

健常兎腎に対する経皮的凍結手術後の組織学的変化に 関する検討:アポトーシスの発生について

学位論文内容の要旨

【目的】

腎の凍結手術では、一定温度以下に凍結された組織に完全凝固壊死が起こるとされているが、氷の表面即ち 0℃からマイナス 16.1℃の間には生存細胞と死細胞が混在する辺縁領域が存在している。また凍結手術により、アポトーシスが生じることは *in vitro* での研究で報告されており、辺縁領域の細胞死に関しては、その細胞死の形として、強制的な細胞死である壊死のみでなく、自己死であるアポトーシスが関係していることが推察される。

腎癌の凍結手術にて生ずる辺縁領域は、治療後の再発の有無に大きく影響し、その領域でどのような機序により細胞死が誘導されるのかを検討する価値がある。

我々は、健常兎腎を用いて MRI 画像誘導下経皮的凍結手術を行い、急性期の凍結手術効果を組織学的に評価し、特に辺縁領域の細胞死の原因にアポトーシスが関連しているかどうか検討した。

【対象と方法】

1. 実験動物

対象として 13-16 週齢、体重 2.8-3.2kg のニュージーランド白兎 5 羽を用いた。

2. 凍結病変の作成

凍結病変の作成は、凍結手術装置を用い、本装置に 2mm 径 MRI 対応凍結用プローブを接続した。高圧のアルゴンガスをプローブ先端の細径部ノズルから噴出させ、Joule-Thomson 効果によりプローブ先端金属部を極低温化しプローブ先端に氷球を作成した。氷球の溶解は、ヘリウムガスをプローブに通ずることにより行われた。プローブの誘導・挿入、氷球作成・溶解のモニターは 0.3 テスラの開放型 MRI 装置を用いた。兎腎へのプローブ挿入、氷球サイズの把握は *real time* で MRI 透視用モードを利用して行った。

3. 凍結プロトコール

対象兎を MRI 装置のガントリー内に側臥位にし、固定した。MR 画像を元に、皮下から挿入した凍結用プローブを腎臓に接するように留置し、組織内凍結を行った。凍結プロトコールは最低到達温度 -125℃に設定し、初回凍結を 8 分間 -125℃で行い、-20℃まで 2 分間解凍し、再凍結を 8 分間施行した。その後、37℃まで再解凍し氷球を溶解した。

4. 組織学的検討

兎は凍結手術後 1.5~3 時間で安楽死させた。直ちに開腹し、治療腎とその周囲の筋や組織を一塊に摘出した。5 羽のうち 3 羽では健側腎も併せて摘出した。摘出臓器は 10%ホルマリン溶液で固定した。肉眼所見として凍結領域の形態及びサイズを観察したのち、パラフィン包埋後 4 μm 厚の切片を作製した。この切片を用いてヘマトキシリン・エオジン (以下 HE) 染色を施行した。HE 染色では、凍結領域及びその周囲の組織学的変化を評価した。またア

ポトースに陥った細胞核を識別する目的で Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (以下 TdT)-mediated dUTP-biotin Nick End-labeling (以下 TUNEL) 法を施行した。本法では染色された核を認める細胞 (以下陽性細胞) の有無と分布を観察した。

[結果]

1. 肉眼的所見:

腎の断面では凍結領域に一致して半円形の暗赤色を呈する出血性梗塞様の出血帯を認め、腎被膜下に出血を伴っていた。固定前後の標本において全例で正常腎実質との境界が明瞭であった。5例のうち3例で凍結領域から腎門側へ連なる嘴状の出血帯を認めた。出血帯の大きさは、嘴状の出血帯を除き、18x5mm から 20x10mm であった。

2. 組織学的変化:

(1) HE 染色:

凍結領域の組織学的所見は、大きく中心・辺縁の2つの領域に分けられた。凍結領域内には多量の出血を認め、血管内には赤血球の貯留を認めた。出血帯のうち腎皮質側に近い凍結中心領域では全ての組織に完全凝固壊死の所見を認めた。完全凝固壊死部外側の辺縁領域には出血に加えて、生存細胞と死細胞の混在する領域を認めた。凍結領域に接する非凍結領域に関しては、凍結領域に接して核のクロマチン濃縮を伴う細胞がわずかに認められた。肉眼的所見で認めた腎門側へ向かう嘴状の出血は尿細管への出血や血管内の鬱血であった。未治療の対側腎3腎については組織学的傷害を認めなかった。

