

ラット同種移植における抗 CD 2 モノクローナル抗体投与と 移植皮膚片の超低温保存法の併用効果についての検討

新潟大学大学院医歯学総合研究科可塑性機能制御講座

形成・再建外科学分野

陳 煒・柴田 実・張 晶・冉 維志

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座

整形外科学分野

小坂 健之・久保田茂夫

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座

免疫学・医学動物学分野

渡部 久実

Cryopreserved Allo-skin Grafting with Immunological Suppression Using Anti-CD 2 MoAb in Rat

Chen WEI, Minoru SHIBATA, Zhang JING, Weizhi RAN

Division of Plastic and Reconstructive Surgery,

Department of Functional Neuroscience,

Niigata University, Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Minoru SHIBATA)

Takeyuki KOSAKA, Shigeo KUBOTA

Division of Orthopaedic Surgery

Department of Regenerative and Transplant Medicine

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

and Hisami WATANABE

Division of Immunology and Medical Zoology

Department of Infectious Disease Control and International Medicine

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Reprint requests to: Minoru SHIBATA
Division of Plastic and Reconstructive
Surgery Department of Functional
Neuroscience Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科可塑性機能制御講座
形成・再建外科学分野 柴田 実

Abstract

Allo-tissue or-organ such as skin or joint transfer requires to induct an efficient immunological suppression with less side effects than those of the present vital organ transfer. We conducted allo-skin grafting using rats with major histocompatibility mismatching.

A full thickness abdominal skin of the Lewis rat, 1.5 × 2.0 cm in size, was harvested and grafted on to the back of Brown Norway rat. We inducted immunological tolerance using daily injection of 2 mg/kg anti-CD 2 monoclonal antibodies to the recipient BN rat starting from one day before surgery until 7 days postoperation except the day of the surgery. We also treated the immunogenicity of the grafting donor skin with cryopreservation. The donor skin grafts were soaked in 1.4 mol glycerol solution for tissue protection and frozen in step wise using programming freezer and then preserved in liquid nitrogen tank for 21 days before grafting.

The results were evaluated by the close observation of the grafted skin condition, and the immunological conditions were assessed by flow cytometry and mixed lymphocyte reaction (MLR) test.

The grafted cryopreserved skin was rejected 17 days postoperatively in average in anti-CD 2 MoAb administrated rats and 14 days in rats without anti-CD 2 MoAb administration. There was no hair regrowth in the skin grafted area which underwent rejection and re-epithelialization suggesting the presence of the dermis of the grafted skin in half of the rats treated with cryopreservation, and only one in rats without cryopreservation 4 months postoperatively. Flow cytometry and MLR test suggested that immunological tolerance was partly established.

These results suggests that combined treatment of the recipient using anti-CD 2 MoAb and that of donor by cryopreservation may establish an effective immunological tolerance in allo-skin grafting.

Key words : allograft, skin graft, anti-CD 2 MoAb, cryopreservation, immunological tolerance

はじめに

心臓・腎臓・肺臓・肝臓などの生命維持に必要な重要臓器移植と異なり、皮膚・神経・関節などの組織・器官移植を始めとするそれ以外の同種組織移植については、現在用いられている免疫抑制剤の投与を中心にした方法に比べ、より副作用の少ない優れた免疫抑制法を確立する必要がある。

モノクローナル抗体投与による選択的免疫抑制は副作用の少ない方法として注目されており、ラット、マウスなどにおいては心臓、腎臓、神経の同種移植の成功例が報告され、一部、心臓移植、腎臓移植において臨床応用が試みられている。また、ド

ナー組織を有効に用いるためにはその長期保存法の確立が必要であるが、近年、進歩が著しい胚凍結保存の手法を応用したプログラミングフリージング法によって移植用組織を凍結し、液体窒素下に超低温保存することにより、長期保存法を確立できる可能性がある。この超低温保存法には、組織の抗原性を低下させる効果があることが認められている。

今回、ラットの MHC (主要組織適合抗原) mismatch model を用いて、抗 CD 2 モノクローナル抗体投与によりレシピエントに選択的免疫寛容を導入するとともに、超低温凍結保存した異系ドナーの皮膚を移植し、その成績を検討した。

材料と方法

実験動物：

6週齢体重 200 g の Brown Norway ラット (以下 BN, N=19) をレシピエントとし, 6週齢体重 250 g の Lewis ラットをドナー (以下 LEW, N=10) として用いた. レシピエントの BN ラット 19匹を抗体投与群 (N=10) と抗体非投与群 (N=9) の2群に分けて皮膚移植を行った.

