移植腎における拒絶反応の診断についての実験的研究

特に組織化学的見地よりの検討

東京大学医学部泌尿器科教室 村 橋 勲
(主任: 高安久雄教授)

EXPERIMENT ON THE DIAGNOSIS OF THE REJECTION IN THE TRANSPLANTED KIDNEY (Histochemical and Biochemical Studies)

Isao Murahashi

Department of urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo
(Director: Prof. H. Takayasu)

Thirty healthy mongrel dogs were used for this study. After bilateral nephrectomy, renal transplantations were done by anastomosing the renal vessels to the common iliac vessels and ureterocutaneostomy was performed simultaneously.

Materials for the histological and histochemical studies were obtained by the open wedge biopsies 4, 7, 10, 12 and 14 days after transplantation, while control specimens were taken before the operations. The methods of histological and histochemical approach were as follows; hematoxylin-eosin stain, periodic acid-Schiff reaction, fatty stain and reactions for leucine aminopeptidase, alkaline and acid phosphatases, succinic dehydrogenase, lactic dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase. The level of leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (AP) activities were determined in daily urine and serum, and kidney biopsy specimens were also used for the determination of the tissue content of these enzymes.

Histological and histochemical findings of the untreated autograft group were not remarkable. However, atrophy of the tubules with dilated lumen and the deterioration of the enzymatic activity in the tubules were noted in some areas of the treated autograft from 7 to 14 days after transplantations. These changes might indicate one effect of azathioprine. In the untreated homograft group, histological findings were characterized not only by lymphocytic infiltration in the peritubular, perivascular and periglomerular region, but also by the reduction of the enzymatic activities. Moreover, both LAP and AP in some of the nephrons were strongly affected from the early stage. In the treated homograft group, no marked infiltrations of the lymphocyte were observed. Nevertheless, LAP and AP demonstrated a marked reduction or complete absence, which was followed by the rejection crisis.

Biochemical estimation in the kidney tissue also showed low values of LAP and AP during the rejection reaction. The mirror image was noted on the level of LAP activity in urine and kidney specimen, while such a relationship was absent on the level of AP activity.

Therefore, it may be suggested that the reduction of LAP activity during the rejection crisis is due to the shift of LAP to urine by an alteration of tubular permeability as a result of the immunological attack.

はじめに

1969年1月の世界の人腎移植症例の Registry¹⁾によると、その数は2,347例におよび、本邦における1970年10月の四方²⁾の統計では、168例と報告されている。またその手術成績も年々向上し、1年以上のいわゆる長期生存例は屍体 donor 腎移植例でも約42%となり¹⁾、従来絶

望的と考えられてきた慢性腎不全患者への大きな光明を与えるようになってきている。

しかし、この結果はまだまだ満足すべきものではない。また、拒絶反応をできる限り早期に発見し、それに適応した免疫抑制法を施行すること、および慢性拒絶反応になり、現在の免疫抑制剤ではとうていそれを生着さ

せることが不可能と思われる場合においては、過剰の免疫抑制剤を投与せず移植腎を摘除し、第2の腎移植または人工透析を行なうようにすることも重要なことである。つまりこれまでに反省しなければならない点があり、第1の問題として、術後2カ月以内の早期拒絶反応時でも、その発見が遅れ、かなり進行した状態の時期に大量の免疫抑制剤を投与したと考えられる場合があげられる。第2の問題点としては、術後第3カ月以後の晩期拒絶反応期になつて、retrospective にみて現在使用されている、Azathioprine, Prednisolone, Actinomycin, Antilymphocyte serum, Antilymphocyte globulin, 放射線照射というような免疫抑制療法を強化したことにより惹起されたと考えられる副作用が死因となつていことが多くあることである。

このことは免疫抑制剤の過剰投与に起因すると考えられる感染症が、腎移植患者の死因の第1位（欧米38.5%，本邦28%）²⁴⁾をしめていること、消化管出血、肝障害も死因としてかなりみられることからもうなずけることであろう。拒絶反応の診断および治療に関しては、臨床所見、尿、血液所見、諸種腎機能検査などにより総合的に行なわなければならないことはいうまでもないが、著者は実際に人腎移植症例の管理にあたり、拒絶反応時の臨床像は、腎血管系の塞栓症あるいは、尿管の閉塞などと類似し確診をうることが困難だつた例に遭遇している。そこで著者はその早期確定診断の特殊検査法の一つとして、数年来、動物実験で、腎生検組織について、組織学的面より、とくに酵素組織化学的立場より検討し、拒絶反応の早期診断上有用と考えられる所見を得たのでここに報告する。

実験対象および方法

雑種成犬（12～26kg）30頭を、次のごとく4群に分け、Nembutal（Pentobarbital）25mg/kg静注による全身麻酔下に実験を行なつた。

第1群. 自家移植, 免疫抑制剤非投与群	6頭
第2群. 自家移植, 免疫抑制剤投与群	5頭
第3群. 同種移植, 免疫抑制剤非投与群	6頭
第4群. 同種移植, 免疫抑制剤投与群	13頭

第2群では免疫抑制剤として、Prednisolone 10mg/日を筋注、Azathioprine 50mg/日は経口投与した。

第4群でも同様な免疫抑制剤投与を行なつたが、実験犬の全身状態、尿量、尿比重、血液生化学的所見で拒絶反応と思われる時期には、これらを適宜増量して拒絶反

応の回復とともに再び減量している。

(1) 腎移植手技

血管の縫合は自家移植の場合には、原則として、左腎を右鼠径部に時に右腎を左鼠径部に動脈は外腸骨動脈と喘々吻合し、静脈は外腸骨静脈と喘側吻合を行ない、同時に他側腎は摘除した。

