

標識リンパ球を用いての移植免疫へのアプローチ

京大結核胸部疾患研究所 胸部外科学部

人 見 滋 樹

I. はじめに

移植片に対する宿主からの拒絶反応の主役はリンパ球系細胞であり、一方免疫学的に完成していない新生児期の動物に他系の成熟動物のリンパ球系細胞を移植すると移植されたリンパ球系細胞が宿主に対して反応して、いわゆる runt 病が惹起される。成熟動物に於ても、免疫活性細胞が多量に移植されると同種移植病を発症する¹⁾。

演者らは、成熟家兎を用いて交叉循環を行ない、その後になるいそうを主症状とする wasting syndrome が招来されることを報告^{2,3)}し、これを交叉循環病と命名しているが、これはその症状、発症の時期、および剖検所見などから、1種の同種移植病であろうと考えられる。

演者らは、これら host versus graft reaction や graft versus host reaction におけるリンパ球系細胞の動きを標識リンパ球を用いて検討したので報告する。

リンパ球系細胞の標識法としては、① 性染色体、② 免疫グロブリンのアロタイプ、③ ³H-thymidine による核の標識、の3方法を用いた。

II. 交叉循環病の概説

演者らのいう交叉循環病とは、無処置の成熟動物を用いて交叉循環を行なったあとに招来されるいわゆる wasting syndrome をいう⁴⁾。

動物は家兎を用い、交叉循環は股動脈と股静脈を用いて動静脈瘻を作製し、ローターポンプ

により1分間2mlの交叉循環を行なった。この方法では、1時間半ないし2時間で2羽の血液が均等に混和されることが、赤血球を⁵¹Crでラベルした基礎実験で明らかになっており、 5×10^8 個のリンパ球が交換される³⁾。

交叉循環後の家兎は、2～3日で術前の健康に回復するが術後10日を過ぎるころから、食欲不振、下痢、るいそう、立毛などの症状を特徴とする wasting syndrome を来たして死亡するものが、主としてペアーの一方に認められるようになる。一方、術後1～2カ月は健康を保ち、2～3カ月後に上記の症状を呈して死亡するものもある。

発症率をみると交叉循環後1カ月では16%、3カ月後で24%、6カ月後で38%である。

病理所見をみると、術後1カ月前後の早期死亡例と術後2カ月以後の晩期死亡例との間には明らかな差違が認められる。

早期死亡例では、脾臓やリンパ節における細網細胞、形質細胞を主とする増殖性の変化が著明であり、脾臓やリンパ節の基本構造はよく保たれている。

晩期死亡例の脾臓やリンパ節では、基本構造が乱れ、濾胞が萎縮し、リンパ球には Pyknotic が認められる。リンパ節の基本構造が破壊されリンパ球数が著明に減少している例もみられる。

演者らは、この両者の差違に注目し、便宜上これらをそれぞれ早期交叉循環病、および晩期交叉循環病と呼ぶことにした。

III. 性染色体を指標とする

交換リンパ球の追跡

交叉循環により2つの個体の間で互いに交換されたリンパ球が、その後相手の体内でどのような消長を示すのかを知るために、リンパ球の性染色体を指標として用いた。

雌雄2羽の家兎の間で交叉循環を行ない、術後に経時的に末梢リンパ球を培養して性染色体を目印として相手方のリンパ球の出現率を検討したわけである。

家兎のリンパ球培養法は京大放射線基礎医学教室の方法を用いた⁵⁾。

交叉循環直後、10日後、15日後に採血して培養を行ない、各被検血の標本からよく分裂し、かつ染色体が適当に分散しているリンパ球50個を選び、その性別を判定し、雌雄細胞混合率を算定した。

表1は、その成績である。交叉循環直後でも末梢流血中には相手の細胞はほとんど出現せず、10日および15日を経た後には相手の細胞は全く認められないことが判る。

1分間2mlというゆっくりとした血液交換では、股動脈から採血され股静脈へと輸血されたリンパ球は直ちに組織に捕獲されてほとんど再循環しないことが判明し、従って、末梢血所見からは、リンパ球の細胞キメラは証明しえなかった。

IV. 免疫グロブリンのアロタイプを

指標とする検討

同種動物の免疫グロブリン(Ig)の間に抗原性の違いがあり、その抗原性が遺伝的に支配されることが、Oudinにより家兎について明らかにされ、OudinはこのようなIgの異なった個々の抗原性をアロタイプと名付けている^{6,7)}。

Harris⁸⁾は、このアロタイプを指標として、他の家兎に注入された移植リンパ球がドナータイプのアロタイプを有する抗体を産生することを明らかにしている。

演者らも、交叉循環後の免疫活性細胞の動向を追求するために、このアロタイプを指標として利用した。

50羽の家兎のアロタイプを検査し、このうちから、互いにアロタイプを可及的に異とするペアを15組作成して交叉循環を行なった。

これら15組30羽のうち術直後に手技上の誤り等で死亡した3羽を除き、27羽について術後のアロタイプの推移を1週間々隔で追求した。その成績を表2にまとめた。

交叉循環では血清が相互に交換されるのであるから、対照として、30mlの血清のみを交換輸注する実験を5羽について行なった。表3はその成績で、輸注後1週間ではほとんど術前のアロタイプにもどっている。

表1 雌雄家兎をペアとした交叉循環後の末梢血中の雌雄リンパ球混合比

ペアー No.	性 別	直 後	10 日 後	15 日 後
		♂ : ♀	♂ : ♀	♂ : ♀
1	♂	50 : 0	50 : 0	50 : 0
	♀	0 : 50	0 : 50	0 : 50
2	♂	50 : 0	50 : 0	
	♀	3 : 47	0 : 50	
3	♂	†		
	♀	0 : 50	0 : 50	0 : 50
4	♂	48 : 2	50 : 0	50 : 0
	♀	0 : 50	0 : 50	0 : 50

表2 交叉循環後のアロタイプの推移

家 兎 No.	交 叉 前	交 叉 循 環 後					
		1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週以後
28 29	11—44 33—44	13—44	13—44	13—44	13—44	11—44	† 13週 † 6週
25 23	13—99 13—44	13—49 13—94	13—49 33—44	13—99			† 16週 † 12週
17 63	11—44 11—49	11—49 11—44	11—49 11—49	11—44 †			
18 22	33—44 13—49	13—49 13—44	33—49 13—49	33—44			
90 88	33—44 11—44	13—44 13—44	33—44 13—44	11—44			
97 140	33—99 33—44	33—49 33—49	33—49 33—49	33—99 33—49	33—49	33—49	† 6週
87 115	33—99 33—44	33—49 33—49	33—49 33—49	33—99 33—44			
116 136	33—49 33—44	33—49 33—49	33—49	†			
130 154	33—44 33—49	33—49 33—49	33—49	33—44 †			
76 145	33—45 33—49	† 屠殺 33—49			†		
11 12	13—99 33—44	33—49 13—49	33—49 13—49	† 33—44			
131 132	11—44 33—49	† 11—49	13—49	33—49			
65 69	13—99 11—44	13—49 11—99	— —	13—99 11—44			† 16週
74 141	33—45 11—44	31—44 11—45	31—45 11—45	33—45 11—44			
75 91	13—49 11—44	11—44 †	11—44	13—49			

表3 アロタイプを異とする血清輸注後の推移

家 兎 No.	アロタイプ	輸注血清	輸 注 後	
			1 週	2 週
1	11—44	13—99	11—44	
2	33—44	13—99	33—44	
3	13—44	11—49	13—44	
4	33—44	11—49	31—44	33—44
5	33—44	11—44	33—44	

これに対し、交叉循環群では、表2で示したように術後1週間で相手のアロタイプを有する免疫グロブリンを消失したものは2羽のみである(No. 29, No. 145)。3週間までに消失したものが19羽でその大半をしめている。4週後、5週後も相手のアロタイプを有していたものは各々1羽(No. 28, No. 140)である。

このことから、交叉循環により移入された免疫活性細胞は、すくなくとも術後2～3週間はその活性を有していると思われる。

次に交叉循環病とアロタイプの推移との関係を見ると、早期交叉循環病と診断されたものは7羽(No. 29, 63, 140, 136, 154, 145, 11)であり、このうち死亡時に相手側のアロタイプを有していたものは3羽(No. 140, 136, 11)であり、相手のアロタイプを証明しえなかったものは4羽(No. 29, 63, 154, 145)である。

術後3カ月後に死亡し、その剖検所見から晚期交叉循環病と診断されたものは4羽(No. 28, 25, 23, 69)である。この4羽は、いずれも相手のアロタイプを失ってから2カ月以上を経過してから死亡している。

このように、交叉循環により移入されたリンパ球系細胞は、宿主のリンパ組織で、宿主組織抗原に対する免疫反応を起こすとともに、宿主リンパ組織からは拒絶反応を受けつつ、術後1カ月内外で宿主を死亡せしめるか、拒絶されてしまうものと考えられる。

一方、晚期交叉循環病の発来機序については、積極的にこれを解明するデータはないが、G.v.H. 反応と H.v.G. 反応の結果、宿主リンパ系組織に何らかの遺伝的変調を来たして宿主組織を抗原と認知するに至ったものではないかとも考えられる^{1,9-11)}。

