

原 著

実験的肺肉芽腫症における肺組織および気管支随伴リンパ組織
(BALT) に対する糖質コルチコイド剤の影響

源 馬 均・佐藤 篤彦

浜松医科大学第二内科

受付 昭和63年11月21日

EFFECT OF GLUCOCORTICOID ON LUNG TISSUE AND BRONCHUS-ASSOCIATED
LYMPHOID TISSUE OF EXPERIMENTAL GRANULOMATOUS LUNG

Hitoshi GEMMA* and Atsuhiko SATO

(Received for publication November 21, 1988)

The effect of glucocorticoid on the immunological response in the delayed type hypersensitivity reaction of granulomatous disorders was investigated in order to elucidate the mechanism of glucocorticoid on the suppressive course of the reaction.

Experimental pulmonary granuloma model in rats was induced by an intravenous injection of heat killed BCG, and the effects of methylprednisolone (MPSL) on the granulomatous lung tissue, bronchus associated lymphoid tissue (BALT) and the population of cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood were examined by the cytological and immunohistochemical methods.

The pulmonary granulomatous reaction was reduced effectively by the administration of MPSL. A remarkable reduction of the number of Ia antigen positive alveolar macrophages ($Ia^+A \cdot M\phi$) and T lymphocytes in the granulomatous lung tissue and BALF was observed. T helper cells to non-helper cells (T_H/T_{NH}) ratio in BALF decreased remarkably. Furthermore, a reduction of Ia antigen positive macrophages ($Ia^+M\phi$) and T cells was noted in the parafollicular area of BALT. These findings suggest that glucocorticoid may suppress the immunological activity of $M\phi$ and T cell through its inhibitory effect on the differentiation of $Ia^+M\phi$ and activated T cells, which may result in the diminishment of pulmonary granulomatous reaction through the disorder of $M\phi$ -T cell interaction.

On the other hand, lymphocytopenia with decreased T_H/T_{NH} ratios in peripheral blood was observed simultaneously with the reduction of the pulmonary granulomatous reaction. Thus, the mechanism of reduced pulmonary granulomatous reaction after MPSL administration may be not only due to local immunosuppression, but also to impaired systemic immune response.

In addition, the disappearance of the germinal center and the reduction of surface IgM-positive cells in the follicular area of BALT occurred with the reduction of pulmonary

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

granulomatous reaction. These results suggest that glucocorticoid also suppress the humoral immune responses in BALT during the course of delayed type hypersensitivity reaction.

Key words : Experimental granulomatous lung, Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT), Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), Glucocorticoid, T-cell subsets, Ia antigen positive macrophages

キーワード : 実験的肉芽腫肺, 気管支随伴リンパ組織, 気管支肺胞洗浄液, 糖質コルチコイド, T細胞亜群, Ia抗原陽性マクロファージ

緒言

肉芽腫性肺疾患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) の導入^{1)~3)}と各種の血液細胞を認識する単クローン抗体を用いた免疫組織化学法などの発達により急速に進展した^{4)~6)}。さらに、肺肉芽腫症動物モデルの開発により肺肉芽腫性病変の形成過程に基礎的検討が加えられてきた^{7)~9)}。一方、これら肺肉芽腫症モデルに対する免疫抑制剤の影響については、サイクロスポリン A やサイクロフォスファミドに関する報告¹⁰⁾¹¹⁾は散見されるが、肉芽腫性肺疾患の治療に臨床上市しばしば用いられている糖質コルチコイド剤の影響に関する基礎的検討はまだまだ乏しい。

気道は常に種々の外来性抗原物質に暴露しており、この気道粘膜下には気管支随伴リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue; BALT) と称される末梢性リンパ組織が存在する¹²⁾¹³⁾。われわれは、過敏性肺炎を含む各種呼吸器疾患患者において BALT 過形成がみられることを報告し¹⁴⁾、さらに家兎およびラットの遅延型アレルギー反応 (delayed type hypersensitivity reaction; DTH 反応) モデルを用いて、肺 DTH 反応と BALT が密接に相関して推移することを明らかにした^{15)~18)}。そこで今回は、肺 DTH 反応モデル動物に糖質コルチコイド剤を投与した際の肺肉芽腫組織、BALT、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF)、末梢血などの変化を檢察し、免疫担当細胞・組織の病態変化の観点から本剤が DTH 反応に及ぼす影響を基礎的に検討した。

材料と方法

1. 実験動物と肺肉芽腫症の作製

近交系雄 DA (RT1^a) ラット (体重 180~220 g) を使用し、非無菌下の状態で飼育した。ラットに BCG 死菌 250 μ g/50 μ l Bayol F を陰茎背静脈より 1 回静注し、肺肉芽腫症モデルラットを準備した。

2. 肺体重比の測定と BALF の回収

ラットを脱血死させたのち肺を摘出し、肺組織反応の簡便な指標として肺重量と体重の比 (肺体重比) を測定した。次いで、摘出肺の気管に 16 G 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 回反復して BALF の総回収量を測定した。回収率は各群、各時期において 90% 以上で、ほぼ一定していた。200 G、10 分間の遠心により分離された細胞成分を 0.5% 牛血清アルブミン・リン酸バッファー (BSA-PBS, pH 7.2) に再浮遊させ、既報¹⁵⁾の方法に準じて BALF 総細胞数と細胞分画を測定した。

3. 末梢血と BALF 中のリンパ球亜群および BALF 中の Ia 抗原陽性マクロファージの測定

末梢血については血液塗抹標本によりリンパ球比率を算定した。一方、赤血球を溶血させたのち白血球浮遊液 (0.5% BSA-PBS) を作製し、細胞遠沈法で細胞塗抹標本を準備した。BALF 細胞についても同様に細胞塗抹標本を作製した。これらの細胞塗抹標本に対してラットの各種白血球の膜抗原を認識する単クローン抗体 (mAb) である W3/25 (抗ヘルパー T 細胞; TH), OX8 (抗ノンヘルパー T 細胞; TNH), OX6 (抗 Ia 抗原) [いずれも Seralab 社] を一次抗体とし、Biotin-Strept Avidin amplified system (B-SA system, Biogenex 社) を用いて間接型免疫組織化学染色を施し、各陽性細胞の比率を算定した。さらに BALF 中に含まれるマクロファージ (M ϕ) のうち Ia 抗原陽性細胞亜群は OX6 で同定した。

4. 組織学的および免疫組織化学的検索

左側肺では HE 染色あるいはメチルグリーンピロニン染色による組織学的検討を、右側肺では periodate-lysine-paraformaldehyde 固定後に凍結切片標本を作製し、免疫組織化学的検索を行った。免疫酵素抗体法的一次抗体としては前述の 3 種類の mAb のほかに山羊抗ラット γ 鎖血清、山羊抗ラット α 鎖血清、山羊抗ラット μ 鎖血清 (いずれも Cappel 社) の 3 種のポリクロナル抗体を用いて、前項と同様に B-SA system により

免疫組織化学染色を施した。

5. 薬 剤

糖質コルチコイドとして methylprednisolone sodium succinate (Upjohn 社) を用い、投与量は methylprednisolone (MPSL) の相当量に従って記載した。

