

# Studies on Lymphocyte Subset and Hepatic Lesions After Experimental Rat Small Bowel Transplantation

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8508">http://hdl.handle.net/2297/8508</a>               |

## 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

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任:宮崎逸夫教授)

樹 谷 博 孝

小腸移植術後早期におこる急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の際に、移植片から宿主の体内に移行した T 細胞が宿主の組織を認識し、さらに攻撃するまでの変化を明確にするために、ラットを用いて、小腸移植後の GVHD による皮膚、小腸粘膜病変が最も顕著に見られる移植後 14 日目の宿主の脾臓と腸間膜リンパ節ならびに血液中に浸潤あるいは遊走する T 細胞分画の比率を GVHD 群と免疫抑制剤 (FK-506) 投与群で比較検討した。その結果、浸潤している T 細胞のうちヘルパー T 細胞のしめる割合は、平均して脾臓で約 66%、リンパ節で約 66%、血中で約 73% といずれもヘルパー T 細胞が優位であった。また肝臓の血管内皮細胞にリンパ球が接着する現象と肝臓の細胆管にリンパ球が浸潤する現象は GVHD 群で著明であったが、免疫抑制剤投与群では明らかに抑制されていた。したがって、FK-506 は宿主抗原の認識を抑制する事が示され、急性 GVHD による宿主の攻撃が最も著明な時期にも宿主抗原の認識は続いているものと考えられた。すなわち、小腸移植においては移植片由来のリンパ球による宿主抗原の認識、攻撃は一連の反応ではなく、同時に進行する反応であることが示され、脾臓とリンパ節および肝臓における変化は、臨床小腸移植においても急性 GVHD の診断、治療の指標となると考えられた。

**Key words** small bowel transplantation, graft-versus-host disease, lymphocyte subset, hepatic lesion, FK-506

近年、短腸症候群の症例を対象に小腸移植または肝・小腸同時移植が行なわれている<sup>1)</sup>。小腸移植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肝臓や皮膚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) が発生する可能性がある。GVHD は一旦発症すると致命的となる。したがって、その予防のための免疫抑制剤や抗リンパ球抗体の投与が必要であり、免疫抑制剤の効果判定と抗リンパ球抗体の投与時期の決定などを可能にするためには、宿主のリンパ系臓器や肝臓等の生検しやすい臓器の移植後早期の変化を正確に把握することが必要と思われる。しかし、急性 GVHD の際の移植腸管から移行したリンパ球による宿主の組織抗原の認識および宿主組織への攻撃が移植後どのような時期に起こるのか、またそれらが同時に起こるのか別々の時期に起こるのかは十分に明らかにされてはいない。そこで、小腸移植後に発生する急性 GVHD の際の宿主臓器におけるリンパ球動態を明らかにすることを目的に、ラットの小腸移植後の GVHD の際の宿主の脾臓と腸間膜リンパ節に浸潤するリンパ球分画を免疫組織染色にて分析し、さらに、標的臓器である肝臓における移植後早期の変化を免疫抑制剤投与群と非投与群とで比較検討した。

### 材料および方法

#### I. 実験モデルの作成

体重 250~300g の雄性ルイス系ラットをドナーとし、同条件

のルイス×ブラウン・ノルウェー F<sub>1</sub> をレシピエントとして用いた。ドナーとレシピエントは共に術前の絶食は 24 時間とし、麻酔はペントバルビタールの筋注により行なった。移植手技はすべて手術用顕微鏡を用いて行なった。

#### 1. ドナー手術

移植片として空腸起始部より回腸末端までの小腸を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切離した。移植腸管の内腔は 20ml の冷生食を緩徐に注入して洗浄し、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。

#### 2. レシピエント手術

Monchik-Russell 法<sup>2)</sup>に準じた異所性全小腸移植を施行した。移植片の動脈茎は末梢側を結紮し、中枢側をレシピエントの腹部大動脈 (右腎動脈の末梢) に端側縫合し、静脈茎はレシピエントの下大静脈 (右腎静脈の末梢) に端側縫合した。移植腸管の口側は結紮し、肛側は右腹壁に縫合して腸瘻とした。術直後の水分補給の目的で、閉腹時に約 20ml の生理食塩水を腹腔内に注入した。

#### 3. 術後管理

移植後 24 時間は水分のみ経口摂取可とし、それ以降は術前と同様の固形飼料を与えた。抗生物質は投与しなかった。

#### II. 実験群

実験群を以下の 3 群に分けた。

平成 5 年 11 月 16 日受付, 平成 5 年 12 月 24 日受理

Abbreviations: GPT, glutamic pyruvic transaminase; GVHD, graft-versus-host disease; HE, hematoxylin-eosin; HPF, high power field; MHC, major histocompatibility complex

## 1. GVHD 群 (n=8)

移植後免疫抑制剤を投与せず、術後14日目に犠死させた。

## 2. FK 群 (n=9)

移植直後から 0.32mg/kg の FK-506 (FR900506, 藤沢薬品工業, 大阪) を連日筋注し、術後14日目に犠死させた。

## 3. 対照群 (n=7)

開腹術のみを施行し、免疫抑制剤を投与せず、術後14日目に犠死させた。

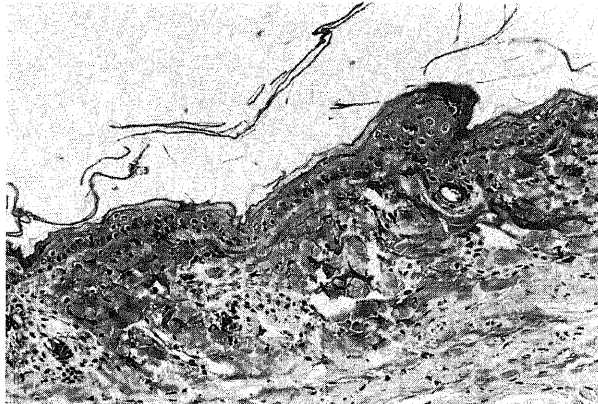
## Ⅲ. 検査項目および方法

## 1. 組織標本の作成

レシピエントは下大静脈からの採血により脱血死させ、レシピエント側の腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓を摘出し、リンパ節は単離し脾臓および肝臓は約 3mm 厚さにスライスして、いずれも 0℃ のアセトンにてすみやかに固定した。約12時間の固定のあと、AMEX 液<sup>3)</sup>にて処理した。

## 2. 組織標本の染色

組織標本を脱パラフィン化し、水素化ほう素ナトリウム、過よう素酸、過酸化水素加メタノールにより内因性ペロキシダーゼを十分に抑制した後、以下のリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体 (Serotec, Oxford, England)<sup>4)</sup>を用いてアビディン・ビオチン複合体 (avidin biotin complex, ABC) 法<sup>3)</sup>により免疫組織染色した。



A



B

Fig. 2. Microscopic view of the skin. A. Graft-versus-host disease (GVHD) model. Lymphocyte infiltration to the epithelial layer is seen. thickening and vesicle formation is also seen in the epithelium. B. Immunosuppressed model. Almost normal construction is preserved.

