

実験過敏性肺臓炎における細胞性免疫の関与に関する研究

中島 正光

BALB/c マウスおよび BALB/c ノードマウスを用い、経気道的および経皮的感作後の経気道的長期曝露にて過敏性肺臓炎 (HP) を作製した。ノードマウスを含むいずれのグループにも同様の程度で肉芽腫の形成を認めた。マウスにおいては経気道的感作の頻回曝露では肺内リンパ球の増生巣、胸膜のリンパ球の増生巣が強く、またノードマウスではマウスに比較して病変の程度は軽度で、経皮的感作においてより病変が強くなる傾向があった。

この実験結果はよりヒト HP の感作、曝露状態に近いと思われる長期曝露感作でヒト HP 類似の病変を作ることができ、肉芽腫の形成にはIV型アレルギーは必ずしも必要ではないが、HP の病理発生に細胞性免疫は何等かの関与があるものと考えられた。

(平成4年10月20日採用)

Cell-mediated Immunity in Experimental Hypersensitivity Pneumonitis

Masamitsu Nakajima

We successfully produced hypersensitivity pneumonitis in normal mice (BALB/c, +/+) and nude mice (BALB/c, -/-) using long instillation of horseradish peroxidase. We divided the mice into four groups: Group 1; normal mice receiving percutaneous sensitization and long-term instillation, Group 2; normal mice receiving long-term instillation but no percutaneous sensitization, Group 3; nude mice receiving percutaneous sensitization and long-term instillation, Group 4; nude mice receiving long-term instillation but no percutaneous sensitization. Granulomas with multinucleated giant cells were observed in all four groups. In Group 2, accumulation of lymphocytes in the lung and pleura was more prominent than in the other groups. Pathological changes were a little greater in the normal mice than in the nude mice. A comparison of Groups 3 and 4 showed pathological changes to be more prominent in Group 3. These results suggest that long-term instillation of antigen is important to produce hypersensitivity pneumonitis, and that type IV allergy (cell-mediated immunity) is not necessary to produce epithelioid granuloma. However, it was suggested that type IV allergy plays some role in hypersensitivity pneumonitis.

(Accepted on October 20, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(3): 237-249, 1992

Key Words ① Hypersensitivity pneumonitis ② Mouse ③ Nude mouse
④ Granuloma ⑤ Cell-mediated immunity

はじめに

ヒト過敏性肺臓炎 Hypersensitivity pneumonitis (以下 HP) とは一般に繰り返し外来抗原を吸入することにより感作された状態で再度同一の抗原を吸入した際に肺内で起こるアレルギー性炎症性疾患と定義されており、組織学的には細気管支、肺胞壁を中心としたリンパ球、単核細胞の浸潤、肺胞腔内のポリープ状の線維化巣(マツソン体)、肉芽腫の形成によって特徴づけられている。この病変は免疫学的には現在の所Ⅲ型とⅣ型アレルギー反応によって起こると考えられている。^{1),2)}しかし、それぞれのアレルギー機構に一致する点、矛盾する点が指摘されており、未だ HP の免疫現象は解明されているとは言えない。むしろ不明な点が多く存在している。¹⁾⁻¹¹⁾

HP 動物モデルの作製にも多くの研究があるが、動物種、抗原物質、感作の仕方、抗原曝露の方法などそれぞれの研究において違いがある。¹²⁾⁻¹⁴⁾また、多くの研究がその初期像をみているにすぎず、その組織像もヒト HP とは大きく異なっている。一方、免疫機序に関してもⅢ型アレルギーの面からの研究は多いものの、細胞性免疫の関与の観点から研究された報告はきわめて少ない。^{15),16)}

そこで今回我々は BALB/c マウスおよび BALB/c ノードマウスを使用し、(1)経気道的および経皮的感作後の経気道的長期曝露で肺内に起こる病変に差があるか、(2)細胞性免疫機構の乏しいノードマウスで同様の感作・曝露によって病変ができるか、(3)できるとすればそれにはⅣ型アレルギーの特徴とされる肉芽腫の形成を伴っているものかを調べてみることにした。この研究により、より良い動物実験モデルの作製ができ、しかも細胞性免疫の関与をより明確に知ることができると考えたからである。今回の

結果からよりヒト HP に近いモデルが作製可能であること、肉芽腫の形成にはⅣ型のアレルギーが直接には関与していない可能性が示唆されたのでここに報告し、さらなる研究へのステップとしたい。

材料及び方法

1) 動物：今回の実験にはマウス：BALB/c AJcl, +/+ (60匹)、およびヌードマウス：BALB/c AJcl, nu/nu (60匹) いずれも雄、6-8週齢のものを使用した。それぞれ経皮的感作群、経気道的感作群に分け、前者をグループ1および3、後者をグループ2、4とした。動物は川崎医大動物飼育センターでアイソレーションキャップを使用し、アイソレーションチャンバー内にて飼育した。その取り扱いには必ずガウン・マスク・手袋などを用いた。また、全てのマウスは購入後1週間上記の条件下で飼育観察した後実験に使用した。

2) 抗原：Horseradish Peroxidase (以下 HRP) (Sigma Chemical co. Type I) を生食にて溶解したものを使用した。

