

Differential Cellular Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Release of Interleukin 1 Derived from Alveolar Macrophages after the Intratracheal Instillation of Bleomycin in the Rats

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	http://hdl.handle.net/2297/8130

ラットのブレオマイシン肺炎における気管支肺胞洗浄液 細胞成分の分析および肺胞マクロファージ由来の インターロイキン-1 活性の測定

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

西 耕 一

(平成1年6月20日受付)

ラットにブレオマイシン (bleomycin, BLM) を気管内注入後様々な時期に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage, BALF) 細胞成分の分析を行い, 肺胞マクロファージ (alveolar macrophage, AM) からインターロイキン-1 (interleukin 1, IL-1) 活性が検出できるかどうかについて検討した。また, 生体内においてリポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼ経路がラット BLM 肺炎に及ぼす影響も調べた。BLM 投与6時間後に有意の炎症細胞の出現が BALF に認められた。最初に出現した細胞は好中球で, 浸潤のピークは BLM 投与24時間後に認められた。リンパ球は BLM 投与24時間後より出現し始め, 4日後から7日後にかけてピークが認められた。この BALF リンパ球は82-85%が Tリンパ球からなり, Bリンパ球は1-3%であった。BALF-Tリンパ球のサブセットでは, W3/25⁺細胞 (ヘルパー細胞) と OX8⁺細胞 (サブレッサー細胞) の比は1:1であり, 経過中この比は変化しなかった。また, BLM 投与後の AM の培養上清から lymphocyte-activating factor (LAF) 活性が検出された。最大の活性は BLM 投与12時間後に認められたが, 24時間後にはほぼ消失した。リポキシゲナーゼ阻害剤の AA-861 (40mg/kg 体重) を毎日腹腔に投与したラットでは, BALF 好中球の有意な減少が認められた。しかし IL-1 活性や組織学的な肺の線維化所見に影響は認められなかった。シクロオキシゲナーゼ阻害剤のインドメサシン (4mg/kg) を投与したラットでは, BALF 細胞所見, IL-1 活性や組織学的所見にはなんら影響が認められなかった。以上から, BLM は炎症細胞の浸潤や AM の活性化 (IL-1 産生で評価される) を伴う肺障害を引き起こすが, 肺の線維化にいたる BLM 肺障害にはアラキドン酸代謝産物の関与は少ないものと考えられた。

Key words bleomycin-induced pneumonitis, bronchoalveolar lavage, alveolar macrophage, interleukin 1, arachidonate metabolites

間質性肺炎は, 種々の刺激によって肺胞壁および肺間質に生ずる炎症の総称であり, 従って, 線維化に至る過程は単一ではないことが推測される¹⁾。しかし, サルコイドーシスや過敏性肺炎のように肉芽腫を形成する疾患にせよ, また特発性間質性肺炎のように肺胞壁の肥厚を主体にする疾患にせよ, 肺胞マクロファージが一連の炎症細胞反応の主役を担っていることが示

唆されている。すなわち, 肺胞マクロファージは肺胞腔内に多数存在するだけでなく, 活性化されて, 様々なホルモン様物質 (いわゆるモノカイン) を遊離する能力²⁾をもっており, 幅広い生物学的作用を及ぼすため, 肺の様々な炎症において重要な役割を果たしていると考えられている。

気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL) は

Abbreviations: AM, alveolar macrophage; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage-fluid; BLM, bleomycin; FCS, fetal calf serum; IDM, indomethacin; IL-1, interleukin 1; LAF, lymphocyte-activating factor; LPS, lipopolysaccharide; LTb,

Reynolds らにより開発された検査法⁹⁾であり、BAL により得られた BAL 液 (BAL-fluid, BALF) の液性成分や細胞成分は、主として肺胞間質の炎症性変化を反映するとされている。各種びまん性肺疾患では、BALF の分析が診断や病態生理の解明に用いられているが、ヒトの間質性肺炎における炎症細胞の研究は、リンパ球を主体として行われてきた⁹⁾。そして、細胞の種類やリンパ球サブセットの不均一性が指摘されてきたが、この原因の一つとして、炎症を引き起こす原因物質の違いにより、肺胞マクロファージの活性化の程度やその結果としてのマクロファージから遊離される各種モノカインの質的、量的な差が考えられる。

極めて難治とされている間質性肺炎の治療の確立のため、炎症の終末像である線維化を対象とするよりも、炎症の早期の段階での肺胞マクロファージの役割を解明することは有用であると思われる。そのためには、既知の催炎症物質を用いた動物モデルでの解析が必要である。

ブレオマイシン (bleomycin, BLM) は、優れた抗腫瘍剤であり、扁平上皮癌や悪性リンパ腫等に広く使われている¹⁰⁾。しかし、抗腫瘍効果が強い反面、副作用として、ヒト⁷⁻⁹⁾や実験動物^{10,11)}に対して肺線維症を引き起こすことが知られている。この BLM による肺病変は、その使用量、使用期間において、若干差はあるものの、次第に線維化に導かれる一種の間質性肺炎であるとされている。BLM の気管内注入により引き起こされたラットの BLM 肺炎は、人に生じた BLM 肺炎ないし肺線維症に極めて類似した肺病変を形成する¹¹⁾。しかし、BLM 肺炎の BALF 所見についての報告は少ない¹²⁾。また、マクロファージの産生するそのモノカインの中でもインターロイキン-1 (interleukin 1, IL-1) は、局所的かつ全身的に様々な細胞に影響を与える^{13,14)}ため、最近特に注目されている。

そこで、著者は、この動物モデルを用いて、1) BALF の細胞所見の経時的な変化を確立し、2) BAL により得られた肺胞マクロファージから IL-1 が遊離されるかどうかについて検討した。また、3) BLM による肺の炎症やマクロファージの機能には、種々のアラキドン酸代謝産物が関与している可能性が指摘されている^{15,16)}ため、シクロオキシゲナーゼ阻害剤としてインドメサシン (indomethacin, IDM), リボキシゲナーゼ阻害剤として AA-861 を用いて、これら薬剤が BALF 細胞所見、肺胞マクロファージ由来の

IL-1 遊離および病理組織所見に対して及ぼす影響について検討した。

対象および方法

I. 対 象

体重 150-200g の雄の Fisher 344 ラット (三共ラボ、富山) を金沢大学動物実験施設内の空調飼育室 (室温 23±2°C, 湿度 55±5%) で 1 週間以上飼育し、肉眼的観察により健康な動物を実験に用いた。

ラットは、1) 対照群: 前処置を行わないで生理食塩水 0.3ml を気管内注入した群、2) BLM 単独投与群: 前処置を行わないで BLM を気管内注入した群、3) BLM+AA-861 投与群: AA-861 (武田薬品株式会社、大阪) を BLM 気管内注入の 1 週間前から気管支肺胞洗浄するまで連日 40mg/kg を腹腔内投与した群、4) BLM+IDM 投与群: IDM (Sigma 社, St. Louis, U.S.A.) を BLM 気管内注入の 1 週間前から気管支肺胞洗浄するまで連日 4mg/kg を腹腔内投与した群、以上の 4 群に分けた。

BLM の気管内投与は、BLM (日本化薬株式会社、東京) 0.75mg/100g 体重を生理食塩水 0.3ml に溶解したものを、エーテル麻酔下で無菌的に気管内注入することで行った。

II. 気管支肺胞洗浄 (BAL)

BAL は以下に示す方法で、BLM ないし生理食塩水を気管内注入の 6 時間後、12 時間後、24 時間後、4 日後、7 日後、14 日後に実施した。

ラットをクリーンベンチ内で、エーテル麻酔下にて、大腿動脈を切開し脱血死させた後、気管内チューブを挿入固定し、滅菌した生理食塩水 5ml を計 8 回注入し、注入の毎にゆっくりと吸引して得られた液を BALF とした。生理食塩水 40ml の注入により平均約 30ml の BALF が得られた。BALF は試験管 (2070 tube, Falcon 社, Lincoln Park, U.S.A.) に回収し、1,200rpm×10min. で遠心した。その沈渣を細胞成分とし、100U/ml のペニシリンと 100μg/ml のストレプトマイシンを含んだ RPMI1640 培養液 (GIBCO 社, Grand Island, U.S.A.) にて 3 回洗浄し、細胞数算定後、RPMI1640 培養液+10% fetal calf serum (FCS, GIBCO 社, Grand Island, U.S.A.) に 2×10⁶ 細胞/ml の濃度に再浮遊し、その細胞浮遊液 100μl から Cytospin 2 (Shandon 社, Sewickley, U.S.A.) を用いて、遠心スライド標本を作成した。作成した標本に

leukotriene B₄; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate buffered saline; PGE₂, prostaglandin E₂

