

ニホンザル同種肺移植におけるFK506の  
免疫抑制効果に関する研究

中 島 淳



## § 1. 研究目的

肺移植術は近年肺線維症、肺気腫などのびまん性肺疾患末期における唯一の治療方法として欧米を中心に年間200例程度（一側肺移植、1990年）に施行されている<sup>1)</sup>。しかし移植成績は年間約3000例に行われている心移植に比べると、術後長期生存率においては心移植の1年生存率が81%、5年生存率が69%であるのに対し、肺移植（片肺移植）の1年生存率は67%、2年生存率は58%と、まだ低い傾向にある<sup>1)</sup>。その原因は高率に発生する急性拒絶反応および呼吸器感染症、気管支吻合部合併症にある。

現在の免疫抑制療法は腎・肝・心移植においては cyclosporine A (CsA)、azathioprine(AZT)にprednisoloneなどのステロイドを加える三者併用療法が通常行われており、良好な免疫抑制効果が得られている。しかし、肺移植においては気管支吻合部の治癒がステロイドにより遅延し、矛盾した治療法となっている。このため肺移植には新しい免疫抑制剤の出現が待望されていた。

FK506は1982年 *Streptomyces tsukubaensis* から分離された分子量822のマクロライド系抗生物質で<sup>2), 3)</sup>、マウスおよびヒトのリンパ球混合培養反応(MLR)の抑制<sup>4)</sup>、IL-2産生とIL-2 receptor発現の抑制<sup>4)</sup>、およびMLRにおける細胞障害性T細胞(CTL)誘導の抑制効果を有する<sup>5)</sup>。CsAと同様な免疫抑制機序を有するが、FK506のヒト MLR の50%抑制濃度は0.1nmol/Lであり、CsAの約100倍の強力な免疫抑制効果を有する<sup>4)</sup>。ラット皮膚移植片<sup>6)</sup>、異所性心移植<sup>7)</sup>においてグラフトの生着延長効果が認められるなど、FK506は強力な免疫抑制剤として注目されている。

肺移植術後の免疫抑制療法としてのFK506単独投与療法の有効性について、ニホンザルを用いた左肺同種同所性移植による実験的検討を行った。

## § 2. 研究の対象と方法

### A. 移植手術

雑種オスニホンザル (*Macaca fuscata*) (体重7.2kg - 13.0kg、平均9.09kg)において、計14回の同種同所性左片肺移植実験を施行した。

肺移植手術手技: Cooperらの方法<sup>8)</sup>に倣った。レシピエントおよびドナーに対し、塩酸ケタミンによる麻酔(15mg/kg筋肉内注射による導入、および1~2時間毎に5mg/kg 静脈注射による維持)、気管内挿管、陽圧調節呼吸下に左開胸し、ヘパリン 1mg/kg 静脈注射後に、レシピエントの左肺全摘を施行した。レシピエントの左肺動脈は主肺動脈分岐直後の部位で血管鉗子で遮断し、なるべく肺に近く切離した。左上下肺静脈は左房を血管鉗子で遮断して切離した後に2つの静脈断端を切りつなげて、大きな1つの吻合口を形成した。気管支は上下葉分岐部で切離し、無傷鉗子で遮断した。ついで、ドナーの左肺を摘出した。ドナーの左肺動脈は、主肺動脈から分岐した直後で切離した。ドナーの上下肺静脈は、摘出時左房壁を含めて一塊として切離した。グラフトの肺動脈から4℃のEuro Collins液200mlを灌流し、グラフト肺内の血液を洗いだしてから、直ちにレシピエントと肺静脈、肺動脈、気管支の順に吻合した。すべての吻合にはモノフィラメントポリプロピレン糸を用い、連続縫合を行った。肺動脈はレシピエントの左肺動脈の可及的近位側で吻合した。気管支はドナーの左上・下幹分岐部より1軟骨輪中枢側の左主気管支とレシピエントの主気管支を外翻させるよう端々吻合した。大網による気管支吻合部のwrappingは行わなかった。

手術時間は150分~180分(平均165分)であり、移植肺の虚



血時間は43分～60分（平均52.3分）であった。術後覚醒し、十分な自発呼吸が再開された時点で、気管チューブを抜管し、檻に戻した。術後には以下の方法による免疫抑制療法に加え、第7病日までアミノペニシリンを毎日筋肉内注射した。

#### B. 術後免疫抑制療法

術後免疫抑制療法の有無によって、レシピエントを次の2群に分けた（表1）。

A群：FK506投与群（N=7）。術後第0病日～第6病日に0.5mg/kg/日、それ以後は連日0.15mg/kg/日のFK506を1日1回筋肉内注射した。その他の免疫抑制剤は投与しなかった。

B群：FK506非投与群（N=7）。術後FK506を投与せず、また他の免疫抑制剤も投与しなかった。

#### C. 移植肺拒絶反応判定法および検査項目

（1）胸部X線写真所見による判定：術後適宜胸部X線単純撮影を施行し、移植肺の浸潤陰影の程度について5段階の陰影度に分類した（図1）。即ち、

0度：浸潤陰影を認めない。

1度：ごく軽度の浸潤陰影を認める。

2度：中等度の浸潤陰影を認める。

3度：高度の浸潤陰影および無気肺を認めるが、一部には含気が残っている。

4度：完全に不透明化し、含気を失っている。

(2) 病理組織学的判定：術後経気管支鏡的肺生検、開胸肺生検、剖検によって移植肺ならびに自己肺(剖検時)を採取した。肺生検はニホンザルの全身状態を観察しながら、適時施行した。

経気管支鏡的肺生検の方法は、以下の通りに行った。ニホンザルを塩酸ケタミン25 - 100mg筋注にて麻酔した後、気管支ファイバースコープ(PENTAX, FB-15X)を経鼻的に挿入し、左側気管支に進めた。生検チャンネルを通して肺生検鉗子を挿入し、左上下葉から検体を2~4個採取した。

開胸肺生検の方法は、以下の通りに行った。ニホンザルを塩酸ケタミン50 - 100mgにて麻酔した後、気管内挿管し、調節呼吸としてから移植手術時の創を再び開くように、左第5肋間開胸を行った。移植肺を可及的に検索した後、開胸操作・移植手術・それ以前の生検などによる免疫反応以外の修飾が加わった部位以外の肺組織を、肺胸膜を含めるように約1 cm<sup>3</sup>部分切除した。切除後は周囲の肺胸膜を連続縫合し、air leakが無い事を確認してから、胸腔ドレーンを挿入して閉胸・閉創し、手術終了した。覚醒し、自発呼吸が十分となった時点で気管チューブおよび胸腔ドレーンを抜去し、檻に戻した。術後3日間アミノベンジルペニシリンを投与した。

得られた移植肺組織は2分し、一方をホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、3μmに薄切し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を施した。HE染色における拒絶反応の程度の検討法としては、第1にPropら<sup>9)</sup>の判定基準を参考にして、移植肺をlatent - early vascular phase, late vascular phase, alveolar phase, destructive phaseの4段階に定性的に分類した(図2)。

さらに、この分類を裏付けるために、肺血管周囲・肺胞壁・胸膜への単核球浸潤について、各検体について光顕(Nikon UFX, 対物x20, 接眼x10)を用いて細胞数を求めた。肺血管周囲単核球浸潤については、1検体あたり7血管周囲の細胞数を計数し、各血管壁円周の長さ100 $\mu$ mあたりの個数の平均値を求めた。肺胞壁浸潤については、肺血管周囲を除いた細胞数を1検体あたり5視野で計数し、100 $\mu$ m平方あたりの個数の平均値を求めた。胸膜浸潤については、胸膜および胸膜下の浸潤細胞数を1検体あたり5視野で計数し、胸膜100 $\mu$ m長あたりの個数の平均値を求めた。但し、細胞数の計測に際して、採取された検体の大きさに従い多少の計測箇所増減があった。さらに移植肺組織に対し、必要に応じてGram染色を施し、細菌感染の有無について検討した。

以上の(1)・(2)の2点を拒絶反応の判定のための主な指標とし、さらに以下の項目について検討を加えた。

(3) 免疫染色所見: 両群の移植肺、正常肺に対し、免疫組織染色を施行した。染色法はABC-PAP法<sup>10)</sup>および既に発表した方法<sup>11)</sup>にならい、これに多少の変更を加え、Streptavidin-Biotin法(Histofine SAB-PO kitを使用)にて行なった(図3)。免疫組織染色施行時には、毎回一次抗体を除いたnegative controlを作成し、対比するとともに、日本猿脾組織を肺と同時に免疫組織染色し、リンパ球の染色性について対照した。

