

①

A Skin Test for an Early Diagnosis of Canine Lung Allograft Rejection

Summary

A skin reaction was assessed in adult mongrel dogs as a predictor of mild rejection of transplanted lungs and as an indicator for early treatment of the rejection.

On the day of transplantation, an extract of the donor lung was prepared with 3M KCl and stored at -20 °C until it was used for skin test (ST) in the recipient. The donor lung was transplanted into the recipient by orthotopic transplantation of the left lungs. The lung rejection was confirmed by histopathological findings of specimens obtained by OLE.

Based on the experimental protocol, transplanted dogs were divided into three different groups. The first group (group I) received no immunosuppressive drugs and was examined every 2-3 days for the parameters associated with rejection. The second group (group II) received cyclosporine A (CsA, 25mg/kg/day, p.o.) for 1-2 weeks and were examined for the parameters as above from 7-8 days before termination of the CsA.

宮崎医科大学 外科学第2講座

清水哲哉, 柴田紘一郎, 古賀保範

A Skin Test for an Early Diagnosis of Canine Lung Allograft Rejection

Tetsuya Shimizu, Koichiro Shibata, Yasunori Koga

The Second Department of Surgery, Miyazaki Medical College

Key words: Skin test

A Skin Test for an Early Diagnosis of Canine Lung Allograft Rejection

Summary

A skin reaction was assessed in adult mongrel dogs as a predictor of mild rejection of transplanted lungs and as an indicator for early treatment of the rejection.

On the day of transplantation, an extract of the donor lung was prepared with 3M KCl and stored at -20 °C until it was used for skin test(ST) in the recipient. The ST, chest x-ray examination(CXP), measurement of bronchial mucosal blood flow(BMBF) and open lung biopsy(OLB) were performed several times after allotransplantation of the left lungs. The lung rejection was confirmed by histopathological findings of specimens obtained by OLB.

Based on the experimental protocols, transplanted dogs were divided into three different groups. The first group of dogs (group I, n=6) received no immunosuppressive drugs and were monitored every 2-3 days for the parameters associated with rejection after transplantation. In the dogs showing mild rejection, the ST was positive at a frequency of 71.4%, whereas the positivities of CXP and BMBF were only 14.3% and 28.6% , respectively. The second group of dogs(group II, n=6) received cyclosporine A (CsA,20mg/kg/day, p.o.) for 1-2 weeks and were examined for the parameters as above from 2-3 days before termination of the CsA treatment. In the dogs showing mild rejection, the positivity of ST was 72.7%, but the positivities of CXP and BMBF were 9.1% and 54.5%, respectively. The third group of dogs(group III, n=6) received CsA (20mg/kg/day, p.o.) and azathioprine (AZP, 25mg/body/day, p.o.) for two weeks and were examined for the parameters every 3 days after CsA and AZP administration. The ST, but not CXP and BMBF, paralleled with lung rejection at mild grades in four out of six dogs. As soon as the ST became positive, a treatment was initiated with methylprednisolone (500mg/body/day, i.v.) for 3 days. The early treatment improved pathological findings of the transplanted lungs in five to six dogs, as evidenced by a diminution of rejection grades.

In conclusion, the skin test with the extract of the donor lung is very useful for predicting mild rejection in lung transplantation. Thus, positive ST can be utilized as an indicator for initiation of early treatment of the lung rejection.

Key words: Skin test

Lung transplantation

Mild rejection

Early diagnosis

Early treatment

I. はじめに

肺移植における拒絶反応は容易に不可逆的な肺機能低下を惹起し、免疫抑制剤の使用は感染症の合併や気管支吻合部の縫合不全をもたらす可能性を増加させる。肺拒絶反応を肺機能上未だ可逆的な時期すなわち早期に的確に診断し、早期に集中的な治療を施行することが肺移植の成功への大きな要因と思われる¹⁻³⁾。しかし、肺拒絶反応を的確に診断する方法は現在のところ侵襲の大きい開胸肺生検による病理組織学的診断法以外にはなく、しかも拒絶反応の進行が不可逆になる以前に診断できる侵襲の小さい早期診断法も確立されてはいない。

そこでベットサイドで容易に施行できるdonor肺抽出物を用いた皮内反応(ST)を肺拒絶反応の診断法として考案し、同種左肺移植を施行した雑種成犬において開胸肺生検による病理組織所見を肺拒絶反応の基準として、STと胸部X線写真(CXP)(この方法は現在最も普及している肺拒絶反応の診断法である)および気管支粘膜血流(BMBF)の減少をみる診断法⁴⁾の陽性率を比較検討した。さらに臨床に近い状態としてcyclosporine Aおよびazathioprine投与の後、ST,CXPおよびBMBFを施行した中でSTによる診断にもとずいて拒絶反応の治療を施行し、早期治療の効果について検討した。

II. 対象と方法

1. 実験対象

Veithらの方法⁵⁾に準じて同種左肺移植を施行した雑種成犬18頭(体重:6.0-14.0kg)を以下の3群に分けて検討した。また、同種移植の雌雄の組み合わせは特に定めなかった。

第I群(Group I):免疫抑制剤を投与しなかった6頭。移植後2-3日毎に皮内反応(ST)、胸部X線写真(CXP)、気管支粘膜血流(BMBF)および開胸肺生検(OLB)を施行した。

第II群(Group II):移植後、免疫抑制剤としてcyclosporine A(CsA),20mg/kg/dayを1-2週間経口投与した6頭。移植後CsA投与を中止する前2-3日、中止時および中止後2-3日毎にSTをはじめとする諸検査を施行した。

第III群(Group III):移植後、免疫抑制剤としてCsA,20mg/kg/dayとazathioprine(AZP),25mg/body/dayを2週間経口投与した6頭。移植後CsA,AZP投与中止時からSTをはじめとする諸検査を3日毎に施行し、STが陽性を示した時点からsteroid pulse療法(methylprednisolone 500mg/body/day, i.v.,for 3days)を施行すると共にCsA,AZP投与を再開した。そしてsteroid pulse療法終了後1日から3日の間に再びSTをはじめとする諸検査を1回施行した。

以上の実験モデルを図1に示す。

なお雑種成犬は宮崎医科大学動物実験施設より入手し、実験動物に関する指針にもとずき実験を施行した。

2. 3 M KCl 抽出法

実験で用いた抽出物はReisfeld法⁶⁾に準じてdonor肺のほか、donorリンパ節、recipientリンパ節より3 M KCl溶液を用いて抽出した。

移植手術時にdonor肺、donor肺門リンパ節およびrecipient肺門リンパ節を一部採取し、3 v/w のphosphate buffered saline(PBS),pH7.4にてhomogenateを作製し、KClを3 M KClとなるように加えて10時間攪拌した。これを160000g,30分間で遠沈し、上清をPBS中で脱塩した。以上の操作はすべて4℃下で行った。bicinchoninic acid protein assay reagent (BCA,Pierce社)を用いて蛋白濃度を測定し調整し,-20℃にて保存した。

3. 3 M KCl 抽出物によるリンパ球増殖反応

Ficoll-ConrayおよびPercoll(Pharmacia社)を用いてrecipient末梢血からリンパ球と単球を得た。さらにリンパ球よりナイロンファイバーカラム法にてT細胞を分離した。

次いで 5×10^5 M 2-mercaptoethanolおよび10%FCS含有RPMI1640を培地としたT細胞(enrich T lymphocyte)を100 μ l(1×10^4 cells)ずつ平底96穴マイクロプレートに分注した。一方 1×10^6 cells/ml に調整した単球に3 M KCl抽出液100 μ g/mlを10 μ l/mlとして加え37℃で30分間放置、さらにmitomycin C(MMC)を25 μ g/mlとなるように加えて37℃で30分間放置の後、3回洗浄してRPMI1640単球浮遊液100 μ l(1×10^3 cells)を上記のマイクロプレートに加えて分注した。37℃,5%CO₂の条件下で3日間incubateし、0.25 μ Ciの³H]thymidineを加えて8時間後にcell harvesterにて細胞を採取し、液体シンチレーションカウンター(アロカ3500)を用いてcpmの単位で測定した。

3 M KCl抽出物によるリンパ球増殖反応の値は抽出物を加えない自然リンパ球増殖に対する比率(stimulation index,SI)で表した。SI=lymphocyte proliferation with an extract(cpm) / lymphocyte proliferation without extracts(cpm)

