

原 著

実験的肺肉芽腫症における肺局所遅延型アレルギー反応の解析

— Ia⁺ 肺胞マクロファージと T 細胞亜群の動態 —

岡野昌彦・佐藤篤彦

浜松医科大学第二内科

受付 昭和62年8月24日

ANALYSIS OF DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY REACTION OF THE
EXPERIMENTAL GRANULOMATOUS LUNG—Changes of Ia-Positive Alveolar
Macrophages and T-cells Subsets—

Akihiko OKANO and Atsuhiko SATO

(Received for publication August 24, 1987)

To clarify the delayed type hypersensitivity reaction induced in rat lungs by heat-killed BCG sensitization, the fluctuations of Ia-positive alveolar macrophages and T-cell subsets in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), in blood and in the pulmonary tissue were studied by the use of flow cytometry and immunohistochemical methods.

It was found in BALF that neutrophil leukocytes increased at early stage and lymphocytes and plasma cells reached the peak on seven days after the secondary sensitization. Analysis of T-cell subsets in BALF revealed that the ratio of helper T-cells to nonhelper T-cells increased by 2.24 on seven days, whereas nonhelper T-cells gradually exceeded helper T-cells at late stage. These data corresponded quite accurately with the changes of cell populations in the lung tissues in the process of the granuloma formation, but these changes of T-cell subsets were not found in the peripheral blood lymphocytes.

The granuloma formation in the lungs was seen remarkably at early stage. At the same time, it was also noted that Ia-positive alveolar macrophages increased by 46.6% in BALF on seven days and Ia antigens on the epithelioid cells in the granulomas were positive.

These results suggest that the local analysis of cell components in BALF yields dynamic details concerning immune responses of pulmonary regions, and that the cellular interaction between Ia-positive alveolar macrophages and helper T-cells might be important in initiating the delayed type hypersensitivity reaction of the lungs.

Key words : Experimental granuloma in the lung, Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), Delayed type hypersensitivity reaction, Ia-positive alveolar macrophage, T-cell subsets

キーワードズ : 実験的肺肉芽腫症, 気管支肺胞洗浄液, 遅延型アレルギー反応, Ia 陽性肺胞マクロファージ, T 細胞亜群

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

緒言

肉芽腫性肺疾患であるサルコイドーシスや過敏性肺炎などにおける肺局所の免疫応答に関する研究は、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) が導入されて以来、急速に進歩してきた^{1)~3)}。これらの疾患において、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF) 中に見出される T 細胞亜群の比率に不均衡が認められ^{4)~9)}、それが診断並びに病態の解明に意義ある現象と報告されている。

しかし、この T 細胞亜群の不均衡が、肉芽腫性疾患における遅延型アレルギー反応 (Delayed-type hypersensitivity reaction : DTH 反応) の進展、治療に及ぼす意義については明らかでない。肺の DTH 反応における肺胞マクロファージ (Alveolar macrophages : AM ϕ) やリンパ球の動態は、実験的肺肉芽腫症のモデルを中心に研究されている^{10)~13)}。我々は、家兎での肺肉芽腫症モデルを作製し、BALF 中のリンホカインの証明や、肺局所における ConA 反応性 T 細胞の増加などの現象を報告してきた^{13)~16)}。

今回、ラットにおいて各種免疫系細胞の膜抗原を特異的に認識する単クローン抗体を用いた免疫学的手法により、肺内 DTH 反応における、肺局所及び BALF 中細胞の細胞病理学的反応を経時的に検索した。特に AM ϕ の Ia 抗原発現と T 細胞亜群の変動を中心に、BALF と肺組織 (胞隔と肉芽腫) の検討を試みた。

材料と方法

1. 動物及び実験的肺肉芽腫の作製

近交系雄 DA ラット (RT1^a) を使用した。加熱 Bacillus Calmette Guérin (BCG) 死菌を抗原として用いた。初回感作として、BCG 100 μ g / 0.1 ml Freund Incomplete Adjuvant を尾静脈より 1 回静注し、3 週後に BCG 500 μ g / 0.1 ml 生理的食塩水を静注して二次感作をおこなった。二次感作後、1, 4, 7, 14, 21, 28, 35 日目で経時的に各時期 5 匹、計 35 匹の感作ラットと対照群として無処置のラット 5 匹を脱血死させて使用した。

2. BALF の回収

摘出肺の気管支に 16G カニューレを挿入し、1 回 5 ml の生理食塩水を注入後、BALF を回収した。同操作を 5 回施行して、BALF の総回収率を測定した。回収率は、各々の時期において 90% 以上でほぼ一定していた。BALF を 200G、10 分間遠心し、上清と細胞成分を分離した。細胞成分を 0.5% 牛血清アルブミンリン酸バッファ-生食水 (BSA · PBS) pH7.2 に再浮遊させ、既報の方法¹³⁾ により BALF 総細胞数と細胞分画を測定した。

3. 末梢血と BALF 中のリンパ球亜群の測定

末梢血及び BALF 中のリンパ球を Ficoll-Conray 比重遠沈法にて分離し、いずれも 1×10^6 個/ml の濃度に調整した。ラットのリンパ球膜抗原に対する単クローン抗体 (mAb) である W3/13 (抗 T 細胞 mAb)、W3/25 (抗ヘルパー T 細胞 mAb)、OX8 (抗ノンヘルパー T 細胞 mAb) OX6 (抗 Ia 抗原 mAb) [いずれも Sera labo 社] を一次抗体として、それぞれ 5 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C、45 分間反応させた後に、0.5% BSA · PBS で 2 回洗浄した。次に二次抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG ヤギ IgG · F (ab')₂ [Cappel 社] を加え、4 $^{\circ}$ C、45 分間反応させ、PBS で洗浄後、EPICS-V (Coulter 社) を利用した Flow cytometry にて各陽性細胞を解析した。

4. BALF 中 Ia⁺ AM ϕ の測定

BALF 中 AM ϕ を約 1×10^6 個/ml に調整し、OX6mAb を一次抗体として 5 μ l 加えた後、リンパ球亜群と同様に二次抗体を反応させ、EPICS-V にて AM ϕ の大きさにゲートを設定し、陽性細胞を解析した。

5. 組織学的及び免疫組織化学的検索

左肺は 10% ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち、切片標本 (約 3 μ m) を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施行し、光顕で観察した。一方、右肺は気道軸に対し、ほぼ直角に横切し、凍結切片 (約 6 μ) を作製した。

凍結切片を冷アセトンにて固定後、内因性ペルオキシダーゼを阻止し、10% ウマ血清加 PBS を加え、20 分間室温にて反応させた。次に上記四つの単クローン抗体を 0.5% BSA · PBS に希釈し、それぞれを加え、室温で約 40 分間反応させた。PBS で洗浄後、第二抗体としてビオチン化抗マウス IgG (H 鎖と L 鎖に特異性) ウマ IgG [Vecter 社] を加え、室温で 30 分間反応させた。次いで Vecstain Avidin - Biotin - Complex 試薬 [Vecter 社] を加え、室温で 40 分間反応させた後、W3/25 と OX については、Vecter-Red 試薬 [Vecter 社] によりアルカリフォスファターゼを発色させ、それ以外の膜抗原については、3', 3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸にてペルオキシダーゼを発色させた後、1% メチルグリーンで核染色を施行し、光顕で観察した。対照標本には、一次抗体としてマウス血清を使用し、その他は同様な方法で酵素抗体反応を施行した。

6. 肺組織における各陽性細胞の定量化

肺の胞隔並びに肺肉芽腫内外に集積している各膜抗原陽性細胞の定量は、光顕にて 125 倍の写真を撮影後、画像解析装置 Videoplan (Kontron 社) を用いて、単位面積当たり (1 mm²) に占める各陽性細胞数を測定しておこなった。

7. 統計学的検索

統計学的有意差判定は、student t 検定によりおこな
い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありとした。

結 果

1. BALF 中の総細胞数と細胞分画の推移

Fig. 1 は BALF 中の総細胞数と細胞分画の経時的変
化である。二次感作後の BALF 中総細胞数は急速に増
加して、7 日目は $5.2 \times 10^5 / \text{ml}$ BALF となり、対照
の約 8 倍まで増加したが、以後漸次減少し、35 日目
にはほぼもとに復した。細胞分画の観察では、初期に好中
球が増加し、4 日目よりリンパ球の増加が主体となり、
7 日目に約 20% を占め、絶対数で見ると、対照の約 60
倍まで増加した。形質細胞も 7 日目にピークに達し、以
後漸次、減少したが、35 日目にも増加していた。

2. 末梢血と BALF 中のリンパ球亜群の変化

Fig. 2 と Fig. 3 は、それぞれ末梢血と BALF 中の

T 細胞及び T 細胞亜群と Ia^+ リンパ球の経時的変化で
ある。

a) T 細胞と T 細胞亜群の変化

対照群での T 細胞の末梢血及び BALF 中リンパ球に
占める率は、各々平均 73.6%、及び 62.6% であった。
二次感作後の T 細胞の比率は、対照に比べていずれも
有意な変化は認められなかった。しかし、BALF 中の
T 細胞の絶対数は著増し、4 日目でピークに達し、以後
35 日目まで増加していた。

$\text{W3}/25^+$ T 細胞 (ヘルパー T 細胞 : T_H) と OX
 8^+ T 細胞 (ノンヘルパー T 細胞 : T_NH) の分画をみ
ると、対照群での末梢血は各々平均 38.6% と 31.1% で
あり、BALF 中では、各々平均 37.2% と 24.0% であ
った (Fig. 2 と Fig. 3)。二次感作後、 T_H は初期にお
いて、末梢血と BALF 中でともに増加し、4 日目には対
照の約 1.5 倍となり、以後徐々に減少した。一方、
 T_NH は末梢血と BALF 中で異なった変動を呈した。末

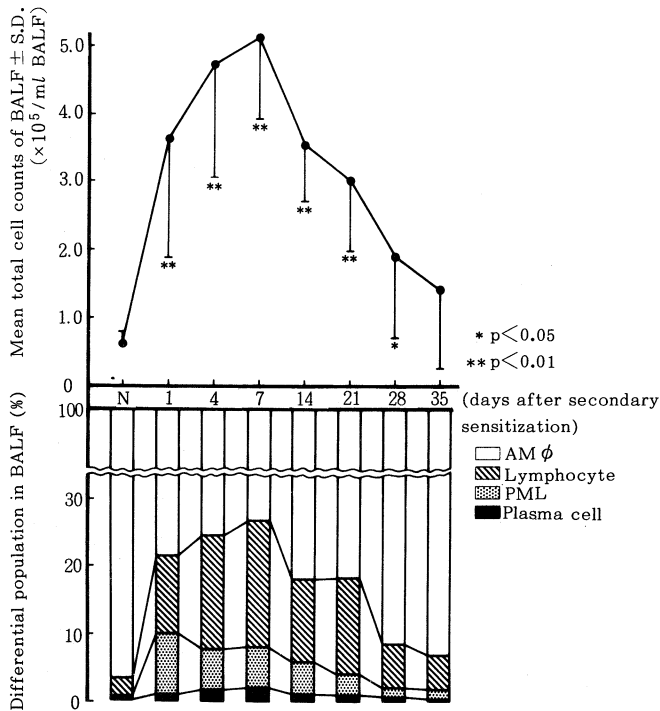


Fig. 1. Total Cell Counts and Their Differential Cell Population in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

The total cell number including lymphocytes and plasma cells reached the peak on 7 days after secondary sensitization, whereas neutrophil leukocytes became predominant at earlier stage.

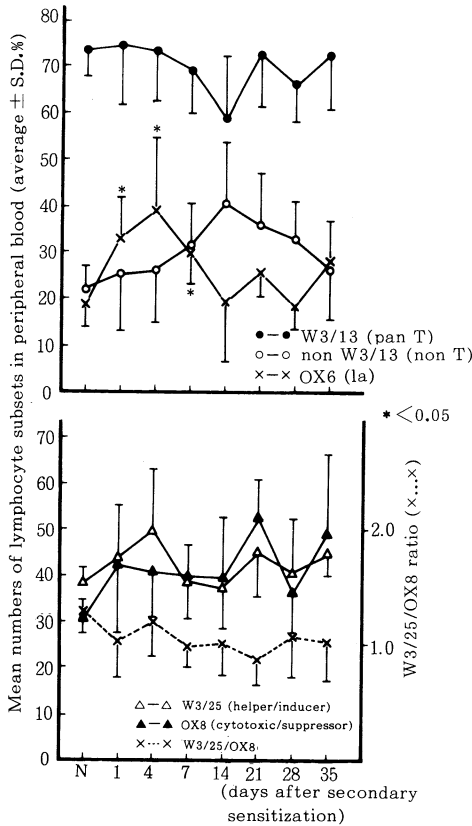


Fig. 2. Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood W3/13-positive T-cells (upper panel), W3/25-positive T-cells and OX8-positive T-cells (lower panel) showed no significant change after the secondary sensitization. On the contrary, initial increase in OX6-positive lymphocytes was significant at $p < 0.05$ level.

梢血において1日目よりしだいに増加し、21日目は対照の約2倍に達した。BALF中のT_Hは、早期(1~4日)と中期(14~21日)において二峰性の増加が認められた。これら二つのT細胞亜群の比(T_H/T_{NH})は、末梢血では明らかな変動を認めなかったが、BALF中では二次感作後7日目に平均2.2までいったん上昇し、14日目以降はほぼ対照のレベルにまで復した。

b) OX6⁺リンパ球(Ia⁺リンパ球:Ia⁺ly)

OX6 mAbはリンパ球の中で、B細胞と活性化T細胞の一部を認識するもので、対照群では、末梢血とBALF中でそれぞれ、平均18.9%と16.7%であった。二次感作後早期は、末梢血とBALF中でいずれも増加したが、中期以降では、末梢血中Ia⁺lyはしだいに減少し、もとに戻ったが、BALF中ではプラトーに達し、増加したままであった。BALF中Ia⁺lyの絶対数は、4日目に対照の約170倍まで著増した(Fig. 1~Fig.

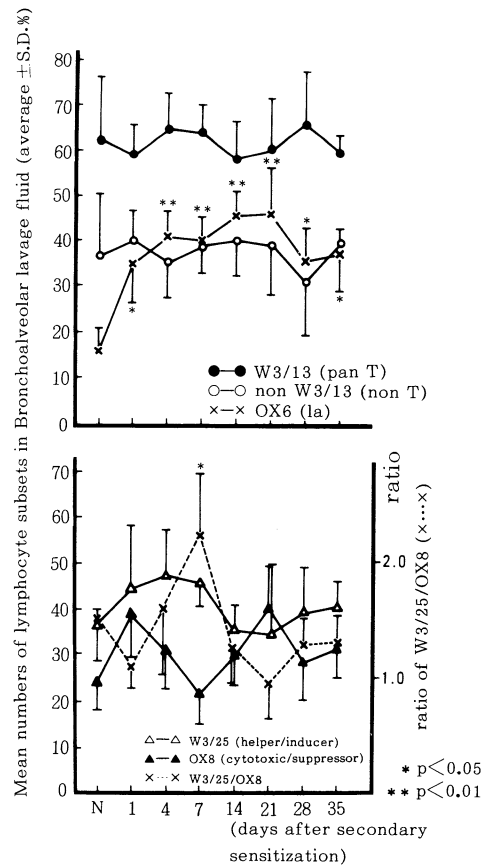


Fig. 3. The Change of Lymphocyte Subsets in BALF.

Neither the change of W3/13-positive T-cells nor W3/13-negative lymphocytes were statistically significant, although OX6-positive lymphocytes were abundant from one day through five weeks after the secondary sensitization(upper panel). W3/25-positive T-cells were predominantly at early stage, and OX8-positive T-cells exhibited the diphasic change. The ratio of W3/25-positive T-cells to OX8-positive T-cells reached its maximum value at seven days after the secondary sensitization(lower panel).

3)。

3. BALF中のIa⁺AMφの変化

対照群でのIa⁺AMφの陽性率は低値(平均7.9%)を示したが、二次感作後は、1日目より著増し(平均46.6%)、以後21日目まで有意に増加していた(Fig. 4)。絶対数でみると、7日目に対照群の約50倍の増加を認めた。

4. 肺胞隔と肺肉芽腫の組織学的変化

Tableに肺の組織学的変化を経時的に示した。二次感作後初期に、肺動脈と細気管支周囲の胞隔を中心にして、好中球と単核球を主体とした細胞浸潤が認められ、7日目以降は単核球細胞の浸潤が主体となった。28日

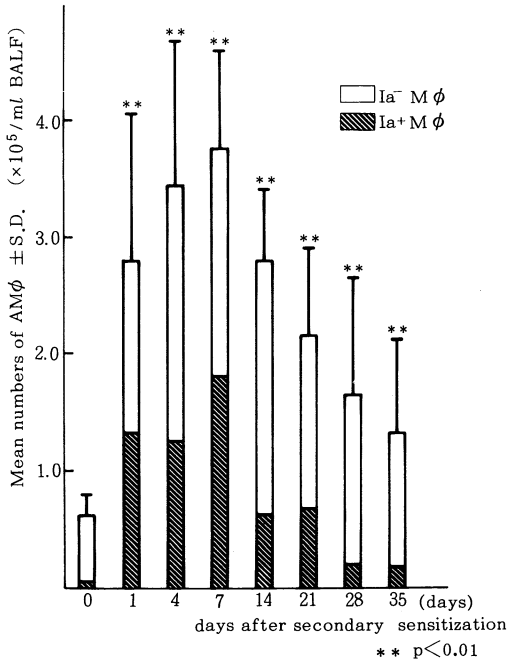


Fig. 4. The Number of Alveolar Macrophages (AMφ) and Ia positive AMφ in BALF. AMφ and Ia positive AMφ increased in number about 7 times and 50 times on 7 days after secondary sensitization, respectively.

