ABSTRACT　I

異種移植のために生み出された multi-transgenic なブタにおける内在性レトロウイルスの分布と発現

Britta Dieckhoff et al.

ロバート・コッホ研究所、ベルリン。ボン大学薬理学・毒理学研究所、ボン

2008 年 9 月 6 日着、2009 年 1 月 13 日受理

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2009.00515

Xenotransplantation 2009; 16: 99-114

背景：異種移植に用いるため生産された multi-transgenic なブタは、ブタ内在性レトロウイルス[porcine endogenous retroviruses（PERV）]の遺伝荷重の低い動物を選び出すため、PERV の存在と発現で選別します。トランスジェニックなブタの生産はまた PERV プロウイルスに隣接しているかもしくはその場所にいるトランスジーンの統合と結び付けられるかもしれませんが、ウイルスの発現が高められる可能性があります。

方法：non-transgenic な動物や single-transgenic, and multi-transgenic なブタを PERV-A, -B, -C や recombinant PERV-A/C があるかどうかで選別しましたが、ポリメラーゼ連鎖反応を用いました。PERV の発現はリアルタイムの逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応で決めました。PERV を作り出す量が多いブタと少ないブタとを識別するのには、マイトジェンによる末梢血の単核細胞に含まれている PERV の活性化に基づく評価を用いました。

結果：すべてのブタは PERV-A と-B の保菌者でした。181 頭のうち 176 頭（97.2%）は PERV-C を生殖細胞系列中に持っていましたし、64 頭のうち 18 頭は PERV-A/C をリンパ細胞のゲノム中に持っていましたが、生殖細胞中にはありませんでした。すべてのブタに

おいて PERV の発現はきわめて低く、トランスジェニックなブタとトランスジェニックでないものとの差はありませんでした。様々なブタの系列の間では PERV の発現は異なりました。最も発現が高かったのはミニブタで、ミニブタとほかの系列のブタを交配させると、次世代においては PERV の発現は高まりました。しかし全てのトランスジェニックなブタにおいて、ウイルスタンパクと粒子放出（particle release）は認められませんでした。

結論：multi-transgenic なブタにおいて PERV の発現が高いという証拠は認められませんでした。PERV の発現の違いは、ブタの遺伝的な背景とは相関関係がありますが、特定のトランスジーンとは無関係です。ミニブタは一貫して最も高い PERV の発現レベルを保持していましたが、ミニブタという背景のないブタと比較すると、そうした背景のあるブタはより高いレベルの発現を示しています。

ABSTRACT　Ⅱ

CO 放出分子 3 [carbon monoxide-releasing molecule-3（CORM-3）]がブタから霊長類への異種間の組織移植という状況下における in vivo と in vitro での効果

Marta Vadori et al.

パドゥア大学等

2008 年 9 月 19 日着　2009 年 3 月 5 日受理

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2009.00521

背景：虚血再灌流による損傷ならびに移植片の拒絶反応と結びつけられている炎症性とアポトーシスな過程を CO は妨害します。今回は新しい水溶性の carbonyl CO carrier である CORM-3 がブタの大動脈の血管壁細胞[porcine aortic endothelial cells（PAEC）]と霊長類の末梢血単核細胞[peripheral blood mononuclear cells（PBMC）]におよぼす in vitro での

効果を調査しました。また霊長類に単回もしくは複数回投薬した場合の CORM-3 の薬動力学と pharmacotolerance は、ブタから霊長類への異種移植モデルへの適用の可能性を考慮して、評価しました。

方法：in vitro での研究では、PAEC と霊長類の PBMC は CORM-3（20~1000μm）に 24 時間、48 時間、72 時間さらし、生存可能性を CFSE ラベリングで評価しました。放射線を照射されたブタのリンパ球の増殖と比較して、霊長類の PBMC の増殖もまた評価しました。腫瘍壊死因子[tumor necrosis factor alpha（TNF-α）]の生産ならびに Concanavalin A（conA）に刺激された霊長類の PBMC における Caspase-3 and -7 の活性を CORM-3 による処置に引き続いて測定しました。 in vivo では、CORM-3 は i.v. で 4 mg/kg の割合でカニクイザルに単回もしくは複数回数で 30 日間まで投与しました。CORM-3 の効果は、species-specific ELISA による LPS での PBMC に対する刺激に引き続く TNF-α とインターロイキン 1β の生産の評価によって、評価されました。全般的な血液学的・化学的な分析は、処置された霊長類においては当然のこととして行われました。

