

ラットの同種複合組織移植におけるFK506の至適維持量とGVHD発症に関する検討

陳, 偉高
九州大学医学部整形外科教室

<https://doi.org/10.15017/7239419>

出版情報：福岡醫學雜誌. 87 (9), pp.197-205, 1996-09-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



ラットの同種複合組織移植における FK 506 の至適維持量と GVHD 発症に関する検討

九州大学医学部整形外科教室 (指導: 杉岡洋一教授)

陳 偉 高

Limb Allograft in Rats: Studies on Optimal Maintenance Dose of FK506 and Development of Graft-versus-host-disease (GVHD).

Chen Weigao

Department of Orthopedic Surgery (Director: Prof. Y. Sugioka), Faculty of Medicine, Kyushu University 60, Fukuoka 812-82

Abstract The optimal dose of FK506 on rat limb allograft was investigated across the BN-to-F344 histocompatibility barrier. BN limb allografts were rejected in untreated F344 hosts within 11 ± 1 days (mean $\pm$ SD) after operation. A single injection of 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, or 2.0 mg/kg of FK506 on the day of transplantation significantly prolonged graft survival, mean survival times (MST) based on gross sign of skin rejection were 16 ± 1 days, 19 ± 1 days, 21 ± 1 days, respectively. Maintenance doses of 0, 0.25, 0.5, 1.0, or 2.0 mg/kg/week of FK506 after a single administration of 10 mg/kg of FK506 on the day of limb allograft prolonged the graft survival, 63 ± 10 , 68 ± 20 , 87 ± 23 , 98 ± 30 , 136 ± 20 days, respectively, and showed no evidence of infection or toxic side effects. The regimen of lower maintenance dose of FK506, however, developed chronic GVHD. In the second set of experiments, development of peripheral blood chimeras was studied in PVG-to-ACI limb allograft model. A single injection of 50 mg/kg of the day of transplantation prolonged graft survival and MST was 154 days. The average rates of peripheral blood chimeras were 2 to 6% and there was no relationship between graft survival and peripheral blood chimeras. However, GVHD developed in one of the six recipients at 201 days after operation. In the similar experiments, grafts were irradiated before operation. Peripheral blood chimeras was not observed in these experiments and GVHD was not developed in 300 days after operation. These data suggest that FK506 is quite effective for rat limb allograft survival in dose-dependent manner and GVHD could be prevented by graft irradiation before operation.

I 緒 言

先天性奇形や腫瘍の広範切除および外傷などにより失われた運動器の機能欠損に対する再建手術は整形外科における大きな課題の一つである。この問題の解決方法の一つとして同種複合組織移植があり、最近の移植免疫学の進歩と共に臨床応用を目指した研究が行われている。とくにラットの肢移植モデルを用いた研究は1970年代後半より行われ³⁾、その後サイクロスポリンA (Cyclosporin A (CsA)) の出現によりその長期生着が可能となり、多くの実験的研究が行われるようになった^{3), 8), 9), 10), 11), 14)}。

さらに1987年日本で発見されたより強力な免疫抑

制剤FK 506¹⁶⁾を用いることにより同様の実験系で一年以上の長期生着が得られるようになった²⁾。しかしながら投与量が多すぎると日和見感染が、また逆に少なすぎると移植片対宿主反応 (GVHD) が発生しており、その至適維持量についての検討が必要である。本研究の目的はラットの同種肢移植モデルにおけるFK 506の至適維持量について検討し、GVHDの発症に関与する末梢血白血球のキメラ化の有無を検討することである。

II 材料及び方法

実験1: ラットの同種肢移植モデルにおけるFK 506の至適維持量の検討

1. 動物

使用した動物はすべて純系のラットであり、recipient として Fisher 344 (以下 F 344), Donor として Brown Norway (BN) を用いた。これらのラットの主要組織適合抗原 (以下 MHC) は F 33 が RT 1-1, BN が RT 1-n であり、この組み合わせによる移植は同種異系移植である。使用したラットはすべて 6-9 の週齢の雌、体重は 120 g-180 g、総計 90 頭である。

2. 手術方法

手術方法は Hotokebuchi ら¹¹⁾の方法に準じて sodium pentobarbital (25 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下に BN の右下肢の大腿のほぼ中央で切断した後、これを予め右下肢を同様に切断しておいた F 344 へ同所性に移植した。この際、大腿骨骨接合術は 18 ゲージの輸血針を髓内釘として用いて行い、大腿動静脈吻合と坐骨神経縫合は顕微鏡下に行った。皮膚は足関節より中枢側を recipient の皮膚で覆い、donor の皮膚は足関節より末梢のみとした (図 1)。自損行為を防ぐため手術後 2 週間はプラスチックのネックカラーを装着した。血栓を防止する抗凝固剤および感染防止のための抗生物質投与は行わなかった。なお、F 344 ラットを用いた同系移植を 30 頭以上行い、90%以上の成功率が得られた後、本実験を行った。平均手術時間は 70 分、移植肢の平均阻血時間は 40 分であった。

3. F 506 の投与方法

FK 506 は生理食塩水に浮遊液とし、約 0.2 ml が目的の投与量となるように調整した後、左大腿部に筋注投与した。対照群には同量の生理食塩水を筋注した。

1) FK 506 少量単回投与による移植肢生着延長効果を確認するために移植当日に FK 506 を 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg 筋注し、対照群として同様に約 0.2 ml

の生理食塩水を投与した。各群 7-8 頭作製した。

2) FK 506 の至適維持投与量を知るために手術当日に初期投与量として FK 506 を 10 mg/kg 筋注し、以後維持量として週 1 回 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg の 4 群を作製した。対照群としては手術当日に 10 mg/kg 筋注し、以後同様に約 0.2 ml の生理食塩水を投与した。各群 10-12 頭作製した。

4. 生着期間の判定

移植肢は毎日観察し、拒絶の判定は移植肢の donor の皮膚が覆った足部皮膚の 2 分の 1 以上がびらんあるいは痂皮に覆われた時とした。生着期間は移植後拒絶と判定された日までの日数とした。ただし、明らかな血管吻合不全および、自損行為により判定できない場合や移植後 10 日以内に死亡したラットは除外した。

5. 移植後の臨床評価

観察期間は 150 日とした。移植後の臨床評価として 1) 皮膚知覚などの機能評価、2) 日和見感染、3) GVHD の発症を主な対象として、体重測定と呼吸状態、活動性、脱毛などの皮膚の状態を観察した。途中死亡のラットを含めてすべてのラットに対して実験終了後、皮膚、肺、肝臓、脾臓の組織をホルマリン固定し切片を作製後顕微鏡下に観察した。GVHD の判定は顔面、胸部、腹部の 25%以上の脱毛による臨床評価によって行い、実験終了後脾臓の重量と組織学的観察を行った。

6. 統計学的解析

生着期間は Mann-Whitney U 検定を、体重は T 検定を、GVHD の発症率は χ^2 乗検定を用いて判定し、それぞれ危険率 5%以下を有意とした。

実験 2 : ラットの同種肢移植モデルにおける末梢白血球のキメラ化の検討

1. 動物

同種肢移植における recipient として ACI (RT 1-a) を、Donor として抗 RT 1 モノクローナル抗体が入手可能であった PVG (RT 1-c) を用いた。使用したラットは全て 6-9 週齢の雌、体重は 120 g-180 g、総計 24 頭であった。なおこの組み合わせによる同種肢移植の免疫抑制剤を用いない場合の平均生着期間は 9 日であった。

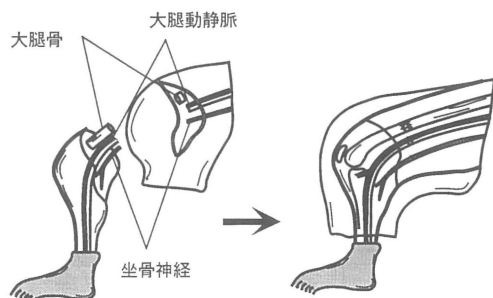


図 1 術式の略図

2. 実験群

手術方法は実験1と同様の同所性肢移植とした。第1群としてFK 506を移植時に50 mg/kg単回投与群と、第2群として同様のFK 506の投与に加えて移植直前にdonorに2000ラドの放射線照射を行った群をそれぞれ各群6頭作製した。実験1と同様の基準による生着期間とGVHDの発症に関する観察を行った。観察期間は300日とした。

3. 末梢白血球のキメラ化の検討

移植後30日おきに後眼窩静脈叢から末梢血をヘマトクリット管を用いて採血した。塩化アンモニウムを用いて赤血球を除いた後、FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) により蛍光標識された細胞の比率を計算した。免疫蛍光法に用いた抗体は、一次抗体としてマウス抗ラットRT 1-cモノクローナル抗体 (Serotec Inc., Oxford, England)、二次抗体としてFITC標識のヤギ抗マウスIgG抗体 (Caltag Laboratories Inc. San Francisco, CA) である。標識された細胞が0.5%以上の場合を有意とした。

4. 各群の平均生着期間の比較はMann-Whitney Uテストを用いて検討した。蛍光陽性細胞の比率はunpaired Tテストを用いて比較した。それぞれ5%以下の危険率をもっと有意とした。

III 結 果

実験1

1. FK 506の単回投与による移植肢の生着期間

血管縫合不全の1頭を除いた36頭について評価できた。移植肢後当日にFK 506を単回投与した結果を表1に示す。FK 506を投与しなかった対照群では生着期間は 11.0 ± 0.8 日であった。これに対してFK 506の0.25 mg/kg投与群では 12.7 ± 1.5 日と有意な延長効果は認められなかったが、0.5 mg/kg以上の投与により生着期間の有意な延長効果が認められた。それぞれの生着期間は0.5 mg/kg投与群 16.0 ± 1.0 日、1.0 mg/kg投与群 18.7 ± 1.0 日、2.0 mg/kg投与群 20.9 ± 1.1 日であった。これらの群では拒絶発症後2週間以内に移植肢は壊死脱落した。

2. FK 506維持投与による移植肢の生着期間

移植肢後当日にFK 506を10 mg/kg初回投与した後、週1回維持量投与した結果を表2および図2に示す。FK 506を維持投与しなかった対照群では生着期間は 3.3 ± 10.4 日であった。これに対してFK 506の0.25 mg/kg維持投与群では 68.0 ± 20.1 日と有意な延長効果は認められなかったが、0.5 mg/kg/week以上の投与により容量依存的に有意な延長効果が認められた。それぞれの維持量投与による生着期間は0.5 mg/kg/week投与群 87.2 ± 23.3 日、1.0 mg/kg/

表1 FK 506の単回投与による移植肢生着延長効果

FK 506の投与量 (mg/kg)	生着期間 (日)	平均±標準偏差
0	10, 10, 11, 11, 11, 11, 12, 12	11.0 ± 0.8
0.25	10, 12, 13, 13, 13, 13, 15	12.7 ± 1.5
0.5	14, 15, 15, 16, 16, 16, 17	16.0 ± 1.0
1.0	18, 18, 18, 18, 19, 20, 20	18.7 ± 1.0
2.0	19, 20, 20, 21, 21, 22, 22, 22	20.9 ± 1.1

表2 FK 506の長期維持投与による移植肢生着延長効果

FK 506の投与量 (mg/kg/week)	生着期間 (日)	平均±標準偏差
0	48, 51, 56, 61, 62, 62, 64, 73, 78, 78	63.3 ± 10.4
0.25	40, 49, 54, 56, 62, 68, 69, 87, 94, 101	68.0 ± 20.1
0.5	54, 60, 63, 69, 70, 80, 98, 104, 111, 111, 112, 114	87.2 ± 23.3
1.0	56, 70, 71, 80, 84, 104, 115, 122, 126, >150	97.8 ± 30.2
2.0	105, 105, 114, 125, 145, >150 (×6)	135.8 ± 19.5

FK 506の初期投与量は10 mg/kgである。

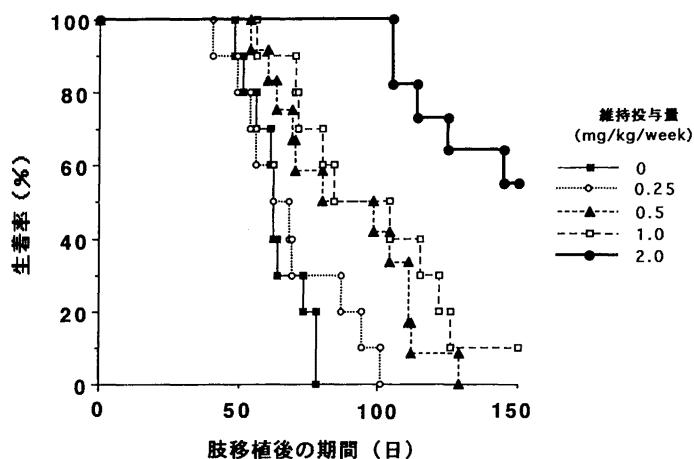


図2 FK 506 の長期維持投与による移植肢生着延長効果

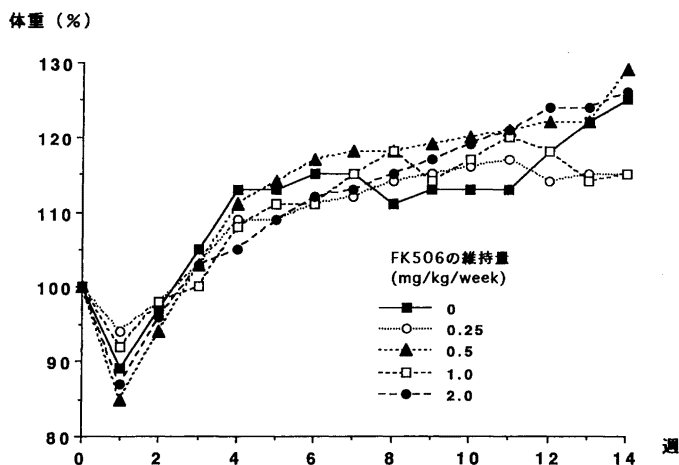


図3 移植後の体重の変動

week 投与群 97.8 ± 30.2 日, 2.0 mg/kg/week 投与群 135.8 ± 19.5 日であった。FK 506 の 10 mg/kg 初回投与したこれらの群では維持投与の有無にかかわらず, 拒絶反応出現後も移植肢は完全な壊死脱落には至らなかった。

3. 移植後の臨床評価

1) 移植後の皮膚知覚など

移植後 1 週間以内に膝関節の動きが良好となり, 歩行可能となった。移植した足関節は観察期間中自発的な動きは見られなかったが, 100 日以上生着した群では移植した足部に対する疼痛反応が認められた。

2) 日和見感染症の発生

明らかな日和見感染によると思われる死亡は確認されなかった。また, 観察期間中, 活動性の低下や呼吸器症状は観察されず, 屠殺後の肺組織の病理組織学的観察でも異常は観察されなかった。

3) 体重の変動について

体重の変化を図 3 に示す。体重は手術後 1 週目頃一過性に体重が減少したが, その後漸増し, 各群間に差を認めなかった。臨床的に GVHD と考えられたラットでも 150 日までの観察期間中には著明な体重減少を認めなかった。

4) GVHD の発症

FK 506 の単回投与群では拒絶後比較的早期に移植

表3 FK 506 の長期維持投与における GVHD の発症

FK 506 の維持投与量 (mg/kg)	発症率 (%)	生着期間 (日)	平均±標準偏差
0	4/10 (40)	49, 50, 70, 78	61.8±14.5
0.25	4/10 (40)	70, 80, 84, 90	81.0±8.4
0.5	3/12 (25)	86, 117, 119	107.3±18.5
1.0	2/10 (20)	98, 128	113.0±21.2
2.0	2/11 (18)	130, 161	145.5±21.9



図4 FK 506 10 mg/kg の初回単回投与群で、移植後 145 日目の写真である。移植肢の足部は火傷後の瘢痕様であるが、壊死脱落には至らず、腹部には脱毛を認める。

肢の壊死脱落にいたり、GVHD の発症は認められなかった。脱毛を指標とした FK 506 の維持投与群における GVHD の発症を表 3 に示す。GVHD の発症は維持投与無しの対照群が 4 / 10, FK 506 の維持投与群では 0.25 mg/kg/week 群で 4 / 10, 0.5 mg/kg/week 群で 3 / 12, 1.0 mg/kg/week 群で 2 / 10, 2.0 mg/kg/week 群で 2 / 11 であった。0.5 mg/kg/week 以下の群で 32 頭中 11 頭と多い傾向を示した。とくに対照群とした維持量なしの群のラットの脱毛が高度であった (図 4)。臨床的に GVHD と判断されたラットは全例脾臓の腫大を認め、脾臓の重量は GVHD を発症していないラットの 3 - 6 倍であった。

実験 2

第 1 群 : FK 506 50 mg/kg 単回投与群

結果を表 4 に示す。FK 506 50 mg/kg 手術時単回投与により移植肢の生着期間は 117 日から 213 日 (平均 154 日) であった。移植後 30 日おきに検討した末梢血白血球のキメラ率は移植後 30 日が平均 3.8% その後 4.1% (60 日目), 2.2% (90 日目), 1.8% (120 日目), 2.0% (150 日目), 1.2% (180 日目) であった。

生着期間とキメラ率には相関は認められず、移植肢拒絶後もキメラは認められた。300 日の経過観察期間において、6 頭中 1 頭に移植後 201 日目に GVHD の発症を認めた。

第 2 群 : FK 506 50 mg/kg 単回投与および radiation 群

結果を表 5 に示す。FK 506 50 mg/kg 手術時単回投与と donor に対する放射線照射による移植肢の生着期間は 99 日から 125 日 (平均 109 日) であった。移植後 30 日目の末梢血白血球のキメラ率は 6 頭中 1 頭に 0.9% 認められたが、移植後 60 日目以降はすべてのラットにおいて検出限界以下であった。300 日の経過観察期間中、GVHD の発症を認めなかった。

IV 考 察

これまで運動器を対象とする同種移植では骨移植のような必ずしも組織の超生を期待せず、むしろ凍結乾燥骨や冷凍骨などの移植、つまり alloimplant が主流であった。このような血管吻合を行わない、alloimplant としての関節移植は、1900 年代初頭から行われてきているが、多くの場合移植片の壊死による関節の

表 4 FK 506 の 50 mg/kg 単回投与における生着期間と末梢白血球のキメラ率

ラット No.	生着期間 (日)	キメラ率 (%)					
		30 日目	60 日目	90 日目	120 日目	150 日目	180 日目
1	124	5.1	5.0	2.5	2.2	2.2	1.2
2	117	4.5	3.9	2.1	0.7	0.7	0.8
3	213	3.2	5.8	2.1	1.4	1.5	1.2
4	160	2.5	3.5	2.5	2.2	3.5	1.1
5	157	2.7	3.7	1.8	1.2	1.3	0.8
6	154	4.7	2.6	2.1	2.9	2.5	2.3
平均	154	3.8	4.1	2.2	1.8	2.0	1.2

No. 3 のラットに移植後 201 日目に GVHD が認められた。

表 5 FK 506 の 50 mg/kg 単回投与と移植肢の radiation における生着期間と末梢白血球のキメラ率

ラット No.	生着期間 (日)	キメラ率 (%)		
		30 日目	60 日目	90 日目
1	99	ND	ND	ND
2	115	ND	ND	ND
3	110	0.9	ND	ND
4	108	ND	ND	ND
5	125	ND	ND	ND
6	97	ND	ND	ND
平均	109			

ND: 0.5%以下を検出限界とした。GVHD の発症は認められなかった。

変性破壊に終わっている¹⁶⁾。

整形外科や形成外科領域において同種複合組織移植に大きな関心が寄せられるようになった大きな理由としてマイクロサージャリーの出現と免疫抑制剤の進歩がある。この 30 年間にめざましい進歩と普及を遂げたマイクロサージャリーは切断指の再接着にとどまらず、器官として複合組織の自家移植が発展させてきた。整形外科や形成外科領域においては欠損した手指の再建に患者本人の足趾を移行する手術や、上肢の重要な関節の再建に同じく本人の足趾の関節を使うことが治療法として確立している。しかしながら、これらの自家移植では採取部位の機能欠損や疼痛などの問題が残る¹⁸⁾、加えて、自家移植では供給の面から限界があるため、同種移植への期待が大きくなってきた。一方、CsA や FK 506 のようなより強力で副作用の少ない新しい免疫抑制剤が登場し、少なくとも実験的には良好な成績が得られるようになってきた。

一方、同種複合組織移植として、先天異常、あるいは

は外傷や腫瘍の広範切除などによって生じた四肢、あるいは運動器系の欠損に対する再建は古くから様々な試みがなされてきた。血管吻合の技術が進歩した 1964 年にはヒトの前腕部での同種移植が試みられたが失敗に終わっている⁴⁾。その後、1960 年代後半からイヌを用いた実験的な研究が盛んに行われるようになったが、当時の免疫抑制剤はアザチオプリン、プレドニゾン、抗リンパ球血清などが主流であり、十分な成果は取られなかった⁷⁾。1970 年代後半頃よりマイクロサージャリーの発達とともに実験動物がイヌから遺伝的背景の明らかなラットの変わり、Doi は⁵⁾アザチオプリンなどの従来の免疫抑制剤を用いたラットの同種肢移植を行っている。しかしながら、重篤な副作用のため、良好な長期成績が得られていない。

1976 年の CsA の登場により、腎臓、心臓、肝臓の臓器移植が実験的にも臨床的にも大きく進歩した。1980 年代中頃より、CsA を用いたラットの同種肢移植の長期生着が得られるようになり、機能的にも良好な成績

が得られた^{1),3),8),9),10),11),14)}。しかしながら他の組織の生着は良好でも皮膚や骨髄の半永久的な生着には至らなかった。その後、より強力な免疫抑制剤とされるFK 506が登場し、その効果が示された^{13),15),20),21)}。Araiら²⁾はこの新しい免疫抑制剤FK 506を用いたラットの同種肢移植実験を行い1年以上にわたる生着に成功した。この実験ではFK 506が進行中の拒絶反応をも抑制することを明らかにした。すなわち、同種複合組織移植のモデルとして、BNからF 344への同種肢移植を行い、FK 506の手術時単回投与(10 mg/kg)と維持量を3.0 mg/kg/weekにより半永久的な生着が得られたが、pneumocystis cariniiによる肺炎が発症したと述べている。

これまでの研究から、同種複合組織移植(composite tissue allograft)が運動器の解剖学的かつ機能的欠損を同種移植に再建することであるという概念が確立された^{1),12)}。対象となるものとして、1)四肢遠位部、手指、足趾、2)全関節、3)血管柄付き骨(成長軟骨板を含む)、4)神経筋複合体、5)神経皮膚複合体、などとされた。心臓や肝臓などの他の生命維持臓器の移植と異なる点は移植の成否が直接生命に関わらないことである。したがって、同種複合組織移植においては他の生命維持臓器と以上にGVHDや日和見感染などが問題となる。

今回の実験の主たる目的はBNラットからF 344への同種肢移植において長期生着が得られ、かつGVHDや日和見感染を起こさないFK 506の維持量を決定することにあった。Araiら²⁾は10 mg/kg初回投与と、維持量として3.0 mg/kg/week投与について検討しているが、それ以下の低容量については行っていない。本実験では維持量として0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg/weekを設定し、長期投与による生着延長効果と合併症の有無を検討した。

最初に維持量として設定したFK 506の0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kgの単回投与の移植肢生着延長効果を検討した。BNラットからF 344ラットへの同種肢移植では免疫抑制剤を使用しない場合、皮膚の拒絶を指標とした生着期間は約11日であり、移植時のFK 506単回投与による生着延長効果は0.5 mg/kg以上で認められ、2.0 mg/kgでは20.9日と約2倍の延長効果があった。Araiらと同様に初回投与量を10 mg/kgとし、0.25から2.0 mg/kg/weekの維持量投与した群では、0.5 mg/kg/week以上の投与群で用量依存性に生着延長効果が得られた。2.0 mg/kg/week投与群では105日以上が生着が得られ、11頭中6頭は観察期間

の150日以上が生着期間を記録した。この間、感染症を示唆する呼吸困難や著明な体重減少などの臨床所見は認められなかった。

ラットの同種肢移植モデルにおけるGVHDの発生はサイクロスポリンやFK 506を用いた長期生着が得られた実験において報告された^{2),10)}。今回の実験では比較的短期の生着しか得られなかったFK 506の低用量単回投与ではGVHDの発症は観察されなかった。これは早期にdonorのリンパ球を初めとする免疫系の細胞が排除されたためと考えられる。これに対して約50日以上長期生着が得られた維持投与群では拒絶反応出現前後よりGVHDの発症が観察された。これらの群では皮膚の拒絶反応にもかかわらず皮膚以外の組織は拒絶されていないと考えられ、この結果はサイクロスポリンを用いた実験結果と合致する。皮膚の拒絶反応出現後も骨髄キメラが維持されGVHDを発症するものと考えられる。今回の実験では維持量の少ない群の方がGVHD発症率が高い傾向であった。Araiら²⁾はFK 506初回投与のみの群ではGVHDの発症を認めているが、3.0 mg/kg/weekの維持投与群ではGVHDの発症はなかったと報告している。

ラットの同種肢移植において骨髄のキメラ化が起きているかについては、これまで報告されていない。そこで今回RT 1抗体が入手できたPVGラット(RT 1-k)からACIラット(RT 1-a)への移植実験を行い、FK 506単独では拒絶前では末梢血中に2-6%のdonor由来のリンパ球が存在し、移植肢拒絶後も1-2%存在することが明らかとなった。またこの実験において移植肢の生着期間とキメラ率との間には相関関係は認められなかったことより、同種肢移植後の末梢血キメラ化が生着期間が規定しないことが示唆された。一方、移植肢に対して術直前にradiationを行うとキメラ化が起らず、GVHDが予防できることが示唆された。したがって、将来の骨髄を含めた同種複合組織移植の場合、GVHD予防のための一つ的手段として放射線照射が有効であると考えられる。

同種複合組織移植において最も早期に拒絶される組織は皮膚と骨髄と考えられる。同種複合組織移植には皮膚や骨髄など免疫原性の強い皮膚や骨髄などの組織から軟骨や靱帯など免疫原性の弱い組織が含まれており、組織によって拒絶される時期が異なることが示されている^{19),22)}。今回の実験からもFK 506維持投与群では皮膚拒絶後も関節組織や神経などは拒絶を免れており、皮膚や骨髄を除いた組織の移植であれば、より低用量の投与で可能であると考えられる。

ところで、同種複合組織移植の最大の長所の一つには知覚機能の再建が挙げられる。すなわち切断肢あるいは指は再接着後知覚機能の回復は多くの場合、受傷前に近いレベルまで回復する。将来的に皮膚を含めた同種複合組織移植が可能となれば、知覚を持った皮膚が再建されることになり、その恩恵をこうむる患者の数は多い。今回の実験においても移植後100日前後から移植した足部には痛覚が回復した。また同種複合組織移植の最終的な目的は手指あるいは四肢遠位部全体の同種移植であり、ラットの同種肢移植モデルにおいて移植後の骨成長が確認されており¹¹⁾、成長能を持った小児の手指の同種移植も期待されている。今回の実験では移植肢全体の完全な長期生着は得られなかったが、今後他剤との組み合わせや新しい免疫抑制法が開発されれば、donorの確保が他の生命維持臓器より容易である点から同種複合組織移植は普及するものと考えられる。

総 括

BNラットからF344ラットへの同種肢移植モデルにおけるFK506の至適維持投与量を検討した。移植当日にFK506を10 mg/kg 初回投与した後、FK506の維持投与を行わなかった対照群では生着期間は 63.3 ± 10.4 日であった。これに対してFK506の週1回0.5 mg/kg以上の維持投与により容量依存的に有意な生着期間の延長効果が認められた。それぞれの維持量投与による生着期間は0.5 mg/kg 投与群 87.2 ± 23.3 日、1.0 mg/kg 投与群 97.8 ± 30.2 日、2.0 mg/kg 投与群 135.8 ± 19.5 日であった。FK506を10 mg/kg 初回投与したこれらの群では維持投与の有無にかかわらず、拒絶反応出現後も移植肢は完全な壊死脱落には至らなかった。移植後1週以内に歩行可能となり、100日以上生着した群では移植した足部に対する疼痛反応が認められた。明らかな日和見感染は認められなかった。脱毛を指標としたGVHDの発症は0.5 mg/kg/week以下の群で32頭中11頭と多い傾向を示した。PVGラットからACIラットへの同種肢移植ではFK506 50 mg/kg 手術時単回投与による移植肢の生着期間は平均154日であり、移植後30日おきに検討した末梢血白血球のキメラ率は2~6%であり、移植肢拒絶後も確認されたが、生着期間キメラ率には相関は認められなかった。300日の経過観察期間において、6頭中1頭に移植後201日目にGVHDの発症を認めた。FK506 50 mg/kg 手術時単回投与とdonorに対する放射線照射により移植肢の生着期間は平均106日であ

った。末梢血白血球のキメラ化は移植後60日目以降はすべてのラットにおいて検出限界以下であり、300日の経過観察期間中、GVHDの発症を認めなかった。同種複合組織移植におけるGVHDの予防には移植片に対する放射線照射が有効であると考えられる。

謝 辞

本稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました杉岡洋一教授に深甚の謝意を表します。終始、直接のご指導賜りました佛淵孝夫講師、犀川勲博士、前田健博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Andrew WP, Pan Y-C, Kesmarky S, Randolph MA, Fiala TS, Amarante TJ, Weiland AJ and Yaremchuk MJ: Experimental orthotopic transplantation of vascularized skeletal allografts: Functional assesment and long-term survival. *Plast Reconstr Surg* 95: 336-349, 1995
- 2) Arai K, Hotokebuchi T, Miyahara H, Arita C, Mohtai M, Sugioka Y and Kaibara N: Limb allografts in rats immunosuppressed with FK506. I. Reversal of rejection and indefinite survival. *Transplantation*, 48: 782-786, 1989
- 3) Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Howard EB, Martin DC, Achauer BM and Furnas DW: Composite tissue (limb) allograft in rats: II. Indefinite survival using low-dose cyclosporin. *Transplantation*, 39: 365-368, 1985
- 4) Brown KLB and Cruess RL: Bone and cartilage transplantation in orthopedic surgery. A review. *J. Bone Joint Surg.*, 64-A: 270-279, 1982
- 5) Doi K: Homotransplantation of limbs in rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, 64: 613-621, 1979
- 6) Fritz WD, Swartz WM, Rose S, Futrell JW and Klein E: Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Ann. Surg.* 199: 211-215, 1984
- 7) Goldwin RM, Beach PM, Feldman D and Wilson RE: Canine limb transplantation. *Ann. Surg.* 37: 184-195, 1966
- 8) Hewitt CW, Black KS, Fraser LA, Osborne JG, Sayles TJ, Achauer BM, Martin DC and Furnas DW: Cyclosporin A (CyA) is superior to donor-specific blood transfusion for the extensive prolongation of rat limb allograft survival. *Transplant. Proc.*, 15: 514-517, 1983
- 9) Hewitt CW, Black KS, Fraser LA, Howard EB, Martin DC, Achauer BM and Furnas DW: Composite tissue (limb) allograft in rats: I. Dose-dependent increase in survival with cyclosporine. *Transplantation*, 39: 360-364, 1985

- 10) Hotokebuchi T, Arai K, Takagishi K, Arai C, Sugioka Y and Kaibara N: Limb allografts rats immunosuppressed with Cyclosporin: As a whole-joint allograft. *Plast. Reconstr. Sur.*, 83: 1027-1036, 1989
- 11) Hotokebuchi T, Arai K, Arita C, Miyahara H, Sugioka Y and Kanbara N: Limb allografts in skelletally immature rats with cyclosporin: Behavior of the growth plate. *Transpl. Proc.*, 21: 3183-3185, 1989
- 12) 佛淵孝夫: 同種複合組織移植の基礎的研究. 日本整形外科学会雑誌 63: 889-898, 1989
- 13) Inamura N, Nakahara K, Kino T, Goto T, Aoki H, Yamaguchi I, Kohsaka M and Ochiai T: Prolongation of skin allograft survival in rats by a novel immunosuppressive agent, FK506. *Transplantation* 45: 206-?, 1988
- 14) Kim SK, Aziz S, Oyer P and Hentz VR: Use of cyclosporin A in allotransplantation of rat limbs. *Ann. Plast. surg.*, 12: 249-255, 1984
- 15) Kino T, Inamura N, Sakai F, Nakahara K, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H and Ochiai T: Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant. Proc.* 19: 36-?, 1987
- 16) Lexer E: Substitution of whole joint or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operation. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 6: 601-607, 1908
- 17) Lipson RA, Kawano H, Halloran PF, Pritzker KPH, Kandel R and Langer F: Vascularized limb transplantation in the rat: II. Results with allogeneic grafts. *Transplantation* 35: 300-304, 1983
- 18) Mahoney J: Complications of free flap sites. *Microsurgery* 16: 437-444, 1995
- 19) Mohtai M, Sugioka Y, Hotokebuchi T, Arai K, Hirana A, Wasano K and Kaibara N: Immunoelectron microscopic analysis of Ia antigen expression in rat skin allograft rejection. *Am. J. Pathol.*, 136: 285-295, 1990
- 20) Ochiai T, Nagata M, Nakajima K, Suzuki T, Sakamoto K, Enomoto K, Gunji Y, Uematu T, Goto T, Hori S, Kenmochi T, Nakagouri T, Asano T, Isono K, Hamaguchi K, Tsuchida H, Nakahara K, Inamura N and Goto T: Studies of the effects of FK506 on renal allografting in the beagle dog. *Transplantation* 44: 729-733, 1987
- 21) Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Hori S, Asano T and Isono K: Studies on the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation* 44: 734-738, 1987
- 22) White E and Hildemann WH: Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney and skin. *Science* 162: 1293, 1968
(受付 1996-7-19)