

## イヌ膵十二指腸移植法モデルを用いた ciclosporin ならびに 免疫抑制剤 FK506の検討

北里大学外科

佐藤 光史 今井 潔 松井 健 杉野三千男  
中山 義介 瀧島 常雅 吉田 宗紀 刑部 恒男  
三重野寛吾 大宮 東生 比企 能樹 柿田 章

雑種成犬42頭を用い膵十二指腸移植同種移植を行い、膵十二指腸移植に対する免疫抑制剤 Ciclosporin (CsA), FK506 (FK) の効果につき検討し、以下の結果を得た。

1) 生存日数は免疫抑制剤非投与群では8~14日、平均 $12.1 \pm 1.1$ 日 (M $\pm$ SE), CsA 投与群は26~185日、平均 $81.3 \pm 14.1$ 日, FK 投与群は22~79日、平均 $53.2 \pm 10.2$ 日であり、CsA ならびに FK 投与群で免疫抑制剤非投与群と比較し有意に生存日数の延長がみられた。

2) FK 投与群では、食欲不振、嘔吐などの消化器症状が著明にみられた。

3) 各群の死因は免疫抑制剤非投与群は全例急性拒絶反応であり、CsA 投与群は2頭が急性拒絶反応、8頭が慢性拒絶反応であり、FK 投与群は2頭が急性拒絶反応、4頭が慢性拒絶反応であった。

**Key words:** pancreaticoduodenal allotransplantation, ciclosporin, FK506, immunosuppression

### はじめに

インスリン依存性糖尿病に対し、1966年 Kelly, Lillehei らが膵十二指腸移植を行ってから現在までに、世界で血管吻合による膵移植は約2,000例に行われてきた<sup>1)~3)</sup>。特に1978年 Calne<sup>4)</sup>が臨床的腎、膵、肝移植に ciclosporin (CsA) を使用して以来膵移植症例も増加しており、またその治療成績も向上してきている<sup>5)~9)</sup>。また近年日本において mizoribin (MZ)<sup>10)11)</sup>、15-deoxyspergualin<sup>12)13)</sup>、そして FK506 (FK)<sup>14)~16)</sup>などが開発され世界的に注目を集めている。われわれもイヌを用い膵移植に対する azathioprine (AZA), MZ の免疫抑制効果を検討してきたが<sup>17)18)</sup>、今回は CsA, FK につき検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 実験材料

雑種成犬(体重10~16kg) 42頭を用いた。

#### 2. 移植手術手技

##### a) Donor の手術

Graft の流入動脈として総肝動脈および胃十二指腸動脈を温存し、また上腸間膜動脈は、その枝である下

膵十二指腸動脈のみを温存し、他の空結腸枝は結紮切離した。静脈も同様に処理し門脈を流出血管とした。十二指腸は球部で切離後、肛門側は第2部で切離した。胆管は膵流入部で結紮切離した。

以上のごとく graft の preparation を行い、直ちに腹腔動脈、上腸間膜動脈を大動脈ごと摘出し門脈は肝門部で切離した。4℃で冷却した Hespander 500cc に heparin 500U, 1% lidocaine 200mg, 7% 重炭酸ナトリウム溶液2ml を加えたものを用いて、1m の高さから落差灌流を行った。さらに摘出した graft を4℃で表面冷却しながら、腹腔動脈、上腸間膜動脈の cuff を作製した。

##### b) Recipient の手術手技

Graft の cuff を recipient の大動脈に6-0 ナイロン血管縫合糸で端側に連続縫合した。また graft の門脈を recipient の下大静脈に5-0 ナイロン血管縫合糸で端側に連続縫合した。移植膵十二指腸 graft の温阻血時間は0分、全阻血時間は120分以内であった。

Graft の血流を再開した後、Graft の十二指腸を recipient の十二指腸第3部に二層で端側吻合した。その後自己膵は Milkowitch の方法により全摘した<sup>19)</sup>。

