

仲宗根 朝 紀 (沖縄県) 昭和31年11月20日生

授与年月日 平成3年3月31日

主 論 文 肺移植における好中球、肺胞マクロ
ファージの活性酸素産生能に関する実験
的検討

論文内容の要旨

緒 言

近年、免疫抑制剤であるサイクロスポリンAの開発により臓器移植は飛躍的に進歩したが、移植後の生着率を更に向上させるためには拒絶反応の正確な早期診断と適切な対応が必要である。現在、肺移植後の拒絶反応の診断は、開胸肺生検による組織診断がもっとも確実な方法とされているが、侵襲が大きく、頻回に行うことは困難である。従って、より侵襲が少なく、正確で、簡便な方法が求められる。著者は拒絶反応発現時における血中及び気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好中球(PMN)と肺胞マクロファージ(PAM)の活性酸素(Active Oxygen Species, AOS)産生能をフローサイトメトリー法を用いて測定し、拒絶反応の早期診断におけるAOS産生能測定の有用性について実験的に検討した。

実験方法

1) 対 象

9-12kgの雑種成犬26頭を用い実験群を以下の3群に分けた。

I群: 自家移植群 (n=7)

II群: 同種移植後免疫抑制剤非投与群 (n=9)

III群: 同種移植後 cyclosporine A (CsA) 20mg/kg/day 投与群 (n=10)

2) 方 法

Nembutal (25mg/kg) で静脈麻酔後、気管内挿管し、100%O₂下に Harverd ventilator を用いて換気量300

—400ml/回,換気回数12—14回/分で調節換気した。左第5肋間で開胸し recipient 犬の左肺動静脈より採血する。ヘパリン5000単位静注後 donor 犬の左肺を摘出し, Veithの方法に準じて recipient 犬に即時移植した。移植後5—9日目に再度肺動静脈より採血した後, 全群犠牲死させ移植肺を摘出し BALF を採取した。採取した肺移植前後の血液, BALF の PMN および PAM の AOS 産生能を測定し, 移植肺の組織学的拒絶反応出現の有無と比較した。AOS 産生能の測定は Bass らの方法に準じ, フローサイトメトリー法を利用して測定した。

測定には ORTHO 社 Spectrum III を用い, PMN 及び PAM の刺激剤としては界面活性剤である phorbol myristate acetate (PMA) を用い, 蛍光物質には, 2, 7—dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いた。

数値は全て Mean±SD で表し有意差の判定には Wilcoxon 検定法を用いた。

結果及び考察

1. 組織学的拒絶反応及び肺炎の発現頻度は, I 群では6頭中2頭に肺炎が認められた。II 群では8頭中7頭に拒絶反応が認められ Grade 2が2頭, Grade 3が5頭で4頭に肺炎の合併が認められた。拒絶反応がみられなかったのは1頭で肺炎も認められなかった。III 群では10頭中7頭に拒絶反応が認められ Grade 1, 2 共に3頭ずつで, 残りの3頭は拒絶反応も肺炎も認められなかった。
2. 肺動脈血 PMN の AOS 産生能は拒絶反応の有無にかかわらず移植前に比べて有意の差は認められなかった。また肺炎合併に関しても有意の差は認められなかった。
3. 肺静脈血 PMN の AOS 産生能も肺動脈血と同様に拒絶反応及び肺炎合併の有無に関しても有意の差は認められなかった。
4. BALF-PMN の AOS 産生能は移植前は測定不可能であり, 移植後の拒絶反応及び肺炎合併の有無に関しては有意の差は認められなかった。
5. PAM の AOS 産生能は I 群の場合には拒絶反応は認められなかったが, 肺炎の有無で有意の差が認められた。拒絶反応のある場合は無い場合に比べて AOS 産生能は増強しており, その中でも肺炎の無い場合には II 群, III 群共に対照群に比べて有意に増強していた。また肺炎のある場合は更に増強する傾向が認められた。

PMN 及び PAM は同種肺移植後の拒絶反応の際に AOS を発生して組織障害を惹起すると考えられる。PMN の AOS 産生能は拒絶反応時に有意の変化を認めなかったが, PAM の AOS 産生能は拒絶反応時に有意に増強し肺炎の合併で更に増強する傾向を示した。

