

ラット角膜全層移植における拒絶反応の免疫組織学的研究

大塚 裕子

東京医科大学眼科学教室

要 約

DA ラット (RT1^a) から Lewis ラット (RT1^l) に角膜全層移植を行い、拒絶反応における浸潤細胞の出現を W3/25 (helper T cell), OX8 (suppressor/cytotoxic T cell), OX6 (Ia antigen positive cell), OX42 (macrophage) の抗ラットモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討した。検索した全ての細胞は2~4日でgraft周辺部に浸潤していた。OX42陽性細胞は移植後早期より最も強い浸潤を呈した。拒絶反応は術後12±2日で認められ、拒絶反応発症前はOX6陽性細胞、W3/25陽性細胞が優位であったが、拒絶反応時にはOX8陽性細胞が著しく増加し優位となった。しかし末梢血にはこれらの変化は反映されなかった。また拒絶反応時の内皮細胞伸展標本では本来の角膜内皮細胞には認められないとされているIa抗原陽性細胞が認められた。(日眼会誌 95:809-816, 1991)

キーワード：角膜全層移植，拒絶反応，モノクローナル抗体，ラット

Immunohistochemical Study of Corneal Allograft
Rejection in Inbred Rats

Hiroko Otsuka

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College

Abstract

Penetrating keratoplasty was performed on inbred rats (DA rat → Lewis rat) and the appearance of infiltrating cells in rejection was studied immunohistochemically using anti-rat monoclonal antibodies W3/25 (helper T cell), OX8 (suppressor/cytotoxic T cell), OX6 (Ia antigen positive cell) and OX42 (macrophage). In all cells evaluated, infiltration around the graft occurred between days 2 and 4. In OX42-positive cells infiltration was most intense in the early phase. Rejection occurred on postoperative day 12±2. Prior to the development of rejection, OX6-positive cells and W3/25-positive cells were dominant. However, during rejection, OX8-positive cells markedly increased, becoming dominant. These changes were not reflected in the peripheral blood. During rejection, the endothelial flat preparation was Ia antigen-positive which not found in normal cornea. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:809-816, 1991)

Key words: Penetrating keratoplasty, Rejection, Monoclonal antibody, Rat

別刷請求先：160 新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学眼科学教室 大塚 裕子

(平成2年11月16日受付，平成3年3月9日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroko Otsuka, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College.

6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received November 16, 1990 and accepted in revised form March 9, 1991)

I 緒 言

角膜移植拒絶反応の機構は他臓器における拒絶反応と同様に生体が移植片を異物と認識し、リンパ球の増殖が起こり移植片に集合して破壊する細胞性免疫とされているが¹⁾²⁾、その実験的免疫組織学的研究は少ない。著者は拒絶反応発症前後の移植片での浸潤細胞の出現形式を検討する目的でラットにて全層角膜移植を行い、拒絶反応に関係する浸潤細胞の動態を抗ラットモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討し、同時に末梢血でのリンパ球サブセットと比較した。また、主要組織適合抗原の class II 抗原は、拒絶反応に重要な役割を果たしている。しかし正常角膜細胞には class II 抗原は認められないとされており、拒絶反応におけるその発現について詳細はわかっていない。拒絶反応による移植片混濁は内皮細胞の障害によるところが大きい。そこでさらに、拒絶反応時の内皮細胞伸展標本作製し、ラットの class II 抗原である Ia 抗原の発現についても検討した。

II 実験方法

拒絶モデル群は、ドナーとして近交系 DA (Dark Agouti) ラット (RT1^a雄, 200~250g), レシピエントとして Lewis ラット (RT1^b雄, 200~250g) を用いた。

