らいの皮膚病変における浸潤リンパ球の観察

加 藤 英 行

(自治医科大学皮膚科学教室 主任：矢尾板英夫教授)

左 奈 田 精 孝 小 関 正 倫

(国立療養所多摩全生園)

小 沢 利 治

(国立多摩研究所)

(受付：1982年12月1日)

らいは、らい菌 (*Mycobacterium leprae*) による感染症で、その発症にはらい菌に対する個体の免疫学的な反応の差に基づいて臨床的、細菌学的、病理組織学的変化が現われることは既に知られている(1)。

そこで我々は、皮膚に浸潤するリンパ球の分布がらい病型間でいかなる差があるかを知る目的で、抗T、Bリンパ球血清とTリンパ球マーカーの1つである acid α -naphthyl acetate esterase 染色 (以下酸エステラーゼ法と省略)、Tリンパ球亜群を知るモノクローナル抗体を用いて、らい皮膚病変について観察したところ、らい腫らいの病勢の異なる病変の間で興味あるリンパ球浸潤様式が認められたので報告する。

実験材料及び方法

実験材料は、主に多摩全生園の患者の皮膚を採取し観察した。らい腫らい16例 (非活動期の皮疹6例、活動期の皮疹10例)、境界群5例につき、その浸潤リンパ球を観察した。各症例の臨床所見は Table 1 に示されている。

方法は、1) 抗T、Bリンパ球血清によるペルオキシダーゼ酵素抗体法 (Table 2)。凍結切片に、一次血清として家兎にヒトリンパ球を免疫して作製した抗T、Bリンパ球血清を反応させた。抗血清は石井(2)、小柴(3)の方法に従い作製、作製法と特異性の検討は既に報告した(4)。二次血清として市販のペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG ヤギ血清 (Cappel Lab.) を用いた。Graham and Karnovsky の方法に準じてペルオキシダーゼ反応基質液 (0.01% H_2O_2 加3, 3'-diaminobenzidine 飽和液, pH 7.64) 中で反応、発色させた。2) 酸エステラーゼ法。

本法も報告済みで(4) Müller の方法を一部変更して行なっている。胞体に粗大な赤褐色の顆粒を1~3個持つものをTリンパ球と判定した。3) モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法 (Table 3)。ヒトリンパ球モノクローナル抗体として OKT シリーズ (Ortho Pharmaceutical Corporation) の OKT 3, 4, 8 を室温1時間反応させ二次血清として FITC 標識ヤギF (ab')₂ 抗マウス IgG と30分反応させる。この時点での蛍光が弱いので、さらに FITC 標識ウサギF (ab')₂ 抗マウス IgG を反応させ蛍光を増強させた(5)。4) 患者末梢血リンパ球表面マーカー検出は末梢血中リンパ球をE, ox-EAC, ox-EA (IgG) とマイクロテストプレートを用いた遠心法によりロゼットを形成させた (日本抗体研究所製 JIMRO T-4)。

結 果

Table 4, 5 は観察結果をまとめたものである。まず Table 4 は、抗T、Bリンパ球血清を用いたもので、No. 1~4 は非活動期 (臨床的に一見正常な乾燥構造) の皮膚である。No. 1 は皮表は一見正常であるので非活動期に分類したが、組織学的に抗酸性菌が細胞質内に認められるマクロファージの浸潤があり、また一部に形質細胞の浸潤も見られる。リンパ球の浸潤はこれら細胞浸潤の辺縁部に多く見られ、抗B血清で陽性を示した。しかし、酸エステラーゼ法でも陽性顆粒をもつ細胞が散見された。No. 2~4 では皮真上中層の血管、附属器周囲にリンパ球が浸潤するのみで (Fig. 1)、らい腫の形成なく抗酸菌も陰性であった。少数の浸潤細胞は主にBリンパ球であり (Fig. 2)、形質細胞の浸潤は見られない。

