

FK506(タクロリムス)とミコフェノール・モフェティルを用いた ラット四肢同種移植における拒絶反応の検討

中村 慎一

〒699-3211 鳥根県浜田市三隅町三隅1356

抄録 ラット同種四肢移植モデルを用い、FK506と Mycophenolate mofetil (MMF) 併用下での移植肢各組織の拒絶反応について組織学的に評価し、その有用性について検討した。

ACI rat (RT-I^a) の後肢を、Lewis rat (RT-I^l) の後肢に移植した (n=15)。術後は FK506 1mg/kg/day, MMF30mg/kg/day を連日投与した。また、Lewis から Lewis への同系移植モデルを作成し、コントロール群とした (n=15)。両群ともに術後30, 60, 90日目に5匹ずつ、移植肢の皮膚、筋肉、軟骨、骨を Büttemeyer らの rejection grading scale に従って組織学的に評価した。

同種移植肢は肉眼的に壊死を生じたものはなかったが、浮腫を認め、拒絶反応の存在を思わせた。一方、同系移植群では、浮腫はなく、非移植肢とほぼ同等の外観であった。同種移植群の各組織の術後90日での rejection grading scale は皮膚が0.6、筋肉が0.4、骨が0.4、軟骨が0.3で、mean rejection score は0.43であった。

FK506と MMF 併用下での同種移植肢は、免疫抑制剤投与中から各組織には軽度の拒絶反応を認めており、四肢同種移植の臨床応用には慎重を期すべきと考える。

(平成23年8月8日受理)

キーワード：ラット四肢同種移植, FK506 (タクロリムス),
ミコフェノール・モフェティル, 組織学的評価

緒言

1998年にフランスで、世界初の人間の手の同種移植が行われた¹⁾。その後2006年までに計27例の手の移植手術が行われている²⁾。しかし技術的には確立したように思われる治療法であるが、ほかの臓器移植と比較して、広く普及しているとは言いがたい。そこにはいろいろな問題が影響しているように思われる。

以前、我々はFK506とMMFとの併用療法下でのラット同種四肢移植モデルを作成し、その機能的評価において、同系移植モデルとほぼ同

等の機能獲得が得られたことを報告した³⁾。しかし、その一方で同モデルの各組織の組織学的評価において拒絶反応が生じていることを認めた。

そこで、今回、同モデルの拒絶反応の形態を、肉眼的、組織学的に詳細に分析し、これまで報告されてきた研究と比較検討したので報告する。

対象と方法³⁾

使用動物

臓器、組織の移植実験においては、基本的

に組織適合抗原の明確な動物を用いるべきであり、今回は組織適合抗原が確認されている種のラットを用いた。ドナーとしては、ACI rat (RT-1^a)を用い、レシピエントとしてはLewis rat (RT-1^l)を用いた。この組み合わせにより、ACI から Lewis への同種移植には、major histocompatibility mismatch が形成される。ACI, Lewis ともに 8 週齢から 10 週齢 (250~350g) の雄ラットを使用した。また、同種移植モデル評価のため、Lewis から Lewis への同系移植モデルを作成し、コントロール群とした。

手術方法

麻酔はエーテル麻酔で導入の後、維持麻酔には、ハロセン、笑気を用いた。ドナーの後肢を切断し、大腿骨は14ゲージのステンレス鋼線で髓内固定する。このとき骨の短縮は行わない。筋肉は4-0ナイロン糸で縫合し、その後、大腿動静脈を手術用顕微鏡下に10-0ナイロン糸にて吻合し、坐骨神経を epineural suture にて縫合する。約15分間、吻合血管の開存状態を観察し、創を縫合する。術後、近くにない移植肢の chewing を防ぐために、円筒状の金属メッシュを直接皮膚に縫合し固定する。同種モデル、同系モデルともに同様の方法でモデル作成を行った。

免疫抑制剤

術後はFK506 (1mg/kg/day)、MMF を連

日投与した。投与量についてはFK506は、Muramatsu ら⁴⁾の投与量である1mg/kg/day を採用し、これを標本作成時まで連日、筋肉内注射にて投与した。またMMFは、Benheim ら⁵⁾がもっとも有効であったと報告した30mg/kg/day を採用し、標本作成時まで、連日経口投与した。なお、コントロールとした同系移植群には免疫抑制剤は投与していない。

評価方法

移植肢の観察は毎日行った。また同種移植モデル (n=15)、同系移植モデル (n=15) ともに 30日、60日、90日でそれぞれ5匹ずつ標本作製を行った。

組織学的評価

筋肉、骨、皮膚にH-E染色を、軟骨にH-E染色、Safranin-O染色を行い顕した。

各組織標本の拒絶反応の程度については、Büttemeyer が提唱した同種四肢移植における拒絶反応の grading system⁶⁾を用いて検討した(表1)。

なお、この研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、動物実験指針に基づき施行された (No.99-061)。

表1 Grading system for tissue rejection^{4), 6)}

a: skin rejection		b: Muscle rejection	
Grade 0	Normal	Grade 0	Normal
Grade 1	Mononuclear focal infiltration, basal cell vacuolation	Grade 1	Focal perivascular or diffuse but sparse interstitial infiltrate or focal aggressive infiltration
Grade 2	Suprabasalbulba formation, mixed infiltration	Grade 2	Multifocal aggressive infiltration with myocyte necrosis
Grade 3	Edeme, vasculitis, necrosis	Grade 3	Diffuse aggressive polymorphous infiltration, hemorrhage, vasculitis, necrosis or fibrosis
c: Articular cartilage rejection		d: Bone rejection	
Grade 0	Normal	Grade 0	Normal
Grade 1	Focal erosion of cartilage, granulation tissue	Grade 1	Periosteal infiltration and reaction Increased marrow cell and partial extravasation
Grade 2	Multifocal mononuclear infiltration with rough surface of the joint	Grade 2	Nonvascularised intertrabecular space, irregular cortical bone, locally nonviable woven bone
Grade 3	Necrosis of the articular cartilage with or without mononuclear infiltration	Grade 3	Edeme, vasculitis, necrosis

結果

肉眼的所見

同種移植群，同系移植群共に，30日，60日，90日において自動運動は見られなかった．同種移植群では，すべての移植肢に浮腫を認めた．しかし壊死に陥ったものはなかった．一方，同系移植群では，浮腫はなく，非移植肢とほぼ同等の外観であった（図1）．

組織学的検討

皮膚：

ほとんどの同種移植群に拒絶反応を思わせる所見を認めたが，壊死を生じているモデルはなかった．ほとんど細胞浸潤が見られないモデル

も存在した（図2）が，多くが皮下に単核球による細胞浸潤（図3）や基底細胞の空胞化（図4）を認め，これらは grade 1の拒絶反応と評価した．また空胞化が癒合して，水泡形成を生じているモデルがあり（図5），grade 2に分類した．術後90日での皮膚の rejection score は0.6であった．同系移植群では拒絶反応は認めなかった．

筋肉：

多くの同種移植群で拒絶反応の所見を認めなかった（図6）が，血管周囲や間質への細胞浸潤をみとめるモデルも認めた（図7）．術後90日での筋肉の rejection score は0.4であった．同系移植群では拒絶反応は認めなかった．

