

原 著

移植腎長期生着例における microchimerism と その免疫学的機序に関する研究

東京女子医科大学 第三外科学教室 (指導: 太田和夫教授)

イシダ ヒデキ
石 田 英 樹

(受付 平成8年2月24日)

The Status of Microchimerism in Long-Term Survivors After Living Related Kidney Transplantation

Hideki ISHIDA

Department of Surgery III (Director: Prof. Kazuo OTA)

Tokyo Women's Medical College

To determine the potential relevance of microchimerism to the long-term outcome of renal allograft, the frequency of microchimerism in kidney transplant recipients with graft function for 15 years or longer were analyzed.

Of 104 recipients who underwent kidney transplantation between 1971 and 1980, 27 renal allografts (26%) are still functioning. Of these functioning grafts, 13 recipients whose donors were still alive and collaborative were investigated for the presence of microchimerism in the peripheral blood and for their immunological status. Microchimerism was tested using polymerase chain reaction (PCR)-single strand conformation polymorphism (SSCP) method. To test the sensitivity of PCR-SSCP, peripheral blood obtained within five weeks after transplantation (four kidney, three liver) was also examined.

Microchimerism was detectable in five patients within five weeks after transplantation (kidney 3/4, liver 2/3), while microchimerism was detected in only one recipient (1/13) of the patients with functioning grafts more than 15 years after transplantation. In this chimeric patient, mixed lymphocyte response (MLR) revealed a high responsiveness against donor antigen. In contrast, some patients without chimerism showed donor specific hyporesponsiveness in the MLR assay and did not develop anti-donor antibody by the flowcytometric analysis.

Microchimerism is uncommon in the long-term survivors with functioning kidney grafts and was not related to donor specific unresponsiveness.

緒 言

1992年, Starzlら¹⁾²⁾は, 肝移植後91カ月の長期生着患者の皮膚やリンパ節などにドナー由来の細胞が存在することを報告した。彼らはこの状態が polymerase chain reaction (PCR) や組織免疫染色によりようやく検知できるような微細な chimera であることより, これを microchimerism と呼び, 移植臓器の長期生着に関連があると

主張した。しかし, このような臓器移植における microchimerism の成立と免疫学的寛容の関係についてはいまだ不明な点が多い。

今回われわれは, 15年以上にわたり移植腎が生着している13症例の末梢血中における microchimerism の成立とその免疫学的機序について検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

1971年から1980年までの10年間にわれわれの施設で施行した腎移植104例のレシピエントのうち、1995年3月の時点で移植腎が生着している27例(26%)の中からさらにドナーが健在であり検査の協力が得られた13例を調査の対象とした(表1)。

これらレシピエントの調査時点における年齢は31歳から51歳、平均 43 ± 1 歳で、性別は男性10例、女性3例であった。一方、ドナーは平均年齢 68 ± 9 歳で、男性8例、女性5例であった。なお、レシピエントの女性2例のドナーは男性であった。これらレシピエントの血清クレアチニン値は $0.9 \sim 6.1$ mg/dl、平均 2.4 ± 1.3 mg/dlであった。

免疫抑制剤については全員がプレドニゾロン8~16mgおよびアザチオプリン25~100mgを内服しているが、肝機能障害により1例はミゾリピンを加えた3剤併用、他の1例はシクロスポリン

およびミゾリピンを加えた4剤併用療法を用いている(表2)。

なお実験は、ヘルシンキ宣言の精神に準拠し、十分に人権を尊重したうえで施行した。

2. 方法

1) Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法

Microchimerismの検出にはOtoら³⁾の方法に準じてPCR-SSCP法を用いた。

(1) PCR

PCRに用いるDNAの採取のため、レシピエントおよびドナーから採血し、Ficoll-Conray比重遠心法にて単核球を分離した。DNAの抽出方法はフェノールクロロホルム法を用いた。PCRは $500 \mu\text{g}$ のgenomic DNAに対し、プライマー 25 pmol 、dNTP $200 \mu\text{mol}$ およびTaq polymerase 0.5unit(Takara Co. Ltd., Tokyo)を用い、3step (94°C 1分 denature, 60°C 1分 annealing, 72°C 1分 extension) で30サイクル実施した(Thermocycler: Takara Co. Ltd., Tokyo)。

プライマーはHLA-DR 2, 4, 3, 5, 6, 8由来のものを用い、染色後明らかなバンドが認められない場合はDR 1, 7, 9のプライマーで再度PCRを行った。

