

β鎖抗体(c)、抗γ鎖抗体(d)単独投与ではT細胞の増殖を抑制できなかった。抗α鎖抗体に抗β鎖抗体又は抗γ鎖抗体を併用した場合や(e、f)さらには3抗体を併用すると(h)60%の抑制が認められた。これらの併用投与は抗α鎖抗体単独投与との間に有意差を認めた(Fig. 1)。

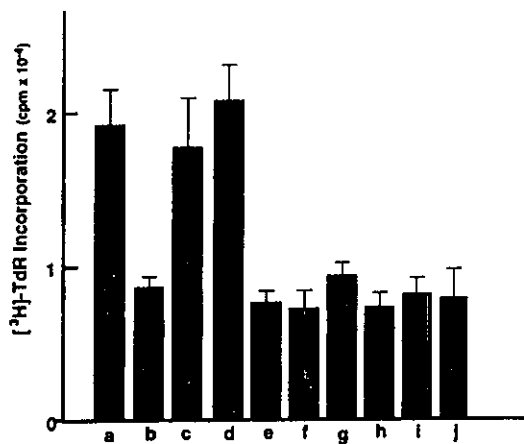


Fig. 1. Effects of anti-IL-2R mAb on MLR. Responder spleen cells of C57BL/6 mice were co-cultured with irradiated stimulator spleen cells of BALB/c mice for 5 days in 96-well round-bottomed microtiter plates in the presence of purified mAb. (a) 15 µg of REY-7 control mAb, (b) 5 µg of anti-IL-2Rα mAb (PC 6153) and 10 µg REY-7, (c) 5 µg of anti-IL-2Rβ mAb (TUm122) and 10 µg of REY-7, (d) 5 µg of anti-γ<sub>c</sub> mAb (TUGm2) and 10 µg of REY-7, (e) 5 µg of anti-IL-2Rα mAb, 5 µg of anti-IL-2Rβ mAb and 5 µg of REY-7, (f) 5 µg of anti-IL-2Rα mAb, 5 µg of anti-γ<sub>c</sub> mAb and 5 µg of REY-7, (g) 5 µg of anti-IL-2Rβ mAb, 5 µg of anti-γ<sub>c</sub> mAb and 5 µg of REY-7, (h) 5 µg of anti-IL-2Rα mAb, 5 µg of anti-IL-2Rβ mAb and 5 µg of anti-γ<sub>c</sub> mAb, and (i) 5 µg of anti-IL-2 mAb (S4B6) and 10 µg of REY-7. The responder cells were also stimulated with syngeneic C57BL/6 spleen cells (j). During the last 18 h of culture, 1.0 µCi [<sup>3</sup>H]thymidine was pulsed. Radioactivities incorporated into the cells were counted. Results are represented as mean ± SD in triplicate assays; (b) and (e-i) are P < 0.05.

## b) 末梢リンパ球分画

スライド上段のT細胞の分画はCD4陽性細胞、CD8陽性細胞とも無処置群、コントロール抗体投与群、抗α鎖、抗β鎖、抗γ鎖抗体併用群で有意差を認めないが、下段のNK細胞は抗体併用群で0.29%と明らかに減少していた(Fig. 2)。

## c) 特異的CTL活性

上段のCBA/Nを刺激細胞とした系と下段のBALB/cを刺激細胞として用いた系で検討したが、いずれの系に於いてもα、β、γ鎖の3抗体を併用した群で最も強い抑制効果を認めた(Table. 1)。

## d) 皮膚移植生着延長効果

抗α抗体投与では僅かな生着延長効果しか認めなかったが、抗α抗体に抗β抗体を併用した群では延長効果が認められ、さらに抗γ鎖抗体を併用すると著名な延長効果が認められた(Fig. 3)。

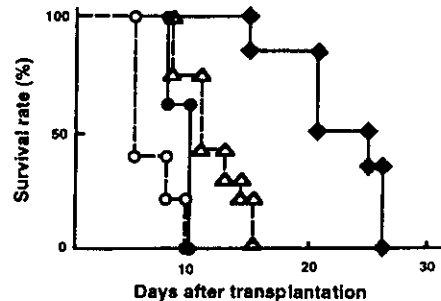


Fig. 3. Effects of anti-IL-2R mAb on MHC-compatible skin allografts. Tail skin grafts of BALB/c (H-2<sup>d</sup>) mice were transplanted onto the tails of CBA/N(H-2<sup>k</sup>) mice. Recipient mice were administered i.p. with anti-IL-2R mAb on days 0, 2, 4, 6 and 8 after transplantation. Five mice were administered with 300 µg of REY-7 control mAb (O), five mice were administered with 300 µg of anti-IL-2Rα mAb, PC6153 (o), 10 mice were administered with 150 µg each of anti-IL-2Rα mAb and anti-IL-2Rβ mAb, TUm122 (Δ), and six mice were administered with 100 µg each of anti-IL-2Rα mAb, anti-IL-2Rβ mAb and anti-γ<sub>c</sub> mAb, TUGm2 (◇). Grafts were visually monitored daily.

## 2. 臨床例における検討

### a) 生体部分肝移植での検討

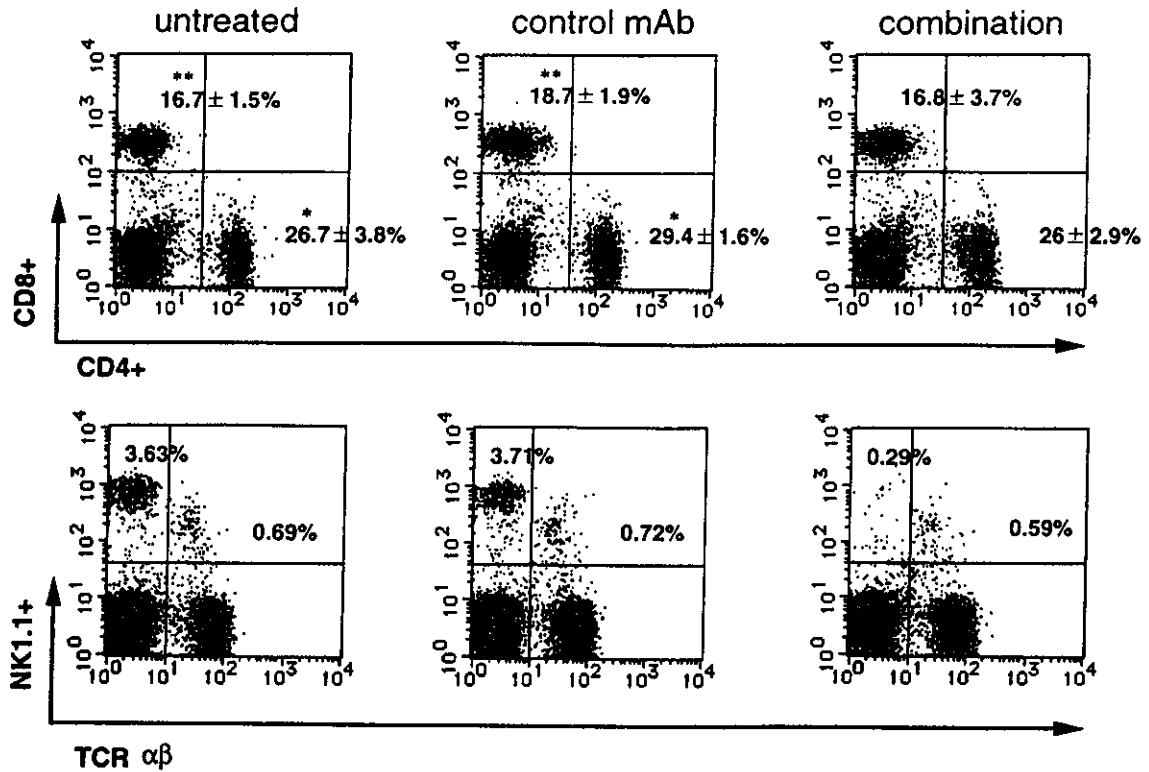
T細胞受容体の術前後の末梢血での比率には変化を認めなかった。しかし、移植前のリンパ球混合培養後には、レシピエントとドナーのHLAにかかわらずVα31、Vβ133が上昇し、Vα23、Vα61、Vα241、Vα251、Vβ201は減少した(Fig. 4)。