Table 1

No.	NAME	Sex	Age	Medication	Type Leprosy	Clinical Symptom	Skin Bacilli	Leprominl	
								M.	Dh.
1	J.F	♂	84	B663 steroid	L	Inactive	1 +	—	—
2	S.I	♀	62	DDS TUMN	L	Inactive	—	—	±
3	I.K	♂	50	DDS	L	Inactive	—	—	—
4	E.I	♂	58	DDS	L	Inactive	—	ND	ND
5	T.S	♂	43	DDS	L	Active	4 +	—	±
6	A.S	♂	40	RFP. DDS steroid	L	Active	6 +	—	—
7	A.S	♂	73	RFP INAH	L	Active	5 +	—	—
8	M.S	♀	42	B663 steroid	L	Active	6 +	—	—
9	T.T	♀	75	INAH steroid	B L	Active	1 +	—	—
10	T.T	♂	68	RFP DDS	B L	Active	6 +	—	—
11	E.Y	♀	72	RFP DDS	B L	Active	3 +	—	—
12	Y.Y	♂	33	DDS INAH 21TH steroid	L	Active	4 +	—	—
13	M.S	♂	59	RFP, E B INAH	L	Active	2 +	—	—
14	T.U	♂	51	RFP INAH EB	L	Active	5 +	—	—
15	S.T	♂	77	B663 steroid	L	Active	2 +	—	—
16	M.M	♂	75	DDS	L	Active	1 +	—	—
17	H.A	♂	72	DDS	L	Active	—	ND	ND
18	Y.K	♂	37	DDS INAH 21TH	L	Inactive	—	—	±
19	Y.M	♀	59	DDS	L	Inactive	—	—	—
20	M.M	♂	23	RFP INAH E B steroid	B B	Active	2 +	—	±
21	H.M	♂	45	DDS INAH 21TH steroid	B L	Active	1 +	—	—

Nos. 10 and 11 were cases from Keiai-en and No. 17 from Minobu Shinkei-en.

N.D : not done

No. 3 についての末梢血中リンパ球数は白血球6,100/mm³ 中42%で、うちわけは、Eロゼット73%, EACロゼット20.3%, IgGFc レセプター29.4%である。No. 5~8 は、らいが活動期で潮紅の強い紅斑性、丘疹性の皮疹である。No. 5, 6 の症例はらい腫の近くにTリンパ球が見られ (Fig. 3), No. 7 は明らかならい腫の形成はないが、抗酸菌を含んだマクロフィージと混在するリンパ球は抗T血清陽性であった。これら3例はいずれもT

リンパ球が観察された (Fig. 4, 5)。No. 6 の末梢白血球数は6,000/mm³ リンパ球25%, うちわけはEロゼット89.6%, EACロゼット9.7%, IgGFc レセプター45.4%である。

境界群の3例中 No. 9, 10がBLの reversal reaction である。No. 9 ではT, Bリンパ球が混在してみられ、境界群については、特定の傾向は認められなかった。

らい腫らいの臨床的に非活動期では、Bリンパ球が優

Table 2 Immunoperoxidase technique

1. Frozen section (6μ)	
2. Fix in acetone	5 min
3. React with specific serum	
anti-T lymphocyte	60 min
anti-B lymphocyte	15 min
4. React with second serum	
Peroxidase-conjugated goat	
anti-rabbit IgG serum	30 min
5. Incubate in a substrate containing	
3,3'-diaminobenzidine	2 min
6. Nuclear staining with 1% methylgreen]	15 min
7. Dehydrate and clear in xylol and	
mount in synthetic resin	
8. Observe through a NIKON microscope	

Table 3 Immunofluorescence technique

1. Frozen section (6μ)	
2. Fix in acetone	5 min
3. React with specific serum	
OKT 3, 4, 8	60 min
4. Wash three times with PBS	
5. React with second serum	
F.I.T.C. conjugated goat F (ab') ₂	
anti-mouse IgG	30 min
6. Wash three times with PBS	
7. React with third serum	
F.I.T.C. conjugated rabbit F (ab') ₂	
anti-mouse IgG	30 min
8. Wash three times with PBS	
9. Mount in buffered glycerin	
10. Observe through a Olympus fl. microscope	

