

家兔心停止ドナー摘出凍結保存気管による同種気管移植に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9443

家兎心停止ドナー摘出凍結保存気管による同種気管移植に関する 実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

和田 真也

臓器を凍結保存すると抗原性が低下し、臓器移植における拒絶反応が抑えられることが報告されている。本研究では家兎を用いて、1ヶ月凍結保存した心停止ドナー摘出同種気管移植を施行し、移植気管の生着過程、心停止後放置時間の限界について検討した。移植気管を心拍動時に摘出した群 (n=15)、心停止後1時間で摘出した群 (n=16)、心停止後2時間で摘出した群 (n=16)、心停止後4時間で摘出した群 (n=12) の4群に分類し、ドナーから摘出した頸部気管10リング長を凍結保存した。1ヶ月後解凍し、5リング長をレシピエントの頸部気管欠損部に移植し、大網で被覆した。術後、免疫抑制剤としてFK506を死亡もしくは犠牲死させるまで連日投与し (長期生存例には6週間)、移植気管の血流回復の推移とあわせて肉眼的、病理組織学的変化について検討を加えた。各群とも1ヶ月凍結保存前後で気管粘膜、気管軟骨、気管腺に変化は認めなかったが、心停止後放置時間が長いほど凍結保存後の気管粘膜固有層内に空洞化が目立った。心拍動時摘出群、心停止後1時間群、心停止後2時間群での血流は4週目までに術前値に回復し、6週目の移植気管においては、肉眼的に生着しており、病理組織学的にも上皮、軟骨は再生されていたが気管腺は消失していた。

心停止後4時間群は他群と比べ2週目までに有意に血流回復が遅延し、1例を除き移植気管の狭窄、融解により4週目までに死亡した。各群とも炎症細胞浸潤は経時的に減少したが、単核球浸潤は6週目でも高度であった。1年以上の長期生存例は心拍動時摘出群2例、心停止後1時間群1例、心停止後2時間群1例認め、いずれも移植気管の開存および生着が確認された。病理組織学的には気管腺の再生を認めたが依然として単核球浸潤が高度であった。以上から心停止後2時間までの摘出気管は1ヶ月凍結保存後の気管移植が可能と考えられた。移植気管の再生、生着には6週間必要と思われるが、1年後でも単核球浸潤を認め、免疫抑制剤の使用量、使用方法、使用期間についてはさらなる検討が必要と思われた。

Key words tracheal allotransplantation, cryopreservation, FK506, rabbit cadaver, safe limit after cardiac arrest

臓器移植法の施行により脳死者からの臓器移植が法的には可能となったが、本邦ではまだまだドナーが不足しているのが現実である。心停止ドナーからの臓器および器官移植が可能であれば、脳死者からの臓器・器官提供が抱える数々のハードルをこえることができる。

気管再建においては、これまで種々の人工材料¹⁾²⁾、生体材料³⁾、自己組織などによる再建が試みられているがいまだ満足な代用材料は得られていない。Belsey⁴⁾による再建気道の条件から考えると宿主気管に最もよく似た条件を備えているのは生体材料の一つである同種気管移植片であり、これによる再建が最も理想的と考えられる。近年、移植臓器を凍結することで抗原性を低下させ、拒絶反応を抑えることで、免疫抑制剤を減量あるいは使用しなくても移植臓器の生着が得られたとの報告が散見される。

本研究では家兎を用いて、1ヶ月凍結保存した心停止ドナー摘出同種気管移植を施行し、移植気管の生着過程、心停止後放置時間の限界について検討した。

対象および方法

I. 実験動物

アイソグラフトとなることを防ぎ、より拒絶反応を明白とするため、体重2.8~3.5kgの日本白色兎雌をドナーとし、同体重のニュージーランド白色兎雌をレシピエントとした。

II. 実験方法

1. ドナー気管の摘出法

ドナー気管の摘出は心拍動群では、硫酸アトロピン (田辺、大阪) 0.5mgを前投薬とし、塩酸ケタミン (三共、東京) 10mg/kgとともに筋肉内注射にて導入し、耳静脈に点滴路を確保した。維持麻酔としてペントバルビタールナトリウム (ダイナボット、大阪) 3mg/kgを適宜静脈内注射し、経鼻にて100%酸素を投与しながら自発呼吸下に頸部気管10リング長を摘出した。心拍動下摘出群以外では上記と同様に麻酔導入したのち、ペントバルビタールナトリウムの大量静注にて心停止させたのち頸部気管10リング長を摘出した。

平成11年8月23日受付, 平成11年9月28日受理

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulphoxide; FBS, fetal bovine serum; HBD, heart beating donor; NHBD, non-heart beating donor

2. レシピエント群の手術法

レシピエントへの気管移植においては、上記の心拍動群と同様の麻酔下で施行した。レシピエント群はドナー気管の摘出時間によって次の4群に分けた。第1群は、心拍動群で、心拍動下のドナー(heart beating donor, HBD) (8羽) より摘出した頸部気管をレシピエント (15羽) に移植した。頸部正中切開によりドナーの頸部気管10リング長を摘出し5リング長ずつに等分し、セファゾリンナトリウムを加えた生食にて十分洗浄した後、RPMI1640培地 (Gibco, Gland Island, USA) に10%ジメチルスルホキシド(dimethyl sulphoxide, DMSO) (Sigma, St. Louis, USA), 10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA) を加えた培養液に浸漬し、 -80°C のディープフリーザー (サンヨー, 東京) で1ヶ月間凍結保存した。1ヶ月後、 37°C の湯槽にて15分で急速解凍した後、レシピエントの頸部気管8リング長切除部にそれぞれ移植し、胸骨前に挙上した大網で移植気管を被覆した。吻合は6-0ポリプロピレン糸 (エチコン, 東京) にて両側断端とも連続の端々吻合を施行した。第2群は、心停止後1時間群で、心停止させたドナー (non-heart beating donor-1hr, NHBD-1hr) (8羽) を室温 (18°C) にて1時間放置した後、頸部気管を採取し、HBD群と同様に凍結保存後、レシピエント (16羽) に移植した。第3群は、心停止後2時間群で、心停止させたドナー (non-heart beating donor-2hr, NHBD-2hr) (8羽) を室温 (18°C) にて2時間放置した後、頸部気管を採取し、HBD群と同様に凍結保存後、レシピエント (16羽) に移植した。第4群は、心停止後4時間群で、心停止させたドナー (non-heart beating donor-4hr, NHBD-4hr) (6

羽) を室温 (18°C) にて4時間放置した後、頸部気管を採取し、HBD群と同様に凍結保存後、レシピエント (12羽) に移植した。

3. レシピエントの術後管理

移植後、抗生剤としてセファゾリンナトリウム (藤沢, 大阪) $30\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を1週間筋肉内投与した。免疫抑制剤としてFK506 (藤沢) $0.15\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を死亡もしくは犠牲死させるまで筋肉内注射した。長期生存例には術後6週間連続投与した。

Ⅲ. 移植気管の血流測定

各群とも術後1週, 2週, 4週, 6週に局所麻酔下に移植気管の中央部を露出し血流測定を行った。測定にはレーザー組織血流計 (アドバンス, 東京) を用い、得られた測定値 ($\text{ml}/\text{分}/100\text{g}$) からレシピエントの健常部気管の組織血流量に対する比率を算出した。

Ⅳ. 肉眼的検討

血流測定の後、犠牲死させ移植気管を健常気管、周囲組織とともに摘出した。死亡例についても同様に摘出し、狭窄度の評価を断面積を測定し術前値との比率で算出した。死亡例についてはその死因を検討し、移植気管の萎縮、融解、潰瘍、肉芽、浮腫、出血の評価については、その程度に応じて、- (なし), + (軽度), ++ (中等度), +++ (高度) の4段階に分類した。

Ⅴ. 病理組織学的検討

摘出した標本は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、垂直方向、水平方向のパラフィン切片を作成しHE染色にて気管粘膜、気管軟骨、気管腺、炎症細胞浸潤、単核球浸潤の評価を行

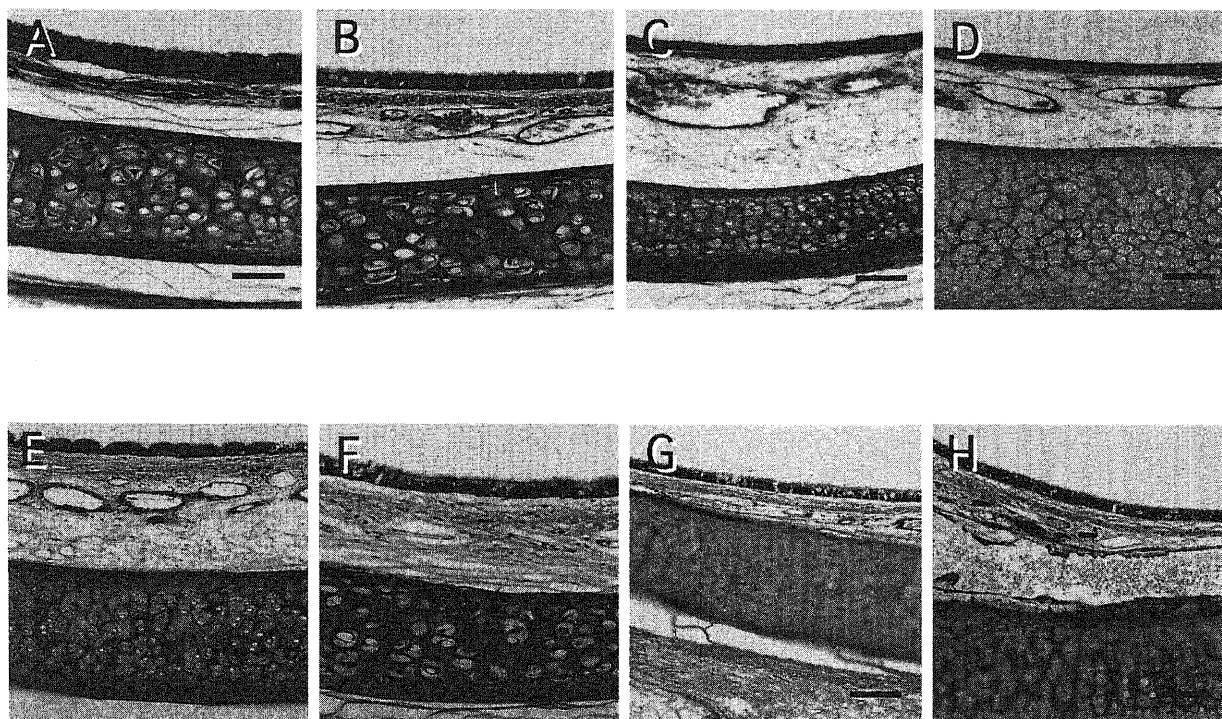


Fig. 1. Histological findings in donor tracheal grafts before and after one month of cryopreservation. Graft in heart beating state was removed from the donor rabbit (A) and cryopreserved for one month (E). Graft removed from the donor rabbit which had been kept at room temperature for one hour after cardiac arrest (B), for two hours (C), for four hours (D) and cryopreserved for one month (F,G,H) at -80°C . The scale bar, $100\ \mu\text{m}$.

