

症 例

肺局所の細胞からのサイトカイン産生能を測定し得た 原発性肺クリプトコッカス症の1例

阿部 航 良永 倫子 石松 祐二
 岩下 徹二 松原 祐一 前崎 繁文
 朝野 和典 門田 淳一 河野 茂

要旨：29歳の女性，検診にて胸部異常影を指摘されて，精査・加療目的にて1996年7月2日当科に入院した．胸部X線写真上右下肺野に散在する1cm大の結節影を認めた．気管支鏡検査にて右B8より経気管支的肺生検（TBLB）と気管支肺胞洗浄（BAL）を施行した．BAL液中に肺胞マクロファージによる酵母様真菌の貪食像がみられ，培養にて*Cryptococcus neoformans*と同定された．BAL液中の細胞より産生されたサイトカインでは，Interferon（IFN） γ やInterleukin（IL）10が治療前に高値を示し，治療後に減少を認めた．IL-2やIL-4は変化がなく，特にIL-4は測定感度以下であった．肺局所における感染成立にIFN- γ やIL-10が重要な役割を果たしている可能性が示唆された．

キーワード：肺クリプトコッカス症，気管支肺胞洗浄，サイトカイン

Primary pulmonary cryptococcosis, Bronchoalveolar lavage, Cytokine

はじめに

近年，世界的な後天性免疫不全症候群の爆発的流行に伴い，深在性真菌症の増加が重要な問題になっている．臨床の場で用いられる抗真菌薬は限られており，副作用対策や耐性菌の出現などのため新規治療薬の開発が急務となっている．また，真菌症の病態解明がすすむことで，ワクチンなどの新たな治療法の開発も期待されている．1986年にMosmannらにより，helper T細胞はサイトカイン産生のパターンでtype 1とtype 2に分けられることが報告された¹⁾．type 1 T細胞はInterleukin（IL）2，Interferon（IFN） γ を産生し，type 2 T細胞はIL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-13を産生して，type 1 cytokine-type 2 cytokine networkを形成している．抗腫瘍作用や感染症の分野で，その作用が研究されているが，近年，マウスを用いた実験系で，複数の報告者によって，type 1 cytokine networkがクリプトコッカス感染症の防御に重要な役割を果たしていることが報告された²⁾⁻⁵⁾．しかし，実際のヒト肺クリプトコッカス感染症における，これらサイトカインの動態は不明である．

今回，我々は，29歳の女性の原発性肺クリプトコッカス症の患者を経験したので，気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage，以下BAL）を施行し，BAL液中の

リンパ球サブセット，およびBAL細胞からの産生サイトカインを測定し，その解析を行った．

症 例

症例：患者は29歳，女性，職業は保母．

既往歴：18歳時虫垂炎，27歳時子宮筋腫．喫煙歴は2本/日で5年間，非飲酒家．

家族歴：祖父；胃癌，父；肺良性腫瘍，母；高血圧，叔母；糖尿病．

環境調査：職場である保育園の駐車場に鳩の糞が認められたが，培養の結果，*Cryptococcus neoformans*（以下*C. neoformans*）は認められなかった．鳩の飼育歴もなかった．

現病歴：1996年5月7日，職場の定期健康診断にて胸部X線上，右下肺野の胸部異常影を指摘された．同年6月4日近医を受診し，胸部X線，断層写真，胸部CTにて多発する大きさ1cm大の結節影の集族を指摘された．感冒薬を処方されたが陰影の消失が認められなかったため，精査・加療目的にて，同年7月2日当科へ入院となった．

入院時現症：身長158cm，体重50.2kg，体温36.5度，血圧100/56mmHg，脈拍72/分整，貧血や黄疸などはなく，胸部に心雑音やラ音なども聴取されなかった．腹部は平坦で，軟らかく，浮腫も認めなかった．また，髄膜刺激症状などの神経学的異常もなかった．

入院時検査所見：血液生化学データでは，軽度の貧血

Table 1 Laboratory data on admission

Hematology			
WBC	5,900 (/mm ³)	Na	141 (mEq/l)
Nt	55 (%)	K	4.3 (mEq/l)
Eo	1 (%)	Cl	108 (mEq/l)
Ly	35 (%)	FBS	92 (mg/dl)
Mo	8 (%)	Tumor markers	
Ba	1 (%)	CEA	0.1 (ng/ml)
RBC	411 (10 ⁴ /mm ³)	NSE	7.8 (ng/ml)
Hb	11.8 (g/dl)	SCC	3.1 (ng/ml)
Plt	19.6 (10 ⁴ mm ³)	PPD	
Biochemistry		skin test	0 × 0/25 × 27 mm
TP	5.8 (g/dl)	IgG	1,061 (mg/dl)
TB	0.6 (mg/dl)	IgA	142 (mg/dl)
DB	0.3 (mg/dl)	IgM	139 (mg/dl)
GOT	14 (IU/l)	ESR	5/11 mm/hr
GPT	13 (IU/l)	<u>Serum C. neoformans antigen</u>	
LDH	434 (IU/l)	positive (× 128)	
AL-P	79 (IU/l)	(1 3)-D-glucan	7.8 (pg/ml)
-GTP	9 (IU/l)		
BUN	13 (mg/dl)		
Cr	0.8 (mg/dl)		
CRP	0.10 (mg/dl)		

Table 2 Cerebrospinal fluid

Appearance	Clear, Turbidity (-)	Bacterial examination		
Pressure	Start	12.5 cmH ₂ O	India ink stain	Negative
	End	5.5 cmH ₂ O	Bacteria	Negative
Cell counts		1/3	Fungus	Negative
Protein		22 mg/dl	<u>C. neoformans antigen</u>	
Glucose		55 mg/dl	Positive (× 1)	
Electrolyte	Na	145 mEq/l		
	Cl	122 mEq/l		



Fig. 1 Chest X-ray on admission, showing multiple nodules bilaterally particularly in the right lower lung field.

と低蛋白血症を認めたが、炎症反応については、陰性であった。また、入院時の血清クリプトコッカス抗原が陽性(128倍)であった(Table 1)。脳脊髄液検査では、外観は透明で混濁なく、細胞数も1/3と増加していなかった。細菌も真菌も培養検査は陰性であったが、髄液のクリプトコッカス抗原は陽性(1倍)であった(Table 2)。

入院時胸部X線写真：右下肺野を中心に5~10mmの結節影が両側肺野に散在していた(Fig. 1)。

入院時胸部CT写真：両側上肺野を中心に全肺野に広がる5~10mm前後の多発結節影を認めた。空洞形成や胸水などは認めなかった。縦隔リンパ節の腫大はなかった(Fig. 2 A, 2 B)。

気管支鏡検査：肺クリプトコッカス症が強く疑われたため、確定診断をつけるために患者の同意のもとに、気管支鏡検査を施行した。肉眼的に気管支粘膜に異常を認めなかった。BALは胸部CT画像から病変部と思われ

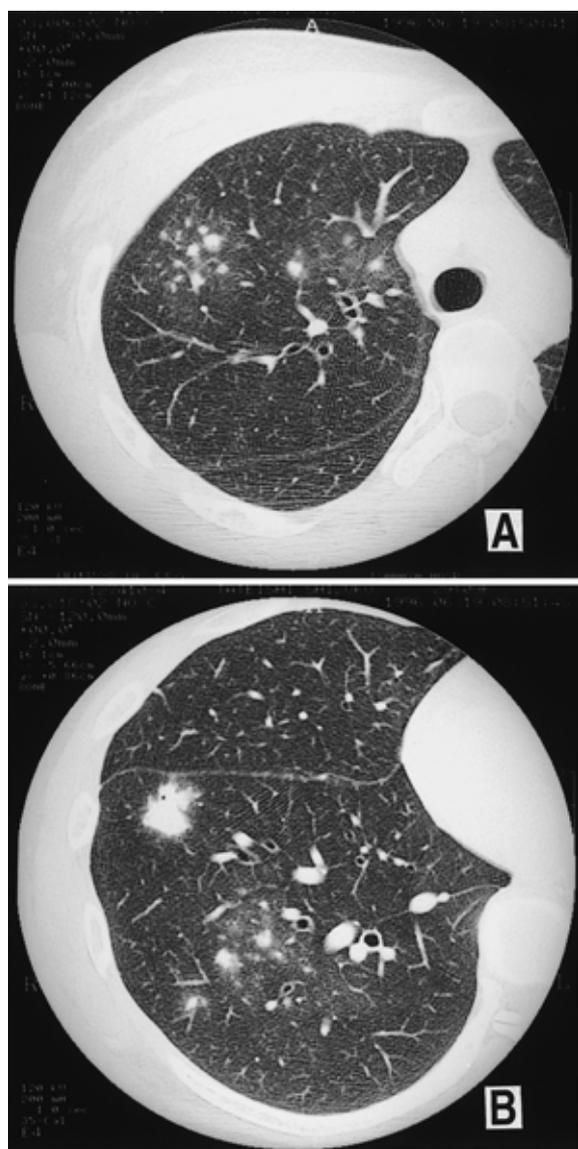


Fig. 2 Computed tomography of the chest on admission, showing multiple small nodules in both lung fields, especially right S 3 (A) and right S 8 (B). No mediastinal lymph node swelling, cavities or pleural effusion were observed.

た右 B 8 a に気管支鏡（オリンパス社製：BF-P 20）を楔入し，あらかじめ 37℃ で温めておいた生理的食塩水 50 ml を注射器を用いて，経気管支的に静かに注入し，これをそのまま回収した．この作業を 4 回繰り返す，生理的食塩水は計 200 ml 使用した．得られた BAL 液は，2 重のガーゼで濾した後，細胞濃度を 2.0×10^5 /ml に調整し，このうちの 0.2 ml をサイトスピン（ $160 \times g$ で 2 分間遠心）にかけ，プレパラートを作製した．これをメイグムザ染色したのち，顕微鏡下に細胞成分を計測した．治療前の BAL 液所見は，総細胞数が増加し，分画はリンパ球の著しい増加を認めた．CD 4/8 比は 0.62 と低値

Table 3 Bronchoalveolar lavage fluid

	First (Jul. 4)	Second (Aug. 8)
Total cell counts ($\times 10^5$ /ml)	2.49	2.86
Cell differentiation (%)		
AM	58.1	79.6
Ly	40.4	19.7
Nt	1.1	0.7
Eo	0.2	0
Ba	0.3	0
Lymphocyte expression marker (%)		
CD4	35.4	22.9
CD8	57.5	66.0
CD4/8 ratio	0.62	0.34
Cytokine (pg/ml)		
Interleukin-2	16.8	20.7
Interleukin-4	* N.D.	* N.D.
Interleukin-10	296.5	34.6
Interferon-gamma	773.0	24.2
<i>C. neoformans</i> antigen	$\times 64$	$\times 16$

*; Not detected

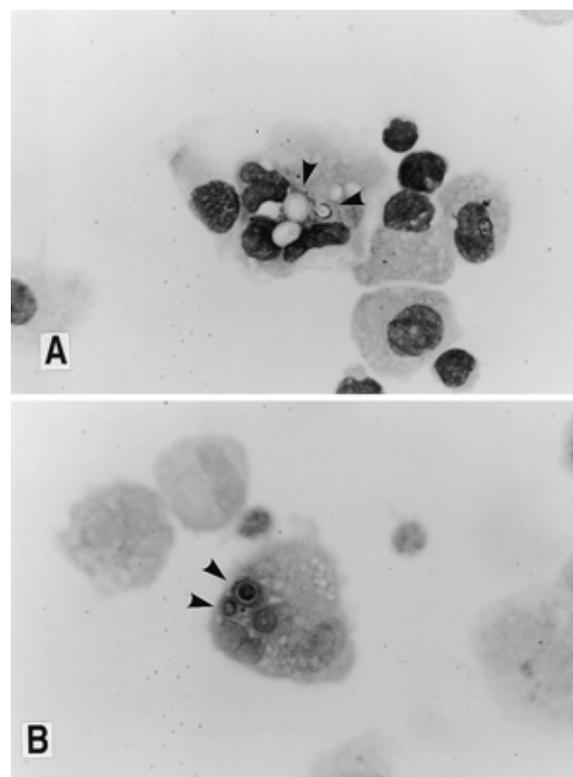


Fig. 3 *Cryptococcus neoformans* (arrow head) phagocytosed by a macrophage in BAL fluid taken from right S 8. (A : May-Giemsa stain, $\times 1000$), B : PAS stain, $\times 1000$)

であった (Table 3). また, BAL 液中からメイギムザ染色にてマクロファージ内に微生物の存在を疑い, PAS 染色にて確認したところ PAS 陽性に染色された莢膜を有する *C. neoformans* を認めた (Fig. 3 A, 3 B).

