

学位論文題名

Immunological analysis of rat renal transplant recipients exhibiting long-term survival following treatment with 15-Deoxyspergualin in the early postoperative phase

(15-Deoxyspergualin 投与ラット腎移植長期生着モデルの移植後早期動態に関する免疫学的検討)

学位論文内容の要旨

目 的

15-Deoxyspergualin(以後DSG)はシクロスポリン等とは異なるユニークな免疫抑制機序を有するとされる薬剤であり,本剤を用いて種々の動物実験において主要組織適合抗原が異なる組み合わせで移植片生着延長効果が得られることが報告されている。我々の施設でも力石らがDSG短期投与でRT1の異なるラット腎移植が著明に生着延長することを示した (Effect of 15-deoxyspergualin(DSG) on rat kidney allograft: Immunological mechanisms implicated in prolomged survival. J.Urol. 154:2197-2203,1995)このモデルにおいては,移植腎長期生着ラットにおいて移植後2週目の時点では組織学的に相当数の浸潤リンパ球が存在していることから,移植腎浸潤リンパ球(GIL)が effector として働いていない可能性が示唆された。そこで今回は本モデルの移植後早期における graft維持に関する免疫学的環境,特に免疫反応の主たる場である移植腎に浸潤しているリンパ球の性質および機能を解明することを目的として以下の実験を施行した。

実験材料および方法

- 1) 近交系ラットTO(RT1A<sup>b</sup>B<sup>b</sup>D<sup>b</sup>)をドナー,WKAH(RT1A<sup>k</sup>B<sup>k</sup>D<sup>k</sup>)をレシピエントとする腎移植を行い,DSG非投与群とDSG投与群(5mg/kg/day, day 4 to 7)で生着日数を比較した。
- 2) DSG非投与群では移植後7日目(急性拒絶モデル:以下AR群),DSG投与群では移植後7,14日目(以下DSG7群,DSG14群)に犠牲死させ,3群の末梢血リンパ球(PBL),脾細胞(SPC),GILの相違をフローサイトメトリー法にて検討した。また3群の血清,SPC,GILをmodulator として添加したリンパ球混合培養反応(MLR)に対する抑制活性の違いについてもそれぞれ比較検討した。具体的方法は以下に示した。  
A)フローサイトメトリー法によるリンパ球サブセットの解析:各群移植ラットのPBL,SPC,GILを採取し,それぞれに発現している表面抗原陽性細胞率の割合を検討した。一次抗体としては抗CD4,抗CD8,抗panT,抗インターロイキン2レセプター(以後IL-2R)の4種類を,2次抗体としては,FITC標識の抗ヤギ

マウスIgGを使用した。陽性細胞率の算定はリンパ球層をゲーティングし、ここに存在する陽性細胞数をカウント、下に示した数式に従い算定した。

陽性細胞率 = (陽性細胞数 / (陽性細胞数 + 陰性細胞数)) × 100 (%)

B) MLR抑制効果：TOのマイトマイシンC (MMC)処理リンパ節細胞 (LNC)  $2 \times 10^5$ 個をstimulator, WKAHのLNC  $1 \times 10^5$ 個をresponderとするMLRを行い、各群移植ラットの血清, SPC, GILをこれらに添加しそのMLR抑制効果について検討した。third partyとしてはBUFラット (RT-1<sup>b</sup>, RT-1A<sup>b</sup>B<sup>b</sup>D<sup>b</sup>)のLNCを使用し同様の検討を行った。判定は下に示した数式に従い、無処置WKAH血清またはSPCを同量添加したものに対する%MLRを求め評価した。

%MLR = (ABm + modulator of transplanted rats / (ABm + sera or spleen cells of normal WKAH rats)) × 100 (%) A: responder Bm: MMC処置後のstimulator

## 結 果

1) 生着日数：DSGを投与した際の生着日数は $207.2 \pm 152.8$ 日 (N=7), DSG非投与では $10.2 \pm 3.06$ 日 (N=6)であり, DSG短期投与により本モデルは有意に生着延長した。

