



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 角膜の凍結乾燥   |
| Author(s)        | 根井, 外喜男; NEI, Tokio; 竹内, 光彦   |
| Citation         | 低温科学. 生物篇, 19, 95-105   |
| Issue Date       | 1961-12-20  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/17655">https://hdl.handle.net/2115/17655</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 19_p95-105.pdf  |



## 角 膜 の 凍 結 乾 燥\*

根 井 外 喜 男  
(低温科学研究所 医学部門)

竹 内 光 彦  
(国立札幌病院 眼科)  
(昭和36年7月受理)

### I. 緒 言

1958年に我国に角膜移植法が制定され、眼球銀行が設立されるようになってきた。しかし、現在ではまだ眼球の入手には種々の隘路があるので、角膜移植に際して随時新鮮材料を入手することは極めて困難である。従って特志家(殆んど死者)よりの提供をまって常時保存しておく必要があり、その為には超低温凍結保存又は凍結乾燥保存が不可欠の条件となってくる。

著者の1人竹内は既に1957年以来角膜移植材料長期保存の研究を行ない、その方法の1つとしてグリセリン加凍結保存法を実施し、動物による同種角膜移植の実験成績<sup>1)</sup>並に臨床成績<sup>2)</sup>を発表している。

著者等は1958年以来、これら凍結保存実験と平行して、更に長期保存が容易であり、また輸送にも有利であるところの角膜凍結乾燥を試みてきた。

一方諸外国の文献によれば、角膜の凍結乾燥に関して相当多数の報告が既に発表されている。その方法を概括すれば、角膜をそのままか或いはグリセリンに浸した後、かなり低い温度まで凍結させて真空乾燥を行なったものである。それらの乾燥試料を生理食塩水又は血清で復水した後、人或いは動物に移植したところ、透明化するものもあれば、溷濁したものもあるという結果で、その成績はかなりまちまちであった。

それらの報告をいまいし具体的に紹介すれば、先ず Weiss and Taylor (1944)<sup>3)</sup> はマウスの角膜を $-40^{\circ}\text{C}$ で凍結し、 $\text{P}_2\text{O}_5$ を使って乾燥し、リングル液で復水してほぼ正常状態の角膜を得、これを全層移植して透明化したという。次いで Katzin (1947)<sup>4)</sup> 或いは Leopold and Adler (1947)<sup>5)</sup> 等は同様の方法で家兎を用いて実験し、ほぼ正常に近い角膜を得たが、移植実験では溷濁して不成功であった。その後 McNair and King (1955)<sup>6)</sup> は猫の全角膜を用い、前処置としてグリセリンに浸した後、ドライアイス・アルコールで予備凍結を行ない真空乾燥をした。復水には生理食塩水を用い、正常外観又は白濁した角膜を得た。これを材料として同種表層移植を行ない透明例を得たことを報告した。Bonhoure (1955)<sup>7)</sup> は方法は不明であるが、人角膜を凍結

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第592号

乾燥し血清で復水したものが成功したとっている。Nicolato et Morone (1957)<sup>9)</sup> はグリセリンを用いて人眼を凍結乾燥し、それを表層移植して成功しているようである。しかし Alberth (1957)<sup>9)</sup> は人眼の乾燥材料を移植したが、溷濁して残ったと報告している。King (1957)<sup>10)</sup> は先の実験を更に進め、動物及び人の全角膜を 95% グリセリンに浸して前処理した後、最初  $-79^{\circ}\text{C}$  に冷して真空乾燥を行ない室温に保存した。使用に際しては生理食塩水に抗生物質を加えた液に浸した。再生角膜は白濁又は透明で、これを同種表層移植した結果は透明化し治癒した。Hénaff et Rey (1957)<sup>11)</sup> は液体窒素、ドライアイス・アルコール等を用いて凍結速度を 4 段階に分け、 $-50^{\circ}\text{C}$  に冷しながら 12 時間乾燥を続けた結果、移植成績は凍結速度により異なり、速度の大きいほど成績が良かった。また Payrau, Bonel et Guyard (1958)<sup>12)</sup> は Hénaff らと同様の方法を詳細に述べ、内容を除去した眼球を金属台につけて直接ドライアイス・アルコール内で急速凍結したものが最も実用的であると結論し、これらを用いて同種並に異種角膜移植に成功したと報告している。Günther und Gebhardt (1959)<sup>13)</sup> は人角膜を  $-180^{\circ}\text{C}$  で予備凍結し真空乾燥した材料を復水して表層移植したが、その結果については不満足であったとっている。

