

過敏性肺臓炎の実験病理学的検討

川崎医科大学 人体病理学教室
(指導: 中川定明教授, 山下貢司教授)

日 浦 研 哉

(昭和57年8月25日受付)

A Study of Experimental Hypersensitivity Pneumonitis

Kenya Hiura

Department of Human Pathology
Kawasaki Medical School

(Accepted on August 25, 1982)

実験的に、マウスを使用して、過敏性肺臓炎の発生病理を検討した。感作抗原には、**Bacterial α Amylase (B α A)** を利用し、種々の感作方法を試みた。すべての感作方法のあと、誘発のための最終曝露は気道を通した吸入法で行った。気道吸入法、または1回だけの筋肉内注射で感作を行った群では、過敏性肺臓炎の像は得られなかった。しかし、5回筋肉内注射によって感作した場合には、可逆的ではあるが、終末細気管支を中心とした単核細胞反応、および肉芽腫様変化がみられた。なお、誘発後2週間目から検索しているためか、その時点では、好中球の関与は、明らかでなかった。

抗原に対するIgG抗体のレベルや、肺組織でのPAP法を用いたIgG沈着の増減と肉芽腫様変化の形成の間には、経過を追ってみると時間的ズレがみられた。すなわち、初期の血清抗体価の上昇は、肺組織内IgGの沈着と平行し、両者の減少しはじめる時期になって肉芽腫様変化が、肺にみられた。細胞反応を主体とした増殖性肺胞中隔炎(肺臓炎)から進展して、固定化した進行性線維性肺胞炎(肺線維症)を発生させるためには、抗原の強さ、頻回の感作、動物種など今後注意しなければならない点があることを考察した。

Hypersensitivity pneumonitis was experimentally studied in mice. Several ways of immunization have been tried using bacterial α amylase (B α A) as an antigen. When mice were originally immunized through respiratory tract, or when original intramuscular immunization was given once, the induction of the hypersensitivity pneumonitis was unsuccessful. Only in a group given immunization for five times, mononuclear cell infiltration surrounding respiratory bronchiole and granulomatous lesion could have been induced. These lesions did not show neutrophilic infiltration possibly because an examination was started from two weeks after the exposure. These changes were reversible and not progressive to the interstitial fibrosis.

Comparative sequences of serum IgG antibody titer against B α A, deposition of IgG in the lung tissue revealed by peroxidase-antiperoxidase technique, and development of granulomatous change were examined. A rise of serum IgG

antibody titer was immediately followed by the deposition of IgG in pulmonary tissue, and then later by the formation of granulomatous lesion. Many of the other factors such as persistence of antigen, host sensitivity, and species difference of animals may take part in the development of progressive fibrosing alveolitis from temporary alveolitis.

はじめに

過敏性肺臓炎は、外因性アレルギー性胞隔炎とも言われ、種々の有機塵埃抗原の吸入感作によって、自然感作状態になっている場合に、同じ抗原性のあるものに再度曝露した際、肺に肉芽腫を伴う慢性炎症細胞浸潤を主体とする肺臓炎(胞隔炎)を発生してくるものである。^{1),2)} 現在この範ちゅうに入れられる疾患は、古くから有機塵埃の吸入による職業性呼吸器疾患と言われたものを含んで、約20種ほど検索され、その中で、Micropolyspora faeni を抗原とする農夫肺³⁾ や鳩飼病⁴⁾ がよく知られている。その発生機序に対する免疫病理学的検索は、ラット^{5),6)} ウサギ^{7)~13)} モルモット^{14)~16)} などが用いられ、種々の感作方法によって、アレルギー症状と、液性および細胞性免疫の関係が報告され、その発生機序には、尙免疫の複雑なからみあいがあることが、指摘されている。^{17),18)} 例えば、Arthus型反応の併発や免疫グロブリン特にIgGの増加、抗原吸入誘発時の経過を追跡した時にみられる増殖炎などは、Gell and Coombs¹⁹⁾ がいうⅢ型アレルギーの所見に類似し、さらには、単核細胞浸潤を主体とする炎症や肉芽腫の存在、特異抗原によるリンパ球芽球化、マクロファージ遊走阻子因子の証明などのⅣ型アレルギーを示すこともあり、また、両者の混合像もみられている。その他、immune complexに関する免疫学的検討²⁰⁾ も行われ、そのimmunopathogenesisについて、Schatz,¹⁷⁾ Robert and Moore,¹⁸⁾ や Lopez and Salvaggio²¹⁾ による詳しい報告があるが、まだ確定的とはいえず、不明な点が多い。

