

マウス心臓移植モデルを用いた柴苓湯による急性期ドナー特異的抗体抑制効果

井上 明¹⁾, 内山 雅照²⁾, 新見 正則¹⁾

1) 帝京大学医学部外科学講座

2) 帝京大学医学部心臓血管外科学講座

キーワード

saireito, murine cardiac transplantation, donor specific antibody

柴苓湯, マウス心臓移植, ドナー特異的抗体

和文抄録

背景・目的: 柴苓湯が誘導した $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞（以下、制御性 T 細胞）によるマウス移植心の長期生着延長効果を報告したが、長期生着に重要なドナー特異的抗体（DSA）に対する効果は未だ検討していない。今回、マウス移植心モデルに柴苓湯を投与し、急性期の DSA の産生抑制効果を調べた。

対象・方法: CBA マウスをレシピエント、C57BL/6 マウスをドナーとし、腹部異所性心臓移植を行った。CBA マウスに柴苓湯エキス 2 g/kg/day を 8 日間投与し、術後 10 日目と 20 日目にフローサイトメーターで制御性 T 細胞と DSA を測定した。移植心を免疫組織染色と HE 染色で評価した。制御性 T 細胞を減少させる抗 IL-2 受容体 α 鎖抗体（以下、PC-61）を柴苓湯投与群に投与し、術後 10 日目に血液を採取しフローサイトメーターで DSA の測定を行った。

結果: 術後 10 日目の柴苓湯投与群では制御性 T 細胞の比率が増加し、心筋組織内に $CD4^+Foxp3^+$ 細胞がより多く誘導されていた。また、DSA の産生抑制も認められた。柴苓湯の効果が無くなる術後 20 日目の柴苓湯投与群でも DSA の産生抑制が認められた。PC-61 を投与し制御性 T 細胞を減少させた柴苓湯投与群でも DSA の産生抑制が認められた。

結論: 柴苓湯の直接的作用と制御性 T 細胞の誘導によって急性期の DSA 産生が抑制された。

はじめに

臓器移植の生着を成功させるためには免疫抑制剤投与による拒絶反応の制御が不可欠である^{1,2)}。副腎皮質ステロイドやカルシニューリン阻害薬に代表される免疫抑制剤は拒絶反応の抑制に対して非常に効果的であるが、感染症³⁾や悪性腫瘍⁴⁾、消化管出血⁵⁾などの副作用も多い。移植臓器に対する機能不全を誘導するという報告もある⁶⁾。そのような免疫抑制薬がほぼ必須の移植患者の最終目標は、免疫抑制剤を中止しても免疫寛容が誘導され、長期にわたり移植臓器の機能的維持が可能となることである。つまり、免疫寛容が誘導でき、かつ副作用が少ない薬剤が求められている。

漢方薬は日本や中国以外の欧米でも徐々に普及しており、西洋薬の補完療法として用いられている⁷⁾。少しずつではあるが、エビデンスの確立も進み、術後腸閉塞に対する大建中湯⁸⁾やオキサリプラチン誘導性末梢神経障害に対する牛車腎気丸⁹⁾などの様に現代医薬を補完する臨床治療効果が証明され始めた。ただ、保険適応以外の効果効能を持つことも多くの研究で示されている。自己免疫性腎炎¹⁰⁾や習慣性流産¹¹⁾、関節リウマチ¹²⁾、自己免疫性ぶどう膜炎¹³⁾などである。我々も2008年頃より漢方薬に注目し、現在までに柴苓湯^{14,15)}や当帰芍薬散¹⁶⁾そして茵陳五苓散¹⁷⁾による制御性T細胞の誘導と移植心の生着延長効果を報告してきた。西洋薬のような単一成分で構成された単一作用ではなく、多くの生薬を組み合わせた複合作用が様々な疾患や症候に対して治療効果を発揮することが漢方薬治療の魅力の1つであり、今後も多くの治療効果が期待されている。

そこで、長期生着効果を示した種々の漢方薬を再検討し、今回は柴苓湯に注目した。既に我々自身で柴苓湯投与による長期生着延長効果を報告しているが^{14,15)}、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞（以下、制御性T細胞）の関与を報告したのみであり、免疫抑制剤では制御不十分とされる抗体関連型拒絶に関する検討は行っていない。抗体関連型拒絶の代表的な抗体であるドナー特異的抗体（Donor specific antibody：以下 DSA）

の産生と心臓移植術後の生命予後が相関することが報告されており¹⁸⁾, DSA 産生を抑制することは移植成績向上に重要であると考えられている。また、漢方薬による抗原特異的抗体の産生抑制も報告されている¹⁹⁾。そこで、長期生着延長効果を示した柴苓湯が制御性 T 細胞を増加させるだけでなく、DSA の産生抑制に関与するのではないかと考え、組織適合抗原 (Major histocompatibility complex : 以下 MHC) 完全不一致マウスの心臓移植モデルを用いて、柴苓湯の急性期 DSA の産生抑制に関する効果を基礎科学的解析によって検討した。

方法

1. 動物

CBA マウス (雄 8 週齢, 三協, 東京) をレシピエントとし, C57BL/6 マウス (雄 8 週齢, 三協, 東京) をドナーとして用いた。この組み合わせは, MHC が CBA (H2^k), C57BL/6 (H2^b) であり, 完全不一致となる。飼育方法は帝京大学の飼育ガイドラインに従い, また本研究は帝京大学動物実験に関する倫理委員会の承認 (帝動倫 19-027:2019 年 10 月 9 日) を得て, 倫理委員会ガイドラインに従って行った。

2. マウスの心臓移植

マウスの心臓移植は既報の方法に従って行った²⁰⁾。マウスの腹腔内で, ドナー心の上行大動脈とレシピエントの腹部大動脈, ドナー心の肺動脈とレシピエントの下大静脈を手術用顕微鏡 (OMS-75 Topcon, 東京) を使用して 10-0 ナイロン糸付縫合糸 (ベアーメディック, 東京) でそれぞれ端側吻合した (図 1A-C)。ドナー移植心を連日腹部の触診にて観察した。触診で心拍動の停止と判断したマウスは, 麻酔下に開腹し直視下で心拍動の停止を確認して拒絶と判定した。心臓移植片は摘出して病理検体とした。

3. 漢方薬

使用薬剤は柴苓湯（構成生薬:黄芩, 甘草, 桂皮, 柴胡, 人参, 生姜, 蒼朮, 大棗, 沢瀉, 猪苓, 半夏, 茯苓）のエキスをを用いた。柴苓湯エキスは株式会社ツムラの医療用製剤と同じ製造工程のものから、乳糖処理をする前段階の乾燥末を使用した。（以下、エキスを省略して、柴苓湯の基本薬名で記入する）。

4. マウスの処置

柴苓湯 2 g を蒸留水 40 ml に溶かし、心臓移植手術当日から 8 日間連日、無麻酔で経口投与用金属管（Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA）を用いてレシピエントマウスの胃内に 1 ml（体重 25 g 換算で 2 g/kg/day）投与した。手術を行い、投薬を行わなかった群を無治療群、手術を行い、投薬を行った群を柴苓湯投与群とした。

5. 組織染色

無治療群と柴苓湯投与群の移植後 10 日、20 日が経過したマウスの腹部から心臓移植片を摘出した。摘出した心臓移植片を O.C.T. Compound Tissue-Tek（Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, CA, U.S.A.）に入れ、-80 °C で冷凍させ、4 μm の切片を作成した。そして anti-CD4（RM4-5; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA）monoclonal antibody（以下、mAb）、anti-Foxp3（FJK-16s; Thermo Fisher SCIENTIFIC, MA, USA）mAb で一次染色を行った。anti-CD4 mAb と anti-Foxp3 mAb に対して、アルカリフォスファターゼを付加された anti-Rat Ig 抗体（二次抗体:712-055-153; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）を用いて二次染色を行った。さらに、心筋細胞膜の染色のために type IV collagen（LB1403, Cosmo Bio, Tokyo）polyclonal antibody（以下、pAb）を用いて一次染色を行い、ペルオキシターゼを付加された anti-Rabbit Ig 抗体（二次抗体:55693; Mitsubishi Chemical, Tokyo）を用いて二次染色を行った²¹⁾。

さらに、無治療群と柴苓湯投与群の移植後 10 日が経過したマウスの腹部から摘出された心臓移植片は 4 μm の切片を作成した後に、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った²¹⁾。

6. フローサイトメトリー

無治療群、柴苓湯投与群の術後 10 日目と 20 日目に脾臓を摘出し、脾細胞を採取した。anti-CD4 mAb（RM4-5）と anti-CD25 mAb（PC61; BD Biosciences Pharmingen）を入れた後、PE anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set（Cat: 72-5775-40; eBioscience, San Diego, CA, USA）の Fixation/Permeabilization Diluent と Concentrate を 3:1 の割合で混ぜたものを 300 μl /tube 入れ、4 $^{\circ}\text{C}$ で 40 分間冷却した。蒸留水で 10 倍希釈した 10 \times Permeabilization で 2 回洗浄し、Goat Serum を 10 μl /tube 入れ、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間冷却した後、anti-Foxp3 mAb（FJK-16s）と IgG2a Isotype を入れた。再び 4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間冷却し、10 倍希釈した Permeabilization で 2 回洗浄した。また、それぞれの isotype controls は以下のものを使用した（CD4: FITC Rat IgG2a, κ Isotype Control; BD Biosciences Pharmingen, CD25: APC Rat IgG1, λ Isotype Control; BD Biosciences Pharmingen, Foxp3: eBR2a; eBioscience）。染色後、フローサイトメーター（BD FACS Canto II; BD Biosciences, CA, USA, 以下 FACS）で分析し、CD4⁺ 細胞の中の CD25⁺Foxp3⁺ 細胞の比率を解析し、各群間で比較した²²⁾。

7. DSA 測定

無治療群、柴苓湯投与群の術後 10 日目と 20 日目に下大静脈から血液を採取した。血液を 20 $^{\circ}\text{C}$ 、3800 rpm、20 分の条件で遠心し、血漿を採取した。血漿を 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間温め、非働化を行った。未手術の C57BL/6 マウスと Balb/c マウス（3rd party）から胸腺を摘出し、胸腺細胞を精製した。胸腺細胞 2.0×10^6 個と血漿 10 μl を混ぜ合わせ、4 $^{\circ}\text{C}$ で 40 分間培養した。培養後、anti-IgG pAb（eBioscience）0.1 μg を混ぜ合わせ、4 $^{\circ}\text{C}$ で 40

分間培養した。PBS で洗浄後, FACS で解析した²³⁾。

8. 抗 IL-2 受容体 α 鎖抗体 (PC-61) 投与および DSA の測定

制御性 T 細胞が DSA の産生抑制に関与するかどうかを確認するために, 抗 IL-2 受容体 α 鎖抗体 (順天堂大学免疫学講座八木田秀雄准教授より譲渡, 以下 PC-61) を用いた実験を行った。PC-61 は depletion 抗体であり, 投与により制御性 T 細胞を減少させる²⁴⁾。PC-61 の投与回数, 投与量は過去の研究を参考にした²²⁾。心臓移植手術当日から 8 日間柴苓湯 2 g/kg/day を投与し, 手術当日, 術後 3, 6, 9 日目に PC-61 を 100 μ g/day 腹腔内投与した。術後 10 日目に下大静脈より血液を採取し, DSA を測定した。血漿の採取法と DSA 測定は 7. DSA 測定と同様の方法で行った。

