

图 4

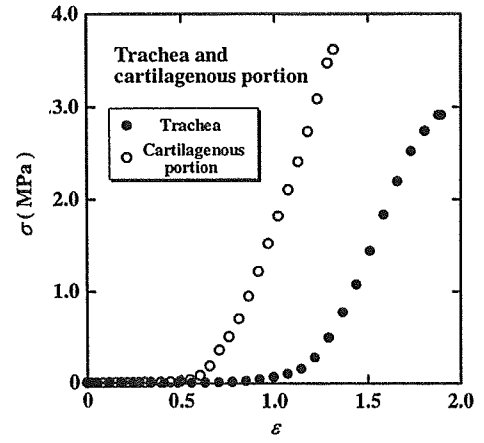


图 8

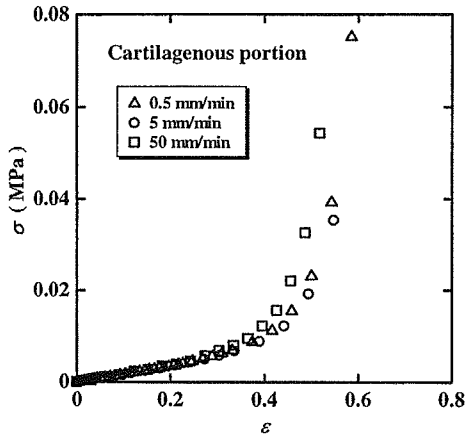


图 5

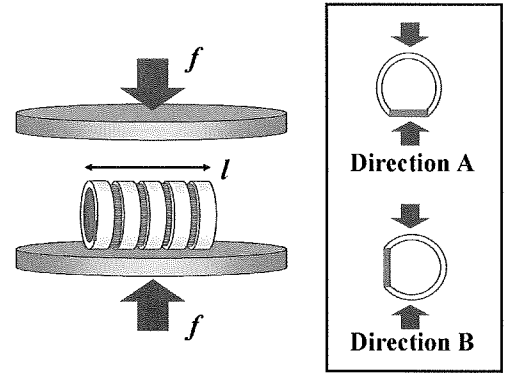


图 9

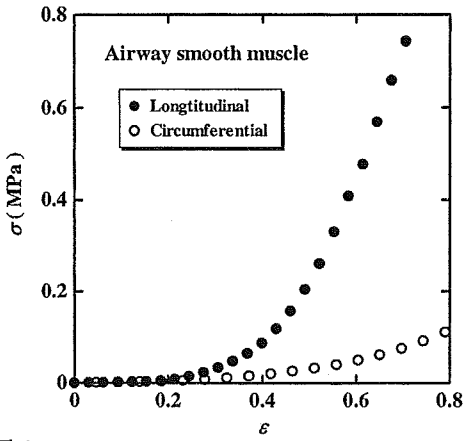


图 6

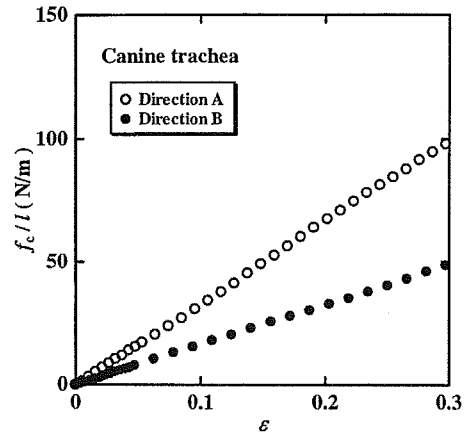


图 10

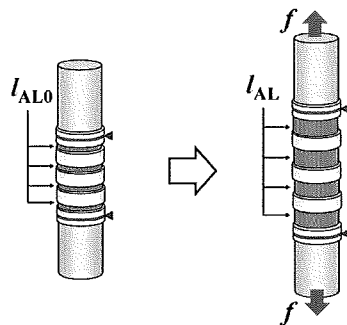


图 7

## 2-1. 人工気管圧縮試験

### 2-1-A 試料

ポリプロピレン (PP) 製の Marlex® メッシュの円筒に、ナイロン (NY) 糸 (直径; 0.70mm) をらせん状に巻きつけた人工気管試料 (NY-s) と NY 糸のリングを連ねた人工気管試料 (NY-r) を作製した。NY-r については単位長さ当たりのリング数が異なる 3 種類の試料 (NY-ra、NY-rb、NY-rc) を作製した。典型的なメッシュ型人工気管の例として NY-rc の写真を Fig. 11 に示す。PP 糸 (直径; 0.80mm) のリングを連ねた試料 (PP-r) と、生体の気管の形に倣って円周の約 5 分の 4 にわたって PP の糸を巻きつけた試料 (PP-a) も作製した。円筒状のメッシュに PP の板から切り出した長方形の切片 (断面の厚さ 1.0mm、幅 3.0mm) をリング状に巻きつけた試料 (PP-R) も作製した。ステントに PP を用いた試料はステントを円筒状のメッシュの外側に溶着した後、6-0 プロリン縫合糸 (直径; 0.070~0.099mm) を用いて補強した。ステントに NY を用いた試料はステントをメッシュに接着剤で固定した後、6-0 プロリン縫合糸で補強した。人工気管試料のコード名、ステントに用いた材料、ステントの巻き方、ステントの単位長さ当たりのリング数を Table 1 に示した。

### 2-1-B 測定方法

引張試験機 (RTM-250、ORIENTEC) を用い、室温、空気中で 5mm/min の圧縮速度で圧縮試験を行った。圧縮試験の模式図を Fig. 12 に示す。作製したメッシュ型人工気管試料について圧縮荷重と相対たわみ量の関係を調べた。PP-a はステントの形状が一様なリングではないため 2 種類の圧縮方向 (Direction A、Direction B) で圧縮試験を行った。この場合、試料の形状を円筒と仮定して解析を行った。

1 つのリングの側面に圧縮荷重をかけた場合の荷重と荷重方向の相対たわみ量 (ひずみ;  $\varepsilon$ ) は (4) 式を満たすことが知られている<sup>10</sup>。

$$(4) \quad f \cong \frac{32\pi EI}{(\pi^2 - 8)d_0^2} \varepsilon$$

ここで、 $f$  は圧縮荷重、 $d_0$  は初期の試料の外径、 $E$  はヤング率、 $I$  はステントの軸方向に垂直な断面の断面 2 次モーメント、 $\varepsilon$  はひずみ ( $\varepsilon = (d_0 - d) / d_0$ ) である。ただし、 $d$  は変形下での試料の外径である。断面 2 次モーメント  $I$  は断面形状が円の場合 (半径;  $r$ )、 $I = \pi r^4 / 4$ 、長方形 (曲げの中立軸と平行な辺の長さ、 $a$ ; 曲げの中立軸と垂直な辺の長さ、 $b$ ) の場合、 $I = ab^3 / 12$  となることが知られている。人工気管試料および気管試料の外径は試料によって異なるため以下の式を用いて外径を 24 mm に補正した。

$$(5) \quad f_c = f \left( \frac{d_0}{d_{0c}} \right)^2$$

ここで、 $f_c$  は外径の差を補正した後の圧縮荷重、 $d_{0c}$  は補正後の外径である。

### 2-1-C 結果と考察

Fig. 13 に NY ステントのリングを連ねた試料 (NY-r) と、NY ステントをらせん状に巻きつけた試料 (NY-s) の力-ひずみ曲線を示す。らせん状のステントとリングを連ねたステントの変形特性を比較するため、 $f$  を試料長 ( $l$ ) で除した換算力 ( $f/l$ ) を縦軸にとっている。全ひずみ領域において NY-r は NY-s より大きな力を示した。らせん状のステントは円周方向に対して一定の角度で巻かれているため、らせん形状をリングと仮定したときにその外径は円の直径よりも大きくなる。外径の大きなリングは外径の小さなリングに比べて変形に必要な力が小さいため、 $(f/l) - \varepsilon$  曲線では NY-s の方が NY-r よりも低いレベルを示したと考えられる。

Fig. 14 に円周の 5 分の 4 にわたってステントを巻きつけた試料 (PP-a) について圧縮試験を行った結果を示す。PP-a はステントがリングではないため、Direction A と Direction B の 2 種類の圧縮方向で圧縮試験を行った。縦軸は単位長さ当たりに換算した力である。全ひずみ領域にわたって Direction A は Direction B の約 2 倍の力を示した。気管が気管軟骨によって形状を保持するのと同じように、Direction A は両側面にあるステントで形状を保持し、Direction B は片側のステントだけで形状を保持している。このため direction B は direction A の約半分の大きさの力しか示さないと考えられる。