コントロールとしては Lewis ラットで同系移植を施行した。トレパン操作時の虹彩損傷をなくすために術前30分よりトロピカミド(ミドリリンP®), 塩酸フェニレフリン(ネオシネジン®), 塩酸シクロペントレート(サイブレジン®)にてドナー, レシピエントともに散瞳した。またフィブリン析出防止のため術前に0.2%ヘパリンナトリウム点眼も用いた。移植手術はエーテル吸入麻酔下にて手術用顕微鏡を用い以下のごとく行った。まずドナー角膜においては直径3mmのトレパンにて角膜中央部をマークしながら一部全層に入り、その部位よりヒアルロン酸ナトリウム(ヒーロン®)を前房内に注入し Vannas 剪刀にて移植片を切り抜いた。同様の操作でレシピエント角膜を打ち抜き、水晶体上にヒアルロン酸ナトリウム(ヒーロン®)を滴下しその上にドナー角膜をのせ、10-0ナイロン糸にて結節縫合を8針行った。術後は抗生物質と散瞳薬の点眼を5回/日行い、細隙灯顕微鏡にて移植片の透明性、血管進入、前房、虹彩の状態などを観察した。透明性については以下のような基準にてスコアをつけた。すなわち、0:完全に透明, 1:表層混濁(軽度), 2:表層混濁(中等度), 3:全層混濁(軽度:瞳孔領透見可能), 4:全層混濁(中等度:瞳孔領透見不可能), 5:全層混濁(強度:壊死性)である(図1)。術後2日, 4日, 7日, 拒絶反応時, 21日に尾静脈より採血後、眼球を摘

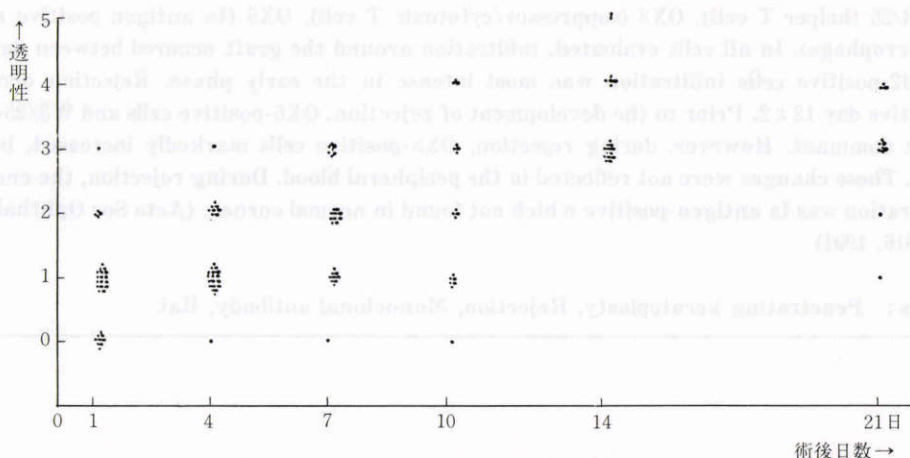


図1 移植片の細隙灯顕微鏡所見

SCORE

0:完全に透明, 1:表層混濁(軽度), 2:表層混濁(中等度), 3:全層混濁(軽度:瞳孔領透見可能), 4:全層混濁(中等度:瞳孔領透見不可能), 5:全層混濁(強度:壊死性)

出した。それぞれにつき 5 眼を用い、3 眼は -80°C に凍結包埋、2 眼はホルマリン固定し HE 染色を行った。凍結包埋したものは抗ラットモノクローナル抗体を用い、PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法にて免疫組織化学染色を行った。用いた 1 次抗体 (Sera-Lab 社, England) は、W3/25(helper T cell: Th), OX8(suppressor/cytotoxic T cell: Ts-c), OX6 (Ia antigen positive cell), OX42 (macrophage) で、染色手技は以下の通りである。クライオスタットにて $6\mu\text{m}$ 凍結切片を作製し、アセトン固定後、0.3% 過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ処理を行い、正常山羊血清に 20 分反応させた。1 次抗体 (抗ラットマウスモノクローナル抗体) 30 分、2 次抗体 (抗マウス免疫グロブリン山羊血清) 30 分、標識抗体 (ペルオキシダーゼ標識マウス免疫グロブリン) 30 分の反応後、AEC(3-amino-9-ethylcarbazole) 基質にて発色させ、ヘマトキシリンにて核染色を行い鏡検した。末梢血については flow cytometry により Th/Ts-c 比を測定した。また、拒絶反応時の眼球から強角膜片を作製し、直径 2mm のトレパンを用いて縫合部位を含まないように注意しながら移植片中央部を打ち抜いた。リン酸緩衝生理食塩水中にて内皮細胞をデスメ膜とともに実質より剝離し、伸展標本を作製した。1 次抗体に OX6 を用い同様の方法にて PAP 法による染色を行った。コントロールには正常眼球を用いた。

