

サルコイドーシスの肺肉芽腫形成に対する Propionibacterium acnes の関与に関する研究

第 1 編

サルコイドーシス肺胞リンパ球の Propionibacterium acnes に対する Interleukin-2 産生及び Interleukin-2 受容体発現について

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

森 由 弘

(平成 3 年11月12日受稿)

Key words : sarcoidosis, Propionibacterium acnes, Interleukin-2,
Interleukin-2 receptor, alveolar lymphocyte

緒 言

サルコイドーシス (サ症) は、全身性の類上皮細胞肉芽腫性疾患である。その病因として細菌、真菌、ウイルス、化学物質の病巣への存在または分離が報告されてきたが、いずれも今日確定されたものはなく、依然としてその原因は不明のままである。一方、本間を中心とした文部省研究班では、サルコイド病巣の生検標本から細菌の分離培養と同定を行い、高頻度にかつ高濃度に Propionibacterium acnes (P. acnes) を分離し、本症のサ症病態への関与を推察している¹⁾。一方、Crystal RG ら²⁾は、サ症活動症例の肺胞リンパ球は無刺激にて Interleukin-2 (IL-2) を産生することが、肺内での T リンパ球の増加の原因であり、且つ T-lymphocyte alveolitis が肺肉芽腫の形成に先行する³⁾ことを一連の研究にて立証している。しかし、その原因については全く追求されていない。

IL-2 は抗原又は mitogen 刺激により T 細胞より産生される cytokine であり、T 細胞の分化、増殖に必須の因子である⁴⁾。IL-2 は IL-2 受容体を介して T 細胞に作用し増殖を開始する⁵⁾。我々は、すでにサ症肺胞リンパ球が P. acnes 刺激により幼若化の亢進を起こすこと⁶⁾を確認しており、今回は P. acnes 刺激によりサ症肺胞リ

ンパ球の増殖の機序を解明する目的で、IL-2 産生及び IL-2 受容体発現について検討した。

対 象

サ症患者26例に計28回気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage ; BAL) を施行した。即ち、2例は治療前後に2回施行した。男性12例、女性14例、年齢は19~70歳で中央値は50歳であった。20例は組織学的に、6例は臨床成績より本症と診断された。未治療症例21例、prednisolone 投与による治療症例7例であり、喫煙者11例、非喫煙者15例であった。胸部X線病期分類では、0期 (肺野病変なし) 3例、I期 (両側肺門リンパ節腫大のみ) 4例、II期 (両側肺門リンパ節腫大と肺野病変) 17例、III期 (肺野病変のみ) 4例であった。対照としては健常者6例、男性3例、女性3例、年齢56~80歳 (中央値60歳) と肺癌患者7例、男性6例、女性1例、年齢58~74歳 (中央値64歳) の健側肺の計13例にBALを施行した。そのうち喫煙者は8例、非喫煙者は5例であった。疾患対照として未治療の過敏性肺臓炎 (HP) 3例、特発性間質性肺炎 (IIP) 2例、塵肺4例を置いた。また、末梢血リンパ球の検討では、健常人16例を対照として用いた。

方 法

1. 細胞の採取⁶⁾

BALは気管支ファイバースコープを使用し、B4又はB5に楔入後、型通り50ml×4回、計200mlの生食水にて洗浄した。回収した洗浄液はステンレス製メッシュにて濾過後、分泌物を除き有核細胞を遠沈にて3回洗浄し、肺胞リンパ球を得た。May-Giemsa染色にて有核細胞500個を分類するとともにリンパ球サブセットをFITC標識モノクローナル抗体(Ortho社)にて染色し、スペクトラムIIIにて測定した。又、末梢血リンパ球は、ヘパリン加静脈血より、Ficoll比重遠沈法により分離採取した。

2. リンパ球幼若化能⁶⁾

肺胞及び末梢血リンパ球を 1×10^6 /mlになるように10%胎児仔牛血清(FCS)(GIBCO社)加RPMI1640培地(GIBCO社)調整浮遊した。96穴マイクロタイタープレート(Costar社)の各wellにリンパ球浮遊液0.1mlを入れP. acnesのpryidine extract residue (PER)(P. acnes, Strain 4182, RIBI Immunochem Research INC, MT, USA)を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加え、6日間CO₂インキュベーターにて培養後、³H-thymidineを添加した。さらに7時間培養した後、セルハーベスターにて細胞を回収し、液体シンチレーションカウンターで細胞内に取り込まれたdpmを測定した。リンパ球幼若化率は、P. acnes添加培養リンパ球のdpmを無添加培養リンパ球のdpmで除してstimulation index (SI)として求めた。

3. Interleukin-2 産生

リンパ球浮遊液0.1mlをマイクロタイタープレートに分注し、P. acnes-PERを $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し48時間培養した。培養終了後、遠沈にて上清を採取し、測定直前まで-70℃にて凍結保存した。上清中のIL-2活性測定は、IL-2依存性細胞株(CTLL-2細胞)を指示細胞として用いるGillisの方法⁷⁾に準じて行った。即ち、7% FCS加RPMI1640液にて倍数希釈した上清と 1×10^5 /mlに調整したCTLL-2細胞浮遊液を各々100 μl ずつマイクロタイタープレートのwellに入れ37℃、5% CO₂にて24時間反応させた後、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の

³H-thymidineをパルスし、18時間後の細胞への取り込みを測定した。IL-2活性は標準IL-2 100 u/ml(味の素中央研究所, Jurkat IL-2 Lot No. J-012)をもとにprobit analysis法より算出した。

