

ラット心移植および肺移植モデルにおける 抗 $\alpha\beta$ T細胞受容体抗体投与による 生着延長効果に関する研究

新潟大学医学部外科学教室第二講座（主任：江口昭治教授）

渡 辺 健 寛

The Effect of Anti- $\alpha\beta$ T Cell Receptor Antibody in
Rat Heart Transplantation and Lung Transplantation

Takehiro WATANABE

*Second Department of Surgery,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoji EGUCHI)*

It was previously demonstrated that preoperative administration of anti- $\alpha\beta$ T cell receptor monoclonal antibody (R73) induced specific unresponsiveness to heart and kidney allografts in a fully MHC incompatible rat strain. In this study, the part of this mechanism was examined by molecular technique. Heterotopic heart and orthotopic left lung transplantation were performed. Experimental groups were divided as follows: Group 1, control group which were injected control antibody once a day for two consecutive days, beginning two days before transplantation. Group 2, preoperative treatment group which were injected R73 for two days as group 1. Group 3, postoperative treatment group which were injected R73 once a day for seven consecutive days, beginning on the day of transplantation. Heart grafts survived more than 200 days only in group 2. On the other hand, lung grafts were rejected with five days delay compared with control group. Phenotypic and functional analyses of T cells obtained from rats treated with R73 suggest that TCR molecules and function of T cells are transiently down-regulated at the time of transplantation. In RNase protection assay, expression of cytokine mRNA on grafts was suppressed only in group 2. These data suggest that exposure to alloantigen during T cell modulation suppress cytokine production which initiate and enhance graft rejection. In normal lung but not

Reprint requests to: Takehiro WATANABE,
Second Department of Surgery, Niigata
University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部外科学教室第二講座
渡 辺 健 寛

heart, cytokine and adhesion molecule were detected in mRNA level. This may be one of the reason of early graft rejection in lung transplantation.

Key words: lung transplantation, heart transplantation, cytokine, $\alpha\beta$ T cell receptor, monoclonal antibody

肺移植, 心移植, サイトカイン, $\alpha\beta$ T細胞受容体, モノクローナル抗体

はじめに

欧米において、心および肺移植はすでに1つの確立した医療となっており、不可逆的な心および肺疾患に冒され、余命少ない人々にとって最終的な治療手技の1つになっている。近い将来わが国においても、心および肺移植の再開が期待されている。さて、サイクロスポリンやタクロリムス (FK 506) などの免疫抑制剤の開発に伴い、レシピエントの長期生存が得られ、移植成績は確実に向上している¹⁾。しかし、これらの新しい免疫抑制剤の使用にもかかわらず、急性²⁾ および慢性拒絶反応³⁾ の抑制は難しく、また、拒絶反応抑制が得られたとしても、非特異的な免疫抑制剤を長期間全身に投与する今までの免疫抑制方法は、発癌⁴⁾ などの副作用が新たな問題である。理想とされる、短期間投与によりドナー特異的なトランスを誘導するような薬剤の開発にはいまだ成功していない。そのため、現在も新しい免疫抑制剤を求め様々な試みが行われている。

アログraftの拒絶には、T細胞が主なエフェクターとして働くと考えられている。そのメカニズムとして、T細胞が抗原呈示細胞 (APC) 上のアロ抗原をT細胞受容体で認識し、活性化されることが重要と考えられている⁵⁾。その際、同時にT細胞上の CD4 または CD8, さらに LFA-1/ICAM-1⁶⁾, B7/CD28⁷⁾ などの接着分子を介した第2のシグナルが重要であることもわかってきている。つまり、CD3・T細胞受容体複合体を介する第1のシグナルと、接着分子を介する第2のシグナルが同時にT細胞に伝わらなければ、T細胞は抗原認識ができず活性化しないと考えられている⁸⁾。そこで、これらT細胞上のレセプターに対するモノクローナル抗体を投与することで、抗原特異的なT細胞の活性化を抑制しようという試みが始まった。抗原認識に関与する CD3 については、OKT3 としてすでに臨床応用が始まっている⁹⁾。また、LFA-1/ICAM-1, B7/CD28 など接着分子を標的としたモノクローナル抗体投与についても、長期の移植片生着が動物モデルで報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。T細胞の抗原認識を担っているもう1つの受容体である $\alpha\beta$

T細胞受容体 ($\alpha\beta$ TCR) を標的としたモノクローナル抗体投与による免疫抑制については、教室の土田らがラット心移植モデルで術前短期間投与による長期生着を報告してきた¹²⁾。今回、このラット心移植モデルで、モノクローナル抗体投与によりT細胞にどのような表面抗原上、機能上の変化が生じるかを検討した。また、ラット肺移植における効果についても検討した。

対象並びに方法

(1) 動物

実験動物には、Charles River Japan (Kanagawa, JAPAN) から購入した体重 200~300 g の雄ラットを使用した。すべてのラットは新潟大学医学部動物施設内で隔離飼育し、実験は新潟大学における動物実験に関する指針に基づいて行った。Brown Norway (BN, RT1ⁿ) ラットをドナー、Lewis (LEW, RT1^l) ラットをレシピエントとした。この組み合わせは、major histocompatibility (MHC), minor MHC とともに異なった、full allogeneic の組み合わせである。

(2) モノクローナル抗体

抗ラット $\alpha\beta$ T細胞受容体抗体 (R73, mouse IgG1) を産生するハイブリドーマを、プリスタンで前処置した BALB/c マウスに腹腔内投与し、7日後に腹水を回収した。腹水を硫酸アンモニウムで精製・透析し、PBS 液で免疫グロブリン量 1 mg/ml に希釈し、使用した。

(3) ラット異所性同種心移植手技

アトロピン 0.01 mg を筋注、ペントバルビタール 4 mg/体重 100 g を腹腔内投与し、麻酔を行った。開腹した後、下大静脈からヘパリン 200 単位を注入した。3分後脱血死させ、大動脈から心筋保護液を冠状動脈へ注入した。肺動脈と大動脈を剝離し、肺静脈を結紮して移植心をハーベストし、移植時まで 4℃生理食塩水に保存した。レシピエントも同様に麻酔した後、頸部動静脈を露出・剝離し、カフ法¹³⁾ を用いてドナーの心臓を異所性に移植した。移植心の生存は頸部の拍動を触知することで確認した。