サイトカインの測定: マクロファージとリンパ球は, 治療前後の BAL 液から Ficoll 比重遠心法によって分離し, それぞれを 1.0×10^6 /ml の濃度 (比率 1:1) に調整後, 96 穴のプレート上に 200 μ l ずつ分注した. さらに分注した培養細胞を 10 μ g/ml の Concanavalin A で刺激した後, 経時的に上清を採取し, サイトカインを測定するまで 80 にて保存した.

サイトカインの測定は, 保存しておいた上清を室温にて解凍後, アマシャム社製ヒト ELISA kit を用いて行った. 項目は IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ について解析を試みた. サイトカインの結果については後述する.

経気管支的肺生検: 右 B8a より得られた標本内に PAS 染色陽性の *C. neoformans* を認めた (Fig. 4 A, 4 B).

経過: 入院時の血清でクリプトコッカス抗原が 128 倍を示し, 気管支鏡検査で TBLB 標本と BAL 液の培養より, *C. neoformans* が同定されたこと, また免疫不全をきたす基礎疾患の存在は認められなかったことから, 原

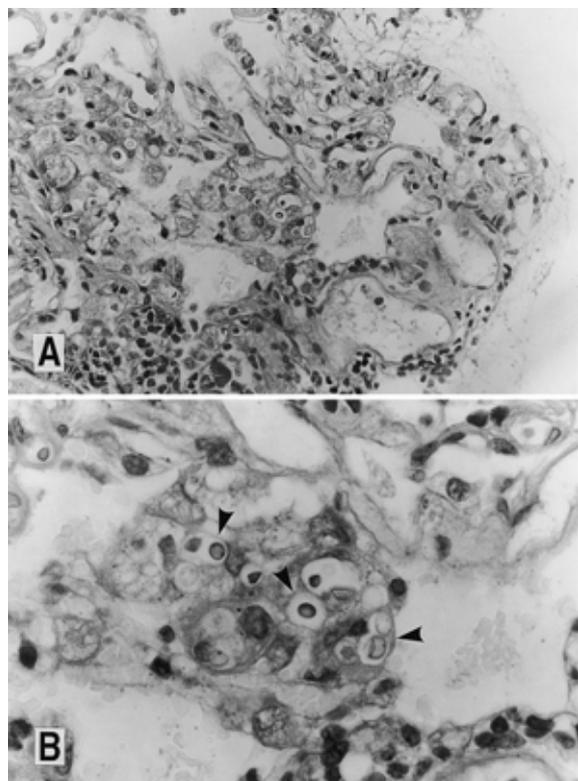


Fig. 4 Lung biopsied specimen from right S8, showing the microorganisms (arrowhead) in the alveoli and interstitium. (A: hematoxylin eosin stain, $\times 400$). (B: hematoxylin eosin stain, $\times 1000$)



Fig. 5 Chest X-ray taken on September 30, 1996, after fungicidal therapy, showing that the multiple nodules had disappeared.

発性肺クリプトコッカス症と診断した. 治療は 7 月 12 日よりフルコナゾール 400 mg/日とフルシトシン 100 mg/kg/日の併用療法を開始した. 開始後 4 週目の 8 月 8 日に 2 回目の BAL を施行した. 2 回目の BAL 液中の細胞濃度に変化はなかったが, リンパ球分画の減少 (19.7%) と肺胞マクロファージの増加 (79.6%) が認められた. CD 4/8 比は 0.32 と低値をとっており変化はなかった. 治療前後で血清抗原価は 128 倍のまま変化はなかったが, 胸部 X 線上, 全肺野にみられていた結節影は消退傾向を認め (Fig. 5), 胸部 CT 写真でも rS 3 領域の病変の消失と rS 8 領域の結節影の縮小傾向を認めた (Fig. 6 A, 6 B). また BAL 液中抗原価も治療前に 64 倍と異常高値だったが, 治療後に 16 倍まで減少していた. サイトカインの結果であるが, IL-2 は治療前に 16.8 pg/ml, 治療後に 20.7 pg/ml とあまり変化しなかった. IL-4 は治療前, 治療後ともに測定感度以下であった. IL-10 は治療前に 296.5 pg/ml と著明高値であったが, 治療後には 34.6 pg/ml と著明に減少していた. IFN- γ も IL-10 と同様に治療前に 773.0 pg/ml と異常高値であったが, 治療後に 24.2 pg/ml と著明に減少していた. 治療前後で IL-10 と IFN- γ の変動が強く認められた (Table 3). 1996 年 11 月 8 日現在, 患者は外来にて, 画像や血清学的検査により経過観察中であるが, 抗真菌薬を 2 剤とも中止した後も増悪傾向は認められていない.

