

# An Immunological Study of Experimental Hypersensitivity Pneumonitis in the Mouse

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8173">http://hdl.handle.net/2297/8173</a>

## 実験的過敏性肺臓炎の免疫学的研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

高 倉 文 嗣

(平成2年1月20日受付)

過敏性肺臓炎 (hypersensitivity pneumonitis, HP) の発症機序に関して, IV型アレルギー反応の関与を証明するため, 抗原に bacterial  $\alpha$  amylase ( $B\alpha A$ ) を使用して, マウス HP モデルを作成した.  $B\alpha A$  と Freund 完全アジュバントの混合液を筋肉内へ注射して全身感作を行った後,  $B\alpha A$  を2週間連続噴霧吸入させた. 経時的な組織学的変化は胞隔炎形成期, 肉芽腫形成期および肉芽腫吸収期の3つに分かれ, ヒト HP と同様な組織所見であった. 胞隔炎や肉芽腫変化の強い時期には, 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中のリンパ球とマクロファージが増加しており, 組織学的に胞隔や肺間質に浸潤している細胞成分と一致していた. BALF リンパ球のサブセットでは, Lyt-1 陽性細胞が Lyt-2 陽性細胞より優位であった. 胞隔炎や肉芽腫様病変内のリンパ球サブセットを免疫組織化学的に検討すると, 組織内でも Lyt-1 陽性細胞が Lyt-2 陽性細胞より優位であり, BALF リンパ球サブセットと一致していた. 強力な免疫抑制剤であるサイクロスポリン A を吸入前に連続投与して HP に及ぼす影響を検討すると, 胞隔炎や肉芽腫様病変の形成は著明に抑制された. BALF 中のリンパ球の増加が有意に抑制され, リンパ球サブセットでは Lyt-1 陽性細胞の減少が Lyt-2 陽性細胞の減少より著明であった. 以上より HP の形成には, ヘルパー/インデューサー T 細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された.

---

**Key words** hypersensitivity pneumonitis, bacterial  $\alpha$  amylase, bronchoalveolar lavage, cyclosporin A, helper/inducer T cell

---

過敏性肺臓炎 (hypersensitivity pneumonitis, HP) は, 外因性物質を気道内に吸入することによって, その物質を抗原とした免疫学的反応により肺に胞隔炎と肉芽腫を形成し, 慢性期では間質の線維化に至る疾患である<sup>1-3)</sup>. ヒトでは, HP 患者の血清中に抗原に対する沈降抗体が証明されることから, 経気道的に肺胞に侵入した抗原に対するIII型アレルギー反応が病因とされていた<sup>4)</sup>. 近年, HP 患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中に T リンパ球が著増することが明らかにされ, IV型アレルギー反応の関与が示唆されるようになった<sup>5)</sup>. HP の動物実験モデルは, 主として家兎, モルモット, ラットに既知の抗原を経気道的に吸入させることによって作成するものが多い<sup>6-8)</sup>. しかし, HP の発症に関するIV型

アレルギー反応の機序を実験的に証明するには, 細胞免疫系の確立された動物を用いる必要があり, この点で純系マウスが最適と思われる. さらに, BALF で得られる炎症細胞が, 真に肺内における病態を反映したものであるかどうかの検討も必要となる.

サルコイドーシスに代表される肉芽腫性肺疾患では, ヘルパー T リンパ球の働きが中心となることが論じられている<sup>9)</sup>. HP でも肉芽腫形成が主体であると仮定するならば, ヘルパー T リンパ球の作用が強く関与することが推定される. 臓器移植の拒絶反応抑制に用いられているサイクロスポリン A (cyclosporin A, CyA)<sup>10)</sup> は, 主としてヘルパー T リンパ球の作用を抑制するといわれており<sup>11,12)</sup>, HP におけるヘルパー T リンパ球の役割を検索するために本薬剤は有効な

---

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BCG, bacille Calmette-Guérin;  $B\alpha A$ , bacterial  $\alpha$  amylase; Con A, concanavalin A; CyA, cyclosporin A; HP, hypersensitivity

手段になると考えられる。

このような観点から、著者は純系マウスを用いて HP のモデルを作成し、経時的な組織学的変化と BALF におけるリンパ球の動態の一致性、CyA 投与の組織学的および BALF 所見に及ぼす影響を検討した。

### 材料および方法

#### I. 動物

8週齢の C57 ブラック/6 マウス、雄 (日本 SLC 株式会社より購入し、金沢大学医学部附属動物実験施設にて飼育) を使用した。

#### II. 抗原および感作方法

日浦<sup>13)</sup>の方法に準じて、抗原には bacterial  $\alpha$  amylase ( $B\alpha A$ ) (1-4- $\alpha$ -D-glucan gluconohydrolase, type II-A, crystallized lyophilized powder, Sigma 社, St. Louis, U.S.A.) を用い、生理食塩水で  $B\alpha A$  を 5mg/ml の濃度に溶解したものを使用した。 $B\alpha A$  の生食溶液と Freund 完全アジュバントの等量混合液 0.2ml をマウスの左右大腿部と背部の筋肉内へ毎回場所をかえて、5日間連続注射して全身感作を行った。さらにブースターとして3週目と4週目に同量を筋注射した。

#### III. 抗原吸入

初回感作後5週目から、自作吸入箱 (プラスチック製 170×120×50mm) の中に感作マウスを4匹ずつ入れ、 $B\alpha A$  溶液 (5mg/ml) 3ml を超音波ネブライザー Omron, NE-U11B (立石電気、京都) にて、毎日10分間ずつ2週間連続噴霧吸入させた。対照としては、感作マウスに生食 3ml を同様に噴霧吸入させた。今回の実験は、過敏性肺臓炎の慢性的な病変である肉芽腫の形成にいたる過程を観察することを目的としたため、安定した感作状態がえられる経皮的感作に加えて、反復吸入による最終暴露を行った。喘息誘発剤である  $B\alpha A$  を用いた理由は、抗原として定量できるからである。一般に超音波ネブライザーでは全抗原の約 0.2% が下気道に到達するといわれており<sup>14)</sup>、今回の実験では、 $B\alpha A$  溶液 3ml が10分間で全量噴霧されるように霧化量を調節した。

#### IV. サイクロスポリン A の投与

サイクロスポリン A (CyA) はサンド薬品株式会社 (東京) より供与を受けた。CyA を生理食塩水で希釈し、50mg/kg/日を噴霧吸入約12時間前に、連日腹腔

内へ注入した。

#### V. 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL)

最終噴霧吸入後1日目、5日目、10日目、17日目にマウスをエーテル麻酔後開胸して気管を露出し、21ゲージテフロン針 (サーフロ、テルモ社、東京) を気管内に挿入し、生食 1ml で計4回 BAL を施行した。対照群と CyA 投与群は1日目に、同様に BAL を行った。

#### VI. BALF 中の細胞の解析

回収された BALF を phosphate-buffered saline (PBS) で2回洗浄後、BALF 細胞を同液に浮遊させた。この一部を用いて総細胞数を算定した。細胞分類は、Cytospin II (Shandon, Southern Products, Cheshire, England) にて遠心分離を行って作成した標本をギムザ染色し、200個の細胞を算定して求めた。

#### VII. BALF 中リンパ球の免疫細胞化学的検索

BALF 中リンパ球の細胞表面マーカーの検索のため、抗マウス Thy1.2 (pan T 細胞)、抗マウス Lyt-1 (ヘルパー T 細胞)、抗マウス Lyt-2 (サブレッサー T 細胞) 抗体 (Becton Dickinson Monoclonal Center, Inc., Mountain View, U.S.A.) を使用し、avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC 法) にて染色を行った。以下に方法を簡単に示す。(1) Cytospin にて作成した標本を 4°C の緩衝アセトンホルマリン液で30秒固定した後、PBS で洗浄。(2) モノクロナール抗体を30分反応させた後、PBS で洗浄。(3) ビオチン化抗ラット IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) を30分反応させた後、PBS で洗浄。(4) ABC 試薬 (Vector Laboratories) を30分反応させた後、PBS で洗浄。(5) 0.01% 過酸化水素加 0.05% ディアミノベンチジンにて10分反応させ、ペルオキシダーゼ染色を行った。(6) 流水で洗浄後ギムザ染色を行い、200個のリンパ球を検索した。

#### VIII. 肺組織の検索

BAL 施行後、肺を摘出し、10%ホルマリンにて固定した。パラフィン包埋後、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的に検討した。肺病変の程度の指標として、Richerson ら<sup>15)</sup>の報告した組織病理学的スコア (histopathologic grading) を用いて以下のように判定した。0: 炎症細胞浸潤なし。0.5: ごく軽度の細胞浸潤。1.0: 軽度の胞隔炎。2.0: 中等度の胞隔炎。3.0: 高度の胞隔炎。4.0: 著明な胞隔

pneumonitis; MF, micropolyspora faeni; PBS, phosphate-buffered saline; PDE, pigeon dropping extract

の肥厚を伴った高度の胞隔炎

#### IX. 肺組織の免疫組織化学的検索

肺組織中のリンパ球の局在を観察するため、5日目の肺組織を O. C. T. compound に包埋し、 $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結した後、クライオスタットマイクロトームにて厚さ  $4\ \mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。前述のモノクローナル抗

体を用い、その後の手順は BALF リンパ球の検索と同様に行い、核染色はヘマトキシリンで行った。

#### X. 統計学的処理

各測定値は平均値±標準誤差 (mean±SEM) で表した。2群間の有意差検定は Student の t 検定法を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

