

2層モデル人工材料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）

研究要旨

喉頭切除術後の声帯隆起部の再建は非常に困難である。喉頭は、静的な強固さとしなやかな動きとを併せ持つ臓器であるため、その再建時にも工夫が必要である。

従来の再建術では皮弁、筋皮弁、甲状腺弁などが用いられてきたが、欠落した組織の不足分を充填することに主眼がおかれ、粘膜が本来は振動体であることを無視しているため、術後の音声機能は考慮されていない。

そこで、声帯隆起や粘膜を含めた術後音声の再建のために、これまで喉頭内腔面の型を石膏で採取して、単層のコラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュを作成したが、上皮化不良、瘻孔形成などで不成功に終わった。

今回は前回の問題点を解消すべく改良を加え、別のモデルを作成した。

A. 研究目的

臓器を再生させるための三要素（細胞、足場、調節因子）のうち、今回のモデルでは細胞と足場とを用いて、声帯隆起の再生の試みを行うこととした。

細胞としては、採取が容易で多系統への分化傾向が近年注目されている骨髄由来間葉系細胞群(BSCs)を利用し、足場としては2層に重層化したコラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュを使って実験を遂行した。

B. 研究方法

ビーグル犬を実験動物として用いた。喉頭内腔の凹凸を再現した歯科印象材である石膏を用いて、ポリプロピレンにその凹凸を再現。強度を高めるために、外側にもう一枚のソフトタイプポリプロピレンメッシュをあて、ポリプロピレン系にて固定する（図1）。表面側が内腔面。

一方、ビーグル犬の上腕骨を骨髄採取針にて穿刺し、骨髄液を約1.5cc採取。37℃、5%CO₂インキュベーター内で約2週間培養した。次に底面に付着している細胞(BSCs)をトリプシン処理にてはがし、移植する直前に、末梢血とともに足場に含浸させた（図2）。

ビーグル犬に喉頭垂直半切除術を施行した（図3）。上が吻側、下が尾側。右側が動物の左側。移植材料を吸収糸にて縫着して手術を終了した（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

術直後の内視鏡所見。血液の付着した移植材料が確

認できる（図6）。術後2週間後。上皮化がすでにみられ、小さな血管の侵入がみられる（図7）。術後1年。若干の凹凸がみられるが人工材料の露出や感染などはみられず、足場の全面が再生した上皮にて被覆されていた（図8）。

D. 考察

今回、ポリプロピレンメッシュを2層に補強し、多分化能をもつBSCsを導入することによって、これまで実現出来なかった、声帯隆起の複雑な形態の表面に粘膜を再生させることに成功した。しかし、BSCsがこの実験系においてどのように作用し、最終的にどのように変化していくのかなど、これから解明していかなければならない点も存在する。

今後の組織学的検討が必要とされる。

E. 結論

組織工学的的手法により、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。

コラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュと骨髄由来細胞群(BSCs)を用いて、複雑な声帯隆起の表面に粘膜上皮を再生させることに成功した。

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）

2) Masaru Yamashita: A preliminary study on laryngeal regeneration using tissue engineering technique. The Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society, 2004

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

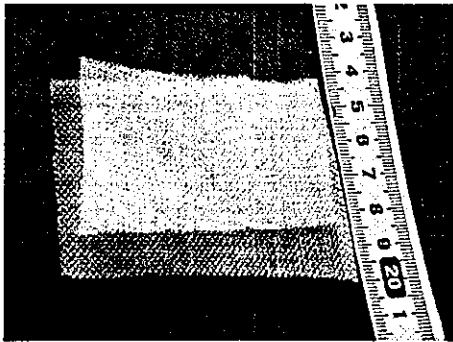


図 1



図 2



図 3



図 4



図 5



図 6



図 7



図 8

自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生

分担研究者 金丸真一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
中村達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野）
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 児嶋久剛（児嶋耳鼻咽喉科）
Magrufov Akhmar（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
伊藤壽一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
清水慶彦（京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野）

研究要旨

幹細胞は、多分化能を有する未分化な細胞で、生体内に広く分布するといわれている。これまで、高度に分化した組織や臓器には、一般に再生能がないと考えられてきたが、近年、適切な場と条件が与えられると、高度に分化した臓器であっても、幹細胞による再生が可能であることが報告された。これを受けて、間葉系幹細胞を含む骨髄由来間葉系細胞（BSCs）の選択的培養とこの培養細胞を用いて、障害された声帯の再生を試みた。本研究ではビーグル成犬8頭を用いて、大腿骨より採取した骨髄を培養、このうち培養フラスコの底面に張り付いた細胞のみを選択増殖させ14日後に回収した。この細胞をアテロコラーゲンと混合し移植材料とした。両側声帯正中を横切開し、声帯粘膜表層から内筋層に至る障害を加えた後、左声帯に上記のアテロコラーゲン+間葉系細胞を、右声帯にはアテロコラーゲンのみを注入し両者を比較した。評価は、声帯の再生状況を喉頭ファイバーにより観察するとともに、摘出喉頭の声帯の組織学的検討を行った。結果として細胞移植群はコラーゲンのみの群と比較して肉眼的にも組織学的にも良好な治癒機転が観察された。これによりアテロコラーゲンを足場とした間葉系細胞移植は障害された声帯の再生に有効に働くと考えられた。

A. 研究目的

自己骨髄由来の間葉系幹細胞移植による傷害された声帯の再生

B. 研究方法

1. 動物実験

実験動物としてビーグル犬8頭（体重：7～14kg、雄2頭、雌6頭）を用いた。動物実験やその飼育に対しては、京都大学動物実験規約に従って行った。動物実験し際は、皮下および筋肉内に麻酔剤として ketamine hydrochloride (50mg/kg) (Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)、xylazine (2.0mg/kg) (Bayer, Tokyo, Japan) を投与して行った。屠殺に際しては十分な麻酔のもと Sodium pentobarbital (50mg/kg) (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を静脈内投与した。

2. 移植細胞の培養

ビーグル犬の大腿骨から骨髄穿刺により骨髄を2ml採取し、これを250mlの培養フラスコ中に15%FBS (fetal bovine serum: ウシ胎児血清) および抗生物質、抗真菌剤の入った培養液(DMEM, Gibco, Invitrogen Co., Ltd., CA, USA) 20ml、37℃、5%CO₂の条件でCO₂インキュベーター (MCO-17AIC, SANYO Co., Ltd., Osaka, Japan) 内で48時間培養した後、培養フラスコの底面に付着した細胞のみを採取し、これをさらに12日間培養した。この間3

日おきに上記の培養液を交換した。計14日間の培養後培養フラスコの底面に付着する細胞が confluent な状態になったのを確認し、0.1%トリプシン処理によりこれらの細胞を底面より剥離し、細胞の総数(2～6×10⁶)をカウントしたのち遠沈(LX-120 トミー精工、東京、日本)し回収した。これらの細胞(BSCs)を豚皮膚由来のアテロコラーゲン(I型コラーゲン70%、III型コラーゲン30%で抗原性を除去)と混合した後、移植材料とした。(図1) また、これとは別の実験系にてBSCsをアテロコラーゲン内培養を行ったが、BSCsはアテロコラーゲン内で生育することが確認できた。

