

コラボレーション

超微小血管外科 \* 食品凍結技術

# 磁場環境下臓器凍結と超微小血管外科技術の融合 ～臓器凍結実用化の可能性～

三原 誠<sup>1</sup>、中川 毅史<sup>1</sup>、野口 修平<sup>1</sup>、藤井 和博<sup>2</sup>、大和田 哲男<sup>2</sup>、河合 達郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京大学医学部形成外科・美容外科（日本）、<sup>2</sup>株式会社アビー、<sup>3</sup>ハーバード大学移植外科（アメリカ）

(Received 6 May 2009; accepted 5 June 2009)

## Abstract

科学的なアプローチによる臓器保存の試みは、1904年ノーベル賞受賞者のアレキシスカレルから始まる。その中で臓器凍結保存は、1950年代から本格的に始まった。しかし、凍結過程での氷晶形成や組織内浸透圧勾配の発生により細胞が著しく破壊され、臓器凍結は不可能とされてきた。その一方で、産婦人科領域では妊孕性温存を目的とした精子・卵子・受精卵等の凍結技術の進歩により、細胞や細断化した組織や薄切組織の凍結は非常に高い確率で成功し、ヒトへの臨床応用研究も報告され始めた。今回我々は、変動磁場環境下の凍結方法を用いて、細胞・組織ではなく、臓器そのものの凍結保存を試みた。この凍結技術は、日本国内の食品凍結技術開発企業が主に開発してきたもので、我々の有する超微小血管外科技術との異分野融合を図ることで、基礎実験のスピードアップと、これまで不可能とされた小臓器、特に生殖臓器の凍結保存が期待される。

## キーワード

超微小血管外科技術、卵巣移植、精巣移植、臓器凍結

## 序文

### 臓器保存について

ノーベル賞受賞者のアレキシス・カレルは臓器保存、組織培養、人工心肺の研究を手がけ、臓器の移植と保存研究の道を切り開いた。臓器保存において重要なのは、細胞の生存率を落とさず、より長期間保存できることである。臓器は体外での保存から移植までに、臓器摘出までの血流遮断による温阻血障害、保存中に受ける障害、臓器移植を行った後に血流を再開することによる障害（再灌流障害）を受けるため、これら回避するための研究が進められている。温度という観点では、常温、冷却、過冷却、凍結での臓器保存が試みられている。代謝レベルを可能な限り低下させ、酸素欠乏障害を回避した、冷却下（0～4℃）での保存が最も効果があることが示されてきた<sup>1)</sup>。完全には臓器が凍結しない温度帯（-2℃～-8℃）での過冷却状態での保存方法は、冷却下よりもさらに代謝レベルを低下させることができ、凍結による細胞障害も回避できるため注目されているが、臨床応用には至っていない<sup>2)</sup>。

臓器保存液の一つであるUniversity of Wisconsin solutionを用いた単純浸漬保存法は現在最も信頼性の高い臓器保存法として汎用されている<sup>3, 4)</sup>。しかし、臓器保存時間は腎臓で3日間、肝臓、脾臓で20時間、心臓で4～6時間、肺で8～12時間が限度というのが現状であり、移植までの保存時間としては十分とは言えない。そこで長期の保存を目指し、臓器の凍結保存が試

みられているが、これまで臓器の凍結保存は不可能とされてきた。細胞や組織の凍結保存において、細部内の氷晶形成や細胞内液濃縮による高張障害が特に問題となるが、体積の大きい臓器ではすべての細胞を一定条件下で凍結させることが難しいため、この問題がより顕著となる。また、実質臓器は構成細胞が単一ではないため細胞ごとに至適温度設定が異なることが予想される。臓器ごとに凍結温度、凍結スピード、凍結保護液を検討し、適切な凍結保存条件を決定する必要がある。

### 超微小血管外科技術を用いた小臓器移植の可能性

臓器移植を行なうには血管吻合技術が不可欠である。実際、前述したアレキシス・カレルはその技術を応用し、ヤギの腎臓の自家異所移植を成功させた。当時、血管吻合は不可能とされており、この血管吻合技術の開発が移植の歴史の扉を開いたといえる。この意味において、我々が有している超微小結果外科技術は、基礎研究領域においても恩恵を与える。0.3～0.5 mm前後の血管吻合まで可能とするこの技術<sup>5)</sup>では、マウス・ラットといった小動物における新しい移植実験モデルの開発が進むものと考えられる<sup>6, 7)</sup>。