結果：500μm よりも小さい濃度では、CORM-3 は PAEC もしくは霊長類の PBMC の in vitro での生存可能性に影響しなかったし、有意義なレベルでのアポトーシスももたらしませんでした。興味深いことに、300μm と 500μm の濃度では有意義な PAEC の増殖が観察されましたが、他方 50μm 以下の濃度では conA が活性化した霊長類のリンパ球の増殖は抑制されました（IC50 of 345.8+_51.9μm）。そしてブタの PBMC に対する霊長類の異種に対する反応も抑制されました。このような反応は CO 次第であることが示されたのです。更に、200μm と 500μm の間の濃度では CORM-3 は caspase-3 and -7 の活動を著しく抑制し、TNF－α の生産を著しく減少させました（IC50 332.8+_33.9μm）。in vivo では複数回数の投与の後、投与前と比較すると TNF-α の生産は相当減少してはいますが、

減少したレベルは研究の全期間を通して維持されています。更に、CORM－3 に複数回数さらされた動物においてはトランスアミナーゼとビリルビンが少量かつ一時的な増加が観察されています。

結論：これらの研究が示唆していることは、霊長類においては CORM-3 は反炎症的・免疫抑制的な性質を持っており、同種間および異種間で移植された臓器に臨床的に有益な結果をもたらす可能性があるということです。

ABSTRACT　Ⅲ

ブタの肝門脈の incremental な弾性率と incremental な伸展性（compliance）に年齢が与える影響

Pei-jun Wang et al.

Yun-yung Medical College, Shiyan,中国、北京工業大学等

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2008.00505

Xenotransplantation 2009; 16: 5-10

背景：現在のところ、ブタはヒトに異種の臓器を提供する最も有望な供給源と見られています。なぜなら、解剖学的にも生理学的にもヒトに類似しているからであり、また多数生育することが比較的容易だからです。肝臓の異種移植の研究は近年非常に高く評価されています。色々な種の肝臓が異種移植後に通常の機能を遂行できるかどうかは、機能の再生と肝門脈の lucid rates 次第です。この研究の目標は、将来におけるブタからヒトへの肝臓の異種移植ための信頼のおける生体適合物質を探求するための道を整備するため、ブタの肝門脈の生体力学的な属性に年齢が及ぼす効果を調べることです。

方法：この研究ではブタの肝門脈のリモデリングを１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、４ヶ月間、５ヶ月間、６ヶ月間（n=6 per month）測定しました。血管には定期的に永続的に負荷を加重したり加重を取り除いたりして、繰り返された加圧による変形についてのデータを入手しました。増分率[incremental modulus（Einc）]、longitudinal incremental modulus（Ep）、circumferential incremental modulus（Ev）、incremental な伸展性[compliance（C）]と血管壁の厚さは、実験データから得られた記録された pressure-diameter curves に基づいて算出しました。

結果：ブタの肝門脈の増分率（incremental modulus）、pressure strain modulus、容積弾性率（volume modulus）は加齢とともに増大し（P<0.01）、他方、伸展性は加齢とともに減少しました（P<0.01）。

結論：現在の研究が示唆していることは、ブタの肝門脈の生体力学的な属性は年齢によって左右されるものであり、肝臓の異種移植に選ばれるべきなのは、ヒトの肝門脈の生体力学的な属性にマッチする属性を持ったブタの肝門脈であるということです。

ABSTRACT　Ⅳ

68 頭の特定の病原体に汚染されていないミニブタを用いて決定された成功するブタの膵島分離のためのパラメータ

Hyoung－Ⅱ Kim et al.

異種移植研究センター、Jongno-gu、韓国

2008 年 9 月 16 日着、2008 年 12 月 5 日受理

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2008.00504

Xenotransplantation 2009; 16: 11-18

背景：膵島細胞の移植は糖尿病のための新しい治療様式です。ブタの脾島細胞はヒトの脾島細胞にとって魅力的な代用品ですが、分離するのが特に困難なことで知られています。なぜかというと、脾島の被膜は弱いし、酵素による消化の期間中に分裂する傾向があるためです。従って、特定の病原体に汚染されていない[specific-pathogen-free（SPF）]なミニブタを使って、ブタの脾島の分離を成功に導くパラメータを調査しました。