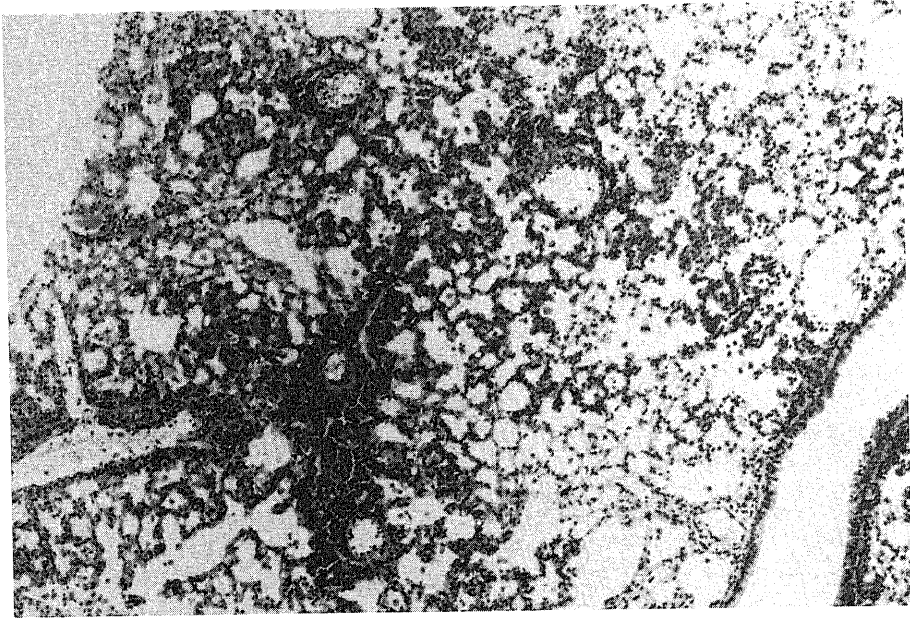


Fig. 1 A

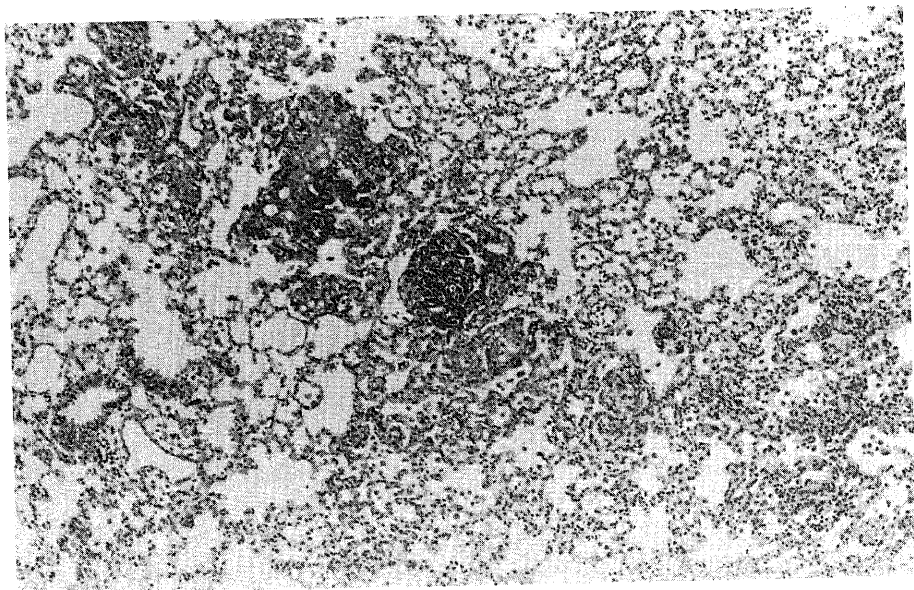


Fig. 1 B

成 績

I. 肺の経時的組織学的変化

1日目の肺では、肺胞中隔に主にリンパ球と組織球の浸潤がみられ、肺胞中隔の肥厚が認められた(図1-A)。5日目になると胞隔炎が増強し、肉芽腫様の変化が肺胞中隔にみられた(図1-B)。これらには、リ

ンパ球、組織球とともに類上皮細胞が混在してみられた(図1-C)。10日目の肺を検索すると、肉芽腫様像の分布が減少し、限局性にみられた胞隔炎も吸収される傾向を認めた(図1-D)。17日目になると、軽度の肺胞中隔の肥厚が散在性にみられたにすぎなかった(図1-E)。

生食を吸入させた対照群ではほとんど変化を認めな

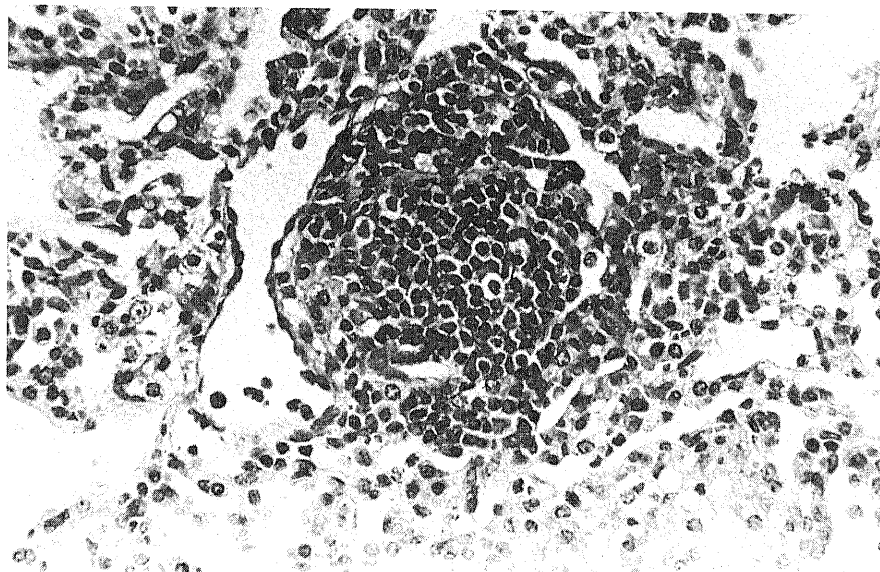


Fig. 1 C

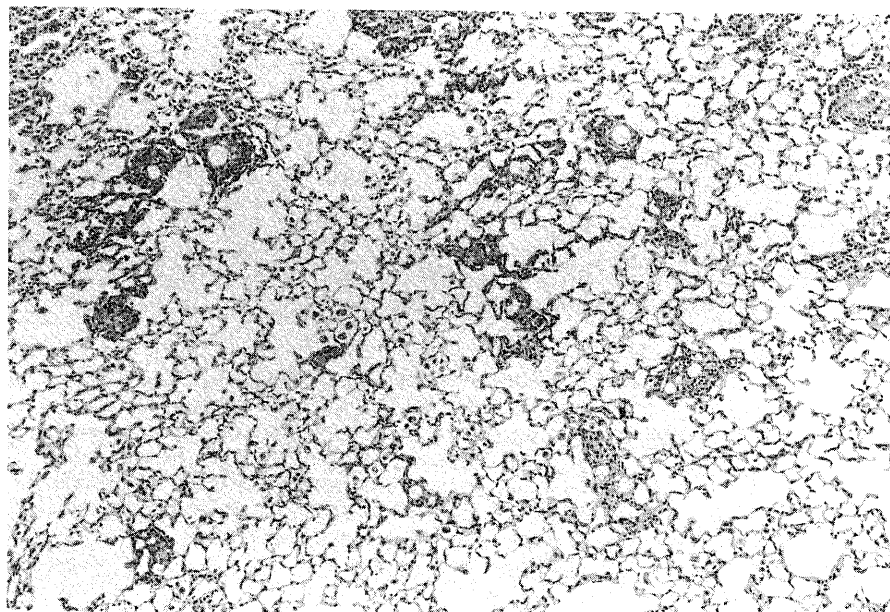


Fig. 1 D

かった (図 2).

各時期の組織像を組織病理学的スコアで表すと (図 3), その平均は 1 日目  $2.29 \pm 0.35$ , 5 日目  $2.50 \pm 0.45$ , 10 日目  $1.79 \pm 0.26$ , 17 日目  $1.21 \pm 0.21$  であり, スコアの平均は 5 日目の肺で最も変化が大きく, 17 日目の肺に比べると有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ).

## II. BALF 中の細胞の経時的变化

1 回 1ml 計 4 回の BAL で, 回収率は全検体で 90% 以上であった. 回収された BALF 中の総細胞数は (図 4-A), 1 日目で  $17.34 \pm 1.47 \times 10^5$ , 5 日目  $8.07 \pm 0.68 \times 10^5$ , 10 日目  $6.65 \pm 0.63 \times 10^5$ , 17 日目  $5.95 \pm 0.69 \times 10^5$  であり, 1 日目で最高値を示し, 5 日目には 1 日目に比べて有意に低下し ( $p < 0.001$ ), その後は徐々に低下した. BALF 中のリンパ球数は (図 4-B), 1 日目で  $7.65 \pm 1.31 \times 10^5$ , 5 日目  $2.72 \pm 0.42 \times$

$10^5$ , 10 日目  $1.54 \pm 0.27 \times 10^5$ , 17 日目  $0.82 \pm 0.11 \times 10^5$  であり, 1 日目で最高値を示し, 5 日目には 1 日目に比べて有意に低下した ( $p < 0.01$ ). また 10 日目には 5 日目に比べて有意に低下し ( $p < 0.05$ ), 17 日目にも 10 日目に比べて有意に低下した ( $p < 0.05$ ). BALF 中のマクロファージ数は (図 4-C), 1 日目で  $8.52 \pm 0.71 \times 10^5$ , 5 日目  $5.26 \pm 0.38 \times 10^5$ , 10 日目  $5.01 \pm 0.49 \times 10^5$ , 17 日目  $5.01 \pm 0.64 \times 10^5$  であり, 1 日目で最高値を示し, 5 日目には 1 日目に比べて有意に低下したが ( $p < 0.001$ ), 10 日目以後はほぼ変化は認められなかった.