4. 皮内反応 (skin test, ST)

donor肺(donorリンパ節、recipientリンパ節)の3 M KCl 抽出物(蛋白濃度 100 μ g/ml)を0.05mlそれぞれ皮内に注入し、24時間後に判定した。判定は注入部位の皮膚損傷と区別するため、短径5mm以上の発赤、硬結、膿瘍あるいは潰瘍の肉眼的炎症所見を呈すものをSTの診断による肺拒絶反応陽性とした。なお、皮内反応部位はイヌが噛んだり、掻いたりすることを避けるために剃毛した背部および側腹部を使用した。また、発赤、硬結を示す所見は皮内注入後24時間前後に最もその反応が認められやすい傾向にあり(皮内注入後6,24,48,72時間で観察した結果)、さらに肺拒絶反応の進行速度とその診断の必要性から、皮内注入後24時間を判定の時間とした。

図2に肺病理組織所見上、肺拒絶反応が存在するときの3 M KCl 抽出物による皮内反応(皮内注入より24時間後)でdonor肺、donorリンパ節の3 M KCl 抽出物が陽性を示したところを示す。

5. 胸部X線写真 (chest x-ray photography, CXP)

イヌを正面腹臥位で200mA,75-85kV,0.02secの条件で撮影し、移植肺野の浸潤陰影の存

在をCXPの診断による肺拒絶反応陽性とした。

6. 気管支粘膜血流 (bronchial mucosal blood flow, BMBF)

気管支鏡下にレーザー血流計 (ALF 2100, アドバンス社) を用いて気管分岐部 (C) と移植側の左気管支第1分岐部 (L) の粘膜血流を測定し, その比 (L/C) が0.7以下をBMBFの診断による肺拒絶反応陽性とした⁶⁾。

7. 開胸肺生検 (open lung biopsy, OLB)

開胸肺生検は左第7-9肋間で開胸し, 主として左下葉の一部を採取して, 病理組織標本を作製した。肺拒絶反応の程度はFujimuraらの肺拒絶反応の病理組織分類法⁷⁾に準じて以下の如く分類した。

0期(Stage 0) : normal appearance. 正常の肺所見。

I期(Stage I) : perivascular cuffing(+). 小血管周囲に軽度の浮腫と軽度の単核細胞浸潤を認めるが, 肺胞構造は正常なもの。

II期(Stage II) : perivascular cuffing(++) & alveolar infiltration(+). 小血管周囲にある程度の単核細胞浸潤を認め, 肺胞壁および肺胞内に単核細胞浸潤を軽度に認めるが, 肺胞構造は破壊されていないもの。

III期(Stage III) : perivascular cuffing(+++) & alveolar infiltration(++) & alveolar wall destruction(+). 小血管周囲に高度の単核細胞浸潤があり, 肺胞壁および肺胞内にもある程度の単核細胞浸潤を認め, 肺胞構造は所々高度に破壊されているもの。

IV期(Stage IV) : alveolar wall destruction(+). いたるところに単核細胞浸潤が高度となり, 肺胞構造は全く破壊されているもの。

8. 統計処理

測定数値は平均値±標準偏差で表し, 関連2項目の検定にはWilcoxon検定を用いた。

III. 実験結果

1. 3 M KCl 抽出物によるリンパ球増殖反応

第II群において移植後2-3日のCsA投与中にOLBより0期であったものを拒絶反応陰性(n=6)とし, CsA中止後OLBによって明かに拒絶反応が認められるものを拒絶反応陽性(n=6)として3 M KCl 抽出物によるリンパ球増殖反応と肺拒絶反応の関連性を評価した。

donor肺抽出物によるSIは拒絶反応陽性時 6.33 ± 3.34 , 拒絶反応陰性時 0.74 ± 0.25 ($p < 0.05$)であった。同様にdonorリンパ節抽出物によるSIは拒絶反応陽性時 4.83 ± 3.19 , 拒絶反応陰性時 1.08 ± 0.45 ($p < 0.05$)であった。一方recipientリンパ節抽出物のSIは拒絶反応陽性時 1.40 ± 0.35 , 拒絶反応陰性時 0.53 ± 0.28 と共に低値であった。また, 拒絶反応陽性時のdonor肺とrecipientリンパ節およびdonorリンパ節とrecipientリンパ節の比較では, donor肺およびdonorリンパ節がそれぞれ有意にSIが大きかった($p < 0.05$)。しかしながら,

拒絶反応陽性時のdonor肺とdonorリンパ節ではそれぞれのSIに有意差はなかった(図3).

また, donorとは異なる他の雑種成犬の肺抽出物, リンパ節抽出物を用いたリンパ球増殖反応(n=3)を施行したが, それぞれSIは拒絶反応陽性時 1.32 ± 0.87 , 1.41 ± 0.34 , 拒絶反応陰性時 0.90 ± 0.30 , 1.51 ± 0.42 とそれぞれ低値を示す傾向にあった.

2. 肺拒絶反応の経時的变化

肺拒絶反応による肺病変が可逆的であると思われる早期肺拒絶反応の期間, すなわち肺拒絶反応I期, II期に留まっている期間を第I群と第II群で比較してみると, 第I群は 1.67 ± 0.75 日, 第II群は 4.50 ± 2.87 日であった. CsAを投与していた第II群において肺拒絶反応が早期である期間が延長していた($p < 0.05$)(図4). しかし, 一旦III期に陥ると両群共に1日以内に肺拒絶反応IV期に移行する傾向がみられた.

3. 肺拒絶反応の病理組織分類に対する皮内反応, 胸部X線写真および気管支粘膜血流の陽性率

第I群と第II群においてOLBによる肺拒絶反応の病理組織分類に対するST, CXPおよびBMBFの陽性率を比較した. STに用いた3M KCl抽出物においてdonor肺とdonorリンパ節の3M KCl抽出物とも皮内反応の判定に差異はなく, recipientリンパ節の3M KCl抽出物によるSTは全例において陰性であった. また, donorとは異なる他の雑種成犬の肺抽出物, リンパ節抽出物を用いて第II群において3頭にSTを施行したが, いずれも陰性であった. 肺感染症については肺病理組織像をもとに検討したが全例について感染症は認めなかった.

STをはじめとする諸検査の施行の回数は, 肺拒絶反応の各病理組織分類期において第I群では0期に5回, I期に3回, II期に4回, III期に5回そしてIV期に6回であり, 第II群では0期に9回, I期に5回, II期に6回, III期に5回そしてIV期に7回であった.

第I群ではSTは0期で陽性を示すものがなく, I期66.7%, II期75.0%, III期80.0%, IV期83.3%の陽性率であった. CXPは0期で20.0%の陽性率が認められ, I期, II期ではそれぞれ0%, 25.0%と低値を示し, III期, IV期ではそれぞれ80.0%, 100%と高い陽性率であった. BMBFも0期で40.0%の陽性率が認められ, I期, II期ではそれぞれ33.3%, 25.0%と低値を示し, III期, IV期でそれぞれ60.0%, 66.7%の陽性率であった. 第II群においてもSTは0期で陽性を示すものがなく, I期60.0%, II期83.3%, III期80.0%, IV期85.7%の陽性率であった. CXPは0期で11.1%の陽性率が認められ, I期, II期, III期, IV期ではそれぞれ0%, 16.7%, 80.0%, 100%を示した. BMBFは0期で33.3%の陽性率が認められ, I期, II期, III期, IV期ではそれぞれ60.0%, 50.0%, 40.0%, 85.7%を示した(図5).

