

特 集 1
研 究 速 報

血管の凍結保存に関する研究

Cryopreservation of Blood Vessel

永 田 真 一*・棚 沢 一 郎*・二 宮 淳 一**
Shinichi NAGATA, Ichiro TANASAWA and Junichi NINOMIYA

1. は じ め に

最近、生体肝移植など臓器移植による疾患の治療が話題となっているが、現実には需要と供給の時間的、空間的アンバランスが大きいために、移植を受けようと遠く海外まで赴き、そこで長時間待機せざるをえないような状況が頻出している。もし、提供者から摘出された臓器を、長期間健全な状態で保存することが可能になれば、医療上大きな問題の一つが解決されることになる。

生体の組織や臓器の保存には、いろいろな方法が試みられているが、期間が長期にわたる場合には、極低温での凍結保存 (cryopreservation) がもっとも有望であると考えられている。周知のとおり、極低温では生体組織の代謝活動はほぼ完全に休止し、凍結前の状態を半永久的に維持することも原理的には可能なはずである。ここで極低温というのは、実際には液体窒素の常圧下での沸点 (-196°C) を指している。液体窒素は安く手に入る冷媒であるために、凍結後の生体組織は液体窒素中で保存される場合が多いからであるが、もっと高い温度 (例えば -100°C 程度) での保存も理論的には可能であろうと考えられる。これまでに、生体の凍結保存は医学あるいは畜産学の分野で試みられており、バクテリア類、精子、卵細胞、赤血球、骨髄あるいは角膜などについての技術はほぼ確立している。しかし、これらはいずれも単細胞あるいは単純な形態・構成をもった、しかも小寸法の組織であって、もっとスケールの大きいもの、あるいは複雑な構造をもつ生体についての凍結保存技術はまだ確立していない。

著者らは、数年前より生体組織の凍結保存に関する基礎的知見の拡充と、技術の確立を目的とする研究を開始し、まず、各種の生命維持器官を備え、かなり複雑な構造を

もった微小生物であるミジンコ (daphnia) を用いて凍結実験を行い、ある程度の成果を得た^{1)~3)}。さらに、この実験で得られた知見を応用して、動物の血管保存実験を行いつつあるが、現在までに一応所期の成果が得られたと考え、ここに報告するものである。

2. 血管の凍結保存の必要性

現在、ヒトの血管に障害が生じ、代替が必要になった場合の処置としては、人工血管、動物の血管、あるいは自分自身の血管の移植が行われている。そのもっとも典型的な例は、心筋梗塞の主原因である冠状動脈の障害の場合で、症例ももっとも多い。これらの処置のうちで、人工血管の移植は、代替を必要とする血管の直径が大きい場合にはある程度可能であり実施例もかなり多いが、冠状動脈の内径程度の血管では、血栓形成による閉塞が問題となる。さらに、対象者が幼児などの場合には、身体の成長に伴って再移植を余儀なくされるなどの不都合がある。動物の血管 (すでに生命活動を停止したもの) の移植についても同様の問題がある。この点、自分自身のからだから採取した血管の移植では閉塞の心配は少ないが、供給源として限りがあり、また採取した部位において後遺症が生ずることがある。このようなことを考えると、血管についても、凍結保存技術の確立によって需要と供給の時間的・空間的不均衡の是正を図ることが最良の解決策ではないかと考えられる。また、血管の凍結保存に成功すれば、その知見を他の生体組織の凍結保存に応用することも十分に可能なはずであり、現在大きな社会的問題となっている臓器移植に一つの解決策を提供することができるのではないかと考えられる。

3. 凍結保存の方法

生体の凍結保存を成功させるにはいくつかの留意すべき事項がある。詳細については既報^{1)~3)}を参照願うとして、

*東京大学生産技術研究所 第2部

**日本医科大学

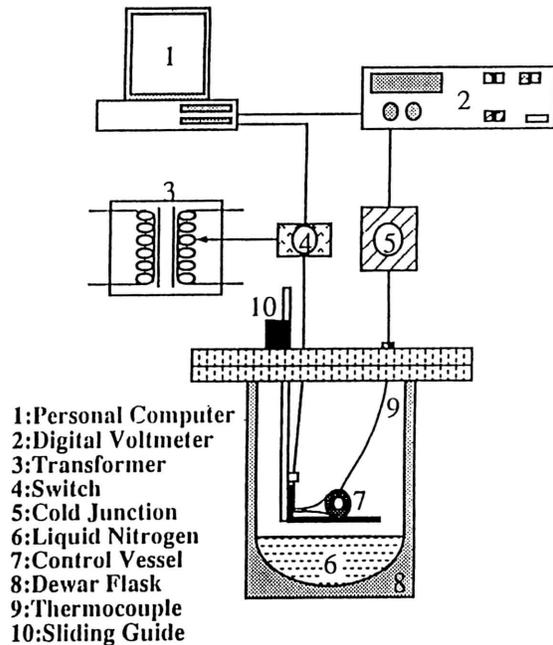


Fig. 1 Experimental Apparatus

主要項目は次の三つである。(1) 冷却凍結速度の最適化、(2) 加熱融解速度の最適化、(3) 凍害防御剤の種類(複数物質の混用を含む)と最適濃度の選定。

これらをどのように決定すればよいかについての理論がほとんどない現状では、実験者のこれまでの経験と勘に頼る以外にない。

図1に凍結装置の概略を示す。これは液体窒素を冷却剤として用いた自製のプログラム・フリーザーで、供試生体組織の温度をきわめて精度よく制御しつつ変化させることができるようになっている。デューワ瓶⑧の中に供試体収納用の容器⑦を懸垂させ、収納容器に巻き付けたヒーターへの電力供給を制御することによって、収納物の温度をコンピューター・コントロールできるようになっている。収納容器の詳細は図2に示すとおりで、円筒容器の外側に巻き付けたコンスタンタン線が加熱用ヒーターとなる。管壁には長さ方向に熱電対が挿入してあり、その出力はデジタル電圧計②とパーソナルコンピュータ①に送られる。

生体を凍結させる際には、清潔な環境下で、収納容器内に供試血管を凍害防御剤とともに納め、ゴム栓をした後、図1のデューワ瓶内に入れる。そして加熱用コンスタンタン線への供試電流を制御しながら所定の冷却速度で凍結を進行させる。本実験では、多くの場合、4°Cから-3°Cまでは-3°C/min、-3°Cから-40°Cまでは-1°C/minの冷却速度を採用し、過冷却防止のため-4°C付近で植氷を行った。-40°Cまで冷却した後は、別の容器の液体

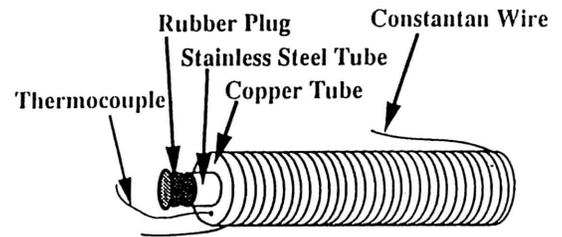


Fig. 2 Test Material Container

窒素中に浸漬して保存した。

解凍の場合にも同様にヒーター入力制御による温度コントロールを行い、-196°Cから-3°Cまでは15°C/min、-3°Cから4°Cまでは0.5°C/minの温度上昇速度とした。

実験には主としてラットの大動脈(長さ約10 mm, 内径約2 mm, 壁厚約0.2 mm)を使用したが、他にイヌの大動脈(長さ約10 mm, 内径約2 mm, 壁厚約0.5 mm)およびブタの頸動脈(長さ約80 mm, 内径約5 mm, 壁厚約1 mm)も用いた。

凍害防御剤としては、イヌの場合には10%グリセリン溶液、ラットおよびブタの場合10% DMSO(ジメチルスルフォキシド)溶液を用いた。ただし、ここでの濃度は、細菌による感染防止のための抗生物質や補助成分(培養剤など)を混入した生理食塩水溶液中の質量分率である。

4. 凍結保存の結果

以前に行ったミジンコの凍結保存実験の場合には、解凍後のミジンコの心臓の鼓動あるいは触肢等の器官の運動によって生死の判別をすることができた。血管の場合には、そのような判定法が使えないため、次のような方法を試みた。

(1) 形態検査: 凍結前の健全な血管と、凍結解凍後の血管の形態・構造などを顕微鏡下で比較し、変化の有無を調べる。

(2) ATP(アデノシン3りん酸)量の比較: 細胞の死によって細胞内のATPの量が減少することを利用して判定する。ATPの量はNMRなどにより測定する。

(3) 細胞培養: 解凍後の血管の内皮細胞あるいは筋肉組織細胞を培養し、それが増殖するかどうかにより成否を判定する。

(4) 同種移植: 解凍後の血管を、同種動物に再移植し、移植された動物が生存できるかどうかを見る。生存できた場合には、数週間あるいは数か月後に解剖して血管を取り出し、状態観察を行って成果を判断する。

以上のうち、(1)は概略の事前判定としてしか役に立たず、形態的異常がないということがそのまま凍結の成功

を保証するものではないことは明らかである。(2)については、イヌの大腿動脈の凍結保存を行ったものについて、解凍後 NMR 法を用いて、血管組織中に存在する ATP 量の測定を試みたが、著者らが用いた装置では検出できなかった。これは、用いた装置の感度が低かったためでもあろうが、血管のような非運動組織では、含まれる ATP の量自体が微量であるためでもあると思われる。

(3) の組織培養は、ブタの頸動脈およびラットの大動脈について行った。凍結保存の後、解凍した組織から凍害防御剤を除去し、メスで血管を 1mm^3 程度の大きさに細分化したものをコラーゲン被覆を施した容器中に培養液とともに入れ、インキュベータ内に静置した。1 週間経過後から培地の交換と顕微鏡観察を繰り返した結果、細胞の増殖が確認された。また、血管壁から内皮細胞のみを取り出して培養し増殖を確認した。

血管の凍結保存の成否は、最終的には(4)の同種移植によって判断すべきものと考えられる。著者らはこれまでに凍結保存したラットの動脈について、約32回の同種移植を試みた。初めのうち、同種移植後のラットの生存率はきわめて低かったが、その原因は、血管直径が小さいために移植手術が難しいことと、雑菌による感染症の併発など

によるものと推測される。しかし最近では、生存率は向上しつつあり、例えば凍結保存を4週間ないし16か月間行った3匹のラットは、移植後3か月以上生存を続けた。これらのラットを解剖し、移植した血管を取り出して顕微鏡観察を行ったところ、血管はいずれも健全な状態にあり、内壁には間隙をもって付着する内皮細胞が認められた。

5. ま と め

血管の凍結保存技術の確立のために、動物の血管を用いて実験を行い、著者らが試みてきた方法が有効であることを確認した。ラットの動脈による実験では、凍結保存後の血管の同種移植を行い、移植されたラットが十分長期間生存し、血管の状態も健全であることを確認した。

(1994年12月13日受理)

文 献

- 1) I. Tanasawa, S. Nagata and J. Igarashi: Proc. 18th Int. Congress of Refrigeration, Vol. 4 (1991), 1681~1684.
- 2) 棚沢・永田・木村：日本冷凍協会論文集, 10-1 (1993), 111~116.
- 3) 棚沢・永田・木村：生産研究, 44-10 (1992), 475-478.