同種移植の場合は左右に関係なく、donor 腎を recipient 犬の反対側の鼠径部におき、動静脈吻合は自家移植と全く同様に吻合した。その際 recipient 犬の両側腎摘も行なつた。

donor 腎の灌流は摘出後ただちに、Saline 100 ml, Dextran 60 g, Heparin 2,000単位, 1% Procain 1 ml の混合液を使用し、静脈側よりの液が清澄となるまで洗滌した。

尿管は尿の採取の正確を計るために鼠径部に皮膚と縫合し、splint catheter を留置した。

阻血時間は24～40分平均30分であつた。

(2) 移植犬の術後管理

移植犬は術後特製の台上に四肢をしぼり、薬剤の投与、尿の採取を完全とし、腎機能検査、血液および腎生検を行ない易いようにし、犬の全身状態とともに、これらの所見を参考に術後の経過をおつていつた。

輸液は、5% Glucose, Lactate Ringer, Saline, 電解質液を使用し、経口摂取可能となるまで行ない、可能となれば、牛乳、固形食物を与え水分は尿量と不感蒸泄に見合うように前記輸液の量は漸減した。その他に感染予防に抗生物質（Sodium aminobenzyl penicillin, Cephaloridine, Chloromycetin）を適当に使用し、免疫抑制剤投与群には、Azathioprine, Prednisolone を前述のように使用した。

(3) 実験用組織の採取

4群の実験犬について腎組織の採取は対照として移植直前に1回生検し、移植後は、4, 7, 10, 12, 14日目に開放性に腎生検を行なつた。

(4) 実験材料の検索法

1) 組織学的検索

a. Hematoxylin-Eosin および Periodic acid Schiff Formalin 固定 Paraffin 切片を使用した。

b. 酵素組織化学的検索

腎生検組織について行なつた酵素染色は、leucine amino-peptidase（以下 LAP と略す）、alkaline phosphatase (Alk-P), acid phosphatase (Acid-P), succinic dehydrogenase (SDH), lactic dehydrogenase (LDH), glucose-

-6phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) である。以下に各酵素の染色法を記す。

1) LAP (Nachlas らの法⁵⁾)

採取組織の処理は開放性腎生検後直ちに、 $10 \times 10 \times 5$ mmの組織塊を作製し、これを acetone, dry ice にて -70°C に冷却した isopentane 中にて2～3分凍結固定し、cryostat に移し、minot rotary microtome で、 8μ の組織切片を作製し、これを cover glass に取り、切片は下記の染色液に 37°C 、15分間 incubate し、ついで生食水にて2分間洗滌後 0.1M硫酸銅液に2分間滲清キュレートし、さらに生食水で2分間洗滌し、10%生食ホルマリン液にて5分間固定し、生食水で洗滌後、glycerine jelly にて封入した。

染色液：

l-leucyl- β -naphthylamide hydrochloride	8 mg
acetate buffer	0.1M, pH 6.5 10ml
sodium chloride	0.85% 8 ml
potassium cyanide	$2 \times 10^{-2}\text{M}$ 1 ml
diazo blue B	10mg

結果：本酵素活性のあるところは青褐色に染色される。

2) Alk-P (Gomori 法⁶⁾)

組織切片の作製は前記 LAP の場合と同様にし、作製後は切片を下記の染色液に 0°C 、15分間 incubate し、生食水で洗滌後、10%生食ホルマリン液にて5分間固定し、生食水で再び洗滌し、glycerine jelly で封入した。

染色液：

α -naphthyl phosphate salt	10mg
borax-NaOH buffer	0.1M, pH 9.2 20ml
diazo blue B	20mg

結果：本酵素活性部位が黒褐色に染色される。

3) Acid-P (Seligman & Manheimer の法⁷⁾)

組織切片の作製は前記したと同様に作製後下記の染色液に 37°C 、15分間 incubate し、生食水で洗滌後、10%生食ホルマリン液で5分間固定し、生食水で洗滌し、glycerine jelly で封入した。

染色液：

α -naphthyl phosphate salt	10mg
acetate buffer	0.1M pH 5.2 20ml
diazo blue B	20mg

結果：本酵素活性のあるところは赤褐色に染色される。

4) SDH (Nachlas & Seligman の法⁸⁾)

組織切片は 10μ としその他の処理は前記のものと同様にして作製した。その後下記の染色液に 37°C 、10分間 incubate し、生食水で洗滌後10%生食ホルマリン液にて5分間固定し、その後生食水で洗滌し、glycerine jelly にて封入した。

染色液：

phosphate buffer	0.2M pH 7.4	10ml
sodium succinate	0.2M	10ml
nitro blue tetrazolium chloride		10mg
phenazine methosulfate		1 mg

結果：本酵素活性のあるところに青色の diformazan が沈着し、深青色に染色される。

5) LDH (Nachlas & Seligman の法⁹⁾)

組織切片の作製は LAP の時と同様にした。その後下記の染色液に 37°C 、15分間 incubate し、生食水で洗滌後10%生食ホルマリン液にて5分間固定し、その後生食水で洗滌し、glycerine jelly にて封入した。

染色液：

DL-lactate	2Na	1.0M	1 ml
DPN			10mg
potassium cyanide	$2 \times 10^{-2} \text{M}$		5 ml
phosphate buffer	0.06M pH 7.4		3 ml
magnesium chloride	0.005M		15ml
nitro blue tetrazolium chloride			20mg
polyvinyl pyrrolidone			15mg

結果：本酵素活性のあるところが青色に染色される。

6) G-6-PDH (Nachlas らの法¹⁰⁾)

