

呼吸器疾患における単球および肺胞マクロファージの走性に関する研究

第 II 編

肺胞マクロファージの化学走性に関する研究

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

佐 藤 利 雄

（昭和56年10月28日受稿）

Key words: 肺胞マクロファージ, 化学走性
気管支喘息, 気管支肺胞洗浄法

緒 言

肺は呼吸に伴い種々の外界異物の侵入にさらされているが、咳嗽、気管支の攣縮、mucociliary ladder等の気道反応や、IgAを中心とする液性免疫、また肺胞マクロファージ、リンパ球、好中球を中心とする細胞性免疫等の反応によりこれらの体内侵入を防いでいる。

肺胞マクロファージは、肺の間質、気道、肺胞腔に存在し、主として骨髓幹細胞から発生し、末梢血単球となり、肺組織において成熟した局所マクロファージであり¹⁾、一部は肺胞局所において増殖すると言われている^{2,3)}。肺胞マクロファージは健康肺においては腔内に存在する細胞成分の大多数を占めているが、その主な作用は、食作用^{4,5)}、微生物や腫瘍細胞に対する細胞障害作用、免疫応答の誘導および発現^{6,7)}、prostaglandinやcolony-stimulation activity⁸⁾等の生物活性物質の産生、lysosome enzyme, lysozyme, protease⁹⁾、superoxide anion等の産生、また肺胞構造の保護¹⁰⁾などと多岐にわたっている。この様な肺胞マクロファージの様々な作用の中でも、特に免疫応答に関する研究は目覚しく進歩しており、近年はアレルギー反応及び肉芽腫形成性反応と肺胞マクロファージとの関係が注目されるようになっている。

一方1961年 Myrvik らがウサギを用いて肺洗浄により高純度の肺胞マクロファージの回収法

を見出して以来¹¹⁾、肺の細胞生物学は飛躍的に進歩した。ヒトにおいても、カフ付メトラカテーテル¹²⁾から気管支ファイバースコープを用いた気管支洗浄¹³⁾さらに気管支肺胞洗浄法¹⁴⁾にと次第に回収法に改良が加えられ、肺末梢部である肺胞・末梢気道腔に局在する細胞成分や液性成分の採取が可能となり、各種呼吸器疾患における肺末梢部の病態解明が盛んに行なわれるようになってきている。アレルギー性呼吸器疾患においては、教室の竹山¹⁵⁾が肺末梢部の出現細胞および生検肺組織との関係¹⁶⁾について詳細に検討し報告している。

著者は、第I編においてアレルギー性呼吸器疾患を中心に、諸種呼吸器疾患における末梢血単球の走性について検討したが、本編では、局所マクロファージの作用を知る目的で、アレルギー性呼吸器疾患、肉芽腫形成性呼吸器疾患を中心とした諸種呼吸器疾患における肺胞マクロファージの走性について検討し、若干の知見を得たので、その概略を報告する。

対象ならびに方法

対象

当科呼吸器外来に通院中および当科に入院中の気管支喘息15例（男性7例、女性8例、年齢23～61才、平均39.7才）、サルコイドーシス11例（男性7例、女性4例、年齢23～61才、平均39.3才）、過敏性肺臓炎4例（男性2例、女性2例、

年齢36~54才, 平均44.0才), 肺線維症2例(男女各1例, 年齢43~51才, 平均47.0才)を対象とした。喫煙については, 過去1年以上毎日喫煙しているものを喫煙者とし, 全く喫煙しないか, 過去1年以上喫煙してないものを非喫煙者とした。気管支肺胞洗浄時には, 感染の有無を知るため全例においてCRPの検査を行ない, また気管支喘息症例では非発作時に施行した。対照としては, 健康人 volunteer 11名(全例男性, 年齢27~34才, 平均29.8才)を選んだ。このうち喫煙者は7名で, CRPは全例陰性であった。

方法

1) 肺胞マクロファージの採取

肺末梢領域よりの肺胞マクロファージの採取は, 右肺B₄, B₅領域の気管支肺胞洗浄により行なった。回収した気管支肺胞洗浄液を二重のガーゼと, 間隙250 μ mのstainless steel mesh(飯田製作所)で濾過して粘液を除き, 4 $^{\circ}$ C, 250 Gで10分間遠心分離し, 沈渣と上清に分離した。沈渣中の細胞成分については, 細胞数と同時に, May-Giemsa染色により出現細胞の分類を行なった。ついで, 沈渣の細胞に10%非動化牛胎児血清加RPMI 1640培養液を加え, よく攪拌し4 $^{\circ}$ C, 250 G, 10分間の遠心を2回行なって細胞を洗浄した後, 最終的に肺胞マクロファージがそれぞれ 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 /mlとなるよう調整して, 肺胞マクロファージ浮遊液を作成した。

2) 肺胞マクロファージの走性の観察

agarose plateの作成は, 第1編の方法に準じたが, mediumには, RPMIのかわりにM-199培養液(千葉県血清研究所製)2mlを用い, 他の健康人非動化血清, NaHCO₃, Penicillin G, Streptomycinは第1編と同量を用いた。さらに各agarose plateには, L-glutamineをそれぞれ0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM加え, L-glutamineの至適濃度を検討した。agaroseが固まった後, agarose plate上に直径2.4 mmのwellを2.4 mm間隔で直線上に3個, 放射線上に6方向作成した。3個のwellのうち中央のwellには前述のマクロファージ浮遊液10 μ lを入れ, 外側のwellにはchemoattractantとしてZymosan activated serumを10 μ l, また内側のwellに

はcontrolとしてM-199を10 μ l注入した。このagarose plateを37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培養器内で12~48時間培養した後, メタノール液3.5 mlを加え反応を止め, 第1編と同様の固定処理を行ない, Giemsa染色後顕微鏡下で遊走細胞の観察を行なった。また同時にNon specific esterase染色¹⁷⁾を併用し, 遊走した細胞中の肺胞マクロファージをリンパ球と鑑別した。

肺胞マクロファージの走性の計測は, Fig. 1の如く行なった。中央wellの中心から, 外側および内側wellの中心に対して各45 $^{\circ}$ の直線を2本引き, 中央wellのまわりを均等な4つの区域に分けた。そして4つの区域のうち, chemo-attractant側(外側)の区域内において遊走した肺胞マクロファージの先端と中央wellの辺縁との距離(A)と同区域内の遊走した肺胞マクロファージの数(M)との積A $\times$ Mをchemotaxis(以下CTと略す。)のmigration valueとして表わした。同様にcontrol側(内側)の区域内において, wellの辺縁から遊走した肺胞マクロファージの先端までの距離(B)と同区域内の肺胞マクロファージの数(N)との積B $\times$ Nをrandom migration(RM)のmigration valueとして表わした。またCTとRMの差をchemotactic differential(CD), 両者の比をchemotactic index(CI)として表わした。

走性の判定は, 第1編と同様に, 2群間においてCTとCDの両方に有意差を認めた場合に化学走性に有意差ありと判定した。また2群間においてCDに有意差を認めないが, CTおよびRMに有意差を認めた場合遊走性に有意差ありと判定した。

