犬腎同種移植における α_2 -globulin, γ -globulin および細胞毒力価の変動

付. 蛍光抗体直接法による γ -globulin の移植腎内吸着について

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 長谷川 昭*
(主任 大越正秋教授)

ALTERATIONS OF α_2 -GLOBULIN, γ -GLOBULIN AND CYTOTOXIC ANTIBODY IN CANINE RENAL ALLOGRAFT WITH SPECIAL REFERENCE TO γ -GLOBULIN DEPOSITION TO THE GRAFT USING DIRECT IMMUNOFLUORESCENT TECHNIQUE

Akira Hasegawa

Department of Urology, Keio University, School of Medicine

(Director: Prof. Dr. Masaki Ohkoshi)

For the purpose of early serological diagnosis predicting renal allograft rejection, detection of changes in serum α_2 -globulin, serum γ -globulin and BUN, detection of cytotoxic antibodies and histological and immunopathological studies (direct immunofluorescent technique using anti-canine- γ -globulin-rat-globulin-F.I.T.C.) were performed in four groups of canine renal allografts.

Group 1. Bilateral nephrectomy and renal allotransplantation.

Group 2. Group 1 with immunosuppression.

Group 3. Unilateral nephrectomy and renal allotransplantation, followed by graftectomy 7 days after transplantation.

Group 4. Group 3 with immunosuppression.

Immunosuppression was carried out with prednisolone 5 mg/kg/day and azathioprine 2 mg/kg/day. Aminobenzyl penicillin 250 mg/kg/day and methylchlorophenyl isoxazolil penicillin 250 mg/day were given for five days after the operation to prevent infection.

1. α_2 -globulin increased after renal allotransplantation and the graftectomy in almost all cases. However because of possible overlapping with α_2 -Acute-Phase-globulin, it seems that immediate postoperative rise of α_2 -globulin level does not indicate directly acute or superacute rejection of the grafts.

2. Serum γ -globulin fraction increased with the increase of BUN or after the destruction of the grafts was completed. Significant increase of γ -globulin was observed after graftectomy in some cases. Rise of γ -globulin fraction in groups 2 and 4 was not so marked with contrast to groups 1 and 3.

3. Appearance of cytotoxic antibodies in the serum following renal allotransplantation indicated graft rejection. On the other hand, there were some cytotoxin-negative cases although histological and immunopathological studies revealed graft destruction and azotemia (cytotoxin false negative). Cytotoxin false negative cases might be due to (a) no common histocompatibility antigens between a kidney donor and lymphocyte donor dogs because lymphocyte donor dogs were relatively small in number. (b) absorption of the cytotoxic antibodies by the grafts which contain very large amount of antigen. Serum cytotoxic antibodies were detected after graftectomy, or low titers of cytotoxin frequently increased more significantly after graftectomy. (c) The cytotoxin could be so-called C-N-A-P antibodies.

4. The appearance of cytotoxic antibodies and the increase of serum γ -globulin level were not always

* 大学院学生

simultaneous.

5. It seems to be possible to predict graft rejection by cytotoxic titration in near future. So storage method of the lymphocytes and collection of pure lymphocyte suspension should be popularized for higher and earlier cytotoxic antibodies detection, if test lymphocytes are obtained from the same graft donor.

6. Kidney sections of four groups of renal allotransplants were examined by immunofluorescence technique to detect deposits of γ -globulin. They were detected from fifth days after transplantation, and they appeared in the glomerular tufts, peritubular capillaries and venules. As the rejection progressed γ -globulin deposits appeared in the relatively large vessels such as interlobular arteries and arcuate arteries, especially in the endothelium and internal elastic layer. In completely rejected allografts, there were γ -globulin deposits in the interstitial tissue of the cortex and medulla. But no specific fluorescence was demonstrated in the tubular cells. γ -globulin was shown in a significant number of rejected kidneys in comparison with the non-rejecting kidneys. There were two types of γ -globulin deposition in the glomeruli, linear and granular. The demonstration of these deposits suggests that humoral antibodies play an important role in the rejection of canine renal allografts.

I 結 言

腎同種移植における拒否反応の診断は、移植患者を管理する際に、免疫抑制反応、ドナーの選択の問題とともに、もつとも重要なことの一つである。ことに免疫抑制療法下に頻発する感染症との鑑別診断は、その治療の方向が逆の立場にあるだけに、より確実な鑑別法を必要とする。

一方、同種移植時の拒否反応における液性抗体の果す役割が、近年ようやく脚光を浴び始めてきたが、拒否反応診断の手掛りとしての血清学的診断法は、まだその端緒についたばかりである。

Medawar¹⁾²⁾の独創的な実験によつて、同種移植臓器に起こる拒否反応が、免疫反応によることが証明されたが、その本態については、同種移植免疫が、感作血清の注射によつて受動的に移入できないこと、生きた感作リンパ球の移入により受動的に同種移植免疫の移入が可能であること³⁾などから、同種移植免疫は細胞性抗体が働く遅延型アレルギーの代表例のごとく理解され、体液性抗体の果す役割は、無視され、あるいは第2義的に考えられて近年に至つたのである。ところが1962年、Najarian, Feldman⁴⁾は、Milipore chamberに封入した感作リンパ球によつて、移植された皮膚の拒否反応が促進されることを報告した。続いて、Terasaki⁵⁾らはラットを用いた実験で、Altman⁶⁾は犬を用いた腎同種移植の実験で、いずれも感作されたリシビエントの血清を、直接腎動脈に注入することによつて、移植免疫の血清による受動的な移入に成功した。また、無グロブリン血症の患者が、液性抗体を作ることが困難であることは広く知られているが、そうした患者はまた、皮膚同種移

植片を拒否し難い⁷⁾、という報告も加わり、臓器同種移植の場で果す液性抗体の役割が次第に研究者の注意を惹きつけるようになってきた。

そうした移植抗体を、腎同種移植個体の血清中に検出することができ、しかも、拒否反応との相関関係を追求できたならば、それが、拒否反応の血清学的診断の1つになりうると考え、犬を用いた腎同種移植の実験を行ない、同時に血清 α_2 -globulin, γ -globulin, cytotoxic antibodiesの経時的な検索を進め、それらと、BUN, 組織学的拒否反応所見の程度、および自家製抗犬- γ -globulin-家兎-globulin-FITCを用いた蛍光抗体直接法による免疫組織学的検索を併せ行なつて得られた結果について報告する。

II 実験材料および方法

1. 犬腎同種移植実験群

実験群として、次の4群に分けた。

A群：同種移植（移植と同時に両側腎摘出術を施行し、免疫抑制処置を行わない群）

B群：免疫抑制群（Prednisolone 2mg/kg/day + azathiopurine 5mg/kg/day）の免疫抑制処置を行なつた群）

C群：腎摘出術を片側にとどめ、移植後5～9日目に移植腎摘出を行なつた群

D群：C群と同様な実験犬に、B群に行なつたと同様の免疫抑制処置を行なつた群

2. 犬腎同種移植手技

体重10～15kgの雑種成犬を用い、Pentobarbital sodium 30 mg/kgの静脈麻酔を行なつた後、気導確保のために気管チューブを挿入した。Renal protection⁸⁾として、graftとなる腎の摘出までに、0.33%塩化ナトリウ

