

# 腎移植患者における EAC ロゼット阻止試験 を用いた Immune Complex 測定の試み

岡山大学医学部第一外科学教室（主任：折田薫三教授）

藤 原 徹

（昭和56年11月17日受稿）

Key words : 腎移植, 拒絶反応,  
EAC ロゼット阻止試験,  
Immune Complex

## 緒 言

今日、病変成立に免疫学的機序の想定される種々の血管炎や糸球体腎炎、慢性関節リウマチ、SLE等の疾患の発症には、immune complex (IC) が関与していると考えられており、血中および組織中の IC を検出するいろいろの方法が開発されている。しかし、IC の生成自体は合目的な防禦反応であり、多くの場合網内系細胞の貪食によって迅速に処理されている。しかし、その量が一定の範囲を越えると流血中に溶けこんだ型の循環免疫複合体 circulating immune complex (circulating IC) として存在し、補体系を活性化して組織に沈着し、組織障害性を発揮する事になる<sup>1,2,32)</sup>。

ヒト同種腎移植においては、ドナーとレシピエントの間の組織適合抗原差を反映して、細胞性および液性の同種移植免疫反応が複雑に関与しながら進行し、ある時は急速な移植腎機能の低下を示す急性拒絶反応として、またある時は数ヵ月から数年に亘って徐々に移植腎機能の低下を示す慢性拒絶反応として移植腎の組織障害性を招来している。急性拒絶反応には細胞性免疫反応が、慢性拒絶反応には液性免疫反応が主として関与しているといわれているが、拒絶腎や長期生着腎の糸球体に免疫グロブリンと補体が顆粒状に沈着している像がみられ<sup>3,4)</sup>、腎移植後の拒絶反応に IC が強く関与している事が示唆されている。

このように IC が移植腎に組織障害性を示すこ

とは蛍光所見からほぼ確実のようであるが、circulating IC と拒絶反応との相関性については未だ報告も少なく、その測定方法も含めて論議のあるところである<sup>5)-11)</sup>。

一般に IC の検出方法には、物理化学的に間接証明する方法と、レセプターを利用して免疫生物学的に直接証明する方法とがある<sup>13)</sup>が、未だ特異性に優れた方法はみい出されていない<sup>13-15)</sup>。今回 circulating IC 検出に用いた EAC ロゼット阻止試験は、1974年 Ezer ら<sup>12)</sup>、1975年 Smith ら<sup>16)</sup>によって開発されたものである。その原理は次のごとく考えられている。すなわち、ヒト B 細胞は補体第 3 成分 (C<sub>3</sub>) のフラグメント C<sub>3b</sub> および C<sub>3d</sub> に対するレセプターを有し、EAC (補体と反応した感作羊赤血球で表面に C<sub>3b</sub> あるいは C<sub>3d</sub> を持つ) と C<sub>3b</sub> あるいは C<sub>3d</sub> レセプターを介してロゼット形成することが知られている。

一方、IC は抗原と抗体が結合して形成されており、活性化された補体第 3 成分 C<sub>3b</sub> と C<sub>3d</sub> を持っている。従って、IC を含有する血清をヒト B 細胞に作用させると、C<sub>3</sub> を介して血清中の IC はすみやかにヒト B 細胞と結合するため、この B 細胞に EAC を作用させてもロゼットの形成が抑制されてしまうことになる。

このように、本法は Raji cell radio immuno assay 法<sup>18)</sup>と同様に B リンパ球膜上に存在する C<sub>3</sub> レセプターを介して IC の存在を知る方法であり、特別な設備も不必要で、操作が簡単であるという臨床上有用な方法である。著者は腎移

植患者において、EAC ロゼット阻止試験を施行し、慢性拒絶反応症例に EAC ロゼット阻止活性が有意に高いことを明らかにし、慢性拒絶反応に circulating IC が強く関与している成績がえられたので報告する。

### 対象及び方法

#### A. 検索対象

岡山大学第一外科において、昭和49年3月から昭和54年10月までに施行された腎移植例は51例で、そのうちの死体腎移植11例、生体腎移植14例の計25例を検索対象として拒絶反応に関して以下のように3群に分けて検討を行った。なお、拒絶反応の分類については Flanigan ら<sup>19)</sup>の基準に従った。

1. 移植後拒絶反応がないか、または一年以上腎機能良好な群 (N=10)
2. 移植後比較的早期に拒絶反応を生じた急性拒絶反応群 (N=8)
3. 移植後半年以上経過し、漸次腎機能が悪化して不可逆性の腎機能低下を生じた慢性拒絶反応群 (N=7)

各症例の移植後経過の概略、拒絶時期および検索血清採取時期は(図1)に示してある。なお、慢性拒絶反応群では原則として、臨床的に慢性拒絶期と診断された後4ヵ月以内に血清を

