

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591880

研究課題名(和文) CD8 KO マウスでの同種皮膚移植片の拒絶反応のエフェクター細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of effector cell to reject skin graft on CD 8 KO mouce

研究代表者

伊藤 慎一(ITO SHINICHI)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号:70324308

研究成果の概要:

1 移植腎において **thyroidization** を認める症例では感染、尿路のうっ滞、逆流など何らかの尿路系合併症を有している症例もみられる。このような症例では移植腎機能の予後に影響する可能性もあり無視できない所見と考えられる。

2 移植腎針生検の本数が多いほど情報が多く正確な診断が可能であった。検体が 1 本での病理診断は正診率が低く、2 本以上の検体が必要と考えられた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード:同種移植、拒絶

1. 研究開始当初の背景

従来の研究においては細胞傷害活性の測定にエフェクター細胞として感作された splenocyte を用い、target として con A activated lymphoblast を用いている事が多く、移植局所でのエフェクター細胞の同定が実際になされた論文は少ない。

2. 研究の目的

CD8 KO マウスを用いて同種皮膚移植片の拒絶反応のエフェクター細胞が CD8⁺CTL でなく macrophage 系に属する細胞である事を証明する。

3. 研究の方法

CD8 KO マウスでの同種皮膚移植片の拒絶反応のエフェクター細胞の同定

CD4 reconstructed C57BL/6J-bg-nu/nuでの

同種皮膚移植片の拒絶反応のエフェクター細胞の同定

4. 研究成果

CD8 KO マウスでの同種皮膚移植片の拒絶反応のエフェクター細胞の同定が不調に終始したため今回は臨床材料を用いて腎移植後のプロトコール腎生検の臨床病理学的検討を行った。

腎移植後プロトコール生検の必要性に関する背景

近年の免疫抑制剤の進歩による急性拒絶反応の発症率の低下には目を見張るものがある。急性抗体関連型拒絶反応 (Acute antibody-mediated rejection、以下 AAMR) に関しては未だ克服すべき診断治療に関する問題はああるものの、急性 T 細胞性拒絶反応

(Acute T-cell-mediated rejection、以下 ATMR) に関しては basiliximab が使用されるようになってからは術後早期の腎機能悪化を伴う拒絶反応はほとんど見られなくなった。しかしその反面、tacrolimus、mycophenolate mofetil (以下 MMF)、basiliximab 登場前にはあまりみられなかった臨床的な徴候を呈さない subclinical rejection (以下 SCR) が問題とされるようになってきた。

また以前は chronic allograft nephropathy (以下 CAN) と呼ばれ、Banff' 05 にて免疫学的要因によるものを除いた尿細管間質の障害である interstitial fibrosis/tubular atrophy (以下 IF/TA) と呼ばれるようになった組織変化は長期予後に影響する因子として重要視されており、これには拒絶反応や薬剤性腎毒性による影響、腎虚血そして高血圧症・高脂血症・移植腎加齢などによる動脈硬化性病変などが原因として考えられている。CAN 或いは IF/TA は移植後早期より進行しその後徐々に進行するとされ、拒絶反応を合併している症例に関しては有意に予後が悪いとされており、これらを早期に発見し治療を行うことが必要と考えられる。

さらに近年、強力な維持免疫抑制による BKV 腎症や細菌性の尿細管間質性腎炎などの感染症も時に見られることがあり、特に BKV 腎症に関しては腎機能悪化が見られた症例では予後も不良であり早期の診断・治療が必要である。

短期的には移植腎生着率は向上しているが、より長期的な視点に立って移植腎機能の維持を図るために免疫学的・非免疫学的なアプローチで治療が行われている現在においては、移植腎に対するプロトコール生検は治療方針を決める上でも重要な検査と考えられる。

