

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791901

研究課題名(和文)脱細胞血管を素材とする小口径血管グラフトの開発

研究課題名(英文)Development of small vessel graft with decellularized animal artery

研究代表者

王 巍(Wang, Wei)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：60451944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：冠動脈バイパス術などのために自分の血管になれる高機能小口径血管移植片の開発を試みった。ラットの大腿動脈から血管を採集し、洗剤(SDS)で細胞を除去し、リン脂質ポリマー(MPC)を抗血液凝固のために塗布した。細胞除去の効率を上げるため、超音波洗浄と循環系を利用した全身灌流も試した。SDSと超音波洗浄の併用が有効な小口径血管脱細胞法だと確認した。しかし、処理したサンプルをラットの大動脈に移植すると術後4週で栓塞した。MPC塗布が組織吸収反応を惹き起すため、他の抗凝固措置が必要だと判断した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop highly functional small artery for clinical transplantation, we tried decellularized animal artery in rat femoral artery model. Femoral arteries at the diameter of 0.8-1mm were harvested from SD rats and decellularized with SDS detergent perfusion followed by MPC coating. Ultrasound wash and whole body perfusion were also tested to raise the decellularization efficacy. Treated samples were transplanted to SD rat femoral arteries. With SEM and immunostain imaging, we found SDS perfusion combined with Ultrasound treatment is an effective way to obtain decellularized artery. At 4 weeks post implant, samples were found all embolized. MPC somehow induced absorption, thus is not an appropriate treatment. Other reliable anti-coagulation method is needed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学形成外科学

キーワード：血管再生 脱細胞

## 1. 研究開始当初の背景

先天的な血管形成異常、外傷や腫瘍手術での切除などによる血管欠損は、遠位組織の壊死を引き起こすので、血管再建は不可欠である。その治療は大きく人工血管移植と自家血管移植の二種類の方法に分かれている。人工血管には、生体親和性、血栓抑制性、密封性、操作性、長期機能性、安全性などが求められ、現在では胸腹部大動脈用の大口径グラフト(内径 10mm 以上)はポリエステル布製が主流で、下肢、頸部、腋窩領域における動脈再建用の中口径グラフト(内径 6~8mm)には同布製及びテフロン製人工血管が多く使用されている。臨床において、中、大口径人工血管の成績に関してはほぼ満足できる状況にあるが、小口径血管(内径 6mm 未満)ではさまざまな材料が試されたが、血栓を生じて栓塞する率が高いため、自家血管移植に匹敵する有効性を持つグラフトはまだ実現されていない。一方、自家血管移植については、移植用血管組織片を採取するドナーサイトでの機能喪失が伴うため、採取する場所と大きさが限られる欠点がある。

これらに対し、生体組織由来の材料を用いることも研究されている。これまでヒトあるいは動物の血管をアルコールやグルタルアルデヒドで化学的に処理して作製したものが試みられているが、臨床的には血栓で詰まりやすく、劣化しやすい欠点があるといわれている。この理由として死滅した細胞の残存とマトリックス分子の失活にあると考えられている。

最近になり組織再生のために用いる生体材料の処理方法として、脱細胞化技術が注目されるようになって来ている。脱細胞化技術は生体由来の組織・臓器に界面活性剤を十分に灌流させ、細胞外マトリックスを温存しながらすべての細胞を除去し 3 次元的な足場を作製する技術である。この手法には次の利点がある。1)細胞が完全に除去されるため、拒絶反応を引き起こす抗原性が殆どない。2)基底膜などのマトリックス(コラーゲン、ラミニン、フィブロクチンなど)が温存されるため、細胞の誘導・制御機能を有する。3)組織の 3 次元構築と血管構造が保存されるため、適切な構造を有する組織を早期に形成できる。4)家畜などの異種動物から簡易に作製することができるので、経済的なグラフトとなる。ヒトとブタなどの家畜では細胞外マトリックスの分子はほとんど同じであるので、抗原性を示す細胞成分を完全に除去できれば、これらの動物から優れた再生用足場材料を作製できる可能性がある。

