

薬剤誘起性アレルギー性呼吸器疾患の 発症病態に関する研究

第 2 編

動物モデルによる肺好酸球症の検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

御 船 尚 志

(平成 5 年 9 月 7 日受稿)

Key words: 薬剤性呼吸器疾患, 肺好酸球症, 動物モデル, BAL, DLST

緒 言

アレルギー反応に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患は、今後その発生の増加が予想される。薬剤誘起性呼吸器疾患の臨床像については諸家の報告¹⁾²⁾があり、新たな症例の報告も次第に増加してきている。しかし、アレルギー学的側面からの薬剤誘起性呼吸器疾患の発生機序については、依然としてほとんど解明されていないのが現状であろう。その理由の一つには、十分に検討可能な症例数が少なく、種々の病態に対するアレルギー学的検索が充分に行ない難いことによると思われる。

著者は第 1 編において、アレルギー反応に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患の臨床像の検討を行ない、bronchospasm, PIE (pulmonary infiltration with eosinophilia) syndrome, IP (interstitial pneumonia) の 3 病型に分類でき、その各々に関与している免疫アレルギー反応が異なることを明らかにし、肺の反応局所の病態を直接に反映する BAL (bronchoalveolar lavage) が病態解明に有用である可能性を示した。しかし、本疾患は比較的稀な発症であるため普遍性が得がたく、また継続的に病態を追及していくことも困難である。かかる観点から実験動物モデルの確立がその病態解明には不可欠と考えられる。そこで本編では、アレルギー反応に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患の動物モデルの作成を

試み、その BAL (Bronchoalveolar lavage) 所見、組織学的検索、リンパ球の反応性の検討を行ない、興味ある成績が得られたので報告する。

対 象 と 方 法

1. 対 象

体重 250 g 前後の Hartley 系雄性モルモット 35 匹を実験対象とし、岡山大学医学部動物飼育室において、感作開始前約 2 週間検疫・飼育を行なった。なお、飼育には通常の固形飼料と水を用いた。

2. 実 験 装 置

表面に直径数 mm の多数の換気孔をあけた、ふたのついた円筒のプラスチック製吸入箱 (直径 15.0 cm, 長さ 28.0 cm) を用い、同筒の内部に 1 匹ないし 2 匹のモルモットを入れて、一端よりネブライザーを挿入して吸入暴露を行ない、他端の透明なふたより動物の観察を行なった。なお、ネブライザーは日商式吸入用ネブライザー (日本商事製) に日商式吸入用コンプレッサー N 型 (日本商事製) を接続して行なった。

3. 抗原および adjuvant

抗原としては PIPC (piperacillin sodium, 富山化学) を生理的食塩水で溶解して 3 % PIPC 溶液を作成し、これを等量の CFA (complete Freund's adjuvant, 和光純薬) と混和して懸濁液とした。

4. 感 作 方 法

3% PIPC 懸濁液を0.2mlずつモルモット背部に皮下注射した。これを1週間ごとに4回繰り返すことにより感作を行なった(n=16)。なお、CFA のみ (n=6) あるいは PIPC のみ (n=6) で感作を行なったモルモットおよび無感作 (n=7) のモルモットを対照群とした。

5. 抗 原 暴 露

感作終了1週間後に、生理的食塩水にて調製した20% PIPC 溶液1.5mlを、ネブライザーを用いて吸入暴露させた。

6. 病理組織標本

吸入暴露24時間後に、モルモット・pentobarbital sodium (Abbot laboratories) 40mg/kgの麻酔後、心臓を穿刺脱血して死亡させた。気管

