

腎移植患者末梢血リンパ球の各種 Mitogen による幼若化反応と、患者血清による 幼若化反応の抑制

岡山大学医学部第一外科教室（指導：折田薫三教授）

折 田 洋二郎

（昭和57年11月15日受稿）

Key words : PHA, PWM, Con A,
幼若化反応, 腎移植

緒 言

近年、移植免疫学の急速な進歩により腎臓移植においても、術前の HLA-A, B, C 抗原系の適合度に加え、HLA-D および HLA-DR 抗原系の適合度が移植腎の生着と密接な関係を握っていることが明らかにされており、また術前の recipient 血清中の preformed antibody の検索の重要性が示されている^{1,2)}。しかしこれら術前の検索後移植されたにも拘らず、急性拒絶反応、慢性拒絶反応を初めとした種々の合併症が長期生着への壁となっているのが現状である³⁾。

そこでこれら移植患者の細胞性、液性免疫能の推移を把握すべく術前術後の monitoring として種々の方法が行なわれており、その中で各種 mitogen によるリンパ球の幼若化反応は、移植のみならず癌患者の免疫能⁴⁾、各種肝疾患の検討⁵⁾等に利用されその有用性が認められている。腎移植患者の術前状態である尿毒症患者において稲本ら⁶⁾はリンパ球幼若化反応を用い、尿毒症患者の細胞性免疫能の低下、並びに幼若化反応に対する血清中抑制因子の存在を示唆する報告をしている。

本論文では腎移植患者における移植後の免疫応答能の推移、拒絶反応時の特異な変化および移植長期生着例における血清中抑制因子の有無について、Phytohemagglutinin（以下 PHA と略記）、Pokeweed mitogen（以下 PWM と略記）、Concanavalin A（以下 Con A と略記）の3種類の mitogen を用いた末梢血リンパ球の幼

若化反応および移植患者血清による幼若化反応の抑制を control 血清との比較において検索し興味ある知見を得たので報告する。

対象ならびに方法

1. 対象

昭和49年3月より昭和54年8月までに、岡山大学第一外科で施行された生体腎移植30例、死体腎移植15例計45例中33例を、また健康人として患者とほぼ同年代の男性24人、女性6人計30人を検索対象とした。

2. 方法

(1) 採血：移植患者より経時的に（術後3ヶ月までは1週間おき、4ヶ月以後は1ヶ月おきに）ヘパリン 0.2ml 添加して 10ml 採血、また健康人より同様にヘパリン添加にて 10ml 採血した。

(2) 血清の分離：移植患者より早朝空腹時(1)と同様に、ヘパリン無添加にて 10ml 採血し、1時間37°Cフ卵器ついで冷蔵庫内へ入れ血餅退縮を促進させ、毛細管ピペットにて血清を採取後56°C30分 water bath 内で非動化、45μの milipore filter (Milipore corp. #DAWPO 2500) にて濾過滅菌後使用した。また control 血清として、岡山日赤血液センターより提供して頂いた AB 型血清を同様に非動化、濾過滅菌後使用した。

(3) 培養液の作製：RPMI 1640（日水）10.4 g+Hepes (SIGMA chemical comp.) 5.9575 g+NaHCO₃ 2.0g を蒸留水にて 1000ml とし、

汚過滅菌したものに、Kanamycin sulfate (萬有製薬K.K.) を60 μ g/mlの濃度に添加し培養液として使用した(以下 RPMI 1640 と略記)。

(4) 培養器具: 培養には, sterile-U-plate (Cooke Eng. # 1-221-24) と sterile lid (Cooke Eng. # 1-220-29-TL) を使用し, 培養は, CO₂ incubator (池本理化工業製) 内で行った。

(5) リンパ球浮遊液の作製: (1)の要領で採取した末梢血を等量の RPMI 1640 で稀釈し, Ficoll (Pharmacia Fine chemicals)-Conray (第一製薬K.K.) 混合液 (9% Ficoll: 33.4% Conray 400=12: 5の割合で混合し, 滅菌蒸留水で比重1.077~1.078に調整し, さらに1 N NaOH で PH 7.2に調整したもの) 5 ml 上に静かに重層し, 2,000rpm で30分間遠沈し, interface に出来たリンパ球層を採取し, それにほぼ等量の RPMI 1640 を加えよく混和後, 2,000rpm で10分間遠沈する。この沈渣に RPMI 1640 を2~3 ml 加え混和後等分し, それぞれについてリンパ球数を算定した。そして一方には(2)で作製した患者血清を, 他方には AB 血清を20%の濃度になるよう加え最終的にリンパ球数を5 $\times$ 10⁵/ml となるよう調整した。

(6) Mitogen の作製: PHA-P (DIFCO labo. 5ml/vial), Con A (SIGMA chemical comp. 5ml/vial) は5ml の RPMI 1640 で溶解し, PWM (GIBCO 10ml/vial) は10ml の RPMI で溶解後, それぞれを RPMI 1640 で10倍稀釈し2 ml のアンプルへ1 ml ずつ分注し0 $^{\circ}$ C に保存, 実験の都度融解し使いきるようにした。mitogen の添加濃度は, 河合の検索にあるように⁷⁾, 最大の幼若化反応を引き起こす濃度である1% (V/V) となるよう1 well に20 μ l ずつ添加した。

(7) 幼若化反応, 抑制反応の検索: (5)で5 $\times$ 10⁵/ml に調整されたリンパ球浮遊液を microplate に200 μ l ずつ患者血清添加群, AB 血清添加群に分け micropipete (光和機材K.K.) にて分注し, それぞれに(6)で作製した3種類の mitogen を各 well に20 μ l ずつ添加, control として RPMI 1640 を20 μ l ずつ添加した。そして5% CO₂ incubator にて3日間培養後さらに1 μ Ci の methyl ³H thymidine (The Radio chemical centre, S-A 5.0 Ci/mMol) を micro-

liter syringe (Hamilton comp.) にて各 well に添加しさらに24時間培養を継続, 計4日間培養を行った。培養終了後 MASH II (Skatron comp.) にて glassfiber filter (Wattmann) にリンパ球を吸着させ充分乾燥後, リンパ球吸着部を scintillation vial に入れ, scintillator (POPOP 0.1g, PPO 5g を1 ℓ の Toluene に溶解したもの) を5 ml ずつ分注後, scintillation spectrometer (Aloka comp.) にて mettyl ³H thymidine の uptake を測定した。培養日数は河合の検索より⁷⁾, PHA は4日目, PWM, Con-A は5日目に反応の peak があるが, 手技上4日間培養を採用した。また実験は全て triplicate で行った。図1に実験のモデルを示す。

(8) Stimulation Index (幼若化率) と % Suppression (抑制率) の算出: scintillation spectrometer にて測定した cpm 値を基に, triplicate の平均値をその群の値とし, 以下の式にて Stimulation Index (以下 S-I と略記) 並びに % Suppression を算出し t-検定にて統計学的処理を行った。

$$S-I = \frac{A}{B}$$

$$\% \text{ Suppression} = \left(1 - \frac{C-D}{E-F} \right) \times 100$$

A: 血清, mitogen 添加群の cpm

B: 血清添加, mitogen 非添加群の cpm

C: 患者血清, mitogen 添加群の cpm

D: 患者血清添加, mitogen 非添加群の cpm

E: AB 血清, mitogen 添加群の cpm

F: AB 血清添加, mitogen 非添加群の cpm

結 果

1. 末梢血リンパ球の幼若化反応

(1) 血液透析患者の幼若化反応

慢性腎不全患者で, 待期手術のため当科で週3回の血液透析を施行している12症例を対象とし, AB 血清添加培養における3種類の mitogen に対するリンパ球の幼若化反応を検討した。

健康人リンパ球の S-I は, PHA 334.1 $\pm$ 145.7, PWM 112.9 $\pm$ 60.4, Con A 113.4 $\pm$ 53.5 で, 透析患者はそれぞれ176.4 $\pm$ 91.7, 79.0 $\pm$ 49.5, 84.5 $\pm$ 66.7 で, PHA, PWM 反応においてのみ有意に