BALF リンパ球のサブセットの検索では, 全経過を通じて, リンパ球の大部分が Thy1. 2 陽性細胞であり, このうち Lyt-1 陽性細胞が Lyt-2 陽性細胞より優位であった. Thy1. 2 陽性細胞数は (図 5-A), 1 日

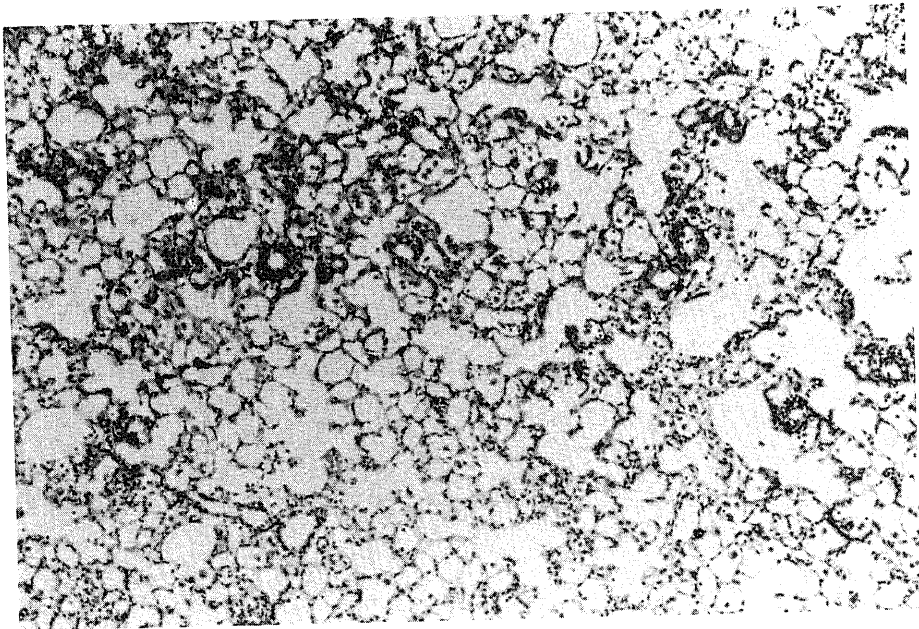


Fig. 1 E

Fig. 1. Microscopic photographs of the lungs of mice immunized with complete Freund's adjuvant and B $\alpha$ A followed by aerosol challenge with B $\alpha$ A every day for two weeks. A: One day after the last challenge. Alveolar septa were thickened with infiltration of lymphocytes and histiocytes (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ). B: Five days after the last challenge. Alveolitis became more prominent and granulomatous changes were observed (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ). C: Higher magnification of Fig. B. Granulomatous lesion was consisted mainly of lymphocytes and histiocytes (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 400$ ). D: Ten days after the last challenge. Granuloma and alveolitis had resolved (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ). E: Seventeen days after the last challenge. There was minimal interstitial infiltration with mononuclear cells (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ).

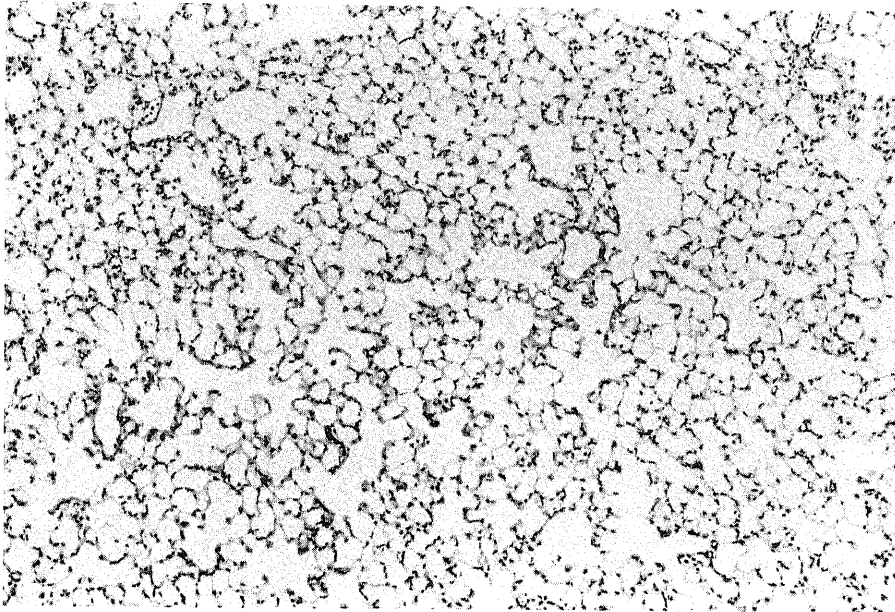


Fig. 2. Microscopic photograph of the lung of a control mouse. The lung histology was essentially normal (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ).

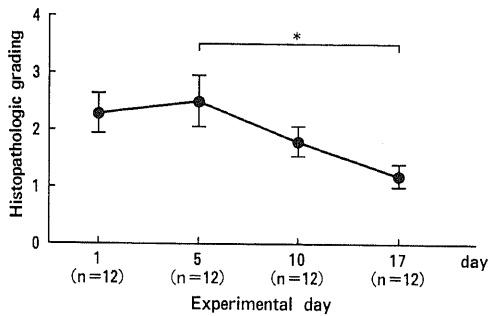


Fig. 3. Time course of changes in histopathologic grading after the last challenge with B $\alpha$  A. There was a significant elevation of histopathologic grading at the fifth day compared to the seventeenth day. \*,  $p < 0.05$ .

目で  $7.16 \pm 1.29 \times 10^5$ , 5日目で  $2.59 \pm 0.40 \times 10^5$ , 10日目で  $1.46 \pm 0.26 \times 10^5$ , 17日目で  $0.79 \pm 0.11 \times 10^5$  であり, 1日目で最高値を示し, 5日目には1日目に比べて有意に低下した ( $p < 0.01$ ). また10日目には5日目比べて有意に低下し ( $p < 0.05$ ), 17日目にも10日目比べて有意に低下した ( $p < 0.05$ ). Lyt-1 陽性細胞数は (図5-B), 1日目で  $5.29 \pm 1.02 \times 10^5$ , 5日目で  $1.72 \pm 0.29 \times 10^5$ , 10日目で  $0.94 \pm 0.20 \times 10^5$ , 17日目で  $0.44 \pm 0.07 \times 10^5$  であり, 1日目で最高値を示し, 5日目には

1日目に比べて有意に低下した ( $p < 0.01$ ). また10日目には5日目比べて有意に低下し ( $p < 0.05$ ), 17日目にも10日目比べて有意に低下した ( $p < 0.05$ ). Lyt-2 陽性細胞数は (図5-C), 1日目で  $1.90 \pm 0.35 \times 10^5$ , 5日目で  $0.84 \pm 0.13 \times 10^5$ , 10日目で  $0.50 \pm 0.09 \times 10^5$ , 17日目で  $0.32 \pm 0.05 \times 10^5$  であり, 1日目で最高値を示し, 5日目には1日目に比べて有意に低下した ( $p < 0.01$ ). また10日目には5日目比べて有意に低下した ( $p < 0.05$ ). Lyt-1/Lyt-2 比は (図5-D), 1日目で  $2.88 \pm 0.26$ , 5日目で  $2.09 \pm 0.18$ , 10日目で  $1.83 \pm 0.16$ , 17日目で  $1.57 \pm 0.18$  であり, 1日目で最高値を示し, 5日目には1日目に比べて有意に低下したが ( $p < 0.05$ ), それ以後は徐々に低下した.

### III. 肺組織の免疫組織化学的所見

肺間質に浸潤しているリンパ球を同定するために, 5日目の肺の凍結切片を用い, 抗マウス Thy1.2, 抗マウス Lyt-1, 抗マウス Lyt-2 抗体で染色を行った. 胞隔炎や肉芽腫様病変の部位では, リンパ球はほとんど抗マウス Thy1.2 抗体で染色され (図6-A), T細胞系の細胞であることが確認された. またリンパ球の約半数は Lyt-1 マーカーを細胞表面に有していたが (図6-B), 抗マウス Lyt-2 抗体ではごく一部にしか染色されなかった (図6-C).

