

犬同種腎移植後の急性拒絶反応に対する 診断と治療に関する研究

第 1 編

メチルプレドニン大量投与時の 臨床検査成績とマクロファージ 遊走阻止活性の推移について

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 田中早苗教授)

田 中 浩 毅

(昭和50年11月21日受稿)

I. 緒 言

臓器移植成功の鍵は拒絶反応を早期にみつけ、早期に至適の免疫抑制法を行い、早期に維持量におとす点にある。

従来の腎移植後の急性拒絶反応の診断は、拒絶反応が起こってその結果生じる腎機能の低下を、臨床的に測定しているものが殆どである。拒絶反応が成立する以前の免疫動態、就中細胞性免疫の動きを定期的に、とくに臨床的に急性拒絶反応を多少疑わしめる場合、checkしてやれば、拒絶反応を開始以前にみつけ、少くとも拒絶反応の開始早期で免疫抑制療法にもちこめるものと思われる。かかる方向での研究がいわゆる免疫生物学的診断法といわれているものであるが、リンパ球混合培養試験¹⁾や、免疫細胞癒合試験²⁾や、マクロファージ遊走阻止試験³⁾や、移植組織に対する抗体の出現に関する試験⁴⁾など多数のものがある。癌患者の術前、術後を通しての免疫状態を check する細胞性免疫テストの中、マクロファージ遊走阻止試験が再現性が高く、容易に臨床レベルに組み込まれることから、阪上⁵⁾は本試験を腎移植後の細胞性免疫の指標として用い、ラット腎移植で拒絶反応を事前に予知することを明らかにした。Eidemiller⁶⁾もラット皮膚および心臓移植で同様の報告をしている。

ラットでは拒絶反応の臨床検査で、検体を連続的に採取するには困難が伴う。そこで、本論文では雑

犬を用い、免疫抑制剤としては最近人で好んで用いられるメチルプレドニゾン (MPSS) を使用し、マクロファージ遊走阻止活性 (MI-活性) を指標として、移植後日を追って検索した。MI-活性は急性拒絶反応を臨床検査成績に先きだしてしめし、拒絶反応が制御できれば、MI-活性もまた陰転することを明らかにした。すなわちMI-活性は移植後の拒絶反応の checker として有用なことを明らかとしたので報告する。

II. 実験材料および実験方法

1, 犬: 体重10~30kgの雑種成犬71頭を用いた。

2, 腎移植

a. 腎摘: 麻酔は静脈麻酔剤ネブタール15~20mg/kgを用い、気管内挿管し呼吸状態が悪い場合にはレスピレーターを使用した。腎を摘出する時、動脈の痙縮を予防するために、腎動脈周囲を剝離する前に、2%プロカイン2mlでブロックした。腎動静脈を十分に剝離し可動性をもたせ、尿管は腎盂から約10cm剝離した。腎摘出の約20分前にラシックス40mg静注し、利尿を促進させた。動脈結紮の2, 3分前にヘパリン1mg/kgを静注し結紮後、硫酸プロタミン1.5mg/kgを静注した。腎動脈は大動脈に近く切断し、腎静脈は可能な限り下空静脈に近く切断した。尿管は約10cm残して切断した。ただちに腎動脈にポリエチレンチューブを挿管し、灌流液で灌流した。灌流液は約4℃に冷却し、乳酸加リンゲル液

500mlにヘパリン5000単位, プロカイン80mg, ラシックス80mgを混じたものを使用した. 100 cmH₂Oの圧で, 100~150ml流した状態で, 腎から流出してくる液に血液が残らなくなるまで灌流した. なお, 温阻血時間は平均3分で, 灌流に要した時間は平均4分であった.

b. 腎移植: 摘出腎を受腎犬の腸骨窩に移植した. 腎動脈は総腸骨動脈に6-0テフデック Q₁で端側吻合し, 腎静脈は総腸骨静脈に6-0テフデック QRで端側吻合した. 尿管は Pacquin の変法で膀胱に吻合した. なお, 冷阻血時間は平均40分で初発尿は平均15分であった.

3. 移植後処置: 全例移植後3~5日間, 抗生物質リラシリン500mgを筋注した.

a. 未処置対照群: 12例中 MI-活性を十分に追跡しえた6例について検討する.

b. MPSS投与群: 移植後イムラン3mg/kgを毎日投与し, MPSSは20mg/kg/日を急性拒絶反応と判定してから3日間連続静注した. 23例中 MI-活性を十分に追跡しえた14例について検討する.

