

腎臓移植の研究

V. 腎臓の凍結保存にかんする実験的研究

長崎大学医学部泌尿器科学教室（主任：近藤 厚教授）

高 野 真 彦

STUDY ON RENAL TRANSPLANTATION

V. EXPERIMENTAL STUDY ON PRESERVATION
OF THE KIDNEY BY FREEZING

Masahiko TAKANO

*From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine**(Director: Prof. A. Kondo, M. D.)*

The canine kidneys were freeze-preserved at $-90\sim-160^{\circ}\text{C}$ using liquid nitrogen. The optimum concentration and the condition of infusion and extraction of cryoprotective agent were investigated. The condition of freezing and thawing were also examined. Function of the preserved kidneys were tested by means of extracorporeal circulation method by which direct renal blood flow (DRBF), extraction ratio of para-aminohippurate and sodium thiosulfate (E_{PAH} and E_{STS}) and clearance of PAH or STS (C_{PAH} and C_{STS}) were evaluated. Histological changes of the kidneys were examined through the process of procedure. Autotransplantation have been tried with 4 freeze-preserved kidneys.

(1) The renal tubular damage occurred even by infusion and extraction of cryoprotectant without freezing, because of the hyper-osmolar gradient. Sufficient blood recirculation of the kidney was not obtained after perfusion of glycerol due to severe outflow block, however this circulating disturbance was steadily diminished by infusion with gradual increase of concentration and extraction with gradual decrease of concentration using 20% DMSO.

(2) Evident deep fissures appeared on the kidney at rapid freezing rate exceeding 10°C per minute, but no injury was produced at slow freezing rate.

The best DRBF was obtained in slow freezing and rapid thawing of the kidney which was infused with gradual increase of concentration and extracted with gradual decrease of concentration using 20% DMSO. E_{PAH} and C_{PAH} were good in slow freezing and slow thawing of the kidney, however E_{STS} and C_{STS} were good in slow freezing and rapid thawing of the kidney.

(3) After cryopreservation, renal function was almost markedly disturbed. Especially tubular function damage was severe, however glomerular function damage remained slight.

(4) Histological changes of the freeze-thawed kidneys showed evident exfoliation and destruction of tubular epithelium, but few changes in glomerular or vascular system. It seems to be difficult to prevent this tubular epithelium injury effectively with the 20% DMSO or 30% glycerol used in this study.

(5) The canine kidneys were infused with gradual increase of concentration and ex-

tracted with gradual decrease of concentration using 20% DMSO and freeze at slow rate and thawed at rapid rate. After autotransplantation of these 4 kidneys, all autografts resulted in necrosis, and the dogs died of uremia on the 3 to 4th day after contralateral nephrectomy.

緒 言

腎保存法は、組織適合性の判定、移植免疫反応抑制の問題とともに、腎臓移植の成功のための重要な課題となっている。また最近では移植腎の入手方法が、生体よりも屍体に求めることが世界的傾向となっている。現在、腎保存法の確立は必然的にその重要性が増大する。

保存法としては、低温下に浸漬保存、灌流保存、高圧酸素下保存をおこなうものおよびこれらの組合せによる保存法が発表されており、当教室においても高崎(1968)¹⁾が常圧酸素下低温浸漬保存をおこない、進藤(1969)²⁾が常圧および高圧酸素下低温灌流保存をおこなって、それぞれ約12時間までは比較的良好な機能を保っていると報告した。しかし、これらの方法では移植後腎機能の再現性の点で保存時間に限界があり、腎移植の実際的な面からは、さらにこれ以上の保存時間の延長が必要である。そのために著者は、半永久的な保存という点で最も希望のもてる凍結保存法について実験を試みた。

現在、生物材料の凍結保存で、赤血球、白血球、骨髄細胞、腫瘍細胞、精子など、いわゆる細胞レベルではすでに成功し、実用化されているが、腎臓のような種々の細胞の集合体で、かなりの容積を有する臓器の凍結保存については、Wheeler (1964)¹⁵⁾がラットの腎について実験をおこなって以来 Mundth (1965)¹⁶⁾, Halasz (1967)⁸⁾, Hamilton (1968)¹⁷⁾ら数名の研究者によって試みられているが、まだ成功例がなく、また保存操作についても確立されたものがない。

本実験では、極超低温下に摘出犬腎の凍結保存をおこない、保存による腎機能への影響および組織学的変化について検討した。

実験方法

雑種成犬を用い、全麻下に経腹腔的に腎を摘出して washing out をおこなった。灌流液としては乳酸リンゲル液 500 cc にヘパリン 50 mg, 塩酸プロカイン 1 g を添加したものをを用いた。これを 4°C に冷却したのち、100 cmH₂O の圧で肉眼的に血液の色が完全に消失するまでだいたい 100~150 cc 注入灌流した。ついで凍害防止剤の希釈液を腎動脈より注入した。凍害

防止剤としては、細胞膜透過性物質であるグリセリン(以下 Gly と略記)とジメチルスルフォオキシド(以下 DMSO と略記)を、それぞれ上記灌流液で希釈し、pH 7.4 に調整し、4°C に冷却したものをを用いた。凍害防止剤を注入すると、はじめに腎表面に無数の小白斑が生じる。これがしだいに拡大融合したのち腎がもとの色調にもどるまで、だいたい 200~300 cc を注入した。

(1) 凍害防止剤の検討

(a) 至適濃度と時間

凍害防止剤の至適濃度と凍結開始までの至適時間を決定するために、腎の washing out 後、10%, 20%, 30% の Gly および DMSO 液を腎動脈より直接注入し、30分、60分、120分、180分間低温保存(4°C)した腎についてテトラゾリウム・テスト^{18,19)}(TTB テストと略記)と組織学的検索をおこなった。

(b) 凍害防止剤注入、除去法

凍害防止剤の注入が腎に及ぼす影響、とくに浸透圧²⁰⁾による影響をみる目的で、次のような方法で注入および除去をおこない、その後の腎機能および組織変化について比較検討した。

① 直接注入、直接除去法

最初から所定の濃度のものを直接注入したのち、灌流液だけを流して凍害防止剤を直接除去する方法である。

② 濃度漸増注入、漸減除去法

凍害防止剤の濃度を徐々に増加しながら注入し、除去にさいしては濃度を徐々に減少するように次のような方法をとった。Fig. 1 のように、(A), (B) 2 個の容器を設置してそれぞれに灌流液または凍害防止剤液をいれておく、(A)→(B) への滴下速度と (B)→腎への注入速度を一定にして、(B) の容量 (V cc) を一定にすれば、(B) 中の濃度は次式で表わされるように徐々に変化する。すなわち 1 滴の容量を d cc, 滴下速度を N 滴/分とすれば、 t 分後の (B) の濃度 (C_t %) は、

$$\text{濃度漸増時: } C_t = C \left\{ 1 - \left(\frac{1}{1 + \frac{d}{V}} \right)^{Nt} \right\}$$

$$\text{濃度漸減時: } C_t = C \left(\frac{1}{1 + \frac{d}{V}} \right)^{Nt}$$

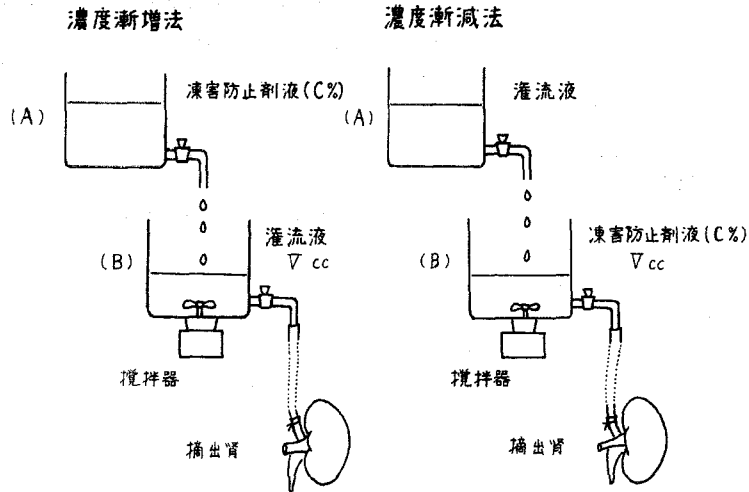


Fig. 1. 凍害防止剤の濃度漸増注入および漸減除去法

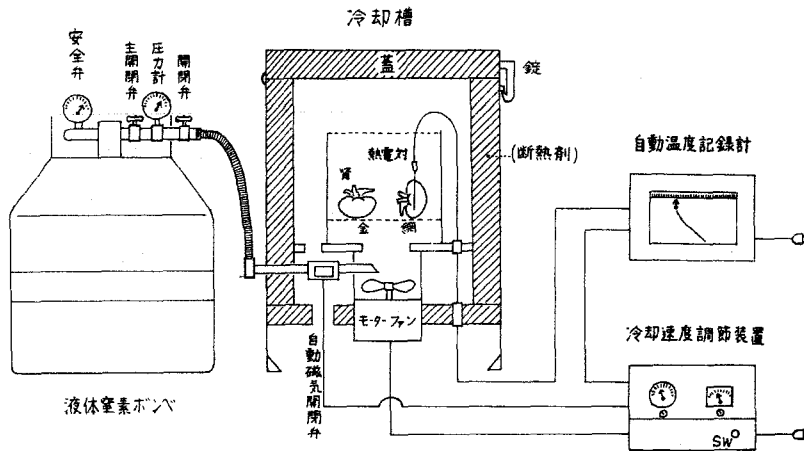


Fig. 2. 腎臓凍結装置

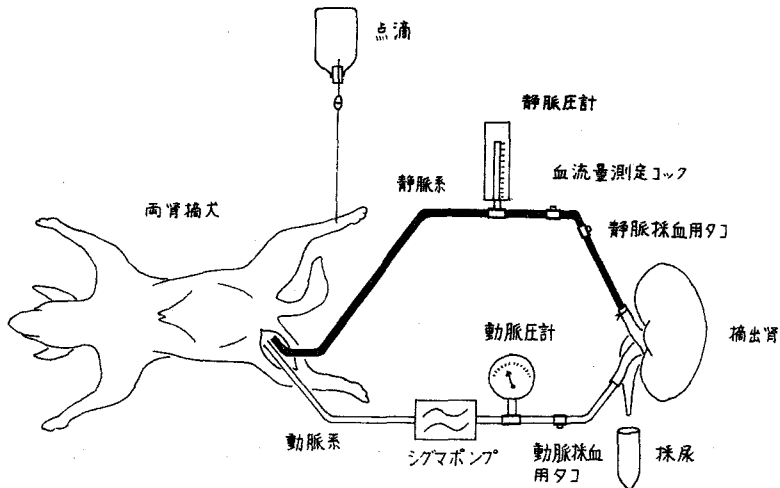


Fig. 3. 体外循環による摘出腎機能検査法

実施にさいしては、 $d=0.08$ cc, $V=50$ cc とし、濃度漸増時は Gly の場合は $C=40\%$, $N=30$ 滴/分, $t=30$ 分, DMSO の場合は $C=30\%$, $N=35$ 滴/分, $t=20$ 分、濃度漸減時はしだいに滴下速度を早めて、最後に灌流液だけを流し、そのときの濃度変化はだいたい $1 \sim 2\%$ /分となるように調節した。

(2) 凍結実験

液体窒素を冷媒とする冷却槽 (Union Carbide 社製, 生物凍結装置, Type BF-4・2, Serial 34 DY-175) (Fig. 2) を使用して凍結をおこなった。凍結速度は $10^\circ\text{C}/\text{分}$ 以上の急速凍結と $1 \sim 4^\circ\text{C}/\text{分}$ の緩速凍結をおこなった。最終凍結温度 ($-90 \sim -160^\circ\text{C}$) に達したのち、冷却槽内の温風による $5^\circ\text{C}/\text{分}$ の緩速解凍と電子レンジ (日立家庭用電子レンジ, MRK-620L) を用いて極超短波エネルギーによる $30 \sim 40^\circ\text{C}/\text{分}$ の急速解凍をおこなった。また解凍のさい、表面解凍までには緩速の場合は $15 \sim 25$ 分、急速の場合は $4 \sim 5$ 分を要し、その後は 40°C の温生食水中に浸して全体的にやわらかくなった時点をもって解凍完了とした。さらに緩速解凍の場合は凍害防止剤の直接注入・直接除去をおこない、急速解凍の場合は濃度漸増注入・漸減除去をおこない、その腎機能と組織変化について比較検討した。

(3) 腎機能検査

無腎犬の股動静脈に canulation をおこない、Fig. 3 のような体外循環回路を作った。動脈圧は 100 mmHg を保ち、それ以下の場合には血流ポンプを用いるようにした。10%パラアミノ馬尿酸 (PAH と略記) および 10%チオ硫酸ソーダ (STS と略記) を点滴静注により負荷して、回路の動静脈血の PAH, STS の濃度を測定し、その除去率 (E-PAH, E-STs), クリアランス (C-PAH, C-STs) および直接腎血流量 (DRBF) を測定した^{1,2)}。