3. 手術手順

全身麻酔到下ビーグル犬の両側声帯に電気メスで生体内筋におよぶ切開を加え、左側声帯には、上記のアテロコラーゲンと混合した培養細胞を27ゲージ針で細胞数にして0.5～2.0×10⁶投与した。右側声帯には、コラーゲンだけを約0.5ml投与した。

4. 評価

声帯の修復過程は、経時的に電子喉頭スコープで観察し、組織学的検討を行った。

C. 研究結果

図2は、一頭の犬の声帯修復の変化を示した。コラーゲンのみ投与した側では、処置後約1カ月半ごろから創部に一致して萎縮が認められるが、細胞移植した側では、ほぼ

正常の形態を保っている。さらに、図3は、処置後2カ月の4頭の大声帯の形態的变化を示したものであるが、コラーゲンのみを投与した右側声帯に比較してあきらかに左側の声帯はより正常に近い形態を示している。表1に8頭の声帯の形態的变化を示した。いずれの評価項目でも、細胞移植した側の声帯は良好な再生結果が得られている。

さらに組織学的検討では、図4のようにコラーゲンのみを移植した側では、声帯を構成する粘膜下層と筋層とが錯綜配列し、いわゆる癒痕形成の組織像が見られる。これに対して、細胞移植した側では、上皮層、粘膜下層、筋層がはっきりと分れ、ほぼ正常の組織像を示している。

D. 考察

近年、再生医学の進歩はめざましく、これまで不可能といわれてきた組織・臓器の再生も夢ではなくなってきた。¹⁻³本研究は、再生医学なかでも組織工学における *in situ* Tissue Engineering という概念に基づき行われてきた。組織工学の概念では、組織再生には3つの要素、すなわち組織再生のもとになる細胞、その細胞が成長する足場、さらにそれを調節する因子が必要とされる。この3要素が適切な環境の下に置かれることにより、組織再生が可能とされている。⁴⁻⁶ (図4) しかし、特定臓器の局所的再生においては、これら3つの要素の一部を生体内に移植することで周囲から再生に必要な要素はおのずと供給されるという概念がある。これが *in situ* Tissue Engineering である。自然な経過の中では組織再生が起こらないのは、欠損した部位に成長の早い fibroblast などが侵入し結合組織によって占有されるため組織再生の場が失われるからである。したがって組織再生のためには、組織再生の場すなわち再生空間を確保するための足場が最も重要な要素となる。

声帯は大きくは3層構造をなしている。すなわち上から上皮層、粘膜下層、筋層である。このうち声帯の振動において最も重要な働きをしているのは、粘膜下層である。声帯萎縮、癒痕などのおもな障害部位はこの粘膜下層で、ときにその下層の筋層にまで及ぶ。

組織が障害を受けると、通常は外部との交通を遮断するために上皮性の細胞が表層を覆うとともに欠損部位に線維性組織が入り込み癒痕を残して修復が完了する。声帯も例外ではなく、障害部位はこのような修復過程をたどる。すなわち、障害部位は線維性組織の進入を受けることによって再生の場が失われてゆくと考えられる。

萎縮や癒痕といった障害声帯に対する治療として、脂肪、筋膜、コラーゲンなどの生体組織や人工材料としてゴアテックス、ハイドロキシアパタイトなどを充填する方法が行われている。⁹⁻¹⁰ これはあくまで、声帯の体積を増し欠損部分からの air leak を防ぐことによって、発声を改善することが目的である。

これに対して、われわれは障害された声帯の完全な再生を目的に、コラーゲン内で3次元培養した自己骨髄由来間葉系細胞を移植した。これはコラーゲンが、再生の場を確保しかつ組織再生の元になる細胞が成長する足場を提供する材料として最適であると考えられたこと、および BSCs

内に含まれる間葉系幹細胞は、声帯を構成する筋肉や粘膜下層、上皮層などのさまざまな組織を再生しうる多分化能を有しているという理由からである。すなわち、これまでの障害部位に何らかの充填物を入れることにより物理的に体積を増やすという考えとは全く異なり、声帯そのものを完全な形態に戻そうとする治療法である。

E. 結論

本研究により、障害声帯の再生にアテロコラーゲンと混合した BSCs の移植の有効性が確認された。

参考文献

1. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5(3):309-13.
2. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;31(1):11-6.
3. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31(1):235-40.
4. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001; 414(6859):118-21
5. Vacanti CA, Upton J. Tissue-Engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg.* 1994;21(3): 445-62.
6. Vacanti JP. Beyond transplantation. *Arch Surg.* 1988;123:545-9.
7. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg.* 1988;23:3.
8. Bruder SP, Fink DJ. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell Biochem.* 1994;56:283-94.
9. Ford CN, Martin DW, Warner TF. Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. *Laryngoscope.* 1984; 94(4):513-8.
10. Ford CN, Gilchrist KW, Bartell TE. Persistence of injectable collagen in the human larynx: a histopathologic study. *Laryngoscope.* 1987;97(6): 724-7.
11. Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: a preliminary clinical study. *Laryngoscope.* 1995;105(9):944-8.
12. Trapp TK, Berke GS, Bell TS, Hanson DG, Ward PH.

Effect of vocal fold augmentation on laryngeal vibration in simulated recurrent laryngeal nerve paralysis: a study of Teflon and Phonogel. Ann Otol Rhinol Laryngol 1989;98(3):220-7.

13. Mikaelian DO, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. Laryngoscope. 1991;101(5):465-8.
14. Brandenburg JH, Unger JM, Koschke D. Vocal cord injection with autogenous fat: a long-term magnetic resonance imaging evaluation. Laryngoscope. 1996;106(21):174-80.
15. Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal fold insufficiency. Laryngoscope. 1998;108(3):393-7.
16. Rodgers BJ, Abdul-Karim FW, Strauss M. Histological study of injected autologous fascia in the paralyzed canine vocal fold. Laryngoscope. 2000; 110(12):2012-5.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T,

Fujino K, Kim TS, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J : Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. Neuro Report 15(19): 1-4, 2004

2. 学会発表

- 1) Kanemaru S, Nakamura T, Magrufov A, Tamura Y, Ito J, Omori K, Yamashita M, Tamaki H, Shimizu Y: A study of the mechanism of functional regeneration of the recurrent laryngeal nerve by tissue engineering. 2004 COSM; American Laryngological Association, Phoenix, U S A, April 30-May 1, 2004
- 2) 金丸眞一、山下 勝、Magrufov Akhmar、喜多知子、玉木久信、井口福一郎、田村芳寛、大森孝一、中村達雄、伊藤壽一：骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 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

表 1.

