

凝固療法として移植後10日間ヘパリンを1日10,000単位持続投与し、以後バイアスピリン100mg/日投与した。膵液分泌抑制と膵炎予防のため、移植後7日間gabexate mesilateを600mg/日持続投与、octreotide(100µg)施行した。また感染予防として、piperacillin, fluconazole, ganciclovirを7~10日間静脈内投与した。移植後は血糖値を100mg/dl台前半に維持するようにインスリンを静脈内投与したが、食事開始後は血糖値に応じて皮下注射を行なった。移植後の移植腎、膵の血流モニタリングはパワードプラー超音波検査にて経時的に施行した。膵機能は血糖値、血中C-ペプチド値、尿中アミラーゼ値の推移で経過観察した。移植後1週間で食事を開始した。

5. ドナー、レシピエントのQOLの評価

移植後6カ月以上経過した生体膵・腎同時移植ドナー5例、レシピエント6例に対し、SF-36v2を使用しアンケート調査を行い、術前、6カ月後、1年後、2年後のquality of life (QOL)の変化を評価した。8つの尺度(PF, RP, BP, GH, VT, SF, RE, MH)およびPCS(身体的サマリースコア)MCS(精神的サマリースコア)を算出し、QOLの評価を行った。

結果

1. レシピエント

10例の経過を表4に示す。1カ月~3年11カ月を経過した。PAKの1例(#3)は、移植後3カ月でクレアチニン値の上昇により透析再導入となり、移植後1年脳出血のため死亡した。死亡時まで膵機能は良好で、インスリン投与はしていなかった。その他の9例は全例移植膵、移植腎ともに機能しており、低血糖発作はまったくみられていない。空腹時血中C-peptide値も1.1~5.1ng/mlとインスリン分泌能も良好で、10例中8例がインスリン完全離脱で経過している。PTAの1例(#4)では8単位、SPKの1例(#5)では少量のインスリンを補助的に使用しているが、HbA_{1c}、M値ともに良好である。

2. ドナー

ドナーは表5に示すように、膵液瘻、糖尿病、腎機能障害などの合併症なく、全例退院し、社会復帰している。しかしながら、1例(#4)に、術後6カ月で腹部違和感と背部痛が出現し、膵仮性嚢胞のため、胃内視鏡的ドレナージを必要とした。術後4~6カ月に施行したドナー7例の75g-OGTTでは、全例正常パターンを示したが、インスリン分泌をみると、グル

表4 生体膵臓移植結果(レシピエント)

	#1	#2	#3	#4	#5	*#6	#7	*#8	*#9	#10
●移植後期間	3年11カ月	3年6カ月	—	2年5カ月	1年10カ月	1年5カ月	1年	10カ月	6カ月	1カ月
●生存	Yes	Yes	No (1年, 脳出血)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
●膵生着	Yes	Yes	Yes (~1年)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
●腎生着	Yes	Yes	HD再導入 (移植後3カ月)	—	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
●低血糖発作	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
●空腹時血糖値	83	90	90	88	95	74	92	89	98	76
●血中CPR	1.8	2.8	4.5	1.1	2.9	1.9	4.5	2.3	2.7	5.1
●HbA _{1c} (%)	5.5	5.5	4.9	5.1	6.9	4.5	5.6	5.1	5.6	6.5
●insulin	0	0	0	8	12	0	0	0	0	0
●M値	4.2	2.9	9.2	5.0	11.2	8.0	2.7	6.2	4.7	ND

*: ABO 不適合移植

(2004.4~2007.11 国立病院機構千葉東病院外科)

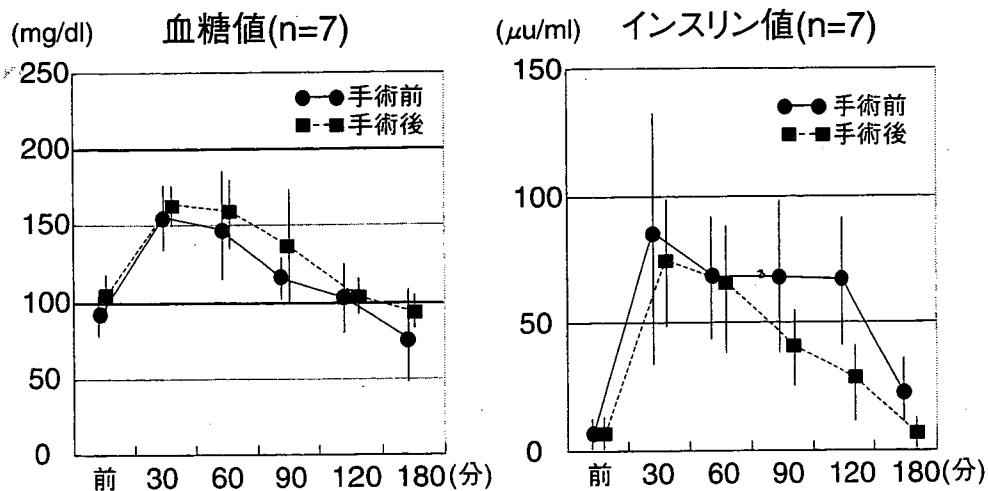
表5 生体膵臓移植結果 (ドナー)

	#1	#2	#3	#4	#5	*#6	#7	*#8	*#9	#10
●膵液瘻	←—————→				なし	—————→				
●糖尿病	←—————→				なし	—————→				
●腎機能障害	←—————→				なし	—————→				
●仮性嚢胞	—	—	—	+ (6Mo)**	—	—	—	—	—	—
●75 g-OGTT	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
●状態	←—————→				社会復帰	—————→				

*: ABO 不適合移植, **: 胃内視鏡的ドレナージにて治療

(2004.4~2007.11 国立病院機構千葉東病院外科)

図3 生体膵・腎同時移植ドナー術前後内分泌機能の変化 (75 g-OGTT 結果)



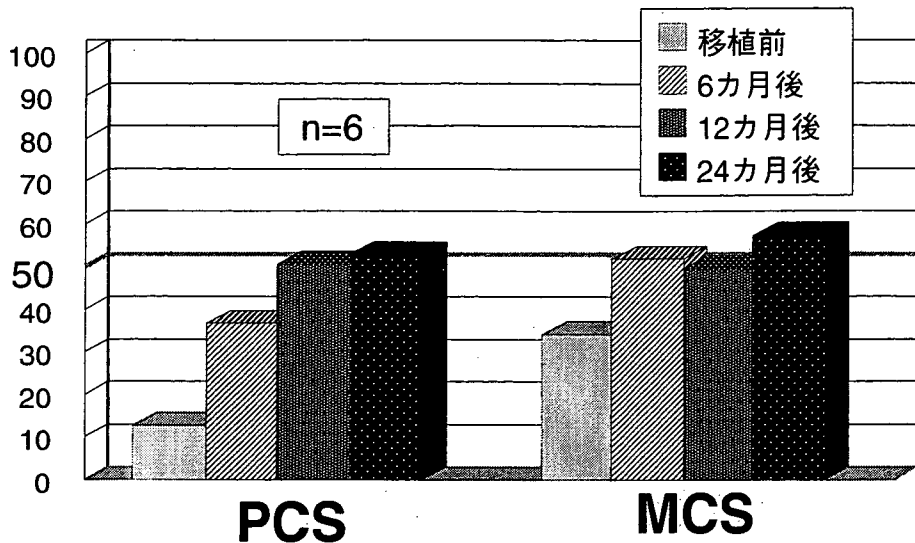
術後4~6カ月に施行したドナー7例の75 g-OGTTでは、血糖曲線は全例正常パターンであったが、インスリン分泌は、90分、120分値で術前に比較して低値を示した。

コース負荷後90分、120分値は術前に比較して低値を示しており、膵体尾部切除に伴うインスリン分泌能の低下が明らかであった(図3)。このデータは現在糖尿病を呈していないものの、今後加齢に伴う膵機能の低下に注意する必要があることを示唆するものである。現在当院では外来において検査を行うのみでなく、体重、血圧のコントロールなど糖尿病、腎不全発症のリスクファクターを減らすよう外科、内科両外来にて指導している。今後長期の経過観察が必要である。

3. 生体膵・腎同時移植ドナー、レシピエントのQOLの評価

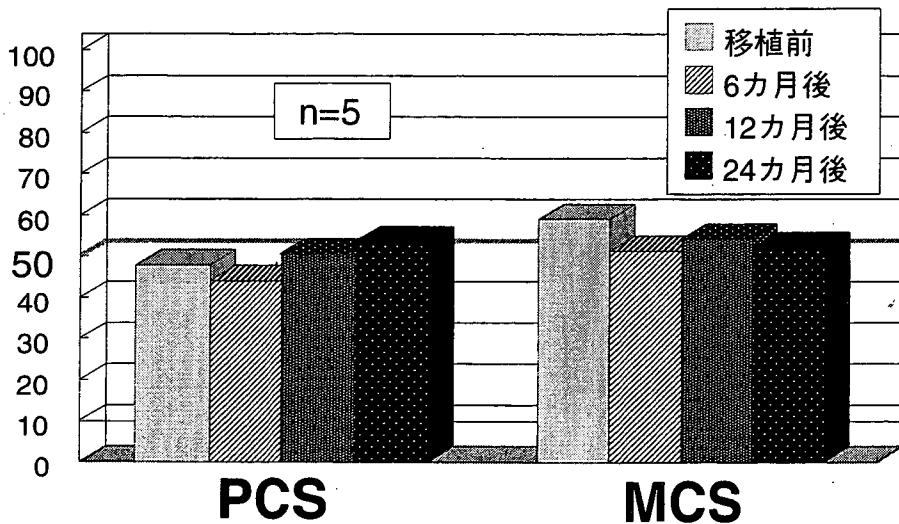
レシピエントは、術前すべての尺度で著明な低値を示し、PCS: 12.9, MCS: 34.3と国民標準値の50を大きく下回った。術後1年ではPCS: 50.6, MCS: 49.6と国民標準値にまで改善し、医学的有効性のみならず、QOLの面からも本医療の有効性が得られた(図4)。ドナーは、術前のPCS: 47.8, MCS: 59.0に比較し、6カ月後にPCSで若干の低下がみられるものの、1年後にはPCS: 55.3, MCS: 54.1とQOLは良好に保たれた(図5)。

