

切断肢の保存に関する実験的研究

—fluorocarbon emulsion 灌流による保存効果について—

奈良県立医科大学整形外科教室

吉井 尚

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE PRESERVATION OF AMPUTATED LIMBS UNDER PERFUSION WITH FLUOROCARBON EMULSION

TAKASHI YOSHII

Department of Orthopedic Surgery, Nara Medical University

Received August 28, 1989

Summary: The 24-hour preservation of amputated rabbit limbs was investigated by perfusion with oxygenated fluorocarbon emulsion (Fluosol-43) using an extracorporeal circulation system. Eighteen limbs amputated at the thigh were immediately stored in ischemic condition at 4°C for one hour, and were perfused at 10°C for 21 hours. In 12 limbs, replantation was initiated at the period of 22 hours, and recirculation commenced at the time of 24 hours after amputation.

In all cases, the viability of gastrocnemius muscle was confirmed by the evoked potential (M-wave) which was observed at the time of 24 hours after amputation. All rabbits survived more than 9 hours after the limb replantation, and 6 rabbits were alive over 4 months until their sacrifice. In histological examination of muscular tissue through the light and electron microscopes, severe atrophic change was not observed in spite of the denervated condition.

The following conclusions were obtained:

- 1) It is possible to preserve an amputated limb for 24 hours without serious damage, under perfusion with fluorocarbon emulsion at 10°C.
- 2) In major limb replantation after 24-hour preservation under FC perfusion, the limb can be totally alive, and the survival of the host is secured without replantation toxemia.

Index Terms

amputated limb preservation, perfusion, fluorocarbon emulsion, evoked electromyography, limb replantation

緒 言

近年, microvascular surgery の発達に伴って, 切断肢指再接着手術が普及し, さらに筋肉を含む血管柄付複合組織移植手術も可能になった。しかし, 切断肢や複合組織内の骨格筋は阻血の影響を受けやすく, 阻血時間の延

長は非可逆性の筋変性を惹起しやすい。このため再接着や移植に成功しても, 良好な機能の回復が得られないこともある。

切断肢指の保存に関しては, 既に多くの研究が行われており, 臨床的には低温 (0~4°C) 保存 (表面冷却法) が広く応用されている¹⁾。しかし, この方法では筋肉を含む

切断肢や移植組織においては、保存時間に限界があり、より長時間保存するための方法が望まれている。

一方、1966年 Clark²⁾は、それまで冷媒あるいは電気絶縁体として開発されていた perfluorochemical の一種である perfluorobutyltetrahydrofuran の酸素溶解能が非常に高くかつ毒性が低いことを発見した。それ以来、多くの人によってこの化学物質を人工血液として応用すべく研究が行われるようになった。

清水³⁾、森田⁴⁾は、家兎の切断後肢を3時間の低温保存の後に、perfluorotributylamine を主成分とする fluorocarbon emulsion (Fluosol-43) を灌流液として 15°C の条件下で保存し、最長 27 時間 10 分、平均 21 時間 48 分の切断肢保存に成功したことを報告した。

今回著者は、この実験モデルを応用して、筋組織を含む切断肢を 10°C の条件下で fluorocarbon emulsion にて灌流保存を行い、24 時間後に実際に再接着し、さらにより良い状態で切断肢の保存が可能か否かを検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

体重 3 kg 前後の成熟家兎の後肢を大腿遠位 3 分の 1 部において完全切断し、その末梢側を実験肢として用いた。使用した切断後肢は総数 39 肢で、うちわけは灌流保存 (I 群) 6 肢、灌流保存の後再接着したもの (II 群) 12 肢、対照群 (III 群) 5 肢、灌流装置の異常により灌流不全をきたしたため実験群より除外したもの 6 肢、予備実験に使用したもの 10 肢であった。

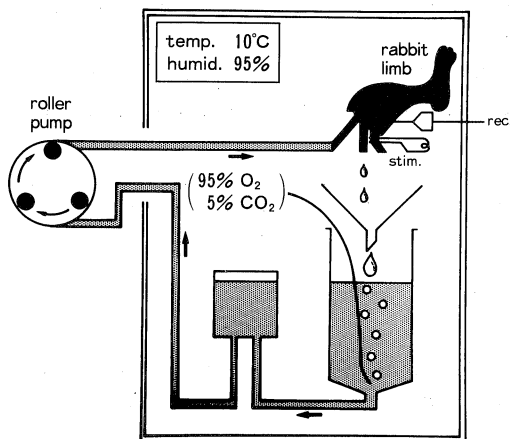


Fig. 1. Schematic drawing of perfusion system for rabbit limb.

2. 灌流装置

灌流装置は教室の清水³⁾、森田⁴⁾の実験装置と同様で、その基本構造はいわゆる人工心肺装置を恒温恒湿槽内で組み立てたものである。恒温恒湿槽としては TABAI 社製の炭酸ガス培養器 LNS-110、恒温槽 LTP-110、冷却機 LCL-120 を組み合わせ、装置内の温度は 10 ± 0.3°C、湿度は 95% と一定に保たれている。大腿動脈よりの灌流液の注入には長岡医科工業製の輸液ポンプ IVC-600 またはテルモ社製 STC-503 を用いた。家兎の後肢大腿静脈や皮下静脈などより回収される灌流液は自然落下にて 50 ml の注射器の外筒に漏斗を使って集め、ここに 95% O₂、5% CO₂ の混合ガスを 50 ~ 70 ml/min の流量で bubbling させ、灌流液を酸素加した (Fig. 1)。この装置を用いると、末梢まで十分に灌流液が循環しうすることは、教室の清水³⁾が microangiography で確認している。

3. 灌流液

20% Fluosol-43 (ミドリ十字社製、以下 FC と略す) を用いた。液の調整は Fluosol-43 (perfluorotributylamine) のマニュアルに従って、emulsion 400 ml に Annex solution A 30 ml と Annex solution B 70 ml を混合し 500 ml とする。その最終組成を Table 1 に示す。

4. 筋電図装置

刺激には Medelec 社製モジュール型筋電計 MS6 の定電圧刺激器 SC6 とアイソレーター IS/V を使用し、家兎切断後肢の坐骨神経を自作の hook 型電極を用いて刺激した。記録電極は一芯同心型針電極を使用し、腓腹筋内に刺入した。誘発筋電位の増幅には Medelec 社の増幅装置 AA6M を使い、MS6 の oscilloscope screen 上に表示したのち photographic paper に記録した。

5. 手術手技および灌流実験

家兎後肢を、ネブプタール静脈麻酔下に大腿遠位 3 分の 1 部において完全切断した。大腿動静脈を結紮して切

Table 1. The constitutions of Fluosol-43 (from technical information of Fluosol-43)

		w/v%
FC-43	20.0	w/v%
Pluronic F-68	2.56	
NaCl	0.60	
KCl	0.034	
MgCl ₂	0.020	
CaCl ₂	0.028	
NaHCO ₃	0.210	
Glucose	0.180	
Hydroxyethyl starch	3.0	