評価項目	細胞移植群		コラーゲンのみの投与	
表面不整	0/8	(0%)	5/8	(62.5%)
肉芽・ポリープの形成	1/8	(12.5%)	4/8	(50.0%)
癒痕	2/8	(25.0%)	6/8	(75.0%)
萎縮	1/8	(12.5%)	7/8	(87.5%)

※図の説明

図 1. a : 培養 2 週間 BSCs の HE 染色像、 b : アテロコラーゲンと混合した BSCs

図 2. a : 両側声帯を電気メスで切除した直後、左声帯に BSCs+コラーゲンの投与、右声帯にコラーゲンのみの投与

b : 切除 2 週間後

c : 切除 1 カ月後

d : 切除 2 カ月後

図 3. 4 頭の犬の処置 2 カ月後の声帯の変化

図 4. 処置 9 ヶ月後の声帯の組織学的変化

a : BSCs+コラーゲンの投与

b : コラーゲンのみの投与

図1

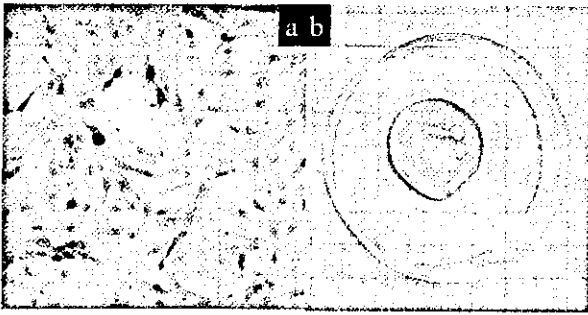


図4

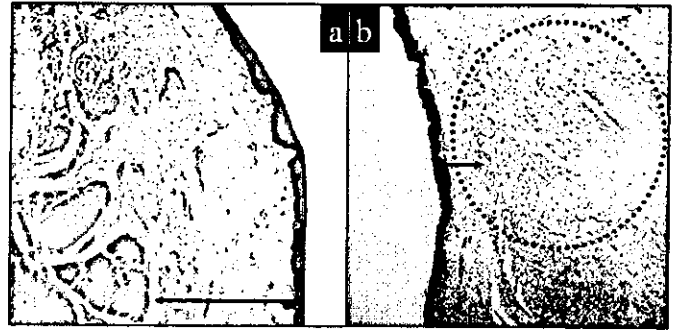


図2



図5

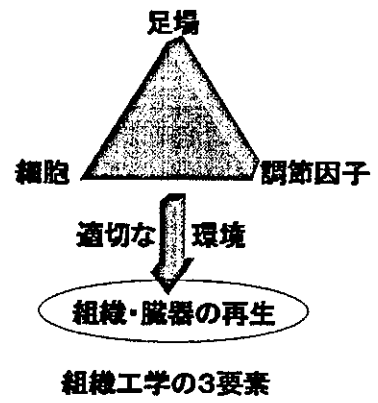


図3



骨髄由来細胞による声帯再生：移植細胞の分化

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）

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）

研究要旨

声帯は一旦傷害されると癒痕を形成したり、体積を減じたりすることにより嚙声をはじめとした機能障害を引き起こす。これらの障害は持続し、自ずと改善することはまれである。そこで、近年多分化能が示された。骨髄由来細胞群を用いて、障害を受けた声帯の治療が可能であるかをマウスおよびラットを用いて検討した。

A. 研究目的

これまでに、われわれはイヌの骨髄由来細胞群を、人工的に傷害を与えた声帯に細胞移植し、良好な形態の維持と組織学的な構造の維持に寄与したことを報告してきた。そこで今回、マウスの骨髄由来細胞群を用いて、表面抗原の解析を、また、同細胞が傷害声帯にどのように働くのかについてヌードラットに移植することで解析することとした。

B. 研究方法

1. GFP トランスジェニックマウスの大腿骨から骨髄を採取し、シャーレ内にて培養液と混合する。37°C、5%二酸化炭素濃度下のインキュベーター内にて培養を行う。シャーレ底面に付着した細胞群、すなわち BSCs を培養開始から2週間後、3カ月後に回収し、Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)によって解析する。一般的に間葉系幹細胞の指標とされる、CD29、CD44、CD49e、Sca-1の他、CD34、CD45についても調べた。

2. 2週間培養した前述の細胞を溶液とし、ヌードラットの声帯に障害を与えた後、局所注射する。頸部皮膚縦切開をおき、輪状軟骨と気管との間の水平切開部から声帯を見上げるようにして細胞の注入を行った。(図1)細胞の注入から6週間後に組織を摘出し、喉頭を組織学的に検討した。

C. 研究結果

われわれの用いた骨髄由来細胞群には造血系由来の細胞も含まれていると思われるが、間葉系幹細胞の存在を示唆する表面抗原、すなわち CD44、CD29、CD49e、Sca-1の発現が高度に認められた。(図2、図3)

これらの細胞群をヌードラットに移植することにより、移植した細胞が一部上皮系のマーカーであるケラチンを発現した。(図4)左図太矢印が移植細胞群。右図太矢印の褐色部がケラチンの存在を示すペルオキシダーゼの発色。また、図5に示すように GFP の緑色蛍光の発現も図4とほぼ同じ断面を蛍光顕微鏡下に観察することによって確認することが出来た。

D. 考察

以上の結果より、間葉系幹細胞を含む骨髄由来細胞群が

傷害声帯からの再生、特に上皮系への分化に有効に働く可能性が示唆された。

E. 結論

GFP トランスジェニックマウスの骨髄由来細胞群を用いて、その表面抗原を FACS によって解析した。間葉系幹細胞に発現するとされる抗原が強陽性であった。

この細胞をヌードラットの傷害声帯に移植することにより、上皮系の細胞へと分化する可能性が示された。今後、声帯病変の治療に応用可能な技術へと発展させるべく研究を進行させる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 金丸眞一、山下 勝、Magrufov Akhmar、玉木久信、田村芳寛、大森孝一、中村達雄、伊藤壽一：自己骨髄由来間葉系幹細胞移植による声帯の再生. 第56回日本気管食道科学会 (2004. 11. 25-26)
- 2) 金丸眞一、山下 勝、Magrufov Akhmar、喜多知子、玉木久信、井口福一郎、田村芳寛、大森孝一、中村達雄、伊藤壽一：骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 第7回日本組織工学会 (東京 2004. 7. 1-2)
- 3) Shin-ichi Kanemaru: Regeneration of the vocal fold by implantation of bone marrow derived stromal cells
The Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society, Lausanne, Switzerland, October 13, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

