

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎における末梢血 および胸腔内の免疫学的検討

—Tリンパ球およびTリンパ球サブセットの解析—

中田 真佐雄 大久保 喜雄 黒 岩 靖
ナムシ・R・ナムシ 和田 茂比古
草間 昌三

信州大学医学部第1内科学教室

Immunological Study of Peripheral Blood and Pleural Space in Patients with Carcinomatous and Tuberculous Pleurisy —Analysis of T-lymphocytes and T-lymphocyte Subsets—

Masao NAKATA, Yoshio OKUBO, Yasushi KUROIWA,
Namushi R. NAMUSHI, Shigehiko WADA
and Shozo KUSAMA

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Surface antigens of peripheral blood mononuclear cells (PMC) and pleural effusion mononuclear cells (PEMNC) from 13 patients with carcinomatous pleurisy and 25 patients with tuberculous pleurisy were analysed using monoclonal antibodies against T (anti-Leu 4), helper/inducer T (anti-Leu 3a) and suppressor/cytotoxic T (anti-Leu 2a) cells, respectively.

The following results were obtained.

- 1) Leu 4⁺ cells in PMC of carcinomatous and tuberculous patients were fewer than those in controls (N=30).
- 2) In PMC, Leu 4⁺ cells and Leu 3a⁺ cells showed no significant difference between carcinomatous and tuberculous pleurisy patients.
- 3) Leu 4⁺ and Leu 3a⁺ cells in PEMNC were more numerous than PMC in both carcinomatous and tuberculous pleurisy.
- 4) Leu 4⁺ and Leu 3a⁺ cells in tuberculous PEMNC were more numerous than in carcinomatous PEMNC.

These results show an immunological difference between peripheral blood and the pleural space. Further, they suggest that Leu 4⁺ and Leu 3a⁺ cells move from peripheral blood to the pleural space in carcinomatous and tuberculous pleurisy. *Shinshu Med. J.*, 35: 222—226, 1987

(Received for publication December 14, 1986)

Key words : carcinomatous pleurisy, tuberculous pleurisy, local immunity, lymphocyte, monoclonal antibody

癌性胸膜炎, 結核性胸膜炎, 局所免疫能, リンパ球, モノクローナル抗体

I 緒 言

われわれは以前より結核性胸膜炎における胸腔内の免疫能について報告してきた¹⁾⁻³⁾。今回、胸水貯留疾患として結核性胸膜炎とともに頻度の高い癌性胸膜炎について、末梢血と胸水単核球のリンパ球表面抗原を各種 monoclonal 抗体および flow cytometry を用いて解析し、結核性胸膜炎との相違につき比較検討した。

II 対象および方法

A 対 象

対象は、癌性胸膜炎は13例（男性7例，女性6例，年齢34～80歳，平均年齢 52.2 ± 11.9 ）であり，その内訳は，原発性肺癌11例（腺癌9例，扁平上皮癌1例，大細胞癌1例），転移性2例（喉頭癌1例，Grawitz 腫瘍1例）であった。結核性胸膜炎は25例（男性22例，女性3例，年齢24～83歳，平均年齢 57.5 ± 16.0 ）であった。癌性胸膜炎は喀痰細胞診，胸水細胞診，気管支鏡下の擦過細胞診または生検組織診により診断した。結核性胸膜炎の診断は胸水または喀痰からの結核菌の検出および臨床経過により行った。なお，癌性胸膜炎は1例，結核性胸膜炎は2例を除き，すべて治療前に検討した。対照は，健常者30例であり，年齢を癌性および結核性胸膜炎例にほぼ合わせた（男性12例，女性18例，年齢22～78歳，平均年齢 49.7 ± 18.5 ）。

B 単核球の分離

単核球の分離は，以前の報告と同様に行った¹⁾。要約すると，癌性胸膜炎，結核性胸膜炎および健常者より heparin 加末梢血 10-30ml を採取し，RPMI-1640 (GIBCO, N. Y.) により2～3倍に希釈後，Lymphoprep (Nyegaard Co, Oslo) に重層し，400G で30分間遠心後，中間層より単核球を採取し，その後 RPMI-1640 で3回洗浄した。末梢血と同時に採取した癌性および結核性胸膜炎の heparin 加胸水 (50-500ml) は，300G，10分間遠心後，細胞成分を RPMI-1640 に浮遊した。結核性胸膜炎は Lymphoprep に重層し遠心後，単核球層を採取した。癌性胸水は，胸水中の腫瘍細胞を除去する目的で，100% Lymphoprep および75% Lymphoprep に細胞成分を重層し遠心後，100% Lymphoprep の液面層より単核球を採取した。得られた単核球 (2×10^6 /ml) を1%非燻化 fetal calf serum (FCS) を添加した phosphate buffered saline (PBS) に浮遊した。

C リンパ球表面抗原の解析

FITC 標識 monoclonal 抗体 (Becton Dickinson, C. A.) は，抗 Leu 4抗体 (pan T cell)，抗 Leu 2a 抗体 (suppressor/cytotoxic T cell) および抗 Leu 3a 抗体 (helper/inducer T cell) を用いた。末梢血，胸水単核球浮遊液 100 μ l を0.1% NaN₃ 存在下で各種 monoclonal 抗体 5-20 μ l と4°C，暗所にて30分間反応させた。その後，各単核球を，1% FCS 添加の PBS により2回洗浄し，最終的に 500-1000 μ l の1% FCS 添加の PBS に浮遊した。リンパ球表面抗原の解析は，flow cytometry (EPICS V, Coulter Co, U. S. A.) を用いて，forward scatter および90° scatter によりリンパ球集団に gate を設定し，これら細胞群 1×10^4 を計測し，fluorescence 陽性細胞 (%) を算出した。

なお，有意差検定は Student's t-test にて行い，統計的有意の水準は， $P < 0.05$ とした。以下の論文中的値は，全て mean (%) \pm SD で示した。

III 結 果

Leu 4+細胞 (%), Leu 2a+細胞 (%) および Leu 3a+細胞 (%) の結果は，それぞれ Fig. 1, Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

A 末梢血の比較

健常者と癌性胸膜炎の末梢血を比較すると，癌性胸膜炎の Leu 4+細胞 (50.5 ± 8.5) は，健常者 (58.0 ± 7.2) 比較し有意 ($P < 0.01$) に低値を示していたが，Leu 2a+細胞は癌性胸膜炎 (23.0 ± 11.9) と健常者 (24.2 ± 5.3) との間に有意差を認めず，さらに Leu 3a+細胞は癌性胸膜炎 (34.7 ± 9.3) と健常者 (37.0 ± 5.6) との間に有意差を認めなかった。

健常者と結核性胸膜炎の末梢血を比較すると，結核性胸膜炎の Leu 4+細胞 (49.8 ± 12.7) は健常者に比較し有意に ($P < 0.05$) 低値を示していたが，Leu 2a+細胞は結核性胸膜炎 (20.9 ± 8.5) と健常者との間に有意差を認めず，さらに Leu 3a+細胞 (31.8 ± 14.1) も健常者との間に有意差は認めなかった。

癌性胸膜炎と結核性胸膜炎の末梢血を比較すると，Leu 4+細胞，Leu 2a+細胞および Leu 3a+細胞は，いずれも両疾患の間に有意差を認めなかった。

B 各疾患における末梢血と胸水の比較

癌性胸膜炎において末梢血と胸水を比較すると，胸水中の Leu 4+細胞 (73.8 ± 13.3) および Leu 3a+細胞 (53.9 ± 12.0) は，末梢血に比較して有意 (それぞ

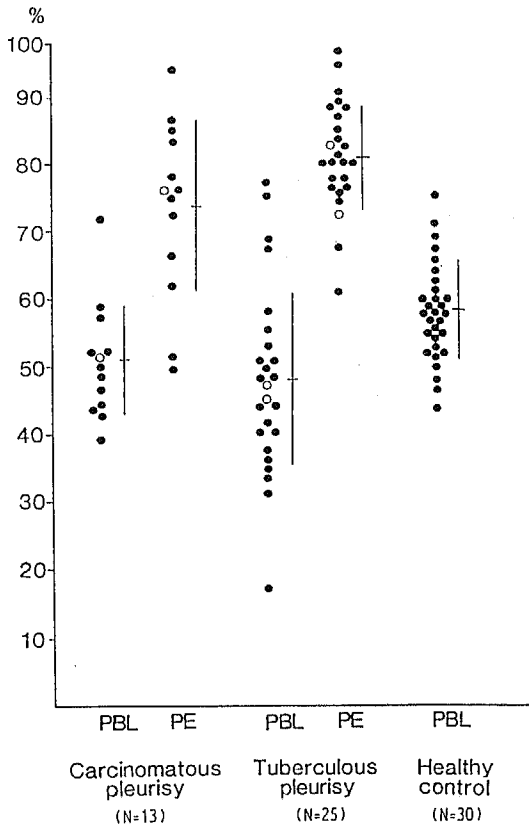


Fig. 1 Proportion of Leu 4⁺ cells

● non-treated patients PBL : peripheral blood
○ treated patients PE : Pleural effusion

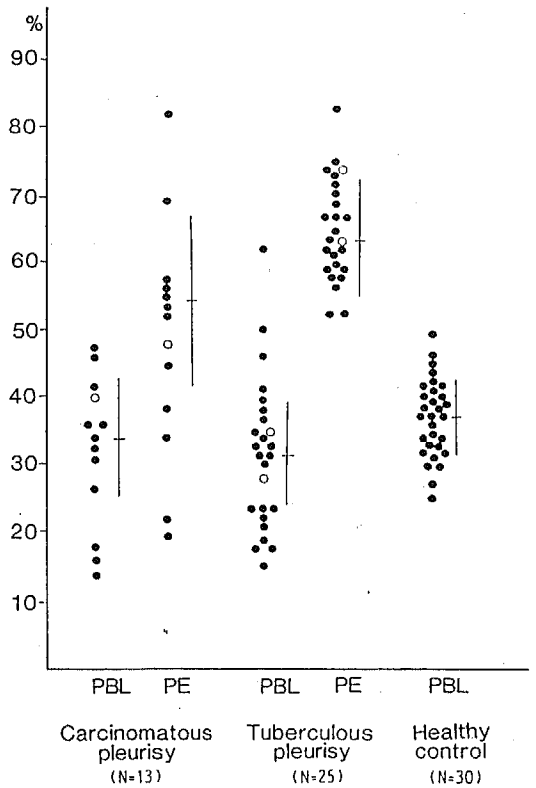


Fig. 3 Proportion of Leu 3a⁺ cells

● non-treated patients
○ treated patients

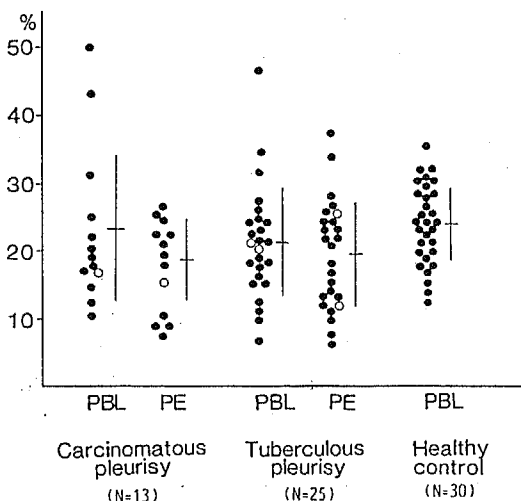


Fig. 2 Proportion of Leu 2a⁺ cells

● non-treated patients ○ treated patients

れ $P < 0.001$, $P < 0.001$) に高値を示していたが、Leu 2a⁺細胞 (18.2 ± 6.4) は末梢血との間に有意差を認めなかった。

結核性胸膜炎において末梢血と胸水を比較すると、胸水中の Leu 4⁺細胞 (81.8 ± 8.0) および Leu 3a⁺細胞 (63.8 ± 8.5) は末梢血に比較し有意 (それぞれ $P < 0.001$, $P < 0.001$) に高値を示していたが、Leu 2a⁺細胞 (19.9 ± 8.9) は末梢血との間に有意差を認めなかった。

C 癌性および結核性胸膜炎における胸水の比較

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の胸水を比較すると、結核性胸膜炎の胸水中 Leu 4⁺細胞は癌性胸膜炎に比較し有意 ($P < 0.05$) に高値を示し、さらに結核性胸膜炎の胸水中 Leu 3a⁺細胞は癌性胸膜炎に比較して有意 ($P < 0.01$) に高値を示していたが、胸水中 Leu 2a⁺細胞は両者間に有意差を認めなかった。

なお，検査時の治療の有無による末梢血および胸水中リンパ球表面抗原の解析結果に，明らかな差異を認めなかった。

IV 考 察

末梢血と病変局所における免疫能の研究は，慢性関節リウマチ⁴⁾⁵⁾，サルコイドーシス⁶⁾，過敏性肺臓炎⁶⁾⁷⁾などにおいて行われており，末梢血と病変局所の免疫反応が異なることが報告されている。これら病変局所の検討は，それぞれの疾患の病態把握ばかりでなく，鑑別診断上も有益であることが知られている。

そこで今回，結核性胸膜炎との鑑別がしばしば問題となる癌性胸膜炎につき，末梢血と胸水のリンパ球表面抗原を解析し，結核性胸膜炎との相違につき検討した。

今回の monoclonal 抗体および flow cytometry を用いた解析では，癌性胸膜炎，結核性胸膜炎の胸水中 Leu 4+細胞および Leu 3a+細胞はそれぞれの末梢血に比較し高値を示し，E-ロゼット法を用いた報告⁸⁾⁹⁾，OKT シリーズを用いた報告¹⁰⁾⁻¹³⁾と一致し，胸水貯留疾患の末梢血と胸腔内における免疫担当細胞分布の相違を示していた。このことは疾患が癌または結核症でも，胸膜炎を併発した例においては，T細胞が末梢血より病変局所である胸腔内へ移行している可能性を示していた。事実，結核性胸膜炎において同一症例につき検討すると，すべての症例で胸水中 Leu 4+，Leu 3a+細胞が末梢血に比較し高値を示し，さらに，今回 data は示さないが，結核性胸膜炎においては，胸水の減少とともに末梢血の Leu 4+，Leu 3a+細胞が漸増し，特に Leu 4+細胞は経過とともに健常者の正常域を示すようになることを認めており，これらの事実からも，末梢血より胸腔内へのリンパ球の移行が強く示唆される。なお，癌性胸膜炎の胸水中 Leu 4+，Leu 3a+細胞は，症例によりばらつきがみられたが，これは腫瘍の組織型，癌の進展形式，さらに臨床病期による免疫応答の多様性によることが考えられた。今

回，抗 Leu 4，抗 Leu 2a，抗 Leu 3a 抗体を用いたが，単一の monoclonal 抗体を使用した表面抗原の解析上からは同一の細胞集団でも機能的には多様性があることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。結核性胸水中に認められた Leu 3a+細胞が helper/inducer 能またはそれ以外の特殊免疫能（たとえば遅延型過敏反応¹⁶⁾）を有するか，さらには癌性胸水中に存在する Leu 3a+細胞と結核性胸水中の Leu 3a+細胞との機能的異質性については現時点では明らかでない。しかしながら，結核性胸膜炎の胸水中 Leu 4+，Leu 3a+細胞は癌性胸膜炎に比較し高値を示すことより，これら表面抗原の解析が両疾患を鑑別するための有用な手段となる可能性を示し，今後さらにリンパ球機能と特異性の高い monoclonal 抗体を用いた two color analysis, three color analysis および機能的解析を併用した詳細な検討により，両者の鑑別も可能と考えられ興味を持たれる。

V 結 語

癌性胸膜炎および結核性胸膜炎の末梢血，胸水について，リンパ球表面抗原の解析を行い，以下の結果を得た。

- 1) 癌性および結核性胸膜炎の末梢血 Leu 4+細胞 (%) は，健常者のそれに比較し低値を示した。
- 2) 癌性および結核性胸膜炎の末梢血 Leu 4+，Leu 3a+細胞 (%) は，それぞれ両疾患の間に有意差を認めなかった。
- 3) 癌性および結核性胸膜炎の胸水中 Leu 4+ Leu 3a+細胞 (%) は，それぞれの末梢血に比較し高値を示した。
- 4) 結核性胸膜炎の胸水中 Leu 4+，Leu 3a+細胞 (%) は癌性胸膜炎のそれに比較し高値を示した。

本論文の要旨は，第27回日本肺癌学会総会（1986年，10月，東京）において発表した。

文 献

- 1) Okubo, Y., Kusama, S. and Yano, A. : PPD-specific proliferative response in humans. 1. Analysis of PPD-specific proliferative cells from tuberculous pleurisy patients and healthy controls with monoclonal antibodies specific for human T subsets. *Microbiol Immunol*, 26 : 511-521, 1982
- 2) 大久保喜雄，和田茂比古，北沢邦彦，草間昌三：結核性胸膜炎におけるモノクローナル抗体を用いた purified protein derivative (PPD) 特異的T細胞活性機構の解析. *日内会誌*, 72 : 582-587, 1983

- 3) 大久保喜雄, 中田真佐雄, 北沢邦彦, 和田茂比古, 草間昌三: 結核性胸膜炎, 肺結核におけるリンパ球表面抗原の解析とリンパ球増殖反応. 信州医誌, 34: 155-159, 1986
- 4) Fox, R. I., Fong, S., Sabharwal, N., Carstens, S. A., Kung, P. C. and Vaughan, J. H.: Synovial fluid lymphocytes differ from peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. J Immunol, 128: 351-354, 1982
- 5) Fox, R. I., Fong, S., Tsoukas, C. and Vaughan, J. H.: Characterization of recirculating lymphocytes in rheumatoid arthritis patients: Selective deficiency of natural killer cell in thoracic duct lymph. J Immunol, 132: 2883-2887, 1984
- 6) Daniele, R. P., Elias, J. A., Epstein, P. E. and Rossman, M. D.: Bronchoalveolar lavage: Role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. Ann Intern Med, 102: 93-108, 1985
- 7) Leatherman, J. W., Michael, A. F., Schwarz, B. A. and Hoidal, J. R.: Lung T cell in hypersensitivity pneumonitis. Ann Intern Med, 100: 390-392, 1984
- 8) Djeu, J. Y., McCoy, J. L. and Cannon, G. S.: Lymphocytes forming rosettes with sheep erythrocytes in metastatic pleural effusions. J Natl Cancer Inst, 56: 1051-1052, 1976
- 9) Domagala, W., Emeson, E. E. and Koss, L. G.: Distribution of T-lymphocytes and B-lymphocytes in peripheral blood and effusion of patients with cancer. J Natl Cancer Inst, 61: 295-300, 1978
- 10) Uchida, A. and Mickshe, M.: Concanavalin A-induced suppressor cells in pleural effusion and peripheral blood of cancer patients. Clin Immunol Immunopathol, 37: 262-275, 1981
- 11) Shiratsuchi, H. and Tsuyuguchi, I.: Analysis of T cell subset by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. Clin Exp Immunol, 57: 271-278, 1984
- 12) 高田勝利, 橋本 裕, 森本宗彦, 山本正彦: モノクローナル抗体による肺結核症の末梢血および胸水リンパ球分画の検討. 結核, 61: 253-256, 1986
- 13) Kochman, S., Bernard, J., Lavaud, F. and Montreynaud, J. M.: T-lymphocyte subsets in pleural fluids: Discrimination according to traditional and monoclonal antibody-defined markers. Eur J Respir Dis, 65: 586-591, 1984
- 14) Engleman, E. G., Benike, C. J., Grumet, F. C. and Evans, R. L.: Activation of human T lymphocyte subsets: Helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. J Immunol, 127: 2124-2129, 1981
- 15) Gatenby, P. A., Kansas, G. S., Xian, C. Y., Evans, R. L. and Engleman, E. G.: Dissection of immunoregulatory subpopulation of T-lymphocytes within the helper and suppressor sublineage in man. J Immunol, 129: 1997-2000, 1982
- 16) Edwards, D. and Kirkpatrick, C. H.: The immunology of mycobacterial diseases. Am J Respir Dis, 134: 1062-1071, 1986

(61. 12. 14 受稿)