投与抗体：

抗 CD2 抗体の産生ハイブリドーマ細胞 (OX34, マウス IgG 2a) を BALB/c マウスの腹腔内に注射し, 腹水を回収後, 常法の硫化アンモニウム沈殿法により抗 CD2 モノクローナル抗体を精製した. 作成した抗体を, BN ラットに 2 mg/kg 及び 4 mg/kg で腹腔内投与し, CD2 陽性細胞の除去効果をフローサイトメトリーにて確認することにより投与抗体量を決定した. 本実験では, 1回に 2 mg/kg の抗 CD2 モノクローナル抗体を腹腔内投与した.

皮膚の凍結及び解凍方法：

LEW ラットにネブタールを腹腔内投与して麻酔を導入・維持し, ラットを仰臥位固定した. 消毒後, 腹部から 1.5 cm × 2.0 cm の皮膚片を2枚採取した. 採取した皮膚は 4℃ の生食で洗浄, 減圧下に 1.4 M のグリセリン液に20分間浸漬した. その後, 4℃ で2時間保存し, 皮膚片をビニールシートで密封保護した後, プログラミングフリーザー (Planer Kryo 10 Series III) を用いて段階的に冷却, 凍結した (図1). 処置した皮膚片は -176℃ の液体窒素で21日間保存した. 移植直前に, 移植片の保存されているビニールシートを水道水に浸し急速解凍後, 4℃ の生理的食塩水で皮膚片のグリセリンを洗浄除去し, 移植に用いた.

皮膚移植の方法：

BN ラットの左右背部に LEW ラットの皮膚 (1.5 cm × 2.0 cm) を1枚ずつ移植した. このうち右背部には, LEW ラットの腹部から採取した皮膚片を生理的食塩水で洗浄後, 直ちに移植した. 左背部には凍結保存しておいた皮膚を移植した. 移植後の皮膚は tie-over 法で圧迫固定を行い, 1

週間後に抜糸, 固定を除去した.

抗体の投与方法：

投与群には移植前1日から手術当日を除いて移植7日後まで, 2 mg/kg の抗体を8日間連続で腹腔内に投与した.

評価方法：

1. 皮膚移植の状態：移植皮膚片が拒絶されるまでの期間と脱落後の創面が癒痕化して完全に上皮化するまでの期間, 及び移植皮膚片の発毛の状態を観察した.
2. フローサイトメトリーによるリンパ球の解析：抗 CD2 モノクローナル抗体投与による T 細胞の変動を測定した. 移植後1週, 2週, 25週目に各群レシピエント BN ラットの末梢血を採取し, 各種標識抗体 (抗 CD3, 抗 CD4, 抗 CD8 ; PharMingen 社) で染色した後, フローサイトメトリーで解析した.
3. リンパ球混合試験：抗 CD2 モノクローナル抗体投与後におけるレシピエントの T 細胞機能を, リンパ球混合培養試験 (Mixed Lymphocyte Reaction Test: MLR) により検討した. Responder としては, 正常 BN ラット及び移植25週後の実験各群の BN ラットの脾臓細胞を用いた. stimulator としては, 33 Gy を照射したドナーの LEW, BW 及び third party としての SD ラットの脾臓細胞を用いた. 10^5 個の responder と stimulator 細胞を micro culture plate で4日間混合培養し, [3 H] - thymidine の取り込みを測定することにより, responder 細胞の増殖反応を調べた.

結 果

1. 移植皮膚の結果：術後7日目では, 全例とも移植皮膚の拒絶は認められなかった (図2). 術後14日目では, 抗体投与ラットの凍結皮膚移植片で70% (7/10), 非凍結片70% (7/10), 抗体非投与ラットの凍結片66.7% (6/9), 非凍結片33.3% (3/9) で拒絶が見られた. 術後21日目では, 抗体投与の凍結片の20% (2/10) で移植皮膚は拒絶されなかった (図3). しかし, 術後28日目で

