

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isobe M, Suzuki J: Prevention of transplantation associated arteriosclerosis. The Ischemic Heart, ed. Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, Dhalla NS, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp551-562, 1998
- 2) Isobe M: Sensitive detection of cardiac allograft rejection by radioimmune scintigraphy targeting accessory molecules on cardiac myocytes. Cardiac Allograft Rejection. ed. Dec W, Ballester M, Narula J, Springer-Verlag, in press.
- 3) Isobe M, Hori J, Suzuki J: Immunosuppression by blocking $\alpha 4$ integrin and VCAM-1. Cur Top Microbiol Immunol 231: 85-98, 1998
- 4) Isobe M, Suzuki J: New approaches to the management of acute and chronic cardiac allograft rejection. Jpn Circ J, [Special article] 62: 315-327, 1998
- 5) Suzuki J, Isobe M, Aoki M, Morishita M, Yamazaki S, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Antisense Cdk2 kinase oligonucleotide inhibits ICAM-1 expression in murine cardiac allograft arteriopathy. Transplant Proc, 30: 89-90, 1998
- 6) Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Down-regulation of endothelin-1 expression in allograft coronary arteries after gene therapy targeting cdk2 kinase. Transplant Proc, 30 : 1007-1008, 1998
- 7) Yamazaki S, Isobe M, Suzuki J, Tojo S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Role of selectin-dependent adhesion in cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant, 17: 1007-16, 1998
- 8) Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Sensitive diagnosis of cardiac allograft rejection by detection of cytokine transcription in situ. Cardiovasc Res, 40: 307-313, 1998
- 9) Watanabe Y, Yoshimura R, Wada S, Suzuki J, Ohyama A, Kishimoto T, Isobe M: Nonmuscle and smooth muscle myosin heavy-chain expression in rat renal allografts. Transplant Proc 30: 2024-2025, 1998
- 10) Schoenbeck A, Isobe M, Suzuki J, Kato M, Kitazawa N, Amano J, Endoh M, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Expression of cell division cycle 2 kinase transcription in chronically rejected cardiac allografts of non-human primates. Heart Vessels, 12: 275-279, 1997
- 11) Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M: Cytokine profile of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. Transplantation, 66: 1504-1510, 1998
- 12) Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Prevention of cardiac allograft arteriopathy by antisense cdc2 kinase oligonucleotide. Transplant Proc, 31: 867-868, 1999
- 13) Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Antisense cdc2 kinase oligonucleotide inhibits adhesion molecule expression in cardiac allograft arteriopathy. Transplant Proc, 31: 955-956, 1999
- 14) Yamagami S, Tsuru T, Endo H, Isobe M: Supression of allograft rejection with anti- $\alpha\beta$ T cell receptor antibody in rat corneal transplantation. Transplantation, in press
- 15) Suzuki J, Isobe M, Okubo Y, Amano J, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Differential regulation of cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. Transplant Immunol, in press

2. 学会発表

- 1) 磯部光章, 鈴木淳一, 山崎諭, 関口守衛:
「移植心生着におけるサイトカイン産生パターン: 特異的免疫抑制と非特異的免疫抑制に対する反応の差」, 第2回日本適応医学会, 東京, 1998
- 2) 鈴木淳一, 磯部光章, 天野純, 森下竜一, 澤芳樹, 伊沢淳, 高橋済, 関口守衛, 荻原俊男, 松田暉: 「アンチセンス遺伝子導入による移植心冠動脈硬化の予防」, 第16回日本心臓移植研究会, 東京, 1998
- 3) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Ogihara T, Sekiguchi M: "Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis with single intraluminal delivery of decoy to transcription factor E2F", 第62回日本循環器学会学術集会総会, 東京, 1998
- 4) 鈴木淳一, 磯部光章, 山崎諭, 関口守衛, 天野純: 「In situ RT-PCR法による心拒絶抑制機序の解析: 細胞接着阻害とFK506治療によるサイトカイン発現の比較」, 第62回日本循環器学会学術集会総会, 東京, 1998
- 5) 鈴木淳一, 磯部光章, 山崎諭, 関口守衛, 天野純, 川内基裕: 「細胞外マトリックス分解酵素発現による心臓拒絶の早期診断 - ニホンザル移植心における検討」, 第62回日本循環器学会学術集会総会, 東京, 1998
- 6) 鈴木淳一, 磯部光章, 山崎諭, 伊沢淳, 高橋済, 関口守衛: ワークショップ「移植免疫寛容の誘導」, 「細胞接着阻害による免疫寛容の誘導」, 第5回日本臓器保存生物医学会総会, 東京, 1998
- 7) 磯部光章, 「移植心冠動脈硬化の遺伝子治療」, 第5回Vascular Remodeling研究会, 東京, 1998年
- 8) Suzuki J, Isobe M, Izawa A, Morishita R, Sawa Y, Kaneda Y, Ogihara T, Amano J, Sekiguchi M: E2F decoy prevents arteriosclerosis and suppresses adhesion molecule expression in murine heart allografts. 第34回日本移植学会総会, 東京, 1998
- 9) 渡邊美博, 吉村力勇, 和田誠次, 岸本武利, 鈴木淳一, 永井良三, 磯部光章: ラット腎移植モデルにおける nonmuscle myosin heavy chain (SMemb)の表現. 第34回日本移植学会総会, 東京, 1998年
- 10) 川内基裕, 磯部光章, 鈴木淳一, 中島淳, 竹田誠, 遠藤宗幹, 岡輝明, 高本眞一: 異種移植肺における非筋型ミオシン重鎖, 細胞外マトリックス分解酵素の発現. 第2回日本異種移植研究会, 広島, 1999年
- 11) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Ogihara T, Sekiguchi M: Antisense oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. 第63回日本循環器学会学術集会, 東京, 1999年
- 12) 鈴木淳一: Novel strategy of gene therapy in attenuating acute rejection and arteriosclerosis with a single intraluminal delivery of decoy against nuclear factor-kappa B. Young Investigator's Award 審査講演, 第63回日本循環器学会学術集会, 東京, 1999年
- 13) 鈴木淳一, 磯部光章, 関口守衛, 川内基裕, 高本眞一, 天野純: Hepatocyte growth factor及びVascular endothelial growth factor 発現による心臓拒絶の早期診断. 第63回日本循環器学会学術集会, 東京, 1999年