採取した。以上3群の血清の他、control に使用した正常人血清を含め、総検体数105例について次に示すような方法でEAC ロゼット阻止試験を行った。

#### B. 方法

##### 1. 患者血清の採集

腎移植患者から移植前後で定期的に採血し、室温にて凝固させた後に分離して、原則として-70℃に分注保存した。そしてその血清を、各症例につき2検体ずつ実験に供した。

##### 2. 末梢リンパ球の分離

control に使用した正常ヒト末梢血リンパ球の分離は、Ficoll-Conray (比重1.077) 混合液を用いる比重遠心法で行った。すなわち、ヘパリン加末梢血3mlに等量の生理食塩水3mlを加えて上記の混合液3ml上に静かに重層した後1,500 r.p.m.にて30分間遠心した。遠心終了後、混合液と plasma との間に生じたリンパ球層をピペットで採集し、2~3倍量の生理食塩水を加えて1,500 r.p.m, 5分間遠心、さらに上清を捨て2回遠心洗浄してPBS (phosphate buffered saline, PH 7.2) に浮遊した。

##### 3. 扁桃リンパ球の分離

扁桃リンパ球浮遊液を作成するには Willson ら<sup>20)</sup>によれば3つの方法があるが、そのうちの mechanical な方法を用い、Ficoll-Conray 混合液 (比重1.077) を使用する比重遠心法でリンパ球を分離した。まず扁桃により得られたヒト扁桃を結合織等を除去し、PBS (PH 7.2) 中で細切した後にスチールメッシュで濾過し組織片を取り除いて、1,000 r.p.m, 5分間遠心を行い、上清を除去してPBS中に再浮遊する。その細胞浮遊液を混合液の上に重層し、1,500 r.p.m, 30分間遠心してリンパ球層を取り出し、2回洗浄を行い培養液 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 中に $8 \times 10^5$  /mlの濃度に調整した。この時リンパ球濃度が90%以上、ならびに trypan blue dye exclusion test にて cell viability が95%以上であることを確認して実験に供した。

##### 4. 指示細胞の作成

指示細胞は橘ら<sup>21)</sup>の方法に従い作成した。その作成法の概略は次のごとくである。

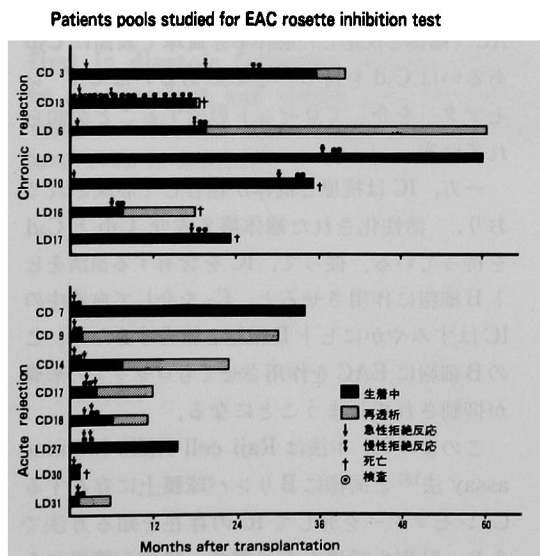


図1

1). EAC<sub>(OX)</sub> (抗体感作牛赤血球) の調整: GVB (gelatin veronal buffer) で洗浄遠心してえた牛赤血球に至適量の抗-OX-RBC-IgM 抗体 (日本抗体研究所) を加えて感作した, 感作牛赤血球 (EA) を  $1 \times 10^9/ml$  に GVB に浮遊.

その 1 ml に GVB 12ml, 新鮮ヒト血清 (50倍稀釈して使用) 2 ml の割合で加え, 37°C, 15 分間 incubate 後遠心洗浄し,  $5 \times 10^8/ml$  に浮遊, 4°C に保存し 3 日以内に使用した.

2). E<sub>n</sub> (ノイラミダーゼ処理羊赤血球) の調整:  $1 \times 10^9/ml$  の GVB に浮遊した羊赤血球 1 ml にノイラミダーゼ (0.2 国際単位/ml, ヘキスト) 0.1 ml を加え, 37°C, 30 分間反応させ洗浄後  $5 \times 10^8/ml$  に GVB に浮遊して 4°C に保存した.

5. ヒト扁桃リンパ球, 正常ヒト末梢血リンパ球 subpopulation の検討

基礎的検討として, 上記 2 種の指示細胞の他に, 牛赤血球を IgG 抗体で感作して作成した EA を加えて, 次項 6, 2) で述べるマイクロテストプレート法を用いて, 扁桃リンパ球ならびに末梢血リンパ球 subpopulation の検討を行い, それぞれの ERFC, EARFC, EACRFC (RFC = rosette forming cells) の比率を求めた.