4. 臨床検査: 移植後毎日尿量を測定し, 隔日に血清クレアチニン, 血清尿素窒素を測定する. 移植後死亡したものはその都度解剖に付し, 移植腎を摘出する.

5. マクロファージ遊走阻止試験

a. 末梢血リンパ球の調製: Böyum変法, 即ち, Ficoll-Conray 比重遠心法である. ヘパリン加血5mlに0.9%生食10mlを加えて混合する. ついで Ficoll-Conray 混合液3mlを入れて生食血液を重層させ, 2000廻転/分で30分遠沈する. リンパ球層をとり0.9%生食10mlを加え, 2000廻転/分で10分遠沈する. 沈渣に培養液(TC-199)10mlを加え, 1000廻転/分で10分遠沈する. 沈渣に培養液を1ml加え, リンパ球数を数える.

b. 抗原の調製: 抗原はリンパ球より作成する. 末梢血20mlから Ficoll-Conray 比重遠心法で分離したリンパ球を, 3~4×10⁸個/mlに調製し全体で5mlとし, 7mmチップ, 160mA, 3分で超音波破壊して作成する. これを0.5mlずつアンプルに分注し-20℃で保存する. 抗原の平均蛋白濃度は80.5mg/dlであった. 遊走阻止試験を施行するとき, 過剰な抗原による非特異的遊走阻止を起さない至適な抗原量を決定するために, 腹腔浸出細胞に種々な濃度(100%, 50%, 25%, 10%)の抗原を添加して, 24時間培養後の遊走阻止率を算定した. 遊走阻止率が100%

を示す抗原の蛋白濃度を至適な抗原量として使用した. 至適抗原濃度は80~150μg/mlであった(図1).

c. マクロファージの調製: 腹腔浸出細胞は300~500gのモルモットの腹腔から採取する. 滅菌した

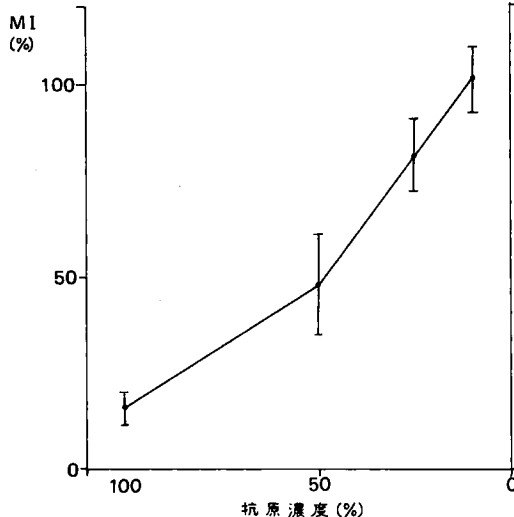


図1 抗原添加によるMIの変化

流動パラフィン20mlを腹腔に注入し, 4~6日後エーテル麻酔後頸動脈切断により脱血した後, 腹腔内に Hanks 液を入れ腹腔浸出液を採取する. これを900廻転/分で5分遠沈し, パラフィン層を吸引除去し腹腔浸出細胞を採取し, Hanks 液で2~3回洗滌する. 腹腔浸出細胞は70~90%がマクロファージで他はリンパ球, 多核白血球などである.

d. マクロファージ遊走阻止試験手技: 秋山の変法に従った. 腹腔浸出細胞とリンパ球を4:1の割合で混合し, 900廻転/分で5分遠沈する. 沈渣に0.6~0.7mlの20%仔牛血清加 TC-199を入れ, 一端を閉じた75×0.7mmの毛細管に, 水流ポンプの陰圧を利用して吸い上げ, この毛細管を別の短試に開口部を上にして移し, 900廻転/分で5分遠沈する. 沈殿した細胞層と上清との間で切断する. 容量1mlの極小シャーレの底に円形カバーガラスを置き, シリコングリスを用いて各々2本ずつ毛細管を固定する. 対照として抗原を加えない培養液(20%仔牛血清加 TC-199)を入れ, これを抗原非添加群とする. 抗原添加群は抗原を培養液で稀釈して適正抗原濃度として添加している. 角型カバーガラス(27×24mm)で中に気泡が入らないようにふたをする. 5%炭酸ガス培養器中で37℃, 24時間培養し遊走面積を測定する.

