

## 論文の内容の要旨

論文題目： 凍結保存同種心臓弁・血管組織の抗原性と  
抗感染性に関する臨床的および基礎的検討

指導教員：高本 眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科・平成14年4月1日 入学

医学博士課程外科学専攻 齋藤 綾

### はじめに

同種心臓弁・血管組織（以降ホモグラフト）とは、心臓死・脳死ドナーより摘出され特殊な方法にて凍結保存された組織を指し、代用弁・血管として組織移植に用いられる。生体材料であるホモグラフトは、長期の抗凝固療法が不要・良好な血行動態が得られる・感染性心疾患に対する手術成績も良好であることから、機械弁や異種生体弁と並んで代用弁としての位置付けが確立した。

日本におけるホモグラフトの歴史はまだ浅く、臨床成績の報告は少ない。本論文では、東大組織バンクより提供されたホモグラフトの臨床成績、品質管理、ホモグラフトの特性（抗感染性、抗原性）について検討することを目的とした。

### 第一章：感染性心内膜炎に対するホモグラフト使用経験

#### 一当科における成績および諸外国報告との比較

背景：感染性心内膜炎、特に人工弁感染は未だに難治性心疾患であり、外科治療に際

する周術期死亡例は2-3割、中期生存率は5割前後といわれる。本章では当施設での感染性心内膜炎に対するホモグラフト使用における早期・中期成績について検討した。

対象：対象は1998年12月-2005年5月の間に自己弁感染性心内膜炎（NVE）、人工弁感染症（PVE）に対し大動脈基部置換術を施行した30例。男性25例、女性5例、年齢16~73歳（平均51.3歳）。殆どがNYHAⅡ度以上の心不全症状を呈し、抗生剤治療に抵抗性を示した。26例にて術前から原因菌が同定され *Staphylococcus spp.* が最多であった。30例中29例に弁輪部膿瘍を認め、PVE症例22例のうち17例では中等度-高度な弁輪破壊を伴った。

結果：周術期死亡は5例、在院死亡1例。遠隔期死亡は2例（癌死、心不全死各1例）。感染再燃例は6例、再手術例は6例であった。周術期死亡を含めた術後の1年、5年、82ヶ月の生存率は80、79、70%、再感染回避率は87.2、76.3、76.3%、遠隔期生存例における再手術回避率は85.7、68.5、68.5%であった。

結論：多くの症例は弁輪膿瘍を伴う重症例であったがホモグラフト使用による術後成績は良好であり、本疾患群に対するホモグラフトの有効性・抗感染性が示唆された。

## 第二章：微生物学的観点からみたホモグラフトの安全性

背景：ホモグラフトを介したレシピエントへの細菌伝播の予防や細菌汚染削減による摘出組織の有効利用は、組織移植運営の上で重要な点と考えられる。本章では、当組織バンクにて扱ったホモグラフトの細菌汚染状況・品質管理状況からみた安全性について検討した。

対象および方法：1998-2004年の間に当組織バンクにて68人より提供を受けた565組織を対象とし、摘出時（'procurement'）、抗生剤処理後（'trimming'）、臨床使用（'thawing'）

時に微生物培養検査を行い汚染状況の詳細を検討した。

結果：摘出組織は心臓弁 124、大血管組織 257、末梢血管組織 184 組織。'Procurement'での細菌陽性率は 26.7% (151/565)、'Trimming'では 7.3% (41/565)。抗生剤処理による検出細菌の陰転化率は、86.1% (130/151) であった。検出細菌の多くは *Staphylococcus spp.*、*Enterobacterium spp.* および *Propionibacterium acnes* であった。

207 組織が臨床使用され、8 例にて解凍時に細菌が検出された。8 例のうち 2 例は周術期に死亡したが、検出細菌と死因との間に明らかな因果関係は認めなかった。

結語：東京大学組織バンクにおける細菌汚染率からみたグラフトの安全性は維持できていると考えられた。グラフトの安全性向上の為に、摘出・保存方法管理の更なる努力を続けることが大切であると考えられた。

### 第三章：ホモグラフト抗感染性における動物実験モデルを用いた検討

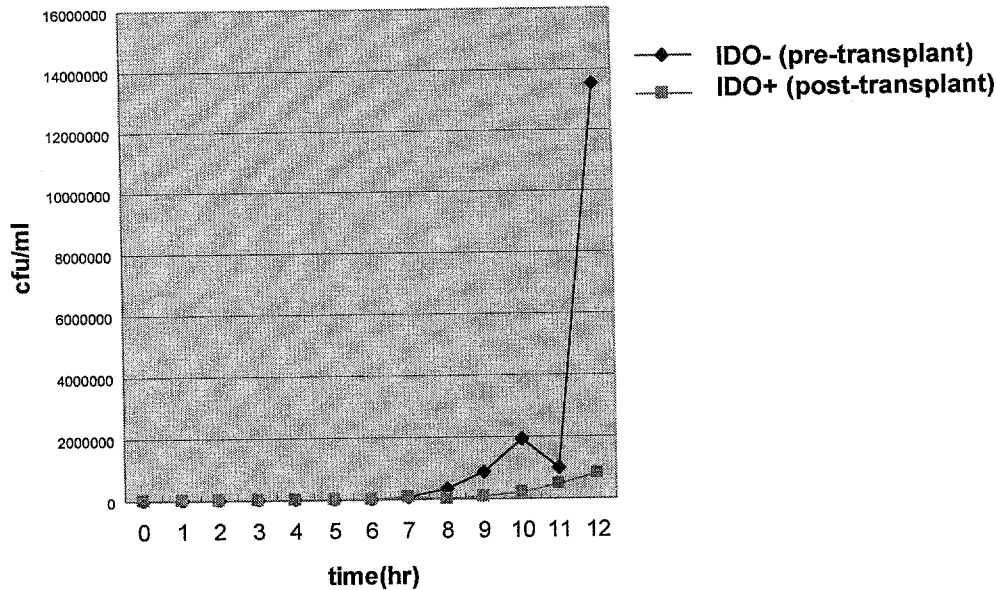
背景：ホモグラフトの生物学的な性質、特に抗感染性を有する可能性やその機構、および凍結保存操作による組織抗原性の修飾については未だに結論が得られていない。本章ではホモグラフトの抗感染性、組織抗原性・移植後の炎症性変化・免疫反応誘導について、動物実験モデルを用い実験的に検討することを目的とした。

#### 3-1：移植後組織の抗感染性に関する評価

方法：ラット大血管組織の皮下同種移植を行った。移植片（以降 post-transplant group）は POD28 に摘出、最小培地・MRSA (N315) と混合培養し cfu/ml を計測した。対照群は移植前組織（no-transplant group）とした。

結果：Post-transplant group における MRSA 増殖は no-transplant group に比べ明らかに

少なく、培養開始 12 時間後での MRSA 増殖は約 20 分の 1 に留まった (Figure 下)。



結語：同種移植の刺激を受けた組織には MRSA の増殖速度を抑える何らかの性質が獲得されていることが予想された。

### 3-2：移植後のレシピエントにおける全身および移植片局所の

#### 免疫応答に関する検討

方法：ラット血管移植モデルを用いた。Lew 胸部下行大動脈を新鮮 (F) または凍結 (CP) グラフトとし、Syngeneic transplantation 群 (Lew-Lew : S) および Allogeneic transplantation 群 (Lew-BN : A) にそれぞれ用いた (SF、SCP、AF、ACP group)。凍結保存方法はヒト心臓弁・血管組織の処理と同様の方法にて行った。グラフトと脾臓は POD7、POD28 に摘出し、移植片は組織病理学検査と real-time PCR による TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  遺伝子発現の検討に、脾臓はリンパ球混合培養 (MLR) に用いた。

