

同種皮膚移植片におよぼす RNA 前処置の効果

田 所 潔*

(昭和 47 年 8 月 28 日受付)

要 旨

ドンリュウ系とウイスター系ダイコクネズミの 2 系間で、相互に同種皮膚移植を行なった。特に移植皮膚片を RNA 溶液中に保温 (incubate) することによる効果を検討し、つぎのような結果を得た。

1) 移植片を RNA に保温することにより、移植片の生着日数は延長するが、RNA の系または種特異性は、はっきりしない。しかし recipient 由来の RNA は、donor の RNA, yeast RNA よりも生着日数を延長した。

2) DNA, d-Ribose, 抗リンパ球血清などによる保温では、RNA にみられた延長効果はなかった。

3) 同一個体に RNA 保温と生食水保温のふたつの移植片を同時に移植しても、RNA に保温した移植片の生着日数は延長する。

4) 二次移植に際しても、RNA 保温による移植片の生着日数延長効果がわずかながら認められる。

5) 移植片を RNA 保温後、生食水で洗滌すると、その生着日数延長効果は消失する。

Keywords: 保温 (incubate), 同種皮膚移植, 拒絶反応, RNA, ATS

略語一覧: RNA : Ribonucleic Acid DNA : Deoxyribonucleic Acid
ALS : Antilymphocyte Serum ATS : Antithymocyte Serum
DNase: Deoxyribonuclease

緒 言

核酸は免疫反応において重要な役割を演じている。また核酸そのものを用いて recipient の方を処置して免疫学的寛容を導入しようという試みは古くからある^{1,2)}。われわれの予備実験でもダイコクネズミの同種皮膚移植の際に、donor 肝由来の DNA を recipient の腹腔内に投与すると皮膚片の生着が延長されることをみた³⁾。一方核酸が少量ですみ、臨床応用の可能性もある donor 側、すなわち graft を移植する前に核酸で処置して拒絶反応を軟らげようという試みがあり、教室でもいくつかの実験を重ねられた⁴⁾。本報告では同種移植皮膚片の RNA 溶液保温 (incubate) による移植片の生着延長効

果を指標とし、保温条件ならびに RNA の系および種特異性の有無を検討した。さらにその作用機序を推測するための実験を行ない、作用機序の異なる抗リンパ球血清との併用も試みた。

実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物

ドンリュウ系およびウイスター系のダイコクネズミとともに closed colony によって繁殖させたものを、日本ラット K. K. より購入し、固型飼料で飼育し 150 ないし 200 g の体重の雌を実験に用いた。各実験には両系

*千葉大学医学部外科学第 2 (主任: 佐藤博教授)

KIYOSHI TADOKORO: Effect of RNA treatment on rat skin allografts.

The Second Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University, Chiba.

Received for publication, August 28, 1972.

あわせて 20 頭を用いた。

2. 核酸の抽出ならびに定量方法

RNA は Muramatsu ら⁴⁾の方法により抽出した。この標品は 260 m μ に最大吸光率をもち、組成分析を RNA に対しては orcinol 反応, DNA は diphenylamine 反応を用い、たんぱくは Lowry の反応により定量した。ここにいう RNA 標品は RNA 84% のほか DNA 1%, たんぱく 3%, 多糖類など未知物質 12% を含んでいる。DNase 処理は、後の除去が難かしいのであえてはぶいた。このようにして得られた RNA 標品はエタノール中に沈殿として deep freezer (-20°C) に保存し、各種実験に際して生食水に溶かし 260 m μ の吸光度から計算して 1.5 mg/ml の濃度⁵⁾とし、RNA 生食水溶液を保温実験に供した。

