

氏名(本籍)	わた なべ とし ぶみ 渡 辺 俊 文 (福岡)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第37号
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
学位論文題名	イヌの同種腎移植における特異的免疫抑制に関する基礎的研究 —とくに抗Ia単クローン性抗体による拒絶反応抑制効果について—
論文審査委員	(主査) 教授 高橋 貢 (副査) 教授 小林 好作 教授 田淵 清

論 文 内 容 の 要 旨

臓器移植における最も重要な問題は移植後に発現する移植免疫反応すなわち拒絶反応をいかに制御するかにある。

1960年代に開発された移植免疫抑制法はそれまで不可能であった同種移植を可能とし、とくに腎移植においてはヒトにおける臨床応用を一般的なものとするに至っている。

しかしながら、現在の免疫抑制法ははまだ不完全なものであり、移植腎の機能を喪失する原因として拒絶反応が約80%を占めているといわれる。また、現在免疫抑制法の主流をなしている免疫抑制剤は、非特異的な免疫抑制法であるため、感染に対する抵抗性の低下ならびに肺炎、髄膜炎などの重篤な合併症の原因となり、さらには造血機能、骨代謝機能ならびに肝機能の障害や発癌率を増加するなどの副作用を発現している。

近年の著しい免疫遺伝学の進歩により、移植の拒絶反応は根本的には遺伝的に規制された免疫応答であり、なかでも免疫学的に自己を決定している移植抗原が拒絶反応の主因をなし、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, 以下, MHC)により最も強い移植抗原が支配されていることが明らかになっている。さらに、興味あることはどの動物種においてもMHCがそれぞれ1つずつ存在していることである。

現在MHCの研究が最も進んでいるのはマウスであり、マウスのMHCは第17染色体上に存在しH-2複合体と命名されている。H-2複合体はK, I, S, G, Dの5つの領域にわけられ、I領域はさらにI-A, B, J, E, Cの亜領域にわけられて、特定の抗原に対する免疫応答を支配している。Ia抗原はI-A, E, C亜領域に支配される3種類が明らかにされ、細胞表面上に存在している。とくにI-A亜領域に規定されるIa抗原が極めて強い移植抗原であり、免疫応答遺伝子と密接な関係にあるとされている。また、マウスのIa抗原に相当する分子がヒト、サル、モルモットならびにラットにおいても存在すること(Ia様抗原)が報告されている。

このように、臓器移植における免疫応答に最も強く関与して個体を表現し、認識するものがMHCであり、とくにI-A亜領域に規定されるIa抗原によって移植片が認識され拒絶反応が発現される。このため一般の免疫能に影響を及ぼさずに移植における拒絶反応のみを抑制する特異的な免疫抑制法の開発が切望されている。

今回著者は、腎移植における特異的免疫抑制法の基礎的研究として、免疫応答のなかで重要な役割をもつIa抗原の関与する特定の免疫応答、すなわち拒絶反応のみを人為的に制御することを目的とし、Ia抗原に特異的な単クローン性抗体(monoclonal antibody, 以下, MCA), すなわち抗IaMCAを用いてイヌの同種腎移植を実施し、その拒絶反応抑制効果について検討した。

実験に使用した抗IaMCAは、H-2複合体のうち、I-A亜領域のKハプロタイプのみの特異的に反応す

るマウス由来の抗体である。

予備実験として、はじめにマウスの Ia 抗原に相当する抗原がイスにおいても存在し、マウス由来の抗 Ia MCA と種を越えて交叉反応を示すか否かを検討した。すなわちイスリンパ球とマウス由来の抗 Ia MCA との交叉反応の有無を FITC (Fluorescein isothiocyanate) を結合したヤギ抗マウス抗体を用いて、染色陽性率を FACS (Fluorescent activated cell sorter) により測定し、検討した。その結果、Control における染色陽性率は 5.4% であったのに対し、抗 Ia MCA により処理することによってその陽性率は 21.9% と高値を示し、イスリンパ球においてもマウスの Ia 抗原に相当する Ia 様抗原が存在し、マウス由来の抗 Ia MCA と交叉反応を示すことが確認された。

ついでイスリンパ球において証明された Ia 様抗原が、臓器あるいは組織においても同様に存在するか否かについて検討するためにマウス、ラットならびにイスの腎臓を、抗 Ia MCA で処理し、FITC 間接蛍光抗体法により腎臓内の Ia または Ia 様抗原の検索を行った。その結果、マウスの腎臓における Ia 抗原の分布は糸球体およびその周囲に強い陽性反応を示し、他の部分ではほとんど陽性反応が見られなかった。また、ラットの腎臓においては糸球体に対する陽性反応は弱く、細～中動脈の内皮細胞およびその周囲に強い陽性反応を示したが、イスの腎臓においては一様に糸球体、尿細管上皮細胞および動脈の内皮細胞に陽性反応を示した。したがって、マウス、ラットならびにイスの腎臓においてもリンパ球と同様に Ia または Ia 様抗体が存在することが確認されたが、その分布に関しては動物種により異なることが推測された。

以上のような予備実験において、マウス由来の抗 Ia MCA によるイスの腎移植における拒絶反応抑制効果が示唆されたことより、イスの同種腎移植実験を実施した。

実験は雑種成犬 61 例を 4 群にわけて行った。Group I (18 例) は対照群として移植腎ならびに宿主に対し抗 Ia MCA を使用しなかった。Group II (25 例) は摘出した移植腎を抗 Ia MCA 10 ml で灌流し、30 分間 4℃ で反応させたのちに、移植を行った。Group III (8 例) は Group II と同様の方法で移植腎を処理したのちに移植を行い、移植後宿主に対して抗 Ia MCA 10 ml を隔日に静脈内に投与した。Group IV (10 例) は移植腎は対照群と同様無処置のまま移植し、移植後宿主に対して抗 Ia MCA 10 ml を隔日に静脈内に投与した。各群ともに移植後宿主の固有腎は摘出し、他の免疫抑制剤は一切使用しなかった。

その結果、Group I における生存日数は 5～13 日、平均 7.2 ± 2.1 日であった。剖検時の移植腎の病理組織学的検査では、全例典型的な急性拒絶反応の所見を示していた。

Group II における生存日数は 10～24 日、平均 14.4 ± 3.6 日であり、Group I と比較し極めて有意 ($P < 0.01$) の差が認められた。移植腎の病理組織学的検査では、生存日数 10～13 日の 4 例においては、急性拒絶反応の所見に加え腎皮質における層状の高度の細胞浸潤が認められ、さらに髄質部における広範囲の壊死像を示す DIC (播散性血管内凝固, disseminated intravascular coagulation) 様の合併症を呈する所見が観察された。また、20 日以上生存した 3 例においては腎皮質の層状の変化はみられず、拒絶反応に DIC 様の合併を呈している所見であった。その他の例については急性拒絶反応の所見のみを示した。

Group III における生存日数は 7～14 日、平均 11.1 ± 2.4 日であり、Group I と比較し有意 ($P < 0.05$) の差がみられた。移植腎の病理組織所見では、2 例に Group II においても観察された腎皮質における層状の特微的变化がみられた。その他の例においては全例急性拒絶反応の所見が観察された。

Group IV における生存日数は 7～12 日、平均 9.4 ± 2.1 日であり、Group I と比較し有意 ($P < 0.05$) の

差がみられた。2例に抗IaMCA投与直後にアナフィラキシー様ショックがみられた。移植腎の組織にはほとんどの例で急性拒絶反応の所見が観察された。

以上の結果から、イヌの同種腎移植においてマウス由来の抗IaMCAを前もって移植腎に灌流、または移植後、宿主に静脈内投与あるいはその両者を併用することにより、明らかに術後の生存日数の延長が認められ、とくに移植腎のみを抗IaMCAで灌流したのちに移植する方法が最も生存日数を延長させる効果があった。また、抗IaMCAの移植腎灌流と術後静脈内投与の併用または術後静脈内投与のみの方法では、移植腎のみの灌流法ほど生存期間の延長効果は著明でなかったが、対照群よりは有意に生存日数が延長した。したがって、抗IaMCAを用いることにより、腎移植後の生存日数が延長する理由は、抗IaMCAが拒絶反応のtriggerとなる腎臓のIa様抗原をブロックし、宿主側のhelper T cellによる抗原認識が抑制されるために、拒絶反応が抑制されるのであろうと推測された。