Table 1. Macroscopic graft findings and percentage of patency

Group	Rabbit Case No.	Survival (day)	Cause of death	Patency (%)	Macroscopic graft findings					
					Atrophy	Malacia	Ulcer	Granulation	Edema	Bleeding
HBD	1	450	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	2	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	++
	3	24	Malacia	10	-	++	+	-	-	-
	4	28	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	-
	5	15	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	-
	6	25	Wasting	100	-	-	+	-	-	-
	7	43	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	8	42	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	9	401	Sacrificed	100	+	-	-	-	-	-
	10	14	Sacrificed	100	-	-	++	-	-	-
	11	14	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	-
	12	28	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	13	27	Sacrificed	80	-	-	-	+	-	-
	14	8	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	++
	15	7	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	++
NHBD-1hr	1	28	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	-
	2	15	Sacrificed	100	+	-	-	-	+	-
	3	3	Mediastinitis	100	-	-	-	-	-	++
	4	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	+
	5	42	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	6	21	Malacia	10	-	+++	++	-	-	-
	7	400	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	8	28	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	9	43	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	10	341	Wasting	30	-	+++	++	-	+	-
	11	8	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	+
	12	21	Stenosis	10	-	+	++	-	-	-
	13	14	Sacrificed	100	-	-	-	-	+	+
	14	7	Sacrificed	100	-	-	++	-	-	++
	15	29	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	-
	16	15	Sacrificed	100	-	-	-	-	+	-
NHBD-2hr	1	14	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	-
	2	28	Sacrificed	100	+	-	+	-	-	-
	3	7	Sacrificed	100	-	-	++	-	-	++
	4	40	Sacrificed	100	+	-	-	-	-	-
	5	17	Malacia	50	+	+++	++	-	-	-
	6	410	Sacrificed	90	+	-	-	++	-	-
	7	19	Malacia	80	+	++	++	-	+	-
	8	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	+
	9	15	Sacrificed	100	-	-	++	-	-	-
	10	42	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	11	27	Sacrificed	80	-	-	-	+	-	-
	12	28	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	13	14	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	-
	14	9	Malacia	80	+	+++	++	-	-	-
	15	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	++
	16	312	Wasting	100	-	-	-	-	-	-
NHBD-4hr	1	4	Mediastinitis	100	-	-	-	-	+	++
	2	41	Sacrificed	100	-	-	-	-	-	-
	3	25	Malacia	80	-	++	+	-	-	-
	4	15	Sacrificed	100	-	-	++	-	+	-
	5	24	Malacia	20	+	+++	-	-	+	++
	6	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	+	++
	7	7	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	++
	8	14	Sacrificed	100	-	-	++	-	+	+
	9	15	Sacrificed	80	+	-	+++	-	+	-
	10	21	Malacia	50	-	++	++	-	-	-
	11	28	Stenosis	10	++	-	++	-	++	-
	12	8	Sacrificed	100	-	-	+	-	-	++

Percentage of patency of the graft is expressed as a proportion of the cross-sectional area of the most stenotic site in the graft to the third tracheal ring below the cricoid cartilage in the recipient trachea. Each graft was evaluated according to the degree of the damage. -, absent; +, mild; ++, moderate; +++, severe. HBD, heart beating donor; NHBD, non-heart beating donor.

った。それぞれの障害の程度に応じて、0 (なし)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (高度) の4段階に分類し、スコア化した。また各群とも1ヶ月凍結前後にドナーより摘出した気管を10%中性緩衝ホルマリン液で固定しその変化も検討した。

VI. 統計学的検討

測定結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の有意差検定はStudentのt検定にて行い、3群以上の平均値の検定には二元配置分散分析後、Scheffeの多重比較を用い、危険率5%未満を有意差ありとした。

成 績

I. 凍結保存前後の気管の変化

凍結保存前では各群とも心停止後放置時間により肉眼的には組織障害に差を認めず、病理組織学的にも気管粘膜、気管軟骨、気管腺は保たれており、構造変化を認めなかった(図1A, B, C, D)。1ヶ月凍結保存後では各群とも肉眼的には組織障害に差を認めず、病理組織学的には気管粘膜、気管軟骨、気管腺は構造を保っているものの心停止後の経過時間が長いほど気管粘膜固有層内の空洞化が目立った(図1E, F, G, H)。

II. 手術成績(表1)

1. 生存期間と死因

犠牲死以外ではHBD群では移植気管の融解、衰弱で24日目と25日目に1例ずつあった。1年以上の長期生存は2例で病理組織検索のため450日目と401日目に犠牲死させた。NHBD-1hr群では3日目に縦隔炎にて1例を、21日目に移植気管の融解、狭窄により2例を、341日目に衰弱により1例を失った。長期生存例は1例で400日目に犠牲死させた。NHBD-2hr群では9日目、17日目、19日目に移植気管の融解により3例を、312日目に衰弱により1例を失った。長期生存例は1例で410日目に犠牲死させた。NHBD-4hr群は4日目に縦隔炎により1例を、18日目に移植気管の狭窄により1例を、21日目、24日目、25日目に移植気管の融解により3例を失った。長期生存例は認めなかった。

2. 肉眼的移植気管の評価

HBD群で1例(7%)、NHBD-1hr群で3例(19%)、NHBD-2hr群で1例(6%)、NHBD-4hr群で3例(25%)に50%以上の狭窄を認めた。摘出した移植気管を評価してみると、移植後1週では、各群とも吻合部近傍に潰瘍、移植気管全体的に浮腫、出血の所見が目立ち(図2A)、2週では浮腫、出血の所見は軽減しているものの潰瘍の所見が継続していた。4週目になると潰瘍は軽快してきており、一部に肉芽形成を認めた(図2B)。6週目で

は全例、潰瘍、肉芽、浮腫、出血は認めず、肉眼的には生着していると考えられた(図2C)。長期生存例では、NHBD-2hr群1例で肉芽による軽度狭窄を認めたが、他は狭窄を認めず生着を確認することができた。

III. 血流回復の推移(図3)

HBD群、NHBD-1hr群、NHBD-2hr群では4週目までに移植気管の血流が回復していたが、NHBD-4hr群では1、2週目で他群と比べ有意($p < 0.05$)に血流回復が遅延しており、1例を除き4週までにすべて死亡した。