6. 統計学的検定

ラットの個体数は糖質コルチコイド投与量決定のための予備実験を除いて、各群の各時期とも4匹以上とし、有意差判定は student t 検定によった。

結 果

1. 肺体重比の変化および糖質コルチコイド剤投与量の決定

BCG 静注後7日、14日、21日、35日、42日にラットを屠殺し、各時期において肺体重比と肉芽腫反応の組織学的検討を行った。その結果は、肺体重比が感作後第35日まで漸増を続けた (Fig. 1)。一方、組織学的には第21日以降で周囲に著しい単核細胞浸潤を伴う成熟した多数の類上皮細胞肉芽腫巣が認められた。したがって、肉芽腫反応抑制の実験系としては、第21日に糖質コルチコイド剤の投与を開始することが妥当と考えられた。

次に、副作用の顕症化を伴わずに肉芽腫反応を抑制する糖質コルチコイド剤の投与量を検討した。実験群として、A群：MPSL 40 mg/kg 体重を第21日に1回筋注、B群：同剤同量を第21日と第22日の2回筋注、C群：同様に第21日、第22日、第23日の3回筋注、の3群を準備し、各群とも MPSL 最終投与の1日後、4日後、8日後に屠殺し、BCG 感作のみの群と対比検討した。

その結果、組織学的には、A群では肉芽腫形成の抑制を認めず、B群では1日後と4日後に肉芽腫反応は消退傾向を示したが、8日後には再び反応の増大をみた。C群では1日後と4日後に著しい肉芽腫の消退をみたが、肺炎を併発する個体も存在した。肺体重比は組織学的に認められた肉芽腫反応の経過をよく反映しており、B群とC群では1日後と4日後に同様の低下がみられ、8日後には回復傾向を示した (Fig. 1)。

以上の予備実験の結果から、BCG 感作後第21日と22日に MPSL 40 mg/kg 体重の2回筋注群を MPSL 処置群とすることが適当であると判断し、第23日、第26日、第30日、第37日に脱血死させて、前述の BCG 単独群と比較検討した。

その結果、MPSL 処置群の肺体重比は BCG 単独群第21日と比較して、第23日に有意な低下を示し第26日にはさらに前値の約80%にまで低下したが、第30日以降には回復傾向を示した。

2. BALF 中の細胞の推移

Fig. 2 は BALF 中の総細胞数と細胞分画の推移を示

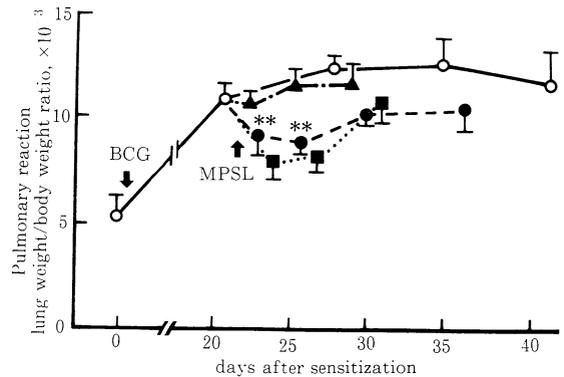


Fig. 1. Effect of glucocorticoid-treatment on the pulmonary granulomatous reaction in the BCG-sensitized rats. The degree of the reaction is expressed as a ratio of the lung weight to the body weight. There was a gradual increment of the ratio until day 35 in the group without MPSL-treatment (○—○), and in the group once MPSL-treated (▲-▲) little change was seen in the ratio. Whereas, in the group twice MPSL-treated (●-●) and thrice MPSL-treated (■-■), the ratios were suppressed on the early phase after MPSL-treatment. ** $p < 0.05$

す。BCG 感作後には BALF 細胞数は著増し、第21日には正常群の約8倍にまで増加した。一方、MPSL 処置群では第23日と第26日ですれも処置前と比べ有意な減少を示したが、その後漸増した。

細胞分画をみると、BCG 感作後第21日にはリンパ球約17%、好中球約14%と増加し、その後も第42日にいたるまでいずれも高値を保った。それに対し、MPSL 処置群では、第23日 (処置1日後) にリンパ球3.8%、好中球2.7%と急速に減少し、絶対数でもリンパ球は処置前の約22%、好中球は約19%へと著明な減少を示した。その後は第26日 (処置4日後) 以降に両者ともしだいに回復した。Mφ は BCG 感作後第21日には、絶対数で正常群の約6倍に増加したが、MPSL 処置後の第26日には処置前の約45%に減少し、その後漸増した。

3. BALF 中の細胞亜群の変化

(a) Ia 抗原陽性細胞

正常群での Ia 抗原陽性肺胞マクロファージ (Ia⁺ A・Mφ) の陽性率は低値 (3.5%) であったが、BCG 感作後第21日には約12倍以上に著増し、以後第42日にいたるまでほぼ同じレベルを保った (Fig. 3-A)。絶対数でみると、感作後第21日には正常群の約60倍に増加した。これに対し MPSL 処置群では、処置直後 (第23日と26日) に Ia⁺ A・Mφ の著明な減少がみられ絶対

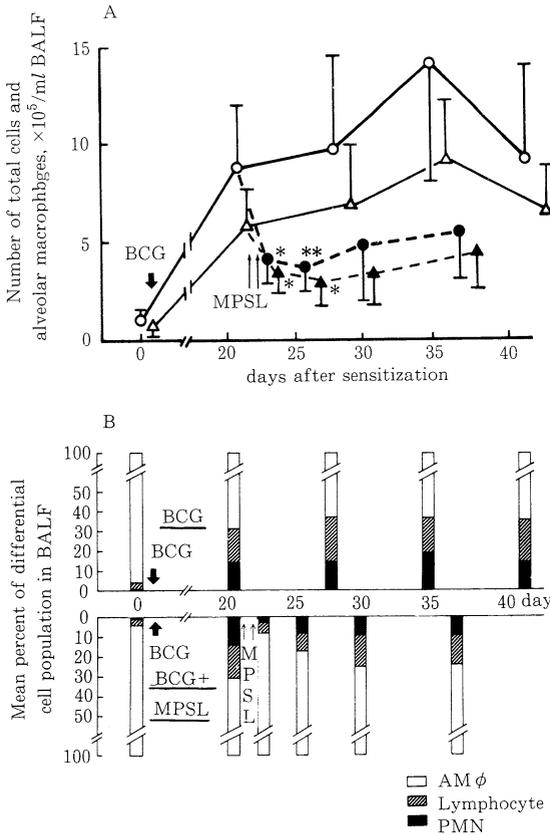


Fig. 2. Changes in the number of total cells and alveolar macrophages in BALF of the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment, and their differential cell populations. (A) The number of total cells and alveolar macrophages in the group with MPSL-treatment were significantly reduced on day 23 and day 26, compared with those in the group without MPSL-treatment on day 21. ○—○: number of total cells, △—△: number of alveolar macrophages, each solid symbol refers to those after MPSL-treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) The percents of lymphocytes and neutrophil leukocytes of BALF cells increased in the group without MPSL-treatment (upper column). On the contrary, those proportions were reduced on the early phase after MPSL-treatment, and showed a gradual recovery on the later phase (lower column).

