

異種心臓弁移植の研究-3-異種心臓弁移植における細胞性免疫の研究

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/2297/8666

異種心臓弁移植の研究

第三報 異種心臓弁移植における細胞性免疫の研究

金沢大学医学部外科学第一講座(主任: 岩 喬教授)

関 雅 博

(昭和52年2月21日受付)

Hufnagel¹⁾ (1951年)が臨床応用として初めて下行大動脈に人工弁を使用して以来、荒廃した心臓弁に対する外科治療法として弁置換術は多数施行されるようになった。一方、それに使用される人工弁自体もその材質、機構などの点で絶えず改良が加えられ、Starr-Edwardsを代表とするCaged ball valve, Kay-ShileyなどのDisc valve, Björk-ShileyなどのHinged valve等、数多くの種類が考案、使用されてきた。しかし、現在これらの器械的人工弁による弁置換術は、血栓形成、血流、血液成分に及ぼす悪影響、弁開閉に要するエネルギー、弁の物理的破損、磨耗など多くの問題を内包している。

これに対し、上述の人工弁の欠点を矯めるものとして、同種弁、異種弁が登場してきた。この生体組織を利用した生物弁は、Murray²⁾ (1956年)が新鮮同種大動脈弁を大動脈弁疾患患者の下行大動脈へ移植して以来、その素材として同種大動脈弁^{3)~5)}、自己肺動脈弁⁶⁾、自己及び異種大腿筋膜^{7)~9)}、異種心膜¹⁰⁾、異種大動脈弁¹¹⁾、同種硬膜¹²⁾などが利用されてきた。又、それらに対する保存処理法も、フォルマリン固定¹³⁾¹⁴⁾、β-プロピオラクトン処理¹⁵⁾、エチレンオキシド消毒¹⁶⁾、電子線照射による滅菌¹⁷⁾¹⁸⁾、凍結乾燥保存法¹⁹⁾などが用いられてきた²⁰⁾。しかし、同種新鮮弁以外は弁の組織変化に由来する機能不全が早期に生じるため、満足すべき成績を得ることが出来ず^{21)~23)}、これらの処理法は現在放棄されている。

これに対し、近年Carpentier²⁴⁾²⁵⁾らは豚大動脈弁に対して新しく、弁処理法としてグルタルアルデヒドおよびメタ過ヨウ素酸ナトリウムを使用した。さらにHancock²⁶⁾らはこれを改良し、0.2%グルタルアルデヒド単独処理を使用したの優れた製品を作成し、現在まで最長7年の経過をみても充分満足のいく結果を得ている^{26)~28)}。教室では²⁹⁾このグルタルアル

デヒド処理異種心臓弁に着目し、わが国に初めてこれを導入すると共にこの本態に関し、一連の研究を開始した。すなわち、この異種心臓弁が臨床上に好成績を示す真因は、従来の生物弁の知識から考えて、弁機構における物理的強靱性と免疫反応による弁の弱化的不成立にあると考えられる。これに沿って教室の土屋³⁰⁾はグルタルアルデヒド処理豚弁の物理的検査を行ない、その強靱性において現行の処理法として最上のものであることを示した。また体液性免疫反応についても検索を進め、きわめて軽度の免疫感作状態の成立をみたが、臨床例で6カ月から1年で無視できる程度に至ることを見出した³⁰⁾³¹⁾。

一般に、グルタルアルデヒド処理異種生物弁の臨床報告例は多数認められるが、異種弁移植に伴う免疫学的研究はきわめて少ない。著者はこの点に着目し、長期にわたる弁変化の予測を目的として、小動物における実験および臨床例における免疫学的、特に細胞性免疫の検索を行った。

I 実験ならびに検査項目

細胞性免疫検索法としては、種々のものがあるが、著者は特に実験手技が比較的簡便で、感度、信頼度の高い³H-サイミジン取り込み試験³²⁾とマクロファージ遊走阻止試験³³⁾³⁴⁾を用いた。その実験内容は、1)新鮮およびグルタルアルデヒド処理豚弁にて感作したモルモット脾細胞での³H-サイミジン取り込み試験、2)同腹腔細胞でのマクロファージ遊走阻止試験、3)感作モルモットのリンパ節組織学的観察、4) Hancock弁置換患者末梢血リンパ球での³H-サイミジン取り込み試験である。

II 小動物実験

1. 実験材料

1) 感作抗原: 成豚屠殺後2時間以内に採取した大動脈弁尖を下記のごとく各種処理して用いた。

まず新鮮弁感作抗原として、上記豚大動脈弁尖採取

後、ただちに4°C Hanks液にて洗浄し、続いて同液中に2~3時間浸漬して血清成分並びに弁尖中の可溶性蛋白を取り除く。次いで弁尖2gに対し、蒸溜水4mlの割合で加え、高速回転粉碎装置(Polytron: Kinema社製)を用いてホモジネートを作製し、感作抗原とした。

グルタルアルデヒド(以下G-Aと略す)処理弁感作抗原として、上記Hanks液浸漬後の弁尖2gを0.2% G-A(LADD社製)含有磷酸塩緩衝液(pH 7.4)内に入れ、密閉状態で、4°C 1週間以上固定し、続いて上記と同方法にて弁尖ホモジネートを作製し、G-A抗原として用いた。

フィシン処理弁感作抗原としては、Hanks液浸漬後の弁尖2gを、L-システイン50mg/ml含有、1% フィシン液(クエン酸緩衝液: pH5.0 Merk社製)内に浸漬、37°C、2.5時間処理後、1% 亜塩素酸ナトリウム内に24時間静置したものを、上記と同方法によりホモジネートとし、フィシン処理弁抗原として用いた。

次いで、フィシン・G-A処理弁感作抗原として、上記フィシンおよび亜塩素酸ナトリウム処理後、弁尖2gを0.2% G-A含有磷酸塩緩衝液(pH7.4)内にて4°C、1週間以上固定したものを同方法によりホモジネートを作製し、2者処理感作抗原として用いた。

2) 刺激抗原: 上記1)の各種処理をほどこした抗原(ホモジネート)を、12,000回転/分、15分間遠心を2回行い残渣を除いた。その上清の蛋白量測定を、Folin-Loury法³⁵⁾にて行った後、更に0.45μ孔サイズのミリポアフィルターに通過させ無菌化したものを刺激抗原とした。

3) 実験動物: 体重200~300gの成獣、Hartley系モルモット、計34匹を用いた。

2. 実験方法

1) 動物感作: 上記各種処理をほどこした弁尖0.5g相当のホモジネート抗原に等量の Freund Complete adjuvant(Difco社製)を加えてエマルジョンとし、モルモット一群2~4匹宛、左右肩胛下腔、および左右臀部筋肉内に分割注射した。1週1回、計4回、弁尖2.0gにて感作終了とし、最終注射後2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月後に脾臓および前縦隔内リンパ節を採取した。

2) 感作モルモット脾細胞による³H-サイミジン取り込み試験

脾細胞調整: 非感作および感作モルモットの脾臓を無菌的に採取後、RPMI 1640液にて洗浄し、ハサミで細切後RPMI 1640液を加え、細目の金網にて

濾過し、細胞塊を除くため更に4枚のガーゼにて濾過した後に低速遠心(1000回転、5分)した。次いで沈渣にトリス緩衝液³⁶⁾を加え、同様に遠心(1000回転、5分)し、さらにその沈渣をRPMI 1640液で洗浄した後、細胞を牛胎児血清(20%)加培養液(RPMI 1640)に浮遊した。細胞数は一試験管あたり 200×10^4 個とした。

³H-サイミジン取り込み量の計測: これらの脾細胞を浮遊した各試験管に対し、特異的刺激抗原として各種処理弁ホモジネートの高速遠心上清のミリポア濾液を蛋白量0.1, 1, 10, 100μg/mlの割合に添加した。又、非特異的刺激剤として周知の phytohemagglutinin(P.H.A.)に対する反応性をみるために、P.H.A.(P.H.A-P. Difco社製)を0.15, 1.5, 15, 150μg/mlの4段階に添加した。これら各抗原、P.H.A.刺激はいずれも3本ずつ試料を検索し、各培養液量は1mlとした。

次いで、この試料は5%CO₂インキュベーターにて37°C、72時間培養した後、³H-サイミジン(TRK-120)を各試験管あて1μci加え、Poonら³⁷⁾の方法に準じて4時間のDNAへの取り込みの後、以下の測定に移った。すなわち、取り込み終了後の試料を、1500回転、5分間遠心して上清をすて、沈渣に5%トリクロール酢酸(TCA)を加えて処理した。かくてTCA不溶性成分をGlass fiber paper(ホワットマン)に吸着させ乾燥後、シンチレーター液を加えて液体シンチレーションカウンターにてTCA不溶性成分(特にDNA分画)への取り込み量を測定した。

結果は刺激指数(Stimulation Index: S.I.)にて表示した。

$$S.I. = \frac{\text{抗原又はP.H.A.添加時のカウント数}}{\text{抗原又はP.H.A.非添加時のカウント数}}$$

である。

3) モルモット腹腔内遊出細胞によるマクロファージ遊走阻止試験(M.I.T.)

