

二次角膜移植片拒絶反応モデルにおけるドナー角膜への ultraviolet-B 前処置による効果

片見 睦夫¹⁾, 皆本 敦²⁾

¹⁾北里大学医学部眼科学教室, ²⁾広島大学医学部眼科学教室

要 約

目的：ラット同所性角膜移植モデルを用いて、ultraviolet-B irradiation (UV-B) による前処置を行った角膜と無処置の角膜を、第 1 眼、第 2 眼と順次行うことを組み合わせて、二次移植における角膜の抗原認識のあり方について考察した。

対象と方法：Albino Oxford (AO) ラットの両眼に 10 週の間隔で Dark Agouti (DA) ラット角膜片を同所性に移植した。無処置のドナーの移植のみ行った群、いずれかの眼に UV-B 前処置を行ったドナーを移植した 2 群の計 3 群の移植片生着期間を検討した。

結果：第 1 眼に無処置のドナーを移植すると急性拒絶され、第 2 眼では無処置のドナーは第 1 眼より加速さ

れて拒絶される ($p=0.00507$)。UV-B 前処置を行ったドナーを第 1 眼に移植すると生着し、第 2 眼の無処置のドナーは無処置の第 1 眼と同じテンポで拒絶された。第 1 眼に無処置の角膜を移植し、第 2 眼に UV-B 前処置を行うと無処置と同じテンポで拒絶された。

結論：UV-B 前処置を受けたドナー角膜は抗原提示の障害を起こしたために、二次移植において免疫学的な特異性と記憶を不完全な形で呈したものと推察された。(日眼会誌 106 : 689—693, 2002)

キーワード：角膜移植, UV-B, 二次移植, ラット

Effect of Ultraviolet-B Irradiation Pretreatment on a Second-set Rejection Model of Orthotopic Corneal Grafts

Mutsuo Katami¹⁾ and Atsushi Minamoto²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

Purpose : To investigate the effect of ultraviolet-B irradiation (UV-B) on the donor cornea in a second-set rejection model of rat orthotopic corneal transplantation.

Materials and Methods : Three patterns of fully mismatched allogeneic bilateral orthotopic corneal transplantations (DA to AO) after 10-week interval were studied : Untreated primary corneal grafts into the right eyes followed by untreated secondary grafts into the left eyes, UV-B treated primary corneal grafts into the right eyes followed by untreated secondary grafts into the left eyes, and untreated primary corneal grafts into the right eyes followed by UV-B treated secondary grafts into the left eyes.

Results : The rejection of untreated secondary

grafts was hastened in recipients who had previously rejected untreated primary grafts ($p=0.00507$). Recipients bearing long-surviving UV-B pretreated corneal grafts rejected secondary untreated corneal grafts at the first-set tempo. Recipients who had previously rejected untreated primary grafts rejected UV-B pretreated secondary grafts at the first-set tempo.

Conclusions : The UV-B pretreatment to donor corneas may induce dysfunction of antigen presentation so that the recipients' immune system fails to be sensitized in second-set phenomena. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 689—693, 2002)

Key words : Corneal transplantation, UV-B, Second-set phenomenon, Rat

別刷請求先：734-8551 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 皆本 敦
(平成 14 年 2 月 13 日受付, 平成 14 年 6 月 19 日改訂受理)

Reprint requests to : Atsushi Minamoto, M. D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

(Received February 13, 2002 and accepted in revised form June 19, 2002)

I 緒 言

実質臓器を含めた種々の移植実験モデルにおいて、ultraviolet-B irradiation (UV-B) が同種異系移植片の生着延長に有効であることが示されている¹⁾。角膜は UV-B で均一な到達深度が得やすい透明な膜組織であり、異所性²⁾³⁾および同所性角膜移植モデル^{4)~6)}においてドナー角膜への UV-B 前処置による移植片の拒絶の頻度の減少^{2)~4)}が報告され、著者ら⁵⁾はラットの同所性全層角膜移植モデルにおいて、ドナー角膜移植片への UV-B 前処置により拒絶が回避され観察期間中に完全に生着していたことを報告した。さらに、新生血管を伴う high-risk な角膜移植においても、拒絶の頻度の減少および生着⁶⁾が報告された。これらの報告では、いずれもレシピエントが感作を受けていない状態でのドナー移植片に対する UV-B 前処置の効果の検討であった。

