

犬同種肺移植における FK-506 の免疫抑制効果

——病理組織学的検討を中心に——

京都大学胸部疾患研究所胸部外科

青木 稔, 人見 滋樹, 和田 洋巳, 乾 健二, 山崎 文郎
横見瀬裕保, 李 民実, 平井 隆, 長谷川誠紀

(1989年6月15日受付)

はじめに

サイクロスポリンAが開発されて以来, 各種臓器移植に格段の進歩がみられた. 肺移植においても, 1983年トロントグループにより初めて長期生存例が得られるようになり, 現在最長健在例は術後5年7カ月を経ている. トロントグループの成功に触発され, その後北米, ヨーロッパにおいて肺移植の臨床例が増加しつつある.

著者らの教室においても1984年以降肺移植の臨床応用をめざし1) 移植手技の確立2) 温阻血の移植肺に及ぼす影響3) 肺保存4) 移植肺の気管支吻合部治癒に及ぼす気管支粘膜血流の影響5) 移植肺の病理組織学的検討などの研究を動物実験で行ってきた. 肺移植の臨床成績向上の背景には, サイクロスポリンAの導入が大きな役割をはたしたことは事実であるが, 現在さらに確実な免疫抑制効果を得, 副作用を軽減させる目的で新しい免疫抑制剤の開発や, 投与法の工夫などが行われつつある.

FK-506 は1984年藤沢薬品工業株式会社の研究グループにより開発された新しい免疫抑制剤であり, *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993株より産生される分子量822の新規の構造を有するマクロライド系抗生物質である. この薬剤はその強力な免疫抑制効果が *in vitro* での基礎研究や, 動物実験で確認されているが, 肺移植における研究の報告はまだ成されていない. 著者らは犬同種肺移植における FK-506 の免疫抑制効果を, 肺及び吻合部気管支の病理組織学

的所見を中心に検討したので報告する.

材料と方法

8~12 kg の雑種成犬14頭に左肺同種移植を行った. ドナー心肺摘出直前にヘパリン 200 U/kg を右心室より注入し肺血管内に循環せしめた. 吻合はまず左房を5-0プロリン糸にて連続マットレス縫合し, 次に気管支を3-0バイクリル糸にて連続オーバーアンドオーバー縫合し, 最後に肺動脈を6-0プロリン糸にて2点支持の上連続オーバーアンドオーバー縫合した. 温阻血時間は60~80分であった. 術中の麻酔はGOFにて維持し, F_{iO_2} は0.5, 換気回数, 1回換気量は各々20回/分, 20ml/kg, PEEP を3cmH₂Oとした.

術直後より屠殺時まで毎日 FK-506 を0.15 mg/kg 筋肉注射にて投与した. セファロスポリン系抗生物質を術当日は点滴投与し, 以後2週間内服投与した.

術後7日に開胸肺生検を行い, 14日, 21日, 28日に屠殺し気管支吻合部及び肺組織の試料を得, ホルマリン固定した. 光顕試料を作製しH.E. 染色を行い検鏡した. 肺組織は, 上葉, 下葉から1カ所ずつ部分切除することを原則とし, 移植肺の肉眼所見を代表し得る部位を選ぶよう努めた. 7日に開胸肺生検を行った犬は9頭, 14日, 21日, 28日に屠殺し病理検索を行った犬は各々2頭, 2頭, 6頭であった.

屠殺時には全例気管支鏡検査と胸部レントゲン撮影を行い, 気管支吻合部の状態の観察と移

植肺のレントゲン上の異常の有無や程度の検討を行った。28日に屠殺した6頭のうち3頭については、屠殺前に移植した左肺の機能を評価する目的で、右開胸を行い右肺動脈主気管支、肺静脈を結紮しその前及び20分後に動脈血ガス分析を行った。

結 果

1. 肺及び気管支の病理組織学的検討

移植7日に行った開胸肺生検、14日、21日、28日の屠殺時に得た肺及び気管支吻合部近傍のドナー気管支の病理組織所見を要約し(表1)に示した。

移植7日の肺組織では、小数例において血管周囲に軽度～中等度の水腫を認めたが、全般的に re-implantation response として表現される、移植時の阻血や移植操作に起因する肺水腫の所見は認められないものが多かった。肺小血管周囲に単核球細胞浸潤 (mononuclear cell cuffing) のみられたものは9頭中2頭で、いずれも軽度の浸潤であった。単核球細胞の小血管周囲への浸潤はサイクロスポリンA投与時の拒絶反応の

組織学的所見として典型的に認められるもので、FK-506 投与時のこの所見も拒絶反応によるものと考えられる。他の7例は拒絶反応によると考えられるいかなる組織学的異常も認めなかった。

