

学 位 論 文 題 名

Effect of a Single Dose-Administration of FK-506
on Allogeneic Limb Transplantation on Rats: Is There
an optimal Timing of Its Administration?

(ラットを用いた同種肢移植における FK506 単回投与の効果：
その投与には至適時期が存在するのか?)

学位論文内容の要旨

近年の免疫学的進歩と外科的手術手技の発達により移植医療は目覚ましい進歩をとげた。整形外科の分野では外傷や骨軟部腫瘍切除後の肢欠損に対する再建術としての肢移植に大きな期待がかけられている。しかし、肢移植にはいくつかの解決すべき重要な問題が残されている。第一に肢移植は、皮膚や骨髄などを含めた多種多様な組織を含む複合組織移植であり、単一臓器とは異なった複雑かつ強い拒絶反応が予測され、その拒絶反応の抑制には、免疫抑制剤の持続的投与が必要なことである。第二には、肢は基本的に non-vital organ であり、生命維持のためにどうしても必要な移植ではないことである。そのため、移植による致命的な副作用はできるだけ減らす必要があり、より効果的な免疫抑制剤の投与方法の開発が要求される。

FK-506(タクロリムス)は多くの基礎的実験や臨床研究において効果が確認されている免疫抑制剤である。実験的肢移植においてもその有用性について多くの報告がある。しかし、拒絶反応の抑制には継続的な投与が必要であり、それによる重篤な副作用の出現が懸念される。

本研究の目的はラット同種肢移植モデルを用いて、中等量 FK-506 の単回投与における投与日による移植肢生着期間への影響を明らかにすることである。また、従来肉眼的所見のみによるが多かった拒絶反応の判定の指標としての血清中サイトカインとして代表的な IL-2 と INF- γ 濃度測定の有用性について検討することである。

実験動物は体重 280g から 340g の近交系の雄ラットを用いた。Donor には ACI ラットを、Recipient には Lewis (LEW) ラットを用いた。ACI ラットの後肢を、Lewis ラットに同所性に移植した。

実験群は各群 n=5 として次のように設定した。対照群:FK-506 投与(-)、Day0 群:FK-506 5mg/Kg, 術当日単回投与、Day1 群:FK-506 5mg/Kg, 術翌日単回投与、Day 2 群:FK-506 5mg/Kg, 術後 2 日目単回投与とした。各群 2 匹の皮膚と筋肉を術後 2 週目に生検した。サイトカイン分析のために、28 匹の尾動脈より採血を行った。移植肢の生着期間は肉眼的に

eschar formation の出現までと定義した。各群間の移植肢生着期間の統計学的検討は Mann-Whitney U 検定を用いて行った。組織学的評価は Büttermeyer の grading に基づき normal, mild, moderate, severe の4段階に評価した。血清サイトカイン濃度は無処置群では術直後と3日目、4日目に、Day0 群は術後7日目と21日目に、Day1 群は7日、21日、49日目に計測した。尾静脈より採取した血液中の IL-2 と INF- γ を Rat ELISA Kit を用いて計測した。

各群の生着期間の中央値は対照群:9日,Day0 群:19日,Day1 群:52日,Day2 群:42日であり術翌日と術後2日目投与群は術当日投与群よりも有意に生着期間が延長していた。組織学的評価では術後2週で対照群は severe な拒絶反応を、Day0 群では mild から moderate の拒絶反応の進行を認めたのに対し、Day1 と Day2 群では明らかな拒絶反応所見は認めなかった。血清中 IL-2 の発現は28例中2例に認めただけであった。INF- γ は28例中14例で発現していた。対照群は術後7日目に発現していた。Day0 群は術後21日目に高率に INF- γ が発現していたが、Day1 群では INF- γ の発現は認められなかった。

本研究の目的はラット同種肢移植モデルを用いて、中等量 FK506 の単回投与における投与日による移植肢生着期間への影響を明らかにすることであるが、肉眼的、組織学的検討およびサイトカインの計測により術後1から2日目の投与により移植肢の生着期間が延長されることが明らかとなった。Sano らは、ラット肺移植モデルにて術後3日目の FK506 単回投与により移植片の生着期間が延長されることを報告している。Venkataramanan らは、犬への FK506 単回投与において血中濃度は4から12時間までにピークに達して、24時間持続することを報告している。また、Fealy らはラット同種肢移植において血中サイトカインは移植直後より増加し、移植後5日でピークに達することを報告している。

今回の実験結果により、移植直後に FK-506 を投与した時には、サイトカインがピークに達するまでに、免疫抑制剤の効果的な血中濃度が維持できないことを示していると考えられた。本研究により移植後24時間から48時間までの免疫抑制剤の投与は、その効果的濃度を維持し、なおかつ、それによりサイトカインの発現の増加を防止することにより移植肢の生着期間の延長が得られたと推測された。

本研究には各組織の評価や神経を含めた機能回復の評価、免疫学的寛容獲得の問題など解決すべき多くの点が存在するが、FK-506 の単回投与には拒絶反応抑制にとって至適な投与時期があり、この時期に投与することにより投与量を減らすことが可能となることが期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Effect of a Single Dose-Administration of FK-506 on Allogeneic Limb Transplantation on Rats: Is There an optimal Timing of Its Administration?

