

ラット同種心移植における血清中免疫抑制物質 (ISS) および NK 細胞活性の推移とその意義に関する研究

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

木 村 隆 信

(平成2年6月20日受稿)

Key words: ラット心移植, ISS, NK 細胞活性, プロスタグランジン,
インドメサシン

緒 言

血清中免疫抑制物質 (immunosuppressive substance 以下 ISS) は癌の進行と共に増量し, 感染症, 慢性腎不全においても高値を示すことが明らかにされている¹⁻⁴⁾。また, ヒト癌患者血清中に存在する ISS が *in vitro* において, PHA 幼若化反応, NK 細胞活性 (以下 NK 活性) を dose dependent に抑制し, その抑制にプロスタグランジン E₂ (以下 PGE₂) が関与しており, 同様の機序がラット心移植においても起こりうるかどうか興味のあるところである。そこで, 本研究ではラット異所性同種心移植モデルを用いて, ISS と細胞性免疫能のパラメーターとして NK 活性の推移を拒絶反応の前後において測定し, その免疫学的意義について検討した。さらに, PG 及びシクロスポリン A (以下 CsA) を投与することによる移植心生着延長効果, インドメサシン投与による移植心生着抑制効果及び ISS と NK 活性に与える影響についても検討した。

材 料 と 方 法

1) 実験動物

使用した近交系ラットはすべて雄で, F344 (RT1^{lv1}) (日本チャールスリバー) および WKA (RT1^k) (静岡実験動物) を donor, ACI (RT1^{av1}) (星野実験動物) を recipient として RT1 不適合の組み合わせを用いた。

2) 異所性心移植と拒絶反応の判定

実体顕微鏡を用い, エーテル麻酔下に, Ono-Linsey の方法⁵⁾ に準じ施行した。donor 心の大動脈と肺動脈をそれぞれ recipient の腹部大動脈と大静脈にモノフィラメントナイロン糸 9-0 (河野製作所) を用いて連続端側吻合を施行した。移植心の拒絶は触診にて心拍動の停止をもって判定した。

3) 血清中免疫抑制物質 (ISS) の測定

移植前と移植後, 経日的にラット尾静脈より採血後, 5 分間 3000rpm にて遠心分離し, 血清を採取し, ウサギ抗ラット IS 抗体を用い, 一元免疫拡散法⁶⁾ にて測定した。

4) NK 活性の測定⁷⁾

移植前と移植後, 経日的にラット尾静脈よりヘパリン採血し, Ficoll-Conray 比重遠沈法でリンパ球を分離し, PBS で洗浄後, 10% FCS 加 RPMI-1640 medium で培養し effector cell とした。target cell はヒト白血病細胞 K562 を使用し, E/T 比 50:1 として microculture plate で, 6 時間, 37°C, 5% CO₂ 下で triplicate で培養した。⁵¹Cr の RI 活性を γ -シンチレーションカウンターにて計測し, K562 細胞の % specific ⁵¹Cr release は下記の式で算出した。

$$\% \text{ specific } ^{51}\text{Cr release} = \frac{\text{Experimental CPM} - \text{Control CPM}}{\text{Maximum CPM} - \text{Control CPM}} \times 100$$

5) 実験群

実験群を以下の 8 群に分け, 各種の検討を施行した。I 群では WKA を donor, ACI を

recipient とする組み合わせを用い、II群とIV群～VIII群は全て F334を donor, ACI を recipient とする組み合わせを用いた。III群は ACI に単開腹術のみを施行した。

I 群：無処置対照群 (n=5), WKA を donor, ACI を recipient とする組み合わせを用い、心移植後何らの免疫抑制処置を加えなかった。

II群：無処置対照群 (n=6), F334を donor, ACI を recipient とする組み合わせを用い、心移植後何らの免疫抑制処置を加えなかった。

III群：単開腹群 (n=6), 心移植操作を行わず単開腹術のみ施行し、術後も何らの免疫抑制処置を加えなかった。

以下のIV群～VIII群は F344を donor, ACI を recipient とする組み合わせを用い、心移植を施行した。

IV群：PGE₂ (小野薬品) 投与群 (n=5), PGE₂ 1 mg/kg/day を腹腔内に術後3日目より7日目まで連続5日間投与した。

V群：PGE₂ およびインドメサシン (Sigma chemical co.) 投与群 (n=5), PGE₂ 1 mg/kg/day およびインドメサシン 5 mg/kg/day を腹腔内に術後3日目より7日目まで連続5日間投与した。

VI群：PGI₂ (小野薬品) 投与群 (n=5), PGI₂ 1 mg/kg/day を腹腔内に術後3日目より7日目まで連続5日間投与した。

VII群：CsA (Sandoz) 7日間投与群 (n=5), CsA 5 mg/kg/day を筋肉内に術後1日目より7日目まで連続7日間投与した。

VIII群：CsA 14日間投与群 (n=6), CsA 5 mg/kg/day を筋肉内に術後1日目より14日目まで連続14日間投与した。

結 果

(1) ラット移植心生着日数

ラット心移植における I・II群, IV～VIII群の移植心生着日数を示した。I群は8.2±1.9日, II群は9.5±2.0日と無処置対照群はほぼ8～10日目に移植心が拒絶された。IV群の PGE₂ 投与群は17.8±6.5日 (p<0.05), VI群の PGI₂ 投与群は16.0±5.4 (p<0.1), VII群の CsA 7日間投

与群は18.2±4.9日 (p<0.05) といずれもII群に比し有意の移植心生着延長効果を認めた。V群の PGE₂ 及びインドメサシン投与群は12.6±1.4日とIV群の PGE₂ 投与群の17.8±6.5日に比し移植心生着延長抑制の傾向を認めた。VIII群の CsA 14日間投与群は1匹が45日目に拒絶されたが、残りの5匹は100日以上生着し、ほとんど完全生着を認めた。

(2) ラット心移植における ISS の推移

ラット心移植における各群の ISS 平均値の推移を移植前と移植後経日的に示した(図1～4)。

I群において、ISS は術後1～3日目に一過性に急増し、5日目には低下し、以後平均拒絶日に向けて漸増し、術後7～9日目にピークを認め、以後漸減した。

II群において、ISS は術後1日目に一過性に急増し、3日目、5日目と低下し、以後平均拒絶日に向けて漸増し、術後9日目にピークを認め、拒絶日後漸減した。

III群では、ISS は術後1日目に一過性に急増し、3日目、5日目と低下し、7日目以降は220～250μg/mlの間を維持し、術前より増加したままであった。

IV群では、ISS は術後一過性に増加した後、術後5日目より13日目まで増加せず、術後15日目より漸増し、術後18日目にピークを認め、平均拒絶日後漸減した。

V群では、ISS は術後3日目に低下し、平均拒絶日前の術後9日目にピークを認め、以後漸減した。

VI群では、ISS は術後5日目に低下し、平均拒絶日前の術後12日目にピークを認めた。

VII群では、ISS は術後5日目に低下し、平均拒絶日前の術後12～15日目にピークを認めた。

VIII群では、ISS は術後3日目に低下し、術後7日目以降は180～300μg/mlの間を推移した。

以上より、I, II, IV～VII群において、ISS は術後1日目に一過性に急増し、術後3～5日目には低下し、その後拒絶反応日に向けて漸増し、拒絶反応4日前から拒絶反応当日にピークを示し、拒絶反応後漸減した。また、移植を行っていないIII群とほとんど拒絶反応の生じないVIII群において、ISS は術後3日目より漸減し、長期

