

原 著

肺の遅延型アレルギー反応(肺肉芽腫形成過程)における  
気管支随伴リンパ組織(BALT)の役割について

早川啓史・佐藤篤彦

浜松医科大学第2内科  
受付 昭和60年11月14日

A STUDY OF THE ROLE OF BRONCHUS-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE  
(BALT) IN DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVE REACTION (GRANULOMA  
FORMATION) OF THE LUNG

Hiroshi HAYAKAWA\* and Atsuhiko SATO

(Received for publication November 14, 1985)

Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is considered to play an important role for the local immune response of the lung. We have been studying the function of BALT in delayed-type hypersensitive reaction of the lung. Our previous report showed that BALT of rabbits was histologically divisible into four different areas: lymphoepithelial layer (LE), dome area (DA), follicular area (FA), and parafollicular area (PFA), and that the structure of BALT changed in rabbits sensitized with heat-killed bacillus Calmette Guérin (BCG). In the present study we researched the distribution of immunoglobulin (Ig) (IgG, IgA, and IgM)-positive cells and T cells in the lungs and BALT in both normal rabbits and rabbits with pulmonary granulomas induced by primary and secondary intravenous sensitization with heat-killed BCG. We detected Ig positive cells by the direct immunoperoxidase technique, using horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti rabbit IgG-, anti rabbit IgA-, and anti rabbit IgM-IgG antibody. Also we detected T cells by the indirect immunoperoxidase technique, using M-108 monoclonal antibody specific for rabbit T cells.

The following results have been obtained.

1) In the normal rabbit-BALT the distribution of the cells was as follows: LE; This area was consisted mainly of IgG-positive cells, IgA-positive cells and T cells. IgM-positive cells were scarce. DA; IgG-positive cells, IgM-positive cells and T cells could be seen in this area. FA; A center of FA is distributed by a number of surfaces IgM-positive cells. A slight degree of infiltration of IgG-positive cells and T cells was found in this area. PFA; This area was consisted mainly of T cells. There were also a number of IgG-positive cells and IgA-positive cells and small number of IgM-positive cells.

2) In normal rabbits a number of IgG-positive cells and IgA-positive cells were seen within bronchial walls, and a few of these cells were found in bronchiolar walls and alveolar septa. IgM-positive cells distributed sparsely in the bronchial walls. The number of the Ig-positive cells distributing in the bronchial walls was closely related to the degree of the development of BALT.

3) A marked infiltration of IgG-positive cells and IgA-positive cells was seen in the

\* From the Second Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu 431-31 Japan.

peripheral regions of the epithelioid cell granulomas from one day after the secondary BCG-sensitization, and then the number of these cells increased gradually. The number of the cells in the granulomas reached the peak three weeks after the sensitization, and subsequently decreased.

4) The number of sIgM-positive cells in FA markedly increased from four days after the secondary sensitization, and the findings could be recognized continuously for the subsequent five weeks.

The above results suggest that BALT may control the production of immunoglobulins of the lung, which may modify the delayed-type hypersensitive reaction in the lung.

**Key words :** Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT), Delayed type hypersensitive reaction, Local immunity, Pulmonary granuloma, Immunohistochemistry, Immunoperoxidase technique

**キーワード :** 気管支随伴リンパ組織, 遅延型アレルギー反応, 局所免疫, 肺肉芽腫, 免疫組織化学, 酵素抗体法

## 緒 言

肺はガス交換と同時に、外来の侵入抗原に対する免疫臓器として認識されてきている。近年、気道における免疫現象の局在化が注目され、局所性免疫応答と全身性免疫応答に関与するリンパ組織が、気管支壁と細気管支壁に存在することが明らかになってきている。1973年に Bienenstock<sup>1) 2)</sup> がこの気管支随伴リンパ組織 (Bronchus-associated lymphoid tissue: BALT) の形態と機能を提唱して以来、動物実験モデルを用いた BALT の基礎的研究が進められてきた。我々は、病因不明のサルコイドーシスや環境抗原に対する特異沈降抗体の検出のみられる過敏性肺炎などの肉芽腫性肺疾患の病態を解明するために BALT の研究に着手した。既に研究段階として、BCG 死菌を各種経路で投与することにより、家兎において肺肉芽腫反応を実験的に惹起させ、BALT の病態変化を組織学的に検索し、その役割を検討してきた<sup>3) 4)</sup>。

最近、細胞膜表面や細胞中に存在する特異抗原をマーカーとして、それに対応する特異抗体を用いることにより、免疫組織化学的に組織内に浸潤する免疫細胞を同定する酵素抗体法が開発され、細胞の分布状態を検索することができるようになった。今回、我々はその酵素抗体法を用い、正常家兎および実験的肺肉芽腫症家兎における BALT 内並びに肺内の分布細胞の同定を行ない、病態の進展に伴って肉芽腫巣と BALT 内で、いかなる細胞がどのような動態と反応を起こすかを明らかにすることにより、肺の遅延型過敏反応に対する BALT の免疫学的機能を研究した。

## 材料と方法

### 1. 動物

体重 1.8 ~ 2.2 kg の成熟雌性 ニュージーランド白色家兎を使用し、実験期間中は飼料 (RM3, 船橋農場) と水を自由に与えて飼育した。

### 2. 実験的肺肉芽腫症の作製

加熱化 Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 死菌を抗原として用いた。初回感作方法として BCG100 $\mu$ g/0.1ml/Bayol F を耳静脈から注射し、更に 3 週後に BCG5mg/1ml/生理食塩水を静注して二次感作を行なった。二次感作後、1日、4日、1週、2週、3週、4週および 5 週目で感作家兎 1 ~ 2 羽を経時的に脱血死させて免疫組織化学的検索を行なった。

なお、正常対照群としては無処置の家兎 6 羽を使用した。

### 3. 細胞浮遊液の準備

a) 胸腺および膝窩リンパ節細胞：正常家兎を脱血死させ、直ちに組織を摘出し、冷 Hanks balanced salt solution (ハンクス液) 中で細胞浮遊液を作製した。

b) BALT 細胞：Clancy ら<sup>5)</sup> の方法に準じて行なった。脱血死させた正常家兎の肺より、肉眼的に認めうる気管支壁をハサミで摘出し、ハンクス液中で細切した。次にテフロンホモゲナイザーを用いて約 400rpm で 1 分程度ホモゲナイズし、上清を無菌単層ガーゼで濾過して浮遊細胞を回収する操作を約 10 回繰り返した。次いで、この回収液より比重遠心法<sup>6)</sup> で単核細胞分画を分離した。なお、回収細胞分画はリンパ球、マクロファージ、形質細胞がそれぞれ 70%、27%、3% であった。

c) 末梢血細胞：正常家兎の右下静脈血を採取し、比重遠心法<sup>6)</sup> にてリンパ球分画を分離した。

### 4. フローサイトメトリー

各種臓器より得られた細胞浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個) に対し、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗家兎 IgG (H鎖とL鎖に特異性) ヒツジ F(ab)<sub>2</sub>, あるいは