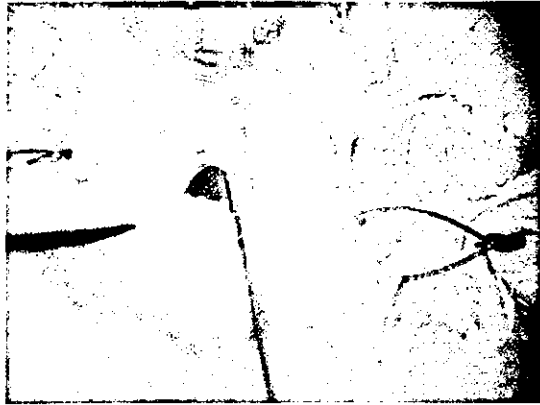
なし

2. 実用新案登録

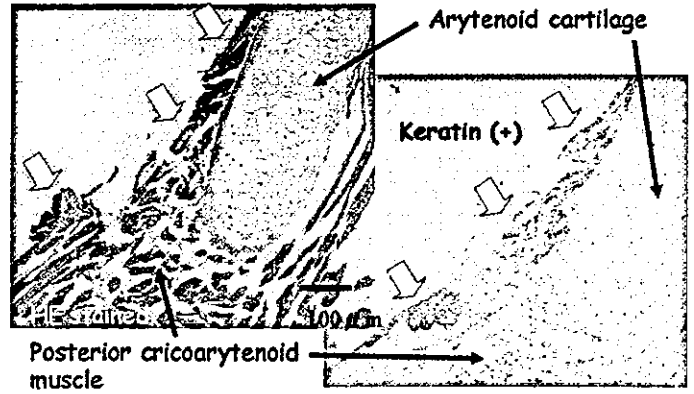
なし

3. その他

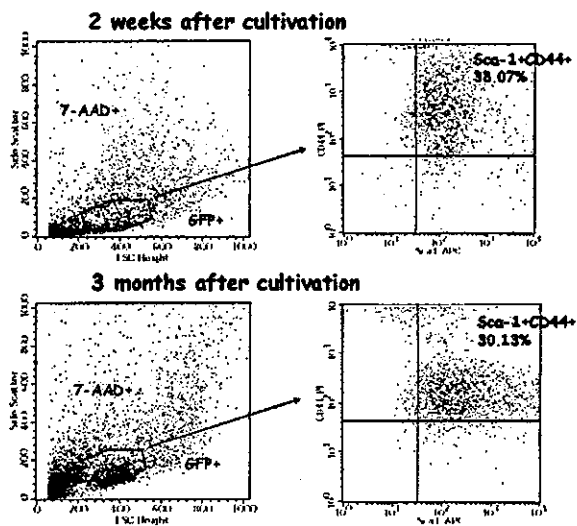
なし



☒ 1



☒ 4



☒ 2



☒ 5

**Summary of cell epitopes
on BSCs of GFP mouse**

Cell epitopes	2 weeks	3 months
CD34	+	++
CD44	+++	+++
CD45	++	++
CD29(Integrin <i>β1</i>)	+++	+++
CD49e(Integrin <i>α5β1</i>)	+	+++
Sca-1	+++	+++

-: <2%, +: 2-20%, ++: 20-75%, +++: >75%

☒ 3

II. 分担研究報告書

3. 基礎研究 (2) 喉頭の再生 ③声帯

声帯損傷モデルの作製と細胞移植

分担研究者 多田靖宏（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
研究協力者 野本幸男（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
鈴木輝久（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

声帯損傷は喉頭癌の術後や外傷などによっておこるが、自然治癒では声帯は瘢痕化し発声時の声門間隙の拡大をきたしてしまうことが多い。改善策としては声帯を内方偏倚させるための外科的治療が選択され、現在のところアテロコラーゲンや自家脂肪注入、筋膜挿入術などが行われている。しかし、結果的には本来の声帯の柔らかさを得ることは難しく、満足のいく音声を獲得するには至っていないのが現状である。

近年、再生領域の発展には目覚ましいものがあり、すでに人体の様々な器官が組織工学的手法を用いて再生可能となりつつある。われわれは、それらの手法をもとに声帯損傷部位に骨髄由来間葉系細胞を注入することで異物を挿入することなく声帯の再生が可能となるのかについて評価した。

A. 研究目的

幹細胞は、様々な分化を経ることができる可能性を持つ未熟な細胞であり、これらの細胞は生体に広く分布している。最近の報告では、発達した組織と器官が適当な環境のもとで幹細胞により再生することができることを示している。

声帯損傷の後、通常は瘢痕治療や萎縮が起こるとされており、難治性の嚔声をきたすことはよく知られている。これらの障害の治療は、現在までいろいろな材料が使われたが注入における理想的な物質はいまのところ見つかっていない。

われわれは、声帯内注入にかわる治療法として、声帯の再生の概念を導入した。組織と器官を再生させるためには適当な環境の下で、細胞、足場とそれを促進する因子が必要とされる。われわれは骨髄由来間葉系細胞（BSCs）を用いることで損傷声帯を自己再生させようと試みた。

B. 研究方法

ウサギの声帯損傷モデルを観察期間に対し2羽ずつ作成し、1羽の損傷部位にラットから採取し培養したBSCsを注入し、もう1羽をコントロールとする。

観察期間は3日・7日・30日と設定し、それぞれに対し創傷治療課程の差について病理組織学的に評価検討する。

1. *in vitro*でラットの骨髄由来間葉系細胞培養

- 1) 9週齢SDラットの大腿骨幹部より骨髄を採取し、ウシ血清加培養液（Dulbecco's Modified Eagle Medium+15%bovine serum +penicillin G +

amphotericin B）にて細胞懸濁液を作製。

- 2) 継代培養をおこなったのちトリプシン処理し再度細胞懸濁液0.5mlを作製。
2. *in vivo*でウサギの声帯損傷モデルを作製
 - 1) 16週日本白色腫家兎を用いた。
 - 2) ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール®）を25mg/kgで耳介静脈より静注し、全身麻酔下に管理する。
 - 3) 専用に作製した喉頭鏡（図1）を用いて喉頭展開し両側の声帯を明視下におき、外形4mmの電子内視鏡にて声帯の詳細を観察する。（図2）
 - 4) 次いで耳用の外形2mmの30度斜視硬性鏡にて喉頭をモニターしながら、ellman社サージトロノ針電極（図3）を用いて一側の声帯を焼灼する。（図4）
 - 5) 同様のモデルを2羽作成し、1羽をコントロールモデルとする。
 - 6) 1羽の損傷声帯に、先に作成したBSCs懸濁液をスパイナル針25Gを用いて0.2ml注入する。（図5）
 - 7) 免疫抑制剤FK506を2mg/kgで耳介静脈より静注する。

3. 標本作製

- 1) ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール®）を致死量耳介静脈より静注し死亡させ、喉頭を摘出し10%ホルマリンにて固定したのち10%ホルマリン+10%蟻酸にて脱灰し標本とする。
- 2) 摘出標本をパラフィン包埋し組織切片を作成する。
- 3) ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、顕微鏡下に観察し病理組織学的に評価する。

4) 抗 GFP 抗体にて免疫染色を行い、レーザー顕微鏡にて観察し病理組織学的に評価する。

C. 研究結果

観察期間 3 日コントロールモデルのファイバー所見および摘出標本では、損傷部位に白苔の付着を認め(図 6)、BSCs 注入モデルでは白苔の付着は認めなかった(図 7)。HE 染色にてコントロールモデルは、上皮の欠損像と出血と炎症性細胞の浸潤を認めた(図 8)。BSCs 注入モデルでは、上皮の欠損は認めるものの炎症性細胞浸潤はコントロールモデルと比べ軽度であった(図 9)。

観察期間 7 日コントロールモデルの摘出標本では、損傷部位に白苔の付着を認めたのに対し(図 10)、BSCs 注入モデルでは癒痕形成はみられたが白苔の付着はなかった(図 11)。HE 染色にて、コントロールモデルで上皮は重層化しており、粘膜下層への炎症性細胞浸潤を認めた(図 12) のに対し、BSCs 注入モデルでは上皮化がみられ、炎症性細胞の浸潤も軽度であった(図 13)。

観察期間 30 日モデルでは、コントロールモデルも BSCs 注入モデルもファイバー所見、摘出標本ともに治癒状態であり明らかな差みられなかった(図 14・15)。HE 染色ではコントロールモデルで空胞形成と炎症細胞の浸潤を認めたのに対し(図 16)、BSCs 注入モデルで炎症性細胞の浸潤もみられなかった(図 17)。上皮化は両者ともにみられた。

免疫染色にて、観察期間 3 日のモデルで BSCs が注入部位を中心に散見されたが(図 18)、7 日、30 日のモデルでは確認できなかった。

D. 考察

注入した BSCs は早期には損傷部位にとどまり、未熟な細胞へと分化し創傷治癒に対し何らかの働きをしていると推測されるが、詳細は確認できなかった。

注入モデルとコントロールモデルを比較した際に、炎症性細胞浸潤がみられなくなるまでの期間が注入モデルで短いことと、傷害部位の上皮化の程度に若干の差を認めるため、早期の創傷治癒過程において、何らかの促進作用が働いている可能性があると考えられた。

正常声帯と比較すると、損傷声帯は明らかにボリュームが少なく、BSCs の注入のみでは不十分と考えられた。

E. 結論

BSCs は、創傷治癒に対し何らかの作用を有すると考えられたが、それのみで正常構造を再生するには至らない。声帯のボリュームを増加させるための足場となる物質を細胞とともに注入する必要があると思われる。理想としては自己 BSCs の注入であるが、同種での実験が必要である。そのためには、ウサギの BSCs の培養を確立したうえで、細胞標識を可能にする必要がある。

参考文献

1. Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, et al:
Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*

112(11):915-920, 2003.

