

## 目 次

はじめに	2
研究報告	4
I. 目的	4
II. 対象と方法	4
III. 結果	11
IV. 考察	21
V. 結論	23
VI. 謝辞	24
VII. 引用文献	25

## はじめに

切断肢の再接着では血流再開までに時間を要すると、その生着率や機能的予後に大きく影響する<sup>1,2</sup>。長時間に及ぶ虚血状態は非可逆的な組織壊死を起こし、その結果、重大な筋萎縮や機能不全となる。筋肉量の多い切断肢では再接着の限界は6-8時間と考えられている<sup>3,4</sup>。臨床の現場で再接着を行う際の指標に用いられる Mangled Extremity Severity Score では虚血時間が6時間を超えると点数が2倍となり、再接着における成績は悪化する<sup>5,6</sup>。さらに血流再開までに長時間を要すると、生着が困難となるばかりか、阻血壊死した筋組織から漏出した嫌気性代謝産物やカリウムが血流再開時に体内に流れ込み、急性腎不全やショックを引き起こすことが知られている(虚血再灌流障害)<sup>7</sup>。

臓器移植において臓器保存液は一般的に使用されるが、切断肢の保存では臓器保存液が用いられることはない。心移植や血管移植の技術進歩に伴い、心筋や平滑筋の保存研究も数多く報告されてきているが、骨格筋の移植は一般的に行わないこともあり、その基礎的な保存研究は多くない。しかし、一部の研究では臓器保存液が骨格筋の保存に有益であると報告されている<sup>8-10</sup>。これらの研究では保存した筋肉の状態の評価法としてアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) の測定や病理組織学的な変化、または電気刺激による筋収縮力などを検討している。切断肢移植後の機能的な回復を調べたものはほとん

どみられていない<sup>11</sup>。

近年、移植・再生研究の分野で生きた細胞や組織を即時に観察できる蛍光イメージング技術が進歩している。我々の研究班は臓器移植や再生医学、形成再建外科などに関する研究に用いるために、発光クラゲの遺伝子である Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を発現する GFP transgenic (GFP-Tg) ラットや蛍の遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだラット (Luciferase transgenic, Luc-Tg) の産出に成功した<sup>12-14</sup>。今回の研究では、阻血筋組織の活性の変化を評価するために Luc-Tg ラットを利用した。最長 24 時間まで筋肉を各種臓器保存液に浸漬して、その発光輝度を定量的に観察した。さらに、ラット下肢移植モデルを用いて、各種臓器保存液による下肢保存効果の有用性を機能的、組織形態学的に評価した。

# 研究報告

## I. 目的

ラット切断肢における臓器保存液の保存効果を機能的、組織形態学的に検討すること。

## II. 対象と方法

### 動物

10-12週の雄LEWラットを日本SLCから購入した。10-12週雄Luc-LEW Tgラットは当研究室で産生したものをを用いた。すべての外科的手技はペントバルビタール (40 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下に行い、麻酔維持に必要であれば15 mg/kgを腹腔内へ追加投与した。すべてのラットは最終評価の後に麻酔薬を過量投与して安楽死させた。すべての動物実験は自治医科大学実験動物委員会の勧告に則って行い、同ガイドラインに従った。

### 実験 1. *Luc-Tg* ラット筋組織保存実験 (図 1)

*Luc-Tg* ラットの大腿四頭筋を径 8 mm、高さ 3 mm、重量 0.5 g の円柱状に切離し、臓器保存液である細胞外液型トレハロース含有京都溶液 (extracellular-type trehalose containing Kyoto solution, ETK) (大塚製薬工場)、ウィスコンシン大学溶液 (University of Wisconsin solution, UW) (DuPont Merck Pharmaceutical 社) に 4°C で浸漬保存した。対照群として乳酸化リンゲル液 (Lactated Ringer's solution, LR) (大塚製薬工場) を用いた (各  $n=16$ ) (表 1)。浸漬後 0、1.5、3、4.5、6、9、12、24 時間で d-ルシフェリンを投与し、イメージングシステム (IVIS system) を用いて観察した。

