

118

腎移植におけるトナ一特異的免疫寛容の導入

課題番号 06404044

平成6年度～平成7年度文部省科学研究費補助金
一般研究 (A) 研究成果報告書

平成9年2月



研究代表者 太田和夫
(東京女子医科大学医学部教授)

腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入

課題番号 06404044

平成6年度～平成7年度文部省科学研究費補助金
一般研究（A）研究成果報告書

平成9年2月

研究代表者 太田和夫
(東京女子医科大学医学部教授)

まえがき

臓器移植は、1980年台におけるシクロスポリンの開発、臨床応用により成績が著明に改善され、臓器不全に対するひとつの治療的手段として広く認められるようになった。さらにその後も新しい免疫抑制薬の開発はとどまるところを知らず、今後もその成績が一層向上していくものと期待される。

しかしながら、長期成績となるとシクロスポリンが臨床で使用され始めた1983年以降の生体腎移植の成績に限ってみても、10年生着率は60%前後とまだ満足のいくものとはなっていない。これは主として慢性拒絶反応に由来する機能不全によるものと思われるが、患者自身が薬剤の長期連用を恐れて勝手に服用を中止してしまうノンコンプライアンスも問題となっている。はたしてこれまでのような免疫抑制療法により10年単位の長期成績を改善していけるかどうかは、現段階で全く予測が立っていない。

免疫寛容の誘導は、移植外科が究極的に目指すべきもので、現在、臓器移植が抱えるさまざまな問題を解決しうる可能性を秘めている。この領域の研究は最近急速に進んでおり、マウスのような小動物においては種々のregimenにより免疫寛容が比較的容易に誘導されている。そして、現在はいかに小動物で得られた知見を大動物ひいては臨床に応用していけるかという段階にあると思われる。

免疫寛容誘導のためにはさまざまなアプローチの方法があるが、本研究でわれわれは霊長類であるサル (*Cynomolgus monkey*) を用いて、mixed chimerismによる免疫寛容の誘導を試みた。その結果、臨床に使用できる範囲内の低線量の全身照射、胸腺に対する局所照射などからなる前処置を施したうえドナー骨髄移植を行うことにより、霊長類では始めて腎移植における免疫寛容の誘導に成功した。

まだ、われわれのregimenの細部については検討すべきことが多々残されているが、本研究により臨床での免疫寛容の実現にむけて大きな突破口が開かれたと考えている。

研究代表者 太田和夫

研究組織

研究代表者	太田和夫	(東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者	東間 紘	(東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者	大川智彦	(東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者	河合達郎	(東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者	早坂勇太郎	(東京女子医科大学医学部講師)
研究代表者	田邊一成	(東京女子医科大学医学部講師)
研究分担者	星野智昭	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	古賀祥嗣	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	君川正昭	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	阿部正浩	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	石田英樹	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	石川暢夫	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	村上 徹	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	沢田登起彦	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	春口洋昭	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	石井保夫	(東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者	藤岡 繁	(富士バイオメデイクス)
研究分担者	清水憲次	(富士バイオメデイクス)
研究分担者	岡 智通	(富士バイオメデイクス)
研究分担者	中川喜晶	(富士バイオメデイクス)
研究分担者	船橋紀男	(富士バイオメデイクス)
研究分担者	松村豪一	(富士バイオメデイクス)

研究経費

平成6年度	18,100,000 円
平成7年度	16,600,000 円
計	34,700,000 円

論文

- (1) Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB et al
Mixed Allogeneic Chimerism And Renal Allograft Tolerance in Cynomolgus Monkeys
Transplantation 59:256, 1995
- (2) Kawai T, Hoshino T, Okawa T, K Ota et. al.
Graft Versus Host Tolerance in Alogeneic Mixed Chimerism
Transplant Proc in press, 1997
- (3) Kawai T, Wong J, MacLean J., et al.
Characterization of a Monoclonal Antibody(6G12) Recognizing the Cynomolgus Monkey CD3
Antigen
Transplant Proc 26:1845, 1994
- (4) H. Ishida, T. Kawai, K Tanabe, Y. Hayasaka, M. Yasuo, H. Toma, K. Ota
Status of chimerism in recipients 15 years after living related kidney transplantation
Transplantation 62:126, 1996
- (5) Abe M, Kawai T, Ota K et. al.
The Postoperative Production of ANTI-DONOR ANTIBODY and Chronic Rejection in Renal
Transplantation.
Transplantation, 1998, in press
- (6) 君川正昭、河合達郎、太田和夫
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
に関する研究。
東京女子医科大学雑誌 12:1151-1159, 1996
- (7) 星野智昭、河合達郎、太田和夫
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
東京女子医科大学雑誌 12:1160-1168, 1996
- (8) 河合達郎、瀧之上昌平、寺岡 慧、田中紘一、太田和夫
Chimerismと免疫学的寛容—臨床応用にむけて
外科 57(10):1148, 1995
- (9) 河合達郎、太田和夫

腎移植における免疫寛容の誘導

Excerpta Medica-Renal Failure, Dialysis and Transplantation 54:2-4, 1995

(10)河合達郎、太田和夫

欧米先進国の移植動向—免疫抑制、免疫寛容そして異種移植

病態生理 14(7):505-512, 1995

(11)河合達郎、太田和夫

キメラ状態による免疫寛容の誘導

Molecular Medicine 32(11), 1204, 1995

(12) 河合達郎、星野智昭、太田和夫、田邊一成、大川智彦、藤岡 繁、清水憲次

A. B. Cosimi, D. H. Sachs

サル腎移植における低侵襲性前処置によるmixed chimerismと免疫寛容の導入

日本臨床免疫学会誌 18(6), 1995

(13)河合達郎、星野智昭、太田和夫

免疫トレランスの導入

Annual Review 腎臓 1996 205-209, 1996

(14) 河合達郎

移植医療の新技术—臓器と一緒に骨髄を移植し免疫寛容を人為的に誘導

日経サイエンス12:80, 1994

(15) 河合達郎

免疫寛容導入の試み

腎不全治療学 (監修; 太田和夫) 1997年(in press) 南江堂、東京

抄録

- (1)河合達郎、春口洋昭、星野智昭、寺岡 慧、太田和夫
サル腎移植におけるMixed chimerismと免疫寛容の誘導
移植 29:118,1994
- (2)河合達郎、星野智昭、瀧之上昌平、寺岡 慧、田邊一成、東間 紘、大川智彦、太田和夫
サル同種腎移植における免疫寛容とGVHD
移植 30:112,1995
- (3)石田英樹、河合達郎、田邊一成、早坂勇太郎、安尾美年子、東間 紘、太田和夫
腎移植における長期生着患者の免疫抑制と免疫寛容
移植 30:116,1995
- (4)星野智昭、河合達郎、瀧之上昌平、寺岡 慧、田邊一成、東間 紘、大川智彦、太田和夫、藤岡 繁、清水憲次
キメラ導入による免疫寛容における脾摘とGVHD
移植 30:178,1995
- (5)河合達郎、星野智昭、古賀祥嗣、阿部正浩、石田英樹、田邊一成、東間 紘、大川智彦、太田和夫
サル同種腎移植における免疫寛容成立のための諸条件
移植 31:143,1996
- (6)T.Kawai, A.B.Cosimi, J. Powelson, J.Eason, M.Sykes, R.Monroy, R.B.Colvin, D.H.Sachs
MULTILINEAGE MIXED CHIMERISM AND TRANSPLANTATION TOLERANCE IN CYNOMOLGUS MONKEYS
American Society of Transplantation Surgeons(ASTS)
Abstract p21, 1994
- (7) T.Kawai, A.B.Cosimi, J. Powelson, J.Eason, M.Sykes, R.Monroy, R.B.Colvin, D.H.Sachs
MULTILINEAGE MIXED CHIMERISM AND TRANSPLANTATION TOLERANCE IN CYNOMOLGUS MONKEYS
XV International Congress of the Transplantation Society, Abstract p323
- (8) T.Kawai, T.Hoshino, S.Fujioka, N.Shimizu,S. Koga, K.Tanabe, H.Toma, T.Okawa,

K.Ota

CD45RA STAINING OF CHIMERIC T CELLS AND GRAFT VERSUS TOLERANCE IN ALLOGENIC MIXED CHIMERISM

XVI International Congress of the Transplantation Society, Abstract p199

(9) H. Ishida, T.Kawai, K.Tanabe, Y.Hayasaka, M.Yasuo, H.Toma, K.Ota

THE STATUS OF MICROCHIMERISM 15 YEARS AFTER LIVING RELATED KIDNEY TRANSPLANTATION

XVI International Congress of the Transplantation Society, Abstract p457

口演

(1) T.Kawai, A.B.Cosimi, J. Powelson, J.Eason, M.Sykes, R.Monroy,
R.B.Colvin,D.H.Sachs

Multilineage Mixed Chimerism and Transplantation Tolerance in Cynomolgus Monkeys

20th American Society of Transplant Surgeons

(Plenary Session)

(2) T.Kawai, A.B.Cosimi, J. Powelson, J.Eason, M.Sykes, R.Monroy,
R.B.Colvin,D.H.Sachs

Multilineage Mixed Chimerism and Transplantation Tolerance in Cynomolgus Monkeys

15th World Congress of The Transplantation Society (Symposium)

(3) 河合達郎、春口洋昭、星野智昭、寺岡 慧、太田和夫

サル腎移植におけるMixed chimerismと免疫寛容の誘導

第30回日本移植学会 (会長推薦発表)

(4) 河合達郎

Multilineage chimerism and transplantation tolerance

INFA and WAITS 1995(invited speaker)

(5) 河合達郎、星野智昭、瀧之上昌平、寺岡 慧、田邊一成、東間 紘、大川智彦、
太田和夫

大動物におけるキメラによる寛容の誘導

日本臨床免疫学会 (シンポジウム)

(6) Mixed chimerismにおける免疫寛容とGVHD

第31回日本移植学会 (シンポジウム)

(7) CD45RA STAINING OF CHIMERIC T CELLS AND GRAFT VERSUS HOST
TOLERANCE IN

ALLOGENEIC MIXED CHIMERISM

16th World Congress of The Transplantation Society

平成6年度 文部省科学研究

一般研究(A)

腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入

研究計画書

I. Background

移植外科の究極の目標は免疫寛容であることに異論はないであろう。ただそれが本当に人類において可能なのか、また可能であるとしても現行の治療よりも安全にそして確実に導入できるものなのかということが問題となってくる。しかし現行の免疫抑制による移植では、終生免疫抑制剤は続けなければならないし、それに伴う感染症、代謝異常、悪性腫瘍の発生は大きな問題となっている。そしてさらに本質的な問題として現行の治療が慢性拒絶反応に対してほとんど無効であることがあげられる。このため5年以上の長期予後になるといまだ満足いくものとなっていない。

いうまでもなく移植治療の進歩はCyclosporine、FK506、OKT3などの有効な免疫抑制剤の開発に拠ってきた。それではこれからも新しい免疫抑制剤の開発によりさらなる進歩が期待できるであろうか。現代の兵器が昔の絨毯爆撃からミサイルによるピンポイント爆撃に変わってきたように、免疫抑制剤もCD4、CD8、adhesion moleculeなどに対する monoclonal antibody、さらにはcytokine receptorなどのように免疫機構のより細かい部分をターゲットにするものが開発されてきている。しかしこれらのものは生体の免疫機構において最も重要な部分をより確実に麻痺させてしまうため結局は免疫システム全体を狂わせてしまい、問題の根本的な解決にはなりえない。

こういった状況の中、免疫寛容を臨床で実現するための試みが始められている。

Alabama大学のBarbarらは、East Calolina Univ.のJ.Thomasのregimen(ALS+Donor Bone Maroow)を臨床の腎移植に用いて、コントロールよりも成績が優れていると報告したが、これらの患者において免疫抑制剤は完全に中止されておらず、その試みの有用性を認めさせるには至っていない。1991年、Pittsburg大学のThomas E.Starzlは、20年以上移植肝が生着している5人の患者においてdonorの細胞が全身の皮膚、リンパ節などに分布していることをPCRなどにより証明した(microchimerism)。そしてこのmicrochimerismが長期の生

着にとって必要であると主張し、すでに臨床においてもdonorのbone marrow cell transplantationの併用を腎移植、肝移植、心移植において開始し、これらの患者をmixed chimerismあるいはmicrochimerismの状態とすることに成功している。しかし、このようなchimerismの状態になりながらも免疫抑制剤は完全に中止できていないうえ、患者には同じように拒絶反応が認められており、この治療の意義については疑問が多い。また、Pichlemyerも肝移植後microchimerismの状態にあっても拒絶反応がみられた症例を報告しており、はたしてmicrochimerismは免疫寛容において必要なのか、あるいは単に免疫寛容となった結果として存在するのか、その意味については結論が出されていない。

免疫寛容については、1955年Medawarがマウスにおいて初めてその導入に成功して以来、幾多の研究がおもに小動物を用いてなされてきた。これらの研究により自己の抗原に対する免疫寛容が解明されてきており、その機序として、おもに胸腺において規定されるcentral toleranceと、末梢において獲得されるperipheral toleranceが考えられている。そしてさらにこれを移植した臓器あるいは細胞において応用しようとさまざまな手法が試みられてきた。まずcentral toleranceを利用したものに、1)Neonatal Tolerance、2)Mixed Chimerismによるtolerance、3)Thymic Injectionによるものがあげられる。

1)Neonatal Tolerance

まだ免疫系の十分に発達していない胎生期に、donorの抗原が提示されると出生後そのdonorに対してspecificに免疫寛容になるというものである。この事実は最初Owenによって、胎児循環を共有する、兄弟として出生したある系のウシがidenticalでないにもかかわらず、生後お互いに抗体を作らないということから発見された。さらにその後Medawarらは、マウスの胎児にドナーのspleen cellを注入して人為的に免疫寛容を誘導することにはじめて成功した。しかし、臨床に応用するとなると胎児診断をしてある臓器が機能不全になることを予測し、さらに胎児のうちにdonorのantigenを注入しなければならず現実的ではな

い。

2)Mixed Chimerismによるもの

RecipientのT cellをradiationあるいはantibodyによって除去した後、T cellを除去したdonorのbone marrowを移植する。Thymusにおける自己反応性クローンの除去にはbone marrow由来のdendritic cellが大きな役割を果たしているとされているが、もしdonor bone marrowのengraftmentに成功し、thymusにdonorのdendritic cellをmigrateさせることができたならdonorに反応するクローンも除去されることになる(図1)。この方法はマウスにおいては一般的ではあるが、大動物に応用しようとするとき非常に難しく、プロトコールの毒性とGVHDのために臨床に応用できるような方法は開発されていない。

3)Thymic Injectionによるもの

Thymusのなかに直接、抗原を注入してtoleranceを得ようとするもの。

また、peripheral toleranceの概念によるものとしては以下のようなものがある。

4)Monoclonal Antibodyによるもの

代表的なものとしては、ICAMとLFA-1、あるいはB7とCD28の組み合わせによるものがあげられる。正常な状態では、RecipientのT cellはそのT cell receptorを介して、Antigen presenting cellのMHC上に提示されたantigen(peptide)を認識しfirst signalがT cell内に送られる。それと同時に、B7とCD28などのcostimulatory moleculeの結合によりsecond signalがT cellに伝達されT cellは活性化される。もしここで、first signalだけが伝達されsecond signalが伝達されないと、T cellはこのantigenに対して specificに免疫寛容となる(図2)。

5) Veto cellによるもの (図3)

Rhesus Monkeyにおける免疫寛容を報告しているEast Carolina Univ.のJudith Thomasは、彼女らのモデルにおけるメカニズムをveto cellに求めている。以前よりA.P.Monacoらによって研究されてきたモデルもこれに近く、同じくveto cellによって説明されうるのかもしれない。彼らのプロトコールはいずれもALSとdonor bone marrowの組み合わせで、放射線照射

は行っておらず、macrochimerismもみられず、central toleranceを期待しているものではない。

このプロトコールにおけるMonkeyは最終的には拒絶されているうえ、長期生着を得るためには、MHCのmatchingになんらかの条件が必要とみられている。

このためか、いずれのプロトコールにおいても臨床での効果ははっきりしていない。

さて、それではいかなるプロトコールが、臨床応用可能となってくるのであろうか。

まず、理論的に言えることとして、peripheral toleranceだけによるプロトコールでは、たとえ一時的なanergyに成功したとしても、新しく作り出されてくるT cellの教育はできず、いずれはこれらにより移植された臓器は拒絶されてしまうと考えられる。しかし、central toleranceのstrategyだけで免疫寛容を得ようとする、完全なmyeloablationが必要となるためリスクが高すぎる。このため現実的には、non-myeloablativeなプロトコールを用いてcentral toleranceを獲得し、かつ残存したリンパ球に対しては、peripheral toleranceのstrategyによりanergyを誘導するというような、2つのtolerance strategyを組み合わせたプロトコールが唯一、臨床応用可能なものであると考えられる。

II. Previous Achievement at MGH

Massachusetts General Hospitalにおいて、MHC full mismatch間のサル腎移植で、非致死的プロトコールによりはじめてmixed macrochimerismと移植腎の免疫寛容の誘導に成功した。この免疫寛容のdonor specificityはMLRと皮膚移植によっても確認され、その寛容状態の安定性も証明されている。この非致死regimenは、300radのTotal Body Irradiation(TBI)、700radのlocal thymic irradiation、donor bone marrow transplantation、3日間のAnti-Thymocyte Globulin(ATG)、1ヶ月のCyclosporine投与から構成されるが、300radのTBIを150radX2に分割投与することによってさらに術後の安全性が向上しており十分に臨床応用可能と思われる。(最初のプロトコールにより3頭中1頭、modifyされたプロトコールにより5頭中5頭に免疫寛容が誘導された。)

この研究から引き出された結論は、

- 1)術後、multilineage chimerismをdevelopしたmonkeyは、cyclosporine中止後も移植腎を拒絶しない。
- 2)Multilineage chimerismのsubpopulationのうちとくに重要と思われるのは、granulocyteとmonocyteでlymphocyteのchimerismはessentialではない。
- 3)Bone Marrow Cellのengraftmentには150rad以上のirradiationが必要。これはimmunosuppressionのために照射するという意味ではなく、bone marrowにdonorのbone marrow cellが入り込んでゆける物理的なspaceを作るためのものと考えている。(bone marrowが自己のbone marrow cellで密集していると外来のstem cellが定着できない)
- 4)ATGだけではリンパ節内のT cellを含めて、完全なT cellの除去は不可能(マウスでは比較的容易)なため、cyclosporineにより一定期間免疫抑制をしないと残存したT cellによりdonor bone marrow cellおよび移植腎は拒絶されてしまう。
- 5)術後100日以内はdonorに対するMLRはpositiveでありこの時期に施行されたbiopsyではcellular infiltrationを認める(しかし腎機能的にはstable)。これが100日以後になるとMLR negativeとなり、biopsyでもnormalとなっていく。このregimenによりT cellは完全にdepleteで

きていないため、免疫寛容となるためには、残存したT cellが何らかの機序でanergizeされなければならない。この術後のdonorに対するreactivityはresidual T cellをanergizeするために必要なものとも考えられる（腎臓自体がperipheral toleranceの誘導に関与している?）。

また同じプロトコールでもドナーのbone marrowなしのコントロールはすべてcyclosporine濃度が治療レベル以下になると同時に移植腎を拒絶しておりdonor bone marrow cellがこの免疫寛容の誘導に必須であることが証明されている。

III. 研究目的

- 1)臨床応用に向けてさらに症例数を増やし、プロトコルの安全性と免疫寛容となる確率を研究する。また、すでにMGHにおいて確立されたプロトコルのうち、thymic irradiationとsplenectomyは、不要である可能性が高い。このため、これらを除いたプロトコールでも免疫寛容が導入できるかどうかを試みる。
- 2)このプロトコールにおける免疫寛容の機序を研究する。とくにchimerismの細胞解析を種々のdendritic cell markerを用いて詳細に検討する。また、移植腎自体が免疫寛容の成立に関わっているかをみるため、まず骨髄移植だけをさきに行いchimerismとしたのち、腎臓移植をするというプロトコール2も検討する。
- 3)Macrochimerismが消失したあとのmicrochimerismをPCRを用いて解析する。
- 4)至適照射線量の検討
- 5)hematologic growth factor(G-CSF)の有用性の検討。
- 6)死体移植のような緊急手術にも対応できるようなプロトコールの開発。具体的には、TBIを腎移植直前におこない、さらに移植後3日間ATGを投与した後、frozen donor bone marrowを注入する。

IV. 実験計画

各プロトコールを図4に示す。各々の結果により minor change をおこなう。

V. 実験動物および実験施設

Cynomolgus Monkey (カニクイサル) を用いる。サルはCSK Research Lab Inc.

より、各種virus free (とくにHerpesvirus simiae, Ebola virusなど) で2世代前まで家系の判明しているものを購入する。実験施設としては富士Biomedicsを使用する。各種in vitro studyについては、血液を速達便にて東京女子医大移植免疫研究室に送る。

VI. 実験方法

1) 術前全身コバルト照射(Total Body Irradiation; TBI)

東京女子医大放射線科において、土曜日の午後行う。

2) Anti-Thymocyte Globulin(ATG) UpJohn ATG(ATGAM)

Day-3,-2,-1に50mg/kgを生理的食塩水100mlに溶解して30-40分で点滴投与。

この後、さらに生食水 50mlを点滴 (ATGによる血管炎を予防するため)。

3) Donor Bone Marrow

Donorのiliac boneより18G針により穿刺吸引する。目標としては最低でもnucleated cell countが 0.5×10^8 /kgとなるようにする。吸引する血液量としては体重5-7kgのサルで50-60ml。

18G吸引針

20ml注射器 (数本)

ヘパリン

シャーレ 1-2コ (どんなサイズでも可)

50ml 試験管 数本 (disposable)----3000rpmの遠沈に耐えうるもの

輸血用点滴セット (フィルター付)

4) Cyclosporine

経口用Sandimmuneをday 1（手術翌日）の夕より10mg/kgで筋肉内注射。通常10mg/kgを4-5日間投与し、以後血中濃度を300ng/ml以上となる範囲内で減量し術後25日に中止する。

Cyclosporine濃度は週1回測定。

5) Kidney Transplantation

Recipient, Donorともに前日夕より禁食。朝 ケタミン 50mg(0.5ml),

●Donorの管理

Bone marrow aspiration, aspiration終了後

BMとdonorのCBCをチェック

点滴開始(BM aspiration終了後)

1)生食100ml(+antibiotics) 2)ラクテック200ml(25%マンニトール6ml)

3)ソリタT3 200ml 30ml/kg/hr

術後、CBCチェック後点滴抜去

Day3,Day7,以後週1回CBC,生化学チェック

●Recipientの管理

Day 0

1) 生食200ml(+antibiotics) 2)ラクテック500ml

3)生食200ml 30ml/kg/hr

5)Donor Bone Marrow

Day1,Day3に生食100ml輸液、その後は通常不要

Day1,Day3,Day6,Day10、その後は週2回（月、木）採血。

（生化学、CBC、CyA濃度（週1回））

適宜、免疫学的検査のための採血（電話で連絡）

◆腎臓摘出 (Donor)

生食水のアイス (Sterile) 1袋 (200ml)

冷却生食200ml (Heparin 1ml, Mannitol mg) X2本

10cm シャーレ X 2

27G注射針

10ml 注射器 X 2

●Donor Bone Marrow (ドナー骨髄) の処理

3000rpmの遠沈に耐えうる50mlの試験管に入れ、3000rpm、5分間遠心分離し血しょうを除く。血しょう成分は凍結保存。この際くれぐれも血球成分を捨てないこと。血しょうを除いた血球に滅菌生食を加えた後、遠心分離3000rpm、5分間施行。上清を捨てた後、再び滅菌生食水を加え総量40mlとする。これを、レシピエントの最後の輸液中に加えて、点滴する。(輸血用のフィルターを使用のこと)

★手術材料および手術器具

5-0 Silk

3-0 Silk

3-0 Nylon(針付) X10

7-0 Prolene X5

7-0

6号ネラトンカテーテル

血管縫合用持針器 (マイクロ用) X 2

血管カンシ

眼科用Scissors

エラスターカッター

あとは、通常の手術器具

VII. 免疫学的検査

●Monkey Pairing

ABO blood type compatible、MHC ClassI, ClassII mismatchの組み合わせを選ぶ。

MHC Class IIについては、ヒトのMHCに対するmonoclonal antibodyのうちcynomolgus monkeyに交叉反応のあるGSP5.3(B7,27,42,54,55,56,57,58,63), GSP5.4(A2,3,28,29,30,31,68,69) Bw6を使用して、Donorの細胞がRecipientから識別できるようにPairingをする。たとえば、DonorにGSP5.3+を選ぶ場合、RecipientにはGSP5.3-のmonkeyを組み合わせる。これによりMHC class Iでは最低1 mismatchということになる。MHC class IIについてはMLCでreactivityの高い組み合わせを選ぶ。さらに、Disparityを確実にするため、monkeyは2世代先まで系のはっきりしているものを使用する。MHC Class IIについてはMLR high reactivityを選択する。(免疫寛容となったサルについては、あとでPCRによりdisparityを確認する。)

●Macro-Chimerism

MHC class IIに対するmonoclonal antibody(GSP5.3,GSP5.4,Bw6)を用いて、FACSによりdonor cellを識別する。Dendritic Cellの各種markerを用いて2 color stainingをおこなう。

●Micro-Chimerism

Macrochimerismが消失してからは、DRに対するprimerを用いてPCRにより全身のmicrochimerismをチェックする。またimmunohistochemical stainingにより組織学的にもmicrochimerismを検索する。

●MLR

CyA中止後、血中濃度が完全に0となってから検査開始。

●CML

CyA中止後、血中濃度が完全に0となってから検査開始。

●Anti-Donor Antibody

FCMとmicrocytotoxicity assayにより検査。

●移植腎infiltration cellのCytokine Profile

移植腎において、通常100日ぐらいまで観察されるinfiltration cellのcytokine profileをSouthern Blotまたはin situ hybridizationにより検討する。

●皮膚移植

術後200日以上、免疫抑制剤なしで移植腎が正常に機能している個体にdonorおよび3rd Partyからの皮膚移植をおこなう。

Ⅳ病理標本

腎生検は適宜施行する。標本はホルマリン固定用および凍結用切片に分ける。

ホルマリン固定された切片はH&E染色する。

免疫染色

A panel of murine mAb to human leukocyte antigens that cross-react with Cynomolgus monkey epitopes was chosen. These included antibodies to CD3 (6G12, Ref 14), CD4 (OKT4, Ortho Pharmaceut. Raritan, NJ), CD8 (Leu2a, Becton Dickinson, San Jose, CA). A polyclonal antibody to mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used to detect the mouse antibody (coating) in the tissue. The avidin-biotin-peroxidase complex technique was used. In brief, cryostat sections 2 to 4 um thick were air dried and fixed in acetone for 10 min. The sections were incubated with normal horse serum (1:100) to inhibit nonspecific binding of horse IgG, and then 2 drops of avidin D (100 ug/ml) were added to block endogenous biotin. MAb was added and incubated for 60 min., washed three times in PBS, and then sections were treated with 0.3% hydrogen peroxidase and biotin (10 ug/ml) to block endogenous peroxidase and biotin binding sites, respectively. After a further three washes, the sections were incubated in biotinylated horse anti-mIgG for 30 min, washed, and incubated for 45 min in a solution of preformed avidin-biotinylated horseradish peroxidase complexes (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections were washed and developed with 3-amino-9-ethyl-carbazole (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI), counter stained with hematoxylin and mounted in Glycergel (DAKO, Accurate Chemical, Westbury, NY). Controls included nonspecific peroxidase activity (omission of the horse anti-mIgG).

Ⅹ Autopsy

サルが死亡した際には、なるべく早く解剖を施行して以下の検体を採取する。（すぐできない場合は、解剖まで冷蔵する。）

1)移植腎 2)リンパ節（そけい部またはえきか部）3)肝臓 4)心臓 5)胸腺 6)ひ臓
7)皮膚

ホルマリン固定および凍結保存（immunohistochemical staining用）。

将来の皮膚移植用に皮膚を凍結保存。保存法はプロトコールに従う。