

# 同種皮膚移植の実験的研究、とくに移植皮膚片に対する物理的ならびに生物学的前処置が拒絶反応におよぼす影響について

岡山大学医学部第二外科教室（主任・砂田輝武教授）

柳 本 誠 一 郎

〔昭和44年6月28日受稿〕

## 目 次

第1章 緒 言	2) 6時間保存皮膚
第2章 実験材料ならびに実験方法	3) 12時間保存皮膚
第1節 実験動物	4) 24時間保存皮膚
第2節 実験方法	5) 小 括
第1項 皮膚移植	第3項 凍結保存皮膚移植後の血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動
1) 麻 酚	1) 単純凍結保存皮膚
2) 移植皮膚片の採取	2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚
3) 移植方法	第4項 凍結保存皮膚の組織学的变化
4) 観察方法ならびに拒絶反応判定	1) 単純凍結保存皮膚
第2項 皮膚保存方法	2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚
第3項 prednisolone 投与方法	第5項 凍結保存皮膚のアミノ酸百分比について
第4項 血清 $\gamma$ -globulin 分画	1) 単純凍結保存皮膚
第5項 皮膚アミノ酸分析	2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚
第6項 皮膚組織像	3) 小 括
第3章 実験成績	第6項 総 括
第1節 大きさを異にする皮膚片の同種移植実験	第3節 prednisolone 投与マウスよりえた皮膚の同種移植実験
第1項 拒絶現象	第1項 拒絶現象
1) 小皮膚片 (1.0cm $\times$ 2.0cm) の拒絶	1) prednisolone 短期投与マウス皮膚の拒絶
2) 大皮膚片 (2.0cm $\times$ 4.5cm) の拒絶	2) prednisolone 長期投与マウス皮膚の拒絶
第2項 血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動	3) 小 括
第3項 同種移植後の皮膚の組織学的变化	第2項 prednisolone 投与マウス皮膚移植後の血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動
第4項 総 括	第3項 prednisolone 投与マウス皮膚の組織学的变化
第2節 凍結保存皮膚の同種移植実験	第4項 prednisolone 投与マウス皮膚のアミノ酸百分比について
第1項 単純凍結保存皮膚の拒絶現象	第5項 総 括
1) 3時間保存皮膚	第4章 考 按
2) 6時間保存皮膚	第5章 結 語
3) 12時間保存皮膚	
4) 24時間保存皮膚	
5) 小 括	
第2項 15% glycerin 添加凍結保存皮膚の拒絶現象	
1) 3時間保存皮膚	

## 第1章 緒 言

同種移植された組織、臓器が宿主によって拒絶される、所謂 homograft rejection phenomenon は同種移植には避けられない免疫反応によっておこるものであり、臓器移植の成功を阻む最も厚い壁となつてゐることは衆知のことである。この拒絶現象は Billingham, Medawar<sup>1)</sup>の研究により移植抗原に対する宿主の免疫反応が同種組織にたいしておこることによるものであることが明らかにされており、その免疫反応抑制方法としては、X線の照射、steroid系薬剤、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質などの投与、抗リンパ球血清の使用がおこなわれているが、未だその効果は適確とはいえず、その副作用も強くて現在なお免疫反応抑制法については暗中模索の状態である。

一方、同種移植免疫反応系を考えるに、移植抗原が導入されて救心性に網内系に到達して抗体が産生され、その抗体が遠心性過程をへて移植抗原に達し、ここに抗原抗対反応がおこなわれ、その結果拒絶現象が起ると考えられている<sup>2)</sup>。したがつて免疫反応を抑制するためにはこの反応系のいづれかの部位でその機構を抑制するかその過程を遮断すればよいわけであるが、従来のこの方面の多くの研究は網内系組織における抗体産生そのものを抑制する点に主眼がおかれてゐる感がある。しかしながら、移植抗原自体に量的ならびに質的な変化が招来された場合にも移植免疫反応なかんずく拒絶現象は異つた様相を示すであろうことは当然考えられることである。著者は、まず移植皮膚片の大きさの相違が拒絶反応におよぼす影響、すなわち免疫反応の移植抗原に対する dosage response を検討したのち、ある程度の生物学的特性を保持する範囲内で物理的あるいは生物学的な変化をうけた皮膚片が同種移植された場合に、免疫反応がいかなる様相を呈するかをみるために凍結保存マウス皮膚ならびに prednisolone 長期投与により萎縮性変化をきたしたマウス皮膚の同種移植実験をおこない、主として拒絶反応を指標とした観察をおこなつたのでその結果を述べる。

## 第2章 実験材料ならびに実験方法

### 第1節 実験動物

実験に使用した動物は、岡山大学附属実験動物室より供与された A 系、Db 系、および C<sub>57</sub>BL 系マウスで、いずれも生後 8 週以上経過した 20ないし 30g

の体重を有する成熟雄で、必要に応じて入手し、皮膚移植前は大型飼育箱に 10 匹宛入れ、水および固形飼料（オリエンタル酵母 K. K.）にて飼育し、皮膚移植後は小型飼育箱に 1 匹づつ飼育した。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 皮膚移植

A 系と Db 系、および A 系と C<sub>57</sub>BL 系マウス間で皮膚移植を施行した。移植皮膚片の大きさは 1.0cm × 2.0cm と 2.0cm × 4.5cm の面積の異つた二種類とし、前者はまた標準面積として実験中とりあつた。

##### 1) 麻酔

Nembutal Sodium (Sodium Pentobarbital Injection 50mg per ml.) を用いた。これを生理的食塩水で稀釀して、平均 0.06mg/g 体重の割合で腹腔内に注射することにより麻酔した。この際、室温が 20°C 以下の場合には麻酔の回復が悪く、体温下降に伴い麻酔死を招来しやすく、また A 系マウスに比較して Db 系、C<sub>57</sub>BL 系マウスは麻酔剤に対する感受性が高いので、その投与量を加減した。

##### 2) 移植皮膚片の採取

麻酔されたマウスを実験台上に固定し、胸部背面を電気バリカン（刃 0.4m/m）を用いて必要範囲の剪毛を施行した。これだけでも充分移植実験に供与しうる皮膚片を得ることが出来たが、さらに完全を期するために硫酸ストロンチウムを主剤とする脱毛クリームを塗布し 2 分後に軽く拭きとつた。移植床の作製にあたつては、文献上 suprapanniculare に調整したものと subpanniculare に調整したものとの間に移植皮膚片の生着日数に有意の差を認めるといわれてゐることを考慮し<sup>3)</sup>、移植床側へ Panniculus を残さない subpanniculare 法に統一した。またこの際、マウス胸部背面の血管の走行を充分考え出血を最少限に喰い止めるように注意した。マウスの皮膚は増殖期 (Anagen) には肥厚し、移植の際に虚血の影響をうけやすく生着期間もかなり短縮するといわれているので、donor, recipient 共々 退行期 (Catagen) 後半より静止期 (Telogen) のものを使用した。

##### 3) 移植方法

subpanniculare 法により採取した皮膚片を 6-0 Blaisted Silk (日腸) により結節縫合固定し、さらに市販の生体接着剤 Biobond (EDA-Adhesive «Yoshitomi») で補強した。移植後は個室飼育として可及的に局所の安静が保たれるようにし、他のマウスにより移植皮膚片が咬みちぎられるのを防いだ。

二次移植は一次移植された皮膚片が完全に脱落した直後、一次移植皮膚片を採取した同一 donor より  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を採取して一次移植と同一手技をもつて移植し、二次移植反応を観察した。尚、凍結保存皮膚移植実験における二次移植皮膚片は、donor から採取した直後凍結することなく用いた。

#### 4) 観察方法ならびに拒絶反応判定

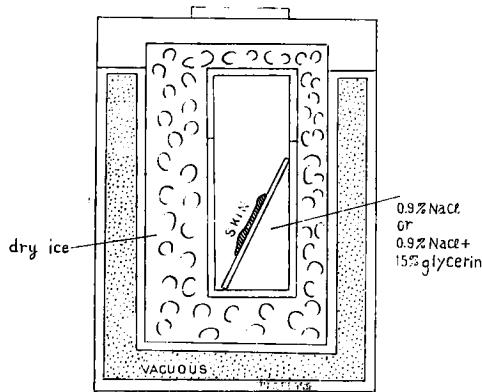
移植後は毎日肉眼的観察により、浮腫、発赤、点状出血、乾燥、硬結、痂皮形成等を記録し、移植後 4 日ないし 6 日目（拒絶現象開始前）、拒絶現象開始後、生着皮膚片脱落前の皮膚片を recipient 側共々採取しその組織像を肉眼的観察と合せ検討した。この際、肉眼的には移植後 3 日ないし 4 日目に移植皮膚片は鮮紅色を呈し血行再開（vasculization）が充分考えられるが、この鮮紅色が淡褐色と変化して浮腫、表面乾燥さらに硬度が増していく。この時期を拒絶現象の開始と考えた。硬度がさらに増強して全域にわたるころには表面全体は乾燥し褐色を呈するようになるが、これをもつて拒絶現象の終了とした。尚、移植皮膚生着期間の中間値は、移植皮膚片の完全に脱落するまでの日数を  $a$ 、拒絶現象が発現するまでの日数を  $b$  とすると、 $b + \frac{a-b}{2}$  であらわされる。

以上に加えて拒絶現象開始前後を中心に移植皮膚片の脱落までの過程を血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動について、また各々の条件下における移植前皮膚のアミノ酸組成について、これらが本実験に如何様の関連性をもつか検討した。

#### 第2項 皮膚保存方法

A 系マウス皮膚片  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  を生理的食塩水および 15% glycerin 添加生理的食塩水に浸漬して滅菌した図 1 に示すような装置内に保存し、dry ice 内

図 1 凍結保存装置



で 3・6・12・24 時間迅速凍結保存し、移植前に  $37^{\circ}\text{C}$  溫浴槽中で 3 分間融解したのち C<sub>57</sub>BL 系マウスに移植した。前者を単純凍結保存皮膚、後者を 15% glycerin 添加凍結保存皮膚とする。

#### 第3項 prednisolone 投与方法

A 系マウスに Prednisone (プレドニゾロン・ソジウム・ヘミサクシネット 20mg/2ml 塩野義) を生理的食塩水にて稀釀して prednisolone として 1mg/day を連日腹腔内に投与し、投与期間を 3 週間以内と 7 週間ないし 9 週間（平均 8 週間）の二つに別け前者を短期投与群、後者を長期投与群としそれぞれの皮膚を Db 系マウスに移植し、移植後は donor, recipient 共に prednisolone の投与はおこなわず、二次移植に供する皮膚片はそれぞれ同一 donor より  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を用いて一次移植と同一面で異つた場所に移植した。