III 結 果

1. 臨床所見：術翌日は移植片は軽度浮腫状であったが透明で、2 日目には浮腫はほとんど軽減していた。術後約 2 日間は前房中にフィブリンが見られるものがあった。また、輪部結膜から徐々に血管が侵入し、約 7 日で移植片辺縁に達した。コントロール群では血管の侵入は移植片内の縫合部までで停止したが、拒絶反応群ではさらに中央部へと伸びていき、10 日より移植片の浮腫性混濁が見られるものがあり、混濁は 2 日以内にさらに増強した。術後 14 日では全例にスコア 3 以上の混濁を認めた。透明 (スコア 2 以下) であった移植片に生ずる急激な混濁を拒絶反応と判定し、術後 12 ± 2 日で認められた。明瞭な rejection line は見られなかった。21 日では透明性はやや回復する傾向にあった。図 1 に細隙灯検査による移植片の透明度をグラフに示す。術翌日より浅前房、前房出血、虹彩前癒着、白内障などを起こしたもののや、術後 7 日以前に混濁を呈したものは、すべて対象から除外した。

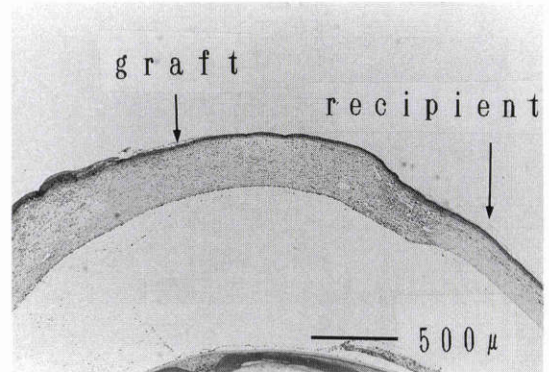


図 2 拒絶モデル術後 14 日の HE 染色所見 ($\times 40$)。移植片は全層に浮腫をきたし、著明な細胞浸潤を認める。細胞浸潤は特に移植片周辺部に強い。

2. HE 染色所見：拒絶モデル群の HE 染色による組織学的所見は以下のようであった。術後 2 日では好中球を中心とした小円形細胞浸潤がすでに移植片周辺部に散在性に認められた。移植片中央部の上皮、実質には異常なく一層の内皮細胞も観察されたが、創部では表層、深層に間隙が認められた。4 日には上皮細胞、線維芽細胞などによりレシピエントとの間隙はほぼ消失した。細胞浸潤は 2 日よりわずかに強く、移植片中央部へも散在性に浸潤していたが、移植片に浮腫は認められず、前房にも異常なかった。10 日では浸潤細胞はリンパ球が主体となり、移植片周辺部に最も強い浸潤が見られた。14 日では移植片全層に急激な浮腫をきたし、毛細血管が拡張し、また著明な細胞浸潤が移植片周辺部から中央部までびまん性に認められ、臨床的拒絶反応を裏付ける所見であった。上皮の菲薄化は特に認められなかった。また内皮細胞は一部脱落していると思われる部位と、前房側より浸潤細胞が多数付着し内皮細胞の状態が不明瞭な部位とが観察された。炎症細胞は角膜全層に浸潤していたが、特に実質浅層に強く、移植片中央部よりも周辺部に多数浸潤していた (図 2)。21 日ではこれらの浮腫、細胞浸潤は減少していた。コントロールでは術後 4 日まで同様の所見であったが 10 日目でもその浸潤程度は変わらず、14 日以降には速やかに減少した。

