

前方のみの分割では必要ないが、側方、後方などでは必須である。内腔がしっかり確保されるまでの3~4週間位を目安に入れておく。

以上が代表的な術式であるが、術後療法としては感染の予防が重要であり、抗生剤の投与を十分に行う。また超音波ネブライザーの加湿も併せて行う必要がある。

### C. 症例呈示

症例：75歳 男性

主訴：頸部腫瘍

家族歴：特記すべきことなし

既往歴：平成2年膀胱腫瘍にて手術

現病歴：昭和63年頃より痛みを伴う右頸部腫瘍が出現。近医での鎮痛剤注射にて痛みが軽快したため放置していた。1年後に左頸部に腫瘍出現し、次第に増大してきた。平成2年10月、膀胱腫瘍にて当院泌尿器科に入院した際に、頸部腫瘍についても精査されたところ、甲状腺腫瘍の気管喉頭浸潤を認めたため、手術加療目的に平成3年1月17日泌尿器科より当科転科した。

入院時所見：前頸部に腫瘍を認めた(図4)。CTにて甲状腺腫瘍の気管浸潤あり、気管ファイバーにて気管狭窄を認め、4cmの浸潤範囲を有していた。

入院後経過：平成3年2月13日甲状腺全摘、両頸部郭清、上縦隔郭清、気管開窓術施行(図5)。術後2週で経口摂取開始するも誤嚥を認めた。術後4週で、手指で気管開窓部を閉鎖することで誤嚥なく経口摂取可能となった。気管開窓部の状態が安定したため4月15日DP皮弁による気管開窓部閉鎖術を施行した(図6)。術後気道狭窄認めず、経口摂取可能であり5月21日退院した(図7)。

### D. 考察

本症例は気管1/3周の欠損でありhinge flapでの気管再建を検討したが、前頸部皮膚の癒痕拘縮があるためDP皮弁による気管再建を行った。退院まで初回手術から3ヶ月を要したが、術後の気管狭窄は認めなかった。

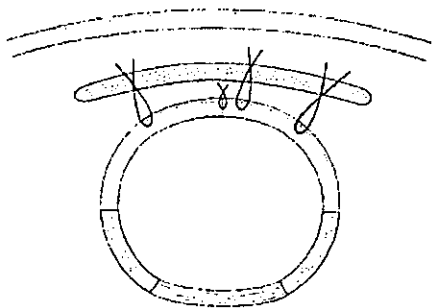


図1：前壁に軟骨をおく

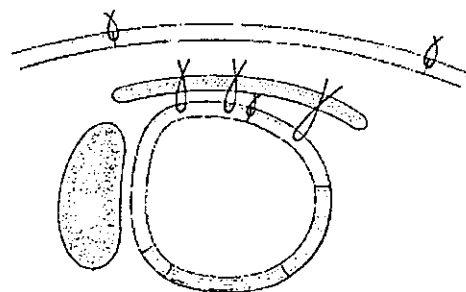


図2：側壁に肋軟骨をおく

### E. 結論

気管の再建手術は、気管端々吻合においては、反回神経麻痺の危険性があり、反回神経麻痺が生じると誤嚥をきたす可能性が高く、温存した喉頭摘出または喉頭閉鎖が必要となる場合がある。また、頻回の咳、人工呼吸器の使用により、気管吻合部の縫合不全が生じる可能性がある。気管溝による再建は安全性は高いが、再建された気道が皮膚であるため、術後内腔への痂皮付着、癒痕狭窄の可能性があり、追加手術が必要なことがある。

また、DP皮弁や肋軟骨を用いて気管の再建を行うことは患者にとってさらなる手術侵襲を加えるばかりでなく、採取部位の癒痕拘縮による術後後遺症が出現する可能性もあり、術式を十分検討する必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 1) 大森孝一：外傷後の気道・食道再建

池田勝久(責任編集)・岸本誠司(編集)「耳鼻咽喉科診療プラクティス 13 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の外傷と異物」文光堂、東京、228-231、2004

#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

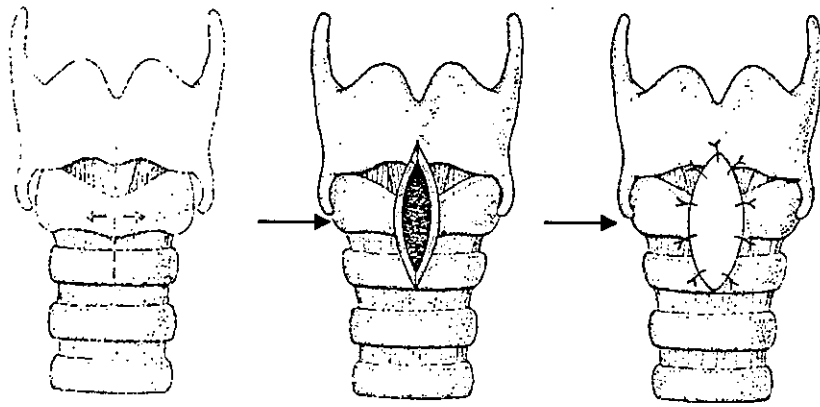


図3：輪状軟骨前方に割を入れ開大し、軟骨をはめ込む



図4：術前写真



図5：初回手術後



図6：局所(DP)皮弁による気管孔閉鎖術後



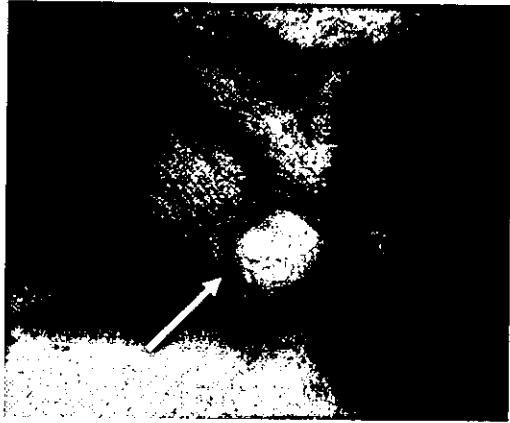
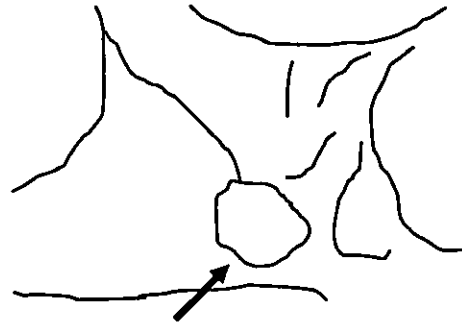


図7：退院時



閉鎖

## 気管切開孔の閉鎖術

分担研究者 小川 洋（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
研究協力者 鈴木政博（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
鹿野真人（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
横山秀二（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
主任研究者 大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

気管切開術は日常的によく行われる手段で、通常はカニューレ抜去により特に問題なく自然閉鎖が期待できる。しかし、なかには閉鎖しない症例もある。当科における緊急気管切開症例では、気管孔の閉鎖を期待して、閉鎖不全に陥った症例がなかった。また、閉鎖不全に対しては、局所皮弁による閉鎖術が報告されており、術後の合併症も保存的な加療で対処であったとされていた。本研究では、気管の欠損部の再建について現状と問題点を把握する。

### A. 研究目的

気管切開術は日常的によく行われる手段で、通常はカニューレ抜去により特に問題なく自然閉鎖が期待できる。しかし、なかには閉鎖しない症例もあり、手術的に気管孔を閉鎖する必要に迫られる場合もある。当科における緊急気管切開術を行った症例での気管孔閉鎖の実態について、また、気管孔の閉鎖術についての文献的考察も報告する。

当科で平成9年1月から平成14年8月までの5年8カ月の間に当科に緊急入院の上、入院当日に緊急気管切開術を施行された34例を対象とした。

### B. 再建方法

当科での緊急気管切開例において、気管孔閉鎖術を必要とした症例はなかったので報告されている気管孔閉鎖術を示す。(fig. 1)

局所麻酔下に手術が施行されていた。皮切はaのごとく、気管孔周囲にhinge flapを2枚、その右側に皮膚欠損部被覆皮弁をデザインする。気管孔左右より1枚ずつの気管前壁形成用のhinge flapを作製する(b)。気管孔近くで、かつ、より正常に近い皮膚を皮膚欠損部被覆用皮弁として1枚作製する(c)。計3枚の皮弁を作製する。その後、hinge flapで気管前壁を再建する。左右の皮弁を、4-0または5-0ナイロン糸を用いてhinge flapの皮膚面が気管内壁になるように縫合する。その際、空気漏れを防ぐため左右のhinge flapの唇を密に縫合する(d)。気管前壁の閉鎖終了後、皮膚欠損部被覆用皮弁を回転し、真皮層で被覆、縫合する(e)。回転の際、皮弁に緊張がかからないように周囲皮下組織の剥離を十分に行う。剥離