#### 第4項 血清 $\gamma$ -globulin 分画

ERMA G-681 Ba. b. d 装置を用い、経時的に recipient の眼窩血管網より毛細管にて採血しこの血清を用いて paper electrophoresis による  $\gamma$ -globulin 分画百分比を測定した。泳動方法は電気泳動学会の標準操作法により東洋濾紙 No. 51、ペロナール・ペロナールソーダー緩衝液 (pH 8.6) を用い、濾紙幅 0.4 mA/cm で血清アルブミンが原点より 8 cm 移動するような泳動図を標準とし、Amidoschwarz 10B にて染色、吸光度測定により判定した。尚、相互関係をみるために百分比を基底とした。測定は移植前と移植後 3 日目より隔日に施行し、拒絶現象開始時期には連日 2 日間測定しその後は移植皮膚片の完全脱落時期およびその 2 日後まで測定した。

#### 第5項 皮膚アミノ酸分析

移植前の皮膚片  $1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$  を採集し中性リン酸緩衝液 (pH 6.86 25°C) を加えて 15 分間ホモゲナイズし（検鏡にて正常細胞形態の認められないのを確認する）、これを 18,000 回転で 30 分間超遠沈したのち、その上澄液 1cc を採取し 1% ピクリン酸 5cc を加えて除蛋白し 3000 回転で 10 分間遠沈した後、その上澄液 5cc を径 1cm の column 内に高さ 1.5cm まで Dowex 50-W を入れたものでピクリン酸を除去する。この際 IN-HCl で洗滌することにより完全にピクリン酸を除去することが出来た。ついでこの濾液を真空ポンプで減圧し水分を蒸発せしめその残渣にクエン酸緩衝液 (pH 2.2) 2cc を加え、その溶解液 0.5cc をアミノ酸自動分析装置（柳本 LC-5 型）で各状態のアミノ酸値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) を測定しその百分比をもつて相

互間の関係を検討した。

#### 第6項 皮膚組織像

無処置(对照), prednisolone 短期・長期投与, 3時間, 6時間, 12時間, 24時間単純および 15% glycerin 添加凍結保存した移植前の皮膚および拒絶現象開始前後の移植皮膚を採取し, 10% ホルマリン固定した後にヘマトキシリソ, エオジン染色を施して検鏡した。

### 第3章 実験成績

#### 第1節 大きさを異にする皮膚片の同種移植実験

##### 第1項 拒絶現象

1) 小皮膚片の拒絶: 大きさ  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を A 系マウスから Db 系マウスに移植すると, 移植後 6 日ないし 9 日目に拒絶現象が発現し, 9 日ないし 12 日目に移植皮膚片の完全脱落がみられる。これらの移植皮膚片の生着期間の中間値は 7.5 日から 10.5 日の間にあり平均  $8.85 \pm 0.88$  日である。さら

に各々のマウスに一次移植と同一 donor から大きさ  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を二次移植すると, 移植後 3 日ないし 5 日目に拒絶現象が発現し, 7 日ないし 8 日目に移植皮膚片の完全脱落がみられる。この二次移植における移植皮膚生着期間の中間値は 5.0 日から 6.5 日の間にあり平均  $6.00 \pm 0.46$  日である(表 1)。

2) 大皮膚片の拒絶: 面積にして約 4 倍大の大きさの  $2.0\text{cm} \times 4.5\text{cm}$  皮膚片を A 系マウスから Db 系マウスに移植すると, 移植後 8 日ないし 9 日目に拒絶現象が発現し, 18 日ないし 23 日目に移植皮膚片の完全脱落がみられる。これらの皮膚片の生着期間の中間値は 13.0 日から 15.5 日の間にあり平均  $14.40 \pm 0.77$  日である。さらに各々のマウスに一次移植と同一 donor から大きさ  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を二次移植すると, 移植後 4 日ないし 6 日目に拒絶現象が発現し, 7 日ないし 10 日目に移植皮膚片の完全脱落がみられる。この二次移植における移植皮膚生着期

表 1. 大きさを異にする皮膚片の同種移植と拒絶現象

一 次 反 応				二 次 反 応 *			
皮膚片の大きさ	開始	終了	中間値(日)	皮膚片の大きさ	開始	終了	中間値(日)
$1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$	7	10	8.5	$1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$	4	8	6.0
	9	12	10.5		5	8	6.5
	6	10	8.0		4	7	5.5
	6	10	8.0		4	7	5.5
	8	11	9.5		5	8	6.5
	7	11	9.0		3	7	5.0
	8	10	9.0		5	8	6.5
	6	9	7.5		4	7	5.5
	7	11	9.0		3	7	5.0
	8	11	9.5		5	8	6.5
平 均	$8.85 \pm 0.88$			平 均	$6.00 \pm 0.46$		
$2.0\text{cm} \times 4.5\text{cm}$	8	18	13.0	$1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$	4	8	6.0
	8	19	13.5		5	8	6.5
	8	20	14.0		6	9	7.5
	8	23	15.5		4	8	6.0
	8	20	14.0		4	8	6.0
	8	21	14.5		4	7	5.5
	9	21	15.0		5	8	6.5
	9	21	15.0		6	9	7.5
	9	20	14.5		5	8	6.5
	9	21	15.0		6	10	8.0
平 均	$14.40 \pm 0.77$			平 均	$6.60 \pm 0.81$		

\* 一次移植と同一 donor より  $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$  の皮膚片を採取し, 一次移植皮膚片完全脱落直後に施行

表 2. マウスの paper-electrophoresis の正常値 \* (%)

	Al	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
小林茂三郎・村井京子	49.6~55.4	15.9~17.6	19.9~21.2	9.1~12.4
Scheiffarath et al	60.30	10.06	18.50	11.40
Geintz W.	42.9	$\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$ 4.2 11.0 5.4	20.2	16.3
Olberg H. et al	38.19	$\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$ 5.24 5.65 6.68	$\beta_1 \beta_2 \beta_3 \beta_4$ 5.41 4.78 20.80 3.85	$\gamma_1 \gamma_2$ 4.0 8.0
Jancovic et al	47.6	26.8	14.1	11.5
著者 (20例の平均値)	51.80	17.31	19.95	10.94

\* 34)

表 3. prednisolone 投与皮膚片同種移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画値 (%)

REJECTION *	-3	-2	-1	0	2	4	6	8	10
対照 小皮膚片 (1.0cm×2.0cm)	12.7	7.9	5.8	4.4	7.3	4.3	10.3		
大皮膚片 (2.0cm×4.5cm)	9.6	8.2	6.3	5.0	9.7	8.1	6.3	5.3	10.4
prednisolone 短期投与皮膚片 (1.0cm×2.0cm)	13.1	11.5	6.1	3.3	10.9	4.4	11.0		
prednisolone 長期投与皮膚片 (1.0cm×2.0cm)	14.4	8.8	5.3	4.4	10.8	3.8	9.2		

\* 拒絶開始日を 0 とし、それ以前は負の日数で示す

間の中間値は 5.5 日から 8.0 日の間にあり平均 6.60  $\pm$  0.81 日である (表 1)。

すなわち、一次移植において移植後拒絶現象の発現までの期間は小皮膚片と大皮膚片との間に差を認めないが、拒絶開始から脱落するまでの期間、ひいては移植皮膚生着期間は大皮膚片の方が明らかに延長している。また二次移植においては拒絶促進現象は一次移植片として大皮膚片を用いた場合も小皮膚片を用いた場合にも発現し、その拒絶促進現象の程度には差は認められず、いずれの場合も 2 日ないし 3 日の生着期間平均値の短縮がみられる。

#### 第 2 項 血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動

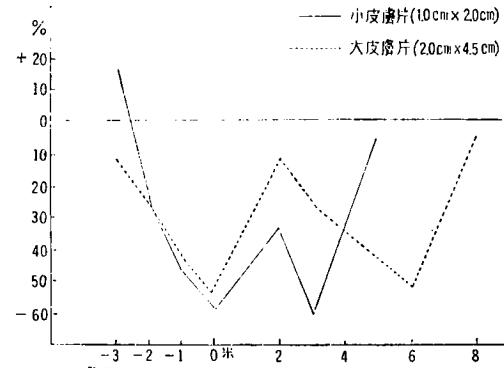
小皮膚片移植後の  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動をみると、移植皮膚片が生着するころ、すなわち移植後 3 日ないし 4 日目ごろまでは上昇するが、その後漸減し肉眼的に拒絶現象が発現する時期には減少してほぼ最低値を示す。その後上昇して移植片が完全に脱落する時期には再び強く減少する。その後は漸次上昇し正常値に復する。大皮膚片移植後の  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動も移植皮膚片の拒絶に関しては小皮膚片移植の場合と同様の変動を示し、変動の程度も拒絶現象開始時期における  $\gamma$ -globulin 分画百分比の低下も弱い。また皮膚片の脱落する時期

にほぼ一致する減少も正常値の 50% ないし 60% で、小皮膚片移植と大皮膚片移植の間には差は殆んどみられない (表 2・3, 図 2)。

#### 第 3 項 同種移植後の皮膚の組織学的変化

移植後から肉眼的に明らかな拒絶現象が発現するまでの間、経時的に移植皮膚の組織像をみると、3 日目では植皮床の血管は拡張、充血している。6 日目ごろでは真皮は浮腫状となり宿主との境界には多形核白血球、小円形細胞の浸潤が著明にみられ、小

図 2 大きさを異なる皮膚片の同種移植後の血清  $\gamma$ -globulin の変動 (分画百分比の増減率)



\* 拒絶現象開始日、開始前は負の日数で示す

血管は拡張充血が著しく所々では出血を認める。9日目頃になると真皮は浮腫状で核は濃縮され全体に染色性が低下してくる。また宿主の表皮が辺縁部より植皮片の表皮下、真皮の上に新生している像がみられる。移植皮膚片の完全脱落前の12日目前後にもなると表皮・真皮の細胞は全体的に染色性が低下して細胞浸潤も減少し、細胞核も破片状に認められるのが大部分で、すべて皮膚片としての機能を失い肉眼的観察時期に先んじて組織学的に脱落していることがうかがわれる。以上の組織学的所見には小皮膚片と大皮膚片の間に本質的な差は認められず、いずれも従来述べられている拒絶反応とともにう組織像を呈している。尚、肉眼的拒絶現象が開始されたと考えられる時期より少くとも1日前にすでに毛細管出血を認め、強い細胞浸潤が宿主と移植皮膚片の境界にみられるところから、すでに組織学的にはこの時期に拒絶現象が開始されたと考えられる(写真5, 6)。