### b) 腎移植における末梢マイクロキメリズムの成立と拒絶反応

donor specific transfusion を移植前に施行した例は高率に末梢血キメリズムが成立していた。また identicalな双生児間の移植では全例にキメリズムが成立していた。拒絶反応の発生頻度やその強さでは有意差がなかった。

### c) 腎移植長期生着者へのステロイド離脱の試み

10例中4例がステロイドを離脱し、内2例に高脂血症の改善を認めた。3例が拒



**Fig. 2.** Immunofluorescence analysis for T and NK cell populations in spleens of mice treated with anti-IL-2R mAb. C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice were administered with purified mAb: no mAb (untreated), 300 µg of REY-7 (control mAb), and 100 µg each of anti-IL-2R $\alpha$  mAb, anti-IL-2R $\beta$  mAb and anti- $\gamma_c$  mAb (combination), on days 0, 2 and 4. On day 5, splenocytes of the mice were subjected to flow cytometric analyses; they were incubated with 20 µl of blocking reagents [culture supernatant containing anti-Fc $\gamma$ R1I mAb (2.4G2) in 50% normal rat serum and 0.02% NaN<sub>3</sub>] on ice for 30 min, then stained with anti-CD4 mAb (H129.19), anti-CD8 $\alpha$  mAb (53-6.7) and anti-NK1.1 mAb (PK136) on ice for 30 min, and analyzed with a flow cytometer (FACScan) after washing. The percentage of positively stained cells is indicated by the number in each quadrant. \**P* < 0.005, \*\**P* < 0.05

**Table 1.** Effects of anti-IL-2R mAb on *in vivo* allospecific CTL induction

Mice	<i>In vivo</i> treatment	Allospecific CTL				
		Stimulator	Target	E:T ratio		
				200:1	100:1	50:1
CBA/N (n = 5)	Control	BALB/c	P815	22.1 ± 3.9 <sup>a</sup>	17.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	13.0 ± 2.8 <sup>a</sup>
	$\alpha$	BALB/c	P815	22.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	18.0 ± 0.7 <sup>d</sup>	9.4 ± 2.0 <sup>a</sup>
	$\alpha + \gamma_c$	BALB/c	P815	27.2 ± 4.8 <sup>b</sup>	20.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	9.4 ± 1.7 <sup>c</sup>
	$\alpha + \beta$	BALB/c	P815	10.3 ± 3.2 <sup>b</sup>	5.6 ± 1.0 <sup>c</sup>	4.1 ± 1.3 <sup>a</sup>
	$\alpha + \beta + \gamma_c$	BALB/c	P815	5.6 ± 1.2 <sup>c</sup>	3.6 ± 1.6 <sup>c</sup>	3.3 ± 1.0 <sup>b</sup>
BALB/c (n = 3)	Control	C57BL/6	EL-4	59.6 ± 7.4 <sup>a</sup>	46.0 ± 8.2 <sup>a</sup>	36.5 ± 9.2 <sup>a</sup>
	$\alpha$	C57BL/6	EL-4	66.0 ± 2.8 <sup>a</sup>	56.4 ± 3.7 <sup>a</sup>	44.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
	$\alpha + \gamma_c$	C57BL/6	EL-4	66.5 ± 8.3 <sup>b</sup>	58.8 ± 7.2 <sup>b</sup>	45.1 ± 7.0 <sup>b</sup>
	$\alpha + \beta$	C57BL/6	EL-4	34.2 ± 7.7 <sup>d</sup>	23.7 ± 7.2 <sup>b</sup>	15.4 ± 5.4 <sup>b</sup>
	$\alpha + \beta + \gamma_c$	C57BL/6	EL-4	26.0 ± 5.9 <sup>d</sup>	17.2 ± 3.7 <sup>c</sup>	10.6 ± 1.8 <sup>b</sup>

CBA/N (H-2<sup>k</sup>) and BALB/c (H-2<sup>d</sup>) mice were i.p. immunized with splenocytes of BALB/c (H-2<sup>d</sup>) and C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice respectively. The mice were then treated with mAb: 300 µg REY-7 (control), 300 µg PC615.3 ( $\alpha$ ), 150 µg each of PC615.3 and TUM122 ( $\alpha + \beta$ ), and 100 µg each of PC615.3, TUM122 and TUGm2 ( $\alpha + \beta + \gamma_c$ ), on days 0, 2 and 4 after immunization. On day 5, spleens were removed and splenocytes were used as effector cells in a <sup>51</sup>Cr-release assay with radiolabeled P815 (H-2<sup>d</sup>) or EL-4 (H-2<sup>b</sup>) target cells. Results are represented as mean  $\pm$  SD in triplicates.

<sup>a</sup>Not significant, <sup>b</sup>*P*  $\leq$  0.005, <sup>c</sup>*P*  $\leq$  0.01, <sup>d</sup>*P*  $\leq$  0.05.

絶反応、1例がステロイド離脱症状で離脱が出来なかった。拒絶反応出現例はサイクロスポリンのTrough levelが離脱例に比べて低かった (Fig. 5)。

#### D. 考察

抗IL-2受容体の $\alpha$ 鎖や $\beta$ 鎖にたいする抗体が免疫抑制効果を持つことは、腎移植や心移植の臨床で報告されている。しかしその効果は抗Tリンパ球抗体の効果と同程度とされている。一方、活性化されたTリンパ球のIL-2受容体は $\gamma$ 鎖を含んでいることが知られている。また $\gamma$ 鎖はIL-2のみならずNK細胞等の活性に関与するサイトカインの受容体の構成成分になっており、 $\gamma$ 鎖に対する抗体はCTLやNK細胞を効果的に抑制し、同種移植に効果的に働くと考えられる。今回の検討では、アロ抗原刺激に反応したT細胞の増殖を表すリンパ球混合培養試験は抗IL-2 $\alpha$ 鎖抗体の単独投与で三者併用投与と同等の抑制効果を示した。このことは抗IL-2 $\alpha$ 鎖抗体が、マウスの抗親和性IL-2受容体に対してIL-2が結合するのを完全に阻害するとするこれまでの報告と一致する。しかしながら、同種皮膚移植では三者併用群が明らかに強い免疫抑制効果を示した。この原因としては抗 $\gamma$ 鎖抗体が、IL-2以外のサイトカインでT細胞やNK細胞の増殖に関与するIL-4、IL-7、IL-9、IL-15の機能を抑制することで、結果として移植片の生着延長に寄与した可能性がある。またIL-2欠損マウスでも野生型に比較して低いものの十分にラ氏島移植を拒絶出来るだけのCTL活性がある事が報告されており、CTLの活性化でも他のサイトカインが関与する経路の存在が示唆される。本研究に於いても、CTLの誘導では三者併用群が、抗 $\alpha$ 鎖抗体単独投与よりも強い抑制効果を示しており、他のサイトカインの関与を強く示唆する結果と思われる。今後は、これら

の抗体をヒト型に変えて臨床例で応用することが必要になろう。

臨床例の検討では、生体部分肝移植の末梢血T細胞のV $\alpha$ 、V $\beta$ 陽性細胞に何らかの分布異常が出現し、あるクローンの消失や特異的な増加が移植の生着と関連するのではとの予想からの検討したが差を認めなかった。しかし、移植前のリンパ球混合培養試験での反応細胞のレパートリーには、HLAに関わり無く一定のレパートリーの増減傾向が認められた。これらの結果は移植後の末梢血の変化に反映されていないが、外来で経過観察中の症例でV $\beta$ 133が上昇している2名の患者に肝機能の悪化が認められており、これらのレパートリーの上昇と拒絶反応の関わりに関しては今後の検討が必要と思われる。

またスターツル等が報告している末梢のマイクロキメリズムと免疫学的寛容との関連を腎移植患者で検討したが、拒絶反応の頻度、強さはキメリズムの成立と関係がなかった。今回はPCR法を用いての検討であり、末梢キメリズムの強さを定量的には測定できなかったために寛容の成立との関連を証明できなかった可能性もあり、今後、測定法を含めての検討が必要となろう。

長期生着している腎移植患者のステロイド離脱はより容易に行えると予想していたが、中止後に30%程度の拒絶反応例が出現した。比較的簡単に離脱できた症例はステロイド以外の免疫抑制剤が非離脱例に比し高かったことを考えると、5年以上経過した例でも全例が免疫学的寛容状態を獲得しているとは言えない。これらの症例間でいかなる免疫学的反応の差が有るのかは今後慎重に検討していく必要がある。

