

## 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58年9月29日受付)

### Lymphocyte Population in Hypersensitivity Pneumonitis

Kenya Hiura

Department of Human Pathology  
Kawasaki Medical School

(Accepted on September 29, 1983)

モルモットを用いた過敏性肺臓炎の実験モデルで、急性期から慢性期に至る経過に好中球が重要な役割を果たしており、その早期消退、肉芽腫形成にリンパ球がなんらかの関与をなしている可能性が考えられた。今回、このことを検討する一環として、過敏性肺臓炎各期における出現リンパ球の変動を肺から抽出したリンパ球のEおよびEACロゼット形成能を調べることにより、T、B細胞の面から検索することとした。

結果は、いずれの時期でも正常肺に比べて、リンパ球は増加しており、T、B-cellの両方の増加によるものだった。しかし、B-cellの増加は、いずれの時期でも一定で、各時期での有意差を認めなかった。T-cellの増加は、1~2週間でピークに達し、以後減少していった。そこで、B-cell系統の刺激は曝露時すでに完成されており、最終曝露では、形成されていた抗体と抗原とのimmune complex形成だけがひきおこされたと考えられ、T-cell系統への刺激は最終曝露後もさらに増強されていると考えられた。

肺内のTおよびB-cellの動態により、過敏性肺臓炎の発生には、体液性および細胞性免疫の連続的あるいは同時発現や、むしろ非独立的なT-cellとB-cellの相互作用が考えられ、今後、TおよびB-cellの作用、特にT-cellのsubsetについて検索していく必要性が考えられた。

In the earlier communication on experimentally induced hypersensitivity pneumonitis, the author emphasized the importance of neutrophils in the transitional period between the acute and granulomatous stages. The author postulated that lymphocytes play some role in the decrease of neutrophils prior to the granulomatous stage when lymphocytes are concomitantly increased.

In this report, the author describes the result of immunological analysis of the lymphocytes obtained from the lung tissue at the various stages of hypersensitivity pneumonitis. The lymphocytes were increased in number at all stages compared with normal lung and this was contributed by both T and B-lymphocytes. In contrast to B-lymphocyte which failed to show a sequential change in number,

T-lymphocyte showed a gradual increase in number up until one to two weeks after the final exposure and declined thereafter. As the reason for this, it was postulated that whereas B-lymphocyte system had already been maximally stimulated at the time of the final exposure, the effect of the latter to T-lymphocyte system was further potentiated. From these results of T and B-lymphocytic behavior, it is possible that both humoral and cellular immunities, either individually or through interaction between the two. Further studies on the subsets of T-lymphocyte may help clarify the pathogenesis of this disease.

Key Words ① Hypersensitivity pneumonitis ② Lymphocyte population

### はじめに

過敏性肺臓炎は、種々の有機塵埃抗原の吸入感作により自然感作状態になっている場合、再度抗原に曝露されると肺内に次のような2つの形態学的変化を経時的にきたしてくる疾患である。急性病変と言われるものは、抗原吸入後、数時間後に出血を伴い、好中球を主体とする胞隔炎形成を示してくるものである。この病変は、以後抗原吸入がなければ消失したり、単核細胞を主体とする胞隔炎の型に変わってくる。慢性病変と言われるものは、くりかえし抗原吸入があった場合、肺胞中隔に単核細胞と類上皮細胞からなる壊死を伴わない肉芽腫病変を示すものである。これら2つの病変ともその発生には免疫学的反応の関与が考えられており、急性病変には、immune complexの沈着による体液性免疫の関与を、慢性病変には、肉芽腫形成を伴うことなどから細胞性免疫の関与が推測され、また両免疫の複雑なからみあいもあると考えられている<sup>1), 2)</sup>。

