Osaka University Knowledge Archive

Title	NITRIC OXIDE PRODUCTION BY BRONCHOALVEOLAR CELLS DURING ALLOGRAFT REJECTION THE RAT
Author(s)	内海, 朝喜
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43029
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 63 】

氏　　名	内　海　朝　喜（うつみ　ともき）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14981　号
学位授与年月日	平成11年10月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	NITRIC OXIDE PRODUCTION BY BRONCHOALVEOLAR CELLS DURING ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT （ラット肺移植急性拒絶モデルにおける気管支肺胞洗浄細胞の一酸化窒素産生に関する検討）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 松田　暉 （副査） 教 授 白倉　良太　教 授 真下　節

論 文 内 容 の 要 旨

［目的］

肺移植は、末期的状態にあるさまざまな呼吸器疾患の治療法としてほぼ確立している。しかし、急性拒絶は依然として移植後早期における重大な合併症のひとつである。さらに、急性拒絶の頻度や重症度は、肺移植術後遠隔期死亡の原因として最も頻度の高い、閉塞性細気管支炎の危険因子となるとも考えられている。急性拒絶は、症状あるいは胸部X線所見によって臨床的に診断され、経気管支肺生検（TBLB）によって確定診断が下される。TBLBは気胸、肺出血などの合併症を伴うので、より侵襲の少ない診断方法の確立が望まれる。

一酸化窒素（NO）はL-アルギニンからNO合成酵素（NOS）によって産生されるフリーラジカルである。NOSは構成型と誘導型（iNOS）とに分類され、iNOSはより多量のNOを産生し、免疫反応に関与するとされる。ラット肺移植急性拒絶モデルにおいて、呼気中のNOが増加することを、我々はすでに報告した。NOの最終代謝産物であるNO_2^-/NO_3^-の血中濃度が急性拒絶の指標として有用であるとの報告もあるが、呼気中のNOはより鋭敏な指標であった。

呼気中のNOは主として肺胞マクロファージや肺胞内浸潤細胞によって産生されると考え、これらの細胞を回収するために気管支肺胞洗浄（BAL）を施行し、産生されるNOを定量した。また、これらの細胞から産生されるNOが急性拒絶の診断上の指標として有用であるかどうかを検討した。

［方法］

ラット左肺移植を異系群（ドナーBN→レシピエントLEW）と同系群（LEW→LEW）に行い、レシピエントを3日目または5日目に犠牲死させた（それぞれn=6）。免疫抑制剤は投与しなかった。この間に、以下の測定を行った。

1）術後2日目から犠牲死させるまで毎日、レシピエントに麻酔、挿管し、強制換気により呼気を回収し、そのNO濃度を測定した。

犠牲死させる際に、

2）血液を採取し、血漿NO_2^-/NO_3^-を測定した。

3）心停止30分後に、再び呼気を回収し、呼気 NO を測定した。

4）BAL を移植肺に施行し、回収された細胞数を計数した。また、回収細胞を気密容器で 3 時間培養し、その気相内の NO を測定した。

5）移植肺を摘出、固定し、パラフィン切片にて急性拒絶の Grade を診断した。

6）また、別のラットにて、BAL 回収細胞の iNOS mRNA と iNOS 蛋白の発現を検索するために、RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) と免疫細胞染色を行った。

[成績]

1）組織診断では、同系群では急性拒絶は認められなかった。異系群では、3 日目に Grade I-II、5 日目に Grade III の急性拒絶を認めた。

2）BAL 細胞培養気相内の NO は、同系群では検出されなかった。異系群では 3 日目に検出され (11.8±2.0 ppb)、5 日目にはさらに増加した (115.3±66.9 ppb)。

3）呼気 NO は同系群では全経過を通じて検出されなかった。異系群では 2 日目には検出されなかった。3 日目に 3/6 匹で検出され、5 日目には有意な増加を認めた (11.6±3.4 ppb)。

4）心停止後の呼気 NO は心停止前よりも高く、検出された NO の大部分は肺で産生されたものであることが示唆された。

5）BAL 細胞の産生した NO と、呼気 NO は、急性拒絶の Grade と有意な相関が認められた ($\rho=0.862$、$P<0.005$；$\rho=0.692$、$P=0.029$)。急性拒絶の Grade の増加につれて、BAL 細胞の産生した NO は呼気 NO に比べてより大きく増加した。

6）血漿 NO_2^-/NO_3^- は 3 日目には異系群・同系群で差が認められなかった。5 日目には異系群 (29.9±8.1 μM) で同系群 (0.5±1.0 μM) に比して有意に増加したが、異系群の 3 日目と比較して有意ではなかった。

7）BAL 回収細胞は、3 日目 (2.5 ± 1.0 vs $7.6\pm5.1\times10^6$)、5 日目 (3.2 ± 0.6 vs $18.3\pm6.8\times10^6$) ともに異系群が同系群よりも多かった。

8）BAL 回収細胞の iNOS mRNA の発現は、同系群では認められなかったが、異系群の 3 日目、5 日目でともに認められた。

9）BAL 細胞の免疫染色では、マクロファージとリンパ球に中等度から強度の免疫反応性が認められ、好中球に弱い反応性が認められた。

[総括]

ラット肺移植急性拒絶モデルにおいて、BAL を施行し、回収細胞の NO 産生、iNOS mRNA、iNOS 蛋白の発現について検討した。拒絶されている移植肺からの BAL 回収細胞のマクロファージ、リンパ球、好中球が iNOS を発現し、NO の産生が認められた。BAL 回収細胞の産生する NO の定量は、呼気 NO や血漿 NO_2^-/NO_3^- に比してより拒絶早期に検出され、肺移植における急性拒絶の診断の指標として有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

肺移植後の急性拒絶は、移植後早期における重大な合併症のひとつである。確定診断は経気管支肺生検 (TBLB) によって下されるが、より侵襲の少ない診断方法の確立が望まれる。ラット肺移植急性拒絶モデルにおいて、呼気中の NO が増加し、急性拒絶の指標として NO の最終代謝産物である NO_2^-/NO_3^- の血中濃度よりも有用であることをすでに報告した。本研究では、呼気 NO の産生源と考えられる肺胞マクロファージや肺胞内浸潤細胞を回収するために気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現と産生される NO を検出した。また、これらの細胞から産生される NO が急性拒絶の診断上の指標として有用であるかどうかを検討した。

ラット左肺移植を異系・同系の組み合わせにて行い、それぞれの群について、BAL 回収細胞の産生する NO、その

iNOS mRNA と iNOS 蛋白の発現、呼気 NO、血清 NO_2^-/NO_3^- を測定した。また、急性拒絶の進行度と BAL 回収細胞の産生する NO、呼気 NO の相関について検討した。その結果、BAL 回収細胞の産生する NO は、同系群では検出されず、異系群では、急性拒絶の早期から有意に高値であった。呼気 NO や血清 NO_2^-/NO_3^- は、早期では同系群と差がなく、中等度の急性拒絶において有意な増加を認めた。また、急性拒絶の進行度と呼気 NO、BAL 回収細胞の産生する NO の間にそれぞれ有意な相関関係を認めた。さらに、異系群の BAL 回収細胞から抽出した RNA に iNOS mRNA が発現しており、このうち、マクロファージ、リンパ球、好中球にて iNOS 蛋白の発現が示された。

これらの結果は、肺移植後の急性拒絶において NO を産生する細胞を同定し、また、BAL 回収細胞の産生する NO の急性拒絶の指標としての臨床的応用への可能性を示したもので、学位に値すると考えられる。