

原 著

同種サル腎移植における mixed chimerism による  
免疫寛容導入についての研究  
—chimerism 検出法ならびに免疫寛容導入と胸腺照射に関する研究—

東京女子医科大学 第三外科学教室 (主任: 太田和夫教授)

ホシノ トモアキ カワイ タツオ オオタ カズオ  
星野 智昭・河合 達郎・太田 和夫

(受付 平成8年8月20日)

**Studies of Tolerance Induction Through Mixed Chimerism in Cynomolgus  
Monkeys: Method for Detection of Chimeric Cells and Effect of  
Thymic Irradiation on Induction of Tolerance**

**Tomoaki HOSHINO, Tatsuo KAWAI and Kazuo OTA**  
Department of Surgery III, Tokyo Women's Medical College

Study 1; To establish the method for the detection of chimerism in cynomolgus monkeys, we tested cross reactivity of various anti-HLA monoclonal antibodies (mAb) to cynomolgus monkeys. In 29 mAb we tested, only three monoclonal anti-HLA antibodies crossreacted with lymphocytes of monkeys. With these mAb, chimeric cell can be detected up to 1% by flow cytometric analysis.

Study 2; Utilizing the method we developed in study 1, we applied the regimen that induces mixed chimerism and skin graft tolerance in mice to renal allotransplantation of cynomolgus monkey. Regimen A includes non-lethal dose of total body irradiation (TBI), administration of anti-thymocyte globulin (ATG) for 3 days, donor bone marrow infusion and 45 days course of cyclosporine (CYA) administration. We added 7 Gy of thymic irradiation on day-6 in regimen B and on day-1 in regimen C. Although all monkeys in regimen A and B consistently developed chimerism, they rejected kidney allografts soon after stopping CYA. In contrast, 4 monkeys out of 5 failed to develop chimerism in regimen C, but renal allograft tolerance was induced in one monkey who developed chimerism in regimen C.

In conclusion, the induction of chimerism is considered necessary but not sufficient for tolerance induction.

緒 言

近年, 臓器移植の成績はシクロスポリンなどの強力な免疫抑制剤の開発により急速な向上をみた。しかしながら免疫抑制剤の副作用によるさまざまな合併症が問題となっているうえ<sup>1)~3)</sup>, 移植臓器の晩期機能喪失の主因である慢性拒絶反応に関しては, いまだに適切な治療法や予防法の展望は見い出せていない。

臨床において免疫寛容の誘導が実現できれば, このような臓器移植における諸問題の大部分は根本的に解決されると考えられ, 種々の動物を用いた基礎的研究が精力的になされてきた<sup>4)5)</sup>, その結果, マウスのような小動物では major histocompatibility complex (以下 MHC) が不適合の場合でも免疫寛容を誘導できる regimen が多数報告されるようになった<sup>6)~9)</sup>。しかしながら, 今

までに小動物において成功したどの regimen を用いても、大動物では前処置による障害や毒性ならびに graft versus host disease などによる死亡例が多く、臨床応用できる可能性を示す成績は得られていない。一方、Starzl ら<sup>10)~12)</sup>は臨床の臓器移植において免疫寛容を誘導する目的で、骨髄移植の併用をすでに始めているが、大動物による実験の十分な裏づけがないため、満足のいく結果は得られていない。

サルは人類と同じ霊長類に属する動物であり、その免疫機構も類似したものと考えられ、臨床導入の前段階における実験動物としては理想的である。また、ヒトのために開発された数多くの抗体も近縁間の交叉性から利用できるものも多々存在すると推察される。しかし、ヒトに対する種々の抗体のサルに対する交叉性に関する研究は少なく、ドナー骨髄移植後の免疫学的研究を正確に行いうる実験モデルの確立にはこの分野の研究が必須と考えられた。

本研究では、研究1として chimerism をとおして免疫寛容を誘導するための大動物実験モデルを確立するために、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) を用いて、さまざまな種類の抗ヒトモノクローナル抗体のサルに対する交叉性を検討し、また研究2としてこの実験モデルを用いて腎移植における免疫寛容の誘導を試み、大動物における免疫寛容成立のための諸条件、とくに胸腺照射の必要性とその条件について検討した。