#### 第4項 総 括

大きさの異なる皮膚片の同種移植に際して拒絶現象の発現までの期間には著明な差を認めないが、拒絶が開始されて移植皮膚片が脱落するまでの期間、ひいては移植皮膚片の生着期間は大皮膚片移植の方が小皮膚片移植より長い。両者の一次移植皮膚片が完全に脱落した直後一次移植片を採取したと同じ donor より 1.0cm×2.0cm 大の皮膚片を二次移植した場合、その拒絶促進現象は小皮膚片移植群・大皮膚片移植群ともに認められ、その程度も両者間に差をみない。

さらに移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動についてみると、小皮膚片移植・大皮膚片移植ともに拒絶現象開始時期に一致して移植前(正常値)の40%ないし45%に減少、その後一時上昇するが再び強い減少を移植皮膚片の完全な脱落時期にほぼ一致して示す。その減少率には両者間に差はないが、拒絶開始から移植皮膚片の脱落までの時間的経過の差によりその変動波形に差が認められる。

また組織学的には、この肉眼的観察時期より約1日先行して拒絶現象開始および完全な移植皮膚片の脱落が生じていることがうかがわれる。

#### 第2節 凍結保存皮膚の同種移植実験

##### 第1項 単純凍結保存皮膚の拒絶現象

1) 3時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後4日ないし7日目であり、移植皮膚片の完全脱落は9日ないし12日目以内におこり、中間値は7.5

日より8.5日にわたりその平均は $8.00 \pm 0.33$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなった場合の拒絶現象は4日ないし6日目に始まり、7日ないし9日目に完全に脱落する。その中間値は5.5日より7.5日にわたりその平均は $6.30 \pm 0.58$ 日である(表6)。

2) 6時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後5日ないし7日目であり、移植皮膚片の完全脱落は9日ないし12日目におこり、中間値は7.0日から10.5日にわたりその平均は $7.85 \pm 1.20$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなった場合の拒絶現象は4日ないし8日目に始まり、7日ないし10日目に完全に脱落する。その中間値は5.5日より9.0日にわたりその平均は $6.50 \pm 0.97$ 日である(表6)。

3) 12時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後6日ないし9日目であり、移植皮膚片の完全脱落は9日ないし13日目におこり、中間値は7.0日から11.0日にわたりその平均は $8.55 \pm 1.42$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなった場合の拒絶現象は4日ないし7日目に始まり、7日ないし11日目に完全に脱落する。その中間値は6.0日より9.0日にわたりその平均は $7.45 \pm 1.21$ 日である(表6)。

4) 24時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後5日ないし7日目であり、移植皮膚片の完全脱落は9日ないし13日目におこり、中間値は6.0日から10.0日にわたりその平均は $8.05 \pm 0.67$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなった場合の拒絶現象は4日ないし6日目に始まり、6日ないし10日目に完全に脱落する。その中間値は5.0日から8.0日の間にありその平均は $6.75 \pm 0.92$ 日である(表6)。

##### 5) 小 括

単純凍結保存皮膚の移植では、拒絶現象開始時期および移植皮膚片の完全脱落時期に関しては凍結保存時間による差は殆んど認められない。さらに、これらを同じ大きさの正常皮膚片を移植した対照群と比較してみても特にその差は認めがたい。これらのマウスに正常皮膚片を二次移植した場合、生着期間はいずれも一次移植された凍結保存皮膚よりも短いが、正常皮膚を一次移植された対照群にみられる程の拒絶促進現象は認められない。また一次移植された凍結保存皮膚の生着期間と二次移植された正常皮膚の生着期間の差も、凍結保存時間が長くなるに従

表 6. 単純凍結保存群

時 間	REJECTION				二次反応			
	開始	終了	中間値	平均	開始	終了	中間値	平均
3	6	9	7.5		5	8	6.5	
	5	10	7.5		4	9	6.5	
	6	10	8.0		5	9	7.0	
	6	10	8.0		6	9	7.5	
	7	10	8.5		5	8	6.5	
	5	12	8.5		4	7	5.5	
	4	12	8.0		5	7	6.0	
	6	10	8.0		5	7	6.0	
	6	10	8.0		5	7	6.0	
	6	10	8.0	8.00±0.33	4	8	6.0	6.30±0.58
6	6	10	8.0		4	9	6.5	
	5	9	7.0		4	8	6.0	
	5	9	7.0		4	9	6.5	
	5	9	7.0		4	8	6.0	
	6	9	7.5		4	8	6.0	
	7	12	9.5		4	7	5.5	
	6	10	8.0		5	7	6.0	
	5	9	7.0		4	9	6.5	
	5	16	10.5		4	10	7.0	
	5	9	7.0	7.85±1.20	8	10	9.0	6.50±0.97
12	8	12	10.0		7	10	8.5	
	9	13	11.0		7	11	9.0	
	6	9	7.5		7	9	8.0	
	6	9	7.5		7	9	8.0	
	6	9	7.5		6	9	7.5	
	6	10	8.0		6	9	7.5	
	8	12	10.0		7	10	8.5	
	6	8	7.0		4	7	5.5	
	6	9	7.5		5	7	6.0	
	8	11	9.5	8.55±1.42	4	8	6.0	7.45±1.21
24	5	9	7.0		5	9	7.0	
	6	9	7.5		5	9	7.0	
	5	8	6.5		5	8	6.5	
	6	11	8.5		5	10	7.5	
	5	9	7.0		4	7	5.5	
	7	13	10.0		4	10	7.0	
	6	12	9.0		6	10	8.0	
	6	10	8.0		5	8	6.5	
	7	11	9.0		6	9	7.5	
	6	10	8.0	8.05±0.67	4	6	5.0	6.75±0.92

表 7. 15% glycerin 添加凍結保存群

REJECTION 時 間	一 次 反 応				二 次 反 応			
	開始	終了	中間値	平均	開始	終了	中間値	平均
3	6	11	8.5	8.30±0.58	5	8	6.5	
	6	12	9.0		4	8	6.0	
	6	10	8.0		5	7	6.0	
	6	10	8.0		4	6	5.0	
	5	12	8.5		4	6	5.0	
	5	12	8.5		5	8	6.5	
	4	10	7.0		4	6	5.0	
	6	10	8.0		5	6	5.5	
	6	11	8.5		4	6	5.0	
	6	12	9.0		5	8	6.5	5.70±0.65
6	6	10	8.0	8.55±1.78	4	7	5.5	
	5	10	7.5		4	6	5.0	
	5	9	7.0		4	6	5.0	
	5	10	7.5		4	6	5.0	
	6	10	8.0		4	8	6.0	
	7	13	10.0		4	6	5.0	
	8	11	9.5		4	6	5.0	
	5	13	9.0		4	6	5.0	
	8	18	13.0		4	9	6.5	
	5	13	9.0		6	10	8.0	5.60±0.99
12	9	15	12.0	9.70±1.44	8	12	10.0	
	9	15	12.0		8	11	9.5	
	6	12	9.0		5	9	7.0	
	8	13	10.5		5	7	6.0	
	6	11	8.5		6	8	7.0	
	8	13	10.5		6	10	8.0	
	6	10	8.0		5	9	7.0	
	6	8	7.0		5	8	6.5	
	7	12	9.5		5	7	6.0	
	7	13	10.0		4	6	5.0	7.20±1.56
24	6	9	7.5	9.30±2.40	4	8	6.0	
	7	10	8.5		4	7	5.5	
	6	8	7.0		4	8	6.0	
	6	9	7.5		5	8	6.5	
	6	10	8.0		4	7	5.5	
	8	16	12.0		5	11	8.0	
	10	15	12.5		7	10	8.5	
	6	10	8.0		6	10	8.0	
	11	16	13.5		7	10	8.5	
	6	11	8.5		5	8	6.5	6.90±1.22

つて二次移植皮膚の生着期間が延長するため短縮されてくる傾向がある(表6, 図3)。

図3 凍結保存皮膚片同種移植における移植皮膚片の生着期間(平均値)

一 次 移 植	保 存 方 法	二 次 移 植
9 8 7 6 5 4 (H)		(H) 4 5 6 7
R	対 照	R
R	3時間 単純凍結	R
R	3時間 15%glycerin添加	R
R	6時間 単純凍結	R
R	6時間 15%glycerin添加	R
R	12時間 単純凍結	R
R	12時間 15%glycerin添加	R
R	24時間 単純凍結	R
R	24時間 15%glycerin添加	R

R:拒絶現象開始

#### 第2項 15% glycerin 添加凍結保存皮膚の拒絶現象

1) 3時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後4日ないし6日目であり、移植皮膚片の完全脱落は10日ないし12日目におこり、中間値は7.0日から9.0日にわたりその平均は $8.30 \pm 0.58$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなつた場合の拒絶現象は4日ないし5日目に始まり、6日ないし8日目に完全に脱落する。その中間値は5.0日から6.5日の間にありその平均は $5.70 \pm 0.65$ 日である(表7)。

2) 6時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後5日ないし8日目であり、移植皮膚片の完全脱落は9日ないし18日目におこり、中間値は7.0日から13日にわたりその平均は $8.55 \pm 1.78$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなつた場合の拒絶現象は4日ないし6日目に始まり、6日ないし10日目に完全に脱落する。その中間値は5.0日から8.0日の間にありその平均は $5.60 \pm 0.99$ 日である(表7)。

3) 12時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後6日ないし9日目であり、移植皮膚片の完全脱落は8日ないし15日目におこり、中間値は7.0日から12.0日にわたりその平均は $9.70 \pm 1.44$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなつた場合の拒絶現象は4日ないし8日目に始まり、6日ないし12日目に完全に脱落する。その中間値は

5.0日から10.0日の間にありその平均は $7.20 \pm 1.56$ 日である(表7)。

4) 24時間凍結保存した皮膚の拒絶現象開始は移植後6日ないし11日目であり、移植皮膚片の完全脱落は8日ないし16日目におこり、中間値は7.0日から13.5日にわたりその平均は $9.30 \pm 2.40$ 日である。これらのマウスに正常皮膚片の二次移植をおこなつた場合の拒絶現象は4日ないし7日目に始まり、7日ないし11日目に完全に脱落する。その中間値は5.5日から8.5日の間にありその平均は $6.90 \pm 1.22$ 日である(表7)。

