

## 原 著

四肢同種移植後におけるドナーとレシピエント間の  
キメリズムの解析栗山龍太郎  
(指導：河合伸也教授)

山口大学医学部高次統御系・整形外科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 四肢移植, キメリズム, 遺伝子解析, 同種移植

## 緒 言

1998年から世界各地で始まった人手同種移植は、基礎的研究がまだまだ熟していない段階で開始された半ば実験的臨床応用という印象もある。人の四肢移植術が信頼の置ける再建手術として認知されるためには移植後に安定した拒絶反応のコントロールが必須である。しかし、四肢は非生命維持器官であり、免疫抑制剤を生涯にわたって投与し続けることは受け入れられるものではなく、免疫抑制剤を用いない免疫学的寛容の導入が望まれる。現在まで様々な免疫抑制療法が実験的に試みられてきたが、いまだ安定した免疫寛容が得られたとする報告は無い。

近年、免疫寛容の導入については内臓器同種移植の臨床や実験的研究の成果によりキメリズムが注目されている。同種移植後に生じるキメリズムとは、ドナー細胞がレシピエント内に移動する全身性キメリズムとレシピエント細胞が移植片内に移動するグラフトキメリズムの2方向性の交通が存在する。第1の全身性キメリズムの寛容導入メカニズムとして特に胸腺内キメラのalloreactive T cellの抑制は重要視されており、実際、胸腺内にドナー細胞を注入する事でドナー特異的免疫寛容が得られる事は周知の事実である<sup>1)</sup>。しかし、この概念にはいまだ批判的意見もあり、果たして本当にキメリズムが免疫寛容を導入するのか、あるいは免疫寛容の結果としてキメリズムが生じるのか議論が分かれ、いまだ意見

の一致をみていない<sup>2)</sup>。移植四肢の主構成組織である同種移植骨は、皮質骨移植という生体力学的骨格支持の観点からの移植意義とは別に、移植片に含まれる骨髓移植という未分化間葉系細胞の同種移植という移植免疫学的に非常に特殊な移植ドナーとも受け取れ、キメリズムの成立に関しては有利であるかもしれない。

第2のグラフトキメリズムは、移植片の細胞起源が最初のドナー細胞からレシピエントからの細胞供給により細胞置換過程が完了すれば、移植片からの抗原呈示は消滅し免疫寛容状態となる。これまで、内臓器移植では肝臓のクッパー細胞や心臓の弁細胞はグラフトキメリズムが成立することが既に明らかである<sup>3)</sup>。四肢の構成体を個々に細胞置換の可能性を推察すると、骨に関しては恒常性維持のため常に細胞置換が行われ、骨起源細胞はレシピエントからの未分化間葉系細胞供給が予測され、グラフトキメリズムが成立する事は期待できる。しかし、筋肉、皮膚に関しては構成細胞の再生はそれぞれの組織内に局限した現象と考えられ、他組織からの細胞置換過程に関しては全く未知である。

キメリズムの研究は、肝、腎、心、肺、骨髓移植の分野では関心の高い話題であり数多くの報告がなされているが、四肢を含めた運動器の移植ではこれまで同種骨移植に関する報告を含め数編が存在するのみで、未だ未知の領域である。それだけにすでに四肢同種移植が行われるようになっている現在、四肢移植におけるキメリズムの解明は急務の課題である。本研究では、四肢移植後に生じるであろうドナ

平成15年11月19日受理

一とレシピエント間の細胞交換現象であるキメリズムを分子生物学的手法を用いて解析した。

実験群	ドナー	レシピエント	N	最終評価(週)				
				1	4	8	12	48
I	雄 Lewis	雌 Lewis	20	4	4	4	4	4
II	雌 Lewis	雄 Lewis	20	4	4	4	4	4

雌レシピエントのDNA解析: 肝臓, 脾臓, 胸腺, 頸部リンパ節, 健常脛骨, 上腕骨, 健常皮膚, 筋肉  
 雄レシピエントのDNA解析: 患側大腿骨, 脛骨, 下腿皮膚, 腓腹筋, 足部皮膚, 足趾

Table 1 実験計画

## 方 法

### 1. 実験群

実験動物には純系Lewisラット(雄250~300g, 雌220~260g)を用い, 実験群には以下の2群を作成した。I群は雄ドナーから雌レシピエントへ, II群は雌ドナーから雄レシピエントへの後肢移植を行った(表1)。両群とも移植後1, 4, 8, 12, 48週で屠殺し3.の項で後述する解析方法に基づいて評価を行った。雄から雌への移植は, 雄のみが有する性染色体Yに基づくMinor抗原(Histocompatibility Y, H-Y抗原)が発現し, 移植肢に拒絶が生じる可能性がある。

### 2. 移植手術

移植手術の麻酔は全身麻酔とし, 麻酔薬にはケタミンとザイラジンの混合薬を筋注で使用した。ドナーの右後肢を骨, 筋肉, 大腿部血管, 大腿神経, 皮膚を含めて大腿部中央で切断した。レシピエントの右後肢も同様のレベルで切断した。その後, 直ちに後肢の移植再建手術を行った。大腿骨の骨接合は18G注射針を用いて髓内固定とし, レシピエントとドナーの大腿動静脈を手術用顕微鏡下で10-0ナイロン糸を用いて血管吻合した。平均虚血時間は45分であった。移植後ラットは外固定を行わず飼育ケージの中で自由に活動させた。

### 3. 解析方法

**臨床的評価** 移植後ラットの全身状態や後肢の状態を毎日観察した。

**皮膚拒絶** 四肢移植の拒絶反応はまず皮膚に赤色変化が現れるため, 皮膚の変色が24時間継続した場合

を拒絶ありと判定した。

**軟X線撮影** ラット屠殺時に軟X線撮影を行い, 大腿骨骨接合部の仮骨形成や骨癒合について評価を行った。

### PCRによるキメリズム解析

#### 1) 雄細胞と雌細胞の定量評価の鋳型作成

Y-chromosomeを有する雄細胞のPCR定量は, コントロール遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; (以下GAPDH)との比較で行った。雄DNAと雌DNAを1:0, 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>と連続的に希釈したサンプルを作成し, 10pMolのY-chromosomeプライマー(5'-GTA GGT TGT TGT CCC ATT GC-3' and 5'-GAG AGA GGC ACA AGT TGG C-3')と10pMolのGAPDHプライマー(5'-GTG GTG CAG GAT GCA TTG CTG A-3' and 5'-GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC G-3')<sup>4)</sup>をそれぞれ加えてPCRを行い定量の鋳型とした。使用したPCR器械はASTECC社製TEMP CONTROL SYSTEM, 30サイクル(denaturation 96°C 1分, annealing 54°C 1分, extension 72°C 1分)とした。PCR産物は2%アガロースゲル上で電気泳動し, エチレンブロマイドで染色しUVライト上で観察した。

#### 2) 組織抽出DNAサンプルのPCR

雌レシピエントの屠殺時には, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 頸部リンパ節, 健常脛骨, 上腕骨, 健常皮膚, 筋肉を採取した。また, 雄レシピエントの屠殺時には, 患側大腿骨, 脛骨, 下腿皮膚, 腓腹筋, 足部皮膚, 足趾を採取した。

屠殺時得られた各組織よりゲノムDNAを抽出した。各組織をDNA抽出液(DNA Zol; Invitrogen Co Ltd.)で攪拌した後エタノールで沈殿させた。抽出したDNAサンプル0.5 μgを前述と同条件でPCRを行い, 鋳型に合わせて定量評価した。PCRbandの検出が見られなかった場合, テクニカルエラーを考慮して3回同様の実験を試みた。

### 組織学的評価

足部中央の横断切片で組織学的評価を行った。標本は脱灰後薄切し, 通常のヘマトキシリンエオジン染色を行い, 拒絶状態や生着性について, 骨, 筋, 神経, 血管, 皮膚など各構成体ごとに検討した。



Fig. 1 雌レシピエントへの雄後肢移植の所見  
移植後12週の後肢の所見である。皮膚の拒絶は見られなかった。矢印は接合部を示す。

評価時期 (週)	胸腺 陽性/例数	脾臓 陽性/例数	頸部リンパ節 陽性/例数	肝臓 陽性/例数
1	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
8	0 / 4	2 / 4	0 / 4	1 / 4
12	0 / 4	0 / 4	0 / 4	2 / 4
48	4 / 4	3 / 4	4 / 4	4 / 4

Table 2 雌レシピエントへの雄後肢移植後のリンパ器官のキメラリズム

## 結 果

### 臨床的評価

ラットの移植肢は全例生着した。移植後1週間までは虚血再還流障害による移植肢の腫脹が見られたが、その後徐々に消退した。術後全身状態の悪化にて死亡した例は無かった。

**皮膚拒絶** 雌レシピエントへの雄の後肢移植では全例で最終屠殺時(1~48週)まで皮膚の拒絶は見られなかった。図1は移植後12週のラットの後肢の写真を示している。雄レシピエントへの雌の後肢移植も拒絶は認められなかった。

**軟X線撮影** 大腿骨接合部は1週で徐々に仮骨の形成が認められ、4週で骨接合が完成した。骨の萎縮性変化は最終屠殺時まで認められなかった。図2は雄レシピエントへの雌の後肢移植後4週時における軟X線撮影像を示している。



Fig. 2 後肢移植後の軟X線撮影所見  
雌レシピエントへの雄の後肢移植後4週時の所見を示している。骨接合が完成している。骨の萎縮性変化は観察されない。

### PCRによるキメラ解析

#### 1) PCR法の検出感度評価

雄DNAサンプルをPCRで30サイクルで増幅後ゲル上で電気泳動にて観察すると、148bpと197bpに2つのDNAバンドが認められた。それぞれのバンドのDNA塩基配列は、148bpバンドはY-chromosomeに、197bpバンドはGAPDHと一致していた。

