

ラット同種拒絶反応におけるマクロファージ・単球エフェクターの関与 新しい単球エフェクター Spontaneous Plaque-Forming Cell について

大阪大学医学部泌尿器科学教室

石橋 道男, ムタバリク・アブデルハキム

亀岡 博, 小角 幸人, 高原 史郎

江 宏思, 高野 右嗣, 園田 孝夫

ACTIVATED MONOCYTES INVOLVED IN ALLOGRAFT REJECTION OF RATS: SPONTANEOUS PLAQUE-FORMING CELL AS A NEW MONOCYTE EFFECTOR

Michio Ishibashi, Abdelhakim Moutabarrik,

Hiroshi Kameoka, Yukito Kokado, Shirou Takahara,

Hongsi Jiang, Yuji Takano and Takao Sonoda

From the Department of Urology, Osaka University Medical School

Spontaneous plaque-forming cell, SPFC, is a new hemolytic effector of monocytes, which is generated 6 to 7 days after antigen unstimulation or stimulation in man. SPFC is also detected in rats. A significant concomitant response of the SPFC, in number of SPFC at the peak response around the rejection day, and histoincompatibility of allogeneic combinations in skin or heart allograft transplantation of rats was found. Peak number of SPFC ($23,850 \pm 1,343/10^6$) on day 6 in H-1 incompatible combination (ACI-Lewis) was higher than that ($11,606 \pm 4,235/10^6$) on day 10 in H-1 compatible combination (F344-Lewis) ($p < 0.05$, Student's *t*-test). The day of peak SPFC response in each experimental group was also concordant with the day of rejection. The OX42 monoclonal antibody against CR3 of leukocyte-adhesion molecules inhibited hemolysis of the SPFC. Since the erythrocyte is a ligand of CR3, it is likely that hemolysis of SPFC is mediated by the CR3 adhesion molecules. In conclusion, SPFC may be an immunologic indicator of allograft rejection in rats.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1135-1140, 1991)

Key words: Allograft rejection, Activated monocyte, Hemolysis, Complement receptor 3 (CR3)

緒 言

より高い腎移植の生着率を得るには拒絶反応の制御がなによりも重要な課題である。最近, 新しい免疫抑制剤の開発導入がすすめられているが, 臨床上の課題は慢性拒絶反応をどのように回避し高い生着率を達成するかであろう。

拒絶反応の制御の対象は, 同種移植免疫におけるT細胞反応の抑制である。このT細胞の反応の指標としては, リンパ球混合反応によるT細胞の活性化をIL-2などのサイトカインやキラー細胞の産生によってみる方法がある¹⁾。サイクロスポリンはT細胞の反応を抑制するすぐれた免疫抑制剤であるが, 長期には慢性

拒絶反応のために移植腎を喪失する症例が全体の約3割をしめる²⁾。この原因としてサイクロスポリンに対するレシピエントの免疫担当細胞の薬剤感受性の差が指摘されているが^{3,4)}、薬剤感受性以外にまだ同定されていない移植免疫反応系を抑制しえていない可能性もあるだろう。

マクロファージ・単球系がエフェクターとして同種拒絶反応に関わっているであろうことは以前より報告されておりその役割についてはいくらかは認められるところである^{5,6)}。ところが, マクロファージ・単球系の関与については, それら細胞による拒絶機構がin vitroであきらかとされていないためあいまいなまま現在に至っている。それは, 第一に, 同種免疫反応

の強さを反映するマクロファージ・単球系エフェクターの活性化を assay する方法が存在しないこと、第二に、標的となる細胞の認識機構が不明であること、であろう。

マクロファージ・単球自身によるエフェクター機構として、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) のK細胞エフェクター、貪食があるが、これらのエフェクターが移植免疫反応とのかわりにおいてT細胞による調節をうけているのか十分な解析はされていない。

われわれは、T細胞の調節をうけ赤血球を非特異的に溶血する単球活性化エフェクター、spontaneous plaque-forming cell SPFC をヒト^{4,7-10}およびラットに見いだした。この SPFC が拒絶反応と一致した動きを示すのか、組織適合抗原の違いによる同種移植免疫反応の強さを反映するのか、そして、SPFC による細胞障害を起こす標的細胞認識のレセプターはなにかについて検討を行った。ラット同種移植モデルにより、SPFC 単球エフェクターの産生が組織適合抗原の差による同種移植免疫反応の強さを反映したこと、標的細胞の障害にかかわる SPFC のレセプターが接着分子の CR3 (complement receptor 3) であることが、あきらかとなったことを報告する。

対象と方法

ラットと同種移植モデル

近交系ラットでレシピエントとして雄 Lewis (RT 1¹), ドナーとして ACI (RT 1a), F344 (RT 1¹) で 8 から 9 週齢のものをを用いた。組織適合性の差異により group 1 は ACI→Lewis の強い組織不適合間の組合せ、Group 2 は F344→Lewis の弱い組合せにおいて、それぞれ皮膚移植と異所性心移植を行った。皮膚移植での平均生着日数は、group 1: 7.67±0.82 日、group 2: 10.50±3.27 日である。SPFC 産生のモニタリングとして、経時的な SPFC 産生をみるためにそれぞれ各移植後の日数に対する実験群のラット数を N=3~4 とした。

移植片浸潤単核球細胞の分離

移植皮膚または移植心を細切したのち、デオキシリボスクレアーゼ、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼをふくむ RPMI-1640 にて 37°C, 30分処理し溶解後、細胞を洗浄遠心し、Ficoll-Conray (d: 1.09) にて比重遠心法によって単核球を得た。

末梢血単核球、末梢血単球、脾細胞の分離

エーテル麻酔下にて心穿刺しヘパリン加末梢血を得たのち、Ficoll-Conray (d=1.09) による比重遠心法

にて単核球をえる。単球の分離は、Nielson らの方法¹¹⁾ により行った。すなわち、4×10⁷ の末梢血単核球を M 199-Hanks 溶液 (10% fetal calf serum を含む) に浮遊させ FCS にてあらかじめ処理したプラスチックディッシュに 37°C, 3時間静置させたのち非付着細胞をピペッティングにて除去し、単球として付着細胞を得る。脾細胞の分離は組織を細切し Ficoll-Conray (d=1.09) により比重遠心法にて単核球を得る。

SPFC assay

すでに報告しているが^{7,9)}, ラットの場合もヒトと同じ方法で行った。Fig. 1 に示すが、標的となる赤血球を poly-L-lysine にてマイクロプレート処理しマイクロプレートウォッシャー (Tite-Tek Lab.) を用いて赤血球を単層化する。エフェクター細胞を各 well に約5,000個/25 ul 入れ、37°C, 3時間反応し、溶血斑を位相差顕微鏡 40倍下で数える (Fig. 2)。SPFC 数はエフェクター 10⁶個あたりにてあらわす。SPFC assay においては血清を含まない Hanks 溶液にて行う。

接着分子に対するモノクローナル抗体による SPFC inhibition assay

ラット接着分子にたいするモノクローナル抗体として、WT-1 (mouse anti-rat LFA-1, IgG2a), OX 42 (mouse anti-rat CR3, iC3b, IgG2a), ラット接着因子 ICAM-1 に対して IA-29 (mouse anti-rat ICAM-1, IgG1) を使用した。WT-1¹²⁾ と IA-29¹²⁾ は宮坂昌之博士からの供与を受けた。OX42 は Serotec 社から得た。

SPFC エフェクターの阻害試験として、SPFC as-

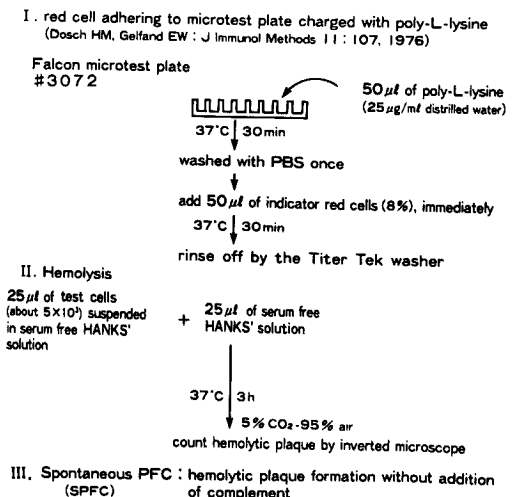


Fig. 1. The spontaneous plaque-forming cell (SPFC) assay

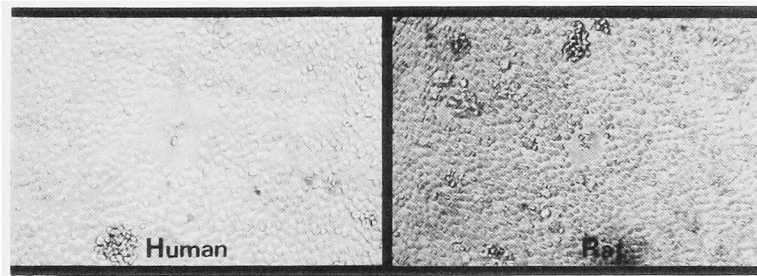


Fig. 2. Hemolytic plaques in human and rat. SPFC is present in the center of plaque (original magnification, $\times 200$)

Table 1. Generation of spontaneous plaque-forming cell, SPFC, of effector isolated from various sources following allografting and its specificity

	Numbers of SPFC per 10^6 cells against target RBC	
	Allogeneic ACI-RBC	Autologous Lewis-RBC
Spleen cells	115 $\pm$ 50	150 $\pm$ 30
PBMC	3,893 $\pm$ 1,273	4,235 $\pm$ 667
Peripheral adherent monocytes	23,093 $\pm$ 8,523	24,399 $\pm$ 8,862
Invading cells	23,850 $\pm$ 1,343	27,507 $\pm$ 2,367

The effector cells of recipient Lewis rats transplanted ACI-skin allograft were isolated from various sources described in Materials and Methods. The generation of SPFC of invading cells and enriched peripheral monocytes are comparable, while spleen cells did not generate a SPFC-effector. The numbers of SPFC of PBMC is low due to limited number of monocyte populations in fraction of PBMC.

say に 25 μ l のエフェクターと 25 μ l のモノクローナル抗体を加え SPFC 数を算定し, モノクローナル抗体を加えない場合と比較し阻害率 (% inhibition = $[1 - (\text{numbers of SPFC with monoclonal antibody}) / (\text{numbers of SPFC without monoclonal antibody})] \times 100$) を求めた。

結 果

1. ラットに見いだされる SPFC について

Fig. 2 にヒトとラットの SPFC を示す。細胞の大きさの差が見られる以外, 溶血斑の形態は同じである。溶血の中心に細胞を認める。溶血斑の大きさは末梢血単核球を混合培養したものや同種移植片の拒絶時に得られた浸潤細胞ではより大きなものとなる。

Table 1 にラット皮膚移植後 6 日目にそれぞれ脾細胞の単核球, 末梢血単核球, 末梢血単球, 同種皮膚移植片からの浸潤細胞を分離し, それぞれの細胞をエフェクターとしたときの SPFC が産生されているかを示した。Table 1 に示す様に SPFC は脾細胞には検出されないが, 末梢血と移植片浸潤細胞に SPFC が産生される。抗原刺激を受けていない時には末梢血中には見いだされない。標的を自己およびドナー赤血

球としても Table 1 に示すように同種抗原特異性は存在しない。すなわち, SPFC は, ヒトの場合同様, 非特異的溶血活性をもったエフェクターである。

2. 同種皮膚および心移植拒絶反応と SPFC 産生

移植後, 3 日目から 13 日目までの間に移植片を摘出し移植片への浸潤細胞を得, 標的赤血球としてドナー赤血球に対する SPFC 数を求めた。組織適合性の違いにより 3 つの実験グループ, 強い組織不適合間の組合せとして ACI $\rightarrow$ Lewis (group I), 弱い組織不適合間の組合せとして F344 $\rightarrow$ Lewis (group II) そして同系間移植として Lewis $\rightarrow$ Lewis (group III) での皮膚移植を行い経時的に SPFC 産生を検討した結果を Fig. 3 に示す。

Group I では, 拒絶日に一致して移植後 6 日目を頂点にして高い SPFC 値, 23,850 $\pm$ 1,343/ 10^6 cells, がみとめられた。以後, SPFC 値は減少した。一方, group II では, 二峰性を示し移植後 6, 7 日目と 10 日目にピークが見られた。group II の実験において, 移植後 6 日目に検討した 3 匹のレシピエントのうち 2 匹において移植片は拒絶されており, 移植後 10 日目ではすべてのレシピエントに拒絶が観察されたために, 二峰性が生じているものと考える。group II での 10

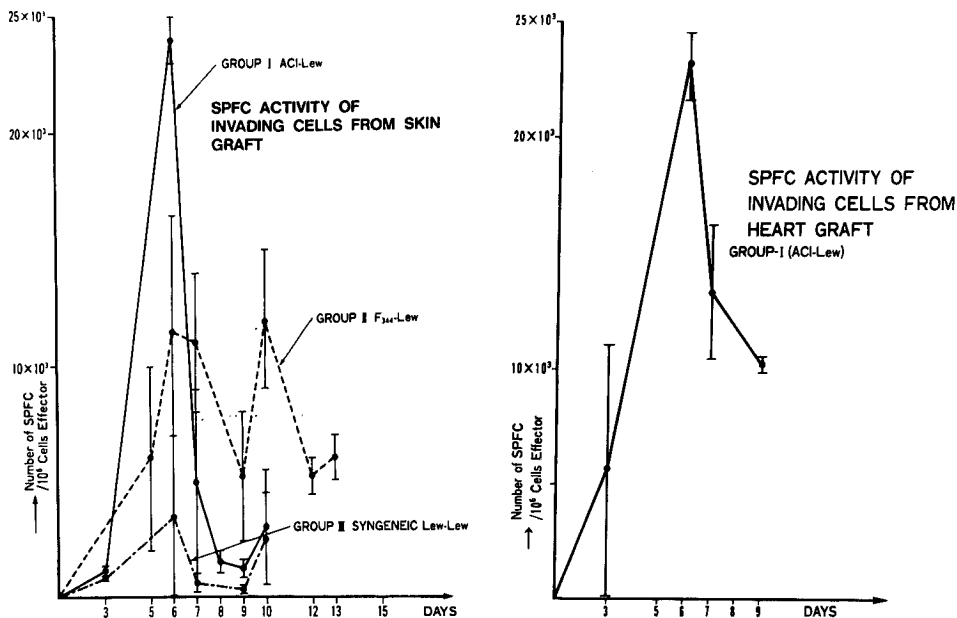


Fig. 3. Kinetics of SPFC generation after skin or heart transplantation in three experimental groups, group I (ACI-Lewis, H-1 incompatible), group II (F 344-Lewis, H-1 compatible) and group III (Lewis-Lewis, syngeneic) Invading cells from grafts were assayed for SPFC against donor RBC, serially and the SPFC response is expressed as the numbers of hemolytic plaque per 10^6 effector cells. Each point indicated the mean SD of 3 or 4 experiments.

日目の SPFC 値は, $11,606 \pm 4,235/10^6$ cells であり, group I の 6 日目と比較明かな差が認められた ($P < 0.05$, student t-test). 同系間移植の group III では, 移植後 6 日目に $3,190 \pm 4,294/10^6$ cells とわずかな上昇が見られるのみである。

心移植後の SPFC 産生については group I についてのみを検討したが, 皮膚移植と同じ SPFC の産生が観察され移植心の拒絶と一致した移植後 6 日目にピークを認められた。

3. SPFC による溶血と接着分子

接着分子に対するモノクローナル抗体を SPFC assay を同時に添加し, SPFC による溶血を阻害するかを検討した。Fig. IV に示すように, 接着分子のうち CR3 に対するモノクローナル抗体 OX42 が 50% 以上の抑制を示した。しかし, 接着分子のうち, LFA-1 に対する抗体に抑制効果は見られなかった。対照として OX42 モノクローナル抗体と同じ isotype である IgG2a として, 接着因子 ICAM-1 はともに阻害を示さなかった。

考 察

組織適合性抗原 H1 の違いによる二つの組合せの

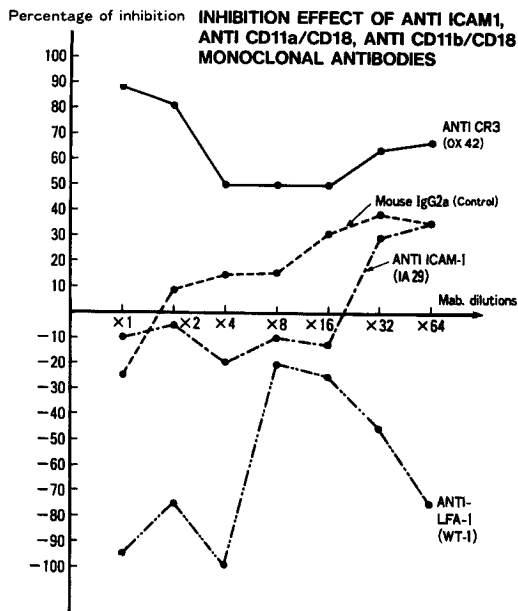


Fig. 4. Inhibitory effect of the OX42 (anti-CR3) monoclonal antibody on hemolysis of SPFC. Per cent of suppression was calculated as described in the text.

ドナー・レシピエント間において同種皮膚移植を行い、活性化単球エフェクターである SPFC が移植片に浸潤し拒絶反応と一致した動きを示すかを検討した。結果は、SPFC エフェクターが拒絶反応と一致した産生応答が観察され、SPFC 産生数の量的な点において組織適合性の違いが見られたことより、SPFC 単球エフェクターの産生応答が組織適合性の違いによる拒絶反応の強弱をそのまま反映しているものと理解される。H1 抗原不適合の強い組織不適合の ACI-Lewis 間では移植拒絶片への浸潤細胞中に量的に多くの SPFC が産生されており、H1 抗原適合のやや弱い組織不適合間の Lewis-F344 間では前者の約半分の SPFC 産生数であった。

この点については以下のように考えている。ラットにおいては、SPFC 産生が T 細胞の調節をうけていることがまだ検討されていないが、ヒトの場合、T 細胞のうち自己赤血球とのロゼット形成 T 細胞 (auto-rosette-forming T cell) ARF-T がヘルパー細胞として作用し SPFC 産生をうながし、非ロゼット形成 T 細胞はサプレッサー細胞として SPFC の溶血作用を抑制し結果として SPFC エフェクターの産生抑制にかかわっている⁹⁾。組織適合性の差により T 細胞の活性化が生じ結果としてヘルパー T 細胞の産生が優位となり、量的に SPFC 数の違いが生じるものと推測される。

すなわち、SPFC 単球エフェクターは組織適合性の違いによる拒絶反応の強弱を直接反映していることから、移植免疫反応にかかわる単球エフェクターとみなしうる。しかし、SPFC が直接にどの程度拒絶にかかわっているかは今回の検討のみで明らかにすることはできない。

白血球接着分子は、臨床的には好中球や単球の貪食能とかかわり、先天性に接着分子の発現に異常を有す患者は LAD (leukocyte adhesion deficiency) と呼ばれ¹³⁾、重篤な細菌感染症をくりかえし予後不良である。接着分子のうち、CR3 は、機能的には好中球・単球の貪食と関係し¹⁴⁾、リガンド (接着因子) として、iC3b, fibrinogen, factor X, Leishmania gp63, zymosan, LPS などがある。最近、Wright ら¹⁵⁾は、CR3 のリガンドのうち iC3b と LPS をそれぞれ別々に認識するモノクローナル抗体 (OKM10 は iC3b をリガンドとして認識する CR3 に対する抗体で、Mo-1 は赤血球または LPS をリガンドとして認識する CR3 に対する抗体である) を用い、CR3 レセプターに多様性のあることを報告している。われわれはヒトの SPFC について今回のラットと同様の溶血阻

害実験をモノクローナル抗体を用いて行い、Mo-1 モノクローナル抗体が普遍的に SPFC による溶血を阻害することを見だし SPFC が CR3 を介しリガンドとしてヒト赤血球を直接に認識し溶血にかかわる結果を得ている。SPFC assay が反応系において血清成分なしに行われることから、標的となる赤血球膜上において補体活性化による iC3b の形成の可能性は少ない。CR3 は直接に赤血球をリガンドとして認識し機能的な活性化を生じて、活性化酸素などの放出によって溶血をきたすものと推測される。

今回のラットにおける SPFC の阻害が OX42 によって生じることから、ヒトの場合と同様に CR3 のレセプターに多様性を認めるなら、ラットの場合も SPFC 膜上の CR3 を介し標的の赤血症を直接に認識し接着し、溶血を完了させているものと推測される。また、液生抗体との関係においては、もし、レシピエントに特異的な同種抗体が産生された場合、標的細胞膜上において補体活性化を生じ iC3b を形成し、SPFC による CR3 を介した接着に、さらに抗体に対する Fc レセプターを介した反応が加わり、より強い細胞障害が生じる。また、CR3 は、NK 細胞や、ADCC の K 細胞の機能にもかかわっていることが知られており¹⁴⁾、SPFC が拒絶反応のはば広いエフェクターとなる可能性は高い。

SPFC 単球エフェクターが実際に移植片の拒絶に実際にかかわっているかは不明である。移植皮膚片には心の場合同様に赤血球抗原が血管系および表皮上に局在し、標的細胞を CR3 を介して接着し細胞障害的に作用する可能性は十分に推察される。

臨床で、SPFC 単球エフェクターが拒絶反応のなかでどのような位置にあるのかはあきらかではない。腎移植の症例で移植腎の腫脹と発熱のため移植腎の摘出をせざるをえなかった症例において、移植腎への浸潤細胞中の SPFC 数と移植後の摘出時期との関係を見ると、移植後 1 カ月以内のものに、SPFC 活性の陽性例は 6 例中 3 例と少なくとも逆に 3 カ月以降から 2 年目以内に拒絶に至った慢性拒絶反応例では 4 例中 3 例が陽性となっていた¹⁰⁾。臨床で、SPFC 単球エフェクターが慢性拒絶反応になんらかのかかわりをもっている可能性が推察される^{4,9)}。

結 語

ラット同種皮膚および心移植において、非特異的溶血活性を示す (spontaneous plaque-forming cells) SPFC 単球エフェクターの産生応答は、拒絶反応に一致してみられた。そのピーク時の SPFC 産生数は組

臓適合性の差による違いとよく相関していることから SPFC 単球は移植免疫反応とよく連動した応答を示すエフェクターとみなされる。

白血球接着分子のうち CR3 が SPFC エフェクターの膜レセプターとして赤血球をリガンドとして接着し溶血機能を有するものである可能性が示唆された。

文 献

- 1) Borel JF and Lafferty KJ: Basic science summation. *Transplant Proc* 15 (suppl. 1): 3097-3102, 1983
- 2) 日本移植学会: 腎移植臨床登録集計報告 (1989). 移植 25: 417-434, 1990
- 3) Bowes LG, Dumble LJ, Clunnie GJA, et al.: Increased risk of rejection in renal transplant recipients with in vitro cyclosporine-resistant lymphoid response. *Transplant Proc* 21: 1470-1471, 1989
- 4) Ishibashi M, Jiang H, Kokado Y, et al.: Immunopharmacologic effects of immunosuppressive agents explored by a new effector monocyte generation assay. *Transplant Proc* 21: 1854-1858, 1989
- 5) Hayry P, von Willebrand E, Parthenais E, et al.: The inflammatory mechanisms of allograft rejection. *Immunol Rev* 77: 85-142, 1984
- 6) MacPherson GG and Christmas SE: The role of the macrophage in cardiac allograft rejection in the rat. *Immunol Rev* 77: 143-166, 1984
- 7) Ishibashi M, Ichikawa Y, Sagawa S, et al.: Immunologic studies of red cell antigens in the renal transplant patient. *Transplant Proc* 16: 1509-1511, 1984
- 8) Ishibashi M, Ichikawa Y, Takaha M, et al.: Monocyte-mediated hemolytic response in renal transplant patients. *Transplant Proc* 17: 264-267, 1985
- 9) Ishibashi M, Kokado Y, Takahara S, et al.: Cellular immune response against human red blood cell antigens and renal allograft rejection. *Transplant Proc* 19: 4511-4515, 1987
- 10) Ishibashi M, Kokado Y, Takahara S, et al.: Novel effector monocyte against human RBC antigens invading rejected renal allograft. *Transplant Proc* 20: 285-288, 1988
- 11) Nielson H: Isolation and functional activity of human blood monocyte after adherence to plastic surfaces: comparison of different detachment methods. *Acta Path Microbiol Scand* 95: 81-84, 1984
- 12) Tamatani T and Miyasaka M: Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *International Immunology* 2: 165-171, 1990
- 13) Kishimoto KT, Larson RS, Corbi AL, et al.: The leukocyte integrins. *Advances in Immunology* 46: 149-182, 1989
- 14) Ross GD and Medof ME: Membrane complement receptor specific for bound fragments of C3. *Advances in Immunology* 37: 217-267, 1985
- 15) Wright SD, Levin SM, Jong MTC, et al.: CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 169: 175-183, 1989

(Received on March 1, 1991)
(Accepted on April 22, 1991)