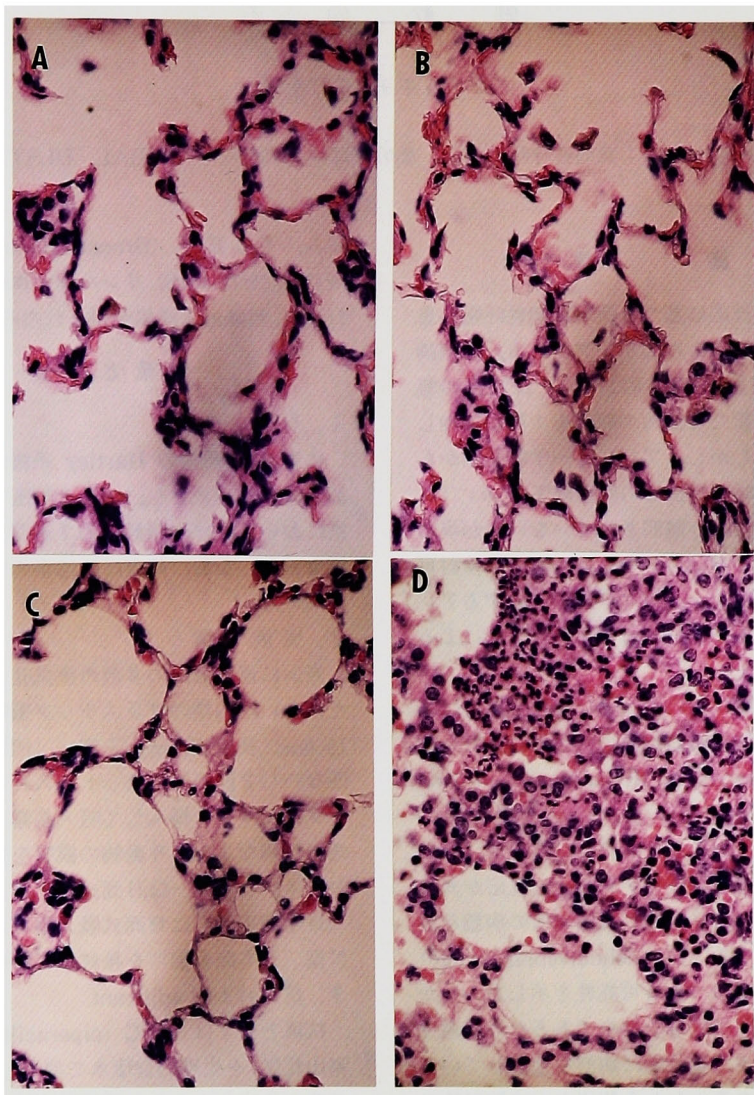


Fig. 1 Histological findings of lungs after antigen challenge. A: non-sensitized animal, B: 3% PIPC sensitized animal, C: CFA sensitized animal, D: 3% PIPC+CFA sensitized animal. No abnormal findings are present in A, B and C. Diffuse alveolitis with intense inflammatory cell infiltration including eosinophils and mononuclear cells were shown in D.

切開後、14-gauge ポリエチレン製カテーテルを挿管し、横隔膜を切開し開胸後、70mlの heparin 溶液（2 units heparin/ml 0.9% saline）を右心より肺血管に注入し、血管床内の血球を除き、心臓と肺を一塊として摘出して生理的食塩水に浸した。ついで組織学的検討に供するために、左主気管支を結紮した後に左側肺を摘出し、10%ホルマリンを気管から注入して伸展固定した。固定肺標本をパラフィン包埋した後、切片を5 μ mに薄切して組織標本とし、型のごとく Hema-toxylin-Eosin 染色を行なって光学顕微鏡で観察した。

7. Bronchoalveolar lavage

右側肺は生理的食塩水30mlを用い、挿入したカテーテルより1回2.5mlずつ注入回収を繰り返して BAL を行なった。BAL 液は500 g、10分間遠沈後、RPMI 1640 (Gibco) に再浮遊させた。Bürger-Turk の血球計算盤で有核細胞数を算定し、サイトスピンにて細胞成分をスライドグラスに付着・固定後、May-Giemsa 染色にて細胞分類を行ない、細胞比率を算出した。

8. Drug lymphocyte stimulation test (DLST)

BALF 中のリンパ球を分離するため、遠沈した BAL の沈査を10mlの RPMI 1640に再浮遊し、その細胞浮遊液を10mlの sodium diatr-

izoate ($d=1.142$ g/ml) (Sigma) 上に重層し、4℃にて600 g、4分間遠沈した³⁾。遠沈後境界面より単核球を回収し、RPMI 1640で洗浄後、 5×10^5 cell/mlとなるように100 μ g/ml streptomycin 及び100 units/ml penicillin-G 含有 RPMI 1640 に再浮遊させた。この細胞浮遊液に、PIPC、モルモット血清を添加し、37℃で72時間培養した。

