

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591626  
 研究課題名（和文） 生体肺移植における新しい急性拒絶反応診断法の確立  
 研究課題名（英文） The serum level of de novo donor specific antibody can predict acute rejection in lung transplantation.

## 研究代表者

佐野 由文 (SANO YOSHIFUMI)  
 岡山大学・岡山大学病院・講師  
 研究者番号：60322228

## 研究成果の概要（和文）：

肺移植急性期における抗ドナー特異的（HLA）抗体の推移を観察し、急性拒絶反応臨床経過との関係について検討をおこなった。

移植後14日間における左右のドナーに対する抗体価の差は、AR群において拒絶側のドナーに対する抗体価のみが上昇していた。またAR群において、抗拒絶側ドナー抗体価と抗非拒絶側ドナー抗体価は、急性拒絶発症2日前の早期から拒絶側ドナー抗体が非拒絶側ドナーに対する抗体価よりも有意に高値を示していた。

この研究結果は、抗HLA抗体の monitoring による肺移植後急性拒絶の早期診断法を提案しうる意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：There is no useful biomarkers for diagnosis of acute rejection have been clinically used after lung transplantation (LTx). In this study, daily transition of de novo donor-specific alloantibodies (DSA) was analyzed for our living-donor lobar LT recipients to determine whether DSA levels are influenced by acute rejection. Ten non-sensitized patients who had received living donor lobar LTx by donation from two individuals were analyzed. Five of them developed unilateral acute rejection during the first 14 days after transplantation (AR+ group), and the others had no rejection episode during the period (AR- group). The immunoreactivity against T-cells from each side of donors was daily monitored by detecting donor-specific IgM using flow cytometry crossmatch technique. The difference between donor-specific IgM levels of serum from each side of donors was more remarkable in the AR+ group than in the AR- group ( $p < 0.05$ ). In the AR+ group, the IgM levels against the rejected donors started to be significantly higher than that against the non-rejected donors from two days before the clinical onset of acute rejection ( $p < 0.05$ ). A greater immunoreactivity only for the rejected donor preceded the clinical onset of acute rejection. Sequential de novo donor-specific IgM monitoring can contribute the early diagnosis of acute rejection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野： 呼吸器外科

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード： 抗ドナー抗体価、肺移植後急性拒絶反応、両側生体肺移植

### 1. 研究開始当初の背景

1983年トロントにて最初の脳死肺移植が成功して以来(1)現在までに22,000例以上の移植例が報告されている(2)。そのうち生体肺移植は約300例に過ぎず、世界では脳死ドナーからの肺移植が主流である。しかしながらわが国においては脳死に対する倫理的な問題などもあり長い間行われることもなく、最初の脳死肺移植は2000年3月まで待たねばならない。またその後もドナー不足は深刻で脳死ドナーからの肺移植の恩恵にこうむれた人は現在までに24人に過ぎない。翻って肺移植しか救命が不可能である末期呼吸不全患者の脳死肺移植待機患者は登録ベースで100人を超えている現実がある。このような現実から、当施設においても1998年10月の第1例目より現在までに40例の生体部分肺移植を行っている。(3-6)。

また肺移植においては特に移植急性期における急性拒絶反応および感染症、慢性期における閉塞性細気管支炎（慢性拒絶反応）が生命予後を規定する最も大きなファクターとなっている。

しかしながら肺移植後の最も大きな問題とされている急性拒絶反応と感染症の診断は、慢性期の閉塞性細気管支炎の発症とも関連して非常に重要となる。しかしながらその診断はいまだ侵襲的診断法である開胸または気管支鏡下肺生検に頼らざるを得ない状況である。また実験的にも多くの試みがなされてきたが、そのほとんどが非特異的なパラメーターの測定に拠っているため、急性拒絶反応と感染症

の鑑別診断にはあまり有効とはいえないものが多い。

### 2. 研究の目的

当施設におけるラット肺移植モデルを用いた動物実験において、肺移植後にレシピエントによって産生されたドナーに対する抗体価を測定することより、ドナー特異的な免疫反応を感知することが可能であり、これは免疫抑制剤を用いた系においても同様であることが明らかになった(9, 10)。またこのドナー特異的な免疫反応を計測することによって急性拒絶反応の診断が非侵襲的に可能であると考えられた。これが実際の肺移植臨床においても可能であるかを確認するのが本研究の目的である。

また本法を確立することによって、移植後の急性拒絶反応をドナー特異的に診断し、あるいは慢性期の閉塞性細気管支炎の診断および予防に役立てようと考えている。

### 3. 研究の方法

当施設において施行した生体肺移植症例のうち保存しえた検体を用いて解析を行う。ドナーから術前に採取・凍結保存しておいたリンパ球（ターゲットセル）を解凍した後に $1 \times 10^5$ 個のリンパ球浮遊液に調整し、術前および術後14日目まで連日採取・凍結保存しておいたレシピエント血清 $20 \mu\text{L}$ を混入、20分間インキュベートし2度の洗浄を行った後、一次FITC標識抗ヒト抗IgG抗体または抗ヒト抗IgM抗体、PE標識抗CD3抗体およびCy-Chrome標