プロトコール生検の必要性について

1994 年 Rush らはプロトコール生検により 30%の症例に SCR を認めたことが報告した。それ以来、プロトコール生検による SCR の診断に関する報告が多くなされており、その頻度は 1-43%と報告されている²⁾。さらに Rush らは術後 1, 2, 3, 6, 12 ヶ月にプロトコール生検を行い術後早期の SCR を診断しステロイドパルス療法を行った群では、移植後早期にプロトコール生検を行わなかったコントロール群 (6, 12 ヶ月目のみの生検) に比して急性拒絶反応の発症率、慢性尿細管間質変化、そして腎機能が良好であったと報告している。

また Choi らは移植後 14 日目のプロトコール生検で SCR を認めた症例ではその後の生着率が有意に低かったと報告している。さらに Shishido らは、CAN に加え再発性の SCR を認めた症例と、SCR を合併しない CAN の症例では 10 年生着率はそれぞれ 51%、93%と SCR を認めた症例で有意に生着率が低かったと報告している。

また CAN の診断に対する有用性も多く報告されており、術後 3-6 ヶ月目での CAN の頻度は 4-79%と報告されている。CAN の存在は移植腎生着率に有意に悪影響を及ぼすとされており、移植後数ヶ月で進行するとされている CAN とその原因をプロトコール生検で早期に発見することは意義のあることだと考えられている。

さらに、シクロスポリン、タクロリムスに関しては急性腎毒性だけでなく、慢性期の血管障害は長期生着を妨げる要因となっており、プロトコール生検の所見により、その後の免疫抑制療法を決める上で有用な情報が得られると考えられる。その他、最近問題となっている BKV 腎症や、subclinical な尿路感染症など治療を要する感染症を認めることもある。

腎移植以外の臓器移植領域でもプロトコール生検は有用とされており、特に心移植では腎移植と違い拒絶反応がおこっても臨床症状や他覚的所見に乏しく、またそれが臨床的に症状を呈してくる段階では非常に重篤な状態に陥る危険性があり、プロトコール生検は長期生着のための必須の検査とされている。福嶋⁹⁾は心移植後にプロトコール生検を術後 1 ヶ月以内は毎週、3 ヶ月までは 2 週毎、6 ヶ月までは毎月、その後年 1 回施行しているとのことである。

しかしその反面、プロトコール生検を全ての症例に対して定期的に行うことの妥当性に関して評価は定まっていない。John⁷⁾は SCR をプロトコール生検で見つけて治療を行うことの有益性に関するエビデンスが不十分であり、また検査及び治療に関するコストとリスクも大きな問題であると述べている。また BL に対する臨床的な扱い、治療の要否においては全く意見が分かれるところである。SCR 既往群がその後の生着率において有意に低いことを述べた Choi らの論文でも BL に関しては正常群と同等の生着率を示しており、CAN との関連性においても Seron らは CAN を認めた症例では過去のプロトコール生検で AR を認めた症例が多く生着率も悪かったが、BL を有していた症例に関しては正常組織であった症例と同等の生着率であったと報告

している。さらに subclinical rejection という概念を提唱しプロトコール生検の有用性を説いてきた Rush は多施設での RCT を行い、タクロリムスとミコフェノール酸モフェチルを用いた免疫抑制療法を行った腎移植（ハイリスク症例は除く）において、術後早期（1-3 ヶ月）のプロトコール生検を行った群と、その時期にはプロトコール生検を行わなかった群では術後 6 ヶ月の時点でのクレアチンクレアランスに有意差は認めず、短期的な評価であるがプロトコール生検を行う有益性は認められなかったと報告している。

リスクに関しては Furness らの 2,127 例の多施設でのプロトコール生検で重度の合併症は 0.4%で、1 例のみ移植腎機能廃絶を認め死亡例は認めなかったと報告しており、重篤な合併症に関しては稀と考えられ、後述のように当科での経験でも重篤な合併症は認めない。