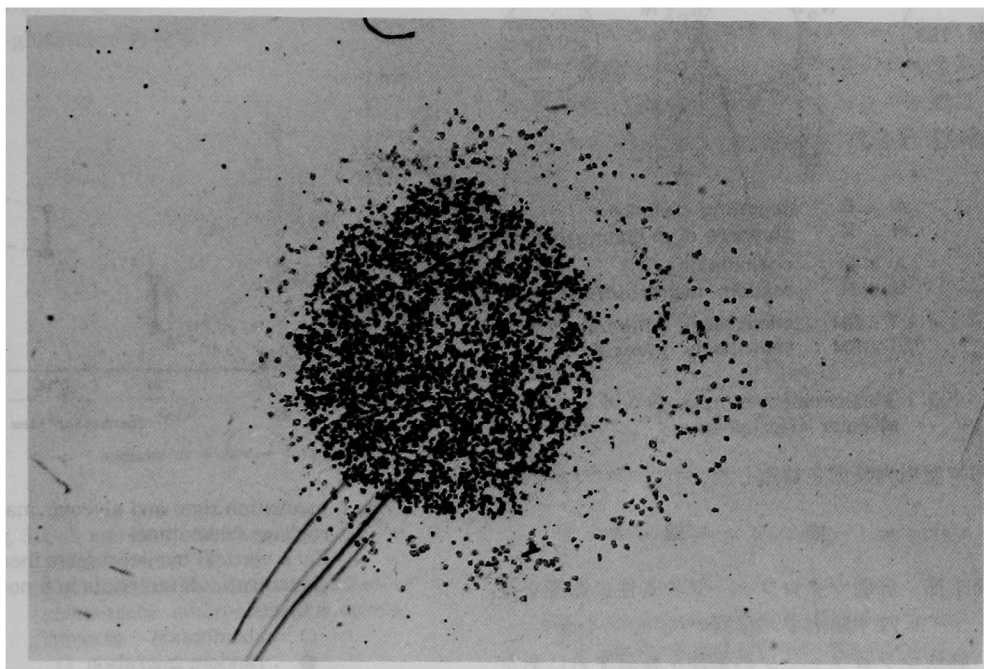
なお肺胞マクロファージのviabilityは, trypanblue dye exclusion法で85%以上(平均93.0%)であった。

3) 血清IgE値

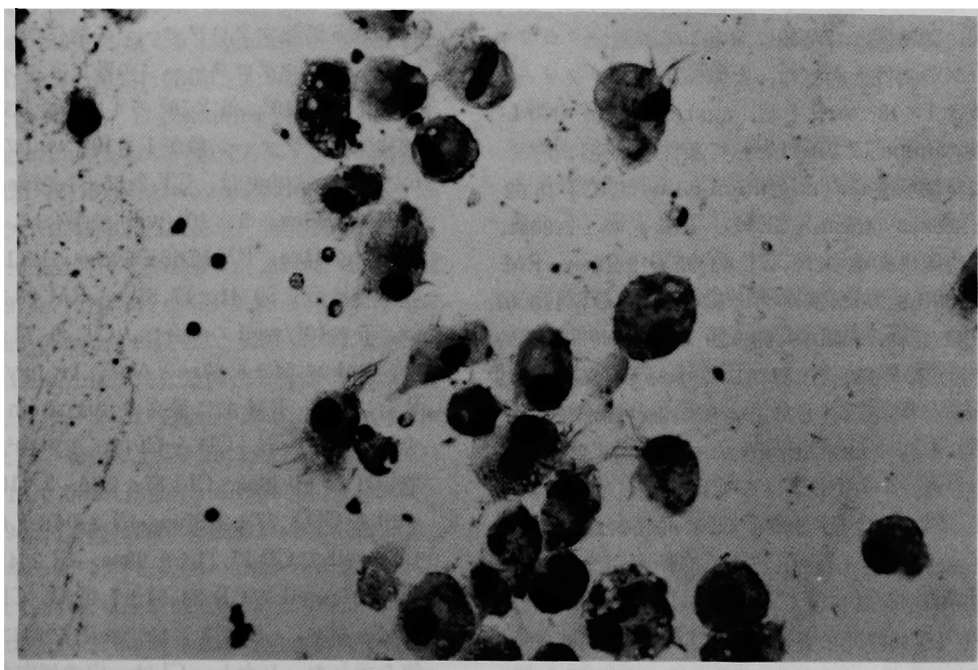
radioimmunosorbent test(RIST)(pharmacia Fine chemicals)により血清IgE値を測定した。

4) 皮内反応

House Dust, Ragweed, Buckwheat, Aspergillus, Silk, Alternaria, Cladosporium(鳥居薬品工業)の7種類のアレルゲンエキスにより



(写真1) 弱拡大(×6)



(写真2) 強拡大(×400)

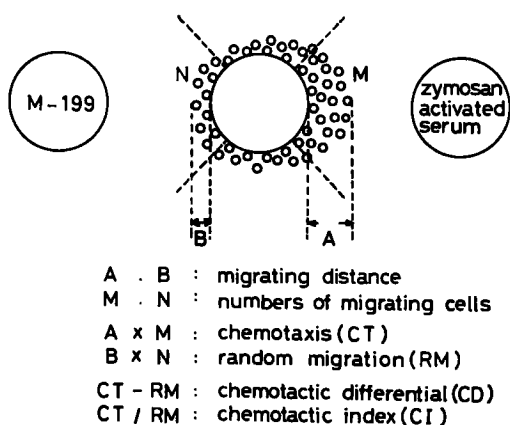


Fig. 1 Measurement of migration of alveolar macrophages.

即時型皮内反応を観察した。

成 績

第1節 肺胞マクロファージの走性に影響を及ぼす諸因子の検討

肺胞マクロファージの走性を検討するにあたり、走性の至適条件を求める為に以下の諸因子について検討した。

1) 培養時間の検討

健康人6名につき、培養時間を12時間、24時間、36時間、48時間に設定して肺胞マクロファージの走性を調べた。なお肺胞マクロファージ数は $1 \times 10^5/\text{well}$ とし、agarose plate中のL-glutamineは1mMとして条件を一定にした。12時間培養時のmigration valueは、CT $10.02 \pm 2.98\text{mm}$ (mean $\pm$ SEM), RM $4.40 \pm 1.60\text{mm}$, 24時間培養時では、CT $63.95 \pm 19.16\text{mm}$, RM $30.68 \pm 9.73\text{mm}$, 36時間培養時では、CT $118.07 \pm 33.15\text{mm}$, RM $79.63 \pm 20.64\text{mm}$, 48時間培養時では、CT $131.7 \pm 37.61\text{mm}$, RM $94.35 \pm 25.19\text{mm}$ となり、CT, RMともに培養時間が長い程、それぞれのmigration valueは増加する傾向を示した。一方CDおよびCIは、12時間培養時では、CD $5.62 \pm 1.59\text{mm}$, CI 2.60 ± 0.27 , 24時間培養時では、CD $33.27 \pm 9.55\text{mm}$, CI 2.19 ± 0.14 , 36時間培養時ではCD $38.43 \pm 16.09\text{mm}$, CI 1.62 ± 0.16 , 48時間培養時ではCD $36.82 \pm 14.00\text{mm}$, CI 1.43 ± 0.08 となり、CDは24時間以降はほぼ同程度となった。一方CIは時間が延びるにつれ

て減少する傾向を示した。以上の結果より、培養時間は24時間が適当と考えられた。(Fig. 2)

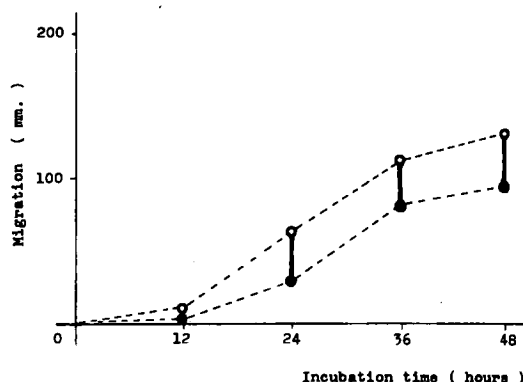


Fig. 2 Incubation time and alveolar macrophage chemotaxis
Each vertical bar represents mean of chemotactic differentials in 6 normal subjects.
○ : chemotaxis
● : random migration
Numbers of alveolar macrophage : $1 \times 10^5/\text{well}$