(ラットを用いた同種肢移植における FK506 単回投与の効果：
その投与には至適時期が存在するのか?)

近年の免疫学的進歩と外科的手術手技の発達により移植医療は目覚ましい進歩をとげた。整形外科の分野では外傷や骨軟部腫瘍切除後の欠損に対する再建術としての肢移植に大きな期待がかけられているが、いくつかの解決すべき重要な問題が残されている。第一に肢移植は、皮膚や骨髄などを含めた多種多様な組織を含む複合組織移植であり、単一臓器とは異なった複雑かつ強い拒絶反応が予測されること。第二には、肢は non-vital organ であり、生命維持のためにどうしても必要な移植ではないことである。そのため、移植による致命的な有害事象はできるだけ減らす必要がある。

本研究の目的はラット同種肢移植モデルを用いて、免疫抑制剤 FK-506 の単回投与における投与日による移植肢生着期間への影響を明らかにすることである。また、従来肉眼的所見のみによるが多かった拒絶反応の判定の指標としての血清中サイトカインとして代表的な IL-2 と INF- γ 濃度測定の有用性について検討することである。

実験動物は近交系の雄ラットを用いた。Donor には ACI ラットを、Recipient には Lewis(LEW)ラットを用いた。

FK506 を投与しないものを対照群とし、Day0 群、Day1 群、Day2 群はそれぞれ FK506 5mg/Kg を術直後、術後1日目、術後2日目単回投与したものとした。各群2匹の皮膚と筋肉を術後2週目に生検し、組織学的変化を評価した。移植肢生着期間の統計学的検討は Mann-Whitney U 検定を用いて行った。血清サイトカイン濃度は対照群、Day0 群、Day1 群の拒絶反応開始時と拒絶の進行時に計測した。

各群の生着期間の中央値は対照群:9日, Day0 群:19日, Day1 群:52日, Day2 群:42日であり術翌日と術後2日目投与群は術当日投与群よりも有意に生着期間が延長していた。組織学的評価では術後2週で対照群は severe な拒絶反応を、Day0 群では mild から moderate の

拒絶反応の進行を認めたのに対し、Day1 と Day2 群では明らかな拒絶反応所見は認めなかった。血清中 IL-2 の発現は 28 例中 2 例に認めただけであった。INF- γ は 28 例中 14 例で発現していた。対照群は術後 7 日目に発現していた。Day0 群は術後 21 日目に高率に INF- γ が発現していたが、Day1 群では INF- γ の発現は認められなかった。

本研究の目的はラット同種肢移植モデルを用いて、FK506 の単回投与における投与日による移植肢生着期間への影響を明らかにすることであるが、肉眼的、組織学的検討およびサイトカインの計測により術後 1 から 2 日目の投与により移植肢の生着期間が延長されることが明らかとなった。Sano らは、ラット肺移植モデルにて術後 3 日目の FK506 単回投与により移植片の生着期間が延長されることを報告している。Venkataramanan らは、犬への FK506 単回投与において血中濃度は 4 から 12 時間までにピークに達して、24 時間持続することを報告している。また、Fealy らはラット同種肢移植において血中サイトカインは移植直後より増加し、移植後 5 日でピークに達することを報告している。

今回の実験結果により、移植直後に FK-506 を投与した時には、サイトカインがピークに達するまでに、免疫抑制剤の効果的な血中濃度が維持できないことを示していると考えられた。本研究により移植後 24 時間から 48 時間までの免疫抑制剤の投与は、その効果的濃度を維持し、なおかつ、それによりサイトカインの発現の増加を防止することにより移植肢の生着期間の延長が得られたと推測されたと発表された。

審査にあたり、守内哲也教授から FK506 の副作用、従来との報告との投与量の比較、最終的に拒絶を抑える方法、動物愛護上の問題、IL-2 の実験精度について、副査三浪明男教授から動物愛護についてのコメントがあり、遺伝子治療や他剤との併用の可能性について、主査上出利光教授から単一臓器移植との相違点、他の免疫抑制剤での報告、拒絶反応のどの段階での効果が考えられるかについての質問があり、これらの質問に対して、今回行った動物実験の結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は同種肢移植における低用量での免疫抑制剤投与の時期についての独創的な研究であり、今後の移植医療における免疫抑制剤の有害事象を減らす投与法の開発に寄与すると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。