## 1) W3/25

ラットのヘルパー/インデューサー T細胞の表面抗原

## 2) OX8

ラットのサイトトキック/サプレッサー T細胞の表面抗原

## 3. 組織標本のリンパ球比率の測定

脾臓の T細胞領域である動脈傍リンパ組織鞘、腸間膜リンパ節の T細胞領域である傍皮質領域、肝臓の門脈域における全リンパ球数と W3/25 ならびに OX8 陽性細胞数を光学顕微鏡で 400倍拡大時の一視野あたりで計測し、さらに全リンパ球に対する W3/25 と OX8 陽性細胞の比率を計算し、GVHD 群と対照群とで比較した。

## 4. 肝病変の検討

GVHD 群と FK 群の血管壁へのリンパ球接着所見および小胆管壁へのリンパ球浸潤所見を比較した<sup>19)~27)</sup>。

## 1) 血管壁へのリンパ球接着 (endothelialitis) 所見

レシピエントの肝臓の一切片あたりの門脈枝、肝静脈枝のうち、リンパ球の接着を認める血管数 (a)、それらの血管に接着しているリンパ球の総数 (b) を計測し、平均接着細胞数 (b/a) を求めた。

## 2) 小胆管壁へのリンパ球浸潤 (emperipoiesis) 所見

レシピエントの肝臓の一切片あたりの直径 100~200 $\mu$  の小胆管数 (c) と、それらのうち一個以上のリンパ球が上皮層内に浸潤している胆管の数 (d) を計測し、リンパ球浸潤率 (d/c) を求めた。

## 5. 血液標本作成法

全血中のリンパ球比率測定用に術後 3, 7, 14 日目に尾動脈より約 2ml 採血した。また、血液生化学検査用に、屠殺時に下大静脈より約 10ml 採血し、3000回転で15分間遠心分離し、血清を-80℃で凍結保存した。

## 1) 全血中のリンパ球比率測定

採取した血液中の全リンパ球に対する W3/13, W3/25, OX8 陽性細胞の比率を、フローサイトメトリー FACS can (Becton Dickinson, San Jose, U.S.A.) にて測定した。

## 2) 血液生化学

血清中のアルブミンをブロモクレゾールグリーン (bromo-

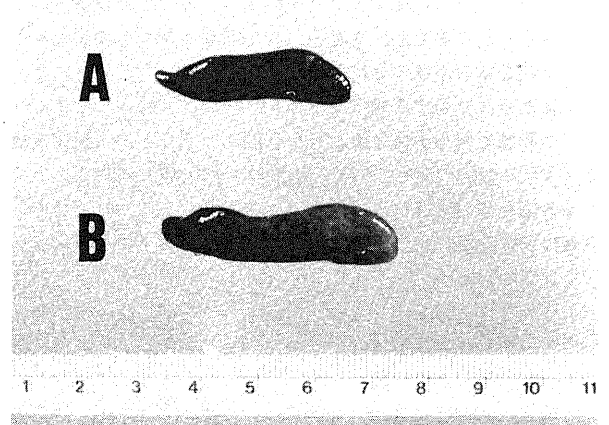


Fig. 3. Macroscopic view of the spleen. A. Control animal. B. GVHD model. The spleen of the recipient of GVHD model is enlarged. The average weight of the spleen of GVHD model was about three times as much as that of the control animal.

cresol green, BCG) 法<sup>6)</sup>, 総ビリルビンをアルカリアゾビリルビン法<sup>6)</sup>, グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvic transaminase, GPT) を紫外線吸光度分析 (ultraviolet, UV) 法<sup>7)</sup> (ドイツ臨床化学会 (German Society of Clinical Chemistry, GSCC) 法準拠) を用いて測定した。

IV. 統計学的検討

測定値はすべて平均値±標準偏差であらわした。測定値の比較は Student's t 検定を用い、危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

成 績

1. 肉眼的変化

GVHD 群の小腸移植後14日目では、脱毛、湿疹等の皮膚変化と下痢に伴う体重減少が著明であった (図1)。

2. 皮膚の顕微鏡所見

GVHD 群では、上皮層への著名なリンパ球浸潤、上皮細胞の空胞変性を認めたのに対し、FK 群ではそれらの変化は見られなかった (図2)。

3. 免疫臓器の変化

GVHD 群の脾臓は著名に腫大し、平均重量は正常動物の約3倍であった (図3)。レシピエントの腸間膜リンパ節も同様に腫大し、組織学的には、リンパ球の消失およびT細胞領域で

ある傍皮質領域における著明なリンパ球浸潤を認めた (図4)。脾臓のT細胞領域である動脈周囲リンパ組織鞘においても著明なリンパ球浸潤所見が認められた。

4. 組織標本のリンパ球比率

1) 腸間膜リンパ節のリンパ球分画

腸間膜リンパ節の傍皮質領域の強拡大一視野あたりの全細胞

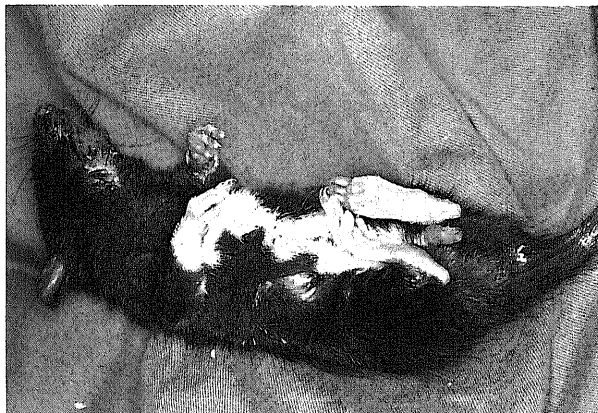
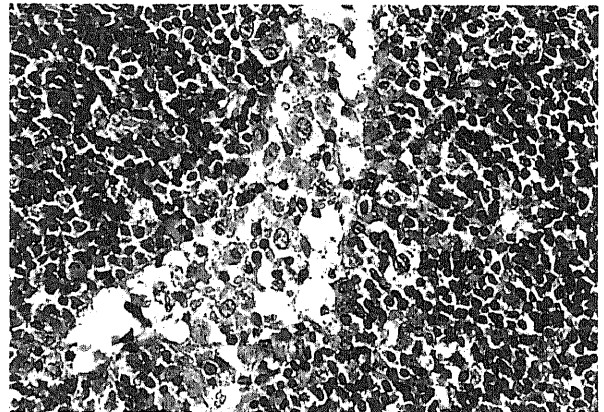
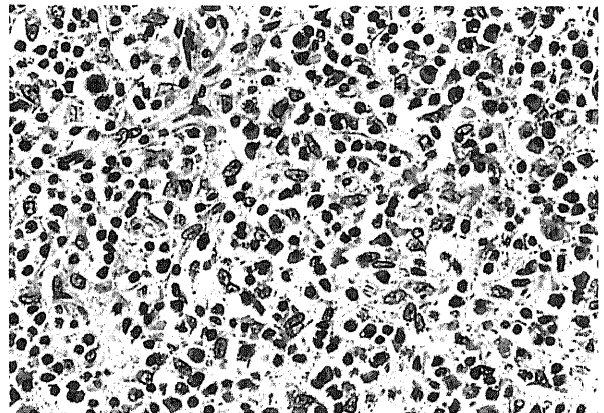


Fig. 1. Macroscopic view of the recipient. Diffuse skin lesion is observed. Diarrhea and body weight loss was also seen.