肺拒絶反応による肺病変が可逆的であると思われる早期肺拒絶反応の期間すなわちI期+II期と, 不可逆的な変化である進行期肺拒絶反応の期間すなわちIII期+IV期の2つにまとめてみると, 第I群では, STが早期(I期+II期)の時に71.4%と高値を示すの

に比して、BMBFおよびCXPはそれぞれ28.6%、14.3%と低い陽性率を示した。これに対して進行期(III期+IV期)ではST、BMBFおよびCXPはそれぞれ81.8%、63.6%および90.9%とST以外の検査法でも比較的高い陽性率を示した。第II群においても、早期(I期+II期)でSTが72.7%と高値を示すのに比して、BMBFおよびCXPはそれぞれ54.5%、9.1%と低い陽性率を示した。これに対して進行期(III期+IV期)ではST、BMBFおよびCXPはそれぞれ83.3%、66.7%および91.7%と比較的高い陽性率を示した(図6)。

4. 第III群における皮内反応の陽性時期

STが陽性になった時点でsteroid pulse療法を施行した第III群において、CsA,AZP投与中止後にはじめてSTが陽性を示した時期と治療の施行前後の肺拒絶反応の動向について観察した。

3頭がCsA,AZP投与中止とした時点に一致してST陽性を示し、2頭がCsA,AZP投与中止後3日目に、残り1頭が6日目にST陽性を示した。前の3頭は治療前にはOLBによりそれぞれIII期、III期、II期の肺拒絶反応所見を呈していたが、治療後はそれぞれI期、III期、I期を示した。CsA,AZP投与中止後3日目にST陽性となった2頭の肺拒絶反応の程度はそれぞれII期、II期であり、治療後はそれぞれI期、0期となった。CsA,AZP投与中止後6日目に はじめてSTが陽性となった1頭は肺拒絶反応I期を示し、治療後は0期となった(表1)。

5. 治療前後の肺拒絶反応病理組織所見と皮内反応、胸部X線写真、気管支粘膜血流の推移

第III群において、STが はじめて陽性を示した時点、つまり拒絶反応に対する治療直前の時点では、OLBによる肺病理組織所見はIII期が2頭、II期が3頭、I期が1頭であった。治療によってもIII期を示した1頭のみが変化なく、steroid pulse療法後より7日後に拒絶反応にて死亡したが、他は治療によりI期が3頭、0期が2頭と軽快した(図7)。図8は肺病理組織所見上、steroid pulse療法後に拒絶反応が軽快した1例を示す(No. 1犬)。

STはsteroid pulse療法後1日から3日の間に1回施行した結果、6頭共に陰性を示した。CXPでは治療前のST陽性時に陽性を示したものは2頭のみであり、それらは肺病理組織所見上、肺拒絶反応III期であった。治療後は1頭のみがCXP陽性を示し、肺拒絶反応III期であった。BMBFは治療前1頭のみが陽性を示し、肺病理組織所見上、肺拒絶反応II期であった。治療後は2頭がBMBF陽性を示し、それらの肺拒絶反応はIII期およびI期であった(図9)。

IV. 考 察

肺移植における拒絶反応は急速に進行し、放置すれば約10日で死の転帰をとるといわれている^{8,9)}。また、未だ肺拒絶反応に対する予防法が確立されていない現況では移植後に程度の差はあれ拒絶反応が出現する可能性は極めて高く、肺拒絶反応を可逆的な時

期に早期診断し、早期に集中的な治療を施行することが必要である。現在肺拒絶反応の確定診断は開胸肺生検による肺病理組織学的診断以外にはないが、この開胸肺生検は侵襲が大きく、繰り返しての施行が困難である。そのため、各種の肺拒絶反応の診断法が報告¹⁰⁻¹²⁾されているが、いずれもある程度進行した拒絶反応か、あるいは免疫抑制剤で修飾されていない拒絶反応の診断に関するものが殆どである。

そこでベットサイドで容易に施行できるdonor肺抽出物を用いた皮内反応(ST)を肺拒絶反応の診断法として考案し、肺拒絶反応の可逆的な時期に発見すること、つまり肺拒絶反応の早期診断の可能性、さらにその診断にもとづく早期治療の効果について検討した。

まず、3 M KCl 抽出物とリンパ球増殖反応については、第 II 群においてdonorの肺とリンパ節およびrecipientのリンパ節の3 M KCl 抽出物を用いて、recipientのリンパ球増殖反応を施行し、またdonorとは異なる他の雑種成犬の肺組織とリンパ節の3 M KCl 抽出物についても第 II 群のrecipientのリンパ球増殖反応(n=3)を施行した。その結果、肺拒絶反応が明らかに存在する時に、donorの肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物のみがリンパ球増殖反応において高いstimulation index(SI)を示した。recipientとthird party の3 M KCl 抽出物では肺拒絶反応時のSIがdonorの肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物のSIに比して低値を示すことから、この条件でのrecipientのリンパ球増殖反応に関与するものは、donor特異性のある3 M KCl 抽出物であり、また肺とリンパ節のそれぞれの臓器に存在する活性ではないと思われる。実験に用いた3 M KCl 抽出物はReisfeldらによってヒトのリンパ節、脾、肺等に高い同種組織適合抗原(major histocompatibility antigen, MHA)活性が認められている⁶⁾。非常に簡単に作製でき冷凍保存が可能であるため実験に使用したが、しかし細胞膜の雑多なperipheral proteinの混入を含め、種々の蛋白の混入が予想される3 M KCl 抽出物はMHA活性のみならずその他の生物学的活性を持つ可能性が十分に考えられる。そのため、今回の実験でMHAが関与しているものとすれば、抗原提示能において抗MHA抗体による細胞間相互作用の阻止実験とantigen processingの阻害剤を用いた阻止実験で確認する必要がある。また、リンパ球増殖反応においてはT細胞を主眼とした実験であるものの、実際の増殖したリンパ球については確証ができておらず、この反応においてのT,B細胞の区別、さらにT細胞であればその主体がどのsubsetにあるのかが、STにおける機序の推定にも必要である。

第 I 群、第 II 群においてはdonorの肺とリンパ節およびrecipientのリンパ節の3 M KCl 抽出物をrecipientの皮内に注入し、第 II 群の3頭にはさらにdonorとは異なる他の雑種成犬の肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物をrecipientの皮内に注入した。その結果、recipientのリンパ節およびdonorとは異なる他の雑種成犬の肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物による皮膚の肉眼的な反応所見は認めなかった。そしてdonorの肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物は肺病理組織上の拒絶反応所見と一致して70%以上に皮膚の肉眼的反応を認めた。このことからdonorの肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物が肺拒絶反応の診断法として、皮内に注入することにより、肉眼的に判別できる反応を惹起できるものであると思われる。このSTはリンパ球増殖反応の結果よりアロ抗原が関与しているのであれば細胞性免疫によるものと考えられ、その反応の経過すなわち24時間以上要するものであることから遅延型過

敏症によるものとも予想できるが、浸潤細胞の詳細な検討と同系動物におけるリンパ球移入実験での確認を必要とする。少なくとも、同時に採取した対側背部の皮膚や死亡時に採取した舌の血管炎が明らかでないため、GVH反応の関与は否定的と推測している。また、肺拒絶反応時に約30%においてSTが生じなかったこと、イヌ以外にも生ずる反応であるかどうかを確かめるためにもSTの機序を解明することが重要と思われる。

肺拒絶反応は経時的に軽度の状態から不可逆的な重度の肺拒絶反応に至る経過をとるが、軽度の拒絶反応を示す時期にその治療を行なうことが極めて重要である。強力な治療により肺機能上にも障害を残さず治癒できる肺拒絶反応の時期が早期の肺拒絶反応であり、OLBによって得られた肺病理組織分類上I期、II期を示す期間がそれに相当する¹⁰⁾。この期間がCsAの影響で変化するかどうかを確かめるため、免疫抑制剤非使用時の肺拒絶反応とCsAを投与していた後に生じた肺拒絶反応の程度を第I群と第II群においてI期またはII期に留まる期間について比較した。第II群においてこの期間は 4.50 ± 2.87 日となり第I群に比して有意に延長を示した。この期間が延長することは、診断上24時間要する皮内反応であっても、臨床上CsAが投与されている肺移植患者に活用できるとと思われる。

現在肺拒絶反応を臨床的に診断する方法として最も普及しているものは胸部X線写真(CXP)である。また気管支粘膜血流(BMBF)の減少をみる方法も報告されている⁴⁾。そこで第I群では免疫抑制剤を使用せず肺拒絶反応を惹起させ、第II群では移植手術の影響が少なくなると考えられる時期にCsAを中止し、CsA前投与の影響下で肺拒絶反応を惹起させる実験モデルを用いて、開胸肺生検(OLB)による病理組織所見を肺拒絶反応の基準としてST,CXPおよびBMBFの陽性率を比較検討した。また、第III群は臨床に近い状態としてCsAおよびAZP投与の後、ST,CXPおよびBMBFを施行し、その中でSTによる診断にもとずいて拒絶反応の治療をおこなった。

