

論文の内容の要旨

論文題目：同種凍結保存気管移植の基礎的研究と
その臨床応用のための組織バンク活動

指導教官：高本眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻（呼吸器外科）

氏名 村川 知弘

【背景】

代用気管の候補として同種凍結保存気管組織が注目されている。現在同種凍結保存気管移植がイヌ、ラットなどの様々な動物モデルで試みられており、これまでの結果からは同種凍結保存気管移植の臨床応用は可能と思われる。しかしながら、同種凍結保存心臓弁移植の長期予後などから移植片拒絶は凍結保存組織においても免れえないことが判明しつつあり、同種凍結保存気管移植においても同様な問題が懸念される。また、欧米では凍結保存技術の開発・進歩ならびに体系的な **banking system** の確立が相まって、同種凍結保存組織の臨床使用が広く普及するにいたっているのに対し、本邦では体系的な組織バンクの確立が欧米に比べ大きく遅れをとっているが現状である。

【目的】

同種凍結保存気管移植の臨床応用を目指すには、基礎的研究をすすめると同時に組織バンクを確立・普及していく社会医療的活動も重要な要素であると考えられる。以下、下記の 3section に分けて報告し、同種凍結保存気管移植の臨床応用が可能かあるいは組織バンクを本邦で設立・運営しうるかを検討した。

- 1: 日本猿を実験モデルとした同種凍結保存気管移植実験：臨床応用に向けた **feasibility study**.
- 2: 凍結保存が組織構成要素である線維芽細胞の表面抗原提示に及ぼす影響に関する実験.
- 3: 同種凍結保存気管バンキングシステム確立のための活動.

1: 日本猿を実験モデルとした同種凍結保存気管移植実験：臨床応用に向けた **feasibility study**.

本実験では解剖学的、免疫学的によりヒトに近縁と考えられる猿をモデルとして同種凍結保存気管移植が臨床応用可能か否かを検討した。

【方法 1】日本猿成獣に対し胸骨正中切開下に気管移植を施行した。Recipient 気管膜様部を温存し気管非膜様部を 5 軟骨輪長切除、同部位に膜様部を切除した Donor 気管をパッチ状に移植した。有茎大網皮弁被覆や免疫抑制剤投与は施さなかった。Donor を犠牲死させた後、気管を抗生剤加培養液中で 24 時間処理、その後 20% fetal bovine serum+10% dimethylsulfoxide 加 RPMI 1640 medium 中に浸漬、プログラムフリーザーにて -80°C まで緩徐凍結、液体窒素気相中にて凍結保存した (9-12 ヶ月)。凍結保存気管は移植直前に温浴槽中にて急速解凍し移植に使用した [cryopreserved allograft 群 / n=3]。コントロールとして新鮮気管移植 [control A 群: 同種抗原性の影響を観察する / n=2]、急速凍結気管移植 [control B 群: 移植組織の viability の影響を観察する / n=1] を施行した。内視鏡的変化を経時的に観察するとともに、

cryopreserved allograft 群の 3 頭を術後 1, 6, 12 ヶ月で, コントロール群の 3 頭を術後 3 ヶ月で犠牲死させ, 組織学的変化を光学/電子顕微鏡的に検討. 免疫染色による検討も施行した.

【結果 1】全例耐術. cryopreserved allograft 群では長期生存例を含め全例良好な気管の開存が確認されたのに対し, コントロール群では全例術後 3 ヶ月までに高度の気管狭窄を来した. cryopreserved allograft 群では良好な軟骨組織構造の保持と気道上皮の lining が観察された. それに対し, control A 群では気道粘膜下に高度のリンパ球浸潤が観察され, 浸潤リンパ球は CD3 強陽性であった. また control B 群では気管軟骨構造の破壊や高度な線維化が観察された. 解凍直後の cryopreserved allograft では高度の気道上皮の脱落とそれに伴う MHC-class II の発現減弱が認められた.

【結論 1】日本猿モデルにおいても同種凍結保存気管移植は可能であった. また凍結保存によって同種抗原性の減弱が期待できること, 組織の viability を良好に維持するためにプログラムフリーズ法が重要であることが再確認できたものと考えられた.

2: 凍結保存が組織構成要素である線維芽細胞の表面抗原提示に及ぼす影響に関する実験.

凍結保存により気道上皮細胞株においては HLA-class II の発現が抑制されるのに対し, 血管内皮細胞では逆に HLA-class II の発現が増強されることが報告されている. 本実験では線維芽細胞に着目し凍結保存の影響を検討した.