V. ^3H -Thymidine による リンパ球の標識と輸注実験

リンパ球系細胞の核を ^3H -thymidine で標識し、これを輸注し、ラジオオートグラフィーにて追跡する実験が Diderholm¹²⁾, Murray¹³⁾, 14), Mims¹⁵⁾, Everett¹⁶⁾, Gowans¹⁷⁾, Parrott¹⁸⁾ らによってなされている。

演者らも、移植されたリンパ球の宿主内での消長を知る目的で、まえもって移植リンパ球の全てを ^3H -thymidine で標識することを試みた¹⁹⁾。DNA 合成期は核に摂り込まれる thymidine で、リンパ球を高率に標識するには、体内に ^3H -thymidine が常に存在することが望ましい。成熟マウスの腹腔に $10\mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine を注射し、2重底のビーカーで飼育し、2時間毎に尿尿を集めて、その中の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定したところ、連続投与の間隔は数時間が理想的で、少なくとも12時間々隔で投与しなければならないことが判明した。演者らは体重 1g 当り $0.5\mu\text{Ci}$ を12時間々隔で投与し、最長90日間の投与を行なった。

実験は新生児マウスと生後3カ月マウスについて行ない、投与開始後1週間々隔で経時的に屠殺し、胸腺、脾臓、腸間膜根リンパ節を採取し、一部は液体シンチレーションカウンターにて mg 当りの放射能を測定し、一部はラジオオートグラフィーに供した。

図1、図2は、新生児マウスと成熟マウスの各臓器の放射能 dpm/mg を示したものである。両者とも脾臓の摂取量が最も多く、次いで腸間膜根リンパ節、胸腺の順となっている。これは

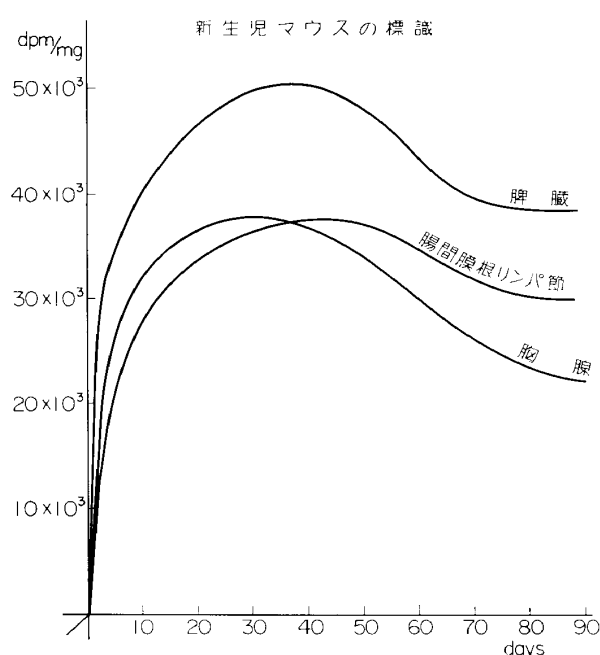


図 1

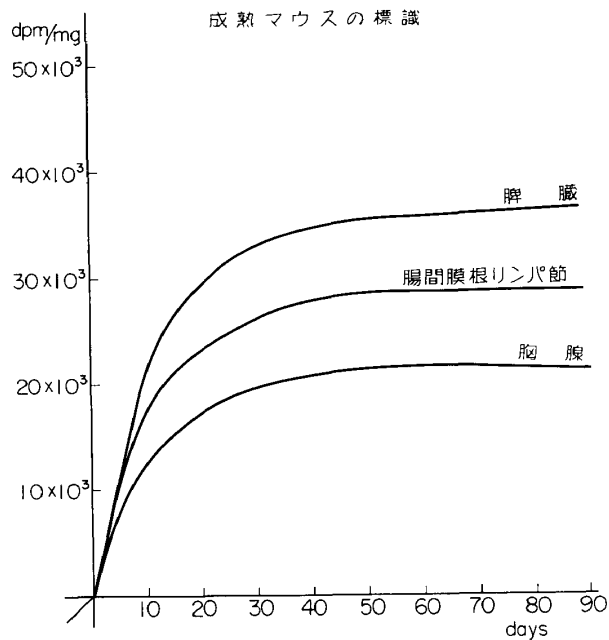


図 2

胸腺では DNA 合成に流血中の deoxycytidine が利用されるためであろうと考えられる¹⁹⁾,

新生児マウスと成熟マウスを比較すると各臓器とも新生児期に摂取量が多く, 以後次第に成熟マウスの値に近づくことが判る。

写真1 は成熟マウスに6週間投与した腸間膜

根リンパ節の暗殻の部分である。リンパ節型リンパ球が多くみられるが芽中心ではグレーンの数は少ないものもみられる。

尚, 90日間の投与でも放射線障害はほとんどみられなかった。

写真2 は, 以上のようにして標識した胸腺を金属メッシュにて破碎したものの塗抹標本である。全ての細胞が標識されている。

胸腺, 脾臓, 腸間膜根リンパ節から, 各々細胞を遊離して浮遊液とし, 同系のマウスに輸注して, 以後経時的に屠殺してラジオオートグラフィーにて輸注細胞を追求した。