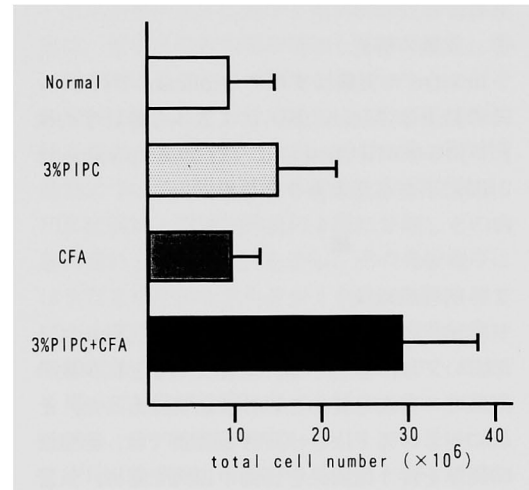


Fig. 2 Total cell number in BALF recovered from control and sensitized animals. The number increased significantly in response to 3% PIPC+CFA sensitization.

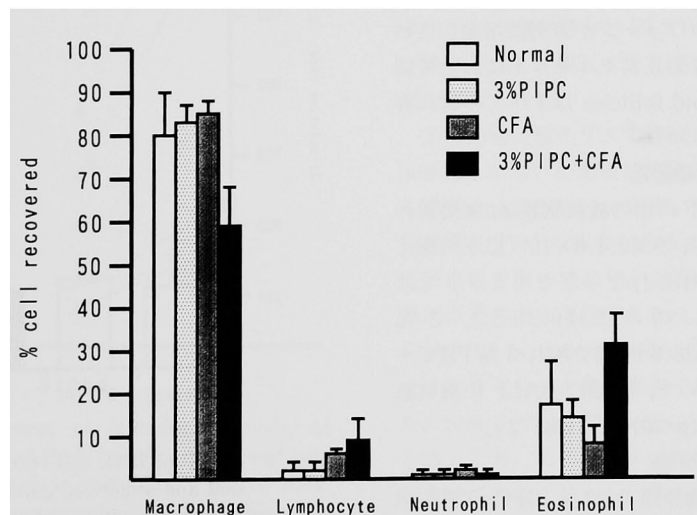


Fig. 3 Proportion of cells recovered by lavage of control and sensitized guinea pigs. There were significant increases in lung lymphocytes and eosinophils in 3% PIPC+CFA sensitized animals.

ついで、 ^3H -thymidine ($1\mu\text{Ci/ml}$) を加えて24時間培養し、放射活性の酸不溶分画への取り込みを liquid scintillation counter で測定した。DLST の成績は、薬剤添加培養の ^3H -thymidine uptake (dpm/well) と無添加培養の ^3H -thymidine uptake の比 (stimulation index; S.I.) で表した。また、モルモット末梢血からも同様の方法でリンパ球を分離し、DLST を測定した。

9. 成績の解析

in vitro の実験はすべて triplicate で行ない、その結果は Mean $\pm$ SD にて表示し推計学的検討は Student's t test により行ない、p value は 0.05 以下を有意差ありとした。

結 果

1. 病理組織像

非感作群 (Fig. 1A), CFA 感作群 (Fig. 1C) においては、肺胞中隔、気管支壁などに少数の好酸球の存在を認めた以外は正常であった。それに対し 3% PIPC+CFA 感作群では、肺胞壁の肥厚を伴う胞隔炎を16例中12例で認め、気管支壁、肥厚した肺胞中隔に好酸球、単核球の浸潤が多数認められた。胞隔への単核球浸潤は他の3群でも軽度認められたが、3% PIPC+CFA 感作群と比較し、明らかに少数であった。また、3% PIPC+CFA 感作群における胞隔炎では、肺胞マクロファージが著明に増加していた (Fig. 1D), なお正常モルモットにおいて認められる lymphoid follicles はすべての群に存在した。

2. BAL 液中総細胞数

回収した BALF 中の総細胞数は、無処置の正常モルモットで、 $9.6\pm 4.0\times 10^6$ (以下同様)、3% PIPC で感作を行なったモルモットでは 14.2 ± 6.3 , CFA のみでは 9.2 ± 2.4 , 3% PIPC+CFA では 28.6 ± 9.2 であり、3% PIPC+CFA 感作群において、有意に BALF 中細胞数は増加していた ($p<0.05$) (Fig. 2)。