IV. 病理組織学的移植気管の評価(図4)

粘膜障害については各群とも1、2週で、線毛の消失、円柱上皮の扁平化、部分的欠損を認め、スコアも高値であったが、次第に改善し6週では丈の高い上皮、線毛も確認することができた(図5A)。軟骨障害については各群とも、2週がピークで軟骨細胞数の減少を認めたが、4週から軟骨輪周囲に新生軟骨細胞を認め、修復再生が行われていると考えられた(図5B)。気

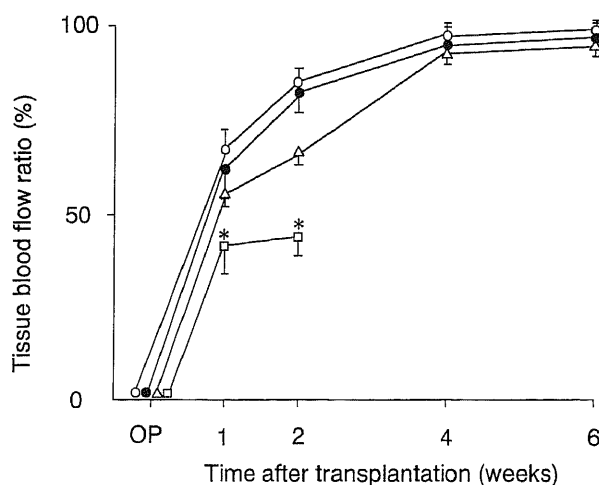


Fig. 3. Ratio curve between blood flow of tracheal allografts and that of recipient trachea after transplantation. Open circles represent the blood flow ratio in group HBD; filled circles represent the blood flow ratio in group NHBD-1hr; triangles represent the blood flow ratio in group NHBD-2hr; and squares represent the blood flow ratio in group NHBD-4hr. Each point represents $\bar{x} \pm SD$. NHBD-4hr group showed significant decrease ($*P < 0.05$) of blood flow compared with other groups.

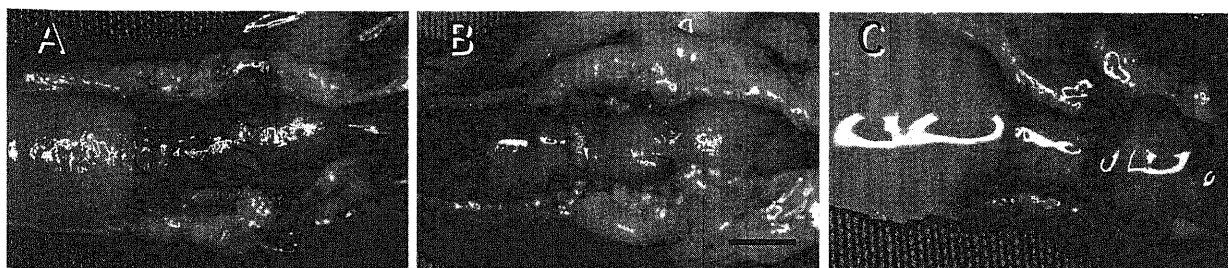


Fig. 2. Macroscopic findings on tracheal allografts at one weeks after operation (A), at four weeks after operation (B), and at six weeks after operation (C) in group NHBD-2hr. The scale bar, 1cm.

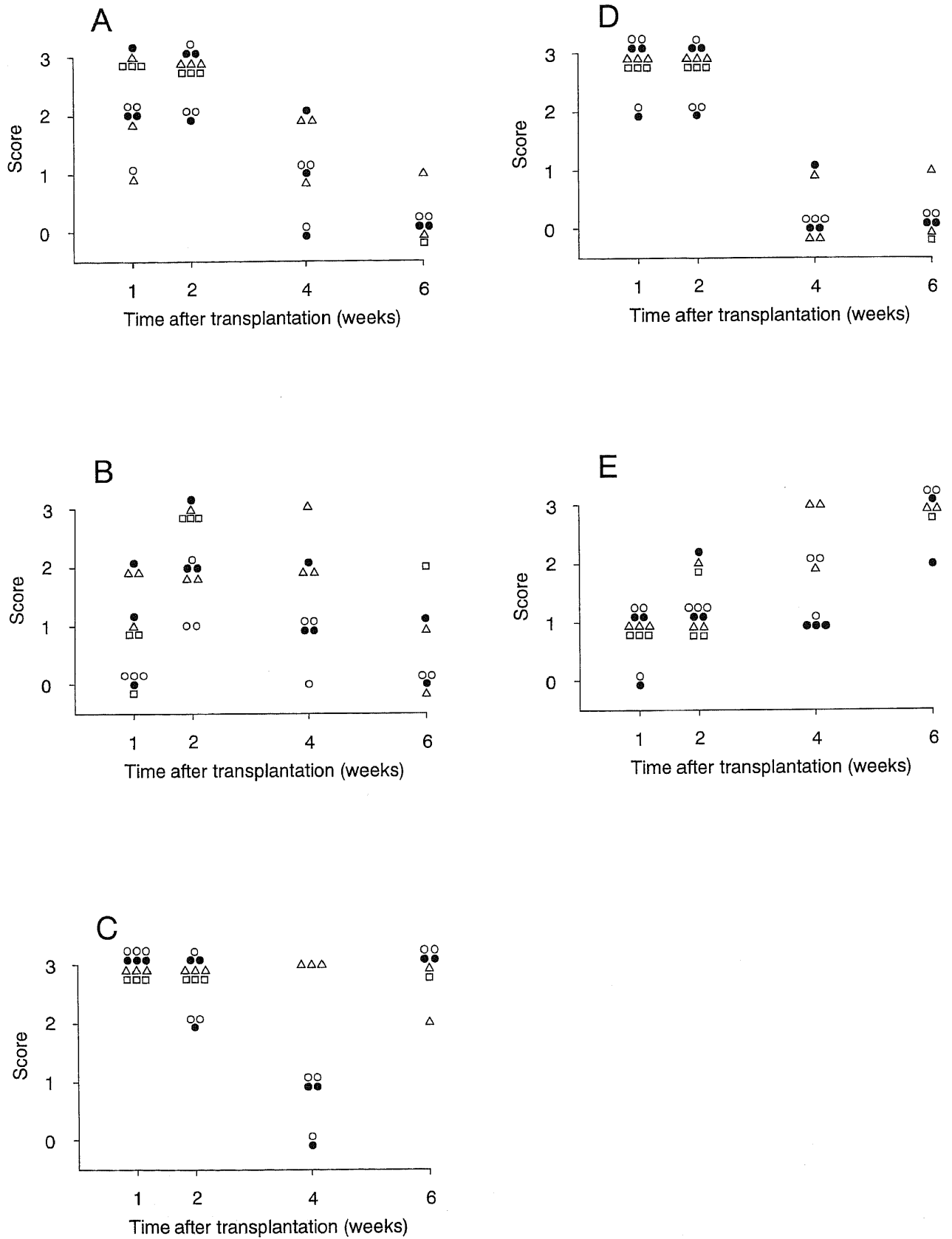


Fig. 4. Graft scores after transplantation. Open circles represent the score in group HBD; filled circles represent the score in group NHBD-1hr; triangles represent the score in group NHBD-2hr; and squares represent the score in group NHBD-4hr. (A) Damage to tracheal epithelium (B) Damage to tracheal cartilage (C) Damage to tracheal glands (D) Infiltration by inflammatory cells (E) Infiltration by mononuclear cells.



Fig. 5. Histological findings in allograft epithelium at six weeks after operation (A), cartilage at four weeks after operation (B), and loose connective tissue at six weeks after operation (C) in group NHBD-2hr. An arrow shows the anastomotic site. Graft was restored with ciliated epithelium and cartilage but no tracheal glands at six weeks after operation. The scale bar, 100 μ m.

Table 2. Comparison of histological score at 6 weeks and 1 year after tracheal allotransplantation

Histological findings	6 weeks	1 year
Damage to epithelium	0.14 \pm 0.14	0 \pm 0
Damage to cartilage	0.57 \pm 0.30	0.75 \pm 0.25
Damage to tracheal gland	2.90 \pm 0.14	0.25 \pm 0.25 *
Infiltration by inflammatory cells	0.14 \pm 0.14	0 \pm 0
Infiltration by mononuclear cells	2.90 \pm 0.14	2.0 \pm 0.41

Each value represents $\bar{x}\pm$ SD.

*P<0.05, compared to histological score at 6 weeks after tracheal allotransplantation by Student-t test.

管腺障害については、HBD群、NHBD-1hr群で、4週目に再生傾向を認めたが、6週目で再消失していた。NHBD-2hr群では再生を認めなかった(図5C)。気管腺が最も単核球浸潤による障害を受けやすいことが示唆された。炎症細胞浸潤は、各群とも1、2週で高度で、経時的に減少していた。単核球浸潤は、経時的に増加していた。移植後6週と長期生存例の平均スコアを比較してみると、粘膜障害、軟骨障害、炎症細胞浸潤に関しては、差をみとめなかったが、気管腺障害についてはスコアが有意に改善しており(p<0.05)、単核球浸潤については改善してはいるものの1年後でも高値であった(表2)。

考 察

近年、臓器を凍結することで抗原性が低下することが皮膚、血管、神経を用いた実験で証明されている^{9) 10)}。Lupinettiら⁹⁾は、心臓弁を凍結保存すると、心臓弁内皮が脱落し、これによる抗原性の低下を指摘している。気管においては気管上皮が抗原性に強く関与しており、凍結保存することで気管上皮が脱落し、抗原性が低下するのではないかと報告もみられる⁹⁾。気管軟骨については、もともと抗原性が低く¹⁰⁾、凍結保存後も機能が保たれることが報告されている¹¹⁾。現在のところ凍結保存が可能な臓器として心臓弁、軟骨などが知られているが、気管においても動物実験において心拍動下にドナーから摘出し、凍結保存後にレシピエントに移植し、長期生存が得られたと報告されている^{9) 11) 12)}。心拍動下摘出気管の場合、9ヶ月凍結保存しても生着したとの報告もある⁹⁾。しかし心停止後に凍結保存し、同種気管移植を試みた報告はなく、心停止後の放置時間の限界

については明らかではなかった。本研究では心停止となってから気管を摘出し凍結保存するまでに要する時間により生着に影響を与えるか否かについて家兎を用いて検討した。

心停止ドナーからの移植可能な臓器としては、角膜、腎臓、最近では肺、肝臓なども研究されているが、その保存期間は腎臓で24時間、肝臓で48時間、肺では数時間といわれている^{13) 14)}。これらの臓器に関する凍結保存についての報告例はなく、凍結保存が可能な臓器は、構造が単純な器官に限られている。本研究では比較的単純構造を有する気管について検討を行った。