G 知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

研究課題 大型動物（イヌ）による免疫寛容モデルに関する研究

分担研究者 渡部浩二 北里大学医学部免疫学助教授

研究協力者 猪股裕紀洋 京都大学大学院医学研究科移植免疫助教授

研究要旨 臨床臓器移植を推進させるためには、より安全な免疫抑制法が必要である。それには、生体の防御機構を損なわずに免疫抑制剤をできる限り少量用いて、生体の免疫応答を移植臓器に対する反応をのみ抑制する免疫寛容状態に誘導させる方策が望まれている。現在、大動物イヌをモデルにして術前recipient (R) の全身のリンパ組織への選択的少量のX線の照射、腎移植時に腎(D)からの骨髄移植(BMT), 術後少量の短期間の免疫抑制剤FK506 の併用療法で目的を達成しつつ改良を重ねている。

A. 研究目的

小動物で成功している免疫寛容の誘導法は、すぐには大動物や臨床には応用できないが、後者での有効な方法は臨床応用に近づけることが可能である。我々はbeagle成犬を用い、従来の免疫抑制剤を出来るだけ少なく用いて、臓器移植時前後の比較的短期間に有効で安全な免疫学的処置を行うことによって、同種移植片を生着維持させる方策を確立することを目的にしている。

B. 研究方法

1) イヌの組織適合抗原の解析

これまで、DLA-DRB1遺伝子の解析に22種のsequence specific oligonucleotide(SSO)プローブを作製し、当施設で自家繁殖犬のfamily studyを行いプローブの改良を試みているが、まだ実際の(D), (R) のtypingの段階には至っていない。そこで、今年度はまず、イヌの遺伝学的にhomozygousな系を得る方法の確立に着手した(PCR-SSCP; Single Strand Conformation Polymorphism)。

非血縁間で、雌雄が異なり、従来施行しているMLR 高反応のpairs についてretrospectiveに上記のPCR-SSCP法によって得られた結果と比較した。

2) Homozygousなイヌの作製

PCR-SSCP法によりfamily studyを実施し、同じtypeの雌、雄を選定し、第2代、第3代のmatingを行い、homozygousなイヌの系を作製する。

3) Recipient (R) の処置

a) (R) の全身のリンパ組織へ術前選択的X線照射(4MeV)(Fractionated Lymphoid Irradiation), 150rads/d 3日間の連日照射、

b) 腎移植(KGT) 時に腎(D) からのPHA 無反応(D) BMCの移植。

c) 術後、FK506(FK) の3か月間のみの連日、筋注投与方法。

4) 術後の免疫学的モニタリング

(D), (R) 間のMLR およびLymphocytotoxicityの他に、a) 術後90日間のFK投与中止後、機能良好な生着例について、中止後約1か月を経た症例について、腎、骨髄(D) および固定した第3者(D) からの皮膚移植片(SG)の生着を観察した。b) 膝窩リンパ節より得たリンパ球によるMLR への抑制効果を検索した。また、術前に同リンパ球を保存した。通常、 2×10^7 /ml をセラミチューブに入れて、 -190°C 下のLN2 貯蔵槽で保存した。MLR に添加する細胞として、術後の①末梢血リンパ球、②術後、両側の上腕骨頭より穿刺によって得た細胞、③術後、照射後の膝窩リンパ節細胞、および上記の保

存細胞である。術後karyotypingにより donorBMCs の生着の有無を検索した。上記と同様に骨髓穿刺により得た細胞を2時間培養しコルセミド処理して、性染色体を検出し、雌雄の割合を算定した。

C. 研究結果および D. 考察

ProtocolのI-IIIについては既に報告した。今回はIV群について報告する(図-1)。PCR-SSCPによるfamily study; イヌの末梢血をヘパリン添加注射器で採血し、型のごとくDNAを分離し一本鎖DNAを非変性条件下で塩基配列の違いを電気泳動で検出した。即ち、ポリアクリルアミドゲル-リアルスラブ電気泳動後、銀染色を行いバンドパターンを比較した。図-2,3に示す二家系について、同じSire, Damから生まれたそれぞれ5頭のバンドパターンからNos. 10(雌),と2(雄),3(雄)を交配すれば、homozygousな個体を得ることができることが示唆された。次に、本法を用いてretrospectiveに図1のprotocolIVの各pairsについて検討したところ、IV-group4(FLI, FK), IV-group5(FLI, BMC, FK)について、full-match, 2-match, 0-matchの3群に分類できるが、本適合度と腎生着日数とは相関していないことが判明した。つまり、不適合間でも本法、)長期生着が得られることが、示唆された。

表-1に示す腎移植生着成績は、4群は全例90日以内に拒絶された。5群の(D) 骨髓移植を併用した群では、8例中4例が生着中で、3例に骨髓(D), および3rd-party(D)からのSGを行ったが、腎(D)からのSGsは生着し続けたが、第3者(D)からのSGは全て対照と同等に拒絶されている(表2)。この中、雌雄の異なるpairの1例では骨髓chimeraが検出された。両群のFKの血中(血清)濃度は、trough levelで安全域である0.5ng/ml前後に維持されていた(図-4)。

(R)の術後のリンパ節に存在するリンパ球について、とくに照射後の右膝下リンパ節から得られたリンパ球によるMLR添加実験では、FLI後、BMTによってmigrateした(D)由来のリンパ球による抑制が、(D)特異的に抑制することが示唆された。

E. 結語

現在、実行中のprotocolでは、(R)に侵襲が最も少なく副作用も殆ど見られず(D)からの腎を生着させ、(D)からのSGのみ生着させた。今後、本処置によって維持している免疫不応答性が、完全な免疫寛容を導入したのか否か、慢性期の拒絶反応が起るのか否かなどについて経過観察中である。また、現在作製中のhomozygousなpairsを用いて実験を進める計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Watanabe, Y. Masaki, S. Maruyama, T. Endo, K. Koshiba, K. Sato, and A. Kakita, :Prolongation effect of FK506 on the survival of 3-day preserved kidney allografts in dogs. Transplant. Proc. 30(7):3603-3605, 1998.

2. 学会発表

- 1)渡部浩二、金子剛久、大谷文雄、遠藤忠雄、佐藤光史、真崎義彦：死体腎移植へ応用可能な成犬をモデルにした免疫寛容の導入法、第34回日本移植学会総会臨時号、33:161, 1998.
- 2)渡部浩二、大谷文雄、金子剛久、大久保みどり、角田みさを、篠原信賢：成犬の腎移植をモデルにした免疫寛容誘導法、第28回日本免疫学会総会・学術集会記録、28:371, 1998.
- 3)小川憲、大沼田治、佐藤光史、今井

潔、阿曾和哲、高橋毅、中山義介、
 柿田章、遠藤忠雄、渡部浩二、竹
 内康雄、鎌田貢寿：腎移植後に髄
 膜炎を併発し死亡した症例の検討。
 第32回日本腎移植臨床研究会、
 抄録, p130, 1999, 3月5日。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図-1

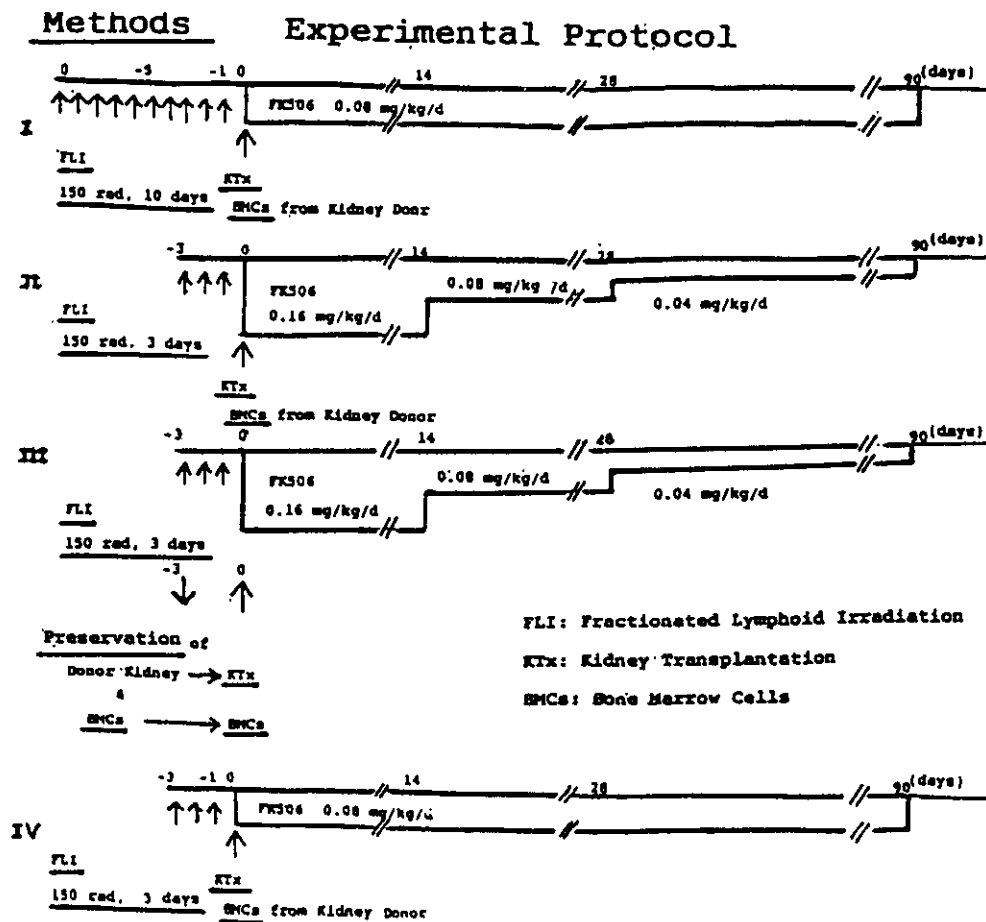


图 -2

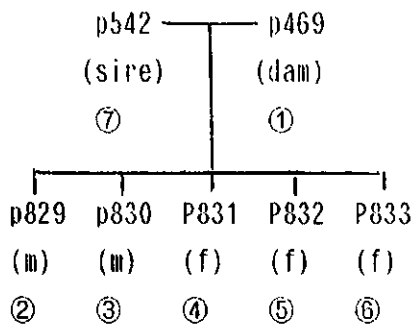
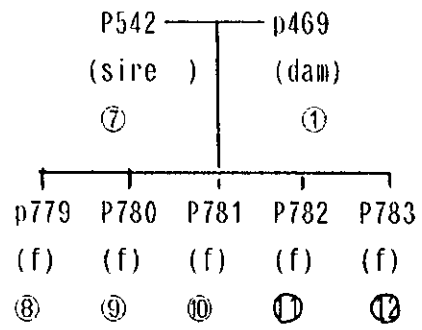


图-3



m ; male
f ; female

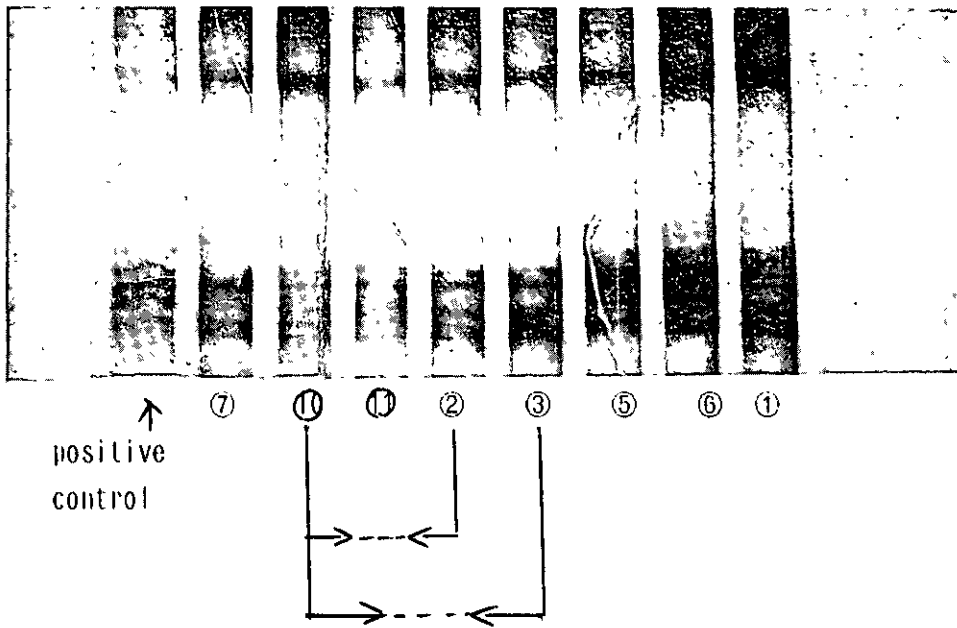


表-1

IV Kidney Allograft Survival				
Group	Treatment	No. of dogs	Graft Survival(d)	Mean (d)
1	None	9	16, 15, 12(x2), 11, 9, 8(x3)	11.0
2	FK506	6	20, 15(x3), 14, 11	15.0
3	FLI, BMC	3	8, 7(x2)	7.3
4	FLI, FK	8	77, 61, 54, >41, 39, 30, 25, 22	> 43.6
5	FLI, BMC, FK	8	>533 ^a , >377 ^a , >194 ^a , 125 ^{d1} , 113 ^{d2} , 70(x2), >34	>189.5

> SGs were surviving(11/25/98) @: Mann-Whitenny analysis
 d1: Died of pancreatitis, d2: Died of infection with viable graft.
 s: Skin Grafting were done. p<0.01^e

