

## 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

大久保喜雄 中田真佐雄 北沢 邦彦  
和田茂比古 草間 昌三  
信州大学医学部第1内科学教室

### Analysis of Surface Antigens and Lymphocyte Proliferative Responses in Patients with Tuberculous Pleurisy and Pulmonary Tuberculosis

Yoshio OKUBO, Masao NAKATA, Kunihiko KITAZAWA,  
Shigehiko WADA and Shozo KUSAMA

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Analysis of surface antigens on peripheral mononuclear cells (PMC) from patients with pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy and healthy controls as well as tuberculous pleural effusion mononuclear cells (TPEMNC) was done using monoclonal antibodies specific for T cells or T cell subsets. The proportion of Leu 1 (pan T) and Leu 3a (helper/inducer T) cells in tuberculous pleural effusion was higher than that in peripheral blood from the patients with pulmonary tuberculosis, tuberculous pleurisy and healthy controls. Lymphocyte proliferative responses induced by phytohemagglutinin-P (PHA-P) or purified protein derivative (PPD) were examined in PMC from the patients and healthy controls and in TPEMNC. PPD-specific proliferative responses of TPEMNC were higher than those of PMC from the patients with pulmonary tuberculosis, tuberculous pleurisy and healthy controls. There was, however, no difference in PHA-P induced lymphocyte proliferative responses between TPEMNC and PMC from the patients with pulmonary tuberculosis, tuberculous pleurisy and healthy controls. These results suggest that the examination of PPD-specific proliferative responses are useful in determining the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Shinshu Med. J.*, 34: 155-159, 1986

(Received for publication December 3, 1985)

**Key words:** tuberculous pleurisy, local immunity, monoclonal antibody, lymphocyte proliferative response

結核性胸膜炎, 局所免疫, モノクローナル抗体, リンパ球増殖反応

### 1 緒 言

結核性胸膜炎は以前若年者の疾患とみられていたが現在では若年者より老年者において発病例が多く認められ, 癌性胸膜炎との鑑別に苦慮する場合がある。結核性胸膜炎は臨床的にはツベルクリン反応(ツ反)の

胸水貯留による陰転化, 末梢血リンパ球の減少, さらには胸腔内に多量のリンパ球, 小数のマクロファージ, 中皮細胞の存在, 胸水の減少とともにツ反の陽性化が認められ, アレルギーの関与が推定される。

一方基礎免疫学の進歩に伴いリンパ球各サブセットに対する monoclonal 抗体の作成, マクロファージ・

リンパ球間およびリンパ球相互間のシグナル伝達効果を有する interleukins の存在が認められ、現在これらが臨床医学において各種疾患の免疫学的解析および検討の手段として用いられている。

今回われわれは結核性胸膜炎例において末梢血、胸水の monoclonal 抗体を用いたリンパ球表面抗原の解析およびリンパ球の phytohemagglutinin-P (PHA-P), purified protein derivative (PPD) に対する反応性さらには臨床経過におけるこれら免疫学的パラメータの推移を検討し、それらの結核性胸膜炎における意義につき考案した。

## II 対象および方法

対象は結核性胸膜炎14例(男性12名,女性2名,年齢34~83歳,平均年齢57.9±16.4),肺結核15例(男性12例,女性3例,年齢24~83歳,平均年齢50.0±20.2)健常者41例(男性24名,女性17名,年齢22~92歳,平均年齢41.0±18.6)である。結核性胸膜炎の診断は喀痰および胸水中より結核菌の検出および臨床経過により,肺結核は喀痰による結核菌の検出および胸部レ線所見により診断した。健常者はすべてツ反陽性であった。

方法は以前報告したごとく<sup>1)</sup>,ヘパリン加結核性胸膜炎患者の末梢血,胸水および肺結核患者,健常者末梢血を RPMI 1640 (GIBCO, N. Y.) により2~3倍に希釈後, Lymphoprep (Nyegaard Co, Oslo) に重層し, 400G, 30分間遠心後単核球層を採取し, RPMI 1640 でさらに3回洗浄した。その後 streptomycin (100μg/ml), penicillin (100U/ml) と10%非働化 fetal calf serum (FCS) (GIBCO, N. Y.) と RPMI 1640 を加えた complete medium 中に単核球を浮遊した。Monoclonal 抗体:各種 monoclonal 抗体 (Becton Dickinson, C. A.) はそれぞれ抗 Leu 1 (pan T)<sup>2)</sup>, 抗 Leu 4 (pan T)<sup>3)</sup>, 抗 Leu 2a (suppressor/cytotoxicity T), 抗 Leu 3a (helper/inducer T)<sup>4)</sup> である。