2A) リンパ球サブセットの解析：AR群, DSG7群, DSG14群 (各群N=5)ともCD8およびIL-2R陽性細胞率がGILでのみ有意にPBL, SPCに比し高く, CD4/CD8も低下していた。各群間での検討では, DSG7群, DSG14群間でDSG14群のGILでのみCD8およびIL-2R陽性細胞率が有意に低下し, CD4/CD8も上昇していた。これらの違いはAR群, DSG7群間では認められなかった。

2B) MLR抑制効果：i) 血清を添加した際, AR群, DSG7群, DSG14群 (各群N=3)の全てで無処置WKAHの血清を添加した際に比べTO, BUFをstimulatorとしたMLRを添加量依存性に抑制した。この抑制効果については, 各群間の検討ではDSG14群でDSG7群に比し抑制活性は有意に低かった。ii) GILを添加した際はAR群 (N=5), DSG7群 (N=6), DSG14群 (N=3)の全てで, 無処置WKAHのSPCを添加した際に比べ有意にMLRを抑制した。BUFをstimulatorとした際にも有意差は認められなかったが, 抑制効果を有している傾向がみられた。またその%MLR値は各群間で差はなかった。SPCを添加した際はいずれの群においてもMLR抑制効果は認められなかった。

## 考 案

リンパ球サブセットの解析でGILのサブセットが明らかにPBL, SPCと異なり, 加えて7日目から14日目の変化が認められるのはGILのみであることから, GILが最も本モデルの移植後早期における免疫学的環境を反映していると思われた。また7日目ではDSGの使用にかかわらず, サブセットの変化はないことおよび組織学的に相当数のGILが存在することからDSGは細胞障害性T細胞の機能的な抑制効果を有していると思われた。さらに7日目から14日目にかけての変化は活性化したCD8陽性細胞の減少を示す所見であり, あわせて活性化した細胞障害性T細胞の増殖抑制効果も有している可能性も示唆された。MLRの結果から移植後早期より腎移植後ラット血清中には, DSG投与の有無にかかわらず非特異的なMLR抑制因子が存在しており, しかし2週目の時点で1週目に比較してその抑制活性の強さは減弱しており, より程度の弱い生体反応でgraftを維持できるようになってきていると考えられた。また, GILが非特異的なMLR抑制効果を有していたことから, 移植後早期において免疫の主たる場である移植腎にはすでに非特異的な抑制性細胞が存在していると思われた。また, その抑制活性は7日目から14日目にかけて変化しておらず, この間活性化した

CD8陽性細胞の減少を認めることから,本モデルではDSG短期投与で急性拒絶反応を克服することにより,2週目の時点でregulatory T細胞が細胞障害性T細胞に対して相対的に有意となりつつある可能性もあると推察された。

#### 結 語

移植腎浸潤リンパ球が最も本モデルの移植後早期における免疫学的環境を反映していると思われた。DSGは作用機序として活性化したCD8陽性細胞に対する機能的抑制効果および増殖抑制効果を有していると推測された。本モデルにおける移植後早期の免疫学的動態としては,生体反応として非特異的な液性,細胞性抑制因子は2週目以内にすでに存在しており,2週目の時点ですでに抑制性T細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

## Immunological analysis of rat renal transplant recipients exhibiting long-term survival following treatment with 15-Deoxyspergualin in the early postoperative phase

(15-Deoxyspergualin 投与ラット腎移植長期生着モデルの  
移植後早期動態に関する免疫学的検討)