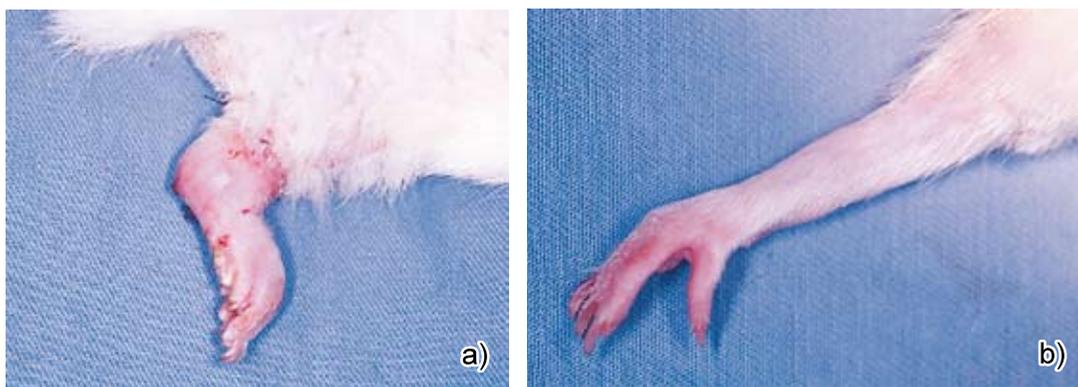


図1 Gross finding. a) The transplanted limb showed swelling and erythema at 90 days after surgery in allograft. b) no rejection occurred in isograft.

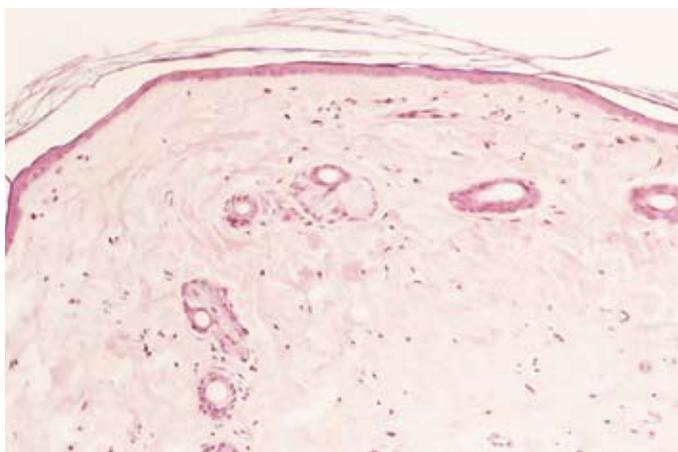


図2 Histological findings of skin in allograft. The skin showed few infiltration of mononuclear cell into the epidermis (Grade 0). (H.E. × 400)

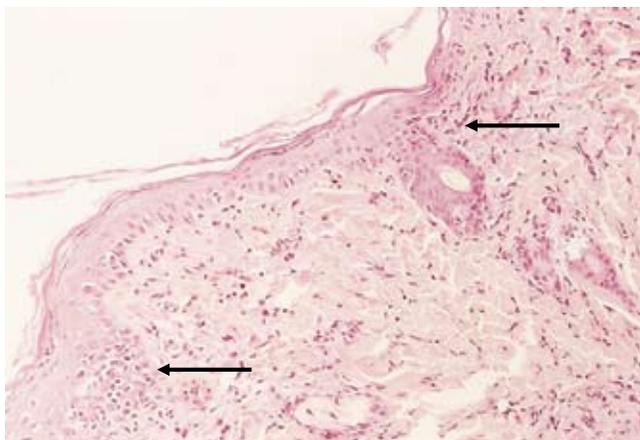


図3 Mononuclear cell infiltration was observed into the epidermis (→) in allograft. The skin was categorized as grade 1 rejection. (H.E. × 400)

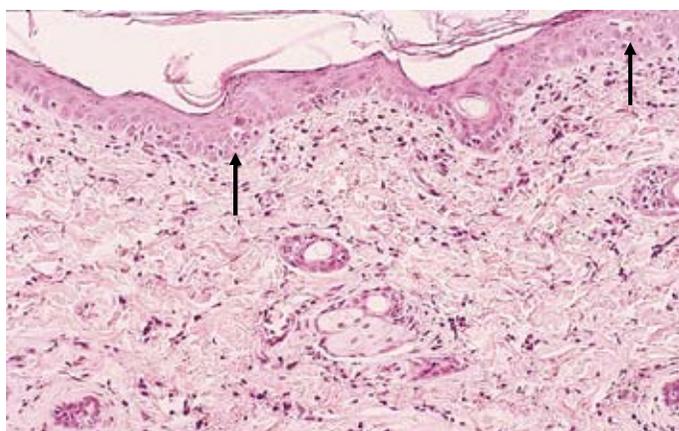


図4 Vacuolated cells (→) were observed into the epidermis in allograft. (H.E. × 400)

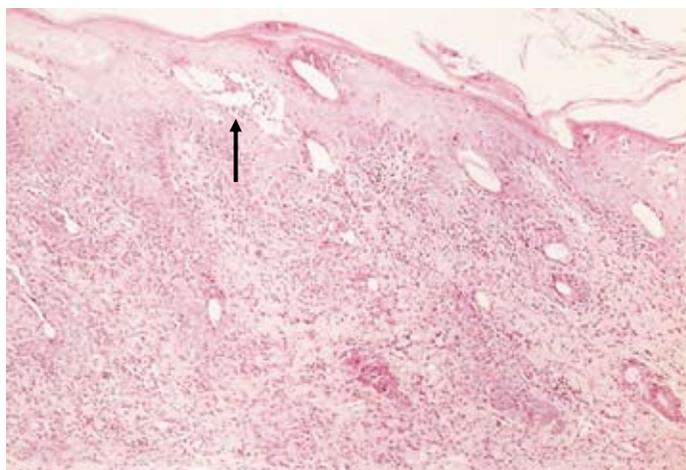


図5 Bulla formation (→) was observed into the epidermis in allograft. The skin was categorized as grade 2 rejection. (H.E. × 100)

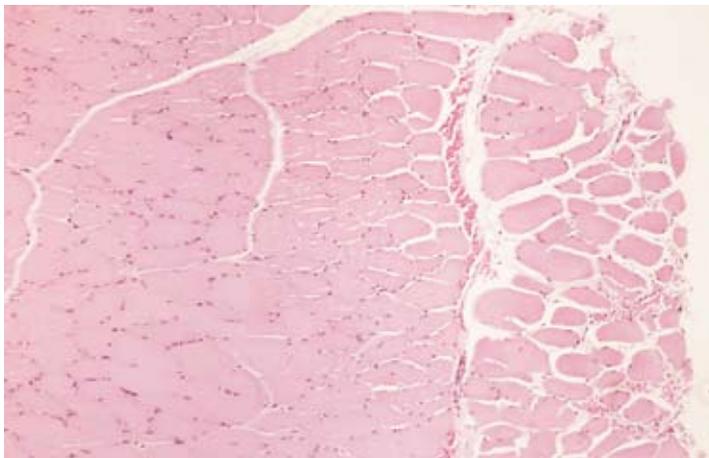


図6 Muscle showed no rejection in allograft (Grade 0). (H.E. × 100)

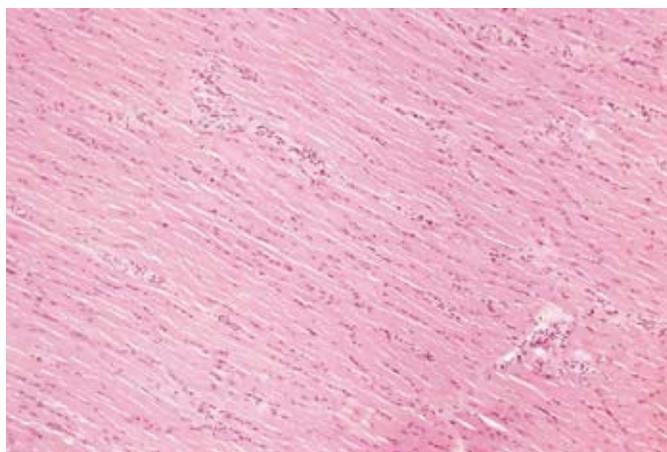


図7 Focal perivascular and diffuse interstitial infiltration of muscle was observed in allograft. The muscle was categorized as grade 1 rejection. (H.E. × 100)