第I群、第II群においてSTはOLBによる肺拒絶反応0期に陽性を示さず、これに対してCXPおよびBMBFは第I群でそれぞれ20.0%,40.0%、第II群ではそれぞれ11.1%,33.3%の陽性率を示した。つまり、STは肺病理組織上に拒絶反応を認めない時には陽性を示さず、CXPおよびBMBFはこの状態で陽性を示すものがあつた。特に第I群で0期でありながらCXPおよびBMBFの陽性率が高かつたのは手術の影響およびreimplantation response⁹⁾が関与しているものと思われる。肺拒絶反応による肺病変が可逆的であると思われる早期肺拒絶反応の期間すなわちI期とII期の期間でのSTは第I群で71.4%、第II群で72.7%の高い陽性率を示した。一方、CXPおよびBMBFはI期とII期の期間で第I群ではそれぞれ14.3%,28.6%、第II群ではそれぞれ9.1%,54.5%であつた。すなわち早期の肺拒絶反応時にSTが70%以上の陽性率を示したのに対して、CXPおよびBMBFはその陽性率が低下していた。また、既に肺拒絶反応が進行した状態のIII期とIV期ではST,CXPおよびBMBFは第I群でそれぞれ81.8%,90.9%および63.6%、第II群ではそれぞれ83.3%,91.7%および66.7%となり、STで80%以上、CXPで90%以上、BMBFで60%以上の陽性率であつた。STの特徴として肺病理組織所見上、肺拒絶反応が認めら

れない時には陽性を示さず、早期の肺拒絶反応時に高い陽性率を示すことが挙げられる。

肺移植後にCsAおよびAZPを投与しSTによる診断で治療を行なった第III群でも、STと同時にOLB,CXPおよびBMBFも施行した。この第III群においては第I群、第II群でdonorの肺とリンパ節の3 M KCl 抽出物とその反応に解離を認めなかったため、また今後donorのものとしてrecipientに存在している肺を考慮して、donorの肺の3 M KCl 抽出物のみによるSTを施行した。第III群ではSTが陽性を示した時の肺病理所見上の肺拒絶反応III期が2頭、II期が3頭、I期が1頭であったが、同時に施行したCXPおよびBMBFが陽性を示したのは2頭および1頭のみであった。治療はCsA,AZP投与中の肺拒絶反応と考えsteroid pulse療法を3日間施行した。その結果、治療後OLBによる肺拒絶反応も6頭中5頭に軽減を認め、III期が1頭、I期が3頭、0期が2頭となった。steroid pulse療法後もIII期を示した1頭はsteroid pulse療法後7日目に拒絶反応と思われる肺肝様変化、肺融解にて死亡した。また、CsA,AZP投与中止時には3頭がST陽性を示したが、この時のOLBによる肺拒絶反応は2頭がIII期、1頭がII期であった。このことはCsA,AZP投与中においても肺拒絶反応が出現するとSTが陽性になり得ることを示している。臨床においても免疫抑制剤を使用しているも肺拒絶反応は出現するとされており、肺移植の成功のためには拒絶反応の早期診断、早期治療がますます重要なものと考えられる。肺拒絶反応の診断法として肺病理組織診断に代わる種々の診断法が報告¹⁰⁻¹²⁾されているが、CsA等の免疫抑制剤を使用している時の拒絶反応の早期診断の報告は殆どない。そのため、臨床上CsA,AZP投与中の肺移植患者に対して、STによる肺拒絶反応の早期診断法は有用であると考えられた。第III群でSTが陽性を示した時期がCsA,AZP投与中止3日後、6日後であったものは残り3頭で、OLBによってII期が2頭、I期が1頭と早期の肺拒絶反応であった。しかし、steroid pulse療法後にはOLBによる肺拒絶反応III期が1頭、I期が3頭いたのにも関わらず6頭全てがST陰性を示した。この原因としてはsteroid pulse療法による治療後1日から3日の間での検査であるためsteroidの強力な抗炎症作用が強く関与し、STが陰性所見を示した可能性が高いと思われた。

現象論的にdonorの肺の3 M KCl 抽出物によってSTによる肺拒絶反応の診断が可能であったが、今後、その機序の解明が最も重要な問題である。また、機序が解明された上でも、STとsteroidとの関係、STが頻回に施行可能であるか、またその定量化や施行間隔等の問題が種々残っているが、今回の実験でdonorの肺の3 M KCl 抽出物を用いたSTによって、肺拒絶反応の診断が拒絶反応の未だ可逆的である時期に、CsA,AZP投与中においても可能であることならびにSTによる診断によって早期治療が可能であることが示された。

以上、donor肺の3 M KCl 抽出物を用いた皮内反応によって、肺拒絶反応が軽度の時期である早期診断が70%以上に可能であった。また免疫抑制剤投与中においても肺拒絶反応の早期診断が可能で、この診断にもとずき施行した早期治療によって良好な結果を得た。臨床においても本法の応用によって肺拒絶反応の早期診断とそれにもとづく早期治療が期待できるものと思われた。

V. 謝 辞

最後に実験考察に際し、御助言の御厚意を賜りました木村廣光先生（国立小児病院小児医療研究センター実験外科）に深く感謝致します。

- 1) Patterson GA, Stinson EB, Hegerl R, et al: Lung transplantation. *Surg Clin North Am* 68 : 345-358, 1983
- 2) Higashimura T, Okamoto S, Itohara A, Wallwork J: Transbronchial lung biopsy for the diagnosis of bronchiolitis obliterans in lung transplant patients. *Transplantation* 46 : 372-379, 1988
- 3) Tazuke H, Taniuchi T, Inoue S, Kurogawa M: Early detection of lung rejection by monitoring of bronchoalveolar fluid flow using laser doppler flowmeter. *Trans Proc* 21 : 2590-2591, 1987
- 4) Yoffe JJ, Stinson EB: Improved results for heart-lung transplantation. *Ann Surg* 171 : 253-258, 1970
- 5) Kawanishi M, Kawanishi H: Serological and clinical characterization of human lymphoglycine antigen. *Pathol Res* 26 : 589-590, 1970
- 6) Yoshida S, Kanda T, Harada H, Higashimura T, Ohno T, Sato H, Ishimae T, Shirahata Y, Nishida T: Histologic and serologic diagnosis of rejection in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 95 : 323-330, 1987
- 7) Jennings M, Luk SC, Cheng J, et al: Lung A. Canine lung allotransplantation. *Ann Thorac Surg* 74 : 462-470, 1987
- 8) Yoffe JJ, Kambholz SL, Stinson EB, et al: Stinson EB: Lung transplantation 1983. *Transplantation* 35 : 217-218, 1983
- 9) 木村 廣、北條 五、高橋 隆、高橋 隆志、一ノ瀬 隆志、白石 裕徳、伊田 祐：肺移植受容体における免疫学的反応とインフルエンザウイルスによる拒絶反応早期診断の研究。 *移植 36* : 263-269, 1989
- 10) Higashimura T, Higashimura T, Okamoto S, Itohara G, Itohara G, Wallwork J: The use of bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of infection following heart-lung transplantation. *Chest* 97 : 786-789, 1990
- 11) Okamoto S, Itohara G, Itohara G, et al: Significance of biochemical markers in the diagnosis of canine lung allotransplantation. *Transplantation* 51 : 579-584, 1991

文 献

- 1) Maurer JR : Therapeutic challenges following lung transplantation. *Clinics in Chest Medicine* 11 : 279-290, 1990
- 2) Patterson GA, Cooper JD : Status of lung transplantation. *Surg Clin North Am* 68 : 545-558, 1988
- 3) Higenbottam T, Stewart S, Penketh A, Wallwork J : Transbronchial lung biopsy for the diagnosis of rejection in heart-lung transplant patients. *Transplantation* 46 : 532-539, 1988
- 4) Tanabe H, Yada I, Namikawa S, Kusagawa M : Early detection of lung rejection by measurement of bronchial mucosal blood flow using laser doppler flowmeter. *Trans Proc* 21 : 2590-2591, 1989
- 5) Veith FJ, Richards K : Improved technic for canine lung transplantation. *Ann Surg* 171 : 553-558, 1970
- 6) Reisfeld RA, Kahan BD : Biological and chemical characterization of human histocompatibility antigens. *Fed Proc* 29 : 2034-2040, 1970
- 7) Fujimura S, Kondo T, Handa M, Yamauchi A, Okabe T, Saito R, Ichinose T, Shiraishi Y, Nakada T : Histologic assessment of bronchial anastomotic healing in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94 : 323-330, 1987
- 8) Goldberg M, Luk SC, Greyson ND, Greenaway A : Canine lung allotransplantation. *Ann Thorac Surg* 24 : 462-473, 1977
- 9) Veith FJ, Kamholz SL, Mollenkopf FP, Montefusco CM : Lung transplantation 1983. *Transplantation* 35 : 271-278, 1983
- 10) 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
- 11) Otulana BA, Higenbottam T, Ferrari L, Scott JS, Igboaka G, Wallwork J : The use of home spirometry in detecting acute lung rejection and infection following heart-lung transplantation. *Chest* 97 : 353-357, 1990
- 12) Chang SC, Hsu HK, Perng RP, Shiao GM, Lin CY : Significance of biochemical markers in early detection of canine lung allograft rejection. *Transplantation* 51 : 579-584, 1991