断した時点をこの実験の開始時間(0時間)とした。家兎母体の切断端は筋・筋膜および皮膚を縫合し、一旦麻酔を覚醒した。

(1) 灌流前の保存：切断した家兎後肢はただちに0~4°Cの冷蔵庫内に入れて、1時間の低温阻血保存を開始した。低温保存の途中で、microscope下に、大腿動脈に19G teflon tubeを入れて8-0 nylon糸で固定し、灌流実験に備えた。この操作は冷蔵庫内では不可能なので氷水冷却下で行った。

(2) 灌流：前述の灌流実験装置にセットして、酸素加FCの灌流を開始した。開始直後に静脈より流出してくるFCは、多量の血液を含んでいるので、約20mlを捨てた。灌流液の温度は10°C、総量500ml、流量は切断肢100g組織(骨を含む)当り125ml/hrとした。

I群では、切断後22時間目より温度を15~25°Cに上昇させ、灌流を続けながら切断後24時間の時点で誘発筋電図を記録した。

II群では、切断22時間後に灌流を中止し、再接着手術を開始した。

(3) 再接着術：II群12羽に行った。切断後24時間の時点で、ネンプター静脈麻酔下に室温で再接着手術を施行した。大腿骨を約1.0~1.5cm短縮してプレートにて固定し、大腿動脈、大腿静脈、大腿後面の皮下静脈1~2本を縫合、筋肉および皮膚を縫合した。大腿動脈の血流再開は切断後24時間の時点でを行った。神経縫合は施行しなかった。術後は下腹部より後肢先端までギプス固定した。手術中または術後に、前もって採血してあった自家血約20mlを輸血した。また、術前から術中および術後4日目まで補液および抗生剤の投与を行った。

6. 観察項目

1) 再接着後の家兎の経過：

定期的にか家兎の全身状態および再接着肢の皮膚の状態や浮腫の程度などを肉眼的に観察した(II群)。

2) 誘発筋電図：

筋のviabilityのcheckを目的に、筋電計を用いて切断後肢の坐骨神経を刺激し、その時に腓腹筋より得られる誘発筋電図を観察記録した。

I群(灌流保存群)：10°Cの低温では筋電図の導出が困難であるので、切断後24時間の時点より温度を15~25°Cに上昇させ、切断24時間後に誘発筋電図を記録した。

II群(灌流保存-再接着群)：切断後24時間の時点で灌流を中止して再接着術を開始し、24時間後の時点で血流を再開して、誘発筋電図を記録した。同時に肉眼的に筋内の収縮を観察した。

3) 灌流液中に遊出する筋由来の酵素量および灌流液の電解質値とガス分析値：

輸液ポンプ部につけた三方活栓からFCを3時間毎に1.5mlずつ採取して、GOT, LDH, CPK, K⁺, PH, PO₂, PCO₂の各項目について測定した(I群)。

4) 灌流圧の測定：

小型圧トランスデューサーおよび日本光電製ライフスコープ11型(改造型)を用いて灌流圧(動脈圧)を測定した(I・II群)。

5) 灌流前後の切断肢の浮腫の程度：

肉眼的観察と灌流前後の切断肢重量の測定を行った(I・II群)。

6) 灌流終了時および再接着後の筋の組織学的変化

腓腹筋より標本を採取して光顕的、並びに電顕的検索をおこなった。標本は、I群では灌流終了時、II群では再接着直後および2週または3週後に採取した。光顕標本の固定にはphosphate buffered formalinを用い、染色はhematoxylin-eosinで行った。一方電顕においては、固定にはglutaraldehydeとosmium tetroxideを用い、染色はuranyl acetateとlead citrateで行った。

7) 血液検査：

術前、再接着後3日、7日、14日目に家兎の耳静脈血を採取し、血清GOT, LDH, CPK, K⁺の各項目について血液検査を行った(II群3羽)。

8) 再接着肢の骨癒合の観察：

定期的にX線検査を行い、大腿骨接合部の骨癒合の状態を観察した(II群)。

7. 対照(5羽)

保存時間を0時間とし、手術操作、脱神経、ギプス固定などによる筋肉への影響を比較するために対照群を作成した。家兎後肢を大腿遠位3分の1部において大腿動脈、1本の皮下静脈、大腿骨を残して切断した後に、神経は切離したまま、筋肉、皮膚を直ちに再縫合した。術後に下腹部より後肢先端までギプス固定した。

1) 2週、3週目に腓腹筋より標本を採取して光顕と電顕の双方で検索した(4羽)。

2) 術前、術後3日、7日、14日目に家兎の耳静脈血を採取し、血清GOT, LDT, CPK, K⁺の各項目について血液検査を行った(3羽)。

結 果

1) 再接着後の経過

II群12羽について再接着術を行った。6羽は最長18ヵ月生存中のものを含めて、標本作成などのために屠殺するまで、全て4ヵ月以上生存した。他の5羽は全て9時

間以上生存したが、2羽は1日目に、1羽は2日目に、1羽は6日目に、1羽は7日目に死亡した。その原因は、骨接合部での plate および screw の逸脱のための出血多量によるもの2羽、骨接合部の骨髓腔よりの大量の出血死2羽、血腫への感染死1羽であった。残りの1羽は骨固定不良により縫合血管の損傷・閉塞をきたしたため2週目に屠殺した。

長期生存した6羽は動静脈とも開存し良好な血流を認めた。再接着肢の外観は術後1日目より浮腫を認めたが、2週目までに軽減した。対照群でも同様の浮腫が観察された。再接着肢の皮膚では大腿中央部の皮膚縫合部で、約3分の1において部分的な皮膚壊死を認めたが (Fig. 2A, 2B)、4週ごろまでには自然治癒し、体毛の発育も良好であった (Fig. 3)。

2) 誘発筋電図：

切断後24時間の時点で、I群6肢、II群12肢の全例にM波出現を確認した (Fig. 4)。筋収縮は、I群では6肢中1肢に、II群では12肢中11肢に肉眼的に観察された。II群の残り1肢においても筋肉の1部分では僅かな

収縮が観察された。

3) 灌流液中の遊出酵素量、電解質値およびガス分析値：

GOT, LDH, CPK, K⁺は灌流中に徐々に増加する傾向を示したが、急激な上昇は認めなかった。PH, PO₂, PCO₂については灌流当初と変化はなかった (Fig. 5A, 5B, 5C, 5D, 6A, 6B, 6C各グラフの実線に示す変化)。なお各グラフの点線には、予備実験での観察であるが、3時間低温阻血保存後に15°CでFC灌流保存を行った2肢での測定値変化を参考に示した。

4) 灌流圧：

灌流開始時における動脈灌流の最大圧、平均圧および最小圧の平均値はそれぞれ43.3 mmHg, 31.1 mmHg, 21.0 mmHgであった。灌流終了時には、それぞれ65.7 mmHg, 53.1 mmHg, 31.0 mmHgと上昇した。

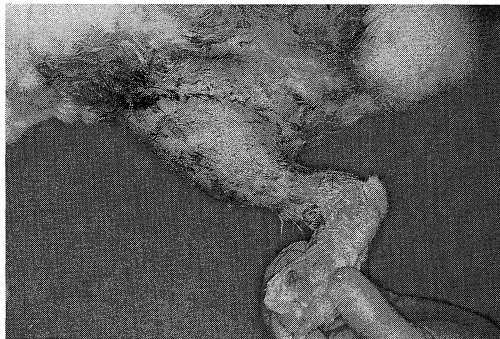


Fig. 2A



Fig. 2B

Fig. 2. Limbs at the time of 2 weeks after replantation following 24 hours preservation.
A: Normal appearance of the limb.
B: Partial skin necrosis is seen on the thigh.