著者は、これまでマウス<sup>3)</sup>とモルモット<sup>4)</sup>で過敏性肺臓炎の実験モデルを作製し、急性期の好中球を伴う胞隔炎形成から慢性期の肉芽腫形成に至る時間的経過における病変の推移について詳しく報告してきた<sup>5)</sup>。そこでは、過敏性肺臓炎の急性期から慢性期に至る経過に好中球が重要な役割を果たしており、その早期消退、ついで肉芽腫形成に至るが、その際リンパ球がなんらかの関与をなしている可能性を指摘した。

今回、この課題を検討する一環として、過敏性肺臓炎各期における出現リンパ球の変動を、

T, B-cellの面から検索することとした。ここでは、肺から抽出したリンパ球のEおよびEACロゼット形成能を調べることにより、T, B-cellの同定を行った結果だけ報告する。

### 材料および方法

実験方法は前回、報告した通りである<sup>3)</sup>。簡単にまとめると、体重250gの雄Hartley系モルモット6匹を使用し、bacterial  $\alpha$  amylase (以下 BaA, Sigma社)を抗原として用いた。BaA生食液(25mg/ml)とcomplete Freund's adjuvantの等量混合液0.5mlを筋肉内に5日間投与した。3週間後、腹腔内にBaA生食液(25mg/ml)0.5mlを投与し、1週間後から2週間にわたって誘発曝露を噴霧吸入装置内で行った。曝露抗原量は、BaA生食液(10mg/ml)を5ml使用し、20分間吸入させた。

2週間の曝露を継続しつつ、初回曝露後、24時間目、6日目、14日目、21日目、28日目に1匹ずつ屠殺して肺組織を取り出した。

○肺組織からのリンパ球の単離抽出およびロゼット形成

#### i) リンパ球の単離抽出

体重100gあたりペントバルビタール0.3ml(50mg/ml)を腹腔内に注射して麻酔を行う。麻酔後、胸腔を開き、右心室からカニューレを通し、ヘパリン加生食水で肺の灌流を行った後、肺を胸腔から取り出した。肺組織はシャーレの中で、気管支、肺門リンパ節ははずし、PBS液2mlを加えハサミで細切した。組織浮遊液は、ガーゼ、ナイロンメッシュ(メッシュ

150, 270) でろ過し, ろ液は, 2000rpm, 10分間遠沈を3回行い沈査を取り, PBS液5mlで再浮遊させた. 再浮遊液に1%硫酸バリウム液1mlを加え, 37°C, 30分間放置した. 混和液からの単核球分離はSeparate L(比重 $1.077 \pm 0.001$ , 武藤化学薬品)を用いて細胞比重法で行った.

#### ii) TおよびB-cellの検出

矢田らの方法<sup>6)</sup>を一部改変し, EおよびEACロゼット形成を行った. 結果判定として, ロゼット形成をしたもののうち赤血球4個以上付着するものを陽性とし, 肺からえられた細胞総数は, 全単核球数を数え, また必要な場合だけ単球による補正值を求めた.

## 結 果

肺内リンパ球の変動ならびに経時的組織変化  
正常モルモット肺から $16 \times 10^6$ 個の単核球が得られ, そのうち $30 \pm 5\%$ がリンパ球で,  $70 \pm 5\%$ がマクロファージであった. 正常モルモットでは, マクロファージが主体を占めていた. リンパ球の内訳はT-cell  $52.6 \pm 6\%$ , B-cell  $9.5 \pm 2\%$ であった.

実験群のリンパ球(T, B-cell)の変動は, Fig. 1, 2に示した.

24時間目は, 組織学的に, 終末細気管支内の好中球の浸潤, 肺胸腔内の好中球, マクロファージの遊出や出血, 肺胞壁内の好中球と少数のリンパ球の浸潤が認められる時期である. 肺から得られた単核球は $20 \times 10^6$ 個であり, そのうちリンパ球が35%を占めており, T-cellは $71.4 \pm 10\%$ , B-cellは $19.8 \pm 3\%$ であった.