3. 免疫組織学的所見：PAP 法にて検索した細胞の浸潤強度を 6 段階に分け、その経時の変化を移植片周辺部と中央部について検討した (表 1, 図 3)。どの細胞も 2 ~ 4 日で移植片周囲に達していた。W3/25 陽性細胞は、移植後比較的早期より移植片全体に中等度の

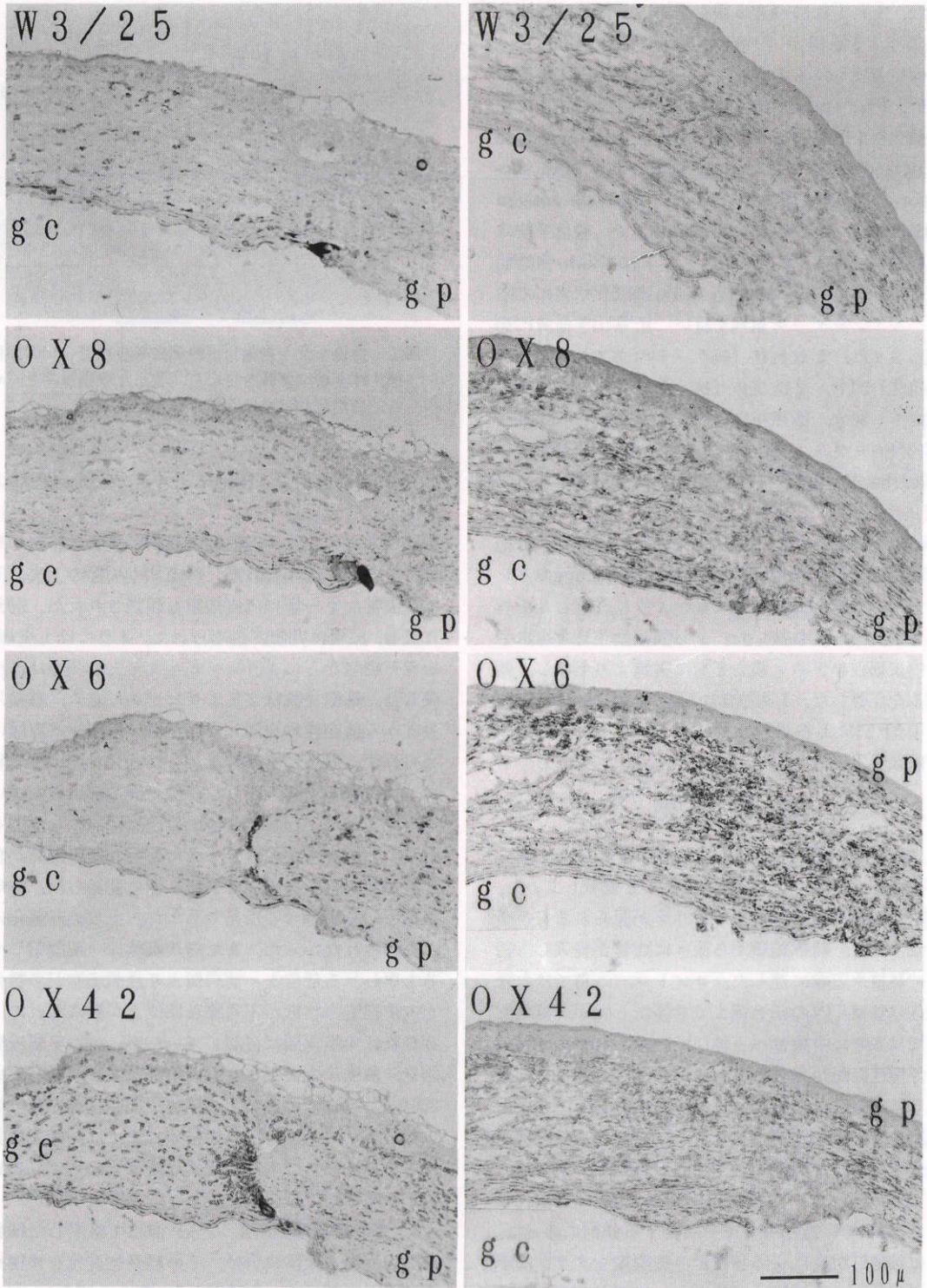


図3 PAP法染色所見(×200)

左:術後7日, 右:術後14日, 上より W3/25, OX8, OX6, OX42.

gc (graft center): 移植片中央部, gp (graft periphery): 移植片周辺部

表 1 光学顕微鏡200倍の観察にて1視野中の陽性細胞数

—: 0 #: 10~20

±: 1~2 #: 20~50

+: 10以下 #: 50以上

g.p. (graft periphery): 移植片周辺部

g.c. (graft center): 移植片中央部

拒絶反応モデル (DA→LEW)

		2 日	4 日	7 日	拒絶反応時 (12±2 日)	21 日
W3/25	g.p.	±	+	+	±	±~+
	g.c.	—	±	+	±	±~+
OX8	g.p.	—	+	+	±~+	+
	g.c.	—	±	±	±~+	+
OX6	g.p.	±	+	+	±	±
	g.c.	—	+	+	±	±
OX42	g.p.	±	±	±	±~+	±~+
