

気道の再生

多田靖宏・野本幸男・鈴木輝久・大森孝一

Regenerative Medicine of the Airway Tract

Yasuhiro Tada, Yukio Nomoto, Teruhisa Suzuki
and Koichi Omori

Airway reconstruction after resection of malignancies or stenotic inflammatory lesions after traumatic injury is one of the most difficult procedures. To provide functional regeneration of the airway, we used *in situ* Tissue Engineering technique. As the tissue scaffold, Marlex mesh reinforced with polypropylene rings covered by a collagen sponge was developed. This scaffold material was implanted in animal models. After the safety and the utility were confirmed in the animal studies, the current regenerative technique was applied in human clinical cases with good results. However the growth speed of the tracheal epithelium over the artificial material was slow. To solve this problem, we tried to develop a hybrid material with which to cover the epithelium of the trachea. In this paper we report the basic research results of tissue engineering for the airway tract to date and of its clinical application. Furthermore, we report our current development of the hybrid artificial material.

Key words: 再生, 気道, 気管上皮細胞

1. はじめに

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^{1, 2)}, 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.

本稿では, 現在までの基礎研究の成果, および臨床応用の結果を呈示し, さらに問題点を解決するために基礎研究へフィードバックし, 現在われわれが取り組んでいるハイブリッド人工材料について述べる.

2. 人工気管の作製と動物実験

臓器再生の三要素として, 足場, 適切な細胞, 環境調節因子が必要であり, その場所に血流が供給されることで臓器再生が促されるとされている¹⁻³⁾. Nakamuraら⁴⁾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 という概念に基づき研究をすすめてきた. 1995年 Teramachiら⁵⁾は気管欠損に対す

る再建材料として, 管状の枠組みを保持するためポリプロピレン性のメッシュを管状にし, さらに同質の材料でリング状に補強し, 組織再生の足場として周囲にコラーゲンスポンジを付加した組織再生型人工気管を開発した. ポリプロピレンメッシュは特定医療保険材料として従来から臨床応用されている材料であり, 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ている. また, 実際にイヌに移植した後, 再生気管に対し圧縮試験を行い正常気管と同程度の強度を保つことを確認している.

また, Nakamuraら⁴⁾は動物実験として, 全身麻酔下でビーグル犬において約4cmの気管管状切除モデルを作製したうえで人工材料を移植し, その1年後の摘出標本にて上皮化と線毛上皮の再生を確認した. また, 内視鏡による最長5年の観察にて再生気管に問題がなかったと報告している.

3. 臨床応用

以上の基礎実験をもとに, 2002年京都大学倫理委員会で「喉頭・気管の再生治療」の承認を得て現在まで2例の臨床応用を行っており最長2年1ヶ月の観察で経過良好である⁶⁾. 本学においても2003年に倫理委員会の承認を得て現在まで2例の臨床応用を行っている. 本学で行った第1例目は, 喉頭気管狭窄例で, 77歳, 男性. 主訴は呼吸困難. 以前の気管切開孔に対する閉鎖術の後, 感染により声門下

から頸部気管に肉芽の増生を認め気道内腔の径が約5mmに狭小化していた。

手術は、局所麻酔下に再度気管切開術を行い、その後全身麻酔下に不良肉芽除去を行った。この際、輪状軟骨、甲状軟骨下縁も瘢痕組織となっておりこれらの軟骨の一部も含めて切除した。その後、13×6mmの欠損部に対し、人工材料をトリミングして30×15mmにしたものに自己の血液を湿潤させ、これで被覆して縫合した(図1)。

術後の内視鏡所見で、人工材料内腔面に対し術後3日、2週間では上皮化は不十分で、術後2ヶ月でようやく上皮化を確認できた(図2)。術後3ヶ月を経過した現在も再狭窄はきたしていない。この症例からは、ヒト喉頭気管においては人工材料上の上皮化に約2ヶ月間を要すると考えた。

4. 基礎研究へのフィードバック：ハイブリッド人工材料の作製と移植

人工材料を用いた再建の利点として、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挙げられる。一方、臨床応用の結果よりその問題点として、上皮化の速度が遅いことが挙げられる。そこで、人工材料の表面に気管上皮細胞層を形成してハイブリッド材料を作製することにより、上皮化を促進することが可能となるのかについて、ラットの気管欠損モデルを作製し、これにハイブリッド材料の移植実験を行った。

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®, Streptomycin®, Amphotericin B®, 及

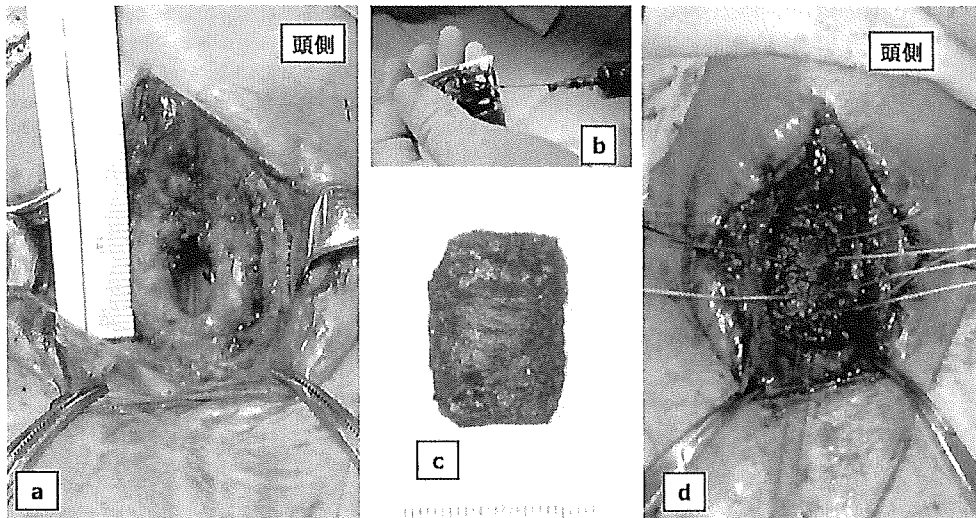


図1 臨床応用：喉頭気管狭窄例
 a. 欠損部 13×6mm
 b. 人工材料に自己の末梢血を湿潤
 c. 人工材料 30×15mm
 d. 被覆後に縫合

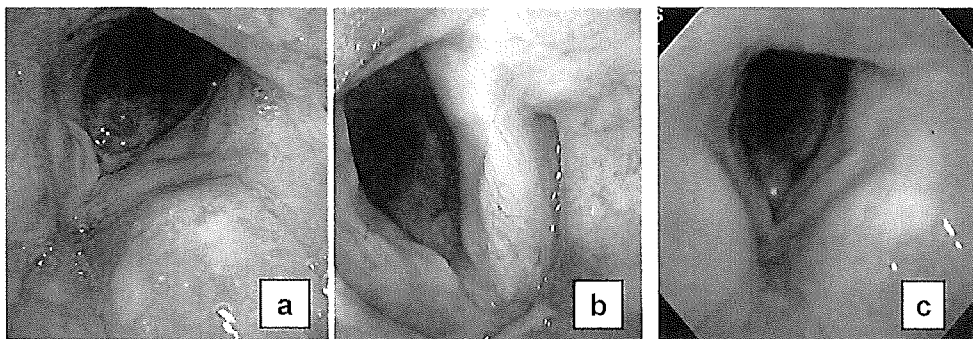


図2 内視鏡所見
 a. 術後3日目：上皮化認めず
 b. 術後2週間：上皮化不十分
 c. 術後2ヶ月：上皮化認める

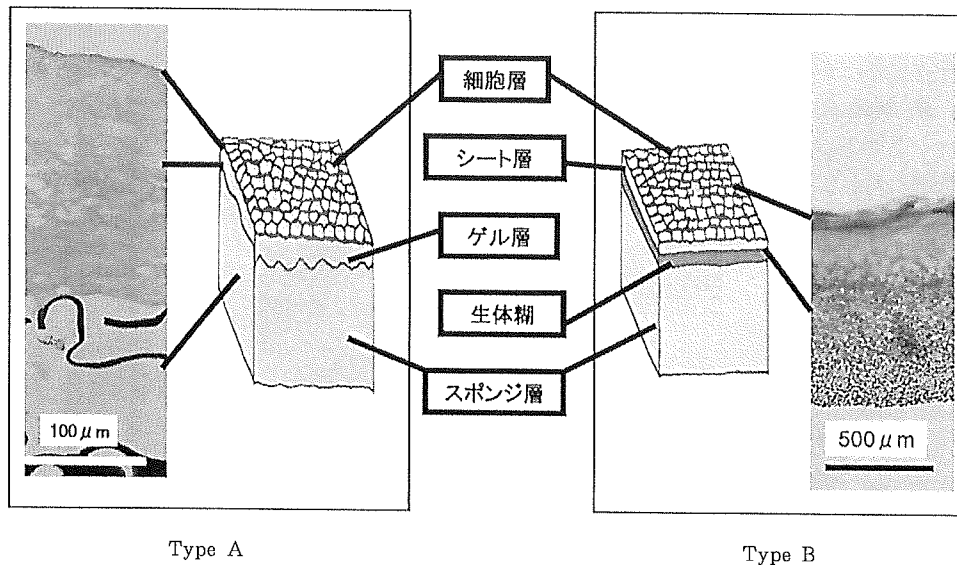


図3 ハイブリット型人工材料の HE 染色と構造模式図
 Type A : 表面はやや不整
 Type B : 表面は平滑

び15% Fetal bovine serumを添加した DMEM 培地で細胞懸濁液を作製し、継代培養法を確立した。

2) ハイブリット型人工材料の作製

培養した細胞を用いてハイブリット型の人工材料を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ゲルを重層化し、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である。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である。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である。それぞれのハイブリット型人工材料についてパラフィン切片を作製し、H-E 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3)。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。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4)。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。

3) 動物実験

作製したハイブリット型人工材料 Type A と Type B の上皮細胞を *in vivo* にて移植した際に上皮細胞が生着するかどうかを、ラットの気管欠損モデルを作製し、これらを移植して評価した。

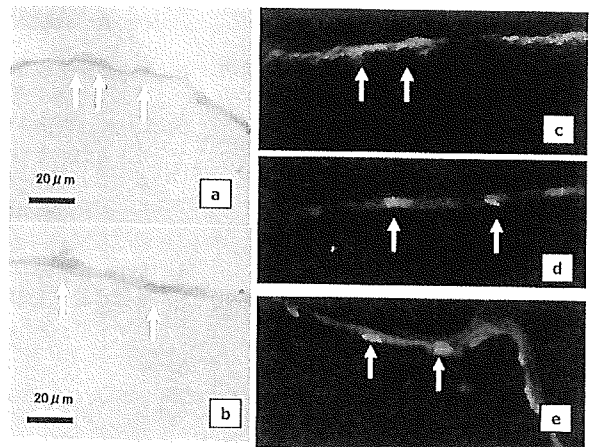


図4 免疫染色：気管上皮細胞にて陽性
 a. cytokeratin14 : (矢印)
 b. cytokeratin18 : (矢印)
 c. occludin : (矢印)
 d. Na-K-ATPase : (矢印)
 e. PCNA : (矢印)

ラットの気管を露出し、電気メスを用いて約 4×2 mm の欠損を作り、人工材料Aを被覆したモデルと、人工材料Bを被覆したモデルを作製した。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た。観察期間はそれぞれ3日・7日・30日とした。

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 (図5a, c)、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。

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 5 b, d) が、術後30日では認められなかった。

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 6)。

免疫組織化学的には、移植した気管上皮細胞は短期では

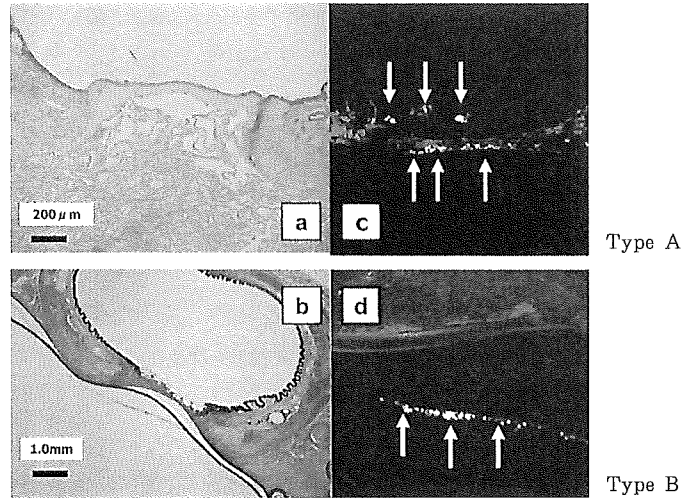


図 5 a. Type A 術後3日目の HE 染色：欠損部に一致して人工材料を認め、上皮形成を認める
 b. Type B 術後7日目の HE 染色：欠損部に一致して人工材料を認め、わずかながら上皮形成を認める
 c. Type A の免疫染色：創部に一致して GFP 陽性細胞を認める (矢印)
 d. Type B の免疫染色：シート上に GFP 陽性細胞を認める (矢印)

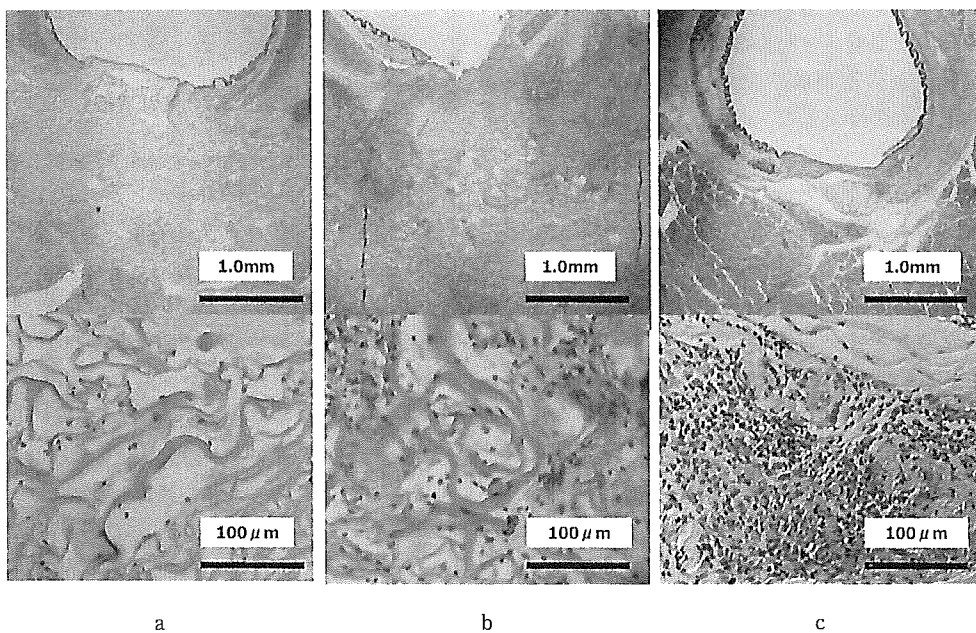


図 6 Type A のコラーゲンスポンジ変化
 a. 術後3日目：スポンジ周囲に細胞浸潤を認めるものの内部への浸潤は極軽度
 b. 術後7日目：内部への細胞浸潤は増加して血管新生を認める
 c. 術後30日目：スポンジはほぼ吸収され器質化を認める

あるが局所にとどまっており、術後7日目には上皮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。

5. 今後の展望

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、さらには上皮下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る。

本研究の一部は、平成16年度 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)の助成を受けて行った。

参 考 文 献

- 1) 大森孝一, 中村達雄, 金丸眞一ほか: 組織工学から見た臓器再生—気管・気管支の再生治療—. 日臨麻会誌 25(3): 310~315, 2005.
- 2) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K et al: Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(11): 915~920, 2003.
- 3) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920~926, 1993.
- 4) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T et al: Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs* 23: 718~724, 2000.
- 5) Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y et al: A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *ASAIO J* 41: M306~310, 1990.
- 6) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S et al: Regenerative Medicine of the Trachea: The first Human Case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114(6): 429~433, 2005.

別刷請求先 〒960-1295 福島県福島市光が丘1番地
 福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座
 多田靖宏

特集 肺の再生医療—現状と展望

気道の再生*

中村 達雄¹

はじめに

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。

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

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

主気管支狭窄などは再建不能であり、臨床で安全に使用できる人工気管の必要性は依然として少なくない。

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

組織親和性の高いバイオマテリアルの開発

新型の人工気管は人工材料で作ったメッシュを芯に自己組織の筒を作り、それを利用する。そこでステントを再生気管壁に取り込ませるために、生体の細胞外基質 Extracellular Matrix を構成する主要な蛋白であるコラーゲンが用いられる。コラーゲンで合成高分子材料(プラスチック)の表面を修飾することにより、材料の生体親和性を飛躍的に向上させる新しい方法が1977年に開発された。まずプラスチックの表面にプラズマ処理をして、プラスチック表面に反応基を作り、その反応基にコラーゲン分子を付加する方法である。この新しい技術を用いて初めてプラスチック材料を生体に素早く取り込ませることが可能になり、自己組織再生型人工気管の開発に大きく貢献した¹⁾。

* Regeneration of Airway

¹ 京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54) Tatsuo Nakamura : Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

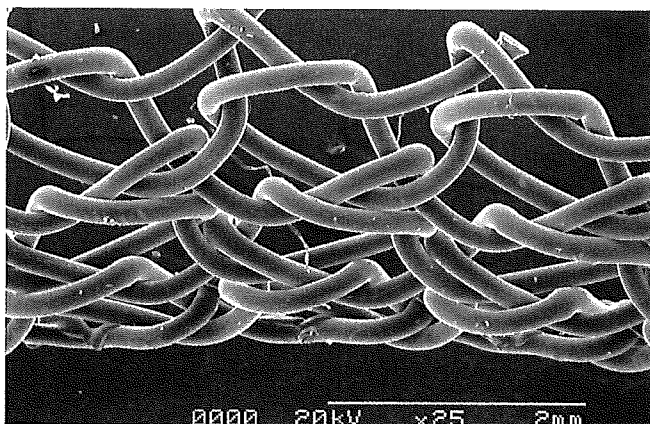


図1 人工気管に用いられるポリプロピレン製のメッシュ(Marlex® Mesh)の走査電子顕微鏡(SEM)写真

Marlex® Meshは腹壁ヘルニア手術などで補強材として使われている外科用材料。至適な間隙があるため生体組織を一体化する。

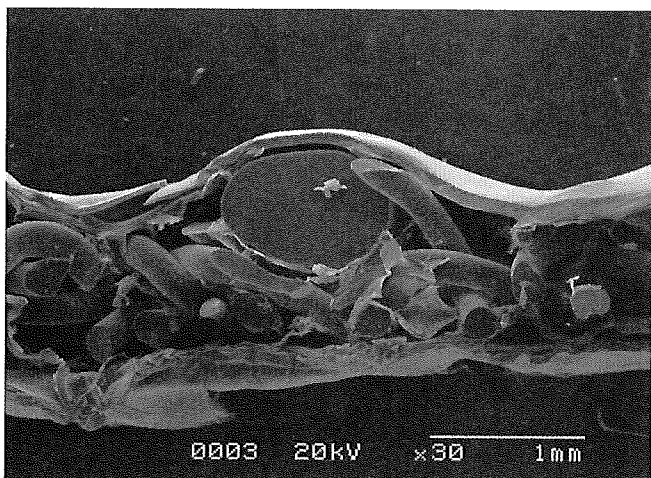


図3 コラーゲンコーティングと風乾を10回繰り返した人工気管壁断面のSEM所見

メッシュの間隙にコラーゲンが入り込み、さらに気管壁の表面に80~120 μ mの厚みにコラーゲンの層が形成されている。中央に太く見えているのがステントの断面

新しいメッシュ型の人工気管の構造

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

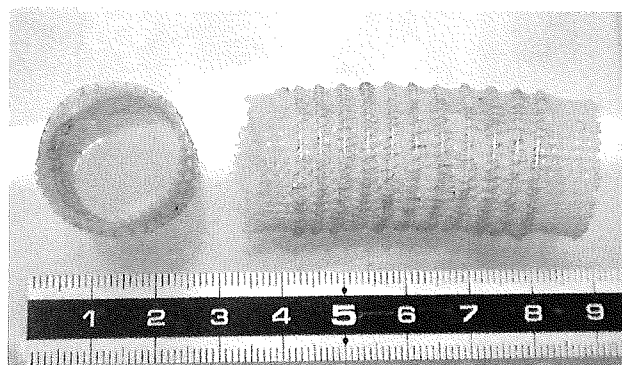


図2 人工気管の芯を構成するメッシュチューブスパイラルに巻き付けたポリプロピレンモノフィラメント繊維で補強してある。メッシュとモノフィラメント繊維は熱融着させ、さらに7-0プロリン糸で縫合されている。

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

気道の力学強度と人工気管による再建

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

実は1980年代にポリエチレン製のheavy Marlex® Meshが気管再建用に米国で開発され、一時期発売されたことがある。この気管再建用ヘビーメッシュは剛性の強い材料で、筒状に巻くと、それだけで内腔が保持できるほど剛い筒になる。しかしながら、臨床で気管再建に用いられているうちに、このハードメッシュは剛性が強すぎるため、これに隣接する血管からの大出血を起し、患者が亡くなる事故が発生することがわかり使われなくなってしまった経緯がある。力学物性の大きく異なる材料、特に気管に比べて著しく剛い材料は隣接臓器を痛めるだけでなく縫合部の生体(host)側に機械的刺戟ストレスが生じるため、反

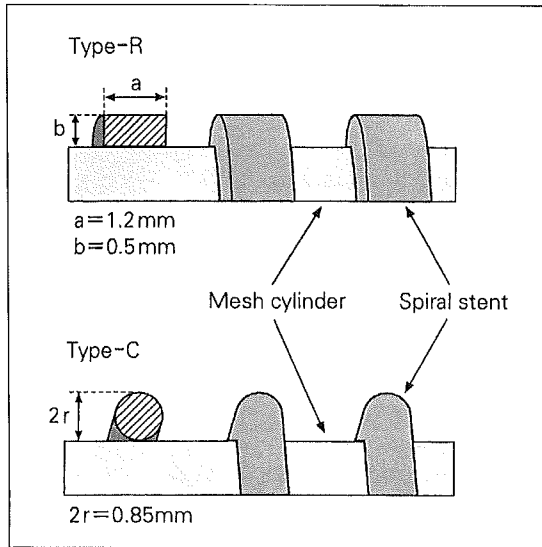


図4 ステント材の形状と耐圧縮力学強度を調べる実験に使った人工気管断面シェーマ
Type-Rは断面が矩形、Type-Cは断面が正円のステントである。(文献¹⁴⁾より引用)

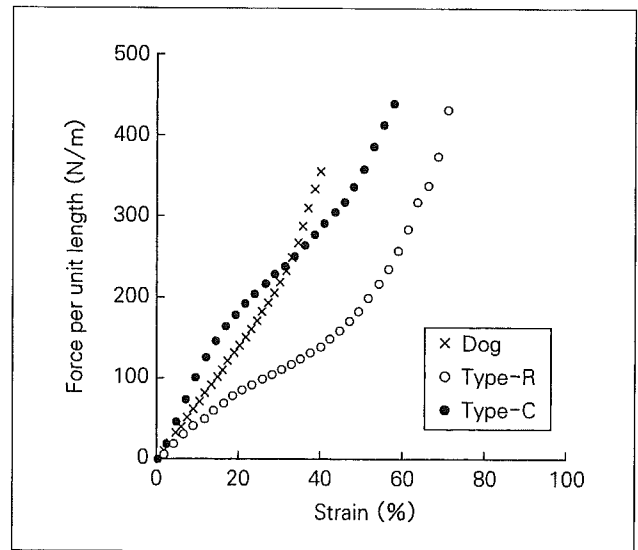


図5 人工気管の耐圧縮力学強度
オートグラフ下で長軸に垂直な方向より圧縮して単位長さ当たりの力をひずみに対して測定した。断面が正円形のステントを用いると生体気管に近い物性になる。

応性の肉芽や縫合離解が生じる危険性が高い。そこで新しい人工気管では内腔を保持でき、かつ生体気管に近い支持材を複合化させた設計になっている。

支持材も体積が大きくなるとそれだけで異物としての生体親和性 biocompatibility が低下すると予想されるので、細いステントをメッシュチューブに巻き付けた。医療用材料として今日広く使用されているメディカルグレードのポリプロピレンのモノフィラメントヤーンをメッシュチューブに巻き付けてメッシュとヤーンは熱融合で固定し、さらに補強のために7-0プロリン糸(ポリプロピレン製外科用縫合糸)の単結節縫合で2mm間隔で固定した。この複合チューブとならんでヤーンの横断面の形状を矩形(a:b=2.4:1)にしたチューブ(図4)の耐圧縮強度の比較を行うと、図5のようになった。このような構造力学検討を行って、メッシュチューブの力学形状が決定された。なお、メッシュチューブの周囲のコラーゲン加工やコラーゲンスポンジの重層はメッシュチューブの力学強度に影響はほとんど与えない。さらに5年間ビーグル犬頸部気管に埋入し経過観察した人工気管の物性を測定したところ、メッシュチューブ周囲に形成された結合織によっ

て再建部の気管は生体気管とほぼ等しい耐圧性を保持することもわかった。

気管の動物実験は、人間と気管の太さが近い体重10kg程度のビーグル犬で行われることが多い。ビーグル犬の頸部気管で4~6気管軟骨輪分を切除した後にこのメッシュ状人工気管で置換すると、再建部の人工気管内腔面は気管上皮に覆われることがまず確かめられた⁵⁾。次に過酷な条件の臨床応用を想定してビーグル犬の頸部気管で10~16軟骨輪を切除して、吻合部に抗張力が900~1,000g重く加わった状態を作り、この欠損を人工気管で再建した。その実験でも人工気管は生体に取り込まれ、抗張力下でも吻合不全は起こらなかった。そしてメッシュは完全に生体と一体化することが判明した⁶⁾。

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

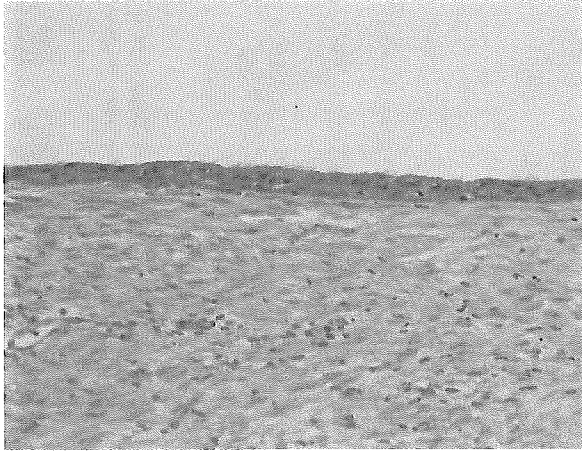


図6 人工気管の内面に再生した上皮の病理組織
(H-E染色, 倍率×400)
埋入2カ月後には形成した粘膜下組織の表面に扁平上皮が伸展し, 一部には線毛が生えている。

再建部の上皮と線毛の再生

コラーゲンの上にはまず線維芽細胞が侵入して, そこで盛んにコラーゲンを分泌する。埋入したコラーゲンはこの過程で消えていき, 自己のコラーゲンと置き換わっていく。その組織の上に上皮が伸びていく。まず, 扁平上皮が両端から伸展する。走査電顕で観察すると五角形か六角形をした扁平上皮が内面を覆い(図7), その扁平上皮に丈の低い線毛が生じ(図8), そういった長い線毛

をもった細胞の数が増加して(図9), 最終的には密集した線毛に覆われた上皮(図10)に変化していく。この過程は1~6カ月で起こる。

頸部気管から縦隔内気管へと再建実験が進められた。縦隔内気管は頸部気管に比べて周囲組織が少ないため再建が困難である。特に術後気管瘻が起これば致命的となる。5 cmの人工気管でこの縦隔内気管の置換を試みた。14頭は組織治癒促進のため大網被覆を行い, 残りの10頭は大網被覆のない群とし, 合計24頭のビーグル犬に人工気管を埋め込んだ。この実験では両群とも全例で良好な術後経過をたどった。しかも内腔狭窄やメッシュの露出は大網被覆群で少ないことが判明した⁸⁾。

組織再生の足場となるコラーゲンのスポンジによる気管壁の重層も試みられた。これは人工食道に応用されていたコラーゲンスポンジの技術で, このスポンジを用いると食道欠損部では自己組織が3週間以内に再生した。しかもそこには平滑筋や食道腺など高度に分化した構造までみられることが確かめられていた。イヌの頸部気管にこのスポンジ状コラーゲンを重層した人工気管(図11)を用いると, 6~24カ月に屠殺するまで全頭経過良好に生存した。気管壁はスポンジに自己の血液を含漬させることにより手術時にはリークが起これら十分気密となった。また, 組織の再生もそれ



図7 人工気管内腔面の走査電子顕微鏡所見
再生した上皮は五角~六角形の細胞で構成され, 気管内面を敷石状に覆う。そのうち一部には島状に線毛上皮が再生していく。線毛は縫合部近くに多く, 中央部が少ない傾向にある。図6と同じ標本。

図8 再生過程にある気管上皮のSEM所見
($\times 5,000$)

扁平上皮の表面には数 μm の線毛様隆起が密生する。細胞によっては丈の低い(10 μm 程度)線毛が生えて、それが伸展して線毛になっていくのがわかる。細胞一つ一つを単位としてこういった変化は進んでいく。

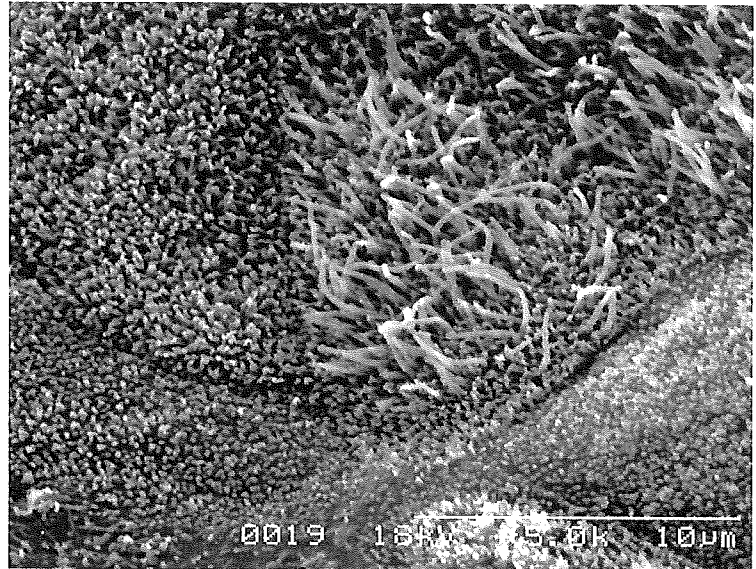


図9 線毛上皮の再生が進んだ人工気管内面の走査電子顕微鏡写真($\times 1,500$)

丈の長い線毛の生えた内皮の数が次第に増加していく(3カ月目)。

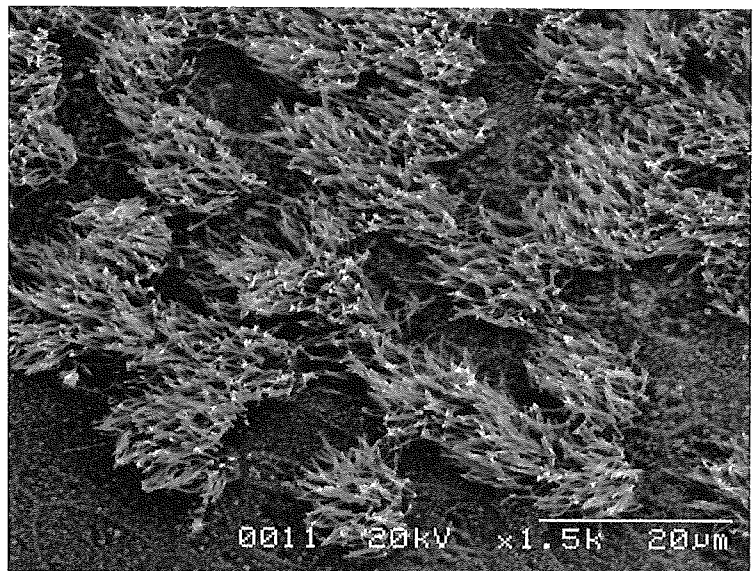
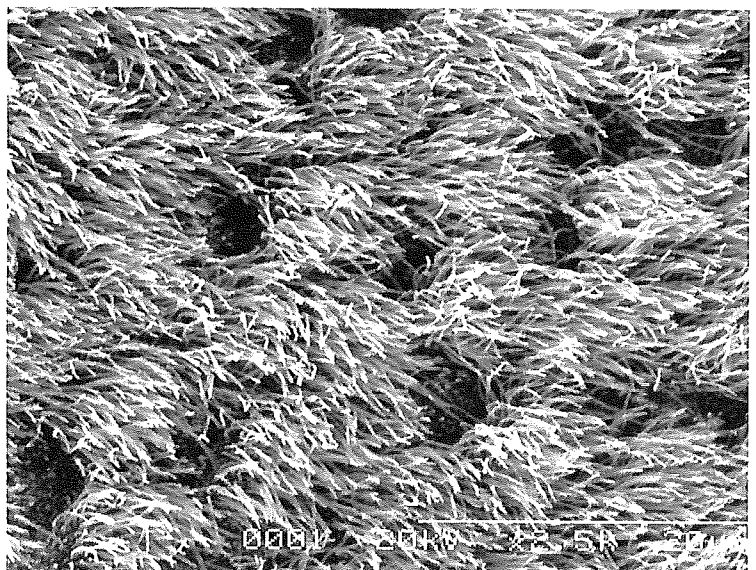


図10 再生した気管内皮は最終的には線毛上皮になる。気管支鏡下に内皮をサンプリングして線毛の運動を測定すると、10~12 Hzの拍動をしていることが判明した。この値は正常のほぼ80%程度の振動数に相当し、再建部上皮は機能的にも良好な再生をしていることが示された。



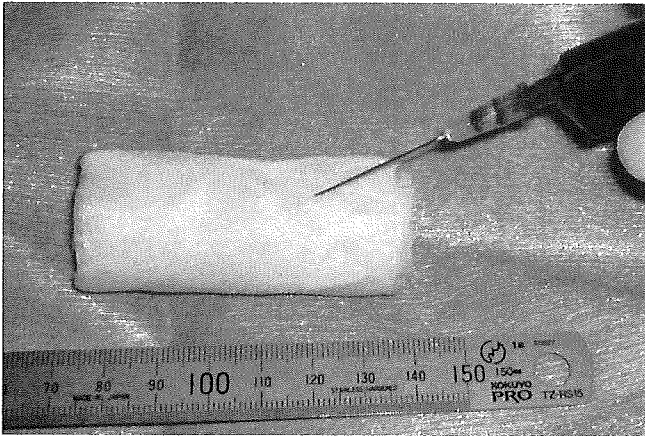


図11 コラーゲンスポンジを表面に重層した人工気管に自己血を含漬させるところ

このように手術時に自己血を沁み込ませると、人工気管壁は気密になる。コラーゲンと塗布しただけのものに比べてスポンジを加えた人工気管はコラーゲンの量が多いため良好な組織再生が得られる。

までのアモルファスコラーゲンに比べ良好であった⁹⁾。

分岐部気管の再建も、Y字型に作ったメッシュ型人工気管で行った。気管分岐部でも内面は完全に上皮が再生し安全に使用可能であることが確かめられた(図12)¹⁰⁾。

現状と今後の展望

従来の組織工学 Tissue Engineering では培養室のシャーレのなかで細胞を増殖させて目的とする組織を作り、それ体内に移植する。これに対し、欠損した組織を体内のその場所(*in situ*)で再生させる方法は *in situ* Tissue Engineering と呼ばれる。自己組織再生型人工気管は、この *in situ* Tissue Engineering を用いたものである。さらに再生治癒を促進させるために穿刺骨髄液や、骨髄から分離培養した間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell)を、このコラーゲンスポンジに含漬させる手法も検討されている¹¹⁾。

生体の気管には内腔を支えるためにU字型の気管軟骨が存在する。近年、組織工学の技法を用いた種々の軟骨再生の試みが行われている。しかしながら、長期に気道を支えるに足る軟骨の再生は未だに報告がない。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



図12 気管分岐部をY字型の人工気管で再建したビーグル犬を12カ月後に剖検した所見

人工気管は分岐部においても宿主の気管と一体化して内面は光沢ある上皮で覆われていることがわかる。断面にはステントがみられる。

脱し直ちに生命に関わる。

長期に化学的に安定しているポリプロピレンメッシュを芯にした人工気管は、5年にわたる長期観察でも逸脱することなく、生体と一体化し続けることが判明した¹²⁾。

現在、京都大学医学部附属病院では倫理委員会の審査を経て、臨床使用が始まっている。2004年9月末現在、2例の頸部気管欠損(甲状腺腫瘍の気管浸潤)例に使用して、良好な組織再生と内腔面上皮化をみている¹³⁾。

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まだ数が少ない。この *in situ* Tissue Engineering を用いた気道の再生は日本で世界に先駆けて実用化されたものである。今後一般医療として普及するように研究をさらに積み重ねていくことが大切であろう。

文献

- 1) Daniel RA Jr: The regeneration of defects of the trachea and bronchi: an experimental study. J Thorac Surg 17: 335-349, 1948
- 2) 松原義人, 畠中陸郎, 小鯖 覚, 他: 人工気管による気道再建術. 日外会誌 88: 478-482, 1987
- 3) 清水慶彦, 田村康一, 加藤弘文, 他: mesh による人工気管における創傷治療に関する検討. 人工臓器 12: 486-489, 1982
- 4) Hirai K, Shimizu Y, Hino T: Epithelial regeneration in collagen-coated and uncoated patch grafts

- into dog tracheas. *J Exp Pathol* 71 : 51-60, 1990
- 5) Okumura N, Nakamura T, Shimizu Y, et al : Experimental study of a new tracheal prosthesis made from collagen-grafted mesh. *ASAIO Trans* 37 : M317-319, 1991
 - 6) Okumura N, Nakamura T, Takimoto Y, et al : A new tracheal prosthesis made from collagen grafted mesh. *ASAIO Trans* 39 : M475-479, 1993
 - 7) Okumura N, Nakamura T, Natsume T, et al : Experimental study on a new tracheal prosthesis made from collagen-conjugated mesh. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108 : 337-345, 1994
 - 8) Teramachi M, Okumura N, Nakamura T, et al : Intrathoracic tracheal reconstruction with a collagen-conjugated prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113 : 701-711, 1997
 - 9) Teramachi M, Nakamura T, Yamamoto Y, et al : Porous-type tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *Ann Thorac Surg* 64 : 965-969, 1997
 - 10) Sekine T, Nakamura T, Matsumoto K, et al : Carinal reconstruction with a Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119 : 1162-1168, 2000
 - 11) Nakamura T, Kawanami E, Ueda H, et al : Novel tracheal prosthesis and in situ Tissue Engineering to enhance tissue regeneration on it. *ASAIO Trans* 47 : 179, 2001
 - 12) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, et al : Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs* 23 : 718-724, 2000
 - 13) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S : Regenerative medicine of the trachea : the first human case. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*(in press)
 - 14) Kawaguchi S, Nakamura T, Shimizu Y, et al : Mechanical properties of artificial tracheas composed of a mesh cylinder and a spiral stent. *Biomaterials* 22 : 3085-3090, 2001

メッシュ型人工気管の力学特性†

野田澤 俊 介* 中 村 達 雄**
清 水 慶 彦** 瀧 川 敏 算***

Mechanical Properties of Mesh-Type Artificial Tracheas

by

Shunsuke NOTAZAWA*, Tatsuo NAKAMURA**,
Yasuhiko SHIMIZU** and Toshikazu TAKIGAWA***

Many studies have been made to develop artificial tracheas with good biocompatibility and mechanical performance. We have designed a new type of mesh-type artificial tracheas. The basic frame of the specimens was composed of a mesh cylinder and stent attached to the outside of the cylinder. We have demonstrated from the mechanical tests that artificial tracheas with ring-type stents are stiffer than those with spiral-type stents. Artificial tracheas with arc-shaped shaped stents are half as stiff as artificial tracheas with whole ring stents. We have compared the mechanical properties of mesh-type artificial tracheas with nylon ring stents and those of canine tracheas, and have found the proper number of rings per unit length for the mesh-type artificial tracheas.

Key words : Artificial trachea, Canine trachea, Compression test, Mechanical property

1 緒 言

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、吸気の際には気管の過度の狭窄を、呼気の際には気管の過度の膨張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)}しかしながら、シリコンチューブの人工気管では内腔に線毛が再生しないため、内腔に痰などの異物が溜まり狭窄を起こ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ステントをらせん状に巻きつけること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粘膜が再生することが確認されている。

これまで生体の気管の力学特性に関する研究は数多くなされてきた。^{8)~19)}人工気管の力学特性は実用化の上で大変重要な要素であったが、上述のメッシュ型人工気管の物性についての実験・解析はほとんど行われていなかっ

た。^{20), 21)}メッシュ型人工気管は内外から受ける力に耐えうるかたさを必要とするため、人工気管の形状を保持する役割を担うステントの変形特性を明らかにすることは非常に重要となる。本研究ではステントの材質、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。各試料の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特性に及ぼす影響を調べた。イヌの気管についても圧縮特性を調べ、メッシュ型人工気管と比較検討を行った。

2 実 験

2.1 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) (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。NY-rc の写真を Fig. 1 に示す。PP 糸 (直径; 0.80mm) のリングを連ねた試料 (PP-r) 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) と、生体の気管の形に倣って、円周の約 4 分の 3 にわたって PP の切片を巻きつけた試料 (PP-A) 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

† 原稿受理 平成 16 年 3 月 16 日 Received Mar. 16, 2004

* 京都大学大学院工学研究科 〒285-8510 京都市西京区京都大学桂, Dept. of Mat. Chem., Kyoto Univ., Nishikyto-ku, Kyoto, 615-8510

** 京都大学再生医科学研究科 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町, Inst. for Frontier Medcal Sci., Kyoto Univ., Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507

*** 正 会 員 京都大学大学院工学研究科 〒285-8510 京都市西京区京都大学桂, Dept. of Mat. Chem., Kyoto Univ., Nishikyto-ku, Kyoto, 615-8510

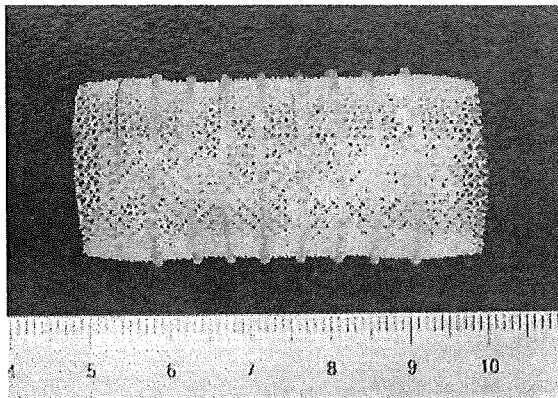


Fig. 1. Photograph of an artificial trachea of NY-rc. For notation, see text.

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 I に示した.

比較のためにイヌの気管も実験に用いた. この気管試料はビーグル犬 (メス, 10kg) から得られたものである. 実験は気管摘出後 24 時間以内に行った.

2・2 側面圧縮試験

引張試験機 (RTM250, オリエンテック) を用い, 室温, 空気中で 5mm/min の Cross-head speed で圧縮試験を行った. 圧縮試験の模式図を Fig. 2 に示す. 人工気管とイヌの気管それぞれについて力と相対たわみ量の関係を調べた. PP-A とイヌの気管では, ステントあるいは気管軟骨のない面が圧縮面と垂直になるような角度で圧縮した. 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; ε) は式 (1) を満たすことが知られている.²²⁾

$$f \equiv \frac{32\pi EI}{(\pi^2 - 8)d_0^2} \varepsilon \quad (1)$$

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, ε 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

Table I. Sample codes of artificial tracheas.

Code	Material for stent	Form of stent	Number of rings per unit length (mm)
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 strip	Arc	

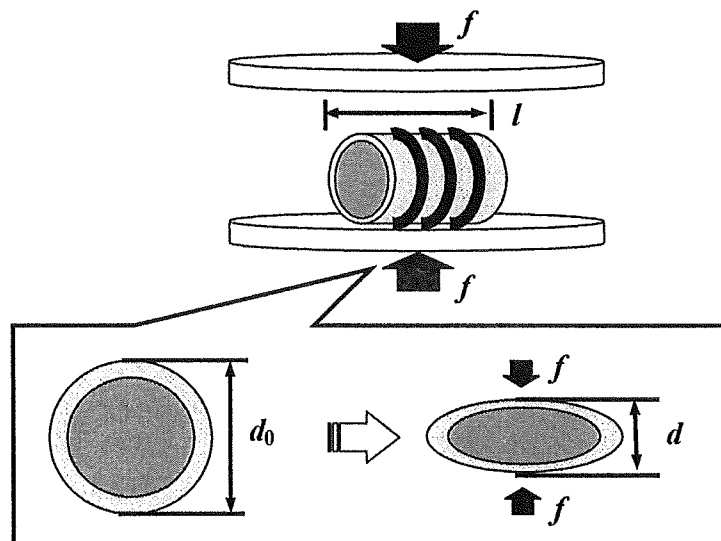


Fig. 2. Schematic representation for the compression test. f is the force, l is the length of specimen, d is the outer diameter of specimen and d_0 is the initial value of d .

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の補正を行った。

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

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

3 結果と考察

Fig. 3 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個あたりに換算した力 (f_{cn}) である。 $\varepsilon > 0.3$ の領域ではリングの数密度が最も小さい NY-ra の曲線が他の2本の曲線から外れているが、 $\varepsilon < 0.3$ の領域では3本の $f_{cn} - \varepsilon$ 曲線はほぼ一致している。微小変形領域において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. 4 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) のカーヒズミ曲線を示す。これらの試料のステント間距離は共に 4mm である。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_c を試料長 (l)

で除した換算力 ($f_c l$) 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ている。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周よりも大きくなる。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、 $f_c l^{-1} - \varepsilon$ 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. 5 は PP の板から切り出した板状の切片をリングにして連ねた試料 (PP-R) と PP の切片を円周の4分の3にわたって巻きつけた試料 (PP-A) のカーヒズミ曲線の比較を行ったものである。縦軸は切片1個あたりに換算した力 (f_{cn}) である。全てのひずみ領域にわたって PP-R は PP-A の約2倍の力を示している。圧縮に対して PP-R は両側面にあるステントで形状を保持しているのに対して、PP-A は片側のステントのみで形状を保持している。このため PP-A は PP-R の約半分の大きさの力しか示していないと考えられる。

Fig. 6 に NY ステントのリングを連ねた試料 (NY-r) と PP ステントのリングを連ねた試料 (PP-r) について側面

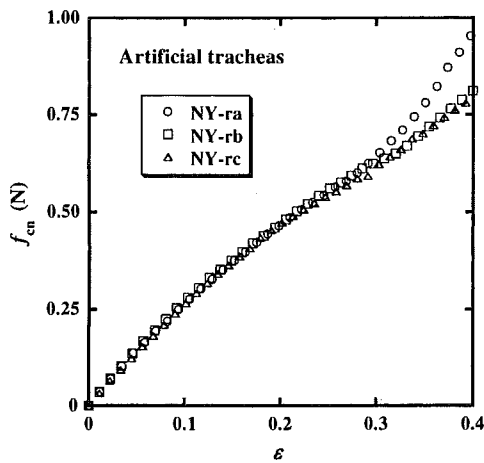


Fig. 3. Plots of force per ring vs. strain for NY-r artificial tracheas.

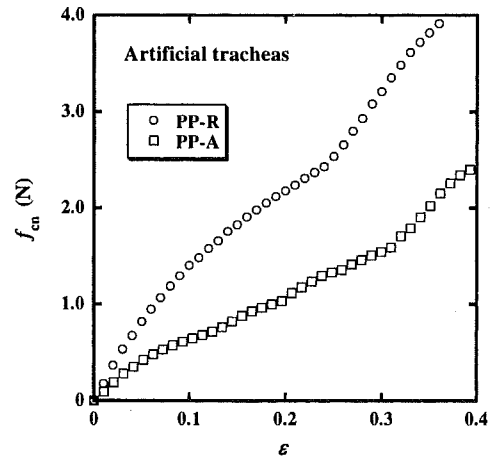


Fig. 5. Plots of force per ring vs. strain for PP-R and PP-A artificial tracheas.

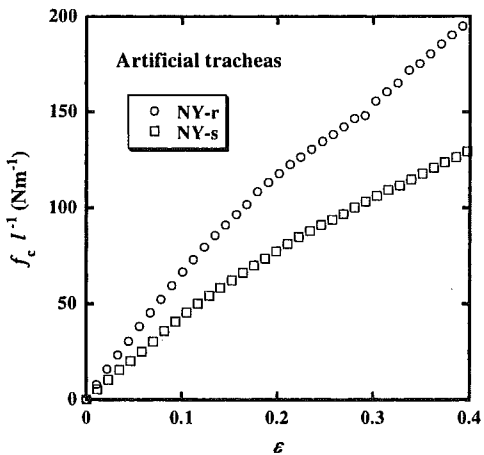


Fig. 4. Plots of force per length vs. strain for NY-r and NY-s artificial tracheas.

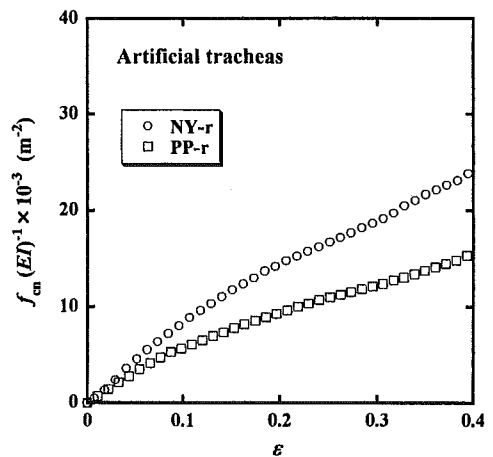


Fig. 6. Plots of force per ring reduced by Young's modulus and second moment of area vs. strain for NY-r and PP-r tracheas.

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、縦軸にはリング1個当たりにかかる力を糸の曲げ剛性（ヤング率と断面2次モーメントの積）で割った値 ($f_{cn} (EI)^{-1}$) を用いている。微小ひずみ領域においては2本の曲線はほぼ一致したが、ひずみが大きくなるに従ってNY-rの方が大きな力を示した。これはステントに用いた糸の一軸変形に対する応力-ひずみ挙動の違いに起因するものと考えられる。NYの糸とPPの糸の引張試験の結果をFig. 7に示す。縦軸は応力 (σ) である。ヤング率はNYの糸 ($2.1 \times 10^9 \text{Pa}$) の方がPPの糸 ($3.0 \times 10^9 \text{Pa}$) よりも小さな値を示したが、PPは $\epsilon = 0.05$ 付近で降伏挙動を示し、それより大きなひずみ領域ではNYの糸の方がPPの糸よりも大きな応力を示す。

Fig. 8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. 6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。PP-rとPP-Rの $f_{cn} (EI)^{-1} - \epsilon$ 曲線には、 $\epsilon < 0.1$ の領域にお

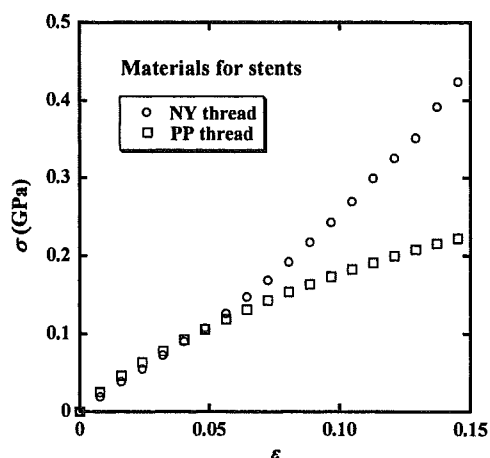


Fig. 7. Plots of stress vs. strain for NY thread and PP thread.

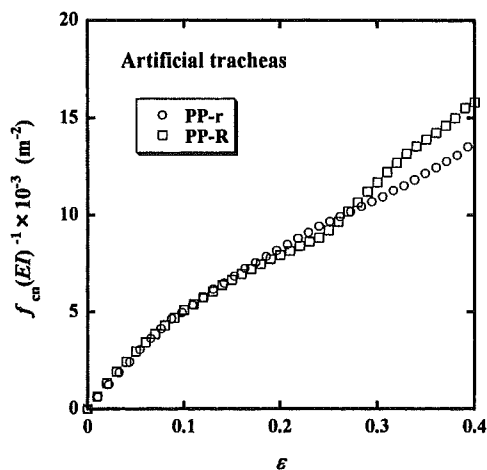


Fig. 8. Plots of force per ring reduced by Young's modulus second moment of area and vs. strain for PP-r and PP-R tracheas.

いて線形関係 (式 (1)) が成立している。2本の曲線は $\epsilon < 0.25$ の領域ではよく一致している。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 $f_{cn} (EI)^{-1} - \epsilon$ 曲線が同じ形状をとることを示している。

Fig. 9にイヌの気管の圧縮試験の結果を示す。比較のためリングの数密度が異なるNY-rと円周の4分の3に板状切片を巻きつけたPP-Aのデータも合わせて示す。縦軸は単位長さ当たりに換算した力である。イヌの気管の $f_c l^{-1} - \epsilon$ 曲線はNY-raとNY-rbの2本の曲線の間にある。メッシュ型人工気管にNY-rステントを用いたとき、リングの数密度を 0.1mm^{-1} 程度にすれば生体の気管に近い圧縮特性を持つ人工気管を作製することができるであろう。PP-Aとイヌの気管の $f_c l^{-1} - \epsilon$ 曲線を比較するとPP-Aの方がイヌの気管よりもはるかに大きな力を示している。PP-Aステントを用いた人工気管は柔軟性に乏しく、実用には適していないといえる。

4 結 言

ステントの異なるメッシュ型人工気管を作製しその圧縮特性を調べることによって、ステントの材質、断面形状、巻き方などが人工気管の力学特性に及ぼす影響を調べた。リングの数密度が異なるメッシュ型人工気管はリングの数に比例してかたくなることがわかった。リングを連ねた人工気管はステントをらせん状に巻いた人工気管の圧縮に比べて単位長さ当たりの力が大きな値を示した。円周の4分の3にわたって板状切片を貼り付けた人工気管は板状切片をリング状に貼り付けた人工気管の約半分のかたさしか示さなかった。材質と断面形状の異なるステントの変形特性の比較から、リングを連ねたメッシュ型人工気管の圧縮特性が微小ひずみ領域においてリングの側面にかけた圧縮荷重と荷重方向の相対たわみ量の関係を表した基本的な式に従うことを示した。生体の気管とメッシュ型人工気管の圧縮特性を比較し、本研究でステントに用いたナイロンリングの数密度を調節することによって生体の気管の圧縮特性に近いメッシュ型人工気管の作製が可能であることを示した。

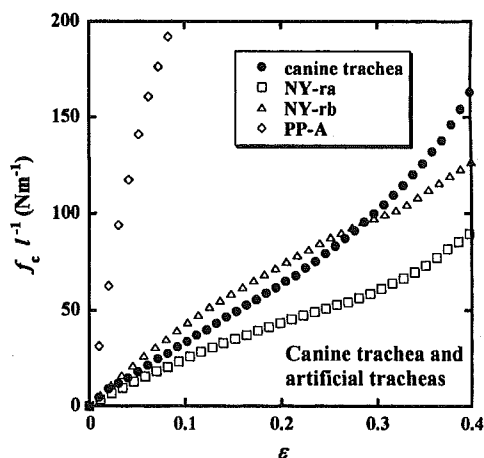


Fig. 9. Plots of force per length vs. strain for canine trachea and artificial tracheas.

参 考 文 献

- 1) W. W. Montgomery, Arch Otolaryngol, **82**, 320 (1965).
- 2) J. F. Dumon, Chest, **97**, 348 (1990).
- 3) K. Ito, Y. Fujimoto, T. Obara, H. Yanagisawa and T. Ohyama., Surg. Today, **22**, 78 (1992).
- 4) K. Wassermann, H. E. Eckel, O. Michel and R. P. Muller., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **112**, 859 (1996).
- 5) N. Okumura, T. Nakamura, T. Natsume, K. Tomihata, Y. Ikeda and Y. Shimizu, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **108**, 337 (1994).
- 6) M. Teramachi, N. Okumura, T. Nakamura, T. Kiyotani, Y. Takimoto, S. Matsuda, Y. Ikada and Y. Shimizu, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **113**, 701 (1997).
- 7) M. Teramachi, T. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Kiyotani, Y. Takimoto and Y. Shimizu, Ann. Thorac. Surg., **64**, 965 (1997).
- 8) J. K. Rains, J. L. Bert, C. R. Roberts and P. D. Paré, J. Appl. Physiol., **72**, 219 (1992).
- 9) C. R. Roberts, J. K. Rains, P. D. Paré D. C. Walker, B. Wiggs and J. L. Bert, J. Biomech., **31**, 81 (1998).
- 10) C. R. Roberts and P. D. Paré, Am. J. Physiol., **261**, L92 (1991).
- 11) R. K. Lambert, E. M. Baile, R. Moreno, J. Bert and P. D. Paré, J. Appl. Physiol., **70**, 1152 (1991).
- 12) K. Ishida, P. D. Pare, T. Blogg and R. R. Schellenberg, J. Appl. Physiol., **69**, 1003 (1990).
- 13) R. B. Penn, M. R. Wolfson and T. H. Shaffer, Pediatr. Res., **26**, 429 (1989).
- 14) D. Begis, C. Delpuech, P. L. Tallec, L. Loth, M. Thiriet and M. Vidrascu, J. Appl. Physiol., **64**, 1359 (1988).
- 15) D. Yager, J. P. butler, J. Bastacky, E. Israel, G. Smith and J. M. Drazen, J. Appl. Physiol., **66**, 2873 (1989).
- 16) B. R. Wiggs, C. A. Hrousis, J. M. Drazen and R. D. Kamm, J. Appl. Physiol., **83**, 1814 (1997).
- 17) L. Wang, R. Tepper, J. L. Bert, K. L. Pinder, P. D. Pare and M. Okazawa, J. Appl. Physiol., **88**, 1014 (2000).
- 18) F. R. shadonofsky, T. M. Officer, A. M. Boriek and J. R. Rodarte, J. Appl. Physiol., **90**, 1258 (2001).
- 19) Y. C. Fung, "Biomechanics-Mechanical Properties of Living Tissue", p.400 (1981) Springer-Verg.
- 20) B. Gustin, C. G'Sell, B. Cochelin, P. Wourms and M. P. Ferry, Biomaterials, **17**, 1219 (1996).
- 21) S. Kawaguchi, T. Nakamura, Y. Shimizu, T. Masuda, T. Takigawa, Y. Liu, H. Ueda, T. Sekine and K. Matsumoto, Biomaterials, **22**, 3085 (2001).
- 22) R. J. Roac, W. C. Young, "Formulas for stress and strain. 5 thed.", p.220 (1975) McGraw-Hill Kogakusha.