広範囲気管切除後の気道再建として、これまで人工材料を利用した人工気管や自家組織を用いた代用気管が試みられてきた。Neville¹⁵⁾や桂型²⁰⁾のような小孔穴のない人工気管では栄養血管を有する支持組織が欠損しているため気管上皮の再生はまったく期待できない。Miyamotoら²¹⁾によるコラーゲンプラスチック構造のメッシュを用いた人工気管では、術後3~4週で上皮が再生したとする成績が報告されているが、小川ら²²⁾によるリング付きゴアテックスを用いた人工気管では術後80日でもほとんど上皮再生を認めなかったと報告している。森²³⁾によるマーレックスメッシュを用いた人工気管では上皮の内面への再生は不十分で吻合部より2cmにとどまったとしている。大西ら²⁴⁾は膜様部欠損をエクспанデットポリテトラフルオロエチレンで修復したが、上皮伸展は1ヶ月に3~5mmであったと報告している。自家組織による代用気管についてみても、三浦ら²⁵⁾の有茎肋間筋弁では1ヶ月で線毛上皮が再生したが、関屋ら²⁶⁾の自家大動脈を用いた実験では線毛が全体を覆うのに6ヶ月要したと報告している。このように長期間臨床的に十分耐えうる人工気管は現在までのところ存在しない。物理的、生理学的には同種気管移植片が最も理想的と考えられ、各施設で研究が進められているが^{27) 28)}、その臨床応用へ向けては、多くの問題が残されている。

凍結保存液としてはRPMI1640培地またはDulbecco培地を修正したEagle培地に10% DMSOを加えた液が主に使用されており、各施設ごとに種々の成分を加え研究している^{30) 31)}。保存液は必ずしも必要ではないという報告もあるが、Yokomiseら¹¹⁾はトレハロースを加えることで気管の長期凍結保存が可能となったと報告している。凍結法は、プログラムフリーザーで-80℃まで凍結する方法が一般的であるが、プログラムフリーザーを使用しない簡易凍結保存法でも良好な成績が報告されている。本研究ではRPMI1640培地に10% DMSO、10%

FBSを加えたものを凍結保存液として利用し、簡易凍結保存法を用いた。凍結保存により気管軟骨に空洞化が生ずることが報告されているが³⁰⁾、本研究では、1ヶ月凍結保後に解凍し保存状態を組織学的に観察すると心停止後放置時間の長い気管ほど気管粘膜固有層に空洞化は認められるものの気管軟骨の空洞化は認めなかった。移植してみるとNHBD-2hr群までは血流が回復し生着したがNHBD-4hr群は生着しなかった。空洞化が目立つほど血管新生が遅れ生着に影響を与える可能性が示唆された。

移植気管の組織血流再開には有茎大網弁による被覆が必要である。Morrisonら³⁵⁾の報告以来、大網には明らかな動脈吻合なしに組織の生育を維持すべく血流再開を促す機能があることが認められ、胸部外科領域でも臍胸、気管支吻合、欧米では肺移植などでその有用性が報告されている^{36)~38)}。気管の場合、血流再開までの期間はMorganら³⁹⁾の実験では最低4日、中西ら⁴⁰⁾も5日かかったと報告している。本研究においてもNHBD-4hr群以外の群では7日で50%以上の血流回復を確認した。術前値まで回復するには4週間必要と考えられた。NHBD-4hr群はグラフトの結合力の低下から血流再開は十分得られなかったと考えられた。

上皮の再生は吻合部から始まることが報告されており⁴¹⁾、ドナー由来の上皮は移植後20日ほどで脱落し、レシピエント由来の上皮に置換されることが証明されている⁴²⁾。本研究でも移植後4週までに線毛上皮の再生を確認した。

臓器移植には免疫を抑制することが不可欠である。免疫抑制にはこれまでアザチオプリン、プレドニゾロン、サイクロスポリンAといった薬剤が使用されてきたが⁴³⁾⁴⁴⁾、1984年に開発されたFK506は、これまでの薬剤と比べ、少量で十分な免疫抑制を発揮することが報告されてきた⁴⁵⁾⁴⁷⁾。術後に免疫抑制剤を使用するにあたっては、少量で、短期間であることが望ましい。凍結保存することで抗原性を低下させることができれば、臓器移植において問題となる拒絶反応を抑えることが可能となる。これにより免疫抑制剤を減量、あるいは使用せず臓器移植を施行できれば免疫抑制剤による副作用を回避することができる。Yokomiseら¹³⁾は免疫抑制剤を使用せずにイスにおける同種気管移植が可能であったと報告している。拒絶反応は急性期と慢性期に分類されるが、本研究では移植後6週までFK506を使用し、以後使用しなかった。急性期の拒絶反応に対しては免疫抑制剤を使用し、慢性期には凍結保存による免疫抑制効果を期待してのことである。1年以上の長期生存が6例中4例あり、死亡した2例も300日以上生存したことから、凍結保存し抗原性を低下させれば、急性期のみ免疫抑制することで拒絶反応を抑えることができると考えられた。病理組織学的には、拒絶反応の指標として単核球浸潤の程度が問題とされるが、移植後6週と1年後の単核球浸潤の程度がほぼ同等であり、拒絶の兆候は認めるものの、組織障害を引き起こす程度ではないと考えられた。さらなる長期生存を得るためには免疫抑制剤の使用量、使用方法、使用期間について検討を要すると考えられた。

以上から気管においては凍結保存により抗原性が低下し、移植してみると特に慢性期にその効果が現れる可能性が高いことが示唆された。またHBD群、NHBD-1hr群、NHBD-2hr群では移植気管の血流回復とともに、肉眼的、病理組織学的に生着を確認することができた。またこれらの群で長期生存が得られたことから、心停止後2時間までの気管は1ヶ月凍結保後に安全に移植が施行できることが示唆された。

結 論

心停止ドナーからの凍結保存同種気管移植を施行し以下の結論を得た。

1. 1ヶ月凍結保存した気管について病理組織学的に検討すると気管粘膜、気管軟骨、気管腺については心停止後放置時間により差を認めなかったが、心停止後放置時間が長いほど気管粘膜固有層内に空洞化をより多く認め生着に影響を与える可能性が示唆された。

2. 心停止後2時間までに凍結保存した移植気管の血流は移植後4週目で術前値まで回復したが、心停止後4時間の移植気管では移植後1, 2週目の血流回復は他群と比較し有意に遅延し生着しなかった。

3. 気管粘膜、気管軟骨についてはその修復に6週を要し、気管腺は1年後には有意に改善を認めた。炎症細胞浸潤は4週目ではほぼ消失したが、単核球浸潤は6週目でも高度で1年後でもわずかに改善を認める程度であった。

4. 凍結保存後の移植気管では免疫抑制剤は、移植後6週までの急性期のみ使用し、慢性期には使用しなくても、障害が現れるほどの拒絶反応は出現しなかった。

以上から心停止後2時間までに凍結された気管は、1ヶ月の凍結保存により抗原性が低下し、安全に移植が施行できると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。終始直接御教示、御助言、御校閲を賜りました金沢大学医学部外科学第一講座村上真也講師、小田誠講師に心からの感謝の意を表します。また、病理学的検討に際し御助言、御指導を賜りました金沢大学医学部病理学第二講座原田憲一講師に心からの感謝の意を表します。併せて本研究に御支援、御協力いただきました外科学第一講座各位に深く感謝致します。また、病理標本作成に御協力頂いた田中洋子氏に深く感謝致します。

なお、本研究の一部は第14回日本呼吸器外科学会総会(1997、金沢)において発表した。

文 献

- 1) Neville WE, Bolanowski PJP, Soltanzadeh H. Prosthetic reconstruction of the trachea and carina. *J Thorac Cardiovasc Surg* 72: 525-538, 1976
- 2) 奥村典仁, 中村達雄, 清水慶彦, 筏 義人, 白木兼人. 吸収性 mesh による気管補填における創傷治癒に関する検討. *人工臓器* 21: 328-333, 1992
- 3) 和田源司. 気管再建に関する実験的研究-生体気管をGraftとした気管再建について-. *日胸外会誌* 28: 48-59, 1980
- 4) Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg* 38: 200-205, 1950
- 5) Friedlaender GE. The antigenicity of preserved allografts. *Transplant Proc* 8: 195-200, 1976
- 6) Hirase Y, Kojima T, Uchida M, Takeishi M. Cryopreserved allogeneic vessel and nerve grafts: hind-limb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg* 8: 437-443, 1992
- 7) Ingham E, Matthews JB, Kearney JN, Gowland G. The effect of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin graft. *Cryobiology* 30: 443-458 1993

- 8) Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106: 912-917, 1993
- 9) Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Long term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111: 930-934, 1996
- 10) Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E, Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 110: 149-154, 1990
- 11) Yokomise H, Inui K, Wada H, Hasegawa S, Ohno N, Hitomi S. Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution. *J Thorac Cardiovasc surg* 110: 382-385, 1995
- 12) Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, Okabayashi K, Shiraishi T, Shirakusa T. Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs. *Ann Thorac Surg* 62: 1480-1484, 1996
- 13) Umemori Y, Date H, Uno K, Aoe M, Ando A, Shimizu N. Improved lung function by urokinase infusion in canine lung transplantation using non-heart-beating donors. *Ann Thorac Surg* 59: 1513-1518 1995
- 14) Scott AB, Nuno FD, Oliver ARB, Michael CM, Jeffrey TC, Scott EL, Kim SS, Joe DB, Vikas IP, Curtis GT, Irving LK. Pulmonary function after non-heart-beating lung donation in a survival model. *Ann Thorac Surg* 60: 38-46, 1995
- 15) Andrea MD, Charles SR, Patrick KG, John JL, Thomas ME. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 13: 741-747, 1994
- 16) Francesca A, Andrea MD, Charles SR, Robert LR, Thomas ME. When does the lung die? II. Ultrastructural evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 13: 748-757, 1994
- 17) Matsumoto N, Sakurai E, Tamaki I, Uchiyama M, Kozaki K, Kozaki M. The effect of machine preservation versus cold storage on the function of kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant* 57: 293-294, 1994
- 18) Furukawa H, Todo S, Oscar I, Adrian C, You MW, Carlo SF, Braian B, John B, Roger D, Thomas ES. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplant* 51: 1000-1004, 1991
- 19) 梅下浩司, 門田守人. 臓器保存の進歩. *日外会誌* 99: 776-780, 1998
- 20) 小鯖 覚, 八木一之, 桑原正喜, 松原義人, 畠中陸郎, 二宮和子, 船津武志, 池田貞雄. 新しい人工気管の開発. *人工臓器* 11: 1162-1165, 1982
- 21) Miyamoto Y, Shimizu Y, Matsunobe S, Kato H, Teramatu T, Okamura S, Hino T, Shibata U. Tracheal reconstruction using Collagen-Plastic composite mesh. *人工臓器* 10: 510-513, 1981
- 22) 小川純一, 金淵一雄, 福田崇典, 井上宏司, 小出司郎策, 川田志明, 正津 晃. リング付きGore-Texを用いた人工気管に関する基礎的研究. *人工臓器* 13: 1284-1286, 1984
- 23) 森 明弘. 気管再建法に関する実験的研究. *日胸外会誌* 29: 74-85, 1981
- 24) 大西 清, 高浜龍彦, 金井福栄, 平石 守, 出月康夫, 松本博志, 浅野献一, 吉竹 毅. E-PTFEパッチによる胸腔内気管粘膜様部欠損の修復. *人工臓器* 15: 306-308, 1986
- 25) 三浦一真, 宇山 正, 原田邦彦, 門田康正. 有茎筋肉弁による気管膜様部再建の実験的研究. *気管支学* 9: 190-197, 1987
- 26) 関屋 亮, 柴田紘一朗, 千代反田晋, 中村都英, 古賀保範. 自家大動脈による気管再建に関する実験的研究. *気管支学* 8: 356-365, 1986
- 27) Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville P. Tracheal allograft replacement. *Eur J Cardio Thorac Surg* 7: 648-652, 1993
- 28) Macchiarini P, Mazmanian GM, Montpreville V, Dulmet E, Fattal M, Lenot B, Chapelier A, Darteville P. Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 1037-1046, 1995
- 29) Lenot B, Macchiarini P, Darteville P. Tracheal transplantation: an experimental technique with revascularization and venous drainage. *Transplant Proceedings* 27: 1684-1685, 1995
- 30) Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K, Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation: canine experiment. *Transplant Proceedings* 28: 1814-1815, 1996
- 31) Meryman HT, Williams RJ, Douglas MJ. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14: 287-302, 1977
- 32) Alan SR, John HC. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377, 1985
- 33) Honadel TE, Killian GJ. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology* 25: 331-337, 1988
- 34) Claud D, Victor FT, Jonathan LF, William JM, Thomas VC, Peter CP, Spencer P. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thorac Surg* 47: 208-212, 1989
- 35) Morrison R. Remarks on some functions of the omentum. *Br Med J* 1: 76-78, 1906
- 36) Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ayabe H, Ferdman A, Cooper JD. Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental wrap. *J Thorac Cardiovasc Surg* 85: 134-139, 1983
- 37) Lina O, Goldberg M, Peter WJ, Ayabe H, Townsend E, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 418-421, 1982
- 38) Young SP, Doo YL, Hyo CP, Ki MB, Sang HC. The role of omentopexy in tracheal transplantation in dogs. *Yonsei Med J* 37: 118-124, 1996
- 39) Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of tottary ischemic bronchial autograft with omental pedicle flap in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 84: 204-210, 1982
- 40) 中西良一, 白日高歩. 大網被覆を併用した気管移植片の治癒過程に関する組織学的検討—自家気管移植片—. *日呼外会*