FITC標識抗家兔IgG ( $r$ 鎖に特異性)ヤギF(ab')<sub>2</sub> (いずれも Cappel社)を加え、4°Cで45分間反応させ、洗浄のちEPICS-V (Coulter Electronics社)を用いて免疫グロブリン陽性細胞を検出した。また、T細胞の検出は、第一次抗体としてM-108抗体(抗家兔T細胞単クローン性,UCB社)を用い、4°Cで45分間反応させ、更に二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG(ab')<sub>2</sub> (Cappel社) ⊕ 非動物家兔血清(2%)を加えて同様に反応させ、洗浄の後にEPICS-Vで行なった。

なお、抗体を加えない検体と、二次抗体のみを反応させた検体を対照として用いた。

### 5. 免疫組織化学的検索

1) 固定および包埋: 屠殺直後に気管から冷 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液60mlを注入した後、肺を摘出し、冷PLP液内にて気道軸に対しほぼ直角に横切し、水流ポンプで軽度陰圧をかけて脱気を促した。続いて冷暗所にて、Rotator (Daiichi Radio Isotope社)内で回転させながら約7時間固定し、冷 Phosphate beffer saline (PBS) で洗浄した後、ドライアイス・アセトンを用いて Tissue-Tek II O.C. T. Compound (Miles Laboratories社) 中へ凍結包埋した。次いで Coldtome, Model CM-41 (Sakura社)を用いて凍結切片(約6 $\mu$ )を作製した。

#### 2) 酵素抗体法

(i) IgG, IgA および IgM の各陽性細胞の検出: 抗体として Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗家兔 IgG ( $r$ 鎖特異性) ヤギ IgG, HRP 標識抗家兔分泌型 IgA ヒツジ IgG 並びに HRP 標識抗家兔 IgM ヤギ IgG (いずれも Cappel社)を用いた。

Isobe らの方法<sup>7)</sup>で内因性 peroxidase 活性を阻止した凍結切片標本に上記の各抗体 (PBSで10倍希釈)を加えて室温で約30分間反応させ、3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸で発色後、1%メチルグリーンで核染色を施した。

対照としてHRP標識抗マウスIgG抗体を用い、同様に検索した。

(ii) T細胞の検出: 内因性 peroxidase を不活性化した標本に10%非動物ヒツジ血清を加え、30分間室温に放置した。次いで一次抗体としてM-108抗体を加え、4°Cで約12時間反応させ、更に二次抗体としてHRP標識抗マウスIgGヒツジF(ab')<sub>2</sub> [Cappel社]を加え、室温で90分間反応させ、3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸にて発色後、1%メチルグリーンで核染色した。

対照として、二次抗体のみと反応させた標本を同時に作製し、同様の検索を加えた。

#### 3) IgG, IgA および IgM の各陽性細胞数の定量

##### (i) 気道並びに肺胞領域

気道については、切片標本でその横断面を呈するもの

において、便宜上、内径の太さが1mm以上を大気管支(中枢側)、1mm以下を小気管支(末梢側)として、それぞれの気管支壁に分布する陽性細胞を光顕下で算定した。肺胞領域に関しては、肺胞200個あたりに認められる陽性細胞を算定し、これから肺胞10個あたりの平均出現数を求めた。

##### (ii) 肺肉芽腫領域

類上皮細胞肉芽腫100個における各陽性細胞数より、肉芽腫1個での平均出現個数を求め、更に肉芽腫100個についてマイクロメーターで大きさを計測して肉芽腫1個の占める平均面積を計算し、これらの成績から肉芽腫1mm<sup>2</sup>あたりの各陽性細胞の出現頻度を算定した。

## 結 果

### I. 正常家兔のBALTおよび肺の免疫組織細胞化学的所見

#### 1) BALT

正常家兔のBALTは光学顕微鏡学的にみて、リンパ性上皮 (lymphoepithelial layer: LE), 円蓋域 (Dome area: DA), 濾胞領域 (Follicular area: FA) および傍濾胞領域 (Para follicular area: PFA) の4領域から構成されていることは、前報告<sup>3)</sup>において既に述べた。今回、これら4領域を構成する免疫グロブリン陽性細胞群の同定を行なうとともに、その分布や出現状態を免疫組織化学的に検索した (Fig.1)。

IgG陽性細胞はLE, PFAおよびBALT周辺の粗性結合織内に比較的多く認められるほか、DAやFA内にも散在性に少数ながら認められた (Fig.1-a)。LEに隣接する線毛上皮細胞間には殆んど認められなかった。なお、IgGの細胞局在の状態を強拡大でみると、大部分が細胞質内に認められた。

IgA陽性細胞の分布様式は、IgG陽性細胞の場合とほぼ同様の傾向を示し、LE, PFAおよびBALT周辺部に多数のIgA陽性細胞がみられた (Fig.1-b,c)。しかし、IgG陽性細胞の場合と比べて、DAやFA内では出現頻度は低かった (Fig.1-c)。なお、IgA分子も大部分は細胞質内に認められた。

IgM陽性細胞については前二者と異なり、IgM分子が細胞質内にみられるものだけでなく、細胞膜表面に局在するものも認められた。そのうち、細胞質内陽性細胞はLEとPFAに散在性にみられるのみであった。ところが、細胞膜表面 (Surface: s) IgM陽性細胞は特異な分布様式を呈し、FAの中心部に比較的局限して集簇をつくる傾向が認められた (Fig.1-d)。

次に、抗M-108陽性T細胞の分布をみると、PFAおよび濾胞間領域 (Interfollicular area: IFA) に選択的に分布する傾向がみられることが特徴であった (Fig.2-a)。その他、T細胞はFAやDAにも少数ではあるが

散在性に認められるほか、PFAやIFAからLEの下層にまで入り込んでいる所見もみられた (Fig.2-b)。

Fig. 3は、以上の成績をもとにBALT内のIgG,IgA,IgMの各陽性細胞並びに抗M-108陽性T細胞の分布を模式的にまとめたものである。これをもとに、各領域別に各々の細胞分布の様式を述べる。LEのリンパ性上皮細胞間にはIgG陽性細胞とIgA陽性細胞がかなり多数浸潤しているほか、少数のIgM陽性細胞も散見された。LEの下層にはT細胞の存在もみられた。DAには、主にIgGやIgMの免疫グロブリン陽性細胞とT細胞が混在していた。FAには、多数のsIgM陽性細胞がほぼ中央に分布しているのが特徴であったが、少数のT細胞やIgG陽性細胞も散見された。PFAを構成する主な細胞はT細胞であったが、そのほかにIgG,IgA,IgMの各陽性細胞もみられた。BALT内のみならず、その周囲の粗性結合織内にも多くのIgG陽性細胞とIgA陽性細胞が存在し、これらは気道の粘膜固有層へと連続的な拡がりを見せていた。