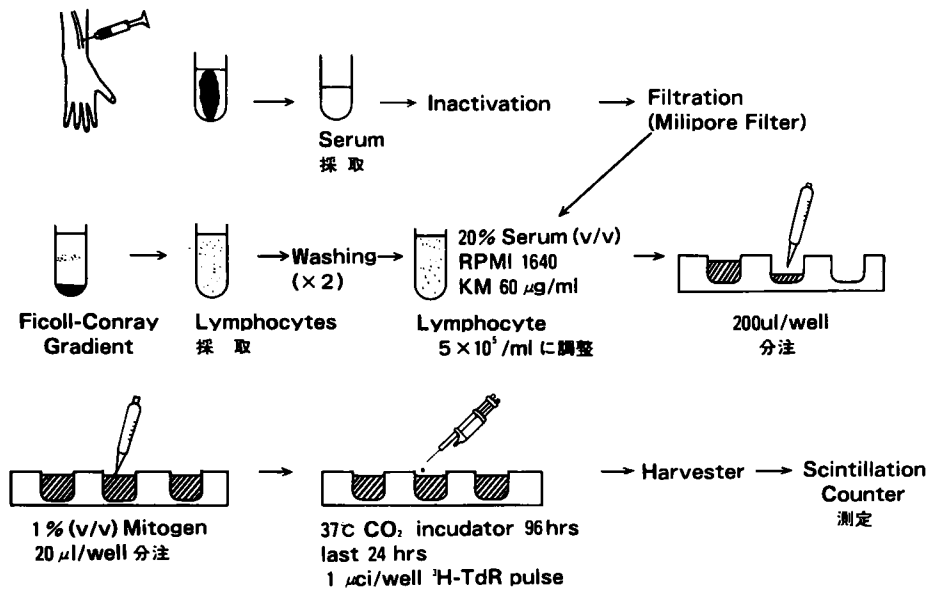


図1 方法

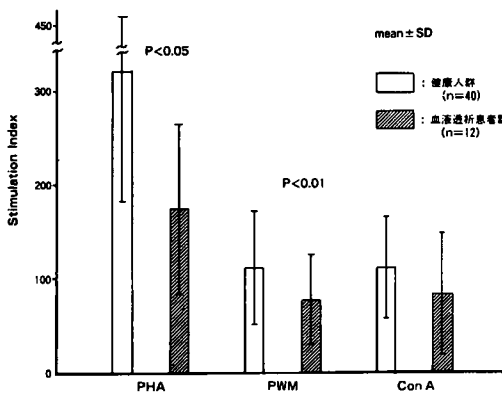


図2 AB 血清添加末梢血リンパ球の Mitogen による幼若化

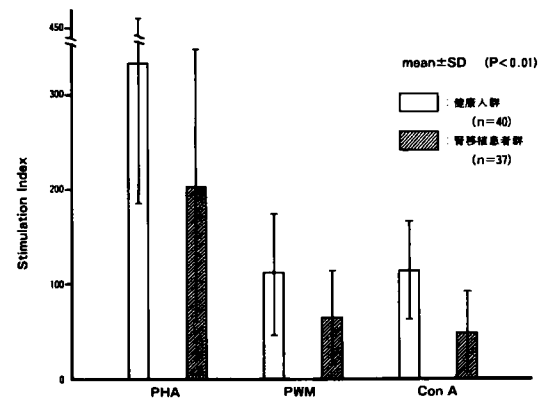


図3 AB 血清添加末梢血リンパ球の Mitogen による幼若化

($P<0.05$), ($P<0.01$) 幼若化率の低下を認め、Con A 反応では有意差を認めなかった (図2)。

(2) 腎移植患者の幼若化反応

移植後急性、慢性拒絶反応、肝機能障害、糖尿病などの合併症を経験していない経過良好な10症例を対象とした37回のAB血清添加培養における幼若化反応を検討した。

健康人リンパ球のS・Iは、PHA 334.1 ± 145.7 , PWM 112.9 ± 60.4 , Con A 113.4 ± 53.5 で、移植患者はそれぞれ 201.6 ± 143.7 , 65.5 ± 49.8 , 49.8

± 42.8 と、全ての mitogen において有意に ($P<0.01$) 幼若化率の低下を認めた (図3)。

(3) 移植後1年以内と1年以上の幼若化反応の比較

移植後1年以内のS・Iは、PHA 148.9 ± 116.3 , PWM 44.9 ± 36.8 , Con A 27.6 ± 26.8 と低値であるが、1年以後のS・Iは、それぞれ 241.7 ± 151.9 , 81.2 ± 53.5 , 66.8 ± 60.0 と全ての mitogen において有意に ($P<0.05$) 幼若化率の回復を認めた (図4)。

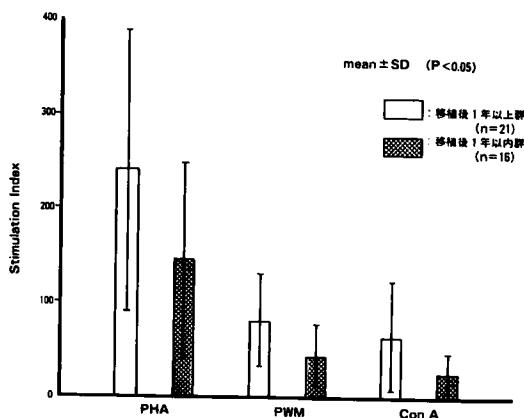


図4 AB血清添加末梢血リンパ球のMitogenによる幼若化

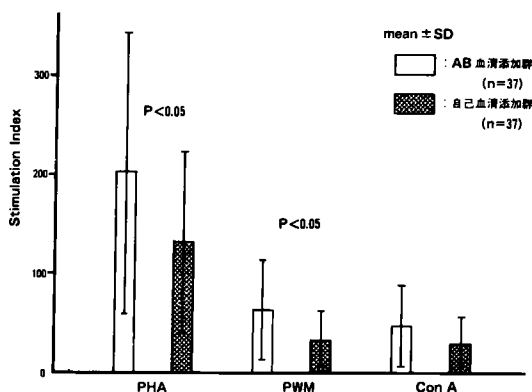


図6 腎移植患者末梢血リンパ球のMitogenによる幼若化

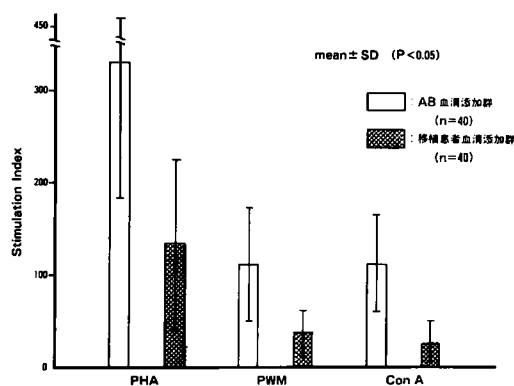


図5 健康人末梢血リンパ球のMitogenによる幼若化

2. 腎移植患者血清と幼若化反応

経過良好な10症例の血清を用い以下の検討を行った。

(1) 健康人末梢血リンパ球幼若化反応への影響

健康人リンパ球を患者血清添加群とAB血清添加群に分けて検討した幼若化反応をみると、AB血清添加群のS-Iは、PHA 334.1 ± 145.7 , PWM 112.9 ± 60.4 , Con A 113.4 ± 53.5 で、患者血清添加群はそれぞれ 169.1 ± 135.7 , 47.4 ± 37.7 , 31.3 ± 22.5 と全てのmitogenにおいて患者血清添加群に有意に ($P < 0.05$) 幼若化率の低下を認めた (図5)。

(2) 腎移植患者末梢血リンパ球幼若化反応への影響

経過良好な10症例の自己リンパ球を、自己血

清添加群とAB血清添加群に分けて施行した37回の幼若化反応をみると、AB血清添加群のS-Iは、PHA 201.6 ± 143.7 , PWM 65.5 ± 49.8 , Con A 48.9 ± 42.8 で、自己血清添加群のS-Iはそれぞれ 132.8 ± 92.7 , 36.7 ± 33.3 , 30.1 ± 26.6 と自己血清添加群においてPHA, PWM反応にのみ有意に ($P < 0.05$) 幼若化率の低下を認め、Con A反応では有意差を認めなかった (図6)。

3. 腎移植患者血清による幼若化反応の抑制

経過良好な10症例の血清を用いて、具体的に幼若化反応の抑制率の検討を以下の如く行った。

(1) 健康人リンパ球と腎移植患者リンパ球に対する抑制率の比較

健康人リンパ球に対する抑制、所謂 *allosuppression* は、PHA $38.0 \pm 29.3\%$, PWM $41.7 \pm 28.0\%$, Con A $62.9 \pm 25.6\%$ で、移植患者自身のリンパ球に対する抑制、所謂 *autosuppression* はそれぞれ $11.9 \pm 31.5\%$, $26.1 \pm 26.6\%$, $17.0 \pm 51.4\%$ と全体に有意の差で ($P < 0.05$) 低く、ことにCon A反応の抑制に関して大きな差を認めた (図7)。

(2) 移植後1年以内と1年以上の抑制率の比較

移植後1年以内の *autosuppression* は、PHA $16.3 \pm 36.0\%$, PWM $9.7 \pm 33.2\%$, Con A $28.6 \pm 43.3\%$ で、1年以上の群ではそれぞれ $8.6 \pm 27.9\%$, $30.1 \pm 26.1\%$, $7.1 \pm 56.6\%$ とCon A反応における抑制率にのみ1年以上の群に有意に ($P < 0.05$) 抑制率の低下を認め、しかも *nega-*