誌 6: 568-574, 1992

41) Inayama Y, Tomiyama I, Akaike M, Kase M, Nakayama H, Morohoshi T, Matsumoto A, Kanisawa M. Morphologic alterations and cytokinetic studies of tracheal autograft epithelium in rabbits. *Ann Thorac Surg* 60: 952-957, 1995

42) 向田尊洋, 市場晋吾, 青江 基, 山下素弘, 岡部和倫伊達洋至, 安藤陽夫, 清水信義. 犬同種凍結保存気管移植における移植片気管上皮の検討. *日胸外会誌* 45: 964-969, 1997

43) Nakanisi R, Yasumoto K. Minimal dose of cyclosporin A for tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 60: 635-639, 1995

44) Pierre RD, Zi YL, Robert H, Raf S, Louw F. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 728-737, 1995

45) 和田洋巳, 平井 隆, 長谷川誠紀, 乾 健二, 横見瀬裕保, 平田敏樹, 福瀬達郎, 室 幸太郎. イヌ同種肺移植におけるFK506の免疫抑制効果. *今日の移植* 5: 387-391, 1992

46) 赤嶺晋治, 川原克信, 高橋孝郎, 小林誠博, 糸柳則昭, 林田 謙, 富田正雄. イヌ同種肺移植におけるFK506の気管支吻合部創傷治癒に及ぼす影響について. *日胸外会誌* 41: 619-624, 1993

47) Takachi T, Shirakusa T, Shiraiishi T, Okabayasi K, Inutsuka K, Kawahara K, Nakanisi R. Experimental carinal autotransplantation and allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 762-767, 1995

Experimental Study of Cryopreserved Tracheal Allotransplantation from Rabbit Cadavers. Masanari Wada, Department of surgery(1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 526 - 534 (1999)

Key words tracheal allotransplantation, cryopreservation, FK506, rabbit cadaver, safe limit after cardiac arrest

Abstract

Cryopreservation of an organ has been reported to reduce rejection after transplantation. In this study, we investigated the healing process of allografts cryopreserved for one month and the safe limit for use after cardiac arrest in the donor rabbits. Four groups of rabbits were used. In group HBD (heart beating donor, n=15), a ten-ring length of trachea was removed from live donor rabbits, immersed in a preservative solution, and cryopreserved for one month. In the NHBD groups (non-heart beating donor), a ten-ring length of trachea was removed from donor rabbits which had been kept at room temperature for one hour after cardiac arrest (NHBD-1hr, n=16), for 2 hours (NHBD-2hr, n=16), and for 4 hours (NHBD-4hr, n=12). The grafts were thawed and a five-ring length of trachea was allotransplanted into the recipient rabbits and covered with an omentum. All groups were given FK506 daily as an immunosuppressant. This was administered intramuscularly for six weeks after operation or until the rabbit was dead or sacrificed. We examined revascularization, macroscopic findings and histological findings of the allografts. Grafts of all groups showed no histological change for epithelium, cartilage and tracheal gland after cryopreservation for one month, but had more free space in loose connective tissue the longer they were left at room temperature after cardiac arrest. In groups HBD, NHBD-1hr, and NHBD-2hr blood flow on the allografts had returned to the preoperative level at four weeks after operation and the grafts were macroscopically viable at six weeks after operation. Histologically, tracheal epithelium and tracheal cartilage were reconstructed, but the tracheal gland was not seen. In group NHBD-4hr, recovery of the blood flow was slower than in other groups at two weeks after operation, and all group NHBD-4hr rabbits except one died within four weeks of transplantation because of stenosis or malacia of the graft. In all groups, infiltration by inflammatory cells decreased gradually, but infiltration by mononuclear cells increased until six weeks after operation. Two rabbits in group HBD, one rabbit in group NHBD-1hr and one rabbit in group NHBD-2hr survived over one year. Allografts on these were macroscopically viable and had no stenosis. We could see histologically regeneration of tracheal glands, but infiltration by mononuclear cells was still very evident at that time. We conclude that tracheal allografts cryopreserved for one month and removed within two hours of cardiac arrest can be viable. Regeneration of tracheal allografts is thought to require six weeks. However, as infiltration by mononuclear cells was still severe at one year after allotransplantation, further research is required to determine the appropriate quantity of immunosuppressants, best methods of use and the length of time they should be used.