

細胞外マトリクス粉末のラット急性心筋梗塞モデル中期評価

The mid-term evaluation of the ECM powder using the acute myocardial infarction rat model

宮木靖子（札幌大 心外）根岸淳（札幌大 心外、JSPS）船本誠一（札幌大 心外）木村剛（東医歯大 物質医工）南広裕（東医歯大 物質医工）藤里俊哉（大工大 工）樋上哲哉（札幌大 心外）岸田晶夫（東医歯大 物質医工）

Yasuko MIYAKI Sapporo medical university, Jun NEGISHI Sapporo medical university, JSPS, Seiichi FUNAMOTO Sapporo medical university, Tsuyoshi KIMURA Tokyo medical and dental university, Kwangwoo NAM Tokyo medical and dental university, Toshiya FUJISATO Oosaka institute of technology, Tetsuya HIGAMI Sapporo medical university, Akio KISHIDA Tokyo medical and dental university

Abstract: Myocardial infarction is one of the worst causes of death in the world along with malignant tumor and various treatments including bypass surgery for the purpose of supplying blood to the site of ischemia have been discussed and examined. In this study, we prepared extracellular matrix powder from liver and heart tissue of a rat and performed a characteristics evaluation of extracellular matrix powder using rat subcutaneous implantation and a rat acute myocardial infarction model in order to examine acute mid-term myocardial infarction. Decellularized tissue powder could be prepared from various rat tissues. Although decellularization includes other methods such as detergent method, an almost same result of decellularization was obtained from the ultrahigh pressure treatment as well. From the rat myocardial infarction model, a possibility of neovascularization into the peri-infarction area was indicated by adding decellularized liver powder. Decellularized tissue powder was considered to be able to improve this situation.

.Key Words: Myocardial infarction, Decellularized tissue, rat acute myocardial infarction model

1. はじめに

血管移植術で用いられる内径 6mm 以下の小口径グラフトでは、早期の血栓形成や狭窄が問題とされている。現在の移植血管第一選択は自家血管であり、他家血管や合成高分子人工血管はほとんど選択されていない。しかし、自家血管において、代替血管の不足、患者の負担が大きいことなどが問題視されている。近年、小口径血管グラフトの開発研究が広く実施され、組織工学的手法を用いた研究にも注目が集まっている。欧米において、脱細胞化ヒト小口径血管グラフトが既に認可を受けているが、ヒト組織を原料としているため供給不足の解決には至っていない。そのため、ヒト以外の脱細胞化組織の研究が試みられている。本研究では、ヒト以外の動物組織としてブタ組織を用いた脱細胞化小口径血管グラフトの作成検討を行った。特に、血管の組織学的構造とその特性に着目した。血管、特に動脈は、その血管にかかる血圧や血流量によって組織学的構造が異なり、生体外マトリクスのコラーゲンとエラスチンの比率が大きく変化する。高血圧領域に位置する血管ほどエラスチンの構成比率が高く、コラーゲンの構成比率が低下し、低血圧領域ではコラーゲンの構成比率は高くなる。当発表では、ブタから採取した種々の脱細胞化動脈の組織学的構造と特性評価を行った。

2. 実験方法

Wister rat（10週令）より、肝臓および心臓を摘出し、超高压処理法を用いた脱細胞化処理により、ラット由来の細胞を組織内より除去した。その後、凍結乾燥処理を行い、種々の脱細胞化組織より水分除去を行った。凍結乾燥を行った組織を粉砕処理し、脱細胞化粉末を作成した。

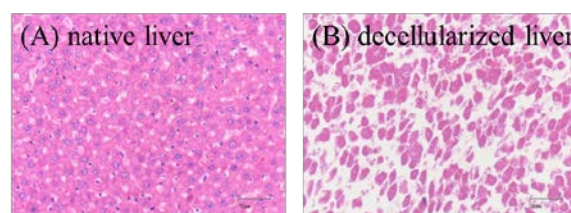
作成した脱細胞化粉末は HE 染色および走査型電子顕微鏡により、脱細胞化の評価及び粉末の形状を評価した。

生体適合性を評価するため、ラット皮下モデル及びラット急性心筋モデルを作成し、脱細胞化粉末による治療効果を検討した。ラット皮下モデルでは、wister rat（10週令）を鎮痛薬および麻酔薬により不動化させ、ラット背部を剃毛後、イソジン溶液にて皮膚表面を消毒した。その後、皮下を 10 mm 切開し、切開部より皮下組織を剥離し縦・横に 20mm ほど剥離し、剥離した部位に、脱細胞化粉末を移植した。移植後 3 日後に移植部位を摘出し、組織周囲の炎症反応を評価した。

ラット急性心筋梗塞モデルでは、wister rat（10週令）を鎮痛薬および麻酔薬により不動化させ、サーフローの外筒を挿管チューブとし、挿管後ベンチレーターにて呼吸を制御した。その後、側開胸により心臓へアプローチを行い、5-0 プロリン糸を用いて、冠動脈を結紮した。結紮後、血流遮断により、心筋梗塞モデルを作成し、白色化した心筋梗塞部へ、脱細胞化粉末およびフィブリンの混合体を塗布し心筋梗塞部位への治療とした。治療後は、閉胸し自発呼吸を確認するまでベンチレーターにて呼吸管理を行い、抜管後は体温低下を防ぐため 37°C にてケージを加温し、経過を観察した。4 週間後にラットを犠牲させ、心臓を摘出し、組織学的に評価した。

3. 結果

超高压処理をした脱細胞化組織の HE 染色結果を Fig1 に示す。



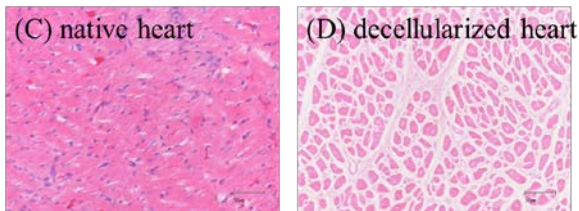


Fig 1 Fig. Sections of hematoxylin and eosin stain of native/decellularized rat tissues (Scale bar: 50 μ m).

高静水圧法により、ラット肝臓・心臓の脱細胞化が可能だった。細胞化肝臓には、ほとんど ECM 構造体が認められなかったが、脱細胞化心臓は、明確な ECM 構造体が認められた。

走査型電子顕微鏡にて評価を行った。脱細胞化組織を、直径 500 μ m 以下の粉末状に調整可能だった。肝臓粉末は、細かい粒子形状を示し、心臓粉末は、比較的サイズの大きな板状を示した

ラット皮下移植モデルでは、脱細胞化肝臓粉末、心臓粉末ともに、顕著な炎症惹起は認められなかった。脱細胞化心臓粉末と比較し、脱細胞化肝臓粉末では細胞が均一に浸潤した。

ラット急性心筋梗塞モデルにおいては、未処置群、フィブリン糊添加群と比較し、脱細胞化肝臓粉末+フィブリン糊添加群では、新生血管の増生が認められた。

4. 考察

種々のラット組織から脱細胞化組織粉末作製が可能だった。脱細胞化方法には他にも界面活性剤法があるが、超高压処理法でもほぼ同一の脱細胞化の結果が得られたと考えられる。生体適合性を評価するため、ラットを用いた動物実験を行った結果、脱細胞化組織粉末は、炎症反応を惹起せず、宿主細胞を誘導することが示された。このことより、脱細胞化によるドナー細胞は炎症反応を惹起しない程度には処理されており、かつレシピエント側の細胞を異所でも誘導することが示された。加えて、組織ごとに、脱細胞化組織粉末の性質が異なることが示された。ラット心筋梗塞モデルにおいては、脱細胞化肝臓粉末添加により、梗塞周囲への新生血管誘導の可能性が示された。このことより、虚血に陥った心筋部位へ血管誘導の自己治癒能力が働くが、その力は弱く、実際は虚血心筋が破壊され、心筋梗塞部位が菲薄されるが、脱細胞化組織粉末は、この状態を改善できる可能性が考えられた。

参考文献

- (1) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Higami T, Kishida A. Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure. *J Artif Organs* 2011;14:223-231.
- (2) Fischer M, Llauro JG. Collagen and Elastin Content in Canine Arteries Selected from Functionally Different Vascular Beds. *Circulation Research* 1966; 19: 394-399.