方法：脾島の分離には 68 頭の SPF のミニブタを使いました。各ブタの出生時の体重、体重、年齢、性別、妊娠歴、空腹時の血糖値は確定されました。各ブタの全般的な状況は、摂食状態と肉体的活動を考慮して評価しました。膵臓の入手は外科チームが担当しました。麻酔時間、手術時間、手順の質、灌流液のタイプは記録されました。膵切除後、脾島の density analysis のため、生検がおこなわれました。被膜剥離、挿管時間、膨張の程度、cold 虚血時間は評価されました。脾島の分離の際に、膵臓の重量、消化時間、消化された組織の割合は記録されました。分離の結果は、total islet equivalents（IEQ)、脾臓 1 グラムあたりの脾島の equivalents（IEQ/g）、分離指数（isolation index）、脾島回復率（islet recovery rate）、純度、視覚による格付け（visual grade）で評価されました。より高い脾島分離の収穫高（islet isolation yield）の predictors を確認するため、単一変数分析の有意義な（$P<0.05$）変数を用いてバイナリーなロジステック回帰分析をおこないました。

結果：median IEQ/g もしくは IEQ values に応じて、ブタは高収穫（n = 34）のグループと低収穫（n = 34）のグループとに分けられました。この 2 つのグループでは体重と年齢は著しく違いました。

ABSTRACT　V

ドイツにおける 40 年間の心臓移植

B. Reichart & U. Brandi

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2008 年 9 月 16 日着、2008 年 12 月 5 日受理

今日では臓器移植は末期の臓器不全に対する確立した有効な治療法であり、生存率は高い。不幸にして臓器移植の素晴らしい可能性はフルに活用できていません。臓器に対する需要と臓器の寄贈との間に大きなギャップがあるためです。統計によれば 90 年代末以来毎年おこなわれている臓器移植の数は小さいままで推移しています。

ドイツにおいて、また世界において継続しているヒトの臓器の大変な不足に対処するため、最適ではない臓器や年寄りの臓器も受理されています。質の悪い臓器の受理も 1997 年にドイツで施行された移植法にしても、この問題に対する答えにはなっていません。ドナーを増やすのは困難だし、結局は充分な数にはなりません。

移植の結果を改善するというのは重要な付加的な達成目標です。どうやって改善するのかというと、例えばより少ない腎毒性の免疫抑制によって、あるいは低反応もしくは免疫寛容を創り出すことによってです。

非常な臓器不足に答える選択肢は、変性疾患や外傷性の組織に対する損傷を治療する代替細胞の実質的には無尽蔵な供給源としての胚性幹細胞の分化（differentiation）あるいは成人の幹細胞の reprogramming かもしれません。しかし倫理的な問題とか、発ガン性細胞の発生といったデメリットは過小評価されるべきでありません。

分別されていない骨髄（CD133+ stem/progenitor）細胞を心筋層に注入する細胞療法は慢性虚血性心臓病に対する大動脈冠状動脈の手術をともなう場合もあればともなわない場合もありますが、羊水（ホウォートンゼリー）由来の細胞の注入とともに臓器欠乏に対する将来的な解決策かもしれません。しかしヒトの心臓の機能的な代替物というにはまだほど遠い代物です。

現在までのところではヒトの臓器に完全かつ永久的に取って代われ、しかも同種移植と同等のクオリティーオブライフを提供できるような移植可能な機械の心臓補助装置は存在しません。

これと対照的にヒトへの移植にブタの臓器を用いる異種移植は、世界的な寄贈臓器の不足に対する潜在的な解決策なのです。異種移植の利点は、ドナーの臓器を無尽蔵に自由に利用できることであり、移植も急を要さないのでひいては虚血時間は短縮され、レシピアントの免疫抑制療法を手術前にスタートさせることが可能となることです。ドナーの脳死がドナーの臓器に与える悪影響は排除されます。共存可能な異種移植片の遺伝子的な手直しが実行可能です。

異種移植の分野における重要な進歩が可能だったのは、human complement regulatory proteins 例えば human decay accelerating factor（hDAF/hCD55）、human membrane cofactor（hMCP/hCD46）、human membrane inhibitor of reactive lysis（hMIRL/hCD59）にトランスジェニックであるように遺伝子を改変されたブタの臓器を導入したおかげです。これらのトランスジェニックなブタと一緒に Galα(1,3) Gal therapeutic（例えば GAS914, TPC）によって preformed cytotoxic anti- Galα(1,3) Gal 抗体（IgM と IgG）の効果的かつ永続的な減少を用いることにより、超急性の拒絶反応を成功裡に避けることができます。移植手術後の初期の段階で誘発された anti- Galα(1,3) Gal 抗体 によって引き起こされた急性の血管性拒絶反応はコントロールできます。幾つかの研究グループは Galα(1,3) Gal 異種抗原を持たないブタを開発しました。同型接合の alpha (1,3)-galactosyltransferase gene ノックアウトブタでおこなわれた異種移植についての研究は、移植片の存続という点に関しては、これらの改変されたブタの臓器はいくらかの進歩がありました。従って主要な異種抗原である Galα(1,3) Gal はブタの臓器をヒトに移植するのを妨げる克服不可能な免疫学的な障害物ではもはやありません。

しかし急性の血管性拒絶反応は異種移植に対する重要な臨床的な障害物であり続けて

います。なぜなら異種移植片の拒絶反応に関係しているのはGalα(1,3) Galだけではなく、他の特性を持った抗ブタの細胞傷害性抗体のせいでもあるのです。更にまた体液だけが異種移植片の拒絶反応に関係している訳ではありません。霊長類の抗ブタ細胞性免疫は多発的なリンパ球性の浸潤によって定義されており、直接的な組織への損傷という形態学的な証拠をともなっています。

異種移植を臨床的におこなうための前提条件は、PERV ノックダウン（si-RNA）のテクニックを用いた PERV-C（porcine endogenous virus C）に汚染されていない動物です。multitransgenic αGalT-KO[alpha(1,3)-galactosyltransferase]ノックアウトブタで更に human complement regulatory proteins と human anticoagulants（例えば human thrombomodulin）を発現しているものが最初の免疫学的な障害物である超急性拒絶反応を防止するためだけでなく、血管性拒絶反応の始まりを防止するのにも必要なのです。ブタの心臓に対する血清細胞毒性が主として Galα(1,3) Gal-specific であるように見えるときは特にそうです。更に co-stimulation blockade（例えば PD-1L, CTLA-4-lg）HLA-E[ヒトの NK 細胞に対する保護]あるいは haemeoxygenase-1（汎発性血管内凝固に対する防御）は異種移植片に対する急性の血管拒絶反応と急性の細胞拒絶反応を抑制するのに役立つでしょう。臓器を提供するブタ用の特別の無菌状態のユニットと特別の繁殖状態があれば、ブタの移植用片から人のレシピエントに移りかねない大半の病原体による汚染の危険性は限定されます。

異種移植の第一の臨床的な目標は、低血糖症を発病した糖尿病患者にブタの膵島細胞（αGalT-KO(?), CTLA-4-lg 発現）やブタの comea、心筋細胞、心臓弁、出来れば骨や歯もといった異種間の組織移植です。最終的な臨床目標は、腎臓や心臓という前途有望な利用でスタートする異種臓器の移植です。

要約すると、臨床的な心臓移植は末期の心臓不全に対する受け入れられた方法ですが、時代遅れの「標準免疫抑制」と一人一人の患者の個別的なニーズに合った個別化された免

疫抑制をともなっています。臓器の不足が心臓移植の主要な障害物です。そのほかの臓器の移植では近い将来に異種移植が可能になるでしょう。

ABSTRACT　VI

ドイツと EU における異種移植の規制

J. Stra β burger

DIGITAL OBJECT IDENTIFIER （DOI） 2008.00484_8

1990 年の中葉以来、異種移植は規制の対象です。重点が置かれているのは、異種移植の危険、特に異種移植と関連した感染の危険から個人と公衆を保護することです。

WHO や欧州評議会のような国際機関は異種移植を扱っている一連の出版物を出してきましたが、法律的な拘束力はありません。しかし EU のレベルでは、法的な拘束力のある規定もあります。まず医薬品についての一般的な規定が適用されています。特に異種間の医薬品に関する規定が Directive 2001/83/EC[4]の Part Ⅳ Annex Ⅰと Directive 2001/20/EC[5]に含まれています。更に「異種間の細胞治療医薬品について考慮すべき諸点」と題する EMEA による文書は、異種間の細胞治療医薬品の開発と評価についての基本的な考慮点が含まれています。

上級治療医薬品についての Regulation（EC）No 1394/2007 は 2007 年末に施行されましたが、異種間の医薬品の認可、管理、医薬品安全性監視についての特定の規定をまもなく導入するでしょう。科学知識の進歩に合わせるため、また規定の枠組みを調和させるため、現在様々な Community rules が更に展開させられ、あるいは巧みに作り上げられています。その上、EMEA に上級治療委員会が設けられることになっています。

ドイツでは異種移植の法的な枠組みは実質的には Community rules、特に ordinances と directives によって定められています。ordinances はすべての加盟国に直接適用され、

従って法律の効力があります。しかし directives はまず国の法律に組み入れなければなりません。この国法化は上記の directives に関する限り実質的には German Medicinal Products Act と German GCP-Ordinance で達成されています。この文脈においては、更なる規定を設けることは適切です。特に遺伝子操作についての立法、動物の福祉についての立法、医師の職業的基準と職業遂行上の規約、感染に対する保護立法といった諸規定です。