

博士（医学） 宮 崎 慶 子

学位論文題名

異種心臓移植における超急性拒絶心臓の微細構造

学位論文内容の要旨

【目的】心臓移植のドナー不足を解決する方法の1つとして異種心臓移植が研究されている。遠い異種間で移植すると移植片は数分から数時間のうちに拒絶され、超急性拒絶反応と呼ばれている。この機序として自然抗体、補体等により血栓形成が生じ、移植片が機能停止することが明らかになっている。しかし、その詳細な組織像、特に電子顕微鏡像で血管内に血栓を認めるか、あるいは内皮細胞障害を認めるかという点については議論がある。また近年、超急性拒絶においてアポトーシスが生じている可能性が示唆されているが、その存在を証明した報告はない。そこで本研究では、モルモット-ラット心臓移植およびハムスター-感作ラット心臓移植での超急性拒絶反応を組織学的に検討し、拒絶の機序およびアポトーシスの関与について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】異種移植のドナーとして、モルモットおよびハムスターを使用した。レシピエントとして、ラットを使用した。感作ラットレシピエントは心臓移植の2週間前にハムスターの皮膚約2.0×2.0cmをラットの背部に移植して作製した。腹部異所性心臓移植はOno & Lindsey法を改良して行った。移植した心臓を直視下に観察、心室拍動停止をもって拒絶とし、移植片に血流が再灌流されてから拒絶されるまでの時間を測定し、生着時間とした。拒絶された心臓は直ちに摘出した。モルモットからラットへ異種心臓移植を4例（グループA）、ハムスターから感作ラットへ異種心臓移植を4例（グループB）行った。また、虚血再灌流傷害を調べるためにハムスターからラットへ心臓移植を2例（グループC）行った。この心臓は拒絶の徵候なく拍動していたが、移植片に血流が再灌流された後12分で摘出した。正常コントロールとしてモルモット、ハムスター各4匹の心臓を用いた。摘出した心臓は長軸に垂直に分割した。一片はザンボニ液（2%パラフォルムアルデヒド-15%飽和ピクリン酸-0.1Mリン酸緩衝液pH 7.4）で固定し、ヘマトキシリントリジン（HE）染色標本、補体C3免疫染色標本、ニックエンドラベル法（TUNEL）標本を作成した。一片は液体窒素で凍結し、切片をPLP液（ペリオデート-リジン-パラフォルムアルデヒド）にて固定後、IgM免疫染色標本を作成した。一片は2.5%グルタールアルデヒドリジン酸緩衝液pH 7.4で固定し透過型電子顕微鏡標本を作成した。透過型電子顕微鏡で内皮細胞壁の厚さ、飲小胞の数について組織計量を行った。各群間の統計学的比較は、F検定をした上でStudent's t検定により検定した。p<0.05を統計学的有意とした。数値の表記は平均値±標準偏差とした。

【結果】生着時間は、グループAは平均32.5±47.7分、グループBは平均12.3±5.0分であった。HE染色標本では、グループA、Bとともに、心筋線維間に多数の赤血球が見られ、