位にみられ、一方活動期ではTリンパ球が主体で、抗酸菌陽性は4例あり、全例にTリンパ球の浸潤が観察された。

以上の結果より臨床的に活動期で抗酸菌が陽性のものにはTリンパが出現し、らい腫と混在する傾向が認められたので、その後はTリンパ球の亜群を観察できるモノクロナール抗体を用いて蛍光抗体法を施行した。OKT-3はヒト末梢Tリンパ球を、OKT-4は inducer/helper T cell を、OKT-8は suppressor/cytotoxic T cell を観察することができる。

Table 5 がその結果である。蛍光抗体法のためマクロ

Table 4 L. and B. by using anti T, B lymphocyte sera

Patient	anti T	anti B	ANAE	Bacteria
No. 1 LL(inactive)	—	+	a few	+
2 "	—	+		—
3 "	—	+		—
4 "	—	+	a few	—
5 LL (active)	+	—		+
6 "	+	—		+
7 "	+	—		+
8 "	+	—		+
9 BL	+	+	+	+
10 "	+	—		+
11 "	—	+		+

Table 5 L. and B. by using monoclonal antibodies

Patient	OKT-3	4	8	Bacteria
No. 12 LL(active)	+	a few	+	+
13 "	+	a few	+	+
14 "	+	—	+	+
15 "	+	—	—	+
16 "	+	—	+	+
17 "	—	—	—	—
18 LL(inactive)	—	—	—	—
19 "	—	—	—	—
20 BB	+	—	+	+
21 BL	—	—	—	+

ファージとリンパ球の位置関係は、酵素抗体法に比べ明確ではないが、明らかな蛍光を発するもののみ陽性と判定した。らい腫らいの活動期の皮疹では、5例に抗酸菌が陽性で、うち4例に OKT-3 と OKT-8 の陽性所見が得られた。

No. 12 では抗酸菌を多数含むらい腫の周囲や内にもリンパ球の浸潤があり (Fig. 6)、蛍光抗体法では、淡く光る細胞の周辺に、輪郭のはっきりした細胞が観察された。この所見は OKT-3 や 8 では多数見られたが、(Fig. 7, 9)、OKT-4 でも少数ながら陽性細胞があった (Fig. 8)。

No. 13 と14ではマクロファージとリンパ球が混在し、蛍光抗体法では OKT-3 と 8 が陽性を呈し、No. 13 に

Fig. 1 (Patient 2) Infiltrated lymphocytes in perivascular area. (HE stain, $\times 100$)
 Fig. 2 (Patient 2) Immunoperoxidase finding of infiltrated B lymphocytes. ($\times 400$)
 Fig. 3 (Patient 5) Infiltrated lymphocytes around leproma. (HE stain, $\times 100$)
 Fig. 4 (Patient 5) Immunoperoxidase finding of infiltrated T lymphocytes. ($\times 400$)
 Fig. 5 (Patient 5) Absence of B lymphocyte. ($\times 400$)
 Fig. 6 (Patient 12) Infiltrated lymphocytes around leproma. (HE stain, $\times 200$)

OKT-4が少数みとめられた。

抗酸菌が陰性の No. 17はリンパ球が巣状に浸潤していたが、No. 14, 16で OKT-3, 8 が陽性であった。

神経麻痺進行部の皮膚を検査した No. 18, 19ではリ

ンパ球の浸潤は少数で、OKT での判定は困難であった。

境界群では No. 20の BB に抗酸菌を貪食した細胞が少数見られた。蛍光抗体法ではらい腫の周囲に OKT-

Fig. 7 (Patient 12) Immunofluorescence finding of OKT-3 positive cells. ($\times 400$)

Fig. 8 (Patient 12) Finding of a few OKT-4 positive cells. ($\times 400$)

Fig. 9 (Patient 12) OKT-8 positive cells with apparently round shape. ($\times 400$)

3, 8の陽性細胞が接し、OKT-4では明らかな所見はみられなかった。

以上、活動期皮疹では抗酸菌を貪食したマクロファージとOKT-3特にOKT-8陽性細胞が混在してみられる傾向があった。

考 察

らいの免疫学的研究から、らい腫らい患者は液性抗体産生能には欠陥なく、典型的らい腫の血中にはらい菌に対する極めて高い値の抗体が存在し、一方らい菌に対する細胞性免疫能は対照的に類結核型患者では正常もしくは亢進、境界群、らい腫型の順に低下、消失するといわれ、このことかららい腫らいの免疫学的不応性は細胞性免疫能にのみ限られているといわれる^(6,7)。

さて局所すなわち皮膚におけるリンパ球についてはどうであろうか。一般に皮膚病理組織学的には、類結核型では類上皮細胞からなる病巣を著明なリンパ球浸潤が囲んでいる。一方らい腫型では、リンパ球は乏しく、リンパ球の存在する場合は極めて散在性に分布する傾向にある⁽¹⁾。我々の観察結果ではリンパ球は、らい腫の内に入りこむものや、その近くにび慢性に浸潤していた。また

らい菌陰性例では、真皮血管、附属器周囲性に散見されるのみであった。

観察結果で興味を示した第一点は、非活動期の皮疹ではBリンパ球が優位の結果を得、活動期のらい菌が陽性の皮疹ではTリンパ球が主体であった点である。全生園の入院患者では類結核型が稀であるため、今回は類結核型を観察できなかったため病型間におけるリンパ球亜群の差を言及できないが、現時点ではらい腫型においてもBリンパ球優位のもの、Tリンパ球主体のものと分かれるため、末梢血で見られる様なT/Bリンパ球比の変化は、皮膚ではないといえる。

さらに興味あるもう一点は、らい腫と共に出現するTリンパ球がモノクローナル抗体による蛍光抗体法でOKT-8陽性細胞が多く見られたことである。OKT-8抗体は suppressor/cytotoxic T cell のリンパ球表面マーカーである。一般的に生体は細胞内寄生細菌に対しては細胞性免疫で防御にあたるといわれ、マクロファージ内の菌の増殖に対して、感作リンパ球がマクロファージ活性化因子を産生し細菌の増殖を抑制し破壊するという⁽⁸⁾。もしこの目的で出現したT細胞ならば、遅延型反応性T細胞(T_D)に属していなければならない。らい腫

型患者の場合この機構が正常に作動していないと思われる。OKT-8陽性細胞であるということは、suppressor T cellとして働いているのか cytotoxic T cellとしての2つの意味を考えねばならない。現在この2つを分ける手段が開発されていないので推論の域を出ないが。

1) cytotoxic T cellとして直接的に標的細胞（この場合はらい腫）を破壊する為に出現した可能性。
2) らい病因論の一つに免疫学的不応性という考えがあるが^(9,10)。これは生体に大量の抗原が入るとその抗原に対する遅延型過敏の不応答が誘導され、同一抗原の再度の刺激に対して遅延反応を発現しなくなる。この機序によって遅延型反応発現を抑制する suppressor T cell が活性化するといわれているが、この suppressor T cell が出現した可能性。などが挙げられる。我々は症例の末梢血中 suppressor T cell の数や機能についての検索は行っていない。らいと suppressor T cell との関係については最近多くの研究があるが^(11,12)、OKT シリーズのモノクローナル抗体を使ったものでは、Bach の報告⁽¹³⁾がある。類結核型や正常人及び結節性紅斑（ENL）を伴わないらい腫患者では末梢血中の OKT-8、OKT-4陽性細胞は正常だが、ENLを伴うらい腫型患者では OKT-8陽性細胞の減少と活性の低下、OKT-4陽性細胞の上昇を報告し、ENLの発現にT細胞亜群の不均衡を指摘している。我々の症例では、ENLを伴ったり、最近その経過をとったものは含まれていない。

今回の我々の観察についての結論を述べることは難かしいが、らい腫と共に出現しているリンパ球はTリンパ球で、かつ suppressor/cytotoxic T cell に属するリンパ球（OKT-8陽性細胞）であった点が、局所免疫の存在、もしくはらいの免疫学的不応性の一断面が示唆されて興味深い。