そこで、疾患モデルを実験的に作製し、その発生機転と経過を動的に観察するために、定量が可能な抗原を用い、免疫方法、抗原曝露時間

などを変え、経時的にそれぞれの肺における病理像の変化を追跡するとともに、慢性曝露感作をくりかえした時の病理像について観察することを試みた。なお、あわせて血清抗体価の変動および酵素抗体法を用いた肺組織内の抗体の存在も検索した。

材料および方法

1. 使用動物

本学動物飼育センターで飼育中のマウス(C₃H/He, DS, BALB/C), 雌雄(3~8週齢)約200匹を用いて以下の実験を行った。

2. 抗原

抗原には、Bacillus subtilis から抽出された、bacterial α amylase (以下 BaA と記す: 1.4- α -D-Glucan gluconohydrolase, Bacterial, type II-A, Crystallized lyophilized powder, Sigma社)を用いた。滅菌生理的食塩水にBaAを、1 mg/mlの濃度に溶解したものを常時使用した。なお、感作には、complete Freund's adjuvant (以下 CFA と記す)を型のように付加した。

3. 噴霧吸入装置

動物に抗原を噴霧吸入する場合には、自作の吸入装置を使用した。Fig. 1 に示すように、

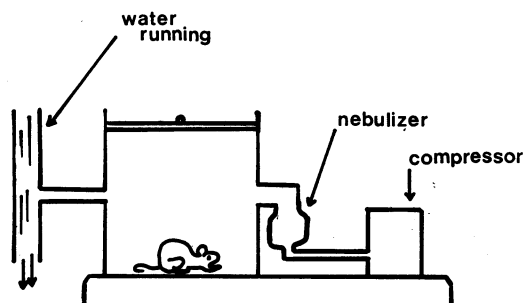


Fig. 1. A scheme of an aerosol chamber used to expose antigen

アクリル樹脂箱の一端に日商式ネブライザーを取り付け、他端に水圧吸引チューブを装置した。ネブライザーは、コンプレッサーによって噴霧できるように工夫して、噴霧吸入装置を作製した。

4. 実験方法

実験は、Table 1 に示すように、免疫方法、曝露時間を変えた3実験グループについて実施した。

Group 1: マウス120匹(実験群103匹, 対照群17匹)を使用し、BaAの生食溶液(1 mg/ml)とCFAの等量混合液0.2 mlを左右大腿部と背部の筋肉内へ毎回場所をかえて、5日間連続注射した。以後4週間放置し、その後噴霧吸入装置内に、感作マウスを5匹ずつ入れ、BaA溶液(1 mg/ml) 1.5 mlを毎日10分間ずつ2週間連続曝露吸入させた。実験対照群には、1) CFAとBaA溶液の混合液0.2 mlを5日間筋肉内へ注射し、4週間放置後、滅菌生食水1.5 mlを実験群と同様毎日10分間ずつ2週間連続曝露吸入させた。2) CFAと生食水を等量混合し、混合液0.2 mlを5日間注射し、4週間放置後、BaA溶液1.5 mlで連続2週間

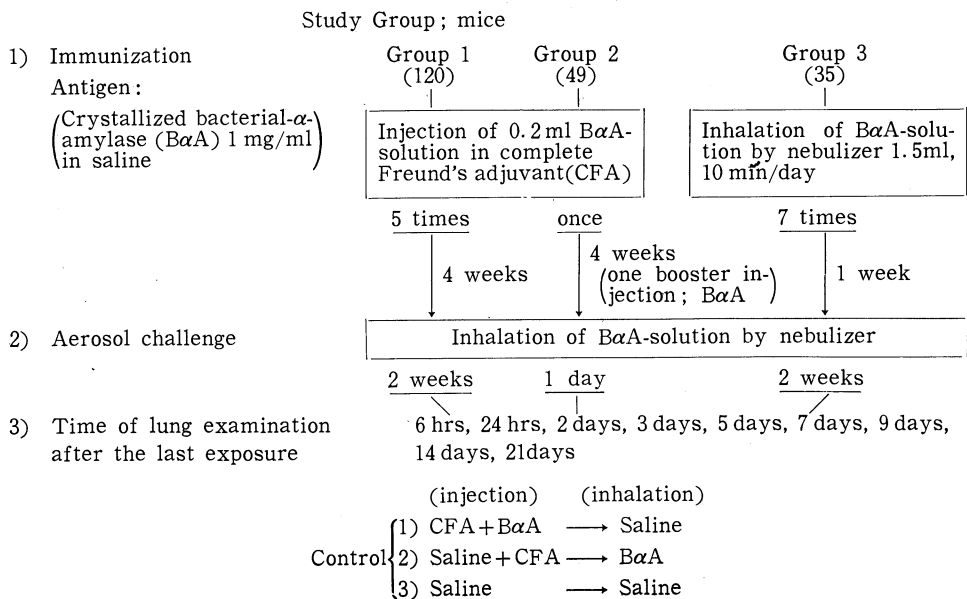
曝露吸入させた。3) 滅菌生食水0.2 mlを5日間注射し、4週間放置後、生食水1.5 mlを連続2週間曝露吸入させた。