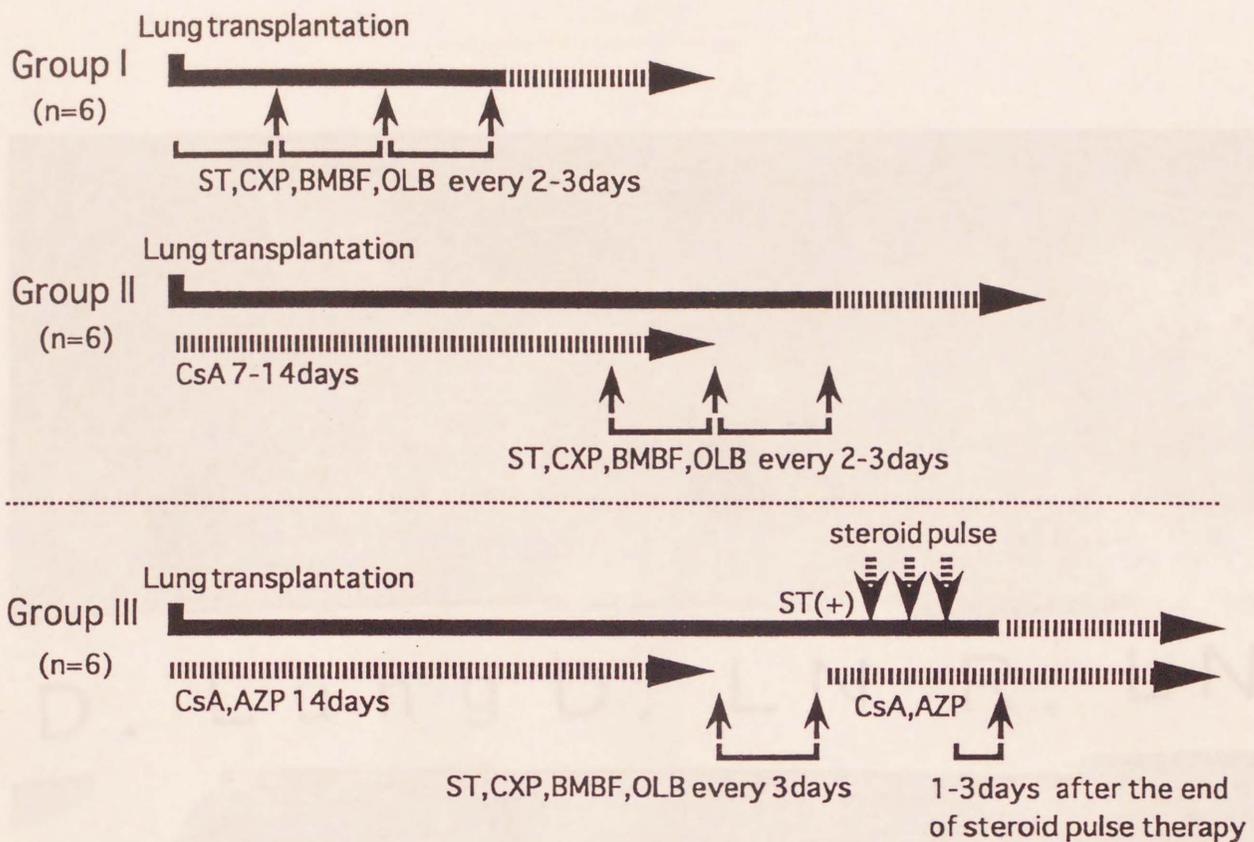


図1 実験モデル

ST: skin test, ST(+): positive response of skin test, CXP: chest x-ray photography, BMBF: bronchial mucosal blood flow, OLB: open lung biopsy, CsA: cyclosporine A, 20mg/kg/day, p.o., AZP: azathioprine, 25mg/body/day, p.o., Steroid Pulse: methylprednisolone, 500mg/body/day, i.v.

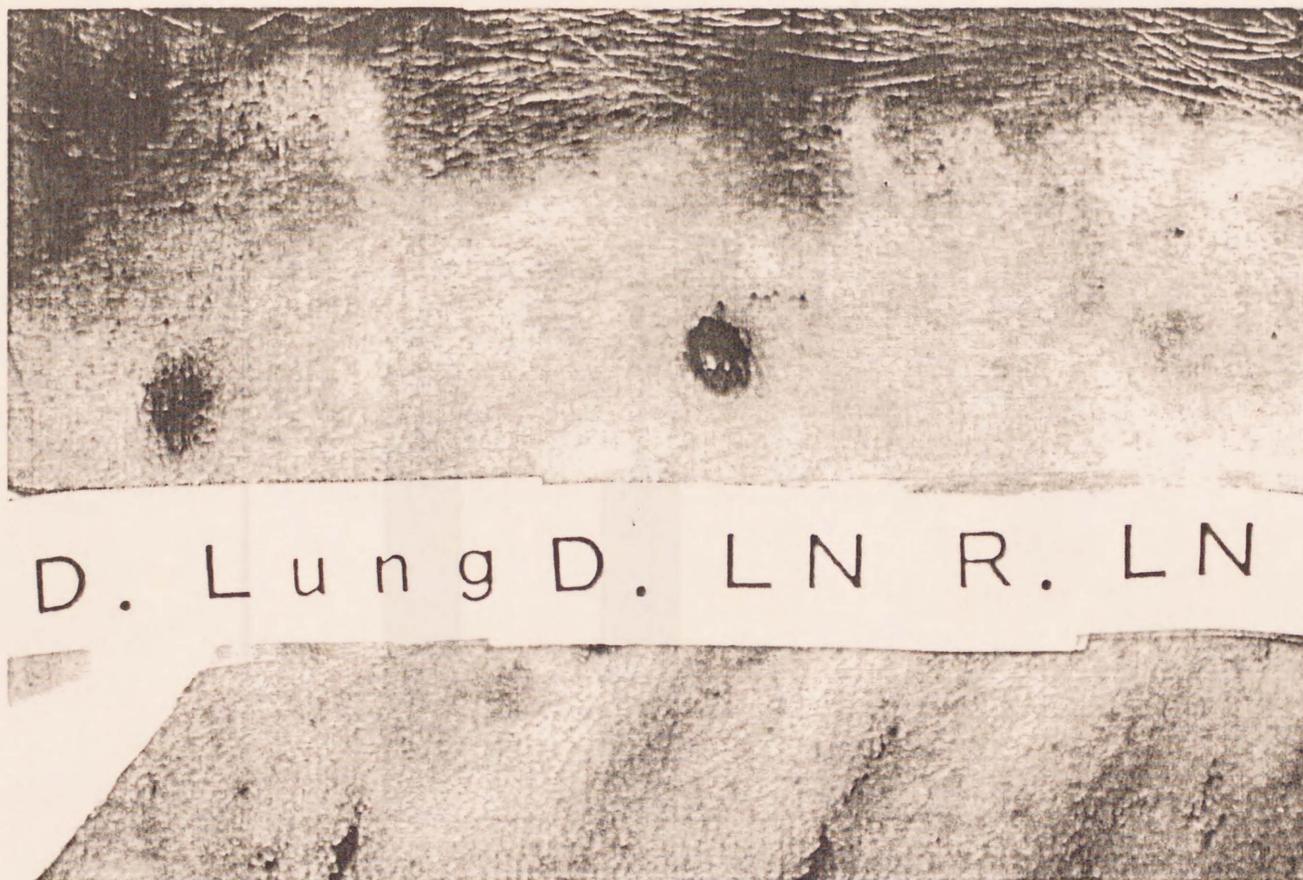


図2 3M KCl抽出物による皮内反応

肺病理組織所見上，肺拒絶反応が存在するときの3M KCl抽出物による皮内反応（皮内注入より24時間後）．左から順にdonor肺，donorリンパ節，recipientリンパ節の3M KCl抽出物による皮内反応でdonor肺，donorリンパ節が陽性を示した．