3) 抗原感作方法：使用した HRP 抗原の濃度は経皮的感作は 1 mg/ml、経気道的感作は 3 mg/ml である。経皮的感作群(グループ1および3)ではこれに等量の complete Freund's adjuvant を加え、Thermo mixture にて3分間混和した後、0.5 ml を4ヶ所に分け皮下注射した。感作は1日1回2日間隔で計5回行った。さらに経皮的感作したグループには2週間後 booster 効果を得る目的で 1 mg/1 ml の HRP 0.05 ml を腹腔内に注入し、さらに、その後1週間目から曝露を開始した。経気道的感作群(グループ2および4)では点鼻にて抗原を吸入させた。この2群では感作と曝露は同一で、1日2回2日間連続点鼻を1コースとし、1コース3 mg/ml の HRP 投与を1週間毎に計7回繰

り返した。また、コントロールとしてこの群に生食を同様の方法で点鼻した。

4) 抗原曝露方法：グループ1および3の経皮的感作群ではHRP腹腔内注入後1週目より1日2回、2日間の点鼻にてHRP 3 mg/mlを経気道的に曝露することとし、1週間毎に7週間、全過程で7回行った。グループ2および4の経気道的感作群への曝露方法はすでに述べた通りである。

5) 組織学的観察：いずれの群の動物も最終点鼻曝露後7日目にエーテルにて軽く麻酔した後、脱血により屠殺した。肺は摘出後10%リン

酸緩衝ホルマリンを気管より、約10 cm水柱圧で注入し、その後、肺全体を10%リン酸緩衝ホルマリン溶液内に浸し48時間以上固定した。固定後肺は少なくとも肺の最大断面ができるように3~4個の断面を切り出し、組織ブロックを作製した。型の如く脱水パラフィン包埋後、4 μ mの薄切切片を作り、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡的に観察した。

結 果

1. 経皮的感作マウス群 (グループ1)

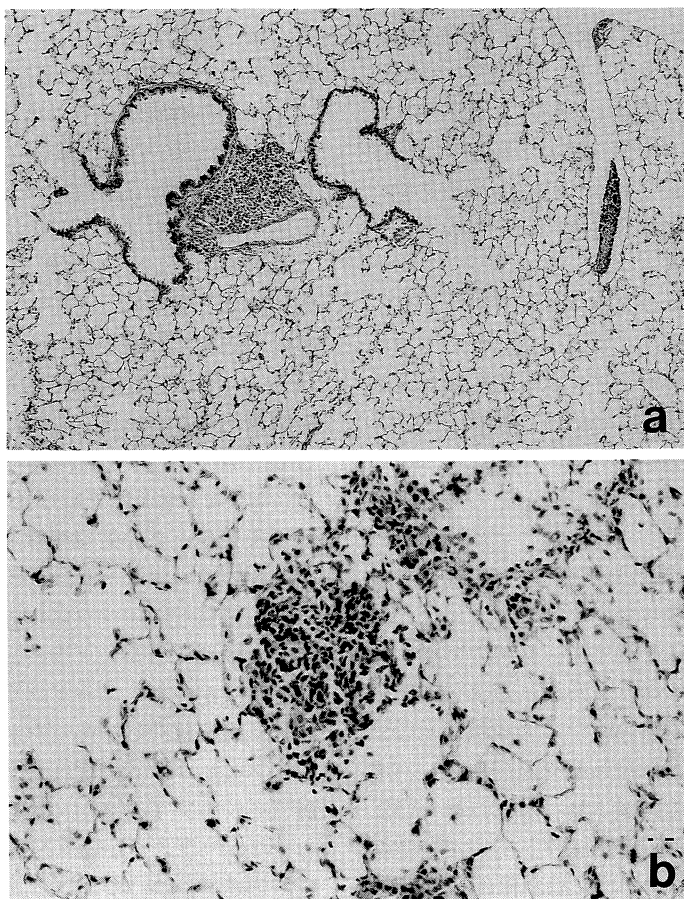


Fig. 1. Pulmonary changes in Group 1 at seven days after one instillation of HRP.

- a. BALT and accumulation of lymphocytes in pleura (H-E)
- b. Accumulation of lymphocytes in the lung (H-E)

グループ1では軽度ではあるが1回の点鼻よりすでに気管支、細気管支周囲や動・静脈周囲(いわゆる気管支随伴リンパ装置;以下BALT)、肺内、胸膜にリンパ球の増生巣が認められた(Fig. 1a, b). 点鼻3回目から肺胞腔内にマクロファージの軽度の逸脱を認めるとともに、肺胞腔内に肉芽腫の形成が観察された。点鼻曝露4回目よりBALT、肺内でのリンパ球の増生巣、肺胞腔内のマクロファージの逸脱、胸膜でのリンパ球の増生巣がより著明となった。点鼻5回目には肺胞腔内のポリープ状の線維化巣が認められるようになった。肺胞壁へのリンパ球の浸潤、肺胞腔内のマクロファージの逸脱、胸膜でのリンパ球の増生巣はさらに強く見られた(Fig. 2a~c)。点鼻6回目では一部の肺胞壁に線維性肥厚が認められた。また、BALT、肺内でのリンパ球の増生巣がより強く認められるようになった。さらに、7回目では肺胞腔内のマクロファージの逸脱、肺胞腔内に肉芽腫の形成もより強くなった。

2. 経気道的感作マウス群(グループ2)

グループ2では点鼻2回目より一部のマウスに少数の肺胞腔内のポリープ状線維化巣が認められた。点鼻3回目ではBALT、肺内でのリンパ球の増生巣、肺胞腔内へのマクロファージの逸脱、肉芽腫の形成、胸膜でのリンパ球の増生巣などがみられるようになった。点鼻4回目には肉芽腫の形成、肺胞腔内のポリープ状の線維化巣の出現頻度が増した。グループ1に比べると肺内でのリンパ球の増生巣、胸膜でのリンパ球の増生巣はむしろ強く認められるようになった。点鼻6回目は一部のマウスで肺胞腔内のマクロファージの逸脱、強い血管周囲のリンパ球の増生が認められた(Fig. 3a~e)。点鼻7回目では全体的に病変の程度は減少していた。肺胞腔内の肉芽腫の形成の程度には変化はなかった。