3. BAL 液細胞分画

BALF 中の細胞分類で、3% PIPC+CFA 感作群において好酸球が $31.1\pm 6.5\%$ と増加しており、非感作群および他の2群に比べて有意の増

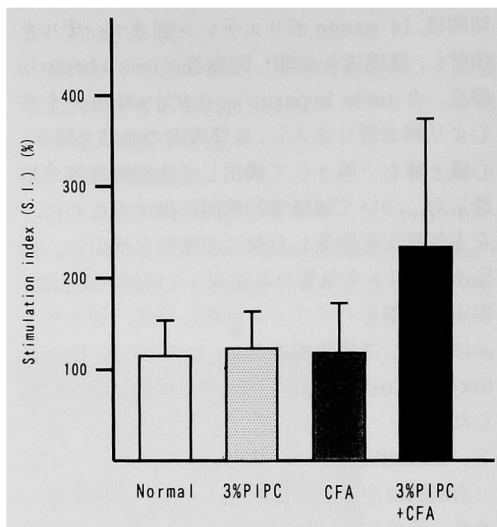


Fig. 4 DLST of peripheral leukocyte from normal and sensitized guinea pigs. Stimulation index (S.I.) of DLST from 3% PIPC+CFA sensitized animal revealed high value, but not significantly.

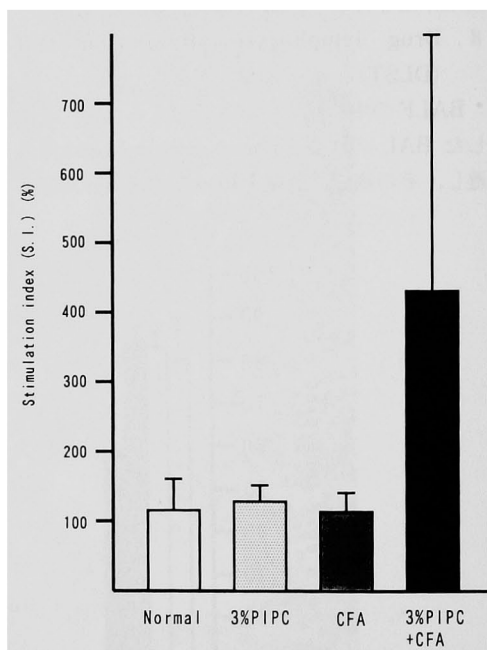


Fig. 5 DLST of BAL cell recovered from normal and sensitized guinea pigs. Stimulation index (S.I.) of DLST from 3% PIPC+CFA sensitized animal revealed significant high value.

加を示した ($p < 0.05$), リンパ球は, 3% PIPC + CFA 感作群において $9.1 \pm 5.2\%$ であり, 非感作群, 3% PIPC 感作群に比べ, 有意に増加していた ($p < 0.01$, $p < 0.01$). また好中球も, CFA 感作群において較度に増加していたが, 有意差は認められなかった (Fig. 3).

4. DLST

末梢血における DLST (drug lymphocyte stimulation test) は, 非感作群及び 3% PIPC 感作群, CFA 感作群の 3 群とも同様の S.I. 値を示した. 一方 3% PIPC + CFA 感作群における DLST は $S.I. = 236.3 \pm 134.8\%$ と高値を示す傾向を認めたが, 他の 3 群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 4).

BALF 中のリンパ球を用いた DLST は, 非感作群, 3% PIPC 感作群, CFA 感作群ともに, 末梢血のそれと同様に 3 群とも同程度の S.I. 値を示した. しかし 3% PIPC + CFA 感作群における DLST は, $S.I. = 432.4 \pm 376\%$ と他の 3 群に比し有意に高値を示した ($p < 0.02$) (Fig. 5).