結果：MLR の結果から、AF、ACP では移植を受けない BN の脾臓細胞に比べ反応性

が 1.5 倍に増加した。移植片における TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  の発現は、SF、SCP で殆んど認めず、AF、ACP での発現は著明であった。尚、F、CP グラフト間において MLR、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  の結果に差を認めなかった。

結語：同種移植後では、レシピエントの全身性および移植片局所の TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を介した炎症反応が生じていた。また、炎症反応の程度は凍結保存操作によって修飾されなかった。

### 3-3：移植後血管の抗感染性のメカニズムに関する検討

これまでに、ホモグラフトは臨床的、実験的に抗感染性を有することが提示された。また、ホモグラフトの抗原性は凍結保存処理後も保持されていることが示された。

移植免疫応答では、IFN $\gamma$  に反応して Indoleamine-2,3-deoxygenase (IDO) と呼ばれる Tryptophan 代謝酵素が免疫寛容に関わる因子が誘導されることが知られているが、IDO は一方で抗菌活性を持つことで最近注目されている。本章では、同種移植後の血管組織における IDO の誘導の有無を調べ、移植後組織の抗感染性作用と IDO の関連性について検討することを目的とした。

#### A. 移植後組織における IDO の発現に関する検討

方法：3-2 と同様のラット血管移植モデルおよび real-time PCR 法を用い、POD7、POD28 に摘出した移植片における IDO の遺伝子・蛋白発現を調べた。組織内の酵素活性は、移植片を培養液に浸透させ、Trp および IDO 阻害剤である 1-Methyl-L tryptophan 添加後の上澄み液中に漏出する血管内成分を、HPLC 法にて測定した。

結果：PCR の結果、AF、ACP group にて IDO 遺伝子の発現を認め、免疫組織化学染色により血管の外膜側の炎症細胞浸潤が高度な部分に一致して染色された。また、

HPLC の結果より、IDO の酵素活性は維持され、1-MT による阻害が可能であった。

まとめ：同種移植後組織では、抗感染性関与因子と考えられる IDO の遺伝子レベル、組織レベルでの発現および酵素活性の維持が確認された。

## B. IDO 阻害実験

一般的に IDO の抗菌作用は Trp 枯渇および Trp 代謝産物の関与が考えられている。本章では同種移植後の組織内に発現する IDO の MRSA 増殖への関与について、上記 2 点につき検討した。

方法：3-1 と同様の MRSA 増殖実験を行った。Trp 枯渇の系として、培地の Trp 含有量に濃度勾配をつけ検討し、Trp 代謝産物の系では 1-MT を用いた。同時に、Trp および代謝産物（Tryptophan、Kynurenine、3-Hydroxy-kynurenine、Anthranilic acid、Quinolinic acid、1-methyl-L tryptophan）の MIC を計測した。

結果：Trp 枯渇の系では、Trp(-)の培地で MRSA 増殖能が最も抑制され、Trp 添加により増殖能は回復した。IDO 阻害剤の系では、1-MT の添加により MRSA 増殖抑制効果が部分的に解除された。MIC の結果から、3-Hydroxy-kynurenine に MRSA に対する抗菌活性を認めた。

結語：同種移植後組織では IFN $\gamma$  を介した免疫応答を認め、IFN $\gamma$  に反応して IDO が誘導された。IDO の作用による Trp の枯渇および Trp 代謝産物が組織の抗感染性に部分的に関与する可能性が示唆された。また Trp 代謝産物 3-Hydroxy-kynurenine に抗菌作用が認められた。

## 第 4 章 まとめ

今回の検討より、同種移植後の血管組織では抗感染性が獲得され、その機構に

IDO が部分的に関与することが示された。この結果は心臓血管外科領域において重症度の高い疾患である感染性心疾患に対するホモグラフトの有効性を科学的に解明する手がかりになると考えられた。今後の更なる抗感染性の詳細なメカニズムの究明や、様々な分野と連携の上での臨床応用の道が開かれることが期待される。