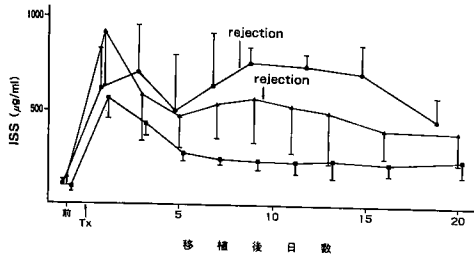


図1 ラット心移植における ISS の推移 (1)
 ● : 無処置対照群 (I群, WKA→ACI),
 ▲ : 無処置対照群 (II群, F344→ACI),
 ■ : 単開腹群 (III群)

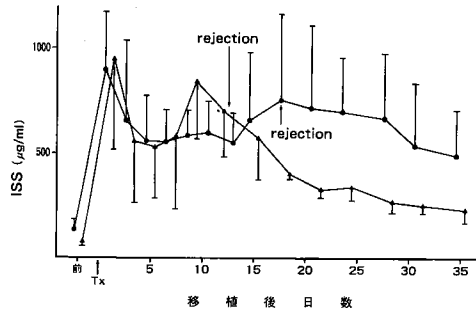


図2 ラット心移植における ISS の推移 (2)
 ● : PGE₂ 投与群 (IV群), ▲ : PGE₂・イン
 ドメサシン投与群 (V群) (F334→ACI)

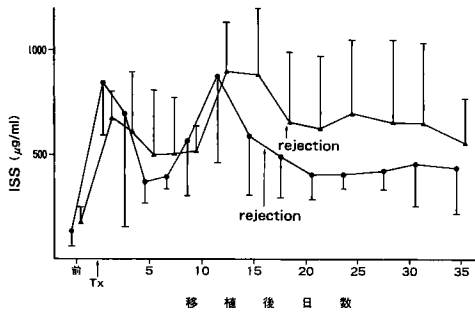


図3 ラット心移植における ISS の推移 (3)
 ● : PGI₂ 投与群 (VI群), ▲ : CsA 7日間投
 与群 (VII群) (F344→ACI)

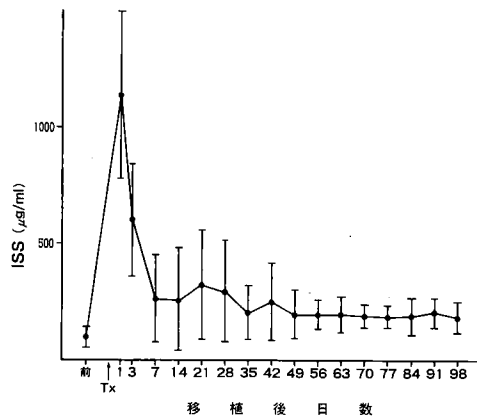


図4 ラット心移植における ISS の推移 (4)
 ● : CsA 14日間投与群 (VII群, F344→ACI)

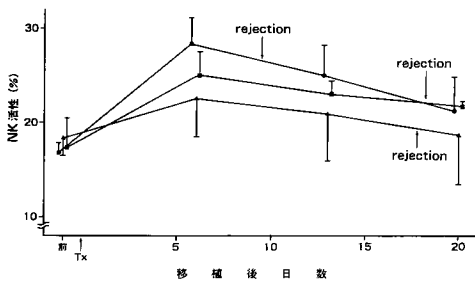


図5 ラット心移植における NK 活性の推移
 ●無処置対照群 (II群), ▲ : PGE₂ 投与群 (IV
 群), ■ : CsA 7日間投与群 (VII群) (F344→
 ACI)

にわたり180~300 μ g/mlの間を推移し、術前に比し有意な高値を示した。

(3) ラット心移植における NK 活性の推移

ラット心移植における II群, IV群, VII群での NK 活性の推移を示した (図5)。

II群では、NK 活性は平均拒絶日前の術後6日目に28.4%と術前の16.7%に比し有意 ($p < 0.01$) の高値を示し、平均拒絶日後の術後13日目にも25.2%と術前に比し有意 ($p < 0.01$) の高値を示した。