(2) SSCP 法

PCR産物を0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue, formamideで希釈した。十分に攪拌した後、 95°C で5分間denatureさせ、その直後に水中急冷し、安定した1本鎖DNAを電気泳動した。泳動は5mM Tris glycineを満たした恒温電気泳動槽(ATTO Co. Ltd., Tokyo)を用いて、 21°C の恒温下に、10% polyacrylamide gel(ATTO Co. Ltd., Tokyo) 1枚あたり20mAで2時間施行した。ゲルは銀染色し(Silver Stain Plus kit: Bio Rad Co., Tokyo)、写真撮影によりバンドを確認した。なお、今回の使用したPCR法の感度についてはコントロールDNAの $1/10^6$ まで検出可能であった。また移植後早期の患者を対象とした予備実験においても移植後8週までの7例中5例(71%)にドナー由来のDNAの存在を検出している。

表1 15年以上腎生着症例の概要

症例	性	年齢(歳)	移植後年数	ドナー	DR mismatch	Cr(mg/dl)
1	M	42	17	母	1	1.8
2	M	41	16	父	1	2.1
3	M	46	17	母	1	2.5
4	M	43	20	父	1	1.1
5	M	31	16	父	1	1.7
6	M	47	25	兄	1	1.0
7	M	44	16	母	1	2.5
8	M	45	16	父	1	2.0
9	M	35	18	母	1	1.5
10	M	39	17	兄	2	1.2
11	F	44	21	兄	2	0.9
12	F	51	22	兄	1	0.9
13	F	41	16	姉	1	6.1

DR mismatch: 移植前のHLA-DRミスマッチ数。

表2 投与された免疫抑制剤

Total (1971~1980)	104
Graft surviving patients	27 (26%)
AZ+MP	24
AZ+MP+MZ	2
AZ+MP+MZ+CYA	1

AZ: アザチオプリン, MP: メチルプレドニゾロン, MZ: ミゾリピン, CYA: シクロスポリン。

2) Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法

男性をドナーとした女性2名の血液におけるY染色体の chimerism の検索には FISH 法を用いた。末梢血3mlをRPMI 1640, PHA(EY Labo Co., Massachusetts)とともに37°C, 3日間インキュベートした後遠沈し, メタノール: 酢酸(2:1)液で固定した。標本はスライドガラス上に0.5ml滴下, 自然乾燥させ, 70%エタノールに浸し作製した。標本をPBSで2回洗浄した後, 70%エタノールで脱水乾燥させ, hybridization solution (Cytocell Co., California) 20 μ lを添加した。さらにビオチン標識のDNA probe S 1370-CF (Oncor Co., California)でcoatingされた Coverslip (Cytocell Co., California)で覆った後, 60°Cで5分間denatureさせ, 37°CのCO₂インキュベーターに24時間保存し, hybridizationを行った。その後50%ホルムアルデヒド, 2 \times SSCにて2回洗浄し Antifade solution 10 μ lを添加し, 蛍光顕微鏡 (Nikon Co., Tokyo) で2,000細胞の蛍光 signal を観察した。

3) リンパ球混合試験 (mixed lymphocyte response; MLR)

末梢血より Ficoll-Conray 比重遠心法を用いてリンパ球を分離後 responder cell (1×10^5 /well) と MMC 処理した stimulator cell (1×10^5 /well) を総量200 μ l/wellとし, 96U bottomed well plateで4日間混合培養した。4日後, plateに1 μ Ci/wellの³H-thymidine (ICN, California)を加え, さらに4時間培養後に cell harvester (Packard, Connecticut) でリンパ球を回収し, β -counter (Packard, Connecticut)により thymidine uptake を測定した。

4) 抗ドナー抗体

末梢血より Ficoll-Conray 比重遠心法を用いてドナーのリンパ球を分離した後, レシピエントの血清10 μ lを加え30分, 室温で静置, その後PBS (燐酸緩衝液)で2回洗浄した。次に FITC で標識したヤギ抗ヒト IgG 抗体または抗ヒト IgM 抗体を加え, さらに Phycoerythrin (PE) で標識した抗 CD3抗体または抗 CD19抗体を加え, 2 color

staining とした。これを4°Cにおいて30分静置した後, 再びPBSを用いて2回洗浄し, FACScan (Becton Dickinson, California)を用いて解析した。

結 果

1. HLA-DR および H-Y microchimerism

対象とした13例 (男性10例, 女性3例)のうち, PCR-SSCP 法によって末梢血の HLA-DR microchimerism が認められたのは症例3の1例のみであった(表3)。本症例では, 図に示すようにドナーに特異的な DR である DR4 のバンドパターンがレシピエントにもみられた。

H-Y については2症例ともドナーの Y 染色体は認めなかった。また chimerism の有無と移植腎機能, 拒絶反応の回数, HLA-DR の適合度などについても明らかな関係は認めなかった。

2. MLR

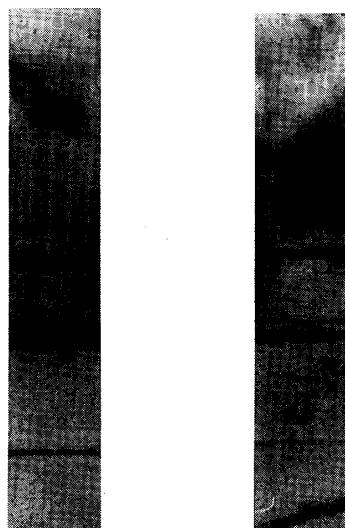
Microchimerism 陽性例である症例3を含む4例について MLR を実施した。しかし, microchimerism の存在を示すことができなかった3症例のうち症例11は高い反応性を示したが, 症例9および13では3rd party に対しては高い反応が

表3 15年以上腎生着症例と microchimerism

症例	AR	Chimerism		MLR-SI	抗ドナー抗体
		HLA-DR	H-Y		
1	1	—		NT	NT
2	1	—		NT	NT
3	3	+		9.5	—
4	2	—		NT	NT
5	1	—		NT	NT
6	1	—		NT	NT
7	2	—		NT	NT
8	5	—		NT	NT
9	2	—		6.8	—
10	1	—		NT	NT
11	1	—	—	28.9	—
12	0	—	—	NT	NT
13	3	—		0.9	—

AR: 急性拒絶反応の回数,

MLR-SI: ドナーを stimulator とした MLR-SI であり以下のごとく計算した; SI = cpm of recipient's responder's cells against donor's stimulator's cells \div cpm of recipient's responder's cells against recipient's stimulator's cells.
NT: not tested.



ドナー レシピエント

図 PCR-SSCP 法による microchimerism 陽性例写真は DR4 のプライマーを用いて PCR を行った後、SSCP 法にて銀染色を行ったものである。移植前の DR はレシピエントが DR2, 6, ドナーが DR2, 4, であった。移植後には写真のようにレシピエントには存在しないはずの DR4 のバンドパターンが認められた。microchimerism の陽性例である。

認められるものの、ドナーに対する反応は stimulation index (SI) でそれぞれ 1.0 および 0.9 であり、ドナー特異的に MLR の消失を認めた。これに対して chimerism の成立していた症例 3 の MLR の SI は 9.5 と高く、ドナー抗原に対して強い反応性を示した (表 3, 4)。

3. 抗ドナー抗体

上記の 4 例について flowcytometry により抗ドナー抗体の有無を検査したが、ドナー T 細胞および B 細胞に対する抗 IgG 抗体、抗 IgM 抗体はともに陰性であった (表 3)。

考 察

免疫寛容における chimerism の重要性は Owen⁴⁾ がウシの双生児において赤血球キメラが成立していることを観察した 1945 年頃より指摘されてきた。そして chimerism による免疫寛容の誘導には、胸腺における clonal deletion によるもの (中枢性寛容) と胸腺以外の末梢において成熟 T 細胞を anergy あるいは deletion へ導くもの (末梢性寛容) の 2 つの機序が考えられている。

移植における中枢性の免疫寛容には通常ドナーの骨髄移植や脾細胞などの造血系の細胞を移植し、mixed chimerism を誘導することが必要と考えられている。レシピエントの骨髄に定着し増殖するドナーの血液細胞の中には、dendritic cell など胸腺において negative selection に関与する細胞も含まれるが、これらのドナーの細胞がレシピエントの胸腺に移住し、ドナー反応性のレシピエント T 細胞をクローナルに除去するものと考えられている。このような中枢性寛容を成立させるための実験モデルとして、Ildstad ら⁵⁾ が報告したような、致死量の放射線照射後にドナーの骨髄移植を行う方法、Slavin ら⁶⁾ の total lymphoid irradiation (TLI) と骨髄移植を組み合わせる方法などがあげられている。また最近では非致死線量の全身照射に抗 T 細胞モノクローナル抗体や胸腺照射を併用する方法が報告⁷⁾ された。しかしながら、骨髄移植を併用せずに実施された臓器移植の術後に観察される microchimerism がこのような中枢性寛容を誘導したという事実は実験例においても証明されたことはない。