BALT内リンパ球のうち、免疫グロブリン陽性所見を示す細胞について、フローサイトメトリーによる蛍光強度の解析を行なったところ、幅広いプロファイルを示す不均一性が認められた (Fig.4-e)。また、IgG陽性細胞についても同様の所見がみられた (Fig.4-f)。これらの事実から、細胞膜免疫グロブリン陽性のいわゆるB細胞と高い免疫グロブリン量を示す抗体産生性B細胞、またはリンパ芽球や形質細胞を含む不均一な細胞群からなることが示唆された。BALT内細胞の中で免疫グロブリン陽性細胞は約50%を占めた。

次に、抗M-108陽性T細胞について同様に解析したところ、胸腺やリンパ節では蛍光強度のプロファイルから、比較的均一な細胞群からなることが示唆された (Fig.4-a, b)。ところが、末梢血リンパ球やBALT内細胞では、蛍光強度からみて不均一性がみられた (Fig.4-c, d)。なお、陽性細胞比率は胸腺、リンパ節、末梢血リンパ球、BALTでそれぞれ94%、83%、77%、36%であった。BALT内ではT細胞の占める割合が、胸腺やリンパ節と比べ低値であることがわかる。

## 2) 気道並びに肺胞領域

Table 1は中枢側気管支から肺胞隔壁に至る領域における、免疫グロブリンおよびそのクラス陽性細胞の出現頻度を示す。免疫グロブリン陽性細胞は、中枢側気管支で最も多く認められ、末梢側になるにつれて出現率は低下した。

各クラス別にその分布状態をみると、IgM陽性細胞は大気管支壁のBALTとそれに近接した周辺部に少数散見されるのみで、IgG陽性細胞とIgA陽性細胞の比率と比べ、極めて低値 (約1/10) を示した。また、細気管支から肺胞領域に至る末梢部分では、殆んど認められ

なかった。一方、IgG陽性細胞とIgA陽性細胞はともに中枢部分から末梢部分まで広範囲にわたり、多数が認められた。IgG陽性細胞の出現率はIgA陽性細胞と比べてやや高値を示した (Table 1)。この出現頻度は中枢側気管支で最も高く、末梢側気管支から細気管支、肺胞となるにつれて次第に低下した。

次に、大気管支においてBALTの発達の程度と免疫グロブリン陽性細胞出現頻度との相関性の有無をみたところ、直径の大小に関係なく、BALTの発達の程度が高いほど全てのクラスの陽性細胞の出現頻度は高く、両者間に強い相関があることが示唆された (Table 2)。

## II. BCG感作家兎の肺およびBALTの免疫組織学的所見

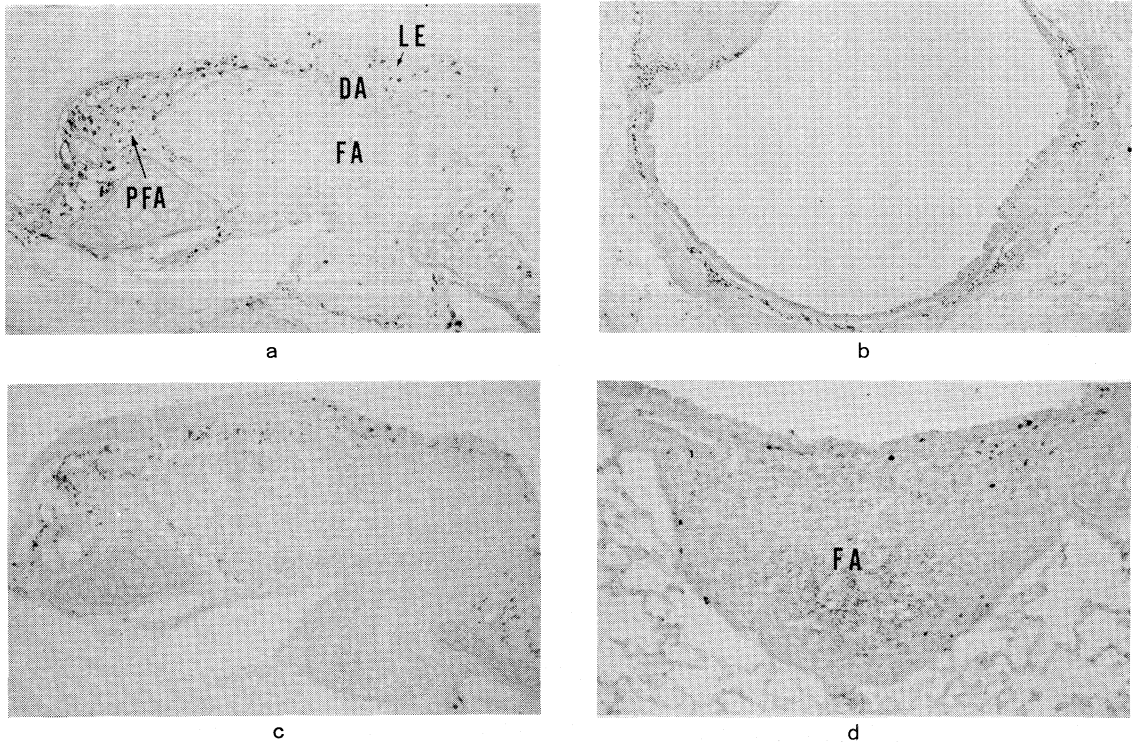
### 1) 肺肉芽腫領域

二次感作1日目から既に肺組織内には類上皮細胞肉芽腫巣が散在性に観察され、2週から3週にかけて更に広範囲において著しい類上皮細胞肉芽腫の形成が認められた。Fig. 5は2週目の肉芽腫領域におけるIgG陽性細胞とIgA陽性細胞の分布を示す。いずれの細胞も肉芽腫の辺縁部を主体として著しい浸潤像が認められる。Fig. 6は肉芽腫反応における各免疫グロブリン陽性細胞の出現頻度の経時的推移をまとめたものである。IgG陽性細胞は感作後1日目で既にかなりの数が認められ、以後経時的に次第に増加した。3週目でピークとなり1日目の値の約2倍に達し、その後漸減した。IgA陽性細胞は1日目において他の二者より高値を示すが、その後1週目にかけて一旦減少した後、3週目まで再び漸増し、その後次第に減少した。観察期間のあいだ、IgA陽性細胞はIgG陽性細胞に比べ1日目を除いて低値を示した。IgM陽性細胞の出現頻度は5週目までの全経過を通して低値を示したが、IgA陽性細胞と同様の推移を呈した。即ち、1日目で比較的高値を示し、再び3週目にピークを作り、以後漸減した。肺肉芽腫病変部位に出現するこれらの免疫グロブリン陽性細胞群は、いずれも細胞質内に各免疫グロブリンの陽性所見を示すことから、免疫グロブリンの産生～分泌型であることが示唆された。

なお、肉芽腫領域には抗M-108陽性T細胞は認められなかった。

### 2) BALT

次に、肺肉芽腫反応経過中におけるBALTの各領域での各免疫グロブリン陽性細胞について検索した。IgG陽性細胞とIgA陽性細胞の分布状態や数値については、前述の正常家兎の場合 (Fig.1)と比べて特に著変は認められなかった。それに対して、FAのsIgM陽性細胞は正常時と著しく異なり、感作後4日目から著増し、以後5週目に至っても同じ傾向が続いていた。5週目のBALTをみると、FAでのsIgM陽性細胞の増加は著しく、DAのみならずLEおよび濾胞周辺部にまで陽性細



**Fig. 1.** Localization of immunoglobulin-positive cells in bronchial walls and BALT from a normal rabbit. These cells were detected by the direct method of immunoperoxidase technique.

a) BALT labeled with anti IgG antibody. Note the presence of a number of IgG-positive cells in lymphoepithelial layer (LE) and parafollicular area (PFA) of the BALT and also in the surrounding connective tissue. A slight degree of infiltration of these cells can be seen in follicular area (FA) and dome area (DA). Methylgreen,  $\times 25$ .

b) A bronchial wall labeled with anti IgA antibody. A massive infiltration of IgA-positive cells can be seen diffusely in lamina propria mucosa of a bronchial wall. Methylgreen,  $\times 10$ .

c) High magnification view of b). A number of IgA-positive cells are found in LE and PFA of the BALT and the surrounding connective tissue, but rarely in DA and FA. Methylgreen,  $\times 25$ .

d) BALT labeled with anti IgM antibody. Note a massive accumulation of surface IgM-positive cells in FA of the BALT. Methylgreen,  $\times 25$ .

胞が観察された (Fig. 7-a)。

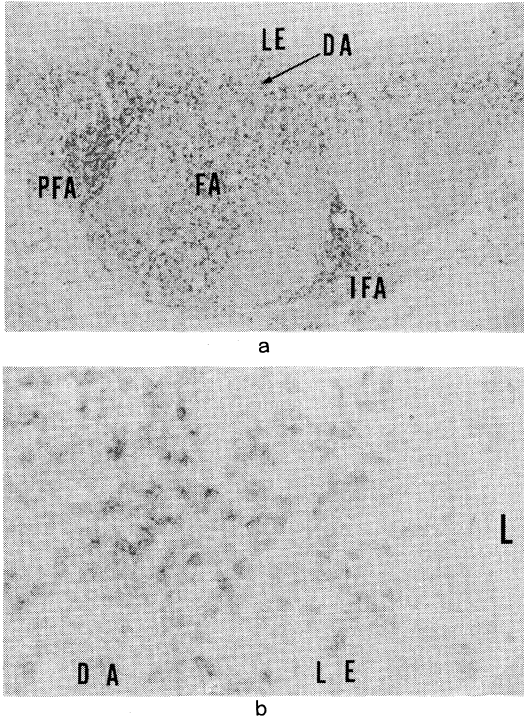
抗M-108陽性T細胞については、正常時と比べて軽度の違いが認められた。即ち、感作後2週目のPFAで、その出現頻度が軽度ではあるが、増加する傾向がみられた (Fig. 7-b)。

#### 考 案

BALTは特異な分布<sup>1) 3)</sup>並びに組織構造<sup>3) 8)</sup>を有しており、これは気道粘膜を経て侵入する外因性抗原や異物に対応し、局所防御を遂行するための極めて有効な免疫装置であると考えられている<sup>3)</sup>。Ráczら<sup>8)</sup>により、BALTが組織学的にDA、FAおよびPFAの3領域より構成されることが提唱されて以来、その生理学および

免疫学的機能が研究されてきた。しかし、最近我々はこの3領域のほかに、更に形態学的な連続性と抗原摂取能からみて、気道に面したLEもBALTを構成する主要な領域であることを提唱した<sup>3)</sup>。これらLE、DA、FAおよびPFAの4領域は密接な関連性を有しながら気道系の免疫学的並びに感染防御装置として独自の役割を果たし、肺局所見免疫応答の成立に密接に関わっていると推定している。しかし、各領域の構成細胞の性状や分布状態については不明な点が多く、その解明が待たれているのが現状である。そこで、本研究ではまず正常時における各領域を構成する免疫担当細胞の分布状態を、免疫組織化学的な方法により検討した。

最も注目されるのはFAでのsIgM陽性細胞の集簇で



**Fig. 2.** Distribution of anti M-108-positive (T) cells in a normal rabbit-BALT. T cells were detected by the indirect method of the immunoperoxidase technique.

a) PFA and interfollicular (IFA) is consisted mainly of T cells. Methylgreen,  $\times 20$ .

b) High magnification view of a). T cells are seen in DA and infiltrate into the lower part of LE. Methylgreen,  $\times 132$ . L: Bronchial lumen.

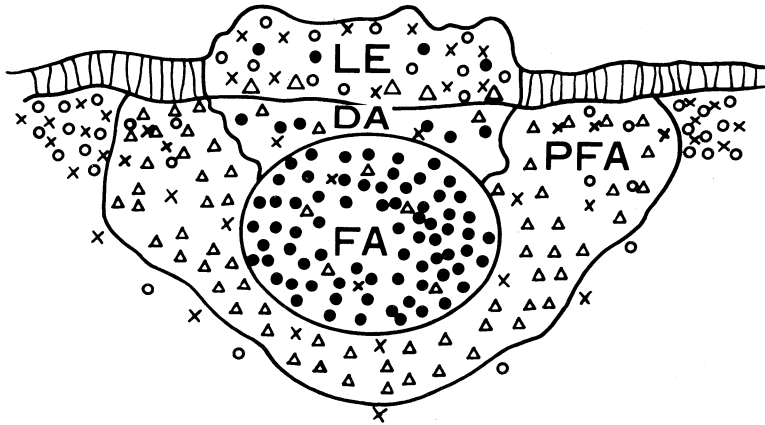
あろう (Fig. 1-d)。これらの細胞はピロニン好性の中～大型リンパ芽球として観察されたものである<sup>3)</sup>。sIgM陽性細胞の出現はB細胞分化の早期にみられる<sup>9)</sup>ことから、BALT内でのIgG陽性細胞とIgA陽性細胞への転換機構が想定される。消化管随伴リンパ組織 (Gut-associated lymphoid tissue: GALT<sup>10)</sup>) の一つであるマウス Peyer 板ではsIgM陽性細胞からsIgA陽性細胞への転換<sup>11) 12)</sup>を、また、脾臓内にはsIgM陽性細胞からsIgG陽性細胞への転換を促す switch T cellが存在することが示唆されている<sup>11)</sup>。BALTとGALTの形態的並びに機能的類似性<sup>13)</sup>から推定すると、BALTでもsIgM陽性細胞からsIgA陽性細胞への転換機構と、switch T cellの存在が充分に予想される。更に、気道並びに肺泡領域においてIgG陽性細胞がIgA陽性細胞よりやや多く認められた (Table 1) 今回の成績から考えると、家兎のBAL TではsIgM陽性細胞からsIgA陽性細胞への転換のみならず、同程度もしくはそれ以上にsIgM陽性細胞か