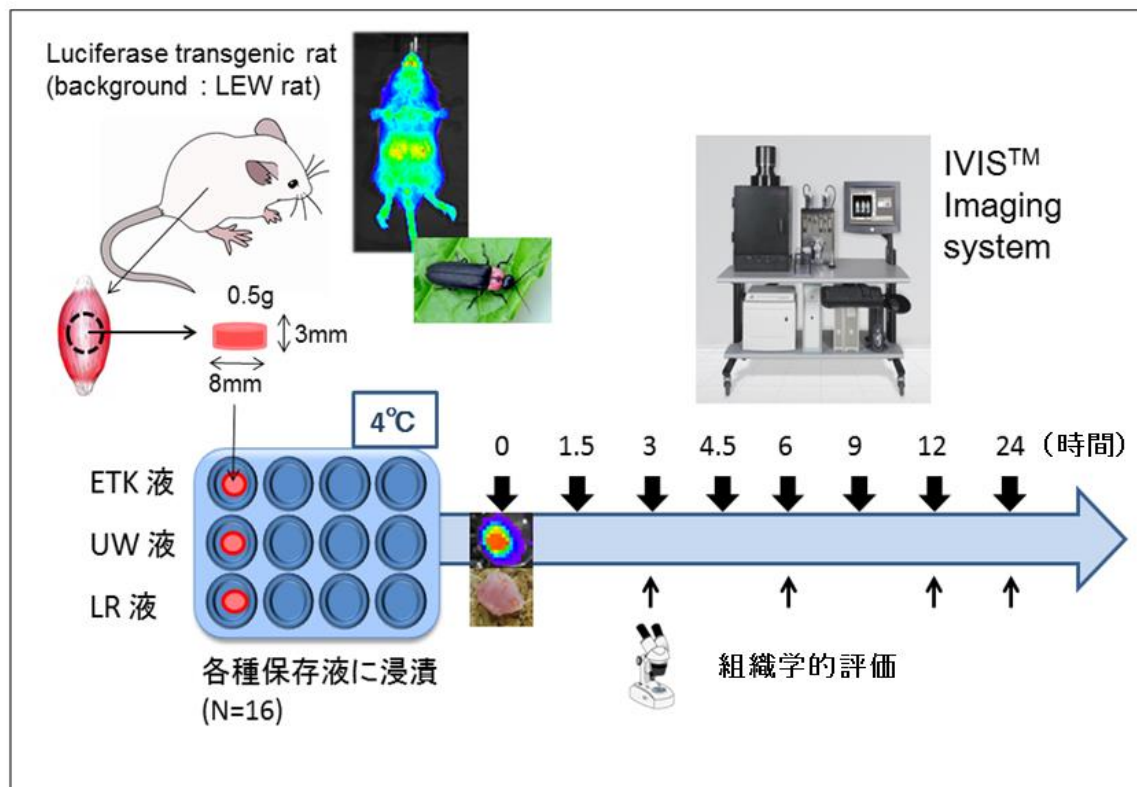


図 1 実験 1. Luc-Tg ラット阻血筋組織保存実験

	ETK	UW	LR
Na (mmol/L)	100	30	130
K (mmol/L)	44	125	4
Cl (mmol/L)	-	-	109
Mg (mmol/L)	-	5	-
Ca (mmol/L)	-	-	1.5
Gluconate (mmol/L)	100	-	-
Phosphate (mmol/L)	25	25	-
Sulfate (mmol/L)	-	5	-
Lactobionate (mmol/L)	-	100	-
Lactate (mmol/L)	-	-	28
Raffinose (mmol/l)	-	30	-
Adenosine (mmol/L)	-	5	-
Alloprinol (mmol/L)	-	1	-
Trehalose (mg/l)	41	-	-
Hydroxyethyl starch (mg/L)	30	50	-
Glutathion (mmol/l)	-	3	-
Osmorality (mOsm/L)	366	320	250

表 1 ETK 液、UW 液、LR 液組成表

## 組織学的評価

組織評価のため LEW ラットの大腿四頭筋を一塊に切離し、これを ETK 液、UW 液、LR 液に 4℃で 3、6、12、24 時間浸漬した (各  $n=5$ )。浸漬後 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋してヘマトキシリンエオジン (HE) 染色をした。中間広筋の横断面中央部を無作為に 10 視野評価した( $\times 200$ )。評価項目は(1)傷害筋細胞の割合 (過収縮した筋線維と円形状に変形した筋線維の割合)、(2)細胞間浮腫の割合とした (図 1)。1 視野での過収縮した筋線維と円形状に変形した筋線維の数を測定し、その割合を計算した。また、細胞間浮腫は間隙の面積の割合を計算した<sup>15,16</sup>。この計算はイメージ解析システム (ImageJ-1.44p, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) を用いて行った。

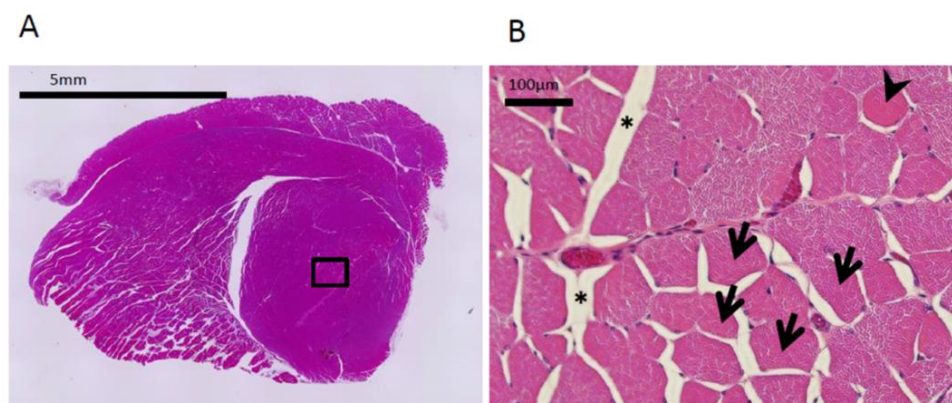


図 2

A 大腿四頭筋横断面像 (HE 染色)

B 図 2A フレーム部位の強拡大

- ▼ 過収縮した筋線維
- ▶ 円形状に変形した筋線維
- \* 細胞間の浮腫

## 実験 2. ラット切断肢の保存移植実験

LEW ラットの大腿部を中央の高さで切断し、直ちに ETK 液、UW 液、LR 液に浸して 4°C で 6 時間保存した (各  $n=5$ )。さらに長時間モデルとして LEW ラットの下肢を ETK 液、UW 液、LR 液に 24 時間 4°C で保存する群を作成した (各  $n=5$ )。保存後に LEW ラットに同系下肢移植を行った。下肢切断後直ぐに移植を行う対照群を作成した ( $n=4$ )。

### 外科的手技

切断肢の大腿骨髓腔内に 18 ゲージ針を刺入し、これを髄内釘として固定した。大腿動静脈、坐骨神経を 10-0 ナイロンで顕微鏡視下に縫合し、筋肉と皮膚は 4-0 ナイロンで縫合した (図 3)<sup>17</sup>。術後に抗凝固薬や抗生剤の投与は行わなかった。平均手術時間は約 60 分であった。下肢移植後に外頸静脈から 0.4 ml 採血し、CPK、AST、ALT、LDH、Cr、BUN、K を測定した。



図 3 右下肢移植後写真 (皮膚縫合前)



## 電気生理学検査

電気生理学検査は下肢移植後 8 週で行った。麻酔下にラット移植肢の皮膚と筋肉を切開し、坐骨神経を露出させた。誘発筋電図を針電極で記録した。坐骨神経の縫合部近位 10 mm で刺激した (1 秒間に 0.2 mA 単相パルス ; パルス持続時間は 1 ms)。前脛骨筋内に針電極を刺して記録した。電気刺激位置と針電極の記録位置の距離は 30 mm に一定した。筋刺激をしてから筋収縮するまでの時間を示す潜時 (latency time) と複合活電位の振幅 (amplitude) を記録した。

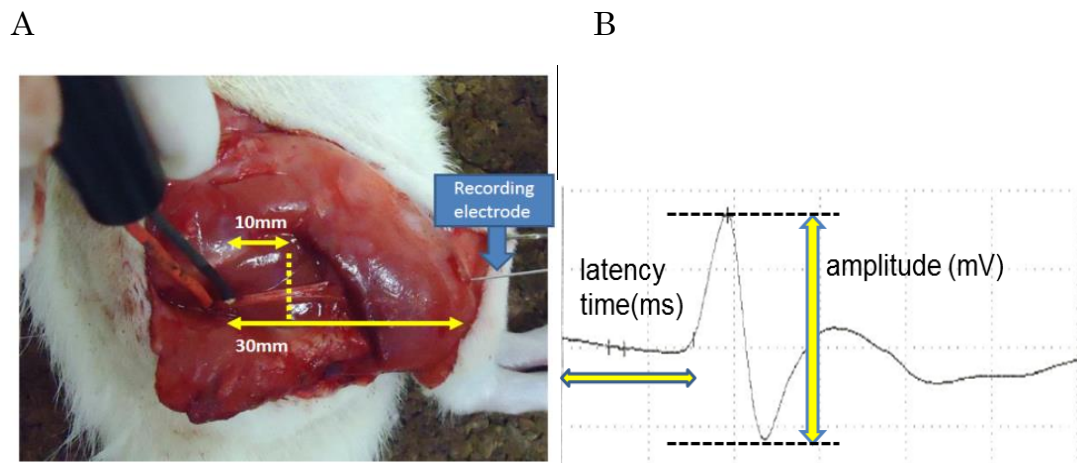


図 4 電気生理学検査

A 右坐骨神経の電気刺激写真

B 筋電計の波形 (潜時と振幅を測定)

### 組織学的評価

電気生理検査後に前脛骨筋を採取し、10%ホルマリン固定しパラフィン包埋した。標本はHE染色とマッソントリクローム染色を行った。横断面の筋線維の径と線維化した面積を測定した。無作為に100本の筋線維の径を測定し平均値を出した。またマッソントリクローム染色で青染される線維化組織の面積を測定した(1標本当たり200倍で無作為に10ヵ所)。測定にImageJ-1.44pを用いた。

### 統計学的評価

特に明記しない限り、値は平均値±標準偏差を示す。統計学的評価はスチューデントのt検定または一元配置分散分析法とTurkey多重比較試験を用いた。 $p<0.05$ をもって有意差ありとした。

### III. 結果

#### 1. バイオイメージングシステムでの筋組織活性の変化

ETK 液と UW 液で保存した筋組織は LR 液と比較して筋組織の発光が長時間保たれた (図 5A)。LR 群では保存後 1.5 時間で直ちにその発光量が低下したが、ETK 群では 12 時間の時点でその発光量は開始時の 6 割以上保たれた (図 5B)。

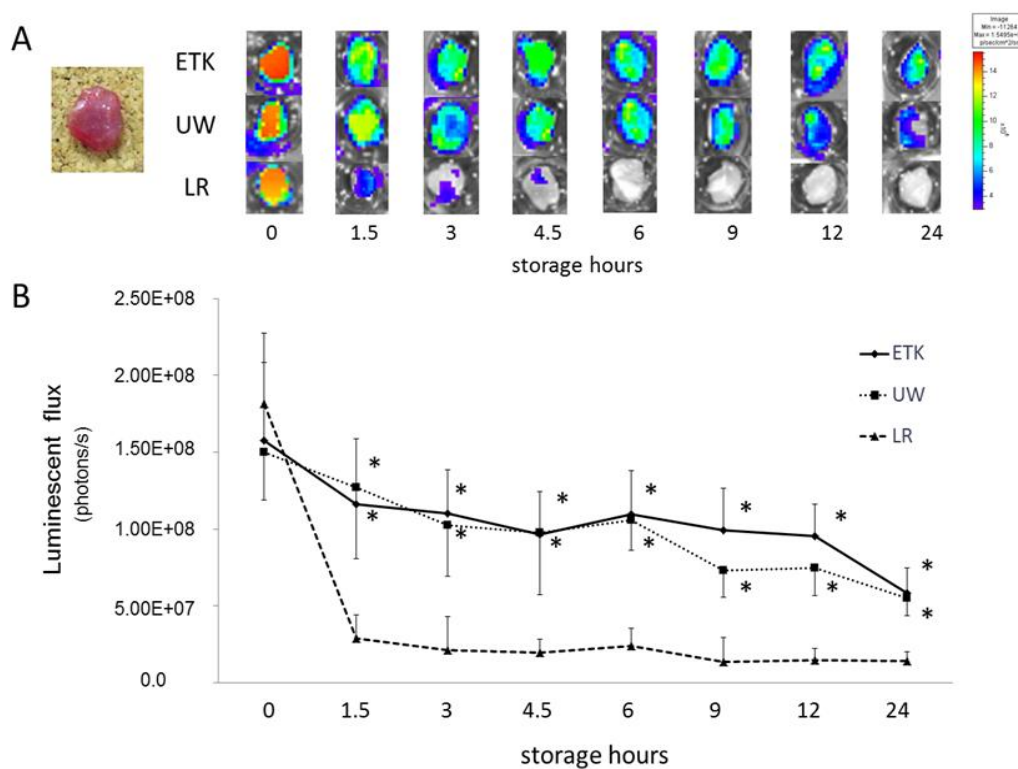


図 5 阻血筋組織の経時的発光輝度の変化

(A) バイオイメージングの観察で ETK 液と UW 液で保存された筋組織はその発光が維持されているが LR 液で保存されたものは直ちにその発光が低下している。(B) 各種保存液での経時的な発光量の変化である。ETK 群、UW 群ではその発光量が保たれているが、LR 群ではその発光量は直ちに低下している ( $n=16$ )。\* $p < 0.05$  vs LR

## 2. 組織学的評価の結果

組織学的に LR 群は保存後 3 時間で傷害細胞、浮腫の割合が高かった。すべての観察時間で傷害細胞の割合は ETK 群と LR 群間に有意差があった ( $p < 0.05$ ) (図 6A)。さらに ETK 群と UW 群は LR 群と比較して保存後 3、24 時間で浮腫の割合が有意に少なかった ( $p < 0.05$ ) (図 6B)。

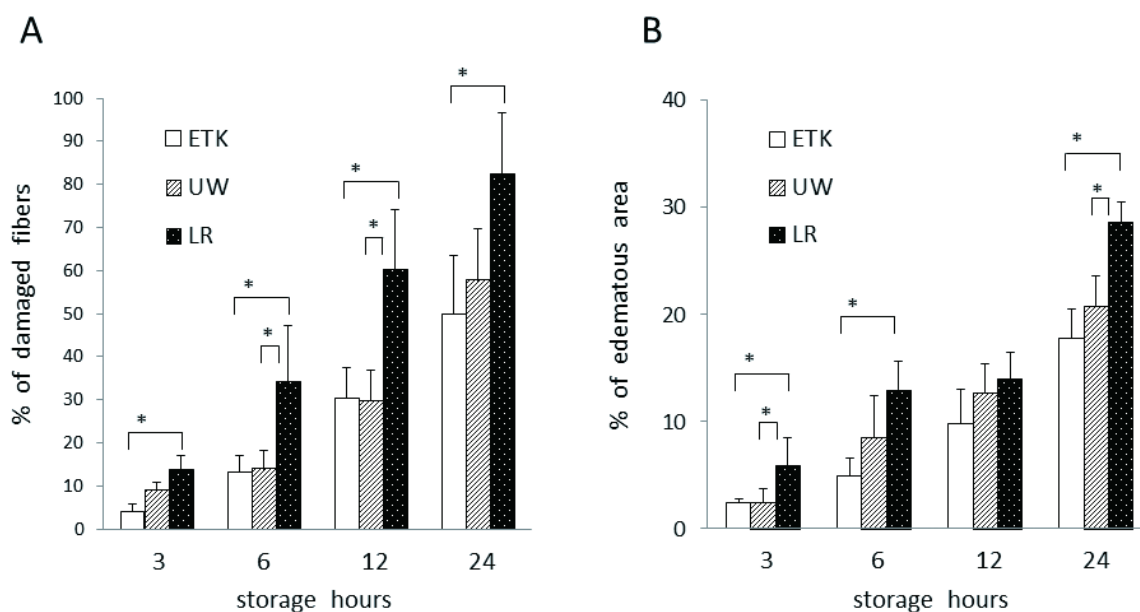


図 6 各保存液における阻血筋組織の経時的組織学的変化

- (A) 傷害細胞の割合はすべての観察時間で ETK 群が LR 群と比較して有意に少なかった。  
(B) 浮腫の割合は保存後 3 時間と 24 時間の時点で ETK 群と UW 群では LR 群と比較して有意に少なかった ( $n=5$ )。\* $p < 0.05$

### 3. 保存下肢移植の結果 (6 時間保存)

移植 8 週後の生存率はすべての群で 100%であった。移植後 8 週で電気生理検査、組織評価を行った。移植後 1 時間で血清 CPK、AST、ALT、LDH、Cr、BUN、K を測定した。CPK は ETK 群、UW 群と比較して LR 群で有意差があった(ETK 群  $5603 \pm 1032$  IU/L, UW 群  $6591 \pm 2149$  IU/L, LR 群  $17147 \pm 8989$  IU/L) ( $p < 0.05$ )。一方で K は UW 群で ETK 群と比較して有意差があった(ETK 群  $4.7 \pm 0.29$  mEq/l, UW 群  $5.4 \pm 0.36$  mEq/l, LR 群  $4.8 \pm 0.45$  mEq/l) ( $p < 0.05$ )。AST、ALT、LDH、Cr、BUN に有意差はなかった。

電気生理検査では筋電計で前脛骨筋の波形を調べた(図 7A)。3 群間に潜時に有意差はなかった(図 7B)。振幅は LR 群で ETK 群、UW 群と比較して有意差があった(図 7C)。

各保存液の組織像の代表例を図 8 に示す。筋線維の形態は 3 群とも保たれており、線維化の割合も 3 群間に有意差はなかった (ETK 群  $2.9 \pm 1.0\%$ , UW 群  $3.1 \pm 1.4\%$ , LR 群  $4.1 \pm 1.4\%$ )。一方で筋線維の径は LR 群で ETK 群と比較して有意差があった (ETK 群  $39.6 \pm 8.0$   $\mu\text{m}$ , UW 群  $35.5 \pm 5.5$   $\mu\text{m}$ , LR 群  $32.7 \pm 6.1$   $\mu\text{m}$ ) ( $p < 0.05$ )。さらに前脛骨筋の湿重量も ETK 群と LR 群で有意差があった(ETK 群  $0.66 \pm 0.10$  g, UW 群  $0.53 \pm 0.09$  g, LR 群  $0.49 \pm 0.04$  g) ( $p < 0.05$ )。

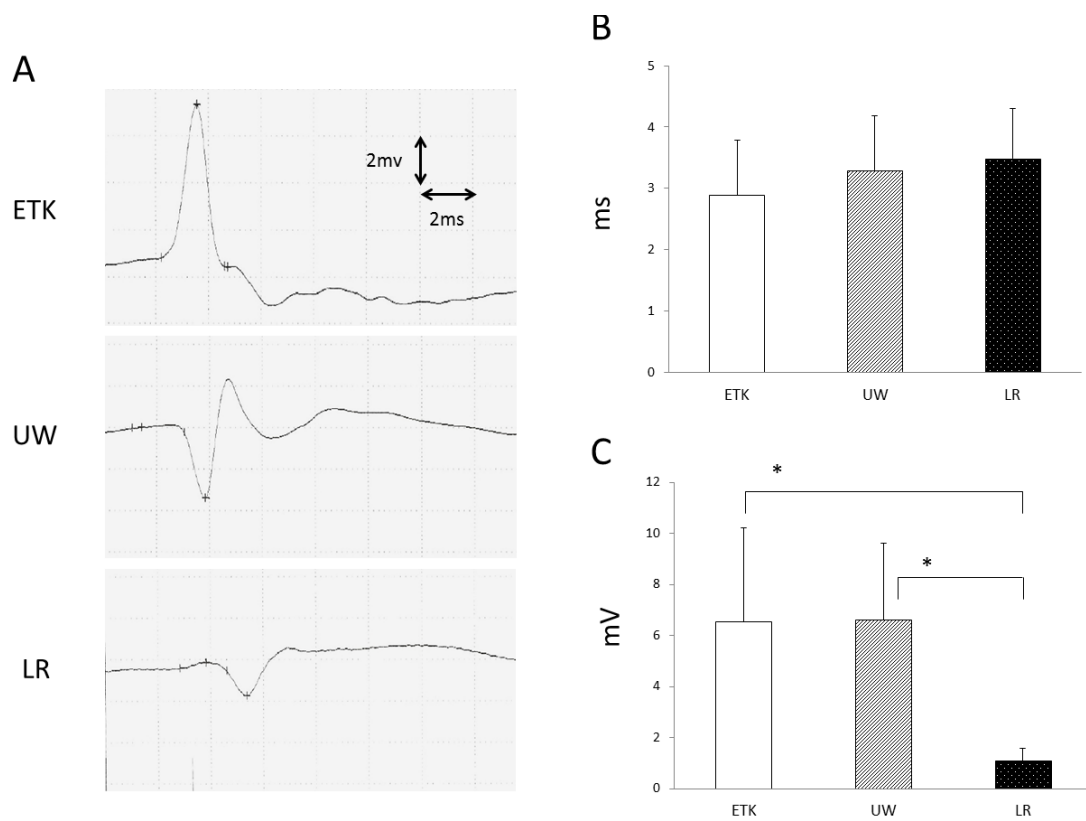


図7 電気生理学検査の結果 (6時間保存)

(A) 各群での代表的な波形を示す。1マスが縦2 mVで横2 msとなっている。(B) 潜時 (ms) と(C) 振幅 (mV) は坐骨神経を電気刺激して前脛骨筋で測定した。潜時は3群間に有意差はなかった。振幅はLR群でETK群、UW群と比較して有意差があった( $n=5$ )。\* $p<0.05$

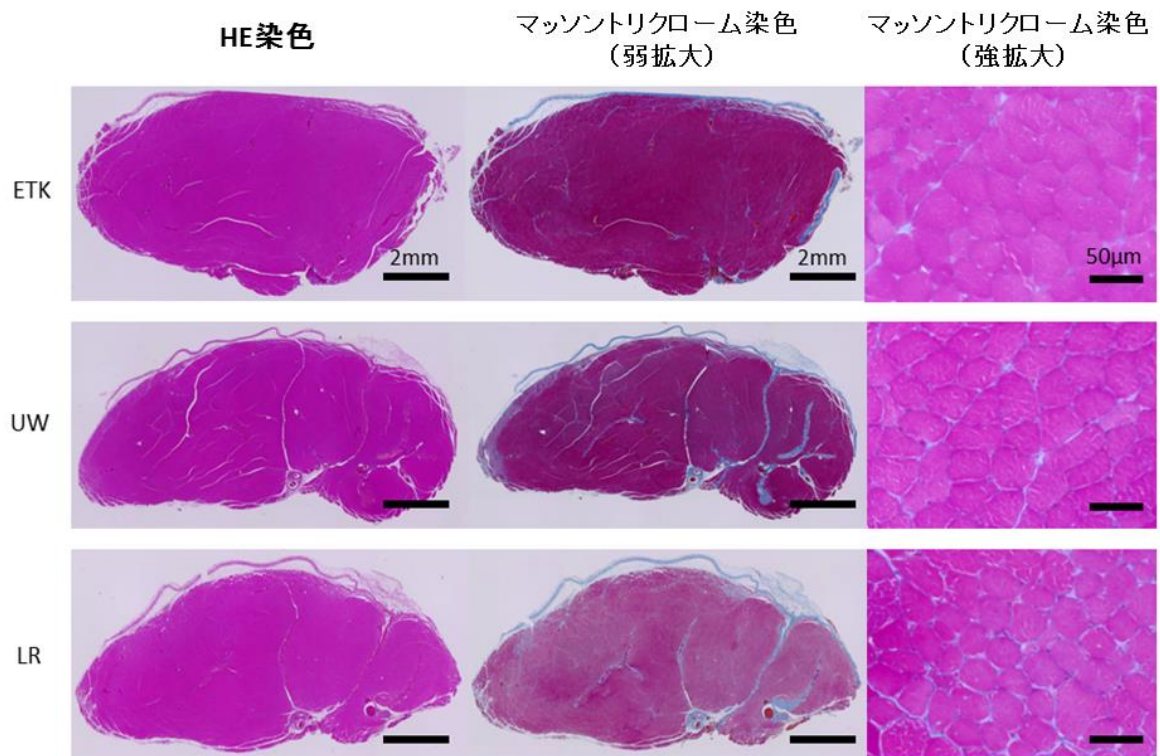


図 8 6 時間保存での前脛骨筋の組織像

下肢移植後 8 週間で前脛骨筋を採取して、横断面での HE 染色、マッソントリクローム染色を行った。3 群いずれも筋線維の形態は概ね保たれている。

#### 4. 保存下肢移植の結果 (24 時間保存)

移植 8 週後の生存率は対照群 100%、ETK 群 80%、UW 群 80%、LR 群 37.5% であった (表 2)。CPK は LR 群と他群で有意差があった ( $p < 0.05$ ) (図 5A)。CPK が 13000 IU/L 以上となった 6 匹中、5 匹は移植後 4 日以内に死亡した。K は対照群、ETK 群と比較して LR 群で有意差があった ( $p < 0.05$ ) (図 5B)。AST、ALT、LDH、Cr、BUN に有意差はなかった。

電気生理検査で LR 群は電気信号がなかった (図 10A)。潜時、振幅ともに対照群は ETK 群、UW 群と有意差があった ( $p < 0.05$ ) (図 10B、10C)。ETK 群と UW 群の潜時と振幅の結果は 6 時間保存時の結果と同等であった。

各群の組織像の代表例を図 11 に示す。マッソントリクローム染色で青染される線維化の面積は LR 群と他群で有意差があった (対照群  $4.0 \pm 0.4\%$ 、ETK 群  $6.5 \pm 1.4\%$ 、UW 群  $8.5 \pm 2.6\%$ 、LR 群  $29.4 \pm 2.0\%$ ) ( $p < 0.05$ )。筋線維径も LR 群で他群と有意差があった (対照群  $40.4 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 、ETK 群  $33.7 \pm 5.7 \mu\text{m}$ 、UW 群  $31.2 \pm 3.6 \mu\text{m}$ 、LR 群  $22.9 \pm 6.1 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0.05$ )。筋湿重量は対照群、ETK 群、UW 群で有意な差はなかった (対照群  $0.67 \pm 0.16 \text{ g}$ 、ETK 群  $0.51 \pm 0.09 \text{ g}$ 、UW 群  $0.42 \pm 0.13 \text{ g}$ 、LR 群  $0.23 \pm 0.06 \text{ g}$ )。



	n	生存期間(日)	生存率(%)
<b>対照</b>	4	>56, >56, >56, >56	100
<b>ETK</b>	5	5, >56*, >56*, >56*, >56*	80
<b>UW</b>	5	3, >56*, >56*, >56*, >56*	80
<b>LR</b>	8	3, 3, 3, 3, 4, >56*, >56*, >56*	37.5

\*下肢移植後56日で組織学的評価のため犠牲死させた

表 2 24 時間下肢保存群での移植後生存率

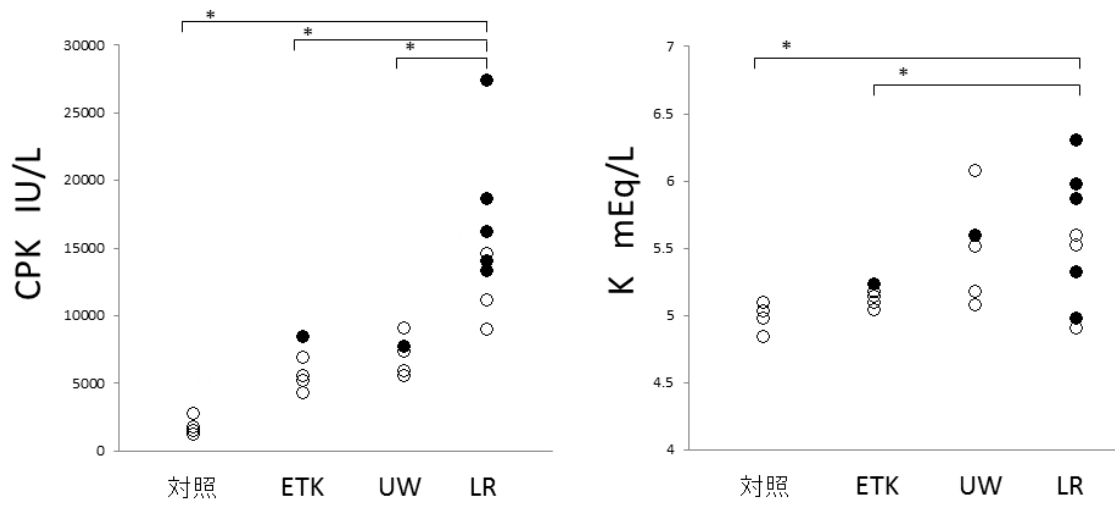


図9 24時間下肢保存実験での移植後1時間の血清CPKとK値

○が生存したラット、●は死亡したラット。(A) CPKが13000 IU/Lを超えた6匹の中で5匹は死亡した。(B) KはLR群で対照群、ETK群と比較して有意に高値であった。 $*p < 0.05$

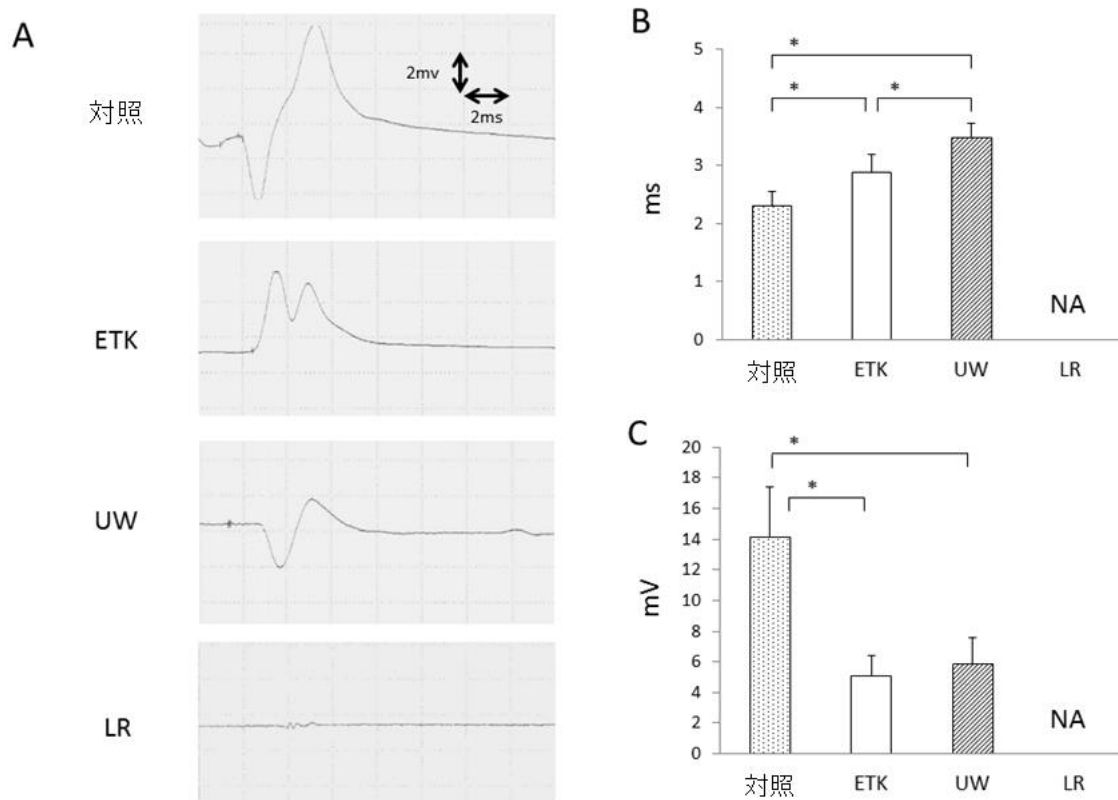


図 10 電気生理学検査の結果 (24 時間保存群)