まず、非感作ならびに感作モルモット腹腔内へ10mlの流動パラフィンを注入し、その4日後に80~100mlのHanks液にて腹腔内を洗浄し、遊出細胞を採取する。次いでこの洗浄液を1000回転、5分間低速遠心し、沈渣にトリス緩衝液を加えて再び1000回転、5分間低速遠心で洗浄し、混在する赤血球を除去した。次いでRPMI 1640液で更に沈渣を洗浄後、集められた腹腔内遊走細胞を20%牛胎児血清加培養液(RPMI 1640)中に浮遊した。細胞濃度は 3×10^7 個/ml程度でヘマトクリット管中へパックした時に、反応に充分

少量の細胞層が得られた。すなわち、陰圧を用いて、一端を盲端としてヘマトクリット管にこの細胞浮遊液をつめ、800~900回転、5分間低速遠心した。次いでこの管を上清と細胞層との境で切断し、小プラスチックシャーレの底にシリコングラスを用いて細胞のつまった管を固定した。その後、特異的刺激抗原濃度1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 含有の各培養液(20%牛胎児血清加 RPMI 1640 液) 1mlをシャーレに加え、5%CO₂, 37°Cにて24時間培養後、細胞の遊走状態を観察、測定した。

測定方法は、これらの毛細管口より、円形に細胞が遊走しているのを顕微鏡を用いて撮影した後、方眼紙を用いてその面積を算出し、Migration Index (M.I.) にて表示した。

$$M.I. = \frac{\text{抗原添加時の遊走面積}}{\text{抗原非添加時の遊走面積}}$$

である。

4) モルモットリンパ節の組織変化の形態学的検索

前述の様に感作したモルモットの前後隔内リンパ節を摘出し、組織学的検索を加えた。

3. 実験成績

1) 感作モルモット脾細胞における³H-サイミジン取り込み

(i) まず予備実験として、取り込みの至適条件を求めた。すなわち、無感作状態のモルモット脾細胞を、100, 200, 300 $\times 10^4$ 個/mlの各濃度にわけ、3日間培養し非特異的 P.H.A. (15 $\mu\text{g/ml}$) 刺激時のとり込みをみるとそれぞれ、984.2 ± 47.8 c.p.m. 1184.1 ± 188.5 c.p.m. 1956.6 ± 199.5 c.p.m. のカウント数であった。1000程度のカウント数があれば、測定誤差3%を考慮しても当実験に充分使用できると考えて、これより培養細胞数は200 $\times 10^4$ /mlと決定した。

次いで、この細胞数において培養期間を3日、4日、5日で比較したところ、それぞれ1184.1 ± 188.5 , 648.3 ± 88.3 , 909.1 ± 107.2 であり、カウント数が最も多い3日培養が至適と考えられた。

更に上記の2条件を同一として、³H-サイミジン取り込み期間を4時間と24時間とで比較したところ、4時間で1184.1 ± 188.1 , 24時間で3201.0 ± 346.7 であり、4時間取り込みにても十分にこの実験の目的は果たせることが判明し、以下の実験では4時間培養とした。

(ii) 新鮮弁抗原感作群とグルタールアルデヒド(G-A) 処理弁抗原感作群における経時的観察

両感作群(各々2~4匹宛)において感作後2週目、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月時において脾細胞の³H-サイミジン取り込み率を測定した。(表1)まず、コントロールとしての非感作群の取り込み率は新鮮弁抗原刺激時、抗原濃度0.1 $\mu\text{g/ml}$ で0.95 ± 0.13 , 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で1.14 ± 0.17 , 10 $\mu\text{g/ml}$ で1.10 ± 0.16 , 100 $\mu\text{g/ml}$ で0.63 ± 0.04 のS.I.を示した。G-A処理弁抗原刺激時の取り込み率は、S.I.よりみて0.1 $\mu\text{g/ml}$ で0.89 ± 0.10 , 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で0.92 ± 0.19 , 10 $\mu\text{g/ml}$ で1.03 ± 0.16 , 100 $\mu\text{g/ml}$ で0.97 ± 0.16 であった。非特異的 P.H.A. 刺激時には、P.H.A. 濃度0.15 $\mu\text{g/ml}$ で1.43 ± 0.24 , 1.5 $\mu\text{g/ml}$ で1.12 ± 0.22 , 15 $\mu\text{g/ml}$ で0.94 ± 0.15 , 150 $\mu\text{g/ml}$ で0.53 ± 0.10 とS.I.は濃度に比例して減少した。従って、これらの値をコントロールとして以下に述べる感作群の値との比較に用いた。

a) まず特異抗原に対する反応では、新鮮弁感作およびG-A処理弁抗原感作両群共に濃度1.0および10 $\mu\text{g/ml}$ において最もよく反応する傾向にあった。刺激抗原濃度1.0 $\mu\text{g/ml}$ では、新鮮弁感作群2週後: 1.40 ± 0.21 , 1カ月: 1.41 ± 0.20 , 2カ月: 1.57 ± 0.24 , 3カ月: 0.90 ± 0.19 , 6カ月: 1.30 ± 0.22 , G-A処理弁感作群では2週後: 0.94 ± 0.04 , 1カ月: 1.24 ± 0.12 , 2カ月: 1.09 ± 0.07 , 3カ月: 0.97 ± 0.17 , 6カ月: 1.04 ± 0.05 のS.I.であった。(図1)

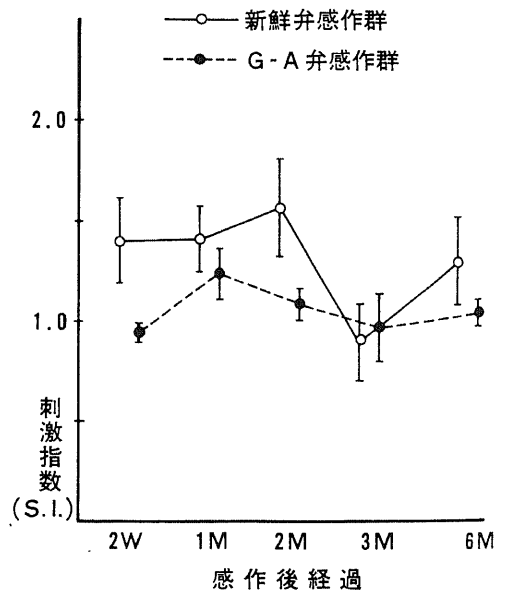


図1 特異抗原刺激に対する反応 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)

表 1 モルモット脾細胞の特異的抗原又は P. H. A. 刺激による³H-サイミジン取り込み率

感作後経過	2 W		1 M		2 M		3 M		6 M	
	感作抗原		感作抗原		感作抗原		感作抗原		感作抗原	
	Fresh	G-A	Fresh	G-A	Fresh	G-A	Fresh	G-A	Fresh	G-A
Control										
Fresh										
0.1	1.37 ± 0.21	1.09 ± 0.18	1.14 ± 0.16	1.13 ± 0.08	1.42 ± 0.08	1.13 ± 0.16	0.83 ± 0.08	0.99 ± 0.19	1.30 ± 0.10	
1	1.40 ± 0.21	1.01 ± 0.05	1.41 ± 0.20	1.26 ± 0.11	1.57 ± 0.24	1.19 ± 0.12	0.90 ± 0.19	1.03 ± 0.20	1.30 ± 0.22	
10	1.85 ± 0.42	1.16 ± 0.14	1.36 ± 0.26	1.00 ± 0.15	1.81 ± 0.33	1.05 ± 0.05	0.88 ± 0.16	1.03 ± 0.19	1.34 ± 0.10	
100	0.63 ± 0.04	0.99 ± 0.08	1.24 ± 0.08	0.62 ± 0.09	1.70 ± 0.31	0.65 ± 0.05	0.66 ± 0.13	1.26 ± 0.05	---	
G-A										
0.1	1.19 ± 0.15	1.05 ± 0.12	1.20 ± 0.06	1.17 ± 0.17	1.62 ± 0.15	1.10 ± 0.06	0.93 ± 0.14	0.84 ± 0.04	1.15 ± 0.02	
1	1.46 ± 0.34	0.94 ± 0.04	1.39 ± 0.11	1.24 ± 0.12	1.76 ± 0.21	1.09 ± 0.07	0.97 ± 0.19	0.97 ± 0.17	1.04 ± 0.05	
10	1.41 ± 0.29	0.79 ± 0.07	1.33 ± 0.30	0.78 ± 0.05	1.59 ± 0.18	1.06 ± 0.04	0.83 ± 0.08	1.18 ± 0.29	0.70 ± 0.09	
100	0.97 ± 0.16	0.65 ± 0.02	1.61 ± 0.11	0.47 ± 0.05	1.33 ± 0.13	0.70 ± 0.04	0.65 ± 0.07	1.21 ± 0.21	---	
P. H. A.										
0.15	1.43 ± 0.24	0.92 ± 0.40	1.92 ± 0.07	1.03 ± 0.24	1.41 ± 0.08	1.48 ± 0.06	0.77 ± 0.09	1.21 ± 0.21	1.07 ± 0.26	1.10 ± 0.25
1.5	1.12 ± 0.22	5.80 ± 1.84	5.54 ± 0.74	1.54 ± 0.24	2.94 ± 0.51	1.25 ± 0.10	2.83 ± 0.24	1.80 ± 0.13	1.45 ± 0.01	1.07 ± 0.16
15	0.94 ± 0.15	2.56 ± 0.17	3.15 ± 0.15	0.58 ± 0.08	1.98 ± 0.10	0.96 ± 0.22	1.92 ± 0.07	1.16 ± 0.23	1.01 ± 0.17	0.97 ± 0.03
150 (μg/ml)	0.53 ± 0.10	0.58 ± 0.03	1.59 ± 0.38	0.44 ± 0.02	1.56 ± 0.26	0.42 ± 0.07	1.76 ± 0.09	0.49 ± 0.08	---	---