(4) ラット同所性同種肺移植手技

アトロピン 0.01 mg を筋注, ペントバルビタール 4 mg/体重 100 g を腹腔内投与し, 麻酔を行った。ドナー, レシピエントともに 16 G 静脈内留置針を手術用顕微鏡下に経口的に気管内挿管した。小動物用ベンチレーター(たかしま商店, 日本)で, 換気条件を room air, 換気回数80~100回/分, 一回換気量 4.5 ml, PEEP 5 cm H₂O に設定して手術を行った。ドナーラットは左第5肋間で開胸し, 肺門組織を剝離し, 心臓内にヘパリン 300 単位注入した後, 肺動脈, 肺静脈, 気管支の順に切断した。レシピエントは左第4肋間で開胸し, 同様に肺門組織を剝離し, マイクロクリップでクランプした後, 肺動脈, 肺静脈, 気管支の順に離断した。吻合は肺静脈, 気管支, 肺動脈の順に9-0 ナイロン糸の連続縫合で行った。胸腔ドレーンを留置し, 胸壁を3層に閉じ, 手術を終了した¹⁴⁾¹⁵⁾。自発呼吸が生じた時点で胸腔ドレーン, 続いて気管内チューブを抜去した。術後抗生物質は使用しなかった。

(5) 治療プロトコル

心移植は, 1群: コントロール抗体 (OX1, mouse Ig-G1) 術前2日間投与群, 2群: R73 術前2日間投与群, 3群: R73 術後7日間投与群, 4群: R73 術前2日間投与+ヒト rIL-2 (Shionogi, Japan), 7×10^4 U/日, 術後5日間投与群, そして5群: R73 術前2日間投与+ヒト rIL-2, 7×10^4 U/日, 術後100日目から5日間投与群に分けた。

肺移植は, 1群: 無治療群 (PBS 投与群), 2群: R73 術前2日間投与群に分けた。

R73 投与は 2 mg/kg/日をラットの腹腔内へ投与した。

(6) 評価

心移植では, 拒絶は心拍動の停止をもって判定し, 組織学的にも確認した。肺移植では, あらかじめ定めた日に犠牲死させ, 組織学的に拒絶反応の程度を評価した。

(7) 組織学的評価

組織学的評価のため, 犠牲死させたラットから心および肺移植片を取り出し, その一部を10%中性ホルマリン液で固定後, パラフィン包埋切片を Hematoxylin-Eosin 染色し, 拒絶反応の程度を組織学的に評価した。肺については, 藤村らの分類¹⁶⁾に準じて以下のように4期に分類し, スコア化した。

1期 (minimal change): 血管及び気管支周囲にごく少量の単核球の浸潤を認めるが, 肺胞の病変をみとめないもの, および reimplantation response の所見の

みを示すもの。(スコア1)

2期 (mild rejection): 血管及び気管支周囲に軽度の単核球の浸潤を認めるが, 肺胞壁の肥厚や肺胞構造の破壊はほとんど認めないもの。(スコア2)

3期 (moderate rejection): 血管及び気管支周囲の単核球の浸潤に加え, 肺胞壁の肥厚や細胞浸潤もみられ, 一部で肺胞構造の破壊も認められるもの。(スコア3)

4期 (severe rejection): 広範に肺胞構造の破壊が認められるもの。(スコア4)

(8) フローサイトメトリー

ラット脾臓を細切後, 200 ゲージのステンレスメッシュを通し Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) で洗浄し, さらに 0.83% NH₄Cl-Tris buffer (pH 7.6) で溶血させ, 単核球を分離した。2重染色によるフローサイトメトリーのために, 1×10^6 個の単核球を未標識1次抗体(マウス)で染色した後, phycoerythrin (PE) 結合抗マウス Ig 抗体 (Vector Burlingame, CA) で染色した。正常マウス血清で洗浄した後, FITC 標識マウスモノクローナル抗体で2重染色し, 1×10^4 個の単核球を FACSscan (Becton-Dickinson) で解析した。

(9) 混合リンパ球反応

抗体投与時のリンパ球の機能的変化を in vitro で調べるために, 混合リンパ球反応を行った。抗体投与後1日目と, 5日目の LEW ラット脾臓から分離したリンパ球を responder とし, また, stimulator として 33 Gy 照射した BN ラットのリンパ球を用いた。stimulator と responder を各々 2×10^5 ずつ 96-well の平底プレート内に加え, 3~5日37℃ 5% CO₂ 下で培養した。解析する18時間前に 0.5 mCi [³H] thymidine を加え, その responder の DNA 内への取り込み量を測定し, 反応の指標とした。また, この反応系にヒト rIL-2 を加えた時の反応の変化についても検討した。

(10) IL-2 バイオアッセイ

混合リンパ球反応の培養上清を-30℃で保存し, その上清中の IL-2 濃度をバイオアッセイ法¹⁷⁾を用いて測定した。方法は, IL-2 依存性の cell line である CTLL-2 に培養上清を加えて 96-well の平底プレート内で2日間培養した (10^4 cells/200 μ l/well)。解析の18時間前に 0.5 mCi [³H] thymidine を加え, その取り込み量を測定し, ヒト rIL-2 を用いた際の標準曲線から培養上清中の IL-2 濃度を求めた。

(11) RNase Protection Assay

犠牲死させたラットから移植したグラフトを迅速に取

り出し、その一部から RNA を抽出し、 -80°C で保存した。RNA の抽出は 0.5 g のグラフトを Guanidium buffer と一緒にホモジェナイズし、Phenol-chloroform 法で行った¹⁸⁾。抽出した RNA 量は 260 nm の吸光度でその濃度を測定した。

RNase Protection Assay¹⁹⁾²⁰⁾ は新潟大学腎研究施設から提供して頂いたラット cytokine DNA テンプレートと RNA polymerase を用いて、 ^{32}P でラベルした cRNA probe を作製して行った。cRNA probe と抽出した RNA をハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしない RNA を RNase で処理した後、6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動させ、オートラジオグラフィーで感光させた。

