Parabiosis 法による皮膚移植の実験的研究

第1編 Parabiont の血液所見について

兼 松 宜 武

Studies on allograft in adult rat parabiont

I. Hematological changes of parabiont.

Nobutake KANEMATSU

緒 言

近年、臓器移植に関する研究が進み、医学においては、角膜、心臓、腎臓、皮膚、歯学においては、歯牙などの移植の試みがなされ、臨床的にもその方法が確立され、かなりの成功をおさめている。しかし、自家および一卵生双生児などの特殊な場合を除いては、長期の移植は成立しがたいといわれている。このことは“移植免疫”による拒否反応が完全に除去されるような方法が確立されていないためである。また、皮膚全層移植においては広範囲の移植は、自家、他家移植ともに困難とされ、主として中間層または表層の皮膚移植がおこなわれているのが現状である。しかし、皮膚表層および中間層の採取は皮膚全層にくらべて困難であり、時には移植した皮膚の変色をおこす場合がある。

そこで著者は、皮膚全層移植に際してかなり大きな移植片を移植可能ならしめる方法として、さらに他家移植において大量の抗原を投与することにより容易に免疫学的寛容を導入し得るといわれている parabiosis¹⁾⁻¹⁰⁾に注目し、rat における主要なる組織適合性因子とみなされている“R抗原”の明らかな系統の rat を用いて parabiosis 実験をおこない、同種同系皮膚移植ならびに同種異系皮膚移植における皮膚全層移植の可能性、および parabiosis をおこなうことによって生じる免疫応答反応が parabiosis rat (parabiont) の全身状態に与える影響について、血液学的検索をおこない興味ある所見を

得たので報告する。

実験材料ならびに実験方法

A 実験材料

a. rat の系統と R 因子

1) Wistar/Mk 近交系 (以下 W/Mk と略)

Wistar 研究所の Wistar rat を北大理学部が入手し、1944年以後牧野教室で兄弟交配により近交系にしたもので、すでに69世代に達している。その rat はすべて R⁺因子を持っていることが明らかにされている¹¹⁾¹²⁾。

2) Fisher-344 近交系 (以下 F/NMk と略)

Dwango 研究所から Dr. Heston および Dr. Joy の手を経て1956年以後牧野教室に移入し、系統保存している近交系で109世代に達している。その rat はすべて R⁺因子を持っていることが明らかにされている¹¹⁾¹²⁾。

以上2系統の rat で生後49~50日 (7週令) 体重150~200g の雄 rat を使用した。

B 実験方法

a. parabiosis の作成法

Parabiosis の作成には、Sauerbruch-Heyde 法¹³⁾、Hill 法¹⁴⁾、Bunster-Meyer 法¹⁵⁾ などいろいろあるが、実験動物への外科的侵襲を出来るだけ少なく、かつ術後固定が確実に出来るように Bunster-Meyer 法を準用した。

体重差10%未満の rat を選び、エーテル麻酔後生理食塩水で10倍に希釈したネブタールを 0.01ml/gm 腹腔内に注入する。そのうち2匹の rat を平行に並べて背側と腹側を電気バリカンで剃毛、局所を5% ヒビテン液で消毒する。

右側 rat の左肩甲骨部から左腸骨部までの線を想定して、その想定線まで背側から基底を腹側においた縦 2cm、横 4cm の矩形に皮膚を全層剥離し、移植弁を作成する。同様に左側 rat の右肩甲骨部から右腸骨部への想定線まで腹側から基底を背側においた 2×4cm の矩形の全層皮

岐阜歯科大学口腔外科学教室第2講座 (主任: 柴田寛一 授)

大阪歯科大学理工学教室・組織培養室 (主任: 川原春幸教授)
Second Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry (Chief: Prof. Kanichi Sibata)

Department of Dental Materials・Tissue Culture Center, Osaka Dental University

(Chief: Prof. Haruyuki Kawahara)

受付 昭和50年5月15日

膚弁を作成し、右側 rat の皮膚弁を左側 rat の腹膜に重ね、左側 rat の皮膚弁を右側 rat の腹膜に重ねて、右側 rat の皮膚弁の遊離縁と左側 rat の創縁を、同様に左側 rat の皮膚弁の遊離縁と右側 rat の創縁を縫合した。皮膚弁の大きさは免疫の寛容の導入、外科的侵襲を考慮して $2 \times 4 \text{ cm}$ とした。固定は両者の相対する肩甲骨部と腸骨部の皮膚を銀線で固定した。組織観察用の parabiosis rat には、parabiosis の最中に皮膚交換部に加わる機械的刺激が出来るだけ少なくなるように特別の固定装置を用いた。術後水溶性ペニシリン 20 万単位を 10ml の生理食塩水に溶かして手術部の洗滌後 2ml ずつ腹腔内に注入した(写真1)。