移植14日、21日の各2頭のうち単核球細胞浸潤がみられたのは14日の1頭のみで他の3頭には拒絶反応を示す組織学的所見はなく、正常の犬の肺組織像と考えられた(図1)。気管支の所見では全例、線毛上皮細胞を含め気管支上皮細胞が保たれていた。一部に上皮細胞の重層化や扁平上皮化生を示す所見も認めたが、これは拒絶によるものではないと考えられた。気管支粘膜下の小血管周囲に単核球細胞浸潤をきたした所見が14日、21日の各1頭に認められた。いずれも細胞浸潤の程度は軽度であった。他の2頭には拒絶反応を示す所見は認められなかった(図2)。

移植28日の6頭のうち3頭で肺小血管周囲に単核球細胞浸潤を認めた。このうち2頭では細胞浸潤の程度がやや著しく、多数の血管周囲に及んでいた(図3)。しかしながらこのような場合においても肺胞構造の全面的変化をもたらすような、肺胞上皮の剝離・脱落や肺胞壁の著しい肥厚・線維化などの所見は認められなかった。他の3頭の肺組織に拒絶反応を示唆する所見は見出し得なかった。気管支の所見では、粘膜上皮は4頭でよく保たれていたが2頭で広範な脱落や扁平上皮化生が認められた。粘膜下組織では5頭に単核球細胞の浸潤がみられ、うち2頭では細胞浸潤がより広範にみられた。

2. 胸部レントゲン、気管支鏡所見

(表2)に胸部レントゲン、気管支鏡の所見を示した。胸部レントゲンの異常を浸潤陰影軽度(+), 中等度(++)で示し、気管支吻合部の異常を正常内腔の1/3までの軽度狭窄(+), 2/3～1/2の中等度狭窄(++)で示した。14日では胸部レントゲンで正常が1頭、浸潤陰影(+)が1頭であった。気管支吻合部に狭窄がみられなかったものが1頭、狭窄(+)が1頭であった。21日の2頭はいずれも胸部レントゲンは正常所見であり(図4)、気管支吻合部も良好な治癒状

表1 肺及び気管支の組織学的所見

Histological Findings

	No.	Lung	Bronchus
7 p.o.d.	9	edema (—) — (+) MNC (—) (7) (+) (2)	ND
14 p.o.d.	2	MNC (—) (1) (+) (1)	MNC (—) (1) (+) (1) epithel. well preserved (2)
21 p.o.d.	2	MNC (—) (2)	MNC (—) (1) (+) (1) epithel. well preserved (2)
28 p.o.d.	6	MNC (—) (3) (+) (1) (+) (2)	MNC (—) (1) (+) (3) (+) (2) epithel. well preserved (4)