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

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

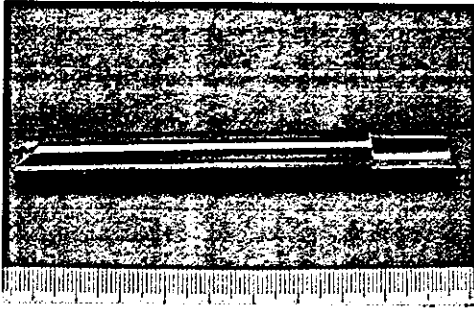


図 1. 作成した喉頭鏡



図 2. ウサギ正常声帯

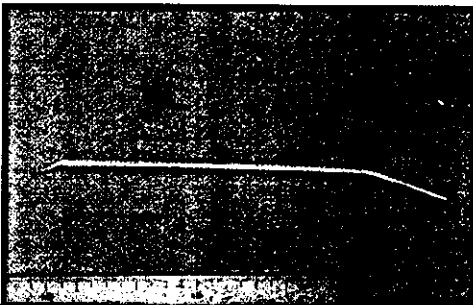


図 3. サージトロン針電極 (ellman 社)



図 4. 30° 硬性内視鏡所見

左：左声帯焼灼時：針を声帯にあてレベル2で焼灼
右：左声帯損傷後



図 5. GFP ラット BSCs 注入後
左声帯に水腫形成を認める



図 6. 左声帯損傷のみ 3 日モデル

左：ファイバー所見：損傷部位に白苔の付着を認める
右：摘出標本：損傷部位に白苔付着を認める



図 7. 左声帯損傷+BSCs 3 日モデル

左：ファイバー所見：損傷部位に白苔付着を認めない
右：摘出標本：損傷部位に瘢痕肉芽形成あり



図 8. 左声帯損傷のみ 3 日モデル (HE 染色)

損傷部位に出血と炎症性細胞浸潤を認める
上皮の欠損を認める

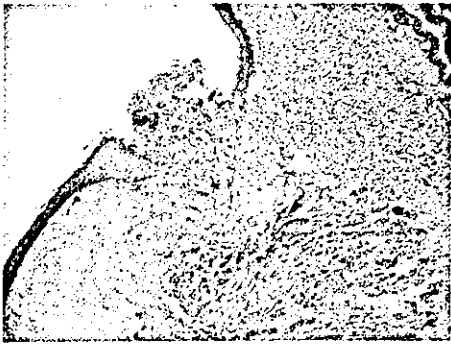


図 9. 左声帯損傷+BSCs 3日モデル (HE 染色)
損傷部位に軽度炎症性細胞浸潤を認める
上皮欠損を認める



図 10. 右声帯損傷のみ 7日モデル (摘出標本)
損傷部位に白苔付着を認める

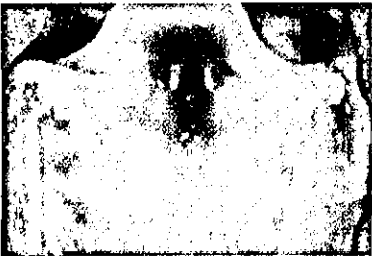


図 11. 左声帯損傷+BSCs 7日モデル (摘出標本)
損傷部位に癒痕形成あり



図 12. 右声帯損傷のみ 7日モデル (HE 染色)
軽度の炎症性細胞浸潤と、重層化した上皮層を認める



図 13. 左声帯損傷+BSCs 7日モデル (HE 染色)
上皮層の形成を認める



図 14. 左声帯損傷のみ 60日モデル
左：ファイバー所見：癒痕治癒
右：摘出標本：癒痕治癒



図 15. 左声帯損傷+BSCs 60日モデル
右：ファイバー所見：ほぼ正常所見
左：摘出標本：軽度癒痕



図 16. 左声帯損傷のみ 60日モデル (HE 染色)
空胞形成と炎症性細胞浸潤と、上皮化を認める

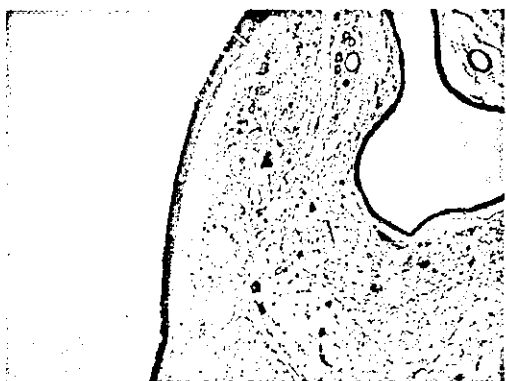


図 17. 左声帯損傷+BSCs 60 日モデル
炎症性細胞浸潤は認めず，上皮層の再生認める。

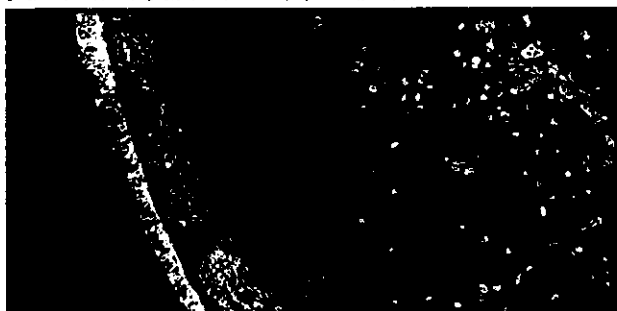


図 18. 左声帯損傷+BSCs 3 日モデル
(抗 GFP 抗体による免疫染色)
左：20 倍 右：60 倍
粘膜下層に GFP 発現細胞を認める

再生医工学的手法による反回神経再生

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）
中村達雄（京都大学再生医科学研究科臓器再建応用分野）
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 児嶋久剛（児嶋耳鼻咽喉科）
Magrufov Akhmar（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
伊藤壽一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
清水慶彦（京都大学再生医科学研究科臓器再建応用分野）

研究要旨

反回神経は機能的再生が困難な神経であるといわれているが、組織再生医工学の概念に基づいて作製した人工神経チューブ（PGA チューブ）によって反回神経の機能的再生を試み、動物実験でこれに成功した。PGA チューブは、ポリグリコール酸の管状構造物の表面をコラーゲンで被覆したものである。犬の反回神経を 10mm 切除し、このギャップを PGA チューブで再建したものと自家神経移植を行ったものとを比較した。PGA チューブでは、9 頭中 7 頭で声帯の動きが改善したが、自家神経移植は 3 頭に行ったが、いずれも回復しなかった。その他、電気生理学的、組織学的検討でも上記の結果を支持するものであった。以上から、PGA チューブは神経再生に際して自家神経移植に変わりうる再生手段になると考えられる。

