

急性拒否反応の補助的診断としての fine needle aspiration cytology の有用性に関する実験的研究

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 田崎 寛教授)

早川 邦弘, 嶋 亮, 出口 修宏, 田崎 寛

EXPERIMENTAL STUDY ON USEFULNESS OF FINE-NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY AS A DIAGNOSTIC TOOL OF ACUTE REJECTION

Kunihiro Hayakawa, Makoto Hata, Nobuhiro Deguchi
and Hiroshi Tazaki

From the Department of Urology, Keio University School of Medicine

The value of fine-needle aspiration cytology (FNAC) for the diagnosis of acute rejection in canine allotransplantation was determined. To reduce the surgical stress associated with repeated anesthesia and operations, the contra-lateral kidney was left intact. FANC, open biopsy and peripheral blood sampling were performed on day 0, 3, 5, postoperatively. Cytocentrifuged cell smear was prepared from each FNAC specimen, and stained with Giemsa. Specimen on day 3 had an increased number of mono-nuclear cells mainly composed of monocytes, and plasmacyte like cells appeared in the specimen on day 5. Also blastoid cells and atypical lymphocytes appeared, but they were not clearly identified. To exclude the contamination of peripheral blood from the specimen, we established an index, increased infiltrate score, to evaluate the percentage gap between the transplanted kidney and the normal own kidney. This score revealed that some kind of mono-nuclear cells increased on day 3, prior to the appearance of plasmacytes which were usually seen on day 5. On the other hand the specimen from the open renal biopsy on day 3 showed little change. We concluded that the FNAC is valuable in the early diagnosis of acute rejection of canine renal allotransplantation.

(Acta Urol Jpn. 36: 247-251, 1990)

Key words: Fine needle aspiration cytology, Acute rejection

緒 言 方 法

同種腎移植術後の急性拒否反応の診断には、現在種々の方法が用いられているが、移植腎組織の needle biopsy は、最も確実な診断方法の一つと考えられている。しかしこの方法には組織挫滅や出血などの様々な合併症があり、頻回に繰り返す行ことができないという欠点がある。この点 fine needle aspiration cytology (FNAC) は侵襲が少なく、移植腎の経時的な変化をとらえるために繰り返し施行することが可能である。今回われわれは、同種腎移植を行った雑種成犬に経時的に FNAC と open biopsy を行い、急性拒否反応に対する補助的診断としての FNAC の有用性を検討したので報告する。

体重 11.5~13.5 kg の雑種成犬を用い、2頭間で計6頭にネンブタール麻酔下で同種腎移植術をおこなった。術中、気管チューブを挿入し room air で補助呼吸下に管理した。手術は donor の左腎を摘出後、冷却したヘパリン加ユーロコリンズ液にて灌流し、recipient の右腸骨窩に腎静脈は右総腸骨静脈と端側吻合、腎動脈は右外腸骨動脈と端端吻合した。吻合には 6-0 ネスピレン両端針を用いた。数度にわたる麻酔、手術のストレスを軽減するため対側の自己腎は摘除せずに温在した。術中ラクテック G で補液をしたが、輸血は行わなかった。実験期間を通じて免疫抑制剤は用いなかった。術当日、第3日目、第5日目にそ

れぞれ移植腎、残存自己腎より FNAC, open biopsy を行い、また末梢血採血を行った。FNAC は RPMI 1640 medium 5 ml にヘパリン 50 単位を混合した溶媒を満たした 10 ml ディスポーザブルシリンジに 0.6 mm 径カラテン針を接続し、これを直視下に穿刺して組織を吸引した。検体はサクラ精器 Auto smear にて 900 rpm, 10 分間で cytocentrifuged cell smear を作成した後メタノール固定して、Giemsa 染色した。open biopsy による検体はホルマリン固定して、H-E 染色をした。各々から得られた標本は 400 倍光学顕微鏡下で 1 検体につき 4 か所以上カウントし、その平均の百分率を求めた。しかしながらリンパ芽球や、単芽球、変形リンパ球などの判別は、一部に明確に判定できたものがあるものの、多くは単球を含めその鑑別が困難であったため、今回は形質細胞、組織細胞を除くこれら全てを一括して結果を解析した。形質細胞は核の遍在性とその周囲の明堤および細胞質の色調から、また組織細胞は核の大きさと核および細胞質の独特の形態により他の単核球と区別したため、これらを別に分類した。すなわち FNAC による検体は、①顆粒球（桿状核球、分葉核球）、②単球やリンパ球を含む一部の単核球（形質細胞および組織細胞をのぞく）、③形質細胞、④組織細胞に分類した。このようにして同種腎移植をした雑種成犬 1 頭につき、移植腎と残存自己腎に分け、術当日、第 3 日目、第 5 日目ごとにそれぞれ FNAC による cytocentrifuged cell smear の百分率を求めた。今回の実験では実験例が 6 例と少数であることより統計検定による棄却や誤差を求めることをせず、粗計算のままとした。

結 果

実験期間を通して生存しえた雑種成犬では、第 3 日

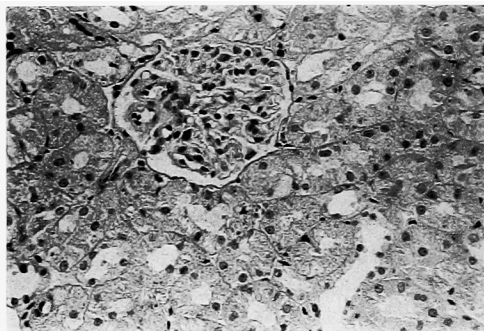


Fig. 1. Specimen of open biopsy, day 3. Only a few cells are seen at interstitium of the graft, while normal structure of glomeruli and tubuli are preserved.

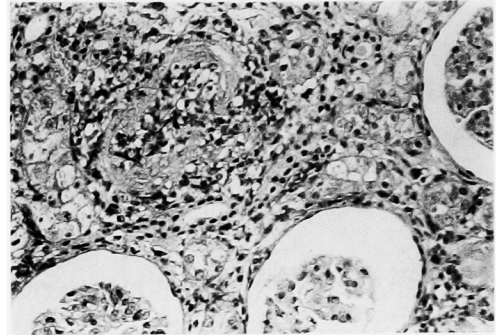


Fig. 2. Specimen of open biopsy, day 5. Although glomeruli look relatively intact, many mononuclear cells infiltrated at the interstitium, especially around vessels.

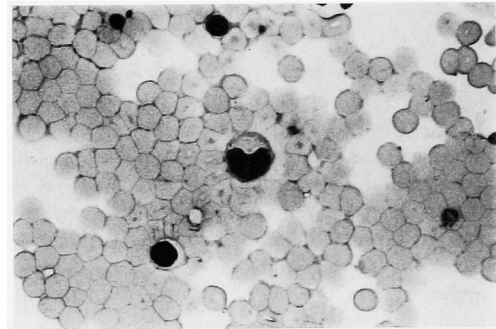


Fig. 3. Specimen of FNAC, day 3. At the center of this photograph, monocyte can be seen, and lymphocytes at top and bottom.

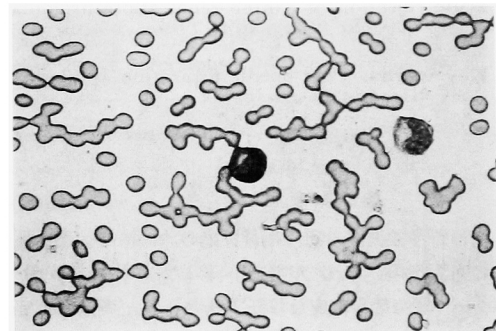


Fig. 4. Specimen of FNAC, day 5. A plasmacyte characterized by its clear band around the nucleus and blue cytoplasm can be seen.

目の open biopsy はいずれも移植腎の変化は軽微で正常ネフロン（腎の機能単位）の形態を維持し、間質への細胞浸潤も一部にごく軽度見られるのみであったが（Fig. 1）、第 5 日目になるとネフロンの形態は比較的維持されているものの、尿細管間質、特に血管周囲に単核球を中心

Table 1. Percentage of centrifuged cell smear from FNAC specimen

検体 番号	術後 日数	顆粒球 (桿状球)	顆粒球 (分葉球)	単核球	形質細胞球	組織細胞
1	残在自己腎	0	18.6	77.1	4.2	0
		2	20.5	66.3	3.3	0
		5	17.3	52.9	1.6	28.2
	移植腎	2	17.7	76.1	2	0.2
		5	26.6	62.2	6.6	1.2
						3.4
2	残在自己腎	0	17.2	58.6	10.3	0
		3	22.3	31.9	11.7	6.4
		5	51.3	28.7	7.4	0.2
	移植腎	3	24.3	36.4	28.6	2.3
		5	35.6	32.2	14.2	11.3
						6.7
3	残在自己腎	0	35.9	37.2	20.5	2.6
		3	41	51.2	6.1	0.7
		5	66.2	23.5	6.5	0.7
	移植腎	3	31.7	40.5	12.3	3.4
		5	55.5	22.5	11.4	5.2
						5.5
4	残在自己腎	0	45.5	20	5.5	0
		3	33.5	49.2	5.4	0
	移植腎	3	37.8	51.7	8.4	0.2
5	残在自己腎	3	34.7	33.1	8.9	1.6
		5	43	40.4	10.5	0
	移植腎	3	53	28.7	13.9	1.8
		5	26.3	30.5	24.2	5.3
						13.7
6	残在自己腎	3	30	52.5	7.5	2.5
	移植腎	3	41.5	31.7	12.2	0

単位: %

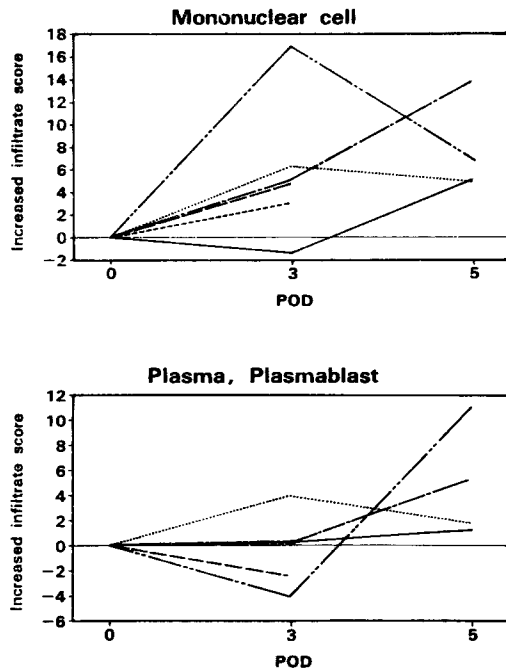
Table 2. Increased infiltrate score -1

検体 番号	POD	Stab.	Seg.	Mononuclear	Plasma	Tissue cell
1	2	-2.8	9.8	-1.3	0.2	-7.4
	5	9.3	9.3	5.0	1.2	-24.8
2	3	2.0	4.5	16.9	-4.1	-19.3
	5	-15.7	3.5	6.8	11.1	-5.8
3	3	-9.3	-10.7	6.2	2.7	10.6
	5	-10.7	-1.0	4.9	4.5	2.4
4	3	4.3	2.5	3.0	0.2	6.0
5	3	18.3	-4.4	5.0	0.2	-19.2
	5	-16.7	-9.9	13.7	5.3	7.7
6	3	11.5	-20.8	4.7	-2.5	7.1

とした細胞浸潤が顕著にみられ, mild から severe な急性拒否反応を示していた (Fig. 2). 一方 FNAC では, 第3日目より単核球を中心とした単核球がめだつようになり (Fig. 3), 第5日目では形質細胞系と思われる細胞の出現が明らかとなった (Fig. 4). このため拒否反応を起こしていない残存自己腎から得た標本とは明かに鑑別することができた. 一方 FNAC による検体から移植腎と残存自己腎に分け, 術当日, 第3日目, 第5日目ごとに cytocentrifuged cell smear

の百分率を求めた (Table 1). さらに末梢細胞の混入を除く方法として両者間の百分率の差をとり, increased infiltrate score を求めて評価の指標とした (Table 2). これをグラフ化したものが Fig. 5 であるが, 形質細胞系の細胞 (形質細胞, および形質芽細胞など) の増加は第3日目では6例中わずか1例にのみ認められるだけであるが, この時点で単核球の増加は6例中すでに5例に認められており, これにより第5日目より著明になる形質細胞系の細胞の出現に

Fig. 5 Increased infiltrate score -2



先立ち、すでに第3日目より単核球の増加がみられるという前述の傾向を比較的明瞭に示すことができた (Fig. 5).

考 察

FNAC が core needle biopsy などの組織生検に比べて有利な点は、侵襲度の違いにより移植腎に対しても繰り返し安全に施行することができ、このため短い間隔での経時的な変化をとらえることが可能な点にある。反面 FNAC の欠点の一つは、グラフトに活動性に浸潤している細胞のみでなく末梢血細胞も混入するため、その影響をできるだけ除いて評価しなければならないことがあげられる。このためわれわれは、正常自己腎からも FNAC を施行してコントロール群ととし、両者の差として活動性の浸潤細胞を捉える方法をとった。しかし臨床の間ではこのようなコントロール群を設定することはできない。このため von Willebrand ら^{1,2)} は、FNAC によって得られた移植腎の百分率分画より末梢血液の百分率分画を引いたものを increment として評価する方法をとっている。しかしながらこの方法も FNAC の検体への末梢血の混入が、浸潤細胞より遥かに多いという前提のもとで近似的に成立するもので、必ずしも問題がないわけではない。

また今回の実験は雑種成犬を用いて行ったため、各

種の免疫染色を施すことが困難であり、おのおのの細胞をその形態学的特徴のみで分類しなければならないという欠点があった。かりに各種抗原に対するモノクローナル抗体が利用できれば、移植腎浸潤細胞のリンパ球サブセットを解析することも可能であると思われる。

検体採取の方法については、Hammerer ら³⁾ は皮質と髄質では結果に有意の差があり、皮質から採取しなければ急性拒否反応やサイクロスポリンによる腎障害を正確に反映しないとしており、この点も考慮すべきであろう。われわれの実験系では、移植腎および自己腎に対し直視下に穿刺を行ったため、採取部位や穿刺の深度を自由に調節することができた。一般に炎症性細胞の浸潤には集簇性があり、FNAC による炎症細胞の数の大小がそのまま拒否反応の程度とは平行しないとの説⁴⁾があり、今回の実験では少なくとも2カ所以上の部位よりの採取をおこなった。これらより作成した標本は、検体番号をブラインドとしてカウントしたが、判定が不能であった不適切な標本を除けば、今回の実験では同一検体の中で明らかに相反する結果をもたらすものはなかった。しかし単独では拒否反応の診断を下すのは難しいと思われる標本も多く、これが浸潤細胞の集簇性の差のためであるかについては断定はできない。

臨床応用を考える際、移植腎に対して直視下に FNAC を行うことができないため、採取された検体が実際に移植腎から得られたものかどうかの判断が必要となってくる。これについては、手技的には超音波ガイド下の穿刺が考えられ、また得られた検体に関しては、組織細胞が一定の割合で混入しているかなどが判断の基準になると考えられる。