写真1 Parabiosis をおこなった rat

飼育は mouse 用ケージ $20 \times 16 \times 15 \text{ cm}$ 大のものをを用い、飼料は日本クレア株式会社製、rat 飼育用固型飼料(CE-2)を術後1頭につき1日10箇(約15g)与えた。飲料水は給水瓶で水道水を毎日交換して与えた。排泄物の処理は毎日おこなった。実験は原則として春秋におこなったが、夏期、冬期におよんだ時は室温を $20 \sim 25^\circ \text{C}$ に保つようにした。

b. 測定事項ならびに測定方法

W/Mk と F/NMk の parabiosis を以下の2群に分けておこなった。

第1群: W/Mk と F/NMk 11組。

第2群: W/Mk と W/Mk 5組。

なお、対照群として W/Mk と F/NMk を固定のみ parabiosis rat と同様におこなった。parabiosis の期間には皮膚移植弁が完全に相手の移植部に生着すると思われる2週間おこない、以下の事項について検索した。

1) 各群 parabiosis rat の全身所見と接合部所見

parabiosis rat の術前、術中の全身所見を目、耳、尾、四肢等を主として観察し、rat の多血症、貧血症の有無と程度、背の彎曲の状態、衰弱の程度、痙攣の有無、糞の状態等を毎日肉眼で観察した。なお、皮膚接合部の所見は、同様に肉眼的に皮膚色、感染の有無、脱毛と発毛の有無を毎日観察した。

2) 各群 parabiosis 中毒の発見率と発現期間ならびに死亡率

肉眼的に parabiosis rat が明らかに貧血状態になったと思われる時期を parabiosis 中毒として経目的に発見日、発現率および発現期間を求めた。

3) 各群 parabiosis rat の体重の変化

各群 parabiosis rat の体重を、術前、術中にわたり毎日ほぼ同時刻に動物用体重計によって計測した。parabiosis 中は parabiosis rat を別個に計測することは困難なため2匹の合計を計測し、死亡時または parabiosis rat 実験終了時に別個に計測し、体重の増加率、減少率ならびに脾臓重量と脾臓重量比を算出した。脾臓重量比は 脾臓重量/死亡時 rat 体重 で求めた。

4) 各群 parabiosis rat の血液学的所見

術前と術後2日目、7日目、14日目に rat の尾を切断して約 0.5cm 採血、0.1g の EDTA と混和後実験に供した。

(a) 赤血球数の変動: メランジュールにて 0.2ml 採取、10ml の生理食塩水を加えて振盪器(サーモミックス TM 100 型)にて混和後、自動カウンター器(東和マイクロ cell カウンター 107)にて計測した。

(b) 血色素量の変動: シアンメト・ヘモグロビン法でおこなった。すなわち、採血した血液 0.2ml をシアンメト液 5ml に溶かし、モルマンの比色計で計測した。

(c) ヘマトクリット値の変動: ヘパリン処理した長さ 75mm の毛細管(Drummond Scientific Co.)で採血し、クボタヘマトクリット用遠沈器で11,000回転、5分間遠心ののち計測した。

(d) 白血球数の変動: 赤血球数の計測の方法に準じておこなった。

(e) 血液像の変動: 塗末標本作成ののちギムザ染色をおこない、鏡検にて計測した。

(f) 血清蛋白量の変動: 毛細管で採血し、室温で30分間以上放置し、3,000回転、15分間の遠心沈殿により、血清を分離し、蛋白計(ツカサ、PRP-B 型)にて計測した。

(g) DISC 電気泳動による血清蛋白の分画 Ornstein¹⁶⁾ および Davis¹⁷⁾ の方法に準じてゲル溶剤の作成、およびゲルの混合比などを決定し、それ以後の操作および定量は阿部¹⁸⁾の方法を用いた。

5) 各群 parabiosis rat の色素移行試験

Parabiosis rat の皮膚接合部を通じて、血液成分および体液成分の交流の有無を観察する目的で、parabiosis 2週間目の rat の皮膚交換側の腹腔内に、3% エバンスブルー液を5倍に生理食塩水で希釈して 2ml 注入した。実験は第1群、第2群とも5組ずつおこなった。判定は注入後12時間、および24時間後に肉眼で片側の rat からペアーの rat への色素の移行を皮膚接合部および全身への着色の程度で判定した。

実験結果

1) 各群 parabiosis rat の全身所見と接合部所見
Parabiosis された rat は術後、一方の rat が貧血症の状態となり、他方が多血症の状態となるいわゆる parabiosis 中毒になる場合がある。parabiosis 中毒は第1群に多く見られ、貧血症の状態になった rat は体重の減少を来とし、立毛、羸瘦、下痢などの症状を呈し、重症の場合は死亡する例が見られた。貧血症および多血症は目、耳に著明に観察され、その他、手肢、尾にも見られた。対照群の rat では2匹の rat が結紮されることによる運動障害および食物摂取困難等により多少衰弱が見られるが、以後この状態になれて回復を来とし毛のつやなどの状態も良くなった。

接合部の所見は、第1群、第2群とも移植直後の皮膚弁は軽度の貧血状態を呈しているが、その後正常な皮膚色になる。しかし、rat が多血症の状態、貧血症の状態になるとその影響を受けて同じく多血、貧血の状態を呈した。外力により縫合部の剥れた症例、ならびに感染した症例は本実験群より除外した。組織検索用に固定した rat では皮膚接合部の剥れは見られなかった。発毛は第

1群、第2群とも8日目位から見られ、皮膚接合部は第1群、第2群ともに8〜10日目に接合がなされた。

2) 各群 parabiosis 中毒の発現率と発現期間ならびに死亡率

parabiosis 中毒の肉眼的な発現率は、第1群 W/Mk においては11頭中10頭 (90.9%)、F/NMk では11頭中5頭 (45.5%) の発現率を示している (表1)。

図1 Parabiosis 中毒発現期間
I : 第1群 (Wistar/Mk × Fisher-344), II : 第2群 (Wistar/Mk × Wistar/Mk), C : 対照群, □ : parabiosis の期間, // : parabiosis 中毒の期間, ● : 死亡 rat, ○ : 屠殺 rat

写真2 Parabiosis 中毒が出現した rat, 向かって左側の rat の目に貧血の出現が見られる

表1 Parabiosis 中毒発現率ならびに死亡率

Rat の組み合わせ	実験 ペアー数	実験頭数	中毒発現率					死亡率		
			発 現 ペアー数	発 現率 (%)	発 現頭数	発 現率 (%)	発 現日数	死亡頭数	死亡 率 (%)	死亡日数
第1群 W/Mk F/NMk	11	11	*4	*36.4	10	90.9	4, 4, 4, 4, 6, 6, 6, 6, 10	4	36.4	5, 5, 5, 6
		11	*7	*63.6	5	45.5	4, 4, 5, 5, 5	1	9.1	6
第2群 W/Mk 右側 W/Mk 左側	5	5	0	0	0	0		0	0	
		5	0	0	0	0		0	0	
対照群 W/Mk F/NMk	5	5	0	0	0	0		0	0	
		5	0	0	0	0		0	0	

※ 2頭とも Parabiosis 中毒を呈したペアー W/Mk : Wistar/Mk 近交系 F/NMk : Fisher-344 近交系。 * どちらか1頭が Parabiosis 中毒を呈したペアー

表 2 体重の変動

日数		0	3	6	9	12	14(日)	初日体重 (g)	死亡時 体 重 (g)	体 重 増加率 (%)	死亡時 脾重量 (g)	脾 臓 重量比 (×1000)
実験群												
14 日間 生存 例	第 1 群	321.8▼ ±14.0	301.5 ±16.2	303.0 ±16.6	308.0 ±23.3	317.3 ±22.5	323.3 ±20.7	W/Mk 170.0 ±8.2	168.8 ±13.6	99.0 ±5.3	0.56 ±0.04	3.5 ±0.5
								F/NMk 151.8 ±6.1	154.5 ±8.0	101.8 ±2.7	0.46 ±0.09	3.0 ±0.2
	第 2 群	262.0 ±8.7	258.3 ±7.3	274.3 ±9.8	286.3 ±9.5	289.3 ±21.1	294.0 ±14.2	※W/Mk 128.3 ±4.3	151.0 ±7.0	117.6 ±2.1	0.32 ±0.02	2.1 ±0.07
								*W/Mk 133.7 ±3.5	143.0 ±7.8	107.3 ±3.1	0.29 ±0.03	2.0 ±0.1
	対 照 群	301.3 ±25.2	282.7 ±26.4	292.0 ±16.5	316.0 ±20.3	325.7 ±20.3	336.0 ±28.6	W/Mk 150.0 ±15.5	174.3 ±13.2	115.4 ±3.5	0.38 ±0.09	2.2 ±0.2
								F/NMk 151.3 ±9.8	161.7 ±13.3	106.7 ±3.2	0.41 ±0.02	2.6 ±0.3
早期 死亡 例	☆W/Mk 死 亡 群	262.8 ±8.2	184.3 ±7.8	166.3 ±7.2				W/Mk 132.3 ±3.7	81.0 ±8.8	60.9 ±5.0	0.10 ±0.02	1.3 ±0.3
								F/NMk 130.5 ±4.9	94.5 ±4.3	72.8 ±1.2	0.17 ±0.03	1.8 ±0.2
	★F/NMk 死 亡 群	297.0	261.0	239.0				W/Mk 154.0	126.0	81.8	0.19	1.5
								F/NMk 143.0	113.0	79.0	0.17	1.5

