

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791904

研究課題名(和文) 口径1mmの再生型人工血管の実用化を目指して

研究課題名(英文) The evaluation of Decellularized vessels for its practical use

研究代表者

高須 啓之(Takasu, Hiroyuki)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40566022

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)：これまでわれわれは高張塩溶液による組織の脱細胞化方法を確立した。また、本方法を小口径の血管に応用し、実際にラットでの移植実験を行ってきた。本研究課題では、移植後の脱細胞化血管の生理学的機能評価、より小口径の血管への応用、神経再支配の可能性、実用化を目指した保存などについて検討を行った。その結果、口径1mmの脱細胞化血管においても長期開存が認められた。凍結乾燥処理後の脱細胞化血管でも開存が認められた。外膜に神経軸索の浸潤および生理的機能の再獲得が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have been developed decellularizing methods of tissues with hyper osmotic solutions. We have applied this methods for small diameter vessels and transplanted to rat model. In this study, we evaluated the decellularized vessels for its physiological property after transplantation, application of further smaller diameter, re-innervation, and preservation. On the result, patency of transplanted small diameter (1mm of diameter) vessels for longterm was obtained. And also, the translated decellularized vessels after the preservation with freeze-dry method showed patency. In addition, on the immunohistochemical study, the innovation of axon for its adventitia was confirmed and physiological property was observed with wire-myograph system.

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：再生医学 再生型小口径人工血管

1. 研究開始当初の背景

近年の手術技術の進歩に加え、心血管疾患・糖尿病の増加により世界的に人工血管の需要は高まっている。特にヨーロッパでは死因の4割を血管疾患が占め、また、世界中で年間に20万肢が血管障害に伴い切断されている。心筋梗塞や小児先天奇形などの冠動脈疾患や透析のシャント作成、下肢のバイパス術時に用いられる、さらにはわれわれ形成外科医が行う遊離組織移植に用いられる血管グラフトに求められる口径は3mmから4mmの物が多い。これに対し、人工血管の開発に多くの研究チームがしのぎを削っているが現在までで実用化されている人工血管の口径は最も小さなものでも6mmを下らない。

人工血管を開発するにあたり、その方向性は二つに大別される。一方は生体由来の組織を脱細胞化し、これを移植することで適切な細胞の定着と分化を誘導することが出来る scaffold を作成すること、もう一方は化学合成により様々なマテリアルの組み合わせにより管腔を作製すること、である。化学合成により得られたチューブは、均一な品質の素材が得られること、感染のリスクから開放されることといった利点を持つ一方で、小口径では主に流体力学的な問題から血栓を生じやすいことが未だ実用化に至らない大きな障壁となっている。われわれは脱細胞化組織に注目し、界面活性剤を用いない新たな方法により組織を脱細胞化することに成功し、現在、特許(特開2010-221012号)を申請している。

これまでにわれわれが開発した小口径脱細胞化血管では、腹部大動脈(口径3mm程度)の脱細胞化に成功し、これを移植した所、長期での開存を認めた。またその実験過程では極めて高い開存率が得られた。

本研究課題では、本脱細胞化方法により作成された高張塩法脱細胞化血管(以下、脱細胞化血管)を臨床応用することを目指した評価を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

われわれはこれまでに移植された人工血管を長期にわたり開存させるというファーストステージには既に達成しており、今回、特に本脱細胞化血管での、特に生理機能に注目した。本脱細胞化血管は移植後3ヶ月の時点で生理的血管拡張物質であるNOに反応し、拡張機能を示した。つまり再生された平滑筋細胞が隣接する平滑筋細胞との間で架橋され、共同運動を行うことが出来ることが示唆される。血管の生理的調節は外因性調節と内因性調節とに区分される。本現象は外因性調節の一部と内因性調節とから説明される。

脱細胞化血管の評価項目として、

- (1) さらに小口径での開存は可能か?
- (2) 凍結乾燥による保存が可能か?
- (3) 再生した平滑筋細胞は生理機能を保持す

るか? 再生した平滑筋細胞を収縮させるための神経再支配はあるのか?

