

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 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

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
	桑畑 直史	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助手
	多田 靖宏	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助手
	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
	安里 亮	京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科	助手
	山下 勝	京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科	大学院生

目 次

班 員 名 簿

I. 総合研究報告

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 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臓器再建応用分野）…………… 22

② 気道再生シートの機能評価

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）…………… 34

③ 自己由来細胞を用いた気管再生組織に関する研究

分担研究者 横山 秀二（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）…………… 37

④ 気管由来の細胞を用いたハイブリット人工気管作製の試み

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）…………… 40

⑤ 気管の効果的再生にむけた自家歯肉線維芽細胞、自家脂肪組織由来細胞の移植

分担研究者 松塚 崇（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）…………… 43

⑥ 声帯再生の研究

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）…………… 46

⑦ 神経再生の研究

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）…………… 50

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）…………… 53

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 56

III. 研究成果の刊行物・別刷…………… 61

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おこな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、臨床に应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わが国で世界に先駆けて実用化されたものである。今後は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、自己の線維芽細胞と人工材料を組み合わせたハイブリッド型人工気管を作製する。また、臨床応用に向けて創傷治癒の促進条件の検索やヒト組織を採取し、その細胞培養法を確立する。

このように Tissue Engineering の手法を用いて、喉頭、気管を標的とし組織再生させることができれば、気道の機能障害回避に大きく貢献できると同時に医療費の削減

に寄与でき、社会的意義は計り知れない。

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

B. 研究方法

[研究における倫理面への配慮]

動物実験に関しては、京都大学および福島県立医科大学に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。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) 人工材料

①人工材料の開発と動物実験

in situ Tissue Engineering により気管を再生させるために、自己組織再生型の人工気管の開発を行った。内腔を保持でき、かつ生体気管に近い支持材を複合化させる設計とした。まず内腔保持のために、医療用材料として今

日広く使用されているメディカルグレードのポリプロピレンメッシュを円筒状にし、ポリプロピレン製のモノフィラメントを外側に巻き付けたチューブを作製した。このチューブに、組織再生の足場となる材料として、コラーゲンをグラフト化および重層コーティングによって厚く付着させ、さらにコラーゲンスポンジを付加させた。この複合チューブの耐圧縮強度の比較試験を行った。各測定の前にプレコンディショニングの操作を行った。測定中は気管試料が乾燥しないように定期的に生理食塩水を噴霧した。各試験には引張試験機を用い、室温、空気中で行った。

①-1. 気管切片引張試験

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

①-2. 気管膜様部引張試験

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

①-3. 気管引張試験

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

①-4. 気管圧縮試験

生体の気管は形状が一樣な円筒ではないため、2種類の圧縮方向 (Direction A, Direction B) で圧縮試験を行った。圧縮速度は5 mm/min に設定し、データの解析は試料の形状を円筒と仮定して行った。

②小欠損モデル

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

2) 気管上皮細胞

①アクアポリンとイオンチャネル

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

免疫染色：ラット気管組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。標本はパラフィンに包埋した。5 μm厚の切片を作製した。その後、各一次抗体と4℃でovernight反応させた。HRP標識またはピオチン標識された二次抗体と室温で反応させた。次に蛍光発色の場合はフルオレセイン標識ストレプトアビジンを反応させ、核染色をヨウ化プロピジウムで行った。酵素発色の場合は対比染色はヘマトキシリンを用いた。染色後、蛍光発色の場合はvector shieldを用いて封入し、酵素発色の場合はエタノール系列、キシレンを通して封入してそれぞれ検鏡した。

一次抗体はAnti-AQP3を100倍希釈、Anti-AQP4を100倍希釈、Anti-AQP5を12,500倍希釈、Anti-Na⁺-K⁺-ATPase

を2,000倍希釈、Anti-PCNA3,000倍希釈で用いた。

②培養上皮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。

③気管の再生

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

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

3) 線維芽細胞

①気管上皮細胞に及ぼす影響

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

ゲンゲル上に上皮細胞を播種し、5日間培養した。GFP陰性の上皮細胞数を測定した。ムチン分泌量の測定は上記の培養10日後の各上皮細胞層上層に分泌されたムチンをPBSで回収し、ELISA法によって測定した。また、移植に適した線維芽細胞の検索を行った。細胞採種はSD系ラットの気管粘膜下層、皮膚真皮、口腔粘膜下層および鼻粘膜下層より組織片培養によって線維芽細胞を、単離して、培養4週間以内に実験に用いた。上皮細胞と線維芽細胞の共培養を行い、培養10日目の標本を免疫染色した。

②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。

③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。

④線維芽細胞と脂肪組織由来細胞群

SD系ラットの口腔粘膜下層から線維芽細胞を単離、3週間培養し、細胞数を4.8から 7.5×10^5 /mlとした。腹部皮下脂肪を酵素処理し脂肪組織を分解した細胞懸濁液をセルストレーナーで濾過、遠心分離しディッシュ上に接着した細胞群(stromal fraction)を3週間培養した。vascular stromal fractionとして培養せず移植に利用した。ハイブリッド人工材料は、(A)から(D)のごとく4種類のハイブリッド人工材料を作製した。尚、採取した自己細胞は移植前にDiIで細胞標識を行った。(A)コントロール：コラーゲンスポンジとコラーゲンメッシュからなる人工材料上にコラーゲンゲルを重層化したもの

(B) fibroblast：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋し、コラーゲンスポンジに重層化したもの (C) fibroblast + stromal fraction：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものとstromal fraction細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したもの (D) fibroblast + vascular stromal fraction：コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものとvascular stromal fraction細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したものとした。

SD系ラットに全身麻酔を行い、頸部正中切開にて気管を露出。第2、3、4気管輪に5×7mm大の気管欠損を作製し、同気管欠損モデルに自家細胞由来のハイブリッド人工材料を移植する再建モデルを作製。前頸筋群、皮膚をそれぞれ縫合した。標本作製は喉頭気管を摘出し凍結標本とし組織切片を作製する。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、顕微鏡下に観察した。抗vWF抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察し組織学的に評価する。評価項目としては、気管上皮再生、血管新生の状態、移植した自家細胞の生着について観察を行った。

4) 脂肪組織由来幹細胞

① in vitro の実験

脂肪由来幹細胞はラットそけい部皮下脂肪を採取し、コラ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。

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。

5) 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

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・開胸をおこなった。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。

6) ヒト細胞・組織

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

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

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

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

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

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

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

(2) 喉頭の再生

1) 甲状軟骨

ビーグル成犬2頭を用い、上腕から骨髓液を採取した。10⁶~10⁷個程度に培養できた時点で、細胞を回収し

て手術を行った。全身麻酔下に甲状軟骨の一部を含め、左声帯を切除する左喉頭部分切除術を行った。

シート状ポリプロピレンを骨格とし、コラーゲンスポンジにて被覆し、回収した細胞を含む末梢動脈血を含浸させ、この材料を吸収糸にて創部に固定した。内腔粘膜の再生状況は、電子内視鏡により内腔面から観察した。

2) 声帯

①自己骨髓由来細胞

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

②声帯再生を目的に移植された自己骨髓由来間葉系細胞の生体内動態の検討

ビーグル犬の骨髓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。

③人工材料と自己筋膜

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。

3) 神経の再生

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

2. 臨床応用

(1) 気管の再生

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1) 悪性腫瘍による喉頭気管浸潤(3例)、2) 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。

(2) 皮膚の再生

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

C. 研究結果

1. 基礎研究

(1) 気管の再生

1) 人工材料

①-1. 気管切片引張試験

ひずみの小さい領域では、 σ と ε の間には線形関係が成り立っている。この領域で定義されるE0を求めると $E0 = (11.0 \pm 3.2) \text{ .kPa}$ となった。高ひずみ領域で定義されるE1.3は $E1.3 = (5.3 \pm 2.2) \text{ MPa}$ となった。3種の引張速度で気管の軸方向切片の引張試験を行った結果、3本の応力-ひずみ曲線は比較的ひずみの小さな領域ではほぼ一致した。このことから、本実験で採用した引張速度の範囲では、引張速度が気管の伸長特性に及ぼす影響がほとんどないことがわかった。