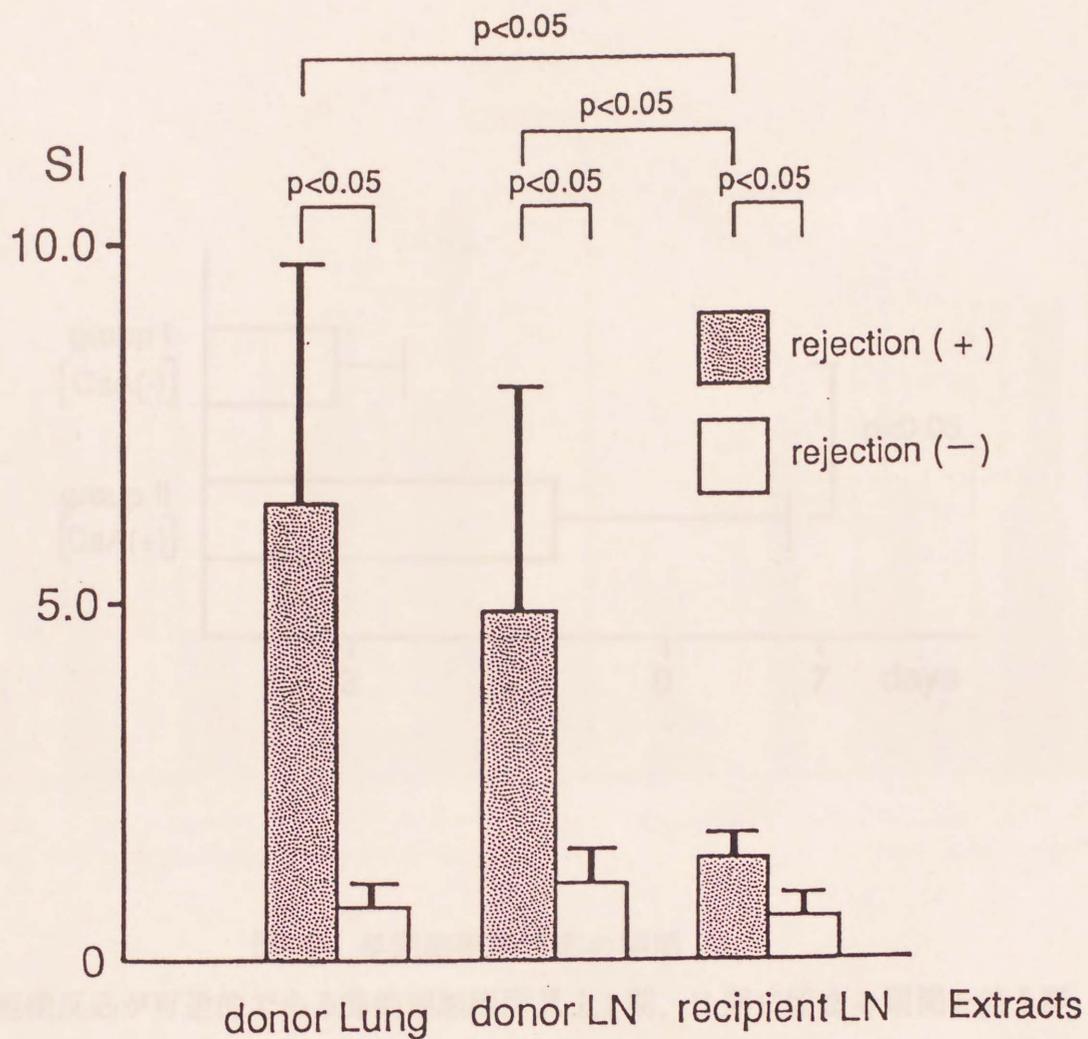


図3 3M KCl抽出物によるリンパ球増殖反応

CsA投与した第II群において肺病理組織所見上、肺拒絶反応が存在するときと存在しないときのdonor肺、donorリンパ節、recipientリンパ節の3M KCl抽出物によるリンパ球増殖反応。肺拒絶反応が存在するときのdonor肺、donorリンパ節の3M KCl抽出物のSIが高値を示した。

SI=lymphocyte proliferation with an extract(cpm)/lymphocyte proliferation without extracts(cpm)

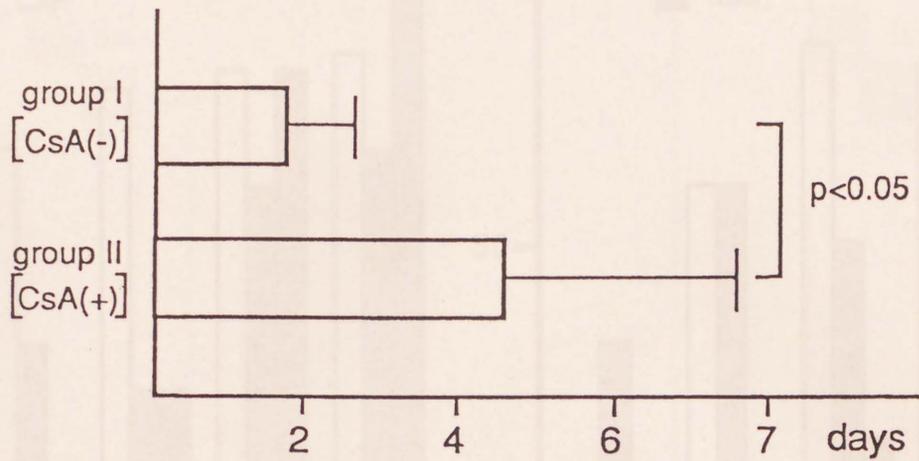


図4 早期肺拒絶反応の期間

肺拒絶反応が可逆的である肺病理組織所見上I期, II期に留まる期間を第I群, 第II群において比較すると, 第I群が 1.67 ± 0.75 日, 第II群は 4.50 ± 2.87 日であり, 第II群が有意に延長した($p < 0.05$).

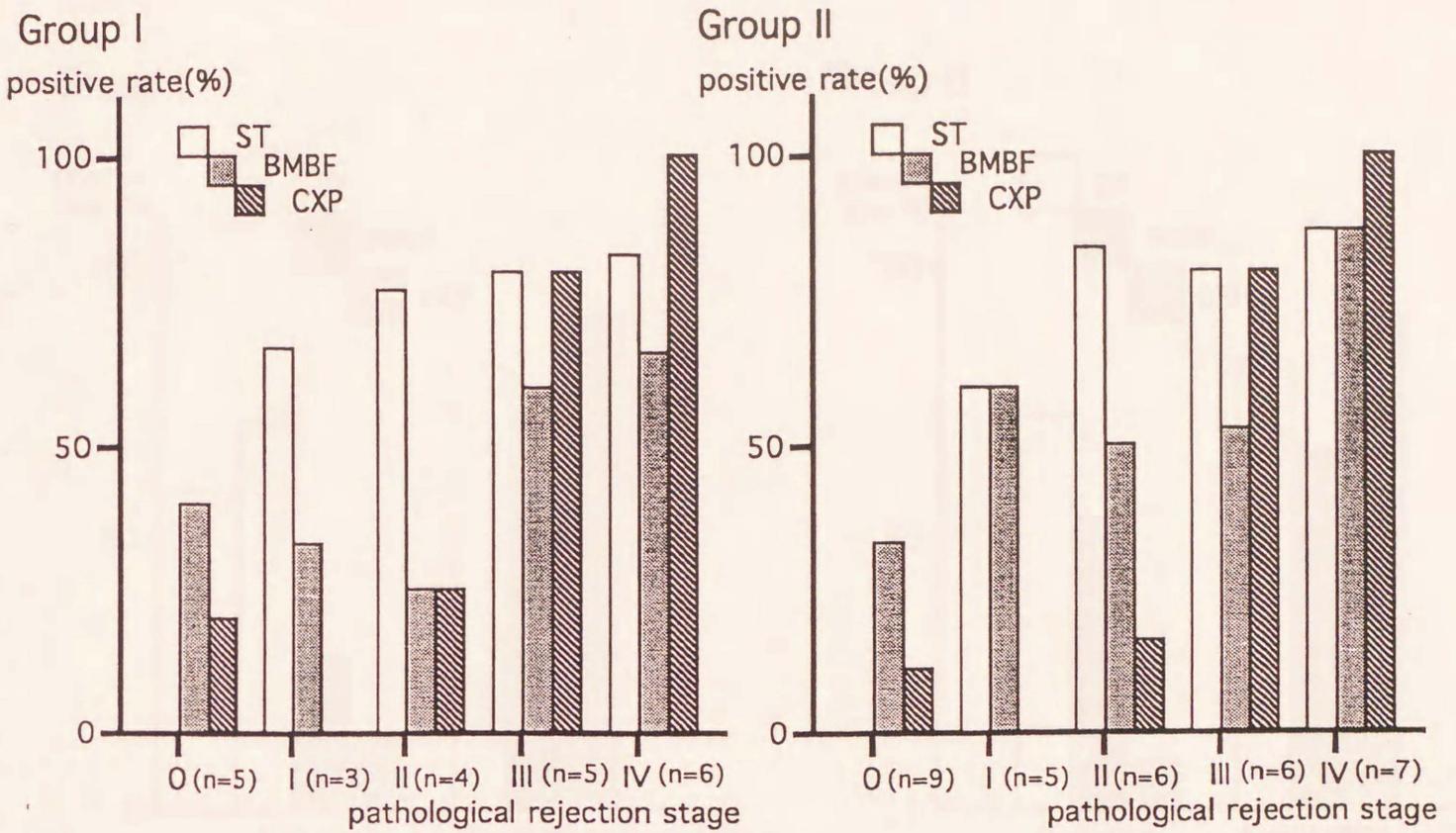
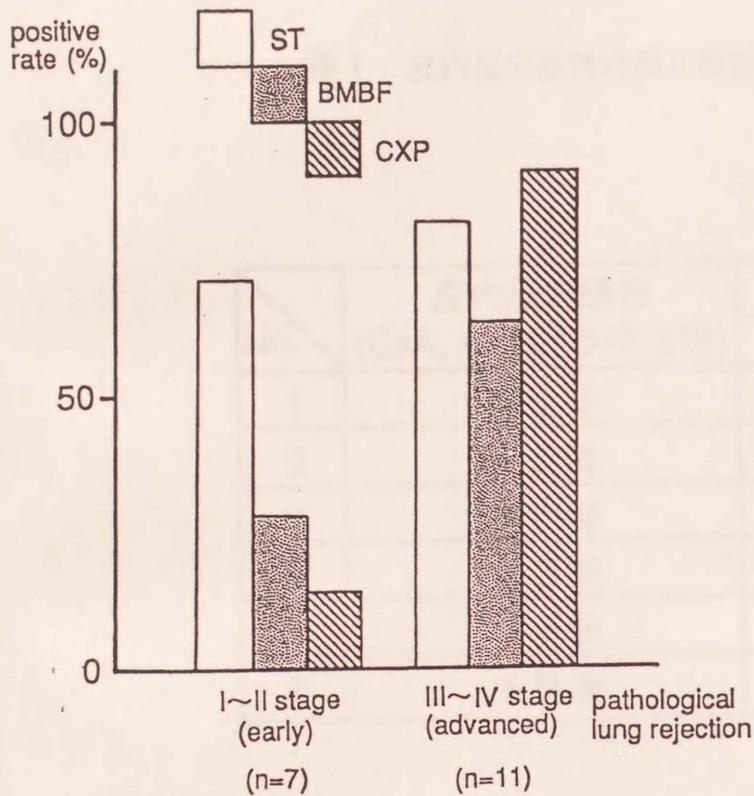


図5 肺拒絶反応に対する皮内反応，胸部X線写真，気管支粘膜血流の陽性率
 左：第I群，右：第II群を示す．n：各肺病理組織分類期における皮内反応をはじめとする諸検査の施行回数，ST：donor肺の3M KCl抽出物による皮内反応，
 CXP：胸部X線写真，BMBF：気管支粘膜血流
 第I群，第II群ともに皮内反応は0期で陽性を示さず，I期より高い陽性率を示す．

Group I



Group II

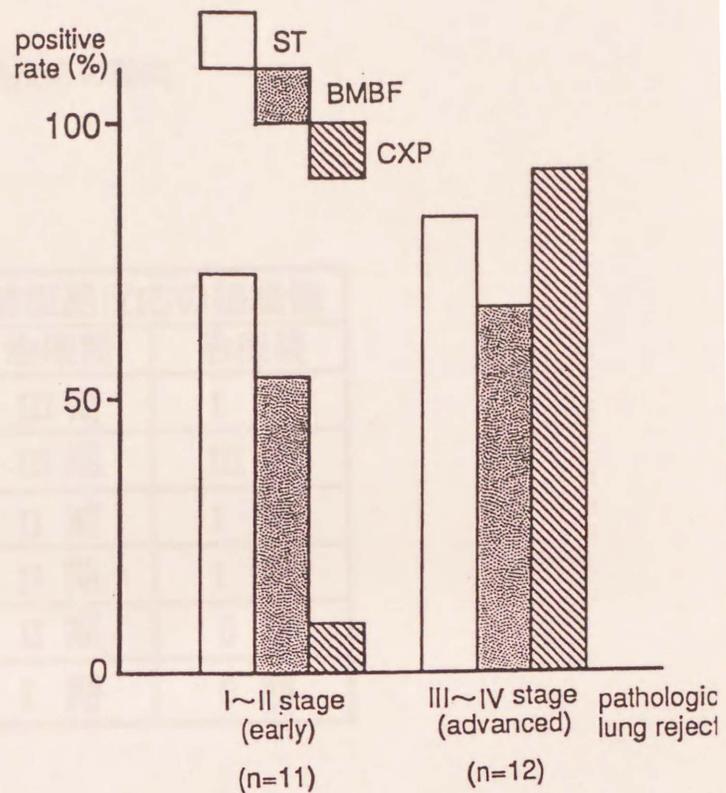


図6 早期および進行肺拒絶反応に対する皮内反応, 胸部X線写真, 気管支粘膜血流の陽性率

左: 第I群, 右: 第II群を示す. n: 各肺病理組織分類期における皮内反応をはじめとする諸検査の施行回数, ST: donor 肺の3 M KCl 抽出物による皮内反応, CXP: 胸部X線写真, BMBF: 気管支粘膜血流, early: 可逆的な肺拒絶反応の時期, advanced: 不可逆的な肺拒絶反応の時期

第I群, 第II群ともに皮内反応は可逆的な肺拒絶反応時期に高い陽性率を示す.

表 1 皮内反応陽性時期と肺拒絶反応の動向

No.	皮内反応陽性 (CsA, AZP投与中止後)	肺拒絶反応の組織像	
		治療前	治療後
1	中止時	III 期	I 期
2	中止時	III 期	III 期
3	中止時	II 期	I 期
4	3 日後	II 期	I 期
5	3 日後	II 期	0 期
6	6 日後	I 期	0 期

No.: 第III群の6頭の犬の番号.

第III群においてdonor肺の3 M KCl抽出物による皮内反応がはじめて陽性を示した時期と, steroid pulse療法前後の肺病理組織分類期の関係を示す.

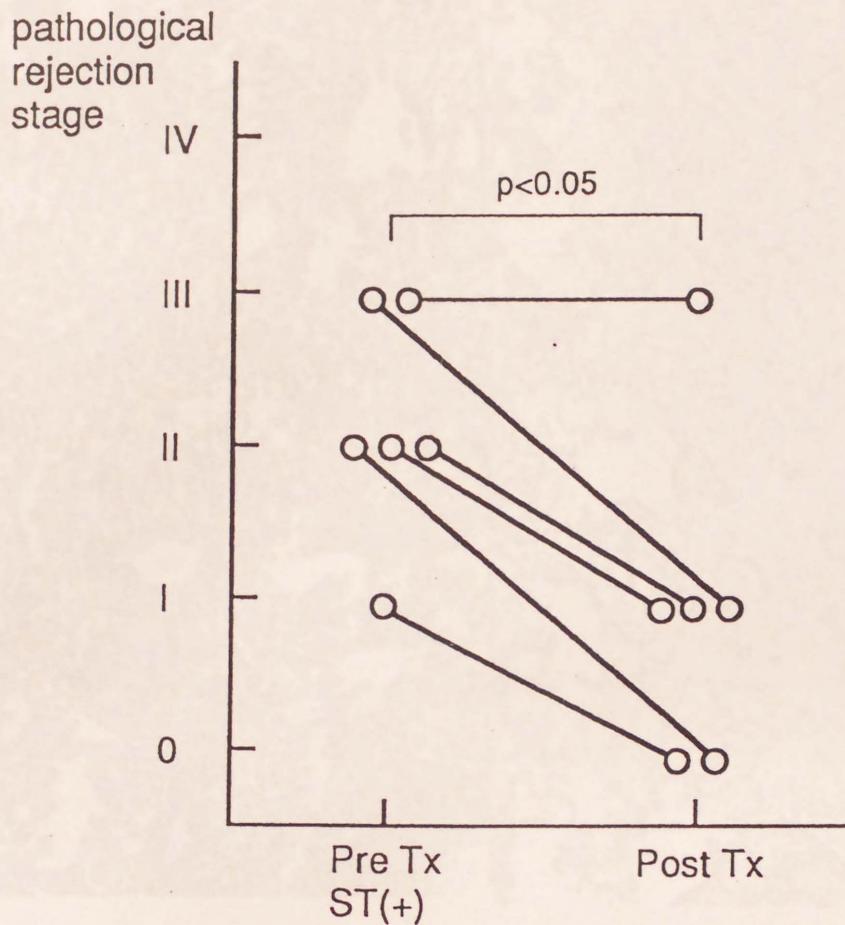


図7 治療前後の肺拒絶反応

Pre Tx,ST(+): donor 肺の3 M KCl 抽出物による皮内反応がはじめて陽性を示した steroid pulse療法前の時期, Post Tx: steroid pulse療法後1日から3日の時期.

