びまん性汎細気管支炎患者肺局所における 炎症細胞集積と関連諸因子の解析

門田淳一・飯田桂子・川上かおる・松原祐一・白井 亮・阿部 航・
谷口治子・藤井 毅・河本定洋・加勢田誠・河野 茂*

Analysis of inflammatory cell infiltration and its related factors in the lung of patients with diffuse panbronchiolitis

Diffuse panbronchiolitis (DPB) is characterized by a dense neutrophil infiltration in association with the high level of interleukin 8 (IL-8) in the airway and an accumulation of lymphocytes, especially CD8⁺HLA-DR⁺ cells. In this study, we demonstrated that IL-8 mRNA was expressed in alveolar macrophages in the air space, bronchiolar epithelial cells and endothelial cells by in situ hybridization method, while not in foamy macrophages in the interstitium. A two-color analysis of T cell subsets in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid also revealed a significant increase in the number of CD8⁺CD11b⁻ cytotoxic T cells and CD4⁺CD29⁺ memory T cells and the mean fluorescence intensity of CD49d (very late antigen, VLA-4 α) on CD4⁺ cells in the patients. Furthermore, the level of RANTES and MIP-1 α in DPB patients was significantly higher than that in healthy volunteers, and there was a trend toward a correlation between RANTES concentration and the absolute number of memory T cells in BAL fluid ($r=0.731$, $p=0.188$).

Our results suggest that elevation of memory T cells and cytotoxic T cells, in addition to neutrophils, in the airway lumen of DPB patients may contribute to chronic bronchial inflammation, possibly through up-regulation of adhesion molecule, VLA-4 and chemokines produced in the lung.

Res. 11/18/1996, Acc. 12/5/1996, pp 261~267

*Jun-ichi Kadota • Keiko Iida • Kaoru Kawakami • Yuichi Matsubara •
Ryo Shirai • Koh Abe • Haruko Taniguchi • Takeshi Fujii •
Sadahiro Kawamoto • Makoto Kaseda • Shigeru Kohno**

key words : *diffuse panbronchiolitis, interleukin 8, memory T cell,
cytotoxic T cell, C-C chemokine*

慢性気道感染症の代表的疾患であるびまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, DPB) は、わが国でその疾患概念が確立された難治性の気道疾患であるが、エリスロマイシンの少量長期持続投与療法が確立されて以来、その予後は著明に改善した¹⁾。

筆者らは DPB の病態解明に気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL) 液を用いて、現在までに肺局所において好中球の過剰集積、好中球走化性因子活性の上昇^{2,3)}および interleukin 8 (IL-8) 濃度の著明上昇⁴⁾と、また末梢血中の好中球接着分子 Mac-1 の過剰発現⁵⁾を報告し、これら好中球集積とその関連因子が DPB の病態形成に重要であることを報告した。さらに DPB の BAL 液中にはリンパ球実数と HLA-DR 陽性の活性化 CD8 細胞が著明に上昇していることを報告した⁶⁾。そこで今回は肺生検組織を用いて、IL-8 産生

* Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部第二内科学教室

Offprint requests to : Jun-ichi Kadota, Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

細胞の同定および BAL 液中リンパ球の表面マーカーと C-C ケモカインについて解析を加えた。

対象と方法

(1) 開胸肺生検組織における IL-8 mRNA 発現細胞の検討

開胸肺生検組織のパラフィン切片を用いた *in situ* hybridization 法により、IL-8 mRNA 発現細胞の検討を行った。

組織の脱パラフィン処理後、リン酸緩衝液 (PBS) に浸し、3% H_2O_2 /メタノールおよび 0.2N HCl にそれぞれ室温で 20 分間浸した。25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K/PBS に 37°C で 15 分間浸し、PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA)/PBS で 5 分間室温で固定、2 mg/ml glycine/PBS に 15 分間ずつ 2 回浸した。DDW で洗浄後、40% deionized formamide/4XSSC (1XSSC: 150mM NaCl, 15mM trisodium citrate, pH7.0) に 30 分間以上保存した。

つぎにハイブリダイゼーション溶液 (40% deionized formamide/0.6M NaCl/1mM EDTA/1XDenhardt's 溶液/10%硫酸デキストラン/125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子 DNA/250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA/10mM TrisHCl (pH7.3)/1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T-T dimerized IL-8 cDNA) を切片に添加し、40°C で 1 晩静置後、40°C で 60 分間ずつ formamide/2XSSC/0.075%Brij で 3 回洗浄後、同じ条件下で 50%formamide/0.5XSSC/0.075%Brij で 2 回洗浄した。さらに 2XSSC で室温で 15 分間洗浄後、blocking 溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 正常マウス IgG 抗体/5%BSA in PBS/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子 DNA/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA) を切片に添加し、室温で 1 時間静置した。HRP 標識マウス抗 T-T dimer IgG 溶液 (HRP 標識マウス抗 T-T dimer IgG 抗体 1:80/5% BSA in PBS/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子 DNA/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA) を切片に添加し、室温で 1 晩静置した。0.075%Brij/PBS で 15 分間、4 回洗浄後、PBS で洗浄し、0.5 mg/ml DAB/0.025% CoCl_2 /0.02% $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0.01% H_2O_2 /0.1M Na phosphate (pH7.5) 溶液にて 6 分間反応させ、発色させた。DDW で洗浄した後、通常のアルコール

脱水し封入した。

(2) BAL

対象はマクロライド抗菌薬治療前の DPB 患者 36 名 (男性 21 名, 女性 15 名, 平均年齢 51.6 歳) および健常成人 16 名 (男性 14 名, 女性 2 名, 平均年齢 24.8 歳) であった。

BAL は全例 informed consent のもとに、気管支ファイバースコープを中葉の区域気管支に wedge し、滅菌生理食塩水を 1 回 50 ml ずつ、合計 200 ml で洗浄した。回収された洗浄液を、既法²⁾のごとく処理し細胞を分類した。上清は -80°C にて保存し、サイトカイン測定に使用した。

(3) BAL 液および末梢血中のリンパ球表面マーカーの解析

BAL 液より得られた細胞は 10% fetal calf serum (FCS) を含む PBS に浮遊後、plastic dish にて 37°C, 60 分間培養した。培養後の浮遊細胞 1×10^7 個/ml に調整し、その 100 μl を、また末梢血は ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 加静脈血 100 μl をモノクローナル抗体にて二重染色し、FACScan flow cytometer (FACS Division, Becton Dickinson) にて解析した。

モノクローナル抗体は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD4, CD8 と phycoerythrin (PE) 標識抗 CD4, CD8, CD11b, CD49d (very late antigen-4 α , VLA-4 α) を Becton Dickinson より購入し、また FITC 標識抗 CD45RA および CD29 抗体を Coulter Immunology より購入し使用した。コントロール抗体として FITC あるいは PE 標識マウス IgG1 を使用した。

(4) BAL 上清中のケモカインの測定

C-C ケモカイン (β サブファミリー) として regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory peptide 1 α (MIP-1 α), macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) を Centriprep-3 (分子量の cut-off 値は 3,000 Daltons, Amicon a GRACE company) で濃縮後、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D systems) にて測定した。濃縮過程におけるそれ

図1 DPB患者の開胸肺生検組織におけるIL-8 mRNA発現細胞(1)

肺胞腔内のマクロファージ(矢印)の細胞質が染色されている(a. $\times 400$. c. $\times 1000$, aの拡大)が、肺胞間質の脂肪を貪食した泡沫細胞(aの右下)は染色されていない。また、sense probeでは肺胞腔内のマクロファージはすべて染色されていない(b. $\times 400$. d. $\times 1000$, bの拡大)。

a: anti-sense($\times 400$). b: sense($\times 400$). c: anti-sense($\times 1000$). d: sense($\times 1000$).

それぞれのC-Cケモカインの回収率は90%以上であり、原液の濃度は、BAL液中の蛋白質の濃縮率で補正を行った。RANTES, MIP-1 α およびMCP-1濃度の検出限界は、それぞれ2.5 pg/ml, 2.0 pg/ml および5.0 pg/mlであり、他のサイトカインとの交差反応は認められなかった。

(5) 統計学的処理

データはすべて平均値 $\pm$ 標準偏差(mean $\pm$ SD)で表記し、統計学的解析はunpaired sampleに対してMann-Whitney U testを、また各種parameter間の相関に対してはSpearman's rank correlationを使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

(1) 開胸肺生検組織におけるIL-8 mRNA発現細胞

図1および2に結果を示している。肺胞腔内のマクロファージや細気管支上皮細胞および血管内皮細胞の核周囲の細胞質が染色されており、IL-8 mRNAの存在が確認された。これらは、IL-8 mRNAに対するsense probeでは染色されなかった。またDPBの組織学的特徴の一つとされている肺胞間質の泡沫細胞は染色されず、IL-8 mRNAの発現は認められなかった。さらにこれら泡沫細胞は、28S rRNAに対するprobeでも染色されなかった。

図 2 DPB 患者の開胸肺生検組織における IL-8 mRNA 発現細胞 (2)

細気管支上皮細胞 (矢印) の細胞質 (a. $\times 400$. c. $\times 1000$, a の拡大) および血管内皮細胞 (矢印) の細胞質 (e. $\times 1000$) が染色されているが, sense probe では染色されていない (b. $\times 400$. d. $\times 1000$, b の拡大, f. $\times 1000$).

a : anti-sense ($\times 400$). b : sense ($\times 400$). c : anti-sense ($\times 1000$). d : sense ($\times 1000$). e : anti-sense ($\times 1000$). f : sense ($\times 1000$).

(2) リンパ球表面マーカーと C-C ケモカインの検討

図 3 に示すように CD4 陽性細胞では, naive T 細胞である $CD4^+CD45RA^+$ 細胞および memory T 細胞である $CD4^+CD29^+$ 細胞ともその実数値

が, また CD8 陽性細胞では, suppressor T 細胞である $CD8^+CD11b^+$ 細胞および cytotoxic T 細胞である $CD8^+CD11b^-$ 細胞とも, その実数値は健常人より有意に増加しており, どちらも後者が優位であった.

図 3 DPB 患者と健康成人における気管支肺胞洗浄液中の CD4 陽性および CD8 陽性細胞サブセット

HV: 健康成人(healthy volunteer)

DPB: びまん性汎細気管支炎(diffuse panbronchiolitis)

図 4 DPB 患者と健康成人における気管支肺胞洗浄液中の C-C ケモカイン

HV: 健康成人(healthy volunteer)

DPB: びまん性汎細気管支炎(diffuse panbronchiolitis)

末梢血中の CD4 および CD8 陽性細胞の二重染色の結果では、DPB 患者と健康成人との間に有意な差は認めなかった。DPB 患者 10 名の末梢血および BAL 液中と健康成人 9 名の末梢血中の CD4 陽性細胞上における CD49d の発現を検討したが、DPB 患者 BAL 液中 CD4 陽性細胞上の CD49d の mean fluorescence intensity は 89.9 ± 7.8 であり、末梢血における 63.3 ± 7.3 と比し有意な発現増強を認め ($p < 0.01$)、また健康成人の末梢血における 70.8 ± 4.5 に比して増強傾向を認めた。

C-C ケモカインの測定は、DPB 患者 16 名および健康成人 12 名で検討することができたが、その結果を図 4 に示す。BAL 液中の RANTES および MIP-1α の濃度は、健康成人と比して有意に高値であったが、MCP-1 においては DPB 患者で高い

傾向にあったものの有意差はなかった。また RANTES は、memory T 細胞である CD4⁺CD29⁺細胞の比率と相関傾向が認められた ($r = 0.731$, $p = 0.188$)。

考 察

現在までに DPB 患者の気道中には多数の好中球が集積し、その集積には BAL 液中の好中球走化性因子^{2,3)}、特に IL-8 が重要である可能性が考えられていたが^{4,7)}、今回の開胸肺生検組織を用いた *in situ* hybridization による検討の結果から、IL-8 産生細胞は肺泡マクロファージや細気管支上皮細胞および血管内皮細胞が主であることが判明した。このことは IL-8 が肺局所で産生され、好中球浸潤に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。一方、DPB の組織学的特徴の一つで

ある泡沫細胞には IL-8 mRNA の発現が認められず、28S rRNA の発現もまったくみられなかったことから、泡沫細胞はまったく蛋白合成を行っていない細胞なのかもしれない。

しかし、DPB 患者における BAL 液中の好中球比率と IL-8 の平均濃度^{2,4)}は、細菌性肺炎の局所における報告⁸⁾とほぼ同様であり、必ずしも DPB に特徴的なことではなかった。

細菌性肺炎の報告ともっとも異なるところは、DPB の BAL 液中のリンパ球実数の著明な上昇であり、HLA-DR 陽性の活性化 CD8 細胞が著明に上昇しているところであるが⁹⁾、今回はさらに memory T 細胞と cytotoxic T 細胞が BAL 液中に上昇し、特に cytotoxic T 細胞が優位であることを明らかにした。

DPB の開胸肺生検組織における bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) の濾胞形成周囲組織では CD4⁺細胞が優位であったと報告されている⁹⁾。しかしながら、DPB 患者すべてに BALT 形成があるわけではなく、気管支拡張症や慢性気管支炎の気管支上皮下の粘膜固有層では、CD8⁺細胞が優位であったと報告されている^{10,11)}。ことから、筆者らの BAL 液での検討は、DPB 患者の気管支上皮下の粘膜固有層での状態を反映しているものと考えられ、活性化 cytotoxic T 細胞が DPB の病態に関与している可能性を示唆している。DPB 患者 BAL 液中の CD4⁺細胞は、接着分子の一つである VLA-4 α を健常人および DPB 患者末梢血中に比して強く発現していた。

また、BAL 液中の CD4⁺細胞は memory T 細胞が優位であったことから、memory T 細胞が VLA-4 α を発現している可能性が考えられた。memory T 細胞の DPB 患者の肺局所への浸潤に VLA-4 α が重要であるのか、あるいは局所で naive T 細胞から memory T 細胞へ分化、増殖の過程で VLA-4 α が発現したのかは現在のところ不明である。いずれにしても memory T 細胞上の VLA-4 α は、そのリガンドである細胞外基質のファイブロネクチンへの接着を介して DPB の病態形成に重要な役割を担っているかもしれない。

RANTES は、刺激 T 細胞より産生され、*in*

vitro では memory T 細胞に選択的に走化性を示し¹²⁾、また最近では CD4⁺T 細胞の細胞外基質への接着を誘導し、この接着は VLA の共通鎖 β 1 (CD29) に対するモノクローナル抗体で部分的に抑制される¹³⁾と報告された。また、DPB 患者に検出された RANTES の平均濃度は、血管内皮細胞への T 細胞の接着を誘導する濃度^{14~16)}と同程度であり、BAL 液中 RANTES 濃度と CD4⁺CD29⁺細胞比率との間に相関傾向が認められたことから、RANTES は memory T 細胞の浸潤あるいは細胞外基質への接着に重要な役割を果たしているものと思われた。一方、MIP-1 α は、マクロファージをはじめとする種々の細胞より産生され、主に T 細胞に作用するとされているが、今回の検討では BAL 液中の細胞との相関関係はなく、その役割は不明である。しかし、これらケモカインは DPB の呼吸細気管支領域のリンパ球を中心とする病態形成、あるいは維持になんらかの役割を果たしていると思われた。

以上より、DPB の肺局所における好中球の持続的浸潤には肺局所での IL-8 の産生亢進が重要であり、また病理組織学的所見と合わせると呼吸細気管支領域における病態形成や維持には、VLA-4 を発現した memory T 細胞と cytotoxic T 細胞、そしてその浸潤あるいは活性化には RANTES を中心とする C-C ケモカインが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

文 献

- 1) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Tamura M, Ando M: Distinguished improvement of survival times of the patients with diffuse pan-bronchiolitis (DPB) treated with 14-membered ring macrolides (14-MM). *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 153: a275, 1996.
- 2) Kadota J, Sakito O, Kohno S, Sawa H, Mukae H, Oda H, Kawakami K, Fukushima K, Hiratani K, Hara K: A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev Respir. Dis.* 147: 153-159, 1993.
- 3) Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K: Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *Chest* 106: 1116-1123, 1994.
- 4) Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K: Interleukin 1 β , tumor necrosis factor

- alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis : A potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 63 : 42-48, 1996.
- 5) Kusano S, Kadota J, Kohno S, Iida K, Kawakami K, Morikawa T, Hara K : Effect of roxithromycin on peripheral neutrophil adhesion molecules in patients with chronic lower respiratory tract disease. *Respiration* 62 : 217-222, 1995.
  - 6) Mukae H, Kadota J, Kohno S, Kusano S, Morikawa T, Matsukura S, Hara K : Increase in activated CD8⁺ cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 152 : 613-618, 1995.
  - 7) Oishi K, Sonoda F, Kobayashi S, Iwagaki A, Nagatake T, Matsushima K, Matsumoto K : Role of interleukin 8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect. Immun* 62 : 4145-4152, 1994.
  - 8) Boutten A, Dehoux MS, Seta N, Ostinelli J, Venembre P, Crestani B, Dombret M-C, Durand G, Aubier M : Compartmentalized IL-8 and elastase within the human lung in unilateral pneumonia. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 153 : 336-342, 1996.
  - 9) Sato A, Chida K, Iwata M, Hayakawa H : Study of bronchus-associated lymphoid tissue in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 : 473-478, 1992.
  - 10) Silvia LE Jr, Jones JAH, Cole PJ, Poulter LW : The immunological component of the cellular inflammatory infiltrate in bronchiectasis. *Thorax* 44 : 668-673, 1989.
  - 11) Fournier M, Lebarry F, Ladurie FLR, Lenormand E, Pariente R : Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 : 737-742, 1989.
  - 12) Conlon K, Lloyd A, Chattopadhyay U, Lukacs N, Kunkel S, Schall T, Taub D, Morimoto C, Osborne J, Oppenheim J, Young H, Kelvin D, Ortaldo J : CD8⁺ and CD45RA⁺ human peripheral blood lymphocytes are potent sources of macrophage inflammatory protein 1 α , interleukin-8 and RANTES. *Eur. J. Immunol.* 25 : 751-756, 1995.
  - 13) Gilat D, Hershkovich R, Mekori YA, Vlodavsky I, Lider O : Regulation of adhesion of CD4⁺T lymphocytes to interact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 β . *J. Immunol.* 153 : 4899-4906, 1994.
  - 14) Tanaka Y, Adams DH, Shaw S : Proteoglycan on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* 14 : 111-115, 1993.
  - 15) Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ : Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* 177 : 1809-1814, 1993.
  - 16) Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ : Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* 260 : 355-358, 1993.