組織切片の作製は LAP などと同様に作製し下記の染色液に 37°C 、15分間 incubate し、生食水で洗滌後10%生食ホルマリン液で5分間固定し、生食水で洗滌後 glycerine jelly で封入した。

染色液：

glucose-6-phosphate 2 Na		10mg
TPN		5 mg
potassium cyanide	$2 \times 10^{-2}\text{M}$	2 ml
magnesium chloride	0.005M	5 ml
tris phosphate buffer	0.2M, pH 7.2	15ml
sodium fluoride		2 mg
phenazine methosulfate		1 mg

結果：本酵素活性のあるところが青紫色に染色される。

c. その他の組織検索

1) oil red O

ホルモール、カルシュウム固定後軽く水洗し、前記し

た方法にて 8μ の切片を作製し、水浸後 60% isopropanol 液に 30 秒浸洗し、下記染色液に 10 分間滲清し、60% isopropanol 液に 30 秒滲清し、その後水洗し、対染色として、Hematoxylin 染色を行ない、glycerine jelly にて封入した。

染色液：

stock solution	6 ml
水	4 ml

stock solution は oil red O 0.5 g, 98% isopropanol 100 ml を混合したものである。

結果：脂肪は黄赤色に染色される。

2) Nile Blue

切片作製は oil red O と同じように行ない、1% Nile Blue sulfate 溶液に 15 分間滲清し、急速に水洗後、1% 酢酸液にて色調一様となるまで弁色、その後水洗し、glycerine jelly にて封入した。

結果：脂肪は pink または blue に染色される。

3) sudan black B

切片の作製は oil red O と同じように行ない、30% 第 3 級ブチルアルコールに 30 秒滲清し、35% 第 3 級ブチルアルコール sudan black B 飽和溶液に 1 時間滲清し、30% 第 3 級ブチルアルコールにて 30 秒液消し、水洗後 glycerine jelly にて封入した。

結果：脂肪は黒褐色に染色される。

2) 生化学的検索

移植腎組織についての LAP, Alk-P 染色の結果は特に注目すべき変化がえられたので、その変化の mechanism 解明のために、血清、尿、腎組織中の両酵素を生化学的に測定した。

測定法は下記のごとくである。

a. LAP (Tuppy らの法¹¹⁾)

血清は静脈血を採血後ただちに分離し使用した。尿は全尿の一部を 0°C 、3,000 回転で、10 分間遠心後の上清について測定した。組織は腎生検後、0.25M 蔗糖液を加え、homogenate 後、 0°C 、3,000 回転で 30 分間遠心後の上清について測定した。

測定方法は、stock solution 1 (0.05 M phosphate buffer pH 7.2) 3 ml と (stock solution 2) (0.025 M leucine-p-nitranilide) 0.1 ml 混合液を 25°C 、5 分間 preincubate し、その後検体 0.10 ml を加え、直ちに波長 $405\text{m}\mu$ を使用し、光電比色計にて測定し、その後 25°C にて 30 分間 incubate し、再び波長 $405\text{m}\mu$ で比色測定し、この差すなわち 30 分間に反応した leucine-p-nitranilide の量にて mu/ml として測定結果を出した。

b. Alk-P (Bessey-Lowry-Brock 法¹²⁾)

検体の処理は LAP の場合と同様にした。測定方法は 0.05M glycine buffer pH 10.5, 0.0005M MgCl_2 , 0.0055 M p-nitrophenyl phosphate sodium salt の混合液 1 ml に検体 0.10 ml を加え、 37°C 、30 分間 incubate し、0.02N の NaOH 溶液にて反応停止後盲検液（前記試薬を 37°C 、30 分間 incubate し、0.02N の NaOH 溶液を加えた後に検体 0.10 ml を加えたもの）を対照として、波長 $405\text{m}\mu$ にて比色測定した。

結果

1) 犬正常腎における各酵素の分布は下記の如き所見であつた。

(1) LAP

犬正常腎の LAP 活性は、糸球体に極軽度の活性が存在し、近位尿細管には強度の活性を有し、ヘンレの係蹄、遠位尿細管には軽度の活性が見られるが、集合管および血管壁には活性は存在しない。犬正常腎の LAP 活性の局在を Schema で第 1 図（その 1）に示した。

(2) Alk-P

犬正常腎の Alk-P 活性は、近位尿細管に強度の活性を有し、血管壁に軽度の活性が見られるが、他の部位には活性は存在しない。犬正常腎の Alk-P 活性の局在を Schema で第 1 図（その 2）に示した。

(3) Acid-P

犬正常腎の Acid-P 活性は、糸球体に軽度、近位尿細管に中等度、ヘンレの係蹄には軽度、遠位尿細管に中等

第 1 図（その 1） 犬正常腎の LAP 活性の局在
第 1 図（その 2） 犬正常腎の Alk-P 活性の局在
第 1 図（その 3） 犬正常腎の Acid-P 活性の局在

第1図(その4) 犬正常腎のSDH活性の局在
第1図(その5) 犬正常腎のLDH活性の局在
第1図(その6) 犬正常腎のG-6-PDH活性の局在

度、集合管および血管壁には極軽度の活性が見られる。犬正常腎の Acid-P 活性の局在を Schema で第1図(その3)に示した。

(4) SDH

犬正常腎の SDH 活性は、糸球体には認められず、近位尿細管、ヘンレの係蹄、遠位尿細管に強度の活性を認め、集合管、血管壁に極軽度の活性が見られた。犬正常腎の SDH 活性の局在を Schema で第1図(その4)に示した。