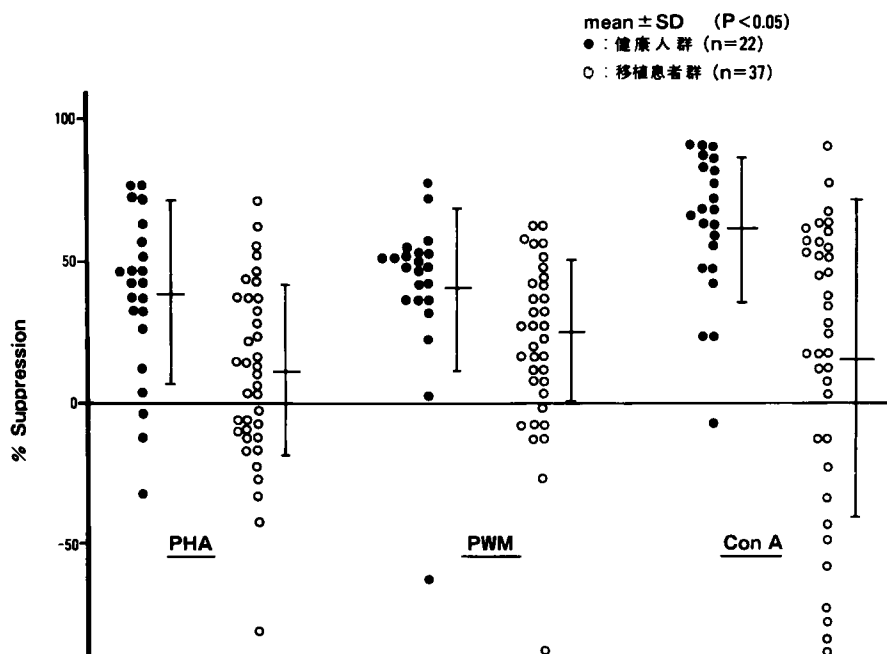


図7 患者血清添加末梢血リンパ球の Mitogen による幼若化の抑制

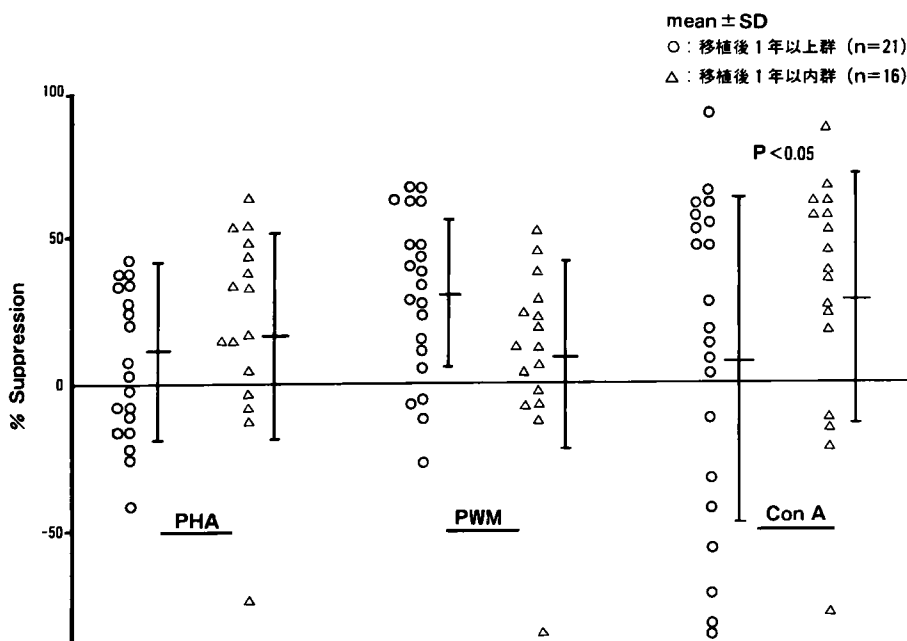


図8 患者血清添加末梢血リンパ球の Mitogen による幼若化の抑制 (腎移植患者)

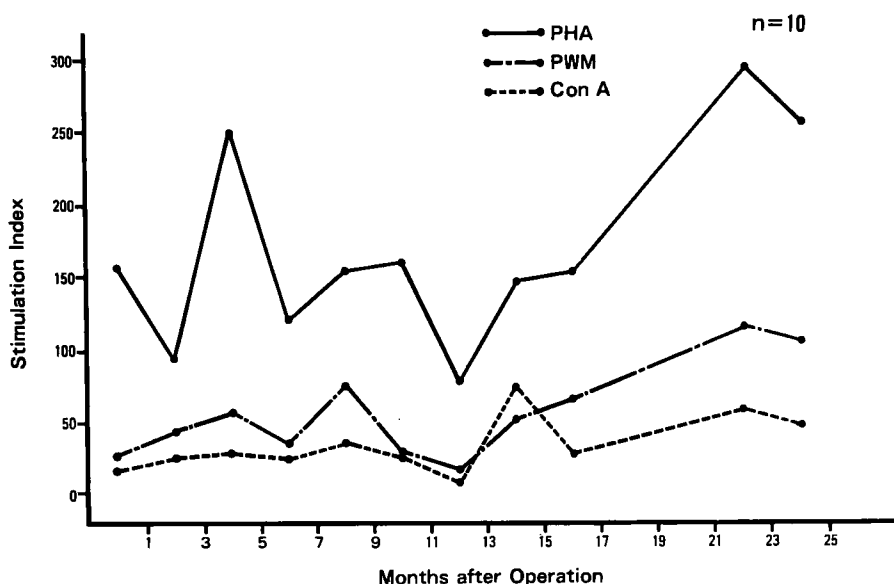


図9 末梢血リンパ球の Mitogen による幼若化 (腎移植患者)

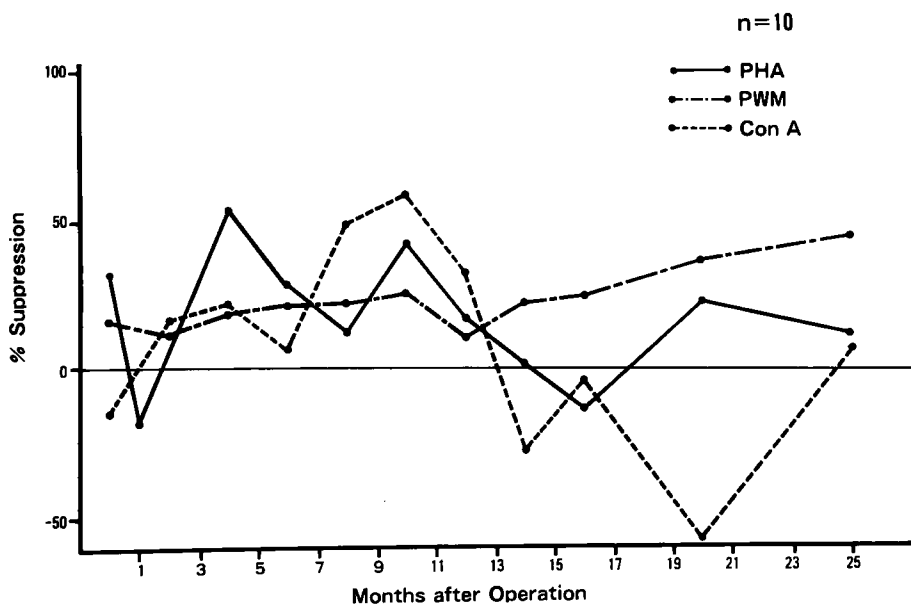


図10 末梢血リンパ球幼若化の自己血清による抑制 (腎移植患者)

tive suppression を示す症例を多く認めた (図 8)。

4. 移植患者末梢血リンパ球の幼若化率と抑制率の推移

経過良好な10症例の各時期での幼若化率の平均値をプロットしてみると、腎生着の一つの壁

である1年を境にして、各々の幼若化率はしだいに回復傾向を認め、特に PHA 反応において顕著である (図 9)

次に、抑制率の推移をみると、全体に auto-suppression は低値であるが術後3ヶ月頃より陽性化を認め、1年を過ぎると PWM 反応は依

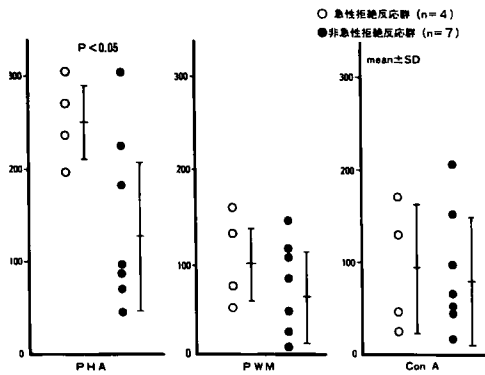


図11 急性拒絶反応と AB 血清添加末梢血リンパ球の術前幼若化率

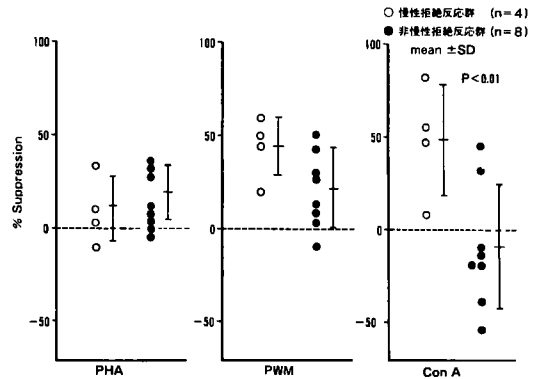


図14 慢性拒絶反応と自己血清による末梢血リンパ球の幼若化抑制率

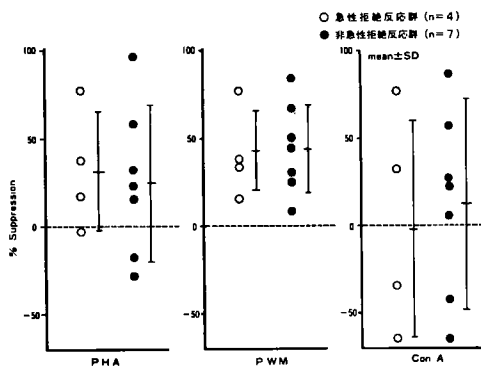


図12 急性拒絶反応と自己血清による末梢血リンパ球の術前幼若化抑制率

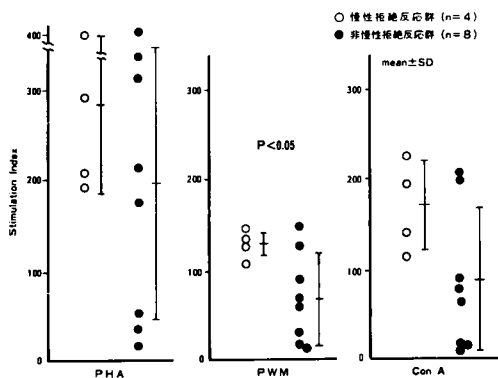


図13 慢性拒絶反応と AB 血清添加末梢血リンパ球幼若化率

然陽性化の傾向にあるのに、Con A 反応は陰性化の傾向を認めた (図10)。

5. 急性拒絶反応と術前の幼若化反応

術前より経過観察出来た11症例につき、急性拒絶反応群と非急性拒絶反応群に分け以下の検討を行った。

(1) 急性拒絶反応と術前幼若化率

急性拒絶反応群リンパ球の AB 血清添加培養時の S-I は、PHA 250.2 ± 45.3 , PWM 98.5 ± 42.3 , Con A 93.6 ± 68.5 で、非急性拒絶反応群ではそれぞれ 128.1 ± 88.1 , 62.5 ± 51.5 , 90.9 ± 67.8 と PHA 反応においてのみ急性拒絶反応群に幼若化率の高値を認めた ($P < 0.05$) (図11)。