以上より、世界的に見ると腎移植後全ての患者に対してプロトコール生検を行うことの必要性に関して見解の一致をみておらず、また生検の適切な時期、回数についても結論は出ていない。しかし、ドナー不足が深刻であり腎移植の機会も限られる現在の日本においては、少しでも生着率向上に寄与する可能性のあることは行うべきとも考えられており、腎移植後プロトコール生検は、その時期・回数に関しての差こそあれ、ほとんどの施設で行われていると思われる。当科でも、長期生着を目指すためには腎機能悪化を来す前に、腎機能障害を来しうる所見をプロトコール生検により早期に発見し、治療することが重要であるとの考え方にに基づき、筆者の着任した 2000 年よりプロトコール生検を行っている。

プロトコール生検の時期

当科では移植後 1 年以内には腎移植手術時（1hr 生検）、手術後退院前（3 週間目前後生検）、3 ヶ月目、6 ヶ月目、1 年目にプロトコール生検を施行している。

1hr 生検は baseline biopsy としての役割を持ちドナーの持ち込み病変、阻血による変化・虚血後再灌流障害や超急性拒絶反応も含めた移植腎のごく早期の組織変化を見るために必須と考えられる（行わない場合は 0hr 生検を）。手術後退院前（3wk 生検）は急性拒絶反応および CNI による急性薬剤性腎毒性、虚血による組織障害の残存などの有無を確認する目的で行っているが、basiliximab を

全例に併用している現在ではこの時点での subclinical な細胞性拒絶反応はほとんど見られなくなった。3 ヶ月目生検では basiliximab の効果が消失した後であり、時に SCR が見られることもあり、また CNI もまだ維持量まで減量されていないこともある時期であり、尿細管に対する薬剤毒性が見られることもあり生検が必要な時期と考える。6 ヶ月目生検では免疫抑制剤がほぼ維持量まで減量していった後の時期であるが、時に免疫抑制剤の過度の減量による subclinical rejection を認めることがあり、Rush らの報告でもその頻度が高まる時期であるとされている。1 年目生検では慢性拒絶反応も出現し始める症例もあり、また CAN も移植後 1 年位までは主に免疫学的要因により進行する（その他、腎阻血・再灌流障害がある）が、1 年以降は動脈硝子化、糸球体硬化、CNI 毒性などに伴い進行するとされている。1 年目生検を行うことにより今後の予後を推測し、また今後の治療戦略を決めるためにも重要と考える。また IgA 腎症など原疾患の再発、CNI による慢性血管障害、BKV 腎症などの感染症についても検討が必要である。

当科でのプロトコール生検の結果

当科では 2000 年 4 月より腎移植後の定期腎生検を開始した。2000 年 4 月～2008 年 9 月までに当科で腎移植を施行した 109 症例（Table 1 および 2）に対して、2000 年 4 月から 2008 年 10 月までの間に計 567 回の腎生検を施行した。このうちプロトコール生検は 475 回、これに対してエピソード生検は 92 回であった。

474 回のプロトコール生検の内訳（Table 3）は 1 時間生検 105 回、3 週間目生検 84 回、3 ヶ月目生検 81 回、6 ヶ月目生検 70 回（6 ヶ月目生検はバシリキシマブを追加した 2004 年よりルーチンとしたため症例が若干少ない）、1 年目生検 81 回、それ以降 54 回であった。

1hr 生検について

死体腎では脳死体腎の 1 例を除いて全例に ATN を認めたが、生体腎では 1 例に認めたのみであった。ドナーからの持ち込みの IgA 沈着が 105 例中 10 例に認められた。このうちの 50%は 3 週間目生検でその沈着が見られなくなっていた。その反面 IgA 沈着が 6 ヶ月目生検でも残存していたものが 2 例あった。また高齢ドナーや高血圧有病ドナーなどでは、動脈硬化の高度な症例もしばしば認められた。

3 週生検について

移植後 2-4 週目（主に 3 週後に実施しているので 3 週目と記載）に施行したプロトコール生検は 84 例であり、BL4 例（4.8%）、ATMR2 例（2.4%）、CNI 毒性 7 例（8.3%）であった。AR の頻度が低かったが、タクロリムス、MMF に加え basiliximab を併用するようになってから、この時期の SCR は以前よりも頻度が低下していると考えられた。最近の 37 例に限ってみれば ATMR だけでなく BL ですら 1 例も認めていない。またこの時期に発症する拒絶反応は AAMR を含め比較的症状の強い AR が多いと考えられ、移植後 4 週以内にプロトコール生検を施行しなかった 25 例中 23 例はエピソード生検を施行しており、うち 15 例（65.2%）では急性拒絶反応を認めていた。また感染症の 1 例はアデノウイルスによるものを疑われた。

3 ヶ月生検について

81 例中 BL9 例（11.1%）、ATMR3 例（3.7%）、AAMR1 例（1.2%）、IF/TA2 例（2.5%）、CNI 毒性 12 例（14.8%）であった。Basiliximab 導入当初、移植後早期から 3 ヶ月目程度の時点で過度の免疫抑制の減量が誘因と考えられる拒絶反応を認めたため、basiliximab の作用消失した後の 3 ヶ月での生検結果を確認した上でステロイドを維持量にするようにし、以後はその頻度は低下している。また今回の検討では IF/TA は 2 例のみに認めた。感染症が疑われた 2 例のうち 1 例は BKV 腎症であった。

6 ヶ月生検について

6 ヶ月目生検は basiliximab 導入後に施行するようになったため若干症例数が少なく 70 症例であるが、BL11 例（15.7%）、ATMR10 例（14.3%）、CAMR（chronic active antibody-mediated rejection）2 例（2.9%）、IF/TA9 例（12.8%）、CNI 毒性 10 例（14.3%）であった。この時期は免疫抑制剤も維持量まで減量されている時期であるが維持免疫抑制が十分でない場合、拒絶反応を発症することがあり SCR の好発時期であると考えられる。IF/TA は 12.9%にみられている。CNI 毒性も 12.9%にみられた。今回の検討でもこの時期に BL も含めた拒絶反応の 32.9%が認められた。また組織学的な IgA 腎症の再発が 2 例にみられ、うち 1 例はその後に顕性化している。感染症の 1 例は細菌性が疑われる腎盂腎炎であった。

1 年生検について

81 症例のうち BL7 例（8.8%）、CTMR（chronic T-cell-mediated rejection）2 例（2.5%）、CAMR1 例（1.2%）、IF/TA23 例（28.4%）、CNI 毒性 10 例（12.3%）をみとめた。BL のほとんどは以前の生検で拒絶反応を指摘されていない症例であったが、BL の病的意義に関しては定まった見解は得られていないが、特にこの時期の BL に関しては非特異的な細胞浸潤ではないかと考え現在では、これに対して特に治療を行っていない。それに対して CTMR の 2 例は ATMR が遷延し治癒させることができず至った症例と考えられる。IF/TA は 28.4%の症例に認められたが、後述するようにその中には以前の生検による組織障害を見ているものも少なからずあると考えられた。また CNI による薬剤毒性は移植後早期では尿細管毒性という形で認められることが多いが、この時期のものでは多くは CNI 毒性が関与した動脈硝子化であった。

プロトコール生検の時期に関して

至適な移植腎生検の時期に関しては、Rush らなどによる検討はあるものの見解の一致は見えていない。当科での検討の結果では 6 ヶ月目に SCR を認める症例が多く、逆に退院前の 3 週間目では多くの症例では所見を認めず、プロトコール生検の回数を減らすとすれば、basiliximab 併用例では 3 週間目であろうという結果であった（basiliximab 非併用例ではこの時期は必要と考える）。しかし、subclinical な薬剤毒性などはみられることもしばしばあり、現時点ではこの時期の生検も継続するつもりである。この点に関しては今後のより大規模な検討が待たれる。

