

OS2-4

低酸素に対する生体適応反応を利用した再生組織への in vivo 血管誘導

Construction of functional vascularized-tissue based on optimal oxygen supply

○ 川村彩智 (芝浦工大) 関谷直美 (埼玉医大) 市岡滋 (埼玉医大) 柴田政廣 (芝浦工大)

Sachi KAWAMURA (Shibaura Institute of Technology), Naomi SEKIYA (Saitama Medical University), Shigeru ICHIOKA (Saitama Medical University), Masahiro SHIBATA (Shibaura Institute of Technology)

Abstract: It is well known that capillary blood flow facilitates the important role of the oxygen supply to tissue under physiological conditions, and during wound healing and tissue regeneration. In this study, we aimed to determine the optimally efficient oxygen level to increase the capillary angiogenesis for the application of regenerative and reconstructive medicine. For this purpose, three different approaches were applied; 1) by measuring the perfused capillary flow in response to changes in tissue oxygen levels, 2) by investigating the effects of blood flow on the capillary angiogenesis, 3) by evaluating the efficiency of regenerative tissue under high and low oxygen conditions. Capillary blood flow depends on tissue oxygen levels. The capillary flow decreased as the oxygen level was elevated, while the capillary flow increased under levels of low oxygen. Increments of capillary flow enhanced the capillary angiogenesis, however the efficiency of regenerative tissue was independent of the capillary flow. Furthermore, high oxygen levels enhanced wound healing at the beginning of regeneration. These results suggest that tissue is kept under high oxygen levels at the beginning of regeneration, and subsequently the oxygen level should decrease to enhance the capillary angiogenesis.

Key Words: oxygen, regenerative medicine, wound healing, capillary angiogenesis, vascularization

1. はじめに

再建医学領域における有効な治療法として自己組織再生と細胞工学的再生組織の移植が考えられる。これらにとって共通の問題点は再生組織を栄養するための微小循環血行の確立が難しいことである。実験室においていかに高性能な再生組織であっても、生体内でその機能を長期に亘り維持するには、栄養血管系が不可欠であることは自明である。しかし細胞培養により目的とする組織を構成する細胞工学プロジェクトの多くは、栄養血管についての配慮が欠けている。本研究では上記問題点の克服、すなわち自己および細胞工学的再生組織への栄養供給を目的とした in vivo 微小血管誘導法の開発を行う。ここでは、組織酸素環境と毛細血管血流の関係、さらには毛細血管血流と血管新生の関連を詳細に調べ、低酸素に対する生体適応反応を利用した再生組織への血管誘導法の確立を試みた。

2. 組織酸素環境と毛細血管血流

組織への栄養供給は、細動脈と細静脈間にある毛細血管で行われるが、この毛細血管血流は周囲組織の酸素状態に関係し、毛細血管上流に位置する細動脈の収縮・拡張により制御されていると考えられている¹⁾。ここでは、動物実験により生体顕微鏡下に微小循環を直接観察することにより、急性時での組織酸素環境と毛細血管血流の関連を in vivo において調べた。家兎の大腿に位置する骨格筋 tenuissimus muscle を対象に、生体顕微鏡下で筋組織の酸素分圧を変化させたときの毛細血管赤血球速度と開存毛細血管数 (実際に血流の存在する血管数) を計測した。筋組織酸素分圧の調節は酸素・窒素・炭酸ガスで泡気し任意の酸素分圧に保ったタイロッド溶液 (pH:7.3, 37°C) で筋表面を灌流することにより行った。毛細血管血流は TV カメラ接続の生体顕微鏡を介し動画として録画し、再生画像から赤血球速度と開存毛細血管数を求めた。図1に実験結果を示す。毛細血管赤血球速度と開存毛細血管数は筋組織酸素分圧に大きく依存することが分かる。毛細血管赤血球速

度、開存毛細血管数ともに筋組織が低酸素状態では高値を示し、酸素分圧の上昇に従い低くなり、最終的には血流が停止する。本結果から、筋組織周囲を低酸素環境にすることにより筋組織毛細血管血流は増加することが確認できた。

3. 毛細血管血流と血管新生

つぎに、毛細血管血流と血管新生の関係を調べた。実験には、家兎耳介チャンパー観察法 (rabbit ear chamber) を用いた²⁾。図2に家兎耳介チャンパー観察法の概要を示す。耳介部に直径7mmの創傷を作成し、その部位に厚み50・mの透明窓を装着する。この厚み50μmの透明窓内には骨格筋等の実質組織は再生せず、膜状組織内の新生毛細血管のみが生体顕微鏡下で観察できる。毛細血管新生量の定量化は窓内面積に占める新生血管面積率で表わした。また実験は、通常血流群と、交感神経遮断剤 (α 1-blocker: Prazosin) 経口投与による高血流負荷群により行い、各群とも受傷後3週間、無麻酔下において毛細血管新生過程を

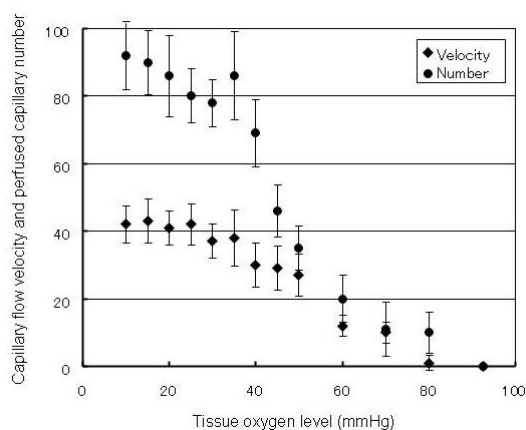


Fig.1 Changes in capillary flow velocity and perfused capillary number in response to tissue oxygen level

観察した。図3には、通常血流群とPrazosin経口投与による高血流群の受傷後9日目からの透明窓内新生血管量の変化を、また図4には、通常血流(A)と高血流負荷(B)における受傷後21日経過時の透明窓内新生血管顕微鏡像の1例を示す。透明窓内血管新生が観察可能となる受傷後9日目から窓内全てに血管網が完成する21日経過時まで全ての期間において高血流群での血管新生亢進の高さが観察できる。また21日目の顕微鏡像においても、高血流群での血管密度の多さが分かる。

以上の組織酸素環境と毛細血管血流、および毛細血管血流と血管新生の各実験結果より、組織周辺を低酸素環境に保つことにより局所血流量を増加させることができ、さら

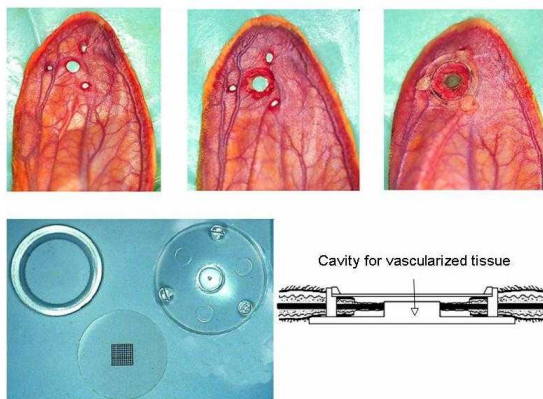


Fig. 2 The chamber implanted in the distal portion of rabbit ear.

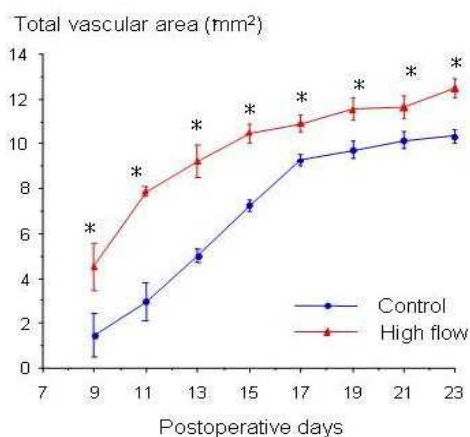


Fig.3 Total vascular area in the prazosin-treated group was significantly greater than those in the control group throughout the entire period of observation.

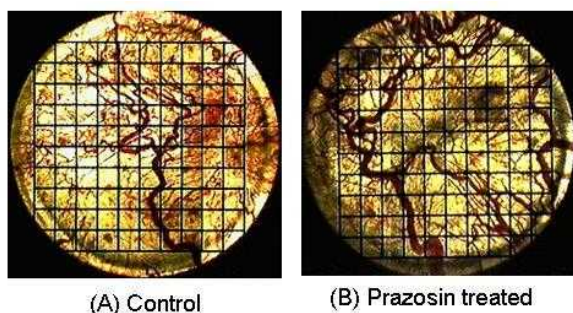


Fig.4 General appearance of the microvasculature in the chamber.

に高血流量を保つことにより血管新生を亢進させることが可能であることが明らかになった。これらの知見を基に、低酸素環境が組織再生に有効であるかを調べた。

4. 組織酸素環境と組織再生能

酸素環境の違いによる組織再生能を in vivo で比較するためには、個体差を排除する必要がある。そのため本実験では、同一個体のラット背部にほぼ同様の傷を作成し、その後の再生・治癒状態を比較した。図5に実験モデルの概要を示す。組織の酸素環境は、剥離した皮膚面に、高酸素透過性および低酸素透過性の透明フィルムを装着しすることにより、再生組織周囲を異なった酸素環境に保った。傷内の酸素分圧は、非接触タイプの光学的酸素分圧測定装置により経透明フィルム的に測定した。高酸素透過性フィルム内の酸素分圧は100-160 mmHgに、一方低酸素透過性フィルム内の酸素分圧は10-40 mmHgに保たれることが確認できた。これらの酸素環境において1週間での組織再生(治癒)過程を観察した。受傷1週間経過時に採取した再生部組織断面標本の顕微鏡像を図6(A)に示す。組織標本中、新生毛細血管は黒い点として示されているが、低酸素環境に保ったほうが明らかに新生毛細血管数が多いことが分かる。つぎに、受傷後1週間経過時の組織再生(治癒)状態を、受傷面積に対する再生組織面積率として表したものを図6(B)に示す。本結果より、低酸素環境時に比べ高酸素環境時では新生毛細血管数が少ないにもかかわらず、組織再生能は高いことが分かる。

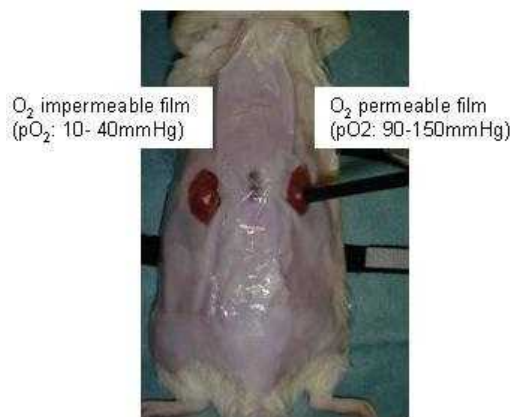


Fig. 5 Animal model to observe the wound healing.

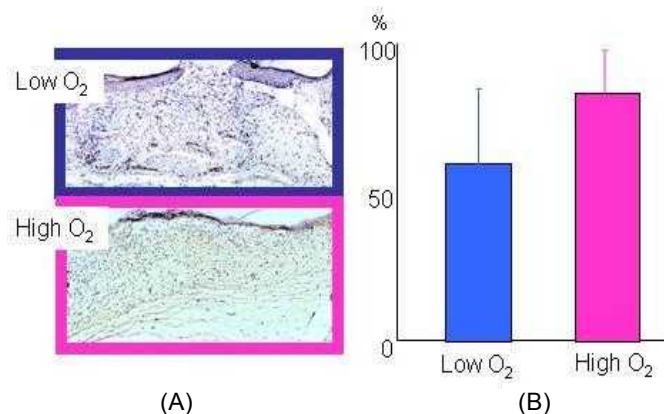


Fig.6 Micrographs of regenerative tissue sample under low and high oxygen levels (A). Relative ratio of regenerative tissue area and total wound area for one week after operation (B).

5. まとめ

今回の結果を総合的に判断すると、毛細血管からの酸素供給を必要としない組織再生過程初期においては、毛細血管新生に有利な低酸素環境よりも、十分な酸素が組織周囲に存在し、周囲からの拡散で酸素供給が可能な高酸素環境に保つほうが組織再生に有利である可能性が高い。しかし、再生組織がある程度の大きさに成長すると外気からの拡散のみでは酸素供給が不十分となり、酸素供給源としての毛細血管が必要となると思われる。このような状況下においては、再生組織周辺を低酸素環境に保ち、毛細血管新生を亢進させる必要が高いのではないかと考えられる。

参考文献

- 1) M. Shibata, S. Ichioka, T. Togawa, and A. Kamiya: Arterioles' contribution to oxygen supply to skeletal muscles at rest. *Eur J Appl Physiol* 97: 327-331, 2006
- 2) S. Ichioka, M. Shibata, K. Kosaki, Y. Sato, K. Harii, and A. Kamiya: In vivo measurement of morphometric hemodynamic changes in the microcirculation during angiogenesis under chronic α 1-adrenergic blocker treatment. *Microvasc Res* 55: 165-174, 1998