(2) 急性拒絶反応と術前抑制率

急性拒絶反応群の抑制率は、PHA $31.6 \pm 34.6\%$, PWM $43.8 \pm 22.8\%$, Con A $-2.3 \pm 72.6\%$ で、非急性拒絶反応群ではそれぞれ $25.4 \pm 43.4\%$, $44.6 \pm 25.5\%$, $12.4 \pm 61.6\%$ で両群に有意差を認めなかった (図12)。

6. 慢性拒絶反応と幼若化反応

慢性拒絶反応の出現した4症例と、1年以上良好に経過している8症例につきほぼ同じ時期の幼若反応について以下の検討を行った。

(1) 慢性拒絶反応と幼若化率

慢性拒絶反応群リンパ球の AB 血清添加培養時の S-I は、PHA 283.9 ± 108.5 , PWM 128.1 ± 15.6 , Con A 168.3 ± 50.6 で、経過良好群ではそれぞれ 196.2 ± 152.3 , 65.9 ± 51.2 , 85.0 ± 81.0 と PWM 反応においてのみ有意に ($P < 0.05$) 慢性拒絶反応群に高値を認めた (図13)。

(2) 慢性拒絶反応と抑制率

慢性拒絶反応群の抑制率は、PHA $12.8 \pm 17.7\%$, PWM $45.7 \pm 16.3\%$, Con A $49.3 \pm 31.3\%$

で、経過良好群ではそれぞれ $20.8 \pm 15.6\%$, $22.5 \pm 20.8\%$, $-9.2 \pm 33.9\%$ と Con A 反応における抑制率にのみ有意に ($P < 0.01$) 経過良好群の低値を認め negative suppression 症例を多く認めた (図14)

7. 症例

術前より経過観察可能であった4症例につき、幼若化率並びに抑制率の immunological monitoring としての有用性を検討した。

(1) CD 10, 21才, 男性

昭和53年9月23日、頭部外傷で死亡した38才男性を donor とした死体腎移植症例である。術前の幼若化反応は3種類共高値で、ことに PHA 幼若化率は269.9 と健康人に近い値を示している。術後幼若化反応は低下、PHA, PWM 反応抑制率は上昇し、Con A 反応抑制率は陰性化していたが、術後21日目に PHA 反応が上昇、PHA, PWM 反応抑制率の低下に伴い、術後27日目急性拒絶反応を認め矢印の如く Solu-medrol 計3g の pulse therapy 施行、幼若化反応も低下を認め急性拒絶反応を乗り切ったかに思え

たが、Con A 反応抑制率は依然陽性のままで、術後42日目 Cytomegalovirus infection を合併、術後70日目 PHA 反応の上昇に伴い2回目の急性拒絶反応を認め再び Solu-medrol の pulse therapy, Imuran の増量にて拒絶反応を離脱し、PHA 反応も健康人の20~30%付近で安定、PHA, PWM 反応抑制率も陽性化、又、Con A 反応抑制率は陰性化し、クレアチニンクリアランス (以下 Ccr と略記) も40~50ml/min と低腎機能ながら安定し、術後137日目退院している (図15)。

(2) CD14, 32才, 男性

昭和53年1月21日、57才の donor よりの死体腎移植症例である。術前の幼若化率は、PWM, Con A 反応に比し、PHA 反応は234.4と高値を示している。術後も PHA 反応は高値を示し、Con A 反応抑制率も陽性のままで術後1週間目急性拒絶反応となり、Solu-medrol 計1.5g の pulse therapy を施行、PHA 反応の低下を認め Ccr も改善傾向を認めたが、再び PHA 反応の上昇、PHA, PWM 反応抑制率の陰性化に伴い