本実験の結果, 肺移植後の拒絶反応診断において, フローサイトメトリー法を利用した PAM の AOS 産生能測定の意義が認められた。また免疫抑制剤であるサイクロスポリン A は AOS 産生能に影響は及ぼさなかった。

結語

1. 肺移植後の肺動脈血中及び BALF 好中球の活性酸素産生能は移植前に比べ有意の変動はなく拒絶反応, 肺炎及び CsA の影響を受けなかった。
2. BALF マクロファージの活性酸素産生能は, 肺炎のある場合はない場合に比べて有意に増強していた。
3. BALF マクロファージの活性酸素産生能は拒絶反応発現時には対照群に比べて有意に増強し, 肺炎時よりも高く, 肺炎を合併すると更に促進される傾向がみられた。
4. フローサイトメトリー法による BALF マクロファージの活性酸素産生能の測定は拒絶反応の診断に有用な手段であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

仲宗根朝紀は昭和56年3月長崎大学医学部を卒業後長崎大学医学部附属病院, 佐世保市立総合病院, 原爆病院, 聖フランシスコ病院, 大村市立病院, 三菱病院を歴任し, 外科診療の経験を重ねるとともに肺移植に多大の関心を寄せ, 平成2年8月主論文肺移植における好中球, 肺泡マクロファージの活性酸素産生能に関する実験的検討を完成し, 参考論文22篇を附して長崎大学医学研究科委員会に医学博士の学位を申請した。長崎大学医学研究科委員会はこれを平成3年1月9日の定例委員会に付議し論文内容の要旨を検討し, 研究歴を審議した結果受理して差し支えないものと認めたので上記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重審査の上平成3年3月6日の定例委員会でその結果を報告した。

主論文は肺移植後の拒絶反応の早期診断のため活性酸素 active oxygen species (AOS) の産生を肺動脈血中および気管支洗浄液 (BALF) 中の好中球 (PMN) と肺泡マクロファージ (PAM) について検討し拒絶反応との関連性を明らかにし早期診断の可能性を検討した。

雑種成犬を用いて左肺移植を自家肺移植群 (I 群) 同種移植後免疫抑制剤非投与群 (II 群) 同種移植後サイクロスポリン A 20mg/kg/day 投与群 (III 群) に分けて検討した。移植肺の組織学的拒絶反応出現 (perivascular cuffing) と対比して血中及び BALF 好中球と肺泡マクロファージの活性酸素産生能を Bass らの方法に準じてフローサイトメトリー法 (ortho 社 spectrum III) にて測定した。PMN PAM の刺激剤として phorbol myristate acetate の界面活性剤を使用し, 蛍

光物質に2,7-dichlorofluorescein diacetateを用い、peroxidaseにより2-7 dichlorofluoresceinに変わる反応で測定した。

移植後肺動脈血 PMN の AOS 産生は拒絶反応の出現や肺炎合併の有無にかかわらず有意の差はみとめなかった。肺静脈血 PMN でも同様に AOS 産生に差はなかったが、BALF PMN では移植前 AOS 産生は測定不能であったが移植後肺炎合併により増加し、拒絶反応出現でさらに増強された。さらに BALF PMN の AOS 産生は拒絶反応出現でも有意の差は示さなかったが、PAM では増強され肺炎合併でその程度は強くなった。一方免疫抑制剤サイクロスポリンは、AOS の産生を抑制し拒絶反応出現を防止している機序がうかがわれた。

以上の結果は、肺移植後の拒絶反応出現は開胸肺生検によらなければ適確に判定できないが、本研究では肺胞洗浄液中のマクロファージの活性酸素産生能を測ることによりそれが可能となることを示したもので、肺移植の研究を一段と推進し臨床応用の可能性を明らかにしたもので、肺移植研究の進歩に貢献したものとして学位に値するものと判定した。

審査担当者 主査 教授 富田 正雄
副査 教授 釘宮 敏定
副査 教授 斉藤 泰