

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

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

近年、細胞の移植を伴う再生医療が現実のものとなってきている。そこで、喉頭癌に対する手術後の再建に、人工材料と自己の細胞を利用した組織工学的手法が応用可能であるか検討する。

A. 研究目的

われわれがすでに、輪状軟骨や気管への臨床応用を始めている素材であるコラーゲン被覆ポリプロピレンと自己から得られた骨髄由来間葉系細胞群を用いて、喉頭組織の再生が可能であるか検討した。

B. 研究方法

ビーグル成犬2匹を用いた。

上腕から骨髄液を採取し、(図1) 培養液を含む培養ボトルへ播種する。(図2)

細胞を継代し、 10^6 – 10^7 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。(図3) 上が頭側、右が左側。

汎用プラスチックである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る。(図4) この材料を吸収糸にて創部に固定した。(図5)

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。

C. 研究結果

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。

モデル動物の喉頭内視鏡写真。(図6)

術前、(図6-A) 術後7日、(図6-B) 術後2週間、(図6-C) 術後2ヶ月。(図6-D)

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。

D. 考 察

これまで、細胞移植を用いた組織工学的手法により、切除後喉頭組織の再生を試みた。

重篤な合併症はみられなかったが、1例では移植物の脱落を生じた。

今後、症例の追加、長期経過の観察、組織学的所見の追加などを行う予定である。

また、細胞培養の際に問題となる添加血清の問題、至適細胞数の決定、細胞の再生への寄与機転の解明などが今後必要である。

E. 結 論

自己骨髄由来間葉系細胞を用いた組織工学的手法により、これまで術後再建が困難であった声帯隆起を中心とした喉頭内腔面の再生を試みた。

2例中1例に良好な声帯様組織を含む上皮化を認めた。今後更なる実験の追加、詳細な検討が必要である。

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

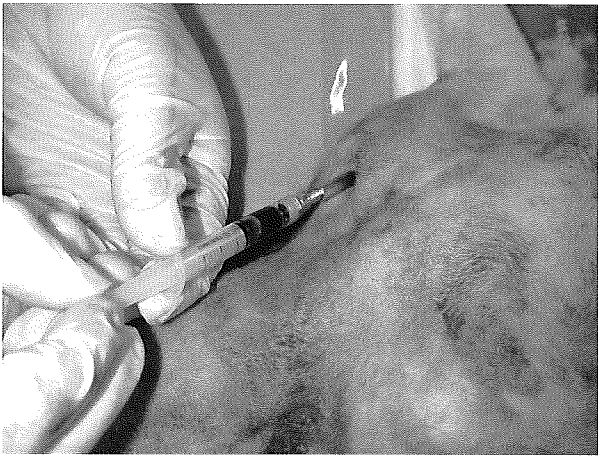


图 1

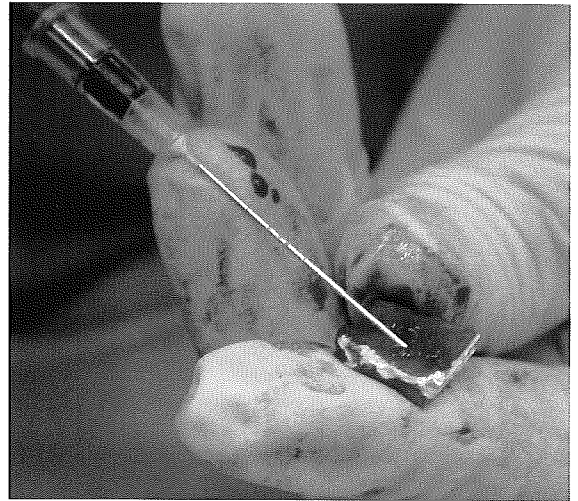


图 4

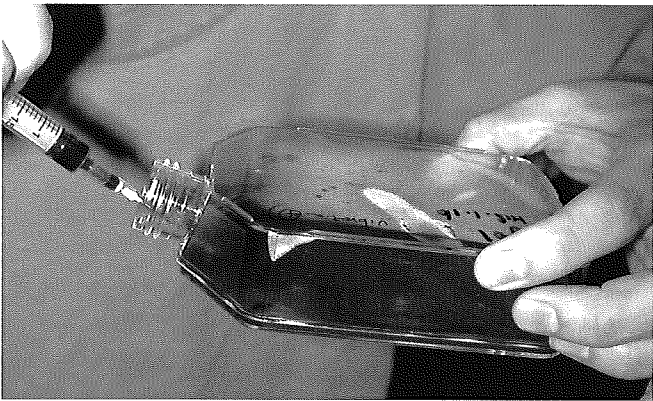


图 2



图 5

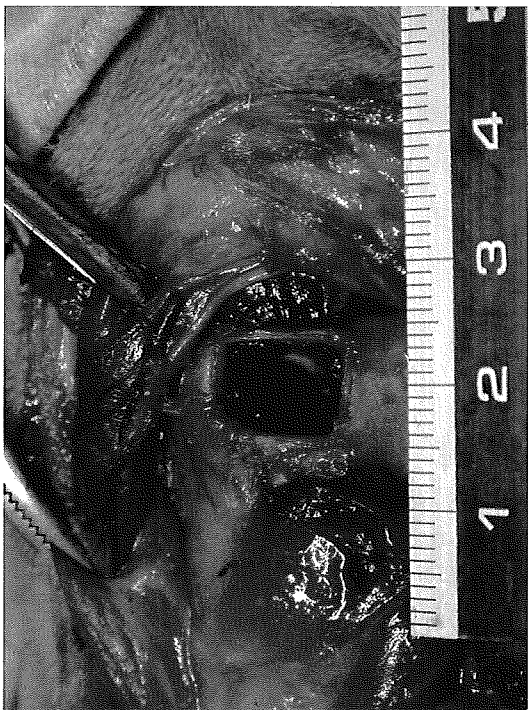


图 3

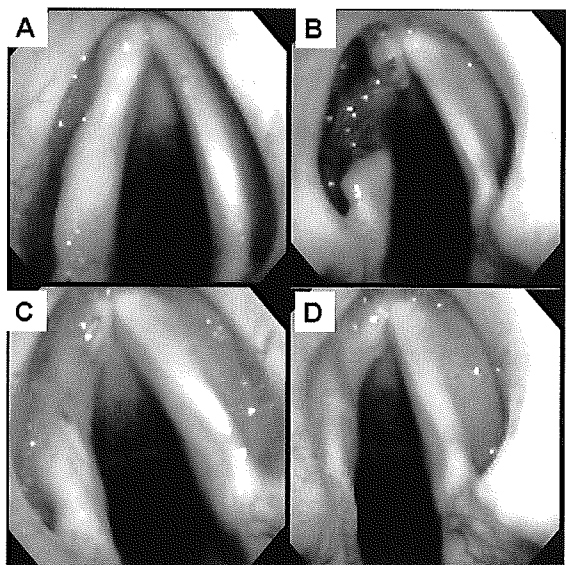


图 6

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—

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 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

傷害された声帯再生を目的に、コラーゲン内で3次元培養された自己骨髄由来細胞の移植を試み、動物実験で良好な再生結果を得てきた。声帯のように上皮層、粘膜固有層、筋層といった複合組織で形成された臓器の再生に対し、移植細胞がどのように寄与しているかを検討した結果、移植細胞は障害組織を構成する2種類以上に細胞、すなわち上皮系細胞や筋系細胞に分化していることがわかった。

A. 研究目的

傷害組織に移植された多分化能を有する間葉系幹細胞を含む骨髄由来細胞が組織再生にどのようにかわるかを検討した。

B. 研究方法

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週間で喉頭の蛍光組織学的検討として、ケラチンとデスミンの発現の有無を観察した。

