

出國報告（出國類別：進修）

- 一、 移植耐受性之誘導
- 二、 異種器官移植之最新發展

服務機關：國立台灣大學醫學院附設醫院 外科部

姓名職稱：戴浩志 主治醫師

派赴國家：美國賓州 匹茲堡

出國期間：中華民國九十四年十月三十一日至九十五年十月二十九日

報告日期：中華民國九十六年一月三十一日

摘要

我國腎、肝、胰、心、肺移植及心肺同步移植，在亞洲器官移植領先其他亞洲國家。目前接受移植的病患可能遭受急性排斥、與慢性排斥等反應，而必須終生服用抗排斥藥物。移植耐受性之誘導 (Induction of Transplantation Tolerance)，可以減緩急性排斥、與慢性排斥，進而減少服用抗排斥藥物。

器官捐贈尚未蔚成風氣，不少末期器官衰竭病人，在等待合適器官當中死亡，所以器官短缺之情況非常嚴重。全球科學家在過去幾十年來，都在探討如何使用動物之器官，作為人類異種移植之器官來源，以解決人類器官極端短缺之現象。

於中華民國九十四年十月三十一日至九十五年十月二十九日，前往美國匹茲堡大學 Thomas E. Starzl 移植中心 (Thomas E. Starzl Transplantation Institute、University of Pittsburgh Medical Center) 進修，學習移植耐受性之誘導之最新發展與研究方法，及學習異種器官移植之最新發展與研究方法。美國匹茲堡大學 Thomas E. Starzl 移植中心 (Thomas E. Starzl Transplantation Institute、University of Pittsburgh Medical Center)，為世界最先進之器官移植中心，台灣許多移植醫學前輩與新生代醫師，均前往進修。Thomas E. Starzl 移植中心最近三年又合併異種移植生技公司 PPL USA，成立 Revivicor 生技公司，發展 Gal Knockout with TFPI Transgenic Pigs，並且邀請 David K. C. Cooper, M.D., Ph.D., F.R.C.S.

(Xenotransplantation 雜誌主編) 前來協助，已經成世界異種移植之研究重鎮，對於移植耐受性之研究及異種移植之研究，均居世界領導地位。

進修期間，學習 In Vitro 實驗技術、運用學習的實驗技術進行 in vitro 實驗，及學習 Large Animal 實驗技術、運用學習的 Large Animal 實驗技術進行 Induction of Tolerance of by Spleen Transplantation 實驗、運用學習的 Large Animal 實驗技術進行同時脾臟、腎臟移植(SLA full-dismatch)以誘發移植耐受性。參與及完成下列論文：

- (1) **Tai HC**, M Ezzelarab, H Hara, D Ayares², DK Cooper. Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. **Transplant International** 2007 Feb;20(2):107-17. (Review)。
- (2) **Tai HC**, Campanile N, Ezzelarab M, Cooper DK, Phelps C. Measurement of anti-CD154 monoclonal antibody in primate sera by competitive inhibition ELISA. **Xenotransplantation**. 2006 Nov;13(6):566-70. (Brief Communication)。
- (3) **Tai HC**, Zhu X, H Hara, Lin Y-J, Ezzelarab M, Long C, Ball S, Ayares D, Cooper DKC. The pig-to-primate immune responses: relevance for xenotransplantation. (submitted)。
- (4) Hara H, Lin Y-J, Zhu X, **Tai HC**, Ezzelarab M, Balamarugan AN, Bottino R, Cooper DKC. Successful induction of diabetes by zanosar streptozotocin in pigs.

(submitted) ◦

(5) Rood PPM, **Tai HC**, Hara H, Long C, Ezzelarab M, Lin Y-J, Busch J, Ball S, Ayares D, Wolf R, Manji R, Bailey L, Cooper DK. Development of anti-pig (anti-Gal and anti-nongal) antibodies in infant baboons and human: implications for xenotransplantation. (submitted) ◦

(6) Lin Y-J, Hara H, **Tai HC**, Long C, Yeh P, Cooper DK. Regulatory T Cells in relation of the human anti-porcine mixed lymphocyte reaction: implications for xenotransplantation. (submitted) ◦

(7) **Tai HC**, Hara H, Zhu X, Lin Y-J, Ezzelarab M, Long C, Cooper DK. Depletion of passenger leukocytes in pigs by irradiation. (撰寫中) ◦

目次

1、	進修之目的	P5
2、	研究問題之重要性	P5
3、	進修過程	P6
4、	進修心得：異種移植的進展 - GT 基因剔除豬產製成功後之研究	P22
5、	進修成果：進修完成之 SCI 論文	P34
6、	建議事項：進行國內異種移植耐受性實驗	P35

本文

一、進修之目的

- 1、學習移植耐受性之誘導之最新發展與研究方法
- 2、學習異種器官移植之最新發展與研究方法

二、研究問題之重要性

- 1、我國腎、肝、胰、心、肺移植及心肺同步移植，在亞洲器官移植領先其他亞洲國家。目前接受移植的病患可能遭受急性排斥、與慢性排斥等反應，而必須終生服用抗排斥藥物。
- 2、移植耐受性之誘導 (Induction of Transplantation Tolerance)，可以減緩急性排斥、與慢性排斥，進而減少服用抗排斥藥物。
- 3、此外，器官捐贈尚未蔚成風氣，不少末期器官衰竭病人，在等待合適器官當中死亡，所以器官短缺之情況非常嚴重。全球科學家在過去幾十年來，都在探討如何使用動物之器官，作為人類異種移植之器官來源，以解決人類器官極端短缺之現象。
- 4、最近科學家以人類壞死加速因子(hDAF)基因進行基因轉殖豬之產製，並由該基因轉殖豬器官移植給狒狒之前臨床實驗，證實異種心臟移植者可克服超急性排斥反應。2002 年底，有二家生技公司產製出 Gal 基因剔除複製豬 (cloned Gal-transferase knockout pig)，也為克服超急性排斥，提供一個方向。在跨越超急性排斥及急性排斥障礙之後，異種移植臨床應用之日子，也越來越近。
- 5、大面積燒傷病人身上，由於殘餘可用皮膚不夠，許多科學家一直在尋找皮膚替代品，以治療大面積燒傷傷口。如果在移植耐受性之誘導下，人類異體移植可以延長存活時間，這將是燒傷治療的一大突破。此外，基因轉殖豬皮的移植，如果可以取代人類異體皮膚，這將是燒傷治療的另一大突破，可以造福大批重度燒傷患者。
- 6、美國匹茲堡大學 Thomas E. Starzl 移植中心 (Thomas E. Starzl Transplantation Institute、University of Pittsburgh Medical Center)，為世界最先進之器官移植中心，台灣許多移植醫學前輩與新生代醫師，均前往進修。Thomas E. Starzl 移植中心最近三年又合併異種移植生技公司 PPL USA，成立 Revivicor 生技公司，發展 Gal Knockout with TFPI Transgenic Pigs，並且邀請 David K. C. Cooper, M.D., Ph.D., F.R.C.S.

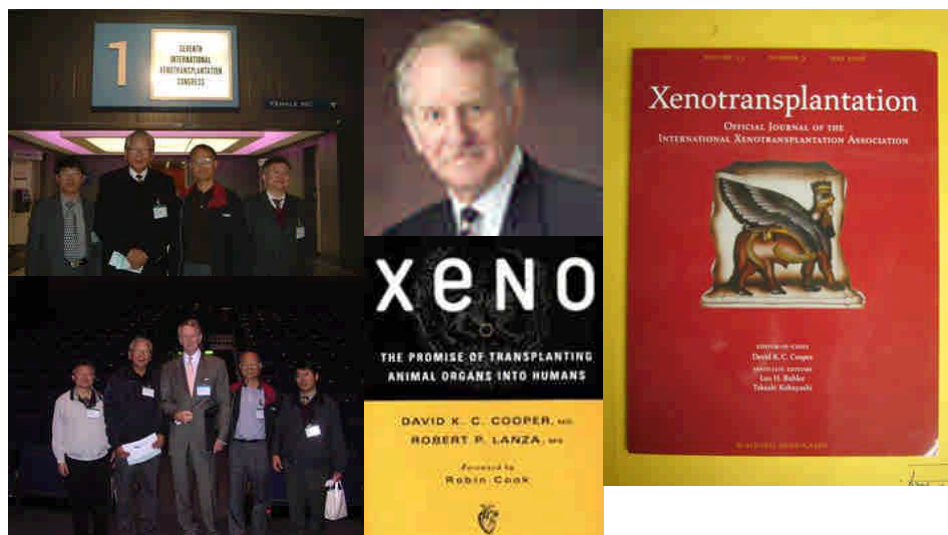
(Xenotransplantation 雜誌主編) 前來協助，已經成世界異種移植之研究重鎮，對於移植耐受性之研究及異種移植之研究，均居世界領導地位。

三、進修過程

Thomas Starzl Transplantation Institute 進修環境

- **Xenotransplantation 實驗室主持人 David K. C. Cooper, M.D., Ph.D., F.R.C.S.**：為 Xenotransplantation 雜誌主編，他是李俊仁教授的好友。李俊仁教授晚年一直致力於異種器官移植的研究。在幾次國際醫學會上（例如 World Congress of International Xenotransplantation Association），國內學者與 David K. C. Cooper 多所接觸。在李俊仁教授安排下，前往 Thomas Starzl Transplantation Institute 之 Xenotransplantation 實驗室進修。

Chun-Jean Lee / David KC Cooper / Xenotransplantation

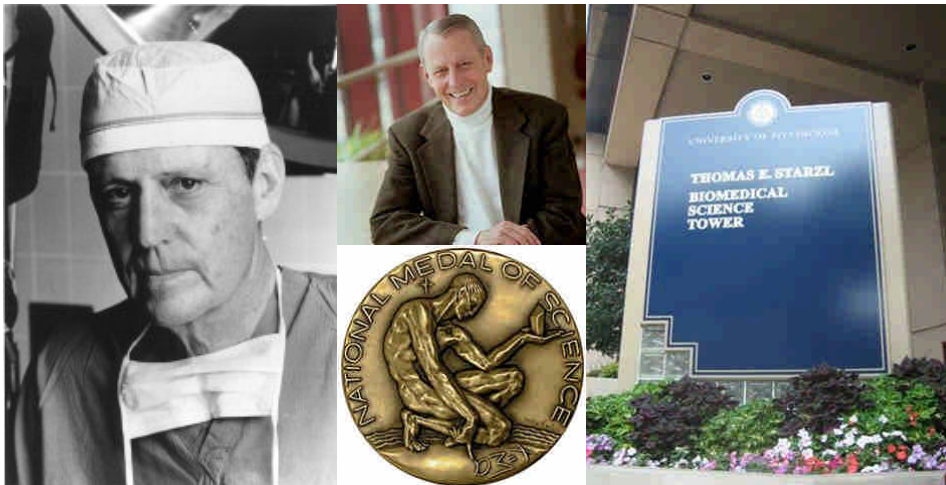


- **Xenotransplantation 實驗室 位於 Starzl Transplantation Institute (STI) of University of Pittsburgh Medical Center (UPMC) 內**：美國匹茲堡大學 Thomas E. Starzl 移植中心 (Thomas E. Starzl Transplantation Institute、University of Pittsburgh Medical Center)，為世界最先進之器官移植中心，台