図4 生体膵・腎同時移植レシピエントのQOLの推移



SF36v2により算出したPCS（身体的サマリースコア）およびMCS（精神的サマリースコア）は移植前に比較し、移植後劇的に改善し、1年後には国民標準値に達した。

図5 生体膵・腎同時移植ドナーのQOLの推移



片腎摘出および膵体尾部+脾臓摘出の手術を受けたが、PCS（身体的サマリースコア）およびMCS（精神的サマリースコア）は比較的良好に保持された。

■ ■ 考 案

生体膵臓移植での大きな問題は他の生体間移植と同様にドナーの安全性の確保である。ミネソタ大学においては、IV-GTTによる第1相インスリン分泌能(rapid insulin release)を重視している¹⁵⁾。当施設でも minimal model analysis 法にて同様に第1相インスリン分泌能

が正常範囲であることを基準としている¹⁰⁾。しかしこの指標だけで安全性が担保されるものではなく、十分なドナー検査を施行し、そのデータを移植・膵臓外科医、糖尿病内科医、腎臓内科医（透析医含む）、麻酔医、移植コーディネーター、看護師などからなる適応評価委員会で十分に検討した上で適応評価している。また、現在膵臓の局在機能が画像で評価可能である11

C-methionine positron emission tomography を応用し、さらなる安全性向上に努めている¹¹⁾。現在まで術後膵液瘻を認めていないが1例のドナーに膵仮性嚢胞の形成があり、今後の十分な経過観察が重要である。また、ドナーの術後糖尿病の発症は認めないが、75 g-OGTTでは、インスリン分泌量は低下しており、今後加齢に伴う膵機能の低下に注意する必要がある。

レシピエント側の問題点としては、提供する膵臓は体尾部のみであり、十分な膵内分泌機能がもたらされ、インスリン離脱が可能であるかという点が危惧される。現在まで移植後迅速にインスリン離脱し、移植後の耐糖能も正常型で推移し、2年以上経過した3例も良好な内分泌機能を維持している。このことは、ミネソタ大学での臨床例と同様、生体膵臓移植においては体積が約50%である体尾部のみで十分な内分泌機能をレシピエントに供給し得ることが明らかとなった。一方、脳死(心停止)ドナーからの移植に比較しての生体膵臓移植の利点として以下があげられる。親子間の移植では、HLAはone haplotype matchのため免疫学的に有利で、その結果免疫抑制剤の投与量を減量し得ること、阻血時間を最小限に抑えられ移植膵のviabilityを良好に保つことが可能であることが最大の利点である。しかし当施設の実験よりさらに重要と考えられるのは、生体膵臓移植は待機的手術であるため、移植前に十分なドナー、レシピエントの評価、informed consentおよびレシピエントへの免疫抑制剤投与、厳重な血糖のコントロールなどの移植前処置が可能であり、安全性が高められる点である。レシピエントは1型糖尿病かつ透析患者であり、種々の合併症を伴っている場合が多く、この点は移植手術を行う上できわめて重要であると考えられた。

また今回施行した、SF36v2を使用したアンケート調査では、生体膵・腎同時移植のレシピエントのQOLの向上がきわめて顕著であったことが明らかであった。しかし、予想外であったのは左腎摘出に加え、膵体尾部切除、膵臓摘出という大きな侵襲の手術を受けた生体膵・腎同時移植のドナーのQOLが良好に保持されたことである。長年レシピエントの病悩期間にサポートし、心配をしていた母親または父親が良くなった子供をみて精神的安堵感や充実感が得られ、精神的なQOLの維持につながったと考えられる。またそのことが、身体的喪失感をも上回るほどのことであることを実感した。しかし、これは1型糖尿病をもつ親特有の環境からの結果であり、兄弟間、夫婦間で同じ結

果が得られるかは疑問である。われわれ移植医は、精神的な影響のみにとらわれず、ドナーの医学的フォローを綿密に行い、糖尿病発症の予防、腎機能障害の予防のための、検査と指導、投薬等を適切に行なっていくことが責務である。

■ ■ おわりに



1型糖尿病腎不全患者は長きに渡りインスリン注射、低血糖発作、網膜症や腎症をはじめとする種々の合併症に苦しんでいる。このような患者に対する生体膵臓移植の施行は、わが国の実情を考慮すれば、厳重なドナーとレシピエントの適応評価、十分なinformed consentを行った上で施行してゆくことは十分に意義を有すると考えられる。しかし生体膵臓移植はまだまだ症例数も少なく、今後1例ごとに十分な評価を行ない、ドナー、レシピエントの安全性追及のための技術開発を行ってゆく必要がある。

文 献

- 1) Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, *et al.* Ilotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967; 61: 827-837.
- 2) International Pancreas Transplant Registry, annual reports 2004
http://www.iptr.umn.edu/IPTR/annual_reports.html
- 3) 深尾 立, 大塚雅昭, 岩崎洋治, 他. 同種膵腎同時移植の1例. *移植* 1986; 21: 331-340.
- 4) 寺岡 慧, 馬場園哲也, 岩本安彦. 膵移植の現況と将来の展望. 矢崎義雄編, 分子糖尿病学の進歩. 東京: 金原出版. 1999: 133-142.
- 5) 伊藤壽記, 杉谷 篤, 石橋道男, 他. 臓器移植実施後に施行された脳死下膵腎同時移植の1症例. *移植* 2001; 36: 174-183.
- 6) Sutherland DE, Goetz FC, Najarian JS. Living-related donor segmental pancreatectomy for transplantation. *Transplant Proc* 1980; 12 (4 Suppl 2) : 19-25.
- 7) Sutherland DER, Gruessner RW, Dunn DL, *et al.* Pancreas Transplantation at the University of Minnesota: 1966-2005. In: Corry RJ, Shapiro R, editors. *Pancreatic Transplantation*. New York: Informa

- Healthcare, 2007; 279-332.
- 8) Gruessner RW, Sutherland DE. Simultaneous kidney and segmental pancreas transplants from living related donors-the first two successful cases. *Transplantation* 1996; 61: 1265-1268.
 - 9) 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 他. わが国初の生体部分膵・腎同時移植の1症例. *移植* 2005; 40: 466-472.
 - 10) Tokuyama Y, Sakurai K, Yagui K, *et al.* Pathophysiologic phenotypes of Japanese subjects with varying degrees of glucose tolerance: using the combination of C-peptide secretion rate and minimal model analysis. *Metabolism* 2001; 50: 812-818.
 - 11) Kono T, Okazumi S, Mochizuki R, *et al.* Clinical application of (11) C-methionine positron emission tomography for evaluation of pancreatic function. *Pancreas* 2002; 25: 20-25.
 - 12) 膵臓移植に関する実施要綱. 移植関係学会合同委員会膵臓移植中央調整委員会編 (委員長: 金澤康徳), 2001年3月.
 - 13) Miura F, Takada T, Asano T, *et al.* Hemodynamic changes of splenogastric circulation after spleen-preserving pancreatectomy with excision of splenic artery and vein. *Surgery* 2005; 138: 518-522.
 - 14) 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 他. Gabexate mesilateによる膵体尾部切除後残膵機能の保持. *胆膵の生理機能* 2004; 18: 25-28.
 - 15) Gruessner RW, Kendall DM, Drangstveit MB, *et al.* Simultaneous pancreas-kidney transplantation from live donors. *Ann Surg* 1997; 226: 471-482.

Question

膵島移植

世界の膵島移植の介入研究から何を学びましたか？

剣持 敬

独) 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター

Answer

膵島移植は1型糖尿病に対する安全な根治療法として期待されていましたが、膵臓移植に比較して成績が不良であることが課題でした。しかし、カナダのアルバータ大学が実施したEdmonton Protocolにより高いインスリン離脱率が報告され¹⁾、臨床例も増加し、1型糖尿病の治療法として現実化しました。Edmonton Protocolの特徴として、脳死ドナー膵から冷却酵素液で持続膵管内灌流させて膵島分離する、分離直後にレシピエントに経皮的門脈穿刺を行い点滴法で移植する、移植後の免疫抑制剤としてステロイドは使用しない、などが挙げられます。この報告は世界の膵島移植施設に衝撃を与え、世界9施設でEdmonton Protocolによる膵島移植のトライアルが行なわれ²⁾、施設間の成績の差はあるものの安全性と短期の有効性が証明されました。しかしながら、その後アルバータ大学の単独トライアルの長期成績が報告されました³⁾。膵島移植後1カ月の成績では47人中44人(94%)がインスリン離脱するという良好な成績でしたが、5年間の結果について詳細に分析されていますが、移植後1年では50%となり、5年ではわずかに7.5%に減少しました。ただし、移植膵島機能を示す血中Cペプチド値は徐々に低下はするものの5年後でも82%が陽性でした(図1)。血糖値の変動を示すHYPO scoreやLIは移植後4年間は良好ですが、5年では移植前に比較しては良いもののかかなり低血糖の頻度も増加してくるという

結果が得られています。この移植膵島の経時的機能消失の原因は明らかではありませんが、膵島の一部が移植直後に破壊されること、免疫反応により拒絶されること、また自己抗体により破壊されること、抗HLA抗体の関与、などの原因が考えられていますが、いまだ詳細は不明です。また2006年には、Edmonton Protocolを用いた世界の多施設臨床トライアル(NCT00014911)の結果が報告されました⁴⁾。このトライアルではPrimary end pointを膵島移植1年後のインスリン離脱率としましたが、36例のエントリー症例のうち16例(44%)が1年後のインスリン離脱を達成、10例(28%)が部分的機能保持、10例(28%)が膵島機能廃絶という結果でした。

以上のように、アルバータ大学での単施設臨床研究、また国際的な多施設臨床研究の結果より、以下のことが明らかとなりました。第一はEdmonton Protocolの導入により、極めて高い安全性を保持しながら、短期の有効性(インスリン離脱や血糖値の安定化)が得られることです。このことは2000年以前には到達し得なかった成績であり大きな進歩と言えます。しかしながら、一方では移植時の膵島機能を長期に保持することが困難であることも明らかとなりました。さらにその原因についても明らかではなく、今後の課題であると考えます。以上の事実を考慮してわが国でも臨床膵島移植が進められています。わが国では7施設が参加し、すで

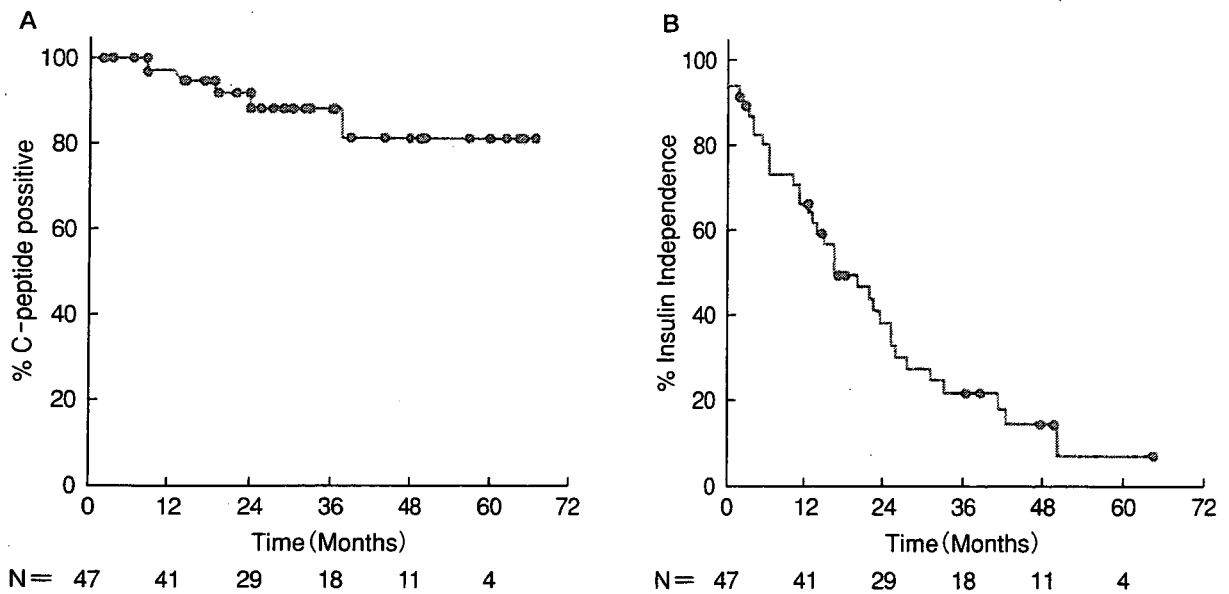


図1 アルバータ大学での単施設膵島移植トライアル結果
 (Edmond, A, Ryan BW, Peter AS, *et al.* : Five-year follow up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54 : 2060-2069, 2005 より引用)

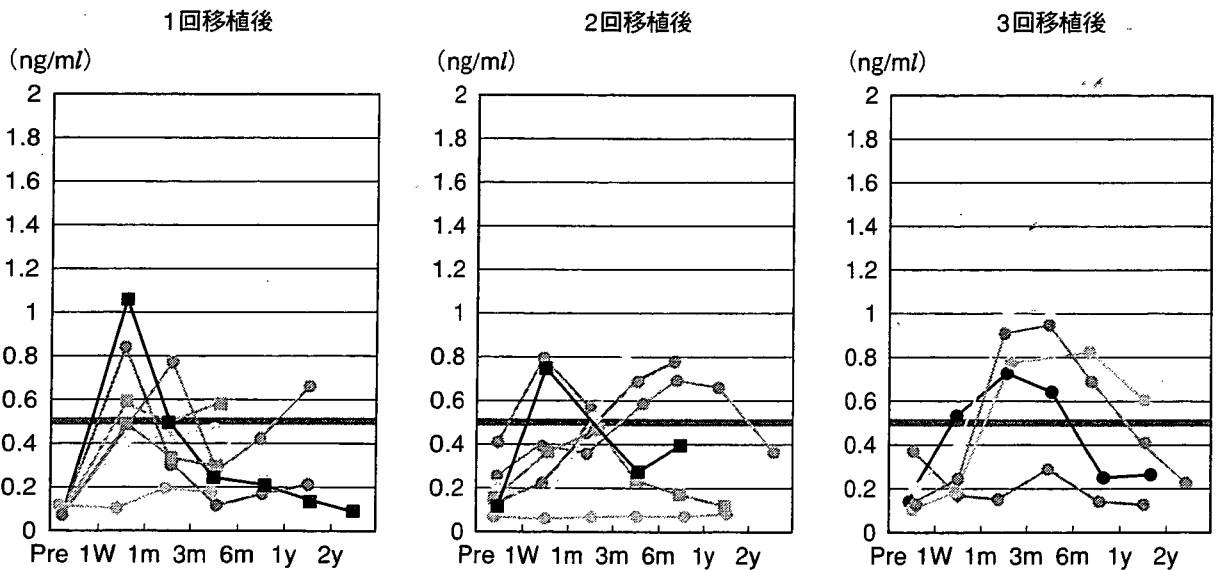


図2 わが国の膵島移植後 basal C-peptide 値の推移

(膵・膵島移植研究会 WG「膵島移植班」2007.1)

に17人の患者さんに多施設臨床研究(膵島移植班)として膵島移植が実施されています。いまだ長期成績が出ていませんが、2007年1月に膵島移植班で集計したデータによると膵島移植後6カ月~1年は血中Cペプチドは陽性(>0.5ng/ml)に保持される例が多いのですが、以後徐々に低下してゆくことがわかってきました(図2)。当院で施行した4例(6回)の膵島移植例でも同様の経過となっています。

世界の膵島移植臨床研究およびわが国での多施設共同臨床研究のデータから、いまだ十分な症例数と観察期間がありませんが、現時点では他の臓器移植の成績と比較して、安全性においては格段に優れているといえますが、成績特に長期の成績に関してはいまだ十分とは言えず、

原因の究明と成績改善が課題であると思われます。

文 献

- 1) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, *et al.* : Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* **343** : 230-238, 2000
- 2) Shapiro AM, Ricordi C, Hering B : Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* **362** : 1242, 2003
- 3) Edmond A, Ryan BW, Peter AS, *et al.* : Five-year follow up after clinical islet transplantation. *Diabetes* **54** : 2060-2069, 2005
- 4) Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, *et al.* : International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* **355** : 1318-1330, 2006

KEY WORD

Edmonton Protocol : 2000年にカナダのアルバータ大学により報告された臨床膵島移植のプロトコルで、(1)分離された膵島は培養や保存せずすぐに移植する、(2)腎不全のないレシピエントに移植する、(3)ステロイドを用いない免疫抑制法を用いる、などの特徴を持ち、飛躍的な成績向上をもたらした。

膵島移植班 : 1997年に膵・膵島移植研究会のワーキンググループとして発足し、わが国の膵島移植の準備、実施を多施設共同研究で進めてきました。現在、東北大、福島医大(事務局)、千葉東病院、京都大、大阪大、神戸大、福岡大の7施設がわが国の臨床膵島分離・移植施設に認定されています。



膵島移植は世界的にも、わが国でもいまだ実験的医療の段階です。したがって保険適応はなく、現在では施設負担や患者負担となっています。実際の費用は膵島分離等に100~150万円、移植1年目400~500万円、2年目以降に150~200万円がかかりますが、費用負担者は施設により異なるため各施設により異なるため各施設にお問い合わせください(当院移植情報センター : rtx@cehprinet.com)。

特集「生体臓器移植における看護」

生体膵臓移植における レシピエントコーディネーターの役割

鈴木亜希子^{1,2}, 宮崎麻里子^{1,2}, 今野弘子¹, 丸山通広³, 剣持 敬^{2,3}

¹ 国立病院機構千葉東病院看護部, ² 同移植情報センター, ³ 同外科

はじめに

膵臓移植は内因性インスリン分泌が枯渇しているインスリン依存型糖尿病 (IDDM: insulin dependent diabetes mellitus, 1型糖尿病) の患者に対して行われ, インスリン分泌を獲得し糖代謝を是正すること, 種々の糖尿病合併症を改善, もしくはその進行を阻止することにより, 患者の生命予後・QOL (quality of life) を改善することを目的とした治療法である。

膵臓移植には, 脳死下または心停止下ドナーから臓器提供をいただく死体膵臓移植と, 生体膵臓移植がある。現在, 前者での死体膵臓移植は30例以上が施行されているが, 日本ではいまだ深刻なドナー不足の現状があるため登録待機期間も数年以上と長期間にわたり, 待機中死亡例も報告されている。一般的に糖尿病性腎症を原疾患とし透析導入された患者の5年生存率は50%以下, 10年生存率も約25%と, 他の原疾患による透析患者に比して予後が格段に悪く¹⁾, 死因として, 脳卒中や心筋梗塞などの重篤な心・血管系合併症によるものが多い。

生体膵臓移植の対象疾患は, 上記のような末期腎不全を伴った1型糖尿病患者に対する生体膵・腎同時移植の形で行われることがほとんどである。当院で施行した生体膵臓移植患者も内因性インスリン分泌枯渇のため, 無自覚性低血糖発作が頻回で日常生活にも多くの支障をきたしていた。また心血管系の異常や自律神経障害を有している患者もみられた。

以上のように1型糖尿病にて腎不全に至った患者は大変重症度の高い状態であり, そばで支える家族は, 何とかして助けたいという必死の思いで生体膵臓移植

の相談に来る場合が多い。

わが国の膵臓移植は1985年に筑波大学において初の脳死膵・腎同時移植が施行され²⁾, 以後脳死問題が社会問題化したことで, 心停止ドナーからの膵臓移植が行われた。臓器移植法の制定とともに, 2000年に脳死膵臓移植が再開され³⁾, 現在までに30例以上が行われている。当院 (国立佐倉病院時代) では, 脳死膵臓移植が少ないこと, 予後・QOLのきわめて不良な1型糖尿病腎不全患者の存在を背景として, 2004年1月7日, わが国で初めての生体膵・腎同時移植を施行した⁴⁾。このことが, メディアで大きく報道され, 膵臓移植を待つ患者・家族へ希望の光が射したのは言うまでもない。本稿では当院で現在までに施行した8例の生体膵臓移植に対するレシピエントコーディネーターの役割について考察したい。

目的

独立行政法人国立病院機構千葉東病院は, 国立佐倉病院の腎移植245例の実績を受け継いで, 2004年4月に統合し新たなスタートをきった。統合後の2年10カ月間 (2007年3月12日現在) で, 献腎移植21例・生体腎移植48例・生体膵臓移植8例 (膵・腎同時移植6例, 腎移植後膵臓移植1例, 膵臓単独移植1例)・膵島移植6例・自家骨髄・末梢血幹細胞移植など, 計104例の移植を経験した。