結 果

(1) 治療効果

(a) 心移植

心移植モデルのコントロール抗体 (OX1) 術前投与群は全例 8 日以内に拒絶された。R73 術前 2 日間投与群は全例 200 日以上以上の生着を認めた。しかし、R73 術後投与群では全例 9 日以内に拒絶された。また、R73 術前 2 日間投与後移植を行い、術直後からヒト rIL-2 を投与した群では全例 17 日以内に拒絶された。ヒト rIL-2 を術後 100 日たってから投与した群では移植心の拒絶は認められなかった (表 1)。移植心の組織学的検索では、コントロール抗体投与群では、心筋内へのリンパ球と思われる単核球の著明な浸潤と著明な心筋壊死を認めた。R73 術前治療群は、心筋の一部にわずかな細胞浸潤を認めるものの、ほぼ正常な心筋構造が保たれていた。

(b) 肺移植

ラット肺移植モデルでは、拒絶の所見を外部から推察することが困難なため、経時的に犠牲死させ、組織学的評価を行った。PBS 投与群では移植後 3 日目に血管および細気管支周囲に単核球の軽度な浸潤が見られ (図 1-1)、4 日目には血管および細気管支周囲の単核球の浸潤

が厚くなると同時に、肺胞壁の肥厚や肺胞内への単核球の浸潤が認められるようになった (図 1-2)。5 日目になると、肺胞の破壊が著明になった (図 1-3)。7 日目になると、肺胞構造はほぼ完全に破壊され線維化が進むと同時に、赤血球や多核白血球などが認められるようになった (図 1-4)。

R73 治療群は、3 日目の組織像では、虚血再灌流障害に伴う軽度の浮腫を認めるのみであった (図 2-1)。4 日目では、ほぼ正常な肺構造が保たれていた (図 2-2)。5 日目には血管および細気管支周囲に単核球の浸潤が見られ (図 2-3)、7 日目になると、肺胞の破壊も認められるようになった (図 2-4)。藤村らの分類で 4 期に分類し、スコア化したものを図に示す (図 3)。

(2) フローサイトメトリー

R73 治療によるリンパ球表面抗原の変化を調べるために、モノクローナル抗体投与後、経時的に犠牲死させたラットの脾臓から単核球を分離し、フローサイトメトリーを用いた二重染色で解析した (図 4)。投与後 1 日目では、T細胞上の $\alpha\beta$ T細胞受容体 ($\alpha\beta$ TCR) と CD3 がほぼ陰性であった。これがモノクローナル抗体による表面抗原のマスキングか否かを判定するために、PE 結合抗マウス Ig 抗体のみの染色を行ったが陰性であった。また、TCR/CD3 複合体と独立した T細胞マーカーである CD2 に対する染色では、陽性細胞は 33.5% 存在しており、正常よりわずかに低下しているものの T細胞が存在していることを示した。投与後 5 日目になるとほぼ正常のパターンに回復していた。以上より抗体投与による T細胞の変化は主に抗原変調であることが示された。実験は 5 回行い、同様の結果が得られた。

(3) 混合リンパ球反応

混合リンパ球反応では、コントロール群で thymidine の取り込みが 19309 ± 6785 c.p.m. に対し、R73 治療群では 1 日目の反応が 3170 ± 280 c.p.m. と抑制されていた。また、フローサイトメトリー同様に徐々に反応は回復し、術後 5 日目になるとほぼコントロールと同じ

表 1 ラットアロ心移植モデルの結果

Group	Treatment	n	Survival	MST
1	OX1 (day -2, -1)	7	6,7,7,7,7,7,8	7
2	R73 (day -2, -1)	7	>200	>200
3	R73 (day 0-6)	5	5,6,6,7,9	7
4	R73 (day -2, -1) + 7×10^4 U/day IL-2 (0-4)	5	9,10,16,17,17	16
5	R73 (day -2, -1) + 7×10^4 U/day IL-2 (100-104)	4	>100	>100

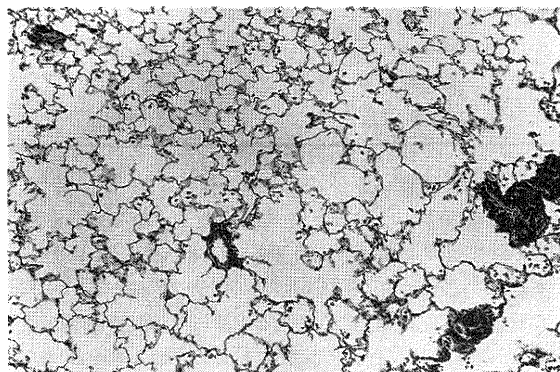


図 1-1 移植後 3 日目

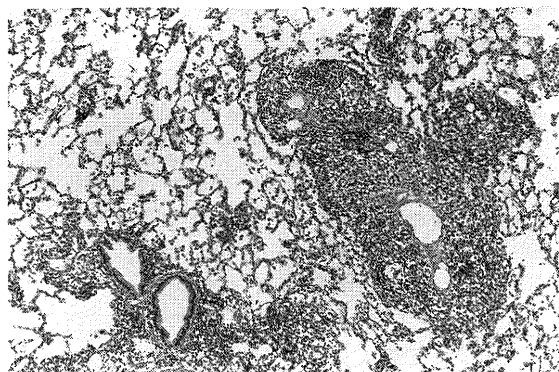


図 1-2 移植後 4 日目

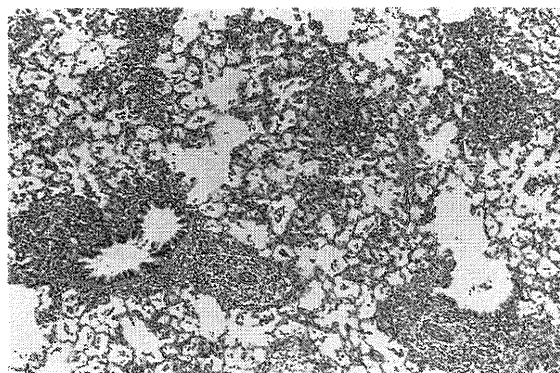


図 1-3 移植後 5 日目

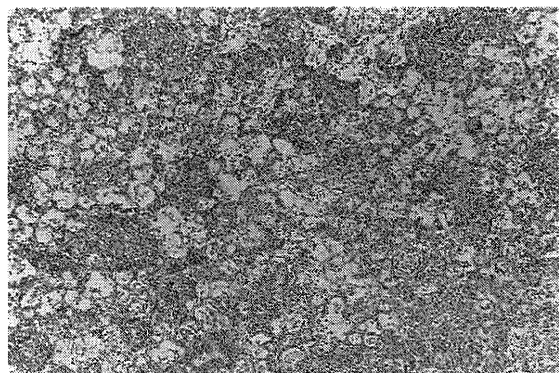


図 1-4 移植後 7 日目

図 1 PBS 投与群病理組織所見 (Hematoxylin-Eosin 染色)

移植後 3 日目には血管および細気管支周囲に単核球の浸潤を認め、その後、徐々に肺胞への浸潤・破壊をきたし、7 日目には線維化が認められるようになった。

程度まで反応が回復した (図 5)。

また、抑制された混合リンパ球反応は、ヒト rIL-2 を加えると反応が回復した (図 6)。

(4) IL-2 バイオアッセイ

混合リンパ球反応の培養上清中の IL-2 濃度は、R73 治療群は移植後 1 日目でコントロール群と比較して約 10 % に抑制されており、混合リンパ球反応の回復とともに上昇し、経時的にコントロール群の値に近づいた (図 7)。

(5) RNase Protection Assay

cytokine および接着分子の移植臓器内での発現を RNase Protection Assay を用いて評価した。その結果を図に示す (図 8-1~7)。

IL-1 β , IL-10, IFN- γ , iNOS の mRNA 発現は、

正常の心および肺ではほとんど認められなかった。拒絶される群の術後 4 日目では、その発現が増強していた。R73 術前治療群の術後 4 日目では、mRNA 発現は正常レベルに抑制されていた。

TNF α , パーフォリンは、心移植モデルで、IL-1 β , IL-10, IFN- γ と同じ発現パターンを示したが、肺移植では正常肺で少し発現しており、拒絶群で発現が増強し、R73 術前治療群では正常肺レベルに発現が抑制されていた。

接着分子 ICAM-1 の mRNA 発現は、正常心では認められなかった。拒絶群では発現が強くなり、R73 治療群では抑制されていた。肺移植では、正常肺、拒絶群、R73 治療群とも強い発現が認められた。実験は 3

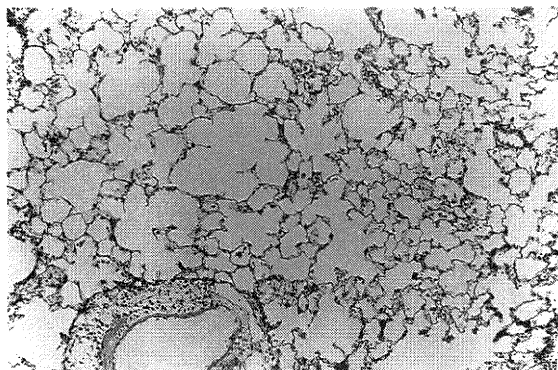


図 2-1 移植後 3 日目

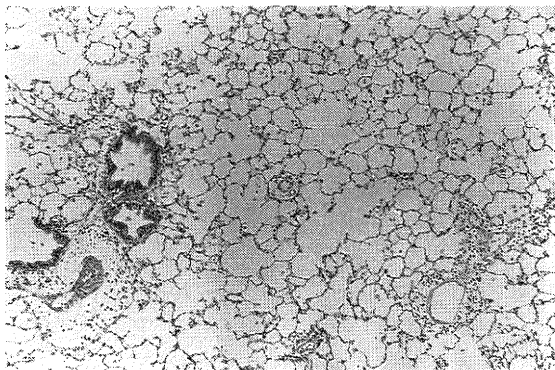


図 2-2 移植後 4 日目

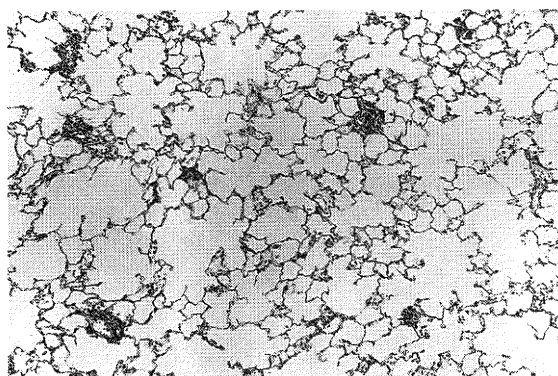


図 2-3 移植後 5 日目

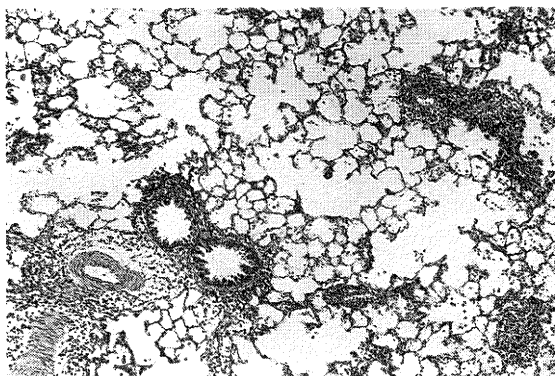


図 2-4 移植後 7 日目

図 2 R73 治療群病理組織所見 (Hematoxylin-Eosin 染色)
R73 治療群は 4 日目まではほぼ正常な肺構造が保たれていたが、5 日目以降拒絶反応の所見が出現し、PBS 投与群同様に拒絶が進行した。

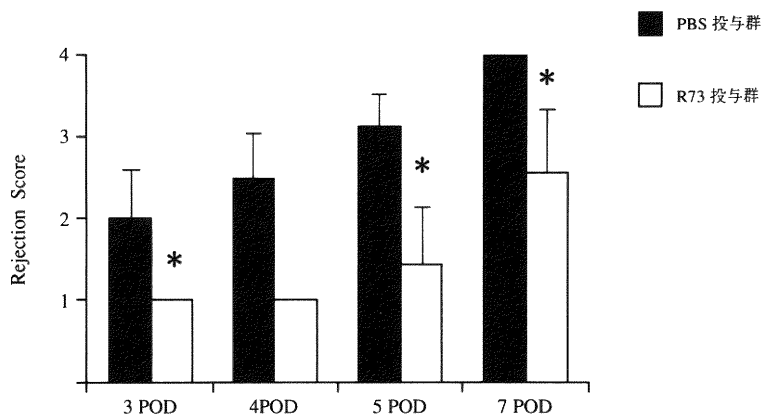


図 3 Rejection Score
藤村らの分類に基づき移植肺の病理組織所見を 4 期に分け、スコア化した。データは全て平均値±標準偏差で示した。(*: $p < 0.05$)

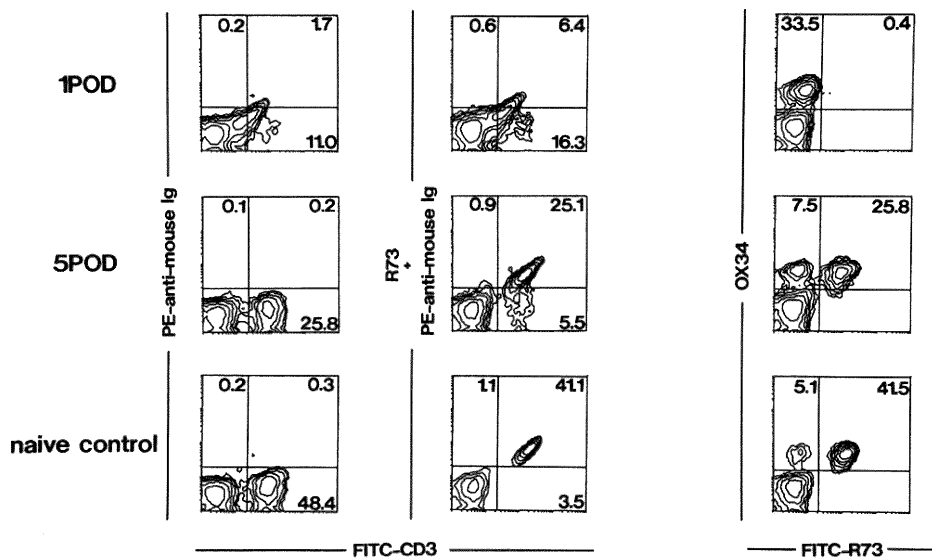


図4 ラット脾臓リンパ球のフローサイトメトリー解析

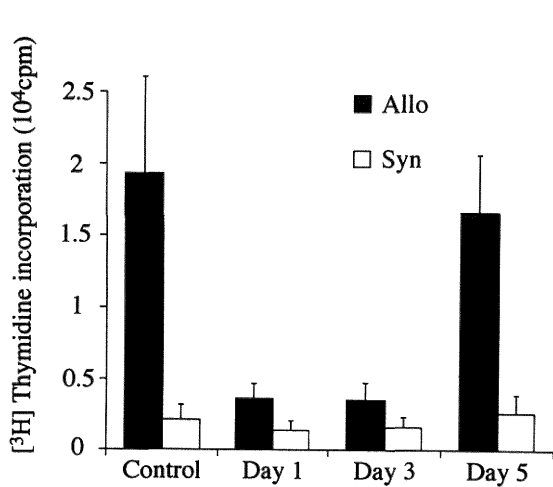


図5 混合リンパ球反応 (MLR)

R73 治療群では MLR の反応が抑制されていたが、経時的に回復してきた。データは全て平均値±標準偏差で示した。

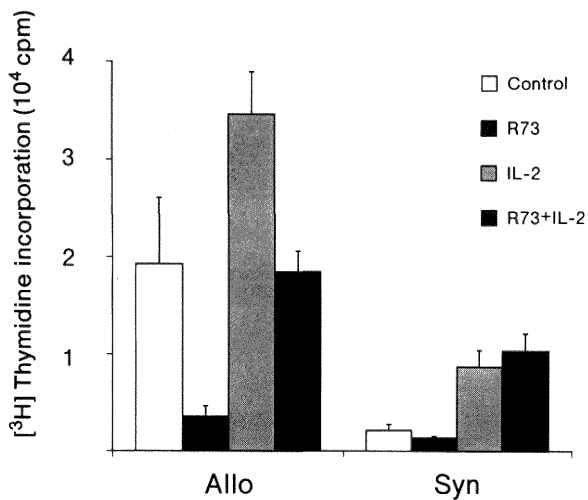


図6 混合リンパ球反応にヒト rIL-2 を加えたときの反応

R73 治療で抑制されていた MLR は、IL-2 を加えると回復した。データは全て平均値±標準偏差で示した。

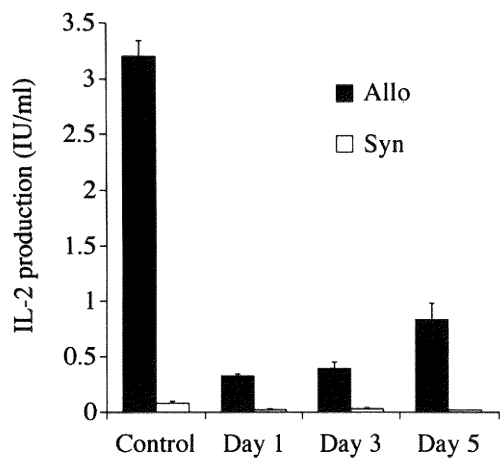


図 7 IL-2 バイオアッセイ
MLR の培養上清中の IL-2 濃度も R73 治療群では抑制されていた。データは全て平均値 \pm 標準偏差で示した。

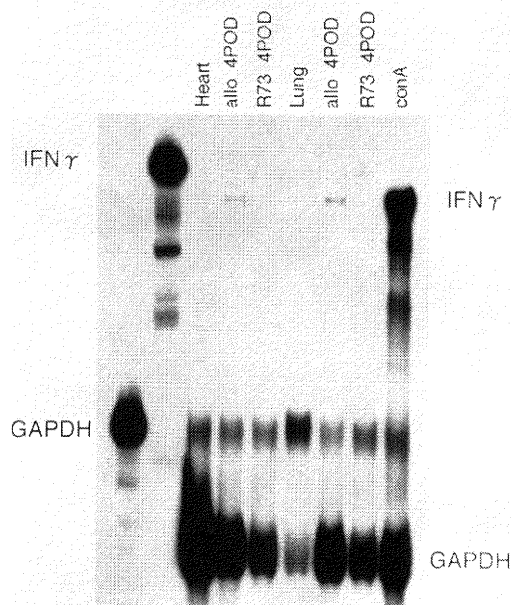


図 8-1 IFN- γ

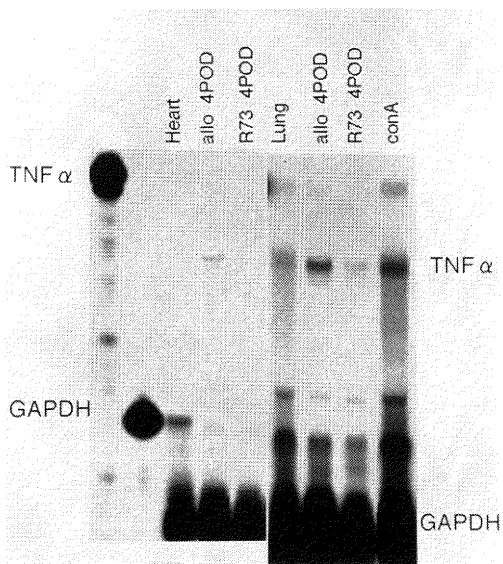


図 8-2 TNF α

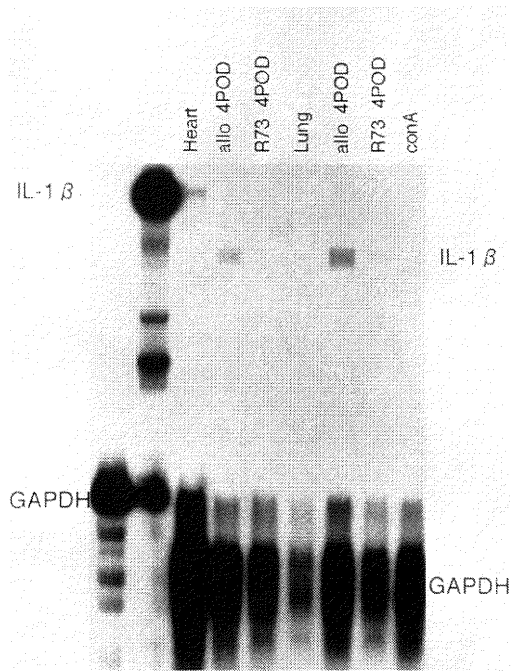


図 8-3 IL-1 β

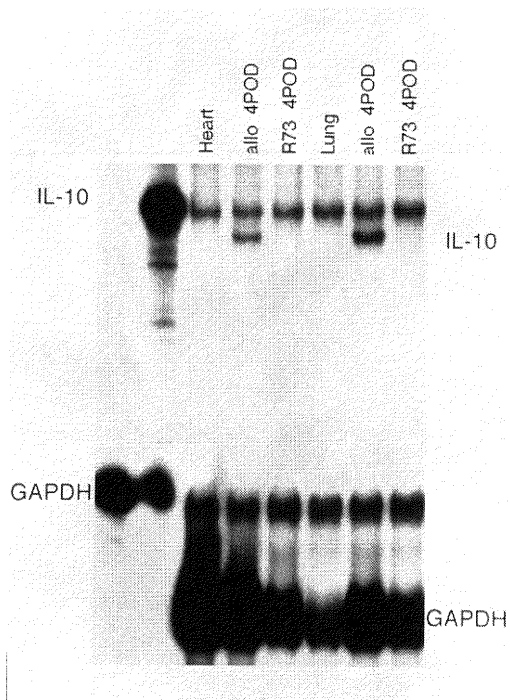


図 8-4 IL-10

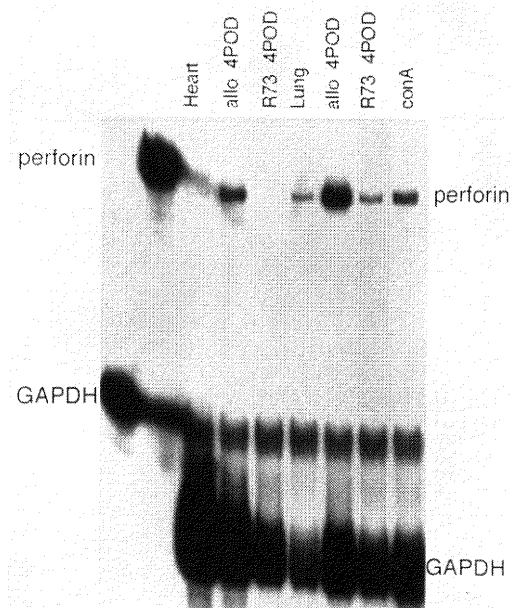


図 8-5 Perforin

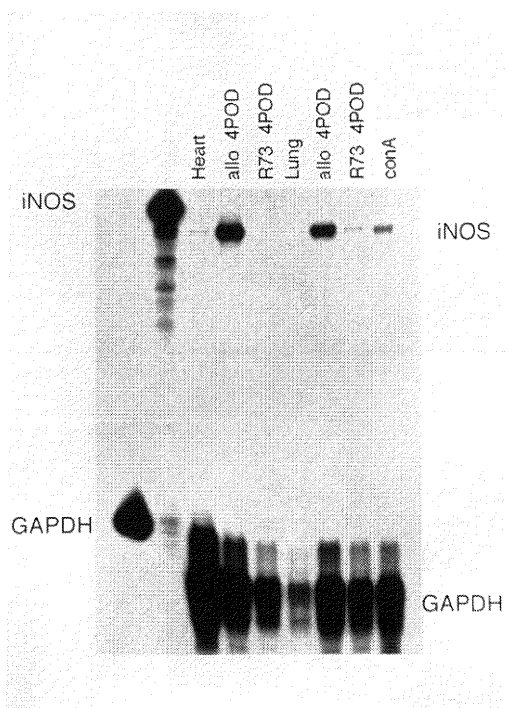


図 8-6 iNOS

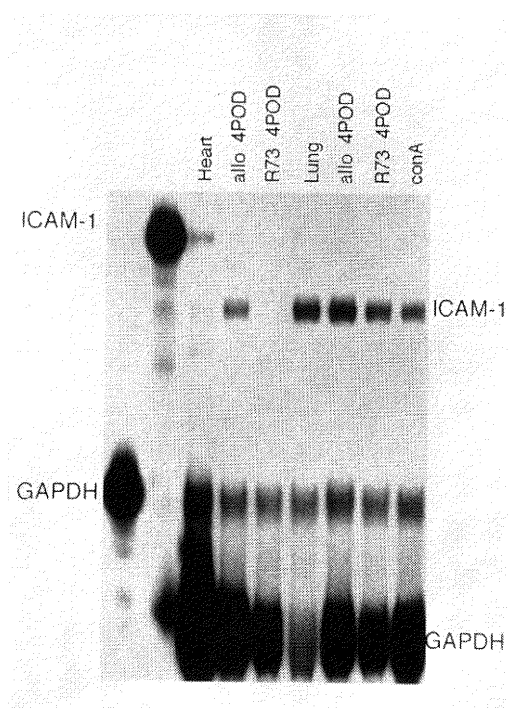


図 8-7 ICAM-1

回行い、同様の結果が得られた。

考 察

同種移植の際の拒絶反応は主にT細胞がエフェクターとして働くと考えられている。拒絶反応は、抗原提示細胞（APC）の組織適合抗原上に提示されたアロ抗原を、レシピエントのTリンパ球が $\alpha\beta$ T細胞受容体（TCR）で認識し、CD3 を介してそのシグナルを細胞内に伝達することで始まる⁵⁾。同時に、T細胞表面に存在する種々の接着分子、LFA-1、CD28 そして CD2 など APC 上の接着分子リガンドと接着し、第2のシグナルを受け取ることもT細胞の活性化に必要なことがわかってきた⁸⁾。従って、理論上このアロ抗原認識に関わるT細胞受容体¹²⁾ および接着分子¹⁰⁾¹¹⁾²²⁾ を標的としたモノクローナル抗体を用いることで、移植片に特異的な免疫寛容が誘導される可能性が考えられる。

R73 術前2日間投与の心移植モデルでは、土田らの報告¹²⁾と同様に200日以上長期生着が認められた。しかし、同じR73の術後投与では長期生着が認められないことから、モノクローナル抗体投与と移植のタイミングが重要と考えられる。実際に、フローサイトメトリーによる解析では、抗体投与後一過性にT細胞上の $\alpha\beta$ TCR/CD3 複合体の変調が認められ、また、*in vitro* の MLR で表面抗原の変調と時間的に一致した反応の低下を認めた。一時的に $\alpha\beta$ TCR/CD3 複合体が down-regulate され、機能的にも抑制された時期にT細胞がアロ抗原と出会うことが、長期生着に重要であると考えられる。また、ヒト rIL-2 を術直後から投与することで長期生着が解除されること、および *in vitro* の MLR で、R73 治療したラットの細胞にヒト rIL-2 を加えて培養すると反応が回復することなどの結果から、長期生着には IL-2 などのサイトカインの産生が周術期に抑制されることが重要と考えられる。実際、今回の実験では、MLR が抑制され、かつ IL-2 産生能が低下していることがわかった。さらに、この反応が IL-2 を添加することで回復することから、抗体治療されたT細胞は clonal anergy である可能性が示唆された。

今回は移植片中のサイトカインの発現を RNase Protection Assay 法で検討したところ、心移植拒絶モデルでは IFN γ 、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現と抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現増強を認めた。IL-10 の発現増強は拒絶反応に伴う炎症反応を抑制する合目的反応と考えられた。一方、R73 術前投与群では、これらサイトカインの発現が正常臓器レ

ベルに保たれていた。また、接着分子の1つである ICAM-1 や拒絶反応の際に組織障害性に働くといわれているパーフォリン²³⁾ や NO の合成酵素である iNOS²⁴⁾ の mRNA 発現も R73 術前投与群で抑制されており、拒絶群では発現が増強していた。一時的に TCR/CD3 複合体が down-regulate され、機能的にT細胞が抑制された状態の時期にアロ抗原が移植されることで、拒絶反応の進展に必要なサイトカインの産生が抑制され、アロ抗原特異的なT細胞の増殖が抑制され、また、ICAM-1 の発現、パーフォリン産生、NO 産生が誘導されなかったと考えられた。さらに、T細胞上の抗原変調が回復した後にもサイトカインネットワークが有効に機能せず、抗原変調時に移植された抗原に特異的なT細胞の無反応性が誘導され、拒絶反応が起きないと考えられた。サイトカインについては、同じ R73 術前投与による腎移植モデルを解析した Heidecke²¹⁾ らは Th1/Th2 サイトカインの概念²⁵⁾²⁶⁾ から、R73 術前投与による Th1 サイトカイン (IL-2、IFN γ など) の抑制と、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-10 など) による Th1 サイトカインの抑制が、Th2 サイトカイン優位の局所環境を作り、移植片の維持につながっていると報告している。逆に、抗 CD2 抗体によるラット心移植モデルを解析した Krieger ら²⁷⁾ は、拒絶・寛容モデルともに Th1 と Th2 サイトカインの発現には差が認められなかったと報告している。今回の実験結果と合わせ、サイトカインがどの過程でどのように拒絶・寛容に関与していくのかさらに詳細に検討していく必要があると思われる。

肺移植に関しては、TCR/CD3 複合体の抗原変調が回復する移植後4日目までは、再灌流障害の所見のみで拒絶反応の所見は認められなかったが、抗原変調が回復した後に拒絶反応が起こることが確認された。これは、肺では正常の状態でも ICAM-1、TNF α 、パーフォリンなどが発現しており、常時気道を介して外界と接し、細菌やウイルスを排除するために免疫系が活性化しやすい肺の特殊性を反映しているものと考えられた。おそらく、肺では抗原変調から回復した際に、比較的容易にサイトカインネットワークがスタートし、T細胞による拒絶反応が始まるのではないかと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導を頂きました新潟大学外科学教室、江口昭治教授、新潟大学医動物免疫学教室、安保 徹教授、新潟大学腎研究施設構造病理学部門、山本 格助教授、ならびに西新潟中

央病院外科，広野達彦先生に深謝致します。また，技術的援助を頂いた畑野高四技官，樋口寿一技官に深く感謝致します。この研究の一部は，文部省科学研究費基盤研究（A）「心および心肺移植における機能保存と実施に関する総合的研究」からの助成に基づいて行われた。なお，本論文の要旨は，第96回外科学会総会で発表した。

参 考 文 献

- 1) Griffith, B.P., Bando, K., Hardesty, R.L., Armitage, J.M., Keenan, R.J., Pham, S.M., Paradis, I.L., Yousem, S.A., Komatsu, K., Konishi, H., Fung, J.J. and Starzl, T.E.: A prospective randomized trial of FK 506 versus cyclosporine after human pulmonary transplantation, *Transplantation*, 57: 848~851, 1994.
- 2) Griffith, B.P., Hardesty, R.L., Armitage, J.M., Kormos, R.L., Marrone, G.C., Duncan, S., Paradis, I., Dauber, J.H., Yousem, S.A. and Williams, P.: Acute rejection of lung allografts with various immunosuppressive protocols, *Ann. Thorac. Surg.*, 54: 846~851, 1992.
- 3) Sundaresan, S., Trulock, E.P., Mohanakumar, T., Cooper, J.D., Patterson, G.A. and The Washington University Lung Transplant Group.: Prevalence and outcome of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation, *Ann. Thorac. Surg.*, 60: 1341~1347, 1995.
- 4) Penn, I.: Incidence and treatment of neoplasia after transplantation, *J. Heart Lung Transplant.*, 12: s328~s533, 1993.
- 5) Marrack, P. and Kappler, J.: The T cell receptor, *Science*, 238: 1073~1079, 1987.
- 6) Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J. and Shaw, S.: The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells, *J. Immunol.*, 144: 4579~4586, 1990.
- 7) Koulova, L., Clark, E.A., Shu, G. and Dupont, B.: The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4⁺ T cells, *J. Exp. Med.*, 173: 759~762, 1991.
- 8) Mueller, D.L., Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H.: Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 445~480, 1989.
- 9) Bristow, M.R., Gilbert, E.M., Renlund, D.G., DeWitt, C.W., Burton, N.A. and O'Connell, J.B.: Use of OKT3 monoclonal antibody in heart transplantation, *J. Heart Transplant.*, 7: 1~11, 1988.
- 10) Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K. and Ihara, A.: Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1, *Science*, 255: 1125~1127, 1992.
- 11) Sayegh, M.H., Akalin, E., Hancock, W.W., Russell, M.E., Carpenter, C.B., Linsley, P.S. and Turka, L.A.: CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2, *J. Exp. Med.*, 181: 1869~1874, 1995.
- 12) Tsuchida, M., Hirahara, H., Matsumoto, Y., Abo, T. and Eguchi, S.: Induction of specific unresponsiveness to cardiac allografts by short term administration of anti-T cell receptor $\alpha\beta$ antibody, *Transplantation*, 57: 256~262, 1994.
- 13) Heron, I.: A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 79: 366~372, 1971.
- 14) Saito, R., Prehn, J., Zuo, X.J., Marchevesky, A., Castracane, J., Waters, P., Matloff, J. and Jordan, S.C.: Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of lung allograft rejection in the rats, *Transplantation*, 55: 967~972, 1993.
- 15) Kondo, T., Wu, G.D., Saito, R., Marchevesky, A., Prehn, J., Matloff, J., Waters, P. and Jordan, S.C.: Immunocytological analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage in a model of rat lung allograft rejection, *J. Surg. Res.*, 51: 351~356, 1991.
- 16) Saito, R., Kondo, T., Fujimura, S., Handa, M., Ichinose, T., Shiraishi, Y. and Nakada, T.: Study of bronchoalveolar lavage fluid in rat lung graft for early diagnosis of rejection, *Ishoku*, 24: 262~269, 1989.
- 17) Chu, J.W.K. and Sharom, F.J.: Glycophorin

- A interacts with interleukin-2 and inhibits interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation, *Cell. Immunol.*, **145**: 223~239, 1992.
- 18) Hanawa, H., Inomata, T., Sekikawa, H., Abo, T., Kodama, M., Izumi, T. and Shibata, A.: Analysis of heart-infiltrating T cell clonotypes in experimental autoimmune myocarditis in rats, *Circ. res.*, **78**: 118~125, 1996.
- 19) Goto, S., Yamamoto, T., Feng, L., Yaoita, E., Hirose, S., Fujinaka, H., Kawasaki, K., Hattori, R., Yui, Y., Wilson, C.B., Arakawa, M. and Kihara, I.: Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in anti-thy-1 glomerulonephritis, *Am. J. Pathol.*, **147**: 1133~1141, 1995.
- 20) Feng, L., Tang, W.W., Loskutoff, D.J. and Wilson, C.B.: Dysfunction of glomerular fibrinolysis in experimental antiglomerular basement membrane antibody glomerulonephritis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **3**: 1753~1764, 1993.
- 21) Heidecke, C.D., Zantl, N., Maier, S., Varzaru, A., Hager, B., Kupiec-Weglinski, J. and Hancock, W.W.: Induction of long-term rat renal allograft survival by pretransplant T cell receptor- α/β -targeted therapy, *Transplantation*, **61**: 336~339, 1996.
- 22) Hirahara, H., Tsuchida, M., Watanabe, T., Haga, M., Matsumoto, Y., Abo, T. and Eguchi, S.: Long-term survival of cardiac allografts in rats treated before and after surgery with monoclonal antibody to CD2, *Transplantation*, **59**: 85~90, 1995.
- 23) McDiarmid, S.V., Farmer, D.G., Kuniyoshi, J.S., Robert, M., Khadavi, A. and Busuttil, R.W.: Perforin and granzyme B. Cytolytic proteins up-regulated during rejection of rat small intestine allografts, *Transplantation*, **59**: 762~766, 1995.
- 24) Stevens, R.B., Ansie, J.D., Mills, C.D., Lokeh, A., Rossini, T.J., Saxena, M., Brown, R.R. and Sutherland, D.E.R.: Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation, *Transplantation*, **61**: 1740~1749, 1996.
- 25) Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J. Immunol.*, **136**: 2348~2357, 1986.
- 26) Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D. and Mosmann, T.R.: Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.*, **166**: 1229~1244, 1987.
- 27) Krieger, N.R., Most, D., Bromberg, J.S., Holm, B., Huie, P., Sibley, R.K., Dafoe, D.C. and Alfrey, E.J.: Coexistence of Th1- and Th2-type cytokine profiles in anti-CD2 monoclonal antibody-induced tolerance, *Transplantation*, **62**: 1285~1292, 1996.

(平成9年1月31日受付)