6. EAC ロゼット阻止試験

1). 移植患者血清による扁桃リンパ球の処理:

EAC rosette inhibition test

1. Lymphocyte treatment with transplant sera

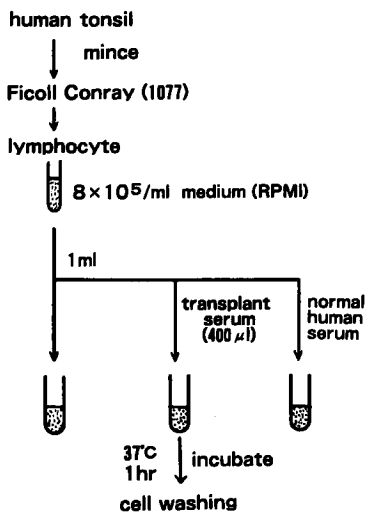


図 2

EAC rosette inhibition test

2. Rosette formation by treated lymphocyte

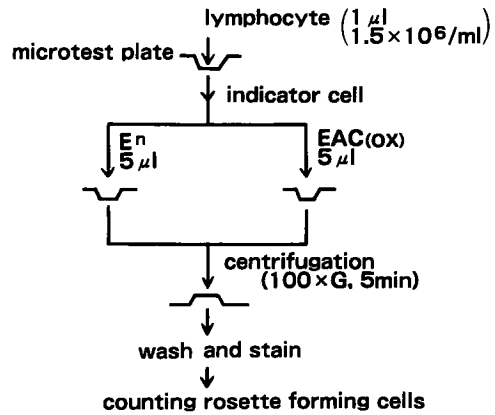


図 3

Ezer ら<sup>2)</sup>の方法に従い, 患者血清 (および正常人血清) 0.4 ml と  $8 \times 10^5/ml$  に調整した扁桃リンパ球 1 ml を混ぜ, 37°C, water bath incubator の中で 1 時間振盪した. (図 2) その後, そのリンパ球を 2 回 PBS で洗浄し,  $1.5 \times 10^6/ml$  に調した. 次に以下の方法でロゼット形成を行った.

2). ロゼット形成:

EAC ロゼット形成については, 改良された橘らのマイクロテストプレート法<sup>22)</sup>を用いた. まず (図 3) のようにマイクロシリンジで扁桃リンパ球を  $1 \mu l$  ずつ PLL (poly-L-lysine) 処理プレート各孔に注入し, 15 分間静置後, FCS (fetal calf serum) を  $5 \mu l$  ずつ各孔に入れ 30 分間静置した. 次に前述した指示細胞 (EAC, E<sub>n</sub>) を  $5 \mu l$  ずつそれぞれの孔に入れ室温でプレートをアダプターをつけた遠心機で 800 r.p.m, 5 分間遠心後, プレートを反転して 30 分間放置した. その後プレートを静かに PBS 中に入れ洗浄して, 0.01% Brilliant Cresyl Blue, 0.25% Glutaraldehyde-PBS 溶液で固定染色し, rosette forming cell を鏡検した. リンパ球を 400~450 個観察して, RBC が 4 個以上付着したリンパ球をロゼット形成陽性細胞とした. この時ペルオキシダーゼ陽性細胞の混入が問題となるが, 文献<sup>20,24)</sup>ならびに著者のデータ (表 1) でも, その混

Subpopulation of lymphocyte in human tonsil and peripheral blood

	n	ERFC	EARFC	EACRFC	P.O.
Tonsil average age (8y.o.)	10	18.7±8.0	3.0±2.6	69.2±10.3	4.7±2.1
Peripheral blood average age (35y.o.)	10	64.0±4.2	26.0±3.5	27.2±4.3	11.5±2.3

表 1

Subpopulation of tonsil lymphocyte according to different authors

	n	ERFC	EARFC	EACRFC
Siegel	10		17.5±5.4	42.2±66.4
Enomoto	51	29.8±8.2		60.6±11.7
Isago	30	32.7±11.5		43.3±11.2

表 2

入率は非常に少なく、ロゼット形成率に及ぼす影響は少ないと考えた。

以上のようにして各血清ごとの EAC ロゼット形成率を算定し、正常人血清を対照として次に述べる方法でロゼット阻止率を求めた。

なおこのさい、同時に medium (RPMI) を control とした値も求め、正常人血清を control とした値と比較したところ、正常人血清にも軽度の阻止性がある為両値には多少の差異がみられたが、その差異の大きい場合には再検した。

### 3). EAC ロゼット阻止率 (%)

$$=100 \times \left( 1 - \frac{\% \text{ rosettes after serum}}{\% \text{ rosettes after control}} \right)$$

control ① Normal human serum  
② Medium (RPMI)

7. In vitro での MPSS (Methylprednisolone Sodium Succinate) の EAC ロゼット阻止率への影響

扁桃リンパ球と正常人血清を前述 6.1) と同じ比率で混ぜ、MPSS を各種濃度 (20~1000 μg/ml) になるように添加して、37℃、1 時間 incubate 後に、リンパ球を洗浄してロゼット形成を行ない、MPSS 各種濃度のロゼット形成に及ぼす影響について調べた。また、MPSS を直接ロゼット形成する場に添加する場合との比較も行