C. 結果

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を発現しているもの、および筋系のマーカーであるデスミンを発現しているなどが観察された。

D. 考察

萎縮や瘢痕といった障害声帯に対する治療として、近年さまざまな方法がなされている。この治療の多くは、何らかの物質を声帯に充填する方法である。充填するものとしては、生体組織と人工材料とに分けられ、生体組織としては、自己の脂肪、筋膜、異種組織としてのコラーゲンなどがあり、人工材料にはゴアテックス、ハイドロキシアパタイトなどが用いられている。

声帯は大きくは3層構造をなしている。すなわち浅い部位から上皮層、粘膜固有層、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、粘膜固有層である。声帯萎縮、瘢痕などのおもな障害部位はこの粘膜固有層で、ときにその下層の筋層にまで及ぶ。

組織が傷害を受けるとその程度にもよるが、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瘢痕を残して治癒する。声帯も例外ではなく、傷害部位はこのような治癒過程をたどる。すなわち、傷害部位は線維性組織の進入を受けるとによって再生の場が失われてゆくと考えられる。

これに対して、われわれは傷害された声帯にコラーゲン内で3次元培養した自己骨髄由来間葉系細胞（BSCs）を移植した。1）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、及び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固有層、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。実際に、電気メスで声帯の筋層にまで及ぶ傷害を与えたイヌの声帯モデルで、コラーゲン内で3次元培養したBSCsの移植を行った側とコラーゲンだけを投与した側では、約9ヶ月の観察期間で、声帯の形態面から両者に非常に大きな差が生じ、コラーゲン内で3次元培養したBSCsの移植の有効性が確認された。また、High speed videoによる声帯振動の観察から、形態的再生のみならず機能的にも良好な再生が得られていることが確認できた。さらに、移植した細胞が声帯およびその周辺の上皮系細胞や筋系細胞に分化していることが認められ、間葉系幹細胞移植が傷害声帯の有効な治療法として期待できると考えられる。2）この研究の意義は、これまでは単一の細胞でできた組織の再生が主体であったが、声帯のような複数の細胞で構成された組織が、組織学的手法で再生しうることが証明されたことにある。

また、上記の細胞移植のほかにHGF（hepatocyte growth factor）などの成長因子の投与やヒアルロン酸の

投与による瘢痕声帯の治療などの試みも行っている。3、4)

E. 結 論

間葉系幹細胞移植が傷害声帯など複数の組織で構成された臓器再生に有効な治療法として期待できると考えられた。

F. 参考文献

1. Kanemaru S, Nakamura T, Kojima H, Magruffov A, Omori K, et al: Regeneration of the vocal cord using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112: 915-920, 2003
2. 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 the Autologous Bone Marrow Derived Stromal Cells Implanted in the Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114: 907-912, 2005
3. Hirano S, Thibeault S, Bless DM., Ford CN, Kanemaru S : Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in rat and rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111: 661-666, 2002
4. Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, et al: Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113: 777-785, 2004

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 金丸眞一：頭頸部領域の再生医療。頭頸部癌, 31(3)：402-407, 2005
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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) 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)
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

米国特許出願中 第10/380,642号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. a,b

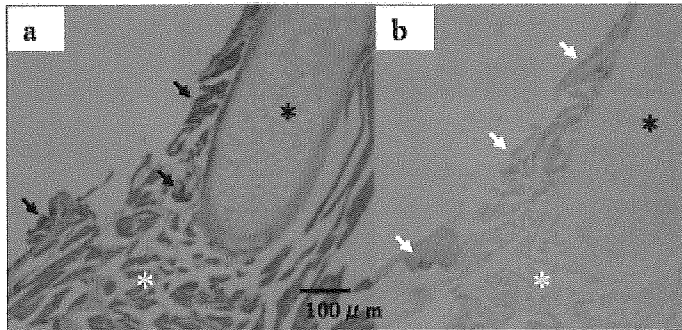


図1. 黒星印：披裂軟骨、白星印：後輪上披裂筋、黒矢印：移植細胞、白矢印：ケラチン陽性細胞

図. 2

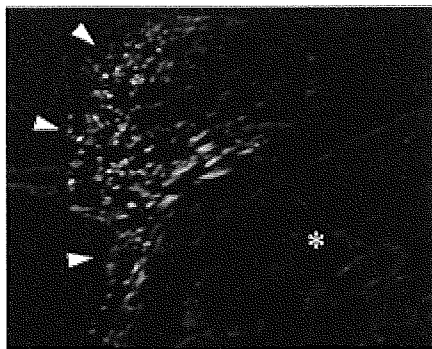


図2. 白星印：後輪上披裂筋、白矢頭：GFP 陽性（移植）細胞

図3. a,b,c

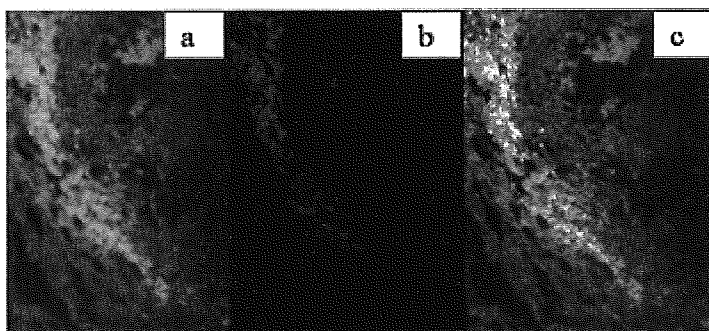


図3.
a：GFP 陽性細胞、b：デスミン陽性細胞、c：両者の重ねあわせ画像
移植細胞で筋系細胞の性質を有した細胞は、黄色の細胞として観察されている。

人工材料と自己筋膜を用いた声帯切除後の組織再生

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 中村 達雄（京都大学再生医科学研究科臓器再建応用分野）

金丸 眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究要旨

喉頭癌切除術後は、従来筋弁、筋皮弁を主とした自己組織によって再建されてきた。

しかし、誤嚥の防止や救命を主眼においた治療であるため、時に会話が不可能であるほどの嗄声の後遺症として残り、治療後のQOL（Quality Of Life）は著しく低下する。

今回われわれは、喉頭部分切除モデル動物を作成し、再生医療の技術を用いて、喉頭組織を再生させ得るかどうかの研究を試みた。

A. 研究目的

われわれがすでに、輪状軟骨や気管への臨床応用を始めている素材であるコラーゲン被覆ポリプロピレンを用いて、喉頭組織の再生が可能であるか検討した。

B. 研究方法

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。（図1）上が頭側、下が左側。

汎用プラスチックである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。（図2）さらに大腿筋膜にて先の材料を包み、（図3）創部に固定した。（図4）

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。

C. 研究結果

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。

典型的なモデル動物の喉頭内視鏡写真。（図5）

術前、（図5-A）声帯切除、（図5-B）材料移植後、（図5-C）術後3週間。（図5-D）

このように、完全に切除した声帯と喉頭室の粘膜が上皮化し、きれいに再生されている事がわかる。他の2例の所見と総合すると、術後1週間までは筋膜が残存し、徐々に白色調に変化する。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も示唆される。