MNC : mononuclear cell

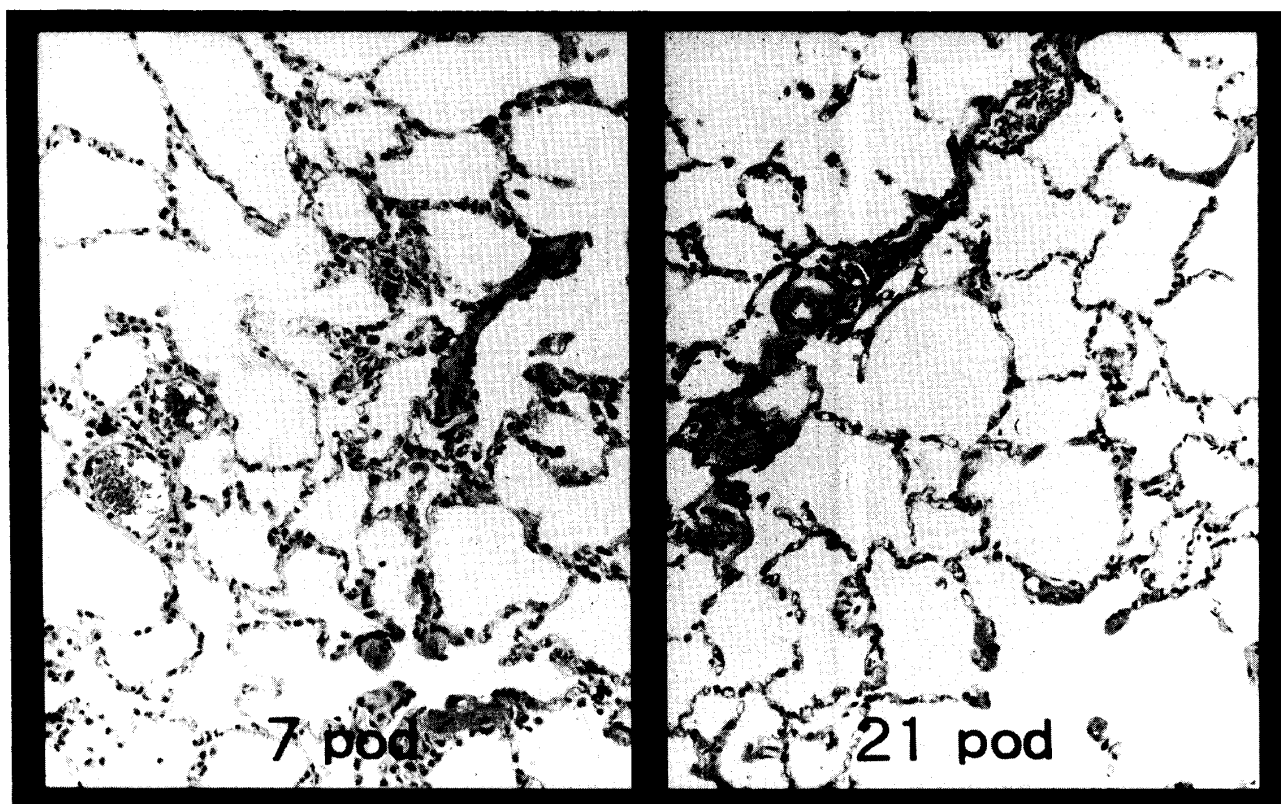


図1 左は移植7日、右は同じ犬の21日の肺組織像を示す。拒絶反応はみられず、いずれも正常所見と考えられる。H.E. 染色 ×100

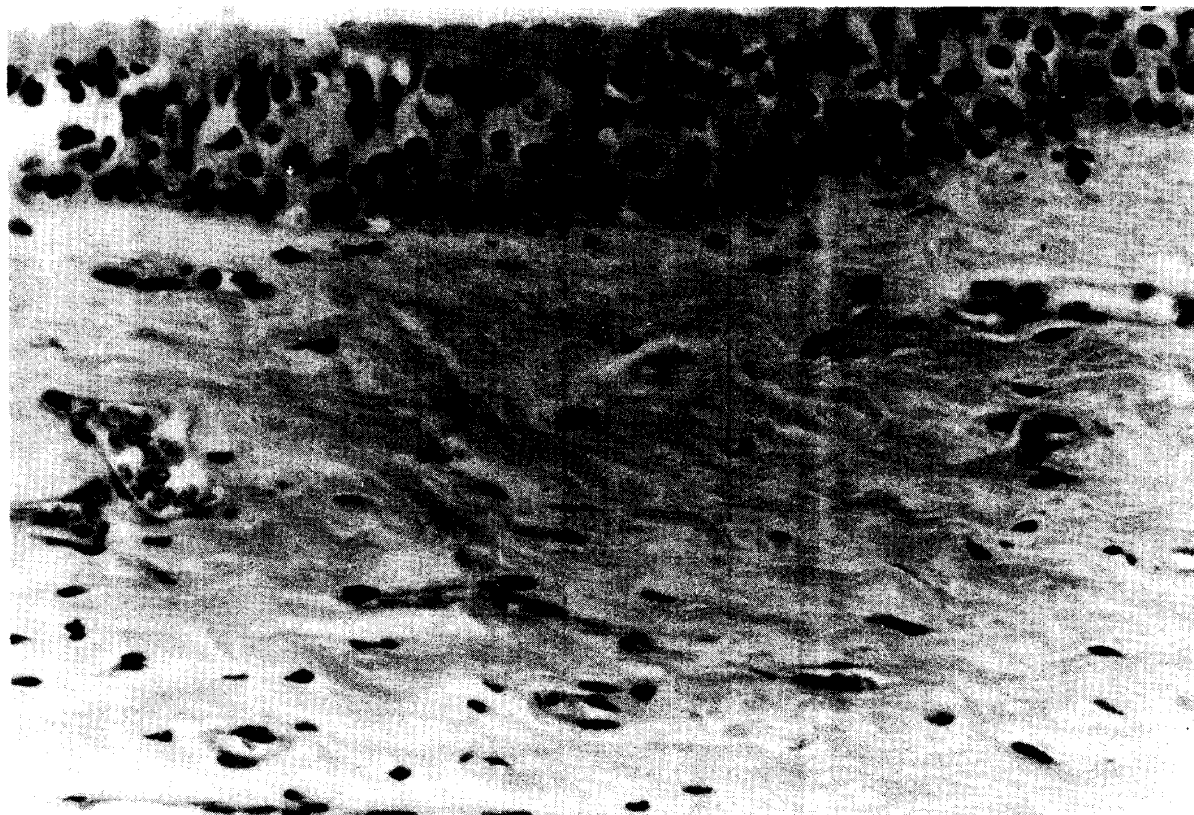


図2 移植21日の気管支組織像。正常の粘膜上皮と粘膜下組織であり拒絶の所見は認められない。H.E. 染色 ×200

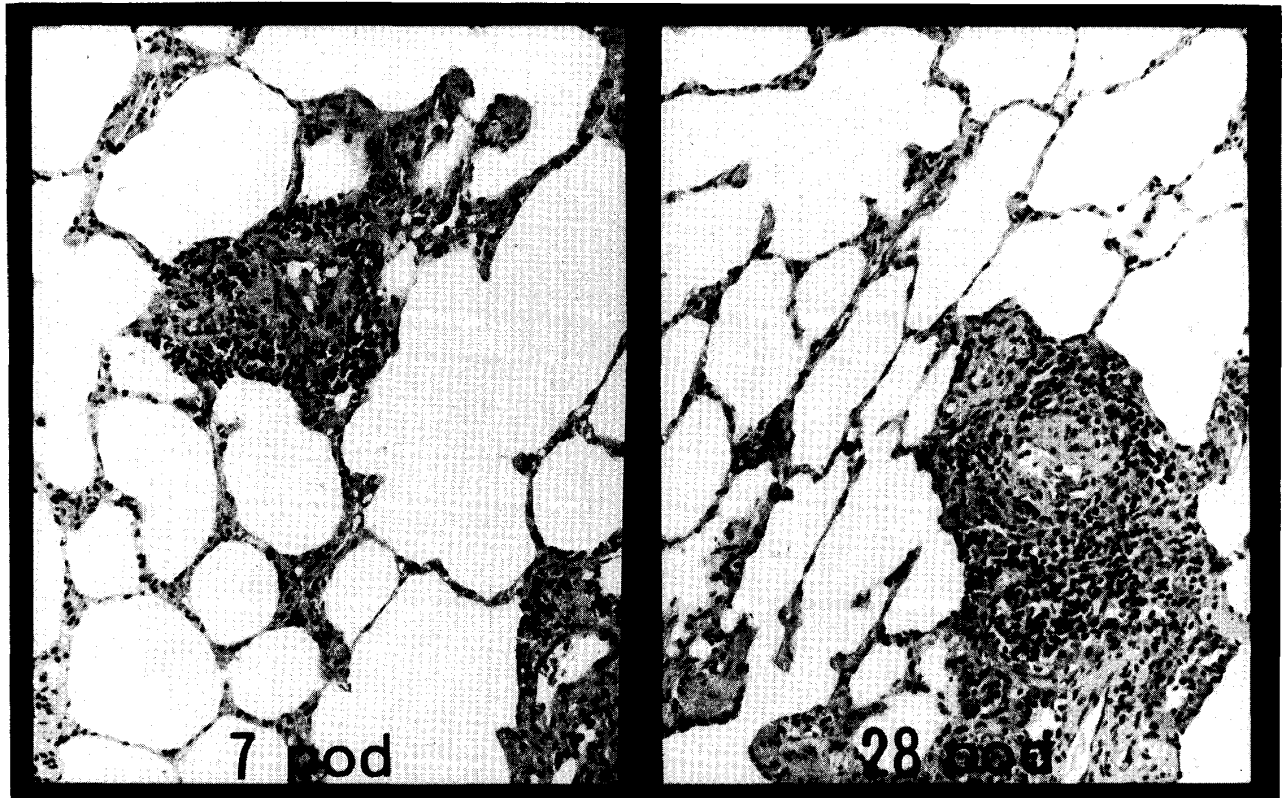


図3 移植7日と28日にみられた単核球細胞浸潤を示す。いずれも肺胞構築は保たれている。
H.E. 染色 ×100

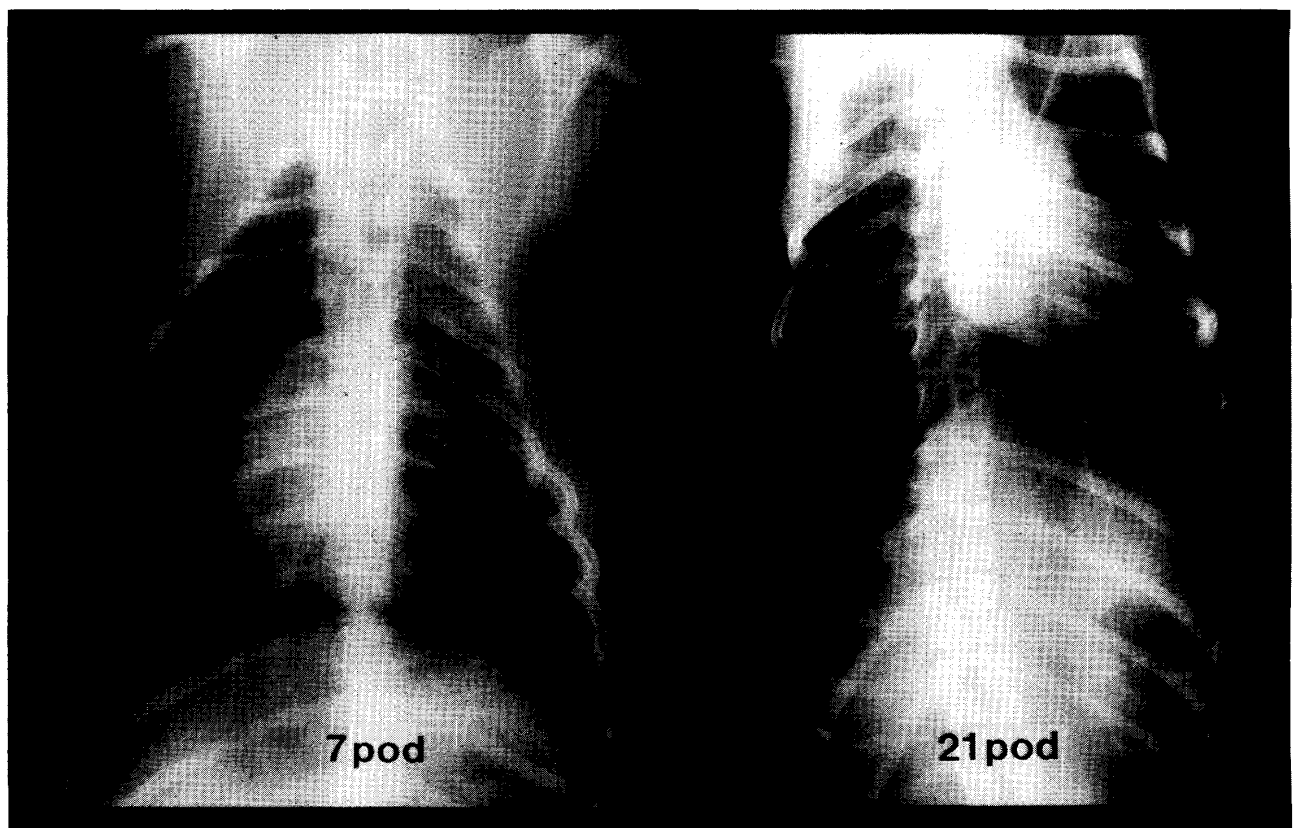


図4 移植7日と21日の胸部レントゲン像を示す。7日でわずかにみられた左肺の浸潤陰影が21日には消失している。

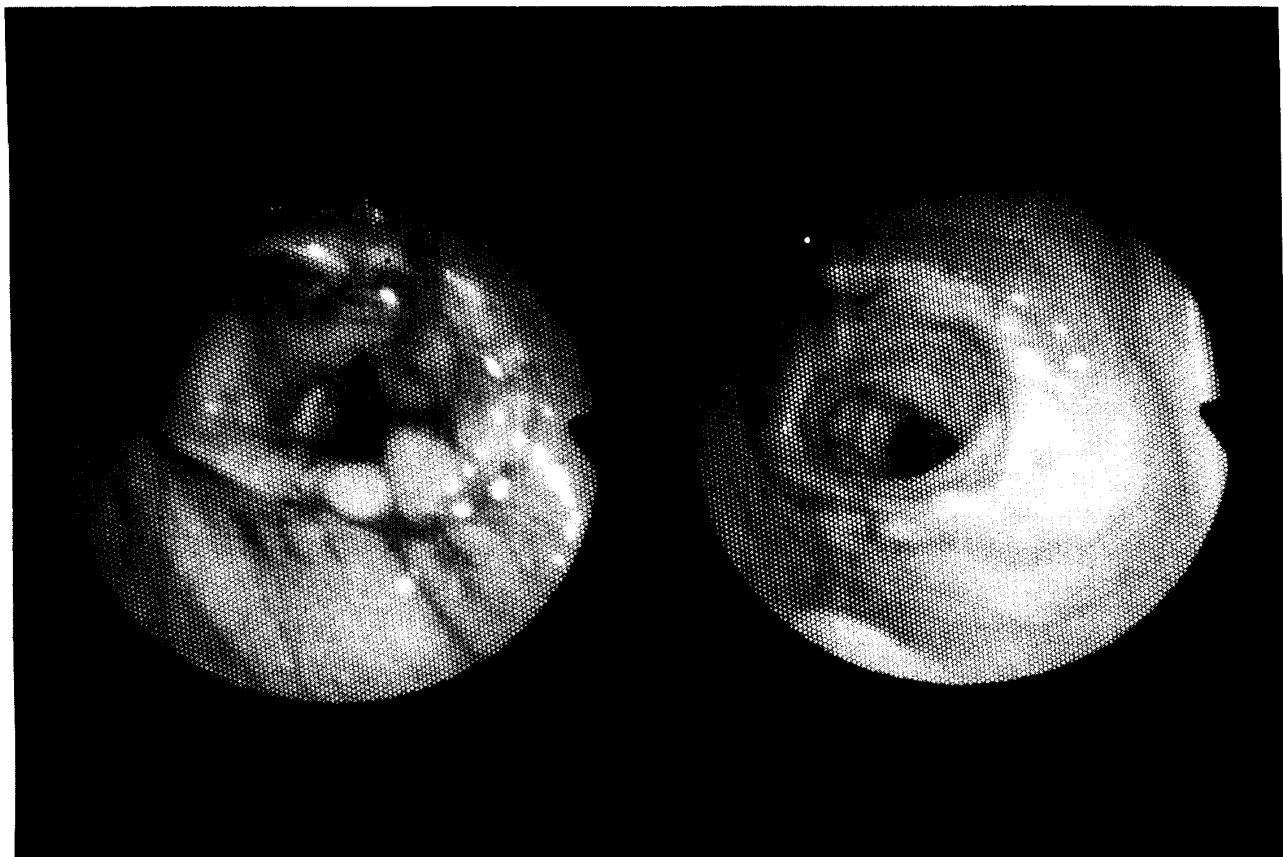


図5 左が移植7日, 右は21日の気管支鏡所見. 7日では吻合部に浮腫がみられるが21日では消褪し良好な治癒状態を示す.

表2 胸部レントゲン, 気管支鏡所見

	No.	Chest x-ray			BFS				
		infiltr.	(-)	(+)	(#)	stenosis	(-)	(+)	(#)
14 p.o.d.	2		1	1			1	1	
21 p.o.d.	2		2				2		
28 p.o.d.	6		2	3	1		4	1	1

態であった(図5). 28日の6頭では正常の胸部レントゲン所見を示したものが2頭, 浸潤陰影(+)が3頭, (++)が1頭であり, 気管支吻合部の良好な治癒状態を示したものが4頭, 狭窄(+)が1頭, (++)が1頭であった.

3. 動脈血ガス分析

移植28日で右肺門部を結紮し, その前, 20分後に行った動脈血ガス分析のデータを(表3)に示した. 換気条件は材料と方法の項で記したものと同一である. 測定した3頭のうち, 2頭で肺門結紮後に PaO_2 の明らかな上昇が認められた. 1頭では PaO_2 の低下をきたしたがいず

表3 移植後28日における血液ガス分析

Blood Gas (28p.o.d.)			
r-hilar ligation		before	after
1)	PaO_2	173 mmHg	222 mmHg
	PaCO_2	25 mmHg	17 mmHg
2)	PaO_2	198 mmHg	312 mmHg
	PaCO_2	11 mmHg	11 mmHg
3)	PaO_2	290 mmHg	217 mmHg
	PaCO_2	13 mmHg	11 mmHg

れにしても移植肺のみの機能により 200mmHg を越す値が得られた. また PaCO_2 の蓄積傾向も認められず良好なガス交換能を有するものと判定された.

4. 死亡例

移植後7日~21日の間に実験を行った14頭のうち4頭が高度の下痢, 食思不振のため衰弱死した.

考 察

