

## 凍結保存同種神経移植

### —— ニホンザル尺骨神経の研究 ——

林 淳 也

東京慈恵会医科大学形成外科学講座  
(指導：栗原邦弘教授)

(受付 平成 19 年 2 月 15 日)

## CRYOPRESERVED NERVE ALLOGRAFTS : RESEARCH ON THE ULNAR NERVE OF JAPANESE MACAQUES

Junya HAYASHI

*Department of Plastic and Reconstructive Surgery, The Jikei University School of Medicine*

In the present study, I evaluated nerve regeneration after the transplant of cryopreserved homogeneous nerves in Japanese macaques. Sections of ulnar nerve were obtained from the process styloid of the ulna, cryoprotected by pretreatment with 1.4 M glycerin, gradually frozen to  $-70^{\circ}\text{C}$ , and preserved at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Rapidly frozen nerves showed destruction of the myelin sheath. However, gradually frozen nerves showed better preservation of the structure of the myelin sheath but also showed myelin destruction in some areas. Allogeneic nerve grafts were retrieved after transplantation in the following 3 groups. In group 1, fresh allografts were transplanted without treatment. In group 2, cryopreserved allografts were transplanted. In group 3, fresh allografts were transplanted after 25 mg/kg/day of cyclosporine A was administered for 4 days for immunosuppression. After transplantation, cyclosporine A (5 mg/kg/day) was administered orally for 4 months. Nerves were transplanted bilaterally as cable grafts from the styloid process of the ulna. The group 3 of nerve regeneration was better than the group 2 and the group 2 from the group 1. Moreover, a significant difference was seen among the groups in mean fiber diameter and the percentage of neural tissue 1 cm from the tip and in the center of the transplanted nerve. These results support the clinical utility of cryopreserved nerve grafts.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2008 ; 123 : 87-97)

Key words: cryopreservation, allogeneic graft, nerve graft, cryoprotection method, long-term storage

### I. は じ め に

臓器移植において同種組織移植が現実に行われている現在、移植組織の長期保存は必要不可欠な課題となっている。とくに自家神経移植は神経採取部の機能的障害の問題があり同種神経移植の臨床応用が期待される。われわれは凍結保存神経が、移植後の抗原抗体反応の遅延がみられる一方で、

軸索の再生を獲得する移植神経となり得る可能性を考え、研究を続けてきた。先ず同種移植を前提として液体窒素 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) を利用した移植組織の長期保存法を確立した。つづいて同種異系間で長期に超冷凍保存 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) した神経移植の生着と拒絶過程を観察し、さらに、神経再生過程を形態学的に検索した結果、ラット皮膚、神経においては凍結保存法による同種神経移植は同系移植には

及ばないものの、良好な成績をおさめる事を確認し報告した<sup>12)</sup>。これらの結果をふまえて本研究はヒトに臨床応用する前段階として、超冷凍保存したサルの尺骨神経を用いた同種神経移植について形態学的に検討した。

## II. 方 法

### 1. 末梢神経凍結保存法

実験動物は日本ザル(体重 8~12 kg, 年齢 5~13 歳, 雄・雌)を使用した。尺骨茎状突起より 2 cm 中枢の前腕より長さ 3 cm の尺骨神経を採取し, 1.4 mol glycerin 内に約 1 時間浸漬し凍結保護処置を行った (Fig. 1)。

尺骨神経の凍結保存は Computer-programmed freezer (SY-LAB 社製, Ice Cube 1610) を使用した。段階的凍結・急速解凍を基本とする超冷凍保存法で行った。すなわち,  $-70^{\circ}\text{C}$  までの段階的凍結操作をコンピューター自動操作で行い,  $-4.2^{\circ}\text{C}$  で植氷したのち,  $-40^{\circ}\text{C}$  と  $-70^{\circ}\text{C}$  の段階でそれぞれ一時的に安定化した (Fig. 2)。

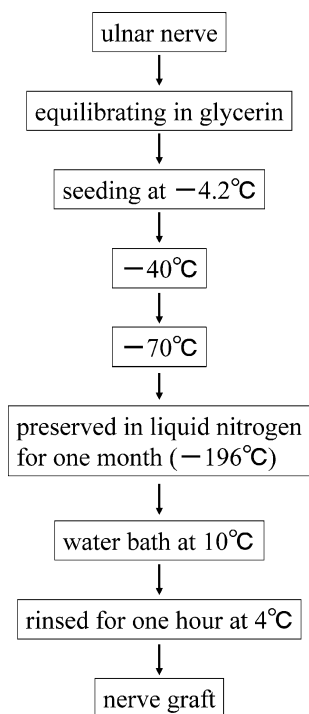


Fig. 1. Schema of cooling and thawing procedure.

$-70^{\circ}\text{C}$  まで凍結したのちは,  $-196^{\circ}\text{C}$  液体窒素保存タンク内 (Minnesota Valley Engineering 社製) に保存した。液体窒素へは試料をビニールシート内に密封し, 液体窒素が直接試料に接する事のないよう「空冷」の状態として凍結保存を行った。

### 2. 凍結保存神経解冻法

凍結保存神経は, 試料をビニールシートに収納したまま水浴 ( $10^{\circ}\text{C}$ ) し解冻した。10 分後に急速解冻された組織が柔軟性を示す事を確認後, 開封して試料を  $4^{\circ}\text{C}$  生理的食塩水内で 1 時間洗浄・浸漬し, 凍結保護に用いた glycerin を可及的に除去した。

