

氏名(本籍)	南 毅 生 (三重県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第306号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	犬の同種腎移植に関する基礎的研究 一特に免疫抑制剤の使用方法和腎機能、肝機能について一
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木 立 雄 (副査) 教授 高 橋 貢 教授 野 村 靖 夫 助教授 武 藤 真

論 文 内 容 の 要 旨

人医界においては慢性腎不全に対する治療方法として、血液透析と腎移植が代表的である。しかし、血液透析は1回4～6時間、週に数回病院内で治療を行なわなければならない。一方、腎移植では、一旦移植腎が機能を開始すると、入院の必要はなく免疫抑制剤の投与以外、通常に近い日常生活を営むことも可能である。

小動物臨床においても高齢化にともない慢性腎不全症例は増加する傾向にあり、適切な治療の実施が望まれている。このような慢性腎不全の治療方法として犬においても腎移植が効果的かつ経済的であると考えられるが、ヒトのような確実な腎移植方法とくに免疫抑制剤の投与方法については未だに確立されていない。ヒトの腎移植においては、ヒトリンパ球抗原系(human leukocyte antigen, HLA)を検査し主要組織適合性抗原(major histocompatibility complex, MHC)を出来るだけ合致させた移植腎の受給者(recipient)と提供者(donor)を選択している。しかし、犬においてはリンパ球抗原(dog leukocyte antigen, DLA)を検査し、確定することは現在のところ困難であり、犬の腎移植においてはヒトよりもより高度の免疫抑制法の確立が必要である。そこで著者は、recipientと同様にdonorにも移植前に免疫抑制剤を投与するという新しい方法を考案し、犬の腎移植について、腎機能はもちろん肝機能にも影響が少なく長期間生存が可能な免疫抑制剤の適切な投与方法を開発する目的で実験を行なった。

1. 自家腎移植群ならびに非免疫抑制群

腸骨窩を移植腎の移植床とし、腎動脈・外腸骨動脈吻合、腎静脈・総腸骨静脈吻合ならびに尿管・膀胱吻合を行う手術方法が有効であることを確認するために5頭の雑種成犬を用いて自家腎移植を行なった。また、生存期間を比較するための対照群として雑種成犬を無作為に抽出し、2頭を一对とした非免疫抑制腎移植群(10頭)を作成した。

自家腎移植群(第1群)においては、腎機能の指標である血清クレアチニン(Cr)ならびに血液尿素窒素(BUN)値は1週間の観察期間を通じて正常範囲内で推移した。このことから、この移植手術手技が腎臓にほとんど障害を与えない有効な方法であることが確認された。

非免疫抑制群（第2群）での生存日数は、 8.7 ± 2.4 日（平均 \pm 標準偏差）であり、生存期間は雑種成犬を使用した従来の報告とはほぼ同様であった。この群では、移植後数日で血清CrならびにBUNの値が上昇したことから移植後短期間で拒絶反応により腎機能が喪失したものと考えられた。