臨床的に全層角膜移植において、移植片拒絶は再移植の予後を悪化させる因子であることが知られており、その理由は主としてドナーの移植抗原に対しレシピエントが感作されるためである、と理解されてきた⁷⁾。しかし、再移植という high-risk な角膜移植における UV-B による角膜移植片の生着延長効果についての報告はこれまでにない。

今回、我々は以上述べたようなドナー角膜に対する UV-B 前処置の効果を二次移植モデルにおいて検討した。すなわち、一定の間隔をおいて両眼に全層角膜移植を行うラットのモデルにおいて、第1眼あるいは第2眼のいずれかのドナー移植片に UV-B 前処置を行い、それらの生着期間の検討から、UV-B 前処置によりドナー移植片の抗原認識機構にもたらされた影響について考察を行った。

II 実験方法

1. 動物

今回の実験に先立ち、純系ラットによる major histocompatibility complex (MHC) および non-MHC がともに異なるドナーとレシピエントの組み合わせ (fully allogeneic strain combination) を 32 種類設定し、同種異系角膜移植片の同所性全層角膜移植を行い、急性拒絶反応を生じる組み合わせ (acute rejection group) の中から一組を選び本実験に用いた⁸⁾。ドナーは Dark Agouti (DA) (RT1^{av1}) を、レシピエントは Albino Oxford (AO) (RT1^u) を選択し、体重約 300 g で雄の純系ラットを用いた。角膜はすべて無血管状態で処置された。

2. 麻酔方法

麻酔導入には酸素中に 2~4% に調整されたハロセンを用い、0.3 mg/kg の fentanyl-fluanisone (Janssen, 英国) を一方の後肢に、2.5 mg/kg の diazepam (Roche, 英国) をもう一方の後肢に筋注し手術操作可能な麻酔状

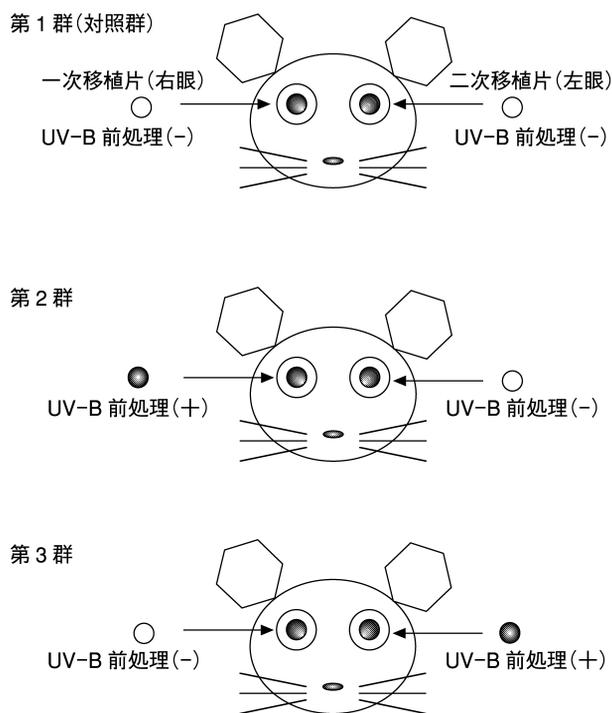


図1 実験群.

UV-B : ultraviolet-B

態を得た。

3. 実験群

第1群：無処置のドナー角膜をレシピエントの右眼に移植し、その10週後に無処置のドナー角膜をレシピエントの左眼に移植した。

第2群：UV-B 前処置を行ったドナー角膜をレシピエントの右眼に移植し、その10週後に無処置のドナー角膜をレシピエントの左眼に移植した。

第3群：無処置のドナー角膜をレシピエントの右眼に移植し、その10週後に UV-B 前処置を行ったドナー角膜をレシピエントの左眼に移植した。

各群は10匹ずつで構成され(n=10)、移植片として角膜組織のみを用いた二次移植片拒絶反応モデルを提示した(図1)。

4. UV-B 前処置

UV-B の線源には、1 kW の xenon arc を用いた。Oriell 社製 monochromator および liquid light guide を用いて 300 nm にピークを有する狭波長域(約 10 nm)の UV-B を 1 cm の距離から摘出眼球のドナー角膜に照射した(図2)。UV-B 前処置は 80~100 秒間の照射で総出力が 200 mJ/cm²になるよう調整し、ドナー角膜を移植に供する直前に行った。