3. 経皮的感作ヌードマウス群(グループ3)

グループ3では点鼻1回目より軽度の肺胞腔内のマクロファージの逸脱が認められた。点鼻3回目よりBALTの増生、胸膜でのリンパ球の増生巣が認められるようになった。点鼻4回目

には肺胞腔内に肉芽腫の形成がみられ(Fig. 4)、胸膜でのリンパ球の増生巣は増強していた。全体的にはグループ1、2に比較して病変の強さは軽度であるが点鼻6回目ではBALTの増生はより強く、胸膜のリンパ球の増生巣、肺胞腔内のマクロファージの逸脱が強くなる傾向にあった(Fig. 5a~c)。点鼻7回目には同様の組織が肺にみられるほか、縦隔の脂肪組織内に多数の肉芽腫の形成を認めるものもあった(Fig. 6)。

4. 経気道的感作ヌードマウス群(グループ4)

グループ4では点鼻2回目より軽度の胸膜でのリンパ球の増生が認められた。点鼻3回目より一部のマウスで肺胞腔内の肉芽腫の形成が認められ、気管支周囲リンパ球集合巣の増生は軽度であった。さらにBALT、肺胞腔内のマクロファージの逸脱がみられはじめた。点鼻4回目より肺内でのリンパ球の増生巣が認められ、BALTの増生、肺内でのリンパ球の増生巣、肺胞腔内のマクロファージの逸脱、胸膜でのリンパ球の増生巣がマウス群(グループ1、2)また、経皮的感作群(グループ3)に比較して全体的に軽度であったが、強くなる傾向があった(Fig. 7a~d)。点鼻5回目より一部のマウスで肺胞腔内のポリープ状の線維化巣が認められた(Fig. 7e)。点鼻5回目以降点鼻6回目、7回目においては組織学的に大きな変化はなかった。

5. 各グループの病理組織像の比較

肺胞腔内のポリープ状の線維化巣、肺胞壁の線維化巣は一部のマウスにみられ、さらに限局性で、軽度であり、グループ間で比較することはできなかった。ヌードマウスにおいては基本的には病変は同じであったが経皮的感作群(グループ3)が病変の程度が強く、さらにマウス群(グループ1、2)に比較して程度は軽度であった。マウスでは経皮的感作群(グループ1)、経気道的感作群(グループ2)で基本的には病理像には違いは認められなかったが、経気道的感作群で肺内でのリンパ球の増生巣、胸膜でのリンパ球の増生巣がより強く認められた。コントロール群では明らかな病変はみられなかった。

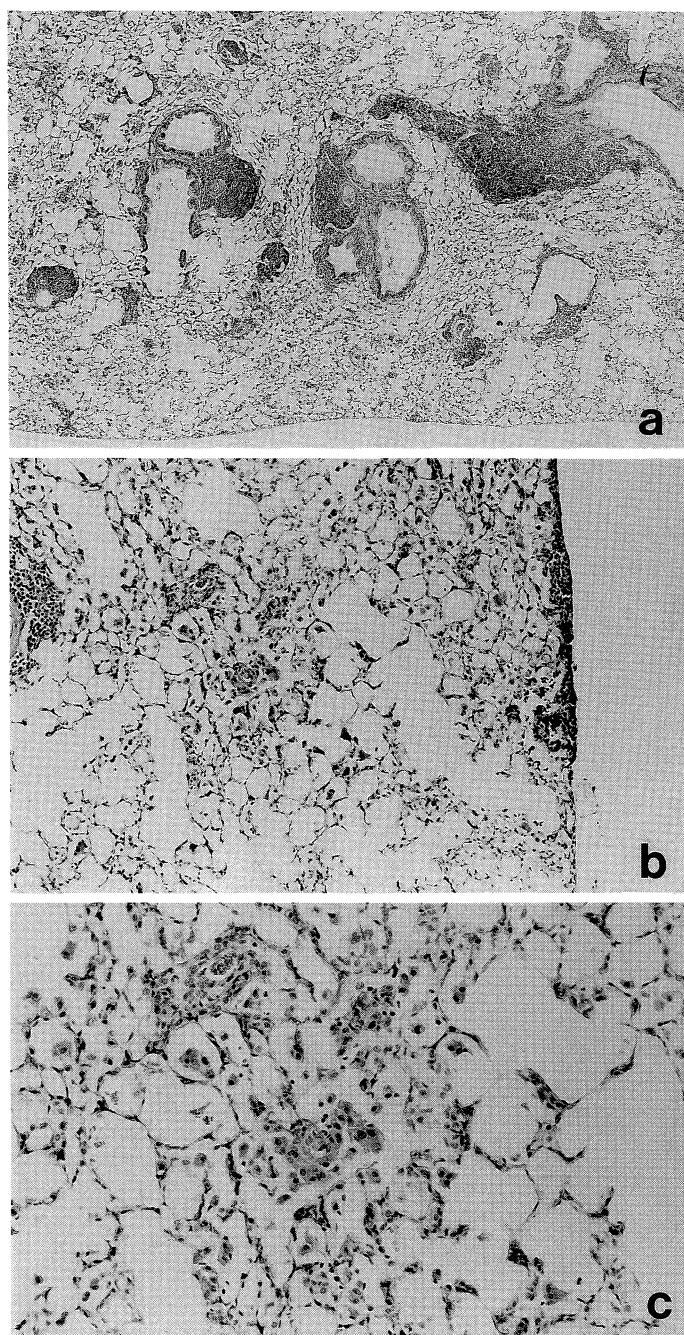


Fig. 2. Pulmonary changes in Group 1 at seven days after five instillations of HRP. (H-E)