(5) LDH

犬正常腎の LDH 活性は、糸球体に極軽度、近位尿細管に強度、ヘンレの係蹄、遠位尿細管に軽度、集合管および血管壁に極軽度の活性を認める。犬正常腎の LDH 活性の局在を Schema で第1図(その5)に示した。

(6) G-6-PDH

犬正常腎の G-6-PDH 活性は、糸球体には認めず、近位および遠位尿細管、ヘンレの係蹄に軽度の活性を有し、集合管、血管壁に極軽度の活性が見られる。犬正常腎の G-6-PDH 活性の局在を Schema で第1図(その6)に示した。

2) 犬移植腎の組織学的所見は以下の如くであつた。

(1) 自家移植、免疫抑制剤非投与群について。

H-E, PAS 染色ではほとんど移植による影響は見られなかつた。

組織化学的には、LAP, Alk-P, Acid-P, SDH, LDH 等5種の酵素はいずれも術後4日目に極軽度の活性低下が

見られたが、7日目以後は全例術前対照腎と同様の所見がみられた。一方 G-6-PDH 活性は術後4日目に尿細管において極軽度の上昇を認めたが、7日目には術前対照腎と同様の活性が見られた。

脂肪染色では脂肪の存在は全例に認められなかつた。

(2) 自家移植、免疫抑制剤投与群について。

本群では、H-E, PAS 染色および6種の酵素染色ともに第1群と比較し、大多数例において第1群とほぼ同様の所見であつたが、少数例で術後7日目頃に H-E 染色所見で近位尿細管の一部に細胞萎縮および管腔の拡張等のみられたものがあり、その部における6種の各酵素活性の低下が見られた。

脂肪染色では全例に脂肪の存在を認めなかつた。

(3) 同種移植、免疫抑制剤非投与群について。

組織学的所見については、4日目にすでに peritubular の lymphocytic infiltration がみられ、時に perivascular, periglomerular にも cell infiltration がみられた。また尿細管には腫脹が、糸球体基底膜には肥厚がみられるものもあつた。4日目の H-E 染色所見を写真1に示した。

ついで日をおつてこれらの cell infiltration はひろがり7~10日目頃には Bowman's capsule の肥厚、糸球体係蹄の cell infiltration がみられるようになる。7日目の H-E 染色所見を写真2に示した。

ついで、10~12日目頃には、糸球体係蹄に hyalinization がみられるようになり、Bowman's capsule 内側には eosinophilic な物質の貯溜するのが見られ、12~14日目頃には上記所見が出そろってくる。すなわち皮質全体に lymphocytic infiltration, Bowman's capsule の著明な肥厚、間質には、cell infiltration, edema 等がみられるようになる。

PAS 染色では、糸球体基底膜および Bowman's capsule の肥厚部、尿細管の一部に PAS 陽性所見が見られた。

組織化学的所見としては、まず LAP については移植後、日をおつて活性は低下する。4日目では尿細管における活性低下は全般的に著明となるが、全く活性の存在しない尿細管もあり、また正常腎に近い活性を有する尿細管もあり、その活性分布は一見地図状となる。

術前対照腎の LAP 染色所見を写真3に、4日目の LAP 染色所見を写真4に示した。

ついで7~10日目頃になると活性の存在している尿細管の分布は非常に少なくなり、またその存在している活性も著明に低下してくる。

7日目の LAP 染色所見を写真5に示した。

ついで12日目頃には極少数の尿細管に弱い活性をみとめるのみとなり全く活性の見られない例もあった。

次に Alk-P についてみると、活性低下の度合が LAP と比較し、やや軽度であるのを除くと、ほぼ LAP の変化と同様の所見であつた。

次に SDH と LDH については、活性の低下は比較的緩徐であつた。10～14日目でも H-E 染色所見で尿細管に cell infiltration の認められた部位にのみ活性の低下が見られるだけであり、これらの部位にては、LAP, Alk-P の活性は完全に消失していた。

次に Acid-P については、活性は尿細管においては、SDH, LDH とほぼ同様の变化を示したが、糸球体では活性の変化のないもの、または軽度上昇の見られるものもあった。

次に G-6-PDH については、活性は移植後4日目は正常または軽度上昇が尿細管においてみられた。ついで日をおつて活性は極軽度の上昇傾向を示した。しかし拒絶反応の完成したときでもその活性上昇は軽度と思われる所見であつた。

次に脂肪染色では、7日目より尿細管に脂肪を認めたものがあつた。

(4) 同種移植, 免疫抑制剤投与群について。

組織学的所見としては、本群の特徴は同種移植免疫抑制剤非投与群と比較し、間質の lymphocytic infiltration が非常に軽微であり、免疫抑制がうまく行なわれなくなつて、拒絶反応を呈した犬移植腎の H-E 染色所見でも、cell infiltration は第3群と比較し軽度であり、また cell infiltration は主として peritubular に見られるだけである。

また免疫抑制が適当なときには cell infiltration は見られないか見られても極軽微である。また間質には時に edema, bleeding が見られるものもある。

組織化学的所見としては、免疫抑制がうまくいつている時には、6種の酵素活性はいずれもほぼ正常腎の pattern を示す、しかし H-E 染色所見で変化のほとんど見られない場合でも、4日目または7日目に、LAP および Alk-P の尿細管における活性低下が著明に見られることがあり、このような場合にはかならず2～3日後に、BUN の上昇、PSP 値の低下、尿量の減少、犬移植腎の腫大など拒絶反応が見られた。これらの変化は Azathioprine, Prednisolone の増量により一部の犬移植腎では酵素活性は正常犬腎とほぼ同様の活性迄数日で回復