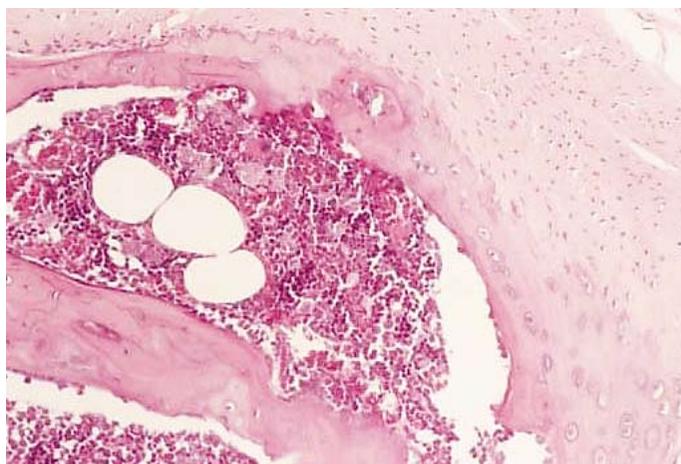


図8 The bone marrow showed partial red cell extravasation and was categorized as grade 1 in allograft. (H.E. × 100)

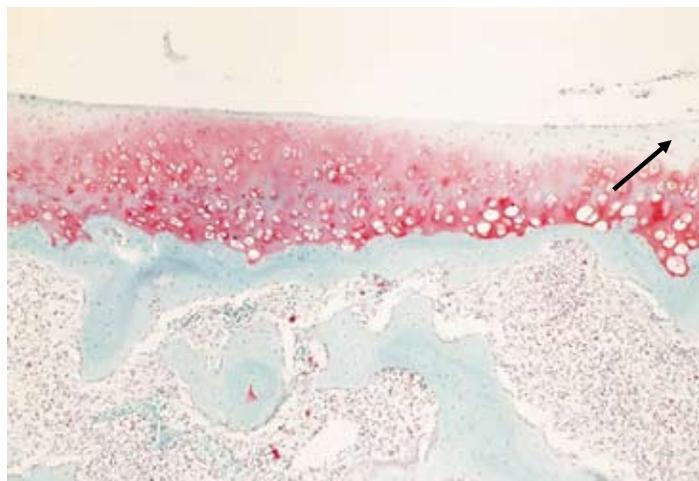


図9 The articular surface of knee joint showed focal erosion of the cartilage(→) in allograft. The cartilage was categorized as grade 1 rejection. (Safranin-O stain; ×100)

骨：

同種移植群では骨壊死や、骨髓内の線維化や極端な細胞の減少を認めたモデルはなかったが、骨髓細胞の増加を認めたモデルがあり(図8)、これらは grade 1とした。術後90日での骨の rejection score は0.4であった。同系移植群では拒絶反応は認めなかった。

軟骨：

同種移植群では軟骨壊死、軟骨組織内への細胞浸潤や肉芽組織浸入は認めなかったが、軟骨表面のびらんを認めたモデルがあり(図9)、術後90日での軟骨の rejection score は0.3であった。同系移植群では拒絶反応は認めなかった。

同種移植群の術後90日での各組織の rejection score は皮膚が0.6、筋肉が0.4、骨が0.4、軟骨が0.3で、mean rejection score は0.43であった。

考 察

1998年にフランスで、世界初の人間の手の同種移植が行われた¹⁾。この症例は免疫抑制剤服用のコンプライアンスが不良であった為、27ヶ月目で切断に至っている⁷⁾。しかしその後は、1999年にアメリカで2例目の人間の手の同種移植⁸⁾が行われて以降、2006年までに計27例の

移植手術が行われている。Swearinger ら²⁾によると、このうち9肢が切断に至っており、主たる原因は服薬コンプライアンスによるものとされている。また Ravindra ら⁹⁾によると、四肢同種移植を受けた18例のうち、12例に急性の拒絶反応を生じたとしている。これら臨床例に対する術後の免疫抑制剤は、今回我々が用いた FK506、MMF や、その他、ステロイド、rapamycin が主として用いられていた。