6日目は, 終末細気管支, 肺胸腔の好中球浸潤の減少, 肺胞上皮細胞の腫大とリンパ球, 形質細胞の浸潤が肺胞壁にみられる時期である. 全単核球数は $16 \times 10^6$ 個が得られ, そのうちリンパ球が41%, T-cell  $78.6 \pm 4.5\%$ , B-cell  $18.4 \pm 2\%$ であった.

14日目は, 細気管支, 肺胸腔に, マクロファージが目立ち, 肺胞壁に, リンパ球, 形質細胞とマクロファージの浸潤がみられ, 肺胞壁が肥厚して胞隔炎像ができる時期である. 全単核球数は $18 \times 10^6$ 個であり, リンパ球は45%を占めており, そのうちT-cell  $80 \pm 6\%$ , B-cell  $19.5 \pm 4\%$ であった. この時期でT-cellは最も増加していた.

21日目は, 肺胞壁に胞隔炎像と共にリンパ球, 形質細胞, 組織球によって構成された肉芽腫様変化が認められる時期である. 全単核球数は,  $18 \times 10^6$ 個であり, リンパ球は47%で, そ

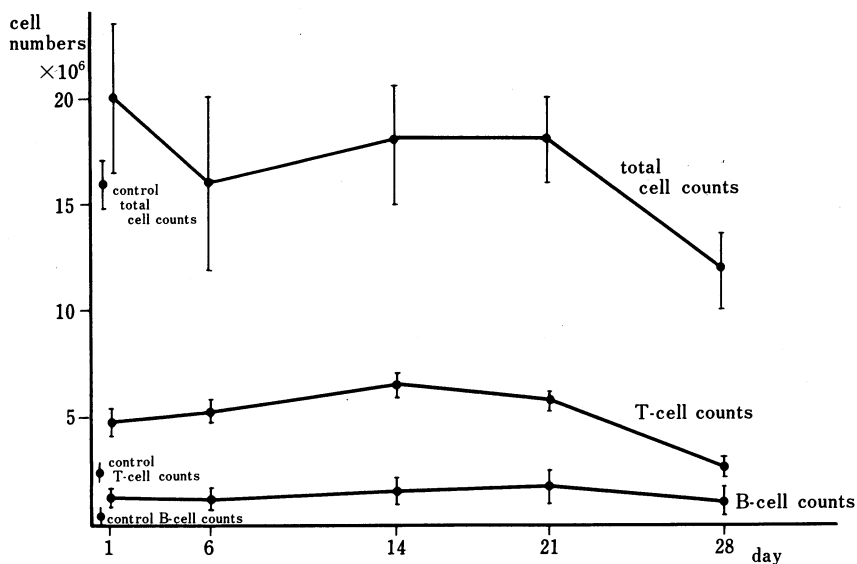


Fig. 1. Lymphocytes harvested at each stage.

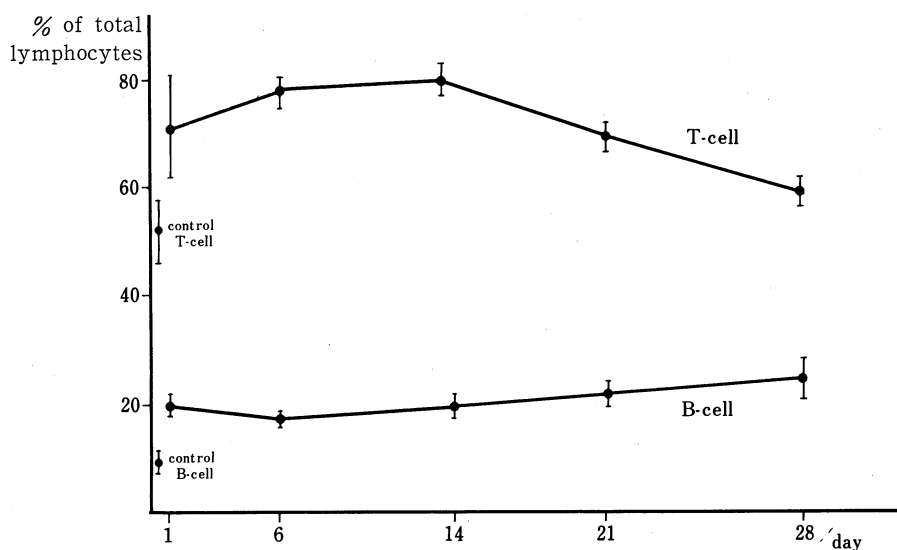


Fig. 2. Percentage of T and B-cells at each stage.