ム加5%ブドウ糖液を体重1kgあたり15~25ml 点滴静注した。腎摘出術および骨盤腔内への腎同種移植は、正中線切開により経腹腔的に行なつたが、犬における皮下出血はなかなか自然に止血しないことが多いため、できるだけ丁寧に結紮止血した。腎の灌流には10°Cに冷却した乳酸化リンゲル液 100ml, ヘパリン・ナトリウム 500単位, 塩酸プロカイン 100mg⁹⁾, を用いた。腎の摘出に際しては、血管の剝離をできる限り腎門部より遠く、すなわち腎動静脈の起始部近くで血管を切断した。動脈吻合は、中山式血管吻合器により、2mmまたは3mm径のリングを用い、外腸骨動脈との間に端端吻合、静脈吻合は6-0血管縫合糸を用い手縫いで外腸骨静脈との間に端側吻合を行なうか、動脈と同様に中山式血管吻合器(リング径4mm)を用いて端端吻合を行なつた。尿管-膀胱吻合はThompson氏法を行なつた。なお術後、感染症予防のために、aminobenzyl penicillin 250mg/day. + methylchlorophenyl isoxazalyl penicillin 250mg/day の筋注を術後5日間毎日行なつた。採血は、術前および術後隔日に行ない、血清分離後滅菌小試験管4本に分注し、検査を行なうまで-20°Cに冷凍保存した。BUNの測定にはConwayの微量拡散法によるクロマトグラフペーパー法(ユニグラフ)を用い、血清総蛋白の測定には、refractomorph (日立蛋白濃度計)を用いた。

3. 血清蛋白分画・免疫電気泳動

血清蛋白分画の定量は、電気泳動学会規定の、セルローザセテート膜電気泳動法による血清蛋白分画量法の標準操作法¹⁰⁾に従つて行なつた。免疫電気泳動は抗血清に、自家製抗犬家兔血清を用いて、Peetoom¹¹⁾の方法に従つて寒天を支持体として行なつた。

4. 細胞毒力価の測定

a) 白血球浮遊液の作製

白血球浮遊液の作製は、Altman & Simonsenの方法¹²⁾を用いた。まず白血球ドナーとなる雑種成犬(5~8頭)からヘパリン加注射器で静脈血を採取した。血液と同量の8% glycerolを含む1.5% polyvinylpyrrolidoneを加えてよく混和し、約30分間放置し、次に白血球と赤血球の少数とが混じた桃色の上清だけを遠沈管に移し、400g, 6分間遠心沈澱を行なつた。次にこの遠心沈澱を行なつた上清を捨て沈澱に、最初の血液量の1/4量のtissue culture用mediumを加え静かに混和する。この操作で、混在する赤血球は溶血し、ほとんど100%の白血球浮遊液が得られる(50~75%がリンパ球)。この

白血球浮遊液の白血球数を血球計算板を用いて算定した後、白血球数が6,000~8,000/mm³になるようにDifco hemagglutination bufferを加える。こうして得られた白血球は、トリパン・ブルー喰食検査では97~100のviabilityを示し、10°C以下で操作され、保存されていれば約8時間はcytotoxic titerの測定に用いることができる。

b) Cytotoxic titer 測定手技 (test-tube-cytotoxic-titration 中村変法¹³⁾)

(i) 被検血清をDifco hemagglutination bufferで倍数稀釈し、2°×から2⁵×までの倍数稀釈系列を作つた。

- (ii) 被検稀釈血清(あるいは対照血清)……3滴
 1)で作製した白血球浮遊液……2滴
 補体(Bacto complement)……1滴

を小試験管内に入れ、よく混和し37°Cの浴槽中で60分間incubateする。続いて2%トリパンブルー1滴を加え、さらに30分間37°C浴槽中に放置し、最後にフォルマリン原液2滴を加えて染色を停止させる。顕微鏡下で対

表 1

Vc: Number of Viable Lymphocytes out of 100 on Control	p = more than 5%
Vt: Number of Viable Lymphocytes out of 100 in Tested Serum	p = 5%
	p = 1%
	p = 0.3%

照血清および被検稀釈血清とともに incubate した白血球 100コのうち、染色されていない細胞数を数え、両者間で X^2 -test を行なつて (表-1), $P < 0.01$ で有意の差を持つ最高の血清稀釈倍数をもつて、その血清の cytotoxic titer とした。

5. 蛍光抗体直接法¹⁴⁾¹⁵⁾

a) 蛍光抗体液 (Anti-dog γ -globulin-rabbit globulin-FITO) の作製

(i) 抗原: dog- γ -globulin は雑種成犬により得た血清の34%飽和硫酸塩析を4回行なつた後、生理食塩水で透析したものをを用いた。

(ii) 家兎抗血清の作製: dog- γ -globulin 10mg と Difco incomplete adjuvant とを週一回、体重 1.5~2.0kgの家兎の足臓皮下へ注射して免疫した。9~13週免疫後試験採血で抗体価の上昇を、重積法による沈降反応で確めた後、ブースターとして dog- γ -globulin を静脈注射し、1週間後に心穿刺により採血した。なお、家兎は3羽を1グループとして免疫した。

(iii) 抗血清より globulin への精製: 50%飽和硫酸塩析1回、次いで34%飽和硫酸塩析を3回おこなつた。透析は0.15M phosphate buffered saline で行なつた。透析の終了した粗 globulin は Ouchterlony 寒天板法および免疫電気泳動法をもつて、蛋白の性状および contamination の有無を調べ、refractometer にて蛋白量を測定した。

(iv) 蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate) の標識: 抗体 (粗 globulin) への FITC の標識は、0.5M 炭酸一重炭酸ソーダ緩衝液の存在下に pH 9.1, 蛋白・色素比 100:1 で、抗体溶液の最終蛋白濃度が1% (10 mg/ml) の状態で、氷室内で一晩撹拌を続けて行なつた。

(v) 遊離色素の除去

遊離色素の除去は Cephadex G-25 column chromatography (0.01M pH 7.2 phosphate buffered saline) を用いて行なつた。

(vi) DEAE-cellulose による非特異物質の除去

Cephadex G-25 column chromatography で得られ conjugate された蛋白溶液を、カーボワックスでいつたん濃縮して蛋白濃度を高めた上 staining buffer で一晩透析後 DEAE-Cellulose による非特異物質の除去に移った。

DEAE-Cellulose を 1N-NaOH で活性化し次に 1N-HCl で酸化し、ふたたび 1N-NaOH で洗い強アルカ

リ性に戻した後、多量の蒸留水で洗い続ける。蒸留水で洗い、流出水が pH 8.4 に近づけたところで pH 8.4, 0.05 M の phosphate buffer でよく洗いカラム管に充填する。一方 Conjugate は 0.05M, pH 8.4 の同じ phosphate buffer で一晩透析しておく。pH 8.4 にされた conjugate をカラムに注入し、200ml の 0.05M, pH 8.4 の phosphate buffer で elute すると、色素と結合していない遊離の蛋白と、蛋白と結合していない遊離の色素が先に流出するからこれを捨てる。

第1分画の elute には、0.05M, pH 6.4 の phosphate buffer を用いフラクションコレクターで第1分画液を収集し、次いで 0.1M, pH 6.4 の phosphate buffer で elute して第2分画をえ、第3分画の elute は pH 7.0, 1N-NaCl で行なつた。今回の実験には、非特異因子の混存する第2, 第3分画で得られた conjugate は使用せず、第1分画で得られたもののみを蛍光抗体液として使用した。フラクションコレクターを用いて収集された各分画液は、引き続いて pH 7.2 の staining buffer による透析を行なつた後、カーボワックス法で濃縮し、最後にふたたび pH 7.2 の staining buffer で透析した後、ミリポアフィルターを通して滅菌小試管に 1 ml ずつ分注し、使用まで -27°C のストッカーに凍結保存した。なお蛍光抗体液の最終蛋白濃度は 4 mg/ml であつた。

b) 低温処理パラフィン切片の作製

蛍光抗体法に用いる組織標本には、浜島¹⁵⁾らの推奨する低温処理パラフィン切片を用いた。すなわち移植腎剔除後ただちに、厚さ約 2 mm, 巾 8 mm に切り出し、ドライアイス・アルコールであらかじめ -70°C に冷却された 95% エタノール中に投入し、2時間固定、次いで -4°C の 95% エタノールで一晩固定する。脱水は -20°C の無水アルコールを用いた。続いて -4°C キシロールを20分毎3回通した後、融点 56°C~58°C のパラフィン溶液に5分毎3回通して包埋し、ブロックは使用するまでストッカー内に保存した。

c) 蛍光抗体による染色・写真撮影

パラフィンブロックから、マイクロームを用いて 4 μ の切片を作製 (無蛍光スライドガラス使用) した後、脱パラフィン、脱キシロールを型のごとく行ない、最後に cold staining buffer でよく洗つてアルコールを落した。

