

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861711

研究課題名(和文) 電圧負荷式冷蔵庫(氷感庫)における組織保存の検討

研究課題名(英文) study of voltage-applied unfrozen storage of tissue

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

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)：氷点下非凍結保存ができる冷蔵庫をもちいて組織保存を検討した。ラット大腿動脈を採取後4 0Vと-2 1000Vの条件下にて保存した。透過電子顕微鏡にて血管内皮細胞の状態を確認した。3日間で4 0V条件下の内皮細胞の剥離が認められた。細胞生存率を測定できるCCKを用いて3日間保存したラット大動脈の血管の生存率を評価した。-2 1000Vの条件下のほうが有意に生存していた。3日間保存したラット血管を同系統ラットにバイパス移植を行った。-2 1000Vの条件下での保存が良い傾向がでた。

研究成果の概要(英文)：Study of voltage-applied unfrozen storage of tissue. Rat femoral artery was preserved under the conditions of 4 0V and -2 1000V. It was observed vascular endothelial cells in a transmission electron microscope. Endothelial cells were dissected under the conditions of 4 0V in 3 days. The viability of the blood vessel for 3 days preserved rat aorta using a CCK that can measure cell viability was assessed. -2 1000V conditions were significantly survival. 3 days preserved rat femoral artery was performed bypass graft to the same strain rats. Good trend at -2 1000V conditions came.

研究分野：形成外科

キーワード：氷点下非凍結保存 組織保存 再接着

### 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。

氷点下での組織保存が生体機能の維持に良いという文献は散見するが、多くは凍結防止剤などを使用しその細胞毒性が問題となる。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

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

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。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り研究を立案した。

### 2. 研究の目的

組織を電圧負荷式冷蔵庫内に保存することで、生体機能を保った状態を従来の保存より長期間維持できることを検討する

### 3. 研究の方法

(1) ラット大動脈の氷点下非凍結保存後の生存率の評価

近交系ラット F344 雄 10 週齢を供死後 4 0 と-2 1000V の条件下に 3 日間保存  
大動脈を 2 mmデルマパンチにて採取 N=10  
2 条件、CCK-8 を用いて細胞の生存率を吸光度測定により評価した。

(2) 近交系ラット F344 雄 10 週齢を供死後、大腿動脈を採取、PBS 溶液内に保存し 4 0V と-2 1000V の条件下に保存した、1・3・7 日目の血管内皮細胞の状態を、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて評価した。

(3) 近交系ラット F344 雄 10 週齢を供死後 4 0V と-2 1000V の条件下に 3 日間保存した。大動脈を採取し HE 染色および vWF による免疫染色で組織学的検討を行った

(4) 近交系ラット F344 雄 10 週齢を供死後 4 0V と-2 1000V の条件下に 3 日間保存した。大腿動脈を採取し同系統のラットの大腿動脈に 11-0b/n にて血管吻合バイパス移植をおこない、開存率を検討した。N=6

#### 4. 研究成果

(1) -2 1000V 条件下での保存のほうが 4 0V 条件下保存より有意に差をもって生存率が高かった。図 1

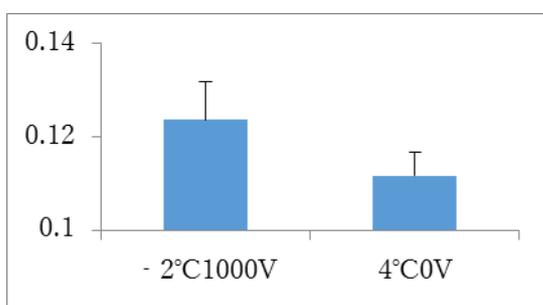


図 1

(2) 1 日目では 4 0V と-2 1000V の条件下で差はほぼ認められなかった。図 2-ab

3 日目では 4 0V の条件下では血管内皮細胞が膨化を認めた、-2 1000V 条件下では変化はなかった。図 3-ab

7 日目では 4 0V と-2 1000V の条件下ともに血管内皮細胞の膨化血管からの剥離を認めた。図 4-ab

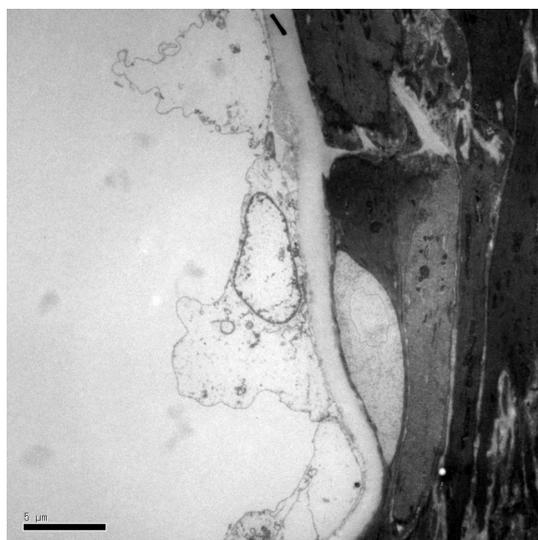


図 2-a 1 日目 4 0V

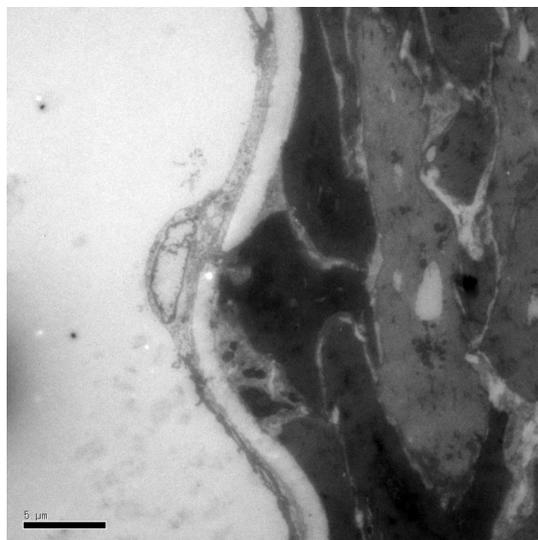


図 2-b 1 日目 -2 1000V

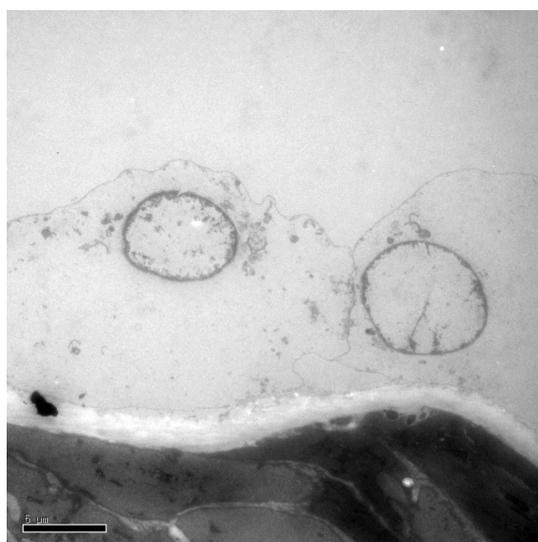


図 3-a 3 日目 4 0V



図 3-a 3日目 -2 1000V

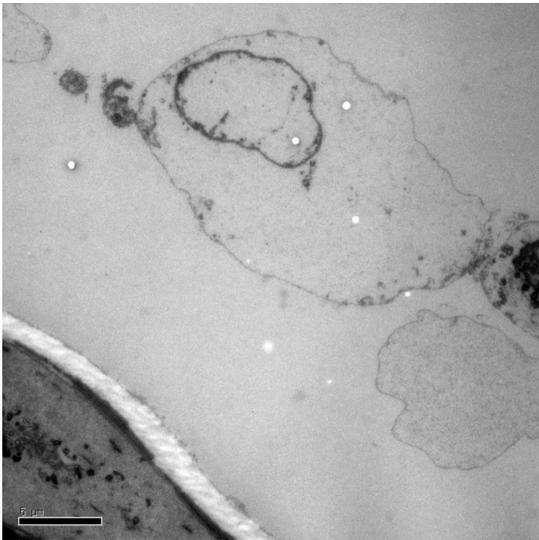


図 4-a 7日目 4 0V

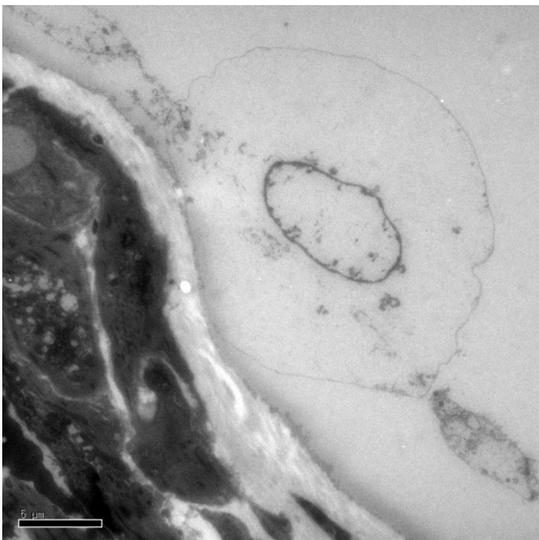


図 4-b 7日目 -2 1000V

(3)3日間保存後の大腿血管をHE染色およびvWFによる免疫染色で血管内皮細胞を評価した。4 0V条件下の保存では血管内皮が剥離していた。図 5-a

-2 1000V条件下では剥離は認められなかった。図 5-b

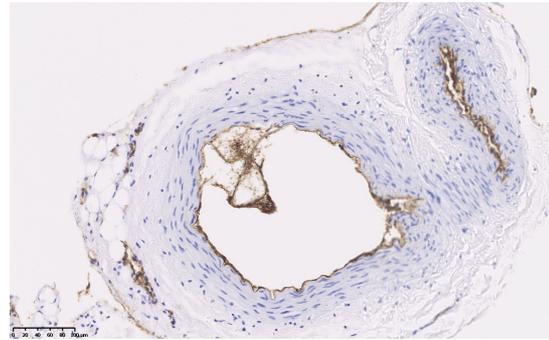


図 5-a 4 0V

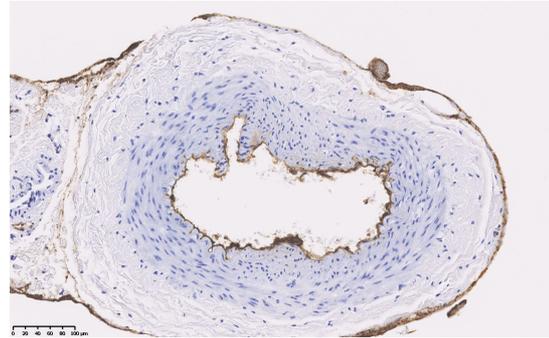


図 5-b -2 1000V

(4)ラット大腿動脈移植後しばらく観察を行い開存していたものを閉創後1週間後に血管の開存の確認を行った

4 0Vの条件下では6例中4例開存を認めた、2例は吻合部による血栓を形成しており移植血管が閉塞していた。図 6-a

-2 1000Vの条件下では6例中6例開存を認めた。図 6-b

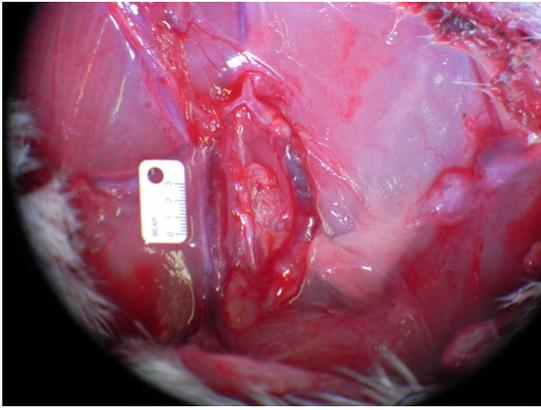


図 6-a 4 0V

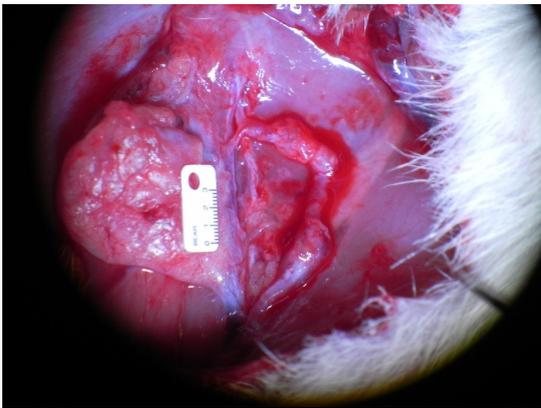


図 6-b -2 1000V

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

2015.10.08 ~ 09

第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会

岩手県民会館 岩手県公会堂 盛岡

血管の氷点下非凍結保存

畔 熱行

## 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