3. 皮膚片移植方法

両系ダイコクネズミをエーテル麻酔下で剃毛し、逆性石けん水で消毒後、背部皮膚全層 (full-thickness) を 1.5 cm $\times$ 1.5 cm の大きさに切除し、あらかじめ用意した核酸溶液中に各時間室温で保温し相互交換移植 (reciprocal grafting) を行なった。2 枚の皮膚片を同時に交換する実験も、2 枚とも背部で移植片同志があまり近くないように、それぞれの採取部位に交換した。移植片は絹糸を用い 8 針固定し、そのまま個室に一頭づつ入れて経過を毎日観察した。

皮膚片の拒絶反応の判定については、色調硬度を観察し、50% 以上壊死あるいは剥離したものをその時点で拒絶反応の終点とした。

4. 抗リンパ球血清 (ALS と ATS)

ダイコクネズミを全採血した後、胸腺および脾臓を摘出し、これらをはさみで細切し、60 ゲージのステンレススチールメッシュを通して細胞浮遊液を作製した。これを生食水で 3000 回転、5 分間遠沈して数回洗った後に最後に生理食塩水に浮遊させた。この細胞浮遊液は、総数 1×10^9 個のリンパ球を含み、これを 2 週間間隔で 2 回ウサギに免疫した。すなわち初回の免疫は静脈注射し、2 回目は Freund の complete adjuvant を混ぜて足蹠に注射し、その 2 週間後に全採血した。脾リンパ球に対する抗血清を ALS、胸腺リンパ球に対する抗血清を ATS とした。ALS, ATS を非働化した後にダイコクネズミの赤血球により十分吸収してから使用した。この ALS と ATS の胸腺リンパ球に対する凝集素価は約 1000 倍であった。

実験成績

図 1 は recipient 系由来の肝 RNA とともに 15 分間、 20°C で保温したものであるが、移植皮膚片採取後直ちに植えた未処置群、また対照として生食水に同条件で保温した群に比べて RNA で保温した群では明らかに移植片の生着延長がみられる。なお図中に示した数字は平均生着日数と標準誤差である。つぎに同条件で保温時間を 120 分に延ばしたところ、ドンリュウからウイスターに移植した皮膚片は 15.8 ± 1.6 日 (対照 9.1 ± 3.7 日)、ウイスターからドンリュウでは 18.1 ± 1.8 日 (対照 9.4 ± 1.1 日) であった。同じく recipient 肝 RNA 液中で、15 分間、 20°C で保温を行ない、生食水で graft のまわりについている RNA 溶液を十分に洗い去った後に皮膚移植を行なった例では、両系移植皮膚片は全く対照と変わらず拒絶された。

つぎにこのような RNA の系または種特異性の有無をみるために、図 2 のよう donor に系の肝より抽出した RNA を用いたところ recipient RNA ほど生着延長をみないが、対照と比較すると明らかに生着延長効果を認めた。つぎに市販の yeast RNA について同条件で保温したのが図 3 の成績である。これもわずかながら延長の効果がみられるが recipient RNA ほどではなかった。また RNA の構成成分である d-Ribose, recipient

