

脱細胞組織とコラーゲン細胞シートを用いたサンドイッチモデルによる血管構築法の開発

In Vitro Aortic Reconstruction by Sandwich Model using Acellular Tissue and Collagen Cell Sheets

○テップトーン・サラウット 藤里俊哉 大阪工業大学大学院

Thepthong Sarawut and Toshia Fujisato, Osaka Institute of Technology

Abstract: Currently, aortic aneurysm is treated by bypass surgery, artificial blood vessel surgery, and catheters. However, all of these methods are expensive and there is a possibility that the body could reject any artificial implants. Artificial blood vessel implantation is not suited to infants as the implant will not continue to grow as the child does and endothelium cells do not cover the interior lining of the vessel, raising the possibility of blood clots in long-term transplantation. Recently, technological development related to arterial tissue regeneration is progressing. In this study, we constructed blood vessels by the outer membrane using a cell sheet of fibroblast, the media membrane using decellularized porcine aorta and the inner membrane using a cell sheet of endothelial cells.

Key words: Biomedical Engineering, Acellularization, Collagen Cell Sheet, Three-dimensional Culture

1. 背景

大動脈瘤などの動脈疾患や心筋梗塞などの冠状動脈疾患は、世界で最も人の命を奪っている病気である。全世界で毎年約730万人[1]、日本で約5万人の患者さんが亡んでいる。更に経済の成長が急変化する発展途上国では冠状動脈疾患の患者数は増える傾向がある。例えば、タイでは、高価な医療費やドナー不足のため、手術を受けられず年間約9万人の患者さんが冠状動脈疾患によって亡くなっている[2, 3]。現在、大動脈瘤の治療方法には、薬物療法、カテーテル治療法、そして人工血管を用いた手術の3つがある。しかし、いずれも高額な上、異物反応、幼児患者さんへの適応などの問題がある上、人工血管では、長期移植後でもほとんど内皮組織化されない。最近、細胞シート、生体吸収性材料などの組織再生に関する技術開発が進んでいる。しかし、合成材料からなるスキャフォールドの開発には、複雑な形状の造形、生体同等の力学特性の付与、吸収速度の制御といった問題点がある[4]。そこで、われわれは胸部外科系の再生医療を目的として、大動脈から細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスを用いたバイオスキャフォールドの作成を行っている。本研究では、生体外での血管構造の再構築を目的として、バイオスキャフォールドにコラーゲン細胞シートを組み合わせたサンドイッチモデルの開発について報告する。

2. 実験方法

2-1 脱細胞化組織による大動脈中膜の作製

約100kgの雄ブタから適出された全長15cm、直径約2cmの大動脈を購入した(東京芝浦臓器株式会社)。大動脈の周りにある血管、脂肪などの組織を除去して長さ2cmに切り、脱イオン水により24時間洗浄した。続けて、脱細胞化のため0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液により24時間攪拌洗浄した。インキュベーター内で脱イオン水により24時間静止状態で洗浄した後、70%エタノールに24時間浸漬することで滅菌を行った。最後に、抗生剤を含むPBSで48時間洗浄し、利用するまでインキュベーター内で保管した。

2-2 コラーゲン細胞シートによる内膜と外膜の製作

内膜の製作には血管内膜細胞、外膜の製作では線維芽細胞を使用した。1.0×10⁶cells/mlのコラーゲン細胞懸濁液を作成し[8]、マイクロピペットを用い、培養皿を傾けながら、泡を立てないように培養皿の表面に500μl塗った後、コラーゲンシートが固まるようにインキュベーター内で30分

加温した。固まったコラーゲン細胞シートに5mlのGM培地(FBS10%,抗生物質1%を含むMEM培地)を入れ、オーバーコンフルエント状態まで約5日間インキュベーター内で培養した。

2-3 合体組織の構築

Fig1に表すように、組織の構築を行った。まず、Cell Shifter(株式会社セルシード)[5]を用いて培養皿からコラーゲン血管内膜細胞シートを採取し、切り開いた脱細胞化ブタ大動脈に乗せた(Fig.2)。次に、1mm²当たり直径0.4mmの穴を開け加工した5mlピペット(Fig.3)に血管内膜細胞層を内側として巻きつけ(Fig.1a)、糸で縫合した(Fig.1b)。続いて、線維芽細胞シートを外側に乗せ(Fig.1c)、しっかり接着させるためにインキュベーター内に約30分静置した(Fig.1d, Fig.4)。最後に無菌内腔と外腔の2灌流路、流速の調節可能な独自開発バイオリアクタ(Fig.5)を用いてインキュベーター内で、2日間ごと培地交換しながら1週間培養した。