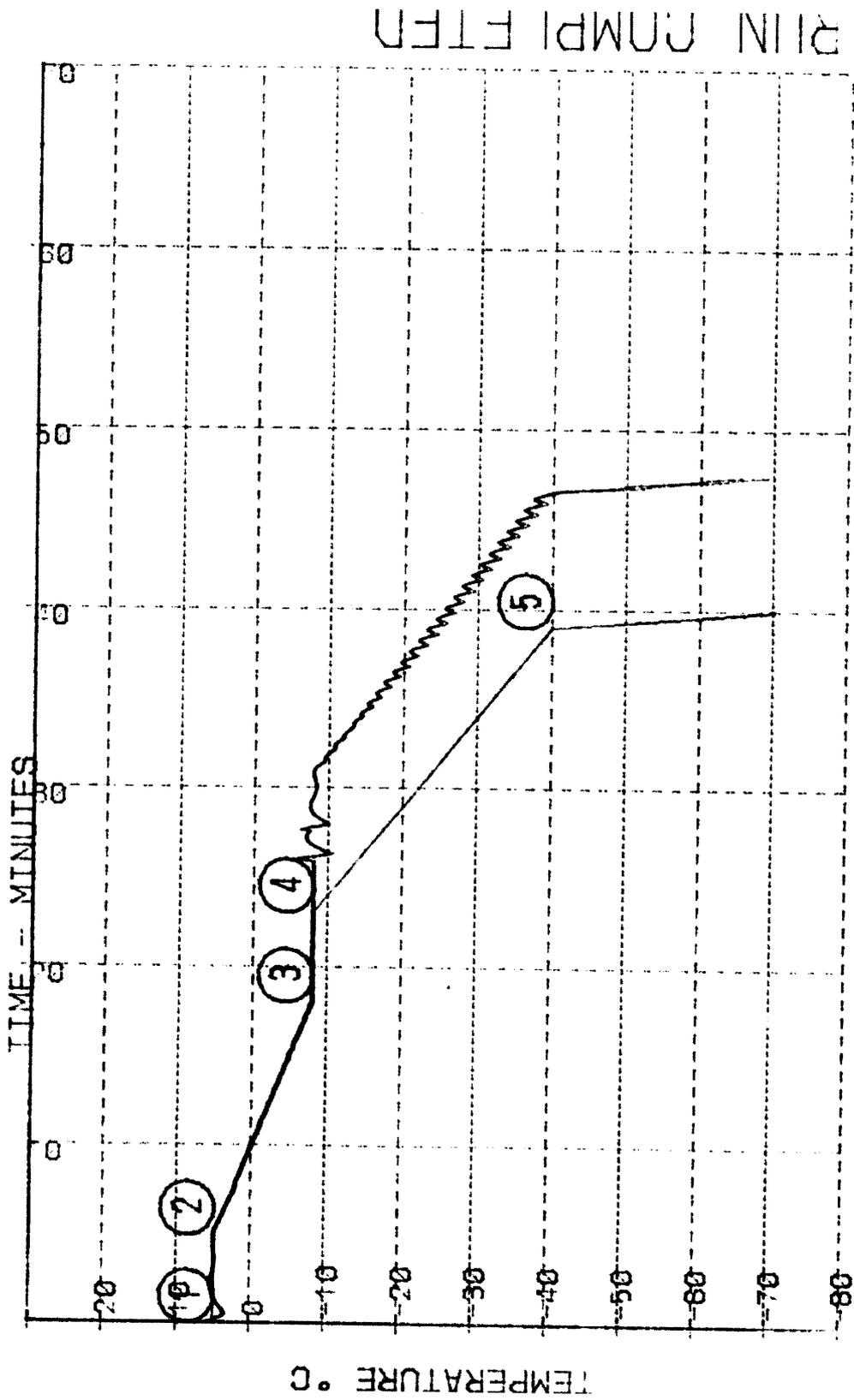


図1 移植片凍結時の温度変化

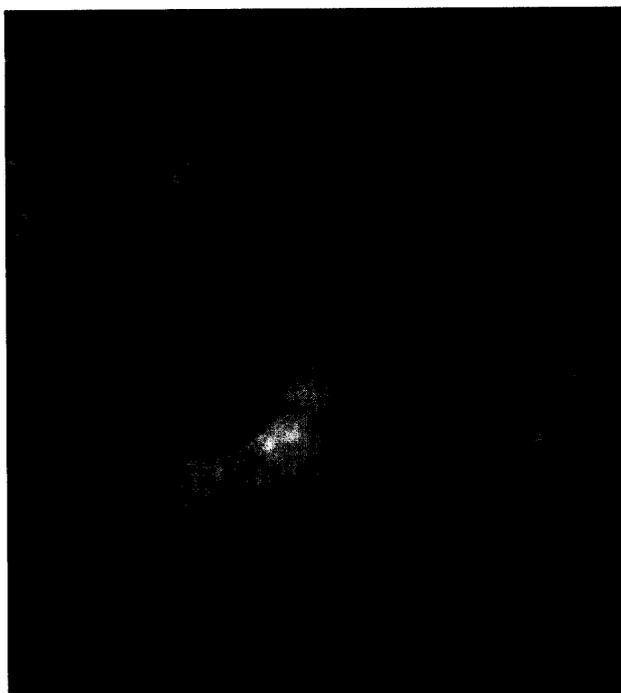


抗体(一) 7日

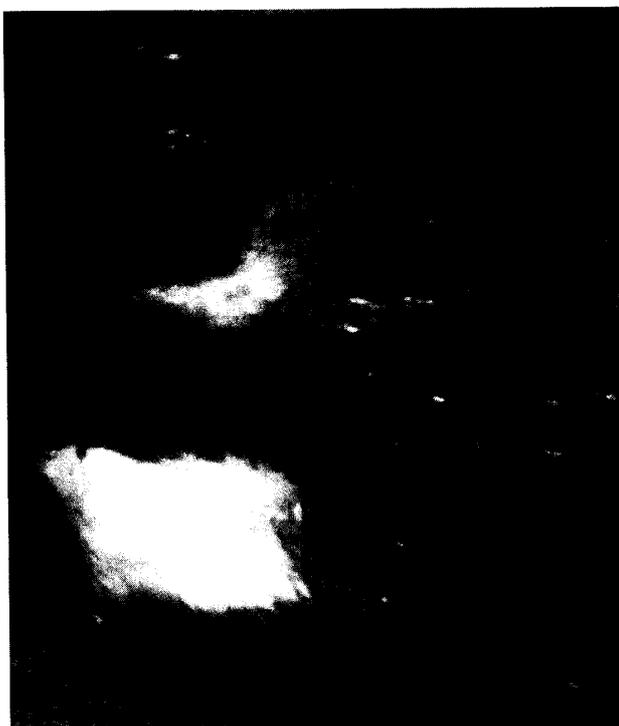


抗体(十) 7日

図 2



抗体 (-) 21日



抗体 (+) 21日

図 3

表 1 移植皮膚片が拒絶される率

日数	抗体投与群 (N=10)				非抗体投与群 (N=9)			
	凍結	拒絶率	非凍結	拒絶率	凍結	拒絶率	非凍結	拒絶率
7	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
14	7	70%	7	70%	6	66.7%	3	33.3%
21	8	80%	10	100%	9	100%	9	100%
28	10	100%	10	100%	9	100%	9	100%

表 2 移植皮膚片脱落后創面が癒痕化するまでの平均日数

群	凍結皮膚 (日)	非凍結皮膚 (日)
抗体投与	49	45
非抗体投与	38	24

表 3 移植 4 ヶ月後、無毛癒痕を認めた例数 (移植片の 1/3 以上)

群	凍結 (匹)	非凍結 (匹)
抗体投与 (n=10)	5	6
非抗体投与 (n=9)	1	0

は全例で移植皮膚が拒絶された (表 1)。

移植皮膚の脱落后創面が癒痕化するのに要した平均日数は、抗体投与の凍結皮膚片で 49 日、抗体投与の非凍結皮膚片で 45 日、抗体非投与の凍結皮膚片で 38 日、抗体非投与の非凍結皮膚片で 24 日であった (表 2)。

移植 4 カ月後で、移植片の大きさの 3 分の 1 以上の無毛癒痕部を認めた例数は、抗体投与の凍結片で 5 例、抗体投与の非凍結片で 6 例、抗体非投与の凍結片で 1 例、抗体非投与の非凍結片は 0 例であった (表 3) (図 4)。

2. フローサイトメトリーでの解析：抗体投与ラットの凍結処理皮膚片移植後、1 週、2 週間及び 25 週目で BN ラットの末梢血を採取し解析を行った。1 週及び 2 週目の解析では、CD 3 / CD 4、CD 8 / CD 4 のいずれの染色でも T リンパ球の出現が抑制されており、その効果は皮膚移植後 2 週目でも維持されていた。移植 25 週後では、対照である未処置ラットと同様にリンパ球は回復してきた (図 5)。

3. 混合リンパ球試験 (Mixed Lymphocyte Reaction test)：移植後 25 週以上経過した実験群ラットより採取した脾臓細胞を用いた混合リンパ球試

験により、抗体非投与群では donor の LEW 及び third party の SD ラット脾臓細胞に対する増殖反応が見られたが、抗体投与群では third party の SD ラット脾臓細胞に対しては反応するが、donor の LEW ラット脾臓細胞に対しては優位に抑制されていた。このことは、抗体投与群では移植皮膚片は拒絶されるものの、donor に対する部分的・選択的な免疫寛容状態が成立しているものと考えられた (図 6)。

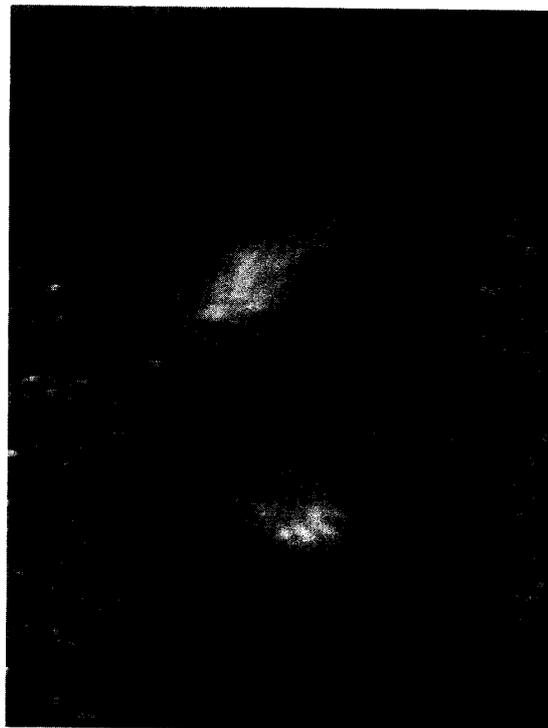
考 察

CD 2 分子は、T 細胞とヒツジ赤血球とのロゼット形成に関与することが知られ、ヒトでは T 細胞、NK 細胞、胸腺細胞に、ラットでは脾臓マクロファージにも発現している 55-kDa の細胞膜を貫通可能な glycoprotein である。その機能としては、細胞接着や T 細胞活性化の補助シグナルを伝達することが報告されている。

近年、この抗 CD 2 モノクローナル抗体の免疫抑制作用が注目され、齧歯類を用いて心臓などの血管付き組織を含めた同種組織移植後において免疫寛容導入作用があることが報告されている。