#### 5) 小括

15% glycerin 添加凍結保存皮膚の一次移植では、3時間および6時間保存したものより12時間および24時間保存した皮膚片の方が拒絶現象開始が遅延するが、生着期間については明らかな差は認められない。二次移植皮膚片の拒絶についてみると、3時間および6時間保存した皮膚の一次移植をうけたものでは正常皮膚片の一次移植をうけた対照群における場合と同じく明らかな拒絶促進現象を認めることができる。しかし12時間および24時間保存皮膚の一次移植をうけたものでは、一次移植と二次移植の皮膚生着期間に尚多少の差を認めることが出来るが、二次移植の皮膚片生着期間は正常皮膚の一次移植をうけた対照におけるよりも延長しており明らかに拒絶促進現象は認められない(表7, 図3)。

#### 第3項 凍結保存皮膚移植後の血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動

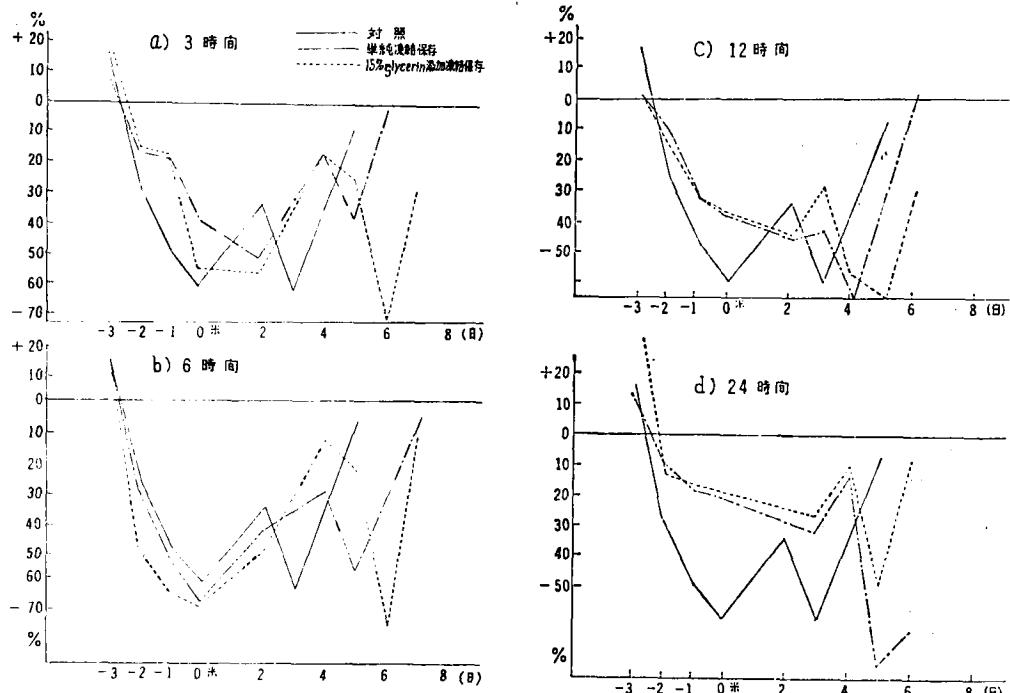
1) 単純凍結保存皮膚移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動は正常皮膚移植後のものと基本的には極めて類似しており、一般には肉眼的に拒絶現象の発現する時期と移植皮膚片の完全脱落がおこる時期の二回にわたり強い減少を示す。拒絶現象発現時期における血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の減少は、3時間凍結保存皮膚片移植群では減少率約40%を示し正常皮膚片移植後のものが減少率約60%を示すのに比較して弱い。さらに12時間および24時間凍結保存皮膚移植群の拒絶現象発現時期に一致する減少率はそれぞれ約35%, 約20%となつておらず、且つその減少が遅延する傾向を示す(表4, 図4)。

2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動も基本的には正常皮膚ならびに単純凍結保存皮膚移植後のものと同じであるが、特に3時間ならびに6時間凍結保存皮膚移植群では正常皮膚移植後のものに極めて類似した変動

表 4. 凍結保存皮膚片同種移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画値 (%)

凍結保存方法	-3	-2	-1	0	2	4	6	8
3時間(単純凍結)	11.9	9.2	9.0	6.8	5.5	9.3	7.0	10.9
3時間(15% glycerin添加)	12.7	9.3	9.1	5.0	5.0	9.5	8.3	3.4
6時間(単純凍結)	12.8	7.9	5.4	3.8	6.4	7.7	4.9	7.5
6時間(15% glycerin添加)	12.8	5.7	4.3	3.8	5.7	9.6	8.6	3.0
12時間(単純凍結)	11.0	9.6	7.3	6.8	6.0	6.3	3.8	—
12時間(15% glycerin添加)	11.0	9.3	7.3	6.8	6.0	7.9	4.7	3.8
24時間(単純凍結)	12.4	9.8	9.0	8.7	7.9	7.6	9.6	2.8
24時間(15% glycerin添加)	16.4	9.6	9.2	8.9	8.3	8.2	9.9	5.7

\* 拒絶開始日を 0 とし、それ以前は負の日数で示す

図 4 凍結保存皮膚片移植後の血清  $\gamma$ -globulin の変動 (分画百分比の増減率)

\* 拒絶開始日を 0 とし、それ以前は負の日数で示す

を示し、3時間保存群では拒絶開始時期における減少は正常皮膚移植群のそれとほぼ一致しており同時に単純凍結保存の皮膚を移植した場合とは明らかにその減少率が強い。しかし12時間ならびに24時間保存のものは拒絶現象発現時期における減少率は低下し、且つやや遅延する傾向を示して同時に単純凍結保存した皮膚片を移植した場合の変動に類似していく(表4、図4)。

#### 第4項 凍結保存皮膚の組織学的变化

##### 1) 単純凍結保存皮膚

3時間凍結保存したものでは真皮層に浮腫があり

表皮細胞の胞体の境界は不鮮明となつてゐるが、その程度は軽微である。6時間凍結保存したものではその程度が進行し、結合繊維維の纖細化・断裂がみられる。12時間凍結保存したものでは核クロマチンの微細顆粒状崩壊等が強く認められ、24時間凍結保存したものではさらに変性が進み、真皮層の細胞はその染色性を失うまでに変性している(写真1)。

##### 2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚

3時間凍結保存したものでは真皮層の浮腫、表皮細胞の胞体の境界不鮮明化、軽度の結合繊維維断裂が認められる(写真2)。6時間凍結保存したもの

ではさらにその変性程度は進んでおり、12時間凍結保存したものではやはり核クロマチンの微細顆粒状変性が所々に認められる。24時間凍結保存したものでは細胞の染色性は単純凍結保存皮膚と同程度までに低下している。

すなはち、15% glycerin 添加凍結保存皮膚は単純凍結保存皮膚の同時間のものと比較して組織変性は軽微であるが、24時間凍結保存したものでは両者間に殆んど差がみられない程度までの変性が認められる。

#### 第5項 凍結保存皮膚のアミノ酸百分比について

1) 単純凍結保存皮膚のアミノ酸百分比を正常皮膚のそれと比較すると、3時間保存皮膚ではリジンは4.6%，グリシンは2.1%と上昇しており、グルタミン酸は6.9%，アルギニンは1.4%と減少している。6時間保存皮膚ではアラニンは2.4%と上昇し、リジンは4.2%とその減少がみられる。12時間保存皮膚ではリジン2.5%，ロイシン2.0%の上昇がみられ、スレオニン、セリン、グルタミン酸、グリシンはそれぞれ2.3%，4.2%，3.2%，3.1%と減少している。24時間保存皮膚では大きな変動はみられない（表5）。

2) 15% glycerin 添加凍結保存皮膚のアミノ酸百分比を正常皮膚のそれと比較すると、3時間保存皮膚ではリジンは2.0%，ロイシンは2.1%と上昇しており、スレオニンは2.2%，グルタミン酸は3.0%，グリシンは2.4%と減少している。6時間保存皮膚ではバリンは6.6%と上昇しており、グルタミン酸は3.8%と減少している。12時間保存皮膚では特に変動がみられない。ただ24時間保存皮膚ではアルギ

ニンが1.8%と軽度に上昇し、グルタミン酸、グリシンはそれぞれ2.1%，1.9%と減少している（表5）。

#### 3) 小括

単純凍結保存皮膚と15% glycerin 添加凍結保存皮膚の間のアミノ酸百分比の変動に関しては特別な相違は認めがたい。グルタミン酸はすべての場合に程度の差はあるが減少するようである。3時間凍結保存皮膚では各種アミノ酸の増減が認められるが、時間が経過するにつれて、特に12時間以上凍結保存した皮膚のアミノ酸百分比の変動は軽微である。

#### 第6項 総括

単純凍結保存皮膚の同種移植では拒絶現象開始時期および移植皮膚片の脱落時期に関しては凍結保存時間による差は殆んど認められず、正常皮膚移植をうけた対照群と比較してみても特に差をみない。さらに、それぞれに一次移植片を得たと同一 donor からの正常皮膚片を二次移植すると、一次移植皮膚片に比較して生着期間はいずれも多少は短縮されているが、正常皮膚の一次移植をうけた対照群と較べて明らかな拒絶促進現象は認めがたい。15% glycerin 添加凍結保存皮膚を移植した場合では、12時間および24時間保存した皮膚の方が3時間および6時間保存したものより一次移植で拒絶現象発現が遅延する傾向にあるが生着期間では差が認められない。さらにこれらに一次移植片を得たと同一 donor からの正常皮膚片を二次移植すると、特に3時間および6時間保存皮膚の一次移植をうけたものでは明らかな拒絶促進現象が認められる。しかも拒絶促進の程度は正常皮膚の一次移植後に二次移植をうけた対照に比