灣許多移植醫學前輩與新生代醫師，均前往進修。台大醫院曾經前往 University of Pittsburgh Medical Center (UPMC) 進修的醫師有陳明庭教授，曾經前往 Starzl Transplantation Institute (STI) 進修的醫師有李伯皇教授、賴鴻緒教授、胡瑞恆副教授、何明志醫師、吳耀銘醫師、陳雲醫師。Thomas E. Starzl 是世界肝臟移植先驅，於 2005 年獲得 President's National Medal of Science 殊榮。



Thomas E. Starzl Transplantation Institute



Transplant Pioneer Thomas Starzl To Receive President's National Medal Of Science, 2005

- **Xenotransplantation 實驗室及 Starzl Transplantation Institute (STI)皆在 Thomas E. Starzl Biomedical Science Tower 研究大樓內：**內有大動物開刀房、Cell Transplantation 實驗室等。Thomas E. Starzl 移植中心合併異種移植生技公司 PPL USA 所成立之 Revivicor 生技公司（發展 Gal Knockout with TFPI Transgenic Pigs），在 Pittsburgh Technology Center 設有實驗室，從事異種移植研究。

Starzl Biomedical Science Tower / Revivacor (Blacksburg, VA)
Animal OR / Cell Transplant Lab



- **Xenotransplantation 實驗室同事**：有日本、埃及 post-doctoral fellow、瑞士 resident、荷蘭 medical student 及美國 UP student、 technician，及台灣成大醫院一般外科主治醫師林毅志醫師。

David Cooper Xenotransplantation Group
Starzl Transplantation Institute



在 STI 學習的 In Vitro 實驗技術

- 分離、儲存、與解凍周邊血液單核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell ; PBMC) 技術：

Isolation & Storage of PBMC

- Load cell on Ficoll
- Spin out PBMC
- Wash out Ficoll
- Add 10%DMSO + 20%FBS
- Store in liquid nitrogen

Thaw of PBMC

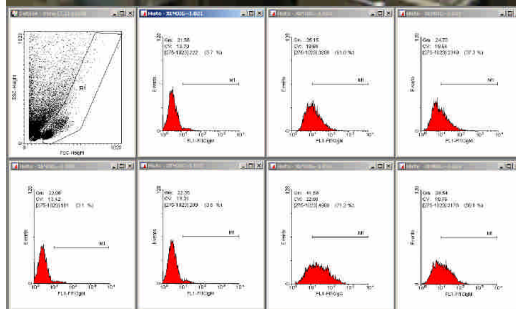
- Warm up at 37°C
- Wash out DMSO



- 以流式細胞分析儀測量 IgG & IgM 結合至 PBMC 的比率：

Binding of Pig IgG & IgM to Human PBMC - FACS

- Inactivate pig sera
- Prepare human PBMC
- Load serum
- Load goat serum
- Add goat anti-pig IgG / IgM-FITC Ab
- Run FACS : + PI



■ 使用 Chromium-51 進行 Complement-dependent Cytotoxicity (CDC)實驗：

Cytotoxicity Assay Using ^{51}Cr

- Inactivate pig sera
- Prepare human PBMC
- Label human PBMC with ^{51}Cr
- Load human PBMC, then pig serum
- Load rabbit Complement
- Harvest supernatant
- Read ^{51}Cr by Gamma Counter



■ H^3 -thymidine 混合淋巴球培養反應(MLR)：

One-Way Mixed Lymphocyte Responses (MLR)

- Thaw of stimulator PBMC
- Prepare responder PBMC
- Inactivate stimulator PBMC
- Mixed lymphocytes culture
- Day 4 : Add ^3H -Thymidine
- Day 5 : Read ^3H by Beta Counter



運用 STI 學習的實驗技術進行 in vitro 實驗

THE IMMUNE RESPONSES OF PIGS TO PRIMATES : RELEVANCE TO XENOTRANSPLANTATION

H-C Tai¹, X Zhu¹, H Hara¹, Y-J Lin¹, M Ezzelarab¹,
C Long¹, S Ball², D Ayares², DKC Cooper¹

1. *Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA,*
2. *Revivicor, Inc., Blacksburg, VA, USA*



目的：

- (1)、檢驗 pig serum IgM & IgG 是否會和 human PBMC 結合，進而造成 human PBMC 死亡。
- (2)、檢驗 Pig PBMC 是否會促使 human PBMC 增生。

Materials

Serum and PBMC from

1. Out bred wild-type pigs (Wally Whippo is a normal farm; WW-WT)
2. Revivicor wild-type pigs (RevWT)
3. Revivicor GT-KO pigs (RevGT-KO)

RevGT-KO pigs

- Derived by nuclear transfer from RevWT
- Different primarily in the absence of Gal epitopes

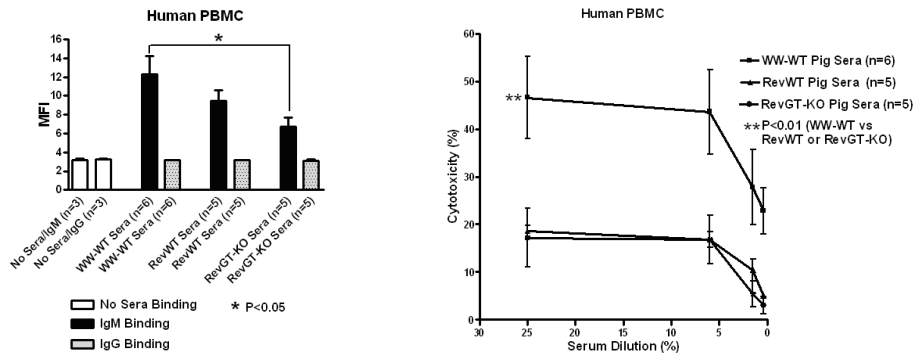


Nat Biotech (2002) 20:252-255

實驗結果：

- pig IgM 會和 human PBMC 結合，進而造成 human PBMC 死亡。
- 和 WT pig IgM 比較，GT-KO pig IgM 造成比較少 human PBMC 死亡。
- 但是 pig IgG 不會和 human PBMC 結合，也不會造成 human PBMC 死亡。

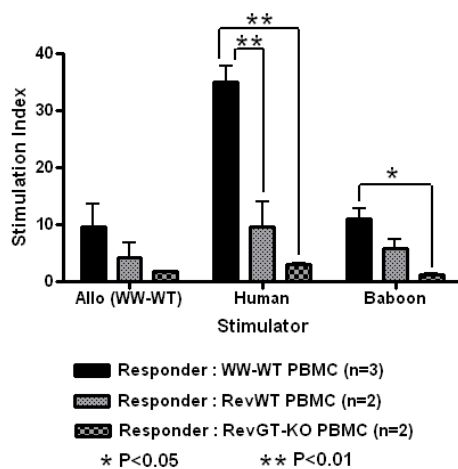
Binding of Pig IgM/G and Cytotoxicity to Human PBMC



- Anti-human IgM antibodies in the sera of all pigs, and associated with complement-dependent lysis of human PBMC

- Pig PBMC 會促使 human PBMC 增生。
- 和 WT pig PBMC 比較，GT-KO pig PBMC 造成比較少 human PBMC 增生。

MLR of Pig PBMC against Human and Baboon PBMC

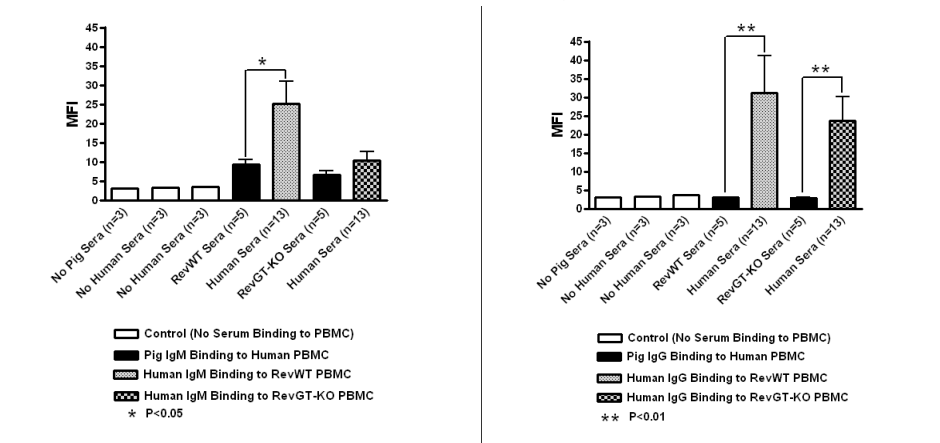


- WW-WT pig PBMC showed a significantly greater response against human or baboon stimulator PBMC.
- The response of RevGT-KO pig PBMC against human or baboon stimulator PBMC was low.

比較 pig serum 和 human serum 的作用：

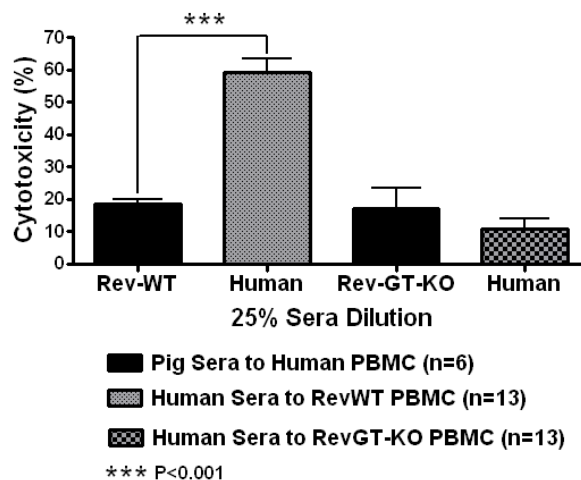
- human IgM & IgG 都會和 pig PBMC 結合。
- human IgM & IgG 和 WT pig PBMC 的結合，比和 GT-KO pig PBMC 的結合強烈。
- human IgM 和 pig PBMC 的結合，比 pig IgM 會和 human PBMC 的結合強烈。

Comparison of IgM / IgG Binding to PBMC
RevWT, RevGT-KO Pig vs Human



- High level of human IgM and IgG binding to RevWT PBMC : related to the anti-Gal antibodies in human serum
- No difference in IgM binding between GT-KO pig and human serum
- human serum 造成 WT pig PBMC 的死亡，比造成 GT-KO pig PBMC 的死亡，強烈多了。

Comparison of Serum Cytotoxicity to PBMC
RevWT, RevGT-KO pig vs Human



- No difference in cytotoxicity between GT-KO pig and human serum

在 STI 學習的 Large Animal 實驗技術

- 建立豬腎臟移植(Life-supporting)實驗模式

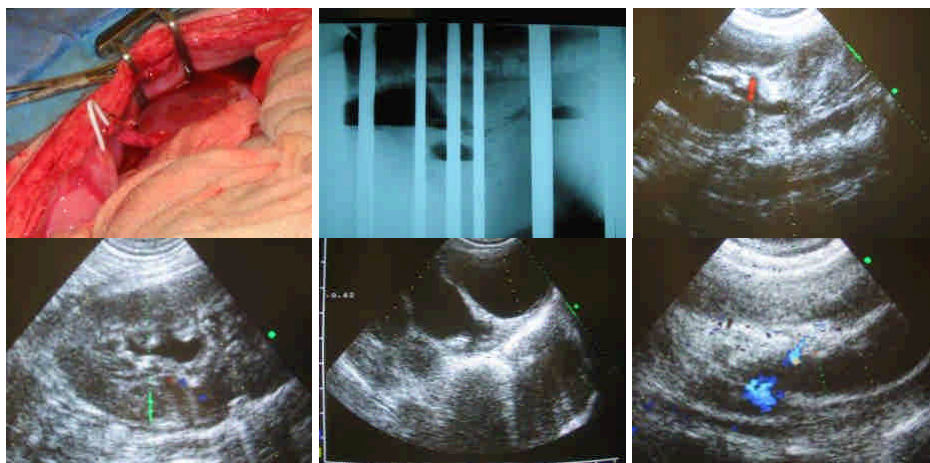
Life-Supporting Kidney Transplantation / Animal Care