- a. BALT is markedly developed. Accumulation of lymphocytes and macrophages in the alveolar spaces was observed. (H-E)
- b. Accumulation of lymphocytes in the pleura and macrophages in the alveolar spaces (H-E)
- c. Macrophages in the alveolar spaces and granuloma with multinucleated giant cells (H-E)

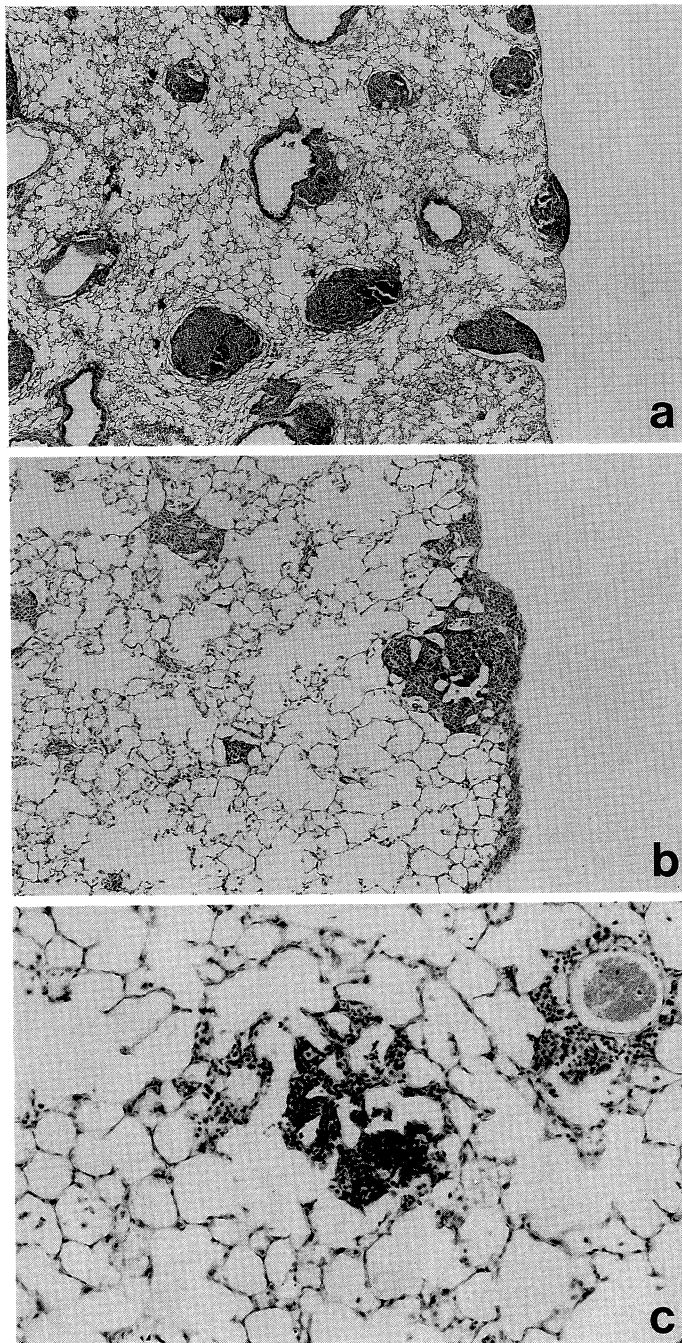


Fig. 3. Pulmonary changes in Group 2 at seven days after six instillations of HRP.

- a. BALTs are markedly developed and accumulation of lymphocytes in the pleura is observed. (H-E)
- b. Accumulation of lymphocytes in the pleura (H-E)
- c. Accumulation of lymphocytes in the lung (H-E)

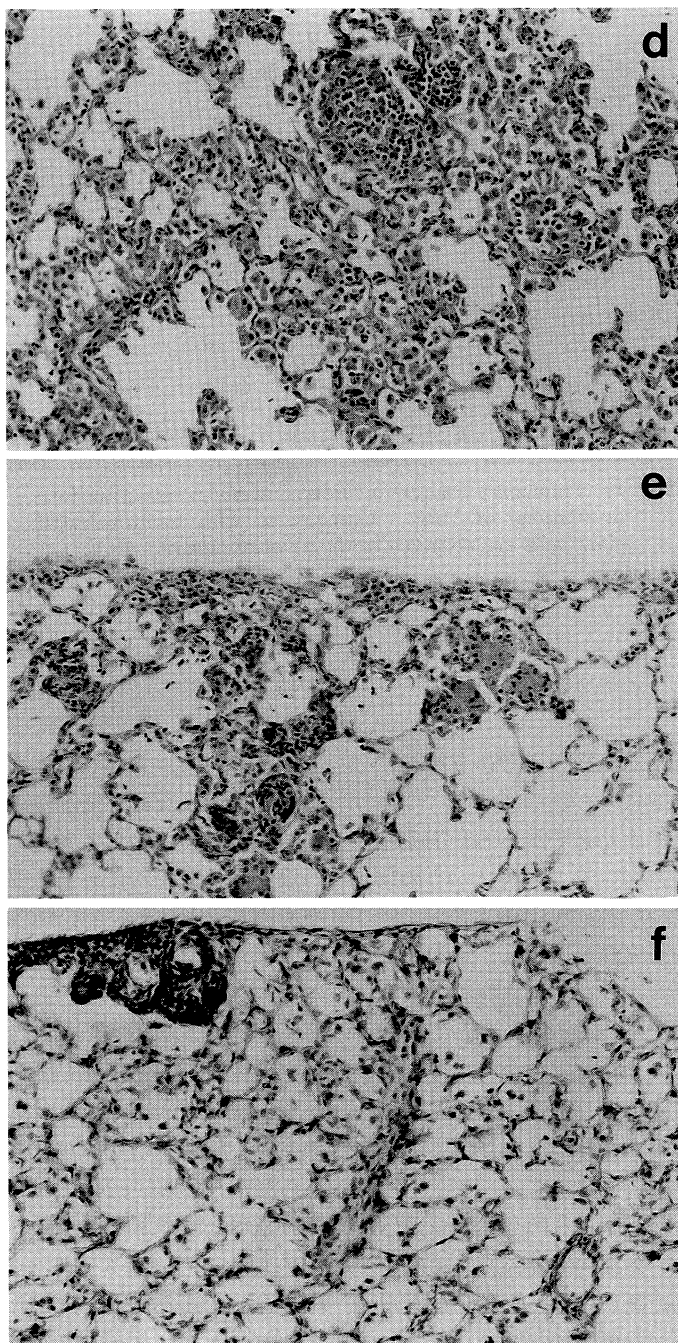


Fig. 3. d, e. Macrophages in the alveolar spaces and granuloma with multinucleated giant cells are observed. (H-E)
f. Intraluminal polypoid fibrosis (H-E)

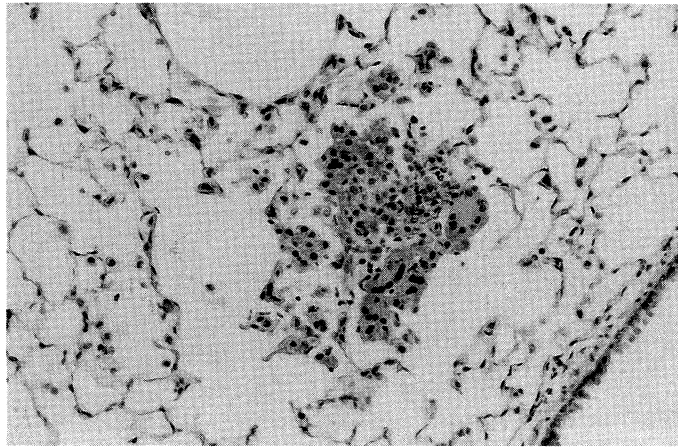


Fig. 4. Pulmonary changes in Group 3 at seven days after four instillations of HRP. Granulomas with multinucleated giant cells are observed in the alveolar spaces. (H-E)

考 察

本実験結果を免疫学的側面から考察を加えていく前に、この実験系にみられる肉芽腫についてまずはっきりさせておく必要がある。肉芽腫には多くの種類が存在する。¹⁷⁾ 肉芽腫という形態を見ただけで原因を推測できないことも多い。頻りに抗原を経気道的に曝露した場合、マウスに肺炎を発生させたり、抗原以外の異物を吸入させる恐れがより強くなる。本実験モデルでは肺炎の発生は見られず、また一部のマウスで異物による異物巨細胞が認められたが、ほとんどの肉芽腫では異物は認められなかったためこの肉芽腫が異物肉芽腫とは考え難い。

免疫反応の関与の有無からも肉芽腫が分類されているが、これに従えば過敏性肺臓炎の肉芽腫は免疫性肉芽腫に属し、ほとんどが類上皮性肉芽腫である。また非免疫性肉芽腫はほとんどが異物性肉芽腫である。本実験で製作された肉腫が免疫性の肉芽腫か否か問題になるところであるが、免疫機序が関与していることを示唆するものとして以下のような事実がある。1) 曝露回数を増やすに従い肉芽腫が出現するようになった。2) 肉芽腫内に異物は光学顕微鏡的に認

められなかった。3) 肉芽腫が存在している周囲にはマクロファージの逸脱、BALTの発達が強く認められた。4) 肉芽腫の多くが類上皮細胞から成っていた。これらは本実験にみられた肉芽腫形成に免疫反応が何等かの形で関与していることを示唆していると考ええる。

以上の論議をふまえた上で、今回の実験結果を次のように考えることができる。(1) 肉芽腫の形成、マッソン体形成を伴うヒトHPに類似したHP動物モデルを作製することができた。(2) HP動物モデルは経気道的感作、経皮的感作の両方において病変を形成させることができた。しかも、経気道的感作の方が胸膜でのリンパ球の増生巣、肺内でのリンパ球の増生がより強く認められた。(3) ノードマウスでも程度はマウスに比較して軽度であるが同様の病変を形成し得ることが解った。(4) ノードマウスでは経皮的感作群の方が経気道的感作群に比較してBALT、肺胞腔内のマクロファージの逸脱が強く認められた。

本実験系がよりヒトのHPに近い事実は、ヒトHPの発症までの感作期間が長いこと、感作が経気道的であることを意味しているのかもしれない。言い換えれば我々の実験が成功した1つの理由は長期抗原を曝露したためとも考えら