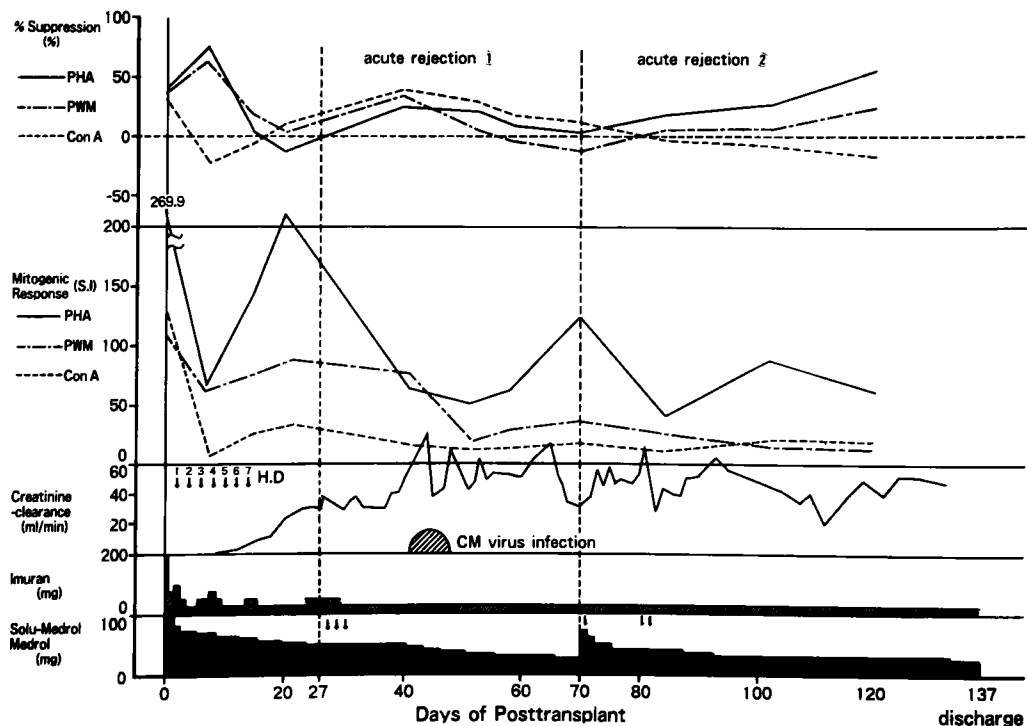


図15 CD 10

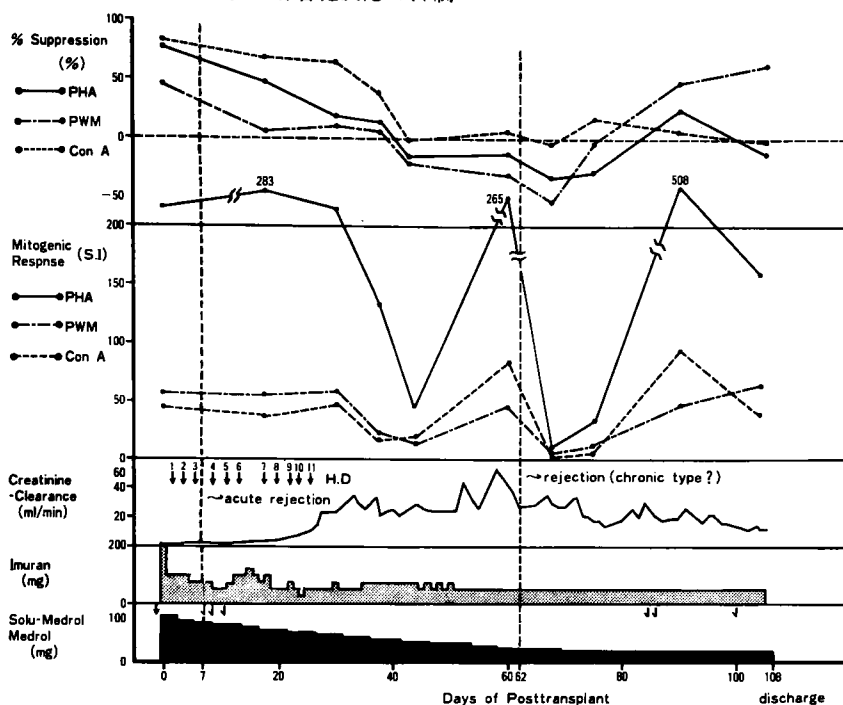


図16 CD 14

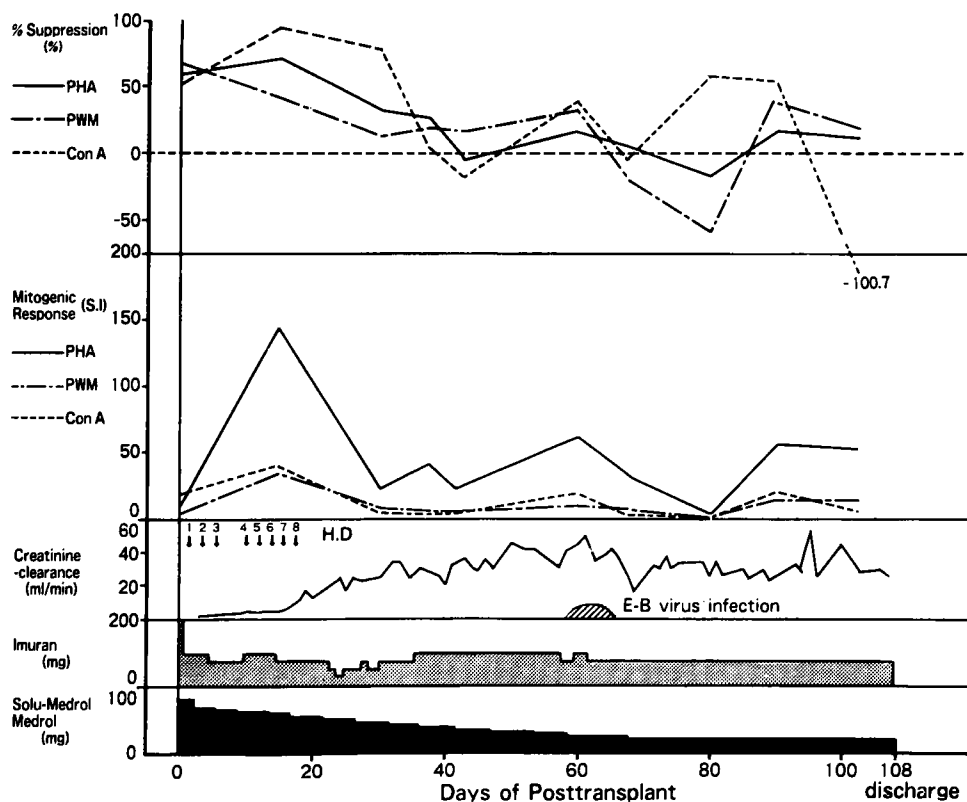


図17 CD 15

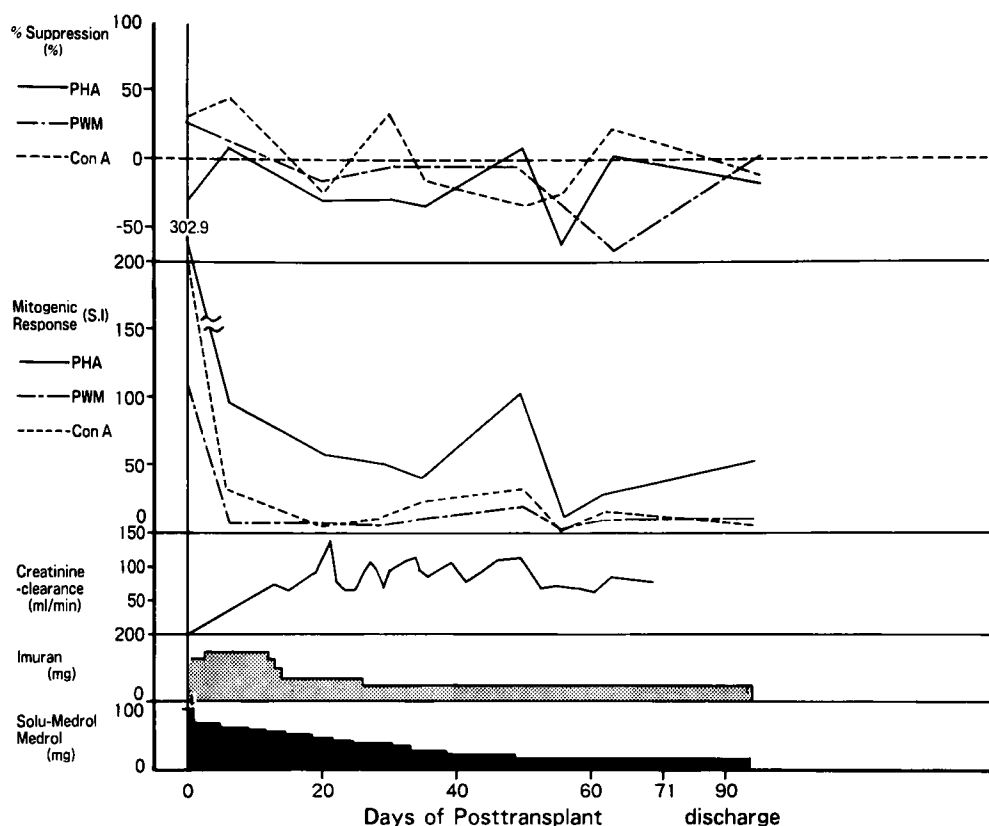


図18 LD 25

術後62日目2回目の急性拒絶反応を認めた。Solu-medrolのpulse therapyにも拘らず、PHA反応は上昇し、Ccrも20ml/min付近と低腎機能の状態であって術後108日目退院している(図16)。

(3) CD15, 46才, 男性

CD14と同一donorよりの死体腎移植症例である。術前の幼若化反応も低値で、術後一過性にPHA反応が147.0と上昇、Con A反応抑制率も陽性のままであったが、臨床的には急性拒絶反応を認めずPHA反応もその後50前後に安定している。Con A反応抑制率も陰性化傾向を認め移植腎機能も徐々に回復を示した。術後60日目頃よりE-B virus感染症を合併するも保存的療法にて治癒し、Ccr 30~40ml/minと安定した腎機能にて術後108日目退院している(図17)。

(4) LD25, 29才, 男性

昭和54年2月1日、母親をdonorとした生体腎移植症例である。術前幼若化反応は全て高値

を示し、急性拒絶反応の出現が強く示唆されたが、術後幼若化反応は低下し、術後49日目一過性にPHA反応の上昇を認めるも臨床的には急性拒絶反応は示さず、術後72日目Ccrも74ml/minと良好な腎機能で退院している。抑制率は、PHA, PWM反応において術後一貫してnegative suppressionの状態を示し、Con A反応においては多少の変動を認めるものの抑制率は低く退院後はnegative suppressionとなっている(図18)。

以上4症例と症例が少なく、また検査間隔が1週間毎のためかなり大まかな動きとしてとらえているためか急性拒絶反応時PHA反応の上昇を認める症例もあるが、逆にPHA反応の上昇にも拘らず急性拒絶反応を示さない症例もある。また抑制率においても、急性拒絶反応時抑制率の低下を認める症例もあるが、抑制率陰性化傾向にも拘らず拒絶反応を示さない症例も存

在し、一定の傾向を認めることは出来なかった。

考 案

以前より腎移植患者の免疫応答能の推移や拒絶反応を予知するために種々の immunological monitoring が行なわれており、標的細胞障害反応を指標とした Cell-mediated lympholysis (CML), Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) などの donor 抗原に特異的な反応と、mitogen による幼若化反応、Spontaneous blastogenesis などの donor 抗原に非特異的な反応とがあり、移植患者の術後管理上有用であるとの報告が多い^{8,9,10)}。しかし特異的な反応は操作の煩雑性、再現性などの問題から一般検査として導入するには困難な点が多い。

そこで本研究では比較的一般検査として容易で再現性のある PHA, PWM, Con A の3種類の mitogen を用い、細胞性免疫能の指標として末梢リンパ球の幼若化反応を、液性免疫能の指標として患者血清による幼若化反応の抑制を用い臨床的有用性を含め検討した。

移植患者の免疫応答能を把握するための control として検討した血液透析患者の幼若化反応は、PHA, PWM 反応において幼若化率の低下を認め、Con A 反応では健康人との間に有意差を認めなかった。田部ら¹¹⁾は、3種類の mitogen を用いた同様の検索で、血液透析患者は、PHA, Con A 反応に低下を認め、PWM 反応は正常であったと異った報告をしている。

一般に慢性透析患者は免疫能低下状態にあるとする報告が多い。松元ら¹²⁾は、末梢血リンパ球の double rosette 形成細胞を FcR⁺-T cell と評価し、透析患者には明らかに FcR⁺-T cell が増加していると述べている。しかも FcR⁺-T cell を suppressor cell と考えた場合、その増加は持続的な異常免疫反応を抑制しようとする生体の免疫調節機構と考えられ、逆に killer cell の増加とすると、FcR⁺-T cell 自体が腎病変の進行に関与している可能性があるとしている。今回の検索で Con A 反応において健康人と透析患者との間に有意差を認めなかったことは Con A により誘導される suppressor T cell の存在が関与しているのかも知れない。そして、PHA,

PWM で誘導される helper T cell, B cell の機能低下が透析患者の免疫能低下の一因をなしている可能性が大きいと考えられる。しかし高橋ら¹³⁾のように、FcR⁺-T cell 数、ADCC 活性とも健康人とほぼ同様であったとする報告もあり、透析状態が大きく影響していると思われる。また PHA 皮内反応も良好な透析状態となれば数ヶ月で陽性傾向を認めるという今川ら¹⁴⁾の報告からも腎不全患者の示す免疫能は、血液透析の良否に大きく左右されていることが推測される。

また血液中に認められる uremic toxin をはじめとした液性因子に関して今回検索していないが、田部ら¹¹⁾は、PHA, PWM, Con A による幼若化反応が透析患者の血漿にて抑制される事を報告し、この抑制は3日以上連続透析例では PWM, Con A 反応において抑制が消失したとし、血液透析により一部の抑制因子は除去可能としている。しかし稲本ら⁶⁾は、尿毒症患者の血清中抑制因子について、抑制効果の発現は分子量30万以上の高分子物質の存在、また DNA 合成を行なうのに必要な物質の欠乏という二つの要因を掲げており、Nelson ら¹⁵⁾も透析により除去されない高分子であるとしている。宮本ら¹⁶⁾は、MLC 反応を用いた尿毒症患者の検索で、リンパ球、血清の両方に MLC を抑制する原因があり特にリンパ球因子にそれが認められたとしている。以上のことから、透析患者の免疫能低下の主体は細胞性免疫能にあると考えられよう。今回の検索でも、PHA, PWM 反応に低下を認めたが健康人に近い症例もあり透析の状態、液性因子の関与が複雑に絡み合っているものと思われる。

腎移植患者の免疫能も透析患者と同様 recall antigen による皮内反応の低下¹⁷⁾、MLC 反応の低下¹⁸⁾などより免疫不全状態として把握され、易感染性¹⁹⁾、悪性腫瘍の発生²⁰⁾などが報告されている。今回の検索でみると、腎移植患者末梢血リンパ球の幼若化反応はいずれの mitogen に対しても AB 血清、自己血清中において健康人に比較して低下が認められた。そして免疫抑制剤が維持量になり移植腎が安定する1年以上経過した状態では健康人に近く回復し1年以内の群と明らかに差を示した。ことにその回復は

PHA 反応において著しい。丹ら²¹⁾も、PHA 反応において移植初期は低下を認めるが2年以降では健康人と同様なしはより高い反応を示しており、T cell機能が正常でもなお移植腎が生着することより移植患者における enhancement 現象あるいは、tolerance が示唆されとしている。また落合ら²²⁾は、PHA, Con A 反応を指標とし、移植患者と健康人との間に有意差を認めないとしている。しかし対象となった症例が免疫抑制剤が維持量となった経過良好例であり、今回の検索と相反しない。草場ら¹⁸⁾も、PHA, PWM, Con A 全ての反応において幼若化能の有意な低下を認め移植患者免疫能低下の主体をリンパ球自体の反応性の低下であると強調している。田部ら²³⁾は、PHA, PWM, Con A 反応において、PHA 反応は $1\mu\text{l/ml}$ の濃度で有意に低値を認めるもその他の濃度では健康人と移植患者間に有意差なく、PWM 反応は低濃度では有意差を認めないが高濃度ではやはり移植患者が有意に低値を示し、Con A 反応は全般に移植患者が低値を示しているが有意差を認めなかったと述べており mitogen の濃度差により幼若化を起こす subpopulation の違いを強調し多種の濃度でのリンパ球培養の必要性があると述べている。今回の検索に使用した mitogen の濃度は、河合ら⁷⁾の報告にあるように、癌患者、移植患者のような免疫能低下状態で最大の反応を得ることを目的として健康人において最大の反応を示した濃度で使用した。確かに PWM 反応に関して、高濃度 PWM は T, B cell mitogen として、また低濃度 PWM は B cell mitogen として報告されているが^{24,25)}、PHA, Con A に関しては後述する如く T cell mitogen として認められており、今回の検索に用いた mitogen 濃度では PHA, Con A 反応が T cell の、また PWM 反応は T, B cell 両方の幼若化能をみていると考えられよう。

腎移植を初めとした移植免疫と癌における腫瘍免疫とは共通の基盤で解析され、癌患者の免疫能の低下には細胞性因子の減弱と血清中に認められる免疫抑制因子が関与していると言われ、ことに免疫抑制因子の解析に焦点が集まっている。Rangel ら²⁶⁾は、Malignant melanoma の患者血清が健康人末梢血リンパ球の PHA, Con A

反応を抑制しことに PHA 反応において強く認められたと述べ、漆崎ら²⁷⁾も消化器癌患者の血清で同様の傾向を報告している。このような抑制因子は癌、移植以外にも種々の肝疾患²⁸⁾、正常妊婦の血清²⁹⁾にも認められている。また免疫抑制因子と tolerance との関連が言われ Good-night ら³⁰⁾は、ラットの heart allograft の実験で長期生着しているラットからの血清を移入すると拒絶反応が数日延びることから、この血清中に抑制因子が存在している可能性があるとして報告している。

今回の検索で移植患者の血清は健康人末梢血リンパ球に対して全ての mitogen 反応で同等の幼若化の抑制を認めた。しかし移植患者自身のリンパ球に対しては PHA, PWM 反応にのみ幼若化反応が有意に抑制され、Con A 反応では有意差を認めなかった。そして具体的に抑制率でみると allosuppression の方が autosuppression より有意に強く認められた。これは先に述べた移植患者末梢血リンパ球の幼若化能の低下と後で述べる血清中に残存しているかも知れない免疫抑制剤の影響が絡んでいるものと思われる。

移植患者における ConA 反応の抑制率をみると移植後1年以上経過した群では有意に低く、しかも negative suppression 症例が増加している。このことは1年以上経過すれば PHA, PWM 反応に対する血清中抑制因子の影響は弱くなり ConA 反応に対する影響が主体となっている可能性があるのかも知れない。草場ら¹⁸⁾は、長期生着例の血清を用いた検索で PHA, Con A 反応の抑制傾向を認め、逆に PWM 反応では抑制の消失傾向を認めたがいずれも有意差はなかったと報告し、長期生着の要因は血清因子より細胞自身の反応性低下にあると述べている。また田部ら¹¹⁾は、PHA, PWM, Con A 反応に対する移植患者血清の抑制を30~40%に認めたとし、さらに拒絶反応群では抑制の消失傾向を、また感染症合併群では100%抑制を認めたと報告し免疫抑制の影響も否定出来ないとしながらも血清中抑制因子、例えば Immunoregulatory α globulin の増加も考えられると結んでいる。

しかしこれら血清中抑制因子を考える場合術後使用される免疫抑制剤の影響も考慮に入れる

必要がある。当科では術後免疫抑制剤として、methylprednisolone と azathioprine を使用している。この steroid hormone が、in vitro でリンパ球幼若化反応を抑制することはすでに Nowell ら³¹⁾によって報告されており、T-rose-tte 形成の減少³²⁾など種々のリンパ球反応を抑制する。リンパ球に対する作用機序は Claman ら³³⁾によると、胸腺における T cell 前駆細胞や PHA 刺激に反応したリンパ球に抑制的に働き、また抗原の刺激に反応した末梢組織のリンパ球に対して抑制的に働くとしている。丹ら³⁴⁾によると、methylprednisolone をラットに10日間連続投与する chronic administration で末梢血リンパ球の PHA 幼若化反応は著明に抑制され、ヒトにおいては 100 μ g/ml の濃度でも十分な抑制効果を認めている。しかし Balow ら³⁵⁾は、モルモットを使用した実験において soluble hydrocortisone の acute administration では MIF 産生、PHA、PWM、Con A 反応には変化を認めず、cortisone の1週間注射による chronic administration では MIF 産生の減少の PPD による増殖の抑制を認めたが、PHA、PWM、Con A 反応には変化を認めておらず glucocorticosteroid のリンパ球 subpopulation に対する感受性の差であろうと推論している。

azathioprine の免疫抑制作用は山田ら³⁶⁾、Brown ら³⁷⁾の報告があり、Brown らは、ヒトのリンパ球を用い mitogen による幼若化反応、MLC、MIF、CML、ADCC について検討し、PHA、Con A 反応は著明に抑制されるが PWM 反応の抑制には大量の azathioprine を要するとし、MLC の抑制を認めたが MIF 産生、CML、ADCC にはあまり抑制力を認めなかったと述べている。以上の如く免疫抑制剤の長期使用がリンパ球幼若化能低下の一因になっているのは疑いのない事実であり、免疫抑制剤が維持量になると幼若化能の回復を認めることから理解出来る。

しかし血清中抑制因子の検索で早坂ら³⁸⁾は、移植患者の血漿を分子濾過膜を通し分離して得られた soluble factor がリンパ球の PHA 反応や MLC を抑制したとし、免疫抑制剤は分子濾過膜で除去され、しかも移植腎機能低下時に増

加する Urea-N、クレアチニン、グアンジン誘導体は透析性があること、spontaneous blastogenesis や soluble factor による抑制力が免疫抑制剤の投与量に相関していないことを掲げ移植患者血漿中の suppressor soluble factor の関与を推論している。

いずれにしても免疫抑制剤の影響は充分考慮する必要があり免疫抑制剤の効果を間接的に観察している可能性が考えられる。しかし移植後1年以上経過しリンパ球の幼若化能の回復にも拘らず移植腎の生着を認めることは血清中抑制因子の関与があるものと思われる。

1960年 Nowell ら³⁹⁾による PHA の発見以来、リンパ球の幼若化を引き起こす各種 mitogen の発見と、リンパ球の subpopulation の研究の進歩により mitogen とリンパ球 subpopulation の関係が明らかにされつつある。従来 PHA と Con A は非特異的な T cell mitogen と考えられていたが、Stobo ら^{40,41)}により PHA と Con A が異った T cell subpopulation を刺激すると報告されたのに始まり、Stout ら⁴²⁾は、マウスの脾細胞において IgG 抗体の Fc 部分が T cell 表面の Fc receptor と結合するか否かで FcR⁺-T cell と FcR⁻-T cell に分け、IgG $\cdot$ FcR⁺-T cell は IgG $\cdot$ FcR⁻-T cell に比べ PHA に対する反応性は不良で Con A に対する反応性は良好であると述べている。そしてヒトにおいても Morretta ら^{43,44)}は、IgG の Fc 部分に対する Fc receptor を有する T cell を T γ cell と、また IgM の Fc 部分に対する Fc receptor を有する T cell を T μ cell と分類し、末梢血 T cell の20%以下が T γ cell、約75%が T μ cell であることを報告している。しかも Con A に対しては T γ 、T μ cell の両方が反応するが、PHA に対しては T γ cell の反応は弱く、また PWM を用いた B cell の IgM 産生能でみると helper 作用を有するのは T μ cell であり、suppressor 作用を有するのは T γ cell に属すると述べている。新保ら⁴⁵⁾も、癌患者の IgG $\cdot$ FcR⁺-T cell の検索より PHA に対する反応性の不良のものほど IgG $\cdot$ FcR⁺-T cell の百分率が高いという逆相関の関係を示し、また T cell の helper 能と IgG $\cdot$ FcR⁺-T cell 百分率にも逆相関を認め、IgG $\cdot$ FcR⁺-T

cell は suppressor T cell だとする意見を支持すると述べている。その他、Con A で健康人の末梢血リンパ球を刺激すると MLC を抑制する suppressor T cell が出現するという事実⁴⁶⁾などからも、Con A 反応では主として suppressor T cell が誘導されているものと思われる。

今回の検索にて移植後1年以上経過した経過良好群では Con A 反応において AB 血清添加培養と自己血清添加培養で有意差がないという事実、また抑制率の陰性化症例の増加という事実は Con A で誘導される suppressor T cell の相対的増加、suppressor T cell の促進効果を引き起こすような血清因子の存在を考えると理解出来ると思われる。