ら sIgG 陽性細胞への転換が起こることが示唆される。しかし、これについては、BALT内B細胞分化について個体発生的立場から、更に詳細な検討を要するであろう。

PFAはT細胞が主に分布するいわゆる胸腺依存領域であるといわれているが<sup>3) 8)</sup>、そのほかに樹枝状マクロファージや細網細胞が存在し、更にリンパ球の再循環経路である毛細血管後静脈 (Postcapillary venule: PCV) がみられるところである<sup>3) 8)</sup>。今回の研究においても同領域は抗M-108陽性T細胞が分布する、いわゆる胸腺依存領域であることを明らかにしたが、同時にIgG陽性細胞およびIgA陽性細胞もかなり多数分布することを示した (Fig. 1-a, c)。B細胞のリンパ節での再循環経路は、T細胞と同様にPCVである<sup>14) ~ 16)</sup>ことから考えると、これらの免疫グロブリン陽性細胞は循環血中由来のものであることが示唆される。

LEは炭粉<sup>17)</sup>、Horseradish peroxidase<sup>18)</sup>並びにBCG<sup>3)</sup>の摂取能を検索した研究から、抗原摂取能をもった特異な細胞であるといわれている<sup>3)</sup>。異物摂取能をもった上皮細胞間並びにその下層に、多数の抗M-108陽性T細胞、IgG陽性細胞、IgA陽性細胞および少数のIgM陽性細胞が存在していた (Fig. 3)。また、DAには多数の免疫グロブリン陽性細胞および抗M-108陽性T細胞が混在していた (Fig. 3)。これらの所見より、LEからDA領域において、マクロファージとT細胞およびB細胞の細胞接着を介する細胞間共同作用の機序が起こる可能性が考えられる。

家兎の気道における免疫グロブリン陽性細胞およびT細胞の定量的成績は、Rudzikら<sup>19)</sup>によって報告されている。彼らは気管支粘膜からホモゲナイズして得たすべてのリンパ球を「BALT cell」と解釈し、検討を加えている。これによると、IgM陽性細胞とIgA陽性細胞がほぼ同じ数で、IgG陽性細胞に比べ優位であった。一方、今回の免疫組織化学的な検討成績では、IgG陽性細胞とIgA陽性細胞が大部分 (90%以上) を占めた。この差異が生じた理由としては、細胞回収法による定量法と組織切片による部位別の計測法の違いや、我々がFAのsIgM陽性細胞を検討の対象から除外したことなどが挙げられる。今回、我々は中枢並びに末梢気管支、非呼吸および呼吸細気管支、肺泡領域に至るまでの免疫グロブリン陽性細胞の部位別の分布比率を検索した。その結果、実数は異なるものの各クラス陽性細胞の出現比率はほぼ一定で、再現性の高いものであった。この研究結果から考えて、我々の成績は、気道や肺の各部位における免疫グロブリン陽性細胞の、より正確な分布を表わしていると考えられる。なお、T細胞については、彼らの成績と我々の免疫細胞化学的な検討結果は類似し、BAL Tでは、リンパ節や末梢血と比べてT細胞の占める率は低かった。



**Fig. 3.** Schematic distribution-pattern of lymphocytes subsets and antibody forming cells in normal rabbit-BALT.

LE: This area is consisted mainly of IgG-positive cells, IgA-positive cells and anti M-108 (T) cells. IgM-positive cells are scarce.

DA: IgG-positive cells, IgM-positive cells and T cells can be seen in this area.

FA: A center of FA is distributed by a number of surface IgM-positive cells. A slight degree of infiltration of IgG-positive cells and T cells are found in this area.

PFA: This area is consisted mainly of T cells. There are also number of IgG-positive cells and IgA-positive cells and small number of IgM-positive cells.

