HTLV-1 感染に関連した気管支肺症(HTLV-1 associated bronchopneumonopathy)における気管支肺胞洗浄液中の細胞解析

森 進一郎・丸山征郎・溝口 亮^{*1)}、城之園 学・太良光利・新名清成^{*4)}、
茆原順一^{*5)}、屋敷伸治・園田俊郎^{*2)}、松元 実^{*3)}、納 光弘^{*1)}

Cellular and virological investigations of the BAL cells from the patients with HTLV-1 associated bronchopneumonopathy(HAB) We performed bronchoalveolar lavage(BAL) in 30 HTLV-1 carriers. They include 17 HTLV-1 associated myelopathy (HAM) patients with chest X-ray abnormality (8 cases) and without chest X-ray abnormality (9 cases) and 13 non-HAM HTLV-1 carriers with pulmonary involvement. We then investigated the immunologic aspects of the cells obtained from BAL. Increased % lymphocyte was observed in 60% and increased neutrophil was observed in 50% of the patients respectively. Lymphocyte surface analysis used monoclonal antibodies revealed that increased lymphocyte were T-lymphocytes.

It seems that CD4⁺T lymphocyte appears to be dominant in the case with manifest chest X-ray abnormalities. HTLV-1 antigen positive lymphocytes were detected by indirect immunofluorescent method used monoclonal antibody, GIN-14 (anti-p19) and F-10 (anti-gp21) in the BAL cell culture. Moreover significant high immune responsiveness against HTLV-1 was observed in BAL cells obtained from HAM patients with chest X-ray abnormalities. These observations suggest that the pulmonary involvement in HTLV-1 carrier may relate to HTLV-1 infection and immune responsiveness against HTLV-1 in the lung.

Shinichiro Mori・Ikuro Maruyama・Akira Mizoguchi^{*1)}, Manabu Jonosono・
Mitsutoshi Tara・Kiyoshige Niina^{*4)}, Junichi Chihara^{*5)}, Shinji Yashiki・
Shunro Sonoda^{*2)}, Makoto Matsumoto^{*3)}, Mitsuhiko Osame^{*1)}

^{*1)} Third Department of Internal Medicine, ^{*2)} Department of Virology and

^{*3)} Department of Oncology, Kagoshima University School of Medicine

^{*4)} Kagoshima City Hospital, Internal Medicine

^{*5)} Fourth Department of Internal Medicine, Kinki University

School of Medicine

key words : HTLV-1, HAM, bronchopneumonopathy, CD4, bronchoalveolar lavage

human T lymphotropic virus type-1(HTLV-1)は、成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスとして知られてきたが^{1,2)}、近年、この癌原性ウイルスが、ヒトの脊髄症、HTLV-1 associated myelopathy (HAM)の原因ともなることが解明された^{3,4)}。すなわち、HAMはHTLV-1キャリアに発症する緩徐進行性の脊髄症で、その発症機構としては、宿主側の免疫遺伝学的背景に基づいた免疫機構の異常が推察されている。この点で、腫瘍細胞の神経系への浸潤によるATLの神経合併症とはまったく異なる疾患概念である。ここに、HTLV-1はまったく異なる二つの疾患、一つは腫瘍性疾患ATLを、

一つはHAMという慢性の神経疾患を引き起こすことが判明したことになる。

ATLには、呼吸器合併症が多発することが知られており⁵⁾、その多くは免疫不全状態を反映した日和見感染症とATL細胞の直接浸潤によるものと理解されてきた。一方、以前より原因不明とされる特発性間質性肺炎患者では、血清中の抗HTLV-1抗体が高率に検出されることの報告⁶⁾や、ATLに伴ったびまん性汎細気管支炎の報告がなされており、これらの呼吸器疾患に関連したHTLV-1の病因論的意義が注目されている。HAMにおいても呼吸器合併症が多いことが、その発見当初より観察されており、その気管支肺胞洗浄(BAL)液中にはTリンパ球の増加が認められることを、筆者らはすでに報告した⁷⁾。この現象は、HAMのみならず、非HAMのHTLV-1キャリアの一部にも見出され、丸山らは、この特異な呼吸器病変をHTLV-1 associated broncho-