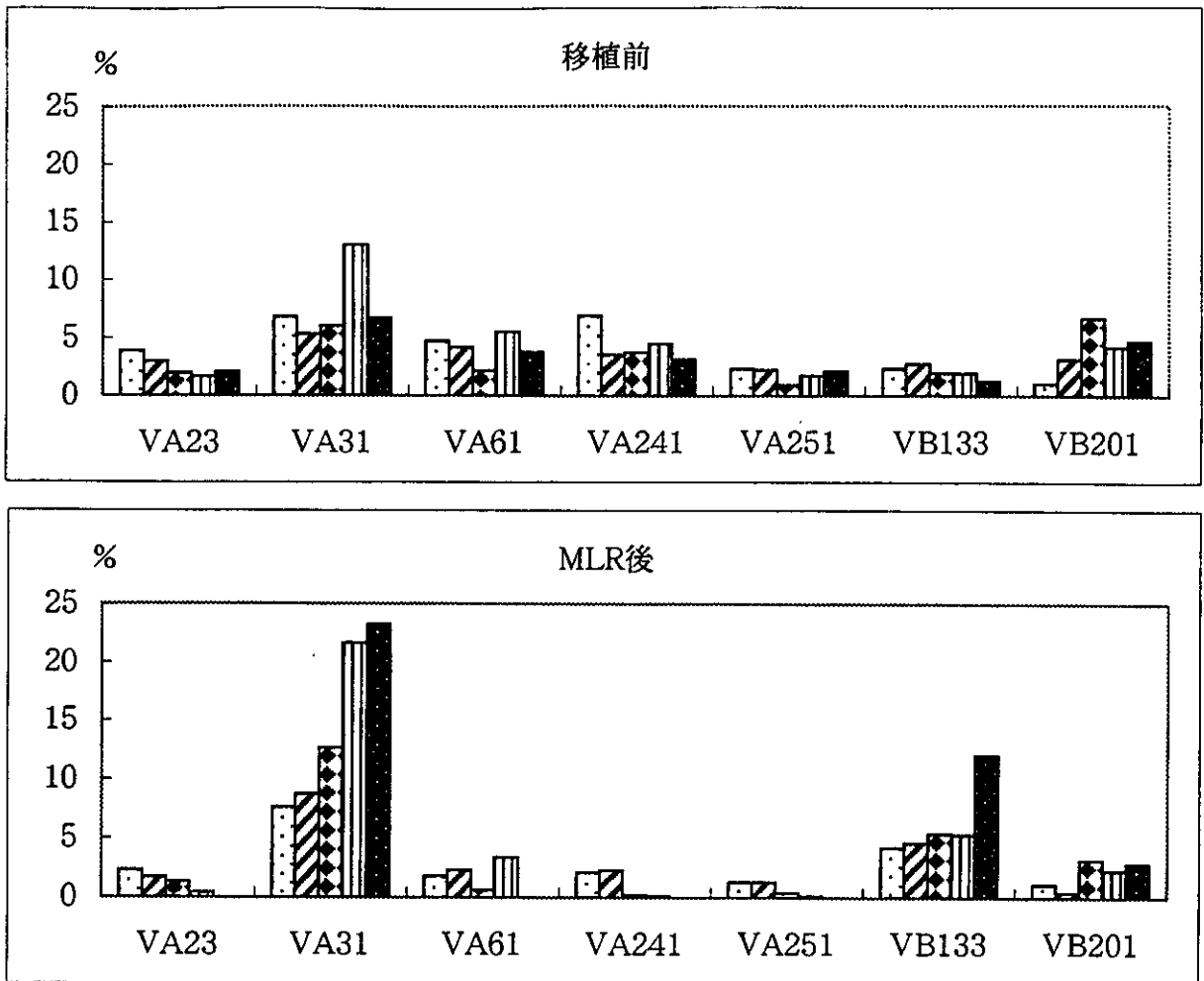


Fig. 4.

## 拒絶反応例のCrの推移

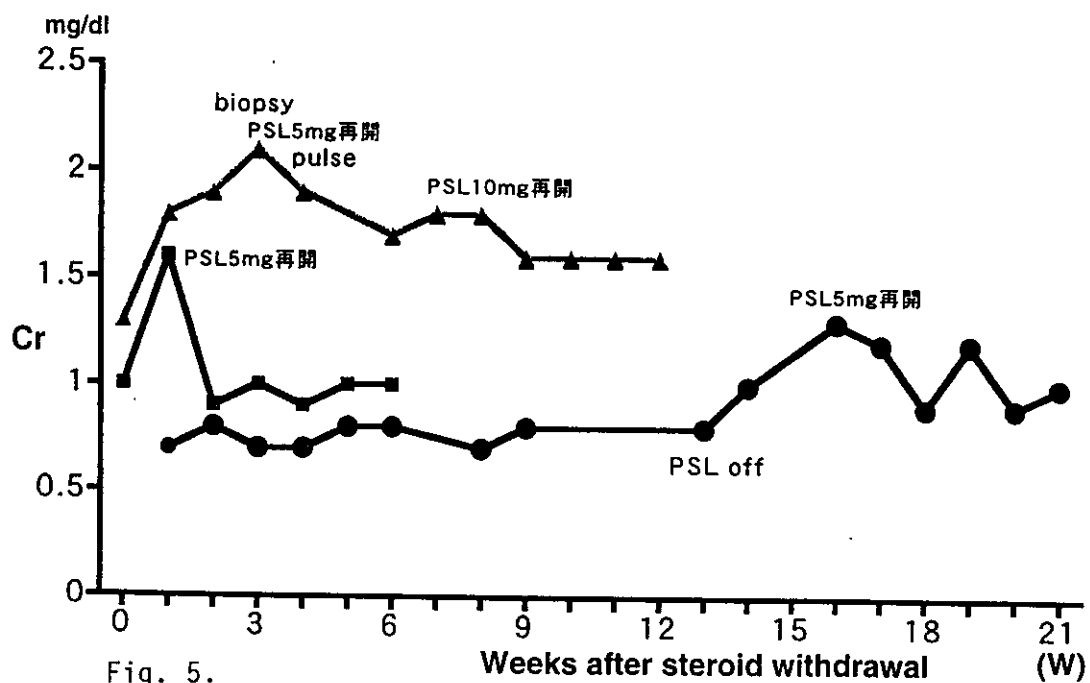


Fig. 5.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. J. Takayama, N. Ohkohchi, K. Oikawa, T. Asakura, N. Kawagishi, H. Kikuchi, N. Koyamada, T. Orii, M. Sakurada, H. Doi, K. Fujimori, H. Katoh, M. Satake, S. Satomi, Living related liver transplantation in patients with ABO incompatibility, Transplantation Proceedings 30:3504-3506, 1998
2. N. Ohkohchi, H. Katoh, T. Orii, K. Fujimori, S. Shimaoka, S. Satomi, Complications and treatments of donors and recipients in living-related liver transplantation, Transplantation Proceedings 30:3218-3220, 1998
3. T. Orii, N. Ohkohchi, M. Satake, H. Doi, H. Kikuchi, T. Asakura, J. Takayama, S. Satomi, Effect of liver transplantation on hepatopulmonary syndrome, Transplantation Proceedings 30:3254-3255, 1998
4. Koji Yasuda, Tadayoshi Nemoto, Youichi Ohashi, Susumu Satomi, Kazuo Murata, Naoto Ishii, Toshikazu Takeshita, Kazuo Sugamura, Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of IL-2 receptor, International Immunology 10(5): 561-567, 1998

### 2. 学会発表

1. 川岸直樹、大河内信弘、桜田正寿、織井崇、菊地廣行、中鉢誠司、小山田尚、浅倉毅、及川公生、高山純、里見進、生体部分肝移植ドナー手術22例の経験、第51回日本消化器外科学会、1998/2/18
2. 川岸直樹、佐竹正博、里見進、ヒトCD8細胞のブタ末梢血リンパ球に対する細胞性反応の検討、第98回日本外科学会総会、1998/4/6
3. 小山田尚、里見進、大河内信弘、宮武司、Fritz H. Bach、マウスからラットへの心移植における'Accommodation'の誘導とその機序の検討、第98回日本外科学会総会、1998/4/10
4. 大河内信弘、里見進、生体部分肝移植の適当と問題点、第33回日本肝臓学会、1998/4

/16

5. Y. Akamatsu, N. Ohkohchi, H. Doi, S. Satomi, Does elimination of Kupffer cells prolong survival time in liver transplantation, 17th International Transplantation Congress of the Society, 1998/7/13
6. 浅倉毅、大河内信弘、織井崇、平野拓司、里見進、生体肝移植における移植後早期の肝増殖関与とサイトカインの変動、第52回日本消化器外科学会、1998/7/17
7. 小山田尚、大河内信弘、小熊司郎、土井秀之、桜田正寿、織井崇、菊地廣行、関口悟、桜井正浩、芳賀泉、中島範昭、里見進、肝臓移植におけるChronic Rejectionとその診断・治療、第16回肝移植研究会、1998/7/30
8. 織井崇、大河内信弘、桜田正寿、小山田尚、菊地廣行、芳賀泉、中島範昭、榎本好恭、里見進、島岡理、成人間生体部分肝移植の問題点、第16回肝移植研究会、1998/7/31
9. M. Gotoh, M. Satake, S. Sekiguchi, N. Ohkohchi, S. Satomi, Characterization of B-cells producing xenoreactive natural antibodies in human, 7th Alexis Carrel Conference, 1998/10/21
10. 小山田尚、宮武司、H. Bach、大河内信弘、里見進、マウスからラットへの心移植におけるAccommodationと長期生存の誘導、第34回日本移植学会総会、1998/12/1
11. 佐々木潔子、干場良司、大河内信弘、里見進、小熊司郎、高橋徹、生体部分肝移植における拒絶反応の組織学的診断と血液生化学データの相関関係についての検討、第34回日本移植学会総会、1998/12/2
12. 水野豊、菊地廣行、藤盛啓成、土井秀之、大河内信弘、里見進、腎移植長期生着例に対するステロイド離脱の試み、第99回日本外科学会、1999/3/26

### F. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

小林英司分担分（研究協力者：自治医科大学臨床薬理学助教授）

【研究背景】

投与時刻の違いにより効果や毒性の出現が異なる薬物がある（時間薬理）。多くの免疫抑制薬にもこの現象がよくあることが知られ、移植治療に応用すること（時間治療）が考えられはじめた<sup>1) 2)</sup>。我が国における腎移植はこれまでシクロスポリン（CyA）またはタクロリムス（FK）をベースに、ステロイド（Pr）、アザチオプリン（Az）、ミゾリビン（Mz）、抗リンパ球抗体などを組み合わせた多剤併用療法が行われてきた。さらにデオキシスパーガリン（Ds）が急性拒絶反応時のレスキュー薬として使われている。

【研究目的】

これらの免疫抑制薬についてこれまで行ってきた時間薬理について検討する。さらに、得られた実験結果をもとに臨床応用への展望について考察する。

【動物実験及び結果】

これまで著者らは種々の免疫抑制薬の時間薬理学的現象をラットモデルを用いて検討してきた<sup>3) 4) 5)</sup>。その結果、多くの免疫抑制薬が活動期投与が非活動期投与に比し毒性が大であり、効果は大きく変わらないことが判明した（表1）<sup>6) 7) 8) 9)</sup>。薬物動態学的には、CyAは、活動期投与と非活動期投与でそれほど明瞭な差はない<sup>5)</sup>。FKは、12時間トラフ値が同じでも活動期投与の方がAUCが表明に大である<sup>7)</sup>。また、Mzの尿中排泄量<sup>4)</sup>やPrによる体重減少<sup>8)</sup>も投与時刻の影響を大きく受ける。すなわちPrは、内因性コルチゾール上昇に合わせ活動期早期の投与が体重減少や免疫臓器の萎縮が小であり<sup>4)</sup>、Mzは、非活動期早期の投与がその薬物の尿中排泄量が大きい<sup>8)</sup>。Dsは、非活動期の投与で効果を下げることなく副作用を減らすことが可能であることがラット心移植モデルで示された<sup>7)</sup>。

表1. ラットモデルにおける免疫抑制薬の時間薬理

薬	毒性発現の差	薬物動態値の差	薬力学的差
シクロスポリン	大	なし～小	なし～小
タクロリムス	大	大	なし～小
ステロイド	大	NT	NT
デオキシスパーガリン	大	なし	なし
ミゾリビン	小	中	NT

差の程度：大、中、小およびなし。

NT: non-tested or unpublished

【臨床応用への展望】

近年、臨床における臓器移植でも免疫抑制薬の投与時刻によりその薬物血中濃度が異なることが知られてきた<sup>1) 2)</sup>。時間薬理学的現象を臨床応用するためには、現在の所、この薬物濃度測定が最も重要かつ簡便である。

肝移植後患者においてFKは、その12時間トラフ値が同じでも、AUCに大きな差があり、活動期（朝）投与が大であることが報告されている。CyAは、脾移植後患者で検討されており、12時間トラフ値比AUCとも非活動期（夕）投与後が大である傾向にある。このシクロスポリンの時間薬理学的薬物動態値の差については、Habaらとの共同研究で腎移植例においても同様な結果が得られている（submitted）。現在の所、これらの現象を用いて実際に副作用軽減や効果を検討する（時間治療）までには至っていない。骨髄抑制などの副作用防止には、極めて展望がある<sup>10)</sup>。

【謝辞】

本報告の動物実験は、当教室（主任：藤村昭夫教授）にて、内田広夫、山内仁、菱川修司、富沢直子、藤秀人、荒川昌史、荻野佳紀、水田耕一、杉本孝一の諸先生らとともに行ったものである。また臨床の腎移植例におけるCyAの血中濃度のデータは、名古屋第二赤十字病院移植外科の幅俊一先生らとともに行った。

## 【文献】

- 1) Cipolle RJ, et al.  
Time-dependent disposition of cyclosporin after pancreas transplantation, and application of chronopharmacokinetics to improve immunosuppression. *Pharmacotherapy* 8: 47-51, 1988.
- 2) Min DI, et al.  
Circadian variation of tacrolimus disposition in liver allograft recipients. *Transplantation* 62: 1190-1192, 1996.
- 3) 小林英司.  
特集◇各種疾患の薬物治療—とくに時間生物学的治療. 免疫抑制薬. *医学と薬学* 38: 659-664, 1997.
- 4) 小林英司.  
特集: ステロイドホルモンと免疫—ステロイドホルモンと拒絶反応. *ホルモンと臨床* 45: 681-686, 1997.
- 5) 小林英司.  
特集: 時間薬理と治療—免疫抑制薬の時間薬理. *臨床医薬* 14: 1528-1532, 1998.
- 6) Yamauchi H, et al.  
Time-dependent cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Clin Exp Pharm Physi* 25: 435-440, 1998.
- 7) Uchida H, et al.  
Chronopharmacology for tacrolimus in rats. *Transplant Proc* (in press).
- 8) Hishikawa S, et al.  
Chronopharmacotoxicity of mizoribine under a repeated administration in the rat. *Transplant Proc* (in press).
- 9) Uchida H, et al.  
Chronopharmacology for deoxyspergualin-I. Toxicity and efficacy in the rat. *Transplantation* (in press).
- 10) 小林英司, 他.  
代謝拮抗薬の時間治療の展望—毒性軽減の一法として、今日の移植 11: 962-963, 1998.
- 2) Saito T, et al.  
Endoscopic findings in transplanted allo-intestine of rats after discontinuance of immunosuppressive agents. *J Gastroenterol* 33: 336-342, 1998.
- 3) Yamauchi H, et al.  
Time-dependent cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Clin Exp Pharm Physi* 25: 435-440, 1998.
- 4) Ohmori M, et al.  
Do immunosuppressants directly affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation* 66: 940-941, 1998.
- 5) Saito T, et al.  
Change in fecal fat excretion from allo-intestine transplanted rats after discontinuance of immunosuppressive agents. *J Gastroenterology* (in press)
- 6) Ogino Y, et al.  
The site of absorption of cyclosporine A in the small intestine of the rat -A preliminary report-. *Transplant Proc* (in press)
- 7) Uchida H, et al.  
Chronopharmacology of tacrolimus in rats -Toxicity and efficacy in a mouse-to-rat intestinal transplant model and its pharmacokinetic profile. *Transplant Proc* (in press)
- 8) Uchida H, et al.  
Experimental intestinal transplantation using mouse fetal intestine to the rat -Combination effect of tacrolimus with cyclophosphamide-. *Transplant Proc* (in press)
- 9) Mizuta K, et al.  
Cyclosporine inhibits transport of bile acid in rats -Comparison of bile acid composition between liver and bile-. *Transplant Proc* (in press)
- 10) Kita J, et al.  
Effect of tacrolimus on small and large bowel anastomoses in the rat. *Transplant Proc* (in press)
- 11) Mizuta K, et al.  
Influence of tacrolimus on bile and lipid composition in a rat model with continuous bile drainage -Comparative study with cyclosporine. *Transplant Int* (in press)

## 【研究発表】

- 1) Mizuta K, et al.  
Dose-dependent reduction of bile secretion in cyclosporine treated rats. *Transplantation* 65: 758-759, 1998.

- 12) Uchida H, et al.  
Chronopharmacology for deoxyspergualin.  
-I. Toxicity and efficacy in the rat.  
Transplantation (in press)
- 13) Uchida H, et al.  
Experimental small bowel transplantation  
using a newborn intestine in rats: I. - Lipid  
absorption was restored after transplantation  
of nonvascularized graft. J Pedia Surg (in  
press)
- 14) Uchida H, et al.  
Experimental small bowel transplantation  
using a newborn intestine in rats: II. -  
Revascularization of newborn intestine is  
independent of vascular endothelial growth  
factor. J Pedia Surg (in press)
- 15) Mizuta K, et al.  
Survival of rats undergoing continuous bile  
drainage depends upon maintenance of  
circadian rhythm of bile secretion.  
Chronobio Int (in press)
- 16) Hozumi Y, et al.  
Immunotherapy for experimental rat  
autoimmune thyroiditis using a novel  
immunosuppressant, FTY720. Life Sci  
(in press)
- 17) Ogino Y, et al.  
Comparison of cyclosporin A and tacrolimus  
concentrations in whole blood between  
jejunal and ileal transplanted rats. J Pharm  
Pharmacol (in press)



## 移植免疫寛容と臓器移植に伴うマイクロキメリズムに関する基礎的研究

木村 廣光 担当分 (研究協力者：国立小児医療研究センター  
生体工学研究室 室長)

### 【目的】

移植免疫学に於ける臓器生着と細胞キメリズムの本質的關係は、通常拒絶さるべき同種異系の細胞が、宿主の免疫系の未発達状態、ないしは、人工的に作られた免疫不全状態に於いて、一時的に導入された細胞キメリズム（リンパ球を含む骨髄系細胞の細胞移植）が、その個体に半永久的に成立する事に伴い、その後、本来拒絶さるべき移植臓器が生着する事によって実験的に示された。所謂、古典的獲得性移植免疫寛容と細胞キメリズムの概念である。こうした概念が更に、一般の臨床移植に於ける、移植臓器の生着、即ち、移植免疫寛容のメカニズムを説明する基礎的な概念として、今日、分子生物学における技術開発、特にPCR法の発達により、遺伝子特異的プライマーを用いて、ドナー移植臓器に由来する細胞が、極少数ではあるが、移植後、安定してレシピエントの遠隔臓器組織に見出される事で更に一般化され、「移植免疫寛容とマイクロキメリズム」という概念が提唱されてきた。「移植免疫寛容とマイクロキメリズム」の概念は、これまで説明する事ができなかった多くの免疫現象に細胞分子生物学的基盤を与える可能性を秘めた極めて魅力的な概念といえる。然しながら、これまでの移植免疫寛容とマイクロキメリズムの解析が、主として、ヒトの臨床例を中心として報告され、直接、移植免疫寛容の成立過程に於けるマイクロキメリズムとの関係、特にマイクロキメリズムを構成する細胞の免疫学的・生理学的な細胞動態を解析する実験動物モデルが確立していなかった。本研究では、移植実験モデル、特にラットを用い

た移植に於いて、これを応用し、種々の移植臓器モデルを用いて、マイクロキメリズムを構成する細胞の起源と細胞動態、並びに、移植免疫寛容状態とマイクロキメリズムの因果關係に関する基礎的研究、免疫抑制剤使用下での臓器移植と骨髄移植の応用性に関する研究を行ない、移植免疫寛容とマイクロキメリズムの成立の、免疫学的意義を明らかにし、一般臨床への診断と治療に役立てる事を目的とする。

### 【方法：材料と方法】

#### 1. 実験動物

RT.1UハプロタイプであるPVG.1U (RT1.AuBuDu)、LEW.1W (RT1u) 近交系ラットを各々H arlan Olac Ltd. (Blackthorn, Bicester, England)、Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover, Germany) より 購入し specific pathogen-free の状態で飼育、繁殖した。実験全期間を通して、実験動物の摂食、飲水は自由とした。

#### 2. 実験方法

##### 1) 糖尿病ラットの作成

生後6-8週齢で胸腺の摘出を行い、その3週後より2週間隔で2.5 Gy 計4回（総線量10 Gy）の放射線照射を linear accelerator (Mevatron, Toshiba Corp., Tokyo, Japan) を用いて施行した。尿糖はダイアステック（バイエル・三共社）、血糖値はラット尾静脈より採血しエクザクテック2A血糖測定システム（メデイセンス社）を用いて測定した。尿糖陽性、または血糖値が200 mg/dLに上昇したものを糖尿病と判定し、病理組織学的所見で確認した。

## 2) 全膵十二指腸移植

### 3) 実験プロトコール

雄LEW.1W(n=17)、雄PVG.1U(n=27)、雌LEW.1W (n=9)に胸腺摘出、放射線照射を行った後、尿糖または血糖値を測定した。糖尿病と判定されたラットを犠牲死させ、膵臓、顎下腺、副腎、消化管より採取した組織標本を10%ホルマリンに固定し、H.E.染色を行い光学顕微鏡で観察した。

また糖尿病発症ラットを二群に分け、(A)群は正常同系ラットをドナーとして、全膵十二指腸移植を施行(n=6)、(B)群は10 Gy全身放射線照射した同系ラットをドナーして全膵十二指腸移植を施行(n=12)。

#### 【結果】

#### 糖尿病の発症

雄性ラットでは全例糖尿病を発症した(LEW.1W: 17/17、PVG.1U: 27/27)。雌性ラット(LEW.1W)は9例中3例が100日以上長期観察中にも糖尿病を発症せず、糖尿病発症までに雄性ラットに比べて長期間を要することが確認された。

#### 病理組織学的所見

糖尿病を発症したラットの膵臓は、ラ氏島にのみ著明なリンパ球浸潤が認められ、発症までに長期の経過を要したラットではラ氏島は殆ど消失していた。一方、膵の外分泌組織は正常に保たれており、また副腎、顎下腺、消化管といった全身の他の内分泌腺、外分泌腺を含めた臓器には、リンパ球浸潤は全く認められなかった。甲状腺は検索しなかった。

#### 全膵十二指腸移植後経過

(A)群では、これまで、最長450日の観察期間中にも、全例血糖値は正常範囲にあり、糖尿病の再発は認められなかった。また移植手術後20日目、90日目、120日目、300日、400日に犠牲死させドナーグラフトを組織学的に検索でも、ラ氏島はほぼ正常に近い形態を示しており、自己免疫性反応に

より予想される移植膵へのリンパ球浸潤のほぼ完全な抑制が認められた。

(B)群では、12例中7例は、全膵十二指腸移植の術中ないし術後二日に死亡。また5例は、いずれも全膵十二指腸移植後、14日目以降に血糖値が、300mg/dlを示し、組織学的に検索でも、膵ラ氏島のみを選択的にリンパ球浸潤が観察された。

#### 【考察】

胸腺摘出と放射線照射を組み合わせた実験的糖尿病ラットの病理組織学的所見は、膵ラ氏島のみを選択的にリンパ球浸潤が起こる点で、人の自己免疫性 I 型糖尿病(IDDM)の優れた実験モデルであることが確認された。

I型糖尿病の発症機序として、本研究から推察される事は、正常なラットが潜在的に兼ね備えている、膵ラ氏島に対する自己免疫能を有する T リンパ球の働きは、通常何らかの機序により調節を受け、その機能の発現が抑制された状態にあると考えられる。その抑制機構が胸腺摘出、全身照射という操作により解除され、膵ラ氏島に選択的にリンパ球浸潤が起こると考えられる。即ち、膵ラ氏島にたいする自己免疫能を有するリンパ球に対する調節機能の破綻がI型糖尿病の発症機序と推察される。

更に、本研究結果から、実験的に発症させた糖尿病は、全膵十二指腸移植後には再発しない事、また10 Gy全身放射線照射された、同種同系ラットをドナーとした場合には、移植後に自己免疫性糖尿病を再発する事から、passenger leukocytes、すなわち膵移植によってレシピエント内に移入され、細胞キメリズムを構成するドナーリンパ球が、自己免疫性リンパ球の機能を抑制し、その結果糖尿病の再発が防げるのではないかと推察される。

以上、本研究で用いた実験的糖尿病モデルとミクロキメリズムに関する検討により

microchimerismを構成している細胞の免疫学的意義、特に免疫応答調節の役割を解明できたものとする。

【研究発表】

1. 論文発表

1) Suzuki K, Yan H, Li X. K., Amemiya H, Suzuki S, Kimura H

Prevention of recurrence of autoimmune diabetes type I in rats following pancreaticoduodenal transplantation

Transplant Proc 30:1071 (1998)

2) Suzuki K, Yan H, Li X. K., Amemiya H, Suzuki S, Kimura H

Prevention of experimentally induced autoimmune type I diabetes in rats by the new immunosuppressive reagent FTY720

Transplant Proc 30:1044 (1998)

3) Yano Y, Hara M, Shibata K, Onituska T, Miyahara T, Li X-K, Amemiya H, Kimura H.

Microchimeric cells from the peripheral blood associated with cardiac grafts are bone marrow derived, long-lived and maintain acquired tolerance to minor histocompatibility antigen H-Y

Transplantation (in press)

4) Suzuki K, Kazui T, Kawabe A, Yan H, Li X-K, Kitazawa Y, Amemiya H, Suzuki S, Kimura H.

Origin, occurrence, and function of microchimeric cells: V. quantitative aspects of microchimerism following pancreaticoduodenal transplantation model in rat

Transplantation Proceeding (in press)

5) Suzuki K, Kazui T, Kawabe A, Yan H, Li X-K, Kitazawa Y, Amemiya H, Suzuki S, Kimura H

Clonal expansion of T lymphocyte lineage cells in microchimeric cells

Transplantation Proceeding (in press)

研究課題 ドナー骨髄細胞分割投与及び flt3 ligand による microchimerism  
の成立、維持と免疫寛容の心移植への応用に関する研究

分担研究者 川合明彦 東京女子医科大学 循環器外科 講師

研究要旨 ドナー骨髄細胞移植による免疫寛容の導入を目的として、心移植直後にドナー骨髄細胞移植を行ないさらに骨髄細胞刺激因子である flt3.ligand によってドナー由来の骨髄樹状細胞を増幅した。心グラフトは免疫抑制剤投与を週 1 回に減少させても 100 日間生着した。

A. 研究目的

ドナー骨髄細胞移植に骨髄幹細胞刺激因子 flt3.ligand を加えマイクロキメリズムによってドナー特異的免疫寛容を成立させることを目的とした。

B. 研究方法

心移植 : Lewis (RT1<sup>L</sup>) をドナー、Brown Norway (RT1<sup>B</sup>) をレシピエントとして Ono-Lindsay 法にて異所性心移植を行なった。骨髄移植 : ドナーラットの unmodified 骨髄細胞  $5 \times 10^7$  個を心移植直後にレシピエントに静注移植した。免疫抑制 : tacrolimus を用いて移植直後より 1mg/kg/day を術後 2 週間は毎日、その後は週に 1 回のみ腹腔内投与した。Flt3.ligand :  $10 \mu\text{g/day}$  を移植後 3 日間腹腔内投与した。Flow cytometry : レシピエント末梢血中の hemato-lymphoid cell を検体とし、ドナー MHC class I に対するモノクローナル抗体 (MRC OX-3) により標識して flow cytometry を行ない末梢血中のドナー由来細胞の割合を % で表示した。実験プロトコール : 実験は 3 群 (各群 = 6) に行なった。I 群-tacrolimus による免疫抑制のみ行なう。II 群-tacrolimus に加え骨髄移植を行なう。III 群-II 群にさらに flt3.ligand を加える。End-point : I-III 群に対し術後 7 日目に、II, III 群に対してはさらに術後 28 日、100 日目に末梢血を検討した。

C. 研究結果

術後 7 日 : 3 群すべてで心拍動は保たれていた。GVHD を示唆する所見も認めなかった。Flow cytometry では I 群 2.5%、II 群 16.5%、III 群 70.1% であり flt3.ligand の効果が認められた。術後 28 日 : II 群のドナー心拍動は良好であった。III 群の 1 例が死亡した。II 群の 1 例、III 群の 2 例に下痢、体重減少を認め III 群で死亡したラットは著明な胸腺の萎縮が認められ GVHD が示唆され、免疫学的に検討している。Flow cytometry では II 群 5.5%、III 群 13.8% のドナー由来細胞を認めた。術後 100 日 : II 群の 4/6 例、III 群の 3/5 例が生存し生存例のドナー心拍動は良好であった。Flow cytometry は現在検討中である。

D. 考察

Flt3.ligand は心移植と同時に移植されたドナー骨髄幹細胞を有意に増殖させ高度のマイクロキメリズムを成立させた。

E. 結論

Flt3.ligand の有効性が示された。

F. 研究発表

1. 学会発表

第 51 回日本胸部外科学会総会  
新しい骨髄細胞刺激因子の心移植への応用  
日本胸部外科学会雑誌 46 ; 61 : 1998

G 知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

分担研究者 南嶋洋一 宮崎医科大学 副学長

研究要旨 感染症において抗体の測定は広く実施されており、診断および治療、宿主の免疫能の評価の指標に用いられてきた。しかし、CMV感染症において通常の抗体測定は補助的な意義をもつにすぎない。そこで、臓器移植において、CMV感染者・感染症患者の血清およびγグロブリン製剤の抗CMV抗体のAvidity Index (AI)を測定し、その臨床応用について検討した。AI値ならびにその推移により、CMV感染の時期の推測、易感染性宿主における抗CMV免疫能の評価、ならびにCMV感染症の発症形式の推測が可能であると考えられた。また、AI値の測定が抗CMV血清療法の新しい効果判定法となり得る可能性が示された。

#### A. 研究目的

CMVは身近なありふれたウイルスである。正常な宿主の場合は、CMVが感染しても発症することは稀である。しかし、胎児、臓器移植患者やヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者およびAIDS患者等の易感染性宿主の場合は、CMVは重篤なCMV感染症を引き起こす。

本邦成人の8割以上はCMV既感染であり、CMV感染症の血清診断は慎重に行う必要がある。一般に、抗体陽転とともにIgM抗体を証明すれば初感染とみなしうるが、本邦のCMV感染症においてその例は極めて稀である。また、抗CMV IgM抗体は初感染、再感染、回帰感染のいずれでも検出されうるものの、一方では感染症の経過中に抗CMV IgM抗体が全く検出されない例も多い。抗CMV IgGの検索においては、抗体価の有意上昇の判定には、ペア血清の同時測定が必要である。そのため、今日までCMVの血清学的診断はCMV感染症の補助的診断としての意義を持つに過ぎなかった。

近年、CMV感染の初期にはCMV抗原に対して、まず、低結合力(low-avidity)抗体が産生され、感染の経過にしたがって、しだいに、高結合力(high-avidity)抗体が産生されることが知られるようになった

(Blackburn, N.K. et al.: J.Med.Virol. 33:6-9,1991)。

我々はこの抗体の抗原結合力(Avidity)に注目し、抗CMV IgM抗体検索や抗体陽転の証明によらないCMV感染時期の推定が可能であるかを検討した。さらに、AI値(avidity index)はCMV感染症の病像を反映しうるか否かをあわせて検討した。

#### B. 研究方法

γグロブリン製剤、被験者の血清あるいは血漿を非働化することなしに用時まで凍結保存した。これらの検体の中の抗CMV抗体をELISAキット(Enzygnost Anti-CMV/IgG)、受け身粒子凝集反応(PPA)キット(富士レビオ)を用いて測定した。また、γグロブリン製剤については50%ブランク減少法によって補体要求性および非要求性中和抗体価をも測定した。

抗体結合力の指標 (Avidity Index : AI)の算出はBlackburnらの報告にしたがった (Blackburn, N.K. et al.: J.Med.Virol. 33:6-9,1991)。すなわち、ELISAにおいて、固相化下したCMV抗原に一次抗体を反応後、8M尿素を含む洗浄液によって2回洗浄し、吸光度を測定した。尿素を含まない洗浄液で洗浄した場合の吸光度との割合でAIを算出した。

また、AIの評価には Lutzらの報告を参照し、AIが0~34のものを low-avidity antibody、60~100%のものを high-avidity antibody、中間値のものを intermediate avidity antibody とした (Lutz, E. et al.: J.Med.Virol. 44:317-322, 1994) (図1)。

**CMV抗体の抗原結合力指数: avidity index (AI)**

$$AI = \frac{\text{尿素(8M)処理抗体の吸光度}}{\text{尿素非処理抗体の吸光度}} \times 100$$

**AI 値の評価**

low-avidity antibody  $\leq 34\%$

$34\% < \text{intermediate avidity antibody} < 60\%$

$60\% \leq \text{high - avidity antibody} \leq 100\%$

**図1 AI の算出法とその評価**

**C. 研究結果**

まず、 $\gamma$ -グロブリン製剤について、AI、PPA抗体価および補体要求性および非要求性中和抗体価を測定した。イオン交換樹脂処理製剤、スルホ化製剤、ポリエチレングリコール(PEG) 処理製剤およびpH4.0酸性処理製剤の4種の $\gamma$ -グロブリン製剤を測定し、そのすべてにおいてAI の算出が可能であった。 $\gamma$ -グロブリン製剤のAI の値はPPAによる抗体価や中和抗体価とは相関がみられなかった (表1)。

次に、実際にCMV感染、感染症を起こした患者の抗体について、AI の値と臨床経過を比較した。

まず、先天性CMV感染症患児における結果を検討した (図2)。この症例では妊娠37週時の胎児エコー診断で脳室拡大と上衣下嚢胞が発見され、羊水診断においてCMV DNAが証明されていた。出生後、臍帯血よりCMV抗原血症を検出、新生児尿より感染性CMVを分離・同定して、先天性CMV感染症と診断した。この患児の抗体のAI 値は、経過中の全般において中間値を保ったままであった。

表1  $\gamma$ -グロブリン製剤の Avidity Index

$\gamma$ グロブリン製剤		Avidity Index(%)	IgM	PPA	中和抗体価(+C)
イオン交換樹脂処理製剤	A	70.14	-	>1:8192	420
イオン交換樹脂処理製剤	B	72.67	-	>1:8192	540
イオン交換樹脂処理製剤	C	78.45	-	>1:8192	640
スルホ化製剤	A	77.67	-	1:1024	200
スルホ化製剤	B	81.61	-	1:512	180
PEG処理製剤	A	95.00	-	>1:8192	640
PEG処理製剤	B	83.79	-	1:2048	620
pH4処理製剤	A	96.04	-	>1:8192	1240

PPA : 受け身粒子凝集反応

PEG : ポリエチレングリコール

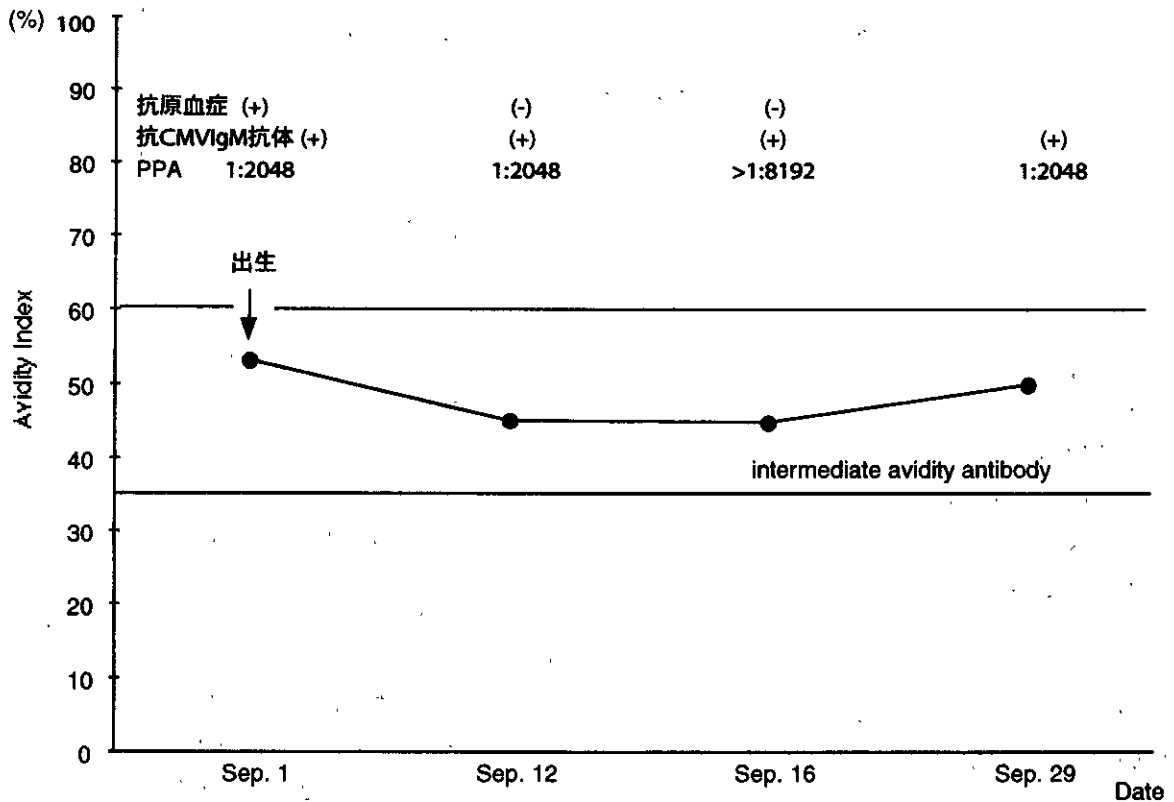


図2 先天性CMV感染症とAI



次に、生体腎移植患者におけるAI値の推移を検討した(図3)。腎移植はドナーがCMV抗体陽性(D+)、レシピエントがCMV抗体陰性(R-)の状況で実施され、輸血は施されていない。移植直後よりしだいにAI値が上昇し、術後約2週間後に抗CMVIgM抗体が陽性化、同時に抗原血症をも認めた。γ-グロブリン製剤投与のみで経過を観察したが、CMV感染症に特有の症状は認めることなく経過した。経過中に、AI値は低結合の閾値からしだいに上昇していった。

また、本邦第一例目の生体肝移植患児におけるAI値の推移をも検討した(図4)。肝移植はドナー、レシピエントともに抗CMV抗体が陰性であった。患児は術中・術後に多量の輸血を受けており、これによるCMV初感染が成立したと考えられた。術後約10週目にCMV間質性肺炎を発病したが、γ-グロブリン療法とガンシクロピルの投与により軽快した。間質性肺炎の発病以後の血漿につきAI値を算定したところ、経過中、常に高いAI値を示していた。

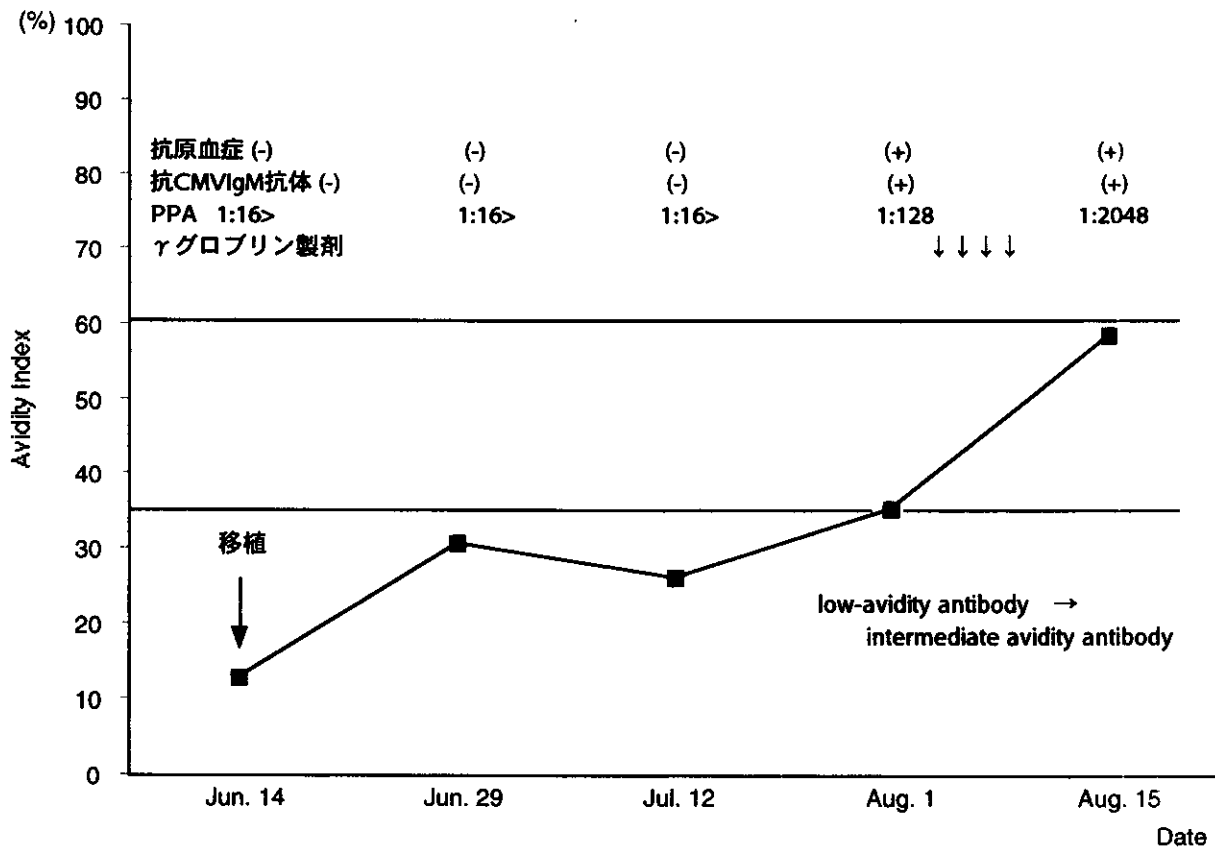


図3 D(+), R(-) 生体腎移植におけるAI値

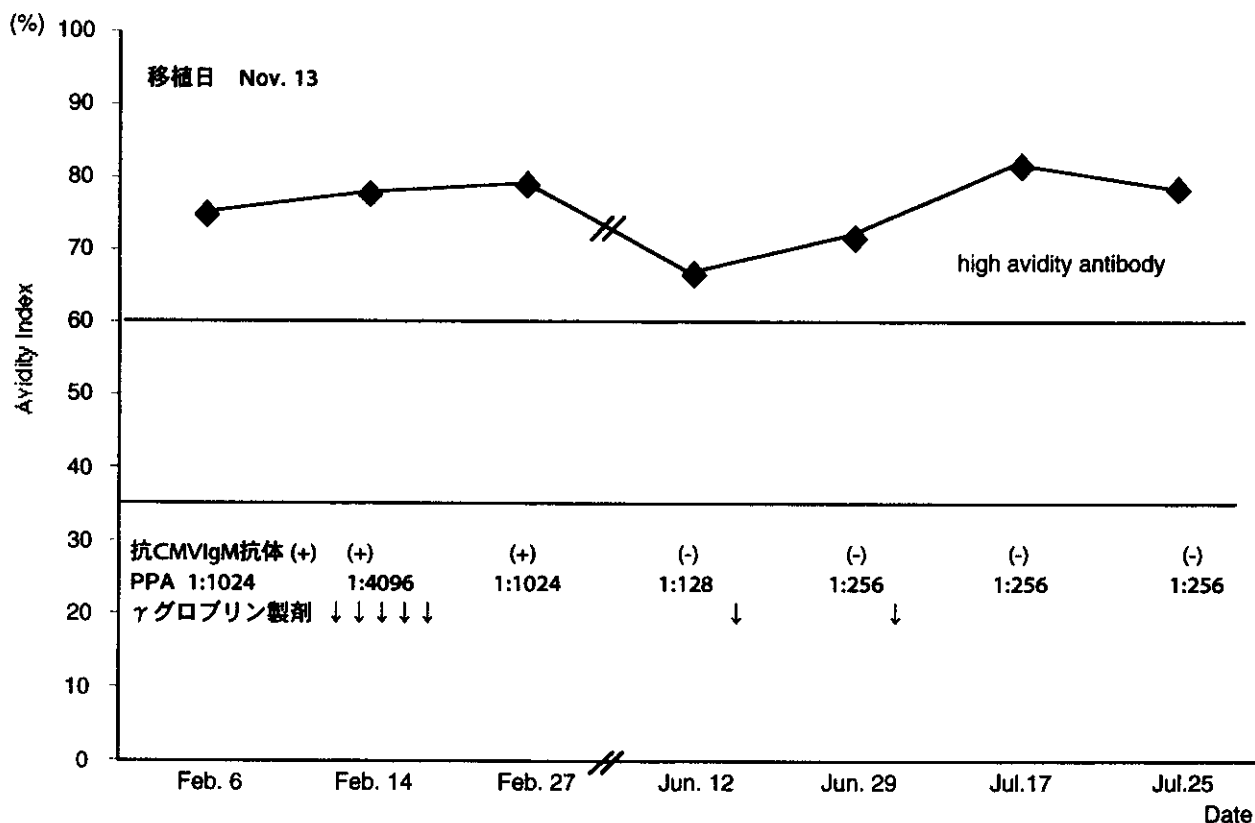


図4 D(-), R(-) 生体肝移植患者におけるAI

#### D. 考察

AIについては、CMV以外の種々の病原体の抗体について報告がある。一般的に、感染初期のAI値は低く、感染後時間経過にしたがい高いAI値を示すとされる。CMVにおいてもAI値についての検討がなされており、Lutzらは低AI値は初感染を、中等度のAI値は免疫グロブリンによる受動免疫を、高AI値は回帰感染または長期感染を示すとした

(Lutz, E. et al.: J. Med. Virol. 44:317-322, 1994)。

今回、本邦で主に使用されているγグロブリン製剤の4種についてAIの測定を試み、そのすべてでAIを算出できた。このAI値はγグロブリン製剤のPPA抗体価や中和抗体価とあまり相関せず、血清療法の評価の新しい指標になりうるか、今後の検討課題とした。

CMV感染者・感染症患者の抗体のAIの検討では、感染時期の推測、発症の予想に対して、AI値の応用の可能性を示唆する結果を得ることが出来た。まず、感染時期の推定では生体腎移植の症例にそれを示すことが出来る。術前、腎移植患者は抗CMV抗体陰性者であり、術後も輸血の既往がないことから、抗体陽性ドナーの腎を移植したことでCMVに初感染したと考えられた。移植後、AIは次第に高値となり、高結合力を示す値付近まで上昇した。初感染後、CMV抗原血症を指標にγグロブリン療法を開始し、CMV感染症を発症することなく経過した。この腎移植患者の例から、感染の時期がいつかを推測するのに、AI値は適当な指標になりうると考えられた。さらに、この患者のAIの推移は健常人におけるそれと類似しており、そのため、CMV感染症が発症しなかったとも考えられた。

それにくらべ、先天性CMV感染症では中等度のAI値であり移行抗体による受動免疫を示したままであった。また、肝移植後のCMV間質性肺炎の例では発症初期から高いAI値を示していた。Lutzらによればγグロブリン製剤によるAIの修飾は中間値領域に留まるとされ、肝移植患者でAIが高値を示したことは、輸血された血球成分の免疫学的な関与が推測された。また、CMV間質性肺炎は免疫学的な機序により発症するとされ、この患者において高いAI値が持続したことは興味深い。以上より、CMV感染症の発症がAI値の推移によって推測できる可能性をも示唆した。

今回の検討では症例が少なく、CMV感染症とAIとの関連性についてはまだまだ検討の余地がのこされている。

CMV感染症は宿主の免疫能と基礎疾患に大きく左右される。今後は、HIV感染症患者を含めて、さまざまな易感染性宿主におけるCMV感染症とAI値の関連、CMV感染様式、CMVの活動性（全身感染か、局所感染か）、種々の抗CMV療法とAIとの関係をも明らかにしたい。

#### E. 結論

抗CMV抗体のAvidityを測定することにより、CMVの感染時期の推定、易感染性宿主の免疫状況およびCMV感染症の発病形式の推測が可能と考えられた。また、血液製剤の投与による受動免疫の評価に際して、AIが新しい指標になりうる可能性を示した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

---

平成10年度(1999年3月)  
厚生科学研究費補助金  
「免疫・アレルギー等研究事業」(臓器移植部門)研究報告書

発行

事務局

国立佐倉病院

〒285-8765

千葉県佐倉市江原台2-36-2

TEL 043-486-1151(代)

印刷所

株式会社文友堂印刷

〒260-0001

千葉県千葉市中央区都町998

TEL 043-231-7301

---