

# ラット小腸移植による Graft-Versus-Host Disease (GVHD) と Natural Killer (NK) 細胞活性の相関

——特に cutaneous GVHD との関連について——

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

藤 岡 正 浩

(平成3年6月3日受稿)

Key words : 小腸移植, GVHD, NK 細胞, AsialoGM 1, Cyclosporine A

## 結 言

小腸はリンパ装置が豊富な臓器であり, その移植においては, 移植片拒絶と共に移植片対宿主病 (Graft-versus-Host Disease (GVHD)) も重要な問題である。しかし, その免疫機構は解明されておらず GVHD においてどの細胞集団が免疫担当細胞であるかは, まだ今のところ議論の途中である。GVHD において主要な細胞集団と考えられているのは, alloreactive T 細胞とNK 細胞の二つである。alloreactive T 細胞を免疫担当細胞と考え, 移植片から取り除くことにより GVHD を予防しようとした報告がある。それらの報告では, 移植片への radiation, microdissection や anti-lymphocyte globulin による移植片からのリンパ球の除去を試み一応の成果をあげている<sup>(1-4)</sup>, しかし他の研究者らによれば, alloreactive T 細胞は, GVHD の担当細胞としては本質的なものではないとしている<sup>(5-7)</sup>。Lopez らの報告によれば, 人の骨髄移植後の GVHD の発生を予知するには, レシーピエントのNK 細胞活性が重要であり, 移植前に正常または高いNK 細胞活性を示すレシーピエントにおいては GVHD の発生率が高く, 低いNK 細胞活性のレシーピエントではその発生率が低いとされている<sup>(8)</sup>。最近のレポートによれば GVHD が導入されたマウスやラットにおいていろいろなリンパ装置におけるNK 細胞活性の増強が示されたり<sup>(9-13)</sup>, NK 細胞がGVHDに

関連した皮膚病変や死亡率において重要な役割をしていることが言われている<sup>(14,15)</sup>。このような報告から我々はNK 細胞に特に注目した。

臨床的に GVHD には, 発熱, 皮膚紅斑, 肝障害, 下痢, 汎血球減少症, 等のように多くの症状が出現するが, GVHD の標的臓器としては, 大きく分けると肝臓, 小腸, リンパ装置, そして皮膚が考えられている。田中らの報告によれば, 皮膚の上皮細胞はNK 細胞に対する感受性があり, また皮膚上皮細胞は mixed skin cell lymphocyte culture において allogeneic lymphocyte を刺激し, 増殖させることができるとしている<sup>(16,17)</sup>。今回の我々の実験では, ラットの parent→F1 の系のコンビネーションを用いて小腸移植を行い GVHD を作製し, 免疫抑制剤投与による GVHD 抑制効果を, 生存期間及び cutaneous GVHD の発生時期により検討した。また, 特にGVHD の皮膚病変に着目し, 免疫担当細胞としてNK 細胞または allogeneic T リンパ球のどちらが大きな役割をしているかを検討した。

## 材 料 と 方 法

### 1. 実験動物

LEW (RT1<sup>l</sup>) ラットおよび WKA (RT1<sup>k</sup>) ラットを日本チャールスリバー社と静岡農協より購入し, 岡山大学医学部附属の動物実験施設にて specific pathogen free (SPF) の状態で飼育した。(LEW×WKA) F1 ラットは同施設

にて繁殖させ、同じ SPF 下にて飼育した。小腸移植には雄の LEW ラットをドナーとし、雄の (LEW×WKA) F1 ラットをレシーピエントとした。ラットの体重は300-400gr のものを用いた。cytotoxic assay には、体重200gr の雄の LEW, WKA, (LEW×WKA) F1 ラットを用いた。