PCRの検出感度について雄DNAと雌DNAを混合したサンプルをPCRでサイクル数を変えながら増幅した。26サイクルでは増幅不足のため2本のバンドは不明瞭であった。30サイクルのサンプルでは、148bpバンド(Y-chromosome)は197bpバンド(GAPDH)と比較すると、雄DNA:雌DNA=1:1サンプルの場合には高輝度に、1:10<sup>2</sup>では同等に、1:10<sup>3</sup>では低輝度に観察され、1:10<sup>4</sup>でも検出可能であった(図3)。35サイクルでは30サイクルと比較し検出感度の改善は認められなかった。以上の結果より、本PCRの雌DNAを検出可能な最低濃度は1:10<sup>3</sup>(0.1%)と判明した。

#### 2) リンパ器官のキメラリズム(表2)

雌レシピエントへの雄の後肢移植では、移植後4週まではリンパ器官の全てにおいてキメラは認められなかったが、8週において脾臓に50%と12週において肝臓に50%の割合でキメラが認められた。胸腺と頸部リンパ節には移植後12週まで全例においてド

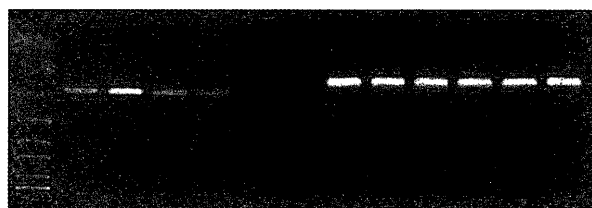


Fig. 3 PCR法の検出感度評価 (30 cycles)

- Lane 1. DNA ladder  
 2. Male DNA only  
 3. Male DNA : female DNA = 1 : 1  
 4. M : F = 1 : 10  
 5. M : F = 1 : 10<sup>2</sup>  
 6. M : F = 1 : 10<sup>3</sup>  
 7. M : F = 1 : 10<sup>4</sup>  
 8-13. Lane 2-7のGAPDH band



Fig. 4 リンパ器官のキメリズム

I 群 (雄ドナーから雌レシピエントへの後肢移植) での移植後48週後のPCR所見

- Lane 1. DNA ladder.  
 2. Thymus  
 3. Lymph node  
 4. Spleen  
 5. Liver  
 6. Humerus  
 7. Left tibia (non-operated side)  
 8. Left gastrocnemius muscle  
 9. Left leg  
 10. Left foot  
 11. Thymus GAPDH

ナー細胞は検出されなかった。移植後48週では、胸腺、脾臓、肝臓、リンパ節のすべてに安定した高濃度のキメラが検出された (図 4)。

### 3) 骨, 筋肉, 皮膚組織のキメリズム (表 3)

雄レシピエントへの雌の後肢移植では、移植後12週まではレシピエントの骨, 皮膚, 筋肉にはキメラが認められなかったが、移植後48週では全例に健側の脛骨と上腕骨にキメラが認められた。しかし、健常皮膚, 筋肉には最終評価時まで1例もキメラは認められなかった。

評価時期 (週)	健側脛骨	上腕骨	健常皮膚	健常筋肉
	陽性/例数	陽性/例数	陽性/例数	陽性/例数
1	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
8	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
12	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
48	4 / 4	4 / 4	0 / 4	0 / 4

Table 3 雌レシピエントへの雄後肢移植後の骨, 筋肉, 皮膚組織のキメリズム

評価時期 (週)	n	雄・雌 比 (%)		大腿骨	脛骨	下腿 皮膚	足部 皮膚	腓腹筋	足趾
		雄	雌						
1	4	0.1	0	1	0	0	0	0	0
		1	0	1	0	0	0	0	0
4	4	0.1	1	2	0	0	0	0	0
		1	1	0	0	0	0	0	0
8	4	0.1	1	2	0	0	0	0	0
		1	1	0	0	0	0	0	0
12	4	0.1	0	1	0	0	0	0	0
		1	2	1	0	0	0	0	0
48	4	0.1	0	0	0	0	0	2	1
		1	0	0	3	3	2	3	
		10	1	2	1	1	0	0	
		50	3	2	0	0	0	0	

Table 4 雄レシピエントへの雌後肢移植後の移植肢のキメリズム

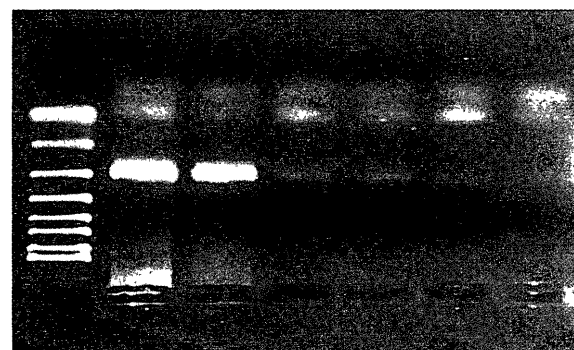


Fig. 5 移植肢中のグラフトキメリズム

II 群 (雌ドナーから雄レシピエントへの後肢移植) での移植後48週後のPCR所見

- Lane 1. DNA ladder.  
 2. Femur ; distal to bone junction, not included host bone  
 3. Tibia  
 4. Leg skin  
 5. Plantar skin  
 6. Toe  
 7. Gastrocnemius muscle