(Stimulation Index にて表示)

Fresh : 新鮮弁
 G-A : グルタールアルデヒド処理弁
 Control : 無感作対照群

刺激抗原濃度 $10\mu\text{g/ml}$ では、新鮮弁感作群で、2週後： 1.85 ± 0.42 、1カ月： 1.36 ± 0.26 、2カ月： 1.81 ± 0.33 、3カ月： 0.88 ± 0.16 、6カ月： 1.34 ± 0.10 、G-A処理弁感作群では、2週後： 0.79 ± 0.07 、1カ月： 0.78 ± 0.05 、2カ月： 1.06 ± 0.04 、3カ月： 1.18 ± 0.28 、6カ月： 0.70 ± 0.09 のS.I.が得られた。(図2)

即ち、新鮮弁感作群は3カ月を除き高い刺激指数値を示し、3カ月時は若干低下したが、G-A処理弁感作群は感作後6カ月間の全経過中、常にコントロール値に近似した値、又はそれより低めの値を示した。

b) P.H.A.刺激に対する反応では、いずれの群もP.H.A. 濃度 $1.5\mu\text{g/ml}$ 時に S.I.の最大値を示した。(表1) この濃度のとき、新鮮弁感作群では2週後： 5.80 ± 1.84 、1カ月： 5.54 ± 0.74 、2カ月： 2.94 ± 0.51 、3カ月： 2.83 ± 0.24 、6カ月： 1.45 ± 0.01 と特に2カ月以後は有意に減少した。ところが、G-A処理弁感作群では2週後： 1.57 ± 0.21 、1カ月： 1.54 ± 0.24 、2カ月： 1.25 ± 0.10 、3カ月： 1.80 ± 0.13 、6カ月： 1.07 ± 0.16 で、全経過中、無感作対照群との差は余り著しくなかった。(図3)

これらより、新鮮弁感作群はG-A処理弁感作群に比し、非特異的 P.H.A. 刺激に対しても明らかに高反応を示し、無感作対照群との差も有意に認められた。この P.H.A. 刺激時には、P.H.A. 濃度が増加するに従い、濃度 $1.5\mu\text{g/ml}$ 時よりも反応値は低くなる傾向を示したが、全経過のパターンとしては $1.5\mu\text{g/ml}$ 時と同一であった。(図4)

(iii) ファイシンおよびファイシンG-A処理弁感作群との比較

血管移植の際ファイシン処理法が用いられているので、G-A処理と比較して更に効果ある結果を期待して本実験を行った。各群は2~4匹宛使用した。

ファイシンおよびファイシンG-A両処理弁感作後1カ月において、各特異抗原および P.H.A. 刺激による ^3H -サイミジン取り込み率を測定した。(表2)

a) 特異抗原に対する反応では、添加した抗原蛋白濃度が $10\mu\text{g/ml}$ となる時に各処理弁感作群における差の特徴が明確であった。この時、新鮮弁感作群では 1.36 ± 0.26 、G-A処理弁感作群 0.78 ± 0.05 、ファイシン単独処理弁感作群 1.22 ± 0.32 、ファイシン+G-A処理弁感作群 1.19 ± 0.22 の S.I. であった。これより、G-A処理弁感作群が最も低い値を示し、次いでファイシン+G-A、ファイシン単独処理弁感作群の順であったが、G-A処理弁感作群以外の差は有意ではなく、かくてファイシン処理の相加的効果はないといえるであろう。

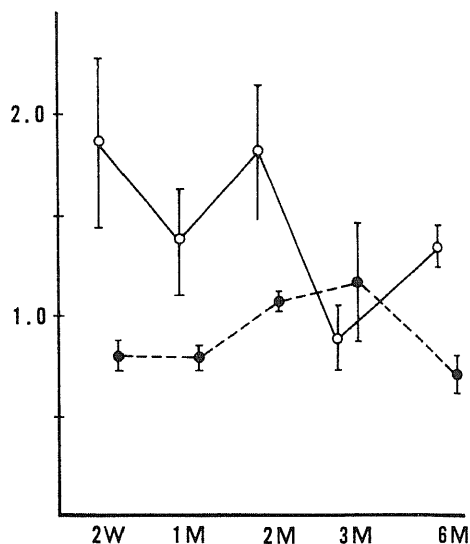


図2 特異抗原刺激に対する反応 ($10\mu\text{g/ml}$)

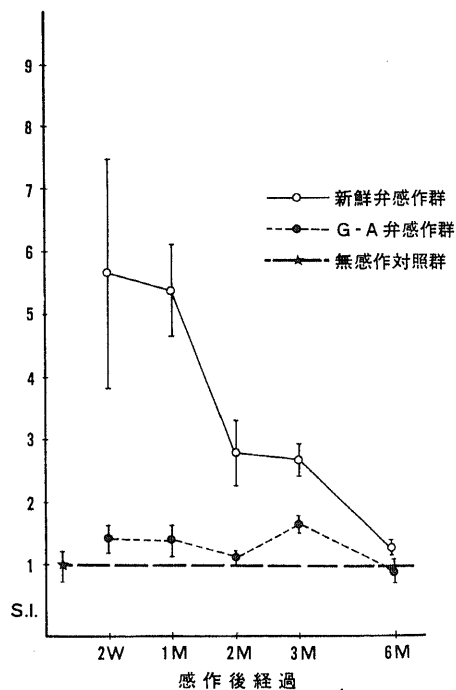


図3 PHA ($1.5\mu\text{g/ml}$) 刺激に対する反応

b) P.H.A. に対する反応では, P.H.A. 濃度として $1.5\mu\text{g/ml}$ を用いた時に取り込み値は最大を示した. その濃度において, 新鮮弁感作群は 5.54 ± 0.74 であり, G-A 処理弁感作群: 1.54 ± 0.24 , フィシン単独処理弁感作群: 6.06 ± 0.67 , フィシン+G-A 処理弁感作群: 3.89 ± 0.56 であった. 即ち, P.H.A. 刺激試験でも G-A 処理弁感作群が最低値を示し, フィシン処

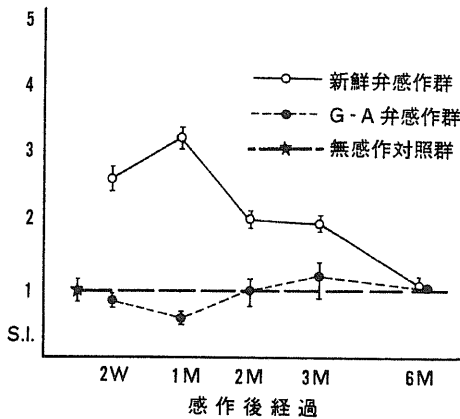


図4 PHA ($15\mu\text{g/ml}$) 刺激に対する反応

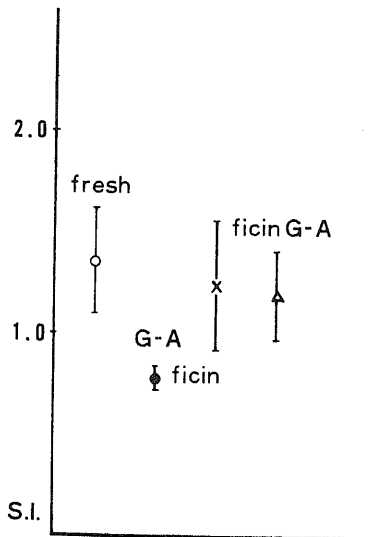


図5 各感作1ヶ月モルモット脾細胞の各対応特異抗原に対する反応
各特異抗原: $10\mu\text{g/ml}$

理の特別効果はみられなかった. (図6)

2) モルモット腹腔内遊出細胞によるマクロファージ遊走阻止試験

新鮮弁感作後2カ月の感作モルモットで, Migration Index (M.I.) は特異抗原濃度 $1.0\mu\text{g/ml}$ 時 1.08 ± 0.09 , $10\mu\text{g/ml}$ 時 1.79 ± 0.30 , $100\mu\text{g/ml}$ 時 2.02 ± 0.25 であった. 一方, 対照としての無感作群では, 抗原濃度 $1.0\mu\text{g/ml}$ で 1.28 ± 0.26 , $10\mu\text{g/ml}$ で 1.58 ± 0.22 , $100\mu\text{g/ml}$ で 1.79 ± 0.32 であり, 新鮮弁感作群で若干高値を示す傾向はあるが, 両群間に有意差は認められなかった. (表3)

3) 感作モルモットリンパ節の組織細胞変化の検索

感作後2カ月から6カ月のモルモット前上縦隔内リンパ節を採取し, 新鮮弁感作, G-A 処理弁感作による組織変化を検索した. その結果, 新鮮弁感動物では芽中心の発達はやや優勢で, 網内系の増殖が多い傾向を示していた. しかし, 感作抗原の差に起因すると思われる著明な所見は見出せなかった. (写真1) このことは, 感作6カ月までのリンパ節においても同様であった.

III 臨床例検査: 異種生物弁置換臨床患者例のリンパ球の ^3H -サイミジン取り込み試験

1. 検査対象

表2 Ficin 及び Ficin G-A 処理弁感作モルモット脾細胞の ^3H -サイミジン取り込み率 (S.I.)

刺激抗原 ($\mu\text{g/ml}$)	感作抗原		
	Ficin	Ficin G-A	
Fresh	0.1	1.22 ± 0.18	1.13 ± 0.22
	1	1.24 ± 0.30	1.40 ± 0.29
	10	1.12 ± 0.14	1.30 ± 0.32
Ficin	0.1	1.05 ± 0.11	
	1	1.09 ± 0.16	
	10	1.22 ± 0.32	
Ficin G-A	0.1		1.27 ± 0.26
	1		1.45 ± 0.28
	10		1.19 ± 0.22
P. H. A.	0.15	1.37 ± 0.11	1.45 ± 0.38
	1.5	6.06 ± 0.67	3.89 ± 0.56
	15	2.82 ± 0.34	2.59 ± 0.33

(Stimulation Index にて表示)

Hancock 弁置換22例のうち、術後2週間から最長2年5か月における心臓弁疾患患者17人を対象とした。男11人、女6人で、年齢は15才から55才にわたっている。このうち3人は時期をかえて2回検査を施行した。疾患別にみると、僧帽弁狭窄又は閉鎖不全症2例、大動脈弁狭窄又は閉鎖不全症3例、僧帽弁および大動脈弁疾患4例、僧帽弁および三尖弁疾患2例、僧帽弁、大動脈弁および三尖弁疾患1例、偽総動脈管症1例、ファロー四徴症1例、マルファン症候群による annulo aortic ectasia 1例、エプシュタイン症+W.P.W. 症候群1例、心筋硬塞1例であった。

又、手術うちわけは、僧帽弁置換術2例、僧帽弁置換術+三尖弁輪形成術3例、大動脈弁置換術4例、大動脈弁置換術+僧帽弁交連切除術2例、僧帽弁および三尖弁置換術1例、弁付人工血管による右室流出路形成術2例、弁付人工血管による上行大動脈形成術 (Bentall 手術) 1例、三尖弁置換+異常刺激伝導路切断1例、僧帽弁置換術+心筋硬塞部切除1例であった。(表4)

又、対照として、健常者11名、術前リウマチ性心臓

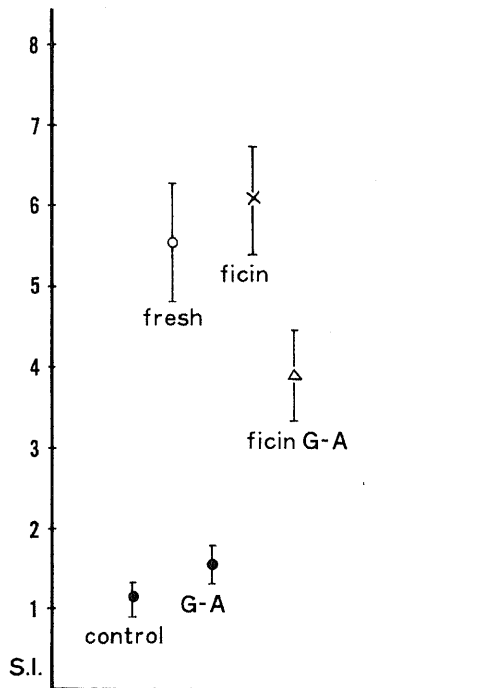


図6 各感作1ヶ月モルモット脾細胞の P. H. A. (1.5 $\mu\text{g/ml}$) に対する反応 (ficin 処理効果の影響)

弁疾患患者12名、弁置換以外の心臓弁膜症手術後患者5名についても検索した。

2. 検査方法

Hancock 弁置換患者および対照者の末梢血を採取、辻ら³⁾の方法に準じてコンレイ・フィコール法により分離したリンパ球細胞 1×10^6 個を20%牛胎児血清加培養液 (RPMI 1640) 2 ml に浮遊し、5% CO_2 , 37°C に培養した。G-A 処理弁抗原刺激として蛋白量 100 μg /試験管を、P.H.A. 刺激として P.H.A.-P 100 μg /試験管をそれぞれ加え、さらに48時間培養した。その後、 ^3H -サイミジン (TRA-120) 1 μCi /試験管を添加して24時間取り込ませた後、ハーベストし、小動物における実験と同方法にて取り込み量を測定した。結果はカウント数および Stimulation Index にて表示した。(表4)

3. 検査成績

1) G-A 処理豚弁特異抗原に対する反応

健常者群の刺激指数 (S.I.) は 0.61 ± 0.20 から最高 1.32 ± 0.13 、平均 0.91 ± 0.24 であった。術前心臓弁膜症患者は 0.56 ± 0.04 から 1.71 ± 0.10 、平均 1.03 ± 0.36 であった。弁置換術以外の心臓弁手術をうけた患者では 0.64 ± 0.14 から 1.21 ± 0.11 、平均 0.89 ± 0.24 であった。一方、弁置換患者では、 0.68 ± 0.04 から 1.96 ± 0.18 、平均 1.18 ± 0.39 であった。(図7) すなわち、これら各群間の全体としての差は比較的少なかった。これを弁置換患者の術後経過をおとしてみると、例数は未

表3 新鮮弁抗原感作モルモット腹腔遊走細胞の M. I. 試験

刺激抗原 ($\mu\text{g/ml}$)	感作モルモット		
	Control	Fresh (2M)	
Fresh	0.1	1.61 \pm 0.21	—
	1	1.28 \pm 0.26	1.08 \pm 0.09
	10	1.58 \pm 0.22	1.79 \pm 0.30
	100	1.79 \pm 0.32	2.02 \pm 0.25
G-A	0.1	1.49 \pm 0.27	—
	1	1.53 \pm 0.15	1.91 \pm 0.25
	10	1.37 \pm 0.25	1.88 \pm 0.03
	100	0.91 \pm 0.06	1.26 \pm 0.18

(Migration Index に表示)

Control : 無感作対照群

Fresh (2M) : 新鮮弁感作後2カ月のモルモット腹腔遊走細胞

だ少ないが、特に術後1年以内の症例に比較的高値を示すものがみられた。

2) P.H.A. 刺激に対する反応

同検査では採取リンパ球数不足例があったため、術前弁膜症患者8例、弁置換患者13例に対してのみしか検索を行えなかった。しかし、その刺激指数値(S.I.)は健常者群で、22.26±2.25から78.73±7.89、平均50.0±18.4であった。術前心臓弁膜症患者では46.45±7.32から114.71±8.27、平均78.4±25.6であった。しかし、この群には健常者に近い値を示すものと、より高値を示す2群が区別された。弁置換以外の心臓弁手

術をうけた患者では43.03±10.50から86.93±0.40、平均63.80±18.73であった。

弁置換患者群では術後2週間で6.96±1.53と著しい低値を示す症例が存在したが、この例を除くと、34.23±2.76から114.09±25.32、平均71.3±29.0であった。(図8)

この試験では弁置換患者群で高値を示す症例も存在したが、術前弁膜症患者でも高値を示す例があり、必ずしも弁置換に対する反応とは考えられなかった。

3) G-A処理弁特異抗原刺激と P.H.A. 刺激に対する反応の相関

表 4 Hancock 弁置換患者リンパ球の³H-サイミジン取り込み試験

性	年齢	術後	診断	手術	無刺激	特異抗原 (100μg/ml)	S. I.	P. H. A. (100μg/ml)	S. I.		
1	F	24	2 Y 3 M	M. I.	M. V. R.	1020 ± 70	1433 ± 997	1.41 ± 0.19	81053 ± 10896	79.4 ± 10.6	
2	F	46	2 Y 2 M	M. I.	M. V. R.	986 ± 147	-	-	45984 ± 9918	46.6 ± 10.0	
3	M	52	2 Y	ASI + MS	AVR + MC	308 ± 6	242 ± 40	0.79 ± 0.13	31575 ± 1023	102.3 ± 3.3	
4	M	50	1 Y 11 M	MI + TI	MVR + TAP	355 ± 14	485 ± 49	1.20 ± 0.15	37938 ± 11019	114.1 ± 25.3	
5	M	29	1 Y 3 M	ASI + MSI	AVR	1985 ± 258	2382 ± 286	1.20 ± 0.14	-	11 -	
6	F	21	1 Y 2 M	Pseudo Truncus	jumping graft VSD patch	336 ± 30	280 ± 13	0.84 ± 0.04	22630 ± 1733	67.2 ± 5.1	
7	F	24	1 Y 1 M	M. I.	M. V. R.	5233 ± 576	4186 ± 628	0.80 ± 0.12	-	-	
(1)	8	F	54	1 Y	MI + TI	MVR + TAP	638 ± 80	995 ± 212	1.56 ± 0.33	25796 ± 1662	40.3 ± 2.6
9	F	54	11 M	ASI	AVR	966 ± 147	1110 ± 270	1.15 ± 0.28	44823 ± 5233	46.4 ± 5.4	
10	M	52	9 M	ASI + MS	AVR + MC	2980 ± 298	3338 ± 567	1.12 ± 0.19	-	-	
(3)	11	M	30	7 M	T / F	jumping graft VSD patch	1890 ± 132	3704 ± 334	1.96 ± 0.18	-	-
12	M	50	7 M	MI + TI	MVR + TAP	2975 ± 238	5652 ± 904	1.90 ± 0.30	-	-	
(4)	13	M	34	7 M	MSI + AI	AVR + MVR	1597 ± 142	1156 ± 234	0.73 ± 0.14	80981 ± 6671	50.7 ± 4.2
14	F	34	5 M	Marfan synd.	Bentall	1030 ± 62	1782 ± 173	1.73 ± 0.17	59478 ± 6816	57.7 ± 6.6	
15	M	54	4 M	ASI + MS	AVR + MC	2121 ± 85	3058 ± 244	1.44 ± 0.11	-	-	
16	M	15	4 M	Ebstein wpw	TVR Kent 束切断	1797 ± 88	1215 ± 92	0.68 ± 0.04	83954 ± 11890	46.7 ± 6.6	
17	M	41	4 M	MIS + TI + AI	MVR + TAP	774 ± 48	894 ± 26	1.15 ± 0.03	80500 ± 2885	103.9 ± 3.7	
18	M	50	2 M	Myocard Infaction	硬塞部切除 MVR	1208 ± 36	1292 ± 900	1.07 ± 0.07	-	-	
19	M	34	1 M	A. I.	AVR	675 ± 132	719 ± 91	1.06 ± 0.13	23124 ± 1858	34.2 ± 2.7	
20	M	55	2 W	A. I.	AVR	887 ± 19	691 ± 13	0.78 ± 0.01	6190 ± 1357	6.9 ± 1.5	

MI = 僧帽弁閉鎖不全症 MS = 僧帽弁狭窄症 TVR = 三尖弁置換術
 TI = 三尖弁閉鎖不全症 AVR = 大動脈弁置換術 AI = 大動脈弁閉鎖不全症
 MVR = 僧帽弁置換術 AS = 大動脈弁狭窄症 TAP = 三尖弁輪形成術

(1), (3), (4) は、それぞれ () 内例と同一症例であることを示す。S. I. 以外は c. p. m. にて表示

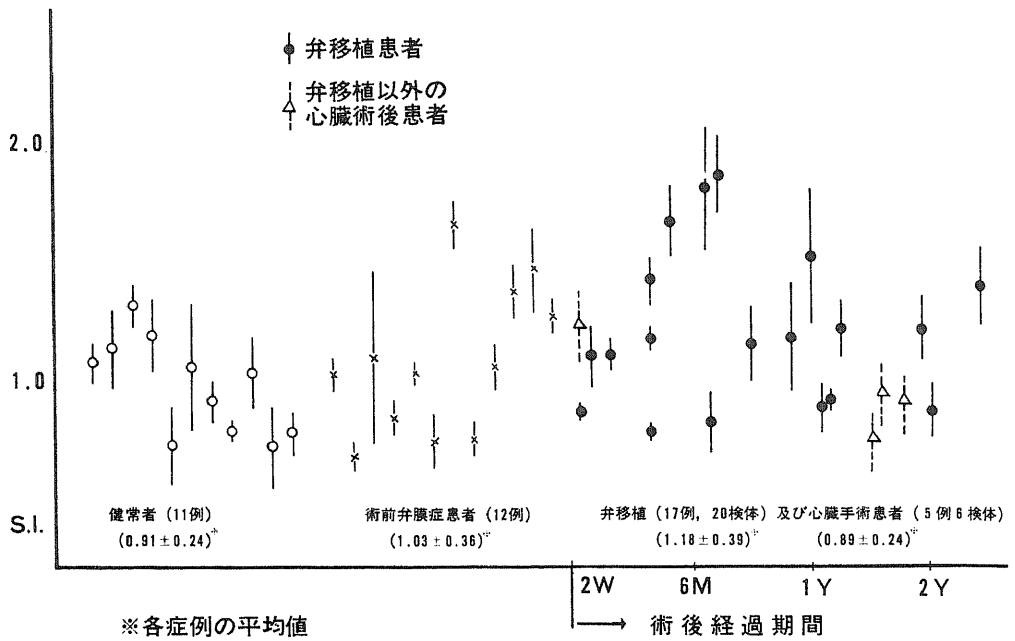


図7 G-A 処理弁特異抗原刺激によるヒトリンパ球の³H-サイミジン取り込み試験

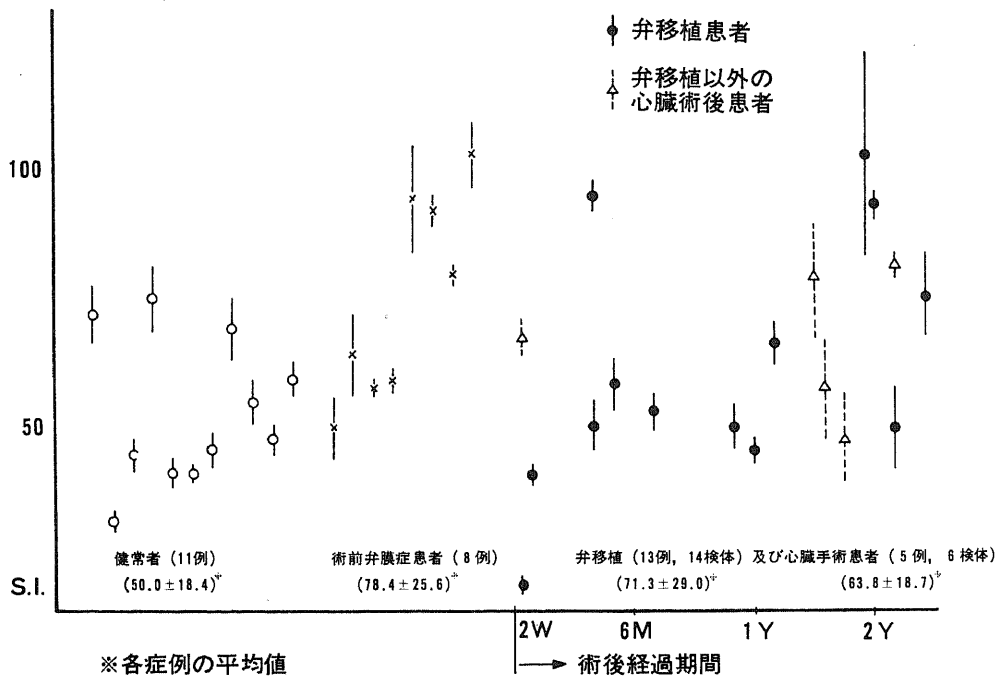


図8 P.H.A. 刺激によるヒトリンパ球の³H-サイミジン取り込み試験

著者は更にG-A処理弁特異抗原刺激に対するリンパ球³H-サイミジン取り込み反応と、P.H.A. 刺激に対する反応から得られる刺激指数値間の相関をみるため、両反応値をそれぞれ、横、縦にスケールし、健常者、術前心臓弁膜症患者、弁置換患者、弁置換以外の心臓弁手術後患者において個々の症例の反応値のプロットを試みた。(図9)更に、全体の分布よりみて、かりに刺激指数値で特異抗原反応1.4、P.H.A. 反応75の点からグラフ上に垂線をひき、A、B、C、D、の4象限に分けた。この際、特異抗原およびP.H.A. ともに最高の³H-サイミジン取り込み反応を起す(最高のS.I.を与える)至適刺激濃度を定める実験が行えず、それぞれ100 μ g/mlの一点のみにより得られたS.I.を用いざるを得なかったため、両者の相関はあくまで、かかる条件下でのものと限定せざるを得ない。しかしながら、かかる条件下でも、健常者群はほとんどがA、すなわち、両刺激に対して比較的低反応の領域、に属していた。術前弁膜症患者はAに入るグループとB(特異抗原刺激は低いが、P.H.A. 刺激には高い反応を示す領域)に入るグループの2つが区別された。弁置換以外の心臓弁手術後患者も同じく、A、Bいずれかに属した。