2) 培養細胞数の検討

7名の健康人において、agarose plateのwellに入れる肺胞マクロファージの数について検討した。肺胞マクロファージの数は、 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 の4段階を設定した。肺胞マクロファージ数が $1 \times 10^4/\text{well}$ の場合のmigration valueは、CT $2.56 \pm 1.01\text{mm}$, RM $1.31 \pm 0.53\text{mm}$, $5 \times 10^4/\text{well}$ の場合は、CT $19.43 \pm 7.41\text{mm}$, RM $10.66 \pm 5.49\text{mm}$, $1 \times 10^5/\text{well}$ の場合はCT $50.41 \pm 17.87\text{mm}$, RM $23.30 \pm 9.02\text{mm}$, $5 \times 10^5/\text{well}$ の場合は、CT $41.71 \pm 13.58\text{mm}$, RM $24.51 \pm 6.67\text{mm}$ となり、 $1 \times 10^5/\text{well}$ の場合にCT, RM共に最高のmigration valueを示した。一方、CDとCIは、 $1 \times 10^4/\text{well}$ でCD $1.24 \pm 0.48\text{mm}$, CI 1.87 ± 0.16 , $5 \times 10^4/\text{well}$ でCD $8.77 \pm 2.37\text{mm}$, CI 3.04 ± 1.00 , $1 \times 10^5/\text{well}$ でCD $27.11 \pm 8.93\text{mm}$, CI 2.41 ± 0.17 , $5 \times 10^5/\text{well}$ でCD $24.51 \pm 7.02\text{mm}$, CI 3.03 ± 0.41 となり、CDは $1 \times 10^5/\text{well}$ の時に最高の値を示した。しかし、CIは一定の傾向を示さなかった。以上より1つのwellに植込む肺胞マク

ロファージの数は、 1×10^5 個が適当であると考えられた。(Fig. 3)

3) L-glutamine の効果

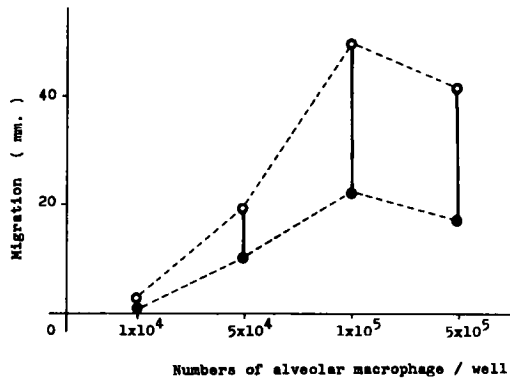


Fig. 3 Cell numbers and alveolar macrophage chemotaxis
Each vertical bar represents mean of chemotactic differentials in 7 normal subjects.
○ : chemotaxis
● : random migration
Incubation time : 24 hours

肺泡マクロファージの走性に対する L-glutamine の影響を検討する為に 6 名において、agarose plate に加える L-glutamine の濃度を 0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM の 4 段階について検討した。L-glutamine を加えない場合の migration value はそれぞれ CT 32.43 ± 12.97 mm, RM 12.10 ± 4.41 mm, L-glutamine 0.5 mM 添加で、CI 40.42 ± 16.86 mm, RM 15.93 ± 6.67 mm, 1.0 mM で CT 57.90 ± 29.38 mm, RM 30.72 ± 15.97 mm, 2.0 mM で CT 9.08 ± 4.26 mm, RM 6.32 ± 3.28 mm となり、CT, RM 共に L-glutamine 1.0 mM 添加時に最高の migration value を示した。一方 CD および CI は、L-glutamine を加えない場合は、CD 20.33 ± 8.65 mm, CI 2.41 ± 0.21 , 0.5 mM 添加で、CD 24.18 ± 8.29 mm, CI 2.96 ± 0.38 , 1.0 mM 添加で、CD 27.18 ± 14.43 mm, CI 1.77 ± 0.08 , 2.0 mM 添加で、CD 2.77 ± 1.34 mm, CI 2.02 ± 0.63 となり、CD は L-glutamine 1.0 mM を加えた時に最高の値を示した。しかし、CI は一定の傾向を示さなかった。以上より agarose plate に加える L-glutamine

の量は 1.0 mM が適当であると考えられた。(Fig. 4)

以上の検討より、著者は、agarose plate 法による肺泡マクロファージの走性の測定条件は、培養時間は 24 時間、肺泡マクロファージ数は 1×10^5 /well, 添加 L-glutamine は 1.0 mM/plate

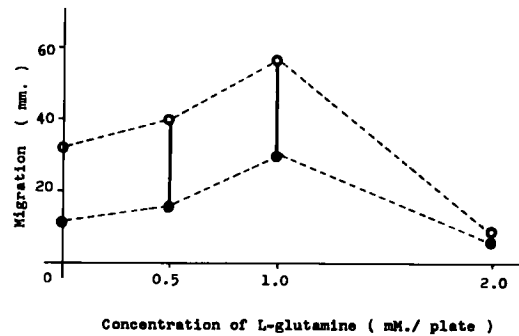


Fig. 4 Concentration of L-glutamine in the medium and alveolar macrophage chemotaxis.
Each vertical bar represents mean of chemotactic differentials in 6 subjects.
○ : chemotaxis
● : random migration
Incubation time : 2 hours
Numbers of alveolar macrophage : 1×10^5 /well

が最も適当と考え、以下の肺泡マクロファージの走性の検討は、この条件下で行った。

第 2 節 健康人の肺泡マクロファージの走性について

健康人 11 名の気管支肺泡洗浄液中の出現細胞の平均は、マクロファージ $88.1 \pm 2.7\%$, リンパ球 $11.0 \pm 2.8\%$, 好中球 $0.6 \pm 0.1\%$, 好酸球 $0.4 \pm 0.1\%$, 好塩基球 0% であった。肺泡マクロファージの migration value の平均は、CT 40.51 ± 8.95 mm, RM 18.16 ± 5.07 mm であり、CD は 22.34 ± 4.19 mm, CI は 2.54 ± 0.16 であった。

第 1 項 喫煙の有無による検討

健康人 11 名のうち非喫煙者 4 名の出現細胞の平均は、マクロファージ $78.3 \pm 3.6\%$, リンパ球 $21.1 \pm 3.5\%$, 好中球 $0.4 \pm 0.1\%$, 好酸球 $0.2 \pm 0.1\%$, 好塩基球 0% であった。一方、喫煙者 7

名の出現細胞の平均は、マクロファージ $93.8 \pm 1.1\%$ 、リンパ球 $5.1 \pm 1.2\%$ 、好中球 $0.6 \pm 0.2\%$ 、好酸球 $0.5 \pm 0.1\%$ 、好塩基球 0% であり、喫煙者においては、非喫煙者に比しマクロファージの出現率の増加 ($p < 0.01$) とリンパ球の出現率の低下 ($p < 0.01$) が認められた。肺泡マクロファージの migration value は、非喫煙者では CT $19.08 \pm 8.95\text{mm}$ 、RM $7.61 \pm 1.72\text{mm}$ であり、喫煙者では CT $52.75 \pm 11.59\text{mm}$ 、RM $24.19 \pm 6.95\text{mm}$ で、両群間に有意の差は認められなかったが、CT、RM ともに喫煙者において亢進する傾向が認められた。一方 CD および CI は、非喫煙者では CD $11.47 \pm 2.35\text{mm}$ 、CI 2.70 ± 0.25 、喫煙者では CD 28.56 ± 5.14 、CI 2.45 ± 0.20 であり両群間に有意の差は認められなかったが、CD は喫煙者において亢進する傾向が認められた。以上の結果より、肺泡マクロファージの化学走性は、非喫煙者に比し喫煙者においてやや亢進する傾向が認められた。(Fig. 5)

