

氏 名（本籍）	桑 原 康 人（愛 知 県）
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第97号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	ネコの移植適合試験に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 佐々木 榮 英 副査 帯広畜産大学 教 授 品 川 森 一 副査 岩 手 大 学 教 授 内 藤 善 久 副査 東京農工大学 教 授 山 根 義 久 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、伴侶動物に対する飼育者の意識の高まりに伴いイヌおよびネコに対しても高度医療が要求されるようになり、それに応じた研究が進んでいる。臓器移植もその一つであるが、これには移植片に対する拒絶反応の克服が最も大きな問題である。ネコでは、腎移植の研究が進んでいるが、移植免疫学的な研究はほとんど進展していない。

本研究では、超急性または促進型急性拒絶反応に関与するリンパ球交叉試験と急性または慢性拒絶反応に関与すると言われていたネコの主要組織適合性複合体（FLA）クラス II DRB の遺伝子タイピングについて臨床応用を目的とした研究を行った。

リンパ球交叉試験における条件設定を検討したところ、生存リンパ球の分離は、Ficoll-diatrizoate を 20℃ で比重 1.078 に調整し、4℃、800xg で 30 分間遠心分離する方法が最も良好であった。リンパ球交叉試験は、T および B 細胞について、各々温式（37℃）抗体と寒冷式（4℃）抗体の有無を検索する必要がある。T および B 細胞の分収にナイロンウールカラムを使用したところ、カラム流出細胞の 95% は T 細胞であったが、カラム付着細胞の B 細胞の純度は 41% であった。前者を T 細胞液とし、後者を B 細胞液とした。B 細胞液純度は低かったが、T 細胞液の結果と組み合わせて判断することによって、移植適合検査として利用することができた。リンパ球の生死の判定は、エオジン染色法よりトリパンブルー染色法の方が容易で時間も短縮できた。この方法を用いて、15 ペアのネコについてリンパ球交叉試験を行ったところ、1 ペアで抗 B 細胞寒冷式抗体が疑陽性であった。2 ペアのネコで行った腎移植前後のリンパ球交叉試験では、移植後の拒絶反応発症時に 2 ペアとも抗 T 細胞温式抗体が陽転し、1 ペアでは抗 T 細胞寒冷式抗体も陽転した。今回の方法によるリ

ンパ球交叉試験は、移植適合試験として臨床応用できると考えられた。

急性拒絶反応にはドナーとレシピエントの主要組織適合性複合体(MHC)のタイプの違いが関連すると考えられており、ヒトの臓器移植に際しては移植適合試験として、必ず血清学的タイピング、リンパ球混合培養反応(MLR)または遺伝子タイピングなどによってMHCのタイピングが行われている。ネコでは血清学的タイピングが困難で、MLRの反応性も低く評価が難しいため、遺伝子タイピングが最も適していると考えられる。

FLA クラス II DRB の遺伝子は、これまでに 61 種類が報告されているが、今回 9 頭のネコから直接塩基配列決定法によって 5 種類の新しい遺伝子を発見した。この 66 種の遺伝子についてグループ特異的プライマーを併用した polymerase chain reaction (PCR) -restriction fragment length (RFLP) 法を試みた。66 種の DRB 遺伝子を 5'末端のアミノ酸配列の違いによって 8 グループに分けるグループ特異的プライマーを作成した。それぞれのグループに分類された遺伝子を制限酵素によって細切して RFLP タイピングを行った。その結果、66 の遺伝子を 37 の遺伝子と 10 のサブグループに分けることができた。9 頭のネコについて直接塩基配列決定法とグループ特異的プライマーを併用した PCR-RFLP 法の比較を行ったところ、6 頭のネコでは両法による結果は一致したが、3 頭では直接塩基配列決定法の結果より 1 つまたは 2 つ多い DRB 遺伝子がグループ特異的プライマーによって増幅された。このことから今回行った PCR-RFLP 法の精度はかなり高いと考えられた。グループ特異的プライマーを併用した PCR-RFLP 法は、FLA クラス II DRB の遺伝子タイピングに応用できると思われた。さらに 68 頭のネコに PCR-RFLP 法を応用したところ、1 頭当たり 1~6、全体では延べ 203 の遺伝子およびサブグループが検出された。検出された遺伝子およびサブグループは G1-1a (28.8%)、DRB*0501 (10.3%)、G1-2a (9.4%)および G6b (7.4%)の順に多かった。

ゲノム遺伝子の中には、RNA に転写されず機能しない遺伝子が知られている。そこで 28 頭のネコについてゲノム DNA と RNA の DRB 遺伝子を比較するため、抽出した RNA にグループ特異的プライマーを併用した逆転写 (RT)-PCR-RFLP 法によるタイピングを試みた。28 頭中 9 頭では、ゲノム DNA からと RNA からの遺伝子およびサブグループは一致したが、残り 19 頭では RNA からの遺伝子およびサブグループ数がゲノム DNA からの数より 1~4 種類少なかった。個々のネコのゲノム DNA からは 2~6 の、RNA からは 1~3 の DRB 遺伝子およびサブグループが検出され、ネコはゲノム DNA に少なくとも 3 つの遺伝子座を持つが、そのうちすべてが発現しているわけではないことが示唆された。したがって、FLA-DRB 遺伝子タイピングを臓器移植の適合試験や DRB 遺伝子の臨床的な意義の検討に利用するには、RT-PCR-RFLP 法を行う必要があると考えられた。

今回の RT-PCR-RFLP 法によってタイピングされた DRB 発現遺伝子の一致率が、ネコの移植免疫に関与しているか否かを確かめるために、2 つの不一致遺伝子を持つペアを A 群、1 つの不一致遺伝子を持つペアを B 群、不一致遺伝子を持たないペアを C 群として、各群間における皮膚移植片の生存日数および MLR の stimulation index (SI) を比較した。その結果、A 群と B 群の皮膚移植片の生存日数には有意な差は認められなかったが、C 群では A 群と B 群に比較して有意に延長した。また、C 群では MLR の SI も A および B 群に比較し低い傾向にあった。したがって、今回の RT-PCR-RFLP 法によってタイピングされた FLA-DRB 遺伝子の一致率は、ネコの移植免疫に関与していることが確認された。

本研究で検討されたリンパ球交叉試験とグループ特異的プライマーを併用した RT-PCR-RFLP 法による FLA-DRB 発現遺伝子のタイピングは、ネコの移植適合試験として有用であることが明らかにされた。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、伴侶動物に対する飼育者の意識の高まりに伴いイヌおよびネコに対しても高度医療が要求されるようになり、それに応じた研究が進んでいる。臓器移植もその一つであるが、これには移植片に対する拒絶反応の克服が最も大きな問題である。ネコでは、腎移植の研究が進んでいるが、移植免疫学的な研究はほとんど進展していない。

本研究では、超急性または促進型急性拒絶反応に関与するリンパ球交叉試験と急性または慢性拒絶反応に関与すると言われていたネコの主要組織適合性複合体 (FLA) クラス II DRB の遺伝子タイピングについて臨床応用を目的とした研究を行った。

リンパ球交叉試験における条件設定を検討したところ、生存リンパ球の分離は、Ficoll-diatrizoate を 20℃ で比重 1.078 に調整し、4℃、800xg で 30 分間遠心分離する方法が最も良好であった。リンパ球交叉試験は、T および B 細胞について、各々温式 (37℃) 抗体と寒冷式 (4℃) 抗体の有無を検索する必要がある。T および B 細胞の分取にナイロンウェルカラムを使用したところ、カラム流出細胞の 95% は T 細胞であったが、カラム付着細胞の B 細胞の純度は 41% であった。前者を T 細胞液とし、後者を B 細胞液とした。B 細胞液純度は低かったが、T 細胞液の結果と組み合わせて判断することによって、移植適合検査として利用することができた。リンパ球の生死の判定は、エオジン染色法よりトリパンブルー染色法の方が容易で時間も短縮できた。この方法を用いて、15 ペアのネコについてリンパ球交叉試験を行ったところ、1 ペアで抗 B 細胞寒冷式抗体が疑陽性であった。2 ペアのネコで行った腎移植前後のリンパ球交叉試験では、移植後の拒絶反応発症時に 2 ペアとも抗 T 細胞温式抗体が陽転し、1 ペアでは抗 T 細胞寒冷式抗体も陽転した。今回の方法によるリンパ球交叉試験は、移植適合試験として臨床応用できると考えられた。

急性拒絶反応にはドナーとレシピエントの主要組織適合性複合体 (MHC) のタイプの違いが関連すると考えられており、ヒトの臓器移植に際しては移植適合試験として、必ず血清学的タイピング、リンパ球混合培養反応 (MLR) または遺伝子タイピングなどによって MHC のタイピングが行われている。ネコでは血清学的タイピングが困難で、MLR の反応性も低く評価が難しいため、遺伝子タイピングが最も適していると考えられる。

FLA クラス II DRB の遺伝子は、これまでに 61 種類が報告されているが、今回 9 頭のネコから直接塩基配列決定法によって 5 種類の新しい遺伝子を発見した。この 66 種の遺伝子についてグループ特異的プライマーを併用した polymerase chain reaction (PCR) -restriction fragment length (RFLP) 法を試みた。66 種の DRB 遺伝子を 5' 末端のアミノ酸配列の違いによって 8 グループに分けるグループ特異的プライマーを作成した。それぞれのグループに分類された遺伝子を制限酵素によって細切して RFLP タイピングを行った。その結果、66

の遺伝子を 37 の遺伝子と 10 のサブグループに分けることができた。9 頭のネコについて直接塩基配列決定法とグループ特異的プライマーを併用した PCR-RFLP 法の比較を行ったところ、6 頭のネコでは両法による結果は一致したが、3 頭では直接塩基配列決定法の結果より 1 つまたは 2 つ多い DRB 遺伝子がグループ特異的プライマーによって増幅された。このことから今回行った PCR-RFLP 法の精度はかなり高いと考えられた。グループ特異的プライマーを併用した PCR-RFLP 法は、FLA クラス II DRB の遺伝子タイピングに応用できると思われた。さらに 68 頭のネコに PCR-RFLP 法を応用したところ、1 頭当たり 1~6、全体では延べ 203 の遺伝子およびサブグループが検出された。検出された遺伝子およびサブグループは G1-1a (28.8%)、DRB*0501 (10.3%)、G1-2a (9.4%) および G6b (7.4%) の順に多かった。

ゲノム遺伝子の中には、RNA に転写されず機能しない遺伝子が知られている。そこで 28 頭のネコについてゲノム DNA と RNA の DRB 遺伝子を比較するため、抽出した RNA にグループ特異的プライマーを併用した逆転写 (RT)-PCR-RFLP 法によるタイピングを試みた。28 頭中 9 頭では、ゲノム DNA からと RNA からの遺伝子およびサブグループは一致したが、残り 19 頭では RNA からの遺伝子およびサブグループ数がゲノム DNA からの数より 1~4 種類少なかった。個々のネコのゲノム DNA からは 2~6 の、RNA からは 1~3 の DRB 遺伝子およびサブグループが検出され、ネコはゲノム DNA に少なくとも 3 つの遺伝子座を持つが、そのうちすべてが発現しているわけではないことが示唆された。したがって、FLA-DRB 遺伝子タイピングを臓器移植の適合試験や DRB 遺伝子の臨床的な意義の検討に利用するには、RT-PCR-RFLP 法を行う必要があると考えられた。

今回の RT-PCR-RFLP 法によってタイピングされた DRB 発現遺伝子の一致率が、ネコの移植免疫に関与しているか否かを確かめるために、2 つの不一致遺伝子を持つペアを A 群、1 つの不一致遺伝子を持つペアを B 群、不一致遺伝子を持たないペアを C 群として、各群間における皮膚移植片の生存日数および MLR の stimulation index (SI) を比較した。その結果、A 群と B 群の皮膚移植片の生存日数には有意な差は認められなかったが、C 群では A 群と B 群に比較して有意に延長した。また、C 群では MLR の SI も A および B 群に比較し低い傾向にあった。したがって、今回の RT-PCR-RFLP 法によってタイピングされた FLA-DRB 遺伝子の一致率は、ネコの移植免疫に関与していることが確認された。

本研究で検討されたリンパ球交叉試験とグループ特異的プライマーを併用した RT-PCR-RFLP 法による FLA-DRB 発現遺伝子のタイピングは、ネコの移植適合試験として有用であることが明らかにされた。

以上について、審査委員会全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. KUWAHARA, Y., KOBAYASHI, R., IWATA, J., KITO, K., KITAGAWA, H., and SASAKI, Y. (1999). Method of lymphocytotoxic crossmatch test for feline renal transplantation. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 481-485.
2. KUWAHARA, Y., KITO, K., KOBAYASHI, R., IWATA, J., OHNE, R., HOSOKAWA, T., MATSUMOTO, Y., KITAGAWA, H., and SASAKI, Y. (2000). Genotyping of feline MHC (FLA) class II DRB by PCR-RFLP method using group-specific primers. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 1283 - 1289.

既発表学術論文

1. KITAGAWA, H., SASAKI, Y., ISHIHARA, K., and KUWAHARA, Y. (1990). Development of artificial model of caval syndrome in canine heartworm disease. *Jpn J. Vet. Sci.* 52: 1029-1035.
2. KITAGAWA, H., SASAKI, Y., ISHIHARA, K., and KUWAHARA, Y. (1990). Laboratory test results in artificial model of caval syndrome in canine heartworm disease. *Jpn J. Vet. Sci.* 52: 1123-1125.
3. KUWAHARA, Y., KITAGAWA, H., SASAKI, Y., and ISHIHARA, K. (1991). Cardiopulmonary values in dogs with artificial model of caval syndrome in heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 59-64.
4. KITAGAWA, H., WAKAMIA, H., KITO, K., KUWAHARA, Y., OHBA, Y., ISAJI, M., IWASAKI, T., and SASAKI, Y. (1997). Efficacy of monotherapy with Benazepril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, in dogs with naturally acquired chronic mitral insufficiency. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 513-520.
5. 桑原康人, 桑原典枝, 吉田智美, 岩崎利郎 (1997). 両耳介末端壊死をともなう犬のクリオフィブリノーゲン血症の1例. *日本獣医師会雑誌*. 50: 657~659.
6. KITAGAWA, H., KITO, K., OHBA, Y., KUWAHARA, Y., IWASAKI, T., and SASAKI, Y. (1998). Comparison of laboratory test results before and after surgical removal of heartworms in dogs with vena caval syndrome. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213:1134-1136.