(A) 各群での代表的な波形を示す。1 マスが縦 2 mV で横 2 ms となっている。(B) 潜時と (C) 振幅は坐骨神経を電気刺激して前脛骨筋で測定した。LR 群ではいずれのラットも電気信号をえることができなかった。ETK 群、UW 群の潜時、振幅は 6 時間保存での結果とほぼ同じ値であった。\* $p < 0.05$  NA: no assessment

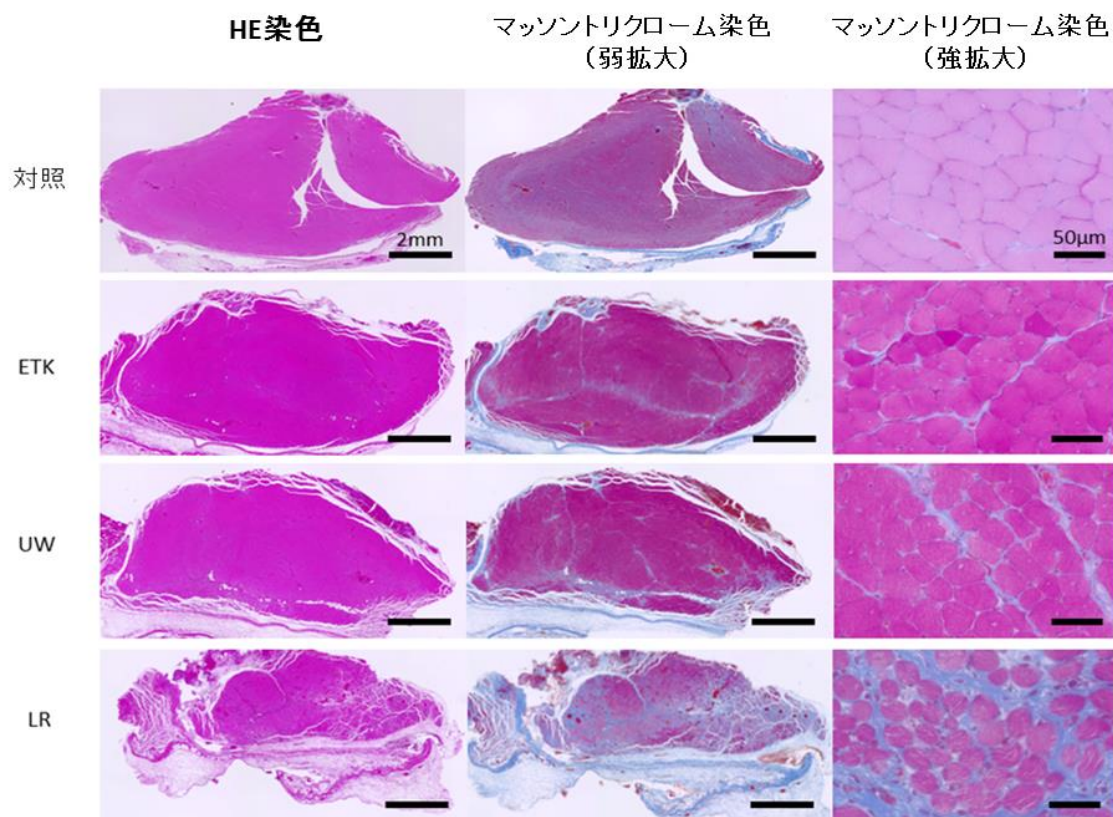


図 11 24 時間保存群での前脛骨筋の組織像

下肢移植後 8 週間での前脛骨筋横断面の HE 染色、マッソントリクローム染色。3 群いずれも筋線維の形態は概ね保たれている。マッソントリクローム染色で青染される線維化の面積は LR 群が他群と比べて大きくなっている。

#### IV. 考察

これまで筋組織や複合組織移植の保存に関する動物実験の報告では、臓器保存液の利用や保存温度の比較、組織灌流の効果などが検討されている<sup>18-20</sup>。しかし、筋組織を多く含む切断肢の保存に特化した臓器保存液などは開発されていない。また、臓器保存液での移植前灌流は臓器移植においては一般的であるが、切断肢に関しては灌流の効果は結論が出ていない<sup>19</sup>。また四肢切断などの外傷は病院外で起こるため、その搬送時の灌流操作は困難である。

今回の実験では細胞外液型の ETK 液と細胞内液型の UW 液を利用した。下肢移植後の血清 K は ETK 群が UW 群と比較して有意に低値であった。高 K 血症は虚血再灌流障害におけるショックの危険因子となる可能性があるため、筋組織の保存では細胞外液型保存液の安全性が高いと考えられる<sup>7,21,22</sup>。さらに ETK 液はその組成が化学的に安定しており、3 年以上の常温保存が可能である<sup>23</sup>。一方、UW 液は冷所保存が必須でグルタチオンの酸化のために早期に使用する必要がある<sup>24</sup>。切断肢など不慮の事故では、救急車内や診療所などに備蓄可能な ETK 液が有用と考える。

再接着の成功は移植肢の生着だけでなく、その機能回復も重要である。Song<sup>25</sup>と辻<sup>11</sup>はラット下肢移植後に電気生理学検査で機能的評価をした。我々も臓器保存液の機能的な保存効果を評価するために電気生理学検査を行った。この評

価では筋肉の機能回復だけではなく、神経再生も結果に影響を及ぼす可能性があるが、今回の結果では筋委縮や線維化と相関性が示された。

実験 1 では筋組織の活性を追跡するために Luc-Tg ラットを利用した。バイオイメージングで発光量を測定し、間接的に筋肉内 ATP 量を測ることで保存状態を評価した。バイオイメージングでの発光強度と細胞活性の相関性は以前に我々の研究班が報告している<sup>26</sup>。細胞における ATP の枯渇は結果として細胞活動を停止させる。これは Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> トランスポーターの活動は ATP 量に強く依存し、ATP の欠乏により Na が細胞内に流れ込み細胞浮腫を起こすためである<sup>27</sup>。それゆえ ATP 量を測定することは保存組織の変性を評価するのに一般的な方法となっている<sup>28</sup>。

24 時間保存での下肢移植では血清 CPK 値、K 値は LR 群で高値となり、移植後死亡率も高率となった。これは LR 群での筋組織の虚血変化が再灌流障害を起こし、さらに腎不全、心不全に至ったためと考えられた。対照的に ETK 群、UW 群は筋組織を虚血から保護することで生存率を保ったと推察された。

## V. 結論

ラット下肢移植モデルを用いて臓器保存液の効果を示した。ETK 液と UW 液は機能的、組織形態学的に筋組織を保護する可能性が示唆された。さらに ETK 液、UW 液は長期保存において虚血再灌流障害を予防する可能性がある。

## VI. 謝辞

本研究に関わる仕事、論文の執筆に当たり、御指導を頂きました先端医療技術開発センター先端治療開発部門の小林英二客員教授、寺谷工講師に厚く御礼を申し上げます。

整形外科学教室の前教授であられる星野雄一先生をはじめ整形外科教室の皆様にも深く御礼を申し上げます。特に講師の安食孝士先生にはマイクロサージャリー技術の指導をはじめ細部に御指導を頂きました。この場を借りて深謝致します。



## VII. 引用文献

1. Chen ZW, Meyer WE, Kleinert HE, Beasley RW. Present indication and contraindication for replantation as reflected by long-term function results. *Orthop Clin NAm.* 1981 ; 12 : 849
2. Leclere FM, Mathys L, Juon B, Franz T, Unqlaub F, Vogelin E. Macroreplantations of the upper extremity: a series of 11 patients. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012 ; 132 : 1797–1805.
3. Gold AH, Lee GW. Upper extremity replantation: Current concepts and patient selection. *J Trauma.* 1981 ; 21 : 551–557.
4. Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg.* 1991 ; 26 : 77–84.
5. Melton SM, Croce MA, Patton JH, et al. Popliteal artery trauma systemic anticoagulation intraoperative thrombolysis improves limb salvage. *Ann Surg.* 1997 ; 225 : 518–529.
6. Prichayudh S, Verananvattna A, Sriussadaporn S, et al. Management of upper extremity vascular injury: outcome related to the Mangled Extremity Severity Score. *World J Surg.* 2009 ; 33 : 857–863.
7. McCutcheon C, Hennessy B. Systemic reperfusion injury during arm replantation requiring intraoperative amputation. *Anaesth Intensive Care.* 2002 ; 30 : 71–73.
8. Yokoyama K, Kimura M, Itoman M. Rat whole-limb viability after cold immersion using university of Wisconsin and Euro-Collins solution. *Transplantation.* 1996 ; 62 : 884-888.

9. Heijden EP, Kroese AB, Werker PM, et al. Improving the preservation of isolated rat skeletal muscles stored for 16 hours at 4 degrees C. *Transplantation*. 2000 ; 69 : 1310-1322.
10. Norden MA, Venkat KR, James HS. Improving preservation of rat hindlimbs with the University of Wisconsin Solution and Butanedione Monoxime. *Plast Reconstr Surg*. 1993 ; 100 : 957-965.
11. Tsuji N, Yamashita S, Sugawara Y, Kobayashi E. Effect of prolonged ischemic time on muscular atrophy and regenerating nerve fibers in transplantation of the rat hind limb. *J Plast Surg Hand Surg*. 2012 ; 46 ; 217–221.
12. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, et al. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg*. 2103 ; 257 ; 542–547.
13. Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. “Firefly rats” as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation*. 2006 ; 81 : 1179–1184.
14. Yamaguchi A, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2011 ; 127 : 78-87.
15. Heijden EP, Kroese AB, Stremel RW, Bar PR, Kon M, Werker PM. Contractile properties of rat skeletal muscles following storage at 4 degrees C. *Clin Sci*. 1999 ; 97 : 45-57.

16. Miriam CJ, Heijden EP, Oosterhout MF, Kon M, Kroese AB. Contractile and morphological properties of hamster retractor muscle following 16 h of cold preservation. *Cryobiology*. 2009 ; 59 : 308–316.
17. Ajiki T, Takahashi M, Inoue S, et al. Generation of donor hemato-lymphoid cells after rat limb composite grafting. *Transplantation*. 2003 ; 75 : 631–636.
18. Nakagawa Y, Ono H, Mizumoto S, Fukui A, Tamai S. Subzero nonfreezing preservation in a murine limb replantation model. *J Orthop Sci*. 1998 ; 3 : 156–162.
19. Tsuchida T, Kato T, Yamaga M, et al. The effect of perfusion with UW solution on the skeletal muscle and vascular endothelial exocrine function in rat hindlimbs. *J Surg Res*. 2003 ; 110 : 266–271.
20. Chin KY, Hart AM. Temporary catheter first perfusion during hand replantation with prolonged warm ischemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011 ; 65 : 675–677.
21. Juang SE, Huang HW, Cao CW, et al. Effect of university of Wisconsin and histidine-tryptophan-ketoglutarate preservation solutions on blood potassium levels of patients undergoing living-donor liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012 ; 44 : 366-368.
22. Waikumal S, Vanadurogwan V, Unnanuntana A. Prognostic factors for major limb re-implantation at both immediate and long term follow up. *J Bone Joint Surg Br*. 1998 ; 80 : 1024-1030.

23. Yoshida H, Okuno H, Kamoto H, et al. Comparison of the effectiveness of ET-Kyoto with Euro-Collins and University of Wisconsin solution in cold renal storage. *Transplantation*. 2002 ; 74 : 1231–1236.
24. Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplant. *Transplant Proc*. 1999 ; 31 : 2069-2070.
25. Song YX, Muramatsu K, Kurokawa Y, et al. Functional recovery of rat hind-limb allografts. *J Reconstr Microsurg*. 2005 ; 21 : 471–476.
26. Negishi K, Teratani T, Iwasaki J, et al. Luminescence technology in preservation and transplantation for rat islet. *Islets*. 2011 ; 3 : 111–117.
27. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 ; 83 : 1289–1298.
28. Lindgard A, Lundberg J, Rakotonirainy O, Elander A, Soussi B. Preservation of rat skeletal muscle energy metabolism by illumination. *Life Sci*. 2003 ; 72 : 2649–2658.