



Acute regeneration and chronic acellular transformation of rabbit cryopreserved aortic allografts

山田, 章貴

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-06-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3189

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003189>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Acute regeneration and chronic acellular transformation of rabbit cryopreserved aortic allografts

ウサギ凍結大動脈アログラフトの急性期の再生及び 慢性期の無細胞化に関する研究

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻大北裕教授)

山田 章貴

(序論)

凍結大動脈 allograft は人工血管を使用した大動脈置換術に比べ抗感染性に優れるとされ、近年では感染性動脈瘤や人工血管感染の治療において良好な臨床成績を治めているが、移植後の組織学的変化についての十分な基礎研究は行われていない。本研究は、凍結大動脈 allograft 移植後の組織を経時的かつ詳細に観察し、移植後急性期および慢性期における組織学的変化を解明することを目的とした。

(方法)

3Kg の日本白色兎の胸部大動脈が摘出され、4℃で 30 分間保たれた後に毎分 1℃の速度で -80℃まで凍結され、液体窒素内で 2 カ月間保存、凍結大動脈 allograft とされた。これが別の日本白色兎の腹部大動脈に端々吻合で移植され、術後 2 (POD2), 5 (POD5), 11 (POD11), 60 (POD60), 210 (POD210), 360 (POD360), 720 (POD720) 日目に組織が摘出された。標本は、対照、POD2, POD5, POD11 が 5 例、POD60, POD210 が 3 例、POD360, POD720 が 2 例であった。摘出標本は、固定後に HE 染色または、免疫染色 (α -SMA, CD141, CD45, Ki67, BrdU) によって評価された。移植後の凍結大動脈 allograft の組織由来を明らかにするため、あらかじめ採取しておいた donor および recipient の肝臓組織より DNA が抽出され、ミクロサテライト分析が行われた。

(結果)

急性期の変化について：

凍結大動脈 allograft の組織の急性期の経時的変化が Fig. 1 に示された。中膜平滑筋細胞の核の数は、コントロール凍結大動脈 allograft が $619 \pm 142/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD2 allograft が $320 \pm 131/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD5 allograft が $471 \pm 140/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD11 allograft が $587 \pm 129/0.1 \text{ mm}^2$ で、移植後 2 日目に半数程度まで減少していた中膜平滑筋細胞の核が、移植後 11 日目にはコントロールと同程度まで増加していた (Fig. 2, closed circles)。POD2 allograft から POD11 allograft までの細胞数の増加に細胞分化が関与したことを明らかにするため、Ki67、BrdU を用いた免疫染色が行われ、Ki67 陽性の細胞は POD2 allograft が $89 \pm 160/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD5 allograft が $58 \pm 31/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD11 allograft が $9 \pm 11/0.1 \text{ mm}^2$ と、POD2 allograft で最も多く、この時期の細胞分化が最も盛んであったことが示された (Fig. 2, open squares)。BrdU 陽性細胞も Ki67 陽性細胞と同様の変化を呈した (Fig. 2, asterisk)。

慢性期の変化について：

POD60 allograft では、核を有する平滑筋細胞数は $162 \pm 68/0.1 \text{ mm}^2$ と、POD11 allograft に比べ大きく減少していた。POD210 allograft、POD360 allograft、POD720 allograft においては、中膜弾性繊維の骨格自体は良好に維持されていたものの、平滑筋細胞は全く存在しておらず無細胞化していた (Fig. 3)。慢性期 (POD60, POD210, POD360, POD720) の凍結大動脈 allograft のいずれの標本からも Ki67、BrdU 陽性細胞は検出されなかった。一方、POD210

allograft において、無細胞化した凍結大動脈 allograft 中膜に接するように、平滑筋細胞が層状に集積しているのが認められた (Fig. 3, D)。POD210, POD360, POD720 allograft も同様の所見であった。カルシウム沈着が POD60 allograft 以降の 7 標本全てに観察され、POD11 以前の 8 標本には認められなかった。散在するカルシウム沈着は、外膜に集積した平滑筋細胞の領域に一致して層状に認められた (Fig 4.)。

移植後の凍結大動脈 allograft 中膜平滑筋細胞の由来について：

POD11 allograft 中膜平滑筋細胞の allelic pattern が donor の DNA と一致したことにより、これらは donor 由来であることが確かめられた (Fig 5, Table 1)。

(考察)

本研究において、ウサギ凍結大動脈 allograft の中膜は、移植後急性期に donor 由来の平滑筋細胞により修復されることが示された。これは、移植後急性期において、donor 由来の細胞により生物活性がもたらされているという点で重要である。POD2 から POD11 にかけての急激な中膜平滑筋細胞の増加は、POD2 allograft で最も多く検出された Ki67 や BrdU 陽性細胞が関与していると考えられる。急速に修復された中膜平滑筋細胞が、donor 由来か recipient 由来かという疑問については、マイクロサテライト分析により、donor 由来の細胞のバンドパターンが急性期に修復された中膜平滑筋細胞のそれと一致したことにより、donor 由来であると結論づけることができる。近年、移植後の新生内膜が recipient 由来であることが報告されているが[11, 19, 28]、中膜については検討されていない。

凍結大動脈 allograft の移植後急性期以降の組織変化についての報告では、6 カ月までに細胞数が 1/5 程度まで減少し、1 年後まで数少ないまま維持されとするもの [23] や、3 カ月後には細胞数が減少するが、2 年後には再び増加するとするもの [24] がある。細胞由来については、Neves らはヒツジ凍結大動脈 allograft を用いて、移植後 1, 2 年の allograft の細胞は donor と recipient の混在か、recipient 由来がほとんどであると報告している [24]。