表-2

Skin Allograft Survival in Recipients treated with FLI, BMC and FK506

Donor	Recipient	Date of SGT after KGT	Kidne Graft Survival (days)	Skin grat survival (days)
397M [#]	398F	120	>533	>412
332M ^{##}				21
397M	398F	200		>333
332M				9
397M	398F	422		>111
403M	400M	112	>377	>265
332M				20
403N		234		>152
332M				10
412F	411F	121	>194	>73
332F	411F			43

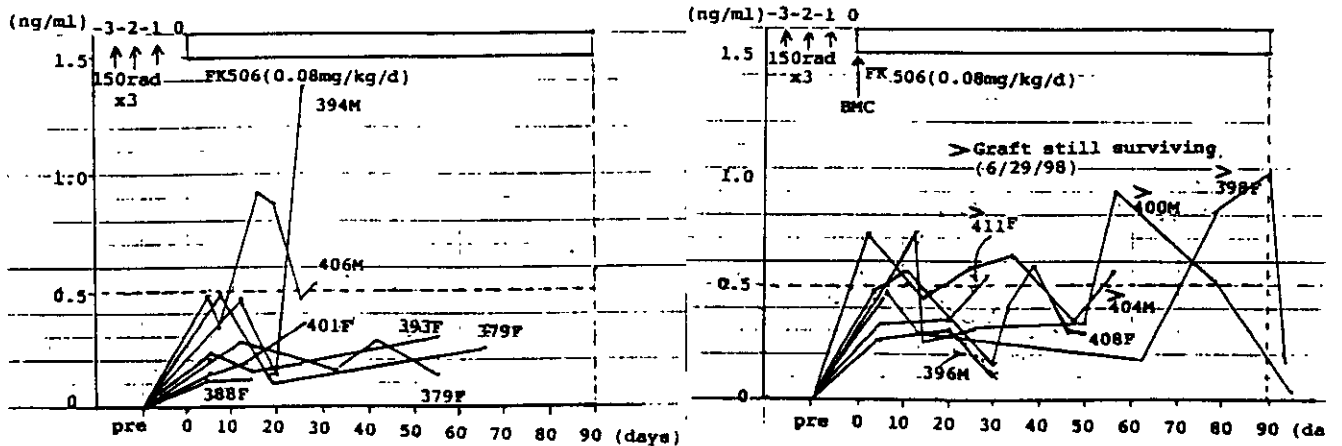
#: kidney Donor, respectively > grafts still srving (Nov.25,1998)
 ##: Fixed Third Party Donor

☒-4

Trough level of FK506 in the serum after IM administration

Group 4 (FLI, FK506)

Group 5 (FLI, BMC, FK506)



肺・気管・大動脈移植における免疫寛容の特性に関する研究

分担研究者 安元公正 産業医科大学第2外科 教授
研究協力者 中西良一 産業医科大学第2外科 講師
江藤正俊 九州大学医学部泌尿器科

研究要旨 ドナー確保の観点から以下の3つの検討を行った。凍結保存気管移植における凍結前の温虚血時間の限界を検討したところ、死後18時間以内であればドナーになりうる可能性が示唆された。One way allo-MLRを用いて凍結保存による免疫反応への影響を検討したが、十分な感作を誘導することができず、その影響を明らかにすることができなかった。凍結保存異種気管移植においてFK506を2.5mg/kg/day（3日間）、術直後と術後3週目に2コース投与したところ移植後13週間の生着が可能であることが明らかとなった。

A. 目的

組織移植と言えども、ドナーの確保は大きな問題の一つである。今回我々は、ドナー確保の観点から、死体移植、凍結保存、及び異種移植の3つのアプローチより検討を加えた。まず、死体気管における凍結保存の有用性を調べるために、気管移植片における温虚血時間の限界を検討した。次に、凍結保存による免疫反応への影響について検討を加えた。さらに、異種気管移植において、免疫抑制剤の短期間投与による移植片長期生着の可否について検討を加えた。

B. 研究方法

1. 腹腔大網内への異所性同系気管移植 (Brown Norway rat) モデルにおいて、死後の温虚血時間 (0, 6, 12, 18, 24, 48時間; 各群ともn=6) 別のドナーに3ヶ月間の凍結保存を加え、移植後3ヶ月めのグラフトの創傷治癒を評価した。凍結はRPMI-1640に20%FCS, 10%DMSOを加えたものを保存液として用い、プログラムフリーザーを使わない簡便なシステムにより、-80℃の保存を行った後、液体窒素に

て保存した。

2. 腹腔大網内へのラット異所性同種異系気管移植モデル (Lewis (以下, Lew[RT1^l]) × Brown Norway (以下, BN[RT1^b])) を用いて、One way allo-MLRを行った。Third partyとしてWister Furth rat (以下, WF[RT1^w]) を用いた。Responderとして、移植後9, 28日目にレシピエントの腸間膜・そけいリンパ節細胞を採取し、 5×10^6 /mLに調整した。StimulatorとしてLew, BN, WFの腸間膜・そけいリンパ節細胞を採取し、MMC処理後 5×10^6 /mLに調整した。Responder, Stimulator各100 μ Lを96well micro plateにて3, 4, 5日間培養後、各wellに1 μ Ciの³H-thymidineを加え8時間培養後、各wellにおける³H-thymidineの取り込みを測定した。移植後9日目および28日目の移植片に対しては、組織学的に検討を加えた。

3. 凍結保存を行った異所性異種気管移植モデル (BN rat × Guinea pig) を用いて、手術当日より3日間の免疫抑制療法 (FK506: 2.5 mg/kg/day) を行い、移植後3週目および13週目の生

着の検討を行った。次に、同様の免疫抑制療法を3週間あけて2回行った群を作成し、移植後13週目の生着の検討を行った。

研究成績は、組織学的に上皮の形態スコア、軟骨の有核細胞率、単核球浸潤スコア及び上皮下組織の肥厚度計測によって評価された。上皮は、0：上皮（－），1：単層性無線毛上皮，2：多層性無線毛上皮，3：正常な粘膜線毛上皮，の形態スコアの占める割合の総和として求められた。軟骨の有核細胞率は、1切片中の全軟骨細胞数に対するviableな核を有する軟骨細胞の割合として求められた。単核球浸潤は、0：（－），1：30%以下，2：30～70%，3：70%以上，の浸潤スコアとして求められた。上皮下組織の肥厚度は、上皮から軟骨膜までの厚さを直接測定した。