4. Interleukin-2 反応能

リンパ球を前述の条件にてP. acnes-PERを加え48時間培養した後、trypan blue染色により確認した生細胞を 1×10^6 /mlに10% FCS加RPMI液にて調整再浮遊した。浮遊液100 μl にrecombinant IL-2(武田薬品中央研究所, TGP-3 Lot No. H-609-504) 0.5u/ml液の100 μl を添加し24時間反応させ、³H-thymidineを $0.25 \mu\text{Ci}$ パルスし、18時間後のリンパ球への取り込みをdpmで表示した。又、P. acnes刺激リンパ球に、抗IL-2受容体抗体である抗Tac抗体を同時添加し同様にdpmの取り込みを測定した。

結 果

1. 気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞成分 (Table 1)

未治療サ症21例のBALF中総細胞数は $25.7 \times 10^6 \pm 13.2 \times 10^6$ 個(平均値±標準偏差値)であり、治療サ症7例、対照13例ではそれぞれ $24.5 \times 10^6 \pm 16.0 \times 10^6$ 個、 $15.4 \times 10^6 \pm 6.4 \times 10^6$ 個であり、未治療サ症は対照例に比し有意に増加がみられた($P < 0.01$)。サ症においては治療の有無による差はみられなかった。リンパ球比率は未治療サ症 $27.6 \pm 20.5\%$ 、治療サ症 $27.7 \pm 20.5\%$ で対照例の $15.2 \pm 9.5\%$ に比して未治療サ症では有意に高率であったが($P < 0.05$)、治療サ症では差はなかった。喫煙による影響では未治療サ症例、対照例のいずれにおいても、喫煙者に総細胞数の増加傾向と未治療サ症例ではリンパ球比率の低下傾向がみられた。

未治療サ症のリンパ球のうちCD3陽性細胞は $87.5 \pm 7.6\%$ と高率であり、CD4陽性細胞が $69.2 \pm 12.7\%$ と増加していた、しかし未治療例と治療例との間には差がみられなかった。又、サ症では治療の有無にかかわらず喫煙者にCD4/CD8比の低下傾向がみられた。これに対しHPでもCD3陽性細胞が $90.2 \pm 11.2\%$ と高率であったが、サ症と反してCD8陽性細胞が 47.5 ± 8.0

Table 1 Cell populations in bronchoalveolar lavage fluids in various disorders

		% of re-covery	Number of cell ($\times 10^6$)	Cell populations (%)					Lymphocyte subset (%)			
				Lym.	Macro.	Neut.	Eos.	Baso.	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
Control	Total (N=13)	53.3 ± 16.2	15.4 ± 6.4	15.2 ± 9.5	86.5 ± 9.9	1.1 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.2	ND	ND	ND	ND
	Non-smoker (N=5)	55.8 ± 10.2	14.0 ± 4.7	13.6 ± 10.2	88.6 ± 7.2	1.3 ± 0.9	0.4 ± 0.6	0 ± 0	ND	ND	ND	ND
	Smoker (N=8)	50.9 ± 21.6	16.2 ± 7.4	16.2 ± 9.6	83.7 ± 13.9	0.8 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	ND	ND	ND	ND
Sarcoidosis untreated	Total (N=21)	65.1 ± 13.4	25.7 ^a ± 13.2	27.6 ^b ± 20.5	70.5 ± 20.6	0.5 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0 ± 0.1	87.5 ± 7.6	69.2 ± 12.7	21.0 ± 11.5	4.6 ± 3.2
	Non-smoker (N=12)	69.0 ± 10.1	23.5 ± 7.8	33.8 ± 23.5	65.6 ± 23.8	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	89.6 ± 5.1	73.8 ± 8.8	17.2 ± 6.8	5.5 ± 3.7
	Smoker (N=9)	60.0 ± 16.0	28.6 ± 18.3	19.4 ± 12.3	78.0 ± 12.6	0.7 ± 0.7	0.2 ± 0.1	0 ± 0	84.8 ± 9.9	62.8 ± 15.0	26.2 ± 14.8	3.3 ± 2.1
Sarcoidosis treated	Total (N=7)	63.6 ± 9.5	24.5 ± 16.0	27.7 ± 20.5	71.7 ± 20.8	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0 ± 0	89.0 ± 6.2	65.7 ± 16.1	29.0 ± 17.9	3.2 ± 2.0
	Non-smoker (N=4)	69.5 ± 3.8	27.9 ± 17.6	39.4 ± 18.4	59.8 ± 19.1	0.9 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0 ± 0.1	90.3 ± 7.2	69.8 ± 12.8	23.6 ± 11.6	3.7 ± 2.1
	Smoker (N=3)	55.8 ± 9.4	20.1 ± 15.8	12.2 ± 9.3	87.5 ± 9.4	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0 ± 0.1	87.3 ± 5.5	60.4 ± 21.5	36.1 ± 24.9	2.6 ± 2.0
Hypersensitivity pneumonitis (N=3)	67.7 ± 20.2	33.4 ± 16.6	60.4 ± 21.5	38.7 ± 21.4	0.7 ± 0.8	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	90.2 ± 11.2	46.6 ± 7.0	47.5 ± 8.0	1.0 ± 0.3	
Idiopathic interstitial pneumonia (N=2)	50.0 ± 7.1	38.2 ± 32.7	18.3 ± 23.3	58.5 ± 12.1	16.3 ± 18.5	6.7 ± 6.2	0.7 ± 0.7	ND	ND	ND	ND	
Pneumoconiosis (N=4)	56.3 ± 11.0	18.0 ± 9.2	34.0 ± 22.4	58.1 ± 29.6	0.3 ± 0.6	1.2 ± 1.9	0.1 ± 0.1	ND	ND	ND	ND	