Life-Supporting Kidney Transplantation
• Orthotopic Kidney Transplantation, Right
• Ligation of ureter, Left

- 以超音波儀器觀察移植器官(腎臟)的血流

Pig kidney Transplantation
Recipient : Female, FK506 for 6 weeks
Donor : Male, Sibling, Non-irradiated



POD +1

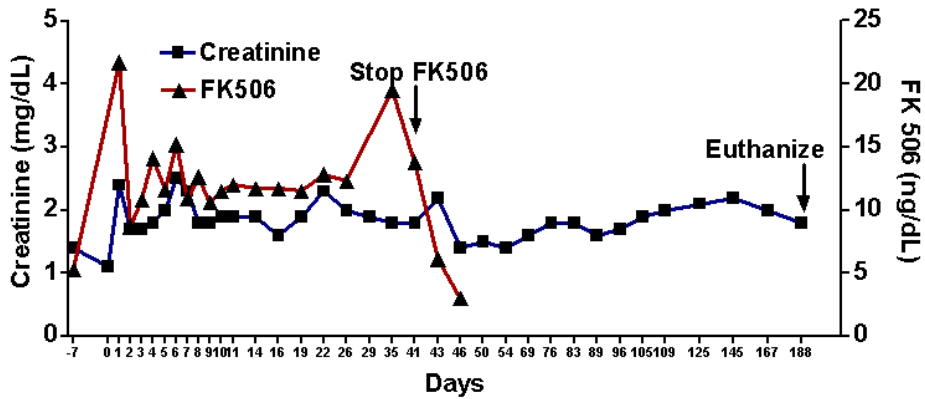
POD +6
POD +28 left hydronephrosis

POD +41 & +49

- 測量器官接受者血液 Creatinine 濃度：觀察移植腎臟的存活時間

Pig kidney Transplantation
 Recipient : Female, FK506 for 6 weeks
 Donor : Male, Sibling, Non-irradiated

Serum Cr & FK506 of Pig Receiving Kidney Transplantation
 (Donor Kidney Non-irradiated / FK 506 6 Weeks)



- 測量 mixed chimerism 的比率：
 - (1)、器官捐贈者為 male，器官接受者為 female。
 - (2)、萃取器官接受者周邊血液血球之 DNA。
 - (3)、再以 Real-Time PCR 測量 DNA 中 Y chromosome 的比率

DNA Purification by QIAGEN Kit

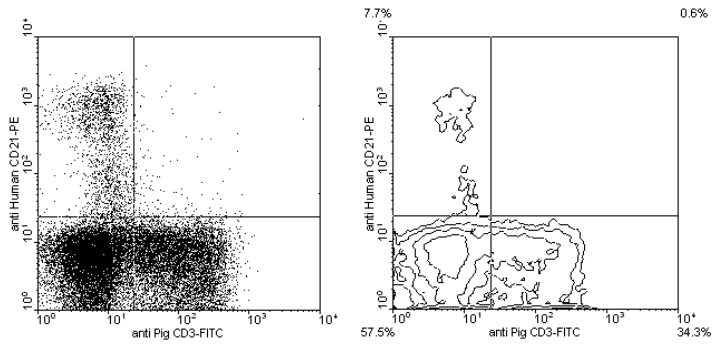
- Add QIAGEN Protease
- Add sample
- Add AL (Lysis) buffer
- Add ethanol
- Add AW1 (Washing) buffer
- Add AW2 (Washing) buffer
- Add AE (Elution) buffer
- Store in -20°C



■ 以流式細胞分析儀測量器官接受者周邊血液淋巴球的比率

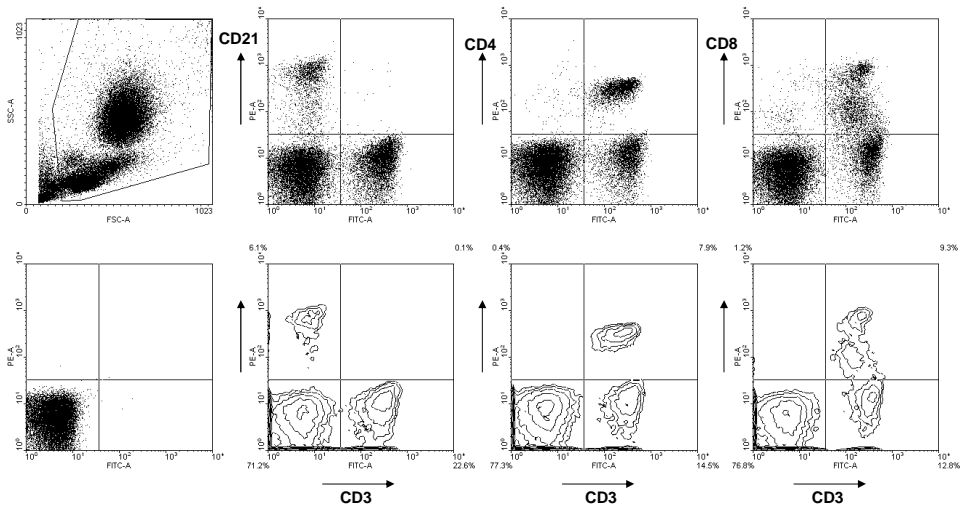
T/B & CD4/CD8 Cell Count by Flow Cytometry

- Whole blood
- Lyse RBC
- Add anti-CD3-FITC Ab, anti-CD21/CD4/CD8-PE Ab
- Run FACS : + PI



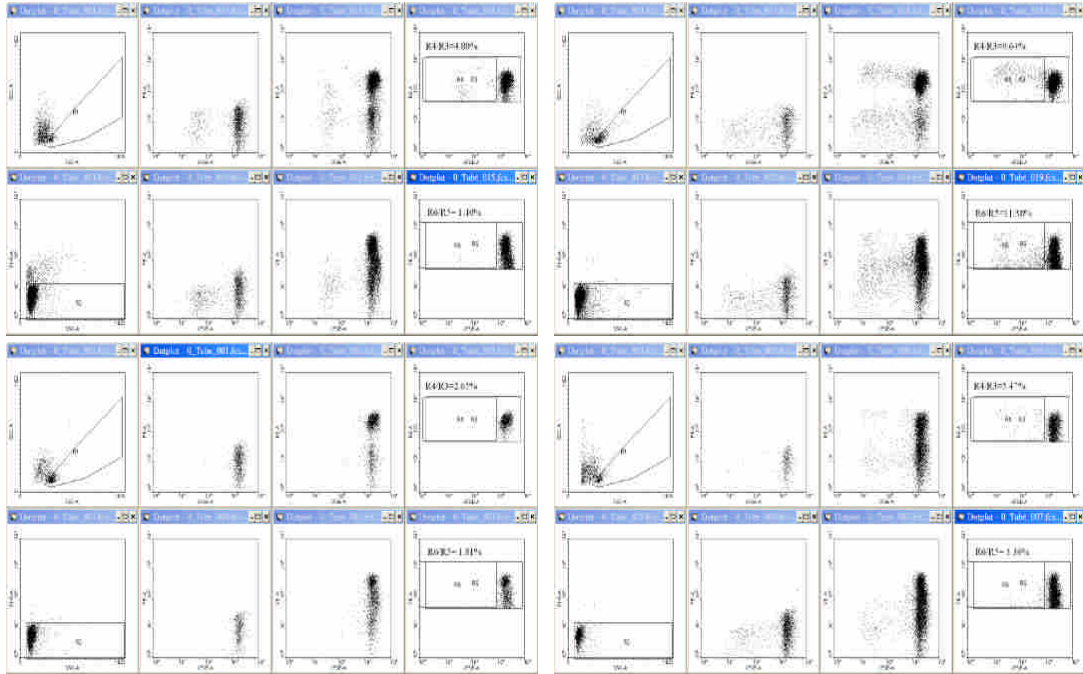
■ 以流式細胞分析儀測量器官接受者周邊血液淋巴球(CD4&CD8)的比率

T / B & CD4 / CD8 Cell Count by Flow Cytometry



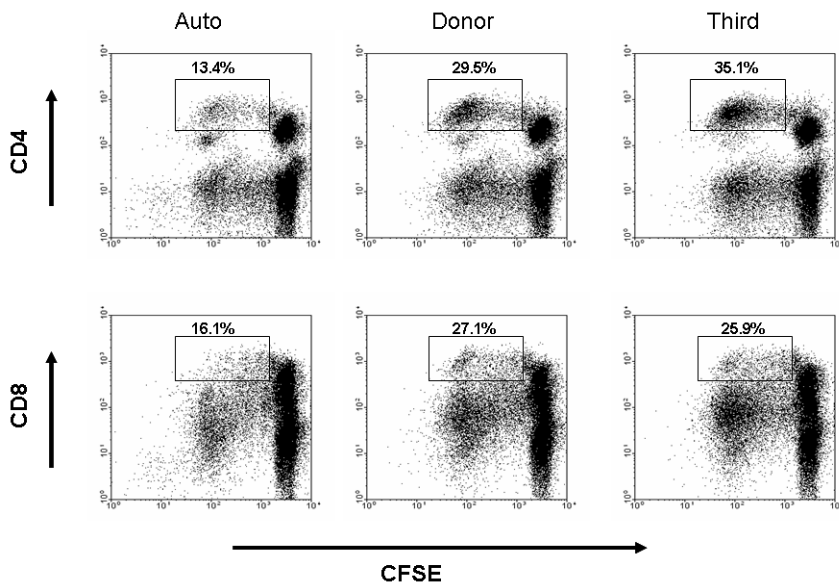
- **CFSE 混合淋巴球培養反應(MLR)：測量豬腎臟移植中器官接受者 (responder)淋巴球(CD4&CD8)增生的比率**

Allo:D CFSE MLR to Check CD4 & CD8 Proliferation / Responder : P5906 Allo:T
 Spont Allo : Donor P6006 / Allo : Third Rev P8206 Auto
 Spontaneous : MLR Medium / Auto : P5906



- **CFSE 混合淋巴球培養反應(MLR)：測量豬脾臟、腎臟移植中器官接受者 (responder)淋巴球(CD4&CD8)增生的比率**

CFSE MLR of 5.5 Days culture (Pre Tx)
 Orthotopic Spleen / Kidney Transplantation



運用在 STI 學習的 Large Animal 實驗技術進行 Induction of Tolerance of by Spleen Transplantation 實驗

David KC Cooper 脾臟移植以誘發移植耐受性之經驗

XENOTRANSPLANTATION

Immunological Unresponsiveness in Chimeric Miniature Swine following MHC-Mismatched Spleen Transplantation

Frank J. M. F. Dor,^{1,2} Yau-Lih Tseng,¹ Kenji Kuwaki,¹ Bernd Gollaciner,¹ Mario L. Ramirez,¹ Derek D. Prabhanasuh,¹ Robert A. Cina,¹ Christoph Knosalla,¹ Matthew G. Nuhn,¹ Stuart L. Houser,³ Christene A. Huang,¹ Dicken S. C. Ko,⁴ and David K. C. Cooper^{1,5}

(*Transplantation* 2005;80: 1791–1804)

- The spleen is an organ with considerable hematopoietic progenitor cell (HPC) activity.
- Successful spleen transplantation in rodents can result in specific tolerance towards donor-matched organ allografts.
- The presence of HPC chimerism alone in a full MHC-mismatched donor-recipient combination may not always be sufficient to induce tolerance to a subsequent donor-matched kidney allograft.