数でも対照の30%以下に減少したが、後期(第30日と37日)に約70%まで回復した。

Ia抗原陽性リンパ球(Ia⁺Ly)の陽性率は、正常群で約20%を示し、感作後にも比率において有意な変化が認められなかったが、絶対数を見ると第21日では正

常群の値の約75倍と著増を示した。MPSL処置群では早期に比率、絶対数とも減少したが、その後しだいに回復した(Fig. 3-B)。

(b) T細胞亜群

W3/25陽性細胞(T_H)とOX8陽性細胞(T_{NH})の分画をみると、正常群ではおのおの平均35.2%と24.3%であり、BCG感作後にも有意な変動はみられなかった(Fig. 3-C, D)。一方、MPSL処置群においては、T_Hの比率は早期に有意な減少を示したが、その後しだいに回復した。T_{NH}の比率は処置後に増加傾向を示した。T_H/T_{NH}比はMPSL処置後早期では一時減少したが、後期になると回復した(Fig. 3-E)。絶対数の変動をみると、両細胞亜群ともBCG感作後に著しく増多し、第21日には両者とも感作前値の約70倍に達した。MPSL処置後では、早期に両者とも処置前の値の10%以下にまで著減した。しかし、後期にはしだいに回復した。

4. 末梢血中の細胞亜群の変化

(a) Ia抗原陽性リンパ球

末梢血中のIa⁺Lyの比率は正常群において約19%であり、BCG感作後にも有意な変化を示さなかった。一方、MPSL処置群では早期にリンパ球の減少(処置前値の約30~40%)を伴ってIa⁺Lyの陽性率の低下が認められ、絶対数では第26日には処置前値の約27%に減少し、その後しだいに回復した(Fig. 4-B)。

(b) T細胞亜群

T細胞亜群はBCG感作前後で有意な変化を示さなかった。MPSL処置群では比率においてT_Hの減少とT_{NH}の増多、およびT_H/T_{NH}比の低下が処置後早期に認められた(Fig. 4-B, C, D)。絶対数においては両者とも有意に減少し、この傾向は第37日まで認められた。

5. 組織学的検索

肺組織をみると、BCG感作後第21日以降に周囲に豊富な単核細胞浸潤を伴う多数の成熟した類上皮細胞肉芽腫巣が肺内に出現し、この肉芽腫性病変は第42日まで持続した(Fig. 5-A)。一方、BALTの変化としては、BCG感作によりBALTは増大し、傍濾胞領域(parafollicular area; PFA)内に散在的に肉芽腫巣が認められ、濾胞領域(follicular area; FA)内に正常群では認められなかったよく発達した胚中心が出現した(Fig. 5-C)。

MPSL処置群では、処置後早期に肺肉芽腫反応の減弱が認められた。すなわち、肉芽腫巣は縮小し、肉芽腫を構成する類上皮細胞の間隙が疎となり、周囲の単核細胞浸潤の程度も減少していた(Fig. 5-B)。しかし、後期になると肉芽腫反応の再燃の所見が認められた。一方、BALTにおいても、処置後早期に胚中心の消失と肉芽腫の減弱を伴ってBALTの大きさも縮小していた(Fig. 5-D)。しかし、後期になるとFAの顕在化とBALT

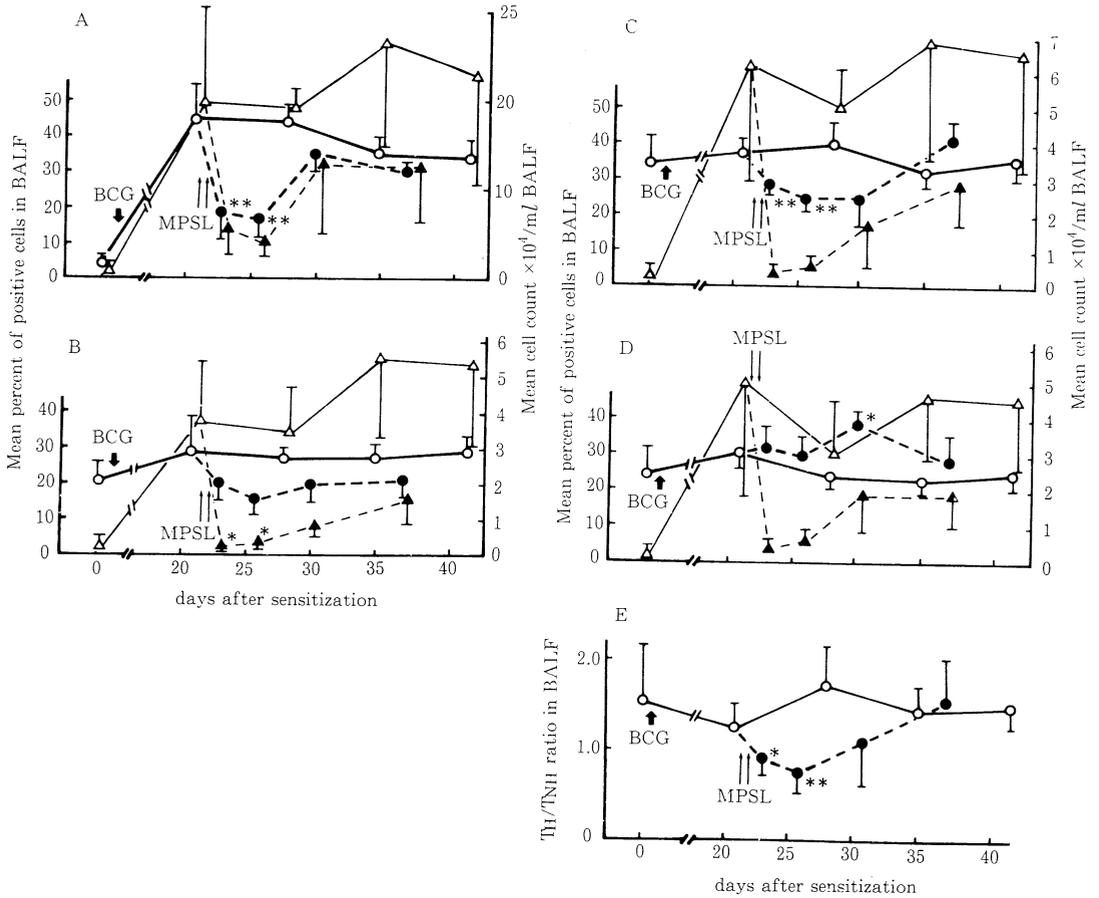


Fig. 3. Changes in the percentage and the number of Ia antigen positive alveolar macrophages ($Ia^+ A \cdot M\phi$) and lymphocyte subsets in BALF of the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment. $\circ - \circ$: percentage of positive cells, $\triangle - \triangle$: number of positive cells, each solid symbol refers to those after MPSL-treatment.

(A) Changes of $Ia^+ A \cdot M\phi$. $Ia^+ A \cdot M\phi$ showed a marked increase in both the number and the proportion after BCG sensitization. Whereas, there was a notable decrease in the both of $Ia^+ A \cdot M\phi$ on the early phase after MPSL-treatment. (B) Changes of Ia antigen positive lymphocytes ($Ia^+ Ly$). There was little change in the percentage of $Ia^+ Ly$ after BCG sensitization, but a remarkable increase in the number was observed. MPSL-treatment resulted in a significant decrease of the number of $Ia^+ Ly$ on the early phase. (C) Changes of W3/25 positive lymphocytes (helper T cells : Th). Th showed a remarkable increase in the number after BCG sensitization, and a significant decrease on the early phase after MPSL-treatment. (D) Changes of OX8 positive lymphocytes (non-helper T cells : Tnh). After MPSL-treatment, Tnh showed an upward trend in the proportion, but a notable decrease in the number on the early phase after MPSL-treatment. (E) Changes in the Th/Tnh ratio. A significant decrease was observed on the early phase after MPSL-treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