(4) 組織学的検査

保存腎を凍結保存操作過程に従って次の 6 群に分類し、組織標本を作製して H-E 染色をほどこした。

- ① 摘出後 washing out した腎
- ② ①をそのまま凍結、解凍した腎
- ③ ①に凍害防止剤を注入した腎
- ④ 凍結することなく③より直接凍害防止剤を除去した腎
- ⑤ ③より凍結、解凍をおこなった腎
- ⑥ ⑤より凍害防止剤を除去した腎

(5) 凍結保存腎の移植実験

最良の条件と思われる方法により凍結した保存腎を用いて、イヌ 4 頭に実際に移植を試み、腎機能および組織変化を観察した。すなわち、左腎を腹腔外的に摘出して、緩速凍結、急速解凍後、右腸骨窩に自家移植

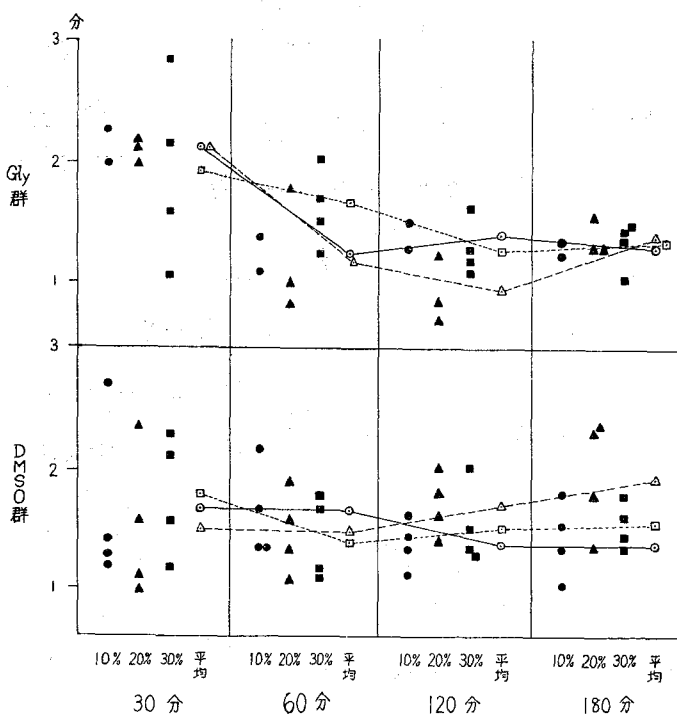


Fig. 4. TTB テスト

した。腎動静脈は股動静脈とそれぞれ端々吻合し、尿管皮膚瘻を造設した。凍害防止剤は 20% DMSO を用い、濃度漸増注入・漸減除去をおこなった。移植後 7 日目に右健常腎を摘出して移植腎のみとして、腎不全の発現を観察した。

結 果

(1) 凍害防止剤の検討

(a) 至適濃度と時間

TTB テストでは、Gly 群 9 腎、DMSO 群 12 腎ともに濃度による差はなく、また時間の経過による viability の程度もほとんど差はなかった (Fig. 4)。組織学的検索では、凍結防止剤注入後、いずれの濃度においても 30 分後すでに近位尿細管上皮の萎縮、変性、遠位尿細管の変性、脱落および間質の浮腫があらわれはじめ、時間の経過とともに増強する傾向にあった (Fig. 5, 6 (a), (b), (c))。しかし、糸球体および血管にはいずれの場合でもほとんど変化はみられなかつ

た。障害の程度が最も軽度なものは、Gly では 30%、DMSO では 20% であった。

(b) 凍害防止剤の注入、除去法

30% Gly 群 (①直接注入・除去群 5 腎, ②濃度漸増注入・漸減除去群 4 腎), 20% DMSO 群 (③直接注入・除去群 5 腎, ④濃度漸増注入・漸減除去群 4 腎) について腎機能を測定した結果を Table 1 に示した。Gly 群ではすべて全腎抵抗増大のために血流ポンプを用いなければ血流が得られず、一方 DMSO 群ではイヌの血圧だけで血流を得ることができた。E-PAH, C-PAH は各群とも半数以上が負、E-STs, C-STs は半数以上が正を示したが、負を示すものは機能 0 として各群の平均値を示した。E-PAH, C-PAH は、Gly 使用群ではすべて機能がなく、20% DMSO 直接注入・除去の場合が比較的良好な機能を示した。E-STs, C-STs は、Gly 群が DMSO 群よりも良好であった。DRBF は 20% DMSO 濃度漸増注入・漸減除去の場合が最もすぐれていた。

Table 1. 凍害防止剤の注入除去法と腎機能 (1)

凍害防止剤 注入・除去法	腎機能	腎番号	腎血流量 cc/min/100g	PAH		STS	
				E-PAH %	C-PAH cc/min/100g	E-STs %	C-STs cc/min/100g
30% Gly	直接注入・ 直接除去	65	8.0	-110.2	0	59.7	2.8
		67	8.8	-33.1	0	63.1	9.9
		73	3.5	-106.7	0	-15.7	0
		74	8.5	-80.4	0	100.0	5.6
		75	27.4	-268.2	0	41.2	7.9
		平均	11.2	0	0	52.9	5.2
	濃度漸増注入・ 漸減除去	76	19.8	-159.1	0	54.4	6.9
		78	22.6	-8.6	0	60.9	8.8
		79	28.4	-750.0	0	19.3	3.6
		91	62.2	-100.0	0	9.6	3.9
		平均	33.2	0	0	36.0	5.8
20% DMSO	直接注入・ 直接除去	95	17.3	-93.6	0	-22.9	0
		96	18.4	-26.2	0	28.2	3.6
		97	20.7	85.6	11.5	27.3	3.7
		103	101.7	5.0	3.3	21.9	11.1
		113	30.0	-127.5	0	-59.7	0
		平均	37.6	18.1	2.9	15.4	3.7
	濃度漸増注入・ 漸減除去	105	10.3	6.8	0.5	42.1	2.9
		107	28.6	-103.3	0	50.0	9.7
		108	18.6	-61.5	0	11.9	1.5
		115	131.5	-12.9	0	1.7	1.5
		平均	47.2	1.7	0.1	26.4	3.9

Table 2. 凍結・解凍法と腎機能 (1)

凍結, 解凍法	腎機能	腎番号	腎血流量 cc/min/100g	PAH		STS	
				E-PAH %	C-PAH cc/min/100g	E-STs %	C-STs cc/min/100g
緩速凍結・ 緩速解凍	30% Gly	26	39.2	2.1	52.0	29.9	7.3
		27	8.9	22.2	1.1	-166.6	0
		29	43.4	-32.2	0	-59.9	0
		33	24.0	54.5	7.6	-199.8	0
		34	24.0	-144.4	0	64.9	9.0
		平均	28.0	15.8	12.1	18.9	3.2
	20% DMSO	38	44.8	-40.5	0	24.0	6.3
		39	32.3	45.8	7.5	36.8	6.8
		41	3.2	69.4	1.8	-263.2	0
		43	20.6	-20.0	0	-13.5	0
		46	4.4	-180.6	0	38.3	1.0
		平均	21.0	23.0	1.7	19.8	2.8
緩速凍結・ 急速解凍	30% Gly	122	5.4	-89.2	0	39.5	1.0
		124	9.3	-26.7	0	60.5	3.2
		125	7.8	-9.1	0	70.2	3.7
		127	82.3	-5.6	0	41.3	15.9
		平均	26.2	0	0	52.8	5.9
	20% DMSO	112	20.3	-149.2	0	-42.3	0
		117	24.5	-118.4	0	-181.9	0
		119	45.7	-380.0	0	12.9	4.1
		120	153.9	-65.7	0	16.4	16.9
		平均	62.3	0	0	7.4	5.2

(2) 凍結実験成績

急速凍結の場合には、腎に腎盂にまで達する亀裂を生じたが、緩速凍結腎では全く亀裂はみられなかった。緩速凍結腎の緩速解凍群と急速解凍群の腎機能測定結果を Table 2 に示した。凍害防止剤は 30% Gly と 20% DMSO を使用した。Gly 群はすべて全腎抵

抗増大のためイヌの血圧では血流が得られず、血流ポンプを使用して血流再開を試みた。E-PAH, C-PAH は両群とも半数あるいはそれ以上が負であったが、E-STs, C-STs は負を示すものは半数以下であった。解凍速度について比較すると、E-PAH, C-PAH は緩速解凍群、E-STs, C-STs は急速解凍群が良好であった。

Table 3. 凍結保存操作による腎の組織変化

腎組織変化 凍結保存操作	糸球体			尿細管				血管破綻	間質浮腫
	萎縮	壊死	脱落	萎縮	破壊	脱落	腫張		
凍結・解凍 ②	—	±	—	±	++	+++	±	—	±
腎摘出後 wash out ①	—	—	—	—	—	—	—	—	—
凍害防止剤注入 ③	—	—	—	+	—	—	+	—	±
凍害防止剤除去 ④	+	—	±	+	++	++	±	—	+
凍結・解凍 ⑤	+	±	—	++	+++	+++	±	+	±
凍害防止剤除去 ⑥	+	+	±	+++	+++	+++	—	±	±

さらに凍害防止剤について比較すると、平均して良好な機能を有していると思われるのは 20% DMSO 緩速解凍群のようであった。DRBF は 20% DMSO 急速解凍群が最もすぐれていた。

(3) 組織学的検査成績

Table 3 に示すように、凍結保存操作過程において

まず摘出後 wash out した腎① および凍害防止剤の注入直後の腎③の組織変化は軽度であった。ところが凍害防止剤を注入したのち、凍結をおこなわずに除去だけをおこなった場合④でも、糸球体の変化は比較的軽度であったが、尿細管上皮の破壊、脱落がみられた (Fig. 7B)。これに血流再開をおこなった場合にはさ

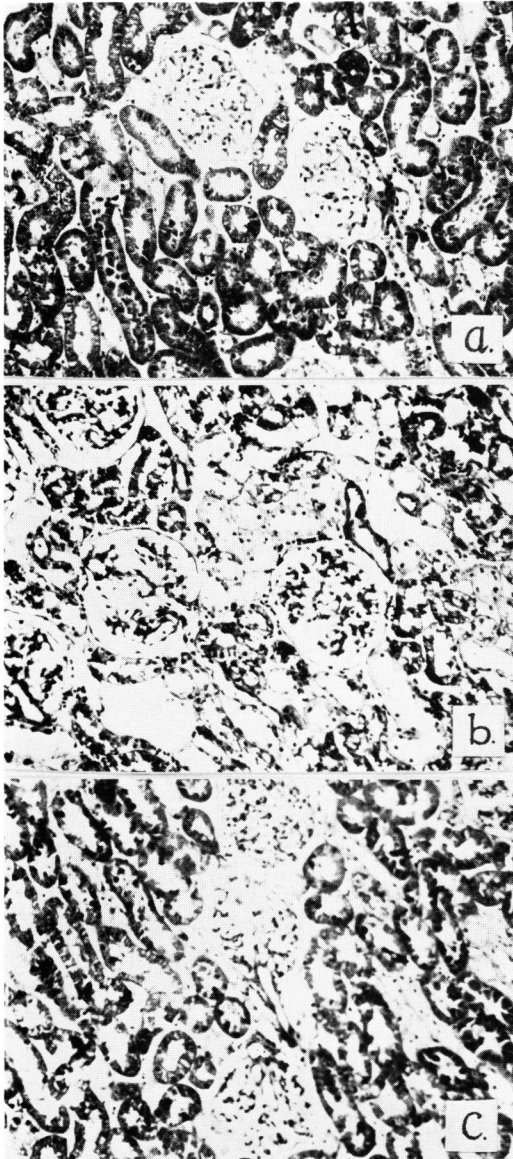


Fig. 5. Gly 注入後の変化

- 10% Gly 注入後180分。尿細管上皮細胞同志の分離が著明。
- 20% Gly 注入後180分。尿細管上皮の空胞変性、萎縮と同時に、一部破壊がみられる。
- 30% Gly 注入後180分。尿細管上皮細胞同志の分離および一部脱落。

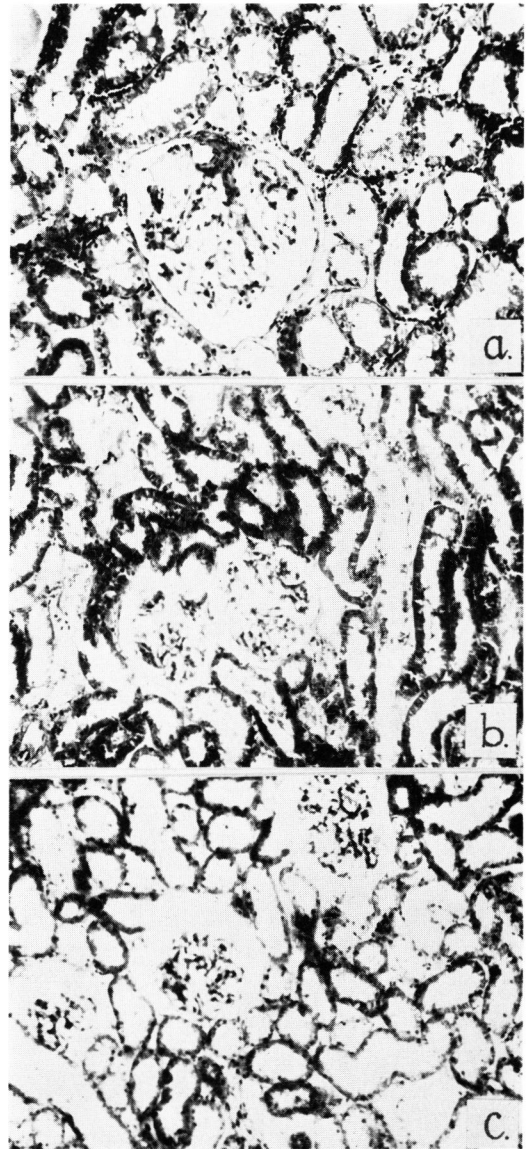


Fig. 6. DMSO 注入後の変化

- 10% DMSO 注入後180分。尿細管上皮の萎縮、管腔の開大および一部脱落しかかった部分がみられる。
- 20% DMSO 注入後180分。尿細管上皮細胞同志の分離が軽度みられる。
- 30% DMSO 注入後180分。尿細管上皮の萎縮性変化、管腔の開大がいっそう著明。

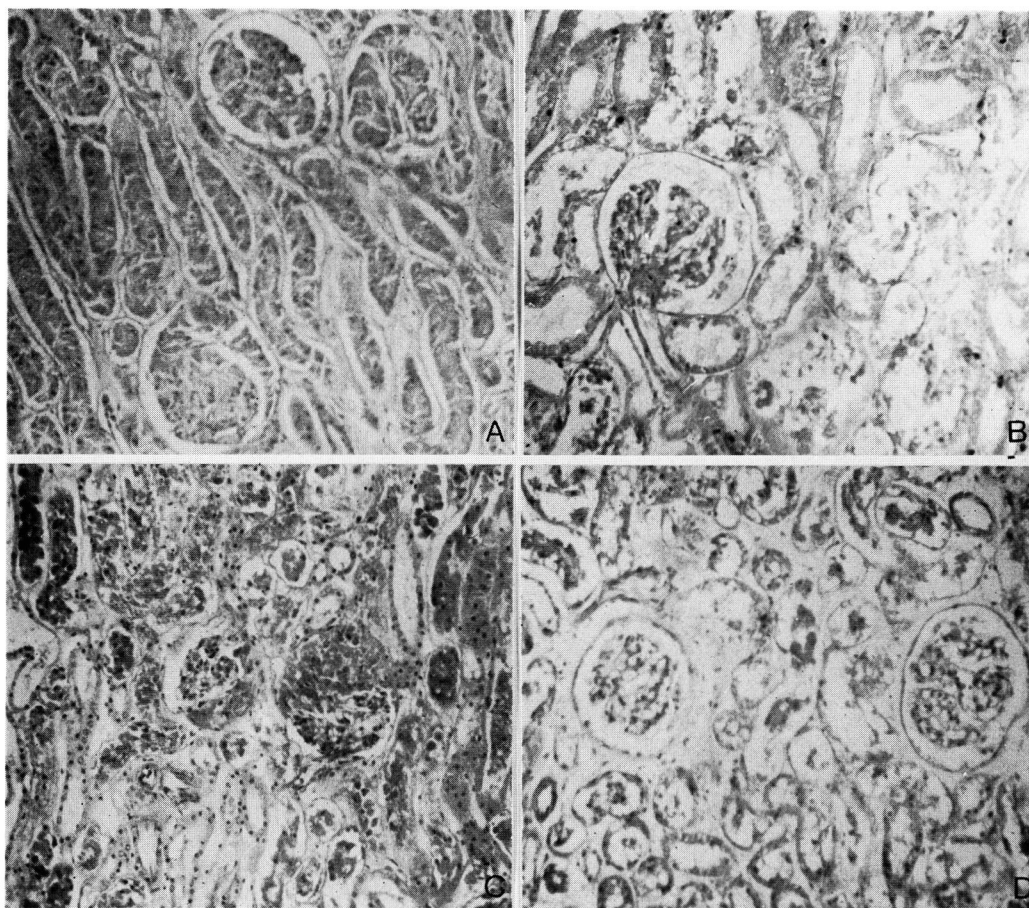


Fig. 7. 凍害防止剤と凍結、解凍による変化

- A. 凍害防止剤を使用せずに腎を凍結、解凍した場合の変化。尿細管上皮の全面的脱落と糸球体の断裂。
 B. 20% DMSO 注入、除去操作による変化（凍結なし）。尿細管上皮の破壊、脱落が一部にみられる。
 C. 30% Gly 処置、凍結、解凍直後の変化。尿細管上皮の破壊、脱落が著明。
 D. 20% DMSO 処置、凍結、解凍後、凍結防止剤除去後の変化。尿細管上皮の破壊がいっそう著明となる。

らに糸球体内ウッ血、尿細管内出血がみられた。このさい、凍害防止剤としては 20% DMSO の濃度漸増注入・漸減除去の場合が、Gly 群に比べて組織変化は軽度であった。凍結解凍直後における腎(②, ⑤)の組織変化で共通してみられるのは、著明な尿細管上皮の基底膜からの脱落および破壊 (Fig. 7C) で、その他一部に糸球体の破壊や血管断裂もみられた。これらの変化は、Gly 群に比して 20% DMSO 濃度漸増注入・緩速凍結・急速解凍の場合には比較的軽度であると思われた。しかし凍害防止剤を用いずに凍結解凍をおこなった場合(②, Fig. 7A)と比較しても大差はみられなかった。さらに凍害防止剤の除去をおこなうと(⑥), 上記組織変化、とくに尿細管上皮の破壊はいずれの場合も激しいものとなった (Fig. 7D)。凍結解凍後の血流再開腎については、さらに糸球体内ウッ血、尿細管内

出血がみられたが、この変化は Gly 群において著明であった。

(4) 保存腎移植実験成績

イヌに自家移植された凍結保存腎は、全例とも移植後全く尿分泌はなく、イヌ 4 頭のうち 2 頭は右健常腎摘出後 3～4 日で尿毒症で死亡し、移植腎は完全に壊死に陥っていた。他の 2 頭については 7 日目に移植腎を摘出してその状態を観察したところ、いずれもすでに壊死に陥っていた。

総括および考察

(1) 凍害について

温血動物の細胞は凍害にあらうと死滅する。この凍害の機序については次のようにいわれている。①氷晶形成による細胞構造の機械的破壊、②脱水による細胞内

電解質の濃度異常および蛋白質沈殿、不可逆的な蛋白質の接近 (cross linking) の発生、③ pH の変化、④構造水の消失による細胞膜蛋白の変性、さらに細胞集合体である組織、臓器の場合には、細胞外結晶による組織構築の破壊、臓器内温度差による歪曲、迂りなどの物理的障害が加わり、その機能が失われる。

液体をしだいに冷却してゆくと特有の曲線 (冷却曲線) を描いて凍結される。すなわち、液相 (liquid phase)、過冷却 (super cooling)、過冷却破壊、移行相 (phase transition)、氷点 (freezing point) を経たのち全く凍結し、固相 (solid phase) となる。純水の場合は氷点は 0°C であるが水溶液の場合は氷点は下降する。氷晶が発生する場合に、冷却速度が遅いと数は少ないが粗大な結晶が生じ、冷却速度が速い場合は微細な結晶が多数発生する (Tamman 現象)。また、水を氷晶の生じる時間的余裕のないくらいの早い速度で冷却すると非結晶無定形の固体となる (透化 vitrification)。生物組織の凍結保存のさいに最も問題になるのは移行相であり、前述した凍害が最も多く生じるのはこの時期であるといわれる。細胞が凍る場合、冷却速度が緩徐であると細胞外に氷晶ができ、この氷晶は細胞を脱水しながら成長するが、急速に冷却すると細胞内外に小さな氷晶が多数発生し、とくに細胞内結晶は細胞の生存にとって致命的である⁴⁾。この氷晶形成による障害から細胞を保護するためには透化が最も都合のよい方法であるが、実際には技術的に不可能である。したがって凍結保存のさいには、冷却速度の適度な調節が重要な要素となってくる。Rowe⁵⁾、朝比奈ら (1967)⁶⁾ のおこなった実験によれば、冷却速度は $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の場合が最も細胞の生存率がよく、速度がこれより早くなっても遅くなっても生存率は低下するという。一方、この冷却速度は細胞の種類によっても異なってくる。例えば、現在実用に供されているものとして、精子の場合は $4\sim 7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、赤血球の場合は $3,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ が最もよい生存率が得られている⁶⁾。しかし、腎のごとき臓器の凍結保存のさいの冷却速度については定説はなく、したがって本実験での緩速凍結速度は、上記文献データを基にして、いちおう $1\sim 4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度を用いたものである。

Rowe ら⁵⁾ は、凍害の最も生じやすい移行相はなるべく短時間に通過したほうが生存率は高くなるといっている。また、凍結材料を高圧環境下に置き、冷却をおこなうとこの移行相は降下するが (氷点降下)、Halasz ら (1970)³⁾ は $1,500\text{ Psi}$ 、10分間の加圧による氷点降下を利用して移行相を短時間に通過せしめることにより、腎組織に著明な障害をきたすことがなか

ったという。しかし、腎機能の再現については疑問が残っている。

腎臓の凍結保存の場合、細胞レベルでは全く問題とならなかった臓器内温度差が問題となる。これは解凍の場合にもいえる。Henderson ら (1964)⁷⁾ は、かかる温度差を解消するためにヘリウムガスおよび窒素ガスを腎動脈より注入し、同時に表面冷却をおこなった。この方法によれば、腎内外の温度差はだいたい 3°C であるといっている。本実験では熱電対を腎内に刺入して腎中心温度のみを測定しながら表面冷却をおこなったので、臓器内の温度差については不明である。

復温、解凍の場合にもまた凍害が生じる。すなわち、再結晶 (recrystallization) によるもので、凍結のさいに生じた比較的微細な氷晶が、解凍のさいに融合して大きい氷晶に成長するためである。とくに $-40\sim 0^{\circ}\text{C}$ の温度帯において著しい。したがって、これを避けるためには、解凍をおこなうに当って再結晶の生じる時間的余裕のない程度に急激におこなわれる必要がある。しかし、腎臓の場合にはなかなか困難である。理想的な解凍速度は $500^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上であるといわれる⁸⁾ が、本実験においても、電子レンジを用いた急速解凍法でも $30\sim 40^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。また、本実験で用いた解凍法で、解凍のさいの臓器内温度差は、温風による場合では中心温度が -40°C くらいでも表面はすでに解凍されており、電子レンジでは表面が解凍されていても中心部では $-20\sim -10^{\circ}\text{C}$ を示した。とくに後者の場合、表面解凍に至るだけでも「解凍むら」を生じた。

(2) 凍害防止剤について

凍害防止剤の凍害防止機構については、凍害防止剤が水分子の間にはいり込んで水と水との水素結合を破り、あらたに水分子との水素結合をおこなって、氷晶の発生と脱水を防ぐ点にあるといわれる。そして、この水素結合力が強く、また分子が水素結合部位を多くもつものほど、その作用は強くなる。細胞内の水には、電解質を溶解している自由水と、蛋白と結合している結合水とがあるが、結合水が凍結すると蛋白変性をきたして細胞は再生しない。凍害防止剤は、この結合水の脱水や凍結をも防ぎ、蛋白質の変性を防止しなければならない。したがって、凍害防止剤としては次のような条件を満足させる必要がある。すなわち、①細胞膜透過性が良好であること、②水との結合が容易であること、③電解質の溶媒となること、④高濃度で毒性のないこと、等である。現在、これらの条件を兼備しているものとして比較的多く使用されているものは

Gly と DMSO である。

生物材料を凍結保存する場合、あらかじめ凍害防止剤をじゅうぶんに浸透させておく必要があり、そのために細胞内外の凍害防止剤が平衡に達するまでには時間的要素が加わる。Lovelock (1959)⁹⁾ は、4°C で Gly の平衡には2時間以上が必要であるが DMSO の場合は30秒でよいといっている。Brada ら (1965)¹⁰⁾ の放射性同位元素を用いての実験では、Gly は20分で80%が平衡に達するが、DMSO は比較的早く浸透するという。Halasz (1970)³⁾ によれば、20°C 以下では Gly はそれほど早く均衡化することはないが、DMSO の場合は温度とは無関係に早い。

凍害防止剤も高濃度で作用時間が長くなると、細胞～組織に対して有害となる。凍害防止剤によって処理された場合、一般に細胞原形質膜の透過性が非選択的となり、細胞の種類によっては被刺激性や興奮性が失われてしまう。また、細胞の可溶成分は取り去られて呼吸や解糖などの代謝系が障害される¹¹⁾。例えば、心筋は強直してしまい、子宮や腸などの平滑筋の収縮力は低下し、神経はその刺激伝導度が低下する。しかし、これらの組織も一定時間内に凍害防止剤が除去されれば機能は再開されるが、処理時間が長くなるとその機能障害は不可逆的となる¹²⁾。

凍害防止剤の上記有害性と同時に液の浸透圧が問題となる³⁾。イヌの血清浸透圧はだいたい 300 mOsm/L であるが、本実験で用いた 30% Gly, 20% DMSO 液は 2,000～3,000 mOsm/L あるいはそれ以上の浸透圧を有している。細胞～組織がこのような高浸透圧下にさらされる場合、細胞内水分、電解質等の可溶成分の急激な移動が起こり、また細胞の物理的破壊にまで至ることは容易に推測される。さらに、腎臓の場合に

は凍害防止剤の除去のさいに浮腫を生じ、血流再開時には全腎抵抗が増大して、いわゆる outflow block が起こる³⁾。とくに Gly は DMSO に比して細胞膜透過性が低いために、脱 Gly の場合には容易に浮腫が生じる。Cady ら (1966)¹³⁾ は凍害防止剤の濃度を段階的に注入、除去をおこなうことにより、かかる障害を防止した。

凍害防止剤の耐容濃度(至適濃度)については報告者により若干の相違がみられるが、Halasz (1966)¹⁴⁾ によれば、Gly の場合はだいたい25%、DMSO は15%となっており、これ以上の濃度では outflow block のため腎機能の回復は望めなかったという。著者の実験で用いた凍害防止剤は Halasz のそれよりもやや高濃度であったが、たしかに凍害防止剤の除去をおこなうさいに全体的に緊満して浮腫状となった。とくに、脱 Gly の場合に著明であった。さらに血流再開時には、Gly 使用腎では著明な outflow block をきたして、全く血流が得られず、血流ポンプを用いてむりに流通しようとすれば腎が強く緊満して、なかには破裂をきたした例もみられた。DMSO ではこのような現象は軽度で、比較的良好な血流を得ることができたが、対照と比較すればやはり腎血流量は減少していた。

(3) 保存後の腎機能について (Table 4, 5)

保存後における腎臓の機能再現については、これを実際に移植してみるのが最も合理的であるが、移植手術操作および合併症などによる影響が加わるため、正確な判定を得ることが困難である。したがって、著者は方法を簡素化してこれらの影響を除外する目的で、体外循環法によって血流再開直後の腎機能を測定し、対照と比較した。対照とは、摘出した腎を wash out

Table 4. 凍害防止剤の注入・除去と腎機能 (2)

凍害防止剤 注入・除去法		30% Gly				20% DMSO				対 照
		直接注入・ 直接除去		濃度漸増注入・ 漸減除去		直接注入・ 直接除去		濃度漸増注入・ 漸減除去		
		例 数	平 均	例 数	平 均	例 数	平 均	例 数	平 均	
腎 機 能										
E-PAH (%)	(+) (-)	0 5	0	0 4	0	2 3	18.1	1 3	1.7	43.9
E-STs (%)	(+) (-)	4 1	52.9	4 0	36.0	3 2	15.4	4 0	26.4	20.9
C-PAH (cc/min/100 g)	(+) (-)	0 5	0	0 4	0	2 3	2.9	1 3	0.1	25.4
C-STs (cc/min/100 g)	(+) (-)	4 1	5.2	4 0	5.8	3 2	3.6	4 0	3.9	13.9
DRBF (cc/min/100 g)		11.2		33.2		37.6		47.2		87.6

Table 5. 凍結・解凍法と腎機能 (2)

凍結・解凍法 腎機能		緩速凍結・緩速解凍				緩速凍結・急速解凍				対 照
		30% Gly		20% DMSO		30% Gly		20% DMSO		
		例 数	平 均	例 数	平 均	例 数	平 均	例 数	平 均	
E-PAH (%)	(+) (-)	3 2	15.8	2 3	23.0	0 4	0	0 4	0	43.9
E-STs (%)	(+) (-)	2 3	18.9	3 2	19.8	4 0	52.8	4 0	7.4	20.9
C-PAH (cc/min/100 g)	(+) (-)	3 2	12.1	2 3	1.7	0 4	0	0 4	0	25.4
C-STs (cc/min/100 g)	(+) (-)	2 3	3.2	3 2	2.8	4 0	5.9	4 0	5.2	13.9
DRBF (cc/min/100 g)		28.0		21.0		26.2		62.3		87.6

することなく、保存せずに直ちに再移植した場合の腎機能であって、高崎 (1968)¹⁾ の実験により得られた成績を引用した。

(a) 直接腎血流量 (DRBF) について

血流再開後における腎血流量は、腎機能回復のための重要な要素である。Gly 使用群では全例とも浮腫による全腎抵抗増大のため、イヌの血圧だけでは腎血流が得られなかったため、血流ポンプによって 200～300 mmHg あるいはそれ以上の圧力を加えてむりに血流を通して得られた成績である。したがって、Gly 使用腎はたとえ移植をしても腎機能の回復はほとんど望めないものと思われる。一方、DMSO 使用群はすべてイヌの血圧のみで血流を得ることができたので、それによって腎機能を測定したものである。したがって両群の測定値はおのずから性格が異なっている。

凍害防止剤の注入、除去実験においては、対照腎の DRBF の平均値が 87.6 cc/min/100 g であったのに対して、30% Gly 直接注入・除去群では 11.2 cc、濃度漸増注入・漸減除去群では 33.2 cc、20% DMSO の直接注入・除去群では 37.6 cc、濃度漸増注入・漸減除去群では 47.2 cc であった。凍結実験においては、緩速解凍の Gly 群では 28.0 cc、DMSO 群では 21.0 cc、急速解凍の Gly 群では 26.2 cc、DMSO 群では 62.3 cc であった。以上の所見より、高浸透圧の凍害防止剤の注入・除去に当っては、徐々に濃度を上げて注入し、徐々に濃度を下げて除去することにより浮腫の発生が防がれて、良好な腎血流が得られることが判明した。なかでも 20% DMSO の濃度漸増注入・漸減除去の場合が最もすぐれており、対照に比してもさほど劣るものではなかった。

(b) PAH, STS の除去率およびクリアランスに

ついて

正常腎では、PAH のクリアランスは単位時間内にネフロンを通過する腎血流量を表わし、STS のクリアランスは糸球体での単位時間における濾過量を表わす。しかし、腎機能障害が高度になり、尿細管壊死をきたすとこれらの物質は逆拡散により再吸収され、除去率およびクリアランス値は著しく低下するのみならず、ついには負の値を示すようになる。この negative extraction ratio については、高崎¹⁾、進藤²⁾らが詳細に述べているが、本実験においても負を示すものが多く認められた。

i) E-PAH, C-PAH について

凍害防止剤の注入および除去実験において、Gly 群はすべて負、DMSO 群も半数以上が負を示し、平均値も対照に比して著しく低下していたが、Gly 群よりも DMSO 群のほうが腎障害はやや軽度であった。そのなかでも DMSO の直接注入・直接除去群が比較的良好な結果であった。

凍結実験においては、緩速解凍腎では Gly 群、DMSO 群ともにだいたい半数が負であったが DMSO 群で緩速解凍の場合が比較的良好であった。急速解凍腎ではすべて負で、平均値も著しく低下し、強い尿細管壊死がうかがわれた。

ii) E-STs, C-STs

E-PAH, C-PAH が各群について半数以上が負を示したのに対して、E-STs, C-STs は正を示すものが多かった。

凍害防止剤の注入および除去実験においては、Gly 群はすべて正を示し、DMSO 群の直接注入・直接除去腎では 5 腎中 3 腎が正、濃度漸増注入・漸減除去腎では全腎とも正を示した。とくに除去率は対照と同程

度であった。

凍結実験においては、緩速解凍群のなかで Gly 使用の5腎のうち2腎、DMSO 使用の5腎のうち3腎が正を示し、急速解凍群のなかで Gly 使用4腎の全腎、DMSO 使用4腎中2腎が正を示した。いずれにしても、糸球体機能は凍結・解凍後においてもかなり残存しているものと思われる。

(4) 組織学的所見について

組織変化のおもなものは尿細管上皮の破壊、脱落、萎縮、変性および糸球体の萎縮、壊死、血管破綻などであるが、最も著明な変化は尿細管上皮の基底膜からの脱落、破壊である。この組織障害は、凍害防止剤を注入するまではみられないのであるが、凍害防止剤の注入、除去の操作をおこなっただけですでに発現し、さらに凍結、解凍操作の直後から著明となり、とくに解凍後、凍害防止剤を除去する段階で尿細管の破壊が最も激しいものとなった。この変化を凍害防止剤を使用せずに腎臓を凍結・解凍した場合の変化と比較すると、その程度はほとんど変わらないのである。したがって、本実験で用いた凍害防止剤は、その溶液の浸透圧が高いために、それ自体による組織障害が起こるのみならず、凍結・解凍操作に対してもじゅうぶんな凍害防止効果が得られなかったものと思われる。

以上今回の実験ではイヌの腎臓の凍結保存には成功しなかったが、操作の各過程において問題点をある程度明らかにするとともに、改めてその困難性を再認識した。今後、よりよい凍害防止剤の開発と使用法の改善、また凍結、解凍の条件などについてたゆまざる研究が必要であろう。

結 語

イヌの腎臓を液体窒素により $-90 \sim -160^{\circ}\text{C}$ に凍結保存を試み、凍害防止剤の濃度、注入・除去の条件および凍結、解凍の条件について検討をおこなった。さらに凍結保存腎の機能を体外循環法で検査し、同時に組織学的検査をおこなった。その後、実際に凍結保存腎の自家移植を試みた。

(1) 凍害防止剤の至適濃度は、Gly では30%、DMSO では20%であり、注入時間による差はなかった。

(2) 凍害防止剤の注入、除去の操作だけで、高浸透圧による尿細管の障害が起こる。Gly の場合には著明な outflow block が起こり、血流の再開は望めない。20% DMSO の濃度漸増注入・漸減除去法が最も障害が少なかった。

(3) $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の急速凍結をおこなうと、腎に

著明な亀裂が生じる。DRBF では20% DMSO 急速解凍がすぐれており、E-PAH、C-PAH では緩速解凍、E-STs、C-STs では急速解凍が良好であった。

(4) 凍結、解凍後の腎機能は一般に著明に低下するが、とくに尿細管機能の障害が強く、糸球体機能の障害は軽度であった。

(5) 凍結、解凍による組織変化は、尿細管上皮の脱落と破壊が著明であった。しかし糸球体および血管の変化は軽度であった。本実験で用いた凍害防止剤では、この変化をじゅうぶんに防止することは期待できなかった。

(6) 前記の実験で最も条件のよいと思われた20% DMSO 濃度漸増注入、緩速凍結、急速解凍、濃度漸減除去により凍結保存した腎を4例に自家移植を試みたが、全例ともに壊死に陥った。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導とご校閲を賜った恩師近藤 厚教授に心から感謝の意を表します。またご協力いただいた教室の諸先生に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第7回および第8回日本移植学会総会、第1回臓器保存研究会、第1回日本低温医学研究会において発表した。

文 献

- 1) 高崎 登：泌尿紀要，**14**：507，1968。
- 2) 進藤和彦：泌尿紀要，**15**：476，1969。
- 3) Halasz, N. A.: Cryobiology, **7**: 163, 1970。
- 4) Merryman, H. T.: Fed. Proc., **22**: 81, 1963。
- 5) Rowe, A. W.: Intracellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. Asahina, E. ed. The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido Univ., Sapporo, p. 21, 1967。
- 6) 朝比奈英三：統生物物理学講座(10)，細胞生物物理研究法 I，p. 235，吉岡書店，京都，1969。
- 7) Henderson, I. and Innes, B.: Cryobiology, **1**: 15, 1964。
- 8) Halasz, N. A.: Surgery, **61**: 417, 1967。
- 9) Lovelock, J. E. and Bishop, M.: Nature, **183**: 1394, 1959。
- 10) Brada, D. R.: Surg. Gynec. Obst., **121**: 1004, 1965。
- 11) 木下清一郎：統生物物理学講座(10)，細胞生物物理研究法 I，p. 257，吉岡書店，京都，1969。
- 12) 隅田幸男：冷凍血液輸血，p. 47，日本医事新報社出版局，東京，1972。
- 13) Cady, B. and Barner, H. B.: Cryobiology, **3**: 76, 1966。

- 14) Halasz, N. A.; Surgery, **60**: 368, 1966.
- 15) Wheeler, T. E.; Transplantation, **2**: 534, 1964.
- 16) Mundth, E. D.; Cryobiology, **2**: 62, 1965.
- 17) Hamilton, R.; Cryobiology, **3**: 265, 1968.
- 18) Terasaki, P. I., Martin, D. C. and Smith, R. B.; Transplantation, **5**: 76, 1967.
- 19) Smith, R. B., Terasaki, P. I. and Martin, D. C.; JAMA, **201**: 160, 1967.

(1975年7月18日受付)