

ラット小腸移植後の移植片対宿主病におけるリンパ球分画の経時的推移に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9218

ラット小腸移植後の移植片対宿主病におけるリンパ球分画の経時的推移に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

井上 哲也

小腸移植後早期に起こる移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の際のリンパ球動態の経時的変化を明らかにすることを目的に、ラット一方向性移植実験群を用いて、移植直後、3, 7, 10, 14日目の移植片中の腸間膜リンパ節、宿主の腸間膜リンパ節、脾臓内のリンパ球分画の変化、インターロイキン2 (interleukin 2, IL-2) 受容体の発現の変化を検討した。その結果、3日目には脾臓へのリンパ球の浸潤が認められ、移植片中の腸間膜リンパ節、宿主の腸間膜リンパ節、脾臓内のいずれにおいても IL-2 受容体陽性細胞は3日目以降増加した。宿主の腸間膜リンパ節と脾臓内では3日目に OKT4/OKT8 比が一旦有意に上昇し、7日目に低下した。移植片中の腸間膜リンパ節では3日目に OKT4 細胞は一過性に減少し、OKT4/OKT8 比は3日目に有意に低下した。以上より、GVHD 発症に先立ち、宿主内においては3日目には移植片から移行したリンパ球の宿主抗原の認識が優位になり、3日目以降に、宿主抗原の認識が優位である誘導相から宿主臓器に対する攻撃が優位である効果相への移行が起こっているものと考えられた。また、3日目にはヘルパー T 細胞が選択的に移植片から宿主内へ遊走しているものと考えられた。

Key words graft-versus-host disease, lymphocyte subset, small bowel transplantation

小腸移植¹⁾においては、移植片中のリンパ組織に含まれる移植片由来のリンパ球が宿主の皮膚や肝臓等を標的臓器として障害する移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) が発症する可能性がある²⁾。急性 GVHD では移植片由来のヘルパー T 細胞が宿主の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス II 抗原を認識し、さらに細胞障害性 T 細胞が活性化され、標的細胞を攻撃することによって臓器障害が起こると考えられている。GVHD は一旦発症すると致命的となるため、その予防のために免疫抑制剤や抗リンパ球抗体の投与が試みられている³⁾が、抗リンパ球抗体の効果的な投与時期の決定を可能にするためには移植片を含めた宿主内の免疫学的な変化を正確に把握する必要がある。

Masutani ら⁴⁾は、ラット小腸移植後の GVHD 発症後の肝臓に浸潤したリンパ球の分画を明らかにしたが、GVHD 発症前後の宿主および移植片の免疫組織におけるリンパ球分画の経時的推移は未だ明らかではない。そこで、移植腸管から宿主のリンパ系組織へのリンパ球の移行と、宿主と移植片のリンパ系組織におけるリンパ球分画の変化を明らかにすることを目的に、ラットのラット小腸移植後の GVHD の際の宿主の脾臓と腸間膜リンパ節、ならびに移植片の腸間膜リンパ節内のリンパ球分画の推移を検討した。

材料および方法

1. 実験動物の作成

体重 250~300g の雄性ルイス系ラットを臓器提供ラットと

し、同条件のルイス×ブラウン・ノルウェー第1世代雑種を被移植ラット (宿主) として用いた。臓器提供ラットと宿主ラットは24時間の絶食の後に、ペントバルビタール 40mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔下に開腹し、移植手術は手術用顕微鏡下を実施した。

1. 臓器提供ラット手術

上腸間膜動脈根部の上下の大動脈 (腹腔動脈から左腎動脈まで) を動脈茎、肝門部までの門脈を静脈茎として、空腸起始部から回腸末端までの小腸を移植片として切離した。移植片は腹部大動脈内に刺入した注射針より 10ml のヘパリン加冷生理食塩水を緩徐に注入して灌流した後摘出した。移植片摘出後に臓器提供ラットは麻酔薬の過量投与により犠牲死させた。

2. 宿主ラット手術

Monchik-Russel 法⁵⁾に準じた異所性全小腸移植を施行した。すなわち、移植片の大動脈は中枢側を結紮し、末梢側を宿主ラットの腹部大動脈 (左腎動脈の末梢) に端側に吻合し、門脈は下大静脈 (左腎静脈の末梢) に端側に吻合した。移植腸管の口側端は結紮閉鎖し、肛門側端は右腹壁に縫合して腸瘻とした。閉腹後、術直後の水分補給の目的で背部皮下に生理食塩水 20ml を注入した。また、手術に伴う感染症の予防の目的に術直後にセフォキシチン 12.5mg を筋注した。

3. 術後管理

移植後24時間は水分のみを経口投与し、それ以降は術前と同様の固形飼料を与え、移植手術終了直後、3日目、7日目、10日目、14日目に犠牲死させた。

平成8年3月8日受付, 平成8年4月22日受理

Abbreviations: GVHD, graft-versus-host disease; HPF, high power field; IL-2, interleukin 2; MHC, major histocompatibility complex

II. 評価項目

1. 組織標本の作成

大動脈からの採血により脱血死させた後、直ちに宿主の腸間膜リンパ節と脾臓、および移植片の腸間膜リンパ節を摘出し、リンパ節は単離し、脾臓は約 3mm の厚さにスライスして 0℃ のアセトンにてすみやかに固定した。約 12 時間の固定の後、AMEX 液[®]にて処理し、免疫組織染色および HE 染色に供した。

2. 組織標本の染色

ラットのリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体である W3/25 と OX8 (Serotec, Oxford, England)[®]ならびに抗インターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) 受容体抗体 (Pharmingen, San Diego, U.S.A.) を用いて、酵素抗体法[®]により免疫組織染色を行った。

3. 脾臓内リンパ球分画

脾臓組織は眼科用尖刀にて細切した後、50 μ m のステンレスメッシュを通して細胞を単離し、リン酸緩衝食塩水で十分に洗浄して試料とした。脾臓内の全リンパ球に対する W3/13, W3/25 と OX8 陽性細胞の比率を、フローサイトメトリー FAC Scan (Becton Dickinson, San Jose, U.S.A.) にて測定した。

4. 脾重量の評価

以下の式にしたがって相対脾重量¹⁰⁾を算出した。

$$\text{相対脾重量} = (\text{脾重量} / \text{体重}) \times 100$$

5. 脾臓の組織学的変化

以下の評価基準に従い脾臓の組織学的変化を評価した (図 1)。

0, 変化なし; 1+, 赤脾髄にリンパ球浸潤を認めるもリンパ濾胞の構造は保たれている; 2+, 1+ と 3+ の中間; 3+, リンパ濾胞は破壊され、その構造を認めない。

6. 組織標本のリンパ球比率の測定

光学顕微鏡を用いて、脾臓の赤脾髄、腸間膜リンパ節の傍皮質領域における抗 W3/25 と抗 OX8, ならびに抗 IL-2 受容体染色陽性細胞数を 400 倍拡大時の一視野あたりで計測し、さらに抗 OX8 染色陽性細胞数に対する抗 W3/25 染色陽性細胞数の比率を計算した。

III. 統計学的検討

脾臓の組織学的評価に関しては中央値で表し、Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した。それ以外はすべて平均値士標準偏差で表し、測定値の比較は Student の t 検定を用いた。

成 績

I. 肉眼的変化

GVHD は移植後 7~9 日に皮膚の発赤として発症した。体重は 10 日目より減少し、14 日目には術前の 81% となった。

II. 皮膚の顕微鏡所見

移植後 7 日目に上皮層へのリンパ球浸潤を認め、10 日目には

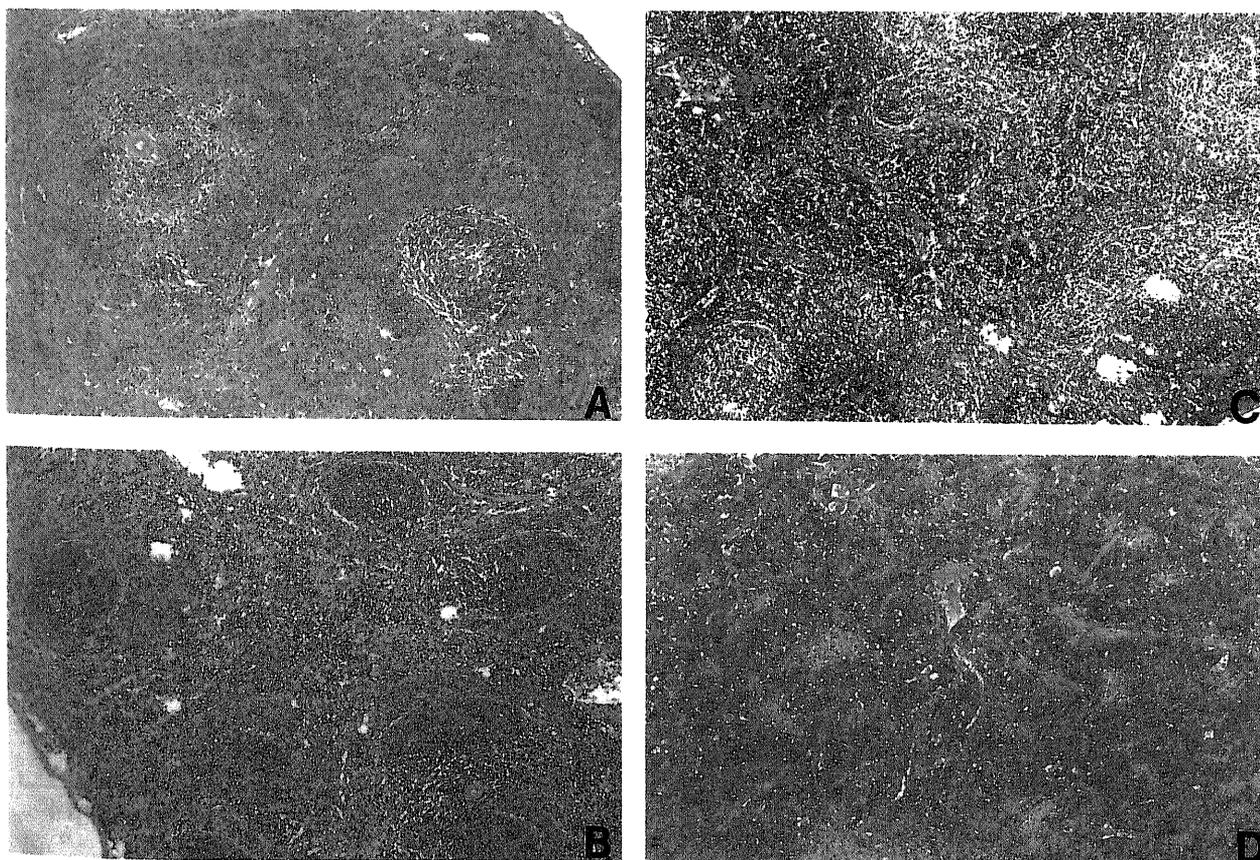


Fig. 1. Histological changes of spleen examined using the following grading system. (A) Grade 0. No changes. (B) Grade 1+. Red pulp is infiltrated by lymphocytes, but lymph follicles are intact. (C) Grade 2+. Intermediate between 1+ and 3+. (D) Grade 3+. Lymph follicles are disappeared. HE stain $\times 40$.

著明となった(図2).

Ⅲ. 脾重量の変化

相対脾重量は移植直後から10日目まで経時的に有意に増加した(図3).

Ⅳ. 脾臓の組織学的変化

3日目では赤脾髄へのリンパ球浸潤が主な所見であり, 7日目にはリンパ濾胞の破壊が明らかとなった(図4).

Ⅴ. 脾臓組織内リンパ球分画

脾臓組織内における T リンパ球の全リンパ球に対する比率は7日目には移植終了直後および3日目に比して有意に上昇し, それ以降は高値が持続した. 各リンパ球分画では, OX8 陽性リンパ球の比率は3日目に有意に減少した後, 7日目には3日目に比して有意に上昇した. W3/25 陽性リンパ球の比率は14日目には移植直後に比して有意に上昇した. W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率は3日目には一旦有意に上昇し, 7日目には再び低下した(表1).

Ⅵ. 宿主の腸間膜リンパ節のリンパ球分画

宿主の腸間膜リンパ節の傍皮質領域の強拡大一視野あたりの W3/25 陽性細胞数は3日目まで有意に増加し, 以後は高値が持続した. 一方, OX8 陽性細胞数は移植直後に比して3日目まで有意に増加し, 7日目にはさらに3日目に比して有意な増加を示した. W3/25 陽性細胞数の OX8 陽性細胞数に対する比率は移植直後に比して3日目に一旦有意に上昇した後, 7日目には移植直後および3日目に比し有意に低下した(表2).

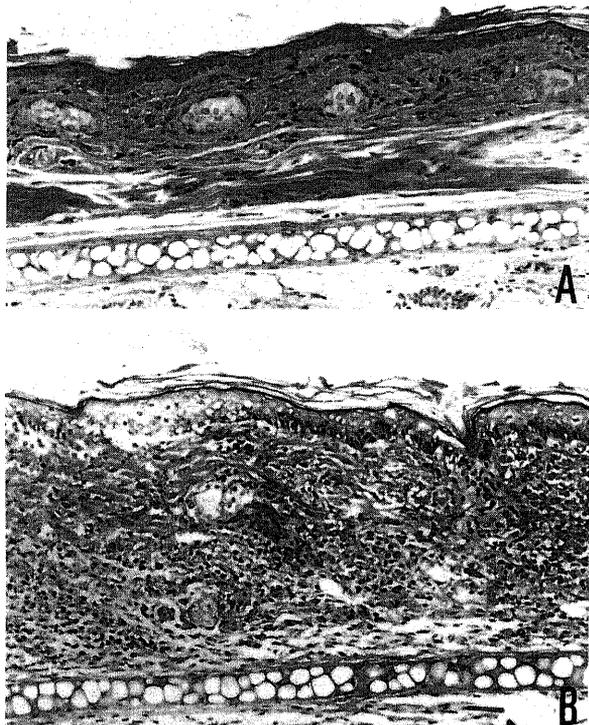


Fig.2. Microscopic view of the skin. (A) Immediately (day0) after small bowel transplantation (HE stain ×100). (B) On the 10th day after small bowel transplantation. Lymphocyte infiltration to the epithelial layer is seen (HE stain ×100).

Ⅶ. 移植片の腸間膜リンパ節のリンパ球分画

移植片の腸間膜リンパ節の傍皮質領域の強拡大一視野あたりの W3/25 陽性細胞数は3日目まで有意に減少した後, 7日目には移植直後および3日目に比して有意に増加した. OX8 陽性細胞数は移植直後と3日目には差を認めなかったが, 7日目まで有意に増加した. W3/25 陽性細胞数の OX8 陽性細胞数に対する比率は移植直後に比して3日目には一旦有意に低下し, 7日目には3日目に比し有意に増加した(表3).

Ⅷ. 脾臓, 腸間膜リンパ節における IL-2 受容体陽性細胞数の推移

脾臓の赤脾髄の強拡大一視野あたりの IL-2 受容体陽性細胞数は7日目まで有意な増加を続けた. 宿主の腸間膜リンパ節の傍皮質領域の強拡大一視野あたりの IL-2 受容体陽性細胞数は, 3日目には移植直後に比して増加傾向を認め, 7日目には移植直後および3日目に比し有意に増加し, 10日目まで増加傾向を

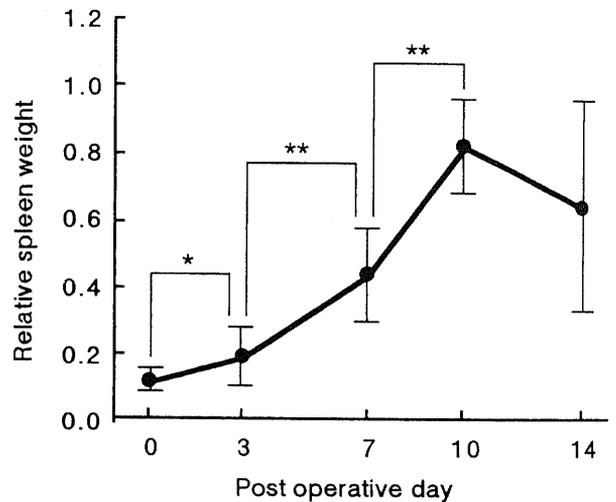


Fig.3. Changes in relative weight of spleen. Relative organ weight, (organ weight/body weight) ×100. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$ in each postoperative day. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ Student's *t* test.

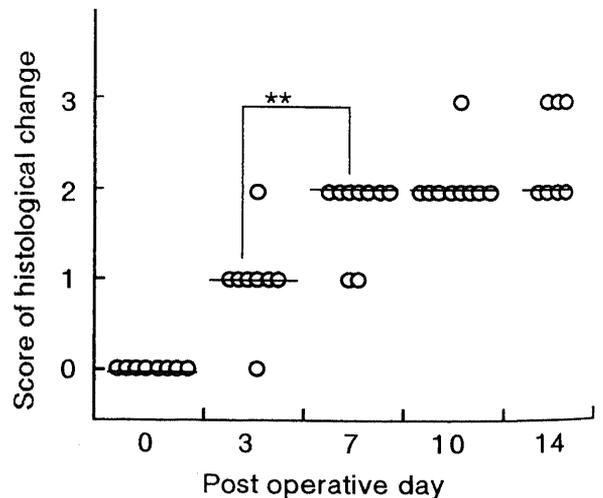


Fig.4. Changes of the median scores of histological change in the spleen. Each bar represents median score. **, $p < 0.01$ Mann-Whitney *U* test.

Table 1. Subset of lymphocytes in the spleen of the recipient

Postoperative day	Ratio (%) of the cells in all lymphocytes			W3/25/OX8 ratio
	W3/13-positive	W3/25-positive	OX8-positive	
0	64.3±6.5	49.5±13.1	28.8±6.0	1.83±0.79
3	63.1±9.8	54.4±9.6	11.5±2.1**	5.01±2.06*
7	87.0±5.2***	56.0±13.5	35.3±7.6#	1.71±0.75
10	84.9±9.5	54.5±10.1	39.5±14.6	1.57±0.78
14	92.9±3.6	72.2±6.0	24.9±3.5	2.98±0.69

Values are expressed $\bar{x} \pm SD$ from five rats on each postoperative day.
* $p < 0.05$ vs. day0, ** $p < 0.01$ vs. day0, # $p < 0.05$ vs. day3, * $p < 0.01$ vs. day3.

Table 2. Subset of lymphocytes infiltrated in paracortex of the mesenteric lymphnode of the recipient

Postoperative day	Number of the cells per HPF ^{a)}		W3/25/OX8 ratio
	W3/25-positive	OX8-positive	
0	87.2±26.9	90.2±20.3	0.97±0.22
3	282.0±38.3**	172.8±21.4**	1.67±0.40*
7	177.6±38.6**	295.4±48.6***	0.61±0.12**
10	249.6±68.6	291.0±45.1*	0.85±0.15*
14	178.4±20.3 ⁺	186.4±13.6	0.96±0.14

Values are expressed $\bar{x} \pm SD$ from five rats on each postoperative day.
^{a)}High power field ($\times 400$).
* $p < 0.05$ vs. day0, ** $p < 0.01$ vs. day0, # $p < 0.05$ vs. day3, * $p < 0.01$ vs. day3.

Table 3. Subset of lymphocytes infiltrated in paracortex of the mesenteric lymphnode of the graft

Postoperative day	Number of the cells per HPF ^{a)}		W3/25/OX8 ratio
	W3/25-positive	OX8-positive	
0	87.2±26.9	90.2±20.3	0.97±0.22
3	56.4±13.9*	97.8±15.2	0.59±0.16**
7	199.8±63.9***	145.2±38.8**	1.45±0.59 ⁺
10	197.6±86.3 ⁺	144.4±20.8 ⁺	1.34±0.44 ⁺
14	130.2±64.3 ⁺	169.6±19.4 [#]	0.98±0.16 [#]

Values are expressed $\bar{x} \pm SD$ from five rats on each postoperative day.
^{a)}High power field ($\times 400$).
* $p < 0.05$ vs. day0, ** $p < 0.01$ vs. day0, # $p < 0.05$ vs. day3, * $p < 0.01$ vs. day3.

Table 4. Number of IL-2 receptor positive cells

Postoperative day	Number of the cells per HPF ^{a)}		
	Spleen	Native MLN ^{b)}	Graft MLN
0	26.8±5.5	66.3±26.8	66.3±26.8
3	88.0±28.2**	136.0±34.8*	133.0±78.0**
7	158.8±27.4***	194.0±35.5***	264.0±29.9***
10	178.3±25.9	168.0±30.2	316.0±65.4
14	159.0±16.3	132.0±20.5	265.0±34.8

Values are expressed $\bar{x} \pm SD$ from six rats on each postoperative day.
^{a)}High power field ($\times 400$), ^{b)}Mesenteric lymphnode.
* $p < 0.05$ vs. day0, ** $p < 0.01$ vs. day0, # $p < 0.05$ vs. day3, * $p < 0.01$ vs. day3.

認めた。移植片のリンパ節では IL-2 受容体陽性細胞数は 7 日目まで有意に増加した (表 4)。

考 察

小腸移植では、実質臓器に比してその血管系を含めた移植片に多くのリンパ組織を含むため、移植後に GVHD が起こる可能性がある²⁾。小腸移植に伴う GVHD に関して、Monchik ら⁷⁾がルイス系ラットを臓器提供ラット、ルイス×ブラウン・ノルウエー第 1 世代雑種を被移植ラットとした一方向性の GVHD 実験群を報告して以来、同様の実験群を用いた実験により小腸移植にともなう GVHD の肉眼的経過および組織学的変化が徐々に明らかにされてきた。Grant ら¹¹⁾は、小腸移植後の GVHD の肉眼的経過について、移植後 7 日目から 10 日目に耳と四肢をはじめとする皮膚に発赤が現れ、同時期より体重減少、下痢と脱毛を認め、12 日目から 14 日目に悪液質様となったと報告している。今回の検討でもその肉眼的経過はこれまでの報告と同様であった。

急性 GVHD による病変は、移植片由来のヘルパー T 細胞が宿主の MHC クラス II 抗原を認識し、これらのヘルパー T 細胞が分泌したサイトカイン、特に IL-2 によって刺激された細胞障害性 T 細胞が皮膚、肝や腸管等の標的細胞を攻撃することによって起こると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。これらの抗原の認識、T 細胞の攻撃の時期はリンパ球動態から推測することが可能であり、ヒト骨髓移植臨床例や、マウスの脾細胞・骨髓細胞移植実験においてはすでにその時期が報告されている。Woodruff ら¹⁵⁾は、サイクロフォスファミドでリンパ球を枯渇させた後に骨髓移植を行った際のリンパ系の再構築の第一段階として、移植後 8~10 日目から宿主のリンパ節全体と脾臓の T 細胞領域である動脈周囲リンパ組織鞘に細胞分裂像を多く示すリンパ芽球の浸潤がはじまることを報告し、この時期を早期リンパ球増殖期とした。また、リンパ節はおびただしいリンパ芽球の浸潤により正常な構築を失っていることを指摘した。その後リンパ球の枯渇、正常細胞による B 細胞領域の再構築を経て正常細胞による T 細胞領域の再構築がおこるのは移植後 200 日目以降であると報告している。Delz ら⁹⁾は、実験的小腸移植後に移植片および宿主の小腸の腸間膜リンパ節の傍皮質領域、および脾臓の動脈周囲リンパ組織鞘 (いずれも T 細胞領域) にリンパ球の浸潤が見られ、この変化は移植後 14 日目に最も著明であったと報告し、宿主の小腸の腸間膜リンパ節の腫大は、宿主内で移植片由来のリンパ球が増殖して宿主を攻撃する効果相を示すものと推測している。しかし、浸潤している細胞の種類や、これらの浸潤細胞が宿主の臓器を認識しているのか、あるいは攻撃しているのかについては明らかにされてはいない。小腸移植と異なり、骨髓移植では宿主のリンパ球を枯渇させているが、移植後早期に宿主のリンパ系臓器の T 細胞領域へのリンパ芽球の浸潤が見られる点で両者の報告は一致している。Woodruff ら¹⁵⁾は、骨髓移植ではこのような免疫芽球の浸潤はその後におこる GVHD による標的臓器障害の準備段階であると推測している。また小腸移植においても、移植片の腸間膜リンパ節から遊走する T 細胞が GVHD の原因であるとする報告は多く、Kirkman ら¹⁶⁾は T 細胞を除去した移植実験により小腸移植に伴う GVHD の発症には T 細胞が必要であることを示し、Pomposelli ら¹⁷⁾も GVHD の発症には T 細胞が必要であると示している。宿主臓器に浸潤する T 細胞の分画については、井

谷⁹⁾は、Delz ら⁹⁾と同様の実験群で、小腸移植後 14 日目には宿主のリンパ系臓器で、ヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞の両者が移植前と比べて有意な増加を示し、ヘルパー T 細胞の増加率は、細胞障害性 T 細胞の増加率よりも高いことを報告している。しかし、これらの細胞が浸潤する時期や、移植片と宿主の腸間膜リンパ節間に浸潤する細胞の違いについては未だ明らかにはされていない。

今回の検討では、脾臓においては 3 日目にはすでに赤脾髄へのリンパ球浸潤が明らかとなり、7 日目にはリンパ濾胞の破壊が認められた。また 3 日目に抗 IL-2 受容体免疫染色陽性細胞の有意な増加を認めた。このことから、3 日目までには移植片内の T 細胞の宿主脾臓への遊走と、遊走した T 細胞への IL-2 受容体を介した刺激が始まっているものと考えられた。また、脾臓においては 7 日目には全リンパ球に対する T 細胞の比率が上昇したことにより、GVHD 発症時期である移植後 7 日目には、移植片から宿主への T 細胞の遊走と宿主のリンパ系臓器での T 細胞の増殖が亢進していると考えられた。一方、脾臓内リンパ球分画では OX8 陽性リンパ球の比率が 3 日目で有意に低下し、W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率が有意に上昇していたことから、脾臓では 3 日目は宿主抗原の認識が優位になっている誘導相であると考えられた。また、7 日目を以降は脾臓ではリンパ濾胞の破壊が明らかとなり、抗 IL-2 レセプター免疫染色陽性細胞の増加、全リンパ球に対する T 細胞の比率の上昇、W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率の減少が認められたことから、3 日目から 7 日目の間に脾臓では、リンパ球動態は誘導相から効果相へ移行し、7 日目を以降は宿主への攻撃が優位になっていると考えられた。また、宿主の腸間膜リンパ節のリンパ球サブセットでは、W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率が脾臓におけるそれと同様に 3 日目で有意に上昇し、7 日目には有意に減少していた。したがって、宿主の腸間膜リンパ節においてもリンパ球動態では、誘導相から効果相からへの移行が脾臓と同時期に起こるものと考えられた。

また、親から第 1 世代雑種への移植では、移植片の小腸は GVHD 発症後も正常であるが、移植片中の腸間膜リンパ節は著明に腫大することが報告されている¹¹⁾。Deltz ら⁹⁾は移植片内での GVHD の誘導を示すものとして移植片中の腸間膜リンパ節の腫大に注目し、さらに移植片中の腸間膜リンパ節を摘除することによって GVHD の発症が抑えられたとしている。しかし、移植片中の腸間膜リンパ節における免疫学的変化の経時的推移は未だ明らかとはなっていない。今回の検討では、移植片の腸間膜リンパ節は、これまでの報告⁹⁾と同様に腫大していた。リンパ球分画の検討では、3 日目に W3/25 陽性リンパ球の減少が起こり、これにともない W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率は低下を示した。移植片の腸間膜リンパ節におけるこの変化は宿主の脾臓および腸間膜リンパ節とは逆であった。3 日目では移植片から宿主へのリンパ球の遊走が主な変化であり、遊走しているリンパ球は主にヘルパー T 細胞であると考えられた。さらに、7 日目を以降には移植片の腸間膜リンパ節でも、宿主の脾臓および腸間膜リンパ節脾臓と同様に W3/25 陽性リンパ球数と OX8 陽性リンパ球数はともに増加を示した。したがって、7 日目には移植片から宿主への一方向の遊走は完了し、移植片由来の T 細胞は移植片を含めた宿主内での効果相に関与するものと思われた。

一方、親から第1世代雑種への小腸移植では、移植片由来の免疫細胞すべてを同定することは困難である。また宿主のリンパ球を枯渇させていないため、増殖しているリンパ球の由来を同定することもできない。しかし、この実験によって、小腸移植にともなう GVHD は、その発症に先立ち、移植片リンパ節内のヘルパー T 細胞の減少、すなわち宿主内への移植片由来のヘルパー T 細胞の遊走が選択的に起こり、GVHD 発症前に宿主のリンパ系臓器においてヘルパー T 細胞優位の認識相が認められることが明らかとなった。さらに宿主のリンパ系臓器でのヘルパー T 細胞の細胞障害性 T 細胞に対する比率の一過性の上昇と、移植片のリンパ節内のヘルパー T 細胞の減少は GVHD 発症に先行して起こるため、移植片および宿主のリンパ系臓器の生検等による免疫学的検討は GVHD の発症の予測に有用と考えられる。

結 論

ラット同種小腸移植後の GVHD において、移植腸管から宿主のリンパ系組織へのリンパ球の移行とリンパ球分画の経時的推移を明らかにすることを目的に、宿主の脾臓、腸間膜リンパ節と移植片の腸間膜リンパ節内のリンパ球分画を検討し、次の結論を得た。

1. 脾臓において、3日目には赤脾髄へのリンパ球浸潤と IL-2 受容体陽性細胞の増加が明らかとなり、7日目には全リンパ球に対する T 細胞の比率が上昇した。
 2. 脾臓内のリンパ球分画では、W3/25 陽性細胞の OX8 陽性細胞に対する比率は3日目に一旦上昇し、7日目には低下した。
 3. 宿主腸間膜リンパ節内のリンパ球分画では、W3/25 陽性細胞と OX8 陽性細胞の絶対数はともに移植後増加したが、W3/25 陽性細胞の OX8 陽性細胞に対する比率の推移は脾臓におけるそれと同様に3日目に一旦上昇し、7日目には低下した。
 4. 移植片の腸間膜リンパ節内のリンパ球分画では、W3/25 陽性細胞は3日目に一旦減少し、7日目で増加した。OX8 陽性細胞は7日目で増加したが、W3/25 陽性細胞の OX8 陽性細胞に対する比率は3日目に一旦減少し、7日目には上昇した。
- 以上より、宿主内においては3日目にはヘルパー T 細胞数が細胞障害性 T 細胞に比して優位になり、7日目を以降は細胞障害性 T 細胞数がヘルパー T 細胞に比して優位となっていることが明らかとなった。一方、移植片では3日目にはヘルパー T 細胞数が減少することが明らかとなった。したがって、GVHD の発症に先立ち、移植片では3日目にはヘルパー T 細胞が選択的に宿主内へ遊走し、宿主内では3日目には移植片より遊走したリンパ球の認識が優位な誘導相となり、3日目を以降に、誘導相から細胞障害が優位となる効果相へと移行するものと考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げると共に、直接御指導戴きました八木雅夫講師ならびに病理学的手法について御指導を戴きました金沢大学医学部附属病院病理部の野々村昭孝助教授に厚く感謝の意を表します。また、御協力いただきました金沢大学第二外科学教室の諸兄に深く感謝いたします。

尚、本論文の要旨は第95回日本外科学会総会（平成7年4月、名古屋）において発表した。

文 献

- 1) Grant, D., Wall, W., Mimeault, R., Zhong, R., Ghent, C., Garcia, B., Stiller, C. & Duff, J.: Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet*, 335, 181-184 (1990).
- 2) Lillehei, R. C., Idezuki, Y., Feamster, J. A., Dietzman, R. H., Kelly, W. D., Merkel, F. K., Goetz, F. C., Lyons, G. W. & Manax, W. G.: Transplantation of stomach, intestine, and pancreas; experimental and clinical observations. *Surgery*, 62, 721-741 (1967).
- 3) Delz, E., Ulrichs, K., Schach, T., Fredrichs, B., Muller-Ruchholtz, W., Muller-Hermelink, H. K. & Thiede, A.: Graft-versus-host reaction in small bowel transplantation and possibilities for its circumvention. *Am. J. Surg.*, 151, 379-386 (1986).
- 4) Shaffer, D., Ubhi, C. S., Simpson, M. A., Gottschalk, R., Milford, E. L., Maki, T. & Monaco, A. P.: Prevention of graft-versus-host disease following small bowel transplantation with polyclonal and monoclonal antilymphocyte serum. *Transplantation*, 52, 948-952 (1991).
- 5) Masutani, H., Yagi, M., Hashimoto, T., Iyobe, T., Iwasa, K., Tomita, K., Kiriya, T., Shimizu, K., Izumi, R. & Miyazaki, I.: Suppression of the histologic changes of GVHD by FK 506 in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc.*, 24, 1185-1186 (1992).
- 6) 榎谷博孝: ラット小腸移植後の移植片対宿主病におけるリンパ球動態および肝病変の検討。 *十全医会誌*, 103, 17-26 (1994).
- 7) Monchik, G. L. & Russell, P. S.: Transplantation of small bowel in the rat; technical and immunological considerations. *Surgery*, 70, 693-702 (1971).
- 8) 堤 寛: パラフィン切片による光顕的酵素抗体法染色。酵素抗体法（渡辺慶一，中根一穂編），第3版，第1巻，99-139頁，学際企画社，東京，1992。
- 9) 佐藤雄一，渡辺 昌，黒木将仁: 組織内 T リンパ球サブセットの同定法について。 *病理と臨床*, 1, 159-163 (1983).
- 10) Delz, E., Muller-hermelink, H. K., Ulrichs, K., Thiede, A. & Muller-Ruchholtz, W.: Development of graft-versus-host reaction on various target organs after small intestine transplantation. *Transplant Proc.*, 13, 1215-1216 (1981).
- 11) Grant, D., Zhong, R., Gunn, H., Duff, J., Garcia, B., Keown, P., Wijsman, J. & Stiller, C.: Graft-versus-host disease associated with intestinal transplantation in the rat. *Transplantation*, 48, 545-549 (1989).
- 12) 藤原道夫: GVHD の機序。 *臨床免疫*, 20, 890-895 (1988).
- 13) 原田実根: 骨髄移植と急性 GVHD。 *医学のあゆみ*, 146, 382-390 (1988).
- 14) 阪上賢一，折田薫三: GVH と GVH 病。 *日本臨床*, 43, 97-103 (1985).
- 15) Woodruff, J. M., Hansen, J. A., Good, R. A.,

Santos, G. W. & Slavin, R. E.: The pathology of the graft-versus-host reaction (GVHR) in adults receiving bone marrow transplants. *Transplant Proc.*, 8, 675-684 (1976).

16) Kirkman, R. J., Lear, P. A., Madara, J. L. & Tilney, N. L.: Small intestine transplantation in the rat-*Immunology*

and function. *Surgery*, 96, 280-287 (1984).

17) Pomposelli, F., Maki, T., Kiyozumi, T., Gaber, L. & Monaco, A. P.: Induction of graft-versus-host disease by small intestinal allotransplantation in rats. *Transplantation*, 40, 343-347 (1985).

Serial Changes in Lymphocyte Subsets in the Immune System Organs of Graft-versus-host Disease (GVHD) after Small Bowel Transplantation in Rats Tetsuya Inoue, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 105, 420—426 (1996)

Key words graft-versus-host disease, lymphocyte subset, small bowel transplantation

Abstract

To clarify the serial immunological changes occurring in graft-versus-host disease (GVHD) after small bowel transplantation (SBT), subsets of lymphocytes infiltrating the immune system organs in the graft and the host were analysed in rats. On day 0, 3, 7, 10, 14 after SBT, subsets of lymphocytes were determined by immunohistological staining and flowcytometry. In mesenteric lymph nodes and the spleen of the host, both helper T cells and cytotoxic T cells transiently increased. Furthermore, the ratio of OKT4 to OKT8 was significantly elevated on the 3rd day and lowered on the 7th day after SBT. On the other hand, in mesenteric lymph nodes of the graft, helper T cells significantly decreased on the 3rd day and increased on the 7th day after SBT with the ratio of OKT4 to OKT8, which was significantly lowered on the 3rd day and elevated on the 7th day after SBT. These results indicate that in the early stage of GVHD, helper T cells transiting from the graft to the host became most numerous, and that, in the host, helper T cells were most numerous on the 3rd day after SBT, and that the immunological environment changed from the induction phase to the effector phase between the 3rd and 7th day after SBT in the immune system organs of the host.