

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791742

研究課題名（和文）電圧負荷式冷蔵庫（氷感庫）を用いた組織保存、再接着の検討

研究課題名（英文）Usefulness of voltage-applied unfrozen storage of organizaion and amputated finger

研究代表者 畔 熱行（KURO ATSUYUKI）
関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20509492

研究成果の概要（和文）：

電圧をかけることにより水分子を振動させ、組織の水分を凝結させずに過冷却することで、氷点下でも凍結しない保存ができる。このような機器を用い、様々な条件で保存したラット血管の保存の評価を行った。結果は 12 日間まで血管内皮細胞の構造が保たれていた。保存後に移植したラットの血管は開存しており、氷点下で 3 日間の保存は可能であった。

研究成果の概要（英文）：

The voltage-applied refrigerator (unfrozen freezer) is a newly developed device to store materials below the freezing point without freezing by supercooling water contained in tissue without condensation through vibrating molecules inside the refrigerator. Using this device, we evaluated the preservation of rat blood vessels stored under various conditions. The vascular endothelial cell structure was retained until day 12. The transplanted femoral blood vessels were patent, showing that the blood vessels could be preserved for 3 days at below the freezing point.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 形成外科

キーワード：

氷感庫 組織保存 再接着 マイクロサージャリー

1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロサージャリーの技術を用いて切断四肢（指趾）の血管吻合を行い、血行再開させることで再接着を行っている。再接着までの間、断端四肢（指趾）は低温保存 2~4℃される。再接着可能時間は 24 時間以内とされ大きな制約がある。

電圧負荷式冷蔵庫（氷感庫）は、庫内で電圧を負荷することにより分子を振動させ、細胞内の水分を凝結させないまま過冷却することにより、マイナス温度で凍結しない保存庫として新規開発された機器である。大きさは冷蔵庫程度で様々あり、家庭用電源にて使用でき、機器価格も高価ではない。本機器は現在、食肉や果実や生花などの保存に用いられ、鮮度をおとすことなく長期間の保存が行われ、食肉では約 1 ヶ月の保存にても鮮度を保つとされている。

マグロの保存では生体内に存する ATP の死後分解に注目した鮮度指標 K 値

$$K \text{ 値} = (\text{Ino} + \text{Hyp}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hyp}) \times 100$$

ATP (アデノシン三リン酸) ADP (アデノシン二リン酸)

AMP (アデノシン一リン酸)

IMP (イノシン酸) Ino (イノシン) Hyp (ヒポキサンチン)

10%以下 高鮮度

20%以下 良鮮度

50%以下 可食限界鮮度

を測定することにより鮮度の指標を示したデータがある。

氷感保存 -3℃ K 値 7.5%

普通冷蔵庫 6℃ K 値 13.5%

財団法人 日本冷凍食品協会調査

切断四肢（指趾）においても冷蔵庫保存より代謝が押さえられ組織鮮度が保たれる可能性を有し、本機器を用いることにより切断四肢（指趾）のみならず生体組織の保存期間を延長させる可能性がある。

2. 研究の目的

形成外科領域では外傷などによる切断四肢（指趾）をマイクロサージャリーの技術を用いて血管吻合を行い、血行再開させることで再接着を行っている。血行再開までの時間が早ければ早いほどよいが、一般的な再接着可能な時間としては室温保存では 3~5 時間で、2~4℃の低温保存では 12~24 時間とされ時間的制約がある、この時間内での血行再開がなされれば生着率が高い。しかし外傷は予期せず生じ常に救急対応を要する。そのため医療現場では常に適切に対応できないこともあり、現場の負担も大きい。またマイクロサージャリーの技術は熟練を要するため手術に時間がかかってしまう。また指趾ではなく四肢などの組織が大きい場合には、再接着可能な時間はさらに短くなり約 4 時間である。この時間をこすと生着率が低下するだけでなく代謝産物や細胞破壊時のカリウムなどが全身に流れ込むことで、心停止などを引き起こす再接着中毒症 replantation toxemia を引き起こすこともある。その際に従来の低温保存ではなく本機器を用いて代謝を押さえ、血行再開までの再接着可能な時間を伸ばすことができれば、再接着の効率を高めることができる可能性がある。

マイナス温度で凍結しない保存庫として新規開発された電圧負荷式冷蔵庫（氷感庫）を用いることにより、組織の代謝を下げ保存時間の延長ができる可能性がある。本研究は電

圧負荷式冷蔵庫による切断四肢（指趾）保存の可能性を検討するため立案した。

3. 研究の方法

本研究では電圧負荷式冷蔵庫（氷感庫）における組織保存が可能かどうかの検討を動物実験にて行う。

(1) 保存した組織を組織学的検査する。それぞれの組織において保存限界の時間を検討する。

(2) これらを電圧負荷式冷蔵庫（氷感庫）での組織保存と低温保存との比較検討を行う。

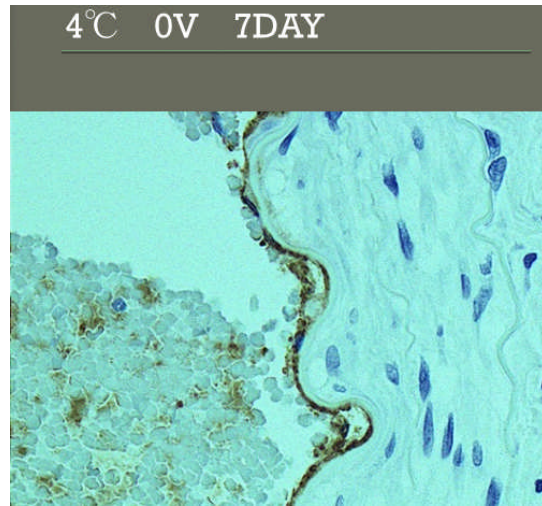
(3) ラット大腿血管を保存後別なラットにバイパス移植を行い開存率と保存限界を検討する。

4. 研究成果

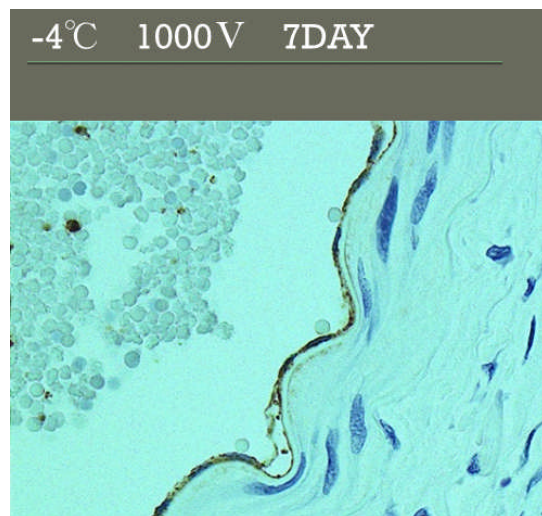
ラット大腿血管にて評価を行った。

Von Willebrand Factor 染色による免疫染色で血管内皮細胞を染色した、その後組織学的検査を行った。4°C 0V 7日目 (fig-1) と-4°C 1000V 7日目 (fig-2) では血管内皮細胞が染色されており、構造が保たれていた。

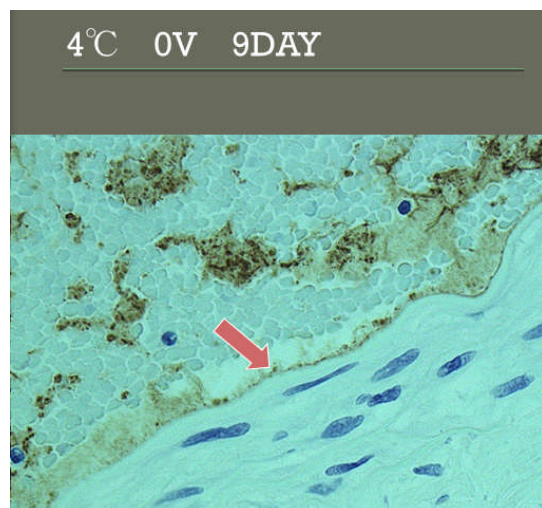
4°C 0V 9日目 (fig-3) と-4°C 1000V 9日目 (fig-4) を比較すると4°C下では血管内皮細胞の脱落が著明であったが、電圧負荷式冷蔵庫下での保存では構造が保たれていた。4°C 0V 12日目 (fig-5) と-4°C 1000V 12日目 (fig-6) を比較すると両方ともに血管内皮細胞の構造が保たれなくなっていた。12日間まで血管内皮細胞の構造が保たれていた。



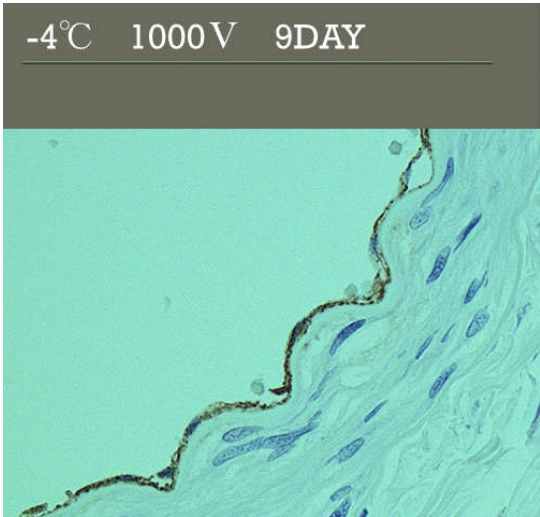
(fig-1)



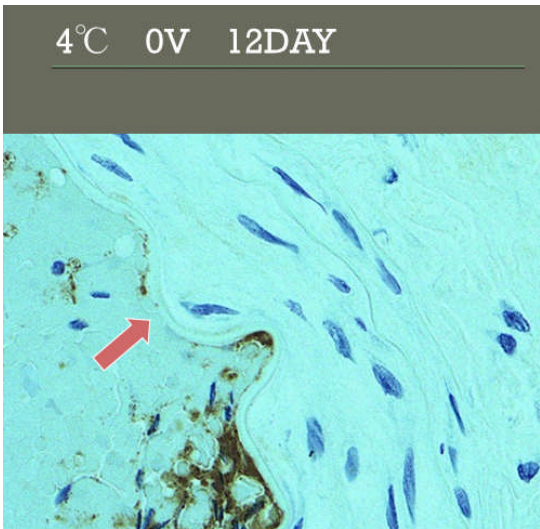
(fig-2)



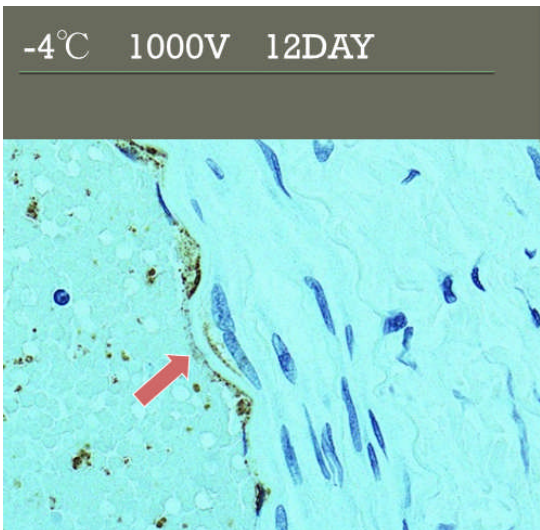
(fig-3)



(fig-4)



(fig-5)



(fig-6)

また移植された大腿血管は開存しており、氷点下での保存は3日間可能であることがわかり電圧負荷式冷蔵庫は血管保存に応用できる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① 畔 熱行

電圧負荷による血管の氷点下非凍結組織保存の有用性

第19回日本形成外科学会基礎学術集会

平成22年9月17日

パシフィコ横浜

② 畔 熱行

電圧負荷による血管の氷点下非凍結組織保存の有用性 (第2報)

第20回日本形成外科学会基礎学術集会

平成23年10月6日

ハイアットリージェンシー東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畔 熱行 (KURO ATSUYUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20509492

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無

研究協力者

楠本 健司 (KUSUMOTO KENJI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20161630

覚道 奈津子 (KAKUDOU NATSUKO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509490