まだ、手術後短期間しか観察できていないため、今後

の長期成績、組織学的所見などについても検討を加える予定である。

D. 考察

これまで、動物実験で成し得なかった、声帯を含む甲状軟骨部分切除モデルにおいて、声帯様隆起を含む粘膜上皮の再生を観察できた。

重篤な合併症などはまったくみられず、当術式の応用の可能性が期待される。

今後、症例の追加、長期経過の観察、組織学的所見の追加などを行う予定である。

E. 結論

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

短期成績ではあるものの、声帯様構造をふくむ上皮の再生所見が得られた。

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



图 1

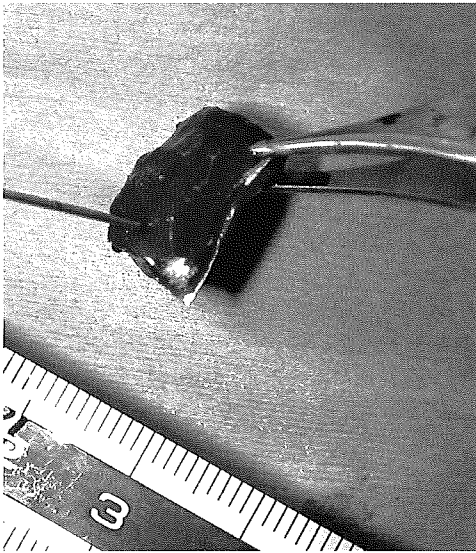


图 2



图 3

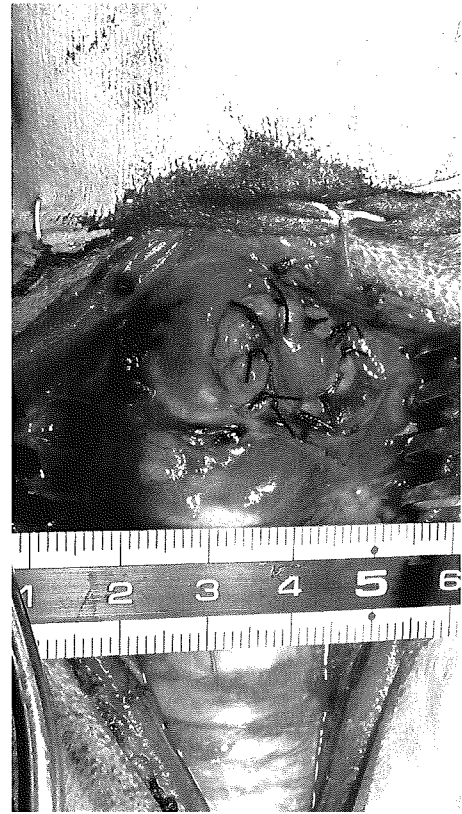


图 4

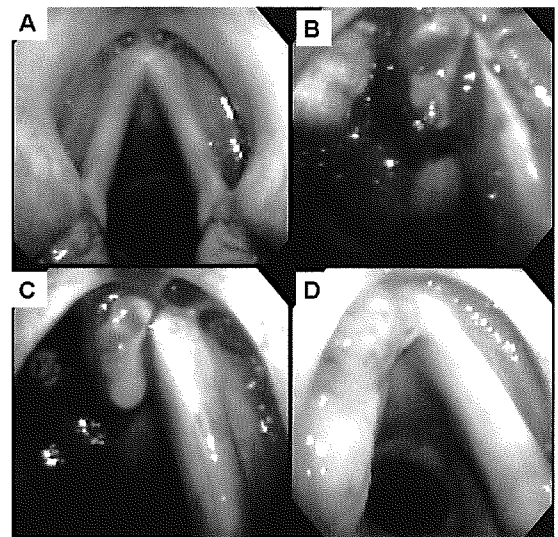


图 5

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 —

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 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

反回神経は最も機能的再生が困難とされている脳神経であるが、われわれは、人工神経チューブ（PGA チューブ）を開発し、大型動物（イヌ）による実験を重ね、機能的に良好な成績を得てきた。しかし、なぜ自家神経移植より PGA チューブの方が良好な再生結果が得られるかは不明であるため、イヌの総腓骨神経を切除して自家神経移植と PGA チューブによる再建を行い、術後 1、2、8 週でその部分を取り出し、組織学的、電気生理学的検討を行った。その結果、自家神経移植群では高率に神経腫瘍の形成が認められる一方で、PGA チューブ群では、神経腫瘍の形成はなく機能的にも良好な再生結果が得られた。これは、移植された自家神経そのものが再生神経の伸長を妨げる障害物として働く一方で、PGA チューブは中空構造で物理的抵抗がなく、発芽した成長円錐やその後の軸索の伸長が妨害を受けることのない良好な環境を提供していることが原因ではないかと考察した。

A. 研究目的

癌や外傷によって切除された末梢神経の再生治療の第一選択は自家神経移植であるが、神経採取部位の後遺症のみならず、実際の成績は非常に悪く、とくに頭頸部に分布する顔面神経や反回神経の機能的再生は絶望的である。これは、再生した神経線維が過誤支配することが最大の原因と考えられている。

これに対してわれわれは、ポリグリコール酸とコラーゲンによる人工神経チューブ（PGA チューブ）を開発し、大型動物（イヌ）による実験を重ね、機能的に良好な成績を得てきた。これを背景に、PGA チューブによる臨床応用を開始している。本研究では、この臨床応用のさらなる発展とより良好な機能再生のためのチューブの改良をめざして、いかにして過誤支配を防止するかを目的に神経再生の過程を評価検討する。

B. 研究方法

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 1 cm 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（ $n = 4$ ）、2（ $n = 5$ ）、8（ $n = 20$ ）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（ $n = 5$ ）し、機能的評価を行った。

C. 結果

[組織学的評価]

1) 自家神経移植群

自家神経移植一週間後、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、ギャップを越えてつながっている神経線維は一例も観察されず、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。

2) PGA チューブによる神経再建群

神経再建 1 週間後は、自家神経移植群と同様に、ワーラー変性が神経切除両断端で観察された。2 週間後、ギャップを越えてつながっている神経線維は観察されなかったが、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]

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。

D. 考察

傷害された神経再建に最も有効な手段とされているのは、直接吻合か自家神経移植である。前者は吻合に際して神経に余分な張力がかからないことが前提となり、そのギャップが非常に小さいごく少数の症例に限られる。

後者では、再建の対象となる神経の多くは運動神経で、移植の材料として採取される神経の多くは感覚神経であり、適切な太さの神経を選択する必要がある。再建材料としての感覚神経の切除によって、支配領域の感覚脱出という後遺症は必発である。また、複数の神経を再建する場合、採取する神経の範囲とそれに伴う後遺症も広範囲に及ぶ。さらに、移植吻合部位に神経腫瘍が発症することもあり、疼痛のために再度神経切除術を施行する場合すらある。これに加えて、自家神経移植による、運動機能の回復成績はさほど良好とは言えず、特に過誤支配の予想される反回神経や顔面神経などでは、良好な再生はほとんど望めない。したがって、これらの神経で再建が行われる場合も、機能回復というよりは支配筋の萎縮防止を目的にしているのが現状である。

これに対してわれわれは、これまで *in situ* Tissue Engineering の基本概念に立脚して PGA (Poly-glycolic acid) チューブという人工神経を用いて、切除した犬の反回神経が機能的に再生しうることを報告してきた。^{1,2)} PGA チューブは、ポリグリコール酸を主成分とした管状構造物の表面を豚皮由来の I 型 III 型コラーゲンをそれぞれ 70%、30% の比率で混合したもので被覆し、さらに管腔内に同じコラーゲンのスポンジを充填したものである。ポリグリコール酸は、最も簡単な構造式を持つ高分子化合物で、生体内で加水分解され約 4 ヶ月で完全に消失する一方で、一定期間その形状を保持している。これまでにわれわれは、数種類の PGA チューブを作成し実験を重ねてきたが、臨床応用を念頭に置き、大量生産が可能でかつ物理的強度にすぐれたものとして現在のタイプに至った。