A



B

Fig. 4. Microscopic view of paracortex of the mesenteric lymph node. A. Control animal. Lymph follicles are preserved (HE stain x400). B. GVHD model. Lymph follicles are disappeared, and lymphocyte infiltration is seen in the parenchyma. Plasma cells are also seen (HE stain x400).

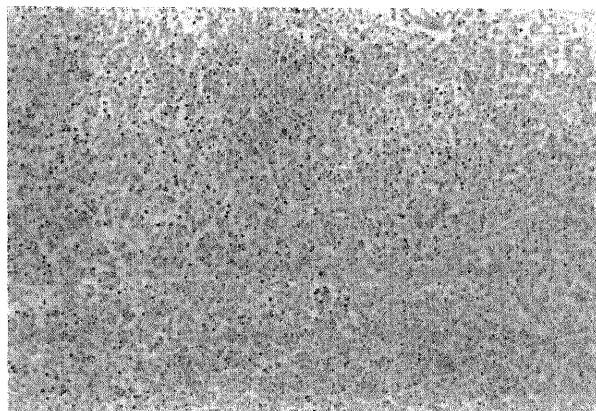


Fig. 5 A

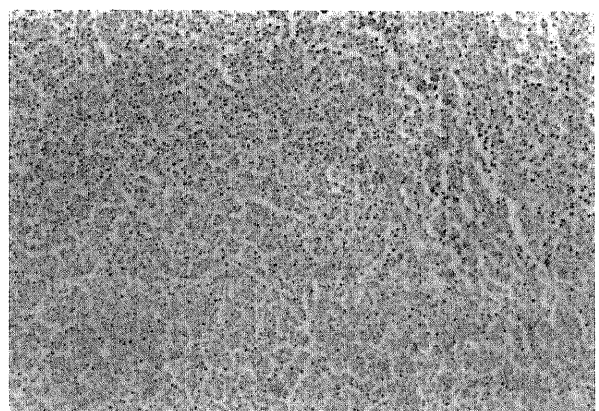


Fig. 5 B

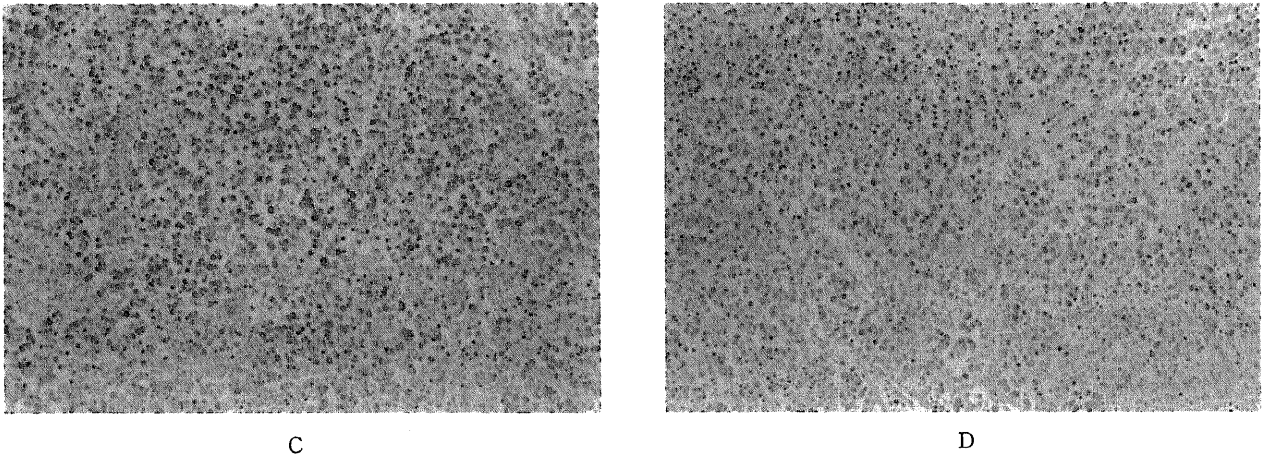


Fig. 5. Microscopic view of the mesenteric lymph node. A. Control animal (anti-W3/25 staining  $\times 100$ ). B. Control animal (anti-OX8 staining  $\times 100$ ). C. GVHD model (anti-W3/25 staining  $\times 100$ ). The number of W3/25-positive cells in parenchyma is increased compared with that of control animal. D. GVHD model (anti-OX8 staining  $\times 100$ ). The number of OX8-positive cells in parenchyma is increased compared with that of control animal. The number of OX8-positive cells is less than that of W3/25-positive cells in GVHD model.

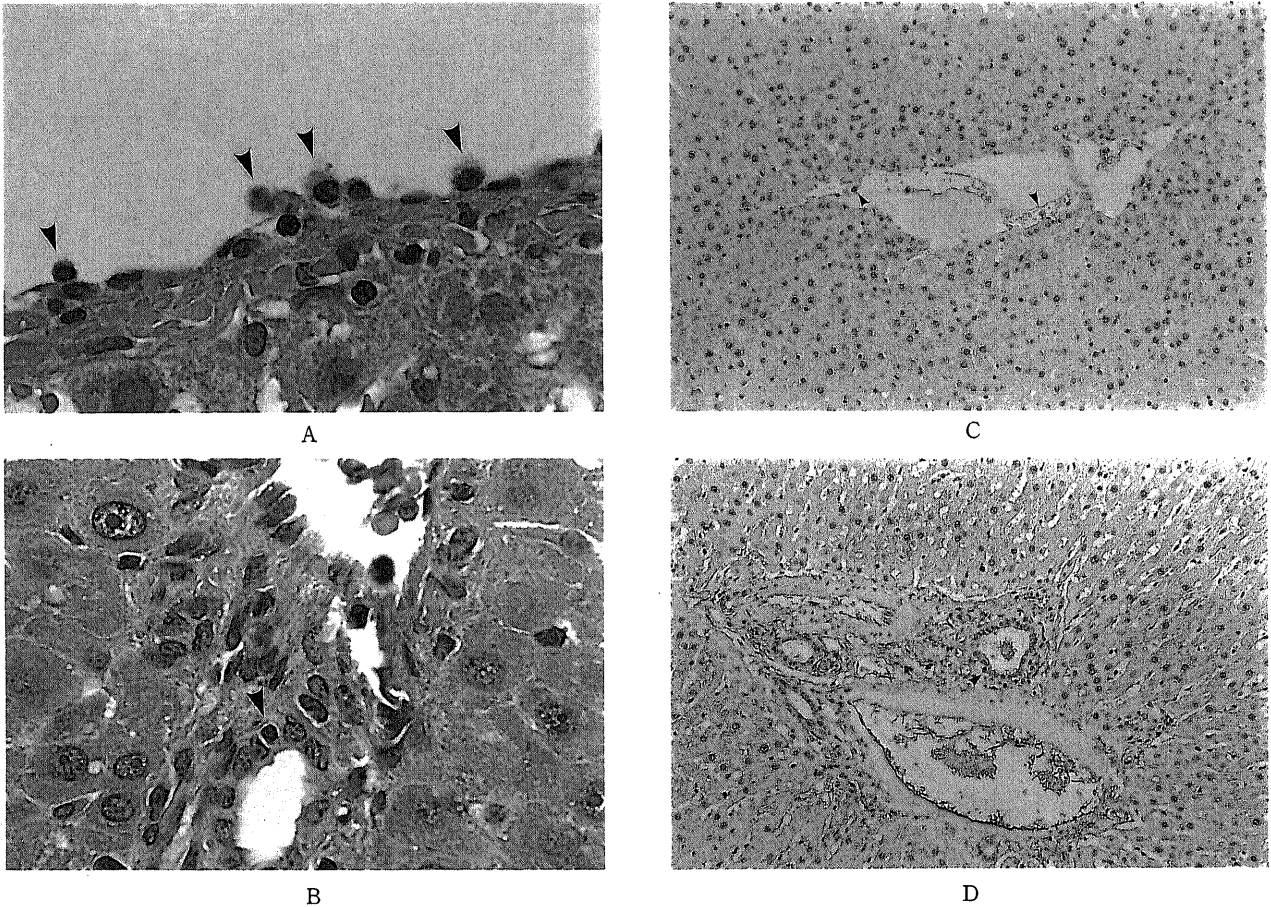


Fig. 6. Microscopic view of the liver of the recipient of GVHD model (HE staining  $\times 1000$ ). A. Lymphocytes attached to the endothelial surface of central vein (arrows), showing endothelialitis. B. Lymphocytes (arrow) invading bile duct epithelium, showing emperipolesis (HE staining  $\times 1000$ ). C. Immunohistological staining of the cells attached to the endothelial surface (anti-OX8 staining  $\times 100$ ). Most of the attached cells were OX8-positive (arrows). D. Immunohistological staining of the cells invading bile duct epithelium (anti-OX8 staining  $\times 100$ ). Most of the invading cells were OX8-positive (arrows).



数は対照群の888±92に対し、GVHD 群の移植後14日目では1224±91と有意 (p<0.01) に増加していた。W3/25 陽性リンパ球数は、対照群の174±23に対し、GVHD 群の移植後14日目では508±118と、有意 (p<0.01) に増加していた。OX8 陽性リンパ球数も、対照群の141±13に対し、GVHD 群の移植後14日目では252±54と、有意 (p<0.01) に増加していた。W3/25 陽性リンパ球数の OX8 陽性リンパ球数に対する比率は、対照群の1.23±0.15に対し、GVHD 群の移植後14日目では2.10±0.78と、有意 (p<0.01) に上昇していた (図5), (表1)。

2) レシピエントの脾臓のリンパ球分画

脾臓の動脈周囲リンパ組織鞘の強拡大一視野あたりの全細胞数は対照群の828±88に対し、GVHD 群の移植後14日目では1182±75と有意 (p<0.01) に増加していた。W3/25 陽性リンパ球数は対照群の77±17に対し、GVHD 群の移植後14日目では484±82と、有意 (p<0.01) に増加していた。同じく、OX8 陽性リンパ球数も、対照群の71±7に対し、GVHD 群の移植後14日目では253±44と、有意 (p<0.01) に増加していた。W3/25 陽性リンパ球数の OX8 陽性リンパ球数に対する比率は、対照群の1.10±0.33に対し、GVHD 群の移植後14日目では1.95±0.42と、有意 (p<0.01) に上昇していた (図2)。

5. 全血中のリンパ球分画

全リンパ球に対する W3/25 陽性リンパ球の比率は、対照群の42.0±5.5%に対し、GVHD では、3日目で34.2±17.6%、7日目で47.5±5.7%、14日目で62.3±9.4%と、移植後次第に上昇した。OX8 陽性リンパ球の比率は、対照群の16.6±2.1%に対し、GVHD 群では、3日目で51.6±27.1%、7日目で33.8±20.0%、14日目で23.5±9.8%と、7日目を以降減少した。W3/25 陽性リンパ球の OX8 陽性リンパ球に対する比率は、対照群の2.57±0.53に対し、GVHD 群では、3日目で1.15±1.17、7日目で2.23±1.76、14日目で3.20±1.70と、移植後一過性に低下した後、7日目より上昇し、移植後14日目には移植前と比べて有意 (p<0.05) に高かった (表3)。

6. 肝臓の変化

GVHD 群の肝臓では、門脈と中心静脈の血管内皮へのリンパ球の接着 (endothelialitis), ならびに胆管上皮へのリンパ球の浸潤 (emperipoiesis) が見られた (図6)。

1) 門脈内皮へのリンパ球接着所見

門脈内皮に接着している平均リンパ球数は GVHD 群の14日目で3.14±0.43に対し、FK 群の14日目では1.91±0.19と有意 (p<0.01) に少なかった (図7)。

Table 1. Subset of the cells infiltrated in paraarterial lymphatic sheath of the spleen of the recipient

| Group              | Number of rats used | Number (mean±SD) of the cells per HPF <sup>a)</sup> |                |              | W3/25/OX8 ratio |
|--------------------|---------------------|---|----------------|--------------|-----------------|
|                    |                     | Total   | W3/25-positive | OX8-positive |                 |
| Control            | 7                   | 828±88  | 77±17          | 71±7         | 1.10±0.33       |
| GVHD <sup>b)</sup> | 8                   | 1182±75*  | 485±82*        | 253±44*      | 1.95±0.42*      |

a) High power field (×400).  
b) Graft-versus-host disease.  
\* p<0.01 vs. control group.

Table 2. Subset of the cells infiltrated in paracortex of the mesenteric lymph node of the recipient

| Group              | Number of rats used | Number (mean±SD) of the cells per HPF <sup>a)</sup> |                |              | W3/25/OX8 ratio |
|--------------------|---------------------|---|----------------|--------------|-----------------|
|                    |                     | Total   | W3/25-positive | OX8-positive |                 |
| Control            | 7                   | 888±92  | 174±23         | 141±13       | 1.23±0.15       |
| GVHD <sup>b)</sup> | 8                   | 1224±91*  | 508±118*       | 252±54*      | 2.10±0.78*      |

a) High power field (×400).  
b) Graft-versus-host disease.  
\* p<0.01 vs. control group.

Table 3. Subset of the lymphocytes in the whole blood of the recipient

| Group               | Number of rats used | Ratio (mean±SD, %) of the cells in all lymphocytes |              |                 |
|---------------------|---------------------|--|--------------|-----------------|
|                     |                     | W3/25-positive                                     | OX8-positive | W3/25/OX8 ratio |
| Control             | 7                   | 42.0±5.5   | 16.6±2.1     | 2.57±0.53       |
| GVHD <sup>a)</sup>  | 8                   |  |              |                 |
| 3 POD <sup>b)</sup> |                     | 34.2±17.6  | 51.6±27.1    | 1.15±1.17       |
| 7 POD               |                     | 47.5±5.7   | 33.8±20.0    | 2.23±1.76       |
| 14 POD              |                     | 62.3±9.4*  | 23.5±9.8     | 3.20±1.70*      |

a) Graft-versus-host disease.  
b) Post-operative day.  
\* p<0.05 vs. control group.