統計学的検定はStudent's *t* testにより行い、 $p < 0.05$ を有意差判定基準とした。

C. 研究結果

1. 温虚血時間の延長により、気管移植片の上皮・軟骨はともに組織学的な変性を強く認めた。上皮では、繊毛の消失や細胞形態の変性がみられ、軟骨では、軟骨中心部における核の膨化や変形、ならびに脱核化がみられた。温虚血時間が24時間以上になるとコントロールに比べて有意に上皮・軟骨ともに不良な形態を示し、さらに48時間のグラフトではどの群と比べても有意に不良であった (Figures 1A and 1B)。
2. まず組織学的に、同系 (syngeneic) 移植片においては移植後9および28日目ともに、軽度の非特異的炎症所見を示すものの形態学的な構造は保たれ

ていた。一方、新鮮同種移植片および凍結同種移植片においては、移植後9日目において上皮の消失、上皮下の肥厚、高度の単核球浸潤を認めたのに対し、28日目においては単核球浸潤が外膜側に偏位してきたこと以外著変はなく、新鮮と凍結移植片との間にも明らかな差は認められなかった。

移植後9および28日目のOne way *al*lo-MLRによる検討結果をStimulation Indexで示した (Table 1)。いずれもドナーであるLewに対する反応性とpositive controlのWFに対する反応性がほぼ同等の成績を示したため、十分なimmunizationが得られていないと判断され、凍結保存の免疫原性に対する影響は明確には示されなかった。

3. FK506 2.5mg/kgの術後3日間投与によって、凍結保存異種移植片は術後13週にわたって軟骨のviabilityの低下を認めず、その管腔保持が可能であった。しかし、上皮は変性もしくは消失し、細胞浸潤も中等度から高度に認められた。術後3週目に2コース目の免疫抑制療法を行った群と1コースしか行わなかった群との術後13週目における比較では、軟骨における有核細胞率においては差が認められなかったが、上皮下の肥厚や細胞浸潤が2コースの治療により軽度に抑えられ、十分なグラフトのviabilityを保持していた (Figure 2)。

D. 考察

死体移植及び異種移植はドナーの母数を拡大し、凍結保存によりドナーの長期的供給の可能性が期待される。今回、この3点について検討を加えた。

古くより死体移植の研究は行われ、新鮮

気管移植片においても、その温虚血時間が24時間以上では壊死に陥るといわれている。しかしながら、凍結保存を組み合わせた研究はこれまで例をみず、今回の検討結果は、その意味でより臨床に即した実際的なモデルによる結果といえる。死後18時間の温虚血時間がグラフトに許されることから、これまでドナーの対象とならなかった多くの死体もその対象となり、ドナーの確保に一層寄与することになると考えられた。

気管移植片における凍結保存に伴う抗原性の変化を検証するために、組織学的解析とともにOne way allo-MLRを行ったが、組織学的には明らかに免疫反応によると考えられる変化がみられたのに対し、MLRでは十分な感作を誘導することができなかった。これは、T細胞を介したドナー特異的免疫応答が誘導されていないのか、もしくは移植片拒絶のメカニズムとしてMLRで探知できない免疫反応が関与している可能性が示唆された。今後、Second graftを用いた検討を行い、凍結保存に伴う抗原性への影響を検討する必要があると考えられる。

同種気管移植において、ドナー移植片の上皮が拒絶反応により脱落した後、2ヶ月後にレシピエント由来の上皮がグラフト内腔を覆う成績が示されていることから、基本的に気管移植片は内腔が開存している形態学的構造を保っていればよいことになる。それゆえ今回の異種気管移植における検討では、グラフトの形態変化に関するパラメーターとして上皮は度外視し、軟骨の有核細胞率、上皮下の肥厚度、及び単核球浸潤の程度について検討を加えた。以前、異種気管移植片に対するFK506の短期間高用量投与に伴う拒絶反応の低減化について報告したが、気管は必ずしも強力な液性免疫が関与している組織ではない。今回の結果、2コースの治療のみで長期的なグラフトの

形態保持が可能であったことから、異種移植片も十分ドナーになりうる可能性が示唆された。今後、さらに異種移植片の長期生着に関する研究が行われる必要がある。

E. 結論

1. プログラムフリーザーを使わない簡便な凍結保存システムによる3ヶ月間の凍結保存を行う場合、気管移植片の温虚血時間の限界は18時間であった。死後18時間以内であれば、十分ドナーとなりうる可能性があると考えられる。
2. 移植後9日および28日目において、組織学的に細胞性免疫反応と考えられる所見が認められているにもかかわらず、One way allo-MLRにおいて十分なImmunizationを誘導することができず、凍結保存による免疫反応への影響を明らかにすることができなかった。今後、Second graftを用いた検討を行う予定である。
3. 凍結保存異種気管移植片において、FK506 2.5mg/kgの3日間投与を術直後と術後3週目に2コース行った場合、術直後1コースしか行わなかった場合と比較して、術後13週間にわたり十分なグラフトのviabilityを保持していた。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal Period of Cryopreservation Using Bicell® for Rat Tracheal Isografts. J Thorac Cardiovasc Surg (in press).
 - 2) Hashimoto M, Nakanishi R, Muranaka H, Umesue M, Eifuku

R, Yasumoto K. Short-course Immunosuppression Using FK506 for Rat Tracheal Allografts. Eur J Thorac Cardiovasc Surg (in submission).

2. 学会発表

- 1) 橋本光孝, 中西良一, 永島 明, 安元公正。同種ならびに異種気管移植におけるFK506を用いた短期免疫抑制療法。第98回日本外科学会総会(東京); 1998年4月発表。
- 2) 橋本光孝, 中西良一, 村中弘之, 永島 明, 安元公正。異種気管移植におけるFK506を用いた短期免疫抑制療法。第15回呼吸器外科学会総会(東京); 1998年5月発表。
- 3) 中西良一, 橋本光孝, 村中弘之, 安元公正。簡易凍結保存システムを用いた気管移植における長期凍結保存。第21回日本気管支学会総会(広島); 1998年5月発表。
- 4) Umesue M, Mayumi H, Kong YY, Omoto K, Muranaka H, Nakanishi R, Kohno H, Yasumoto K, Nishihara K, Nomoto K. Rejection of discordant skin xenografts by CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells in CD4⁻ and CD8⁻ deficient mice. XVII World Congress of the Transplantation Society (Montreal); July, 1998.
- 5) 中西良一, 小山倫浩, 大崎敏弘, 安元公正。凍結保存気管移植における死体気管の有用性 — 温虚血時間の限界 —。第50回日本気管・食道科学会総会(神戸); 1998年11月発表。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. Stimulation Index of One-way Allo MLR

Responder	Stimulation Index			
	9POD		28POD	
	Stimulator			
	Lew	WF	Lew	WF
Syngeneic	2.08	1.36	2.91	2.78
Fresh allo	10.31	9.55	2.03	2.03
Cryopreserved allo	2.79	2.24	0.39	0.39