^{*1)} 鹿児島大学医学部第三内科学教室

^{*2)} 同 ウイルス学教室

^{*3)} 同 腫瘍研究施設

^{*4)} 鹿児島市立病院内科

^{*5)} 近畿大学医学部第四内科学教室

図 1

pneumonopathy(HAB)とよぶことを提唱している^{8,9)}。

今回、筆者らは、HAM 患者および非 HAM の HTLV-1 キャリアで肺病変を伴うもの(すなわち HAB) 30例の BAL 液中の細胞数、細胞分画、T cell subset を測定し、併せて BAL 細胞中の HTLV-1 抗原陽性細胞の出現率と BAL リンパ球の HTLV-1 特異 T細胞の免疫応答反応を調べ、HAB 患者の肺組織障害に関連する免疫病理学的要因を検討したので報告する。

対象と方法

(1) 対 象

HTLV-1 キャリア 30例、男性 8 例、女性 22例で、年齢は平均 62.4 歳(33~78 歳)であった。このうち 17 例は臨床的に HTLV-1 associated myelopathy (HAM) を伴い、残り 13 例は神経症状を有していなかった。この 13 例はすべて年余にわたる咳、痰などの呼吸症状を有し、また既知の疾患では説明しがたい胸部 X 線異常を有していた。HAM 群 17 例は胸部 X 線異常の明らかな群(A 群、9 例)と胸部 X 線異常の明らかな群(B 群、8 例)の 2 群に分類した。正常対象者としては、なんら呼吸器疾患を有さない、抗 HTLV-1 抗体陰性の健康者 6 例(男性 6 例、平均年齢 47.3 歳)を用いた。

(2) 方 法

① 気管支肺胞洗浄(BAL): 上記対象者全例に標準的

方法に従い、BAL を施行した。気管支ファイバースコープを右中葉枝に楔入し、160~200 ml の滅菌生食水で 4 回にわけて洗浄した。得られた回収液について、細胞数の算定と細胞分画の評価(May-Giemsa 染色)を行い、残りの回収液は PBS にて洗浄後、RPMI-1640 培地の中に再浮遊させた。

② リンパ球表面マーカー: BAL 液中の T cell subset は、コールター社の FITC 標識マウスモノクローナル抗体、CD2(T_{11})、CD4(T_4)、CD8(T_8)を使用し、直接蛍光抗体法により解析した。

③ HTLV-1 抗原陽性細胞の検出: BAL 細胞 1×10^6 個を 20% TCGF + 10% pooled human serum + RPMI-1640 培養液で 6 日間培養後、反応した幼若化細胞を Percoll 法にて分離を行い、PBS で洗浄後スライドグラス上に固定し、抗 HTLV-1 モノクローナル抗体、GIN-14(抗 p19)、F-10(抗 gp21)を用いて、間接蛍光抗体法により HTLV-1 抗原陽性細胞を算定した。

④ HTLV-1 特異 T細胞増殖反応: 宇宿らの方法により、MT-2 細胞上清のシロ糖密度勾配($d=1.15$)遠心法で精製した HTLV-1 virion を抗原として、患者末梢血単核球および BAL 細胞 5×10^4 個と混合培養(6 日間、10% ヒト血清加 RPMI-1640 培養液)し、 ^3H -チミジンの取り込み(16 時間)で HTLV-1 特異 T細胞の増殖反応を測定し、免疫応答の指標とした。

表 1 detection of HTLV-1 antigen in lymphocytes derived from BAL cells

patients No.	anti-HTLV-1 p19 (GIN-14)	anti-HTLV-1 gp21 (F-10)
HAB -1110	++	+
-4110	+	+
-1910	+	+
HAM-4610	+	+
A -6410	-	-
HAM-7210	+++	++
B -8010	++	+

HTLV-1 Ag expression(%) - : 0, + : 1~10, ++ : 11~50, +++ : 51~
 Lymphocytes derived from BAL cells were cultured for 6 days in RPMI-1640 containing 10% human serum plus 20% TCGF.

結 果

① 気管支肺胞洗浄液所見: HAB 30例および正常者 6 例の BAL 所見は図 1 に示した. HAM 合併群は前述した A 群と B 群にわけて別に示した.

② 細胞数: 回収液中の細胞数は正常者 $0.96 \pm 0.27 \times 10^5/\text{ml}$ に対し, HAB 患者では $2.76 \pm 1.95 \times 10^5/\text{ml}$ で HAB 群で有意に増加していた ($P < 0.01$). また, HAM 合併群のうち A 群は $1.18 \pm 0.62 \times 10^5/\text{ml}$, B 群は $3.91 \pm 2.44 \times 10^5/\text{ml}$ で B 群は A 群に比し有意に増加していた ($P < 0.05$).

③ 肺胞マクロファージ: 回収液中の肺胞マクロファージの比率は, 正常者 $96.0 \pm 2.3\%$ に対し, HAB 患者では $61.8 \pm 25.0\%$ で HAB 群で有意に減少していた ($P < 0.01$). HAM 合併群のうち A 群は $68.6 \pm 18.6\%$, B 群は $51.9 \pm 27.3\%$ で両群間に有意差を認めなかった.

④ リンパ球: 回収液中のリンパ球比率は正常者 $3.8 \pm 2.0\%$ に対し, HAB 患者では $28.5 \pm 19.5\%$ で HAB 群で有意に増加していた ($P < 0.01$). HAM 合併群のなかで A 群は $29.6 \pm 18.6\%$, B 群は $38.2 \pm 27.0\%$ で両群間に有意差を認めなかった.

⑤ 好中球: 回収液中の好中球比率は正常者 $0.2 \pm 0.4\%$ に対し, HAB 患者では $9.4 \pm 15.9\%$ で HAB 群で有意に増加していた ($P < 0.01$). HAM 合併群のなかで A 群は $1.4 \pm 2.1\%$, B 群は $10.3 \pm 15.4\%$ で両群間に有意差を認めなかった.

⑥ 好酸球: 回収液中の好酸球比率は, 正常者 $0.2 \pm 0.4\%$ に対し HAB 患者では $0.4 \pm 0.8\%$ で, 両群間に有意差を認めなかった. HAM 合併群のなかで A 群は $0.4 \pm 0.8\%$, B 群は $0.3 \pm 0.6\%$ で両群間に有意差を認めなかった.

⑦ リンパ球表面マーカー: 回収液中の T cell subset

図 2 HTLV-1 specific responses

は 20 例で評価しえた. CD4/CD8 比は図 1 に示した. CD2⁺ T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell の比率はそれぞれ正常者 $61.3 \pm 10.5\%$, $46.4 \pm 10.0\%$, $34.4 \pm 8.9\%$ に対し, HAB 患者では $80.2 \pm 5.5\%$, $52.5 \pm 13.0\%$, $33.4 \pm 12.6\%$ で CD2⁺ T cell の比率が, HAB 群で有意に増加していた ($P < 0.05$) が, 他は両群間に有意差を認めなかった. CD4/CD8 比は正常者 1.5 ± 0.6 に対し, HAB 患者では 2.0 ± 1.3 で両群間に有意差を認めなかった. HAM 合併群のなかで CD2⁺ T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, CD4/CD8 比を比較すると, A 群は $80.4 \pm 6.3\%$, $42.1 \pm 10.0\%$, $47.6 \pm 6.4\%$, $0.9 \pm 0.3\%$, B 群は $83.3 \pm 3.6\%$, $56.4 \pm 15.3\%$, $32.7 \pm 9.5\%$, $2.1 \pm 1.7\%$ で, CD8⁺ T cell の比率が B 群で有意に減少していた ($P < 0.05$) が, 他は両群間で有意差を認めなかった.

⑧ HTLV-1 抗原陽性細胞の出現率: HAB 患者 7 例における回収液中の HTLV-1 抗原陽性細胞の出現率は図 2 に示した. 図のとおり, 7 例中 6 例で HTLV-1 抗原陽性細胞が高率に認められた. HAM 合併群のなかで比較すると, A 群にくらべ B 群で HTLV-1 抗原陽性細胞の出現がより高率であった.

⑨ HTLV-1 特異 T 細胞増殖反応: HAB 患者 6 例および正常者 2 例における BAL リンパ球の HTLV-1 特異的増殖反応は図 2 に示した. HAB の 6 例は全例 HAM 合併例である. ³H-チミジン取り込みでみた HTLV-1 特異的増殖反応は平均値で正常者 138.0 cpm に対し, HAB 患者では 11206.0 cpm で HAB 群で有意に増加していた. また, A 群と B 群の比較では A 群 883.7 cpm に対し, B 群 21528.3 cpm で, 両群間に統計学的に有意差を認めなかったが, B 群は A 群に比し上昇する傾向が認められた.

考 按

HTLV-1 associated bronchopneumonopathy (HAB) は, HTLV-1 キャリアにみられる慢性的呼吸器障害で, 1988 年, 丸山らにより報告され提唱された疾患概念である. HTLV-1 感染と呼吸器疾患の関連については,すでに特発性間質性肺炎 (IIP) やびまん性汎細気管支炎 (DPB) の報告があり, それぞれたんなる合併ではなく,

両者は密接に関連したものとして考察、報告されている。丸山らが報告した HAB のなかには、IIP や DPB の記載はなく、HAB はこれらの疾患とは臨床的に異なったものと考えられる。

今回筆者らは、HAB 患者の肺病変の特徴づけを BAL 液中の細胞成分の面から試みるとともに、肺病変の成立機序を解明する目的で、いくつかの免疫学的方法を導入して BAL 細胞の機能を解析した。

まず、HAB 患者の BAL 所見の特徴は図 1 に示したように、総細胞数の増加とリンパ球分画および好中球分画の増加であり、特にリンパ球増加は HAB 全体では約 60%、HAM 合併群では約 70% と高率に認められた。表面マーカーの検索では、この増加したリンパ球は T リンパ球を主体にしたものであった。

一般的に、BAL 液中の細胞成分は、末梢気道から胞隔域に集積した炎症性細胞を反映するものとされている¹⁰⁾。したがって、今回の成績は、過半数例の HAB 患者の末梢気道～胞隔域に T リンパ球を主体とした炎症性細胞の集積が起きていることを示している。これは、組織学的には bronchiolitis を含む末梢気道炎ないし alveolitis を反映するものと思われる。

HAM 患者の alveolitis については、Sugimoto らが、6 例の HAM 患者に BAL を施行し、5 例で洗浄液中の T リンパ球増多を認めたが、そのなかで 4 例は胸部レ線異常を認めなかったと報告している¹¹⁾。これに基づいて、HAM 患者では subclinical な T lymphocyte alveolitis が高率に合併しうることを指摘している。

一方、筆者らも HAM 患者では高率に胸部レ線異常を伴っていることを報告した¹²⁾。今回筆者が得た HAM 症例での BAL 液所見もほぼ同様の結果であり、HAM 患者の肺内に T リンパ球の集積が存在していることはほぼ間違いない事実と思われる。

つぎに、筆者らは肺内に集積した T リンパ球の subset について解析したが、胸部レ線異常の有無との関連において興味ぶかい事実が観察された。すなわち、HAB 患者 BAL 液中の CD4/CD8 比は全体でみると CD4 優位であり、なかには正常値を超えて上昇している例も認められたが、HAM 患者で胸部レ線異常の明らかでない群では CD8 優位の例が多かった。

このことから、肺病変の初期には、CD8⁺T cell 主体のリンパ球集積が生じ、ついで CD4⁺T cell 優位のリンパ球集積へと変化し、これは呼吸病変の進展と併行している可能性が示唆されるが、この病因的な意義づけに関してはさらに多数例での検討が必要と思われる。

いずれにしても、BAL 液中のリンパ球絶対数でみると、胸部レ線異常を有する群は、胸部レ線異常を有しない群に比し T リンパ球数がより多いことは今回の成績でも示されており、HAB 患者の肺病変と T リンパ球の肺

局所への集積にはなんらかの関連があるものと考えられる。

BAL 液中に T リンパ球増多を示す疾患には、サルコイドーシス、過敏性肺臓炎、慢性ペリリウム肺などが知られている。これらの疾患では、既知ないし未知の抗原物質に感作されたリンパ球が肺局所において、抗原物質との間に過剰な免疫応答を引き起こし、これと関連して肺組織障害が生ずるものと考えられている。BAL 所見の類似性から、HAB 患者の肺病変もこれらのアレルギー性肺疾患と類似した機序により発症している可能性が推察される。そこで、筆者らは、HAB 患者の肺病変と HTLV-1 との関連をより直接的に確認するため、肺局所における HTLV-1 抗原の検出と、局所に集積したリンパ球の HTLV-1 刺激に対する反応性を検討した。HTLV-1 抗原の検出は BAL 細胞を 6 日間培養したあと、間接蛍光抗体法により試みたが、図 2 に示したとおり、7 例中 6 例で HTLV-1 抗原陽性細胞が検出された。これらのウイルス抗原陽性細胞はリンパ球様の形態を示すものが大部分であったが、一部には大型細胞も認められ、これは肺胞マクロファージないし単球の可能性も除外できなかった。

今回の成績で興味ぶかいのは、HAM 合併群のなかの A 群と B 群間での HTLV-1 抗原陽性細胞の出現率の比較で、このウイルス抗原陽性細胞の比率が胸部レ線異常の明らかな群で高いことであった。これは第一に、肺内のウイルス抗原量が肺組織障害の進展を左右する重要な因子となっている可能性を示唆している。第二に、HAB 患者 BAL リンパ球が HTLV-1 virion 刺激に対して高い免疫応答反応を示したことである。特に、図 2 に示したように、HTLV-1 特異 T 細胞増殖反応は胸部レ線異常を認めない HAM 群よりも、胸部レ線異常を有する HAM 群で明らかに亢進していた。これは呼吸病変が明らかな HAM 患者では肺内に、より多数の HTLV-1 感作リンパ球が集積した結果を反映したのと考えられる。

以上の成績から、HAM を伴う HAB 患者の 1 群の肺内には HTLV-1 抗原陽性リンパ球と HTLV-1 感作リンパ球が共存していることが示され、両者間の活発な免疫応答が生じ、これに伴う免疫病理学的機序で、肺組織障害が生じる発症のメカニズムが示唆される。

今回の成績では、胸部レ線異常を有しない HAM 2 例の BAL リンパ球は、HTLV-1 virion 刺激に対し正常者レベルの反応しか示さなかった。この結果は、これらの患者では HTLV-1 感作リンパ球が少なかったということのほかに、HTLV-1 抗原提示機能の成否が要因としてあげられる。

一般に、肺胞マクロファージは、末梢血単球にくらべて抗原提示能が弱く、被検抗原濃度によって免疫応答機

能が左右されることが報告されている¹³⁾。今後、この面からの検討を行い、上述の低応答性の背景を明らかにする必要がある。

近年、HAM 患者においていくつかの免疫異常の存在が指摘されており^{14,15)}、HAM が他の HTLV-1 キャリアとは異なった免疫動態を有することが明らかとされている。HAB の肺病変も、HTLV-1 感染により生じた宿主のなんらかの免疫異常を介して起こされる可能性が考えられる。