### IV. サイクロスポリン A 投与による影響

CyA 投与群 (B $\alpha$ A + CyA) と CyA 非投与群 (B $\alpha$ A 単独) で1日目の肺組織と BALF 細胞の比較検討を行った。

B $\alpha$ A + CyA 群では、軽度の肺胞中隔の肥厚が認められたが、B $\alpha$ A 単独に比べて胞隔炎の程度は弱く、肉芽腫形成はみられなかった (図7)。

組織病理学的スコアは (図8), B $\alpha$ A + CyA 群では

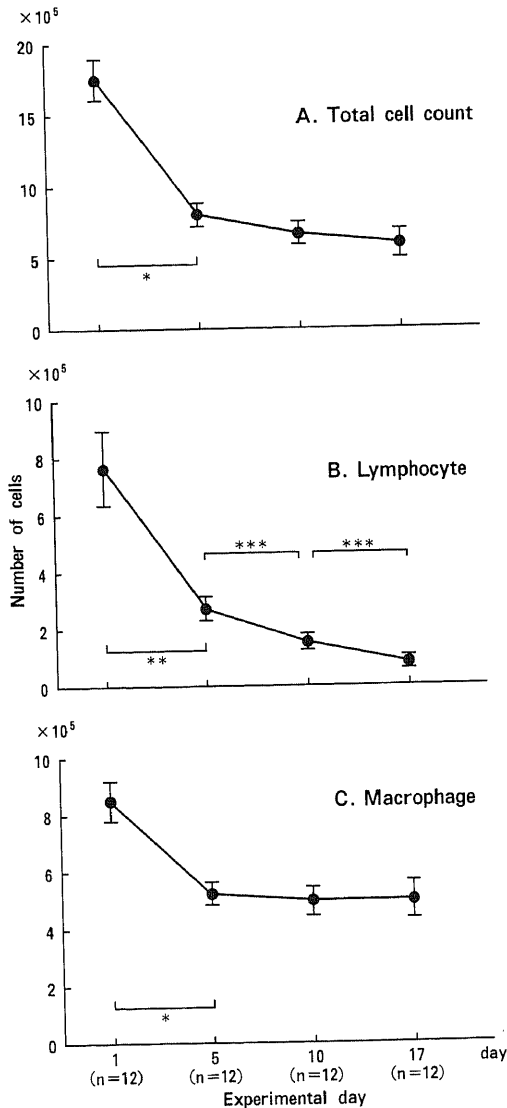


Fig. 4. Time course of changes in total cell count and its cell differentials in BALF after the last challenge with B $\alpha$ A. The numbers of total BAL cells (A), lymphocytes (B) and macrophages (C) had peaks at the first day. \*, p < 0.001, \*\*, p < 0.01, \*\*\*, p < 0.05.

0.75 ± 0.11であり、B $\alpha$ A 単独群の2.29 ± 0.35に比べて有意に低下していた (p < 0.001)。

BALF 所見を比較すると、B $\alpha$ A + CyA 群では、総細胞数の増加は有意に抑制された (B $\alpha$ A: 17.34 ±

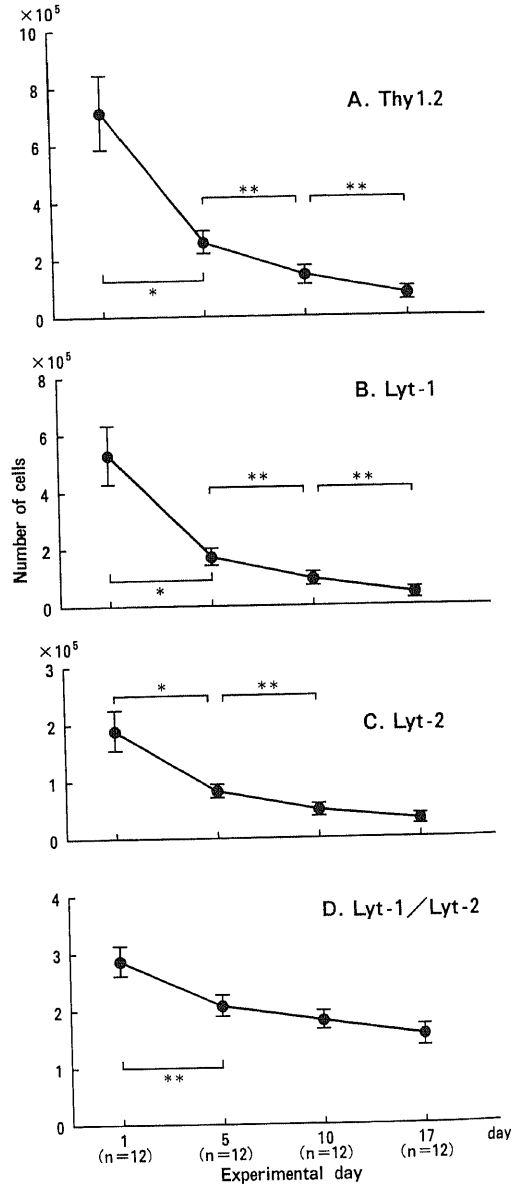


Fig. 5. Time course of changes in BALF lymphocytes subpopulations after the last challenge with B $\alpha$ A. The numbers of the Thy1.2 (A), Lyt-1 (B) and Lyt-2 positive cells (C) remarkably elevated at the first day. Lyt-1/Lyt-2 ratio (D) was maximum at the first day and was followed by continuous decline. \*, p < 0.01, \*\*, p < 0.05.



$1.47 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA$ :  $7.79 \pm 0.62 \times 10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (図9-A). また  $B\alpha A + CyA$  群では, リンパ球数の増加も有意に抑制された ( $B\alpha A$ :  $7.65 \pm 0.62 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA$ :  $0.95 \pm 0.14 \times 10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (図9-B). しかし,  $B\alpha A + CyA$  群ではマクロファージ数は抑制されなかった ( $B\alpha A$ :  $8.52 \pm 0.71 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA$ :

$6.73 \pm 0.65 \times 10^5$ , 有意差なし) (図9-C).

リンパ球のサブセットの検索では,  $B\alpha A + CyA$  群のリンパ球はほとんど Thy1.2 陽性細胞であったが, Thy1.2 陽性細胞数の増加は有意に抑制された ( $B\alpha A$ :  $7.16 \pm 1.29 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA$ :  $0.84 \pm 0.14 \times 10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (図10-A). T リンパ球サブセットでは,

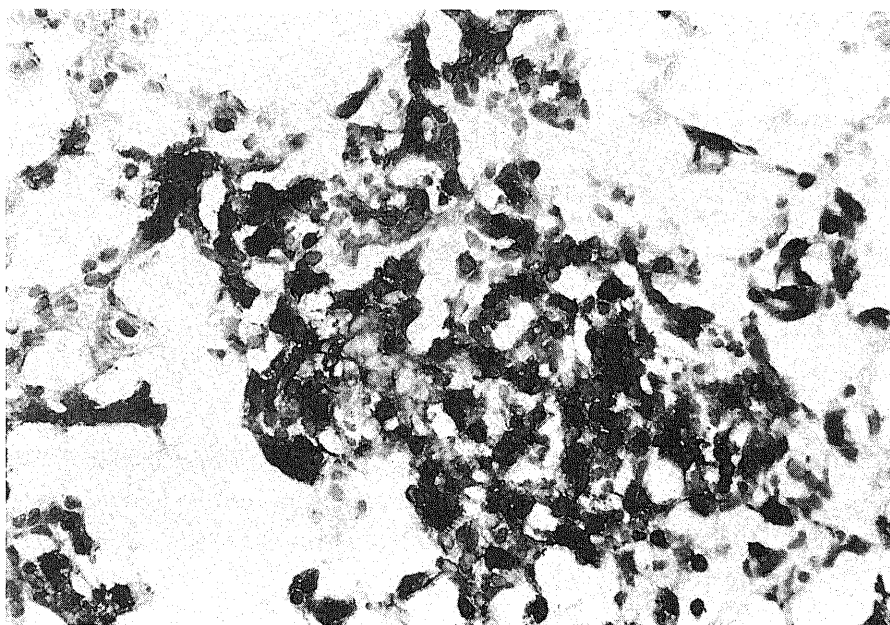


Fig. 6 A

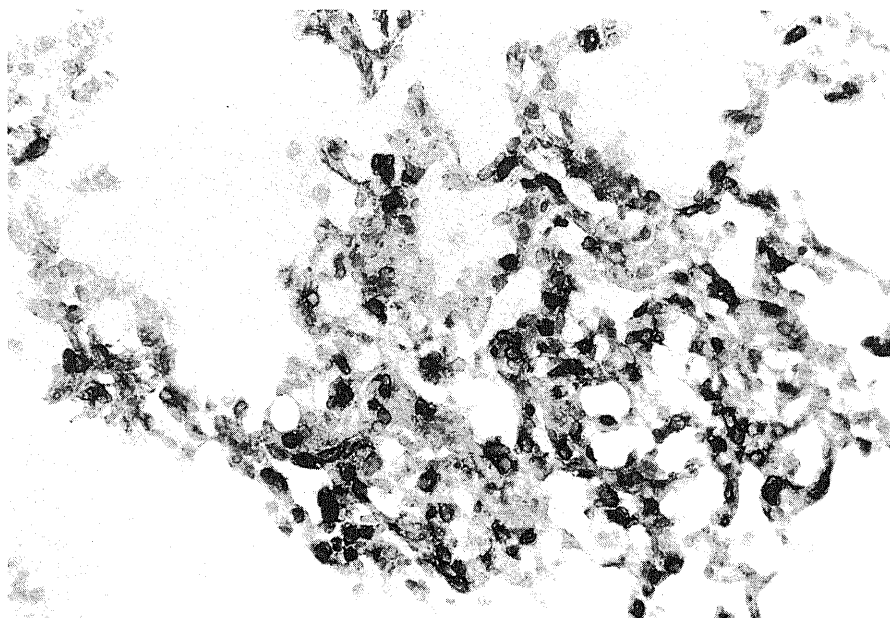


Fig. 6 B

Lyt-1 陽性細胞数は有意に抑制され ( $B\alpha A: 5.29 \pm 1.02 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA: 0.48 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (図10-B), また Lyt-2 陽性細胞数も有意に抑制された ( $B\alpha A: 1.90 \pm 0.35 \times 10^5$ ,  $B\alpha A + CyA: 0.30 \pm 0.07 \times 10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (図10-C). しかし, Lyt-1/Lyt-2 比は  $B\alpha A + CyA$  群では,  $1.68 \pm 0.12$ であり,  $B\alpha A$  単独群の  $2.88 \pm 0.26$ と比べて有意に低下しており ( $p < 0.001$ ), Lyt-1 陽性細胞数の減少が著明であった (図10-D).

### 考 察

過敏性肺臓炎 (HP) は, 有機粉塵吸入によって発症するびまん性肉芽腫性間質性肺疾患である. 本疾患は外因性アレルギー性肺胞炎とも呼ばれ, 免疫学的機序にもとづいて発症すると考えられている<sup>11,215</sup>. ヒトでは抗原として, ハト排泄物などの蛋白抗原 (ハト飼病), *micropolyspora faeni*, *thermoactinomyces*

*vulgaris* などの真菌 (農夫肺) などが知られているが, 近年わが国では, 夏型過敏性肺臓炎と呼ばれる一群の報告が増加して, 環境性肺疾患の一つとして注目を集めている<sup>16</sup>.

BAL は Myrvik ら<sup>17</sup>の動物を用いた報告に続き, Reynolds ら<sup>18</sup>によってヒトに導入され, 以来サルコイドーシス, 過敏性肺臓炎, 特発性間質性肺炎などの疾患において, 肺局所における炎症反応や免疫反応を検索できる有効な検査法として, これらの疾患の病態解明に大きな進歩をもたらした<sup>19</sup>.

HP の病因については, 抗原特異的 IgG 抗体が証明されることから Gell-Coombs の III型アレルギー反応によるものとされていたが<sup>4</sup>, BALF 中の T リンパ球の著増, 抗原によるリンホカインの遊離, 病理学的所見が肉芽腫を伴う間質性肺炎であることなどから, IV型アレルギー反応の関与が想定されるようになった<sup>11,25</sup>. 最近では III型反応から IV型反応に移行する病

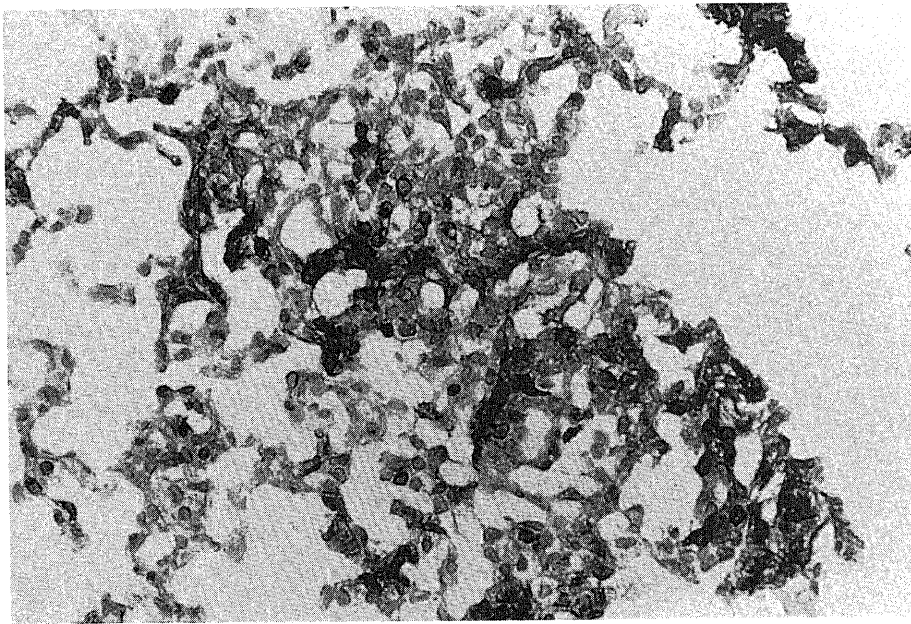


Fig. 6 C

Fig. 6. Immunohistochemical staining of the lung tissue of mice five days after the last challenge. A: Cryostat section stained with Thy1. 2 monoclonal antibody at magnification  $\times 400$ . A large rate of lymphocytes was consisted of Thy1. 2 positive cells in the alveolitis and/or granulomatous lesions. B: Cryostat section stained with Lyt-1 monoclonal antibody at magnification  $\times 400$ . A half of lymphocytes in the alveolitis and/or granulomatous lesions was consisted of Lyt-1 positive cells. C: Cryostat section stained with Lyt-2 monoclonal antibody at magnification  $\times 400$ . Only a small number of Lyt-2 positive cells were observed in the alveolitis and/or granulomatous lesions.

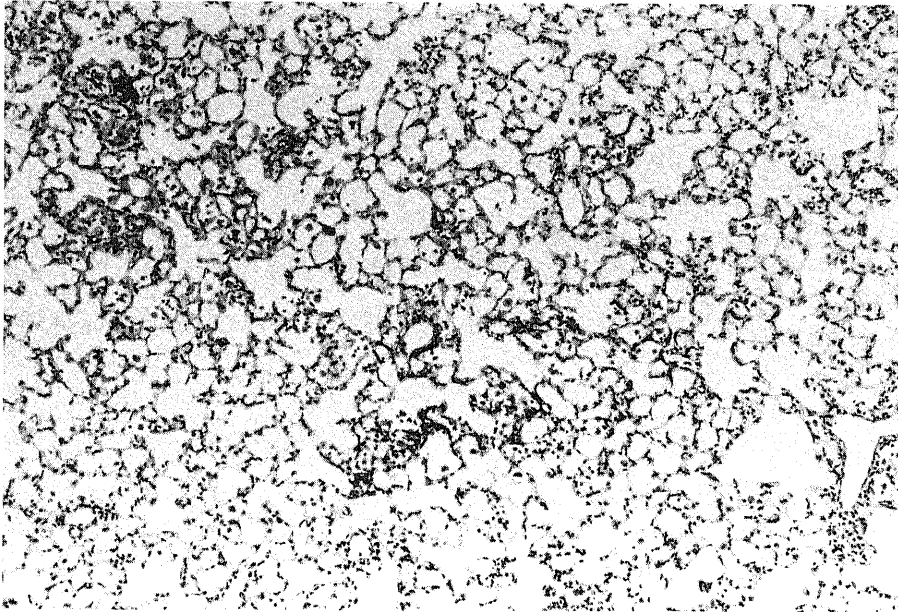


Fig. 7. Microscopic photograph of the lungs of a mouse treated with  $B\alpha A$  and CyA.  $B\alpha A$ -induced granulomatous pneumonitis was clearly suppressed by the CyA administered throughout the period of the  $B\alpha A$  inhalation (Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ).

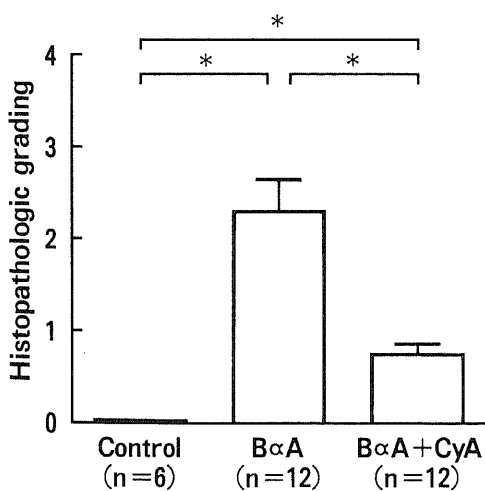


Fig. 8. Effect of CyA treatment on the histopathologic grading. An increase in the histopathologic grading in the  $B\alpha A$ -treated group was significantly suppressed by the CyA administration. \*,  $p < 0.001$ .

変があり<sup>20)21)</sup>, IV型反応に先行してIII型反応が必要であるという報告もみられ<sup>22)</sup>, III型・IV型の両者の反応が関与していると考えられている。

本実験における肺臓炎の経時的な組織変化は、次の3つにまとめることができる。1) 胞隔炎形成期(1日目): 肺胞中隔へのリンパ球, 組織球の浸潤。2) 肉芽腫形成期(5日目): 胞隔炎像が強くなり, リンパ球, 組織球を中心とする肉芽腫様変化の形成。3) 肉芽腫吸収期(10日目, 17日目): 肉芽腫様変化の減少と胞隔炎の吸収。このような組織学的変化は、ヒトのHPと同様な変化を示しており, また諸家の実験モデルの組織変化と矛盾しない<sup>23)~25)</sup>。動物モデルで肺病変の強弱を比較する上で最も重要なことは、定量的ないし半定量的な指標を設定することである。ラットのブレオマイシン肺線維症においては既に形態計測的な手法が試みられているが<sup>26)</sup>, マウスの、それも肉芽腫性肺病変に関しては未だ確立されたものがない。著者は、Richersonら<sup>9)</sup>の報告した組織病理学的スコア(histopathologic grading)を肺病変の程度の指標として用いたが、これは変動も少なく、また最も変化の強い5日目と吸収期にある17日目とで有意な差が得られたことから、経時的な組織学的変化を比較するには

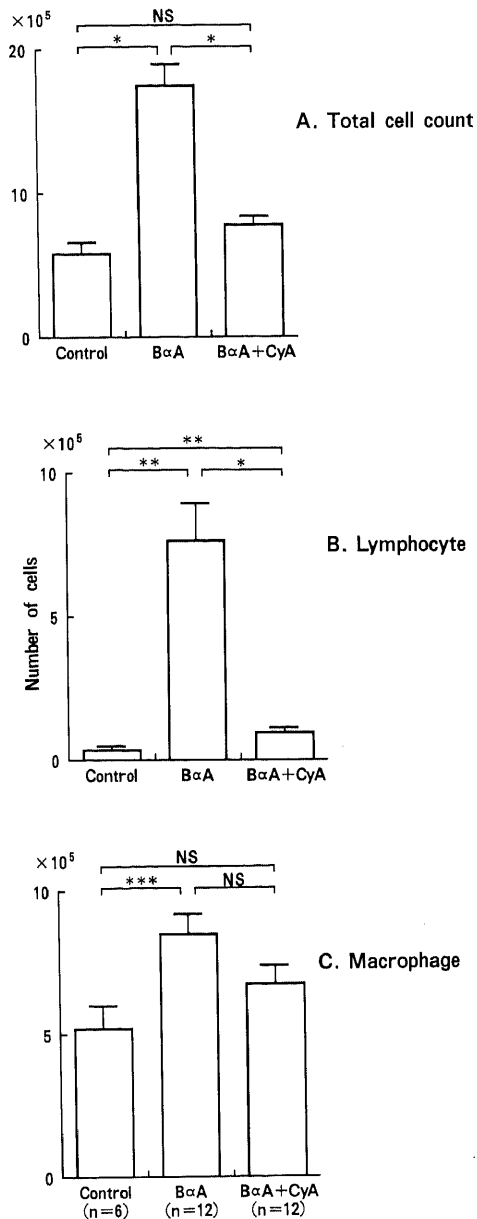


Fig. 9. Effects of CyA treatment on total cell count and its cell differentials in BALF. An increase in the numbers of total BAL cells (A) and lymphocytes (B) observed in the BαA-treated group was significantly suppressed by the CyA treatment. \*, p<0.001, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.05, NS, not significant.

