

論文内容要旨

我々は、肺移植における拒絶反応の早期診断方法を確立する事を目的として、ラットを用いて肺移植実験を行ってきたが、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のリンパ球の検索が早期診断に有用であることが示された。この結果を実際に臨床で応用する為には、霊長類モデルでの有用性の確認が必要と考えられる。そこで本研究では抗ヒトモノクローナル抗体に cross reactivity を持つニホンザルを用いて同種左肺移植を行い、移植モデルとして確立するために移植手技及び免疫抑制法について検討した。次いで、移植後経時的に BALF 及び末梢血を採取して、開胸肺生検による組織所見に基づいて拒絶反応モニタリングとしての有用性について検討した。

ニホンザル 22 頭を用いて、11 回の同種左肺移植実験を行った。免疫抑制は、cyclosporine 20mg/kg/day 筋肉内注射と azathioprine 2.0mg/kg/day 皮下注射の投与方法で行った。移植時及び移植後 1 - 3 日間は methylprednisolone 125-250mg も併用投与した。

的確な cyclosporine の免疫抑制効果を調べるために投与開始を移植当日 (2 頭)、移植前日 (3 頭)、移植 1 週間前 (3 頭) に分けて比較した。

また 6 頭を用いて、拒絶反応のモニタリングを行った。移植後経時的に血液及び BALF の採取を行い、血液については血液ガス、白血球数、リンパ球数、リンパ球の自然芽球化反応値、リンパ球の表面抗原 (CD2, CD4, CD8, HLA-DR) を測定した。また BALF についても細胞数、細胞分画、回収率、リンパ球の表面抗原 (CD2, CD4, CD8, HLA-DR) を測定した。測定結果は、開胸肺生検で得た移植肺組織の拒絶反応の進行程度に基づき検討した。

その結果、移植手術は手術時間 157 ± 5 分 (平均 \pm S. E.), 肺動脈遮断時間 85 ± 5 分, 移植肺虚血時間 59 ± 5 分であり、イヌで行ってきた方法を一部改良することにより十分移植可能となった。また免疫抑制の効果は、移植時よりの cyclosporine の投与開始では不良であり、1 週間前後で移植肺は拒絶された。移植前日よりの投与開始でも免疫抑制は不完全であり、ステロイドの pulse therapy により移植肺の含気性は一時回復したものの 1 ヶ月程で拒絶された。これに対して cyclosporine の投与開始を移植 1 週間前からしたサルでは、移植時の血清中の trough level が 100-150ng/ml まで上昇した。この事により 3 頭中 2 頭で 1 ヶ月以上の移植肺の生着を得ることができた。

拒絶反応のモニタリングの結果では、一般臨床検査である末梢血液像、動脈血ガス分析では、末梢血白血球、リンパ球数は拒絶反応に伴う変動は明確には認められず、モニタリング法としては利用できないことが明らかとなった。一方、動脈血ガス分析は II 期において PaO_2 の低下が認められ、検査としての特異性はないものの拒絶反応の前兆の 1 つとして有用である事が判明した。

イヌおよびラットの移植実験ではモニタリング方法として有用とされた末梢血リンパ球の自然芽球化反応値は、拒絶反応の進行に伴いニホンザルでも上昇するのが認められた。しかし、測定結果のばらつきが大きく診断可能とは言えなかった。

拒絶反応の進行に伴いBALFでは、回収率の低下、総細胞数の増加、リンパ球、好中球の割合及び絶対数の増加が観察された。しかし、これらの変化は拒絶反応の初期では明らかではなく、BALFの回収率及びBALF中の総細胞数、細胞分画比のモニタリングのみでは、拒絶反応の早期発見は難しいと考えられた。

リンパ球の表面抗原の検索では、健康なニホンザルの末梢血リンパ球の抗原分布はCD2⁺細胞 71.2±2.9%，CD4⁺細胞 31.6±1.9%，CD8⁺細胞 42.2±2.4%，HLA-DR⁺細胞 30.7±2.6%であった。また、BALFリンパ球の抗原分布は、CD2⁺細胞 93.0±2.5%，CD4⁺細胞 50.7±2.8%，CD8⁺細胞 67.5±3.3%，HLA-DR⁺細胞 16.8±2.5%であった。

拒絶反応に伴う変動はCD4，CD8，HLA-DRで認められた。BALFリンパ球ではCD8⁺細胞の増加とCD4⁺細胞の減少が認められた。また末梢血リンパ球ではCD4⁺細胞の増加とCD8⁺細胞，HLA-DR⁺細胞の減少が認められた。特に、CD4/CD8比の変化は、拒絶反応の早期よりBALFリンパ球では低下したのに対して、末梢血リンパ球では上昇して解離した。このCD4/CD8比の変化は拒絶反応の早期診断に有用と考えられた。

以上より、ニホンザルにおいてもBALFの検索は、拒絶反応の診断に有用である事が判明した。

審査結果の要旨

本論文は、肺移植における拒絶反応の早期診断方法を末梢血、気管支肺胞洗浄液（BALF）の変化により検討したものである。

従来、肺移植での拒絶反応診断の研究はイヌまたはラットを用いて主に行われており、本研究のように霊長類を用いた系統的な研究報告は未だない。

本論文において著者は、ニホンザルを用いて同種肺移植を行い、その移植手技、免疫抑制法について最初に検討しているが、本邦における霊長類の肺移植実験の報告は本研究が初めてである。近い将来、本邦で肺及び心肺移植の臨床応用が開始されるにあたり、ニホンザルを用いた研究が盛んになると思われるが、本研究での移植手技、免疫抑制法の結果は基礎的資料として重要である。

拒絶反応の診断はラットを用いた研究では、BALF中のリンパ球の検索が早期診断に有用であるとされているが、ラットは発達したリンパ組織を気管支系に持つため、その結果がそのまま臨床応用できるか不明であった。本研究において著者は、移植後経時的に気管支肺胞洗浄を行い、その結果を開胸肺生検所見と対比することにより、ニホンザルにおいてもBALF中のリンパ球の検索が、拒絶反応早期診断に有用であることを明らかにした。また同時に行った末梢血リンパ球の検索により、移植肺内と血液中ではCD4/CD8比の解離が起きることを示した。

この研究から得られた結果は、ヒト肺移植におけるimmunological monitoringの可能性を示すものであり、BALF中のリンパ球のCD4/CD8比測定によって、現在、拒絶反応診断のために行われている侵襲的な検査である肺生検の回数を減らすことができると考えられる。

以上より、本論文は、学位論文に値すると考える。