筋線維間は解離して浮腫を認めた。炎症細胞の浸潤は認められなかった。グループCは正常と同様であった。抗ラットC3免疫染色では、グループAではすべての血管の内皮細胞に補体の沈着を認めた。グループBでは動脈の内皮細胞にのみ補体が沈着していた。抗ラットIgM免疫染色では、グループAでは動脈の内皮細胞にのみIgMの沈着を認めた。一方、グループBですべての血管の内皮細胞にIgMの強い沈着を認めた。正常コントロール群、グループCには補体、IgMの沈着は認められなかった。TUNEL染色では、グループAで、核が茶褐色に陽性を示す細胞を散在性に認めた。陽性細胞は内皮細胞が $2.0 \pm 0.9\%$ 、心筋細胞が $0.5 \pm 0.2\%$ であった。グループB、グループC、正常コントロール心臓では陽性細胞は認められなかった。透過型電子顕微鏡では、心筋細胞はグループA、Bとも正常構造を保っていた。毛細血管内の血小板の凝集はグループA、Bともに認められたが、グループAで多く認めた。正常コントロール群では、血管内の血漿部分の電子密度は血管周囲の電子密度より高かったが、グループA、Bでは、血管内の血漿部分の電子密度と血管周囲の電子密度が同じ程度に上昇していた。グループA、Bでは、毛細血管壁の菲薄化、電子密度の増加、飲小胞の減少を認めたが、この所見は血小板が付着している部分でも、付着していない部分でも認められ、グループAでグループBよりしばしば認めた。また、グループAでは、核および細胞質の分断像を示す細胞や、クロマチン凝集を示す内皮細胞の核をまれに認めた。グループCでは、血管内に血小板の凝集を認めず、心筋細胞とともに内皮細胞は正常と同様の所見であった。グループAでは内皮細胞壁の厚さ 169.7 ± 27.9 nm、単位面積あたりの飲小胞の数 6.6 ± 2.8 で、正常モルモットの壁厚 282.5 ± 76.2 nm、飲小胞数 31.2 ± 7.2 に比べて有意に減少していた。グループBでは壁厚 300.1 ± 113.8 nm、飲小胞数 20.0 ± 14.2 で、正常ハムスターの壁厚 292.2 ± 55.8 nm、飲小胞数 33.5 ± 2.1 に比べ有意差は認められなかった。

【考察】本研究では光学顕微鏡および電子顕微鏡所見で、グループA、Bの両者において血栓を認めた。血栓形成は超急性拒絶の重要な特徴と考える。しかし血小板が付着していない部分にも毛細血管壁の変性所見を認め、血栓による傷害の他に、補体や抗体といった液性の因子により内皮細胞が直接傷害を受けている可能性を示している。

飲小胞の減少と内皮細胞壁の菲薄化や電子密度の増加といった細胞の変性を窺わせる所見は、アポトーシスの所見を示したグループAにおいて多く認めた。したがってこの所見は、内皮細胞の変性、細胞死への過程に先行する機能停滞を示すものとみることができる。上記所見は、感作ラット移植ハムスター心臓では顕著ではなかった。

グループAでは、TUNELで陽性を示し、電子顕微鏡像で核のクロマチン凝集や分断像を示す細胞が認められたことから、血管内皮細胞および心筋細胞にアポトーシスが生じていることが明らかになった。血管内皮細胞で心筋細胞よりもTUNEL陽性率が高かったことは、傷害の主体が血管内皮であることを示唆している。超急性拒絶反応は、虚血再灌流障害の影響を強く受ける可能性がある。しかし、グループCは正常ハムスター心臓と同様の所見を示しており、今回の実験では、虚血再灌流障害の影響はないものと考える。グループAでC3分布がIgM分布より広範囲であったことは、グループAでは補体の別経路が主体であることを示唆している。一方、グループBでIgM分布がC3分布よりも広範囲であったことは、補体の古典経路が主体であり、IgM自体が補体を介さずに直接、拒絶に関与している可能性をも示唆している。

【結語】血栓形成および血管内皮障害は異種移植超急性拒絶心臓における基本的特徴と考える。血管内皮傷害としての毛細血管壁の菲薄化、電子密度の増加、飲小胞の減少、および血管内皮細胞と心筋細胞のアポトーシスの存在がモルモット-ラット心臓移植で明らかになった。異種移植超急性拒絶は、ドナー-レシピエントの組み合わせの違いにより多彩性を示すことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査教授 安田慶秀
副査教授 阿部和厚
副査教授 北畠顯
副査教授 小林邦彦

学位論文題名

異種心臓移植における超急性拒絶心臓の微細構造

異種心臓移植における超急性拒絶反応の機序として自然抗体、補体等により血栓形成が生じ、移植片が機能停止することが明らかになっている。しかし、その詳細な組織像、特に電子顕微鏡像で血管内に血栓を認めるか、あるいは内皮細胞障害を認めるかという点については不明瞭である。また近年、超急性拒絶においてアポトーシスが生じている可能性が示唆されているが、その存在を証明した報告はない。

本研究では、モルモット-ラット心臓移植およびハムスター-感作ラット心臓移植での超急性拒絶反応を組織学的に検討し、拒絶の機序およびアポトーシスの関与について明らかにすることを目的とした。

Ono & Lindsey法に従い、モルモットからラットへ異種心臓移植を4例（グループA）、ハムスターから感作ラットへ異種心臓移植を4例（グループB）行った。感作ラットは心臓移植の2週間前にハムスターの皮膚をラットの背部に移植して作製した。拒絶は心室拍動が停止した時点とし、移植片に血流を再灌流してから拒絶までの時間を生着時間とした。また、虚血再灌流傷害を調べるためにハムスターからラットへ心臓移植を2例（グループC）行った。この心臓は拒絶の徵候なく拍動していたが、移植片に血流を再灌流した後12分で摘出した。正常コントロールとしてモルモット、ハムスター各4匹の心臓を用いた。摘出した心臓の組織標本を作成し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色、C3、IgM免疫染色、ニックエンドラベル法（TUNEL）、透過型電子顕微鏡にて検討した。

生着時間は、グループAは平均32分、グループBは平均12分で有意差は認めなかった。HE染色標本では、グループA、Bとともに、間質の浮腫、出血を認めたが、2群間に明らかな違いは認められなかった。抗ラットC3免疫染色では、グループAではすべての血管の内皮細胞に補体の沈着を認めたが、グループBでは動脈の内皮細胞にのみ補体が沈着していた。抗ラットIgM免疫染色では、グループAでは動脈の内皮細胞にのみIgMの沈着を認めたが、グループBですべての血管の内皮細胞にIgMの強い沈着を認めた。この分布の違

いは動物の種による違いの他に補体の活性化経路の違いによるものと考えられる。TUNEL染色ではグループAのみで陽性細胞を認め、陽性細胞は内皮細胞が2.0%、心筋細胞が0.5%であった。透過型電子顕微鏡にてグループAでは、核および細胞質の分断像を示す細胞や、クロマチン凝集を示す内皮細胞の核を認め、アポトーシスが生じていると考えられる。毛細血管内にはグループA、Bともに血小板の凝集を認めた。グループA、Bでは毛細血管壁の菲薄化、電子密度の増加、飲小胞の減少を認めた。この所見は血小板が付着している部分でも、付着していない部分でも認められ、抗体、補体により直接、内皮細胞障害が生じている可能性が示唆される。内皮細胞壁の厚さ、飲小胞数について組織計量を行うと、グループAでは内皮細胞壁の厚さ、飲小胞数ともに有意に減少していたが、グループBでは有意差を認めなかった。グループCでは検討項目すべてにおいて正常コントロールと同様であった。今回の実験では虚血再灌流障害の影響はないものと考える。

血栓形成および血管内皮障害は異種移植超急性拒絶心臓における基本的特徴と考える。血管内皮傷害としての毛細血管壁の菲薄化、電子密度の増加、飲小胞の減少、および血管内皮細胞と心筋細胞のアポトーシスの存在がモルモット-ラット心臓移植で明らかになった。異種移植超急性拒絶は、ドナー-レシピエントの組み合わせの違いにより多彩性を示すことが示唆された。

公開発表に際して、副査の北畠教授からはモルモット-ラット心臓移植、ハムスター-感作ラット心臓移植の2つの超急性拒絶モデルの違い、ヒト-ブタ心臓移植との関係、超急性拒絶を回避するための治療、小林教授からは一方は感作して一方は感作しないというモデルを使わざるを得なかったのはなぜか、感作ラットにおいて血清学的に本当に抗体価が上昇していたのか、自然抗体が存在するなら古典経路も活性化されるはずではないか、抗体と補体の染色の分布から補体の活性化経路は言えないのではないか、抗体だけが内皮細胞障害を起こすことはあり得ないのでないか、主査の安田教授からはdiscordantとconcordant異種移植の根本的な違い、異種における遲延型反応は同種における急性拒絶反応と同様と考えてよいか、等の質問があった。申請者は実験結果、文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。一部、不十分な回答であった点は、後に個別に面談し回答した。

副査の阿部教授には別日審査を頂き、教授から心臓停止は血行遮断によるものではないか、血漿のものはどこからか等質問があった。申請者は明快に回答した。

本研究は、超急性拒絶における新たな組織学的所見、アポトーシスの関与を明らかにし、異種移植のメカニズム解明、治療に寄与するものであり、審査員一同はこれらの結果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。