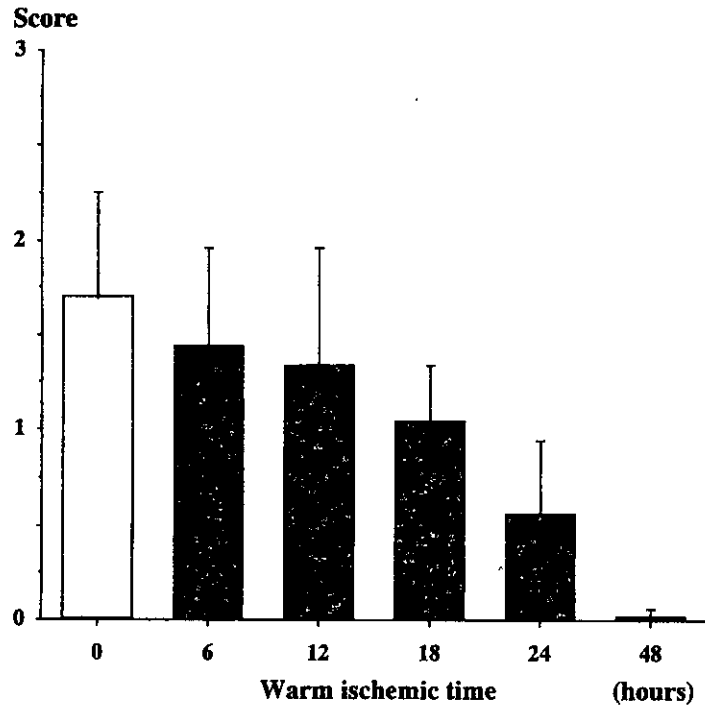


Figure 1A. The epithelial score of tracheal isografts (mean ± standard deviation of the mean)

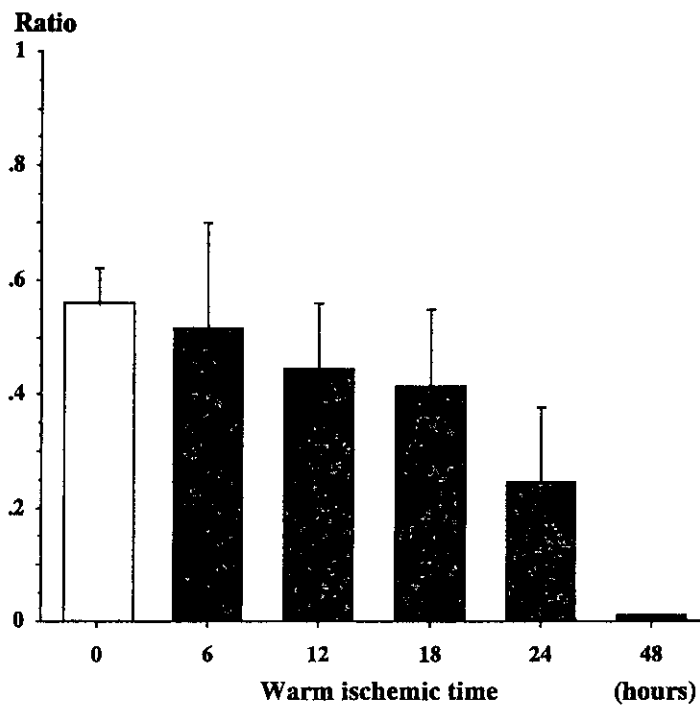
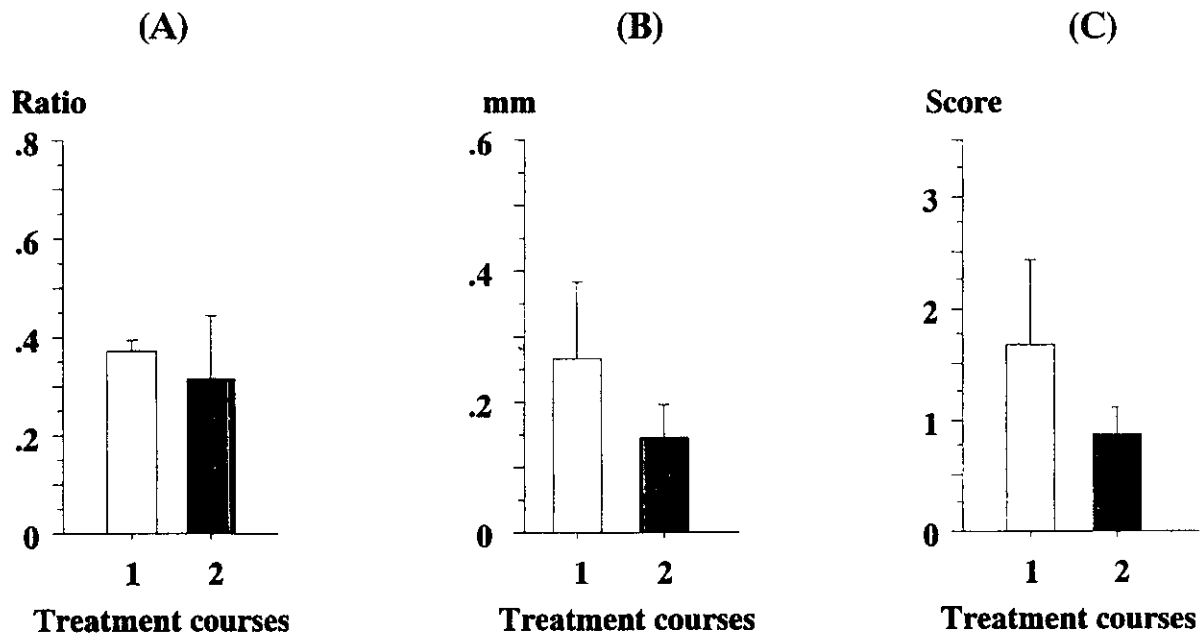


Figure 1B. The ratio of viable chondrocytes of tracheal isografts (mean ± standard deviation of the mean)



**Figure 2. (A) Ratio of viable chondrocytes of tracheal xenografts
 (B) Subepithelial thickness of tracheal xenografts
 (C) Mononuclear cell infiltration score of tracheal xenografts
 (mean ± standard deviation of the mean)**

CTLA4Ig を用いたグラフト特異的免疫抑制療法の開発に関する研究

分担研究者： 藤堂省 北海道大学医学部第一外科教授

研究要旨： CTLA4Ig をアデノウイルスベクターを用いてラットに投与し、免疫寛容導入法への応用について検討した。AxCTL の ACI ラットへの静注投与により血中に CTLA4IgG が検出され、ピークはベクター投与量に依存性であった。in vitro, in vivo において AxCre の投与により CTLA4IgG 産生が減少し、Cre/loxP システムによる導入遺伝子発現のコントロールが可能であった。

A. 研究目的

免疫抑制法の進歩により臓器移植の成績は飛躍的に向上し、重篤な臓器不全に対する日常的な治療となっている。しかしながら、現在の免疫抑制療法は宿主の免疫能を非特異的に抑制するため、感染症、悪性腫瘍の危険性の高まりを避けられず、移植された臓器に対する反応のみを特異的に抑制する方法が求められている。また、この特異的な免疫不応答状態が薬剤の投与なしに持続すること、すなわち免疫寛容の導入が免疫抑制療法の最終的目標である。一方、深刻なドナー臓器不足を解決する方法として異種移植が試みられているが、拒絶反応の壁は同種移植におけるそれよりも厚く、分子生物学的アプローチあるいは遺伝子導入アプローチによるドナー臓器の操作を含め、免疫寛容誘導法の開発が求められる。

本研究は、アデノウイルスベクターを用いた移植前遺伝子導入によって CD28/B7 系をブロックし、ドナー特異的寛容誘導を図ろうとするものである。また、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入において Cre/loxP システムによる遺伝子産物の発現コントロールを試みた。

B. 研究方法

(1) 小動物移植モデル確立を目的として、ACI(RT1^{av1})から LEW(RT1^l)ラットへの腹部異所性心移植、同所性肝移植において新規免疫抑制剤 FTY720、KF20444 の有効性を検討した。薬剤は移

植後 1 4 日間経口、または経静脈的に投与し、移植心の生着日数を検討した。

(2) ACI(RT1^{av1}) ラットに CTLA4IgG 遺伝子を含むアデノウイルスベクター(AxCTL)を静注投与し、遺伝子産物発現効率を検討した。

(3) Cre 酵素を組み込んだ AxCre の働きにより CTLA4IgG の産生が停止する AxLCTL を作成し、cos7 細胞を用いた in vitro 及びマウスを用いた in vivo で CTLA4IgG 発現をフローサイトメトリー、ELISA で検討した。

C. 研究結果

(1) FTY720 : FTY720 は移植後経口、経静脈的投与により、1~10mg/kg/day の範囲で容量依存生に移植心、肝の生着延長効果を示した。投与量 30mg/kg/day では全例が投薬期間中に死亡し、明らかな毒性を示した。Cyclosporine または FK506 との併用投与により相乗効果を示した。

(2) KF20444 : KF20444 は移植後経口投与により、0.5~2mg/kg/day の投与量で容量依存生に移植心、肝の生着延長効果を示した。4mg/kg/day 以上の投与では著明な体重減少、消化管出血や下痢が観察された。Cyclosporine との併用投与により相乗効果を示した。間欠投与 (12mg, 3 日毎) により副作用を抑え生着延長を得ることが可能であった。

(3) CTLA4Ig : ACI(RT1^{av1}) ラットへの AxCTL

静脈内投与後, 1 日目から血中に CTLA4Ig が検出され, 4 日から 7 日目にピークとなった. 血中濃度のピークはベクター投与量依存性に高値であった.

(4) AxLCTL は正常な CTLA4IgG を産生した. in vivo では AxCTL 静注後 2 ヶ月以上血清 CTLA4IgG の発現を認め, in vitro, in vivo で AxCre 投与後 CTLA4IgG 産生は有意に減少した.

D. 考察

臨床心, 肝, 腎移植において移植後の成績は FK506 の開発により飛躍的な向上が見られた. しかしながら, 感染症, 悪性腫瘍, が問題となっている. 一方, CTLA4Ig は costimulatory signal を伝達する代表的な系である CD28/B7 系をブロックする事により免疫学的寛容を誘導する事が可能と報告されている. 本研究で, AxCTL の静注後, 血中に CTLA4IgG が検出されたことは, アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術の免疫寛容導入への応用の可能性を示すものである. また, Cre/loxP システムにより CTLA4IgG 産生が有意に減少したことは, 導入した遺伝子産物の発現の人為的なコントロールができることを示しており, 臨床応用に向けて極めて有用と考えられる.

E. 結論

AdexCTLA4IgG の投与による同種移植臓器に対する

免疫寛容導入の可能性が示された. また, 遺伝子産物発現の人為的コントロールが可能であった.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 山下健一郎, 野村克, 大村孝志, 竹原めぐみ, 柳田尚之, 小西勝人, 鈴木友巳, 嶋村剛, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. FTY720 のラット心及び肝移植における免疫抑制効果. 第 99 回日本外科学会 (福岡) 1999 年 3 月 26 日

2) 竹原めぐみ, 村上正晃, 中川泉, 小西勝人, 野村克, 柳田尚之, 大村孝志, 古川博之, 岸田明博, 鐘ヶ江裕美, 斉藤泉, 上出利光, 藤堂省. CTLA4IgG 発現アデノウイルスベクターの Cre/loxP による発現制御. 第 99 回日本外科学会総会 (福岡) 1999 年 3 月 26 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究課題 生体肝移植における免疫寛容の研究

分担研究者 田中 紘一（京都大学大学院移植免疫学講座教授）

研究協力者 林 衆治（名古屋大学医学部第二外科助手）

研究要旨 生体肝移植後、長期を経過し肝機能良好な症例19例に対しインフォームドコンセントのもとに計画的に減量・離脱を試みた。その結果15例は減量中で2例に離脱を得た。2例は減量中に拒絶が起きたが治療できた。このことからこの試みが安全であるとともに生体肝移植後に免疫寛容が好率に発現することが明らかになった。

A. 研究目的

組織適合性が良いとされる親子間肝移植後に免疫寛容発現の可能性を検討し、この事実が確認されれば免疫寛容機構を明らかにするとともに免疫寛容の誘導を導入する。

B. 研究方法

移植後3年以上経過・肝機能正常・最近1年間に拒絶反応がなく、家族の協力が得られる症例に6か月毎に段階的に免疫抑制剤を減量し、最終的に離脱する。

C. 研究結果

1998年9月の時点で、計画的減量可能症例15例、計画的離脱症例2例、非計画的減量症例13例、非計画的離脱症例13例である。対象の2例が拒絶を起こした。

D. 考察

肝臓は他の臓器より免疫原性が弱いといわれ、実験的には免疫寛容が得られている。しかし臨床肝移植においては免疫寛容の発現、その機構は明らかにされていない。今回の検討で長期的経過の中で免疫抑制剤が減量・中止できる症例が多数存在することは、肝臓の免疫原性の特徴とともに、親子間の良好な組織適合性も関与している可能性がある。免疫寛容

を遺伝子レベルで導入できる可能性が生まれる。

E. 結論

生体肝移植後長期経過中に様々な理由のため免疫抑制剤の減量離脱できる症例および計画的離脱ができる症例が存在することは、移植後に免疫寛容を獲得でき、免疫抑制剤が不必要になることを証明できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小児生体肝移植の長期予後：
肝胆膵37(6)1998