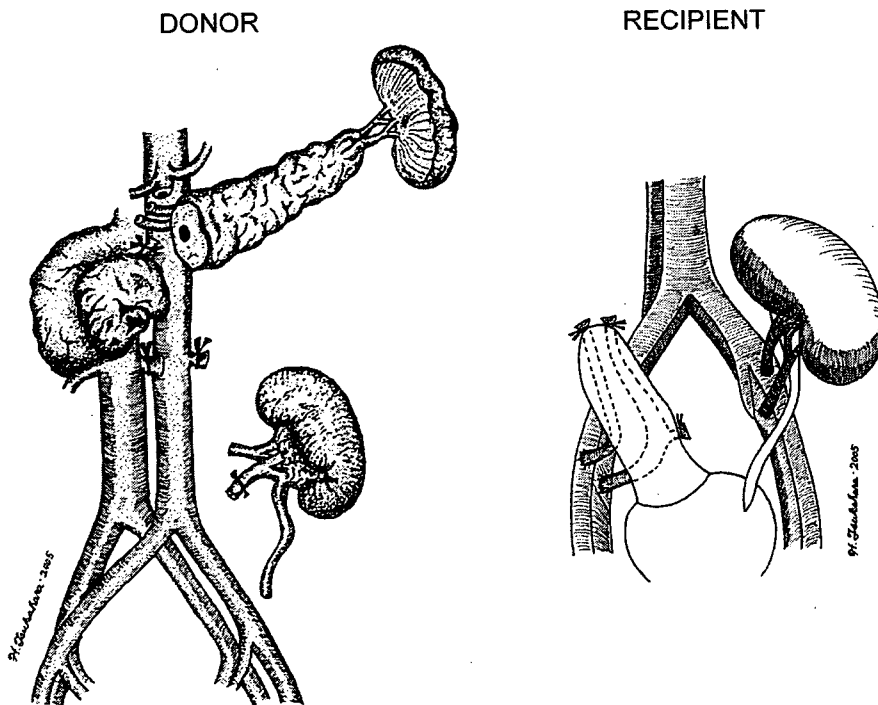
今回は, これらの経験を踏まえ, 生体膵臓移植におけるレシピエントコーディネーターの役割について患者・家族を支援する立場から述べていく。

表1 生体臓器移植症例

No.	実施年月日	疾患	Category	関係	ABO 血液型
#1	2004/1/7	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	父→娘	ABO 一致
#2	2004/6/30	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	父→娘	ABO 一致
#3	2004/7/20	1型糖尿病	腎移植後膵移植	母→息子	ABO 一致
#4	2005/7/6	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	母→息子	ABO 一致
#5	2006/2/8	1型糖尿病	膵臓単独移植	母→息子	ABO 一致
#6	2006/7/5	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	母→娘	★不適合
#7	2006/12/6	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	父→息子	ABO 一致
#8	2007/2/14	1型糖尿病腎不全	膵腎同時移植	母→娘	★不適合

(2004.1~2007.3 国立病院機構千葉東病院外科)

図1 生体膵・腎同時移植手術術式



(国立病院機構千葉東病院外科)

■ 対象と方法

当院で2004年1月～2007年3月までの期間中、生体臓器移植を受けた患者8例（ドナーも含む）を対象とした。表1に示すように、全例1型糖尿病であり、6例は腎不全を伴っていたために、膵・腎同時移植例であった。レシピエントは18～25年のインスリン治療歴を有しており、全例無自覚性低血糖発作のため

QOLの低下が著明であった。ドナーは全例親であり、当院の生体臓器移植適応基準を満たし、適応検討委員会、倫理委員会での承認を受けた患者である。ABO血液型は6例で一致、2例は不適合例（A→O, AB→B）であった。ドナー手術は開腹下で左腎および膵体尾部+膵臓を摘出し、レシピエント手術は左腸骨窩に腎移植、右腸骨窩に膵移植を行う（図1）。

生体臓器移植のレシピエントコーディネーターとし

て、1) 他の移植も含めた移植診療システムの構築、2) 意思確認、情報提供、インフォームドコンセントの方法の確立、3) 外来受診から退院後のフォローまでのトータルコーディネートの方法の確立について8例の経験より試行してきたので報告する。

■ ■ 結果および考察

1. 移植診療システムの構築

当院では開院と同時に移植情報センターを診療部として設置した。同センターは医師、千葉県移植コーディネーター、レシピエントコーディネーター、看護師、薬剤師、栄養士、事務などの人員で構成され、生体腎移植や膵臓移植に関する相談受付、献腎移植希望患者登録、膵臓移植希望者の相談受付、登録業務の他、日本臓器移植ネットワークや日本組織移植ネットワークと連携し、摘出チームの編成や準備、レシピエントの意思確認、入院要請、術前検査、インフォームドコンセント、院内調整、など移植へのすべてのサポートを行っている。

初診・外来相談時の流れを記す。膵臓・膵島・腎臓移植の相談は必ず移植情報センターに通すようにしており、レシピエントコーディネーターは移植の問い合わせの窓口となっている。相談は、電話やメールでの対応や、移植についての資料郵送などを行っている。受診方法・手続きの進め方などを説明し、受診希望する場合は、医師・レシピエントコーディネーター・メディカルソーシャルワーカー（MSW）との面談を行い移植に関しての情報提供をする。その後HLA検査・外来検査へと進み、ドナー・レシピエントの一次検査にて評価。それらがクリアされれば、ドナー検査入院を施行し適応判定を行い、レシピエントの術前検査を行う。生体膵臓移植では生体腎移植とほぼ同様の手続きがとられるが、適応検討委員会、倫理委員会などの承認が必要であるため、かなりの時間を要する。

2. 意思確認、情報提供、インフォームドコンセントの方法の確立

生体膵臓移植を受けるかどうかの意思決定は、患者やドナー、家族が生体膵臓移植の利益および危険性、問題点を十分理解した上で決定することが重要である。情報提供の際には、患者・家族が情報を正しく理解しているかどうか、何がわからないのか、不安な点はどこか、確認しながら繰り返し行っていくことが大

切である。

○ドナーの危険性の情報提供

ドナーのリスクや危険性については十分説明し、具体的に提供後の自己管理の重要性を理解した上で、ドナーとなる決意をしているかどうか確認する。何とかして子を助けたいという一心で移植にかける思いが強く冷静に判断できないケースもあるため、各患者や家族の状況を十分察し、思いやりある態度で、理解度に合わせてサポートしていくことが必要である。ドナーは、膵の約半分の提供となり、生体膵・腎同時移植では、さらに片腎の提供も加わり、傷も手術侵襲も大きい。膵断端からの膵液瘻、膵炎、膵仮性嚢胞、耐糖能障害、腎提供に伴う腎機能障害などの合併症が起こりうることを十分理解する必要がある。当院で施行した生体膵臓移植ドナーに、術後75g OGTTを施行すると、全例とも正常型を示すが、インスリン分泌能は低下しており、今後の食生活や自己管理次第では、糖尿病を発症する危険性もある。その点についてよく検討し、セルフコントロールの重要性を理解できるようかわることが重要である。

退院後も定期的な外来通院で経過を見ていく必要がある。また、3カ月後、半年後、1年後など、機能評価・経過チェックのための検査が必要となる。

○レシピエントへの利益についての情報提供

膵臓移植の適応のある患者、特に膵・腎同時移植を受ける患者では、内因性インスリン分泌が枯渇しており、無自覚性の低血糖発作も頻回でかつ人工透析が必要、糖尿病性の合併症や神経障害などを有した、著しく日常生活に支障をきたした患者が多い。患者・家族は、常に突然死の恐怖やいつ起こるかわからないコントロールの難しい低血糖発作に悩み、多くのストレスを抱えている。そのため、精神的に不安定な側面が多く、強迫観念のようなものを抱えた患者もみられる。

生体膵臓移植を受けた後は、移植された膵から、インスリンが分泌されるため、血糖値の安定化が図れる。糖尿病のコントロールがよくなることで、合併症の進展阻止も期待される。今までのような低血糖発作はなくなるため、QOLの向上が大きく期待される。当院で経験した8症例では、1例を除きインスリンの完全離脱が達成された。他の1例も少量のインスリン投与で、低血糖発作はみられない。全例血中Cペプチドは3-4 ng/mlと良好に分泌されている。感染症のコントロールや拒絶反応出現時には、少量のインスリンが必要なケースもあった。患者・家族は、このこと

を十分に理解した上で意思決定をすることが大切である。

○レシピエントへの不利益・合併症についての情報提供

腎移植と比して、膵臓移植では、動静脈が細く血流が少ないため、血管吻合に起因する血栓形成のリスクがある。そのため、抗凝固剤を使用し、さらに蛋白合成酵素阻害剤を使用することにより後出血のリスクは高いと考えられる。また、膵・腎同時移植患者では、神経因性膀胱を認めることが多く膀胱尿管吻合部および膵膀胱吻合部の減圧のため、術後2~4週間は尿道カテーテルを留置しておく。特に膵膀胱吻合部の縫合不全は起こりやすいため、完全に吻合部のドレーン周囲からの浸出液がなくなってから、尿道カテーテルを抜くことが望ましい。その間、膀胱炎なども起こりやすい。これらについて、患者・家族が理解しやすいよう、視覚的なわかりやすい図やパンフレットなどを用いて病態生理を説明し、理解を促している。腎臓移植に比して、膵臓移植では、より強い免疫抑制療法となるため、移植後の副作用の出現や感染症発症へ注意が必要である。患者・家族には、予想される副作用や感染症の種類と程度、治療法、その後の経過など、具体的に説明することが必要である。移植後の最大の合併症である急性拒絶反応の臨床症状は、発熱、全身倦怠感、グラフト部の違和感・腫脹・圧痛等である。急性拒絶反応の診断は膵・腎同時移植では血清クレアチニンや移植腎生検で行う。拒絶反応の治療で使用するステロイドパルスは耐糖能が低下する可能性のあることも、念頭に十分に入力十分に情報提供する必要がある。

○移植が家族関係にもたらす影響についての情報提供

患者・家族が病気とどのように向き合ってきたか、対処してきたのか、どのように受け止め、どんなきっかけで移植をしようと決意したのか、移植後の希望、ドナー・レシピエント・家族へのそれぞれの思いなどを、十分に把握してかかわることが重要である。術後、ドナー・レシピエントと家族内に2人の患者が発生するため、両者の周術期をサポートする人が必要になる。家族のサポートは、患者にとって、精神的にも一番大きな支えとなる。退院後も、内服管理や食事管理・異常時の受診時、通院時など、家族の助けが必要である。インスリン離脱ができなかった場合や拒絶反応や感染症の治療で難渋した際には、こんなはずではなかったと弱気になることもありうる。提供したドナーにおいても、うつ状態になったり、自責の念を抱いた

り、さまざまな葛藤や精神的ストレスが予測されるため、家族の心身ともにあたたかいサポートが必要となることをよく検討してもらえるようかかわる。

○術後の療養期間・医療費に関する情報提供

ドナーは術前2日前に入院し、術後約2~3週間で退院となる。退院後は自宅療養が必要で、職場復帰できる体力が回復するには個人差が大きい、2~3週間は必要である。

レシピエントは術前1カ月前に入院し、糖尿病専門医の厳重な血糖コントロール下で術前検査・準備を行う。術前十分な時間的余裕があるため、オリエンテーションや理解度に合わせた補足説明・精神的サポートが必要となる。医師には聞きづらいことや具体的な質問も出てくることもある。レシピエントコーディネーターは、外来相談時から、気軽に何でも相談できる相手として相互信頼関係が得られるため、患者・家族の強いサポーターとなれる。レシピエントは術後1.5~2カ月の入院が必要となる。ドナー・レシピエントとも、入院中、退院後しばらくは、仕事量を減らしたり、収入が減ることが予測されるため、事前に対応策を検討しておく必要がある。

移植にかかわる医療費については、2006年4月から、脳死・心停止下膵臓移植が保険適応となったが、生体膵臓移植は保険適応ではない。当院では、現在までに施行した8例の膵臓移植について、病院負担で対応し、患者の自己負担は一切ない。現在、先進医療の申請中である。

○インフォームドコンセントの方法

移植相談時には、保険証に加えて、本人確認、ドナー・レシピエントの関係確認のため、運転免許証等のコピー、戸籍謄本の写しを提出していただく。また面談は医師、コーディネーター、看護師の他に第三者としてMSWの同席で行う。上記の情報につき詳細に説明し、説明確認書を作成する。以後適応検査、移植と進むが、3回のインフォームドコンセントの後、適応検討委員会、倫理委員会への書類提出を行う。移植直前に再度意思確認を上記メンバーで行い、提供承諾書(ドナー)、膵臓移植依頼書(レシピエント)を作成する。

3. 外来受診から退院後のフォローまでのトータルコーディネートの方法の確立

レシピエントコーディネーターの大きな役割は前述した情報提供やインフォームドコンセントなどの流れ

を円滑に進め、ドナー・レシピエントの精神的、肉体的負担を可及的に軽減することにある。そのためには、医師との連携により医学的知識の把握、患者の病態の把握、精神的不安の評価と対処、などを行う。また血液浄化センター、薬剤科、検査科、NST、ICTなどの他部門と連携し、チーム医療の要として果たすべき役割は大きい。患者がこの人に聞けば私のことが全部わかってくれると感じてもらうことがレシピエントコーディネーターとしての使命であると考えている。

■ ■ 結 語

生体臓器移植におけるレシピエントコーディネーターは、他の臓器移植と同様、医師、看護師のみではカバーしえない種々の問題点につき常に気を配り、介入するとともに、移植医療が円滑に行われるように他部門との連携を密にチーム医療を遂行させる大きな役割を担っている。レシピエントコーディネーターの適

切な介入は移植医療の質の向上に有用であると考えられる。

文 献

- 1) 日本透析医学会統計調査委員会. わが国の慢性透析療法の現況 (2002年12月31日現在). 2003.
日本透析医学会ホームページ <http://www.jsdt.or.jp/overview/index> 2003.html
- 2) 深尾 立, 大塚雅昭, 岩崎秀生, 他. 同種膵腎同時移植の一例. 移植 1986; 21: 331-340.
- 3) 伊藤壽記, 杉谷 篤, 石橋道男, 他. 臓器移植法実施後に施行された脳死下膵腎同時移植の1症例. 移植 2001; 36: 174-183.
- 4) 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 他. わが国初の生体部分膵・腎同時移植の1症例. 移植 2005; 40: 466-472.

The Immunoregulatory Roles of Natural Killer T Cells in Cyclophosphamide-Induced Tolerance

Toshiro Iwai,¹ Yukihiko Tomita,^{1,6} Ichiro Shimizu,¹ Takashi Kajiwara,¹ Tatsushi Onzuka,¹ Shinji Okano,² Yohichi Yasunami,³ Yasunobu Yoshikai,⁴ Kikuo Nomoto,⁵ and Ryuji Tominaga¹

Background. Recent studies have indicated that natural killer T (NKT) cells are essential for the establishment of transplantation tolerance. In the present study, we have elucidated the role of recipient and donor NKT cells in cyclophosphamide (CP)-induced tolerance.

Method. DBA/2 (DBA; H-2^d) mice were used as donors and BALB/c (BALB; H-2^d) wild-type (WT) or V α 14 NKT-knockout (KO, BALB/c background) mice were used as recipients. Recipients were treated with CP-induced tolerance regimen, which consists of donor spleen cells (SC) on day 0 and CP on day 2. In some experiments, NKT KO mice, which received NKT cells from either WT, interferon- γ KO, or interleukin-4 KO mice, were treated with tolerant regimen. To deplete Ly49 inhibitory receptors on NKT cells in the recipient mice, anti-Ly49 monoclonal antibody cocktails were injected on day -1 when indicated.

Results. Donor skin graft was permanently accepted in recipient BALB WT mice with induction of donor mixed chimerism. On the contrary, donor DBA skin allografts were chronically rejected in NKT KO recipient. Lower levels of mixed chimerism were observed in NKT KO recipients comparing to the WT recipients. The production of interferon- γ or interleukin-4 from NKT cells did not affect the induction of tolerance. Depletion of Ly49 positive NKT cells abrogated the induction of skin graft tolerance.

Conclusion. Recipient NKT cells, but not donor NKT cells, were dominantly required for the induction of allograft tolerance. Our results indicated that the single cytokine produced by NKT cells did not mediate the regulatory function in the induction of allograft tolerance.

Keywords: Cyclophosphamide, Tolerance, Transplantation, NKT.

(*Transplantation* 2007;84: 1686–1695)

Natural killer T (NKT) cells, which are characterized by co-expression of natural killer (NK) cell receptors and a single invariant T-cell antigen receptor (TCR) encoded by V α 14 and J α 281 gene segments, have been identified as a novel lymphoid lineage distinct from conventional T cells or NK cells. CD1 is related to major histocompatibility complex (MHC) I antigen, and classified to group I of CD1a, CD1b, and CD1c, and group II of CD1d (1). Group I of CD1 molecule is expressed on human, and present lipid-containing antigens to T cells with diverse TCRs (2). CD1d form a dimer with β 2-microglobulin, which is expressed in both human and mice. Humans have invariant V α 24 NKT cells, and the antigen recognition by TCR of NKT cell is highly restricted to group II CD1d in both human and mice (3). Thus, V α 14

NKT cell recognize endogenous antigen as well as exogenous antigen expressed via CD1d of antigen-presenting cells (APC) (4, 5). Although the physiological role of NKT cells remains obscure, V α 14 NKT cells have been demonstrated to play an important role in tumor immunity (6), suppression of autoimmune disease (7), and infectious immunity (8, 9), or suppress graft-versus-host disease (GVHD) (10) via the dominant production of Th1 cytokine interferon (IFN)- γ and Th2 cytokine interleukin (IL)-4. With regard to transplantation immunity, it has been indicated that NKT cells have a regulatory role in both allogeneic and xenogeneic organ transplantation (11–13).

We have investigated cyclophosphamide (CP)-induced tolerance, which consists of an intravenous (i.v.) injection of 1×10^8 allogeneic spleen cells (SC; day 0) followed by an intraperitoneal (i.p.) administration of 200 mg/kg of CP on day 2 (14–25). Using this method, long-lasting skin allograft tolerance was induced in the recipient received graft from H-2-matched and minor antigen mismatched donors (17–19). Our previous studies have elucidated the two major mechanisms of tolerance induction (18–21). The first mechanism is the clonal deletion of the donor reactive T-cell populations, which proliferate in the periphery after donor SC injection, and deleted by CP treatment (21). The second mechanism is the establishment of intrathymic chimerism and intrathymic clonal deletion of donor-reactive T cells at 4–6 weeks after treatment (19, 20).

The aim of the present study was to investigate the regulatory role of NKT cells in our CP-induced tolerance system by using V α 14 NKT-knockout (KO) mice. Although an essential role of NKT cells for the induction of transplantation tolerance has been suggested in two previous reports (11, 12),

This study was supported by the Scientific Research from the Ministry of Health and Welfare, Japan (to Y. T.). Y. T. is a recipient of surgical research foundation grant from the Japanese Surgical Association.

T. I. and Y. T. contributed equally to this work.

¹ Department of Cardiovascular Surgery, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

² Department of Pathology I, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

³ Department of Surgery I, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka, Japan.

⁴ Department of Infection Control, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

⁵ Department of Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

⁶ Address correspondence to: Yukihiko Tomita, M.D., Ph.D., Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

E-mail: tomita@heart.med.kyushu-u.ac.jp

Received 21 December 2006. Revision requested 12 April 2007.

Accepted 18 September 2007.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8412-1686

DOI: 10.1097/01.ip.0000295933.94854.d4

1686

Transplantation • Volume 84, Number 12, December 27, 2007

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

the detailed mechanisms have not been clarified. Here, we evaluated the role of both recipient and donor NKT cells, and which cytokine generated by NKT cells is essential in the CP-induced tolerance system. The results suggested that the NKT cells from recipient mice play an important role for the induction of tolerance; however, donor NKT cells do not. In addition, Ly49 inhibitory receptors on NKT cells played an important role for its regulatory function. The lack of each single cytokine production from NKT cells (such as IFN- γ , IL-4, or IL-10) did not affect the induction of graft tolerance. The role of NKT cells in transplantation tolerance is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Inbred mice of the Balb/c AnNCrj (BALB; H-2^d, Lyt-1.2, Mls-1^b, Mls-2^a) and DBA/2 NCrj (DBA; H-2^d, Lyt-1.1, Mls-1^a, Mls-2^a) strains were obtained from Charles River Japan Inc. (Yokohama, Kanagawa, Japan). Inbred mice of the B10.D2 SnSlc (B10.D2; H-2^d, Mls-1^b, Mls-2^b) strain were obtained from Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Shizuoka, Japan). Ja281 knockout (V α 14 NKT KO) mice with a BALB background were also used as recipients (6). IFN- γ and IL-4 knockout (KO) mice with a BALB background were purchased from Jackson Laboratory (Ann Arbor, MI) and maintained in the Animal Facility of Kyushu University. The recipients were used at 12–16 weeks of age. All animals received humane care in compliance with the Guidelines for Animal Experiments of Kyushu University and the Law (no. 105) and Notification (no. 6) of the Japanese government.

Cell Preparation

Mice were sacrificed by decapitation. The spleens were collected and kept on ice in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with antibiotics (100 u/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin). Spleens were disrupted in the medium by pressing spleen fragments between two glass slides. Cell suspensions were filtered through cotton gauze and washed three times with the RPMI medium. Viable nucleated cells were counted and usually adjusted to 2×10^8 /mL.

Conditioning of CP-Induced Tolerance

A 0.5-mL aliquot containing 1×10^8 SC from donor mice was injected into the tail vein of recipient mice. Two days later, CP (Endoxan, Shionogi, Osaka, Japan) dissolved in phosphate-buffered saline at a concentration of 10 mg/mL was injected i.p. at a dose of 200 mg/kg. The day of the injection of DBA SC is referred to as day 0 throughout this report.

Reconstitution of NKT Cells in NKT KO Mice

To reconstitute NKT cells in NKT KO mice, recipient BALB NKT KO mice were irradiated with 3 Gy on day -28 and then received 1×10^7 SC and 5×10^6 bone marrow cells (BMC) from wild-type (WT), IFN- γ KO, or IL-4 KO mice on the same day. The preparation of BMC was performed according to a previous method (26). Briefly, the bone marrow in the femoral and tibial bones was flushed out using a 5-mL syringe with a 26-G needle (Terumo, Tokyo, Japan).

Skin Grafting

Skin grafting was performed using our previously reported procedure (27). Briefly, a square full-thickness skin

graft (1 cm²) was prepared on the right lateral thoracic wall of the recipient mouse. The graft was fixed to the graft bed with eight interrupted sutures of 5–0 silk thread and covered with protective tape. The first inspection was carried out on the seventh day, followed by daily inspection for 3 weeks. Grafts were considered as rejected at the time of complete sloughing or when they formed a dry scar. Survival was expressed as the median survival time (median) and the mean survival time (MST) \pm standard deviation (SD).

Flow Cytometry

Phenotyping was performed at various times, beginning at 2 weeks after the injection of SC. Recipients were tail-bled and white blood cells (WBC) were prepared by hypotonic shock (28). Staining with both donor-specific and T-cell-specific monoclonal antibodies (mAbs) was performed on each recipient and control mouse. Cells were incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Lyt-1 (Lyt-1.1 + Lyt-1.2; PharMingen, San Diego, CA) mAb and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Lyt-1.1 (PharMingen) mAb for 30 min at 4°C and then washed twice. To block nonspecific Fc γ R binding of labeled antibodies, 10 μ L of an undiluted culture supernatant of 2.4G2 (rat antimouse Fc γ R mAb) was added to the first incubation. All data were collected and analyzed by a FACSCalibur and CellQuest software (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Dead cells were excluded by gating out low forward scatter-high propidium iodide-retaining cells.

For the analysis of TCR expression on T cells of WBC, two-color analysis was performed (28). WBC were labeled with FITC-conjugated anti-V β 6, V β 3, or V β 8.1/8.2 mAb (PharMingen), and PE-conjugated anti-CD4 (PharMingen) mAb. To determine the percentage of CD4⁺ T cells that were V β 6⁺, V β 3⁺ or V β 8.1/8.2⁺, 10,000 to 20,000 gated CD4⁺ cells were collected.

For the staining NKT cells, SC or liver mononuclear cells (LMNC) were stained with PE-conjugated α -galactosyl ceramide (α GalCer)/CD1d-tetramers and FITC-conjugated anti-CD3 mAb (PharMingen). PE-conjugated α GalCer/CD1d-tetramers were prepared as previously described (29). The liver was disrupted in the RPMI 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) by pressing liver fragments between two-glass slides, washed, resuspended in a 40% isotonic Percoll solution (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), and underlaid with a 67.5% isotonic Percoll solution. Centrifugation for 30 min at 3000 rpm at room temperature isolated the liver mononuclear cells (LMNC) at the interface. Cells were washed two times with Hank's balanced salt solution containing 2% FCS and resuspended in it.

Monoclonal and Polyclonal Antibodies

To elucidate the role of IL-10 in NKT cell-mediated immunoregulation, anti-IL-10 mAb (100 μ g; PharMingen Co, San Diego, CA) was injected into NKT cell-reconstituted NKT KO recipients on day -28, and then weekly until the end of the experiment. Anti-Ly-49A (YEL48), C/I (5E6), and G2 (4D11) mAbs, which were kindly provided by Dr. William J. Murphy (Intramural Research Support Program, Frederick, MD), were injected i.p. into recipients on day -1 (each mAb: 25 μ g) and then weekly until the end of the experiment. The depletions of Ly-49A-, C/I-, and G2-positive cells were con-

firmed by a flow cytometry by both direct staining with Ly49 mAb, and indirect staining with PE-conjugated antimouse immunoglobulin (Ig), κ -light chain, and PE-conjugated antirat Ig, κ -light chain Abs. Rabbit polyclonal antisialo GM1 was purchased from Wako Chemical Industries (Osaka, Japan).

Statistics

The statistical significance of the data was determined by a Mann-Whitney *U* test when the data were nonparametric, or a Student's *t* test when the data were parametric. A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Skin Allograft Prolongation in H2-Matched DBA (H-2^d) → BALB WT (H-2^d) or BALB Background Va14 NKT KO (H-2^d) Combination Mice by Using 1×10^8 DBA SC Followed by 200 mg/kg CP

In the first experiment, DBA/2 (DBA, H-2^d) mice were used as donors, and BALB/c (BALB, H-2^d) mice or NKT KO (H-2^d, BALB background) mice were used as recipients. H2 matched DBA skin allografts (H-2^d) were rejected within 14 days in untreated BALB WT or NKT KO recipients (Fig. 1A, B). DBA skin grafts were rejected within 14 days in BALB WT or NKT KO mice treated with DBA WT SC alone or 200 mg/kg CP alone (data not shown). All of the DBA skin allografts survived for more than 100 days in the recipient BALB WT mice treated with DBA WT SC followed by CP (*n*=6; MST >100 days; median >100 days). On the other hand, the survival of DBA skin grafts was only partially prolonged, and all grafts were rejected within 48 days in the recipient NKT

KO mice treated with DBA WT SC followed by CP (*n*=10; MST=36.4±7.1 days, median 39 days). This skin allograft prolongation was tolerogen-specific since the third-party skin graft of the B10.D2 strain (H-2^d) was rejected in a normal fashion (Fig. 1B).

Skin Allograft Prolongation in H2-Matched BALB WT or NKT KO → DBA WT or B10.D2 WT (H-2^d) Combination Mice by Using 1×10^8 Donor SC Followed by 200 mg/kg CP

In the next experiment, BALB NKT KO mice were used as donors, and DBA or B10.D2 mice were used as recipients. Donor BALB skins survived permanently in recipient DBA or B10.D2 WT mice treated with BALB WT SC and CP (*n*=6 in each group; Fig. 2). All of the BALB skin grafts were accepted in DBA or B10.D2 WT mice treated with BALB NKT KO SC and CP (*n*=10 in each group). BALB skin grafts were rejected within 14 days in DBA or B10.D2 WT mice treated with BALB NKT KO SC alone or 200 mg/kg CP alone (data not shown). This skin allograft prolongation was tolerogen-specific since the third party skin grafts were rejected in a normal fashion (Fig. 2A[ii] and 2B[i]; *n*=5 in each group).

Chimerism and Reduction of MIs-1^a-Reactive CD4⁺Vβ6⁺ or MIs-2^a-Reactive CD4⁺Vβ3⁺ T Cells of WBC in Recipient Mice Treated With Donor SC Plus CP

The kinetics of the donor mixed chimerism after the treatments with donor SC and CP were examined by flow

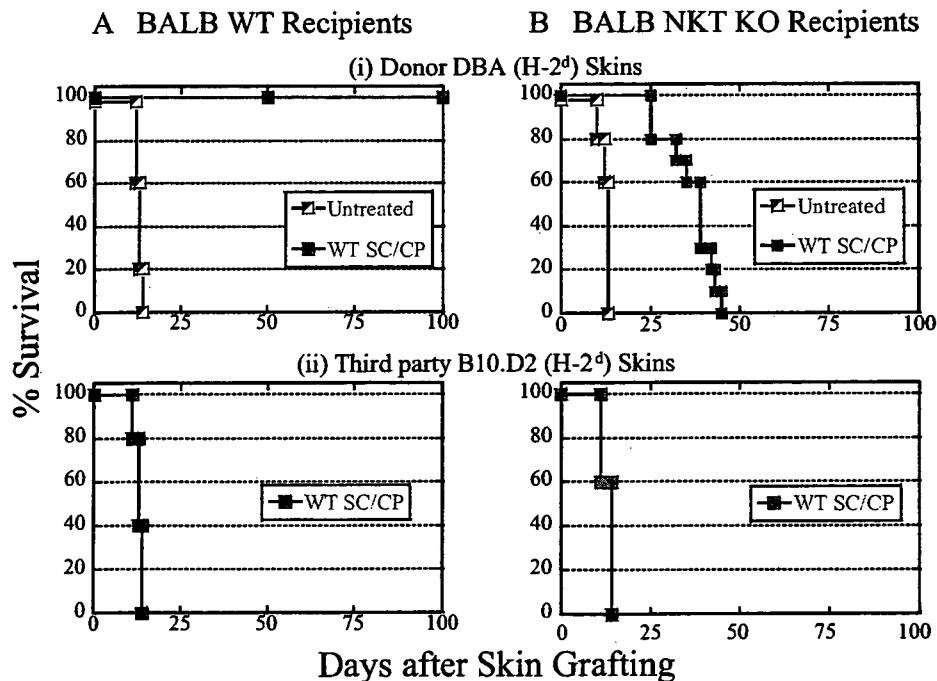


FIGURE 1. (i) Donor DBA skin allograft survival in the recipient BALB WT mice treated with DBA WT SC and CP (WT SC/CP) (A; *n*=6; MST >100 days; median >100 days) or BALB NKT KO mice treated with WT SC/CP (B; *n*=10; MST 36.4±7.1 days, median 39 days). Untreated BALB WT or NKT KO recipient mice rejected donor DBA skin grafts within 14 days (*n*=5 in each groups). (ii) Third-party B10.D2 skin grafts were rejected within 14 days after grafting in all groups. Recipient mice received donor or third mice skin grafts at 4 weeks after treatments.