範囲の広い症例にはペンローズドレーンを留置する。局所皮弁を周囲皮膚と5-0ナイロン糸にて縫合し終了する。

### C. 結果

当科で施行した緊急気管切開例34例中33例に中気管切開術、1例でのみ下気管切開術を施行した。術後当科で施行された緊急気管切開例34例では、閉鎖すべき症例で閉鎖不全が起こった症例はなかった。しかし、気管孔の閉鎖までに最長50日かかった症例もあった。気管孔閉鎖までの期間を疾患別にまとめた。(表1)

当科における気管孔閉鎖の処置について、気管孔が閉じられずにレチナやカニューレを挿入したままの症例4例と原疾患の加療のため喉頭全摘術を施行された7例を除き、閉鎖を期待した21例中、縫合なく自然閉鎖した症例が9例であった。気管孔が閉鎖しないため縫合した症例は12例であり、11例は離開なく閉鎖可能であった。1例は離開したが再縫合にて閉鎖可能であり、全例局所皮弁は使用せず一期縫縮可能であった。

### D. 考察

1. 気管孔閉鎖不全の原因として以下のものがあげられる。

1) 器質的な原因：カニューレの挿入に無理があり、気管軟骨の切り口の屈曲や肉芽増生により内腔の狭小化がある場合、気管孔が輪状軟骨、甲状軟骨に及ぶ場合、気管孔より上部の気道に狭窄の原因が残存する場合とされている。

2) 基礎疾患のため、ステロイドの長期の服用により、その副作用の易感染性と免疫機能低下を起こし、創傷治癒遷延した場合。

3) MRSAや緑膿菌などの感染

- 4) 気管孔の開存期間が長い場合
- 5) 気管切開術後管理の問題：専門医以外のカニューレ交換が閉鎖不全の原因となるとの報告もある。

2.気管孔閉鎖術の手術手技について

1)気管壁に大きな欠損が生じている場合には、耳介軟骨を使用した術式、耳介軟骨、肋軟骨を使用した術式、大胸筋皮弁を使用した術式などが報告されている。一般に気管壁の 1/3 周までの欠損では支持枠の再建の必要はないとされている。

2)通常の気管切開孔の閉鎖が悪い場合には、頸部局所皮弁を用いた二次的術式、気管孔周囲を円周状に剥離し上下方向の hinge flap を作製し、閉鎖する術式、前頸筋群を用いた術式などがよいとの報告がある。

3.術後の合併症について

皮下気腫や創部の感染が報告されているが、保存的な加療で軽快していた。

E. 結論

気管孔の閉鎖について、当科の現況を報告した。緊急気管切開術を施行し、その後閉鎖を期待した症例 21 例で気管孔閉鎖不全となった例はなかったが、最長 50 日かかった。

通常の気管孔閉鎖不全に対する、閉鎖術は局所皮弁で報告されており、術後の合併症として、皮下気腫や創部の感染が報告されているが、保存的な加療により対処可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 大森孝一：外傷後の気道・食道再建

池田勝久(責任編集)・岸本誠司(編集)「耳鼻咽喉科診療プラクティス 13 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の外傷と異物」文光堂、東京、228-231、2004

2. 学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

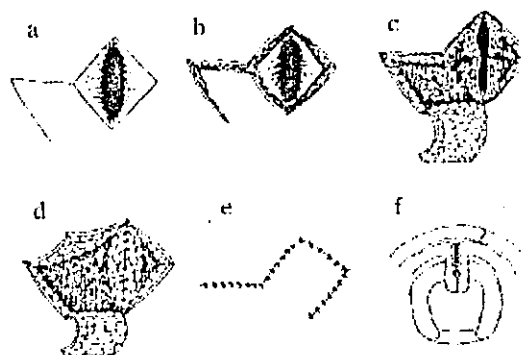


Fig. 1 Techniques for closure of tracheostoma.

表 1)

気管孔閉鎖までの期間	～10日	～20日	～30日	～40日	～50日	レチナカニューレ	喉頭全摘	計
疾患								
急性喉頭蓋炎	5	0	0	0	0	0	0	5
両反回神経麻痺	0	0	1	0	0	2	0	3
頸部膿瘍(咽後膿瘍を含む)	4	1	2	0	0	0	0	7
縦隔膿瘍	0	1	1	0	0	0	0	2
咽頭出血	1	0	0	0	0	0	0	1
喉頭肉芽	0	0	0	0	0	1	0	1
喉頭癌	0	0	1	1	1	1	6	10
下咽頭癌	0	0	0	0	0	0	1	1
悪性リンパ腫(舌根部)	0	2	0	0	0	0	0	2
計	10	4	5	1	1	4	7	32

## *in situ* Tissue Engineering を用いた人工気管の開発

分担研究者 中村達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野）

研究協力者 森野茂行、福田正順、田尾裕之、中田 颯、河南里江子、  
小林丈士、吉谷 信、早川克己、野田澤俊介、瀧川敏算、  
東 高志、堤 定美

（京都大学再生医科学研究所、京都大学大学院工学研究科）

### 研究要旨

気道は中枢の気管と末梢の気管支・細気管支によって構成されるが、外科的な再生（再建）は気管支までが対象になる。気管支よりさらに末梢の細気管支や肺胞レベルの再生は内科治療の対象である。本研究では中枢気道を人工気管で再生させる治療法の開発を行った。

### A. 研究目的

外科的な気管再建の対象となる疾患は、悪性腫瘍の気管浸潤や外傷や気管内挿管チューブのカフによる癒痕狭窄などである。こういった疾患に対して病変部を切除して、ゴム管などの人工物で欠損部を再建しようとする試みが1940年代より始まった。しかしながら、人工血管の開発成功とは対照的に、人工気管開発は遅れ、現在も市販されている人工気管はないのが現状である。

一方、高分子材料による生体内吸収性縫合糸をはじめとする外科用手術材料の進歩に伴い、気管外科学は第2次大戦後1970年代から大きく発展した。米国ハーバードのGrilloのグループは6cm以下の気管切除に際しては端々吻合で気管再建が可能であることを確かめた。以来、気管の端々吻合は気管外科の標準術式となっている。しかし広範囲の切除では気道の広範剥離と肺門の授動が必要であり、端々吻合ができない症例も多い。また従来の気管端々吻合術では患者は術後の1カ月にも及ぶ苦しい頸部前屈位の保持を強いられるなど負担が極めて大きかった。しかも左の主気管支狭窄などは再建不能であり、臨床で安全に使用できる人工気管の必要性は依然として少なくない。

アメリカを中心とする諸外国のグループは人工気管開発を断念してしまった一方、日本では上皮が再生する新しいタイプの人工気管が進められた。この自己組織再生型人工気管は、気道の再生治療として世界にも他に例がない。本稿では、この自己組織再生型人工気管の開発の経緯と現状について述べる。

### B. 組織親和性の高いバイオマテリアルの開発

新型の人工気管は人工材料で作ったメッシュを芯に自己組織の筒を作り、それを利用する。そこでステントを再生気管壁に取り込ませるために、生体の細胞外基質

Extracellular Matrixを構成する主要な蛋白であるコラーゲンが用いられる。コラーゲンで合成高分子材料（プラスチック）の表面を修飾することにより、材料の生体親和性を飛躍的に向上させる新しい方法が1977年に開発された。まずプラスチックの表面にプラズマ処理をして、プラスチック表面に反応基を作り、その反応基にコラーゲン分子を付加する方法である。この新しい技術を用いて初めてプラスチック材料を生体に素早く取り込ませることが可能になり、自己組織再生型人工気管の開発に大きく貢献した。

### C. 新しいメッシュ型の人工気管の構造

新しく開発された人工気管は、円筒状にした fine Marlex® mesh (Fig 1) にポリプロピレン製のモノフィラメントステントを螺旋状に外側に巻き付けた支持材にコラーゲンをグラフト化および重層コーティングによって厚く附着させて作成した (Fig 2) (Fig 3)。

こうした設計にしてメッシュ周囲に自己組織を再生させ人工気管を生体に取り込ませることが可能になり、長期に安定した成績が期待出来るようになった。

### D. 気道の力学強度と人工気管による再建

気管や気管支は解剖学的に見ると軟骨によって支えられていて、呼吸に伴う気道内圧の変化、ならびに外部からの圧迫や咳嗽時喘息発作時の吸気に抗して気道内腔を虚脱させることなく内腔を保持する。Fine Marlex Mesh 筒の力学強度は極めて弱いので、組織再生型人工気管の設計に際してこれを支える気管軟骨にあたる支持材としてのステントを巻き付ける必要があった。