蛍光抗体法:単核球(1×10<sup>5</sup>:100μl)を各種精製 monoclonal 抗体5μlと氷上で30-40分間反応させ,その後細胞を phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄し,100μlに細胞を浮遊させ FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago inc, Burlingame, C. A.) で30分間氷中で反応させ,その後2回 PBS で洗浄した。その後蛍光顕微鏡下で細胞200~300を観察し,蛍光陽性率を算出した。この反応系には0.1%NaN<sub>3</sub>を添加した。また一部検体は Flow cytometry (EPICS

V, Coulter Co, USA) を用いて各種蛍光陽性細胞を算出した。

リンパ球増殖反応:今回の実験は予備実験での至適濃度,至適培養時間によった。すなわち単核球(1×10<sup>5</sup>)を PHA-P (Difco, M. I.) 15μg 添加群と非添加群および PPD (日本 BCG Co, Tokyo) 5μg 添加群と非添加群に別け,総量 200μl として microtissue culture plate (Falcon #3040, C. A.) に分注した。培養は37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%air 存在下で PHA-P assay は72時間, PPD assay は120時間培養し,培養終了20時間前に0.5μCiの<sup>3</sup>H-Thymidine (3H-TdR), NEN Co., M. D.) を添加した。3H-TdR の取り込みは Scintillation Counter (Packard instrument Co., Downers, Ill) により測定した。培養は triplicate でおこなった。なお測定値の有意差検定は Student's *t*-test によった。

臨床経過:一部結核性胸膜炎例では抗結核剤治療 (INH, RFP, SM or EB) によるリンパ球表面抗原およびリンパ球増殖反応の経過を検討した。

## III 結果

肺結核・結核性胸膜炎および健常者の Leu 1, Leu 2a, Leu 3a 細胞の割合 (mean±SD) は Table 1 に示した。末梢血の Leu 1 細胞の割合は肺結核,結核性胸膜炎,健常者の3者間には有意の差は認めなかった。しかし結核性胸水中の Leu 1 細胞の割合は肺結核,結核性胸膜炎,健常者の末梢血の Leu 1 細胞の割合に比較して明らかに高値を示した (P<0.01)。Leu 2a 細胞の割合は肺結核,結核性胸膜炎,健常者の末梢血および結核性胸水の4者間には有意の差を認めなかった。末梢血中の Leu 3a 細胞の割合は肺結核,結核性胸膜炎,健常者3者間にも有意の差を認めなかった。しかし結核性胸水中の Leu 3a 細胞の割合は肺結核,結核性胸膜炎,健常者の末梢血中の Leu 3a 細胞の割合に比較して明らかに高値を示した (P<0.01)。これらの結果は,結核性胸水中の Tリンパ球の増加はおもに helper/inducer T 細胞の増加によることを示している。

肺結核,結核性胸膜炎,健常者の末梢血および結核性胸水の PHA-P および PPD によるリンパ球増殖反応は Table 2 に示した。肺結核,結核性胸膜炎,健常者末梢血単核球の PHA-P のリンパ球増殖反応 (Δcpm±SD) は,3者間において有意の差を認めず,さらに結核性胸膜炎,末梢血,胸水単核球の PHA-P に

結核性胸膜炎・肺結核の免疫学的検討

Table 1 Phenotypic analysis of the mononuclear cells in peripheral blood and pleural effusion using monoclonal antibodies

			Leu 1 (%)	Leu 2a (%)	Leu 3a (%)
TB <sup>1)</sup>	PBL <sup>2)</sup>	(N=15)	57.6±8.6 <sup>a)</sup>	24.2±5.7	38.2±10.2 <sup>e)</sup>
TB pleurisy <sup>3)</sup>	PBL	(N=14)	52.7±13.5 <sup>b)</sup>	23.9±8.5	34.6±11.0 <sup>f)</sup>
	PE <sup>4)</sup>		83.4±6.7 <sup>c)</sup>	23.3±7.9	64.0±7.5 <sup>g)</sup>
Control		(N=41)	59.2±8.4 <sup>d)</sup>	25.2±6.0	37.1±6.9 <sup>h)</sup>

- 1) TB : pulmonary tuberculosis      3) TB pleurisy : tuberculous pleurisy  
 2) PBL : peripheral blood            4) PE : pleural effusion  
 a) vs c)    p<0.01                            e) vs g)    p<0.01  
 b) vs c)    p<0.01                            f) vs g)    p<0.01  
 d) vs c)    p<0.01                            h) vs g)    p<0.01

Table 2 Blastogenic responses of mononuclear cells in peripheral blood and pleural effusion