x: IgG-positive cells

o: IgA-positive cells

•: IgM-positive cells

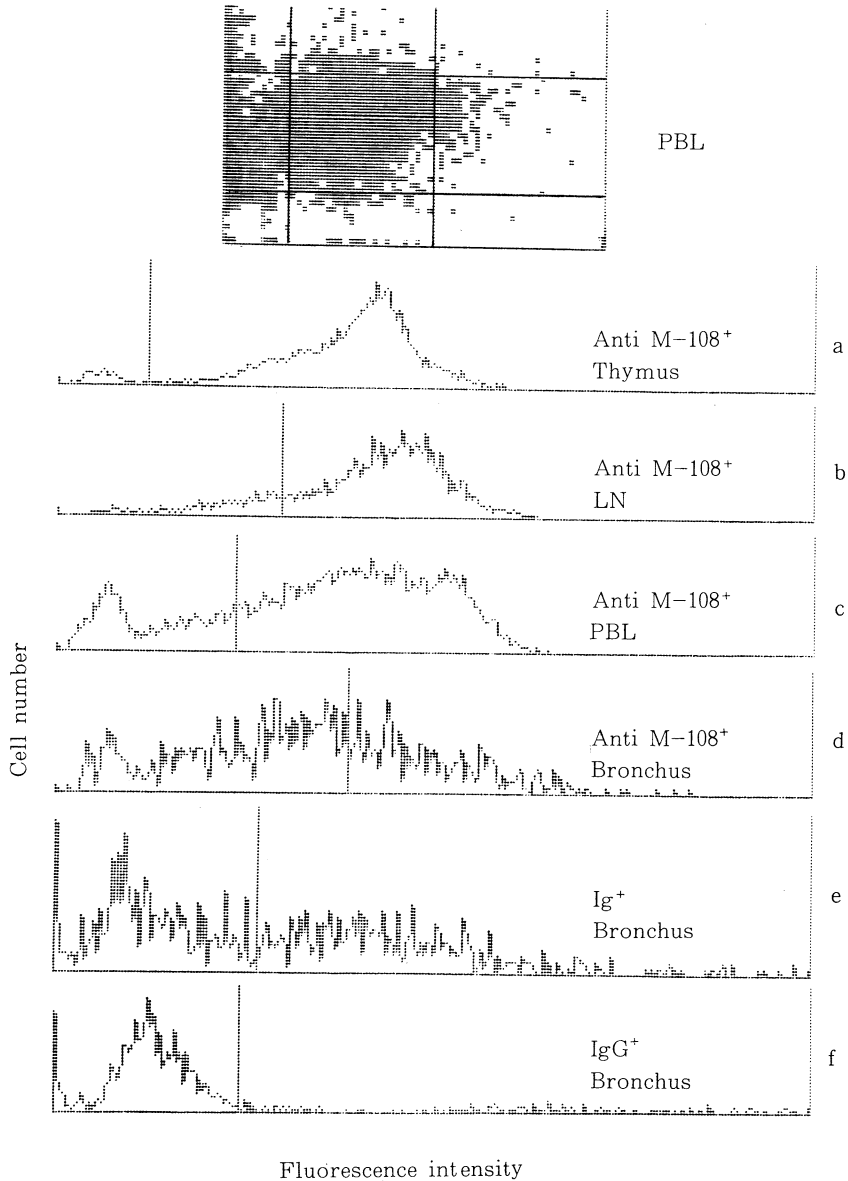
Δ: anti M-108-positive T cells

BCG死菌の静脈内投与(二次感作)により惹起した肺肉芽腫反応において、免疫グロブリン産生による液性免疫応答が類上皮細胞肉芽腫形成の調節機能を果たす可能性については既に報告した<sup>3)4)</sup>。今回は、同様の実験系を用いて肉芽腫組織での各免疫グロブリン陽性細胞の変化を経時的に検索した。感作1日目から肉芽腫の辺縁部にIgG陽性細胞とIgA陽性細胞の浸潤がみられ、その後次第に増加し、3週目をピークとして以後減少した(Fig. 6)。千田ら<sup>4)</sup>は肺肉芽腫症家兔での気管支肺胞洗浄液(Broncho alveolar lavage fluid: BALF)のIgG, IgAおよびIgM量を測定し、経時的にIgGとIgA量が増加することを報告している。BALF中にみられる免疫グロブリンの一部は、おそらく肉芽腫病変部位に出現したIgG陽性細胞とIgA陽性細胞により産生分泌されたものであると考えられる。

一方、肺肉芽腫反応の経過におけるBALTの変化としては、感作後4日目以降に認められたFAのsIgM陽性の著しい増加(Fig. 7-a)が特徴的である。Krause<sup>20)</sup>やMyrvik<sup>21)</sup>らにより、経静脈的に投与した抗原はBA

LT内に出現するといわれ、上記の所見は、経静脈的に侵入したBCG抗原の刺激に対するB細胞が芽球化反応を起こしたものと思われる。更に、これらの芽球化したB細胞はIgG陽性細胞やIgA陽性細胞への転換を起こし、再循環機構によりBALTおよび肉芽腫巣の抗原の存在する部位へrecruitment<sup>22) 23)</sup>し、肺肉芽腫病変の進展に関与することが示唆される。

本実験系は二次免疫応答をみていることから、免疫記憶機構の関与を評価しておく必要がある。千田ら<sup>4)</sup>はBCG死菌で肺肉芽腫反応を実験的に誘導する際、初回感作群と二次感作群の2群において、両群間でのBALF中の免疫グロブリン量を比較したところ、一次免疫応答群に比べ、二次応答群ではIgGおよびIgA量はいずれも感作後迅速に、且つ著しく増加し、いわゆる二次反応を示すことを報告している。従って、IgGのみならずIgA<sup>24) 25)</sup>に関してもBCGに対する免疫記憶機構が働いていると考えられる。本研究ではFAでのsIgM陽性細胞が著明となるのは感作4日目以後であった。これらの事実より、肺肉芽腫反応に伴って早期に出現する



**Fig. 4.** Fluorescence histogram from EPICS analysis of normal rabbit lymphocytes labeled with antibodies against T cells and immunoglobulin (Ig). Two dimensional light scatter of peripheral blood lymphocytes (PBL) is shown in upper margin of the figure. The antibodies used and cells tested are on the figure. Positive profiles are for million cells and expressed as cells with more fluorescence than the marker position shown.

The cells tested were : a) thymocytes, b) lymph node cells (LN), c) peripheral blood lymphocytes (PBL), d) bronchial (BALT) lymphocytes labeled with anti T cell monoclonal antibody (M-108), e) BALT lymphocytes labeled with anti Ig antibody, f) BALT lymphocytes labeled with anti IgG antibody. Note a marked heterogeneity of the fluorescent intensity in both Ig-positive cells and IgG-positive cells obtained from BALT.



**Table 1.** The Distribution of Immunoglobulin (Ig)- and the Class-Positive Cells in the Wall of Airway and Alveoli

Site examined	Mean No. of Ig <sup>+</sup> cells /Cross section	Mean No. of cells/Cross section			Number of examined
		IgG <sup>+</sup>	IgA <sup>+</sup>	IgM <sup>+</sup>	
Large bronchi <sup>a)</sup>	612.4±416.7	309.1±242.9	286.7±160.1	25.6±21.3	7
Small bronchi <sup>a)</sup>	41.7±20.6	25.7±12.7	15.3±7.2	0.7±1.2	3
Non-respiratory bronchioles	4.9±1.2	3.4±4.8	1.3±1.4	0.2±0.8	24
Respiratory bronchioles	2.0±0.4	1.0±1.0	0.9±1.0	0.1±0.4	24
Alveoli <sup>b)</sup>	3.0±0.6	1.7±0.1	1.2±0.1	0.1±0.1	200

a) Bronchi which are over or less than 1 mm. in the diameter of lumen were arbitrarily classified as "large type" or "small type", respectively.

b) Number of immunoglobulin- and the class-positive cells in the alveolar region is expressed as the number of the positive cells per 10 alveoli.

**Table 2.** Relationship between the development of BALT and the distribution of immunoglobulin (Ig)- and the class-positive cells in the wall of large bronchi

Experimental number	Diameter of bronchi(mm)	No. of BALT recognized	Number of Ig <sup>+</sup> cells		Mean number of cells per cross section(5mm) <sup>a)</sup>		
			/Cross section	/Cross section (5mm) <sup>a)</sup>	IgG <sup>+</sup>	IgA <sup>+</sup>	IgM <sup>+</sup>
1	1.9×3.5	4	1,264	744	403	306	35
2	1.0×2.5	3	1,144	1,040	547	463	30
3	2.0×2.9	2	578	385	203	152	31
4	2.0×2.8	2	403	269	117	147	5
5	1.5×2.0	1	336	305	154	140	20
6	2.8×3.3	1	443	233	104	55	4
7	2.0×3.0	0	182	114	20	91	3

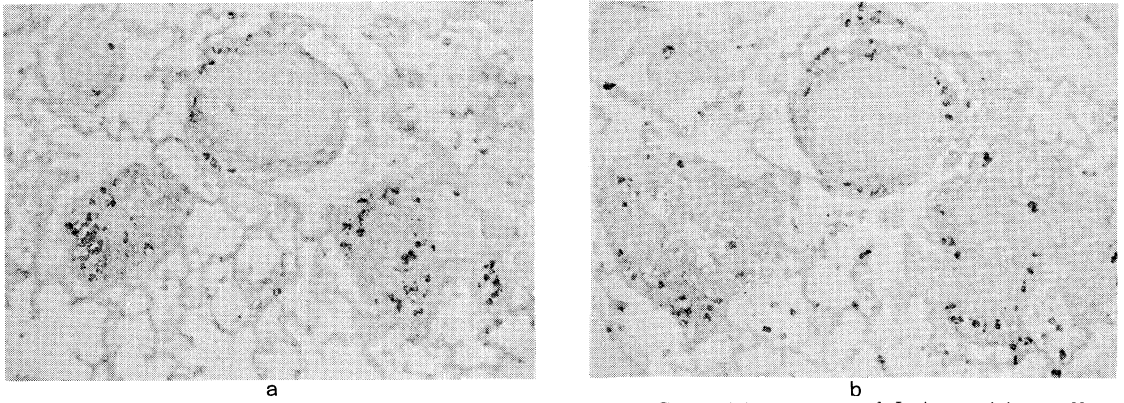
a) Number of immunoglobulin- and the subclass-positive cells is expressed as the relative number of the cells found in each 5 mm. -length of the lamina propria mucosa of bronchial walls.