写真3 は胸腺細胞 5×10^6 個を腹腔内に注入し, 3日後に屠殺したものの胸腺のスタンプ標本のラジオオートグラフィーで, 注入されたグレーンをもつ胸腺細胞が約10個認められる。

写真4 は, 脾臓の細胞 10×10^6 個を腹腔内に注入し3日後の胸腺で, 数個の標識された脾細胞がみられる。

このように ^3H -thymidine による標識法では, 移植リンパ球の追求は比較的簡単に行なえる。ただ, 細胞分裂により細胞1個宛の ^3H -

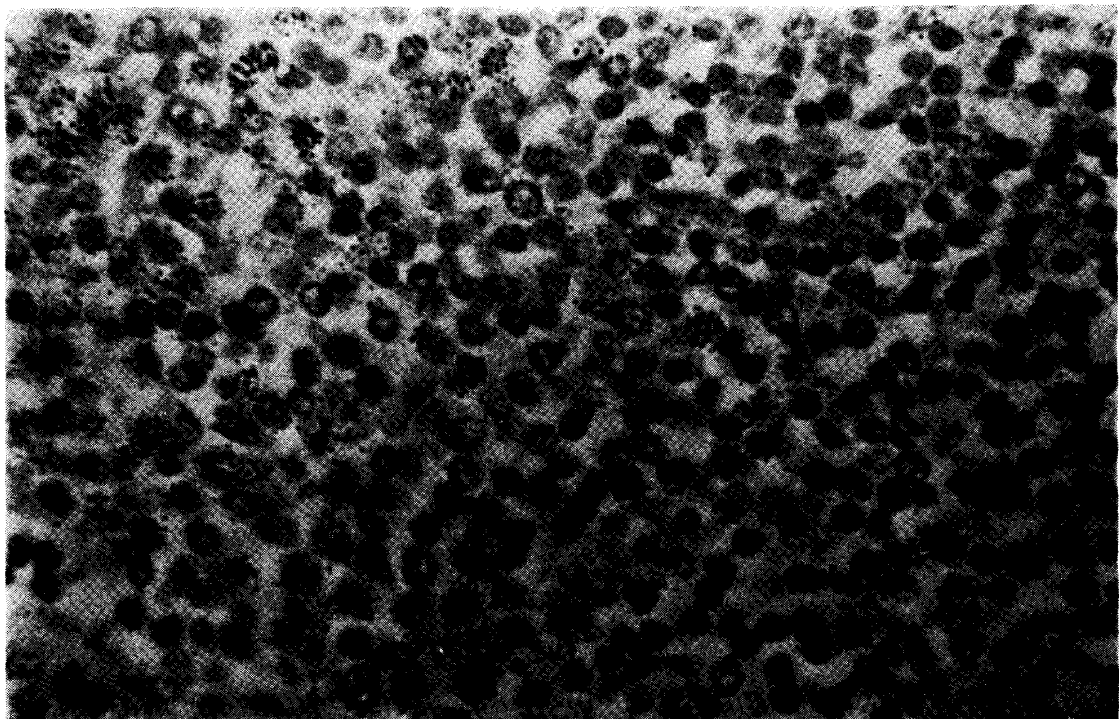