【対象と方法 2】肺手術摘出標本(n=6)の健常部から trypsin-EDTA による酵素分解で線維芽細胞を遊離し 15% fetal bovine serum 加 RPMI 1640 中で 4-5 継代培養の後, 一部は継代培養し, 他は 20% fetal bovine serum+10% dimethylsulfoxide 加 Medium199 中でプログラムフリーザーにて -80°C まで凍結し液体窒素気相中で保存した. 凍結保存した細胞は 1, 4, 24 週間後に 37°C 温浴槽中で急速解凍し実験に使用した. 継代培養細胞(Fresh; F 群)と凍結保存細胞(cryopreservation; C 群)に対しそれぞれ interferon- γ (100ng/ml)非添加(-)と添加(+))した計 8 群(F-群, F+群, C1W-群, C1W+群, C4W-群, C4W+群, C24W-群, C24W+群)を 48 時間培養後, HLA-class I, HLA-class II, ICAM-1 の各モノクローナル抗体を用いて, それぞれの発現につき flow cytometry にて解析した. また, colorimetric MTT assay 法にて継代培養線維芽細胞と凍結保存線維芽細胞の proliferation index (PI), および, リンパ球との混合培養による stimulation index (SI)測定を行った. データーは 1-way あるいは 2-way analysis of variance (ANOVA)と Fisher's post hoc multiple comparison technique にて比較検討した.

【結果 2】凍結保存による PI, SI の変化は認められなかった. IFN- γ 添加によって線維芽細胞の HLA-class I, HLA-class II, ICAM-1 の発現は有意に増強したが, 凍結保存による発現への影響は認められなかった.

結果 2

Cell surface antigens	
HLA-class I	Constitutive に発現. IFN- γ 添加により発現増強. 発現度への凍結保存の影響なし.
HLA-class II	非刺激下では発現認められず. IFN- γ 添加により発現. 発現度への凍結保存の影響なし.
ICAM-1	Constitutive に発現. IFN- γ 添加により発現増強. 発現度への凍結保存の影響なし.
Proliferation index	凍結保存の影響なく, 長期凍結保存後も増殖能は良好に維持されている.
Stimulation index	SI は低値. 凍結保存による SI 値の変動は認められない.

【結論 2】線維芽細胞の PI は良好に保たれており, 組織の viability 保持に凍結保存は寄与していると考えられた. その一方で凍結保存による線維芽細胞表面抗原提示低下は認められ

ず、線維芽細胞が移植片拒絶に関与する可能性が示唆された。

3: 同種凍結保存気管バンクシステム確立のための活動。

東京大学医学部倫理委員会による承認のもとに、1998年凍結保存ヒト組織の採取・保存・分配使用を目的とした7つの教室からなる東京大学組織バンクが発足し、心臓弁・血管・気管組織の採取・保存・分配を中心に現在活動を続けている。これまでの活動状況を検討した。

【対象と方法 3】首都圏にて得られたドナー情報をもとに、組織ドナー適応基準を充たし、かつ、移植コーディネーターによる十分な **informed consent** の後に遺族から組織提供承諾書が得られた場合に組織摘出を施行した。提供された組織は抗生剤処理後凍結保存用バッグ中に **double package** した後プログラムフリーザーにて-80℃まで凍結、液体窒素気相中で保存した。凍結保存組織は移植手術の際に解凍して使用した。

【結果 3】2001年6月末日までの時点で、首都圏を中心とした28施設35例より計208個の組織提供があった。その内訳は心臓弁組織61、血管組織126、気管組織21であった。組織提供者は男性23名、女性12名からなり、それぞれの年齢分布は男性16-59歳（平均39.3歳）、女性9-55歳（平均28.8歳）であった。摘出組織の温阻血時間分布は、心臓弁・血管組織では123-710分（平均287分）、気管組織では172-745分（平均310分）であった。抗生剤処理後細菌陽性につき絶対的使用不可と判断され **discard** された組織は208組織中17組織（8.2%）であった。31症例に対して組織移植手術が施行されたが全例心臓弁・血管組織の移植であり、気管組織移植は現時点までは施行されていない。

【結論 3】多組織バンク活動によって心臓弁・血管組織に加え気管組織の凍結保存バンクが可能であり組織移植の臨床応用を行えた。

【結語】

これまで報告されてきた動物実験レベルでの同種凍結保存気管移植は、解剖学的、免疫学的によりヒトに近縁と考えられる霊長類においても可能であり、また凍結保存気管組織では凍結保存の良い意味での **side effect** として **allogenicity** が現弱する可能性が示されたと考えられる。しかしながら、凍結保存組織における組織の **allogenicity** に線維芽細胞が関与しており、凍結気管組織移植においても長期的には組織片拒絶を免れえない可能性が本実験から示唆されたものと思われる。また、同種凍結保存気管移植を実験レベルで留まること無く臨床レベルで施行していくために必要な気管組織の凍結バンクが現在の社会的な枠組みのなかでも可能であることが確認できたものと考えられる。