これに対し、弁置換患者は全象限に広く分布する傾向があった。即ち、A、Bに属するものが多いが、他の群ではみられないC群にも存在した。更に、C象限の2例はいずれも術後1年以内の症例で、図7で論じた例と同一であった。

以上より、弁置換患者にはC象限、即ち、P.H.A. 刺激に対する反応は低く、特異抗原刺激に対する反応の高いものが、術後1年以内には存在することもあ

いう特徴を示した。かくて、かかる解析法は、至適条件下で例数をふやし、又同一患者で経過を追えば、G-A処理弁の特異抗原性追求にははなはだ有効であることを示唆している。

考 案

心臓弁置換に用いられている生物組織を利用した生体弁とは、他の臓器移植の様な単なる組織の移植ではない。その概念は生物組織を素材として利用する弁ということであり^{39,40}、その耐久性をささえるものは、移植片の Host cell による置換、又は移植片中の donor cell の生存による組織再生ではなく、純粋に素材としての生物組織の性質、即ち、構成々分の物理的、器械的性質が主である。いいかえれば、素材として生物組織を用いるが、それは出来るだけ人工合成物質に近く、生物学的および免疫学的に安定し、それ自身は不活性であることが望ましい。従ってこの点では、弁の Viability を Durability の必要条件とする新鮮弁移植^{41,42}とは全く異っている。

Hancock 弁は、新鮮豚大動脈弁に0.2%グルタルアルデヒド処理をほどこすことにより、弁を強化し、生物学的活性を低下させることを可能にした。大動脈弁尖の構成々分はコラーゲン線維が主であり、このほかに弾力線維、基質および細胞構成々分としてのムコ多糖類、グリコプロテインおよび可溶性蛋白等である⁴³。Hanks 液浸漬により、強い抗原性を持つ可溶性蛋白を除去した後の弁尖において、G-Aは更に隣接する膠原線維の側枝であるアミノ基間に架橋結合を形成し、同線維間の結合を強化することにより、弁尖自体の強度を増す⁴³といわれている。同時にこの側枝に由来する抗原性も低下させると考えられている。

著者らはまず、弁尖中に含まれる蛋白量を知るため、Folin-Loury 法にて高速回転粉砕装置を用いてホモジネートとしたG-Aなど各種処理弁尖(0.5g)について蛋白量測定を行った。それによると新鮮弁: 7.85mg/1mlホモジネート、G-A処理弁: 5.0mg/ml、フィシン処理弁: 6.5mg/ml、フィシン+G-A処理弁: 5.0mg/mlで、明らかに各処理により蛋白の除去がみられた。更に、ホモジネートを高速遠心かけた後の上清中へ抽出される蛋白量を同方法にて測定した結果では、新鮮弁: 7.0mg/弁尖1g、G-A処理弁: 2.2mg/g、フィシン処理弁: 1.5mg/g、フィシン+G-A処理弁: 1.2mg/gであり、G-A処理を行った弁尖では新鮮弁の約31%に可溶性蛋白量が低下していた。これは膠原線維間の架橋結合により、G-A処理弁のホモジネートは新鮮弁ホモジネート分子の大きさ

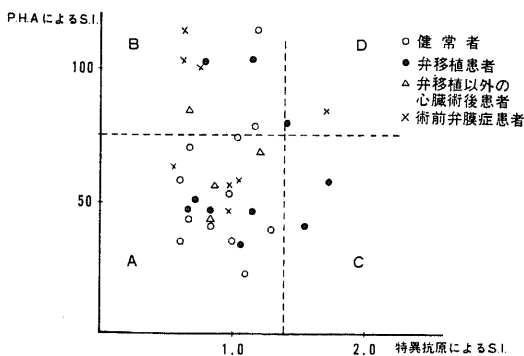


図9 ヒトリンパ球のP.H.A.とG.A.処理弁特異抗原刺激に対する³H-サイミジン取りこみ反応の相関性

まで碎屑され得なかったためと考えられる。以前、教室の土屋³⁰⁾が行った実験では、0.2%G-A 処理弁からの溶出蛋白質量は新鮮弁に比べ、その9.9%と僅少であった。これは一部固定液中へ溶出したものを除き、多くが架橋結合で固定された形となって上清中への蛋白成分溶出を妨げるためである。

これらの結果から、生体内へ同処理弁を移植した際、蛋白溶出量は僅少であるし、更に豚弁尖全重量は0.5g程度であるので、長期にわたって蛋白溶出がおこったとしても、ほとんど問題にならない程の微量であるといえる。

次に、G-A処理によってもたらされる抗原性の変化を検索するために行った感作モルモット脾細胞における³H-サイミジン取り込み試験では、まず特異抗原刺激に対する反応において、感作後3カ月を除いては、刺激抗原濃度1.0および10 μ g/mlのいずれにおいても、G-A処理弁感作群は新鮮弁感作群に比して有意の低い反応値を示した。一方、前者は、この観察期間を通じて多少の変動はあるものの、ほぼ一定に近い低反応値を示し、又、コントロール(無感作群)との間にも明確な差を認めなかった。(図1および2)これは、新鮮弁の方がより高い抗原性を有し、逆にG-A処理弁は殆んど抗原性を持たなくなったためと解釈出来よう。

刺激抗原濃度100 μ g/mlでは、特にG-A処理弁感作群においてコントロールよりもかなり低値を示している。これは高濃度の刺激抗原が、培養モルモット脾細胞増殖または生物学的活性維持に対し、inhibitorとして働いたためと考えられ、同様の傾向は何れの刺激抗原又はP.H.A.についても観察された。

この実験より刺激抗原の至適濃度はモルモット脾細胞の場合、1.0~10 μ g/mlと考えられた。そしてこの濃度では、G-A処理弁感作群の反応値(S.I.)は無感作群と差がなく、G-A処理により豚大動脈弁の抗原活性は著明に低下することが示された。

P.H.A.刺激時においては、新鮮弁感作群の刺激指数値低下は2カ月後から認められ、以後減少傾向を示している点を除き、前述の特異抗原刺激の場合と同じ現象が一段と明確に示された。即ち、新鮮弁感作群における反応は明らかにG-A処理弁感作群のそれを上回っており、やや誤差の大きい傾向はあるが、P.H.A.1.5 μ g/ml濃度の時、特に両群の差は顕著であった(図3および4)。一方、G-A処理弁感作群の反応値は無感作群の上限付近に観察された。

以上より、新鮮弁感作群では、P.H.A.刺激反応(特にT型リンパ球を中心とする反応⁴¹⁾)は2カ月ま

では高い値を示すが、以後は急速に低下することが示された。又、G-A処理弁感作群におけるかかる細胞性免疫誘発は皆無とはいえないが、極めて僅少なものであると結論されよう。一方、特異抗原刺激に対する反応は、新鮮弁感作群で6カ月まで高値であり、抗体産生能を含む上記免疫反応誘発が長期にわたり保持されていることが判明した(図1~4)。

以上のごとく、新鮮弁と比べた時、G-A処理豚大動脈弁においては著しい抗原性の低下が認められた。そこで著者は同処理以外の新しい弁処理法について検索し、血管移植に際し用いられているフィシン処理方法⁴⁵⁾に着目、フィシン単独処理およびフィシン+G-A処理をほどこした豚大動脈弁尖についても検討を加えた。

その結果、確かに刺激抗原作製時の蛋白質量は、フィシン処理のみでは新鮮弁の21.4%、フィシン+G-A処理では17.1%と低下しているが、特異抗原刺激に対する感作モルモット脾細胞の反応試験では、刺激抗原濃度10 μ g/mlにてもG-A処理弁感作群のみが低い値を示している以外、他の3者間に有意な差は認められなかった。P.H.A.刺激に対する反応でも、著明な低値を示すG-A処理弁感作群に次いで、フィシン+G-A処理弁感作群が残り2者に比し低反応値であった。

従って、これらフィシンを用いた処理法はいずれもG-A処理に比し、特に優れた効果は見出せなかった。フィシン処理後更にG-A処理をほどこした群においてもG-A単独に及ばない結果となったが、これはフィシン処理により、G-Aの作用する部位の変化が生じ、このために充分作用しきれなかったものと推察される。

G-A処理豚大動脈弁は臨床的に1968年、Carpentierら^{24,43)}により使用開始されている。その成績は低血栓発生率を含め、従来の人工弁置換に比してすぐれたものであり、教室の経験でも同様良好であった²⁹⁾。彼らの考案した弁処理法は、弁尖中の可溶性蛋白をHanks液にて洗浄後、ムコ多糖類および糖蛋白をメタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、この余分のメタ過ヨウ素酸ナトリウムをエチレンジアミンで中和した後に、0.65%G-A液中に浸漬し保存するものである²⁵⁾。しかし、この方法にて処理した弁の移植後の組織学的所見では、免疫学的反応は認められないというもの、膠原線維の変性に起因する弁尖穿孔、石灰沈着、非特異的炎症反応等の惹起が報告されている⁴⁰⁾。土屋³⁰⁾の研究でもこの処理法では、弁の硬化が強過ぎ、弁閉鎖不全をきたす傾向を認めている。