### 4) 移植肢中のグラフトキメリズム (表 4)

雄レシピエントに対する雌の後肢移植では、移植後1週で移植肢の脛骨にわずかなレシピエント細胞が認められたが、下腿, 足部皮膚, 腓腹筋, 足趾には認められなかった。4週を過ぎると大腿骨および

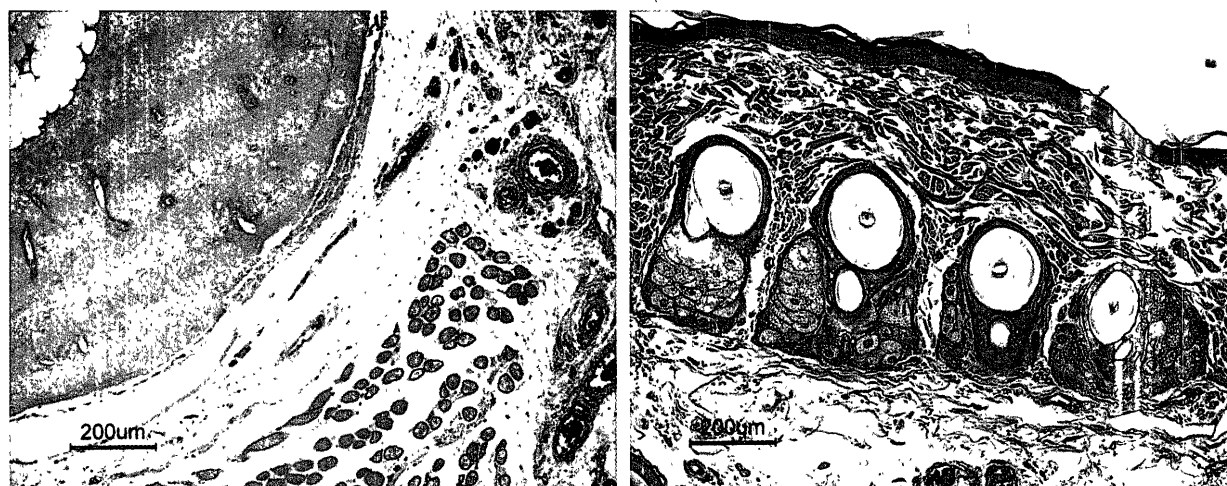


Fig. 6 後肢移植後の移植肢中央部の横断面での所見

雄の後肢を雌に移植した場合の移植後12週の所見である。図の左は骨や筋肉部を図の右は皮膚の部分の所見を示している。骨、皮膚、筋肉など各構成体に炎症細胞浸潤など拒絶を疑う所見は全く認めなかった。また、H-Y抗原による拒絶で特徴的である微小血管の内膜肥厚や炎症細胞浸潤は全く認められなかった。

脛骨でレシピエント細胞の比率が徐々に増加し、48週では大腿骨では50%、脛骨では10-50%がレシピエント細胞に置換されていた(図5)。下腿、足部皮膚には12週までレシピエント細胞の存在は認められなかったが、48週では1-10%がレシピエント細胞に置換されていた。腓腹筋は12週までは皮膚同様にレシピエント細胞の存在は認められなかったが、48週では1%程度がレシピエント細胞に置換されていた。足趾は骨と皮膚の複合組織と考えられるが、48週では1%程度がレシピエントに置換されていた。

#### 組織学的所見

移植足中央部の横断面では、骨、皮膚、筋肉など各構成体に炎症細胞浸潤など拒絶を疑う所見は全く認められなかった。また、H-Y抗原による拒絶に特徴的である微小血管の内膜肥厚や炎症細胞浸潤は全く認められなかった(図6)

## 考 察

#### 細胞標識の方法論

本研究の目的であるキメリズムの解析に必須の実験手法としてドナーとレシピエントの細胞標識がある。これまで臓器移植後のキメリズムを解析するために多くの細胞標識が試みられてきたが、その方法論には議論が分かれる。

Adams<sup>2)</sup>は、全身性キメリズムの診断にはレシピエント内でのドナー細胞の存在をFlow Cytometryらの古典的な方法によって証明するのではなく、より信頼性における分子生物学的手法によって証明することが不可欠であると述べている。PCR法は非常に少量のDNAを特異的かつ鋭敏に検出でき、移植研究には欠かせない手法となっている。Tashiroら<sup>5)</sup>は、性別不一致のラット間で肝移植実験を行い、Y染色体プライマーを用いたPCR法でキメリズムを評価し、雄DNAを検出できる最低濃度は1:10<sup>3</sup>(0.1%)であったと報告している。本研究の方法はTashiroらの方法に準じたPCR法であるが、確実な結果を得るためにプライマーのデザインを改良した。Shirwanら<sup>6)</sup>はLewisラットを用いた心移植実験で、Lewis T細胞Cb遺伝子特異的プライマーを用いたPCR法を報告している。Elwoodら<sup>7)</sup>は臨床例においてHLA DR遺伝子を増幅するため2段階のNested PCR法を用いている。何れの方法もドナー細胞を検出する最低濃度は1:10<sup>3</sup>であり、その検出感度は本研究の方法とほぼ同等である。