った。

8. PEG (Polyethylene glycol) および RID (radial immunodiffusion) による可溶性 IC の検出

安部らによって改良された PEG 沈澱法を用いて移植患者 (CD-13) 血清中の IC の推移をみた。本法の原理は、4% PEG および冷沈降法で IC を沈澱させ、その complex を形成している Immunoglobulin および C<sub>3</sub> を RID plate で測定し、それぞれの沈降指数 (PEG precipitates index\*) を求めるものである<sup>29,30)</sup>。

\*PEG precipitates index (%)

$$= \frac{\text{precipitates Immunoglobulin (or C}_3\text{)}}{\text{whole serum Immunoglobulin (or C}_3\text{)}} \times 100$$

## 結 果

1. ヒト扁桃リンパ球および末梢血リンパ球 subpopulation の比較検討

結果は (表 1) に示してあるように、扁桃リンパ球では ERFC, EARFC, EACRFC, ペルオキシダーゼ陽性細胞比率の平均値は (mean ± S. D.) 18.7 ± 8.0%, 3.0 ± 2.6%, 69.2 ± 10.3%, 4.7 ± 2.1% であった。末梢リンパ球では ERFC, EARFC, EACRFC, ペルオキシダーゼ陽性細胞比率の平均値は 64.0 ± 4.2%, 26.0 ± 3.5%, 27.2 ± 4.3%, 11.5 ± 2.3% であった。扁桃リンパ球

は B cell rich であり、またペルオキシダーゼ陽性細胞%が少ない。

2. In vitro における MPSS の EAC ロゼット阻止率への影響 (図 4)

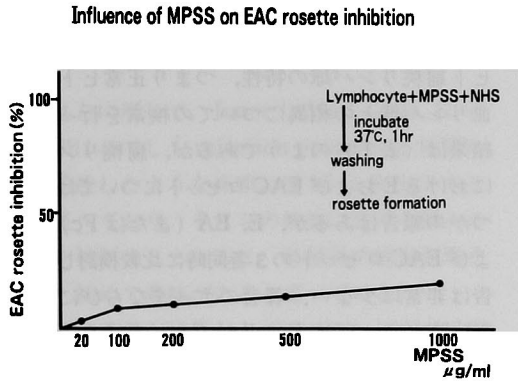


図 4

MPSS, 扁桃リンパ球, 正常人血清を混和して incubate 後にリンパ球を洗浄してロゼット形成を行なう場合には, ロゼット阻止率は 100, 200, 500, 1000 µg/ml の MPSS 濃度で, それぞれ, 9, 11, 13, 17% であった。ところが, MPSS を直接ロゼット形成する場に添加する場合には, ロゼット阻止率は 500 µg/dl の MPSS 濃度で 29% であった。

3. 腎移植患者血清による EAC ロゼット阻止率  
1). medium (RPMI) を control とした健康成人では, ロゼット阻止率平均値 (mean ± S.D.) は 8.0 ± 6.5% であった。

2) 健康成人を control とした移植患者のロゼット阻止率平均値は, 第 1 群 (腎機能良好例) で 3.5 ± 3.4%, 第 2 群 (急性拒絶例) で 6.2 ± 5.8%, 第 3 群 (慢性拒絶例) で 15.0 ± 13.4% であった。(図 5) また第 1 群の腎機能良好例を対照として, 他の 2 群と比較すると, 急性拒絶群では 8 例中 1 例 (12.5%), 慢性拒絶群では 7 例中 4 例 (57.1%) にロゼット阻止がみられ, 急性拒絶群では推計学的有意差は認められないが, 慢性拒絶群では有意の差 (P < 0.01) が認められる。

3). 腎移植後の IC, 補体等の推移

術後慢性拒絶反応を生じた 1 例 (CD-13) についてその推移を測定した。術前および術後 5 ヶ月間は, EAC ロゼット阻止率は低値であるが

臨床的に慢性拒絶期にはいった術後 6 ヶ月目には急上昇している。(図 6) その後 5 ヶ月間は多

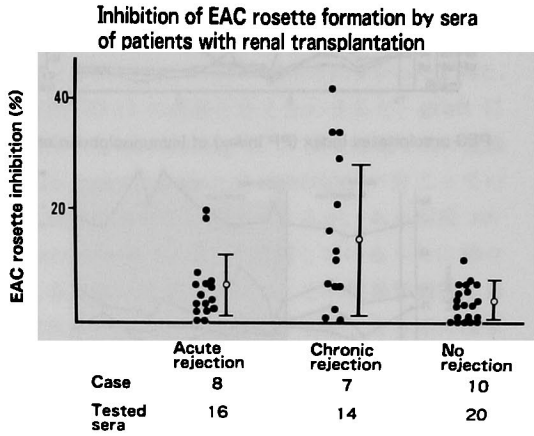


図 5

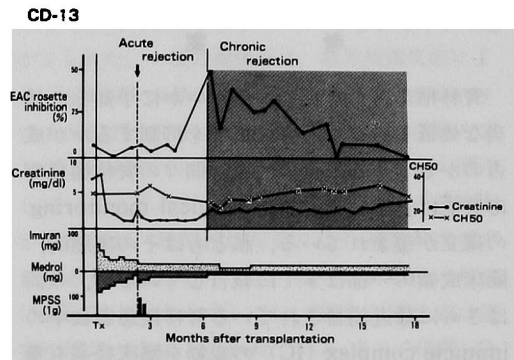


図 6

少の変動をしながら高値を保っているが, 術後 12 ヶ月頃からその阻止率は漸次減少している。また血清補体価 (CH50) を測定したところ, 6 ヶ月を過ぎた頃から一過性の低下傾向がみられるが, その後漸次上昇して正常値になった。その他の免疫学的検索では, 慢性拒絶期に一致して血中 Immunoglobulin ならびに C<sub>3</sub> の低下がみられるが, C<sub>3</sub> はその後漸次上昇して正常になった。(図 7.上) もちろん, これらの値には種々の薬剤の影響が少なからずあると考えられる。

ついで, 安部らの方法により, 各時期に採集した血清について PEG 沈降指数 (P.P index) を求めたところ, 慢性拒絶期に入ると IgM は多少の変動はあるが漸増し, また時期は多少ず

## CD-13

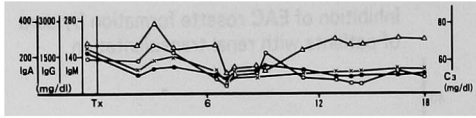
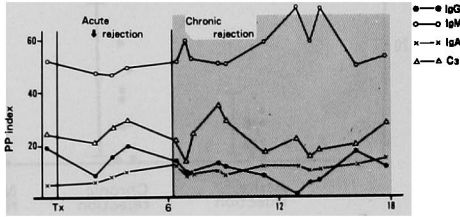
Immunoglobulin and C<sub>3</sub> in whole serumPEG precipitates index (PP index) of Immunoglobulin and C<sub>3</sub>

図 7

れるが C<sub>3</sub> の一過性の上昇がみられている。(図 7.下)

## 考 案

腎移植において拒絶反応をいかに予知し、適当な処置を行ない、その反応を抑制するかが成否のかぎである。その為には個々の腎移植免疫応答能に基づいた immunological monitoring の確立が望まれている。私どもはその実験的、臨床成績の一部はすでに報告している<sup>31)</sup>。今回はさらに最近注目されている腎移植患者血中の immune complex (IC) の変動を臨床経過を参考にして、EAC ロゼット阻止試験を用いて検討した。

扁桃リンパ球、羊赤血球、被検血清を用いた EAC ロゼット阻止試験は 1974 年 Ezer ら<sup>12)</sup> により最初に報告されているが、著者は本実験で羊赤血球のかわりに牛赤血球を用い、また、ロゼット形成法は試験管法ではなく、橘らの改良されたマイクロテストプレート法(迅速簡便法)<sup>22)</sup> を用いて行った。牛赤血球を用いる EAC ロゼット形成法については、橘、Johnsen ら<sup>23)</sup> により検討されているが、E ロゼットの混入が阻止できる。著者も最初は、EAC を作成する時赤血球は羊を用いたが、E ロゼットの混入影響がかなりあり、データにばらつきがみられた為、牛赤血球を用いた。

またマイクロテストプレート迅速簡便法は、

従来とは異なり、プレートをそのまま遠心するが、操作も簡略化されており、リンパ球と種々の因子の反応時間も短かく、ロゼット形成に及ぼすその他の影響も従来の方法より少ないと考えられる。

まず、本実験に入る前の基礎的検討として、ヒト扁桃リンパ球の特性、つまり正常ヒト末梢血リンパ球との相異についての検索を行った。結果は(表 1)のようであるが、扁桃リンパ球における E および EAC ロゼットについてはいくつかの報告はあるが、E, EA (または Fc), および EAC ロゼットの 3 者同時に比較検討した報告は非常に少ない。著者のデータならびに他文献<sup>25,28)</sup> から、扁桃 B cell は C<sub>3</sub> レセプターを有するが、しかし、Fc レセプターは稀少か、たとえあってもほとんど反応しないと考えられる。著者のデータ(表 1)と(表 2)<sup>25-27)</sup> を比較すると、報告により多少の相異があるようである。次に、本実験に IC 測定の目的で行なう EAC ロゼット阻止試験についてであるが、本法は抗原特異的なものではなく問題がないわけではない。糸球体腎炎<sup>12,16,17)</sup>、crohn 氏病および lepra<sup>12)</sup> で本法が陽性といわれているが、しかし crohn 氏病、lepra については検体数が少ないようである。