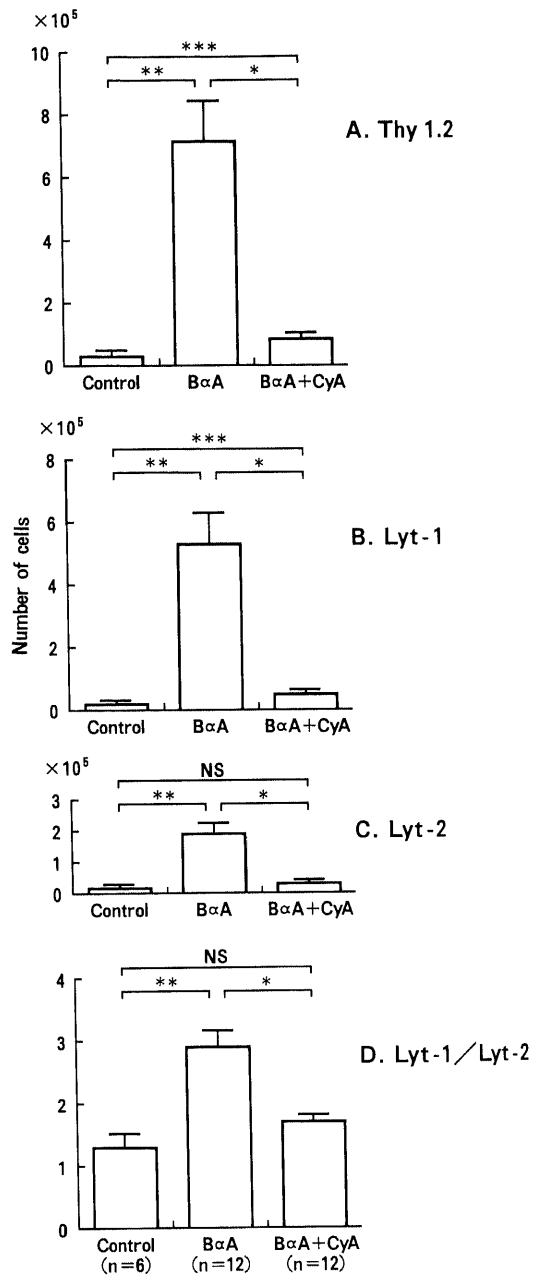


Fig. 10. Effects of CyA treatment on BALF lymphocyte subpopulations. An increase in the numbers of the Thy1. 2 (A), Lyt-1 (B) and Lyt-2 positive cells (C) in the BαA-treated group was significantly suppressed by the CyA treatment, and the Lyt-1/Lyt-2 ratio (D) was decreased by CyA, indicating that the increase in Lyt-1 positive cells was more predominately inhibited than that in Lyt-2 positive cells. \*, p<0.001, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.05, NS, not significant.

有用な方法と思われた。しかし、この方法は胞隔炎の指標であり、肉芽腫の定量的評価ではなく、更に客観的な指標の開発が望まれる。

著者の作成したマウス HP モデルでは、胞隔炎や肉芽腫様変化の強い時期に、BALF 中のリンパ球、マクロファージの増加が認められ、組織学的に胞隔や肺間質に浸潤している細胞成分と一致していた。Takizawa ら<sup>29)</sup>は、マウスで *thermoactinomyces vulgaris* を抗原として HP モデルを作成し、BALF 中のリンパ球やマクロファージの増加が組織所見と一致したことを報告しており、肉芽腫性肺疾患のモデルでは BALF と組織所見はよく一致し、BALF の分析が病因の解明に有用であることを証拠づけるものと思われる。

BALF リンパ球のサブセットをみると、大部分のリンパ球は Thyl. 2 陽性細胞であった。しかも、これらの T リンパ球のうちでは、Lyt-1 陽性細胞（ヘルパー/インデューサー T 細胞）が Lyt-2 陽性細胞（サブプレッサー/サイトトキシク T 細胞）より優位であった。Takizawa ら<sup>29)</sup>も、*bacille Calmette-Guérin* (BCG) によるマウス肉芽腫性肺臓炎モデルを用いて同様な結果を報告している。

さらに著者は、このような BALF リンパ球サブセットが免疫組織化学的に肺組織中のリンパ球サブセットと一致することを示し、この点でも BALF 細胞成分が肺組織の変化を忠実に反映していることを証明した。動物の肺肉芽腫モデルで、これまで BALF リンパ球サブセットと肺組織のそれを検討した報告はみられない。ヒトでは、Paradis ら<sup>30)</sup>が、著者と同様の方法を用い、サルコイドーシスで、BALF 中の Leu3/Leu2 比と肺組織中の Leu3/Leu2 比がほぼ一致したことを報告している。しかし、Thrall ら<sup>31)</sup>はラットのプレオマイシン肺線維症モデルにおいて、BALF と肺組織で、T/B 細胞比とヘルパー/サブプレッサー細胞比に相関をみなかったと述べている。この相違の原因は明らかではないが、プレオマイシンでは肉芽腫は形成されず肺炎および肺線維化が主体であること、プレオマイシンの気管内注入で作成される肺線維症は全肺で一様でないのに対し、BAL は全肺を洗浄しているので、病変部位の変化を表していない可能性があること、などが考えられる。

ヒトの過敏性肺臓炎でも、BALF 中の T リンパ球の増加が重要な所見とされているが<sup>32)</sup>、そのサブセットは種々であり、ハト飼病や夏型過敏性肺臓炎ではサブプレッサー/サイトトキシク T 細胞がヘルパー/インデューサー T 細胞より優位である<sup>33)34)</sup>とされてい

るのに対し、農夫肺ではヘルパー/インデューサー T 細胞がサブプレッサー/サイトトキシク T 細胞よりも優位であるという報告もみられる<sup>33)34)</sup>。

サルコイドーシスは肺やリンパ節を中心に肉芽腫病変が持続し、肺線維化へと移行する疾患であり、BALF においても肺組織においてもヘルパー T リンパ球が増加することが特徴である。今回の実験結果を考慮すると、サルコイドーシスも HP も肺に肉芽腫を形成する疾患であり、その肉芽腫形成期においてはヘルパー T リンパ球が優位の変化を示すのであろうと考えられる。そして、その主体はサルコイドーシスでいわれているようにマクロファージの活性化であり、活性化マクロファージからインターロイキン-1 が遊離されることに端を発すると思われる。しかし、マクロファージは極めて多彩な機能を有する細胞であり、抗原の種類によりマクロファージから遊離されるサイトカインも質的、量的に異なり、肺における病変もそれに応じて異なってくるものと思われる。ヒトの過敏性肺臓炎でサブプレッサー T リンパ球が優位になることがあるのは、マクロファージに作用する抗原の種類や、抗原暴露からの経過時間によるマクロファージ機能の相違が原因となっている可能性も考えられる。今後はマクロファージの活性化や遊離されるサイトカインの検索が必要であろう。また、ヒト HP におけるサブプレッサー/サイトトキシク T 細胞はヘルパー/インデューサー T 細胞中のサブプレッサーインデューサーを抑制する細胞である可能性がある<sup>35)~37)</sup>。なぜならば、サブプレッサーインデューサーを抑制することは、結局、ヘルパー機能を高めることになるからである。今後は BALF リンパ球の機能的検索も必要と考えられる。

今回の HP モデルでは、抗原である B $\alpha$ A の吸入を続けているにもかかわらず、BALF 炎症細胞の減少および組織病変の軽減がみられた。この減少は漸減 (waning) と呼ばれている<sup>38)~40)</sup>。この機序は解明されていないが、マクロファージの関与を示唆する報告と、サブプレッサー T リンパ球の関与によるものとする報告がある。Schuyler ら<sup>41)</sup>は *micropolyspora faeni* (MF) 抗原を用いて実験的過敏性肺臓炎を作成し、漸減の状態にあっても MF に対する特異的抗原は存在し、リンパ球の幼若化反応やリンホカインの産生も起こることから、漸減は免疫学的トレランスのためではないと考え、活性化マクロファージによる抗原除去などの機序を想定している。他方、Keller ら<sup>42)</sup>サルに pigeon dropping extract (PDE) を免疫、反復吸入させたところ過敏性肺臓炎症状をもつものと、もたないものに分