について行う事を目的とした。

3. 研究の方法

実験動物にはラット(Wistar系、メス、リタイア)を用いた。

< 脱細胞化血管の作成 >

実験動物を深い麻酔下に仰臥位とし、腹壁を正中にて開創した。後腹膜を開き、腹部大動脈に到達した。顕微鏡下に丁寧に腹部大動脈周囲の剥離を行い、途中、大動脈からの分岐は血管クリップで結紮、またはバイポーラコウチで焼灼した。腹部大動脈(2-3mm)を約15-20mm長さで総腸骨動脈の分岐部まで求め、切断/採取した。また、口径1mmのモデルとしては、ラットの頸部より総頸動脈を同定し、これを採取した。

採取された血管はヘパリン加生理食塩水で内腔を十分に洗浄し、血液の付着を除去した。18Gの注射針の先端をニッパーで切除、鈍針とした。採取された血管の中核側をこの鈍針に血管クリップを用いて固定した。この後、次のような脱細胞化処理を行った。

(1) 1M NaCl水溶液中で震盪しながら18G針に溶液を流入させ、内腔も洗浄した。(24h)

(2) PBSに置換したのち、さらに7日間、震盪/環流洗浄を行った。

上記過程は全て室温で行った。

< 脱細胞化血管の移植 >

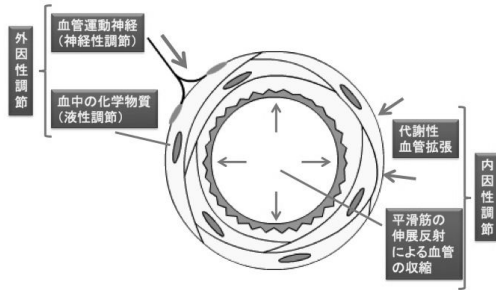
脱細胞化処理後、脱細胞化血管はPBS中で冷蔵保存し、数日以内に別個体のラットの腹部大動脈に作成した15mm程度のギャップに顕微鏡下に9-0ないしは10-0黒ナイロンで吻合した。

< 脱細胞化血管の凍結乾燥処理 >

脱細胞化血管は、蒸留水で洗浄後、真空凍結乾燥機に導入し、一旦、凍結乾燥させた。これをPBSに浸漬したところ、容易に水和し、柔軟な脱細胞化血管が得られた。これを前述と同様に実験動物の腹部大動脈に移植した。

< ワイヤーミオグラフィシステムによる解析 >

脱細胞化血管をラット腹部大動脈に移植してから12ヶ月後に採取し、ワイヤーミオグラフィシステムで血管の生理機能の解析を行った。本装置は、2本のL字状のフックを用いて輪切りにした血管を牽引する。このとき、片方は固定され、もう片方はアンプに繋がれ、牽引された血管にかかる力をg数として表す事が出来る。



(標準生理学より改変)

脱細胞化血管を移植された実験動物を深麻酔下に仰臥位に固定し、腹部大動脈を顕微鏡下に摘出した。摘出された血管は、リンゲル液 (NaCl 118mM, KCl 4.7mM, CaCl₂/2H₂O 2.5mM, MgSO₄/7H₂O 1.2mM, KH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, C₆H₁₂O₆ 11mM, Na₂EDTA 0.5mM) に浸漬した。保存する場合は冷蔵保存とし、翌日までに実験を行った。

リンゲル液内で幅約 1mm の輪切りとしたのち、L 字フックに引っ掛けた。チャンバーはリンゲル液 3ml を添加し、95%O₂, 5%CO₂ ガスを送気しバブリングを行った。またチャンバーは灌流液により 37℃ とした。

フックを牽引し、1g の負荷をかけた。数分で血管が弛緩してくる為、10 分程度の静置期間を要した。およそプラトーに達した時点で、最終濃度が 5µM になるようにノルエピネフリンを添加した。これにより血管の収縮が認められるため、ミオグラフ上は 1g を上回る様になる。この数値が安定した後、5µM ニトロプルシドナトリウム溶液を添加した。