PWM も当初 T B cell を刺激する mitogen として注目されていたが、Waxdal ら⁴⁷⁾により、PWM が5つの成分に分離され4つは T cell mitogen でありポリマーを形成している分子量の一番大きな蛋白質 (Pa-I) のみ T B cell 両方を刺激するものとし、笠原ら⁴⁸⁾も、PWM は B cell 単独では全く反応を起こさず T cell 単独の場合より B cell が数%混入する方がより強い刺激効果を認めたとし、T-B interaction の効果としている。今回の検索では T B cell を分離していないので PWM 反応において B cell の幼若化能を幾分なりとも反映しているものと考えられる。

以上のような腎移植患者の免疫能を基盤にして拒絶反応と幼若化反応の関係ならびに抑制反応との関係を検討してみると、術前の PHA 反応において幼若化亢進例では有意の差で急性拒絶反応の出現を認めた。Jones ら⁴⁹⁾も、術前の PHA 反応は術後3～6ヶ月の所謂急性拒絶反応と大いに相関していたと述べており、浅原ら⁵⁰⁾も、PHA 反応が 30,000 c.p.m 以上を示す T cell reactivity の強い症例では拒絶反応の出現頻度が高いと述べている。また術前の幼若化抑制率と急性拒絶反応の出現に関しては、3種類全ての mitogen において有意差を認めず急性拒絶反応においては細胞性因子の影響が主体となっているのは間違いないと思われる。

術後発生する拒絶反応の予知に関して、Thomas ら⁵¹⁾は、術後1ヶ月の PHA 反応が健康人の

50%以上に亢進している症例においては80%以上拒絶反応の出現を認め、Con A 反応においては相関を認めなかったと報告している。Chatterjee ら⁵²⁾は、PHA, PWM, Con A, LPS による幼若化反応を用い、PHA, PWM 反応が移植腎機能の指標として有用であったと述べている。確かに今回個々の症例の mitogen response の推移、ことに急性拒絶反応時の幼若化反応の動きをみると、それぞれの mitogen 単独では PHA 反応亢進時に拒絶反応の出現を示す症例もあるが、逆に PHA 反応亢進時でも拒絶反応を示さない症例もあり一定の傾向を捕えられなかった。Páge⁵³⁾、草場ら¹⁸⁾のように PHA 反応と拒絶反応には相関性を認めないとする報告もある。しかし八木⁵⁴⁾は、PHA, PWM, ATG を用い個々の反応単独では移植成績との関連を認めず、PHA, PWM 反応合併群、PHA, PWM, ATG 反応合併群ではその反応性と6ヶ月生着率と正の相関を認めたとし、PHA, PWM 反応を組み合わせれば充分移植成績を予測出来るとしている。

次に慢性拒絶反応時における検討では PWM 反応においてのみ拒絶反応群に有意に高値を認めた。確かに慢性拒絶反応の診断時期の問題、ならびに経過良好群のどの時期の幼若化率を対象にするかという問題はあるが、PWM 反応亢進例に慢性拒絶反応を認めたことは興味ある事と思える。田部ら²³⁾も、経過不良群に PWM 反応亢進例を多く認めたとし B cell の反応性が移植腎の生着に大きな影響を与えている可能性があるかと結んでいる。B cell の DNA 合成能と抗体産生能とは必ずしも一致しないのは周知の事実であるが PWM 反応において有意差を認めたことは PHA, Con A に反応するリンパ球以外の subpopulation、換言すれば B cell の関与と推測出来るよう。

抑制反応と拒絶反応の検索で、Con A 反応にのみ有意に抑制率が低くことに negative suppression 症例を多く認めた。このことは前述した如く Con A にて誘導されるのが suppressor T cell とすると、経過良好群の血清中に suppressor T cell を activate する液性因子の存在を示唆しているのかも知れない。

拒絶反応前後で抑制率の推移をみると、CD

14, CD15 のように PHA, PWM 反応抑制率が拒絶反応時陽性から陰性へ変化する傾向は認められたが, LD15 のように良好な経過にも拘らず PHA, PWM 反応抑制率は陰性の症例もあり, Con A 反応抑制率においても一定の傾向は認められず急性拒絶反応の予知には抑制率の推移の診断的価値は少ないと考えられる。しかし田部ら¹¹⁾は, 拒絶反応時自己血漿による幼若化率が control 血漿添加培養の反応値より逆転上昇する症例を認めたとしながらも全例ではなく, また血漿の抑制を認めない症例は将来拒絶反応を招来する可能性もあり, 拒絶反応の危険性も考え免疫抑制剤の増量が必要であろうと述べている。

以上のように治療により回復の可能性のある急性拒絶反応においては, PHA 反応の明らかな上昇が補助診断上有用と思われる, 1 年以上経過し PWM 反応が高値を示し Con A 反応抑制率の高い症例は経過不良すなわち慢性拒絶反応への移行が示唆されると思われる。しかし症例で提示したように PHA 反応が高値をとっても臨床的には拒絶反応を認めない症例もあり, mitogen による幼若化反応で拒絶反応を予知することは補助的診断の域を出ないと考えられる。

ま と め

岡山大学第 1 外科教室で施行された生体腎移植, 死体腎移植 33 例を対象に非特異的 mitogen である PHA, PWM, Con A を用い, 腎移植患者末梢血リンパ球の幼若化反応とそれに対する患者血清による抑制について検討した。さらに拒絶反応と幼若化反応ならびに抑制率について検討し以下のような結果を得た。

1. 待期手術のため当院で週 3 回の血液透析を受けている透析患者において, PHA 反応 ($P < 0.05$), PWM 反応 ($P < 0.01$) の幼若化率の

低下を認めた。

2. 移植患者の幼若化反応は, PHA, PWM, Con A 全ての mitogen に対して健康人より有意に ($P < 0.01$) 低下していた。

3. 腎機能が安定した移植患者の幼若化反応は, 1 年以降全ての mitogen において明らかな回復を認めた ($P < 0.05$)。

4. 移植患者の血清は, 健康人末梢血リンパ球の全ての mitogen による幼若化反応を明らかに抑制した ($P < 0.05$)。

5. 移植患者の血清は, 自己末梢血リンパ球に対し, PHA, PWM 反応のみ有意に ($P < 0.05$) 抑制し, Con A 反応では有意差を認めなかった。

6. 良好な腎機能を有する 1 年以上長期生着例では, 自己血清による Con A 反応の抑制は明らかに弱く陰性例を多く認めた ($P < 0.05$)。

7. 急性拒絶反応群は, 術前の PHA 反応において有意に高値を示した ($P < 0.05$)。

8. 慢性拒絶反応群は, PWM 反応の高値を認め ($P < 0.05$), また Con A 反応の抑制率も高値を示した ($P < 0.01$)。

9. 拒絶反応の診断には症例が少なく一定の傾向を示していないが, PHA, PWM 反応の明らかな上昇ならびに Con A 反応抑制率の上昇が補助診断として意義あるものと思われる。

稿を終るにあたり, 御校閱を賜りました折田薫三教授に感謝の意を表します。また終始御指導, 御教示頂きました阪上賢一講師並びに本研究に御協力頂いた教室の諸先生, 研究室の諸嬢に心から感謝致します。

なお本論文の要旨は第 14 回日本移植学会, 第 15 回同学会にて発表した。

文 献

1. Williams, G.M.: Progress in clinical renal transplantation. *Transplant. Proc.* 11, 4—10, 1979.
2. Moen, T., Albrechtsen, D., Flatmark, A., Jakobsen, A., Jervell, J., Halvorsen, S., Solheim, B.G. and Thorsby, E.: Importance of HLA-DR matching in cadaveric renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 303, 850—854, 1980.
3. 草場亮輔, 稻生綱政: 1980年度腎移植臨床登録集計報告. 移植, 16, 258—262, 1981.
4. 折田薫三: 担癌患者の免疫機能. 最新医学, 33, 1521—1527, 1978.
5. Dupuy, J.M., Tardieu, M. and Héry, C.: Inhibition of phytohaemagglutinin transformation by serum of patients with fulminant viral hepatitis. *Lancet* ii, 578—579, 1976.
6. 稲本 元, 稲本伸子: ヒトリンパ球の DNA 合成を抑制する尿毒症患者血清因子. 臨床免疫, 9, 699—704, 1977.
7. 河合知則: 各種 mitogen に対する癌患者末梢血リンパ球の幼若化反応. 岡山医会誌, 91, 697—711, 1979.
8. Thomas, J., Thomas, F., Mendez-Picon, G. and Lee, H.: Immunological monitoring of long-surviving renal transplant recipients. *Surgery* 81, 125—131, 1977.
9. Stiller, C.R. and Sinclair, N.R. StC.: Monitoring of rejection. *Transplant. Proc.* 11, 343—349, 1979.
10. Miller, J., Kyriakides, G. and Flaa, C.: Long-term follow-up of renal transplant recipients using immunologic monitoring. *Transplant. Proc.* 11, 360—363, 1979.
11. 田部康次, 福田康彦, 八幡 浩, 小野栄治, 土肥雪彦, 江崎治夫: 腎移植患者, 血液透析患者および癌末期患者における末梢血リンパ球のマイトゲン反応に対する autoplasmic inhibition の検討. 移植, 15, 63—73, 1980.
12. 松元 正, 宮沢修三, 上村伸一郎, 尾辻義人, 橋本修治, 松元 実, 柚木一雄: 慢性腎不全患者における IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の動態. 医学のあゆみ, 103, 752—753, 1977.
13. 高橋 寿, 安保 徹, 太宰幸子, 高橋一江, 石崎 九, 門間弘道, 関野 宏, 金田 巖, 里見 進, 熊谷勝男: 生体腎移植患者および慢性腎不全患者の antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. 医学のあゆみ, 107, 387—390, 1978.
14. 今川章夫, 海部泰夫, 滝川 浩: 透析患者の phytohaemagglutinin 皮内テスト. 腎と透析, 4, 195—198, 1978.
15. Nelson, D.S. and Penrose, J.M.: Effect of hemodialysis and transplantation on inhibition of lymphocyte transformation by sera from uremic patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 143—146, 1975.
16. 宮本克彦, 小崎正己, 高橋雅俊, 佐丸義雄, 藤井源七郎: 血液透析患者の MLC 反応. 腎と透析, 3, 695—700, 1977.
17. 八幡 浩, 福田康彦, 浅原利正, 田部康次, 表原多文, 土肥雪彦, 江崎治夫: 移植腎長期生着例における免疫能. 臨床免疫, 10, 268, 1977.
18. 草場亮輔: 腎同種移植後の免疫動態. 移植, 16, 508—516, 1981.
19. Eickhoff, T.C., Olin, D.B., Anderson, R.J. and Schafer, L.A.: Current problems and approaches of diagnosis of infection in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 4, 693—697, 1972.
20. Penn, I.: Development of cancer as a complication of clinical transplantation. *Transplant. Proc.* 9, 1121—1127, 1977.
21. 丹 正義, 西平哲郎, 田口喜雄, 堤 栄昭, 葛西森夫: 腎移植患者の免疫能. 臨床免疫, 10, 741—746, 1978.
22. 落合武徳, 鈴木盛一, 大森耕一郎, 渡辺一男, 丸尾亜莉沙, 雨宮 浩, 宮島哲也, 佐藤 博: 腎移植患者