さらに, 心臓移植手術当日から 8 日間柴苓湯 2 g/kg/day を投与し, 術後 20 日目に尻尾より血液を採取し, DSA を測定した。PC-61 の投与回数, 投与量は過去の研究を参考にし²²⁾, PC-61 を術後 20, 23, 26 日目に 100 μ g/day 腹腔内投与した。術後 29 日目に尻尾より血液を採取し, DSA を測定した。血漿の採取法と DSA 測定は 7. DSA 測定と同様の方法で行った。

9. 統計検定

フローサイトメーター解析と蛍光強度中央値 (Mean Fluorescent Intensity: 以下 MFI) の検定は Mann-Whitney U test で解析した。P-value が 0.05 未満を有意水準とした。FACS の多群間の検定は analysis of variance (Tukey-Kramer 法) で解析した。

結果

1. 心筋組織保護の Foxp3⁺ 細胞の増加

術後 10 日目に無治療群と柴苓湯投与群の心臓移植片を組織学的に評価した。HE 染

色では、柴苓湯投与群は無治療群に比べ、心筋への細胞浸潤は軽度であり心筋組織は保たれていた（図 2A, B）。冠動脈周囲への細胞浸潤も軽度であった（図 2C, D）。免疫組織染色では、柴苓湯投与群で CD4⁺Foxp3⁺ 細胞が増加していた（図 3）。

2. 脾臓内制御性 T 細胞の増加

術後 10 日目と 20 日目に無治療群と柴苓湯投与群の脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 細胞の割合を測定した。両日とも、柴苓湯投与群は無治療群に比べ、CD4⁺ 細胞中の CD25⁺Foxp3⁺ 細胞の比率が増加していた（図 4A, B）。

3. DSA 産生抑制

術後 10 日目の無治療群、柴苓湯投与群の血液から DSA を測定した。柴苓湯投与群は無治療群に比べ、DSA の産生抑制が認められた（図 5A, B）。術後 20 日目も柴苓湯投与群が無治療群に比べ、DSA の産生抑制が認められた（図 5C, D）。3rd party に対する反応は認められなかった。

4. 制御性 T 細胞による DSA 産生抑制

柴苓湯投与群に術当日、術後 3, 6, 9 日目に PC-61 を投与し、術後 10 日目に DSA を測定した。PC-61 により制御性 T 細胞を除去しても、DSA の抑制は認められなかった。（図 6A, B）。しかし、柴苓湯の効果切れと判断した術後 20 日目から PC-61 を投与し制御性 T 細胞を除去したところ、DSA の増加が認められた（図 6C, D）。

考察

臓器移植における拒絶反応には、細胞性免疫が移植片に対して反応する細胞性拒絶と液性免疫が移植片に対して反応する抗体関連型拒絶がある。抗体関連型拒絶は、移植片を抗原提示された活性化 B 細胞によって産生された DSA が移植片に結合し、補体活性や

血栓形成を起こすと考えられている²⁵⁾。細胞性拒絶が免疫抑制薬で制御可能となりつつある一方で、抗体関連型拒絶は未だ解明されていない点も多く、臓器生着率の悪化の大きな要因として挙げられている。この抗体関連型拒絶に大きく関与するDSAの制御が現在の移植医療の命題と考えられる。そこで、我々は以前我々が報告した柴苓湯の制御性T細胞誘導による長期生着効果に関する基礎研究^{14, 15)}を基に、柴苓湯による急性期DSAの抑制効果を検討した。

柴苓湯投与群の術後10日目に測定したDSAは無治療群と比べて明らかに産生抑制されていた（図5A）。MFIの測定でも同様の結果であった（図5B）。まず、この急性期DSAの産生抑制に、柴苓湯により誘導された制御性T細胞が関与するかどうか調査した。柴苓湯投与後10日目に評価した免疫組織染色ではCD4⁺Foxp3⁺細胞が移植心筋内に多く浸潤し（図3）、HE染色でも心筋構造や血管構造は保たれていた（図2）。柴苓湯投与後10日目と20日目に評価した脾臓内制御性T細胞も増加しており（図4A, B）、柴苓湯投与による制御性T細胞の誘導を確認した。また、柴苓湯内服（術後8日間）の効果は切れる術後20日目に再度測定したDSAも、術後10日目の結果と同じく、産生抑制を認めた（図5C, D）。さらに、術後20日目から制御性T細胞を除去したところDSAの増加が認められた（図6C, D）。つまり、柴苓湯の効果が無い状態でもDSAの産生が抑制された要因は、柴苓湯に誘導された制御性T細胞に依るものと考えられた。制御性T細胞による腎移植後のde novo DSA抑制²⁶⁾やT細胞除去後のDSA産生亢進²⁷⁾などの先行研究と一致して、制御性T細胞がDSA抑制に関与する可能性は高いと考えられた。但し、制御性T細胞を誘導するには我々の異所性心臓移植マウスモデルを使用すると最短でも約7日を要すると考えている²⁸⁾。術後20日目のDSA産生抑制は制御性T細胞によるものと説明可能であるが、術後10日目のDSA産生抑制を制御性T細胞だけで説明することは困難と考えた。そこで、柴苓湯によって誘導された制御性T細胞を除去するために抗CD25

depletion抗体であるPC-61を投与し、DSAが産生抑制されるかどうかを調査したところ、DSAの産生は明らかに抑制されていた（図6A, B）。この結果から、術後10日目までには制御性T細胞の関与ではなく、柴苓湯自身の直接的抑制効果によってDSA産生が抑制されていることが判明した。

