

OS2-4

種々の脱細胞化法にて調製した脱細胞化血管のタンパク質透過

Comparison of Protein Permeability of Decellularized Aorta Using Various Methods

○ 木村 剛 (東医歯大 生材研)、田所 弘子 (東医歯大 生材研)、
南 広祐 (東医歯大 生材研)、岸田晶夫 (東医歯大 生材研)

Tsuyoshi KIMURA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Hiroko TADOKORO, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Kwangwoo NAM, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Akio KISHIDA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Abstract: Recently, as a scaffold for regenerative medicine, decellularized tissues, in which the cells and antigen molecules are removed to diminish the host immune reaction, are developed. The acellular scaffold should have the similar structure and composition as the natural tissue and the regeneration within the scaffold is expected to be regulated by donor cells. However, the structure and composition of the acellular scaffold changed by decellularization method, such as chemical and physical methods. This difference affects cellular behavior and substance permeability. In this study, we investigated that the model protein permeability in decellularized aorta prepared using various methods. When aorta was decellularized by chemical detergent treatment and physical high hydrostatic pressure (HHP) treatment, the structure of decellularized aorta with detergent was disordered. On the other hand, the structure of the HHP decellularized aorta was similar to the native aorta. Although there was no change in the protein permeability in the HHP decellularized aorta and the native aorta, the permeability in the aorta decellularized with detergent was increased. These results suggest the relationship between structure and protein permeability.

Key Words: Decellularized tissue, Protein Permeability, tissue structure

1. 緒言

近年、組織再生用のスキャフォールドとして、生体組織から細胞成分のみを除去した脱細胞化組織が、人工材料では再現が困難な生体組織特有の複雑な三次元構造と物性を有する点で注目されている。脱細胞化組織の調製法には、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、TritonX-100などの界面活性剤を用いた化学的方法と高静水圧印加を用いた物理的方法があり、脱細胞化法の違いによって組織構造への影響が異なることが報告されている。脱細胞化による組織構造変化は、細胞挙動や物質透過に影響すると考えられる。これまで脱細胞化組織に対する細胞挙動については多くの研究が行われているが、組織構造変化が物質透過に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。しかし、物質透過、特にタンパク質透過に関する基礎的検討は、細胞増殖因子等を介した組織再生に有用な知見を与えると考えられる。そこで本研究では、種々の脱細胞化法にて調製した脱細胞化血管のタンパク質透過について検討した。

2. 実験

ブタ大動脈を種々の厚さに成形し、種々の界面活性剤(SDS, TritonX-100)処理、あるいは高静水圧処理にて細胞を破壊後、4℃にて生理的食塩水による振盪洗浄により組織内の細胞残渣を除去した。続いて生理食塩水に4℃にて浸漬し、脱細胞化大動脈から経時的に漏出するタンパク質を回収し、SDS-PAGEにて漏出タンパク質を評価した。その後、37℃にて再び浸漬し、経時的に漏出するタンパク質をSDS-PAGEにて評価した。また、得られた組織の脱細胞化

をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色、組織構造変化はSEMにより評価した。

膜透過実験装置(図1)を用い、種々の脱細胞化大動脈の物質透過性について検討した。透過物質としてリゾチーム(14kDa)、レシーバー液として生理食塩水を用いた。経時的にレシーバー液を採取し、Lowry法により得られたタンパク質濃度から透過係数を算出した。

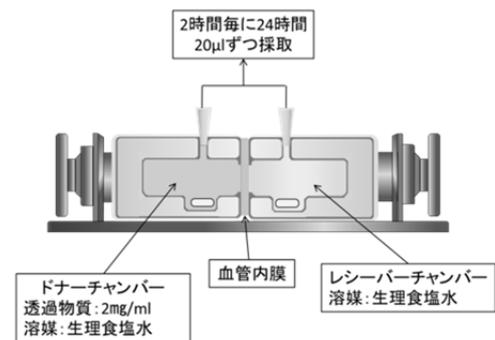


Figure 1. Measurement of protein permeability in a decellularized aorta.

3. 結果と考察

H-E染色評価により、高静水圧処理およびSDS処理にて脱細胞化が確認され、繊維間はSDS処理に比べ高静水圧処理にて比較的維持されていた(図2)。大動脈を構成する内膜、中膜、外膜のそれぞれの表面のSEM観察では、内膜表面が比較的均一な構造を有していた。脱細胞化大動脈の生理的食塩水への浸漬時におけるタンパク質の漏出は、用いる脱細胞化大動脈の厚みに依存した。また、4℃にて16

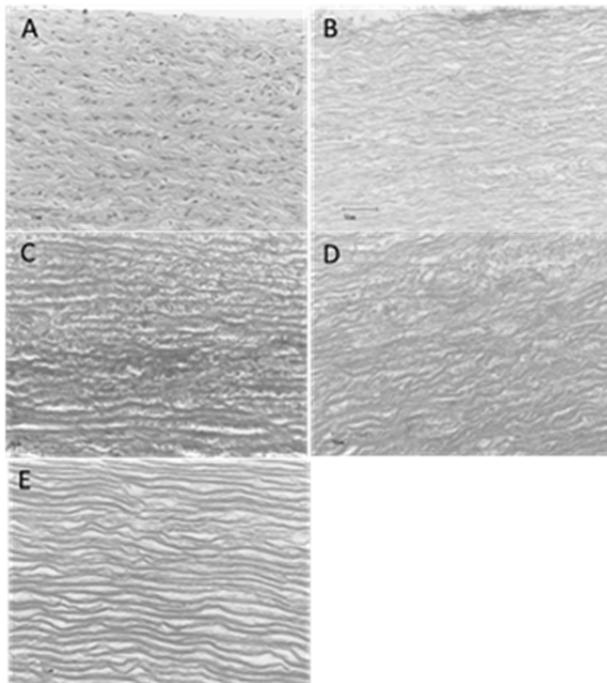


Figure 2. H-E stain of decellularized aorta with various methods.
 A: Native, B: HHP treatment, C: TritonX-100 (24hrs), D: TritonX-100 (72hr), E: SDS treatment.

日間、続いて 37℃にて 5 日間浸漬を行うことで脱細胞化大動脈からのタンパク質の漏出が消失した。さらに、29kDa 以下の低分子量タンパク質は比較的早期に完全に漏出した。これらの結果より、透過試験では、タンパク質漏出を完了した高静水圧処理および SDS 洗浄法にて得られた脱細胞化大動脈を用い、透過タンパク質としてリゾチーム(14kDa)を用いることとした。

種々方法にて得られた脱細胞化大動脈の物質透過を 21℃および 37℃にて検討した (表 1)。

Table 1. Permeability coefficient ($K(\text{cm/hr}) \times 10^{-3}$)

	21℃	37℃
Native	2.2± 1.5	6.1±3.1
HHP treatment	4.2± 2.4	13.0±9.2
SDS treatment	12.0±11.0	14.0±4.4

総括物質移動係数は脱細胞化法により異なり、未処理、高静水圧処理、SDS 処理の順に増加した。この傾向は、21℃、37℃のいずれの温度条件においても示され、それぞれの総括物質移動係数は 21℃に比べて 37℃にて増加した。総括物質移動係数の脱細胞化法による差異については、SEM 観察、H-E 染色による脱細胞化組織の微小構造評価にて、SDS 処理の場合にコラーゲン繊維の切断や繊維間の拡大が示されており、HHP 処理による構造変化は比較的抑制されていたことから、脱細胞化処理による組織構造変化が総括物質移動係数に強く影響したと考えられる。また、温度上昇に伴う総括物質移動係数の上昇については、温度上昇に伴う脱

細胞化組織の構造変化およびタンパク質の拡散速度上昇によると考えられる。これは脱細胞化処理における組織構造の変化によるものと考えられる。特に、高静水圧処理血管では未処理と同程度の透過係数を示したことから、より組織構造が維持されていることが示唆された。