ヒト、動物由来の血管を上記の脱細胞処理法で処理すると血管壁の基底膜、弾性板、弾性線維、膠原線維などの構造がほぼ完全に温存される(図 1)。血管内皮細胞、平滑筋細

胞、線維芽細胞はこの天然スキャフォールドのもとで自発的に遊走、着床、増殖し、正常なレイヤー構造を持つ血管が短期間で再生すると期待できる。さらに自家骨髄幹細胞を播種して一時培養してから移植すると、高度の血管機能の再建が期待できると考えられる。われわれは既に予備実験で脱細胞化血管組織片の吻合操作性と密封性を確認した。再生医療の最新技術である灌流脱細胞化処理法を生かし、組織構造と生体活性をそのまま温存した脱細胞化血管グラフトの可能性を見出し、今回の研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

先天的な血管形成異常、あるいは外傷や外科的侵襲による小口径血管欠損を治療するための高機能な人工移植材を開発することを目的とする。同種および異種動物由来の小口径血管組織を素材として、種々の脱細胞化処理とヘパリン浸透による抗凝固処理を行って血管グラフトを試作し、実験動物の血管欠損部位に移植してその機能を評価する。これにより自家血管移植に匹敵する術後開存性を持つ血管グラフトの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、同種および異種動物由来の小口径血管組織を対象として、種々の条件で脱細胞化処理およびヘパリン浸透による抗凝固加工処理を行ない実験用グラフトを作製する。そして実験動物の血管欠損部位に移植し、血管グラフトとしての機能を評価して最適な処理条件を見出して、脱細胞化血管グラフトの臨床応用の可能性を検討する。具体的には、次のような手順で研究を実施する：1. 血管組織片の脱細胞処理の最適化を目指し、超音波処理の併用と全身灌流の有効性を検討する。2. 走査電子顕微鏡(SEM)と免疫蛍光染色法を用いて、脱細胞化血管組織片の構造を特定する。3. 凍結乾燥とヘパリン浸透処理の抗凝固効果を検討する。4. 脱細胞化処理を施した同種と異種の小口径血管移植片をラットの大腿動脈に移植し、自家血管移植を対照として、小口径血管グラフトの有効性を定量的に評価する。

1. 同種、異種脱細胞化血管移植片の作製：SDラットの大腿動脈と日本白色家兔の上腕動脈を 20 mm の長さで採取し、室温で PBS で 15 分洗浄、1% SDS で 24 時間洗浄、純水で 30 分洗浄、1% Triton-X100 で 60 分洗浄、抗生剤入り PBS で 6 日間洗浄する。同程度の直径の静脈は血管壁が薄く強度が不十分のため、使用時の操作性に問題があることを予備実験で確認しているため、実験対象外とする。

2. 脱細胞化処理の最適化：a, 上記 SDS 処理後、超音波洗浄を 15~30 分にわたり行う。b, SDラットを安楽死させ、皮膚を剥離し開胸して右心房を開け、左心室から注射針を挿入して、PBS を全身灌流し血液を放出した後、1% SDS を 24 時間灌流し、全身脱細胞化処理を施す。各臓器組織は全身灌

流脱細胞処理完了後採取する。

3、上記の処理法を次の評価法で比較する。脱細胞化血管組織片の分子構造評価：作製された試料を臨界点乾燥とイオンコーティング処理を施し、走査電子顕微鏡で立体構造を観察する。一方、ホルマリン固定、パラフィン包埋の後に薄切切片を切り出し、免疫蛍光染色で Collagen, Fibronectin, Laminin などの細胞外マトリックス構造と細胞核を観察する。血管組織に対し最適な脱細胞処理法を検討する。

4、血管移植及び機能評価：a, Wistar ラットの大腿動脈と大腿静脈のそれぞれに 20 mm の欠損を作製し、同種と異種脱細胞化血管移植片（各 10 例）を 10-0 ナイロン糸で端端吻合する。術後 3 週目、3 か月目にサンプルを採取し、血管の開存を確認後、下記の組織評価を行う。b, 脱細胞血管組織片を凍結乾燥し、1000u/mL ヘパリン液に 1 時間浸漬後、移植材とする。