今回の実験から、柴苓湯は直接的にDSAの産生抑制を示すと同時に、柴苓湯により誘導された制御性T細胞もDSA産生を抑制したことが示唆された。

引用文献

- 1) 川原敏靖. 臓器移植における免疫抑制 —免疫寛容への挑戦—. 順天堂医学 2010 ; 56 : 314-20.
- 2) 落合武徳. 臓器移植と免疫抑制剤. 化学と生物 1989 ; 27 : 433-8.
- 3) 竹之内盛志. 特集 膠原病・血管炎:ステロイド・免疫抑制剤・生物学的製剤に関連した感染症疾患と治療薬から微生物を推測する. Intensivist 2018 ; 10 : 987-1000.
- 4) 帆足俊彦. 臨床力をアップする リウマチ性疾患と皮膚症状 知っておきたい皮膚症状 免疫抑制剤投与中の皮膚悪性腫瘍. Modern physician 2019 ; 39 : 950-2.
- 5) 富澤 満, 堀 俊太, 前阪 郁賢, 他. 献腎移植後 10 年目に 2 度の大腸穿孔を起こした 1 例. 日本透析学会雑誌 2019 ; 52 : 551-7.
- 6) Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2009 ; 4 : 481-508.
- 7) Complementary medicine is booming worldwide, BMJ 1996 ; 313 : 131-3.
- 8) Kono T, Kanematsu T, Kitajima M. Exodus of Kampo, traditional Japanese medicine, from the complementary and alternative medicines: is it time yet? Surgery 2009 ; 146 : 837-40.
- 9) Kono T, Mamiya N, Chisato N, et al. Efficacy of goshajinkigan for peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in patients with advanced or recurrent colorectal cancer. Evid Based Complement Alternat Med 2011 ; 2011 : 418481.
- 10) Ono T, Liu N, Makino T, et al. Suppressive mechanisms of Sairei-to on mesangial matrix expansion in rat mesangioproliferative glomerulonephritis. Nephron Experimental Nephrology 2005 ; 100 : 132-42.
- 11) Nagamatsu T, Fujii T, Matsumoto J, et al. Theoretical basis for herbal medicines, Tokishakuyaku-San and Sairei-To, in the treatment of recurrent abortion: enhancing the

production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in decidual stromal cells.

American Journal of Reproductive Immunology 2007 ; 57 : 287-93.

- 12) Borigini MJ, Egger MJ, Williams HJ, et al. TJ-114(Sairei-To), an Herbal Medicine in Rheumatoid Arthritis. Journal of Clinical Rheumatology 1996 ; 2 : 309-16.
- 13) Kaburaki T, Qi Zhang, Jin X, et al. Effects of Japanese herbal medicine Sairei-to on murine experimental autoimmune uveitis. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2013 ; 251 : 2733-9.
- 14) Zhang Q, Iwami D, Aramaki O, et al. Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generation of Regulatory Cells by Sairei-to, a Japanese Herbal Medicine. Transplantation 2009 ; 87 : 1787-91.
- 15) 張 琦. 柴苓湯のマウス心臓移植片生着延長に及ぼす効果について. 日東医誌 2010 ; 61 : 138-46.
- 16) Zhang Q, Uchiyama M, Jin X, et al. Induction of regulatory T cells and prolongation of survival of fully allogeneic cardiac grafts by administration of Tokishakuyaku-san in mice. Surgery 2011 ; 150 : 923-33.
- 17) Jin X, Uchiyama M, Zhang Q, et al. Inchingorei-san (TJ-117) and Artemisiae Capillaris Herba Induced Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generated Regulatory Cells in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012 ; 1-9.
- 18) Smith JD, Banner NR, Hamour IM, et al. De novo donor HLA- specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. American Journal of Transplantation 2011 ; 11 : 312-9.
- 19) Makino T, Sasaki S, Ito Y, et al. Pharmacological properties of traditional medicine (XXX):

- effects of Gyokuheifusan(玉屏風散) on murine antigen-specific antibody production. *Biol Pharm Bull* 2005 ; 28 : 110-3.
- 20) Niimi M. The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 30 operations by one surgeon. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2001 ; 20 : 123-8.
 - 21) Yin E, Matsuyama S, Uchiyama M, et al. Graft protective effect and induction of CD4⁺ Foxp3⁺ cell by Thrombomodulin on allograft arteriosclerosis in mice. *J Cardiothorac Surg* 2018 ; 13 : 48.
 - 22) Uchiyama M, Jin X, Matsuda H, et al. An Agonistic Anti-BTLA mAb (3C10) Induced Generation of IL-10-Dependent Regulatory CD4⁺ T Cells and Prolongation of Murine Cardiac Allograft. *Transplantation* 2014 ; 97 : 301-9.
 - 23) Amano H, Bickerstaff A, Orosz GC, et al. Absence of Recipient CCR5 Promotes Early and Increased Allospecific Antibody Responses to Cardiac Allografts. *J Immunol* 2005 ; 174 : 6499-508.
 - 24) Setiady YY, Coccia AJ, Park UP. In vivo depletion of CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγR1 phagocytes. *European Journal of Immunology* 2010 ; 40 : 780-6.
 - 25) Saito S, Matsumiya G, Fukushima N, et al. Successful Treatment of Cardiogenic Shock Caused by Humoral Cardiac Allograft Rejection. *Circulation Journal* 2009 ; 73 : 970-3.
 - 26) Alberu J, Vargas-Rojas MI, Morales-Buenrostro LE, et al. De Novo Donor-Specific HLA Antibody Development and Peripheral CD4⁺CD25^{high} Cells in Kidney Transplant Recipients: A Place for Interaction? *Journal of Transplantation* 2012 ; 2012 : 302539.
 - 27) Oh B, Yoon J, Farris III A, Kirk A, et al. Rapamycin Interferes With Postdepletion Regulatory T Cell Homeostasis and Enhances DSA Formation Corrected by CTLA4-Ig.

American Journal of Transplantation 2016 ; 16 : 2612-23.

- 28) Uchiyama M, Jin X, Zhang Q, et al. Auditory stimulation of opera music induced prolongation of murine cardiac allograft survival and maintained generation of regulatory CD4+CD25+ cells. Journal of Cardiothoracic Surgery 2012 : 7 : 26.