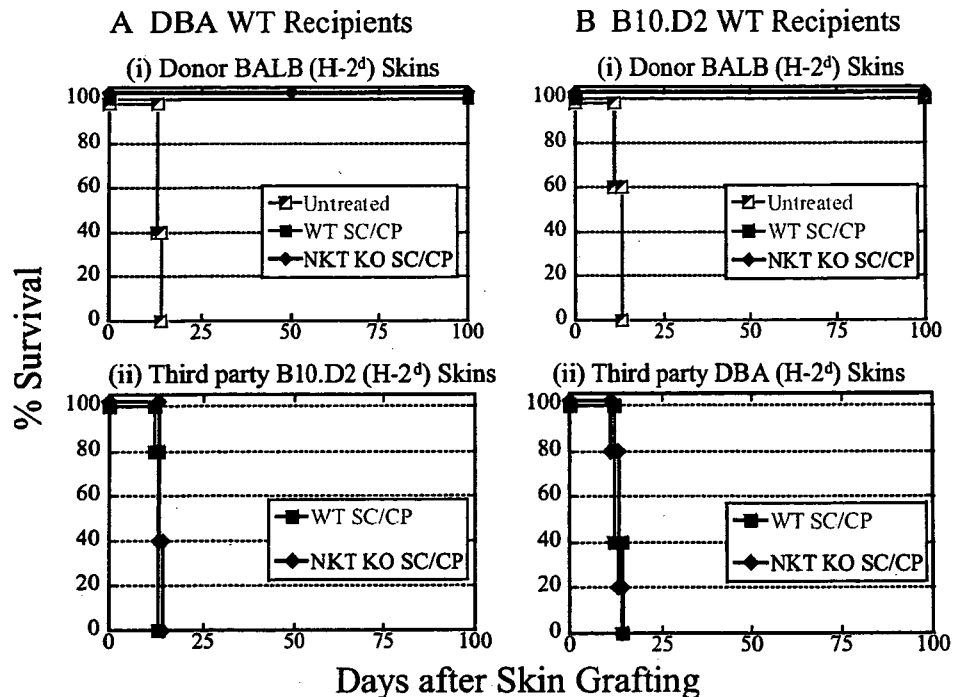


FIGURE 2. (A) (i) Donor BALB skin allograft survival in the recipient DBA WT mice treated with BALB WT SC and CP (WT SC/CP) ($n=6$, MST >100 days, median >100 days) or BALB NKT KO SC/CP ($n=10$, MST >100 days, median >100 days). (ii) Third party B10.D2 skin grafts were rejected within 14 days after grafting in all groups. Recipient mice received donor or third party skin grafts at 4 weeks after treatments. (B) (i) Donor BALB skin allograft survival in the recipient B10.D2 WT mice treated with BALB WT SC/CP ($n=6$, MST >100 days, median >100 days) or BALB NKT KO SC/CP ($n=10$, MST >100 days, median >100 days). (ii) Third-party DBA skin grafts were rejected within 14 days after grafting in all groups. Untreated BALB WT or NKT KO recipient mice rejected donor DBA skin grafts within 14 days ($n=5$ in (A)i and (B)i). Recipient mice received donor or third party skin grafts at 4 weeks after treatments.

cytometry. WBCs were obtained from the recipient mice at 2 and 8 weeks after tolerance induction (Table 1).

In the first experiment (EXP1), where BALB WT or NKT KO mice were used as recipient and DBA as donors, 2–4% of Lyt-1.1+ donor DBA cells were detected in the recipient peripheral WBC after tolerance induction (Table 1, EXP1, Group 4). In contrast, the level of the mixed chimerism was significantly low in the NKT KO recipient treated with donor DBA SC and CP (EXP1, Group 4 vs. Group 5, 3.5 ± 1.2 vs. 1.3 ± 0.3 , and 4.0 ± 0.5 vs. 0.9 ± 0.3 , at 2 weeks and 8 weeks, respectively; $P < 0.01$ in both time point). These results were reproducible in five independent experiments (data not shown).

Donor Mls-1^a-reactive TCR $V\beta 6$ in BALB WT or NKT KO (Mls-1^b) mice were also examined after treatments with DBA (Mls-1^a) WT SC and CP (first experiment). The WBC from the recipients was stained with FITC-conjugated anti- $V\beta 6$ mAb and PE-conjugated anti-CD4 mAb (EXP1, Table 1). In the WBC of untreated BALB WT and NKT KO mice, CD4⁺ $V\beta 6$ ⁺ T cells were detected (EXP1, Groups 1 and 2, respectively), whereas they were hardly detectable in the WBC of untreated DBA mice (EXP1, Group 3). In all of the BALB WT mice treated with DBA WT SC and CP (EXP1, Group 4), CD4⁺ $V\beta 6$ ⁺ T cells were significantly reduced at 3 weeks. The same results were obtained in the WBC of NKT KO mice treated with DBA SC and CP (EXP1, Group 5). There was no significant difference between Groups 4 and 5. The disappearance of T cells from the WBC was specific for

$V\beta 6$ ⁺ T cells, and the percentage of non-donor reactive $V\beta 8.1/8.2$ ⁺ T-cells population were similar (EXP1, Groups 4 vs. 5).

The level of the mixed chimerism was also analyzed in DBA WT recipient mice treated with BALB WT or NKT KO SC and CP (EXP2, Groups 4 and 5). There was no statistical significance between the level of mixed chimerism in DBA WT mice treated with SC from either BALB WT or NKT KO mice and CP (EXP2, $P > 0.05$, Groups 4 vs. 5).

In the third experiment (EXP3), in which B10.D2 mice were used as recipients and BALB WT or NKT KO mice used as donors, the expression of donor Mls-2^a-reactive TCR $V\beta 3$ was examined by flow cytometry (Table 1, EXP3). Certain level of CD4⁺ $V\beta 3$ ⁺ T cells were detected in the WBC of untreated B10.D2 WT mice (EXP3, Group 1), which was eliminated in the WBC of untreated BALB WT and NKT KO mice (EXP2, Groups 1 and 2, respectively). In all of the B10.D2 WT mice treated with BALB WT SC and CP (EXP3, Group 2), CD4⁺ $V\beta 3$ ⁺ T cells were significantly reduced at 3 and 9 weeks. The same results were obtained in B10.D2 WT mice treated with BALB NKT KO SC and CP (EXP3, Group 3). The disappearance of T cells from the WBC was specific for $V\beta 3$ ⁺ T cells, since the percentage of non-donor reactive $V\beta 8.1/8.2$ ⁺ T cells was observed in the similar level throughout the experiment. These results indicated that the NKT cells in the recipient, but not the donor NKT cells, were critical for the induction and the subsequent maintenance of donor mixed chimerism.

TABLE 1. Chimerism and clonal destruction in recipients treated with WT or NKT KO SC and CP

Exp.	Group	Recipient	Treatments ^a		No. of mice	Chimeric analysis (% positive cells ± SD)		Analysis of TCR expression (% positive cells ± SD)							
			SC (day 0)	CP (mg/kg) (day 2)		%Ly1.1 ⁺ /Ly1 ⁺		CD4 ⁺ Vβ6 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ8 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ3 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ8 ⁺ /CD4 ⁺	
						2W	8W	3W	9W	3W	9W	3W	9W		
1	1	BALB WT	(-)	(-)	6	0.0 ± 0.0		9.5 ± 1.1		16.7 ± 2.1					
	2	BALB NKT KO	(-)	(-)	6	0.0 ± 0.0		11.2 ± 0.5		12.5 ± 1.9					
	3	DBA WT	(-)	(-)	6	97.3 ± 2.5		0.0 ± 0.0		12.3 ± 1.6					
	4	BALB WT	DBA WT	200	6	3.5 ± 1.2 ^b	4.0 ± 0.5 ^b	1.4 ± 0.7 ^c	1.1 ± 0.7 ^c	16.8 ± 1.9	16.3 ± 2.0				
	5	BALB NKT KO	DBA WT	200	6	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.4	14.5 ± 3.1	14.3 ± 3.2				
2	Chimeric analysis (% positive cells ± SD)						Analysis of TCR expression (% positive cells ± SD)								
			%Ly1.1 ⁻ /Ly1 ⁺				CD4 ⁺ Vβ3 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ8 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ3 ⁺ /CD4 ⁺		CD4 ⁺ Vβ8 ⁺ /CD4 ⁺		
			2W	8W	3W	9W	3W	9W	3W	9W	3W	9W	3W	9W	
	1	BALB WT	(-)	(-)	6	100 ± 0.0		0.0 ± 0.0		18.7 ± 2.1					
	2	BALB NKT KO	(-)	(-)	6	100 ± 0.0		0.2 ± 0.1		16.4 ± 0.9					
	3	DBA WT	(-)	(-)	6	0.8 ± 0.1		ND (not done)		ND					
	4	DBA WT	BALB WT	200	6	32.3 ± 5.6 ^d	27.4 ± 5.3 ^d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	5	DBA WT	BALB NKT KO	200	6	30.4 ± 13.5	24.1 ± 6.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1	B10.D2 WT	(-)	(-)	6	ND (not done)		6.2 ± 1.2		20.6 ± 1.5					
	2	B10.D2 WT	BALB WT	200	6	ND	ND	0.3 ± 0.2 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	21.8 ± 1.9	22.7 ± 3.2				
3	B10.D2 WT	BALB NKT KO	200	6	ND	ND	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	20.6 ± 1.5	20.9 ± 2.2					

^a Recipient mice were primed i.v. with 1 × 10⁸ SC on day 0, and given 200 mg/kg CP on day 2.

^b P < 0.01 compared with group 5 of exp. 1.

^c Not significant compared with group 5 of exp. 1.

^d Not significant compared with group 5 of exp. 2.

^e Not significant compared with group 3 of exp. 2.

Induction of DBA Skin Graft Prolongation in NKT KO Mice Reconstituted With NKT Cells From BALB WT Mice

To clarify whether NKT cells were involved in the limitation of skin graft tolerance in CP-induced tolerance, NKT cells were reconstituted into NKT KO mice. When SC and liver mononuclear cells (LMNC) were stained with PE-conjugated α GalCer/CD1d-tetramers and FITC-conjugated anti-CD3 mAb, α GalCer/CD1d-tetramers⁺CD3⁺ cells accounts for about 1.0 ± 0.3 and $19.5 \pm 5.4\%$ of SC and LMNC in untreated BALB WT mice ($n=3$), respectively, and 0.3 ± 0.1 and $1.2 \pm 0.2\%$ in SC and LMNC of untreated NKT KO mice ($n=3$), respectively. Small percentage of α GalCer/CD1d-tetramers⁺CD3⁺ cells were detected in NKT KO mice because NKT KO mice in this study were generated by the disruption of $J\alpha 18$ gene (6).

