コレラトキシンのラット腎同種移植における免疫抑制効果

防衛医科大学校泌尿器科学講座 (主任: 中村宏教授)

浅 野 友 彦

THE IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF CHOLERA TOXIN ON RAT RENAL ALLOGRAFT

Tomohiko Asano

Department of Urology, National Defense Medical College

(Director: Prof. H. Nakamura)

Immunomodulatory effects of cholera toxin (CT) were investigated in a rat model, and the effects of CT on rat renal allograft (from Lewis rat to WKAH rat) were also examined. The results are: 1) The number of lymphocytes in the thymus, spleen and peripheral blood was remarkably decreased after 7 day administration of CT (0.1 and 0.2 mg/kg/day), but the number of red blood cells and neutrophils was not decreased. 2) CT suppressed mixed lymphocyte reaction (MLR) in a dose dependent fashion, and %suppression reached 97% at the concentration of 10 μ g/ml. The later the time of addition of CT to MLR, the less became this effect. 3) In the control group, the mean survival time (MST) after transplantation was 8.5 ± 0.3 (Mean $\pm$ SE) days. CT, given 1 day before transplantation, did not prolong MST. In the group to which CT was given daily for 14 days from the day of transplantation, MST was prolonged with the increase of CT. CT at the dosage of 0.2 mg/kg/day prolonged MST (16.2 ± 3.2 days) significantly ($p < 0.05$), where treated with CT from the 3rd day after transplantation, MST (10.3 ± 1.3 days) was not significantly prolonged. From the above findings, CT seems to act mainly on the early phase of acute rejection and prolongs rat renal allograft survival.

Key words: cholera toxin, renal transplantation, immunosuppression

要旨: コレラトキシン (以下 CT) が免疫機能に及ぼす効果についてラットを用い, in vivo, in vitro で検討を加えた。さらに, WKAH ラットをドナー, Lewis ラットをレシピエントとするラット腎同種移植モデルを用いて CT の拒絶反応抑制効果について検討を加え, 以下の結果を得た。1) CT は胸腺, 脾, 末梢血中のリンパ球数を著明に減少させるが, 赤血球数, 好中球数は減少させず, 骨髄抑制作用はみられなかった。2) CT はリンパ球混合培養反応を濃度依存性に抑制し, CT 10 μ g/ml の時の%抑制率は 97% であった。また, この抑制効果は CT の添加時期により経時的に減弱し, 時間依存性を示した。3) CT 非投与群のラット腎同種移植後の生存日数は 8.5 ± 0.3 (Mean $\pm$ SE) 日であり, CT を移植前日に 1 回投与した群では生存日数の延長はみられなかった。CT を 14 日間連続投与した群では投与量の増加とともに生存日数が延長する傾向がみられ, 0.2mg/kg 投与群では 16.6 ± 3.2 日と有意に ($p < 0.05$) 延長した。また, 移植後第 3 日目から CT を 0.2mg/kg 投与した群では生存日数は 10.3 ± 1.3 日と有意な生存日数の延長はみられなかった。以上の結果から, CT は拒絶反応の特に初期に作用し, 拒絶反応を抑制するものと思われた。

キーワード: コレラトキシン, 腎移植, 免疫抑制

緒 言

腎移植の成績は, 1960年代のアザチオプリン, ステロイド, 抗リンパ球血清グロブリン等による免疫抑制の時代に比べ, 1978年のシクロスポリンの登場以降飛躍的に向上した¹⁾。しかしながら, シクロスポリンも腎

毒性, 肝毒性, 高血圧等の副作用を有することが明らかとなり, なおより強力で, より副作用の少ない新しい免疫抑制剤を求めて研究開発が進められている。わが国でも FK-506²⁾ や 15-deoxy spargualin³⁾ 等の新しい免疫抑制剤が発見され, すでに臓器移植の臨床に一部用

いられつつある。

一方コレラトキシン(CT)は、コレラ菌から分泌される分子量約86,000の蛋白であるが⁴⁾、Concanavalin A や phytohemagglutinin に対するリンパ球の幼若化反応を抑制したり⁵⁾、抗体産生を調節したりする⁶⁾などの免疫抑制作用を有することが報告されている。本研究では臓器移植におけるCTの免疫抑制効果について、ラットの腎同種移植をモデルに用いて in vitro 及び in vivo の双方から検討した。

対象及び方法

A. ラットの免疫系に及ぼす影響について

1. ラット胸腺、脾、末梢血血液像に及ぼす影響について

Lewis ラット(雄性、6週齢、体重約150g)を3群に分け、以下のようにCT(コルトックス、生化学工業)を7日間連続皮下投与した。

第1群(n=7) 生食水のみ

第2群(n=7) CT 0.1mg/kg/day

第3群(n=7) CT 0.2mg/kg/day

CT投与開始後第7日目に採血を行い赤血球数、白血球数、リンパ球数を測定した。また第7日目に犠死せしめ、胸腺、脾を摘出しその質量を測定し、ホルマリン固定の後パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的検討を加えた。

2. リンパ球混合培養(mixed lymphocyte reaction, MLR)に及ぼす影響について

Lewis ラットを responder, WKAH ラットを stimulator とする one way MLR を行った。リンパ球は無菌的に頸部リンパ節を採取し、medium(RPMI 1640)中で細切しステンレス・メッシュを通して細胞浮遊液とした。stimulator は、最終濃度25 μ g/ml のマイトマイシン C(協和発酵)で、37 $^{\circ}$ C、30分間処理し不活化した後、medium で3回洗浄した。1 $\times 10^5$ 個の responder cell (0.1ml) と 2 $\times 10^5$ 個の stimulator cell (0.1ml) を96 well 丸底タイタープレート(Nunc, デンマーク)で混合培養した。final medium として10%FBS(GIBCO, Lot. No. 28K6155)加 RPMI 1640(GIBCO), 25mM HEPES buffer, 5 $\times 10^{-5}$ M 2-メルカプトエタノール、ペニシリン100unit/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml を用いた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で5日間培養を行い、培養終了16時間前に³H-thymidine(³H-TdR) 0.5 μ Ci/well (デュボン NEN リサーチ・プロダクト)を添加し、セル・ハーベスターで細胞をガラス・フィルター上に採取し、乾燥後液体シンチレー

ジョン・カウンター(アロカ LSC 673)で³H-TdR の取り込みを測定した。

CTの濃度がMLRに及ぼす影響について検討を加えるために、最終濃度が0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml となるようにCTを培養初期から添加し、³H-TdR の取り込みを測定、これを%抑制率として表した。また、CTの添加の時期がMLRに及ぼす影響について調べるために、CTを培養開始後24, 48, 72, 96時間目に添加し(最終濃度0.1, 1, 10 μ g/ml)、添加の時期による³H-TdR の取り込みの変化を調べた。尚、本実験は triplicate で3回行いその平均値を比較した。

$$\%抑制率 = \left(1 - \frac{CT \text{ 添加時の取り込み (CPM)}}{CT \text{ 非添加時の取り込み (CPM)}} \right) \times 100 (\%)$$

B. CTのラット腎同種移植における免疫抑制効果について

実験動物は、近交系のWKAH ラット(RT-1^a)をドナー、Lewis ラット(RT-1^b)をレシピエントとして用いた。ドナー、レシピエントともに雄性、週齢8~12週、体重200~250gのものをを用いた。ラット腎同種移植はLeeら⁷⁾の方法に基づいて行った。すなわちネンブタール麻酔下にドナー腎を大動脈及び下大静脈の部位で切除、摘出し、これを各々レシピエントの大動脈と下大静脈に8-0ナイロン糸で端側に吻合した。尿路の再建は、ポリエチレン・チューブ(外径0.61mm, 内径0.28mm, 夏目製作所)をステントに用いて尿管尿管端々吻合を行った。腎同種移植終了後、レシピエントの両側固有腎を摘出した。移植腎拒絶の判定は、腎移植後7日目に血清クレアチニンの測定、移植腎の生検を行い、これらのデータと腎移植後のラットの生存日数により行った。

CTを生理的食塩水に溶解したものをを用い、下記の群に分けて投与した。

第1群 CT非投与群(n=8)

第2群 下記の量のCTを移植前日に1回静脈内投与した群

① 0.1mg/kg (n=4)

② 0.2mg/kg (n=7)

第3群 下記の量のCTを移植当日から移植後14日目まで連続皮下投与した群

① 0.05mg/kg/day (n=6)

② 0.1mg/kg/day (n=6)

③ 0.2mg/kg/day (n=5)

図1 CT投与群, 非投与群における胸腺質量

第4群 CT 0.2mg/kg/day を移植後3日目から2週間連続皮下投与 (n=5)

結 果

A. ラットの免疫系に及ぼす効果について

1. ラット胸腺, 脾, 血液像に及ぼす影響について

1) 胸腺: 質量は, 第1群では 599 ± 50 (平均値 $\pm$ SD, 以下同様)mgであったのに対して第2, 3群では各々 74 ± 24 mg, 74 ± 9 mgと著明に減少した。また, 対体重比(臓器質量/体重)で比べても第1群では $3.2 \pm 0.28 \times 10^{-3}$ であったのに対し, 第2, 3群では各々 $0.49 \pm 0.14 \times 10^{-3}$, $0.51 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ と著明に低下していた(図1)。病理組織学的には, CT投与群では, 皮質領域のリンパ球は著明に減少し, 多数の foamy cell によって置き換えられていた。また胸腺髄質領域もリンパ球の減少を認めたが, 皮質に比べるとその変化は軽度であった(写真1)。

2) 脾: 質量は, 第1群では 506 ± 50 mgであったのに対して, 第2, 3群では各々 300 ± 48 mg, 234 ± 62 mgと著明に減少していた。また, 対体重比でも第1群では $2.71 \pm 0.28 \times 10^{-3}$ であったのに対し, 第2, 3群では $2.00 \pm 0.25 \times 10^{-3}$, $1.26 \pm 0.43 \times 10^{-3}$ と著明に低下していた(図2)。病理組織学的には, CT投与群の脾は, 第2, 3両群とも非投与群と比べ白脾髄の中心部(T

写真1 胸腺の病理組織学的所見(HE染色): M: 髄質, C: 皮質

対照群(A)に比しCT 0.2mg/kg投与群(B)では皮質領域のリンパ球は著明に減少し, 多数の foamy cell によって置き換えられている。髄質領域のリンパ球も減少している。(a: $\times 32$, b: $\times 80$)

細胞領域)で著明な, 周辺部(B細胞領域)では軽度のリンパ球の減少がみられたが, 胸腺でみられた変化に比べると全体的にその変化は軽度であった。また赤脾髄は非投与群と比べて明らかな変化は認められなかった(写真2)。

3) 血液像(図3): 赤血球数では, 第1群 $699 \pm 48 \times 10^4/\text{mm}^3$, 第2群 $692 \pm 34 \times 10^4/\text{mm}^3$, 第3群 $651 \pm 58 \times 10^4/\text{mm}^3$ と3群間に有意差は認められなかった。白血球数では, 第1群 $7,757 \pm 2,219/\text{mm}^3$, 第2群 $6,500 \pm 1,084/\text{mm}^3$, 第3群 $4,557 \pm 1,522/\text{mm}^3$ と第3群で有意に($p < 0.005$)減少していた。リンパ球数では, 第1群では $6,727 \pm 2,195/\text{mm}^3$, 第2群 $4,097 \pm 597/\text{mm}^3$ ($p < 0.05$), 第3群 $2,384 \pm 787/\text{mm}^3$ ($p < 0.005$)と第2, 3群で有意に減少していた。多核白血球数は, 第1群 $499 \pm 227/\text{mm}^3$, 第2群 $1,878 \pm 389/\text{mm}^3$, 第3群 $1,640 \pm 914/\text{mm}^3$ と第1群と比べて第2, 3群では有

図2 CT投与群、非投与群における脾質量

意に ($p < 0.05$) 増加していた。

2. MLR に及ぼす効果について

MLR の培養初期から CT を添加した場合、CT 濃度が 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の時の取り込みの%抑制率は各々 47, 77, 87, 97% であり、濃度依存性に $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを抑制した (図 4)。

培養開始後 24, 48, 72, 96 時間後に CT を添加した場合、その%抑制率は CT 濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の場合

写真2 脾の病理組織学的所見 (HE 染色) : W : 白脾髄, R : 赤脾髄
非投与群 (A) に比し CT 0.2mg/kg 投与群 (B) では白脾髄の中心部で著明なリンパ球の減少がみられ、周辺部でも軽度の減少を見る。(a : $\times 32$, b : $\times 80$)

図3 CT投与群、非投与群における末梢血血液像

図4 MLR に対する各種濃度 CT の効果

各々63, 40, 24, 23%であり, 培養後期に添加するほど ^3H -TdR の取り込みに対する抑制効果は減少する経時的減少を示した. CT 濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ における%抑制率は56, 51, 35, 3%であり, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ では, 74, 48, 49, 21%と同様の傾向がみられた(図5). 尚, トリパンプルーによる dye exclusion test の結果, CT $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においてもリンパ球の viability には影響はみられなかった.

写真3 移植後7日目腎生検 (CT 非投与群) (HE 染色): 間質へのリンパ球, 単球を主体とする細胞浸潤, 尿細管の変性壊死, 糸球体には多核白血球, リンパ球, 単球の浸潤と内皮細胞の増殖を見る. (a: $\times 80$, b: $\times 320$)

B. CT のラット腎同種移植に対する免疫抑制効果について

第1群では平均生存日数は 8.5 ± 0.3 日で, 術後7日目の血清クレアチニン値は $6.0\pm 0.5\text{mg}/\text{dl}$ であった. また術後7日目に行った移植腎の生検では, 間質への中等度の細胞浸潤, 糸球体, 尿細管の変性壊死など典型的な急性拒絶反応の像がみられた(写真3). 第2群の CT 0.1, 0.2mg/kg の移植前日1回投与群の平均生存日数は各々 9.4 ± 0.9 , 8.6 ± 1.0 日と CT 非投与群と比べて生存日数の延長はみられなかった(表1). 第3群の連続投与群では, 0.05, 0.1, 0.2mg/kg/day 投与群の平均生存日数は各々 10.6 ± 0.6 , 12.3 ± 1.0 , $16.6\pm$

図5 MLR に対する CT 添加時期の影響

表1 CT投与群のラット腎同種移植後生存日数

群	CT(mg/kg)	生存日数(日)	Mean±SE	P value
第1群	0. (n=8)	7,8,8,8,9,9,9,10	8.5±0.3	
第2群 ①	0.1 (n=5)	8,8,9,9,13	9.4±0.9	N.S.
②	0.2 (n=7)	7,8,8,9,9,9,10	8.6±1.0	N.S.
第3群 ①	0.05(n=6)	9,9,9,10,12,12	10.6±0.6	N.S.
②	0.1 (n=6)	9,11,11,13,15,15	12.3±1.0	N.S.
③	0.2 (n=5)	10,11,14,21,27	16.6±3.2	<0.05
第4群	0.2 (n=5)	8,9,9,9,15	10.0±1.3	N.S.

写真4 移植後7日目腎生検(CT 0.2mg/kg 連続投与群)糸球体の細胞浸潤は少なく、構造はよく保たれ、間質の細胞浸潤は軽度で尿細管の拡張を軽度認める。(a:×80, b:×320)

3.2日と投与量の増加とともに生存日数が延長する傾向がみられ、0.2mg/kg/day 投与では非投与群に比べて有意に($p<0.05$)生存日数の延長がみられた(表1)。また術後7日目の血清クレアチニン値は、0.05, 0.1, 0.2mg/kg/day 投与群では各々 3.9 ± 0.8 , 2.3 ± 0.6 , 1.1 ± 0.2 mg/dl と0.1, 0.2mg/kg/day 投与群は非投与群と比べて有意に($p<0.01$)低値を示した(表2)。移植後7日目の移植腎生検の病理組織学的所見でも、0.1, 0.2mg/kg/day 投与群では、間質への細胞浸潤は著明に抑制されており、糸球体や尿細管の変化も軽度であった(写真4)。移植後第3日目からCTを投与し始めた第4群では、生存日数は 10.0 ± 1.3 日と非投与群と比べて有意な生存日数の延長はみられなかったが(表1)、移植後7日目の血清クレアチニン値は 2.1 ± 0.4 mg/dl と非投与群に比べて有意に($p<0.01$)低値をしめた(表2)。また、移植後7日目の移植腎生検では血管周囲に細胞浸潤はみられるが、糸球体や尿細

表2 CT連続投与群のラット腎同種移植後7日目の血清クレアチニン値

群	CT(mg/kg/day)	血清クレアチニン値(mg/dl)	P value
第1群	0 (n=4)	6.0 ± 0.5	
第3群 ①	0.05 (n=6)	3.9 ± 0.8	N.S.
②	0.1 (n=6)	2.3 ± 0.6	<0.01
③	0.2 (n=5)	1.1 ± 0.2	<0.01
第4群	0.2 (n=5)	2.1 ± 0.4	<0.01

写真5 移植後7日目腎生検(CT 0.2mg/kg, 移植後3日目から投与開始した群)血管周囲に細胞浸潤はみられるが、糸球体や尿細管の変化は軽度であった。(a:×80, b:×160)

管の変化は軽度であった(写真5)。

考 察

CTはコレラ菌から分泌される分子量86,000の蛋白であり、A, Bのサブユニットから成り立っている⁴⁾。細胞表面に到達した後、まずCTのBサブユニットがそのリセプターである細胞表面のGM₁ガングリオンドに結合し、次にそこに形成されたporeからAサブユニットが細胞内に進入する。Aサブユニットはアデニレートサイクラーゼを持続的に活性化作用をもっており、細胞内のc-AMP濃度を上昇させ、その細胞に特有な生物学的機能を発現させるとされている。CTの免疫系の細胞に対する作用としては、細胞障害性リンパ球の産生⁸⁾と機能発現の抑制⁹⁾、IL-2の産生及びIL-2に対する反応性の抑制¹⁰⁾、NK活性の抑制¹¹⁾など様々な作用を有することが報告されている。また最近では、c-AMPを介さずにBサブユニットのみでも

マイトゲンや抗原刺激に対するリンパ球の増殖反応を抑制する機構も報告されている¹²⁾¹³⁾。CT 投与によるマウスの免疫系に対する影響について Morse ら¹⁴⁾は、CT 1 μ g の静脈内投与により末梢血、胸腺、脾内のリンパ球の減少がみられたと報告している。これは副腎を摘出したマウスではみられなかったため、CT が副腎皮質を刺激し、ステロイドの分泌を促したためではないかとしている。本実験においてもコルチゾンに感受性の強い胸腺皮質の未熟なリンパ球が消失し、コルチゾン抵抗性の胸腺髄質のリンパ球は余り影響を受けていないことや、CT のリセプターである GM₁ ガングリオンドは髄質に選択的に存在する¹⁵⁾にもかかわらず、髄質のリンパ球は余り影響を受けていないことなどから、*in vivo*における CT のリンパ球に対する作用は、直接作用ではなく、副腎皮質を介したものと思われた。腎移植の臨床において胸腺摘除や、脾摘除が移植腎の生着率を向上させたとの報告もあり、本実験でも CT が免疫反応を担当するいわゆる“lymphoid mass”である胸腺、脾、末梢血のリンパ球を減少させることにより拒絶反応の抑制に関与している可能性も考えられた。また、末梢血においては CT 投与により赤血球が減少しないこと、多核白血球も減少せずにむしろ増加していることから、CT はアザチオプリンやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤と異なり骨髓抑制作用はないものと思われた。尚、多核白血球が増加する原因として Morse ら¹⁴⁾は CT を精製する際にごく微量混入するエンドトキシンのためではないかとしている。

MLR に対して CT は 0.01 μ g/ml の低濃度で 47% の抑制率を示し、10 μ g/ml では 97% とほとんど完全にこれを抑制した。しかしながら 10 μ g/ml の CT でも培養開始後 72, 96 時間後に添加した場合は % 抑制率は 49, 21% とその効果は低下した。この CT の MLR に対する抑制効果の時間依存性が、CT とリンパ球との接触時間の差によるものか、あるいは CT の MLR における存在時期の違いによるものかは今回の実験からだけでは判定できない。細胞内の c-AMP 濃度の上昇はリンパ球の増殖反応を抑制するが、この場合もリンパ球の増殖反応の初期から c-AMP 濃度が上昇していることが必要であり、c-AMP 濃度の上昇の時期が遅いほど抑制効果は低下するとされている¹⁶⁾。CT も細胞内の c-AMP 濃度を上昇させることにより作用することから、この CT の MLR 抑制効果の時間依存性は CT の存在時期の差によるものである可能性が高いと思わ

れた。

Henny ら⁹⁾は、CT が細胞障害性リンパ球を抑制することに注目し、拒絶反応の抑制に有効であるか否かを、マウス同種皮膚移植モデルを用いて実験を行っている。彼らは CT 1 μ g を皮膚移植と同時に、あるいは移植後 1, 2 または 4 日目に腹腔内に投与したが、皮膚移植片の生着日数の延長はみられなかったと報告している。また、Warren ら¹⁷⁾は同様にマウスの同種皮膚移植モデルで CT 1 μ g を移植後第 6, 9 日目に静脈内に 2 回投与し、生着日数が非投与群の 13.2 $\pm$ 0.3 日から CT 投与群の 17.4 $\pm$ 1.2 日と有意に延長したと報告している。鶴ら¹⁸⁾は、皮膚移植の前日に CT 1 μ g を静脈内に投与し、非投与群の 16.1 $\pm$ 1.2 日と比べ投与群 173.5 $\pm$ 23.9 日と著明に生着日数が延長したと報告している。皮膚移植以外の実験モデルとしては、Ljungstrom ら¹⁹⁾がマウスの心同種移植をモデルとして CT の拒絶反応抑制効果を調べているが、やはり移植前日に 1 μ g を静脈内に投与したときに生着日数は延長するが、移植後 0, 1, 7 日目に投与した場合には生着日数の延長はみられなかったと報告している。しかし Ljungstrom らの方法は、心筋片を直接皮下に移植したものであり、拒絶反応の様式としては血管茎を有する臓器移植のモデルというよりも皮膚移植のそれに近いものであり、血管茎を有する臓器移植のモデルとして、ラットの腎同種移植を用いて CT の拒絶反応抑制効果を調べたのは今回が初めてと思われる。

CT の投与経路については、腹腔内投与では 0.1~0.2mg/kg/day の投与量では著明な腸管の浮腫や腹水の貯留などが起こり、3~4 日で死亡するため拒絶反応を抑制するのに必要な量を投与することはできなかった。CT を血管内に投与した場合には、CT のもつ血管透過性亢進作用²⁰⁾により血管の周囲には著明な浮腫を来とし、血管内に連日投与することは困難であった。皮下投与を行った場合には、やはり投与した局所に浮腫を生じたが、これは数日で吸収されるので、投与する部位を毎回変えることで連日投与は可能であった。

鶴ら¹⁸⁾は移植前日の 1 回投与で皮膚移植が長期生着するメカニズムとして、移植後早期には非特異的な免疫抑制、その後はドナー特異的なサプレッサー細胞により拒絶反応が抑制されるためではないかとしている。今回の実験では移植前日の 1 回投与では腎移植後の拒絶反応を抑制できなかったが、これは皮膚移植と、腎のように血管茎を有する臓器移植とでは、抗原量、

感作の起こる時期と部位, revascularization の起こる時期など拒絶反応の様式が異なっており²¹⁾, 腎移植ではCTの1回投与のみでは免疫抑制剤の量としては不十分なのではないかと思われた。そこで, シクロスポリンやFK-506などの免疫抑制剤の動物実験の際に投与されるのと同様に移植後2週間の継続投与を試みた。その結果, 1日投与量を0.05, 0.1, 0.2mg/kgと増量するにつれて生着日数が延長し, 0.2mg/kgで非投与群と比べて有意に生着日数が延長した。MLRにおいてCTを添加する時期が遅れるほどその効果が減弱することや, 腎移植後3日目以降に投与した場合にはその免疫抑制効果が弱くなることなどから, CTは拒絶反応のinductionが起こってから投与されても, その免疫抑制効果は不十分であり, 主としてTリンパ球による移植抗原の認識¹²⁾や, その後起きるヘルパーTリンパ球によるIL-2の産生抑制など²²⁾, 拒絶反応のearly phaseに作用している可能性が高いと考えられる。

CT 0.2mg/kg投与群の7日目の血清クレアチニン値や, 移植腎生検の所見をみる限り, この時点では拒絶反応は完全に抑制されており, その後CTの投与を続けているにもかかわらず死亡するラットがみられたが, その原因としてはCTに対する中和抗体の出現やCTそのもののもつ毒性による可能性が考えられた。現在臨床において急性拒絶反応の治療に用いられているOKT3は, ヒトT₃抗原認識複合体に対するマウス由来モノクローナル抗体であるが, やはり投与後高率に中和抗体が産生され, その効果が低下するとされている²³⁾。CTの場合も異種蛋白であるCTに対する中和抗体が産生され, その効果が不定となる可能性が考えられた。また, Warrenら¹⁴⁾はマウスに対してCT 0.5, 1 μ gを2回静脈内に投与したところ死亡率はそれぞれ44, 52%と高率であったと報告しており, 著者の実験でも死亡したラットの臓器を検索した結果ではCTによる死因となるような組織学的な変化は認められなかったが, 血清クレアチニンの上昇がみられないまま死亡するラットもあり, CTそのもののもつ毒性による死亡の可能性も考えられた。

今回の実験でCTはラット腎同種移植において拒絶反応を抑制することが明かとなった。CTのヒトへの応用に関しては, 毒性や中和抗体の問題が残されている。しかし, これらの問題については今後他剤との併用による小量投与などにより解決可能と思われるので, CTは臓器移植における新しい免疫抑制剤の一つ

となり得ると考える。

結 語

CTの免疫抑制効果についてラット腎同種移植モデルを用いて実験を行い, 以下のような結果を得た。

1. CTの投与により末梢血, 胸腺, 脾臓内のリンパ球は著しく減少したが, 骨髄抑制作用はみられなかった。
2. CTはMLRを濃度依存性に抑制した。
3. CTのMLRに対する抑制は添加時期により経時的に減弱し, 時間依存性を示した。
4. CTの移植前1回投与ではラット腎同種移植後の生存日数は延長しなかった。
5. CTを移植後3日目から連続投与した場合には, ラット腎同種移植後の生存日数は延長したが有意差を認めなかった。
6. CTの移植当日からの連続投与では, ラット腎同種移植後の生存日数は1回投与量の増加とともに延長し, 0.2mg/kg/dayでは非投与群と比べて有意に($p < 0.05$)延長した。

本論文の要旨は, 第76回日本泌尿器科学会総会(盛岡), 及び第84回国泌尿器科学会(Dallas)において報告した。

稿を終えるにあたり, ご指導を賜った田崎 寛教授(慶応義塾大学)と御校閲を賜りました中村 宏教授に深謝致します。また, 折りにふれ御助言を賜りました村井 勝助教授, 研究に御協力いただきました家田和夫講師に心から感謝致します。

文 献

- 1) Calne, R.Y., Rollers, K., White, D.J.G., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.N., Henderson, R.G., Aziz, S. and Lewis, P.: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 patients of cadaveric organs. 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. *Lancet*, 2, 1033-1036, 1979.
- 2) Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Hori, S., Asano, T. and Isono, K.: Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK 506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation*, 44, 734-738, 1987.
- 3) Amemiya, H., Suzuki, S., Manabe, H., Fukao, K., Iwasaki, Y., Dohi, K., Isono, K., Orita, K. and Yamanaka, N.: 15-deoxyspergualin as an immunosuppressive agent in dogs. *Transplant. Proc.*, 20, 229-232, 1988.
- 4) Holmgren, J.: Action of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature*,

- 292, 413—417, 1981.
- 5) Vischer, T.L. and LoSpalluto, J.J.: The differential effect of cholera toxin on the lymphocyte stimulation induced by various mitogens. *Immunology*, 29, 275—282, 1975.
 - 6) Chisari, F.V., Northrup, R.S. and Chen, L.C.: The immunomodulating effect of cholera enterotoxin on the immune response. *J. Immunol.*, 113, 729—739, 1974.
 - 7) Lee, S.: An improved technique of renal transplantation in rat. *Surg.*, 61, 771—773, 1967.
 - 8) Tsuru, S., Nomoto, K., Oka, M. and Zinnaka, Y.: Effects of cholera toxin on the lymphoid system. III. In vivo generation of cytotoxic lymphocytes. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 4, 209—214, 1983.
 - 9) Henney, C.S., Lichtenstein, L.M., Gillespie, E. and Rolley, R.T.: In vivo suppression of the immune response to alloantigen by cholera enterotoxin. *J. Clin. Invest.*, 52, 2853—2857, 1973.
 - 10) Lycke, N., Bromander, A.K., Ekman, L., Karlsson, U. and Holmgren, J.: Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin in vitro with possible association to the adjuvant function in vivo. *J. Immunol.*, 142, 20—27, 1989.
 - 11) Fuyama, S., Naiki, M. and Sendo, F.: The mechanism of cholera toxin induced suppression on natural killer cytotoxicity. *Gann*, 73, 798—804, 1982.
 - 12) Imboden, J.B., Shoback, D.M., Pattison, G. and Stobo, J.D.: Cholera toxin inhibits the T-cell antigen receptor mediated increases in inositol triphosphate and cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 5673—5677, 1986.
 - 13) Woogen, S.D., Ealding, W. and Elson, C.O.: Inhibition of murine lymphocyte proliferation by B subunit of cholera toxin. *J. Immunol.*, 139, 3764—3770, 1987.
 - 14) Morse, S.I., Stearns, C.D. and Goldsmith, S.R.: Lymphocyte depletion induced by cholera toxin; relationship to adrenal cortical function. *J. Immunol.*, 114, 665—670, 1975.
 - 15) Bouchom, B., Iwamori, M., Masago, H. and Nagai, Y.: Selective expression of cholera toxin receptor in rat medullary thymocytes. *Cell Struct. Funct.*, 12, 339—344, 1987.
 - 16) Smith, J.W., Steiner, A.L. and Parker, C.W.: Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.*, 50, 442—448, 1971.
 - 17) Warren, K.S., Mahmoud, A.A.F., Boros, D.L., Rall, T.W., Mandel, M.A. and Carpenter, C.C.J. Jr.: In vivo suppression by cholera toxin of cell-mediated and foreign body inflammatory responses. *J. Immunol.*, 112, 996—1007, 1974.
 - 18) Tsuru, S., Taniguchi, M., Shinomiya, N., Takemura, T. and Togami, M.: Histoincompatible skin and marrow grafts in mice given cholera toxin. *Transplant. Proc.*, 21, 1158—1160, 1989.
 - 19) Ljungstrom, I., and Holmgren, J.: In vivo suppression of allograft rejection by cyclic AMP increasing agents. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 58, 99—104, 1979.
 - 20) Craig, J.P.: A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature*, 207, 614—616, 1965.
 - 21) Morris, P.J.: *Kidney Transplantation*, 3rd ed., p. 15—36, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1988.
 - 22) Munoz, E., Zubiaga, A.M., Merrow, M., Sauter, N.P. and Huber, B.T.: Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: Role of c-AMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 172, 95—103, 1990.
 - 23) Bach, J.F. and Chatenoud, L.: Immunologic monitoring of orthoclone OKT-3 treated patients: The problem of antimonoclonal immune response. *Transplant. Proc.*, 19, 17—20, 1987.

(1991年6月13日受理, 特別掲載)