a : P<0.01 compared with control b : P<0.05 compared with control

%と増加していた。

2. 肺胞リンパ球の P. acnes 刺激 IL-2 産生能

IL-2 測定のため Fig. 1 に示した。培養上清を倍率希釈することによって CTLL-2 細胞への ³H-thymidine の摂取は直線的に減少がみられ、probit analysis 法による本法の測定限界は 0.1u/ml であった。尚、recombinant IL-2 1 u の活性は今回使用した標準 IL-2 2,000 u に相当した。

肺胞リンパ球密度による IL-2 産生は 1×10^6 /ml で 4.3 ± 1.5 u/ml, 2×10^6 /ml で 8.2 ± 2.5 u/ml と、リンパ球数に依存していた。又、培養時間は 24 時間で 3.6 ± 4.4 u/ml, 48 時間で 5.5 ± 7.3 u/ml, 72 時間で 0 u/ml と 48 時間が最も高値を示したので以後の実験は 48 時間とした (Fig. 2)。

P. acnes 添加肺胞リンパ球培養上清中の IL-2 活性は未治療サ症 21 例で 9.8 ± 15.7 u/ml, 治療サ症 7 例で 1.9 ± 4.7 u/ml であったが、対照 13 例では 0.2 ± 0.8 u/ml と殆ど活性がみられず、未治療サ症においては対照例に比して有意に高値であった (P<0.02)。また、治療例は未治療例に比して IL-2 活性の低下傾向がみられた。尚、

prednisolone 投与前後で検討ができた 2 症例では、投与前それぞれ 11.7 u/ml, 1.9 u/ml であったが、投与後は両者とも活性は全くみられなかった。HP 3 例では 0.1 ± 0.2 u/ml であったが、IIP 2 例、塵肺 4 例ではいずれも活性を検出できなかった (Fig. 3)。

未治療サ症において肺胞リンパ球の P. acnes 添加培養時の IL-2 産生と、幼若化率との間には相関係数 0.478 と弱いながら正の相関 (P<0.05) がみられた (Fig. 4)。

3. 肺胞リンパ球の非刺激培養時の IL-2 産生

未治療サ症 21 例の P. acnes 無添加培養上清中の IL-2 活性は 0.9 ± 2.3 u/ml と、添加時の約 1/10 の低値であった (Fig. 5)。尚、prednisolone 投与前後で検討ができた 2 症例のうちで投与前の 1 例に 5.1 u/ml と IL-2 活性がみられた。しかし、投与例には両者とも IL-2 活性は検出できなかった。無添加にて 1 u/ml 以上の IL-2 活性がみられたのは未治療サ症 3 例 (14%)、治療サ症 2 例 (29%)、対照 2 例 (15%)、塵肺 0 例 (0%)、HP 1 例 (33%)、IIP 0 例 (0%) であり、各疾患群間に有意差を認めなかった。

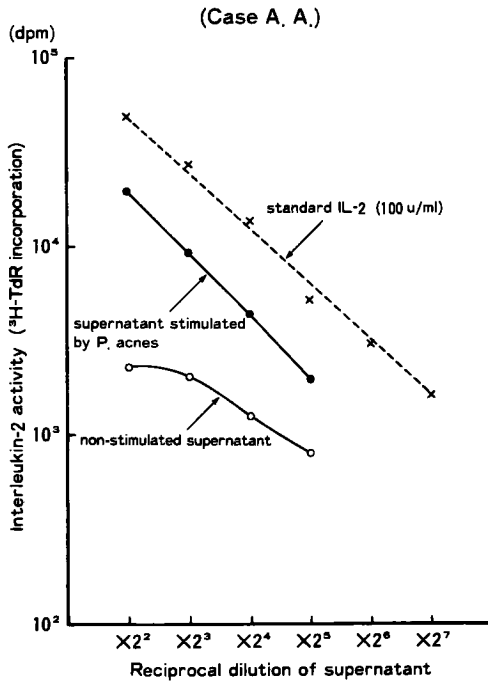


Fig. 1 Measurement of Interleukin-2 activities of fluids released from cultured alveolar lymphocytes stimulated by *P. acnes* in a patients with sarcoidosis.

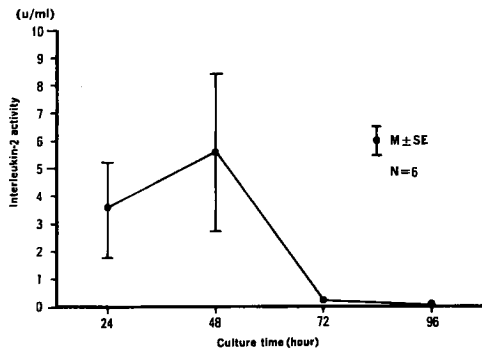


Fig. 2 Time course of Interleukin-2 activities released from cultured alveolar lymphocytes stimulated by *P. acnes*.

未治療サ症のうち非刺激時に IL-2 産生が認められた 3 例のリンパ球の CD4/CD8 比は 8.4 ± 5.0 と、IL-2 産生がみられなかった 16 例 3.8 ± 2.3 に比し有意に高かった ($P < 0.02$)。さらに、*P. acnes* 添加培養による IL-2 産生は、 24.3 ± 19.5 u/ml と、

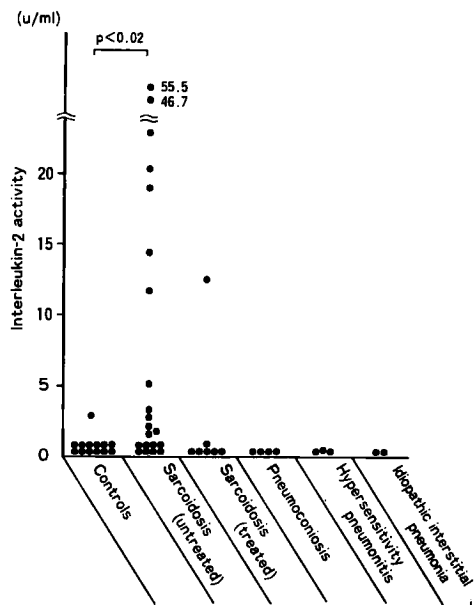


Fig. 3 Interleukin-2 activities of a fluid released from cultured alveolar lymphocytes stimulated by *P. acnes*.

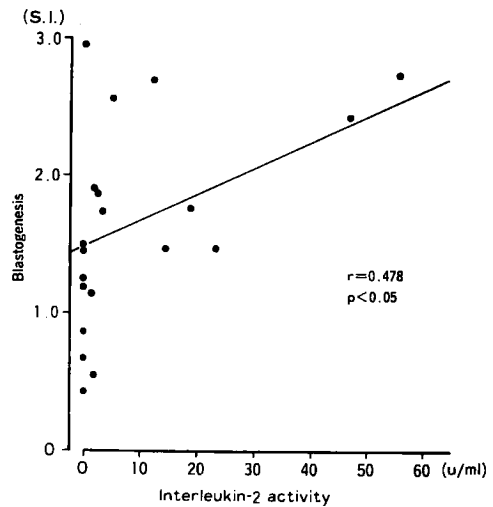


Fig. 4 Correlation between the *P. acnes*-induced production of Interleukin-2 by alveolar lymphocytes and the blastogenesis of alveolar lymphocytes in untreated patients with sarcoidosis.

他の 18 例の 7.4 ± 14.2 u/ml に比しやや亢進がみられた。

未治療サ症のうち喫煙者 9 例の IL-2 活性は

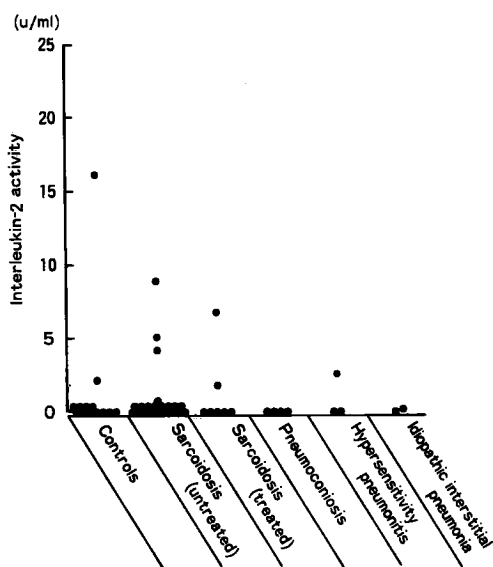


Fig. 5 Spontaneously released Interleukin-2 activities from cultured alveolar lymphocytes.

4.3±7.0u/mlで、非喫煙者12例の13.9±19.2u/mlに比し低値ではあったが有意差は認めなかった。対照例の喫煙者8例では0.4±1.0u/mlであり非喫煙者5例は全例検出できなかった。

4. サ症肺胞リンパ球の P. acnes 刺激 IL-2 産生と臨床検査所見との相関

1) 胸部X線病期との相関(Fig. 6) : 未治療サ症の病期別 IL-2 産生は、II期13例で14.1±18.2u/mlと最も高く、0期3例、III期3例ではほとんどIL-2産生を認めなかった。しかし、症例数に偏りがあり一定傾向は認められなかった。

2) 血清アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性との相関 : 未治療サ症21例の血清 ACE 活性は23.3±9.2IU/ml/37℃ (正常値 : 8.3~21.4) と高値であったが肺胞リンパ球の IL-2 産生との間に相関を認めなかった (r=-0.048)。

3) BALF 中リンパ球百分率との相関 : 未治療サ症における肺胞リンパ球の IL-2 産生と BALF 中リンパ球百分率との相関係数は0.299, CD4/CD8 比との相関係数は0.320であったが、いずれも有意差は認められなかった。

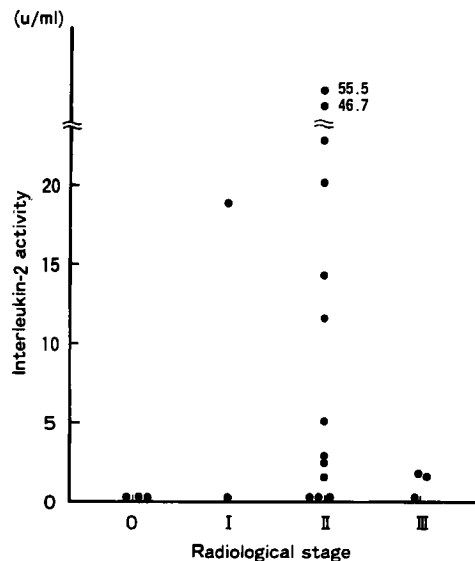


Fig. 6 Interleukin-2 activities of fluids released from cultured alveolar lymphocytes stimulated by P. acnes in untreated patients with sarcoidosis : radiological stage.

