

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大森 孝一

平成 19 (2007) 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第一生理	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	助教授
	松塚 崇	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	講師
	多田 靖宏	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助手
	横山 秀二	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第一生理	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

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）…………… 1

II. 分担研究報告

1. 基礎研究

(1) 気管の再生

1) 人工材料

① 組織工学的手法を用いた組織再生型胸腔内人工気管の研究

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）…………… 11

2) 気道上皮細胞

① 上皮培養細胞を用いた障害に起因する細胞死を防止する方法の研究

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）…………… 20

3) 線維芽細胞

① 気管再生に用いる自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

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）…………… 22

② 気管由来線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管

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）…………… 25

③ 自家脂肪組織由来幹細胞を利用した気管再生

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）…………… 28

(2) 喉頭の再生

① 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体動態の検討

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）…………… 31

② 人工材料と自己筋膜を用いた声帯再生の試み

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）…………… 33

2. 臨床応用

気管の再生治療

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）…………… 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 44

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 47

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。さらに、気道上皮化の加速をはか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の開発や脂肪組織由来幹細胞と線維芽細胞の移植を行い、その有用性を確認した。また、形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生を目的に声帯の隆起を型取った人工材料を開発した。

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し、現在では7例に行い良好な成績を得ている。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 を用いた気道の再生治療は我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研究をさらに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。多方面からの臓器再生医工学的研究から、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した。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した。

1. 基礎研究

(1) 気管の再生

1) 上皮培養細胞を用いた障害に起因する細胞死を防止する方法の研究

培養上皮組織を移植に用いる際に、細胞死を防ぐような手段を講ずると組織の生着率が向上することが予想される。その条件を見出すために、培養上皮細胞株である HeLa 細胞を用いて、細胞保護因子の検討を行った。細胞外液に通常条件では細胞膜を通過しない蛍光色素

(propidium iodide : PI) を加え、細胞に膜透過亢進させ細胞障害をもたらす薬物 (amphotericin B) を細胞外液に加えた条件で、倒立蛍光顕微鏡にて経時的に観察を行うと、細胞が障害を受け細胞膜の透過性が亢進すると蛍光色素が細胞内に流入し、核 DNA と結合すると蛍光を発するのが観察できる。細胞死を防ぐような薬物を同時投与し、障害を受けた細胞数を蛍光顕微鏡にて定量した。

2) 線維芽細胞 :

① 気管再生に用いる自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

実験動物としてラットを用い、同一個体から気管、皮膚、歯肉粘膜および鼻粘膜より線維芽細胞を outgrowth 法にて採取し、培養した。

線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に気管より酵素処理にて採取した上皮細胞を播種して共培養した。

上皮細胞層の一部を剥離し、再び上皮細胞被覆するまでの時間を測定した。WST-1 試薬を用いて発色した培地の吸光度を測定し共培養した上皮細胞の増殖率を調べた。11日間共培養したコラーゲンゲルを薄切して HE 染色し線維芽細胞が上皮細胞層の形態を調べた。

② 気管由来線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管

Sprague-Dawley (SD) 系ラットの気管を採取し、酵素処理にて気管上皮細胞を除去した。気管を大きさ数mm程度の組織片に分割し、これを培養皿上で組織片培養した。培養開始後5日程度すると組織片から培養皿上に線維芽細胞が遊走・増殖するため、これを回収し継代培養した。得られた気管由来の線維芽細胞に、蛍光蛋白である monomeric yellow fluorescent protein (m-YFP) の遺伝子をウイルスベクターを用いて導入した。I型コラーゲン溶液に m-YFP で標識された線維芽細胞及び培地を混合し、自己再生型人工気管に用いられているコラーゲンスポンジ上に重層し、さらにゲル化させた。これを移植片(A)とし、コントロールとしてコラーゲンスポンジにコラーゲンゲルのみ重層したモデル(B)、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)を用意した。全身麻酔下に SD 系ラットの気管を開窓し、(A)、(B)、(C)を開窓部に充て閉鎖した。術後観察期間は3日、7日、14日とし、気管を摘出した上で、組織学的検討を行った。

3) 自家脂肪組織由来幹細胞を利用した気管再生

① in vitro の実験

脂肪由来幹細胞はラット鼠径部皮下脂肪を採取し、コラーゲナーゼ処理して分解したものから、遠心後の上澄みの脂肪細胞を除いた沈殿分画を、セルストレーナーによって血管断片や未消化の脂肪組織を除いて得られる細胞をディッシュ上に播種、接着した細胞群を3週間培養した。そのようにして得られた細胞の多分化能は骨誘導培地、軟骨細胞誘導培地、神経細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地を使用することで各々骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞へと分化を誘導し確認を行った。脂肪組織由来幹細胞は本手法により得られることが判明した。

上記手法で得られた脂肪組織由来幹細胞をコラーゲン

ゲル内に、気管上皮細胞はそのコラーゲンゲル上で培養した。また、コントロールとして気管上皮細胞のみをコラーゲンゲル上で培養し、両者を比較した。

② in vivo の実験

ラット気管欠損モデルを作製し、脂肪組織由来幹細胞を含むコラーゲンゲルをコラーゲンスポンジとポリプロピレンメッシュからなる組織再生型人工材料上に重層したハイブリッド人工気管をラット気管欠損モデルに移植した。細胞を含まないものをコントロールとして、脂肪組織由来幹細胞が上皮層の再生に及ぼす影響を組織化学的手法で評価した。

4) 組織工学的手法を用いた組織再生型胸腔内人工気管の研究

従来開発してきたコラーゲンによる細胞外マトリックスを持つ人工気管を、腹部内に埋入し自己組織化した上で胸腔内へ血流付グラフトとして移植する新たなモデルを試みた。合成高分子骨格と3次元コラーゲンマトリックスで構成された気管原基を血流の豊富な腹腔内脂肪組織(大網)に埋入、自己組織化した上で胸腔内へ導き気管と置換するものである。気管骨格(長さ5cm直径30mm)は合成高分子(ポリプロピレン-ソフトマレックスメッシュ™)で作成した。シート状のメッシュを加熱して接合し十分な強度と耐久性を持つものとした。この骨格にプラズマ放電を1分間行い、表面構造を変化させる。さらに1%コラーゲン溶液を骨格周囲に10mmの厚みで流し込み、-80℃で冷凍後、凍結乾燥し、スポンジ様構造とする。低圧乾熱器で140度24時間熱架橋をおこない、コラーゲンスポンジに強度を与えた。実験動物(ビーグル成犬 体重7から12kg 3頭)の腹腔内脂肪組織(大網)に被覆、埋入し3週間後、開腹・開胸を行った。自己組織化された人工気管を横隔膜を通して有茎性に胸腔内へ導入し、自己気管を3cmにわたり切除し、この人工気管を間置・置換した。実験動物は術直後・翌日・1週間後・1ヵ月後・3ヵ月後・6ヵ月後と電子内視鏡で内腔を観察した。

(2) 喉頭の再生

1) 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討

ビーグル犬の骨髄より採取した間葉系細胞を2週間シャーレで培養・継代を行い、5-bromodeoxyuridine (BrdU) を添加する。BrdUは細胞周期S期に特異的に取り込まれるDNA合成基質の1つであるチミジンのアナログで、分裂増殖する細胞にのみ取り込まれる。2週間後にこの細胞を回収し、電気メスで傷害を加えた同じイヌの声帯に移植し、2週間後屠殺。摘出喉頭を抗BrdU抗体で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

別のビーグル犬で上記の条件と同じ手法で培養した間葉系細胞に、レンチウイルスを用いて緑色蛍光蛋白であるGFPを導入。2週間後にこの細胞を回収し、約300万個の細胞を同ビーグル犬の傷害声帯に移植。2ヵ月後に屠殺し、摘出喉頭を上皮系細胞のマーカーであるパンサイトケラチン、筋系細胞のマーカーであるデスミンで染