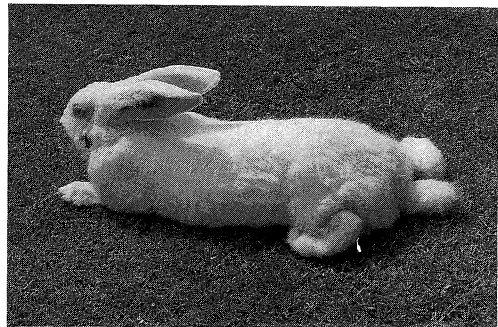


Fig. 3. Rabbit at the time of 18 months after replantation following 24 hours preservation. Muscular atrophy is seen on the left hind limb which was replanted.

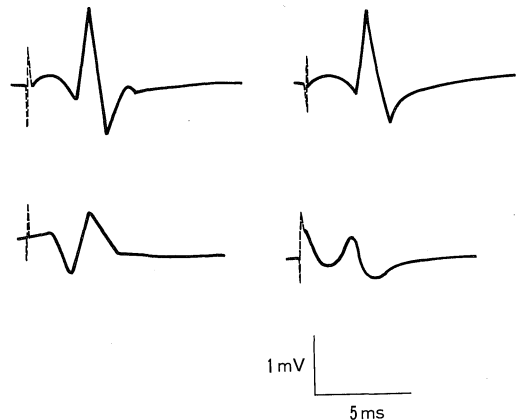


Fig. 4. M-waves recorded from gastrocnemius muscle after 24 hours preservation.

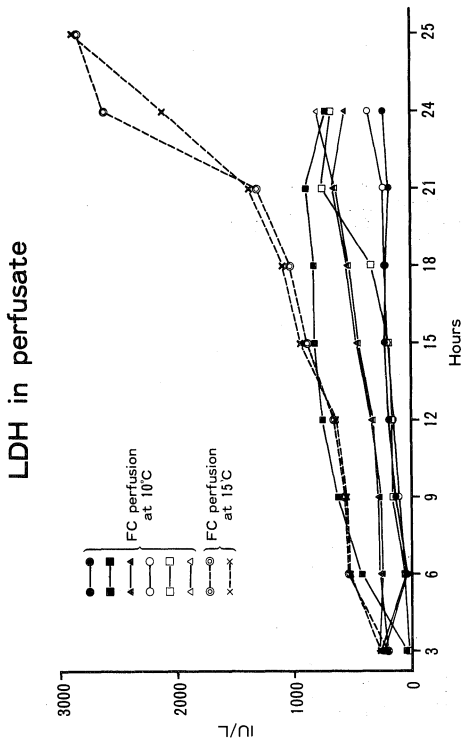


Fig. 5B

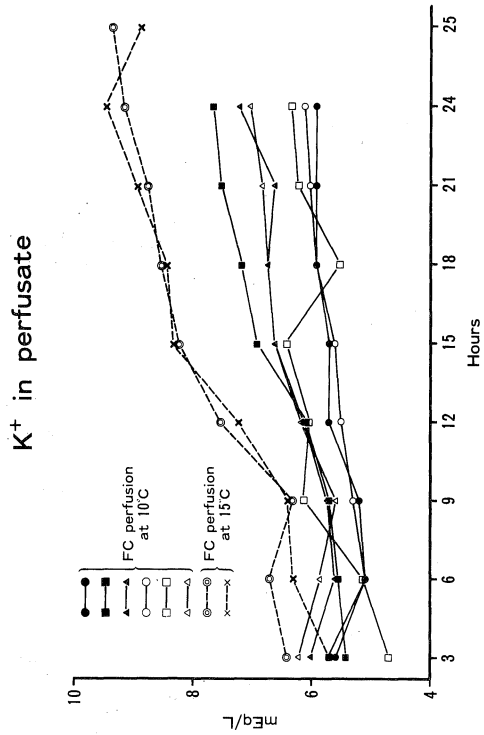


Fig. 5D

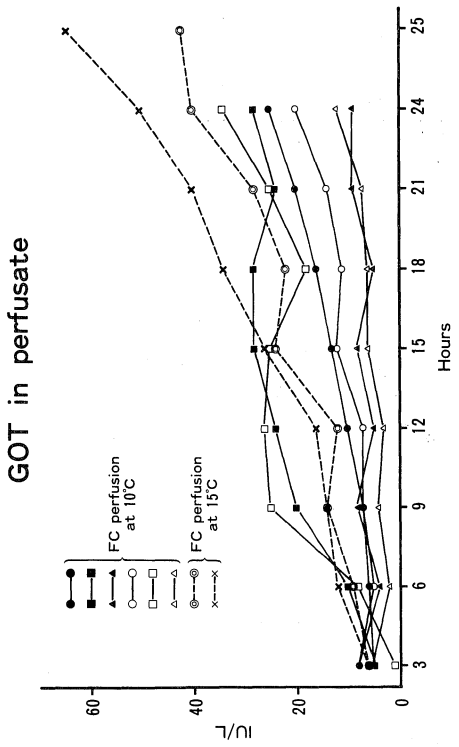


Fig. 5A

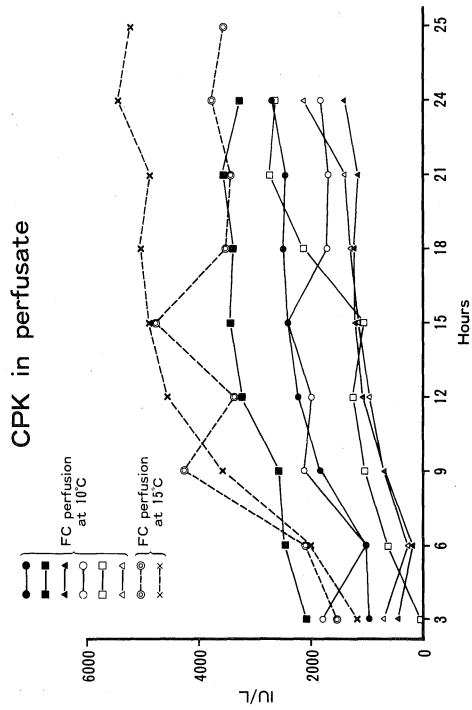


Fig. 5C

Fig. 5. GOT, LDH, CPK, K⁺ concentrations in the perfusate.

