P. acnes* 添加培養リンパ球の dpm を無添加培養リンパ球の dpm で除して stimulation index (SI) として求めた⁶⁾。

spleen index は、超音波断層装置を用いて最大の脾断面像が得られるように走査し、長径と厚みを乗じた値として求めた⁸⁾。

血清 angiotensin converting enzyme (ACE) 活性の測定は笠原氏の変法により、リゾチム活性は血清を *Micrococcus lysodeikticus* に反応させる比濁法にて測定した。 ^{67}Ga シンチグラフィは ^{67}Ga を静注後、72時間後にスキヤニングを施行し、肺野への集積が明らかなものを陽

性とし、background と差がないものを陰性とした。PPD 皮膚反応は PPD 0.1mg/0.1ml を前腕皮内に注射し、48時間後の紅斑の長径が10mm 以上を陽性とした。

結 果

1. マクロファージ機能と臨床検査成績との相関

肺胞マクロファージ機能と血清中酵素活性、肺機能検査、BALF 中リンパ球数、spleen index との相関を検討した(表1)。spleen index と貪食指数との間には相関係数0.519 ($p < 0.05$) と正の相関が見られた(図1)。

^{67}Ga シンチグラムでは肺野への取り込み陽性8例の貪食指数は 41.9 ± 8.4 と陰性7例の 32.2 ± 7.1 に比して有意に亢進していた ($p < 0.05$)。また ^{67}Ga 取り込み陽性例のCD 15陽性マクロファージ百分率は 14.9 ± 8.9 と陰性例の 7.4 ± 5.4 に比して有意に増加していた($p < 0.05$) (図2)。

PPD 皮内反応陽性7例の acid phosphatase 活性は 705 ± 219 と陰性10例の 1902 ± 1813 に比して有意に低下 ($p < 0.05$) していた。また陽性例のCD 15陽性マクロファージ百分率は 14.4 ± 9.2 と陰性例の 7.0 ± 5.2 に比して有意に増加 ($p < 0.05$) していた(図3)。その他血清中 ACE 活性、血清中リゾチム活性、%

肺活量, 拡散能, BALF 中リンパ球数, BALF 中 CD 4 (+) リンパ球数, CD 4/CD 8比との間にはいずれも相関関係は認められなかった。

また肺胞マクロファージ機能は胸部 X 線における各病期間で差はなかった。

2. 肺胞マクロファージ機能と肺胞リンパ球の

P. acnes 刺激幼若化反応との相関

stimulation index と CD 14陽性マクロファージ百分率との間に相関係数0.886 ($p < 0.01$) と正の相関関係が認められた(図4)。しかし走性能, 食食能との相関は認められなかった。

考 察

サルコイドーシスは全身性肉芽腫性疾患であるが, なかでも肺が95%以上と最も高率に侵されている⁹⁾¹⁰⁾。本症の下気道には活性化Tリンパ球とマクロファージの集積が著明であり¹¹⁾、未知の抗原を肺局所のマクロファージが食食, 処理するとともに, Tリンパ球に抗原を提示し, Interleukin-1 (IL-1) の産生によりTリンパ球を増殖させ, Interleukin-2 (IL-2), マクロファージ遊走因子(MCF), マクロファージ活性化因子(MAF)等のリンホカインの分泌を亢進させている。これらのリンホカインによる末梢血単球の肺局所への動員, 集積, 活性化が, 類上皮細胞肉芽腫の形成に関与していると考えられる⁹⁾¹¹⁾¹²⁾。先に著者はサルコイドーシスの肺胞マクロファージにおいて走性能, 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ることを報告⁴⁾し, マクロファージの肺病巣局所への動員, 集積が増加していることを示した。

これらサルコイドーシスにおける肺胞マクロファージ機能の異常と臨床検査所見との関係を検討したところ, spleen index と食食指数との間には有意の正の相関関係が認められた。サルコイドーシスにおいて10~60%の症例で脾の腫大が認められ⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾、約60%に組織学的に類上皮細胞肉芽腫が認められている⁹⁾。肺胞マクロファージと同様に脾における網内系細胞の賦活状態を表しているとも考えらる。また⁶⁷Ga の肺への取り込み亢進例において食食能の亢進が認められたことは, ⁶⁷Ga のマクロファージによる取り