FNAC の結果の定量化には困難な点も多いが、今回のわれわれの結果から FNAC を経時的に反復検査することによって急性拒否反応の早期診断が可能になると考える。すなわち第5日目特に顕著にみられる組織生検による病理像は、Porter による分類の acute rejection reaction の predominantly cellular reaction に当たると考えられ、病変は主に間質、尿細管や小血管にあり、単核球主体の細胞浸潤がみられ、いわゆる tubulitis の像を呈している。一方 FNAC では第5日目より著明になる形質細胞系統の細胞の出現に先立ち、組織生検上は未だ軽微な変化にとどまっている第3日目よりすでに一部単核球の増加がみられはじめている。つまり今回の FNAC による細胞の動きは組織生検による移植腎の変化にはほぼ平行し、このような急性拒否反応の成立に関わる移植腎へ

の浸潤性の細胞の動きを反映したものとみることができ、以上のことから FNAC によって得られた細胞分画の変化が場合によっては拒否反応の成立を臨床的、血清学的診断に先立ち、より早期から明確に示す可能性もあり得ることが示唆された。

結 語

1. 雑種成犬に同種腎移植術を行ない、FNAC による急性拒否反応のモニタリングとしての有用性を検討した。

2. FNAC の結果の定量化には困難な点も多いが、急性拒否反応を定性的にとらえるには有用であり、経時的に反復検査することによって臨床的、血清学的診断に先立つ可能性も示唆された。

本研究の一部は文部省科学研究費一般研究B (62480341)からの助成金によって行われた。

文 献

- 1) von Willebrand E: Fine-needle aspiration cytology of human renal transplants. *Clin Immunol Immunopathol* 17: 309-322, 1980
- 2) Hayry P, von Willebrand E: Monitoring of human renal allograft rejection with fine-needle aspiration cytology. *Scand J Immunol* 13: 87-97, 1981
- 3) Hammerer P, Arndt R, Kramer-Hansen H, Huland H, Klosterhalfen H: Consecutive selective aspiration cytology of renal cortex and renal medulla in kidney transplants. *Transplant Proc* 20: 577-578, 1988
- 4) Manalich R, Lagarde M, Cuellar C, Jimenez P: Intrarenal inflammation during rejection crises in renal allografts: comparison between fine-needle aspiration cytology and renal biopsy. *Transplant Proc* 20: 601-602, 1988
- 5) 小宮正文: 図説血球の見方. pp. 95-121, 南山堂, 1972

(Received on June 12, 1989)
(Accepted on August 8, 1989)

Editorial Comment

Von Willebrand, P. Häyry らにより導入された移植腎への FNAC については、その後多くの研究者により検討され、これについての国際シンポジウムも開催され、その有用性と共に欠点や限界も指摘されているが、今や欧米の多くの施設で日常的に行われている monitoring の一つである。したがって、この論文で取り扱われている内容もすでによく知られているものであるが、FNAC と移植腎バイオプシーを同時に行い、病理組織学的変化と FNAC の結果を対比して経時的に観察するという著者らの実験方法は、初歩的、古典的な方法ではあるが FNAC の臨床病理学的意義を検証する方法としてはきわめてよい実験系といえる。わが国においては、FNAC に関する検討はまだ少なく臨床的にもまだ確立したものとなっていないので、こうした研究も意義があるものと考えられる。

移植後3日目に open biopsy により得られた組織

においては、極く軽微な間質への細胞浸潤を認めるだけであるのに対し、FNAC では単核球の出現が目立つという所見は重要で、これと同じような所見が腎移植後の尿中細胞診でも得られることが知られている¹⁾。このことは FNAC (あるいは尿中細胞診)が必ずしもそのときの固定された器質的な病理組織学的変化をそのまま反映するというものではなく、もっと動的で機能的な病理学的変化を表現している可能性があるものと考えられる。従って、この研究において免疫染色による浸潤細胞および FNAC で得られた細胞の分類が行われなかったことが非常に残念である。今後の発展をぜひ期待したい。

東京女子医科大学泌尿器科

東間 紘

<参考文献>

- 1) 東間 紘: 腎移植後急性拒絶反応の診断法に関する研究. 東女医大誌 51: 704-723, 1981