## 2. 手術手技

ドナーラットは6-8時間絶食とし、全ての操作はエーテル麻酔下に行った。Monchik and Russell の方法に準じて異所性小腸移植を行った<sup>(1)</sup>。その方法は、グラフトの上腸間膜動脈から100i. u. のヘパリンを含んだ冷生理食塩水20ml (4℃) でフラッシュし、腸管内腔は10mgのゲンタマイシンを含んだ冷生理食塩水25ml (4℃) によりイリゲーションし、レシーピエントの準備ができるまで冷生理食塩水の中で保存した。micro surgery にて8-0 prolene を使用して移植片の aortic cuff をレシーピエントの infrarenal aorta に端側吻合し、portal vein を infrarenal vena cava に端側吻合した。腸管の口側は閉じ、肛門側はレシーピエントの腹壁に人工肛門とした。

## 3. 術後管理

術後ラットの食餌は自由とし、抗生物質の投与はしなかった。術後5日以内の死亡は technical failure として除外した (除外率=10%以下)。ラットは毎日観察され、耳や鼻の発赤を確認した日で cutaneous GVHD の発症とした。

## 4. 免疫抑制剤

免疫抑制剤には Cyclosporine A (サンド社製) と anti-ASGM1 抗体 (和光社製) を Fig. 1 のプロトコールで投与した。Cyclosporine A はオリーブオイルで希釈し、5 mg/ml の濃度として筋肉内注射した。anti-ASGM1 抗体はマウスとラットの NK 細胞に対する monoclonal antibody であるが、今回は50 $\mu$ l を0.3ml の生理食塩水に溶かして尾静脈より投与した。

## 5. 皮膚上皮細胞浮遊液作製

この方法は田中らによって1979年に報告されているが、ラットの tail skin を70% ethanol で消毒し、骨格より剥し細片にする。この細片を0.5% trypsin-saline に浮遊させ37℃で3時間

incubation する。次に0.025% DNase の phosphate buffer solution の中で dermis から epidermis を剥し、epidermis の basal cell layer をガラス棒で静かに擦って epidermal cell を単離する。この cell suspension をメッシュを通して毛や debris を取り除き、2% fetal calf serum を含んだ phosphate buffer solution で3回洗浄した後、25mM HEPES buffer, 10% fetal calf serum, 1% 抗生物質を含んだ RPMI-1640 に浮遊させた<sup>(16-18)</sup>。

## 6. レシーピエントからの spleen cell の分離

assay の為の spleen cell の分離は、小腸移植後7日目にレシーピエントのラットを屠殺し、無菌状態にて spleen を採取した。spleen は25 mM HEPES buffer を含んだ RPMI-1640 の中でつぶし、0.75% ammonium chloride で赤血球を取り除き、3回 phosphate buffer solution で洗浄後、再び25mM HEPES buffer, 10% fetal calf serum, 1% 抗生物質を含んだ RPMI-1640 に浮遊させ spleen cell を単離した。

## 7. cytotoxic assay

<sup>51</sup>Cr-release assay にてレシーピエントの cytotoxic activity を評価した。標的細胞には、K-562 tumor cell line と3系統のラット、LEW, WKA, (LEW×WKA) F1 の皮膚上皮細胞を用いた。<sup>51</sup>Cr-labelling time は K-562 1時間、skin cell 2時間とした。incubation は37℃で K-562 4時間、skin cell 12時間で ET ratio 100:1 にて行った。% cytotoxicity を次の式から求めた。

% cytotoxicity =

$$\frac{\text{experimental} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

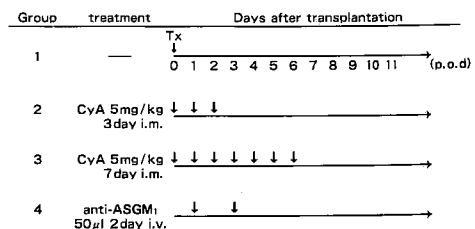


Fig. 1 Protocol of administration of CyA or anti-ASGM<sub>1</sub> ab on P→F<sub>1</sub> small bowel transplantation

## 結 果

## 1-a. 生存期間及び cutaneous GVHD 発症時期 (CyA protocol)

Table 1 に CyA protocol の生存期間と cutaneous GVHD 発症時期を示した。group 1 (GVHD モデル) の全例に GVHD の発症をみた。まず術後7日から9日目に cutaneous GVHD が発症し、ついで systemic GVHD へ移行し19日までに全例が GVHD で死亡した。平均生存日数 (MST) は  $17.5 \pm 1.5$  であった。group 2 (CyA 5 mg/kg 0-2 pod) も全例に cutaneous GVHD の発症をみたがその発症時期は術後11日から14日とやや遅延した。その後やはり全例に systemic GVHD が発症し術後25日までに全例が GVHD で死亡した (MST =  $22.7 \pm 1.6$ )。しかし Cyclosporine A の投与期間を延長した group 3 (CyA 5 mg/kg 0-6 pod) では7例のうち3例に cutaneous GVHD が発症し、その発症時期も group 1, 2 と比べかなり遅延し術後25, 30, 49日であった。この3例は引き続き systemic GVHD で死亡した。残る4例は2例が肺炎などの感染症で死亡し、その他2例は感染症や GVHD も無く術後200日経過しているが生存中である (MST =  $>107.6 \pm 106.9$ )。Cyclosporine A 5 mg/kg 7日間投与は cutaneous GVHD と systemic GVHD の両方に、その抑制において有効と思われた。

## 1-b. 生存期間及び cutaneous GVHD 発症時期 (ASGM 1 protocol)

group 4 (anti-ASGM 1  $50 \mu\text{l}$  2 day) では、全例に cutaneous GVHD の発症はみられなかった。しかし6例中4例は感染症などと思われる死因にて術後20日から30日の早期に死亡した。

残り2例は cutaneous GVHD の発症は無く100日以上と長期生存が得られた (MST =  $52.5 \pm 41.9$ )。ASGM 1 の投与は cutaneous GVHD の抑制には効果的であったが、生存期間の延長にはいたらなかった。

## 2. レシーピエントの spleen cell の cytotoxic activity

我々のラットの実験系で GVHD においては小腸移植の術後7日目にレシーピエントの spleen cell の cytotoxic activity は maximum となることを報告している ("小腸移植及び脾細胞移入による GVHD における NK 活性動態の意義について" 岡田博文, 移植 (投稿中))。そのため今回の実験でも術後7日目の cytotoxic activity を比較した。Fig. 2 に CyA protocol を、Fig. 3 に anti-ASGM 1 protocol の cytotoxic activity を示した。Fig. 2, 3 が示すように、いずれの group の cytotoxic activity も全てのラットの skin cell と K-562 に対して同様の活性を持っており、標的細胞による差異はなかった。

cytotoxic activity の増強の程度と臨床の cutaneous GVHD の発症とはよく相関した。つまり、術後7日目の cytotoxic activity の高いものほど cutaneous GVHD の発症率は高く、また発症時期も早かった。Fig. 2 に示すように group 1 や 2 のように全例に cutaneous GVHD が発生した group では何もしていない同週齢の F1 ラット (正常 F1 ラット) の cytotoxic activity と比較して増強しており、group 1 では正常 F1 ラットの約2倍に増強していた。group 2 では group 1 に比較すると、cytotoxic activity の増強の程度が少し低いが、cutaneous GVHD の発症時期も少し遅れている。group 3

Table 1 Survival times and onset of cutaneous GVHD of F<sub>1</sub> recipient bearing LEW small bowel

Group	cutaneous GVHD onset	Survival times	MST ± SD
1	8, 8, 8, 9, 9, 9	15, 16, 18, 18, 19, 19	$17.5 \pm 1.5$
2	11, 12, 12, 13, 13, 14	22, 22, 24, 20, 23, 25	$22.7 \pm 1.6$
3	—, 25, 30, —, 49, —, —	24, 33, 37, 56, 63, >220, >320	$>107.6 \pm 106.7$
4	—, —, —, —, —, —	20, 21, 21, 31, 102, 120	$52.5 \pm 41.9$

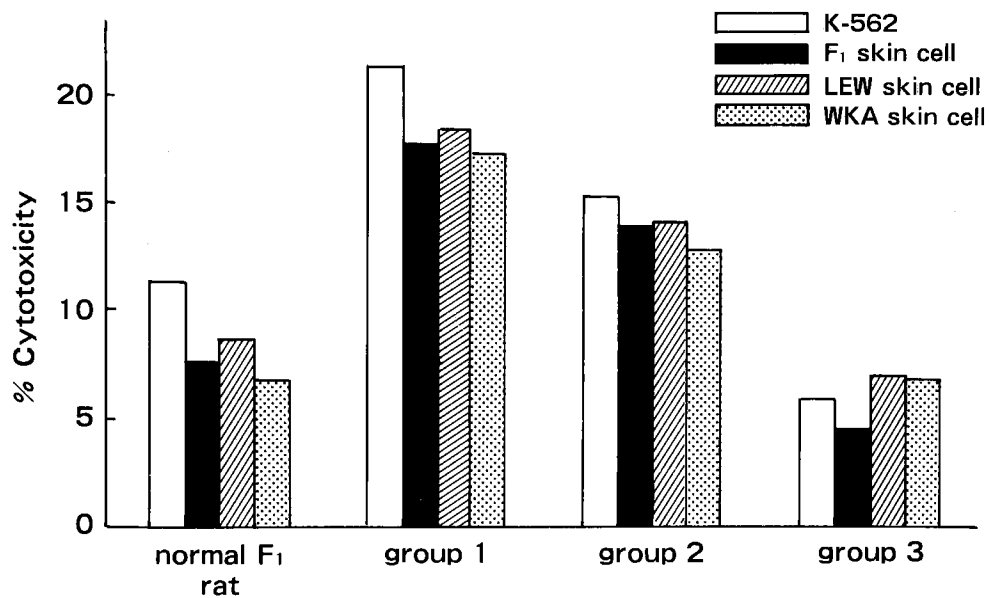


Fig. 2 Cytotoxic activity of spleen cell in the F<sub>1</sub> recipient bearing LEW small bowel (CyA protocol)

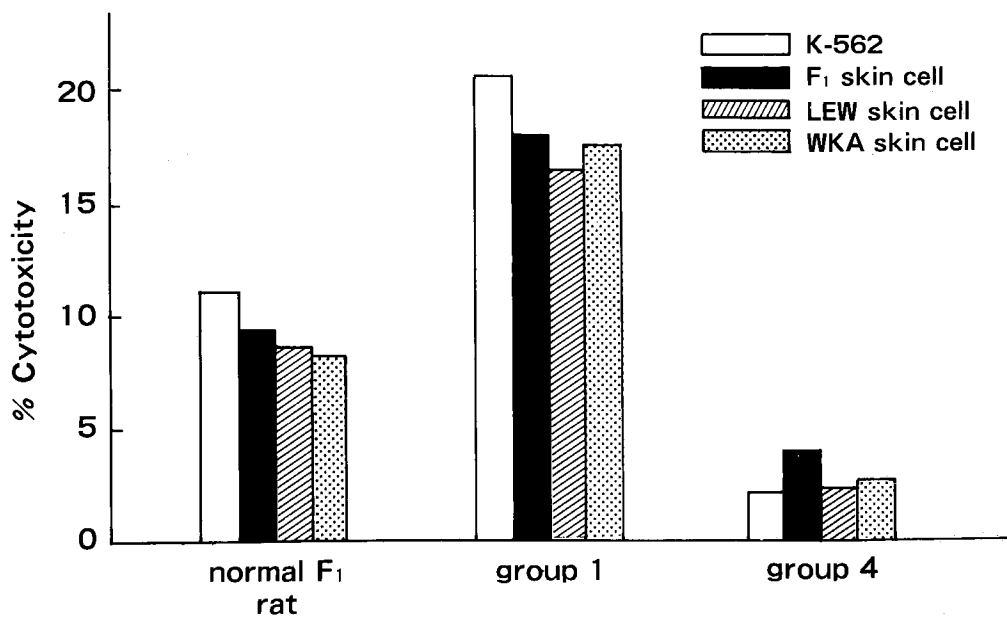


Fig. 3 Cytotoxic activity of spleen cell in the F<sub>1</sub> recipient bearing LEW small bowel (anti-ASGM<sub>1</sub> protocol)

のように cutaneous GVHD の発症が回避または著しく遅延したレシーピエントではその cytotoxic activity は group 1, 2 と比較して抑制されており正常 F1 ラットの cytotoxic activity よりも低い値を示した。次に、選択的に NK 細胞活性を抑えるため anti-ASGM 1 を投与した group 4 では臨床的に cutaneous GVHD は抑制され Fig. 3 のように、その cytotoxic activity はかなり抑制されており正常 F1 ラットよりも低値を示した。

### 考 察

Graft-Versus-Host Disease は今までは主に骨髄移植や大量輸血の合併症として議論の対象となってきたが、心、肝、腎などの臓器移植においてはその可能性の低さ故に大きな問題では無かった。しかし小腸移植では移植片の中に多くのリンパ球を含むため、GVHD は重要な問題である。人間における小腸移植ではまだ術後の合併症としての GVHD はまだ報告されていないようだが、動物実験では GVHD が発生することが多数報告されている<sup>(19-22)</sup>。今回の実験では parent→F1 の移植を行なったが、これは拒絶はおこらずに GVHD のみ発症する系の組合せである。我々の系の組合せでは、まず7日前後に耳の発赤などの cutaneous GVHD が発症し、次いで下痢や体重減少などの systemic GVHD へと移行し19日までに全例が死亡した。これに一般的な免疫抑制剤である Cyclosporine A と選択的に NK 細胞を抑制する anti-ASGM 1 を投与し GVHD にどのような影響を与えるかを検討した。

最近の報告では、動物実験における GVHD の発生子防や重症度の軽減には Cyclosporine A の投与はあまり意味がないと言われている<sup>(21-23)</sup>、確かに今回の実験でも完全に GVHD を抑制することはできなかったが、今までに報告された Cyclosporine A の量より低い量を使用して group 3 では7例中4例は GVHD は回避され残り3例も cutaneous GVHD の発症時期がかなり遅延した。この点より Cyclosporine A は GVHD の抑制に効果的と思われる、以前より報告されているものより少ない量の方が有効と思わ

れた。

次にこれらのレシーピエントの cytotoxic activity を調べてみた。spleen cell の cytotoxic activity は cutaneous GVHD が発症した group 1, 2 では正常 F1 ラットと比較してかなり増強しており、その活性は標的皮膚上皮細胞による差異は無く、みな一様であった。もしこの cytotoxic activity が allogeneic T 細胞によるものであれば、WKA と (LEW×WKA) F1 の二つの系の皮膚上皮細胞に対する活性は増強し LEW に対する活性は低いというように標的細胞の系により差があるはずである。そのため、この cytotoxic activity は MHC non-restricted の NK 細胞によるものと考えた。他の研究者によれば、GVHD が導入されたマウスやラットのリンパ様臓器において高い NK 細胞活性があることが言われている。また GVHD の病変が severe または moderate であったマウスでは、導入後8日目に NK 細胞活性は peak を迎える事も言われており今回の我々の結果と一致する<sup>(8-12)</sup>。group 3 では group 2 と比べて Cyclosporine A の投与期間を4日延ばしただけにも関わらず臨床的に cutaneous GVHD は回避または遅延された。この group の cytotoxic activity は、やはり標的皮膚上皮細胞の系による差異は無く、全ての皮膚上皮細胞に対する活性と K-562 に対する活性はみな一様に減弱しており、正常 F1 ラットより低値を示した。この結果より、NK 細胞は cutaneous GVHD において主要な役割をしていることが in vivo, in vitro の両方で示された。また、Cyclosporine A は NK 細胞活性を抑制することが示されたが、これは以前の報告と一致するところである<sup>(24,25)</sup>。

そこで、より選択的に NK 細胞を抑制する為 anti-ASGM 1 を in vivo に投与してみた。ラットの GVHD を防ぐ為の anti-ASGM 1 の in vivo における効果的な投与量は文献的にはまだ確立されていない様である。マウスを使った実験では、anti-ASGM 1 を in vivo に投与して GVHD の抑制に効果的であったとの報告がある。このマウスの投与量を参考に<sup>(14,26-29)</sup>して、体重当りの anti-ASGM 1 の投与量を考えてまず最初に 200 $\mu$ l を2回投与してみた。しかし、全例が消

化管出血などで術後3—5日で死亡した。そこで投与量を半分とし100 $\mu$ lを2回投与してみたが結果は同じであった。次にもう半分として50 $\mu$ l, 2回投与してみたところ、今回の様な結果を得ることができた。今回はこれより少ない量を用いていないが、より少ない量で有効な結果が得られるのかもしれない。今回用いた量はマウスへの投与量と同じ為、体重当りの量を考えるとNK細胞活性を抑制するのには不十分ではないかと思っただがFig. 3に示す様にNK細胞活性を抑制することができた。しかし、anti-ASGM1は高用量で用いるとNK細胞だけでなくmature T lymphocyteにも反応することが言われているが、マウスの実験の投与量と比較してみると、かなり低用量であるので今回の量ではNK細胞だけを抑えることができたと思われる。マウスの実験ではcutaneous GVHDだけでなくsystemic GVHDにもanti-ASGM1の投与は有効であるとの報告があるが<sup>(28,29)</sup>、今回の我々の結果からはcutaneous GVHDの抑制には有効であったが生存期間の延長にはあまり効果的ではなかった。この理由としては、ラットとマウスという種の違い、小腸と骨髄という移植片の差異によるため移入されるcell populationの違い、anti-ASGM1の毒性や、また投与量としてoverdoseであったのかもしれないなどのことが考えられる。

NK細胞はMHCの拘束なしに腫瘍細胞、感染した細胞、rapid dividing cellを融解すると定義されてきた。今回我々がGVHDの免疫担当細胞としてNK細胞に着目したのは、GVHDの標的器官(皮膚、肝臓、小腸)とNK細胞の

標的と言われているrapid dividing cell (skin cell, hepatocyte, enterocyte)が以通っていたからである。これに加えて、NK細胞の様々な機能が報告されている。たとえば、cytokine(IL-1, IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF等)の産生<sup>(30-32)</sup>、抗体産生の統御<sup>(33-36)</sup>等である。このようにNK細胞はprimitiveではあるが多種多様な機能を持っている。このような点から、NK細胞は宿主におけるauto self regulation systemの一躍を担っていて、GVHDや拒絶に関与する事が考えられる。もちろん、NK細胞のみがGVHDの免疫担当細胞であるとは考えられないが、GVHDの皮膚病変に限って言えば、今回の実験でNK細胞が直接的に皮膚細胞に働いている事がin vivo, in vitroの両方で示された。

GVHDは様々な免疫系の複合体であると思われる。この様々な問題を解決するには、さらなる研究が必要である。

## 結 論

ラット小腸移植後のGVHDにおいて、NK細胞が大きな役割をしている可能性があり、特にcutaneous GVHDにおいてはNK細胞が直接的に皮膚に作用している事がin vivo, in vitroの両方で示された。

## 謝 辞

今回この研究の機会を与えてくださった岡山大学第一外科折田薫三教授に深く感謝するとともに、直接御指導頂いた国立岡山病院外科田中 信一郎先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Monchik GJ and Russell PS : Transplantation of small bowel in the rat ; technical and immunologic considerations. *Surgery* (1971) **70**, 693—702.
- 2) Lee KW and Schraut WH : In vitro allograft irradiation prevents graft-versus-host disease in small bowel transplantation. *J Surg Res* (1985) **38**, 364—372.
- 3) Deltz E, Ulrick K, Schack T, et al : Graft-versus-host reaction in small bowel transplantation and possibilities for its circumvention. *Am J Surgery* (1986) **151**, 379—386.
- 4) Wallander J, Lackgren G, Sandstrom E, et al : Small bowel transplantation in the rat : a new technique. *Transplant Proc* (1987) **19**, 4387—4388.

- technique. *Transplant Proc* (1987) **19**, 4387—4388.
- 5) Elkins WL : Effector mechanisms in graft-versus-host disease. *Transplant Proc* (1978) **10**, 15—17.
  - 6) Jadus MR, Peck AB : Lethal murine graft-versus-host disease in the absence of detectable cytotoxic T lymphocytes. *Transplantation* (1983) **36**, 281—289.
  - 7) Hamilton BL : Absence of correlation between cytotoxic T lymphocytes and the lethal murine graft-versus-host disease in response to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* (1984) **38**, 357—360.
  - 8) Varkila K, Hurme M : Natural killer cells and graft-versus-host disease : no correlation between the NK cell levels and GVHD in the murine P to F1 model. *Immunology* (1985) **54**, 121—126.
  - 9) Roy C, Ghayur T, Kongshavn PAL, Lapp WS : Natural killer cell activity by spleen, lymph nodes, and thymus cells during the graft-versus-host reaction. *Transplantation* (1982) **34**, 144—146.
  - 10) Borland A, Mowat A McI, Parrott DMV : Augmentation of intestinal and peripheral natural killer cell activity during the graft-versus-host reaction in mice. *Transplantation* (1983) **36**, 513—519.
  - 11) Pattengale PK, Ramstedt U, Gidlund M, Orn A, Axberg I, Wigzell H : Natural killer activity in (C57BL/6xDBA/2) F1 hybrids undergoing acute and chronic graft-versus-host reactions. *Eur J Immunol* (1983) **13**, 912—919.
  - 12) Mowat A McI, Borland A, Parrott DMV : Augmentation of natural killer cell activity by anti-host delayed-type hypersensitivity during graft-versus-host reaction in mice. *Scand J Immunol* (1985) **22**, 389—399.
  - 13) Clancy J, Mauser L, Chapman AL : Level and temporal pattern of natural cytolytic clls during acute graft-versus-host disease (GVHD) in the rat. *Cell Immunol* (1983) **79**, 1—10.
  - 14) Charley MR, Mikheal A, Bennett M, Gillam JM, Sontheimer RD : Prevention of lethal, minor-determinate graft-versus-host disease in mice by the in vivo administration of anti-asialoGM1. *J Immunol* (1983) **131**, 2101—2103.
  - 15) Varkila K and Hurme M : Acute graft-versus-host disease mortality in murine parent vs F1 model can be prevented by treatment of the recipient mice with anti-asialoGM1 antibody. *J Leukocyte Biol* (1985) **38**, 124.
  - 16) Tanaka S and Sakai A : Stimulation of allogeneic lymphocytes by skin epidermal cells in the rat. *Transplantation* (1979) **27**, 194—199.
  - 17) Tanaka S, Ota T, Amamiya S, Kobatake T and Orita K : Spontaneous-cell mediated cytotoxicity (SCMC) against rat epidermal cells. *Transp Proc* (1983) **15**, 1662—1663.
  - 18) Steinmuller D, Wunderlich JR : The use of freshly explanted mouse epidermal cells for the in vitro induction and detection of cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* (1976) **24**, 146—163.
  - 19) Lillehei RC, Longerbeam JK, Goott B, et al. Gastrointestinal transplantation. *Surg Clin North Am* (1962) **42**, 1191—1216.
  - 20) Cohen Z, MacGregor AB, Moore KTH, et al : Canine small bowel transplantation—a study of immunologic responses. *Arch Surg* (1976) **111**, 248—253.
  - 21) Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, et al : The use of FK-506 for small intestine allotransplantation : inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* (1990) **49**, 483—490.
  - 22) Saat RE, deBruin RWF, Heineman E, Jeekel J and Marquet RL : The limited efficacy of cyclosporine in preventing rejection and graft-versus-host disease in orthotopic small bowel transplantation in rats. *Transplantation* (1990) **50**, 374—377.

- 23) Glazier A, Tutschka PJ, and Farmer E : Studies on the immunobiology of syngeneic and autologous graft-versus-host disease in cyclosporine-treated rats. *Bone Marrow Transplant* (1983) **15**, 819—825.
- 24) Martino I, Paola A, Federico S and Alberto M : Inhibition of human natural killer activity by cyclosporine A. *Transplantation* (1981) **31**, 113—116.
- 25) Lefkowitz M, Kornbluth J, Tomaszewski JE and Jorkasky DK : Natural killer cell activity in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *J Clin Immunol* (1988) **8**, 121—127.
- 26) Varkila K : Depletion of asialo GM1<sub>+</sub> cells from the F1 recipient mice prior to irradiation and transfusion of parental spleen cells prevents mortality to acute graft-versus-host disease and induction of anti-host specific cytotoxic T cells. *Clin Exp Immunol* (1987) **69**, 652—659.
- 27) Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K and Tada T : Aglycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* (1980) **10**, 175—180.
- 28) Cipriano D, Faanes RB and Merluzzi VJ : Protection of mice against acute lethal graft-versus-host disease by treatment with anti-asialoGM1 antibody : alopecia dermatitis in long-term survivors. *Transplantation* (1989) **47**, 922—924.
- 29) Ghayur T, Seemayer TA and Lapp WS : Prevention of murine graft-versus-host disease by inducing and elimination ASGM1<sub>+</sub> cells of donor origin. *Transplantation* (1988) **45**, 586—590.
- 30) Cassatelia MA, Anegon I, Cuturi MC, et al : Fc R (CC16) interaction with ligand induces Ca<sup>2+</sup> mobilization and phos-phoinositide turnover in human natural killer cells ; Role of Ca<sup>2+</sup> in Fc R (CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* (1989) **169**, 549—567.
- 31) Cuturi MC, Anegon I, Sherman F, et al : Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* (1989) **169**, 569—583.
- 32) Abo T, Sugawara S, Arenomori A, et al : Selective phagocytosis of Gram-positive bacteria and interleukin 1-like factor production by a subpopulation of qarge granular lymphocyte. *J Immunol* (1986) **136**, 3189—3197.
- 33) Kimata H, Sherr EH and Saxon A : Human natural killer (NK) cells produce a late-acting B-cell differentiation activity. *J Clin Immunol* (1988) **8**, 381—389.
- 34) Rodriguez MA, Blanca I, Baroja MI, et al : Helper activity by human large granular lymphocytes in vitro immunoglobulin synthesis. *J Clin Immunol* (1987) **7**, 356—364.
- 35) Arai S, Yamamoto H, Itoh K, et al : Suppressive effect of human natural killer cells on pokeweed mitogen induced B cell differentiation. *J Immunol* (1983) **131**, 651—657.
- 36) Robles CP and Pollack SB : Regulation of the secondary in vitro antibody response by endogeneous natural killer cells : kinetics, isotype preference, and non-identity with T suppressor cells. *J Immunol* (1986) **137**, 2418—2424.



**Correlation between natural killer (NK) cell activity and graft-versus-host disease (GVHD) after small bowel transplantation of rat**

— especially for cutaneous GVHD —

**Masahiro FUJIOKA**

First Department of Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

Using (LEW) parent to (LEW×WKA)F1 combination, heterotopic total small bowel transplantation was performed in rats. We divided this GVHD model into four groups (group 1 ; control, group 2 ; Cyclosporine A (CyA) 5 mg/kg 0-2 pod, group 3 ; CyA 5 mg/kg 0-6 pod, group 4 ; anti-ASGM1 antibody 50  $\mu$ l twice). All rats in group 1 developed cutaneous GVHD on 8 or 9 pod, and developed systemic GVHD and died within 19 pod (Mean Survival Times (MST)= 17.5 $\pm$ 1.5). All rats in group 2 developed cutaneous GVHD on 11-14 pod and died in 20-25 pod due to systemic GVHD (MST=22.7 $\pm$ 1.6). However, 3 of the 7 rats in group 3 and none of those in group 4 developed cutaneous GVHD and survival times were elongated (MST $\geq$ 107.6 $\pm$ 106.9, 52.5 $\pm$ 41.9). We also evaluated the cytotoxic activity of recipient spleen cells against three strains of rat skin cells (LEW, WKA, (LEW×WKA)F1) and K-562 cell line on 7 pod. In group 1 and 2, cytotoxic activity was augmented, compared with that in normal F1 rat, against all target cells. However, in group 3 and 4, cytotoxic activity was attenuated, compared with that in group 1 and 2, and lower than in normal F1 rat. We considered that this cytotoxic activity was due to MHC non-restricted NK cells, because there were no differences in any kind of target cells.

We concluded that the NK cell might play a great role in GVHD, especially for skin lesions.