### 対象および方法

#### 1. chimerism 検出法に関する基礎的検討 (研究1)

##### 1) 実験動物

年齢2~4歳、体重2.5~4.0kgのカニクイザル (*Macaca fascicularis*, CSK リサーチパーク, 諏訪) 31頭を使用した。これらのサルを用いて下記の全ての実験を行ったが、採血のみの検査、腎移植のドナー、ならびにレシピエントなどについて同一個体が重複して使用される例がある。したがってそれぞれの実験につき頭数を記載したがその合計が31頭以上になっている。

##### 2) フローサイトメトリー

ヒトに対する種々のモノクローナル抗体 (以下 mAb) のサルに対する交叉性を検索するために、flow cytometry (以下 FCM) を用いて検討した。

(1) マウス抗 HLA class I モノクローナル抗体のサル白血球に対する交叉性

表1に示す29種類のマウス由来の抗 HLA class I モノクローナル抗体 (以下 anti-HLA mAb) を使用して、各抗体とも25頭のサルを用いて検討した。サルの末梢血2~3ml を塩化アンモニウム溶液により溶血した後、リン酸緩衝液 (以下 PBS) で洗浄した。得られた細胞浮遊液を FACS tube に分注し、10 $\mu$ l の anti-HLA mAb を加え、30分間冷暗所で静置した。その後 PBS で洗浄後、goat anti mouse antibody (PE conjugated) を10 $\mu$ l 加え、再び30分間冷暗所に静置した。これを2回 PBS で洗浄し、2%ホルマリン PBS 固定液を加え、FACScan (Becton Dickinson, CA, USA 以下 BD 社) を用いて解析した。25頭中1頭も交叉反応を示さない抗体を陰性とした。

(2) ヒトリンパ球表面抗原に対する mAb のサルリンパ球に対する交叉性

表2に示す10種類の BD 社ヒトリンパ球表面抗原に対する mAb を使用し、各抗体とも5頭のサルを用いて検討した。サルの末梢血2~3ml を塩化アンモニウム溶液により溶血した後、PBS で洗浄した。得られた細胞浮遊液を FACS tube に分注し、10 $\mu$ l のヒトリンパ球表面抗原に対する mAb を加え、30分間冷暗所で静置した。その後 PBS で洗浄し、2%ホルマリン PBS 固定液を加え、PACScan を用いて解析した。

(3) FCM による chimerism の検出感度

2頭のサルの末梢血より Ficol-Conray 比重遠心法を用いてリンパ球を分離し、1 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ml に調整した。MHC class I の抗原が異なる2頭のサルのリンパ球を100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 3:97, 2:98, 1:99, 0:100の割合で混合した後、相違する MHC class I 抗原に対する mAb 10 $\mu$ l を加え30分間冷暗所で静置した。その後 PBS で洗浄後、goat anti mouse antibody (PE conjugated) を10 $\mu$ l 加え、再び30分間冷暗所に静置した。これを

表1 マウス抗 HLA class I モノクローナル抗体のサル白血球に対する交叉性

Polymorphic epitopes	Ig subclass	Cross reactivity (n=25)	Class I HLA specificity	Source
Genox 2B2		—	A2, B17	SU #1
GSP 5.1	Ig M	—	A2, w69(28)	MGH #2
GSP 5.3	Ig G2a	+ (11/25)	B7, 27, 42, 54, 55, 56, 57, 58, 63(14,46)	MGH
GSP 5.4	Ig G2a	+ ( 9/25)	A2, 3, 28, 29, 30, 31, 68, 69	MGH
GSP 7.1	Ig G2a	—	B7, 27, 42, 54, 55, 56, 57, 58, 63(14,46)	MGH
GSP 16.1	Ig M	—	A1, 11, 23, 24, 25, 26, w36	MGH
GSP 17.2	Ig M	—	B8, 39, 41, 45, 61, short Bw6	MGH
GSP 20.1	Ig G2b	—	A2, w69(28)	MGH
GSP 20.2	Ig G2b	—	A2, w69(28)	MGH
GSP 20.3		—	A2, w69(28)	MGH
GSP 35.1	Ig M	—	A2, w69(28)	MGH
GSP 37.1	Ig M	—	(polymorphic)	MGH
GSP 38.1	Ig G2b	—	Bw6	MGH
GSP 41.1	Ig M	—	(polymorphic)	MGH
GSP 41.3		—	(polymorphic)	MGH
GSP 55.1	Ig G2b	—	A25, 32	MGH
GSP 56.1	Ig M	—	A32, B27	MGH
GSP 56.2	Ig M	—	A32, B27	MGH
GSP 65.2		—	(polymorphic)	MGH
GSP 77.1	Ig M	—	Bw6	MGH
GSP 84.1	Ig M	—	A25, 32	MGH
GSP 84.2	Ig G2b	—	B14, 18, 39, 59	MGH
GSP 85.1	Ig M	—	A23, 24, 25, 32, Bw4-short27, 38, 49, 52, 53, 57, 59, 63	MGH
HS-2	Ig G2a	+ ( 8/25)	BW6	OL #3
MA 2.1	Ig G2a	—	A2, B17	SU
MEI 1C11		—	B7, B27, BW55, BW56, BW42, BW14.1(BW60, BW46)	DU #4
MEI 1D3		—	B7, B27, BW55, BW56, BW42, BW14.1(BW60, BW46)	DU
MEI 2F4		—	B7, B27, BW55, BW56, BW42, BW14.1(BW60, BW46)	DU
SFR8.421.6	Ig G2b	—	Bw6	DU