### 変動磁場環境下凍結について

日本国内の食品凍結技術開発企業が、解凍後もより品質を維持したまま食品を凍結させる技術を開発した。その技術は、変動磁場環境下において食品を凍結し、細胞破壊の少ない凍結を

実現している。我々はこの凍結保存技術を臓器凍結保存に応用することで、細胞への障害を抑制し、細胞生存率を落とさずに凍結保存できるのではないかと考えている。

### 生殖器臓器凍結の必要性・緊急性

小児癌患者（特に小児白血病患者）に対し、化学療法、放射

線療法は無くしてはならない治療法である。しかし、その副作用として「医原性不妊症」を高率にもたらす。小児癌治療の成績が向上するに比例して、治療後のQOL向上、特に、妊孕性温存は社会問題となっている。小児白血病の完全寛解率が、70%を超える現代では、早急に、QOL改善を目的とする不妊症治療法を確立しなければならない。

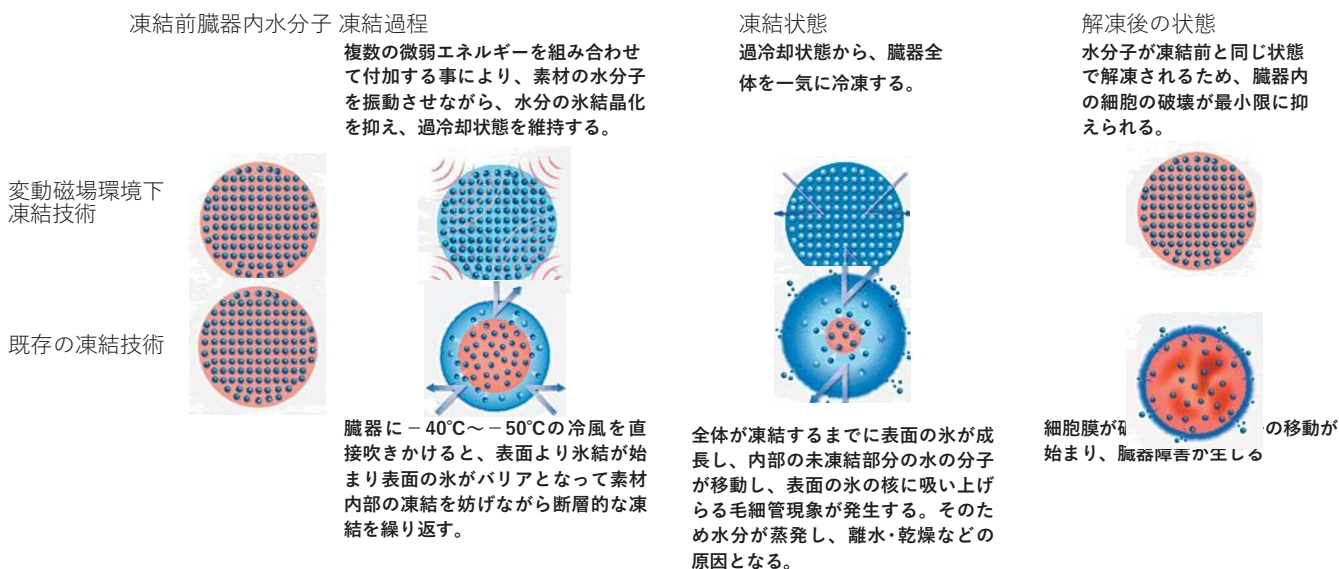


図1 変動磁場環境下凍結の仮説

凍結過程で発生していると考えられる現象について、既存の凍結技術と、変動磁場環境下凍結技術について比較した。

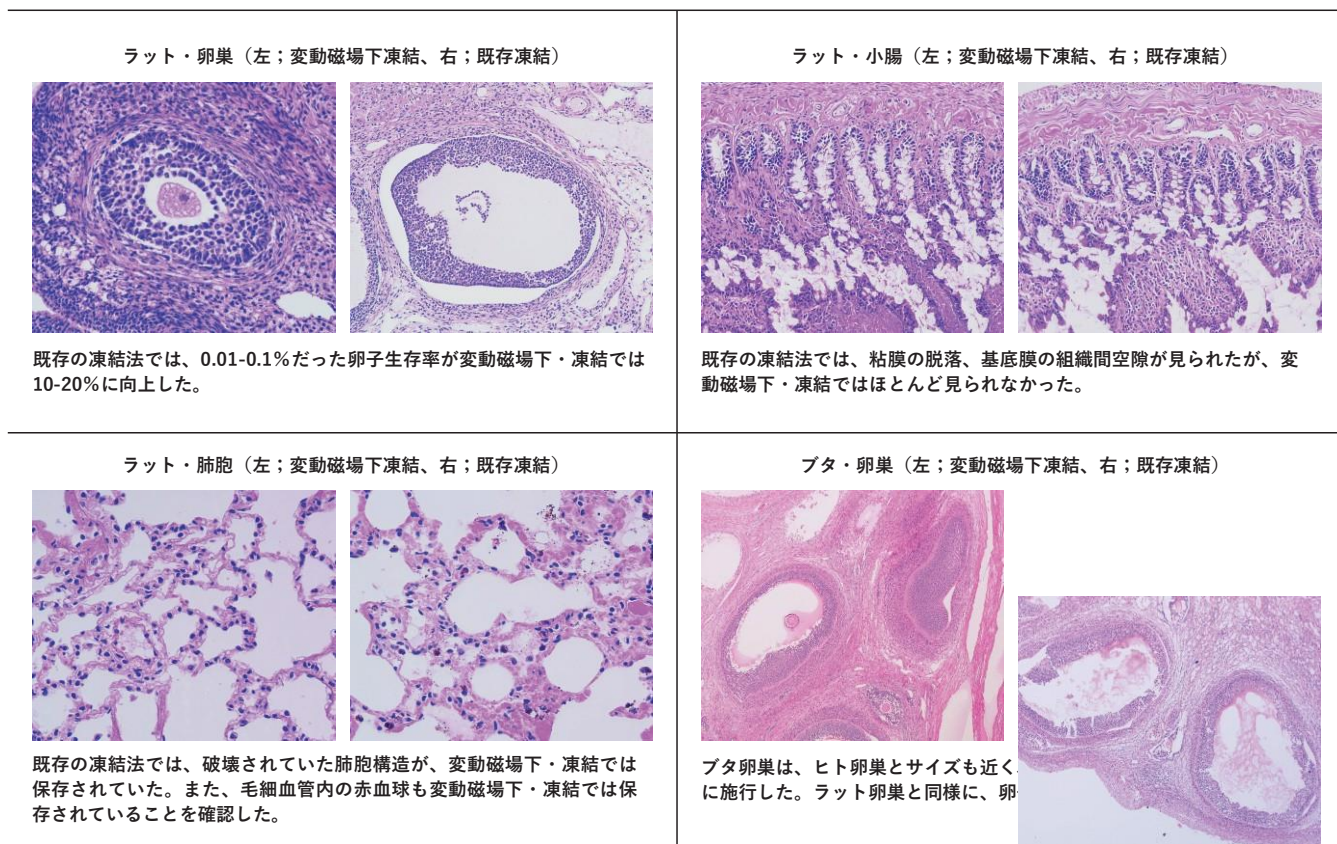


図2 凍結解凍後の組織

凍結解凍後の組織をHE染色で組織学的に評価した。



## 方法

### 凍結実験

2匹のLewis雌性ラット（250～300g）を24時間の絶食の後にエーテル麻酔下で安楽死させ、臓器は摘出せずそのまま凍結実験に用いた。1匹は変動磁場を発生する凍結装置（アビー）で凍結した。凍結装置のブライン槽に60%エチレングリコールを満たし、可能な限り空気を除いてナイロンバックに封入したラットを、重りのついたゲージに入れてブライン層に沈めた。

磁場強度は0.1～0.2 mTとし、2℃で1時間冷却し、-0.5℃/分間の速度で冷却し、-30℃まで凍結した。冷却開始から凍結終了まで2時間45分間経過した。実験に使用するまで-80℃の超低温冷凍庫で保存した。もう1匹はコントロールとして-80℃の超低温冷凍庫で同時間凍結した。凍結後は24時間-80℃で保存し、30℃の生理食塩水に浸漬することで、急速解凍を行なった。

### 組織学的検討

2匹のラットからそれぞれ心臓、肝臓、肺、腎臓、卵巣、脳、膵臓を摘出し、それぞれ10%ホルマリンで固定後、常法に従ってパラフィン包埋ブロックより厚さ4-5μmの連続切片を作製した。

## 結果

磁場環境下凍結が臓器凍結保存にとって有効であるかどうか組織学的に検討した(図2)。

脳：磁場環境下凍結保存法で神経細胞の破壊が低減した。

心臓：磁場環境下凍結保存法で心筋の破壊が低減したが、心筋細胞同士の接着は完全に分離していた。

膵臓：磁場環境下凍結保存法ではランゲルハンス島細胞にやや組織破壊の低減が認められた。

肝臓、腎臓：変動磁場環境下凍結保存法で組織凍結が著しかった。

肺：磁場環境下凍結保存法で肺胞の構造破壊が著しく低減した。超低温冷凍庫保存法では肺胞がつぶれていた。

小腸：磁場環境下凍結保存法で小腸粘膜上体の破壊が低減した。超低温冷凍庫保存法では組織間に著しい空隙が認められた。

卵巣：磁場環境下凍結保存法で卵胞構造がより維持されていた。

臓器によって組織の破壊の程度が異なるが、磁場環境下凍結保存法の方がより臓器の保存に適していることが示唆された。

## 考察

日本国内の食品凍結技術開発企業が、食品の品質を落とさずに冷凍する技術を開発した。我々はこの凍結技術を臓器凍結保存に応用できないかと考え、本研究で検討した。その結果、この技術を用いると、脳、膵臓、小腸、卵巣で特に組織破壊の低減を認めた。特に、超低温冷凍庫で凍結した小腸では組織内で大きくなった氷晶が溶け、空隙となったと思われる箇所が多々観察された。変動磁場環境下での凍結では水分子の氷晶形成を抑制され、細胞破壊が低減したと考えられる。

変動磁場が細胞にどのような影響を与えているかは不明であるが、臓器全体が過冷却状態から瞬時に凍結したのではないかという仮説を立てている。図5に示すように、変動磁場環境下では食紅の溶液が均一に凍結された。過冷却状態の液体に氷核や振動を与えると瞬時に凍結する現象が知られているが<sup>8, 9)</sup>、変動磁場がこの現象を発生しやすい状態を作り上げ、細胞内液濃縮による高張障害を防いでいるのかもしれない。また、今回の研究では凍結保護液を全く使用していないが、今後は磁場環

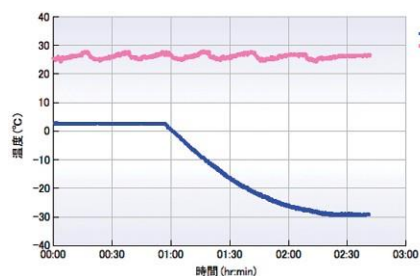


図3 変動磁場環境下でのラット凍結保存過程  
凍結中のブライン槽のエチレングリコール（青線）と外気温（赤線）の温度を測定した。2℃でラットを十分に冷却後、-30℃まで凍結した。

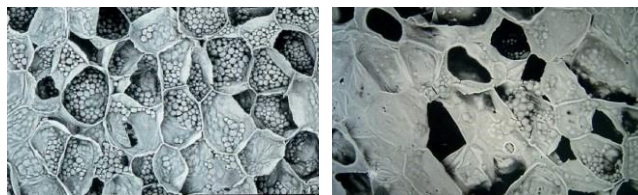


図4 凍結わさびの電子顕微鏡写真  
左写真は、変動磁場下・凍結技術を用いて凍結したわさびの断面である。細胞壁の破壊が少なく、細胞壁内の澱粉粒の流出も見られない。対して、右写真は既存の凍結技術により凍結したわさびの断面である。氷晶が成長し、細胞膜構造が破壊されたため、細胞内の澱粉粒も流出している。凍結後の味の保存状態は、凍結技術により大きく影響される。



図5 組織内浸透圧勾配の抑制

左は変動磁場環境下で、右は通常の冷凍庫で、食紅を添加した水を凍結した写真を示した。通常の冷凍庫で凍結すると、外側の水分子から凍結し始めるため、食紅成分が中心部分に濃縮される。しかし、変動磁場環境下では、このような食紅成分の濃縮が見られず、全体が均一に凍結された。

境下凍結保存に適切な凍結保護液の開発が必須となるだろう。すでに述べたように、臓器によって保存時間は異なり、冷却保存への耐性は臓器によって異なる。凍結保護液を臓器に十分に浸透させると、逆に凍結保護液によって細胞障害が起こるという矛盾を抱えている。これらの問題をクリアした凍結保護液の開発も今後の課題である。ブタやサルのようなより体積の大きい臓器を用いた凍結研究を実施し、ヒトへの臨床応用へと繋げたい。