合併症について

検査直後に肉眼的血尿、腎動静脈瘻に認められた症例はあるが、検査後全て自然消失しており処置を要した症例は 1 例も認めなかった。また血腫（軽微なものは除く）も 1 例も認めていなかった。

SCR に対する治療

当科では SCR に対しては全例ステロイドパルス療法（MPSL 500mg×2 日、その後漸減）施行している。6 ヶ月以降の症例ではデオキシスパーガリンを併用することも多い。前述のように Rush らは SCR に対してステロイドパルス療法を行うことにより、その後の腎機能、急性拒絶反応の発症率、慢性尿細管間質病変の程度で、SCR の診断治療を行わなかった群に比べ良好であったと報告している。BL に関しては前述の如く治療の要否に関して

意見が分かるところであるが、当科ではほとんどの症例でミニパルス (MPSL 250mg×2日のみ) もしくは維持免疫抑制剤の調節を行っている。時に病理医より活動性が低いと診断された場合は、特に治療を行わない場合もある。維持免疫抑制剤の調整を選択する症例は、CMV などの感染症、骨髄抑制で代謝拮抗剤が減量されている症例が多く、CNI・ステロイドの増量より代謝拮抗剤の増量を行うことが多い。10例の ATMR 症例のうち9例はステロイドパルス療法 (時にデオキシスパーガリンを併用) にて治癒、1例のみ CTMR に移行していた。31例の BL 症例のうち、その後生検を行っている 28例中 25例は BL が消失していたが、1例は BL が遷延、1例が ACR1B に進展、1例が CTMR に進展していた。

IF/TA について

Nankivell らは CAN では移植後早期の虚血障害、高度の拒絶反応、SCR による尿細管間質障害により急速に進行し、1年以降は微小血管及び糸球体の障害により緩徐に進行するとしており、移植後1年でのその頻度は 94.2%にも及ぶと報告している。しかし、この CAN の中には CAMR、CTMR による尿細管間質病変も含まれ、さらに非免疫学的な要因の中でも原因が明らかなものも含まれていると考えられるため、現在の IF/TA という診断の範疇に入るものは従来の CAN に比べ少ないものと考えられる。今回の検討では術後早期の IF/TA はわずかであり、6ヶ月~1年で増加しており1年目で 28.4%と比較的低頻度であった。これは移植後早期に AR による組織障害を受ける頻度が減少していることや、生体腎移植が大多数を占める日本では死体腎ドナーが主体の諸外国に比べ虚血障害が軽微であることも一因と考えられた。さらに Banff '05 では IF/TA は interstitial fibrosis and tubular atrophy, no evidence of any specific etiology と定義されており、当科では CNI 毒性や感染症に伴う medullary ray injury など病因が明らかと考えられる症例に対してはそれぞれ診断を下し、非特異的機序による IF/TA から除外しているため IF/TA の頻度が少なめであったと考える。

また今回 IF/TA と診断された症例の中には本当の意味での IF/TA ではなく過去の生検が原因と考えられる組織障害も見られた。中には前回の生検では IF/TAIII と診断されたものの、その後の生検では全く IF/TA の所見を認めなかった症例もある。この症例では高度な IF/TA を伴っていたにもかかわらず腎機能は正常であった。プロトコール生検をルーチン

で行うようになり多数回の穿刺により IF/TA 様の所見を認める場合があり注意を要する。この症例のように組織所見と腎機能との間に乖離がある症例、また2本の検体でその所見に乖離が見られる場合、前回の IF/TA の所見が改善している場合などはこのような原因も考えるべきである。

髄質病変について

近年、免疫抑制剤が強力になり今まで見られなかった BKV 腎症のような感染症が腎移植患者に見られるようになってきた。それ以外にも細菌性尿路感染症が subclinical なかたちで持続する症例も見られている。従来、移植腎生検においては糸球体及びその周辺の尿細管間質を中心とした皮質病変を主に評価対象としていた。しかし、髄質にも目を向ける必要があると考えられる。今回の検討でも1例の BKV 腎症をプロトコール生検で認めた (現在では尿沈渣における核内封入体細胞のスクリーニングを行っており以後腎症に至った症例は認めていない)。また、細菌性の腎盂腎炎、もしくは尿細管間質性腎炎と診断されたものは4例に認めた。これらの症例に対しては長期の抗菌剤投与を行い、その後評価のための生検を行っている。

また我々は最近、Tamm-Horsfall 蛋白 (THP) に注目している。THP は Henle's loop の上行脚から遠位尿細管の一部から分泌され尿路系の感染防御に関わるとされている蛋白であるが、これが尿細管腔内にうっ滞しコロイド結晶となったものをその様相から thyroidization と呼んでいる。従来から慢性腎盂腎炎などの尿路感染、また VUR、尿路結石など尿路の閉塞・うっ滞によってもおこるとされており、腎移植後の患者においても何らかの尿路系異常でこのような変化が見られることがある。この他 THP は、尿細管腔外への溢流、ボウマン嚢内への逆流・沈着などを来すことがあり、thyroidization に加えこれらの所見を認める場合は尿路系の異常を疑い精査する必要があると考えられる。また thyroidization に加え尿細管間質の炎症を合併するものに関しては感染症の合併を疑う必要がある。

生検本数に関する検討

検体の core 数は2本以上が望ましいとされているが、当科では先述のように計3本採取している。移植腎病理は複数の病変が混在し、さらに focal、local な病変も見られるため、より広範囲の組織を検査することが正確な診断に繋がると考えられる。このため、

生検の本数による診断の狂いがどの程度見られるかを検討した。まず1本(院内用検体)での診断と2本(慈恵医大用検体)での診断との主たる診断の一致率は69.6%で、一致しなかったものが30.4%あった。さらに3本の検体での結果を正しい診断とした場合、1本そして2本での診断がどの程度の正診率であるかをみた。その結果、1本での正診率は73.9%、2本での正診率は88.2%であり2本での診断の方が約15%正診率が良好であった。

結語

プロトコル生検はSCR、CNI毒性、IF/TAの診断など、移植腎の長期予後に影響する組織障害を早期に発見し、治療戦略を決定する上でも重要な情報を提供してくれ、移植腎生着率を改善するための必須の検査と考えられる。しかし、適切な回数・時期など今後の検討課題も残っている。また、BLに対する治療の要否に関して一定の見解が得られておらず、今後更なる検討が望まれる。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1

Ito S, Kobayashi A, Tsuchiya T, Moriyama Y, Kikuchi M, Deguchi T, Yamaguchi U. Thyroidization in renal allografts. Clin Transplantation 2009; in press 査読有り

2. 伊藤慎一, 出口 隆, 山口 裕. 当科におけるプロトコル腎生検の臨床病理学的検討. 今日の移植 22(1), 23-31, 2009, 査読無し

3. 伊藤 慎一, 土屋 朋大, 守山 洋司, 稲垣 勇夫, 出口 隆. 腎移植後BKウイルス腎症とデコイセルの意義. 検査と技術 35(4), 407-410, 2007 査読無し

[学会発表] (計 4 件)

1. 伊藤慎一, 土屋朋大, 守山洋司, 菊地美奈, 出口 隆. 移植腎組織におけるThyroidization (Thyroid-like appearance)に関する泌尿器科的検討. 第44回日本移植学会総会. 2008. 10. 21(大阪市)

2. 伊藤 慎一, 土屋朋大, 守山洋司, 菊地美奈, 出口 隆, 小林賛光, 山口 裕
Thyroid-like appearanceにおける泌尿器科

的検討. 移植腎病理研究会 第12回学術集会. 2008. 7. 19 (東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・医員
研究者番号:10260176 ※2007年まで

伊藤 慎一 (ITO SHINICHI) ※2008年から
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70324308

(2) 研究分担者

出口 隆 (DEGUCHI TAKASHI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40163935

(3) 連携研究者