2. 学会発表

- 1) A prospective trial of corticosteroid withdrawal in Tacrolimus base-line immunosuppression in living related liver transplantation. The 7th Alexis Carrel Conference: Kyoto 1998

- 2) 生体肝移植後の免疫抑制剤減量、離脱の試み：第34回日本移植学会：東京1998

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

研究課題： 胸腺内ドナー細胞移入による免疫寛容の特性に関する研究

分担研究者： 里見 進 東北大学医学部第二外科教授

研究協力者： 小林 英司 自治医科大学臨床薬理学助教授

木村 廣光 国立小児病院小児医療研究センター

生体工学研究室室長

大河内信弘 東北大学医学部第二外科助教授

土井 秀之 東北大学医学部第二外科講師

研究要旨： IL-2受容体に対する抗体を作成し免疫抑制効果を検討した。抗 γ 鎖抗体を抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体と併用投与することで同種皮膚移植片の拒絶反応は著明に抑制された。その機序としてIL-2のシグナル伝達が完全に抑制されるため、アロ特異的なCTLの誘導が起こらないことと、さらにIL-2、IL-15の阻害によるNK細胞の消失が関与していると考えられた。

生体部分肝移植患者にて、生着例の術前後でV α 及びV β 細胞陽性細胞の比率に変化があるかを検討したが一定の傾向を認めなかった。移植前のリンパ球混合培養試験での反応細胞には、ある一定のレパートリーに増減が見られた。また腎移植に於いて、生着例での末梢キメリズムの成立と拒絶反応の頻度との関連を検討したが、差を認めなかった。さらに腎移植長期生着例でステロイドの離脱が可能かを検討したが、長期生着例でも拒絶反応が起こる症例が認められた。

A. 研究目的

IL-2はその受容体を介してT細胞、B細胞、単球、マクロファージ等の分化、活性化を誘導するサイトカインである。一方IL-2受容体は α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3つのサブユニットから構成され、 γ 鎖はコモン γ 鎖と呼ばれ、少なくともIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15に対する受容体の共通のサブユニットになっている。これまでにIL-2やIL-2受容体に対する抗体を用いて移植後の拒絶反応をコントロールする試みが成されてきた。特にIL-2受容体の α 鎖、 β 鎖にたいする抗体は実際の臨床に於いても使用されているが、十分な効果を上げているとは言えない。

今回、新たにマウスのIL-2受容体 γ 鎖に

対する抗体を作成し、単独又は α 鎖、 β 鎖抗体との組み合わせでIL-2受容体を完全にブロックすることで拒絶反応を抑制できるかの検討を行った。

一方、実際の臨床の間では様々な理由から免疫抑制剤を中止せざるを得なかった症例で、中止後も移植臓器が生着している例は多く見られる。しかし、中には中止後に拒絶反応を引き起こす例もあり、寛容状態を引き起こす誘因や、維持の機構は未解決の問題として残されている。今回はその機序解明の一助として生体部分肝移植生着例のV α 、V β 陽性細胞分画に変化がないかを検討した。また、腎移植生着患者の末梢血でのマイクロキメリズムの存在と拒絶反応について検討、さらには腎移植長期生存

者のステロイド離脱が可能かの検討も合わせて行った。

B. 研究方法

1. 抗IL-2受容体単クローン抗体の移植における免疫抑制効果

a) 混合リンパ球培養試験に与える抗体の効果

6から7週令の雄性のCBA/N、BALB/c、C57BL/6マウスを使用した。モノクローナル抗体としてはPC61（抗 α 鎖抗体）、TUm122（抗 β 鎖抗体）、新たに作成したTUGm2（抗 γ 鎖抗体）、コントロールとしてHTLV-1に対する抗体であるREY7をプロテインAカラムで精製して用いた。また、マウスIL-2に対するモノクローナル抗体S4B6はプロテインGカラムで精製して使用した。これらの抗体を用いて混合リンパ球培養試験に及ぼす抗体の効果を検討した。反応細胞にC57BL/6、刺激細胞にBALB/cマウスの脾細胞を使用し、抗体は5 μ gずつ混合培養と同時に投与した。

b) 末梢リンパ球分画に与える影響

抗IL-2受容体抗体をin vivoに投与して末梢リンパ球の分画に変化が起こるかをフローサイトメトリーで検討した。C57BL/6の腹腔内にBALB/cの脾細胞を投与感作し、同時に抗IL-2受容体抗体を0、2、4日目に投与し、5日目に分析した。

c) 特異的CTL誘導の検討

in vivoでのアロ特異的CTLの誘導に対する抗体の効果を検討した。マウスの腹腔内にアロの刺激細胞を投与しアロ特異的なCTLの誘導を行った。抗体の投与は、刺激細胞投与当日、2日目、4日目の3回投与とし、5日目にassayを行った。

d) 種皮膚移植の生着延長効果

BALB/cマウスの尾部皮膚移植片をCBA/Nマウスの尾部に移植し抗体は移植当日より隔日投与で5回行った。単独投与

では300 μ gずつ、2抗体併用では150 μ gずつ、3抗体併用では100 μ gずつの投与とした。

2. 臨床例における免疫学的寛容の検討

a) 生体部分肝移植症例でのV α 、V β 陽性細胞の変化

生体部分肝移植を実施した症例の術前後におけるT細胞レセプターのV α 、V β 陽性細胞の比率について検討した。術前は末梢血中のT細胞受容体レパートリーに加えて、ドナー細胞とのリンパ球混合培養後に反応細胞を取り出しその変化を検討した。術後は末梢血からT細胞を分離して陽性細胞率を検討し、特定のV α 、V β が増減しているかを検討した。

b) 腎移植患者での末梢マイクロキメリズムの成立と拒絶反応の頻度の検討

腎移植生着例中男性から女性に移植された例についてレシピエントの末梢血中にドナー由来のY染色対が存在するか否かをPCR法にて検討し、キメリズムの存在と拒絶反応の頻度、強さに関連があるかを検討した。

c) 腎移植後長期生着者へのステロイド離脱の試み

移植後、5年~23年を経過し腎機能が安定している10症例に対し、段階的にステロイドから離脱するプロトコールを実施した。連日、5mg投与から隔日投与を最低3月間行い、その後にステロイドを中止した。2週間に1度血液生化学検査、検尿を行いながら実施し、ケレアチニンが上昇したりステロイド離脱症状の出現した例では再投与した。

C. 研究結果

1. 抗IL-2抗体の移植における効果

a) 混合リンパ球培養試験

抗 α 鎖抗体(b)は単独でもコントロール抗体(a)に比して55%の抑制が見られた。抗