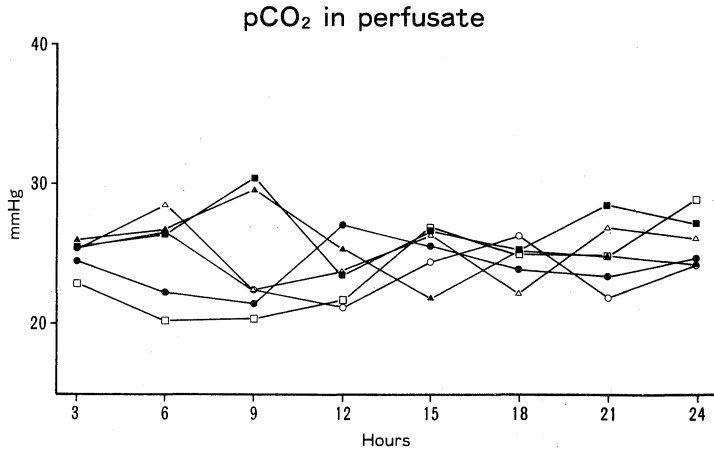


Fig. 6A

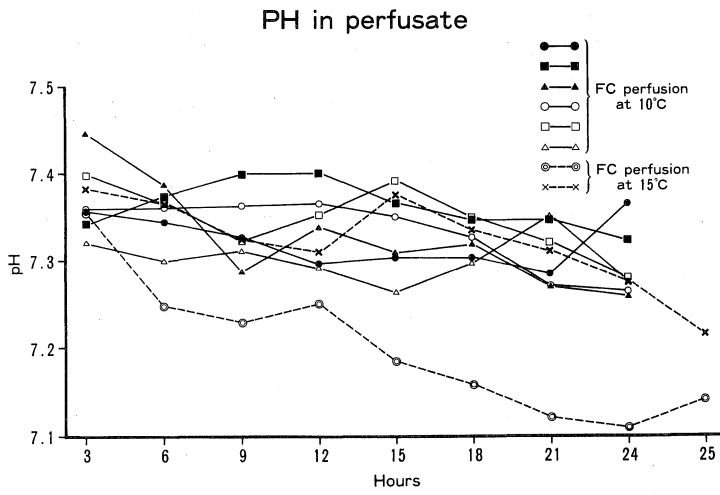


Fig. 6B

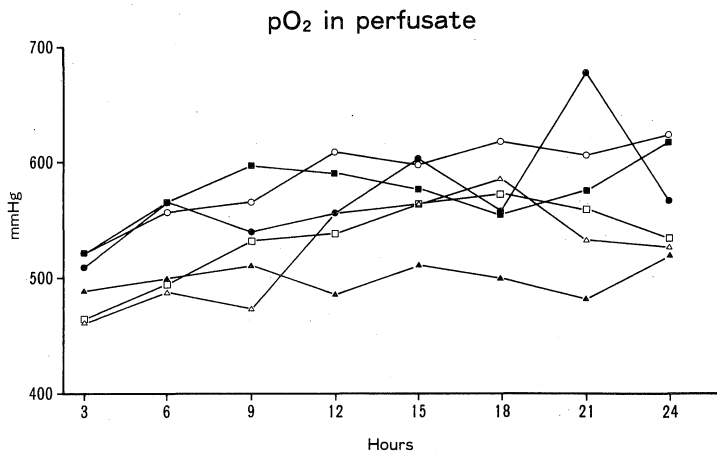


Fig. 6C

Fig. 6. Gas analysis of perfusate-pO₂, pCO₂, & pH.

5) 灌流前後の切断肢の浮腫の程度:

灌流終了時に、18肢中6肢(33%)の切断肢に軽度の浮腫が観察された。他の切断肢には浮腫は殆ど認めなかった。切断肢の重量は灌流前の平均は134gで、灌流後の平均は131gとほとんど差はなかった。重量増加の最大は5%で、重量減少の最大は7%であった。

6) 灌流終了時および再接着後の筋の組織学的な変化:

灌流終了時および再接着直後の筋肉の光顕像においては、特に著変を認めなかった。perimysiumに軽度の浮腫

が見られる程度である(Fig. 7A)。また電顕においても、筋線維は正常像を示し、細胞内小器官の微細構造も良く保たれている(Fig. 7B)。

再接着後2週の光顕においては、perimysiumの浮腫、筋線維の萎縮、再生筋線維の出現などが見られたが(Fig. 8A)、それは対照群と同程度であった(Fig. 10A)。再接着後3週間になると、個体および部位によりばらつきがあり、再生筋線維の出現、筋線維の壊死、吸収、脂肪浸潤、瘢痕形成を認めるものがあったが、変化の軽度なものもあった(Fig. 9A)。この変化は対照群でも同じ様に

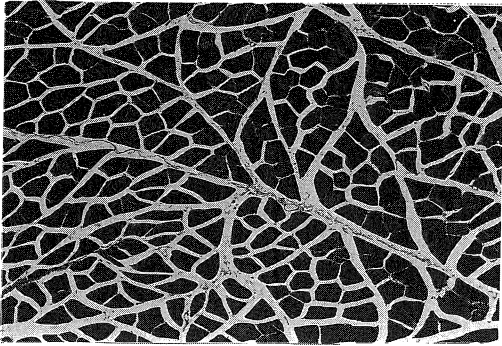


Fig. 7A

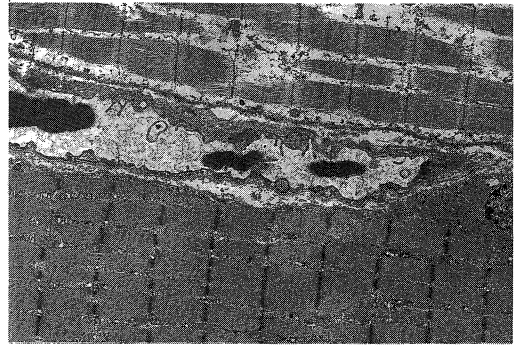


Fig. 7B

Fig. 7. After 24 hours preservation under FC perfusion.

A: Photomicrograph of gastrocnemius muscle (hematoxylin and eosin, x100). Size of muscle fibers is constant, and widening of endomysium is observed.

B: Electron photomicrograph of the muscle (x4000). Muscle fibers show normal appearance, and normal microstructure of organelle and capillary can be seen.

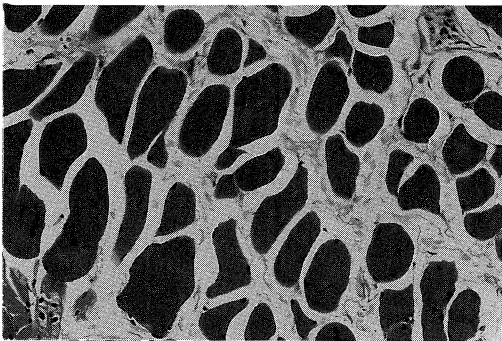


Fig. 8A

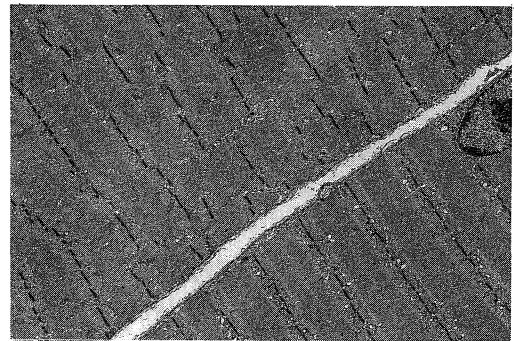


Fig. 8B

Fig. 8. Two weeks after replantation following FC perfusion.