一方、移植における末梢性免疫寛容の誘導とはドナー反応性 T 細胞を胸腺以外の組織において

表 4 リンパ球混合試験

Stimulator cell	Responder cell			
	レシピエント 3*	レシピエント 9	レシピエント 11	レシピエント 13
Self	54	136	56	68
ドナー	511(9.5)	141(1.0)	1,616(28.9)	58(0.9)
3rd party	1,052(19.5)	921(6.8)	5,400(96.4)	212(3.1)

単位は cpm, () 内は stimulation index,

*: PCR により末梢血中に microchimerism が陽性.

除去するか、ないしは anergy に導くことを意味する。この成立の機序については多数の報告があるが、chimeric cell によるものとしては veto cell が重要視されている。veto phenomenon については不明な点も多いが、一般的にはあるドナー細胞がレシピエントの T 細胞と反応し、この T 細胞を apoptosis により消滅させる現象と考えられている。veto cell にも種類があり、MHC class I あるいは minor 組織適合抗原に反応性のある CD8+ precursor cytotoxic T lymphocyte (pCTL) に対するもの、また class II に反応性の CD4+ T 細胞に対するものなどの存在が確認されている。一方、Verbanac ら⁹⁾はサル腎移植の系でドナー由来骨髄細胞中の CD8細胞に pCTL を不活性化させるような veto 作用が見出されると報告している。

一方、Starzl ら¹¹⁾がこのようなドナー由来細胞の存在を PCR 法によってレシピエントの末梢血中に認め microchimerism として報告して以来、臨床および基礎の両面から数多くの研究がなされてきた^{9)~20)}。彼らの提示した chimerism と臓器生着との関連は、肝移植後の長期生着例 9 例のすべてにおいて末梢血中と皮膚に Y 染色体をもつ細胞が存在していたという事実に立脚したものであり、移植肝由来のドナー細胞がレシピエントの組織内に存在することが移植臓器生着に関与している可能性を示した。Zucman ら²¹⁾や Suberbielle ら²²⁾も、腎移植後のレシピエント 20 例について PCR 法を用いて調べ、うち 4 例に microchimerism を認めている。しかし、Schlitt ら²³⁾²⁴⁾や Rolles ら²⁵⁾の報告のように、microchimerism の長期生着に関わる意義については否定的なものも多い。さらに実験的には、Smith ら²⁶⁾がマウスを用いた実験においてレシピエントの皮膚中にドナー由来の細胞が認められるにもかかわらず、移植皮膚片が拒絶されたと報告しており、現時点ではこのような microchimerism の長期生着における免疫学的意義について結論は出されていない。

今回、われわれは移植腎が長期にわたり生着している 13 症例のうち 1 例においてのみ末梢血の microchimerism を認めた。ここで用いた方法は、

移植後早期例に対する基礎的な検討で 71% の検出率を示していることから考えて、腎移植の長期生存例で microchimerism の成立している例はきわめて少ないと考えざるをえない。

さらに興味深いことは、microchimerism の成立している 1 症例の MLR が高値を示し、反対に成立していない 3 症例のうち 2 症例が低値を示したことである。この事実は、microchimerism の成立が必ずしもドナー特異的な低反応性を誘導してはいないことを意味すると同時に、この低反応性の誘導に何らかの未知の因子が関与していることを示唆しており、今後さらにこれらを解明するための検討が必要と考えられる。

Microchimerism の成立している症例は成立していない症例に比べ、末梢血中に存在し veto 作用を有するドナー細胞は多いはずであるが、MLR の検討からは必ずしも低反応性を示す結果とはならなかった。これらの結果より、移植臓器の長期生着の免疫学的機序に microchimerism の関与は少ないと考えられた。

結 語

1. 腎移植後の長期生着患者において microchimerism は 13 例中の 1 例にのみ認められた。
2. Microchimerism が認められた症例のドナーに対する MLR は高値を示し、逆に microchimerism を認めなかった症例の中にドナー特異的低反応性を示す例があった。
3. Microchimerism の存在は、移植臓器の機能や免疫学的状態を反映するものではなく、移植臓器の長期生着の必要条件ではないと考えられた。