実は1980年代にポリエチレン製の heavy Marlex Mesh が気管再建用に米国で開発され、一時期発売されたことがある。この気管再建用ヘビーメッシュは剛性の強い材料で、筒状に巻くと、それだけで内腔が保持できるほど剛い筒に

なる。しかしながら臨床で気管再建に用いられているうちに、このハードメッシュは剛性が強すぎるため、これに隣接する血管からの大出血を起こし、患者が亡くなる事故が発生することがわかり使われなくなってしまった経緯がある。力学物性の大きく異なる材料、特に気管に比べて著しく剛い材料は隣接臓器を痛めるだけでなく縫合部の生体 (host) 側に機械的刺戟ストレスが生じるため、反応性の肉芽や縫合離解が生じる危険性が高い。そこで新しい人工気管では内腔を保持でき、かつ生体気管に近い支持材を複合化させた設計になっている。

支持材も体積が大きくなるとそれだけで異物としての生体親和性 *biocompatibility* が低下すると予想されるので、細いステントをメッシュチューブに巻き付けた。医療用材料として今日広く使用されているメディカルグレードのポリプロピレンのモノフィラメントヤーンをメッシュチューブに巻き付けてメッシュとヤーンは熱融合で固定し、さらに補強のために 70 プロリン糸 (ポリプロピレン製外科用縫合糸) の単結節縫合で、2mm 間隔で固定した。この複合チューブとならんでヤーンの横断面の形状を矩形 ( $a \times b = 1 \times 2.4$ ) にしたチューブ (Fig 4) の耐圧縮強度の比較を行うと図 5 (Fig 5) のようになった。このような構造力学検討を行って、メッシュチューブの力学形状が決定された。なおメッシュチューブの周囲のコラーゲン加工やコラーゲンスポンジの重層はメッシュチューブの力学強度に影響はほとんど与えない。さらに 5 年間ビーグル犬頸部気管に埋入し経過観察した人工気管の物性を測定したところ、メッシュチューブ周囲に形成された結合織によって再建部の気管は生体気管とほぼ等しい耐圧性を保持することもわかった。

気管の動物実験は、人間と気管の太さが近い体重 10kg 程度のビーグル犬で行われることが多い。ビーグル犬の頸部気管で 4 ~ 6 気管軟骨輪分を切除した後にこのメッシュ状人工気管で置換すると、再建部の人工気管内腔面は気管上皮に覆われることがまず確かめられた。次に過酷な条件の臨床応用を想定してビーグル犬の頸部気管で 10 ~ 16 軟骨輪を切除して、吻合部に抗張力が 900 ~ 1000g 重加わった状態を作り、この欠損を人工気管で再建した。その実験でも人工気管は生体に取り込まれ、抗張力下でも吻合不全は起こらなかった。そしてメッシュは完全に生体と一体化することが判明した。

さらに長い 7 ~ 9 気管軟骨輪分の人工気管を用いた置換実験が行われた。この実験では置換手術後、内腔保持のために一時的にメッシュの内側にシリコンチューブを挿入した。この管状置換でも人工気管は宿主気管と術後速やかに一体化してメッシュ内に生体組織が再生し、内腔の上皮化が進んだ。22 カ月後に病理組織学的検討を行うと連続した上皮再生が口側から尾側端まで認められた (Fig 6)。

### E. 再建部の上皮と線毛の再生

コラーゲンの上にはまず線維芽細胞が侵入して、そこで

盛んにコラーゲンを分泌する。埋入したコラーゲンはこの置換で消えてゆき、自己のコラーゲンと置き換わってゆく。その組織の上に上皮が伸びてゆく。まず、扁平上皮が両端から伸展する。走査電顕で観察すると 5 角型か六角形をした扁平上皮が内面を覆い (Fig 7)、その扁平上皮に丈の低い線毛が生じ (Fig 8)、そういった長い線毛をもった細胞の数が増加して (Fig 9) 最終的には密集した線毛に覆われた上皮 (Fig 10) に変化してゆく。この過程は 1 ~ 6 カ月で起こる。

頸部気管から縦隔内気管へと再建実験が進められた。縦隔内気管は頸部気管に比べて周囲組織が少ないため再建が困難である。特に術後気管瘻が起これば致命的となる。5cm の人工気管でこの縦隔内気管の置換を試みた。14 頭は組織治癒促進のため大網被覆を行い残りの 10 頭は大網被覆のない群とし、合計 24 頭のビーグル犬に人工気管を埋め込んだ。この実験では両群とも全例で良好な術後経過をたどった。しかも内腔狭窄やメッシュの露出は大網被覆群で少ないことが判明した。

組織再生の足場となるコラーゲンのスポンジによる気管壁の重層も試みられた。これは人工食道に応用されていたコラーゲンスポンジの技術で、このスポンジを用いると食道欠損部では自己組織が 3 週間以内に再生した。しかもそこには平滑筋や食道腺など高度に分化した構造まで見られることが確かめられていた。イヌの頸部気管にこのスポンジ状コラーゲンを重層した人工気管 (Fig 11) を用いると、6 ~ 24 カ月に屠殺するまで全頭経過良好に生存した。気管壁はスポンジに自己の血液を含潤させることにより手術時にはリークが起こらず十分気密となった。また組織の再生もそれまでのアモルファスコラーゲンに比べ良好であった。

分岐部気管の再建も、Y 字型に作ったメッシュ型人工気管で行った。気管分岐部でも内面は完全に上皮が再生し安全に使用可能であることが確かめられた (Fig 12)。

### F. 現状と今後の展望

従来の組織工学 *Tissue Engineering* では培養室のシャーレの中で細胞を増殖させて目的とする組織を作り、それ体内に移植する。これに対し、欠損した組織を体内のその場所 (*in situ*) で再生させる方法は *in situ Tissue Engineering* と呼ばれる。自己組織再生型人工気管は、この *in situ Tissue Engineering* を用いたものである。さらに再生治癒を促進させるために穿刺骨髄液や、骨髄から分離培養した間葉系幹細胞 (*Mesenchymal Stem Cell*) を、このコラーゲンスポンジに含漬させる手法も検討されている。

生体の気管には内腔を支えるために U 字型の気管軟骨が存在する。近年、組織工学の技法を用いた種々の軟骨再生の試みが行われている。しかしながら長期に気道を支えるに足る軟骨の再生はいまだに報告がない。関節軟骨と異なり、気管軟骨の場合は力学的強度が低下した場合、気道が虚脱し直ちに生命に関わる。

長期に化学的に安定であるポリプロピレンメッシュを芯

にした人工気管は、5年にわたる長期観察でも逸脱することなく、生体と一体化し続けることが判明した。

現在京都大学医学部附属病院では倫理委員会の審査を経て、臨床使用が始まっている。

再生医学研究は急進に進められているものの、臨床に応用されているものはまだまだ数が少ない。この *in situ* Tissue Engineering を用いた気道の再生は日本で世界に先駆けて実用化されたものである。今後一般医療として普及するように研究をさらに積み重ねていくことが大切であろう。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamura, T, Inada, Y, Fukuda, S, Yoshitani, M, Nakada, A, Itoi, S, Kanemaru, S, Endo, K, Shimizu, Y: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Research*. 1027: 18-29, 2004
- 2) Nakamura, T: Regenerative medicine for respiratory diseases. *JMAJ. (Japan Medical Association Journal)* 47(7): 333-337, 2004
- 3) 中村達雄: 人工気管. 「先端医療シリーズ 26 呼吸器外科 呼吸器外科の最新医療」(末舛恵一、人見滋樹: 監修者、加藤治文、小林紘一、近藤 丘、清水信義、白日高歩、和田洋巳 編、厚徳社、東京) 62-65 (2004)
- 4) 中村達雄: 神経誘導管 (人工神経). *高分子*. 53:154, 2004
- 5) Takahashi, M, Nakamura, T, Toba, T, Kajiwara N, Kato, H, Shimizu, Y: Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Engineering*. 10(5/6): 771-779, 2004
- 6) 森野茂行、福田正順、中村達雄: 再生医療と画像診断-失われた機能の再生をめざして-大型動物モデルの生体モニタリング. *映像情報 Medical*. 36(8): 821-825, 2004
- 7) 大森孝一、中村達雄、金丸眞一、Magruffov Akhmar、山下 勝、安里 亮、平塚康之、田中信三、伊藤壽一、清水慶彦: 喉頭・気管の形成手術: 再生医学的アプローチ. *日本気管食道科学会会報* 55(2): 145~152, 2004