のうち T-cell  $70.4 \pm 5\%$ , B-cell  $22.2 \pm 4.6\%$ であった。14日目に比して T-cell は減少を示していた。

28日目は、肉芽腫の大きさとその細胞成分が減少し、胞隔炎としての細胞浸潤も減少する時期である。全単核球数は、 $12 \times 10^6$ 個で、リンパ球は40%で、そのうち T-cell  $60.4 \pm 4\%$ , B-cell  $24.8 \pm 8\%$ であった。T-cell の減少はさらに進み、B-cell は軽度ながら上昇傾向がみられた。

#### 考 察

過敏性肺臓炎をはじめ、炎症性肺疾患における肺実質内でのリンパ球の動態を調べる研究は、それほど多くない。しかも、多くの場合、人体材料、動物実験いずれも、気管支肺洗浄液 (Bronchoalveolar lavage; BAL) 内のリンパ球の動態を調べるにとどまっております。本研究のように肺実質から直接リンパ球を単離して検索したものは、Bernardo<sup>7)</sup>の報告以外にみあたらない。

リンパ球の機能的検索の困難さの一つは、その検索に特異的な、しかも高感度の検出法がない点である。例えば、T, B-cell という大ざっぱな分類にせよ、その検出手段、手技によって

は大きくEロゼット、EACロゼット形成細胞、あるいは表面免疫グロブリン保有細胞としてだけしか同定できず、また陰性細胞に関しては同定不能である。従って、今回、検討したE, EACロゼット形成細胞数も、必ずしもT-cell, B-cellを正しくとらえているとは言えない。しかし、それを各病期における細胞数を比較した場合、少なくともそれらの増減は、T, B-cellの動態を反映する一つの指標としてみることはできよう。以下、T-cell, B-cellとだけ記載するが、それは、我々の理解がある程度よりよくするための手段であって、結果では、それはEおよびEACロゼット形成細胞の面から推測した表現にすぎない。

今回得た実験結果は、Bernardo<sup>7)</sup>らの結果とほぼ同様であった。実験モルモット肺では、いずれの時期でも正常肺に比べてリンパ球は増加しており、それはT-cell, B-cell (Eロゼット, EACロゼット形成細胞)の両方の増加による ( $p < 0.05$ , Fig. 1, 2)。しかし、B-cellの増加はいずれの時期でも一定しており、各時期における有意差を認めなかった。T-cellの増加は1~2週間でピークに達し、3週間では初回曝露時へ、4週間では未感作のモルモット肺内のリンパ球数のレベルまで減少している。いい

かえれば、B-cell は最終感作 (booster) 直後にはすでに増加しており、肺内病巣の強弱に無関係に一定している。一方、T-cell は最終感作後すでに増加状態にはあるが、さらに増加して噴霧曝露後2週間でそのピークに達するようになる。

B-cell の出現状態を理解するためには、血清中の免疫グロブリン (以下 Ig とする) の変動、肺内の Ig の沈着状態、形質細胞の存在状態と比較しながら検討する必要がある。前々回に報告した血清中、肺内の Ig の状態をまとめると次の様である<sup>4)</sup>。(1) 増加する Ig は IgG である。(2) 血清 Ig は曝露後6時間にはすでに増加しており、ごく軽度増加傾向を示しながら3~4週間まで持続している。(3) 肺内に沈着する Ig も IgG である。(4) 肺内に IgG 陽性の形質細胞が出現する。(5) 肺内の IgG 沈着は曝露後2~3週後にピークに達し、4週間後に消失する。

これらの事実と肺内 B-cell の出現状態と照らしあわせてみると、B-cell 系統への刺激は、肺を含め全身的であり、曝露時にはすでに完成されていることが推測できる。これは初回からの感作が、筋肉注射によって行われたために起こったと考えられる。最終的な気道感作では、その体液性免疫への刺激は強くなく、すでに形成されていた抗体と曝露により肺内へ導入された抗原との間で immune complex 形成だけをひき起こしたと解釈するのが妥当であろう。

これに反して、T-cell 系統への刺激、肺内の T-cell の増加は、最終気道曝露後もさらに続いていると理解することができる。つまり、T-cell の反応は肺内で次第に増強されてくるということであり、これらの結果は現在の免疫論によく合致したものと考えられる<sup>8)</sup>。

前回の報告<sup>5)</sup>で、気管支肺炎様期、胞隔炎形成期における好中球の出現が、肉芽腫形成期では消失し、リンパ球、マクロファージにとって代わられることを指摘し、この間に出現するリンパ球がなんらかの関与をしている可能性を考えた。今回の研究で出現リンパ球の多くは、

T-cell であろうということを示した。しかしこれが、前回可能性としてあげた肉芽腫形成に関与する遅延型アレルギーに関与する T-cell (Td-cell) なのか、Ig の産生、つまり B-cell の増殖をおさえるサプレッサー T-cell (Ts-cell) なのかを明らかにするまではしていない。ただ、肺内 B-cell の動態、血清抗体価の変動、Ig の肺内沈着の状態を比較して考えると、Moore<sup>9)</sup> らのいう様なヘルパー T-cell (Th-cell) 関与の可能性は否定的であると考ええる。

Maish<sup>10)</sup> らはモルモットを用い、agarose bead に付着させた dinitrophenylated bovine serum albumin を抗原として肉芽腫形成をみた実験で、リンフォカインである migration inhibitor factor (MIF) 活性の上昇がみられたことを報告した。MIF 出現のピークは肉芽腫形成前であるとしている。従って、彼らの結果は肉芽腫形成には、リンフォカインが重要な役割を果たしており、それには T-cell が関与していることを示唆している。Richerson<sup>11)</sup> らは、モルモットで、tuberculin, hapten を抗原として用い、気管内注入による実験的過敏性肺臓炎では、抗体産生がなくても急性胞隔炎の所見がみられたとしており、細胞障害性 T-cell (Tc-cell) の関与の可能性をあげている。また、Kawai<sup>12)</sup> らもウサギを用い、micropolyspora faeni を抗原とした実験で、細胞性免疫の関与による急性胞隔炎がみられたことを報告している。

しかしながら、急性過敏性肺臓炎の発生に関しては、immune complex による反応、すなわち体液性免疫の関与によるとする報告もないわけではない。Johnson<sup>13)</sup> らは、BSA を気管内注入したラットの実験で、肺胞腔、肺胞壁に蛍光抗体法で明らかにされる immune deposit を観察しているし、Roska<sup>14)</sup> らの、モルモットを用い、pigeon serum を抗原とした実験でも、急性病変が、immune complex による反応であろうと報告している。また、これら急性期における体液性および細胞性免疫とのかかわりについて、Lopez<sup>15)</sup> らが、T-cell またはマク

ロファージが B-cell を活性化させ抗体産生をうながし、またリンパ球からリンフォカインによって B-cell の増加がみられてくると考えているように、B-cell の反応を強調しながらも、種々の段階で T-cell, マクロファージ, B-cell の相互のからみあいを指摘する者もいる。このように細胞性免疫に関与している T-cell が好中球を主体とする急性期から増加し、胞隔炎形成期まで継続して増加していることは、Reynolds<sup>16)</sup> らの人体例での慢性過敏性肺臓炎の BAL の所見と一致するものである。またリンフォカインや chemotactic factor の分泌があることは、Hunninghake<sup>17)</sup> や Schuyler<sup>18)</sup> も人体例で報告している。

以上のように、過敏性肺臓炎の発生について

は、体液性免疫および細胞性免疫の連続的あるいは同時発現や、むしろ非独立的な T-cell と B-cell の相互作用による結果としての組織学的、血清学的変化として発現してくるものと考えられることもできる。今日、リンパ球の検索は、monoclonal 抗体などを用いた方法で、その種類および機能について細かく検索されており、今後、T および B-cell の相互作用、特に T-cell の subset である Tc-cell, Td-cell がどの程度関与しているか、また Th-cell, Ts-cell がどのように B-cell に関与しているかを検索していく必要がある。

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、山下貢司教授ならびに真鍋俊明助教授に謹んで深謝致します。

## 文 献

- 1) Robert, R. C. and Moore, V. L.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. respir. Dis.* 116: 1075-1090, 1977
- 2) Schatz, M., Patterson, R. and Fink, J.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy clin. Immunol.* 60: 27-37, 1977
- 3) 日浦研哉: 過敏性肺臓炎の実験病理学的検討. *川崎医学会誌* 8: 322-331, 1982
- 4) 日浦研哉: 実験的過敏性肺臓炎の免疫組織学的研究. *アレルギー* 32: 546, 1983
- 5) 日浦研哉: 過敏性肺臓炎における好銀線維の動態. *川崎医学会誌* 9: 326-332
- 6) 矢田純一, 橋 武彦: 免疫実験操作法 II: 473-475, A: 451-454, 1972
- 7) Bernardo, J., Hunninghake, G. W., Gradek, J. E., Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.: Acute hypersensitivity pneumonitis: Serial changes in the lung lymphocytes subpopulation after exposure to antigen. *Am. Rev. respir. Dis.* 120: 985-994, 1979
- 8) 矢田純一: 図説臨床内科講座, 免疫 (1), 本間光夫編. 東京, メジカルビュー社, pp. 18-25, 1981
- 9) Moore, V. L., Hensley, G. T. and Fink, J. N.: An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbit. *J. clin. Invest.* 56: 937-944, 1975
- 10) Maish, N., Majeska, J. and Yoshida, T.: Studies on experimental pulmonary granuloma. I. Detection of lymphokins in granulomatous lesion. *Am. J. Pathol.* 95: 391-406, 1979
- 11) Richerson, H. B.: Acute experimental hypersensitivity pneumonitis in the guinea pig. *J. lab. clin. Med.* 79: 745-757, 1972
- 12) Kawai, T., Salvaggio, J., Lake, W. and Harris, J. O.: Experimental production of hypersensitivity pneumonitis with bagasse and thermophilic actinomycete antigen. *J. clin. Invest.* 50: 276-288, 1972
- 13) Johnson, K. J. and Ward, P. A.: Acute immunologic pulmonary alveolitis. *J. clin. Invest.* 54: 349-357, 1974
- 14) Roska, A. K. B., Moore, V. L. and Abramoff, P.: Immune complex disease in guinea pig lungs; Elicitation with pigeon serum. *Am. Rev. respir. Dis.* 120: 129-136, 1979

- 15) Lopez, M. and Salvaggio, J.: Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts of etiology and pathogenesis. *Ann. Rev. Med.* 27 : 453—463, 1976
- 16) Reynolds, H. Y., Fulmer, J. D., Kazmierowski, J. A., Roberts, W. C., Frank, M. M. and Crystal, R. G.: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. clin. Invest.* 59 : 165—175, 1977
- 17) Hunninghake, G. W., Gradek, J. E., Kawanami, O., Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* : 97 : 149—206, 1979
- 18) Schuyler, M. R., Thigpen, T. P. and Salvaggio, J. E.: Local pulmonary immunity in pigeon breeder's disease. A case study. *Ann. Int. Med.* 88 : 358, 1978