識抗 CD20 抗体を加え、再度 20 分間インキュベートする。3 度の洗浄を行った後に得られたリンパ球浮遊液をフローサイトメーターで T 細胞 (Class I) および B 細胞 (Class I + Class II) 別に、それぞれ IgM 抗体価および IgG 抗体価として解析する。解析は CellQuest を用いて行う。

#### 4. 研究成果

肺移植周術期の急性拒絶反応の診断においては、感染や虚血再灌流障害など他の炎症病態との鑑別が問題となるが、適時診断/予見に寄与する有効な biomarker はない。我々は過去に異系ラット肺移植モデルにおいて急性細胞性拒絶に伴い抗ドナー特異的 (HLA) 抗体 donor specific antibody (DSA) が上昇する結果を報告した。これは液性拒絶のみならず、一般的な急性拒絶の形態である細胞性拒絶の過程においても早期に一過性の DSA 上昇があることを示唆するものであった。今回臨床肺移植急性期における DSA の推移を調査し、急性拒絶反応臨床経過との関係について検討をおこなった。

1998年10月から2009年11月に岡山大学で行った両側生体肺移植 (2人のドナーからそれぞれ左右1肺葉ずつ一人のレシピエントに移植する) 50例のうち、レシピエントに術前免疫学的感作歴がない10例を対象とした。移植後14日以内に片側性 (2人のドナーからのグラフトのうち一方のみに対する) 急性拒絶症状があったもの5例 (AR群), なかったもの5例 (NR群) に分類し DSA を検討した。DSA の測定は、flow cytometry crossmatch法を用いて左右各ドナーの Tリンパ球に対するレシピエント血清中の IgM 価および IgG 価を術後14日間毎日測定した。ドナーのリンパ球およびレシピエントの血清サンプルはともに末梢血より採取した。

移植後14日間における左右のドナーに対す

る抗体価の差について、AR群ではNR群と比較して有意に大きな差を認め、AR群において拒絶側のドナーに対する抗体価のみが上昇している可能性が示唆された。またAR群において、抗拒絶側ドナー抗体価と抗非拒絶側ドナー抗体価を、臨床的急性拒絶発症の前後の期間で比較したところ、急性拒絶発症2日前の早期から拒絶側ドナー抗体が非拒絶側ドナーに対する抗体価よりも有意に高値を示していた。

この研究結果は、一般的な急性細胞性拒絶が早期から液性反応を伴っていることを示す新たな免疫学的知見から、DSAの monitoring による肺移植後急性拒絶の早期診断法を提案しうる意義あるものであると考えられる。

#### 参考文献:

- (1) Cooper JD, Pearson FG, Patterson G A, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, DeMajo WA. Technique of successful lung transplantation in humans. J Thorac Cardiovasc Surg. 1987;93:173-81.
- (2) Registries-Heart/Lung Transplant Registry: IHS LTホームページ. <http://www.ishlt.org/registries/heartLungRegistry.asp>
- (3) 佐野由文・伊達洋至・永広 格・青江基・岡部和倫・安藤陽夫・清水信義. 当院における生体部分肺移植の現状. 岡山医学会雑誌 114: 53-57, 2002
- (4) Date H, Aoe M, Nagahiro I, Sano Y, Andou A, Matsubara H, Goto K, Tedoriya T, Shimizu N. Living-donor lobar lung transplantation for various lung diseases. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;126:476-81.
- (5) Date H, Aoe M, Sano Y, Nagahiro I, Miyaji K, Goto K, Kawada M, Sano S, Shimizu N. Improved survival after living-donor lobar lung transplantation. J Thorac

Cardiovasc Surg. 2004;128:933-40.

(6) Date H, Tanimoto Y, Goto K, Yamadori I, Aoe M, Sano Y, Shimizu N. A new treatment strategy for advanced idiopathic interstitial pneumonia: living-donor lobar lung transplantation. Chest. 2005;128:1364-70.

(7) Yamane M, Sano Y, Nagahiro I, Aoe M, Date H, Ando A, Shimizu N. Humoral immune responses during acute rejection in rat lung transplantation. Transpl Immunol. 2003;11:31-7.

(8) Yamane M, Sano Y, Shimizu N. Significant changes in the alloantibody after lung transplantation in the cyclosporine treated rat model. Transpl Immunol. 2004;1:143-50.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

① 三好健太郎、佐野由文、大谷真二、脇直久、山根正修、大藤剛宏、三好新一郎。急性拒絶反応発症と抗ドナー特異的抗体価推移—急性拒絶反応発症を予見できるか、第26回日本肺および心肺移植研究会、2010年1月30日、大阪大学中之島センター

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐野 由文 (SANO YOSHIFUMI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：60322228

##### (2) 研究分担者

山根 正修 (YAMANE MASAOMI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：20432643

豊岡 伸一 (TOMIOKA SHINICHI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：30397880

伊達 洋至 (DATE HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：60252962

(3) 連携研究者  
なし