- の免疫能。臨床免疫, 9, 819, 1977.
23. 田部康次, 土肥雪彦, 福田康彦, 浅原利正, 八幡 浩, 小野栄治, 田中一誠, 山根修治, 辰川自光, 井藤久雄, 竹中正治, 江崎治夫: 腎移植患者の ConA, PWM, PHA, 各 mitogen に対する反応。移植, 14, 76—80, 1979.
 24. Biberfeld, P. and Mellstedt, H.: Selective activation of human B-lymphocytes by suboptimal doses of Pokeweed mitogen. *Exp. Cell. Res.* 89, 377—388, 1974.
 25. Mellstedt, H.: In vitro activation of human T and B lymphocytes by Pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.* 19, 75—82, 1975.
 26. Rangel, D.M., Golub, S.H. and Morton, D.L.: Demonstration of lymphocyte blastogenesis-inhibiting factors in sera of melanoma patients. *Surgery* 82, 224—232, 1977.
 27. 漆崎一朗, 後町洋一, 長井忠則, 西条 登, 小山隆三, 福田守道: がん血清中のリンパ球の PHA 反応抑制因子。最新医学, 29, 1974.
 28. 門馬 孝, 鈴木健二, 大川正臣, 川部汎康, 奈良秀八洲, 吉田 豊: A 型肝炎における細胞性免疫学的検討。臨床免疫, 10, 1041—1046, 1978.
 29. Kasakura, S.: A factor in maternal plasma during pregnancy that suppresses the reactivity of mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 107, 1296—1301, 1971.
 30. Goodnight, J.E., Coleman, D.A. and Steinmuller, D.: Serum-blocking factors versus specific cellular tolerance in long-term survival of rat heart allografts. *Transplantation* 22, 391—397, 1976.
 31. Nowell, P.C.: Inhibition of human leukocyte mitosis by prednisolone in vitro. *Cancer Res.* 21, 1518—1521, 1961.
 32. Bach, J.F., Duval, D., Dardenne, M., Salomon, J. C., Tursz, T. and Fournier, C.: The effects of steroids on T cells. *Transplant. Proc.* 7, 25—30, 1975.
 33. Claman, H.N.: Corticosteroids and lymphoid cells. *N. Engl. J. Med.* 287, 388—397, 1972.
 34. 丹 正義, 西平哲郎, 堤 栄昭: Methylprednisolone の T リンパ球におよぼす影響。移植, 11, 239—243, 1977.
 35. Balow, J.E., Hurley, D.L. and Fauci, A.S.: Immunosuppressive effects of glucocorticosteroids. *J. Immunol.* 114, 1072—1076, 1975.
 36. 山田 尚, 溝口靖紘, 門奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司: 各種免疫抑制剤の in vitro におけるリンパ球幼若化反応に及ぼす影響について。臨床免疫, 10, 55—62, 1978.
 37. Brown, T.E., Ahmed, A., Filo, R.S., Knudsen, R.C. and Sell, K.W.: The immunosuppressive mechanism of azathioprine. *Transplantation* 21, 27—35, 1976.
 38. 早坂勇太郎, 東間 紘, 高橋公太, 鳴海福星, 山縣 淳, 安尾美年子, 西川 恵, 伊藤克己, 阿岸鉄三, 太田和夫: 腎移植後の患者血漿における suppressor soluble factor の検討。移植, 17, 73—81, 1982.
 39. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin, an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462—468, 1960.
 40. Stobo, J.D., Rosenthal, A.S. and Paul, W.E.: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. *J. Immunol.* 108, 1—17, 1972.
 41. Stobo, J.D. and Paul, W.E.: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. *J. Immunol.* 110, 362—375, 1973.
 42. Stout, R.D. and Herzenberg, L.A.: The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 142, 1041—1051, 1975.
 43. Moretta, L., Ferrarini, M., Mingari, M.C., Moretta, A. and Webb, S.R.: Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J. Immunol.* 117,

- 2171—2174, 1976.
44. Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. and Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations. *J. Exp. Med.* **146**, 184—200, 1977.
 45. 新保敏和, 矢田純一, 日江井歌子, 菅原真智子, 斉藤祺一, 谷村 修: 悪性固型腫瘍患者における IgG-Fc リセプター陽性 T 細胞の意義について. *臨床免疫*, **9**, 487—493, 1977.
 46. Shou, L., Schwartz, S.A. and Good, R.A.: Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. *J. Exp. Med.* **143**, 1100—1110, 1976.
 47. Waxdal, M.J.: Isolation, characterization, and biological activities of five mitogens from Pokeweed. *Biochemistry* **13**, 3671—3677, 1974.
 48. 笠原 忠, 金 衡仁, 伊藤喜久, 河合 忠, 森田 守: 扁桃および末梢血から高度に精製された T・B リンパ球の各種 mitogen に対する反応性. *臨床免疫*, **10**, 68—76, 1978.
 49. Jones, A.R., Vaughan, R.W., Bewick, M. and Batchelor, J.R.: Transformation of lymphocytes from patients awaiting cadaver renal transplants. *Lancet* **ii**, 529—531, 1976.
 50. 浅原利正, 福田康彦, 小野栄治, 田部康次, 八幡 浩, 辰川自光, 田中一誠, 山根修治, 土肥雪彦, 江崎治夫: 腎移植患者における末梢血リンパ球 PHA 反応測定の意味. *移植*, **13**, 185—189, 1978.
 51. Thomas, F., Lee, H.M., Wolf J.S., Mendez-Picon, G. and Thomas, J.: Monitoring and modulation of immune reactivity in human transplant recipients. *Surgery* **79**, 408—413, 1976.
 52. Chatterjee, S.N., Gershwin, M.E. and Eckles, D.: Characterization and alterations of lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* **11**, 374—378, 1979.
 53. Páge, D., Posen, G., Stewart, T. and Harris, J.: Immunological detection of renal allograft rejection in man. *Transplantation* **12**, 341—347, 1971.
 54. 八木禧徳, 柏木 登: PHA, ATG および PWM 反応の加齢変化と腎臓移植成績との関連性. *移植*, **14**, 81—86, 1978.

Induction of blastogenesis of peripheral lymphocytes by various mitogens and suppression of blastogenesis by sera in renal allograft recipients.

Yojiro ORITA

The 1st Department of Surgery, Okayama University Medical School.

Director: Prof. K. Orita

It has been reported that a decrease in cellular immunity occurs and a serum immunosuppressive factor exists in uremic patients. In this study, we attempted to examine the change in cellular immunity after renal transplantation, the serum immunosuppressive factor and the usefulness of mitogenic blastogenesis for immunological monitoring.

Peripheral blood lymphocytes were isolated by the Ficoll-Conray gradient from 10 ml of fresh heparinized blood obtained from renal allograft recipients and healthy individuals. Serum was isolated from 10 ml of fresh nonheparinized blood and added in culture after inactivation and sterilization. Pooled AB serum was used for control. Lymphocytes were adjusted to a concentration of $5 \times 10^5/\text{ml}$ in RPMI, supplemented with $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin and 20% patient's serum or AB serum, and then to $200 \mu\text{l}$ of this suspension, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen and concanavalin A were dispensed. The culture was incubated for 72 hrs in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and air, after which $1 \mu\text{Ci}$ tritiated thymidine was added to each well and the incubation continued for 24 hrs. The contents of each well were transferred to glassfiber filters, and the amount of isotope incorporated was determined in a liquid scintillation counter.

PHA and PWM blastogenesis of patients treated with hemodialysis were significantly decreased. PHA, PWM and Con A blastogenesis of renal allograft patients were significantly decreased, but turned to recover 1 year after renal transplantation. Sera of renal allograft patients suppressed all kinds of blastogenesis of healthy individuals, but only PHA and PWM blastogenesis of renal allograft patients themselves. In renal allograft patients with good renal function 1 year after transplantation, Con A auto-suppression was very weak and negative suppression increased significantly. There were correlations between preoperative PHA blastogenesis and acute rejection, and between postoperative PWM blastogenesis and chronic rejection.

From these findings, it is concluded that clear elevation of PHA, PWM blastogenesis and suppression of Con A blastogenesis are slightly useful for immunological monitoring of acute and chronic rejection.