			PHA-P ( $\Delta$ cpm <sup>1)</sup> ±SD <sup>2)</sup> )	PPD ( $\Delta$ cpm±SD)
TB	PBL	(N=15)	121,186±37,490	18,843±10,858 <sup>a)</sup>
TB pleurisy	PBL	(N=14)	103,948±38,196	24,773±19,470 <sup>b)</sup>
	PE		75,648±41,044	65,131±16,422 <sup>c)</sup>
Control		(N=41)	117,345±38,666	28,691±16,954 <sup>d)</sup>

- 1)  $\Delta$  cpm : lymphocyte proliferative responses induced by mitogen (PHA-P) or antigen (PPD)—medium alone responses  
 2) SD : standard deviation  
 a) vs c)    p<0.01  
 b) vs c)    p<0.01  
 d) vs c)    p<0.01

Table 3 Analysis of surface antigens and PPD-specific proliferative responses in clinical course

Treatment			Leu 1* or Leu 4 (%)	Leu 2a (%)	Leu 3a (%)	PPD-specific responses( $\Delta$ cpm) <sup>1)</sup>
Case 1	(-)	PBL/PE	51.7/75.8*	17.5/22.9	38.0/58.2	29,228/80,799
	(+)	PBL/PE	63.1/79.4*	19.0/15.0	34.0/59.3	13,877/86,181
Case 2	(-)	PBL/PE	40.2/72.8	6.1/12.8	46.1/65.9	20,479/67,058
	(+)	PBL/PE	49.8/76.0	16.6/11.4	35.3/61.4	29,650/54,515
Case 3	(+)	PBL/PE	55.5/80.0	30.9/19.1	33.1/53.0	10,952/48,939
	1 M after	PBL/PE	52.1/83.4	31.1/24.4	37.1/57.5	15,754/84,524

- 1)  $\Delta$  cpm : See footnote in/ Table 2

よるリンパ球増殖反応でも両者間に有意の差を認めなかったが、結核性胸水単核球の PHA-P によるリンパ球増殖反応は低値を示す傾向を認めた。肺結核、結核性胸膜炎、健常者末梢血単核球の PPD に対するリンパ球増殖反応は3者間において有意の差を認めなかった。一方結核性胸水単核球の PPD に対するリンパ球増殖反応は結核性胸膜炎末梢血単核球ばかりでなく肺結核、健常者末梢血単核球の PPD に対するリンパ球増殖反応に比較して明らかに高値を示した ( $P < 0.01$ )。

結核性胸膜炎における臨床経過、リンパ球表面抗原およびリンパ球増殖反応は Table 3 に示した。Case 1, 2 は抗結核剤投与前と投与後1カ月で胸水が胸部レ線除々に減少しつつある時期における検討である。Case 3 は既に抗結核剤を投与中の胸水が徐々に減少しつつある前後計2回の時期でかつ1カ月の間隔をおいた検討である。治療後および治療経過中における検討でも、胸水中 Leu 1, Leu 3a 細胞の割合は末梢血のそれぞれの細胞の比率に比較して高値を示した。PPD によるリンパ球増殖反応は治療後および治療経過中における検討でも、治療前の反応と同様に胸水の反応が末梢血の反応に比較して高値を示した。

#### IV 考 案

ヒトの疾病において末梢血と局所における免疫反応の検討は慢性関節リウマチ<sup>5)</sup>、癌性胸膜炎<sup>6)</sup>、サルコイドーシス<sup>7)</sup>、メラノーマ<sup>8)</sup> 等多くの報告がある。今回われわれがおこなった研究は肺結核、結核性胸膜炎におけるリンパ球の表面抗原の解析、リンパ球増殖反応および結核性胸膜炎の臨床経過におけるそれらの検討である。末梢血リンパ球表面抗原は肺結核、結核性胸膜炎、健常者間において Leu 1, Leu 2a, Leu 3a 陽性率とも有意差を認めなかった。しかし結核性胸膜炎においては胸水中 Leu 1, Leu 3a 細胞は同末梢血に比較して明らかに高値を示し、以前補体依存性細胞障害試験での検討<sup>9)</sup> と今回症例数を増した蛍光抗体法による検討は同様な結果を得た。これらの結果は炎症局所においては helper/inducer 能を持った T 細胞が多く存在していることを示している。この原因としては T 細胞が炎症局所へ集積あるいは局所での増殖が考えられている。われわれも結核性胸水中の interleukin-2 活性を concanavalin A によるリンパ球の blast を用いて検討したが、T 細胞増殖作用は結核性胸水中には認められなかった。なおこの Leu 3a 細胞の胸水中での意義であるが、胸水中の多数のリン