このように、抗IaMCAを同種腎移植に用いることにより、明らかに移植後の生存日数は延長したが、移植腎の完全な生着例は得られず、病理組織学的検査にみられたように抗IaMCAを使用した群においてもほぼ全例において急性拒絶反応の所見が観察されたことから、現段階においては抗IaMCAにより、完全に拒絶反応を抑制するまでには至っていない。しかしながら、今回使用した抗IaMCAは、マウスのI-A亜領域のkハプロタイプに規定されるIa抗原のみと特異的に反応する抗体であり、I-A亜領域のk以外のハプロタイプまたはI-E、C亜領域の各ハプロタイプとは反応しないため、それらに規定されるIa抗原により拒絶反応が出現したためであらうと考えられる。

今後、I-A亜領域のkハプロタイプ以外のIa抗原を規定するI-A、E、C亜領域の各ハプロタイプに対する抗IaMCAのほか、H-2複合体のK、D領域に規定される標的抗原など、移植免疫反応を司っている遺伝領域にそれぞれ反応する特異的なMCAを用いることによって、それらが関与する免疫反応のみを特異的に制御することができ、従来の非特異的な免疫抑制剤を使用することなく、同種腎移植を成功させることが可能となるであろう。

さらに異種の認識に関与する遺伝子領域の解明による種を超えた異種移植の可能性をも示唆するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

生体内の重要臓器がその機能を喪失したとき、その臓器の機能を代償する方法として、外科的には各種の臓器移植または人工臓器による代替が行われる。

実際の臨床において臓器移植と人工臓器による生体機能の代替については、両者間でその利害得失が論議されている。臓器移植では移植臓器が個体の臓器として生着する可能性があり、移植臓器が直ちにその機能を発揮し得る可能性がある。また、腎臓などでは移植臓器が比較的入手し易いなどの点から臓器移植は実際の臨床にも活用されてきている。しかしながら、臓器移植における最大の欠点は、組織親和性の高い臓器以外では、必然的に拒絶反応を発現することであり、移植臓器に対するrecipient個体の拒絶反応が適確に抑制できない限り、移植臓器の永久的な生着は望めない。

一方、人工臓器では、recipientの拒絶反応はほとんど考慮されないが、生体臓器に代る機能を完全に具備し得る人工臓器の開発が進展せず、一部の機能代償は可能であっても、実際の臨床に活用し得る人工臓器はいま

だ開発されていない。

生体の臓器移植または人工臓器が対象とされるものは心、腎、肝、肺であるが、現段階における実際の臨床面では、いずれも人工臓器より臓器移植が優位であり、とくに心、肝、腎移植は永久生着は望めないとしても、さまざまな拒絶反応抑制剤を使用することによって、かなりの期間生命を延長することに役立っている。

しかしながら、現在の臓器移植による拒絶反応の抑制法は、いずれの臓器移植においても不完全であり、永久的に個体の拒絶反応を抑制することはできないとされている。そこで臓器移植における最大の課題とされている拒絶反応の抑制法が、各方面から検討されてきたが、臓器移植における拒絶反応は遺伝的に規制された免疫応答であり、免疫学的に自己を決定している移植抗原がその主因をなしていることから、免疫学的な拒絶反応抑制法の開発が重視されてきている。

近年では、とくに主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) によって、最も強く移植抗原が支配されていることがわかり、このMHCはいずれの動物種においてもそれぞれ1つずつ存在することが明らかにされて以来、特異的免疫抑制法を開発する基礎として注目されるようになってきた。

MHCについては現在のところ、マウスに関する研究が最も進展している。マウスのMHCは第17染色体の上に存在して、H-2複合体と命名され、K, I, S, G, Dの領域にわけられ、I領域はさらにI-A, B, J, E, Cの亜領域にわけられて、特定の抗原に対する免疫応答を支配する。一方、Ia抗原はI-A, E, Cの3種に支配される細胞の表面に存在しており、とくにI-A亜領域に規定されるIa抗原が極めて強い移植抗原であり、免疫応答遺伝子と密接な関係があるとされている。

このことから、臓器移植における免疫応答に最も強く関与して個体を表現し、それを認識するのがMHCであり、とくにI-A亜領域に規定されるIa抗原によって移植片が認識され、拒絶反応が発現することから、このIa抗原に特異的な免疫抑制法が開発されることによって、これまでの非特異的な免疫抑制法よりも優れた免疫抑制法が開発される可能性があることが示唆されている。

そこで著者は、腎移植における特異的免疫抑制に関して、基礎的な研究を試み、免疫応答のうち重要な役割をもつIa抗原の関与する特定の免疫応答、すなわち拒絶反応のみを人為的に制御することを目的として、Ia抗原に特異的な単一クローン性抗体 (monoclonal antibody, MCA) すなわち抗Ia MCAを用いて、イヌの同種腎移植時における拒絶反応の抑制効果について検討している。

実験方法として、はじめにマウスのH-2複合体のうちI領域のみが異なるkハプロタイプのA・THマウスとsハプロタイプのA・TLマウスを用い、図1に示した方法によって抗Ia MCAを大量に作製して実験に供している。この抗Ia MCAは、マウスのH-2複合体のうち、I-A亜領域のkハプロタイプのみの特異的に反応する抗体である。

著者は、この抗Ia MCAを用いてイヌの同種腎移植時における拒絶反応の抑制効果を検討しようとしたものであり、それには、マウス由来の抗Ia MCAが種を越えてイヌに存在するIa様抗原と交叉反応を示すか否かが検討されなければならないことから、イヌのリンパ球とマウス由来の抗Ia MCAとの交叉反応を検討した。すなわちFluorescein isothiocyanate (FITC) を結合したヤギ抗マウス抗体を用いてFluorescent activated cell sorter (FACS) で測定した結果、イヌのリンパ球においても、マウスのIa抗原に相当するIa様抗原が存在し、マウス由来の抗Ia MCAと交叉反応を示すことが確認された。また、イヌのIa様抗原がイヌのリンパ球だけでなく腎臓にも存在するか否かについて、抗Ia MCAで処理した腎臓をFITC間

接蛍光抗体法で検索した結果、腎臓にも Ia 様抗原が存在することを確認している。このことから、イスの腎移植を行ったときに Ia 抗原によって発現するであろう拒絶反応を、マウス由来の抗 Ia MCA によって抑制し得ることが示唆されたとして、これをイスの腎移植に応用し、その拒絶反応の抑制効果について検討している。

イスの同種腎移植は 61 例の雑種成犬を用いてこれを 4 群に分け、第 1 群は腎移植を行ったのち、抗 Ia MCA を投与しない対照群であり、第 2 群は移植腎を抗 Ia MCA 10 ml で灌流し、30 分間 4℃ で反応させたのちに移植を行った群である。第 3 群は、第 2 群と同じ腎処理を行って移植を行ったのち、recipient に抗 Ia MCA を隔日に静脈内投与を行った群である。第 4 群は、移植腎は無処理で移植し、移植後隔日に抗 Ia MCA を静脈内に投与した群である。この場合、各群とも recipient の固有腎は摘出し、他の免疫抑制剤は使用していない。

この実験の結果、対照群の生存日数は 5～13 日、平均 7.2 ± 2.1 日であり、剖検による移植腎の病理組織学所見から、全例ともに典型的な急性拒絶反応の所見を示していた。第 2 群では、生存日数が 10～24 日、平均 14.4 ± 3.6 日であり、対照群と比較して明らかに有意の差をもって生存日数の延長が認められている。これらの実験例のうち、生存日数の比較的短い例のなかに通常の拒絶反応に加えて腎皮質の層状変化ならびに Disseminated intravascular coagulation (DIC) 様の合併症がみられた。また、比較的生存日数の長い例においても DIC 様の変化を示した例もあるが、最終的には拒絶反応の所見を示して死に至った。第 3 群では、対照例と比較すると有意の差をもって生存日数の延長が認められたが、大部分の例では病理組織学的に急性拒絶反応の所見がみられた。第 4 群においても、対照群と比較すると有意に生存日数の延長が認められているが、一部の例ではアナフィラキシー様ショックを発現し、大部分の例では急性拒絶反応の所見を示している。

このような実験成績から、著者は、イスの同種腎移植について、マウス由来の抗 Ia MCA で、移植腎を前もって灌流したのちに移植する方法が、最も生存日数が延長することを確認し、マウス由来の抗 Ia MCA が、イスの腎移植時における拒絶反応の trigger となる腎臓の Ia 様抗原をブロックし、recipient の helper T cell による抗原認識が抑制されるものと推測している。

しかしながら、腎移植後における生存日数が有意に延長したとしても、いずれの例においても最終的には、拒絶反応の所見を現して死に至っている事実から、マウス由来の抗 Ia MCA のみでは、完全な免疫抑制の段階には至らなかったとしている。そして著者はその理由を、今回使用した抗 Ia MCA は、マウスの I-A 亜領域の k ハプロタイプに規定される Ia 抗原のみと特異的に反応する抗体であり、それ以外の各ハプロタイプとは反応しないため、それらに規定される Ia 抗原によって拒絶反応が出現するものであろうと推定している。

したがって、今後 k ハプロタイプ以外の Ia 抗原を規定する各ハプロタイプに対する抗 Ia MCA のほかに H-2 複合体の K、D 領域に規定される標的抗原など、それぞれに対する特異的な MCA が開発されれば、それぞれ特異性のある免疫抑制効果を得ることができるであろうとしている。

いずれにしても、本研究においては、これまでに臓器移植に対する拒絶反応の抑制法として使用されてきた非特異的免疫抑制法と比較して、移植臓器に対する副作用の少ない特異的免疫抑制法の将来性を示唆しており、このことをマウス由来の抗 Ia MCA を使用し、イスの同種腎移植によって確認し得た成果は、今後の臓器移植に大きく貢献するものと考えられ、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績と考える。

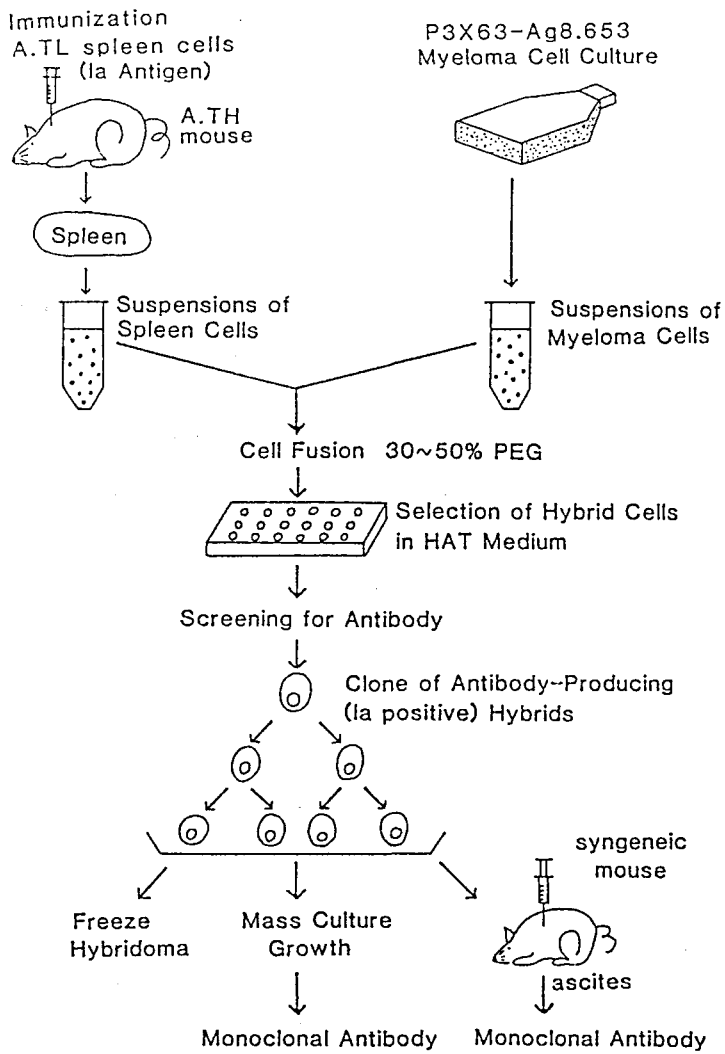


Figure 1. Production of the monoclonal antibody