このように円周の一部にステントを巻かない部分を作ることによって、生体の気管と同じように、圧縮方向によってかたさが異なるメッシュ型人工気管を作製できることがわかった。

Fig. 15 にステントに用いた NY の糸と PP の糸の引張試験の結果を示す。縦軸は応力 ( $\sigma$ )、横軸はひずみ ( $\varepsilon$ ) である。2 本の応力-ひずみ曲線はひずみの小さな領域ではほぼ一致したが、ひずみが大きくなるにつれて NY の糸の方が高い応力レベルを示した。Fig. 16 にステントにこれらの糸のリングを連ねた NY-r と PP-r について側面圧縮試験を行った結果を示す。ステントに用いた糸の材質と断面形状が異なるため、縦軸には試料にかかる力をリングの数 ( $n$ ) とステントの曲げ剛性 (ヤング率 ( $E$ ) と断面 2 次モーメント ( $I$ ) の積) で割った換算値 ( $f/nEI$ ) を用いている。 $\varepsilon < 0.1$  の領域では 2 本の曲線は直線となり、それらはほぼ一致している。これは、上記の領域ではメッシュ型人工気管の圧縮特性がステントの材質と断面形状だけで決定されるためである。 $\varepsilon > 0.1$  の領域ではひずみが大きくなるにつれて NY-r の方が大きな力を示す。これは Fig. 15 で示したステントに用いた糸の大変形下での応力-ひずみ挙動の違いに起因するものであると考えられる。

Fig. 17 は PP の糸をステントとして用いた試料 (PP-r) と PP の板から切り出した板状切片をステントとして用いた試料 (PP-R) の圧縮特性を比較したものである。縦軸は Fig. 16 と同様にリング 1 個当たりにかかる力をステントに用いた材料の曲げ剛性で割った値を用いている。 $\varepsilon < 0.1$  の領域では、力とひずみの間に線形関係 ((4)

式)が成立しており、2本の曲線はよく一致した。また、 $\varepsilon > 0.1$ の線形関係を越えた領域でも2本の曲線はほぼ一致した。このことは同じ材質でできたステントであれば断面形状や弾性率がある程度異なっても比較的大きなひずみまで ( $f_c/nEI$ ) -  $\varepsilon$  曲線が同じ形状をとることを示している。

Fig. 18にリングの数密度が異なるNYステントの試料について側面圧縮試験を行った結果を示す。縦軸はリング1個当たりに換算した力 ( $f_c/n$ ) である。全てのひずみ領域で3本の ( $f_c/n$ ) -  $\varepsilon$  曲線はほぼ一致した。メッシュ型人工気管のかたさはリング状のステントの数に比例して増加するといえる。Fig. 19ではリングの数密度が異なるNY-rの圧縮試験の結果をビーグル犬の気管のデータと比較した図を示す。縦軸は単位長さ当たりに換算した力である。ビーグル犬の気管の ( $f/l$ ) -  $\varepsilon$  曲線はNY-rbの曲線とほぼ同じレベルにあった。すなわち、メッシュ型人工気管にNY-rステントを用いた場合には、リングの数密度を0.16/mm程度に設定すれば生体の気管に近い圧縮特性を持った人工気管が作製できることがわかった。

## 2-2. 人工気管動物実験

らせん状のステントを持つメッシュ型人工気管やリング状のステントを持つメッシュ型人工気管についての動物実験はこれまでに数例行われている。メッシュ型人工気管は生体組織に取り込まれ、内腔には繊毛を持つ気管上皮が再生することが確認されている。本研究では、新しく考案した円周の5分の4にわたってステントを巻きつけたメッシュ型人工気管試料 (PP-a) について動物実験を行い、気管組織の再生について検討した。

### 2-2-A 試料

まず、力学試験用に作製したPP-aの試料をEtOHで消毒した。表面と内腔にプラズマ照射した後、1% collagen溶液を塗布して乾燥させる操作を20回繰り返した。8,000rpmで15分間攪拌した1% collagen溶液でこの試料を覆い、凍結乾燥することによって、試料をcollagen spongeで被覆した。最後に140°C下で24時間熱架橋処理を行った後、Et<sub>2</sub>Oガスで滅菌処理を施した。上記の工程を経て完成したメッシュ型人工気管の写真をFig. 20に示す。

### 2-2-B 実験方法

ビーグル犬の気管(咽頭部)を4cm程度切除し、骨髓液を浸潤させたメッシュ型人工気管を埋植した。手術の様子をFig. 21に写真で示す。(a)は作製したメッシュ型人工気管と骨髓液、(b)はメッシュ型人工気管に骨髓液を浸み込ませている様子、(c)は骨髓液を浸潤させたメッシュ型人工気管、(d)はビーグル犬に埋植したメッシュ型人工気管の様子である。術後の気管内腔の様子は定期的に気管支鏡で観察した。

### 2-2-C 結果と考察

Fig. 22に術後3週間の気管内腔の写真を示す。ステントが巻き付けてある部分は肉芽に覆われ気管上皮が再生してきている様子が観察されたが、ステントが無い気管

膜様部を模倣した部分はメッシュがむき出しであった。Fig. 23は術後5週間の気管内腔の写真である。ステントが巻き付けてある部分は術後3週間に比べて表面が白く滑らかになっているように見えた。この部分では気管上皮の再生が順調に進行していると考えられる。しかし、ステントがない部分は術後3週間とほとんど変化がなく、メッシュがむき出しのままであった。ステントが巻き付けてある部分はステントによってメッシュが固定されているため、結合組織が進入しやすく結合組織に覆われた後も上皮が成長しやすい環境であったと考えられる。一方、気管膜様部を模倣したステントのない部分は、メッシュが張ったりたわんだりして動いてしまうことによって周囲の組織の進入や気管上皮の再生が妨げられたのであろう。このことから、少なくとも上皮が再生し始めるまでの一定期間、足場が固定された環境にないと気管組織は再生しにくいということがわかった。

## 2-3. 再生人工気管圧縮試験

### 2-3-A 試料

ビーグル犬に埋植後、内腔に気管上皮が再生したメッシュ型人工気管 (PP-a) を摘出し、これを試料とした。どの試料も気管膜様部を模倣したステントのない部分はメッシュがたわみ、むき出しになっていた。

### 2-3-B 測定方法

引張試験機 (RTM-250, ORIENTEC) を用い、室温、空気中で5mm/minの圧縮速度で圧縮試験を行った。試料はステントの形状が一様なリングではないため2種類の圧縮方向 (Direction A, Direction B) で圧縮試験を行った。測定中は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。

### 2-3-C 結果と考察

Fig. 24に埋植後3ヵ月で摘出したメッシュ型人工気管について圧縮試験を行った結果を示す。埋植前、PP-aはDirection AがDirection Bの2倍の力を示していたが、埋植後3ヵ月ではDirection AとDirection Bはほぼ同じレベルを示した。メッシュ型人工気管は、ステントが巻き付けてある部分もステントがないメッシュがむき出しであった部分も、管の外側がかたい肉芽に覆われていた。そのため、圧縮方向によるかたさの違いはなくなっていたのだろう。2本の曲線の形状の違いはメッシュ型人工気管内腔に進入した肉芽組織の厚さが一様でないことに起因するものと考えられる。ステントを巻きつけない部分は、メッシュがたわみ、変形した部分に肉芽組織が集中してしまうため、期待していたやわらかさは得られないことがわかった。

## B. まとめ

ビーグル犬の気管について一軸伸長試験と側面圧縮試験を行った。人工気管を設計する際に重要な生体の気管の力学物性を明らかにした。

種々のステントを持つメッシュ型人工気管を作製し、側面圧縮試験を行った。メッシュ型人工気管を作製する

とき、ステントの材質、断面形状、巻き方、単位長さ当たりのリング数が重要な指標となることを示した。また、これらの指標を調節することで適切な力学物性を備えたメッシュ型人工気管を作製することもできた。

生体の気管の軟骨の形状を模して円周の一部にステン

トを巻かないメッシュ型人工気管を作製し、その臨床的な有用性について検討を行った。動物実験の結果、ステントを巻かない部分の組織の再生が不十分であることがわかった。気管組織の再生には足場となるメッシュの部分が固定されている必要があるということが示唆された。