図の説明

図1 異所性（腹部）心臓移植術

A: C57BL/6ドナーの心臓をCBAレシピエントの腹部に手術用顕微鏡を用いて心移植を行う。

B: CBAレシピエントの腹部大動脈にC57BL/6ドナー心臓の上行大動脈を吻合する。次に、CBAレシピエントの下大静脈にC57BL/6ドナー心臓の肺動脈を吻合する。吻合の手順は①～⑧の手順で行う。

C: 血流はCBAレシピエントの腹部大動脈からC57BL/6ドナー心臓の上行大動脈に逆行性に流れ、冠動脈に流入し心筋を栄養する。冠動脈に流れた血液は冠静脈、冠静脈洞を経由し、右房の冠静脈洞口から排出される。排出された血液は右房、右室を経由し、肺動脈からCBAレシピエントの下大静脈へ流れる。（赤線: 動脈血流, 青線: 静脈血流）

RAA: Recipient Abdominal Aorta レシピエントの腹部大動脈

RIVC: Recipient Inferior Vena Cava レシピエントの下大静脈

DAA: Donor Ascending Aorta ドナーの上行大動脈

DPA: Donor Pulmonary Artery ドナーの肺動脈

CS: Coronary Sinus 冠静脈洞

図2 心臓移植片のヘマトキシリン・エオジン染色

柴苓湯投与群と無治療群の術後10日目の移植心に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行った（A, B: 心筋, C, D: 心筋内冠動脈）。

図3 心臓移植片の免疫組織染色

柴苓湯投与群と無治療群の移植後10日目の移植心に対して免疫組織染色を行った。

図4 脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の分析

A, B: 心臓移植後 10 日目 (A) と 20 日目 (B) に 柴 苓 湯 投 与 群 と 無 治 療 群 の 脾 細 胞 を 採 取 し, CD4, CD25, Foxp3 に 対 す る 蛍 光 色 素 標 識 し た 抗 体 で 染 色 し, フ ロー サ イ ト メ ー タ ー で 解 析 し た (#: $P < 0.05$, ###: $P < 0.001$) 。

図5 ドナー特異的抗体 (DSA) の分析

A, B: 柴 苓 湯 投 与 群 と 無 治 療 群 の 術 後 10 日 目 の DSA 評 価 (A: ヒ ス ト グ ラ ム, B: 蛍 光 強 度 中 央 値, #: $P < 0.05$)

C, D: 柴 苓 湯 投 与 群 と 無 治 療 群 の 術 後 20 日 目 の DSA 評 価 (C: ヒ ス ト グ ラ ム, D: 蛍 光 強 度 中 央 値, #: $P < 0.05$)

図6 抗 IL-2 受容体 α 鎖抗体 (PC-61) 投与後の DSA の分析

A: 柴 苓 湯 投 与 群 と 抗 IL-2 受 容 体 α 鎖 抗 体 を 投 与 し た 柴 苓 湯 投 与 群 の 術 後 10 日 目 の ヒ ス ト グ ラ ム に よ る DSA 評 価

B: 柴 苓 湯 投 与 群, 抗 IL-2 受 容 体 α 鎖 抗 体 を 投 与 し た 柴 苓 湯 投 与 群 と 無 治 療 群 の 術 後 10 日 目 の 蛍 光 強 度 中 央 値 に よ る DSA の 評 価 (NS: not significant)

C: 柴 苓 湯 投 与 群 (術 後 20 日 目) と 柴 苓 湯 投 与 + 抗 IL-2 受 容 体 α 鎖 抗 体 術 後 20, 23, 26 日 目 投 与 群 (術 後 29 日 目) の ヒ ス ト グ ラ ム に よ る DSA の 評 価

D: 柴 苓 湯 投 与 群 と 無 治 療 群 の 抗 IL-2 受 容 体 α 鎖 抗 体 投 与 前 後 (投 与 前: 術 後 20 日, 投 与 後: 術 後 29 日) で の 蛍 光 強 度 中 央 値 に よ る DSA の 評 価

Saireito induced the suppression of donor-specific antibody in a murine cardiac allograft

transplant model

Akira Inoue, Masateru Uchiyama, Masanori Niimi

Department of Surgery, Teikyo University, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

Abstract

Background: We have reported that Saireito could induce the long-term cardiac allograft survival through the generation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells (regulatory T cells). However, little is known about the effect of donor-specific antibody (DSA) that plays an important role in the long-term engraftment. We investigated the effects of Saireito on DSA production in the acute phase in a murine model of cardiac allograft transplantation.

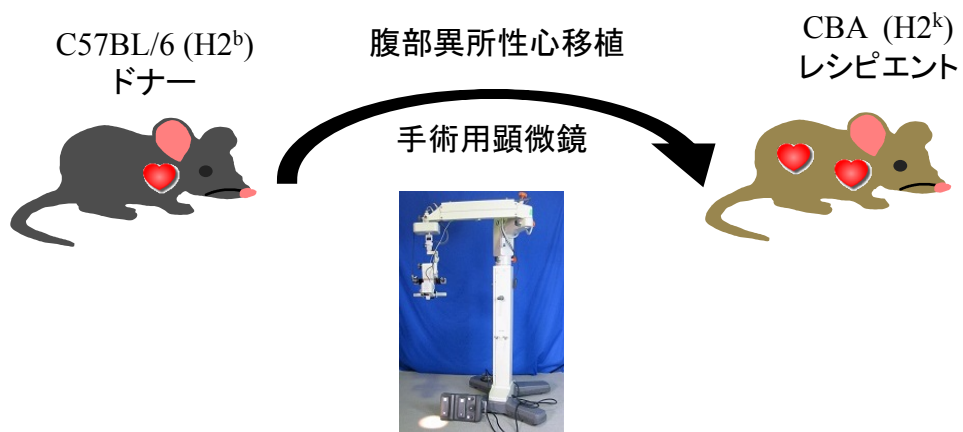
Method: CBA mice underwent transplantation of a C57BL/6 heart and received oral administration of 2 g/kg per day of Saireito from the day of transplantation until 7 days afterward. Histologic and flow cytometry analyses were performed. Moreover, to confirm the involvement of regulatory T cell, anti-interleukin-2 receptor alpha antibody (PC-61) was administered to a Saireito-treated CBA recipient.