2. 免疫抑制剤短期間投与群

ここでは、アザチオプリン (azathioprine, Az)、ミゾリビン (mizoribine, Mz) ならびにプレドニゾン (prednisolone, Pr) の3種の免疫抑制剤を2剤または3剤併用することによって、免疫抑制効果を最大限に利用し、副作用を最小限とする投与方法を確立する目的で実験を行なった。免疫抑制剤は donor と recipient の両者に移植5日前から移植前日まで投与し、さらに recipient には移植後7日目まで投与し、投与期間中の腎臓ならびに肝臓の機能に対する影響について観察した。その後は拒絶反応を誘発する目的で、recipient の免疫抑制剤の投与を中止した。免疫抑制方法は、次の4群に分けて行なった。AzとPrの2剤を投与した群、すなわち移植5日前より donor と recipient の両者に Az 2.5mg/kg、3日前より Pr 1mg/kg をそれぞれ1日1回経口投与し、移植当日からは recipient に Az, Pr 共に1.0mg/kgを7日目まで投与した Az (2.5 mg/kg)/Pr群 (第3群: 10頭)。移植5日前より両者に Az 5.0mg/kgを、3日前より Pr 1.0mg/kgを1日1回経口投与し、移植当日からは recipient に Az, Pr 共に1.0mg/kgを7日目まで投与した Az (5.0 mg/kg)/Pr群 (第4群: 12頭)。MzとPrの2剤を投与した群、すなわち移植5日前より Mz 5.0mg/kg、3日前より Pr 1.0mg/kgをそれぞれ1日1回経口投与し、移植当日からは Mz 2.5mg/kg、Pr 1.0mg/kgを7日目まで投与した Mz (5.0mg/kg)/Pr群 (第5群: 10頭)。移植5日前より Mz 5.0mg/kg、3日前から Az 2.0mg/kg、Pr 1.0mg/kgを1日1回毎日経口投与し、移植当日からは Mz 2.5mg/kg、Az 1.0mg/kg ならびに Pr 1.0mg/kgを投与した Az, Mz, Pr の3剤投与群 (第6群: 10頭) である。

第3群と第6群の生存日数はそれぞれ、 16.2 ± 4.1 日ならびに 14.0 ± 2.6 日であった。生存日数について、対照群 (第2群) に対して第3群と第6群には有意な延長が観察された。しかし、この2群間には有意差は認められなかった。

腎機能では、第3群と第6群では免疫抑制剤の投与期間中に異常所見は認められなかったが、第5群では免疫抑制剤投与中も拒絶反応によると考えられる腎機能の低下が認められた。全群共に免疫抑制剤の投与中止後は数日以内に拒絶反応の発現によって腎機能は消失した。

肝機能を示す、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) ならびにアルカリフォスファターゼ (ALP) 値は、AzとPrの2剤を併用した群において、Az, Mz, Prの3剤を併用した群あるいはMz, Prの2剤を併用した群よりも上昇する傾向が観察され、Azを高用量使用した第4群においては重度の肝障害が観察された。AzとPrの2剤の組み合わせでは、長期間投与に伴って肝障害を起こすことが考えられた。

以上の結果より、腎移植後、長期間免疫抑制剤を投与する最も有効な方法は、Az, Mz, Prの3剤投与方法 (第6群) であることが示唆された。

そこで、この免疫抑制方法が従来のAzとPrの2剤を投与する方法に比較してより有効な方法であることを確認する目的で、Az, Mz, Prの3剤投与方法を雑種成犬ならびにビーグル成犬に腎移植後長期間実施し、その有用性を確認した。

3. 免疫抑制剤長期間投与群

第6群での Az, Mz, Pr の3剤投与方法を実験犬の死亡時まで、雑種成犬8頭(第7群)とビーグル成犬8頭(第8群)に実施した。また、ビーグル成犬群には著者が開発した急性拒絶反応の診断基準(1:血清 Cr 値が1日で0.5 mg/dl以上上昇したこと,あるいは2:血清 Cr 値が2.0 mg/dl以上上昇したこと)を適用して治療(デキサメサゾン1.0 mg/kg, 1日1回3日連続静脈内投与)し長期生存に努めた。生存日数は、雑種成犬群ならびにビーグル成犬群それぞれ 44.5 ± 20.5 日ならびに 142.5 ± 111.4 日であり、両群共に生存日数の有意な延長が認められた。

腎機能は、両群共に免疫抑制下で正常に保たれていた。しかし、一旦拒絶反応が発現すると Cr ならびに BUN は上昇した。このような場合ビーグル成犬群には、拒絶反応の基準に準じて急性拒絶反応の治療を行なった結果、処置後2~3日で治療前に回復し効果が認められた。また、ビーグル成犬群に行なった静脈性腎盂造影ならびに内因性クレアチンクリアランス(CCr)では、急性拒絶反応時には腎機能が低下し、治療後回復することが分かった。なお、拒絶反応後の血清 Cr 値は数日で回復するものの、CCr 値はさらに数日遅れて正常に回復した。このことは、腎機能を判断するうえで、血清 Cr 値よりも CCr 値は、よりの確に腎機能を把握できるものと考えられた。ビーグル成犬群において長期間生存した例において Cr は正常範囲内で推移しているにもかかわらず、BUN の中程度の上昇がみられた。このことは、長期間生存例においては何らかの腎機能低下あるいはその前駆症状を示していることが示唆された。腎臓の組織学的検査では、糸球体内微小血栓を含むリンパ球と形質細胞を主体とする細胞介在性の急性拒絶反応ならびに長期間生存例では糸球体硬化を主病変とする慢性拒絶反応によるものと思われる所見が観察された。肝機能においては、ALP, ALT ならびに、 γ -グルタミールトランスフェラーゼ(GGT)を測定した結果、移植後一過性にこれらの酵素値は上昇し、その後徐々に低下する傾向にあった。長期間生存例ではこれらの値はほぼ正常値に回復した。また、ビーグル成犬群(第8群)で行なった ALP の電気泳動法では、免疫抑制剤投与初期に認められた ALP の上昇はほとんどステロイド誘発性であることが確認された。肝臓の組織学的検査においては、ステロイド性肝症と考えられる種々の程度の肝細胞の空胞化が観察された。しかしながら、その他には免疫抑制剤の副作用と考えられる異常所見は観察されなかった。とくにビーグル成犬群では手術中に肝生検を実施し、剖検時の所見と比較した。その結果、剖検時には数例にステロイド性肝症が観察されたが、免疫抑制剤の投与期間あるいは免疫抑制剤の総投与量と肝臓の病変の程度には関係は認められなかった。

以上の結果より、ステロイド性肝症に関しては、今後 Pr 減量を含む長期間投与方法を検討する必要性が示唆されたが、著者の行なった Mz, Az, Pr の3剤を donor と recipient の両者に移植の5日前より前処置として投与する免疫抑制方法は数力月から半年間は移植腎の機能を維持でき、犬における慢性腎不全の治療として腎移植が臨床的に応用可能であることが確認された。

論文審査の結果の要旨

近年、犬においてもヒトと同様、高齢化が進むに伴い老年性疾患が増加している。その一つに腎臓病がある。腎臓病の場合、一時的に腎機能を補助する保存方法があるが、機能不全により全身状態が悪化した慢性腎不全(chronic renal failure, CRF)に対しては何らかの積極的方法で腎機能を補助あるいは代行してや

らなければならない。

人医界での CRF に対する積極的治療法は透析療法と腎移植に大別されるが、根治療法となると現時点では腎移植に勝る方法はない。犬においても CRF の治療法として腎移植が最も効果的な方法と考えられるが、ヒトのような腎移植方法、とくに免疫抑制剤の投与方法については未だ確立されていない。

ヒトの腎移植においては、ヒトリンパ球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) を検査し、主要組織適合性抗原系をできるだけ合致させた移植腎の受給者 (recipient) と提供者 (donor) を選択して行なっている。しかし、犬においてはリンパ球抗原 (dog leukocyte antigen, DLA) を日常の臨床で検査し、組織適合性を確定することは現在のところ困難であり、犬の腎移植においてはヒトよりもより高度の免疫抑制法の確立が必要である。

本研究では犬の腎移植について、腎機能はもとより肝機能にも影響が少なく、移植腎が長期間生着可能な免疫抑制剤の適切な投与方法を開発する目的で第 1 に自家腎移植群 (第 1 群) で手術手技を確認したうえで、非免疫抑制群 (第 2 群) で移植腎の機能について検討を加えた。第 2 に第 2 群を対照群として、アザチオプリン (azathioprine, Az), ミゾリビン (mizoribine, Mz) およびプレドニゾロン (prednisolone, Pr) の 3 種の免疫抑制剤を 2 剤または 3 剤併用し、最も有効な免疫抑制方法について検討した。第 3 に Az, Mz, Pr の 3 剤を長期間投与 (第 7, 8 群) するとともに急性拒絶反応発現時に治療を行ない (第 8 群) 長期生存に努めるべく実験を行なった。その結果、以下の成績を得た。

1. 自家腎移植群ならびに非免疫抑制群

5 頭の雑種成犬を用いて自家腎移植 (第 1 群) を行ない、移植手技について検討した。腎機能の指標である血清クレアチニン (Cr) ならびに血液尿素窒素 (BUN) 値は 1 週間の観察期間中、正常範囲内で推移した。このことから、腸骨窩を移植腎の移植床として、腎動脈と外腸骨動脈を、腎静脈と総腸骨静脈を、尿管と膀胱をそれぞれ吻合する移植手術手技は腎臓にほとんど障害を与えない適切な方法であることが確認された。そこで以下の免疫抑制剤投与群の対照群として雑種成犬 10 頭を無作為に抽出し、direct crossmatch 陰性の 2 頭を一对とした非免疫抑制群 (第 2 群) を作成し、生存日数等について検討した。第 2 群での生存日数は、 8.7 ± 2.4 日 (平均 \pm 標準偏差) であり、雑種成犬での従来の報告とほぼ同様であった。この群では、移植後数日で Cr ならびに BUN の値が上昇したことから移植後短期間で拒絶反応により腎機能が消失したものと考えられた。

2. 免疫抑制剤短期間投与群

本章では、Az, Mz および Pr の 3 種の免疫抑制剤を 2 剤または 3 剤併用することによって、免疫抑制効果を最大限に利用し、副作用を最小限とする投与方法を確立する目的で実験を行なった。免疫抑制剤を donor と recipient の両者に移植前 5 日間、さらに recipient には移植後 7 日目まで投与し、投与期間中の腎ならびに肝の機能に対する影響について観察した。その後は拒絶反応を誘発する目的で、免疫抑制剤の投与を中止した。免疫抑制方法は、次の 4 群に分けた。Az と Pr の 2 剤を投与した群、すなわち移植前 5 日間 Az 2.5 mg/kg と 3 日間 Pr 1.0 mg/kg、移植当日より Az 1.0 mg/kg、Pr 1.0 mg/kg を移植後 7 日目まで投与した Az (2.5 mg/kg)/Pr 群 (第 3 群: 10 頭)。移植前の Az の量を 5.0 mg/kg とした以外は第 3 群と同様とした Az

(5.0 mg/kg)/Pr 群 (第4群: 12頭)。MzとPrの2剤を投与した群すなわち移植前5日間Mz 5.0 mg/kgと3日間Pr 1.0 mg/kg, 移植当日よりMz 2.5 mg/kgとPr 1.0 mg/kgを移植後7日目まで投与したMz (5.0 mg/kg)/Pr 群 (第5群: 10頭)。移植前5日間Mz 5.0 mg/kgと3日間Az 2.0 mg/kg, Pr 1.0 mg/kg, 移植当日よりMz 2.5 mg/kg, AzとPr 1.0 mg/kgを移植後7日目まで投与したAz, Mz, Prの3剤投与群 (第6群: 10頭) である。

生存日数は第3群 16.2 ± 4.1 日, 第4群 8.5 ± 0.8 日, 第5群 11.2 ± 2.9 日ならびに第6群 14.0 ± 2.6 日であり, 対照群 (第2群) に対して第3群と第6群で有意 ($P < 0.05$) な延長が観察された。しかし, この2群間では有意差は認められなかった。

腎機能では, 免疫抑制剤の投与期間中に第3群と第6群では異常所見は認められなかったが, 第5群では免疫抑制剤投与中も拒絶反応によると思われる腎機能の低下が認められた。また, 全群免疫抑制剤の投与中止後は数日以内に拒絶反応の発現によって腎機能は消失した。

肝機能を示す血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) ならびにアルカリフォスファターゼ (ALP) 値は, AzとPrを併用した群においてAz, Mz, Prの3剤あるいはMz, Prの2剤を併用した群よりも上昇が認められ, とくにAzを高用量投与した第4群では重度の肝障害が観察された。これらのことからAzとPrの2剤の組み合わせでは, 長期間投与に伴って肝障害が発現するものと思われた。