Table 1

Code	Material for stent	Form of stent	Number of rings per unit length (mm <sup>-1</sup> )
NY-ra	Nylon thread	Ring	0.094
NY-rb			0.16
NY-rc			0.25
NY-s	Nylon thread	Spiral	
PP-r	Polypropyrene thread	Ring	
PP-R	Polypropyrene strip	Ring	
PP-a	Polypropyrene thread	Arc	

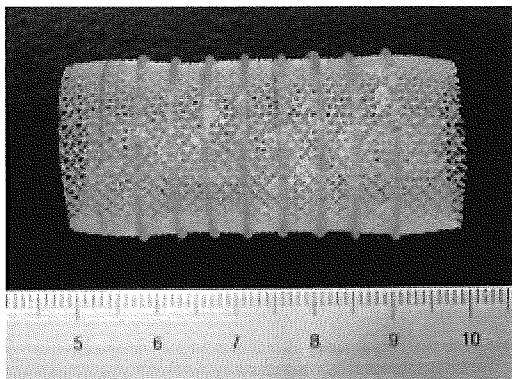


図11

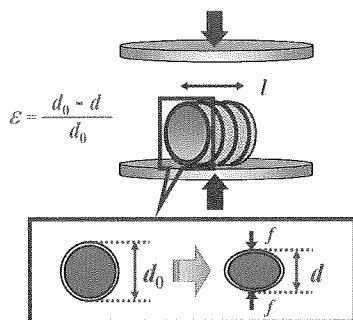


図12

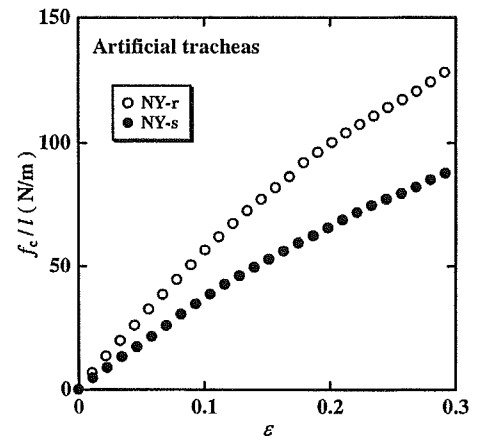


図13

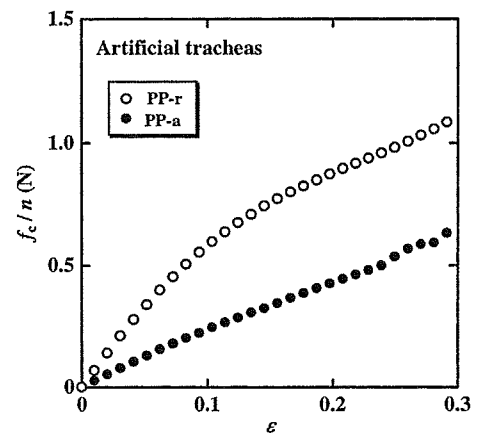


図14

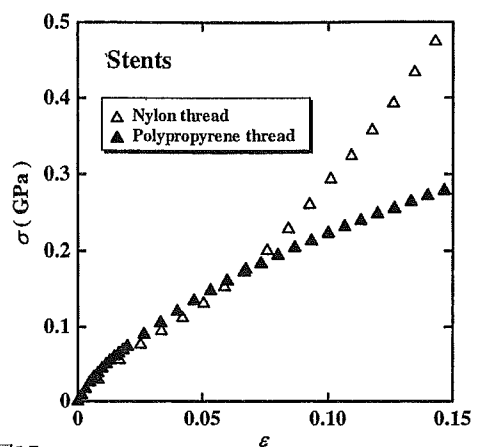


図15

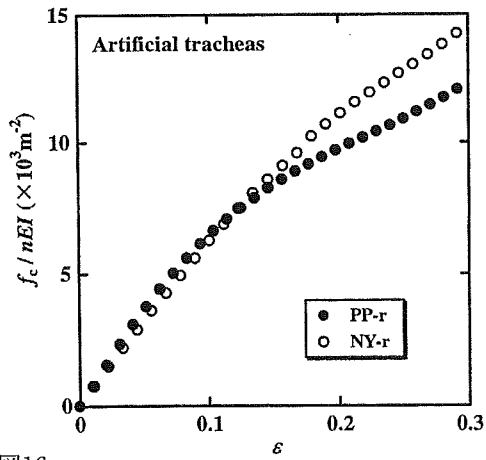


图16

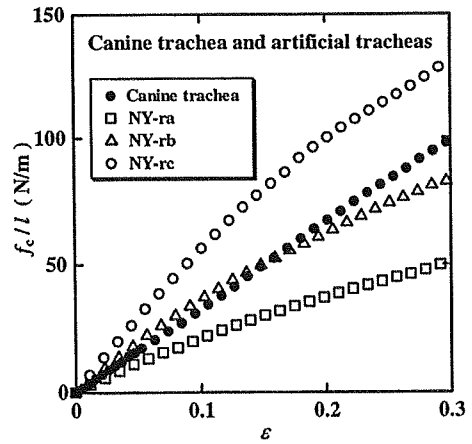


图19

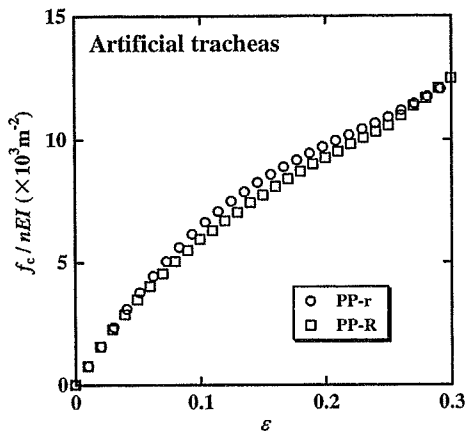


图17



图20

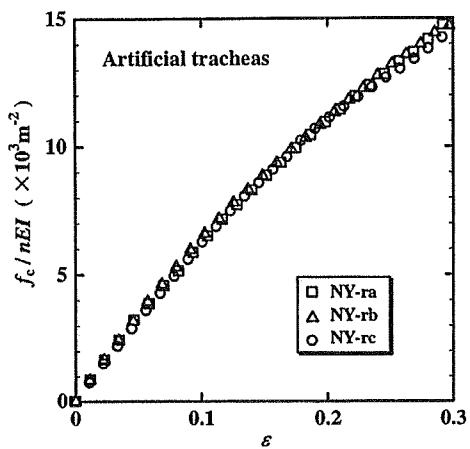
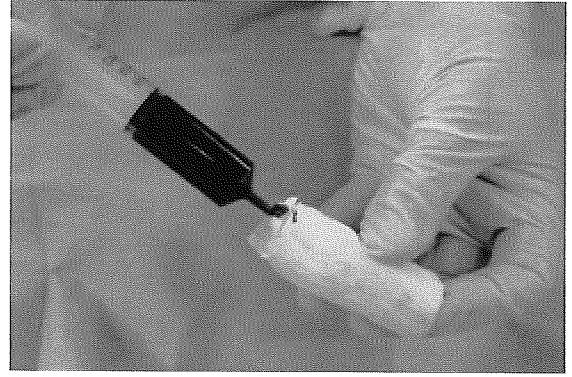


图18



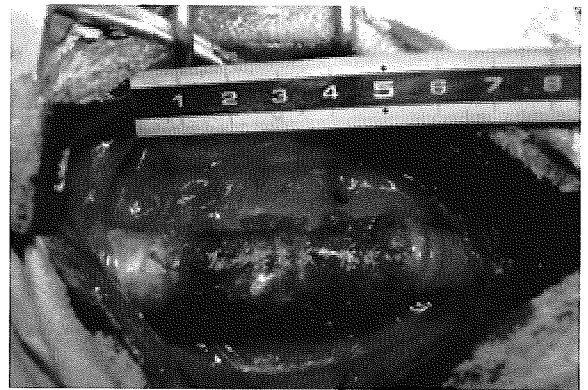
(a)



(b)



(c)



(d)