末梢神経は切断されるとそのシグナルが中枢側の神経細胞体に伝達され、再生が開始される。数時間以内にその切断端の Ranvier 絞輪が膨大化して形成される先端膨大部から発芽し、成長円錐を先頭に裸の軸索が末梢に伸長する。その後 schwann 細胞が再生軸索に沿って遊走し、さまざまな因子を放出しながら神経線維の伸長をリードする。これらの神経再生の過程においてもっとも重要なことは、発芽した成長円錐やその後の軸索の伸長が妨害を受けることなく、目的とする末梢標的器官に最短時間で達することである。

これまで、犬を用いた動物実験のデータから、自家神経移植では非常に高率に再建部分に神経腫瘍が形成されることがわかってきた。これは、移植神経が waller 変性を起こして再生軸索の通路を提供する以前に中枢側神経切断端からの再生が開始されるため、移植神経が再生軸索の伸長の通路を塞ぐ障害物となるためではないかと考えられる。すなわち、行き場を失った再生軸索やそれに続く schwann 細胞、神経線維はその周囲で腫瘍を形成する。このような環境の下では、標的臓器に到達できる神経線維は非常に少なく、遅くも到達できてもそれまでに非常に時間がかかり、標的臓器の萎縮や過誤支配のために機能的回復が不可能となることも予想される。とくに反回神経などは、①径が非常に小さい、②中枢から標的臓器までの距離がながい、③一束の神経内に声帯の開閉

という拮抗する運動を支配する神経線維が混在する、④標的臓器である筋が非常に小さい、といった再生に不利な条件がそろっている。

Uno ら³⁾は、末梢神経が傷害されたシグナルを受けた中枢側の神経細胞体における代謝活動の変化を検討し、再生において重要な役割を果たすと考えられる GAP-43 (growth factor associated protein-43) の産生の変化に注目している。それによるとラット反回神経切除後の疑核運動神経細胞体では GAP-43mRNA 発現増加が認められるが、1 週間をピークに約 2 週間程度しか持続せず、その他の末梢神経の GAP-43mRNA 発現増加の持続期間と比較して反回神経の再生能力が非常に弱いことを指摘している。したがって、障害を受けた早い時期にできる限り良好な再生環境を提供することが重要であると考えられる。

以上の研究成果を踏まえ、現在 PGA チューブによる神経再生の臨床応用を展開中である。まだ評価できる症例数は少ないが、その一部を表に紹介した。

E. 参考文献

1. Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, et al: Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112: 492-498, 2003
2. Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, et al: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen(PGA-collagen)tube. *Brain Res* 1027: 18-29, 2004
3. Uno T, Shogaki K, Bamba H, Koike S, Naruse Y, et al: Growth associated protein-43 mRNA expression in nucleus ambiguus motoneurons after recurrent laryngeal nerve injury in the rat. *Acta Otolaryngol* 123: 292-296, 2003

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 金丸眞一：頭頸部領域の再生医療。頭頸部癌, 31(3)：402-407, 2005
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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) 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)
 - 2) 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)
 - 3) 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)

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

表

神経：	顔面神経					鼓索神経							反回神経		
症例：	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
結果：	◎	×	◎	×	-	×	◎	○	○	×	-	-	○	-	-

◎：極めて良好、○：良好、×：不良、-：判定不能

多血小板血漿 (PRP) を使用した甲状腺手術創の治癒促進

分担研究者 松塚 崇 (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

頸部やその他の露出部の皮膚潰瘍・術後創の縫合不全などは治癒に難渋し、隠しにくいいため注意を要する。現在、多血小板血漿 (PRP) を使用した組織再生の臨床使用が試みられている。自己血由来の血液成分を用いて創部の治癒機構を促進させることができるとされ、その安全性・方法の合理性については検討がなされている。今回、甲状腺腫瘍の症例に対し本方法を行ったので報告する。PRP には PDGF (platelet-derived growth factor) や TGF- β (transforming growth factor- β) など創傷治癒に関わる成長因子が濃縮された状態となっている。本方法はこれらの創傷治癒因子が自己から抽出するので安全であり、術後創治癒に有用であると考えられる。

A. 研究目的

頸部やその他の露出部の皮膚潰瘍、術後創の縫合不全などは、治癒に難渋し隠しにくいいため注意を要する。さらに、骨（上顎や下顎）、軟骨を切除したり、切断する場合は、露出部の変形を生じたり、縫合不全に悩まされることも少なくない。放射線治療後に生じることがある皮膚の潰瘍や腐骨病変では治癒が遅延することが多い。また、鼓膜のように欠損があると機能が不完全となる器官もある。このように皮膚や骨病変における創傷治癒は日常診療における重要な課題であり、これを改善することが必要である。

現在、多血小板血漿 (PRP) を使用した組織再生の臨床使用が試みられている。海外では形成外科領域での創部に使用されており、本邦においては歯科口腔外科領域におけるインプラント埋め込み時の使用の報告がある。自己血由来の血液成分を用いて創部の治癒機構を促進させることができるとされ、その安全性・方法の合理性については検討がなされている。

今回の研究はこれらの使用法の追試を含めて、耳鼻咽喉科、皮膚科、形成外科、歯科口腔外科領域の創治癒改善を図ることが目的である。

B. 研究対象および方法

福島県立医科大学付属病院耳鼻咽喉科で術前にインフォームドコンセントが得られ鼓膜を含む皮膚切開を要する手術を受ける患者を対象とした。なお、本研究は福島県立医科大学倫理委員会の承認を受けている（平成16年6月30日）。

方法は以下のとおりである（図1）。

1. 採血：適切な静脈に穿刺し、充分量の自己血を血液パックあるいは採血管に採血した。
2. 血小板と白血球層の調整：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。

3. 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。

4. 投与：1. から3. で得られた製剤と市販または自己トロンビン（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。

5. 観察：至適投与量の設定、創傷治癒、有害事象の有無を評価した。

C. 研究結果

[準備実験 (表1)]

ボランティア1名より末梢血を採血し、PRP 作製過程における血小板数を確認した。

はじめに抗凝固剤である CPDA 液（カーミ® CA 液）をあらかじめ 2 ml 吸引したシリンジで末梢血を 20 ml 採血した。末梢血の血小板数は $8.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。

次に末梢血を 1,500 rpm で 10 分間遠心し血漿層（上層）と赤血球層（下層）とに分離し、上下の層の間にある細胞層を含めて上層の血漿を吸引採取した。この血漿中の血小板数は $8.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。

最後に採取した血漿を 3,000 rpm で 15 分間遠心し、上層の血漿を下層を 2 ml 残して吸引除去し、残った血漿を PRP とした。PRP 中の血小板数は $26.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。末梢血より PRP を作製した結果、血小板数にして 3.0 倍の濃縮を確認した。

[臨床試験]

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。

このうち甲状腺手術を行った2症例を提示する。この

2例はいずれもこれまでに癬痕ケロイドを生じていた。

[症例1 (図2)]

27歳女性。大腿に外傷の既往があり、創は肥厚性癬痕を生じていた。全身麻酔下に甲状腺左葉切除術を施行した。摘出した腫瘍径は45×40mmであった。腫瘍の永久病理組織診断は濾胞腺腫であった。

術前に採血した末梢血20mlより作製したPRPの血小板数は $44.9 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。閉創時にPRP 2mlに2%塩化カルシウム液0.5mlを添加し、凝固物を除いた液成分を創部に塗布し、その後1日間創部をガーゼで被覆し湿潤状態とした。術後創部には発赤や腫脹などなく、術後5ヵ月経過しているが肥厚性癬痕など生じず経過順調である。

[症例2 (図3)]