免疫グロブリン陽性細胞の一部は、二次感作後にFAで分化増殖したsIgM陽性細胞に由来するものではなく、記憶B細胞の増殖反応によるものであることが示唆される。

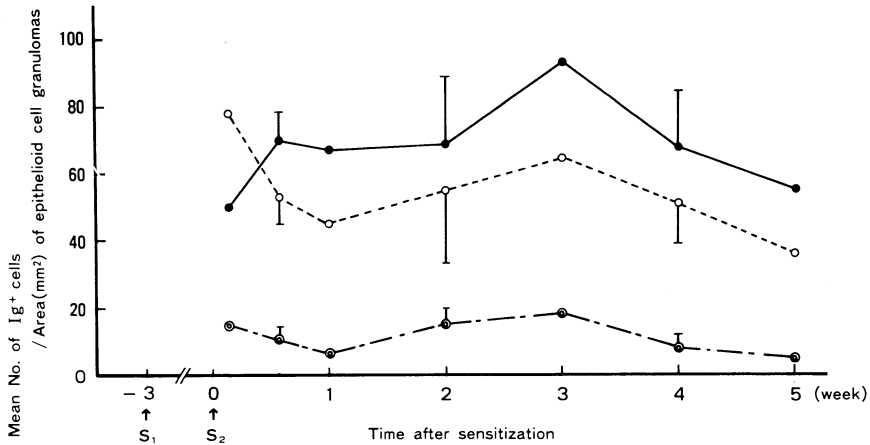
なお、肉芽腫を構成する細胞には、その細胞性免疫の関与する形成機序<sup>4)</sup>からみて、T細胞が含まれると予想されるが、病変部では抗M-108陽性T細胞は検出でき

なかった。この理由として、M-108抗体は活性化T細胞とは強い反応を示さないことが考えられる。

既報<sup>3)4)</sup>の研究成績から、BALTが肺局所における免疫グロブリン産生の調節機序を介して肺肉芽腫反応に関与していることが示唆されたが、本報ではこのBALTの反応様式を、免疫細胞組織化学的方法により、更に詳細に解析することができた。しかし、肺肉芽腫反応



**Fig. 5.** Representative findings of distribution of IgG-positive cells and IgA-positive cells in the pulmonary granulomas induced by the secondary sensitization with heat-killed BCG. a) IgG-positive cells, and b) IgA-positive cells two weeks after the sensitization. Note a massive infiltration of IgG-positive cells and IgA-positive cells into the peripheral regions of the epithelioid cell granulomas. a) and b), Methylgreen,  $\times 25$ .



**Fig. 6.** Changes in the number of immunoglobulin class-positive cells distributing into the pulmonary granulomas.

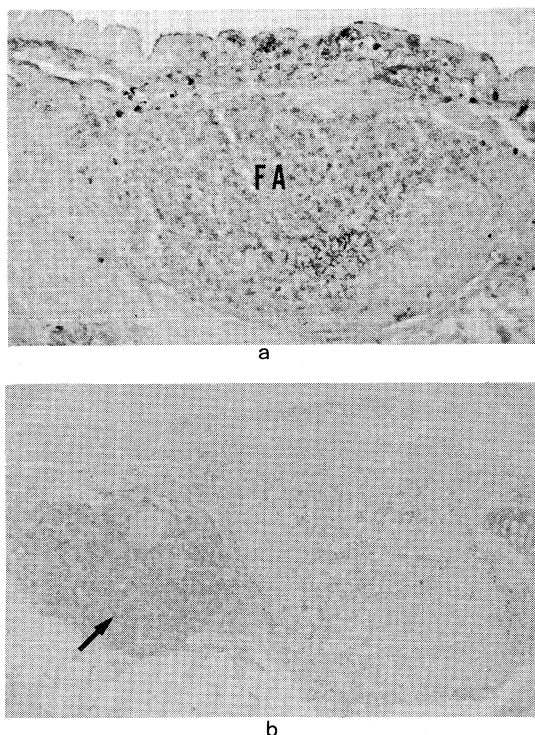
Number of the positive cells is expressed as relative number of the cells found in one  $\text{mm}^2$  of granulomatous region. The number of IgG-positive cells gradually increased, reaching the peak three weeks after the sensitization, and then decreased. The number of IgA-positive cells and IgM-positive cells decreased in early phase, and subsequently increased, reaching the peak three weeks after the sensitization, and then decreased.

S1 = Primary sensitization three weeks before secondary sensitization. S2 = Secondary sensitization.

- : IgG-positive cells
- - -○ : IgA-positive cells
- ◎- - -◎ : IgM-positive cells

の成立過程には、従来より指摘されてきた活性化T細胞由来のリンフォカインに加えて、免疫グロブリンおよびマクロファージ由来のインターロイキン1など、各種の液性因子が相互的に作用していると考えられ、この過程

の中で BALT がどの程度に肉芽腫形成に対する免疫学的関与を果たしているのかはまだ明らかではない。今後は、BALT 内のマクロファージや多数集積するT細胞の機能を追求するとともに、更にB細胞および抗体産生



**Fig. 7.** Distribution-pattern of lymphocyte subsets in the BALT from a rabbit with granulomatous lung. a) BALT five weeks after the sensitization. Marked increase of surface IgM-positive cells can be seen in FA. b) BALT two weeks after the sensitization. Note intense accumulation of anti M-108-positive T cells in PFA (arrow). a) and b), Methylgreen,  $\times 33$ .