著者らはこれまで肺移植の臨床応用における問題点について研究を進めてきた。研究の基礎となる手術手技の検討は、自家肺移植、同種左肺移植、同種右肺移植、同種両側肺移植において成され現在では各々いずれも手技の確立が得られたと考えている。温阻血による肺傷害の研究では、虚脱肺における温阻血の限界が120分であることが明らかとなった^{1,2)}。また臨床の肺移植において気管支吻合部の合併症が重大な問題となっているが、著者らはレーザートップラ法により気管支粘膜の血流を測定し吻合部の治癒状態が粘膜血流の測定値と密接に関連することを明らかにした^{3,4)}。

肺移植における拒絶反応の診断は、他の臓器の移植の場合と同様、極めて重要な課題であると思われる。しかしながら実際の臨床においては簡便かつ確実な診断法がいまだなく、胸部レントゲン上の浸潤陰影の出現、発熱、動脈血酸素飽和度の低下など臨床所見が重要視されている⁵⁾。他に経気管支肺生検、経皮肺生検⁶⁾、気管支肺胞洗浄後^{7,8)}、末梢血リンパ球サブセットや種々の免疫パラメータの研究が成されているが、拒絶の最終的根拠は現在のところ開胸肺生検による組織診断に頼らざるを得ないと思われる。