On the other hand, α GalCer/CD1d-tetramers⁺CD3⁺ cells account for about 0.4 ± 0.1 and $4.3 \pm 0.5\%$ in SC and LMNC of NKT KO mice ($n=3$) injected with BALB WT SC 7 days earlier, respectively. When NKT KO mice were injected with 1×10^6 SC from BALB WT mice on day -7 and treated with SC on day 0 and CP on day 2, the survival of DBA skin grafts was significantly prolonged, but 3 of 7 recipients chronically rejected ($n=7$; MST > 100 days).

We planned the following experiment. To further reconstitute NKT cells in NKT KO mice, recipient NKT mice were irradiated with 3 Gy on day -28 and then injected with 1×10^7 SC and 5×10^6 untreated BMC from WT mice on the same day. In NKT KO mice ($n=5$) irradiated and injected with BALB WT SC and BMC 28 days earlier, α GalCer/CD1d-tetramers⁺CD3⁺ cells account for about $0.7 \pm 0.1\%$ and $9.5 \pm 2.6\%$ of SC and LMNC, respectively. DBA skin grafts were accepted for more than 100 days in all the NKT KO mice irradiated with 3 Gy on day -28, reconstituted with 1×10^7 SC and 5×10^6 BMC from BALB WT mice on day -28, and then treated with DBA SC on day 0 and CP on day 2 (Fig. 3A; $n=6$; MST > 100 days). This skin allograft prolongation was tolerogen-specific since the third-party skin of the B10.D2 strain (H-2^d) was rejected in a normal fashion (Fig. 3A and B; $n=5$ in each group).

NKT cells have been well documented to produce large amounts of both IL-4 and IFN- γ upon activation, which are considered to play a role in both immunoactivation and immunoregulation (6-9). More recent studies have suggested that IL-10 produced by NKT cells mediates immunoregulation (30). To elucidate the role of cytokines produced from NKT cells, BALB NKT KO mice were reconstituted with NKT cells from IFN- γ or IL-4 KO mice and received tolerance conditioning. In the other group, BALB NKT KO mice were reconstituted NKT cells from WT mice and treated with anti-IL-10 mAb weekly. As shown in Figure 3A, all of the donor DBA skin grafts were accepted more than 100 days in irradiated BALB NKT KO mice reconstituted NKT cells from IFN- γ or IL-4 KO mice and received tolerance conditioning (each group, $n=6$; MST > 100 days). On the other hand, only partial prolongation of donor skin graft survival was observed in NKT KO mice reconstituted from NKT KO mice and received tolerance conditioning ($n=6$; MST = 51.5 ± 13.8 days, median 54.5 days). In the BALB NKT KO mice reconstituted with WT NKT cells and received tolerance conditioning together with anti-IL-10 neutralizing mAb weekly, all of the

donor skin grafts survived more than 100 days ($n=6$; MST > 100 days). This skin allograft prolongation was tolerogen-specific because the third-party skin of the B10.D2 strain (H-2^d) was rejected in a normal fashion (Fig. 3A; $n=5$ in each group). Thus, each single cytokine from NKT cells, such as IFN- γ , IL-4, IL-10, was dispensable to induce tolerance in CP-induced tolerance conditioning.

Anti-Ly-49 Inhibitory Receptor mAbs Can Attenuate Graft Prolongation

NKT cells express -49 inhibitory receptors, such as Ly-49A, G2, and C/I, and do not express activation receptors, such as Ly-49D and Ly-49H molecules (31). Next study was designed to determine the regulatory function of the NKT cells via Ly49 receptors. WT or NKT KO recipients were treated with anti-Ly49A (A-1), Ly49C/I (5E6), and Ly49G2 (4D11) mAb cocktail from day -1 (each mAb: 25 μ g) and then weekly, and received tolerance conditioning. Depletion of Ly49-positive cells were confirmed by flow cytometry as described in Materials and Methods. As shown in Figure 3B, DBA skin allografts survived for more than 100 days in WT mice treated with SC and CP without mAbs ($n=6$; MST > 100 days). In Ly49-depleted WT mice treated with SC and CPs, however, the survival of DBA skin grafts was prolonged, but 4 of 6 recipient WT mice rejected donor grafts within 100 days after grafting ($n=6$; MST = 57.8 ± 36.2 days, median = 52.5 days). DBA skin grafts were rejected within 52 and 45 days in NKT KO mice treated with SC and CP with or without mAbs, respectively ($n=6$; MST = 33.7 ± 11.8 days or 38.3 ± 7.6 days, median = 31.5 or 41 days, respectively). NK cells were selectively depleted, but not NKT cells, by the treatment with anti-asialo GM1, because of the marginal expression of asialo GM1 on NKT cells as a surface molecule (32, 33). Thus, NK cells of recipient BALB WT mice were depleted by anti-asialo GM1 injected on day -1 and then weekly, and then treated with donor DBA SC and CP. Donor DBA skin grafts were permanently accepted ($n=6$) in the NK-depleted WT recipients. However, DBA skin grafts were rejected within 70 days in WT mice treated with DBA SC, anti-asialo GM1, and anti-Ly49 mAbs ($n=6$; MST = 55.1 ± 30.5 days, median ≥ 57 days). Thus the donor skin graft tolerance was abrogated by the depletion of Ly49-positive NKT cells, but not by the depletion of NK cells. This skin allograft prolongation was tolerogen-specific since third-party skin B10.D2 (H-2^d) allografts were rejected in a normal fashion (Fig. 3B; $n=6$ in each group). Thus, NKT cell, but not NK cells, was required to induce skin graft tolerance. The results also indicated that NKT cells with Ly49 inhibitory receptors were the major population for induction of tolerance.

DISCUSSION

Using the H2-matched murine combination of DBA into BALB and mAbs against T-cell markers (Lyt-1.1 and Thy-1.2) and TCR V β 6, we have demonstrated the sequential mechanisms of cyclophosphamide-induced tolerance (18-20). These are as follows: 1) clonal destruction of antigen-stimulated T cells followed by destruction of proliferating T cells by CP; 2) establishment of stable mixed chimerism; 3) intrathymic clonal deletion; and 4) regulatory mechanisms at the late stage of tolerance. These four conditions are achieved

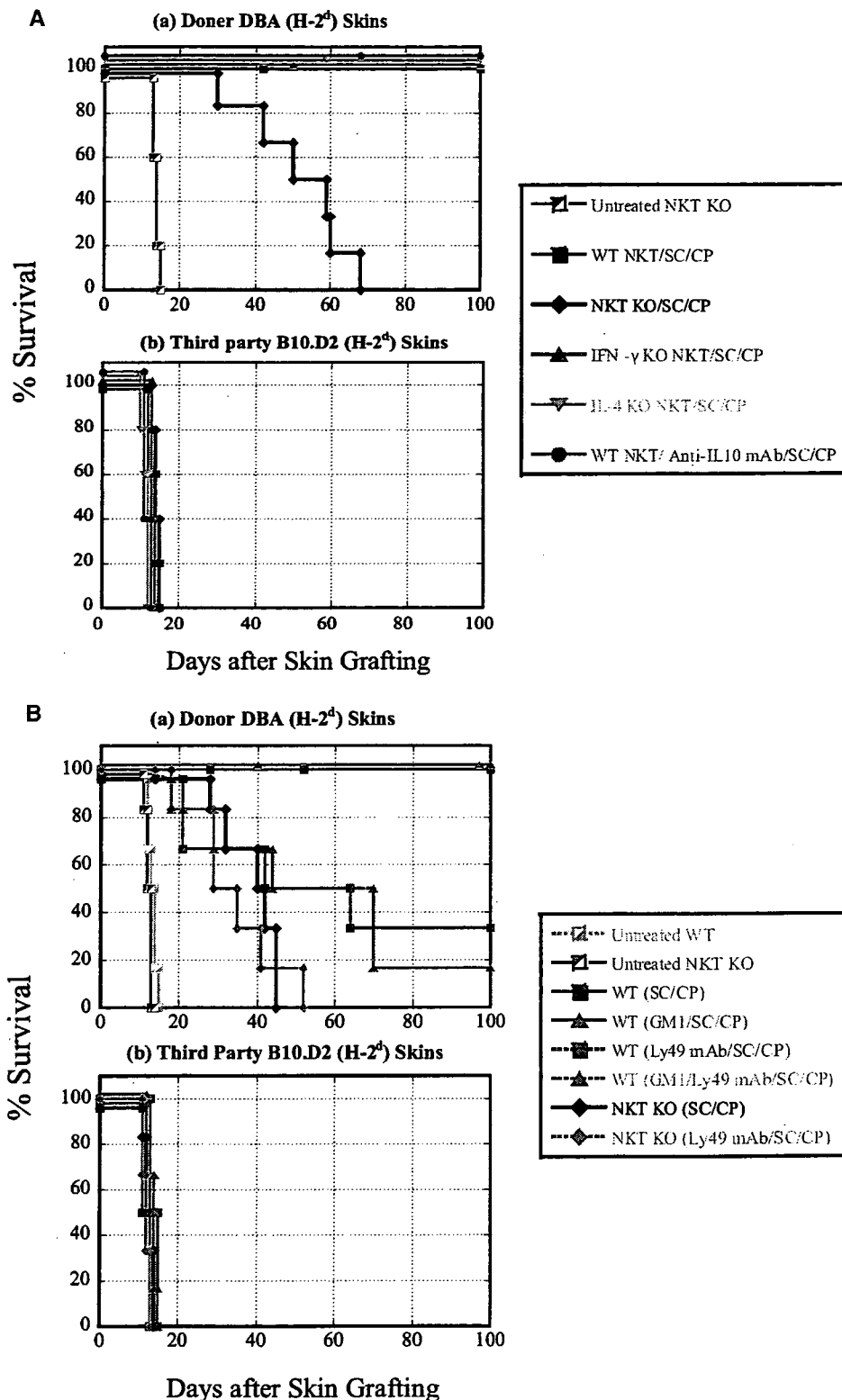


FIGURE 3. (A) (a) Donor DBA skin allograft survival in recipient BALB NKT KO mice reconstituted with NKT cells from cytokine knockout mice. Recipient BALB NKT KO mice were irradiated with 3 Gy and received both SC and BMC from BALB WT (red square, n=6; MST >100 days), BALB NKT KO (black diamond, n=6, MST 51.5±13.8 days, median 54.5 days), BALB IFN- γ KO (green triangle, n=6, MST >100 days), or BALB IL-4 KO (yellow inverted triangle, n=6, MST >100 days), and then treated with DBA SC/CP. In another group, irradiated BALB NKT KO mice were reconstituted with SC and BMC from BALB WT mice, administered with anti-IL10 mAb, and then treated with DBA SC and CP (purple circle, n=6, MST >100 days). NKT