今後、末梢血中のリンパ球機能を合わせ研究をすすめていきたい。

結 語

らいの皮膚病変に浸潤するリンパ球が病勢の違いによって差があるかを知る目的で、本研究を行なった。

らい腫らい16例、境界群5例につき、抗ヒトT、Bリンパ球血清、酸エステラーゼ法、抗ヒトTリンパ球モノクローナル抗体を用いて観察した。

らい腫らいと境界群の病型間では、明らかな浸潤T、B細胞の差はなかった。しかし、らい腫らいの活動期と

非活動期の間では、前者ではT細胞が優位で、後者はB細胞が優位であった。特に、活動期でのらい腫周囲のT細胞は OKT-8が陽性であった。このT細胞が suppressor cell か、cytotoxic cell については不明である。

本論文の要旨の一部は第55回日本らい学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み御校閲を賜った矢尾板英夫教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Ridley, D. S. and Jopling, W. H.: Classification of leprosy according to immunity, *Internat. J. Leprosy* **34**, 255-273 (1966).
- 2) Ishii, Y. et al.: Characterization of human B lymphocyte specific antigens, *J. Immunol.*, **114**, 466-469 (1975).
- 3) Kosiba, H. et al.: Identification of human peripheral T cell antigens, *J. Immunol.*, **118**, 625-629 (1977).
- 4) 加藤英行, 他: 抗T, 抗Bリンパ球血清ならびに acid α -naphthyl acetate esterase 染色による皮膚リンパ腫の観察. *日皮会誌*, **91**, 1321-1327 (1981).
- 5) 藤本聡子, 他: モノクローナル抗体を用いたヒトリンパ球亜群の検出, *臨床免疫*, **13**, 954-963 (1981).
- 6) Turk, J. L. et al.: Immunological phenomena in leprosy and related diseases, *Adv. Immunol.*, **13**, 209-266 (1971).
- 7) Godal, T.: Immunological aspects of leprosy, *Prog. Allergy*, **25**, 211-242 (1978).
- 8) 菊地浩吉, 他編: 医科免疫学改訂第2版. 南江堂, 東京, 253-256 (1981).
- 9) Godal, T. et al.: Evidence that mechanism of Immunological tolerance (central failure) is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy, *Scand. J. Immunol.*, **1**, 311-321 (1972).
- 10) Turk, J. L. et al.: Leprosy as a model of subacute and chronic Immunologic diseases, *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 457-463 (1976).
- 11) Mehra, V.: Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy, *J. Immunol.*, **123**, 1813-1817 (1979).
- 12) Mehra, V.: Delineation of a human T cell subset responsible for lepromin-induced suppressor in leprosy patients, *J. Immunol.*, **125**, 1183-1188 (1980).
- 13) Bach, M. A.: Studies on T cell subsets and functions in leprosy, *Clin. Exp. Immunol.*, **44**, 491-500 (1981).

Identification of Lymphocyte Subpopulation in Cutaneous Lesions of Leprosy

HIDEYUKI KATO

(Department of Dermatology, Jichi Medical School)

KIYOTAKA SANADA and MASAMICHI KOSEKI

(National Leprosarium, Tama Zensho-en)

TOSHIHARU OZAWA

(National Institute for Leprosy Research)

We investigated 21 cutaneous lesions of leprosy in several clinical stages, using anti-human T, B lymphocytes sera, acid α -naphthyl acetate esterase stain and anti-human T lymphocytes monoclonal antibodies.

We found the difference in lymphocyte subpopulation between inflammatory infiltrates in active and inactive lesions of lepromatous leprosy.

The mononuclear cell infiltrates in active lesions were composed mainly of T lymphocytes, and sparse perivascular infiltrates in inactive lesions were mainly of B lymphocytes.

Particularly, the infiltrates in active lesions were composed predominantly of OKT-8 (suppressor/cytotoxic T) positive cells, in addition, it also contained a small number of OKT-4 (helper/inducer T) positive cells. It is not clear that either suppressor or cytotoxic T cells infiltrated around leproma.

These findings suggest lymphocyte infiltrates concerned with immunological tolerance in lepromatous leprosy.