

原 著

(東女医大誌 第66巻 第12号)  
(頁 1151~1159 平成8年12月)

## 同種サル腎移植における mixed chimerism による免疫寛容導入と 全身照射の至適条件に関する検討

東京女子医科大学 第三外科学教室（主任：太田和夫教授）

君川 正昭・河合 達郎・太田 和夫

(受付 平成8年8月20日)

### Optimized Total Body Irradiation for Induction of Renal Allograft Tolerance Through Mixed Chimerism in Cynomolgus Monkeys

Masaaki KIMIKAWA, Tatsuo KAWAI and Kazuo OTA

Department of Surgery III, Tokyo Women's Medical College

We previously demonstrated that a nonmyeloablative preparative regimen can induce mixed chimerism and renal allograft tolerance between MHC-disparate non-human primates. The basic regimen includes anti-thymocyte globulin (ATG), total body irradiation (TBI, 300 cGy), thymic irradiation (TI, 700 cGy), splenectomy, donor bone marrow (DBM) infusion, and posttransplant cyclosporine therapy (CYA, discontinued after 4 weeks). To evaluate the importance and to minimize the toxicity of irradiation, kidney allografts were transplanted with various manipulations of the irradiation protocol. Monkeys treated with the basic protocol without TBI and TI did not develop chimerism or long-term allograft survival. In monkeys treated with the full protocol, all six monkeys treated with two fractionated dose of 150 cGy developed chimerism and five monkeys appeared tolerant. In contrast, only two of the four monkeys treated with fractionated doses of 125 cGy developed chimerism and only one monkey survived long term. The degree of lymphocyte depletion in all recipients was proportional to the TBI dose. The fractionated TBI regimen of 150 cGy appears to be the most consistently effective regimen for establishing donor bone marrow cell engraftment and allograft tolerance.

### 緒 言

免疫抑制剤の長期連用を必要としない、ドナー抗原に特異的な免疫寛容の誘導は、臓器移植における究極の目標であり、以前からさまざまな研究がなされている。その中で、ドナーの骨髄移植を併用して移植臓器の免疫寛容を獲得する方法が、臨床応用に最も近いものと期待されており、マウスのような小動物では多数の成功例が報告されている<sup>1)~3)</sup>。大動物においても、これまでに全身照射<sup>4)</sup>、全身リンパ腺照射<sup>5)~7)</sup>、抗リンパ球抗体投与<sup>8)9)</sup>、ATG (anti-thymocyte globulin) 投与<sup>10)11)</sup>などを前処置として、ドナー骨髄移植を併用した

臓器移植が試みられてきたが、どの試みも前処置による侵襲が大きく、臨床応用に結び付く結果はえられていない。したがって大動物を用いた免疫寛容の研究では、いかに侵襲の小さい前処置により mixed chimerism ならびにドナーに特異的な免疫寛容を誘導できるかが、現在大きな課題となっている。

本研究では、1988年に Sharabi ら<sup>3)</sup>がマウスの皮膚移植で成功した侵襲の少ない regimen をサルの腎移植に応用し、大動物において mixed chimerism および免疫寛容を誘導するための前処置、特に全身照射の至適条件について検討した。

## 対象と方法

### 1. 実験動物

体重3~8kgのcynomolgus monkeyを36匹使用し、これをドナーおよびレシピエントに分けた。各ドナー、レシピエントの組み合わせは、ABO血液型の適合性およびcynomolgus leukocyte (Cy-LA)-MHC抗原の不一致により決定した。Cy-LAクラスI抗原は血清学的に分類し、クラスII抗原の不一致はリンパ球混合培養試験により決定した。またドナーおよびレシピエントは、抗クラスIモノクローナル抗体により検出可能な、少なくとも一つの抗原がドナーにのみ存在するような組み合わせを選択し、移植後mixed chimerismが検出されるようにした。

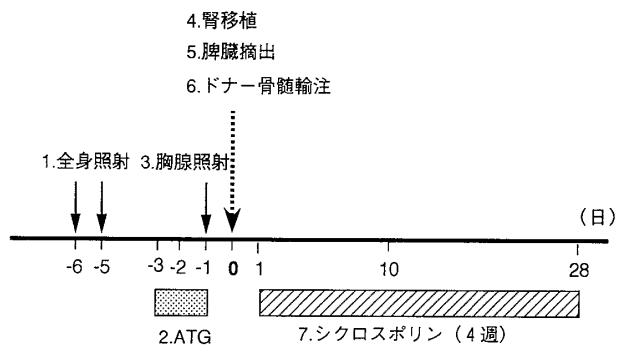
すべての外科的処置および術後のケアはNIHならびにMGH (Massachusetts General Hospital) のガイドラインに沿って行った。

### 2. 前処置ならびに免疫抑制剤の投与

基本的プロトコールを図1に示した。移植6日前(分割照射の場合は移植6日前と5日前)の全身照射、移植前日の700cGyの胸腺照射、移植前3日間のATG投与からなる前処置を施した後、移植0日に腎移植、脾摘、ドナー骨髄細胞移植を行い、さらに移植後28日間のシクロスボリン(CYA)投与を行った。

#### 1) 放射線照射

$^{60}\text{CO}$ を用いて全身照射(20~30cGy/min)、胸腺照射(100~200cGy/min)を行った。表に示すように、放射線照射の条件により、A群：放射線照



ATG: Anti-thymocyte globulin

図1 免疫寛容誘導の基本的プロトコール

移植6日前(分割照射の場合は移植6日前と5日前)の全身照射、移植前日の胸腺照射、移植前3日間のATG投与からなる前処置を施した後、移植0日に腎移植、脾摘、ドナー骨髄細胞移植を行い、さらに移植後28日間のシクロスボリン(CYA)投与を行った。

射を全く行わなかったもの(非全身照射、非胸腺照射:n=2), B群:全例に全身照射、胸腺照射を行ったものに分け、なおかつB群を全身照射の照射法、線量により4つの亜群に分けて検討した。各亜群の全身照射線量は、B-I群(n=1)では150cGy 1回、B-II群(n=4)では125cGy 2回、B-III群(n=6)では150cGy 2回、B-IV群(n=3)では300cGy 1回とした。

#### 2) ドナー骨髄細胞輸注

骨髄細胞はドナーの腸骨もしくは脊椎骨より15Gないし18Gの骨髄穿刺針を用いて、血液量として50~80ml、有核細胞数として $0.5 \times 10^8/\text{kg}$ 以上採取し、腎移植が終了した直後、経静脈的にレシ

表 放射線照射とmixed chimerism、拒絶反応、グラフト生着

| 群 | 照射法                  | 例数 | Mixed chimerism | 拒絶反応 | 生着期間(日数)                        |
|---|----------------------|----|-----------------|------|---------------------------------|
| A | 全身照射(-)、胸腺照射(-)      | 2  | 0/2             | 2/2  | 47, 61                          |
| B | 全身照射(+)、胸腺照射(+)      |    |                 |      |                                 |
|   | I. 全身照射 150 cGy x1   | 1  | 1/1             | 1/1  | 56                              |
|   | II. 全身照射 125 cGy x2  | 4  | 2/4             | 2/4  | 37#, 50, 90, 155*               |
|   | III. 全身照射 150 cGy x2 | 6  | 6/6             | 1/6  | 37, 196*, 198*, 406*, 771, >935 |
|   | IV. 全身照射 300 cGy x1  | 3  | 1/3             | 1/3  | 14**, 174, 834*                 |

#: 外科的合併症により死亡(移植腎機能は正常), \*: 尿路合併症により死亡(移植腎機能は正常),

\*\*: 敗血症により死亡, \_\_: mixed chimerismが誘導された例。

ピエントに輸注した。

### 3) ATG

Horse anti-human anti-thymocyte globulin (ATGAM, Upjohn, Kalamazoo, MI)を移植前3, 2, 1日もしくは2, 1, 0日に、経静脈的に50mg/kg/day 投与した。

### 4) シクロスボリン (CYA)

移植後1日目に15mg/kg 筋注した。その後は血中濃度域が300~500ng/ml となるように投与量を調節した。術後28日目で投与を中止した。

## 3. 腎移植および脾摘除

ドナーおよびレシピエントの麻酔は、ketamine (10mg/kg) ならびに valium (0.8mg/kg) の筋注により導入し、その後は必要に応じて ketamine の静注を追加した。ドナーの左腎を尿管とともに摘出し、以前報告<sup>12)</sup>した手術法によりレシピエントの右下腹部に移植した。腎動脈は大動脈に、腎静脈は下大静脈にそれぞれ端側吻合した。レシピエントの自己腎は同時に摘出した。

脾摘は腎摘と同時に開腹手術で実施した。

## 4. Mixed chimerism の検討

Mixed chimerism の成否は、末梢血白血球のフローサイトメトリーによった。装置は FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を使用した。末梢血単核細胞は hypotonic lysis により赤血球を除去して採取した。移植前にあらかじめ Cynomolgus monkey と交叉性のあるマウス抗ヒト HLA クラス I 抗体 (mouse anti-human HLA class I mAb) のパネルから選択しておいた。ドナーに特異的なモノクローナル抗体 (MGH David Sachs 教授より供与) を使用した。最初レシピエントの細胞に、ドナーに特異的なモノクローナル抗体を加えて30分間 4 °Cで反応させ、その後 fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヒツジ抗マウス IgG2a 抗体 (FITC-conjugated goat anti-mouse IgG2a mAb, Biosource, Camarillo, CA) を加えて暗所でさらに30分間 4 °C反応させた。その後 FACScan を用いて mixed chimerism について解析を行った。ドナー由来細胞は FITC 蛍光輝度が強く、レシピエント由来細胞は弱いため、FITC 蛍光輝度の違いにより両者を識別した。

ドナー細胞と、移植前にあらかじめ凍結保存しておいたレシピエント細胞をそれぞれ陽性、陰性のコントロールとして用いた。Mixed chimerism はリンパ球、顆粒球、単球それぞれについて解析した。リンパ球、顆粒球、単球は FSC (forward scatter), SSC (side scatter) の違いにより識別した。死細胞は propidium iodide (PI) を用いて除去した。

## 5. 末梢血白血球数、リンパ球数検査

移植前および移植後定期的に採血し、各治療群における末梢血白血球数、リンパ球数の経時的変化について比較検討した。

## 6. リンパ球混合培養試験

移植前および移植後30, 60, 100, 150日目前後、その後は随時検査を行った。被験リンパ球 ( $2 \times 10^5$ ) と放射線照射した刺激リンパ球 ( $2 \times 10^5$ ) を混合して4日間培養した。その後アイソトープ (<sup>3</sup>H) 標識チミジン (thymidine) を培養液に加え、さらに8時間培養した後、リンパ球だけを分離してその放射能を測定した。刺激リンパ球を加えず、被験リンパ球のみを培養したものとの比をとって stimulation index (SI) として評価した。

## 7. 病理学的検討

移植腎の生検は定期的に行なったが、移植腎機能が悪化した場合は必要に応じて追加した。また死亡時には剖検により組織を摘出した。なおすべての組織から光顕ならびに免疫染色のための凍結標本を作製した。

## 結 果

### 1. 全身照射と免疫寛容誘導効果

放射線照射を全く施行しなかった A 群 (非全身照射、非胸腺照射群) では、2例とも mixed chimerism は誘導されず、移植腎は CYA 中止後それぞれ術後47, 61日目に拒絶された。

一方、全例に700cGy の胸腺照射を移植前日に行い、全身照射法のみ変更して検討した B 群では、照射線量や回数により異なる結果がえられた。B-I 群 (150cGy 1回) では、術後13日目に一過性にリンパ球のみ mixed chimerism を認めたが、CYA 中止とともに移植腎は術後56日目に拒絶された。また B-II 群 (125cGy 2回) では4例中2例

で multilineage mixed chimerism が誘導され、そのうち 1 例は CYA 中止後も拒絶反応はみられず、長期間にわたり生存した。しかし術後 155 日目に尿管狭窄による尿毒症のため死亡した。また他の 1 例は chimerism が誘導されたにもかかわらず、移植後 50 日目に拒絶された。これに対して、B-III 群 (150cGy 2 回) では 6 例全てに multilineage mixed chimerism が認められ、そのうち 5 例に移植腎の長期生着がえられた。この 5 例のうち 3 例は移植後 196, 198, 406 日目に各々尿路合併症により死亡し、他の 1 例は 771 日目に糸球体腎炎により死亡した。残りの 1 例は移植後 935 日経過した現在、なお正常な腎機能を保っており、生存中である。いずれも腎生検および剖検で病理学的に拒絶反応は認められなかった。しかし残りの 1 例は multilineage mixed chimerism が検出されたにもかかわらず、術後 37 日目に拒絶反応により死亡した。B-IV 群 (300cGy 1 回) では 3 例中 1 例に multilineage mixed chimerism が誘導

されたが、他の 1 例は移植後 175 日目に慢性拒絶反応により死亡し、残る 1 例も移植後 14 日目に汎血球減少症による敗血症により死亡した。しかしながら、この群において multilineage mixed chimerism が誘導された 1 例は、尿路合併症により死亡する 834 日目まで移植腎を拒絶することなく長期生存した。

## 2. 全身照射線量と末梢血白血球数、リンパ球数の変動

B-I 群から B-IV 群における末梢血白血球数、リンパ球数の経時的変化を図 2 および図 3 に示した。図から明らかなように、全例で移植後 7 日目前後から 20 日目前後にかけて白血球、リンパ球の減少が見られ、照射線量に比例して骨髄抑制も強くなっていることが示された。

図 2 に示したとおり、B-I 群 (150cGy 1 回照射) ではごく軽度の白血球減少がみられたのみであった。B-II 群 (125cGy 2 回照射) でも白血球数はそれほど減少せず、 $1,500/\text{mm}^3$  以下にまで減少する

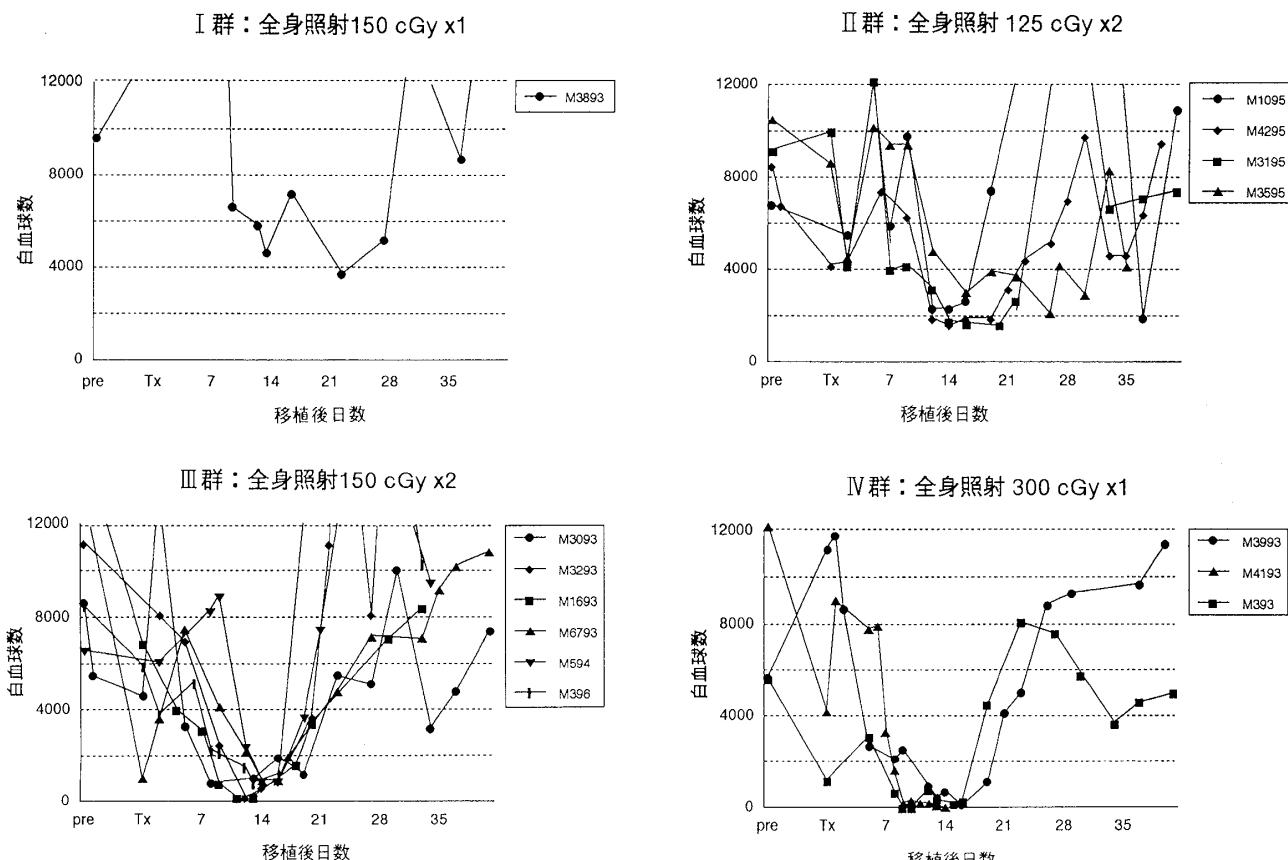


図 2 全身照射線量、方法の相違による末梢白血球数変動の比較

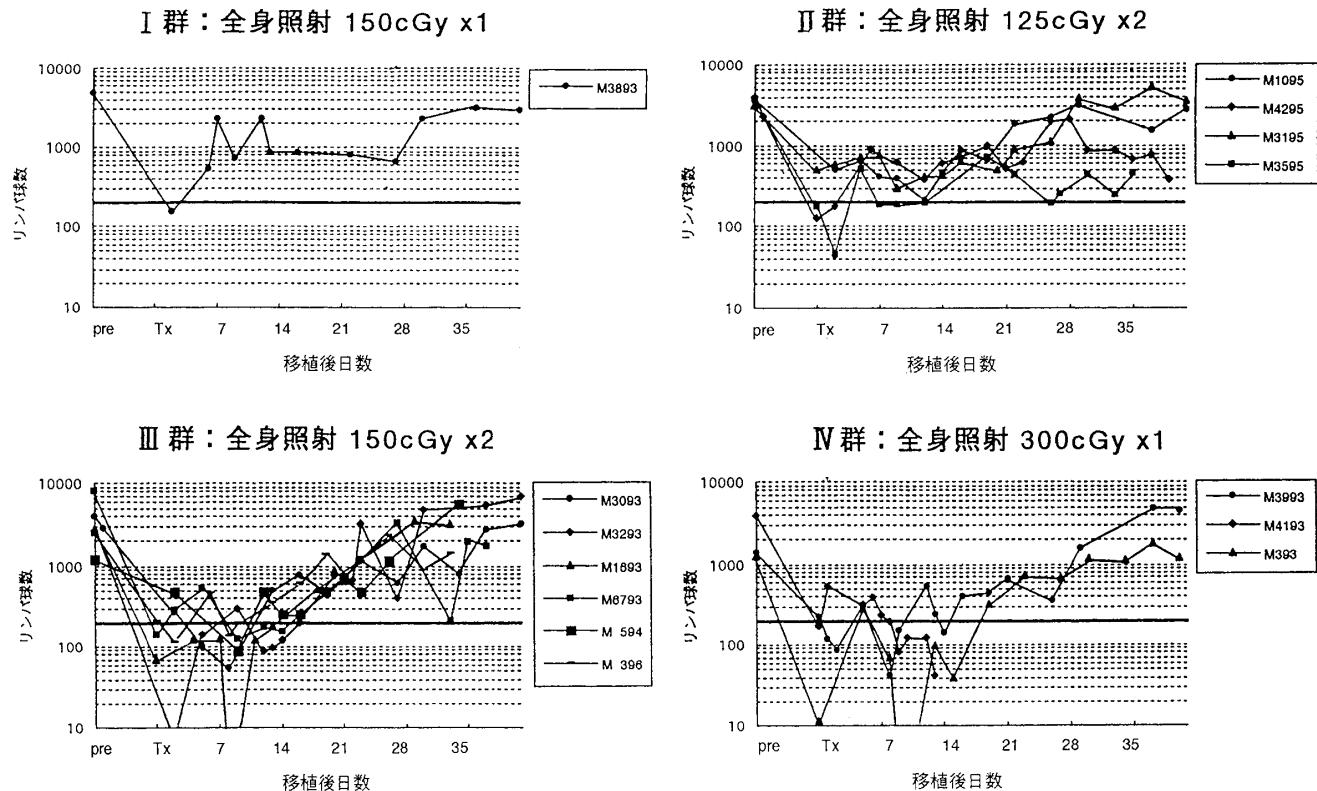


図3 全身照射線量、方法の相違による末梢血リンパ球数変動の比較

ことはなかった。B-III群（150cGy 2回照射）ではB-II群に比べ白血球減少は顕著で、7日目から20日目前後にかけて $1,000/\text{mm}^3$ 以下に減少した。またB-IV群（300cGy 1回照射）ではさらに白血球減少は著しく、 $100/\text{mm}^3$ 以下まで減少した。

また図3に示したように、リンパ球数も白血球と同様な傾向が見られた。移植直後リンパ球数は一過性に減少しているが、これは術前投与したATGによるものと考えられた。B-II群では術後一過性に減少した後直ちに $200/\text{mm}^3$ 以上に回復し、以後 $200/\text{mm}^3$ 以下に減少することはほとんどなかった。一方B-III群、B-IV群では7日目前後から14日目前後まで全例で $100/\text{mm}^3$ 以下に減少していた。その後は徐々に正常範囲に回復した。

### 3. Mixed chimerism

図4、5にフローサイトメトリーにより検出された典型的な multilineage mixed chimerism の1例を示す。

図4のヒストグラムでは、あらかじめ凍結保存しておいた移植前のレシピエント細胞を用いて、レシピエント細胞の FITC 蛍光輝度が $10^1$ 以下に

なるように設定してあるが、3つの分画とも明らかに2峰性のヒストグラムがみられ、術後14, 19, 22日目のレシピエント末梢血中にレシピエント、ドナー細胞の混在をはっきり認めている。どの分画でも14, 19, 22日目とその比率が変化していた。

図5にこの1例の mixed chimerism の経時的变化を示す。ドナー骨髄細胞輸注後ドナー細胞の割合は一旦減少した後、リンパ球、単球は7日目から、顆粒球は14日目から増加し始め、20日前後にはピークに達している。その後はどの分画も徐々に減少し、37日目以降は検出不能となった。Mixed chimerism を認めた他の例でもほぼ同様の経過であった。

### 考 察

これまでの大動物における免疫寛容の誘導を目的とした研究は、前処置として高い線量の放射線照射を行うもの<sup>4)~7)</sup>と放射線照射は併用せず、抗リンパ球抗体を使用するもの<sup>8)9)</sup>とに大別される。前者の場合は chimerism の誘導を狙うものであるが、これまで致死的な線量が使用されてきたため、侵襲が大きく臨床応用に結び付く結果はえら

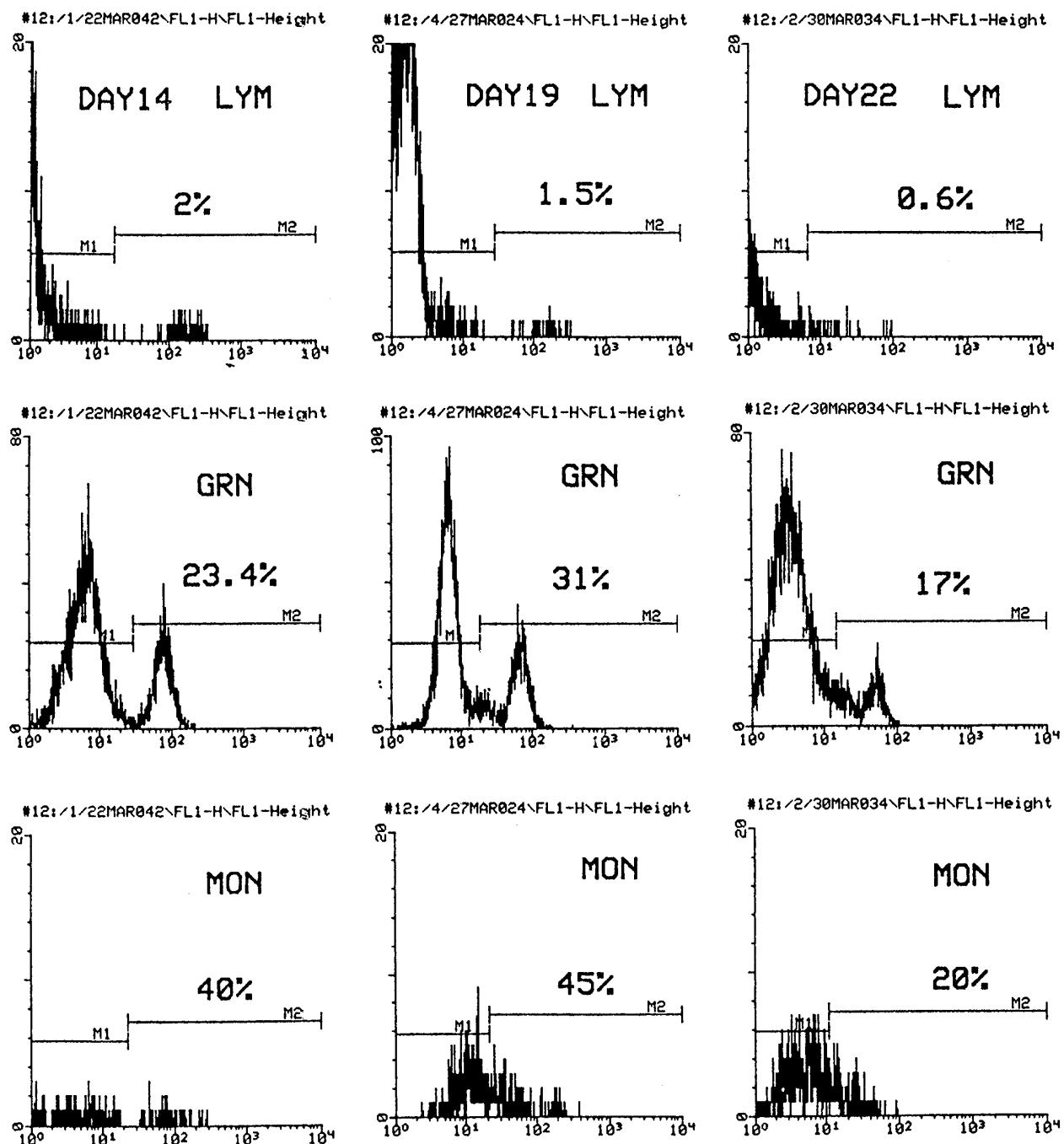


図4 フローサイトメトリーによる mixed chimerism

リンパ球 (LYM, 上段), 顆粒球 (GRN, 中段), 単球 (MON, 下段) のヒストグラムを示す。また左より術後14, 19, 22日のヒストグラムを示す。各ヒストグラムの縦軸は細胞数を、横軸は FITC 蛍光輝度を示す。各ヒストグラムの FITC 蛍光輝度の強いものはドナー由来の細胞、輝度の弱いものはレシピエント由来の細胞であり、明らかに移植後のレシピエント末梢血中に mixed chimerism を認める。

れていない。一方後者の場合は侵襲が小さく、また必ずしも chimerism を誘導する必要がないため、すでに臨床において試みられてはいるが、こちらも満足のいく結果はえられていない<sup>13)</sup>。また

最近 Barber ら<sup>14)</sup>が臨床において試みているものは、まったく通常の免疫抑制法で臓器移植を行い、これにドナー骨髄移植を併用するものであるが、micro-chimerism は認められるものの、明らかな

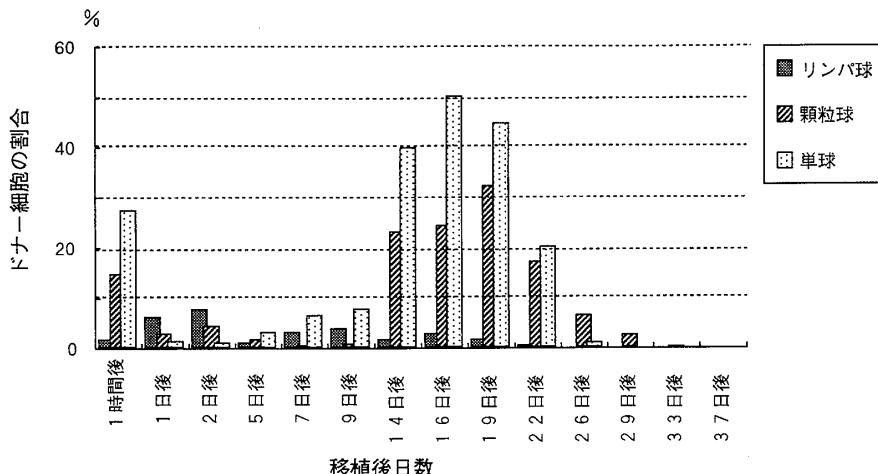


図5 末梢血中における chimeric cell の経時的变化

リンパ球と単球は7日目より、顆粒球は14日目より増加し始め、20日前後にピークとなった。その後は徐々に減少し、37日以降は検出不能になった。

免疫寛容を誘導するには至っていない。このため、臨床応用を考える場合、はっきりとした形の免疫寛容を誘導できる可能性が残されているのは、ある程度の前処置を施したうえでドナーの骨髄移植を行い、chimerismを誘導する方法と考えられる。これまでにもマウスにおいては、侵襲の少ない前処置で chimerism を誘導するための研究が続けられてきた。その結果、まず Cobbold ら<sup>15)</sup>が anti-CD4 と anti-CD8 モノクローナル抗体を併用することによって、全身照射線量を 600cGy まで減量しても、マウス皮膚移植において免疫寛容が誘導されることを報告した。その後 Sharabi ら<sup>3)</sup>は、これに 700cGy の胸腺照射を併用することにより、全身照射線量を 300cGy まで減量しても、マウス皮膚移植における免疫寛容が誘導されることを示した。

本研究においては、この Sharabi ら<sup>3)</sup>の regimen をサルの腎移植に応用し、chimerism および免疫寛容の誘導を試みるとともに、臨床応用にあたって最も危惧される全身照射による副作用をできるだけ軽減するために、300cGy 1 回照射を上限として、150cGy 1 回照射まで線量、照射法を変更して比較検討した。その結果、300cGy 1 回照射 (B-IV 群) では 3 例中 1 例で mixed chimerism、免疫寛容の誘導に成功したが、いずれも副作用が強く、1 例は術 14 日目に敗血症により死亡し、他

の 2 例も術後 7 日目から 20 日目前後にかけて強度の汎血球減少症に陥り、全例で輸血を必要とした。逆に全身照射を 125cGy 2 回照射 (B-II 群) まで減量すると、副作用はそれほど強くないが、4 例中 2 例しか chimerism が誘導されず、長期生着は 1 例にしかえられなかった。これに対して、150cGy 2 回照射した B-III 群では、ある程度の汎血球減少症はみられたものの、輸血を必要とするほどではなく、また chimerism は全例に誘導された。さらにこの群の 6 例中 5 例は長期生存し、リンパ球混合培養試験ではドナー特異的に低反応性が確認されている。これらの結果から、最も副作用が少なく、chimerism を誘導する可能性の高い線量は 150cGy 2 回照射であると考えられた。

Tomita ら<sup>15)</sup>、Vriesendorf ら<sup>16)</sup>は、拒絶反応が発現しないマウスの同系骨髄移植においても、200cGy 前後の全身照射を施さないと輸注された骨髄細胞は生着しないと報告している。そしてこの場合の全身照射は、免疫抑制効果ばかりでなく、ドナーの骨髄幹細胞を生着させるための物理的なスペースを作るためであると考えている。本研究では、レシピエントの末梢血リンパ球数の最低値が少なくとも  $200/\text{mm}^3$  以下まで減少しないと chimerism の誘導が難しいという結果が得られた。末梢血リンパ球数の減少度は、Tomita ら<sup>15)</sup>、Vriesendorf ら<sup>16)</sup>のいうドナー骨髄幹細胞生着を

可能にする物理的スペースが、骨髓に十分に形成されたか否かの良い指標になると考えられる。本研究においては全身照射を移植6日前、5日前に固定して行っているが、今後はさらに照射の時期を変えて至適条件を検討する必要があると思われた。

本研究により、大動物におけるより確実な mixed chimerism および免疫寛容誘導のための至適全身照射法が示され、臨床応用に向けて大きく前進したと思われる。しかし移植免疫寛容の成立機序に関してはいまだ不明な点が多く、今後はより確実、より安全なプロトコールの確立とともに、ドナー特異的な移植免疫寛容の成立機序解明への努力が、より一層必要であると思われた。

### 結 論

1. 移植6日前(分割照射の場合は移植6日前と5日前)の全身照射、移植前日の700cGyの胸腺照射、移植前3日間のATG投与からなる前処置の後、腎移植、脾摘、ドナー骨髄移植を同日に行い、さらに移植後28日間のCYA投与というregimenによりmixed chimerismと免疫寛容を誘導することが、靈長類においても可能であることが判明した。

2. 今回のプロトコールにおける至適全身照射法は、150cGy 2回照射であることが判明した。

3. 末梢血白血球数、リンパ球数の減少度は全身照射線量に比例していた。またリンパ球数の減少度はドナー骨髄細胞の生着を可能にする物理的スペースが、レシピエントの骨髓に十分に形成されたかの良い指標になるとと考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に直接御指導、御協力を戴いたHarvard Medical School, Massachusetts General Hospital A.B. Cosimi教授、D.H. Sachs教授に深く感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Ildstad ST, Sachs DH: Reconstruction with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 307: 168-170, 1984
- 2) Sykes M, Sachs DH: Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Immunol Today* 9: 23-27, 1988
- 3) Sharabi Y, Sachs DH: Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 169: 493-502, 1989
- 4) Smith CV, Suzuki T, Guzzetta PC et al: Bone marrow transplantation in miniature swine: IV. Development of myeloablative regimens that allow engraftment across major histocompatibility barriers. *Transplantation* 56: 541-549, 1993
- 5) Raaf J, Bryan C, Monden M et al: Bone marrow and renal transplantation in canine recipients prepared by total lymphoid irradiation. *Transplant Proc* 13: 429-430, 1981
- 6) Myburgh JA, Smith JA, Hill RRH et al: Transplantation tolerance in primates following total lymphoid irradiation and allogeneic bone marrow injection. *Transplantation* 49: 405-410, 1980
- 7) Gottlieb M, Strober S, Hoppe RT et al: Engraftment of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease in mongrel dogs using total lymphoid irradiation. *Transplantation* 29: 487-493, 1980
- 8) Cardis DT, Liegeois A, Barrett I et al: Enhanced survival of canine renal allografts of ALS-treated dogs given bone marrow. *Transplant Proc* 5: 671-672, 1973
- 9) Wood ML, Monaco AP: Models of specific unresponsiveness to tissue antilymphocyte serum treated mice. *Transplant Proc* 10: 379-380, 1978
- 10) Thomas JM, Carver FM, Cunningham PRG et al: Kidney allograft tolerance in primates without chronic immunosuppression—The role of veto cells. *Transplantation* 51: 198-204, 1991
- 11) Thoams JM, Carver FM, Kasten-Jolly J et al: Further studies of veto activity in rhesus monkey bone marrow in relation to allograft tolerance and chimerism. *Transplantation* 57: 101-110, 1994
- 12) Cosimi AB, Delmonico FL, Wright JK et al: Prolonged survival of nonhuman primate renal allograft recipients treated only with anti-CD4 monoclonal antibody. *Surgery* 108: 406-414, 1990.
- 13) Fontes P, Rao AS, Dementris AJ et al: Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet* 344: 151-155, 1994
- 14) Barber WH, Mankin JA, Laskow DA et al:

- Long-term results of a controlled prospective study with transfusion of donor specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 51 : 70-76, 1991
- 15) **Cobbold SP, Martin G, Quin S et al:** Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 323 : 164-166, 1986
- 16) **Tomita Y, Sachs DH, Sykes M:** Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate dose of syngeneic bone marrow. *Blood* 83 : 939-948, 1994
- 17) **Vriesendorf H:** Bone marrow transplantation. In *Hematology* Vol 3 (van Bekkum DW, Lowenberg B eds) p7, Marcel Dekker, New York (1985)