拒絶反応の組織学的所見は免疫抑制剤の種類や投与法により異なる。Veith ら⁹⁾ は肺における拒絶反応の所見を 1) classic form, 2) alveolar rejection, 3) vascular form に大別した。1) は免疫抑制剤を投与しない場合に典型的にみられ、血管周囲の単核球細胞浸潤と肺胞腔への脱落した肺胞上皮や炎症細胞を含んだ浸出液の貯留により特徴づけられる。2) はアザチオプリンとプレドニゾロンを免疫抑制剤として投与した際にしばしばみられる所見で、肺胞腔にフィブリンに當んだ浸出液の貯留が著明で、血管周囲の単核球細胞浸潤はむしろほとんどみられない。3) はサイクロスポリン投与時のみにみられる所見で、小血管周囲の単核球細胞浸潤が主体で肺胞領域や間質の変化がほとんどみられないとされている。この分類は著者らのこ

れまでの動物実験における検討結果とおおむね合致するものであるが、免疫抑制剤の種類による本質的な差異と考えるよりも、一連に進行し得る拒絶の各相の所見が、免疫抑制剤の効果の強弱により示されたと考える方が理解しやすい。Prop ら¹⁰⁾ はラットを用いた研究で移植肺における拒絶のプロセスの形態学的な段階を 1) latent phase, 2) vascular phase, 3) alveolar phase, 4) destruction phase の 4 段階に分類している。

本研究では新しく開発された FK-506 を、肺移植における免疫抑制効果を検討する目的で単独使用した。FK-506 は基礎的研究で、interleukin 2 産生の抑制や mixed lymphocyte culture におけるリンパ球増殖の抑制などの効果が、サイクロスポリンの 100 分の 1 程度の低い濃度で発現することが示されている。動物実験では犬の腎移植^{11,12,13)}、ヒヒの腎移植¹⁴⁾、犬の肝移植¹⁵⁾、ラットの心移植^{16,17)}、での使用報告例がみられ、その免疫抑制効果やサイクロスポリンとの併用投与例での有用性が示唆されている。

犬同種肺移植において著者らの使用した FK-506 の投与量は 0.15 mg/kg であり、サイクロスポリンの 100 分の 1 程度の投与量であったが、優れた免疫抑制効果が示されたと考える。拒絶の組織学的所見は肺小血管周囲の単核球細胞浸潤で特徴づけられ、移植 7 日で 22% (2/9)、14 日～21 日で 25% (1/4)、28 日で 50% (3/6) で発現した。いずれも肺胞領域での変化は乏しく、肺胞構築を破壊するような進行した拒絶の所見は認められなかった。これらの所見はサイクロスポリン投与時の拒絶の発現の仕方と似ており、Veith らのいう vascular form の拒絶所見と考えられた。気管支吻合部のドナー気管支の組織所見では、粘膜下小血管周囲の単核球細胞浸潤が移植 14 日～21 日で 50% (2/4)、28 日で 83% (5/6) に認められた。肺組織での単核球細胞浸潤の出現頻度に比べ気管支レベルではやや増加している傾向が得られた。一方気管支上皮は 28 日の 2 頭を除き全例正常の円柱上皮細胞が保たれていた。

肺組織における拒絶の程度と気管支レベルで

の拒絶の程度に密接な相関がみられることが Fujimura ら¹⁸⁾ により報告されているが本研究においても肺組織に単核球細胞浸潤が広範に認められた例では、気管支レベルでも粘膜下の単核球細胞浸潤が著明である傾向が示された。

中等度以上の胸部レントゲンでの浸潤陰影や気管支吻合部の狭窄を示す犬は14日以降で1頭のみ(10%)であり、良好な免疫抑制効果を裏づける所見と考えられた。また術後28日に動脈血ガス分析による移植肺の機能評価を行ったが移植肺が良好なガス交換能を有していることが示された。

FK-506 の副作用として、高度の下痢、食思不振、体重減少が特に犬において高率に発現するとされている。本研究でも4頭の犬が高度の下痢による衰弱で死亡した。したがって今後、より適切な投与量やサイクロスポリンを初めとする他剤との併用投与などに関する研究が必要であると思われる。

ま と め

犬同種肺移植における FK-506 の免疫抑制効果を肺及び気管支の組織学的検索を中心に検討し以下の結論を得た。

1. 拒絶の初期の段階を表わすと考えられる血管周囲の単核球細胞浸潤が肺組織において、移植7日で22% (2/9), 14日~21日で25% (1/4), 28日で50% (3/6) に出現した。気管支粘膜下組織では14日~21日で50% (2/4), 28日で83% (5/6) に認められた。

2. 肺胞領域での拒絶の所見は乏しく、拒絶の程度は軽度であると判定された。

3. 移植後28日に3頭の犬で動脈血ガス分析による移植肺の機能評価を行ったが、いずれも良好なガス交換能を有することが示された。

4. 実験で使用した14頭のうち4頭が高度の下痢、食思不振のため衰弱死した。副作用を軽減させるため今後至適投与量やサイクロスポリンを初めとする他剤との併用投与方法に関する研究が必要と考えられる。

