

学 位 論 文 題 名

ラット同種左肺移植の旧姓拒絶反応時における
移植片への反応細胞の接着分子発現に関する研究

学位論文内容の要旨

研究目的

臓器移植における急性拒絶反応機構の解明は、免疫抑制療法の開発や拒絶反応の早期診断を試みる上で重要な課題である。近年心移植や腎移植においてICAM-1/LFA-1, CD28・CTLA4/B7などの接着分子が急性拒絶反応に関与して重要な役割を果たしていることが明らかとなり、これらの接着分子に対するモノクローナル抗体を用いた拒絶反応の抑制効果が報告されている。しかしながら肺移植では、その拒絶時における接着分子の役割りはいまだ十分な研究がなされていない。そこで純系ラットを用いた左肺移植手技を導入し、同種肺移植の急性拒絶反応時における移植片および移植片への浸潤細胞における接着分子の発現を免疫組織化学的手法により経時的に検索した。

実験材料および方法

1. ラット同所性左肺移植手技

- 1). 動物 8-10週齢の雄のラット (WKAH/Hkm:RT-1^K, F344/NSlc:RT-1^{lv1}) を用いた。
- 2). 麻酔 エンフルレン吸入麻酔後pentobarbital sodium 5mg/100gを腹腔内投与し、続いて気管内挿管による人工呼吸下に全身麻酔とした。
- 3). 移植手技 まずrecipientを顕微鏡下に左第4肋間開胸し左肺門部の結合組織を剥離したのち左肺を摘出した。donorは開胸後heparin 1000U/1kgを

心腔内注入した後recipientと同様に左肺を摘出した。吻合は肺静脈、主気管支、肺動脈の順番に9-0ナイロン糸でそれぞれ連続縫合した。特に気管支の吻合はtelescopic型に吻合した。移植肺の換気は気管支吻合が完了してすぐに開始した。CPZ500mgを生理食塩水20mlに溶かして胸腔内に散布した後、胸壁は絹糸で3層に閉鎖した。ラットが完全に覚醒したことを確認して気管内チューブを抜去した。術後はステロイド、抗生物質は使用しなかった。

2. 術後検査項目

1). 経時的胸部X線写真

移植翌日から連日、無麻酔で胸部単純X線撮影をおこなった。

2). 移植肺の組織学的検索

i). H-E染色 術後経時的に屠殺して移植肺を摘出し48時間ホルマリン固定後5 μ mの切片を作製しH-E染色を施行した。

ii). 免疫組織染色

a). 抗体：一次抗体(生化学工業,Tokyo, Japan)：すべてマウス抗ラットリンパ球モノクローナル抗体で、抗CD5抗体(R1-3B3), 抗CD54抗体(1A-29), 抗マクロファージ・好中球抗体(R2-1A6a), 抗CD11 α 抗体(WT.1), 抗CD18抗体(WT.3)を用いた。二次抗体はビオチン標識ヤギ抗マウスIgG+IgA+IgM(ニチレイ,Tokyo, Japan)を用いた。

b). 凍結切片の作製と染色 移植肺を摘出後直ちにO.C.T.包埋液で包埋し液体窒素で凍結させた。6 μ mの切片を作製しアセトン固定を10分間行なった後、内因性ペルオキシダーゼ除去を行ない、一次抗体を4℃で12時間反応させた。二次抗体をラット正常血清と1:1の割合で混合させた後室温で10分間反応させた。発色はDABを用いて行なった。

LFA-1陽性細胞の判定は、各切片につき光学顕微鏡下に400倍の倍率で10視野を無作為に選び、周囲に5個以上の陽性細胞を認める血管の数を算定し、その平均が0のものを-とし、1-5個を+, 5-10個を++, 10個以上を+++とした。

結果

1. 移植成績

施行した48例の移植手術中、32例が予定の屠殺日まで生存した。感染例は組織学的に評価し排除した。

i). 同系移植：Donor, RecipientがともにF344/NSlcの同系移植で成功例6例が得られた。術後7日まで胸部X線写真上全例移植肺の良好な含気が認められた。術後7日目の移植肺の組織像は全例正常なラットにみられる所見とほぼ同様であった。

ii). 同種移植：WKAH/HkmをDonorとし、F344/NSlcをRecipientとした組み合わせで26例の成功例を得た。胸部X線写真では術後4日目までは同系移植と同様に移植肺の良好な含気を認めたが、術後5日目より浸潤影が出現し7日目には移植肺は完全に含気を失った。H-E染色による移植肺の組織学的評価では、術後1-2日目にはvenuleを中心とした単核細胞浸潤perivascular infiltrationを散在性に認め（Grade 1）、2-3日目にはこの所見の頻度が増してさらにこれらの血管にEndolithialitisを認め（Grade 2）、4-6日目では浸潤細胞はその数を増してvenuleの閉塞もみられ肺胞への浸潤もときに認められた（Grade 3）。7日以降は単核球浸潤は間質、肺胞腔に多数みられときに肺胞壁の破壊像を認めた（Grade 4）。術後日数と拒絶の程度の関係はF344/NSlcをDonorとし、WKAH/HkmをRecipientとした組み合わせでも同様であった。

2. 免疫染色

同種肺移植例において経時的に免疫染色を施行した。抗CD5抗体(R1-3B3)による染色では浸潤単核細胞のほとんどが陽性であった。抗マクロファージ・好中球抗体(R2-1A6a)染色ではGrade2-3の時期にvenule周囲の浸潤単核細胞に限局した染色像が認められた。抗CD54抗体(1A-29)染色では肺胞上皮細胞に染色が認められ、経時的变化を認めなかった。抗CD11 α 抗体(WT.1)、抗CD18抗体(WT.3)染色では共にvenule周囲に浸潤した単核細胞に局在して陽性細胞を認め、Grade2-3で最も強く染色された。