#1: Stanford University, USA, #2: Massachusetts General Hospital, USA, #3: One Lambda, Inc., USA, #4: Duke University, USA.

表2 ヒトリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体のサルリンパ球に対する交叉性

Monoclonal antibodies	Cross reactivity
CD 2	+
CD 3	—
CD 4	+
CD 8	+
CD 11b	+
CD 19	—
CD 21	+
CD 23	—
CD 45RA	+
CD 45RO	—

2回PBSで洗浄し、2%ホルマリンPBS固定液を加え、FACScanを用いて解析した。

## 2. 免疫寛容誘導と胸腺照射に関する研究(研究2)

### 1) 実験動物

年齢2~4歳、体重2.5~4.0kgのカニクイザル(Macaca fascicularis, CSK リサーチパーク, 諏訪)20頭を用い、12回の移植実験を施行した。class Iについてはanti-human MHC class Iに対するmAbを用いてタイピングを行い、またclass IIについてはリンパ球混合培養(MLR)にて検討した。MLRは、サルの末梢血よりFicol-Conray比重遠心法を用いてリンパ球を分離し、 $1 \times 10^5$ 個/wellのresponder cellとmitomycin Cで処理したstimulator cellを1:1の割合で混合した。培養液としては10%サル血清を加えたRoswell Park

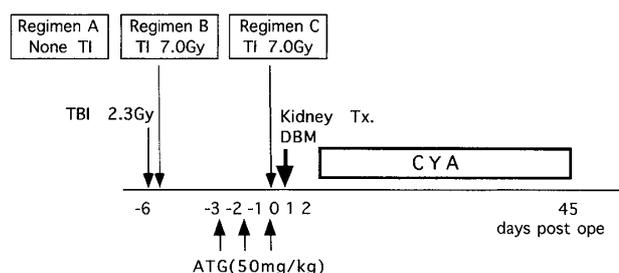


図1 免疫寛容誘導実験の regimen

TBI: total body irradiation, TI: thymic irradiation, ATG: antithymocyte globulin, CYA: cyclosporine.

Memorial Institute 1640 Medium (コスモ・バイオ社, 東京) を使用した。96U bottomed well にて 4 日間培養した。5 日目に  $1\mu\text{Ci}/\text{well}$  の thymidine (ICN, CA, USA) を加え, さらに 4 時間培養後に cell harvester (Packard, CT, USA) でリンパ球を回収し,  $\beta$  counter (Packard, CT, USA) により thymidine uptake を測定した。ドナー, レシピエントの組み合わせは, class I についてはいずれかの抗原がミスマッチとなるように, また class II については MLR にて stimulation index が 3.0 以上になるように選択した。

