

氏名	しみず たかし 清水 崇
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第155号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Isolation and immunophenotyping of mononuclear cells from human lung tissue (ヒト肺組織からの単核球の分離およびその免疫表現型)
論文審査委員	主査 教授 内藤 眞 副査 教授 下條 文武 副査 教授 鈴木 榮一

#### 博士論文の要旨

[目的]これまで肺組織中の細胞の解析には、おもに気管支肺胞洗浄 (BAL) と、免疫組織化学を含む病理学的検討が行われてきたが、BAL では主に洗浄した気道粘膜表面と肺胞腔内に存在する細胞しか採れず、また病理検査では生検肺の形態学的な評価や、切片上での免疫学的な評価は可能だが、生検肺全体の定量的な評価はほぼ不可能である。そこで生検肺組織から単核球を抽出し、肺組織全体に含まれる単核球をフローサイトメトリーにて解析し、生検肺組織内の炎症細胞の定量的な評価を試みる。また肺組織中より得られた単核球の肺内での局在を確認するため、肺組織の免疫染色を行う。

[対象]他疾患で切除された肺葉の非疾患部分 19 例および、明らかな疾患の認められなかった健常者の末梢血 12 例。

[方法]他疾患にて肺葉切除が行われた肺組織の非疾患部分を切除し、洗浄後細切する。collagenase にて処理し、金属メッシュにて濾過、phosphate-buffered saline (PBS) に  $2 \times 10^6$  cells/ml となるよう浮遊させる。また健常者よりヘパリン加にて末梢血を採取し、Ficoll を用いて単核球を分離、同様に PBS に  $2 \times 10^6$  cells/ml となるよう浮遊させる。こうして得られた細胞を抗 CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD161 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて解析を行う。また肺組織の凍結切片を用い抗 CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, CD161 抗体にて免疫染色を行う。フローサイトメトリーでのリンパ球領域において、肺組織および末梢血からの分離単核球での CD45 陽性細胞の割合を

Mann-Whitney の U 検定を用いて解析した。なお P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

#### [結果]

肺組織より得られた単核球のフローサイトメトリー解析を行ったところ、リンパ球領域における  $92.1 \pm 7.8\%$  の細胞が白血球の共通抗原である CD45 を発現していた。末梢血より分離した単核球において同様の解析を行ったところ、CD45 の発現率は  $91.5 \pm 12.5\%$  であり、これらに有意差は認められなかった。

肺組織より分離したリンパ球のうち、CD4 陽性細胞は 32.6% で、CD8 陽性細胞は 40.4% であった。その他の細胞は CD4・CD8 ともに陰性であり natural killer cell (NK cell) であろうと考えられた。フローサイトメトリーでの monocyte-macrophage の領域における CD68 の発現率は、肺組織より分離した細胞では 46.1% であり、末梢血より分離した細胞でのそれよりも高かった。

肺組織の PBS による洗浄効果を見るために、抗 CD68 抗体にて洗浄前後の肺組織の免疫染色を行ったところ肺胞腔のほとんどの肺胞マクロファージは除去されていた。また T 細胞は血管やリンパ管の周囲に多く認められたが、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の局在に差は認められなかった。CD20 陽性細胞はリンパ濾胞内に多く認められた。CD161 陽性細胞は血管・リンパ管周囲や胸膜の近傍に多く認められた。CD68 陽性細胞は肺胞腔内、および肺間質に認められた。

#### [考察]

肺組織を酵素にて処理し単核球を分離するという方法を human の肺組織にて試みた。分離された細胞のフローサイトメトリー解析を行った結果、リンパ球領域の多くが白血球の共通抗原である CD45 を発現しており、末梢血から分離した細胞での CD45 発現率との間に差は認められなかった。よって本法にて肺組織からの単核球の分離が可能であることが分かった。

BAL は多くの肺疾患において有益な方法ではあるが、肺の一部しか洗浄することができず、また解剖学的な理由からその洗浄部位は中葉や舌区となることが多い。また疾患によっては炎症細胞は肺間質内にも浸潤しており、BAL ではそれらの細胞の回収は不可能である。今回我々の行った方法で得られた単核球は肺間質に存在していた可能性があり、本法は間質性肺疾患の新たな評価法となりうるかもしれない。また本法によって得られた炎症細胞を解析することは、炎症性肺疾患のメカニズムを解ききっかけとなるかもしれない。

この研究における問題点としては、単核球の分離を行う肺組織を肺腫瘍のある肺葉から採取している点があげられる。肺組織からの分離単核球ではNK細胞の割合が増加していたが、肺腫瘍の存在が影響している可能性は否定できない。炎症性肺疾患患者での肺胞洗浄液中の単核球と、肺組織からの分離単核球との比較を行った研究は現在進行中である。

(論文審査の要旨)

本研究では生検肺組織から単核球を抽出し、肺組織全体に含まれる単核球をフローサイトメトリーにて解析し、生検肺組織内の炎症細胞の定量的評価を試みた。

19例の肺癌手術症例において、切除された肺葉の非疾患部分を対象として、肺組織の非疾患部分を細切・酵素処理し、単核球を分離した。そしてこれらの単核球の細胞表面抗原の解析を行った。

肺組織より得られた単核球のフローサイトメトリー解析を行ったところ、リンパ球領域における90%以上の細胞が白血球の共通抗原であるCD45を発現していた。それらの単核球の細胞表面抗原はCD4/CD8=32.6%/40.4%であり、残りの細胞の多くはNK cellであった。肺組織中の肺胞マクロファージはその処理過程において洗浄・除去されていることが光顕でも確認されており、今回得られた単核球は肺間質に存在していたと思われる。

本法により肺間質からの単核球の分離が可能であり、間質性肺疾患等の新たな評価法となる可能性がある。肺組織からの炎症細胞の分離法を確立した点、およびそれらの細胞表面抗原の解析から新知見を得た点に、本研究の学位論文としての価値を認める。