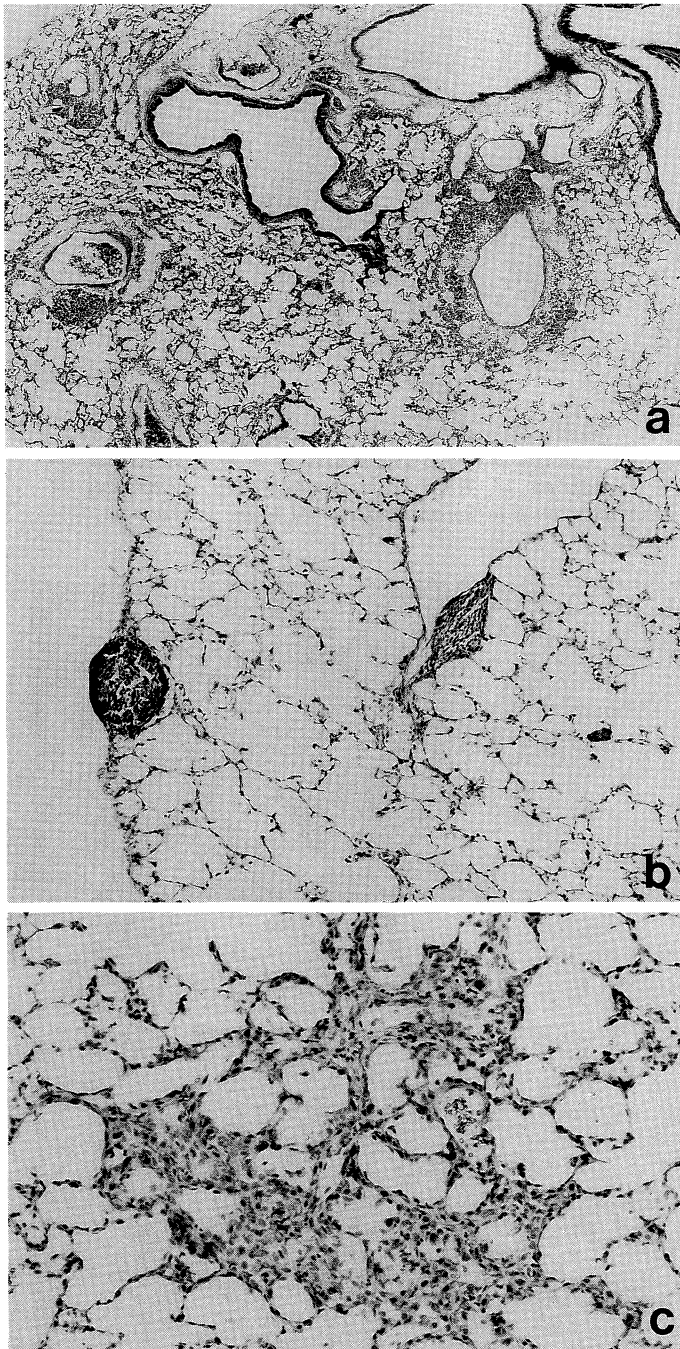


Fig. 5. Pulmonary changes in Group 3 at seven days after six instillations of HRP.

- a, b. Accumulation of lymphocytes in the around vessels and the pleura.
Desquamation of macrophages in the alveolar spaces is observed. (H-E)
- c. The alveolar walls are thick with interstitial fibrosis. (H-E)

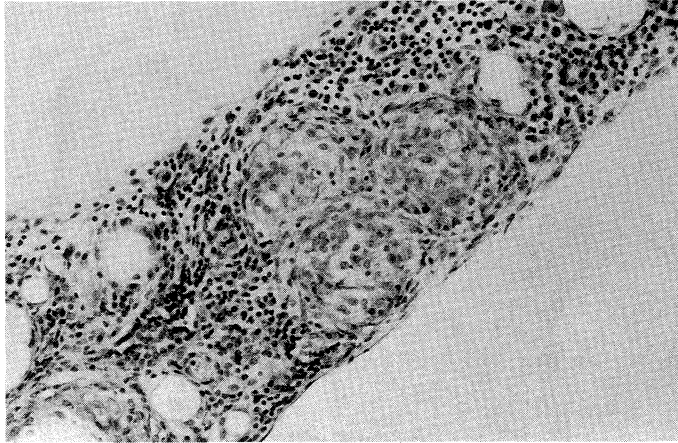


Fig. 6. Changes in Group 3 nude mice at seven days after seven instillations of HRP. Granuloma with infiltration of lymphocytes in the mediastinal fat tissue is observed. (H-E)

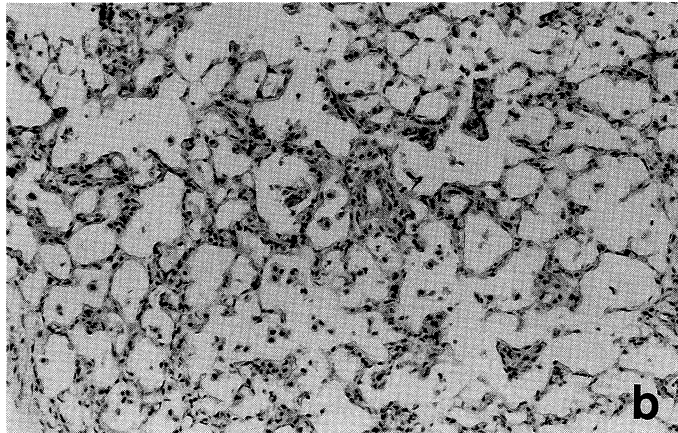
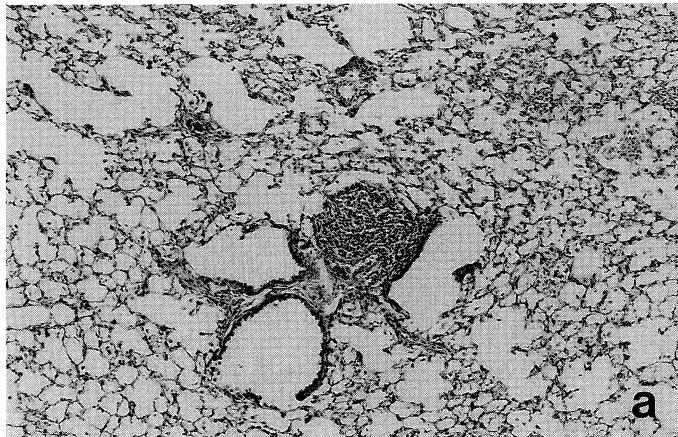


Fig. 7. Pulmonary changes in Group 4 at seven days after five instillations of HRP.
a. BALTs and macrophages in the alveolar spaces are observed. (H-E)

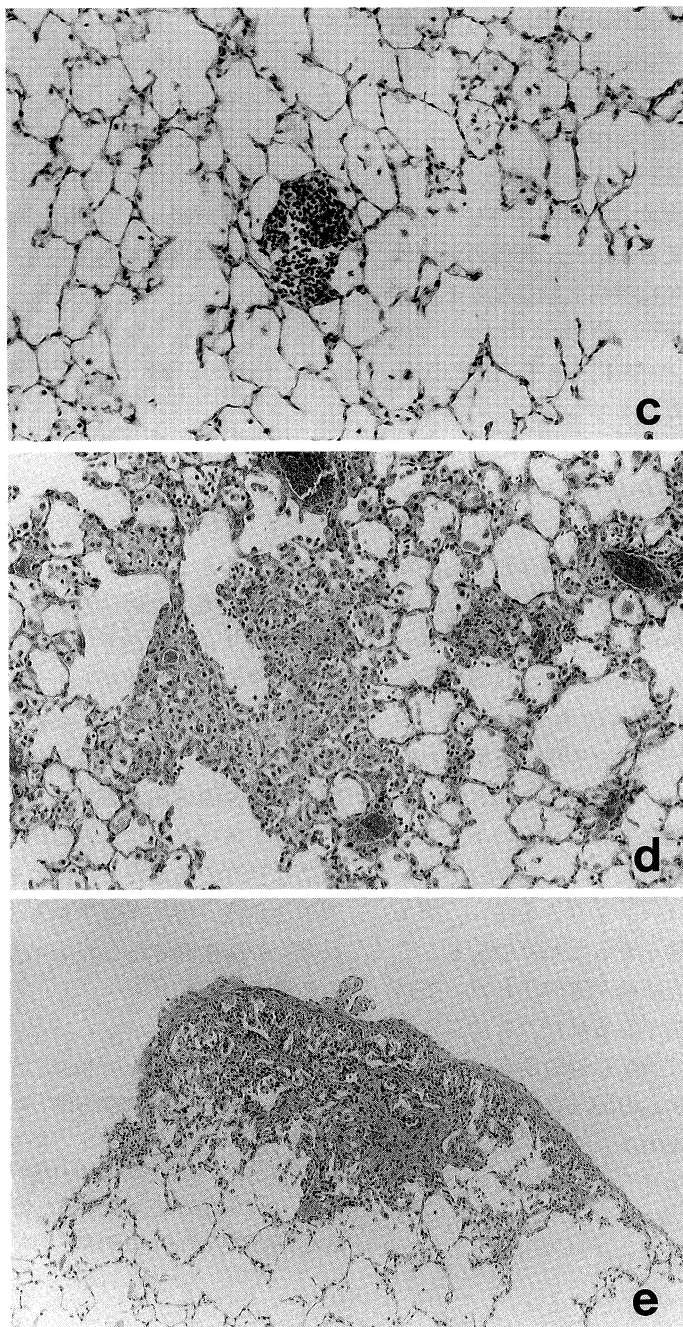


Fig. 7. b, c. Accumulation of lymphocytes and desquamation of macrophages (H-E)
d. Granuloma in the alveolar spaces (H-E)
e. Intraluminal polypoid fibrosis (H-E)

れるのである。頻回、長期の曝露が肺に強い障害をもたらし、マッソン体形成をひきおこしたのであろう。残念なことに抗原曝露を頻回にしかも長期に行った実験は少ない。^{12)~15)} 一方、我々の投与抗原量が多いことも事実で、この点は投与量を減少した実験群を用いる等して確かめる必要があると考える。また、肺内の免疫機構が肺以外の臓器の免疫機構とは異なるとの報告も多い、^{18),19)} また肺内の在住マクロファージの重要性の報告もある。^{20),21)} 従って経気道的感作の方がその他の感作方法よりも優れていることは想像にかたくない。

今までに T リンパ球がないとされるヌードマウスを用いた実験 HP の報告は少なく、まして経気道的抗原感作、頻回抗原曝露を行った実験モデルはない。また、ヌードマウスに全く T リンパ球がないかどうかについては問題も残されていると思われる。この点に関しては項を改めて別の研究結果を提示したいと考えているが、少なくともこの動物では T リンパ球による反応、細胞性免疫反応はない、もしくはほとんどないと考えてよい。従って細胞性免疫反応の1つである遅延型過敏反応も当然起り難いと考えられる。この理論に基づいてヌードマウスを用い、グループ3および4の実験を行ったわけである。これらのグループでも肉芽腫が形成された。この実験系で肉芽腫の形成がみられたことは HP における肉芽腫の形成は遅延型過敏反応、すなわち IV 型のアレルギー反応の関与なしに形成できるのではないかとも思われる。また、BALT、肺内リンパ球の増生巣はマウスに比較してヌードマウスで病変の程度が軽度であった。IV型アレルギーは HP 発症に必ずしも必要ではないのか