## 2) 免疫寛容誘導実験の regimen

regimen A ( $n=2$ ) は, 移植 6 日前の 2.3Gy の全身照射, 移植前 3 日間の anti-thymocyte globulin (以下 ATG) 投与, 腎移植と同日のドナー骨髄移植および移植後 45 日間のシクロスポリン (CYA) 投与から構成されるが, regimen B ( $n=5$ ) では, これに移植 6 日前の胸腺照射 (7Gy) を, regimen C ( $n=5$ ) では移植前日の胸腺照射 (7Gy) をそれぞれ加えた (図 1)。なお, 放射線照射は全身照射, 胸腺照射ともに線源としては  $^{60}\text{Co}$  を用いた。また, 薬剤については ATG (ATGAM, Upjohn, Kalamazoo, MI) は 50mg/kg を移植 3 日前, 2 日前, 1 日前に点滴静注し, CYA については移植後 2 日より移植後 45 日まで筋注し, through level で 250ng/ml 以上の血中濃度を維持した。

## 3) 腎移植

塩酸ケタミン 10mg/kg の筋注にて麻酔導入後, 1 回 5mg の追加投与にて麻酔を維持した。ドナーは腹部正中切開にて開腹し, 原則として左腎を尿

管とともに摘出した。レシピエントは腹部正中切開にて開腹し, 腎静脈は下大静脈, 腎動脈は腹部大動脈に端側吻合し, extra vesical に膀胱尿管吻合を行った。また, レシピエントの自己腎は同時に摘出した。

## 4) 骨髄移植

ドナーの腸骨から, 18G 骨髄穿刺針を用いて, 血液量として 40ml 前後, 有核細胞数として  $0.5 \times 10^8/\text{kg}$  以上を採取し, 腎移植直後に経静脈的にこれを輸注している。

## 5) chimerism の検出ならびに免疫寛容の確認

chimerism の有無は研究 1 にて示した方法を用いてフローサイトメトリーを行い検討した。術前のレシピエント凍結細胞によるコントロールおよびアイソタイプコントロールにおいて intensity の高い部位に細胞を認めず, かつ, ドナーコントロールと同じ intensity の高い部位にピークを示す細胞を認めた場合に chimerism が存在するとした。また免疫寛容の確認は, CYA 投与終了後に血中濃度が検出されなくなった移植後 60 日目以降においても良好な腎機能を維持し続けるものとし, MLR ならびに移植腎生検による検討を加えた。

なお, 以上の動物実験のすべては本学動物実験倫理委員会規程を遵守して行われた。

## 結 果

### 1. chimerism 検出法に関する基礎的検討 (研究 1)

1) マウス anti-HLA mAb のサル白血球に対する交叉性

サル MHC class I のタイピングのために, 29 種類の anti-HLA mAb を用いて, その交叉性を検討した結果, 表 1 に示すように GSP 5.3, GSP 5.4, HS-2 の 3 種類の抗体のみに交叉性が認められた。これらの 3 種類の抗体はそれぞれ 25 頭中, GSP 5.3 は 11 頭, GSP 5.4 は 9 頭, HS-2 は 8 頭において陽性であった。