### 2. 学会発表

- 1) 森野茂行、中村達雄、鳥羽紀成、高橋 充、永安 武、櫛引俊宏、田畑泰彦、吉谷 信、清水慶彦: 肺気腫: グロースファクターによる治療. 第44回日本呼吸器学会学術講演会 (東京 2004. 3. 31-4. 2)
- 2) Morino, S, Nakamura, T, Toba, T, Takahashi, M, Nagayasu, T, Yoshitani, M, Shimizu, Y: Basic fibroblast growth factor induces recovery of pulmonary blood flow in the canine emphysema models: Quantitative

assessment using dynamic contrast-enhanced MRI. *American Society for Artificial Internal Organs, 50<sup>th</sup> Anniversary Conference, Washington DC, June 17-19, 2004*

- 3) 森野茂行、中村達雄、鳥羽紀成、高橋 充、永安 武、東 高志、堤 定美、櫛引俊宏、田畑泰彦、吉谷 信、清水慶彦: 徐放性線維芽細胞増殖因子を用いた肺機能再生に関する検討. 第25回日本炎症・再生医学会 (東京 2004. 7. 13-14)
- 4) 大森孝一、中村達雄、金丸眞一、Magruffov Akhmar、山下 勝、安里 亮、田中信三、伊藤壽一: <シンボジウム>気管の再生医療. 第42回日本癌治療学会 (京都, 2004. 10. 27-29)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



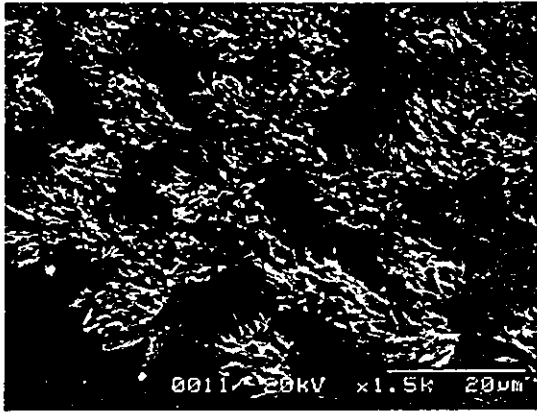


Fig.1

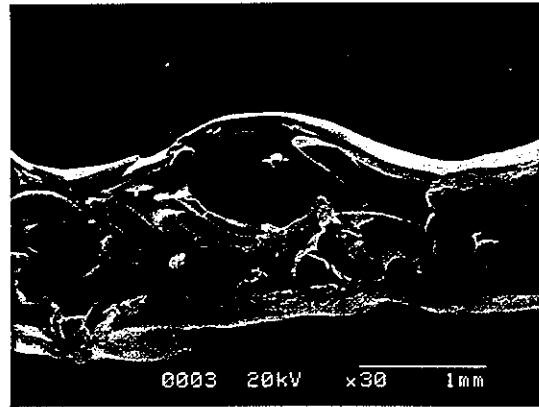


Fig.4

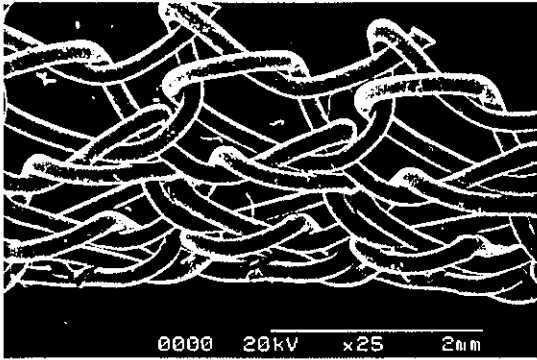


Fig.2

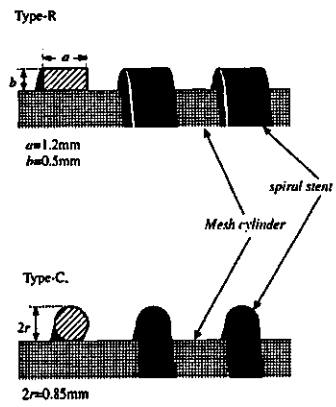


Fig.5



Fig.3

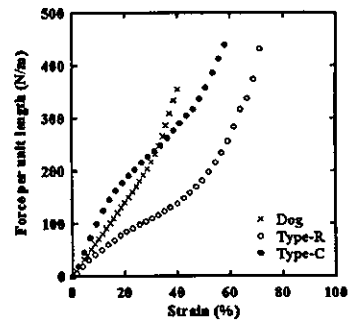


Fig.6

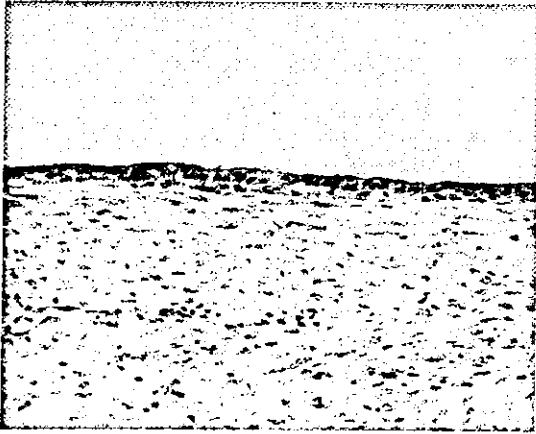


Fig 7

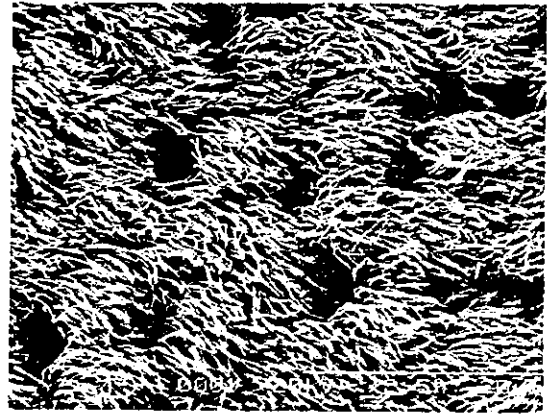


Fig 10

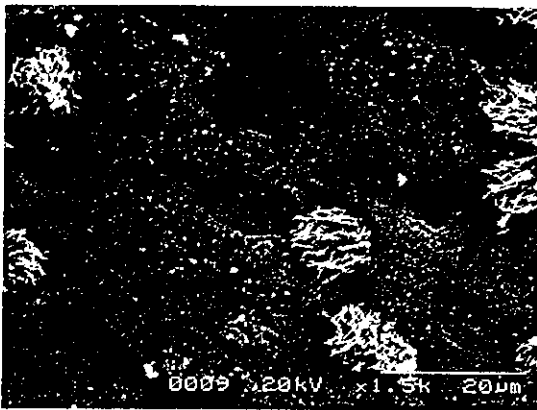


Fig 8

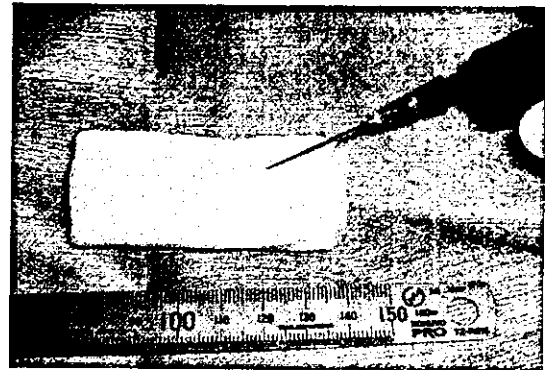


Fig 11

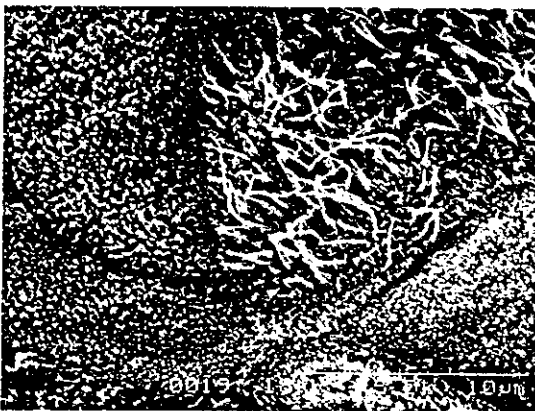


Fig 9



Fig 12

**Fig 1** 人工気管に用いられるポリプロピレン製のメッシュ (Marlex Mesh) の走査電子顕微鏡 (SEM) 写真。Marlex Mesh は腹壁ヘルニア手術などで補強材として使われている外科用材料。至適な間隙があるため生体組織を一体化する。

**Fig 2** 人工気管の芯を構成するメッシュチューブ。スパイラルに巻き付けたポリプロピレンモノフィラメント繊維で補強してある。メッシュとモノフィラメント繊維は熱融着させ、さらに 7-0 Prolen 糸で縫合されている。

**Fig 3** コラーゲンコーティングと風乾を 10 回繰り返した人工気管壁断面の SEM 所見。メッシュの間隙にコラーゲンが入り込み、さらに気管壁の表面に 80~120 $\mu\text{m}$  の厚みにコラーゲンの層が形成されている。中央に太く見えているのがステントの断面。

**Fig 4** ステント材の形状と耐圧縮力学強度を調べる実験に使った人工気管断面シエーマ。Type-R は断面が矩形、Type-C は断面が正円のステントである。(文献 14 より)

**Fig 5** 人工気管の耐圧縮力学強度。オートグラフ下で長軸に垂直な方向より圧縮して単位長さあたりの力をひずみに対して測定した。断面が正円形のステントを用いると生体気管に近い物性になる。

**Fig 6** 人工気管の内面に再生した上皮の病理組織。HE 染色。倍率 $\times 400$ 。埋入 2 カ月後には形成した粘膜下組織の表面に扁平上皮が伸展し、一部には線毛が生えている。

**Fig 7** 人工気管内腔面の走査電子顕微鏡所見。再生した上皮は 4 角~6 角形の細胞で構成され、気管内面を敷石状に覆う。そのうち一部には島状に線毛上皮が再生してゆく。線毛は縫合部近くに多く、中央部が少ない傾向にある。Fig 6 と同じ標本。

**Fig 8** 再生過程にある気管上皮の SEM 所見 ( $\times 5000$ )。扁平上皮の表面には数  $\mu\text{m}$  の細毛様隆起が密生する。細胞によっては丈の低い (10  $\mu\text{m}$  程度) 線毛が生えて、それが伸展して線毛になってゆくのわかる。細胞 1 つ 1 つを単位としてこういった変化は進んでゆく。

**Fig 9** 線毛上皮の再生が進んだ人工気管内面の走査電子顕微鏡写真 ( $\times 1500$ )。丈の長い線毛の生えた内皮の数が次第に増加してゆく。3 カ月目。

**Fig 10** 再生した気管内皮は最終的には線毛上皮になる。気管支鏡下に内皮をサンプリングして線毛の運動を測定すると、10~12Hz の拍動をしていることが判明した。

この値は正常のほぼ 80% 程度の振動数に相当し、再建部上皮は機能的にも良好な再生をしていることが示された。

**Fig 11** コラーゲンスポンジを表面に重層した人工気管に自己血を含込させるところ。このように手術時に自己血を沁み込ませると、人工気管壁は気密になる。コラーゲンと塗布しただけのものに比べてスポンジを加えた人工気管はコラーゲンの量が多いために良好な組織再生が得られる。

**Fig 12** 気管分岐部を Y 字型の人工気管で再建したビーグル犬を 12 カ月後に剖検した所見。人工気管は分岐部においても宿主の気管と一体化して内面は光沢ある上皮で覆われていることがわかる。断面にはステントが見られる。

II. 分担研究報告書

3. 基礎研究 (1) 気管の再生

## 気管小欠損モデルへの人工気管を用いた組織再生

主任研究者 大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

分担研究者 金丸眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究協力者 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

これまでにわれわれはポリプロピレンメッシュを用いた人工気管を作成し、動物実験を経て臨床応用に導いてきた。実際、これまでに数例の気管切除症例を経験し、この人工材料を用いてきたが、実際の臨床例では巨大な欠損を再生させなければいけないという症例はむしろ少なく、多くは部分欠損を再生させることが必要であると思われる。そこで、従来の術式を改良することで、上皮化の状態を改善させる余地があるかどうかについて検討した。

### A. 研究目的

一般に臓器を再生させるためには、細胞、足場、制御因子の3つの要素が必要とされるが、手術創などの特殊で再生に理想的な環境では、適切な足場を局所に供与することにより、良好な再生結果が得られる。今回はわれわれが従来から用いてきた人工気管を使用し、手技の改良によって、より早期にきれいな上皮化を得ることができないか検討した。

### B. 研究方法

実験動物にはビーグル成犬を用いた。全身麻酔下に気管を開窓する。この際、図1のごとく粘膜を一部保存した。上が口側、下が吻側。従来の術式では、人工気管を欠損した軟骨の範囲より大きくトリミングして、局所に大きく被せるようにして縫合していたが、今回は欠損した軟骨の範囲と同じ大きさにトリミングした（図2）。

一方、ビーグル犬の末梢血液を採取し、足場に含浸させた（図3）後、吸収糸にて縫着し手術を完了した（図4）。

術後の粘膜再生の状態は内腔面をファイバースコープにて比較することにより行った。術前（図5）。上が腹側、下が背側。

### C. 研究結果

術後10日目の気管内腔面（図6）。周辺部は上皮化が始まっているが、中心部にはメッシュが透見できる。

手術1カ月後のファイバー所見（図7）。上皮化はほぼ完了し、小さな血管の侵入がみられる。周辺部には肉芽による小隆起が認められる。

術後2カ月のファイバー所見（図8）。上皮化は完了し、表面の肉芽も消失している。

術後7.5カ月の所見（図9）。長期経過しても足場の逸脱や変形、狭窄を認めない。

### D. 考察

今回、ポリプロピレンメッシュを用いた人工気管を使用し、気管の小欠損モデルを作成した。ヒトでの臨床例に比

して、早期の局所変形の程度や早期の上皮化が認められたものの、肉芽の形成などの不良な所見もみられた。

今後組織学的検討によって、再生の程度の評価を行う予定であるが、局所に何らかの因子を添加して肉芽を予防したり、早期の上皮化をさらに促進するなどのさらなる改良を試みたい。

### E. 結論

人工気管を用いた組織工学的手法により、気管の部分欠損モデルの再生治療を試みた。

コラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュによって、より迅速で、変形の少ない再生結果を得た。

更なる材料、手技、条件の改良で、肉芽の抑制やより感染の少ない局所環境を整えたい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

1) 山下 勝、金丸眞一、大森孝一、Magrufov Akhmar、玉木久信、田村芳寛、中村達雄、伊藤壽一：気管の部分欠損に対する組織工学的再生。第56回日本気管食道科学会（2004.11.25-26）

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

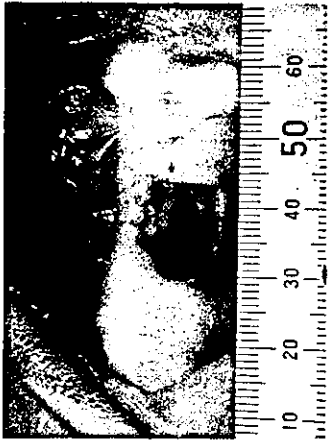


图 1

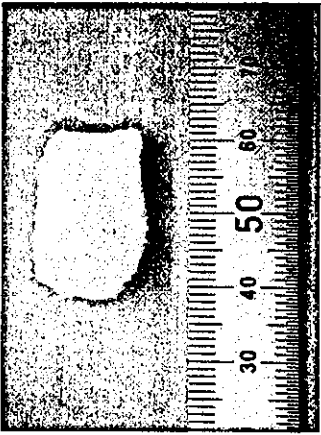


图 2

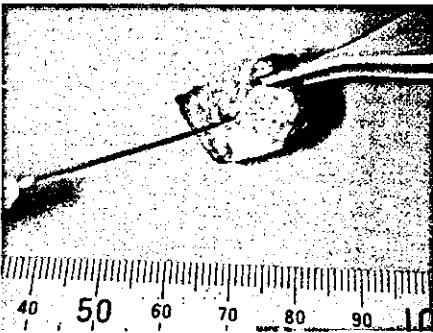


图 3



图 4

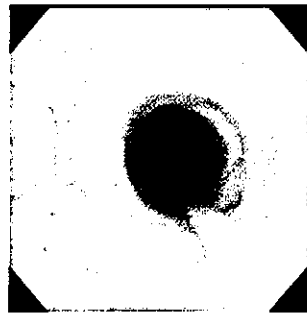


图 5

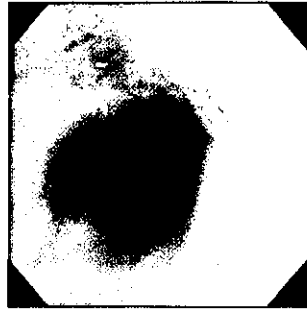


图 6

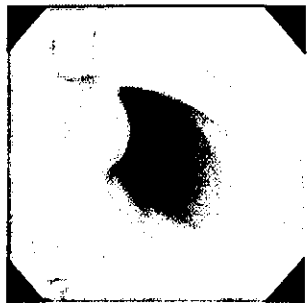


图 7

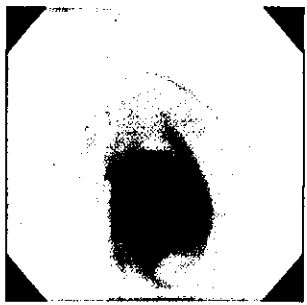


图 8



图 9

## *in situ* Tissue Engineering を用いた輪状軟骨の再生

主任研究者：大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

分担研究者：中村達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野）

金丸眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究協力者：安里 亮、山下 勝、Magrufov Akhmar

（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

悪性腫瘍が気道に浸潤した例や炎症性疾患、外傷例などで病変を切除した際、気道欠損部の再建が問題である。本研究では、気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再生させることを目的として、*in situ* tissue engineering の手法による足場だけの移植で、イヌを用いて輪状軟骨・気管の組織再生をはかり、内視鏡、組織所見、機械的圧縮試験いずれにおいても良好な結果を得た。組織再生の足場となる人工材料、手術手技、術後経過から臨床応用の可能性を示す。

### A. 研究目的

悪性腫瘍が気道に浸潤した例や気道の炎症性疾患、外傷例などで病変を切除した際、気道欠損部の再建が問題になる。輪状軟骨・気管は管状の枠組みを軟骨が保持しており、内腔面は気道という外界に接している。この構造を再建するためには、気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再建する必要がある。従来、硬性組織には各種の軟骨、骨、人工材料などが、内腔面組織には皮膚や粘膜などが用いられたが<sup>1)2)</sup>、二期的にしかも他部位の手術が必要である。中村らは1985年頃より様々な人工気管を試作してきたが、1995年、自己組織が再生するようにデザインした人工材料を開発し、動物実験で良好な気管再生を実現できることを報告した<sup>3)5)</sup>。さらに同様の人工材料を輪状軟骨の切除後の欠損モデルに移植し、再生組織は正常と同等の硬さを持ち、かつ良好な上皮化が得られることがわかった<sup>6)</sup>。

本研究の目的は、これらの組織工学的技術を集約し、気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再生させることにある。

### B. 組織工学と臓器再生

臓器再生には足場、細胞、環境調節因子が必要で、この三要素に加えて血流が供給されると臓器再生が得られるとされている（図1）。

組織工学（Tissue Engineering）は、工学的手法を使って細胞を二次元的、三次元的に組み上げ、本物の臓器や組織に近いものを再生させようというもので、Vacanti, Langer らによって始められた。彼らの tissue engineering は、体外で細胞を培養して目的とする組織をつくり、これを体内に移植する方法である<sup>7)</sup>。また、幹細胞や前駆細胞を移植することで組織再生をはかろうという研究が数多く

行われているが、自己由来の細胞移植としては、循環器領域で下肢や心筋の血管再生を目指した血管内皮前駆細胞の移植<sup>8)</sup>、整形外科領域で骨関節疾患の治療に骨髄間葉系幹細胞の移植<sup>9)</sup>、眼科領域で角膜再生を目指して角膜上皮幹細胞を羊膜上で培養した移植などが行われている<sup>10)</sup>。

一方、我々の研究グループでは、体内の、再生を目的とする臓器の場所で組織を再生させる *in situ* tissue engineering という新しい概念に基づいて、1997年以後、動物実験で自己組織再生型の人工材料を移植し気管、食道、胃、輪状軟骨などが再生することを報告してきた<sup>3)6)</sup>、11)13)。これらの実験では細胞移植や増殖因子は使わずに足場の移植のみでの組織再生を行ってきた。Vacanti らの tissue engineering や細胞移植では、生きた細胞や組織を取り扱うので、感染症対策や細胞の品質管理など臨床応用へのハードルが高い。これらの方法に比べて、我々の行っている *in situ* tissue engineering により足場のみを移植する手法は安全性が高く臨床応用に近い。

### C. 人工材料

輪状軟骨、気管ともに管状の枠組みを保持するためポリプロピレン製のメッシュを管状にしさらに同質の材料でリング状に補強し、組織再生の足場としてその周囲にコラーゲンスポンジを付加して、自己組織再生型の人工材料を開発した<sup>4)</sup>。マーレックスメッシュは特定保険材料として従来から胸壁や腹壁の補強に臨床に使用されているもので、開発の過程で生体に取り込まれるメッシュの至適な編み目の大きさを決定し260 $\mu$ mとした。コラーゲンスポンジは医療用のブタ皮膚由来のI型およびIII型コラーゲンを用いた。組織再生の良好な足場として近年、各領域でコラーゲンが使われている。本人工材料ではコラーゲンとメッシュ

がはずれにくいようにするために、コラーゲン液をメッシュ上に塗布した上で、140°C、24時間の熱架橋を加えた。図2に人工材料の構造、外観を示す。輪状軟骨、気管ともに部分欠損例には、この人工材料をトリミングし1/2周～2/3周を使って気道を再建した。

#### D. 動物実験

ビーグル犬5頭に対して、輪状軟骨の前半部約1/2周切除し、輪状軟骨欠損モデルとした<sup>7)</sup>。さらにビーグル犬4頭に対して、輪状軟骨と気管を前半部約1/2周切除し、輪状軟骨・気管欠損モデルとした。自己組織再生型の人工材料を気管の場合と同様に作製し、その形状は円筒状で欠損範囲に応じて1/2周から2/3周を用いた。人工材料は、自己の血液でコラーゲンを湿潤させてから欠損部に合わせて形状を調整し、上方は甲状軟骨断端、下方は切除気管断端と吸収性糸で縫合した。輪状軟骨前半部の切除と人工材料の移植手術を図3(A、B)に示す。

術後、3カ月・20カ月の観察で、内視鏡検査で全例、喉頭・気管の内腔面は上皮に覆われていた。全例で気道は十分保たれ人工材料は生体組織内に取り込まれた。2例で肉芽、1例でメッシュの露出を認めたがいずれも軽度で呼吸には問題なかった。術後4カ月の摘出喉頭の外観と内腔からのマクロ像を図3(C、D)に示す。再生組織は上方の甲状軟骨、下方の気管輪と連続し、内腔面の上皮化がみられている。組織学的に評価するとポリプロピレンメッシュは周囲組織に取り込まれ異物反応を認めなかった。図4に光学顕微鏡像を示す。内腔面を走査型電子顕微鏡で観察すると線毛上皮の再生を認めた(図5)。機械的圧縮試験では、再生組織は正常組織と同等の支持力を示した(図6)。つまり、気道の枠組みと内腔上皮の両者を再生できたといえる。

これらのことから、自己組織再生型の人工材料は頭頸部癌の気道浸潤、声門下や気管の炎症性狭窄などにおける輪状軟骨・気管切除後の再建に臨床応用可能と考えられた。

#### E. 結論

体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* tissue engineering の手法で輪状軟骨・気管の再生が可能であることがわかった。ポリプロピレンメッシュとコラーゲンスポンジから構成される足場材料を開発し、動物実験で気道の安定した組織再生が得られた。これらの結果をふまえて臨床応用の可能性を示した。

#### 参考文献

1. Cotton R. Management of subglottic stenosis. DeJong, Kupper-Smith, eds. Otolaryngologic Clinics of North America;33:111-30, 2000.
2. Caputo V, Consiglio V. The use of patients' own auricular cartilage to repair in deficiency of the tracheal wall. J Cardiovasc Surg (Torino);20:613-4,1950.
3. Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y. A new porous tracheal prosthesis sealed

with collagen sponge. ASIO J;41:306-310,1995.

4. Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Nakahara T, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. Int J Artificial Organs;23:718-24,2000.
5. Sekine T, Nakamura T, Matsumoto K, Liu Y, Ueda H, Tamura N, Shimizu Y. Carinal reconstruction with a Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. J Thoracic Cardiovascular Surg 119:1162-1168,2000.
6. Omori K, Nakamura T, Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, Shimizu Y. Cricoid regeneration using in situ tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. Ann Otol Rhinol Laryngol 113:623-627,2004.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 14: 260 (5110):920-6, 1993.
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 14:275 (5302):964-7, 1997.
9. Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Muraki K, Takakura Y. Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. Yonsei Med J 30:45 Suppl:61-7, 2004.
10. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. N Engl J Med 3:340(22):1697-703, 1999.
11. Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Takimoto Y, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Liu Y, Tamura N. Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with a double-layered silicone tube. J Thorac Cardiovasc Surg 118(2):276-86,1999.
12. Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y. Experimental study on in situ tissue engineering of the stomach by an acellular collagen sponge scaffold graft. ASAIO J 47:206-10, 2001.
13. Hori Y, Nakamura T, Kurokawa Y, Satomi S., Shimizu Y. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. Int J Artif Organs 24:(1) 50-54, 2001.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Omori K, Nakamura T, Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magrufov A, Hiratsuka Y, Shimizu Y: Cricoid regeneration using in situ tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113(8) : 623-627, 2004
- 2) 大森孝一、中村達雄、金丸眞一、Magrufov Akhmar、山下 勝、安里 亮、平塚康之、田中信三、伊藤壽一、清水慶彦：喉頭・気管の形成手術：再生医学的アプローチ。日本気管食道科学会会報 55(2) : 145~152, 2004

### 2. 学会発表

- 1) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magrufov A, Yamashita M, Asato R, Shimizu Y : <Special Lecture>Regeneration of the laryngeal and tracheal tissue using in situ tissue engineering. The 4th East Asian Conference on Phonosurgery, Kyoto, December 4, 2004
- 2) 大森孝一：<特別講演>喉頭・気管領域の外科治療：デイ・サージャリーと再生医療について。第53回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会(秋田 2004. 7. 24-25)
- 3) 大森孝一：<シンポジウム>再生医療について。第22回呼吸器・免疫シンポジウム(東京 2004. 10. 23)
- 4) 大森孝一：<講座>頭頸部領域の組織再生。神戸大学工学部バイオテクノロジーコース「再生医療と工学」(神戸 2004. 11. 6)
- 5) 大森孝一：<シンポジウム>喉頭・気管領域のトランスレーショナルリサーチ。第17回日本喉頭科学会(名古屋 2005. 3. 18-19)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



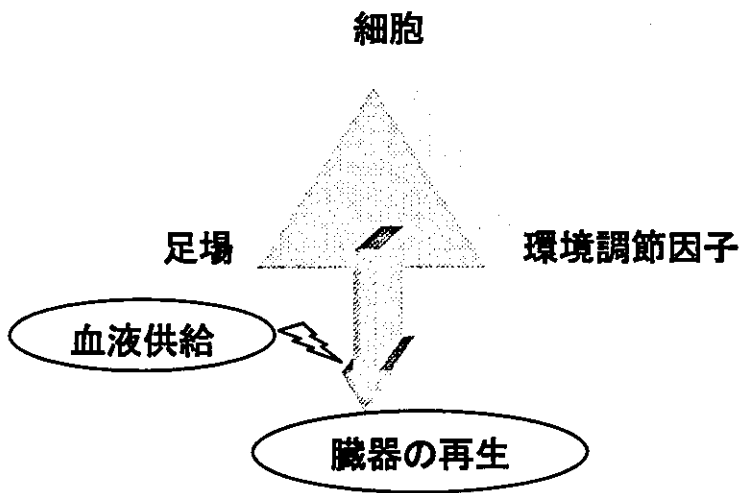


図1 臓器再生の3要素

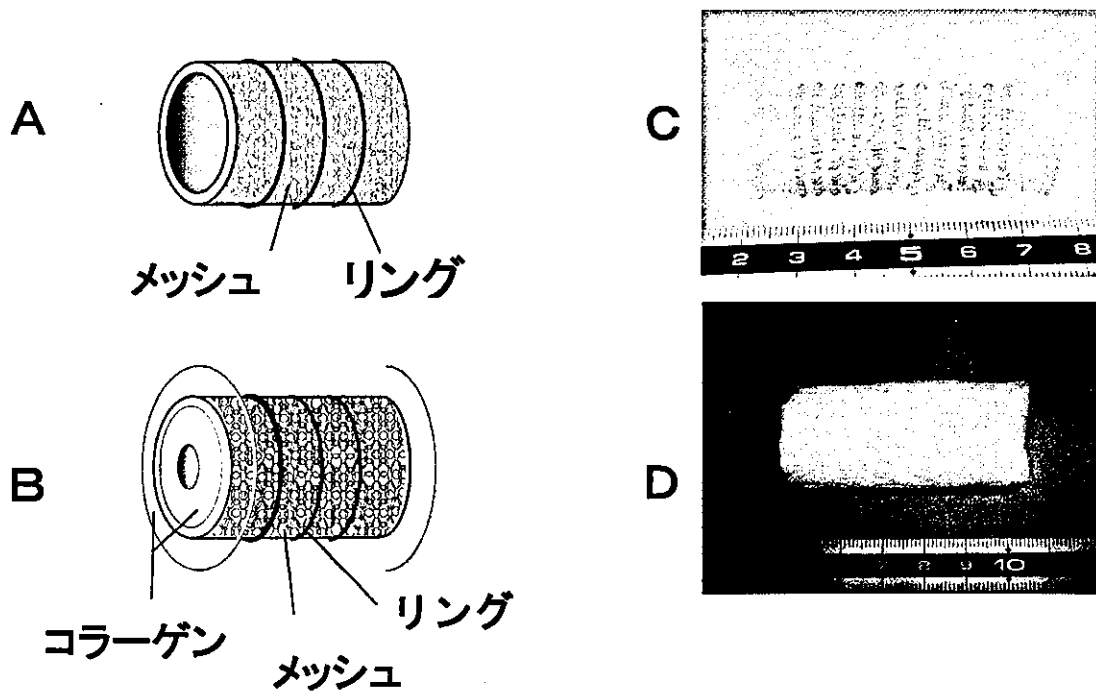


図2 人工材料

A、B：構造

C：外観（ポリプロピレンメッシュ）

D：外観（コラーゲンスポンジ）

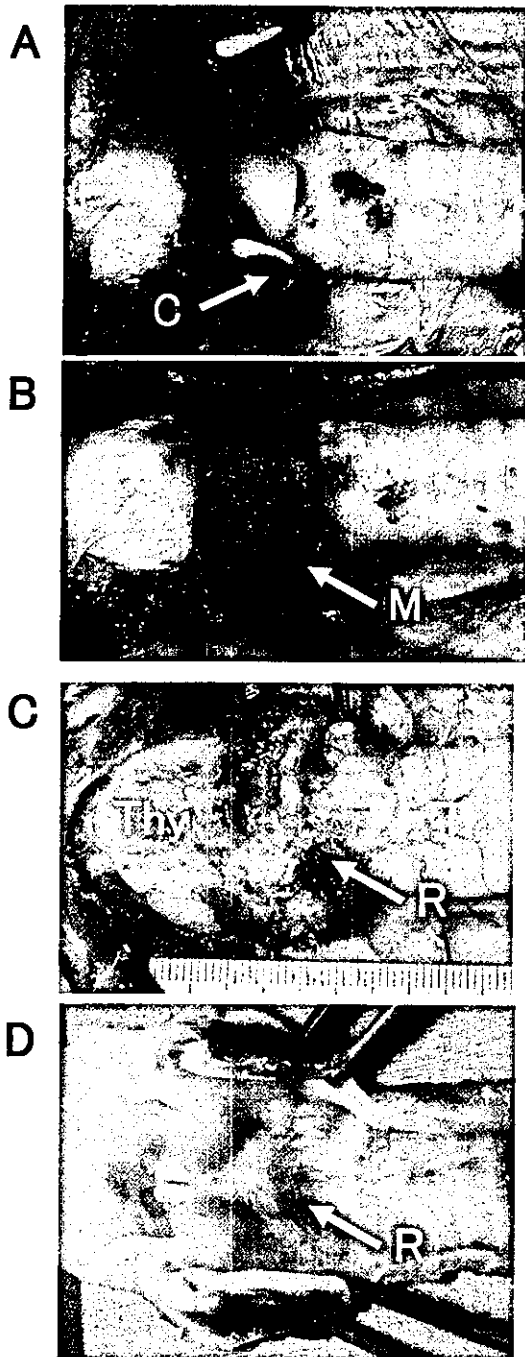


図3 動物実験

A : 輪状軟骨前半部切除 (C : 輪状軟骨)  
 B : 人工材料の移植 (M : 人工材料)  
 C : 術後4カ月の摘出喉頭の外観  
 (R : 再生組織、Thy : 甲状軟骨、Tr : 気管)  
 D : 術後4カ月の摘出喉頭の内腔面 (R : 再生組織)

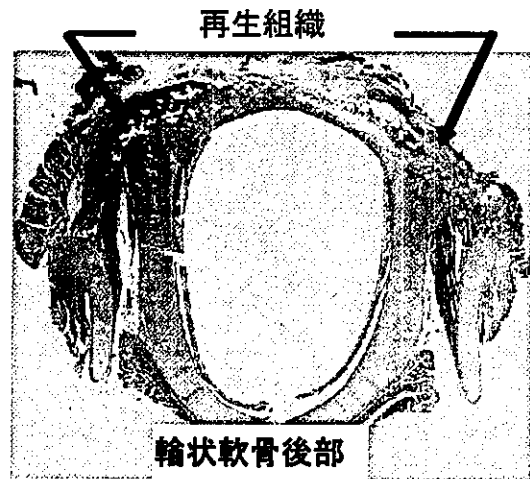


図4 組織像 (光学顕微鏡像)

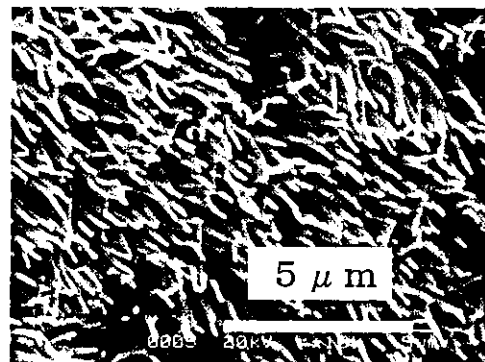


図5 組織像 (走査型電子顕微鏡像)  
 再生した線毛が観察される。

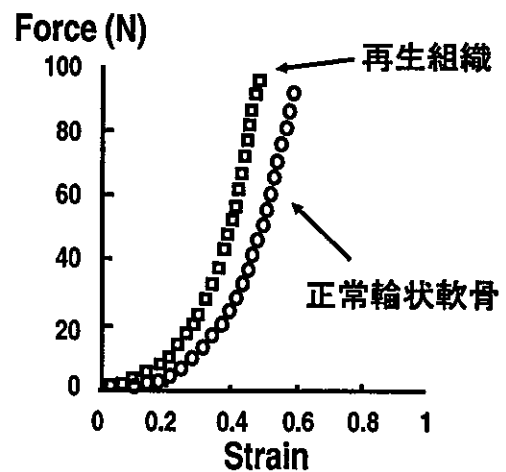


図6 機械的圧迫試験

## 喉頭内腔型どりによる声帯隆起の再生

主任研究者 大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
研究協力者 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）  
分担研究者 中村達雄（京都大学再生医科学研究科臓器再建応用分野）  
金丸眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

これまで、悪性腫瘍手術や外傷などにより喉頭組織が欠損した際の再建法については様々なものが考案され、実際に行われてきたが、治療後のQOL（Quality Of Life）は著しく低下し満足できる状況ではない。この困難さは声帯隆起を中心とした内腔の複雑な形が、再建する際の障害となっているためである。そこで、再生医療の技術を用いて、喉頭の内腔面が再生するための研究を試みた。

### A. 研究目的

組織工学による臓器再生は細胞、足場、調節因子の3要素に加え、適切な栄養供給が局所に及ぶことによりはじめて可能となる。我々はこの手法を改良し、輪状軟骨と気管において、動物実験において足場のみを手術創に導入することによって組織を再生させることに成功し、ヒトへの再生治療をすでに始めている。

そこで輪状軟骨や気管に用いているものと同じ素材であるポリプロピレンを用いて、声帯の構造を再現した人工の足場を作成し、その再生が可能であるか検討した。

### B. 研究方法

実験動物としてはビーグル成犬を用いた。あらかじめ採取しておいた、別の死体喉頭に歯科印象材である石膏を流し込み、喉頭内腔面の凹凸を石膏に反映させる（図1）。

つぎにこの型にあわせて汎用プラスチックであるポリプロピレンを加熱して形成する（図2）。

さらに細胞の侵入、増生を促進するためにコラーゲンスポンジにて被覆したものを移植材料とした（図3）。

実際の手術にあたっては、経口挿管下に全身麻酔をかけ、実際の喉頭垂直半切除術に模して、甲状軟骨左半部を声帯を含めて切除した（図4）。上が吻側、下が尾側。右側が開かれた左声帯。

内腔粘膜の再生状況は、電子内視鏡による内腔面からの観察により行った。

術直後の内視鏡所見（図5）。上が腹側、下が背側。左の赤い部分が移植した人工材料である。

### C. 研究結果

術後2週間の喉頭内視鏡写真。内腔側のコラーゲンは消失し、内部のメッシュが露出（図6）。手術から1年後の喉頭内視鏡所見、やはり上皮化は認めない（図7）。組織学的検討も加えたが、粘膜上皮、筋肉、軟骨を含めた再生は認められなかった。

### D. 考察

足場は1層のソフトタイプポリプロピレンメッシュで作成しており、強度が弱く、従来より使用してきた管状のものとは大きく異なる。また、口側が咽頭という不潔な環境にある。など不利な条件が数多く存在していたことがわかった。

一方で、大きな感染や、致命的な障害は気道手術を行ったものまったくみられず、ポリプロピレンの材質そのものは当手術にふさわしいものであると思われた。

今後、構造の改良、手術手技の向上により喉頭内腔面の再生の可能性を探りたい。

### E. 結論

組織工学的手法により、これまで術後再建が困難であった声帯隆起を中心とした喉頭内腔面の再生を試みた。

粘膜上皮や筋肉、軟骨などの再生結果は得られなかった。ポリプロピレンという材質そのものは高度の異物反応もみられず、今後の有用性を示唆した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 山下 勝、大森孝一、金丸眞一、Magrufov Akhmar、田村芳寛、中村達雄、伊藤壽一：喉頭声帯隆起の組織工学的再生のこころみ。第7回日本組織工学会（東京2004.7.1-2）

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

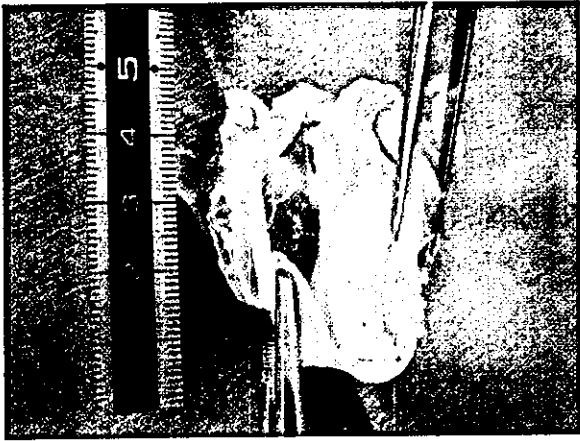


图 1



图 4

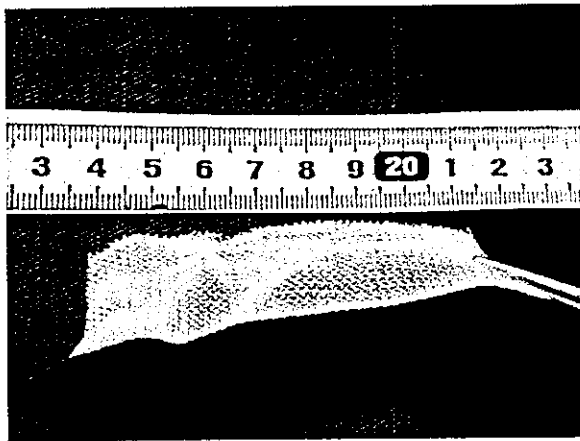


图 2



图 5

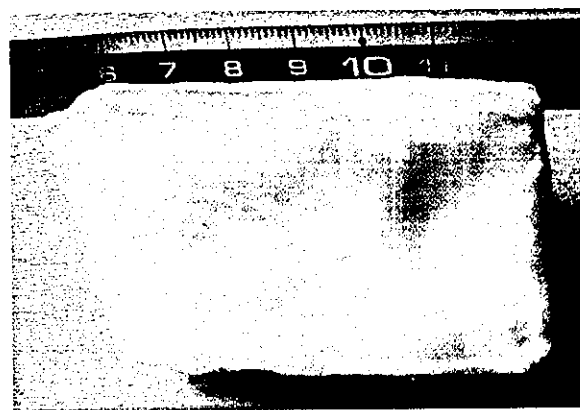


图 3



图 6