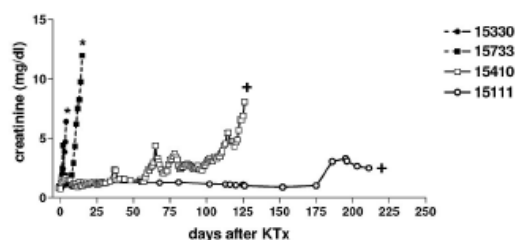
David KC Cooper 脾臟移植以誘發移植耐受性之經驗

TABLE 1. Immunosuppressive therapy and clinical course in pigs

Pig	Immunosuppression					Spleen graft survival (days)	T-cell depletion (%)	Chimerism blood (days)	In vitro DSH	Complication (day of euthanasia)
	WBI	TI	CYA (days)	Other	GVHD					
Group A										
14534	-	-	0	-	+ ^a	8	ND	5	No	NA
14646	-	+	0	CPP	+ ^a	16	ND	10	No	NA
14832	-	+	12	-	-	47	ND	32	ND	NA
14840	-	-	28	-	+ ^a	62	ND	48	ND	NA
15311 ^b	+	+	45	-	-	61	64.5	49	No	NA
15733 ^c	+	+	45	-	-	3	78.3	50	No	NA
Group B										
15111 ^d	-	+	12	-	-	>363	ND	79	Yes	NA
15051	+	+	45	-	-	>59	82.4	>59	Yes	PCV-2 (59)
15242	+	+	45	-	-	>57	71.4	>57	Yes	PCV-2 (57)
15410	+	+	45	-	-	>183	77.7	178	Yes	NA
15842	+	+	45	-	-	>100	73.9	>100	Yes	NA
Group C										
15312	+	+	45	-	-	NA	72.5	4	No	NA
15330	+	+	45	-	-	NA	76.1	11	No	NA

- In 2 pigs tolerant to the spleen graft, donor MHC-matched kidney grafts survived for 4 and 7 months without immunosuppression
- In 2 asplenic pigs, kidney grafts were rejected on days 4 and 15

(DSH : Donor Specific Hyporesponse)

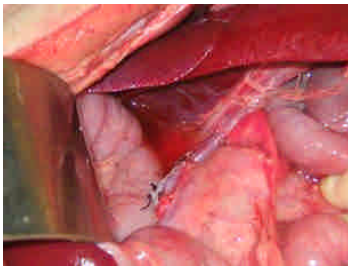


目的：進行同時脾臟、腎臟移植以誘發移植耐受性

(We have not yet performed simultaneous Tx of the spleen and kidney, but we hypothesize that tolerance to the kidney graft would be easier to achieve than when kidney Tx is delayed.)

- 建立豬脾臟移植實驗模式

Orthotopic Spleen Tx in SLA-Mismatched Pig

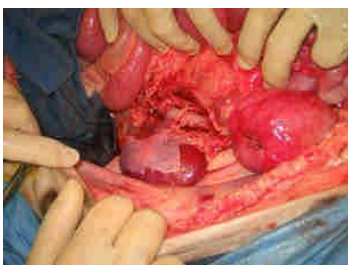
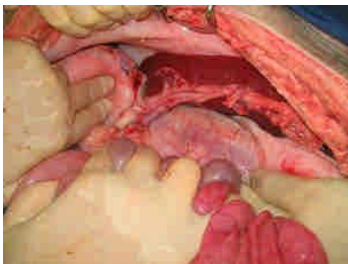


OP 3/23/06 POD +7

POD +40 & +95

- 進行同時脾臟、腎臟移植實驗

Orthotopic Spleen / Kidney Tx in SLA-Mismatched Pig



OP 7/12/06

POD +40 & +54

Mixed chimerism 實驗設計：

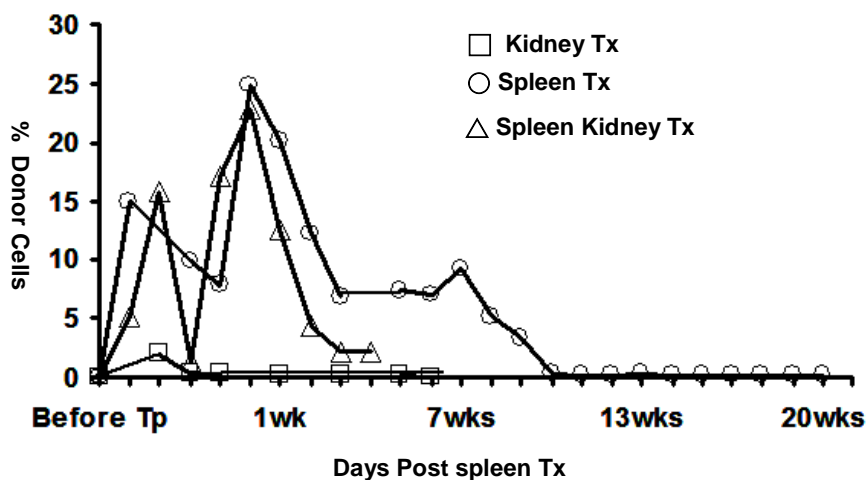
- (1)、進行脾臟、腎臟移植。
- (2)、器官捐贈者為 **male**，器官接受者為 **female**。
- (3)、萃取器官接受者周邊血液血球之 DNA。
- (4)、再以 **Real-Time PCR** 測量 DNA 中 **Y chromosome** 的比率

Chimerism in Blood after Orthotopic Spleen / Kidney Transplantation

<u>Tx</u>	<u>Type of pig</u>	<u>irradiation</u>	<u>Immunosuppression Tx</u>	<u>Blood transfusion</u>
Kidney	W.W brother	none	FK506 6wks	(+)
Spleen	Sinclair Full mismatch	120cGy WBI 700cGy TI	FK506 6wks	(+)
Spleen + Kidney	Sinclair Full mismatch	100cGy WBI 700cGy TI	FK506 6wks	(+)

- (1)、接受脾臟移植者，可以達到 **mixed macrohimerism**。
- (2)、只有接受腎臟移植者，無法達到 **mixed himerism**。

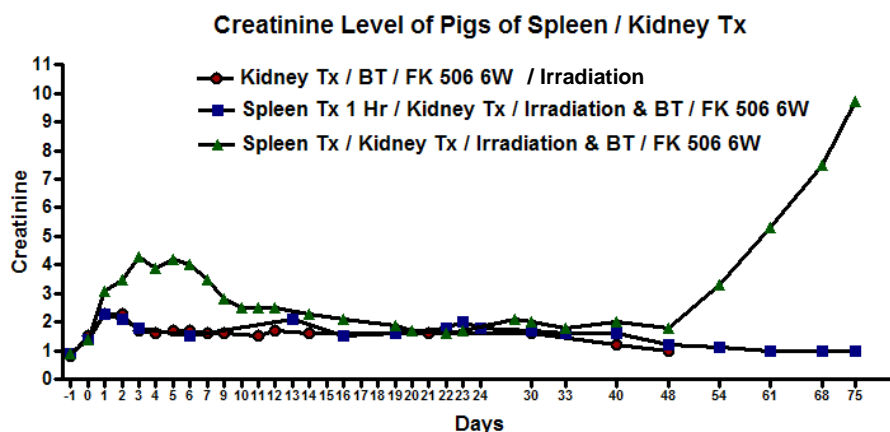
Chimerism in Blood after Orthotopic Spleen / Kidney Transplantation



同時脾臟、腎臟移植(SLA full-dismatch)以誘發移植耐受性

實驗結果：

Creatinine of Pigs of Spleen / Kidney Tx (SLA Full-Mismatch)



- Tolerance to the transplanted spleen was clearly achieved.
- It is not clear why chimerism should be slowly lost while the spleen graft remains viable.
- We cannot completely rule out that the perioperative donor-specific red blood cell transfusion participated in tolerance induction.
- Prolonged survival of the spleen graft were unable to conclusively demonstrate tolerance to the kidney.

進修心得

異種移植的進展 - GT 基因剔除豬產製成功後之研究

異種器官移植 (xenotransplantation)，是將一種生物的器官移植至另一種生物身上的過程。從二十世紀初期起，就有醫師嘗試將動物的器官移植至人類，但動物器官都沒有長久存活。1964 年，美國醫師 Reemtsma 報告了黑猩猩腎臟移植至人類的經驗；同年，美國醫師 Starzl 報告了狒狒 (baboon) 腎臟移植至人類經驗。1992 年至 1993 年，Starzl 醫師再進行了兩例狒狒肝臟移植至人類的手術，此兩例肝臟各自存活了 70 天及 26 天^{1,2}。

異種移植後，最先見到的排斥反應是超急性排斥 (hyperacute rejection)，超急性排斥是造成異種移植器官衰竭的主因。超急性排斥是非常快速的排斥過程，是接受者體內的自然抗體 (preformed natural antibody) 和補體 (complement)，共同沈著在異種器官的血管內皮上所致。自然抗體，和異種器官的血管內皮細胞上的抗原結合後，會活化補體系統，進而活化異種器官的血管內皮細胞，引發一連串複雜的排斥反應。在異種器官移植中，若器官接受者經過事先處置，使得超急性排斥不發生，則另一類型排斥會在數日，甚至數週後才發生，這種排斥稱為延遲性異種器官排斥 (delayed xenograft rejection; DXR)，或稱急性體液性異種器官排斥 (acute humoral xenograft rejection; AHXR)，或稱急性血管性排斥 (acute vascular rejection)。超急性排斥中，血管內皮細胞並沒有足夠時間產生新的抗體，但在延遲性異種器官排斥中，血管內皮細胞則有新的抗體產生。

豬在解剖構造及生理功能與人類極為近似，數量多，又無猿猴保育之問題，可為人類異種器官最佳的來源。不過，豬器官移植至靈長類的異種移植中，豬器官的存活率仍然受限於上述兩項排斥反應，一是移植後二十四小時內產生的超急性排斥，另一是移植後數日至數週產生的延遲性排斥，這二項排斥反應的來源，主要是來自於對抗 Gal α 1,3Gal (Gal) 抗原的抗體。而 anti-Gal 抗體的形成，一部份是在豬器官移植前就存在靈長類體內的自然抗體 (preformed natural antibody)，一部分是在豬器官移植後所誘發出來的抗體 (elicited antibody)^{3,4,5,6}。

靈長類體內的 anti-Gal 自然抗體和豬血管內皮細胞 Gal 抗原結合後，會活化靈長類補體系統 (Complement cascade)，進而造成豬器官內小血管血栓 (Thrombosis) 的形成，也造成豬血管內皮細胞的分離，與豬組織間隙出血與水腫，最後造成豬細胞的損害^{7,8,9}。

hDAF 基因轉殖豬的異種移植進展

有幾項方法可以避免超急性排斥的產生，例如體外吸收抗體 (extracorporeal antibody immunoadsorption) 的方法來除去 anti-Gal 自然抗體^{10,11}，或是將抑制人

類補體活化的蛋白轉殖至豬血管內皮細胞上¹²。

科學家產製了帶有人類基因的基因轉殖豬，這些基因轉殖豬可以在血管內皮細胞膜表現出上補體抑制劑，例如人類衰變加速因子（human decay accelerating factor；hDAF）；hDAF 可抑制人類補體 C3 的活化，因而抑制人類補體系統的活化，以致可以減緩超急性排斥。由 hDAF 基因轉殖豬器官移植至狒狒之前臨床實驗，證實異種心臟移植者可維持 30 天以上、異種腎臟移植者可超過 78 天，移植之器官可克服超急性排斥反應。理想上，基因轉殖豬的血管內皮細胞上表現愈多 hDAF，則豬器官用於人類做器官移植的希望愈大。

豬器官移植至靈長類的超急性排斥被克服之後，原先存在的 anti-Gal 抗體，或是 innate 免疫細胞，或是 T 細胞依賴性誘發抗體（elicited anti-pig antibody）都可能引發急性體液性異種器官排斥（AHXR），造成豬器官衰竭^{13,14}。抑制 T 細胞辨認 Costimulatory 路徑的免疫抑制劑，可以防止 T 細胞依賴性誘發抗體產生的排斥反應。在豬血液先驅細胞（hematopoietic progenitor cell；HPC）移植至狒狒的實驗中，併用 anti-CD154 單株抗體，mycophenolate mofetil 及 corticosteroids，顯示 anti-CD154 可有效抑制急性體液性異種器官排斥（AHXR）的產生^{15,16}。在豬器官轉殖至靈長類實驗中，anti-CD154 都有相似效果^{17,18}。

在使用有效的免疫抑制劑（例如 anti-CD154）來防止誘發抗體的產生時，hDAF 基因轉殖豬的器官存活時間可以相對延長許多，但 hDAF 豬器官最後仍因體液性排斥而衰竭，其中 innate 免疫細胞可能也有參與作用。若注射合成的 Gal 抗體，來吸收或去除受贈者體內的 anti-Gal 抗體，也可以延長豬器官存活時間，然而此項抗排斥方法在臨床上的可行性很小^{19,20,21}。

GT 基因剔除豬的異種移植進展

2003 年後，galactosyltransferase（GT）基因剔除豬產製成功，使得豬器官移植至非人類靈長類，可以獲得較長存活，並且受贈者接受較少的抗排斥免疫治療^{22,23,24}。此 GT 基因剔除豬的產製，需要有核轉移（nuclear transfer）/胚胎轉移（embryo transfer）的動物複製技術^{25,26,27,28}，首先是在細胞階段將豬的 $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase 基因剔除，此豬細胞則不會產生 Gal 抗原，之後利用核轉移/胚胎轉移的動物複製技術，將 GT 基因剔除豬細胞轉產製成 GT 基因剔除豬，如此這頭 GT 基因剔除豬則不會表現出 Gal 抗原。

GT 基因剔除豬產製成功後，克服了 Gal 抗原所產生排斥問題，使得豬心臟移植至狒狒的存活率可提高至兩個月至六個月^{22,23}，以及豬腎臟移植至狒狒的存活率提高至 83 天²⁴。

雖然 GT 基因剔除技術的進步，使得 anti-Gal 抗體的障礙獲得解決，但是豬器官在非人類靈長類存活的時間，仍然沒有長足的進步，表示其中仍有未知的排斥存在，必須再加以深入研究探討。GT 基因剔除豬器官最後仍被排斥掉，其排斥的原因並不是典型的體液性排斥，而是源於血栓性微血管病變（Thrombotic

microangiopathy；TM)²⁹。如果沒有使用免疫抑制劑（例如 anti-CD154）來防止誘發性抗體的產生，則 GT 基因剔除豬器官因受贈者產生對抗 non-Gal 抗原的抗體，而在移植後 16 天內被急性體液性異種器官排斥（AHXR）所排斥掉¹⁴。

在 GT 基因剔除豬的器官移植實驗結果發表後，目前異種移植的研究重點有三項：（1）受贈者體內 anti-non-Gal 抗體的毒性有多高，以及如何防止此毒性。（2）上述 anti-non-Gal 抗體是否是對抗醣類抗原（carbohydrate antigen），如果答案是正面的話，則此醣類抗原的結構為何？（3）是否有其他造成血栓性微血管病變（TM）的原因存在呢？

爲了檢測靈長類體內 anti-Gal 抗體的作用，可將未活化的靈長類的血清，和 GT 基因剔除豬的周邊血液單核球（peripheral blood mononuclear cell；PBMC）相互作用，以流式細胞分析儀（flow cytometry）檢測靈長類的 IgM 及 IgG 抗體結合至 GT 基因剔除豬周邊血液單核球的比率；及使用放射性鉻（chromium-51）標示 GT 基因剔除豬周邊血液單核球，並加入靈長類的血清與兔子補體，再讀取放射性鉻釋放程度，以檢測靈長類血清對 GT 基因剔除豬周邊血液單核球的補體依賴性細胞毒殺作用（complement-dependent cytotoxicity；CDCC）。檢測結果，約有 50% 靈長類體內的 IgM 及 IgG 會結合至 GT 基因剔除豬的周邊血液單核球，同樣約有 50% 靈長類的血清會毒殺 GT 基因剔除豬的周邊血液單核球。如果使用一般野生型（wild type）豬的周邊血液單核球爲作用對象，則靈長類血清中 IgM 和 IgG 的結合比率和血清毒殺作用都可達 100%^{30,31,32}。

由於一般野生型豬的周邊血液單核球帶有 Gal 抗原，故靈長類血清中會結合至野生型豬周邊血液單核球並造成毒殺作用的抗體，主要是 anti-Gal 抗體。但 GT 基因剔除豬的周邊血液單核球並沒有帶 Gal 抗原，故靈長類血清中會結合至 GT 基因剔除豬周邊血液單核球並造成毒殺作用的抗體，應該是 anti-non-Gal 抗體。在豬器官移植至靈長類的實驗中，anti-non-Gal 抗體作用的目標是豬的血管內皮細胞，而不是周邊血液單核球。豬血管內皮細胞與周邊血液單核球在生物學上有所差異，在一項初步實驗中，靈長類血清對豬的血管內皮細胞的 IgM 和 IgG 結合比率和毒殺作用，都比對豬的周邊血液單核球低（Hara H 未發表的數據）。

如果以野生型豬的細胞爲目標，且將靈長類血清中的 anti-Gal 抗體去除掉，估計靈長類血清中 anti-non-Gal IgM 抗體約佔 10% 至 30%，而 anti-non-Gal IgG 抗體約佔 20% 至 50%³³。而在 GT 基因剔除豬的細胞上，由於沒有 Gal 抗原，其 non-Gal 抗原的表現可能會比較多，因此靈長類血清對 GT 基因剔除豬細胞作用中，anti-non-Gal 的抗體可能會比較多。

有人擔心在某些人因輸血，或懷孕，或同種異體器官移植而致敏化（allosensitization）後，其體內可能產生 anti-HLA 抗體，這些 anti-HLA 抗體可能和豬抗原產生交互反應（cross-reaction），使得這些致敏化病人將來如果接受豬器官移植時，可能產生超急性排斥。然而最近實驗數據顯示，從致敏化病人（panel reactive antibodies > 70%）取得的血清，其對 GT 基因剔除豬或野生豬型細胞的 anti-pig 抗體（IgM 或 IgG），及毒殺作用，都沒有比正常人的血清高^{31,34}。

致敏化病人由於帶有 anti-HLA 抗體，使得他們比較困難取得異體器官，而由於致敏性病人並沒較高的 anti-pig 反應，故使得他們成為將來異種移植的首選對象之一。

尋找解決 non-Gal 抗原問題的方法

雖然有實驗顯示，在 GT 基因剔除豬體內可能仍有 Gal 抗原表現，例如透過 iGb3 synthetase 的作用而產生 Gal 抗原^{35,36}。但也有實驗持不同看法，在靈長類接受豬心臟或腎臟移植後，雖然有 anti-non-Gal 抗體產生，但是並沒有產生 anti-Gal 抗體^{22,23,24}。

辨認出 non-Gal 抗原是解決 anti-non-Gal 抗體問題的重要步驟，目前有一些醣類分子被認為參與 anti-non-Gal 抗體的產生^{37,38,39}。N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) 抗原，廣泛地表現於除人類之外的哺乳類血管內皮細胞上，因而被認為會促使人類產生 anti-non-Gal (anti-NeuGc) 抗體^{40,41,42}。和 anti-Gal 抗體比較，由 anti-non-Gal 抗體所產生的血管內皮細胞活化及毒殺作用都比較低，使得單靠 hDAF 等補體系統調節蛋白的作用，即可以克服較弱的 anti-non-Gal 抗體的排斥反應。

某些 innate 免疫細胞可以直接辨認豬抗原，因而參予急性體液性異種器官排斥 (AHXR) 排斥反應^{43,44}。對於 NK 細胞或巨噬細胞引起的反應，可能可以透過競爭性基因 (例如 α 1,2-fucosyltransferase ; H transferase) 的轉殖^{45,46}，或透過 HLA 抗原基因 (例如 HLA-E 或 HLA-G) 的轉殖^{47,48,49,50}，達到抑制 AHXR 排斥反應的效果。

凝血機制失調在豬器官移植至靈長類的器官衰竭中扮演重要角色^{51,52,53,54}。豬血管內皮細胞在暴露於靈長類 anti-pig 抗體、補體、血小板、免疫細胞及細胞激素時，會失去天然的抗凝血功能，而轉變為易於凝血的狀態。豬和人類凝血系統不相容，會造成凝血機制失調，生成的血栓蛋白 (thrombin) 和纖維蛋白 (fibrin) 是強力發炎反應介子，會活化血小板及血管內皮細胞^{53,54}。

在鼠類的異種移植實驗中，帶有人類組織因子路徑抑制劑 (human tissue factor pathway inhibitor ; hTFPI) 或血蛭素 (hirudin) 轉殖基因的小鼠心臟，在移植至大鼠及短暫免疫抑制後，可以存活一百天以上，而沒有轉殖基因的小鼠心臟，在移植至大鼠後，即使有免疫抑制下，仍在移植 6 日後因急性體液性異種器官排斥 (AHXR) 而被排斥掉⁵⁵。使用纖維蛋白原相似蛋白 (fibrinogen-like protein 2 ; fgl-2) 的轉殖基因小鼠，也有相似的結果⁵⁶。使用血管內皮細胞上的主要 nucleotidase human CD 39 的轉殖基因小鼠，也有相似結果⁵⁷。

抑制凝血機制中特定物質，可能可以在抑制或清除免疫細胞下，直接抑制 AHXR 或 TM 的產生。如果 GT 基因剔除豬同時表現抗凝血基因 (如 hTFPI, hirudin, thrombomodulin, CD39)，則豬血管內皮細胞可以維持在抗凝血狀態，甚至抑制凝血機制的活化。因此，帶有抗凝血基因的 GT 基因剔除豬的產製，是