A. 研究目的

組織再生医工学の概念に基づいて作製した人工神経チューブによる反回神経の機能的再生

B. 研究方法

1. 動物実験

実験動物としてビーグル犬 12 頭（体重：7~15kg、雄 4 頭、雌 8 頭）を用いた。動物実験やその飼育に対しては、京都大学動物実験規約に従って行った。動物実験に際しては、皮下および筋肉内に麻酔剤として ketamine hydrochloride (50mg/kg) (Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)、xylazine (2.0mg/kg) (Bayer, Tokyo, Japan) を投与して行った。屠殺に際しては十分な麻酔のもと Sodium pentobarbital (50mg/kg) (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を静脈内投与した。

2. 人工神経チューブ

神経再生のための適切な足場として、コラーゲン被覆 PGA (PolyGlycolic Acid) チューブという人工材料を作製した。これは、高分子化合物では最も簡単な構造のポリグリコール酸を主成分とし、140℃、10 気圧、24 時間の条件による脱水処理を行いチューブ状に形成したものに、豚皮より酵素ペプシンにより抽出し、抗原性を除去したアテロコラーゲン (I 型：70~80%、III 型：30~20%) で内外をコーティングしたのち凍結乾燥を行った Type I (図 1 a, b) とさらにこれにコラーゲンスポンジをチューブ内に充填した Type II (図 2) を作り、微細線維化スポンジ構造の人工神経チューブとした。この PGA チューブは、1) 組織親和性が高く拒絶反応が起

こらない、2) 生体内では徐々に加水分解され約 4 カ月で消失する、3) 約 2 カ月間は形状を保持し周囲からの組織進入を防ぐ、などの特徴がある。

3. 手術手技

十分な全身麻酔のもとに、頸部に約 10cm の皮膚正中切開を加え、左反回神経を露出。左反回神経を輪状軟骨下端より約 20mm 下方で 10mm 切除した。12 頭のうち 6 頭は Type I、3 頭は Type II の PGA チューブ（長さ 20mm、径 4mm）で、このギャップを再建した。再建方法は反回神経を PGA チューブの両端から挿入し、神経上膜を 8-0 ポリプロピレン縫合糸で PGA チューブと固定する。（図 3 a, b）コントロールとして、3 頭の犬で同ギャップを大耳介神経の自家移植で再建したものを作成した。

神経再建については、手術用顕微鏡 (OLYMPAS OME KA-1; OLYMPAS Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用して行った。術後は、3 日間抗生剤 Ampicillin Sodium 500mg/day (ピクシリン：明治製菓、東京、日本) を投与した。

4. 評価方法

1) 声帯の動きの観察

反回神経の機能再生の評価については、経時的に電子内視鏡システム（光源：CLV-U40D、カメラ：CV-240、モニター：OEV143、ファイバースコープ：BF Type 1T240、OLMPUS Co., Ltd., Tokyo, Japan）による声帯の動きの観察を行った。

2) 複合筋活動電位 (CMAP : compound muscle action potential) の測定

神経機能回復の電気生理学的評価として声帯の内転筋の1つである甲状披裂筋の複合筋活動電位の測定を行った。測定装置として、Nicolet Viking Quest System (Nicolet Biomedical Inc., Madison, WI, USA)を用い、再建した反回神経より中枢端でステンレスのバイポーラー電極を用いて神経刺激を行い、甲状披裂筋に挿入した針電極から活動電位を測定するものである。コントロールとして、正常側の反回神経についても同様の手技にて活動電位を測定した。

3) 物質輸送能の測定

神経機能再生の評価の1つとして、順向性物質輸送能の測定を行った。再建した反回神経より中枢端から30G針のマイクロインジェクターを用い、Wheat Germ Agglutinin horseradish peroxidase (WGA-HRP; TOYOBO CO. LTD., Osaka, Japan)を投与5日後に犬を屠殺し、喉頭甲状披裂筋のを組織学的標本として採取。De Olmosら¹⁾の方法に基づき甲状披裂筋内の神経終末へのWGA-HRPの取り込みの有無を観察した。

C. 結果

表1に結果を示した。Type IのPGAチューブを使用した6頭中4頭で声帯の動きが観察された。とくにNo.5, 6においては、ほぼ正常と変わらない声帯の動きが観察できた。Type IIのPGAチューブを使用した3例では全例に声帯の動きがみられた。一方、自家神経移植した3例とも声帯の動きが観察されなかった。(図4a, b)

CMAPについては、図5a, b, cに示したように声帯の動きが回復したPGAチューブ使用の犬No.5では、潜時および振幅も正常にかなり近い波形が得られたが、自家神経移植の犬No.11では、CMAPの波形は測定できなかった。WGA-HRPの取り込みについても、PGAチューブ使用の犬では甲状披裂筋の神経終末に多数の取り込みが観察された一方で、自家神経移植の犬では観察されなかった。(図6a, b)

D. 考察

頭頸部領域には、多数の脳神経が分布しており、それぞれ重要な働きをしている。一方、外傷や悪性腫瘍などの浸潤によってこれらの神経が障害されると、非常に重大な機能障害を引き起こすため、なんらかの神経再建治療が必要となる。これまで、神経再建の治療として行われてきたのは、①神経の直接吻合、②自家神経移植、③人工材料、④静脈片などである。しかし、①の場合、神経の欠損が5mm以内で、吻合部に張力がかからないことが条件となり、これを満たす症例は実際にはほとんどない。②の神経移植の場合は、移植材料として多くは周辺より感覚神経が採取されるが、その支配領域の感覚障害などの後遺症を引き起こす。特に外傷などで多数の神経再建を必要とするときなどは、それに応じた数の神経を採取する必要から、後遺症も広範囲となる。また、②の場合、実際の神経機能回復の成績はさほど良好ではなく、加えて吻合部に神経腫瘍が発生することもあり注意を要す。²⁾ ④の静脈片は、再建神経よりやや大きい径で弁を含まない部位の静脈を採取しなければならないことと、静脈片は周囲の組織から押しつぶされやすいといった欠点がある。③の人工材料については、あらゆる大きさの神経に対応でき、後遺症

もないと言う点では理想的である。これまでに数多くの研究がなされており、材質についても改良が進んでいる。また、神経移植などよりも良好な成績が報告されてきているが、⁴⁾ 臨床応用にいたっているものは少ない。

以上のような理由から反回神経のように機能的再生が難しいといわれている神経⁹⁾では、事故や手術などで切断された場合でも実際に再建することはまれで、他の神経との吻合や自家神経移植が行われる場合でも、多くは声帯の萎縮防止程度の意味合いでしかないのが現状である。

近年、再生医学のめざましい進歩によって、従来不可能とされてきた組織再生の可能性が出てきた。組織を再生させるためには、再生の元になる細胞、その細胞が増殖する足場、さらに再生を調節する因子の3つの要素が必要で、これが適切な環境下に置かれたときに組織再生が可能であるといわれている。¹⁶⁻²⁰⁾ また、*in situ* Tissue Engineeringという概念では、特定臓器の局所再生には、適切な足場を生体内に提供するだけで周囲から細胞、調節因子の分泌が誘導され、再生が行われるといわれている。²¹⁻²⁴⁾ したがって、どのような足場を設置するかが再生を可能にする最も重要なポイントとなる。