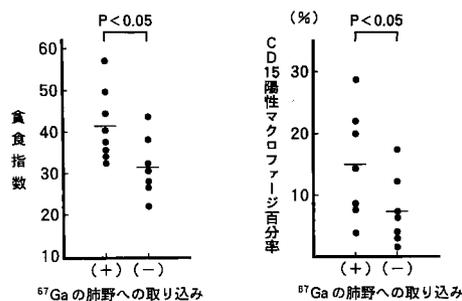


図2 ⁶⁷Ga の肺野への取り込みと肺胞マクロファージ機能

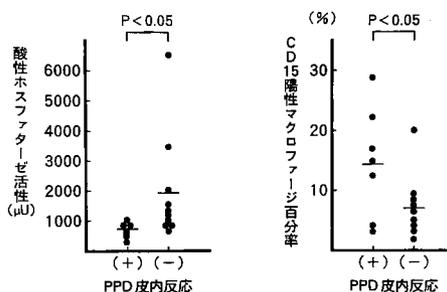


図3 PPD 皮内反応と肺胞マクロファージ機能

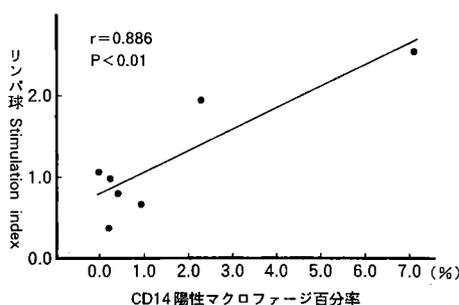


図4 サルコイドーシス肺胞リンパ球の *P. acnes* 添加幼若化率と CD 14陽性マクロファージ百分率との相関

込み亢進を示唆している¹⁴⁾。また CD 15陽性マクロファージが⁶⁷Ga 取り込み陽性例に増加していた事から, ⁶⁷Ga 取り込み陽性例では陰性例よりも肺への末梢血よりのマクロファージの動員, 集積が盛んなことを示している。即ち, 肺胞マクロファージの食食能の亢進や CD 15陽性細胞の増加は, ⁶⁷Ga シンチグラフィーとともに肺病

巢の活動性の亢進を示すものと考えられる。

PPD 皮内反応と肺胞マクロファージ機能異常との間にも関連が見られた。PPD 皮内反応の陰性化は活動期サルコイドーシスに特徴的な所見であり、寛解と共に再び陽転が見られる¹⁵⁾。今回の著者の実験で PPD 皮内反応陰性者において陽性者よりも acid phosphatase 活性の亢進が認められたことは、本酵素活性亢進もサ症の全身的活動性を反映しているのかもしれない。しかし PPD 陽性者における CD 15陽性細胞の高率については不明である。血清 ACE 活性、血清リゾチーム活性、肺機能検査、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 所見のいずれも肺胞マクロファージ機能との関連は見られなかった。

P. acnes は本問らによりサルコイドーシス病巣の生検標本から高頻度かつ高濃度に分離され、サルコイドーシス病態への関与が強く推察されている⁹⁾。サルコイドーシス肺リンパ球に *P. acnes* を添加培養したところ幼若化反応の亢進⁶⁾、IL-2 産生、IL-2 receptor 発現の亢進¹⁶⁾を来すことが明かにされ、これらの亢進は本症の活動性を反映している⁷⁾。またサルコイドーシス患者の肺胞マクロファージを *P. acnes* にて刺激すると、IL-1の分泌が亢進することも示された¹⁷⁾。今回の成績ではこの幼若化反応の亢進と CD 14陽性細胞の増加との間に有意な正の相関関係が認められた。マクロファージ上の CD 14抗原の機能的意味については未だ明らかにされてはいないが、この抗原が免疫反応の場であるリンパ小節の胚中心において高率に認められることから、抗原提示に積極的に関与していることが推察されている¹⁸⁾。即ち肺リンパ球が *P. acnes* 刺激にて増殖するにあたり、CD 14陽性マクロファージが helper cell として作用していることが窺われた。しかし、マクロファージの抗原処理に関与すると考えられる β -galactosidase 活性は、本症で

は低下が認められた事から、貪食を介しての抗原提示によるリンパ球増殖ではなく、IL-1分泌亢進などによるリンパ球の増殖に関与していることが考えられた。このことはサ症肺胞マクロファージにおいて HLA-DR 陽性細胞の増加を認めなかった事からも窺われる。

結 論

サルコイドーシス患者の肺胞マクロファージは健常人に比して機能的に種々の差異を持つことが明かとなったため、この肺胞マクロファージ機能異常と各種臨床検査所見との関係を検討すると共に、肺局所のリンパ球の *P. acnes* 刺激による幼若化反応との関連も検討し、以下の結果を得た。

1. 脾腫大と貪食能との間に正の相関がみられた。また⁶⁷Ga の肺野への取り込み亢進例では貪食能の亢進と CD 15陽性細胞の増加が見られた。
2. PPD 皮内反応陰性例に acid phosphatase 活性の亢進と、陽性例に CD 15陽性細胞の増加がみられた。
3. 肺胞リンパ球の *P. acnes* 刺激幼若化反応の亢進と CD 14陽性細胞の増加とは相関が認められた。

以上の結果から、肺胞マクロファージ機能異常はサルコイドーシスの活動性を反映するとされる臨床検査所見と関連が見られた。また本症マクロファージは肺胞リンパ球の *P. acnes* 刺激による反応に際し、helper cell として作用していることが窺われた。

稿を終えるに臨み御指導並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並びに片岡幹男博士に深謝致します。