検体は採取後、直ちにOCT compoundにて包埋し、液体窒素にて急速凍結して-80℃で保存した。この凍結肺組織検体を5 $\mu$ mの厚さに薄切し、-20℃、10分間のアセトン固定の後、37℃、30分間ブロッキング血清(ウサギ血清)と反応させた。次に37℃、30分間1次抗体と反応させた。



1次抗体として用いたモノクローナル抗体は、ニホンザル白血球と交叉反応性を有することが確認されている<sup>1)12)</sup>抗ヒトモノクローナル白血球抗体 anti-CD4 ( helper/inducer T cell, Leu3a), anti-CD8 ( suppressor/cytotoxic T cell, Leu2a)を10倍希釈して用いた。次に37℃、30分間2次抗体 (Biotin結合抗免疫グロブリン)を反応させ、ついで37℃、30分間peroxidase標識streptavidinを反応させた。発色にはDAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発色液 (3,3'-diaminobenzidine·4HCl 4mg +Tris buffer 15ml + 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.02ml)を反応させ、室温で検鏡しながら十分に反応が進行し、染色された時点 (約5~10分)で洗浄して反応を中止させた。染色された検体には、hematoxylin核染色を加えて光顕による検討を行なった。ブロッキング血清からDAB発色までの各反応間の洗浄にはPBS液を使用した。

肺血管周囲浸潤単核球中各モノクローナル抗体染色陽性細胞数を光顕を用いてHE染色における方法と同様に、1検体あたり7血管周囲の細胞数を計数し、各血管壁円周100μmあたりの個数の平均値を求めた。

さらに、組織染色に加え、FK投与群 (A群)については術前及び術後経過中の末梢血リンパ球のCD4, CD8陽性率の変動についてフローサイトメトリーによる測定を行った。

方法は (図4)、各時期における末梢血検体を凝固せぬようEDTA採血した後、各試験管に200μlずつ取り、それぞれに蛍光抗体標識付きモノクローナル抗体 (FITC標識Leu-2a, Leu-3a) 10μlを加えた。15分間室温放置後、溶血剤 (10倍希釈FACS lysing solution, 2ml)を加え、さらに10分間放置した。十分溶血が完了してから、遠沈 (1200rpm x 5分)し、上清を除去した。次に沈渣に対し牛胎児血清3g/dl加PBS緩衝液2mlを加え、よく攪拌し、遠沈 (1200rpm x 5分)、上清除去を行った。残った沈渣に対し、PBS 0.5mlを加え、よく攪拌した液 (反応済み白血球浮遊液) につい

て、FACSCANを用いてフローサイトメトリーを施行した。

CONSORT 30 programを用いて、全白血球からリンパ球成分をfrontal scatter(FSC),side scatter(SSC)の2次元表示を用いてgatingし、各検体のリンパ球10,000個についてFITC蛍光強度のヒストグラムを求めた。

CD4またはCD8の染色陰性細胞・陽性細胞がそれぞれピークを作り、2峰性のヒストグラムが得られたが、陽性側の峰を作る細胞数を全計測細胞数で除し、陽性率とした。

(4) FK506血中濃度: FK506血中trough levelは、A群について、術後第2、4、7病日および以後毎週1回FK506血中濃度を測定した。EDTA採血し、室温にて遠沈分離して、血漿中濃度を高感度EIA法<sup>13)</sup>により測定した。

(5) 血液生化学検査: A群の術前と死亡前およびB群の死亡前に採取した血液について血液生化学検査(total protein, A/G ratio, total bilirubin, glucose, BUN, creatinine, GOT, GPT, LDH)を施行した。

平均値の有意差検定にはt-検定を用い、危険率(p) 0.05未満を有意差あり、と判定した。

### § 3. 結果

#### A. 移植成績 (表 2)

A 群では術後 5 日ないし 18 2 日、B 群では 5 日ないし 35 日の生存を得た。死因は、A 群では 1 頭が右側無気肺にて死亡し、1 頭が経過中肺炎と判断され犠牲死せしめた他は、標本の採集の目的で適宜犠牲死せしめたものである。B 群はいずれも経過中胸部 X 線上肺陰影が増強し、拒絶反応が進行したと判断されたため犠牲死せしめた。

#### B. 胸部 X 線写真所見 (図 5、6、7)

A 群では、術直後いずれも移植肺陰影度 1 度であったが、次第に肺陰影の増強を認め、術後 7 から 14 病日に肺陰影度が 2 度 1 例、3 度 5 例とピークに達した後、再び次第に肺陰影が軽快し、術後 3 週以上生存した 4 頭では、明かな肺炎を起こした 1 例を除き、犠牲死させるまで陰影度は 1 度で、再増強は認められなかった。また、経過中左胸腔内には air space は認められなかった。A 群の中で長期生存が得られた 1 例 (A-4) の経過中の胸部 X 線写真を図 5 に示したが、上述のような経過を辿っている。

一方 B 群では、いずれも術後第 2 ～ 3 病日頃より移植肺陰影の増強を認め、術後第 5 ないし 7 病日で陰影度 3 度 3 例、4 度 4 例となり、その後改善の傾向を認めなかった。術後 35 日生存した 2 頭については、犠牲死前に胸腔内に X 線上 air space が認められ、解剖にて気管支吻合部断端瘻による気胸と判明した。B 群の 1 例 (B-6) の胸部 X 線写真の変化を図 6 に示した。全例について群別に陰影度の推移をまとめると図 7 のよ

うになるが、明らかにA群において移植肺の陰影が軽快することが示されている。

#### C. 移植肺病理組織所見 (図8、9、10、11)

A群の移植肺の開胸生検または剖検所見では、視診上移植肺の表面は桃色を呈し、触診上柔らかく、含気が十分に認められた。移植側胸腔内には胸水はほとんど認められなかった。

HE染色所見では、肺組織 (図8上) においては、術後2週までは肺血管周囲を中心とした間質の浮腫ならびに肺胞内浸出液を認めるものの、単核球浸潤はまったく認められないか、ごく軽度認められるのみであった。移植後2週以後も肺血管周囲の細胞浸潤はまったく見られないかごく軽度であった。すなわちA群の移植肺組織病理所見は、Propら<sup>9)</sup>の分類を適用すると、latent phase - early vascular phaseに相当するものであった。

移植肺の吻合部近傍の気管支上皮は剖検時においても保たれており、組織学的には線毛上皮が認められた。粘膜下組織へのリンパ球浸潤はまったく見られないかごく軽度であった (図8下)。気管支吻合部はいずれも肉眼的に治癒しており、気管支瘻の形成を認めなかった。

移植肺の胸膜の組織学的所見では、肥厚した胸膜ならびに胸膜直下にリンパ球ならびにマクロファージの浸潤が中等量認められた。

一方B群では、視診上移植肺は第5病日頃より表面色調が灰色ないし暗赤色となり、また触診上では弾性硬で、含気がほとんど無い、あるいは非常に低下している状態であることが認められた。移植側胸腔内には中等量漿液性胸水を認めた。

HE染色組織所見では、肺組織においては、第2病日までは肺血管周



囲を中心とした間質の浮腫ならびに肺胞内浸出液が主体であるが、第3病日から間質では肺血管、特に中小静脈の周囲にリンパ球を主体とした単核球の浸潤を認めた。また、肺胞内ではマクロファージの増加を認めた。さらに第5～7病日においては、その浸潤が高度となり、肺胞壁にも同様の細胞による浸潤を認めた(図9上)。浸潤細胞は主にリンパ球であったが、好酸球および形質細胞も認められた。Prop分類<sup>9)</sup>に準じれば、B群移植肺は第3病日にはlate vascular phase、第5～7病日にはalveolar - destructive phaseに相当すると考えられた。第14病日以後は移植肺は壊死に陥り、中小肺動静脈内には血栓が認められ、血流が途絶されたことが確かめられ、拒絶が完成されたと考えられた。

移植肺の気管支吻合部近傍の内腔上皮は、剖検時には第5～7病日死亡例では剖検時に扁平上皮化生を認め(図9下)、それ以上の生存例では上皮の脱落を認めた。粘膜下組織にはリンパ球浸潤を認めた。35日生存した2例では、いずれも肉眼的に気管支吻合部に瘻孔を認めた。

移植肺の肺胸膜の組織学的所見では、肥厚した胸膜ならびに胸膜直下にリンパ球ならびにマクロファージの浸潤が中等量認められたが、肺胸膜への細胞浸潤の程度についてはA群と大差は認められなかった。