☆ Wistar/Mk が死亡し Fisher-344 が同時に屠殺された群   ★ Fisher-344 が死亡し Wistar/Mk が同時に屠殺された群   ※ 7日目の赤血球数が相手より少ない Wistar/Mk   * 7日目の赤血球数が相手より多い Wistar/Mk   W/Mk: Wistar/Mk 近交系   F/NMk: Fisher-344 近交系   ▼ 平均値 ± S. E.

第2群、対照群に parabiosis 中毒の発現は見られなかった。発現期間は W/Mk, F/NMk とともに4〜6日以後に parabiosis 中毒が発現し、14日まで継続している。なお、14日以前に parabiosis 中毒の消失した例が、W/Mk 2頭 (18.2%), F/NMk 4頭 (36.4%) に見られた。parabiosis rat の死亡日数は術後5〜6日に死亡し、死亡率は第1群 W/Mk 11頭中4頭 (36.4%), F/NMk 11頭中1頭 (9.1%) である (表1, 図1)。

3) 各群 parabiosis rat の体重の変化

parabiosis rat の体重の変化は、14日間生存ベアーにおいては実験群、対照群ともに良く似た傾向を示し、術後6日目までは体重の減少が見られるが、1週間をすぎると体重の増加する傾向が見られた。体重の減少は第1群よりも第2群や対照群の方が少ない。第1群の W/Mk が平均値において F/NMk よりわずかに減少している。14日以前に死亡したベアーの例においては、14日間生存例よりも体重の減少が著しかった。また、W/Mk の方が F/NMk よりも体重の減少が著明であった。

脾臓重量については、第1群14日間生存例の rat は、第2群、対照群よりも脾臓重量が重く、かつ脾臓重量比が高い。また W/Mk の方が F/NMk よりも脾臓重量が

重く、かつ脾臓重量比が高い。早期死亡例は両 strain とともに14日間生存例にくらべて脾臓重量が軽く脾臓重量比

図 2 体重の変動

▼: 第1群 (Wistar/Mk × Fisher-344)   □: 第2群 (Wistar/Mk × Wistar/Mr)   ☆: Wistar/Mk 死亡群   ★: Fisher-344 死亡群   ●: 対照群

が低い(表2, 図2)。

4) 各群 parabiosis rat の血液学的所見

各群 parabiosis rat の赤血球数, 血色素量, ヘマトクリット値, 白血球数, 血清蛋白量の変動は以下に示すとおりである。

(a) 赤血球数の変動: 7日目の第1群 W/Mk は著明に貧血状態となり, F/NMk は多血症の状態になる。第2群の W/Mk は貧血症, 多血症に似た傾向を示すが非常に軽微である。14日目の所見では, 第1群生存例は7日目と同じく W/Mk 貧血症, F/NMk の多血症の状態を維持しており, 第2群においては完全に消失している(図

3)。

早期死亡例においては, 死亡の前日に採血した血液所見において高度の貧血が存在しており, 同時に採血したペアの屠殺された rat は多血症を呈していた(図4)。

(b) 血色素量の変動: 赤血球数の変動と非常によく似た傾向を呈している。すなわち術後7日目で第1群 W/Mk の血色素量は減少し, F/NMk は増加し14日まで持続する(図5)。第2群の rat では血色素量の変動は著明でない。早期死亡例では血色素量の減少が著明であり, ペアの rat に血色素量の増加が見られた(図6)。

図3 赤血球数の変動(第1群および第2群)

図5 血色素量の変動(第1群および第2群)

図4 赤血球数の変動(早期死亡例および対照群)

図6 血色素量の変動(早期死亡例および対照群)

図7 ヘマトクリット値の変動
(第1群および第2群)

図8 ヘマトクリット値の変動 (早期死亡例
および対照群)

(c) ヘマトクリット値の変動: 赤血球数の変動と同じく7日目で第1群 W/Mk のヘマトクリット値は減少し, F/NMk のそれは増加し, 14日まで持続する(図7). 第2群における変動は軽微である. 早期死亡例においては減少が著明で, 屠殺されたペアの rat のヘマトクリット値は増加している(図8).

(d) 白血球数の変動: 7日目は第1群, 第2群ともに白血球数が増加している. 第1群 F/NMk は W/Mk にくらべて白血球数の増加率が高い. 14日目では第1群, 第2群ともほぼ術前の値に近くなるが, 第1群 W/Mk に減少の傾向が見られる. 早期死亡例では白血球の増加はあまり見られず, W/Mk においてはむしろ減少して

いる(図9, 10).

図9 白血球数の変動 (第1群
および第2群)

図10 白血球数の変動 (早期死亡例
および対照群)

- ▲：第1群Wistar/Mk (14日間生存例)   ▲：第1群Fisher-344 (14日間生存例)
■：第2群Wistar/Mk (7日目の赤血球数が相手より少ないrat)
□：第2群Wistar/Mk (7日目の赤血球数が相手より多いrat)
▽：Wistar/Mk早期死亡例   ▼：Wistar/Mk早期屠殺例
☆：Fisher-344早期死亡例   ★：Fisher-344早期屠殺例
●：対照群Wistar/Mk   ○：対照群Fisher-344

図 11 血液像の変動

B：好塩基球   E：好酸球   N：好中球   L：リンパ球   M：単球   BI：赤芽球

表 3 色素移行試験

			12 時 間 後				24 時 間 後			
			皮膚接合部所見		全 身 所 見		皮膚接合部所見		全 身 所 見	
第 1 群			W/Mk	F/NMk	W/Mk	F/NMk	W/Mk	F/NMk	W/Mk	F/NMk
No.	注入側	移行側								
1. 2. 3.	W/Mk	F/NMk	+	-	+	-	+	-	+	-
4. 5.	F/NMk	W/Mk	-	+	-	+	-	+	-	+
第 2 群			W/MkR.	W/MkL.	W/MkR.	W/MkL.	W/MkR.	W/MkL.	W/MkR.	W/MkL.
No.	注入側	移行側								
1. 2. 3.	W/MkR.	W/MkL.	+	+	+	+	+	+	+	+
4. 5.	W/MkL.	W/MkR.	+	+	+	+	+	+	+	+

W/MkR. : Wistar/Mk 右側   W/MkL. : Wistar/Mk 左側
W/Mk : Wistar/Mk 近交系   F/NMk : Fisher-344 近交系

+: 色素の移行がみられる
-: 色素の移行がみられない

図 12 リンパ球数の変動

図 13 好中球数の変動

(e) 血液像の変動: 実験群, 対照群とも術後リンパ球の比率の減少, 好中球の比率の増加が認められる。好中球の比率とリンパ球の比率の変動を各実験群別にみる

図 14 血清蛋白量の変動 (第1群および第2群)

図 15 血清蛋白量の変動 (早期死亡例および対照群)

と, 早期に死亡した rat は好中球の比率の減少が見られ, 反対に屠殺した rat においては増加が認められる。第1群の F/NMk は W/Mk にくらべて好中球の比率は増加している。第2群では, 赤血球数の増加している W/Mk に好中球の比率の増加が認められる。対照群においては, W/Mk, F/NMk ともよく似た値を示している。

赤芽球の比率の増加が, 貧血の状態の rat において認められる。その他の血液像については, 実験群, 対照群とも術前の値にくらべて変動は出現していない (図11)。

白血球のうちリンパ球および好中球の占める率より。リンパ球数, 好中球数を求めると図12, 13のようになる。すなわちリンパ球数の増加は, 7日目の測定値において著明に認められ, 第1群 W/Mk, F/NMk, および第2群 rat において認められる。リンパ球数の減少は, 早期死亡 rat, および14日目の測定値における第1群 W/Mk

(早期死亡 Wistar/Mk) (対照群 Wistar/Mk 7日目)
 alb: Albumin, α_L : α -Lipoprotein, α_1' : α_1' -Globulin, α_2' : α_2' -Globulin, Fa_2 : Fast α_2 -Globulin, tr: Transferrin, β_2' : β_2' -Globulin, Hp+ γ : Haptoglobin+ γ -Globulin, $s\alpha_2$: Slow α_2 -Globulin, $s\beta$: Slow β -Globulin

図 16 血清蛋白の分画

に認められる (図12)。

好中球数の増加は、早期屠殺 rat、および7日目の測定値における第1群、第2群 rat、14日目の測定値における第1群 F/NMk に認められる。好中球数の減少は、早期死亡 rat、とくに W/Mk に見られ、また14日目の測定値における W/Mk においても認められる (図13)。

(f) 血清蛋白量の変動: 7日目に第1群では W/Mk に減少が、F/NMk に増加が見られた。第2群では赤血球数の多い rat に増加が、少ない rat に減少が見られた (図14)。また、早期死亡 rat においては血清蛋白量の減少が見られ、ベアの屠殺した rat には増加が見られた (図15)。

(g) 血清蛋白の DISC 電気泳動による分画: 著明に parabiosis 中毒の出現した rat、早期死亡例にアルブミン分画の減少、 α グロブリンとくに α_2' グロブリン分画の増加が見られた (図16)。

(5) 各群 parabiosis rat の色素移行試験: 14日目の色素移行試験の結果は、第1群では色素注入後12時間、24時間後ともに色素の移行が皮膚接合部で停止しているのが観察された。色素移行の停止は W/Mk から F/NMk へ、逆に F/NMk から W/Mk への双方の場合に見られた。第2群においては12時間後にベアの rat の皮膚接合部ならびに全身に色素の移行が観察された (表3)。

絶括ならびに考按

Parabiosis については北村¹⁹⁾らによると、1864年に Bert²⁰⁾ によって初めてなされた。今世紀にはいり多くの研究者により、主として内分泌の研究分野で種々の目的に使用されている^{21)~23)}。移植学分野では、parabiosis 中毒と runt disease, secondary disease のような Graft-Versus Host reaction の関係が論じられ^{24)~27)}。また、parabiosis によって成熟動物に寛容状態を導くことの可能性が示唆されている^{1)~10)}、²⁸⁾。

Parabiosis によって、免疫学的に成熟動物を寛容の状態に導こうとする試みはいろいろとなされた。Mariani⁸⁾は性のみが異なる mouse 間で、Leonard と Albright⁹⁾は H-2 抗原は同じだが、他の組織適合性因子の異なる mouse 間で、Rubin³⁾、McBride と Simonsen¹⁰⁾は H-2 抗原を含むすべての組織適合性因子の異なる mouse 間で parabiosis をおこない、また、本邦において、内田²⁸⁾は呑竜系 rat 間の parabiosis と同時に、皮膚交換移植をおこない、いずれも多く動物を寛容の状態に導くか、または、皮膚の生存期間を延長することが出来たと報告している。また、宮本²⁹⁾は家兎を用いて、毎分 2ml の流量で1日約2時間にわたり血液の交差循環をおこなった結果、皮膚生着期間の延長が見られたと述べている。

実験動物については、mouse における組織適合性因子の研究はかなり進んでいるが、rat においてはまだまだ不明点が多い。組織適合性の遺伝子の座は mouse においては14個の常染色体性組織適合性座 (autosomal histocompatibility loci) と X, Y 染色体上に存在している1個ずつ、計16個の組織適合性因子の存在が明らかにされている³⁰⁾。Rat においては、Billingham³¹⁾は血縁関係の全くない近交系 rat の同種皮膚移植をおこない、14~16個の組織適合性因子が存在することを推定している。Ramseir と Palm³²⁾は mouse の H-2 座に相当すると思われる Ag-B 座を見出し、Ag-B 座で支配される抗原がもっとも強い移植免疫を起こすことを見ている。本邦においては、武田と相沢³³⁾は methylcholanthrene により誘発させた肉腫を退縮治癒させた rat の血清中に赤血球を凝集する凝集素を見出し、これを R 抗原と名付けた。その後の研究により、この R 抗原が移植と密接な関係を有し、また、R 抗原の allele もいくつか存在することが判明している¹²⁾。

本実験においては R^W を所有している W/Mk、および R^F を所有している F/NMk を用いて parabiosis をおこない、R 抗原の異なる rat 間での皮膚移植の可能性を追求した。R 抗原の異なる rat 間での parabiosis による免疫寛容の導入の可能性についての報告は著者の渉猟した範囲では見られない。

Parabiosis をおこなっている際に出現する parabiosis

中毒は、Finerty²³⁾により、“Red と White”として記載されているように parabiosis rat (parabiont) の片方が多血症となり、他方は貧血症となる。その多くは体重減少のち死亡するといわれている。近交系間では parabiosis 中毒は発生しないといわれ⁸⁴⁾⁸⁵⁾、parabiosis 中毒は parabiosis rat (parabiont) 間の遺伝的な差異によって決定されると思われるが具体的な発現機序については不明である。

Parabiosis rat (parabiont) の皮膚接合部に毛細血管の吻合が存在することは種々の検索により認められている⁸⁶⁾⁸⁷⁾。Sodicoff と Binhammer⁸⁷⁾によると ⁵¹Cr でラベルした赤血球が術後 22 時間目に少量相手の rat に移行し、47 時間目には著明に移行すると述べている。その後の血液交換量の変化は parabiosis rat 間の組織適合性因子の差によって決定するといわれており⁸⁴⁾⁸⁸⁾、この血液成分の交換を通じてお互いが免疫応答反応をおこなうものと思われる。