臓器移植後のグラフトキメリズムについて、これまでその解析方法に言及した報告は非常に少ない。Porter<sup>8)</sup>は、肝移植患者においてKaryotyping Techniqueを用いて移植肝内のドナー細胞とレシピエント細胞を鑑別しているが、これには細胞がMetaphaseの段階でなければならないという欠点がある。Sedmakら<sup>9)</sup>は腎移植患者で移植腎の血管内

皮細胞の置換を血液型抗原に対する免疫組織学的手法を用いて解析しているが、これにはドナーとレシピエントの血液型が異なる事が必然であり、血液型が存在しない動物実験には応用が不可能である。Hrubanら<sup>10)</sup>は性別が異なる間での心臓移植患者でY染色体に対するProbeを用いたIn Situ Hybridization Techniqueを応用している。組織学的にドナー細胞とレシピエント細胞を識別するためにはHrubanらの分子生物学的手法を用いた方法が最も確実な方法と考えられる。しかし、骨組織に対するIn Situ Hybridizationは脱灰操作が加わるため技術的に極めて困難であり、またラットのY染色体プローブはいまだ市販として製品化されていない。さらに正常雄細胞に対するY染色体のHybridization率はほぼ100%に近いであろうが、薄切切片では核も薄切されており、Hybridization率は低下するものと考えられる。本研究におけるY染色体プライマーを用いたPCR法は、技術的に容易で1回の反応で完了し、雄細胞と雌細胞の比を定量解析するのに信頼が置ける方法である。しかし、どのドナー細胞がレシピエント細胞に置換されたかという組織学的所見が評価不可能であるため、今後トランスジェニック動物を用いて解析していく必要がある。

#### 四肢移植におけるH-Y抗原の発現

同種移植において性別の差によるH-Y抗原の発現は皮膚移植や肝移植ではすでに拒絶発症の研究で確認されている。Eichwaldら<sup>11, 12)</sup>は、マウス皮膚同種移植ではH-Y抗原は必ず発現し、移植皮膚は拒絶される事を示した。Chenら<sup>13, 14)</sup>は、ラット皮膚移植では系統の相違はあるもののH-Yの違いにおける移植は高率に拒絶される事を報告している。H-Y抗原の発現は動物種や移植臓器に特異的であり、これまで四肢移植に関しては全く未知であった。

今回の結果では、四肢移植モデルでは少なくとも移植後1年まではH-Y抗原の発現は認められず、移植四肢の拒絶は骨、筋肉、皮膚など各構成体ともに生じていなかった。H-Y抗原の発現は植皮という移植法では生じるが、皮弁という移植片の血行を保った移植法では生じないのかもしれない。その理由の1つとして安定した全身性キメリズムの成立が推測される。皮膚移植は四肢移植と異なり移植片中に骨

髄などのキメリズムを成立させる供給細胞を有していないため、レシピエント内に安定したキメリズムを得ることは不可能である。四肢移植後に成立したキメリズムは移植後1年で胸腺などリンパ器官全てに認められたため、Minor抗原の発現が無く寛容状態になったのかもしれない。Matenzingerら<sup>15, 16)</sup>は移植片への手術侵襲が抗原性を増幅させるというDanger説を提唱している。植皮では皮膚を剥切する事となり手術侵襲は著しいが、四肢移植という形での移植となると皮膚そのものに対する侵襲は切開部位を除けばほとんど無く、H-Y抗原が発現しないのかもしれない。今後、大型動物を用いた追加実験が待たれる。

#### 四肢移植後のドナー細胞のレシピエント内分布

これまで臓器移植の実験的研究では、全身性キメリズムは移植片が生着すれば高頻度に成立することが報告されている。しかし、免疫寛容が得られた場合キメリズムの程度や分布には大きな違いがあり、この原因は移植組織の種類に大きく関与すると考えられている。Tashiroら<sup>5)</sup>はラット肝移植実験において、移植後60日で移植肝が生着すれば100%にキメリズムが成立したことを報告している。

Furukawaら<sup>17)</sup>はラット心移植実験において、キメリズムは認められなかったと報告している。本実験の四肢移植モデルでは、移植後2ヶ月を経過すると高率に全身性のキメリズムが認められた。四肢の構成体である骨組織は多くの未分化間葉系細胞を骨髓内に含んでいるため、ドナー細胞のレシピエント血流中への遊走は心移植など他の臓器移植と比較すると、より高頻度であると思われる。

今回の実験ではレシピエント内でキメリズムの成立する臓器や組織分布については興味ある結果が得られた(表2, 3)。脾臓でのキメリズムは8週で2/4となり、12週では0/4と低下し48週では3/4と再度増加するといった2つの波を持つ結果となった。Uedaら<sup>18)</sup>は肝移植後のキメリズム成立は移植後早期に上昇するキメリズムはドナー内の成熟血球細胞がレシピエントの血行循環に入ると報告している。次に、第2波は移植後後期に生じ、ドナー内の未分化間葉系細胞が放出されこれがトランスを導入すると説明している。今回の8週で脾臓に見られたキメリズムはこの早期のキメリズムに相当