第2図 同種移植, 免疫抑制剤投与, 一実験例の腎機能, び血清, 尿量及尿, 腎組織中 LAP, Alk-P 活性の推移。この実験例においては、LAP の尿中活性と腎組織中活性との間に拒絶反応をかいして mirror image の関係が見られる。Alk-P については血清中活性の上昇があるため尿中活性と腎組織中活性との間に一連の関係は見い出せなかつた。

し、BUN, PSP 値も改善し、尿量も増加してくる。上記の如く拒絶反応から回復したと思われる所見を呈した犬腎移植実験例の腎移植後の血清中、尿中、腎組織中の LAP, Alk-P の生化学的測定値および BUN, PSP 値、尿量等を第2図に示した。またこの例の術前対照腎の Alk-P 染色所見を写真6に、活性の低下しはじめた4日目の Alk-P 染色所見を写真7に、活性の最も低下した7日目の Alk-P 染色所見を写真8に、拒絶反応経過後活性の回復した13日目の Alk-P 染色所見を写真9に示した。

またこのように LAP, Alk-P の活性の著明な変化の見られた時でも Acid-P, SDH, LDH, G-6-PDH の活性の変化は極軽微であつた。

また上記のように拒絶反応より回復した実験群の中

第3図 同種移植. 免疫抑制剤投与. 一実験例の腎機能, 尿量及び血清, 尿, 腎組織中 LAP, Alk-P 活性の推移. この実験例においては, LAP の尿中活性, 腎組織中活性及び尿量の減少, 腎機能低下 (拒絶反応) との間に一連の関係をみい出せるが, Alk-P については, 血清中活性が上昇するため, LAP の如き拒絶反応と結びつくような関係は見い出せなかった.

に, nephron 単位で尿細管の LAP, Alk-P 活性の完全な消失および Acid-P, SDH, LDH の著明な活性低下を見たものがあり, 当該部位には lymphocytic infiltration も見られた. しかし, G-6-PDH の活性低下は他の5種の酵素と比較し軽度であった. また特異な所見としてこのような lymphocytic infiltration および酵素活性の著明な低下の見られた部位の糸球体には Alk-P の活性が見られた.

一方免疫抑制が不良となり, 拒絶反応におちいついく犬移植腎でも組織学的所見は第3群と比較し軽微であるが, LAP, Alk-P の酵素活性は第3群とほぼ同様の活性低下を見た. しかし Acid-P, SDH, LDH, G-6-PDH の

活性変化は著明でなかった. 同種移植免疫抑制剤投与群で Azathioprine, Prednisolone の増量にもかかわらず拒絶反応が回復せずに腎機能不全になった犬移植腎実験例の血清中, 尿中, 腎組織中の LAP, Alk-P の生化学的測定値および BUN, PSP 値, 尿量等を第3図に示した. またこの例の4日目の SDH 染色所見を写真10に, 7日目の SDH 染色所見を写真11に, 11日目の SDH 染色所見を写真12に示した.

第4群では脂肪染色で脂肪の存在は全例に認めなかった.

以上同種移植免疫抑制剤投与群および非投与群の2群のうちで14日以内に拒絶反応をおこさない例は1例もなかった.

3) 血清中 LAP, Alk-P の変化について.

血清中 LAP については, 自家移植免疫抑制剤投与群および非投与群との間に差はなかった. 同種移植免疫抑制剤投与群および非投与群の結果は第4図に示したが, 免疫抑制剤投与, 拒絶反応等に関係なく 5~21 mu/ml の値であった.

第4図 同種移植, 免疫抑制剤非投与群及び投与群の血清 LAP 値の推移. 同種移植, 免疫抑制剤非投与及び投与群ともに, 術後日数にかかわらず, ほぼ一定の値が見られる.

次に Alk-P については, 自家移植免疫抑制剤投与群と非投与群との間には免疫抑制剤の影響と思われる免疫抑制剤投与群の異常高値が見られた. 同種移植免疫抑制剤投与群と非投与群との間にも第5図に示した如く, 免疫抑制剤投与群に異常高値が見られた.

4) 尿中 LAP, Alk-P の変化について.

LAP については, 自家移植および同種移植, 免疫抑制剤投与および非投与の間に, 移植後1~3日間は差は見られなかった. 4日目以後は自家移植群では免疫抑制

第5図 同種多植, 免疫抑制剤非投与及び投与群の血清Alk-P値の推移。同種移植, 免疫抑制剤非投与群では, 術後ほぼ一定の値である。免疫抑制剤投与群では全般的に Alk-P 値の上昇が見られ, 時に異常高値を示すものもある。

第6図 同種移植, 免疫抑制剤非投与群及び投与群の尿中LAP値の推移。免疫抑制剤非投与群では術後連日多量に尿中にLAPは排泄されている。免疫抑制剤投与群では抑制がうまく行われている場合は少量が, 抑制がうまく行われなくなると多量に尿中に排泄される。

剤投与および非投与群との間に差はなくほぼ一定の値が連日排泄されている。

一方同種移植, 免疫抑制剤投与群および非投与群では

第7図 同種移植, 免疫抑制剤非投与及び投与群の尿中Alk-P値の推移。同種移植, 免疫抑制剤非投与群では術後連日ほぼ一定量が排泄されている。免疫抑制剤投与群では血清中Alk-P値の上昇が関係してくるため, 拒絶反応との関係は一概にはいえない。

差が見られた。同種移植2群の値について第6図に示したが, 免疫抑制剤非投与群では4日目以後も連日相当量が排泄されている。

一方同種移植, 免疫抑制剤投与群では, 抑制がうまくいつているときは, LAPの尿中排泄は少なく, 抑制が不十分になつてくると尿中に多量に排泄され, その後2~3日後には尿量も減少してくる。