以上の結果より, Az, Mz, Prの3剤投与 (第6群) が移植腎の機能を長期間維持するために最も有効な方法であることが示唆された。

3. 免疫抑制剤長期間投与群

Az, Mz, Prの3剤投与が従来 of Az, Prの2剤投与による免疫抑制法に比較してより有効な方法であることを確認するため, 雑種成犬8頭 (第7群) とビーグル成犬8頭 (第8群) に腎移植後から死亡時まで3剤投与を長期間実施した。また, 第8群には著者が考案した急性拒絶反応の診断基準, すなわちCr値が1日で 0.5 mg/dl 以上上昇した場合あるいはCr値が 2.0 mg/dl 以上に上昇した場合を, 拒絶反応と判断し, デキサメサゾン 1.0 mg/kg , 1日1回連続3日間静脈内投与し, 長期生存に努めた。

その結果, 第7群の生存日数は 44.5 ± 20.5 日, 第8群は 142.5 ± 111.4 日であり, 両群共に有意 ($P < 0.05$) に生存日数の延長が認められた。

腎機能は, 両群共に免疫抑制下ではほぼ正常に保たれていた。しかし, 一旦拒絶反応が発現するとCrならびにBUNは上昇した。このような場合第8群には, 拒絶反応に対する治療を行なったところ, 処置後2~3日でCrならびにBUNは治療前の値に回復し効果が認められた。また, 第8群で行なった静脈性腎盂造影ならびに内因性クレアチニンクリアランス (CCr) では, 急性拒絶反応時には腎機能が低下し, 処置後回復することが分かった。さらには, 拒絶反応後の血清Cr値は数日で回復するものの, CCr値はさらに数日遅れて回復した。このことは, 腎機能を判断するうえで, 血清Cr値よりもCCr値がより的確に腎機能を表現しているものと考えられた。第8群において長期間生存した例においてはCr値は正常範囲で推移しているにもかかわらず, BUNの中程度の上昇がみられた。このことは, 長期間生存例においては何らかの腎機能の低下あるいはその前駆症状を示していることが示唆された。

腎臓の組織学的検査では, 糸球体内微小血栓を含むリンパ球と形質細胞を主体とする細胞介在性の急性拒

絶反応ならびに長期間生存例では糸球体硬化を主病変とする慢性拒絶反応によるものと思われる所見が観察された。

肝機能については、ALP, ALTならびに γ -グルタミールトランスフェラーゼ (GGT) が移植後一過性に上昇し、その後徐々に低下した。長期間生存例ではこれらの酵素値はほぼ正常値に回復した。また、第8群で行なったALPの電気泳動法では、免疫抑制剤投与初期に認められたALPの上昇はステロイド誘発性であることが確認された。肝臓の組織学的検査においては、ステロイド性肝症と考えられる種々の程度の肝細胞の空胞化が観察された。しかし、その他には免疫抑制剤の副作用と考えられる異常所見は観察されなかった。とくに第8群では移植手術中に肝生検を実施し、剖検時の所見と比較した。その結果、剖検時に数例でステロイド性肝症が観察されたが、免疫抑制剤の投与期間あるいは免疫抑制剤の総投与量と肝の病変の程度には関係は認められなかった。

以上の結果、ステロイド性肝症に関しては、今後Pr減量を含む長期間投与方法を検討する必要性が示唆されたが、著者の行なったAz, Mz, Prの3剤をrecipientと同様にdonorにも移植5日前より投与すると共に、拒絶反応発症時にデキサメサゾンで治療するという免疫抑制方法は数カ月から半年間は移植腎の機能を維持でき、犬のCRFの治療として臨床的に応用できることが確認された。

このことは、獣医臨床の分野のみならず基礎医学分野にも大きく貢献するものと考え、博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしい業績と評価する。