IC は本来、生体内に入った病原物の活性をなくし処理する為に作られたもので、血清中に IC が証明されても、それがすぐに疾病の発症とは結びつかない。組織障害性のある IC はその分子量の大きさや、抗原の種類、組織親和性、抗原抗体の量的関係が特定の条件になった時に、種々の免疫反応を惹起し、組織障害をひきおこすといわれている<sup>1,32)</sup>。

現在腎移植患者における IC の検討についてはいくつかの報告<sup>5-11)</sup> があるが、その測定方法ならびに結果も報告によりそれぞれ異なるようである。Ooi<sup>6)</sup>、Junor ら<sup>7)</sup> は Ciq binding assay, Smith ら<sup>9)</sup> は Raji cell assay, Bakkaloglu ら<sup>10)</sup> は Fc rosette inhibition test, Matl ら<sup>8)</sup> は PEG assay, そして Palosuo ら<sup>5)</sup> は血小板凝集法を用いて graft rejection と IC の関係について論じている。Bakkaloglu, Smith, Ooi らは acute rejection においてはかなりの率に IC が検出されると述べている。その検出率はそれ

ぞれ、100% (13/13), 59% (7/12), 58% (14/24) である。このなかでも Ooi らは acute rejection を cellular type と humoral type にわけて検討した結果、IC は特に humoral type の rejection に高率に検出でき、治療が奏効し、rejection がおさまるとその IC も消失すると述べている。

これらに反して、Junor<sup>7)</sup>, Matl<sup>8)</sup>は、IC の検出率は必ずしも rejection episode と相関せず、前述したような高率には IC は検出できないと述べており、それらの検査における種々の要因を検討するとともに、移植後の経過観察を行い、初めて意味があると述べている。

今回、著者が注目した chronic rejection であるが、これは移植片の運命にとっては、しばしば長期間にわたる脅威であるが、現在のところ体液性反応が関与する免疫反応といわれており、組織学的には移植片の血管壁の胞厚、狭窄を特徴として、糸球体に IC が次着してその障害を来すといわれている<sup>1,19)</sup>。

chronic rejection と IC については文献が比較的少ないが、Bakkaloglu らは 3 人について検討し、2 人に IC 陽性であると述べている。

以上の事より humoral type の rejection すなわち、chronic rejection および、Ooi らのいう一部の acute rejection では IC が関与していると想定され、IC が circulating IC として存在する場合には、理論的にはその血中から免疫生物学的方法ないしは物理化学的方法により検出されるはずである。

Rejection 時における IC の増量する理由として graft rejection の他に、glomerulonephritis や infection に起因するものも考慮に入れておく必要があるが、現在のところでは抗原特異な IC 検出は困難である。

本研究においては、急性拒絶群では 12.5% (1/8)、慢性拒絶群では 57.1% (4/7) に IC が検出された。この慢性拒絶反応群 7 例のなかで、IC の検出されなかった 3 例 (LD6, LD16, LD17) のうち 2 例は、慢性拒絶反応開始より再透析までの期間が短いようであった。

また症例 CD-13 について EAC ロゼット阻止試験を行って術後の推移をみたところ、慢性拒

絶期に入るとロゼット阻止率は高くなっていったが、しばらくその拒絶反応が続いて漸次腎機能が低下して全身状態が悪化するにつれ、その阻止率も低下していった。以上より、慢性拒絶例 (7 例) のうち IC の検出されなかった 2 例と、症例 CD-13 の経過を考え合わせると、graft に由来する circulating IC は臨床経過と共に変動するもので、humoral rejection が起こっている期間は血中から検出できるが、ある程度 rejection が続き、IC が循環しているうちに徐々に各臓器に沈着するため、その結果腎機能も当然低下してゆき、再透析が必要となる頃にはすでに血中の circulating IC は減少しているのではないかと推論できる。もちろん IC が血中に循環しているか、あるいは組織に沈着するかはその抗原抗体比等も関係してくるであろう。

次に症例 CD-13 について追加検討した、補体系ならびに PEG assay についても興味ある知見がえられた。一般に補体系は、抗原抗体反応による classical pathway と alternative pathway により活性化されて、種々の生物学的活性を表わすといわれている。それゆえ免疫現象の関与していると思われる諸疾患では、補体系の変動が考えられ、抗原抗体反応により補体が消費されると補体価は低下する。従ってある種の疾病 (SLE, 関節リウマチ) では、病状と補体価は密接な関係があると云われている。そこで症例 CD-13 について CH50 を検索したところ、慢性拒絶期に入ると軽度の低下がみられるが、その後漸次正常になっている。(図 6) また、補体の中でも中心的な重要な役割を担う C<sub>3</sub> にも同様な傾向がみられる。