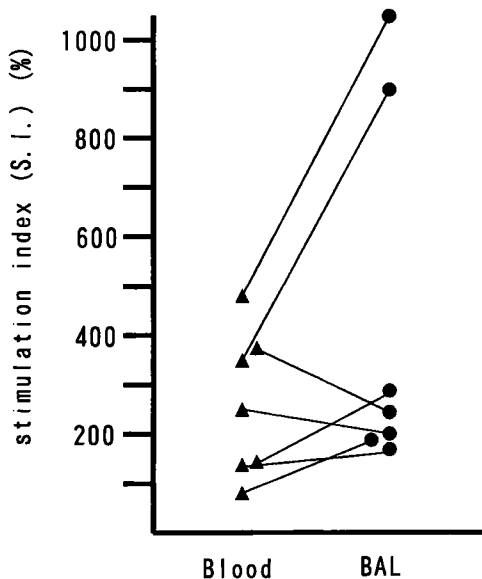


Fig. 6 Comparison of stimulation index of blood and BAL lymphocyte. Results are illustrated an individually paired data. Five of seven animals revealed higher S.I. value of BAL lymphocytes than those of blood cells.

3% PIPC + CFA 感作群 7 匹において, 末梢血と BAL の DLST を測定したが, その両者間には有意な差は認められなかった. 一方, BAL 中のリンパ球を用いて行なった DLST は高値を示す傾向が認められ, そのうち 2 匹は末梢血と比較して著明に高値を示した (Fig. 6).

考 察

アレルギー反応に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患は, 近年その報告例が増加してきており, 特に抗生剤によるものの増加が著しい⁴⁾. しかしその症例は限られており, 現在にいたるも比較的稀な疾患と考えられている. 著者は第 1 編で自験例についての臨床解析を行ない, 気管支攣縮・PIE 症候群・間質性肺炎の 3 型に分類しその病態の違いを検討した. しかし, その発症機序にはまだまだ不明な点も少なくないため, 本編ではかかるアレルギー反応に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患の機序を詳細に解明する目的で, PIPC を用いて好酸球浸潤を呈する動物モデルの作成を試み, その病態を検討した. その結果, CFA と PIPC を併用して感作を行なった群では肺胞壁への多数の好酸球・単核球の浸潤を伴う胞隔炎を認め, 肺好酸球症に一致する病理所見であった. また, 気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の総細胞数, 好酸球比率も CFA あるいは PIPC 単独感作群に比し, 有意に増加しており, BAL 液中のリンパ球を用いた DLST では, 末梢血リンパ球のそれと比較してより高い S.I. 値を示す傾向が認められた.

まず動物実験モデルの作成については, ovalbumin を用いた過敏性肺臓炎の動物実験モデル^{5,6)}や, ascaris suum を用いた肺好酸球症の動物実験モデル⁷⁾の報告があるが, これは抗原として蛋白質を用いており, 1 価の hapten である薬剤にそのまま適応できない. 一方, Schneider⁸⁾や村中⁹⁾は benzylpenicillin (PcG) に対するアナフィラキシーを動物実験で報告しており, また, Sun ら¹⁰⁾は, Polymyxin B のエアゾールを吸入させ, モルモットに好酸球性胞隔炎を惹起させている. しかし, Polymyxin B は肥満細胞の脱顆粒をおこさせる作用をもち, 肥満細胞から放出された ECF (eosinophil chemotactic

factor)の作用で好酸球性胞隔炎を惹起しているとも考えられる。

今回検討したモデルでは piperacillin (PIPC) を用い、complete Freund's adjuvant (CFA) と混合投与して感作を行なった。その結果、肺組織において胞隔の肥厚、好酸球・リンパ球の胞隔への浸潤、肺胞マクロファージの増加が特徴的な alveolitis の所見が認められた。これは、ヒトの薬剤誘起性肺好酸球症の病理組織所見である多数の好酸球、マクロファージを混じた間質と肺胞の水腫像¹¹⁾とはほぼ一致した。また、PIPC のみ、あるいは CFA のみを投与した群に比較し、BAL 中の総細胞数および好酸球の有意な増加を認めた。正常のモルモットの BAL 中には 15%前後の好酸球が認められる¹⁰⁾が、今回検討したモデルにおいては非感作群・3% PIPC 感作群は正常モルモットと同程度の値を示し、PIPC 皮下投与あるいはエアゾール吸入では、好酸球の増加は生じないことが示された。また、CFA 単独感作群においては、むしろ好酸球比率は正常より低下していた。これは CFA 処置動物に出現する好酸球遊走抑制因子¹²⁾によるものと考えられる。