さて著者等も、これらの報告にあらわれたものと大同小異の方法を用いていろいろと検討してみたが、いずれも不成功に終わった。ただ Meryman (1959)<sup>14)</sup> (1960)<sup>15)</sup> が精液の乾燥に成功したと称する減圧自働凍結乾燥法を用いて、ようやく満足すべき成績を得たので、その結果について報告する。

## II. 実験方法

### 1. 実験材料

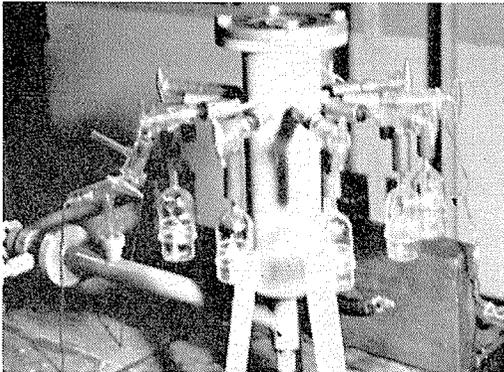
成熟家兎を用い、窒息致死後直ちに無菌的に眼球剔出を行ない、それから更に鞏膜側 2~3 mm をつけた全角膜をとり出して材料とした。

### 2. 凍結乾燥方法

凍結乾燥機は吾々が常時使用している多岐管式のもので、凝縮器には液体窒素を用い、ロータリーポンプは排気量 100 l/min, 到達真空度  $3 \times 10^{-3}$  mmHg のものである。試料を入れる容器は容量約 50 cc の磨り合わせガラス製のものである。

凍結並に乾燥の方法は、種々の組合せで行なってみた。予備凍結を行なったものは、先ず剔出全角膜を鋼製又はガラス製の半球に被せて、そのまま  $-30^{\circ}\text{C}$  の低温室中に放置して空気冷却で緩慢に凍結させるか、或いは直接液体窒素中に浸して急速に凍結させた後、前記ガラス容器中に移して、多岐管にとりつけ減圧を開始する。乾燥過程での温度については、試料を入れた容器をそのまま室温に露出した場合と、 $-50^{\circ}\text{C}$  に冷却した場合とがある。前者では 3 時間ではほぼ乾燥が完了し、後者では 24 時間おいてみた。

予備凍結を行わずいわゆる減圧自働凍結を行なうものは、角膜をそのまま容器中に吊り下げて、直ちに乾燥機が多岐管に接続し減圧を開始する。真空に達すると角膜から急激に水分がとられるので、蒸発の潜熱の為に角膜はほぼ瞬間的に凍結する。減圧開始後大体 5 秒前後で、どこか一部が白くなると忽ち全体に拡がって白濁する。これは氷晶のできたことを示すもので、



