



冷凍保存法による同種血管に関する実験的研究

草野, 昌治
岡田, 昌義

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(1):53-59

(Issue Date)

1999-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042530>



凍結保存法による同種血管に関する実験的研究

草 野 昌 治, 岡 田 昌 義

神戸大学大学院医学研究科外科Ⅱ
(担当: 岡田昌義教授)
神戸市中央区楠町7丁目5-1
神戸大学医学部外科学第2講座内
草野 昌治
電話 078-341-7451 内線 5582

(平成11年1月26日受付)

要 約

新鮮同種血管を凍結保存することによりその保存効果について血管の機能面での回復状況の程度を検討した。実験モデルは、日本白色家兎の雄の胸部大動脈を摘出し、 -196°C の液体窒素保存槽内で凍結保存した。保存血管は解凍後、腹部大動脈に端々吻合にて移植した。機能温存の評価法として、血管収縮hormoneの一種である希釈serotonin, 5HT (以下5HT) を保存血管に投与して行った。凍結保存し解凍した直後の血管は、凍結保存期間の長短に関わらず、5HTの投与に対し全く反応しなかった。一方、凍結保存後移植した血管のうち、凍結保存期間1週間、移植期間2日の2例と、凍結保存期間2週間、移植期間20日の1例で良好な濃度依存性の収縮反応がみられた。組織学的検討では、凍結保存後解凍した直後の血管では、凍結保存期間の長短に関わらず、血管壁の構築、平滑筋細胞の構造、弾性繊維の配列にほとんど障害はみられなかったが、内皮細胞は、保存期間が3週間以上に及ぶと、血管壁からの部分的な脱落がみられた。一方、凍結保存後に移植した血管では、平滑筋細胞は若干内腔側に偏在し細胞配列は比較的良好に保持されていた。内皮細胞は移植後1日目に脱落してしまうが、移植後20日目になると宿主由来の内皮細胞が単層に表面を被ってることが確認された。

緒 言

最近の人工血管の開発には、非常にめざましいものがある。しかし、なお十分な強度を有し、かつ良好な伸展性をも保持する生体血管の物理学的特性を越えるものはない。

そこで今回我々は、将来の臓器移植や小口径の血管

材料の開発を念頭において、凍結保存後解凍直後の血管、並びに凍結保存後同種に移植された血管に対して種々の観点から評価を加えた。凍結保存の評価法としては、多くの施設でcell viabilityを測定しており、80%前後で満足すべき結果が報告されている^{1)~8)}。今回我々は、凍結保存後の生体血管を、機能面からみてどの程度温存させるかについて血管収縮ホルモンに対する反応で評価し、凍結保存後の血管の機能面での回復状況の程度を検討した。

I. 対象と方法

対象は、日本白色家兎(体重2.9~3.4kg)雄の胸部大動脈(外径4~5mm)を使用した。動物実験に関しては、「動物実験に関する指針(日本実験動物学会)」並びに「神戸大学動物実験施設の基準」に基づき実験を施行した。

1) 凍結保存

凍結保存法として、緩徐凍結、急速解凍を原則とした^{9)~14)}。

i) 保存液 Hepes Bufferを加えたTC-199Hanks塩の液体培地に細胞凍害保護液である10%dimethylsulfoxide (DMSO)を添加して用いた。

ii) 凍結法 ネンブタール60mg/kgを日本白色家兎に静脈投与して犠牲死させた後、胸部大動脈を全長にわたり採取し、周囲組織の十分なtrimingを行った後、前記液体培地4℃内に浸水し、ミスターフロスティ(ナルゲン社製)を用いて、組織温度 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の率で -80°C まで冷却し、凍結した。その後、液体窒素保存槽(-196°C)内で保存した。

iii) 解凍法 検体を液体窒素より取り出した直後より7分間室温($20\pm 4.8^{\circ}\text{C}$)で放置し、その後 37°C 恒温槽内で4℃まで急速解凍し(平均約1分30秒)、DMS

キーワード: 凍結保存, 同種血管移植, 血管収縮能, 小口径血管

Oを希釈した後、再び恒温槽内で急速解凍した。

2) 血管移植

日本白色家兎にネブタール (20mg/kg) を静脈注射した後、1%キシロカインで腹壁の局所麻酔を行い、無痛とした後に開腹した。腎動脈分岐部より末梢側の腹部大動脈 (外径2~3mm) を露出した後遮断し、凍結保存後解凍した胸部大動脈を用いて移植実験を行った。

3) 移植血管の評価方法

i) 機能温存の評価

血管収縮hormoneの1種である希釈serotonin, 5HT (以下5HT) を用いて、血管収縮能がどの程度温存されているか、犠牲死直後に採取した胸部大動脈をcontrol群として、凍結保存解凍直後の血管および凍結保存解凍後に一定の期間移植した後に採取した血管の実験群とを比較した (Fig.1)。採取した胸部大動脈から長径5mmの動脈輪を作製し、これを、95% O₂ - 5% CO₂により吹送平衡させたKrebs-Heseleit液 (NaCl 18mM, KCl 4.0mM, CaCl₂ 1.5mM, MgSO₄ 1.2mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, D-

Glucose 5.6mM) を満たしたorgan chamberに懸垂させ (37°C, PH7.4), その等尺性収縮を張力トランスジューサー (日本光電, TB-651T) により連続的に測定した。採取した動脈輪の静止時の張力は、1.5gに調節し、60分間incubateして安定させた。

次いで、20mM K⁺溶液の中で2回収縮させ、標本の膜電位を安定させた。

5HTの投与方法は、異積投与方法を用い (濃度変化 1.0×10^{-9} , 3×10^{-9} , 1.0×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1.0×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 3×10^{-5} M), 連続測定した^{15)~17)}。

血管収縮に対する5HTの効果は、血管収縮反応閾値の5HT濃度とその際の張力、最大張力発現時の5HT濃度とその際の張力、最終投与濃度 (3.0×10^{-5} M) での収縮張力とその際の20mM KCLの収縮値を100%とし、その相対値を、犠牲死直後に採取した胸部大動脈をコントロール群として比較した。

ii) 病理組織学的評価 凍結保存後解凍した直後の胸部大動脈と、移植後採取した胸部大動脈の各々に対して、凍結期間並びに移植による影響を病理組織学的に比較検討した。

II. 結 果

1) 凍結保存後移植した血管の収縮能

凍結保存し解凍した直後の胸部大動脈は、凍結保存期間の長短に関わらず、20mM KCLや5HTの投与に対しても、全く反応を示さなかった。

一方、凍結保存後移植した血管のうち、5HTの投与により、凍結保存期間1週間、移植期間2日の5例中2例で良好な収縮反応が認められた。また、凍結保存期間2週間、移植期間20日の1例と併せ、計3例で良好な濃度依存性の収縮反応が確認された (Fig.2)。これらの結果は、Table 1に示す如くである。すなわち、閾値濃度及び最大張力発現濃度はともに、コントロール群とほぼ同程度であったが、最大張力及び最終濃度での収縮張力は、コントロール群と対比して優位に増加傾向を示した (Fig.3)。

2) 病理組織学的検索結果

凍結保存期間1週間、2週間及び14週間の後解凍した直後の各胸部大動脈との比較 (Fig.4 ×40, HE stain.) では、平滑筋細胞の構築や層状配列は、保存期間が長期に及んでも短期の保存例と対比して、障害はみられず、良好に保持されていた。また、平滑筋細胞自体の構造にも、核の断裂、融解、扁平化の障害もほとんどみられなかった。一方、内皮細胞は、保存期間が2週間までは良好に保持されていたが、保存期間

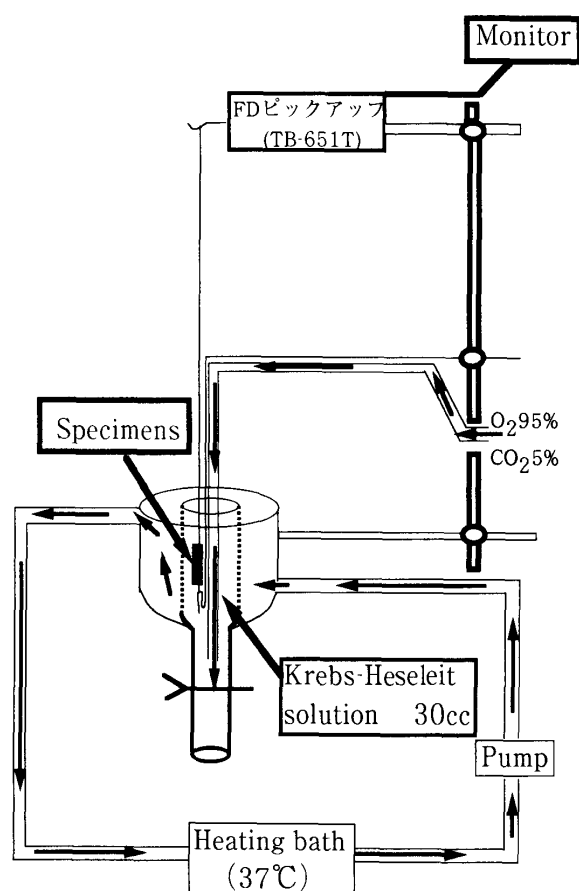


Fig 1.: Measurement of vascular contraction in vitro

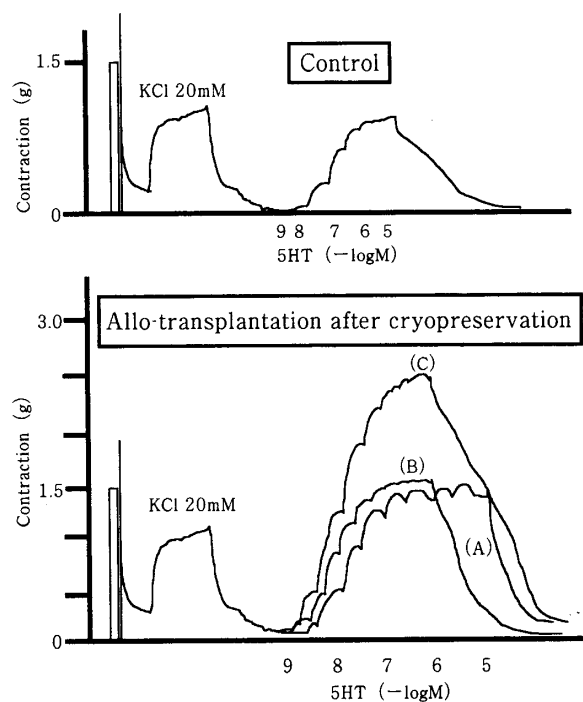


Fig. 2. Typical recordings of contractions induced by cumulative addition of 5HT to the bath. (A) 1 week after cryopreservation, 2days after allo-transplantation. (B) 1 week after cryopreservation, 2days after allo-transplantation. (C) 2 week after cryopreservation, 20days after allo-transplantation.

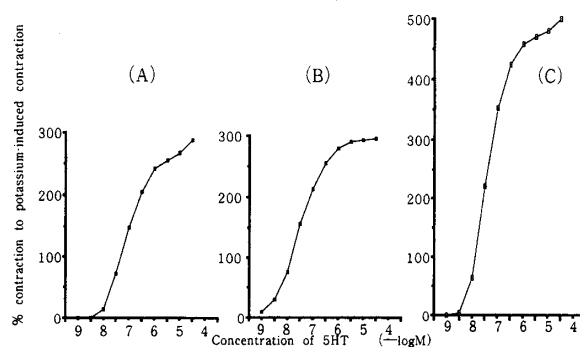


Fig 3. Concentration-response relationship for 5HT in Japanese white rabbit artery induced in a dose-dependent manner. After determining baseline responses, tissues were washed, 5HT (1.0×10^{-9} M) was added, and the measurements were repeated. The maximum contraction induced by 20mM K^+ was taken as a relative amplitude of 100%. (A) 1 week after cryopreservation, 2days after allo-transplantation. (B) 1 week after cryopreservation, 2days after allo-transplantation. (C) 2 weeks after cryopreservation, 20days after allo-transplantation.

Table. 1. 5HTに対する血管収縮能

		閾値濃度Mol (張力mg)	最大張力濃度Mol (張力mg)	最終張力mg (3×10^{-5} Mol)	20mM KCl との相対値
コントロール		1×10^{-8} Mol (50mg)	3×10^{-5} Mol (250mg)	875mg	1.75倍
実験群	(A)	1×10^{-8} Mol (75mg)	3×10^{-5} Mol (375mg)	1438mg	2.88倍
	(B)	1×10^{-9} Mol (50mg)	3×10^{-5} Mol (400mg)	1475mg	2.95倍
	(C)	3×10^{-9} Mol (25mg)	3×10^{-5} Mol (775mg)	2495mg	4.99倍

(A), (B): 凍結保存1週, 移植2日
コントロール: 犠牲死直後の血管

(C): 凍結保存2週, 移植3週

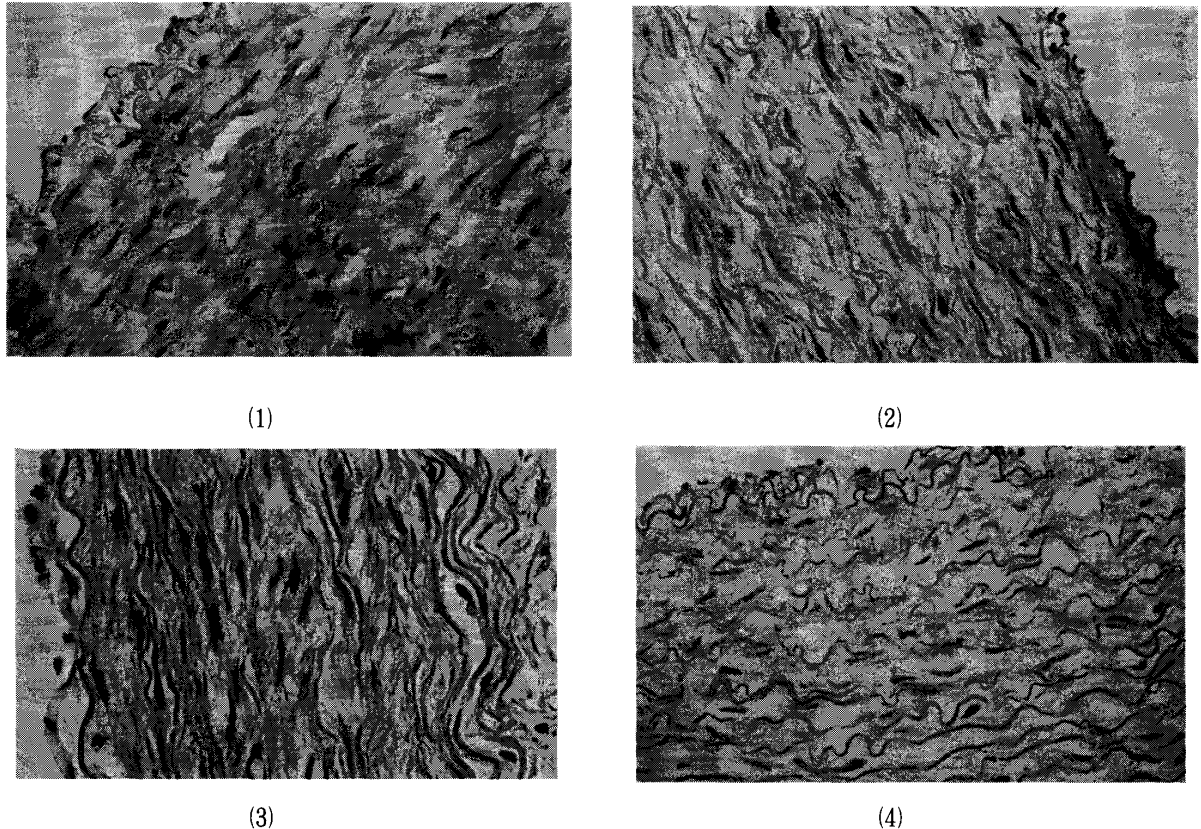


Fig. 4 Microscopic findings after preservation with TC199 solution. (1) control (2) 1st week (3) 2nd week (4) 14th week.
Light microscopic original magnification is $\times 40$. HE stain.

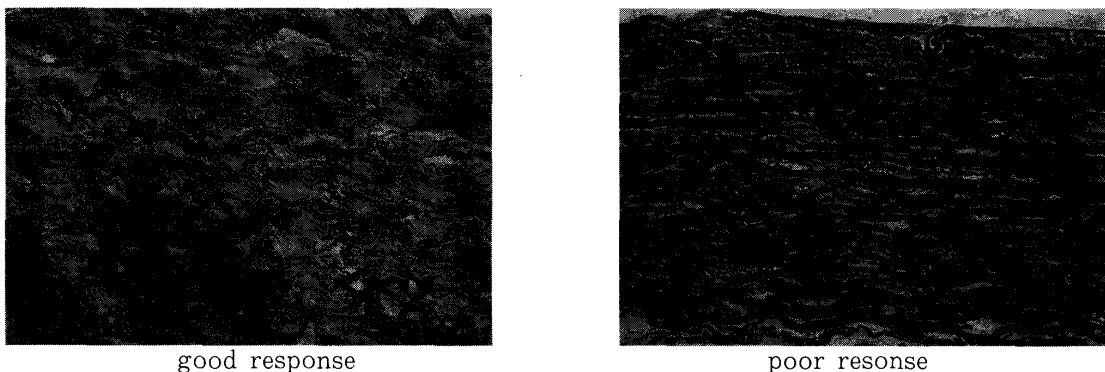


Fig. 5 Microscopic findings of the good and poor groups which were induced contractile responses in 1 week after cryopreservation, 2days after allo-transplantation artery in a dose-dependent manner by 5HT. Original magnification is $\times 40$. HE stain.

が3週間以上に及ぶと、血管壁から部分的に脱落している所見がみられた。さらに、弾性繊維の配列には、断裂も認められず、保存期間の長短期にもかかわらず、良好に保持されており、移植後も血管の柔軟性は十分に保持されていた。一定期間凍結保存し、解凍後に移植した血管のうち、血管収縮能で反応が不良であった血管では、内皮細胞は脱落ないし形態が不明瞭となり、平滑筋細胞の配列が乱れていた。また外膜側は融解もしくは消失し内腔側に偏在してみられ、かつ核の

扁平化や空泡形成が顕著にみられた。一方、これに対し、収縮反応が良好であった血管では、平滑筋細胞が若干内腔側へ偏在していたが、細胞配列は比較的良好に保持され、また核の融解や消失などの所見はごく軽度にとどまっていた (Fig.5 $\times 40$. HE stain.). また、内皮細胞は、移植後1日目より脱落、消失してしまうが、移植後20日目になると、新たに宿主由来と思われる内皮細胞が出現し、これらは血流方向とほぼ平行に配列し単層となってみられた (Fig.6 $\times 10$, $\times 20$, $\times$

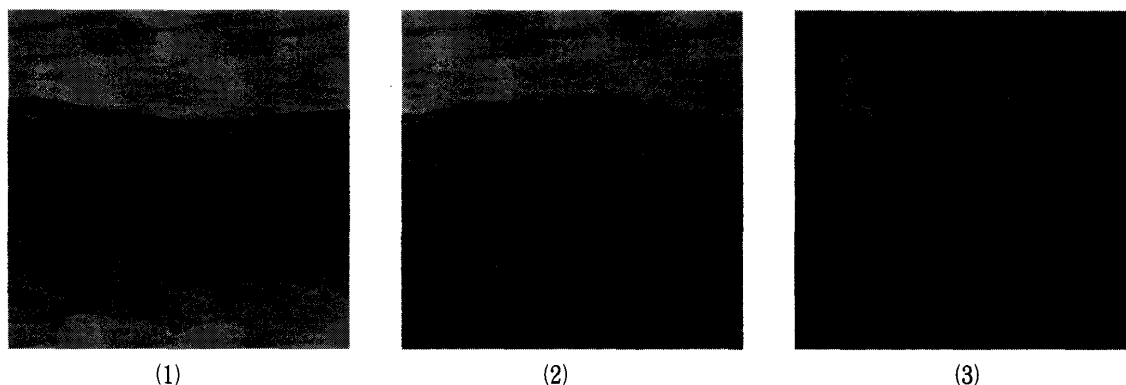


Fig. 6 Microscopic findings of 2 weeks after cryopreservation, 20days after allotransplantation artery which induced contractile response in a dose dependent manner by 5HT. Monolayered endothelial cells from recipient tissue covered luminal surface of the allograft. Original magnification is (1) $\times 10$, (2) $\times 20$, (3) $\times 40$. HE stain.

40. HE stain.)。

Ⅲ. 考 察

動脈壁の組織構造は、内側から内膜、中膜、外膜と呼ばれる3層から構成されており、このうち中膜は動脈壁の最も厚い部分で、その性質は動脈壁の物理学的特性をほぼ決定している。血管の緊張度（トーン）は、中膜の血管平滑筋の緊張度によって決まるが、この緊張度を制御するものは、神経、血管内皮細胞及び体液性因子である事が明らかになってきた。これらの制御因子のうち、内皮細胞非依存性で、血管平滑筋に直接作用する5HTの血管収縮反応は、平滑筋の5HT₂受容体を介してCa²⁺ channelの活性化とphospholipase Cの活性化を介して、細胞内よりCa²⁺が放出されることによって発生するものと考えられている。

今回我々は、この体液性因子である5HTに対する血管収縮反応を比較検討することにより、凍結保存した血管、凍結保存後に同種に移植した血管が、どの程度これら平滑筋細胞の生理的活性を温存しているのか検討した。病理組織学的観点からみれば、凍結保存期間の短期、長期に関わらず、平滑筋細胞とその配列は良好に保たれていたにも関わらず、解凍直後では5HTの投与によっても血管収縮は発生しなかった。ところが、凍結保存後に移植を行うことにより、コントロールよりもはるかに大きい収縮反応が認められた。その理由としては、凍結保存により形態学的には平滑筋細胞自体は良好に温存されているが、5HTの投与に対する収縮能は、解凍直後では平滑筋細胞自体が不応期の状態にあり、それが移植によって生体内に復元

されることにより、次第に回復してくる可能性が大きく示唆された。また、平滑筋細胞の数を分析したところ、解凍直後より移植した後の方が平滑筋細胞の数が明らかに減少していた。それにも関わらず、血管収縮の張力が増大傾向を示したという事実は、移植後には5HTに対する血管平滑筋の5HT₂受容体を介した反応の活性化が大きく亢進したものと考えられた。移植後の平滑筋細胞の障害は、移植免疫による拒絶反応が関与しているものと思われた。移植後2日目には内皮細胞は脱落していたが、その後宿主側の内皮細胞の新生がみられ、移植後20日目は単層となって出現していることが確認された。これらの所見から、i) 移植した血管が生体材料であるため、血管内皮細胞が新生しやすいことに加え、ii) 宿主側と移植側の血管にコンプライアンスの差が小さくコンプライアンスミスマッチが発生しにくいこと、iii) 移植後の移植血管の機能回復が宿主側との弾性特性の適合に良好に作用していることが考えられた。

同種血管の移植に関して、現在大きな障害となっているのが移植免疫である^{18)~20)}。凍結保存片の免疫に関しては、最近の報告では免疫原性を有するとするものが多い。今回の我々の実験結果からは、移植を行うことで移植側の内皮細胞は早期に脱落してしまうこと、移植側の平滑筋細胞数が減少することより、移植血管の抗原性の低下が確認された。

Ⅳ. 結 語

- 1) 日本白色家兎の胸部大動脈を用いた実験モデルにおいて、凍結保存法により血管の平滑筋細胞は長期にわたって良好に保存された。
- 2) 凍結保存後同種に移植された血管は、解凍直後で

は機能面の停止状態であるが、移植することにより機能面の回復がみられた。

3) 移植後20日目に、宿主側由来の内皮細胞の新生がみられ、単層に配列していた。

4) 移植を行うことで移植側の内皮細胞は早期に脱落し、移植側の平滑筋細胞数も減少することより、移植血管の抗原性の低下が確認された。

5) 凍結保存後同種血管の移植は、特に小口径血管のグラフト材料として有効であると考えられた。

本論文の要旨は、第26回日本血管外科学会総会（平成10年5月、東京）において発表した。

文 献

- 1) 木村 昇, 川副浩平, 今北正美, 由谷親夫: 凍結保存rat同種大動脈移植に関する基礎的研究。低温医学, 17 : 137-143, 1991.
- 2) 庭屋和夫, 北村惣一郎, 河内寛治, 森田隆一: ヒト同種弁の冷蔵及び凍結保存におけるcell viabilityの研究—flowcytometry法を用いて—。日本胸部外科学会誌, 41 : 1335-1340, 1993.
- 3) Brockbank, K. G. M. Bank, H. L.: Measurement of Postcryopreservation Viability. J. Cardiac. Surg. 1 : 145-151, 1987.
- 4) Gonzalez-Lavin, L. : Determining viability of fresh or cryopreserved homograft valves at implantation. Heart and Vessels. 3 : 205-208, 1987.
- 5) 中山正吾, 伴敏彦, 岡本好史: 凍結保存大動脈弁における繊維芽細胞生存性の定量的評価。日本胸部外科学会誌, 41 : 1357-1362, 1993.
- 6) Watts, L. K., Duffy, P., Field, R. B., Stafford, E. G., O'Brien, M. F.: Establishment of a viable homograft cardiac valve bank. A rapid method of determining homograft viability. Ann Thorac Surg. 21 : 230-236, 1976.
- 7) van der Kamp. A. W. M., Visser. W. J., van Dongen, J. M., Nauta, J., Galjaard, H.: Preservation of aortic heart valve with maintenance of cell viability. J. Surg Res. 30 : 47-56, 1981.
- 8) Hu, J., Gilmer, L., Hopkins, R., Wolfenbarger, L.: Assessment of cellular viability in cardiovascular tissue as studied with 3Hproline and 3Hininulin. Cardiovasc Res, 24 : 528-531, 1990.
- 9) 窪田倭, 野崎豊, 林淳也: 超低温保存（凍結保存）。病態生理, 10 : 685-690, 1993.
- 10) 酒井昭: 凍結保存。朝倉書店, 3-56,
- 11) 隅田幸男: 組織凍結保存の基礎知識, 低温医学, 22 : 187-199, 1996.
- 12) Lovelock, J. E.: The haemolysis of humanned blood cells by freezing and thawing. Biochim. Biophys. Acta. 10 : 414-426, 1953.
- 13) 徳永滋彦, 富永隆治, 安井久喬: 心臓弁, 血管の凍結保存法と原理。低温医学, 22 : 200-205, 1996.
- 14) 木村昇, Marie L. Foegh : 凍結保存血管の基礎的研究の最前線。低温医学, 22 : 213-219, 1996.
- 15) 石川智久, 後藤勝年: in vitro血管収縮反応の実験法。実験医学, 14 (増刊):1721-1724, 1996.
- 16) 浦川紀元 監修, 高柳一成, 砂野哲, 唐木英明編: 平滑筋の薬物反応, 分光堂, 1986
- 17) 石川智久, 後藤勝年: 血管内皮由来の収縮因子と弛緩因子。循環器科, 39:221-227, 1996.
- 18) Muller Hermelink H. Yankah, A. C.: Immuno-histopathology of cardiac valve Allograft explants. Cardiac Valve Allograft. Steinkopff Verlag Darmstadt Springer Verlag New York, 89-94, 1987.
- 19) Yankah, A. C., Wotteg, H. U., Muller Hermelink, H. K.: Transplantation of aortic and pulmonary allografts, enhanced viability of endothelial cells by cryopreservation, importance of histocompatibility. J. Cardiac Surg2 (Suppl):209-220, 1987.
- 20) Cuono, C. B., Langdon, R. Birchall, N.: autologous, allogenic skin replacement : Development and clinical application. Plast Reconstr Surg. 80 : 626-637, 1987.

EXPERIMENTAL STUDIES ON CRYOPRESERVED ALLOGRAFTS IN RABBITS

Syouji KUSANO and Masayoshi OKADA

Second Division, Department of Surgery, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

Aim : Experimental results of an allogenic arterial graft with a cryopreservation method were reported. This study was designed to investigate how vessels after cryopreservation recovered their contractive function.

Materials and methods : Male Japanese white rabbits were used. The thoracic artery was harvested from Japanese white rabbits. They were frozen in a step-wise manner from 4°C to -80°C using a programmed freezer, and then, preserved in liquid nitrogen at -196°C for one or two weeks. After thawing the graft, the vessel was transferred into abdominal aortas of different rabbits. The rabbits were sacrificed after two or 20 days.

Patency of the grafted vessels was observed postoperatively. Loosely adhering connective tissue was removed from each artery and the artery was cut into rings 5mm in length. Each ring was suspended by a pair of hooks. Isometric force generation was registered using a polygraph recorder.

Serotonin 5HT (5HT) concentration-response curves were constructed by adding cumulative doses of 5HT to the baths.

Histopathological microscopic specimens were examined.

Result : No contractive response to 5HT was detected for vessels immediately after rapid thawing. However, two and 20 days postoperatively, after the patency of the grafted vessels was confirmed, contraction induced by 5HT was significantly increased.

Pathological examination revealed no significant difference between short-term and long-term storage of the cryopreserved vessels. On the vessels after transference, most epithelia were absent at two days, but on day 20, the inner surface of the graft was lined with endothelial cells originating from the recipient.

Conclusion : In this study, a satisfactory contractive response to 5HT in vessels after transference was observed at two and 20 days. Furthermore, satisfactory morphological results of the cryopreserved grafts may lead to new techniques for cardiovascular surgery.