の再発達の所見がみられた。

一方、他のリンパ系組織をみると、MPSL 処置後早期に胸腺皮質の萎縮が認められたが、後期には回復して

いた。脾臓においても、処置後早期にその重量の低下を伴って白脾髄領域が萎縮したが、やはり後期には回復した。

6. 免疫組織化学的検索

BCG 感作群においては、肉芽腫周囲および胞隔に多数の $Ia^+ A \cdot M \phi$ と $Ia^+ Ly$ (Fig. 6-A) および Th (Fig. 7-A), TnH (Fig. 8-A) の出現が認められた。膜表面免疫グロブリン陽性リンパ球 ($sIg^+ Ly$) としては $sIgM^+ Ly$ が少数出現したが、 $sIgA^+ Ly$ や $sIgG^+ Ly$ はほとんど認められなかった。一方、BALT においてはその大きさの増大に伴って、PFA 内の $Ia^+ M \phi$, $Ia^+ Ly$, Th , TnH のいずれも増加しており、FA 内では $Ia^+ Ly$ と Th の増加が認められ (Fig. 6-C, D, 7-C, 8-C), FA 内のリンパ球の多くが $sIgM$ 陽性であった。 $sIgG^+ Ly$ は BALT 内にほとんど認められず、 $sIgA^+ Ly$ は BALT の気道粘膜面を構成するリンパ上皮 (lymphoepithelium) 内に限局的に認められた。

MPSL 処置群においては、処置後早期に肺肉芽腫反応の消退と一致して肉芽腫周囲の $Ia^+ A \cdot M \phi$, $Ia^+ Ly$, Th , TnH のいずれも著しく減少し (Fig. 6-B, 7-B, 8-B), $sIgM^+ Ly$ はほとんど認められなかった。BALT

においても早期に PFA 内の $Ia^+ M \phi$ と $Ia^+ Ly$, Th , TnH の四者とも減少し (Fig. 6-E, 7-D, 8-D), FA 内では $Ia^+ Ly$ (Fig. 6-E) と $sIgM^+ Ly$ の消退が認められた。これら一連の変化は、後期にははだいに回復した (Table)。

考 察

死菌 BCG 1 回感作によりラット肺肉芽腫モデルを作製した。この実験モデルでは、感作後第 21 日から第 42 日まで長期間にわたり成熟した類上皮細胞肉芽腫巣が認められ、薬剤による肉芽腫抑制実験に適する動物モデルと考えられ、MPSL を 40 mg/kg 体重で BCG 感作後第 21 日と第 22 日にラットに筋注することにより、肺肉芽腫反応が消退した。

薬物処置後早期に BALF 中の細胞数が減少したが、とくに $A \cdot M \phi$ の減少が著しかった (Fig. 2-A)。 $A \cdot M \phi$ の起源については、van Furth¹⁹⁾ はそのほとんどが末梢血単球に由来すると主張した。しかし最近、

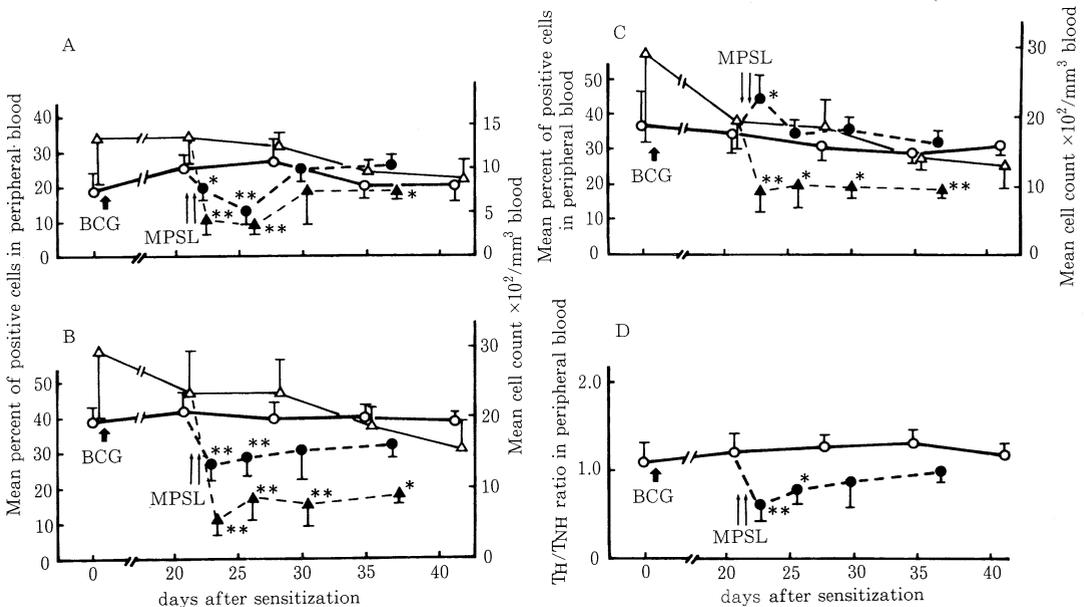


Fig. 4. Changes in the percentage and the number of lymphocyte subsets in peripheral blood from the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment. (○—○, △—△, ●—●, ▲—▲: see fig. 3.)

(A) Changes of Ia antigen positive lymphocytes ($Ia^+ Ly$). $Ia^+ Ly$ showed a significant decrease in both the proportion and the number after MPSL-treatment. (B) Changes of W3/25 positive lymphocytes (helper T cells: Th). Th showed a significant decrease in both the proportion and the number after MPSL-treatment. (C) Changes of OX8 positive lymphocytes (non-helper T cells: TnH). TnH showed an upward trend in the proportion after MPSL-treatment, but was significantly reduced in the number. (D) Changes in the Th/TnH ratio. A significant decrease was presented on the early phase after MPSL-treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

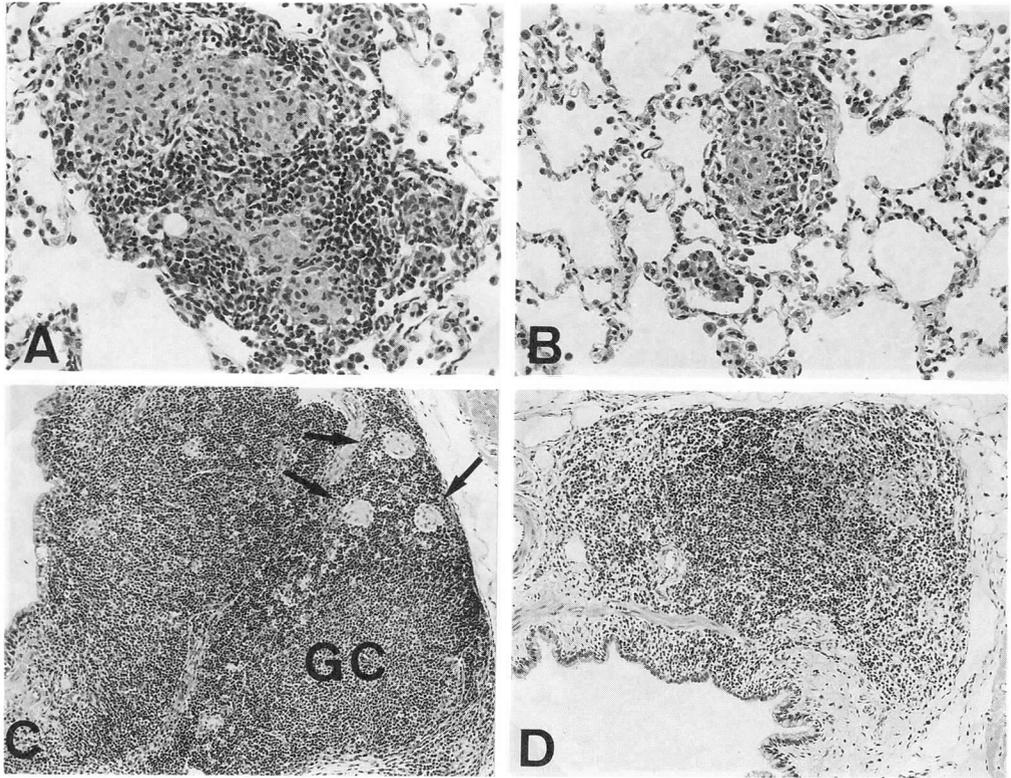


Fig. 5. Pathological findings of the epithelioid cell granulomas in the lung and the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment.

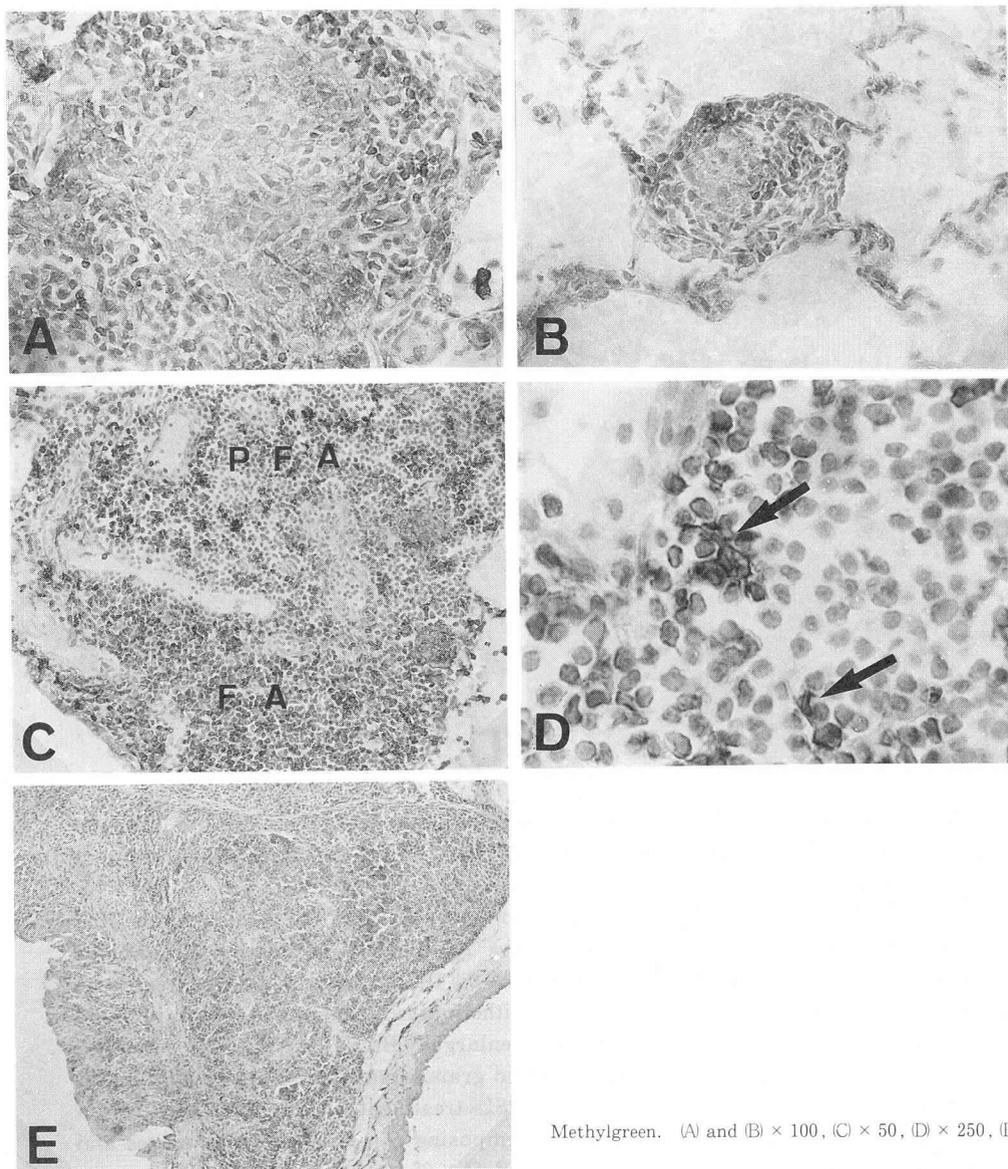
(A) The group without MPSL-treatment on day 21. Note the mature epithelioid cell granuloma-formation and a massive lymphocyte-infiltration around the granulomas and within the alveolar septa. (B) The group with MPSL-treated on day 26. There was a rapid reduction of epithelioid cell granuloma-formation and lymphocyte-infiltration. (C) Note the enlarged BALT with well developed germinal center (GC) in follicular area and granulomas (arrow) in para-follicular area on day 21. (D) The group with MPSL-treatment on day 26. There was a marked reduction of the size of BALT composing of scarce of lymphocytes and germinal center. HE, (A) and (B) $\times 50$, (C) and (D) $\times 25$.

彼らは一部 (30%以下) には肺内増殖する $M\phi$ が存在することを報告し、修正説を提唱した。さらに BCG 死菌投与による肺急性炎症マウスでは、血液単球の肺内への流入と肺局所での増殖がともに増加することを報告している²⁰⁾。またサルコイドーシスを含むヒトの慢性炎症性肺疾患においても、 $A \cdot M\phi$ が肺内増殖することが報告されている²¹⁾。

一方、糖質コルチコイドの効果については、正常マウスにおいて持続型ヒドロコチゾン投与が末梢血単球の著減をもたらし、さらに肺内流入と局所増殖を抑制して BALF 中の $A \cdot M\phi$ が減少する事実²²⁾ や、*in vitro* での単球から $M\phi$ への分化を糖質コルチコイドが抑制

すること²³⁾、 $M\phi$ の migration inhibitory factor に対する感受性を低下させること²⁴⁾ などが報告されている。したがって、本実験においてみられた $A \cdot M\phi$ の減少は、糖質コルチコイドが肺肉芽腫性炎症においても血液単球の肺内への流入、 $M\phi$ への分化および肺内増殖のいずれに対しても抑制的に作用した結果であろうと推察される。

さらに、薬物投与後、肺肉芽腫反応が減弱するにつれて $Ia^+ A \cdot M\phi$ の著減が認められた (Fig. 3-A)。 $Ia^+ M\phi$ を誘導する因子としては、BCG を含む各種の菌体成分やリンホカインが知られている²⁵⁾。最近、Snyder ら²⁶⁾ は糖質コルチコイドが *in vitro* でリンホカインに



Methylgreen. (A) and (B) $\times 100$, (C) $\times 50$, (D) $\times 250$, (E) $\times 25$.