PEG assay と IC については、その作用機序については未だ不明な点があるが、患者血清中に存在する IC を物理化学的な操作を加えて沈澱させて、それに含まれる成分を測定するものである。一般的に IC を構成している成分は IgG、次いで IgM、IgA の順といわれているが、CD-13 について検索したところでは、慢性拒絶期に入り IgM、C<sub>3</sub> の上昇がみられている事から、この場合の IC には IgM および C<sub>3</sub> がかなり関与していると考えられる。すなわち、以上述べた補体系ならびに PEG assay を共に考えると CD-13

の慢性拒絶期に一致して IC の生成を裏づけるデータがでている。

### 結 語

腎移植において、種々の移植免疫反応が起こり、その際生じた immune complex (IC) はある一定の範囲をこえると、移植腎に障害を来し、臨床上その生着に重要な意味を持つ。そこで著者は、移植後の免疫能指標の一つとして、EAC ロゼット阻止試験を用いて、移植患者を 3 群に分けて血中 IC の検索を行った結果、慢性拒絶反応例にロゼット阻止率が高くでる傾向があり、そしてそれは病状とともに変動することが判明した。以上の事から、慢性拒絶反応には液性免疫による IC の関与が想定され、その検出を行った EAC ロゼット阻止試験は多少の問題点も

あり必ずしも circulating IC を適確に表わすとはいえないが、経時的に測定して種々のパラメーターといっしょに考察すれば腎移植後の経過判定、特に慢性拒絶反応の診断に有用で臨床的応用が可能であると考ええる。

### 謝 辞

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜りました折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、終始御指導いただいた阪上賢一講師ならびに堀見忠司先生に心から感謝致します。

なお、本論文の要旨は第16回日本移植学会にて発表した。

(本研究の一部は文部省特定研究岩崎班「腎移植の基礎的研究」助成金によった。)

### 文 献

1. Thaler, M.S., Klausner, R.D. and Cohen, H.J.: *Medical Immunology*, J.B. Lippincott Comp, Philadelphia pp. 139-223, 1977.
2. 京極方久, 窪田 彬, 能勢真人, 渡辺 信, 鶴飼和浩, 松本正道, 下村林平, 白根博文, 木崎智彦: Immune complex による血管病変. *日本臨床* 33, 72-87, 1975.
3. Busch, G.J., Reynolds, E.S., Galvanek, E.G. and Braun, W.E.: Human renal allografts. *Medicine* 50, 29-77, 1971.
4. Andres, G.A., Accinni, L., Hsu, K.C., Penn, I., Porter, K.A., Rendall, J.M., Seegal, B.C. and Starzl, T.E.: Human renal transplants. (Immunopathologic studies). *Lav. Invest* 22, 588-604, 1970.
5. Palosuo, T., Kano, K., Anthone, S., Gerbas, J.R. and Milgrom, F.: Circulating immune complexes after kidney transplantation. *Transplantation* 21, 312-316, 1976.
6. Ooi, Y.M., Ooi, B.S., Vallota, E.H., First, M.R. and Pollak, V.E.: Circulating immune complexes after renal transplantation. *J. Clin. Invest.* 60, 611-619, 1977.
7. Junor, B.J., D'Apice, A.J. and Smith, P.K.: Circulating immune complexes after renal transplantation. *Transplantation* 30, 111-113, 1980.
8. Matl, I., Haskova, V. and Kaslik, J.: Circulating immune complexes in renal transplant patients. *Transplantation* 27, 358, 1979.
9. Smith, M.D., Verroust, P.J., Griffin, P.J. and Salaman, J.R.: The detection of circulating immune complexes in renal transplant patients. *Clin. Exp. Immunol.* 39, 141-145, 1980.
10. Bakkaloglu, A., Sandilands, G.P., Briggo, J.D. and Anderson, J.R.: Inhibition of Fc rosette formation by serum of patients with renal allograft rejection. *Lancet* 2, 430-432, 1977.
11. Jordan, S.C., Sakai, R., Malekzadeh, M.H., Pennis, A.J., Ettenger, R.B., Uittenbogaart, C.H. and Fine, R.N.: Circulating immune complexes in pediatric renal allograft rejection. *Transplantation* 31, 190-194, 1981.
12. Ezer, G. and Hayward, A.R.: Inhibition of complement dependent lymphocyte rosette formation: a