もしれない。しかし、T リンパ球の関与する免疫反応が病変の形成に何等かの形で関与しているものと考えられた。マウスにおいては経気道的感作は HP の病変を作製する上で有効であったが、ヌードマウスでは逆の結果であった。この結果は興味深く、抗原提示に関してヌードマウスの肺では異常があること示唆しているかもしれない。

結 語

(1) ヒト HP に類似した HP 動物モデルを作製した。

(2) 作製に成功した原因は長期の抗原曝露にあると考えられた。

(3) 経気道的感作群の方が経皮的感作群に比し肺内リンパ球の増生巣、胸膜でのリンパ球の増生巣の程度が強かった。

(4) ヌードマウスにおいても同様の肉芽腫が認められた。すなわち細胞性免疫の乏しい状態でも肉芽腫は形成されると考えられた。

(5) ヌードマウスでは肉芽腫以外の病変の程度は軽度であった。このことは HP の発症に細胞性免疫、特に IV 型アレルギー (遅延型過敏反応) の直接的関与はむしろ少ないのではないかと考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲をいただきました川崎医科大学病理学教室の山下貢司教授ならびに真鍋俊明助教授に深謝いたします。また、多くのご助言をいただきました呼吸器内科 副島林造教授、ならびに終始ご協力いただいた川崎医科大学病理学教室、呼吸器内科の諸兄、研究補助員の山根朋美さんに感謝いたします。

文 献

- 1) Salvaggio, J. E.: Hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79: 558-571, 1987
- 2) Fink, J. N.: Hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74: 1-10, 1984
- 3) Roberts, R. C. and Moore, V. L.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 1075-1090, 1977
- 4) Soda, K., Ando, M., Sakata, T., Sugimoto, M., Nakashima, H. and Araki, K.: C1q and C3 in

- bronchoalveolar lavage fluid from patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 93 : 76—80, 1988
- 5) Kobayashi, K., Kasahara, K., Yoneya, I., Takahashi, T. and Yoshida, T. : Comparative studies on granuloma formation in vivo and in vitro. *In* Basic mechanisms of granulomatous inflammation, ed. by Yoshida, T. and Torisu, M. Elsevier Science Publishers. B. V. P. Amsterdam. 1989, pp. 163—180
 - 6) Ando, M., Hirayama, K., Soda, K., Okubo, R., Araki, S. and Sasazuki, T. : HLA-DQw3 in Japanese summer-type hypersensitivity induced by *Trichosporon cutaneum*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 : 948—950, 1989
 - 7) Basset, F., Nioch, S., Soler, P., Valeyre, D., Battesti, J. P., Georges, R. and Hance, A. J. : The role of mast cells in the pathogenesis on hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 (Suppl.) : A375, 1987
 - 8) Roberts, R. C. and Moore, V. L. : Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116 : 1075—1090, 1977
 - 9) 馬場 徹：実研的過敏性肺臓炎の免疫組織学的研究. 日大医誌 45 : 29—40, 1986
 - 10) Perterson, L. B., Braley, J. F., Calvanico, N. J. and Moore, V. L. : An animal model of hypersensitivity pneumonitis in rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119 : 991—999, 1979
 - 11) Johnson, K. J., Chapman, W. E. and Ward, P. A. : Immunopathogenesis of the lung disease. A review. *Am. J. Pathol.* 95 : 795—800, 1979
 - 12) 日浦研哉：過敏性肺臓炎における肺内リンパ球の種類およびその変動. 川崎医学会誌 9 : 341—347, 1983
 - 13) 外山譲二：過敏性肺臓炎の実験的研究—特に吸入誘発試験における抗原吸入後早期の特異的アレルギー反応の機序の検討—。日胸疾会誌 22 : 288—303, 1984
 - 14) Sugihara, K. and Manabe, T. : Experimental model of extrinsic allergic alveolitis in rats. *Kawasaki Med. J.* 15 : 81—84, 1989
 - 15) 滝沢 始, 須甲松信, 小林信之, 大田 健, 野上 誠, 杉山温人, 奥平博一, 宮本昭正, 志賀淳治：純系マウスを用いた過敏性肺臓炎モデルに関する基礎的研究. 日胸疾会誌 25 : 1302—1308, 1987
 - 16) 安藤正幸, 山崎寿人, 坂田哲宣, 有馬和子, 荒木淑郎, 尾上 薫：夏型過敏性肺臓炎における T リンパ球の反応性について. 厚生省特定疾患, びまん性肺疾患調査研究班平成 2 年度研究報告書 1990, pp. 53—54
 - 17) Adamas, D. O. : The biology of the granuloma. *In* the pathology of granulomas, ed. by Ioachim, H. L. New York, Raven Press. 1983.
 - 18) Daniele, R. P. : Immunology and immunologic diseases of the lung. Boston Blackwell scientific publications. 1988
 - 19) Ansfield, M. J., Benson, B. J. and Kaltreider, H. B. : Immunosuppression by surface active material. *Am. Rev. Resp. Dis.* 120 : 949—952, 1979
 - 20) Bitterman, P. B., Saltzman, L. E., Adelberg, S., Ferrans, V. J. and Crystal R. G. : 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
 - 21) 高橋 潔, 内藤 眞：肉芽腫形成における在住マクロファージの役割. 呼吸 11 : 937—940, 1992