(2) TUNEL 法:

凍結中心領域の完全凝固壊死部には陽性細胞は認めなかった。辺縁領域のうち皮質側については凍結手術辺縁域及び隣接する治療域外にも陽性細胞は明らかではなかった。辺縁領域の髄質側に核の濃染される細胞を多数認めた。陽性細胞を認めた領域は凍結手術域外縁より凍結領域中心側 2~4mm の幅でみられ、その平均は 3mm であった。辺縁領域には核形態に異常がなく核の濃染の見られない生存細胞と、核のクロマチン濃縮に加えて茶褐色に染色される陽性細胞が見られた。しかし核濃縮があるにもかかわらず茶褐色に染色されない細胞核もあり、生存細胞とアポトーシス細胞、壊死細胞が混在していた。凍結領域外においては、髄質側に陽性細胞が多数みられ、凍結手術辺縁域から連なるように認められた。陽性細胞は非陽性細胞と混在して認められ、凍結手術域から離れるに従って減少し消失した。その幅は凍結手術域外縁より 1~10mm でみられ、その平均は 5mm であった。陽性細胞は主に尿細管細胞に見られた。血管内皮細胞にも認められたが少数であった。凍結手術を行わなかった対側3腎については陽性細胞を認めなかった。

[考察]

我々の実験ではアポトーシスが辺縁領域の主に尿細管上皮細胞に存在しており、さらに凍結手術域外にまで広がっていた。凍結手術辺縁域に関しては、最低到達温度は少なくともマイナス 16℃から零度の間であったと推測され、垂致死温度への暴露状態であり、さらに虚血が起こることによりアポトーシスが生じたと考えられる。またハムスターの線維芽細胞を用いた実験で、アポトーシスが、凍結に至らない 6℃でも生じているとの報告があり、凍結領域に接している非凍結領域においては、凍結に至らない低温刺激が原因となってアポトーシスを生じている可能性がある。

辺縁領域には、近傍の非凍結領域も含めてアポトーシス細胞が多く見られたが、すべての細胞に認めたわけではない。今回は凍結手術直後の一時相での検討であり、凍結後急性期にアポトーシスの見られなかった細胞が、その後アポトーシスを生じるか否かについては不明である。辺縁領域は生存細胞も混在するために一般的には凍結手術による治療効果が完全に期待できる部位ではなく、腫瘍性病変を完全壊死部に内包するように治療することが要求されるが、少なくとも凍結療法後急性期において辺縁領域にアポトーシスが一定の役割を果たし

ていることが今回の研究で明らかとなった。今後の課題として、髄質と皮質の反応性の違いや、治療後更に時間が経過した場合のアポトーシスの有無や程度などを検討することにより、凍結手術辺縁域における経時的なアポトーシスの関与を解明し、ひいては辺縁領域の治療効果を考えるための有用な情報となることが期待される。

【結論】

健常兔腎を用いた腎に対する凍結手術後急性期において、髄質側凍結手術辺縁部とその隣接する非凍結領域にアポトーシスの発生を証明した。辺縁領域における、生存細胞と死細胞の混在の原因の一つとして、アポトーシスの関与が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 野々村 克 也

学 位 論 文 題 名

健常兎腎に対する経皮的凍結手術後の組織学的変化に 関する検討:アポトーシスの発生について

腎の凍結手術では、一定温度以下に凍結された組織に完全凝固壊死が起こるとされているが、凍結領域辺縁には生存細胞と死細胞が混在する領域が存在する。また凍結手術により、アポトーシスが生じることが *in vitro* での研究で報告されており、辺縁領域の細胞死には、強制的な細胞死である壊死のみでなく、アポトーシスが関係していることが推察される。腎癌の凍結手術にて生ずる辺縁領域は、再発の有無に影響する為、どのような機序により細胞死が誘導されるのかを検討する価値がある。そこで本論文では健常兎腎を用いて MRI 画像誘導下経皮的凍結手術を行い、急性期の凍結手術効果を組織学的に評価し、特に辺縁領域の細胞死の原因にアポトーシスが関連しているかどうか検討した。

ニュージーランド白兎 5 羽を対象とした。凍結病変は凍結手術装置と凍結用プローブを用いた。プローブの誘導・挿入、氷球作成・溶解のモニターは低磁場開放型 MRI 装置を用いた。MR 画像を元に、皮下からプローブを腎臓に接するように留置し組織内凍結を行った。凍結は最低到達温度 -125°C に設定し、初回凍結を 8 分間 -125°C で行い、 -20°C まで 2 分間解凍し、再凍結を 8 分間施行した。その後、 37°C まで再解凍し氷球を溶解した。

兎は凍結手術後 1.5~3 時間で安楽死させ、治療腎を摘出した。3 羽では健側腎も併せて摘出した。肉眼所見として凍結領域の形態及びサイズを観察した。また薄切切片を作製し HE 染色を施行し凍結領域及びその周囲の組織学的変化を評価した。またアポトーシスに陥った細胞核を識別する目的で TUNEL 法を施行し、染色された核を認める細胞（以下陽性細胞）の有無と分布を観察した。

断面では凍結領域に一致して半円形の暗赤色を呈する出血性梗塞様の出血帯を認めた。3 例で凍結領域から腎門側へ連なる嘴状の出血帯を認めた。出血帯の大きさは、嘴状の出血帯を除き、 $18\times 5\text{mm}$ から $20\times 10\text{mm}$ であった。

凍結領域の組織学的所見は、大きく中心・辺縁の 2 つの領域に分けられた。出血帯のうち腎皮質側に近い凍結中心領域では全ての組織に完全凝固壊死を認めた。完全凝固壊死部外側の辺縁領域には出血に加えて、生存細胞と死細胞の混在する領域を認めた。凍結領域

に接する非凍結領域には、わずかに傷害を認めた。腎門側へ向かう嘴状の出血は主に血管内の鬱血であった。未治療の対側腎3腎には組織学的傷害を認めなかった。

TUNEL法では凍結中心領域の完全凝固壊死部には陽性細胞は認めなかった。辺縁領域のうち皮質側には凍結手術辺縁域及び隣接する治療域外にも陽性細胞はなかった。辺縁領域の髓質側に陽性細胞を多数認めた。陽性細胞を認めた領域は凍結手術域外縁より凍結領域中心側2~4mm(平均3mm)の幅であった。辺縁領域には生存細胞と、核のクロマチン濃縮に加えて茶褐色に染色される陽性細胞が見られた。しかし核濃縮があるにもかかわらず茶褐色に染色されない核もあり、生存細胞とアポトーシス細胞、壊死細胞が混在していた。凍結領域外においては、髓質側に陽性細胞が多数みられ、凍結手術辺縁域から連なるように認められた。陽性細胞は非陽性細胞と混在して認められ、凍結手術域から離れるに従って減少し消失した。その幅は凍結手術域外縁より1~10mm(平均5mm)であった。陽性細胞は主に尿細管細胞に見られた。凍結手術を行わなかった対側3腎については陽性細胞を認めなかった。

健常兎腎を用いた腎に対する凍結手術後急性期において、髓質側凍結手術辺縁部とその隣接する非凍結領域にアポトーシスの発生を証明した。辺縁領域における、生存細胞と死細胞の混在の原因の一つとして、アポトーシスの関与が示された。

口頭発表に際し、副査の長嶋教授から実験対象となった腎凍結療法後の腎皮質と髓質の反応性の違い、アポトーシスのパスウェイに関する質問があった。次いで、副査の野々村教授から凍結条件の設定、癌と正常組織における凍結治療への反応性の違い、尿細管再生の有無に関する質問があった。最後に主査の宮坂教授から、アポトーシスへの血流の影響、腎皮質と髓質の反応性の相違への血流の影響に関する質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果や文献的知識により、おおむね適切な回答を行った。

この論文は、従来部分壊死とされていた腎の凍結手術辺縁域にアポトーシスが生じていることを示した。将来的には腎癌と正常腎細胞における治療効果の差異に関する研究につながり、ひいては臨床の場で腎癌を治療する際の重要な基礎データとなることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。