つぎに尿中Alk-Pについては, 自家移植免疫抑制剤非投与群ではLAPと同様の傾向であつたが, 自家移植免疫抑制剤投与群では血清中Alk-Pの上昇につれて尿中排泄も増加してくるのが見られた。

一方同種移植免疫抑制剤非投与群および投与群の値を第7図に示したが, 免疫抑制剤非投与群ではLAPと同様の傾向を示した。しかし免疫抑制剤投与群では血清中Alk-Pの上昇につれて尿中排泄も増加してくるのが見られた。

5) 組織中LAP, Alk-Pの変化について。

まずLAPについては正常腎では, 30例測定し, その値は9,000~16,500 mu/mg.dry.weight 平均11,517.5 mu/mg.dry.weightであつた。同種移植2群の値につい

第8図 同種移植，免疫抑制剤非投与及び投与群の腎組織中LAP値の推移。同種移植，免疫抑制剤非投与群では活性は術後漸次低下していくのが見られる。免疫抑制剤投与群では抑制が不十分である場合には，活性の著明な低下を見るが，抑制がうまく行われているときには，活性は対照腎とほぼ同様の値を示している。

第9図 同種移植，免疫抑制剤非投与群及び投与群の腎組織中Alk-p値の推移。同種移植，免疫抑制剤非投与群では，活性は漸次低下していく。免疫抑制剤投与群では抑制が不十分である場合は，活性の著明な低下を見るが，抑制がうまく行われているときには，活性は対照腎とほぼ同様の値を示している。

ては第8図に示した如く術後4日目の値は全例対照腎の値と比較し，10～90%の低下をきたしていた。その後は免疫抑制剤非投与群では日をおつて活性は低下していく。一方同種移植免疫抑制剤投与群では，免疫抑制剤の効果が十分な場合には活性は対照腎に近い値を示す。しかし免疫抑制がうまく行われなくなると活性は低下してくる。

一方自家移植群では，術後4日目の値は全例対照腎の値と比較し，10～30%の低下をきたしていたがその後は日を経るにしたがい，活性は回復しはじめ，7～10日目

頃にはほぼ術前対照腎と同値を示していた。

次にAlk-Pについては，正常犬腎30例を測定し，その値は5,800～13,000 B.U/mg.dry. weight 平均9,329.2 B.U/mg. dry. weightであつた。同種移植免疫抑制剤非投与および投与群2群の値については第9図に示した如く術後4日目の値は全例対照腎の値と比較し20～85%の低下を示していた。その後の活性の変化はLAPと同様であつた。

一方自家移植群では，術後4日目の値は，0～20%の低下をきたしていた。その後の活性の変化はLAPと同様であつた。

考案

免疫抑制法として十分満足すべきものがなく，かつ組織適合性についても問題の残されている現状ではやはり腎における抗原抗体反応の臨床的表現型としての拒絶反応を早期に診断することは，腎移植を成功させるための一つの重要な手段と考えられる。

この問題を解決する一法として，拒絶反応時に移植腎におこっている変化を主として，酵素組織化学的な面からとらえようとしたのが著者の試みである。

検討した酵素は第10図に示した様にそれぞれの糖代謝経路を代表するものとして，G-6-PDH, LDH, SDHをえらび，蛋白代謝系酵素として，LAPをえらび，その他腎における活性が高く，古くからその存在が知られている，Alk-p, Acid-Pについて検討した。

第10図 解糖系，TCA cycleの脱水素酵素等の作用点

これらの酵素の染色法および生化学的定量法は広く認められているところである。

自家移植免疫抑制剤投与群は、阻血およびdenervationの影響に加えるに、免疫抑制剤が間接あるいは直接にどのような影響を腎に与えるかを見るために施行したものであるが、前記の如く組織学および酵素組織化学的には、自家移植免疫抑制剤投与群と非投与群との間には大多数例で差は見られなかった。

しかし一部の例で見られた軽度尿細管上皮の萎縮および尿細管腔の拡張は、おそらく、犬の免疫抑制剤に対する感受性の個体差により肝機能がおかされ、全身状態の悪化をきたし、腎もその影響を受けたものと思われた。

これらの変化からも免疫抑制剤の投与に際しては十分注意しなければならないことが示唆される。

同種移植免疫抑制剤投与群では、いわゆる早期拒絶反応期のはじまりは、臨床的には勿論であるが、これを形態学的にとらえることも大変難しい。

これは著者の行なつた動物実験でも示されている。

つまり、移植後7日目になると、H-E染色標本でも間質の細胞浸潤、浮腫、糸球体係蹄基底膜の軽度肥厚などが出現し、腎移植犬の尿量、移植腎の腫大、PSP値等からも拒絶反応が疑われる状態となるが、術後4日目の時点では、H-E染色標本ではほとんど変化は見られない。

しかし、酵素組織化学的染色標本では、すでに変化がみられている。

著者の染色した6種の酵素の中では特に、LAP、Alk-Pの活性低下がnephron単位でみられた。

しかし他の4種の酵素にはほとんど活性の低下が見られない。

しかもこの時期に免疫抑制剤を少しずつ増量すると、拒絶反応をうまくのりきれる場合が多い。

もちろん、組織適合性が非常に悪い場合には腎機能不全で死に至ることはいうまでもない。

問題はこの酵素活性の低下が拒絶反応という抗原抗体反応によるものであるかどうかということである。

これを直接証明するためには、移植腎に対する抗体に標識した蛍光抗体をつくり、蛍光抗体法を行なつてみるのも一法と考えられ、著者は現在それを試行中であり、おつて報告したいと考えている。