A: Photomicrograph of gastrocnemius muscle (hematoxylin and eosin, x200). Muscle fibers are not constant in size, and widening of endomysium and some fibroblasts are observed.

B: Electron photomicrograph of the muscle (x2500). Muscle fibers show normal appearance.

見られた (Fig. 11A). 電顕標本では、各個体の部位によって筋線維の微細構造に差異を認めるが、多くの筋線維に正常像が認められ、変性像は軽度であった (Fig. 8B, 9B). このような変化は個体により差はあるが、全体としては対照群と同程度であった (Fig. 10B, 11B)

また毛細血管の電顕像では灌流終了時、再接着後2週および3週目のいずれの標本でも、どの部位でも、内腔は平滑で正常の形態を示した (Fig. 12).

7) 血液検査:

血清 GOT, LDH, CPK とも測定値にばらつきはあったが、術後3日目に急激な上昇を認めた. 7日目にはやや下降し, 14日目には術前とほぼ同様の値となった (Fig. 13A, B, C 各グラフにおいて実線で示す変化). カリウム値は 3.9~5.2 mEq/l の範囲内で術前, 術後を通じて変化はなかった. これらの傾向は対照群でも同様であった.

8) 再接着肢の大腿骨接合部癒合の観察:

家兎においては, 筋肉に比較して大腿骨が細く, また運動も激しく, 内固定にギプス固定を加えても安定した

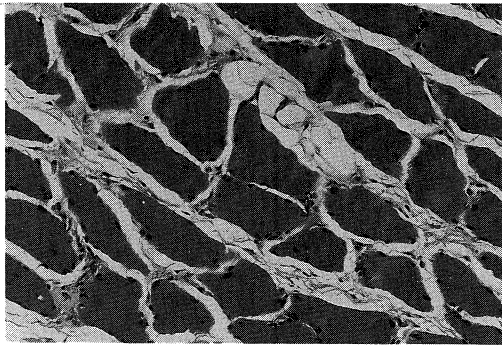


Fig. 9A

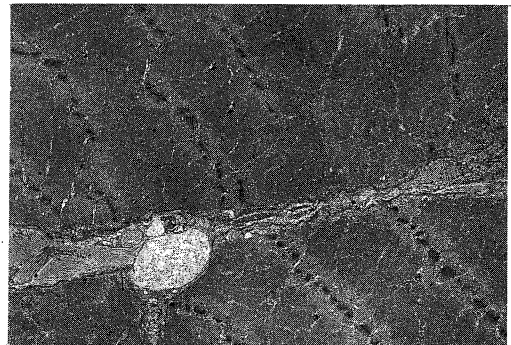


Fig. 9B

Fig. 9. Three weeks after replantation following FC perfusion.

A: Photomicrograph of gastrocnemius muscle (hematoxylin and eosin, x200). Muscle fibers are not constant in size, and muscle-fiber-separation from endomysium is observed.

B: Electron photomicrograph of the muscle (x3000). Most of muscle fibers show normal appearance.

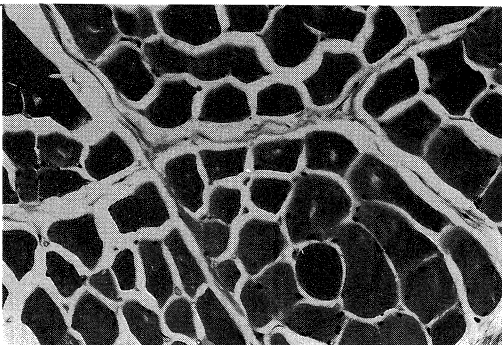


Fig. 10A

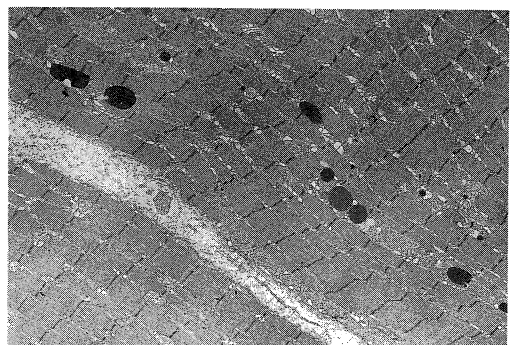


Fig. 10B

Fig. 10. Control group, 2 weeks after operation.

A: Photomicrograph of gastrocnemius muscle (hematoxylin and eosin, x200). Muscle fibers are not constant in size, and widening of endomysium is observed.

B: Electron photomicrograph of the muscle (x3000). Normal muscle fibers can be partially seen, but microstructure of organella is atrophic and degenerative. Lysosomes and large dense bodies are observed between atrophic muscle fibers.

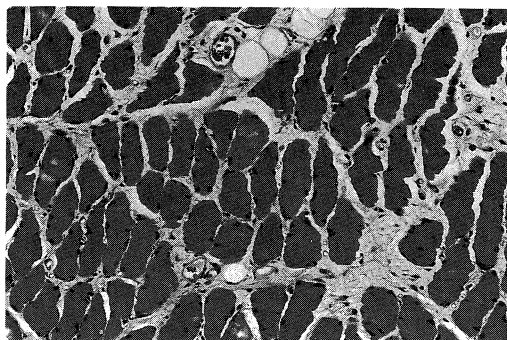


Fig. 11A



Fig. 11B

Fig. 11. Control group, 3 weeks after operation.

A: Photomicrograph of gastrocnemius muscle (hematoxylin and eosin, x100). Muscle fibers are not constant in size, and some necrotic muscle fibers are observed, with increase of interstitial connective tissues.

B: Electron photomicrograph of the muscle (x1500). Most of muscle fibers show normal appearance, and normal capillary can be seen.

骨固定が困難であったため、骨癒合の時期については、明確な判定は出来なかった。しかし、骨固定が良好であった例では、再接着後6週にて十分な骨癒合が得られた (Fig. 14A)。また家兎の過度の運動で、早期にプレートが脱落した症例でも、旺盛な仮骨形成が観察された (Fig. 14B)。

なお、灌流実験中に輸液ポンプの不良、停電、灌流用ルート中のフィルター不良、動脈内に挿入したチューブの位置不良などの原因により灌流不全をきたした6肢については、実験群より除外し、上記の結果には含めていない。

考 察

筋組織を含む切断肢の阻血保存における時間的な限界については、多くの報告がみられる。玉井⁵⁾は犬の大腿切断の再接着実験において、その成功例の検討から室温で3時間以内が再接着手術の適応であり、阻血時間が進むにつれて組織変化が増強すると述べている。また木下⁶⁾は遊離筋肉移植における阻血後の組織像および筋収縮の研究より、室温での保存限界は2時間以内としている。また清水³⁾は、30°Cでの阻血保存後にFCによる灌流を行い、灌流中の誘発筋電図の観察より、30°Cでは阻血保存の限界は2時間以内と結論している。

一方、薄井⁷⁾、村松⁸⁾らは、犬の大腿切断実験における保存・再接着後の生存率、筋肉からの逸脱酵素であるCPK、GOT、LDH値、および筋の組織学的検索より、

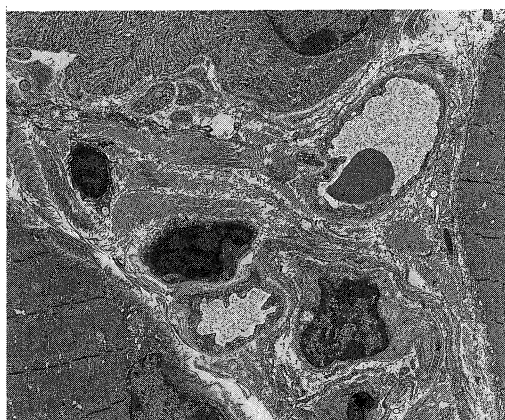


Fig. 12. Electron photomicrograph of a capillary, 2 weeks after replantation following FC perfusion (x2000). Capillary shows normal appearance.

低温(氷水中)阻血保存法による限界は6時間以内としている。また森田⁴⁾は冷蔵庫内(0~4°C)での阻血保存後にFCによる灌流を行い、誘発筋電図の観察から、0~4°Cでの阻血保存の限界は6時間と結論している。

灌流によって切断肢に代謝を継続させながら保存しようという試みとしては、Lapchinsky⁹⁾、Snyder & Knowles¹⁰⁾の報告を始め、本邦でもOnjiら¹¹⁾、玉井⁵⁾、村井¹²⁾、三橋¹³⁾、山口¹⁴⁾、広岡¹⁵⁾、福西¹⁶⁾らが長時間保存をめざして実験を行っている。しかし、いずれも自家血

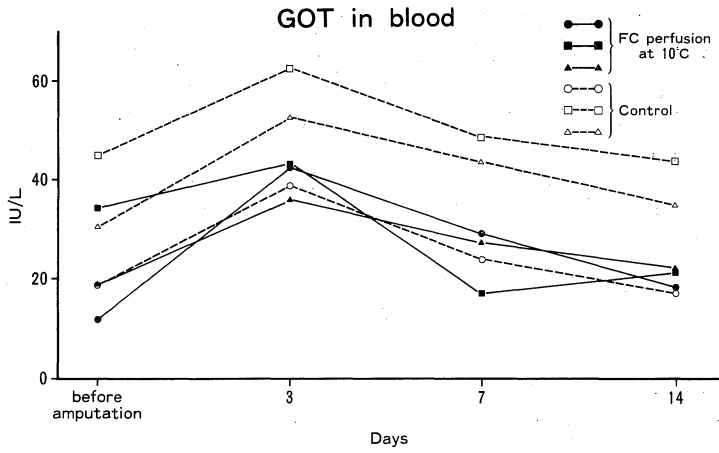


Fig. 13A

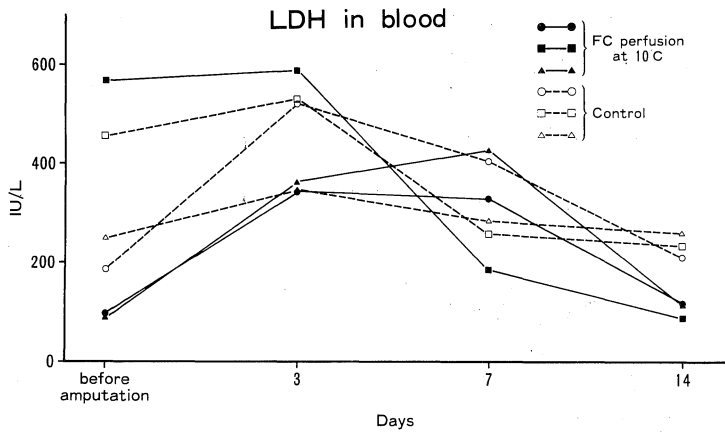


Fig. 13B

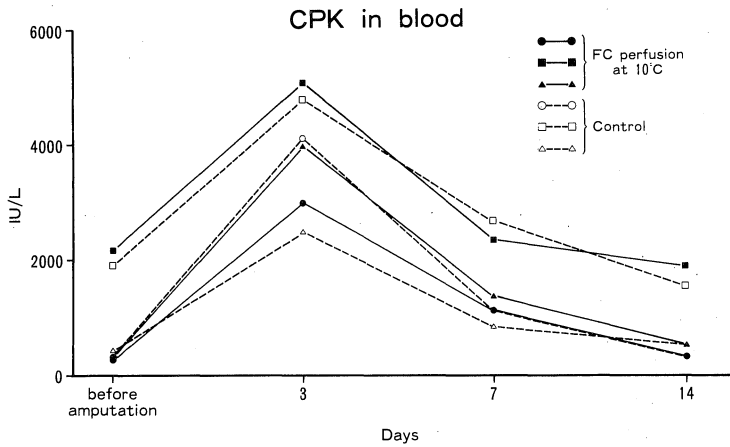


Fig. 13C

Fig. 13. GOT, LDH, CPK concentrations in the blood.

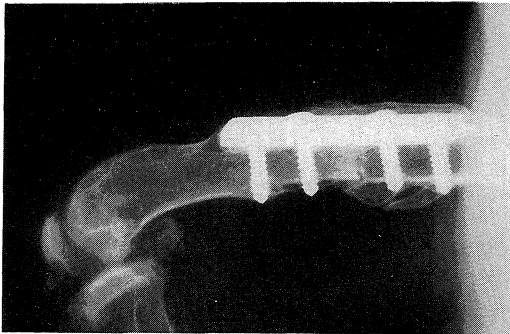


Fig. 14A

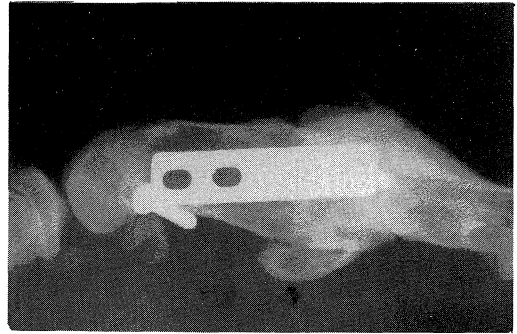


Fig. 14B

Fig. 14.A: Radiograph of the femur 6 weeks after replantation.
 B: Radiograph showing abundant callus formation in spite of displacement of fixation material.