### 3. 同種神経移植手技

麻酔法は, ketamine hydrochloride (5 mg/kg) の筋肉内注射による全身麻酔を用いた。麻酔覚醒に応じ ketamine hydrochloride (2.5 mg/kg) を追加した。Povidone iodine 液による局所消毒の後に前腕掌尺側を縦切開し, 尺骨神経を展開し, 手関節より 2 cm 中枢部で尺骨神経を 1 cm 切除した。切除肢位は肩関節, 外旋外転位で肘関節, 手関節ともに  $0$  度位 (伸展位) で行った。この欠損部に他のサルから採取した長さ 3 cm の尺骨神経を, 手術用拡大鏡下で端々吻合を行った。手技は 8-0 黒ナイロンを用い神経上膜縫合法で移植した (Fig. 3)。ここで移植神経の長さを 3 cm に決定したのは, 1 cm の欠損部が手関節, 肘関節を過伸展した際に神経縫合部に張力が加わらない長さを計測した結果である。この方法で行った移植神経は神経組織採取時に神経の折れ曲がりはなく,

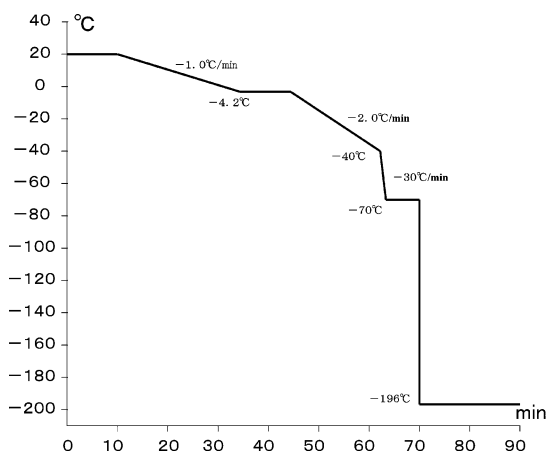


Fig. 2. Freezing time schedule

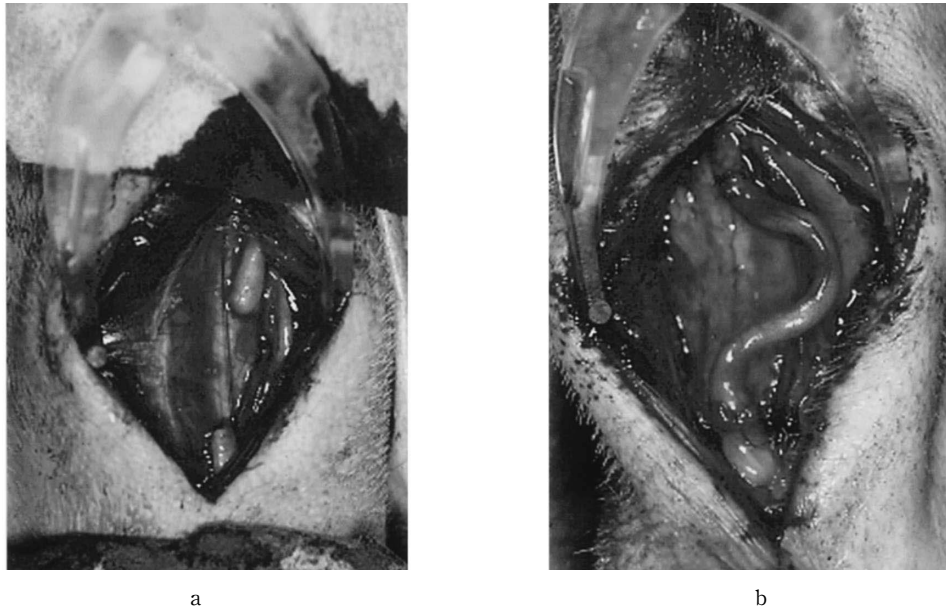


Fig. 3. The ulnar nerve was exposed in the forearm 2 cm proximal to the ulnar styloid and sharply divided. Then 1 cm of an ulnar nerve was resected (deficit 1 cm) (a), and nerve graft was performed without tension by another Japanese monkey's ulnar nerve (length 3 cm) (b).

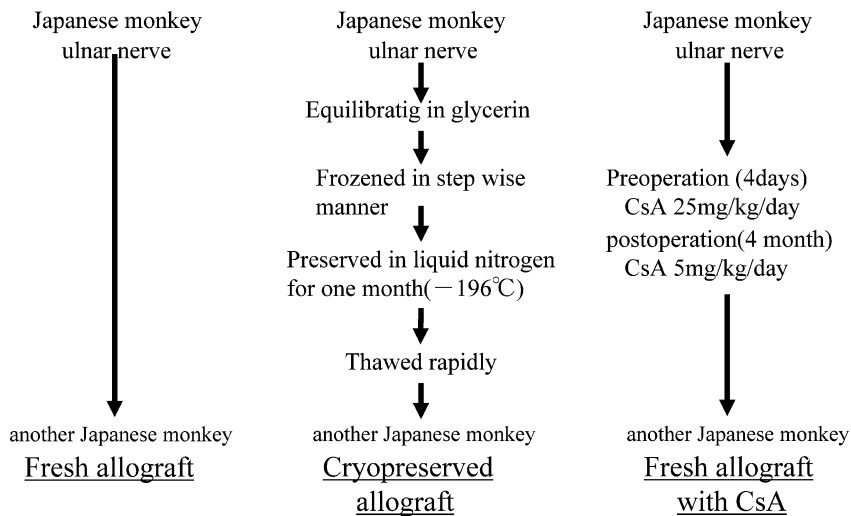


Fig. 4. Japanese monkey used as donor and recipient animals were divided into three groups. CsA : cyclosporine A (should define)

ほぼ直線的な形状を呈していた。

#### 4. 実験系

実験系は移植する神経の条件を次の3群で行った。

- 1) 新鮮同種移植群 <Fresh allograft> (第1群) : 採取した尺骨神経を何ら処置を行わ

ずただちに新鮮同種神経移植した。

- 2) 凍結保存同種移植群 <Cryopreserved allograft> (第2群) : 段階的凍結して1ヵ月間保存した神経を急速解凍し移植した。
- 3) 免疫抑制薬投与同種移植群 <Fresh allograft with CsA> (第3群) : 新鮮同種神経

移植の host に cyclosporin A 投与による免疫抑制を行った。移植 4 日前より cyclosporin A を 25 mg/kg/day 経口投与したのち、他のサルから新鮮同種神経移植を行い、移植後は同薬物を 5 mg/kg/day 4 カ月間持続経口投与した (Fig. 4)。

### 5. 移植後の飼育

サルの飼育ならびに麻酔法、術後処置は東京慈恵会医科大学動物実験指針に基づいて行った。1 cage に 1 匹ずつ飼育した。各群 2 匹ずつの移植を行い、移植後 4 カ月で組織学的検索を行った。

### 6. 凍結保存神経および移植神経の組織学的検索

#### 1) 凍結保存神経の組織学的検索

長さ 1 cm の尺骨神経を急速凍結および、我々の開発した段階的凍結の 2 つの方法で  $-196^{\circ}\text{C}$  ままで凍結し、1 週間保存した。さらに保存した各組織を急速解凍し、凍結方法による神経組織の経時の変化を予備的検索した。また、段階的凍結群の保存期間を 1 週間から 1 年 5 カ月まで行い、保存期間による神経組織の経時の変化を検索した。

#### 2) 移植神経の組織学的検索

神経移植後 4 カ月で移植神経中央部および神経移植部より 1 cm 末梢の尺骨神経をそれぞれ 1

cm 採取した。この検体は glutaraldehyde 固定の後に、epon 包埋し、厚さ  $1\mu\text{m}$  の切片標本とし、toluidine blue 染色を行った。画像解析には画像解析装置 (PC9800, NEC 社製) と画像解析用ソフト (Image Command 5098, オリンパス社製) を用いた。1 つの検体からの標本はそれぞれの 10 部位について検索した。1 検体の切片標本 2 枚について 1 標本 5 視野それぞれ重ならない独立した部位を検索した。計測は 400 倍の鏡視下に有髄神経線維の直径と単位面積内に占める有髄神経線維の面積比を求めた。

## III. 結 果

### 1. 凍結保存末梢神経

1 週間液体窒素保存タンクに保存した各凍結保存法による神経組織を急速解凍した後の組織・形態検索からは次の結果を得た。

① 急速凍結群では myelin 鞘の著明な膨化を認めた。これに対して段階的凍結群では部分的な myelin 鞘の膨化をみるが、myelin 鞘は新鮮神経移植組織の形態に近く保たれていた (Fig. 5)。有髄神経線維面積に対する軸索のみの面積率を測定した結果 (平均値  $\pm$  標準偏差) は急速凍結群では

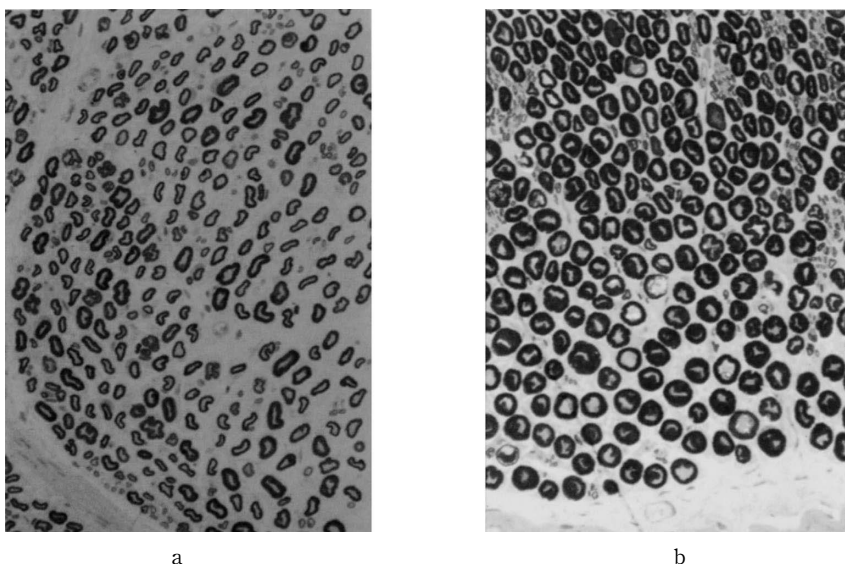


Fig. 5. Frozen nerves,  $1\mu\text{m}$  epon section stained with toluidine blue. ( $\times 400$ )  
a: Nerve frozen in a stepwise manner.  
b: Nerve frozen rapidly.

10.91±5.76% ( $n=10$ ), 段階的凍結群では 21.47±10.36% ( $n=10$ ) であり, Unpaired  $t$ -test で 2 群間に有意差が認められた ( $P<0.01$ ) (Fig. 6).

② 段階的凍結群の保存を液体窒素保存タンクで 1 週間, 2 カ月, 4 カ月, 1 年 5 カ月まで行った. 各保存期間の組織を解凍した後の所見は, myelin 鞘の膨化はそれぞれの群で見られたが, 急速凍結群と比較してその変化は軽微であった (Fig. 7, 8). 有髄神経線維面積に対する軸索のみの面積率の結果 (平均値±標準偏差) は急速凍結群 10.91±5.76% ( $n=10$ ), 段階的凍結群 1 週間保存 21.47±

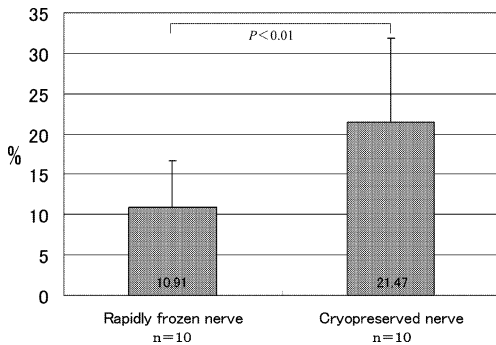
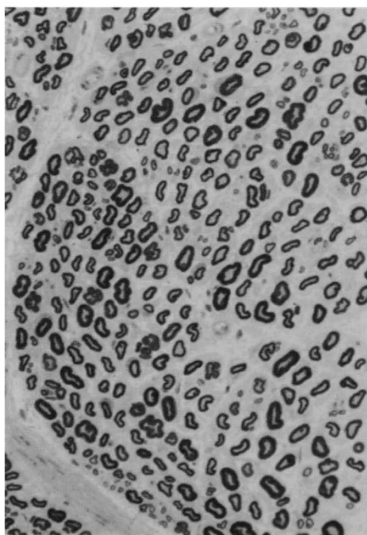
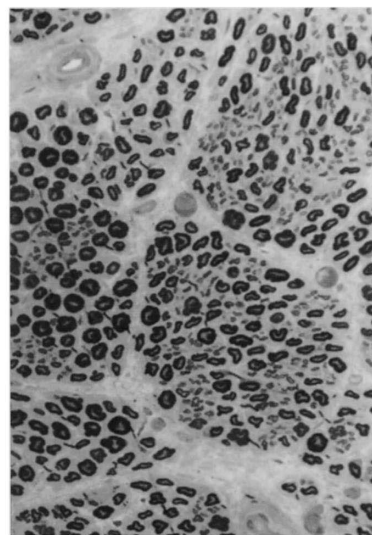


Fig. 6. The rate of axon area



a



b

Fig. 7. Frozen nerves, 1  $\mu$ m epon section stained with toluidine blue. ( $\times 400$ )

a: Nerve frozen in a stepwise manner and stored for 1 week at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen.

b: Nerve frozen in a stepwise manner and stored for 2 months at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen.

10.36% ( $n=10$ ), 2 カ月保存 24.49±8.64% ( $n=10$ ), 4 カ月保存 26.63±12.02% ( $n=10$ ), 1 年 5 カ月保存 7.37±4.04% ( $n=10$ ) であった. Unpaired  $t$ -test で急速凍結群と段階的凍結群 1 週間保存群, 1 週間保存群と 2 カ月保存群, 2 カ月保存群と 4 カ月保存群, 4 カ月保存群と 1 年 5 カ月群それぞれの 2 群間に有意差が認められた ( $P<0.01$ , 0.05) (Fig. 9). 1 年 5 カ月保存群では myelin 鞘の膨化は強く出現した.

## 2. 移植神経

移植神経 (Fig. 10, 11) については, 単位面積 ( $225 \mu\text{m}^2$ ) における有髄神経線維の数を測定した. 結果 (平均値±標準偏差) は, 移植神経中央部では新鮮同種移植群 109±30 個 ( $n=9$ ), 凍結保存同種移植群 164.22±28.99 個 ( $n=9$ ), 免疫抑制薬投与同種移植群 258.44±55.85 個 ( $n=9$ ), 末梢 1 cm 部位では新鮮同種移植群 138.44±28.90 個 ( $n=9$ ), 凍結保存同種移植群 144±26.24 個 ( $n=9$ ), 免疫抑制薬投与同種移植群 246.67±37.22 個 ( $n=9$ ) であった. 末梢 1 cm の部位では新鮮同種移植群 (以下 1 群) と凍結保存同種移植群 (以下 2 群) 間に有意差は認められなかったが, 中央部では 1 群 2 群間に有意差が認められた ( $P<0.01$ ). また 2 群と免疫抑制薬投与同種移植群 (以

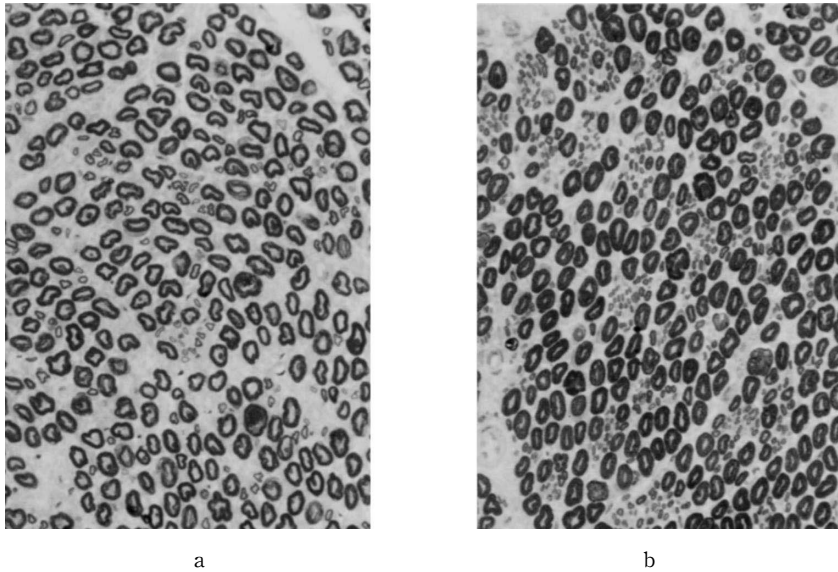


Fig. 8. Frozen nerves, 1  $\mu\text{m}$  epon section stained with toluidine blue. ( $\times 400$ )  
 a: Nerve frozen in a stepwise manner and stored for 4 months at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen.  
 b: Nerve frozen in a stepwise manner and stored for 1 year 5 months at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen.

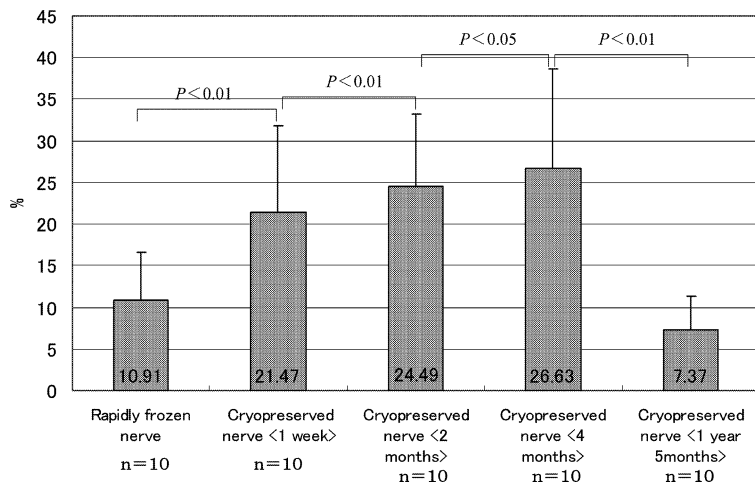


Fig. 9. The rate of axon area

下3群)間では末梢1 cm, 中央部ともに有意差が認められた ( $P<0.01$ ) (Non-repeated Measures ANOVA, Student-Newman-Keuls test) (Fig. 12).

有髄神経の直径の測定結果(平均値 $\pm$ 標準偏差)は, 移植神経中央部では新鮮同種移植群  $2.15 \pm 0.62 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), 凍結保存同種移植群  $2.13 \pm 0.54 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), 免疫抑制薬投与同種移植群  $1.87 \pm 0.44 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), 神経移植部より末梢1 cm の尺

骨神経は新鮮同種移植群  $1.61 \pm 0.34 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), 凍結保存同種移植群  $2.10 \pm 0.43 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), 免疫抑制薬投与同種移植群  $1.56 \pm 0.29 \mu\text{m}$  ( $n=9$ )であった。中央部では1群2群間に有意差は認められなかったが, 末梢1 cm の部位では1群2群間に有意差が認められた ( $P<0.01$ ) (Non-repeated Measures ANOVA, Student-Newman-Keuls test) (Fig. 13).

単位面積内に占める有髄神経線維の面積比の測

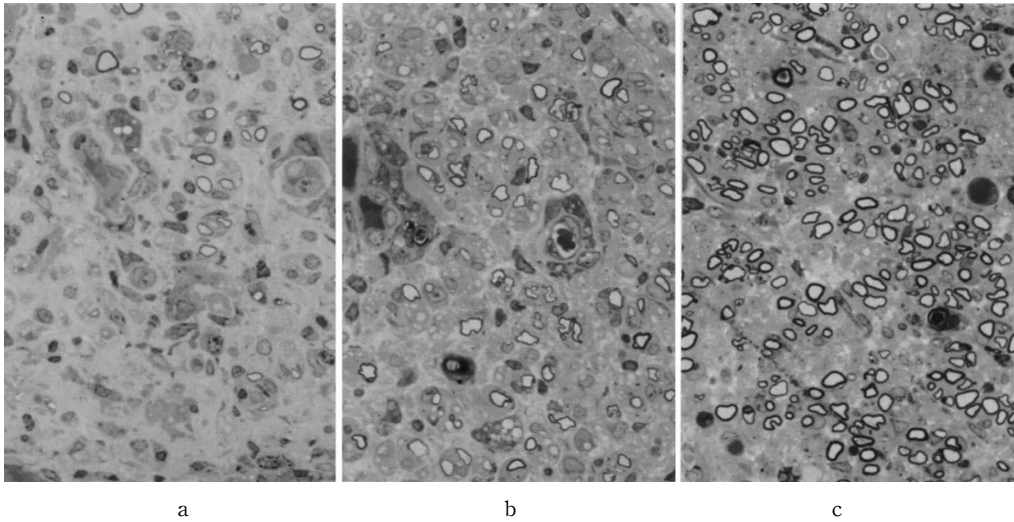


Fig. 10. Grafted nerve, 1  $\mu$ m epon section stained with toluidine blue. ( $\times 400$ )

- a: Fresh allograft
- b: Cryopreserved allograft
- c: Fresh allograft with CsA

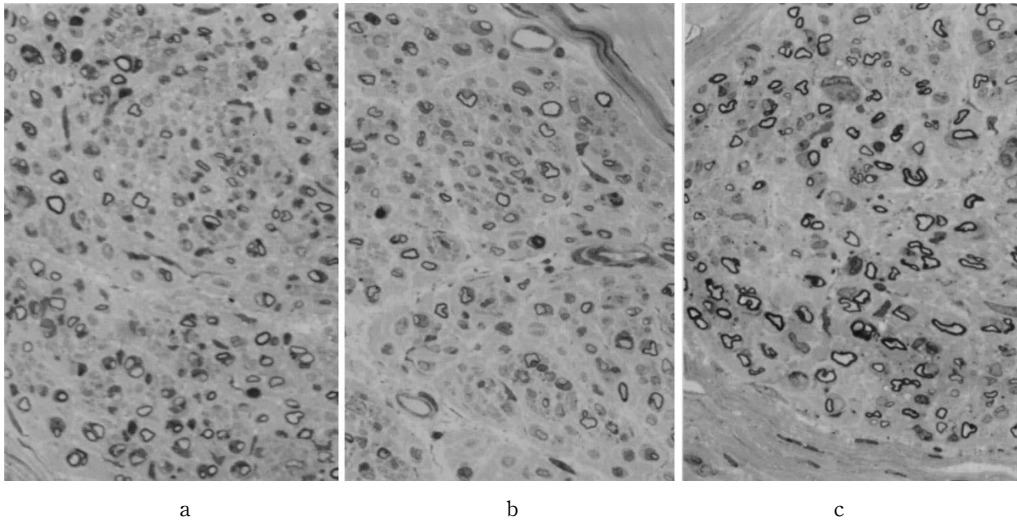


Fig. 11. Host ulnar nerve 1 cm distal to graft, 1  $\mu$ m epon section stained with toluidine blue. ( $\times 400$ )

- a: Fresh allograft
- b: Cryopreserved allograft
- c: Fresh allograft with CsA

定結果（平均値 $\pm$ 標準偏差）は、移植神経中央部では新鮮同種移植群  $3.55 \pm 0.06\%$  ( $n=9$ )、凍結保存同種移植群  $7.06 \pm 0.64\%$  ( $n=9$ )、免疫抑制薬投与同種移植群  $12.34 \pm 1.54\%$  ( $n=9$ )、移植神経より末梢 1 cm の尺骨神経は新鮮同種移植群  $2.60 \pm 0.30\%$  ( $n=9$ )、凍結保存同種移植群  $5.37 \pm 0.99\%$  ( $n=9$ )、免疫抑制薬投与同種移植群  $8.53 \pm 1.20\%$

( $n=9$ )であった。末梢、中央いずれでも 1 群 2 群間、2 群 3 群間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ ) (Non-repeated Measures ANOVA, Student-Newman-Keuls test) (Fig. 14)。

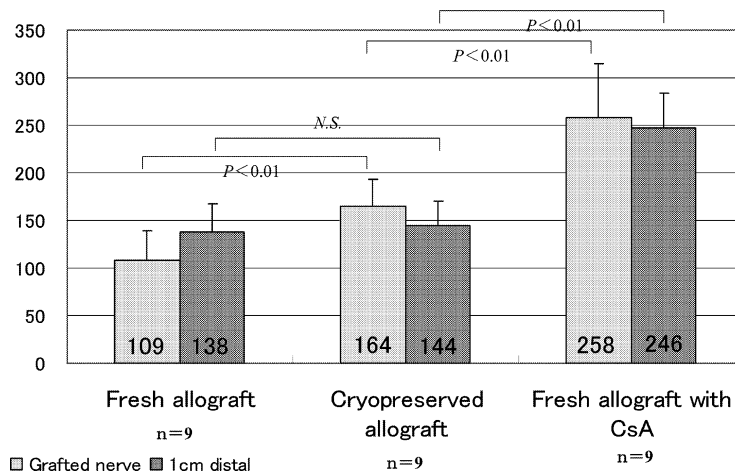


Fig. 12. Number of myelinated fiber

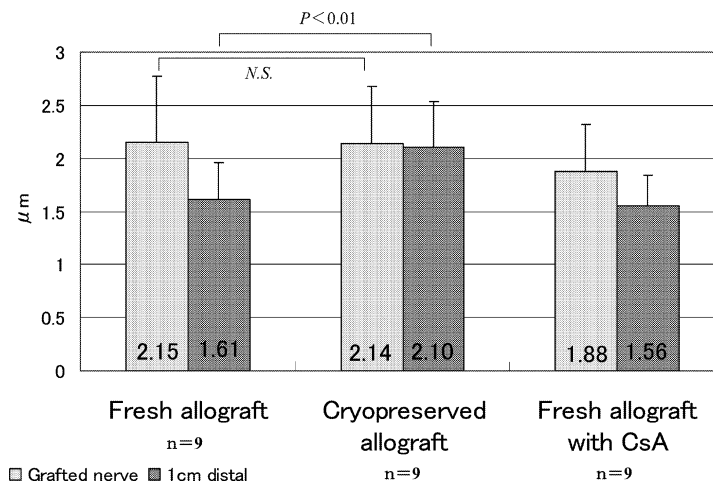


Fig. 13. Mean fiber diameter

#### IV. 考 察

細胞の凍結保存法は細胞の性質を変えずに長期間保存する方法として古くから試みられてきた。組織を構成する細胞の生化学的反応は温度に依存して進行する速度が異なり、温度を下げることで反応の速度を低下させ細胞の変性を遅らせることと考えられている。しかし凍結による細胞破壊が生ずることは組織の保存法として致命的であり、より破壊の少ない凍結方法が研究されてきた。Glycerin, dimethyl sulfoxide (DMSO) などの凍結保護剤の出現と液体窒素を用いた保存法は細胞の長期保存を飛躍的に発展させた。すでにわれ

われの教室で報告した超冷凍保存の研究<sup>1)2)7)–13)</sup>からも段階的凍結と急速解凍は細胞の長期的な保存法として定着している。しかし細胞保存と一口にいても種々さまざまな細胞が存在し、細胞により最適な凍結条件が求められる。

組織凍結による細胞破壊のメカニズムに関しては Mazur<sup>3)4)</sup>の2要因説(two-factor hypothesis)が定説となっている。急速に冷却すると細胞内に大きな氷結晶が形成され、その体積が10%増加し細胞構造を破壊する。一方、非常にゆっくり冷却すると、氷結しうる細胞内自由水が除去されて氷結晶はできないが脱水状態となる。この状態が長く続くことは細胞が高浸透圧、高塩濃度にさらさ



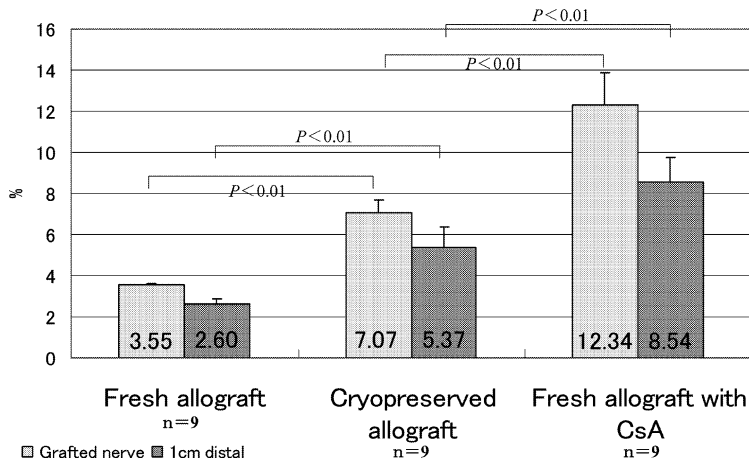


Fig. 14. % Neural tissue

れて細胞内外の溶液濃度の不均衡を起こし、傷害されることとなる。したがって、これらの中間の冷却温度、すなわち細胞内自由水が抜け、細胞の物理化学的性質を変化させない温度と冷却速度がよい<sup>5)</sup>。しかしこの2つの要因を冷却速度の調節だけで避けることは難しく、Mazur<sup>6)</sup>は浸透圧を有する物質を追加することを提唱した。すなわち凍結保護剤を使用して凍結時の損傷を避けようというのである。

凍結保護剤としては glycerin, DMSO, acetamide, propylene glycol, sucrose, poly N-vinyl-2-pyrrolidone などが報告されている。われわれの教室で超冷凍組織保存移植を行った内田ら<sup>112)</sup>、平瀬ら<sup>7)</sup>、武石ら<sup>8)</sup>、黄ら<sup>9)</sup>、寺尾ら<sup>10)</sup>、松岡ら<sup>111)</sup>、宮脇ら<sup>13)</sup>は glycerin を使用している。

凍結保存後の融解は一般的に急速解凍を行う。なぜなら細胞を徐々に融解させると小さな氷の結晶が集合して大きな結晶を形成する再結晶化をおこし、細胞構造を破壊するからである。したがって液体窒素から取り出した後、一定時間内に氷晶が融解しない前に温湯へ浸透して解凍する方法を行う。解凍後は移植に先立って高浸透圧である媒液を等張に戻す必要がある。われわれは生理的食塩水を用いゆっくり連続的に希釈してできるだけ凍結保護剤を取り除いている。

凍結により移植神経の抗原性を低下させ移植免疫反応あるいは拒絶反応を抑制し、移植神経の破壊を減少させようとする試みは多くなされてき

た。しかし、自家または同系移植に匹敵するほど拒絶反応を抑制し、かつ、機能回復をもたらす方法は報告されていない。Mackinnon ら<sup>14)15)</sup>は、移植神経に対して抗原性を低下させることが知られている数種類の処置を加えてその結果を比較したところ、350 Gy 以上の放射線照射と lyophilization (凍結乾燥法) のみが有意の差を示したと述べている。移植神経の Schwann 細胞を完全に除去することにより拒絶反応を減弱しようとする田島ら<sup>16)</sup>の報告をはじめ、移植前に移植神経に対して行う処理は神経組織の viability の重要性を無視している。Ruwe & Trumble<sup>17)</sup>は保存を行った神経の自家移植に関する実験の中で、viable な Schwann 細胞の存在が移植後の機能回復を促進すると報告し、Schwann 細胞のもつ生理学的な neurotropic および neurotrophic な作用の重要性を指摘している。今日行われる血管柄付遊離神経移植は血行を維持し Schwann 細胞の活性を保った状態で移植する方法である。これに対し神経単独移植は、Schwann 細胞活性が一時的に停止するために血管柄付遊離神経移植の方が軸索再生が速い成績の説明につながると考えられる。

内田らはラットの坐骨神経を用いた、超冷凍保存同種移植群、新鮮同種移植群、同系移植群の神経組織学的検索および前脛骨筋の湿重量、足関節屈曲拘縮の程度について検討し、超冷凍保存された神経が viability を保ちつつその抗原性を低下させることと結論している<sup>112)</sup>。今回われわれは凍

結保存同種移植, 新鮮同種移植に加え免疫抑制薬投与同種移植についてサルを用いて比較検討した。まず, 移植群とは別に凍結保存として行われる段階的凍結と急速凍結が神経に及ぼす変化を探索した。2つの方法で凍結した神経を液体窒素保存タンク内に1週間保存した場合では明らかに組織学的に段階的凍結が良好な結果であった。そして段階的凍結後の保存期間が1週間, 2カ月, 4カ月, 1年5カ月について観察すると膨化するmyelin鞘の割合は, 1年5カ月を除いてその程度はいずれも急速冷凍より軽微であった。さらに6カ月, 1年などの保存期間について検討を要すると思われるが, この結果から組織学的には現在の方法ではおおよそ1年以上の保存は限界と思われる。次に移植群の比較では, 移植神経中央, 末梢いずれでも有髄化された神経の単位面積に占める面積比は免疫抑制同種移植群には劣るが, 新鮮同種移植群より凍結保存同種移植群は良好な結果を得た。このことは, われわれの行った段階的凍結法は, その神経の viability を保つとともにその抗原性は低下している可能性が考えられる。

凍結保存法により抗原性が低下する機序は, Cuono ら<sup>18)</sup>の報告によると, 凍結により細胞の表面抗原が変化するためと考えられるが, いまだ不明である。Schwann細胞が段階的凍結保存により, その viability を保持しつつ表面抗原だけを変えするという現象が起こっているかどうかについては将来の研究に待たなければならない。

また, 免疫抑制薬の cyclosporin A 投与によりラット<sup>19)–21)</sup> ヒト<sup>22)</sup>において良好な神経再生が得られている。今回サルでは, 移植4日前より cyclosporin A を 25 mg/kg/day 経口投与し, 移植後は 5 mg/kg/day で4カ月間持続経口投与したが, 今回の投与量では特に副作用と思われる症状は発現せず, また, 比較的低濃度の維持量でも免疫抑制効果があることが示唆された。

サルを用いた組織移植の実験は, 動物の性質上, 入手の困難さ, 費用や感染症の問題, 飼育環境の整備, さらには倫理的問題などがある。ヒトに臨床応用する前段階としての今回の実験結果は重要かつ貴重なものと考えるが, 使用匹数, 実験系の制約があった。

## V. ま と め

サルの尺骨神経の同種移植を新鮮同種移植法, 超冷凍保存法 (Cryopreservation) と, 免疫抑制剤の投与法で行った結果, 段階的凍結保存法は免疫抑制剤投与法に比較し再生神経線維数は少ないが, 新鮮同種移植にくらべ良好な神経再生が得られた。以上の結果より, 段階的超冷凍保存法による同種末梢神経移植は神経線維が再生される期間, 免疫抑制効果があると示唆された。

稿を終えるにあたり, 直接実験, 検索の御指導をいただいた東京慈恵会医科大学形成外科学講座内田満教授ならびに御校閲, 御指導賜りました, 東京慈恵会医科大学形成外科学講座栗原邦弘教授に深謝いたします。ニホンザルを提供していただいた日本畜犬, 東京慈恵会医科大学実験動物研究施設の成相孝一先生に感謝いたします。また Cyclosporin A を提供していただいたノバルティスファーマ株式会社に感謝いたします。

本論文の要旨は第7回日本形成外科学会基礎学術集会 (1998年10月22日, 於香川) および第8回日本形成外科学会基礎学術集会 (1999年10月28日, 於東京) で報告した。

本研究は文部省科学研究費補助金 (課題番号 09671260) 基盤研究 C2 のもとで行われた。

## 文 献

- 1) 内田 満, 平瀬雄一, 小川祐一郎, 児島忠雄. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第5報 同種移植を前提とする神経の長期保存. 日形会誌 1992; 12: 279–87.
- 2) 内田 満, 平瀬雄一, 小川祐一郎, 児島忠雄. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第6報 同種神経移植後の神経再生の長期予後. 日形会誌 1993; 13: 113–20.
- 3) Mazur P. A two-factor hypothesis of freezing injury. Exp Cell Res 1972; 71: 345–55.
- 4) Mazur P. Cryobiology, the freezing of biological systems. Science 1970; 168: 939–49.
- 5) 広井正彦. 受精卵 (胚) 凍結保存と臨床応用. 医のあゆみ 1988; 146: 647–54.
- 6) Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 1984; 247: c125–42.

- 7) 平瀬雄一, 児島忠雄, 武石明精, 黄 貴興, 田中 貢. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による皮膚・軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第1報 同種組織移植を前提とする皮膚の長期保存. 日形会誌 1991; 11: 441-52.
- 8) 武石明精, 平瀬雄一, 黄 貴興, 児島忠雄. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第4報 血管の長期保存と同種移植. 日形会誌 1991; 11: 846-54.
- 9) 黄 貴興, 平瀬雄一, 内田 満, 武石明精, 児島忠雄, 田中 貢. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による皮膚・軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第7報 皮膚の長期保存・皮膚同種移植. 日形会誌 1993; 13: 385-95.
- 10) 寺尾保信, 平瀬雄一, 武石明精. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による軟部組織同種移植に関する実験的研究: 第8報 静脈の長期保存と同種移植. 日形会誌 1995; 15: 625-35.
- 11) 松岡玲玲, 平瀬雄一, 児島忠雄. 超冷凍保存法 (Cryopreservation) による同種軟部組織移植に関する実験的研究: 第9報 ミニブタ皮膚の長期保存と同種移植. 日形会誌 1996; 16: 754-64.
- 12) 松岡玲玲. 凍結保存同種異系皮膚移植: 凍結保護法, および免疫組織化学的検索. 日形会誌 2001; 21: 82-95.
- 13) 宮脇剛司, 平瀬雄一. 超冷凍保存による同種軟骨移植に関する実験的研究. 日形会誌 1997; 17: 6-16.
- 14) Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Kline D, Hunter D. Peripheral nerve allograft: an immunological assessment of pretreatment methods. *Neurosurgery* 1984; 14: 167-71.
- 15) Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Kline D, Hunter D. Peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration across pretreated nerve allografts. *Neurosurgery* 1984; 15: 690-3.
- 16) 田島克巳, 阿部正隆, 井手千束, 遠山稿二郎, 長文昭. 同種移植による末梢神経再生の実験的研究. 日手の外科会誌 1989; 6: 26-9.
- 17) Ruwe PA, Trumble TE. A functional evaluation of cryopreserved peripheral nerve autografts. *J Reconstr Microsurg* 1990; 6: 239-44.
- 18) Cuono CB, Langdon R, Birchall N, Barttelbort S, McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 1987; 80: 626-37.
- 19) Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 1052-66.
- 20) Bain IR, Mackinnon SE, Hudson AR, Wade J, Evans P, Makino A, et al. The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with cyclosporin A: I. Histologic and electro-physiologic assessment. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 1036-46.
- 21) Fish JS, Bain JR, McKee N, Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with cyclosporin A: II. Functional evaluation of reinnervated muscle. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 1047-52.
- 22) Mackinnon SE, Hudson AR. Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 695-9.