肉芽腫炎症の発症および制御機序

小林和夫*¹⁾, 吉田 彪*²⁾

Regulatory mechanisms of granulomatous inflammation

Granulomas are focal, predominantly mononuclear tissue inflammations evoked by persistent irritants. The lesions are classified as hypersensitivity and foreign-body granulomas. In view of the predominant participation of macrophages in granulomas such as hypersensitivity, foreign-body and tuberculous lesions, it is reasonable that macrophages and their products may be involved in granulomatous inflammation. We developed experimental murine models of hypersensitivity, foreign-body and BCG granulomas. Presence of macrophage-derived cytokines (monokines) such as interleukin 1 (IL-1) is a common feature in granulomatous lesions. IL-1 activity is well associated with size/activity of lesions. Also, our studies have demonstrated that macrophages and monokines such as IL-1 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) play a critical role in the development of granulomas *in vivo* and *in vitro*. To investigate modulatory mechanisms of granuloma formation, we examined the effects of various mediators such as IL-1, TNF- α , interferon- γ (IFN- γ), IL-4, IL-6, transforming growth factor- β (TGF- β), dexamethasone and prostaglandin E₂ (PGE₂) on the development of lesions. The lesions were suppressed by dexamethasone, PGE₂ or certain T cell-derived lymphokines such as IL-4 and IFN- γ . These results suggest that suppressive signals are different from granulomatogenic cytokines including IL-1 and TNF- α and that granulomas are regulated by multi-actor dependent mechanisms.

Kazuo Kobayashi*¹⁾, Takeshi Yoshida*²⁾

key words : macrophages, macrophage-derived cytokines, granulomas, endogenous mediators

肉芽腫炎症疾患には結核, Hansen 病(癩), 梅毒など細菌感染, cryptococcus, histoplasma や coccidioid などの真菌感染, schistosoma などの寄生虫感染, beryllium, silica や刺激性油剤などの異物反応, さらに, 原因不明疾患の慢性関節リウマチ, sarcoidosis, Crohn 病, Wegener 肉芽腫症などが知られている。これらに共通してみられる

肉芽腫病変は病理形態学的に, “巣状炎症であって主としてマクロファージ, マクロファージが活性化または分化した細胞と考えられる類上皮細胞やリンパ球などが, 集積あるいは増殖して惹起された病変である”と定義されている¹⁾。

また, 発症機序により, 過敏性(免疫性)と異物性肉芽腫に分類される。過敏性肉芽腫は, 免疫反応(特に, 細胞性)により惹起され, 異物性肉芽腫は免疫反応が関与せずに, 惹起物質が, 直接, 炎症性細胞を刺激することにより生ずる。上述した多種多様な肉芽腫炎症はこれらの2種類の発症機序が関与して生ずると考えられる^{2,3)}。しかしながら, 肉芽腫炎症の詳細な発症機序や制御機構は, ほとんど不明である。ここでは, 筆者らの *in vivo* や *in vitro* 実験的肉芽腫から得られた成績に基づき, 肉芽腫の発症/制御機構について考察する。

実験的肉芽腫病変の病理形態学

図1に示すように, 過敏性肺肉芽腫は, 異種蛋白抗原で免疫したマウスに対応する抗原を結合した agarose beads を気管内注入することにより惹起した^{4,5)}。異物性肺肉芽腫は, 非免疫マウスに dextran beads を気管内注入することにより誘導した^{6,7)}。結核性肺肉芽腫は, BCG 生菌を気管内注入することにより惹起した^{8,9)}。

病理形態学的にはいずれの肉芽腫もマクロファージ, 類上皮細胞や多核巨細胞が病変の主体を構成していたが, リンパ球や好中球の浸潤は軽度であった。免疫組織学的検索では, 肉芽腫誘導期には Mac 1 陽性マクロファージが, 肉芽腫終末期には Mac 2 陽性マクロファージが主構成細胞であった¹⁰⁾。肉芽腫形成に必須な構成細胞を検索する目的で, athymic nude mice で試みたところ, 異物型肺肉芽腫が生じ, T細胞が病変形成には必須でないことが判明した⁶⁾。

さらに, 解析を進めるために, 細胞(脾, 胸腺, 各分画細胞)と dextran beads を混合培養するこ

*¹⁾ The First Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142 昭和大学医学部第一内科学教室

*²⁾ Tokyo Institute for Immunopharmacology, 3-41-8 Takada, Toshima-ku, Tokyo 171 東京免疫薬理研究所

図1 マウス肺肉芽腫の病理形態

異物性肉芽腫(A: 誘導1日後, B: 誘導3日後, C: 誘導7日後, D: 誘導14日後), 過敏性肉芽腫(E: 誘導1日後, F: 誘導3日後, G: 誘導7日後, H: 誘導14日後), いずれの肉芽腫も macrophages を中心とする細胞浸潤が beads 周囲に認められる。

図2 *in vitro* 肉芽腫の走査電子顕微鏡解析(A:誘導1日後, B:誘導3日後)
macrophages の集積が beads 周囲に認められる。

図3 Dextran beads による *in vivo* および *in vitro* 異物性肉芽腫の時間的経過
Dextran beads の陰性対照として latex beads を用いた。

図4 Dextran beads による *in vivo* および *in vitro* 異物性肉芽腫病変部における IL-1 活性
IL-1 の特異性については抗体および CTLL assay で確認された。

とにより, *in vitro* 肉芽腫実験系を開発した^{11,12)}. この *in vitro* 系は, 上述した *in vivo* 肺肉芽腫系と形態(マクロファージを中心とした細胞浸潤)および時間的経過ともに類似していた(図2, 3). *in vitro* 系で細胞を negative や positive selection した結果, 肉芽腫形成にはマクロファージが必須の細胞成分であることが判明した。

実験的肉芽腫症における cytokines の役割

前述した *in vivo* および *in vitro* モデルを用い

て, cytokines が病変形成に果たす役割について検討を加えた. 過敏性肺肉芽腫や結核性肺肉芽腫では monokine (interleukin 1: IL-1) や, lymphokines (migration inhibition factor: MIF, macrophage chemotactic factor: MCF) などが肉芽腫病変局所に証明された^{4,5,8,9)}. なお, IL-2 や IL-4 およびそれらの抑制因子は存在しなかった。

一方, 異物性肺肉芽腫では monokine(IL-1) のみが存在していた^{7,9)}. これらの cytokine 活性は, いずれも病変の活動性/大きさを良く反映してい

図5 recombinant cytokines による肉芽腫誘導

cytokine (A: IL-1 β , B: TNF- α , C: IL-2, D: IFN- γ) 結合 agarose beads をマウスに気管内注入3日後の肺組織像を示した。IL-1 β や IFN- γ は著明な肉芽腫を誘導した。

た。図4に示すように、これらの成績は *in vitro* 系においても同様であった^{11,12)}。

肉芽腫惹起因子の同定

過敏性肺肉芽腫や結核性肺肉芽腫では、形成機序において免疫学的因子が関与し、肉芽腫惹起因子の同定するうえで複雑化が想定されたため、より単純な系、すなわち異物性肺肉芽腫において肉芽腫惹起因子の解析を試みた。異物性肺肉芽腫抽出液を gel filtration し、得られた各分画を cynogen bromide activated agarose beads (agarose beads 自身は肉芽腫惹起能は有していない)に結合させ、マウスに気管内注入し、肉芽腫形成を観察した。

分子量 12-25 kd および 25-45 kd の分画に肉芽腫惹起活性を認め、同時にこれらの分画は IL-1 活性を示した⁷⁾。過敏性肺肉芽腫、結核性肺肉芽腫や異物性肺肉芽腫で病変局所に活動性に一致し、さらに各病変に共通して検出された cytokines は IL-1 であり、IL-1 は肉芽腫惹起因子と想定される。この仮説を検証するため、recombinant cytokines (IL-1, tumor necrosis factor α : TNF-

α , IL-2, interferon- γ : IFN- γ)を agarose beads に結合させ、*in vivo* および *in vitro* 肉芽腫形成を観察した^{7,11-13)}。

monokines (IL-1, TNF- α)は著明な肉芽腫を誘導したが、T-lymphokines (IL-2, IFN- γ)はまったく病変を惹起しなかった(図5)。monokine(特に、IL-1)がすべての活動性肉芽腫病変(異物性、過敏性、結核性)から検出された事実と考え合わせると、共通な肉芽腫惹起因子であると考えられる。したがって、直接マクロファージを刺激/活性化し monokines を産生させて生じる病変は異物性肉芽腫であり、間接的、すなわち、T細胞およびT細胞由来 lymphokines を介して、マクロファージを刺激/活性化し、monokines を産生させて生じる病変は、過敏性および結核性肉芽腫であることを示している(MIF, MCFなどのT細胞由来 lymphokines は過敏性および結核性肉芽腫病変のみから検出されているが、異物性病変には存在しない)。

このことは、初期の実験で粗 lymphokine 含有液を agarose beads に結合して気管内注入するこ

図 6 肉芽腫惹起因子および抑制因子

とにより、肉芽腫が形成されたのは、IL-2 や IFN- γ ではなく、MIF、MCF や macrophage activating factor などのマクロファージを標的とした T-lymphokines が病変形成に重要であることを支持する¹⁴⁾。これらの成績を総合すると、肉芽腫惹起因子は図 6 に集約される（抑制因子については“肉芽腫の制御機構”の項を参照）。

肉芽腫発症におけるマクロファージと monokines の必須性

肉芽腫の最小構成単位を解明する目的で、*in vitro* 系において実験を進めた。その結果、マクロファージと monokines(IL-1 あるいは TNF- α)が同時に存在するときのみ、肉芽腫が誘導された。したがって、肉芽腫形成の最小単位はマクロファージとマクロファージ由来 cytokines(monokines)であることが判明した^{11,12)}。マクロファージが“刺激”により活性化を受け、活性化マクロファージが monokines を産生し、肉芽腫炎症を発症/進展させると考えられた。そして、生体内(特に過敏性肉芽腫や結核性肉芽腫)においては、マクロファージと monokines の相互作用に加えて、T細胞や T-lymphokines が関与し病変を修飾(増大/縮小)していることが考えられる。

肉芽腫の制御機構

実験的肉芽腫炎症は自然消退して行くが、この機序の解明は残された課題である。この疑問に答えるべく、種々の生理活性物質を *in vitro* モデルに添加し、病変形成を観察した¹⁵⁾。肉芽腫惹起因子である monokines(IL-1, TNF- α , IL-6)、T-lymphokines(IL-2)や transforming growth factor-

β は、病変をまったく修飾しなかった。しかし、IL-4 や IFN- γ は肉芽腫形成を顕著に抑制した(図 6)。IL-4 や IFN- γ が活性化マクロファージからの monokine 産生を抑制するとの報告と、筆者らの monokines が肉芽腫形成に必須要素であるとの成績を考え合わせると、IL-4 や IFN- γ が活性化マクロファージからの monokine 産生を抑制することにより、肉芽腫形成を抑制したと考えられる。

その他の生理活性物質としては、dexamethasone と prostaglandin E1 & 2(特に PGE₂) が肉芽腫形成をよく抑制した。このことは局所で産生された monokines が血中に放出され、視床下部-下垂体-副腎皮質系を刺激し、内因性 cortisol の分泌亢進を招来し、monokine 産生を抑制する immunoendocrine feedback loop 存在が生体内での病変の修飾/退縮に関与していることが想定される。

また、prostaglandin E1 & 2 も monokine 産生の down-regulator であり、活性化マクロファージからの monokine 産生を抑制することにより肉芽腫形成を抑制したと考えられる。すなわち、肉芽腫制御系は ① 血液循環系を介する monokine-下垂体-副腎皮質系 (immunoendocrine feedback loop) および ② 細胞レベル(肉芽腫抑制性 cytokines や prostaglandins など)の調節系から成立していると考えられる。現在、この *in vitro* から得られた成績に基づき、*in vivo* での治療効果について、検討を加えている。

肉芽腫の遺伝的制御

マウス結核性肉芽腫においては明らかに、肉芽腫高反応系と低反応系の二系統が存在する。しかし、この問題に関する詳細な機構解明はなされていない。筆者らは、すでに、C57BL/6 と BALB/c が肉芽腫高産生系であること、CBA/J が肉芽腫低産生系であることを報告した⁸⁾。また、肉芽腫高産生系マウスでは病変局所で多量の cytokines(IL-1, MIF)が検出されたが、肉芽腫低産生系では cytokines(IL-1, MIF)が検出されなかった。

BCG に対する自然抵抗性はマウス chromosome 1(ヒトでは chromosome 2)に存在する Bcg gene により支配されていることは、E. Skamene ら¹⁶⁾ により報告されているが、Bcg gene を導入した

図7 Bcg 遺伝子 congenic mice による BCG 誘導肺肉芽腫形成

()内は遺伝子型を示している: BALB/c(BALB/c, Bcg^s), CD2(BALB/c, Bcg^r), B10. A(B10. A, Bcg^s), B10. Ar(B10. A, Bcg^r)

congenic mice で解析を進めた⁹⁾。その結果, Bcg^r gene を有する mice は BCG 増殖抑制, monokine 産生不全と肉芽腫形成不全を示したが, Bcg^s gene を有する mice は BCG 増殖増強, monokine 産生亢進と肉芽腫形成促進を示した(図7)。このことは結核性肉芽腫という生体防御機構は, 殺結核菌能の高い個体(Bcg^r mice)には不必要であり, 逆に, 殺結核菌能の低い個体(Bcg^s mice)には生存のため必須であると考えられる。この結果は, 従来よりヒトにおける結核症が, その本態が結核菌感染症であるにもかかわらず, 遺伝的傾向を有して発症する事実を支持する。

結 語

これらの成績を総合すると, 肉芽腫の発症および退縮機構は図8に集約される。マクロファージは, TやB細胞とは異なり, 生命体に必須の構成要素である。肉芽腫炎症はマクロファージ(monokinesを含む)を中心とした病変であり, 生体防御の基本的表現と考えられる。肉芽腫惹起機構は過敏性と異物性の二種類のモデルを開発し, 解析し

図8 肉芽腫発症および退縮機構

“刺激”とは炎症性細胞に対して肉芽腫性細胞反応を惹起する能力を含んでいる。

たことにより, マクロファージの動態や cytokines の役割など, かなり明らかとなってきた。特に, cytokines の病変部位における証明, 肉芽腫惹起作用の解明は筆者らの報告(病変形成と cytokines の因果関係)が世界ではじめてであり, 肉芽腫形成機序は cytokines の生体内での役割を考える上で重要である。

しかし, 肉芽腫制御機構, すなわち, 惹起された病変があるときは成長し, また, あるときは退縮/消失し, さらに, 組織破壊や線維化に至る機序は, まだほとんど不明である。今後, 本稿で述べたモデルを用いて, 肉芽腫制御機構の解明を進めたい。

recombinant cytokines や reagents をご提供いただいた大塚製薬(IL-1), 旭化成(TNF- α), 塩野義製薬(IL-2, IFN- γ), 万有製薬(dexamethasone), 小野薬品(PGE1 & 2)に感謝申し上げます。