四肢同種移植実験における拒絶反応の組織学的評価法として、Büttemeyer ら⁶⁾が、histological grading system を提唱しており、Muramatsu ら⁴⁾が、各種免疫抑制剤を用いて、この system を用いた移植肢評価を追試している。Büttemeyer らは高容量 FK506 長期単独投与(2 mg/kg を術後1-14日間、以後、2 mg/kg を週2回)での四肢同種移植実験において、mean rejection score が0.5であったと報告している。一方、Muramatsu らは各種免疫抑制剤を用いた同種移植肢の評価を行っており、術後 FK506 と15-deoxyspergualin の併用(FK506、1mg/kg/day を30日、15-Deoxyspergualin、2.5mg/kg/day を30日間)を行った同種移植肢の mean rejection score は0.14と良好な結果が得られたが、皮膚の拒絶反応は避け得なかったと報告し

表2 Histological mean rejection gradings.

	skin	muscle	bone	cartilage	Total MRG*
Muramatsu ⁴⁾ (FK-DSG †)	1.0	0	0	0	0.14
Büttemeyer ⁶⁾ (FK long ¶)	0.89	0.67	0.33	0.11	0.5
Our study	0.6	0.4	0.4	0.3	0.43

(*MRG: Mean rejection grading score, †FK-DSG: FK506 1mg/kg/day and 15-deoxyspergualin 2.5mg/kg/days for 30 days, ¶FK-long: FK506 long : FK506, 2mg/kg, for 14days, followed by 2mg/kg twice weekly)

ている。本研究での mean rejection score は0.43で、これは Muramatsu らの報告より下回るものの、Büttemeyer らの FK506長期投与より良好な結果が得られた(表2)。しかし、今回の我々の実験でも拒絶反応を完全に制圧し、免疫寛容状態に至ったモデルはなかった。

人間の移植の際には、免疫抑制剤として FK506は0.15mg/kg/day, MMF は1～3g/day で使用されている⁸⁾。今回、我々はこれらの報告で使用されていた FK506と MMF を移植後の免疫抑制剤としてより高容量で使用しているが、免疫抑制剤投与中にもかかわらず、組織学的に皮膚の拒絶反応を認めていた。このことは、現在最強と思われるこれらの免疫抑制剤を高容量で投与しても、抗原性の高い皮膚の拒絶反応を完全に抑制する事は困難と考えられた。

本研究では、現時点で最強とされ、実際に最も重要で汎用される免疫抑制剤を2剤併用で、しかも高容量で用いたにもかかわらず、皮膚を中心に様々なレベルの拒絶反応を認めた。人間の手の同種移植臨床例においても高頻度で急性拒絶反応の発生が報告されており、また長期にわたる高容量の免疫抑制剤投与が避けられないのが現状である⁹⁾。免疫抑制剤長期投与により発生しうる感染症や悪性腫瘍、代謝性疾患等の合併症は、決して見過ごす事の出来ない重大な問題であり、これが服薬コンプライアンスに大きく影響しているものと思われる。現在も臨床応用が着々と進行中である四肢同種移植について、今後も十分な見守りが必要と考える。そして、人間の手の同種移植がより広く普及するためには、より効果的で安全性の高い免疫抑制剤の開発が必須と思われる。

結 語

- 1) ラットをモデルに四肢同種移植実験を行い、移植肢の拒絶反応の評価を行った。
- 2) 術後の拒絶反応予防にはFK506と mycophenolate mofeti の2種類の免疫抑制剤を併用した。
- 3) 比較的多量の免疫抑制剤を継続使用したにもかかわらず、移植肢には拒絶反応を認めた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導と御校閲いただいた川崎医科大学脊椎・災害整形外科教室 長谷川徹教授に深く感謝いたします。また多くのご助言を賜りました整形外科教室員諸兄ならびに実験に大きくご協力いただいた白井美枝子様に感謝いたします。