#### 3. 実験群および免疫抑制法

Recipient を3群に分けた。第1群(n=5)は膵十二

指腸移植を行い、免疫抑制剤は投与しなかった。第2群(n=10)は膵十二指腸移植を行い、免疫抑制剤としてCsAを術前日より術後3週まで、20mg/kg/dayを筋肉内に投与し、それ以降は、10mg/kg/dayに減量した。第3群はFKを0.1~0.3mg/kg/day筋肉内投与した。第2あるいは第3群は免疫抑制剤を死亡するまで連日投与した。

4. 検査項目および方法

a) 血液生化学検査

術当日ならびに術後、定期的に空腹時血糖インスリン、血液生化学を週2回検査した血糖値は酸素電極法により、インスリンはradioimmunoassay法により測定した。

b) 病理組織学的検査

イヌは生存しうる限り生かしたが、死亡時には全例直ちに剖検を行い、死因を検討した。摘出した膵十二指腸 graft は、10%formalin液に固定し、paraffin包埋後、5μの薄切切片とし、hematoxylin-eosin (HE)染色およびaldehyde-fucsin(AF)染色を行い光学顕微鏡下で病理組織学的に診断を行った。

5. 統計学的検討

測定値は平均値±標準誤差(m±SE)で示した。平均値間の有意差の検定にはStudentのt検定を用い、危険率5%以下をもって有意とした。

実験結果

1. 生存日数と死因

各群のイヌの生存日数は第1群は8, 11, 13, 14, 14日で、その平均生存日数は12.1±1.1日であった。第2群は26, 34, 59, 62, 78, 84, 85, 90, 110, 185日で、平均生存日数は81.3±14.1日であり、第1群と比較して有意に生存期間の延長が見られた。第3群は22, 25, 55, 60, 78, 79日であり、平均生存日数は53.2±10.2日であり、第1群と比較し有意に生存期間の延長がみられた。また第2群と第3群を比較すると、生存日数に有意差はみられなかった (Table 1)。

Table 1 Survival of the recipient dogs with pancreaticoduodenal allograft

Group	Immunosuppressant	Survival days	M±SE (days)	p value
I (n=5)	(-)	8, 11, 13, 14, 14	12.0±1.1	(p<0.05)
II (n=10)	CsA 20mg/kg/day after 3 weeks 10mg/kg/day	26, 34, 59, 62, 78, 84, 85, 90, 110, 185	81.3±14.1	
III (n=6)	FK 0.1~0.3mg/kg/day	22, 25, 55, 60, 78, 79	53.2±10.2	(n.s)

それぞれの群の死因についてみると、第1群では5頭すべてが膵または十二指腸の急性拒絶反応で死亡した。第2群では2頭が膵の急性拒絶反応で、26日と34日で死亡した。この群の残りの8頭は、すべてが膵の慢性拒絶反応による高血糖、ないしは栄養障害で死亡した。第3群の死因についてみると、22日、25日で死亡した2頭は膵の急性拒絶反応で死亡した。残りの4頭は、すべてが膵の慢性拒絶反応による高血糖、ないしは栄養障害で死亡した (Table 2)。

2. 生化学検査

空腹時血糖値ならびに血清インスリンの推移についてみると、第1群では全例とも手術後比較的早い時期より空腹時血糖は200mg/dl以上に上昇し、血清インスリン値は逆に下降傾向を示した (Fig. 1)。

第2群では、移植後空腹時血糖は数日間一時的に上昇するも、その後はほぼ正常値となり比較的安定していたが、10頭中7頭が空腹時血糖が200mg/dl以上の糖尿病状態を示した。血清インスリン値は死亡直前に低値を示す症例が多かった (Fig. 2)。