Results: Flow cytometry studies on postoperative day 10 showed an increased CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cell population in splenocytes and suppression of DSA production. Immunohistochemical studies showed more CD4⁺Foxp3⁺ cells in myocardium. Moreover, DSA production was suppressed on postoperative day 20 when the effect of Saireito was wearing off. Administration of PC-61 attenuated DSA production in Saireito-treated CBA recipients.

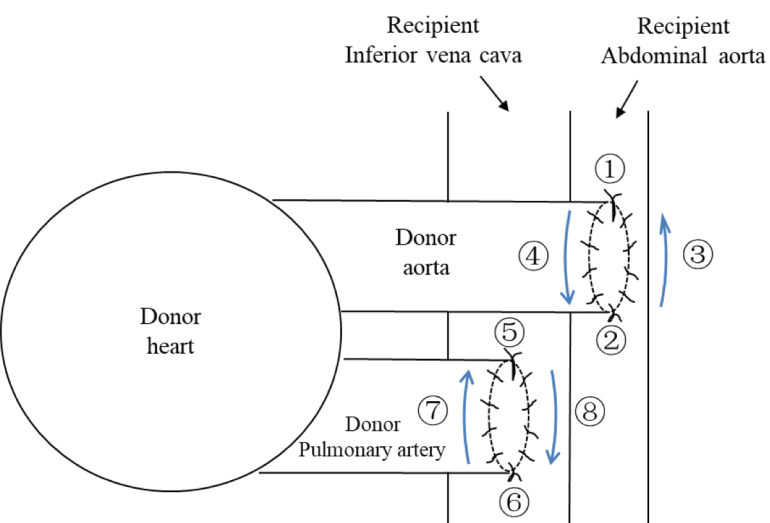
Conclusion: Saireito could suppress DSA production in the acute phase through its direct immunosuppressive effect and induction of regulatory T cells.

図1

A



B



C

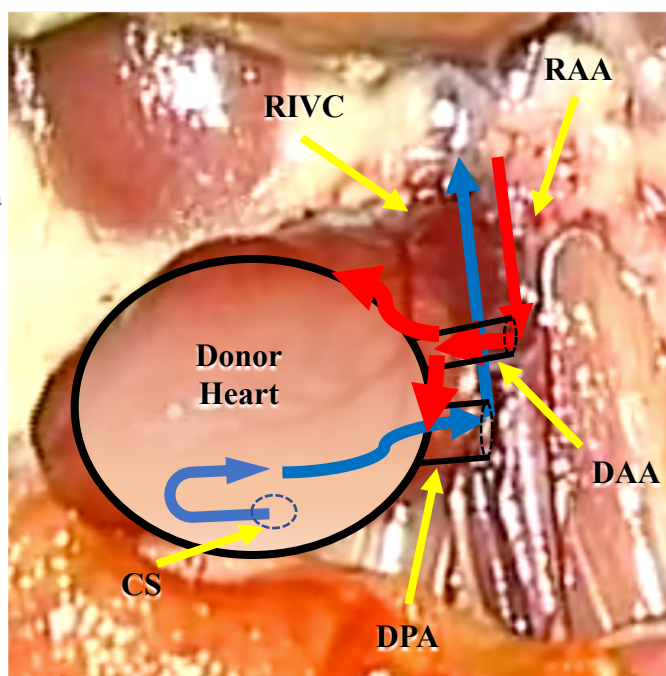


図2

柴苓湯投与群

無治療群

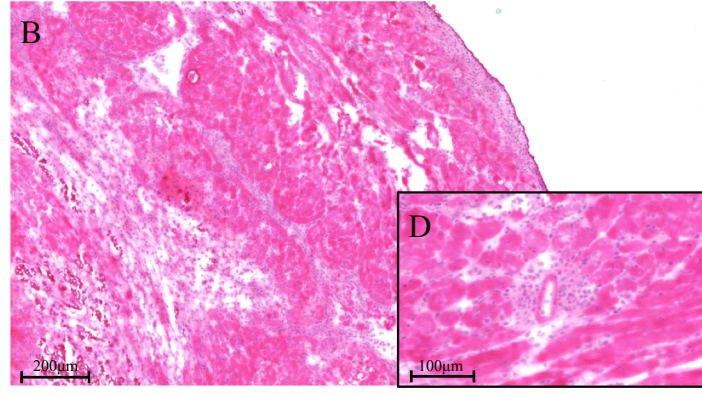
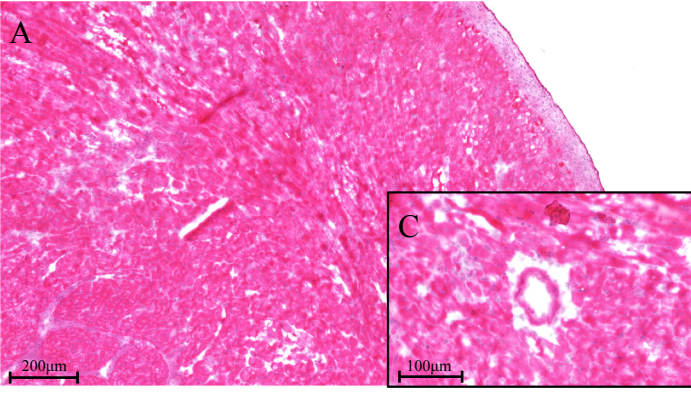
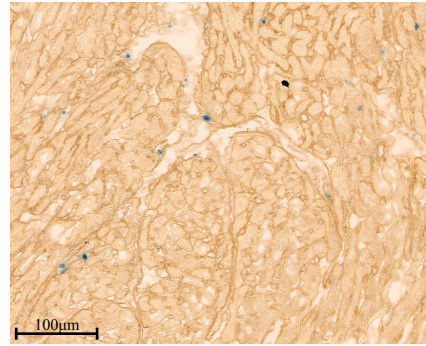
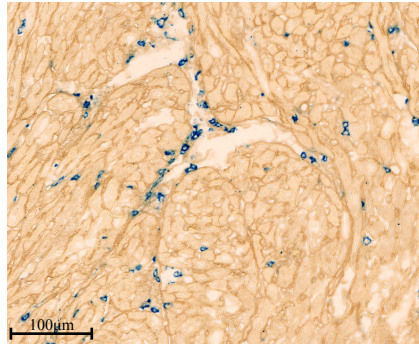