かれた。そして症状をもたないサルは、concanavalin A (Con A) 誘導のサブレッサー T リンパ球や PDE 特異的サブレッサー T リンパ球が認められ、症状をもたない状態はこれらのサブレッサー T リンパ球の働きによって誘導されていることを示唆した。Chensue ら<sup>43)</sup>は schistosoma mansoni egg を用いた過敏性肉芽腫モデルにおいて、病変の自然消退期のマウス脾細胞を病変出現前の同系マウスに移入すると肉芽腫が出現しないこと、そして移入細胞を抗 Thyl. 2 抗血清と補体で処理すると上記の抑制活性が低下すること、一方マクロファージを除去してもこの抑制活性は低下しないことを示した。この結果は、漸減はマクロファージよりもサブレッサー T リンパ球に基づくことを示唆していると思われる。今回の HP モデルでは、病変の消退につれて BALF 中のリンパ球が減少し、相対的にマクロファージが増加した。経時的に Lyt-1/Lyt-2 比は低下したが、Lyt-1 陽性細胞とともに Lyt-2 陽性細胞も減少しており、病変の消退にはマクロファージの役割が重要であると考えられた。そして、このマクロファージの変化がサイトカインを介してリンパ球の変化をきたしているものと考えられる。

近年、臓器移植の分野で注目されている CyA<sup>40)</sup>は、主として T リンパ球に作用し、特にヘルパー/インデューサー T リンパ球の活性化を抑制するといわれている<sup>41)</sup>。著者は、過敏性肺臓炎においても肉芽腫形成時期にはヘルパー/インデューサー T リンパ球の働きが重要であるという仮説を検討するために、CyA 投与時の組織像と BALF 細胞の変化を調べた。その結果、組織病理学的スコアは CyA の投与によって有意に低下し、病変の形成は抑制された。また BALF ではリンパ球の増加が抑制され、サブセットでは、Lyt-1 陽性細胞も Lyt-2 陽性細胞も減少したが、特に前者の減少が著明であった。以上の所見は、HP の形成にヘルパー/インデューサー T リンパ球が関与していることを支持するものと考えられる。Takizawa ら<sup>28)</sup>は、BCG で形成したマウス肉芽腫性肺臓炎の実験で BALF 細胞の検討を行い、CyA 投与により肉芽腫形成は抑制され、BALF リンパ球の増加が抑制されたと報告している。そして、リンパ球のサブセットでは、Thyl. 2 陽性細胞および Lyt-1 陽性細胞の増加が抑制されたが、Lyt-2 陽性細胞数はほぼ変わらなかったと述べている。著者の実験モデルでは、CyA 投与によって Lyt-2 陽性細胞も軽度ながら減少しているが、CyA はサイトトキニック T リンパ球も抑制するとの報告もあり<sup>44)</sup>、減少した Lyt-2 陽性細胞がサイトトキニック T リンパ球である可能性も考えられる。また

Lyt-2 陽性細胞の減少が、サブレッサー活性の減少を示すものではないので、今後サブレッサー活性の測定が必要であると思われる。

また、著者の実験モデルでは、抗原感作時には CyA を投与しておらず、抗原吸入時より投与しており、CyA が抗原感作課程を抑制したのではなく、抗原吸入チャレンジ後の変化を抑制したことを示している。これは Kopp ら<sup>45)</sup>の結果と同様であり、CyA は抗原感作されたリンパ球に抗原刺激が加わったときのリンホカインの産生を抑制することによって、HP の形成抑制に関与している可能性を示すものであると考えられる。

サルコイドーシスでは、BALF でヘルパー T リンパ球が増加することが定説になっている<sup>46)</sup>。しかし、ヒトの過敏性肺臓炎では、サブレッサー T リンパ球が優位であるとするものや、農夫肺のようにヘルパー T リンパ球が優位であるとするものなど、一定していない。HP は、抗原からの暴露を離れば、病変は定型的に消退していくことから、抗原暴露から BAL 施行までの時間的経過が、この BALF 所見の差のキーポイントである可能性が考えられる。HP の動物実験モデルでは、抗原吸入を継続しても漸減という現象が起こるため、ヒトと同じレベルでの解析は困難であるが、少なくとも抗原暴露初期においてはヘルパー T リンパ球が優位となっており、このヘルパー T リンパ球を抑制すると病変形成も抑制されることから、HP の病変形成初期にはヘルパー T リンパ球が大きな役割を果たしていることが示唆された。ヒトでも農夫肺のように、常に抗原に暴露されているような場合には、BALF 中にヘルパー T リンパ球が増加していることから、著者の動物モデルと同様なことがいえると思われる。しかし、夏型過敏性肺臓炎などでは、BALF 中にリンパ球が増加しており、しかもその大部分がサブレッサー T リンパ球であることから、抗原の相違による病変形成の違いも考える必要がある。すなわち、抗原の違いによって遊離されるリンホカインの質的、量的な差が生じてくることも考えられる。

今回は肺マクロファージの検討を行わなかったが、吸入された抗原を最初に処理するのは肺マクロファージであり、この細胞は抗原の提示の他にも、種々のサイトカインの遊離、プロスタグランジンやロイコトリエンの産生などを通して、免疫反応を調節していることが知られている<sup>46)-48)</sup>。サルコイドーシスではインターロイキン-1 の産生が亢進しているとの報告<sup>49)</sup>もあるが、HP における肺マクロファージの機能は全くといってよいほど不明である。前述のよう

なヒトの HP における BALF リンパ球サブセットの相違は、リンパ球レベルでの問題ではなく、肺胞マクロファージから遊離されるサイトカインの質的、量的差違による可能性も充分に考えられる。

この点、今後は、HP における肺胞マクロファージの機能を検討していく必要があると思われる。

## 結 論

純系マウスを用いて過敏性肺臓炎 (HP) モデルを作成し、経時的な組織学的変化と気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞の変動の比較検討を行った。また肉芽腫形成期におけるリンパ球の動態を免疫組織学的に検討し、BALF 中のリンパ球の動態と比較した。さらにマウスにサイクロスポリン A (CyA) を投与し、HP に及ぼす影響を組織と BALF 所見で検討した。

1. B $\alpha$ A の噴霧吸入により、ヒト HP と同様な組織学的変化が得られた。経時的組織変化は次の3つに要約することができた。1) 胞隔炎形成期: 肺胞中隔へのリンパ球と組織球の浸潤。2) 肉芽腫形成期: 胞隔炎像の増強とリンパ球、組織球を中心とする肉芽腫様変化の形成。3) 肉芽腫吸収期: 肉芽腫様変化の減少と胞隔炎の吸収。

2. 組織学的に胞隔炎や肉芽腫様変化の強い時期には、BALF 中のリンパ球とマクロファージが増加しており、組織学的に肺胞中隔と肺間質に浸潤している細胞成分と一致していた。BALF 中の大部分のリンパ球は Thyl.2 陽性細胞で、T リンパ球と考えられた。これらの T リンパ球のうちでは、Lyt-1 陽性細胞 (ヘルパー/インデューサー T 細胞) が Lyt-2 陽性細胞 (サブプレッサー/サイトトキニック T 細胞) より優位であり、マウス HP の形成にはヘルパー/インデューサー T 細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 胞隔炎や肉芽腫病変内のリンパ球サブセットは、BALF リンパ球サブセットと一致しており、BALF 細胞成分が肺組織の変化を正確に反映していることを証明した。

4. CyA 投与により、胞隔炎や肉芽腫様病変の形成は著明に抑制された。BALF ではリンパ球の増加が抑制され、Lyt-1 陽性細胞および Lyt-2 陽性細胞も減少したが、特に前者の減少が著明であった。この所見も HP の形成にヘルパー/インデューサー T 細胞が関与していることを支持するものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学

第三内科松田保教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を戴いた福井厚生病院内科金森一紀先生に深謝致します。また、研究に御協力頂きました第三内科の諸先生に感謝いたします。サイクロスポリン A を提供していただいたサンド薬品株式会社に御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第36回日本アレルギー学会 (1986年岐阜)、第27回日本胸部疾患学会 (1987東京) にて発表した。

## 文 献

- 1) Robert, R. C. & Moore, V. L.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **116**, 1075-1090 (1977).
- 2) Schatz, M., Patterson, R. & Fink, J.: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **60**, 27-37 (1977).
- 3) Lopez, M. & Salvaggio, J.: Hypersensitivity pneumonitis: current concepts of etiology and pathogenesis. *Annu. Rev. Med.*, **27**, 453-463 (1976).
- 4) Pepys, J.: Hypersensitivity disease of the lungs due to fungi and organic dusts. In Kallos, P (ed.), *Monographs in Allergy*, 1st ed., Vol. 4, p69-131, S. Karger, A. G., Basel, 1964.
- 5) Godard, P., Clot, J., Jonquet, O., Bonsquet, J. & Michel, F. B.: Lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Chest*, **80**, 447-452 (1981).
- 6) Richerson, H. B. & Rose, E. F.: Chronic hypersensitivity pneumonitis produced in the rabbit by the adjuvant effect of inhaled muramyl dipeptide (MDP). *Am. J. Pathol.*, **106**, 409-420 (1982).
- 7) Wikie, B., Pauli, B. & Gyax, M.: Hypersensitivity pneumonitis: Experimental production in guinea pigs with antigens of *Micropolyspora faeni*. *Pathol. Microbiol.*, **39**, 393-411 (1973).
- 8) Schuyler, M., Schmitt, D. & Steinberg, D.: Hypersensitivity pneumonitis in strain II guinea pigs. I. Histological features. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **68**, 108-111 (1982).
- 9) Costabel, U., Bross, K. J., Ruehle, K. H., Loehr, G. W. & Matthys, H.: Ia-like antigen on T cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in hypersensitivity pneumonitis. Analysis of bronchoalveolar lavage and blood lymphocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **123**, 407-412 (1981).