染色は室温, moist chamber 内で12時間行なつた。染色終了後ただちに cold staining buffer で切片をよく洗い、glycerine buffer (無蛍光 glycerine 9:

staining buffer.) で封入した。

観察および写真撮影にはカール・ツァイス社製蛍光顕微鏡装置を用い、フィルムはコダック社のエクタクローム・タイプB・フィルムを使用した。なお対照として正常腎および抗体吸収試験¹⁴⁾、blocking test¹⁴⁾を行なつて蛍光の特異性の検討を行なつた。

III 実験結果

犬腎同種移植実験の各群における BUN, α_2 -globulin, γ -globulin の変動および cytotoxic antibody の推移を図1～図4に示す。

1. A群(同種移植群, 図一参照)

A-1 は術後12日目に死亡し、解剖の結果拒否反応による急性腎機能不全によつて死亡したものと推定された。この例では、移植5日目から、血中に cytotoxic anti-

から急激な上昇を示した。すなわち術後9日目には 1,638mg/dl, 術後12日目には 2,122mg/dl と 231%もの増加を示した。一方 γ -globulin は、術後3日目までは減少(1,453mg/dl→898mg/dl), その後は BUN の上昇とほとんど平行して増加し、そのまま死亡するまでに上昇線を辿つた。術後12日目には 2,600mg/dl と、79%の増加を示した。

A-2 は移植後7日目に尿管一膀胱吻合部の縫合不全で死亡した例であるが、移植腎の組織学的検索では、明らかに拒否反応所見を呈していながらも、血中に cytotoxic antibody は証明できなかった。BUN は、移植翌日から死亡時まで例40～50mg/dl であつたが、 α_2 -globulin, γ -globulin は、移植後2日目から上昇しはじめ、いずれも 100%以上の増加を見ている。

A-3 は移植後12日目に拒否反応によつて死亡した例である。移植後6日目に初めて流血中に cytotoxic antibody が証明され、BUN の上昇と時を同じくしている。力価は6日目、7日目が $2^0 \times$ 、9日目、11日目が $2^1 \times$ 例でつた。 α_2 -globulin は、術前 570mg/dl であつたが、移植術後しだいに増加し、6日目には 1,190mg/dl, 11日目には 1,863mg/dl と 227%の上昇を示した。

γ -globulin も術前の 455mg/dl から、ゆるやかに上昇線をたどり、11日目には 1,170mg/dl と 158%の増加を見た。

A-4 は、術後12日目に腸重積を起こして死亡した例であるが、移植腎は、一部梗塞を認めながらも、拒否反応所見は軽微であつた例でである。BUN は術後2日目に40mg/dl と一過性に上昇したが4日目には 15mg/dl に戻り、以後死亡するまで、20～27mg/dl に止まつた。cytotoxic antibody は、死亡するまで血中に証明されず γ -globulin もほとんど変動が認められなかつた。ただ α_2 -globulin のみは、術前 642mg/dl であつたものが、術後4日目に突然 1,840 mg/dl と急激に上昇し、それらが死亡時(1,658mg/dl)まで続いた。

(小括)

A群の平均生存日数は10.7日で、その内直接拒否反応で死亡したと考えられるのは、A-1、A-3 の2例である。移植腎の組織学的検索では、いずれの腎にも、程度の差こそあれ拒否反応の所見が認められたが、A-2、A-4 の移植腎は、死亡時までその機能のある程度充分に果していたと推察される。Cytotoxic antibody は、A-1、A-3 の2例において証明された。その出現は BUN の上昇と時を同じくしていた。 α_2 -globulin は A群4

図 1

bodyが証明された。この抗体の出現は、術後一過性に軽度上昇した BUN が術前値に戻り(術後3日目)ふたたび上昇しはじめるのと時を同じくしている。その力価は、術後7日目までは $2^0 \times$ で、9日目には $2^1 \times$ 、死亡した12日目には $2^3 \times$ に上昇している。 α_2 -globulin は移植直後に一過性に軽度の上昇を示したが、術後7日目まではまば術前値(642mg/dl)を保ち、術後9日目

頭の全例において術後顕著な増加が認められたが、BUN との間に相関関係は見られなかった。γ-globulin は、A-4 を除く他の3例において、上昇する傾向を示した。

2. B群 (免疫抑制群 図2参照)

B群は、prednisolone 2mg/kg/day と azathioprine 5mg/kg/day の免疫抑制処置を施した群である。

B-1 は移植術後12日に創縫合不全で死亡した例であるが、移植腎の組織学的検索で、拒否反応所見を認めなかった例である。BUN は、術前15mg/dlで下がったが、術後2日目45mg/dl、その後下降の傾向をとり術後9日目は

図 2

27mg/dlとなったが、死亡当日は37mg/dlと上昇傾向を示した。α₂-globulin は術後4日目に軽度の上昇を示した後、死亡当日は1,358mg/dlと、術前値(760mg/dl)の79%増加を見た。γ-globulin 分画には、見るべき変動なく、cytotoxic antibody は終始証明されなかった。

B-2 は、移植術後22日に拒否反応によって死亡したが、cytotoxic antibody は、BUN がすでに75mg/dl以上に上昇した術後20日目にはじめて血中に証明された(2¹×)。α₂-globulin は術前627mg/dlであったものが、術後漸次上昇し術後11日目には1,566mg/dlと上昇したが、ふたたびやや下降し死亡前日の術後21日目には

1,080mg/dlとなった。γ-globulin は術前343mg/dlで術後はほとんど平行線を辿り、術後14日目からはやや下降気味となり、術後21日目には248mg/dlと、28%の低下を示した。

B-3 は、移植術後21日に死亡するまで、移植腎は良好な機能を営み、BUN は術後7日目に20mg/dlと上昇したのを最高に終始10~17mg/dlを保った。移植腎の組織学的検索例も、拒否反応の所見を欠き、解剖の結果、気管支肺炎によって死亡したものと推定された。この拒否反応を生じなかった B-3 では、cytotoxic antibody は、一度も証明されなかった。

α₂-globulin, γ-globulin はこの例では術前値が、α₂-globulin 1,262mg/dl, γ-globulin 897mg/dlと、他犬に比してやや高値を示したが、術後漸次下降の傾向を示し、術後20日目にはα₂-globulin 756mg/dl(−40%)、γ-globulin 236mg/dl(−74%)と下降を示している。

B-4 は prednisolone 2mg/kg/day と azathioprine 5mg/kg/day という比較的強力な免疫抑制処置を行なっていたが、術後8日目頃から移植腎機能障害を生じ、術後14日目に尿毒症により死亡した例である。移植腎の組織学的検索では、腎の拒否反応による破壊は強度であった。cytotoxic antibody は術後11日目に初めて証明されたが、力価は2⁰×であり、その後も力価の上昇は見られなかった。α₂-globulin は、術前832mg/dlであったが、移植術後漸次増加し8日目には2,133mg/dlとピークを示した後急激に下降し、cytotoxic antibody の初めて証明された術後11日目には488mg/dl、13日目には384mg/dlと、術前の54%減となった。γ-globulin は逆に術後11日目には上昇し、術前の34%増の766mg/dlであった。

(小括)