図3

CD4

Foxp3

柴苓湯
投与群



無治療群

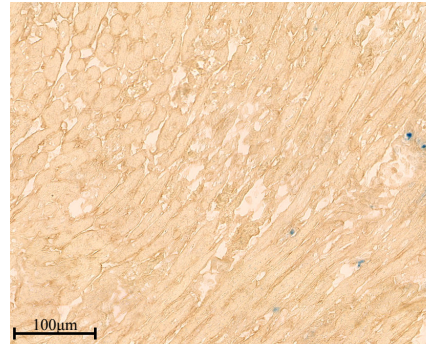
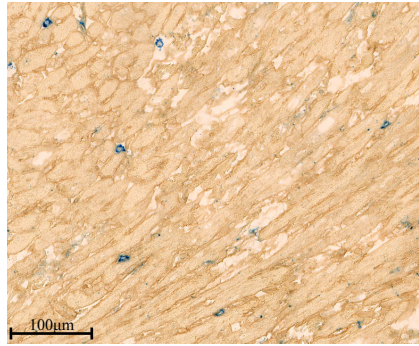


図4

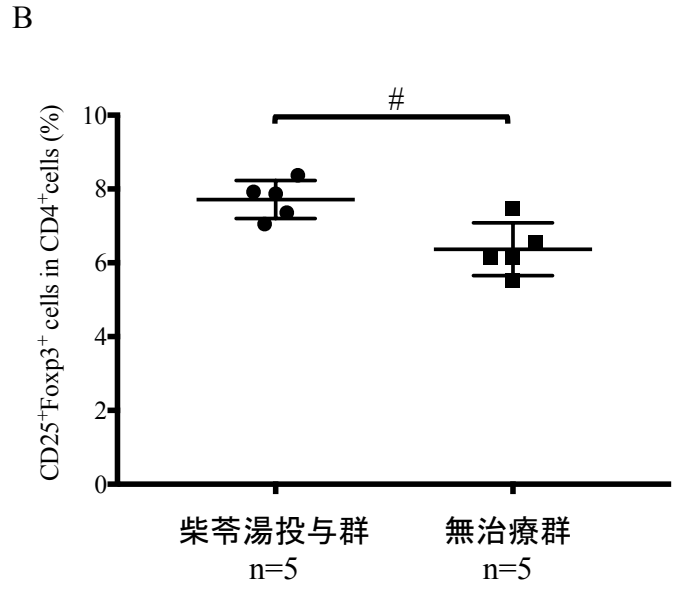
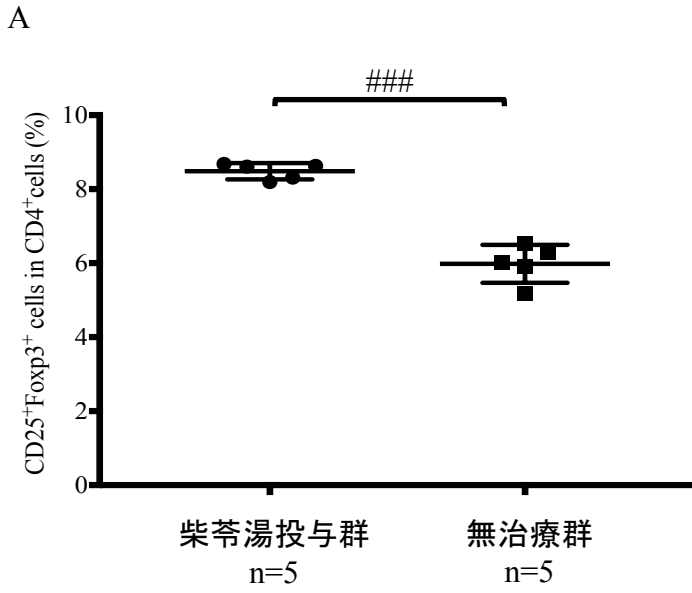
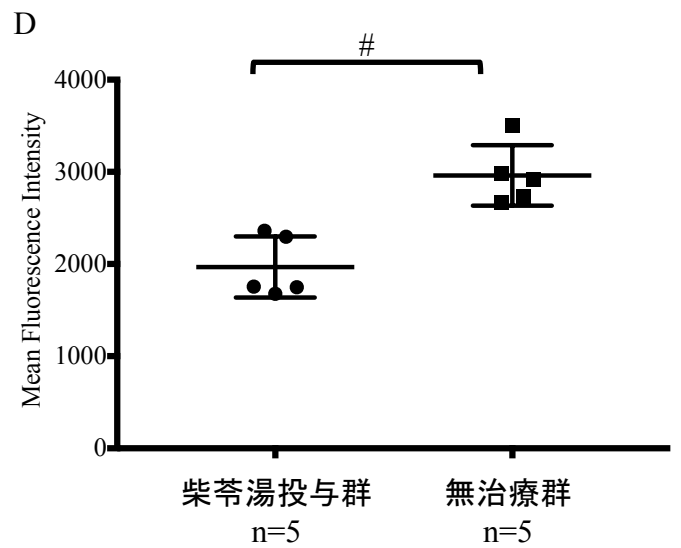
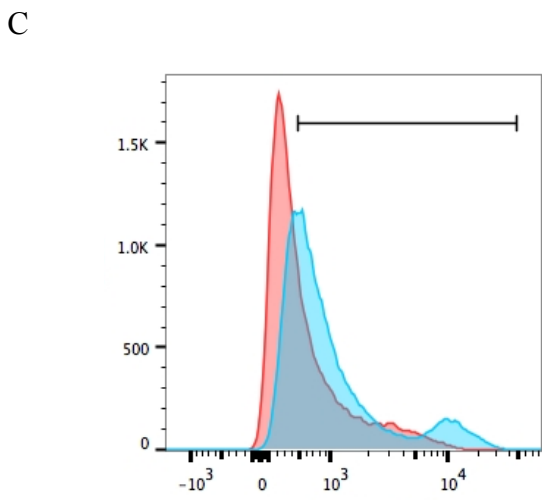
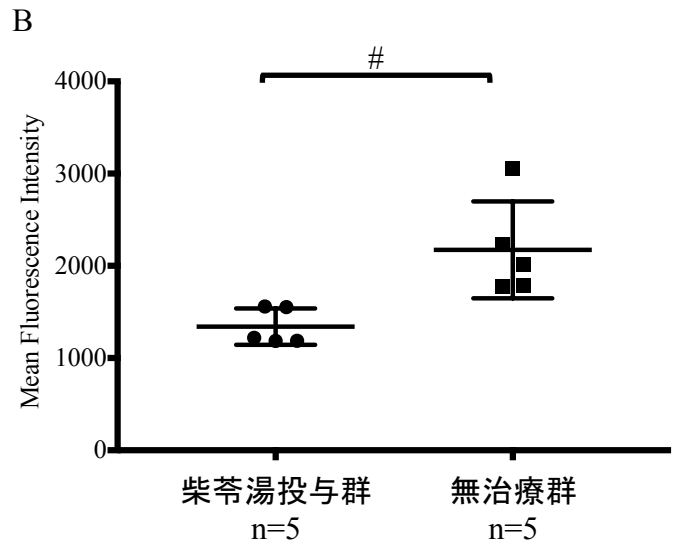
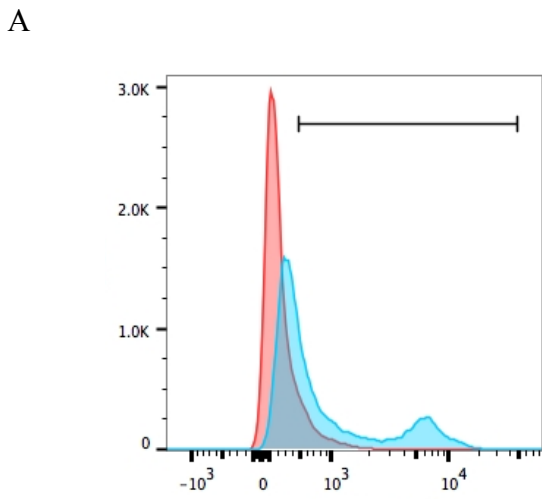


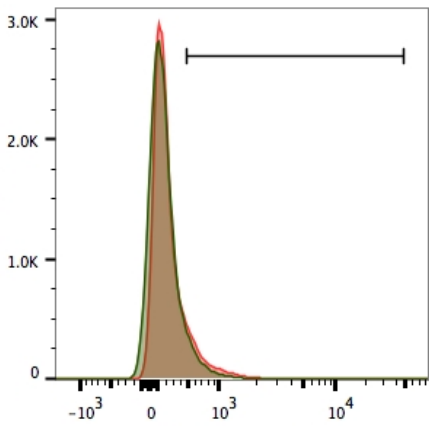
図5



: 柴苓湯投与群
 : 無治療群

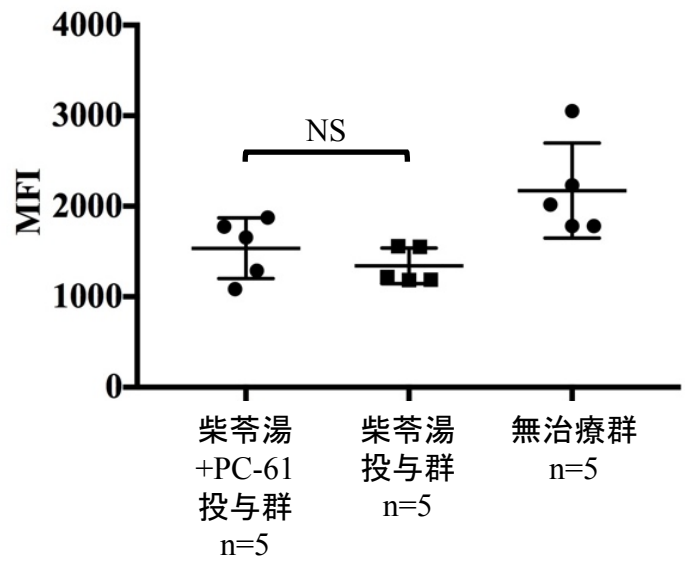
図6

A

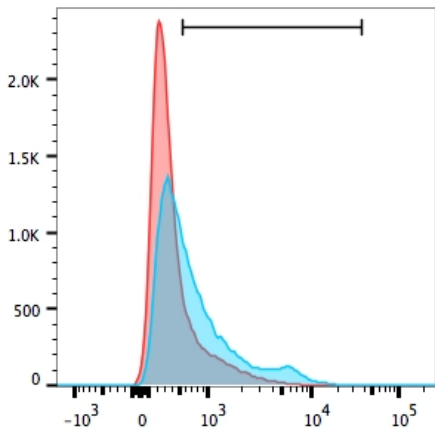


:柴苓湯投与群(術後10日目)
 :柴苓湯+PC-61投与群(術後10日目)

B



C



:柴苓湯投与群(術後20日目)
 :柴苓湯
+PC-61術後20,23,26日目投与群
(術後29日目)

D