	g.c.	±	+	+	±~+	+

コントロール (LEW→LEW)

		2 日	4 日	7 日	14 日	21 日
W3/25	g.p.	±	+	+	+	±
	g.c.	—	±	+	+	±
OX8	g.p.	—	+	+	+	±
	g.c.	—	+	+	±	—
OX6	g.p.	+	+	±	±	+
	g.c.	—	+	±	±	±
OX24	g.p.	±	±	+	±	±
	g.c.	±	+	±	±	±

浸潤を呈し、拒絶反応発症前後でなだかな増加、減少を示した。OX8陽性細胞は、7日目までは浸潤はW3/25陽性細胞よりやや軽度であったが、拒絶反応時より急激に浸潤が強くなり、21日目では速やかに減少していた。OX6陽性細胞は、移植後早期の浸潤は軽度であったが、拒絶反応時にピークとなり、21日目でも移植片周辺部にまだ強く浸潤していた。OX42陽性細胞は、初期より最も強い浸潤を全層に呈していたが、拒絶反応後は急激に減少していた。また、浸潤部位では、どの細胞も移植片周辺部で最も強度であった。W3/25陽性細胞とOX8陽性細胞を比較すると、拒絶反応発症前はW3/25が軽度優位に浸潤していたが、発症後にはOX8陽性細胞が著しく増加し、W3/25陽性細胞より優位となっていた。コントロールではどの時点でも

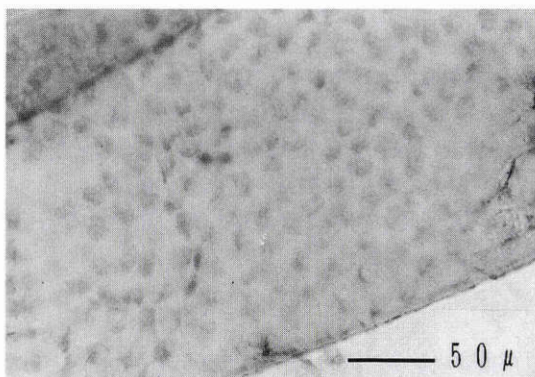
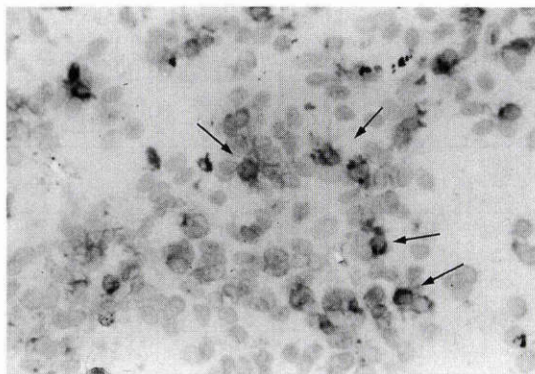


図 4 内皮伸展標本の Ia 抗原陽性所見. PAP 法染色, (×400)

上: 拒絶モデル. 同一平面上に並んだ内皮細胞に散在性に陽性所見 (矢印) が認められる. 下: コントロール

も細胞浸潤は中等度以下であった。特にW3/25とOX8陽性細胞については拒絶反応モデルに比して非常に軽度であった。OX6陽性細胞は7日、14日で他の細胞よりも多く、特に創部周囲に強く浸潤していた。OX42陽性細胞は拒絶反応モデルと同様2日より最も強い浸潤を呈していたが、その後特に著明な増加は見られなかった。拒絶反応発症後のOX6による内皮細胞の染色結果は、通常のtransverse sectionにおいても、OX6陽性と思われる所見を認めたが、前房側に付着している浸潤細胞と紛らわしく、鑑別は困難であった。しかし3眼につき作製した伸展標本では、同一平面上に並んだ一層の細胞が散在性に陽性所見を呈し、位相差顕微鏡にて内皮細胞層であることが示された。コントロールである正常Lewisラットの内皮細胞では陽性所見は得られなかった(図4)。

表2 末梢血におけるリンパ球サブセット

	W3/25 (%)	OX8 (%)	W3/25/OX8 比
2 日	62.7	27.8	2.26
	62.4	27.9	2.24
4 日	56.3	27.4	2.05
	55.1	27.8	1.98
7 日	55.7	26.2	2.04
	57.8	25.0	2.33
12±2 日	54.3	26.2	2.07
	59.7	25.0	2.39
	61.7	32.3	1.91
正常ラット (n=5)	54.3± 3.2	27.6± 1.6	1.97± 0.14

4. 末梢血におけるリンパ球サブセットについて：正常ラットの W3/25/OX8 比は 1.97 ± 0.14 (平均 $\pm$ S.D., $n=5$) であった。拒絶モデル群での値は拒絶反応前 ($n=6$)、拒絶反応時 ($n=3$) につき検討したが、どれも $1.91 \sim 2.29$ と常に 1.0 以上であり、経時的にも一定の傾向は見られなかった (表2)。

IV 考 按

角膜移植拒絶反応の免疫機構についてはこれまで数多くの研究がなされており、近年ではモノクローナル抗体を用いた局所での浸潤細胞の解析も行われている³⁴⁾。しかし人眼における拒絶反応では、試料は拒絶反応から時間のたった再手術時のものであり、拒絶反応発症前、発症時など組織の経時的な観察は不可能である。実験動物では、免疫学的に安定なマウスやラットが用いられるが、手術手技が困難なこともあり、全層移植や層間移植がこれまでに主に行われており、全層角膜移植においては十分に検討されているとは言えない。今回われわれは、ヒアルロン酸ナトリウム(ヒーロン®)などの使用によりラットに全層角膜移植を行うことができ、機械的な内皮の障害を除外して拒絶反応を免疫組織学的に検討することができた。またラットの組合せについては、Katami ら³⁵⁾は種々の近交系ラットを用いて角膜移植を行い、拒絶反応の発生率を検討し、組織適合性と拒絶反応の生着期間には関連が認められなかったと報告している。しかし、同じラットを用いた実験においても組織適合抗原が適合性のものより非適合性の組合せのほうが拒絶反応の発生率が高かったとの報告³⁶⁾があり、また臨床的には HLA をマッチングさせることにより拒絶反応の発生頻度が低