を灌流液として用いているため、溶血、高カリウム血症、浮腫などのトラブルが多く、低温保存に優る成績を上げることができなかった。

また、Collin's solution, Hartmann solution, Phosphate-buffered Ringer's solution など特に酸素運搬能を持たない種々の灌流液を用いた実験報告も見られるが、短時間の灌流で成績の良否を述べているのがほとんどで、保存時間の延長は得られていない^{17,18,19,20,21}。

FCは、いわゆる人工血液として開発されたもので、今日では、心、腎、肝の体外灌流実験をはじめ²²、臨床的に人体への輸注も行われている。また、脳や脊髄の阻血に対して保護作用のあることが報告されている^{23,24}。

FCの灌流による切断肢の保存は浅井²⁵、坂田²⁶、高橋²⁷などの報告が見られ、筋の傷害抑制効果の大きいことを論じているが、長時間の保存を試みていない。Smith²⁸は、5例の切断肢指をFCで灌流し、切断後24時間を経た母指の再接着に成功したと報告しているが、筋組織を含む切断肢の再接着には応用しておらず、また、この方法による保存限界についても明らかにしていない。

清水³・森田⁴は、家兔の切断後肢を3時間の阻血低温保存の後、Fluosol-43を灌流液として、温度15°C、灌流量125 ml/hr/100 g、灌流液総量250 mlの条件下で灌流保存し、最長27時間10分、平均21時間48分の切断肢保存に成功したことを報告した。さらに今回の予備実験において同じ条件で切断後12時間の時点より3時間毎に灌流液を50 mlずつ新しいFCと交換することにより(結果的に灌流液総量は700 mlとなった)、切断より45時間までM波が出現し、筋肉のviabilityが保たれていることを確認した。

これらの結果より、24時間の保存を安定して行い得る灌流条件を設定した。まず、灌流量は良好な末梢循環が得られ、筋肉に酸素や栄養を十分に供給できる量でなければならないが、血管床にたいする影響を最小限にするには、出来るだけ低圧でなければならない。骨格筋は末梢血管抵抗が高いと言われ、安静時の血流量はBard²⁹により2.7 ml/100 g/min (162 ml/hr/100 g)と記述されている。さらに予備実験にて15°Cの条件で125 ml/hr/100 gの流量で安定してM波が出現し続けることを確認している。今回の灌流条件として設定した10°Cでは、15°Cよりさらに筋肉での代謝が抑制されていると思われる。以上を考慮して、灌流量は15°C実験時と同様に125 ml/hr/100 gとした。この灌流装置自体は、肝や腎に代わるものをもたないため、被灌流筋の代謝産物の処理は行われず、よって総灌流量は多量の方が望ましいが、経済的な理由もあって、500 mlと設定した。

灌流保存群(I群)では、切断後24時間の時点より灌流温度を上昇させ、誘発筋電図を観察しているが、これは10°C以下の低温ではM波は観測が困難であり、15°C以上ではほぼ確実に観測できるからである。往々の理由による灌流不全のため実験群より除外した6肢を除いて、I群6肢・II群12肢の全肢にM波の出現を確認したが、これは筋肉のviabilityを保ちながら灌流が良好に行われたことを示している。しかし、そのM波は2,3相性で、その振幅、持続時間、および潜時は、さまざまであった(Fig. 4)。これは、灌流保存されたとしても、筋肉によりそのviabilityが異なるためと思われる。また、潜時の差については測定時の温度の差によるものが大きいと考えられる。肉眼的に観定された筋収縮は、I群では6肢中1肢、II群では12肢中11肢であるが、この差は再

接着後の血行再開により温度が十分に上昇すること、血液によりなんらかのエネルギー源が供給される為と思われる。

灌流液中の GOT, LDH, CPK, K⁺ などの遊出酵素量および電解質値や, PH などのガス分析値は, 灌流中の筋肉の viability と相関があり, 灌流の状態を表す指標になると言う報告が多い^{3,4,26,27}。予備実験での観察であるが, 3 時間低温阻血保存後に, 15°C で FC 灌流保存(灌流液総量 250 ml)を行った 2 肢での酵素量及び電解質値やガス分析値の変化を Fig. 5, 6 の点線に示した。この 2 肢では 22~23 時間までに M 波が消失しているが, これに伴って各測定値に大きな変化が表れている。これに対して, 今回の 10°C 灌流実験群において, GOT, LDH, CPK, K⁺ については灌流中に徐々に増加する傾向にあるが, 急激な上昇は認めていない (Fig. 5)。PH についても灌流当初と変化はなかった (Fig. 6)。これらの事実は灌流保存が良好に行われたことを示している。

また, 灌流開始時における灌流最大圧の平均値は 43.3 mmHg であり, 灌流終了時には約 50% の上昇であるが, 平均 67.1 mmHg と比較的低値であった。灌流圧については諸家により報告があるが^{12,26,27}, 本実験では比較的低圧であり, これが長時間の灌流を可能にした一つの必要条件と思われる。今回の実験群からは除外したが, 種々の原因による灌流不全例では 90 mmHg 以上を示したことからみても, 灌流量が一定の場合, 灌流圧のモニターは毛細血管抵抗および灌流状態を表す良い指標である。

灌流不全をきたすと浮腫が著明になり, 重量増加が認められることが報告されているが^{3,4,12,14}, 本実験では 33% の灌流肢に軽度の浮腫が観察され, 他には浮腫は殆んど認めなかった。灌流肢の重量増加の最大は 5% で, 重量減少の最大は 7% であったように, 重量変化は僅かであったことからみると, 灌流保存は良好に行われたと考えられる。

以上の灌流保存実験より今回の条件で 24 時間の保存は可能と考えて, 実際に灌流保存後に再接着実験を行った。再接着 12 羽中 6 羽は長期の生存が得られた。しかし他の 5 羽は全て 9 時間以上生存したが, 7 日目までに死亡した。Replantation toxemia による死亡は再接着後 6~12 時間以内に発生することが多いと言われており,^{16,30} また本実験においても, 実験群から除外したものはあるが, ポンプ不良により灌流不全に陥ったもので再接着を行ったところ約 1 時間以内に死亡している。一方, 本実験の死亡例は 1 羽が再接着後 9~12 時間, 他の 1 羽が 12~18 時間後, その他は何れも 24 時間以上である。また死亡時の解剖で局所に多量の血腫が認められ,

出血が死亡原因の大多数を占めるとと思われる。これらよりいわゆる replantation toxemia の発生はないものと推定された。

また, 対照群で手術操作後にギプス装着することのみで死亡するものもあったことなど, 家兎の術後管理やギプス障害の防止などは非常に困難である。しかし骨接合部への fibrin 糊の使用など手術法の改善および自家血輸血の採用で, 実験後期においては生存率の改善を得ている。

再接着肢の皮膚壊死は部分的であり, 4 週ごろまでには自然治癒し体毛の発育も良好であった。しかも, このような皮膚壊死は大腿部の皮膚縫合部のみに見られ, 下腿部および足部ではギプスによる僅かな褥瘡を除いて観察されなかった。これは灌流中および再接着後も皮膚の末梢循環は十分に保たれていることを示しており, 筋肉より阻血に抵抗性が強いと言われる皮膚は 24 時間の保存が十分可能であった。

再接着後の筋の逸脱酵素である血清 GOT, LDH, CPK 値の変化の傾向は対照群でも同様であった。これは灌流中の筋肉の障害は僅かであり, むしろ十分に灌流保存された下腿部の筋肉より大腿部の筋切断縫合部での筋肉への機械的操作が血清酵素値に及ぼす影響が大きいと考えられる。

灌流終了時の筋肉の光顕像および電顕像においては, 特に著変を認めなかった。再接着後 2 週および 3 週の光顕, 電顕標本ともに, 個体によってばらつきはあったが, 筋の変性の程度は対照群と同様であった。脱神経やギプス固定などの影響が大きと思われるが, 悪条件にもかかわらず筋肉の組織は比較的良く保たれている。森田⁴ は灌流保存が限界になり誘発電図上で M 波が導出できない状態に陥った時点では, 毛細血管の内腔に突起が出現するなど内膜障害が起こっていることを電顕的観察より示した。今回の 24 時間保存実験では, 灌流直後および再接着後のいずれの電顕標本でも血管内膜障害を認めおらず, 適当な灌流が行われたと考えられる。