表5. アミノ酸分析百分比

	リ	ア	ア	ス	セ	グ	グ	ア	バ	イ	ロ	チ	フ
	リ	ス	ス	レ	セ	ル	リ	ラ	バ	イ	ロ	チ	エ
	チ	アル	アル	バ	リ	グル	リ	ラ	ソ	イ	イ	チ	ア
	チ	ギ	ギ	バ	ギ	ル	リ	ニ	ソ	イ	イ	チ	エ
	ニ	ニ	ニ	ラン	ラン	ミン	ミン	ニ	ロ	イ	シ	チ	ア
	ン	ン	ン	酸	酸	酸	酸	ン	ン	ン	ン	ン	ル
対照群	12.4	2.8	4.6	5.7	12.6	11.7	12.8	10.9	6.2	4.2	7.0	3.8	4.2
prednisolone 短期投与群	16.7	5.3	5.2	4.4	11.9	11.7	11.4	10.8	6.4	3.6	7.0	3.2	3.8
prednisolone 長期投与群	12.8	3.4	4.8	5.0	11.8	11.0	12.2	12.2	8.1	4.0	6.9	3.4	3.9
3時間 単純凍結保存群	17.0	1.4	2.4	6.7	9.9	4.8	14.9	10.6	9.3	4.4	9.1	5.7	5.7
3時間 15% glycerin 添加凍結保存群	14.4	4.5	3.7	3.5	13.5	7.7	10.4	11.4	7.6	5.2	9.1	4.3	5.2
6時間 単純凍結保存群	8.2	4.3	4.1	5.9	13.4	12.2	11.6	13.8	7.8	4.5	6.5	4.3	3.8
6時間 15% glycerin 添加凍結保存群	11.8	5.0	3.3	4.5	13.1	7.9	12.7	10.4	12.8	3.9	6.4	3.8	4.6
12時間 単純凍結保存群	14.9	2.7	4.9	3.6	8.4	8.5	9.7	11.5	7.7	3.7	9.0	5.0	5.7
12時間 15% glycerin 添加凍結保存群	14.8	2.2	5.8	5.1	13.5	10.4	11.4	11.6	6.5	4.3	7.0	3.1	4.5
24時間 単純凍結保存群	11.5	5.0	4.8	5.4	11.8	10.3	11.8	11.5	7.5	4.1	7.1	4.3	4.8
24時間 15% glycerin 添加凍結保存群	11.9	4.6	4.6	4.9	12.6	9.6	10.9	11.1	6.3	4.0	6.8	3.2	4.2

表 8. prednisolone 投与皮膚片の同種移植と拒絶現象

REJECTION	一次反応				二次反応			
	開始	終了	中間値(日)	平均	開始	終了	中間値(日)	平均
prednisolone 短期投与皮膚片 (1.0cm×2.0cm)	13	15	14.0		4	6	5.0	
	12	14	13.0		4	8	6.0	
	10	13	11.5		4	8	6.0	
	8	13	10.5		3	6	4.5	
	11	13	12.0		3	5	4.0	
	10	17	13.5		4	6	5.0	
	9	12	10.5		4	6	5.0	
	8	13	10.5		3	6	4.5	
	9	15	12.0		5	7	6.0	
	11	17	14.0	12.15±1.32	4	6	5.0	5.10±0.70
prednisolone 長期投与皮膚片 (1.0cm×2.0cm)	10	14	12.0		5	9	7.0	
	9	14	11.5		4	8	6.0	
	11	17	14.0		6	9	7.5	
	12	15	13.5		4	8	6.0	
	8	12	10.0		4	7	5.5	
	10	15	12.5		3	7	5.0	
	12	15	13.5		4	8	6.0	
	9	13	11.0		4	7	5.5	
	9	14	11.5		4	8	6.0	
	13	18	15.5	12.50±1.63	3	7	5.0	5.95±0.53
対照皮膚片 (1.0cm×2.0cm)				8.85±0.88				6.00±0.46

較して殆んど差が認められない。

これらの皮膚片移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動をみると、一般的には正常皮膚片を移植した対照群と同じように、肉眼的に拒絶現象が発現する時期と移植皮膚片の完全脱落がおこる時期に強い減少を示す。しかし単純凍結保存皮膚を移植した場合には拒絶現象発現時期の  $\gamma$ -globulin の減少率は対照群に比較して低く、且つ反応の遅延する傾向がある。15% glycerin 添加凍結保存皮膚を移植した場合、特に3時間および6時間保存皮膚を移植した場合の変動は正常皮膚を移植した対照群に極めて類似し、同時間単純凍結保存皮膚を移植した場合より拒絶現象開始時期の  $\gamma$ -globulin の減少率は強い。さらに保存時間が長くなり12時間・24時間となつた場合には対照群とは異なり、むしろ単純凍結保存皮膚移植群に近い変動を示す。

これらの凍結保存皮膚の組織像をみると、6時間までの保存では組織構造もほぼ正常に近い状態で保たれており、特に15% glycerin 添加凍結保存皮膚ではその障害程度も軽微である。しかし保存時間が延

長するにつれて組織障害の程度も進み、24時間保存皮膚では保存方法の如何を問わず高度に認められている。

凍結保存皮膚アミノ酸百分比の変動をみると、程度の差はあるが殆んどグルタミン酸の減少がみられる。また保存時間が延長するにつれて変動域も小さくなり、12時間以上保存したものでは凍結保存方法の如何にかかわらず殆んど変動がみられない。

### 第3節 prednisolone 投与マウスよりえた皮膚の同種移植実験

#### 第1項 拒絶現象

##### 1) prednisolone 短期投与マウス皮膚の拒絶

prednisolone を平均20日間投与したマウスからえた 1.0cm×2.0cm の皮膚片を移植すると、拒絶現象は移植後8日ないし13日目に始まり、移植皮膚片の完全脱落は9日から17日目の間で中間値は10.5日から14.0日にわたり、その平均は 12.15±1.32である。これらのマウスに一次移植片をえたと同じ donor から 1.0cm×2.0cm の皮膚片を二次移植すると、拒絶現象発現は移植後3日ないし5日目におこ

り、移植皮膚片の完全脱落は5日ないし8日目にみられる。この二次移植における移植皮膚生着期間の中間値は4.0日より6.0日にわたり、その平均は $5.10 \pm 0.70$ 日である（表8）。

### 2) prednisolone 長期投与マウス皮膚の拒絶

prednisolone を7週間ないし9週間（平均8週間）投与したマウスからえた $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ の皮膚片を移植すると、拒絶現象は移植後8日ないし13日目から始まり、移植皮膚片の完全脱落は12日から18日目の間で中間値は10.0日から15.5日にわたり、その平均は $12.50 \pm 1.63$ 日である。これらのマウスに一次移植片をえたと同じ donor から $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ の皮膚片を二次移植すると、拒絶現象発現は移植後3日ないし6日目におこり、移植皮膚片の完全脱落は7日ないし9日目にみられる。この二次移植における移植皮膚生着期間の中間値は5.0日より7.5日にわたり、その平均は $5.95 \pm 0.53$ 日である（表8）。

### 3) 小括

prednisolone を比較的の短期間（20日）投与したマウスからえた皮膚を同種移植した場合、正常皮膚片移植（対照）に比較して拒絶現象の開始がおそらく生着期間も延長する。prednisolone を比較的の長期間（平均8週間）投与したマウスからえた皮膚を同種移植した場合にも、正常皮膚片移植（対照）に比較して拒絶現象の発現がおくれ生着期間も延長している。

しかし prednisolone 投与期間の長短による移植皮膚生着期間の延長の程度には差がない。また二次移植皮膚片の拒絶促進現象の程度でも prednisolone 投与期間の長短による差はみられない。

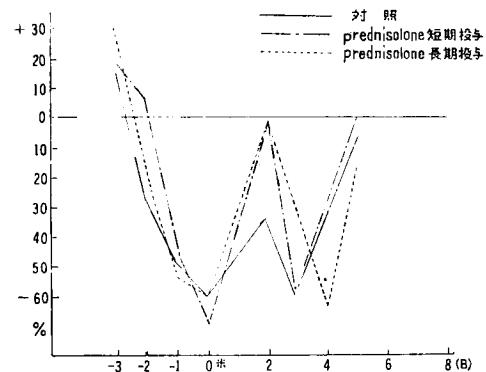
### 第2項 prednisolone 投与マウス皮膚移植後の血清 $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動

一般的には正常皮膚片を移植した場合と同様に血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比は移植後一時上昇するが、拒絶現象の発現と共に強く減少する。その後一時増加するが、さらに移植皮膚片の完全脱落時期に一致して再び強い減少を示し、その後増加して正常に復する。

prednisolone の短期投与をうけたマウスからえた皮膚片の同種移植をすると、 $\gamma$ -globulin 分画百分比は拒絶現象開始の時点では正常値の約30%までに減少している。その後再び上昇し正常値までに達するが、正常値を越えることなく一時減少し、移植片が殆んど脱落する時期に一致して正常値の約40%に減少する。

prednisolone の長期投与をうけたマウスからえた皮膚片の同種移植の場合にもこれと類似の変動がみられ、移植後一時的に  $\gamma$ -globulin 分画百分比は上昇するがその後減少し、拒絶現象開始の時点では正常値の約40%に減少している。その後再び上昇し、ついで漸減して生着皮膚片の完全脱落時期には正常値の約40%までに減少する（表3、図5）。

図5 prednisolone 投与皮膚片の同種移植後の血清  $\gamma$ -globulin の変動（分画百分比の増減率）



\* 拒絶現象開始日を0とし、それ以前は負の日数で示す

しかし拒絶現象発現時期に一致する  $\gamma$ -globulin 分画百分比の減少率は prednisolone 投与期間の長短により特に差はみられない。

### 第3項 prednisolone 投与マウス皮膚の組織学的变化

prednisolone 投与マウスの皮膚組織像をみると、上皮細胞の核分裂像の減少ないし消失、真皮・間葉系細胞の萎縮がみられる。その他皮下組織の萎縮も認められる。すなわち皮下脂肪組織の減少、結締織細胞の減少・萎縮、筋線維・細胞核・毛のう上皮の萎縮等が漸次増強し、中胚葉のみならず外胚葉性組織の萎縮が認められる（写真3、4）。これらの変化は prednisolone 投与期間が延長するに従つて増強し、とくに中胚葉性組織に著明にみられるようである。

### 第4項 prednisolone 投与マウス皮膚のアミノ酸百分比について

prednisolone 短期投与をうけたマウス皮膚では、リジンは3.3%，アルギニンは2.5%と上昇しており、スレオニンは1.3%，グリシンは1.4%，セリンは0.8%，イソロイシンは0.6%と減少している。その他のアミノ酸百分比は対照群と比較して増減の差は0.5%以内にとどまっている。prednisolone 長期投