目より、肉芽腫周囲を除く胞隔での細胞浸潤の程度は軽微となった。この変化は、BALF中総細胞数及び細胞分画の変化とほぼ相関していた。

類上皮細胞肉芽腫の形成をみると、一次感作後は小型

の肉芽腫巣が少数認められたが、二次感作後は、1日目より既に成熟した大型の類上皮細胞肉芽腫巣が多数認められた。7日目以降より類上皮細胞間の境界がしだいに不明瞭となり、融合傾向がみられ、また肉芽腫周囲への単核球の著しい集積像も認められた (Fig. 5-a)。

5. 免疫組織化学的变化

胞隔に浸潤しているリンパ球の膜抗原表現型を観察すると、多くがT細胞であった。T細胞亜群では、二次感作後中期まではTHが主体であったが、14日以降は減少し、TNHが優位となった。TH/TNHの経時的变化は、4日目に平均3.4と上昇したが、28日目には、0.47と減少していた (Fig. 6)。

類上皮細胞肉芽腫の周囲に集積したリンパ球亜群をみると、4~7日目には、TH細胞を主体とする著しいT細胞の浸潤像がみられた (Fig. 5-b)。また肉芽腫の内部には、TH細胞のみが散在的に認められた (Fig. 5-c)。しかし後期になると、浸潤細胞数の減少とともにTH細胞は減少し、その主体はTNH細胞となった (Fig. 5-d)。これらT細胞亜群の比率は、7日目に2.8と上昇し、28日目は0.5と減少し、胞隔の変化よりピークがやや遅れ、BALFとほぼ同様な変化であった (Fig. 7)。

胞隔及び肉芽腫周囲のIa⁺ lyの変化は、ともに7日目をピークに著増し、以後はしだいに減少した。この変化はT細胞とほぼ同様な変化であった (Fig. 6, Fig. 7)。なお、sIg陽性細胞の分布を検索したところ¹⁶⁾、一部の浸潤細胞はB細胞であることが判明したが、多くはT細胞であり、これらT細胞もIa抗原を発現していることが認められた。

一方、肉芽腫の類上皮細胞自体のIa抗原の発現をみると、7日目までは大部分が認識されたが (Fig. 8-a)、融合化がすすむにつれ、しだいにIa抗原は陰性化した

Table Histological Change of Lung after Secondary Sensitization

Histological change of the lung*	Days after secondary sensitization			
	Before challenge	Early stage (1-4)	Intermediate stage (7-21)	Late stage (28-35)
Alveolar septa				
Neutrophilic infiltration	±	+++	+	-
Lymphocyte infiltration	±	++	+++~++	+
Epithelioid cell granuloma				
central necrosis	-	±	+	++~±
fusion	-	±~+	++	++
maturity**	I	II-III	III-IV	IV

* : Degree of histological change, - : absent, ± : slight changes, + : mild changes, ++ : moderate changes, +++ : sever.
 ** : Degree of maturity of the epithelioid cell granuloma, I : immature, II : mature, III : mature with aggregate of lymphocyte, IV : atrophic.

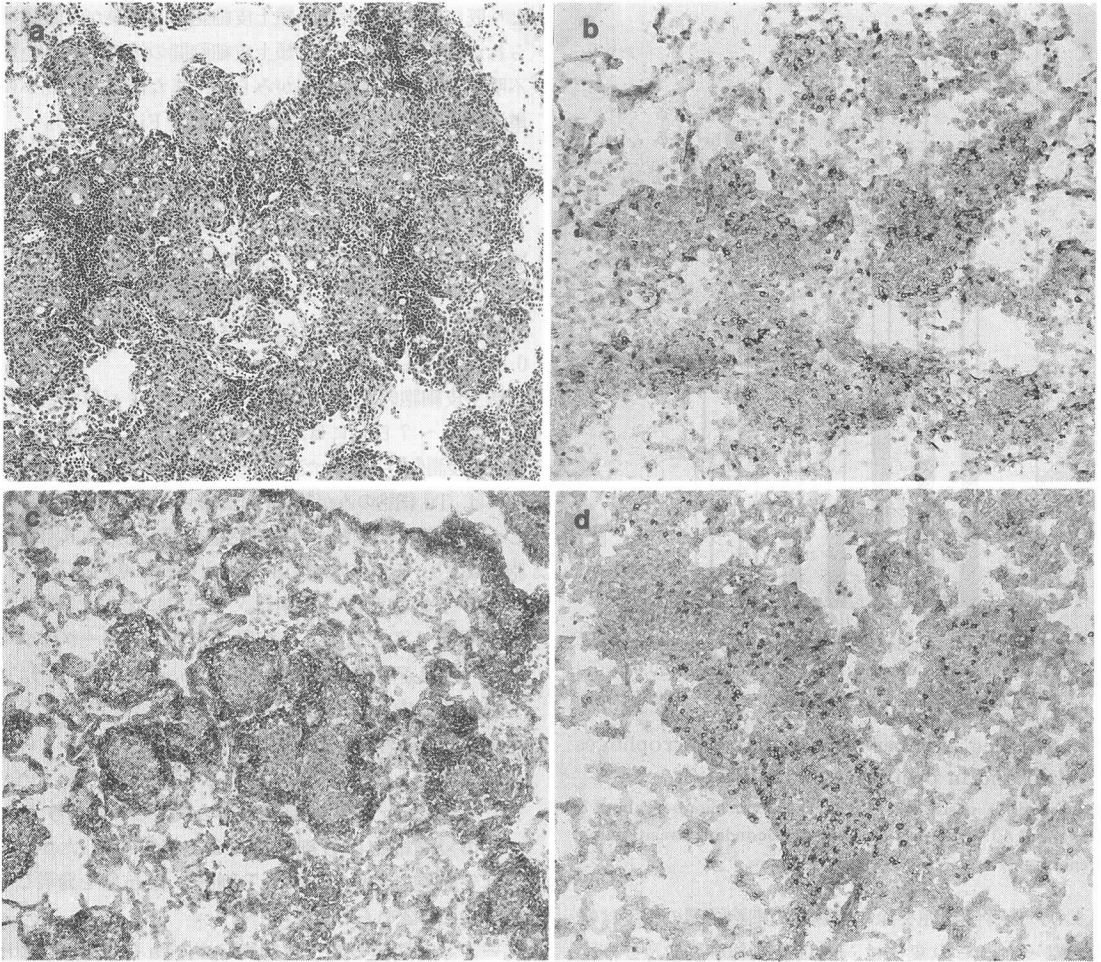


Fig. 5. Histopathological and Immunohistopathological Findings of Epithelioid Cell Granulomas in the Lungs of the Heat-killed BCG Sensitized Rats

a) The mature epithelioid cell granulomas were seen seven days after the secondary sensitization. There was a massive accumulation of lymphocytes around the granulomas and within the alveolar septa. H.E 25.

b) W3/13-positive T-cells and c) W3/25-positive T-cells infiltrated massively into the peripheral regions of the granulomas seven days after the secondary sensitization.

d) OX8-positive T-cells accumulated around the granulomas four weeks after the secondary sensitization b),c),d), Methylgreen. $\times 25$.

(Fig. 8-b).

考 案

肉芽腫性肺疾患の病態と機序については、結核の研究に始まる長い歴史を持ち、その主体が遅延型アレルギー反応である¹⁰⁾¹¹⁾ ことより、サルコイドーシスや過敏性肺炎の発症機序についてもDTH反応を中心に検討されてきている^{3)~9)}。

近年、DTH反応の主体となるリンパ球に関しては、その分化、動態及び細胞性または液性調節機構が詳細に解明されつつある。特に、肺局所での免疫系細胞の動態

の研究は、実験的肺肉芽腫モデルの開発^{10)~12)} や、BALの施行^{1)~2)} などにより飛躍的に研究が進められている。

我々は、これまで家兎を用いて実験的肺肉芽腫症を作成し、肺局所のDTH反応をBALF中細胞と肺組織の動態を検索してきた^{13)~15)}。今回、近交系ラットを用い、同様に肺肉芽腫症を誘導し、単クローン性抗体を用いて、マクロファージ亜群とT細胞亜群を中心に免疫系細胞の動態を詳細に解析した。本実験における問題点として、第1に、BALF中各細胞亜群の変化と肺組織における変化が相関しているか、第2に、肺内DTH反

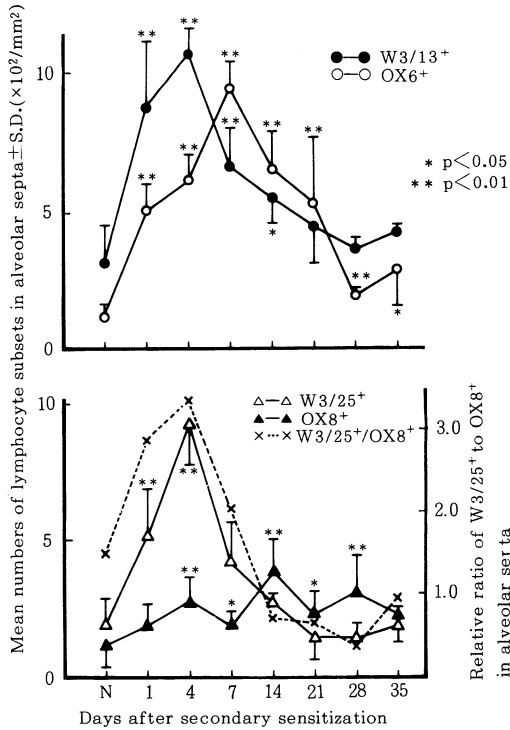


Fig. 6. The Changes of Number of Lymphocyte Subsets in Alveolar Septa by Immunohistochemical Method

Note that W3/13-positive T-cells peaked at fourth day and statistical significant increase of OX6-positive cells were seen ranging from one day to thirty five days after the secondary sensitization (upper panel). There was a rapid increase in the number of W3/25-positive T-cells and the ratio of W3/25-positive T-cells to OX8-positive T-cells at early stage, which decreased at late stage (lower panel).

応は AMφ の Ia 抗原の発現によりどのように修飾されるか、第3に Th 細胞と T_H 細胞のバランスの変化は、DTH 反応に影響されるか、更に肺局所と全身反応において異なった動態を示すがあげられ、これらについて研究の焦点を求めた。

一般に BALF 中細胞成分は気道-肺胞系由来の細胞が主体であり、肺実質の間質に分布する細胞をも含んでいるかは定かでない¹⁾⁻³⁾。しかし、同様の実験系においても、BALF 中総細胞数と肺重量の変化が極めて相関し¹⁶⁾、更に BALF 中細胞分画の比率が、肉芽腫を含んだ肺胞胞隔のリンパ球並びに好中球の浸潤の程度と相関していたことは、肺内の病態変化が BALF 中細胞に反映されていたことを示唆している。また、T 細胞亜群の変化をみると、BALF と肺組織において、いずれ

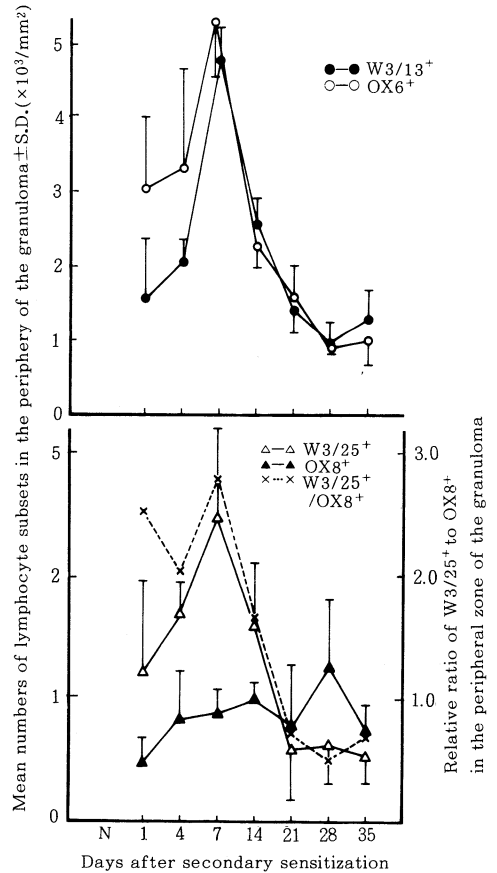


Fig. 7. The Fluctuations of Lymphocyte Subsets in the Periphery of the Granulomas in the Lungs Both W3/13-positive lymphocytes and OX6-positive lymphocytes showed a peak level on seven days after the secondary sensitization (upper panel). W3/25-positive T-cells reached a peak on seven days after the secondary sensitization while the ratio of W3/25-positive T-cells to OX8-positive T-cells kept high values during early stage and decreased at late stage (lower panel).

も DTH 反応初期には Th 細胞が増加し、後期になると T_H 細胞が増加するパターンを呈し、T 細胞亜群の変化においても、肺組織の反応と BALF の変化はほぼ相関していることが確認された。

肺組織反応の変化を胞隔と肉芽腫に分けて検討すると、胞隔におけるリンパ球浸潤は4日目ピークとなり、Th 細胞と T_H 細胞の比は平均 3.4 であった。肉芽腫においては7日目ピークで、平均 2.8 であり、BALF における変化とはほぼ同様であったが、その比は平均 2.2 と肺組織反応に比べやや低い値を示した。

サルコイドーシスや特発性間質性肺炎における BALF と肺組織について対比検討した報告¹⁷⁾¹⁸⁾によると、細胞分画の比率はほぼ一致するが、BALF 中の絶対数

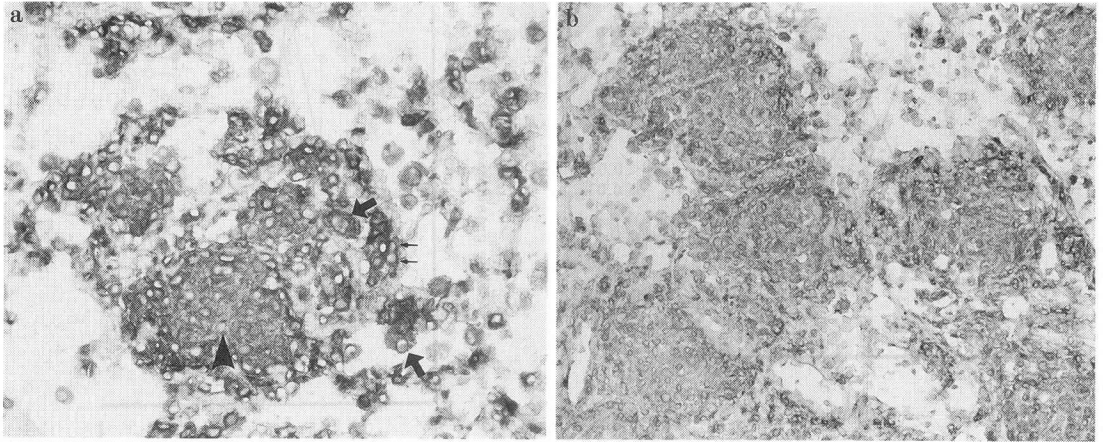


Fig. 8. Distribution of Ia-positive Alveolar Macrophages (AM ϕ) and Lymphocytes in the Granulomas of the Lungs

a) Ia-positive epithelioid cells (\blacktriangle) and AM ϕ (\blacktriangleright) in the granulomas and Ia-positive lymphocytes (\blacktriangleright) in the periphery of the granulomas were seen one day after the secondary sensitization. Methylgreen, $\times 100$.

b) Ia-positive epithelioid cells were seen diffusely in the granulomas at three weeks after the secondary sensitization. Methylgreen, $\times 50$

と組織における浸潤の程度には解離がある。Thrall¹⁹⁾らはブレオマイシン誘動ラット肺線維症において、BALFと肺組織のT細胞とB細胞の比はほぼ一致していたが、Th/TnH細胞比は異なっていることを報告している。この所見は本実験結果と異なるが、BALF中リンパ球の増加が軽微であること、BAL洗浄量が少量であること、肺組織分離リンパ球を対象としていることなどの実験方法上の相違によることが考えられる。ヒトにおけるBALFの意義については、更に喫煙その他の因子が加わり、慎重な評価が必要であろう。即ち対象となる疾患やBALFの施行部位における病変の分布や程度、及びBALF回収率の影響を考慮して肺組織反応を推察すべきである。実験動物では末梢血の混入が問題となろうが、この点に注意すれば、BALFは間質を含めた肺組織反応を十分に反映しており、BALは肺局所免疫担当細胞を検討する上で有意義な方法と考えられた。

次にDTH反応におけるAM ϕ の動態については、DTH反応でみられる類上皮細胞肉芽腫の細胞性起源として、単球からAM ϕ へ、AM ϕ から類上皮細胞へ分化することが以前より報告されている²⁰⁾²¹⁾。本実験系においては、二次感作後早期に、BALF中のIa⁺AM ϕ が著増するとともに、肺組織内における類上皮細胞膜抗原にもIa抗原が検出されることを示した(Fig. 8-a)。この結果は、局所へ浸潤したIa⁺AM ϕ が類上皮細胞へ分化することを示唆する現象と考えられる。Ia⁺AM ϕ を誘導させる因子としては、細菌菌体成分や感作T細胞からのリンホカインが報告されている²²⁾²³⁾。

本実験で示されたように、DTH反応で、Ia⁺AM ϕ が対照の約40倍まで増加するその機序として、二次感作後肺内で、BCGが検出されたこと¹⁴⁾から、AM ϕ がBCG菌体を貪食することにより活性化され、Ia抗原が発現されるとともに、肺内感作T細胞のリンホカインによって、更に増強されることが考えられる。Ia抗原が発現されたAM ϕ に、各種のサイトカイン¹³⁾²⁴⁾²⁵⁾が促進的に作用し、類上皮細胞へ分化し、肉芽腫形成を促していることが推察される。

AM ϕ のT細胞の機能と分化に対する影響については、まだ一定の見解はない²⁶⁾²⁷⁾。Holtらのラットにおける研究では、AM ϕ の多くはT細胞の増殖に抑制的に働き、少数のAM ϕ のみが刺激的に働くことを報告している²⁸⁾。本実験では、正常ラットにおけるAM ϕ のIa抗原陽性率は10%以下であり、DTH反応初期にIa⁺AM ϕ が急増した後に、Th細胞の増加がみられ、後期には、Ia⁺AM ϕ の減少とともに、リンパ球(Th細胞)が減少したことから、ラットにおいて肺内のT細胞増殖にIa⁺AM ϕ が関与していることが示唆される。

ヒトにおけるAM ϕ のIa抗原陽性率は90%以上であり²⁹⁾、Rossiらは³⁰⁾、ヒトHLA-DR⁺AM ϕ はT細胞の増殖に刺激的に、HLA-DR⁻AM ϕ は抑制的に働くことを報告しており、AM ϕ のIa抗原がT細胞の分化増殖において重要な役割を担っていると考えられる。

BALF中T細胞亜群の動態については、多くの研究報告がある。Crystalら及びHunnighakeらは、活動性の高いサルコイドーシス(BALF内リンパ球が28%

以上)のBALF中T細胞の多くは活性化しており、その亜群は T_H 細胞が主体で、 T_H 細胞と T_{NH} 細胞の比率は高くなることを示し、一方非活動型のサルコイドーシスでは低く、 T_H 細胞と T_{NH} 細胞のバランスは病勢に関連していると報告している⁴⁾⁵⁾。過敏性肺炎でのBALF中T細胞亜群のバランスは、吸入抗原の種類と量により異なり、夏型過敏性肺炎における T_H/T_{NH} 比は1以下が多く³¹⁾、農夫肺では1.0以上³²⁾と報告されている。Costabelらが3例の過敏性肺炎について、6カ月後にBALを施行し、そのT細胞亜群の比が正常化したと報告している⁷⁾。

本実験では、対照群のBALF中T細胞亜群では、 T_H 細胞がやや優位であり、 T_H/T_{NH} 比は末梢血よりも高かった。DTH反応初期の T_H/T_{NH} 比は、BALFと肺組織でともに上昇し、後期になると減少した。この事実はDTH反応の進行に伴って、T細胞亜群の生体内分布と病態が変化することを示唆している。

Ia^+ リンパ球は、DTH反応後1日目より増加し、末梢血では4日目まで、BALF中は35日目まで増加していた。 Ia 抗原を表現するリンパ球はB細胞と活性化T細胞であり、増加した Ia^+ リンパ球には両者が含まれていると考えられる。しかし、BALF中に占めるB細胞の比率に著変はないことより、BALF中に増加した Ia^+ リンパ球の多くが活性化T細胞と推定される。サルコイドーシスにおいても、BALF中T細胞が活性化されていることが示され⁴⁾、肺局所のDTH反応に伴う病態の一つと考えられる。

これらのT細胞や Ia^+ AM ϕ がDTH反応に伴い肺内に多数認められたが、その機序として、末梢血から肺局所への集積と肺内での増殖が考えられ、本実験系では両者の関与が推定される。前者については、気管支随伴リンパ組織(Bronchus-associated lymphoid tissue: BALT)の増大や、それに属する後毛細管静脈の拡張並びに内腔へのリンパ球の集積が観察³³⁾され、BALTを介した感作T細胞の帰巢現象³⁴⁾の関与が示唆された。後者については、 Ia^+ AM ϕ との関連で、T細胞が増殖する可能性について指摘した。

本実験において、BALF及び肺組織における Ia^+ AM ϕ や T_H 細胞、 T_{NH} 細胞の経時的分布を観察した結果から、機能的病態は推察されたが、AM ϕ の抗原提示能やT細胞との共同作用、T細胞亜群の機能面について、今後更に検討が必要であろう。

ま と め

近交系DAラットを用いて、BCG死菌感作による実験的肺肉芽腫症を作製し、肺局所のDTH反応における免疫系細胞の分布・病態について、特に Ia^+ AM ϕ とT細胞亜群のBALFと肺組織での変化を中心に検討した。

1. DTH反応の進行に伴い、初期に好中球が、中期よりリンパ球が増加した。BALF中T細胞亜群では、DTH反応中期まではヘルパーT細胞が主体であり、後期になるとノンヘルパーT細胞が主体となった。以上の病態変化は、末梢血では認められず、DTH反応に関与する免疫系細胞の肺局所の特異的動態であることが示唆された。更に、これら免疫担当細胞の動態が、肺組織とはほぼ同様にBALFでも観察され、BALFが肺組織反応を明確に反映することが認められた。

2. DTH反応による肉芽腫形成は、二次感作1日目より著明に認められた。この反応と同時に、BALFでは Ia^+ AM ϕ が著増し、肺組織では、類上皮細胞膜に Ia 抗原が認められ、AM ϕ の類上皮細胞への分化並びに肉芽腫形成反応に Ia 抗原が関与してい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第二内科学千田金吾博士に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第27回胸部疾患学会総会(東京)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59年度一般研究C59570323。

文 献

- 1) Myrvik, Q. N. et al. : Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in high state of purity, *J Immunol*, 86 : 128, 1961.
- 2) Reynolds, H. Y. et al. : Analysis of protein and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage, *J Lab clin Med*, 84 : 559, 1974.
- 3) Hunninghake, G. W. et al. : Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage, *Am J Pathol*, 97 : 147, 1979.
- 4) Crystal, R. G. et al. : Pulmonary sarcoidosis : A disease characterized and perpetuated by activated lung T-lymphocytes, *Ann Int Med*, 94 : 73, 1981.
- 5) Hunninghake, G. W. et al. : Pulmonary sarcoidosis. A disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of

- disease activity, *N Engl J Med*, 305 : 429, 1981.
- 6) Leatherman, J. W. et al. : Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis, *Ann Int Med*, 100 : 390, 1984.
 - 7) Costabel, U. et al. : T-lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis changes in profile of T-cell subsets during the course of disease, *Chest*, 85 : 514, 1984.
 - 8) Viale, G. P. et al. : T-cell subsets in sarcoidosis : an immunocyto-chemical investigation of blood, bronchoalveolar lavage fluid and prescalenic lymph nodes from eight patients, *Human Pathol*, 17 : 476, 1986.
 - 9) Semenzato, G. et al. : Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis. Phenotypic and functional analysis, *J Immunol*, 137 : 1164, 1986.
 - 10) Unanue, E. R. et al. : Immunologic events in experimental hyper-sensitivity glanulomas, *Am J Pathol*, 71 : 349, 1973.
 - 11) Salvaggio, J. et al. : Experimental production of glanulomatous pneumonitis, *J Allergy Clin Immunol*, 56 : 364, 1975.
 - 12) Moore, L. V. et al. : An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbit, *J Clin Invest*, 56 : 937, 1975.
 - 13) 千田金吾 : 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—気管支肺胞洗浄液の免疫学的意義—, *結核*, 60 : 7, 1985.
 - 14) 早川啓史 : 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.
 - 15) 早川啓史 : 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, *結核*, 61 : 57, 1986.
 - 16) 岡野昌彦他 : 実験的肺肉芽腫症での気管支随伴リンパ組織 (BALT) の役割—気管支肺胞洗浄細胞と肺組織の免疫組織化学的検討—, *リンパ学*, 10, 101, 1987.
 - 17) Davis, S. G. et al. : Analysis of airspace and interstitial mononuclear cell population in human diffuse interstitial lung disease, *Am Rev Respir Dis*, 118 : 7, 1978.
 - 18) Semenzato, G. et al. : Bronchoalveolar lavage and lung histology, Comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cells in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis, *Am Rev Respir Dis*, 132 : 400, 1985.
 - 19) Thrall, S. R. et al. : A comparison of lymphocyte population in lung tissue and in bronchoalveolar lavage fluid of rats at various times during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Am Rev Respir Dis*, 129 : 279, 1984.
 - 20) Chambers, J. T. et al. : Inflammatory giants cells, *Immunobiol*, 161 : 283, 1982.
 - 21) Hance, A. J. et al. : Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies : Changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis, *J Immunol*, 134 : 284, 1985.
 - 22) Beller, D. I. et al. : Reciprocal regulation of macrophage and T cell function by way of soluble mediators lymphokines, *Academic Press New-York*, 6 : 25, 1982.
 - 23) 山下 昭 : GVH 反応における T 細胞—マクロファージの相互作用 : マクロファージとその周辺, 小島瑞編, 羊土社, 東京, 301, 1985.
 - 24) Sone, S. et al. : Kinetics and ultrastructural studies of the induction of rat alveolar macrophage fusion by mediators released from mitogen-stimulated lymphocyte, *Am J Pathol*, 103 : 234, 1981.
 - 25) Onozaki, K. et al. : Role of lymphokines in regulation of macrophage differentiation, *Cell Immunol*, 76 : 129, 1983.
 - 26) Poulter, W. L. : Review. Antigen presentation cells in situ ; their identification and involvement in immunopathology, *Clin Exp Immunol*, 53 : 513, 1983.
 - 27) Unanue, R. E. et al. : Antigen presentation : Comments on its regulation and mechanism, *J Immunol*, 132 : 1, 1984.
 - 28) Holt, G. P. : Alveolar macrophages, II Inhibition of lymphocyte proliferation by purified macrophages from rat lung, *Immunology*, 37 : 429, 1979.
 - 29) Razma, G. A. et al. : Expression of Ia-like (DR) antigen on human alveolar macrophage isolated by bronchoalveolar lavage, *Am Rev Respir Dis*, 129 : 419, 1984.
 - 30) Rossi, A. G. et al. : Alveolar macrophage

stimulation of T-cell proliferation in autologous mixed lymphocyte reactions, *Am Rev Respr Dis*, 133 : 78, 1986.

- 31) 泉 考英 : 肉芽腫性肺疾患, 呼吸 3 : 2, 1984.
- 32) 小西一樹他 : 農夫肺 17 例の臨床像とその疫学的背景因子, 日胸疾誌, 23 : 679, 1985.
- 33) 岡野昌彦他 : 実験的肺肉芽腫症における肺局所免疫

の研究—遅延型アレルギー反応に果たす気管支随伴リンパ組織の役割について—, 結核, (投稿中)

- 34) Brugge-Gamelkoorn, G. J. et al. : The specificity of the high endothelial venule in Broncho-associated lymphoid tissue (BALT), *J Immunol*, 134 : 3746, 1985.