しかしこのようなことを行なわなくても、実験動物の検査結果および経過をよく観察し、拒絶反応と考えられた時期に、免疫抑制剤の投与を増量することによつて、

拒絶反応を抑制すれば、この酵素活性の低下は回復してくること、さらに阻血腎や尿管閉塞による水腎症などの場合は、少なくともこれらの酵素は一樣に低下する傾向があること¹³⁾、また拒絶反応が進行した状態の時の腎では、lymphocytic infiltrationの出現した部の尿細管で酵素活性の低下のはげしいことなどからも、今回著者の見出した変化は、何か抗原抗体反応に起因するものと考えられる。

もちろん、拒絶反応の初期変化は、リンパ管、小血管のリンパ球等による閉塞、あるいは血管壁の透過性の増加による間質の浮腫のための血管系の圧迫によりおこるものである¹⁴⁾から阻血による原因を全く否定するわけではない。

また、14日目の酵素染色で、7日目のものより、LAP、Alk-Pをはじめとして、他の酵素もさらに低下を示し、活性が殆どみられなくなっているような例では、移植腎の予後は大変悪く、7日目の生検材料での酵素活性の低下度だけでもある程度の移植腎のviabilityはわかるが、14日目のものと比較するとさらに確実になる。

Lindquist¹⁵⁾らは同種移植免疫抑制剤非投与例の2日目の移植腎で、Embden-Meyerhof glycolysis, Krebs' cycle, 脂肪酸酸化系およびHexose-monophosphate shuntに関する脱水素酵素染色を行ない、Hexose-monophosphate shuntのG-6-PDH, 6-PGDHのみ尿細管における活性増加がみられたが、他の脱水素酵素活性はすべて減少していたとのべているが、拒絶反応との関係については言及していない。著者も同種移植免疫抑制剤非投与群で同様の傾向をみとめ、免疫抑制剤投与群では術後4日目に多少活性上昇がみられ、拒絶反応時上昇の傾向にある。その原因は抗原抗体反応でenzymeのinhibiterが消費されること、本酵素の産生の増加、あるいは尿細管細胞の透過性の変化で、血中、尿中への流出が阻害されることなどが考えられる。

糸球体の変化については、ここには本来酵素活性の余りない場所であるが、Alk-Pに関しては、拒絶反応が進行し尿細管における活性が低下してくると逆に糸球体に活性が出現し、その局在は、PAS染色の濃染する部とはほぼ一致し、糸球体係蹄の肥厚した基底膜に附着しているかと思われる。すでに徳江¹⁶⁾らは電顕的に拒絶反応時にsubendothelialに濃度の低い何かがdepositしていることを報告しており、当然ながら早期拒絶反応時にも糸球体に何らかの変化がおこり、本来の糸球体から尿中に漏出する筈のAlk-Pがここに附着したことが一つの原

写真1 同種移植, 免疫抑制剤非投与4日目, **H-E**染色. ごく軽度のperitubular, periglomerularの cell infiltration 及び尿細管上皮の萎縮, 管腔の拡張等が見られる. (×100)

写真2 同種移植, 免疫抑制剤非投与7日目, **H-E**染色. 皮質全体に lymphocytic infiltration, Bowman's capsule の著明な肥厚, 糸球体係蹄の cell infiltration, 尿細管上皮の萎縮等が見られる. (×100)

写真3 犬正常腎の **LAP** 染色. 糸球体に 極軽度, 近位尿細管に強度, ヘンレの係蹄, 遠位尿細管に軽度の活性をみるが, 集合管には活性は見られない. (×100)

写真4 同種移植, 免疫抑制剤非投与, 4日目, **LAP** 染色. 全般的に尿細管の著明な活性低下が見られるが, 一部の尿細管では正常に近い活性を有し, 又一部の尿細管では完全な活性の消失が見られる. (×100)

写真5 同種移植, 免疫抑制剤非投与, 7日目, **LAP**染色. ごく一部の尿細管に軽度の活性を認めるのみとなつてきている. (×100)

写真6 犬正常腎 **Alk-P** 染色. 近位尿細管に強い活性が見られるが, 糸球体やその他の部位には活性は見られない. (×100)

写真7 同種移植, 免疫抑制剤非投与, 4日目, **Alk-P** 染色 (拒絶反応初期). 一部の尿細管では, 正常の活性が見られるが, 一部の尿細管では極軽度の活性をみる. 即ち地図状の活性低下が見られる. (×100)

写真8 同種移植, 免疫抑制剤投与, 7日目, **Alk-P** 染色 (拒絶反応極期). ごく一部の尿細管にほぼ正常に近い活性を認めるが, 大部分の尿細管では活性の著明な低下又は活性の完全な消失が見られる. (×100)

写真9 同種移植, 免疫抑制剤投与, 13日目, **Alk-P** 染色 (拒絶反応回復期). 一部の尿細管で完全な活性の消失を見るが, 大部分の尿細管では, ほぼ正常の活性が見られる. 又一部の糸球体で軽度の活性が見られる. (×100)

写真10 同種移植, 免疫抑制剤投与, 4日目 **SDH** 染色 (拒絶反応極期). 糸球体には活性は見られない. ヘレンの係蹄, 近位, 遠位尿細管に強い活性が見られる. この活性所見は術前対照腎とほぼ同様の強さである. (×100)

写真11 同種移植, 免疫抑制剤投与, 4日目, **SDH** 染色 (拒絶反応初期). 4日目の活性 (写真10) とほぼ同様の活性が見られる. (×100)