5. 手術方法

DA ラットは CO₂ 下に窒息死させ、両眼球を全摘出し実験に供した。直径 3 mm のトレパンを用いて角膜中央部からドナー移植角膜片を採取した。レシピエントである AO ラットの術眼は 1% アトロピンおよび 10% フ

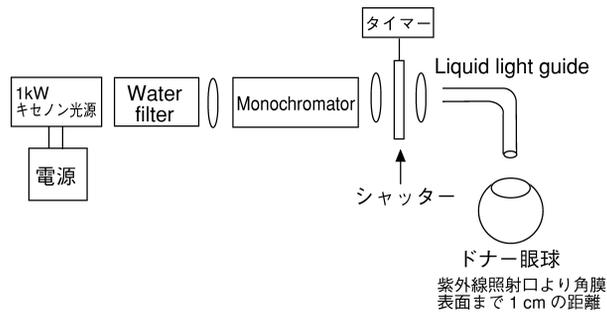


図 2 UV-B 照射装置のシエマ。

フェニレフリン点眼で散瞳した。全身麻酔下に、6-0 ポリプロピレン縫合糸を上下の直筋付着部に通糸して眼球を固定した。レシピエント角膜中央部に直径 3 mm のトレパンを用いてマーキングし、レーザー刃で前房を穿刺しそこからマーキングした創に沿って角膜剪刀で切開を完成した。ドナー角膜片を 10-0 ナイロン糸で continuous chain suture technique⁸⁾によりレシピエント角膜に縫着した。糸の緊張が均等になるように調整した後、結紮を内皮側に置くようにして縫合を終了した。

6. 術後の処置および観察

術後観察期間を通じて縫合糸の抜糸は行わなかった。術直後の 1 週間は 1% アトロピンおよびクロラムフェニコール眼軟膏を 1 日 1 回術眼に点眼した。それ以外には全身的にも局所的にも免疫抑制作用を有するものも含め薬剤は一切使用しなかった。術後 3 週間は術眼の所見を毎日手術顕微鏡下に観察し、4 週目以降は週に最低 4 回は観察した。移植角膜片の混濁が進行し瞳孔および虹彩大血管の透見が不能となった時点で拒絶と判定した。なお、両眼に拒絶が完成し全盲になったと判断された個体は直ちに殺処分された。

7. 統計学的検討

生着期間(日数)は平均値±標準偏差において示し、各群の第 1 眼と第 2 眼の生着期間の比較は Wilcoxon 符号付順位和検定、各群の間の生着期間の比較は Mann-Whitney U 検定を用い、two-tail で $p < 0.05$ を有意差ありとした。

III 結 果

第 1 群(対照群)：右眼に移植された無処置のドナー角膜は 10.2 ± 1.2 (平均値±標準偏差) 日で拒絶され(図 3)、10 週後に左眼に移植された無処置のドナー角膜は 5.0 ± 0.5 日と加速されて拒絶され、右眼に比較して有意差を示した($p = 0.00507$)。

第 2 群：右眼に移植された UV-B 前処置を行ったドナー角膜のうち、2 眼に術後 2~3 週目に一過性の軽度の角膜混濁があったが数日で消失し、10 週後に左眼の手術を行うまで全例で拒絶されずに透明に生着していた(図 4)。左眼に移植された無処置のドナー角膜は $9.7 \pm$

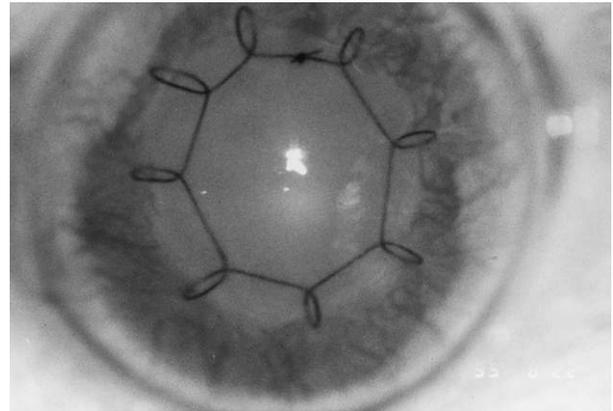


図 3 術後 9 日目に拒絶された移植片(第 1 群の右眼)。縫合糸を中心に形成された新生血管は怒張し、角膜は拒絶による混濁のため瞳孔領は不明瞭となる。

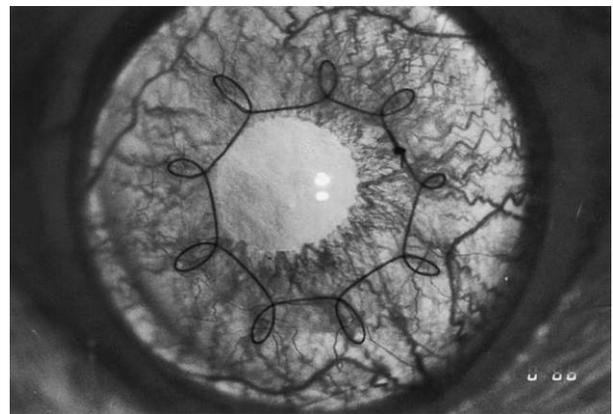


図 4 術後 79 日を経過して透明性を維持している移植片(第 2 群の右眼)。角膜中央部は混濁がなく、瞳孔領が明瞭に透見される。微小血管が縫合糸の周辺に残存する。

0.9 日で拒絶され、右眼に比較して有意差を示した($p = 0.00507$)。

第 3 群：右眼に移植された無処置のドナー角膜は 11.3 ± 2.5 日で拒絶された。10 週後に左眼に移植された UV-B 前処置を行ったドナー角膜は 11.7 ± 3.2 日で拒絶され、第 1 眼と第 2 眼の生着期間に有意差はなかった。

なお、左眼の二次移植に注目すると、第 1 群と比較して第 2 群および第 3 群の角膜の生着期間は有意に延長していた($p = 0.00011$)。以上の結果の要約を表 1 に示す。

第 2 群の 10 匹において、6 つの右眼の移植片は左眼の二次移植後も 10 週(すなわち計 20 週)に渡り透明性を維持して生着し、遺伝学的に全く同一の性質を有するドナーの角膜が右眼では生着し、左眼では急性拒絶された状態が同一個体において出現している。一方、左眼の二次移植後 18 日目に 2 つの右眼の一次移植片が拒絶された。また、残りの 2 眼に角膜後面沈着物と移植片最周辺部での血管侵入があり、その後これらの所見は数日で消退した。これらは二次移植片のドナーと同一の抗原性を

表 1 角膜移植片の生着日数

	右眼(第1眼)への移植片	左眼(第2眼)への移植片	p ^a	p ^b
第1群 (対照群)	9, 9, 9, 10, 10, 10, 11, 11, 13 (10.2±1.2) ^c	4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6 (5.0±0.5)	0.00507	—
第2群	70>, 70>, 70>, 70>, 70>, 70>, 70>, 70> [*] (>70)	9, 9, 9, 9, 9, 10, 10, 10, 10, 12 (9.7±0.9)	0.00507	0.00011
第3群	9, 9, 10, 10, 10, 10, 11, 13, 15, 16 (11.3±2.5)	9, 9, 9, 10, 10, 10, 12, 14, 17, 17 [*] (11.7±3.2)	0.17754 (NS)	0.00011

* イタリック：ultraviolet-B(UV-B)前処置を施行した移植片

^a：Wilcoxon 符合付順位和検定(各群の第1眼と第2眼を比較)

^b：Mann-Whitney U 検定(第1群の第2眼と各群の第2眼との比較)

^c：平均値±標準偏差(日数)

一次移植片が生着後も一部保持していたために二次的に拒絶反応を生じたものと考えられる。

IV 考 按

本実験の同所性角膜移植モデルにおいて、同じドナーからのともに無処置の角膜片による二次移植の拒絶反応に免疫学的な特異性と記憶(immunological specificity and memory)の機能が存在し、二次移植において角膜は原則的に通常の移植の概念に従うことを本報は明らかにしている(第1群)。一方で、UV-B 前処置を行ったドナー角膜移植片がすでに長期生着したレシピエントに対し、無処置のドナー角膜片を二次移植しても生着せず、免疫学的寛容(immunological tolerance)は導入されていないことが示された(第2群)。また、無処置のドナー角膜片の移植をすでに拒絶したレシピエントに対して、UV-B 前処置を行ったドナー角膜片を二次移植しても加速された拒絶は観察されず、二次拒絶(second-set rejection)は成立していなかった(第3群)。すなわち、第2群および第3群においていずれかのドナー角膜に本報で用いた UV-B 前処置を行うと、免疫学的な特異性や記憶に基づく donor-specific な二次移植片の反応が起きず、その大部分はドナーとは無関係な第三者からの異系移植(third party allograft)としてレシピエントによって認識されていたことが示された。この現象は UV-B がドナー角膜の本来の抗原性に何らかの変化をもたらすことによって生じたものと推定された。

今回ドナー角膜照射に用いた UV-B が、ドナーの抗原提示細胞(antigen presenting cells, APC)の機能を障害することは良く知られた事実である⁹⁾。近年、green fluorescent protein を用いたトランスジェニックマウスの角膜移植において、移植前にドナーの角膜内では APC の主体である dendritic cells(DC)は MHC class II-negative の形で存在するが、移植後数時間で頸部リンパ節に移動して MHC class II-positive に変化し、術後 72 時間はこの変化した DC がレシピエントの T 細胞のプライミングを優位に行うことが確認された¹⁰⁾。このことにより、移植を naive のレシピエントに行う限り、

UV-B 前処置を受けた角膜片の生着が延長する事実はドナー由来の APC の不活化という機序によるものと思われる³⁾⁻⁶⁾。しかし、今回の二次移植モデルの結果から示された UV-B 前処置を受けた移植片が third party allograft として拒絶されたことを説明するためには、UV-B がもたらすさらなる影響について考慮する必要がある。

紫外放射(ultraviolet radiation)は、その波長が短いほどエネルギーレベルは高く、その電磁波エネルギーは生体に波長特性に応じて異なる化学作用を引き起こす。UV-B の波長域(280~315 nm)では、細胞内の分子を励起状態にしフリーラジカルや活性酸素を産生したりするため、塩基の 2 量体形成などによる DNA 損傷を起し突然変異や皮膚癌の発生に影響を与えることが知られている¹¹⁾。物理的・化学的刺激により発生した皮膚癌は移植されてもそのまま増殖を続けるが、マウスの皮膚に UV-B を繰り返し放射して発生した皮膚癌は他の同系マウスに移植しても拒絶され、多量の UV-B により本来の免疫学的な自己特異性が変化する可能性が指摘された¹²⁾。

本報の実験結果から、ドナー角膜への少量の UV-B 前処置によりドナーの抗原の特異性(donor-derived peptides¹⁰⁾)の情報が MHC から喪失した¹³⁾か、あるいはその免疫情報がレシピエントの T cell receptor に伝達されなかった¹⁴⁾ため、ドナーの APC からレシピエントの T 細胞への情報伝達が障害され direct antigen presentation¹³⁾の機能不全が生じたことが推定された。対照群では MHC を伴ったドナー抗原を共通の免疫情報として T 細胞に提示することで二次移植片に二次拒絶が成立したが、実験群のようにいずれかの移植片に UV-B 前処置を施す場合には 2 つの移植片の間で異なる T 細胞の反応が惹起され、二次移植片の移植後は両移植片の間では donor-specific な二次免疫応答が成立せず、特異的な記憶の喪失(failed sensitization)という現象が生じたと推定される。また、同じ推定に基づくならば、一次移植が UV-B 前処置により長期に渡って遅延性拒絶反応が生じていない理由は、ドナーの MHC 由来の可溶性抗原(soluble MHC molecules)¹³⁾がその特異性の情報を UV-B によりすでに喪失していたため、レ

レシピエントの APC による indirect antigen presentation¹³⁾が機能不全を起こしたものと考えられる。第 2 群で UV-B 前処置を施され生着した一次移植片がレシピエントに anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)¹⁵⁾¹⁶⁾を含む免疫学的寛容を二次移植角膜片に導入しなかったのも、同様な理由と思われる。たとえば免疫学的寛容が一部導入されていても、non-MHC に基づくドナー抗原の特異性の情報がレシピエントの APC による indirect antigen presentation を介して T 細胞に伝達され、二次移植時の十分に惹起された拒絶反応の要因の方が大となり、二次移植片が通常の急性拒絶の様相を呈したと推定された。

一方、UV-B の角膜に及ぼす副作用については、電子顕微鏡による形態学的な障害⁴⁾や増加する放射量に伴い培養された内皮細胞の viability が低化する傾向が報告²⁾⁴⁾されてきた。動物種による差はあるが、300 nm の UV-B がヒトの生体の角膜上皮に障害を起こす閾値は 7 mJ/cm²、内皮では 100 mJ/cm²とされ、ラットの閾値データはない¹⁷⁾。本実験は、たとえば生理学的にはやや劣悪な環境であっても、摘出されたラットのドナーの組織に免疫学的な修飾を施すことによって再移植という high-risk な角膜移植における拒絶反応を回避する可能性を検討することを目的⁵⁾として行われた。本報で提示された現象は、角膜移植片の拒絶反応機構の解明の一助になるものと考えられるが、今後さらにその機序の詳細な検討が必要である。

摺筆に当たり、Chen Zonghua 博士、平沢計介博士、古海浩博士の貴重な助言に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) **Deeg HJ** : Ultraviolet irradiation in transplantation biology. *Transplantation* 45 : 845—851, 1988.
- 2) **Guymer RH, Mandel TE** : UV-B irradiation of donor skin and cornea prior to allotransplantation in mice. *Transplant Proc* 21 : 3771—3772, 1989.
- 3) **Ray-Keil L, Chandler J** : Reduction in the incidence of rejection of heterotopic murine corneal transplants by pretreatment with ultraviolet radiation. *Transplantation* 42 : 403—406, 1986.
- 4) **Dana MR, Olkowski ST, Ahmadian H, Stark WJ, Young EM** : Low-dose ultraviolet-B irradiation of donor corneal endothelium and graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 2261—2268, 1990.
- 5) **Katami M, White DJG, Watson PG** : Site-specific immunosuppression for corneal graft survival in the rat. *Transplant Proc* 24 : 1406—1408, 1992.
- 6) **Hill JC, Sarvan J, Maske R, Els WJ** : Evidence that UV-B irradiation decreases corneal Langerhans cells and improves corneal graft survival in the rabbit. *Transplantation* 57 : 1281—1284, 1994.
- 7) **Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ** : Graft survival after corneal transplantation : Role of factors with the potential for recipient presentation. *Transplant Proc* 27 : 2141—2142, 1995.
- 8) **Katami M, Madden PW, White DJG, Watson PG, Kamada N** : The extent of immunological privilege of orthotopic corneal grafts in the inbred rat. *Transplantation* 48 : 371—376, 1989.
- 9) **Baadsgaard O, Wang T** : Immune regulation in allergic and irritant skin reaction. *Int J Dermatol* 30 : 161—172, 1991.
- 10) **Liu Y, Hamrah P, Zhang Z, Taylor AW, Dana MR** : Draining lymphonodus of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med* 195 : 259—268, 2002.
- 11) **Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ** : Sunlight and sunburn in human skin cancer : p 53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1 : 136—142, 1996.
- 12) **Kripke ML, Fisher MS** : Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 57 : 221—215, 1976.
- 13) **Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, et al** : Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med* 177 : 1643—1650, 1993.
- 14) 蕪城俊克, 山上 聡, 掘 純子, 小幡博人, 磯部光章, 水流忠彦 : 抗 $\alpha\beta T$ 細胞受容体抗体によるラット角膜移植モデルにおける拒絶反応抑制効果. *あたらしい眼科* 14 : 1371—1374, 1997.
- 15) **Streilein JW** : Anterior chamber associated immune deviation : The privilege of immunity in the eye. *Surv Ophthalmol* 35 : 67—73, 1990.
- 16) **She SC, Steahly LP, Moticka EJ** : Intracameral injection of allogeneic lymphocytes enhances corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 1950—1956, 1990.
- 17) **Pitts DG, Kleinstein RN** : Environmental vision. Butterworth-Heinemann, MA, 161—171, 1993.