e. 判定: 遊走面積の測定は顕微鏡で40倍に拡大

表 1. 未処置群

犬番号	生存日数	死 因
010	7	尿毒症
012	9	"
018	5	"
032	7	"
036	5	"
038	6	"
051	5	"
052	13	"
054	5	"
066	7	"
070	7	"
071	9	"

上を陰性（正常）とする。

III. 実験結果

1. 未処置対照群：平均生存日数は 8.8 ± 2.4 日である（表 1）。急性拒絶反応を臨床所見で判定すると、平均 4.5 ± 0.9 日である。この時の MI-活性は $77.0 \pm 15.6\%$ で、血清クレアチニン $6.3 \pm 3.1 \text{ mg/dl}$ 、血清尿素窒素 $82.8 \pm 37.6 \text{ mg/dl}$ である。MI-活性を経日的に測定すれば、3日目にすでに $65.2 \pm 15.7\%$ と強陽性を示した。この時、血清クレアチニン $5.0 \pm 3.2 \text{ mg/dl}$ 、血清尿素窒素 $68.5 \pm 7.6 \text{ mg/dl}$ であった。MI-活性を測定すれば、一般臨床所見で判定するよりも36時間早く拒絶反応を予測することを明らかにした（図 2）。

2. MPSS投与群：平均生存日数は 17.5 ± 2.6 日

表 2. MPSS投与群

犬番号	生存日数	死 因
007	15	尿毒症
011	18	"
013	17	"
014	22	"
019	20	"
020	13	"
021	8	"
023	9	"
025	9	"
034	17	"
039	17	"
040	15	"
041	29	"
042	19	肺炎
043	9	尿毒症
044	15	肺炎
045	22	肺炎
047	11	尿毒症
055	9	"
059	15	"
061	12	"
062	13	"
067	10	"

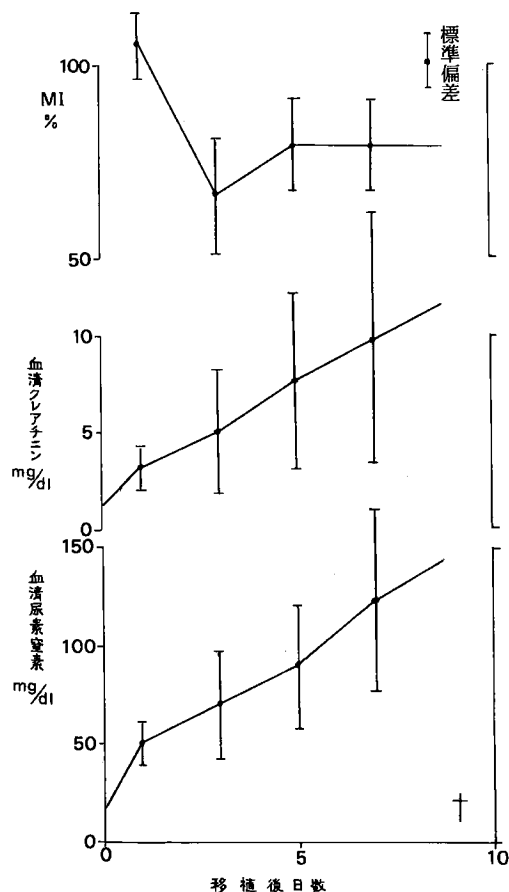


図 2 未処置群

し、縦径と横径を測定しその積で面積をだし

$$\frac{\text{抗原添加群の遊走面積}}{\text{抗原非添加群の遊走面積}} \times 100$$

を遊走指数とする。結果は80%以下を陽性、81%以

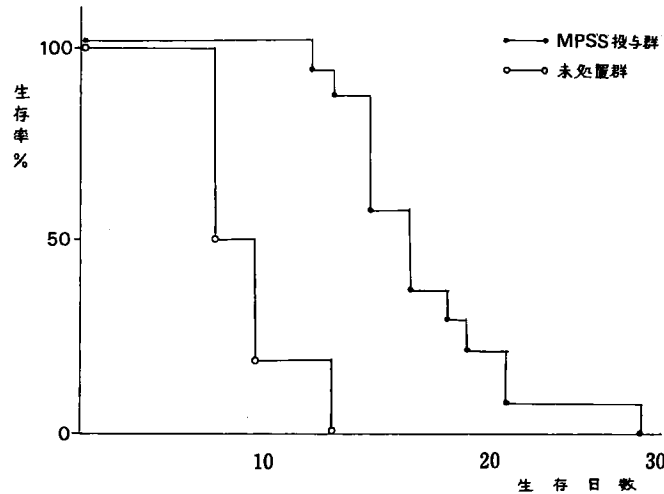


図3 未処置群とMPSS投与群の生存曲線

である(表2)。未処置群よりもはるかに延長している(図3)。急性拒絶反応は通例の臨床所見で判定すると、平均 6.3 ± 1.1 日と未処置群よりも延長している。これはイムランの効果によるものである。この時のMI-活性は $74.9 \pm 7.0\%$ と陽性である。血清クレアチニンは 3.4 ± 0.7 mg/dl、血清尿素窒素は 58.0 ± 22.5 mg/dlである。急性拒絶反応の2日前のMI-活性は $85.1 \pm 14.0\%$ であるが、14例中6例(43%)に陽性を示し早期診断に有効であった。この時の血清クレアチニンは 2.9 ± 1.0 mg/dl、血清尿素窒素は 39.4 ± 13.0 mg/dlである(図4)。

急性拒絶反応に対してMPSS 20mg/kgを3日間投与した結果、その前後のMI-活性は $75.9 \pm 6.1\%$ から $94.3 \pm 6.1\%$ へと有意差($P < 0.001$)をもって正常域に回復している。血清クレアチニンも 3.7 ± 0.7 mg/dlから 2.4 ± 0.7 mg/dlと低下し、血清尿素窒素も 68.5 ± 23.5 mg/dlから 49.2 ± 18.8 mg/dlと回復している(表3)。このようにMPSSは急性拒絶反応に対して著明な効果を発揮している。また、MI-活性は急性拒絶反応に対する治療の効果判定にも有力な指標を与えてくれる。

IV. 考 案

本実験においてMI-活性を経日的に測定すると、通常の臨床所見より判定した急性拒絶反応の36~48時間前に陽性となることが明らかとなった。Turni-

pseed⁷⁾はマクロファージ遊走阻止試験は不可逆性組織損傷の起こる前に、細胞性免疫を検出するのに有用であると述べている。この試験は急性拒絶反応に関連しておこる細胞性免疫を検出するのに、特異的で感受性が高く再現性のあるものとして臨床によく使われている。またEidemiller⁸⁾も免疫抑制剤非使用動物において、臨床拒絶反応がおこる24~48時間前にマクロファージ遊走阻止試験で移植抗原に対する細胞性免疫の程度を測定することができると述べている。

急性拒絶反応の早期診断は移植抗原に対する、特異的な細胞の存在を証明することにある。証明する方法には直接顕微鏡的に明らかにするか、感作リンパ球と特異抗原との反応を間接的に定量するかである。直接に移植抗原に対する特異的な細胞を証明したのはHäyry⁹⁾らである。急性拒絶反応の時、組織所見の特徴は単核細胞の高度浸潤である。拒絶反応の極期には単核細胞の35%までが芽細胞である。免疫抑制剤を使用するとき、使用中は移植組織の中に稀に芽細胞をみる程度で、0.2%をこえることはない。中止すると1~2日で芽細胞が出現して、それから2~3日で血清クレアチニンが増加してくると述べている。感作リンパ球と特異抗原との反応を証明する色々な方法がある。感作リンパ球は特異抗原との接触によって、いろいろな生物活性を有する可溶性物質を培養上清に放出することが知られている。