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜りました太田和夫教授ならびに、直接ご指導いただきました河合達郎助教授および技術的な面でご協力をいただきました安尾美年子博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Starzl TE, Demetris AJ, Murase N et al: Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 339: 1579-1582, 1992
- 2) Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M: Systemic chimerism in human female recipients of

- male livers. *Lancet* 340 : 876, 1992
- 3) **Oto M, Miyake S, Yuasa Y** : Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minilab gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem* 213 : 19-22, 1993
 - 4) **Owen RD** : Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102 : 400-401, 1945
 - 5) **Ildstad ST, Sachs DH** : Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 307 : 168, 1984
 - 6) **Slavin S, Reitz B, Bicker CP** : Mixed allogeneic chimerism. *J Exp Med* 147 : 700-707, 1978
 - 7) **Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB et al** : Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 59(2) : 256-262, 1995
 - 8) **Verbanac KM, Carver FM, Haisch CE** : A role for transforming growth factor-beta in the veto mechanism intransplant tolerance. *Transplantation* 57 : 893-900, 1994
 - 9) **Nagano H, Monden M, Gotoh M et al** : Existence of microchimerism in the spleen after intraportal injection in molecular biological and immunofluorescence study. *Transplant Proc* 26(6) : 3471, 1994
 - 10) **Masaki Y, Hirasawa A, Okuyama S et al** : Microchimerism and heart allograft acceptance. *Transplant Proc* 27 (1) : 148-150, 1995
 - 11) **Knoop C, Andrien A, Defleur V** : Detection of blood chimerism after lung and heart-lung transplantation. *Transplantation* 58 : 1335-1338, 1994
 - 12) **Eckert JW, Buerkle CJ, Major AM** : In situ hybridization utilizing a Y chromosome DNA probe. *Transplantation* 59 : 109-111, 1995
 - 13) **Fontes P, Rao AS, Demetris AJ** : Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, and pancreas islet transplantation. *Lancet* 344 : 151-155, 1994
 - 14) **Hamano K, Rawsthorne M, Bushell A** : Donor microchimerism is not responsible to donor alloantigen in recipients tolerance of cardiac allografts. *Transplant Proc* 27(1) : 151-152, 1995
 - 15) **Nagano H, Monden M, Gotoh M** : Restriction fragment length polymorphosm analysis to detect microchimerism at the DNA levels in rats. *Transplant Proc* 26(4) : 1970-1971, 1994
 - 16) **Demetris AJ, Murase N, Delaney CP** : The liver allograft, chronic (ductopenic) rejection, and microchimerism : What can they teach us? *Transplant Proc* 27(1) : 67-70, 1995
 - 17) **Alard P, Matriano JA, Socarras S** : Detection of donor derived cells by polymerase chain reaction in neonatally tolerant mice. *Transplantation* 60(10) : 1125-1130, 1995
 - 18) **Dzik WH** : Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusion. *Transfusion* 34(11) : 1007-1012, 1994
 - 19) **Starzl TE, Demetris AJ, Murase N et al** : Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs : A new view of organ transplantation. *Immunol Today* 14(6) : 326-332, 1993
 - 20) **Starzl TE, Demetris AJ, Ricordi C** : Chimerism and donor specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* 55(6) : 1272-1277, 1993
 - 21) **Zucman SC, Legender C, Suberbielle C** : Microchimerism frequency two to thirty years after cadaveric kidney transplantation. *Hum Immunol* 41 : 91-95, 1994
 - 22) **Suberbielle C, Zucman SC, Legender C** : Peripheral microchimerism in long-term cadaveric-kidney allograft recipients. *Lancet* 343 : 1468-1469, 1994
 - 23) **Schlitt HJ, Hundrieser J, Ringe B** : Donor type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. *N Engl J Med* 330(9) : 646-647, 1994
 - 24) **Schlitt HJ, Hundrieser J, Pichlmayr R et al** : Donor type microchimerism after heart transplantation — A dynamic process. *Transplant Proc* 27(1) : 155-157, 1995
 - 25) **Rolles K, Burroughs AK, Davidson BR et al** : Donor-specific bone marrow infusion after liver transplantation. *Lancet* 343 : 263-265, 1994
 - 26) **Smith JP, Kasten JJ, Field LJ** : Assesment of donor bone marrow cell-derived chimerism in transplantation tolerance using transgenic mice. *Transplantation* 58 : 324, 1994