2) ヒトリンパ球表面抗原に対する mAb のサルリンパ球に対する交叉性

10 種類の BD 社製 mAb の交叉反応性を検討したところ, CD2, CD4, CD8, CD11b, CD21, CD45

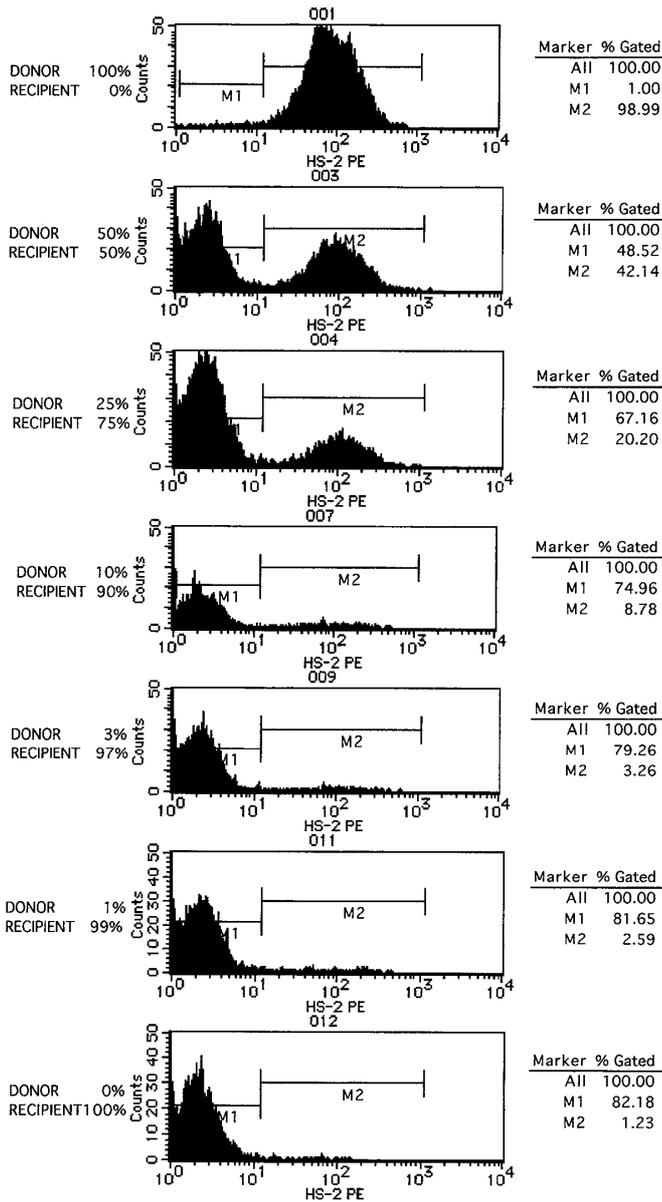


図2 フローサイトメトリーによる chimerism の検出感度

1st Ab に HS-2, 2nd Ab に goat anti-mouse antibody (PE conjugated) を使用した。

RA の 6 種類に 5 頭とも交叉反応を認めた。しかしながら、CD3, CD19, CD23, CD45RO の 4 種類には 5 頭とも交叉性を認めなかった (表 2)。

3) FCM による chimerism の検出感度

MHC class I のタイプが異なる 2 頭のサルの末梢血よりリンパ球を分離し, in vitro において各種の比率で混合したうえで anti-HLA mAb を反応させ, FCM を用いて解析したところ, 図 2 に示す成績が得られた。すなわちドナー細胞混合率が

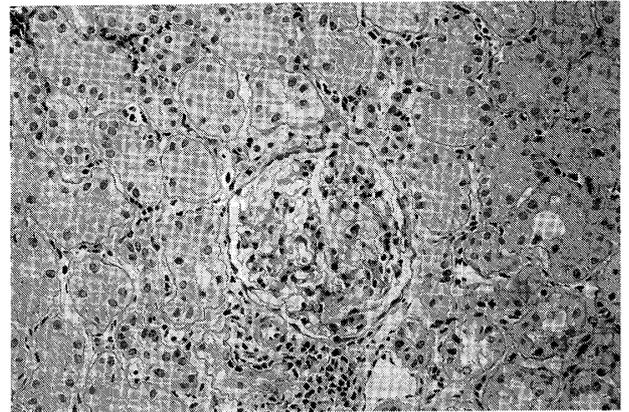


図3 移植腎生検の光顕像

術後232日目の移植腎光顕像 (ヘマトキシリン-エオジン染色, 200倍)

尿細管, 血管系, 糸球体に著変を認めない。

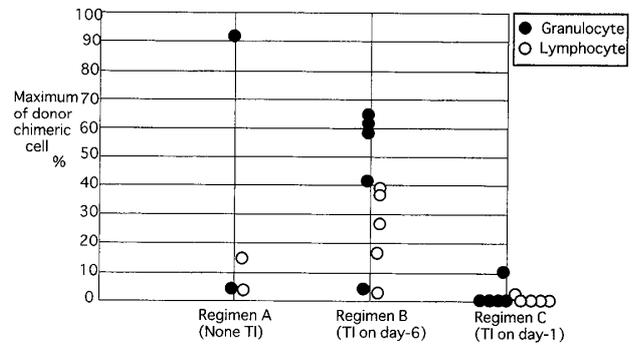


図4 出現した chimeric cell の比率の最大値

各 regimen における chimeric cell の比率の最大値を顆粒球, リンパ球に分別して示す。

5%のものでは4.19%, 3%では3.26%, 1%では2.59%の細胞が, 蛍光強度が10以上である M2 領域に検知された。ドナー細胞を全く混合しなかったコントロールにおいて, M2領域に検知される細胞は1.23%であった。

2. 本実験モデルのサル腎移植への応用 (研究 2)

胸腺照射を施行しなかった regimen A (n=2) では, chimerism の誘導は全例において可能であったが, 移植腎に免疫寛容を誘導することはできず, 移植腎は移植後それぞれ41日目および59日目に拒絶された。また, 胸腺照射を移植6日前に施行した regimen B (n=5) でも, chimerism は同様に全例において誘導されたが, 移植腎は移植後100日前後までに全てが拒絶された。しかし, 胸

表3 各 regimen における chimerism の誘導と移植成績

Regimen	Mokey	Treatment					Chimerism	Outcome	Graft survival # <sup>1</sup>
		Antibody	TBI # <sup>2</sup> (day-6) (Gy)	TI # <sup>3</sup> (Gy)	CYA # <sup>4</sup>	DBM # <sup>5</sup> (10 <sup>8</sup> /kg)			
A	1R(M715)	ATG # <sup>6</sup>	2.3	0	yes	4	yes	AR # <sup>7</sup>	41
	3R(M705)	ATG	2.3	0	yes	1.8	yes	AR	59
B	5R(F948)	ATG	2.3	7(day-6)	yes	3.6	yes	AR	41
	7R(M840)	ATG	2.3	7(day-6)	yes	1.4	yes	dead # <sup>8</sup>	48
	8R(F857)	ATG	2.3	7(day-6)	yes	1.06	yes	alive # <sup>9</sup>	no kidney Tx
	9R(F935)	ATG	2.3	7(day-6)	yes	2.1	yes	dead # <sup>10</sup>	55
	10R(M414)	ATG	2.3	7(day-6)	yes	2.5	yes	AR	101
C	12R(C113)	ATG	2.3	7(day-1)	yes	1.3	no	AR	64
	13R(F884)	ATG	2.3	7(day-1)	yes	1.9	no	AR	61
	14R(C127)	ATG	2.3	7(day-1)	yes	0.56	yes	good	>346
	19R(1-130)	ATG	2.3	7(day-1)	yes	1.6	no	AR	87
	21R(1/914)	ATG	2.3	7(day-1)	yes	1.04	no	AR	95

#<sup>1</sup>: days post transplant, #<sup>2</sup>: total body irradiation, #<sup>3</sup>: thymic irradiation, #<sup>4</sup>: cyclosporine, #<sup>5</sup>: donor bone marrow, #<sup>6</sup>: anti-thymocyte globulin, #<sup>7</sup>: acute rejection, #<sup>8</sup>: died due to lymphoma, #<sup>9</sup>: no kidney Tx. only donor BMT, #<sup>10</sup>: died due to unknown cause.

表4 14R の術後 MLR

Responder \ Stimulator	3rd party 1	3rd party 2	Donor	Self(auto)	Medium
Pre-Tx(cpm) (Stimulation index)	1,195 (6.8)	1,024 (5.9)	854 (4.9)	175	289
Day 75(cpm) (Stimulation index)	4,649 (3.9)	7,666 (6.7)	956 (0.6)	1,4112	313

Stimulation index: self(autologous) > medium; test(cpm) - medium(cpm) / autologous(cpm) - medium(cpm), self(autologous) < medium; test(cpm) / autologous(cpm).

腺照射を移植前日に施行した regimen C (n=5) では, regimen A, B と異なり chimerism が5頭中1頭においてのみ誘導された。そして, この1頭・14R (C127) においては, CYA 中止後も腎移植後340日を経過した現在も正常な機能 (serum creatinine 0.9mg/dl, BUN 27.0mg/dl) を維持している (表3)。術後232日目に行われた移植腎生検では, 尿細管, 血管系, 糸球体に著変を認めず (図3), また術後75日目に施行した MLR でもドナー特異的な低反応性が示されている (表4)。

各 regimen において出現した chimeric cell の比率の最大値を, 顆粒球, リンパ球に分別して図4に示す。regimen A では, 顆粒球領域の chimeric cell の最大値が, 1R においては91.6%, 2R に

おいては4.0%, リンパ球領域ではそれぞれ16, 3.9%であった。また, regimen B における5頭の顆粒球領域における chimeric cell の最大値は大きいものから63.5, 60.6, 59.0, 4.3%と5頭中4頭において50%以上の chimeric cell が出現した。この群におけるリンパ球領域の chimerism も大きく, それぞれ39, 38, 26, 18, 2.1%であった。しかし, 胸腺照射を移植前日に行った regimen C において chimerism が認められたのは, 14R (C127) の1頭のみでその最大値も顆粒球領域で11%, リンパ球で1.2%と小さいものであった。

#### 考 察

マウスを用いた基礎的研究により, ドナー骨髄移植により mixed chimerism を誘導する方法が免疫寛容の導入に有効であることが知られてき

た<sup>5)~9)</sup>。しかしながら、次の段階として、これを大動物の実験に適用する場合、MHCの不適合性をどのように確認するのか、chimerismの程度をどのように検査するのか、あるいはレシピエントの免疫状態をどのように解析していくのかなどの問題が存在する。従って、これらの事項が明確にできない限り、マウスで得られるように正確な研究結果の分析は行えないと考えられる。

本研究ではカニクイザルを用いて、まず研究1として、chimerismを正確に検査するための基礎的研究を行い実験モデルを確立した。さらに研究2として、この実験モデルを用いて、Sachsら<sup>9)</sup>がマウスの皮膚移植で免疫寛容の誘導に成功した低侵襲性のregimenをサル腎移植に適用し免疫寛容の誘導を試みた。そして、このregimenによって免疫寛容が誘導されるための諸条件のうち、とくに胸腺照射の必要性について検討した。

まず、移植後にchimeric cellの識別に利用できる抗体を探し出すために、表1にあげた29種類のanti-HLA mAbについて検討したところ、GSP 5.3, GSP 5.4, HS-2の3種類の抗体に交叉性が認められた。われわれが検討した個体では、交叉性を示す個体の母集団における比率はそれぞれ11/25, 9/25, 8/25であった。29種類のanti-HLA mAbのうち、わずかに3種類の抗体にしか交叉性が認められなかったが、MHCのpolymorphismと異種動物間であることを考えると、この交叉性の頻度は必ずしも低いとはいえない。免疫寛容の研究では、ドナーとレシピエントの組み合わせにおける組織適合度を明確に知る必要がある。MHC class Iに関してはこの3種類の抗体を利用して決定したが、1つの抗体の差異は少なくとも1つのMHC class I抗原が異なることを意味すると考えられる。

MHC class IIの不適合性については、DRに対するmAbのうち、サルに交叉性のあるものがないため、抗体によってタイピングすることは現段階では難しい。このため、MHC class IIの不適合性に関しては、MLRの結果により判定した。

ヒトリンパ球表面抗原に対するmAbのサルリンパ球に対する交叉性では、今回10種類のmAbに

ついて検討したところ、CD2, CD4, CD8, CD11b, CD21, CD45RAの6種類に交叉反応を認めた。これらを用いて、リンパ球サブセットの解析をすることにより、今後におけるchimerismの質や意義の検討ならびに免疫寛容の機序の解析に役立つと考える。

骨髄移植後におけるFCMによるドナー細胞(chimeric cell)の検出限界であるが、in vitroでドナーとレシピエントを想定して種々の割合でこの2者の細胞を混合し、実際にFCMでどの程度正確に検出できるかを検討した。この結果、1%ドナー細胞混合におけるFCMの陽性細胞は2.59%、ドナー細胞0%のコントロールにおけるバックグラウンドが1.23%であることから1%のドナー細胞の混入でも検出可能と考えられた。これについては、現在さらに低いレベルのchimeric cell (microchimerism)の存在を検出するためのプロトコールをpolymerase chain reaction (PCR)を用いて検討中である。

これらの基礎的検討をもとに、Sachsら<sup>9)</sup>がマウスにおいてMHC full mismatch間の皮膚移植で安定した免疫寛容を誘導することに成功したregimenをサル同種腎移植に応用し、大動物におけるchimerismおよび免疫寛容誘導のための諸条件を研究した。

このregimenの目的はいかに侵襲の低い前処置によりmixed chimerismと免疫寛容を誘導するかにあるが、その実際的な方法としては、まず2.0~3.0Gy程度の低線量の全身照射により骨髄にdonor bone marrowをengraftmentさせるための物理的スペースを作り、さらに抗T cell抗体により体内のT cellを除去したうえで骨髄移植を施し、mixed chimerismを誘導する。この際、抗T cell抗体の作用を逃れて胸腺内に存在するT cellを、胸腺照射により死滅させておかないと、安定したmixed chimerismと免疫寛容は誘導されない。

さらに、このモデルでは、胸腺におけるclonal deletionが免疫寛容誘導の主要な機序であることがその後の研究で判明している<sup>13)</sup>。

本研究では、このマウスのregimenをサルに応

## 結 論

用するにあたり、以前にサルを用いて行った予備実験の結果(未発表データ)から以下の2点でregimenの変更を行った。そのひとつは、マウスの実験で使用されている3.0Gyの全身照射は大動物においては依然として侵襲が大きいということである。このため、本研究では全身照射線量を2.3Gyとやや低くした。もうひとつは、現存するいかなる抗T cell抗体を用いても、大動物においてはレシピエントのT cellを完全に除去することが難しいことにある。このため、移植後に全く免疫抑制剤を使用しないと、chimerismの発現する前に残存T cellにより移植腎は拒絶されてしまう。そこで、サルのregimenではchimerismの発現を保証するため、移植後45日間のCYA投与を行った。

まず、chimerismが誘導される条件であるが、図4に示したようにregimen A, Bは、全例にchimerismが誘導されたのに対して、胸腺照射を前日に施行したregimen Cでは明らかにchimerismは誘導されにくくなっていた。しかしながら、高いレベルのchimerismが誘導されたregimen A, Bではともに移植腎はCYA中止後まもなく拒絶されており、chimerismの誘導がただちに免疫寛容の誘導に結びつくものではないという結果も得られた。一方、regimen Cでは、chimerismのレベルは低くなったものの、このregimenにより唯一chimerismが認められた14Rにおいてのみ移植腎の長期生着が認められた。14RはMLRでドナー特異的に低反応性を示し、移植後232日に行った移植腎生検でも拒絶反応を認めないことから、免疫寛容が誘導されたものと判断している。

以上の結果から骨髄移植と胸腺照射の時間的関係が何らかの影響をもっていると考えられた。今後は全身照射の線量や照射のタイミングを変えるなどにより、免疫寛容をより高率に誘導できるregimenを開発していく必要がある。そのためには、胸腺を移植前日に照射するとなぜchimerismは誘導されにくくなるのか、また免疫寛容を誘導するためにはなぜ胸腺照射を移植前日に施行しなければならないのかなども今後解明していかなければならない問題であると考えている。

1. 本研究により、カニクイザルにおいてもchimerismを正確に判定できる検査法が確立された。

2. サルを用いた腎移植実験より、chimerismは免疫寛容誘導のための必要条件ではあるが、十分条件でなく、免疫寛容を誘導するためにはさらに移植直前の胸腺照射を必要とするという結論が得られた。

本論文の要旨は、第31回日本移植学会総会(1995年、京都)において発表した。

## 文 献

- 1) **Cecka JM**: Outcome statistics of renal transplants with an emphasis on long-term survival. Clin Transplant 8: 324-327, 1994
- 2) **Klintmalm G, The U.S. Multi-center FK506 Liver Study Group**: A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after liver transplantation. N Engl J Med 331: 1110-1115, 1994
- 3) **Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ et al**: Cause of renal allograft loss: Progress in the 1980s, challenges for the 1990s. Ann Surg 214: 679-688, 1992
- 4) **Owen RD**: Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins. Science 102: 400-401, 1945
- 5) **Billingham RE, Brent L, Medawar PB**: Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature 172: 603-606, 1953
- 6) **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
- 7) **Cobbold SP, Martin G, Qin S et al**: Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. Nature 323: 164-166, 1986
- 8) **Sykes M, Sachs DH**: Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation tolerance. Immunol Today 9: 23-27, 1988
- 9) **Sharabi Y, Sachs DH**: Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. J Exp Med 169: 493-502, 1989
- 10) **Starzl TE, Demetris AJ, Murase N et al**: Cell migration, chimerism, and graft acceptance. Lancet 339: 1579-1582, 1992

- 11) **Fontes P, Rao AS, Demetris AJ et al**: Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet* **344** : 151-155, 1994
  - 12) **Schlitt HJ, Hunbrieser J, Ringe B et al**: Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. *N Engl J Med* **330** : 646-647, 1994
  - 13) **Tomita Y, Khan A, Sykes M**: Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. *J Immunol* **153** : 1087-1098, 1994
-