呼吸器領域ではないが、池澤ら¹³⁾はモルモットにはほぼ同様な方法によって感作を成立させ、その後腹腔内に抗原を投与することによって、実験的薬疹 (generalized rash) を誘発したことを報告している。この generalized rash は、感作リンパ球によるトランスファーが可能であることから、細胞性免疫によるものと考えられている¹⁴⁾。しかし、この generalized rash の組織学的所見は、表皮下への好塩基球の浸潤を特徴とする cutaneous basophil hypersensitivity¹⁵⁾に一致することも報告されている¹⁶⁾。今回検討したモデルでは好酸球の増加・浸潤を特徴としており、肺と皮膚の臓器の違いにより池澤らのモデルとは解離が認められるものと考えられるが、Polymyxin B による肺好酸球症のごとく、肥満細胞あるいは好塩基球を介した好酸球集簇の可能性も考えられる。

Drug lymphocyte stimulation test (DLST) は報告者により陽性率が異なり、感受性を高める試みが種々行なわれているが、第1編で示唆

した様に、反応局所である肺胞・気道の細胞を用いた DLST では鋭敏な反応を示す可能性がある。今回のモデルでは、3% PIPC+CFA で感作した群のみ、末梢血を用いた場合と比べ BAL 中のリンパ球が高い S.I. 値を示した。さらに末梢血および BAL の両者を検討した7匹では有意差は認められなかったが5匹が高値を示し、そのうち2匹が著明な高値を示した。有意差が得られなかった理由として、BAL の場合にはリンパ球の分離時にマクロファージが大量に混入することが影響している可能性がある。このためリンパ球分画分離後、更にマクロファージを分離した上で DLST を検討する必要があるだろう。また、池澤ら¹⁷⁾は実験的薬疹を惹起した動物モデルにおける DLST を全血を用いて検討しており、薬剤によって特異的にリンパ球増殖を抑制するものと、逆に感作の有無にかかわらずリンパ球増殖を亢進する mitogenetic activity を有するものが存在することを報告している。今回用いた PIPC では、抑制や非特異的反応亢進は認められなかったが、DLST を広く応用するためには更に検討が必要であろう。

以上、ヒトの検討が困難なアレルギー性の薬剤性呼吸器疾患の動物実験モデルを検討し、その発症病態にはヒトと同様に好酸球とリンパ球の関与が想定され、診断と治療への指針となり得るものと考えられ、今後の更なる研究が望まれる。

結 語

アレルギー機序に基づく薬剤誘起性呼吸器疾患の動物実験モデルの作成を試み、その際の細胞組織学的検討を行ない、以下の結果を得た。

1. complete Freund's adjuvant (CFA) と抗原 (PIPC) を併用した場合には、それぞれの単独投与と比較して肥厚した肺胞中隔が認められ、多数の好酸球・単核球浸潤がみられた。また、肺胞マクロファージも増加し、肺好酸球症に一致する所見であった。

2. CFA と抗原を併用した群においては、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球比率は単独投与と比較して有意に増加していた ($p < 0.05$, $p < 0.05$)。

3. 気管支肺胞洗浄液中のリンパ球を用いた drug lymphocyte stimulation test (DLST) は、末梢血リンパ球のそれと比較し、より高い stimulation index (S.I.) 値を示す傾向が認められた。

以上より、動物モデルの病態の研究は、薬剤誘起性アレルギー性呼吸器疾患の機序解明に有益であり、特に反応局所である肺・気道の細胞は病態をより明確に反映することが示唆された。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝するとともに、終始懇切なる御指導と助言を頂きました高橋清講師に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第39回日本アレルギー学会総会（平成元年9月29日）において発表した。