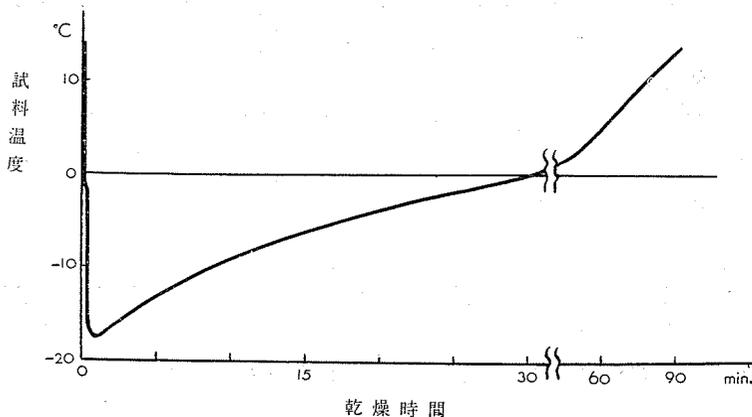
第1図 多岐管式凍結乾燥装置



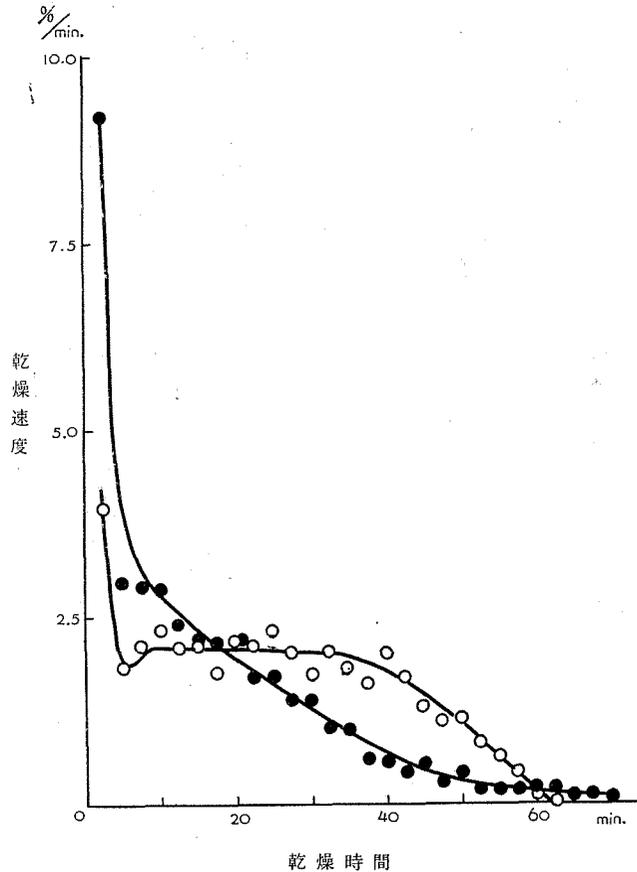
第2図 容器内に吊り下げた角膜

寒剤を用いなくても蒸発によって自働凍結がおきたわけである。このようにして一旦試料が凍結してしまえば、あとは通常の予備凍結を行なったものと同一の乾燥経過を辿る。この自働凍結による乾燥過程を検討する目的で、乾燥過程の温度変化、及び重量変化をしらべた。温度の測定は熱電対(径 0.1 mm の銅・コンスタンタン)を角膜に密着させて行なった。但し乾燥がかなり進むと、熱電対の先端が角膜表面から離れやすいので、乾燥末期には必ずしも正確に試料温度を示していないことがある。その温度の消長を記録すると第3図に示す如く、5秒で凍結が始まり急激に温度が低下して、1分で最低温の  $-18^{\circ}\text{C}$  に達する。その後は徐々に上昇し、1時間半でほぼ室温まで戻った。

また試料の重量変化から乾燥過程、特に自働凍結前の蒸発による水分量を知りたいと考えて、吉本等<sup>16)</sup>がかって考案した装置を用いて側定した。但しこの装置は別に設けられたもので



第3図 自働凍結乾燥過程の試料の温度曲線



第4図 自動凍結乾燥の過程の角膜の乾燥速度・時間曲線  
○そのまま ●グリセリン・リンゲル液に浸したもの

乾燥に関与する諸因子が多岐管式乾燥機の場合と必ずしも一致しない。従って乾燥所用時間などは異なるかもしれないが、全体としての傾向はつかめるわけである(第4図)。

### 3. 再生法(復水法)

以上のような種々の方法で乾燥した材料を室温で次の液に浸して復水再生させ、どれが再生に最も有効であるかをしらべた。

- 1) 生理食塩水
- 2) 家兎血清
- 3) 20% デキストラン液, 又は20% PVP (polyvinyl pyrrolidone) 液に一旦浸し, 透明化した後, 更に生理食塩水に移す。
- 4) 20% グリセリン・リンゲル液に浸し, 透明化後, 生理食塩水に移す。