色し、蛍光顕微鏡で観察した。

2) 人工材料と自己筋膜を用いた声帯再生の試み

ビーグル成犬5頭を用い、全身麻酔下に甲状軟骨の一部を含め、左声帯を切除する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を被覆した。この材料に末梢動脈血を含浸させ大腿筋膜にて先の材料を包み、創部に固定した。

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4例のあわせて7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、喉頭内視鏡やCTにて評価した。

C. 研究結果

1. 基礎研究

(1) 気管の再生

1) 上皮培養細胞を用いた障害に起因する細胞死を防止する方法の研究

これまでアポトーシスを防ぐことが知られている低塩素イオン濃度条件で、研究方法に示した細胞障害の実験を行ったところ、コントロール条件（細胞外NaCl溶液）においては、amphotelicin B投与により、約1時間で、殆どの細胞に蛍光色素の流入が認められ、細胞が障害を受けたことが明らかとなった。塩素イオンの代わりに分子量の大きい有機陰イオンであるグルコン酸を用いた溶液で細胞障害刺激を行うと、蛍光色素の細胞内へ流入が遅延し、ヨウ素イオン、臭素イオンにより塩素イオンを置換した場合は、コントロール溶液と同様の細胞障害が起きた。塩素イオンチャネル阻害剤（DIDS、NPPB）を用いて塩素イオンの細胞内流入を防ぐと細胞障害は抑制された。更に培養気道上皮細胞においても低塩素イオン濃度条件、および塩素イオンチャネル阻害剤により細胞障害の低減が明らかとなった。

2) 線維芽細胞：

①気管再生に用いる自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

歯肉粘膜に由来する線維芽細胞は、気管上皮細胞の増殖、移動、細胞分化気管線維芽細胞と同等もしくはそれ以上の促進作用を示し、誘導された上皮層の形態も正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層であった。

②気管由来線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管

(A)線維芽細胞を混合・ゲル化しコラーゲンスポンジ上に重層したモデル、(B)コラーゲンスポンジにコラーゲンゲルのみ重層したモデル、(C)コラーゲンスポンジのみのモデルのそれぞれをラット気管欠損モデル

に移植したところ、移植より14日目では、(A)では円柱線毛上皮が多数認められ、(B)では立方線毛上皮が部分的に認められ、(C)では重層扁平上皮が認められた。ゲル層のm-YFP陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、術後3日目ではゲル層に分散したままであったが、7日目では上皮下への遊走・配列が認められ、14日目にはほぼ消失していた。線毛の有無、上皮細胞の形態などといった上皮層の分化は(A)が最も進んでおり、(C)が最も遅れていた。

3) 自家脂肪組織由来幹細胞を利用した気管再生

①in vitroの実験

脂肪組織由来幹細胞と共に培養した気管上皮細胞はいずれも線毛細胞や杯細胞が極性をもって存在する多列線毛上皮層を再構築しており、上皮層の表面には線毛細胞による線毛運動や杯細胞による粘液の分泌が観察された。コントロールでは、線毛細胞や杯細胞は少なく、多列線毛上皮層は形成していなかった。

②in vivoの実験

脂肪組織由来幹細胞を含むハイブリッド人工気管の移植1週間後、その表面にはコントロールと比較して上皮化が促進しており、移植2週間後には円柱状の線毛細胞に分化した細胞および偽多列線毛上皮層が認められたが、コントロールではほとんど認められなかった。

4) 組織工学の手法を用いた組織再生型胸腔内人工気管の研究

実験動物（3頭）は術直後・翌日・1週間後・1ヵ月後・3ヵ月後・6ヵ月後、12ヵ月経過後に電子内視鏡で内腔を観察した。術直後より気管の内腔は自己組織で覆われており、完全に気密が保たれていた。経時的な内視鏡の観察では3頭とも人工気管の内腔の狭窄・感染・空気漏れ・逸脱を認めず、内腔からは粘膜下に発達した微小血管がみとめられ、血流が再建気管全長にわたり良好であることが認められた。短期的な合併症は認めなかったが1頭は術後8ヵ月経過後に腸閉塞から腸管壊死をおこし死亡した。術後4ヵ月に1頭を犠牲死させ評価を行った。実験動物の胃大網動脈に血管造影用カテーテルを挿入し、血管造影を行った。人工気管内への血流が全長にわたり確保されているのが確認された。再生気管組織厚は3mmで、内腔は自己組織に覆われていた。摘出人工気管の内腔には一部線毛上皮の再生を認めた。

(2) 喉頭の再生

1) 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討

BrdUでラベルしたイヌ声帯に移植した間葉系細胞は、移植2週間後でも蛍光顕微鏡にて組織内で多数観察することができた。

レンチウイルスでGFPを導入した間葉系細胞の一部は、移植された領域で上皮系、筋系細胞に分化していた。

2) 人工材料と自己筋膜を用いた声帯再生の試み

5例全例で術後の全身状態は良好であり、皮下気腫などの合併症も認めなかった。

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週間目ころには筋膜が消失し、上皮化がほぼ完了。1ヵ月目には通常と同様のきれいな粘膜面が観察され切除部に充填した人工材料は上皮化し、声帯と喉頭室の粘膜がきれいに再生したことがわかった。

5例全例で喉頭粘膜の完全な上皮化を認めたが2例では左声帯の変形を生じ、また、うち1例で小肉芽の形成を認めた。

摘出喉頭の組織所見ではポリプロピレンの内腔側に完全な上皮化を認め、上皮組織も層状に形成されていた。上皮を拡大すると正常と同様の重層扁平上皮の再生がみられ、一部で筋組織の再生を生じていた。

ハイスピードビデオによる声帯振動解析では、再生声帯の振動幅は健側比11.3%であった。

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た。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4例のあわせて7例に行った。

A. 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4年の時点では、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3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スポンジがみられていたが、術後2ヵ月で人工材料内腔面はほぼ上皮化し、術後2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。

B. 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2週間ではコラーゲンスポンジみられ、術後2ヵ月で人工材料に一致して肉芽増生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9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。

2) 症例5：気管狭窄症

48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スポンジ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12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スポンジが観察され、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1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。

4) 症例7：特発性気管狭窄症

29歳、女性。主訴は呼吸困難。平成3年に意識消失発作にて某大学病院小児科を受診し、てんかん等が疑われたが原因不明であった。平成7年呼吸苦出現し同院耳鼻咽喉科初診、頸部Xp、内視鏡で全周性の声門下狭窄と診断された。平成8年と9年に合計4回の喉頭気管形成術をうけたが再狭窄を来し、T-tubeを輪状軟骨から第1-2気管軟骨の高さに挿入した。

手術は、全身麻酔下に瘻孔部の皮膚と内腔の肉芽を除去し、最終的な軟骨欠損部は11×20mmに形成した。同部に末梢血で湿潤した組織再生型人工材料を22×35mmにトリミングしパッチする形で縫合した。

術後2週間では白苔の付着がみられていた。術後1ヵ月程で軽度肉芽形成を認めたが、術後3ヵ月では人工材料内腔面はほぼ上皮化し、現在のところ再狭窄も認めず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には大きな機能障害が残り 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、一期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るという研究には、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4年で、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7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 1例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。

気道上皮化の加速に対する方策として細胞障害の軽減策を検討した。その結果、これまでアポトーシスを防ぐことが知られている低塩素イオン濃度条件で細胞が障害を受けたことが明らかとなり、ヨウ素イオン、臭素イオンにより塩素イオンを置換した場合も同様の細胞障害が起こった。細胞外の塩素濃度を下げたり、塩素イオンチャネル阻害剤を投与したりすることで細胞死が防げることが分かった。培養組織を生体に移植すると、虚血や免疫応答により様々な形で移植組織中の細胞の障害が起こることが予想されるが、ハロゲンイオンの細胞内流入

を抑えるとそれらの障害が低減できる可能性があると考えられる。実際の組織においては、体液のイオン組成を大きく変えることは不可能なので、塩素イオンチャネル阻害剤の投与が移植組織の生存を助ける薬物として有用と考えられる。ただし、塩素イオンチャネル阻害剤は、実際に臨床で使われておらず、実際の使用には、今後安全性の検討などを行う必要がある。

また、癌や外傷などで気管の一部を切除した場合、物理的、生理的な機能を消失しているため、感染や機能障害のリスクが高くなる。この対策法として人工材料へ線維芽細胞、および脂肪組織由来幹細胞を組み込んだハイブリッド人工材料による気管の再生を考案した。線維芽細胞は、全身の結合組織に散在する細胞であり、組織が損傷を受けると周囲から集まり、細胞外マトリックス (ECM) を産生して結合組織を再生する。線維芽細胞が産生する ECM は、結合組織だけではなく同時に上皮組織の再生を促進し、由来組織が異なる線維芽細胞は ECM の産生量や上皮細胞に及ぼす効果が異なることが報告されている。歯肉粘膜に由来する線維芽細胞は、気管上皮細胞の増殖、移動、細胞分化気管線維芽細胞と同等もしくはそれ以上の促進作用を示し、誘導された上皮層の形態も正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層であった。歯肉粘膜の採取は容易であり、患者への負担も少ないことから、気管上皮層の形成を促進する線維芽細胞の供給組織として口腔粘膜が最も適切であると考えられた。

線維芽細胞を混合し、自己組織再生型人工気管に用いられているコラーゲンスポンジ上に重層しゲル化させた移植片は、線維芽細胞を含まないコラーゲンスポンジのモデルより移植後に気管の正常構造と同じ円柱線毛上皮が多数認められ、線毛の有無、上皮細胞の形態などといった上皮層の分化が最も進んでいた。気管上皮細胞の増殖・分化に対する線維芽細胞の促進的効果を示唆するものと考えられた。

脂肪組織由来幹細胞は上皮層・上皮下層の再構築を促進することが明らかになった。特に上皮に関しては正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層形成が促進しており、本研究で使用した幹細胞が分化誘導に大きな役割を果たしたものと考えられた。

頸部に比べて胸腔内の気管は周囲の組織からの血流が乏しいため、再建後の壊死や縫合不全の可能性も高いことが予想される。そこでわれわれは人工気管を、腹部内に埋入し自己組織化した上で胸腔内へ血流付グラフトとして移植する新たなモデルを作製した。この手法で作成された人工気管は、実験動物において気管としての機能を発揮できることが示された。再建された気管は、再建手術時より全長にわたり自己組織化され、自己血流が確保され生着していることが示された。

細胞移植は将来有望な再生治療のひとつである。しかし、移植された細胞が組織再生にどのように働くかといった生体内動態についてはいまだ十分な検討はなされていない。喉頭に移植した細胞の細胞内動態の検討を

行った。ラベルした骨髄由来イヌ間葉系細胞を同一のイヌ声帯に移植。2週間後移植部位を切除したところ移植細胞の少なくとも一部は生体内で増殖していないことが分かり、一方で移植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わかった。移植細胞の多くは、細胞増殖することなく組織内にとどまり、直接分化することにより声帯再生に寄与している可能性を見出した。さらに、損傷組織の大きさと移植細胞数から考えて、移植細胞のおもな働きは Paracrine、といったシグナル伝達で、これによるホストの自己再生が関与していることを示唆させた。

さらに、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を作製し、正常粘膜上皮が再生することを観察できた。あきらかな合併症はみられず、人工材料と自己筋膜を用いる新規技術の確立により、声帯や甲状軟骨など喉頭の複雑構造を再生できる可能性が見いだされた。

本研究により、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。今後の展望として、我々が開発した自己組織再生型の人工材料は、特殊な技術を要し手作業で少数例にしか対応できないため、広く国民に成果を還元するためには量産ラインの整備に向けたモデルを構築し、一般臨床として普及させることである。また、本研究では、気道の部分欠損に限定して再生医療を行ってきたが、今後は全周性欠損にも応用し、より多くの患者の QOL 向上への貢献が期待される。

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。

近年再生医学研究は急速に進められているものの、臨床に应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) Nagase H, Gren J, Saito A, Liu K, Agre P, Hazama A, Yasui M: Molecular cloning and characterization of mouse aquaporin 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 352:12-16, 2007
- 2) Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magruffov A, Tamura Y, Umeda H, Kishimoto M, Nakamura T, Ito J: Experimental regeneration of canine larynx: a trial with tissue engineering techniques. *Acta Otolaryngol* 557:66-72, 2007
- 3) Yamashita M, Kanemaru S, Hirano S, Magruffov A, Tamaki H, Tamura Y, Kishimoto M, Omori K, Nakamura T, Ito J: Tracheal regeneration after partial resection: A tissue engineering approach. *Laryngoscope* 117(3): 497-502, 2007
- 4) Nakashima S, Nakamura T, Miyagawa K, Yoshikawa T, Kin S, Kuriu Y, Nakase Y, Sakakura C, Otsuji E, Hagiwara A, Yamagishi H: In situ tissue engineering of the bile duct using polypropylene mesh-collagen tubes. *Int J Artif Organs* (in press)
- 5) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. *Tissue Eng* 12 (9) : 2619-2628, 2006
- 6) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(7): 501-506, 2006
- 7) Katsuda S, Miyashita H, Takazawa K, Machida N, Kusanagi M, Miyake M, Hazama A. Mild hypertension in young Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolaemic (KHC) rabbits. *Physiol Meas* 27:1361-1371, 2006
- 8) Matsuno T, Nakamura T, Kuremoto K, Notazawa S, Nakahara T, Hashimoto Y, Satoh T, Shimizu Y: Development of β -tricalcium phosphate/ collagen sponge composite for bone regeneration. *Dental Materials Journal* 25: 138-144, 2006
- 9) Morino S, Toba T, Araki M, Azuma T, Tsutsumi S, Tao H, Nakamura T, Nagayasu T, Tagawa T: Noninvasive assessment of pulmonary emphysema using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Exp Lung Res* 32: 55-67, 2006
- 10) Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kuriu Y, Miyagawa K, Sakakura C, Otsuji E, Ikada Y, Yamagishi H, Hagiwara A: Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue-engineered small intestine. *J Surg Res* 137: 61-68, 2007
- 11) Nakase Y, Hagiwara A, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kuriu Y, Miyagawa K, Sakakura C, Otsuji E, Shimizu Y, Ikada Y, Yamagishi H: Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng* 12: 403-412, 2006
- 12) Tao H, Araki M, Sato T, Morino S, Kawanami R, Yoshitani M, Nakamura T: Bronchoscopic treatment of postpneumectomy bronchopleural fistula with a collagen screw plug. *J Thorac Cardiovasc Surg* 132: 99-104, 2006
- 13) Tanaka S, Takigawa T, Ichihara S, Nakamura T: Mechanical properties of the bioabsorbable polyglycolic acid-collagen nerve guide tube. *Polym Eng Sci* 46: 1461-1467, 2006
- 14) 大森孝一：喉頭疾患の治療：最近の話題。大阪府耳鼻咽喉科医学会会報，(66)，23～44，2007
- 15) 大森孝一，中村達雄，多田靖宏，野本幸男，鈴木輝久，小林 謙，佐藤 聡，金丸眞一，安里 亮，山下 勝：気道の再生と臨床応用。分子呼吸器病 10(3)：216-219, 2006
- 16) 大森孝一，中村達雄，多田靖宏，野本幸男，鈴木輝久，金丸眞一，安里 亮，山下 勝：甲状腺癌治療における気道の再生医療。再生医療5(4)：545-549, 2006
- 17) 中村達雄：末梢神経の再生。治療88: 3028-3032, 2006
- 18) 稲田有史，中村達雄，諸井慶七郎，森本 茂：神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療。末梢神経 17: 325-327, 2006
- 19) 萩原明於，阪倉長平，大辻英吾，山岸久一，中村達雄，清水慶彦：癌治療における神経再生の応用。再生医療5: 99-103, 2006
- 20) 大森孝一，多田靖宏，松塚 崇，野本幸男，鈴木輝久，中村達雄，金丸眞一，安里 亮，山下 勝，田中信三：喉頭・気管狭窄の再生治療。日本気管食道科学会会報 57(2) :153-154, 2006
- 21) 森野茂行，永安 武，中村達雄：肺気腫。「細胞増殖因子と再生医療」松本邦夫，田畑泰彦(編集)，メディカルレビュー社，101-105, 2006

