

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09234

研究課題名(和文)液体窒素処理による切断肢の長期凍結保存と再接着に関する実験研究

研究課題名(英文) Study on long-term cryopreservation and replantation of amputated limbs using liquid nitrogen.

研究代表者

岡田 博 (Okada, Hiroshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90896721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：切断肢に対する再接着術は0度の低温処理を行った場合24時間が限界とされてきた。近年、切断指を液体窒素を使用した凍結処理で長期保管後に再接着術が可能であった臨床例が中国から報告された。しかしながら液体窒素を使用した凍結処理に伴う組織の変化についての基礎的研究結果は乏しい。本研究ではラットの下腿切断肢を液体窒素を使用して急速および緩徐凍結法で処理を行い、2週間保管後に急速および緩徐解凍法を行い、ホルマリン固定後にそれぞれの組織を顕微鏡下に評価した。結果はいずれの方法でも血管障害を認め、神経障害は緩徐凍結法より急速凍結法の方が強いのが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではラットの切断肢を液体窒素を使用した複数の凍結法や解凍法にて長期保存を行い、顕微鏡にて組織の変化を検討した。その結果、いずれの方法でも組織障害性を認めた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that 24 hours is the limit for replantation of an amputated finger after storage at a low temperature of 0°C. Recently, a clinical case was reported from China in which replantation of an amputated finger was possible after long-term storage by cryopreservation using liquid nitrogen. However, there is a lack of basic research on tissue damage caused by liquid nitrogen cryopreservation. In this study, amputated lower leg limbs of rats were frozen with liquid nitrogen using rapid and slow freezing methods, stored for 2 weeks, and then thawed rapidly and slowly, and each tissue was evaluated under a microscope after formalin fixation. The results showed vascular damage in both methods, and neurological damage was more severe in the rapid freezing method than in the slow freezing method.

研究分野：整形外科

キーワード：cryopreservation replantation liquid nitrogen

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

切断肢の保存に関しては、現在では、低温(2~4℃)保存(表面冷却法)が一般的に用いられており、保存限界時間は指趾では24時間、筋の多い四肢では6時間とされている。近年、液体窒素処理による凍結保存(Cryopreservation)技術は目覚ましく進歩しており、Cryopreservation技術を切断指の保存に用いることで、5日~81日後に再接着術が可能であったとする、これまでの常識を覆す臨床応用の3例が、近年に中国から報告された。しかし、四肢を構成する様々な器官や組織の長期保存に伴う変化や再接着後の安全性や活動能力についての基礎的研究結果はほとんどなく、臨床応用の拡大は懸念される。

### 2. 研究の目的

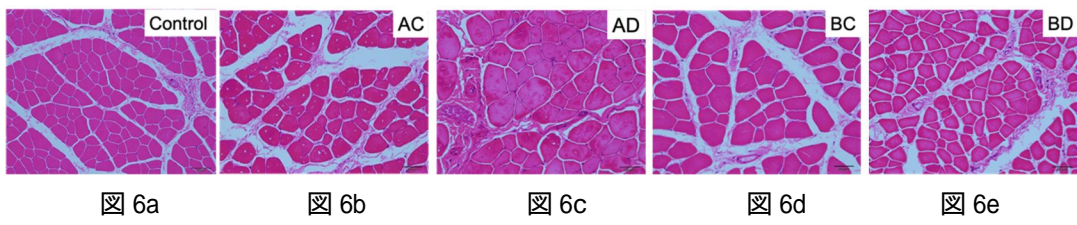
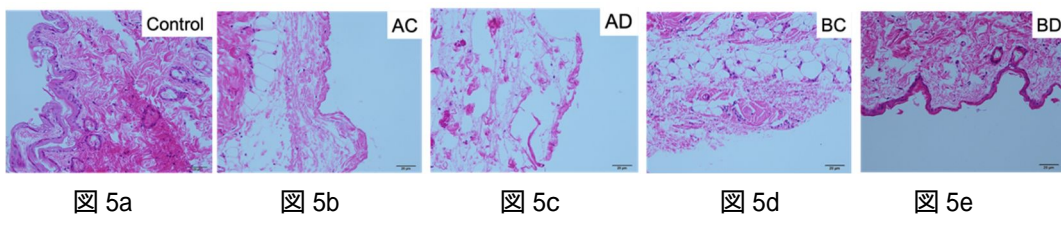
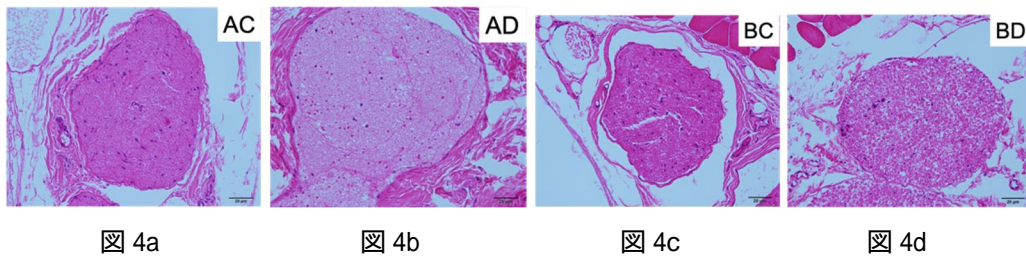
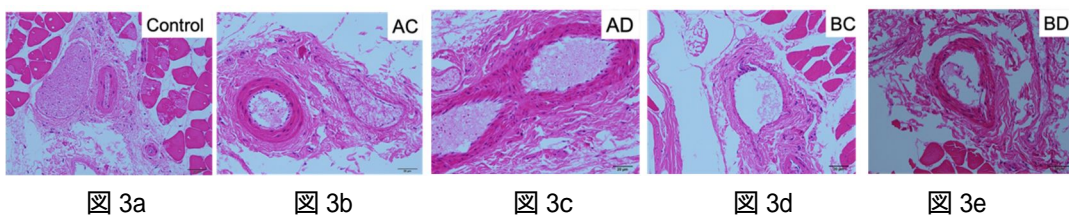
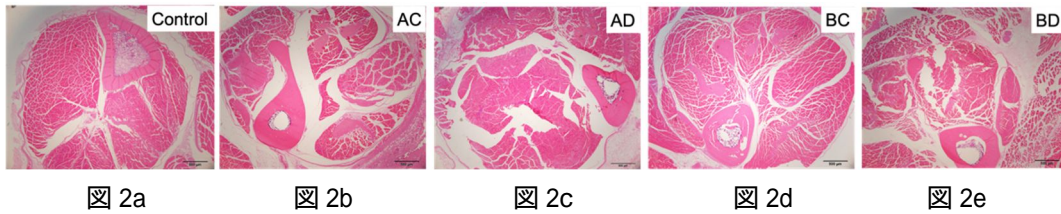
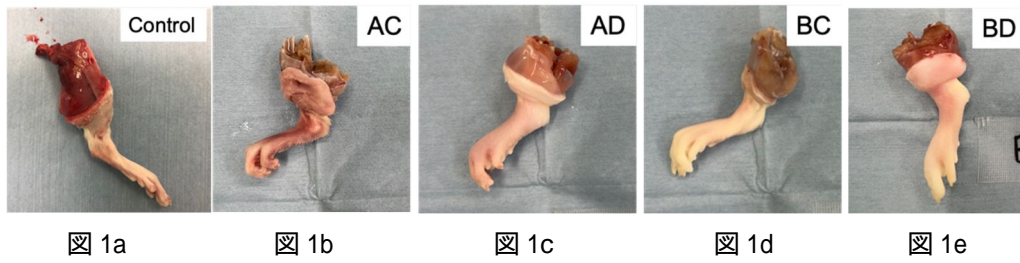
本研究では、ラットを用いて液体窒素処理で凍結保存した切断肢の再接着実験を行うことで、Cryopreservation技術が切断肢の長期保存と再接着に安全かつ有効に利用可能であるかどうかを調査することを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験動物としてはFischer 344ラットを用いた。15週齢のラット片側後肢を下腿中央で切断した。切断肢の保存方法としては、A法としてはWangらの臨床報告に従い、切断肢を凍結保護物質で血管内を灌流した後にガーゼでくるみ、それを滅菌ゴム手袋の中に密閉した後に4℃冷蔵庫で15時間、-20℃冷凍庫で4時間、-80℃冷凍庫で24時間保存した後、液体窒素(-196℃)に入れ、緩徐凍結を行った。原法では凍結保護物質の組成は10% fetal bovine serum、12% dimethyl sulfoxide、78% 標準培養液:RPMI1640培地であったが、fetal bovine serumおよびdimethyl sulfoxideは国内では体内および血管内への投与が認められていないため、使用しなかった。B法としてChenらの臨床報告に従い、ガーゼでくるみ、それを滅菌ゴム手袋の中に密閉した後に液体窒素につけて急速凍結を行った。切断肢を14日間液体窒素で保存した後に取り出し解凍を行った。解凍方法はC法として0.9%生理食塩水に切断肢を入れ、45℃の恒温振盪水槽に15分間入れ、50mlのマンニトール、25,000Uのヘパリン、4mgのデキサメタゾンを含む溶液に室温(約20℃)で10分間入れるChenらの緩徐解凍法と、D法として42℃の標準培養液の入った恒温振盪水槽に約5分間入れ、その後大腿動脈から標準培養液を1ml/分の速度で15~20分間灌流するWangらの急速解凍法をとした。AとBの凍結法、CとDの解凍法をそれぞれに対して行い(計AC、AD、BC、BDの4群)解凍終了後に同系ラットの別固体背部に、血管は大腿動静脈同士を吻合して保存肢を移植し、生着率を観察した。また4群をホルマリン固定後にHE染色を行い、組織学的評価を行った。骨、筋肉、神経、皮膚、血管を組織サンプルとして採取し、組織標本作製した。コントロールである保存処理を行っていない健肢の組織標本と比較することで、組織の変性所見を定性的に分析した。

### 4. 研究成果

まず凍結保存した切断肢を2週間保管後に再接着を行ったが、生着は困難であった。続いて切断肢を凍結、解凍後したAC、AD、BC、BDの4群とコントロールである切断直後の下肢の組織学的変化を評価した。標本の肉眼的な評価として、コントロールとAC、BCと比較してADとBDは組織の膨化を認めた(図1a,b,c,d,e)。これは血管内を灌流した影響であると考えた。それぞれの標本を下腿遠位1/3の部位で横断し、脱灰処理後に、HE染色を行い組織標本の作成を行なった。顕微鏡下に20倍率で標本の比較を行なった際、AC、AD法の方がBC、BD法より間質の膨化が認められた。またAD、BD法は組織の破壊性変化を認めた。(図2a,b,c,d,e)400倍率で観察したところ、血管において4群すべての標本で内膜損傷を認めた(図3a,b,c,d,e)神経においては神経周膜の離開がAC、ADと比較してBC、BD群に強く認められた(図4a,b,c,d)。皮膚においてはコントロールとBDは比較的類似していたが、AD、BCは基底膜の損傷が強かった(図5a,b,c,d,e)。筋体においては4群すべてがコントロールと比較して筋の核の量は少なかった(図6a,b,c,d,e)。骨においてはコントロールと比較して大差はなかった。過去の先行研究においては、ラットを膝上切断のモデルとサイム切断の切断肢の液体窒素処理後の再接着を行った場合、筋体成分が多く含まれる膝上切断での再接着は生着が認められなかったとの報告がある。本研究においても生着しなかった理由として、血管径が0.5mm程と非常に細いため技術的な問題も大きい。下腿中央での切断肢は筋体を含む多くの複雑な組織を保有しているのが原因の一つと考えられた。組織学的から見ても本研究で液体窒素処理を行なった凍結保存ではいずれも組織障害性を認めている。しかしながら過去の臨床報告や動物実験報告では切断指や気管なども生着していることから、今後の課題として使用薬剤や凍結解凍法により組織障害性の低い保存方法があるのではないかと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河村 健二  (Kawamura Kenji)  (20445076)	奈良県立医科大学・医学部・准教授   (24601)	
研究分担者	面川 庄平  (Omokawa Shohei)  (70597103)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	
研究分担者	前川 尚宜  (Maegawa Naoki)  (90596660)	奈良県立医科大学・医学部・准教授   (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関