下したとの報告⁷⁾もある。このように組織適合抗原と角膜移植拒絶反応との関係は現在なお不明であるが、本実験のように組織適合性が完全に非適合である2種のラット間では移植片の混濁が100%拒絶反応によって起こることが示された。

全層角膜移植における拒絶反応は、上皮・実質・内皮のどの層にも起こりうるとされている。本実験では組織学的には上皮基底細胞への軽度リンパ球浸潤、実質の全層特に浅層における強い細胞浸潤、及び内皮細胞の脱落と前房側でのリンパ球の接着所見が認められた。そして臨床的には移植片の強い浮腫性混濁が認められ、拒絶反応は上皮・実質・内皮の全層に起きたと考えられる。

免疫組織学的には、まず拒絶反応発症前は OX6 陽性細胞及び W3/25 細胞が早期より浸潤しており、拒絶反応発症時には OX8 陽性細胞が著しく増加し優位になった。これは抗原呈示細胞によりヘルパー T 細胞が誘導され細胞障害性 T 細胞が組織を障害するという通常の拒絶反応の過程を反映していると考えられた。Sanfilippo ら³⁷⁾は人眼の拒絶反応時に輪部の生検を行い Ts-c 細胞が上皮と実質に優位に浸潤していたと報告している。また Treseler ら⁴⁾はラット角膜の異所性移植を行い拒絶反応時にやはり Ts-c 細胞が優位であったという結果を得ている。これらの報告は拒絶反応の一時点についてのみの検討であるがわれわれの結果と一致している。ラットの心臓移植、肺移植など他臓器の拒絶反応においては、末梢血の Th/Ts-c 比の変動が拒絶反応の inductive phase と effective phase を反映するモニターとして検討されている³⁸⁾。しかし今回の角膜移植の結果からは、末梢血 Th/Ts-c 比は局所の反応を反映しておらず、臨床応用は難しいと思われる。この理由としては、角膜が全身から見れば臓器として非常に小さく、反応が局所に限局し末梢血に影響しにくいことが考えられ、また本来無血管組織であることも関係していると思われる。次に OX42 陽性細胞は移植後初期より最も強い浸潤を呈していた。OX42 は OX6 陽性細胞とかなりオーバーラップしていると思われるが、OX42 陽性細胞は OX6 に比べて非常に強く浸潤していた。そして拒絶反応後は OX6 に比して速やかに減少していた。OX42 は macrophage の他に granulocyte も認識するとされている。この結果と浸潤細胞の形態から陽性細胞は、macrophage と好中球の両者と思われ、syngeneic model でも早期から浸潤していたことより、OX42 陽性細胞の動態は小動物に

における手術侵襲を反映した非特異的炎症反応であると考えられた。

主要組織適合抗原のうち特に class II 抗原 (Ia 抗原) は移植免疫に重要な役割を果たすことが知られており、OX6陽性細胞は抗原呈示細胞として拒絶臓器に浸潤してくるとされている。著者の拒絶モデルにおいても拒絶反応時にコントロールに比べびまん性に強く浸潤していたことは前述のことを示唆する所見と考える。また拒絶後に他の陽性細胞が著しく減少するのに対し、Ia 抗原陽性細胞が強く残存している所見は再度拒絶反応を起こす要素を示しているとも思われる。一方、同種同系モデルにおいても軽度はこの細胞が浸潤していたが、特に創部の縫合部に強く浸潤していた所見より、縫合糸の影響も大きく関与していると思われる。茂沢¹⁰⁾はラットの角膜を縫合し、ナイロン糸をはじめプロリン糸においても Ia 抗原陽性細胞が実質に浸潤してくることを報告している。また Tagawa ら¹¹⁾は角膜の縫合糸に対し、輪部結膜からランゲルハンス細胞が浸潤してくることをマウスにて確認している。この点については縫合糸の影響を除外するために抜糸モデルを作製し、今後長期の観察を行ってみる必要がある。