パ球および少数のマクロファージの存在、PPD に対する高値を示すリンパ球増殖反応、macrophage migration inhibitory factor が認められることなどからわれわれは胸腔内における遅延型アレルギーの表現型として Leu 3a 細胞が増加していると考えている。mitogen (PHA-P) および antigen (PPD) を用いたリンパ球増殖反応は肺結核、結核性胸膜炎、健常者の末梢血における検討では、3者間には有意の差を認めなかった。しかし結核性胸水単核球の PPD に対するリンパ球増殖反応は同末梢血の反応に比較して有意な高値を示し、PHA-P に対する反応と異なった。この結果は PPD 特異的増殖細胞が胸腔内に多く存在していることを示している。さらに既に報告したように PPD 特異的増殖細胞は Leu 1, Leu 3a であり、結核性胸水中の多量の Leu 1, Leu 3a 細胞の存在は著明な PPD 特異的増殖反応をおこすと考えられる。一方われわれはすでに癌性胸膜炎において PHA-P, PPD に対するリンパ球増殖反応を検討しているが、末梢血、胸水とも PHA-P, PPD に対するリンパ球増殖反応は両者間に差を認めていない<sup>9)</sup>。さらに膠原病性胸膜炎、malignant lymphoma、宮崎肺吸虫症<sup>10)</sup> では胸水中の PHA-P, PPD に対するリンパ球増殖反応は末梢血の反応に比較して低値を示す。これらの結果は結核性胸膜炎と他の胸水貯留疾患とは局所の免疫反応が異なることを示し、PPD 特異的リンパ球増殖反応は結核性胸膜炎の診断的手段として有用と思われる。

さらに抗結核剤投与による経過観察が可能であった結核性胸膜炎例のリンパ球表面抗原、リンパ球増殖反応を検討した。胸水中の Leu 1, Leu 3a 細胞の割合は末梢血のそれぞれの細胞の割合に比較して常に高値を示し、治療による変化を認めなかった。一方胸水単核球の PPD 特異的リンパ球増殖反応も治療にかかわらず、常に胸水の反応が末梢血の反応に比較して高値を示した。これらの結果は、本検査が結核性胸膜炎診断のためには、病期にかかわらず施行が可能であることを示している。

#### V 結 語

1 肺結核、結核性胸膜炎、健常者の末梢血および結核性胸水単核球を monoclonal 抗体を用いてリンパ球表面抗原を検討し、さらに PHA-P, PPD に対するリンパ球増殖反応を検討した。

2 結核性胸水中の Leu 1, Leu 3a 細胞は同末梢

血, 肺結核, 健常者末梢血に比較して高値を示した。

3 結核性胸水単核球の PPD 特異的増殖反応は同末梢血, 肺結核, 健常者末梢血の PPD 特異的増殖反応に比較して高値を示したが, PHA-P によるリンパ

球増殖反応は 4 者間には, 有意の差を認めなかった。

4 抗結核剤投与例においても胸水単核球の PPD 特異的増殖反応は末梢血の反応に比較して高値を示した。

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) Engleman, E.G., Warnke, R., Fox, R.L., Dilley, J., Benike, C.J. and Levy, R. : Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 1791-1795, 1981
- 3) Kan, E.A.R., Wang, C.Y., Wang, L.C. and Evans, R.L. : Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with anti-Leu 4 antibody. *J Immunol*, 131 : 536-539, 1983
- 4) Engleman, E.G., Benike, C.J., Glickman, E. and Evans, R.L. : Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte reaction in man. *J Exp Med*, 153 : 193-198, 1981
- 5) Dobloug, J.H., Forre, O., Kvien, T.K., Egeland, T. and Degre, M. Natural killer cell activity of peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 41 : 490-494, 1982
- 6) Uchida, A. and Micksche, M. : Natural killer cells in carcinomatous pleural effusions. *Cancer Immunol Immunother*, 11 : 131-138, 1981
- 7) Lem, V.M., Lipscomb, M.F., Weissler, J.C., Nunez, G., Ball, E.J., Stastny, P. and Toews G.B. : Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation. *J Immunol*, 135 : 1766-1771, 1985
- 8) Burns, G.F., Good, M.F., Riglar, C., Bartlett, P.F., Crapper, R.M. and Mackay, I.R. : Activated lymphocyte killer cells derived from melanoma tissue or peripheral blood. *Clin Exp Immunol*, 57 : 487-494, 1984
- 9) 大久保喜雄, 杉森正克, 古川 厚, 木暮文博, 小瀬川和雄, 酒井真英, 山口文雄, 和田茂比古, 高橋俊彦, 草間昌三 : 結核性および癌性胸水中リンパ球の PPD, PHA-P による幼若化反応の臨床的意義. *日胸痰会誌 (抄録)*, 17 : 83, 1979
- 10) 大久保喜雄, 岡野芳紀, 和田龍蔵, 望月一郎, 草間昌三, 小島莊明 : 宮崎肺吸虫症の 1 例—細胞性免疫と液性免疫の検討—. *日内会誌*, 72 : 582-587, 1983

(60. 12. 3 受稿)