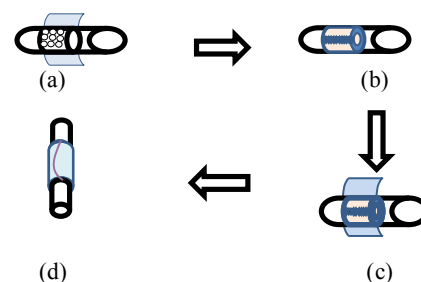


Fig.1 Schematic drawing of sandwich model



Fig.2 Endothelial cell sheet and decellularized blood vessel



Fig.3 Holding tube



Fig.4 Reconstructed blood Vessel



Fig.5 Bioreactor

2-4 力学的評価

小型卓上試験機 (EZGraph5 Shimatsu) を用い、4mm/min の速さで伸展してストロークと実験力を測定し、フックの法則により再構築血管の弾性率を求めた。

3. 結果

H&E 染色法による評価から、脱細胞組織は細胞の核がきれいに脱落し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスだけが残っていた(Fig.6, Fig.7)。バイオリアクタで1週間培養した再構築血管では内腔のコラーゲン血管内皮細胞シートと外腔のコラーゲン線維芽細胞シートが脱細胞組織としっかり接着していた(Fig.8)。SDS が細胞に悪影響を与えることが報告されているが、Live Dead 細胞毒性検査法により評価したところ、細胞が生着していることを確認した(Fig.9)。引っ張り試験の結果より、脱細胞組織や再構築組織は正常組織と弾性率がほぼ等しかったことから、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックス維持されていることが示唆された(Fig.10)。

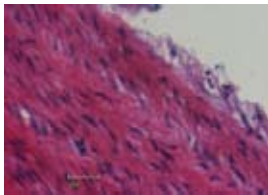


Fig.6 Native aorta



Fig.7 Decellularized aorta

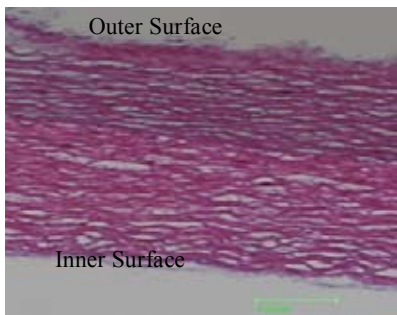


Fig.8 Reconstructed aorta

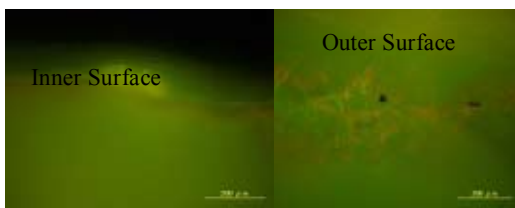


Fig.9 Live-Dead Immune-staining

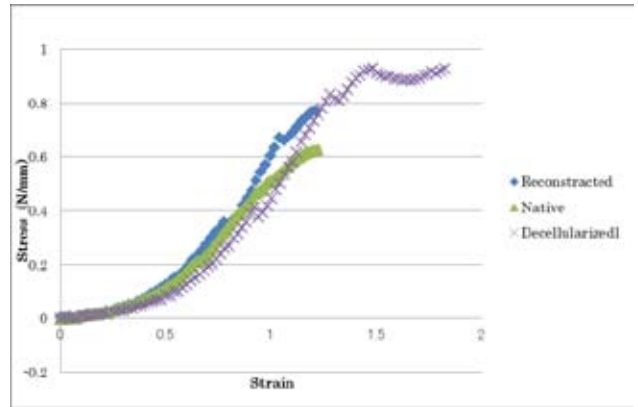


Fig.10 Stress-Strain Curve

3. 結論

本サンドイッチモデルによって、生体外にて血管構造を再構築できることが示唆された。さらに、脱細胞化組織内に平滑筋細胞を播種し、より正常大動脈に近い構造の再構築を目指す予定である。

5.参考文献

- [1] World life expectancy, World Ranking total deaths, www.worldlifeexpectancy.com/world-rankings-total-deaths (参照 2012 年 9 月 10 日)
- [2] Leading Cardiac Center and Heart Surgery Center in Asia at Vejthani Hospital, Bangkok, Thailand, Asia Heart Diseases Center Thailand, <http://www.heartsurgery-asia.com> (参照 2012 年 9 月 10 日)
- [3] Victual Medical World, Robot-assisted stem cell therapy a first in Thailand, <http://www.hoise.com/vmw/05/articles/vmw/LV-VM-12-05-38.html> (参照 2012 年 9 月 10 日).
- [4] 石井庸介, バイパスと人工血管冠動脈バイパス術に対する小口径人工血管の開発, 日医大医学会誌, vol.3, no. 3, pp.151, 2007.
- [5] 小林純, 岡野光夫, 細胞シート工学部のため温度応答性培養皿, 遺伝子医学 MOOK 別冊, ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術, pp. 349-353, 2009.
- [6] Freshney, R.I., Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique. 3rd Ed. Wiley-Liss. New York. USA, 1994.