同種複合組織移植における成長軟骨板の形態学的 変化について

第一報：急性拒絶時における成長軟骨の変化

九州大学医学部 整形外科

馬 渡 正 明・佛 淵 孝 夫

新 井 堅・杉 岡 洋 一

Morphological Changes of Acute Rejection Vascularized Growth Plate Allografts in the Rat

by

Masaaki Mohtai, Takao Hotokebuchi,
Ken Arai and Youichi Sugioaka

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka (Japan)

Using a genetically defined rat model, light and electromicroscopic examinations of acute rejection in vascularized allografts of growth plate were carried out. Vascularized allografts that were transplanted across a weak histocompatibility barrier showed gradual, less intense process of rejection than that transplanted across a strong histocompatibility barrier, so that these grafts allowed observation of the evolution of the process. In these grafts, the osteoclasts in the primary spongiosa of the metaphysis were early targets of rejection and loss of osteoclasts resulted in the cessation of resorbing the calcified cartilage. However, the proliferation and maturation of chondrocytes in the zone of proliferating chondrocyte and in the upper hypertrophic zone continued and resulted in the formation of a thickened calcified cartilage of the growth plate.

は じ め に

シクロスポリンを始めとする新しい免疫抑制剤の開発により、整形外科領域でも同種複合組織移植（以下CTA）の研究が脚光を浴びている^{1,6,7)}が、この研究に際し、移植片の拒絶時に於ける変化を知ることは、基本的に必要な事である。今回複合同組織の構成体のひとつである成長軟骨板について、その拒絶による変化を報告するが、この分野における報告はほとんどなく、inbred ratを用いたものでは、僅かに87年のGotfriedらの報告⁸⁾がある程度である。彼らの報告は顕微鏡レベルのものであり、我々はさらに軟X線撮影や電子顕微鏡を用いて詳細に検討し、彼らとは異なる結果が得られたので報告する。

材料及び方法

材料：動物はinbred ratであるF344とLewisを用いた。F344とLewisは主要組織適合抗原が一致して（共にRT-1⁹⁾）、この間の移植はminor mismatchとして比較的緩やかな拒絶が起こるとされており⁵⁾、経時の変化を調べるには適した組合せと考えられた。以下の2群を作製し経時的に屠殺し観察した。

Group 1

F344をrecipient, Lewisをdonorとするminor mismatch群, 15頭（7-8週令, 体重150gm-170gm）

術後, 2, 7, 9, 11, 14日目に3頭ずつ屠殺

Group 2

対照群としてdonor, recipient共にLewisである

isograft 群 10頭

group 1 と同様の期間で、2頭ずつ屠殺
成長軟骨板を観察するという目的のため、donor, recipient 共に体重150gm-170gmの若い rat を用いた。

方法：1. 外科的手技 これまで報告してきた方法に準じ、donor の右後肢を大腿中央部で切断後、recipient に同所性に、大腿骨骨接合と顕微鏡視下の大腿動静脈吻合を行った。

2. 試料作製 ネブタール麻酔下、左心室より1/2 Karnovsky 固定液にて灌流固定し (20分, 120mmHg), 移植した右後肢の脛骨を摘出し、軟X線撮影を行った。撮影後直ちに脛骨近位成長軟骨板を切り出し、長軸方向に細切後、さらに上記固定液にて浸漬固定した (2時間, 4℃)。一部は未脱灰のまま、一部は5% EDTA (3日間, 室温) にて脱灰後、1% OsO₄ による後固定を行い、脱水後 Epon812 に包埋した。0.5μm の切片を作製し、未脱灰標本はフォンコッサ+トルイジンブルー染色、脱灰標本はトルイジンブルー染色を行い、一部はトリミング後70nmの超薄切片を作製し、ウラン、鉛による電子染色後、JEOL 100CX にて電顕観察を行った。

結 果

1. 軟X線像 (図1)

対照群である Lewis の isograft では成長軟骨板に変化はみられなかった (1-a)。一方 minor mismatch 群では、術後11日目より成長軟骨下部の石灰化層の拡大がみられ、術後14日ではさらに顕著な拡大を認めた (1-b)。

図1 軟X線像

a; 対照群 isograft Day 14 成長軟骨板に変化はみられない。

b; minor mismatch Day 14 成長軟骨下部の石灰化層の延長がみられる。

2. 光顕像 (図2)

対照群では実験期間を通して成長軟骨板に変化はみられなかった (2-a)。一方 minor mismatch 群では、術後11日より成長軟骨下部の石灰化層の拡大がみられた (2-b)。軟X線で見られた変化が、組織学的にも石灰化層の拡大である事が確認された。更に詳細に観察するため脱灰標本にて検討すると骨幹端部において術後11日に破骨細胞の周辺にリンパ球の浸潤を認め (2-c)、術後14日になると、さらに強い細胞浸潤があり、もはや多核の破骨細胞は認められなかった (2-d)。他方、成長軟骨上部にはリンパ球の浸潤はなく、わずかにその栄養血管の周辺にのみ細胞浸潤を認めた。

図2 光顕像

a; 対照群 isograft Day 14 非脱灰

b; minor mismatch Day 14 非脱灰
石灰化層の延長がみられる。

c; minor mismatch Day 14 脱灰
破骨細胞の周辺にリンパ球(▲)の浸潤を認める。

d; minor mismatch Day 14 脱灰
Day 11 よりさらに強い細胞浸潤を認め、もはや破骨細胞はみられない。

図3 電顕像

a; minor mismatch Day 11にみられた破骨細胞. 細胞質内空胞はなく, 刷子縁, 明帯の形成もない. N: 核

b; minor mismatch Day 14 変性破骨細胞

ミトコンドリア(M)は腫大化し, 細胞質内に脂肪滴(L)がみられる. この細胞のまわりをマクロファージ(Mφ)がとり囲んでいる.

図4 minor mismatchにおける成長軟骨板の変化を示すスキーマ. 本文参照

3. 電顕像 (図3)

光顕での観察により, minor mismatch 群ではリンパ球の浸潤とともに石灰化層の延長がおこり破骨細胞の傷害が疑われたため, さらに電顕にて破骨細胞を観察すると, 対照群でみられた破骨細胞は多核の巨細胞であり, 細胞質内には多くのミトコンドリアと大小多

数の空胞をもち, 基質に接して, 細胞膜には ruffled border や clear zone といった基質の吸収に関与する構造がみられ, active な破骨細胞であった. 一方 minor mismatch 群ではリンパ球浸潤がおこる術後11日に破骨細胞には特徴的な変化がみられた. つまり基質より遊離し細胞質内空胞がほとんどなく, ruffled border や clear zone を認めず, inactive な破骨細胞と考えられた (3-a). 術後14日になると電子密度が増加し, 多くのミトコンドリアは腫大化した破骨細胞の変性像と考えられる細胞が観察された (3-b) が, 正常な破骨細胞は認められなかった.

考 察

臓器移植としてのCTAを考える場合, その拒絶時における変化を知ることは最も基本的なことである. 今回の我々の報告はまずCTAの中で成長軟骨板についてであるが, 87年 Gotfried らは minor mismatch 群において成長軟骨板の拡大がおこると報告している⁹⁾が, 彼らの報告は脱灰標本での検索であり, 我々の報告で明らかになったように, 成長軟骨板の拡大は, 石灰化層の拡大であることが判明した. そしてこの病態には破骨細胞の傷害が関与するものと考えられた. つまり骨幹端の破骨細胞はマクロファージやリンパ球といった免疫担当細胞の浸潤にともない, 不活性化し, さらに変性, 壊死に落ちいる. この結果成長軟骨下部

の石灰化層の吸収が抑制される。一方、成長軟骨上部では細胞浸潤は栄養血管の周囲のみで増殖層への浸潤はなく、拒絶の影響を受けずに増殖を続ける。その結果が石灰化層の延長となってあらわれるものと考えられた(図4)。今回の実験のような minor mismatch の場合, major mismatch の場合と異なり, 血行障害がゆるやかであり成長軟骨全体の早期の壊死が起こらないため, このような特異な病態がおこるものと思われた。破骨細胞は造血幹細胞由来の単核細胞が癒合して生じる細胞と考えられている^{3,4,8)}が, 移植免疫学的には骨髄細胞は最も免疫原性が強いとされており²⁾, 拒絶にさいし, 破骨細胞は早期の標的になるものと思われた。

ま と め

1. 近交系ラットを用いた肢移植モデルを使用し, 拒絶における成長軟骨板にみられる変化を軟X線・光顕・電顕を用い, 経時的に観察した。
2. Lewis rat を donor, F344 rat を recipient にした minor mismatch 群では, 術後11日より石灰化層 (Zone of calcification) の拡大がみられるようになり, 術後14日にはより一層の拡大が認められた。
3. 石灰化層の拡大が始まる11日の骨幹端部にはリンパ球やマクロファージの浸潤がみられ, 破骨細胞の不活化がおこり, 術後14日にはさらに強い細胞浸潤を認め, 破骨細胞は変性壊死に陥っていた。これは拒絶により, 骨髄由来の細胞と考えられている破骨細胞が初期の標的となり傷害を受け, 壊死に陥るものと考えられた。
4. 一方, 成長軟骨板の静止細胞層, 増殖細胞層にはリンパ球等の細胞浸潤はなく, 細胞の変性も認められなかった。
5. 対照群の Lewis 間の isograft では, 上記の変化は認められなかった。
6. 以上により, minor mismatch 群というゆるやかな拒絶のモデルの場合, 成長軟骨板の増殖細胞層は分裂を続けるが骨幹端部では拒絶により破骨細胞が消失するため石灰化層の吸収が妨げられ, 結果として石灰化層の拡大がおこるものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Black, K. S. et al.: Composite tissue (limb) allograft in rats. 2 Indefinite survival using low-dose cyclosporine. Transplantation, 39: 365, 1985.
- 2) Burchardt, Hans.: The biology of bone graft repair. Clin. Orthop. 174: 28, 1983.
- 3) Burger, E. H. et al.: In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 156: 1604, 1982.
- 4) Coccia, P. F. et al.: Successful bone-marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis. New Engl. J. Med. 302: 701, 1980.
- 5) Gotfried, Y. et al.: Histological characteristics of acute rejection in vascularized allografts of bone. J. Bone and Joint Surg. 69-A: 410, 1987.
- 6) Hewitt, C. W. et al.: Cyclosporine A (CyA) is superior to prior donor specific blood transfusion for the extensive prolongation of rat limb allograft survival. Transplant Proc, 15: 514, 1983.
- 7) Hewitt, C. W. et al.: Composite tissue (limb) allograft in rats. 1 Dosedependent increase in survival with cyclosporine. Transplantation, 39: 360, 1985.
- 8) Kahn, A. J. et al.: Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. Nature, 258: 325, 1975.

質 問

長崎大学 岩崎 勝郎

main target は osteoclast か?

解 答

九州大学 馬渡 正明

今回は osteoclast のみについて述べたが, osteoblast も当然 target になる。しかし術後14日に osteoclast は消失するが, osteoblast はまだ形態を保っており, 両者の間には免疫原性に違いがあると考えられる。

質 問

久留米大学 小宮 節郎

active osteoclast と inactive osteoclast は電顕上どのように区別できますか。

解 答

九州大学 馬渡 正明

細胞核の減少, 細胞質内空胞の減少, 刷子縁, 明帯の消失等である。