文 献

- 1) 人見滋樹, 他: 肺移植の実際—温阻血保存と拒絶反応. 胸部外科, 40: 180-185, 1987.
- 2) Yamazaki F., et al.: An evaluation of the tolerance of the allotransplanted canine lung against warm ischemia. The Japanese J. of Surgery, in press.
- 3) 和田洋巳, 他: イヌ同種肺移植における気管支吻合部拒絶反応についての検討. 文部省科学研究費補助金による研究報告書「肺および心肺移植の適応, 保存および機能維持に関する研究」, 31-32, 1988.
- 4) Yokomise H., et al.: Application of laser doppler velocimetry to lung transplantation. Transplantation, in press.
- 5) Toronto Lung Transplant Group: Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. The New England J. of Medicine, 314: 1140-1145, 1986.
- 6) Koerner S.K., et al.: Transbronchial biopsy for the diagnosis of lung transplant rejection. Am. Rev. of Resp. Dis., 114: 575-579, 1976.
- 7) Veith F.J., et al.: Cyclosporin A in experimental lung transplantation. Transplantation, 32: 474-481, 1981.
- 8) Norin A.J., et al.: Cyclosporin A as the initial immunosuppressive agent for canine lung transplantation: short and long term assessment of rejection phenomena. Transplantation, 34: 372-375, 1982.
- 9) Veith F.J., et al.: Lung transplantation 1983. Transplantation, 35: 271-278, 1983.
- 10) Prop J., et al.: Lung allograft rejection in the rat. III. Corresponding morphological rejection phase in various rat strain combinations. Transplantation, 40: 132-136, 1985.
- 11) Ochiai T., et al.: Prolongation of canine renal allograft survival by treatment with FK-506. Transplantation proceedings, 19: 53-56, 1987.
- 12) Todo S., et al.: Canine kidney transplantation with FK-506 alone or in combination with cyclosporine and steroids. Transplantation proceedings, 19: 57-61, 1987.
- 13) Collier D.St.J., et al.: Kidney transplantation in the dog receiving FK-506. Transplantation proceedings, 19: 62, 1987.
- 14) Calne R., et al.: Observations about FK-506 in primates. Transplantation proceedings, 19: 63, 1987.
- 15) Todo S., et al.: Orthotopic liver transplantation in dogs receiving FK-506. Transplantation proceedings, 19: 64-67, 1987.
- 16) Lim S.M.L., et al.: Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506. Transplantation proceedings, 19: 68-70, 1987.

- 17) Murase N., et al.: Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506 alone or with cyclosporine. Transplantation proceedings, 19: 71-75, 1987.
- 18) Fujimura S., et al.: Histologic assessment of bronchial anastomotic healing in canine lung transplantation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 94: 323-330, 1987.

HISTOLOGICAL OBSERVATIONS OF IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF FK-506 IN CANINE LUNG ALLOTRANSPLANTATION

Minoru AOKI, Shigeki HITOMI, Hiromi WADA, Kenji INUI
Fumio YAMAZAKI, Hiroyasu YOKOMISE, Minsil LEE
Takashi HIRAI Seiki HASEGAWA

Department of Thoracic Surgery, Chest Disease Research Institute, Kyoto University.

The Immunosuppressive effects of FK-506 were studied histologically in allotransplanted canine lungs. FK-506 was administered daily in a dose of 0.15 mg/kg after left lung allotransplantation.

Nine dogs underwent open lung biopsy on the 7th postoperative day (p.o.d.). Mild mononuclear cell infiltrations around small vessels (MNC cuffings), which suggested an early phase of rejection, were observed in 2 dogs. Two dogs were sacrificed on the 14th and 2 on the 21st p.o.d. MNC cuffings were observed in the lung of one dog and in the bronchial submucosa of 2 dogs. Six dogs were sacrificed on the 28th p.o.d. MNC cuffings were observed in the lungs of 3 dogs and in the bronchial submucosa of 5 dogs. The MNC cuffings were of nearly the same extent in the lung and in the bronchial submucosa of most of the dogs. Alveolar structures were well in all the dogs and the bronchial epithelium in all except 2 of the dogs sacrificed on the 28th p.o.d. preserved.

Arterial blood gas was examined before and 20 min. after right hilar ligation in 3 dogs on the 28th p.o.d. The PaO₂ (228 mmHg, 312 mmHg, 217 mmHg at FiO₂: 0.5, tidal volume: 20 ml/kg, respiratory rate: 20 /min) and PaCO₂ after rt. hilar ligation indicated that the transplanted lung was functioning well in these dogs.

The present study suggests that FK-506 could be a potent immunosuppressive agent in lung transplanation. As 4 of the 14 dogs used in this experiment died from severe diarrhea caused by FK-506, further studies are needed to determine the suitable dose and route of administration of FK-506.