考 案

今回, BAL 液より菌体が顕微鏡下に発見され, BAL 液と TBLB 組織の培養にて *C. neoformans* が同定されたことから, 肺原発クリプトコッカス症との確定診断に至った. 本症は, 過去には診断に難渋することが多く,

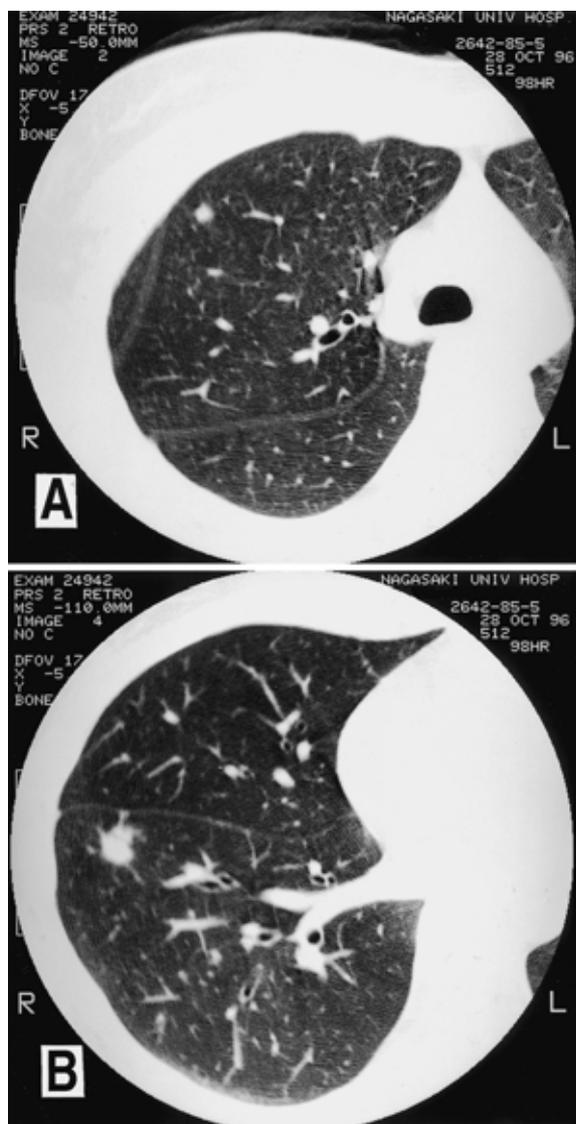


Fig. 6 Chest CT after fungicidal therapy taken in October 28, showing a decrease in the number and size of the nodules bilaterally, especially at right S3 (A) and right S8 (B).

試験開胸肺生検によって診断がなされることも稀ではなかったが、最近では気管支鏡検査の普及により確定診断されることが多くなっている。私達の検討では、全陽性検体の頻度は TBLB 7 検体中 3 検体 (43%)、BAL 液 14 検体中 3 検体 (21%) であった⁶⁾。

