特集13

画像解析手法の移植病理への応用:小腸移植の保存に伴う 傷害と粘膜修復の関連性

九州大学第1外科,九州大学医学部総合診療部¹,原土井病院臨床研究部² 中村賢二郎 田中 雅夫 中房 祐司 亀井 降史 池松 秀之¹⁾²⁾

小腸グラフトの冷保存による組織傷害と移植後の粘膜修復の相互関係を画像解析手法で明らかにした。0,6,12時間冷保存グラフト(n=9)でラット小腸移植を行い,再灌流時に bromodeoxyuridine (BrdU)を投与して S 期細胞の核を標識した。移植後 1,24,48時間のグラフト小腸粘膜を組織学的,免疫組織化学的に検索し,コンピュータ画像解析は Macintosh,NIH Image を用いて行った。組織傷害は再灌流後に明らかで,保存時間が長いほど高度だった。画像解析では,移植後 1 時間の BrdU 標識率および移植後24,48時間の標識細胞の上皮列内移動速度はともに,6,12,0時間保存群の順で有意に大きかった。以上より,小腸保存に伴う傷害は,陰窩の細胞増殖を刺激して粘膜修復を促進するが,傷害が大きすぎるときはその刺激に対する増殖反応が減弱することを意味する。このように新しい画像解析手法は,今後移植病理の分野でも応用可能である。

Key words: computer morphometry with NIH image on Macintosh, preservation and reperfusion injury in small bowel transplantation, labeling with bromodeoxyuridine

はじめに

小腸は阻血・虚血性傷害を受けやすいが、粘膜修復能力が高い臓器でもある。臨床小腸移植において、保存に伴うグラフト傷害は、外界からの細菌の侵入に対するバリヤー機能の不全として現れ、bacterial translocation に続く敗血症対策が術後早期の重要な問題である"。防御機能は、粘膜の傷害と修復のバランスの上に成り立っており、その相互関係はいまだ明らかではない。

一方,臓器移植の発展に病理学的アプローチは多大に貢献しており,拒絶反応や保存に伴う傷害評価には必須である²⁰. 近年,移植にかかわる病態解明は様々な分野でなされており,移植病理も従来の方法に加えて客観的データの分析に画像解析手法が応用されつつある。今回,小腸グラフトの冷保存による組織傷害と移植後の粘膜修復の相互関係を,コンピュータ画像解析

<1995年12月6日受理>別刷請求先:中村賢二郎 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学 部第1外科 手法を用いて明らかにした。

材料と方法

Lewis ラット小腸グラフト(n=9)を,0,6,12時間冷保存し,同所性同系移植を行った³)。それぞれ再灌流時に Bromodeoxyuridine (BrdU) 100mg を静脈内投与し,移植時における S 期細胞の核を標識した⁴)。移植前および移植後 1,24,48時間で経時的にグラフト小腸粘膜を外科的に採取して連続切片を作成し,組織学的には HE 染色を,免疫組織化学的には抗 BrdU 抗体 (DAKO)を用いて ABC 法による免疫染色を行った。

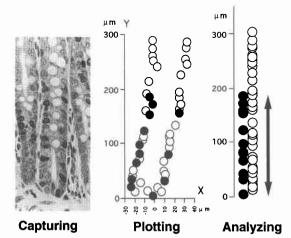
組織学的検索は小腸粘膜の変化を Park の分類 5 に準じて,軽度(粘膜固有層の浮腫または絨毛上皮の剝離:Park の grade 0~3),中等度(絨毛構築の破壊:grade 4~5),高度(陰窩から粘膜全体の傷害:grade 6~8)に分けて評価した。

画像解析は免疫組織化学的に染色された BrdU 標識細胞の腺管上皮列内の局在・分布状況を分析した (Fig. 1). 画像解析に用いた腺管は, 腺底部から同一面で陰窩・絨毛上皮列がカットされ, 長軸方向に全体が観察できる腺管のみを対象とした. 選定された腺管は,

^{*}第46回日消外会総会シンポ2・臓器移植の現況と21 世紀への展望

1996年 4 月 123(917)

Fig. 1 Methods of computer morphometry. Proper glandular outline was captured into the computer system via video camera apparatus (capturing), distributions of both positive and negative cells for BrdU were plotted on the X-Y plane (plotting), and the distance from the bottom of the crypt to the positive/negative cells were measured (analyzing). Labeling index at 1 hour after transplantation was calculated with positive and negative cells between the arrow heads.