写真1 成熟マウスに ^3H -thymidins 6週間授与した腸間膜根リンパ節の暗殻, 80%以上の細胞が標識されている。

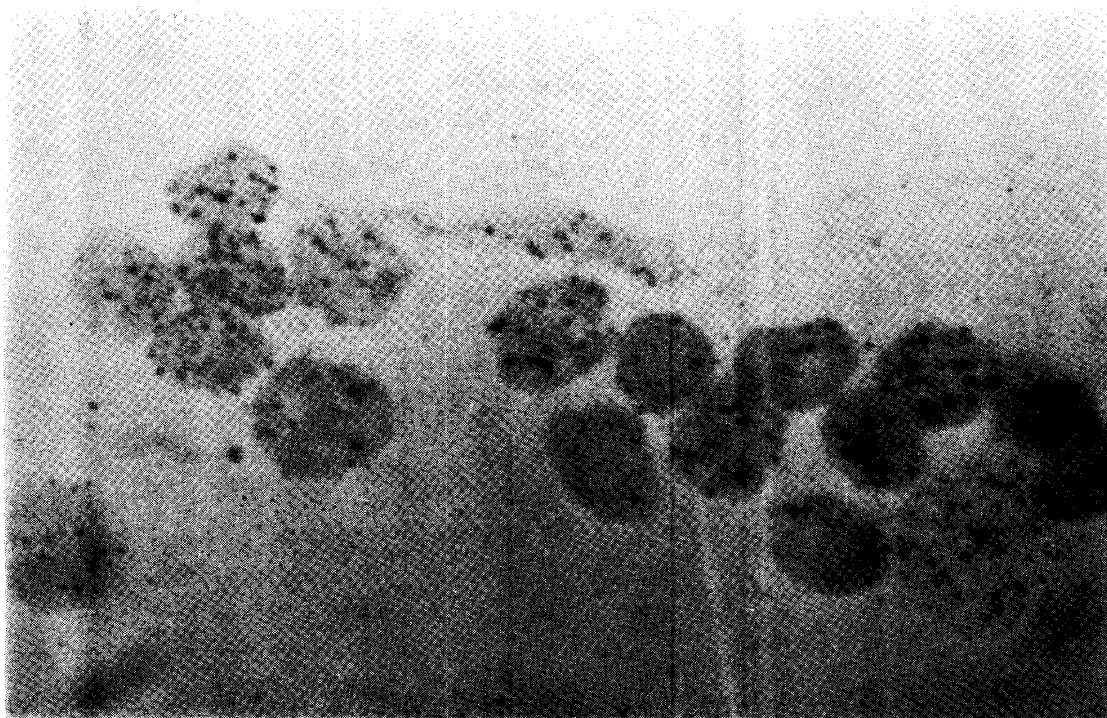


写真2 注入用標識胸腺細胞のラジオオートグラフィー

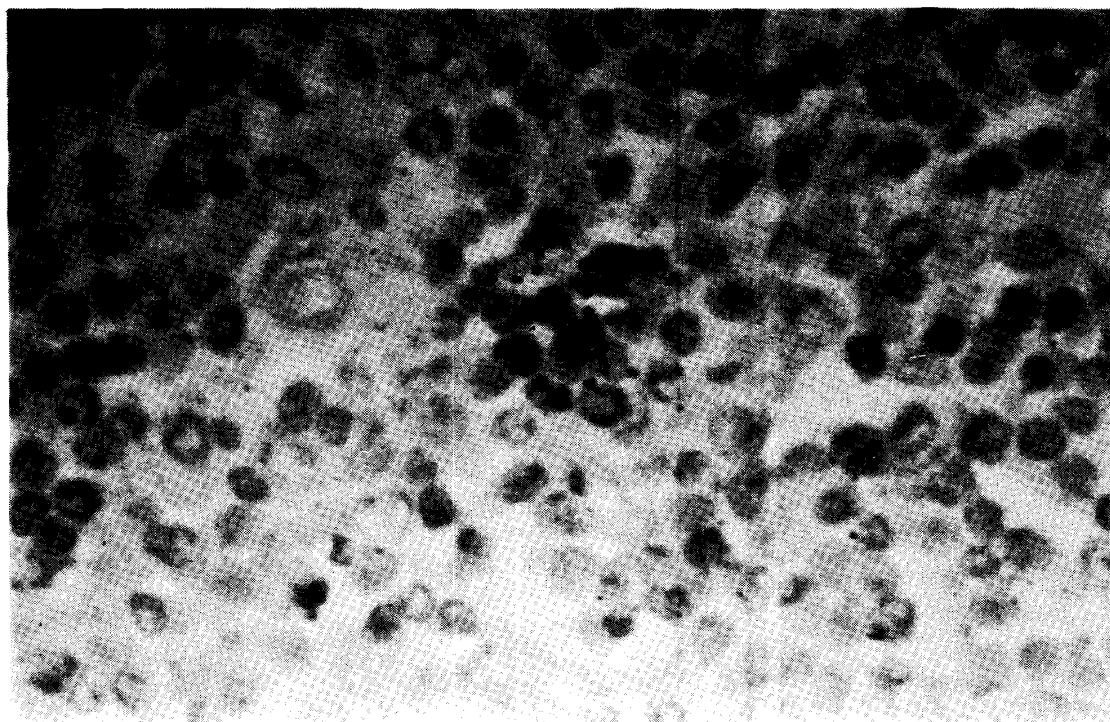


写真3 同系胸腺細胞を輸注されたマウスの胸腺のラジオオートグラフィー。視野の中央に数ヶの標識細胞がみられる。

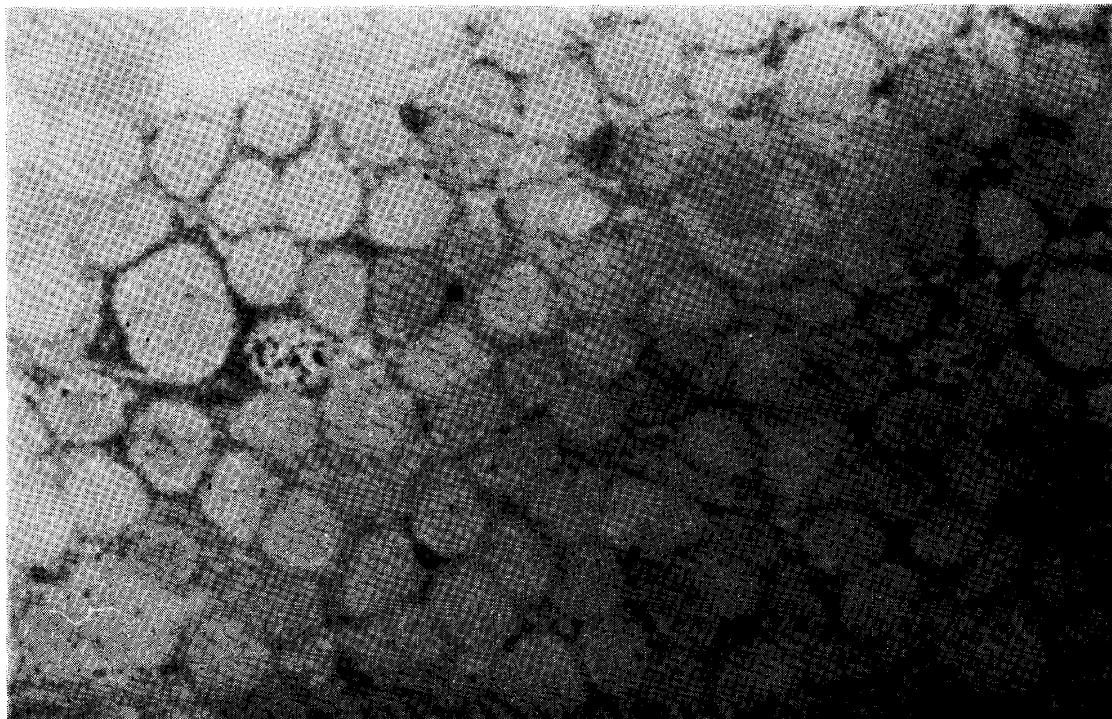


写真4 同系マウスの脾細胞を輸注されたマウスの胸腺。2ケの標識細胞がみられる。

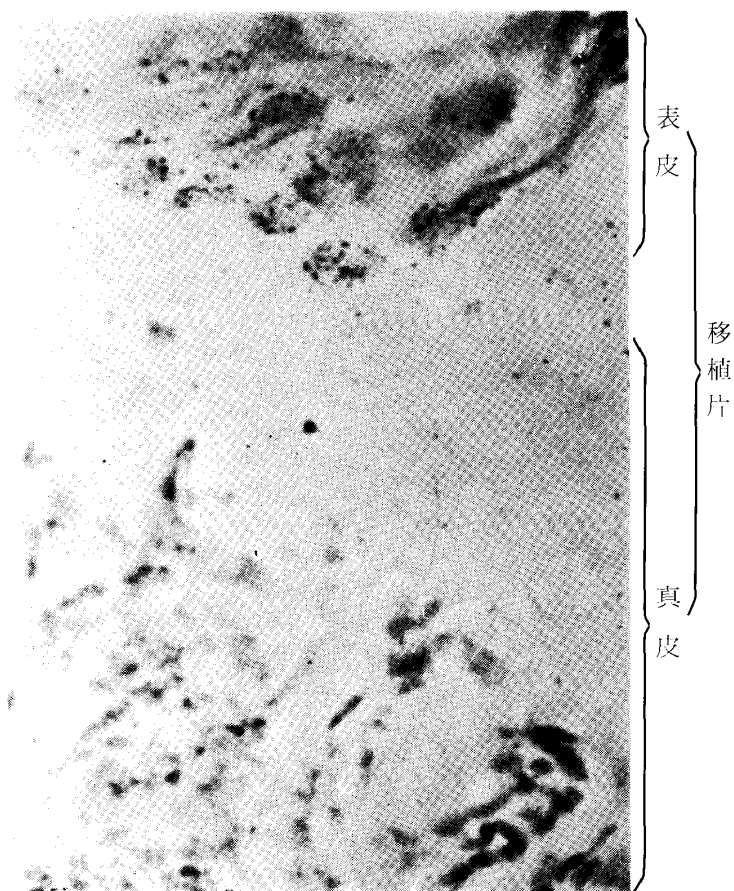


写真5 標識皮膚片移植後5日目、表皮の細胞は標識されている。視野の下半分は標識されていない。真皮層に浸潤して来た宿主の細胞である。

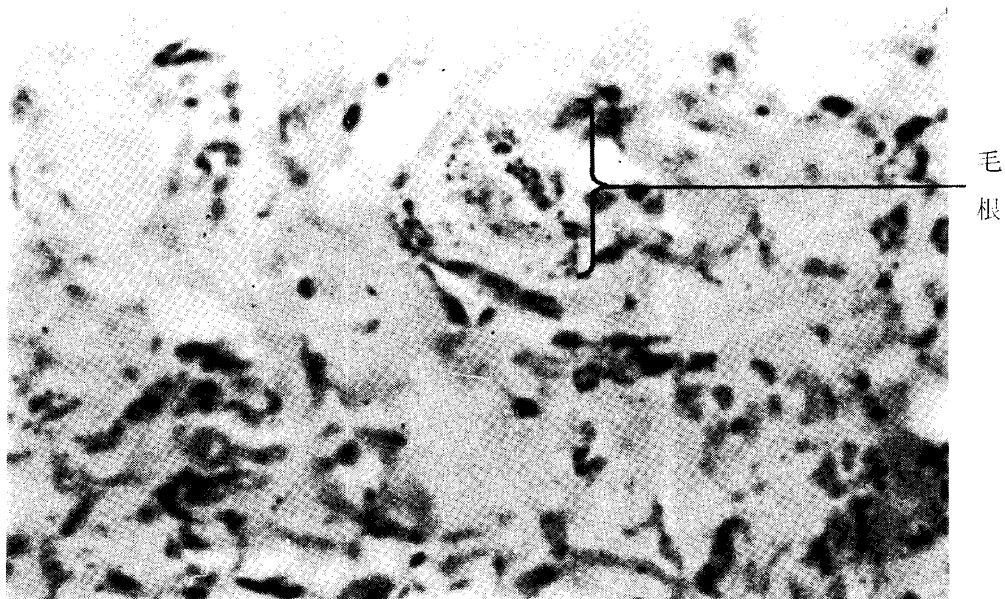


写真6 移植後5日目，視野の中央に，移植片の毛根が標識されており，周囲の真皮層には宿主からの細胞浸潤が多数認められる．

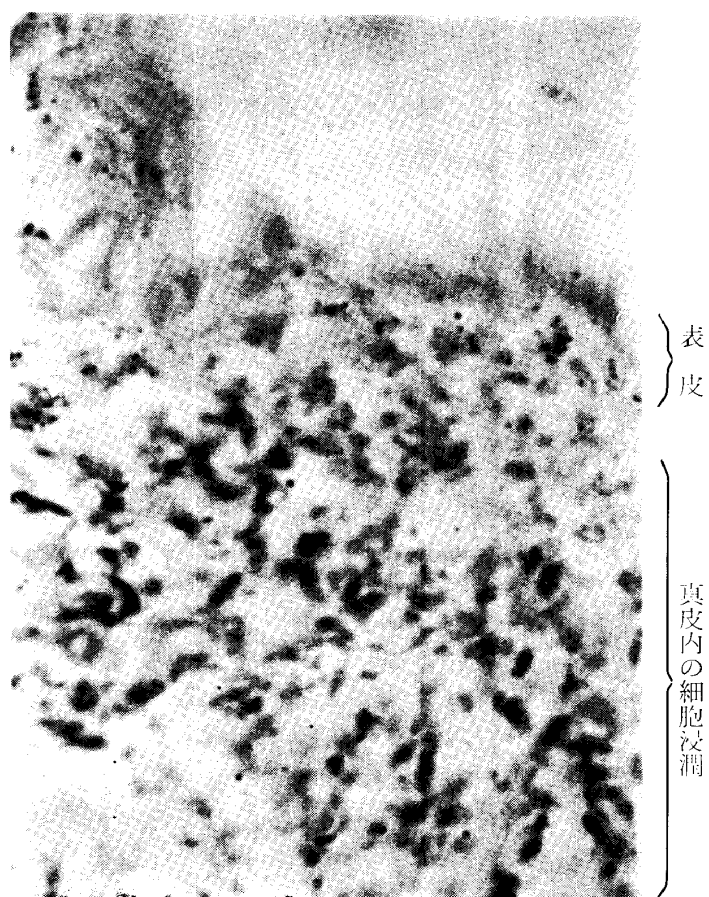


写真7 移植後7日目，表皮層のみに標識された細胞がみられ，その下に宿主からの細胞浸潤が認められる．

thymidine の量が減少すること、細胞が破壊された場合に再利用される可能性があることの2点から、移植後長期間にわたる観察には本法は不適當と思われる。

本実験はまだ途上にあるため、G.v.H. 反応や H.v.G. 反応について解明する十分なデータはないが、今後、リンパ球移植、リンパ球混合培養法における一方のリンパ球の標識法として応用していきたいと考えている。