Group 2: マウス49匹(実験群44匹, 対照群5匹)を使用し、同様のBaA溶液とCFA等量混合溶液0.2 mlを、マウスの大腿部筋肉内へ1回だけ注射した。2週間放置後、同濃度のBaA溶液0.5 mlをboosterとして腹腔内へ注入した。さらに2週間後、BaA溶液1.5 mlの10分間曝露吸入を1回だけ行った。対照群もGroup 1と同様に処置した。

Group 3: マウス35匹(実験群30匹, 対照群5匹)を使用した。Group 1, 2と異なり、Group 3は気道から感作を行った。噴霧吸入装置内に5匹ずつ入れ、BaA溶液1.5 mlを10分間ずつ7日間曝露吸入させた後、1週間放置し、その後2週間連続してBaA溶液1.5 mlを1日10分間ずつ曝露吸入させた。対照群は、BaA溶液のかわりに生食水を用い、同様に行った。

実験マウスの肺組織は、どのGroupも2週間の曝露吸入終了後、6時間、24時間、2日、3日、5日、7日、9日、14日、21日目に動物

Table 1. Experimental design.



をと殺して採取し、対照群のそれは、曝露吸入終了後6時間目に採取した。

血清抗体価測定

Group 1 についてのみ行った。同じ実験群の5匹のプール血清を凍結保存しておいて、塩化クロム法²²⁾による赤血球凝集反応を利用して抗体価を測定した。

酵素抗体法

肺のパラフィン切片を用い、Sternberger²³⁾や Taylor²⁴⁾らの peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法で、型のように行い、一次抗体として、Anti-mouse IgG (rabbit, Anti-mouse IgG, Heavy & Light chain, Lot #160523, Cappel 社) を用いた。発色は、3,3'-diaminobenzidine (DAB) と 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) を使用した。

成 績

1) 肺の組織の経時的变化

Group 1: 2週間の曝露吸入終了後、6時間目に採取した肺組織では、細気管支、特に終末細気管支を中心とした肺胞壁に、リンパ球、形質細胞、組織球の浸潤がみられ、肺胞壁の肥厚を示した (Fig. 2)。また肺胞上皮細胞の増生、腫大もみられ、その細胞には、線毛上皮細胞も

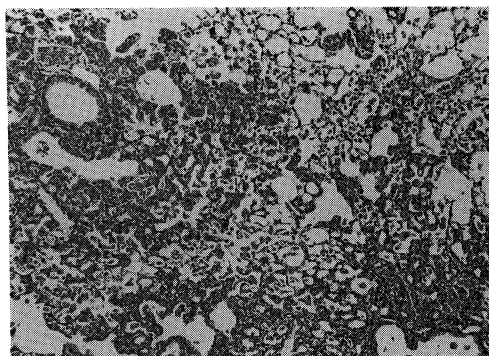


Fig. 2. Pulmonary lesion seen 6 hours after the last exposure of BaA. Note the bronchiolecentric and alveolar infiltration. At this stage infiltration were composed of mononuclear cells and mainly locate with the interstitium.

(H. and E.; original $\times 100$)

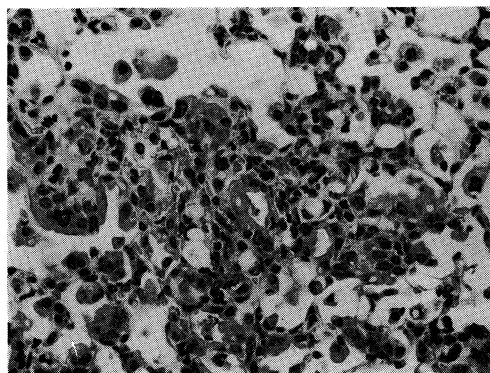


Fig. 3. Higher magnification of Fig. 2. Alveolar septum were infiltrated plasma cells, lymphocytes and histiocytes. Lining alveolar epithelium were swollen.
(H. and E.; original $\times 400$)

混ざっていた (Fig. 3)。肺胞腔内には、マクロファージが集積し、好中球および好酸球の遊出はみられなかった。なお、肥厚した肺胞壁には、reticulin fiber の増生はみられたが、collagen fiber の増生は明らかでなかった。1日目、2日目の肺では、以上の反応の拡大像を示したものはなかった (Fig. 4)。3日目の肺

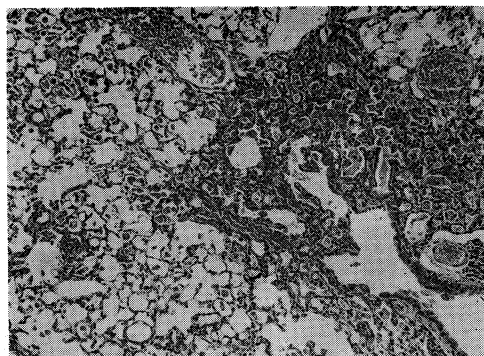


Fig. 4. 2 days after exposure. Infiltrates were reduced.