角膜移植拒絶反応時に内皮細胞が class II 抗原を発現するという点に関しては、臨床的には Pepose ら¹²⁾が、拒絶反応後に上皮、実質、内皮細胞全てに陽性所見を得たとしているが、試料は時間のたった再手術時の水疱性角膜症のものであり、陽性細胞の起源については確かではない。今回の実験結果では、上皮層では基底細胞付近に周辺部から経時的に陽性細胞が観察され、これは輪部からのランゲルハンス細胞や Ia 陽性 macrophage の浸潤と考えられたが、上皮細胞の Ia 抗原発現の可能性についてはさらに検討を要すると思われる。同様に実質においては、臨床的に血管の侵入していない早期から移植片周辺部を中心に浸潤しており、光顕所見と照らし合わせるとレシピエントから浸潤してきた Ia 抗原陽性の macrophage と思われた。内皮細胞層では transverse section にて褐色に陽性を示す細胞は観察されたが、実質深部の浸潤細胞か前房からの遊走細胞あるいは内皮細胞であるかは鑑別できなかった。しかし作製した伸展標本において内皮細胞が明らかに陽性を呈していたことは注目すべき所見と考えられる。臨床的に拒絶反応による移植片混濁は内皮細胞の障害に起因することは良く知られている。今回の内皮細胞の Ia 抗原の発現は内皮細胞が標的細胞

となり T 細胞により障害されることを示唆する免疫組織学的所見と考えられる。今後経時的に伸展標本作製し、Ia 抗原の発現時期、そして Ia 抗原とリンホカインの関係を手術による炎症という観点から検討する必要もあると考えている。

稿を終えるにあたり、御校閲戴きました松尾治亘教授に深謝致します。また直接御指導戴きました臼井正彦教授ならびに村松隆次講師に感謝致します。

本論文の要旨の一部は第5回国際眼免疫学会にて発表した。

文 献

- 1) Khodadoust AA, Silverstein AM: Induction of corneal graft rejection by passive cell transfer. *Invest Ophthalmol* 15: 89-95, 1976.
- 2) Pepose JS, Nestor MS, Gardner KM, et al: Composition of cellular infiltrates in rejected human corneal allografts. *Graefes Arch Clin Expr Ophthalmol* 222: 128-133, 1985.
- 3) Sanfilippo F, MacQueen JM, Vanghn WK, et al: Histocompatibility testing in high risk corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 27, 1984.
- 4) Treseler PA, Foulks GN, Sanfilippo F: Immunity to class I major histocompatibility complex(MHC) antigens evoked by heterotopic corneal allografts in the rat. *Invest Ophthalmol* 25: 299, 1984.
- 5) Katami M, Madden PW, White DJ, et al: The extent of immunological privilege of orthotopic corneal grafts in the inbred rat. *Transplantation* 48: 371-376, 1989.
- 6) Lang RF, Riekhof FT, Steinmuller D: Interlamellar corneal grafts in rats. *Arch Ophthalmol* 93: 349-354, 1975.
- 7) Foulks GN, Sanfilippo FP, Locascio JA, et al: Histocompatibility testing for keratoplasty in high-risk patients. *Ophthalmology* 90: 239-244, 1983.
- 8) 井村正史: ラット心移植における宿主免疫担当細胞の解析. *三重医学* 31: 243-250, 1987.
- 9) 東憲太郎, 金田正徳, 坂井 隆, 他: Rat 肺移植の実験的研究—モノクローナル抗体を用いた rejection monitoring の検索—. *移植* 20: 653-661, 1985.
- 10) 茂沢克己: ラット角膜に対する縫合糸の影響について (免疫酵素抗体法による浸潤細胞の定量的検討). *日眼会誌* 92(抄録): 193, 1988.
- 11) Tagawa Y, Kitagawa F, Matsuda H: The