今回われわれはこの概念に立脚し、神経再生のための適切な足場として、コラーゲン被覆PGAチューブという人工材料を作成した。このPGAチューブは、1) 組織親和性が高く拒絶反応が起こらない、2) 生体内では徐々に加水分解され、約4カ月で消失する、3) 約2カ月間は形状を保持し、周囲からの組織進入を防ぐ、など神経再生にとって理想的な条件を兼ね備えている。本研究からこのチューブによって従来困難とされた反回神経の機能的再生が可能であることがわかったが、これは上記に示したPGAチューブの特徴が神経再生にとって良好な環境にあるからであると考えられる。現時点では、神経線維の過誤支配を防ぐ方法に関しては不明であるので、^{10,25,26)} 今後PGAチューブ内での神経線維再生過程の研究が必要であると考えられる。

E. 結論

組織再生医工学により作製した人工神経チューブにより反回神経の機能的再生をはかることが可能である。

参考文献

1. Olmos JD, Heimer L. Mapping of collateral projection with the WGA-HRP-method. *Neurosci Lett* 1977; 6:107-14.
2. Eppley BL, Delfino JJ. Collagen tube repair of the mandibular nerve: A preliminary investigation in the rat. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46:41-7.
3. Scott JJA. The functional recovery of muscle proprioceptors after peripheral nerve lesions. *J Peripher Nerv Syst* 1996; 1:19-27.
4. Meek MF, Dijkstra JR, Den Dunnen WFA, Ijkame-Paassen J, Schakenraad JM, Gramsbergen A, Robinson PH. Functional assessment of sciatic nerve reconstruction: biodegradable poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guides versus autologous nerve grafts.

- Microsurgery 1999; 20: 401-8.
5. Den Dunnen WFA, Van Der Lei B, Schakenraad JM, Stokroos I, Blaauw E, Bartels H, Pennings AJ, Robinson PH. Poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guides perform better than autologous nerve grafts. *Microsurgery* 1996; 17: 348-57.
 6. Giardino R, Nicoli Aldini N, Perego G, Cella G, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Giavaresi G. Biological and synthetic conduits in peripheral nerve repair: a comparative experimental study. *Int J Artif Organs* 1995; 18: 225-30.
 7. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: A tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Ann Plast Surg* 2000; 105: 660-6.
 8. Hazari A, Wiberg M, Johansson-Ruden G, Green C, Terenghi G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *BJPS* 1999; 52: 653-7.
 9. Nahum I, Shin T, Watanabe H, Maeyama T. Misdirected regeneration of injured recurrent laryngeal nerve in the cat. *Am. J. Otolaryngol* 1993; 14: 43-8.
 10. Nahum I, Shin T, Chiba T. Regeneration of recurrent laryngeal nerve in the guinea pig: Reorganization of motoneurons after freezing injury. *Am. J. Otolaryngol* 1990; 11: 90-8.
 11. Siribodhi C, Sundmaker W, Atkins JP, Bonner FJ. Electromyographic studies of laryngeal paralysis and regeneration of laryngeal motor nerves in dogs. *Laryngoscope* 1963; 73: 148-64.
 12. Hiroto I, Hirano M, Tomita H. Electromyographic investigations of human vocal cord paralysis. *Ann Otolaryngol* 1968; 77: 296-304.
 13. Ohyama M, Ueda N, Harvey JE, Mogi G, Ogura JH. Electrophysiologic study of reinnervated laryngeal motor units. *Laryngoscope* 1972; 82: 237-51.
 14. Dedo HH. Electromyographic and visual evaluation of recurrent laryngeal nerve anastomosis in dog. *Ann Otol* 1971; 80: 664-8.
 15. Tashiro T. Experimental studies on the reinnervation of larynx after accurate neurotomy. *Laryngoscope* 1972; 82: 225-36.
 16. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; 414(6859):118-21
 17. Vacanti CA, Upton J. Tissue-Engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg*. 1994; 21(3): 445-62.
 18. Vacanti JP. Beyond transplantation. *Arch Surg*. 1988; 123: 545-9.
 19. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*. 1988; 23:3.
 20. Bruder SP, Fink DJ. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell Biochem*. 1994; 56: 283-94.
 21. 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*. 2001; 47: 206-10.
 22. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Eng*. 2003; 9:153-62.
 23. Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Taka TN, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs*. 2000; 23: 718-24.
 24. Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, Ito J, Shimizu Y. Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003; 112: 492-8.
 25. De Medinaceli L. Functional consequences of experimental nerve lesions. *Exp Neurol* 1988;100: 166-78.
 26. De Medinaceli L, Raelings RR. Is it possible to predict the outcome of peripheral nerve injuries? A probability model based on prospects for regenerating neurites. *Biosystems* 1987; 20: 243-58.
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1)金丸眞一：頭頸部領域における神経再生医療.日本気管食道科学会会報 55(2): 135-136, 2004
 2. 学会発表
 - 1)金丸眞一：＜シンポジウム＞頭頸部領域における神経再生医療 第16回日本頭蓋底外科学会（横浜 2004.7.1）
 - 2)金丸眞一：＜シンポジウム＞頭頸部領域における再生医療 第18回エムイー学会秋季大会（松山 2004.11.5）
 - 3)金丸眞一：＜シンポジウム＞人工神経チューブを用いた神経再生医療 第17回日本喉頭科学会（名古屋 2005.3.18）
 - 4)金丸眞一、中村達雄、Akhmar Magruffov、大森孝一、山下 勝、安里 亮、玉木久信、田中信三、伊藤壽一：神経再生医療—反回神経の機能的再生をめざして— 第16回日本喉頭科学会（松山 2004.3.19）

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

表1. 神経再建6か月後の声帯の動き

再建材料	PGA tube Type I						PGA tube Type II			自家神経		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
イヌNo.												
左声帯の動き	×	×	○	△	◎	◎	△	○	◎	×	×	×