A・B両群全体について、Prop分類に準じて経過中の移植肺組織所見をまとめて図10に示した。また、肺血管・肺胞壁・胸膜へ浸潤した単核球細胞数について図11に示した。単位当り細胞数は、左右別ではいずれの部位においても両群とも左肺(移植肺)が右肺に比べて有意に細胞数が多かった。また、両群における移植肺の肺血管周囲浸潤細胞数では、A群  $12.3 \pm 27.3$ 、B群  $63.8 \pm 38.5$  (血管壁100 $\mu$ m長あたりの平均 $\pm$ 標準偏差)と、A群が有意に浸潤細胞数が少なかった( $P < 0.005$ )。また肺胞壁浸潤細胞数においても、A群  $2.94 \pm 2.48$ 、B群  $22.0 \pm 31.6$  (100 $\mu$ m

平方あたりの平均±標準偏差)と、A群が有意に少なかった( $P<0.005$ )。一方、胸膜浸潤細胞数では、A群  $15.3\pm 9.34$ 、B群  $16.8\pm 9.15$ (100 $\mu$ m平方あたりの平均±標準偏差)と、両群間に有意差を認めなかった。

移植肺のGram染色では、B群の拒絶進行例については、組織中に特に細菌像を認めなかった。

#### D. 免疫染色所見(図12、13、14、15)

SAB法による染色性を脾組織を基準として検討したが、良好な染色性が得られた。CD4,8陽性リンパ球は、その抗原を細胞膜表面に有するため、細胞周囲が環状に染色された(図12上)。肺組織においてもCD4,8陽性リンパ球は同様に染色された。なお、肺組織で一次抗体を用いないnegative controlでは、好中球の一部が非特異的に染色されたが、細胞質全体が染色されるためにリンパ球とは容易に鑑別できた(図12下:移植肺組織におけるCD8陽性細胞の染色所見の例)。

肺血管周囲の染色陽性の単核球の数について検討を加えた。CD8陽性細胞について、図13下に各検体における血管壁100 $\mu$ mあたりの数を示した。B群では、CD8陽性細胞は第2病日から認められ、日数の経過につれて次第に増加する傾向が認められた。一方A群においても、第5病日の検体からCD8陽性細胞が認められたが、同時期のB群と比較すると明らかに少ない傾向があった。また、経過中特に浸潤細胞数の増加傾向は認められなかった。CD4陽性細胞(図13上)はB群においてその出現がCD8よりもやや遅れるが、B群では日数の経過にともない次第に増加する傾向がみられた。一方A群では、B群よりもCD4陽性細胞は少ない傾向にあり、また経過中増加傾向が認められなかった。

図14にCD4, 8陽性細胞の肺血管周囲浸潤数の群別・左右別の平

均値（血管壁100 $\mu$ m長あたりの平均 $\pm$ 標準偏差）を示した。移植肺中のCD8陽性細胞は、A群  $5.61 \pm 4.47$ 、B群  $8.65 \pm 3.77$ と、有意にA群において少なかった（ $P < 0.05$ ）。またCD4陽性細胞数もA群  $3.37 \pm 2.42$ 、B群  $9.68 \pm 6.55$ と、有意にA群において少なかった（ $P < 0.05$ ）。

A群各例における末梢血リンパ球中のCD4・8陽性率の変化を図15に示した。CD4については、術前平均値が $38.8 \pm 2.94\%$ （平均 $\pm$ 標準偏差）で、術後は第7病日までの早期平均が $44.1 \pm 17.2\%$ 、第8～第30病日までの平均が $47.6 \pm 19.8\%$ と、平均値としては上昇傾向にあるが、いずれも有意差は得られなかった。CD8については、術前平均値が $50.5 \pm 11.4\%$ 、術後第7病日まで平均 $42.6 \pm 21.8\%$ 、第8～第30病日までの平均が $47.6 \pm 13.8\%$ とやや減少傾向にあるが、いずれも有意差は得られなかった。

E. FK506血中濃度（図16）：A群におけるFK506血中濃度は、術後1.06 - 1.81ng/mlのレベルに保たれていた。血中濃度は第2～3病日には平均1.81ng/mlであり、早期に十分な濃度に達することが示された。

F. 血液生化学検査（図17）：A群における術前および術後の血液生化学の検査値では、A/G比が術後に有意に低値であった他はいずれも有意差を認めなかった。また術後のA・B群の比較では、総ビリルビン、クレアチニン、GOT値がいずれもA群において有意に低値であった。以上の所見から、本実験におけるFK506投与量においては肝腎障害をきたさないと考えられた。A/G比は有意でないが非投与群でも低下傾向にあり、むしろ手術侵襲による影響がA/G比低下に関係あると考えられた。



#### § 4. 考察

本研究のニホンザルにおける実験的同種同所性左片肺移植において、FK506投与は胸部X線写真所見および移植肺組織所見から明らかに移植肺の急性拒絶反応の抑制および移植肺の生着延長効果を有することが認められた。また、FK506の単独投与により、大きな副作用を見る事なく、十分な免疫抑制効果が得られることが示された。

現在の肺移植の臨床における免疫抑制療法のプロトコールでは、ステロイド投与に伴う組織修復遅延や易感染性がもたらす重大な副作用を回避するため、種々の工夫が行われている。Cooperら<sup>8)14)</sup>は術直後にはCsA, AZTおよび抗胸腺グロブリンを用い、急性拒絶の発生がなければ術後気管支吻合部の十分治癒したと考えられる第3週以後に、少量のprednisoloneを開始する、としている。Reitzら<sup>15)</sup>も心肺移植において術直後に1回Methylprednisolone 500mgを投与した後は2ないし3週間は原則としてステロイドを使用しないとしている。またKhaghaniら<sup>16)</sup>は心肺移植術中にmethylprednisoloneを使用する以外は、CsA, AZTの2剤による免疫抑制療法を基本的なプロトコールとしており、術後3回以上急性拒絶反応のエピソードがあったものについてのみ、ステロイド経口投与の適応としている。以上のように、主要な臨床報告においてはステロイド投与を極力制限する傾向にあるが、しかし、同じくKhaghaniら<sup>16)</sup>によれば、最初の1年で肺に平均3.6回の拒絶反応のエピソードが認められたとも報告されている。心肺移植の急性拒絶反応の診断は肺生検のみで十分である、という報告も認められ<sup>17)</sup>、移植肺は移植心と比較しても、従来の免疫抑制療法によっては拒絶反応を回避することが困難な臓器であるといえる。



FK506を用いた免疫抑制療法は、臨床ではPittsburgh大学において<sup>18)</sup>肝移植術後CsA抵抗性の急性拒絶反応のrescue therapyの1プロトコールとして始められ、その良好な結果が発表された後、次第に広く臨床応用がなされるようになりつつあるが、肺および心肺移植においては数例の臨床応用がなされたのみであり<sup>19)</sup>、統計学的評価は未だなされていない。

FK506の至適投与量についてはヒトおよび種々の動物において検討がなされている。ヒトでは急性期0.15mg/kg/day静脈注射、経口摂取可能後は0.15mg-0.3mg/kg/day 経口で十分な免疫抑制効果が得られたと報告されている<sup>20)</sup>。ラットでは1-1.28mg/kg 筋肉内注射<sup>21), 21)</sup>、イヌで0.16mg/kg/day筋肉内注射<sup>22)</sup>によって十分な免疫抑制効果が得られたと報告されている。他の霊長類においては、Cynomolgus monkey (肝移植)で1mg/kg/day筋注(10mg/kg/day経口)<sup>23)</sup>ヒヒで2.0mg/kg/day筋注(腎移植)とFK506投与量がややヒトよりも多い<sup>24)</sup>。ヒヒではMLR抑制のためのin vitro FK506 濃度が高いことが示唆されているが<sup>24)</sup>、ニホンザルに対するFK506の免疫抑制効果についてはin vitro, in vivoいずれも未だに検討されていない。今回のわれわれのニホンザルにおける検討ではヒト、イヌと同程度量のFK506の単独投与にて十分な免疫抑制効果が得られた。この原因としては、種差による感受性の違いがその1つと考えられる。また、FK506の肺内濃度は他臓器や血中濃度よりも高いことがラットにおいて示されており<sup>25)</sup>、比較的少量で移植肺の免疫抑制効果が得られる原因の1つではないかと考えられる。

ニホンザルを用いた同様の実験では、同種同所性心肺移植実験の報告があり<sup>26)</sup>、CsA 25mg/kg/dayの筋肉内投与により長期生存が得られており、これと比較すればFK506の免疫抑制効果はCsAの50分の1ない

し160分の1の投与量で達成されるといえる。

移植肺の拒絶反応の診断は肺移植術後管理において重要であるにも関わらず、その発現が非特異的であることと、肺感染症との鑑別が困難であることから問題となっているところである。末梢血液所見からの診断は現在のところ確定的なものはなく、臨床的には術後早期には呼吸困難、チアノーゼなどの臨床症状および胸部X線写真所見が最も重要であるとされている。後期には臨床症状、呼吸機能（一秒量低下）が早期発見に重要で、経気管支鏡的肺生検ならびに気管支肺胞洗浄液検査、胸部単純X線写真所見が最も信頼できる方法である<sup>17)27)</sup>。

本研究においても、移植肺拒絶反応の判定には臨床に即して胸部X線写真所見並びに肺生検H.E染色所見を拒絶反応判定の基準とした。胸部X線写真所見ではFK506投与群においても第7～14病日において、いったん移植肺陰影が増強するが、同時期の組織所見では肺間質への細胞浸潤は無いしごく軽度で、主に肺胞腔内浸出液貯溜および間質浮腫が主たる所見であった。ヒヒを用いた自家肺移植実験において術後移植肺陰影の回復には4～6週を要したという報告<sup>28)</sup>を参考にすれば、本研究における術後早期の胸部X線陰影、特にFK506投与群における陰影は、いわゆるreimplantation response<sup>29)</sup>と呼ばれる移植肺間質の浮腫を主体とした変化を反映したものと考えられた。

これに対して非投与群では移植肺の陰影は、ほぼ一方行性に増強し、第7病日までにはほぼ不透明化し、殆ど機能を有さなくなったと考えられた。この所見はreimplantation responseよりも高度な単核球浸潤による血管壁・肺胞肥厚をより反映していると考えられた。

すなわち、胸部X線写真上の陰影増強は拒絶反応の進行に対応するものと考えられたが、肺炎例(A-5)においても陰影は増強し、最終的に含気

が失われた。つまり、移植肺のX線写真上陰影増強は、肺内におけるなんらかの病変の進行を示唆するものであるが、拒絶反応に必ずしも特異的なものではなく、注意が必要である。

移植肺組織HE染色所見においては、非投与群と比較して、FK506投与群では明らかに肺血管周囲・肺胞壁への単核球浸潤が少ないことが本研究において示された。すなわち、FK506投与群においては経過中いずれも肺胞腔は保たれ、肺胞壁の肥厚は認められず、時に肺血管周囲に少数の単核球浸潤を認めるのみであった。Propら<sup>13)</sup>がラットによる実験的肺移植の組織所見について病期を定めているが、これに従うとFK506投与群における移植肺はいずれも latent phase - early vascular phaseに相当すると考えられた。一方、非投与群においては、第3病日には late vascular phase、第5～7病日となると alveolar - destructive phaseに達した。以上の組織学的所見から明かにFK506投与群では急性拒絶反応が抑制されたと判定できた。

拒絶反応の診断法として、末梢血中のリンパ球分画の変化から判定が行えれば簡便である。末梢血リンパ球のCD4、CD8陽性率については、臨床の腎移植で検討がなされているが、CD4/CD8陽性比については拒絶の進行によって低下する<sup>30)</sup>という報告や、逆に増加する<sup>31)</sup>という報告がみられるなどまちまちであり、また拒絶反応とは対応していないという報告<sup>32)33)34)</sup>も認められ、末梢血リンパ球のCD4/CD8陽性比の変化は急性拒絶反応の診断法としては問題があると考えられる。本研究においても、FK506投与群各例について術前ならびに術後各時期のCD4、CD8陽性率について検討を行ったが、一定の傾向を得られなかった。その原因としては、上述のように移植組織局所の変化を末梢血では捉えられなかったとも考えられるが、FK506によって十分な免疫抑制が得られたこと



もその一因と考えられる。さらに本研究におけるFK506投与量においては、末梢血リンパ球のCD4、CD8陽性率に影響を与えない、ということも示唆された。

全身的な検査では正確な診断が困難なため、移植組織局所における細胞性免疫のモニタリングが拒絶反応診断に重要であると考えられる。肺移植においては、ラットを用いた実験的検討において末梢血ならびに移植肺のBronchoalveolar lavage(BAL)中リンパ球の helper T / non-helper T細胞数比の検討がなされている<sup>35)36)</sup>が、末梢血では有意な変化が認められない一方、BALでは拒絶反応の進行にともない、この比率が有意に低下することが示された<sup>36)</sup>。即ち、BALリンパ球の由来する移植肺内のリンパ球の動態を直接求めることが重要と考えられた。

移植組織そのものに対する免疫学的検討は腎移植臨床例において既に行われている。移植腎間質のリンパ球分析において、拒絶反応の発現とともにCD3陽性細胞(T細胞)が他疾患と比較して有意に増加し、またCD3+増加の原因はCD8+細胞の増加であり、CD4+は有意な増加を認めないことが報告された<sup>37)38)</sup>。細胞性免疫の機序からすれば、マクロファージ等の抗原提示細胞がhelper/inducer T cellを賦活させ、これが cytotoxic T cellを誘導させるわけであるから、CD4+細胞も早期から出現すると考えられるが、実際の組織所見ではCD4+細胞がCD8+細胞に先立ち明かに増加する所見は得られていない。移植術後非常に早期にいったんCD4+細胞が減少するという報告<sup>39)</sup>があり、免疫抑制療法や手術侵襲がCD4+細胞を減少させている可能性もある。また、拒絶腎組織におけるCD8+リンパ球の多くはCD11b陽性(cytotoxic T cell)であり<sup>40)</sup>、急性拒絶反応における移植組織の病理学的所見は、移植組織に直接障害を与える役割であるcytotoxic T cellが集合した状態を示しているものとも考



えられる。

本研究における移植肺の免疫組織染色でも、非投与群において第2病日より肺血管周囲の単核球にCD8陽性細胞が認められ、その数はCD4陽性細胞より多く、また期間中次第に増加する傾向にあった。一方、FK506投与群では、移植肺血管周囲におけるCD4・8陽性細胞数は明らかに非投与群よりも少なく、また、経過中増加傾向は認められなかった。即ち、拒絶反応早期からCD8陽性細胞が移植肺に出現し、また腎移植における報告と同様に、拒絶反応の進行によってCD4、CD8陽性細胞、殊にCD8+が増加することが示されたと考えられる。

## § 5. まとめ

ニホンザルを用いた左肺同種同所性移植におけるFK506の免疫抑制効果について検討を行った。FK506投与群には、術後当日～第6病日 0.5mg/kg、第7病日以後0.15mg/kgのFK506筋注を行った。術後投与群では、最高182日の生存（移植肺生着）を得たが、投与群と非投与群を比較すると、

1. 胸部X線写真所見上FK506投与群においては術後第7～14病日にいったん移植肺の陰影が増強し、その後次第に陰影が軽快した。これに対し、非投与群においては移植肺の陰影は第5～7病日で含気を失い完全に不透明化し、以後軽快しなかった。

2. 移植肺のHE染色所見においては、拒絶反応の程度はFK506投与群においてはProp分類にて latent ないしearly vascular phase に

とどまっていた。これに対し、非投与群においては第3病日より間質の肺血管周囲の単核球浸潤および肺胞内マクロファージの遊走が認められ、Prop分類の late vascular phaseに相当した。また、第5病日になると肺胞壁細胞浸潤、壁肥厚が認められ、alveolar-destructive phaseへと進行した。

3. 移植肺の免疫組織染色においては、FK506投与群では肺血管周囲のCD4, CD8染色陽性細胞が非投与群に比べて有意に少なかった。非投与群においては第2病日より肺血管周囲に主にCD8染色陽性細胞が認められ、HE所見に平行し、拒絶所見が高度になるにつれてCD4, CD8染色陽性細胞数が増加する傾向にあった。一方、FK506投与群における末梢血中リンパ球のCD4, CD8陽性率の術後変化については、一定の傾向を示さなかった。

4. 投与群ではFK506の術後血中濃度は 1.06 - 1.81ng/ml程度にほぼ一定に保たれた。期間中血液生化学検査においてFK506が原因と思われる肝・腎機能障害を示唆するものは認められなかった。