本論文の要旨は、第16回日本整形外科学会基礎学術集会において発表しました。なお本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費(11-602)の援助によって行われたことを付記し深謝いたします。

文 献

- 1) Dubernald JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, Dawahra M, Hakim NS: Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet* 353 : 1315-1320, 1999
- 2) Swearingen B, Ravindra K, Xu H, Wu S, Breidenbach WC, Ildstad ST : Science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 86 : 627-635, 2008
- 3) 中村 慎一, 長谷川 徹, 三河 義弘: FK506と Mycophenolate mofetil を用いたラット四肢同種移植における神経再生についての検討. *日本手の外科学会雑誌*18: 42-46, 2001
- 4) Muramatsu K, Doi K, Kawai S: Limb allotransplantation in rats : combined immunosuppression by FK-506 and

- 15-deoxyspergualin. *J Hand Surg Am* 24 : 586-593, 1999
- 5) Benheim P, Anthony JP, Ferreira L, Borsanyi JP, Mathes SJ : Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 61 : 527-532, 1996
- 6) Büttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U: Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 97: 139-148, 1996
- 7) Gander B, Brown CS, Vasilic D, *et al* : composite tissue allotransplantation of the hand and face: a new frontier in transplant and reconstructive surgery. *Transpl Int* 19: 868-880, 2006
- 8) Jones JW, Gruber SA, Barker JH, Breidenbach WC: Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team. *N Engl J Med* 343: 468-473, 2000
- 9) Ravindra KV, Wu S, Bozolic L, Xu H, Breidenbach WC, Ildstad ST: Composite tissue transplantation: a rapidly advancing field. *Transplant Proc* 40: 1237-1248, 2008

Histological Evaluation of Composite Tissue Allograft Survival in A Rat Model with FK506 (Tacrolimus) and Mycophenolate Mofetil

Shinichi NAKAMURA

1356 Misumi-cho Misumi, Hamada, Shimane, 699-3211, Japan

ABSTRACT The goal of limb transplantation, which consists of composite tissue transplantation, is to attain good functional recovery without immunological responses. Many experimental studies have examined the immunosuppressive effects of FK506. However, few experimental reports on an immunosuppressive regimen consisting of FK506 and mycophenolate mofetil have been made. We performed a series of experimental studies on vascularized rat hind limb allografts with FK506 and mycophenolate mofetil. The purpose of this study was to investigate the immunosuppressive effects of a combined regimen using FK506 and mycophenolate mofetil on rejection responses to vascularized limb allografts in rats. Vascularized limb allografts were microscopically transplanted from ACI (RT-1^a) rats to Lewis (RT-1^l) rats. An isografts without immunosuppression group and an allograft with FK506 and mycophenolate mofetil immunosuppression group were then compared. Gross findings for the transplanted limbs, and the histological findings of the transplanted limb component tissues were then evaluated at 30, 60, or 90 days after surgery. All the grafted limbs survived, and no signs of rejection were observed in the isografts. The transplanted limbs showed mild swelling and erythema, but no mummification occurred in the allografts during the evaluation periods. Histologically, no skin rejection occurred in the isografts, and no rejections of bone, cartilage, or muscle occurred. In the allografts, however, the skin was moderately rejected, and bone, cartilage and muscle were minimally rejected. The rejection was graded as follows: skin, 0.6; muscle, 0.4; bone, 0.4; and cartilage, 0.3; the mean rejection grading score was 0.43 for the allografts. The rejection of the skin was severer than that of the other components. Further immunological and pharmacological investigations of immunosuppressants are needed prior to

the clinical application of allogenic limb transplantation.

(Accepted on August 8, 2011)

Key words : Rat Limb Allograft, FK506, Mycophenolate Mofetil, Histological Evaluation

Corresponding author

Shinichi Nakamura

1356 Misumi-cho Misumi, Hamada, Shimane, 699-3211, Japan

Phone : 0855 32 0021

Fax : 0855 32 3221

E-mail : nakamura-shinryo@mist.ocn.ne.jp