### 4. 移植法

復水再生した全角膜は, 鋼半球又はコルク台に固定し, 深さ0.4mmにガードをセットし



第 I 表 (つづき)

| 番号 | 予 備 凍 結         |     |      |     | 乾 燥    |     | 復 水 再 生          |              |     | 同種表層<br>角膜移植 |
|----|-----------------|-----|------|-----|--------|-----|------------------|--------------|-----|--------------|
|    | 試 料             | 速 度 | 到達温度 | 時 間 | 温 度    | 時 間 | 溶 液              | 時 間          | 所 見 |              |
| 23 | 吊り下げる           |     |      |     | 減圧自動凍結 | 3時間 | 20% PVP<br>生 塩 水 | 20 分<br>1 時間 | 殆透明 | 成 功          |
| 24 | "               |     |      |     | "      | "   | 生 塩 水            | 5~30分        | 透明  | 不成功          |
| 25 | "               |     |      |     | "      | "   | 20% PVP<br>生 塩 水 | 20 分<br>1 時間 | 殆透明 | "            |
| 26 | "               |     |      |     | "      | "   | 生 塩 水            | 20 分         | 透明  | "            |
| 27 | "               |     |      |     | "      | "   | "                | "            | "   | 家兎死亡         |
| 28 | "               |     |      |     | "      | "   | 20% G-R          | 3時間30分       | "   | 成 功          |
| 29 | "<br>(20% G-R)* |     |      |     | "      | 5時間 | "                | 5~30分        | "   | 事 故          |
| 30 | "<br>(20% G-R)  |     |      |     | "      | "   | 生 塩 水            | "            | "   | 不成功          |
| 31 | "               |     |      |     | "      | 3時間 | "                | 20~30分       | "   | 成 功          |
| 32 | "               |     |      |     | "      | "   | "                | "            | "   | 不成功          |
| 33 | "<br>(20% G-R)  |     |      |     | "      | 5時間 | "                | 5~20分        | "   | 成 功          |
| 34 | "<br>(20% G-R)  |     |      |     | "      | "   | 20% G-R<br>生 塩 水 | 3~30分<br>5分  | "   | "            |
| 35 | "               |     |      |     | "      | 3時間 | 生 塩 水            | 7~30分        | "   | "            |
| 36 | "               |     |      |     | "      | "   | "                | 10~40分       | "   | "            |
| 37 | "<br>(20% G-R)  |     |      |     | "      | 5時間 | "                | 5~45分        | "   | 一部成功         |
| 38 | "<br>(20% G-R)  |     |      |     | "      | "   | "                | 5分~2時間       | "   | 成 功          |

\* G-R: グリセリン・リンゲル液

第 I 表中に記載された実験例について、更に詳しく述べる。

### 1. -30°Cまで緩慢に凍結した場合 (No. 1~10, 13, 14)

-30°Cに到達後更にその温度に20~30分或は20時間おいてから、乾燥機にとりつけ室温で乾燥した。乾燥後24時間真空のまま室温に保存した。復水はやはり室温で行ない、生理食塩水又は血清を加えた時は1~2時間で角膜内に僅かに気泡を残すが殆んど透明化し柔軟になった。20%デキストランを用いて復水すると2時間浸しても完全に透明にならなかったが、それを更に生理食塩水に移すとほぼ透明になった。鋼又は硝子半球を用いた場合、鋼半球の方が角膜に濃い白濁を残さず透明化には良いように思われた。

これらの試料は移植後、第1週初期には透明又は半透明であるが、末期には白濁が強くなり、8~10日目に多くは脱落した。No. 5及び6は第2~3週まで癒着していたが、遂に透明治癒に至らなかった。

### 2. -196°Cまで急速凍結した場合 (No. 11, 12, 15, 16)

全角膜を鋼半球に被せて液体窒素中に直接浸して-196°Cまでの急速凍結を行ない、更にこれを-30°Cの低温室に15時間おいてから(乾燥の時間的な都合の為)、室温で7時間真空乾

乾燥したものである。復水に家兎血清又はデキストランを用いたが、血清の方がやや透明化が遅かった。移植後は始めはいずれも透明であるが、1週間前後で移植片はすべて脱落した。No. 17, 18 は特に眼球をそのまま液体窒素に浸したもので、眼球は破裂し乾燥によって更に甚だしくなり、復水状態も全角膜の場合より不良であって移植材料として不適當であった。