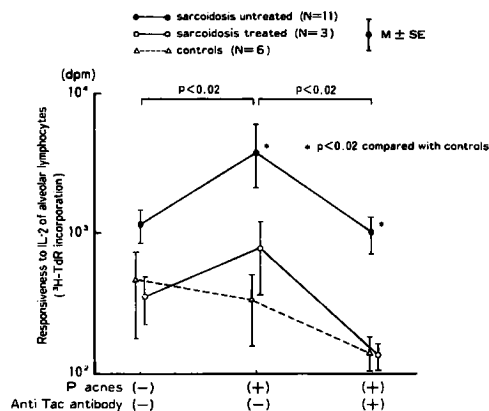


Fig. 7 Responsiveness to Interleukin-2 of alveolar lymphocytes stimulated by P. acnes in patients with sarcoidosis.

5. サ症末梢血リンパ球の IL-2 産生

P. acnes 添加培養による末梢血リンパ球の IL-2 産生は、未治療サ症17例で0.3±0.6u/ml、健康人16例で0.3±0.6u/mlと両者間に全く差を認めなかった。治療サ症6例は全例0 u/mlであった。

6. *P. acnes* 刺激による肺胞リンパ球の IL-2 反応能 (Fig. 7)

IL-2 反応能測定時の肺胞リンパ球の生細胞率は *P. acnes* 添加で平均82.0%, 非添加で77.7%と差はなかった。末梢血リンパ球の IL-2 受容体の抗 Tac 抗体による阻害を DNA 合成の阻害率で示した (Fig. 8)。抗 Tac 抗体による DNA 合成の阻害は抗 Tac 抗体の濃度に対し依存性が認められ、2,500倍希釈でも有意な阻害効果が得

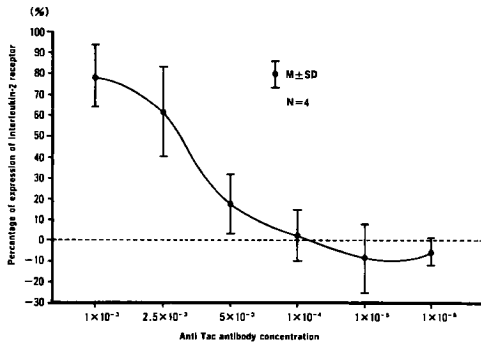


Fig. 8 Anti Tac antibody inhibitory effect of expression of lymphocytes Interleukin-2 receptors

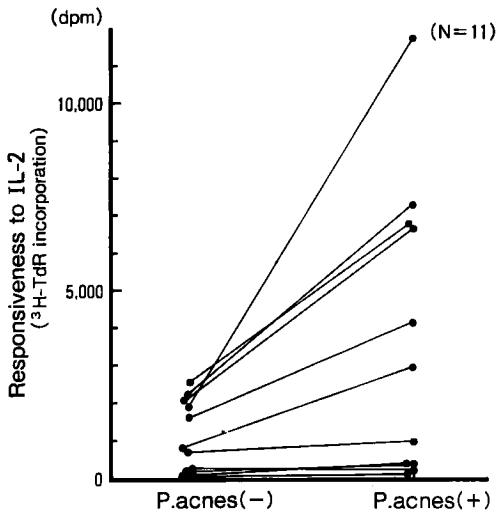


Fig. 9 Correlation of the responsiveness to Interleukin-2 of alveolar lymphocytes between by stimulation with *P. acnes* and by non-stimulation in untreated patients with sarcoidosis.

られ ($P < 0.05$) たので、以後この濃度を使用した。

未治療サ症11例の *P. acnes* 非添加時肺胞リンパ球の IL-2 反応能は $1,123 \pm 968$ dpmであったが、*P. acnes* 添加時には $3,766 \pm 3,929$ dpmと有意に亢進した ($P < 0.02$)。さらに、*P. acnes* と抗 Tac 抗体をともに加えると $1,001 \pm 1,017$ dpmと有意に低下した ($P < 0.02$)。しかし、対照6例ではそれぞれ 460 ± 687 dpm, 335 ± 444 dpm, 140 ± 84 dpmと *P. acnes* 添加による IL-2 反応能の亢進はみられなかった。*P. acnes* 非添加時の IL-2 反応能は、サ症と対照例との間に差を認めなかった。治療サ症においても、*P. acnes* 添加により IL-2 反応能の亢進がみられたが、未治療サ症のそれに比し低かった。

未治療サ症11例における IL-2 反応能は、*P. acnes* 非添加時に既に高い症例ほど、添加時にもより高い IL-2 反応能を示した (Fig. 9)。

7. *P. acnes* 刺激による末梢血リンパ球の IL-2 反応能 (Fig. 10)

末梢血リンパ球の生細胞率は *P. acnes* 添加の有無にかかわらず、ほぼ100%であった。

未治療サ症12例の *P. acnes* 非添加時末梢血

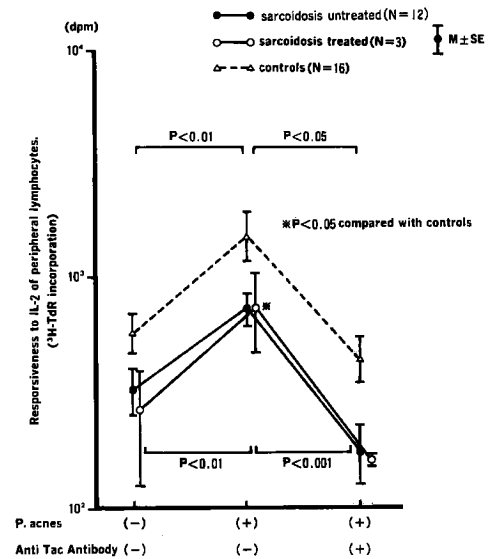


Fig. 10 Responsiveness to Interleukin-2 of peripheral lymphocytes stimulated by *P. acnes* in patients with sarcoidosis.

リンパ球の IL-2 反応能は 322 ± 254 dpm で、P. acnes 添加時には 728 ± 407 dpm と有意に亢進がみられた ($P < 0.01$)。P. acnes と抗 Tac 抗体をともに加えた場合の IL-2 反応能は 177 ± 167 dpm と P. acnes 添加時に比し有意に低下していた ($P < 0.001$)。

対照健康常人16例の末梢血リンパ球の IL-2 反応能はそれぞれ 581 ± 469 dpm, $1,583 \pm 1,599$ dpm, 449 ± 369 dpm であった。未治療サ症の末梢血リンパ球の反応能はこれらに比し低反応であり、P. acnes 刺激時には有意差がみられた ($P < 0.05$)。又、治療の有無による有意な差はみられなかった。

8. サ症肺胞リンパ球と末梢血リンパ球の IL-2 産生の比較

未治療サ症において P. acnes 刺激による IL-2 産生は肺胞リンパ球で 9.8 ± 15.7 u/ml と末梢血リンパ球の 0.3 ± 0.6 u/ml に比して有意 ($P < 0.02$) に亢進が認められた。しかし非刺激時には差を認めなかった。

考 察

サ症に伴う免疫異常については以前から指摘されてきたところである⁷⁾。近年、気管支肺胞洗浄法の普及にともない肺病変局所の病態解明は著しい進歩をとげた。しかし、サ症の病因物質については依然として不明のままである。本間らを中心とした文部省サルコイドーシス研究班は、サ症の原因を感染論的立場に焦点をしばり検討を行い、サ症患者材料から高率かつ高頻度に P. acnes を分離し、病巣部分に本菌の存在を確認した¹⁾。

一方、我々は未治療サ症の肺胞リンパ球を P. acnes にて刺激すると幼若化が亢進する事を見いだした⁶⁾。さらに、幼若化の亢進は本症における活動性の指標である血清 ACE 活性、血清リゾチーム活性、あるいは肺胞リンパ球の増加と相関がみられることより、P. acnes 添加幼若化率の亢進はサ症の活動性を反映すると考えられた⁶⁾。更に、モルモットに P. acnes を経気道的感作することにより、肺肉芽腫症を作製することに成功するとともに、本動物モデルにおいてもサ症と同様に BALF 中にリンパ球が増加する

こと、IL-2 産生の亢進することを報告した⁹⁾。今回は、サ症肺局所におけるリンパ球増殖への P. acnes の関与を検討するために、肺胞リンパ球の IL-2 産生及び IL-2 受容体発現について検討した。

未治療サ症肺胞リンパ球は P. acnes 刺激にて IL-2 産生が亢進し、かつ P. acnes による幼若化反応の亢進と正の相関がみられた。さらに、IL-2 受容体の発現も亢進を認めた。即ち、このことはサ症肺胞リンパ球は P. acnes 刺激にて IL-2 の産生を亢進し、産生した IL-2 を介して肺胞リンパ球が増殖することを支持する所見と考えられる。

Crystal RG ら²⁾は、活動性サ症の肺胞リンパ球は非刺激下でも IL-2 を産生すると報告しているが、我々の成績でも、非刺激下でも IL-2 産生の認められる症例も存在したが、対照群例および他疾患例と比較して差はなかった。この原因としては、実験方法の差異が考えられるが、測定方法に大きな違いはなく、また IL-2 の活性単位も international unit に換算して比較すると、我々の 1 u は彼らの 0.9 u に相当することから測定感度にも差はなかった。次に、対象症例の活動性の違いが問題となるが、我々の成績でも IL-2 の自然放出のみみられた 3 例では肺胞リンパ球の CD4/CD8 比の高値、すなわち helper T-cell の増加が認められた。肺胞リンパ球の CD4/CD8 比の高値は、活動性の亢進を示し¹⁰⁾、さらに CD4 陽性 T-cell が非刺激下で IL-2 を産生することから、Crystal RG ら¹¹⁾の対象例には活動性の高い症例が多く含まれている可能性がある。

P. acnes 刺激によりサ症肺胞リンパ球の recombinant IL-2 に対する反応能の亢進がみられた。このことは、P. acnes の刺激によりリンパ球の IL-2 受容体の機能的な発現が亢進したと考えられる。さらに抗 IL-2 受容体抗体である抗 Tac 抗体¹²⁾を加えることにより亢進が阻害されたことから裏付けられた。対照例では、P. acnes 刺激による IL-2 受容体の発現の亢進は認められず、また非刺激下での IL-2 受容体の発現にも差はなかった。サ症のうちで無刺激にて IL-2 受容体の発現の強い症例ほど P. acnes 刺激にて、より多量の IL-2 受容体の発現を認めた。

中嶋ら¹³⁾は、サ症血清中および BAL 液中の遊離 IL-2 受容体が増加していることを報告している。この明確な意義については不明であるが、活性化されたリンパ球から分泌された可能性がある。