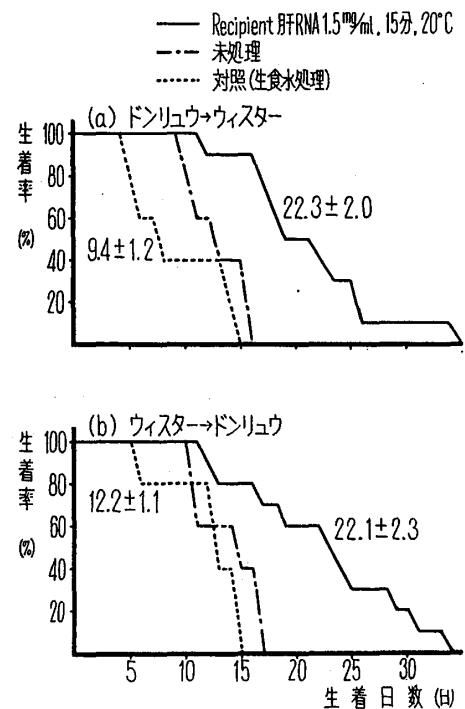


図 1. Recipient RNA の皮膚移植片におよぼす影響

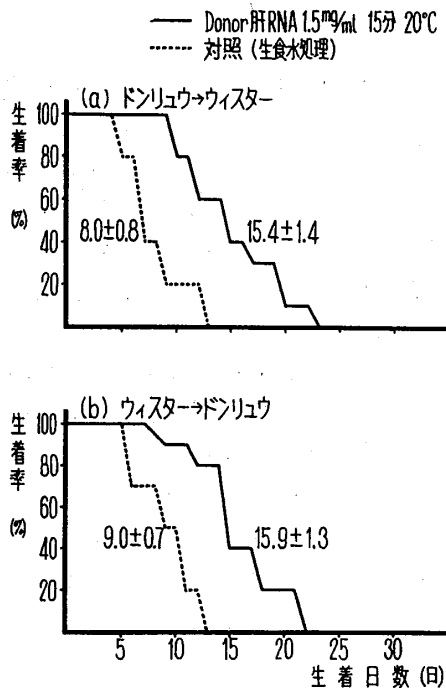


図 2. Donor RNA の皮膚移植片におよぼす影響

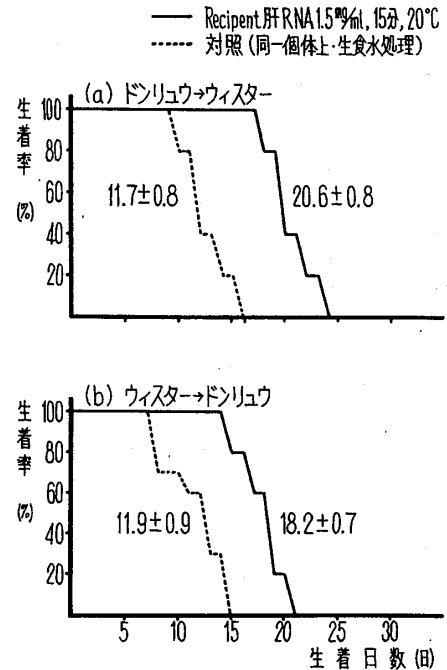


図 4. Recipient RNA 保温と対照の同一個体における比較

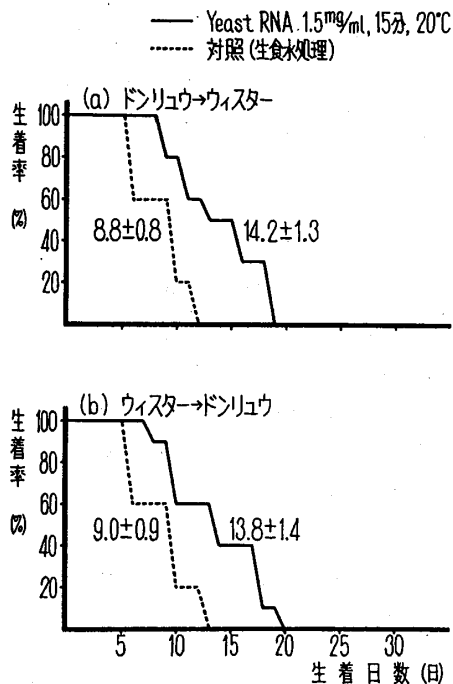


図 3. Yeast RNA の皮膚移植片におよぼす影響

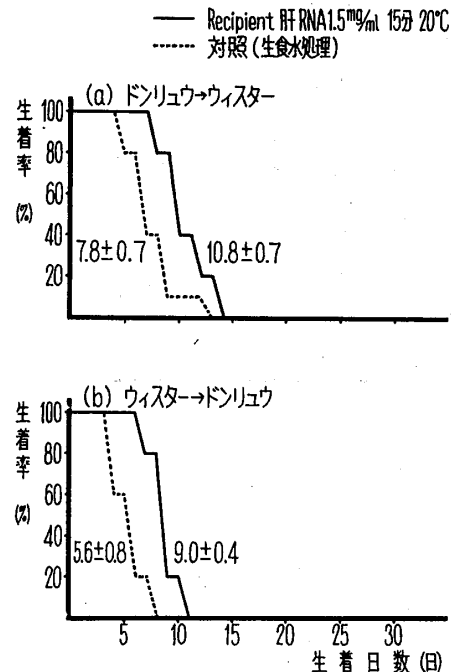


図 5. Recipient RNA 保温と対照の同一個体における second-set reaction の比較

肝由来の DNA を用いた実験では全く対照と変らず移植皮膚片は拒絶された。なお量ならびに保温条件は d-Ribose, DNA とともに recipient RNA と同様にして行なった。

さらに RNA 保温による移植皮膚片の生着延長効果を

確かめ、その効果の機序を推測するひとつの実験として、同一 recipient に同時に RNA 保温と生食水保温の 2 枚の皮膚片を移植する方法を試みた。1 枚ずつ植えた図 1 の成績と同様に、同時に 2 枚移植した際にも図 4 のように明らかに RNA 保温群と対照群との間に差がみられ

た。

つぎに second-set reaction に対する効果を同じ方法によって検討した。後の実験にさしつかえないように頸部近くに同じ大きさの皮膚移植を行なって2週間後拒絶反応の完成したダイコクネズミに RNA 保温と対照の2枚の皮膚片を相互交換移植を行なった。図5がその成績であるが、second-set のために対照、RNA 保温群ともに移植皮膚片の脱落は早い、全体的に recipient 由来の RNA に保温した graft は対照に比べて生着期間がわずかながら延長され、拒絶反応の現われ方がゆるやかなのである。

つぎに抗リンパ球血清との併用の効果を検討するためにつぎのような実験を行なった。まず抗リンパ球血清の blocking antibody ならびに血清としての効果を吟味するため、図6(a)のように移植片を ALS に保温したのちに移植したが、生着日数の延長は得られなかった。

つぎに ATS を 0.5 ml づつ移植前日、当日、以後2日間隔で3回計 2.5 ml を皮下注射した。同一個体に2枚植え、1枚は無処置で ATS の注射の効果をみた。もう1枚は recipient 系由来の RNA 保温後移植した。図6(b)のごとく RNA 保温との併用の方が生着日数が長く、特に早期に拒絶される移植片がなく平均して延長している点が興味深い。