抗体(一) 4ヶ月



抗体(十) 4ヶ月

図 4

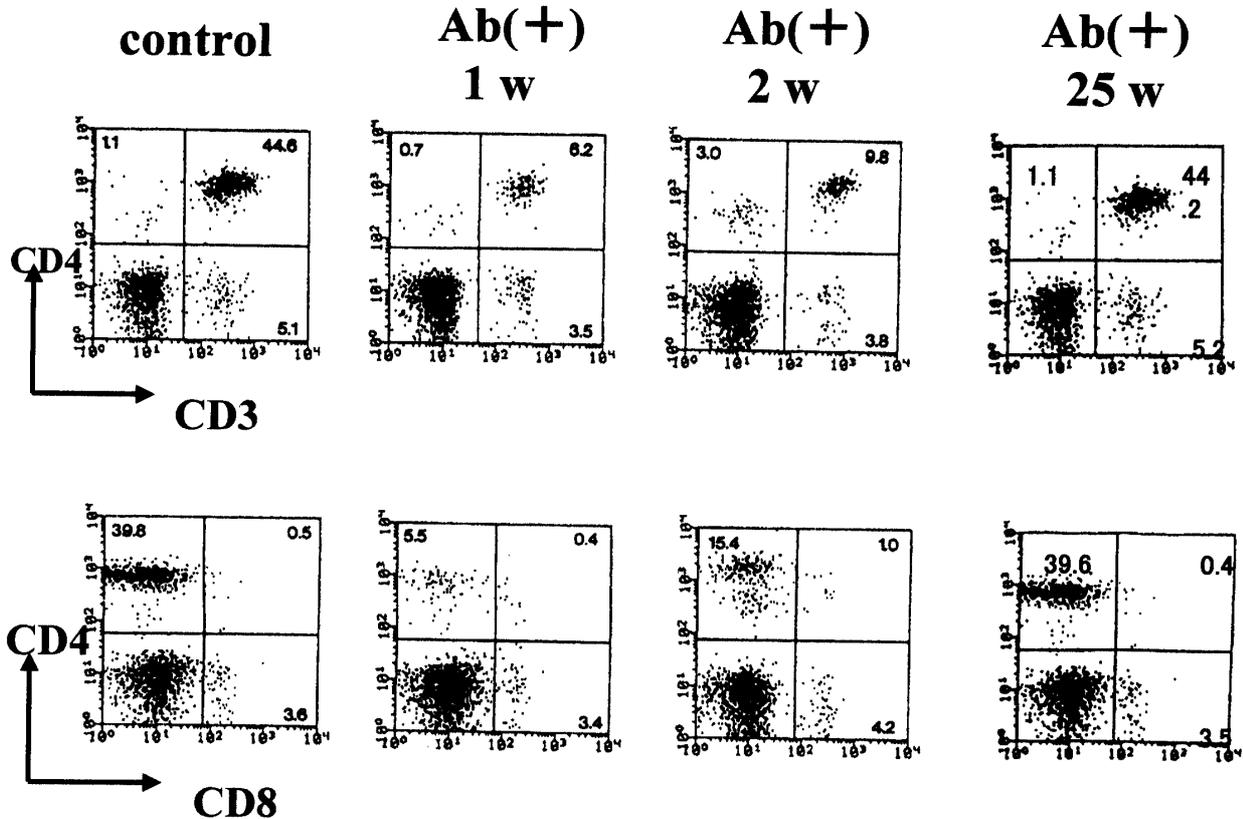


図5 フローサイトメトリーによるリンパ球解析

抗体投与群の末梢血をフローサイトメトリーで解析した。抗体投与群では皮膚移植後1週、2週めでCD3陽性であるTリンパ球が顕著に抑制されている。移植後25週では抑制は解除されており、CD8/CD4の分画比からも機能的にTリンパ球は回復していると判断される。

Chavin¹⁾, Hirahara²⁾らは抗CD2モノクローナル抗体投与により、同種の心臓を移植したラットが長期間生存できることを報告し、Krieger³⁾らは抗CD2モノクローナル抗体投与によりラット同種血管移植における免疫寛容状態の導入が可能であることを示した。

一方、平瀬⁴⁾⁻⁷⁾, 武石⁸⁾, 内田⁹⁾らにより、皮膚、血管、神経など軟部組織を胚凍結保存法に準じた方法で凍結し、超低温下の保存後に行った同種移植により、これら軟部組織の正常構造を維持した状態で移植可能なこと、凍結保存により組織の抗原性が低下することを報告した。しかし、超低温凍結保存による免疫抑制効果のみでは、同種皮膚移植の系で真皮層だけを拒絶せずに残存させることはできたが完全に生着させることはできなかったため、Hirase⁷⁾らは超低温凍結保存法と免疫抑

制剤タクロリムス(FK-506)を併用した。

久保田¹⁰⁾らはLEWラットをレシピエントに、BNラットをドナーとしたMHC mismatch modelを用いて同種皮膚移植を行い、著者らと同じ方法で作成・精製した抗CD2モノクローナル抗体を移植の前日より術後7日まで合計9回投与した群において、移植片を平均51.3日、最長98日の長期間生着させることができた¹⁰⁾。

今回、著者らは久保田らのモデルとは逆にBNラットをレシピエントに、プログラムフリージングを用いて段階的に凍結後に超低温保存し抗原性の低下したLEWラットの皮膚をドナーとして用いた。抗体投与は久保田らに従い、移植の1日前から手術当日を除いた術後7日までの合計8回行った。凍結処理皮膚移植が拒絶されるまでの平均日数は17日と抗体非投与群の14日より延長するも