### 3. 急速凍結後 $-50^{\circ}\text{C}$ に冷却しながら乾燥した場合 (No. 19~22)

剔出した全角膜を金網で半球状に作ったものの上に被せ、直接液体窒素中に浸して急速凍結させ、乾燥機にとりつけてからは容器外部を  $-50^{\circ}\text{C}$  に冷却しながら 24 時間乾燥を続けた場合である。復水は 20% PVP 又は生理食塩水で行なった。PVP を用いた時は 2~3 時間後でもあまりよく透明化せず、生理食塩水に移してから 2~4 時間たって漸く一部透明化した。最初から生理食塩水のみで再生した場合は 2 時間でかなりよく透明化した。金網に接した部分は濁っていた。その移植成績はいずれも不良であった。

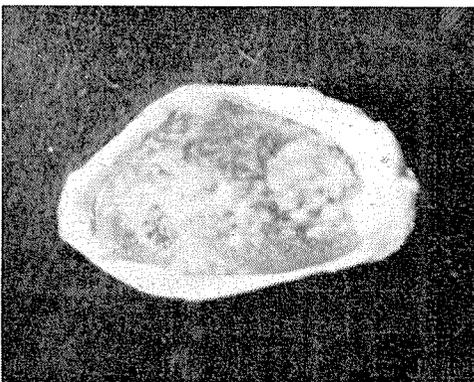
### 4. 減圧自働凍結乾燥した場合

#### a) 角膜をそのまま乾燥したもの (No. 23~28, 31, 32, 35, 36)

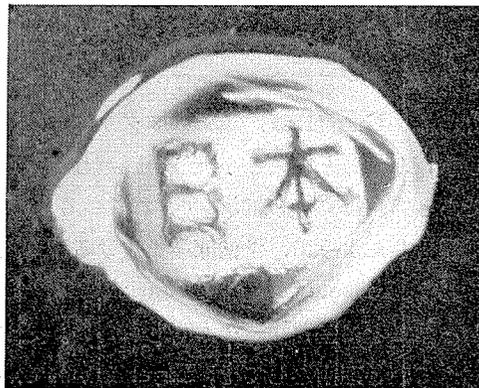
実験方法の項で述べたように、予備凍結を行わず減圧によって自動的に凍結を起させた後乾燥した。乾燥後数時間或いは 2~3 日間室温に真空保存し、 $27\sim 30^{\circ}\text{C}$  で PVP、生理食塩水、20% グリセリン・リンゲル液等で復水再生させた。

そのうち PVP で再生したものは、20 分後でもあまり透明化せず、生理食塩水に移して 30 分たってもまだ角膜中央に 1/3 大の白濁を残し、更に 1 時間たって漸く表層に僅かの溷濁を残すだけで透明柔軟となった (No. 23, 25)。移植後の所見は、No. 23 は一時白濁したが 4~5 週でほぼ透明化した。しかし No. 25 は 5 カ月でもなお白濁していた。

生理食塩水で復水したものは、大半が 20 分以内に殆んど透明化し、30 分後には表層に薄い微濁を残すだけで活字を透視することができた。弾性も旧に復し、肉眼的には新鮮角膜とほぼ同様だった (第 5, 6 図) (No. 24, 26, 27, 31, 32, 35, 36)。移植成績は 7 例中 4 例が一時軽度の白濁後透明化治癒し、3 例が脱落した。



第 5 図 自働凍結乾燥角膜



第 6 図 第 5 図のものの生理食塩水復水 30 分後

20% グリセリン・リングル液で復水したものでは、1 時間以内は角膜内に気泡が残ったが、3 時間半で完全に透明柔軟化した。移植後 2 週で透明化し治癒した。

b) 20% グリセリン・リングル液で前処置したもの (No. 29, 30, 33, 34, 37, 38)

20% グリセリン・リングル液に浸した角膜を自働凍結乾燥した。復水には同じ 20% グリセリン・リングル液、又は生理食塩水を用いた。いずれも 5 分以内で殆んど透明化し、20~30 分で表面のごく僅かの白濁を除いて殆んど全く透明且つ柔軟になった。これら 6 例の移植成績透明治癒したもの 3 例、白濁又は脱落したもの 3 例であった。

以上のように減圧自働凍結乾燥を行なったものの復水再生時の所見では、16 例全例に完全に透明化がみられた。予備凍結を行なった後乾燥したものに比較して、肉眼的にかなりまさり、組織膨化、上皮脱落、白濁痕跡等がみとめられなかった。これら減圧自働凍結乾燥の中、グリセリン前処置を行なったものは、行なわないものに比較して、復水再生時の透明化がやや早いように思われたが、30 分後の所見では大差はなかった。再生に PVP やグリセリンを用いると復水に多くの時間を要し、しかも組織に軽い膨化がみられるようなので、余り好ましくなかった。

#### IV. 臨床例 (3 例)

以上の動物実験の成績に鑑みて、減圧自働凍結乾燥角膜の臨床的応用を試みた。材料は死後 3 時間以内に剔出した人眼球で、前述と同様の方法で自働凍結させ、凡そ 5 時間乾燥したものである。これを真空中に封入したまま室温又は 5°C の低温室に保存し、10 日及び 5 カ月後に使用した。この時の所見は、乾燥直後と同様灰白色を呈しているが、生理食塩水を加えて復水させると、5 分くらいで殆んど透明化した。2 時間後抗生物質加生理食塩水に浸してから、患者に移植した。その成績は最初やや半透明であったのが、次第に透明化し、2 例は 2 カ月後には完全に透明治癒し、1 例は 4 カ月後に内皮の一部に白濁を残した。移植片には萎縮、脱落等の徴候は全く認められない。

#### V. 考 察

既に緒言で述べたように、角膜の凍結乾燥を試みたものは十指に余る。それらの乾燥の方法は殆んどすべて角膜そのまま、またはグリセリンを加えて予備凍結を行なった後乾燥したものである。King (1957)<sup>10)</sup> は 95% グリセリンに浸した後、真空乾燥を行なっているが、これは真の意味の乾燥といえるかどうか疑わしい。これら凍結乾燥角膜の移植後の成績は良、不良種々であって、どの方法が特にすぐれているとはつきり云えないようである。ただ Hénaff (1957)<sup>11)</sup> 等の報告したように、予備凍結に於ける冷却速度の大きなものの方が成績が良いという結果からみれば、Leopold (1947)<sup>9)</sup> 等 Katzin (1947)<sup>9)</sup> 或いは Günther (1959)<sup>13)</sup> の不成績は冷却速度の小さかったことに基因するのかもしれない。とにかく Hénaff 等が急速凍結の方がすぐれていると述べている理由としては、Luyet がかねてから強調している如く、超急速凍結による細胞の生活機能の保持、つまり細胞障害をきたすような氷晶を形成させないように急激に冷却するこ

とをねらいとしているものと思われる。その為には当然再結晶 (Recrystallization 又は Devitrification といわれている) をおこすおそれのある温度範囲と乾燥過程での試料温度との関連が問題となる。 $-50^{\circ}\text{C}$  に冷却しながら乾燥を行なったということは、その点をも考慮したからであろうが、この温度で再結晶を防げるかどうかは明らかでない。

我々の今回の実験では、以上の過去の報告の再検討というよりは、むしろ凍結或いは凍結乾燥に関する一般の常識から可能と考えられる幾つかの条件を選んで試みたものである。

先ず多くの動植物細胞を通じて、凍結による障害の比較的小さい条件の一つとしてあげられている緩慢な冷却による凍結を起させ  $-30^{\circ}\text{C}$  まで冷却したもの、或いは  $-196^{\circ}\text{C}$  まで冷却したものについて、乾燥後の移植成績をみたが、すべて不成功に終わった。もちろんこの際復水に用いる液についても検討し、生理食塩水、血清、デキストラン等を用いてみた。