- 10) Starzl, T. E., Klintmalm, G. B., Porter, K. A., Iwatsuki, S. & Schroter, G. P. J.: Liver transplantation with use of Cyclosporin A and predonisone. *N. Eng. J. Med.*, **305**, 266-269 (1981).
- 11) Wang, B. S., Heacock, E. H., Chang-Xue, Z., Tilney, N. L., Strom, T. B. & Mannick J. A.: Evidence for the presence of suppressor T lymphocytes in animals treated with cyclosporin A. *J. Immunol.*, **128**, 1382-1385 (1982).
- 12) Bunjes, D., Hardt, C., Roellinghff, M. & Wangen, H.: Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell response by impairing the release of interleukin I and interleukin II. *Eur. J. Immunol.*, **11**, 657-661 (1981).
- 13) 日浦研哉: 過敏性肺臓炎の実験病理学的検討. *川崎医学会雑誌*, **8**, 322-331 (1982).
- 14) Richerson, H. B., Cheng, F. H. F. & Bauserman, S. C.: Acute experimental hypersensitivity pneumonitis in rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **104**, 568-575 (1971).
- 15) Salvaggio, J. E. & Reynold, M. K.: Hypersensitivity pneumonitis; State of the art. *Chest*, **75**, 270-274 (1979).
- 16) 安藤正幸: 夏型過敏性肺臓炎と病因. *Medical Immunol.*, **10**, 497-501 (1985).
- 17) 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).
- 18) Reynolds, H. Y. & Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.*, **84**, 559-573 (1974).
- 19) Reynolds, H. Y., Fulmer, J. D., Kazmierowski, J. A., Roberts, W. C., Frank, M. M. & 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).
- 20) Slauson, D. O. & Dahlstrom, M. A.: The pulmonary inflammatory response. Cellular events in experimental pulmonary arterial hypersensitivity disease. *Am. J. Pathol.*, **79**, 119-130 (1975).
- 21) Bernardo, J., Hunninghake, G. W., Gradek, J. E., Ferrans, V. J. & Crystal, R. G.: Acute hypersensitivity pneumonitis; serial changes in lung lymphocytes subpopulation after exposure to antigen. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **120**, 985-994 (1979).
- 22) Yoshizawa, Y., Nakazawa, T., Ripani, L. M. & Moore, V. L.: Development of chronic pulmonary inflammation in immunized guinea pigs by aerosol challenge with antigen; relationship of immune complex disease and cell-mediated hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **70**, 114-119 (1982).
- 23) Roska, A. K. B., Moore, V. L. & Abramoff, P.: Immune complex disease in guinea pig lungs: Elicitation with pigeon serum. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **120**, 129-136 (1979).
- 24) Salvaggio, J., Phamiphak, P., Stanford, R., Bice, D. & Claman, H.: Experimental production of granulomatous pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **56**, 364-380 (1975).
- 25) Peterson, L. B., Braley, J. F., Calvanico, N. J. & Moore, V. L.: An animal model hypersensitivity pneumonitis in rabbits. Development of chronic pulmonary inflammation and cell mediated hypersensitivity after repeated aerosol challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **119**, 991-999 (1979).
- 26) Adler, K. B., Callahan, L. M. & Evans, J. N.: Cellular alterations in the alveolar wall in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **133**, 1043-1048 (1986).
- 27) Takizawa, H., Suko, M., Kobayashi, N., Shoji, S., Ohta, K., Nogami, M., Okudaira, H., Miyamoto, T. & Shiga, J.: Experimental hypersensitivity pneumonitis in the mouse: Histologic and immunologic features and their modulation with cyclosporin A. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **81**, 391-400 (1988).
- 28) Takizawa, H., Suko, M., Shoji, S., Ohta, K., Horiuchi, T., Okudaira, H., Miyamoto, T. & Shiga, J.: Granulomatous pneumonitis induced by bacille Calmette-Guérin in the mouse and its treatment with cyclosporin A. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **134**, 296-299 (1986).
- 29) Paradis, I. L., Dauber, J. H. & Rabin, B. S.: Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **133**, 855-860 (1986).



- 30) Thrall, R. S. & Barton, R. W.: A comparison of lymphocyte populations 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**, 279-283 (1984).
- 31) Hirata, T., Nagai, S., Ohshima, S. & Izumi, T.: Comparative study of T-cell subsets in BAL fluid in patients with hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Chest*, **82**, 232 (1982).
- 32) Costabel, U., Bross, K. J. & Matthys, H.: 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).
- 33) Keller, R. H., Swartz, S. Schlueter, D. P., Bar-Sela, S. & Fink, J. N.: Immunoregulation in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional studies of bronchoalveolar lavage lymphocyte. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **130**, 766-771 (1984).
- 34) 小西一樹: 農夫肺とその発症に関わる環境因子. 第25回 FLD シンポジウム「過敏性肺炎の問題点をめぐって」. **3**, 16 (1985).
- 35) Gershon, R. K., Eardley, D. D., Durum, S., Green, D. R., Shen, F. W., Yamauchi, K., Cantor, H. & Murphy, D. B.: Contrasuppression: A novel immunoregulatory activity. *J. Exp. Med.*, **153**, 1533-1546 (1981).
- 36) Morimoto, C., Reinherz, E. L., Borel, Y. & Schlossman, S. F.: Direct demonstration of the human suppressor inducer subset by anti-T cell antibodies. *J. Immunol.*, **130**, 157-161 (1983).
- 37) Thomas, Y., Rogozinski, L. & Chess, L.: Relationship between human T cell surface molecules. *Immunol. Rev.*, **74**, 113-128 (1983).
- 38) Richerson, H. B., Seidenfeld, J. J., Ratajczak, H. V. & Richard, D. W.: Chronic experimental interstitial pneumonitis in the rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **117**, 5-13 (1978).
- 39) 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).
- 40) Peterson, L. B., Braley, J. F. & 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).
- 41) Schuyler, M. R. & Schmitt, D.: Experimental hypersensitivity pneumonitis: Lack of tolerance. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **130**, 772-777 (1984).
- 42) Keller, R. H., Calvanico, N. J. & Stevens, J. O.: Hypersensitivity pneumonitis in nonhuman primates. I. Studies on the relationship of immunoregulation and disease activity. *J. Immunol.*, **128**, 116-122 (1982).
- 43) Chensue, S. W. & Boros, D. L.: Modulation of granulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.*, **123**, 1409-1414 (1979).
- 44) Orosz, C. G., Fidelns, R. K., Roopenian, D. C., Widmer, M. B., Ferguson, R. M. & Bach, F. H.: Analysis of cloned T cell function. I. Dissection of cloned T cell proliferative responses using cyclosporin A. *J. Immunol.*, **129**, 1865-1868 (1982).
- 45) Kopp, W. C., Dierks, S. E., Butler, J. E., Upadrashta, B. S. & Richerson, H. B.: Cyclosporine immunomodulation in a rabbit model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **132**, 1027-1033 (1985).
- 46) Elias, J. A., Rossman, M. D., Zurier, R. B. & Daniele, R. P.: Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **131**, 94-99 (1985).
- 47) Hammarstrom, S.: Leukotrienes. *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 355-377 (1983).
- 48) Johnson, H. M. & Torres, B. A.: Leukotrienes: positive signals for regulation of  $\gamma$ -interferon production. *J. Immunol.*, **132**, 413-416 (1984).
- 49) Hunninghake, G. W., Garrett, K. C., Richerson, H. B., Fantone, J. C., Ward, P. A., Rennard, S. I., Bitterman, P. B. & Crystal, R. G.: Pathogenesis of the granulomatous lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **130**, 476-496 (1984).

**An Immunological Study of Experimental Hypersensitivity Pneumonitis in the Mouse** Bunshi Takakura, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 142—158 (1990)

**Key words** hypersensitivity pneumonitis, bacterial  $\alpha$  amylase, bronchoalveolar lavage, cyclosporin A, helper/inducer T cell

#### Abstract

In order to clarify the importance of cell-mediated immunity in the immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis (HP), a murine model of HP was established with bacterial  $\alpha$  amylase (B $\alpha$ A) as the antigen. After intramuscular immunization with B $\alpha$ A and complete Freund's adjuvant, aerosol challenge with B $\alpha$ A was performed every day for two weeks. The histological changes following the aerosol inhalation could be separated into three stages: the first stage was development of alveolitis, the second stage was formation of granuloma, and the third stage was resolution of granuloma. These histological findings were similar to findings observed in human HP. An increase of numbers of lymphocyte and macrophage in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was observed at the first and second stages. The changes of cell populations in BALF were consistent with those in the lung tissue. Lyt-1 positive cells predominated over Lyt-2 positive cells in the BALF lymphocytes. Using immunohistochemical techniques, it was demonstrated there was a predominance of Lyt-1 positive cells over Lyt-2 positive cells in alveolitis and/or granulomatous lesions. In the present model of experimental HP, the subpopulations of the lymphocytes in the BALF corresponded to those in the lung tissue. Cyclosporin A (CyA) clearly suppressed development of HP in this model when this potent immunosuppressive drug was administered throughout the period of B $\alpha$ A inhalation. An increase in BALF lymphocytes was significantly suppressed, and the increase of Lyt-1 positive cells was inhibited more than that of Lyt-2 positive cells by the CyA treatment. These results suggest that Lyt-1 positive cells (helper/inducer T lymphocytes) play an important role in the development of HP.