以上より、ニホンザル同種同所性左片肺移植において、FK506の単独投与によって十分な免疫抑制効果が得られたと結論した。

実験の実施に際しては、『動物の保護及び管理に関する法律』ならびに『実験動物の飼育及び保管などに関する基準（昭和55年3月27日総理府告示第6号）』を遵守した。

§ 6. 参考文献

- 1) Kriett, J.M., and Kaye M.P. : The registry of the international society for heart transplantation: Eighth official report- 1991. J Heart Lung Transplant 10:491-498, 1991
- 2) Goto T., Kino T., Hatanaka H., Nishiyama M., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., and Imanaka H.: Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. Transplant Proc 19(suppl 6):4-8, 1987
- 3) Tanaka H., Kuroda A., Marusawa H., Hashimoto M., Hatanaka H., Kino T., Goto T., and Okuhara M.: Physicochemical Properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. Transplant Proc 19(suppl 6):11-16, 1987
- 4) Kino T., Inamura N., Sakai F., Nakahara K., Goto T., Okuhara M., Kohasaka M., Aoki H., and Ochiai T.: Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. Transplant Proc 19(suppl 6): 36-39, 1987
- 5) 別宮好文 細胞性免疫に対するFK506の抑制効果。 移植 26: 72-81, 1991
- 6) Honbo T., Kobayashi M., Hane K., and Ueda Y.: The oral dosage

form of FK-506: Transplant Proc 19(suppl 6):17-22, 1987

7) Murase N., Todo S., Lee P-H., Lai H-S., Chapman F., Nalesnik MA., Makowka L, and Starzl TE. : Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506 alone or with cyclosporine. Transplant Proc 19(suppl 6):71-75, 1987

8) Cooper JD., Pearson FG., Patterson GA., Todd TRJ., Ginsberg RJ., Goldberg M., and DeMajo WAP: Technique of successful lung transplantation in humans. J Thorac Cardiovasc Surg 93:173-181, 1987

9) Prop J., Wildevuur CRH., and Nieuwenhuis P.: Lung allograft rejection in the rat. II Specific immunological properties of lung grafts. Transplantation 40:126-131, 1985

10) 森 茂郎 免疫組織学の現況。 - 抗体と技術面 -  
臨床免疫 19 (Suppl 11):150-155, 1987

11) 中島 淳、進藤 剛毅、宮入 剛、近田正英、大岩 博、大塚 俊哉、  
窪田 博、古瀬 彰、岡 輝明: 抗モノクローナル抗体を用いたニホン  
ザル肺移植拒絶反応の免疫病理組織学的検討。  
日胸外会誌 39:1980-1986, 1991

12) Murayama, V., Fukao, K., Noguchi A., and Takenaka O.: Epitope



expression on primate lymphocyte surface antigens.

J Med Primatol 14:215-220, 1986

13) Tamura K., Kobayashi M., Hashimoto K., Kojima K., Nagase K., Iwasaki K., Kaizu T., Tanaka H., and Niwa M.: A highly sensitive method to assay FK506 levels in plasma.

Transplant Proc 19(Suppl 6):23-29, 1987

14) Cooper JD.: Lung transplantation. Heart and heart-lung transplantation. (edited by Baumgartner, WA., Reitz BA., and Achuff SC.) Saunders Co., Philadelphia, USA, 1990.

15) Reitz BA. Heart and lung Transplantation. Heart and heart-lung transplantation. (edited by Baumgartner, WA., Reitz BA., and Achuff SC.) Saunders Co., Philadelphia, USA, 1990.

16) Khaghani A., Banner N., Ozdogan E., Musumeci F., Theodoropoulos S., Aravot D., Fitzgerald M., and Yacoub M.:

Medium-term results of combined heart and lung transplantation for emphysema. J Heart Lung Transp 10:15-21, 1991

17) Higenbottam T., Mutler JA., Stewart S., and Wallwork J.:

Transbronchial biopsy has eliminated the need for endomyocardial - biopsy in heart-lung recipients. J Heart Transplant 7:435-9, 1988

18)Fung JJ., Todo S., Jain A., McCauley J., Alessiani M., Scotti C.,and Starzl TE.: Conversion from cyclosporine to FK506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. Transplant Proc 22(Supple 1):6-12, 1990

19)Keenan RJ.,Bruzzone P., Paradis IL., Yousem SA.,Dauber JII., Stuart RS., and Griffith BP.: Similarity of pulmonary rejection patterns among heart-lung and double-lung transplant recipients. Transplant Proc.23:1162-1164, 1991

20)Jain AB., Fung JJ., Venkataramanan R., Todo S., Alessiani M, and Starzl TE.: FK506 Dosage in human organ transplantation. Transplant proc 22(Suppl 1):23-24, 1990

21)Lim SNL, Thiru S., and White DJG. :Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506: Transplant proc 19 (suppl 6):68-70, 1987

22)Ochiai T., Nagata M., Nakajima K., Sakamoto K., Asano T., and Isono K.: Prolongation of canine renal allograft survival by treatment with FK-506:Transplant proc 19:53-56, 1987

23)Monden M., Gotoh M., Kanai T., Valdivia LA., Umeshita K., Endoh W., Nakano Y., Kawai M., Ohzato H., Ukei T., Dono K.,

Tono T., Murata M., Wang KS., Okamura J., Tanimoto Y., Hashimoto M., and Mori T : A potent immunosuppressive effect of FK506 in orthotopic liver transplantation in primates.: Transplant Proc 22(suppl 1):66-71, 1990

24)Imventarza O, Todo S., Eiras G., Ueda Y., Furukawa H., Wu YM., Zhu Y., Oks A., Demetris J., and Starzl TE: Renal transplantation in baboons under FK506. Transplant Proc 22(suppl 1):64-65, 1990

25)Venkataramanan R., Jain A., Cadoff E., Warty V., Iwasaki K., Nagase K., Krajack A., Imventarza O., Todo S., Fung JJ., and Starzl TE. Pharmacokinetics of FK506: Preclinical and clinical studies. Transplant Proc 22(Suppl 1):52-56, 1990

26)川内基裕、古瀬 彰、進藤剛毅、松永 仁、マテイソン恵、横井 泰、中島 淳、吉竹 毅、鈴木安弘、浅野献一：日本猿による同種同所心肺移植の検討。日本胸部外科学会雑誌 37:455-461, 1989

27) Higenbottam T.: Physiology of the transplanted lungs and the results. Heart and heart-lung transplantation (edited by Wallwork J.) pp523-531: Saunders Co. Philadelphia, USA, 1989

28)Tsazi SH., Arnar O., and Haglin JJ.: Roentgenographic appearance of the transplanted primate lung. The autotransplanted lung. Am J Roentogenol 106:563-566, 1969

29) Prop J., Ehrie, MG., Crapo JD., Nieuwenhuis NCP., and Wildevuur CRH: Reimplantation response in isografted rat lungs.  
J Thorac Cardiovasc Surg 87:702-711, 1984

30) Van Es A., Meyer CJLM., Oljans PJ., Tanke HJ., and Van Es LA.: Mononuclear cells in renal allografts. Correlation with peripheral blood T lymphocyte subpopulations and graft prognosis.  
Transplantation 37:134-139, 1984

31) Binkley WF., Valenzuela R., Braun WE., Deodhar SD., Novic AC., and Steinmuller DR.: Flow cytometry quantitation of peripheral blood (PB) T-cell subsets in human renal allograft recipients.  
Transplant Proc 15:1163-1165, 1983

32) Carter NP., Cullen PR., Thompson JF., Bewick ALT., Wood RFM., and Morris PJ.: Monitoring lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients. Transplant Proc 15:1157-1159, 1983

33) Guttman RD. and Poulsen RS.: Fluorescence activated cell sorter analysis of lymphocyte subsets after renal transplantation. Transplant Proc 15:1160-1162, 1983

34) McWhinnie DL., Thompson JF., Taylor HM., Chapman JR., Bolton EM., Carter NP., Wood RFM., and Morris PJ.: Morphometric analysis



of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies.

Transplantation 42:352-358, 1986

35) 東 憲太郎、金田正徳、坂井 隆、鈴木 聡、井村 正史、齊藤圭治、武内義広、木村 誠、森本 保、矢田 公、草川 實：Rat肺移植の実験的研究 ―モノクローナル抗体を用いたrejection monitoringの検索―  
移植 20:653-661, 1985

36) 斎藤 亮、近藤 丘、藤村重文、半田政志、一ノ瀬高志、白石裕治、仲田 祐：ラット肺移植における気管支肺胞洗浄液リンパ球による拒絶反応早期診断の研究。 移植 24:262-269, 1989

37) Platt JL., LeBien TW., and Michael AF.: Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections.  
J Exp Med 155:17-30, 1982

38) 大坪 修、川口 浩、前田時彦、西村光世、柳沢孝己、野崎治重、竹田 泰、富川伸二、高橋郁夫、山内 潤、秋山揚夫、若林とも、森 茂郎：モノクローナル抗体を用いた移植腎病理学的所見。  
移植 19: 215-219, 1984

39) Ellis TM., Mohanakumar T., Muakkassa W., Lower RR., and Lee HM.: Influence of immunosuppressive therapy and blood transfusion

on human T-cell subpopulations. Transplant Proc 15:1173-1175, 1983

40)Preffer FI., Colvin RB., Leary CP., Boyle LA., Tuazon TV.,  
Lazarovits AI., Cosimi AB., and Kurnick JT.: Two-color flow cyto-  
metry and functional analysis of lymphocytes cultured from human  
renal allografts: identification of a Leu-2+ 3+ subpopulation.  
J Immunol 137:2823-2830, 1986

### 図表の説明

図1：肺陰影度の段階分類。1度(Grade 1)から4度(Grade 4)までそれぞれ典型的な例を示した。

図2：移植肺の病理組織学的変化の分類例(HE染色、x100)。

左上：latent-early vascular phase    右上：late vascular phase  
左下：alveolar phase    右下：destructive phase

図3：免疫組織染色法フローチャート。

図4：フローサイトメトリのチャート。

図5：A群(A-4)1例の胸部X線写真の変化(POD:病日、Grade:X線写真所見における移植肺陰影度)。

図6：B群(B-6)1例の胸部X線写真の変化(POD:病日、Grade:X線写真所見における移植肺陰影度)。

図7：A・B群全体の胸部X線写真所見(移植肺の陰影度)の術後経時的変化。

図8：A群の移植肺HE染色所見の1例(A-4、182POD。上図：肺組織。下図：気管支吻合部近傍内腔、x100)。

図9：B群の移植肺HE染色所見の1例(B-6、6POD。上図：肺組織。

下図：気管支吻合部近傍内腔、x100）。

図10：A・B群全体の移植肺組織H E染色所見の術後経時的変化。

図11：H E染色所見におけるA・B群それぞれの移植肺（左肺）および自己肺（右肺）内の単核球細胞浸潤数（平均値±標準偏差）。左図：肺血管周囲浸潤数（血管壁長100 $\mu$ mあたり）。中央：肺胞壁浸潤数（肺胞100 $\mu$ m平方あたり）。右図：胸膜・胸膜下浸潤数（胸膜100 $\mu$ m長あたり）。

図12：モノクローナル抗体による脾・移植肺組織の免疫染色所見の1例。細胞表面にCD8抗原を有する細胞は環状に茶色に染色されている。

上図：ニホンザル 脾 抗CD8(Leu-2a) x100

下図：ニホンザル No.B-6,第3病日 左肺 抗CD8 x125

図13：移植肺組織各検体の肺血管周囲におけるCD4・8染色陽性細胞数（各検体の平均±標準偏差/血管壁100 $\mu$ m）。上図：CD4 下図：CD8

図14：A・B群別の移植肺および右肺（両群）内肺血管周囲CD4・8陽性細胞数（肺血管壁100 $\mu$ mあたり）平均値の比較。

図15：A群（FK投与群）末梢血リンパ球中のCD4・CD8陽性率の変化。上段：CD4 下段：CD8

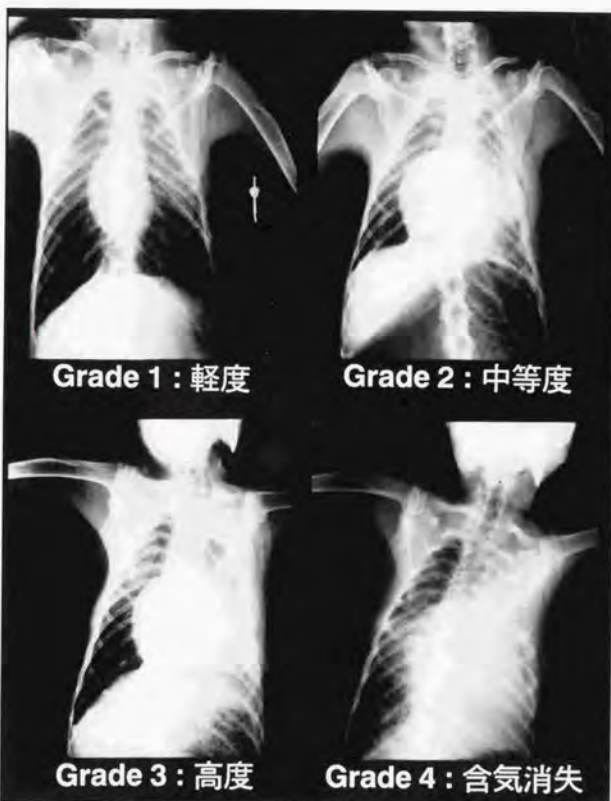
図16：FK506血漿中濃度の経時的変化。A群全例の平均値。

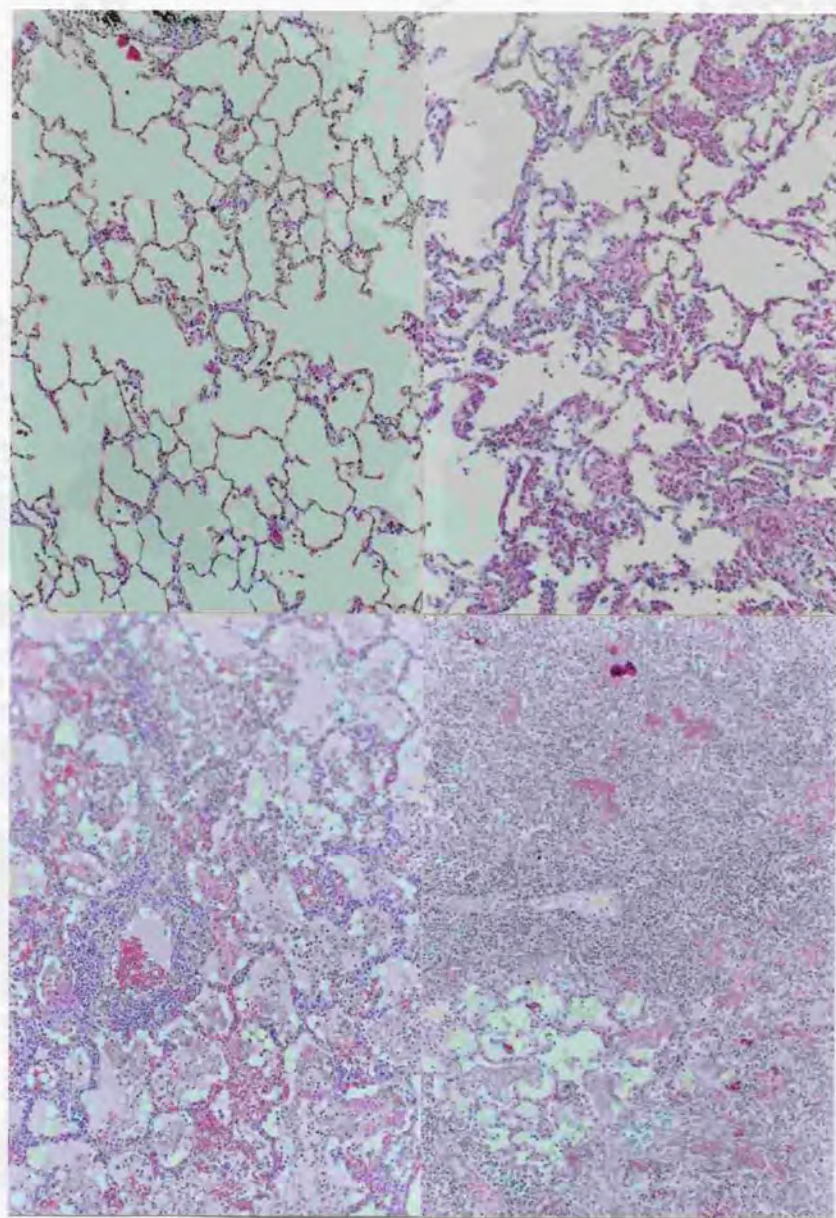


図17: 血液生化学データ。A群の術前値、A群の術後死亡前の値、B群の術後死亡前の各群の平均値を示す。

表1: FK506投与プロトコール。

表2: 移植成績・手術時間・移植肺虚血時間。



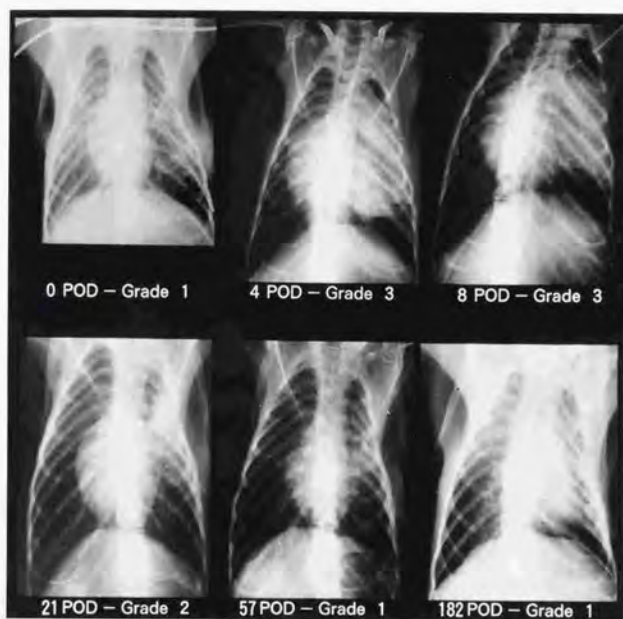


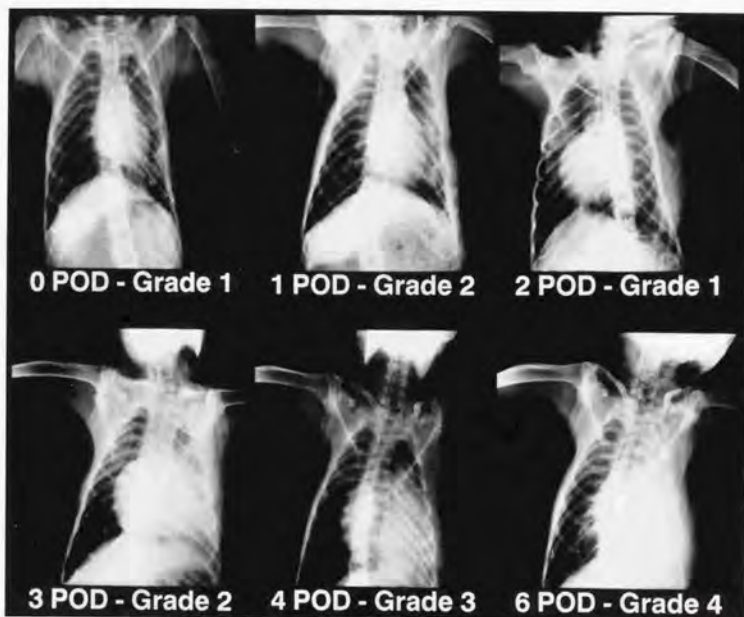
< 图 2 >

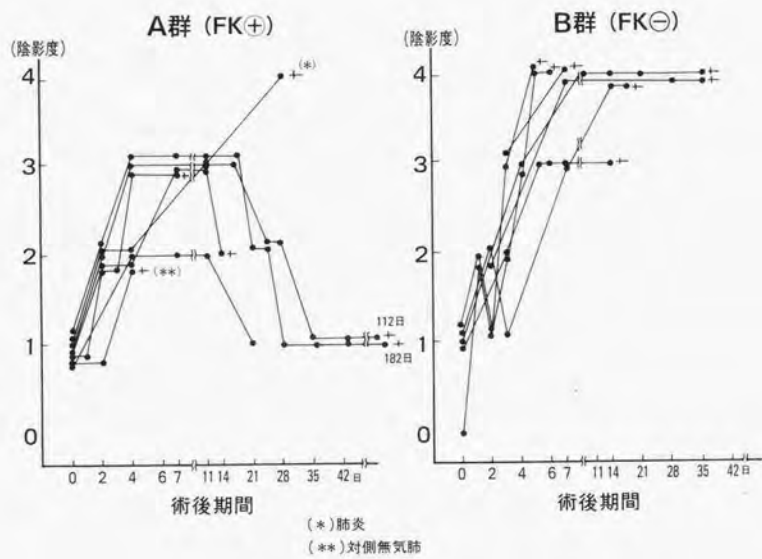




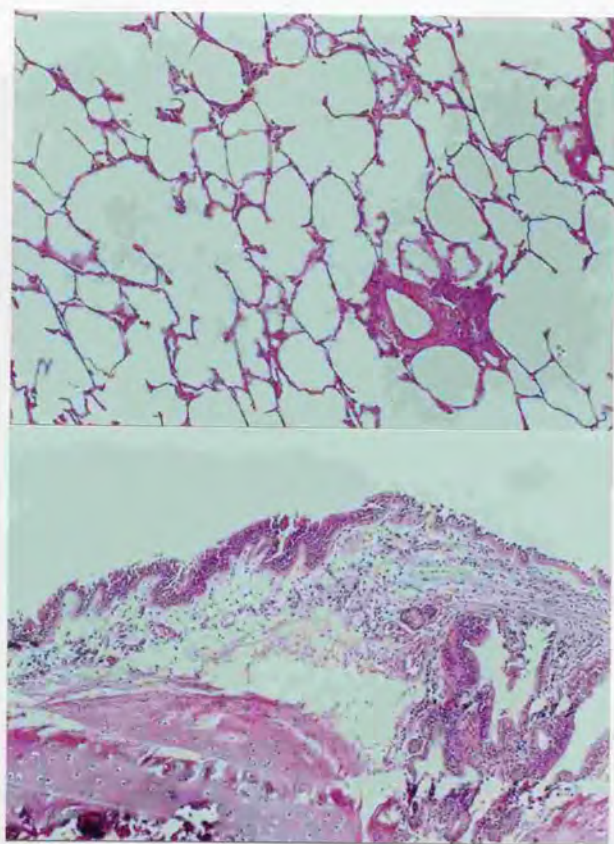


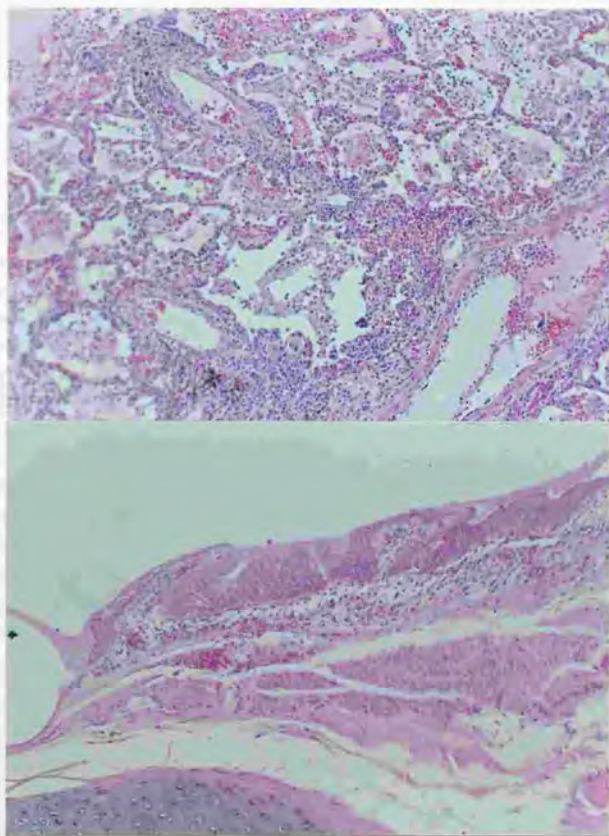


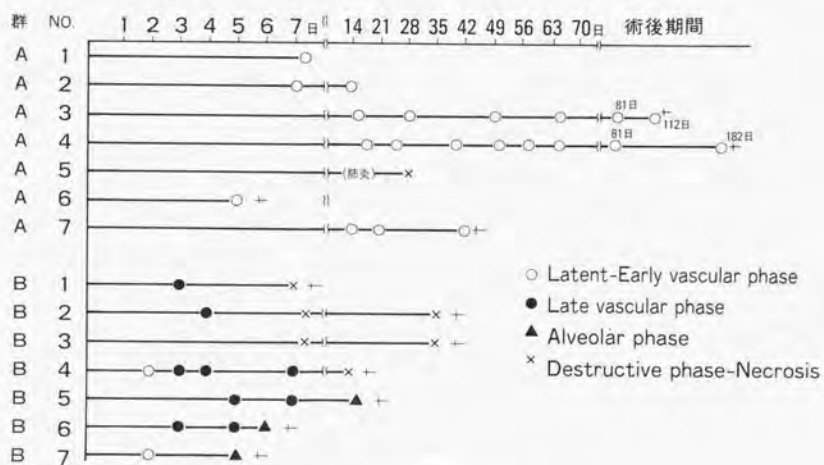




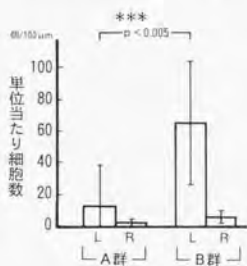




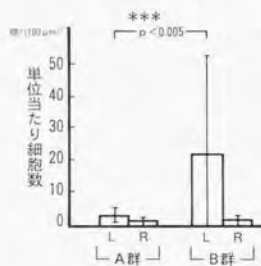




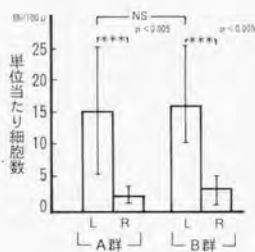
肺血管周囲浸潤細胞数



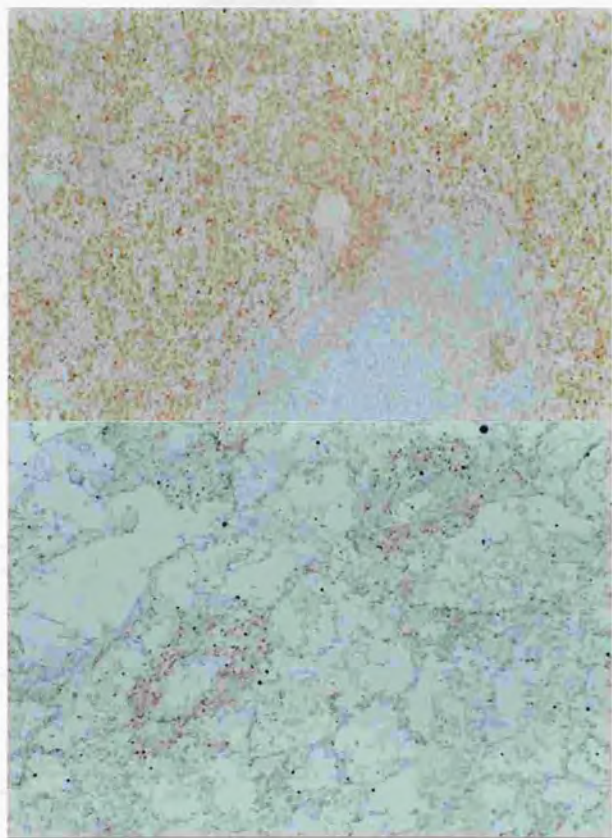