細胞を含めた細胞間の相互作用の機序を明らかにしていくことが必要であると思われる。

### まとめ

正常家兎の BALT, 気道および肺野領域における免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) 陽性細胞と抗M-108陽性T細胞の分布状態を, 酵素抗体法により免疫組織化学的に検討した。また, BALT を含む気道壁より得られたリンパ球について, フローサイトメトリーにてその細胞型を解析した。次に, BCG死菌の静注二次感作によって実験的肺肉芽腫症を作製し, BALT並びに肺肉芽腫病変における上記細胞群の経時的な分布様式の変化を観察した。

①正常家兎において, BALTの4領域(リンパ性上皮: LE, 円蓋域: DA, 濾胞領域: FA, 傍濾胞領域: PFA)を構成する細胞群について検討した。LEには多数のIgG陽性細胞とIgA陽性細胞が分布するほか, 少数のIgM陽性細胞も散見され, LEの下層部には抗M

-108陽性T細胞の存在もみられた。DAにはIgGとIgMの各免疫グロブリン陽性細胞と抗M-108陽性T細胞が混在していた。FAでは多数の細胞膜表面(S)IgM陽性細胞が中央部に集簇してみられ, 抗M-108陽性T細胞とIgG陽性細胞も散見された。PFAを構成する主たる細胞は抗M-108陽性T細胞であったが, ほかに多数のIgG陽性細胞とIgA陽性細胞も認められた。

②正常家兎の気道壁より分離回収した細胞液の検討では, 免疫グロブリン陽性細胞, 抗M-108陽性T細胞ともに幅広い蛍光強度のプロファイルを示すことから, 不均一な細胞群からなることが示唆された。

③正常家兎の中樞気道から肺野領域に至る領域での各免疫グロブリン陽性細胞の分布を検索した。これらの陽性細胞群は中樞側気管支で最も多く認められ, 末梢側になるにつれて出現率は低下した。また, BALTの発達程度が高いほど, 陽性細胞の出現率も高値を示した。

④BCG感作家兎では感作後1日目から多数のIgG陽性細胞とIgA陽性細胞が, 類上皮細胞肉芽腫の辺縁部に認められた。両細胞の出現数がピークとなるのは3週目であり, 以後漸減した。

⑤肺肉芽腫反応でのBALTの変化として, 感作4日目からFAのsIgM陽性細胞の著しい増加が認められ, 5週目においてもこの傾向は続いていた。

以上の結果により, BALTの4領域は免疫学的に独自の細胞構造を呈しながらも有機的なつながりを持ち, 肺野所免疫応答に関与していると推定された。また, BALTは肉芽腫病変の免疫グロブリン(IgG, IgA)の産生を調節することにより, 肺肉芽腫反応の成立過程に関与することが示唆された。

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 終始にわたり御指導と御校閲を賜りました第二内科学吉見輝也教授, 第二解剖学山下昭教授に深甚なる謝意を表します。また, 研究面での御指導を頂いた山口大福本哲夫教授, ウェイクフォレスト大学ボーマングレイ医学部免疫微生物学千田金吾博士に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は第60回日本結核病学会総会(名古屋)にて発表した。

本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金の援助を受けた。昭和55年度一般研究C557193, 昭和57年度一般研究C57570302, 昭和59年度一般研究C59570323。

### 文 献

- 1) Bienenstock, J., et al.: Bronchial lymphoid tissue, I, Morphologic characteristics, Lab Invest, 28: 686, 1973.
- 2) Bienenstock, J., et al.: Bronchial lymphoid

- tissue, II, Functional characteristics, Lab Invest, 28: 693, 1973.
- 3) 早川啓史他: 肺の遅延型アレルギー反応における気管支随伴リンパ組織 (BALT) の病態組織学的研究 結核, 60: 65, 1985.
  - 4) 千田金吾他: 肺の遅延型アレルギー反応における気管支随伴リンパ組織 (BALT) の研究—気管支肺胞洗浄の意義—, 結核, 60: 7, 1985.
  - 5) Clancy, R., et al.: The proliferative response of bronchus-associated lymphoid tissue after local and systemic immunization, J Immunol, 112: 1997, 1974.
  - 6) 辻 公美: 比重遠心法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法, 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 金沢, P. 443, 1976.
  - 7) 渡辺慶一他: 酵素抗体法, 学際企画, 東京, P. 85, 1981.
  - 8) Rácz, P., et al.: Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit, J Reticuloendothel Soc, 22: 59, 1977.
  - 9) Strober, W., et al.: Cellular differentiation, migration, and function in the mucosal immune system, Advances in host defense mechanisms, 4 (Mucosal immunity): 1, 1985.
  - 10) Waksman, B., et al.: Specialized amplification elements in the immune system, The role of nodular lymphoid organs in the mucous membranes, Prog Allergy, 21: 1, 1976.
  - 11) Kawanishi, H., et al.: Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues, I, T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro, J Exp Med, 157: 433, 1983.
  - 12) Kawanishi, H., et al.: Characteristics and regulatory function of murine con-A induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen: Mechanisms regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patch B cells, J Immunol, 129: 475, 1982.
  - 13) Bienenstock, J.: Bronchus associated lymphoid tissue, Immunology of the lung and upper respiratory tract, McGraw-Hill, Inc., New York, p. 96, 1984.
  - 14) Butcher, E. C., et al.: Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules, Eur J Immunol, 10: 556, 1980.
  - 15) Gallatin, W. M., et al.: A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes, Nature, 304: 30, 1983.
  - 16) Chin, Y. H., et al.: Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium, V, Isolation of adhesion molecules from lysates of rat lymphocytes, J Immunol, 131: 1368, 1983.
  - 17) 西川忠英: 吸入炭末の運命, 特に之と肺内リンパ組織との関係に就ての実験的研究, 京都医学雑誌, 37: 1779, 1940.
  - 18) Rácz, K. T., et al.: Uptake and transport of horseradish peroxidase by lymphoepithelium of the bronchus-associated lymphoid tissue in normal and Bacillus-Calmette-Guérin-immunized and challenged rabbits, Lab Invest, 41: 106, 1979.
  - 19) Rudzik, O. et al.: The distribution of a rabbit thymic antigen and membrane immunoglobulins in lymphoid tissue, with special reference to mucosal lymphocytes, J Immunol, 114: 1, 1975.
  - 20) Krause, A. K.: Studies on tuberculous infection, XIV, The localization of tuberculous infection in the rabbit, with particular reference to that in the lungs, Am Rev Tbc, 14: 243, 1926.
  - 21) Myrvik, Q. N., et al.: Transport of horseradish peroxidase from the vascular compartment to bronchial associated lymphoid tissue, J Reticuloendothel Soc, 31: 267, 1982.
  - 22) Husband, A. J., et al.: The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine, J Exp Med, 148: 1146, 1978.
  - 23) Husband, A. J.: Kinetics of extravasation and redistribution of IgA-specific antibody containing cells in the intestine, J Immunol, 128: 1355, 1982.
  - 24) Pierce, N. F., et al.: Immunity to experimental Cholera, II, Secretory and humoral antitoxin response to local and systemic toxoid administration, J Infect Dis, 131: 383, 1975.

25) Pierce, N. F., et al.: Cellular kinetics of the intestinal immune response to Cholera

toxoid in rats, J Exp Med, 142: 1550, 1975.