与をうけたマウス皮膚では、パリンは1.9%，アラニンは1.3%，アルギニンは0.6%と上昇しており、セリンは0.8%，スレオニンは0.7%，グルタミン酸は0.7%，グリシンは0.6%と減少している。その他では増減は0.5%以内にとどまっている（表5）。すなわち対照群と比較して増減の差は最高3.3%で、一定の著明な増減傾向は認められない。

#### 第5項 総括

prednisolone の投与によってマウス皮膚には上皮性ならびに非上皮性組織の萎縮性変化が招来され、且つ投与期間の延長によってこの変化は増強される。この皮膚を同種移植した場合、一次皮膚移植の拒絶現象についてみると、prednisolone を短期間投与したマウスからえた皮膚を移植した場合には移植皮膚片の生着期間の中間値平均は  $12.15 \pm 1.32$  日で、正常皮膚片移植群（対照）と比較すると約4日間の生着延長がみられる。prednisolone を長期間投与したマウスからえた皮膚を移植した場合には、移植皮膚片の生着期間の中間値平均は  $12.50 \pm 1.63$  日で、やはり対照と比較して約4日間の延長がみられる。

二次皮膚移植の拒絶現象についてみると、prednisolone を短期間投与したマウスからえた皮膚を移植したマウスでは、二次移植皮膚片生着期間の中間値平均は  $5.10 \pm 0.70$  日、prednisolone を長期間投与したマウスからえた皮膚を一次移植したマウスでは  $5.95 \pm 0.53$  日であり、いずれも一次移植群に比較して生着期間が短縮されて拒絶促進現象が認められる。しかも対照の正常皮膚片移植群における二次移植皮膚片の生着期間と比較して特に差は認められない。すなわち prednisolone 投与をうけたマウス皮膚を移植した場合、prednisolone 投与期間が平均約3週間の場合も平均約8週間の場合でも一次移植皮膚片の生着期間の延長があり、これらに同じ donor からえた皮膚を二次移植すると拒絶促進現象がみられるが、その程度は prednisolone 投与期間によって差がなく、正常皮膚を一次移植された対照群における拒絶促進の程度と殆んど異なるところはない。

血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比は拒絶現象開始時期には正常値の30%ないし40%まで低下するが、prednisolone 投与の有無、prednisolone 投与期間の長短による著るしい相違は見出されない。その後は再び上昇して移植された皮膚片の完全脱落時期に再び最低値を示すが、減少率も特に著るしい相違がない。ただ prednisolone を長期にわたって投与したマウスからえた皮膚を移植されたマウスでは、この時期の減少

がややおくれて発現する傾向を示す。

prednisolone の投与をうけたマウス皮膚のアミノ酸百分比を対照と比較してみると、その増減の程度は最高3.3%であり大部分は0.5%以内で、特に prednisolone 処理の影響は軽微で一定の傾向はみられない。

#### 第4章 考 按

マウスの histocompatibility antigen (H-抗原) にはいろいろ知られているが、このうち H-2 抗原は他の H- 抗原に較べて最も強い移植抗原性を有しており、これが同種移植拒絶現象における最も重要な役割を演じていることは今日一般に認められている<sup>22)41)43)</sup>。したがつて拒絶現象を指標に免疫反応を観察する皮膚同種移植実験ではとくに組織適合性抗原の明らかにされている近交系マウスを使用することが要求される。著者はこの観点から A 系・Db 系・C<sub>57</sub>BL 系マウスを使用し、実験方法の項に述べた方法で一定して皮膚移植をおこなつた。

有色動物の皮膚は自体が着色しているが、静止期 (Telogen) と増殖期 (Anagen) が地図状に混在しているマウスもあり、これを肉眼的に識別するのは容易であり、実験結果を統一するために除外し退行期 (Catagen) 後半より静止期 (Telogen) にある成熟マウスを使用した<sup>8)</sup>。皮膚移植に際してその生着期間を観察する場合には、皮膚採取は suprapanniculare にすべきであるともいわれるが<sup>7)8)16)</sup>、比較対照を目的とした本実験の場合には subpannicular 皮膚採取法でも不適性はないと考え、時間的に速く容易でもありこの subpannicular 法を用いることにした。ただ出血に関しては皮膚血管網を損傷して移植後の経過に悪影響を及ぼすことのないよう充分注意した。

移植後の観察では3日以前に脱落したものは技術的な移植失敗例として成績より除外した。肉眼的観察は毎日施行し、移植皮膚片の50%脱落をもつて生着期間が終了したとするものもいるが<sup>8)</sup>、拒絶現象開始と移植皮膚片完全脱落の中間値を指標とし更に標準偏差を追加した。同種皮膚移植実験の成績評価はその移植皮膚片の拒絶現象および生着期間の如何によって判断される。したがつてこの決定は極めて重要であり、その方法如何によつては実験成績は異なるものになりうる。拒絶現象そのものは一連の変化の集積とでもいうか、その一局面のみをもつて全体を把握することは困難である。またその決定方法にも統一されたものがなく同一方法をもつてして

も判定規準が異なるとその結果も様々な成績を示すことになりかねない。そこで著者は移植後の経時的肉眼的観察に加えて組織学的な裏付けをし、さらに移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動との相関々係によってその確実性をきした。

移植皮膚片の経時的变化は Taylor の stereomicroscope 観察では肉眼的観察より 2 日早く発現しているというが<sup>21)22)</sup>、著者の組織学的観察でも、拒絶現象開始時期および移植皮膚片完全脱落時期ともども平均 1 日早く発現していることが判明した。移植後 24 時間以内には血管新生がみられ 6 日以内には周囲組織と融合するわけであるが、このころは血管拡張が著しく出血傾向がみられる<sup>1)24)</sup>。この時期をもつて拒絶現象が開始されたとするのであるが<sup>7)11)13)14)25)26)</sup>、ちょうど肉眼的に移植片の浮腫状膨隆、鮮紅色調が急速に変化拡大し黄褐色調を呈するころである。さらに進むと一度増加した細胞浸潤も減少し細胞の染色性も低下してくるが、ちょうどこの時期が移植皮膚片の完全脱落時期である。いずれにせよ拒絶現象に伴う皮膚組織像の変化は従来述べられてきたものと大差なく、移植皮膚片を如何に移植前に処理しようとその差は殆んどみられない。

血清  $\gamma$ -globulin と形質細胞の態度は表裏一体をなすものであるといわれており、Medawar は血清抗体は本質的には細胞抗体と同一のものであり<sup>7)44)</sup>、組織免疫における細胞抗体の重要性を強調している。Nossal<sup>27)</sup> も抗原陽性細胞は濾胞内の reticular note 近辺から由来するもので、抗体産生細胞は形質細胞あるいは小リンパ球でもあるといつてはいる。移植皮膚片脱落後かなり日数経過後採取した血清には 7S 抗体 (IgG) が大部分をしめ、脱落直後採取した血清には 19S 抗体 (IgM) が多くみられ、前者では抗移植性が認められないのに後者には強い抗移植性が認められるという報告があり<sup>28)</sup>、paper electrophoresis のみでこの 7S・19S 抗体を論ずることは出来ないが、この血清  $\gamma$ -globulin の変動が抗移植抗体の動きを直接に反映するものでないとしても、その変動をひとつの指標として拒絶現象の過程を観察するのも一つの方法として意味をもつものであろう。

大小の異なる皮膚片を同種移植した場合に、その拒絶現象開始時期においては両者間に差が認められないにとかかわらず、その生着日数では大皮膚片を移植した方に明らかな延長がみられた。この現象が Sotikor, Converse<sup>4)</sup> のいう antigenic overloading に

よつておこるものか、immunological response の減弱に因るのか、この結果のみからは不明である。しかしこれらマウスに同一 donor からの皮膚を再度移植した場合の二次移植反応をみると、すべてに拒絶の促進がみられることは一次移植に際し宿主が移植抗原によって充分に感作され、その結果二次移植の拒絶促進現象が生じたと考えられるものであり、この程度の大量皮膚移植では antigenic overloading による免疫反応抑制現象は惹起されないものといえる。生着期間の延長はむしろ大量抗原に対する相対的抗体不足のために標的組織における抗原抗体反応によって皮膚片が拒絶されるにいたるまでの過程に時間を要したものと考えてよからう。このことは大小皮膚片一次移植後の immuno-response に特に相違が認められず、血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動が相互に特別な相違を示さないことによつてもうかがうことができる。

同種移植皮膚片を凍結保存した場合、一次移植皮膚片の生着期間には影響はみられない。しかし一次移植片をえたのと同じ donor からえた正常皮膚片を二次移植した場合には、移植皮膚片の生着期間は一次移植の場合よりやや短縮はするが正常皮膚の一次移植後にみられる二次移植片の拒絶に比較すればその拒絶が促進されているとはいがたい。これに反し 15% glycerin 添加凍結下に 3 時間および 6 時間保存した皮膚片の一次移植をうけたマウスでは、正常皮膚片の一次移植をうけたマウスと同様に明らかに二次移植の拒絶促進を認めることが出来る。

一次移植の生着期間には、同種移植免疫反応の強さのほかに、凍結保存にともなう皮膚片の viability の低下も関係するので、一次移植拒絶現象の状態から凍結保存にともなつておこる一次移植皮膚片中の同種移植抗原の変化をみると出来ない。しかしながら、二次移植において拒絶促進現象が発現するためには宿主が一次移植によって二次移植片に含まれると同一の抗原によって感作されていることが必要であるから、donor の immuno-response に差がない場合には、二次移植の拒絶促進の有無によって二次移植片に含まれる移植抗原が一次移植片中に存在していたか否かを知ることが出来る。このことから著者のおこなつた凍結保存皮膚同種移植実験の成績を考按すると、3 時間以上単純凍結保存された皮膚片中の移植抗原は、同じ donor から二次移植された正常皮膚片の拒絶を促進するに充分なだけ宿主を感作しないほどに質的变化か量的な減少をうけてい

るものといいうる。しかし 15% glycerin 添加凍結下に 3 時間ならびに 6 時間保存した皮膚を一次移植された場合には、宿主は同一 donor から二次移植された正常皮膚の拒絶を促進するに充分な感作をうけていることが示されている。このことは 15% glycerin 添加凍結保存法が組織の viability に及ぼす影響とは別に移植抗原の保存に単純凍結保存法よりもすぐれていることを示す。しかしながら 15% glycerin 添加凍結保存法によつても 12 時間あるいは 24 時間と長時間保存された皮膚には、その一次移植をもつて同一 donor からの正常皮膚の二次移植の拒絶を促進するに充分なほど宿主を感作する能力が失われていること、すなわち移植抗原の抗原特異性の低下ないし消失、あるいはその量的減少のあることがわかる。抗原保存性の意味を含めて凍結保存による組織障害を防止するため、従来 glycerin の添加がおこなわれその有用性が認められてきたが、glycerin の細胞破壊にたいする防禦機構については未だ不明の点が多い<sup>31)</sup>。皮膚は全水分の 25% 以上の dehydration には堪え得ず<sup>33)</sup>、氷晶形成によるイオン濃度の上昇が glycerin を添加することにより氷点を下降され抑制されて細胞膜に対する影響が減少するためであろうと考えられる。組織の viability を保つためにも Billingham<sup>12)</sup> は slow freezing better than rapid freezing, quick thawing better than slow thawing と述べおり、glycerin を添加することにより rapid freezing の有害性を償いといつてゐる。しかし添加する glycerin の濃度にも問題があり、Billingham (1952)<sup>33)</sup> は 98.1% glycerin 添加リソゲル液中で、0°C で 8 時間、室温では 35 分、また 80% glycerin 添加リソゲル液中で、室温では 2 時間皮膚を保存しえたと報告しており、諸家の報告を総括してみて 15% 前後が至適濃度と考えられたので本実験では 15% glycerin 添加生理的食塩水を使用した。凍結・融解する方法にも問題点はあるが、-15°C までは 1°C/分、以下 -70°C までは 10°C/分以内の速度で冷却し、37°C 恒温槽を用いて出来るだけ早く短時間 (1 分以内) に融解するのが原則であるといわれている<sup>31)32)</sup>。この実験では移植皮膚の viability よりもむしろ凍結保存にともなう移植抗原性の変化を知ることを目的としたので、dry ice を使用した quick freezing 法と 37°C の温水中で 3 分間融解する方法をえらびこれに統一して実験をおこなつた。したがつてこの実験範囲内での凍結保存皮膚についてのみいえるのであるが、これらの皮膚のアミノ酸の分析

結果からしても、3 時間および 6 時間保存ではその増減がかなり多種に及び、その変動域もせまいながら存在する点から、細胞 level における viability が存在しておると考えられる。しかし 12 時間および 24 時間と保存時間が長くなるにつれて変動はほとんどなくなり、このことは細胞個々の viability が減少もししくは消褪したことを示すものと考えられる。尚、アミノ酸分析にあたり蛋白質融解による変動が成績に加ることを排除するためピクリン酸で除蛋白処理を皮膚片採取直後ホモゲナライズ終了時におこなつた。正常皮膚一次移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動は既に述べた如く一定の様相を示すが、凍結保存皮膚移植後のものでは、15% glycerin 添加凍結保存 3 時間および 6 時間皮膚移植後のもののみが時間の関係および変動率ともに正常皮膚移植後のものに近似する変動を示し、単純凍結保存皮膚および 15% glycerin 添加凍結保存皮膚でも 12 時間ならびに 24 時間保存のものを移植した後の変動は、正常皮膚移植後のものと時間的関係はほぼ一致しても変動率においてはかなり相違した様相を示し、これら皮膚片の一次移植における移植免疫反応が正常皮膚移植後の移植免疫反応とは異なつてゐることを示しており、この相違は二次移植片の拒絶にみられる相違と相関するものと考えられる。

prednisolone の投与をおこなつたマウスからえた皮膚片の同種移植では、prednisolone 投与期間の長短に關係なく拒絶現象の遅延および移植皮膚片の生着日数の延長がみられたが、これは prednisolone 投与をうけたマウス皮膚の移植抗原にある程度の量的減少あるいは質的変化が招来されたためのものであろうと考えられる。一方これらマウスに正常皮膚の二次移植をおこなうと、正常皮膚を一次移植された対照群と同程度に拒絶の促進がみられる。この二次移植での拒絶促進は、一次移植皮膚片に宿主を感作するに充分な抗原が存在しており、宿主がその抗原に対する抗体産生をおこなつてゐることを示すものである。

prednisolone を含めて steroid 系薬剤の長期投与をおこなつた場合に、マウスの表皮ならびに真皮の萎縮と菲薄化、表皮ならびに毛のう上皮細胞の分裂抑制がおこることが知られているが<sup>34)</sup>、その発生機序は、真皮において膠原線維の形成に関与する線維芽細胞 (fibroblast) の増殖が steroid により抑制されるためと報告されている<sup>37)38)</sup>。したがつて prednisolone 投与期間の長短と皮膚萎縮の程度には一

定の関係があるが、著者の実験成績からすれば、組織学的にみられる萎縮の程度の差が必ずしも拒絶現象に差を生ずる程の抗原性の変化につながるものではないようである。prednisolone 投与マウス皮膚のアミノ酸組成と正常皮膚のアミノ酸組成との間にもとくにみるべき相違がなく、この点からも prednisolone 投与による皮膚変化は皮膚蛋白の変動を伴なわない単純な萎縮性変化と考えられるが、このような皮膚の萎縮性変化は prednisolone のかなり長期の投与によって組織学的にも明らかに証明される程の著しいものであつても、移植免疫反応を大きく修飾する程の抗原性の変化を伴うものではないことが判明した。これら皮膚片を一次移植した後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動で、正常皮膚移植のものと類似した様相を示すことも間接的にこのことを裏付けるものと考えてよかろう。

## 第5章 結 語

A系、D5系、C57BL系成熟雄マウスを用いて同種皮膚移植実験をおこない次の結果を得た。

1) 大皮膚片 (2.0cm  $\times$  4.5cm) 移植の方が小皮膚片 (1.0cm  $\times$  2.0cm) 移植より、移植皮膚片の生着期間が延長するが、拒絶現象開始時期は両者間に差を認めず、移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動も互に類似した経過をとり、それぞれに施行した二次移植の拒絶促進現象もいずれも同程度に認められることから、この程度の大量皮膚移植した際の宿主の一次移植に対する immuno-response は小皮膚片移植の場合と較べて差がないことが判明した。大皮膚片移植時の生着期間延長は移植皮膚組織内における抗原抗体反応が拒絶をひきおこすにいたる経過の延長と考えられる。

2) 3時間以上24時間までの凍結保存後に一次移植された皮膚の生着期間と正常皮膚の生着期間との間には特に差が認められない。また単純凍結か15% glycerin 添加凍結かの保存方法の差による生着期間の差もこの保存時間内では認められない。しかし15% glycerin 添加凍結保存をおこなつた場合、3時間ならびに6時間保存皮膚を一次移植した場合には、これに正常皮膚の二次移植をおこなうと、正常皮膚を一次移植した対照群と同程度に拒絶促進現象を見ることが出来る。また一次移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動も15% glycerin 添加凍結による3時間ならびに6時間保存皮膚を移植したものでは正常皮膚移植後のものとほぼ一致した変動を示し、15

% glycerin 添加凍結保存法によりこの時間内では移植抗原性が移植免疫反応をおこすに充分なだけ保たれるものであることが判明した。しかし、15% glycerin 添加凍結保存でもこれより長時間の保存では二次移植の拒絶促進現象が惹起されない程度に移植抗原性の低下がおこるようである。凍結保存による組織障害も、3時間および6時間までの保存では、15% glycerin 添加凍結保存皮膚の方が軽微であるが、15% glycerin 添加凍結保存しても24時間経過したものでは、単純凍結保存と同程度の障害を認める。また保存皮膚のアミノ酸分析では時間の経過とともに変動が少くなり、特に12時間以上保存したものではその変動はごくわずかとなり、保存方法による差はみられない。

3) prednisolone の連続投与により組織学的に上皮性ならびに間葉性組織の萎縮をきたした皮膚を移植すると、移植皮膚の生着期間が延長する。しかし二次移植の拒絶促進現象は明らかにみられ、且つ正常皮膚移植群における二次移植拒絶促進と同程度にみられる。prednisolone 投与期間が延長するにつれて皮膚の萎縮は組織学的に著明になってくるが、このような単なる皮膚の萎縮性変化は、たとえ組織学的に明らかなものであつても、同種移植抗原性の点からみると一次移植免疫反応における宿主の immuno-response をやや低下させるにとどまり、二次移植の拒絶促進現象を抑制する程の抗原性の変化を伴うものではない。また移植後の血清  $\gamma$ -globulin 分画百分比の変動にも特に差はみられず、prednisolone 投与をうけたマウス皮膚のアミノ酸分析でも著明な変化を認めない。

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師砂田輝武教授、ならびに田中聰講師に深甚なる感謝の意を表するとともに、終始御懇切な御指導、御鞭撻をいただいた移植研究班の諸兄に深く感謝いたします。

(本論文の要旨は第2、3回日本移植学会総会において発表した。)

## 文

- 1) R. E. Billingham and P. B. Medawar: The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.* 28: 358, 1951.
- 2) R. E. Billingham: Free skin grafting in mammals. *Transplantation of Tissue and Cells*. 1, 1961.
- 3) D. L. Ballantyne, W. H. Siegel and J. M. Converse: The behavior of massive skin homografts in adoptively and actively immunized rats. *Plastic & Reconst. Surg.* 32: 310, 1963.
- 4) J. M. Converse, W. H. Siegel, and D. L. Ballantyne: Studies in antigenic overloading with massive skin homografts in rats. *Plastic & Reconst. Surg.* 31: 13, 1963.
- 5) W. S. Lapp and J. Q. Bliss: Skin graft size, its effect on graft survival in mice incompatible at a weak locus. *Transplantation* 4: 754, 1966.
- 6) 陣内伝之助: 抗免疫法の理論と実際. *移植*, 1: 269, 1966.
- 7) 藤井源七郎: 同種皮膚移植に関する実験的研究. *アレルギー*, 8: 549, 1959.
- 8) 藤井源七郎・他: 皮膚移植の手技と成績判定. *移植*, 1: 43, 1966.
- 9) 藤本吉秀・他: 組織移植の免疫機序と臓器移植. *医学のあゆみ*, 52: 649, 1965.
- 10) 佐藤渭・他: マウスにおける皮膚移植実験の技術に関する2, 3の考察. *総合医学*, 15: 183, 1958.
- 11) 赤沢彬: 同種皮膚移植に関する実験的研究. *形成外科*, VI: 350, 1963.
- 12) C. F. Zukoski, J. M. Callaway, and W. G. Rhea: Prolonged acceptance of a canine renal allograft achieved with prednisolone. *Transplantation* 3: 380, 1965.
- 13) Toolan H. W.: Studies of adult and embryonic skin homografts on conditioned or normal rabbits, with emphasis on the possible role of the ground substance. *Annals New York Academy of Science*. 73: 546, 1958.
- 14) Toolan H. W.: *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 69: 841, 1957.
- 15) G. H. Hitchings and G. B. Elison: Chemical suppression of the immuno response. *Pharmacol. Rev.* 15: 365, 1963.

