

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目： 若手研究 B
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号：20791311
 研究課題名（和文） 同種間複合組織移植における組織虚血と拒絶反応の関係
 研究課題名（英文） Relationship between prolonged ischemia and rejection in composite tissue allotransplantation
 研究代表者
 清水史明（Shimizu Fumiaki）
 大分大学・医学部 助教
 研究者番号：50347027

研究成果の概要（和文）：

ラットをモデルにして、同種異系間複合組織移植において移植組織の虚血時間が長くなると移植後拒絶反応は増強されるかどうかを検討した。肉眼的観察、病理組織学的観察、In vitro の検討で行ったリンパ球混合刺激試験にて虚血時間が長くなると拒絶が増強されることを確認した。免疫染色では虚血の組織で MHC-II 抗原の発現が増しており、これが拒絶反応の増強に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Relationship between ischemia time and rejection of transplanted allograft was assessed using Rat composite tissue allo-transplantation model. As the result, clinical observation, histopathological examination and mixed lymphocyte reaction assay revealed that prolonged ischemia increases severity of rejection in skin flap allotransplantation. Higher expression of MHC-II antigen in longer ischemia group might cause these results.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2009 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・形成外科学

キーワード： 組織培養・移植学

1. 研究開始当初の背景

同種異系間での臓器移植では、その移植臓器の虚血時間が長くなると移植の成功率が

低くなることはよく知られている。しかし実際に移植臓器の虚血時間が長くなった場合、移植後の免疫学的拒絶反応が増強されるかどうかについては知られていない。これまで

動物モデルを用いて心臓、腎臓、肝臓などの同種間臓器移植を行い、虚血時間が拒絶反応に影響を及ぼすかどうか検討する試みは多くなされているが、はっきりとした因果関係は証明されていない。その原因として内臓器は移植後の組織の変化を経時的に観察することが困難であることが挙げられる。皮膚、脂肪、筋膜などからなる複合組織は体表面から観察可能で、移植後の微細な変化を経時的に観察することが可能であり、虚血時間と拒絶反応の関係を観察するのに適するモデルと思われた。

2. 研究の目的

同種異系間にて複合組織移植を行った際、移植組織の虚血時間が長くなると移植後の拒絶反応が増強されるかどうかラットを用いて検討した。

3. 研究の方法

遊離鼠径皮弁を Brown Norway (BN) ラットから挙上して、これを Lewis (Lew) ラットに顕微鏡下血管吻合を用いて移植した。グループ 1 では移植から血流再開までの虚血時間を 1 時間と設定し、グループ 2 では 6 時間と設定してこの 2 グループ間での拒絶反応の差を検討した。通常遊離皮弁移植を同種異系間に行った場合、ほとんどが 7 日以内で拒絶される。7 日では観察期間が短くなるため、観察期間を延長させる目的で、移植後はシクロスポリン (4mg/kg/day) 投与による免疫抑制をおこなった。

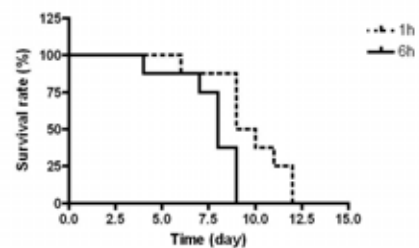
- (1) 移植後は拒絶反応の重症度の差を肉眼的に観察した。
- (2) 移植 10 日目に移植組織を一部採取して HE 染色を行い病理組織学的観察にて拒絶の重症度の差を比較した。この際、表皮 真皮の厚さを測定しその差の違いをもち、炎症の強さを比較した。さらに拒絶の重症度分類を使い重症度の差を比較した。正常を grade 0、表皮の浮腫を grade 2、水疱形成を grade 2、表皮壊死を grade 3 として観察した。
- (3) *in vitro* の 検討として移植 7 日目に宿主ラット脾臓からリンパ球を分離 (responder) して、これと BN ラットのリンパ球 (stimulator) とを混合培養して、リンパ球混合刺激試験