29歳女性。帝王切開術を受けた既往があり、創は肥厚性癬痕を生じていた。全身麻酔下に甲状腺左葉切除術を施行した。摘出した腫瘍径は60×45mmであった。腫瘍の永久病理組織診断は濾胞腺腫を一部含む腺腫様甲状腺腫であった。

術前に採血した末梢血20mlより作製したPRPの血小板数は $62.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。閉創時にPRP 2mlに2%塩化カルシウム液0.5mlを添加し、凝固物を除いた液成分を創部に塗布し、その後1日間創部をガーゼで被覆し湿潤状態とした。術後創部には発赤や腫脹などなく、術後7ヵ月経過しているが肥厚性癬痕など生じず経過順調である。

D. 考 察

耳鼻咽喉科における手術後に代表される顔面・頸部の創は、通常露出する場所になることが多く、その創の処置には注意を要する。外科医としては手術を行ったことが限りなく判別できない状態を追求すべく手術手技を改善させて来ている。特徴的な例として甲状腺の手術における内視鏡の使用があげられる。胸部を皮膚切開しこより患部へアプローチする方法で、頸部に切開創をつくらぬ目的であるが、手術時間は長くなること、適応は一般に良性疾患に限られるという短所をもつ。また、耳鼻咽喉科の手術において、骨、軟骨を切除したり、切断したりする機会がある。その際に露出部の変形や、縫合不全に悩まされることも少なくない。このように耳鼻咽喉科領域では創傷の完全な治癒が手術全体の評価の中でも重要な要素となっている。

多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma, PRP) とは、濃縮された血小板と白血球を含む血漿であり、一般には血小板製剤を作製する工程のひとつである。血液を遠心分離すると密度の低い順に少血小板血漿 (Platelet-Poor Plasma, PPP)、PRP、血球層の3つの層に分けることができる。

血小板の中にあるアルファ顆粒には血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、トランス

フォーミング成長因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) が含まれており、加えて血小板中にはインシュリン様成長因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) が存在する¹。

PDGFは皮膚線維芽細胞に対して走化性作用と増殖促進作用の両者を有する細胞増殖因子で、創傷治癒早期における皮膚線維芽細胞の遊走に関与していると考えられている²。

TGF- β はコラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外基質の産生を強力に誘導する³。

IGF-Iは、骨芽細胞へ分化する細胞の分裂を促進し骨芽細胞を増殖させ、骨形成を活性化させる。

PRPは多数の血小板が集められており、言い換えれば血小板に含まれる多くの成長因子、すなわちPDGFやTGF- β 、IGF-Iなど創傷治癒に関わる成長因子が濃縮された状態となっていることになる。すなわちPRPを創部に投与することにより治癒が促進されることが予測される。

PRPを作製するにあたり、血液成分が必要となる。一般に血液製剤を使用することはHBVやHCVなどの肝炎ウイルスやHIV感染、血液型不適合やGVHDなど血液製剤特有の危険性がありその取扱いは慎重を要する。しかしながら今回の方法では、自己血を採取してPRP製剤を作るのでそれらの危険は回避できる。また、今回PRPを凝固させる際に塩化カルシウムを添加しているが、トロンビンを添加して作製する方法もある。トロンビン添加は凝固までの時間は短い利点がある一方で、トロンビンはそれ自身が血液や組織から抽出した製剤であるため塩化カルシウムを添加する方法の方が安全性は高く、今回は塩化カルシウムを添加して使用した。

PRPの分離には1回遠心しPRPをbuffy coatとして吸引するsingle spin法と、1回遠心後PPPとPRPを吸引し2回目遠心しPRPを分離するdouble spin法がある。single spin法は遠心処理が1回で、より短時間での製剤作製が可能である。一方、double spin法は血小板成分の回収率が高まるため、PRPをより高濃度で作製できる。今回はdouble spin法を選択し、準備実験では末梢血より血小板量にして3倍に濃縮したPRPを作製することができた。

今回対象として提示した2症例はともに甲状腺腫瘍の手術例であり、今回の治療の前に別の創部で肥厚性癬痕を生じている。肥厚性癬痕の本態はケロイドと同様で真皮中深層に膠原線維が増殖、言い換えれば創傷治癒が亢進した病態であり、正常な創傷治癒が促進されれば予防が期待できる。2症例とも現在のところ経過順調で肥厚性癬痕を生じていない。

創傷治癒における細胞増殖因子の中には塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) のようにすでに市販化された製剤 (一般名:トラフェルミン、商品名:フィブラストスプレー) もある。bFGFの場合、悪性腫瘍の術創にはその再発の危険があるために使用を禁じることが添付文書内に記されている。今回は

検討の対象には悪性腫瘍症例は含まれてはいなかったが、PRPを使用するにあたりその投与対象には注意が必要かもしれない。

E. 結 論

手術後の創傷治癒の問題は、患者の大きな関心事であり、耳鼻咽喉科領域のような露出部の場合は特に重要である。血小板にはPDGFやTGF- β などの創傷治癒に関わる成長因子が含まれている。血小板を濃縮した血漿、すなわちPRPにはこれらが多く含まれていることとなる。

われわれは活性化したPRPを皮膚などの切開創に塗布し創傷治癒を促す工夫を行った。PRPは自己血から分離して作製するため安全性が高く、PRPを活性化の際に今回は塩化カルシウムを使用しより安全性に配慮した。今回提示した2症例は肥厚性瘢痕の既往をもつ甲状腺腫瘍の手術例であり、現在のところ経過順調である。

今後症例を重ねるとともに創部の経過を観察しその有用性を確かめていく予定である。

F. 参考文献

1. Marx RE: Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering* 5: 71-82, 1999
2. Seppa HE, Grotendorst GR, Seppa S, et al: Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92: 584-588, 1982
3. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al: Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4167-4171, 1986

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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回甲状腺外科学研究会 (2005. 10. 27-28, 神戸)

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

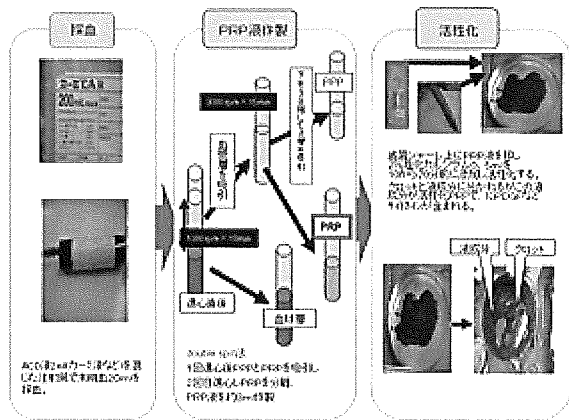


図1
PRPの作成方法

表1
末梢血からPRP作製の過程における検査結果

	採血時	血漿分離後	PRP
全体量	20ml	13ml	2ml
白血球数 [$\times 10^9 / \text{l}$]	3.8	1.5	11.3
ヘモグロビン [g/dl]	9.0	1.8	11.1
血小板数 [$\times 10^4 / \text{l}$]	8.8	14.0	26.5

図2

症例1：27歳女性

- A：全身麻酔下に甲状腺左葉切除術施行した。
- B：術後7日。創部には発赤や腫脹などなし。
- C：術後5ヵ月。肥厚性瘢痕など生じず経過順調。
- D：今回の手術の前に存在していた下腹部の肥厚性瘢痕。

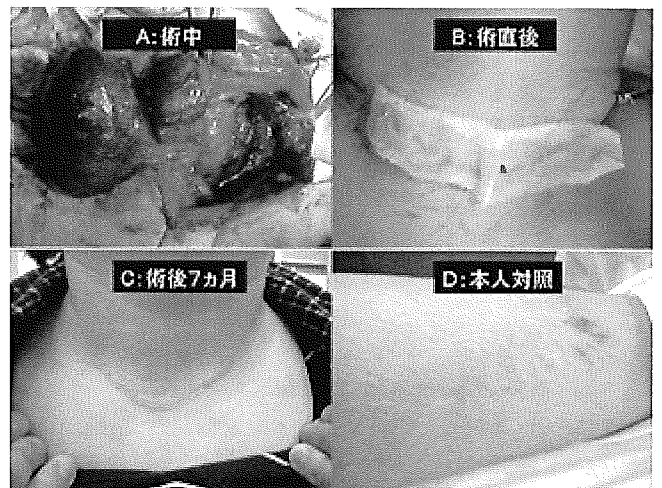
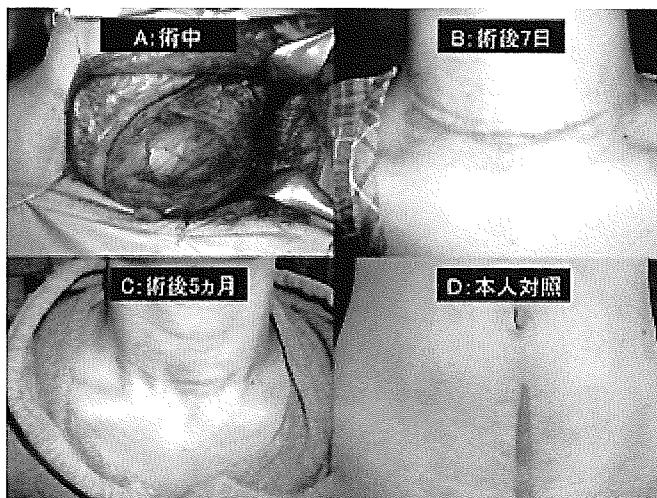


図3

症例2：29歳女性

- A：全身麻酔下に甲状腺左葉切除術施行した。
- B：術直後。創部にPRPを塗布した後、ガーゼで被覆し湿潤状態とした。
- C：術後7ヵ月。
- D：今回の手術の前に存在していた大腿部の肥厚性瘢痕。



気道の再生治療

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

気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再生させることを目的として、組織工学的手法による気道再生のトランスレーショナルリサーチを行ってきた。本研究では動物実験による気管再生に関する長年の研究成果の蓄積をふまえて、「喉頭・気管の再生治療」について倫理委員会の承認を得て、主任研究者らは本再生治療を世界に先駆けて臨床応用を始め、現在までに6例に行っている。自己組織再生型の人工材料、手術手技について、またそれぞれの術後経過を述べ、今後の課題を明らかにする。

A. 研究目的

気道への悪性腫瘍の浸潤や炎症性疾患などで病変を切除した後の再建は難しく、複数回の複雑な手術や侵襲の大きな治療が行われており、未だ決定打がない状況である。主任研究者らは気管欠損部の組織再生をはかるために、*in situ Tissue Engineering* の手法を用い、自己組織再生型の人工材料を足場として移植する技術を開発し、動物実験で有効性と安全性を確認してきた¹⁻⁴⁾。本研究の目的はこの技術をヒトに臨床応用し、世界に先駆けて気管の再生医療を行うことで、低侵襲の医療の実現と医療費の削減をめざすことにある。さらに、本再生治療の今後の課題を明らかにする。

B. 研究方法

1. 人工材料の開発

管状の枠組みを保持するためポリプロピレン製のメッシュを管状にし、これを同質の材料でリング状に補強した。さらに組織再生の足場としてその周囲にコラーゲンスポンジを付加して、自己組織再生型の人工材料を開発した²⁾。ポリプロピレン製メッシュは特定保険材料として従来から胸壁や腹壁の補強に臨床に使用されているもので、開発の過程で生体に取り込まれるメッシュの至適な編み目の大きさを決定し260 μ mとした。コラーゲンスポンジは医療用のブタ皮膚由来のI型およびIII型コラーゲンを用いた。本人工材料ではコラーゲンとメッシュがはずれにくいようにするために、コラーゲン液をメッシュ上に塗布した上で、140 $^{\circ}$ C、24時間の熱架橋を加えた。

2. 動物実験の概要

ビーグル犬を用いた動物実験で、本人工材料を気管欠

損部に移植し、最長5年の観察で、気管内腔の良好な上皮化が得られ、気道としての管腔も十分保たれている。組織学的評価では、このようにしてできた管状の組織管に、メッシュ内に結合織が入り込み、内腔面は再生した気管上皮で覆われ電子顕微鏡で線毛を確認した。軟骨組織は再生しなかったが、再生気管の硬度については機械的圧縮試験を行い生体気管と同程度であった。少数例で肉芽やメッシュの露出を認めたがいずれも軽度で呼吸には問題なかった。生体気管との接合部も安定した組織移行がみられ、長期に安全に使用できることがわかった。最長5年の観察で、気管の上皮再生は良好で問題なく経過している³⁾。これらのことから、自己組織再生型の人工材料は頭頸部癌の気道浸潤、声門下や気管の炎症性狭窄などにおける気管、輪状軟骨切除後の再建に臨床応用可能と考えられた。

3. 倫理的配慮

以上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。

C. 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た。

1. 悪性腫瘍による喉頭気管浸潤

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(図1)。

手術は、全身麻酔下に頸部襟状切開を加え、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(図2)。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射器で注入し、気管欠損部をパッチする形で縫合した。

術後の気管内視鏡所見を図3に示す。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。

手術は全身麻酔下にて行い、甲状腺腫瘍を露出した。腫瘍は右反回神経を巻き込んでおり、神経切断を余儀なくされた。腫瘍は第1-2気管輪に浸潤しており、約1/2から1/3周切断した。その欠損部は10mm×12mmで、本人工材料をトリミングして1/2周分の材料に自己の血液を注射器で注入し、気管欠損部を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年に局所再発、CTにて腫瘍は輪状軟骨、気管に浸潤が認められた(図4)。

手術は全身麻酔下にて行い、残存した前頸筋を剥離していくと甲状軟骨、輪状軟骨が現れた。輪状軟骨の一部が破壊され、第1-2気管軟骨も破壊されており、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。腫瘍を剥離し、基部を含む輪状軟骨下縁、第1-2気管輪を半周切断した。その欠損部に本人工材料をトリミングして2/3周分の材料に自己の血液を注射器で注入し、気管欠損部をパッチする形で縫合した(図5)。

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はほぼ上皮化し、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(図6)。3-DCTにて術前と術後を比較し人工材料の被覆状況が確認できた(図7)。

2. 喉頭気管狭窄

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(図8)、CTでは気管内腔の90%狭小化を認めた。

手術は局所麻酔下に気管切開を行った。後日創部感染

がないことを確認した上で全身麻酔下に狭窄組織除去術を行い、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(図9)。本人工材料を25mm×17mmにトリミングしたものに自己の血液を浸透させパッチする形で縫合固定した(図10)。

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ヵ月で人工材料に一致して肉芽造成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。3-DCTにて術前と術後を比較し人工材料の被覆状況が確認できた(図11)。

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手術を施行されているが、再狭窄をきたしTチューブ挿入となった。

手術は、先に全身麻酔下に声門下瘢痕を除去したあと右頬粘膜を採取し移植を行い、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前頸部に喉頭瘻・気管孔を取り巻くように縦切開を加え、前頸筋を確認し甲状軟骨より鋭的に剥離し甲状軟骨を可能な限り露出させた。瘻孔部の皮膚をトリミングし瘻孔内腔の肉芽を気管軟骨とともに除去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を25×24mmに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はほぼ上皮化し、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月に飲酒後転倒した際、ガラスに頭から突っ込んでしまい、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閉鎖術を施行し、以降レティナ管理となった。当科受診時、喉頭所見では声帯に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。声門下には厚い瘢痕組織を認めた。

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、全身麻酔下に前頸部の瘢痕と瘻孔の周囲に皮膚切開をおき瘢痕除去から行った。瘢痕を鋭的に切離し最終的な甲状軟骨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を30×25mmに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ヵ月で人工材料に一致して肉芽造成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

気道に悪性腫瘍が浸潤した例や気道の炎症性疾患、気道の狭窄、外傷例などで病変を切除した際、気道欠損部の再建が問題になる。これには、気道としての硬度を持った粹組みと内腔粘膜を同時に再建する必要がある。従来、硬性組織には各種の軟骨、骨、人工材料などが、内腔面組織には皮膚や粘膜などが用いられたが、二期的にしかも他部位の手術が必要である。また、気管切除後の端々吻合術は、縫合不全の可能性や術後の挿管および頸部前屈体位など解決すべき問題点が残されている。

1960年代から人工気管については多くの研究が行われてきたが、現在まで安心して臨床使用できる人工材料は開発されていない。Nevilleらの人工気管が一時的に臨床応用されたが⁵⁾、気管断端との接合部の離開が起こり現在は使われていない。中村らは1985年頃より様々な人工気管を試作してきたが、1995年、自己組織が再生するようにデザインした人工材料を開発し、動物実験で良好な気管再生を実現できることを報告した²⁾⁻⁴⁾。同様の人工材料を輪状軟骨の切除後の欠損モデルに移植し、再生組織は正常と同等の硬さを持ち、かつ良好な上皮化が得られることがわかった¹⁾。

臓器再生には足場、細胞、環境調節因子が必要で、この三要素に加えて血流が供給されると臓器再生が得られるとされている。本研究では足場のみの移植を行い、組織再生をはかった。

組織工学 (Tissue Engineering) は、工学的手法を使って細胞を二次元的、三次元的に組み上げ、本物の臓器や組織に近いものを再生させようというもので、Vacanti、Langerらによって始められた。彼らのTissue Engineeringは、体外で細胞を培養して目的とする組織をつくり、これを体内に移植する方法である⁶⁾。この考え方でKojimaら⁷⁾は羊の鼻中隔軟骨と上皮細胞を培養し、シリコンチューブの周囲に内腔を上皮に被覆された軟骨管を作製しマウスの背中に移植した。これにより正常の気管とよく似た管腔組織を再生させたが、ヒトへの臨床応用には超えなければならないハードルがある。

幹細胞や前駆細胞を移植することで組織再生をはかろうという研究が数多く行われている。自己由来の細胞移植としては、循環器領域で下肢や心筋の血管再生を目指した血管内皮前駆細胞の移植⁸⁾、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⁹⁾、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ある¹⁰⁾。

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、1997年以後、動物実験で自己組織再生型の人工材料を移植し気管、食道、胃、輪状軟骨などが再生することを報告してきた¹⁾⁻⁴⁾。これらの実験では細胞移植や増殖因子は使わずに足場の移植のみでの組織再生を行ってきた。Vacantiらのように体外で組織を再生してから移植する方法や、自

己由来であっても細胞移植を行うと、生きた細胞や組織を取り扱うので、感染症対策や細胞の品質管理など臨床応用へのハードルが高い。これらの方法に比べて、われわれの行っている *in situ* Tissue Engineering により足場のみを移植する手法は安全性が高く臨床応用に近いといえる。気管、輪状軟骨までは、この方法である程度満足する成績が得られるものと思われる。

臨床応用の経過から被覆した人工材料内腔面上の上皮化には最低でも2ヵ月を要することが判ってきた。さらに喉頭レベルの症例では一旦肉芽形成がみられ、その消退に伴い上皮化が起こる傾向にあることも判った。上皮化の遅延は創部感染を惹起する危険性があり、次のステップとして解決すべき問題点は、上皮化を加速する方法の開発であり、さらには形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生などがあげられる。これらの臨床的問題点をフィードバックさせ、本研究グループでは気道の上皮再生を加速するために、気管上皮細胞の培養、気管上皮細胞と人工材料からなるハイブリッド型の足場材料を開発し、その細胞の性質を免疫組織化学的手法で解析している。また、声帯の隆起を再生するために、喉頭内腔を型どりした材料を作製した。これらの結果は別項目に述べたが、問題点を克服することで、より多くの患者により安定した喉頭・気管の再生治療を実現できると考えられる。

E. 結 論

われわれは、体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の考え方で気道再生研究を行った。ポリプロピレンメッシュとコラーゲンスポンジから構成される足場材料を開発し、動物実験で気道の安定した組織再生が得られた。これらの結果をふまえて世界に先駆けて頸部気管で臨床応用を開始し全例において現時点では気管内腔は上皮化し順調である。しかしながら、現時点で上皮化は早期には得られておらず、今後もさらなる工夫が必要であると考ええる。気道の再生治療は端緒にすぎたばかりであり、今後、臨床成績を長期的に評価することが重要である。

F. 参考文献

1. Omori K, Nakamura T, Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, Shimizu Y: Cricoid regeneration using *in situ* tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113: 623-627, 2004
2. Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y: A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *ASIO J* 41: 306-310, 1995
3. Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Nakahara T, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y: Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artificial Organs* 23: 718-724, 2000

4. Sekine T, Nakamura T, Matsumoto K, Liu Y, Ueda H, Tamura N, Shimizu Y: Carinal reconstruction with a Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. *J Thoracic Cardiovascular Surg* 119: 1162-1168, 2000
5. Neville WE, Bolanowski PJ, Koita GC: Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 99: 604-13, 1990
6. Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 14; 260(5110): 920-926, 1993
7. Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, Mizuno H, Cortiella J, Vacanti CA: A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells. *FASEB J* 17(8): 823-828, 2003
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 14; 275(5302): 964-967, 1997
9. Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Muraki K, Takakura Y. Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. *Yonsei Med J* 30;45 Suppl: 61-67, 2004
10. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J: Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 3; 340(22): 1697-1703, 1999

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magrufov A, Ito J, Shimizu Y: Regenerative medicine of the trachea: The first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114(6): 429-433, 2005
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

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 Phoniatics(2005.11.11, Seoul)
- 3) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magrufov 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)

- 4) 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: <ワークショップ> 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)

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

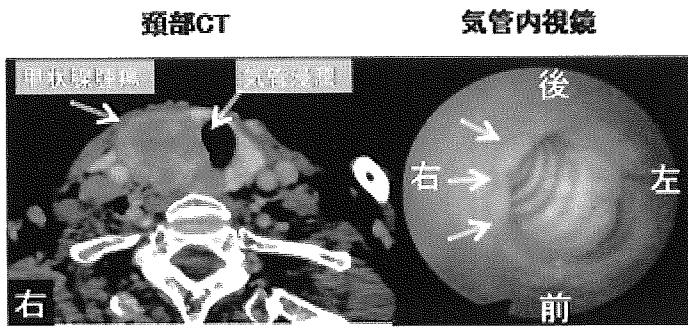


図1. 術前所見 [症例1]

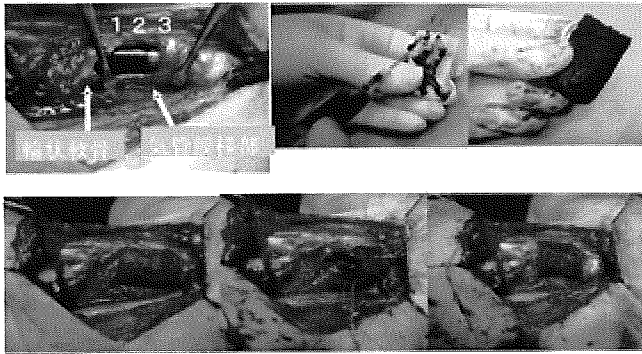


図2. 術中所見 [症例1]

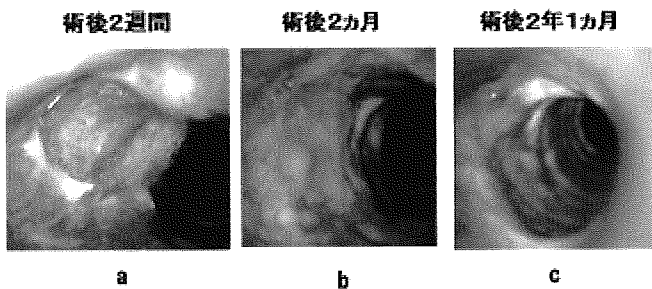


図3. 術後内視鏡所見 [症例1]
 a : 人工材料の上皮化は不十分
 b : ほぼ上皮化
 c : 全て上皮化

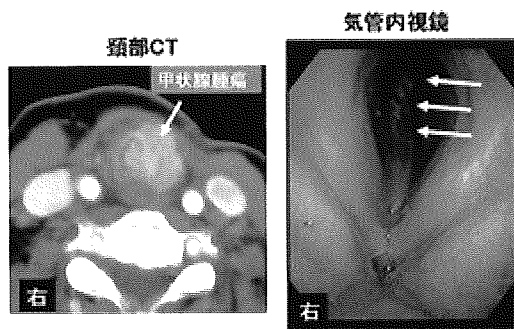


図4. 術前所見 [症例3]

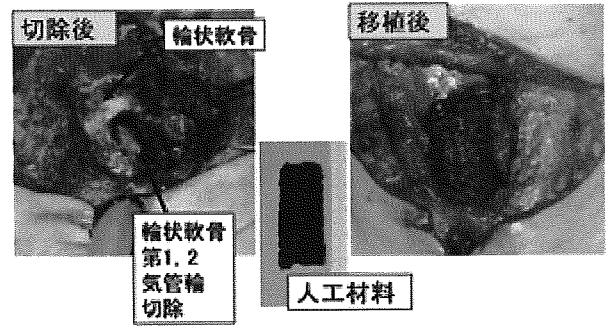


図5. 術中所見 [症例3]

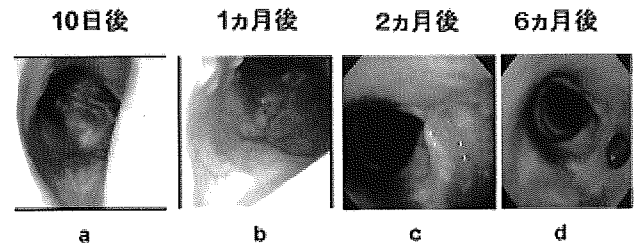


図6. 術後内視鏡所見 [症例3]
 a : 人工材料露出あり
 b : 一部上皮化あり
 c : ほぼ上皮化
 d : 完全上皮化

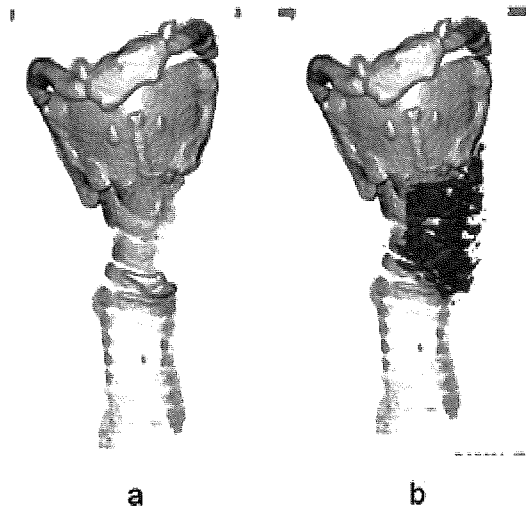


図7. 3-DCT [症例3]
 a : 術前
 b : 術後 (赤色部分は人工材料)

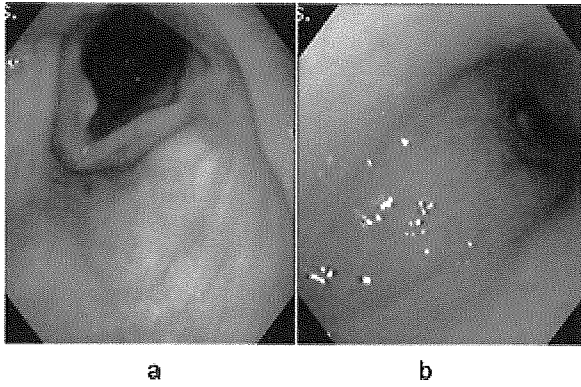


図8. 内視鏡所見 [症例4]
 a : 声門腔
 b : 声門下腔 (内腔の90%狭窄)

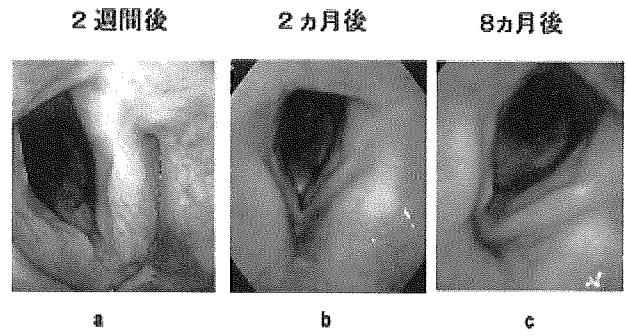


図11. 術後内視鏡所見 [症例4]
 a : 人工材料の上皮化不十分
 b : 人工材料上に肉芽形成
 c : 上皮化あり

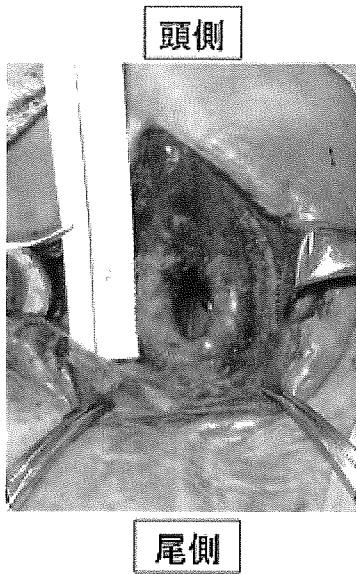


図9. 欠損部 (15×7mm) [症例4]
 甲状軟骨下縁の一部から第3気管輪までの欠損

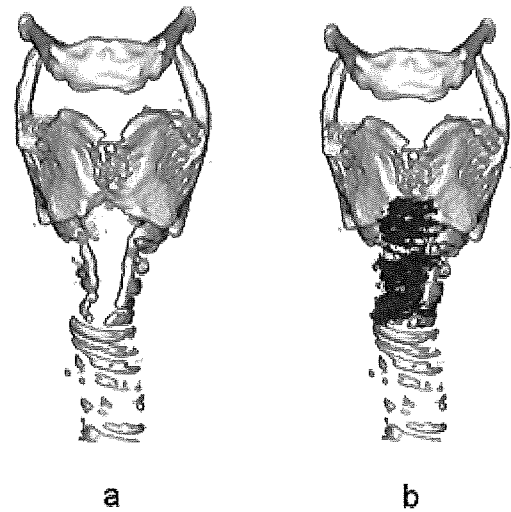


図12. 3-DCT [症例4]
 a : 術前
 b : 術後 (赤色部分は人工材料)



図10. 人工材料被覆 (25×17mm) [症例4]