图21

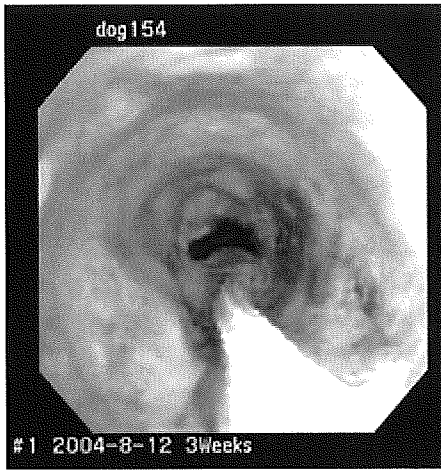


图22



图23

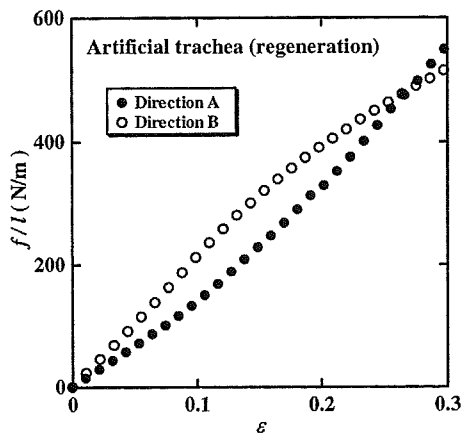


图24

## C. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 中村達雄：気道の再生. 呼吸と循環. 53(2) : 119-125, 2005
- 2) 高橋 充, 加藤治文, 中村達雄, 清水慶彦：EPCによる肺高血圧の治療. 呼吸と循環. 53(2) : 159-165, 2005
- 3) 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 (Mechanical properties of mesh-type artificial tracheas.). 材料. 54(1) : 85-89, 2005
- 4) 森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 中村達雄：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

### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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, 51<sup>th</sup> Annual Conference(2005. 6. 9-11 Washington, DC)
- 3) 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)
- 4) 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 顕, 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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, 長束美貴, 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)
- 8) 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)

- 9) 森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 橋爪 聡, 松本桂太郎, 櫛引俊宏, 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)
- 10) 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. 日本胸部外科学会総会 (2005.10. 4 - 7, 岡山)
- 11) 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)

## D. 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



## 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）

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 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

臨床例により近い、気管部分欠損後の再生にもポリプロピレンを用いた人工気管が有用であることを、これまでに報告してきた。

今回、気管小欠損再生モデル犬を作成し、病理組織学的、放射線学的評価を追加した。

### A. 研究目的

これまでに行ってきた再生気管の内腔面からの形態評価のみでなく、病理組織学的検査や放射線学的検査を追加する事により、多方面からの再生気管の状態を調べる。

### B. 研究方法

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（図1）。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（図2）。

術後13ヵ月でCT撮影後、気管を摘出し標本作成、光学顕微鏡・走査電子顕微鏡下に観察を行った。

### C. 研究結果

術後8ヵ月の気管内腔面。（図3）足場の逸脱や変形、狭窄を認めない。

Hematoxyline-Eosin 染色（図4）ポリプロピレン(P)の内側に周囲より伸びている軟骨(C)、新生軟骨（矢印）を認める。腺(G)、内腔(L)。

図4の拡大所見（図5）。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する。

再生気管内腔面のSEM（走査電子顕微鏡）像（図6）。規則正しい線毛がみられ、良好な気管上皮の再生が示唆される。

再生気管部CT水平断像（図7-A）。周囲の正常気管と段差なくきれいな内腔の形態がみてとれる。図7-Bは細切水平断像を3次元構築した画像。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。

### D. 考 察

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。

再生気管は長期的にも良好に内腔の形状を保持する能

力があり、組織学的にも正常と同等の上皮構造を持つ。また、軟骨組織の周囲よりの進入や新生所見も認め、経時的に構造がより強く保持される可能性がある。線毛の運動機能や、気管腺の分泌能、内腔の清浄能などを計測する事ができれば、再生気管のより機能的な側面を推定することができるかもしれない。

### 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。

臨床に準じたモデルにおいて、内腔形状とともに、組織学的にも正常気管に近い再生気管を生じ得ることを示した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

1) 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(108<sup>th</sup> Annual Meeting)(2005. 5. 13-16, Boca Raton, Florida)

2) 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)

### 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

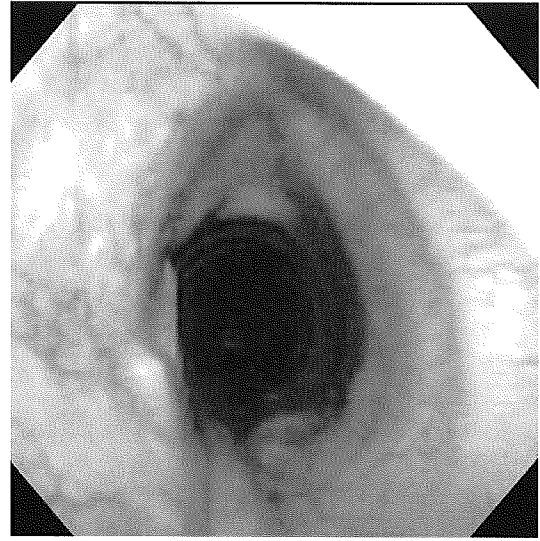


图 3

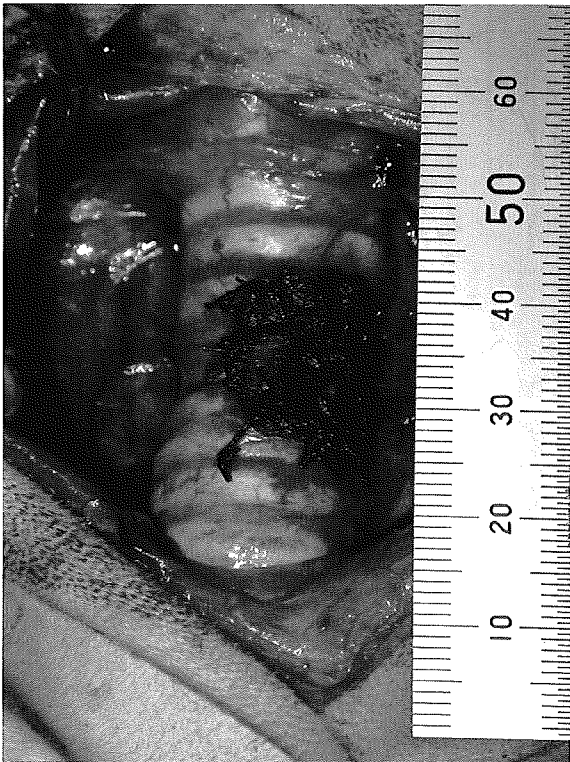


图 2

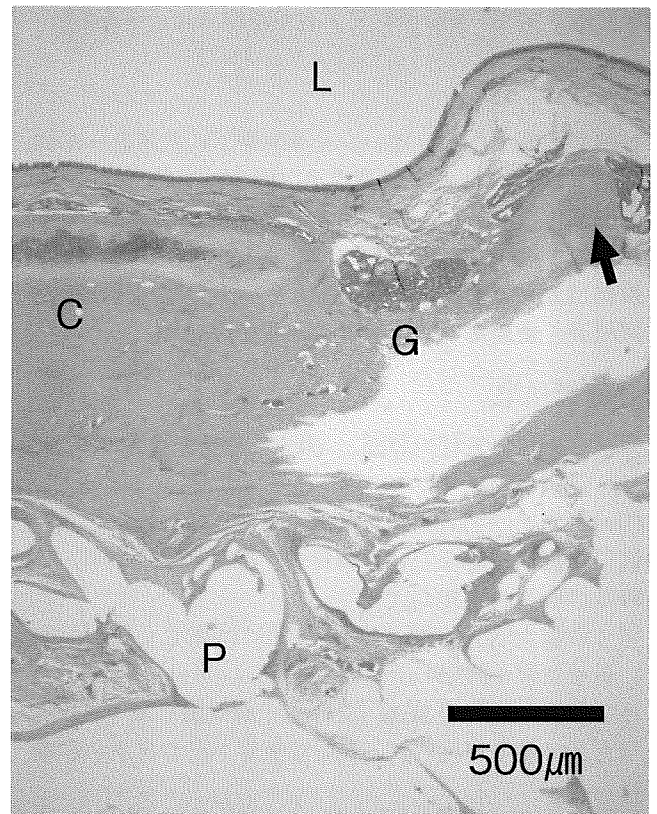


图 4

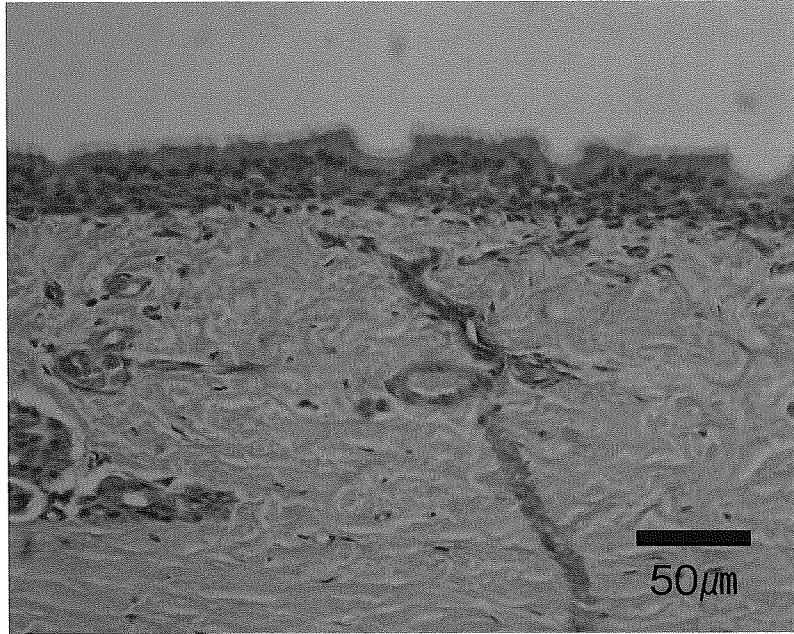


图 5

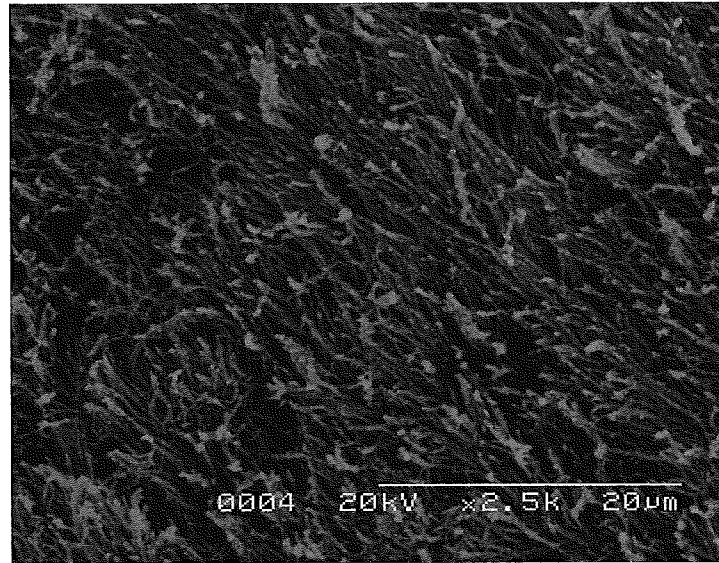


图 6

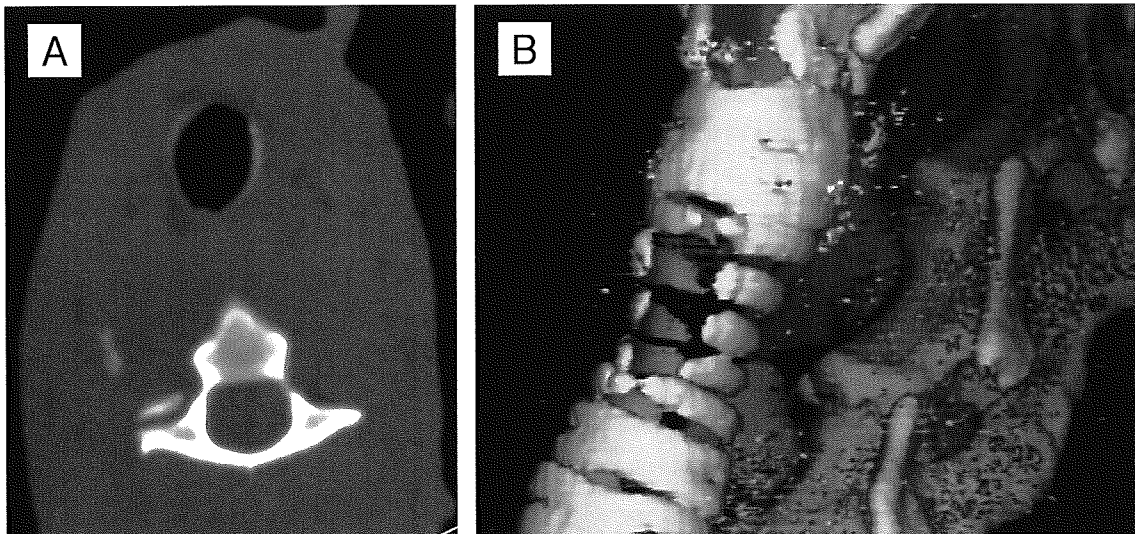


图 7

## 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

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

培養細胞シートを用いた気道再建術のカギとなるのは、シート中の細胞の適切な分化と組織構造の構築である。本年度は気道培養上皮の重層化に成功したため、本研究では免疫組織化学的手法と RT-PCR 法を用いてアクアポリン (AQP3、AQP4、AQP5)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、上皮性ナトリウムチャネル (ENaC-alpha、ENaC-beta、ENaC-gamma) の発現を解析してその機能レベルを推定した。また、培養上皮層の基底側での細胞増殖も観察した。その結果、今回使用している気道培養上皮と生体内における気道上皮との構造的・機能的な類似性が明らかになった。培養気道上皮細胞を気道再生治療に用いることが非常に妥当な方法であることが示唆された。

### A. 背景

本研究では気道再生に培養細胞のシートを用いているが、そのシート中の細胞を本来生体内であるべき方向に分化させることは、安全で成功率の高い機能再建を実現する上で必要不可欠である。そのためにはシート中の細胞がどの方向に、どの程度分化・機能しているのかを評価する必要がある。前年度において、我々は正常気道組織と単層気道培養上皮細胞で水やナトリウムの輸送に関与している分子であるアクアポリン (aquaporin) やナトリウムトランスポーターの発現を確認した。こうした分子は気道上皮における分泌等に深く関与していることが示唆されている。

### B. 目的

本年度においては気道培養細胞の多層化に成功したことをふまえ、多層培養上皮における増殖細胞の分布を解析した。また、細胞膜を介した物質輸送で重要な役割を果たしている（気道上皮への適切な湿度の供給に用いられるなど、呼吸器分野での生理的な意義も大きい）上皮性ナトリウムチャネル (ENaC)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  とアクアポリン (aquaporin) の発現もラット多層気道培養上皮細胞を用いてさらに詳細に解析した。解析手法は RT-PCR による mRNA 発現解析と免疫染色による局在確認

とを用いた。これにより、培養上皮における物質輸送の動態と増殖機構に関する理解が深まり、気道再生法の評価と改善に寄与するものと考えられる。

### C. 方法

RT-PCR 法：

シート状に培養された細胞（本報告書中の別の章で作製）数mg採取し、500 $\mu$ l の PBS (pH7.4) 中でホモジナイズした後、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて mRNA を抽出した。実際の方法は kit 添付のプロトコールに従って行った。抽出された mRNA は Onestep PCR kit (QIAGEN) と Mini cyclor (MJ research) を用いて RT-PCR を行った。簡単に方法を記載すると、mRNA と各遺伝子のプライマーを酵素反応液10 $\mu$  l に入れ、50 $^{\circ}$ C で30分逆転写を行った。その後95 $^{\circ}$ C で15分間保持し、逆転写酵素の失活と Taq 酵素の活性化を行った。さらに95 $^{\circ}$ C 30秒、57 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分の反応サイクルを40回行い、DNA を増幅した。増幅産物は3.5%アガロース電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色して画像取得した。

PCR プライマー：

RT-PCR に使用したプライマーの配列と増幅産物の長さは以下の通りである。

Gene	Length	Forward	Reverse
AQP4 (rat)	143	tcagcatcgccaagtctgtc	gccagcagtgaggtttcca
AQP5 (rat)	210	tctgggacctgtgagtgggtg	ccaggcgttgtgttggtt
ENaC-alpha (rat)	122	tgatgatggtggcttcaact	cgggacatcgctaccattct
ENaC-beta (rat)	98	tccaagagttcaactaccgtacca	ccccatccagaagccaaa
ENaC-gamma (rat)	299	cggaaaatcagcgggaaa	ggatggtgaaaagcgtga

#### 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。標本はエタノール系列(70%、80%、90%、95%、95%、99%、99%、99%：各60分)で脱水後、キシレン(2時間×3回)を通し、パラフィン(2時間×4回)に包埋した。5 μm厚の切片を作成し、キシレン(15分×3回)、99%エタノール(10分×3回)を通した後に、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールで1時間インキュベートして内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後エタノール系列によって親水化させ、1% BSA / 0.2% gelatin / 0.05% saponin / PBS (pH7.4) でブロッキングした後、各一次抗体と4℃でovernight反応させた。さらに0.1% BSA / 0.2% gelatin / 0.05% saponin / PBS (pH7.4) で5分間3回洗浄し、HRP 標識またはビオチン標識された二次抗体と室温で1時間反応させた。次に0.1% BSA / 0.2% gelatin / 0.05% saponin / PBS (pH7.4) で5分間3回洗浄後、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30分間反応させ、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Tris / DAB (0.2mg/ml) / 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液で10分行い、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：

Anti-AQP3：ウサギポリクローナル抗体(オーフス大学 Nielsen 教授より分与)、100倍希釈

Anti-AQP4：ウサギポリクローナル抗体(Chemicon 社)、100倍希釈

Anti-AQP5：ウサギポリクローナル抗体(Chemicon 社)、12,500倍希釈

Anti-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase：マウスモノクローナル抗体(オーフス大学 Nielsen 教授より分与)、2,000倍希釈

Anti-PCNA：マウスモノクローナル抗体、3,000倍希釈

## D. 結 果

#### RT-PCR：

図1に示すように、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(図2)。

#### 免疫染色：

アクアポリンを免疫染色した結果、AQP3は基底側の細胞の細胞膜に(図3 a、図4 a-c)、AQP4は表層側の細胞の basolateral membrane に(図3 b)、AQP5は基底側の細胞に見られた(図3 c)。

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase は、基底細胞や杯細胞などの basolateral membrane で染色が見られた(図4 d-f)。PCNA は基底層の細胞のみで強い染色がみられた(図4 g-i)。

## E. 考 察

本年度は、重層化したラット気道上皮培養細胞を用いて物質輸送と細胞増殖の動態を解析した。結果を総合すると、アクアポリンについてはRT-PCRでも免疫染色でも生体内での気管上皮におけるアクアポリンの発現パターンと一致しており、本プロジェクトで作成している培養上皮細胞が生体内のものに近い状態であることを強く示唆している。つまり、AQP3、AQP5の基底側での発現や、AQP4の basolateral membrane での発現が基底細胞や繊毛細胞への分化と細胞の再生産機構が正常組織と同様に働いていたと示唆している。また、こうした細胞の3次元的な配置も正常組織に近いものが観察された。こうした観点からPCNAの染色結果を考察すると、基底層で盛んに細胞増殖が行われて表層に向かって分化していくという、正常組織と様態がここでも見られた。

物質輸送の観点から見ると、アクアポリンによる水の輸送も正常に行われていることが考えられる。また、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase と ENaC の発現様態からはイオン輸送も行われていると考えられ、この培養気道上皮からの物質分泌もある程度正常組織に近いような形で運搬されうると想定される。このように重層化した培養気道上皮細胞では単層のときにくらべても、本来の気道の構造や機能を保持・獲得していることが水やイオン輸送の面からも明らかになった。

## 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 102(6): 2192-2197, 2005

#### 2. 学会発表

- 1) Hazama A, Miyake M, Saito A.: "Symposium" Role of Cl<sup>-</sup> ion permeability in cytoprotection. The Physiological Society of Japan(The 82<sup>nd</sup> Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)
- 2) 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 82<sup>nd</sup> Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)

## 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



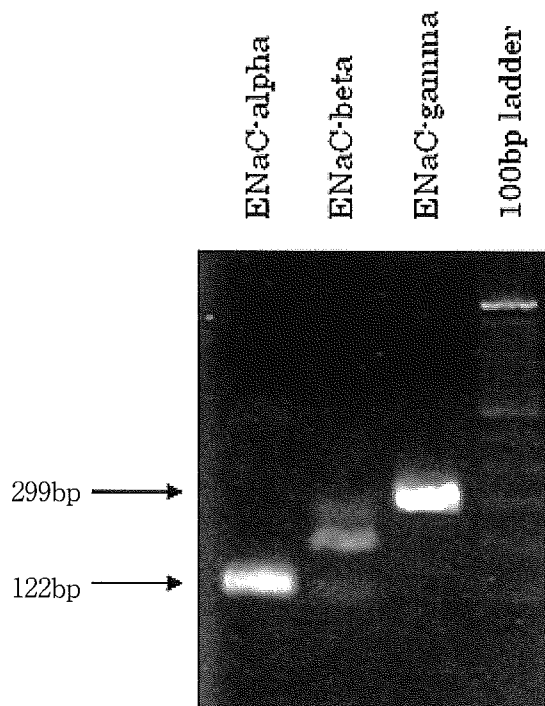


図1 気道培養上皮細胞における ENaC 発現

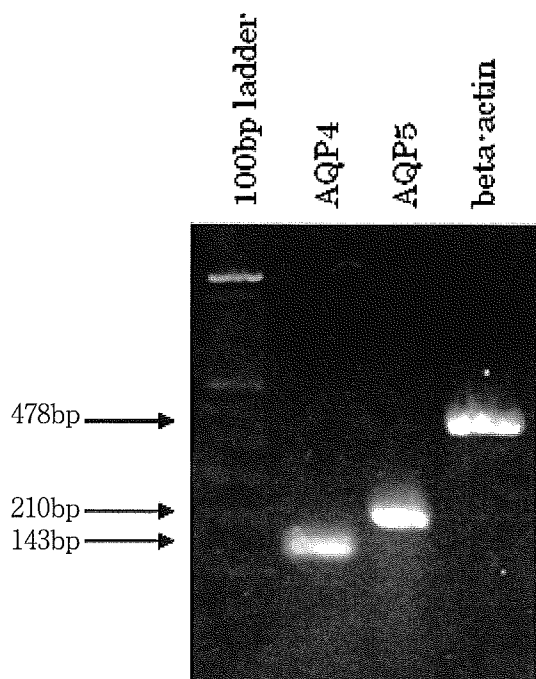
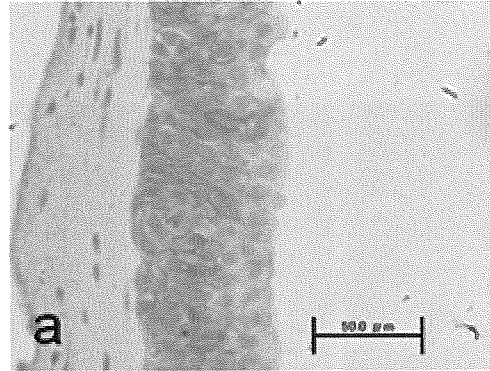
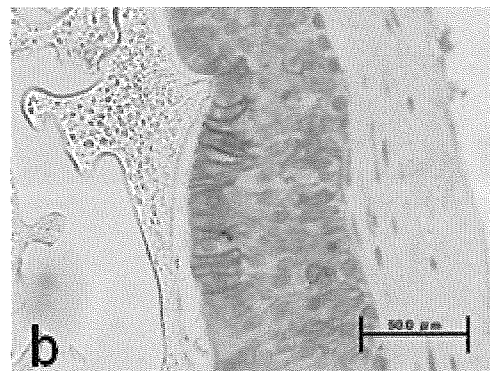


図2 気道培養上皮細胞における AQP 発現

AQP3



AQP4



AQP5

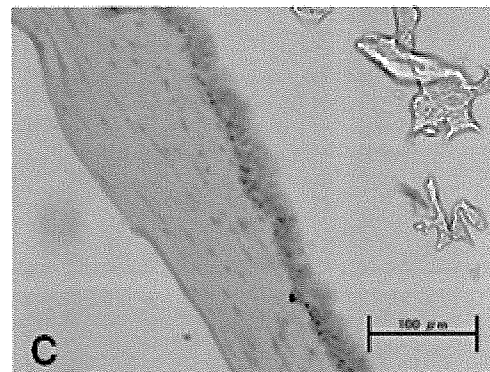


図3 気道培養上皮細胞におけるアクアポリンの免疫染色（酵素発色法）

a) AQP3、基底側の細胞の細胞膜に見られる。対物40倍。b) AQP4、表層側の細胞の basolateral membrane に見られる。対物40倍。c) AQP5、基底側の細胞に見られる。対物20倍。

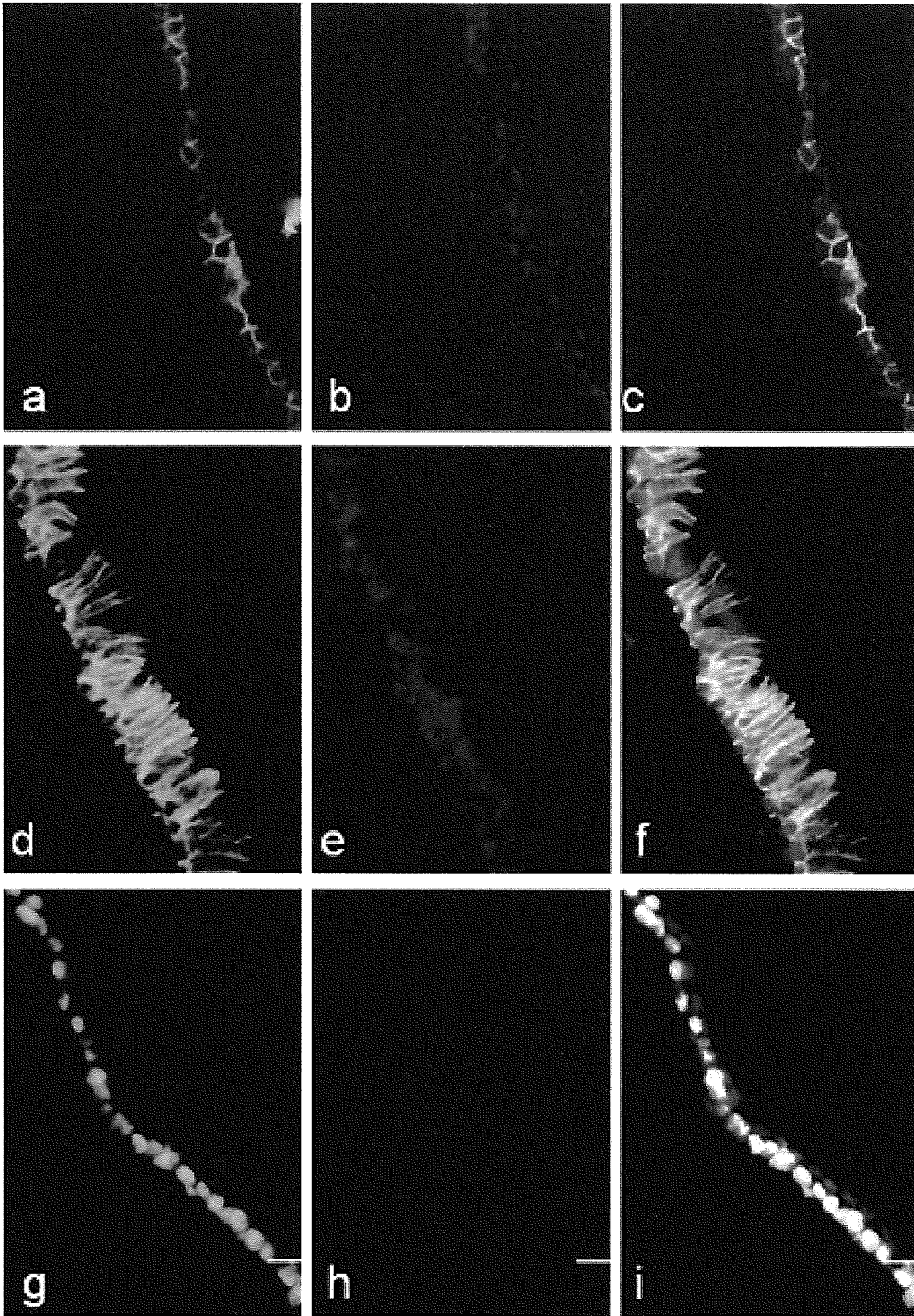
図4 気道培養上皮細胞における AQP3、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、PCNA の免疫染色（蛍光発色法）

a) - c) AQP3 基底側の細胞の細胞膜に見られる。d) - f)  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  basolateral membrane に見られる。g) - i) PCNA 基底側の細胞に見られる。a)、d)、g) 抗体染色、b)、e)、h) PIによる核染色、c)、f)、i) 合成画像。対物40倍。

antibody

PI

merge





## 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—

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）  
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 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）

### 研究要旨

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。本研究の目的は気道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。気道の再生アプローチとして気管・気管支・声帯に対する報告はすでになされているが、現在われわれは細胞や組織、動物を扱う基礎研究の成果を臨床に橋渡しするトランスレーショナルリサーチにより、有効かつ安全な喉頭・気管の再生治療の確立を目指している。

現在まで6例の臨床応用がなされているが、問題点として上皮化の促進があげられている。この問題点を解決するために基礎研究へフィードバックし、人工材料の内腔面に気管上皮細胞層を形成することで上皮化が促進するかについて評価した。

### A. 研究目的

組織再生型人工材料を用いた気道再建は2002年より既に臨床応用されており、現在まで6例行われている。

その利点として、低侵襲であり症例によっては気管切開が不要となり、また2次手術が不要となる可能性があげられ、問題点としては、上皮化の速度が遅いことがあげられる。

そこで、本研究では人工材料の表面に気管上皮細胞層を形成することにより上皮化を促進することが可能となるかについて、ラットの気管欠損モデルを作製し上皮層および上皮下層の形成過程とコラーゲンスポンジの変化をもとに評価する。

### B. 研究方法

#### 1. *in vitro*

##### 1) 気管上皮細胞の採取・培養

SD系ラットの気管を摘出し、4℃、24～48時間プロテアーゼ処理を行い、気管上皮細胞を採取する。洗浄後、Penicillin G<sup>®</sup>、Streptomycin<sup>®</sup>、Amphotericin B<sup>®</sup>、及び15% Fetal bovine serumを添加したDMEM培地で細胞懸濁液を作製し、継代培養した。

##### 2) ハイブリッド型人工材料の作製

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型コラーゲンに再構成用緩衝液を作用させ生じた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した。type Bは、組織培養用コラーゲン膜（cellgen<sup>®</sup>）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した。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である。

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、HE染色と免疫染色を行い評価する。

#### 2. *in vivo*

ラットの気管を露出し、電気メスを用いて約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。

### C. 研究結果

#### 1. *in vitro*

HE染色にて観察したところ人工材料の表面に気管上皮細胞層の形成を確認できた（図1・2）。免疫染色での観察ではtype Aにて基底膜の指標となるcytokeratin14と、上皮細胞の指標となるcytokeratin18で培養上皮細胞での発現を認め、タイトジャンクションの指標となるoccludinにおいても発現が認められた（図3ab）。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 (図 3 c d e)。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。

## 2. *in vivo*

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 (図 4 a b)、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。上皮層の変化を HE 染色にて観察したところ、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 日では上皮層の形成を認めた。(図 5 a b c)

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 (図 6 a b) が、術後 30 日では認められなかった。上皮層の変化を HE 染色にて観察したところ、上皮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、上皮層とシートの上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 (図 7 a b c)。

移植後のコラーゲンスポンジの変化を type A 移植モデルの HE 染色で観察したところ、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 (図 8)。

## D. 考 察

免疫組織化学的には、移植した気管上皮細胞は短期ではあるが局所にとどまっておらず、術後 7 日目には上皮層形成を認めていることから、組織再生に影響を与えている可能性が示唆された。

上皮層の形成には、両者の間に明らかな差は認められないが、より生理的な形成過程をとるのは type A であると考えられる。

コラーゲンスポンジは、周囲よりスポンジ内に線維芽細胞が入り込み自己のコラーゲンを産生すると同時に徐々に吸収され、30 日程度でほぼおき換わるものと考えられ、足場としての性質を有すると考えられた。

## E. 結 論

今回の基礎実験の結果が上皮化促進にどの程度寄与するかの評価については、より大きな気管欠損モデルでの評価と、さらには上皮層の組織再生についての評価が必要である。

現在までに当該施設の倫理委員会での承認の上で、喉頭・気管領域の再生治療の臨床応用を開始し現時点では

良好な術後経過を得ているが、次のステップとして、問題点をあきらかにし、さらにこれを解決するために基礎研究にフィードバックすることが重要である。このような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化することが可能となると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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

### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

## 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

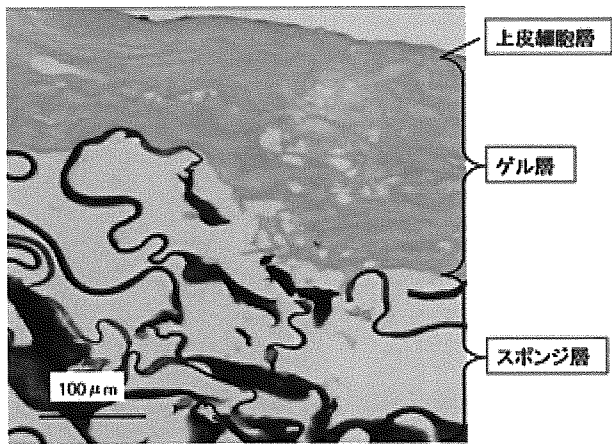


図1. type A (HE 染色)

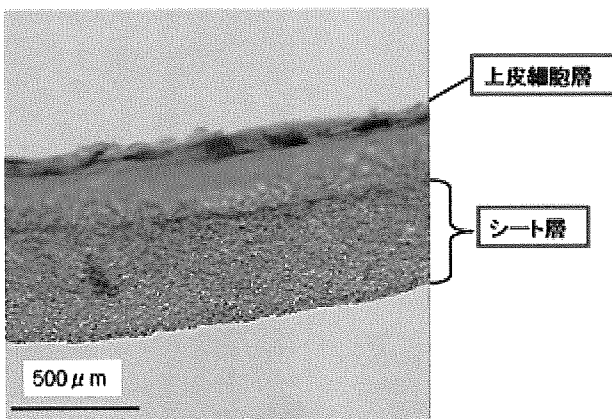


図2. type B (HE 染色)

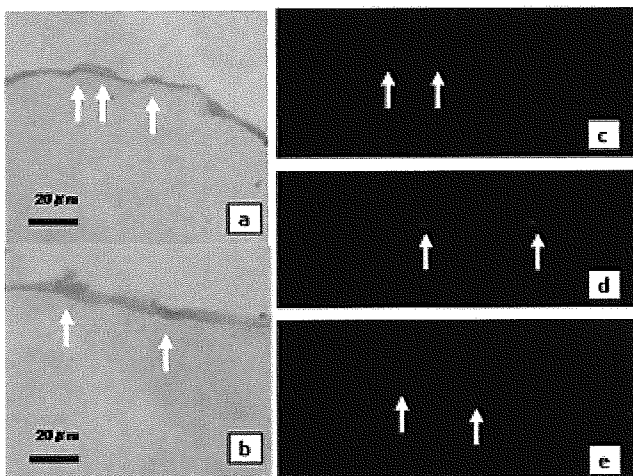


図3. 免疫染色：気管上皮細胞にて陽性

- a. cyokeratin14：(矢印)
- b. cyokeratin18：(矢印)
- c. occludin：(矢印)
- d. Na-K-ATPase：(矢印)
- e. PCNA：(矢印)

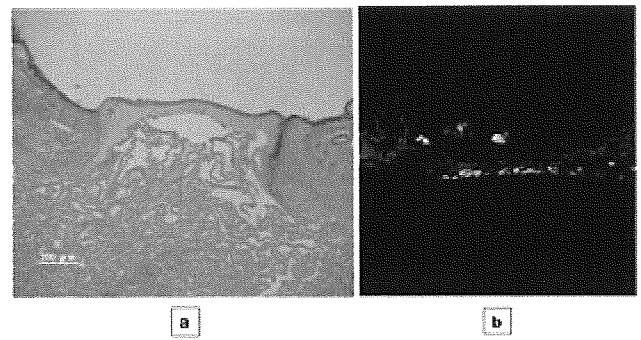


図4. type A (術後7日モデル)

- a：HE 染色
- b：免疫染色（緑色：GFP 陽性細胞、赤色：核染色）

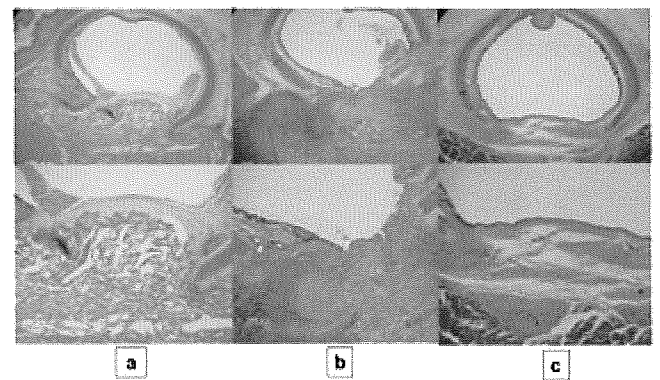


図5. type A (HE 染色)

- a：術後3日
- b：術後7日
- c：術後30日

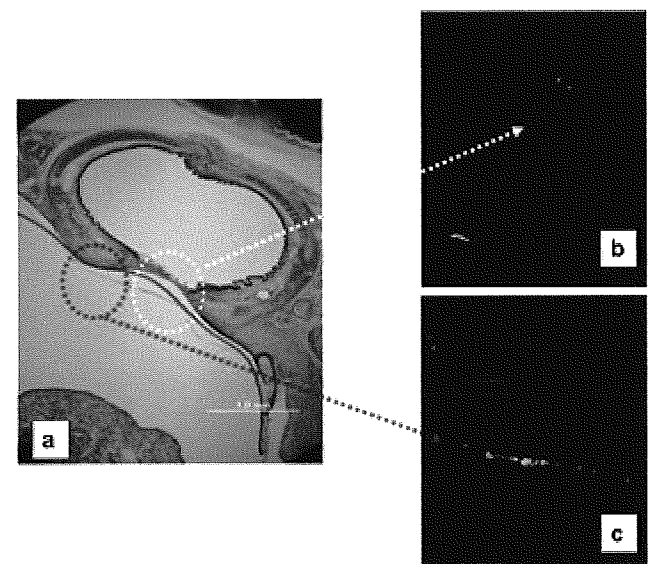


図6. type B (術後7日モデル)

- a：HE 染色
- b：免疫染色（緑色：GFP 陽性細胞、赤色：核染色）

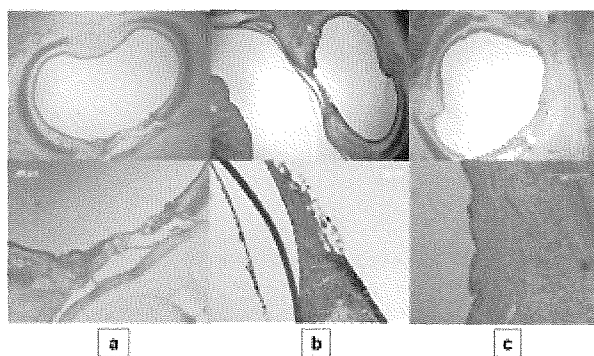


図7. type B (HE 染色)

a : 術後3日 b : 術後7日 c : 術後30日

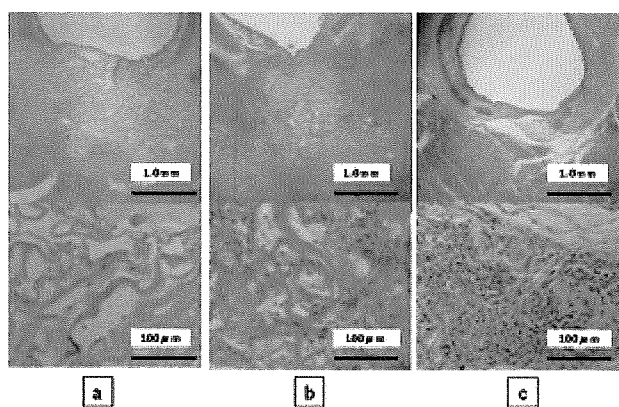


図8. コラーゲンスポンジの変化 (HE 染色)

a : 術後3日 b : 術後7日 c : 術後30日