一方、今回の研究では、HTLV-1 抗原の局在をTリンパ球において確認したが、HTLV-1 は、fibroblast にも感染しうることが報告されており¹⁶⁾、肺間質細胞へのウイルス感染と、これに対する反応性のリンパ球の浸潤のメカニズムも否定できない。今後の詳細な検討が望まれる。

文 献

- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S., Miyoshi, I.: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6476-6480, 1981.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., Hinuma, Y.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2031-2035, 1982.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., Tara, M.: HTLV-1 associated myelopathy, A new clinical entity. *Lancet* 1: 1031-1032, 1986.
- Osame, M., Matsumoto, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Tara, M., Igata, A.: Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to HTLV-1 and adult T-cell leukemia like cells. *Ann. Neurol.* 21: 117-122, 1987.
- Yoshioka, R., Yamaguchi, K., Yoshinaga, T., Takatsuki, K.: Pulmonary complications in patients with adult T-cell leukemia. *Cancer* 55: 2091-2094, 1985.
- 坂井八重子, 上拾石秀, 李 聖烈, 富野新八郎, 山口一成, 高月 清: 間質性肺炎とくすぶり型 ATL, ATL endemic area における慢性肺疾患の抗 ATLA 抗体陽性率. *臨床血液* 26: 499-503, 1985.
- 森進一郎, 溝口 亮, 坂下 泉・他: BALF の細胞および液性成分の解析. 特に HTLV-1 associated bronchopneumonopathy(HAB)を中心として. *日胸疾会誌* 26(増): 464, 1988.
- 丸山征郎, 坂下 泉, 荏原順一・他: 成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) に関連した肺病変, HTLV-1 Associated Bronchopneumonopathy (HAB)——新しい疾患概念の提唱. *日胸疾会誌* 26(増): 464, 1988.
- Maruyama, I., Chihara, J., Sakashita, I., Mizoguti, A., Mori, S., Usuku, K., Jonosono, M., Tara, M., Matsumoto, M., Niina, S., Sonoda, S., Yashiki, S., Osame, M.: HTLV-1 associated bronchopneumonopathy—A new clinical entity?. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137(4-II): 46, 1988.
- Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J., Crystal, R.G.: Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* 97: 149-206, 1979.
- Sugimoto, M., Nakashima, H., Watanabe, S., Uyama, E., Tanaka, F., Ando, M., Araki, S.: T-lymphocyte alveolitis in HTLV-1 associated myelopathy. *Lancet* 2: 1220, 1987.
- 川畑政治, 森進一郎, 溝口 亮・他: HTLV-1 associated myelopathy(HAM) 40例の胸部X線解析. *日胸疾会誌*(投稿中).
- Vavidi B. Etensohn, Peggy A. Lalor, Norbert J. Roberts: Human alveolar macrophage regulation of lymphocyte proliferation. *Am. Rev. Resp. Dis.* 133: 1091-1096, 1986.
- Mori, M., Kinoshita, K., Ban, N., Yamada, Y., Shiku, H.: Activated T-lymphocyte with polyclonal gammopathy in patients with human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy. *Ann. Neurol.* 24: 280-282, 1988.
- Usuku, K., Sonoda, S., Osame, M., Yashiki, S., Takahashi, K., Matsumoto, M., Sawada, T., Tsuji, K., Tara, M., Igata, A.: HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-1 in HTLV-1 associated myelopathy: Comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann. Neurol.* 23: 143-150, 1988.
- Hayami, M., Tsujimoto, H., Komuro, A., Hinuma, Y., Fujiwara, K.: Transmission of adult T-cell leukemia virus from lymphoid cells to non-lymphoid cells associated with cell membrane fusion. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 75: 99-102, 1984.