本研究では、凍結大動脈 allograft 中膜の無細胞化は、移植後 7 カ月から 2 年維持されているのが確認された。Vogt らは、1999 年に 27 例のヒト allograft (2 週間～7 年) において組織学的変化を報告し、そのほとんどが無細胞で、donor 由来の fibrocyte がわずかに存在するとして [31]。移植後慢性期の中膜無細胞化の報告も散見される [15, 23]。

凍結大動脈 allograft 中膜の無細胞化の機序については不明だが、単核球の明らかな浸潤がないことから、免疫学的な拒絶反応は病理学的には考えにくい。慢性期の中膜の無細胞化は好ましくない変化とされが、炎症細胞や細菌だけでなく、それらを運搬するであろう vasa vasorum の侵入さえも、中膜弾性繊維を維持しながら長期にわたり防いでいるととらえることができ、抗感染性への関与も考えられる。実際、高度な感染部位へ移植されたヒト凍結大動脈 allograft の中膜は、外膜がおびただしい細菌や炎症細胞に浸潤されていたのにも関わらず、その浸潤から守られていた [33]。無細胞化した中膜に接する外膜に平滑筋細胞の集積が 7 カ月後以降の標本に見られたが、Ki67 または BrdU 陽性細胞は検出さ

れなかった。これら集積した平滑筋の役割は不明だが、大動脈壁が血圧に耐えるためになんらかの補助的役割を果たしているかもしれない。

凍結大動脈 allograft の石灰化は主に中膜の内側に認められたとの報告があるが[23]、本研究では、石灰化は外膜に層状に認められた。我々は、同部位に集積が認められた平滑筋細胞となんらかの関わりがあるのではと推測している。

(結論)

本研究は、ウサギ凍結大動脈 allograft 移植後の急性期および慢性期の病理組織学変化を示した。中膜平滑筋細胞は、術後変化としての急性期の一時的な危機を乗り越えた後、急速に再構築される。対照的に、慢性期における中膜の無細胞化への形質転換は、凍結大動脈 allograft の最終形態として認識でき、凍結大動脈 allograft の維持に対して何らかの役割を持つかもしれない。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2105号	氏 名	山田 章貴
論文題目 Title of Dissertation	ウサギ凍結大動脈アログラフトの急性期の再生及び慢性期の無細胞化に関する研究 Acute regeneration and chronic acellular transformation of rabbit cryopreserved aortic allografts		
審査委員 Examiner	主 査 岡藤 智雄 Chief Examiner 副 査 平田 健一 Vice-examiner 副 査 黒坂 昌弘 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

凍結大動脈 allograft は人工血管を使用した大動脈置換術に比較し抗感染性の点で優れるとされ、近年では良好な臨床成績を治めている。しかし、移植後の組織学的変化についての十分な基礎研究は行われていない。発表者は、凍結大動脈 allograft 移植後の組織を経時的かつ詳細に観察し、移植後急性期および慢性期における組織学的変化を解明することを目的とし研究を行った。

日本白色兔の胸部大動脈を摘出し、4℃で30分間保たれた後に毎分1℃の速度で-80℃までプログラムされた凍結を行い、液体窒素内で2カ月間保存、allograft とした。別個体の腹部大動脈に端々吻合で移植し、術後2 (POD2), 5 (POD5), 11 (POD11), 60 (POD60), 210 (POD210), 360 (POD360), 720 (POD720) 日目に組織が摘出された。標本は、対照、POD2, POD5, POD11 が5例、POD60, POD210 が3例、POD360, POD720 が2例とした。摘出標本は、固定後にHE染色および免疫染色 (α -SMA, CD141, CD45, Ki67, BrdU) によって評価された。さらにあらかじめ採取しておいた donor および recipient の肝臓組織よりDNAが抽出され、ミクロサテライト分析を行った。

その結果、急性期の変化については、中膜平滑筋細胞の核の数は、移植後2日目に半数程度まで減少していた中膜平滑筋細胞の核が、POD11にはコントロールと同程度まで増加していた。Ki67, BrdUを用いた免疫染色では、Ki67陽性の細胞はPOD2 allograft が $89 \pm 160/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD5 allograft が $58 \pm 31/0.1 \text{ mm}^2$ 、POD11 allograft が $9 \pm 11/0.1 \text{ mm}^2$ と、POD2 allograft で最も多く、この時期の細胞分化が最も盛んであった。BrdU陽性細胞もKi67陽性細胞と同様の変化であった。

慢性期の変化についてはPOD60 allograft では、核を有する平滑筋細胞数はPOD11 allograft に比べ大きく減少していた。POD210 allograft、POD360 allograft、POD720 allograft においては、中膜弾性繊維は良く維持されていたものの、平滑筋細胞は全く存在しておらず無細胞化の状況を呈していた。いずれの標本からもKi67, BrdU陽性細胞は検出されなかった。一方、POD210, POD210, POD360, POD720 allograft において、無細胞化した凍結大動脈 allograft 中膜の外側に、平滑筋細胞が層状に集積している所見が認められた。外膜に集積した平滑筋細胞の領域にカルシウム沈着がPOD60 allograft 以降の7標本全てに認められた。

POD11 allograft 中膜平滑筋細胞の allelic pattern が donor のDNAと一致したことにより、これらは donor 由来であることが確かめられた。

本研究は、ウサギ凍結大動脈 allograft 移植後の変化を経時的に検討し、中膜が移植後急性期に donor 由来の平滑筋細胞により修復されるが、慢性期には無構造化に陥ることを示したものである。慢性期における中膜の無細胞化への形質転換は、凍結大動脈 allograft の最終形態である可能性があり、今後、凍結大動脈 allograft の長期予後に及ぼす影響に関して新たな知見を加えたものと考えられる。従来ほとんど行われてこなかった観点から研究を行い、新たな知見を多数含む価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。