B群の平均的生存日数は17.3日であったが、そのうち、拒否反応によって死亡したものは B-2, B-4 の2例であった。cytotoxic antibody の証明されたのは B-2, B-4 の2例においてのみであったが、その抗体価はA群のそれに比して低いものであり、その出現もほぼ、拒否反応が極期に達してから現れたものと思われる。cytotoxic antibody が証明されなかった B-1, B-3 の移植腎は、組織学的にも、拒否反応の所見を欠いていた。α₂-globulin は、術後一過性に高値を示したが、BUN との相関関係は認められなかった。γ-globulin は、この抗免疫処置群では、術後漸次減少する傾向にあり、B-4 においてのみ術後11日目に BUN が上昇し、cytotoxic an-

tibody が証明されると同時に、増加の傾向を示した。

3. C群 (図3参照)

C群は、腎同種移植術を施行する際、リシビエントの固有の腎の摘出を片側のみに止め、移植後、5日～9日後に移植した腎の摘出を施行し、その前後の cytotoxic titer, α_2 -globulin, γ -globulin の変動を観察したものである。

C-1 は、移植後7日目に移植腎の摘出を行なった。移植腎の組織学的検索では、拒否反応の所見が認められた。cytotoxic antibody は移植後7日目までは証明さ

行なつた。摘出された移植腎の組織学的検索では、中等度の拒否反応が認められた。cytotoxic antibody は、移植腎摘出後2日目から血中に出現し始めた。その力価は、移植腎摘出後2日目 $2^3\times$ 、4日目 $2^2\times$ 、7日目 $2^2\times$ 、9日目 $2^2\times$ 、11日目 $2^0\times$ で、14日目以後は antibody は検出しえなかつた。

α_2 -globulin は移植術前が 521mg/dl、術後2日目、4日目が 1,170mg/dl、1,162mg/dlと上昇後移植腎を摘出した7日目には 350mg/dl と減少、移植腎摘出後ふたたび増加し、11日目(移植腎摘出後4日目)には 868mg/dl、21日目には 1,088mg/dl とピークに達した後次第に減少する傾向をとつた。

γ -globulin は興味あるカーブを画いた。すなわち、術前 980mg/dl であつた γ -globulin は、術後4日目まで減少した後6日目にはほぼ術前値に復した。7日目に移植腎の摘出を行なつたが、それを境に上昇し2日後の、術後9日目には 1,363mg/dl と58%の増加を見た。その後は漸次ゆるやかに減少した。このC-2では、cytotoxic antibody の出現と、 γ -globulin の増加が、移植腎摘出直後から時を同じくしている。

C-3 では、移植術後5日目に、移植腎の摘出を行なつた。移植腎は組織学的に拒否反応を呈していたが、5日目までは、血中に cytotoxic antibody は検出されなかつた。しかし移植腎を摘出した翌日から $2^3\times$ の力価を持つ cytotoxic antibody が血中に現れ始めた。7日目(移植腎摘出後2日目)には、その力価は $2^3\times$ 、9日目(同4日目)から18日目(13日目)までは $2^4\times$ 以上、21日目(16日目)には $2^1\times$ でつた。すなわちこの例では、移植腎摘出の際に高力価の cytotoxic antibody が現れ、腎摘出後16日間にわたつて血中に証明された。この間 α_2 -globulin は、移植術後には減少し、移植腎摘出後旧値に復し、一方 γ -globulin は、移植腎摘出までは横這いてあつたものが、その後じよじよに増加し、術後16日目には 1,021mg/dl と、術前の約 100%を示した後、漸次減少の傾向をとつた。

C-4 は、移植後9日目に移植腎の摘出を行なつた。移植腎は組織学的に拒否反応を呈しながらも、cytotoxic antibody は、腎摘前後に、1度も血中に検出されなかつた例である。 α_2 -globulin は、術後じよじよに増加して9日目には術前の86%増の 722mg/dl、腎摘後も4日間じよじよに上昇した後、漸次減少の傾向を示した。 γ -globulin は、高力価の cytotoxic antibody が検出された前は、C-3 と同様のパターンを示し、移植後横這

図 3

れず、移植腎摘出後2日目に、 $2^3\times$ 力価の cytotoxic titer が血中に証明された。翌日(術後10日目)も $2^3\times$ の抗体が証明されたが、その後の追求は、実験犬が逃亡したためできなかった。 α_2 -globulin は、移植前 590 mg/dl 例あつたものが、術後7日目(移植腎摘施行当日)には 1,710mg/dl、移植腎摘出後も上昇し続け術後9日目には 1,820mg/dl に達した。一方 γ -globulin は術後5日目まで漸次増加したが、移植腎摘出後は横這いないし軽度の上昇を呈したのみで、期待したような移植腎摘出後の急激な γ -globulin の増量は認められなかつた。

C-2 も、C-1 と同様に移植後7日目に移植腎の摘出を

い、9日目の脳摘出を境に、11日目、16日目の2つのピークをもって急激に増加し、16日目には術前の129%増の1,283mg/dlとなった。その後かなり速い速さで減少し、術前値に近づいていった。

(小括)

C群では4頭の実験犬中、2頭は移植後7日目に、1頭は5日目に、残る1頭は9日目に移植腎摘出を行なった。cytotoxic antibodyは4頭中3頭に現れ、いずれも移植腎摘出後に血中に証明され、follow upのできたC-2、C-3ではそれぞれ11日間、16日間血中に抗体を証明しえた。 α_2 -globulinは、C-3犬の第1回手術後 γ -globulinの増加と高力価のcytotoxic antibodyの出現が同時に認められた。C-4犬では、 γ -globulinは、前述のC-2、C-3と同様に、移植腎摘出後急激に増加したが、血中にはcytotoxic antibodyは証明されなかった。

D群(図4参照)

D群は、腎同種移植後 prednisolone 2mg/kg/day と azathioprine 5mg/kg/day の免疫抑制処置を行ない、術後7日目に移植腎の摘出を施行したものである。

D-1は、7日目に摘出した移植腎が光顕的に明らかに

拒否反応を呈していたこの群で唯一の例である。

この例でも α_2 -globulin は移植術後上昇傾向を辿り7日目には術前値の214%増の1,322mg/dl、移植腎摘出後も上昇し9日目には1,728mg/dlとピークに達した後しだいに減少し、15日目には799mg/dlと低下し以後横這いとなった。

γ -globulin は、術後4日目までやや減少し、7日目にはほぼ術前値(864mg/dl)に復した。そして、移植腎摘出後増加の傾向を示し、18日目(移植腎摘出後11日目)には1,584mg/dlとピークに達した後、漸減の傾向を示した。

cytotoxic antibody は、移植腎を摘出した翌日の8日目から血中に現れ、9日目には $2^3 \times$ 、11日目には $2^2 \times$ 、13日目、13日目、15日目はそれぞれ $2^3 \times$ 、18日目 $2^2 \times$ 22日目には $2^0 \times$ の力価であつた。

D-2犬の、移植腎の組織学的検索では、拒否反応所見は見られなかった。 α_2 -globulin は術前730mg/dl、術後7日目まで上昇し続け7日目には193%増の2,176mg/dl移植腎摘出後も高値を保ち、15日目には2,455mg/dl、その後漸減の傾向を示した。 γ -globulin 値は術前より235mg/dlと低値を示し、移植術後および移植腎摘出後も明らかな変動を示さず、cytotoxic antibody も終始証明されなかった。

D-3犬の移植腎の摘出標本は光顕的にも軽微な拒否反応所見しか呈していなかった。 α_2 -globulin はこの例でも、移植術後増加を示し、移植腎摘出後も11日目までは増加し、その後術前値に復した。 α_2 -globulin は、D-2と同じく術前より低値で、術前301mg/dl、7日目276mg/dl、9日目366mg/dl、15日目285mg/dlとほとんど変化を見せなかった。cytotoxic antibody は8日目、9日目(移植腎摘出後1日目、2日目)にのみ、 $2^1 \times$ の力価を有する抗体を証明した。

D-4犬では、移植腎は拒否反応を呈さず、流血中のcytotoxic antibody も証明されなかった。 α_2 -globulin は、術前498mg/dlであつたものが術後6日目まで上昇し、6日目には1,295mg/dlと133%の増加を示した後、じよじよに減少、術後9日目には886mg/dl、その後ふたたび増加を示し、15日目には1,242mg/dlであつた。 γ -globulin は、術前476mg/dl、6日目296mg/dl、8日目350mg/dl、11日目389mg/dl、15日目396mg/dlと大きな変動は認められなかった。

(小括)

抗免疫療法を行なったD群では、移植後7日目に摘出

図 4

表 2

	組 織 摘 出 術 後 日	光顕的 拒絶反 応所見	蛍光抗体法による γ -globulin の存在					細胞 毒力 価	血 清 中		B U N	備 考
			糸球体	血管 (大)	血管 (小)	尿管 上皮	間質		α_2 -globulin	γ -globulin		
A-1	12日	+	+	+	+	-	+	$2^3 \times$	↑(+ 231%)	↑(+ 79%)	70以上	
A-2	7日	+	+	-	+	-	-	0	↑(+ 328%)	↑(+ 140%)	47	尿管・膀胱吻合部縫 合不全
A-3	12日	+	+	+	+	-	+	$2^1 \times$	↑(+ 227%)	↑(+ 158%)	70以上	
A-4	12日	+	+	+	+	-	-	0	↑(+ 177%)	(+ 5%)	27	腸重積
B-1	12日	-	-	-	+	-	-	0	↑(+ 79%)	(+ 5%)	37	創縫合不全
B-2	22日	+	+	+	+	-	+	$2^1 \times$	↑(+ 72%)	(- 28%)	70以上	
B-3	21日	-	±	-	-	-	-	0	(- 40%)	↓(- 74%)	10	肺炎
B-4	14日	+	+	-	+	-	-	$2^0 \times$	↓(- 54%)	(+ 34%)	70以上	

表 3

	組 織 摘 出 術後日	光顕的 拒絶反 応所見	螢光抗体法による γ-globulin の存在					細胞毒力価		血 清 中				B U N	
			糸球体	血管 (大)	血管 (小)	尿管 上皮	間質	移植腎 摘出の	α ₂ -globulin 移植腎摘出の		γ-globulin 移植腎摘出				
									前	後	前	後	前		後
C-1	7 日	+	+	+	+	-	-	0	2 ³ ×	↑+190%	+ 5%	+14%	+14%	27	
C-2	7 日	+	+	-	+	-	-	0	2 ³ ×	-32%	↑+68%	-21%	↑+58%	15	
C-3	5 日	+	+	-	+	-	+	0	2 ⁴ ×	-26%	+14%	± 0%	+36%	15	
C-4	9 日	+	±	-	-	-	-	0	0	↑+86%	- 2%	- 4%	↑+129%	10	
D-1	7 日	+	+	-	+	-	+	0	2 ³ ×	↑+214%	-40%	+13%	+ 7%	15	
D-2	7 日	-	-	-	-	-	-	0	0	↑+193%	+13%	↑+74%	- 5%	10	
D-3	7 日	±	+	-	+	-	-	0	2 ¹ ×	↑+68%	-26%	- 8%	+ 3%	10	
D-4	7 日	-	±	-	-	-	-	0	0	↑+133%	+ 8%	- 8%	- 9%	10	

した移植腎が、明らかに光顕的に拒否反応の所見を示していたものは D-1 のみであつた。この D-1 において、移植腎の摘出の際に、流血中に cytotoxic antibody の出現をみ、また γ -globulin の増加が認められた。D-3 においても移植腎摘出後に cytotoxic antibody が認められたが、低力価で、その現れた期間も短いものであつた。 α_2 -globulin はいずれにおいても術後ただちに上昇傾向が認められ、移植腎摘出後も高値を保つものが認められた。 γ -globulin 分画は D-1 を除く 3 例では、有意の変動と思われるものは見られなかつた。

VI 蛍光抗体直接法による γ -globulin の移植腎への吸着 (表-2, 3, 図5-9)

蛍光抗体液として anti-dog γ -globulin-rabbit-globulin-FITC を用いた今回の実験で、 γ -globulin は移植後 5 日の腎にすでに証明された。 γ -globulin は、糸球体 tuft (C-3) は線状の沈着を起こし、糸球体以外的小血管、すなわち vas afferens, peritubular artery

にもこまかい斑状の沈着として証明された。腎髄質内の比較的大きな血管には 5 日目の移植腎では γ -globulin は認められなかつた。光顕的に拒否反応の所見のより進んだ移植腎では、術後 7 日～12 日目頃から、腎髄質内の比較的大きな血管および腎間質にも γ -globulin の沈着が認められた。血管壁への γ -globulin は内膜および内弾性板に非常に強度の蛍光を呈し、より深層にまで斑状の沈着物が認められるものもある。間質への γ -globulin の沈着は、peritubular artery や venule を中心に拡大しており、おそらくはそれからの漏出によるものと思われる。腎間質に γ -globulin の沈着の認められたのは A-1, A-3, B-2, C-3, D-1 の 5 例であるが、いずれも光顕的にも拒否反応の所見が高度のものであつた。またこの 5 例では、全例に cytotoxic antibody が、 $2^1 \times$ 以上に検出されたことは興味深い。

光顕的に、拒否反応の所見を欠いた B-1 (術後12日)、B-3 (同21日)、D-2 (同7日)、D-4 (同7日) において

図5 糸球体 tuft への, こまかい顆粒状の γ -globulin の沈着

図6 糸球体血管極へのより強度な γ -globulin の沈着

図7 糸球体 tuft へのこまかい線状の γ -globulin の沈着

は, B-1 では, vas afferens, peritubular artery のような小血管壁にわずかに γ -globulin の沈着を認め, B-3, D-4 では糸球体 tuft に微弱な線状の蛍光所

図8 髄質内の比較的大きな血管 ことに, その内膜, 内弾性板への γ -globulin の沈着

図9 拒否反応のより進んだ移植腎での間質への γ -globulin の沈着

見が認められたに過ぎず, その他の糸球体, 血管, 間質, 尿管上皮には γ -globulin の沈着は証明されなかつた。またこの組織学的に拒否反応の所見を欠き, 著明な γ -globulin の沈着を証明されなかつた4例では, いずれも血中に cytotoxic antibody が証明されなかつた。

糸球体 tuft への γ -globulin の沈着の状態は, 線状に, 1つの糸球体全体にわたり, 均一な状態で特異蛍光を発するものが多いが, 少数例においては, 血管極のみに強い特異蛍光を発するもの, あるいは糸球体 tuft の一部のみに強い特異蛍光を発するものも認められた。また糸球体全体に蛍光を発する例では, 線状の蛍光が多く, 糸球体血管極のみ, あるいは糸球体の一部のみのものでは顆粒状の γ -globulin の沈着が多く認められた。

腎内血管への γ -globulin の沈着は peritubular artery, venule, vas afferens のように小血管壁への

斑状の沈着からはじまり、拒否反応の進行するにつれて髄質内の比較的大きな血管壁、ことに内膜および内弾性板への沈着へと進んで行く。腎間質への γ -globulin の沈着は上述のような拒否反応のさらに高度のものに認められ、peritubular artery や venule を中心に拡がるように思われる。また尿細管上皮への γ -globulin の沈着は、まったく見られず、尿細管腔では、ただ1例において強い特異蛍光を発する細胞塊を認めた。

同一条件で施行した対照では、 γ -globulin の沈着は認められなかつた。また、抗体吸収試験および blocking test では、顕著な蛍光の減弱あるいは消失が認められた。

V 考 按

(a) α_2 -globulin

血清蛋白の変動は、各種疾患の診断や予後の判定に役立つている。臓器移植後の血清蛋白の変動についても、枚挙のいとまのない程多数の報告がある。その内でも α_2 -globulin については、移植後その増加を認めた論文が多いが、その評価に関しては、異論も多い。

1960年 West¹⁶⁾ らは、犬を用いた腎同種移植、回腸移植後に血清中の α_2 -globulin が上昇することを述べ、そしてこの α_2 -globulin の増加の主たるものは glycoprotein であることを証明した。しかしながら、この α_2 -globulin の増加は腎盂腎炎のような非特異的炎症や、Freund's adjuvant や松脂の注射によつて生ずる無菌性膿瘍によつても生じ、これも同じ glycoprotein の増加による α_2 -globulin の増加であることが確かめられ、したがつて α_2 -globulin の増加は移植臓器の拒否反応に関与する抗原-抗体反応の一部であるというより、むしろ拒否された臓器内に存在する2次的な炎症反応に対する反応として生ずるものであろうとしている。 α_2 -globulin が、拒否反応を起した臓器を摘出した後でも上昇し続けるという事実は、それが炎症を生じているその病巣から産出されるものではなく、何かの刺激に対する反応として、どこかで産出されるものであろうとする考え方に、著者も同意するが、それに加えて、その臓器を摘出するのに第2回目の手術的侵襲がさらに加えられているという事実も考慮に入れられるべきであろうと考える。

腎以外の臓器については、1966年 Kukral¹⁷⁾ は、やはり犬を用いた肝同種移植後に α_2 -globulin が上昇すると述べ、この α_2 -globulin 分画の上昇は肝自家移植後にも同様のパターンを認めており、拒否反応に特異的

なものではないとしている。

これより先、1965年に Weimer & Benjamin¹⁸⁾ は、鼠を用いた実験で、 α_2 -AP (acute phase) globulin の存在を提起した。すなわち、かれらは松脂を注射して無菌性膿瘍を作つた鼠の血清中に、正常鼠血清中には証明されない蛋白を、免疫化学的方法で検出し、これを α_2 -AP-globulin と名付けた。そして、この α_2 -AP-globulin は炭水化物を含む euglobulin で濾紙および寒天を用いた電気泳動では α_2 -globulin の移動度を有し、アクリルアミドや澱粉ゲルを用いた場合には非常に低い移動度を有し、macroglobulin に属すると述べている。続いてかれらは α_2 -AP-globulin と C-reactive protein, Cx-reactive protein との異同につき言及し、それらが、正常血清中には存在せず、組織損傷のあとに出現すること、抗原性を持つこと、globulin であることなどでは共通した性格を持つているが、抗原的に両者は異つたもので、硫酸アンモニウム液への溶解度、電気泳動による移動度、カルシウム・イオンの存在下における C-polysaccharide による沈降反応などにおいて相異なるものであると述べている。

一方、 α_2 -globulin の上昇が、移植腎の拒否反応あるいは、耐容 (tolerance) に特異的なものであるとする意見があり、それは Riggio¹⁹⁾ の論文に代表される。かれらは26名の腎移植臨床例について検討し、拒否反応を起こした17名に、20.7%~212.3%の α_2 -globulin の上昇を認め、28回の拒否反応の内、17回の拒否反応では50%以上の上昇が認められ、その平均は70.2% (±42.1%) であると報告している。しかし α_2 -globulin の上昇はいずれも臨床症状、あるいは検査成績が、腎機能の変動を示した後に現われることも付け加えている。また前に述べた West らや Weimer & Benjamin らの実験結果と異なる点は、急性腎盂腎炎や後腹膜腔膿瘍などの細菌感染によつて、重篤な臨床症状を呈した場合にも、 α_2 -globulin の上昇を認めていないことである。これは人と犬または鼠との実験動物の違いによる血清蛋白の相違によるものとも考えられる。さらに α_2 -globulin の上昇が、1例を除く全例において glycoprotein の増加によることを認めているが、その glycoprotein 増加の主因が haptoglobulin, ceruloplasmin, α_2 -globulin orsomucoid のいずれの増加によるものかについては結論が出されていない。Riggio らはこのように拒否反応の場合に α_2 -glycoprotein が増加し、細菌感染や原発性腎疾患では、それが認められないということで、この

蛋白質が拒否反応または耐容のどこかの相と特異的な関係があるのではないかと述べている。

また、この α_2 -globulin が、耐容と深い関係にできるのではなからうか、ということについては、Mowberay や Mannic & Schmid の興味ある論文がある。1963年 Mowbray²⁰⁾²¹⁾ は、正常の哺乳類の血清から DEAE セルローズ・カラム・クロマトグラフィーでえた (0.5 M acetate buffer) α_2 -globulin を、家兎や鼠の皮膚移植の際にシビュントに注射して、移植皮膚生着期間の延長を認め、また通常の抗原に対する circulating antibody の生成が、この α_2 -globulin の注射によつて抑制されることを報告した。しかしそれを追試した Davis & Boxer (1965)²²⁾ や、Spiegelberg & Weigle (1964)²³⁾ のそれを否定する報告の故に α_2 -globulin の免疫抑制効果に対する興味も失われがちであつた。1967年になつて Mannick & Schmid²⁴⁾ は、ACD 加保存血から、血清 10 l を集め Mowbray の方法よりも、より稀薄な 0.2M の acetate buffer で、elute した B 分画を、皮膚移植の実験に用いて、やはり移植皮膚の生着期間の延長を認めたとし、ふたたび α_2 -globulin の抗免疫効果が注目を集め始めた。続いて1968年 Cooperbend et al²⁵⁾ らは in vitro の実験で、正常人血清の α_2 -globulin が免疫抑制効果を持つと述べている。

このように、 α_2 -globulin の抗免疫効果が、注目され始めているが、その作用機序については、いまだ仮説の域を脱しない。Currie & Bagshawe²⁶⁾ は、 α_2 -globulin 中の Sialomucin が、陰性に帯電した glycoprotein であるので、それが抗原の表面に付着して被覆している例はなからうかと述べているが、 α_2 -globulin の免疫反応における位置は今後も検討されるべき大きな課題を多数 かかえていると言えよう。Kamrin²⁷⁾ が指摘しているように、特異的な α_2 -globulin に同位元素をラベルして radioautography および蛍光顕微鏡を用いれば、免疫反応と関係ある細胞の表面に存在する特殊な α_2 -globulin 粒子を発見することが将来できるかも知れない。

(b) γ -globulin

移植免疫と γ -globulin との関係について、多数の研究がなされているが、その結論はなかなか出そうにない。移植免疫は、細胞性抗体と体液性抗体のいずれか、またはその両者から成り立っている以上、一刀両断に結論が出ないのも止むをえない。一言に移植免疫といつたところで、同種移植と異種移植とでは、それに関与する

抗体は態度を異にするであらうし、腎・肝・心のように直接血管同志の吻合を必要とする臓器と、皮膚移植とではおのずと差が生じても不思議ではない。

犬を用いた実験的心移植において、隅田ら²⁸⁾は無処置群では移植後 γ -globulin の増加を認め、methotrexate, prednisolone X線照射などによつて移植心の生着延長が得られたものでは、 γ -globulin の増加は抑制されたとして、 γ -globulin の臓器移植前後の変動に注意を促している。

一般に抗体産生の時期については、初期には IgM 抗体が増加し、少し遅れて IgG 抗体が増加することは知られているが、Phillips²⁹⁾ Nagi³⁰⁾ は、それぞれ、はつか鼠、家兎を用いた皮膚同種移植の実験を行ない、移植後4日目頃から IgM globulin の産生が増加し次いで拒否反応と時を同じくして、IgG globulin が増加することを報告している。腎同種移植については、鼠を用いた実験で、1968年 Spong ら³¹⁾はIgG, IgM globulin に、組織適合性抗体が存在することを明らかにした。そして抗体価の高い IgG を注射することによつて、腎の細小動脈壁への単核細胞の浸潤が生ずることをも付け加えている。

腎同種移植臨床例において、大越ら³²⁾は拒否反応と時を同じくして IgG globulin の増加、補体の第3成分である B₁C/B₁A-globulin の急激な減少が認められたと報告した。

B₁C/B₁A-globulin については、Carpenter ら³³⁾も、その変動と拒否反応との関係が興味深いものであると述べている。この補体の低下は、遅くなつてから生ずる complement fixing antibodies の出現³⁴⁾によるものかも知れない。

(c) Cytotoxicity

腎移植後血中に cytotoxic antibody の出現を、臨床例で最初に報告したのは1967年の Morris ら³⁵⁾の論文である。かれらは同種のリンパ球ドナーからリンパ球を集め、Terasaki ら³⁶⁾の microcytotoxicity test を行なつて、腎移植後の患者の血清に cytotoxic antibody が出現することを認め、これらの血清は組織適合検査用血清の供給源になりうることを示唆した。もつとも、動物実験では、1964年にすでに Altman & Simonsen³⁷⁾が、腎移植後流血中に cytotoxic antibody を証明している。

1968年には Morris³⁸⁾ らは、41名の臨床例について同種リンパ球に対する cytotoxic titration を行ない、

cytotoxin 陽性の患者の移植腎機能は失敗に終る傾向にあると述べた。続いて Manzler³⁹⁾ は、腎ドナーのリンパ球に対する cytotoxic antibody は、14名中5名が陽性で、その内4名が急性拒否反応に悩む cytotoxic antibody の出現は臨床的に拒否反応の診断が下される以前であることから、腎ドナーのリンパ球に対する cytotoxic titration の重要性を説いている。これに関しては、Stewart⁴⁰⁾ ら、Patel ら⁴¹⁾ も同意見で、Stewart らは、同種リンパ球に対する cytotoxicity が陽性でありながら、ドナーリンパ球との cytotoxicity が陰性で移植後相当長期間良好な腎機能を営んだ2名を報告している。また、Patel らは移植前に、ドナーのリンパ球とリシピエントの血清との間に、cytotoxicity test を施行し、陽性であつた30名中24名に移植後急激な腎機能障害を認めた一方、陰性であつた195名中、移植後急激な腎機能障害を認めたものはわずかに8名で、有意の差 ($P < 0.01$) があり、術前すでにドナーに対する cytotoxin の認められるということは、移植の禁忌であると述べている。

こうした cytotoxic antibody は、 γ -globulin 分画中のどの部分にあるか、ということに関して、Mc. Donald は、IgG (7S) におそらくあるのだらうに述べている。一方 anti-globulin consumption test で証明されるものは IgM (19S) 抗体だとしている。

1968年 Dubernard らは⁴²⁾、Dog A から Dog B に腎同種移植を行ない、cytotoxic titter の上昇を待つて Dog B から採血し、その血清を Dog A の残つたひとつの腎の腎動脈から注入して、急激な腎機能低下をきたした例を報告した。また正常な血清を腎動脈に注入しても腎機能不全を起こさないことから、これは cytotoxic titter の上昇した血清による移植免疫の受動的移入であるとしている。組織学的には糸球体の細胞増多、メサンギウムの濃縮化、基底膜肥厚、蛋白円柱が認められ、皮質には小血栓を伴う急性腎皮質の壊死が認められたと述べている。

著者の実験では、同種リンパ球に対する cytotoxic antibody が検出されなかつたにもかかわらず、移植腎に拒否反応が進行している場合があつた。この原因として、(i) cytotoxic titration に用いたリンパ球のドナー犬の数が少ないために、腎のドナー犬とリンパ球のドナー犬との間に共通した組織適合抗原が存在しなかつたのか、(ii) 非常に多量の抗原である移植腎に流血中の抗体が吸収され見かけ上陰性であるのか、(iii) Cyto-

toxin negative absorption 陽性の抗体によるものか、の3つが考えられる。

(d) 蛍光抗体所見

同種移植腎の免疫組織学的追求は1958年 Linquist ら⁴³⁾ に始まる。かれらは、単における腎同種移植で、早期に細小動脈に immunoglobulin を見出した。1965年には、Horowitz ら⁴⁴⁾ が、犬を用いた同種移植腎の血管上に γ -globulin の沈着が認められたと述べている。1967年に Williams ら⁴⁵⁾ は、17名の移植腎の糸球体や血管に γ -globulin の沈着を認めたが、拒否反応との相関関係は認め難いとした。翌1968年には、Porter ら⁴⁶⁾ は immunoglobulin、補体、線維素の沈着を糸球体に認めたが、やはり拒否反応との相関関係は認め難かつたと述べている。それに対して1968年、Mackenzie, Whittingham⁴⁷⁾ は immunoglobulin の移植腎の糸球体および血管壁への沈着は、拒否反応と非常に密接な関係にあると述べた。すなわち、28名の臨床例から計82回の免疫組織学的検討を行なつて、拒否反応を起こしている間の腎の血管壁、糸球体に immunoglobulin、補体、線維素の沈着が著明に認められ、拒否反応を起こしていない腎(14名)や拒否反応の収まつた後の腎組織には、それらの沈着がより少なくなつたと報告している。かれらはまた、immunoglobulin、補体、線維素の沈着があつて、albumin, α_2 -macroglobulin の沈着が認められないことから、これらの所見は、血清蛋白成分の非特異的沈着というより、特異的免疫反応によるものであらうと述べている。

今回の実験の結果では、すでに述べたように、 γ -globulin の沈着は、移植後5日目から、vas afferens, peritubular artery, venule, のような細小管壁や糸球体 tuft に線状にあるいは顆粒状に現われ、しだいに腎髄質内の比較的大きな血管の内膜、内弾性板に現われた。拒否反応のより進んだ腎ではそれらの γ -globulin の沈着はより強度となり、ついには腎間質にまで現われるようになる。免疫抑制処置が効を奏して、拒否反応を起こさないか、軽微である例では、 γ -globulin の沈着は微弱なものであるか。ほとんど認められなかつた。

糸球体における γ -globulin の沈着の状態には、前述のようにほぼ均一に線状な沈着を示すものと血管極ないしは tuft の一部に顆粒状な沈着を示すものがあつた。糸球体腎炎における糸球体 tuft への immunoglobulin の線状の沈着は、基底膜抗原と抗体との反応を意味し、顆粒状の沈着は circulating antigen-antibody com-

plex の沈着である⁴⁹⁾とする説があるが、臓器同種移植においても γ -globulin の沈着の状態が異つた2つの形状をとることは興味深い。しかしながら、そうした沈着の状態の相異と、拒否反応の程度との間には明らかな関係を認めえなかつた。

以上述べた蛍光所見につき、その特異性を証明するために、正常腎、抗体吸収試験、blocking test を行なつたが、正常腎には上に述べたような蛍光は認められず、抗体吸収試験および bloking test により著しい蛍光の微弱化および消失を認めたことから、前述の蛍光所見は、特異的免疫反応による γ -globulin の沈着で、腎同種移植の拒否反応において、cytotoxic antibody と態度を同じくする、体液性抗体の重要性を示すものであると考える。

VI 総括および結語

拒否反応の血清学的診断の1つの手掛りとして、雑種成犬を用いた腎同種移植4実験群において、血清 α_2 -globulin, γ -globulin, cytotoxic antibodies の経時的検索を行ない、それらと BUN, 光顕的拒否反応の検索、および自家製抗犬 γ -globulin 家兎 globulin-FITC を用いた、蛍光抗体直接法による免疫組織学的検索を併せ行なつた。