IV群では、NK 活性は平均拒絶日前の術後6日目に22.5%、術後13日目に20.9%、平均拒絶日後の術後20日目に18.7%と術前の18.3%に比しそれぞれ若干の高値を示すが、有意差は認められなかった。

VII群では、NK 活性は平均拒絶日前の術後6日目、13日目にそれぞれ25.0%、23.0%と術前の17.4%に比し有意 ($p < 0.05$) の高値を示した。また、VII群の術後6日目、13日目はII群の術後6日目、13日目に比し、それぞれ有意差を認め

なかった。

考 察

ISS は Fujii ら¹⁾により大腸癌患者腹水から分離された糖蛋白で、分子量52000、等電点 pH2.7~3.3である。この物質は *in vitro* でリンパ球幼若化反応を示し、*in vivo* でマウス遅延型足蹠反応を抑制する²⁾。本研究における I, II, IV~VI群においては、ISS は移植後3~5日目に低下し、その後拒絶反応4日前より拒絶反応日にピークを示し、拒絶反応後漸減した。ISS は移植心拒絶予知マーカーとなり得ることが明らかとなった。拒絶反応は移植組織が recipient の特異的な液性・細胞性免疫反応とそれに続く非特異的炎症反応により障害細胞による組織破壊がおこるものとされる。ISS のような血清中の糖蛋白は炎症による障害細胞あるいは腫瘍細胞に付着する成分であり、これら細胞の宿主に対する免疫反応や抗原性発現を抑制する。ラット心移植における移植後1日目の急増は、手術による炎症により生じたものであり、拒絶反応時の増量も障害細胞の組織破壊によるものと考えられる。すなわち、ISS の拒絶反応時の増量は拒絶反応を炎症とみなせば、組織破壊が生じるとき、ISS は増加し、また免疫反応によりおこる拒絶反応時には ISS のような血清中免疫抑制因子がフィードバック的に増加するものと考えられる。

ISS はマクロファージに作用し、PGE₂ を産生する³⁾、また拒絶反応時に PGE の組織濃度が上昇することが報告されている⁹⁾。本研究では、ラット心移植時に PGE₂ を投与し、その後の ISS の推移をみた。PGE₂ は PHA による T 細胞増殖や T 細胞による IL-2 産生を抑制するとともに、NK 活性を抑制し、またサプレッサー因子を放出しサプレッサー T 細胞を産生し、細胞性免疫を抑制する¹⁰⁻¹⁵⁾。Strom ら¹⁶⁾ はラット腎移植モデルに PGE₁ の誘導体である 15(S)-15-methyl PGE₁ 250ng を 1 日 2 回連続投与し、ほとんど完全に拒絶反応を抑制でき、また移植後4日目より投与を開始しても同様の効果を認め、ラット心あるいは腎のような移植モデルでは臓器は、移植後ただちに血流が開通するため、recipi-

ent の免疫反応は直ちに成立し、donor 臓器による感作が移植4日後に達せられ、PGE₁ は感作後誘導される細胞障害性 T 細胞を抑制すると述べている。本実験でも、PGE₂ を術後3日目より連続5日間投与し、有意の生着延長効果を認めた。

インドメサシンはシクロオキシナーゼ活性を阻害して PG 産生を抑制し、NK 活性を活性化させる¹⁷⁻¹⁸⁾。本実験でも、V群の PGE₂ およびインドメサシン投与群はインドメサシンが生着延長効果を抑制し、生着抑制の傾向を認めた。

移植拒絶、特に慢性拒絶においては移植臓器の動脈の内膜肥厚があり、血小板の内膜面への付着に由来するといわれている。従って拒絶反応には血管内皮への血小板の沈着が重要な役割を果たすと思われる。PGI₂ は細胞性免疫抑制とともに、血小板半減期の延長、血小板凝集抑制、血管拡張の作用により、拒絶反応を延長させることが示唆される¹⁹⁻²⁴⁾。

CsA はヘルパー T 細胞を抑制し、MLC における IL-2 産生や PHA 反応を抑制する²⁵⁻²⁸⁾。また、細胞性免疫反応における T 細胞の初期増殖期を抑制し、いったん誘導された細胞障害性 T 細胞に対して抑制作用を示さないため²⁹⁾ 術当日もしくは術後1日目より投与しなければならぬとされている。また、ラット心移植において、CsA 10mg/kg/day を10~14日間連続投与するとほとんど完全生着するといわれている³⁰⁾。本研究においても VIII群の CsA 5 mg/kg/day を連続14日間投与する群においては、1匹が45日目に拒絶されたのを除いて他の5匹は100日以上生着した。

II群の無処置対照群において、NK 活性は平均拒絶日前後に高値を示すが、このことは NK 細胞が移植拒絶において重要であり、拒絶を併発する免疫反応により活性化されるということを示唆している³¹⁾。一方、PGE₂ 投与は PHA 反応や IL-2 産生を抑制するとともに、NK 活性のような自発的殺細胞障害能を抑制する^{18),32-33)}。これに対し、CsA 投与はヘルパー T 細胞を抑制し、PHA 反応や IL-2 産生を抑制するが、NK 活性は PGE₂ 程抑制されなかった³⁴⁻³⁷⁾。

本実験から、ISS はラット移植心拒絶予知マ

一カーとなり得、今後ヒト心あるいは腎移植の拒絶予知マーカーとして臨床応用が期待される。また、ISS はリンパ球幼若化反応やマウス遅延型足蹠反応を抑制し、 PGE_2 を産生し拒絶反応時には免疫抑制因子として増加することにより、拒絶反応前に ISS を投与すれば拒絶反応を延長できる可能性が示唆された。

結 論

ラット異所性同種心移植モデルを用いて ISS と NK 活性の推移を拒絶反応の前後において測定した。さらに PG および CsA を投与することによる移植心生着延長効果と、インドメサシンを投与することによる移植心生着抑制効果および ISS と NK 活性に与える影響を検討し、以下の結論を得た。

1. ISS は拒絶反応 4 日前から拒絶反応当日までにピークを認め、移植心拒絶予知マーカーとなり得ることが示唆された。

2. PGE_2 および PGI_2 は有意の移植心生着延長効果を示した。

3. インドメサシンは PGE_2 の生着延長効果を抑制した。

4. PGE_2 は NK 活性を抑制した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った折田薫三教授ならびに、終始御指導、御教示いただいた淵本定儀講師、また実験遂行に種々御高配いただいた半田外科病院半田祐彦博士に深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Fujii M, Takahashi N, Hayashi H, Furusho T, Matsunaga K and Yoshikumi C: Comparative Study of α_1 -Acid Glycoprotein Molecular Variants in Ascitic Fluid of Cancer and Non-Cancer Patients. *Anticancer Research* (1988) **8**, 303-306.
- 2) 万波徹也, 淵本定儀, 小長英二, 折田薫三: 各種疾患における血清中免疫抑制物質 (IS 物質) の検討. *癌と化療* (1982) **9**, 2104-2112.
- 3) 松田好史, 田村啓二, 北目文郎, 石田名香雄: 癌患者血清中に存在する免疫抑制酸性蛋白 (IAP) の性状と免疫抑制活性. *医のあゆみ* (1978) **105**, 154-157.
- 4) 石田名香雄, 田村啓二, 柴田芳美: 免疫抑制酸性蛋白の性状と癌患者における検出意義. *医のあゆみ* (1980) **115**, 423-433.
- 5) Ono K and Linsey E: Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1969) **57**, 225-229.
- 6) Mancini G: Immunochemical quantitation of antigen by single radical immunodiffusion. *Immunochimistry* (1965) **2**, 235-254.
- 7) 森谷行利: 胃癌患者の胃癌組織, 健常胃, と各組織におけるリンパ球 Subpopulation と NK 活性に関する研究. *日外会誌* (1983) **85**, 132-142.
- 8) 大西和彦, 淵本定儀, 浜田史洋, 飽浦良和, 紙谷晋吾, 米花孝文, 猶本良夫, 木村隆信, 板野 聡, 田中紀章, 阪上賢一, 折田薫三: 消化器癌患者における免疫抑制物質 (IS 物質) の細胞性免疫抑制機序. *消化器と免疫* (1985) **14**, 267-271.
- 9) Jaffe BM, Moore TC and Vigran TS: Tissue levels of prostaglandin E following heterotopic rat heart allografting. *Surgery* (1975) **78**, 481-484.
- 10) Tannenbaum JS, Anderson CB, Sicard GA, Mckee DW and Etheredge EE: Prostaglandin Synthesis Associated with Renal Allograft Rejection in the Dog. *Transplantation* (1984) **37**, 438-443.
- 11) 牧野莊平: プロスタグランジンの生化学 免疫とPG. *治療* (1986) **68**, 1091-1099.
- 12) Goodwin JS and Webb DR: Regulation of the Immune Response by Prostaglandins. *Clin Immunol*

- (1980) **15**, 106—122.
- 13) Rappaport RS and Dodye GR : Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J Exp Med* (1982) **155**, 943—948.
 - 14) Goodwin JS, Messner RP and Peake GT : Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* (1978) **62**, 753—760.
 - 15) Chouaib S, Welte K, Mertelsmann R and Dupont B : Prostaglandin E₂ acts at two distinct pathways of T-lymphocyte activation : inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferin receptor expression. *J Immunol* (1985) **135**, 1172—1179.
 - 16) Strom TB and Carpenter CB : Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients. *Transplantation* (1983) **35**, 279—281.
 - 17) Voth R, Chmielarczyk W, Storck E and Kirchner H : Induction of natural killer cell activity in mice by injection of indomethacin. *Nat Immun Cell Growth Regul* (1986) **5**, 317—324.
 - 18) Zielinski CC, Gisinger C, Binder C, Mannhalter JW and Eibl MM : Regulation of NK cell activity by prostaglandin E₂ : The role of T-cells. *Cell Immunol* (1984) **87**, 65—72.
 - 19) Leithner C, Sinzinger H, Angelberger P and Syre G : Indium-111 labelled platelets in chronic kidney transplant rejection. *Lancet* (1980) **2**, 213—214.
 - 20) Leithner C, Sinzinger H and Schwarz M : Treatment of chronic transplant rejection with prostacyclin-reduction of platelet deposition in the transplant : prolongation of platelet survival and improvement of transplant function. *Prostaglandins* (1981) **27**, 783—788.
 - 21) Leithner C, Sinzinger H, Silberbauer K, Wolf A, Stummvoll HK and Pinggera W : Enhanced prostacyclin synthesis in acute human kidney transplant rejection. *Proc EDTA* (1980) **17**, 424—428.
 - 22) Dosekun AK, First MR, Chandranp KG, Kant KS, Greenwalt PG, Weiss MA, Alexander JW and Pollak VE : Successful treatment by defibrination with anicrod in a patient with hyperacute renal allograft failure and a deficiency of plasma prostacyclin stimulating factor. *Clin Nephrol* (1982) **18**, 101—105.
 - 23) Mundy AR, Bewick M, Moncada S and Vane JR : Experimental assessment of prostacyclin in the harvesting of kidneys for transplantation. *Transplantation* (1980) **30**, 251—255.
 - 24) Shaw JFL : Prolongation of rat cardiac allograft survival by treatment with prostacyclin or aspirin during acute rejection. *Transplantation* (1983) **35**, 526—529.
 - 25) Palacios R : Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol* (1982) **128**, 337—342.
 - 26) Leapman SB, Filo RS, Smith EJ and Smith PG : In vitro effects of cyclosporin A on lymphocyte subpopulations. *Transplantation* (1980) **30**, 404—408.
 - 27) Abbund-Filho M, Kupiec-Weglinski JW, Araujo JW, Araujo JL, Heidecke CD, Tilney NL and Strom TB : Cyclosporine therapy of rat heart allograft recipients and release of interleukins (IL1, IL2, IL3) : A role for IL3 in graft tolerance? *J Immunol* (1984) **133**, 2582—2586.
 - 28) Martinelli GP, Chung Loy R, Sher L, Racelis D, Miller CM and Schanzer H : Long-term prolongation of cardiac allografts by subtherapeutic levels of cyclosporine in rats conditioned with pretransplant blood transfusions and cyclosporine. *Transplantation* (1985) **39**, 1—5.
 - 29) 原田実根, 塩原信太郎, 上田幹夫, 中尾真二, 近藤邦夫, 尾高和亮, 末永孝生, 森 孝夫 : Cyclosporine の免疫抑制作用- I Cyclosporine の細胞障害性 T 細胞に対する作用機序. *移植* (1985) **20**, 169—173.
 - 30) White DJG, Timmerman W, Davies HS, Nagao T, Kasahara K and Plumb A : Properties of Cyclosporine-A-Induced Graft Acceptance. *Transplant Proc* (1981) **13**, 379—382.

- 31) Soulillou JP, Vie H, Moreau JF, Peyrat MA and Blandin F : Increased NK cell activity in rats rejecting heart allografts. *Transplantation* (1983) **36**, 726—727.
- 32) Ching CY, Ching N, Seto DSY and Hokama Y : Relationships of prostaglandin levels and natural killer (NK) cell cytotoxicity of mononuclear cells in cord blood. *J Medicine* (1984) **15**, 233—236.
- 33) Chun M, Krim M, Granelli Piperno A, Hirst JA and Hoffman MK : Enhancement of Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells by Interleukin 2 and Antagonism between Interleukin 2 and Adenosine Cyclic Monophosphate. *Scand J Immunol* (1985) **22**, 375—381.
- 34) Molajoni ER, Barnaba V, Bachetoni A, Lervero M, Cinti P, Rossi M, Alfani D and Cortesini R : Monitoring of NK-1 and NK-15 Subsets and Natural Killer Activity in Kidney Transplant Recipients Receiving Cyclosporine. *Proc EDTA-ERA* (1984) **21**, 1042—1046.
- 35) Xi En G, Charles R, Rinaldo JR and Monto H : Natural Killer Cell Activity in Renal Transplant Recipients Receiving Cyclosporine. *Infect Immun* (1983) **41**, 965—970.
- 36) Dupont E, Huygen K, Schandene L, Vandercruys M, Palfliet K and Wybran J : Depressed Natural Killer Function in Transplant Recipients : An Analysis. *Transplant Proc* (1984) **16**, 1506—1508.
- 37) Rigby RJ, Smillie A, Cheung K and Robinson MF : Natural Killer Activity in Renal Allograft Recipients and Response to Interferon. *Transplant Proc* (1985) **17**, 1682—1684.

**Changes in and the significance of serum
immunosuppressive substances (ISS) and NK activity in
murine cardiac homotransplantation**

Takanobu KIMURA

First Department of Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

Heterotopic homotransplantation of rat hearts was performed and ISS and NK activity levels were determined before and after rejection. The effects of prostaglandin (PGE₂), cyclosporin A, and indomethacin on the acceptance of transplanted hearts as well as on ISS and NK activity were studied. PGE₂ and PGI₂ significantly extended survival when compared to a control group, while indomethacin decreased survival.

ISS peaked 4 days before the rejection of transplanted hearts, suggesting its usefulness as a marker of rejection. Moreover, NK activity was significantly higher around the time of rejection, suggesting the importance of NK cells in this process. Finally, rejection was suppressed by administration of PGE₂.