要約と考察

1. 同系移植の成績より、手術手技の安定性が確認された。
2. 前記の同種移植の組み合わせでは、急性拒絶反応は手術翌日より漸次進行し術後7日目までに肺胞壁の破壊を伴う像が完成した。
3. 胸部X線写真上、移植肺に浸潤影が認められる以前に組織学的にはすでに移植肺への単核細胞浸潤を認めた。
4. 組織学的な拒絶反応の変化は一定の進行形式をとり、4つの時期に分類可能でそれぞれの段階の組織学的特徴はヒトの場合の急性拒絶程度分類とよく一致した。これよりこのラットの組み合わせはヒト肺移植急性拒絶反応の検索に適当なモデルであると考えられた。
5. 抗CD5抗体(R1-3B3)による染色結果は移植肺への浸潤単核細胞の多数をT細胞が占め拒絶の程度と相関してその数が増加することを示した。浸潤単核細胞の由来は約10%が移植肺由来で約90%が宿主由来であることが報告されている。また拒絶反応の初期から中期にかけてはCD4陽性細胞の割合が高く拒絶が進行するにつれてCD8陽性細胞の比率が増すことがすでに報告されている。
6. R2-1A6aによる染色の結果はこの抗体陽性の細胞が肺胞マクロファージ以外のマクロファージもしくはdendritic cellであることを示唆した。
7. ICAM-1は肺胞上皮細胞に発現しており、急性拒絶反応時にLFA-1陽性細胞のターゲットとなっている可能性が示唆された。
8. LFA-1の発現はvenule周囲への浸潤単核細胞に局在して認められ、その発現のピークがGrade2-3でありGrade4ではすでに発現が認められなかったことより、急性拒絶反応初期から中期段階でのLFA-1分子のvenule周囲での急性拒絶反応への関与が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 武 市 紀 年

副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

ラット同種左肺移植の旧姓拒絶反応時における 移植片への反応細胞の接着分子発現に関する研究

同種肺移植後の急性拒絶反応時における接着分子の動態は免疫抑制療法や拒絶反応の早期診断の基礎となるにもかかわらず、現在十分に理解されていない。一方臓器移植においてICAM-1, LFA-1などの接着分子が急性拒絶反応に関与して重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。本研究は、純系ラットを用いた左肺移植手技を導入し、同種肺移植の急性拒絶反応時における移植片の接着分子発現を免疫組織化学的手法を用いて検索したものである。

動物は主要組織適合抗原の異なる2種類のラットWKAとF344の8-10週齢の雄を用いて、人工呼吸器下に同所性左肺移植を施行した。術後経時的に胸部X線写真の撮影、移植肺のH-E染色および一次抗体として抗CD5抗体(R1-3B3)、抗CD54抗体(1A-29)、抗マクロファージ・好中球抗体(R2-1A6a)、抗CD11 α 抗体(WT.1)、抗CD18抗体(WT.3)を用いた免疫組織学的検索を行なった。

結果は48例の移植手術中32例が予定の屠殺日まで生存した。Donor, RecipientがともにF344/NS1cの同系移植の成功例は術後7日まで胸部X線写真上全例移植肺の良好な含気が認められ、術後7日目の移植肺の組織像は全例正常なラットにみられる所見とほぼ同様であった。これより手術手技の安定性が示された。WKAをDonorとし、F344をRecipientとした組み合わせでは胸部X線写真上7日目までに移植肺は完全に含気を失った。H-E染色では術後1, 3, 5, 7日がそれぞれ急性拒絶反応Grade分類0, 1, 2, 3にそれぞれ相当した。

術後日数と拒絶の程度の関係をF344/NS1cをDonorとし、WKAH/HkmをRecipientとした組み合わせでも同様であった。以上よりこのラットの組み合わせはヒト肺移植急性拒絶反応の検索に適当なモデルであると考えられた。

抗CD5抗体(R1-3B3)による染色では浸潤単核細胞のほとんどが陽性であった。抗マクロファージ・好中球抗体(R2-1A6a)染色ではGrade2-3の時期にvenule周囲の浸潤単核細胞に限局した染色像が認められこの抗体陽性の細胞が肺泡マクロファージ以外のマクロファージもしくはdendritic cellであることを示唆した。抗ICAM-1抗体(1A-29)染色では肺泡壁を中心に染色が認められ、経時的变化を認めなかった。これは正常ラットにおいても認められ、急性拒絶反応時にLFA-1陽性細胞のターゲットとなっていることが示唆された。LFA-1の発現はvenule周囲への浸潤単核細胞に局在して認められた。その発現のピークはGrade2-3でありGrade4ではすでに発現が認められなかった。これは急性拒絶反応初期から中期段階でのLFA-1分子の急性拒絶反応への関与を示唆した。

口頭発表にあたり武市教授より1)LFA-1分子の発現の経時的变化の意義2)心・腎移植と比較して肺移植での特徴的な所見について、細川教授より移植肺とICAM-1の発現の関係について、内野教授より肝臓移植に関連した質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をした。また副査である武市教授、細川教授には個別に審査を受け合格と判定された。

以上本研究は、免疫抑制療法や拒絶反応の早期診断と深く関わる同種肺移植後の接着分子(ICAM-1, LFA-1)の動態を明らかとしたものであり、肺移植後の急性拒絶反応の解明に大きく寄与したものである。よって医学博士の学位授与に充分値するものと判定された。