し成熟血球細胞が脾臓のフィルター効果で取り込まれたものと考えられる。その後、12週でキメリズムは低下するが48週では未分化間葉系細胞がドナー細胞から放出され胸腺など各リンパ器官に移動したものと考えられる。これはドナーが未分化間葉系細胞を含んでいる場合に見られる特有の現象と考えられ、肝臓や四肢の移植でのみ起こるキメリズムであると考えられた。

前述のTashiroら<sup>5)</sup>の肝移植実験では、ドナー細胞はリンパ節や脾臓では認められたが胸腺では見つからなかったと報告している。Suberbielleら<sup>19)</sup>は腎移植実験でドナー細胞がレシピエントの皮膚内で認められたと述べている。本実験結果では、胸腺、脾臓、肝臓内キメラが成立することを示した。Starzl<sup>20)</sup>やCharltonら<sup>21)</sup>はドナー細胞がレシピエント胸腺内に駐留することがレシピエントのAlloractive T細胞の不活性化をもたらすと述べており、この胸腺内キメラは免疫寛容の導入に関して重要な現象と考えられる。

移植後1年で、ドナー細胞がレシピエントの健側脛骨や上腕骨に認められたのは非常に興味深い。Pittengerら<sup>22)</sup>は骨髄に含まれる未分化間葉系細胞は四肢構成組織へ多様に分化する可能性を示しており、この結果からドナー移植骨中の骨髄がレシピエントの骨組織の再構築に伴う骨起源細胞を供給していると考えられた。

後肢移植は骨髄移植と同じ働きをすると考えられる。しかし、Fosterら<sup>23)</sup>が指摘するとおり、骨髄移植の場合は細胞を直接移植するために高度のキメリズムが生じるためFlow cytometryの評価では骨髄移植後のキメリズムの濃度はほぼ60%以上であった。しかし、われわれのPCRの評価では四肢移植のデータではキメリズムの濃度は10%以下であった。評価の違いはあるが両者間（骨髄移植と四肢移植）ではキメリズムの濃度に大きく相違があるようであった。さらにFosterら<sup>23)</sup>は骨髄移植後に四肢移植を行い免疫寛容を導入した。このことから四肢移植は骨髄のキャリアーではあるが、骨髄移植と比較して十分な骨髄の供給には至らないと考えられる。Suzukiら<sup>24)</sup>はラット大腿骨を血管柄付きで移植して骨髄移植のモデルとしているが、キメリズムの成立は確認されたものの、同種移植での生着は得られていないと報告している。この結果もキメリズムの

濃度が不十分であるという裏付けかもしれない。

#### 四肢移植後における移植片内の各構成細胞の置換

四肢移植片内の各構成細胞のレシピエント細胞による細胞置換現象は非常に興味深い結果である。このグラフトキメリズムについては、これまで臓器移植ではむしろ興味の対象とは考えられていないのか多くの論文を見ない。Porter<sup>25)</sup>は、肝移植患者において移植肝内の肝細胞と大血管の内皮血管は長期にわたりドナー起源性を持続するが、クッパー細胞などのマクロファージ系の細胞は早期にレシピエント由来の細胞に置換されると述べている。肝細胞は移植肝内での分裂増殖が可能で、レシピエント由来の細胞に置換されることなく永久的にドナー細胞は生存すると考えられる。Hrubanら<sup>10)</sup>は心移植患者で移植心のマクロファージ、浸潤リンパ球、マスト細胞などはレシピエント由来であるが、心筋細胞、血管平滑筋細胞、大部分の血管内皮細胞は永久的にドナー由来である事を示した。心筋細胞は人では生涯にわたって同一細胞が生存し続け、レシピエント細胞による置換が進行しないのかもしれない。

骨組織は、生涯常に基質再構築と細胞置換を継続する特異な組織である。骨起源細胞は、骨髄や骨膜中の未分化間葉系細胞という異所性の起源から供給される。本実験では四肢移植片内の同種移植骨の細胞置換過程を明らかにした。移植手術による骨切り操作や移植術自体がこの骨再構築や細胞置換を促進し、新たに導入された骨起源細胞が骨癒合を促進すると考えられる。移植後1年では移植骨中の骨細胞は約50%がレシピエント細胞で置換されていた。この結果は、置換を受けた骨細胞は拒絶の標的から免れる事を意味している。

筋組織は障害を受けた場合、自己再生、自己修復を行う骨とは恒常性維持の過程が相反する組織である。これまでの古典的概念では、障害筋にはまずマクロファージが侵入し放出されたサイトカインが筋衛星細胞を刺激する事で筋組織への分化誘導遺伝子が発現するとされている。この再生過程は全て障害筋あるいは隣接筋内でのみで生じている事で、異所性の筋再生を援助する細胞の侵入は無いとされていた。しかし、近年心筋再生などの実験では異所性の骨髄細胞が再生の一部を司る事が証明されている<sup>26)</sup>。また、筋ジストロフィでは慢性的に筋破壊が生じ、

その障害程度に近い筋再生が生じているが、次第に筋再生が破壊に追いつかなくなり、筋衛星細胞の枯渇が生じる。これに対して筋再生幹細胞を供給し筋再生を促す試みがなされ、近年筋衛星細胞などの筋組織幹細胞には僅かながら未分化間葉系細胞からの供給経路があることが明らかとなった。本実験で移植された後肢の筋組織ではまさしく筋組織幹細胞の枯渇状態なのかもしれない。手術操作による侵襲、虚血による虚血再還流障害と筋の部分壊死、神経切断による脱神経等により移植筋組織の障害は著しいと考えられる。再生が始まりつつある筋組織は何らかの筋再生を司る細胞を異所性起源から誘導しても全く不思議な現象ではないと推察される。

皮膚はある程度の障害を受けても障害部位の皮膚組織内で自己修復が可能であり、再生過程は筋組織に類似した組織である。皮膚の組織幹細胞は毛根内の立毛筋根部のBulgeと呼ばれる部位に集属している。Bulge細胞は基底細胞、ケラチン細胞のみならず汗腺や毛母細胞への分化が可能で、いわば皮膚組織の全細胞への起源となっている。皮膚は恒常性を保つ手段として、この皮膚幹細胞が生涯分化し、細胞新生を繰り返していると考えられてきた<sup>27, 28, 29)</sup>。熱傷などで皮膚が傷害された場合、残存する毛根から皮膚再生が生じてくる事からも大いなる再生能力は疑いの余地は無い。今回の結果でドナー皮膚細胞の一部がレシピエントの細胞に置き換わっていた事は非常に興味深い。PCRによる解析で細胞の種類を同定する事は不可能であるが、2つの可能性があると考えられる。1つは近年の再生医学の発展により解明されつつある異所性骨髄細胞によるBulge細胞への細胞供給の可能性である。この細胞供給経路は古典的には考えられなかった概念である。もう1つはメラニン細胞やランゲルハンス細胞等、起源をBulge細胞とは異なる細胞の侵入である。特にランゲルハンス細胞は、その起源は異所性の骨髄であると考えられており、細胞密度などを考慮するとこの細胞が皮膚組織の再生にかかわることは大いに可能性がある。今後、細胞同定を目的とした細胞標識法を用いた組織学的解析が待たれる。

## 要 旨

四肢移植後のキメリズムについて分子生物学的的手法を用いて解析した。実験動物は純系ラットであるLEWラットを用い、血管柄付き後肢移植を行った。実験は性別の異なるラット間で血管柄付き脛腓骨移植を行い、Mixed Chimerismの評価としてY染色体遺伝子の特異的に増幅、検出するPolymerase Chain Reaction (PCR) を用いた。移植後3ヶ月までの観察では、ドナー細胞はレシピエントのリンパ器官に移動しており、レシピエント内では安定したキメリズムが成立していた。ドナー骨組織は徐々にレシピエント細胞に置換されており、皮膚や筋肉などの軟部組織にもレシピエント細胞が認められた。四肢移植はグラフト内に骨髄などレシピエントへの細胞供給可能な組織を含む移植であるため、キメリズムの成立は安定し、免疫学上有利な移植組織となると思われた。骨はその再構築過程において骨髄内による未分化間葉系細胞という異所性にその起源細胞を求める特異的な組織であるため、レシピエントからの細胞置換が早期に進行しやすいと考えられた。さらに、本研究においては自己再生によって恒常性を保つ筋肉や皮膚組織にもキメリズムが成立する可能性を示した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました河合伸也教授に深謝致します。また、本研究遂行に際し、直接御指導下さった整形外科学講座 村松慶一博士、ならびに山口大学医学部高次統御系・整形外科学講座教室員各位に心より謝意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) Remuzzi G. Cellular basis of long-term organ transplant acceptance: Pivotal role of intrathymic clonal deletion and thymic dependence of bone marrow microchimerism-associated tolerance. *Am J Kidney Disease* 1998; 31: 197-212.
- 2) Adams DH, Hutchinson IV. Microchimerism and graft tolerance: cause or effect? *Lancet*



- 1997 ; **349** : 1336-1337.
- 3) Kashiwagi N, Porter KA, Penn I, Brettschneider L, Starzl TE. Studies of homograft sex and of gamma globulin phenotypes after orthotopic homotransplantation of human liver. *Surg Forum* 1968 ; **20** : 374-376.
  - 4) Zhao J, Araki N, Nishimoto SK. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 1995 ; **155** : 159-165.
  - 5) Tashiro H, Fukuda Y, Hoshino S, Furukawa M, Shintaku S, Dohi K. Monitoring for engraftment following rat orthotopic liver transplantation by in vitro amplification of Y-chromosome gene using polymerase chain reaction. *Cell Transplant* 1995 ; **4** : S61-63.
  - 6) Shirwan H, Wang HK, Barwari L, Makowka L, Cramer DV. Pretreatment injection of allograft recipients with donor blood or lymphocytes permits allograft tolerance without the presence of persistent donor microchimerism. *Transplantation* 1996 ; **61** : 1382-1386.
  - 7) Elwood ET, Larsen CP, Maurer DH, Routenberg KL, Neylan JF, Whelchel JD, O'Brien DP, Pearson TC. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet* 1997 ; **349** : 1358-1360.
  - 8) Porter KA. Pathology of the orthotopic homograft and heterograft. In : Starzl TE, ed. Experience in hepatic transplantation. Philadelphia : WB Saunders, 1969 : 464-465.
  - 9) Sedmak DD, Sharma HM, Czajka CM, Feuguson RM. Recipient endothelialization of renal allografts. *Transplantation* 1988 ; **46** : 907-910.
  - 10) Hruban RH, Long PP, Periman EJ, Hutchins GM, Baumgartner WA, Baughman KL. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol* 1993 ; **142** : 975-980.
  - 11) Eichwald, E. J., Davidson, N. Male-specific graft rejection of mouse tumours and the Y chromosome. *Folia Biol (Praha)* 1968 ; **14** : 89.
  - 12) Eichwald, E. J., Silmsler, C. R. H-Y and serendipity. *Hum Genet* 1981 ; **58** : 6.
  - 13) Chen, H. D., Silvers, W. K. Studies on the behavior of H-Y incompatible skin grafts in rats. *J Immunol* 1982 ; **128** : 2044.
  - 14) Chen, H. D., Silvers, W. K. Major histocompatibility complex restriction and cross-priming of H-Y antigen in rats. *Transplantation* 1991 ; **51** : 259.
  - 15) Matzinger, P. The danger model : a renewed sense of self. *Science* 2002 ; **296** : 301.
  - 16) Matzinger, P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998 ; **10** : 399.
  - 17) Furukawa M, Fukuda Y, Tashiro H, Ohdan H, Hoshino S, Shintaku S, Itou H. Analysis of PCR microchimerism induced by intrathymic inoculation of donor alloantigens in rats. *Cell Transplant* 1996 ; **5** : S75-S77.
  - 18) Ueda M, Hundrieser J, Hisanaga M. Development of microchimerism in pediatric patients after living-related liver transplantation. *Clin Transplant* (in press) .
  - 19) Suberbielle C, Caillat-Zucman S, Legendre C, Bodemer C, Noel LH, Kreis H, Bach JF. Peripheral microchimerism in long-term cadaveric-kidney allograft recipients. *Lancet* 1994 ; **342** : 1468-1471.
  - 20) Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992 ; **339** : 1579-1582.
  - 21) Charlton B, Auchincloss H Jr, Fathman CG. Mechanism of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol* 1994 ; **12** : 707-734.
  - 22) Pittenger MF, Mackay AM, Marshank DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; **284** : 143-147.

- 23) Foster RD, Ascher NL, McCalmont TH, Neipp M, Anthony JP, Mathes SJ. Mixed Allogeneic chimerism as a reliable model for composite tissue allograft tolerance induction across major and minor histocompatibility barriers. *Transplantation* 2001 ; **72** : 791-797.
- 24) Suzuki H, Narendra Patel, Martha Matthews, Anthony J, Del Rossi, Edward J. Doolin, Charles W. Hewitt. Vascularized Bone Marrow Transplantation : A New Surgical Approach Using Isolated Femoral Bone/Bone Marrow. *J Surgical Research* 2000 ; **89** : 176-183.
- 25) Porter KA. Pathology of the orthotopic homograft and heterograft. In : Starzl TE, ed. Experience in hepatic transplantation. Philadelphia : *WB Saunders*, 1969 : 464-465.
- 26) Ferrari G., Cusella-DeAngelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998 ; **1529** : 1528-1530.
- 27) Potten C.S. Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *Investigative Dermatology* 2002 ; **104** : 888-899.
- 28) Oshima H., Rochat A., Kedzia C., Kobayashi K., Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001 ; **104** : 233-245.
- 29) Rochat A., Kobayashi K., Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994 ; **76** : 1063-1073.

## Detection of Chimerism Following Rat Limb Allograft

Ryutaro KURIYAMA  
(Director : Prof. Shinya KAWAI)

*Dept of Orthopedics. and. Human Science, Yamaguchi University School of Medicine,  
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

### SUMMARY

Chimerism following rat limb allograft was assessed by a technique of molecular biology. Genetically inbred LEW rats with a defined major histocompatibility complex were used and their vascularized whole-limb transplantations were performed between pairs of rats sex-mismatched. A semi-quantitative polymerase chain reaction for Y-chromosome following the sex-mismatched whole-limb transplantations enabled us to identify the donor-derived (male to female transplantation) or the recipient-derived (female to male transplantation) cells. The donor cells were detected in recipient lymphoid tissues at 48 weeks after the transplantation and microchimerism was concluded in recipient tissues. The donor cells in the grafted bone, skin and muscle were gradually repopulated with the recipient-originated cells. Because limb allograft tissues include the bone marrow, a source of cell-supply, systemic microchimerism is concluded in recipient tissues and limb allograft tissues are immunologically useful. Since bone is a unique for generating the organ with mesenchymal cells in the process of its reconstruction, an interchange of cells from recipient progresses in the early stage. This study indicates that organs of muscle and skin which maintain their constancy by self-regeneration, also show the potentiality of graft chimerism.