その結果をまとめると次のようになる。

(1) α_2 -globulin は、術後 BUN の上昇と平行して増加するが、術後短日時で現われる急性拒否反応では、非特異的炎症性血清反応による α_2 -globulin の増加と、重なり合うことがあり、犬では α_2 -globulin の増加をすぐに拒否反応と結びつけることはできないように思われる。

(2) γ -globulin 分画は、ほぼ拒否反応が完成された後に増加するものが多い。

また、免疫抑制処置群では、拒否反応時の γ -globulin の増加はより軽微で、免疫抑制処置が奏効したものでは、減少するものが認められた。

γ -globulin の増加と、cytotoxic titer の上昇の時期とはかならずしも平行関係にない。

(3) 同種リンパ球に対する cytotoxic antibodies の陽性例では、組織学的に 100%拒否反応の所見が認められ、また BUN の上昇が認められた。

(4) 同種リンパ球に対するが検出されず、しかも移植腎の拒否反応が進行している場合がある(仮性陰性)。

(5) Cytotoxic titration は、移植腎の拒否反応の血清学的診断方法として、近い将来利用しうるものと考え

えられる。

そのためには、リンパ球ドナーとしては、同種ドナーを用いるより、腎ドナーを用いた方が良く、したがってリンパ球の保存の普及が望まれる⁵⁰⁾。

さらに純度の高いリンパ球浮遊液を cytotoxic test に用いることが必要である⁵¹⁾。

(6) 蛍光抗体直接法を用いて、 γ -globulin の移植腎への沈着の状態を検索した。

無処置群・免疫抑制処置群ともに BUN の上昇と、 γ -globulin の移植腎内沈着の状態、Kincaid-Smith による光顕的拒否反応の所見はほぼ一致する。

γ -globulin は、無処置群では移植後5日目からすでに glomerular capillary, peritubular capillary に認められ、7~12日後には vas afferens, a. interlobularis, a. arorata としだいに大きな血管壁(ことに内臓・内弾性板)に認められるようになる。

拒否反応のより進んだ例では、腎間質にも γ -globulin の沈着を生じ、上に述べた血管系への沈着も同時に増加するものが多いが、尿細管上皮には、最後まで特異蛍光は認められなかつた。

稿を終えるに当たり、御校閣下さつた恩師・大越正秋教授に深甚なる謝意を表します。

また、直接指導下さつた、慶応義塾大学泌尿器科学教室・中村宏博士、同病理学教室坂口弘助教授、動物実験に際し助力を惜しまれなかつた泌尿器科学教室・腎移植研究班の諸兄、研究設備を快くお貸し下さつた病理学教室の各位、東京国立第2病院・細菌科小沢博士に心からの謝意を表します。

なお、この論文の要旨は第57回、日本泌尿器科学会総会にて発表した。

なお本研究の研究費の一部に、福沢諭吉基金よりの補助を受けた。

文 献

- 1) Medawar, P.B.: J. Anat., **78**, 176, 1944.
- 2) Medawar, P.B.: J. Anat., **79**, 157, 1945.
- 3) Mitchson, N.A., and Duke, O.L.: J. Exper. Med., **102**, 179, 1955.
- 4) Najarian, J.S. and Feldman, J.D.: J. Exper. Med., **115**, 1083, 1962.
- 5) Terasaki, P.I. et al.: Ann. New York Acad. Scien., **99**, 645, 1962.
- 6) Altman, B.: Ann. Roy. Coll. Surg. England., **33**, 79, 1963.
- 7) Good, R.A. et al.: Ann. New York Acad. Scien., **64**, 924, 1957.

- 8) Najarian, J.S. et al.: *Ann. Surg.*, **164**, 398, 1966.
- 9) 中村宏：移植，**1**, 434, 1967.
- 10) 小川恕人ほか：生物物理化学，**11**, 75, 1966.
- 11) Peetoom, F.: The agar precipitation technique and it's application as a diagnostic and analytical method. Illinois. 1963.
- 12) Altman, B. and Simonsen, M.: *Ann. New York Acad. Scien.*, **120**, 128, 1964.
- 13) Nakamura, H. et al.: *Surg. Forum.*, **19**, 182, 1968.
- 14) 安田健次郎ほか：モダンメディア，**8**, 438, 1962.
- 15) 浜島義博，京極方久：免疫組織学，医学書院，1965.
- 16) West, C.D. et al.: *Ann. New York Acad. Scien.* **87**, 522, 1960.
- 17) Kukral, J.C. et al.: *Surg. Forum.*, **18**, 218, 1966.
- 18) Weimer, H.E. and Benjamin, D.C.: *Am. J. Physiol.*, **209**, 736, 1965.
- 19) Riggio, R.R. et al.: *Lancet*, i, 1218, 1968.
- 20) Mowbray, J.F.: *Immunol.*, **6**, 217, 1963.
- 21) Mowbray, J.F.: *Fed. Proc.*, **22**, 441, 1963.
- 22) Davis, W.C. and Boxer, L.A.: *Transplant.*, **3**, 673, 1965.
- 23) Spiegelberg, H.L. and Weigle, W.O.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**, 413, 1964.
- 24) Mannick, J.A. and Schmid, K.: *Transplant.*, **5**, 1231, 1967.
- 25) Cooperbend, S.R. et al.: *Science, N.Y.* **159**, 1243, 1968.
- 26) Currie, G.A. and Bagshawe, K.D.: *Lancet*, i, 708, 1967.
- 27) Kamrin, B.B.: *Transplant. Proc.*, **1**, 506, 1969.
- 28) 隅田幸男，平野敬八郎：移植，**2**, 175, 1967.
- 29) Phillips, M.E.: *Lab. Inv.*, **19**, 539, 1968.
- 30) Nagi, J.: *Acta. Haemat. Jap.*, **31**, 182, 1968.
- 31) Spong, F.W. et al.: *J. Immunol.*, **101**, 418, 1968.
- 32) 大越正秋ほか：生物物理化学，**14**, 73, 1969.
- 33) Carpenter, C.B. et al.: *Transplant.*, **5**, 865, 1967.
- 34) Austin, K.K. and Russel, P.S.: *Ann. New York Acad. Scien.*, **129**, 657, 1966.
- 35) Morris, P.J. et al.: *Surg. Forum.*, **18**, 270, 1967.
- 36) Terasaki, P.I. et al.: *Transplant.*, **5**, 1057, 1967.
- 37) Altman, B. and Simonsen, M.: *Ann. New York Acad. Scien.*, **120**, 28, 1964.
- 38) Morris, P.J. et al.: *Transplant.*, **6**, 392, 1968.
- 39) Manzler, A.D.: *Transplant.*, **6**, 787, 1968.
- 40) Stewart, J.H. et al.: *Lancet*, i, 176, 1969.
- 41) Patel, R. et al.: *New Eng. J. Med.*, **280**, 735, 1969.
- 42) Dubernard, J.M. et al.: *Surg.*, **64**, 752, 1968.
- 43) Linquist, et al.: *Advance in transplantatino.* 1611. Copenhagen. 1958.
- 44) Horowitz, R.E. et al.: *Transplant.*, **3**, 318, 1965.
- 45) Williams, G.M. et al.: *Surg.*, **62**, 204, 1967.
- 46) Porter, K.A. et al.: *Lab. Invest.*, **18**, 159, 1968.
- 47) McKenzie, I.F.G. and Whittingham, S.: *Lancet*, ii, 1313, 1968.
- 48) Lerner, R.A. et al.: *J. Exp. Med.*, **126**, 989, 1967.
- 49) Unanue, E.R. and Dixon, R.G.: *Advan. Immunol.*, **6**, 1, 1967.
- 50) Rowe, A.W. et al.: *Fed., Proc.* **22**, 170, 1963.
- 51) 辻公美ほか：移植，**3**, 326, 1968.

(昭和45年1月23日受付)