モルモットーラット異種肝移植における拒絶反応の機序

－異種肝移植モデルの作製と抗補体物質

Perfluorochemical (FC43)の効果－

学位論文内容の要旨

現在、脳死ドナーからの臓器移植は臓器不全の治療法として確立されているが、ドナー不足の現状から異種移植が再び注目されている。解剖学的、倫理的、社会的などの理由から異種移植のドナーとして、ブタが最も適当であると考えられているが、ブターヒト間の異種移植は系統発生学的には discordant の組み合わせであり、抗体、補体を引き金として発症する超急性拒絶反応が大きな障害となっている。この異種移植拒絶反応の解明を目的とした動物実験モデルとして、大動物ではブター霊長類、小動物ではモルモットーラット間の移植が代表とされる。とくにモルモットーラット間の心移植は、最も激しい超急性拒絶反応を起こす discordant model として類用されているが、肝移植モデルを用いた実験報告は極めて少ない。その原因として、第一に手技的に繁雑であること、第二に血流再開後の移植片が完全に灌流されず、肉眼的にも組織学的にも拒絶の判定が困難であることが挙げられる。モルモット肝移植片の灌流不全の原因が免疫学的反応なのか生理学的現象なのかは明らかでなく、これまで基礎的研究には不適當なモデルであるとされてきた。

本研究は、異種肝移植術の繁用化を目的として、手技的な改良点ならびに血流再開後のモルモット肝移植片の灌流不全の病態生理を検討した。さらに、モルモットーラット異種肝移植における拒絶反応の発生様式について血液生化学的、免疫学的、および病理組織学的に検索するとともに、酸素運搬体として開発された抗補体物質 Perfluorochemical 乳剤 (FC43) を使用して、異種肝移植片の生着延長効果を検討した。

実験 1. モルモット肝移植片の再灌流不全の検討

モルモットーラット異種肝移植術は、肝下部大静脈の吻合にモルモットの左腎静脈を用いることで比較的容易に行えるようになった。モルモット肝移植片の温度に対する感受性を検討するために、モルモット同種、異種肝移植モデルを用いて、肝移植片を 4℃ と 15℃ の lactated Ringer (LR) 液で初期洗流を行った。同種、異種肝移植ともに、4℃ で洗流した場合、移植片は血流再開直後に部分的に灌流されるか、あるいは全く灌流されないのに対し、15℃ で洗流した場合は、移植片は血流再開後約 1-2 分で肝固有色に末梢側まで一様に灌流された。この良好な灌流状態は、摘出肝の門脈造影においても確認された。一方、阻血時間を短縮した異種肝移植片では、4℃ で洗流したにもかかわらず血流再開直後に肝固有色に灌流された。同種肝移植片において、4℃ 洗流群の生着時間 6.06 ± 1.90 時間に対して、15℃ 洗流群は 14.95 ± 10.20 時間と有意な生着延長を示した ($p < 0.05$)。

実験 2. モルモットーラット異種肝移植における FC43 の効果

実験 1 の結果から、LR 洗流液および保存液の温度は 15℃ に設定した。FC43 (25 v/w%)、

Pluronic F68 3.20 v/w%) は、レシピエントの陰茎静脈から移植前 30 分に投与して、未処置対照群と比較検討した。対照群では、血流再開後の移植片は 1-2 分で肝固有有色に灌流され、その後約 5 分で腫大して不均一な色調となり、1、3 時間後では腫大と色調の不均一性はさらに著明となった。一方、FC43 投与群では、1、3 時間後においても移植片の色調は肝固有有色のままに維持され、生着時間も有意に延長した (8.06 ± 1.45 vs 4.23 ± 0.89 時間; $p < 0.005$)。末梢血液所見では、両移植群とも好中球の減少、GOT、GPT 値の上昇、補体活性とくに ACH_{50} 値の著明な低下が認められた。HE 染色では、対照群では血流再開 10 分後から類洞の著明な鬱血と肝細胞の空胞変性、染色の淡明化が認められたのに対し、FC43 投与群では鬱血、肝細胞変性は認められず、血流再開 3 時間後においてもほぼ正常の細胞構築であった。また、免疫組織染色では、FC43 投与によって対照群における類洞、血管内皮の著明な C3 の沈着が抑制され、対照群ではみられなかった RP-1 (抗顆粒球抗体)、ED-1 (抗マクロファージ抗体) 陽性細胞が、FC43 投与群では経時的に増加した。