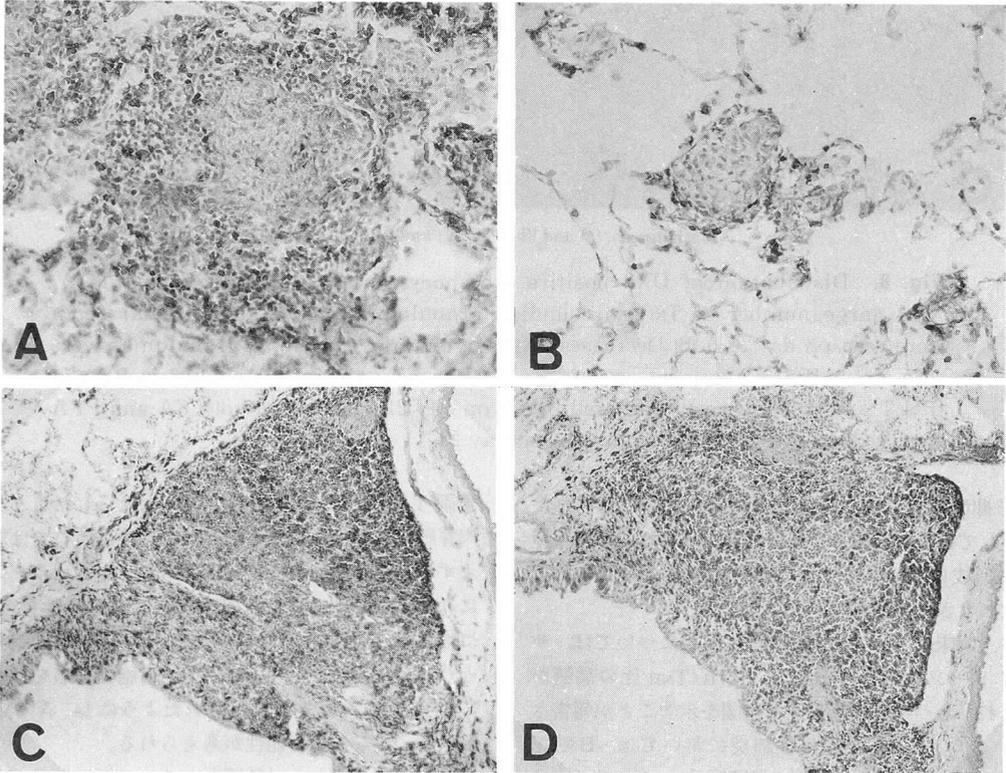
Fig. 6. Distributions of Ia antigen positive (Ia⁺) cells in the granuloma of the lungs and BALT of the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment. (A) Accumulation of Ia⁺ lymphocytes and Ia⁺ alveolar macrophages into the periphery of granulomas was seen in the group without MPSL-treatment on day 21. (B) Infiltration of Ia⁺ lymphocytes and Ia⁺ alveolar macrophages surrounding granulomas decreased in number in the group with MPSL-treatment on day 23. (C) Follicular area (FA) of BALT mainly consisted of Ia⁺ lymphocyte, and a massive infiltration of Ia⁺ cells were seen within enlarged parafollicular area (PFA) on day 21. (D) High magnification view of PFA on day 21 reveals that Ia⁺ cells are composed of Ia⁺ macrophages (arrow) and Ia⁺ lymphocytes. (E) Degree of Ia⁺ cell-infiltration decreased in both FA and PFA after MPSL-treatment on day 23.

より誘導されるMφのIa抗原発現を抑制することを明らかにし、アラキドン酸代謝産物がIa抗原の発現を変化させることから、同剤はプロスタグランジン系への作用を介して抑制作用を発揮する可能性を指摘している。Fig. 3で示されたように、MPSL処置後T細胞が減少することから考えると、 $Ia^+ A \cdot M\phi$ の減少は、リンホカインのIa抗原誘導作用の抑制のほかに、リンホカインの産生細胞であるT細胞の絶対数減少にも起因すると推測される。

次に、BALF中のリンパ球の変動をみると、肉芽腫の消退に一致してリンパ球数の著減が認められ (Fig. 2)、また、リンパ球亜群のうち $Ia^+ Ly$ の減少が著明であった (Fig. 3-B)。一般にIa抗原を表現するリンパ球はB細胞と活性化T細胞であるので、変動した $Ia^+ Ly$ には両者が含まれていると考えられる。しかし、BCG単独群肺組織の免疫組織化学的検索では、 $Ia^+ Ly$ に比べ

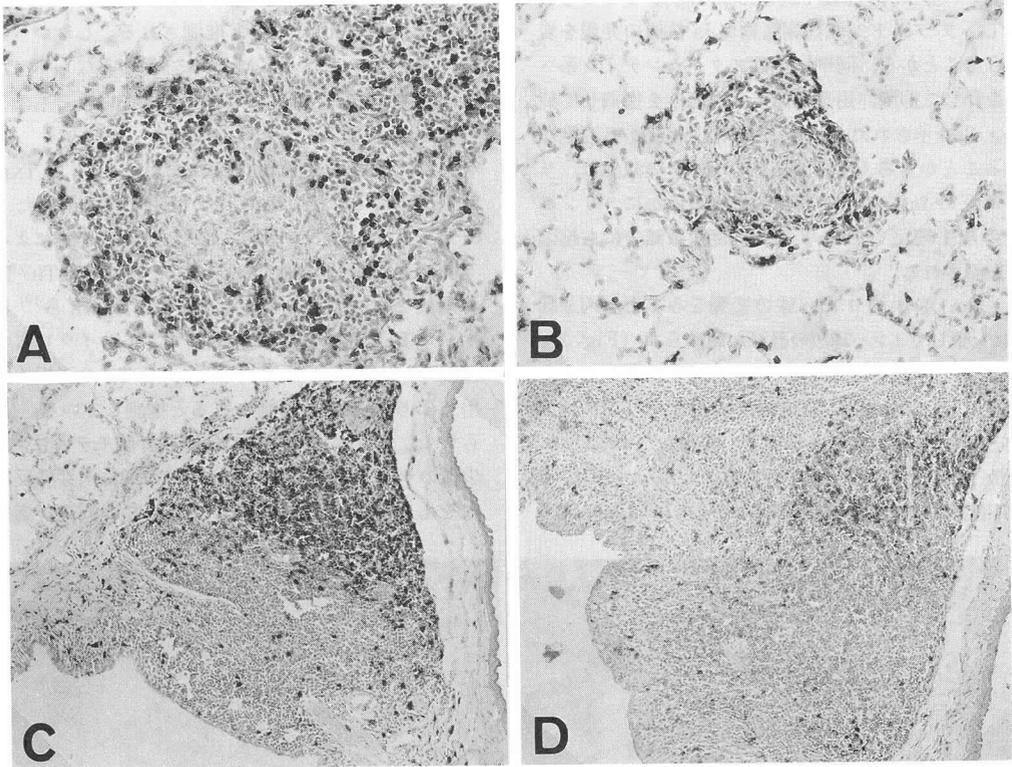
て $sIg^+ Ly$ が少数であったことから、変動した $Ia^+ Ly$ の多くは活性化T細胞と推測される。したがって、糖質コルチコイドは $Ia^+ M\phi$ の分化のみならず、活性化T細胞のIa抗原発現にも抑制的に作用するものと考えられる。

次に、MPSL処置後早期において、 T_H と T_{NH} の絶対数が著減し、 T_H/T_{NH} 比の低下が認められた (Fig. 3-C, D, E)。すでに岡野ら²⁷⁾は、BCG感作によるラット肺肉芽腫形成過程において、その初期に T_H/T_{NH} 比が高値を示すことを報告した。Takizawaら¹⁰⁾は、マウスのBCG肺肉芽腫モデルに対するサイクロスポリンA投与の実験成績から、同剤による T_H の選択的減少作用により肉芽腫が抑制されると推測している。Mooreら¹¹⁾は、同じくマウスBCG肺肉芽腫モデルにおいて、少量のサイクロフォスファミドが逆に肉芽腫反応の増大をもたらすことを報告し、低濃度の同剤が選択的に



Methylgreen. (A) and (B) $\times 50$, (C) and (D) $\times 25$.