VI. ^3H -Thymidine 標識皮膚片を用いての移植実験

DDY 系マウスに ^3H -thymidine を V で述べた方法で連続投与 (60~90日間) し、移植される皮膚の細胞を全て標識しておき、これを C57 Black の背部に移植し、経時的に屠殺してラジオオートグラフィーにて検討した。

標識された DDY の皮膚片では、表皮の胚芽層の細胞、それより深層の真皮と皮下組織にある毛根の細胞がラジオオートグラフィーにて全てグレーンを有している。

写真5 は、移植後5日目の組織標本であり、上半分の細胞は標識されており、移植片の細胞であることが判り、下半分の細胞は標識されておらず、移植片の真皮層の内へ浸潤して来た宿主の細胞であることが判る。

写真6 は移植片の真皮層内の毛根が、宿主側からの細胞浸潤により取り囲まれているところである。

写真7 は、移植後7日目のもので表皮層のみに標識された細胞が並び、その下は全て宿主側からの浸潤細胞で占められているところを示している。

このように、 ^3H -thymidine による標識を用いると、移植免疫における反応を組織学的に明確に追求することが出来る。

VII. おわりに

性染色体、免疫グロブリンのアロタイプ、

^3H -thymidine の3種の標識方法を用いて、交叉循環、リンパ球移植、皮膚移植などにみられる免疫学的反応を検討したので報告した。

(本研究に御協力下さった京大解剖学教室清木勘治先生、京大ウイルス研究所増田徹先生、京大放射線基礎医学教室桜井雅温先生、教室の共同研究者の諸学兄に感謝する)。

文 献

- 1) Billingham, R. F.: Reaction of grafts against their host. Transplantation immunity works both ways—host destroy graft and graft may harm host. Science, 130: 947-953, 1959.
- 2) 宮本信昭: 交叉循環の研究, 京大胸部研紀要, 2 : 246-277, 1969.
- 3) 人見滋樹: 交叉循環病の発来機序に関する実験的研究, 移植, 5 : 41-49, 1970.
- 4) Kekis, B. P., et al: Parabiosis with cross circulation in adult mongrel dogs. Ann. N. Y. Acad. Sci., 120: 367-378, 1964.
- 5) 張 炎森: 輸血用血液中の白血球系細胞の生存期間の検討, 日本輸血学会雑誌, 17 : 194-198, 1970.
- 6) Oudin, J.: The allotype of certain blood protein antigens. Compt. rend. Acad. sc., 242: 2606-2608, 1956.
- 7) 増田 徹: 免疫グロブリンの構造の遺伝的支配, アロタイプについて, 臨床科学, 3 : 78-89, 1967.
- 8) Harris, T. N., et al.: Rabbit gammaglobulin allotypes as genetic markers for shigella incubated lymph node cells. Immunol., 6: 169-178, 1963.
- 9) Cole, L. J. et al.: Homograft reactive large mononuclear leucocytes in peripheral blood and peritoneal exsudates. Amer. J. Physiol., 200: 147-151, 1961.
- 10) Dameschek, W., et al.: Leukemia and auto-immunization — Some possible relationships. Blood, 14: 1151-1158, 1959.
- 11) Kaplan, H. S., et al.: Auto-immunity in man and homologous disease in mice in relation to the malignant lymphomas. Lancet, 2: 1-4, 1959.
- 12) Diderholm, H., et al.: An autoradiographic study of the fate of transfused thymus lymphocytes. Acta paediat. (Uppsala), 48, suppl, 117: 13-17, 1959.

- 13) Murray, R. G. et al.: A studies on the fate of lymphocytes. I. Labelling small thymic lymphocytes with tritiated thymidine. *Blood*, 18: 737-749, 1962.
- 14) Murray, R. G. et al.: A studies on the fate of lymphocytes. II. Intravenous injection of labelled thymic lymphocytes into homologous rats and isologous mice. *Anat. Rec.*, 150: 95-111, 1964.
- 15) Mims, C. A. et al.: Experiments on the origin and fate of lymphocytes. *Brit. J. exp. path.*, 43: 639-649, 1962.
- 16) Everett, N.B. et al.: Recirculation of lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 113: 887-897, 1964.
- 17) Gowans, J. L. et al.: The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. Royal Soc. B.*, 159: 257-282, 1964.
- 18) Parrott, D. M. V. et al.: Thymus dependents areas in lymphoid organs of neonately thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, 123: 191-207, 1966.
- 19) 尾曾越文亮: リンパ球の増殖様式, とくに DNA の合成経路について, *最新医学*, 26: 1456-1463, 1971.