目前異種移植研究的重點。

豬胰島細胞的異種移植

早期及最近的研究顯示，成豬的胰島細胞表現很少或甚至沒有 Gal 抗原^{27,58,59}，因而不會引起誘發性 anti-Gal 抗體的排斥反應。因此，野生型成豬的胰島細胞移植至非人類靈長類時，在只使用 T 細胞免疫抑制劑下，可以獲得不錯成績⁶⁰。同理，使用 GT 基因剔除豬的胰島細胞移植至非人類靈長類時，並沒獲得重大進展，但也沒有產生壞的影響⁶¹。然而，也有研究顯示野生型豬胰島細胞會表現其他醣類，因而誘發受贈者產生 anti-non-Gal 自然抗體^{62,63,64}。

在非人類靈長類的胰島細胞異種移植中，經由肝門靜脈注射胰島細胞時，有一大部分胰島細胞在移植後數小時內會喪失，此現象稱為 instant blood-mediated inflammatory response (IBMIR)，其反應主要是急性凝血反應及補體系統的活化^{61,65,66}。實驗結果顯示 IBMIR 和胰島細胞在移植後表現出組織因子 (tissue factor) 有關。因此，胰島細胞如果表現出 hTFPI，可能有利於減緩 IBMIR 現象。

移植胚胎或新生豬胰島細胞會有一些好處，因為這些胰島細胞中含有的初級細胞可以增殖成胰島素分泌細胞⁶⁷。胚胎或新生豬胰島細胞會表現出較高的 Gal 抗原，因此 GT 基因剔除豬的胰島細胞相對會有好處。

異種移植中能否產生移植耐受性？

如果 innate 免疫系統及凝血機制失調的問題克服之後，T 細胞耐受性的誘發是可能達成的。在同種異體移植，對移植器官的耐受性，可以在術前或術中同時移植捐贈者的血液先驅細胞 (Hematopoietic progenitor cell; HPC) 後，被誘發而產生，這當中所產生的移植混合體 (chimerism) 可以維持數週至數個月，甚至永久存在^{68,69}。

在異種移植，移植大量的野生型豬血液先驅細胞移植至非人類靈長類後，這些血液先驅細胞幾乎在移植後數分鐘喪失掉，主要是靈長類巨噬細胞吞噬豬血液先驅細胞的結果⁷⁰。即使使用 hDAF 基因轉殖豬，或使用 GT 基因剔除豬的血液先驅細胞，仍無法防止血液先驅細胞的喪失，因而使得耐受性的誘發仍有困難。

移植細胞喪失的問題和豬肝臟異種移植也有相關。在人血灌流離體豬肝臟的實驗中，顯示豬巨噬細胞會持續吞噬人類紅血⁷¹，這個吞噬過程和抗原抗體結合無關，也和補體系統活化無關，而是和豬 Kupffer 細胞直接辨認人類紅血球有關。據估計，一個豬肝臟每 24 小時大約會移除一個單位的人類紅血球^{72,73}。豬巨噬細胞辨認及摧毀人類紅血球的機制，牽涉到醣類-lectin 反應^{74,75}；靈長類巨噬細胞辨認及清除豬紅血球的機制應該是類似的反應。

臺灣的異種移植進展

在國科會支持計畫，台灣動物科技研究所（Animal Technology Institute；ATIT）已產製 hDAF 基因轉殖豬，第二型人類白血球表面抗原（human leukocyte antigen class II；HLA-II）基因轉殖豬、及血色質氧合酵素（heme oxygenase-1；HO-1）基因轉殖豬，可以克服超級性及減緩急性體液性異種器官排斥^{76,77}。HLA-II 基因轉殖豬之產製非常困難，其成功率在 0.6 – 2 %；前臨床實驗中，豬淋巴球對人類淋巴球之混合淋巴球培養（MLC）及 Primed Lymphocyte Test（PLT）中，已經證實使用 HLA-II 基因轉殖豬淋巴球時，其刺激指數（SI）比使用非基因轉殖豬淋巴球時為低，表示 HLA-II 基因轉殖豬引起之急性體液性異種器官排斥程度減緩⁷⁸。目前，台灣動物科技研究所（Animal Technology Institute; ATIT）也利用基因剔除技術，與核轉移（nuclear transfer）之動物複製技術，預備產製 GT 基因剔除豬。上述臺灣產製的基因轉殖豬，與預備產製的基因剔除豬，已由臺大醫院外科與成大醫院外科進行異種移植的前臨床實驗。

備註：本文資料取材自下列文章

1. *Progress in Xenotransplantation Following the Introduction of Gene-Knockout Technology.* Hao-Chih Tai, Mohamed Ezzelarab, Hidetaka Hara, David Ayares, David K.C. Cooper. *Transplant International* 2006 December (early online).
2. *Cooper DKC. Xenotransplantation: the road ahead. Curr Opin Organ Transplant* 2006;11:151-153.

參考資料

1. Starzl TE, et al. Baboon to human liver transplantation. *Lancet* 1993;341:65-71.
2. Triulzi DJ, et al. Heteroagglutinins and their significance in baboon hepatic xenotransplantation. *Transplantation* 1995;60:127-131.
3. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988;263:17755–17762.
4. Good AH, Cooper DKC, Malcolm AJ et al. Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 1992;24:559–562.
5. Cooper DKC, Good AH, Koren E et al. Identification of alpha galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1993;1:198–205.
6. Lambripts D, Sachs DH, Cooper DK. Discordant organ xenotransplantation in

- primates: world experience and current status. *Transplantation* 1998; 66:547-561.
7. Cooper DKC. Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation* 1998;5:6-17.
 8. Rose AG, Cooper DKC. A histopathologic grading system of hyperacute (humoral, antibody-mediated) cardiac xenograft and allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.* 1996;15:804–817.
 9. Rose AG, Cooper DKC. Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection. *Xenotransplantation* 2000;7:31-41.
 10. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, et al. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal α 1-3Gal β 1-4 β Glc-X immunoaffinity column. *Transplantation* 1998;65:172-179.
 11. Kozlowski T, Ierino FL, Lambrigts D, et al. Depletion of anti-Gal α 1-3Gal antibody in baboons by specific alpha-Gal immunoaffinity columns. *Xenotransplantation* 1998;5:122-131.
 12. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995;1:964–966.
 13. Buhler L, Yamada K, Kitamura H, et al. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal α 1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation* 2001;72:1743-1752.
 14. Chen G, Starzl T, Sun H, et al. Induced anti-non-Gal antibodies lead to acute humoral xenograft rejection in baboons using α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as kidney donors. *Nat Med* 2005;11:1295-1298.
 15. Buhler L, Awwad M, Basker M, et al. High-dose porcine hematopoietic cell transplantation combined with CD40 ligand blockade in baboons prevents an induced anti-pig humoral response. *Transplantation* 2000; 69:2296-2304.
 16. Buhler L, Awwad M, Down JD, et al. Pig hematopoietic cell chimerism in baboons conditioned with a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade. *Transplantation* 2002;73:12-22.
 17. Knosalla C, Gollackner B, Buhler L, et al. Correlation of biochemical and hematological changes with graft failure following pig heart and kidney transplantation in baboons. *Am J Transplant* 2003;3:1510-1519.
 18. Knosalla C, Ryan DJJ, Moran K, et al. Initial experience with the human anti-human CD154 monoclonal antibody, ABI793, in pig-to-baboon xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2004;11:353-360.
 19. Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, et al. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen. *Am J Transplant* 2004; 4:363-372.
 20. McGregor CG, Teotia SS, Byrne GW, et al. Cardiac xenotransplantation:

- progress toward the clinic. *Transplantation* 2004;78:1569-1575.
21. McGregor CG, Davies WR, Oi K, et al. Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130:844-851.
 22. Kuwaki K, Tseng Y-L, Dor FJMF et al. Heart transplantation in baboons using α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005; 11:29–31.
 23. Tseng Y-L, Kuwaki K, Dor FJMF, et al. α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching six months. *Transplantation* 2005;80:1493-1500.
 24. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of gal-T knock out donors and the co-transplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 2005;11:32–34.
 25. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003;299:411–414.
 26. Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, et al. Production of α 1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7335-7340.
 27. Dor FJ, Cheng J, Alt A, et al. Gal α 1,3Gal expression on porcine pancreatic islets, testis, spleen, and thymus. *Xenotransplantation* 2004;11:101-106.
 28. Dor FJM, Tseng YL, Cheng J, et al. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout miniature swine produce natural cytotoxic anti-Gal antibodies. *Transplantation* 2004;78:15-20.
 29. Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, et al. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* 2004;11:416-425.
 30. Rood PPM, Hara H, Busch J, Ezzelarab M, Ibrahim Z, Zhu X, Ball S, Ayares D, Awwad M, Cooper DKC. Incidence and cytotoxicity of antibodies in cynomolgus monkeys directed to nonGal antigens, and their relevance for experimental models. *Transplant Int* 2006;19:158-165.
 31. Hara H, Ezzelarab M, Rood PPM, et al. Allosensitized humans are at no greater risk of humoral rejection of GT-KO pig organs than other humans. *Xenotransplantation* 2006;13:357-365.
 32. Ezzelarab E, Hara H, Busch J, et al. Antibodies directed to pig nonGal antigens in naïve and sensitized baboons. *Xenotransplantation* 2006. In press.
 33. Kobayashi T, Cooper DKC. Anti-Gal, α -Gal epitopes, and xenotransplantation. In Galili U, Avila JL, eds. *α -Gal and Anti-Gal: α -1,3-Galactosyltransferase, α -Gal*

- Epitopes, and the Natural Anti-Gal Antibody. Kluwer Academic/Plenum, New York, London (Subcellular Biochemistry Series, Volume 32). 1999. pp. 229-257.
34. Wong BS, Yamada K, Koumi M, et al. Allosensitization does not increase the risk of xenoreactivity to α 1,3-Galactosyltransferase gene-knockout (GalT-KO) miniature swine in patients on transplantation waiting lists. *Transplantation*. In press.
 35. Taylor SG, McKenzie IF, Sandrin MS. Characterization of the rat α (1,3)galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Gal α (1,3)Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology* 2003;13:327-337.
 36. Sharma A, Naziruddin B, Cui C, et al. Pig cells that lack the gene for α 1-3 galactosyltransferase express low levels of the Gal antigen. *Transplantation* 2003;75:430-436.
 37. Cooper DKC, Human PA, Lexer G, et al. Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplant* 1988;7:238-246.
 38. Cooper DKC, Tseng Y-L, Saidman SL. Allo- and xeno-antibody cross-reactivity in transplantation. *Transplantation* 2004;77:1-5.
 39. Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DKC. Carbohydrates in xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 2005;83:396-404.
 40. Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation* 2002;9:376-381.
 41. Miwa Y, Kobayashi T, Nagasaka T, et al. Are N-glycolylneuraminic acid (Hanganutziu-Diecher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation? *Xenotransplantation* 2004;11:247-253.
 42. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Dias S, et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic non-human dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12045-12050.
 43. Inverardi L, Clissi B, Stolzer AL, et al. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* 1997;63:1318-1330.
 44. Baumann BC, Forte P, Hawley RJ, et al. Lack of galactose- α 1,3-galactose expression on porcine endothelial cells prevents complement-induced lysis but not direct xenogeneic NK cytotoxicity. *J Immunol* 2004;172:6460-6467.
 45. Cooper DKC, Koren E, Oriol R. Genetically engineered pigs. *Lancet* 1993; 342:682-683.
 46. Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, et al. Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody

- binding and complement-mediated lysis. *Nat Med.* 1995;1:1261-1267.
47. Seebach JD, Comrack C, Germana S, LeGuern C, Sachs DH, DerSimonian H. HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells. *J Immunol* 1997;159:3655-3661.
 48. Dorling A, Monk NJ, Lechler RI. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 2000;30:586-593.
 49. Forte P, Baumann BC, Weiss EH, Seebach JD. HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. *Am J Transplant* 2005;5:2085-2093.
 50. Crew MD, Cannon MJ, Phanavanh B, Garcia-Borges CN. An HLA-E single chain trimer inhibits human NK cell reactivity towards porcine cells. *Mol Immunol* 2005;42:1205-1214.
 51. Rosenberg JC, Broersma RJ, Bullemer G, et al. Relationship of platelets, blood coagulation, and fibrinolysis to hyperacute rejection of renal xenografts. *Transplantation.* 1969;8:152-161.
 52. Buhler LH, Basker M, Alwayn IPJ, et al. Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hematopoietic cell transplantation in nonhuman primates. *Transplantation* 2000;70:1323-1331.
 53. Robson SC, Cooper DKC, d'Apice AJF. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000;7:166-176.
 54. Dorling A, Lechler RI. Disordered thromboregulation after xenografting. *Curr Opin Organ Transplant* 2001;6:36-41.
 55. Chen D, Weber M, McVey JH, et al. Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium. *Am J Transplant* 2004;4:1958-1963.
 56. Mendicino M, Liu M, Ghanekhar A, et al. Targeted deletion of fgl-2/fibroleukin in the donor modulates the immunologic response and acute vascular rejection (AVR) in cardiac xenografts (Abstract). *Am J Transplant* 2005;5[suppl 11]:561.
 57. Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, et al. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J Clin Invest* 2004;113:1440-1446.
 58. Oriol R, Ye, Y, Koren E, Cooper DKC. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* 1993;56:1433-1442.
 59. McKenzie IF, Xing PX, Vaughan HA, Prenzowska J, Dabkowski PL, Sandrin MS.

- Distribution of the major xenoantigen (Gal[α 1-3]Gal) for pig to human xenografts. *Transpl Immunol* 1994;2:81-86.
60. Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006;12:301-303.
 61. Rood PPM, Bottino R, Balamurugan AN, et al. Reduction of early graft loss after intraportal porcine islet transplantation in monkeys. Submitted.
 62. McKenzie IF, Koulmanda M, Mandel TE, Sandrin MS. Pig islet xenografts are susceptible to “anti-pig” but not Gal α (1,3)Gal antibody plus complement in Gal^{0/0} mice. *J Immunol* 1998;161:5116-5119.
 63. Komoda H, Miyagawa S, Kubo T, et al. A study of the xenoantigenicity of adult pig islets cells. *Xenotransplantation* 2004;11:237-246.
 64. Komoda H, Miyagawa S, Omori T, et al. Survival of adult islet grafts from transgenic pigs with N-acetylglucosaminyltransferase-III (GnT-III) in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation* 2005;12:209-216.
 65. Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 2000;105:125-33.
 66. Soderlund J, Wennberg L, Castanos-Velez E, et al. Fetal porcine islet-like cell clusters transplanted to cynomolgus monkeys: an immunohistochemical study. *Transplantation* 1999;67:784-791.
 67. Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, et al. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* 2006;12:304-306.
 68. Kawai T, Cosmi B, Colvin RB, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; 59: 256-262.
 69. Spitzer TR, Delmonico F, Rubin NT, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: The induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; 68: 480-484.
 70. Tseng Y-L, Sachs DH, Cooper DKC. Porcine hematopoietic progenitor cell transplantation in nonhuman primates: a review of progress. *Transplantation* 2005b;79:1-9.
 71. Rees MA, Butler AJ, Negus MC, Davies HF, Friend PJ. Classical pathways complement destruction is not responsible for the loss of human erythrocytes during porcine liver perfusion. *Transplantation* 2004;77:1416-1423.
 72. Ide K, Ohdan H, Kobayashi T, Hara H, Ishiyama K, Asahara T. Antibody- and

- complement-independent phagocytotic and cytolytic activities of human macrophages toward porcine cells. *Xenotransplantation* 2005;12:181-188.
73. Ide K, Wang H, Asahar T, et al. Human CD47 expression protects porcine cells from xenogeneic human macrophage phagocytosis through inhibitory CD47-SIRL signaling. (Abstract). World Transplant Congress, Boston, July 2006.
 74. Rees MA. A novel role for lectins in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2005;12:7-12.
 75. Rees MA, Butler AJ, Brons IG, et al. Evidence of macrophage receptors capable of direct recognition of xenogeneic epitopes without opsonization. *Xenotransplantation* 2005;12:13-19.
 76. Tu CF, Lee JM, Sato T, Tai HC, Lee FR, Yang CK, Tsuji K, and Lee CJ., Expression of HLA-DQ Genes in Transgenic Pigs. *Transplantation Proceedings* 2003;35:513-515
 77. Wang BT, Tu CF, Hsieh LJ, Tai HC, Chiu YL, Lee JM, Kuo SJ, Tsuji K, Lee CJ., Rapid Detection of Human HLA Transgenes in Pigs by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) for Adjuvant Study of Human Xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2004; 11:471-475.
 78. Lee JM, Tu CF, Yang PW, Lee KH, Tsuji K, Tsai MK, Chen RJ, Hu CY, Hsieh RP, Tai HC, Chiang BL, Weng CN, Lee YC, Lee CJ., Reduction of human-to-pig cellular response by alteration of porcine MHC with human HLA DPw0401 exogenes. *Transplantation* 2002;73(2):193-197.

進修成果

戴浩志醫師 進修完成之 SCI 論文 第一作者：

1. **Tai HC**, M Ezzelarab, H Hara, D Ayares², DK Cooper. Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. **Transplant International** 2007 Feb;20(2):107-17. (Review)
2. **Tai HC**, Campanile N, Ezzelarab M, Cooper DK, Phelps C. Measurement of anti-CD154 monoclonal antibody in primate sera by competitive inhibition ELISA. **Xenotransplantation**. 2006 Nov;13(6):566-70. (Brief Communication)
3. **Tai HC**, Zhu X, H Hara, Lin Y-J, Ezzelarab M, Long C, Ball S, Ayares D, Cooper DKC. The pig-to-primate immune responses: relevance for xenotransplantation. (submitted)

戴浩志醫師 進修完成之 SCI 論文 第二作者 or 其他作者：

1. Hara H, Lin Y-J, Zhu X, **Tai HC**, Ezzelarab M, Balarugan AN, Bottino R, Cooper DKC. Successful induction of diabetes by zanosar streptozotocin in pigs. (submitted)
2. Rood PPM, **Tai HC**, Hara H, Long C, Ezzelarab M, Lin Y-J, Busch J, Ball S, Ayares D, Wolf R, Manji R, Bailey L, Cooper DK. Development of anti-pig (anti-Gal and anti-nongal) antibodies in infant baboons and human: implications for xenotransplantation. (submitted)
3. Lin Y-J, Hara H, **Tai HC**, Long C, Yeh P, Cooper DK. Regulatory T Cells in relation of the human anti-porcine mixed lymphocyte reaction: implications for xenotransplantation. (submitted)

戴浩志醫師 撰寫中之進修論文

1. **Tai HC**, Hara H, Zhu X, Lin Y-J, Ezzelarab M, Long C, Cooper DK. Depletion of passenger leukocytes in pigs by irradiation.

建議事項

運用在 Starzl Transplantation Institute (STI) of University of Pittsburgh Medical Center (UPMC) 學習之技術，籌劃下列之異種移植耐受性實驗

一、轉殖基因 HLA-DR15 Tg 誘發異種移植耐受性之實驗：Studies of Cyclophilin Effect in HLA-DR15 Tg Pig

1. 進行 One-way mixed lymphocyte reaction (MLR) + CyA 之實驗使用 MTT、 H^3 -Thymidine、CFSE - MLR。Responder 為 HLA-DR15(+) human PBMC Stimulator 為 HLA-DR15(+) Tg Pig PBMC。
2. 進行 HLA-DR15 轉殖基因豬皮覆蓋至 hPBMC-SCID 小鼠之實驗排除 Leaky of SCID：FASC for SCID PBMC：anti-mouse CD3/CD21
 - 建構 hPBMC-SCID：HLA-DR15 Human PBMC into non-leaky SCID & FASC for hPBMC-SCID：anti-human CD3/CD21
 - Skin Grafting to hPBMC-SCID
 - HLA-DR15 Tg pig skin into HLA-DR15 hPBMC-SCID
 - 短期免疫抑制：使用 Cyclosporin-A 二週；術後 day 1 至 day 4 餵食劑量為 20 mg/kg/day，之後劑量為 10 mg/kg/day，直至 day 12。
 - 測量豬皮存活時間&組織切片檢查以流式細胞分析儀檢查豬皮接受者周邊血液淋巴球的比率

One-way mixed lymphocyte reaction (MLR) + CyA 之實驗設計：

**Induction of hyporesponses by HLA-DR15 Tg
Mixed Lymphocyte Reaction + CyA**

Stimulator	Responder	Cyclosporin A	Proliferation
DR15(+) pig	DR15(+) Human	(+)	(-) / CyA effect
DR15(+) pig	DR15(+) Human	(-)	(-) / DR match
DR15(+) pig	DR15(-) Human	(+)	(-) / CyA effect
DR15(+) pig	DR15(-) Human	(-)	(+) / mismatch
DR15(-) pig	DR15(+) Human	(+)	(-) / CyA effect
DR15(-) pig	DR15(+) Human	(-)	(+) / mismatch
DR15(-) pig	DR15(-) Human	(+)	(-) / CyA effect
DR15(-) pig	DR15(-) Human	(-)	(+) / mismatch

HLA-DR15 轉殖基因豬皮覆蓋至 hPBMC-SCID 小鼠之實驗設計：

**Induction of hyporesponses by HLA-DR15 Tg
Skin Grafting to hPBMC-SCID**

PBMC	Skin	Short Cy A	Rejection
DR15(+) Human	DR15(+) pig	(+)	(-) / DR match
DR15(-) Human	DR15(+) pig	(+)	(+) / mismatch
DR15(+) Human	DR15(-) pig	(+)	(+) / mismatch
DR15(-) Human	DR15(-) pig	(+)	(+) / mismatch

水蛭素(hirudin)轉殖基因減緩異種移植排斥之實驗雖然 GT 基因剔除技術的進步，使得 anti-Gal 抗體的障礙獲得解決，但是 GT 基因剔除豬器官最後仍被非人類靈長類排斥掉，其排斥的原因並不是典型的體液性排斥，而是源於血栓性微血管病變(Thrombotic microangiopathy；TM)。

在鼠類的異種移植實驗中，帶有水蛭素(hirudin)轉殖基因的小鼠心臟，在移植至大鼠及短暫免疫抑制後，可以存活一百天以上，而沒有轉殖基因的小鼠心臟，在移植至大鼠後，即使有免疫抑制下，仍在移植 6 日後因急性體液性異種器官排斥(AHXR)而被排斥掉。

在國科會支持計畫，台灣動物科技研究所(Animal Technology Institute；ATIT)已產製水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠。

1、進行水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠血漿中水蛭素(Hirudin)濃度、血小板計數、纖維蛋白原(Fibrinogen)的分析

2、進行水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠流血時間(Bleeding time)分析

3、進行水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠凝血(In vitro clotting)分析：小鼠微細血管內皮細胞的分離

4、進行水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠內毒素(Endotoxic)休克實驗

5、進行水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠心臟異種移植：

Donor：水蛭素(hirudin)基因轉殖小鼠

Recipient：大鼠 (Male inbred Lewis rats)

Recipient：大鼠之骨髓重建(reconstitution)

短期免疫抑制：使用 Cyclosporin-A 二週；術後 day 1 至 day 4 餵食劑量為 20 mg/kg/day，之後劑量為 10 mg/kg/day，直至 day 12。

測量小鼠心臟存活時間&組織切片檢查

水蛭素(hirudin)轉殖基因減緩異種移植排斥之實驗設計

水蛭素(Hirudin)轉殖基因減緩異種移植排斥之實驗 小鼠心臟異種移植

大鼠 BMT	小鼠心臟	Short Cy A	Rejection
(+)	Hirudin (+)	(+)	(-) / mismatch
(-)	Hirudin (+)	(+)	(+) / mismatch
(+)	Hirudin (-)	(+)	(+) / mismatch
(-)	Hirudin (-)	(+)	(+) / mismatch

實驗材料與方法

水蛭素(Hirudin)轉殖基因的建構

帶有水蛭素(hirudin)轉殖基因的 constructs 包括 human **Hirudin-P-selectin**。

水蛭素(Hirudin)基因轉殖小鼠的產製

水蛭素(Hirudin)基因轉殖小鼠 founder 的產製是經由 microinjection。水蛭素(Hirudin)基因轉殖小鼠的確認是經由 Southern blot analysis of tail-tip DNA。水蛭素(Hirudin)基因轉殖小鼠的 backcrossing background 是 C57BL/6 (B6)。水蛭素(Hirudin)基因轉殖小鼠，至少經過 5 代的 backcrossing 才用來進行實驗。

免疫組織化學染色

免疫組織化學染色依照 IHC 病理切片標準步驟進行。小鼠器官包埋在 optimal cutting temperature (OCT)中，置入液體氮中，之後進行冷凍切片(frozen sections)步驟，並以 methanol 固定。冷凍切片(frozen sections)浸泡在 1% bovine serum albumin-phosphate-buffered saline (BSA-PBS)、與 10% goat serum (Sigma) 中 30 分，之後在 4° C 下和初級抗體培養一夜。初級抗體包括 sheep anti-**hirudin** (both from Enzyme Research Laboratories, Swansea, United Kingdom), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-human fibrinogen (also binds fibrin) (DAKO, Glostrup, Denmark), rat antimouse CD31 (PharMingen, San Diego, CA), or mouse antihuman α -actin (Sigma)。之後，冷凍切片(frozen sections)再以二級抗體染色，二級抗體包括 goat anti-rabbit IgG-FITC, donkey anti-sheep IgG-FITC, sheep anti-mouse IgG-FITC (Sigma), or rabbit anti-rat IgG-FITC (DAKO)。

冷凍切片(frozen sections)以 immunofluorescence microscope 判讀，影像以 MetaMorph imaging system (Universal Imaging, Downingtown, PA)分析。

Hematoxylin and eosin (H&E)染色依照病理切片標準步驟進行。

小鼠微細血管內皮細胞的分離

小鼠器官在細孔濾網中磨碎，並以 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) 潤濕，再於 37° C 下以 collagenase (3 mg/mL ; Roche Diagnostics) 消化 30 分鐘。消化過的組織通過 cell strainer 後收集的混合細胞，以 0.5% fetal calf serum (FCS)-DMEM 清洗，再於 4° C 下以 rat anti-mouse CD31 and CD105 (Pharmingen) 培養 30 分鐘。之後，混合細胞以 0.5% FCS-DMEM 清洗，並於 4° C 下以 goat anti-rat microbeads (Miltenyi Biotec , Auburn , CA)-0.5% FCS-DMEM 培養 15 分鐘，再以 0.5% FCS-DMEM 清洗，然後通過 magnetic column (Miltenyi Biotec) ，以分離出血管內皮細胞。最後，將 Retained beads 沖洗下來，得到血管內皮細胞，並培養於 20% FCS-DMEM 。

分析血管內皮細胞純度時，血管內皮細胞先於 37° C 下以 phorbol myristate acetate (PMA) (1 μ M; Sigma) 來活化 30 分鐘。

白血球的分離

周邊血液白血球取自周邊血液。由小鼠尾巴取得的血液，加入 heparin，防止血液凝固，並於室溫下以 ACK buffer (10 mL, 5 分鐘; 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)) 溶解掉紅血球，之後以 3% FCS-DMEM 清洗，分離出白血球。之後，以流式細胞分析儀(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)確認白血球純度，使用 anti-mouse CD14 mAb (Pharmingen) 確認單核細胞 phenotype 。

Splenocytes 取自小鼠脾臟，homogenized mouse spleen 於室溫下以 5 mL ACK buffer 作用 5 分鐘，溶解掉紅血球，分離出 Splenocytes。之後，Splenocytes 置於 10% FCS-RPMI 中。Splenocytes 的活化是於 37° C 下以 concanavalin A (5 μ g/mL) 作用 48 小時。

血小板的分離

血小板取自 platelet-rich plasma。由小鼠尾巴取得的血液，加入 heparin，防止血液凝固，再以 80g 離心速度離心 10 分鐘，取得 plasma 層即為 platelet-rich plasma，之後以 1% ammonium oxalate 及 2.5 mM Gly-Pro-Arg-Pro peptide (Sigma) 稀釋，稀釋比率為 1:20。血小板計數是以 counting chamber 計算。計算 1 mm² 內血小板數目為 N，則每升血液內血小板總數為 2N x 10⁹。

血小板 phenotype 以流式細胞分析儀 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 確認, 使用 anti-CD41 mAb (Pharmingen) 來染色血小板。的活化是於 37° C 下以 1 U/mL thrombin (Enzyme Research Laboratories) 作用 30 分鐘。

流式細胞分析儀分析

約 1×10^5 細胞或血小板於 4° C 下和抗體作用 30 分鐘, 染色的細胞或血小板再以流式細胞分析儀判讀(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。

凝血(In vitro clotting)分析

凝血分析是 recalcified mouse plasma clotting assay, 使用純化的血管內皮細胞為材料。首先, 血管內皮細胞以 6-well plate 培養(density of 10^5 /mL), 在血管內皮細胞接近 confluence 時, 加入 interleukin-1 α (IL-1 α ; 10 ng/mL) (Sigma), 作用 12 小時, 最後以 PMA 作用 30 分鐘。血管內皮細胞以 serum-free DMEM 清洗後, 以 EDTA 來從培養皿中分離下來。之後, 將 5×10^6 血管內皮細胞加到 200 μ L recalcified plasma 中, 再計數 clot 時間。

內毒素(Endotoxic)注射

在 sodium pentobarbitone (60 ng/g) 麻醉下, 體重 25 ± 1 g 小鼠給予一劑 LPS (2 μ g/g, 腹腔注射; *Escherichia coli* serotype 0127; B8, Sigma), 對照組小鼠給予一劑同劑量 saline。在 LPS 或 saline 注射前 30 分鐘、及注射後 0、2、及 4 小時, 小鼠給予一劑 Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (50 μ g/g, 腹腔注射; Alexis, Nottingham, United Kingdom)。在 LPS 或 saline 注射 4.5 小時, 犧牲小鼠, 自小鼠心臟取得血液, 再加入 0.1 vol of 3.8% sodium citrate (Sigma), 防止血液凝固。

流血時間(Bleeding time)分析

在 sodium pentobarbitone (60 ng/g) 麻醉下, 小鼠固定在固定板上, 將小鼠尾巴在離尖端 2-mm 處切斷, 並將流血的斷端置入 37° C 之 0.9% saline 中, 記錄至流血停止的時間(bleeding time)。

纖維蛋白原(Fibrinogen)分析

纖維蛋白原濃度的測量方法是 von Clauss method，使用 fibrinogen determination kit (Baxter Diagnostics；Deerfield，IL)，此 kit 包含 Dade Data-Fi fibrinogen determination reagents、及 fibrinogen calibration reference。首先是 pooled mouse plasma (n = 5) 以 0.05 M imidazole per 0.1 M sodium chloride (pH 7.3) 做 serial dilutions，再將高濃度 bovine thrombin (Sigma) 加至 diluted plasma 中，並測量 clotting time，之後計算 logarithm of the clotting time 和 logarithm of fibrinogen concentration 之關係。如果 20 分鐘後仍然沒有 clot 形成，則纖維蛋白原分析結束。測量結果以 percentage fibrinogen relative to control mice 來表示。

大鼠之骨髓重建(reconstitution)

在 Cervical Dislocation 下，將小鼠犧牲，骨髓自小鼠長骨 (long bones)中沖刷出來，再以 fresh RPMI 調整成 5×10^7 cells per milliliter。接受者大鼠(recipient mice) 施以 12 Gy (1200 rad)之放射線照射，之後自大鼠尾巴靜脈注射 1×10^7 骨髓細胞。大鼠隔離 4 週後進行器官移植實驗。

小鼠血漿中水蛭素(Hirudin)濃度的分析

小鼠血漿取自 freshly heparinized blood，小鼠血液於 4° C 下以 2000g 離心 15 分鐘，分離出血漿，小鼠血漿儲存於 -80° C。分析時，解凍之小鼠血漿加入 anti-hirudin mAb，並於室溫下作用 30 分鐘；之後將此小鼠血漿加至 10^5 血管內皮細胞，並於 4° C 下作用 15 分鐘，最後加入 FITC-conjugated 二級抗體後，以流式細胞分析儀判讀(Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ)判讀小鼠血漿中水蛭素 (Hirudin) 的濃度。

實驗用小動物

體重 190–210 gm 之 male inbred Lewis rats，為器官接受者(recipients)；體重 25–30 gm 之 C57BL/6 (BL/6) Hirudin-transgenic (Hir-Tg) mice，為器官捐贈者 (donors)。基因轉殖小鼠，至少經過 5 代的 backcrossing 才用來進行實驗；所有基因轉殖小鼠器官來自 heterozygous mice。

小鼠心臟異種移植

在 sodium pentobarbitone (60 mg/kg) 麻醉下，進行小鼠開腹手術，並於下腔靜脈注射 heparin (300 U/gm)。之後，進行小鼠開胸手術，並結紮上、下腔靜脈、及肺靜脈，再將小鼠心臟取下。小鼠心臟以 cold heparin (100 U/mL) 灌流，並保存於 ice-cold saline。大鼠以 halothane 麻醉，再進行大鼠 (Male inbred Lewis rats) 開腹手術 (midline laparotomy)，之後進行小鼠心臟異種移植，將小鼠主動脈以 end-to-side 方式縫合至大鼠主動脈，小鼠肺動脈以 end-to-side 方式縫合至大鼠下腔靜脈。小鼠心臟移植手術，於手術顯微鏡下，使用 10-0 縫線進行縫合。

移植之小鼠心臟，每日以觸摸檢查其跳動情況。當觸摸不到小鼠心臟跳動時，則認定排斥反應已經產生。

Cyclosporin A 之用法

Cyclosporin A (Sandimmun[®], Novartis Pharmaceuticals, Surrey, UK) 經由 gastric feeding tube (CH 5, Popper & Sons, NY) 餵食，術後 day 1 至 day 4 餵食劑量為 20 mg/kg/day，之後劑量為 10 mg/kg/day，直至實驗結束。

統計分析

小鼠心臟存活時間，以 Log-rank test 分析。血小板與纖維蛋白原濃度等之差異，以 unpaired *t*-test 分析。如果 $p < 0.05$ ，則認為數值間差異達到統計上差異。