

C. 研究結果

1) 62例中、24例(38.7%)が完全離脱となり、1例を交通事故で失った以外良好な肝機能を維持し生存中である(計画的離脱6例、非計画的離脱18例)。移植時平均年齢3.6才、平均離脱期間28.2ヶ月であった。非計画的離脱症例の中止の理由は大半がPTLDを含めた重症感染症であった。16例(25.8%)が、減量・離脱後拒絶反応が出現し、FK506の投与量を元に戻さざるを得なかった(計画的減量4例、非計画的減量・離脱12例)。減量・離脱開始後拒絶反応が生じるまでの平均期間は12.4ヶ月(1.4-63.3ヶ月)であった。いずれの症例も拒絶の治療は容易であった。残りの22例(35.5%)が様々な投与間隔で減量中である(計画的減量15例、非計画的減量7例)。

2) 完全離脱例と拒絶出現例において、ABO血液型適合性、HLA適合性、ステロイド離脱時期のいずれも両者間に有意差を認めなかったが、完全離脱例にABO血液型一致、HLAゼロミスマッチの症例が多い傾向があった。

3) MLRにおいて、完全離脱症例のドナーへの反応性を3rd partyに対する比(抗ドナーcpm/抗3rd party cpm)で術前の症例(n=13)と比較したところ、有意にドナーに対する反応性が低下していた(1.421 ± 0.615 vs 0.835 ± 0.762 , $p < 0.05$) (図1)。

さらに培養上清中のサイトカイン(INF- γ , IL-10)を測定したところ、離脱症例において対ドナー培養上清中のINF- γ は対3rd partyのそれに比し有意に低値(11.049 ± 6.590 pg/ml vs 82.123 ± 91.345 pg/ml, $p < 0.01$)であり、IL-10に有意差は認めなかった(図2)。つまり、TH1サイトカインのdown regulationが、ドナーに対するリンパ球増殖活性低下の原因である可能性が示唆された。

4) 肝組織内のサイトカインgeneの発現に関しては、TH1(IL-2, INF- γ)、TH2(IL-4, IL-10)ともに対照(ドナー開腹時の生検組織)と比較して有意差は認め

なかった。その他のサイトカイン(IL-1, IL-5, IL-8, IL-12, IL-15, TNF α)についても同様であった。

D. 考察

動物実験においては、特に肝移植は他の臓器移植と比較して免疫寛容を獲得しやすいとされ、その機序としてTH1/TH2サイトカインバランスによる免疫調節、アポトーシスによる浸潤リンパ球の排除などが挙げられている。臨床においては海外の諸施設からいくつかの報告があり、ピッツバーグ大学のスターツルらはmicrochimerismの免疫寛容への関与を提唱したが、否定的な報告もあり、まだ決着をみていない。生体肝移植に関してはまだ報告はなく、血縁者間、小児症例が多いという特徴を有する本医療における研究は、脳死肝移植との比較という観点からも免疫機構を解明する糸口となる可能性がある。今回我々は、生体肝移植後、免疫抑制剤離脱症例において術前の症例に比しドナー特異的に反応性が低下していること、またその要因としてドナーに対してTH1サイトカインがdown regulateされているという可能性を見出した。肝内のサイトカインは、未移植の正常肝と比較してTH1、TH2いずれの優位性も確認されず、検索したサイトカインに関しては同様のパターンを示していた。以上の結果で生体肝移植後の免疫寛容の機序が十分に解明されたとはいえないが、少なくとも症例を選択すれば免疫抑制剤は安全に、計画的に中止できることは示された。これを根拠に今後免疫抑制剤離脱症例は更に増加するはずであり、それらの症例をまた詳細に検討することにより最終的に免疫寛容導入への糸口が解明されることが期待される。

E. 結論

今回の研究により、症例を選択すれば免疫抑制剤は安全かつ計画的に中止できること、また、それらの症例は術前の症例と比較しドナーへの反応性が低下していることが示された。

F.研究発表

1.論文発表

「臓器移植後の免疫抑制剤の使い方と効果」猪股裕紀洋、田中紘一、他
小児科 1999；第40巻9号：1070-1078

「生体肝移植後の免疫抑制剤限量・離脱の試み」高槻光寿、田中紘一
今日の移植 2000；第13巻1号19-23

2.学会発表

「生体肝移植後の免疫抑制剤減量・離脱の試み」高槻光寿、田中紘一、他
第34回日本移植学会

「Weaning of immunosuppression in living donor liver transplantation」
Mitsuhisa Takatsuki, Koichi Tanaka, et al.
The 17th Annual Scientific Meeting of the Transplantation Society of Australia and New Zealand

「Weaning of immunosuppression in living donor liver transplantation」
Mitsuhisa Takatsuki, Koichi Tanaka, et al.
9th World Congress of The International Gastro-Surgica Club

