

論文の内容の要旨

論文題目 移植片保存による拒絶反応抑制効果とその機序の解明

—マウス異系角膜移植モデルによる検討—

氏名 神谷 和孝

角膜移植は、臓器移植の中で最も広く行われており、最も成功率の高い手術方法の一つである。しかしながら、移植片混濁の原因としては、拒絶反応によるものが最多であり、角膜移植後の拒絶反応を抑制することは、最も重要な課題の一つであると考えられる。従来角膜移植で使用する移植片は、保存期間が短く、新鮮なほど良好な移植成績が得られると考えられてきたが、他の臓器移植と比較して、角膜移植では長い期間組織を保存することが可能である。また、近年強角膜片保存法の導入および保存液の改良によって、ドナー移植片の代謝環境が良好となり、さらに長期に及ぶ保存期間の延長が可能になってきている。本研究では、移植片を保存することにより、その抗原性が減少し、移植後の免疫反応を回避できるのではないかとこの仮説に基づき、マウス異系全層角膜移植モデルを使用し、移植片保存による拒絶反応抑制効果とその機序について検討した。

レシピエントとして BALB/c、ドナーとして C3H/He, B10.D2 マウスを用いて、直径 2mm のドナー角膜片を強角膜保存液 (Optisol-GS[®]) 内に 4°C にて (3.7.) 14 日間保存した後に、レシピエントに 11-0 ナイロン糸 8-12 針端々縫合した後、手術顕微鏡下で経過観察した。また、保存せず直ちに移植したものを対照とした。

1. 移植片保存による生着延長効果

(1) MHC、Minor H 不適合系での検討

MHC、Minor H 不適合系による異系移植後、無保存群は、術後 4 週以内に 90% (n=20) が拒絶されたが、14 日保存後の同系移植群は、全例 (n=19) 生着していた。術後 16 週の時点での移植片生着率は、3 日保存群で 38% (n=17)、7 日保存群で 56% (n=18)、14 日保存群で 70% (n=20) であった。無保存群に比較して、7 日保存群、14 日保存群は統計学上有意に生着が延長した ($p < 0.01$, Log-rank test)。

(2) Minor H 不適合系での検討

MHC 適合、Minor H 不適合系による角膜移植術後 16 週の時点での移植片生着率は、無保存群で 40% (n=15)、14 日保存群で 75% (n=16) であり、無保存群に比較して、14 日保存群は統計学上有意に生着が延長した ($p < 0.05$, Log-rank test)。

2. 組織学所見

術後 3 週のヘマトキシリン-エオジン染色の所見では、無保存アログラフトは移植片接合部を中心として細胞浸潤、浮腫が顕著であった。一方、保存アログラフトは細胞浸潤がごく軽度であり、移植片の

浮腫を認めなかった。

3. 細胞障害性 T 細胞 (CTL) 活性

術後 3 週の時点での無保存群マウス(n=6)の脾細胞の CTL 活性は、正常マウス(n=6)のそれに比較して有意な高値を示した($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。それに対し、保存群マウス(n=5)の CTL 活性は、無保存マウスのそれに比較して有意に抑制され、ほぼ正常マウスのレベルまで抑制されていた($p < 0.01$, Mann-Whitney U-test)。

4. 遅延型過敏(DTH)反応

術後 3 週の時点での無保存群(n=6)および 10×10^6 のドナー C3H/He 脾細胞を皮下注射した陽性対照群(n=6)マウスの DTH は耳介注射のみ施行した陰性対照群のそれに比較し、有意に高値を示した($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。それに対し、保存群(n=5)マウスの DTH は、ほぼ陰性対照群(n=6)のレベルまで抑制されていた($p > 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

5. ドナー脾細胞による感作後の DTH 反応

さらに移植片保存による DTH の抑制機序を明らかにする目的で、ドナー脾細胞による感作後の DTH を検討したところ、耳介注射のみ施行した陰性対照群(n=6)マウスの DTH は、 15×10^6 のドナー C3H/He 脾細胞を皮下注射した陽性対照群(n=6)のそれに比較し、有意に低値を示した($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。それに対し、保存群(n=5)、無保存群(n=7)マウスの DTH は、陽性対照群に比較し、有意な抑制を示さなかった($p > 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

6. ドナー MHC class I の発現の変化

保存前後の角膜組織における MHC class I の発現の変化をウエスタンブローディングにより検討した。

無保存角膜片では、ドナー由来 MHC class I の明確なバンドが検出されたのに対し、保存角膜片では、ドナー由来 MHC class I の発現が著明に減弱していた。

7. 移植片内皮細胞

保存前後の角膜片の内皮細胞形態を走査型電子顕微鏡により観察した。無保存角膜片の内皮細胞の境界は明瞭であり、細胞環境は良好である。一方、保存移植片のそれは一部細胞境界が不明瞭な部分が認められるが、角膜内皮細胞数はほとんど変化を認めず、良好な環境を保っていると考えられた。

本研究により以下のことが明らかになった。移植片を7日および14日間強角膜保存液中に保存した後、角膜移植を施行した症例は、移植片生着が有意に延長し、14日保存した症例が最も生着率が高かった。また、移植片保存により、角膜移植後の主要な細胞性免疫のエフェクター機構である CTL 活性、DTH 反応ともに抑制され、組織学的な検討からも、拒絶反応の抑制に有効であることが明らかとなった。今回の拒絶反応抑制の機序として、ドナー抗原 (MHC class I および Minor H) の抗原性低下による、認識相における抗原感作の回避 (failure of allo-sensitization) が考えられた。また、保存後の移植片の内皮細胞形態への影響は少なかったことから、临床上においても移植片保存が拒絶反応の回避に有効である可能性が示唆された。今後角膜移植において、移植片の viability を重視し、新鮮な移植片を使用するのではなく、保存による抗原性低下に伴う免疫反応回避効果も考慮した上で最適な手術施行時期を決定することが重要であると考えられた。