は、ギムザ染色を施し、光学顕微鏡で300個を調べて細胞分画を評価した。

Ⅲ. 肺泡マクロファージの分離とマクロファージ培養上清の作成

肺泡マクロファージの分離は、肺泡マクロファージがきわめて付着能が強いことを利用して行った¹⁷⁾。細胞分画判定後マクロファージ分画が 1×10^6 細胞/mlの濃度になるように再浮遊した。この時の細胞の生存率は、trypan blue dye exclusion test (Flow Laboratory 社, McLean, U.S.A.) によれば平均95%以上であった。この細胞浮遊液を24well (平底) 組織培養プレート (25820 plate, Corning 社, Corning City, U.S.A.) に各0.5ml ずつ入れ、37°C、5% CO₂ インキュベーターに静置した。24時間後、プレートに非付着の細胞は静かに吸引し、プレートに付着した細胞分画に対しては温 RPMI1640 培養液にて3回丁寧に洗浄した。肺泡マクロファージは付着能が極めて強く、浮遊液中のマクロファージの内平均90%が付着した。プレートに付着した細胞の分画は95%以上が肺泡マクロファージからなっていた。RPMI1640 培養液+10% FCS を各 well に0.5ml ずつ加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターで24時間培養した後、この肺泡マクロファージの無刺激培養上清を集め、ミリポアフィルター (0.45 μm) に通した後、測定するまでの間-20°Cで凍結保存した。

Ⅳ. IL-1 活性の測定

マウス胸腺細胞を用いた co-stimulator 法で行った lymphocyte-activating factor (LAF) 活性を IL-1 活性として用いた¹⁸⁾。クリーンベンチ内で、遺伝的に lipopolysaccharide (LPS) に不応性である4-6週齢の雄性 C3H/HeJ マウス (三共ラボ, 富山) から胸腺を摘出し、RPMI1640 培養液+10% FCS 中で、滅菌した2枚のスライドガラスで軽く押しつぶすことにより、胸腺単細胞浮遊液を作成した。trypan blue dye exclusion test では胸腺細胞の生存率は、 $98.24 \pm 0.25\%$ であった。同様の培養液で2回遠心洗浄した後、 1×10^7 細胞/ml に再浮遊させ、2メルカプトエタノールおよび phytohemagglutinin (Wellcome 社, Dartford, England) がそれぞれ 2.5×10^{-5} M/ml および $2 \mu\text{g/ml}$ になるように加えた。肺泡マクロファージ培養上清を 96well (平底) 組織培養プレート (3596 plate, Costar 社, Cambridge, U.S.A.) に $100 \mu\text{l}$ /well ずつ入れ、各 well に胸腺細胞浮遊液 (1×10^6 細胞/well) を添加した。このプレートを37°C、5% CO₂ インキュベーターで48時間培養した後、 $0.5 \mu\text{Ci/well}$ の ³H-thymidine (NEN 社, Boston, U.S.A.) を加え、

さらに24時間培養してから、cell harvester (Labo Science 社, 東京) を用いて濾紙上に移し、細胞に取り込まれた ³H-thymidine を液体シンチレーションカウンターで測定した。IL-1 活性は、対照 (RPMI1640 培養液のみ) の ³H-thymidine incorporation に対する増加率にて表示した。

Ⅴ. リンパ球サブセットの測定

BALF の細胞を 1×10^6 細胞/ml の濃度に調節した。ラットのリンパ球膜抗原に対する単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) である W3/13 (抗T細胞 mAb), OX33 (抗B細胞 mAb), W3/25 (ヘルパーT細胞 mAb), OX8 (抗サブレッサーT細胞 mAb) (いずれも Sera Labo 社, Kidlington, England) を一次抗体として、それぞれ $5 \mu\text{l}$ 加え、4°Cで45分間反応させ、0.5%牛血清アルブミン (Sigma 社, St. Louis, U.S.A.) を含む phosphate buffered saline (PBS, 日本製薬, 東京) にて2回洗浄した。次に二次抗体として fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgG ヤギ IgG·F (ab)₂ (Cappel 社, West Chester, U.S.A.) を加え、4°Cで45分間反応させ、PBS で洗浄した。Flow cytometry には、Epics-CS (Coulter 社, Hialeah, U.S.A.) を用いて、各陽性細胞比率を解析した。

Ⅵ. 組織標本

BLM 気管内注入6時間後、12時間後、24時間後、4日後、7日後、14日後のラットに10%ホルマリン液5mlを気管内注入して伸展固定肺を作成し、パラフィン包埋した後、切片標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施行し、顕微鏡で観察した。

Ⅶ. 統計計算

得られた計測値は、すべて平均値±標準誤差 (n) で示した。得られた計測値の評価には、ノンパラメトリック検定として Wilcoxon の対応のない検定を使用し、 $p < 0.05$ 以上を有意差ありと判定した。

成 績

Ⅰ. BALF 細胞所見

1. 細胞数の変化 (図1)

生理食塩水を気管内注入した対照群のラットの細胞数は、 $0.90 \pm 0.08 - 0.98 \pm 0.07 \times 10^6$ 細胞/ラットの値を示し、注入後から BAL までの時間による有意な変動は認められなかった。

BLM 単独投与群では、6時間後 $3.55 \pm 0.27 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=11), 12時間後 $5.00 \pm 0.30 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=15), 24時間後 $5.62 \pm 0.43 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16), 4日後 $7.84 \pm 0.58 \times 10^6$ 細胞/ラット

(n=17), 7日後 $7.23 \pm 1.24 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=10), 14日後 $4.95 \pm 0.39 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=19) と6時間後から14日後の全ての時期において対照群に比べて有意の細胞数増加が認められ ($p < 0.01$), 4日後から7日後にかけてピークが認められた。

BLM+AA-861 投与群においては, 6時間後 $3.39 \pm 0.29 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=10), 12時間後 $5.32 \pm 0.46 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16), 24時間後 $5.24 \pm 0.23 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16), 4日後 $6.58 \pm 0.56 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=13), 7日後 $6.81 \pm 0.74 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=6), 14日後 $6.17 \pm 0.95 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=6) と6時間後から14日後の全ての時期で対照群に比較して有意の細胞数の増加が認められ, 4日後から7日後にかけてピークが認められた。BLM 単独投与群とは各時期において有意な差は認められなかったが, 以下に

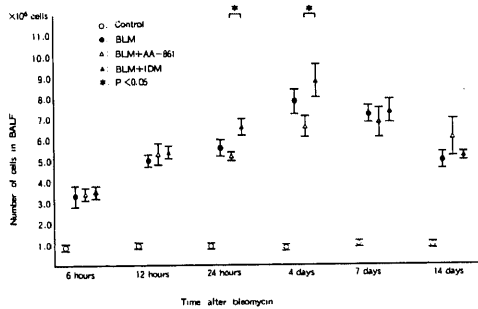


Fig. 1. Changes in total cell count of nucleated cells obtained from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) during the development of the bleomycin (BLM)-induced pulmonary pneumonitis. A significant increase in the number of cells of the BLM-treated rats (the BLM rats, the BLM+AA-861 rats and the BLM+IDM rats) compared with those of the control rats was observed at 6 hours after the BLM treatment and persisted for as long as 2 weeks. A significant decrease in the number of cells of the BLM+AA-861 rats compared with those of the BLM+IDM rats was observed at 24 hours and 4 days after the BLM treatment. The control rats (○) received 0.3ml of sterile saline intratracheally. The BLM rats (●) received single intratracheal injection of 0.75mg/100g body weight of BLM in 0.3ml of sterile saline. The BLM+AA-861 rats (△) received daily intraperitoneal injections of AA-861 (40mg/kg) 7 days before the BLM treatment until the bronchoalveolar lavage (BAL) procedures. The BLM+IDM rats (▲) received daily intraperitoneal injections of indomethacin (4mg/kg) 7 days before the BLM treatment until the BAL procedures.

示すように, BLM+IDM 投与群と比較すると, 24時間後と4日後において, 有意の ($p < 0.05$) 細胞数減少が認められた。

BLM+IDM 投与群においては, 6時間後 $3.47 \pm 0.32 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=13), 12時間後 $5.43 \pm 0.33 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=18), 24時間後 $6.62 \pm 0.43 \times 10^6$

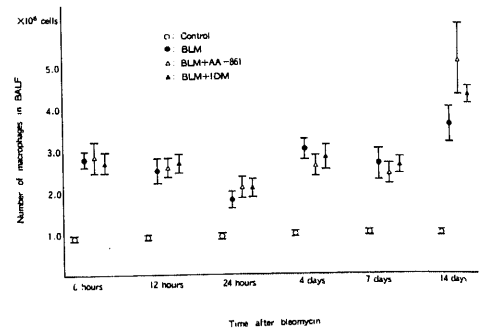


Fig. 2. Changes in the number of alveolar macrophages obtained from BALF during the development of the BLM-induced pulmonary pneumonitis. A significant increase in the number of macrophages of the BLM-treated rats (the BLM rats, the BLM+AA-861 rats and the BLM+IDM rats) compared with those of the control rats was observed at 6 hours after the BLM treatment and persisted for as long as 2 weeks.

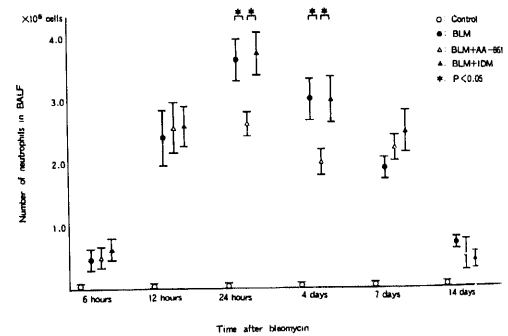


Fig. 3. Changes in the number of neutrophils obtained from BALF during the development of BLM-induced pneumonitis. A significant increase in the number of neutrophils of the BLM-treated rats (the BLM rats, the BLM+AA-861 rats and the BLM+IDM rats) compared with those of the control rats was observed at 6 hours after the BLM treatment and persisted for as long as 2 weeks. The number of neutrophils of the BLM+AA-861 rats was significantly lower than that of the BLM rats and the BLM+IDM rats at 24 hours and 4 days after the BLM treatment.

細胞/ラット (n=16), 4日後 $8.78 \pm 0.75 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=15), 7日後 $7.37 \pm 0.56 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=12), 14日後 $5.24 \pm 0.26 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=7)とやはり4日後から7日後にかけてピークが認められ, 対照群とは各時期において有意に細胞数が増加していた. BLM 単独投与群との有意差は各時期とも認められなかったが, BLM+AA-861 投与群と比較すると, 24時間後と4日後において有意の ($p < 0.05$) 細胞数増加が認められた.

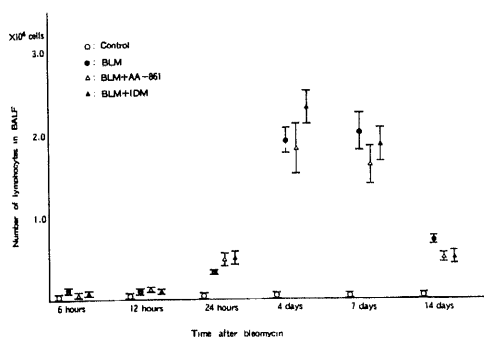


Fig. 4. Changes in the number of lymphocytes obtained from BALF during the development of the BLM-induced pneumonitis. A significant increase in the number of lymphocytes of the BLM-treated rats (the BLM rats, the BLM+AA-861 rats and the BLM+IDM rats) compared with the control rats was observed at 24 hours after the BLM treatment and persisted for as long as 2 weeks.

2. 細胞分画の変化

1) マクロファージ分画 (図2)

対照群は98.5±0.27%が肺胞マクロファージからなっており, マクロファージ細胞数は, $0.90 \pm 0.07 - 0.96 \pm 0.07 \times 10^6$ 細胞/ラットの間の値を示し, 経過中有意な値の変動は認められなかった.

BLM 単独投与群では, 6時間後が $2.78 \pm 0.24 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=11) と対照群に比べて有意 ($p < 0.01$) の細胞数増加が認められ, その後やや減少し24時間後には $1.83 \pm 0.21 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16) となったが, 再び細胞数は徐々に増加し, 14日後には $3.56 \pm 0.42 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=19) を示した. いずれの経過においても, 対照群より細胞数が有意 ($p < 0.01$) 増加していた.

BLM+AA-861 投与群や BLM+IDM 投与群においても BLM 単独投与群と同様な所見が得られ, 各時期において各群間に有意な差は認められなかった.

2) 好中球分画 (図3)

対照群ではほとんど認められず, いずれの時期においても 0.01×10^6 細胞/ラット以下であった.

BLM 単独投与群では, 6時間後が $0.45 \pm 0.16 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=11) で, 既に対照群より有意 ($p < 0.01$) の増加を示し, 12時間後は $2.39 \pm 0.44 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=15), 24時間後には $3.64 \pm 0.35 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16) とピークが認められた. その後減少し始め, 14日後には $0.70 \pm 0.11 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=19) となったがそれでも対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) の増加が認められた.

Table 1. The lymphocyte subpopulations present in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

Treatment	Days after BLM (No. of animals)	T-cells (%) (mean±S.E.M.)	W3/25cells (%) (mean±S.E.M.)	OX 8cells (%) (mean±S.E.M.)	B-cells (%) (mean±S.E.M.)
BLM	4 days (n= 6)	85.1±3.5	45.5±2.7	40.0±1.8	2.7±1.0
	7 days (n= 9)	84.5±2.2	43.9±1.5	40.8±1.7	2.7±0.6
	14 days (n= 7)	83.7±4.1	44.9±1.9	38.9±2.9	2.2±0.7
BLM+AA-861	4 days (n=10)	85.1±6.6	45.4±4.5	40.0±3.3	2.5±1.2
	7 days (n= 7)	85.1±4.0	44.4±2.4	40.9±2.2	2.4±0.6
	14 days (n= 6)	83.1±5.2	45.2±3.6	39.2±5.0	2.2±0.7
BLM+IDM	4 days (n= 9)	84.6±6.1	44.7±3.8	40.5±3.8	2.5±1.1
	7 days (n= 9)	82.6±4.0	44.3±2.6	38.5±2.0	2.1±0.8
	14 days (n= 6)	83.0±3.1	44.5±2.3	38.9±2.9	2.0±0.8

The lymphocytes populations present in BALF. BALF-lymphocytes were composed of about 85% T-lymphocytes and about 3% B-lymphocytes. BALF-T-lymphocytes were shown to be present in a 1 : 1 ratio of W3/25⁺ cells (helper) : OX8⁺ cells (suppressor). The control rats received 0.3ml of sterile saline intratracheally. No lymphocytes were found in BALF of the control rats after the saline administration.

BLM+AA-861 投与群では、6 時間後 $0.53 \pm 0.15 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=10)、12 時間後は $2.56 \pm 0.39 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16) とこの時点では、BLM 単独投与群と差は認められなかったが、24 時間後 $2.62 \pm 0.22 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16)、4 日後 $1.95 \pm 0.22 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=13) と BLM 単独投与群や BLM+IDM 投与群に比べて有意 ($p < 0.05$) の好中球減少が認められた。しかし 7 日後 $2.23 \pm 0.20 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=7)、14 日後 $0.49 \pm 0.25 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=6) は、BLM 単独投与群と有意な差は認められなかった。

BLM+IDM 投与群は各々の経過において、BLM 単独投与群と同様な所見を示し、24 時間後 $3.76 \pm 0.35 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=16)、4 日後 $2.96 \pm 0.36 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=15) で、BLM+AA-861 投与群より有意 ($p < 0.05$) に好中球数が増加していた。

3) リンパ球分画 (図 4)

対照群ではどの時期においても 0.01×10^6 細胞/ラット以下であり、経過中有意な変動は認められなかった。

BLM 単独投与群では、12 時間後までは対照群と差は認められなかったが、24 時間後より出現し始め ($0.33 \pm 0.05 \times 10^6$ 細胞/ラット, n=16)、4 日後 $1.87 \pm 0.16 \times 10^6$ 細胞/ラット (n=17) から 7 日後 $1.96 \pm$

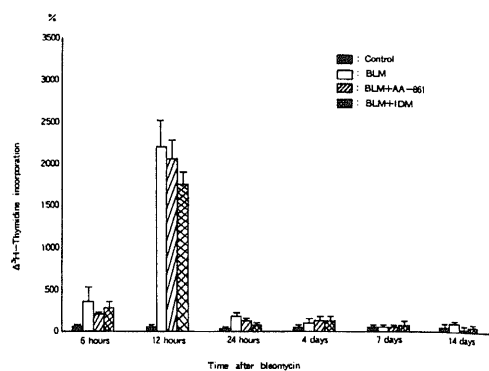


Fig. 5. Activities of the lymphocyte-activating factor (interleukin 1, IL-1) in the supernatants of unstimulated alveolar macrophages. Maximal activities of the BLM rats, the BLM+A-A-861 rats and the BLM+IDM rats were detected at 12 hours after BLM treatment. IL-1 activities of the BLM rats, the BLM+A-A-861 rats and the BLM+IDM rats were barely detectable 24 hours after the BLM treatment. The results are expressed as percent change from the control value. The control value was obtained by incubating mice thymocytes in RPMI-1640 medium with 10% FCS.

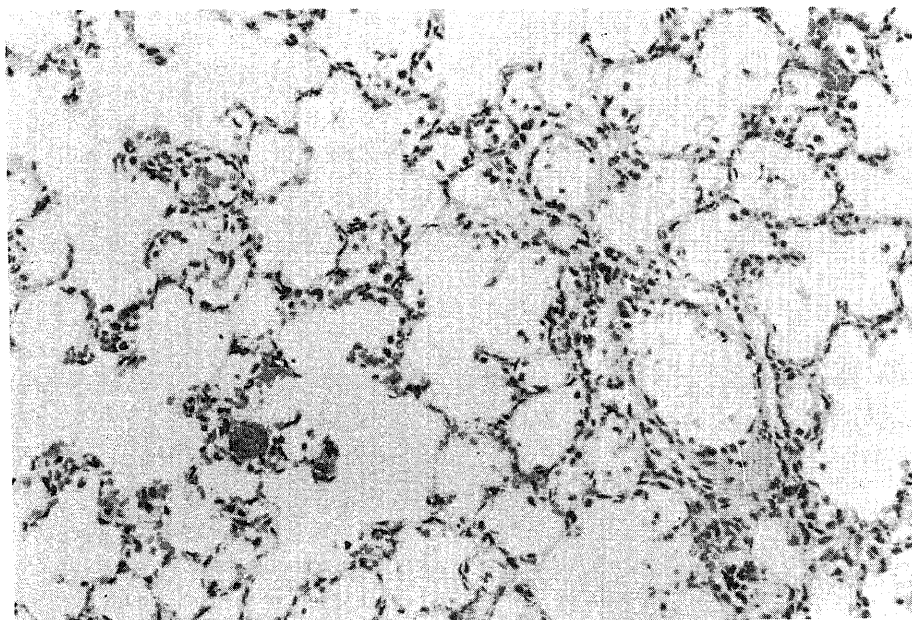


Fig. 6. Light micrograph of the lung of the BLM rats at 24 hours after the BLM treatment. Neutrophil infiltration in alveolar space and peribronchial lesion and peribronchial edema were observed. H. E. stain, $\times 50$.

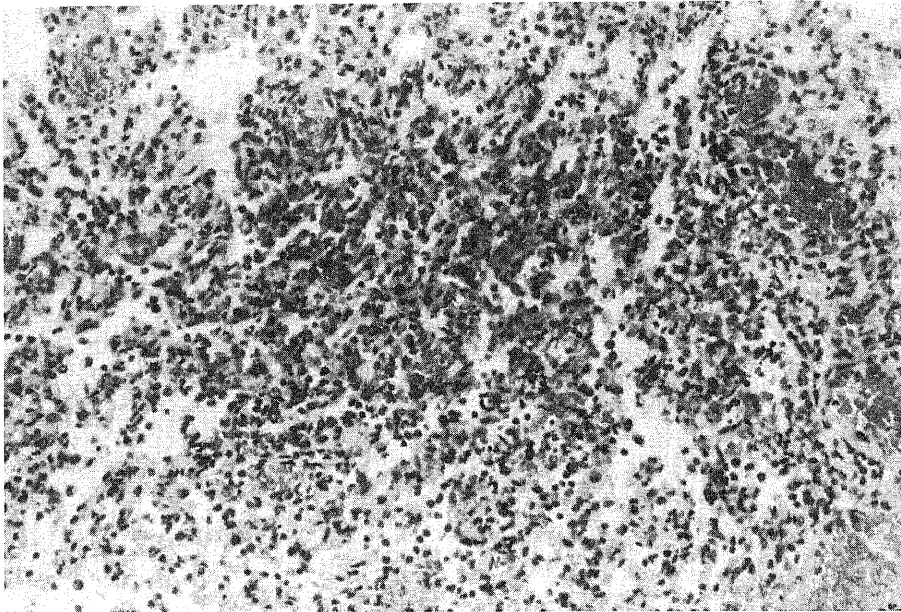


Fig. 7.a Light micrograph of the lung of the BLM rats at 4 days after the BLM treatment. Diffuse inflammatory cell infiltration (macrophages \geq lymphocytes \geq neutrophils) in alveolar space, lymphocytes infiltration in alveolar wall and peribronchial lesion and peribronchial fibrosis were observed. H.E. stain, $\times 50$.

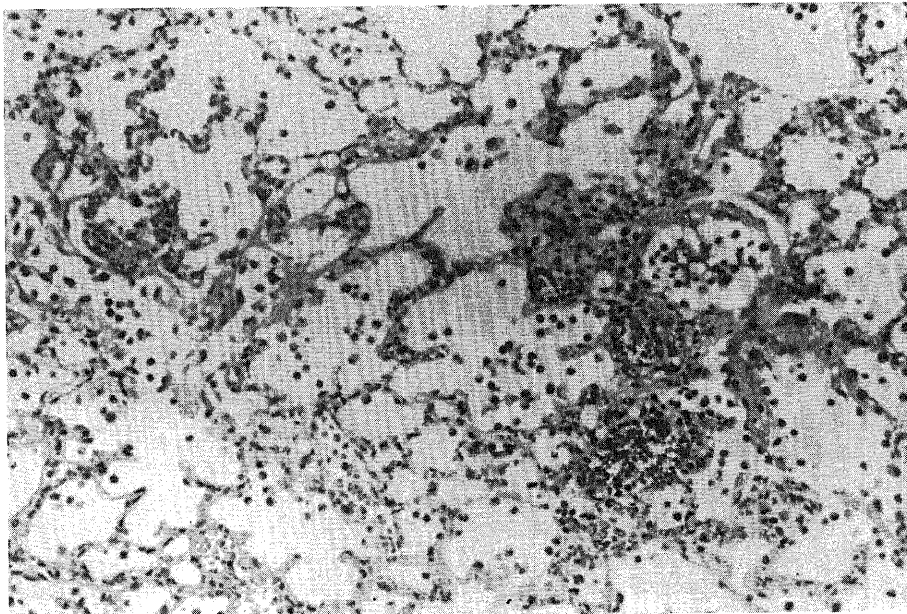


Fig. 7.b Light micrograph of the lung of the BLM+AA-861 rats at 4 days after the BLM treatment. Infiltration of neutrophils was decreased. H. E. stain, $\times 50$.

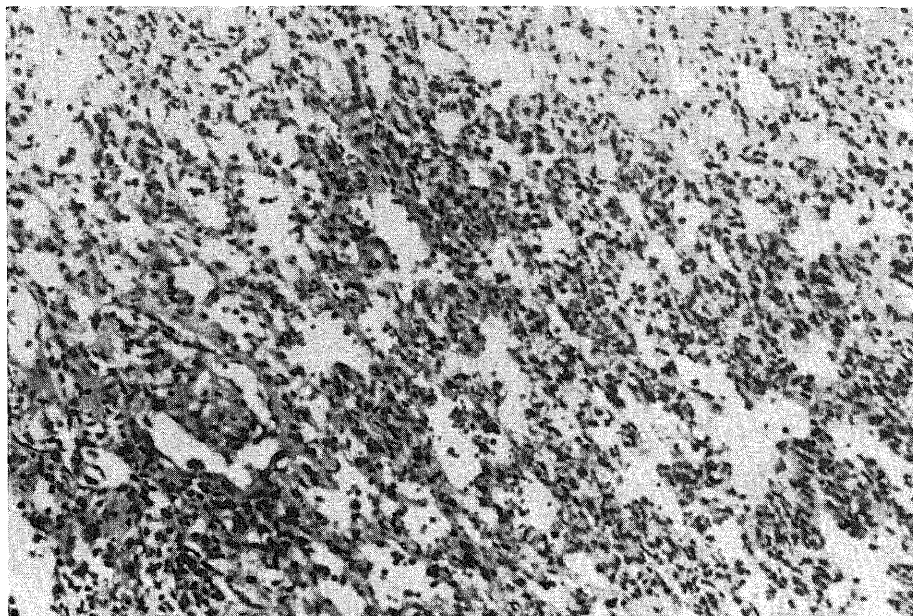


Fig. 8. Light micrograph of the lung of the BLM rats at 7 days after the BLM treatment. Diffuse inflammatory cell infiltration (lymphocytes \geq neutrophils \geq macrophages) in alveolar space and in alveolar wall with lymphoid cell infiltration was observed. The fibrosis in alveolar wall, especially in subpleural space was observed. H. E. stain, $\times 50$.

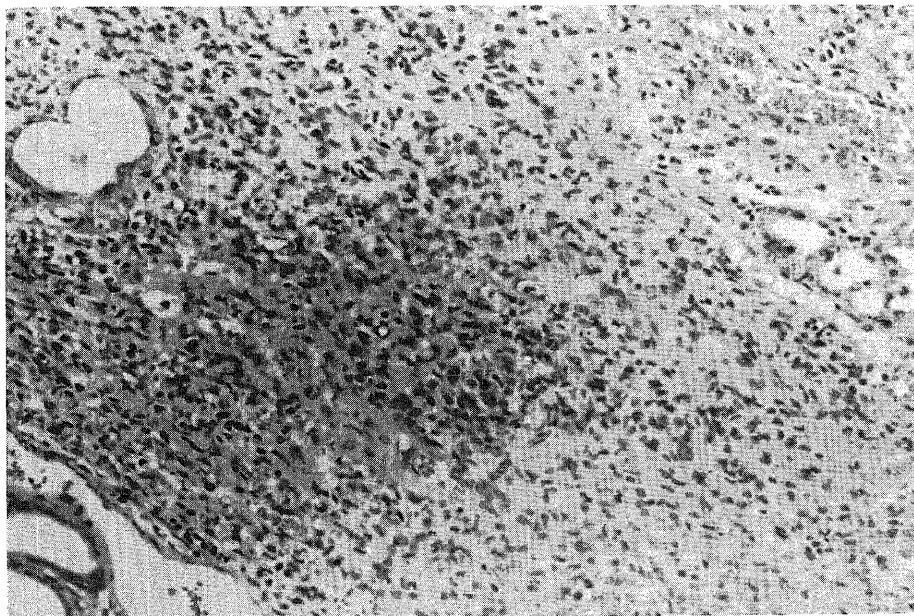


Fig. 9. Light micrograph of the lung of the BLM rats at 14 days after the BLM treatment. Interstitial fibrosis localized in peribronchial and subpleural lesion with infiltration of cells (lymphocytes \geq neutrophils) was observed. H. E. stain, $\times 50$.

0.23×10⁶細胞/ラット (n=10) にかけて最大値を示した。14日後には0.66±0.06×10⁶細胞/ラット (n=19) と減少傾向を示したが、対照群よりは有意 (p<0.01) に増加していた。

BLM+AA-861 群や BLM+IDM 投与群は、BLM 単独投与群と同様な所見を示し、各時期において各群間に差は認められなかった。

II. BALF リンパ球サブセットの変動 (表 1)

対照群は、既に述べたように BALF 中にリンパ球が出現しないため、リンパ球サブセットは検討できなかった。リンパ球細胞分画は、BLM を投与した 3 群において 4, 7, 14 日目にリンパ球サブセットを検討した。

BALF 中に出現したリンパ球のうち T リンパ球は 82-85% を占め、B リンパ球は 1-3% であった。W3/25 (ヘルパー T 細胞), OX8 (サブプレッサー T 細胞) の 2 種の抗体を用いて T リンパ球のサブセットを調べてみると、W3/25⁺ 細胞は平均 43-45% で、OX8⁺ 細胞は平均 38-40% で、W3/25 と OX8 の比は約 1:1 を示し、経過中ほとんど変動しなかった。また、BLM を投与した 3 群においても各々の間に差は特に認められなかった。

III. 無刺激肺胞マクロファージ培養上清中の IL-1 活性 (LAF 活性) の変動 (図 5)

培養液単独では、平均 1500-2000 CPM を示した。対照群では % ³H-thymidine incorporation は平均 33.3-75.0% を示し、経過中有意な変動は認められなかった。

BLM 単独投与群では、6 時間後に 339.0±54.0% (n=10) と有意の活性が認められ、12 時間後に 2186.3±343.36% (n=10) と最大値を示したが、24 時間後に 184.3±46.7% (n=9) と対照群と同じレベルになり、その後も対照群と同様な値を示し、有意な差は認められなかった。

BLM+AA-861 投与群でも、BLM+IDM 投与群でも 12 時間後にそれぞれ 2060.0±239.0% (n=12), 1735.0±114.5% (n=10) と最大値を示したが、24 時間後以後は、それぞれ 127.8±66.8% (n=9), 82.5±60.1% (n=13) と対照群とほぼ同じレベルとなり、有意差は認められなかった。また各々の時期において BLM を投与した 3 群間に有意な差は認められなかった。

IV. 病理組織変化

生理食塩水を投与した対照群は、組織学的には、正常のラットの肺とほとんど同様な所見であり、炎症細胞の浸潤や線維化病変は認められなかった。

BLM 単独投与群では、6-12 時間後には、気管支周囲にリンパ球浸潤がごく軽度認められた。24 時間後には、肺胞腔内に好中球が多数出現し、気管支周囲にも浮腫性変化や好中球の浸潤が認められた (図 6)。4 日後には、肺胞腔内にびまん性にマクロファージやリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤が認められ、好中球の浸潤も認められた。また気管支周囲には線維化とリンパ球の浸潤も認められた (図 7a)。7 日後には、肺胞腔内にびまん性のリンパ球、マクロファージおよび好中球の浸潤が認められた。気管支周囲の線維化も進み、特に胸膜下の肺胞壁に線維化が出現し始めた (図 8)。14 日後では、気管支周囲や胸膜下に局在する線維化病変が出現し、細胞の浸潤は、単核球が主体で好酸球や好中球の浸潤も一部認められた (図 9)。

BLM+AA-861 投与群では、24 時間後や 4 日後の組織標本で、肺胞腔内の好中球浸潤がやや減少していたが (図 7b)、7 日後の組織所見は、BLM 単独投与群のものとはほぼ同様の所見が認められた。

IDM+BLM 投与群では、各々の時期において、BLM 単独投与群とほとんど同様な所見が認められた。

考 察

肺の炎症から線維化にいたる過程には、様々な炎症細胞の関与が指摘されているが、なかでも肺胞マクロファージは幅広い生物学的作用を及ぼすため¹⁹、重要な役割を担っていると考えられている。肺胞マクロファージは、肺胞内に豊富に存在するだけでなく、活性化されることにより様々なモノカインを産生することが知られている。モノカインの中でも IL-1 は、1) 好中球に対しては、試験管内²⁰⁽²¹⁾ および生体内²²⁽²³⁾ で化学走性を有し、その代謝を活性化し種々の酵素分泌を促進する²²⁽²³⁾、2) リンパ球に対しては、T リンパ球に対する化学走性を有し、さらに増殖や活性化を引き起こし¹⁴⁽²⁰⁾、種々のリンホカインの分泌を促し²⁷⁽²⁸⁾、直接ないし間接的に B リンパ球をも活性化し抗体産生を促す²⁹、また 3) 線維芽細胞は肺胞マクロファージから産生される各種モノカインによりその増殖が調節 (paracrine regulation) されていると考えられ、IL-1 もこの paracrine regulation に関与³⁰⁻³¹⁾ し、プロスタグランジン E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) の産生を促すこと³⁴⁽³⁵⁾ も知られている。

今回の著者の実験からは、BLM を気管内注入することにより、BLM で得られた肺胞マクロファージ培養上清から、IL-1 活性が 6 時間後から有意に出現し始め、12 時間後に最大値を示すことが観察された。

LPSなどで刺激しない無刺激の肺胞マクロファージ培養上清で IL-1 活性が認められるということは、BLM 気管内注入により生体内で活性化された肺胞マクロファージが、実際に生体内で IL-1 を産生していることを示すものと考えられる。肺胞マクロファージが活性化されて IL-1 を産生する詳しい機序は不明だが、Jordana ら³⁰⁾は BLM 自体が直接肺胞マクロファージを活性化し IL-1 の産生を促すことを指摘している。また BLM が肺組織に直接傷害を与えること³¹⁾から、BLM により傷害を受けた上皮細胞や肺実質細胞から産生される様々な mediators による相互作用の結果、肺胞マクロファージが活性化される側面も考えられるであろう。

BALF の炎症細胞の中では、好中球の出現が最も早期に認められ、少なくとも 6 時間後より出現し始め、ピークは 24 時間後に認められた。急性期に肺へ好中球が集積する機序としては、1) BLM 自体の好中球化学走性、2) BLM により活性化ないし傷害された肺内細胞からの好中球化学走性因子の産生、3) BLM による血清因子(補体由来の化学走性因子など)の活性化などが考えられ、1) については、Kaelin らが BLM 自体が好中球に対する化学走性を有することを指摘している³²⁾。また、2) についてはであるが、ヒト recombinant IL-1 をマウスに腹腔内投与することにより、投与後 8 時間後をピークとする好中球浸潤が出現することが報告³³⁾されている。しかもこの IL-1 の好中球遊走活性は、同じモノカインである tumor necrosis factor よりもはるかに強力であったとしている。著者の成績から、無刺激肺胞マクロファージ培養上清の IL-1 活性は BLM 投与 12 時間後にピークを示すことが観察されており、したがって、この IL-1 が、好中球の肺へ集積する現象に重要な役割を果たしている可能性が十分考えられる。

BALF リンパ球は、BLM 投与 24 時間後に有意に出現し始め、ほぼ 4 日後-7 日後にピークを示し、7 日後以後は減少傾向を示した。Kaelin らによれば³⁴⁾、BLM 自体にはリンパ球に対する化学走性はなく、肺胞マクロファージ由来のリンパ球に対する化学走性因子は BLM 投与 8 日後にピークを示すと報告している。従って、この BALF リンパ球の出現は、BLM 自体が原因とは考えにくく、肺胞マクロファージ由来のリンパ球に対する化学走性因子の関与はあっても、必ずしも主体とはいえないことになる。最近では、IL-1 がリンパ球に対する化学走性を示し、T リンパ球に活性化し増殖を促すことが指摘¹⁴⁾²⁰⁾されており、IL-1 を結合した sepharose4B という beads をマウスに気管

内注入すると、3 日後をピークとするリンパ球浸潤が sepharose4B の周囲に生じることが報告されている³⁵⁾。従って、肺胞マクロファージ由来の IL-1 が肺へのリンパ球に浸潤に一部関与している可能性が考えられる。

ところで、BALF リンパ球は、大部分が T リンパ球(平均 82-85%)よりなり、B リンパ球はそれに比べて少数(平均 1-3%)であった。BALF-T リンパ球のサブセットを検討すると、W3/25⁺細胞(ヘルパー T 細胞)と OX8⁺細胞(サブプレッサー T 細胞)の比は約 1:1 であった。Thrall らの報告によれば⁴⁰⁾、BALF リンパ球のうち T リンパ球が平均 97% を占め、B リンパ球はわずか 3% に過ぎず、T リンパ球サブセットは W3/25⁺細胞と OX8⁺細胞の比は 1:1 と報告しており、著者の成績に一致するものであった。Thrall らは⁴⁰⁾、末梢血 T リンパ球サブセットも検討しており、W3/25⁺細胞と OX8⁺細胞の比は 2:1 であり、BALF-T リンパ球サブセットとは異なると指摘している。

また、このような末梢血とは異なるサブセットを形成する BALF リンパ球は、1) 動物の BLM 肺炎に対し抗リンパ球グロブリンを前投与すると、肺内コラーゲン濃度が減少する⁴¹⁾、2) 同様に動物の BLM 肺炎において、BALF リンパ球数がピークに達する 4 日後より 10 日後にかけて肺内のコラーゲン合成が増加する⁴²⁾、3) 試験管内でリンホカインが線維芽細胞やコラーゲン合成に対して促進的に働いているといった報告⁴³⁾などから、BLM 肺炎の形成に促進的な役割を果たしていると考えられる。

リボキシゲナーゼ阻害剤(今回は AA-861 を使用した)は、単球やマクロファージに対して IL-1 遊離を抑制⁴⁴⁾し、IL-1 による好中球の活性化や様々な酵素分泌をも抑制することも報告されている²⁹⁾。従って、リボキシゲナーゼ阻害剤の投与により、BLM 肺傷害が抑制される可能性が考えられ、実際にリボキシゲナーゼ阻害剤として nordihydroguaiaretic acid を使用したモデルでは、肺胞マクロファージ由来の線維芽細胞増殖因子の自発的な産生を抑制する結果が得られている⁴⁵⁾。AA-861 は 20mg-80mg/kg の投与で、生体内におけるリボキシゲナーゼ代謝産物の産生を抑制することが知られており⁴⁶⁾、筆者は AA-861 を 40mg/kg の量を投与したが、今回の実験結果からは、肺胞マクロファージの IL-1 産生に対しては抑制効果は認められなかった。またこの群では、24 時間後、4 日後に BALF 好中球数の減少を来したが、肺胞マクロファージ由来の IL-1 産生が低下しなかったことから、この

原因として、リポキシゲナーゼ代謝産物のなかでも好中球に対する化学走性の最も強いロイコトリエン B₄ (leukotriene B₄, LTB₄)⁴⁷⁾ の生体における産生低下 (肺胞マクロファージは、比較的アラキドン酸を豊富に含み LTB₄ の産生能が高いことが指摘⁴⁸⁾ されており、生体内の LTB₄ の産生は、主として肺胞マクロファージ由来である可能性がある) により、好中球減少が生じた可能性が考えられた。ただ、AA-861 の効果も好中球数の減少にとどまり、7日後、14日後の BALF 細胞所見や組織所見に対する影響は認められなかったことから、リポキシゲナーゼ代謝産物は、BLM による急性期の炎症反応には、肺への好中球の動員という点で一部関与しても、それに引き続いておこる線維化に対する関与は、今回の我々の実験の結果からは、少ないものと考えられた。また、見方を変えれば、好中球の肺への浸潤が減少しても以後の線維化に影響が認められないことは、BLM 肺炎における線維化に関しては、好中球の果たす役割が小さいことを示すものと考えられ、この意見を支持する成績として、好中球減少マウスにおいて BLM による肺組織障害は変わらなかったという報告⁴⁹⁾ がされている。

種々の刺激により活性化した肺胞マクロファージは、IL-1 を産生する一方で、同時に PGE₂ を産生し、その PGE₂ はマクロファージの IL-1 活性を抑制し、IL-1 が T リンパ球に及ぼす効果をも抑制し、マクロファージの Ia 抗原の発現を抑制することが知られている⁵⁰⁾。以上のことから、マクロファージの IL-1 産生に関しては autoregulation が働いていると考えられている。従って、シクロオキシゲナーゼ阻害剤 (今回は IDM を使用した) を投与して、生体内における PGE₂ 産生を抑制すると、肺胞マクロファージ由来の IL-1 活性は相対的に増強し、BLM による肺病変が増悪する可能性が考えられた。IDM は、2mg/kg の投与で内因性のプロスタグランジン産生を抑制することが知られており⁵¹⁾、著者は IDM を 4mg/kg 使用したが、今回の成績からは、BALF 細胞所見や肺胞マクロファージの IL-1 産生や肺の組織所見に関しては、明らかな影響は認められなかった。すなわち、BLM による肺胞マクロファージの活性化や、後に線維化にいたる肺の炎症には、シクロオキシゲナーゼ代謝産物の関与はさきわめて少ないものと考えられた。

BLM による肺傷害や、肺胞マクロファージの活性化に関しては、アラキドン酸代謝産物の関与は少ないものと考えられ、BLM 自体やアラキドン酸代謝産物に依存しないなんらかの mediators などに関与しているものと考えられた。

今後は、1) ラット肺胞マクロファージ由来の IL-1 が、肺の線維芽細胞の増殖に関して実際の様に働くか、2) IL-1 以外のモノカインが肺胞マクロファージから産生されているのかどうか、さらに3) 治療薬としてステロイド剤がどの様な影響を及ぼすのか、以上の点についてさらに検討を加えたいと考えている。

結 論

1. ラットの BLM の気管内投与による急性期の肺傷害において、BALF 細胞成分では、6時間後より細胞数の増加が認められ、4日後にピークが認められた。

2. BALF 細胞分画に関しては、まず最初に出現するのが好中球で、6時間後より出現し始め、24時間後にピークを示した。リンパ球は、24時間後より出現し始め、4日後-7日後にかけて、ピークが認められた。

3. BALF リンパ球は、主として、T リンパ球よりなり、ヘルパー T 細胞：サブプレッサー T 細胞の比は、約 1：1 であった。

4. 無刺激肺胞マクロファージ培養上清中に、6時間後より出現し始め、12時間後にピークを示す IL-1 活性を検出することができた。これは、肺胞マクロファージの活性化を示すものである。

5. 病理所見では、BALF 細胞所見と同様な所見を示し、24時間後に好中球の浸潤が著明となり、4日後にはリンパ球浸潤が著明となった。肺の線維化は、4日後より出現し始め、14日後には細胞浸潤は軽度だが、胸膜下に強い線維化が認められた。

6. AA-861 投与群では、24時間後や4日後の BALF 好中球数の減少が認められたが、そのほかの BALF 細胞所見や肺胞マクロファージの IL-1 産生に影響は認められず、7日後以後の組織所見にも影響は認められなかった。

7. IDM 投与群では、BALF 細胞所見、肺胞マクロファージの IL-1 産生活性や組織所見に対して明らかな影響は認められなかった。

8. 従って、BLM は肺胞マクロファージの活性化を伴い (IL-1 産生で評価される)、炎症細胞浸潤および線維化にいたる肺損傷を引き起こしたが、これらの現象にはアラキドン酸代謝産物の関与は少ないものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました松田 保

教授に深謝致します。また、ご協力下さいました金森一紀先生、そして第3内科呼吸器グループの諸先生に感謝の意を表し、本研究のために、貴重な薬品を提供していただきました武田薬品工業株式会社および日本化薬株式会社に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Crystal, R. G., Gadek, J. E., Ferrans, V. J., Fulmer, J. D., Line, B. R. & Hunninghake, G. W.: Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am. J. Med.*, **70**, 542-568 (1981).
- 2) Nathan, C. F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326 (1987).
- 3) 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).
- 4) 長井苑子: リンホカインと肺の免疫-各種肺疾患におけるリンホカインの関与・意義をめぐって. *呼吸*, **5**, 244-258 (1986).
- 5) Crooke, S. T. & Bradnar, W. T.: Bleomycin, a review. *J. Med.*, **7**, 333-428 (1976).
- 6) Blum, R. H., Carter, S. K. & Agre, K.: A clinical review of bleomycin. A new antineoplastic agent. *Cancer*, **31**, 903-914 (1973).
- 7) DeLena, M., Guzzon, A., Monfardini, S. & Bonadonna, G.: Clinical, radiologic, and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC125066). *Cancer Chemother. Rep.*, **56**, 343-356 (1972).
- 8) Rudders, R. A. & Hensley, G. T.: Bleomycin pulmonary toxicity. *Chest*, **63**, 626-628 (1973).
- 9) Catane, R., Schwade, J. G., Turrisi, A. T., Webber, B. L. & Muggia, F. M.: Pulmonary toxicity after radiation therapy and bleomycin; a review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **5**, 1513-1518 (1979).
- 10) Adamson, I. Y. R. & Bowden, D. H.: The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.*, **77**, 185-198 (1974).
- 11) Snider, G. L., Celli, B. R., Goldstein, R. H., O'Brien, J. J. & Lucey, E. C.: Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced by hamsters by endotracheal bleomycin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **117**, 289-297 (1978).
- 12) Fahey, P. J., Utell, M. J., Mayewski, R. J., Wandtke, J. D. & Hyde, R. W.: Early diagnosis of bleomycin pulmonary toxicity using bronchoalveolar lavage in dogs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **126**, 126-130 (1982).
- 13) Lamontagne, L. R., Gaudie, J., Stadnyk, A. W., Richards, C. D. & Jenkins, E.: In vitro initiation of unstimulated in vitro Interleukin-1 release by alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **131**, 326-330 (1985).
- 14) Dinarello, C. A.: An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J. Clin. Immunol.*, **5**, 287-297 (1985).
- 15) Trall, R. S., McCormick, J. R., Jack, R. M., McReynolds, R. A. & Ward, P. A.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am. J. Pathol.*, **95**, 117-130 (1979).
- 16) Phan, S. M. & Kunkel, S. L.: Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by nordihydroguaiaretic acid, the role of alveolar macrophage activation and mediator production. *Am. J. Pathol.*, **124**, 343-352 (1986).
- 17) Clark, J. G., Kostal, K. M. & Marino, B. A.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *J. Clin. Invest.*, **72**, 2082-2091 (1983).
- 18) Oppenheim, J. J., Shneyour, A. & Kook, A. I.: Enhancement of DNA synthesis and cAMP of mouse thymocytes by mediator (s) derived from adherent cells. *J. Immunol.*, **116**, 1466-1472 (1976).
- 19) Willoughby, P. L., Willoughby, J. B., Cantrell, B. B. & Wheelis, R.: In vivo responses to inhaled proteins. Induction of interstitial pneumonitis and enhancement of immune complex-mediated alveolitis by inhaled concanavaline A. *Lab. Invest.*, **40**, 399-414 (1979).
- 20) Luger, T. A., Charon, J. A., Colot, M., Micksche, M. & Oppenheim, J. J.: Chemotactic properties of partially purified human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor (ETAf) for polymorphonuclear and mononuclear cells. *J. Immunol.*, **131**, 816-820 (1983).
- 21) Saunder, D. N., Mounessa, N. L., Katz, S. I., Dinarello, C. A. & Gallin, J. I.: Chemotactic cytokines: The role of leukocyte pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *J. Immunol.*, **132**, 828-832 (1986).

- 22) Sayers, T. J., Wiltrout, T. A., Bunn, C. A., Denn, III, A. C., Pilaro, A. M. & Lokesh, B.: Effect of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. *J. Immunol.*, **141**, 1670-1677 (1988).
- 23) Margaret, J. & Epps, D. E.: In vivo neutrophil emigration in response to interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Leuko. Biol.*, **45**, 62-68 (1989).
- 24) Smith, R. J., Epps, D. E., Justen, J. M., Sam, L. M., Wynalda, M. A., Fitzpatrick, F. A. & Yein, F. S.: Human neutrophil activation with interleukin-1. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3851-3858 (1987).
- 25) Smith, R. J., Bowman, B. J. & Speziale, S. C.: Interleukin-1 stimulates granule exocytosis from human neutrophils. *Int. J. Immunopharmac.*, **8**, 33-40 (1986).
- 26) Miossec, P., Yu, C. & Ziff, M.: Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin 1. *J. Immunol.*, **133**, 2007-2011 (1984).
- 27) Smith, K. A., Lachman, L. B., Oppenheim, J. J. & Favata, M. F.: The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.*, **151**, 1551-1556 (1980).
- 28) Kasahara, T., Mukaide, N., Hatake, K., Motoyoshi, K., Kawai, T. & Shiori-Nakano, K.: Interleukin 1 (IL 1)-dependent lymphokine production by human leukemic T cell line HSB. 2 subclones. *J. Immunol.*, **134**, 1682-1689 (1985).
- 29) Lipsky, P. E., Thompson, P. A., Rosenwasser, L. J. & Dinarello, C. A.: The role of interleukin 1 in human B cell activation, inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. *J. Immunol.*, **130**, 2708-2714 (1983).
- 30) Schmidt, J. A., Mizel, S. B., Cohen, D. & Green, I.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.*, **128**, 2177-2182 (1982).
- 31) Schmidt, J. A., Oliver, C. N., Lepe-Zuniga, J. L., Green, I. & Gery, I.: Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin-1. *J. Clin. Invest.*, **73**, 1461-1472 (1984).
- 32) Postlethwaite, A. E., Lachman, L. B. & Kang, A. H.: Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells. *Arthritis Rheum.*, **27**, 995-1001 (1984).
- 33) Bitterman, P. B., Wewers, M. D., Rennard, S. I., Adelberg, S. & Crystal, R. G.: Modulation of alveolar macrophage derived fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J. Clin. Invest.*, **77**, 700-708 (1986).
- 34) Elias, J. A., Gustilo, K., Braeder, W. & Freundlich, B.: Synergic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **138**, 3812-3816 (1987).
- 35) Bernheim, H. A. & Dinarello, C. A.: Effects of purified human interleukin-1 on the release of prostaglandin E₂ from fibroblasts. *Br. J. Rheum.*, **24** (Suppl. 1), 122-127 (1985).
- 36) Jordana, M., Richards, C., Irving L., B. & Gauldie, J.: Spontaneous in vitro release of alveolar-macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**, 1135-1140 (1988).
- 37) Moseley, P. L., Shasby, D. M., Brady, M. & Hunninghake, G. W.: Lung parenchymal injury induced by bleomycin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **130**, 1082-1086 (1984).
- 38) Kaelin, R. M., Center, D. M., Bernardo, J., Grant, M. & Snider, G. L.: The role of macrophage-derived chemoattractant activities in the early inflammatory events of bleomycin-induced pulmonary injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 132-137 (1983).
- 39) 笠原慶太, 小林和夫, 米谷郁世, 賀島直隆, 平泉隆, 高橋昭三: IL-1 による肺内芽腫形成について. *日胸疾会誌*, **25** (Suppl.), 138 (1987).
- 40) Thrall, R. G. & Barton, R. W.: A comparison of lymphocyte population in lung tissue and in bronchoalveolar lavage fluid of rats at various time during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **129**, 279-283 (1984).
- 41) Thrall, R. S., McCormick, J. R., Jack, R. M., Phan, S. H. & Ward, P. A.: The effect of antilymphocyte globulin on the development of

- bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat (abstract). *Am. Rev. Respir. Dis.*, **119** (Suppl.), 83 (1979).
- 42) **Phan, S. H., Trall, R. S. & Ward, P. A.** : Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats; biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **121**, 501-506 (1980).
- 43) **Wahl, S. M., Wahl, L. M. & McCarthy, J.** : Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J. Immunol.*, **121**, 942-946 (1978).
- 44) **Dinarelo, C. A., Bishai, I., Rosenwasser, L. J. & Coceani, F.** : The influence of lipoxygenase inhibitors on the in vitro production of human leukocytic pyrogen and lymphocyte activating factor (Interleukin-1). *Int. J. Immunopharmac.*, **6**, 43-50 (1984).
- 45) **Phan, S. H. & Kunkel, S. L.** : Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by nordihydroguaiaretic acid, the role of alveolar macrophage activation and mediator production. *Am. J. Pathol.*, **124**, 343-352 (1986).
- 46) **Makino, H., Ashida, Y., Kuriki, H., Terano, S. & Maki, Y.** : Role of leukotriens in rat reversed passive arthus pleurisy and the effect of AA-861, a 5-lipoxygenase inhibitor. *Int. Arch. Allerg. App. Immunol.*, **79**, 38-44 (1986).
- 47) **Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A. & Doig, M. V.** : Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, **286**, 264-265 (1980).
- 48) **Chauncey, J. B., Simon, R. H. & Peters-Golden, M.** : Rat alveolar macrophages synthesize leukotriene B₄ and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid from alveolar epithelial cell-derived arachidonic acid. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**, 928-935 (1988).
- 49) **Thrall, R. S., Phan, S. H., McCormick, J. R. & Ward, P. A.** : The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in neutrophil-depleted and complement-depleted rats. *Am. J. Pathol.*, **105**, 76-81 (1981).
- 50) **Monick, M., Glazier, J. & Hunninghake, G. W.** : Human alveolar macrophages suppress interleukin 1 (IL-1) activity via the secretion of prostaglandin E₂. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 72-77 (1987).
- 51) **Flower, R. J.** : Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol. Rev.* **26**, 33-67 (1974).

Differential Cellular Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Release of Interleukin 1 Derived from Alveolar Macrophages after the Intratracheal Instillation of Bleomycin in the Rats Kohichi Nishi, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 731—745 (1989)

Key words bleomycin-induced pneumonitis, bronchoalveolar lavage, alveolar macrophage, interleukin 1, arachidonate metabolites

Abstract

The purpose of this study was to analyze the cellular components of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and to detect the release of interleukin 1 (IL-1) activity from alveolar macrophages (AM) at various times after single instillation of bleomycin (BLM) in rats. In addition, the author examined the *in vivo* effects of inhibitors of lipoxygenase and cyclooxygenase pathways on BLM-induced pneumonitis in the rats. The results demonstrated that the inflammatory cells appear in BALF as early as 6 hours after BLM treatment. Neutrophils were the first cells to appear and the peak of neutrophil infiltration occurred 24 hours after BLM treatment. A significant increase in the number of lymphocytes was observed at 24 hours and the peak of lymphocyte infiltration occurred between 4 and 7 days after BLM treatment; T-cells were 82-85% and B-cells were 1-3%. The ratio of W3/25⁺ cells (helper cells) and OX8⁺ cells (suppressor cells) comprising the BALF-T-lymphocyte was about 1:1. There were no significant changes in the BALF-lymphocyte subpopulation. The author showed that supernatants of AM contained lymphocyte-activating factor (LAF) activity. Maximal activity was detected 12 hours after BLM treatment. IL-1 activity was barely detectable 24 hours after BLM treatment. Daily intraperitoneal injections of a lipoxygenase inhibitor, AA-861 (40mg/kg body weight), significantly inhibited neutrophil infiltration in the lung. But IL-1 activities and histological fibrotic change of the lungs were not affected by AA-861 treatment. By administration of a cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (4mg/kg), the BALF cellular findings, IL-1 activities and histological fibrotic changes in the lungs were not changed. These studies suggested that BLM-induced lung damages were associated with inflammatory cell infiltration and AM activation as assessed by the release of IL-1, and these damages followed by the development of pulmonary fibrosis were almost independent of the arachidonate metabolites.