を行い 2 群間において抗原刺激に対するリンパ球増殖能に差が出るかどうかを検討した。

- (4) 免疫組織学的検討として移植 10 日目に移植組織を一部採取し、免疫染色を行い MHC-II 抗原の発現の程度の差を比較検討した。

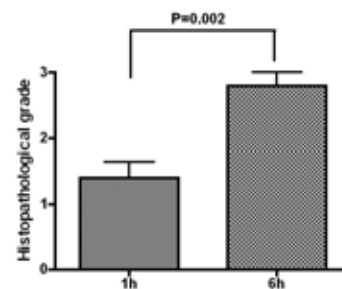
4. 研究成果

- (1) 肉眼的観察においては、グループ 1 (虚血時間 1 時間) では約 10 日で移植組織の拒絶を認めただけに対して、グループ 2 (虚血時間 6 時間) では約 8 日で拒絶され、虚血時間が長いグループのほうが拒絶反応が早く、強く出現することが確認された。

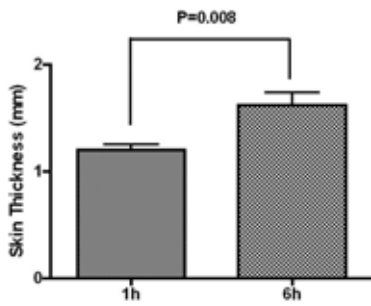


移植後の生存曲線

- (2) 移植後 10 日目に移植組織から一部組織を採取して HE 染色を行い病理組織学的観察を行ったところ、肉眼的観察と同様に、虚血時間が長いグループのほうが短いグループより皮膚の厚さが厚く、病理組織学的にもその変化の程度が高度であった。

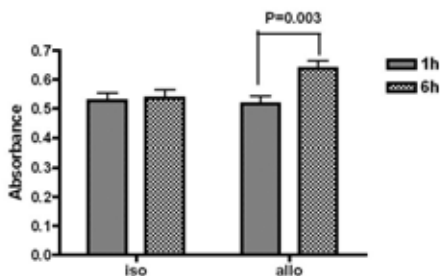


病理組織学的拒絶反応重症度



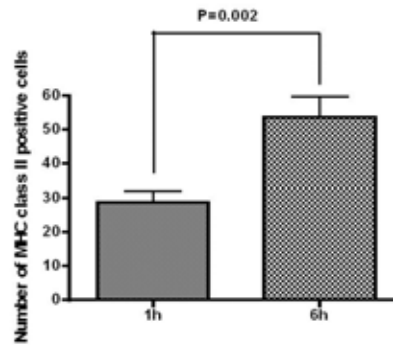
移植組織の皮膚の厚さ

- (3) *in vitro* の検討として行ったリンパ球混合刺激試験ではグループ2（虚血時間6時間）のLEWラットリンパ球の方が、グループ1（虚血時間1時間）のLEWラットリンパ球よりもBNラットリンパ球による抗原刺激に対して増殖反応が強く現れることが確認された。一方でコントロールとして行ったLEWラットLEWラット間 iso graft のモデルでは移植組織の拒絶時間によってBNラット抗原に対する増殖反応には差が生じなかった。



リンパ球混合刺激試験結果

- (4) 移植後10日目に行った移植組織の免疫染色では、虚血時間が長い組織の方がMHC-II抗原が強く発現していた。



移植組織のMHC-II抗原の発現

以上の結果より、虚血時間が長くなると移植後の拒絶反応が増強されることが明らかになった。そのメカニズムとして、虚血時間が長くなると虚血再灌流障害が強く生じ、それにより組織のMHC-II抗原の発現が増して拒絶反応を促進されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計1件)

Fumiaki Shimizu et al, Prolonged ischemia increases severity of rejection in skin flap allotransplantation in rats, *Microsurgery*, 査読あり, 30(2), 2010, p132-137

〔学会発表〕(計1件)

清水史明、佐藤治明、加藤愛子、種子田紘子、佐藤精一、藤原作平、片桐一元、岡本修、同種異系間複合組織移植における組織虚血時間と拒絶反応の関係. 第16回日本形成外科学会基礎学術集会, 10月11日, 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水史明 (Shimizu Fumiaki)
大分大学・医学部・助教
研究者番号： 50347027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし