

補体活性を利用した脱細胞法による再生型小口径人工血管の作成

Decellularization of small diameter blood vessels by use of the complement system

○ 山岡哲二、玉井克明、馬原 淳（国循研センター研）、藤里俊哉（大工大）

Tetsuji YAMAOKA, Katsuaki TAMAI, Atsushi MAHARA, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

Toshiya FUJISATO, Osaka Institute of Technology

Key Words: Decellularized Tissue, Blood vessel, Complement System

1. 緒言

現在の ePTFE や Dacron で作製した人工血管グラフトの問題点を解決する一つの戦略として、ヒトあるいは動物の血管から細胞成分を取り除いた脱細胞血管の研究が進められている。われわれは、これまでに液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発してきた。980MPa の圧力を 30°C 下で 10 分間加え、続いて洗浄処理を行い細胞除去することで細胞成分を効率よく除去できるのみならず、多くの可溶性タンパク成分も除去でき、さらには滅菌効果も確認されている。

しかしながら、小口径の血管に対して適応した場合血管壁構造が脆弱となる問題点が浮上した（図 1）。一方で、native の血管を動物皮下に移植することで細胞が除去される現象は生体内成分による脱細胞効果を示しており、また、血清による脱細胞効果も報告されている（特開 2009-50297）。本研究では、生体成分による脱細胞効果を *in vivo* および *in vitro* で検証するとともに、いかなる生体成分が脱細胞に関与しているかについて検討することで、血管壁構造を保持した脱細胞血管の作製を目指した。

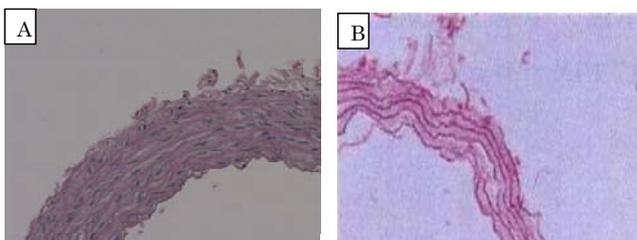


図 1 未処理のラット動脈 (A) および、超高压法により作成したラット脱細胞血管

2. 実験

2-1 生体内埋入による脱細胞

まず、Lewis ラット動脈を透析膜に封入し、SD ラットの腹腔内に留置することで、生体内成分で細胞除去できるかを検討した。ドナーとして Lewis ラット (male, 8-10 週齢)、レシピエントとして SD ラット (male, 8-10 週齢) を用いた。Lewis ラット犠牲後、上行大動脈から大腿動脈を剥離摘出した。超高压脱細胞処理を施した摘出 Lewis ラット血管と、未処理の血管を、透析膜 (MWCO100,000) に封入した。SD ラットをイソフルラン麻酔下、1cm 程度開腹し透析膜に上記のサンプルを留置して閉腹した。腹腔内留置期間は 3 週間とした。腹腔内留置 3 週間後、取り出した血管を H&E

染色し組織学的評価を行なった。

2-2 血清による細胞除去

摘出した Lewis ラット血管を用いて、血清による細胞除去について検討した。透析膜 MWCO10,000~100,000 に封入した包んだ Lewis ラット血管、および、直接血清により処理した血管を、非働化血清、および、非働化していない通常血清（いずれも 1% ペニシリンストレプトマイシン添加）に浸漬し、37°C 下で所定期間インキュベートした。

透析膜 MWCO100,000、50,000、10,000 を用いることで、どのような分子量の血清成分が細胞除去に関与したか検討した。

3 結果

3-1 腹腔内留置後の組織学的評価

透析膜を用いずに直接腹腔内留置した血管の組織学的評価では、腹腔内留置後、細胞核は全く認められずその脱細胞効果の高いことが明らかとなった。さらに、血管壁構造も十分に保持されていたことも示された。未処理組織と超高压印加した組織とを比較した場合にも、血管壁構造や細胞除去率に違いは無く、腹腔内に留置するのみで、ことで一定の細胞除去効果が得られることがわかる。ただし、本ドナーレシピエントシステムにおいては、細胞性免疫応答も考慮する必要がある

3-2 血清による細胞除去

そこで、直接、血清への浸漬法を検討した。血清浸漬後、透析膜の有無に関わらず細胞核は認められず、血管壁構造が脆くなることなく十分に保持されていた。この細胞除去は、従来の超高压印加処理法による細胞除去法と同程度の細胞除去効率 (90% 以上) であり、血管壁構造の保持効率からも優れた手法である。

次に、いかなる血清成分が細胞除去に関与したか検討した結果、今回の処理期間では、非働化血清では細胞は全く除去されなかった。さらに、通常血清を用いても、分画分子量 10,000、50,000 の透析膜に包んだ場合、細胞核は除去されず、分画分子量 100,000 の透析膜に包んだ場合のみで細胞が除去された。このため、断定することは困難であるが、細胞除去の原因物質は、血清に含まれる可溶性因子で、非働化という熱処理により不活化される分子量 5 万以上の成分として、補体の関与が強く示唆された。

さらに、本手法により作成した脱細胞小口径血管は、従来の超高压処理条件で作成した血管より、2 倍強の強度があり、未処理の血管とほぼ同等の強度を有していた。