第III群においてsteroid pulse療法前後で6頭中5頭が肺病理組織所見上肺拒絶反応の軽減を示した.

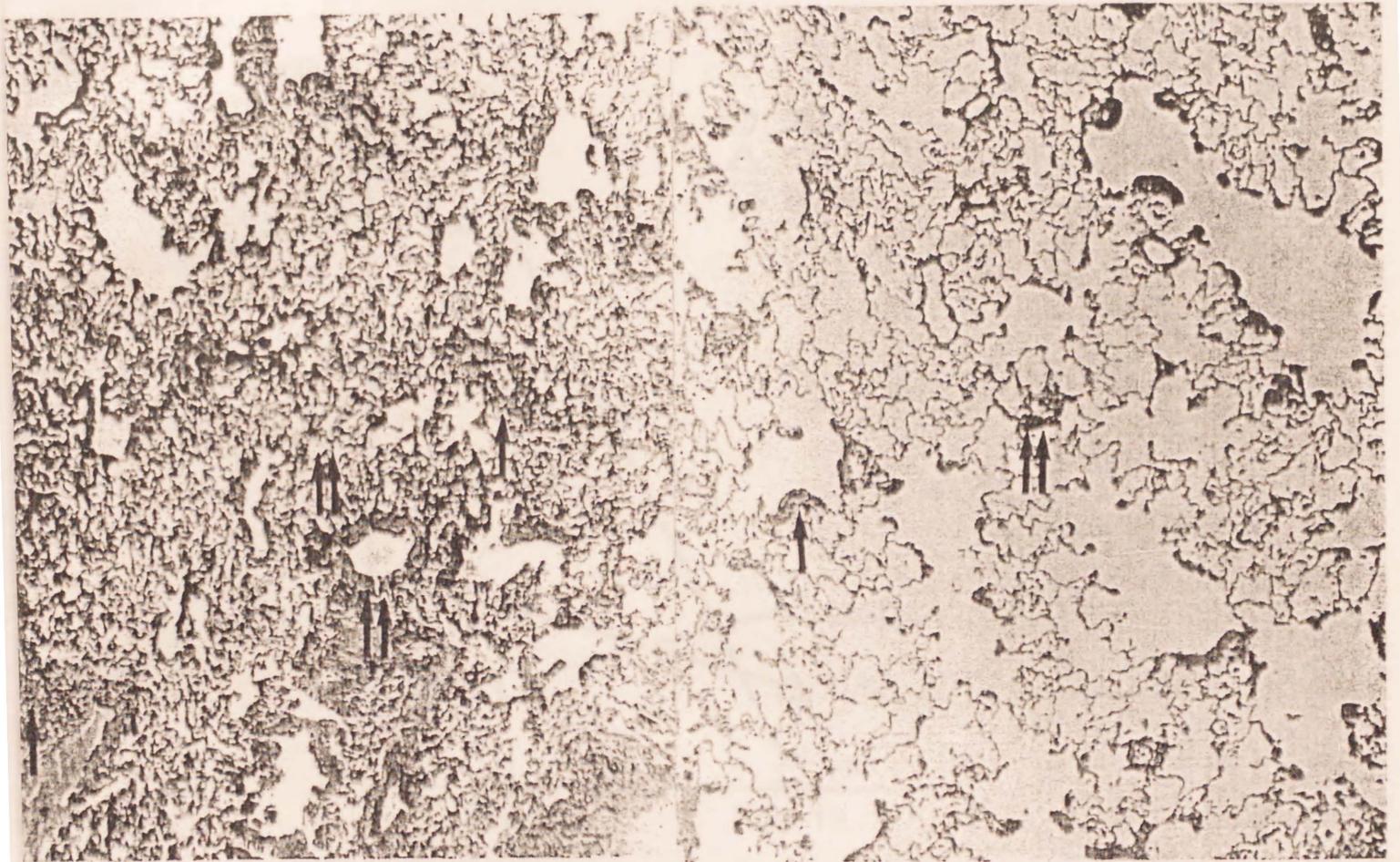


図8 治療前後の肺病理組織所見

左：肺拒絶反応 III期(steroid pulse療法前). 小血管周囲の単核細胞の浸潤と壁の肥厚(矢印↑)と，細気管支壁および肺胞壁の肥厚(矢印↑↑)，さらに単核細胞浸潤を認める肺胞構造の破壊(矢印↑↑↑)を一部に認めた(第III群，No. 1 犬，H&E染色，×25).

右：肺拒絶反応 I期(steroid pulse療法後). 細気管支壁に少量の単核細胞の浸潤(矢印↑)と小血管周囲に少量の単核細胞の浸潤(矢印↑↑)を認めるのみで，肺胞壁の肥厚および肺胞構造の破壊は認めなかった(第III群，No. 1 犬，H&E染色，×25).

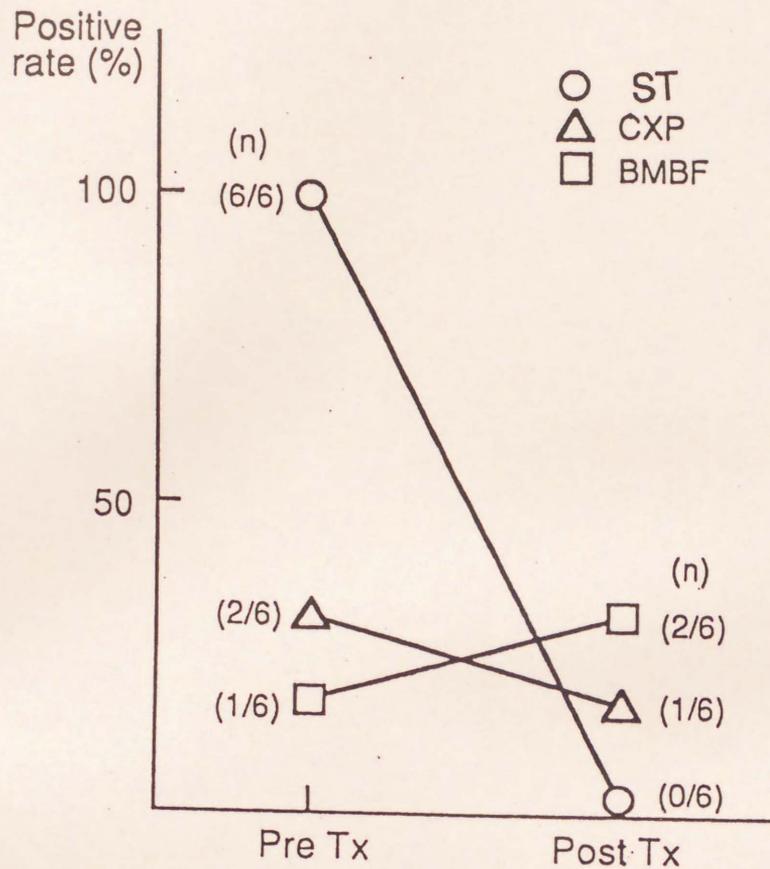


図9 治療前後の皮内反応，胸部X線写真，気管支粘膜血流の陽性率

ST: donor 肺の3 M KCl 抽出物による皮内反応， CXP: 胸部X線写真， BMBF: 気管支粘膜血， Pre Tx: donor 肺の3 M KCl 抽出物による皮内反応がはじめて陽性を示したsteroid pulse療法前の時期， Post Tx: steroid pulse療法後1日から3日の時期。

第III群において皮内反応はsteroid pulse療法後には6頭全例陰性を示した。