15- $\alpha$  Deoxyspergualin(以後DSG)はシクロスポリン等とは異なるユニークな免疫抑制機序を有するとされる薬剤であり,本剤を用いて種々の動物実験において主要組織適合抗原が異なる組み合わせで移植片生着延長効果が得られることが知られている. 北海道大学泌尿器科でも力石らがDSG短期投与(5mg/kg/day, i.m., day 4 to 7)でRT1の異なるラット腎移植が著明に生着延長することを示し,このモデルにおける生着延長効果について移植腎浸潤リンパ球(GIL)がeffectorとして働いていない可能性等の様々な解析結果を報告した. (J.Urol. 154,1995) 本研究は本モデルの移植後早期におけるgraft維持に関する免疫学的環境,特に免疫反応の主たる場である移植腎に浸潤しているリンパ球の性質および機能を解明することを目的としている. 方法は近交系ラットTO(RT1<sup>l</sup>)をドナー,WKAH(RT1<sup>k</sup>)をレシピエントとする腎移植を行い,DSG非投与群では移植後7日目(急性拒絶モデル:以下AR群),DSG投与群では移植後7,14日目(以下DSG7群,DSG14群)に犠牲死させ,3群の末梢血リンパ球(PBL),脾細胞(SPC),GILを採取し,フローサイトメトリー法にてそれぞれの表面に発現しているリンパ球抗原の検討によりリンパ球サブセットの相違を,さらに3群の血清,SPC,GILをmodulatorとして添加した際のリンパ球混合培養反応(MLR)に対する抑制効果の違いをそれぞれ比較検討した. フローサイトメトリー法によるリンパ球サブセットの解析では,一次抗体として抗CD4,抗CD8,抗panT,抗インターロイキン2レセプター(以後IL-2R)の4種類を,2次抗体としては,FITC標識のgoat anti-mouseIgGを使用し,陽性細胞率についてはリンパ球群をゲーティングの上,ここに存在する陽性細胞率の割合をカウントし算定した. MLRを用いた検討では,TOのマイトマイシンC処理リンパ節細胞(LNC)  $2 \times 10^5$ 個を

stimulator, WKAHのLNC  $1 \times 10^5$ 個をresponderとするMLRを行い,各群移植ラットの血清,SPC,GILをこれらに添加しそのMLR抑制効果を調べた. third partyとしてはBUFラット(RT-1<sup>b</sup>)のLNCを使用した. 判定は無処置WKAH血清またはSPCを同量添加したものに対する%MLRを求め評価した. 結果は,リンパ球サブセットの解析では,AR群,DSG7群,DSG14群(各群N=5)ともGILはすべての群でPBL,SPCに比較して著明に異なるパターンを呈していた. GILに着目するとAR群,DSG7群間では差を認めなかったが,DSG14群ではDSG7群に比しCD8,IL-2R陽性細胞率の低下およびCD4/CD8の上昇を認めた. これらの違いはPBL,SPCでは認められなかった. MLR抑制効果の検討では,血清を添加した際,AR群,DSG7群,DSG14群(各群N=3)の全てで無処置WKAHの血清を添加した際に比べMLRを添加量依存性に抑制した. この抑制効果は,DSG7群でDSG14群に比し顕著であった. この効果はthird partyであるBUFに対しても認められた. GILを添加した際はAR群(N=5),DSG7群(N=6),DSG14群(N=3)の全てで,無処置WKAHのSPCを添加した際に比べ有意にMLRを抑制したが,その抑制効果は各群間で差はなかった. BUFをstimulatorとした際にも同様の抑制効果を有している傾向がみられた. SPCを添加した際はいずれの群においてもMLR抑制効果は認められなかった. 以上の結果より,GILが最も本モデルの移植後早期における免疫学的環境を反映しており,DSGの作用機序としては細胞障害性T細胞の機能的な抑制効果および活性化した細胞障害性T細胞の増殖抑制効果を有していると思われる. さらに非特異的な液性,細胞性抑制因子は移植後早期よりすでに存在しており,14日目の時点では抑制性細胞が重要な役割を果たしている可能性があることが示唆されたと考えられる. 質疑応答では,吉木教授からDSGのB細胞,補体系に対する影響,本モデルのサイトカイン,マクロファージ,今回調べた以外の表面マーカー動態,脾細胞中での抑制性細胞の存在,今後の本実験系に関する将来展望について,上出教授よりDSGのadhesion細胞に対する影響,腎細胞に対するDSGの保護作用について,小柳教授より臨床への応用方法,長期生着ラット移植腎の組織像についての質問がそれぞれあり,いずれの質問に対しても,申請者は今回発表していないデータや他の文献を引用し,おおむね妥当な回答を行った.

この論文は,移植腎浸潤リンパ球の性質,機能を直接証明した点に意義があり,いまだ詳細には解明されていないDSGの作用機序についても言及した点で高く評価され,今後臨床的にDSGを使用した際の急性拒絶反応時の病理組織像と臨床所見との関連について応用できる可能性があり,非常に期待される.

審査員一同は,これらの成果を高く評価し,申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.