Fig. 7. Distribution of W3/25 positive lymphocytes (helper T cells : T_H) in the granuloma of the lungs and BALT of the BCG-sensitized rats given the glucocorticoid-treatment. (A) Numerous T_H surrounding granulomas and within alveolar septa were seen on day 21. (B) Decreased T_H surrounding diminished granulomas were seen after MPSL-treatment on day 23. (C) T_H were distributed mainly in PFA of BALT which seen diffusely in FA on day 21. (D) T_H in both FA and PFA were reduced after MPSL-treatment on day 23.



Methylgreen, (A) and (B) $\times 50$, (C) and (D) $\times 25$.

Fig. 8. Distribution of OX8 positive lymphocytes (non-helper T cells : T_{NH}). (A) A large number of T_{NH} surrounding granulomas and within alveolar septa were seen on day 21. (B) Decreased T_{NH} surrounding diminished granulomas were seen after MPSL-treatment on day 23. (C) T_{NH} were almost distributed in PFA of BALT and were scarcely scattered in FA on day 21. (D) T_{NH} in both FA and PFA were reduced after MPSL-treatment on day 23.

T_{NH}を抑制することによって肉芽腫反応が強化されたと推定している。これらの報告では、いずれも肺肉芽腫反応の形成に T_H が関与し、抑制に T_{NH} が関与するとの推定がなされている。

一方、臨床上、ヒトの肉芽腫性肺疾患については、サルコイドーシス患者の BALF で T_H/T_{NH} 比の高値が認められ、かつ疾病の活動性と相関を示すことが報告されている⁴⁾。しかし、過敏性肺炎においては、BALF 中の T_H/T_{NH} 比が 1.0 以下の症例がむしろ多数を占めている²⁸⁾。著者らも抗原からの隔離直後にも BALF 中の同比が低値を示す過敏性肺炎症例の存在を報告した²⁹⁾。

以上のごとく、動物モデルにおいて、T_H が肺肉芽腫の形成維持に促進的に、T_{NH} が抑制的に関与が考えられる実験的事実に対比して、ヒトにおいては、肉芽腫性肺疾患の病態に果す両者の意義はまだ明らかでない。今回の研究成績では、MPSL 投与が T_H/T_{NH} 比のみなら

ず両 T 細胞群の絶対数の著減をもたらしたことから、肉芽腫形成過程における両亜群の意義については言及しえず、この問題は今後の課題である。糖質コルチコイドによる T 細胞の減少の機序としては、活性化 T 細胞におけるインターロイキン 2 産生を本剤が抑制すること³⁰⁾、さらに I_a⁺ A⁺ M ϕ が T 細胞の増殖を刺激すること³¹⁾ から、本実験で示されたように I_a⁺ A⁺ M ϕ の減少によるなどの可能性が考えられる。

これらの所見から、糖質コルチコイドは単球-M ϕ の肺局所への流入、分化、増殖に影響を及ぼし、I_a 抗原陽性 M ϕ の分化をも抑制してその免疫補助機能の低下をもたらし、さらに T 細胞の増殖分化にも抑制的に作用し、その結果 T_H と M ϕ によって惹起された DTH 反応を減弱させるにいたったものと推測される。

肺組織の組織学的変化をみると、MPSL 処置前後において肉芽腫周囲と胞隔に存在するリンパ球亜群と I_a⁺ A⁺ M ϕ は、BALF 中細胞の変化とほぼ一致した推移

Table Immunohistochemical Changes in Immunocytes and Accessory Cells in BALT, Alveolar Septa and Periphery of Granuloma

Treatment	BALT							Lung granuloma (alveolar septa and periphery)			
	PFA				FA			Ia ⁺ Mφ	Ia ⁺ Ly	T _H	T _{NH}
	Ia ⁺ Mφ	Ia ⁺ Ly	T _H	T _{NH}	Ia ⁺ Ly	T _H	T _{NH}				
Before BCG	+*	+	++	++	++	+	±	+	±	+	+
After BCG day 21	++	+++	++	+++	+++	++	±	++	+++	+++	++
After MPSL											
day 1	±	±	+	+	+	+	-	-	+	+	+
day 4	+	+	++	++	++	+	±	+	+	+	+
day 8	++	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++
day 15	++	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++

* : Degree of immunohistochemical change, - : absent, ± : slightly positive, + : mildly positive, ++ : moderately positive, +++ : highly positive

Ia⁺ Mφ : Ia antigen positive macrophage, Ia⁺ Ly : Ia antigen positive lymphocyte, T_H : helper/inducer (W3/25 positive) T lymphocyte, T_{NH} : non-helper (OX8 positive) T lymphocyte

を示し、BALFが肺組織での病態をよく反映することが確認された。

BALTにおいては、MPSL処置後早期にPFA内の肉芽腫の減弱とIa⁺ Mφ, T_H, T_{NH}の減少が認められ、これらの変化はBALFおよび肺組織の推移とほぼ一致していた。この事実は、肺のDTH反応の消退と一致してPFAの構成細胞であるMφとT細胞がともに変化することを示しており、BALTは肺局所の細胞性免疫応答に深く関与しているとの見解¹⁵⁾¹⁸⁾をさらに強調する所見と考えられる。

さらにBALTのFA内の変化としては、MPSL処置後早期に胚中心の消失とIa⁺ Lyの減少がみられた。FA内のIa⁺ Lyとしては、同部のT_HとT_{NH}の分布がIa⁺ Lyに比べて少数であり、同領域に多数のsIgM⁺ Lyが認められたことから、B細胞が主体をなすものと考えられる。千田ら¹⁵⁾は、家兎肺肉芽腫症モデルにおいてFAの形態学的変化とBALF中の免疫グロブリン値が相関を示すことを報告し、BALTは肺局所における免疫グロブリン産生の調節の場であろうと推測した。これらの所見から考えると、糖質コルチコイドは肺局所における液性免疫応答に対しても抑制的に作用すると推察される。

末梢血におけるリンパ球の変動をみると、肺肉芽腫反応の消退と平行して、T細胞の減少とT_H/T_{NH}比の低下が観察された(Fig. 3)。この機序としては、胸腺におけるT細胞の産生低下、末梢性リンパ組織への貯留、リンパ細網系における溶解死滅などが考えられる。Sladeら³²⁾は、ヒトにおいてprednisone 40 mgの投与が末梢血リンパ球の減少とT_H/T_{NH}比の低下をもたらすことを報告し、骨髄への貯留がその有力な機序と示

唆している。

糖質コルチコイドに対するリンパ球の感受性には、種によって著しい差異が存在しており、ラットやマウスは感受性が高いがヒトは比較的抵抗性である³³⁾といわれている。今回の検討では、MPSL処置後早期に脾臓が縮小した事実から、末梢性リンパ組織へのリンパ球貯留に関しては否定的である。同時期に胸腺皮質の萎縮が認められたことから、胸腺における産生の低下が末梢血のこれらの変化をもたらした主な原因と考えられる。したがって、糖質コルチコイドによる肺肉芽腫病変の消退は、肺局所のみならず、血中リンパ球亜群の変化としてもとらえられる免疫臓器に対する全身的な抑制効果によってもたらされた可能性が示唆された。