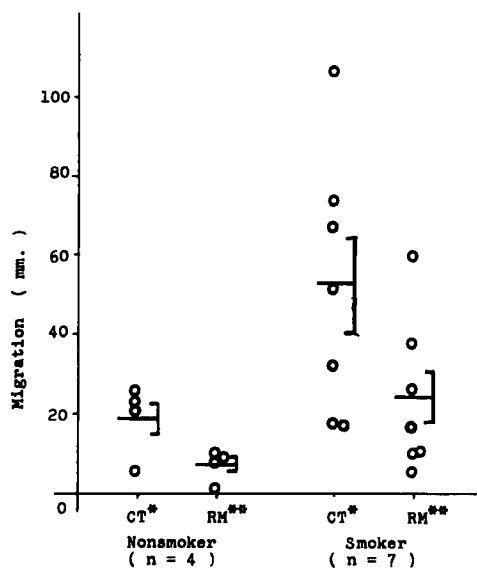


Fig. 5 Smoking and alveolar macrophage chemotaxis in normal subjects. Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration

第2項 喫煙量による検討

健康人喫煙者7名を喫煙量に応じて10 pack years 未満と10 pack years 以上の2群に分け、

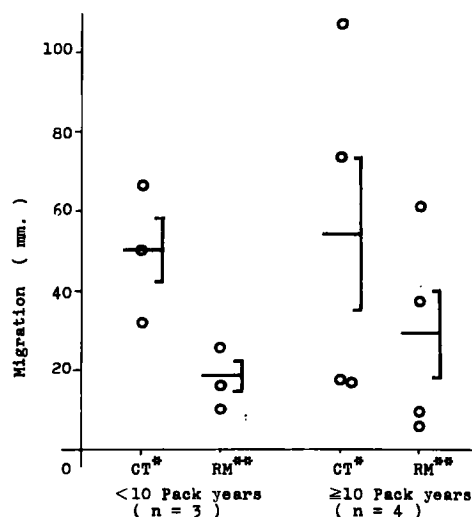


Fig. 6 Amount of smoking and alveolar macrophage chemotaxis in 7 healthy smokers. Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration

喫煙量と肺泡マクロファージの走性について検討した。肺泡マクロファージの migration value は、10 pack years 未満の例では、CT $50.50 \pm 8.31\text{mm}$ 、RM $18.09 \pm 3.94\text{mm}$ 、10 pack years 以上の例では、CT $54.44 \pm 19.25\text{mm}$ 、RM $28.78 \pm 11.26\text{mm}$ であり両群間に差は認められなかった。また CD および CI は、10 pack years 未満の例では、CD $32.42 \pm 4.45\text{mm}$ 、CI 2.90 ± 0.16 、10 pack years 以上の例では、CD $25.67 \pm 8.06\text{mm}$ 、CI 2.11 ± 0.21 であり両群間に差は認められなかった。すなわち、喫煙量による走性の有意差は認められなかったが、10 pack years 以上の喫煙者において CT、RM とも著明な亢進を示すものが観察された。(Fig. 6)

第3節 気管支喘息における肺泡マクロファージの走性について

第1項 全症例における走性の検討

気管支喘息患者15例における出現細胞の平均は、マクロファージ $77.0 \pm 4.3\%$ 、リンパ球 $16.4 \pm 3.8\%$ 、好中球 $1.9 \pm 0.9\%$ 、好酸球 $4.7 \pm 1.8\%$ 、好塩基球 $0.1 \pm 0\%$ であり、健康人11名の平均に比べ好酸球の増加傾向が認められた。肺泡マク

ロファージの migration value は, CT 11.95 ± 5.04 mm, RM 6.91 ± 3.70 mmであり, 健康人11例の平均に比し CT が有意 ($P < 0.01$) の低下を示した。また CD は 5.04 ± 1.67 mm, CI は 2.33 ± 0.26 で健康人に比し CD が有意 ($p < 0.001$) の低下を示した。すなわち気管支喘息15例全症例における肺胞マクロファージの化学走性の検討では, 健康人全般に比較して有意に化学走性が低下していることが認められた。(Fig. 7)

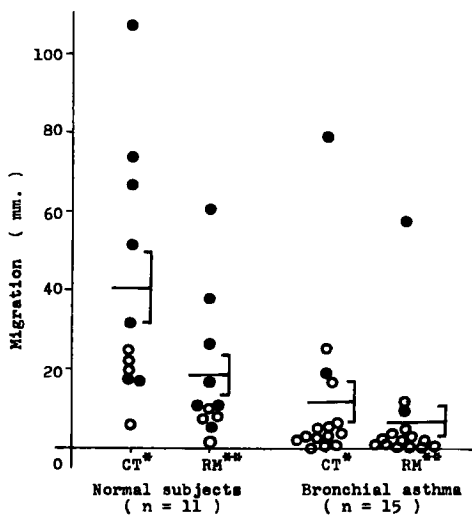


Fig. 7 Alveolar macrophage chemotaxis in bronchial asthma
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration
○: nonsmoker
●: smoker

第2項 非喫煙気管支喘息患者における走性の検討

非喫煙気管支喘息患者で, 気管支肺胞洗浄時 CRP 陰性の11例における出現細胞の平均は, マクロファージ $76.3 \pm 4.8\%$, リンパ球 $19.8 \pm 4.6\%$, 好中球 $0.9 \pm 0.2\%$, 好酸球 $3.0 \pm 1.0\%$, 好塩基球 0% で, 健康人非喫煙者4名と比べ好酸球の増加傾向が認められたが, 両群間に有意差は認められなかった。この11例における肺胞マクロファージの migration value は CT 3.19 ± 0.62 mm, RM 1.66 ± 0.48 mmで, 健康人非喫煙者4名に比べ有意 (CT: $p < 0.001$, RM $p <$

0.001) の低下が認められた。また CD は 1.52 ± 0.28 mm, CI は 2.24 ± 0.23 であり, CD において健康人非喫煙者に比べ有意 ($p < 0.001$) の低下が認められた。すなわち非喫煙気管支喘息例で CRP 陰性の症例では, 健康人非喫煙者に比べ肺胞マクロファージの化学走性は有意に低下している事が認められた。(Fig. 8)

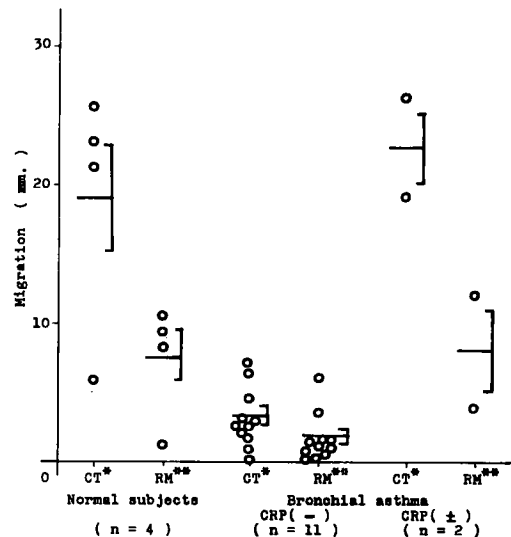


Fig. 8 Alveolar macrophage chemotaxis in bronchial asthma (nonsmokers)
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration

非喫煙気管支喘息患者で, 気管支肺胞洗浄時 CRP が(+)であった2例における出現細胞の平均は, マクロファージ $64.6 \pm 19.7\%$, リンパ球 $11.0 \pm 6.8\%$, 好中球 $8.8 \pm 4.2\%$, 好酸球 $15.7 \pm 8.8\%$, 好塩基球 0% で, 好中球が高い値を示した。肺胞マクロファージの migration value は, CT 22.82 ± 2.43 mm, RM 8.05 ± 2.93 mmであり, CD は 14.77 ± 0.50 mm, CI は 3.56 ± 1.00 となり, CT, RM, CD いずれも CRP 陰性例に比べ高い値を示した。すなわち CRP が陽性を示す例では, 化学走性が亢進する傾向がうかがわれた。(Fig. 8)

第3項 副腎皮質ホルモンの走性におよぼす影響について

非喫煙気管支喘息患者で CRP 陰性の11例に

において副腎皮質ホルモンの走性におよぼす影響について検討した。副腎皮質ホルモン非使用5例の出現細胞は、マクロファージ $69.3 \pm 5.6\%$ 、リンパ球 $26.7 \pm 6.1\%$ 、好中球 $1.1 \pm 0.5\%$ 、好酸球 $2.9 \pm 1.1\%$ 、好塩基球 0% であった。一方、副腎皮質ホルモン使用中の6例（うち1例は吸入用副腎皮質ホルモンのみ使用、平均使用量prednisolone 換算 $9.6 \pm 10.7 \text{ mg/day}$ ）の出現細胞は、マクロファージ $82.1 \pm 6.7\%$ 、リンパ球 $14.1 \pm 5.2\%$ 、好中球 $0.7 \pm 0.1\%$ 、好酸球 $3.1 \pm 1.6\%$ 、好塩基球 0% であり、両群間に有意の差は認められなかった。肺胞マクロファージの migration value は、副腎皮質ホルモン非使用例では、CT $3.73 \pm 0.92 \text{ mm}$ 、RM $2.09 \pm 0.90 \text{ mm}$ でまた CD は $1.64 \pm 0.34 \text{ mm}$ 、CI は 2.87 ± 0.32 であった。一方副腎皮質ホルモン使用例では、CT $2.73 \pm 0.79 \text{ mm}$ 、RM $1.31 \pm 0.42 \text{ mm}$ で、CD は $1.43 \pm 0.42 \text{ mm}$ 、CI は 2.11 ± 0.33 であり、両群間において肺胞マクロファージの走性に有意の差は認められなかった。すなわち、気管支喘息において副腎皮質ホルモンの少量～中等量の投与は、肺胞マクロファージの走性に影響を与えないことが示唆された。（Fig. 9）

第4項 血清IgE値による走性の検討

非喫煙気管支喘息患者でCRP 陰性の11例において、血清IgE値と肺胞マクロファージの走性との関連を検討した。血清IgE値 500 IU/ml 未満の8症例の出現細胞は、マクロファージ $79.1 \pm 4.8\%$ 、リンパ球 $17.3 \pm 4.6\%$ 、好中球 $0.9 \pm 0.3\%$ 、好酸球 $2.7 \pm 0.9\%$ 、好塩基球 0% であった。一方血清IgE値 500 IU/ml 以上の3例では、マクロファージ $68.8 \pm 11.0\%$ 、リンパ球 $26.6 \pm 10.3\%$ 、好中球 $0.8 \pm 0.2\%$ 、好酸球 $3.9 \pm 2.6\%$ 、好塩基球 0% であり、両群間に有意の差は認められなかった。肺胞マクロファージの migration value は、血清IgE値 500 IU/ml 未満の例では、CT $3.34 \pm 0.81 \text{ mm}$ 、RM $1.80 \pm 0.65 \text{ mm}$ であり、CD は $1.54 \pm 0.31 \text{ mm}$ 、CI は 2.30 ± 0.29 であった。血清IgE値 500 IU/ml 以上の例では、CT $2.79 \pm 0.70 \text{ mm}$ 、RM $1.31 \pm 0.12 \text{ mm}$ であり、CD は $1.48 \pm 0.59 \text{ mm}$ 、CI は 2.05 ± 0.32 であった。すなわち、両群間に有意差は認められず、血清IgE値は肺胞マクロファージの走性に影響を与えないと考えられ

た。（Fig. 10）

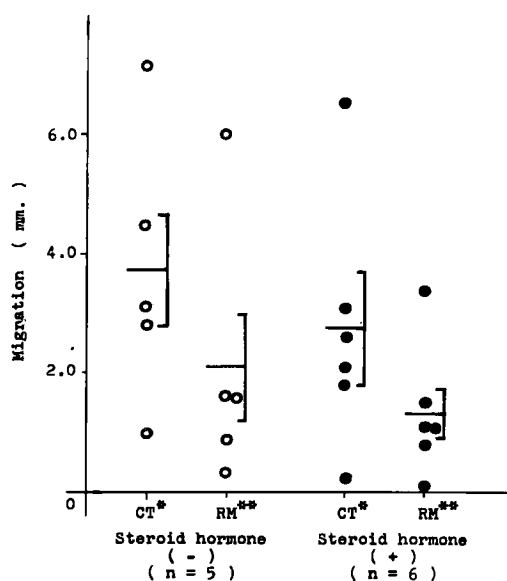


Fig. 9 Glucocorticoid hormone and alveolar macrophage chemotaxis in bronchial asthma (nonsmokers)
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM

*CT: chemotaxis

**RM: random migration

第5項 皮内反応による走性の検討

非喫煙気管支喘息患者でCRP 陰性の11例において、皮内反応と肺胞マクロファージの走性との関連について検討した。前述の7種のアレルゲンエキスのうち1種類以上に対して即時型皮内反応陽性を示す例を皮内反応陽性例、全て陰性の例を皮内反応陰性例とした。皮内反応陰性の5例の出現細胞は、マクロファージ $77.9 \pm 8.1\%$ 、リンパ球 $19.8 \pm 8.6\%$ 、好中球 $0.9 \pm 5.2\%$ 、好酸球 $1.4 \pm 0.7\%$ 、好塩基球 0% であった。一方皮内反応陽性の6例では、マクロファージ $75.0 \pm 5.6\%$ 、リンパ球 $19.8 \pm 4.3\%$ 、好中球 $0.8 \pm 0.1\%$ 、好酸球 $4.4 \pm 1.5\%$ 、好塩基球 0% であり、皮内反応陽性例において好酸球の出現率がやや高い値を示したが、両群間に有意の差は認められなかった。肺胞マクロファージの migration value は、皮内反応陰性例では、CT $4.32 \pm 1.13 \text{ mm}$ 、RM $2.56 \pm 0.90 \text{ mm}$ であり、CD は $1.76 \pm 0.51 \text{ mm}$ 、CI は 1.81 ± 0.27 であった。皮内反応陽性例では、CT $2.44 \pm 0.29 \text{ mm}$ 、RM $0.91 \pm 0.12 \text{ mm}$ で

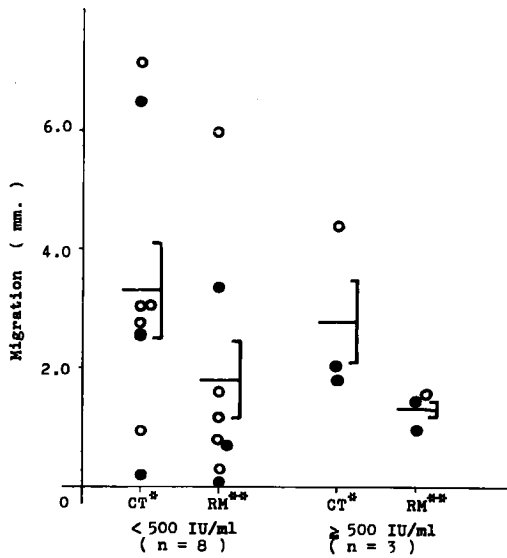


Fig. 10 Serum IgE levels and alveolar macrophage chemotaxis in bronchial asthma (nonsmokers)
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration
●: steroid dependent

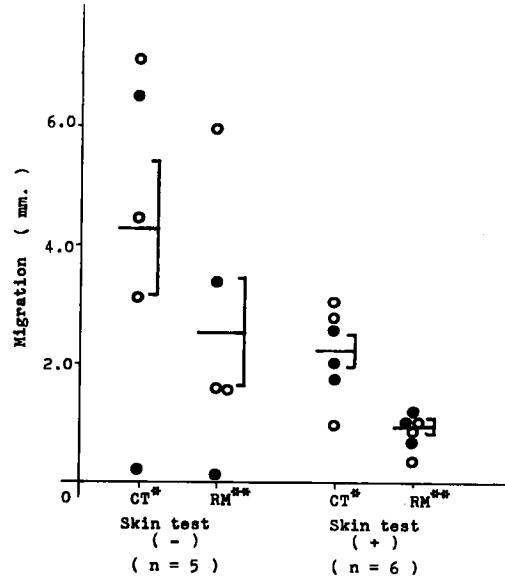


Fig. 11 Skin test and alveolar macrophage chemotaxis in bronchial asthma (nonsmokers)
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration
●: steroid dependent

あり、CDは 1.33 ± 0.25 mm, CIは 2.58 ± 0.29 であった。すなわち、両群間に有意の差は認められなかったものの、皮内反応陽性例において、CT, RM, CD はやや低い値を示し、皮内反応陽性例では化学走性はより低下する可能性が示唆された。(Fig 11)

第4節 サルコイドーシスにおける肺胞マクロファージの走性について

第1項 全症例における走性の検討

サルコイドーシス患者11例における出現細胞の平均は、マクロファージ $52.8 \pm 8.0\%$ 、リンパ球 $45.8 \pm 8.0\%$ 、好中球 $0.3 \pm 0.1\%$ 、好酸球 $1.0 \pm 0.6\%$ 、好塩基球 0% であり、健康人と比較して、マクロファージの出現率の低下 ($p < 0.001$) とリンパ球の出現率の増加 ($p < 0.001$) が認められた。肺胞マクロファージの migration value は、CT 55.06 ± 33.74 mm, RM 30.10 ± 21.84 mmであり、CDは 24.96 ± 12.33 mm, CIは 2.52 ± 0.26 で、健康人との間に走性の有意差は認められなかった。(Fig. 12)

第2項 非喫煙サルコイドーシス患者における走性の検討

非喫煙サルコイドーシス患者6例をCRP 陰性の3例とCRP (±)の3例の2群に分けて検討した。出現細胞は両群とも健康人非喫煙者に比し肺胞マクロファージの出現率は低い値を示し、リンパ球の出現率は高い値を示した。また、この両群間に出現細胞には有意の差は認められなかった。肺胞マクロファージの migration value は、CRP 陰性例では、CT 4.83 ± 1.03 mm, RM 2.23 ± 0.40 mmであり、CDは 2.60 ± 0.73 mm, CIは 2.14 ± 0.30 となり、健康人非喫煙者に比べ有意の低下 (CT: $p < 0.05$, CD: $p < 0.05$) が認められた。すなわち、非喫煙サルコイドーシス例でCRP 陰性の症例では、健康人非喫煙者に比べ、肺胞マクロファージの化学走性は有意に低下している事が認められた。(Fig. 13)。CRP (±)の例では、CT 12.47 ± 7.82 mm, RM 4.51 ± 2.88 mmであり、CDは 7.95 ± 4.94 mm, CIは 2.49 ± 0.35 であった。すなわち、CRP 陰性

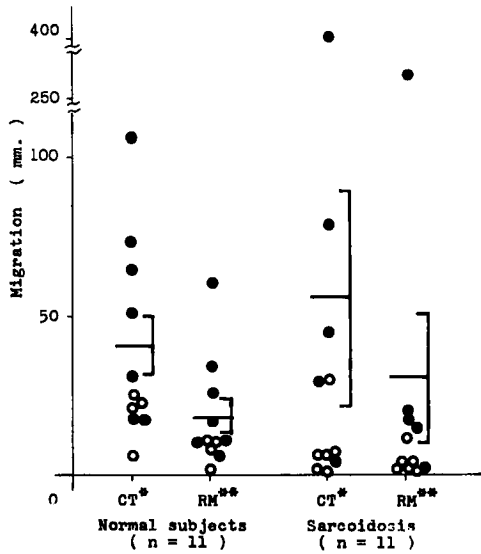


Fig. 12 Alveolar macrophage chemotaxis in sarcoidosis
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration
○: nonsmoker
●: smoker

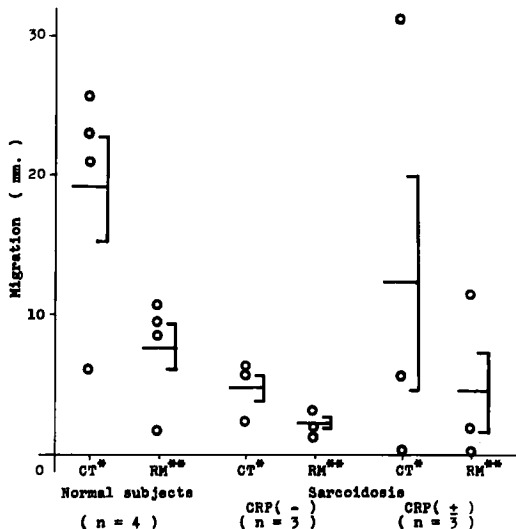


Fig. 13 Alveolar macrophage chemotaxis in sarcoidosis (nonsmokers)
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration

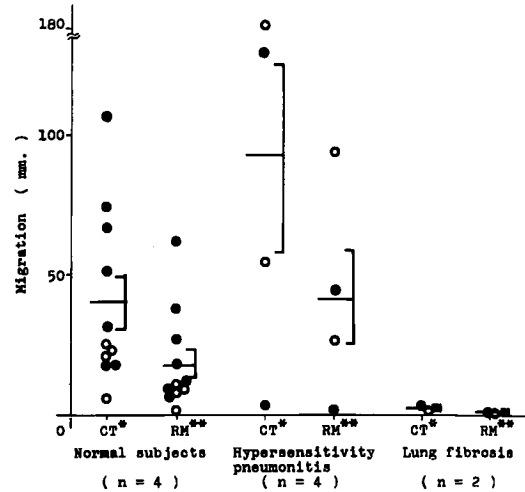


Fig. 14 Alveolar macrophage chemotaxis in patients with hypersensitivity pneumonitis or with lung fibrosis.
Each horizontal bar represents mean $\pm$ SEM
*CT: chemotaxis
**RM: random migration
○: nonsmoker
●: smoker

群と CRP (±) の群の間には有意差は認められなかったが、CRP (±) の例では、CRP 陰性の例に比べて、CT, RM, CD いずれも高い値を示す例が認められた。(Fig. 13)

第5節 その他の呼吸器疾患における肺胞マクロファージの走性について

過敏性肺臓炎4例の出現細胞の平均は、マクロファージ $65.3 \pm 12.3\%$ 、リンパ球 $33.9 \pm 12.6\%$ 、好中球 $0.3 \pm 0.2\%$ 、好酸球 $0.6 \pm 0.3\%$ 、好塩基球 0% であり、健康人と比べて、マクロファージの出現率の低下 ($P < 0.05$) とリンパ球の出現率の増加 ($P < 0.05$) が認められた。肺胞マクロファージの migration value は、CT $92.45 \pm 34.10\text{mm}$ 、RM $41.65 \pm 16.84\text{mm}$ であり、CD は $50.80 \pm 18.48\text{mm}$ 、CI は 2.38 ± 0.21 であった。健康人と比べて、有意差は認められなかったが、非喫煙で CRP 陰性の1例において、CT, RM, CD いずれも著明に高い値が認められた。(Fig. 14)

肺線維症2例の出現細胞の平均は、マクロファージ $85.0 \pm 9.0\%$ 、リンパ球 $12.8 \pm 6.2\%$ 、好中球 $1.8 \pm 0.1\%$ 、好酸球 $0.4 \pm 0.3\%$ 、好塩基球

0%であり、健康人と比べて差は認められなかった。肺胞マクロファージの migration value は、CT 1.62 ± 0.51 mm であり、RM 0.91 ± 0.51 mm であり、CD は 0.71 ± 0 mm、CI は 3.12 ± 1.19 であり、健康人に比べ2例ともCT、RM、CD いずれも低い値が認められた(Fig. 14)。

総括ならびに考案

健康肺においては、肺胞マクロファージは肺間質から肺腔内に入り、resident macrophage となり種々の機能を営み、一部は気管支の mucociliary ladder に乗って肺の外に出、また一部は再び間質に入ると言われている^{18,19)}。そしてこれらの移動に際しては、肺胞マクロファージは化学走性を示していると考えられている。しかし各種呼吸器疾患では、肺胞マクロファージを取り囲む局所環境はそれぞれに変化し、肺胞マクロファージは特徴ある反応を示すと考えられる。今回著者は、肺胞マクロファージの走性を agarose plate 法²⁰⁾で検討したが、agarose plate 法を用いたヒト肺胞マクロファージの走性に関する詳細な報告はまだなく、また従来の Boyden chamber 法²¹⁾においても、呼吸器疾患別の検討は未だ少ない²²⁾。

肺胞マクロファージの走性の検討においては、若干の問題が提起される。まず、末梢血単球に比べて response が低いということであり、さらに同一細胞数を用いても、遊走距離は延びるが遊走細胞数は少ない例や、遊走距離は短いが遊走細胞数は多い例があり、遊走距離のみ又は遊走細胞数のみによる判定では実際の標本の遊走状態をうまく反映しないことが多い。この点を考慮して今回の検討では、方法論で述べたように遊走距離と遊走細胞数の積をそれぞれ chemotactic value, random migration value と定義して用いた。また末梢血単球に比べ response が低いことから、まず agarose plate に L-glutamine を加えることにより肺胞マクロファージの走性の亢進をはかった結果、L-glutamine の添加至適濃度は 1 m mole/plate であることが判明した。さらに medium としては、単球には RPMI 1640 培養液を用いたが、肺胞マクロファージでは M-199 を用いた方がより強い走性が認め

られたため、今回の検討では M-199 を使用した。その他、1つの well に入れる肺胞マクロファージ数は 1×10^5 個が適当であり、また培養時間の検討では、著者の assay ではリンパ球を分離していないので、lymphokine²³⁾ 等の影響を少なくし、なおかつ chemotactic differential が安定している時間を求めて24時間が適当とした。

健康人の肺胞マクロファージに対する喫煙の影響については、これまで種々の項目^{4,5,9,24,25)}について検討されてきている。著者は健康人において肺胞マクロファージの走性に対する喫煙の影響について検討したが、喫煙者において走性の亢進する傾向が認められた。さらに、気管支喘息患者、サルコイドーシス患者においても喫煙者では走性の亢進傾向が認められた。この結果、Boyden chamber 法で測定した Warr²⁶⁾の報告と同じ傾向を示している。一方 Gerald²⁷⁾は、Boyden chamber 法を用いて、急激な喫煙は肺胞マクロファージの化学走性を低下させると報告しているが、これらの差は喫煙の時間的、量的差による為と考えられる。喫煙と出現細胞との関連を検討すると、喫煙者において肺胞マクロファージの増加とリンパ球の減少が認められた。リンパ球の減少は、肺胞マクロファージの絶対数の増加に伴う相対的な面もあるが、喫煙とリンパ球と肺胞マクロファージの走性の関連については今後も検討を重ねる必要があると考えられた。喫煙量と肺胞マクロファージの走性の関係について、10 pack years を境にして2群に分けて検討したが、両群間に差は認められなかった。出現細胞では、喫煙量が多い群において肺胞マクロファージが増加し、リンパ球が減少する傾向がうかがわれた。以上の結果から、各種疾患における肺胞マクロファージの走性を検討する際には、喫煙の影響が大きい為、非喫煙者のみで比較するべきであると考えられた。

気管支喘息における単球の走性については著者は第I編で検討したが、肺胞マクロファージは直接アレルギー反応の場に存在している為、単球よりもより direct に種々の働きに関与していると考えられる。しかし、気管支喘息における肺胞マクロファージの作用については、まだ

まだ未知の点が多い。気管支喘息における肺胞マクロファージの走性については、非喫煙喘息患者でCRP陰性の症例では、非喫煙健康人に比べ有意の化学走性の低下が認められた。一方、CRP(±)を示した2例では、非喫煙健康人と同程度の走性を示した。これは、呼吸器感染症の合併による走性の亢進である可能性が高い。さらに非喫煙気管支喘息患者において、肺胞マクロファージの走性に対する副腎皮質ホルモンの影響を検討したが、少量～中等量の副腎皮質ホルモンの使用では走性に影響は認められなかった。血清IgE値と走性の検討では、血清IgE値500IU/ml以上の群と500IU/ml未満の群において、走性に差は認められなかった。さらに皮内反応と走性の検討においても、皮内反応陽性例と陰性例の間に差は認められなかった。出現細胞の検討では、喘息例では健康人に比べ好酸球の増加傾向にあり、また皮内反応陽性例は陰性例に比べ好酸球は増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。いずれにせよ、気管支喘息患者においては肺胞マクロファージの化学走性は低下していることが示されたが、その原因は未だ不明である。第I編で、血清IgE高値例では単球の遊走性が低下することを示したが、肺胞マクロファージにおいても、今後さらにアトピーとの関係、MIF等のLymphokineとの関係、その他液性成分中の因子等について検討が必要と考えられる。

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫形成疾患であるが、肺において高率に類上皮肉芽腫を形成し、一部は自然消退し、一部は線維化へと進行する。類上皮肉芽腫の形成には肺胞マクロファージが重要な役割をはたすが、その関与の仕方については未知の点が多い。サルコイドーシス11例において出現細胞と肺胞マクロファージの走性について検討したが、健康人と比べリンパ球の出現率が有意に増加していたが、走性に差は認められなかった。非喫煙サルコイドーシス例でCRP陰性の症例と非喫煙健康人を比較すると、サルコイドーシス例において化学走性は有意に低下していた。またCRP(±)の例では、走性はやや高値を示す例や、逆に低値を示す例もあり様々であった。

過敏性肺臓炎もまた類上皮肉芽腫を形成する呼吸器疾患であるが、その成立機序にはⅢ型及びⅣ型アレルギー反応^{28,29)}が関与すると考えられている。過敏性肺臓炎4例の出現細胞は健康人に比べリンパ球が増加していたが、肺胞マクロファージの走性は健康人と有意差は認められなかった。しかし、非喫煙過敏性肺臓炎でCRP陰性の1例において、走性が著しく高値を示した。このように過敏性肺臓炎では、サルコイドーシスの場合と異った肺胞マクロファージの走性傾向を示すものがあるので、類上皮肉芽腫形成の機序に差がある可能性が示唆された。また両疾患とも類上皮肉芽腫は消退することがあり可逆性であるので、病期との関連も走性に影響があると考えられる。以上はCRP陽性例を除いてであるが、CRP陽性が病期を反映しているものとすれば、さらにこの傾向を支持するものであろう。また同様に呼吸器のアレルギー疾患である気管支喘息と過敏性肺臓炎において、肺胞マクロファージの走性が一方では低下、一方では亢進するという相反する傾向を示すとすれば、このことも興味ある現象であり、免疫アレルギー反応機序との関連を含めて今後検討されねばならないと考えられる。

結 語

気管支喘息15例、サルコイドーシス11例、過敏性肺臓炎4例、肺線維症2例、健康人11名について、気管支肺胞洗浄を実施し、出現細胞、肺胞マクロファージの走性について検討した。

1. 健康人において、喫煙者は非喫煙者に比べ、肺胞マクロファージの走性の亢進傾向を示した。この傾向は、気管支喘息例、サルコイドーシス例においても同様に認められた。

2. 非喫煙気管支喘息例では、非喫煙健康人に比べ、化学走性は有意に低下していた。

3. 非喫煙気管支喘息例において、少量～中等量の副腎皮質ホルモンの投与、血清IgE値等は走性に対する影響が認められなかった。

4. 非喫煙サルコイドーシス例では、非喫煙健康人に比べ、化学走性は有意に低下していた。

5. 過敏性肺臓炎では、亢進した走性を示す例が認められ、肺線維症では、低い走性が認めら

れた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導御高聞を賜った恩師木

村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、直接御指導御教示を賜った聖マリア病院内科細川正雄先生に深謝いたします。

なお本論文の要旨は、第31回日本アレルギー学会総会において発表した。

文 献

1. Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Sparkes, R.S. and Golde, D.W.: Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* **192**, 1016-1018, 1976.
2. Golde, D.W., Byers, L.A. and Finley, T.N.: Proliferative capacity of human alveolar macrophage. *Nature* **247**, 373-375, 1974.
3. Bowden, D.H. and Adamson, I.Y.R.: The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *Am. J. Pathol.* **68**, 521-537, 1972.
4. Yeager, H.Jr., Zimmet, S.M. and Schwartz, S.L.: Pinocytosis by human alveolar macrophages. Comparison of smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* **54**, 247-251, 1974.
5. Harris, J.O., Swenson, E.W. and Johnson J.E. III: Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* **49**, 2086-2096, 1970.
6. Laughter, A.H., Martin, R.R. and Twomey, J.J.: Lymphoproliferative responses to antigens mediated by human pulmonary alveolar macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 1326-1332, 1977.
7. Merrill, W.W., Naegel, G.P., Matthay, R.A. and Reynolds, H.Y.: Production of chemotactic factor(s) by *in vivo* cultured human alveolar macrophages. *Chest* **75S**, 224S, 1979.
8. Golde, D.W., Finley, T.N., and Cline, M.J.: The pulmonary macrophage in acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* **290**, 875-878, 1974.
9. Harris, J.O., Olsen, G.N., Castle, J.R. and Maloney, A.S.: Comparison of proteolytic enzyme activity in pulmonary alveolar macrophages and blood leukocytes in smokers and nonsmokers. *Am. Rev. Resp. Dis.* **111**, 579-586, 1975.
10. Blondin, J., Rosenberg, R. and Janoff, A.: An inhibitor in human lung macrophages active against human neutrophil elastase. *Am. Rev. Resp. Dis.* **106**, 477-479, 1972.
11. Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Fariss, B.: Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: A technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* **86**, 128-132, 1961.
12. Finley, T.N., Swenson, E.W., Curran, W.S., Huber, G.L. and Ladman, A.J.: Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann. Intern. Med.* **66**, 651-658, 1967.
13. Patterson, R., McKenna, J.M., Suszko, I.M., Solliday, N.H., Pruzansky, J.J., Roberts, M. and Kochoe, T.J.: Living histamine-containing cells from the bronchial lumens of humans-description and comparison of histamin content with cells of rhesus monkeys- *J. Clin. Invest.* **59**, 217-225, 1977.
14. Reynolds, H.Y. and Newball, H.H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* **84**, 559-573, 1974.
15. 竹山博泰, 谷崎勝朗, 細川正雄, 多田慎也, 中村之信, 原田 寛, 佐藤利雄, 木村郁郎: 気道細胞反応からみた気管支喘息の病態に関する研究—気管支肺胞洗浄法による検討—アレルギー **29**, 875-881, 1980.

16. 竹山博泰：気道細胞反応からみた呼吸器疾患の研究。第I編：気管支肺胞洗浄法による気管支喘息の病態に関する研究。岡山医学会雑誌 93, 667—683, 1981.
17. Knowles, D.M., II, Hoffman, T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G.: The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. *Cell. Immunol.* 35, 112—123, 1978.
18. Schwartz, L.W. and Christman, C.A.: Alveolar macrophage, migration: influence of lung lining material and acute lung insult. *Am. Rev. Resp. Dis.* 120, 429—439, 1979.
19. Brain, J.D., Sorokin, S.P. and Godleski, J.L.: Quantification, origin, and fate of pulmonary macrophages, In *Respiratory Defense Mechanisms*. Vol.5 Part 2, ed, J.D. Brain, DR Proctor and L.M. Reed. Marcel Decker New York and Basel, pp. 849—892, 1977.
20. Nelson, R.D., Quie, P.G. and Simmons, R.L.: Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115, 1650—1656, 1975.
21. Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453—466, 1962.
22. Golde, D.W., Territo, M., Finley, T.N. and Cline, M.J.: Defective lung macrophages in pulmonary alveolar proteinosis. *Ann. Int. Med.* 85, 304—309, 1976.
23. Warr, G.A. and Martin, R.R.: Response of human pulmonary macrophage to migration inhibition factor. *Am. Rev. Resp. Dis.* 108, 371—373, 1973.
24. Hoidal, J.R., Fox, R.B., LeMarbe, P.A., Perri, R. and Repine, J.E.: Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am. Rev. Resp. Dis.* 123, 85—89, 1981.
25. Mann, P.E.G., Cohen, A.B., Finley, T.N. and Ladman, A.J.: Alveolar macrophages: Structural and functional differences between nonsmokers and smokers of Marijuana and tobacco. *Lab. Invest.* 25, 111—120, 1971.
26. Warr, G.A. and Martin, R.R.: Chemotactic responsiveness of human alveolar macrophages: Effects of cigarette smoking. *Infect. Immun.* 9, 769—771, 1974.
27. Demarest, G.B., Hudson, L.D. and Altman, L.C.: Impaired alveolar macrophage chemotaxis in patients with acute smoke inhalation. *Am. Rev. Resp. Dis.* 119, 279—286, 1979.
28. Caldwell, J.R., Pearce, D.E., Spencer, C., Leder, R. and Waldman, R.H.: Immunologic mechanisms in hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 52, 225—230, 1973.
29. Hasen, P.J., and Penny, R.: Pigeon-breeder's disease: Study of the cell mediated immune response to pigeon antigens by the lymphocyte culture technique. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 47, 498—507, 1974.

**Studies on migration of monocytes and alveolar macrophages
in patients with respiratory diseases**

**Part II. Studies on alveolar macrophage chemotaxis in
patients with respiratory diseases**

Toshio SATO

Second Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. I. Kimura)

Cells were taken from the peripheral lung by bronchoalveolar lavage in 43 subjects including 15 patients with bronchial asthma, 11 patients with sarcoidosis, 4 patients with hypersensitivity pneumonitis, 2 patients with lung fibrosis, and 11 normal adults as controls. Chemotaxis of alveolar macrophage to zymosan activated serum was observed, using an agarose plate method. The results were as follows.

1) The chemotaxis of alveolar macrophages from healthy smokers was increased, compared to that of nonsmokers. The alveolar macrophages from smokers with bronchial asthma or sarcoidosis also showed increased chemotaxis.

2) Alveolar macrophage chemotaxis was significantly decreased in asthma patients (nonsmokers) than in healthy nonsmokers.

3) Alveolar macrophage chemotaxis in asthma patients(nonsmokers) was not influenced by the regimen of small or middle doses of glucocorticoid hormone.

4) The chemotaxis of alveolar macrophages from patients with sarcoidosis(nonsmokers) was significantly decreased, compared to that of healthy nonsmokers.

5) Alveolar macrophage chemotaxis was increased in a patient with hypersensitivity pneumonitis, and decreased in patients with lung fibrosis.

**Key words: alveolar macrophage, chemotaxis bronchial asthma,
broncho-alveolar lavage**