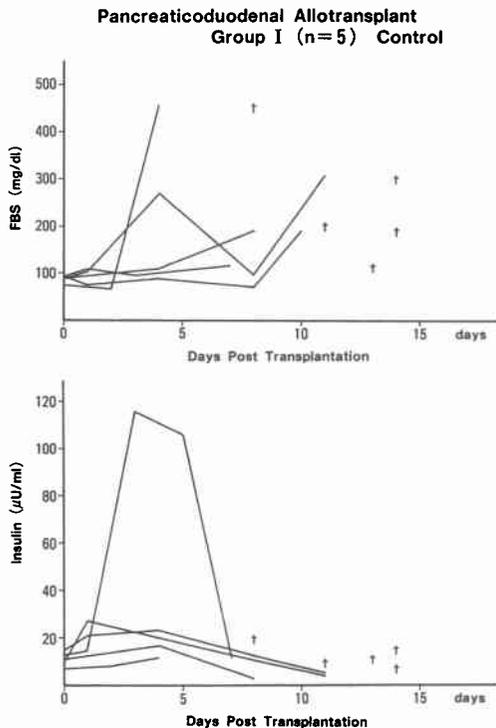
第3群でも空腹時血糖は移植後数日は上昇するが、その後は比較的安定しており、空腹時血糖は死亡前でも上昇していない症例が多かった。血清インスリン値は手術数日後やや高値を示す傾向がみられた (Fig. 3)。

3. 病理組織学的検査

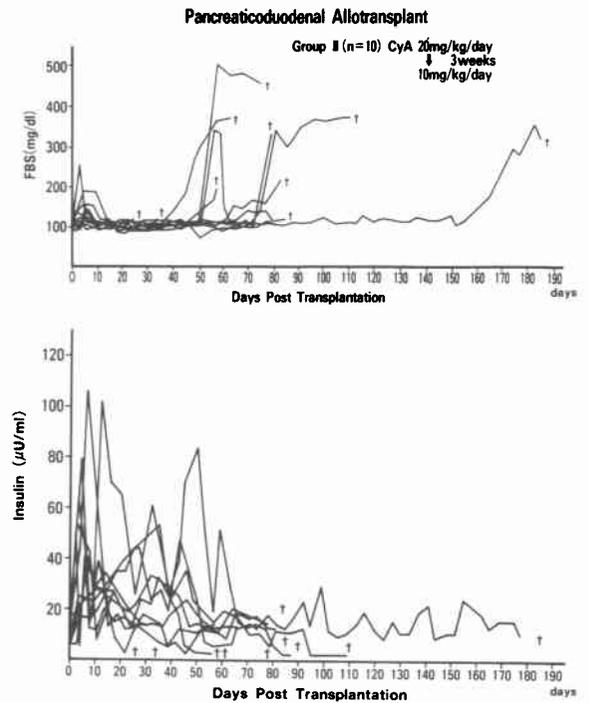
Table 2 Causes of death in the recipient dogs with pancreaticoduodenal allograft

Group	Immunosuppressant	Survival days	Cause of Death
I	(-)	8	Acute rejection
		11	Acute rejection
		13	Acute rejection
		14	Acute rejection
		14	Acute rejection
II	CsA 20mg/kg/day after 3 weeks 10mg/kg/day	26	Acute rejection
		34	Acute rejection
		59	Chronic rejection
		62	Chronic rejection
		78	Chronic rejection
		84	Chronic rejection
		85	Chronic rejection
		90	Chronic rejection
		110	Chronic rejection
		185	Chronic rejection
III	FK 0.1~0.3mg/kg/day	22	Acute rejection
		25	Acute rejection
		55	Chronic rejection
		60	Chronic rejection
		78, 79	Chronic rejection

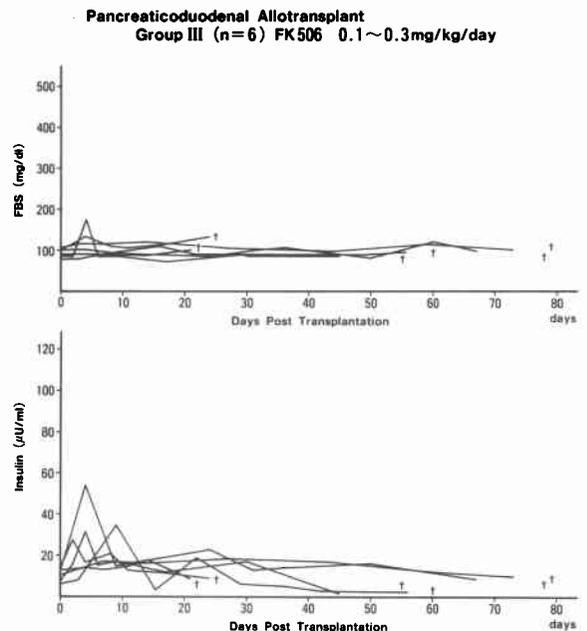
**Fig. 1** Changes in fasting blood sugar and insulin level in group



**Fig. 2** Changes in fasting blood sugar and insulin level in group



**Fig. 3** Changes in fasting blood sugar and insulin level in group III



1) 第1群の移植膵は、腺房細胞の萎縮と変性壊死が著しく、間質には水腫と小円形細胞浸潤、出血が認められ、かつ新鮮な血栓を形成している血管がみられた。壊死部との境界にはリンパ球、形質細胞を主体とした小円形細胞浸潤が著明で、また空胞変性を数多く認めた急性壊死性膵炎の像で、急性拒絶反応と考えられた (Fig. 4)。

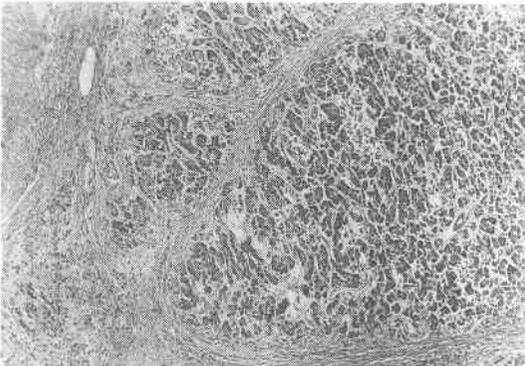
2) 第2群の1か月前後の短期生存例の移植膵は、膵実質の萎縮、変性、壊死が著しく、間質には水腫と小円形細胞浸潤、出血が認められ、第1群の移植膵と同じような所見であった。これに対し100日以上長期生存例では間質の著明な繊維化と小円形細胞浸潤、リポマトーシスが認められ、動脈は内膜および中膜の肥厚が著しく、内膜は狭小化を来していた。また外分泌腺組織は萎縮しているが個々の形態は保たれており、ランゲルハンス島(以下ラ島)の変性、萎縮がみられ、いわゆる慢性拒絶反応の所見であった (Fig. 5)。

3) 第3群の22, 25日に死亡した2頭の移植膵は、膵実質の萎縮、変性、壊死が著しく、間質には水腫と小円形細胞浸潤、出血が認められ急性拒絶反応の所見で

**Fig. 4** Histopathological findings of the pancreas allograft obtained at death of a dog in group I on day 13. There is severe degeneration in acinar cells, Langerhans islets, and interstitium, indicating acute rejection. (H & E, original magnification  $\times 40$ )



**Fig. 5** Histopathological findings of the pancreas allograft obtained at death of a dog in group III on day 60. There is severe atrophy and degeneration in acinar cells and Langerhans islets, and fibrosis and small round cell infiltration in interstitium, indicating chronic rejection. Intimal thickening of the arteriolar is also seen. (H & E stain, original magnification  $\times 40$ )