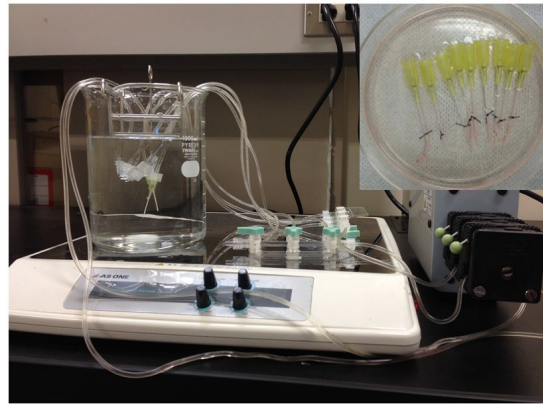
5、組織学的評価：移植部位を採取し、ホルマリン固定、パラフィン包埋の後に縦方向に薄切切片を切り出し、免疫蛍光染色で膠原線維、弾性線維、基底膜の変化と、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の形態を観察するとともに定量的な計測を行う。同種、異種脱細胞血管片による血管移植再生形態の差異を比べる。ヘパリン処理による血管開存率の差異を比べる。脱細胞血管グラフトを小口径動脈と静脈移植に応用する可能性を検討する。

#### 4. 研究成果

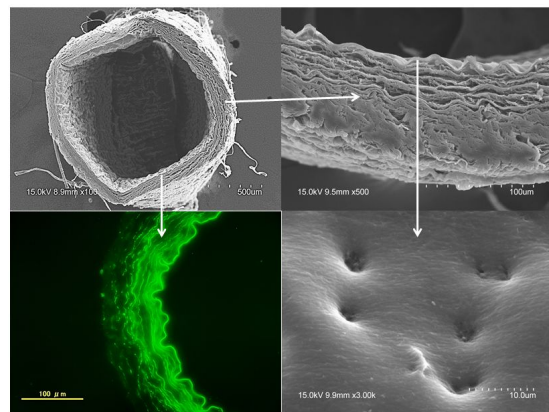
24 年度：上記の SDS 洗剤脱細胞法が血管全層の細胞を溶解除去できることを免染で確認した。SEM で滑らかな内膜基底膜構造を確認し、高密度の穿通孔も観察された。しかし、内膜と中膜の間に核残骸の沈着も確認された。術後 4 週でラット大腿動脈に移植されたサンプルが全例栓塞した。脱細胞法のさらなる効率向上が望ましい、内膜抗凝固措置が不可欠だと示された。

25 年度：超音波処理による脱細胞効率の上昇を確認した。全身灌流は腹腔内臓器には有効だが、下肢の動脈には無効だった。ラットの大腿動脈に移植されたサンプルが術後 4 週で栓塞した、MPC 塗布群は血管自身が吸収された。

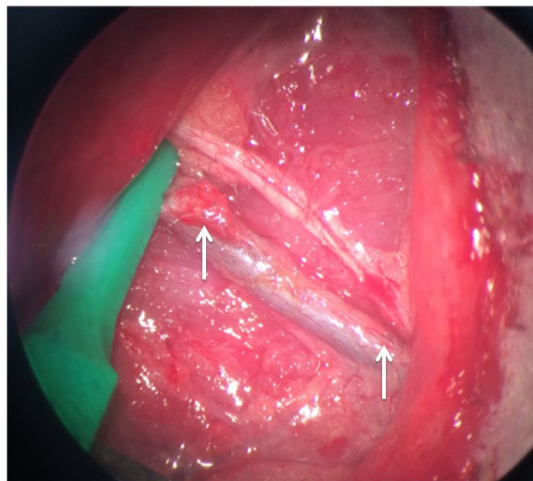
結論：SDS と超音波洗浄の併用が有効な小動脈脱細胞処理法だと確認できた。径 0.8~1 mm の血管では脱細胞血管移植の開存は難しい。MPC 塗布が組織吸収反応を惹起するため、脱細胞血管に不適切だと考え、他の血管内膜抗凝固処置法が必要だと判断する。



開発した小口径血管脱細胞装置：  
処理液は血管外壁と内腔を同時に循環できる、脱細胞の効率を上げた。



脱細胞血管走査電子顕微鏡と免疫染色像：  
内膜に細胞が綺麗に抜けて、滑らかな基底膜が見える、穿通枝の穴が高頻度で分布する。コラーゲン成分が確認される。



ラットの大腿動脈に移植後 4 週目：  
MPC 塗装した脱細胞の血管が吸収されて、大腿静脈上に痕跡として残った。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

王 巍 (Wei Wang)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・

助教

研究者番号: 60451944