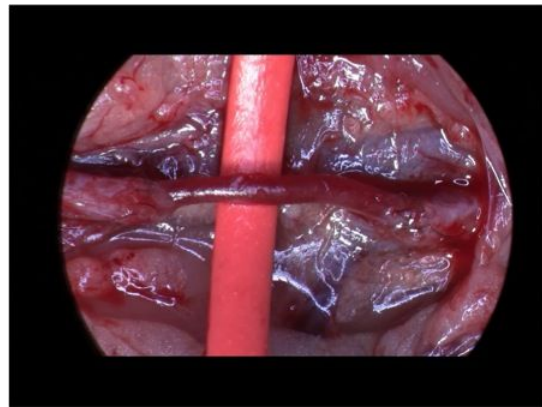
<抗 neurofilament 抗体による免疫染色>

ラットに移植された脱細胞化血管を 12 ヶ月の生存期間をおいた後、採取した (ワイヤーミオグラフシステムに用いた血管と同じ血管)。これを輪切りにし、ホルマリンで固定した後、凍結切片を作成した。抗 neuro-filament 抗体を一次抗体として用い、蛍光標識された二次抗体を反応させた後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

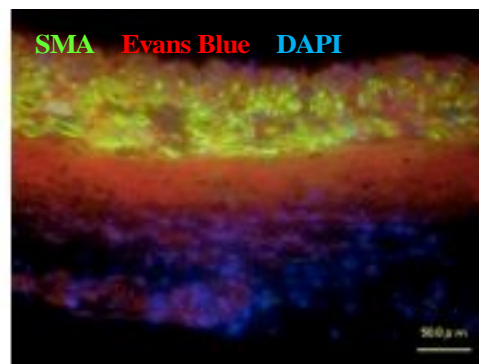
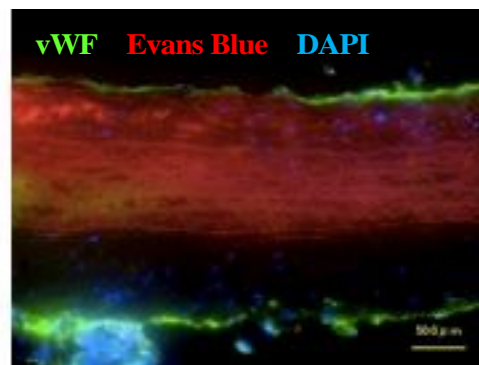
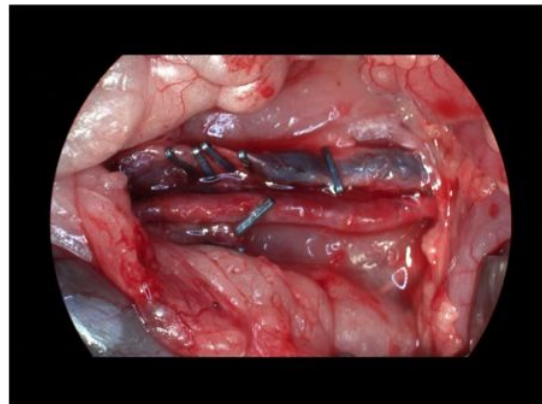
(1) 口径 1mm の脱細胞化血管の開存

口径 1mm の脱細胞化血管をラット腹部大動脈に移植した。移植後 2 週間の時点で解剖し、直視下に開存が確認された (図)。また、他の個体は移植後 14 ヶ月の時点でも生存しており、超長期における開存が示唆された。



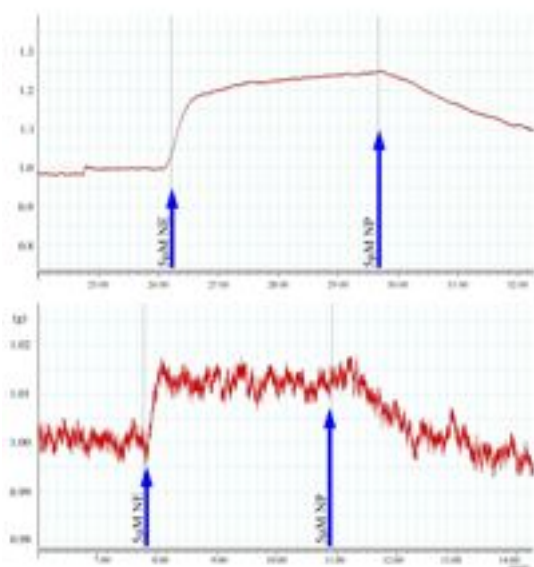
(2) 凍結乾燥保存後の脱細胞化血管の開存

口径 3mm の脱細胞化血管を真空凍結乾燥機にセッティングし、凍結乾燥を行った。その後、PBS で水和し、ラット腹部大動脈へ移植を行った。3 ヶ月の後、開腹し、移植後血管の開存を直視下に確認したところ、開存が得られていた。また、本脱細胞化血管を抗 vWF 抗体および抗 SMA 抗体により免疫染色を行った所、いずれの抗体においても染色が認められた。



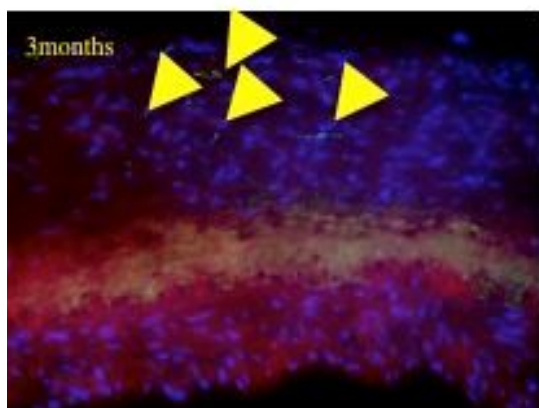
(3) 移植後長期経過後の脱細胞化血管の生理機能

移植後 12 ヶ月の時点で脱細胞化血管を採取し、ノルエピネフリンで血管の収縮を、ニトロプルシドナトリウムで収縮した血管の拡張を検討した。対照として、正常血管について検討した。図上段は対照、下段は移植後の脱細胞化血管での各薬剤への反応を示す。図に見られる様に、収縮の程度は小さいながらも脱細胞化血管においても収縮および弛緩反応を示した。以上より、再生血管が生理的機能を果たす事が示唆された。

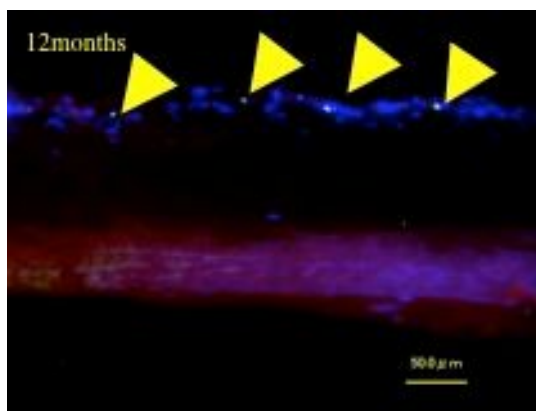


(4) 抗 neurofilament 抗体による免疫染色

脱細胞化血管の移植後、3 ヶ月では血管の外膜側の堆積した細胞層に抗 neurofilament 抗体で染色される神経線維の滲潤を認めた。



さらに 12 ヶ月後においては、外膜側の細胞の堆積はコンパクトになり、抗 neurofilament 抗体により染色された神経線維の分布も平坦化した。



以上のデータより、我々が作成した高張塩溶液による脱細胞化血管は、長期開存が可能である事、口径 1mm 程度の小口径でも長期開存できること、凍結乾燥による保存が可能であること、生理的機能が付加される事、が明らかとなった。

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 1 件)

榊原俊介、野村正 高須啓之ら (著者 5 名、掲載されている順番: 3 番目)
様々な血管吻合術後皮弁モニタリング
日本マイクロ会誌 in press (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

榊原俊介、石田泰久、高須啓之ら
小口径脱細胞化血管の開発とその評価
第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会
(2013.11.7-8、新潟)

榊原俊介、高須啓之、野村正ら
多様な血管吻合術後皮弁モニタリング
第 40 回日本マイクロサージャリー学会学術集会
(2013.9.26-28、盛岡)

高須啓之、寺師浩人ら
reversed cephalic vein graft を用いて
distal venous arterialization を行った示
指 PAD の 1 例
第 40 回日本マイクロサージャリー学会学術集会
(2013.9.26-28、盛岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 啓之 (TAKASU HIROYUKI)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40566022

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：