光学顕微鏡に備え付けたビデオカメラ装置を介してコンピュータに取込んだ(capturing)。マッキントッシュ・コンピュータ上で,パブリックドメインソフトの NIH Image を用いて腺管の構成細胞を,陰窩基底部を原点として XY 座標上に陽性細胞,陰性細胞を別々にプロットし,再構築を行った(plotting)。それぞれの細胞について,原点(腺底部基点)からの距離(μ m)を計算して分布状態を単純化し解析に用いた(analyzing)。

解析はS期細胞標識率 (labeling index) として,各0,6,12時間保存グラフトの移植後1時間における,陰窩部 BrdU 陽性細胞の割合を計47腺管について行い,各群の平均値を算定した。次に標識細胞の陰窩・絨毛上皮列内移動状況 (migration of labeled cells)として,移植後1,24,48時間の各群における BrdU 陽性細胞の,腺底部基点からの距離の平均値の算定を,計88腺管,8,213陽性細胞について行った。統計学的平均値の差はt検定を用い,p<0.05を有意差ありと判定した。

結 果

1) 組織学的所見

0, 6,12時間冷保存直後の粘膜組織像は,全群で 傷害は軽度だった。移植1時間後の標本では,冷保存 時間が長いほど傷害程度が高い傾向が明らかだった。 すなわち,0時間保存群では粘膜固有層の浮腫や絨毛 上皮の遊離,剝離を認め(軽度傷害),6時間保存群で は上皮のみならず絨毛の荒廃,脱落が見られるように なり(中等度傷害),12時間保存群では,絨毛構築の破 壊のみならず粘膜全層の炎症所見と浅部陰窩の傷害ま で認めた(高度傷害)が,深部陰窩の構築は保たれて いた。なお,試験的に行ったBrdU 非投与群と投与群 の間に組織像の違いは認めなかった。

2) 免疫組織化学的所見

BrdU 陽性細胞は,抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的染色にて核内のみに明瞭に検出された.光学顕微鏡下における BrdU 陽性,陰性細胞の判定は容易で,取り込まれた画像を処理するコンピュータモニター上でも十分に識別可能であった.免疫染色で判別される BrdU 陽性,陰性細胞は,連続切片の HE 染色にてそれらを識別することはできなかった.まれにモニター上で陽性,陰性の判断に苦慮する細胞は,光学顕微鏡にて強拡大で確認した.

移植後1時間の標本でBrdU陽性細胞はほとんど 陰窩部に存在し、24時間、48時間後は陰窩・絨毛上皮 列を上方(内腔側)に移動していたが、ごく少数の陽 性細胞が、陰窩・絨毛上皮列のなかに取り残されたよ うに認められた。

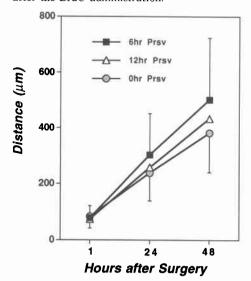
3) S期細胞標識率 (labeling index)

移植後 1 時間の標本における BrdU 標識率は,0 時間保存群 $34\pm8\%$,6 時間保存群 $52\pm11\%$,12時間保存群 $43\pm8\%$ で,6 時間,12時間,0 時間保存群の順で S 期細胞標識率が高かった。平均値の統計学的有意差を6 時間・0 時間保存群間(p<0.01)と12時間・0時間保存群間(p=0.02)で認めたが,6 時間・12時間保存群間に有意差は認めなかった(p=0.08)。

4) 標識細胞の陰窩・絨毛上皮列内移動状況 (migration of labeled cells)

移植後 1 時間のグラフトでは、BrdU 陽性細胞はほとんど陰窩底部から中部に存在し、陽性細胞の陰窩腺底部からの平均距離は 0 時間保存群で83±41μm, 6 時間保存群78±43μm, 12時間保存群74±44μm で 3 群間に有意差はなかった。24時間後は絨毛・陰窩移行部付近に陽性細胞の主座がばらつきを持って移行し、平均距離は 0 時間保存群で238±99μm, 6 時間保存群303±149μm, 12時間保存群258±129μm で、各群の平

Fig. 2 Mean distance of labeled cells from the bottom of the crypt. Migrating velocity is higher in the order of 6, 12 and 0 hour preservation during 24 to 48 hours after transplantation and the zone of labeled cells broadened with time after the BrdU administration.



均値に有意差を認めた(p<0.01)。48時間後は絨毛中部から先端部にかけてさらにばらつきを持って存在し,平均距離は0時間保存群で $382\pm142\mu m$,6時間保存群 $502\pm222\mu m$,12時間保存群 $434\pm244\mu m$ で各群の平均値に有意差を認めた(p<0.05)(**Fig. 2**)。

考察

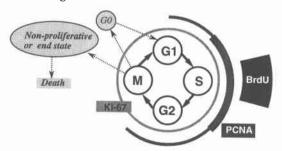
組織学的、免疫組織化学的検索に画像解析手法を応 用して、保存小腸グラフトにおける粘膜の傷害と修復 の特徴を明らかにした、保存に伴う組織学的傷害は、 再灌流後に明らかとなり, 保存時間が長いほど高度で あった⁶⁾。一方, 6, 12, 0 時間保存グラフトの順で, BrdU の標識率と陽性細胞の上皮列内移動速度がとも に大きかったという本実験のデータは、保存に伴う傷 害が陰窩部に存在する増殖細胞の分裂能を刺激し粘膜 再生を促進していること、傷害が大きすぎるときはそ の刺激に対する増殖・再生反応が減弱することを意味 している。攻撃物質は虚血と再灌流に伴う xanthine oxidase 反応生成物と言われておりっ、この酵素が豊富 に存在する絨毛のみに傷害が限局する場合, 陰窩部増 殖帯の細胞群は増殖促進刺激を受けるが、さらに傷害 が大きく陰窩部まで及ぶと,増殖細胞そのものが顕性, 非顕性に傷害を受けるためだろう.

新しい保存液の開発によって, 腎, 肝グラフトの冷

保存許容時間は画期的に延長したが、小腸移植においては最良保存液や冷保存許容時間はいまだ明らかではない。本研究により、再灌流後に陰窩部の細胞が残存していれば粘膜再生が期待でき、少なくともnonfunctioning bowel を回避できることが予想される。臨床小腸移植41例の観察でも、再灌流後に陰窩部が辛うじて残存する高度傷害を示していた2例(冷保存約10時間)で、術後2週間以内の粘膜修復が組織学的に確認されている。しかし、小腸の重要機能であるバリヤー機能や消化吸収機能が、実際にいつ頃、どれほど回復するかは不明であり、今後bacterial translocation、種々の消化吸収試験などの研究によって明らかにされるであろう10~13)。

増殖細胞の評価に関しては、特に腫瘍病理学の分野 において BrdU、Ki-67、PCNA などが多用されてい る¹⁴⁾¹⁵⁾ Ki-67や PCNA は外部から投与する繁雑さは ないものの、細胞周期の広い範囲に関与しているため 染色性や再現性に乏しい (Fig. 3)。今回用いた BrdU は自然界には存在しない thymidine アナログで、S期 の細胞のみを標識し、血液中の BrdU は肝臓にてすみ やかに代謝され、投与後10~20分で血中から消失す る¹⁶⁾ので pulse labeling に相当し、染色性や再現性も 良好で画像処理に最適であった。 なお, 本研究で最も 苦心したのは, 画像処理を行う対象腺管の選定であっ た. 主観に陥りやすい病理と完全に客観的データに基 づく画像解析の間には、橋渡しの役目として対象選定 に際して理論的に厳密な基準が必須である。今後コン ピュータ処理能力の拡大に伴い, 画像解析手法は形態 学の様々な分野で多用されるだろうが、その客観性と 再現性を繰り返し検証し続けねばならない。

Fig. 3 Cell cycle distributions for immunohistochemical staining of the three proliferation markers, cited from references 14 and 15. Thickness of the line refers to the intensity of each staining.



文 献

- 1) Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K et al: Intestinal transplantation in composite visceral grafts or alone. Ann Surg 216: 223—234, 1992
- 2) 中村賢二郎,岩城裕一:移植免疫2. 臟器移植の病理. 飯島宗一編. 現代病理学大系. 第6巻. 免疫. 中山書店,東京,1994,p199-211
- Murase N, Demetris AJ, Matsuzaki T et al: Long survival in rats after multivisceral versus isolated small bowel allotransplantation under FK 506. Surgery 22: 87—98, 1991
- Wynford-Thomas D, Williams ED: Use of bromodeoxyuridine for cell kinetic studies in intact animals. Cell Tissue Kinet 19: 179—182, 1986
- 5) Park PO, Haglund U, Bulkley GB et al: The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischaemia and reperfusion. Surgery 107:574—580, 1990
- 6) 中村賢二郎,亀井隆史,田中雅夫ほか:小腸グラフトの冷保存・再灌流性組織傷害:臨床・実験病理学的解析.今日の移植 9:59-63,1996
- 7) Fridovich I: The biology of oxygen radicals. Science 201:875—880, 1978
- 8) Kokudo Y, Furuya T, Takeyoshi I et al: Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, and lactated Ringer's solutions in rat small bowel preservation for orthotopic small bowel transplantation. Transplant Proc 26: 1492—1493, 1994
- 9) Nakamura K, Alexander KS, Demetris AJ:

- Histologic evaluation of preservation injury in clinical small bowel transplantation. Transplant Proc 26: 1416, 1994
- 10) Deitch EA, Berg R, Specian R: Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. Arch Surg 122: 185—190, 1987
- 11) Takeyoshi I, Kokudo Y, Zhang S et al: Susceptibility to ischemia: The large bowel versus the small bowel. Transplant Proc 26:1491, 1994
- 12) Nakamura K, Nalesnik M, Todo S et al: Lymphocyte trafficking using In Situ hybridization and physioanatomy of the intestinal immune system after human small bowel transplantation. Transplant Proc 24: 1197—1198,
- 13) Yoshimi F, Nakamura K, Zhu Y et al: Canine total orthotopic small bowel transplantation under FK 506. Transplant Proc 23: 3240—3242, 1991
- 14) Hall PA, Levison DA: Reivew: Assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol 43: 184—192, 1990
- Pathol 43: 184—192, 1990
 15) Coltrera MD, Gown AM: PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. J Histochem Cytochem 39: 23—30, 1990
- 16) Gonchoroff NJ, Greipp PR, Kyle RA et al: A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2 deoxyuridine that does not require DNA denaturation. Cytometry 6:506—512, 1985

Morphometric Analysis in Transplantation Pathology —Relationships between Preservation Injury and Mucosal Recovery in Small Bowel Transplantation—

Kenjiro Nakamura, Masao Tanaka, Yuji Nakafusa, Takafumi Kamei and Hideyuki Ikematsu¹⁾²⁾
Department of Surgery 1, Kyusnu University, Faculty of Medicine

¹⁾Department of General Medicine, Kyushu University

²⁾Department of Clinical Research, Hara-Doi Hospital

Relationships between preservation injury and mucosal recovery of the graft intestine were investigated histologically, immunohistochemically and by computer morphometry. Rat graft intestines (n=9) were preserved with cold lactated Ringer's solution for 0, 6 and 12 hours and then used for orthotopic small bowel transplantation with pulse labeling of bromodeoxyuridine (BrdU) in the reperfusion period. Samples of the graft intestine were collected 1, 24 and 48 hours after transplantation and examined histologically and immunohistologically with anti-BrdU antibody. Histological examination showed that the grades of tissue damage after reperfusion were related to the duration of the graft cold ischemia. Morphometric analysis of labeled cells with NIH image on Macintosh computer revealed that both the labeling index 1 hour after surgery and the migrating velocity of the labeled cells 24 and 48 hours after surgery were higher in the order of 6, 12 and 0 hour preservation, these results indicate that preservation injury to the graft intestine would stimulate the proliferating activity of crypt cells resulting in the immediate recovery from the mucosal barrier damage, while the excessive injury suppressed the regenerative reaction. We conclude that our new methods of computer morphometry and analysis should be applicable to transplantation pathology.

Reprint requests: Kenjiro Nakamura Department of Surgery 1, Kyushu University, Faculty of Medicine

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-82 JAPAN