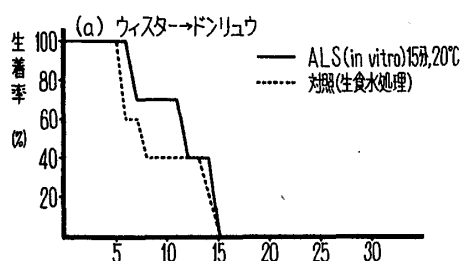


図 6. (a) ALS による保温 (in vitro) の移植片におよぼす影響

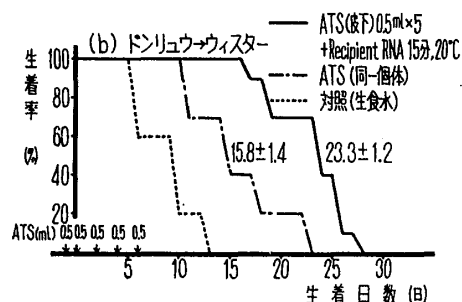


図 6. (b) ATS (in vivo)-RNA 保温併用の移植片におよぼす影響
(対照は比較のため、他個体の実験をの) せた。

考 案

graft を recipient RNA で処理して生着を延長させようという試みについては、Lemperle⁵⁾ がハツカネズミを用い、recipient 系の脾あるいは皮膚より抽出した RNA あるいは DNA を用いて、時間や温度を種々変えて実験を行なっている。RNA, DNA ともに 7.5 mg/ml という高濃度で 20°C, 3 時間保温した群が最も成績がよかったという。また核酸分解酵素で、その効果は消失する。そしてこの実験から recipient 由来の RNA あるいは DNA が、保温の間にわずかながら graft の細胞に入りこみ、移植片の組織適合抗原を修飾し、拒絶反応の発現を遅らせるのではないかと推測している。Kay⁶⁾ や Niu⁷⁾ は哺乳動物でも in vitro, in vivo で DNA, RNA がとりこまれ、腫瘍細胞など⁸⁾ の genetic structure を変化させる可能性を示唆している。今回の実験では、温度、濃度、時間などの保温条件を変えても生着の期間はあまり変わらず、RNA 保温後に生食水で洗滌したものは、ほとんど対照と変わらず早期に拒絶された。このことから graft が皮膚の場合は RNA が細胞にとりこまれて作用するというよりは、むしろ移植片の表面に対する効果のように思われる。腹水肝癌や肝臓のように核酸代謝のはげしいものでは in vitro に用いた RNA がとりこまれ、その生物学的な作用を期待し得るが、腎臓や皮膚のようにそれ自体比較的核酸代謝の少ないと思われる組織では、その作用機序も異なる可能性がある。本実験で同一個体に RNA 保温の移植片と生食水保温の移植片を同時に移植した場合も、さらには二次移植の場合もその生着延長効果が認められることから、移植片表面の RNA のため少なくとも effector cell による移植片の破壊が弱められることが推測される。しかし RNA により抗原認識が阻害されるか否かについては、上記の実験結果から推測し得ない。羊赤血球をダイコクネズミ RNA に保温した後に、ダイコクネズミに注射し、羊赤血球に対する plaque forming cell の数を測定した結果では RNA 保温による抗体産生抑制の効果は認められなかった。しかし抗原の違いもあるため移植片の表面にある抗原決定基に対する RNA の効果については今後の課題として残されている。

また本実験では RNA の系または種特異性は厳密な意味では認められず、donor 由来の RNA や yeast RNA でも生着延長の効果がみられたが、recipient RNA と比較すると、それらの生着延長効果は弱い。小越⁹⁾ は牛肝由来の RNA は、ダイコクネズミの皮膚片に対して効果がなかったといっているが、この場合は、高等動物

であり、RNA 標品からたんぱくなどを除くことが困難で、yeast RNA とは異なった結果がみられたものと思われる。一方 d-Ribose や ALS の保温でもやはり効果はみられなかった。

本実験に用いた RNA 標品に関しては、RNA の分離純化による検討も興味深いが、本実験では、むしろ純化操作による生物学的な失活をおそれあえて粗標品のまま実験に供した。また皮膚片の拒絶反応の判定に関しても問題の多いところであるが、この RNA の効果はマウスの小皮膚片による完全脱落の実験によっても確めている。

Groth ら¹⁰⁾ は、イヌの腎を RNA 溶液で灌流し、RNA が腎細胞にとりこまれることを期待しているが、わずかにみられる生着延長効果は non-specific であるような成績を得ている。

また実際臨床的にも、Jolley らは^{11,12)} 広範囲の火傷の治療に、あらかじめ死体より採取しておいた皮膚を仔牛の肝 RNA 溶液で保温し、その保存死体皮膚を移植し 21 カ月後も生着し、十分な治療効果をあげ得たと述べている。

また本実験で antigen sensitive cell に主に作用するといわれている ATS との併用でも、RNA 保温の移植片の生着日数の方がより延長され、特に早期の脱落が防がれたことは、両者の相乗的な効果を期待し得る。しかし本実験はある意味での基礎的な報告であり、完全な解明をするためには、今後多方面からの検討を必要とする。

稿を終るにあたり、ご校閲を賜った千葉大学第 2 外科教室佐藤博教授、第一生化学教室三浦義彰教授に厚くお礼申し上げます。また終始ご指導をいただきました当教室の岩崎洋治講師、小越章平助手ならびにご協力いただきました碓井貞仁、落合武徳両博士はじめ教室の移植グループの皆様に深く感謝いたします。

SUMMARY

Acquired immunological tolerance has been induced by injection of living nucleated cell, antigenic extracts, microsome and ribonucleic acid(RNA). And the majority of this kind of studies are concerned with alterations of the recipient, especially in the foetal life or neonatal animals.

Recently attempts to prolong survival of skin grafts after incubation with recipient RNA or foreign nucleic acids are reported by Guttman, and Lemperle.

This experiments were designed to determine whether survival times of skin allografts were prolonged after incubation with recipient or donor liver RNA and were concerned with the possibility of transformation of antigenicity in adults rats of Wistar and Japanese Donryu strain.

The recipient liver RNA are more effective than donor liver RNA or yeast RNA in survival of the skin allografts after incubation at 20°C for 15 minutes and this effect of RNA was reduced after washing skin grafts with saline prior to transplantation.

Survival of one graft are prolonged after incubation with recipient RNA in comparing with other control graft which was transplanted simultaneously on the same recipient. And the question of whether RNA is responsible for transformation of antigenicity cannot yet be answered.

More effective survival was achieved with incubation of recipient RNA and repeated injection of antithymocyte serum to the recipient.

文 献

- 1) Ashley, F. L., Mcnall, E., Dutt, N. R., Garcia, E. N. and Sloan, R. F.: The effects of nucleic acids homograft tolerance., Ann. N. Y. Acad. Sci., 87, 429-441, 1960.
- 2) Axelrod, A. E. and Lowe, M. L.: Effect of ribonucleic acid extracts upon viability of skin homografts in the rat., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108, 549-554, 1961.
- 3) Satoh, H., Makino, H., Iwasaki, Y., Kashiwagi, N., Makino, K., Amemiya, H., Ogoshi, S., Yokoyama, T., Nishizawa, T., Watanabe, K. and Ohki, I.: Effect of DNA extracts on skin isograft and homograft in the rat., Jap. J. Transpl., 1, 40, 1965.
- 4) Muramatsu, M., Hodnett, J. L., Steele, W. and

- Busch, H.: Synthesis of 28-S RNA in the nucleolus., *B. B. A.*, 123, 116-125, 1966.
- 5) Lemperle, G.: Pronlonged survival of skin allograft after incubation with recipient DNA or RNA., *J. Surg. Res.*, 8, 511-521, 1968.
- 6) Kay, E. R. M.: Incorporation of deoxyribonucleic acid by mammalian cells in vitro., *Nature*, 191, 387-388, 1961.
- 7) Niu, M. C., Cordova, C. C. and Niu, L. C.: Ribonucleic acid-induced changes in mammalian cells., *Proc. N.A.S.* 47, 1689-1700, 1961.
- 8) De Carvalho, D. and Rand, H. J.: Comparative effects of liver and tumor ribonucleic acids on the normal liver and the Novikoff Hepatoma cells of the rat., *Nature*, 189, 815-817, 1961.
- 9) 小越章平, 碓井貞仁, 田所 潔, 花岡建夫, 横山健郎, 宮島哲也, 木内政寛, 深尾 立, 岩崎洋治, 佐藤 博: 核酸溶液による保温の同種皮膚移植片におよぼす影響 (第1報), *移植*, 4, 351-357, 1970.
- 10) Groth, C. G., Porter, K. A., Daloze, P. M., Hugest, C., Smith, G.V., Brettschneider, L. B. and Starzl, T. E.: Effect of ribonucleic acid perfusion on canine kidney and liver homograft survival., *Surgery*, 64, 31-38, 1968.
- 11) Jolley, W. B., Hinshaw, D. B. and Peterson, M.: Effect of RNA on homograft survival, *Surg. Forum*, 12, 99-101, 1961.
- 12) Jolley, W. B. and Hinshaw, D. B.: Basis studies on homograft acceptance including early clinical results., *Amer. J. Surg.*, 112, 308-313, 1966.
-