本実験において、2 週間生存ペアで第 1 群に色素の移行が見られないのは皮膚接合部においてお互いの血管が閉塞したと思われる。parabiosis をおこなった早期には体液および血液成分の交換も考えられ、それがお互いの parabiosis 中毒の出現、血液成分の変動となって出現し、術後 1 週間目の採血時の著明な血液成分の変動の原因をなしているものと考えられる。その後、血管の閉塞もしくは体液成分の交換停止を来し、Parabiosis rat (parabiont) 相互が自己防禦をなし、その結果体調および血液成分の回復傾向が軽度ながら見られ、小康状態を保っているものと考えられる。第 2 群においては parabiosis rat (parabiont) 間の色素の移行は完全におこなわれ、皮膚接合部において、血液ならびに体液成分の交換が盛んであることを示している。このことより W/Mk の皮膚がお互いに完全に接合生着していると思われる。

Parabiosis 中毒が血液成分におよぼす影響についての詳細な研究は少ない⁸⁹⁾⁹⁰⁾。北村ら¹⁹⁾は DS と (DS×C₅₇BL) F₁ の mouse を用いた parabiosis の実験で、術後 7 日頃より F₁ の貧血、リンパ球の減少、好中球の増加が見られ、死亡前に好中球が減少すると述べている。また、宮本²⁹⁾は成熟家兎を用いての交叉循環における末梢血液成分の変動は、白血球增多症が発病時に著明であり、術後 1 か月以内の早期死亡例ではリンパ球の増加が見られ、3 か月以後の晩期死亡例では好中球増加を示し、かつ、低色素性貧血症が認められ、また血清蛋白の濾紙電気泳動法による分画では、術後 1～3 週目のものにアルブミンの減少、 α_2 グロブリン分画の増加が見られたと述べている。Kekis⁴¹⁾は成犬の交叉循環において、術中、術後を通じて低アルブミン血症と過グロブリン血症が見られ、特に α_2 グロブリン分画の増加が見られたと述べている。

本実験においては、第 1 群 W/Mk が術後 1 週間目の

採血で著明な赤血球数の減少が見られ、F/NMk では反対に増加しており、いわゆる parabiosis 中毒が発現しているのが分かる。この parabiosis 中毒は、組織適合性因子の違う親の間に生まれた F₁ とその親とを parabiosis をおこなった場合 100% F₁ に出現することから、抗原を多量に持っている方の rat に中毒が出現すると見なされている¹⁰⁾。その成因は貧血状態を呈している rat から多血状態を呈している rat への血液の一方的流出を考えている人が多く^{42)~46)}、その原因は血管の一方的閉鎖と考えられている^{47)~49)}。閉鎖の機構については、(1) 抗体の付着により凝集した赤血球のために親から F₁ に流れる毛細血管の閉鎖。(2) 親の免疫適格細胞により F₁ の毛細血管内皮の障害の発現。の 2 つが考えられている¹⁰⁾。

本実験において、parabiosis 中毒の持続している第 1 群の 2 週目の rat において、parabiosis 中毒を呈している W/Mk から F/NMk への色素の移行のなかったこと、第 1 群 rat の parabiosis 中に中毒症状が両方の rat に交互に出現した例が 36.4% 存在したことを考えると、血管の一方的閉鎖のみが parabiosis 中毒の原因とは考えにくい。なお、宮本²⁹⁾の家兎交叉循環中に赤血球寿命が短縮する現象などを考えると、不適合輸血の場合に出現する同種抗体による獲得性溶血性貧血が parabiosis 中毒の原因として考えられる。事実、Ghute と Sommers⁵⁰⁾は Parabiosis 中毒になった rat において間接クームズ試験が陽性であると述べている。しかし、溶血性貧血でもし、貧血症 rat の病因は解明し得たとしても、反対側の多血症 rat の病因の説明がつかず、parabiosis 中毒に出現する多血症、貧血症の原因解明には不十分である。本実験において、多血症、貧血症の発現機序についての詳細な検索はおこなっていないが、組織適合性因子の違う rat 間の parabiosis において見られるところから、何らかの免疫学的機序が働いているであろうことは想像出来る。

つぎに白血球数の変動であるが、相対する parabiosis rat (parabiont) のうち抗原をより多く持つ方の動物は parabiosis 中毒となり、しばしば白血球減少を来すと述べている¹⁰⁾。これに反し宮本²⁹⁾のように、“Wasting Syndrom”で死亡した家兎の白血球の増加が見られたという報告も存在する。

本実験においては、死亡した rat に白血球数の減少が見られ、とくに好中球の減少が著明であった。しかし、parabiosis 中毒と白血球数の減少とは必ずしも相関関係ではなく、parabiosis 中毒で貧血症の状態にある W/Mk においても、術後 7 日目の測定値において白血球数は増加している。ただし、多血症を呈している F/NMk の方が貧血症を呈している W/Mk より白血球数の増加している割合が高い。本実験において好中球の変動がリンパ球よりも敏感に parabiosis 中毒にともない減少するこ