になると、腫大を示していた肺胞上皮細胞が扁平となり、肺胞壁にみられたリンパ球、組織球が限局性に集合化してみられるようになった (Fig. 5-A, B)。以上、曝露終了後3日目までの肺には、気管支細気管支周囲の胞隔炎の像を示していたが、好中球滲出を伴う急性炎症の所見は、明らかでなかった。ところが、5日目の

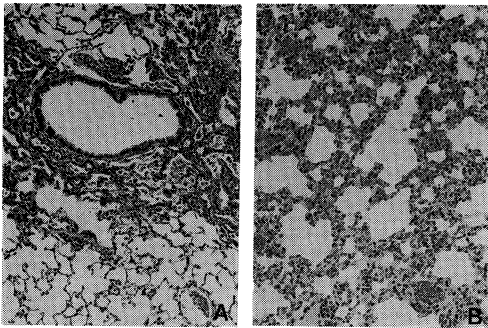


Fig. 5. 3 days after exposure. (A) Bronchiolecentric and alveolar infiltrates became mild and epithelial cells were no longer swollen. (B) Alveolar septa at this stage became to have focal accumulation of plasma cells, lymphocytes and histiocytes.

(H. and E.; original $\times 100$)

肺を検索すると、散在性の肺胞壁の肥厚とともに、肉芽腫様の変化が、肺胞壁にみられた (**Fig. 6**)。これらには、リンパ球、形質細胞、組織球とともに、epithelioid cell が混在してみられた (**Fig. 7**)。これらの肉芽腫様病巣には、巨細胞形成、壊死巣、およびフィブリンの析出などはみられなかった。肺胞壁内や肉芽腫様病巣には、reticulin fiber の増生がみられたが、膠原化の傾向は、明らかでない (**Fig. 8**)。以上の組織反応は、肺にびまん性にみられるのではなく、限局性、散在性であり、個々のマウスによって、病変に軽重がみられた。7日目

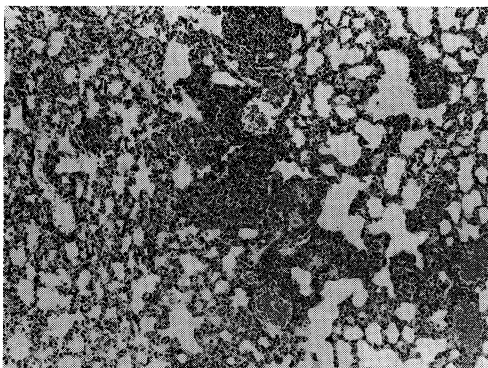


Fig. 6. Five days after exposure. Thickening of alveolar septa became more prominent and granulomatous.

(H. and E.; original $\times 100$)

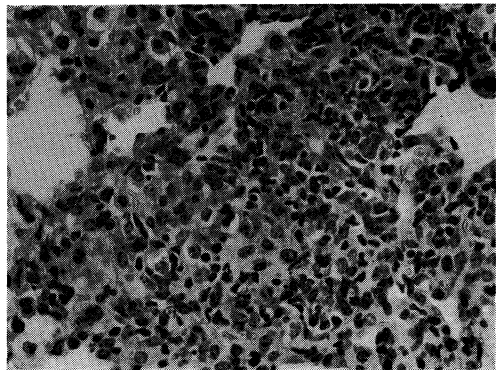


Fig. 7. Higher magnification of Fig. 6. Note that this granulomatous lesion was composed mainly of histiocytes and lymphocytes. (H. and E.; original $\times 400$)

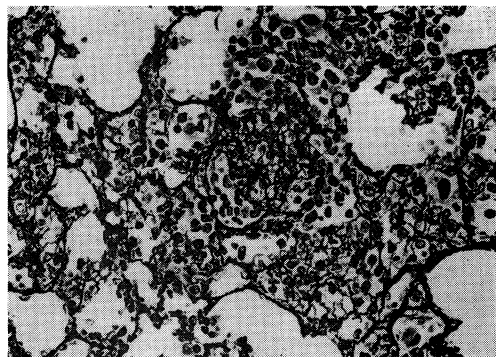


Fig. 8. Silver staining of the lesion. In granulomatous lesion reticulin fibers were increased, but no collagen fiber appeared. (Pap.; original $\times 400$)

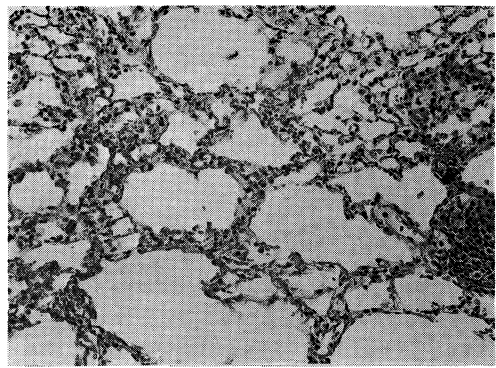


Fig. 9. Fourteen days after exposure. Slight thickening of alveolar septa remained but mononuclear infiltrates was minimal.

(H. and E.; original $\times 100$)

の肺では、肉芽腫様像の分布が減少し、限局性にみられた細気管支周囲の胞隔炎も吸収され、9日目以降では、ほとんどの細胞反応が消失し、reticulin fiberの増生だけを残して肺胞壁の肥厚が散在性にみられたにすぎなかった (Fig. 9). なお、数量的にいえば、肺の肉芽腫様変化は、3日目は20匹中6匹 (30%)、5日目と7日目は20匹中15匹 (75%)、9日目は15匹中5匹 (33%)、14日目は10匹中2匹 (20%)であった。対照群には、上記の所見は、全くみとめられなかった。

Group 2: 曝露終了後6時間目に採取した肺組織では、肺胞壁が浮腫状を示し、毛細血管の拡張だけがみられた。肺胞壁の肥厚および単核細胞浸潤もみられず、終末細気管支周囲にも著変がなく、以後、経時的にみても、Group 1にみられたような所見には接しなかった。対照群も同様に、著変はまったくみられなかった。

Group 3: 曝露終了後6時間目の肺組織では、肺胞壁が浮腫状を示していたが、1日目以降の肺には、これらも消失し、気管支周囲にリンパ球がわずかにみられただけで、以後は、まったく所見を認めなかった。

なお、各グループとも、曝露吸入期間中、呼吸困難、喘鳴、チアノーゼなどの症状はみられていない。しかし曝露吸入中および直後には、毛立がみられ、うずくまる像が観察された。

2) 血清抗体価の変動

Fig. 10に示すように、Group 1の2日目、3日目に最高値10,240倍の抗体価をみたが、以後7日目以降は、640~1,280倍の値をとって持続した。

3) 肺組織における抗体分布

Group 1について、IgGの存在分布をPAP法で検

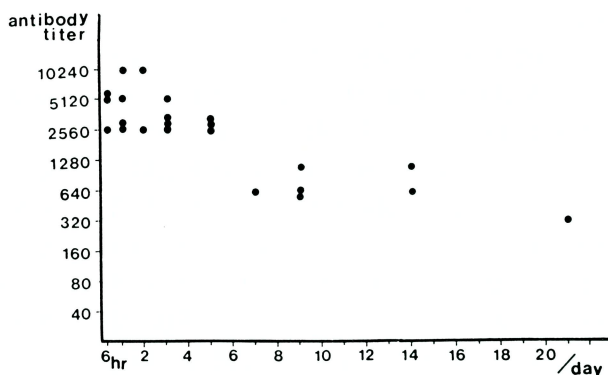


Fig. 10. Serum antibody titer against BαA. A dot indicates that of pool serum from five animals.

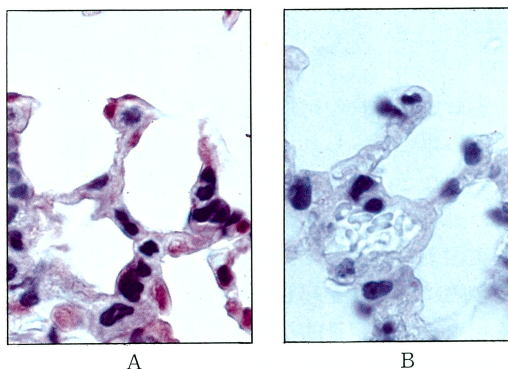


Fig. 11. The presence of IgG by PAP method. A. Positive staining (brown color) are seen. B. The absence of deposits in control mouse. (At the first day after exposure. Original ×1,000)