## 献

- 16) R. E. Billingham and P. L. Krohn: Effect of locally applied cortisone acetate on survival of skin homografts in rabbits. *British Medical Journal*. 3: 1046, 1951.
- 17) R. J. Scuthorne: The effect of cortisone acetate on the response of the regional lymph node to a skin homograft. *J. Anat.* 90: 417, 1956.
- 18) R. E. Billingham, P. L. Krohn, and P. B. Medawar: Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *British Medical Journal*. 1: 1157, 1951.
- 19) J. F. Jennings: The effect of hydrocortisone on immune lysis of cells induced by cytotoxic antibody and complement in vitro. *The Journal of Immunology*. 96: 409, 1966.
- 20) 田中信男: 抗免疫剤の作用機序. *移植*, 2: 1, 1967.
- 21) Taylor A. C. and Lehrfeld J. W.: Determination of survival time of skin homograft in the rat by observation of vascular changes in the graft. *Plastic & Reconst. Surg.* 12: 423, 1953.
- 22) 熊西敏郎: 移植に利用する実験動物の選び方とその意義. *移植*, 2: 358, 1968.
- 23) 薄丈夫: 同種植皮における拒否現象の観察. *皮膚*, 9: 232, 1967.
- 24) J. A. Haller and R. E. Billingham: Studies of the origine of the vasculature in free skin grafts. *Ann. Surg.* 166: 896, 1967.
- 25) R. E. Billingham and P. B. Medawar: The antigenic stimulus in transplantation immunity. *Nature*, 178: 514, 1951.
- 26) Taylor A. C. and Lehrfeld J. W.: *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 59: 351, 1955.
- 27) G. J. V. Nossal, G. M. Williams, and C. M. Austin: Antigens in immunity. XIII. The antigen content of single antibody-forming cells early in primary and secondary immune responses. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 45: 581, 1967.
- 28) 秋山武久: 移植の細胞免疫・代謝, 2: 967, 1965.
- 29) 石橋幸雄: 免疫学的寛容について. *移植*, 1: 16, 1966.
- 30) 蝶良英郎・他: 同種移植の免疫化学. 代謝,

- 2: 956, 1965.
- 31) J. E. Lovelock: The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. J.* 56: 265, 1954.
- 32) 陣内伝之助・他: Freezing の臨床的応用. *外科診療*, 7: 529, 1965.
- 33) R. E. Billingham and P. B. Medawar: The freezing, drying and storage of mammalian skin. *J. Exp. Biol.*, 29: 454, 1952.
- 34) 岡谷照太: 胸腺摘出の免疫能に及ぼす影響に関する実験的研究. *岡山医雑誌*, 78: 792, 1966.
- 35) E. J. Holborow: Immunoglobulin physiology. *Lancet*, 1: 942, 1967.
- 36) E. J. Holborow: The immunological capability of small lymphocytes. *Lancet*, 1: 1049, 1967.
- 37) Rahmann, A. G. & Berliner, D. L.: Endocrinology, 76: 916, 1965.
- 38) Goodman, L. S.: Adrenocortical steroid and their synthetic analogs. The pharmacological Basis of Therapeutics, chap. 72: 1615, 1968.
- 39) Klingman, A. M.: 外用副腎皮質ホルモンの生物学的活性について (講演), 於 大阪, Oct. 1967.
- 40) Gillman, T. et al: Influence of cortisone on connective tissue, epithelial relation in wound healing, hair regeneration and the pathogenesis of experimental skin cancers. *Nature*, 176: 932, 1955.
- 41) 田中早苗・他: 移植免疫に関する展望. *治療* 45: 1199, 1963.
- 42) 田中早苗・他: 移植免疫に関する展望. *治療* 45: 1381, 1963.
- 43) 田中早苗・他: 移植免疫に関する展望. *治療* 47: 309, 1965.
- 44) 田中早苗・他: 移植免疫に関する展望. *治療* 48: 495, 1966.
- 45) 田中早苗・他: 移植免疫に関する展望. *治療* 48: 1055, 1966.

**Experimental Study on Skin Homograft, with Particular Reference  
to Influence of Physical and Biological Pretreatment  
of Graft upon Homograft Rejection Reaction**

By

Seiichiro YANAGIMOTO

Department of Surgery, Okayama University Medical School  
(Director: Professor Terutake Sunada, M. D.)

Some experimental studies on skin homograft were performed between A and C 57 BL or Db strain of mice, to investigate the influence of qualitative and quantitative difference of graft antigen upon homograft rejection reaction.

In this study, difference in amount of graft antigen in homograft rejection was tested in the experiment with two kinds of different size of normal skin (1.0 cm.  $\times$  2.0 cm. and 2.0 cm  $\times$  4.5 cm.). The normal skin was kept frozen either simply or in 15% glycerin in saline for 3 to 24 hours to have physical denaturation of the graft, and to have a biologically deteriorated graft, atrophied skin was harvested from mice, which were administered with 1 mg. of prednisolone intraperitoneally daily for 3 to 9 weeks.

The results obtained were as follows,

1) The larger piece of skin survived longer than the smaller piece, although no significant difference in time before onset of rejection was observed. The rejection of the second set graft was accelerated, regardlessly of the size of the first graft.

This suggested that the longer survival of the larger graft was due merely to requirement of excess time to complete the rejection process after its onset.

2) There was no significant difference in the survival time of the first graft between the frozen and normal skin, and the same was also observed between the grafts which were simply frozen and were frozen in 15% glycerine in saline.

No second set phenomenon was observed when the skin simply frozen for 3 to 24 hours was used as the first graft. However, the acceleration rejection of the second set graft was clearly observed in mice who received the first graft which was kept frozen in 15% glycerine saline for 3 to 6 hours.

This indicated that freezing storage of skin in 15% glycerine saline for up to 6 hours could save enough antigen of the skin to sensitize the mice for the second set phenomenon with its first graft.

3) The atrophied skin obtained from prednisolone-treated mice survived longer than the healthy skin from untreated mice in its first graft. When the second set graft was made on mice who received and rejected the skin from prednisolone-treated mice, the rejection was accelerated as equally as in mice who received and rejected the normal skin as first graft, indicating that in skin showing simple atrophy, though it was macroscopically and histologically demonstrable, no qualitative deterioration of transplantation antigen might occur, in contrast to the occurrence of quantitative reduction of the antigen according to the grade of atrophy.

4) The results were also obtained from the study in the analysis of the serum  $\gamma$ -globulin and tissue amino acid in the skin, to support the above statements.

(the author's abstract)

## 柳本論文附図

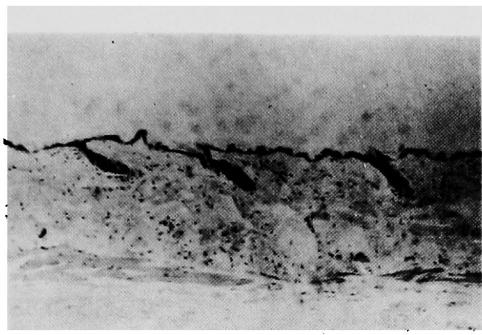


写真1 24時間単純凍結保存皮膚片 H. E染色  
10×10



写真4 prednisolone 8週間投与マウス皮膚片  
H. E染色 10×10

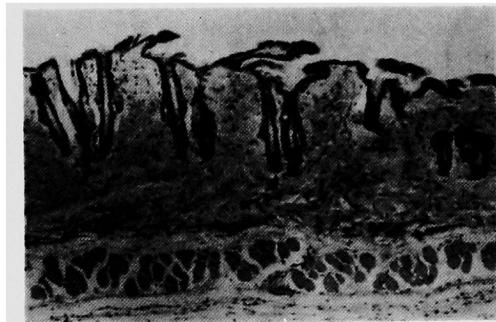


写真2 3時間15%glycerin添加凍結保存皮膚片  
H. E染色 10×10

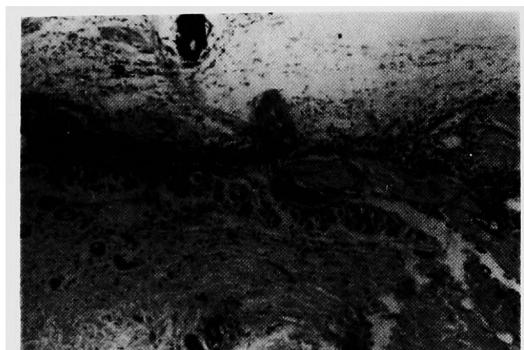


写真5 移植後5日目、拒絶現象開始前 H. E染色  
10×10

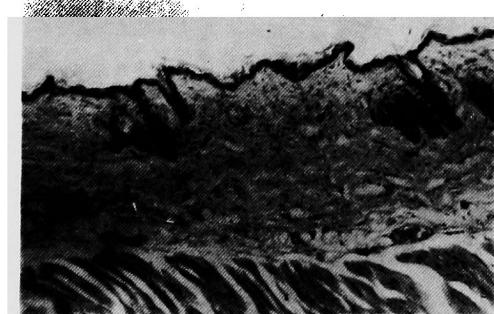


写真3 prednisolone 4週間投与マウス皮膚片  
H. E染色 10×10

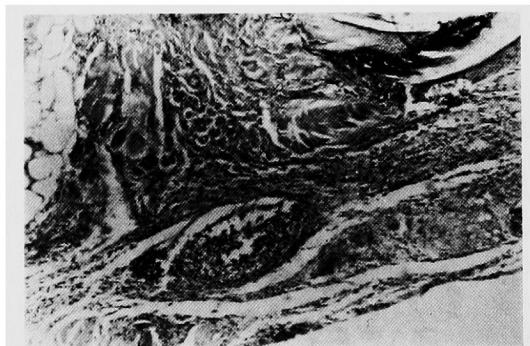


写真6 移植片完全脱落 H. E染色 10×10