Semenzato ら¹⁴⁾は、サ症の肺胞リンパ球およびリンパ節組織中のリンパ球は、末梢血リンパ球に比し、Tac 抗原陽性リンパ球の増加が認められると報告している。サ症では病変局所において IL-2 受容体を発現した活性化 T リンパ球の増加が示唆される。

ステロイドホルモンが IL-2 産生および IL-2 受容体発現を抑制することが報告¹⁵⁾されているが、我々の成績においても、prednisolone 投与例では肺胞リンパ球の IL-2 産生の低下、IL-2 受容体発現の抑制傾向がみられた。さらに投与前後で検討し得た 2 例ではともに投与により、IL-2 産生の著明な低下がみられた。

末梢血リンパ球の IL-2 産生はサ症、健常人ともにほとんど認められず、両者間に差が無かった。一方、末梢血リンパ球の IL-2 受容体発現は、サ症では肺胞リンパ球と異なり P. acnes の刺激の有無にかかわらず健常人に比し、低下傾向が認められた。Semenzato ら¹⁴⁾も、PHA 刺激で同様の結果を得ており、サ症末梢血リンパ球の IL-2 受容体発現の障害を推定している。これは、従来より我々が報告してきた末梢血リンパ球ではサ症、健常人ともに、幼若化の亢進はみられないという結果を支持する成績である。その理由として IL-2 産生と IL-2 受容体発現の障害が一因である可能性が示唆された。

以上の成績から、サ症肺胞リンパ球は P. acnes に感作されており、P. acnes の存在下で IL-2 産生を亢進するとともに、IL-2 受容体の発現を来たし、増殖することが示唆された。この肺局所でのリンパ球の増殖が、いわゆる T リンパ球胞隔炎の病態と考えられた^{16,17)}。

サ症では末梢血リンパ球と肺病変局所のリンパ球は、その表面マーカー、機能において際だった対比を見せている¹⁸⁾。即ち、サ症の病態を考える上で肺という病変局所で病因物質とリンパ球が会うことが重要である。しかし病因物質が肺局所に存在するか、あるいは一度、感作さ

れたリンパ球の内因的免疫制御の欠陥に起因するかは不明である。Crystal RG ら¹⁹⁾はサ症肺胞リンパ球は、IL-2 mRNA が活性化されていることを見いだしたが、末梢血リンパ球には、その発現はなく、また肺胞リンパ球も構成的に mRNA を発現させているのではなく、肺という環境下に置かれることによって初めて IL-2 mRNA の活性化が起こると、即ち肺病巣に IL-2 産生 gene の活性化因子が存在していると述べている。

我々は、この病因物質として P. acnes を想定し実験を重ねてきた。P. acnes はヒトにおいては常在菌であり、何等かの原因で肺で増殖する可能性は高いと考えられ、実際に、サ症肺病変中に、P. acnes を高濃度に認めている¹⁾。さらに肺の肉芽腫形成には肺胞マクロファージによる Interleukin-1 産生亢進²⁰⁾、抗原提示活性の亢進²¹⁾などリンパ球と同様、肺胞マクロファージの反応亢進状態の関与も大きいと考えられ、現在肺胞マクロファージの関与についても検討中である。

結 論

未治療サ症の肺胞リンパ球は、P. acnes 刺激により幼若化率の亢進を来たす。この病態解析の目的で、リンパ球の P. acnes 刺激による IL-2 産生、IL-2 受容体発現の検討を行った。その結果、未治療サ症の肺胞リンパ球は、P. acnes 刺激にて IL-2 産生、IL-2 受容体発現の亢進がみられ、IL-2 産生と幼若化率との相関があり、このことは P. acnes によりサ症肺胞リンパ球が感作されていることを支持する所見であり、サ症における P. acnes の関与が示唆された。

稿を終えるに臨みご指導ならびに御校閲いただきました恩師木村郁郎教授に謝意を捧げますと共に、研究に際して御指導いただきました医療技術短期大学部中田安成教授に深謝致します。さらに、貴重な抗 Tac 抗体を戴きました、京都大学第一内科内山卓博士に深謝致します。