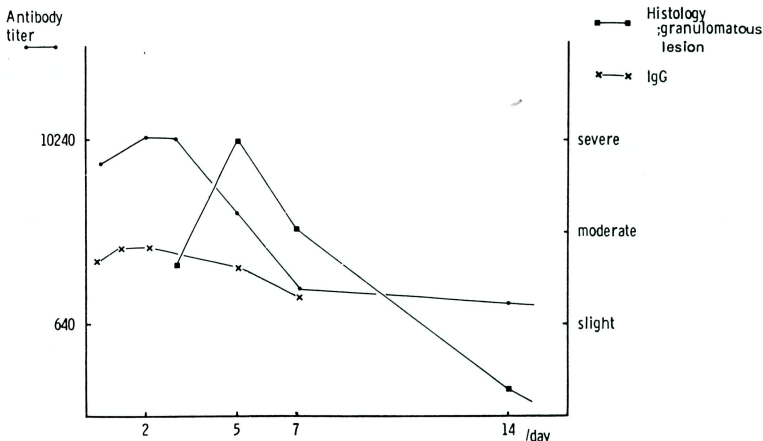


Fig. 12. Comparative sequence of serum antibody, the deposition of IgG in pulmonary tissue and histological presence of granulomatous lesion.

索した。6時間目、および1日、2日、3日目に、肺胞壁および肺胞マクロファージにIgGの沈着を認めた(Fig. 11)。IgGの沈着は、特に胞隔炎を示している部に強くみる傾向があった。しかし、5日目以降には、強い沈着は明らかでなく、また肉芽腫様部にもみられず、周囲組織の細胞に散在性にみとめられた。このIgGの沈着の程度を severe, moderate, slight の3段階に分けてプロットしたものが、Fig. 12の中の×印であり、同じく、組織変化の度を■印、血清抗体価の変動を●印で記し、3者の状態を経時的に比較したものである。

考 按

過敏性肺臓炎の病理発生に関しては、すでに多数の報告がみられるが、抗原の量的問題、感作方法など、それぞれの実験系で差がある。また、動物の選定、抗原の処理方法など多くの未確定因子が介在していると考えられる。そこで比較的肺病変を起しにくいとされる動物であるマウスに、定量的抗原を与えて、あえて、その経時的動態、予後を観察し、できるならば、人の慢性肺臓炎の病理発生モデルを作製しようとして、本実験を施行した。肺病変を起しにくいマウスを使用したわけは、動物を多量に使えることと、肺病変を発生しにくいことから、もし起るのであれば純粹の反応としてとらえることができるからである。喘息誘発剤であるBaAを用いた理由は、抗原として定量できるものであることにほかならない。感作ルートも、人の過敏性肺臓炎の発生を考慮して、抗原の直接吸入法と、確定に感作できる意味から筋肉内注射法を併用した。また、曝露吸入誘発も1回だけと、慢性的曝露の意味から連続2週間くりかえし投与する場合を設定した。

感作方法の差異、誘発感作としての曝露時間の差異による肺の組織像を経時的に観察した結果は、各Groupとも急性炎症性循環障害の強い変化はみられず、また固定化した病像を作ることでもできず、可逆的病変の形成に留まった。Group 1は感作後、2週間連続曝露吸入誘発し

ているために、その間の急性炎の像は把握し得なかったのかもしれない。また、Group 2は、曝露吸入誘発は1回だけであり、経気道感作を行ったGroup 3は、抗体価が十分上昇していなかったためと考える。本実験をかえりみて、今回のマウス対BaAの組合せでは、感作抗原が吸収される可能性を示唆している。このことから他の動物種対抗原の組合せを行ってみる必要性が考えられた。しかし、一般に、動物実験で、長期抗原曝露による慢性的肺病変の発生、誘導は困難であり、Richersonら¹²⁾ Mooreら⁸⁾ および Petersonら¹³⁾も指摘しているように、感作後、長期抗原曝露を施行しても、可溶性抗原を用いた場合、慢性肺病変の誘発は極めて難しいという論に一致した結果となった。その理由として考えられることは、肺の臓器特異性として、抗原に対する抵抗性すなわち、脱感作能力、耐性などが考えられる。本実験の場合、肺病変の経時的变化をみても、2週間の曝露吸入後、6時間目から3日目までにみられた終末細気管支周囲の胞隔炎と5日目以降にみられた肉芽腫様細胞集積像までにとどまり、以後、吸収されたと考えられる。

一般に、人の例にみられるように、非可溶性抗原で感作された場合には、過敏反応とともに異物反応がみられ、比較的定型的な肉芽腫形成をみることが多い。Mooreら⁸⁾の pigeon dropping extract を抗原として、BCGをアジュバントとしたニュージーランドウサギの実験では、最終曝露後6時間目に気管支を中心とした急性炎症像がみられたという。Richerson,¹⁴⁾ Petersonら¹³⁾ および Bernardoら¹⁵⁾は、ニュージーランド白色兎またはモルモットを用い、抗原として、BCG, ovalbumin を使用して吸入および注入による抗原曝露実験を行い、主として急性炎症がみられたり、ときに、慢性炎症が気管支中心にみられたりとしている。また、時間的差はあっても、肉芽腫形成像を観察している。吸入抗原に対する反応は、どんな宿主に対する感作実験の場合でも、まず終末細気管支を中心起ってくるのは事実である。また、他の病因であっても、リンパ球系の反応はまず、気

管支，細気管支を中心として発生することも，以上の事実を裏書きしているように思われる．なお，本実験の場合，reticulin fiber の増生が軽度のみられたが，膠原化には，到らず，これも可逆性の反応とみなされる．これらの実験成績から考えて，病因はともかくとして，人にみられる肺の肉芽腫病変の形成像には，かなりの抗原曝露のくりかえしによってひきおこされる病変と考えられる．実験的過敏性肉芽腫の誘発は，曝露処置の持続，その他の何らかの因子の関与を必要とする厳しい条件が必要であり，かなりの慢性長期感作を行わないと誘導できないものであろう，諸家の報告^{5), 6), 9), 16)}には，単核球および epithelioid cell を含む肉芽腫形成がみられたとあるが，肉芽腫の推移と運命については，ほとんど記載がない．

抗体価変動と病理像との関連性は，Group 1 について，血清抗体価の測定とパラフィン切片による抗体分布を酵素抗体法を用いて検討した．血清抗体価の上昇は，肺組織内 IgG の沈着と平行し，両者が減少しはじめる時期になって，肉芽腫様病変が肺にみられた．肉芽腫様病変形成時期と抗体価，IgG の沈着の増減との間には，多少とも関連がみられたが，肉芽腫様病変の持続性がみられず，このことが慢性化への誘導の難しさを示唆した．血清抗体価の力価としては，640 倍程度を持続しているが，臓器特異性によるのか，より頻回の曝露が必要なのか，細胞性免疫の関与があるのか，今後の検討を要する問題である．ただ本実験の観察事実から，血清抗体価が上昇している3日目には，終末細気管周囲の胞隔炎がある程度おさまり，肺胞壁にリンパ球，組織球が集合してみられ，また抗体価が下りはじめる5日目には，肉芽腫様変化がみられ，また，肺胞壁に IgG の沈着がみられたことを考えあわせると，一応抗原抗体反応が肺胞壁を場として行われ，それに伴う傷害の修復過程において非特異的な肉芽腫様変化が表現されてくるのか，この肉芽腫様変化が

T cell の関与による可能性も考えられるが，これらは，明らかでない．

また感作を大腿筋肉内1回と腹腔内注入1回行った Group 2 の結果は，Olenchok²⁵⁾ が，抗原投与法，曝露法あるいは感作抗原量の差によって病変の違いが生じると述べているように，曝露時間や感作回数が Group 1 にくらべて少なかったことは，肺組織に特記できる病変があらわれなかったことから容易に肯定でき，感作抗原量の問題が大きいと考える．

なお使用抗原に関して，八倉²⁶⁾ は，モルモットを用いて，同じ BaA 抗原で気管支喘息の誘発に成功しているが，マウスを用いた本実験では，呼吸困難，喘鳴などの症状もみられず，病理組織像も人の気管支喘息にみられるような所見は示さなかった．このことも，最初に述べたように，2週間という誘発曝露期間が長いために，その間の初期の変化を捕捉していないのかもしれない．

このように，動物を使用した過敏性肺臓炎の実験モデルは，過去の文献にみられるほど容易ではなく，わずかに BCG などで修飾を付加した実験でだけ，肉芽腫性病変が認められているにすぎない．リウマチを中心とした人の肺臓炎のように，かなりの長年月の感作が必要なかもしれないし，動物差，気道過敏性の違いによるものかもしれない．本実験では，Group 1 に，諸家のいう過敏性肺臓炎に類似した所見がえられた．ただしこの病変は可逆的であった．今後，さらに抗原の種類，動物種，感作方法の検討を加えていきたい．

本論文の要旨は，昭和57年7月，第17回日本胸部疾患学会中国四国地方会で発表した．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を頂いた川崎医科大学人体病理学教室，中川定明教授ならびに山下貢司教授に謹んで深謝致します．研究に御協力いただいた山成憲子，太田節子，山元しのぶ各氏に感謝いたします．

文 献

- 1) Nicholson, D. P.: Extrinsic allergic pneumonia. *Am. J. Med.* 53: 131—136, 1974
- 2) Schlueter, D. P.: Response of the lung to inhaled antigens. *Am. J. Med.* 57: 476—492, 1974