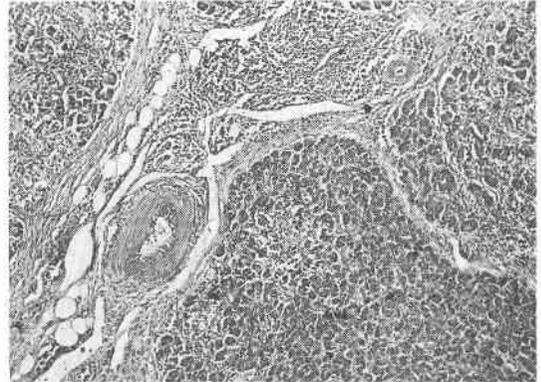


あった。55日以上生存した4頭の移植膵は間質の著明な繊維化と、小円形細胞浸潤、リポマトーシスが認められ動脈は内膜および中膜の肥厚が著しく、内膜は狭小化を来していた。また外分泌腺組織は萎縮、破壊、消失がみられ、ラ島の変性萎縮もみられ、慢性拒絶反応の所見であった (Fig. 6)。

#### 考 察

1980年、ケンブリッジ大学の Calne ら<sup>4)</sup>が腎移植に

**Fig. 6** Histopathological findings of the pancreas allograft obtained at death of a dog in group II on day 38. There is small round cell infiltration and fibrosis in the interstitium, atrophy and degeneration in acinar cells and Langerhans islets, indicating chronic rejection. (H & E, original magnification  $\times 40$ )



対し CsA を使用して以来、CsA は肝臓、心臓移植などにも用いられるようになり、これらの移植成績が著明に向上してきた<sup>20)21)</sup>。しかし膵臓移植においては肝臓、心臓移植などと比較し CsA の使用にもかかわらずその成績はあまり向上しなかった。その理由としては膵が外科的侵襲に対して弱い。膵管の処理がまだ確立せず、膵管の吻合部の狭窄や吻合不全を起こしやすい。膵の血流動態が複雑で血管吻合部の血栓を起こしやすいなどが考えられる。そこでわれわれは手術手技としては膵管の吻合が無い膵十二指腸移植を選び、免疫抑制剤としては CsA のみならず、1986年 Ochiai ら<sup>22)</sup>のラットの心臓移植の報告以来注目を集めている新免疫抑制剤 FK のイヌ膵十二指腸移植に対する効果を検討した。FK は筑波の土壌から採られた分子量822の新規の構造を有する *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993株の産生するマクロライド系の抗生物質であり、作用機序としては感作 T 細胞からの IL-2 の産生抑制作用および感作 T 細胞上の IL-2 受容体発現抑制による T 細胞活性化抑制作用などが考えられている。

In vitro の実験では、マウスのリンパ球混合培養反応、IL-2 の産生、キラー T 細胞の誘導、ヒトリンパ球表面の IL-2 の発現など CsA の100分の1の量で抑制されることが示され、臓器移植における拒絶反応の抑制に効果があることが示された。

われわれのイヌ肝移植 FK 0.1mg/kg/day 投与群

の剖検で得た脾臓、腹腔リンパ節の病理組織学的所見では著明に萎縮し、リンパ節の皮質および傍皮質領域でリンパ球の著明な減少が認められ、FKがリンパ組織のT・B細胞を抑制することが示唆された<sup>23)</sup>。

イヌ腎移植では、筋注で0.08~0.32mg/kg/day、経口では1.0~1.5mg/kg/dayの範囲が有効量であり、またイヌ肝移植では経口で1.0mg/kg/dayが最適投与量で0.75mg/kg/dayに減量すると拒絶反応が起こってくることを示された<sup>24)</sup>。

そこでわれわれのイヌ豚十二指腸移植実験ではFK 0.1~0.3mg/kg/day 筋肉内投与し検討した。FK 0.1~0.3mg/kg/day 筋肉内投与群はコントロール群と比較し有意に生存延長がみられ効果が認められた。またCsA 10~20mg/kg/day 筋肉内投与においてもコントロール群と比較し生存日数は有意に延長した。しかしCsA群とFK使用群の比較においては有意差はみられなかった。以上イヌ豚十二指腸移植に対しFK 0.1~0.3mg/kg/day 筋肉内投与はCsA 10~20mg/kg/day 筋肉内投与と同じ程度の生存延長効果が有ることが判明した。

FKは臓器特異的な副作用の報告は少なく嘔吐、下痢、食思不振、体重減少などの消化器症状が多い。われわれのFK投与群においても上記の消化器症状は全例にみられ、体重減少はCsA群より著明であった。

Ochiaiらの報告でもイヌ腎移植においてわれわれの実験と同様にFK 0.32mg/kg/day 経静脈投与において食思不振にて4頭中1頭が死亡している<sup>22)</sup>。またTodoらもイヌ肝移植実験にて1mg/kg/day 経口投与10日間、0.75mg/kg/day 経口投与を行い10頭中1頭が2か月で体重が半分になって55日目に死亡したと報告している<sup>24)</sup>。

そこでTodoらはイヌ腎移植でFKを0.5mg/kg/dayとし、CsA 5mg/kg/day、Predonine 5mg/kg/dayの3剤経口投与において良好な結果を得た<sup>25)</sup>。われわれも現在FK, CA, M2の3剤併用による膵移植について検討している。現在臨床の臓器移植においても3剤、4剤などの多剤併用療法が主流であり<sup>26)</sup>、FKの臨床応用にむけて多剤併用療法の研究が重要である。

#### 文 献

- 1) Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK et al: Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61: 827-837, 1967
- 2) Najarian JS: Landmarks in clinical pancreatic transplantation in pancreatic transplantation. Edited by Groth GC. WB Saunders Company, Philadelphia, 1988, p15-19
- 3) Sutherland DER: Pancreas transplant registry report. *Transplant Proc* 11: 2759-2762, 1989
- 4) Calne RY, Rollers K, White DJG et al: Cyclosporine A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet* 2: 1033-1036, 1979
- 5) Sutherland DER, Moundry GC, Goetz FC: Long term outcome of pancreas transplants functioning at one year. *Transplant Proc* 11: 2845-2859, 1989.
- 6) Sutherland DER, Kendall D, Goetz FC, Najarian JS: Pancreas transplantation. *Surg Clin North Am* 66: 557-583, 1986
- 7) Sollinger HW, Beltzer FO: Pancreas transplantation with urinary tract drainage in pancreatic transplantations. Edited by GC Growth. WB Saunders Company, Philadelphia, 1988, p131-146
- 8) Groth GC, Tyden G: Segmental pancreas transplantation with enteric exocrine drainage in pancreatic transplantation. Edited by Groth GC. WB Saunders Company, Philadelphia, 1988, p99-112
- 9) Sutherland DER, Goetz C, Najarian JS: Pancreas transplantation at the University of Minnesota: Donor and recipient selection, Operative and postoperative management and outcome in pancreatic transplantation. Edited by GC Growth. WB Saunders Philadelphia, 1988, pp63-74
- 10) Mizuno K, Tsujino M, Takada M: Studies on bredinin I isolation, characterization and biological properties. *J Antibiot* 27: 775-782, 1974
- 11) Uchida H, Yokota K, Akiyama N et al: Effectiveness of a new drug bredinin on canine kidney allo-transplantation survival. *Transplant Proc* 11: 865-870, 1979
- 12) Umezawa H, Kondo S, Kunimoto S et al: Structure of an antitumor antibiotics, spergualin. *J Antibiot* 34: 1622-1624, 1981
- 13) Takeuchi T, Iinuma H, Kunimoto S et al: A new antitumor antibiotics, spergualin: isolation and antitumor activity. *J Antibiot* 34: 1619-1621, 1981
- 14) Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al: FK506, a novel immunosuppressant isolated

- from a streptomycetes I Fermentation isolation, and physio-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* 40 : 1249—1255, 1987
- 15) Kino T, Hatanaka H, Miyata S et al : FK506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. *J Antibiot* 40 : 1256—1265, 1987
  - 16) Ochiai T, Nakajima T, Nagata M et al : Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc* 19 : 1284—1286, 1987
  - 17) 佐藤光史 : 臍移植に対する mizoribine, azathioprine の免疫抑制効果—微小血管造影法ならびに病理組織学的方法による拒絶反応に関する検討一. *北里医* 12 : 453—465, 1982.
  - 18) 佐藤光史, 横田和彦, 内田久則ほか : 血管吻合による臍移植法の実験的検討. *北里医* 11 : 493—498, 1981
  - 19) Milkowitch V, Campiche MS : Successful intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomized dogs. *Transplantation* 21 : 265—269, 1976
  - 20) Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S et al : Experience in 1000 liver transplants under cyclosporine"steroid therapy : A survival report. *Transplant Proc* 20 : 498—504, 1988
  - 21) Losman JG : Clinical heart transplantation. *Transplant Proc* 19 : 2500, 1987
  - 22) Ochiai T, Sakamoto K, Nagata M et al : Studies on FK506 in experimental organ transplantation. *T Transplant Proc* 20 : 209—214, 1988
  - 23) 横田和彦, 瀧島常雅, 佐藤光史ほか : 無肝期に Bio-Pump によるバイパス手技を用いたイヌ同所性同種肝移植術—手術手技の確立と新免疫抑制剤 FK506 の免疫抑制効果について—, *北里医* 19 : 501—509, 1989
  - 24) Todo S, Podesta L, Chapchap P et al : Orthotopic liver transplantation in dogs receiving FK506. *Transplant Proc* 19 : 64—67, 1987
  - 25) Todo S, Dometris V, Ueda Y et al : Canine kidney transplantation with FK506 alone or in combination with cyclosporine and steroids. *Transplant Proc* 19 : 57—61, 1987
  - 26) Osakabe T, Uchida H, Masaki Y et al : Studies on immunosuppression with low dose cyclosporine combined with mizoribine in experimental and cadaveric renal allotransplantation. *Transplant Proc* 21 : 1598—1600, 1989

### Clinical Evaluation of Ciclosporin and the Immunosuppressant FK506 on Pancreaticoduodenal Allotransplantation in Dogs

Koshi Sato, Kiyoshi Imai, Ken Matsui, Michio Sugino, Yoshisuke Nakayama, Tsunemasa Takishima, Muneki Yoshida, Tsuneo Osakabe, Hiroyoshi Mieno, Harumi Omiya, Yoshiki Hiki and Akira Kakita  
Department of Surgery, School of Medicine, Kitasato University

Pancreaticoduodenal allotransplantation was performed to evaluate ciclosporin (CSA) and FK506 in dogs. Forty-two mongrel dogs were used for these experiments. There were three experimental groups, group 1 (n=5), controls, no immunosuppression was given. In group 2 (n=10), intramuscular injections of CSA 20 mg/kg/day were given initially, this was reduced to 10 mg/kg/day 3 weeks later. In group 3 (n=6), 0.1~0.3 mg/kg/day of FK506 was given intramuscularly. The conclusions of these experiments were following. 1) Significant prolongation of pancreaticoduodenal allograft survival was obtained with CSA and FK506 compared with control animals without immunosuppression. 2) Toxicity of FK506 was loss of appetite and weight loss. 3) In group 1 without immunosuppression, all dogs died of acute rejection. In group 2 with CSA, two dogs died of acute rejection, eight dogs died of chronic rejection. In group 3 with FK506, two dogs died of acute rejection, four dogs died of chronic rejection.

**Reprint requests:** Koshi Sato Department of Surgery, School of Medicine, Kitasato University  
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, 228 JAPAN