- possible test for activated complement products. *Eur. J. Immunol.* 4, 148-150, 1974.
13. 濱島義博: Immune complex 検出法の歩み. 最新医学 33, 1295-1300, 1978.
  14. Lambert, P.H., Dixon, F.J., Zubler, R.H., Agnello, V., Cambiaso, C., Casali, P., Clarke, J., Cowdery, J.S., McDuffie, F.C., Hay, F.C., MacLennan, I.C., Masson, P., Müller, H.J., Penttinen, K., Smith, M., Tappeiner, G., Theofilopoulous, A.N. and Verroust, P.: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1, 1-15, 1978.
  15. 濱島義博: (ワークショップ) Immune complex の測定法(1). 日本臨床37, 894-911, 1979.
  16. Smith, M.D., Barret, T.M., Hayward, A.R. and Soothill, J.F.: The inhibition of complement dependent lymphocyte rosette formation by the sera of children with steroid-sensitive nephrotic syndrome and other renal disease. *Clin. Exp. Immunol.* 21, 236-243, 1975.
  17. Smith, M.D., Verroust, P.J., Adam, C., Galceran, M. and Morel, M.L.: A study of the material inhibiting EAC rosette formation in the sera of patients with nephropathies. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 364-369, 1977.
  18. Theofilopoulous, A.N., Wilson, C.B. and Dixon, F.J.: The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J. Clin. Invest.* 57, 169-182, 1976.
  19. Flanigan, W.J., Caldwell, F.T., Williams, G.D., Brewer, T.E., Glenn, W.E. and Headream, J.W.: Clinical patterns of renal allograft rejection. *Ann. Surg.* 173, 733-747, 1971.
  20. Willson, J.K., Zaremba, J.L., Pitts, A.M. and Pretlow, T.G.: A characterization of human tonsillar lymphocytes after separation from other tonsillar cells in an isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium. *Am. J. Pathol.* 83, 341-355, 1976.
  21. 橋 武彦, 吉田明子: ヒトの T 細胞, B 細胞の微量測定法. 免疫実験操作法, 日本免疫学会, 金沢, pp. 455-462, 1978.
  22. 近藤富雄, 橋 武彦: マイクロテストプレートを用いたヒト末梢血 T, B 細胞測定の迅速簡便法. 医学のあゆみ 107, 312-314, 1978.
  23. Johnsen, H.E. and Madsen, M.: Lymphocyte subpopulation in man: Ox erythrocytes as indicators in the EA- and EAC- rosette test. *Scand. J. Immunol.* 8, 247-256, 1978.
  24. 北庄司信裕, 田端敏考: 疾患における扁桃の役割 (扁桃リンパ球). 臨床免疫 9, 203-213, 1977.
  25. Siegel, I., Grieco, M.H. and Gupta, S.: Fc and complement receptor rosette-forming cell ratios in human tonsils and peripheral blood. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 50, 488-496, 1976.
  26. 榎本雅夫: 扁桃の免疫機能に関する研究—ヒト扁桃の免疫機能, ことに羊赤血球に対する抗体産生能および E および EAC 結合性リンパ球について. 和歌山医学 27, 51-60, 1976.
  27. 砂金秀充, 荒ひろみ, 形浦昭克: 口蓋扁桃リンパ球の分画. 日扁桃誌 17, 41-46, 1978.
  28. Shevach, E.M., Jaffe, E.S. and Green, I.: Receptors for complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transplant Rev.* 16, 3-28, 1973.
  29. Digeon, M., Laver, M., Riza, J. and Bach, J.H.: Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. *J. Immunol. Methods* 16, 165-183, 1977.
  30. 安部千之: Polyethylene glycol (PEG) および radial immunodiffusion (RID) による可溶性 immune complex の検出. 最新医学 33, 1360-1365, 1978.
  31. 阪上賢一, 瀧本定儀, 中原東亜, 堀見忠司, 山本泰三, 折田洋二郎, 滝 正憲, 折田薫三: 腎移植の拒絶反応に対する免疫学的診断法. 腎と透析 6, 155-165, 1979.
  32. Theofilopoulous, A.N. and Dixon, F.J.: Detection of immune complexes. Techniques and implications. *Hospital Practice* 15, 107-121, 1980.

**EAC Rosette Inhibition for Detecting Immune Complexes  
in Renal Transplant Patients**

**Touru FUJIWARA**

**First Department of Surgery, Okayama University**

**Medical School, Okayama, 700, Japan**

**(Director: Prof. K. Orita)**

In human renal allografts, recipients respond with various specific immune reactions, such as the production of immune complexes. The circulating immune complexes provoke damage of the grafted kidney under the appropriate condition. Therefore, the detection of circulating immune complexes is important in predicting the rejection of grafted kidneys. Several methods of measuring immune complexes have been reported. In this study, sera from 25 patients who had received renal allografts were studied for the presence of circulating immune complexes by using a EAC rosette inhibition test. Sera from 25 patients were divided into three groups (1. acute rejection, 2. chronic rejection, 3. no rejection episode) and EAC rosette inhibition tests performed. Serum samples from the chronic rejection group gave high inhibition of EAC rosette formation, showing good correlation with clinical chronic rejection episodes.

It was concluded that circulating immune complexes play an important role in chronic rejection. Therefore, the EAC rosette inhibition test is useful for predicting chronic rejection, and measuring circulating immune complexes.