更に Hénaff 等と同様の液体窒素を用いての  $-196^{\circ}\text{C}$  までの急速凍結、 $-50^{\circ}\text{C}$  に冷却しながらの乾燥も行なってみたのだが、すべて失敗に終わった。ただプロパンなどは用いず、試料を直接液体窒素の中に投入したものであるから、彼等の用いた最良の条件よりは冷却速度は小さかったかもしれない。

最後に Meryman が好んで用いる方法で、血球や精子の乾燥に利用して成功したと称する減圧自働凍結乾燥法を採用してみた。これは一方には、当時我々の研究室に於いてこの方法が精子の凍結乾燥実験に用いられていたからである。その結果は、これまでに用いられて成功例もあるといわれる通常の乾燥方法が全然失敗であったのに反し、今までに角膜については試みられたことのないこの方法でかえって好成績を得たわけである。この場合、凍結乾燥過程の中のどの条件が好結果をもたらしたのであるかはわからないが、例えば Meryman がその有効性を強調しているところの PVP を復水時に使用してみても、殆んど特別な効果がみとめられなかったことから、精子とはちがった試料の差違による複雑な機構が想像される。Meryman 自身この減圧自働凍結乾燥法のすぐれていることについては何の説明もしていないが、我々が乾燥過程をしらべてみた結果から想像すれば、凍結開始前の最初の減圧によって全脱水量の 15~20% が急速にとられ、凍結のおきるときにはそれだけ既に脱水された状態になっていることが、それから後におきるべき障害をある程度軽減するのかもしれない。またこの方法による凍結速度はかなり大きいとはいっても、液体窒素中に直接投入するのに比較すれば大分遅いし、しかも肉眼的に観察していても、蒸発の途中で試料の一部に白濁がおこり、それが忽ち試料全体に拡がるのがわかるので、明らかに凍結がおきたものとみとめられる。この場合にも、表面に附着した組織液だけが凍結したものかどうかはわからないが、細胞自身も凍結した可能性がかなり大きい。

次に凍結乾燥を行なった角膜組織の移植能と活性度との関係に注目しなければならない。Payrau 等<sup>12)</sup> も述べているように、Warburg 法による組織の酸素消費や組織培養での細胞増殖のみとめられない点からみて<sup>12), 18), 19)</sup>、乾燥再生角膜の活性度は殆んど 0 とみなしてよいのではなからうか。それにも拘らず、移植実験に於いて脱落をみず完全に透明化し治癒することは既

に認められているところである。近時の報告者<sup>20), 21)</sup>によれば、表層移植にては角膜全層の十分な生活力の必要はないといわれている。他方 King<sup>10)</sup>, Payrau 等<sup>12)</sup>, Günther 等<sup>13)</sup> 及び吾々<sup>17)</sup> が検索したところでは、乾燥後の再生角膜の組織学的所見に特別な変化がみとめられていない。従ってここでもまた凍結乾燥という外的条件によってうける組織の形態的機能的障害とその移植効果との間にかなり複雑な関係のあることをよく考慮しておかなければならない。

以上要するに、通常行なわれる予備凍結を伴う乾燥法では移植に成功せず、角膜の乾燥に始めて試みられた自働凍結法によって良成績を得たもので、その簡便な乾燥法と優秀な移植成績をここにくりかえし強調したい。

## VI. 結 論

角膜の凍結乾燥法として種々の方法を取りあげ、家兎角膜について検討した結果、次のような成績を得た。

1)  $-30^{\circ}\text{C}$  で緩慢に予備凍結し、室温で乾燥、生理食塩水又は血清で復水させたものは透明化したが、移植後溷濁又は脱落し、成績は不良であった。

2) 液体窒素 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) を用いて急速に予備凍結した後、室温又は  $-50^{\circ}\text{C}$  に冷却しながら乾燥し、生理食塩水、デキストラン及び PVP で復水させたものも同様の結果であった。

3) 予備凍結を行わず、減圧自働凍結乾燥を行なったものは、復水後の所見も移植後の成績も、肉眼的顕微鏡的にすぐれていた。

減圧自働凍結乾燥を行なった人眼の移植例でも優秀な臨床成績を得た。

## 文 献

- 1) 竹内光彦 1959 冷凍保存角膜による角膜移植について. 臨床眼科, **13**, 461-468.
- 2) 竹内光彦・小崎雅司 1961 角膜移植に於ける凍結保存眼球の臨床応用. 臨床眼科, **15**, 555-564.
- 3) Weiss, P. and Taylor, A. C. 1944 Transplantation of frozen-dried cornea in the rat. Anat. Rec., **88**, 49.
- 4) Katzin, H. M. 1947 Preservation of corneal tissue by freezing and dehydration. Am. J. Ophth., **30**, 1128-1134.
- 5) Leopold, I. H. and Adler, F. H. 1947 Use of frozen-dried cornea as transplant material. Arch. Ophth., **37**, 268-276.
- 6) McNair, J. N. and King, J. H. 1955 Preservation of cornea by dehydration. Arch. Ophth., **53**, 519-521.
- 7) Bonhoure, C. 1955 Kératoplastie lamellaire par greffon conservé lyophilisé. Ann. d'oculist., **188**, 49-54.
- 8) Nicolato, A. et Morone, G. 1957 La cornea lyophilizzata suo impiego nella cheratoplastica. Boll. d'Ocul., **36**, 3-8.
- 9) Alberth, B. 1957 Ein Fall von Autokeratoplastik (Ersatz der Donorstelle mit lyophilisierter menschlicher Hornhaut). Ophth., **133**, 61-64.
- 10) King, J. H. 1957 Experimental studies with corneas preserved by dehydration. Am. J. Ophth., **43**, 353-380.

- 11) Hénaff, F. et Rey, L. R. 1957 Sur une technique de préparation de greffons de cornée lyophilisés. *Compt. rend. Acad. Sci.*, **245**, 582-583.
- 12) Payrau, P., Bonel, L. and Guyard, M. 1958 Kératoplasties homogènes et hétérogènes pratiquées avec des greffons conservés par une méthode de lyophilisation. *Ann. Ocul.*, **41**, 636-669.
- 13) Günther, G. und Gebhardt, J. C. 1959 Erste klinische Erfahrungen und histologische Untersuchungen zur Frage der Anwendung von gefriertrocknetem Hornhautmaterial bei der Keratoplastik. *Acta Ophth.*, **37**, 241-252.
- 14) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1959 Survival of spermatozoa following drying. *Nature*, **184**, 470.
- 15) Meryman, H. T. 1960 Drying of living mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **85**, 729-734.
- 16) 吉本千禎・千葉重雄・根井外喜男 1957 記録式真空重量計の試作. *低温科学, 生物篇*, **15**, 71-74
- 17) 竹内光彦・根井外喜男 1961 凍結乾燥角膜の実験的研究. *臨床眼科*, **15**, 130-140.
- 18) Stocker, F. W., Eiring, A. and Co-workers 1959 Evaluation of viability of preserved rabbit corneas by tissue culture procedures. *Am. J. Ophth.*, **47**, 772-782.
- 19) Chavan, S. B. and King, J. H. 1960 Experimental lamellar heterografts; Comparison fresh and preserved donor corneas. *Am. J. Ophth.*, **49**, 1387-1395.
- 20) Katzin, H. M. and Martinez, M. 1959 Endothermal studies of corneas preserved in various media. *Arch. Soc. Amer. Optom.*, **2**, 173-180.
- 21) King, J. H. and Chavan, S. B. 1959 The preservation of the eye tissues: Current status in transplantations. *Am. J. Ophth.*, **47**, 303-307.

### Résumé

Attempts to freeze-dry human and rabbit corneas for preservation as grafts were made using several methods.

Rabbit corneal tissues, either slowly frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  and dried at room temperature or rapidly frozen in liquid nitrogen and dried at room temperature or at low temperature of  $-50^{\circ}\text{C}$ , regained their proper transparency after rehydration in serum, physiological saline or PVP solution. Grafting, using these materials, was unsuccessful; grafts lost transparency, turned opaque and finally separated and fell out.

Only in the case of using a procedure in which the samples were quick-frozen by evaporation in vacuo without any cryogen and subsequently dehydrated, did the dried human and rabbit corneal tissues prove macroscopically and microscopically to be reconstituted by immersion in physiological saline or PVP solution; they were grafted successfully.