

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 24 年度

課題番号：24659787

研究課題名（和文） CAS フリーザーによる凍結動物肢解凍後顕微鏡下再接着技術の開発

研究課題名（英文） Technical development of microscopic replantation of animal leg frozen with CAS freezer.

研究代表者

佐野 和史 (SANO KAZUFUMI)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40287769

研究成果の概要（和文）：生体組織を凍結・解凍すると通常では細胞破壊を起こすが、既に食品鮮度を保つために利用されている凍結・解凍時の細胞破壊を極力抑える特殊な冷凍技術（Cells Alive system, 略称 CAS）を用いて切断後凍結保存した動物肢を解凍し顕微鏡下に血管吻合再接着して生着生存させる技術開発を行った。結果現時点では CAS 凍結により細胞破壊をある程度抑える事ができたが、生着生存させるには至らなかった。今後に繋がる本研究成果として瞬時に組織内をむら無く均一に凍結し得る実験用 CAS 冷凍装置の冷凍能力を向上と、より組織障害性の少ない細胞凍結保存液の調整調合が鍵である事がわかった。

研究成果の概要（英文）：Usual freezing process causes completely cell death in the vital tissue. Cells Alive System (CAS) is a particular freezing technique which restrains cell death during freezing at minimum. Purpose of this research was to develop replantation technique of amputated, CAS frozen, and thawed animal leg. As results, although replanted leg resulted in complete necrosis eventually, very useful findings for the future were achieved. That is, progress of performance of CAS freezer as to produce quicker and more uniform freezing, and adjustment and preparation of cryopreservation solution would lead to future success.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：マイクロサージェリー学・凍結医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 外傷性手指切断に代表される血行再建を必要とする組織切断の再接着を生着率は、結構再開までの時間に大きく依存しており、この分野においては従来より長時間、長期間保存可能な技術開発が望まれているが、未だ有用な方法はない。

(2) 一方で、細胞内水分の結晶化を抑えた凍結を可能にした技術 CAS(cells alive

system)が開発され、解凍後の細胞生存率の向上、細胞分化能、接着性、増殖能の普遍性が基礎研究にて実証されている。歯科領域では、CAS を用いた歯根膜細胞、歯髓組織の凍結保存(tooth banking)が移植に用いられ成果があげられ、さらに日本国内では、卵子卵巣の冷凍保存後解凍移植に際し、微小な卵巣動静脈を吻合し卵子の生存率を飛躍的に向上させている。これら「CAS 冷凍技術」と「微

小血管外科技術」の異分野融合による成果は、より大きな複合組織であっても組織バイアビリティを有した凍結技術の開発に繋がるのではないかと考えるに至った。

(3) 本研究が成功すると現在長期保存が不可能な切断四肢や、臓器の半永久的保存が可能となり、血行途絶から再開までの時間的制約は消え、切断四肢の再接着手術は緊急手術から予定手術へと変貌し、腎臓、肝臓移植は、冷凍バンキングが可能となる。また、同時に距離的制約も消失し、移植手術、再接着手術を行う施設は日本のみならず世界中でごく限られた一部の特殊医療施設に集中させる事も可能となる。さらに細胞の「生」と「死」と言う、より根源的な問題への糸口がつかめる可能性がると思われた。

2. 研究の目的

個体より分離・切断され血行途絶した組織片の細胞破壊を起こさずバイアビリティを有したまま、いわゆる「冬眠状態」で保存しうる凍結技術を開発する。さらに解凍し微小血管吻合を行い元個体からの血行再開により生存、生着し得る技術を開発すること。