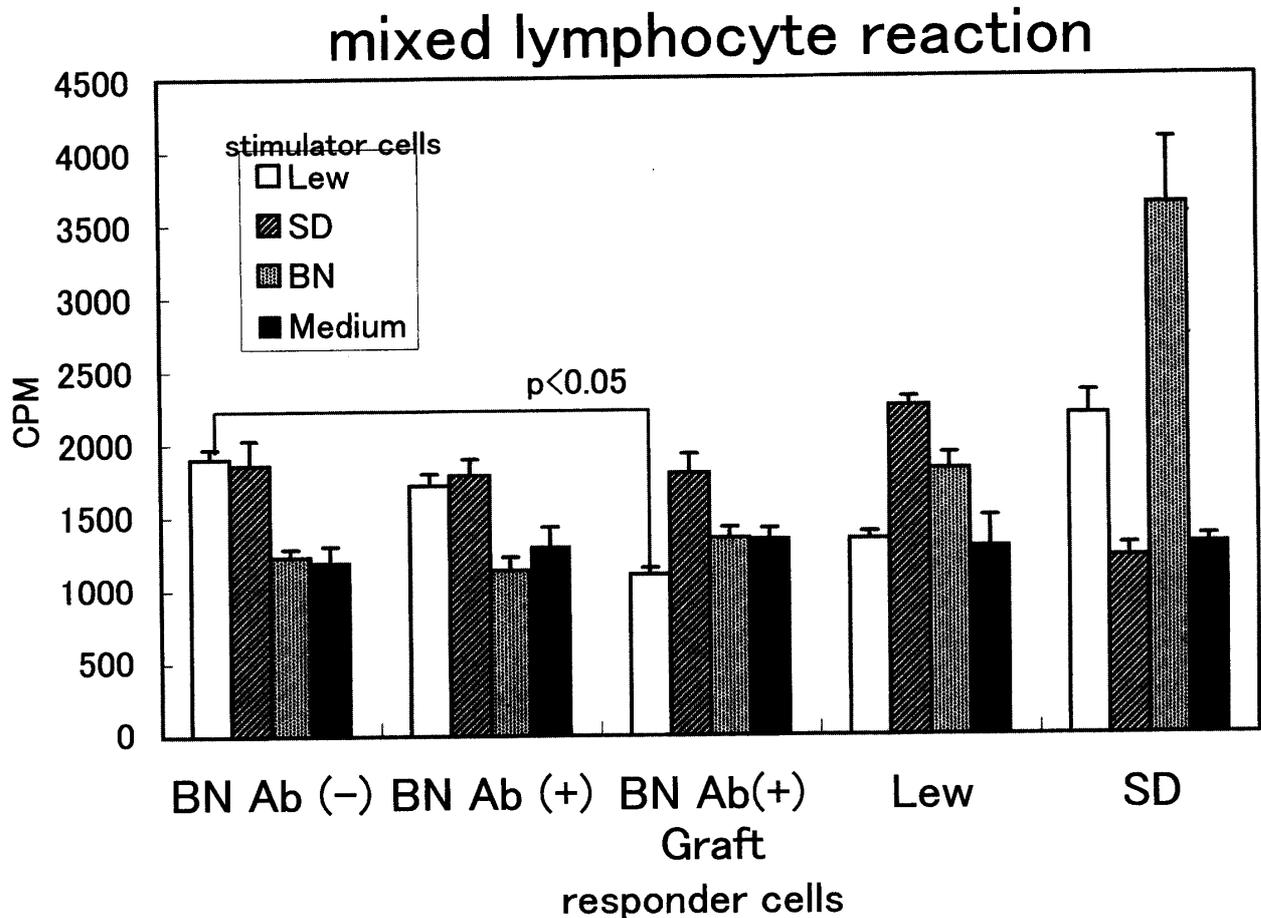


図6 皮膚移植後25週目でリンパ球混合試験を行った。抗体投与群では非投与群に比較してドナーである LEW に対するレシピエントの BN のリンパ球反応が有意に抑制されている。Third Party である SD に対しては抗体投与群においても他の群と同様に反応が認められることから LEW に対する選択的免疫寛容が成立していることが推測される。

の有意な延長効果は認められなかった。移植皮膚の生着、発毛にいたった例は無かったが、移植4ヵ月後に移植皮膚片の1/3以上の無毛癬痕部が、抗体投与の凍結皮膚移植片で5例、非凍結片で6例見られたが、抗体非投与の凍結片では1例のみであった。この無毛癬痕部は移植真皮が拒絶されずに生着しており、抗体投与によりある程度の免疫寛容状態が成立したためと考えられた。久保田らの実験結果との差は、同じ MHC mismatch model の組み合わせを用いても、レシピエントの選択により抗 CD2 モノクローナル抗体に対する応答性が異なるためと考えられた。著者らのモデルにおいて、凍結皮膚移植片と非凍結片での差は

抗体投与、非投与のいずれも凍結片の方が拒絶や癬痕化までの期間や長い傾向が見られたが、有意の差は認められなかった。

フローサイトメトリーでの解析結果から、抗体投与群では投与1週後、2週後の拒絶急性期に明らかに T リンパ球が抑制されており、従って、抗 CD2 モノクローナル抗体投与により移植皮膚の拒絶、脱落が遅延したと考えられる。しかし、25週後には抑制状態が解除され、抗体投与群と抗体非投与群での差は認められなかった。抗体投与群で、真皮が残存しレシピエントの発毛に置き換わらない状態となったのは、抗 CD2 モノクローナル抗体が残存していたためではなく、部分的免疫寛容

が成立したためと考えられる。

混合リンパ球試験からも抗体投与により部分的免疫寛容状態が成立していることが示唆されている。

まとめと結語

ラット MHC (主要組織適合抗原) mismatch モデルを用いて, 抗 CD 2 モノクローナル抗体療法と超低温凍結保存法を併用し, 皮膚同種移植の実験を行った. 抗体投与群において, 移植皮膚片に発毛はみられなかったが, 真皮は生着したと判定される例数が多かった. フローサイトメトリーでは T リンパ球の機能が維持されており, リンパ球混合試験でドナーに対する反応が減弱していることから部分・選択的免疫寛容が成立したと考えられた.

抗 CD 2 モノクローナル抗体投与と超低温凍結の併用療法は同種皮膚移植の部分的免疫寛容誘導に有効であると考えられた.

文 献

- 1) Chavin KD, Qin L, Lin J, Yagita H and Bromberg JS: Combined anti-CD 2 and anti-CD 3 receptor monoclonal antibodies induce donor-specific tolerance in a cardiac transplant model. *J Immunol* 151: 7249-7259 1993.
- 2) Hirahara H, Tsuchida M, Watanabe T, Haga M, Matsumoto Y, Abo T and Eguchi S: Long-term survival of cardiac allografts in rats treated before and after surgery with monoclonal antibody to CD 2. *Transplantation* 59: 85-90 1995.
- 3) Krieger NR, Most D, Bromberg JS, Holm B,

Huie P, Sibley RK and Alfrey EJ: Coexistence of Th 1 -and Th 2 -type cytokine profiles in anti-CD 2 monoclonal antibody-induced tolerance. *Transplantation* 15: 1285-1292 1996.

- 4) 平瀬雄一, 児島忠雄, 武石明精, 黄 貴興, 田中 貢: 超低温保存法 (Cryopreservation) による皮膚・軟部組織同種移植に関する実験的研究—第一報 同種組織移植を前提とする皮膚の長期保存—. *日形会誌* 11: 441-452 1991.
- 5) 平瀬雄一, 児島忠雄, 黄 貴興, 田中 貢: 超低温保存法 (Cryopreservation) による皮膚・軟部組織同種移植に関する実験的研究—第 2 報 同種異系間の植皮, 遊離皮弁組織と人工皮膚の可能性について—. *日形会誌* 11: 453-461 1991.
- 6) 平瀬雄一, 児島忠雄: 超低温保存法 (Cryopreservation) による皮膚, 軟部組織同種移植に関する実験的研究—第 3 報 免疫抑制を併用した同種皮膚移植—. *日形会誌* 11: 462-470 1991.
- 7) Hirase Y, Kojima T, Takeishi M, Hwang KH and Tanaka M: Transplantation of Long-term cryopreserved allocutaneous tissue by skin graft or microsurgical anastomosis: Experimental studies in the rat. *Plat. Reconstr Surg* 91: 492-501 1993.
- 8) 武石明精, 平瀬雄一, 黄 貴興, 児島忠雄: 超低温保存法 (cryopreservation) 軟部組織同種移植に関する実験的研究—血管の長期保存と同種移植—. *日形会誌* 11: 846-854 1991.
- 9) 内田 満, 平瀬雄一, 小川裕一郎, 児島忠雄: 超低温保存法 (Cryopreservation) による皮膚, 軟部組織同種移植に関する実験的研究—同種移植を前提とする神経の長期保存—. *日形会誌* 12: 279-287 1992.
- 10) 久保田茂夫, 柴田 実, 三輪 仁, 松崎浩徳, 渡部久実: 抗 CD 2 モノクローナル抗体を用いたラット異系皮膚移植の検討. *日手会誌* 13: 564-567 1996.
(平成14年 1月23日受付)