- 3) Pepys, J., Jenkins, P. A., Festenstein, G. N., Gregory, P. H. and Skinner, F. A.: Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 2: 607, 1968
- 4) Fink, J. N., Sosman, A. J., Barboriak, J. J., Schlueter, D. P. and Holmes, R. A.: Pigeon breeder's disease. A clinical study of a hypersensitivity pneumonitis. *Ann. intern. Med.* 68: 1205—1219, 1968
- 5) Nagaya, H., Schauble, M. K. and Sieker, H. O.: Experimental hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. resp. Dis.* 91: 375—382, 1965
- 6) Kawai, T., Salvaggio, J., Lake, W. and Harris, J. O.: Experimental production of hypersensitivity pneumonitis with bagasse and thermophilic actinomycete antigen. *J. clin. Inves.* 50: 276—288, 1972
- 7) Richerson, H. B., Cheng, F. H. F. and Bauserman, S. C.: Acute experimental hypersensitivity pneumonitis in rabbits. *Am. Rev. resp. Dis.* 104: 568—575, 1971
- 8) Moore, V. L., Hensley, G. T. and Fink, J. N.: An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbit. *J. clin. Inves.* 56: 937—944, 1975
- 9) Salvaggio, J., Phanuphak, P., Stanford, R., Bice, D. and Claman, H.: Experimental production of granulomatous pneumonitis. Comparison of immunological and morphological sequelae with particulate and soluble antigens administered via the respiratory route. *J. Allergy clin. Immunol.* 56: 364—380, 1975
- 10) Joubert, J. R., Ascah, K., Moroz, L. A. and Hogg, J. C.: Acute hypersensitivity pneumonitis in the rabbit. 1. An animal model with horseradish peroxidase as antigen. *Am. Rev. resp. Dis.* 113: 503—513, 1976
- 11) Peterson, L. B., Thrall, R. S., Moore, V. L., Stevens, J. O. and Abramoff, P.: An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbit. Induction of cellular hypersensitivity to inhaled antigens using carrageenan and BCG. *Am. Rev. resp. Dis.* 116: 1007—1012, 1977
- 12) Richerson, H. B., Seidenfeld, J. J., Ratajczak, H. V. and Richard, D. W.: Chronic experimental interstitial pneumonitis in the rabbit. *Am. Rev. resp. Dis.* 117: 5—13, 1978
- 13) Peterson, L. B., Braley, J. F. and Moore, V. L.: Experimental hypersensitivity lung disease. Chronic pulmonary inflammation and cell-mediated hypersensitivity by exposure to aerosolized antigens in the rabbit. *Chest* 75: 274—275, 1979
- 14) Richerson, H. B.: Acute experimental hypersensitivity pneumonitis in the guinea pig. *J. Lab. clin. Med.* 79: 745—757, 1972
- 15) Bernardo, J., Hunninghake, G. W., Gadek, J. E., Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.: Acute hypersensitivity pneumonitis: Serial changes in the lung lymphocyte subpopulation after exposure to antigen. *Am. Rev. resp. Dis.* 120: 985—994, 1979
- 16) Masih, N., Majeska, J. and Yoshida, T.: Studies on experimental pulmonary granuloma. 1. Detection of lymphokins in granulomatous lesion. *Am. J. Path.* 95: 391—406, 1979
- 17) Schatz, M., Patterson, R. and Fink, J.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy clin. Immunol.* 60: 27—37, 1977
- 18) Robert, R. C. and Moore, V. L.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. resp. Dis.* 116: 1075—1090, 1977
- 19) Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A. (Eds): *Clinical aspects of immunology.* Philadelphia, F. A. Davis Co., 1963
- 20) Brentjens, J. R., O'connel, D. W., Pawlowski, I. B., Hsu, K. C. and Andres, G. A.: Experimental immune complex disease of the lung. The pathogenesis of a laboratory model resembling certain human interstitial lung disease. *J. exp. Med.* 140: 105—125, 1974

- 21) Lopez, M. and Salvaggio, J.: Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts of etiology and pathogenesis. *Ann. Rev. Med.* 27: 453—463, 1976
- 22) 右田俊介編: 免疫化学, 東京, 中山書店, 1972, pp. 176—177
- 23) Sternberger, L. A., Harday, P. H. and Cuculis, J. J.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 79: 226—231, 1971
- 24) Talyer, C. R.: Immunoperoxidase technique. Practical and theoretical aspects. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 102: 113—121, 1978
- 25) Olenchock, S. A.: Animal models of hypersensitivity pneumonitis: A review. *Ann. Allergy* 38: 119—126, 1977
- 26) 八倉隆保: 実験的アレルギー性喘息, *最新医学* 28: 1464—1472, 1973