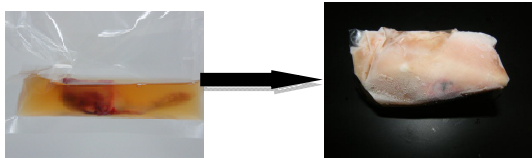
3. 研究の方法

(1) ラット後肢を用いた研究

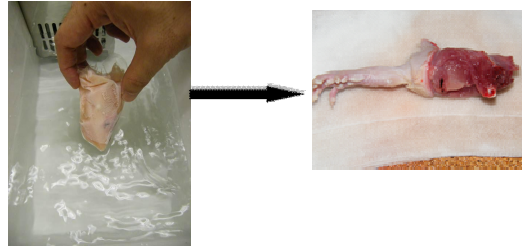
①切断したラット後肢を大腿動脈よりカテーテル挿入下に臓器移植用灌流液 (University of Wisconsin (UW) 液) で灌流し、次に細胞凍結保存液で灌流する。



②さらに同様の細胞凍結保存液に浸漬保存した後肢をCASフリーザーで-50℃までプログラム凍結する。



③さらにCASフリーザーにて5℃までプログラム解凍した後、25℃のエタノール恒温槽で15分間加温解凍する。



④解凍肢を再度UW液で灌流し組織内に残留する細胞凍結保存液を洗い出す。さらに再灌流後の血管透過性亢進予防のため、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム 30mg/kg、クロルフェニラミンマレイン酸塩 0.15mg/kg 投与し、感染予防に対してペニシリンG1万u/kgを灌流する。次に顕微鏡下に11-0ナイロン糸で大腿動静脈を血管吻合し、大腿骨を鋼線固定、大腿筋肉群、皮膚を縫合し再接着する。

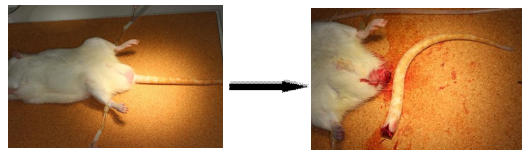


⑤再灌流が確認された後に経時的に再接着肢のバイアビリティを観察する。またメチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、クロルフェニラミンマレイン酸塩ペニシリンGはそれぞれ同量を24時間おきに腹腔内注射を三日間行う。

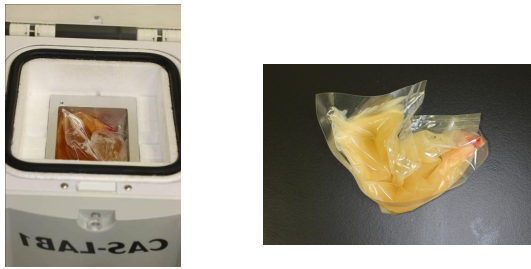
(2) ラット尾を用いた研究 ((1)の研究後の追加研究)

①研究(1)同様の手順をラット尾に対して行った研究

ラット尾を切断し同様の灌流を行う



同じく CAS によるプログラム凍結。



その後、同様の解凍操作後に顕微鏡下再接着施行。



再接着から肉眼所見でのバイアビリティの経時的確認とともに、0, 2, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 時間における尾の組織標本を作成しバイアビリティを確認する。

②CAS 凍結の有用性の組織学的実証研究
ラット尾を切断し UW と細胞凍結保存液で灌流し直ちにホルマリン固定した群 (コントロール群)、同じく灌流後研究(1)②③同様の手順で CAS 凍結解凍した後ホルマリン固定した群 (CAS 群)、さらに同じく灌流後一般冷凍庫で -20°C に凍結させ加温槽で解凍した群 (一般冷凍群) の組織を作成し比較した。

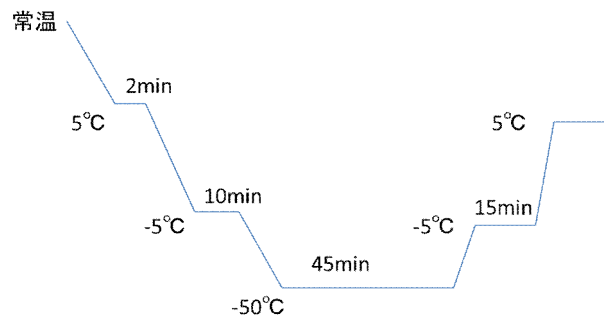


4. 研究成果

(1) ラット下肢を用いた研究結果について

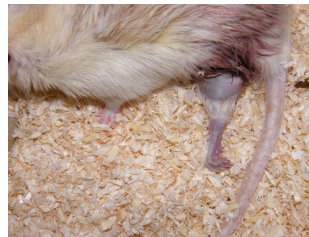
①切断肢の灌流操作について
涙嚢洗浄針を用いて UW 液に引き続き粘稠度の高い細胞凍結保存液を灌流する操作で血管内血液は全て wash out することが出来た。
②CAS 凍結プログラムについて
凍結プログラムでは図の如く段階的凍結を行い、組織内温度を -50°C で均一化するために 45 分間の温度維持が指摘と考えられた。この際、凍結強度は 0.9 アンペア、29.6 ボルトとし変化率を 24 ヘルツとした。

CAS 凍結曲線



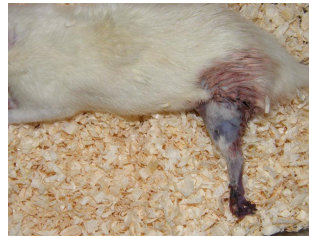
③再接着の結果について

本実験の n は 10 匹であったが、いずれも再接着 6 時間後までは血色良好であったが、



6 時間後

24 時間～48 時間後には完全壊死に陥った。



12 時間後

再接着 6 時間までの経過より、解凍再接着後に組織末梢での微小血管を介した組織内灌流が維持されている事は実証できたと考えるが、24-48 時間後に再接着肢は筋組織の浮腫に引き続き壊死に陥り、所謂、再灌流症候群を生じているものと推測された。そのため対象組織をラット後肢から相対的筋体量の少ないラット尾に変更し追試した。

(2) ラット尾を用いた研究結果について

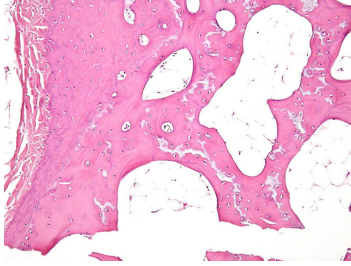
①研究(1)のラット下肢で施行した同じ手順での実験を 17 匹に対して施行した結果、おいて、肉眼的に壊死が確認できるまで平均 20 日かかったが、経時的切断標本では再接着 6 時間後には既に有効な血行を認めなかった。



20 日後のラット尾壊死所見

②CAS 凍結の有用性の組織学実証研究結果について
骨組織

コントロールでは骨小窩に骨細胞を入れる。viable な骨細胞、脂肪織の脂肪細胞からなる。



CAS 群では、○部分の骨は empty lacunae となり壊死となっているが、右側には viable な骨細胞も見られる。

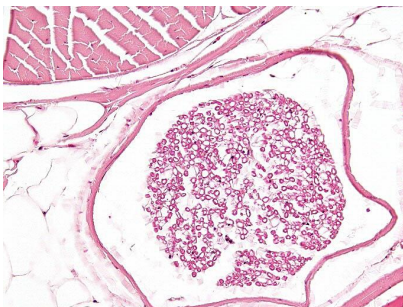


一般冷凍群では、骨は empty lacunae となり壊死し周囲の脂 viable とは言えない。

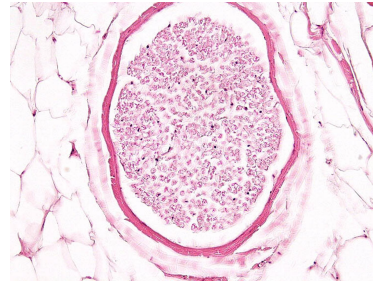


神経組織

コントロールでは、末梢神経背には軸索を取り囲む schwann 細胞の構造が明瞭。

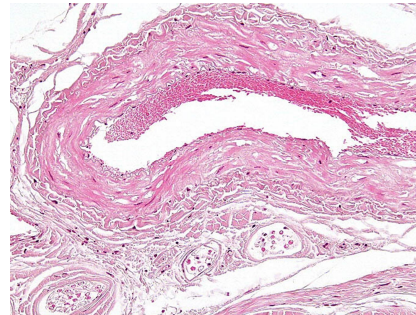


CAS 群、一般凍結群ではともに末梢神経線維は軸索を囲む schwann 細胞の臨場構造が崩れていた。

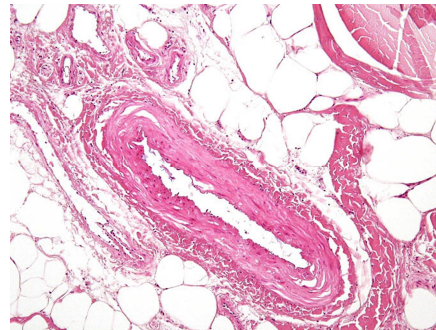


血管

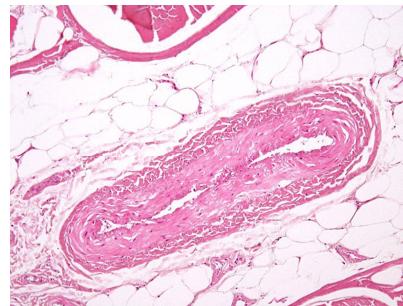
コントロールでは血管壁は artifact で空隙が出来ているが血管壁を構成する平滑筋細胞は viable であった。



CAS 群でも血管壁を構成する viable な平滑筋細胞も十分見られた。

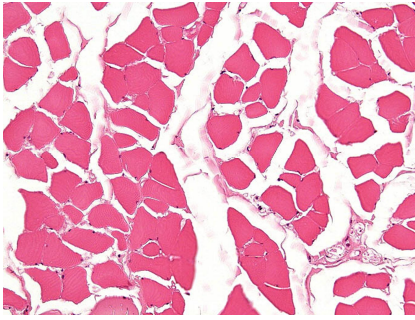


一般凍結群では、viable な部分はかなり少ない。

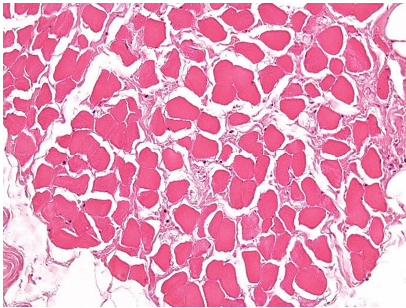


筋組織

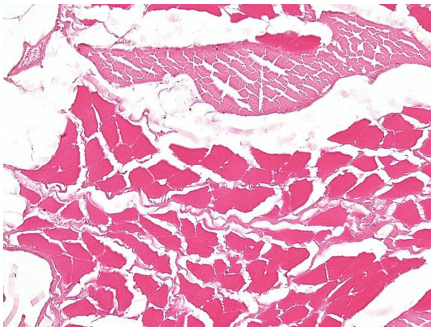
コントロールでは、横紋筋は保たれ筋繊維周囲に核がみえる。



CAS 群では、横紋筋は好酸性が強く、変性・壊死の状態に近いが、少ないながら核を認めた。



一般凍結群では、横紋筋は核を認めず、完全に変性・壊死した状態であった。



以上、神経線維に関しては、CAS 凍結によっても変性を防ぐ事はできなかったが、骨、血管、筋組織に関しては、明らかに一般凍結に比較して、バイアビリティを維持出来ている事が実証できた。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 和史 (SANO KAZUFUMI)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40287769

(2) 研究分担者

大関 寛 (OZEKI SATORU)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：50223821
木村 和正 (KIMURA KAZUMASA)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：00296146
橋本 智久 (HASHIMOTO TOMOHISA)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：70364635
増田 陽子 (MASUDA YOKO)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：60534112

(3) 連携研究者

なし