

脱細胞化ブタ頸動脈の作製と評価

Preparation and evaluation of decellularized porcine carotid artery

○樋上哲哉（札幌医大 心外） 根岸淳（札幌医大 心外、JSPS） 船本誠一（札幌医大 心外）

木村剛（東医歯大 物質医工） 南広裕（東医歯大 物質医工） 藤里俊哉（大工大 工）

岸田晶夫（東医歯大 物質医工）

Tetsuya HIGAMI Sapporo medical university, Jun NEGISHI Sapporo medical university, JSPS, Seiichi FUNAMOTO Sapporo medical university, Tsuyoshi KIMURA Tokyo medical and dental university, Kwangwoo NAM Tokyo medical and dental university, Toshiya FUJISATO Oosaka institute of technology, Akio KISHIDA Tokyo medical and dental university

Abstract: Approximately 20 thousands of and 500 thousands of cases of coronary-artery bypass surgery, which is an effective procedure for angina and myocardial infarction, are performed annually in Japan and in the US, respectively. The self-vascular graft using the internal thoracic artery is considered to be the first choice, but there still remain many problems such as insufficient supply of graft and invasion out of the affected area. In this study, we prepared a decellularized small-diameter vessel from the porcine carotid artery and conducted a basic study of the vascular graft. As a result, decellularized porcine carotid artery was successfully prepared by the HHP treatment. In the rat carotid artery transplantation experiment, the result of transplantation of decellularized blood vessel has improved and the 2-week patency was confirmed. From the above results, a possibility of application of the decellularized carotid artery as a small-diameter vessel was suggested.

Key Words: coronary-artery bypass surgery, decellularized small-diameter vessel, HHP treatment

1. はじめに

狭心症や心筋梗塞などに対する有効な治療法である冠動脈バイパス手術は、日本では年間約2万件、米国では約50万件の手術が行われている。内胸動脈のような自己血管グラフトが第一選択とされているが、グラフトの供給不足や患部以外の侵襲などが問題視されている。中・大口径においては高分子人工血管が主に使用され、良好な移植成績を示しているが、小口径領域ではサイズの不適合や早期閉塞などの問題があり、使用には至っていない。以上のような背景から、内径6mm以下の小口径血管グラフト開発が強く望まれており、これまで多くの研究、開発がなされているが未だ満足できるものはない。中・大口径に比べ、小口径血管には高い抗血栓性が要求され、患者自己細胞による早期内皮化が重要であると考えられている。近年、生体由来組織から細胞除去し、残存する細胞外マトリクスである脱細胞化組織を移植材料として用いる手法が検討されている。我々のグループでは、高静水圧印加を利用した脱細胞化血管において、中・大口径結果にて良好な内皮化を確認してきた。本研究では、ブタ頸動脈から脱細胞化小口径血管を調製し、移植血管グラフトとしての基礎検討を行った。

2. 実験方法

食用ブタ組織は、食用ブタ繁殖場より、頸動脈を摘出後、4℃下にて保存、24時間以内に超高压処理法による脱細胞化処理を行った。超高压処理法による温度条件は37℃および4℃とした。超高压処理後に、洗浄処理を4℃下にて行い、組織内の残留細胞片を洗浄した。得られた脱細胞化組織は、HE染色、EVG染色および走査型電子顕微鏡下にて断面および表面観察により、脱細胞化処理の影響を評価した。

ラット頸動脈への移植実験は、wister rat（10週令）を鎮痛薬および麻酔薬により不動化させ、ラット頸部を剃毛後、イソジン溶液にて皮膚表面を消毒した。その後、皮下を10

mm切開し、切開部より皮下組織を剥離し、頸動脈へアプローチした。Nativeの頸動脈を摘出し、ブタ脱細胞化頸動脈をラット頸動脈部へカフ法にて移植した。移植後1週間及び2週間経過観察を行い、その後犠死させ移植組織を摘出し、組織工学的に評価した。

3. 結果

HE染色およびEVG染色結果より、HHPにて、頸動脈から細胞の除去が確認された。HHP/37℃脱細胞化頸動脈と比較し、HHP/4℃脱細胞化頸動脈の組織構造が維持されていることが示された。

走査型電子顕微鏡下の結果をFig1に示す。

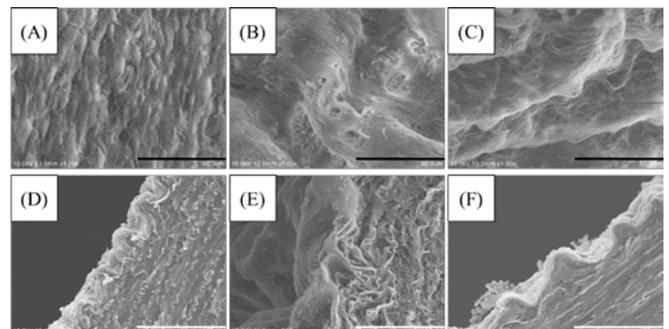


Fig 1 . SEM images of porcine carotid arteries treated under various conditions. (A, D): Native carotid artery, (B, E): the HHP/37 °C decellularized carotid artery and (C, F): the HHP/4 °C decellularized carotid artery. Black scale bar: 50 μm; white scale bar: 100 μm.

HHPにより、血管内皮細胞が除去されることが示された (B, E, H)。HHP/37℃脱細胞化頸動脈内腔表面、弾性板に、軽微な構造破壊が認められた (B, E)。

HHP/4°C 脱細胞化頸動脈において、顕著な構造破壊は認められず、比較的組織構造が維持されていた (C, F)。ラット頸動脈移植では、HHP/37°C 脱細胞化頸動脈移植において、移植後 1 週間では 3 例中 2 例の開存が認められ、1 例は血栓形成により閉塞していた。移植後 2 週間評価において、HHP/37°C 脱細胞化頸動脈移植ラット 3 例全ての閉塞が認められた。HHP/4°C 脱細胞化頸動脈移植の 2 週間評価において、3 例全ての開存が認められ、血栓形成の兆候も認められなかった。また、移植組織内面への細胞接着が認められた。

4. 考察

種々の脱細胞化方法があるが、今回 HHP 処理により、ブタ頸動脈の脱細胞化頸動脈の作製が可能だった。洗浄条件の検討により、組織構造破壊を抑制した脱細胞化処理が可能になった。生体組織内のコラーゲンやエラスチンを保つためには、洗浄時の温度が重要であることが考えられた。

ラット移植実験において、組織構造維持した脱細胞化血管の移植成績が向上し、2 週間の開存を確認できた。

以上の事より、脱細胞化頸動脈の小口径血管としての応用可能性が示唆された。

参考文献

- (1) Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31:3590-5.
- (2) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Higami T, Kishida A. Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure. *J Artif Organs* 2011;14:223-231.