文 献

- 1) Cooper JAD, White DA and Matthay RA : Drug-induced pulmonary disease. Part 2: noncytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis* (1986) **133**, 488—505.
- 2) Rosenow EC : Drug-induced bronchopulmonary pleural disease. *J Allergy Clin Immunol* (1987) **80**, 780—787.
- 3) Gleich GJ and Loegering D : Selective stimulation and purification of eosinophils and neutrophils from guinea pig peritoneal fluids. *J Lab Clin Med* (1973) **82**, 523—528.
- 4) 近藤有孝 : 間質性肺炎. *最新医学* (1990) **45**, 962—972.
- 5) Richerson HB, Cheng FHF and Bauserman SC : Acute experimental hypersensitivity pneumonitis in rabbits. *Am Rev Respir Dis* (1971) **104**, 568—575.
- 6) 原田 寛 : 呼吸器アレルギーにおける肺の組織学的研究. 第2編 実験的感作における肺の組織学的検討. *岡山医誌* (1980) **92**, 531—544.
- 7) 野上 誠, 須甲松信, 奥平博一, 宮本昭正, 志賀淳治, 粕谷志郎 : 肺好酸球症のマウスモデル. *炎症* (1989) **9**, 205—208.
- 8) Schneider CH, Guenin R and Toffler O : Penicillin derivatives as monovalent elictors of anaphylaxis: The importance of the thiozolidine moiety. *Mol Immunol* (1981) **18**, 341—352.
- 9) 村中正治, 水井 晃, 大利隆行 : 薬物による過敏反応に関する新しい知見. *内科* (1987) **59**, 655—663.
- 10) Sun X, Davis WB, Fukuda Y, Ferrans VJ and Crystal RG : Experimental polymyxin B-induced interstitial lung disease characterized by an accumulation of cytotoxic eosinophils in the alveolar structures. *Am Rev Respir Dis* (1985) **131**, 103—108.
- 11) 吉田 稔, 中西真之 : 薬物誘発性 PIE 症候群. *最新医学* (1990) **5**, 973—978.
- 12) Hirashima M, Tashiro K and Hayashi H : The regulation of tissue eosinophilia. I. Coexistence of chemotactic factor and inhibitor in allergic skin lesions of complete Freund's adjuvant-treated guinea pigs.
- 13) 池澤善郎, 永井隆吉 : モルモットにおける penicillin 疹および cephalosporin 疹の研究 —実験的薬疹における細胞性免疫と血中抗体—. *日皮会誌* (1981) **91**, 419—431.
- 14) 北村和子, 池澤善郎, 村上淳子, 永井隆吉, 岩田正之 : ペニシリンおよびセファロスポリンによる generalized rash (実験的薬疹) の免疫学的性質について. *アレルギー* (1980) **29**, 503.
- 15) Dvorak HF, Hammond ME, Colvin RB, Manscau EJ and Goodwin J : Systemic expression of cutaneous gasophil hypersensitivity. *J Immunol* (1977) **118**, 1549—1557.
- 16) 北村和子, 池澤善郎, 村上淳子, 永井隆吉 : 実験的薬疹と systemic cutaneous busophil hypersensitivity. *日皮会誌* (1981) **91**, 829—835.
- 17) 池澤善郎, 北村和子, 村上淳子, 長岡英和, 永井隆吉 : モルモットの実験的 Penicillin 疹および Cephalosporin 疹における全血を用いたリンパ球幼若化試験. *アレルギー* (1981) **30**, 124—137.

Studies on respiratory disorders induced by drug allergy
Part 2. Experimental studies of drug allergy in guinea pigs

Takashi MIFUNE

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School.

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify the pathogenesis of respiratory disease induced by drug allergy, an animal model of eosinophilic lung disease induced by drug was developed. Administration of an aerosol of piperacillin (PIPC) to guinea pigs immunized with emulsion of PIPC and complete Freund's adjuvant (CFA) produced diffuse interstitial lung disease with alveolar wall thickening and alveolitis characterized by marked increase in eosinophils and mononuclear cells. A significant increase of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid was shown in PIPC+CFA-sensitized animals compared with that in non-sensitized, PIPC-sensitized and CFA-sensitized animals. Using lymphocytes from BAL fluid, drug lymphocyte stimulation test (DLST) revealed a higher stimulation index (S. I.) than that using lymphocytes from peripheral blood in 5 of seven animals.

These findings suggest that eosinophils and lymphocytes (especially lymphocytes sensitized by antigen) play important roles in drug-induced respiratory disease. Furthermore, it is considered that lung lymphocytes were more active than lymphocytes in peripheral blood in the experiment, and local lymphocytes in BAL contributed to the pathogenesis of the respiratory disease induced by drug allergy.