これに対し、Hancock ら²⁶⁾は1969年以来、豚大動脈弁を0.2% G-A のみで処理し、臨床に用い、現在までその良好な成績を示す数多くの報告がされている。1976年6月現在、世界257施設での最長6年の経過例を含む、2万個の Hancock 弁置換例の集計では、血栓発生率は2%以下、弁機能不全はわずか19個にし認められていない。このうち、血栓形成、並びに感染後に続発した弁機能不全例を除くと、弁穿孔例は4例のみである⁴⁶⁾。又、摘出された弁の組織学的変化について検索した報告においても、免疫学的所見をはじめとして著変は認められていない²⁶⁾。

臨床使用におけるこの様に優れた成績に着目し、教室はこの Hancock 弁を初めてわが国に導入したが、1974年以来、1976年12月現在では22症例に23個の Hancock 弁置換を行い、生存3年を有する教室例でも、同弁は機能においても durability においてもきわめて良好な成績を示している²⁹⁾。

しかし、この異種生物弁の durability、弁機能について検討を加えた結果、今後の経過を予測するには異種弁に起因する弁置換患者の特に細胞性免疫反応の有無、程度を知る必要がある。その検索法として著者は患者リンパ球培養による³H-サイミジン取り込み試験を行った次第である。

その結果、まず特異抗原による刺激を行ったものでは、弁置換患者群平均刺激指数値は健常者、術前心臓弁膜症患者、弁置換以外の心臓弁手術後患者のいずれよりも若干高かった。特に弁置換後1年を経っていない症例13例の平均は高く、 1.22 ± 0.44 であり、術後1年以上の6例の平均 1.04 ± 0.26 よりも高値を示すことが判明した。

即ち、Hancock 弁置換患者ではわずかながら弁に対する細胞性免疫反応が術後1年以内に認められ、以後は減少し、健常者、その他の対照例に近づく傾向を持っていた。従って弁置換後何ら問題なく1年以上を経過した症例では、置換弁の免疫学的抗原性物質としての役割は、ほぼ無視できるものとしてさしつかえないと思われる。

P.H.A. 刺激を行った実験では、健常者群平均刺激指数値 50.0 ± 18.4 に対し、弁置換患者群では平均 71.3 ± 29.0 であり、特異抗原に対する反応と同様、弁置換患者群でやや高い値を示した。しかしこの場合、症例数の少ないことにもよるが、術後1年未満と以後で明確な差は見出せなかった。又、術前弁膜症患者平均が 73.2 ± 22.8 と弁置換患者群に近似した値を示し、弁置換患者で認められた P.H.A. 刺激に対する高反応値は Hancock 弁置換に由来するものではない可能性が示

された。即ち、これらの反応はリウマチ等、弁病変をひきおこす原因自体と関連している可能性がある。

更に、Down syndrome では P.H.A. による blastoid transformation は高反応を呈すること⁴⁷⁾などが知られており、免疫以外の状態が関与することもあり得ると考えられる。

弁置換患者群で術後間もない時期(2週間後)の本反応低値については、手術侵襲から体力が十分に回復していないこと⁴⁸⁾、抗生物質をはじめとして多種多量の薬剤が投与されていることなどが原因として考えられた。

生物弁の抗原性については、種々の報告がなされており、犬および人大動脈弁における蛍光抗体法ではほとんど検出され得ない程度のもものとされている⁴⁹⁾。又、犬⁵⁰⁾、ラット⁵¹⁾における新鮮同種弁移植においても免疫反応は見出されていない。人の新鮮同種弁移植においても多くの場合、donor との HL-A 抗原は異なる⁵²⁾にもかかわらず、その抗体は検出されていない⁵³⁾。このために、同種弁移植においてはその抗原性は無視することができると思われる。

しかし長年月の間に一般に Ross らの同種新鮮弁では移植弁の老化を起し、弁尖の菲薄化、穿孔をきたし、これに対し自己肺動脈弁移植ではこれを起さぬことが示されている⁵⁴⁾。これはむしろ弁の生育、再生の重要性を示すものである。一方、Barratt-Boyse⁵⁵⁾の同種処理弁が同種新鮮弁の様な移植弁の弱化を来していないとの報告は、この移植弁の物理的強度の重要性を示している。(勿論、自己肺動脈弁、また同種処理弁は同種新鮮弁よりも抗原性は弱い筈なので、この点の有利性は考慮に入れておく必要がある。)

これに対し、異種弁の場合には免疫反応に起因すると思われる移植弁の石灰化、円形細胞浸潤、弁への血栓沈着等の所見が報告されており⁵⁶⁾⁵⁷⁾、羊弁に対する犬の液性抗体の存在も認められている⁵⁸⁾。従って、異種生物弁を臨床に用いるには何らかの処理をほどこし、以上の変化を抑えることが必要である。この点で、グルタールアルデヒド処理法は諸家の報告にみられるごとく弁移植後の組織変化も少なく⁵⁹⁾、弁機能の保持にもすぐれ⁶⁰⁾、現在まで、世界例でも教室例でも充分臨床応用に耐えるものであった。

又、今回の Hancock 弁に対する実験的感作モット脾細胞および臨床的には人リンパ球というごとく、反応細胞が若干異なるものを用いた著者の実験においても、特に移植拒否と関連する細胞性免疫反応は極めて微量なものであり、臨床使用上ほとんど問題にならないことが示された。特に1年以上経過したもの

では対照例と全く差を見出せなかった。

結 語

グルタルアルデヒド (G-A) 処理豚大動脈弁によって感作したモルモット脾細胞および Hancock 弁置換術をうけた計17人の患者の末梢血リンパ球において、G-A 処理弁抗原および P.H.A. 刺激による ^3H -サイミジン取り込み率を測定し、細胞性免疫反応を検索した結果、以下のことが観察された。

1. モルモット感作実験において、新鮮弁感作群と対比した場合、 ^3H -サイミジン取り込み率は特異抗原刺激、P.H.A. 刺激いずれにおいても新鮮弁感作群では高値を示すのに対して、G-A 処理弁感作群では無感作に近似した値を示した。これは検索した感作後6カ月迄継続した。

2. 臨床応用実験において、Hancock 弁置換患者の ^3H -サイミジン取り込み率は、健常者、術前心臓弁膜症患者、弁置換以外的心臓弁手術後患者にくらべてやや高値を示す傾向にあった。これは、弁置換術後1年以内の患者でこの傾向があり、それ以後は減少し、健常者のレベルに達することが判明した。

以上より、グルタルアルデヒド処理豚大動脈弁は、新鮮弁に比して免疫学的抗原性は著しく低下しており、生物学的にも安定し、臨床応用において、物理的強靱性と相まって、移植弁の免疫学的反応による劣化、弱化をきたすことなく、長期の耐久性が期待される。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師岩喬教授に衷心より深甚の謝意を表します。また、リンパ球培養、その他免疫学的諸検査法につき御教示いただきました癌研究所ウイルス部波田野基一教授並びに技術的協力をいただきました小倉寿先生に心より感謝いたします。

終始御助言をいただきました第一外科土屋和弘博士、並びに実験に御協力いただいた教室員各位に心より感謝いたします。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助第57118号の補助を受けた。また、この内容の一部は、第29回日本胸部外科学会(神戸)、第3回アジア胸部外科医学会(Sydney 1976)で発表した。

文 献

- 1) Hufnagel, C. A., Harvey, W. P., Rabil, P. J. & McDermott, T. F. : *Surgery*, **35**, 673 (1954).
- 2) Murray, G. : *Angiology*, **7**, 466 (1956).
- 3) Ross, D. N. : *Lancet*, **2**, 487 (1962).
- 4) Duran, C. G. & Gunning, A. J. : *Lancet*, **2**, 488 (1962).
- 5) Angell, W. W., Shumway, N. E. & Kosek, J. C. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **64**, 329 (1972).
- 6) Lavin, L. G., Geens, M. & Ross, D. N. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **60**, 322 (1970).
- 7) Senning, A. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **54**, 465 (1967).
- 8) Ionescu, M. I., Ross, D. N., Deac, R. C. & Wooler, G. H. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **60**, 331 (1970).
- 9) Ross, J. K. & Johnson, D. C. : *J. Cardiovasc. Surg.*, **15**, 242 (1974).
- 10) Ionescu, M. I., Pakrashi, B. C., Mary, D. A. S., Bartek, I. T. & Wooler, G. H. : *Thorax*, **29**, 56 (1974).
- 11) Ionescu, M. I., Ross, D. N. & Wooler, G. H. : *Biological Tissue in Heart Valve Replacement*, p.409, London, Butterworths, 1972.
- 12) Zerbini, E. J. : *Chest*, **67**, 706 (1975).
- 13) Paneth, M. & O'Brien, M. F. : *Thorax*, **21**, 115 (1966).
- 14) Ionescu, M. I., Wooler, G. H., Whitaker, W., Smith, D. R., Taylor, S. H. & Hargreaves, M. D. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **56**, 333 (1968).
- 15) Mohri, H., Reichenbach, D. D., Barnes, R. W. & Merendino, K. A. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **54**, 622 (1967).
- 16) Longmore, D. B., Lockey, E., Ross, D. N. & Pickering, B. N. : *Lancet*, **2**, 463 (1966).
- 17) Malm, J. R., Bowman, F. O., Jr., Harris, P. D. & Kowalik, A. T. W. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **54**, 471 (1967).
- 18) 太田里美・塩野恒夫・高橋 透・杉山 誠・横田 旻・久保良彦・田辺達三・村上忠司・杉江三郎・東 匡伸・谷田弘明 : *外科診療*, **15**, 220 (1973).
- 19) Marrangoni, A. G. & Cecchini, L. P. : *Ann. Surg.*, **134**, 977 (1951).
- 20) 岡村健二・北村信夫・工藤龍彦・富野哲夫・川副浩平・小柳 仁・今野草二 : *医学のあゆみ*, **89**, 320 (1974).
- 21) Harris, P. D., Kowalik, A. T. W., Marks, J. A. & Malm, J. R. : *Surgery*, **63**, 45 (1968).
- 22) Barnes, R. W., Rittenhouse, E. A., Mohri,

- H. & Merendino, K. A. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 59, 785 (1970).
- 23) Dubiel, W. T., Johansson, L. & Willen, R. : Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg., 9, 16 (1975).
- 24) Carpentier, A., Lemaigre, G., Robert, L., Carpentier, S. & Dubost, C. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 58, 467 (1969).
- 25) Carpentier, A. & Dubost, C. : Biological Tissue in Heart Valve Replacement, p.515, London, Butterworths, 1972.
- 26) Zuhdi, N., Hawley, W., Voehl, V., Hancock, W., Carey, J. & Greer, A. : Ann. Thorac. Surg., 17, 479 (1974).
- 27) Horowitz, M. S., Goodman, D. J., Fogarty, T. J. & Harrison, D. C. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 67, 885 (1974).
- 28) Brown, J. W., Myerowitz, P. D., Cann, M. S., Colvin, S. B., McIntosh, C. L. & Morrow, A. G. : Surgery, 76, 983 (1974).
- 29) 岩 喬・土屋和弘・上山武史・関 雅博・川筋道雄・永井 晃・三好恵一・桜井潤司 : 胸部外科, 29, 1 (1976).
- 30) 土屋和弘 : 日胸外会誌, 24, 1420 (1976).
- 31) 岩 喬・上山武史・土屋和弘・関 雅博・三崎拓郎 : Ⅲrd Congress of Asian Thoracic & Cardiovascular Surgeons, Sydney, 1976.
- 32) Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L., Firshein, I. L. & Hasham, N. : Science, 142, 1185 (1963).
- 33) George, M. & Vaughan, J. H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 514 (1962).
- 34) Al-Askari, S., David, J. R., Laurence, H. S. & Thomas, : Nature, 205, 916 (1965).
- 35) Loury, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 36) 吉永 秀 : 免疫実験操作法 (日本免疫学会編), 692頁, 1973.
- 37) Poon, S. P. & Cauchi, M. N. : Cancer Research, 33, 2677 (1973).
- 38) 辻 公美 : 免疫実験操作法 (日本免疫学会編), 443頁, 1971.
- 39) Carpentier, A. : Thoraxchirurgie, 19, 375 (1971).
- 40) Carpentier, A., Deloche, A., Relland, J., Fabiani, J. N., Forman, J., Camilleri, J. P., Soyer, R. & Dubost, C. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 68, 771 (1974).
- 41) Al-Janabi, N., Gonzalez-Lavin, L., Neirotti, R. & Ross, D. N. : Thorax, 27, 83 (1972).
- 42) McGregor, C. G. A., McGree, J. O'D. & Wheatley, D. J. : Cardiovasc. Research, 10, 394 (1976).
- 43) Carpentier, A. : Biological Tissue in Heart Valve Replacement, p.49, London, Butterworths, 1972.
- 44) 折田薫三 : 腫瘍免疫学 (小林・橘編), 356頁, 東京, 朝倉書店, 1974.
- 45) Defalco, R. J. : J. Surg. Research, 10, 95 (1970).
- 46) Zuhdi, N. : Ann. Thorac. Surg., 21, 573 (1976).
- 47) Hayakawa, H., Matsui, I., Higurashi, M. & Kobayashi, N. : Lancet, 1, 95 (1968).
- 48) 小林 登・早川 浩 : 免疫学叢書 (畔柳・大高・松橋編), 3, 101頁, 東京, 医学書院, 1970.
- 49) 森 渥視・城谷 均・日笠頼則 : 移植, 4, 344 (1970).
- 50) Mohri, H., Reichenbach, D. D., Barnes, R. W., Nelson, R. J. & Merendino, K. A. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 54, 564 (1967).
- 51) Heslop, B. F., Wilson, S. E. & Hardy, B. E. : Ann. Surg., 177, 301 (1973).
- 52) Dausset, J. : Transplant. Proc., 3, 8 (1971).
- 53) 白倉良太・中田精三・広瀬 一・松山正経・森透・森 隆・川島康生・曲直部寿夫 : 移植, 10, 170 (1975).
- 54) Ross, D. N. : Circulation, 45, 1259 (1972).
- 55) Barratt-Boyes, B. G. : Thorax, 19, 131 (1964).
- 56) Gunning, A. J. : Transplantation, p.560, Philadelphia, Lea & Febiger, 1972.
- 57) Blundell, P. E., McFarlane, J. K. & Sutherland, N. G. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 54, 616 (1967).
- 58) Pierce, G. E., Hellstrom, I. E., Mohri, H., Reichenbach, D. D. & Merendino, K. A. : Surgery, 67, 328 (1970).
- 59) Yarbrough, J. W., Robert, W. C. & Reis, R. L. : J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 65, 364

(1973).

60) Johnson, A. D., Daily, P. O., Peterson, K. L., LeWinter, M., DiDonna, G. J., Blair, G. &

Niwayama, G. : Circulation, 50 & 51 (suppl. I), 40 (1975).

A b s t r a c t

The cellular immunological responses were examined by the ^3H -thymidine uptake test, in spleen cells of guinea pigs sensitized with porcine aortic fresh cusp and cusps preserved by glutaraldehyde, ficin and ficin with glutaraldehyde.

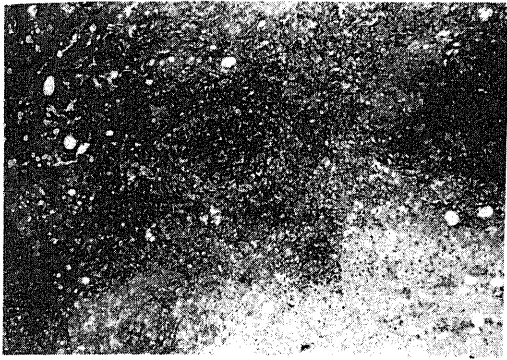
From the results of this study, we concluded as follows.

- 1) Fresh porcine aortic cusp has a high antigenicity to the guinea pig.
- 2) Ficin and ficin with glutaraldehyde preservation showed unsatisfactory results in lowering cusp's antigenicity.
- 3) Cellular immunological responses in guinea pigs sensitized with glutaraldehyde preserved cusp were almost equivalent to that in the non-sensitized guinea pig.

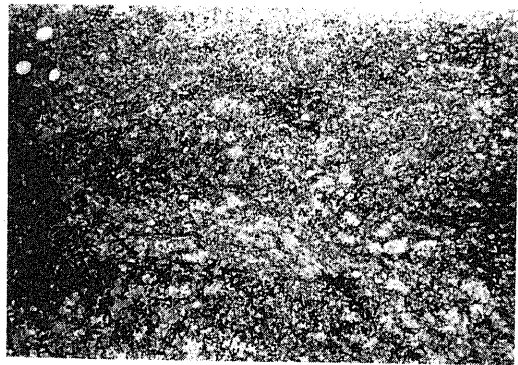
Next, the cellular immunological responses were examined by the same method, in lymphocytes of 17 patients implanted with Hancock porcine aortic xenograft.

In this clinical examination, responses of the patients who received Hancock valve replacement showed weak cellular immunological activity within 1 year of the operation. And after 1 year, no cellular immunological activity was shown.

From these studies, it was confirmed that glutaraldehyde preserved porcine aortic valve had little antigenicity, and in clinical use, it had no cellular immunological affect after 1 year of the operation.



(a)



(b)

写真1 新鮮弁 (a), G-A 処理弁 (b) 感作後2カ月のモルモットリンパ節の組織像