### 生殖臓器凍結と他の臓器凍結研究の違い

生殖臓器凍結と、その他の腎臓や肝臓といった他の臓器凍結研究とは、目標が大きく異なる。精巣や卵巣の臓器凍結の意義としては、将来的に産児を得ることにある。そのため、臓器内にある配偶子が必要数のみ生存していれば解決される。具体的には、卵巣内には数十から百万個の卵原細胞が存在するため、一人の産児を得るための目標成功率は、数十から百万分の一である。対して、腎臓や肝臓といった生命維持に必須な臓器は、絶対の成功が必要とされる。ここに、生殖臓器凍結と他の生命維持臓器との研究における成功目標の差異が生じる。

### 結論

臓器移植は免疫抑制療法の進歩によって臓器不全の一治療法として確立された。その反面、現段階ではドナー不足は深刻な問題であり、臓器移植の候補者の中でドナー臓器の不足により死亡する患者は年々増加している。臓器をより長時間、良好に保存することにより、移植候補者は適宜臓器移植を受ける可能性

向上し、またよりマッチングの良好な臓器を選択できることから免疫抑制剤内服の少量化が可能となる。

世界初の一卵性双生児間の腎臓移植を成功させ、さらには免疫抑制剤アザチオプリンの開発でノーベル賞を受賞した形成外科医ジョセフ・マレーの功績は、内科医・形成外科医・泌尿器科医、基礎免疫科学者、製薬会社の密接な連携によりなされた。我々の研究チームも彼らになぞらえ、形成外科医を中心に、基礎科学者、食品凍結企業が密接な学術連携をとること、革新的な臓器凍結技術の開発に挑む。

#### 〈争点1 磁場環境下凍結保存の可能性〉

磁場の細胞に対する影響や、臓器凍結に与える効果の原理が不明である。

#### 〈争点2 臓器凍結保護剤の開発〉

様々な種類の細胞で構成される臓器の凍結保護剤の研究は発展途上で、今後の研究開発が待たれる。

#### 〈争点3 解凍法の確立〉

体積の大きい臓器凍結においては、解凍中の再氷晶化を抑制するための方法論の確立が必須である。

### ●文献

- 1) Zhou YC, Cecka JM : Preservation. Clin Transpl, 1992;383-90.
- 2) Monzen K, Hosoda T, Hayashi D, et al : The use of a supercooling refrigerator improves the preservation of organ grafts. Biochem Biophys Res Commun, 2005;337 (2) :534-9.
- 3) Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO : Development of a cold storage solution for pancreas preservation. Cryobiology, 1986;23 (6) :477-82.
- 4) Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, et al : Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation, 1988;46 (2) :191-6.
- 5) Koshima I, Inagawa K, Urushibara K, et al : Supermicrosurgical lymphaticovenular anastomosis for the treatment of lymphedema in the upper extremities. J Reconstr Microsurg, 2000;16 (6) :437-42.
- 6) Fukushima T, Nakagawa T, Noguchi S, et al : Temporary ovarian transplantation for iatrogenic sterility. ACSC, 2009;1 (1) :38-41. 7) Ong WC, Nakagawa T, Noguchi S, et al : Super-Microsurgery for vascularized ovarian transplantation and cryopreservation. ACSC, 2009;1 (1) :30-3.
- 8) Inaba H, Takeya K, Nozu S : Fundamental Study on Continuous

Ice Making Using Flowing Supercooled Water. JSME Int. J. Ser. B, 1994;37:385-93.

- 9) Shichiri M, Araki Y : Nucleation mechanism of ice crystals under electrical effect. J. Crystal Growth, 1986;78:502-8.

### ●参考website

- ・社団法人日本臓器移植ネットワーク  
<http://www.jotnw.or.jp/>
- ・日本移植学会  
<http://www.asas.or.jp/jst/>
- ・移植グラフィティ  
<http://www.medi-net.or.jp/tcnet/history/history.html>
- ・東京大学医学部附属病院 組織バンク  
<http://uttb.umin.ac.jp/>
- ・東京大学医学部形成外科・美容外科  
[http://www.h.u-tokyo.ac.jp/patient/depts/pras\\_md.html](http://www.h.u-tokyo.ac.jp/patient/depts/pras_md.html)
- ・株式会社アビー  
<http://www.abi-net.co.jp/>
- ・Core Dynamics  
<http://www.coredynamics.com/CoreDynamic/index.asp>