◎：ほぼ正常， ○：良好， △：わずかな動き， ×：全く動かない

※図の説明

図1

a：PGAチューブType I、b：PGAチューブType Iの走査電顕像

図2

PGAチューブType II

図3 手術所見

a：輪状軟骨下端より約2cmの部位で反回神経を約1cm切除

b：PGAチューブType IIにより反回神経を再建

図4 電子内視鏡による声帯の動きの観察（イヌNo. 5、術後6ヶ月）

a：外転

b：内転

図5 複合筋活動電位（CMAP、術後6ヶ月）

a：PGAチューブType Iによる再建を行ったイヌNo. 5

b：正常

c：自家神経移植を行ったイヌNo. 11

図6 甲状披裂筋内の神経終末へのWGA-HRPの取り込み（術後6ヶ月）

a：神経終末に多数のWGA-HRPの取り込みが観察される（イヌNo. 5）

b：神経終末に全くWGA-HRPの取り込みが見られない（イヌNo. 11）

图1a,b

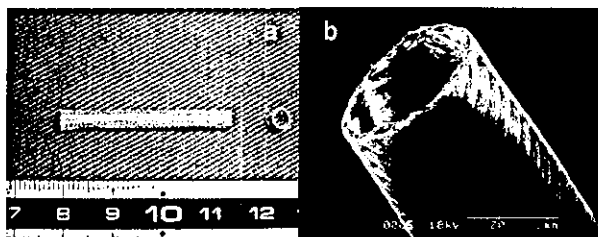


图5a,b,c

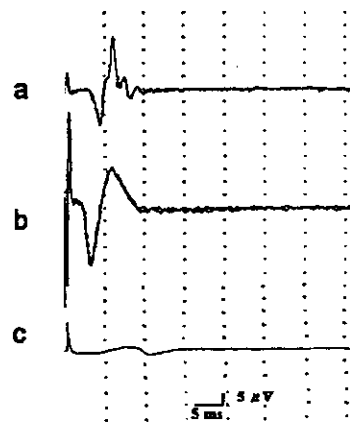


图2



图6a,b

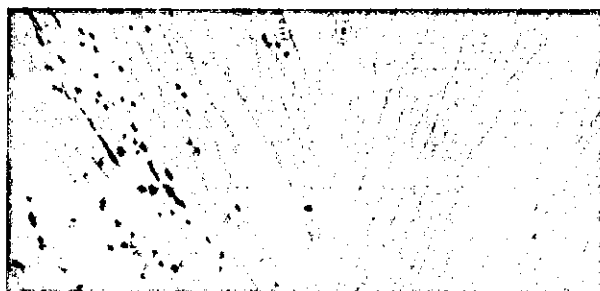


图3a,b



图4a,b



ラット気道上皮細胞培養法の確立

分担研究者 挾間章博（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究協力者 三宅将生（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究要旨

これまで気道再建治療のために用いられたコラーゲン及びポリプロピレンからなる人工気管の場合、気道の上皮化に時間がかかるという問題点があった。その問題点を解決するために人工気管の表面を培養上皮細胞で覆ってから再建に用いるという手法を考案した。そのためには気道上皮細胞の培養法を確立する必要がある。今回、動物実験としてラットを用いるため、ラットの気道上皮細胞培養法の確立を行った。過去、ヒト気道上皮細胞培養およびモルモット気道上皮培養に用いられた手法を採用し、ラット気道上皮細胞の初代培養系を確立することが出来た。また、人工材料へ細胞を貼り付ける試みを行い、単層細胞をPTFE製の人工膜上に貼り付けることが出来た。

A. 研究目的

コラーゲン及びポリプロピレンからなる人工気管を用いた気道再建治療は、イヌを用いた動物実験およびヒトでの臨床応用で成功を見たが、人工気管表面の上皮化に時間がかかり、人工材料が露出するという問題点があった。その問題点を解決するために人工気管表面を培養気道上皮細胞で覆ってから再建術に用いるという手法を考案した。そのためには最初に気道上皮細胞の培養法を確立する必要がある。今回、気道再建術の動物実験としてラットを採用したため、ラットの気道上皮細胞培養法の確立を行うことを第一の目的とし、さらに人工材料の上に確立された培養細胞を貼り付ける方法を確立することを第二の目的とした。

B. 研究方法

ラットをエーテル吸入またはペントバルビタール投与により麻酔し気管を摘出した。その後ラットは脱血により安楽死させた。摘出気道について、トリプシン、プロテアーゼ、コラーゲナーゼ等の種々の酵素を作用させ効果を比較した。また、酵素の作用時間についても検討を行った。また人工材料上の培養法の検討を行うために、ミリポア社の millicell CM (PTFE製フィルター膜) 上にコラーゲンコートを行い(新田ゼラチン Cellmatrix type IA)、その上に細胞を培養した。

C. 研究結果

シグマ社の protease type XIV が最も上皮細胞を単離するうえで有効であった。酵素を 0.05% の濃度で PBS に溶かし、ラット摘出気管を酵素液に入れた。従来報告のあったヒト気道上皮あるいはモルモット気道上皮細胞培養法に従って、4℃条件で翌日まで静置した。その後、ウシ胎仔血清 (FBS) 入りの培養液でプロテアーゼ活性を中和し、さらに振盪により上皮細胞を脱落させた。脱落

した上皮細胞を遠心処理により回収し、培養用プラスチックディッシュに播き培養を行った。図1に示すとおり上皮細胞の増殖が認められ、中には図2に示すような杯細胞が観察された。トリプシンやコラーゲナーゼは通常種々の組織から細胞を単離するのに用いられるが上皮細胞のみを単離するには適さなかった。また、37℃条件下で短時間の酵素処理を試みたが、平滑筋細胞の混入も認められ、また上皮細胞のダメージも大きかった。また、4℃条件下での反応時間については、24時間でも上皮細胞の剥離が認められない場合があり、その際は48時間まで反応を延長させることにより上皮細胞を得ることができた。

ラット気道上皮細胞の初代培養法を確立したあと人工材料上に気道上皮細胞を貼り付ける試みを行った。人工材料として、培養上皮細胞の輸送能を調べるのに用いられるミリポア社の millicell CM を採用し、フィルター膜上にコラーゲングルを作製した(新田ゼラチン コラーゲン type IA)。コラーゲングル上に上記の方法により単離した気道上皮細胞を播き5日後にパラホルムアルデヒド固定およびパラフィン包埋を行った。切片作製後 HE 染色にて形態観察を行った(図3)。また、GFP 発現ラットの気道細胞を同様の手法で初代培養を行い、フィルター上で培養し細胞形態を観察した(図4)。

D. 考察

ヒトやモルモットの気道上皮細胞の場合、プロテアーゼ処理の時間は24時間で十分であるが、ラットの場合はより長い時間の酵素処理が必要になることが明らかになった。また、ヒトやモルモット気道上皮細胞のように、単離直後は線毛細胞が観察されるもののディッシュ上で分裂増殖する細胞については、非線毛細胞が主体であることが明らかになった。より正常の上皮に近い線毛上皮を

主体とする細胞シートを得るには分化誘導を行う必要があると考えられた。

E. 結論

本研究によりラット気道上皮細胞の初代培養法を確立できた。また、人工材料の上に細胞シートを培養することも可能になったが、人工材料上により正常に近い線毛上皮をいかにして生着させるか、という点が次の課題として挙げられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu K, Kozono D, Kato Y, Agre P, Hazama A, Yasui M. Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 25;
- 2) Hayashi S, Hazama A, Dutta AK, Sabirov RZ, Okada Y. Detecting ATP release by a biosensor method. Sci STKE. 2004; 258: p114.
- 3) Katsuda S, Machida N, Hasegawa M, Miyashita H, Kusanagi M, Tsubone H, Hazama A. Change in the static rheological properties of the aorta in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits with progress of atherosclerosis. Physiol Meas. 2004 (2):505-522.
- 4) Katsuda S, Miyashita H, Hasegawa M, Machida N, Kusanagi M, Yamasaki M, Waki H, Hazama A. Characteristic change in local pulse wave velocity in different segments of the atherosclerotic aorta in KHC rabbits. Am J Hypertens. 2004 (2):181-187.

2. 学会発表

- 1) 野本幸男、鈴木輝久、多田靖宏、三宅将生、挟間章博、金丸眞一、大森孝一：組織工学的手法による気管上皮細胞組織の作成。第 56 回日本気管食道科学会 (2004. 11. 25-26)
- 2) 鈴木輝久、野本幸男、多田靖宏、三宅将生、挟間章博、金丸眞一、大森孝一：ラット気管上皮細胞組織の作成と気管損傷モデルへの移植。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. 特許申請

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし