

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学的手法を用いた気道再生の基礎的・臨床的研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大森 孝一

平成18 (2006) 年 3 月

班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
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	教 授
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	教 授
	中 村 達 雄	京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野	助 教 授
	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	助 手
	小 川 洋	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	講 師
	松 塚 崇	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	講 師
	桑 畑 直 史	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助 手
	多 田 靖 宏	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助 手
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	大 学 院 生
	鈴 木 輝 久	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	大 学 院 生
	小 林 謙	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	博 士 研 究 員
	三 宅 将 生	福島県立医科大学医学部生理学第一	助 手
	瀧 川 敏 算	京都大学大学院工学研究科	教 授
	野田澤 俊 介	京都大学大学院工学研究科	大 学 院 生
	安 里 亮	京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科	助 手
	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	大 学 院 生

目 次

班員名簿

I. 総括研究報告書

組織工学的手法を用いた気道再生の基礎的・臨床的研究	1
---------------------------	---

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）

II. 分担研究報告書

1. 基礎研究

(1) 気道の再生

1) 人工材料

① 組織工学的手法を用いた気道の再生治療法の開発	14
--------------------------	----

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）

② 気管小欠損モデルへの人工気管を用いた組織再生	25
--------------------------	----

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）

2) 気道上皮細胞

① ラット気道上皮培養細胞におけるアクアポリンとイオンチャネルの発現	28
------------------------------------	----

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）

② ハイブリッド人工材料を用いた気管の再生 - 上皮層および上皮下層について -	33
--	----

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）

3) 線維芽細胞

① 気管線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす影響	37
------------------------	----

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）

② 自家移植に適した線維芽細胞の検索	42
--------------------	----

分担研究者 桑畑 直史（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

③ 培養気管上皮細胞及び線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管の作製	46
------------------------------------	----

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）

④ 自己口腔線維芽細胞と自己脂肪組織由来細胞群を用いたハイブリッド人工材料の被覆	49
--	----

分担研究者 小川 洋（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

4) ヒト細胞・組織

気道領域におけるヒト組織の培養および再生に関する研究	54
----------------------------	----

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）

(2) 喉頭の再生

1) 甲状軟骨

人工材料と自己間葉系細胞を用いた甲状軟骨および声帯切除後の組織再生	57
-----------------------------------	----

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）

2) 声 帯	
① 自己骨髄由来細胞による声帯再生 – 移植細胞の行方の検討 –	59
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)	
② 人工材料と自己筋膜を用いた声帯切除後の組織再生	62
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)	
(3) 神 経 の 再 生	
人工神経チューブによる神経再生過程の評価 – 反回神経再生の機能的再生をめざして –	64
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)	
(4) 皮 膚 の 再 生	
多血小板血漿 (PRP) を使用した甲状腺手術創の治癒促進	67
分担研究者 松塚 崇 (福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科)	
2. 臨 床 応 用	
気道の再生治療	71
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)	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	79

組織工学的手法を用いた気道再生の基礎的・臨床的研究

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

本研究の目的は気道の臓器の機能的再生をはかり、気道病変切除後の呼吸、嚥下、発声、構音の機能障害を回避し、Quality of Lifeの向上を実現することにある。

本研究班は、体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の手法を用いて、気道の組織再生をはかることを目標に、基礎的・臨床的研究を行ってきた。基礎実験として、自己の組織が再生するようにデザインされた人工材料を開発し、この移植により動物実験で気道の安定した組織再生を最長5年の観察にて確認した。

これらの成果を基盤として、倫理委員会で承認の上「喉頭・気管の再生治療」を世界で初めて臨床応用を開始した。現在では6例に行い良好な成績を得ている。

次のステップとして解決すべき課題は気道上皮化の加速、形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生であり、平成17年度には、動物実験で、気管上皮細胞層とコラーゲンからなるハイブリッド人工材料や線維芽細胞、脂肪組織由来細胞群、コラーゲンからなるハイブリッド人工材料、声帯の隆起を型取った人工材料を開発し、気道組織の効果的再生に有用であることが判明した。平成18年度には今回開発した新技術の安全性を検証し、基礎実験の成果を臨床応用に結びつけるトランスレーショナルリサーチにより、本再生治療を気道の各部位に応じた組織再生が可能なレベルに高める必要がある。

近年、再生医学研究は急速に進められているものの、臨床に応用されている研究はまだ数少ない。この *in situ* Tissue Engineering を用いた「気道の再生治療」はわが国で世界に先駆けて実現されたものである。本研究により喉頭・気管の再生治療が十分期待の持てるものであり、気道の機能障害回避に大きく貢献できることが明らかとなった。今後、一般医療として普及するように人工材料の安定供給、安全性の確保、再生治療技術の向上、長期的評価について継続した研究を積み重ねていくことが重要である。

A. 研究目的

気道は鼻腔、口腔、咽頭、喉頭、気管からなり、呼吸、嚥下、発声、構音という、ヒトの生命としての基本的な機能や社会生活をおくる上で基盤となる機能を持つ。癌や外傷などで気道の組織が侵された場合、これを切除した後に機能障害なく再建することは難しい。平成15年版「障害者白書」によると、音声言語、咀嚼および呼吸の認定機能障害者は約12万3千人で、これらの疾患に悩まされている人はその10倍はいるとされている。本研究の目的は気道の臓器の機能的再生をはかり、気道病変切除後の呼吸、嚥下、発声、構音の機能障害を回避し、Quality of Lifeの向上を実現することにある。

本研究では組織工学（Tissue Engineering）の手法を用いて気道の組織再生を目指して、自己組織再生型の人工材料を開発する。動物を用いて臓器再生の足場として人工材料あるいは骨髄由来間葉系細胞などを気管及び喉頭の欠損部に移植し、組織再生をはかる。特に、気道上皮の形態と機能の再生を早期に実現するために、気管上皮細胞あるいは骨髄由来間葉系細胞と人工材料を組み合わせたハイブリッド型人工気管や脂肪組織由来の血管間質画群細胞と自己の線維芽細胞と人工材料を組み合わせた

ハイブリッド型人工気管を作製する。また、臨床応用に向けて創傷治癒の促進条件の検索やヒト組織を採取し、その細胞培養法を確立する。

このように Tissue Engineering の手法を用いて、喉頭、気管を標的とし組織再生させることができれば、気道の機能障害回避に大きく貢献できると同時に医療費の削減に寄与でき、社会的意義は計り知れない。

本研究では細胞や組織、動物を扱う基礎部門、ヒトへの応用を行う臨床部門を統括してトランスレーショナルリサーチを行い、基礎実験の成果を臨床に橋渡しする。倫理委員会での承認の上で「喉頭・気管の再生治療」を臨床応用し、術後の気道再生を評価すると同時に、問題点をあきらかにしてこれを解決するための基礎実験にフィードバックする。このように多方面からの臓器再生医工学的研究により、より有効で安定した気道の再生治療を実現する。

B. 研究方法

[研究における倫理面への配慮]

動物実験に関しては、京都大学および福島県立医科大学に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行する。臨床応用に関しては倫理委

員会の承認の上、ヘルシンキ宣言に則り人権擁護の配慮を行い、対象者に対する不利益、危険性の排除へ十分な配慮をはかり、研究計画に対する説明と同意（インフォームド・コンセント）を得られた上で研究を実施する。

1. 基礎研究

(1) 気管の再生

1) 人工材料

① 人工材料の開発と動物実験

in situ Tissue Engineering により気管を再生させるために、自己組織再生型の人工気管の開発を行った。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る設計とした。まず内腔保持のために、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メッシュを円筒状にし、ポリプロピレン製のモノフィラメントを外側に巻き付けたチューブを作製した。このチューブに、組織再生の足場となる材料として、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付着させ、さらにコラーゲンスポンジを付加させた。この複合チューブの耐圧縮強度の比較試験を行った。各測定の前にプレコンディショニングの操作を行った。測定中は気管試料が乾燥しないように定期的に生理食塩水を噴霧した。各試験には引張試験機を用い、室温、空気中で行った。

①-1. 気管切片引張試験

気管試料の両端に自作の治具に取り付けて固定し、引張試験を行った。引張速度は5 mm/min に設定した。

①-2. 気管膜様部引張試験

ビーグル犬の気管から気管膜様部を切り取り、軸方向切片と円周方向切片に切り分けた。両切片において、それぞれ一軸伸長試験を行った。引張速度は5 mm/min に設定した。

①-3. 気管引張試験

気管試料の両端に自作の治具に取り付けて固定し、引張試験を行った。引張速度は5 mm/min に設定した。

①-4. 気管圧縮試験

生体の気管は形状が一様な円筒ではないため、2種類の圧縮方向（Direction A、Direction B）で圧縮試験を行った。圧縮速度は5 mm/min に設定し、データの解析は試料の形状を円筒と仮定して行った。

② ビーグル成犬3匹を用い、全身麻酔下に粘膜を一部保存し、気管を1.5cm大に開窓する。ビーグル犬の末梢血液を採取し、足場に含浸させた後、吸収糸にて縫着し手術を完了した。術後13ヵ月でCT撮影後、気管を摘出し標本作製、光学顕微鏡・走査電子顕微鏡下に観察を行った。

2) 気道上皮細胞

① アクアポリンとイオンチャネル

RT-PCR法：シート状に培養された気管上皮細胞数mgを採取し、ホモジナイズした後、mRNAを抽出しRT-PCRを行った。

免疫染色：ラット気管組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。標本はパラフィ

ンに包埋した。5 μm厚の切片を作製した。その後、各一次抗体と4℃でovernight反応させた。HRP標識またはビオチン標識された二次抗体と室温で反応させた。次に蛍光発色の場合はフルオレセイン標識ストレプトアビジンを反応させ、核染色をヨウ化プロピジウムで行った。酵素発色の場合は対比染色はヘマトキシリンを用いた。染色後、蛍光発色の場合はvectorshieldを用いて封入し、酵素発色の場合はエタノール系列、キシレンを通して封入してそれぞれ検鏡した。

一次抗体はAnti-AQP3を100倍希釈、Anti-AQP4を100倍希釈、Anti-AQP5を12,500倍希釈、Anti-Na⁺-K⁺-ATPaseを2,000倍希釈、Anti-PCNA3,000倍希釈で用いた。

② 気管の再生

SD系ラットの気管を摘出し、プロテアーゼ処理を行い、気管上皮細胞を採取する。DMEM培地で細胞懸濁液を作製し、継代培養する。培養した細胞を用いてハイブリッド型の人工材料を2種類作製した。type Aはすでに臨床応用されているコラーゲンスポンジ上に豚腱由来のI-A型にコラーゲンを重層化し、次いで培養皿の底に留置して細胞懸濁液を満たし、表面に気管細胞層を形成させたものとする。type Bは、組織培養用コラーゲン膜（cellgen[®]）を培養皿に留置し、細胞懸濁液を満たして表面に気管細胞層を形成させ、後にコラーゲンスポンジと生体糊で接着させたものとする。それぞれの構造的特徴はtype Aの表面はやや不整であり、それに対しtype Bの表面は平滑なものとする。それぞれのハイブリッド型人工材料についてパラフィン切片を作製し、H-E染色と免疫染色を行い評価する。

ラットの気管を露出し、約4×2mmの欠損を作り、type Aを被覆したモデルと、type Bを被覆したモデルを作製する。人工材料上の気管上皮細胞には9W齢SD系GFP遺伝子改変導入ラットより採取し培養した細胞を用いることとした。それぞれに対し移植後の気管内腔上皮層と上皮下層の形成過程を観察し、さらにコラーゲンスポンジの変化についても観察する。観察期間はそれぞれ3日・7日・30日とする。

3) 線維芽細胞

① 気管上皮細胞に及ぼす影響

上皮細胞はSD系ラットの気管から単離して、線維芽細胞はGFPラット気管の組織片培養によって単離、増殖させた。増殖させた線維芽細胞は低密度と高密度でコラーゲン溶液に懸濁し、コラーゲンゲル上に気管上皮細胞を播種し培養した。上皮細胞移動能の測定は上述と同じ線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上にカバーグラスを用いて上皮細胞非被覆部を作製し、上皮細胞がコンフルエントに達した後、カバーグラスを除き、周囲からの上皮細胞の移動を経時的に写真撮影し、Scion Imageによる画像解析によって上皮細胞の移動能を測定した。上皮細胞増殖能の測定は上述と同じ線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に上皮細胞を2×10³ cell/cm²の密度で播種し、5日間培養した。GFP陰性の上皮細胞数を測定した。ムチン分泌量の測定は上記の培養10日後の各上皮細胞層

上層に分泌されたムチンをPBSで回収し、ELISA法によって測定した。また、移植に適した線維芽細胞の検索を行った。細胞採種はSD系ラットの気管粘膜下層、皮膚真皮、口腔粘膜下層および鼻粘膜下層より組織片培養によって線維芽細胞を、単離して、培養4週間以内に実験に用いた。上皮細胞と線維芽細胞の共培養を行い、培養10日目の標本を免疫染色した。

② 自家移植に適した細胞検索

細胞採種はSD系ラットの気管粘膜下層、皮膚真皮、口腔粘膜下層および鼻粘膜下層より組織片培養によって線維芽細胞を、単離して、培養4週間以内に実験に用いた。上皮細胞と線維芽細胞の共培養を行い、培養10日目の標本を免疫染色した。

③ ハイブリッド人工材料

SD系ラットの気管を摘出し、気管上皮細胞、及び気管上皮下線維芽細胞を採取した。DMEM培地で気管上皮細胞懸濁液を作製した。豚腱由来のI-A型コラーゲンゲルを自己再生型人工気管に用いられているものと同じコラーゲンスポンジ上に重層化し、細胞懸濁液中に沈め培養を行った。さらに継代培養を経た線維芽細胞が包埋されたコラーゲンゲルを用意し、先と同様の操作を行った。培養後人工材料を組織学的および免疫組織化学的に評価した。

SD系ラットに対して全身麻酔下に気管を露出させ、気管前面に1.5×3.0mmの気管欠損を作製し、GFP遺伝子導入気管上皮細胞を用いた人工材料を移植した。術後3日、7日、14日、30日に再建部を含め気管を摘出し、経時的な組織学的変化を観察した。

④ 線維芽細胞と脂肪組織由来細胞群

細胞採取はSD系ラットの口腔粘膜下層から線維芽細胞を単離、3週間培養し、細胞数として4.8から7.5×10⁵/mlとした。腹部皮下脂肪を2ml採取し、酵素処理し、脂肪組織を分解した細胞懸濁液をセルストレーナーで濾過。遠心分離して得られた細胞をディッシュ上に播種し、ディッシュに接着した細胞群(stromal fraction)を3週間培養した。vascular stromal fractionとして培養せず移植に利用した。ハイブリッド人工材料の作製は、コントロールを含め、上記により得られた細胞を含む4種類のハイブリッド人工材料を作製した。尚、採取した自己細胞は移植前にDiIで細胞標識を行った。①コントロール：コラーゲンスポンジとコラーゲンメッシュからなる人工材料上にコラーゲンゲルを重層化したもの②fibblast：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋し、コラーゲンスポンジに重層化したもの③fibblast + stromal fraction：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものとstromal fraction細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したもの④fibblast + vascular stromal fraction：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものとvascular stromal fraction細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したものとした。次に気管欠損モデルを作製した。SD系ラットに全身麻酔を行い、頸部正中切開にて気管を露出。第2、3、4

気管輪に5×7mm大の気管欠損を作製し、同気管欠損モデルに自家細胞由来のハイブリッド人工材料を移植する再建モデルを作製。前頸筋群、皮膚をそれぞれ縫合した。標本作製は喉頭気管を摘出し凍結標本とし組織切片を作製する。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。血管のマーカーとなる抗vWF抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察し組織学的に評価する。評価項目としては、気管上皮再生、血管新生の状態、移植した自家細胞の生着について観察を行った。

4) ヒト細胞・組織

気管上皮細胞の培養は、摘出した気管片をPBSで洗浄した後、酵素処理を施し、気管上皮層を回収した。気管上皮層は緩やかなピペッティングによって十数個の上皮細胞塊に解した後、気管上皮細胞専用の増殖培地で培養した。

気管線維芽細胞は、上述の酵素処理を施した気管から組織片培養法によって単離した。増殖培地としてはDMEMを用いた。

口腔粘膜上皮細胞は、摘出した口腔粘膜をPBSで洗浄した後、Dispase溶液で酵素処理を施すことによって粘膜下層から上皮層を分離した。得られた上皮層はトリプシン・EDTA溶液中で解した後、DMEMを用いて培養した。

口腔粘膜線維芽細胞：上述の上皮層を除いた粘膜下層を組織片培養することによって単離し、DMEMを用いて培養した。

末梢血由来細胞(血管内皮前駆細胞を含む分画)は、ヘパリン入りシリンジで採血した20mlの血液をクリーンベンチ内でPBSで希釈した。希釈血液からFicollを用いた密度勾配遠心法によって単核球分画を分離した。得られた末梢血由来細胞をFibronectinでコートしたガラスコ上に播種し、血管内皮前駆細胞用培地で培養した。

脂肪由来細胞は、摘出した皮下脂肪はPBSで洗浄した後、collagenase II溶液で酵素処理を施すことによって細胞懸濁液にした。遠心分離によって脂肪細胞と脂肪滴を分離した後、濾過し、脂肪由来細胞群としてDMEMを用いて培養した。

線維芽細胞層はコラーゲンスポンジ上に線維芽細胞を懸濁したコラーゲンゲル溶液を滴下して37℃でゲル化させることによって作製し、上皮細胞層は、ゲル上に上皮細胞を播種してコンフルエントに達するまで気管上皮細胞培地で培養することによって作製した。

(2) 喉頭の再生

1) 甲状軟骨

ビーグル成犬2匹を用い、上腕から骨髓液を採取した。10⁶~10⁷個程度に培養できた時点で、細胞を回収して手術を行った。全身麻酔下に甲状軟骨の一部を含め、左声帯を切除する左喉頭部分切除術を行った。

シート状ポリプロピレンを骨格とし、コラーゲンスポンジにて被覆し、回収した細胞を含む末梢動脈血を含浸させ、この材料を吸収糸にて創部に固定した。内腔粘膜

の再生状況は、電子内視鏡により内腔面から観察した。

2) 声帯

① 自己骨髄由来細胞

GFP トランスジェニックマウスの大腿骨より骨髄を採取し、付着系の細胞を2週間培養後回収し、ヌードラットの声帯に障害を加えた後にその部位に移植した。この細胞移植後6週間で、ヌードラットの喉頭を摘出し、蛍光組織学的にケラチンとデスミンの発現を観察した。

② 人工材料と自己筋膜

ビーグル成犬3匹を用いた。全身麻酔下に甲状軟骨の一部を含め、左声帯を切除する左喉頭部分切除術を行った。シート状ポリプロピレンを骨格とし、コラーゲンスポンジにて被覆した。この材料に末梢動脈血を含浸させる。さらに大腿筋膜にて先の材料を包み、創部に固定した。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。

(3) 神経の再生

神経再生過程の検討を目的にイヌ ($n=29$) を用いて下肢の感覚神経である総腓骨神経 (CPN) を1cm切除し、そのギャップを一方はPGAチューブで再建、他方は反対側より得たCPNで再建し、術後1、2、8週に再生部位を切除して神経線維の再生状況を組織学的に比較検討した。また8週目に再生部位の電気生理学的検査として複合神経活動電位 (CNAP) を測定し、機能的評価を行った。

(4) 皮膚の再生

採取した自己血液を遠心分離法により、血球層と血漿層の境界付近に血小板を集め、血小板層あるいは白血球沈層を回収した。分離された血小板と白血球層には創傷治癒に関わる成長因子が濃縮された状態となる。得られた製剤と市販または自己トロンピン (採血の上調整)・塩化カルシウム混合液との混合したものを、皮膚切開創に対して塗布した。観察は至適投与量の設定、創傷治癒、有害事象の有無を評価した。

2. 臨床応用

人工気管に対する種々の動物実験の結果をふまえ、「喉頭・気管の再生治療」は京都大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則り、2002年に本人工材料のヒトへの応用を開始した。さらに本再生治療は福島県立医科大学倫理委員会でも承認された。

現在までに甲状腺癌の気管浸潤3例、喉頭・気管狭窄3例のあわせて6例に施行した。手術は、全身麻酔下に行い、病変部位を切除し、生じた欠損部位にあわせて本人工材料をトリミングして自己の血液を注入し、気管欠損部をパッチする形で縫合した。術後の経過は、喉頭ファイバーやCTにて評価した。

C. 研究結果

1. 基礎研究

1) 人工材料

①-1. 気管切片引張試験

ひずみの小さい領域では、 σ と ε の間には線形関係が成り立っている。この領域で定義される E_0 を求めると

$E_0 = (11.0 \pm 3.2) \text{ kPa}$ となった。高ひずみ領域で定義される $E_{1.3}$ は $E_{1.3} = (5.3 \pm 2.2) \text{ MPa}$ となった。3種の引張速度で気管の軸方向切片の引張試験を行った結果、3本の応力-ひずみ曲線は比較的ひずみの小さな領域ではほぼ一致した。このことから、本実験で採用した引張速度の範囲では、引張速度が気管の伸長特性に及ぼす影響がほとんどないことがわかった。

①-2. 気管膜様部引張試験

気管膜様部の引張試験の結果、2本の曲線は $\varepsilon < 0.2$ の領域ではほぼ同じレベルを示したが、 $\varepsilon > 0.2$ の領域ではひずみが大きくなるにしたがって軸方向切片の方が高い応力レベルを示した。気管膜様部は伸長特性において異方性を示し、軸方向よりも円周方向に伸びやすい組織であることがわかった。これは気管膜様部に存在しているコラーゲン線維が主に軸方向に配向していることに起因していると考えられる。

①-3. 気管引張試験

気管の応力-ひずみ曲線は2本の曲線はほぼ同じ形状を示した。軸方向切片と同様に低ひずみ領域ではエラスチン線維の物性が反映され、高ひずみ領域ではコラーゲン線維の物性が反映されていると考えられた。低ひずみ領域で定義される E_0 の値は $E_0 = (6.3 \pm 1.7) \text{ kPa}$ であり、高ひずみ領域で定義される $E_{1.3}$ の値は $E_{1.3} = (2.8 \pm 1.5) \text{ MPa}$ であった。これらの値を気管の軸方向切片の値 ($E_0 = (11.0 \pm 3.2) \text{ kPa}$ 、 $E_{1.3} = (5.3 \pm 2.2) \text{ MPa}$) と比較すると、どちらも気管試料の方が軸方向に切り出した切片試料よりも値が小さくなっていった。見かけの断面積が気管試料では切片試料よりも大きくなるため、気管試料の応力値が切片試料のそれよりも低下するものと考えた。

①-4. 気管圧縮試験

全ひずみ領域でDirection AはDirection Bの約2倍の力を示した。Direction Aは両側面にある軟骨で形状を保持しているのに対して、Direction Bは片側のみで形状を保持している。このためDirection BはDirection Aの半分の大きさの力を示していると考えられる。

② 小欠損モデル

術後8カ月の気管内腔面で足場の逸脱や変形、狭窄を認めなかった。HE染色ではポリプロピレンの内側に周囲より伸びている軟骨、新生軟骨を認めた。内腔面には線毛上皮が再生し、正常気管と同様の所見を呈していた。再生気管内腔面の走査電子顕微鏡像では、規則正しい線毛がみられ、良好な気管上皮の再生が認められた。再生気管部CT水平断像では周囲の正常気管と段差なくきれいな内腔の形態がみとれた。組織学的には島状の軟骨組織再生所見が得られたが、CT上は明らかな軟骨や骨の形成は認めなかった。

2) 気管上皮細胞

① アクアポリンとイオンチャネル

RT-PCR: ENaC-alpha、ENaC-gammaについては予期された位置にバンドが見られ、発現を確認することができた。しかし、ENaC-betaに関しては正しい位置に確認することができなかった。AQP4、AQP5は予想通りの位置

に発現を確認することができた。

免疫染色：AQP3は基底側の細胞の細胞膜に、AQP4は表層側の細胞の basolateral membrane に、AQP5は基底側の細胞にみられた。Na⁺-K⁺-ATPase は、基底細胞や杯細胞などの basolateral membrane で染色がみられた。PCNA は基底層の細胞のみで強い染色がみられた。

② 気管の再生

HE 染色にて人工材料の表面に気管上皮細胞層の形成を確認できた。免疫染色では type A にて基底膜の指標となる cytokeratin14、上皮細胞の指標となる cytokeratin18、タイトジャンクションの指標となる occludin において発現が認められた。type B においては occludin の培養上皮細胞での発現を認め、膜輸送タンパクの指標となる Na-K-ATPase と、増殖能の指標となる PCNA の培養上皮細胞での発現を認めた。これらの結果より作製した人工材料上の気管上皮細胞層は上皮の性質を有すると考えられた。

type A 移植モデルの HE 染色にて術後3日では欠損部に一致して人工材料を認め、その表面に上皮層の形成を認めた。免疫染色にて創部に GFP 陽性細胞層を認めており、これと同様の所見が術後7日でも確認されたが、術後30日では確認できなかった。術後3日ではゲル層がそのまま残存しており細胞浸潤は周囲に軽度あるのみであったが、術後7日ではゲルは吸収され細胞浸潤を多く認め、30日では上下層の形成を認めた。

type B 移植モデルの HE 染色にて術後3日では欠損部の上皮層形成は不十分であったが、7日では形成を認めた。免疫染色にて術後7日まではシート上に GFP 陽性細胞を認めたが、術後30日では認められなかった。上皮下層はシート上に自己の細胞が入り込むように形成されており、術後3日では、上皮層とシートとの間に軽度細胞浸潤を認めるのみであるが、術後7日では細胞浸潤も増加し血管新生も認めた。術後30日では、上皮下層の形成がみられたが、シートはほとんど吸収されていなかった。

type A 移植モデルでの移植後のコラーゲンスポンジの変化は、術後3日ではスポンジ周囲に細胞浸潤を認めるものの内部への浸潤は軽度であったが、術後7日では内部への細胞浸潤も増加し血管新生も認められた。術後30日では、スポンジはほぼ吸収されていた

3) 線維芽細胞

① 気管上皮細胞に及ぼす影響

線維芽細胞が上皮細胞の移動を活発にすることがわかった。線維芽細胞存在と非存在条件における上皮細胞移動率の差は、培養5日間を通して線維芽細胞の密度によって上皮細胞の移動能も上昇していた。また、上皮細胞の増殖率も線維芽細胞によって上昇しており、低密度で20%、高密度で60%の上皮細胞が線維芽細胞非存在下よりも増加していた。

走査型電子顕微鏡では、線維芽細胞の密度上昇に伴って線毛被覆領域の拡大が認められた。免疫染色で線維芽細胞は、上皮細胞の線毛細胞、杯細胞および基底細胞への分化を促進して、極性をもって適切に配置した偽多列線毛上皮層を形成していた。一方、線維芽細胞非存在下

ではこれらの機能細胞へ分化した細胞は少なく、細胞の形状は立方上皮や扁平上皮であった。線毛細胞、杯細胞および基底細胞へ分化した上皮細胞数を比較すると、高密度の線維芽細胞存在下で線維芽細胞非存在下に対して、2.3倍、2.5倍、5.4倍であった。

基底膜の主成分である laminin、type IV collagen および上皮細胞表面に存在する基底膜への接着分子である integrin beta4の抗体による免疫染色法で調べた結果、線維芽細胞存在下において laminin と type IV collagen は上皮細胞層下側に局在していた。線維芽細胞の密度が高いほど基底膜の形成は促進されており integrin beta4も上皮細胞下側の細胞膜に局在していた。一方、線維芽細胞非存在下の laminin や type IV collagen は上皮細胞層下側だけではなく、上皮細胞層全体にまばらに存在しており、integrin beta4は上皮細胞層全体でほとんど認められなかった。

上皮細胞によるムチンの分泌は、低密度で線維芽細胞が存在するとその分泌量は線維芽細胞非存在下の約2倍に増加していた。さらに高密度で線維芽細胞が存在すると、ムチンの分泌量は非存在下の約5倍になっていた。

② 自家移植に適した細胞検索

共培養によって形成された上皮層を HE 染色像で観察すると、線維芽細胞の由来組織毎にその形態が大きく変化することがわかった。気管由来の線維芽細胞は円柱上皮細胞を主体とした偽多列線毛上皮層、鼻腔由来の線維芽細胞は立方上皮細胞主体の単層、口腔由来の線維芽細胞は立方上皮と円柱上皮細胞による多列線毛上皮層、皮膚線維芽細胞は扁平上皮細胞層の上に線毛を有する立方上皮細胞層が重層していた。免疫染色では、線毛細胞に特異的な beta-tubulin- IV はいずれの線維芽細胞と共培養した上皮層でも同程度の陽性反応を示した。杯細胞の指標である MUC5AC は、鼻粘膜と皮膚の線維芽細胞において幾分反応部位が少なかったが、線維芽細胞の由来毎に大きな違いはなかった。基底膜の再構築は、その主成分である laminin の抗体による免疫染色像で観察した。気管、口腔および皮膚由来の線維芽細胞と共培養した場合は laminin の局在部位が上皮層-コラーゲン境界部に集中して観察されたが、鼻腔由来線維芽細胞との共培養では境界部以外もまばらに染色されていた。また、type IV collagen の局在も laminin と同様に観察された (data not shown)。水を選択的に通過させるチャネルタンパク質の aquaporin4は、気管、鼻腔および口腔に由来する線維芽細胞との共培養では上皮細胞の側部に局在していたが、皮膚由来線維芽細胞と共培養した上皮細胞層では基底部側で観察された。aquaporin4と同じく水輸送に関わる aquaporin5は、気管、口腔および鼻腔線維芽細胞と共培養した上皮層では基底細胞層に局在していた。一方、皮膚由来線維芽細胞との組み合わせでは、基底細胞ではなくその上に存在する扁平上皮細胞の表面で aquaporin5 の陽性反応が観察された。また、上皮層からの溶質もれを防ぐ密着結合の構成タンパク質である Zo-1は気管および鼻腔の線維芽細胞と共培養した上皮層では基底細胞

層中心に局在していたが、鼻腔線維芽細胞との組み合わせでは陽性部位が少なかった。口腔線維芽細胞の場合では基底細胞層とその上の細胞間隙に多く局在しており、皮膚線維芽細胞の場合は扁平上皮細胞の表面であった。なお、気管線維芽細胞と組み合わせた上皮層におけるこれらの機能タンパク質の局在は、in vivo 気管で報告されているものと一致していた。

③ ハイブリッド人工材料

気管上皮細胞を用いた人工材料を組織学的に観察したところコラーゲンスポンジに重層化されたコラーゲンゲルの表面に気管上皮細胞層の形成が確認できた。蛍光免疫染色での観察では、上皮細胞層は cytokeratin14、cytokeratin18、occludin のいずれも陽性を示した。気管上皮細胞と線維芽細胞を用いた人工材料を組織学的に観察したところコラーゲンゲルの内部に線維芽細胞が観察され、ゲルの表面には気管上皮細胞層の形成が確認できた。細胞の形態、線毛の発現など、線維芽細胞なしのタイプと比べ、より強い分化傾向をもつ上皮細胞が観察された。移植実験においては、移植した GFP 陽性細胞は移植後3日では残存していたが、7日以降では消失し GFP 陰性の上皮細胞で置き換わっていた。上皮細胞層の形態は移植3日後では2層性扁平上皮、7日後では重層扁平上皮、14日以降では線毛円柱上皮へと分化した。上皮層については移植3日後ではコラーゲンゲル及びスポンジに大きな変化がなかったものの、7日目では線維芽細胞、炎症細胞の侵入が観察され、14日以降では正常に近い上皮層組織の再生が観察された。

④ 線維芽細胞と脂肪組織由来細胞群

ハイブリッド人工材料移植後7日目の HE 染色結果では、コントロール例は、気管欠損部位には上皮化は認められず、強拡大で少数の細胞が気管内腔面に確認されるのみであった。fibroblast 例は、気管欠損部位に2から3層の上皮層が認められた。fibroblast + stromal fraction 例は気管欠損部位の上皮化はほぼ終了しており、強拡大で偽多列円柱上皮細胞からなる上皮層が形成されていた。また、細胞の極性もそろっているのが確認された。fibroblast + vascular stromal fraction 例も気管欠損部の上皮化はほぼ終了していた。強拡大では偽多列円柱上皮細胞からなる上皮層が形成され、少数ではあるが、気管内腔に面して線毛が確認され、また、粘膜下組織には血管も確認された。一部の免疫染色では気管欠損部と気管残存部の境界粘膜下組織に抗 vWF 抗体陽性細胞が認められた。また、それは、DiI にて標識した細胞と同一のものであり移植細胞が血管新生に影響を与えている可能性が示唆された。

4) ヒト細胞・組織

気管上皮細胞、気管線維芽細胞、口腔粘膜上皮細胞、口腔粘膜線維芽細胞、末梢血由来細胞、脂肪由来細胞について、培養方法を確立した。

(2) 喉頭の再生

1) 甲状軟骨

術後の全身状態良好、皮下気腫などの合併症も認めな

かった。完全切除した声帯と喉頭室の粘膜が上皮化し、きれいに再生されている所見が得られた。但し、もう1例では人工材料が脱落し、瘢痕治癒をおこなっている。感染によるものか、固定が不十分であったのかは不明である。長期観察後、組織標本などで確認する予定である。

2) 声帯

① 自己骨髄由来細胞

移植細胞は、それぞれ障害部位に応じ上皮系のマーカーであるケラチンの発現、および筋系のマーカーであるデスミンの発現が観察された。

② 人工材料と自己筋膜

術後の全身状態良好、皮下気腫などの合併症も認めなかった。完全に切除した声帯と喉頭室の粘膜が上皮化し、きれいに再生された。術後1週間までは筋膜が残存し、徐々に白色調に変化し、2週間目ころには泡沫が付着するが、上皮化が透見される。3週間目には通常と同様のきれいな粘膜面が観察される、ということがわかった。1匹では、咳払いの際、不完全ではあるが声門間隙の閉鎖がみられ、十分な発声の可能性が示唆される。

(3) 神経の再生

組織学的評価として、自家神経移植群では1週間後、ワーラー変性が移植神経の縫合部特に末梢端で観察された。2週間後、5例中3例で神経縫合部両端で小さな神経腫瘍が観察された。8週間後には、20例中13例で神経腫瘍が認められた。PGA チューブによる神経再建群では、神経再建1週間後は、ワーラー変性が神経切除両断端で観察された。2週間後、再生した神経線維が神経両断端から伸長しているのが観察された。さらに8週間後では、ギャップは神経線維でつながり神経腫瘍の形成は一例も認めなかった。

機能的評価として、コントロール（無処置）、自家神経移植群、PGA チューブ移植群の CNAP の潜時を測定したが、PGA チューブ移植群の潜時がコントロールと近く、機能的にもより良好な再生結果が得られた。

(4) 皮膚の再生

臨床応用として、平成17年の間に4例に対し準備実験の方法に順じて PRP を作製し、術創に投与した。内訳は甲状腺良性腫瘍の手術が2例、鼓膜形成術が2例であった。いずれも術後の有害事象は生じておらず、経過良好である。

2. 臨床応用

人工材料を用いた再生医療を応用するにあたり、患者・家族には治療内容を十分に説明し同意を得た上で、京都大学付属病院および福島県立医科大学付属病院において本再生治療を実施している。現在までに甲状腺癌気管浸潤例の即時再建3例、喉頭・気管狭窄の病変切除後再建3例のあわせて6例に行った。

(1) 悪性腫瘍による喉頭気管浸潤例

① 症例1：甲状腺進行癌の気管浸潤例

79歳女性、主訴は右頸部腫脹。CTにて、甲状腺右葉全体を占める直径約5cmの腫瘍を認め、頸部気管右側への浸潤が疑われ、気管内視鏡でも声門下に続く気管内腔

の右側に隆起を認め、甲状腺腫瘍の気管浸潤と考えられた。

手術は、全身麻酔下に甲状腺腫瘍を露出した。甲状腺右葉は腫瘍で占拠され、頸部気管に癒着していた。癌組織の浸潤した頸部気管を、安全域を付けて3気管輪、半周を切除した。その欠損部に本人工材料をトリミングして2/3周分の材料に自己の血液を注入し、気管欠損部をパッチする形で縫合した。

気管内視鏡所見は、術後2週間にはコラーゲンとメッシュが透見され、術後2ヵ月で上皮化し人工材料はほぼ被覆され、術後3年2ヵ月の現時点では、気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好な経過である。

② 症例2：甲状腺進行癌気管浸潤例

71歳男性。主訴は前頸部腫脹。CTにて、甲状腺右葉に腫瘍を認め、甲状腺癌気管浸潤が疑われた。

腫瘍は第1-2気管輪に浸潤しており、その欠損部は10mm×12mmで、本人工材料を1/2周分で、パッチする形で縫合した。術後3日目に軽度のair leakを認めたが、ドレインと圧迫で軽快した。術後2年1ヵ月経過した現在、気管内腔の上皮化は良好で順調な経過である。

③ 症例3：甲状腺癌再発気管浸潤例

59歳女性。S63年に他施設にて甲状腺癌の診断にて甲状腺左葉切除術を施行され、H13年に局所再発し左上極気管浸潤にて甲状腺全摘術を行った上で¹³¹I内照射を施行された。H16年に輪状軟骨、気管に局所再発した。

手術所見は輪状軟骨の一部第1-2気管軟骨が破壊されており、腫瘍が露出していた。左反回神経は腫瘍を貫いており、切断を余儀なくされた。輪状軟骨下縁、第1-2気管輪を半周切断した。その欠損部に本人工材料2/3周分で、気管欠損部をパッチする形で縫合した。

術後2週間ではコラーゲンメッシュの露出がみられていたが、術後2ヵ月で人工材料内腔面ほぼ上皮化し、術後1年の現時点で、気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好な経過である。

(2) 喉頭気管狭窄例

① 症例4：喉頭気管狭窄症

73歳男性。主訴は呼吸困難。喉頭ファイバーで声門下に肉芽、瘢痕の増生を認め気管内腔の径が約5mmに狭小化し、CTでは気管内腔の90%狭小化を認めた。

手術は、全身麻酔下に瘢痕組織切除術を行い、甲状軟骨下縁及び輪状軟骨の一部を肉芽とともに合併切除した。最終欠損径は15mm×7mmであった。本人工材料25mm×17mmでパッチする形で縫合固定した。

術後の気管内視鏡所見を図7に示す。術後2週間ではコラーゲンメッシュの一部露出が認められ、術後2ヵ月で肉芽がみられたが自然消退し最終的には上皮化し人工材料はほぼ被覆され、術後8ヵ月の時点では気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好な経過である。

② 症例5：気管狭窄症

42歳女性。主訴は呼吸困難。他施設にて特発性気管狭窄症に対して手術を受け、再狭窄をきたした。

手術は、先に全身麻酔下に声門下瘢痕除去、右頬粘膜

移植を行い、Tチューブ抜去後も再狭窄が起きないことを確認した。次いで全身麻酔下に瘻孔部の皮膚と内腔の肉芽を気管軟骨とともに切除し最終的な軟骨欠損部は15×5mmであった。その欠損部に本人工材料25×24mmでパッチする形で縫合した。

術後2週間ではコラーゲンメッシュの一部露出と白苔の付着がみられていたが、術後2ヵ月で人工材料内腔面ほぼ上皮化し、術後5ヵ月の現時点で、気管内腔面は上皮で覆われ再狭窄も認めず組織再生は良好な経過である。

③ 症例6：喉頭気管狭窄症

29歳女性。主訴は呼吸困難。平成15年12月に転倒した際、ガラスに頭から突っ込み、頸部切傷受傷。他施設にて緊急手術となり気管切開のうえ喉頭創部閉鎖術を施行し、以降レティナ管理となった。当科受診時、声帯から声門下にweb形成がみられ声門の1/2は狭窄し固定していたが、両披裂部の可動性は比較的良好であった。CTでは甲状軟骨前方が声帯レベルから声門下にかけて欠損していた。

手術は、先に全身麻酔下に喉頭截開による声門形成術を施行しweb切除を行った。その後web再形成がないことを確認した上で、全身麻酔下に瘢痕組織を鋭的に切除し、最終的な喉頭・気管欠損部位の大きさは内周が15×7mm、外周が20×17mmであった。その欠損部に本人工材料30×25mmでパッチする形で縫合した。

術後2週間ではコラーゲンメッシュの一部露出が認められ、術後2ヵ月で肉芽がみられたが自然消退し最終的には上皮化し人工材料はほぼ被覆され、術後3ヵ月の現時点では気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好な経過である。

D. 考 察

気道における癌や外傷などの病変を切除した後は大きな機能障害が残るQuality of Lifeを著しく低下させる。喉頭、気管などの気道疾患で喉頭全摘出術を受けると、音声言語機能を喪失し身体障害者3級となり、咀嚼及び呼吸の機能障害も起こる。これらの機能は日常生活には必須のものであり、本研究は厚生労働行政において重要かつ緊急性を要するものと思われる。

本研究で組織工学技術により喉頭や気管などの気道を再生できれば、一次的な再建手術が容易に行えることから、患者への手術侵襲は極めて低いものとなり、かつ、機能障害を伴わない治療を行うことが期待される。従来、気道の再生という概念はなく、主任研究者らが始めた気道の再生医療は世界に先駆けたものである。本研究班の班員は喉頭機能解析(1995年アメリカ喉頭科学会賞受賞)、コラーゲンと骨髄間葉系幹細胞による声帯再生(2002年アメリカ気管食道科学会賞受賞)および気管、食道、胃、小腸の再生に成功してきた(Int J Artif Organs 2000)。これらの方法を応用して動物実験を進め、自己組織再生型の人工材料を用いた喉頭・気管の再生治療を目指した。

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。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には、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、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、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。

一方、われわれ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臓器再生を目指してきた。現在までに、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がわかった。この際足場の移植のみで細胞移植や増殖因子は使わなかった。Vacantiらのように体外で組織を再生してから移植する方法や、細胞移植を行うと、生きた細胞や組織を取り扱うことになるので、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、われわれの行っている *in situ* Tissue Engineering の手法は安全性が高く臨床応用に近い。

気管には内腔を支えるために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が、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、動物実験で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。さらに、線毛上皮の再生が確認され、線毛機能が保たれていることが判明した。輪状軟骨においても同様の人工材料を用いて移植手術を行い、枠組みとしての硬さ、内腔粘膜の線毛上皮の再生が確認された。約20年にわたる人工気管の基礎研究を基盤として、安全性有効性を確認し、臨床応用への可能性が示されたといえる。

基礎実験の成果を基盤として、京都大学医学部倫理委員会にて「喉頭・気管の再生治療」が承認され、平成14年、主任研究者はヒトへの気管再生治療を世界で初めて行った。甲状腺癌の気管切除例に対して、自己組織再生型の人工気管を用いて再生治療を行い、術後3年3ヵ月経過した現在、気管内腔面は上皮に覆われ良好な経過である。本研究は福島県立医科大学倫理委員会においても承認を得ており、現在までにあわせて6例に手術を行い、呼吸、嚥下、発声、構音機能には影響なく、早期の社会復帰が可能であった。現時点では術後の軽度の air leak のみで大きな合併症なく良好な成績ではあるが、内腔面の上皮化に2ヵ月かかることから、感染のリスク回避には、上皮化の加速が必要で、今後の重要課題である。また、形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生も解決すべき課題である。

気道上皮化を加速させるための方策として、ラット気道上皮細胞の培養法を確立した(2005年アメリカ気管食道学会賞受賞)。正常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。作製した上皮細胞層は単層で密度としては正常な上皮層と比べ疎な状態であった。ラット気管の免疫染色によって、アクアポリン、ナトリウムチャンネル、cytokeratin14、cytokeratin18、occludin、PCNA の発現を確認できた。人工材料上に作製した気管上皮細胞層は、免疫組織学的には気道粘膜上皮の性質を有し、上皮細胞に特徴的な細胞骨格や物質輸送能、増殖能の一部が保たれていることが確認できた。

作製したハイブリッド人工材料を気管欠損モデル動物に移植し、移植細胞の生着の有無、上皮化への影響に関して *in vivo* にて評価を行った。上皮化するまでの期間、損傷部位に移植した上皮細胞が残存することが確認できた。免疫組織学的には、作製した気管上皮細胞層は気道粘膜上皮の性質を有していた。本手法が上皮化促進にどの程度寄与するかの評価について、今後より大きな気管損傷モデルでの治療比較が必要と考えられた。

気管線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす影響を調べた結果、気管線維芽細胞は、上皮細胞の移動、増殖、分化および分化細胞による上皮層の構造的・機能的な再構築を促進することが判明した。

次に自己移植に適した線維芽細胞を検索した結果、皮膚真皮、鼻粘膜、口腔粘膜より採取した線維芽細胞の中で、口腔粘膜下層由来の線維芽細胞によって誘導された上皮層は、形態、機能タンパクの局在、基底膜や密着結合の状態が気管線維芽細胞のものと類似していた。臨床応用を考えるにあたって気道の上皮層再生の促進には、口腔粘膜下層由来の線維芽細胞が有力であると考えられた。

さらに、脂肪組織由来の血管と間質を含む細胞群をあわせて使用した方が血管の新生、誘導しやすく、有望である。これらの新技術について、平成18年度に、安全性、有効性を検証していく予定である。

甲状軟骨の切除後の組織再生は、声帯の隆起を作ることが難しい。口側が咽頭という不潔な環境にあるなど不利な条件が存在しているからであろう。本研究では内腔を型どりした2層モデル人工材料に多分化能をもつ骨髄由来間葉系細胞(BSCs)を導入することによって、これまで実現でき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ができた。喉頭部分切除後に、人工材料と自己筋膜を用いて欠損部を再建し、声帯様隆起と内腔面上皮の再生を確認した。これらの新規技術は短期間の観察であり、まだ安定した結果は得られていないが有望な治療法になるものと考えられる。

障害された声帯の組織再生には、コラーゲン内で3次元培養したBSCsを移植し組織学的には非移植側に比べて正常に近い声帯の構造が再生した。この理由として、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適切であること、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ことが考えられた。また、炎症性細胞浸潤が見られなくなるまでの期間が移植モデルで短いことと、障害部位の上皮化の程度に差を認めるため、移植細胞は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。

声帯の運動を支配する反回神経については、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開発した。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ヵ月で消失する、3) 約2ヵ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。平成17年度の研究で、自家神経移植では高率に神経腫瘍の形成が認められたが、PGAチューブによる再建では神経腫瘍を認めず機能的にも良好であった。上記にあげたPGAチューブの特徴が神経再生にとって良好な環境を提供し、従来困難とされた反回神経の機能的再生を可能としたのではないかと考えられた。

本研究班ではこの2年間の研究事業により、喉頭・気管の再生治療が十分期待を持てることを明らかにした。今後は、基礎実験の成果を臨床応用に結びつけるトランスレーショナルリサーチにより、本再生治療を気道の各部位に応じた組織再生が可能なレベルに高めるための研究が必要である。さらに、本治療を広く臨床に応用するために、人工材料の安定供給、安全性の確保、再生治療技術の向上、長期的な評価を継続していくことが重要である。

E. 結 論

気道は呼吸、嚥下、発声、構音という、ヒトの生命としての基本的な機能や社会生活をおくる上で基盤となる機能を持ち、癌や外傷などで気道の組織が侵された場合、これを切除した後に機能障害なく再建することは難しい。本研究班は、体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の手法を用いて、気道の組織再生をはかることを目標に、基礎的・臨床的研究を行ってきた。自己の組織が再生するようにデザインされた人工材料を開発し、この移植により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ヒト頸部気管で世界に先駆けて臨床応用を開始し良好な成績を得た。さらに、上皮化の加速、形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生などを解決するべく動物実験で気管上皮細胞層とコラーゲンからなるハイブリッド人工材料や声帯の隆起を型取った人工材料を開発し、気道組織の効果的再生に有用であることを示した。

以上のようにこの2年間の研究により、喉頭・気管の再生治療が十分期待を持てることを明らかにした。今後は、今回開発した新規技術の安全性を検証し、基礎実験の成果を臨床応用に結びつけるトランスレーショナルリサーチにより、本再生治療を気道の各部位に応じた組織再生が可能なレベルに高めるための研究を行う。

近年再生医学研究は急速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数少ない。この *in situ* Tissue Engineering の手法を用いた気道の再生治療はわが国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、人工材料の安定供給、安全性の確保、再生治療技術の向上、長期的評価などについての研究をさらに積み重ねていくことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokoyama S, Kano M, Watanabe M, Ogawa H, Omori K: Morphological and histologic examination of the epiglottis: Implications for improving epiglottic closure technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(1): 23-29, 2006
- 2) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magruffov A, Ito J, Shimizu Y: Regenerative medicine of the trachea: The first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114(6): 429-433, 2005
- 3) Shinohara K, Yamashita M, Sugimoto K, Tsuji T, Omori K: Transcatheter arterial embolization of auricular arteriovenous malformation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132(2):345-346, 2005
- 4) Shinohara K, Hashimoto K, Yamashita M, Omori K: Schwannoma of the nasal septum removed with endoscopic surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132(6):963-964, 2005
- 5) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magruffov A, Yamashita M, Ito J: Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by *in situ* tissue engineering. *Laryngoscope* 115(2): 253-258, 2005
- 6) Matsuzuka T, Kano M, Ohtani I, Miura T, Shishido F, Omori K: Impact of sentinel node navigation technique for carcinoma of tongue with cervical node metastases. *Auris Nasus Larynx* 32(1): 59-63, 2005
- 7) Nishimura K, Omori K, Haga H, Fujimoto Y, Ito J: Successful laser ablation of diffuse laryngeal swelling in posttransplant lymphoproliferative disorder: The Japanese first case. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 69(6): 869-873, 2005
- 8) Tateya I, Hirano S, Kojima H, Omori K, Shoji K, Mitsumori M, Nagata Y, Ito J: Hyperfractionated radiotherapy for T2 glottic cancer for preservation of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263(2): 144-148, 2005
- 9) Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Iguchi F, Kim TS, Kishimoto M, Omori K, Ito J: Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the

- vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114(12), 907-912, 2005
- 10) 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* 102(6): 2192-2197, 2005
 - 11) Morino S, Nakamura T, Toba T, Takahashi M, Kushibiki T, Tabata Y, Shimizu Y: Fibroblast growth factor-2 induces recovery of pulmonary blood flow in canine emphysema models. *Laboratory and Animal Investigations* 128: 920-926, 2005
 - 12) Inada Y, Morimoto S, Moroi K, Endo K, Nakamura T: Surgical relief of causalgia with an artificial nerve guide tube: Successful surgical treatment of causalgia (Complex Regional Pain Syndrome Type II) by in situ tissue engineering with a polyglycolic acid-collagen tube. *Pain* 117: 251-258, 2005
 - 13) Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, Endo K, Azuma T, Fujikawa T, Tsutsumi S, Shimizu Y: New canine spinal cord injury model free from laminectomy. *Brain Research Protocols* 14: 171-180, 2005
 - 14) Lynn AK, Nakamura T, Patel N, Porter AE, Renouf AC, Laity PR, Best SM, Cameron RE, Shimizu Y, Bonfield W: Composition-controlled nanocomposites of apatite and collagen incorporating silicon as an osseopromotive agent. *J Biomed Mater Res* 74A: 447-453, 2005
 - 15) 大森孝一, 中村達雄, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝, 清水慶彦: [肺病変の修復・再生へのアプローチ] 組織工学からみた臓器再生－気管・気管支の再生治療－. *日本臨床麻酔学会誌*, 25(3): 310-315, 2005
 - 16) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 大森孝一: 気道の再生. *喉頭*, 17(2): 84-88, 2005
 - 17) 多田靖宏, 大森孝一: 〈特集 声帯麻痺 up to date; Q & A〉 甲状軟骨形成術の適応と限界は? *JOHNS* 21(5): 757-760, 2005
 - 18) 多田靖宏, 大森孝一: 〈シリーズ／難治性疾患への対応〉 ①喉頭肉芽腫症. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 77(13): 1023-1027, 2005
 - 19) 中村達雄: 〈特集 肺の再生医療－現状と展望〉 気道の再生. *呼吸と循環* 53(2): 119-125, 2005
 - 20) 森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 中村達雄: 〈特集 肺の再生医療－現状と展望〉 肺気腫のグロースファクターによる治療. *呼吸と循環*, 53(2): 141-147, 2005
 - 21) 高橋 充, 加藤治文, 中村達雄, 清水慶彦: 〈特集 肺の再生医療－現状と展望〉 EPCによる肺高血圧の治療. *呼吸と循環* 53(2): 159-165, 2005
 - 22) 野田澤俊介, 中村達雄, 清水慶彦, 瀧川敏算: メッ
シュ型人工気管の力学特性. *材料* 54(1): 85-89, 2005
 - 23) 稲田有史, 中村達雄, 森本 茂, 飯田秀之, 古家 仁, 諸井慶七郎: 人工神経移植術を用いた末梢神経生体内再建法, 「PEPARS 末梢神経再建－up date－」光嶋 勲 (編集), (株)全日本病院出版会, 3: 12-17, 2005
 - 24) 中原 貴, 中村達雄, 小林英三郎, 呉本晃一, 松野智宣, 田畑泰彦, 江藤一洋, 清水慶彦: 歯根膜由来細胞播種による歯周組織の In situ ティッシュ・エンジニアリング. *歯科臨床研究* 2: 28-34, 2005
 - 25) 中村達雄, 茂野啓示: 確立した再生医療の基本コンセプト. 「新・一から学ぶ歯周外科の手技」茂野啓示 (著), 医歯薬出版, 356-361, 2005
 - 26) 稲田有史, 中村達雄: 末梢神経損傷に対する生体内再生治療－Polyglycolic Acid-Collagen Tube による CRPS Type II の外科的治療－. 「痛み治療のアプローチ」小川節郎 (編集), 真興交易(株)医書出版部, 94-112, 2005
 - 27) 金丸眞一: 頭頸部領域の再生医療. *日本耳鼻咽喉科学会会報* 108(4): 330-331, 2005
 - 28) 金丸眞一: 難治性中耳炎に対する再生医学アプローチ－in situ tissue engineering による乳突蜂巣再生の試み－. *Otology Japan* 15: 195-202, 2005
 - 29) 金丸眞一: 頭頸部領域の再生医療. *頭頸部癌*, 31(3): 402-407, 2005
 - 30) 金丸眞一: 再生医療を支える基本概念. *耳鼻咽喉科臨床*, 98(7): 519-527, 2005
 - 31) 金丸眞一: 人工神経チューブによる神経再生医療. *喉頭*, 17(2): 84-88, 2005
 - 32) 金丸眞一, 伊藤壽一: 小耳症における先天性外耳道閉鎖症と聴力の問題点. 「耳介の形成外科」福田 修, 荻野洋一 (編集), 25-35, 克誠堂出版, 東京, 2005
 - 33) 金丸眞一: 〈特集 声帯麻痺 up to date: Q & A〉 声帯麻痺に対する再生医療は可能か? *JOHNS* 21(5): 797-800, 2005
 - 34) 金丸眞一: 〈トピックス〉 頭頸部領域の再生医療. *専門医通信*, (85): 28-29, 2005
- ## 2. 学会発表
- 1) Omori K: "Symposium" New perspectives of airway management using in situ tissue engineering. 8th Taiwan-Japan Conference in Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (2005. 12. 16-18, Taipei)
 - 2) Omori K: "Special Lecture" Tissue engineering of the larynx and trachea. The 23rd Congress of The Korean Society of Logopedics and Phoniatrics (2005.11.11, Seoul)
 - 3) Nakamura T, Fukuda S, Nakada A, Kobayashi T, Itoi S, Inada Y, Endo K, Shigeno K, Kanemaru S, Tao H, Kin S, Nakase Y: Peripheral nerve regeneration on an artificial nerve (Biodegradable nerve guide tube).

- American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference(2005. 6. 9-11, Washington, DC)
- 4) Tao H, Nakamura T, Morino S: Bronchoscopic treatment of postoperative bronchopleural fistulas using collagen sponge spigots. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference(2005. 6. 9-11, Washington, DC)
 - 5) Nakada A, Fukuda S, Kobayashi T, Ueda H, Tao H, Nakamura T: De- and re-differentiation of the progenitor cells to the neurons. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference(2005. 6. 9-11, Washington, DC)
 - 6) Hazama A, Miyake M, Saito A.: "Symposium" Role of Cl-ion permeability in cytoprotection. The Physiological Society of Japan(The 82nd Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)
 - 7) Miyake M, Yamasaki M, Waki H, Katahira K, Katsuda S, Nielsen S, Ijiri K, Hazama A, Shimizu T: Expression of renal aquaporins and sodium transporters in neonatal rats after spaceflight. The Physiological Society of Japan(The 82nd Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)
 - 8) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magruffov A, Yamashita M : In situ tissue engineering of the cricoid and trachea in canine model. The American Broncho-Esophagological Association(85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 9) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. The American Broncho-Esophagological Association(85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 10) Kanemaru S, Omori K, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Kishimoto M, Asato R, Nakamura T, Ito J: The destiny of the autologous bone marrow derived stromal cells implanted to the vocal fold. The American Broncho-Esophagological Association(85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 11) Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magruffov A, Ito J: A trial for the framework regeneration of the larynx using tissue engineering techniques-a preliminary report. American Laryngological Association(126th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 12) Yokoyama S, Kano M, Watanabe M, Ogawa H, Omori K: Morphological and histological examination of the epiglottis: Implications for improving the epiglottic closure technique. American Laryngological Association(126th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 13) Yamashita M, Kanemaru S, Omori K, Magruffov A, Kishimoto M, Ito J: A Study for tracheal regeneration after partial resection using a tissue engineering technique. The Triological Society(108th Annual Meeting)(2005. 5. 13-16, Boca Raton, Florida)
 - 14) Tamura Y, Kanemaru S, Yamashita M, Magruffov A, Tamaki H, Ito J: Regeneration of the palatal bone by in situ tissue engineering. The Triological Society(108th Annual Meeting)(2005. 5. 13-16, Boca Raton, Florida)
 - 15) Ogawa H, Baba Y, Suzuki Y, Suzuki T, Sato H, Omori K: Value of multiplanar reconstruction(MPR)images for cochea implant. 2005 COSM(Combined Otolaryngological Spring Meetings); The Triological Society(2005. 5. 13-16, Phoenix)
 - 16) Kanemaru S: Regeneration of the vocal fold by implantaion of autologous bone marrow stromal cells. The 7th Symposium of the International Asociation of Phonosurgeons(2005. 2. 26, Madrid)
 - 17) 小林 謙, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 挟間章博, 大森孝一: 線維芽細胞が気管上皮層の再構築に及ぼす影響. 第5回日本再生医療学会 (2006. 3. 8-9, 岡山)
 - 18) 中村達雄: 感覚器再生と組織工学. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005. 11. 28-29, 京都)
 - 19) 中村達雄, 稲田有史, 茂野啓示, 早川克己, 堀 義生, 遠藤克昭, 福田正順, 田尾裕之, 荒木政人, 佐藤寿彦, 中田 颯, 上田寛樹, 糸井真一, 市原理司: 再生医療の臨床とバイオマテリアル. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005. 11. 28-29, 京都)
 - 20) 上田寛樹, 中村達雄, 福田正順, 田畑泰彦: 骨組織再生に用いるコラーゲンスポンジのポアサイズの影響. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005. 11. 28-29, 京都)
 - 21) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 松塚 崇, 金丸眞一, 山下 勝, 安里 亮, 田中信三:〈ワークシヨップ〉気管狭窄への対応「喉頭・気管狭窄の再生治療」. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)
 - 22) 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 玉木久信, 安里 亮, 大森孝一, 伊藤壽一: 自己間葉系細胞移植による声帯の再生 - 移植細胞の所属と行方 -. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)
 - 23) 山下 勝, 大森孝一, 金丸眞一, 田村芳寛, 岸本正直, 玉木久信, 伊藤壽一: 声帯隆起再生を目指した組織工学的アプローチ. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)
 - 24) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有するハイブリッド人工材料の作製. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)
 - 25) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生,

- 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: ラット気管損傷モデルへの気管上皮細胞層を有する人工気管移植の試み. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)
- 26) 松塚 崇, 大森孝一: 多血小板血漿 (PRP) を使用した甲状腺手術創の治癒促進. 第38回甲状腺外科研究会 (2005. 10. 27-28, 神戸)
- 27) 森野茂行, 鳥羽紀成, 田尾裕之, 荒木政人, 永安 武, 高橋 充, 宮崎拓郎, 松本桂太郎, 山崎直哉, 中村昭博, 田川 努, 中村達雄: 肺気腫に対する Growth Factor を使用した呼吸機能再生. 第58回日本胸部外科学会定期学術集会 (2005. 10. 5- 7, 岡山)
- 28) 田村芳寛, 金丸眞一, 山下 勝, 玉木久信, 安里 亮, 岸本正直, 大森孝一, 松野智宣, 中村達雄, 伊藤壽一: 組織再生医工学的手法による上顎 (口蓋) の骨再生. 第 8 回日本組織工学会 (2005. 9. 1-2, 東京)
- 29) 山下 勝, 金丸眞一, 大森孝一, 玉木久信, 田村芳寛, 岸本正直, 中村達雄, 伊藤壽一: 犬気管部分欠損モデルにおける組織工学的再生の試み. 第 8 回日本組織工学会 (2005. 9. 1- 2, 東京)
- 30) 小林 謙, 中村富美男, 大森孝一: VI型コラーゲンによる皮膚および皮膚付属器官形成の促進. 第 8 回日本組織工学会 (2005. 9. 1-2, 東京)
- 31) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有する人工気管作製の試み. 第 8 回日本組織工学会 (2005. 9. 1-2, 東京)
- 32) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有する人工気管移植の試み. 第 8 回日本組織工学会 (2005. 9. 1-2, 東京)
- 33) 多田靖宏: 〈Research Forum 1〉気道上皮の再生. 第54回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会 (2005. 7. 23-24, 仙台)
- 34) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: ラット気管損傷モデルへラット気管上皮細胞組織の移植. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 35) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞組織による人工気管表面の被覆の試み. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 36) 中村達雄, 早川克己, 茂野啓示, 稲田有史, 堀 義生: In situ tissue engineering と医用材料. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 37) 中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一, 糸井真一, 遠藤克昭, 茂野啓示, 吉谷 信, 中田 顕, 福田正順: In situ tissue engineering と末梢神経の再生医療の現状. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 38) 田尾裕之, 中村達雄, 森野茂行, 福田正順, 中田 顕, 市原理司: ラット肺実質への自己骨髄培養細胞移植. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 39) 森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 橋爪 聡, 松本桂太郎, 榑引俊宏, 田畑泰彦, 荒木政人, 田尾裕之, 中村達雄: 肺気腫に対する FGF-2 の経気道的投与による呼吸機能再生に関する検討. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
- 40) 高橋 充, 木村雅一, 鳥羽紀成, 森野茂行, 梶原直央, 内田 修, 宮島邦治, 長東美貴, 鈴木明彦, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄, 加藤治文: 呼吸器外科領域に関する再生医工学の応用. 第30回日本外科系連合学会学術集会 (2005. 6. 24-25, 東京)
- 41) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 山下 勝, 安里 亮: 〈シンポジウム〉頭頸部癌治療における再生医療「気道の再生医療」. 第29回日本頭頸部癌学会 (2005. 6. 16-17, 東京)
- 42) 金丸眞一: 〈シンポジウム〉頭頸部癌治療における再生医療「頭頸部領域における再生医療」. 第29回日本頭頸部癌学会 (2005. 6. 16-17, 東京)
- 43) 森野茂行, 鳥羽紀成, 永安 武, 高橋 充, 國崎真己, 松本桂太郎, 中村昭博, 田川 努, 東 高志, 堤 定美, 田尾裕之, 中村達雄: 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた肺機能再生に関する検討. 第28回日本呼吸器内視鏡学会総会 (2005. 6. 9-10, 東京)
- 44) 金丸眞一: 〈シンポジウム〉耳鼻咽喉科疾患治療の最前線「頭頸部領域の再生医療」. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005. 5. 19-21, 大阪)
- 45) 山下 勝, 大森孝一, 金丸眞一, 岸本正直, 田村芳寛, 玉木久信, 伊藤壽一: 組織工学的手法を用いた喉頭声帯隆起再生の試み. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005. 5. 19-21, 大阪)
- 46) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小川 洋, 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付人工材料のラット気管損傷モデルへの移植. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005. 5. 19-21, 大阪)
- 47) 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 (2005. 3. 18-19, 名古屋)
- 48) 金丸眞一: 〈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「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 (2005. 3. 18-19, 名古屋)
- 49) 多田靖宏：〈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「気道の再生」。第17回日本喉頭科学会 (2005. 3. 18-19, 名古屋)
- 50) 山下 勝, 金丸眞一, 喜多知子, Magrufov Akhmar, 井口福一郎, 玉木久信, 田村芳寛, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一：骨髄由来細胞による声帯再生の試み。第17回日本喉頭科学会 (2005. 3. 18-19, 名古屋)
- 51) 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 (2005. 3. 18-19, 名古屋)
- 52) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭疾患の治療：最近の話題。第84回社団法人大阪府耳鼻咽喉科医会研修会 (2006. 2. 25, 大阪)
- 53) 大森孝一〈特別講演〉喉頭・気管の再生医療。第37回西埼玉地区耳鼻咽喉科研究会 (2006. 1. 12, 所沢)
- 54) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭・気管の低侵襲治療と再生医療。第9回奈良県耳鼻咽喉科処置・手術手技研究会 (2005. 11. 26, 奈良)
- 55) 大森孝一：〈特別講演〉気道の再生と臨床応用。第4回肺サーファクタント分子病態研究会 (2005. 11. 12, 東京)
- 56) 大森孝一：〈講義〉頭頸部領域の再生医療。バイオテクノロジー医工融合講座 (神戸大学工学部バイオテクノロジーコース)「バイオマテリアルの基礎」中級「再生医療 I, II」(2005. 11. 5, 神戸)
- 57) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭・気管の再生医療。第31回山形県耳鼻咽喉科疾患研究会 (2005. 10. 15, 山形)
- 58) 大森孝一：〈特別講演〉再生医療の現状と今後の展開。平成17年度福島県国保地域医療学会 (2005. 8. 6, 福島) 抄録集83~101, 2006
- 59) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭デイ・サージャリーと再生治療。日本耳鼻咽喉科学会福井県地方部会学術講演会 (2005. 6. 11, 福井)
- 60) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭デイ・サージャリーと再生治療。第28回大分耳鼻咽喉科臨床研究会 (2005. 6. 2, 大分)
- 61) 大森孝一：〈招待講演〉喉頭外科：デイ・サージャリーと再生医療。第25回日本耳鼻咽喉科学会高知県地方部会学術講演会 (2005. 4. 17, 高知)
- 62) 大森孝一：〈講演〉再生医療の現況と今後の課題。平成16年度福島市医師会医事法制委員会講演会 (2005. 3. 23, 福島)
- 63) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭デイ・サージャリーと再生医療。第5回徳島県耳鼻咽喉科疾患研究会 (2005. 2. 24, 徳島)
- 64) 大森孝一：〈特別講演〉喉頭・気管領域の外科治療。長崎県耳鼻咽喉科専門医講座 (2005. 2. 3, 長崎)
- 65) 中村達雄：再生医学の臨床応用。城東区医師会学術講演会 (2005. 12. 20, 大阪)
- 66) 中村達雄：In situ tissue engineering とその臨床応用。医工学フォーラム-2004年度特別学術講演会- (2005. 2. 23, 京都)
- 67) 中村達雄：神経の再生と再生医療。第2回香川泌尿器疾患フォーラム (2005. 2. 15, 高松)
3. 学会賞
- 1) The American Broncho-Esophagological Association **Steven Dean Gray Resident's Research Award 2nd Place** (2005)
Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium.
- 2) American Laryngological Association Poster **Presentation Second Place Award** (2005)
Yokoyama S, Kano M, Watanabe M, Ogawa H, Omori K: Morphological and histological examination of the epiglottis: Implications for improving the epiglottic closure technique.
- 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

組織工学の手法を用いた気道の再生治療法の開発

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 野田澤俊介、瀧川 敏算（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。昨年度は中枢気道は人工気管で、末梢気道は増殖因子等を用いた Tissue Engineering の手法で再生させる 2 つの治療法の開発を目指した研究報告を行ったが、今年度は気管の力学物性の検討と、膜様部構造を有した新しい人工気管の開発研究を行った。

—新しい人工気管の設計のための気管の力学物性の研究—

A. 研究目的

気管は気管軟骨によって形状を保持している。気管の骨格は気管の円周に沿って存在する軟骨切片の連なりで形成されており、気管の過度の狭窄を防ぐ役割を果たしている。気管中の軟骨のない部分は主に平滑筋からなっており、気管膜様部と呼ばれている。

疾患や外傷で気管が損傷を受けたとき、人工物を用いて気管を再建しようとする試みは以前から行われてきた。1960年代後半にはシリコンチューブを用いた人工気管が考案された¹。シリコンは化学的に安定で柔軟な素材であるという点で臨床的に有用であった²⁻⁴。しかし、シリコンチューブの人工気管では内腔に上皮が再生しないため、内腔に痰などの異物が溜まり気道が閉塞してしまうという問題点があった。最近、新しいタイプのメッシュ型人工気管が開発された⁵⁻⁷。このメッシュ型人工気管は円筒状のメッシュに巻きつけたステントによって内腔を保持している。また、気密性を向上させるとともに結合組織・粘膜組織の進入を促すため、メッシュの両面をコラーゲンで被覆してある。この人工気管は、埋入後は生体組織に害を与えることなく体内に留まり、内腔には線毛を持つ気管上皮が再生することが確認されている。

人工気管はやわらかすぎると狭窄し、逆にかたすぎても隣接する血管などの組織を傷つけてしまう。生体内で気管の機能を代替するために、人工気管には適切な力学物性が要求される。したがって、メッシュ型人工気管の力学物性を明らかにすることはその実用化の上で非常に重要となる⁸。

本研究では、まず、人工気管の適切な力学物性の指標となる生体の気管の力学物性を調べた。ビーグル犬の気管の一軸伸長試験と側面圧縮試験を行い、得られたデータについて考察した。次に、ステントの材質、断面形状、巻き方などが異なるメッシュ型人工気管を作製し、側面

圧縮試験を行った。各試料にかかる力と相対たわみ量の関係を比較することによって、ステントがメッシュ型人工気管の力学物性に及ぼす影響を明らかにした。また、新たに考案したメッシュ型人工気管について動物実験を行い、気管組織の再生についても検討を行った。

1-1. 気管切片引張試験

1-1-A 試料

試料にはビーグル犬（オス、体重10~20kg；メス、体重9~18kg）の気管を用いた。Fig. 1にビーグル犬の気管の写真とその模式図を示す。気管切片引張試験では、気管を切り開き、気管膜様部を取り除いて作製した気管軟骨と輪状靭帯からなる軸方向切片を試料とした。Fig. 2に気管の軸方向切片の写真を示す。

1-1-B 測定方法

作製した気管の軸方向切片に対して引張試験機（RTM-500、ORIENTEC）を用いて一軸伸長試験を行った。引張試験は室温、空気中で行い、気管試料の乾燥を防ぐため定期的に生理食塩水を噴霧した。各測定の前には、生体組織内の繊維の配向を促すため、プレコンディショニング⁹の操作を行った。

得られた応力-ひずみ曲線から微小ひずみ領域において(1)式で定義される初期ヤング率 (E_0) を求めた。

$$(1) \quad E_0 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

ここで、 σ は応力、 ε は(2)式で定義されるひずみである。

$$(2) \quad \varepsilon = \frac{l_{AL} - l_{AL0}}{l_{AL0}}$$

l_{AL} は靭帯部分の長さ、 l_{AL0} はその初期値である。

また、 $\varepsilon = 1.3$ での微分弾性率 ($E_{1.3}$) を以下の式で定義した。

$$(3) \quad E_{1.3} = \frac{d\sigma}{d\varepsilon} \Big|_{\varepsilon=1.3}$$

1-1-C 結果と考察

Fig. 3とFig. 4に気管の軸方向切片の引張試験の結果を示す。引張速度は5 mm/minに設定して試験を行った。Fig. 3の横軸には気管切片全体の長さに対する相対的な変形量（見かけ上のひずみ； ε_{tot} ）を、Fig. 4の横軸には靱帯部分の長さに対する相対的な変形量（真のひずみ； ε ）を用いている。縦軸はどちらも単位面積当たりにかかる力（応力； σ ）である。どちらの応力-ひずみ曲線も比較的勾配の小さな前半部分の領域と勾配の大きな後半部分の領域に分けられる。靱帯の力学物性は比較的弾性率の低いエラスチン線維と非常に高い弾性率を示すコラーゲン線維に支配されている。低ひずみ領域にある曲線はエラスチン線維の物性を反映し、高ひずみ領域にある曲線はコラーゲン線維の物性を反映していると考えられる。図では明瞭ではないが、ひずみの小さい領域では、 σ と ε の間には線形関係が成り立っている。この領域で定義される E_0 を求めると $E_0 = (11.0 \pm 3.2)$ kPaとなった。高ひずみ領域で定義される $E_{1.3}$ は $E_{1.3} = (5.3 \pm 2.2)$ MPaとなった。

Fig. 5に3種の引張速度（ $v = 0.5$ mm/min、5 mm/min、50 mm/min）で気管の軸方向切片の引張試験を行った結果を示す。縦軸は応力、横軸は靱帯部分の相対的な変形量（ひずみ）である。3本の応力-ひずみ曲線は比較的ひずみの小さな領域ではほぼ一致した。このことから、本実験で採用した引張速度の範囲では、引張速度が気管の伸長特性に及ぼす影響がほとんどないということがわかった。

1-2. 気管膜様部引張試験

1-2-A 試料

ビーグル犬の気管から気管膜様部を切り取り、軸方向切片と円周方向切片に切り分けた。

1-2-B 測定方法

引張試験機（RTM-500、ORIENTEC）を用いて気管膜様部の軸方向切片と円周方向切片の一軸伸長試験を行った。引張試験は室温、空気中で行った。引張速度は5 mm/minに設定した。各測定の前にはプレコンディショニングの操作を行った。測定中は試料の乾燥を防ぐために定期的に生理食塩水を噴霧した。

1-2-C 結果と考察

Fig. 6に気管膜様部の引張試験の結果を示す。縦軸は応力（ σ ）、横軸はひずみ（ ε ）である。2本の曲線は $\varepsilon < 0.2$ の領域ではほぼ同じレベルを示したが、 $\varepsilon > 0.2$ の領域ではひずみが大きくなるにしたがって軸方向切片の方が高い応力レベルを示した。気管膜様部は伸長特性において異方性を示し、軸方向よりも円周方向に伸びやすい組織であることがわかった。これは気管膜様部中に存在しているコラーゲン線維が主に軸方向に配向していることに起因していると考えられる。

1-3. 気管引張試験

1-3-A 試料

ビーグル犬の気管を試料に用いた。

1-3-B 測定方法

気管試料の両端に自作の治具に取り付けて固定し、引張試験機（RTM-500、ORIENTEC）を用いて引張試験を行った。Fig. 7にその模式図を示す。引張試験は室温、空気中で行い、引張速度は5 mm/minに設定した。各測定の前にはプレコンディショニングの操作を行った。測定中は気管試料が乾燥しないように定期的に生理食塩水を噴霧した。

1-3-C 結果と考察

Fig. 8に気管の引張試験の結果を示す。比較のため、気管の軸方向切片の引張試験の結果も合わせて示した。縦軸には応力（ σ ）を、横軸には靱帯の長さに対する相対的な変化量（ ε ）をとっている。気管の応力-ひずみ曲線は2本の曲線はほぼ同じ形状を示した。軸方向切片と同様に低ひずみ領域ではエラスチン線維の物性が反映され、高ひずみ領域ではコラーゲン線維の物性が反映されていると考えられる。低ひずみ領域で定義される E_0 の値は $E_0 = (6.3 \pm 1.7)$ kPaであり、高ひずみ領域で定義される $E_{1.3}$ の値は $E_{1.3} = (2.8 \pm 1.5)$ MPaであった。これらの値を気管の軸方向切片の値（ $E_0 = (11.0 \pm 3.2)$ kPa、 $E_{1.3} = (5.3 \pm 2.2)$ MPa）と比較すると、どちらも気管試料の方が軸方向に切り出した切片試料よりも値が小さくなっている。これは気管試料中の平滑筋が非常に柔らかいため、応力の保持には平滑筋がほとんど寄与しないためである。すなわち、見かけの断面積が気管試料では切片試料よりも大きくなるため、気管試料の応力値が切片試料のそれよりも低下する。

1-4. 気管圧縮試験

1-4-A 試料

ビーグル犬（メス、10kg）の気管を試料に用いた。

1-4-B 測定方法

引張試験機（RTM-250、ORIENTEC）を用い、室温、空気中でビーグル犬の気管の圧縮試験を行った。生体の気管は形状が一般的な円筒ではないため、2種類の圧縮方向（Direction A、Direction B）で圧縮試験を行った。圧縮試験の模式図をFig. 9に示す。圧縮速度は5 mm/minに設定し、測定中は気管試料が乾燥しないように定期的に生理食塩水を噴霧した。データの解析は試料の形状を円筒と仮定して行った。

1-4-C 結果と考察

Fig. 10にビーグル犬の気管の圧縮試験の結果を示す。縦軸には単位長さ当たりに換算した力（ f/l ）を、横軸にはひずみ（ ε ）をとっている。全ひずみ領域でDirection AはDirection Bの約2倍の力を示した。Direction Aは両側面にある軟骨で形状を保持しているのに対して、Direction Bは片側のみで形状を保持している。このためDirection BはDirection Aの半分の大きさの力を示していると考えられる。

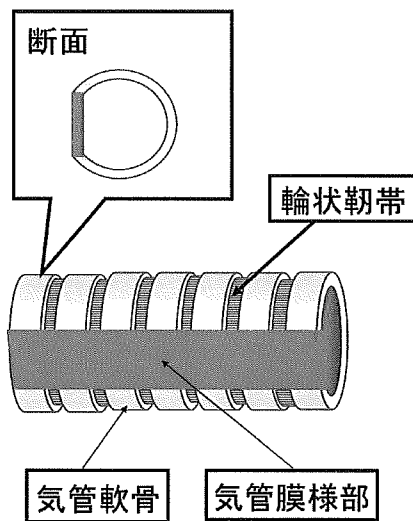
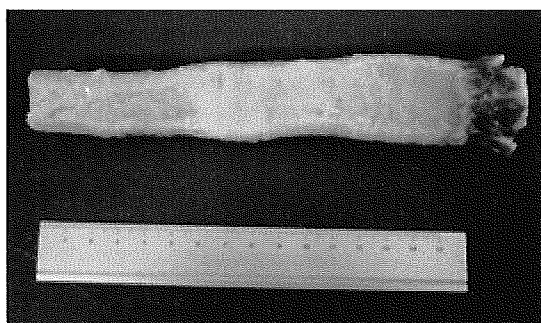
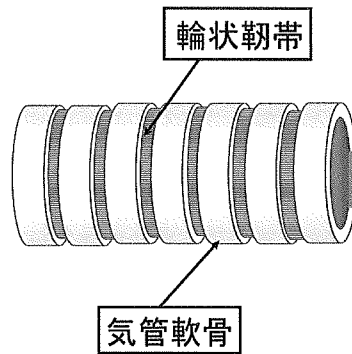
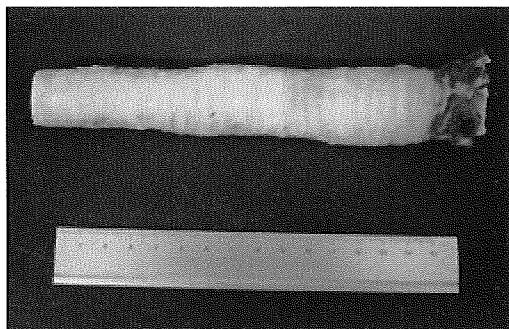


图 1

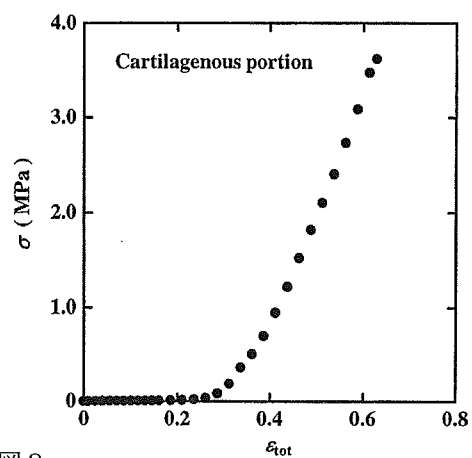
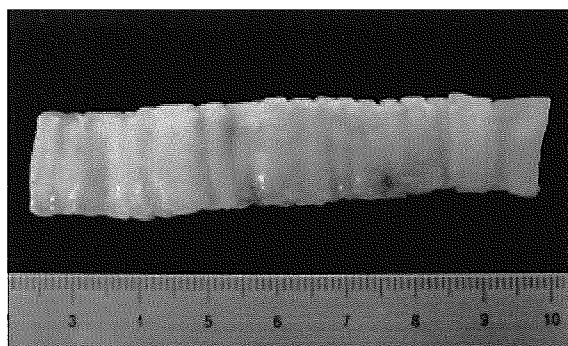


图 3

图 2