

脱細胞化ブタ橈骨動脈の作製と評価

Characteristic of decellularized porcine radial arteries using each decellularized method

○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: For small-diameter grafts (6 mm or less in the inner diameter) used for cardiac bypass surgery, however, artificial blood vessels having a stable transplantation result have not been developed yet because of early thrombus formation and angiostenosis. In this study, we performed a characteristics evaluation of the decellularized porcine radial artery using the radial artery that belongs to the similar blood pressure area as the blood vessel of the target transplantation. To assess the biological reaction, an experiment of transplant into the carotid artery of a rat was conducted. Compared with Triton/SCD treatment, the HHP treatment enabled the decellularization with the tissue structure being maintained. It was indicated from the rat carotid artery transplantation experiment that xenograft rejection observed in the untreated porcine radial artery was suppressed in the HHP decellularized porcine radial artery. From the above results, a possibility of application of the decellularized radial artery as a vascular graft was suggested.

Key Words: small-diameter grafts, cardiac bypass surgery, porcine radial artery

1. はじめに

血管移植・バイパス術は年間 60 万件以上が実施され、大、中口径（内径 6mm 以上）において、人工高分子材料血管による治療が確立されている。しかし、心臓バイパス術などに使用される小口径グラフト（内径 6mm 以下）では、早期血栓形成や血管狭窄などにより安定した移植成績を有する人工血管が得られていない。現在、小口径血管移植・置換術の移植血管グラフトの第一選択は自己血管であるが、患者への負担、再手術時の代替血管不足などの問題がある。

これらの問題の解決法として、機能化高分子材料人工血管や組織工学的的手法による人工血管開発が行われている。人工血管の機能化として、抗血栓性付与や血管内皮細胞播種の研究が試みられているが、生体血管との物性の相違や内膜肥厚などの問題が報告されている。一方、組織工学的的手法において、生体血管と同程度の力学的特性を有する小口径人工血管が得られているが、作製期間や費用面において改善すべき課題が多い。血管移植術の対象となる血管群は、冠動脈や橈骨動脈など比較的低血圧領域であるが、脱細胞化血管は頸動脈など比較的高血圧領域の血管が利用されている。しかし、動脈の構成成分はその血管にかかる血圧によって異なることが知られている。

本研究では、移植対象となる血管と同様の血圧領域に属する橈骨動脈を用いた、脱細胞化ブタ橈骨動脈の特性評価を行った。

2. 実験方法

食用ブタ組織は、食用ブタ繁殖場より、下肢を購入し、投稿動脈を摘出後、4℃下にて保存、24 時間以内に界面活性剤法および超高压処理法による脱細胞化処理を行った。超高压処理は処理後に、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、ブタ脱細胞化橈骨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、その後犠牲させ移植組織を摘出し、組織工学的に評価した。

3. 結果

脱細胞化橈骨動脈の HE 染色を Fig1 に示す。

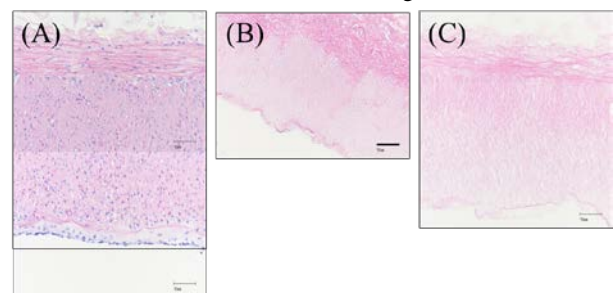


Fig 1 Fig. Photographs and histological evaluation of porcine radial arteries under various conditions. (A.) Native, (B) Triton/SCD and (C) HHP decellularized artery. Scale bar: 50 μm.

HHP、Triton/SCD により、橈骨動脈から細胞が除去された。Triton/SCD と比較し、HHP 脱細胞化橈骨動脈内弾性板の内腔にコラーゲンの保存が認められた。Triton/SCD と比較し、HHP 脱細胞化橈骨動脈の組織内残存 DNA が有意に減少していた。HHP、Triton/SCD により、血管内皮細胞が除去されることが示された。

Triton/SDC 脱細胞化橈骨動脈内腔表面、弾性板に、構造破壊が認められた。HHP 脱細胞化橈骨動脈において、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、弾性板上に基底膜構造の維持が認められた。縫合糸保持強度試験において、Triton/SDC 脱細胞化橈骨動脈では、未処理橈骨動脈と比較して、有意な力学的強度の減少が認められた。一方、HHP 脱細胞化橈骨動脈は、未処理橈骨動脈と同等の力学的強度を示した。

ラット頸動脈移植実験においては、未処理ブタ橈骨動脈-ラット頸動脈移植の3日目評価において、グラフトの拍動は確認されず、移植グラフト内は血栓により閉塞していた。移植後3日、1週間、2週間評価において、HHP 脱細胞化ブタ頸動脈-ラット頸動脈移植ラット全てのグラフト開存が認められた。HHP 脱細胞化ブタ橈骨動脈-ラット頸動脈移植2週間評価において、グラフトの拍動が認められ、HE染色から、移植血管内全域に細胞浸潤が認められた。免疫染色評価より、移植血管の外膜～中膜領域に抗 α -SMA陽性細胞の浸潤が認められ、移植血管内腔に抗Factor VIII陽性細胞の接着が認められた。

4. 考察

HHP 処理により、Triton/SDC 処理と比較し、組織構造を維持した状態での脱細胞化が可能だった。HHP 脱細胞化橈骨動脈は血管特異的構造を比較的維持していることが示され、力学的強度の維持も同様に認められた。ラット頸動脈移植実験から、未処理ブタ橈骨動脈で認められた異種拒絶反応が、HHP 脱細胞化ブタ橈骨動脈では抑制されていることが示された。移植2週間でのグラフト再細胞化が認められ、かつ、グラフト領域に則した細胞が浸潤していることが明らかになった。

以上の事より、脱細胞化橈骨動脈の血管グラフトとしての応用可能性が示唆された。

参考文献

- (1) 1) Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):399-405.