G.知的所有権の出願・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

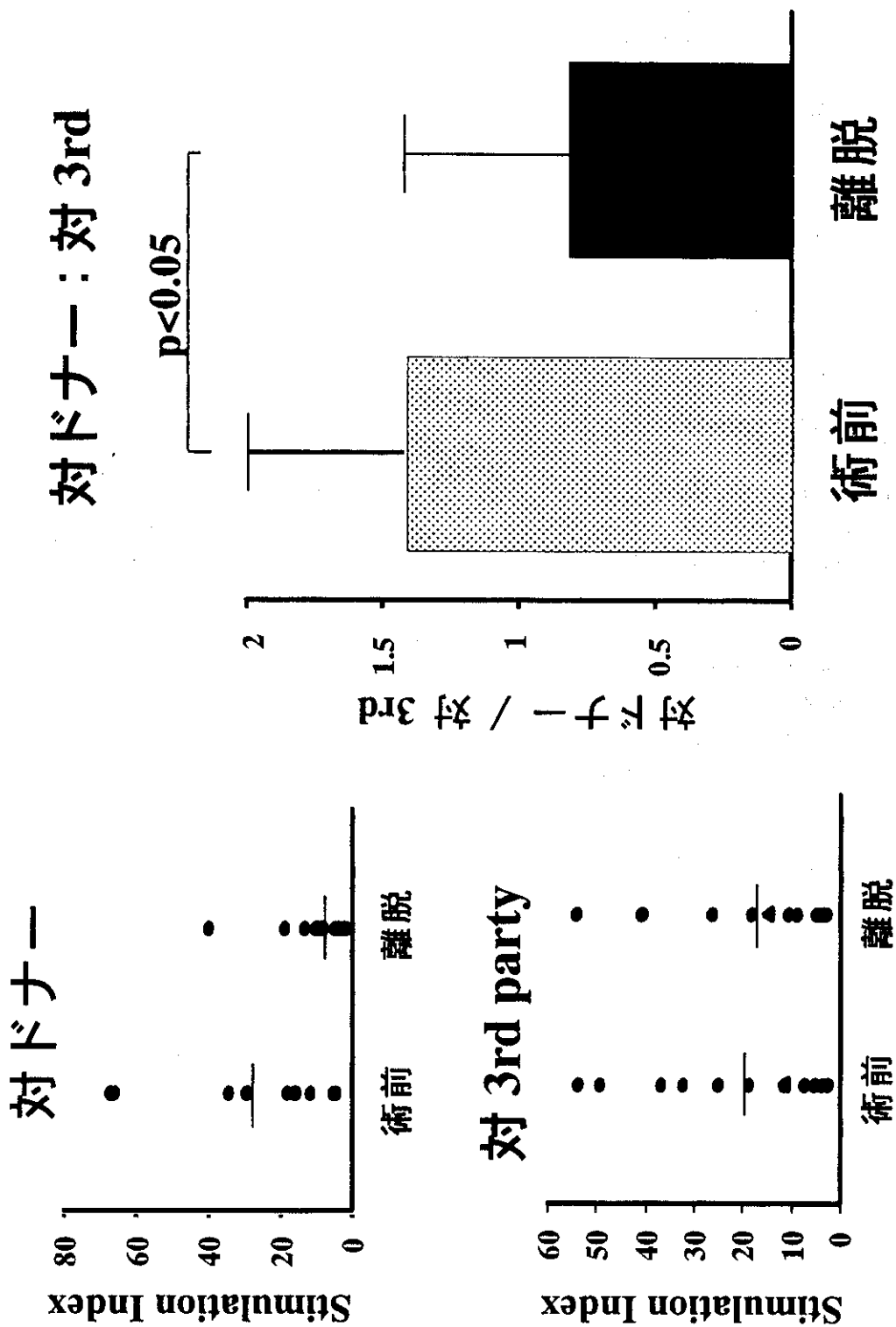
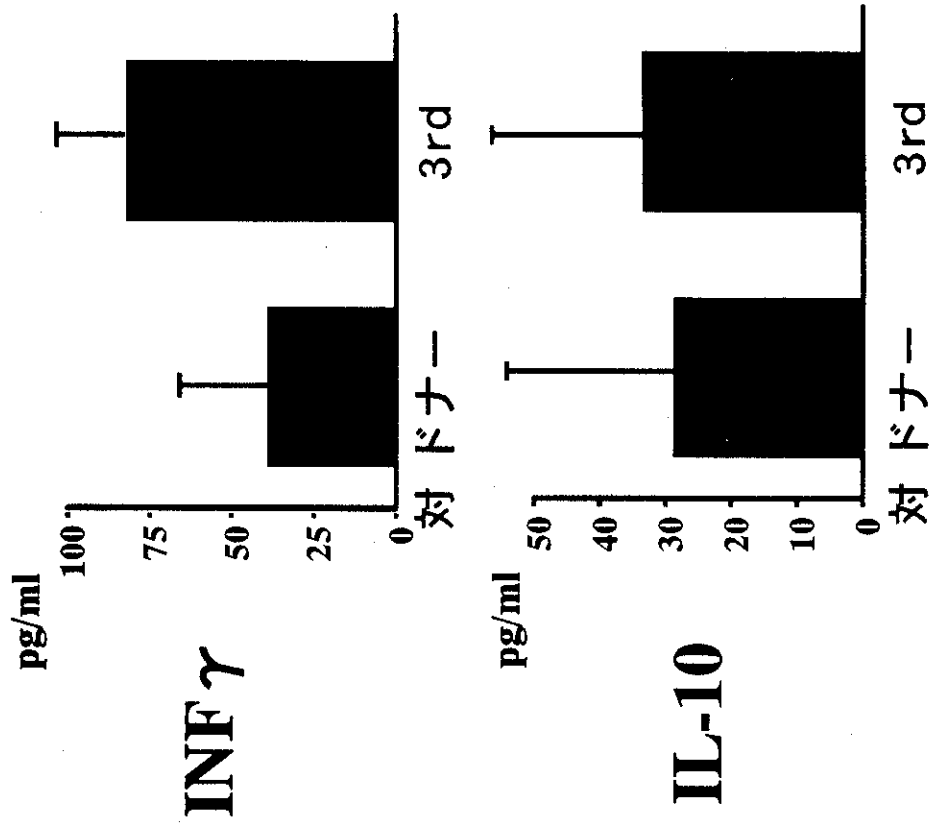


図1. MLRにおけるドナーに対する反応性

術前



離脱

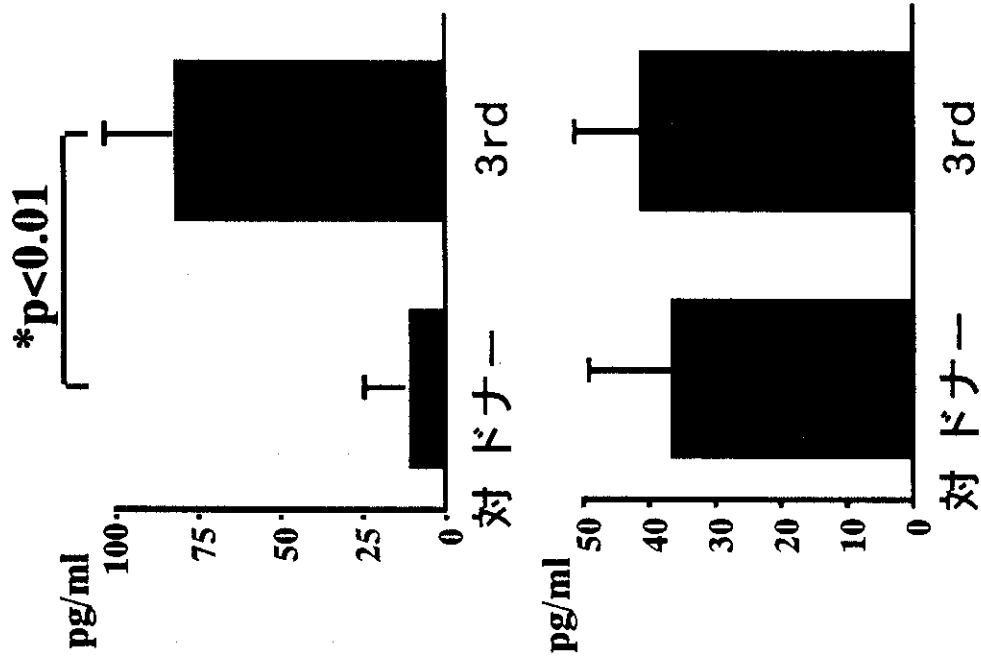


図2. MLR上清中のサイトカインパターン

分担研究報告

研究課題： 移植の免疫寛容に関する研究
(胸腺内ドナー細胞移入による免疫寛容の特性に関する研究)

分担研究者： 里見 進 東北大学医学部第二外科教授
研究協力者： 小林 英司 自治医科大学臨床薬理学助教授
木村 廣光 国立小児病院小児医療研究センター
生体工学研究室室長
土井 秀之 東北大学医学部第二外科助手

研究要旨 本研究では、リンパ球が分化誘導される過程で得られる自己抗原に対する寛容獲得のメカニズムに果たす胸腺支質細胞の役割に注目し、これらの細胞を胸腺内に移入することで皮膚移植をも長期に生着させる系を確立した。長期生着例でV β 陽性細胞の比率からclonadeletionを検討したが差を認めなかった。肝細胞を移入する系で小腸移植を行ったが生着の延長は認めなかった。臨床の長期生着例でステロイドの離脱を試みたが、離脱できない例があり、薬剤を中止する指標の確立が望まれた。抹消リンパ球のキメリズムを検討したがキメリズムノの存在と拒絶反応の頻度や強さに関係はなかった。TCRのV α 、V β レパートリーの変化、CDR3 length assayは寛容誘導の指標と成る可能性が示唆された。

A. 研究目的

免疫学的寛容を誘導にはこれまでも数々のモデルが提示されたが、誘導された寛容状態は弱いものが多く、大動物のレベルで確かめられ臨床応用されたものは非常に少ない。臨床で応用するためには、これまで提唱されたモデルよりも強い免疫寛容のモデルを作成し、得られた実験結果が、ヒトの免疫学的寛容と共通のメカニズムで成り立っているかを検討していくことが必要である。

これまでに胸腺内に細胞を移入し免疫学的寛容を誘導する試みがなされてきたが、一連の実験では胸腺内の移入に非胸腺支質細胞を用いており、実際の移植においては十分な効果を発揮し得ずにいる。本実験では末梢の記憶T細胞を抗リンパ球抗体で除去した後に、前駆細胞の分化を誘導すると考えられる胸腺支質細胞をアロ胸腺内に移植するという独創的な方法で、より強い免疫学的寛容を誘導しようと試みた。

一方、実際の臨床に場においては、様々な理由から免疫抑制剤を中止せざるを得なかった症例で、中止後も移植臓器が生着している例は多く認められる。このような例では寛容状態が誘

導されていると考えられるが、免疫抑制剤を中止した症例の中には拒絶反応で脱落する例もあり、寛容状態を引き起こす誘因や、維持の機構は未解決の問題として残されている。それ故に、寛容状態の成立していると思われ長期の移植症例の免疫能を分析し、免疫抑制剤を中止する理論的根拠を明らかにしていくことは、移植の臨床においては大きな課題である。

本研究の目的は、従来手法よりもさらに強力な免疫学的寛容状態を誘導するモデルを作成し寛容誘導の機序を明らかにするとともに、臨床に応用することにある。

B. 研究方法

A)胸腺内細胞移入の研究

1.胸腺内胸腺上皮細胞及び胸腺ナース細胞移入による免疫学的寛容の誘導に関する研究

a) 睨ラ氏島移植における生着延長効果

BALB/c 由来の胸腺上皮細胞と胸腺ナース細胞 2×10^5 をレシピエントの胸腺内に移入した後に、睨ラ氏島移植を行い生着延長効果を検討した。角質細胞を同数胸腺内に移入した群をコントロールとした。レシピエントの末梢記憶リ

ンパ球を除去する目的で、移植前に抗リンパ球抗体を3回腹腔内投与したが、移植後は免疫抑制剤は使用しなかった。

b) 皮膚移植における生着延長効果

ラ氏島移植と同様のプロトコールで皮膚移植を行った。

c) ラ氏島移植後の皮膚移植

免疫学的寛容状態が維持されているかを検討するために、C3H/HeレシピエントにBALB/cラ氏島移植を行った後に、ラ氏島移植片を長期生着したマウスに、同系ドナーの皮膚を移植した。

d) 胸腺キメラの成立に関する研究

ラ氏島移植が長期生着したレシピエントの胸腺を移植後279日に摘出し、BALB/cのClass 1抗原H-2Kに対するモノクローナル抗体で染色した。

e) 胸腺内肝細胞移入後の小腸移植に関する研究

肝移植と同時に小腸移植を行うと小腸移植の生着が延長するが、この効果が肝細胞の胸腺内移入においても認められるかを検討した。

2. 胸腺内胸腺細胞移入による寛容誘導の機序に関する検討

抹消リンパ節内T細胞のサブセット及びT細胞抗原レセプターの解析

ラ氏島を長期に生着したレシピエントの抹消リンパ節を摘出しCD4又はCD8 positive細胞の比率を検討した。さらにVb陽性細胞の比率を調べた

B) 臨床例での免疫学的寛容の検討

1. 腎移植後末梢マイクロキメリズムの成立と拒絶反応頻度の検討

腎移植生着例中男性から女性に移植された例についてレシピエントの末梢血中にドナー由来のY染色体が存在するか否かをPCR法にて検討し、キメリズムの存在と拒絶反応の頻度、強さに関連があるかを検討した。

2. 腎移植後長期生着者のステロイド離脱の試み

腎機能が安定している症例に、段階的にステロイドから離脱するプロトコールを実施した。

3. 生体部分肝移植患者での末梢リンパ球にお

けるTCR (T細胞レセプター) レパートリー及び、CDR3 size spectrotypingの変化に関する検討

TCRレパートリーの解析をMicroplate hybridization assayにて行った。V α 鎖サブファミリー40種類、V β 鎖37種類について検討した。

成熟型T細胞のTCRの可変部の中で抗原ペプチドと結合するCDR3部のPCR産物をsequenceし、Lengthanalysisを行った。

C. 研究結果

A. 胸腺内細胞移入の検討

1. 胸腺内胸腺上皮細胞移入による免疫学的寛容の誘導に関する研究

a) 無処置群のラ氏島は14.5日で拒絶されるが、ALSを投与すると52.6日まで生着が延長した。ALSに加えて胸腺内に胸腺上皮細胞を移入した群では、200日を越える生着延長効果を得た。胸腺内に移入した胸腺上皮と異なるドナーからのラ氏島は拒絶された(表1)。100日を越えて生着しているラ氏島移植の組織にはリンパ球の浸潤もなく拒絶反応は起こっていない。

b) 皮膚移植においても胸腺内胸腺上皮細胞移入による生着延長効果が認められた。胸腺内へ細胞を移入した群では100日を越える生着延長効果を得た。胸(表2)。

c) ラ氏島を長期に生着しているレシピエントへの皮膚移植はいずれも50日を越える生着延長を示した。(表3)。

d) ラ氏島を生着しているレシピエントの胸腺内にはドナー由来の細胞が存在し胸腺内キメラが成立していた。

e) 無処置の胸腺内には肝細胞が存在し、胸腺内キメラが成立していた。しかしながら小腸移植の生着延長効果は認められなかった。小腸が拒絶された後も肝細胞は胸腺内に存在していた。

2. ラ氏島を長期に生着したレシピエントのCD4,CD8サブセットは同週令のコントロールと差がなかった。またVb陽性細胞の比率にも差を認めなかった。

B) 臨床例での免疫学的寛容に関する検討

1. 腎移植患者での末梢キメリズムと拒絶反応に関する検討

Donor specific transfusion を施行した例では高率に末梢血キメリズムが成立していた。しかし拒絶反応の頻度や強さに関してはキメリズムの成立、存続の期間とに有意差を認めなかった。

2. 腎移植長期生着者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その内2例に高脂血症の改善を認めた。3例が拒絶反応、1例がステロイド離脱症状で離脱に失敗した。再投与で離脱前の状態に復帰した。

3. TCRレパートリー及び、CDR3の解析

a) TCRレパートリーの解析

図1に α 鎖(上段)、 β 鎖(下段)の解析結果を示す。棒グラフは正常人の平均を示し、ドットが肝移植者の値である。肝移植後にレパートリーの変化が見られるが、骨髄移植で見られた変化に比すると小さかった。

b) CDR3 length assay

移植前、移植後の末梢血サンプルについて、TCRレパートリーの変化のかかわらず、23種のV β セグメントについてCDR3 size spectrotyping を解析した。その結果、長期にクローナルバンドが出現する症例と変化が殆ど無い症例に分けられた。高頻度に出現する症例はサイクロ投与で拒絶反応が認められた例や、FK506投与でも拒絶反応、感染症で安定しない例であった。これに対して変化のない症例は拒絶反応を殆ど起こさなかった症例であった。

D. 考察

アロの細胞を胸腺内に移入することでアロの抗原を自己として認識させ免疫学的寛容を誘導し、移植に応用する試みが数多く見られる。しかしこれまでの研究ではNaji等の報告を含め、得られた寛容状態は比較的弱く、かつ移入した細胞原基に留まるものであった。

我々はマウスの胸腺上皮細胞と胸腺ナース細胞を胸腺内に移入して胸腺内キメリズムを成立させ、暁ラ氏島のみならず皮膚移植をも長期に生着させる強い寛容状態を誘導しえた。またラ氏島を生着しているレシピエントは、その後の皮膚移植を免疫抑制無しでも生着させ、寛容状

態が成立していることが確認された。この寛容は移入した胸腺上皮に特異的であり、かつ胸腺外移入では効果がなかったことより、アロ胸腺内に存在するドナーの胸腺上皮がレシピエントのTリンパ球の分化に何らかの影響を与えた結果と考えられる。しかしながらその機序に関しては不明のままである。我々のモデルでの寛容機序として、ドナーアロ抗原特異的なTリンパ球の消去あるいは不活化が考えられる。これらを検討する一つの方法として、寛容が成立したマウスのT細胞のサブセットの解析とT cell receptor (TCR)の解析を行ったが、無処置のマウスとの間に差を認めなかった。

移植が困難とされている小腸移植で、肝臓移植と小腸移植を同時に行った場合比較的成績の良いことが鎌田等によって報告されている。肝細胞の存在が小腸移植に有利に働くかを検討するために、胸腺内に肝細胞を移入した後に小腸移植を行ったが、生着の延長は認められなかった。しかしながら小腸移植が拒絶された後も肝細胞は胸腺内に存在しており、胸腺が免疫学的に特殊な環境であることが示唆された。

長期生着例で免疫抑制剤を切る指標として、末梢血でのキメリズム、T細胞でのTCRレパートリーの変化、CDR3のlength assayを行った。CDR3のクローナリティーの変化がその指標になりうるかもしれないとの結果を得たが、今後のさらなる検討が必要であろう。

E. 評価

本研究の目的は臨床に応用できる免疫学的寛容状態を人為的に創り出すことと、臨床に於いて寛容状態が成立していると考えられる長期生着患者で、免疫抑制剤の中止の目安となる使用を確立することにあった。胸腺内への細胞移入による免疫学的寛容誘導に関しては、移入細胞として胸腺上皮と胸腺ナース細胞を用いた我々の系で、小動物では従来の方法よりも強力な寛容状態を誘導できた。この寛容はラ氏島のみならず皮膚移植をも長期に生着させる強力なものであった。寛容誘導の機序としてTCRクローンの消失、スプレッサー細胞の出現、キメリズムの関与を検討したが正確な機序の解明には到らなかった。人への臨床応用のために大動物での

実験を試みたが、大動物の研究では胸腺上皮の分離培養、胸腺ナース細胞の分離培養が困難で、かつその代用としようとした胸腺そのものが萎縮しており、移入細胞としても、また移入の場所としても使用できなかった。人の胸腺は成人では萎縮しているが、最近になり機能的にはまだT細胞の中核として働いているとの報告もある。萎縮した胸腺を同定できれば胸腺内への細胞移入による寛容誘導の可能性は残されていると考えている。

臨床での長期生着例の検討では、腎移植に於いて、ドナー血リンパ球を術前に投与された例に末梢血キメリズムの存在することが分かった。但し、キメリズムと拒絶反応の発生頻度、強さには関連が無く、キメリズムをもって寛容状態の判断すなわち免疫抑制剤の中止の目安にすることは出来ないとの結論に達した。一方、長期患者で腎機能の安定している者にステロイドの離脱を試みたが、拒絶反応の為に再投与を余儀なくされた例があった。長期で安定していると思われても免疫学的には寛容といえない症例が有り、ステロイドだけの離脱でも困難であれば、イムランやサイクロスポリン、FK506をの離脱はより困難と予想される。免疫学的反応のより正確な分析が必要になる。平成11年度にT細胞のTCRレパートリー解析、さらにはその可変部の抗原ペプチドとの結合部(CDR3)の詳細な検討を行ってきた。比較的安定した長期の時期でも拒絶反応や感染症を経験した症例ではCDR3 assayで多くのクローンの増加が継続していることが分かった。拒絶反応の無かった例ではクローンの増加は非常に少なかった。クローンの変化が完全に終息する時期が免疫学的寛容を意味するのか、さらには長期例で出現するクローンがサプレッサー細胞として作用しているかの検討は今後、臨床例での時間的推移を追って検討する必要がある。

F. 結論

1) 小動物では免疫学的寛容状態を胸腺内へのアロ胸腺上皮と、ナース細胞の移入によって誘導できた。しかし、大動物では難しくヒトへの応用は困難であった。

2) 臨床例では長期生着し安定している症例で

も、免疫抑制剤からの離脱は困難で、離脱の為に安全な指標が必要である。TCRのCDR3 length assayにその可能性があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Koja, H. Doi, S. Satomi, K. Fujimori, M. Takemura, N. Ohkohchi, S. Miura, Y. Takeda, K. Morimoto, T. Itoh, Y. Taguchi, H. Okazaki, Induction of tolerance to islet and skin allografts by intrathymic inoculation of thymic stromal cell clones in mice, Transplantation Proceedings 29:765-766, 1997
2. H. Katoh, N. Ohkohchi, T. Orii, H. Doi, S. Satomi, Effectiveness of 15-Deoxypergualin on steroid-resistant acute rejection in living related liver transplantation, Transplantation Proceedings 29:553-554, 1997
3. M. Sakurada, H. Okazaki, T. Sato, S. Miura, N. Amada, N. Ohkohchi, S. Satomi, Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with donor-specific blood, Transplantation Proceedings 29:1187-1188, 1997
4. Hirota Katoh, Nobuhiro Ohkohchi, Susumu Satomi, Satoru Shimaoka, Ryoji Ohi, Living related partial liver transplantation in biliary atresia: 11 cases of experience, Tohoku J. Exp. Med. 181:139-144, 1997
5. Yorihiro Akamatsu, Nobuhiro Ohkohchi, Kazuhiko Seya, Susumu Satomi, Analysis of bilirubin fraction in the bile for early diagnosis of acute rejection in living related liver transplantation, Tohoku J. Exp. Med. 181:145-154, 1997
6. J. Takayama, N. Ohkohchi et al Living related liver transplantation in patients with ABO incompatibility, Transplantation proceedings 30:3504-3506, 1998
7. K. yasuda, S. satomi et al

Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of IL-2 receptor, *International Immunology* 10(5): 561-567, 1998

8.

2. 学会発表

1. H. Doi, S. Satomi et al., Induction of tolerance to islet and skin allografts by intrathymic inoculation of thymic stromal cell clones in mouse, 16th International Congress of the Transplantation Society, 1996/8/28

2. M. Sakurada, S. Satomi, et al., Donor specific transfusion prior to living related renal transplant can induce peripheral blood chimerism, *American Society of Transplant Surgeon*, 1997/5/14

3. N. Kawagishi, S. Satomi, et al., Combination of mAb against SLA class I and human CD2, CD11a or CD45 decreases the in vitro human CTL killing against pig PBL, 4th International Congress of Xeno Transplantation, 1997/9/1

4. 高山純、里見進他、肝移植における免疫抑制剤療法と拒絶反応、第33回日本移植学会、1997/9/18

5. J. Takayama, S. Satomi, et al., Living related liver transplantation in patients with ABO-incompatibility, 5th Congress of Asian Society of Transplantation, 1997/12/7

6. 佐藤雅榮、里見進他、当科における腎移植慢性期患者に対するステロイド離脱の試み、第31回日本腎移植臨床検討会、1998/1/24

7. 小山田尚、里見進、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、1998/4/16

8. Y. Akamatsu, N. Ohkochi, 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

9. 小山田尚、大河内信弘、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

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. 水野豊、菊地廣行、藤盛啓盛、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

12. Y. Akamatsu, N. Ohcohi, H. Doi, S. Satomi,

The effect of depletion of Kupffer cells /macrophages in acute rejection after liver transplantation, 25th Annual Scientific Meeting of American society of Transplantation surgeons, 1999/5/20

13. N. Koyamada, N. Ohcochi, S. Satomi et al, Strategy for chronic rejection in recipient of living related liver transplantation, 6th Asian Society of Transplantation, 1999/9/21

14. Y. Mizuno, H. Kikichi, K. Fuzimori at al, Trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients with long-term ALLOGRAFT SURVIVAL, 6th Asian Society of Transplantation, 1999/9/21

分担研究報告

Flt3 ligand と骨髄移植併用による慢性拒絶反応の予防に関する研究

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

ドナー由来リンパ系細胞がレシピエント体内に生着する microchimerism(MC)の成立がドナー特異的免疫寛容の導入に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、MC を長期間維持するのは困難であり、MC が慢性拒絶反応に抑制的な作用するかは未だ不明である。そこで本研究では他の本研究では早期に慢性拒絶反応が生じる異所性気管移植モデル¹を用い MC が慢性拒絶反応に効果的であるか、また、造血幹細胞増殖因子である Flt-3 ligand を用いることにより長期にわたり MC を維持できるかを検討した。【方法】雄 Lewis rat ドナーとして、雌 Brown-Norway rat をレシピエントとして使用し異所性気管移植を行った。ドナー骨髄細胞を採取し 5×10^7 個を経静脈的に移植した。Flt-3 ligand を移植当日より 3 日間腹腔内に投与した。flow cytometry(FC)、PCR 法にてドナー由来リンパ系細胞を検索した。移植した気管を移植後 4 週、6 週の時点で摘出し気管内腔狭窄率を測定した。【結果】 FC では、ドナー由来細胞は検出されなかった。気管内腔狭窄率は免疫抑制剤のみを投与した群(FK 群)、FK+BMT 群、FK+BMT+FL 群の各群について検討した。移植後 4 週では、FK+BMT 群は FK 群に比べ有意に気管狭窄率が低かった。移植後 6 週では、FK+BMT+FL 群は、FK 群、FK+BMT 群に対し、有意に低かった。PCR によるドナー特異的 DNA の検索では移植後 4 週では末梢血、脾細胞において FK+BMT 群、FK+BMT+FL 群でドナー特異的 DNA を認めた。移植後 6 週では FK+BMT 群は脾細胞において、FK+BMT+FL 群では末梢血、脾細胞においてドナー特異的 DNA を認めた。【結論】 MC の成立は慢性拒絶反応にも抑制的に働くと考えられた。また Flt-3 ligand は MC の維持に有効であると考えられた。

1.研究目的

臓器移植後の長期生存の主な阻害因子は、免疫抑制剤の副作用に起因する合併症と慢性拒絶反応による移植臓器不全である。ドナー特異的免疫寛容の導入は、免疫抑制剤の減量または中止を可能とし、同時に慢性拒絶の予防効果から移植患者の長期生存率向上が期待されている。固形臓器移植とともにドナーから採取した骨髄細胞を移植し、microchimerism を導入し、ドナー特異的免疫寛容を誘導する試みが臨床応用されているが、移植後早期に microchimerism が消失し免疫寛容状態を維持するにはいたっていない。最近骨髄幹細胞増殖因子として cloning された Flt-3 ligand 用い、microchimerism の維持、ドナー特異的免疫寛容を誘導が可能であるかをラット異所性気管移植モデルで検討した。

2.研究方法

体重 200-250g の Lewis rat (LEW;RT1l)をドナーとして、体重 170-200g の Brown-Norway rat(B.N.;RT1n)をレシピエントとして使用した。

異所性気管移植

ドナー手術

LEW に pentobarbital sodium を 30mg/kg 腹腔内投与し全身麻酔をかけた後、前頸部より前胸部にかけて皮膚切開をおき、筋組織を鈍的に剥離し気管を露出し甲状軟骨から気管分岐部の範囲で摘出した。気管は摘出後直ちに内腔を生理的食塩水 10ml で洗浄し、全長約 2cm 程度にトリミングして摂氏 4 度に冷却した生理的食塩水中に保存した。

レシピエント手術

BN に pentobarbital sodium を 15mg/kg 腹腔内投与し全身麻酔をかけた後、上腹部を切開し大網を胃、脾臓とともに露出した。大網に小切開を加えドナーより摘出した気管を留置し、大網切開部を 6-0 ポリプロピレン糸にて縫合した。

骨髄移植

ドナーラットを気管摘出後脱血死させ、大腿骨、頸骨を摘出した。骨両端を切断し注射針付きシリンジを用い RPMI1640 で骨髄腔を wash out した。この骨髄細胞浮遊液をナイロ

ンメッシュでろ過し、ろ液を冷却遠心し上清を除き、再び RPMI1640 を 1cc 加えた。血球計算板で細胞数を計算し、骨髓細胞 5×10^7 個を気管植え込み直後のレシピエントラットに尾静脈から移植した。なお骨髓細胞はトリパンブルー液で染色後検鏡し生細胞率が 90%以上であることを確認した。

免疫抑制剤投与

tacrolimus 1.5mg/kg を移植当日より 7 日間腹腔内に投与した。

Flt-3 ligand 投与

Flt-3 ligand 40 μ g/kg を移植当日より 2 日間腹腔内に投与した。

組織学的検討

移植後 4 週または 6 週間後に、レシピエントラットに pentobarbital sodium を 30mg/kg 腹腔内投与し全身麻酔をかけた後脱血死させ、グラフトを摘出した。摘出したグラフトは直ちに 20%フォルマリン中で固定した。組織標本はパラフィン包埋後、気管横断面厚さ 5 μ m の切片として通常のヘマトキシリン-エオジン染色を行った。これを顕微鏡で写真撮影し、画像解析ソフト (NIH image, USA) を用いて解析した。

気管軟骨内側の面積と、開存している気管内腔の面積を測定し、 $100 - (\text{開存している気管内腔の面積} / \text{気管軟骨内側の面積}) \times 100$ を狭窄率 (luminal obstruction) (%) とした。

Flow cytometry

移植後 4 週または 6 週間後に、レシピエントラットより末梢血をヘパリン加採血し、LEW MHC に対する FITC 標識モノクローナル抗体 (MRC OX-3) を用い Flow cytometry を行いドナー細胞の検索を行った。

統計学的処理

狭窄率の統計学的処理は Mann-Whitney test で行い危険率 1%以下で有意差とした。

倫理面への配慮

本実験における実験動物の取り扱いについて

は、東京女子医科大学動物実験倫理委員会規定を遵守した。

3. 結果および考察

結果

Flow cytometry

骨髓移植 + 免疫抑制剤投与群、骨髓移植 + 免疫抑制剤投与 + Flt-3 ligand 投与群の 2 群について、移植後 4 週後の時点で測定した。各群ともドナー由来の細胞は検出できなかった。

組織学的検討

対象例として、ドナー、レシピエントともに B.N. ラットを用いたの同系移植 (n=5)、免疫抑制剤のみを投与した群 (FK 群) (移植後 4 週、n=5)、骨髓移植 + 免疫抑制剤投与群 (FK+BMT 群) (移植後 4 週、6 週、各 n=5)、骨髓移植 + 免疫抑制剤投与 + Flt-3 ligand 投与群 (FK+BMT+FL 群) (移植後 4 週、6 週、各 n=5) の各群について検討した。移植後 4 週の比較では、FK+BMT 群は、FK 群に比べ有意に気管狭窄率が低かった。(Figure 1)

6 週での比較では、FK 群、FK+BMT に対し、FK+BMT+FL 群では有意に狭窄率が低かった。(Figure 2)

考察

ラット異所性気管移植モデルは同所性気管移植モデルに比べて肺移植における慢性拒絶反応である obliterative broncholitis を移植後早期より再現できるとされている。従来より microchimerism の導入が急性拒絶反応の抑制に効果があるとされてきたが、microchimerism を長期にわたって維持することが困難であるため、慢性拒絶反応においても効果的か否かは明らかではなかった。今回の研究で移植後 4 週の時点において FK+BMT 群が FK 群に比べ有意に拒絶反応が抑制されていることより、microchimerism が慢性拒絶反応についても抑制的に作用する可能性が示唆された。

Flt-3 は、受容体型 tyrosine kinase で hematopoietic progenitor cell とされている CD34(+) cell に発現している。その ligand は血液幹細胞の増殖を促進すると報告されている。また特に、樹状細胞がドナー特異的免疫寛容導入に重要な働きをしていると報告されているが、Flt-3 ligand は樹状細胞の増殖させるとされている。今回の実験では、移植後 6 週で Flt-3 投与群が他の群に比べ有意に拒絶反応が抑制されていたが、これは Flt-3 投与により microchimerism がより長期にわたり維持された結果と考えることができる。しかし、移植後 4 週の末梢血における flow cytometry では、FK+BMT 群、FK+BMT+FL 群ともにドナー由来のリンパ球は検出されなかった。同様の実験で、PCR 法によってドナー由来 DNA が確認されたという報告があり、また現在我々が進めている実験でも FK+BMT 群で移植後 4 週の時点で PCR 法により、レシピエントの末梢血、胸腺、脾臓、骨髄よりドナー由来の DNA が検出されていることから、今回の実験においても flow cytometry による検出感度以下のレベルで microchimerism が成立していたと考えられる。

5.結論

microchimerism が急性拒絶反応だけではなく、慢性拒絶反応に対しても効果的であることが明らかになった。

Flt-3 ligand の投与が拒絶反応抑制に効果的であった。これは Flt-3 ligand 投与により microchimerism が長期間維持されたためと考えられた。

6.研究発表

(1) 国内

口頭発表 1件
学会発表

胸部外科学会総会 (1998,10 東京)

(2) 海外

なし

7.知的所有権の出願、取得状況

なし

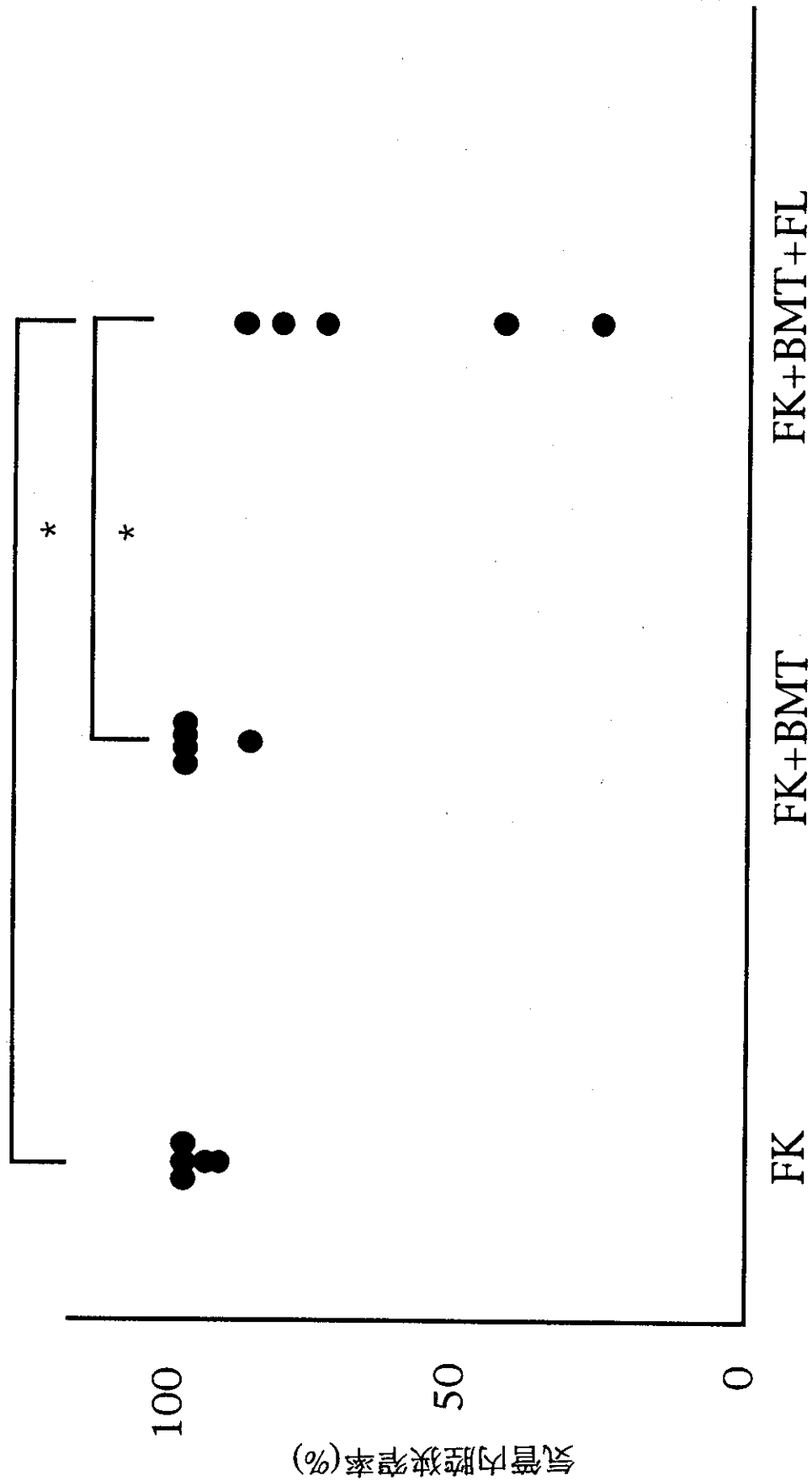


Figure 2. 移植後6週における、FK,FK+BMT,FK+BMT+FLの各群の気管内腔狭窄率。
FK+BMT+FL群は、FK,FK+BMT各群に比べ有意に気管内腔狭窄率が低かった。(* $p < 0.01$)

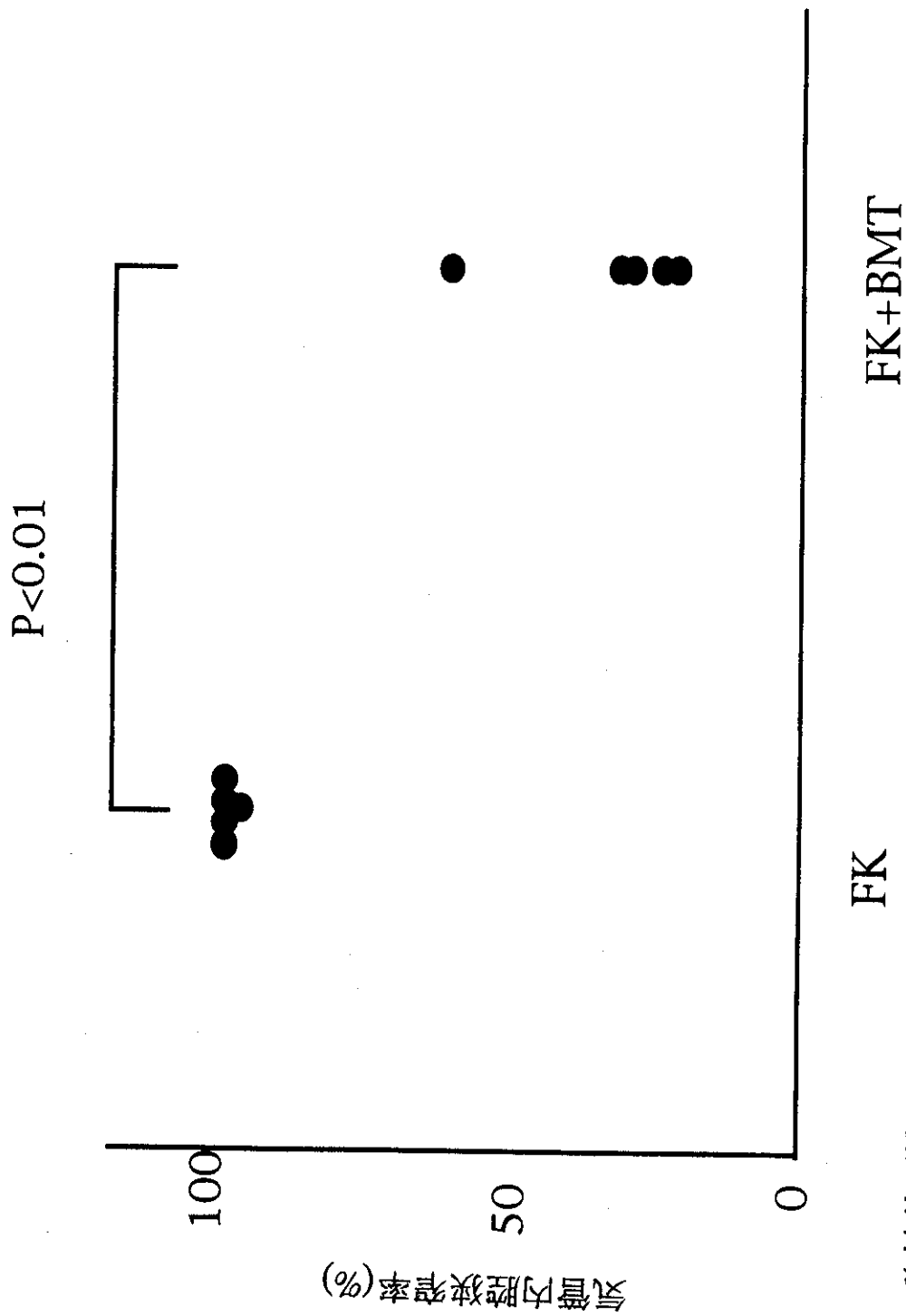


Figure 1. 移植後6週における、FK,FK+BMTの各群の気管内腔狭窄率。FK+BMT群は、FK群に比べて有意に気管内腔狭窄率が低かった。(p<0.01)

臓器移植におけるサイトメガロウイルス（CMV）感染症の診断・治療と免疫寛容のかかわり

分担協力者 南嶋洋一 宮崎医科大学副学長
研究協力者 峰松俊夫 宮崎医科大学微生物学講座助手
吉田朱美 宮崎医科大学実験実習機器センター感染部門技官

研究要旨 サイトメガロウイルス(CMV)は移植患者などの易感染性宿主において重篤なCMV感染症を引き起こす。しかしながら、日本人成人の約90%はすでにCMVに不顕性に感染している。したがって、単なるCMV感染と治療を要するCMV感染症の判別が重要である。我々は臓器移植患者に好発するCMV感染症の診断において、従来のCMV分離に代わりうる新しい診断法を研究した。CMVのp65抗原検出、核酸検出、抗CMV抗体のavidity法について検討し、(CMV)感染症の発症予知・早期診断・治療の指標となる診断法の確立、ならびに易感染性宿主における抗CMV免疫能の評価、CMV感染症の発症形式の推測についての検討を行った。

我々が検討したこれらの方法は他の微生物の検査法としても応用可能であり、特別な機器を必要としないため、検査法として簡単に導入しうるものである。そのため、全国の医療施設での使用が可能であり、今後、移植後感染症の病原診断の他、化学療法の指標、拒絶反応との鑑別診断など、多目的に活用されることが期待される。

A. 研究目的

サイトメガロウイルス(CMV)は移植患者やエイズ患者などの易感染性宿主においては網膜炎、肺臓炎(肺炎)をはじめとする重篤なCMV感染症を引き起こし、しばしば失明さらに失命するに至る。日本人成人の90%以上がCMVのキャリアーであり、体内のどこかにCMVが潜伏している。移植に際しては、免疫抑制療法を強力に施行すればCMVの内因感染が起こりやすく、免疫抑制を緩和すれば拒絶反応が起こりやすくなるというジレンマがある。このような背景の下で、ウイルス学的検査を行い、その検査成績を解釈する際には、単なるCMV感染と治療を要するCMV感染症を判別することが最も重要である。さ

らに、化学療法の指針となる的確な早期迅速診断が必要である。我々は、CMV感染症の迅速診断の目的に適する病原診断法の開発を試みた。また、診療の現場においては、ウイルス感染症の診断法として抗体測定による診断が主体となっているのが現状であるため、CMV感染症診断により有用で実用的な抗体測定法の開発と患者の免疫能との関連を検討することにした。

B. 研究方法

CMV感染者、感染症患者より血液（抗凝固剤含む）を採取し、多形核白血球中のp65抗原の検出、CMV核酸の検出、抗体価の測定ならびに抗体のAvidityの測定を行った。なお、細胞の形態学的観察

を必要としないCMV核酸の検出ならびに抗体測定においては、ろ紙に乾燥させた血液をも検体として用いた(図1)。

CMV抗原血症はCMV粒子のテグメントに存在するp65抗原に対するヒトモノクローナル抗体を用い、直接免疫ペルオキシダーゼ法により、末梢血中のp65抗原陽性多形核白血球を検出した。CMV核酸検出では、ジゴキシゲニン(DIG)ラベルPCR産物を作成し、固相ハイブリダイゼーションにより、96ウェルマイクロタイタープレート上でDIGを検出するPCR-ELISAを行った。また、新しい抗体測定法の試みとしてBlackburnらの(J. Med. Virol. 33: 6-9, 1991)方法に従って、抗体結合力の指標となるAvidity Index (AI)を算出した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントに留意し、臨床施設よりCMVの検査依頼があった検体については主治医に患者本人・家族から主治医にCMV検査の同意があったものを、その他の検体については被験者から研究への同意があったものを用いた。

C. 研究結果

骨髄移植、肝移植、腎移植後のCMV感染症において、CMV p65抗原血症はCMV感染症の発症に一致して、あるいはその発症に先行して検出された。また、抗原血症は末梢血白血球5万個当たりの陽性細胞数として数値化することが可能であり、その陽性細胞数は症状と連動し、免疫能と逆相関した。さらに、抗ウイルス剤の投与による症状の改善とともに抗原血症は陰転し、化学療法の治療期間決定の指標となった。

PCRによるCMV核酸検出においては、乾燥血漿を検体とした場合と冷蔵保存血漿を検体とした場合の結果が一致し

た。また、数カ月室温保存した乾燥血漿をもPCRの検体として用いることが可能であった。

PCR-ELISAによる核酸検出法はゲル内DNAのエチジウムブロマイド染色による検出法よりも高感度であり、96検体を解析するのに要した時間は3時間であった。さらに、PCR-ELISAでは、RT活性を有するDNAポリメラーゼを利用することで、DNAだけでなくRNAも一回のPCR反応で増幅可能であり、一度に多種の病原体の核酸を検出できた。また、吸光度を測定することで半定量的にCMV核酸を検出できた。

抗体の検査については、ろ紙試験紙から回収できたIgGおよびIgMの量は、共に冷蔵保存血漿中のそれらの約80%であった。ろ紙から抽出した抗CMV抗体はELISAにより検出可能であり、その結果は冷蔵保存の血清のものと定性的に一致した。さらにAIについて、腎移植時のCMV初感染(不顕性)、生体肝移植患者におけるCMV肺炎について経時的に測定したところ、AIの推移がそれぞれの感染状態で異なっていた。すなわち、経過中、不顕性初感染ではlow-avidityからhigh-avidityに上昇し、CMV肺炎ではhigh-avidityを維持していた。CMV網膜炎はAI値が減少する時点で発症がみられた。

D. 考察

CMV抗原血症の検査により、CMV感染症と拒絶反応の鑑別、CMV感染症と他の感染症との鑑別、移植患者におけるCMV感染症のモニタリングが可能であった。しかも、抗原陽性細胞数は症状と連動し、免疫能と逆相関するため、CMVに対する免疫能を間接的に評価する目的にも応用できると考えられた。

核酸診断および血清学的診断では乾燥血液・血漿を利用できることを証明し

た。糖尿病検査で用いるパンチ法を応用すれば、患者個人がろ紙に採取することも容易である。さらに、乾燥検体は郵送が可能であり、遠隔地における感染症患者の病原診断と血清学的診断を可能にする。ELISA や PCR-ELISA はマイクロプレートを用いるため、短時間のうちに多数の検体の抗CMV抗体測定やCMV核酸検出が可能である。特にPCR-ELISAはCMV 以外の病原微生物の検査へ理論的に応用可能であるため、移植後の感染症診断として一度に多種の病原体の検出に用いることが可能である。現在、CMV感染症においてPCR単独検査の感染症診断への意義は未だに確立していないが、PCR-ELISAではCMV mRNAの検出やCMVDNAの半定量をも可能とするため診断的意義は大きい。また、高価な機器を必要としないため、検査の導入経費をほとんど必要としない利点がある。

血清学的検査法においては抗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おいて、AIが新しい指標となりうる可能性を示した。

E. 結論

抗原検出、核酸診断、血清学的診断の3つの視点から、CMV感染症の診断のアプローチを行った。抗原血症検査は現在、臓器移植患者とエイズ患者におけるCMV感染症の診断法として保険適用の承認をうけ、民間の検査センターへの検査依頼が可能となっている。また、PCR-ELISAによる核酸診断やAIに基づく抗体測定はいずれも迅速かつ簡便な方法であり、今後、CMV感染症における核酸診断や抗体のAI値測定の有用性が

確立すれば、我々が示した検査法は各病院単位でも日常的に行いうるため、移植医療の発展に大きく寄与できるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

峰松俊夫, 南嶋洋一: 抗サイトメガロウイルス (CMV) 抗体のavidityに基づく感染動態の解析. 第14回ヘルペスウイルス研究会, 1999, 6, 福岡

峰松俊夫, 南嶋洋一: 抗サイトメガロウイルス (CMV) のavidityに基づくCMV感染動態の解析. 47回日本ウイルス学会学術集会, 1999, 11, 横浜

G. 知的所有権の取得状況

なし

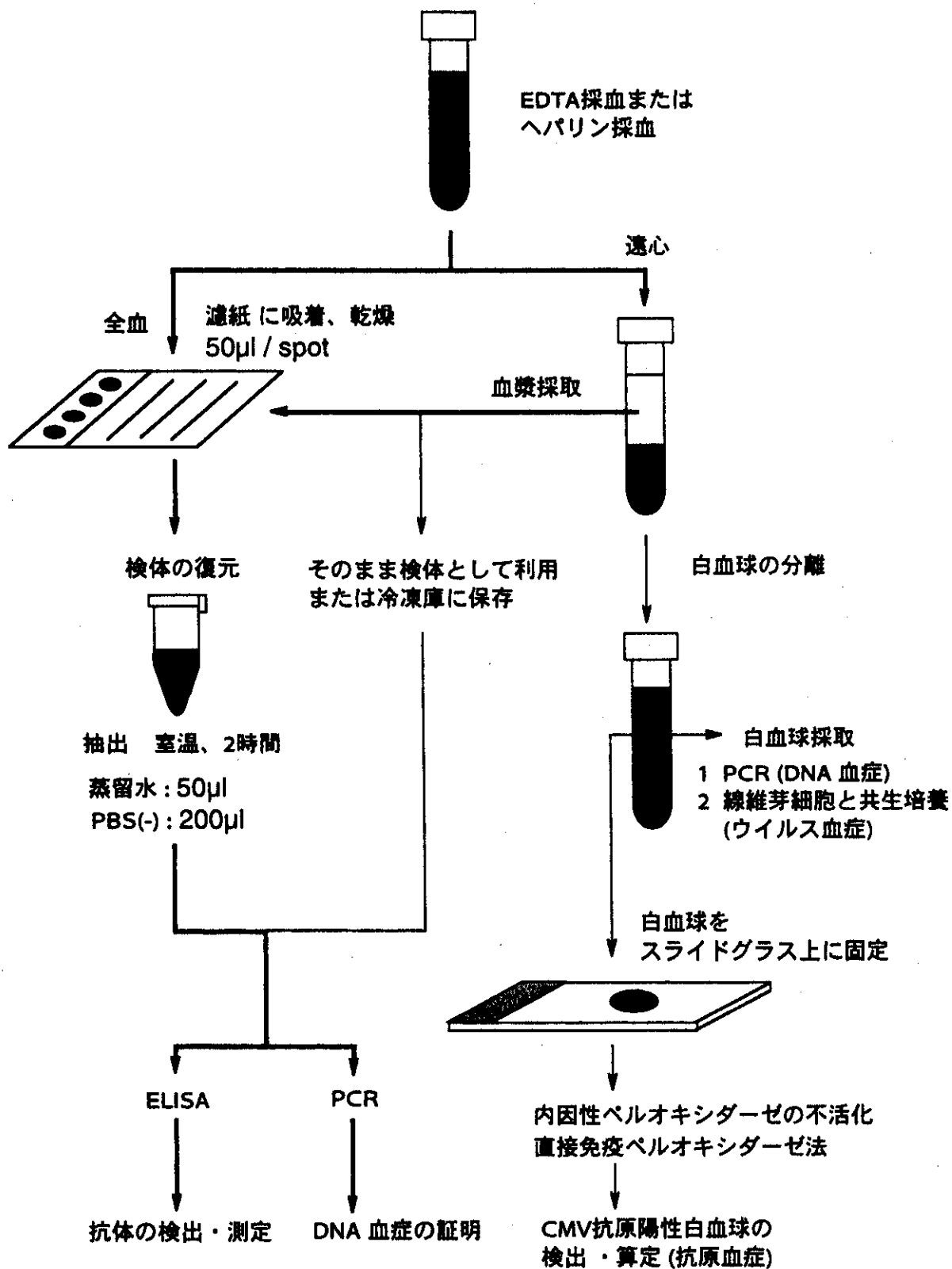


図1 血液検体の検査法