2. 学会発表

- 1) Omori K: Regenerative medicine of laryngeal and tracheal tissue by in situ tissue engineering technique. The 5th East Asian Conference on Phonosuegery (2006. 12. 2, Seoul)
- 2) Omori K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Nakamura T, Kanemaru S, Yamashita M, Asato R: Clinical application of in situ tissue engineering for the laryngeal and tracheal tissue. 127th American

- Laryngological Association (2006.5.19-20, Chicago)
- 3) Nomoto Y, Kobayashi K, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Omori K, Hazama A, Nakamura T: The effects of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. 86th The American Broncho- Esophagological Association (2006.5.19-20, Chicago)
 - 4) Nakashima S, Nakamura T, Yoshikawa T, Kin S, Kuriu Y, Nakase Y, Sakakura C, Otsuji E, Hagiwara A, Yamagishi H: Tissue engineering of the common bile duct using mesh-collagen hybrid scaffolds. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10, Chicago)
 - 5) Nakase Y, Hagiwara A, Nakamura T, Nakashima S, Ikada Y, Yamagishi H: Morphologic evaluation of autologous in situ tissue-engineered small intestine. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10, Chicago)
 - 6) Araki M, Tao H, Sato T, Nakajima N, Sugai H, Nagayasu T, Nakamura T: Experimental study on in situ tissue engineering of stomach using new collagen sponge scaffold coated with biodegradable copolymers. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10, Chicago)
 - 7) Inada Y, Nakamura T, Toba Y, Morimoto S, Yamashita S, Takakura Y, Inada M: In-situ tissue engineering for the treatment of peripheral nerve injuries with a Polyglycolic acid-Collagen tube in Japan. 44th Annual Meeting of the Italian Society for Surgery of the Hand (2006.10.13, Milano)
 - 8) Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Ohno T, Suehiro A, Hirano S, Omori K, Nakamura T, Ito J: The destiny and the behavior of the autologous bone marrow derived stromal cells implanted into the vocal fold. 2nd Modern Drug Discovery and Development Summit (2006.12.4-6, Philadelphia)
 - 9) Kanemaru S, Yamashita M, Magruffov A, Umeda H, Tamura T, Omori K, Nakamura T, Ito J: Tissue engineered regeneration of recurrent laryngeal nerve by two types of artificial nerve conduits. 127th American Laryngological Association (2006.5.19-20, Chicago)
 - 10) Yamashita M, Kanemaru S: Tracheal regeneration after partial resection using tissue engineering technique- in vivo animal experiment. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International (2006.4.25-27, USA)
 - 11) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 挾間章博, 中村達雄, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド型人工気管の作製. 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2006.5.11-13, 東京)
 - 12) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 挾間章博, 和田郁夫, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド人工気管作製の試み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 13) 小林 謙, 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 脂肪組織由来の細胞が気管上皮層の再生に及ぼす影響. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
 - 14) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 金丸眞一, 大森孝一: in situ Tissue Engineering の手法を用いた気道再生の臨床応用. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
 - 15) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 佐藤 聡, 岡野渉, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 線維芽細胞を組み合わせたハイブリッド人工気管作製の試み. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
 - 16) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤聡, 和田郁夫, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: 気管由来線維芽細胞を含有したハイブリッド人工気管モデル. 第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6, 札幌)
 - 17) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙, 佐藤聡, 小川 洋, 三宅将生, 挾間章博, 中村達雄, 金丸眞一, 田畑泰彦, 大森孝一: ラット気管上皮・上皮下層の組織再生の試み. 第18回日本喉頭科学会 (2006.4.13-14, 熊本)
 - 18) 荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 永安 武, 中村達雄: コラーゲンスポンジと吸収性ポリマーを用いた in situ tissue engineering による胃壁再生への取り組み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 19) 荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 玄 丞然, 永安 武, 中村達雄: 新しい生体内分解性合成接着剤を用いた肺瘻閉鎖の研究. 第59回日本胸部外科学会定期学術集会 (2006.10.1-4, 東京)
 - 20) 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 高倉義典: 末梢神経生体内再生治療: 臨床応用の現状. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会 (2006.10.19, 長崎)
 - 21) 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 川西弘一, 橋爪圭司, 古家 仁, 小島康宣, 重松浩司, 河村健二, 矢島弘詞, 高倉義典, 面川庄平: 神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療の成績. 第33回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (2006.10.27, 奈良)
 - 22) 市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 遠藤克昭, 藤川孝満, 福田正順, 糸井真一, 中田 顕, 種谷 出, 瀧川敏算, 黒澤 尚: 距離のある神経欠損に対する神経チューブの開発. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)

- 23) 上田寛樹, 福田正順, 山本雅哉, 中村達雄, 田畑泰彦: 熱脱水架橋コラーゲンスポンジとトランスフォーミング増殖因子 β 1との相互作用. 第9回日本組織工学会 (2006.9.8. 京都)
- 24) 岡本英之, 細井裕司, 稲田有史, 金丸眞一, 中村達雄: 人工神経 (PGA-collagen tube) を用いて顔面神経再建術を施行した耳前部悪性腫瘍の1例. 第29回日本顔面神経研究会 (2006.6.1-2. 新潟)
- 25) 田尾裕之, 中村達雄: プレオマイシン肺線維症モデルラットに対する, 自己骨髄培養細胞経気道投与の効果. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 26) 中井隆介, 東 高志, 福田正順, 中村達雄, 浦山慎一, 岸上義弘, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Diffusion Tensor MRI を用いたイヌの脊髄損傷モデルにおける脊髄修復過程の画像化. 第34回日本磁気共鳴医学会大会 (2006.9.14-6. つくば)
- 27) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジを用いた新しい人工胆管作成の試み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 28) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 栗生宜明, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジ及びポリ乳酸メッシュを用いた人工胆管作成の試み. 第61回日本消化器外科学会定期学術総会 (2006.7.13-15. 横浜)
- 29) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第65回日本癌学会学術総会 (2006.9.28-30. 横浜)
- 30) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第44回日本癌治療学会総会学術集会 (2006.10.18-20. 東京)
- 31) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Polypropylene Mesh-Collagen Tube による総胆管再生の試み. 第68回日本臨床外科学会 (2006.11.9-11. 広島)
- 32) 中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第15回日本形成外科学会基礎学術集会 (2006.10.12-13. 埼玉)
- 33) 中村達雄: 末梢神経損傷と再生医学の臨床応用. 第10回京都内科神経懇話会 (2006.9.2. 京都)
- 34) 中村達雄: 末梢神経の再生 人工神経の基礎と臨床応用. 第9回 Sensory Rehabilitation セミナー (2006.9.23-24. 愛知)
- 35) 中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第3回癌治療への再生医療応用研究会 (2006.10.19. 東京)
- 36) 中村達雄, 佐藤寿彦, 市原理司, 小林丈士, 中田 顕, 荒木政人, 田尾裕之, 上田寛樹, 遠藤克昭, 東 高志, 稲田有史, 早川克己: 組織再生型人工気管の6年間長期観察. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 37) 福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 東 高志, 遠藤克昭, 早川克己, 市原理司, 西尾健資, 藤川孝満, 堤 定美: 脊髄損傷に対する有茎大網被覆治療の有効性. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 38) 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 大森孝一, 平野 滋, 伊藤壽一: 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討. 第18回日本喉頭科学会 (2006.4.13-14. 熊本)
- 39) 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 大野恒久, 大森孝一, 平野 滋, 中村達雄, 伊藤壽一: 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 40) 金丸眞一, 中村達雄, 山下 勝, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大野恒久, 大森孝一, 伊藤壽一: 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)
- 41) 山下 勝, 金丸眞一, 梅田裕生, 田村芳寛, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: 気管部分切除モデルに対する組織工学的再生. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12. 東京)
- 42) 山下 勝, 金丸眞一, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: コラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュと大腿筋膜を用いたイヌ声門の再生. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8. 京都)
- 43) Omori K, Nakamura T, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Kobayashi K, Kanemaru S, Yamashita M, Asato R: [シンポジウム] Regenerative medicine of the trachea and larynx by in situ tissue engineering. 第23回日本呼吸器外科学会 (2006.5.25-27. 東京)
- 44) 大森孝一: [ランチョンセミナー] 再生医療の現状と展望. 第68回耳鼻咽喉科臨床学会 (2006.6.23-24. 金沢)
- 45) 鈴木輝久: [Research Forum] 組織工学的手法を用いた気管再生. 第55回日耳鼻東北連合学会 (2006.7.22-23. 弘前)
- 46) 鈴木輝久, 小林 謙, 多田靖宏, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: [ワークショップ] 気管上皮層の効果的再生. 第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6. 札幌)
- 47) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 中村達雄, 安里 亮, 山下 勝, 大森孝一: [ワークショップ] 組織工学的手法を用いた気道再生の臨床応用. 第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6. 札幌)

- 48) 大森孝一：〔特別講演〕 喉頭・気管疾患の再生医療。第241回筑後耳鼻科カンファレンス(2006.6.20, 久留米)
- 49) 大森孝一：〔特別講演〕 喉頭外科：デイ・サージャリーと再生医療。第4回北海道耳鼻咽喉科セミナー(2006.7.15, 札幌)
- 50) 大森孝一：〔特別講演〕 喉頭疾患の治療：最近の話題。第38回鹿児島県耳鼻咽喉科学術集会(2006.3.16, 鹿児島)
- 51) 大森孝一：〔特別講演〕 気道領域の再生医療。NAGOYA ENTセミナー2006(2006.11.2, 名古屋)
- 52) 小林 謙：〔指定講演〕 細胞を用いた気管組織再生。第94回日本耳鼻咽喉科学会福島県地方部会学術講演会(2006.4.16, 福島)
- 53) 大森孝一：〔特別講演〕 喉頭デイ・サージャリーと再生医療。第9回御茶ノ水耳鼻咽喉・頭頸科治療研究会(2006.4.20, 東京)
- 54) 大森孝一：〔特別講演〕 喉頭・気管の外科治療。第3回頭頸部手術手技・感染症研究会(2006.11.22, 福岡)
- 55) 大森孝一：気道の再生治療。先端医療実現のための基盤技術開発研究はどこまで進んだか？平成18年度厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会。(2007.2.21, 東京)
- 56) 金丸眞一：〔ワークショップ〕 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生。第58回日本気管食道科学会(2006.10.6, 札幌)
- 57) 山下 勝：〔ワークショップ〕 声門の再生へむけて。第58回日本気管食道科学会(2006.10.5-6, 札幌)

3. 報道

「医療材移植、気道を再生」日本経済新聞、
(2007.3.26) 日刊

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組織再生型胸腔内人工気管の研究

分担研究者 中村 達雄（京都大学再生医科学研究所）

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

われわれのグループでは組織再生工学の手法を用いて呼吸器系の臓器の再生研究に取り組んできた。呼吸器系は中枢気道系（気管）・末梢気管支肺胞系に大別される。一昨年度の研究では主として末梢気管支肺胞系の再生に取り組み、増殖因子 bFGF 投与による犬疾患モデルの再生効果について報告した。昨年度の研究では人工気管の力学的特性についての研究と膜様部をもつ新しい構造の人工気管の開発設計を行った。本年度は臨床应用到に必要な要件をみだし、あらたな人工気管の設計開発を行った。胸腔内気管は周囲の組織からの血流が乏しいため、再建後の壊死や縫合不全の可能性も高い。今回われわれは人工気管を、腹部内に埋入し自己組織化した上で胸腔内へ血流付グラフトとして移植する新たなモデルを作製した。

A. 研究の目的

外科的な気管再建の対象となる疾患は、主として気管原発性腫瘍、肺がんの気管浸潤のほか良性疾患として外傷や気管内挿管チューブのカフによる瘢痕狭窄があげられる。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。しかしながら、人工気管開発は遅れ、現在も臨床使用可能な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系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6 cm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。しかし長区域の切除では気道の広範剥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。このような症例では、気管吻合部両端にかかる張力を減ずるために、患者の頸部と前胸部の固定を行う必要があるなど負担が極めて大きかった。さらに胸腔内気管周囲組織は両側に肺・前面に胸骨・後ろ側に胸椎で囲まれた空間であり、気管自体も血流が乏しく、広範囲の剥離・受動操作によりさらに条件は悪化する。このため、吻合部の血流不全および張力による吻合不全はもっとも危惧される合併症である。

また、気管は気道という外界と人体内を隔てる組織であり、常に気流が外界より流れ込んでいる状態にあるため、感染の可能性も高い。

われわれのグループでは上皮が再生し、自己組織化する新しいタイプの人工気管が進めている。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。

1) 組織親和性の高いバイオマテリアルの開発

人工気管に求められる性質としてまず器官として機能するために内腔を保持する力学的強度と耐久性を備えていなければならない。新型の人工気管は高分子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。さらに人口高分子材料を自己組織化し、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。

2) 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 (Fig 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。

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出来るようになった。

3) 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見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こし、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側に機械的刺戟ストレスが生じるため、反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（ $a \times b = 1 \times 2.4$ ）にしたチューブ（Fig 2）の耐圧縮強度の比較を行うと（Fig 3）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。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900~1000g重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。

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（Fig 4）。

4) 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置換で消えてゆき、自己のコラーゲンと置き換わってゆく。その組織の上に上皮が伸びてゆく。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型か六角形をした扁平上皮が内面を覆い（Fig 5）、その扁平上皮に丈の低い線毛が生じ（Fig 6）、そういった長い線毛をもった細胞の数が増加して最終的には密集した線毛に覆われた上皮（Fig 7）に変化してゆく。この過程は1~6ヵ月で起こってゆくことがこれまでの研究で確認されている。

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。5cm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。

新たな自己組織型人工器官モデルの開発

これまで開発研究にあたってきた自己組織再生型気管では5cmにわたる胸腔内気管再建に成功してきた。

5) 今後臨床応用をするためには

(1) 再建時にすでに全長にわたり自己組織化され、人工物の露出がないこと。

(2) 再建時に全長にわたり血流が確保されていること。

という特性が必要である。これらを解決するために自己組織化されたあらたな人工気管の開発をおこなった。

B. 方 法

われわれはあらたに従来開発してきたコラーゲンによる細胞外マトリックスを持つ人工気管を、腹部内に埋入し自己組織化した上で胸腔内へ血流付グラフトとして移植するあらたなモデルを試みた。Fig. 8に示すとおり、合成高分子骨格と3次元コラーゲンマトリックスで構成された気管原基を血流の豊富な腹腔内脂肪組織（大網）に埋入、自己組織化した上で、Fig. 9に示すように胸腔内へ導き気管と置換するものである。

気管原器の作成

Fig.10に気管原器の外観を示す。気管骨格（長さ5cm 直径30mm）は合成高分子（ポリプロピレン-ソフトマレックスメッシュ™）で作成した。シート状のメッシュを加熱して接合し十分な強度と耐久性を持つものとした。この骨格にプラズマ放電を1分間行い、表面構造を変化させる。さらに1%コラーゲン溶液を骨格周囲に10mmの厚みで流し込み、-80℃で冷凍後、凍結乾燥し、スポンジ様構造とする。低圧乾熱器で140度24時間熱架橋を行い、コラーゲンスポンジに強度を与えた。

実験動物への埋入・気管再建術

実験動物（ビーグル成犬 体重7から12kg 3頭）の腹腔内脂肪組織（大網）に被覆、埋入した。3週間を経過させて後、開腹・開胸を行った。Fig.11は腹腔内脂肪組織（大網）に埋入後3週間経過した人工気管である。肉眼的に気管原器は大網組織で完全に置換されており、組織血流が良好に保たれているのが観察された。自己組織化された人工器官を、横隔膜を通して有蓋性に胸腔内へ導入し、自己気管を3cmにわたり切除し、この人工気管を間置・置換した。(Fig.12)

実験動物は術直後・翌日・1週間後・1ヵ月後・3ヵ月後・6ヵ月後と電子内視鏡で内腔を観察した。

C. 結 果 (図1参照)

合併症他

実験動物（3頭）は術直後・翌日・1週間後・1ヵ月後・3ヵ月後・6ヵ月後、12ヵ月経過後に電子内視鏡で内腔を観察した。短期的な合併症は認めなかった。術後8ヶ月経過後に1頭が腸閉塞から腸管壊死を起こし死亡した。術後4ヵ月に一頭を犠牲死させ評価を行った。

内視鏡的観察

術直後より気管の内腔は自己組織で覆われており、完全に気密が保たれていた。Fig.13に内視鏡所見を示す。

経時的な内視鏡の観察では3頭とも人工気管の内腔の狭窄・感染・空気漏れ・逸脱を認めず、内腔からは粘膜下に発達した微小血管が認められ、血流が再建気管全長にわたり良好であることが認められた。

人工気管の血流評価

4ヵ月経過後犠牲死させた実験動物の胃大網動脈に血管造影用カテーテルを挿入し、血管造影を行った。人工気管内への血流が全長にわたり確保されているのが確認された。(Fig.14)

再生人工気管の肉眼的所見

再生人工気管は肉眼的に再生気管組織厚は3mmの厚みをもっており、内腔は自己組織に覆われている。(Fig.15)

組織所見を Fig.16、17に示す。高分子骨格の間隙に自己組織の再生が認められ、また多数の微小血管が発達しているのが観察された。

摘出人工気管の内腔には一部線毛上皮の再生を認めた。

D. 考 察

われわれのグループではコラーゲンによる細胞外マトリックスをそなえた自己組織誘導型の人工気管の再建につき一定の成果をあげてきた。これまでに

①合成高分子による気管骨格の作成とコラーゲンの繊維化と3次元マトリックスの成型加工技術の確立

②大動物（ビーグル犬）での完全な自己組織化した気管の再建の成功

③頸部気管での臨床応用の成功

を達成し報告してきた。しかしながら、胸部人工気管の臨床応用に必要な要件として、比較的長く、かつ全長にわたり血流が確実に保障されていることがあげられる。

さらにこの特徴は再建術を行う時点にすでに人工器官に備えられていることが望ましい。この点われわれの開発してきた従来の人工気管では不十分である。

気管再建に関してこれまで最長約6cmの欠損は直接に端々吻合が可能であるとされている。しかしながら、血流が乏しい臓器であり、また気道という外界に吻合部がさらされ、高い張力がかかることから長い欠損部気管再建では高い率で致命的な合併症吻合部の縫合不全が生じる危険性があった。このため、これまで種々の気管移植（同種移植）および人工気管が試みられてきた。

気管は比較的他臓器に比べて拒絶反応が比較的軽度であることから気管移植も考慮されているが、気管という臓器の特性として元来血流が乏しく、生着し内腔を保持し続けることが困難である。また免疫抑制の必要性、さらにソースが絶対的に不足している等種々の制約もあげられる。人工物では、気管内腔という体外空間と接する場所にさらされることから常に局所の感染の問題が生じる。臨床的に有用なものは見られないのが現状である。

今回われわれの提案する新たな自己組織再生型人工気管モデルはこれらの問題を解決するものである。

E. 結 論

今回われわれは人工気管を腹腔内で作製の上、胸腔内へ血流を維持したまま自己組織として移植する方法を試みた。この手法で作製された人工気管は、実験動物において気管としての機能を発揮できることが示された。再建された気管は、再建手術時より全長にわたり自己組織化され、自己血流が確保され生着していることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishimoto M, Kanemaru S, Yamashita M, Nakamura T, Tamura Y, Tamaki H, Omori K, Ito J: Cranial bone regeneration using a composite scaffold of beta-tricalcium phosphate, collagen, and autologous bone fragments. *Laryngoscope*. 116: 212-216, 2006
- 2) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. *Tissue Eng*. 12: 2619-28, 2006
- 3) Tao H, Araki M, Sato T, Morino S, Kawanami R, Yoshitani M, Nakamura T: Bronchoscopic treatment of postpneumonectomy bronchopleural fistula with a collagen screw plug. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 132: 99-104, 2006
- 4) Tanaka S, Takigawa T, Ichihara S, Nakamura T: Mechanical properties of the bioabsorbable polyglycolic acid-collagen nerve guide tube. *Polym. Eng. Sci*. 46: 1461-1467, 2006
- 5) Nakashima S, Nakamura T, Miyagawa K, Yoshikawa T, Kin S, Kuriu Y, Nakase Y, Sakakura C, Otsuji E,

- Hagiwara A, Yamagishi H : In situ tissue engineering of the bile duct using polypropylene mesh-collagen tubes. *Int J Artif Organs*. (in press)
- 6) Nakase Y, Hagiwara A, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kuriu Y, Miyagawa K, Sakakura C, Otsuji E, Shimizu Y, Ikada Y, Yamagishi H.: Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng*. 12: 403-412, 2006
- 7) Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kuriu Y, Miyagawa K, Sakakura C, Otsuji E, Ikada Y, Yamagishi H, Hagiwara A: Endocrine cell and nerve regeneration in autologous *in situ* tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 137: 61-68, 2007
- 8) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Tissue Engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 115: 501-6, 2006
- 9) Matsuno T, Nakamura T, Kuremoto K, Notazawa S, Nakahara T, Hashimoto Y, Satoh T, Shimizu Y: Development of β -tricalcium phosphate/ collagen sponge composite for bone regeneration. *Dental Materials Journal*. 25: 138-144, 2006
- 10) Morino S, Toba T, Araki M, Azuma T, Tsutsumi S, Tao H, Nakamura T, Nagayasu T, Tagawa T: Noninvasive assessment of pulmonary emphysema using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Exp Lung Res*. 32: 55-67, 2006
- 11) Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magruffov A, Tamura Y, Umeda H, Kishimoto M, Nakamura T, Ito J: Experimental regeneration of canine larynx: a trial with tissue engineering techniques. *Acta Otolaryngol*. (in press)
- 12) Yamashita M, Kanemaru S, Hirano S, Magruffov A, Tamaki H, Tamura Y, Kishimoto M, Omori K, Nakamura T, Ito J: Tracheal regeneration after partial resection: A tissue engineering approach. *Laryngoscope*. (in press)
- 13) 中村達雄 : 末梢神経の再生. *治療*. 88 : 3028 - 3032, 2006
- 14) 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 森本 茂 : 神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療. *末梢神経*. 17 : 325 - 327, 2006
- 15) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 佐藤 聡, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝 : 気道の再生と臨床応用. *分子呼吸器病*. 10 : 72 - 75, 2006
- 16) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝 : 甲状腺癌治療における気道の再生医療. *再生医療*. 5 : 89 - 93, 2006
- 17) 大森孝一, 多田靖宏, 松塚 崇, 野本幸男, 鈴木輝久, 中村達雄, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝, 田中信三 : 喉頭・気管狭窄の再生治療. *日本気管食道科学会会報*. 57 : 153 - 154, 2006
- 18) 萩原明於, 阪倉長平, 大辻英吾, 山岸久一, 中村達雄, 清水慶彦 : 癌治療における神経再生の応用. *再生医療*. 5 : 99 - 103, 2006
- 19) 森野茂行, 永安 武, 中村達雄 : 肺気腫. 「細胞増殖因子と再生医療」(編 : 松本邦夫, 田畑泰彦, メディカルレビュー社) 101 - 105, 2006
2. 学会発表
- 1) Asato R, Kanemaru S, Yamashita M, Omori K, Nakamura T, Ito J: Skull base regeneration by polypropylene mesh coated with collagen+beta-TCP. 109th The Triological Society (2006.5.19-22 Chicago)
- 2) Araki M, Tao H, Sato T, Nakajima N, Sugai H, Nagayasu T, Nakamura T: Experimental study on in situ tissue engineering of stomach using new collagen sponge scaffold coated with biodegradable copolymers. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10 Chicago)
- 3) Inada Y, Nakamura T, Toba Y, Morimoto S, Yamashita S, Takakura Y, Inada M : In-situ tissue engineering for the treatment of peripheral nerve injuries with a Polyglycolic acid-Collagen tube in Japan. 44th Annual Meeting of the Italian Society for Surgery of the Hand (2006.10.13 Milano)
- 4) Umeda H, Kanemaru S, Yamashita M, Kishimoto M, Tamura Y, Nakamura T, Asato R, Omori K, Ito J: Tissue Engineered bone regeneration of canine skull using bone marrow derived stromal cells and β -TCP. 109th annual meeting of Triological Society (2006.5.19-22, Chicagao)
- 5) Omori K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Nakamura T, Kanemaru S, Yamashita M, Asato R: Clinical application of in situ tissue engineering for the laryngeal and tracheal tissue. 127th American Laryngological Association (2006.5.19-20 Chicago)
- 6) Kanemaru S, Yamashita M, Magruffov A, Umeda H, Tamura T, Omori K, Nakamura T, Ito J: Tissue engineered regeneration of recurrent laryngeal nerve by two types of artificial nerve conduits. 127th American Laryngological Association (2006.5.19-20 Chicago)
- 7) Nakashima S, Nakamura T, Yoshikawa T, Kin S, Kuriu Y, Nakase Y, Sakakura C, Otsuji E, Hagiwara A, Yamagishi H: Tissue engineering of the common bile duct using mesh-collagen hybrid scaffolds. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10 Chicago)
- 8) Nakase Y, Hagiwara A, Nakamura T, Nakashima S, Ikada

- Y, Yamagishi H: Morphologic evaluation of autologous in situ tissue-engineered small intestine. American Society for Artificial Internal Organs, 52nd Annual Conference (2006.6.8-10 Chicago)
- 9) Nomoto Y, Kobayashi K, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Omori K, Hazama A, Nakamura T: The effects of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. 86th The American Broncho-Esophagological Association (2006.5.19-20 Chicago)
 - 10) Yamashita M, Kanemaru S: Tracheal Regeneration after Partial Resection Using Tissue Engineering Technique- in vivo animal experiment. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International (2006.4.25-27 USA)
 - 11) 中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第15回日本形成外科学会基礎学術集会 (2006.10.12-13, 埼玉)
 - 12) 中村達雄: 末梢神経損傷と再生医学の臨床応用. 第10回京都内科神経懇話会 (2006.9.2, 京都)
 - 13) 中村達雄: 末梢神経の再生 人工神経の基礎と臨床応用. 第9回 Sensory Rehabilitation セミナー (2006.9.23-24, 愛知)
 - 14) 中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用. 第3回癌治療への再生医療応用研究会 (2006.10.19, 東京)
 - 15) 中村達雄, 佐藤寿彦, 市原理司, 小林丈士, 中田 顕, 荒木政人, 田尾裕之, 上田寛樹, 遠藤克昭, 東 高志, 稲田有史, 早川克己: 組織再生型人工気管の6年間長期観察. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 16) 荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 永安 武, 中村達雄: コラーゲンスポンジと吸収性ポリマーを用いた in situ tissue engineering による胃壁再生への取り組み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 17) 荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井 一, 玄 丞然, 永安 武, 中村達雄: 新しい生体内分解性合成接着剤を用いた肺瘻閉鎖の研究. 第59回日本胸部外科学会定期学術集会 (2006.10.1-4, 東京)
 - 18) 荒木政人: 新しい痔瘻治療材料の開発. 第77回近畿肛門疾患懇話会 (2006.11.11, 大阪)
 - 19) 稲田有史: 神経因性疼痛に対する生体内再生治療の現状. 第4回整形外科痛みを語る会 (2006.7.1, 札幌)
 - 20) 稲田有史: 四肢軟部組織, 末梢神経損傷に対する生体内再生治療. 第3回群馬創傷治療フォーラム (2006.7.7, 群馬)
 - 21) 稲田有史: 神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療. 日本ペインクリニック学会第40回大会 (2006.7.15, 神戸)
 - 22) 稲田有史: 神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療. 第17回日本末梢神経学会学術集会 (2006.8.19, 守口)
 - 23) 稲田有史: 難治性疼痛への再生医療の応用. 学術フロンティア推進事業キックオフシンポジウム (2006.8.25, 広島)
 - 24) 稲田有史: 神経因性疼痛に対する生体内再生治療の現状. 第5回神奈川痛みの研究会 (2006.9.2, 横浜)
 - 25) 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 高倉義典: 末梢神経生体内再生治療: 臨床応用の現状. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会 (2006.10.19, 長崎)
 - 26) 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 川西弘一, 橋爪圭司, 古家 仁, 小島康宣, 重松浩司, 河村健二, 矢島弘詞, 高倉義典, 面川庄平: 神経因性疼痛ならびに CRPS (Complex regional pain syndrome) に対する生体内再生治療の成績. 第33回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (2006.10.27, 奈良)
 - 27) 稲田有史, 川西弘一, 面川庄平: 指尖損傷に対する遊離穿通皮弁移植術. 第33回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (2006.10.27, 奈良)
 - 28) 稲田有史, 中村達雄, 遠藤克昭, 諸井慶七郎, 中山佳奈, 橋爪圭司, 古家 仁: 難治性疼痛に対する生体内再生医療最前線: 21世紀のミステリーへの挑戦. 第44回日本人工臓器学会大会 (2006.11.1, 横浜)
 - 29) 稲田有史: 生体内再生治療による末梢神経ならびに軟部組織再建の現状. 第26回兵庫県形成外科医学会研究会/第3回近畿形成外科医学会連合学術講演会 (2006.11.11, 神戸)
 - 30) 市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 遠藤克昭, 藤川孝満, 福田正順, 糸井真一, 中田 顕, 種谷 出, 瀧川敏算, 黒澤 尚: 距離のある神経欠損に対する神経チューブの開発. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 31) 上田寛樹, 福田正順, 山本雅哉, 中村達雄, 田畑泰彦: 熱脱水架橋コラーゲンスポンジとトランスフォーミング増殖因子β1との相互作用. 第9回日本組織工学会 (2006.9.8, 京都)
 - 32) 梅田裕生, 金丸眞一, 岸本正直, 山下 勝, 田村芳寛, 中村達雄, 大森孝一, 伊藤壽一: β-TCP を利用した組織工学的犬頭蓋骨再生. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
 - 33) 梅田裕生, 金丸眞一, 岸本正直, 山下 勝, 田村芳寛, 中村達雄, 大森孝一, 伊藤壽一: β-TCP と自己骨髄由来間葉系細胞を利用した組織工学的犬頭蓋骨再生. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)

- 34) 岡本英之, 細井裕司, 稲田有史, 金丸眞一, 中村達雄: 人工神経 (PGA-collagen tube) を用いて顔面神経再建術を施行した耳前部悪性腫瘍の1例. 第29回日本顔面神経研究会 (2006.6.1-2, 新潟)
- 35) 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 大野恒久, 大森孝一, 平野 滋, 中村達雄, 伊藤壽一: 声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の生体内動態の検討. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 36) 金丸眞一, 中村達雄, 山下 勝, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大野恒久, 大森孝一, 伊藤壽一: 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
- 37) 田尾裕之, 中村達雄: プレオマイシン肺線維症モデルラットに対する, 自己骨髄培養細胞経気道投与の効果. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 38) 中井隆介, 東 高志, 福田正順, 中村達雄, 浦山慎一, 岸上義弘, 丸山克也, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美: Diffusion Tensor MRI を用いたイヌの脊髄損傷モデルにおける脊髄修復過程の画像化. 第34回日本磁気共鳴医学会大会 (2006.9.14-6, つくば)
- 39) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジを用いた新しい人工胆管作成の試み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 40) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 栗生宜明, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: コラーゲンスポンジ及びポリ乳酸メッシュを用いた人工胆管作成の試み. 第61回日本消化器外科学会定期学術総会 (2006.7.13-15, 横浜)
- 41) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第65回日本癌学会学術総会 (2006.9.28-30, 横浜)
- 42) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Collagen Sponge-Mesh tube による胆道再建の試み. 第44回日本癌治療学会総会学術集会 (2006.10.18-20, 東京)
- 43) 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: Polypropylene Mesh-Collagen Tube による総胆管再生の試み. 第68回日本臨床外科学会 (2006.11.9-11, 広島)
- 44) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 狭間章博, 中村達雄, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド型人工気管の作製. 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2006.5.11-13, 東京)
- 45) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 小林 謙, 三宅将生, 狭間章博, 和田郁夫, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド人工気管作製の試み. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 46) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 佐藤 聡, 岡野 渉, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 線維芽細胞を組み合わせたハイブリッド人工気管作製の試み. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
- 47) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 和田郁夫, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: 気管由来線維芽細胞を含有したハイブリッド人工気管モデル. 第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6, 札幌)
- 48) 福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 東 高志, 遠藤克昭, 早川克己, 市原理司, 西尾健資, 藤川孝満, 堤 定美: 脊髄損傷に対する有茎大網被覆治療の有効性. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 49) 山下 勝, 金丸眞一, 梅田裕生, 田村芳寛, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: 気管部分切除モデルに対する組織工学的再生. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 50) 山下 勝, 金丸眞一, 平野 滋, 田村芳寛, 梅田裕生, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一: コラーゲン被覆ポリプロピレンメッシュと大腿筋膜を用いたイヌ声門の再生. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
- 51) 山下 勝: 声門の再生へむけて. 第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6, 札幌)

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

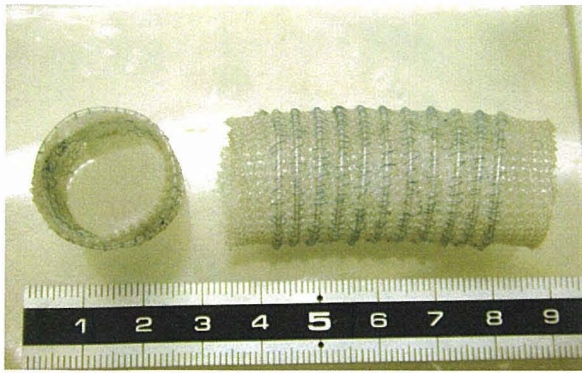


Fig. 1



Fig. 5

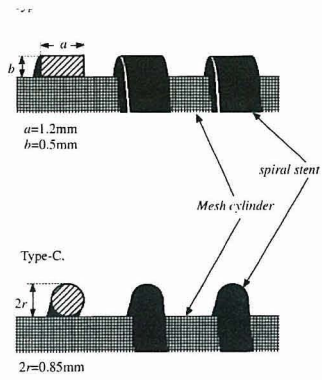


Fig. 2

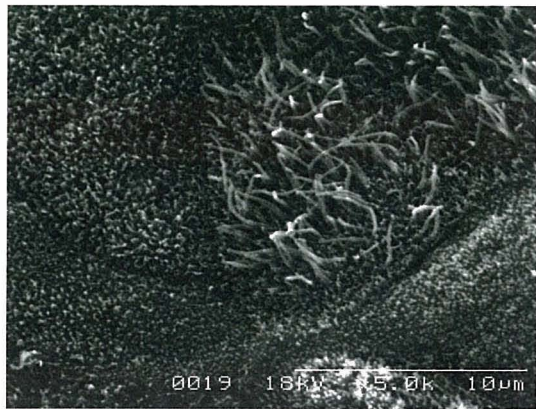


Fig. 6

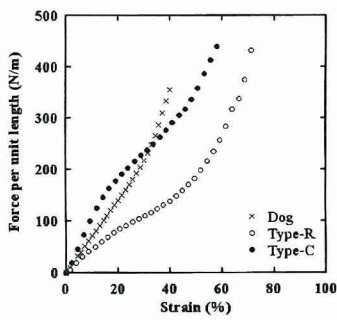


Fig. 3

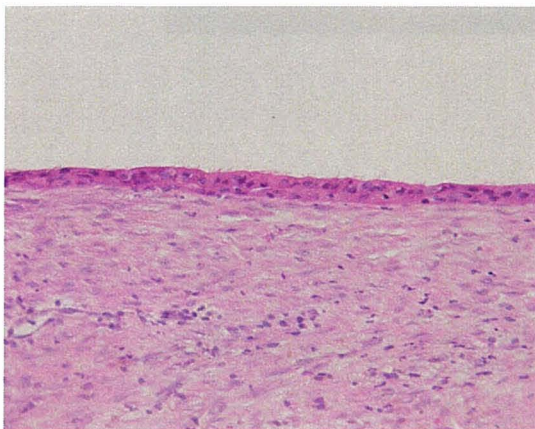


Fig. 4

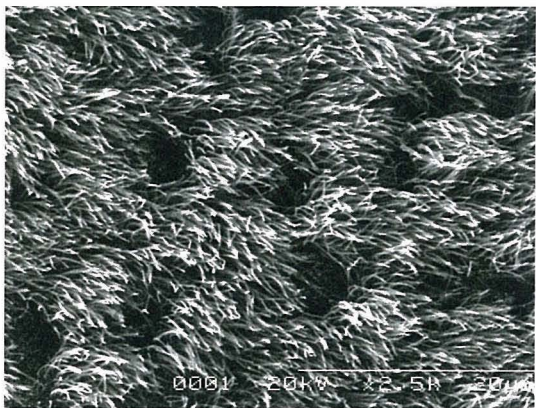


Fig. 7