とは興味深い。また中等の重篤な rat は好中球の増加が不十分で、侵入してくる抗原とくに相手側からの免疫担当細胞および血清抗体を含む血液成分、体液成分および皮膚移植片、または術中、術後に侵入する細菌などを排除出来ず衰弱して死亡に至る過程を示唆している。なお、比較的白血球数の減少を来すことの多い W/Mk は McBride¹⁰⁾ の言に従えば、F/NMks に対してより多く抗原として働くのかも知れない。

また、各種の stress によって rat の胸腺は約 50~60%、リンパ節は 20~30% の重量減少を来し、流血中のリンパ球数も約 50% 減少する。これは下垂体-副腎皮質系の作用にもとづいた corticosteroid の分泌による適応症候群の部分現象として理解されている¹¹⁾。本実験において parabiosis された rat が早期に白血球数の減少を来すのは、この stress による影響と関連があるように思われる。

血清蛋白量は、宮本²⁰⁾、Kekis⁴¹⁾ は家兎ならびに成犬を使用しての実験において著明な変動は見られないが、その分画においてアルブミン分画の減少、 α_2 グロブリン分画の増加が見られたと述べている。また、人見ら⁶³⁾ は、アルブミン分画の減少、 α_2 グロブリン分画の増加は、同種移植の際に移植片が排除される場合も見られるので、このような所見は交叉循環によって網内系が刺激された結果生じたものであろうと述べている。

著者の実験においても、早期死亡 rat、parabiosis 中毒の激しい rat にアルブミン分画の減少、 α_1 グロブリン分画の増加が見られた。なお、前記の所見を呈している rat は衰弱が激しく、白血球数の増加もあまり見られないこと、また、parabiosis 中毒により貧血症の状態を呈しているが、比較的全身状態も良く、白血球数の増加の見られる rat には前記の所見は出現しないことから、アルブミン分画の減少、 α_2 グロブリン分画の増加は、免疫応答反応のみならず、parabiosis の状態にある rat が、衰弱など何らかの理由により抗原を排除出来る状態を確立することが困難な場合に出現するのではないかと考えている。

以上の所見より、parabiosis をおこなった rat においては、組織適合性因子の違う場合お互いに免疫応答反応、とくに Graft-Versus-Host reaction、または、反対に Host-Versus-Graft reaction をおよぼし、その結果 parabiont の血液所見において多血症、貧血症の出

現、ならびに貧血症の rat に出現する白血球数の減少が見られ、ひいては、parabiosis における寛容状態導入に関与しているものと考えられる。

結 論

著者は、rat における主要な組織適合性抗原である R 抗原に注目し、R^w を保有している Wistar/Mk 近交系および R^f を保有している Fisher-344 近交系を使用して parabiosis をおこない、皮膚移植片の移植の可能性について検索した。なお、parabiosis をおこなった際に出現する全身状態に対する影響について、血液学的検索をおこない次の結論を得た。

1) Wistar/Mk 近交系と Fisher-344 近交系の parabiosis において、Wistar/Mk の 90.90% に parabiosis 中毒の出現を見、36.4% が死亡し、Fisher-344 近交系では 54.5% に parabiosis 中毒の出現を見ており、9.1% が死亡している。

2) 早期死亡例、ならびに第 1 群 Wistar/Mk 近交系において、術後 7 日目の測定値から赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量の減少が見られ、Fisher-344 において増加が見られ、14 日目まで持続している。

3) 白血球数の変動においては、早期死亡例において減少が見られた。14 日間生存例においては Wistar/Mk 近交系、Fisher-344 近交系とも増加しているが、貧血状態を呈している Wistar/Mk 近交系の増加率は少なく、多血症を呈している Fisher-344 近交系の増加率は高い。この白血球の変動は、主として好中球ならびにリンパ球の変動によるものである。

4) 血清蛋白の分画では、早期死亡例、および parabiosis 中毒の重篤な rat において、アルブミン分画の減少、 α_1 グロブリン分画の増加が見られた。

5) 皮膚接合部の色素移行は、術後 14 日目の所見において、Wistar/Mk 近交系と Fisher-344 近交系の parabiosis で、Wistar/Mk 近交系から Fisher-344 近交系、Fisher-344 近交系から Wistar/Mk 近交系への双方の色素移行の停止が見られた。なお、Wistar/Mk 同志の parabiosis では、色素注入 12 時間後にベアーの rat の皮膚接合部ならびに全身に色素の移行が観察された。

本論文の要旨は、第 19 回日本口腔外科学会総会（昭和 49 年 11 月）において発表した。