写真12 同種移植, 免疫抑制剤投与, 11日目, **SDH** 染色 (無尿期). 4日目 (写真10) 及び7日目 (写真11) と比較し, 活性にはさほど変化が見られない. (×100)

因となり血清中 Alk-P も上昇すると考えられる。Vink¹⁷⁾ からも同様の事実を認めているが、その原因は抗原抗体反応により糸球体の permeability が二次的に亢進したため糸球体係蹄に Alk-P が増加したと述べているが、著者の見解では、糸球体基底膜の肥厚等前記した如き糸球体の変化により permeability が低下し、Alk-P が貯溜したと考えており彼らとは逆のようである。いずれにせよ糸球体への Alk-P 活性の出現の程度が予後判定の一助となりそうである。

次に LAP, Alk-P の腎組織中活性が低下することの mechanism の検討のために、血清中、尿中および組織中の活性を生化学的に測定したが、LAP については拒絶反応時にも血清中の活性には著変は見られなかったが、尿中の活性は増加し、腎組織中の活性の減少がみられ、後二者は mirror image 的關係にあり、LAP の組織中の活性低下は尿細管壁の permeability の変化により本酵素が尿中に逸脱するためと考えられた。

Alk-P については、血清中の活性は免疫抑制剤の肝への影響も考えられ、日を経るにしたがって上昇してくる。そして尿中活性も増加してくるため組織活性と尿中活性に一連の關係を見い出せなかった。しかし血清中活性に關係なく組織中活性と酵素組織化学的所見とはほぼ行平關係にあつた。

なお Azathioprine, Prednisolone 投与時の開放性腎生検に際しては感染に十分注意しなければならないが、著者はこの操作により状態の悪化した例は経験していない。

人腎移植症例でも、オーストラリアの Kincaid-Smith¹⁸⁾ らは針生検の有用性を報告しているが、安全で十分確実に組織を採取できる開放性生検の方が診断的価値は高く、治療方針決定上有用と言えそうである。

結 語

1) 腎生検組織で、LAP, Alk-P 染色は拒絶反応時に他の酵素より早く活性が低下し、その早期診断、予後判定上有用である。反対に G-6-PDH 染色では拒絶反応時に多少上昇の傾向がある。

2) これらの酵素活性の低下あるいは上昇は nephron 単位でみられ、その結果拒絶反応時の標本は地図状の染色状態を呈する。

3) 早期拒絶反応は尿細管のみでなく、当然ながら糸球体にもおこってくる。

4) 拒絶反応時の腎組織内 LAP 活性の低下は抗原抗体反応により尿細管の permeability が変化したため、腎組織中の LAP が尿中に漏出したためと考えられる。

本論文の要旨は、第7回、第8回、第9回日本組織細

胞化学会総会（1966年11月、1967年11月、1968年11月）及び第56回日本泌尿器科学会総会（1968年4月）において発表した。

稿を終るに臨み高安久雄教授の御指導及び御校閲に深甚な謝意を表すると共に直接御指導下さった阿曾佳郎講師、星野嘉伸博士、小磯謙吉博士並びに移植実験に御協力戴いた北川竜一講師はじめ医局諸先生方に感謝いたします。本研究の一部は文部省科学研究費によるものである。

文 献

- 1) Advisory Committee of the Human Kidney Transplant Registry: Transplantation, **8**: 721 1969.
- 2) 四方統男: 第13回日本腎臓学会総会, シンポジウム, 腎移植にて口演, 1970.
- 3) Simmons, R.L., Tallent, M.B., Kjellstrand, C.M. and Najarian, J.S.: Am. J. Surg., **119**: 553, 1970.
- 4) Murray, J.E., Gleason, R.E., and Atkinson, J.C.: Transplantation, **5**: 752, 1967.
- 5) Nachlas, M.M., Crawford, D.T. and Seligman, A.M.: J. Histochem. Cytochem., **5**: 264, 1957
- 6) Gomori, G.: J. Lab. Clin. Med., **37**: 526, 1952.
- 7) Seligman, A.M. and Manheimer, L.H.: J. Natl. Cancer. Inst., **9**: 427, 1949.
- 8) Nachlas, M.M., Isou, K.C., Souzo, E.D., Cheng, C.C. and Seligman, A.M.: J. Histochem. Cytochem., **5**: 420, 1957.
- 9) Nachlas, M.M., Walker, D.G. and Seligman, A.M.: J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**: 29, 1958.
- 10) Nachlas, M.M., Walker, D.G. and Seligman, A.M.: J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**: 467, 1958.
- 11) Tuppy, H., Wiesbauer, U. und Wintersberger, E.: Hoppe-Seylers. Zschr. physiol. Chem., **329**: 278, 1962.
- 12) Bessy, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: J. Biol. Chem., **164**, 321, 1946.
- 13) 阿曾佳郎: 日泌尿会誌, **53**, 243, 1963.
- 14) Kountz, S.L., Williams, M.A., Williams, P.L., Kapros, C. and Dempster, W.J.: Nature, **199**, 257, 1963.
- 15) Lindquist, R.R. and Hager, E.B.: Ann. N.Y. Acad. Sci., **120**, 50, 1964.
- 16) 徳江章彦, 横山正夫, 岡田清己, 高安久雄: 第57回日本泌尿器科学会総会にて口演, 1969.
- 17) Vink, B.V.H. and Willighagen, R.G.J.: Transplantation, **5**: 420, 1967.
- 18) Mathew, T.H., Kincaid-Smith, P., Eremin, J. and Marshall, V.C.: Med. J. Aust., **1**: 6, 1968.
- 19) 高安久雄, 小磯謙吉: 小児科診療, **33**, 453, 1970. (1971年6月18日受付)