文 献

- 1) 本間日臣: サルコイドーシスの発生機構に関する研究. 難病の発生機構. 豊倉康夫編, 東京大学出版会, 東京 (1981), pp 245—303.
- 2) Pinkston P, Bitterman PB and Crystal RG: Spontaneous release of interleukin-2 by lung T-lymphocyte in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med* (1983) **308**, 793—800.
- 3) Hunninghake GW and Crystal RG: Pulmonary sarcoidosis. A disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* (1981) **305**, 429—433.
- 4) Gillis S, Ferm MM, Ou W and Smith KA: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* (1978) **120**, 2027—2032.
- 5) Uchiyama T, Broder S and Waldmann TA: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. *J Immunol* (1981) **126**, 1393—1397.
- 6) 中田安成, 江尻東伍, 岸 俊行, 小林洋三, 藤田道雄, 大熨泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の *Propionibacterium acnes* に対する反応性の検討. *日胸疾会誌* (1985) **23**, 413—419.
- 7) Daniele RP, Dauber JH and Rossman MD: Immunologic abnormalities in sarcoidosis. *Ann Int Med* (1980) **92**, 406—416.
- 8) 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 森 由弘, 飛岡 徹, 細谷茂衛, 大熨泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の *P. acnes* 刺激幼若化反応の臨床. *日胸疾会誌* (1989) **27**, 837—841.
- 9) 森 由弘: サルコイドーシスにおける肺肉芽腫形成への *P. acnes* の関与 第2編: *Propionibacterium acnes* による実験的肺肉芽腫症における肺胞リンパ球の Interleukin-2 産生能および Interleukin-2 受容体. *岡山医誌* (1992) **104**, 129—136.
- 10) Ceuppens JL, Lacquet LM, Marien G, Demedts M, Andre Van Den Eeckhout and Stevens E: Alveolar T-cell subsets in pulmonary sarcoidosis. Correlations with disease activity and effect of steroid treatment. *Am Rev Respir Dis* (1984) **129**, 563—568.
- 11) Saltini C, Spurzem JR, Lee JJ, Pinkston P and Crystal RG: Spontaneous release of Interleukin-2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis is primarily from the Leu3+DR+ T cell subset. *J Clin Invest* (1986) **77**, 1962—1970.
- 12) Toshio Miyawaki, Akihiro Yachie, Naoto Uwadana, Shigeharu Ohzeki, Takeshi Nagaoki and Noboru Taniguchi: Functional significance of Tac antigen expressed on activated human T lymphocytes: Tac antigen interacts with T cell growth factor in cellular proliferation. *J Immunol* (1982) **129**, 2474—2478.
- 13) 中嶋博徳, 杉本峯晴, 池田和隆, 安藤正幸, 荒木淑郎: サルコイドーシスにおける血清遊離インターロイキン2レセプター値と臨床経過. *呼吸* (1990) **9**, 225—228.
- 14) Semenzato G, Agostini C, Trentin L, Zambello R, Chilosi M, Cipriani A, Ossi E, Angl MR, Moritta L and Pizzolo G: Evidence of cells bearing Interleukin-2 receptor at sites of disease activity in sarcoid patients. *Clin Exp Immunol* (1984) **57**, 331—337.
- 15) Horst HJ and Flad HD: Corticosteroid-Interleukin-2 interactions: inhibition of binding of Interleukin-2 to Interleukin-2 receptors. *Clin Exp Immunol* (1987) **68**, 156—161.
- 16) Hunninghake GW, Gadek JE, Young RC, Kawanami O, Ferrans VJ and Crystal RG: Maintenance of granuloma formation in pulmonary sarcoidosis by T-lymphocytes within the lung. *N Engl J Med* (1980) **302**, 594—598.

- 17) Rosen Y, Athanassiades TJ, Moon S and Lyons HA : Nongranulomatous interstitial pneumonitis in sarcoidosis. Relationship to development of epithelioid granulomas. *Chest* (1978) **74**, 122—125.
- 18) Hunninghake GW, Fulmer JD, Young RC Jr, Gadek JE and Crystal RG : Localization of the immune response in sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* (1979) **120**, 49—57.
- 19) Müller-Quernheim J, Saltini C, Sondermeyer P and Crystal RG : Compartmentalized activation of the Interleukin-2 gene by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* (1986) **137**, 3475—3483.
- 20) Hunninghake GW : Release of Interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* (1984) **129**, 569—572.
- 21) Vanet A, Hance AJ, Saltini C, Robinson BW and Crystal RG : Enhanced alveolar macrophage-mediated antigen-induced T lymphocyte proliferation in sarcoidosis. *J Clin Invest* (1985) **75**, 293—301.

Studies on pulmonary granuloma formation by *Propionibacterium acnes* in sarcoidosis

Part 1. Interleukin-2 production and receptor expression of alveolar lymphocytes stimulated by *Propionibacterium acnes* in sarcoidosis

Yoshihiro MORI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

We previously reported that alveolar lymphocytes in patients with active sarcoidosis are sensitized to *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) which may play a significant role in the induction of alveolitis in these patients. We further investigated the production of Interleukin-2 (IL-2), and the responsiveness to IL-2 of alveolar lymphocytes obtained from sarcoidosis patients and stimulated by *P. acnes* in vitro.

In 21 untreated sarcoidosis patients, 7 treated patients and 13 control subjects, the mean IL-2 activity of fluid released from cultured alveolar lymphocytes was 9.8 ± 15.7 ($M \pm SD$), 1.9 ± 4.7 and 0.2 ± 0.8 u/ml respectively. The IL-2 activity of lymphocytes from untreated patients was significantly higher than that of control subjects ($p < 0.02$).

Neither peripheral lymphocytes in sarcoidosis patients nor in controls produced IL-2 stimulated by *P. acnes*.

The responsiveness of alveolar lymphocytes to recombinant IL-2 was evaluated by ^3H -thymidine uptake in the presence and absence of *P. acnes*. Lymphocytes stimulated by *P. acnes* showed a significantly increased uptake ($3,766 \pm 3,929$ dpm) compared to unstimulated lymphocytes ($1,123 \pm 968$ dpm) obtained from 11 untreated sarcoidosis patients ($p < 0.02$). On the other hand, the responsiveness of lymphocytes obtained from 6 control subjects was low regardless of stimulation by *P. acnes*.

There was a significant correlation ($p < 0.05$) between the *P. acnes*-induced production of IL-2 by alveolar lymphocytes and the blastogenesis of alveolar lymphocytes in untreated sarcoidosis patients.

Our findings indicate that *P. acnes* stimulates IL-2 production and IL-2 receptor induction in alveolar lymphocytes from patients with active sarcoidosis. This study supported our hypothesis that *P. acnes* could be an antigen causing sarcoidosis.