解析に使用した BAL 液は、画像上病変と思われる箇所より得られた検体から病原真菌が認められたことから、炎症局所の病態を反映していると判断した。得られた BAL 液は細胞濃度とリンパ球分画の上昇がみられ、CD 4/8 比は低下していた。前田らは血清クリプトコッカス抗原価が高値であった 1 症例の BAL を報告しているが、やはりリンパ球分画の増加を認めており、この結果から肺クリプトコッカス症の病態は、lymphocyte al-

veolitis ではないかと述べている⁷⁾。我々の成績では、リンパ球分画は治療後には正常化したことより、治療によって病原真菌が病変部より消失するのに伴ってリンパ球の病態に対する関与が少なくなったためと思われる。リンパ球の感染防御への関与が推定された。BAL 液中のリンパ球表面マーカーの CD 4/8 比の低値に関しては、AIDS 患者においてみられるように、感染局所における helper T 細胞の減少を *C. neoformans* 感染の原因と考えるか、*C. neoformans* 感染に伴う 2 次的な変化と考えるか、不明である。しかし、マウスを用いた実験系において、抗 CD 4 抗体投与群で、*C. neoformans* 感染に対して抵抗性が減弱することや、*C. neoformans* の死菌を経気道的に投与すると 8 日目の組織中には CD 4 陽性リンパ球が優位になるという報告から、ヒトにおける BAL 液中リンパ球表面マーカーの CD 4/8 比の低下は、*C. neoformans* に対する易感染の原因となっていた可能性が推察された。

Hoag らは、クリプトコッカスに感受性を有さないマウスにおいて IL-2 が有意に増加していたと報告し⁸⁾、Kawakami らは、抗 IFN- γ 抗体にて前処理したマウスに病原菌を気道内注入した実験系で、クリプトコッカスの増殖が抑制されず全身に播種したことから、IFN- γ が感染防御に重要な因子となっていることを証明した^{2,3)}。IFN- γ は T 細胞や NK 細胞から産生され、マクロファージを活性化することが知られている。また、活性化したマクロファージは、IL-12 を産生することで type 0 T 細胞を type 1 へと分化させる。さらに、Kawakami らは、IL-12 を気道内に注入することで、クリプトコッカスの肺からの全身性播種を阻止することを報告し、感染防御の早期には IL-12 が不可欠であると述べている⁴⁾。最近、Clemens らは、マウスの実験的クリプトコッカス髄膜炎感染症モデルで、IL-12 を加えることで fluconazole の殺菌作用が増強したことを報告し、IL-12 が感染防御に重要な役割を果たしていると述べている⁵⁾。これらから、クリプトコッカスに対する感染防御機構において、Th 1 細胞が重要な役割を果たしていることが、マウスの実験系より明らかとなっている。

一方、IL-10 は、マウスでは Th 2 細胞から産生されることが広く知られ、Th 1 細胞への分化を抑制し、クリプトコッカスに対する感染を助長する原因であるとする報告がみられる⁸⁾。本症例は BAL 細胞培養上清中の IFN- γ と IL-10 が治療前に高値を示していたことから、Th 1 系、Th 2 系とも関係していることが示唆される。しかし Sornasse らは、ヒトの IL-10 産生は type 2 細胞だけでなく、type 1 T 細胞からも産生されることを報告しており⁹⁾、また今回測定した type 2 cytokine である IL-4 は、治療前後で測定感度以下であり、培養上清中に

認められなかったことから、本症例では type 1 cytokine immune system のみが働いている結果である可能性も考えられる。一方、健康人から得られた BAL 液中細胞を ConA で刺激したサイトカインの成績や報告などはなく、今回の我々の検討ではクリプトコッカスに対する健康人の反応は不明であり、この IFN- γ と IL-10 の異常がクリプトコッカス感染の成立に特異的反応かどうかは不明である。しかし、治療前に高値をとっていた IFN- γ と IL-10 が、治療後に低下していたことは、治療前後の検討でマクロファージとリンパ球の比率や量は一定に合わせており、BAL 液中細胞成分の違いによる変化とは考えられず、むしろ BAL 液中クリプトコッカス抗原が治療前の 64 倍から治療後に 16 倍と減少していることから、BAL 液中の菌の抗原量の低下に伴うマクロファージ/リンパ球のサイトカイン産生能の変化の為ではないかと考えられた。抗原量の増加は夾膜成分である glucuronoxylomannan 抗原の増加とも関係しており、これについて Kozel らは in vitro の実験系で encapsulated strain の方が acapsulated strain よりも macrophage からの TNF- α や IL-1 beta などの炎症性サイトカイン産生を抑制することを示し、夾膜中の成分である manoprotein と galactoxylomannan が cytokine を抑制する物質であると報告した¹⁰⁾。さらには glucuronoxylomannan が、macrophage からの IL-10 産生を誘導し、cytokine network を通じて炎症性 cytokine の down regulation を起こし、*C. neoformans* の易感染性を作り出すことも報告している¹¹⁾。