ま と め

BALT過形成を有するBCG肺肉芽腫モデルラットに対しMPSLの短期大量投与を施行し、肺肉芽腫組織、BALT、BALFおよび末梢血の変化を観察し、肺のDTH反応における肉芽腫巣とBALTの構成細胞に及ぼす糖質コルチコイド剤の影響を検討した。

その結果、MPSL投与により、肺肉芽腫は周囲のIa⁺ A・MφとT細胞の著減にほぼ併行して消退した。BALF中の細胞の変化としてはT_H/T_{NH}比の低下を伴うT細胞とIa⁺ A・Mφの減少が、血中白血球の変化としてはリンパ球の減少とT_H/T_{NH}比の低下がそれぞれ観察された。さらに、BALTの組織学的検索では、PFA内のIa⁺ MφとT細胞の消退が認められた。これらの事実から、糖質コルチコイドは肺局所でのMφの分化機構に影響を及ぼしてIa⁺ Mφの分化を抑制し、さらに肺局所のみならず全身的にT細胞の分化に抑制

的に作用し、その結果 DTH 反応の消退を誘導することが示唆された。

さらに、BALT の FA 内の胚中心が消失し、Ia⁺ Ly が減少する観察から、本剤は肺局所における液性免疫応答に対しても抑制的に作用すると考えられた。

謝 辞

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謝いたします。また研究面で御指導を頂いた第二内科学千田金吾助手、岡野昌彦助手に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第38回日本アレルギー学会総会で発表した。

文 献

- 1) Myrvik, Q. N., Leake, E. S., 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.
- 2) Reynolds, H. Y., Newball, H. H. : Analysis of protein and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage, *J Lab Clin Med*, 84 : 559-573, 1974.
- 3) Hunninghake, G. W., Gadek, J. E., Kawamura, O. et al. : Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage, *Am J Pathol*, 97 : 147-205, 1979.
- 4) Hunninghake, G. W., Crystal, R. G. : Pulmonary sarcoidosis. A disorder mediated by excess T lymphocyte activity at site of disease activity, *N Engl J Med*, 305 : 429-434, 1981.
- 5) Costabel, V., Bross, K. J., Marxen, J. 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 : 514-518, 1984.
- 6) Semenzato, G., Agostini, C., Zambello, R. et al. : Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis : phenotypic and functional analysis : *J Immunol*, 137 : 1164-1172, 1986.
- 7) Myrvik, Q. N., Leake, E. S., Oshima, S. : A study of macrophages and epithelioid-like cells from granulomatous (BCG-induced) lungs of rabbits, *J Immunol*, 89 : 745-751, 1962.
- 8) Moore, V. L., Hensley, G. T., Fink, J. N. : An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbit, *J Clin Invest*, 56 : 937-944, 1975.
- 9) Allred, D. G., Kobayashi, K., Yoshida, T. : Anergy-like immunosuppression in mice bearing pulmonary foreign-body granulomatous inflammation, *Am J Pathol*, 121 : 466-473, 1985.
- 10) Takizawa, H., Suko, M., Shoji, S. et al. : Granulomatous pneumonitis induced by Bacille Calmette-Guerin in the mouse and its treatment with cyclosporin A, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 296-299, 1986.
- 11) Moore, V. L., Mondloch, V. M., Pedersen, G. M. et al. : Strain variation in BCG-induced chronic pulmonary inflammation in mice : control by a cyclophosphamide-sensitive thymus-derived suppressor cell, *J Immunol*, 127 : 339-342, 1981.
- 12) Bienenstock, J., Johnston, N., Perry, D. Y. E. : Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics, *Lab Invest*, 28 : 686-692, 1973.
- 13) Bienenstock, J., Befus, D. : Gut-and bronchus-associated lymphoid tissue, *Am J Anat*, 170 : 437-445, 1984.
- 14) 岩田政敏, 佐藤篤彦, 早川啓史 : 各種呼吸器疾患における気管支随伴リンパ組織 (BALT) の組織学的検討, *リンパ学*, 10 : 81-85, 1987.
- 15) 千田金吾, 早川啓史, 佐藤篤彦 : 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 : 7-22, 1985.
- 16) 早川啓史, 千田金吾, 佐藤篤彦 : 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 : 65-75, 1985.
- 17) 早川啓史, 佐藤篤彦 : 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) の役割について, *結核*, 61 : 57-69, 1986.
- 18) 岡野昌彦, 佐藤篤彦 : 実験的肉芽腫肺における肺局所遅延型アレルギー反応の研究—気管支随伴リンパ組織 (BALT) の免疫担当細胞の解析—, *結核*, 63 : 215-226, 1988.
- 19) van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G. et al. : The mononuclear phagocyte system : a new classification of macrophages, mono-

- cytes and their precursor cells, *Bull Wld Hlth Org*, 46 : 845-852, 1972.
- 20) van Furth, R., van Oud Albas, A. B. : The current view on the origin of pulmonary macrophages, *Path Res Pract*, 175 : 38-49, 1982.
- 21) Bitterman, P. B., Saltzman, L. E., Adelberg, S. et al. : Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung, *J Clin Invest*, 74 : 460-469, 1984.
- 22) van Oud Albas, A. B., van der Linden-Schrever, B., Mattie, H. et al. : The effect of glucocorticosteroid on the kinetics of pulmonary macrophages, *J Reticuloendothel Soc*, 30 : 1-14, 1981.
- 23) Rinehart, J. J., Wuest, D., Ackerman, G. A. : Corticosteroid alteration of human monocyte to macrophage differentiation, *J Immunol*, 129 : 1436-1440, 1982.
- 24) Balow, J. E., Rosenthal, A. S. : Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor, *J Exp Med*, 137 : 1031-1041, 1973.
- 25) 山下 昭 : Ia 陽性細胞の分布・形態, *臨床免疫*, 18 : 505-519, 1986.
- 26) Snyder, D. S., Unaue, R. : Corticosteroid inhibit murine macrophage Ia expression and interleukine 1 production, *J Immunol*, 129 : 1803-1805, 1982.
- 27) 岡野昌彦, 佐藤篤彦 : 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, *結核*, 63 : 121-131, 1988.
- 28) 泉 孝英 : 肉芽腫性肺疾患, *呼吸*, 3 : 2-14, 1984.
- 29) Gemma, H., Sato, A., Chida, K. et al. : Studies on antigens and cellular components in bronchoalveolar lavage fluid with hypersensitivity pneumonitis In : *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*, editors C. Grassi, G. Rizzato, E. Pozzi, Elsevier Science Publishers B. V. pp.703-704, 1988.
- 30) Crabtree, G. R., Gillis, S., Smith, K. A. et al. : Glucocorticoid and immune responses, *Arthritis Rheum*, 22 : 1246-1256, 1979.
- 31) Rossi, A. G., Zocchi, E., Sacco, O. et al. : Alveolar macrophage stimulation of T-cell proliferation in autologous mixed lymphocyte reactions, *Am Rev Respir Dis*, 133 : 78-82, 1986.
- 32) Slade, J. D., Hepburn, B. : Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets, *J Lab Clin Med*, 101 : 479-487, 1983.
- 33) Claman, H. N. : Corticosteroids and lymphoid cells, *N Engl J Med*, 287 : 388-397, 1972.