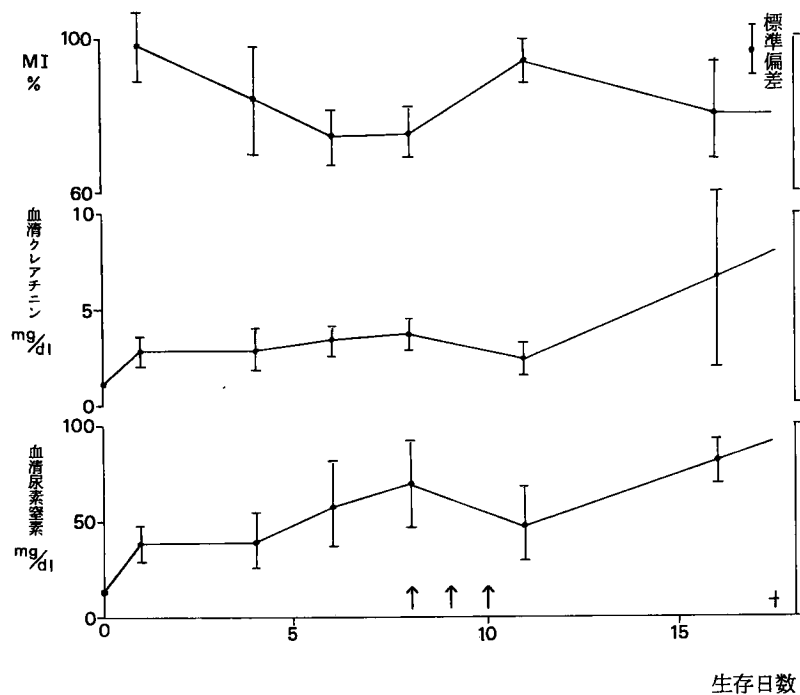


図4 MPSS 投与群 (↑=MPSS 20mg/kg 静注)

表3. MPSS投与前後の拒絶反応の変化

犬番号	MPSS 投与前			MPSS 投与後				
	日	MI (%)	血清クレアチニン (mg/dl)	血清尿素窒素 (mg/dl)	日	MI (%)	血清クレアチニン (mg/dl)	血清尿素窒素 (mg/dl)
041	7	50.3	3.20	39.5	10	101.2	2.30	29.0
061	5	65.9	3.00	67.5	8	106.1	2.00	31.0
059	5	67.5	4.10	58.2	8	101.5	1.80	43.5
014	19	70.2	1.98	66.5	22	81.2	1.79	87.6
062	5	74.0	5.70	79.7	8	101.3	3.60	37.5
039	6	74.4	4.76	112.0	9	76.9	4.91	119.2
013	11	75.6	3.48	121.0	14	89.2	2.54	62.7
007	12	79.3	6.03	107.3	15	102.8	2.29	72.1
045	7	80.2	2.70	62.8	10	82.6	2.30	39.0
044	7	80.2	4.20	51.5	10	82.6	2.90	39.0
019	12	80.5	4.30	120.0	15	89.5	2.46	78.8
042	7	83.5	2.90	17.0	10	97.2	1.90	12.3
034	6	90.3	1.64	12.8	9	97.3	1.00	9.8
040	7	90.9	3.10	45.2	10	111.4	1.79	27.5
平均	8.3	75.9	3.65	68.6	11.3	94.3	2.40	49.2
標準偏差	2.3	6.1	0.7	23.5	2.4	6.1	0.7	18.8

可溶性物質には、マクロファージ遊走阻止因子、皮膚反応因子⁹⁾、リンパ性毒素¹⁰⁾、および、マクロファージ凝集因子¹¹⁾などがある。本実験ではマクロファージ遊走阻止因子を利用して試験を行ない、急性拒絶反応時の変化を経日的に測定した。

本実験において、急性拒絶反応に対して MPSS 20mg/kg/日を3日間連続静注すると、MI-活性は投与前の75%から投与後の94%へと有意差 ($P < 0.001$) をもって、正常域に回復した。Falk¹²⁾らは急性拒絶反応の治療に大量のステロイドを使った時、遊走阻止はすばやく陰性化すると述べている。Wood¹³⁾らはステロイド治療で急性拒絶反応が改善され、白血球遊走阻止試験も正常になると述べている。しかし、ステロイド治療をした後、拒絶反応が続いているのに MI-活性が正常域にあることがある。これはステロイドによってリンパ球が変化したためか、感作リンパ球が末梢血中で減少し、移植組織の中に濃縮するためではないだろうかと述べている。Dormont¹⁴⁾らも急性拒絶反応に対して大量のコルチコステロイドを投与すると、MI-活性は短時日に抑制され、通常7日目、早くは1~3日以内に正常化すると述べている。Turnipseed⁷⁾らも拒絶反応に対して免疫抑制療法を行なうと、遊走が迅速に阻止されなくなると述べている。最近、MPSS 20~30mg/kg/日を2~3日間連続点滴静注すると、腎移植後の急性拒絶反応は90~95%逆転可能であると報告され、多くの施設で MPSS の治療が行なわれるようになった。

マクロファージ遊走阻止試験施行上注意すべきは、抗原含有液の抗原濃度、特に過剰な抗原によるマクロファージの非特異的阻止の問題である。腎移植後に通常使用される抗原源は、供給者リンパ球、リンパ節、脾抽出物、腎抽出物、肝抽出物等である。生体供給者の場合はリンパ球を、屍体供給者の場合にはリンパ節や脾抽出物を使用するのが一般的である。抗原濃度に関しては通常蛋白濃度で表現され、100 $\mu\text{g/ml}$ から 2 mg/ml まで種々の報告がみられる。Wood¹³⁾らは12例の屍体腎移植における白血球遊走阻止試験において、抗原源として肝、脾、リンパ節を使用し、抗原含有液の蛋白濃度は50~100 $\mu\text{g/ml}$ を至適濃度であるとし、200~400 $\mu\text{g/ml}$ 以上の抗原を使用すれば非特異的阻止がみられたとし、仮性陽性の少なかった原因は比較的低い蛋白濃度の抗原を用いたためと述べている。

Dormont¹⁴⁾らは74例の腎移植における白血球遊走阻止試験において、抗原に脾抽出物と腎抽出物を用い、

脾抽出物はあらかじめ HL-A 抗血清でタイピングし、抗原含有液の HL-A 特異性を決定して使用している。脾抽出物では 1~2 mg/ml 、腎抽出物は 125 $\mu\text{g/ml}$ が至適抗原濃度であるとしている。また脾抽出物と腎抽出物との抗原としての感受性を比較し、拒絶反応における遊走阻止陽性率は脾抽出物使用群 85%、腎抽出物使用群 45% と脾抽出物がより感受性が高いとし、両方の抗原を同時に使用した場合の陽性率は 95% に上昇したと述べている。Falk¹²⁾らは供給者リンパ球を 1×10^6 個/ml に調製後超音波破壊し、その上澄液を -20℃ に保存して使用している。Turnipseed⁷⁾らはヒト腎移植においてマクロファージ遊走阻止試験を応用し、抗原源として供給者リンパ球 25×10^6 個/ml に調製後、-30℃ にて凍結溶解を7回行って、細胞破壊しその浮遊液を抗原含有液とし、蛋白濃度は 0.8~1 mg が至適抗原濃度として使用している。阪上⁵⁾は MP ラット (供給者) 腎由来の粗製可溶性抗原では 180 $\mu\text{g/ml}$ を非特異阻止を起さない至適抗原濃度として使用している。本実験ではリンパ球を $3 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml に調製し、全体で 5 ml とし 3 分間超音波破壊し、その上澄液を抗原含有液 (平均 80.5 mg/dl) として用い、至適抗原濃度は 80~150 $\mu\text{g/ml}$ であった。

今後の臨床上の問題として、急性拒絶反応の早期診断を確実に、簡潔に、短時間で行なえ、患者の負担にならない方法を考えなければならない。その1つとして Harrington¹⁵⁾らの寒天培地法がある。この方法によれば容量は 0.25 ml で充分で、マクロファージの浮遊液は 2 μl でよく、技術も簡便である。マクロファージ遊走阻止試験では培養時間が 24 時間かかり、この間拒絶反応は進行する可能性もっている。倉持¹⁶⁾らは白血球遊走阻止試験において次のことを明らかにしている。毛細管に詰められた白血球は培養開始 1 時間後には管外に遊出し、陽性の場合 4~6 時間後には抗原添加群と抗原非添加群との間に相違が観察でき、その後 21 時間まであまり大きな差を認めていない。また、早期診断のためにはマクロファージ遊走阻止試験の他、諸種の免疫生物学的診断法を行ない、総合的判定を下すことが必要である。

V. 結 語

犬同種腎移植後、急性拒絶反応の診断法の 1 つであるマクロファージ遊走阻止試験を経日的に測定した。

未処置群では通常の臨床所見より急性拒絶反応と

診断した時、MI-活性は77%と陽性であった。拒絶反応と診断した36時間前にすでに65%と強陽性を示した。

MPSS投与群では急性拒絶反応と診断した時、MI-活性は75%と陽性であった。拒絶反応と診断した48時間前に14例中6例(43%)に陽性を認めた。

イムランを投与したにもかかわらず急性拒絶反応が出現した14例に対し、MPSS 20mg/kgを3日間連続静注したところ、血清クレアチニンは3.4mg/dlから2.4mg/dlと減少し尿量も増加し、MI-活性も75%から94%へと有意差をもって($P < 0.001$)正常

域に回復した。

以上よりマクロファージ遊走阻止試験は腎移植後の急性拒絶反応を判定する免疫学的診断法として有用であるばかりでなく、免疫抑制の効果の判定にも有用であると考えられる。

稿を終るにあたり終始御指導を載いた田中早苗教授、折田薫三講師に感謝の意を表す。

(本論文の要旨は昭和49年11月第10回日本移植学会総会において発表した)

文 献

- 1) Häyry, P. and Defendi, V.: *Science*, **168**: 133, 1969.
- 2) Bach, J.F., Dardeene, M. and Fournier, C.: *Nature*, **222**: 698, 1969.
- 3) Ferraresi, R.W., Gohman-Yahr, M. and Raffel, S.: *Transplantation*, **10**: 237, 1970.
- 4) Jeannet, M., Pinn, V.W., Flax, M.H., Winn, H.J. and Russel, P.S.: *N. Engl. J. Med.*, **282**: 111, 1970.
- 5) 阪上賢一, 内田善夫, 北村武司, 国米欣明, 折田薫三, 田中早苗: *医学のあゆみ*, **84**: 556, 1973.
- 6) Eidemiller, L.R. and Bell, P.R.F.: *Transplantation*, **13**: 5, 1972.
- 7) Turnipseed, W.D., Folger, M.R. and Cerilli, J.: *Transplantation*, **17**: 341, 1974.
- 8) Häyry, P., Lindström, B.L., Virolainen, M., Pasternack, A., Lindfors, O.: *Surgery*, **71**: 494, 1972.
- 9) Krejčí, J., Pekárek, J., Johanovský, J., and Sveicar, J.: *Immunology*, **16**: 677, 1969.
- 10) Granger, G.A., Shacks, S.J., Williams, T.W. and Kolb, W.P.: *Nature*, **221**: 1155, 1969.
- 11) Lolekha, S., Dray, S. and Gotoff, S.P.: *J. Immun.*, **104**: 296, 1970.
- 12) Falk, R.E., Guttman, R.D., Beaudoin, J.G., Morehouse, D.D. and Oh, J.H.: *Transplantation*, **13**: 461, 1972.
- 13) Wood, R.F.M., Gray, A.C., Briggs, J.D. and Bell, P.R.F.: *Transplantation*, **16**: 41, 1973.
- 14) Dormont, J.: *Transplantation*, **13**: 48, 1972.
- 15) Harrington, J.T. and Stastny, P.: *J. Immun.*, **110**: 752, 1973.
- 16) 倉持恒雄, 桑原修, 近藤芳夫: *移植*, **8**: 146, 1973.

**Diagnosis and treatment of acute rejection
after kidney homotransplantation in dog**

**Part 1. Clinical results and change of macrophage migration
inhibition activity at the administration of methylprednisolone in a large dose**

Kohki TANAKA

Department of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. Sanae Tanaka)

ABSTRACT

After kidney homotransplantation in dogs we pursued daily the macrophage migration inhibitory (MI) activity, which is one of the diagnostic parameters, and obtained the following results.

At the time when it was diagnosed to have an acute rejection from routine clinical findings in the untreated control group, MI-activity was positive in 77% of the cases. The MI-activity was positive in 65% already 36 hours prior to the diagnosis was clinically made as of acute rejection case.

With the test group treated with MPSS (methylprednisolone) MI-activity was positive in 75% of the cases at the time when diagnosed as of acute rejection. In 6 cases (43%) out of 14 the MI-activity was positive 48 hours prior to the diagnoses of acute rejection.

When 20 mg/kg/day of MPSS was injected intravenously to 14 cases that had shown acute rejection despite Imuran administration for 3 consecutive days, serum creatinine decreased from 3.4 mg/dl to 2.4 mg/dl, urine excretion increased, and MI-activity also recovered to the normal range from 75% to 94% by a significant difference ($P < 0.001$).

These findings seem to indicate that the macrophage migration inhibitory activity test after kidney transplantation is not only an effective, immunological diagnosis to assess the acute rejection after kidney transplantation but also useful in determining the effect of immunosuppression.