## 2) 胆管上皮へのリンパ球浸潤率

リンパ球浸潤を認める胆管の割合は、GVHD の14日目での75±10%に対し、FK 群の14日目では35±10%と有意 ( $p < 0.01$ ) に少なかった (図8)。

## 7. 血清生化学 (図4)

## 1) アルブミン

血清アルブミン値は対照群の3.6±0.3 g/dl に対し、GVHD 群では2.8±0.5g/dl, FK 群では3.6±0.2g/dl と、GVHD 群で対照群と比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に低かった。

## 2) 総ビリルビン

血清総ビリルビン値は、対照群の0.14±0.05mg/dl に対し、

GVHD 群では0.25±0.12mg/dl, FK 群では0.23±0.05mg/dl と、各群で差がなかった。

## 3) GPT

血清GPTは、対照群の53.4±11.1IU/l に対し、GVHD 群では51.4±22.6IU/l, FK 群では39.0±19.9IU/l と各群で差がなかった。

## 考 察

急性GVHDによる病変は、ドナー由来のヘルパーT細胞がレシピエントの主要組織適応遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラスII抗原を認識し、これらのへ

Table 4. Serum biochemical data

| Group              | Number of rats used | Albumin (g/dl) | Total bilirubin (mg/dl) | GPT <sup>c)</sup> (IU/l) |
|--------------------|---------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|
| Control            | 7                   | 3.6±0.3        | 0.14±0.05               | 53.4±11.1                |
| GVHD <sup>a)</sup> | 8                   | 2.8±0.5*       | 0.25±0.12               | 51.4±22.6                |
| FK <sup>b)</sup>   | 8                   | 3.6±0.2        | 0.23±0.05               | 39.0±19.9                |

Values represent the mean±SD.

a) Graft-versus-host disease.

b) FK-506-administered group.

c) Glutamic pyruvic transaminase.

\*  $p < 0.01$  vs. control group, and FK-506-administered group.

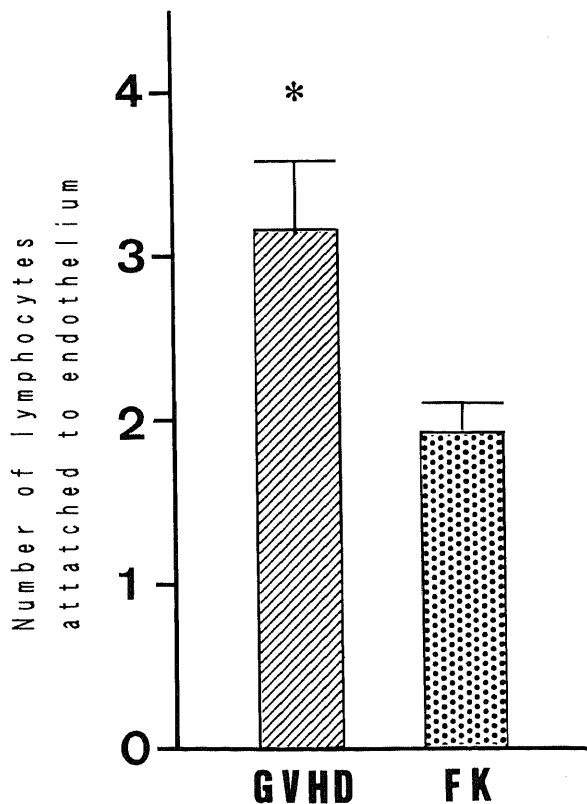


Fig. 7. Comparison of the number of lymphocytes attached to the endothelial surface of the portal vein of the liver of the recipient. Each bar represents mean±S.D. GVHD, GVHD group 14 post-operative day (n=9); FK, FK-506-administered group 14 post-operative day (n=8). \* $p < 0.01$  vs. FK-506-administered group.

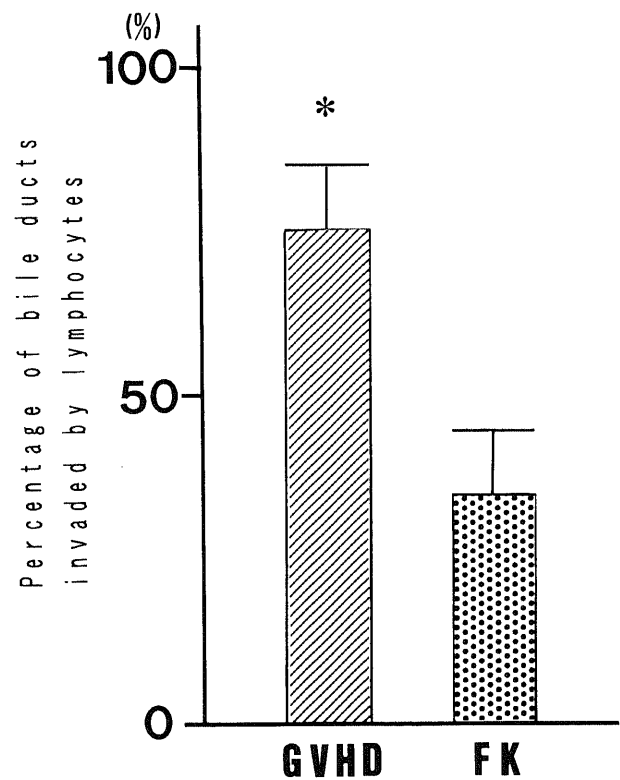


Fig. 8. Comparison of the percentage of the bile ducts of the liver of the recipient invaded by lymphocytes. Each bar represents mean±S.D. GVHD, GVHD group 14 post-operative day (n=9); FK, FK-506-administered group 14 post-operative day (n=8). \* $p < 0.01$  vs. FK-506-administered group.

ヘルパー T 細胞が分泌したリンフォカイン、特にインターロイキン 2 によって刺激された細胞傷害性 T 細胞が肝 (特に肝内胆管)、腸管、皮膚の標的細胞を攻撃することによってこれらの臓器が障害されることによっておこると考えられている<sup>8-10</sup>。リンパ球動態からこれらの認識、攻撃の時期を推測することが可能であり、ヒト骨髄移植臨床例や、マウスの脾細胞・骨髄細胞移植モデルにおいては既に報告されている。GVHD による免疫臓器病変について骨髄移植の臨床例で Woodruff ら<sup>11</sup>は、サイクロフォスファミドでリンパ球を枯渇させたのちに骨髄移植を行なった時のリンパ系の再構築の第一段階として移植後 8~10 日目からレシピエントのリンパ節全体、および脾臓の 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事を報告し、この時期を早期リンパ球増殖期としている。とくに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へて正常細胞による T 細胞領域の再構築がおこるのは移植後 200 日目以降であるとしている。Delz ら<sup>12,13</sup>は、筆者と同様のラット小腸移植 GVHD モデルで、小腸移植後に移植片およびレシピエントの小腸の腸間膜リンパ節の傍皮質領域及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していない。小腸移植では骨髄移植と異なり宿主のリンパ球を枯渇させていないが、移植後早期にレシピエントのリンパ系臓器の T 細胞領域へのリンパ芽球の浸潤が見られる点では両者の報告は共通している。Woodruff ら<sup>11</sup>は、骨髄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 の原因である事が示されている<sup>12,14,15</sup>。しかし、小腸移植モデルではこれらの細胞が浸潤する時期や、浸潤する細胞の種類に関する詳しい検討は現在までに見られない。

今回の検討では、Delz ら<sup>12,13</sup>の報告と同様に、GVHD 群で移植後 14 日目に宿主の脾臓、腸間膜リンパ節の T 細胞領域に対照群と比べて明らかに細胞数の増加がみられた。さらに、これらの細胞の多くは免疫組織染色によって T 細胞と同定され、W3/25 陽性細胞 (OKT4: おもにヘルパー T 細胞)、OX8 陽性細胞 (OKT8: おもに細胞傷害性 T 細胞) の数がともに移植前と比べて有意に増加していた。移植前後の増加率は W3/25 陽性細胞のほうが高く、OKT4/OKT8 比が移植前と比べて有意に上昇していた。この事より、移植後 14 日目には脾臓、腸間膜リンパ節の T 細胞領域に浸潤している細胞の数自体が増加し、ヘルパー T 細胞の増加が細胞傷害性 T 細胞の増加よりも著明であると推測される。Goldman ら<sup>16</sup>によれば、骨髄移植の場合移植された骨髄細胞は、はじめに脾臓にとりこまれ、そこから二次的に骨髄に広がる。小腸移植の際にも同様に脾臓に明らかなリンパ球浸潤が見られた事より、これらのリンパ球は、移植腸管から遊走し、一時的に脾臓にとりこまれたものと推測される。

全血中のリンパ球分画では GVHD 群の移植後 14 日目で対照群と比べて W3/25 陽性細胞の比率が上昇し、OKT4/OKT8 比も上昇していた。ヒト骨髄移植臨床例の免疫学的再構築の際

は、移植後 OKT4/OKT8 比が逆転し、1 以下となる事が特徴的とされている<sup>17</sup>。ラットの移植後においては少なくとも移植後 14 日目には OKT4/OKT8 比が移植前と比べて上昇しており、この時期までは血中にヘルパー T 細胞の増加があるものと考えられる。この時期に脾臓に著明なヘルパー T 細胞の浸潤が見られた事とあわせて移植後 14 日目までにはドナー由来のヘルパー T 細胞の脾臓、腸間膜リンパ節へのとりこみと、さらに血液中への遊走が完了していると考えられた。

移植抗原の認識は、抗原提供細胞によって抗原に対する情報を得たヘルパー T 細胞によって行なわれ、移植抗原の攻撃はヘルパー T 細胞が産生するインターロイキン 2 によって刺激された細胞傷害性 T 細胞によっておこなわれる事が知られている。小腸移植後の GVHD の際の抗原の認識は、脾臓、腸間膜リンパ節および血中のヘルパー T 細胞の増加所見から判断して、少なくとも移植後 14 日目までは継続していると推測された。

また、GVHD の肝病変に関して Snover ら<sup>18</sup>は、ヒト骨髄移植 GVHD 発症例の肝における病変として、門脈と中心静脈の内皮細胞への炎症性細胞の接着を示す、血管壁へのリンパ球接着 (endothelialitis)、および胆管へのリンパ球浸潤に伴う様々な病変を報告している。また、マウス骨髄・脾細胞移植モデルにおいて、Nonomura ら<sup>19-21</sup>は、血管内皮に接着する平均細胞数を定量化し、その数が移植後 2 週間目にもっとも多かったと報告した。今回の検討でも GVHD 群で血管内皮に接着する平均細胞数は移植後 2 週間目には免疫抑制剤投与群と比べて有意に多かった事より、この時期には小腸移植においても骨髄移植と同様に血管壁へのリンパ球接着が起こっていると考えられる。さらに、Nonomura ら<sup>22-26</sup>は、同じくマウス骨髄・脾細胞移植モデルにおいて胆管上皮の間にリンパ球が浸潤し、封入体様の所見を呈する所見を報告し、小胆管壁へのリンパ球浸潤 (emperipoiesis) とした。小腸移植モデルでも GVHD 群でリンパ球浸潤を伴った胆管の比率は移植後 2 週間目には免疫抑制剤投与群と比べて有意に多い事が示され、この時期には小腸移植においても骨髄移植と同様に小胆管壁へのリンパ球浸潤が起こっている事が示された。血管壁へのリンパ球接着について Nonomura ら<sup>21</sup>は、接着しているリンパ球の約 90% がヘルパー T 細胞であったとし、これらの細胞が、血管内皮細胞から抗原の提示を受けている状態にあるのではないかと推測し、また、胆管に浸潤しているほとんどの細胞がヘルパー T 細胞であったことから、これらの浸潤細胞は胆管細胞の抗原認識をおこなっているのではないかと推測している<sup>27</sup>。また、骨髄移植後の GVHD 発症例で胆管上皮に MHC クラス II 抗原が表出されているとの報告<sup>28,29</sup>もみられ、このことから胆管上皮が宿主抗原の認識に関与している事が示唆され、GVHD において肝臓は、標的臓器と言うよりも、ドナー由来のリンパ球に抗原提示を行なう場となっていると考えられる。移植後 14 日目では脱毛等の皮膚病変および下痢等の消化管病変や体重減少等の GVHD による変化が著明であり、肝臓における変化も、少なくとも胆管病変に関しては、細胞傷害性 T 細胞が標的組織である胆管細胞を攻撃している像と解釈される<sup>21</sup>。しかし、GVHD モデルの血液生化学検査で、トランスアミナーゼの上昇、アルブミンの低下、ビリルビンの上昇等の肝機能障害の指標の変化は軽微で、組織学的にも胆管の形態的变化は軽微であり、皮膚、小腸における変化が致命的となっている事と比べると、肝臓が純粋な標的臓器となっているとは考え難い。肝臓における血管



内皮や総胆管の著明な病変は、攻撃よりもむしろ抗原認識の状態を示しているとするのが妥当と考えられる。

さらに、Snoverら<sup>30)</sup>は、急性GVHDはナチュラルキラー(natural killer, NK)細胞のみによって発生し得るとしている。その根拠として急性GVHDの標的となる皮膚の基底層や小腸粘膜、ならびに胆管上皮などの細胞は抗原性が弱く増殖能が高いという幼若な特徴を共通点として持つと言う点と、それらの細胞がGVHDでは選択的に攻撃される点をあげ、ヘルパーT細胞による宿主抗原の認識が行なわれる前にも急性GVHDがおこりうるとしている。他にもドナー由来のNK細胞が急性GVHDの発症に深く関わっている事を示す報告は多い<sup>31)~37)</sup>。従来、GVHDで皮膚、小腸病変部に浸潤する細胞は細胞傷害性T細胞がほとんどであるとされてきたが<sup>38)39)</sup>、最近の報告では、骨髓移植臨床例で病変部の上皮にMHCクラスⅡ抗原が表出され、ヘルパーT細胞も細胞傷害性T細胞と同様に浸潤することが報告されており<sup>40)</sup>、これらの標的臓器においても抗原提示と攻撃が同時に進行していると考えられる。肝臓の細胆管の浸潤細胞がヘルパーT細胞優位であるという知見<sup>27)</sup>とあわせて、従来GVHDの標的とされてきたこれらの臓器は、同時に抗原提示にも関わっていると考えることが可能である。Mason<sup>41)</sup>はラットの胸管リンパ球移植によるGVHD発症実験で、未処置の胸管リンパ球移植群が急性GVHDを発症して移植後2~3週間で死亡したのに対し、ヘルパーT細胞のみを除去した群と細胞傷害性T細胞のみを除去した群で、ともに致死性のGVHDの発症が見られなかった事を報告しており、今回の検討でも、急性GVHDによる病変がほぼ致死性となる時期に、ヘルパーT細胞のリンパ系臓器、血中への浸潤・遊走が著明であった事から、急性GVHDの発症にはNK細胞のみではなく、ヘルパーT細胞およびそれによる刺激を受けた細胞傷害性T細胞が関与していると思われる。

一方、FK506は、臨床小腸移植例で使用され、良好な効果が報告されている薬剤である<sup>42)~45)</sup>。FK506の投与により肝臓における血管内皮および細胆管の変化が抑制されたが、これらの変化を宿主抗原の認識によるものと考えると、この薬剤の効果は、少なくとも宿主抗原の認識の抑制に関与していると考えられた。FK506投与群では組織学的検索によって、GVHD群でみられた脾臓、リンパ節、皮膚、小腸における病変もほとんど完全に抑制された事から、この薬剤による宿主抗原の認識の抑制が、続いて起こる標的臓器の攻撃にいたる過程の抑制につながっている可能性が示唆された。同時に、肝臓、脾臓、リンパ節等の生検組織による定量可能な病変の検討は、移植直後の急性GVHD発症の予測、免疫抑制剤の効果の判定に有用であると思われる。小腸移植例の術後成績は従来不良とされてきたが、最近小腸・肝同時移植例で良好な成績が示され、この方法では移植腸管と肝臓は同一の抗原性をもつため肝臓における抗原認識が起こらない事を考えると、免疫学的寛容の機序の点からも興味深い事実と思われる。

## 結 論

ラット小腸移植GVHDモデルにおけるレシピエントの脾臓、リンパ節、肝臓の組織学的検討により以下の知見を得た。

1. 脾臓、リンパ節のT細胞領域におけるW3/25陽性細胞、OX8陽性細胞の絶対数は、いずれも移植後14日目で移植前と比べて有意な増加を示し、W3/25陽性細胞の増加率はOX8陽

性細胞の増加率より高かった。

2. 血液中のリンパ球に占めるW3/25陽性細胞の比率は、移植後14日目で移植後3日目と比べて有意に上昇していた。

3. GVHD群では移植後14日目に肝臓の血管内皮と胆管上皮へのリンパ球浸潤所見が著明であった。FK506投与群ではこれらの変化は抑制されていた。

以上より、小腸移植後のGVHDの際の抗原認識を担当するヘルパーT細胞のレシピエントのリンパ系臓器、血中における増加は少なくとも移植後14日目まで持続していることを明らかにした。従来標的臓器と考えられてきたレシピエントのリンパ系臓器、肝臓、小腸、皮膚などの臓器における浸潤細胞は必ずしも攻撃のみをおこなっているのではなく、同時に宿主抗原の認識にも関係していると考えられた。また、骨髓移植で認められていた肝臓の血管内皮、胆管上皮におけるリンパ球浸潤所見は小腸移植でも同様におこり、宿主抗原の認識に関係すると考えられるこれらの変化はFK506の投与によって抑制されることを明らかにした。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、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付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。

なお本論文の要旨は第28回日本移植学会総会(平成4年9月、大阪)において発表した。

## 文 献

- 1) Grant, D., Wall, W., Mimeault, R., Zong, R., Ghent, C., Garcia, B., Stiller, C. & Duff, J.: Successful small-bowel/ liver transplantation. *Lancet*, 335, 181-184 (1990).
- 2) Monchik, G. L. & Russell, P. S.: Transplantation of small bowel in the rat: Technical and immunological conditions. *Surgery*, 70, 693-702 (1971).
- 3) 病理技術研究会編: 免疫組織化学, 病理標本の作り方, 第1版 118-120頁, 文光堂, 東京, 1992.
- 4) 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).
- 5) 金井 泉, 金井正光: 臨床化学検査, 臨床検査法提要, 第29版, 410-413頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 6) 金井 泉, 金井正光: 肝・胆道機能検査, 臨床検査法提要, 第29版, 722-728頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 7) 金井 泉, 金井正光: 臨床化学検査, 臨床検査法提要, 第29版 514-522頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 8) 藤原道夫: GVHDの機序. *臨床免疫*, 20, 890-895 (1988).
- 9) 原田実根: 骨髓移植と急性GVHD. *医学のあゆみ*, 146, 382-390 (1988).
- 10) 阪上賢一, 折田薫三: GVHとGVH病. *日本臨床*, 43, 97-103 (1985).
- 11) 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).

- 12) Delz, E., Müller-Hermelink, H. K., Ulrichs, K., Thiede, A. & Müller-Ruchholtz, W.: Development of graft-versus-host reaction on various target organs after small intestine transplantation. *Transplant Proc.*, **13**, 1215-1216 (1981).
- 13) Delz, E., Ulrichs, K., Schack, T., Fredrichs, B., Müller-Ruchholtz, W., Müller-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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) Goldman, J. M., Johnson, S. A., Islam, A., Catovsky, D., & Galton, D. A. G.: Haematological reconstitution after autografting for chronic granulocytic leukemia in transformation: the influence of previous splenectomy. *Br. J. Haematol.*, **45**, 223-231 (1980).
- 17) 原田実根, 上田幹夫, 塩原信太郎, 末永孝夫, 森 孝夫: 骨髄移植後の免疫学的再構築. *臨床病理*, **35**, 132-140 (1987).
- 18) Snover, D. C., Weisdorf, S. A., Ramsay, N. K., McClave, P. & Kersey, J. H.: Hepatic graft versus host disease: A study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology*, **4**, 123-130 (1984).
- 19) Nonomura, A., Mizukami, Y., Matsubara, F. & Kobayashi, K.: Clinicopathological study of lymphocyte attachment to endothelial cells (endothelialitis) in various liver diseases. *Liver*, **11**, 78-88 (1991).
- 20) 野々村昭孝, 吉田一晴, 河野尚子, 三輪 亘, 太田五六: minor 組織適合抗原不一致マウス GVHD の肝病変—肝内胆管以外の肝病変の検討—. *消化器と免疫*, **18**, 120-124 (1987).
- 21) Nonomura, A., Kono N., Yoshida, K., Mizukami, Y., Matsubara, F., & Nakanuma, Y.: Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. V. A study of lymphocyte-endothelial interaction. *Liver*, **9**, 294-301 (1989).
- 22) Nonomura, A., Koizumi, H., Yoshida, K. & Ohta, G.: Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. I. Light microscopic and immunocytochemical observations. *Acta Pathol. Jpn.*, **37**, 763-773 (1987).
- 23) Nonomura, A., Yoshida, K., Kono, N., Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. II. Electron microscopic observations. *Liver*, **8**, 32-41 (1988).
- 24) Nonomura, A., Kono, N., Yoshida, K., Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. III. Immunoelectron microscopic observations. *Acta Pathol. Jpn.*, **38**, 269-280 (1988).
- 25) Nonomura, A., Kono, N., Yoshida, K., Mizukami, Y., Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. V. A light and electron microscopic study of the intralobular changes. *Liver*, **11**, 149-157 (1991).
- 26) 野々村昭孝, 松原藤継, 河野尚子, 中沼安二: GVHD マウス肝内胆管病変の発生に関する電顕的考察. *今日の移植*, **3**, 197-206 (1990).
- 27) 野々村昭孝, 小泉博志, 吉田一晴, 河野尚子, 太田五六: minor 組織抗原 (mHA) 不一致マウスの肝内胆管病変発生機序. *消化器と免疫*, **17**, 125-130 (1986).
- 28) Dilly, S. A. & Sloane, J. P.: An immunohistological study of human hepatic graft-versus-host disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **62**, 545-550 (1985).
- 29) Miglio, F., Pegnatelli, M. & Mazzeo, V.: Expression of major histocompatibility complex class II antigens on bile duct epithelium in patients with hepatic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J. Hepatol.*, **5**, 182-187 (1987).
- 30) Snover, D. C.: Acute and chronic graft-versus-host disease: histopathological evidence for two pathogenic mechanisms. *Hum. Pathol.*, **15**, 202-205 (1984).
- 31) Ghayur, T., Seemayer, T. A. & Lapp, W. S.: Kinetics of natural killer cytotoxicity during the graft-versus-host disease. *Transplantation*, **44**, 254-260 (1987).
- 32) Ghayur, T., Seemayer, T. A. & Kougsham, P. A. L.: Graft-versus-host reactions in the beige mouse: an investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Transplantation*, **44**, 261-267 (1987).
- 33) Ghayur, T., Seemayer, T. A. & Lapp, W. S.: Prevention of murine graft-versus-host disease by inducing and eliminating ASGM<sub>1</sub><sup>+</sup> cells of donor origin. *Transplantation*, **45**, 586-590 (1983).
- 34) Borland, A., Mowat, A. H. & Parrot, D. M.: Augmentation of intestinal and peripheral natural killer cell activity during the graft-versus-host reaction in mice. *Transplantation*, **36**, 513-519 (1983).
- 35) Charley, H. R., Mikhael, A., Bennett, M., Gilliam, J. N. & Sondheimer, R. D.: Prevention of lethal minor determinant graft-versus-host disease in mice by the in vivo administration of anti-asialo GM<sub>1</sub>. *J. Immunol.*, **131**, 2101-2108 (1983).
- 36) Clancy, J., Mauser, L. & Chapman, A. L.: Level and temporal pattern of naturally cytolytic cells during acute graft-versus-host disease (GVHD) in the rat. *Cell Immunol.*, **79**, 1-7 (1983).
- 37) Ferrara, J. L. M., Guillen, F. J., Dijken, P. L., Marion, A., Murphy, G. F. & Burakoff, S. J.: Evidence that large granular lymphocytes of donor origin mediate acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, **47**, 50-54 (1989).

- 38) Lampert, I. A., Janossy, G. & Suitters, A. J.: Immunological analysis of the skin in graft-versus-host disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **50**, 123-128 (1982).
- 39) Sloane, J. P., Thomas, J. A., Imrie, S. F., Easton, D. F. & Powles, R. L.: Morphological and immunohistological changes in the skin in graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow recipients. *J. Clin. Pathol.*, **37**, 919-924 (1984).
- 40) Nakleh, R. E., Snover, D. C., Weisdorf, S. & Platt, J. L.: Immunopathology of graft-versus-host disease in the upper gastrointestinal tract. *Transplantation*, **48**, 61-65 (1989).
- 41) Mason, D. W.: Subsets of T cells in the rat mediating lethal graft-versus-host disease. *Transplantation*, **32**, 222-226 (1981).
- 42) Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Aoki, H. & Imanaka, H.: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces. *J. Antibiot.*, **40**, 1249-1255 (1987).
- 43) Sawada, S., Suzuki, G., Kawase, Y., Takaku, F.: Novel immunosuppressive agent, FK-506-in vitro effects on the cloned T cell activation. *J. Immunol.*, **139**, 1797-1803 (1987).
- 44) Kay, J. E., benzie, C. R., Goodier, M. R., Wick, C. J. & Doe, S. E. A.: Inhibition of T lymphocyte activation by the immunosuppressive drug FK-506. *Immunology*, **67**, 473-477 (1989).
- 45) Hoffman, A. L., Makouka, L., Banner, B., Cai, X., Todo, S. & Starzl, T. E.: The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. *Transplantation*, **49**, 483-490 (1990).

**Studies on Lymphocyte Subset and Hepatic Lesions After Experimental Rat Small Bowel Transplantation**  
 Hirotaka Masutani, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **103**, 17—26 (1994)

**Key words** small bowel transplantation, graft-versus-host disease, lymphocyte subset, hepatic lesion, FK-506

#### Abstract

In order to determine the period in which lymphocytes from a donor organ recognize the host organs, and attack target organs in graft-versus-host disease (GVHD), we determined the subset of the lymphocytes infiltrating the spleen, mesenteric lymph node, and the whole blood of the recipient of GVHD model of rat small bowel transplantation. At 14 days after transplantation, the recipient showed severe symptoms of graft-versus-host disease, i.e., skin damage and diarrhea. On the same day, the spleen and mesenteric lymph node of the recipient showed marked infiltration of lymphocytes, and most of these cells were proved to be T cells by immunohistological staining. The percentage of helper T cells in all the infiltrating T cells were 66% in the spleen, 66% in the mesenteric lymph node, and 73% in the whole blood. The result indicated that helper T cells were dominant in the lymphoid organs of the recipient even in the period in which symptoms of graft-versus-host disease was seen. The liver of the recipient 14 days after transplantation was also investigated in the GVHD group and in the immunosuppressed group, which received FK-506. The liver changes caused by graft-versus-host disease were endothelialitis, in which lymphocytes are attached to the endothelial surface of the portal vein and central vein, and emperiporesis, in which lymphocytes infiltrate the bile duct epithelium. These changes were seen only in the GVHD group, and were suppressed in the immunosuppressed group. These changes are thought to be caused by the lymphocytes recognizing host antigen, and this fact shows that recognition occurs in this period. These results indicate that in small bowel transplantation, recognition of host organs still occurs in the period of significant graft-versus-host disease, i.e., recognition and cytotoxicity occurs at the same time some period after transplantation. The immunosuppressant FK-506 was shown to suppress recognition of host antigen in the liver. These changes in the spleen, lymph node and the liver may be good criteria for identification of graft-versus-host disease in clinical small bowel transplantation.