肺胞壁浸潤細胞数

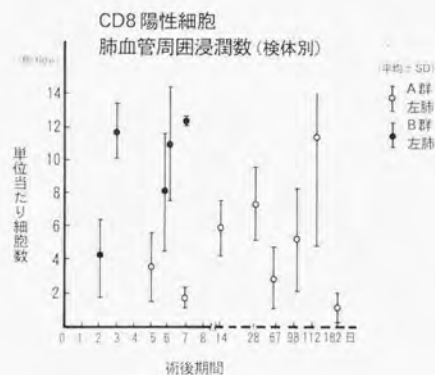
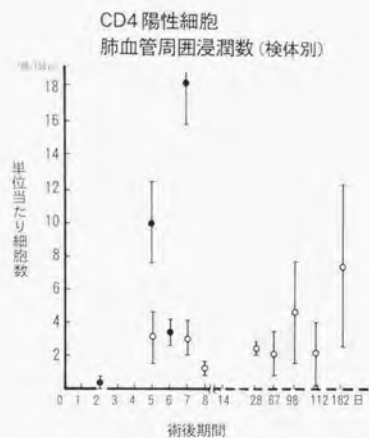


肺胸膜浸潤細胞数

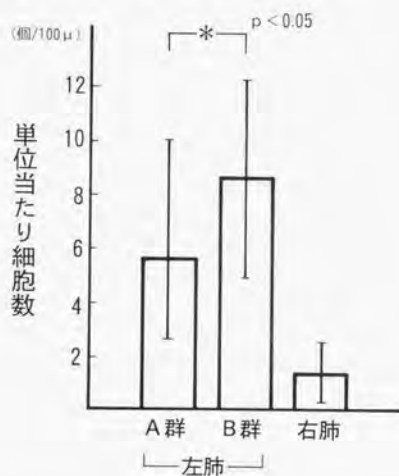




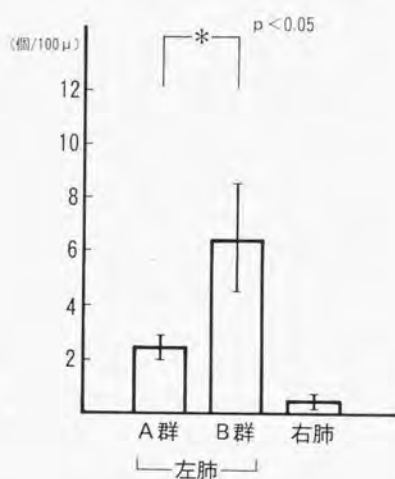


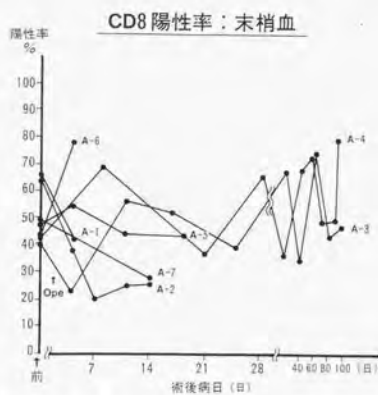
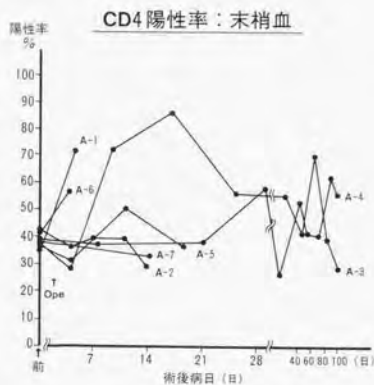


CD8 陽性細胞  
肺血管周囲浸潤数



CD4 陽性細胞  
肺血管周囲浸潤数

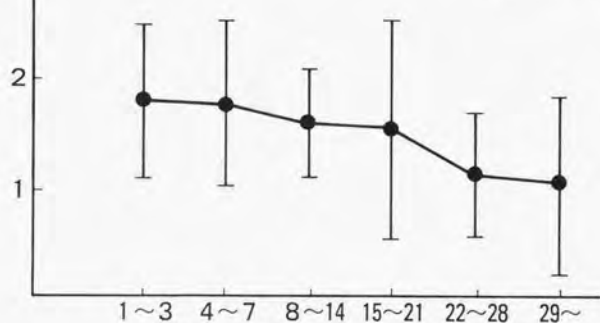




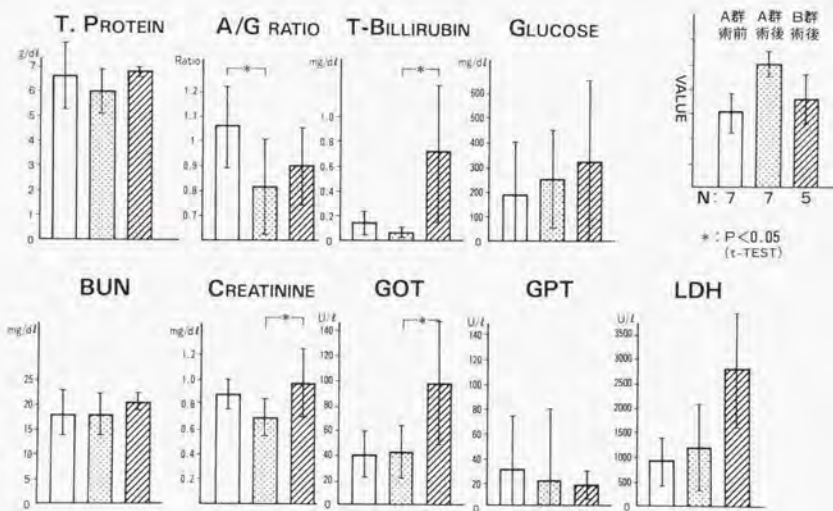


血漿 FK506 濃度  
(ng/ml)

(Mean  $\pm$  SD)



術後病日(日)



群	例数	術後免疫抑制療法
A 群	7	FK506 0.5mg/kg/day 筋肉内投与(第0~6病日) 同 上 0.15mg/kg/day 筋肉内投与(第7病日以後)
B 群	7	FK506 非投与, 他の免疫抑制剤も非投与

No.	FK 506 投 与	Recipient weight(kg)	Donor weight	移 植 肺 虚血時間	生 存 (日)	死因
A-1	+	9.1	8.9	60分	8	犠性死
A-2	+	8.4	8.0	45	14	犠性死
A-3	+	9.2	8.2	55	112	犠性死
A-4	+	8.5	8.3	52	182	犠性死
A-5	+	7.4	7.4	60	28	犠性死 (肺炎)
A-6	+	7.4	7.4	60	5	対側無気肺
A-7	+	9.0	7.2	45	42	犠性死
B-1	-	12.0	10.0	60分	7	犠性死
B-2	-	13.0	8.5	60	35	犠性死
B-3	-	10.0	13.0	30	35	犠性死
B-4	-	8.5	8.5	50	14	犠性死
B-5	-	11.0	9.0	52	17	犠性死
B-6	-	11.0	7.6	43	6	犠性死
B-7	-	10.4	7.6	60	5	犠性死