文 献

- 1) 中田安成, 片岡幹男, 小林洋三, 岸 俊行, 江尻東伍, 森 由弘, 飛岡 徹, 前田 剛, 大塚泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の異常. 日本臨床免疫学会会誌 (1987) 10, 278—285.
- 2) 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.
- 3) Ceuppens JL, Lacquet LM, Marien G, Demedts M, van den Eckhout A and Stevens E : Alveolar T-cell subsets in pulmonary sarcoidosis. Correlation with disease activity and effect of steroid treatment. *Am Rev Respir Dis* (1984) **129**, 563—568.
 - 4) 細谷茂衛 : 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. *岡山医誌* (1991) **103**, 1089—1095.
 - 5) 本間日巨 : サルコイドーシス発症機構に関する研究. 難病の発生機構, 豊倉康夫編, 東京大学出版会, 東京 (1981) pp 245—303.
 - 6) 江尻東伍 : サルコイドーシス肺病態への *Propionibacterium acnes* の関与に関する研究第一編サルコイドーシス肺胞リンパ球活性化について. *岡山医誌* (1988) **100**, 803—809.
 - 7) 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 森 由弘, 飛岡 徹, 前田 剛, 細谷茂衛, 大槩泰亮, 木村郁郎 : サルコイドーシス肺胞リンパ球の *P. acnes* 刺激幼若化反応の臨床. *日胸疾会誌* (1989) **27**, 837—841.
 - 8) 片岡幹男, 中田安成, 前田 剛, 細谷茂衛, 西崎 浩, 小野芳郎, 飛岡 徹, 森 由弘, 玉井 守, 江尻東伍, 大槩泰亮, 木村郁郎 : サルコイドーシスにおける脾腫の検討 — 超音波診断法による —. *日胸疾会誌* (1990) **28**, 750—755.
 - 9) 岩放和郎, 立花輝夫, 松井泰夫, 重松信昭, 泉 孝英 : サルコイドーシス剖検例の統計的, 病理的観察. *日胸疾会誌* (1980) **11**, 749—762.
 - 10) Scadding JG and Mitchl DN : *Sarcoidosis*. Chapman and Hall Medical Co., London (1985) pp 43—71.
 - 11) Thomas PD and Hunninghake GW : Current concepts on the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Dis* (1987) **135**, 747—760.
 - 12) Saltini C and Crystal RG : Pulmonary sarcoidosis : Pathogenesis, Staging and Therapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 76 : suppl. 1 (1985) pp 92—100.
 - 13) Kimbrell OC : Sarcoidosis of the spleen. *N Engl J Med* (1957) **257**, 128—131.
 - 14) 中島重徳, 遠藤文子, 大石光雄, 鴨下一郎 : ^{67}Ga -citrate の特徴と臨床応用. *肺と心* (1977) **24**, 190—196.
 - 15) Chusid EL, Shan R and Sillzbach LE : Tuberculin tests during the course of sarcoidosis in 350 patients. *Am Rev Resp Dis* (1971) **104**, 13—21.
 - 16) 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, 大槩泰亮, 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.
 - 17) 飛岡 徹, 前田 剛, 森 由弘, 江尻東伍, 細谷茂衛, 片岡幹男, 中田安成, 木村郁郎 : サルコイドーシス患者のマクロファージのIL-1産生能の検討. *アレルギー* (1988) **37**, 636.
 - 18) Hofman FM, Lopez D, Husmann L, Meyer PR and Taylor CR : Heterogeneity of macrophage populations in human lymphoid tissue and peripheral blood. *Cell Immunol* (1984) **88**, 61—74.

**Studies on alveolar macrophage function in interstitial lung disease
Part 2. Abnormalities of alveolar macrophages in sarcoidosis
and the correlations with clinical findings**

Shigee HOSOYA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Several abnormalities of alveolar macrophage function were found in patients with sarcoidosis, and such abnormalities reflected the recruitment of immature macrophages to the local sites. In this study, alveolar macrophage function was compared with the disease activity in patients with sarcoidosis.

The alveolar macrophage phagocytic index correlated closely with the spleen index obtained by ultrasonography, but not with serum angiotensin converting enzyme levels, lung function tests, or the cell differentiations of bronchoalveolar lavage fluid. The patients who had a positive uptake of ⁶⁷-gallium scintigram showed a higher phagocytic index and a higher percentage of CD15-positive alveolar macrophages than those with negative scintigrams. Acid phosphatase activity and the percentage of CD15-positive alveolar macrophages were increased in patients with negative PPD skin tests compared to those with positive tests.

We previously reported that alveolar lymphocytes in patients with sarcoidosis are sensitized to *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), which may play a significant role in the induction of alveolitis in these patients. There was a significant correlation between the blastogenesis of alveolar lymphocytes induced by *P. acnes* and beta-galactosidase activity as well as the percentage of CD14-positive alveolar macrophages.

These findings suggest that alveolar macrophages play an important role in the pathogenesis of sarcoidosis, in which the clinical abnormalities may reflect abnormal alveolar macrophage function.