本研究において、同種、異種移植のいずれにおいても、4℃で洗流したモルモット肝移植片は灌流不全を示したが、一方、15℃で洗流された移植片では血流再開後直ちに灌流され均一な肝固有の色調を示した。以上の結果から、モルモット肝の灌流不全の原因の一つとして低温に対する高い感受性が考えられた。これまでにモルモット同種肝移植における長期生存例の報告はなく、今回の研究においても、15℃洗流群の生存時間は 4℃洗流群に比較して有意に延長したが、最長生存時間は 36 時間であった。長時間生存した例の剖検所見では、4℃洗流群でみられた門脈、腸管の鬱血、腸管の漿膜下出血は認められず、死亡原因は不明であり、モルモットの手術ストレスに対する脆弱性が示唆された。さらに、モルモットは膨大な消化管血管床を有するため門脈遮断によって容易に消化管鬱血、出血を起こしやすいので、門脈を遮断するような実験系、すなわち肝移植のレシピエントとしては限界があることが示唆された。今後、長期生存例を得るにあっては、門脈バイパス術を付加するなど手技的工夫が必要であると考えられた。

本実験における異種肝移植の生着時間は洗流液温度、冷阻血時間に関係なく約 4 時間であった。4℃で洗流した場合は灌流不全により移植片喪失を引き起こし、一方、15℃で洗流された時は、引き続き免疫学的反応によって移植片拒絶を招くと考えられた。そこで、15℃の洗流によりモルモット肝の初期灌流不全をとり除いた異種肝移植モデルを用いて抗補体物質 FC43 の効果を検討した。

FC43 投与群では閉腹時まで肝固有の色調が保たれ、生着時間は未処置対照群と比較して有意に延長した。さらに、FC43 投与群では血流再開 3 時間後においても、HE 染色所見はほぼ正常の細胞構築が保たれ、C3 の沈着が著明に抑制されていたことから、肝移植の超急性拒絶反応においても、心移植モデルと同様に補体第二経路が拒絶反応の最初の引き金になるものと考えられた。しかし、FC43 によって超急性拒絶反応が回避されても生着時間は最長 13.5 時間で、剖検時の肉眼的所見は、色調の不均一と腫脹がみられ、対照群とはほぼ同様の所見であり、遅延性移植片廃絶の原因は補体以外の機序が考えられた。異種肝移植後の末梢血液所見では、対照群は移植直後から白血球とくに好中球と血小板の著明な減少がみられ、FC43 投与群においても 1、3 時間後では有意に減少した。これらの結果から、白血球、血小板は移植片に沈着して消費され、FC43 による補体抑制下においても引き続き拒絶反応が少なくとも血流再開後 1 時間以内に開始されることが推測された。そこで、FC43 による補体抑制後に進行する遅延型異種拒絶反応様式を検討した。

未処置対照群では、顆粒球とマクロファージの浸潤は移植後 3 時間においても軽度であったが、FC43 投与群においては、いずれも経時的に増加し、対照群に比較して浸潤細胞数は有意な増加を示した。これまでモルモットーラット異種肝移植における遅延型異種拒絶反応の詳細な報告はないが、補体が抑制されていない対照群においては、血流再開後、局所の凝固亢進とともに補体を介する超急性液性免疫反応によって肝組織は急激に破壊され、

一方、FC43による補体抑制によって超急性拒絶反応を逃れた後に、好中球、マクロファージなどが関与する細胞性免疫反応が追従されるものと考えられた。

モルモットーラット肝移植は、モルモットの生理学的特徴を考慮した洗流温度、阻血時間の短縮、移植手技の改善を行うことにより繁用化が可能である。モルモットーラット心移植の研究成績が心移植の基礎的研究に大きく貢献しているのと同様に、モルモットーラット肝移植は小動物の discordant 肝移植モデルとして、様々な異種移植免疫研究の分野において極めて有用な役割を果たすものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

モルモットーラット異種肝移植における拒絶反応の機序 — 異種肝移植モデルの作製と抗補体物質 Perfluorochemical (FC43) の効果 —

現在、脳死ドナーからの臓器移植は臓器不全の治療法として確立されているが、ドナー不足の現状から異種移植が再び注目されている。解剖学的、倫理的、社会的などの理由から異種移植のドナーとして、ブタが最も適当であると考えられているが、ブターヒト間の異種移植は系統発生的には discordant の組み合わせであり、抗体、補体を引き金として発症する超急性拒絶反応が大きな障害となっている。この異種移植拒絶反応の解明を目的とした動物実験モデルとして、小動物ではモルモットーラット間の移植が代表とされる。とくにモルモットーラット間の心移植は、最も激しい超急性拒絶反応を起こす discordant model として頻用されているが、肝移植モデルを用いた実験報告は極めて少ない。その原因として、第一に手技的に繁雑であること、第二に血流再開後の移植片が完全に灌流されず、肉眼的にも組織学的にも拒絶の判定が困難であることが挙げられる。モルモット肝移植片の灌流不全の原因が免疫学的反応なのか生理学的現象なのかは明らかでなく、これまで基礎的研究には不適當なモデルであるとされてきた。

本研究は、異種肝移植術の繁用化を目的として、手技的な改良点ならびに血流再開後のモルモット肝移植片の灌流不全の病態生理を検討し、さらにモルモットーラット異種肝移植における拒絶反応の発生様式について血液生化学的、免疫学的、および病理組織学的に検索するとともに、酸素運搬体として開発された抗補体物質 Perfluorochemical 乳剤 (FC43) を使用して、異種肝移植片の生着延長効果を検討したものである。

モルモットーラット異種肝移植術は、肝下部大静脈の吻合にモルモットの左腎静脈を用いることで比較的容易に行えるようになった。モルモット肝移植片の灌流不全に対し、モルモット同種、異種肝移植モデルを用いて、肝移植片を 4℃ と 15℃ の lactated Ringer (LR) 液で初期洗流を行い、肝移植片の温度に対する感受性を検討した。同種、異種肝移植ともに、4℃ で洗流した場合、移植片は血流再開直後に部分的に灌流されるか、あるいは全く灌流されないのに対し、15℃ で洗流した場合は、移植片は血流再開後約 1-2 分で肝固有有色に末梢側まで一様に灌流された。この良好な灌流状態は、摘出肝の門脈造影においても確認され、モルモット肝移植片の灌流不全の原因は生理学的現象であることが明らかとなった。一方、阻血時間を短縮した異種肝移植片では、4℃ で洗流したにもかかわらず血流再開直後

に肝固有色に灌流された。同種肝移植片において、4℃洗流群の生着時間 6.06 ± 1.90 時間に対して、15℃洗流群は 14.95 ± 10.20 時間と有意な生着延長を示した ($p < 0.05$)。

以上の結果から、LR 洗流液の温度を15℃に設定し、モルモットーラット異種肝移植における拒絶反応の発生様式について検討した。FC43 (25 v/w%, Pluronic F68 3.20 v/w%) は、レシピエントの陰茎静脈から移植前 30 分に投与して、未処置対照群と比較検討した。対照群では、血流再開後の移植片は 1-2 分で肝固有色に灌流され、その後約 5 分で腫大して不均一な色調となり、1、3 時間後では腫大と色調の不均一性はさらに著明となった。一方、FC43 投与群では、1、3 時間後においても移植片の色調は肝固有色のままに維持され、生着時間も有意に延長した (8.06 ± 1.45 vs 4.23 ± 0.89 時間; $p < 0.005$)。末梢血液所見では、両移植群とも好中球の減少、GOT、GPT 値の上昇、補体活性とくに ACH_{50} 値の著明な低下が認められた。HE 染色では、対照群では血流再開 10 分後から類洞の著明な鬱血と肝細胞の空胞変性、染色の淡明化が認められたのに対し、FC43 投与群では鬱血、肝細胞変性は認められず、血流再開 3 時間後においてもほぼ正常の細胞構築であった。また、免疫組織染色では、FC43 投与によって対照群における類洞、血管内皮の著明な C3 の沈着が抑制され、対照群ではみられなかった RP-1 (抗顆粒球抗体)、ED-1 (抗マクロファージ抗体) 陽性細胞が、FC43 投与群では経時的に増加した。

本研究において、同種、異種移植のいずれにおいても、4℃で洗流したモルモット肝移植片は灌流不全を示したが、一方、15℃で洗流された移植片では血流再開後直ちに灌流され均一な肝固有の色調を示した。以上の結果から、モルモット肝の灌流不全の原因の一つとして低温に対する高い感受性が考えられた。これまでにモルモット同種肝移植における長期生存例の報告はなく、今回の研究においても、15℃洗流群の生存時間は 4℃洗流群に比較して有意に延長したが、最長生存時間は 36 時間であった。長時間生存した例の剖検所見では、4℃洗流群でみられた門脈、腸管の鬱血、腸管の漿膜下出血は認められず、死亡原因は不明であり、モルモットの手術ストレスに対する脆弱性が示唆された。さらに、モルモットは膨大な消化管血管床を有するため門脈遮断によって容易に消化管鬱血、出血を起こしやすいので、門脈を遮断するような実験系、すなわち肝移植のレシピエントとしては限界があると思われた。本実験における異種肝移植の生着時間は洗流液温度、冷阻血時間に関係なく約 4 時間であった。4℃で洗流した場合は灌流不全により移植片喪失を引き起こし、一方、15℃で洗流された時は、引き続き免疫学的反応によって移植片拒絶を招くと考えられた。そこで、15℃の洗流によりモルモット肝の初期灌流不全をとり除いた異種肝移植モデルを用いて抗補体物質 FC43 の効果を検討した。FC43 投与群では閉腹時まで肝固有の色調が保たれ、生着時間は未処置対照群と比較して有意に延長した。さらに、FC43 投与群では血流再開 3 時間後においても、HE 染色所見はほぼ正常の細胞構築が保たれ、対照群でみられた C3 の著明な沈着が抑制されていたことから、肝移植の超急性拒絶反応においても、心移植モデルと同様に補体第二経路が拒絶反応の最初の引き金になるものと考えられた。しかし、FC43 によって超急性拒絶反応が回避されても生着時間は最長 13.5 時間で、剖検時の肉眼的所見は、色調の不均一と腫脹がみられ、対照群とほぼ同様の所見であり、FC43 投与群の移植片廃絶の原因は補体以外の機序が考えられた。異種肝移植後の末梢血液所見では、対照群は移植直後から白血球とくに好中球と血小板の著明な減少がみられ、FC43 投与群においても 1、3 時間後では有意に減少した。これらの結果から、白血球、血小板は移植片に浸潤して消費され、FC43 による補体抑制下においても引き続き拒絶反応が開始されることが推測された。そこで、FC43 による補体抑制後に進行する異種拒絶反応様式を検討した。未処置対照群では、顆粒球とマクロファージの浸潤は移植後 3 時間においても軽度であったが、FC43 投与群においては、いずれも経時的に増加し、対照群に比較して浸潤細胞数は有意な増加を示した。補体が抑制されていない対照群においては、血流再開後、局所の凝固亢進とともに補体を介する超急性液性免疫反応によって肝組織は急激に破壊され、

一方、FC43による補体抑制によって超急性拒絶反応を逃れた後に、好中球、マクロファージなどが関与する非特異的な細胞性免疫反応が追従されるものと考えられた。今後、これらの浸潤細胞の拒絶反応における役割についてさらに検討が必要であると考えられた。

この論文は、これまで困難とされてきたモルモットーラット肝移植術を手技的な改良と移植片灌流不全の改善によって確立したこと、さらに同モデルの超急性拒絶反応の様式が示されたことで高く評価され、今後様々な異種移植免疫研究の分野において有用な情報を提供するものと期待される。

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。