本研究は, 米国 NIH 研究費, 日本文部省科学研究費, 持田医学薬学研究振興財団, 昭和医学振興財団により援助されており, 深謝致します。

稿を終えるにあたり, ご指導を賜った昭和大学第一内科学教室高橋昭三教授に深謝致します。

文 献

- 1) Adams, D.O.: The granulomatous inflammatory

- response. *Am. J. Pathol.* 84: 164-191, 1976.
- 2) Boros, D.L.: Granulomatous inflammation. *Prog. Allergy* 24: 184-243, 1978.
 - 3) Kunkel, S.L., Chensue, S.W., Strieter, R.M., Lynch, J.P., Remick, D.G.: Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1: 439-448, 1989.
 - 4) Kobayashi, K., Allred, C., Cohen, S., Yoshida, T.: Role of interleukin 1 in experimental pulmonary granuloma in mice. *J. Immunol.* 134: 358-364, 1985.
 - 5) Kobayashi, K., Allred, C., Yoshida, T.: Mechanisms of suppressed cell-mediated immunity and impaired antigen-induced interleukin 2 production in granuloma-bearing mice. *J. Immunol.* 135: 2996-3003, 1985.
 - 6) Allred, C., Kobayashi, K., Yoshida, T.: Anergy-like immunosuppression in mice bearing pulmonary foreign-body granulomatous inflammation. *Am. J. Pathol.* 121: 466-473, 1985.
 - 7) Kasahara, K., Kobayashi, K., Shikama, Y., Yoneya, I., Soejima, K., Ide, H., Takahashi, T.: Direct evidence for granuloma-inducing activity of interleukin-1: Induction of experimental pulmonary granuloma formation in mice by interleukin-1-coupled beads. *Am. J. Pathol.* 130: 629-638, 1988.
 - 8) Kobayashi, K., Allred, C., Castriotta, R., Yoshida, T.: Strain variation of *Bacillus Calmette Guérin*-induced pulmonary granuloma formation is correlated with anergy and the local production of migration inhibition factor and interleukin 1. *Am. J. Pathol.* 119: 223-235, 1985.
 - 9) Sato, I.Y., Kobayashi, K., Kasama, T., Kaga, S., Kasahara, K., Kanemitsu, T.H., Nakatani, K., Takahashi, R., Nakamura, R.M., Skamene, E., Yoshida, T.: Regulation of *Mycobacterium bovis* BCG and foreign body granulomas in mice by the Bcg gene. *Infect. Immun.* 58: 1210-1216, 1990.
 - 10) Yoshida, T., Kobayashi, K., Koike, T.: Cellular dynamics in experimental pulmonary granuloma formation. *Basic Mechanisms of Granulomatous Inflammation*. (eds. Yoshida, T., Torisu, M.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p 135-141, 1989.
 - 11) Shikama, Y., Kobayashi, K., Kasahara, K., Kaga, S., Hashimoto, M., Yoneya, I., Hosoda, S., Soejima, K., Ide, H., Takahashi, T.: Granuloma formation by artificial microparticles *in vitro*: Macrophage and monokines play a critical role in granuloma formation. *Am. J. Pathol.* 134: 1189-1199, 1980.
 - 12) Kobayashi, K., Kasahara, K., Shikama, Y., Yoneya, I., Takahashi, T., Yoshida, T.: Comparative studies on granuloma formation *in vivo* and *in vitro*. *Basic Mechanisms of Granulomatous Inflammation*. (eds. Yoshida, T., Torisu, M.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p 163-183, 1989.
 - 13) Kasahara, K., Kobayashi, K., Shikama, Y., Yoneya, I., Kaga, S., Hashimoto, M., Odagiri, T., Soejima, K., Ide, H., Takahashi, T., Yoshida, T.: The role of monokines in granuloma formation in mice: The ability of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α to induce lung granulomas. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 51: 419-425, 1989.
 - 14) Yoshida, T.: Role of lymphokines in the induction and maintenance of the granuloma. *Basic and Clinical Aspects of Granulomatous Diseases* (eds. Boros, D.L., Yoshida, T.) Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p 81-96, 1980.
 - 15) Sato, I.Y., Kobayashi, K., Yamagata, N., Shikama, Y., Kasama, T., Kasahara, K., Takahashi, T.: Modulation of *in vitro* granuloma formation by endogenous mediators. *Immunopharmacol.* 21: 73-82, 1991.
 - 16) Skamene, E.: Genetic control of susceptibility to mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* S394-S399, 1989.