以上から、ヒトの肺クリプトコッカス症の感染成立には、肺内でのマクロファージやリンパ球を中心として IFN- γ や IL-10 などのサイトカインが重要な役割を果たしている可能性があると思われた。

なお、入院時に血清 SCC 値が 3.1 ng/ml と高値を示したが、治療後には 0.7 ng/ml に減少し、正常化していた。原発性肺クリプトコッカス症で腫瘍マーカーが異常を示し、治療に伴って正常化した例は、CEA 値が 7.0 ng/ml から 0.8 ng/ml に改善したという、五十嵐らの報告がある¹⁰⁾。彼らは、そのなかで肺泡マクロファージの機能異常が原因ではないかと述べているが、本症例も IL-10 の著明高値から肺泡マクロファージの機能が抑制され、その原因となっていたことも考えられる。しかし、喫煙により気道上皮障害を引き起こし、SCC 値が上昇することがあるため、入院後に禁煙をしたことで正常化した可能性もあり、本症例における機序について明らかではない。

まとめ：気管支鏡検査によって、原発性肺クリプトコッカス症と確定診断した症例において、BAL 液を解析し、サイトカインを主とする肺病変局所の感染防御につ

いて検討したので報告した。

文 献

- 1) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al: Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activity and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 135: 2348-2357.
- 2) Kawakami K, Kohno S, Kadota J, et al: T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: Involvement of IFN- γ and its prospective effect against Cryptococcal infection. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 135-143.
- 3) Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, et al: Contribution of interferon- γ in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *Immunol Med Biol* 1996; 13: 123-130.
- 4) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, et al: IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 208-214.
- 5) Clemens, KV, Brummer E, Stevens DA: Cytokine treatment of central nervous system infection: efficacy of interleukin-12 alone and synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 38: 460-464.
- 6) 河野 茂, 田中研一: 肺真菌症の基礎と臨床 肺クリプトコッカス症 . 臨床と微生物 1993; 20: 169-174.
- 7) 前田重一郎, 田村伸介, 池田寿一, 他: 血清クリプトコッカス抗原価が高値を示した多発性空洞形成の一症例. 日胸疾会誌 1989; 27: 1330-1333.
- 8) Hoag KA, Street NE, Huffnagle GB, et al: Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 487-495.
- 9) Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, et al: Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD 4+ T cells, analyzed at the single cell level. *J Exp Med* 1996; 184: 473-483.
- 10) Kozel TR, Vecchiarelli A, Retini C, et al: Downregulation by Cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infect Immun.* 1995; 63: 2919-2923.

11) Kozel TR, Vecchiarelli A, Retini C, et al: Purified capsular polysaccharide of *cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. Infect Immun. 1996; 64: 2846-2849.

12) 五十嵐知文, 中川 晃, 吉田 豊, 他: 血清 CEA 高値を示した原発性肺クリプトコッカス症の 1 例. 日胸疾会誌 1994; 32: 339-342.

Abstract

Cytokines Produced by Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid from a Patient with Primary Pulmonary Cryptococcosis

Koh Abe, Michiko Yoshinaga, Yuji Ishimatsu, Tetsuji Iwashita,
Yuichi Matsubara, Shigefumi Maesaki, Kazunori Tomono,
Jun-ichi Kadota and Shigeru Kohno

Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine,
1-7-1 Sakamoto Nagasaki, Japan

Cytokines in the culture supernatant of concanavalin A-stimulated macrophages/lymphocytes isolated from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in a 29-year-old patient with primary pulmonary cryptococcosis were evaluated to study the immune reaction against *Cryptococcus neoformans* in the lung. Before fungicidal therapy, levels of interferon- γ and interleukin-10 were markedly elevated, and declined after therapy. There were no changes in interleukin-2 or interleukin-4 throughout the clinical course. This result suggests that IFN- γ and IL-10 may be involved in the immune reaction against pulmonary cryptococcosis.