再接着肢の骨固定部では, X 線検査で旺盛な骨形成が観察されたが, これは骨組織にも十分な循環が保たれ, viable であったことを示している。

本実験により, FC による灌流で 24 時間に亘って切断肢保存が安定して行い得ることが確認され, 種々の条件さえ整えば, 本法の臨床応用も可能であると思われる。

結 語

1. 家兎後肢を大腿部で完全切断し, 1 時間低温阻血保存した後, 酸素加した 20% fluorocarbon emulsion を

10°Cの条件で持続灌流し、筋組織を含む切断肢を活きた状態で24時間保存することを試みた。

2. 灌流保存後に誘発筋電図で筋のviabilityを証明でき、切断肢の24時間保存に成功した。

3. 24時間後の筋肉を含む切断肢の再接着にて、Replantation toxemiaの発生を認めず、生きさせることができた。

4. 灌流保存により筋肉への影響は最小限に押えられた。

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師増原建二前教授、玉井進教授、ならびに終始直接の御指導、御協力をいただきました清水豊信博士、森田吉英博士に対し心より感謝いたします。また、組織学的観察に御協力いただきました三井宜夫助教授、木村通郎博士に深謝いたします。

(本研究の要旨は第4回日本整形外科学会基礎学術集会および第8回骨・関節・軟部組織移植研究会で発表した。)

文 献

- 1) Tamai, S.: Twenty years' experience of limb replantation-Review of 293 upper extremity replants. *J. Hand Surg.* **7**: 549, 1982.
- 2) Clark, L.C., Jr. and Gollan, F.: Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* **152**: 1755, 1966.
- 3) 清水豊信: 家兎切断肢の保存法に関する実験的研究—fluorocarbon emulsionの灌流による筋組織の保存. *奈医誌.* **34**: 81, 1983.
- 4) 森田吉英: 切断肢の保存に関する実験的研究. *奈医誌.* **38**: 260, 1987.
- 5) 玉井 進: 切断肢再接着に関する実験外科的研究. *日整会誌.* **37**: 375, 1963.
- 6) 木下光雄: 遊離筋肉移植に関する実験的研究—阻血とうっ血が移植筋に及ぼす影響について. *日整会誌.* **56**: 1707, 1982.
- 7) 薄井正道: “Replantation Toxemia”に関する実験的研究—切断阻血肢の冷却保存効果について. *日整会誌.* **52**: 663, 1978.
- 8) 村松郁夫: 阻血が切断肢筋組織の障害および代謝に与える影響. *日整会誌.* **55**: 713, 1981.
- 9) Lapchinsky, A.G.: Recent result of experimental transplantation of preserved limb and kidneys and possible use of this technique in clinical practice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **87**: 539, 1960.
- 10) Snyder, C. and Knowles, R.P.: Extremity replantation. *Plast. & Reconstr. Surg.* **26**: 251, 1960.
- 11) Onji, Y., Murayama, Y., Tamai, S., Hashimoto, T., Yamaguchi, T., Akiyama, H. and Tsujimoto, A.: Experimental surgery on resuscitation and reunion of amputated or nearly amputated leg. *Plast. & Reconstr. Surg.* **31**: 151, 1963.
- 12) 村井泰裕: 切断肢再接着に関する実験外科的研究のための pump oxygenator の構造について. *奈医誌.* **16**: 171, 1965.
- 13) 三橋二良: 切断肢再接着に関する実験外科的研究—主として病理組織学的研究について. *奈医誌.* **16**: 229, 1963.
- 14) 山口敏美: 切断肢の代謝に関する研究. *奈医誌.* **16**: 217, 1963.
- 15) 広岡靖隆: 切断肢再接着に関する実験外科的研究—主として再接着肢の機能を左右する因子と再接着術後の死因について. *奈医誌.* **16**: 448, 1963.
- 16) 福西博恒: 切断肢再接着後に起るショックの原因に関する研究. *奈医誌.* **19**: 127, 1968.
- 17) Harasima, T. and Buncke, H. J.: Study of washout solution for microvascular replantation and transplantation. *Plast. & Reconstr. Surg.* **56**: 542, 1975.
- 18) Hayhurst, J.W., O'Brien, B. McC., Ishida, H. and Baxter, T.J.: Experimental digital replantation after prolonged cooling. *Hand* **6**: 134, 1974.
- 19) Hicks, T.E., Boswick, J.A. and Solomons, C.C.: The effects of perfusion on an amputated extremity. *J. Trauma.* **20**: 632, 1980.
- 20) Maurer, W.G., Wilson, L.C. and Higgs, W.R.: The preservation of a traumatically amputated limb utilizing crystalloid cardioplegia solution: Case report. *J. Extracorp. Technol.* **14**: 453, 1982.
- 21) 清水豊信, 玉井 進, 保利喜英, 龍見良隆, 奥田寿夫, 中村義彌, 坂本博志, 田北武彦: 切断肢再接着における灌流についての考察. *整形外科* **26**: 1371, 1975.
- 22) Iwai, M., Yamada, N., Kono, N., Okamoto, H., Yokoyama, K., Suyama, T. and Naito, R.: Long-term preservation of canine kidneys: Perfusion with perfluorochemical emulsion. *Proc.*

- 4th Intern. Symp. Perfluorochemical Blood Substitutes, Kyoto, October 1978.
- 23) 鈴木二郎, 吉本高志, 溝井和夫: 脳梗塞の新しい治療法の開発. 北海道医誌. **56**: 367, 1981.
- 24) 吉井 尚, 森田吉英, 清水豊信, 増原建二: 脊髄急性阻血による脊髄誘発電位の波形変化—fluorocarbon emulsion の脊髄保護作用の検討. 中部整災誌. **31**: 753, 1988.
- 25) 浅井正大, 長沢博正, 和田栄二, 児玉直樹, 八木沢芳生, 赤星義彦, 浦野博秀: Fluorocarbon emulsion を利用した切断阻血肢の保存に関する実験的研究. 整形外科 **31**: 1416, 1980.
- 26) 坂田 仁: 切断肢保存における Fluorocarbon 灌流効果に関する実験的研究—Replantation Toxemia と筋組織障害に対する抑制効果について. 日整会誌. **58**: 497, 1984.
- 27) 高橋文人: 人工血液 (Fluosol-DA) 灌流による切断肢保存に関する実験的研究. 日整会誌. **61**: 1123, 1987.
- 28) **Smith, A.R.**: Limb Preservation in replantation Surgery. *Plast. & Reconstr. Surg.* **75**: 227, 1985.
- 29) **Bard, P.**: *Medical Physiology*. 10th ed., C.V. Mosby, St. Louis, p. 220-248, 1956.
- 30) 小浜啓次: 阻血肢の血流再開後における変化について. 中部整災誌. **12**: 555, 1969.