

## 脱細胞化ブタ動脈の構造と特性評価 2

## Evaluation of characteristic and structure for decellularized porcine aorta: part 2

○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:** Vascular transplantation using small sized grafts of 6 mm or less in diameter such as coronary artery bypass surgery and shunt surgery is widely performed in current clinical practice. However, the blood vessels used are mainly self-blood vessels and insufficient supply of graft for transplantation and low patency rate are considered as problems. In this study, we prepared several decellularized arteries to conduct experiments such as cell seeding and rat subcutaneous implantation and discussed the relationship between the structure of decellularized artery and biological reaction. In addition, we also conducted rat carotid artery transplantation experiment using the decellularized carotid artery and the radial artery to make a comparative analysis of the effect of the tissue structure on the biological reaction. It was revealed that recellularization was achieved at an early stage in the collagen-rich blood vessels but needed time in the elastin-rich blood vessels.

**Key Words:** coronary artery bypass, decellularized arteries, carotid artery, radial artery

## 1. はじめに

現在、臨床現場において冠動脈バイパス術、シャント手術など小口径領域 (内径 6mm 以下) の血管移植術が広く実施されている。しかし、使用される血管は自己血管が主であり、移植用グラフトの供給不足ならびに、低い開存率などが問題視されている。そのため、これらの移植術において、新たな小口径人工血管の開発が望まれている。近年、組織学的手法を用いた小口径血管の開発が広く検討され、そのひとつとして脱細胞化小口径血管の作製も様々な検討がなされている。しかし、脱細胞化小口径血管の材料として選択される血管は、内径と長さが重要視されている。しかし、動脈はその血管にかかる圧力や血液量によって細胞外マトリクスであるコラーゲンとエラスチンの組成が異なることが知られている。

当研究グループでは、これまでにブタ大動脈、頸動脈、橈骨動脈など、種々の脱細胞化動脈を作製、特性評価を行ってきた。

本研究では、種々の脱細胞化動脈を作製し、細胞播種実験、ラット皮下埋植実験を行い、脱細胞化動脈の構造と細胞、生体反応の関係性について検討した。また、脱細胞化頸動脈、橈骨動脈のラット頸動脈移植実験を行い、組織構造が生体反応に及ぼす影響の比較検討も行った。

## 2. 実験方法

食用ブタ組織は、食用ブタ繁殖場より、大動脈、橈骨動脈を摘出後、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。

脱細胞化表面の特性評価として、ラット繊維芽細胞および HUVEC を用いた、細胞播種実験を行った。細胞播種後 24 時間静置培養を 37℃、CO<sub>2</sub> 5% 下で行い、その後組織を固定し、組織学的に評価した。

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、皮フを 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

細胞播種実験より、血管内腔側からの線維芽細胞浸潤は認められなかったが、橈骨動脈外膜側からの細胞浸潤が観察された。血管内膜に播種した血管内皮細胞は、正常な形状になったが、外膜側に播種した細胞は球状を示した。

橈骨動脈>頸動脈≒大動脈の順番で、組織内部までの細胞浸潤が見られた。熱処理によって構造を破壊した組織では、どの動脈においても組織内部までの細胞浸潤は観察されなかった。

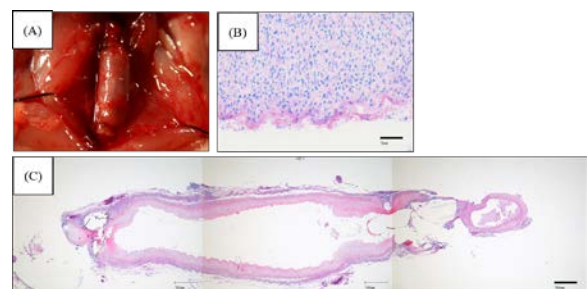


Fig 1 Photographs (A) and HE staining (B, C) of HHP-treated porcine radial artery transplanted to rat carotid artery 2). Scale bar: 50  $\mu$ m (B), 500  $\mu$ m (C).

脱細胞化動脈のラット頸動脈移植2週間評価において、脱細胞化頸動脈移植では2週間後の内腔への細胞接着は認められたが、組織内部への細胞浸潤は不完全であった。脱細胞化橈骨移植群では、移植2週間後において、移植組織全域への再細胞化が認められた。

#### 4. 考察

脱細胞化頸動脈と橈骨動脈の細胞播種実験から、血管中膜の弾性板が SMC 浸潤に大きく関与し、弾性板が少ないほど浸潤が早く起こることが示された。

ラット皮下埋植実験から、*in vitro* 同様に弾性板が少ない組織への細胞浸潤が早期に起き、構造破壊により細胞浸潤が抑制されることが示された。内膜構造を維持した血管での開存率の向上が明らかになった。

血管移植において、コラーゲンリッチな血管は再細胞化が早期に達成され、エラスチンリッチな血管では再細胞化に時間を要することが明らかになった。

#### 参考文献

- (1) 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.
- (2) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, et al. *J Tissue Eng Regen Med*. In press.
- (3) Fischer M, Llauro JG. Collagen and Elastin Content in Canine Arteries Selected from Functionally Different Vascular Beds. *Circulation Research* 1966; 19: 394-399.