①-2. 気管膜様部引張試験

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

①-3. 気管引張試験

気管の応力-ひずみ曲線は2本の曲線はほぼ同じ形状を示した。軸方向切片と同様に低ひずみ領域ではエラスチン線維の物性が反映され、高ひずみ領域ではコラーゲン線維の物性が反映されていると考えられた。低ひずみ領域で定義されるE0の値は $E0 = (6.3 \pm 1.7) \text{ .kPa}$ であり、高ひずみ領域で定義されるE1.3の値は $E1.3 = (2.8 \pm 1.5) \text{ MPa}$ であった。これらの値を気管の軸方向切片の値($E0 = (11.0 \pm 3.2) \text{ .kPa}$ 、 $E1.3 = (5.3 \pm 2.2) \text{ MPa}$)と比較すると、どちらも気管試料の方が軸方向に切り出した切片試料よりも値が小さくなっていった。見かけの断面積が気管試料では切片試料よりも大きくなるため、気管試料の

応力値が切片試料のそれよりも低下するものと考えた。

①-4. 気管圧縮試験

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

②小欠損モデル

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

2) 気管上皮細胞

①アクアポリンとイオンチャネル

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

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

②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、amphotericin 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。

③気管の再生

HE染色にて人工材料の表面に気管上皮細胞層の形成を確認できた。免疫染色ではtype Aにて基底膜の指標となるcytokeratin14、上皮細胞の指標となるcytokeratin18、タイトジャンクションの指標となるoccludinにおいて発

現が認められた。type B においては occludin の培養上皮細胞での発現を認め、膜輸送タンパクの指標となる Na-K-ATPase と、増殖能の指標となる PCNA の培養上皮細胞での発現を認めた。これらの結果より作製した人工材料上の気管上皮細胞層は上皮の性質を有すると考えられた。

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

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

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

3) 線維芽細胞

①気管上皮細胞に及ぼす影響

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

走査型電子顕微鏡では、線維芽細胞の密度上昇に伴って線毛被覆領域の拡大が認められた。免疫染色で線維芽細胞は、上皮細胞の線毛細胞、杯細胞および基底細胞への分化を促進して、極性をもって適切に配置した偽多列線毛上皮層を形成していた。一方、線維芽細胞非存在下ではこれらの機能細胞へ分化した細胞は少なく、細胞の形状は立方上皮や扁平上皮であった。線毛細胞、杯細胞および基底細胞へ分化した上皮細胞数を比較すると、高密度の線維芽細胞存在下で線維芽細胞非存在下に対して、2.3倍、2.5倍、5.4倍であった。

基底膜の主成分である laminin、type IV collagen および上皮細胞表面に存在する基底膜への接着分子である integrin beta4 の抗体による免疫染色法で調べた結果、線維芽細胞存在下において laminin と type IV collagen は上皮細胞層下側に局在していた。線維芽細胞の密度が高い

ほど基底膜の形成は促進されており integrin beta4 も上皮細胞下側の細胞膜に局在していた。一方、線維芽細胞非存在下の laminin や type IV collagen は上皮細胞層下側だけではなく、上皮細胞層全体にまばらに存在しており、integrin beta4 は上皮細胞層全体でほとんど認められなかった。

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

②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。

③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。

④線維芽細胞と脂肪組織由来細胞群

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

4) 脂肪組織由来幹細胞

① in 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。

② in 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。

5) 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ヵ月に一頭を犠牲死させ評価をおこなった。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、血管造影をおこなった。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みとめた。

6) ヒト細胞・組織

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

(2) 喉頭の再生

1) 甲状軟骨

術後の全身状態良好、皮下気腫などの合併症も認めなかった。完全切除した声帯と喉頭室の粘膜が上皮化し、きれいに再生されている所見が得られた。但し、もう1例では人工材料が脱落し、癒痕治療をおこなっている。感染によるものか、固定が不十分であったのかは不明である。長期観察後、組織標本などで確認する予定である。

2) 声帯

①自己骨髄由来細胞

移植細胞は、それぞれ障害部位に応じ上皮系のマーカーであるケラチンの発現、および筋系のマーカーであるデスミンの発現が観察された。さらに、移植されたBSCsの生体内動態を検討し、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直接的に組織再生に働く一方で、BSCs自身が細胞増殖することなく組織内にとどまり、Paracrineなどシグナル伝達によるホスト細胞への働きかけで、間接的に再生に寄与している可能性を見出した。

②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。

③人工材料と自己筋膜

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、上皮下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。

3) 神経の再生

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

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

2. 臨床応用

(1) 気管の再生

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、京都大学附属病院および福島県立医科大学附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。

1) 悪性腫瘍による喉頭気管浸潤例

①症例1: 甲状腺進行癌の気管浸潤例

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

の右側に隆起を認め、甲状腺腫瘍の気管浸潤と考えられた。

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

気管内視鏡所見は、術後2週間にはコラーゲンとメッシュが透見され、術後2ヵ月で上皮化し人工材料はほぼ被覆され、術後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131-I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。

2) 喉頭気管狭窄例

①症例4：喉頭気管狭窄症

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

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

術後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。

(2) 皮膚の再生

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

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

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

Tissue Engineering は、工学的手法を使って細胞を二次元的、三次元的に組み上げ、本物の臓器や組織に近いものを再生させようというもので、Vacanti、Langerらによって始められた。彼らの Tissue Engineering は、体外で細胞を培養して目的とする組織をつくり、これを体内に移植する方法である。また、幹細胞や前駆細胞を移植することで組織再生をはかろうという研究には、循環器領域で下肢や心筋の血管再生を目指した血管内皮前駆細胞の移植、整形外科領域で骨関節疾患の治療に骨髄間葉系幹細胞の移植、眼科領域で角膜再生を目指して角膜上皮幹細胞を羊膜上で培養した移植などが行われている。

一方、われわれの研究グループでは、体内の、再生を目的とする臓器の場所で組織を再生させる *in situ* Tissue Engineering という新しい概念に基づいて臓器再生を目指してきた。現在までに、動物実験で自己組織再生型の人工材料を移植し気管、食道、胃、輪状軟骨などが再生することがわかった。この際足場の移植のみで細胞移植や増殖因子は使わなかった。Vacanti らのように体外で組織を再生してから移植する方法や、細胞移植を行うと、生きた細胞や組織を取り扱うことになるので、感染症対策や細胞の品質管理など臨床応用へのハードルが高い。これらの方法に比べて、われわれの行っている *in situ* Tissue Engineering の手法は安全性が高く臨床応用に近い。

気管には内腔を支えるために気管軟骨が存在する。近年、組織工学の技法を用いた種々の軟骨再生の試みが行われているが、長期に気道を支えるに足る軟骨の再生はいまだに報告がない。関節軟骨と異なり、気管軟骨の場合は力学的強度が低下した場合、気道が虚脱し直ちに生命に関わる。長期に化学的に安定であるポリプロピレン

メッシュを芯にした人工気管は、動物実験で5年にわたる長期観察でも逸脱することなく、生体と一体化し続けることが判明した。さらに、線毛上皮の再生が確認され、線毛機能が保たれていることが判明した。輪状軟骨においても同様の人工材料を用いて移植手術を行い、枠組みとしての硬さ、内腔粘膜の線毛上皮の再生が確認された。約20年にわたる人工気管の基礎研究を基盤として、安全性有効性を確認し、臨床応用への可能性が示されたといえる。

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

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

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、塩素イオンチャン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、塩素イオンチャン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、塩素イオンチャンネル阻害剤は、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

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

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

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。

甲状軟骨の切除後の組織再生は、声帯の隆起を作ることが難しい。口側が咽頭という不潔な環境にあるなど不利な条件が存在しているからであろう。本研究では内腔を型取りした2層モデル人工材料に多分化能をもつ骨髄

由来間葉系細胞 (BSCs) を導入することによって、これまで実現できなかった声帯隆起の複雑な形態の表面に粘膜を再生させることができた。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。

障害された声帯の組織再生には、コラーゲン内で3次元培養した BSCs を移植し組織学的には非移植側に比べて正常に近い声帯の構造が再生した。この理由として、コラーゲンが、再生の場を確保しかつ組織再生の元になる細胞が成長する足場を提供する材料として適切であること、BSCs 内に含まれる間葉系幹細胞は、声帯を構成する筋肉や粘膜下層、上皮層などのさまざまな組織を再生しうる多分化能を有していることが考えられた。また、炎症性細胞浸潤が見られなくなるまでの期間が移植モデルで短いことと、障害部位の上皮化の程度に差を認めるため、移植細胞は早期の創傷治癒過程において何らかの促進作用が働いている可能性があると考えられた。BSCs 移植によって骨・軟骨といった単一組織の再生のみならず、声帯のような複数の種類の細胞で構成された組織が再生しうることが示され、傷害声帯への有効な治療法として期待できる。

声帯の運動を支配する反回神経については、神経再生のための適切な足場として、コラーゲン被覆 PGA チューブという人工材料を開発した。この PGA チューブは、1) 組織親和性が高く拒絶反応が起こらない、2) 生体内では徐々に加水分解され、約4ヵ月で消失する、3) 約2ヵ月間は形状を保持し、周囲からの組織進入を防ぐ、など神経再生にとって理想的な条件を兼ね備えている。平成17年度の研究で、自家神経移植では高率に神経腫瘍の形成が認められたが、PGA チューブによる再建では神経腫瘍を認めず機能的にも良好であった。上記にあげた PGA チューブの特徴が神経再生にとって良好な環境を提供し、従来困難とされた反回神経の機能的再生を可能としたのではないかと考えられた。

本研究により、喉頭・気管の再生治療が十分期待を持つ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。また、近年再生医学研究は急速に進められているが、臨床に応用されているものはまだ数少ない。本研究班は、この3年間の研究により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。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り、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。今後は、今回開発した新規技術の安全性を検証し、基礎実験の成果を臨床応用に結びつけるトランスレーショナルリサーチにより、本再生治療を気道の各部位に応じた組織再生が可能なレベルに高めるための研究を行いたい。

F. 研究発表

《平成18年度》

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) 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
- 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) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 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) 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 丞休, 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 $\beta 1$ 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] 気道領域の再生医療. NAGOYA ENT セミナー2006 (2006.11.2, 名古屋)
- 51) 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)
- 52) 大森孝一: [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)
- 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
- 《平成17年度》
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) Shinohara K, Yamashita M, Sugimoto K, Tsuji T, Omori K: Transcatheter arterial embolization of auricular arteriovenous malformation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132 (2): 345-346, 2005
 - 3) Shinohara K, Hashimoto K, Yamashita M, Omori K: Schwannoma of the nasal septum removed with endoscopic surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132 (6): 963-964, 2005
 - 4) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magrufov A, Yamashita M, Ito J: Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 115 (2): 253-258, 2005
 - 5) Matsuzuka T, Kano M, Ohtani I, Miura T, Shishido F, Omori K: Impact of sentinel node navigation technique for carcinoma of tongue with cervical node metastases. *Auris Nasus Larynx* 32 (1): 59-63, 2005
 - 6) Nishimura K, Omori K, Haga H, Fujimoto Y, Ito J: Successful laser ablation of diffuse laryngeal swelling in posttransplant lymphoproliferative disorder: The Japanese first case. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 69 (6): 869-873, 2005
 - 7) Tateya I, Hirano S, Kojima H, Omori K, Shoji K, Mitsumori M, Nagata Y, Ito J: Hyperfractionated radiotherapy for T2 glottic cancer for preservation of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263 (2): 144-148, 2005

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

2. 学会発表

- 1) Omori K: "Symposium" New perspectives of airway management using in situ tissue engineering. 8th Taiwan-Japan Conference in Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (2005. 12. 16-18, Taipei)
- 2) Omori K: "Special Lecture" Tissue engineering of the larynx and trachea. The 23rd Congress of The Korean Society of Logopedics and Phoniatics (2005. 11. 11, Seoul)
- 3) Nakamura T, Fukuda S, Nakada A, Kobayashi T, Itoi S, Inada Y, Endo K, Shigeno K, Kanemaru S, Tao H, Kin S,

- Nakase Y: Peripheral nerve regeneration on an artificial nerve (Biodegradable nerve guide tube). American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005. 6. 9-11, Washington, DC)
- 4) Tao H, Nakamura T, Morino S: Bronchoscopic treatment of postoperative bronchopleural fistulas using collagen sponge spigots. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005. 6. 9-11, Washington, DC)
 - 5) Nakada A, Fukuda S, Kobayashi T, Ueda H, Tao H, Nakamura T: De- and re-differentiation of the progenitor cells to the neurons. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005. 6. 9-11, Washington, DC)
 - 6) Hazama A, Miyake M, Saito A.: "Symposium" Role of Cl-ion permeability in cytoprotection. The Physiological Society of Japan (The 82nd Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)
 - 7) Miyake M, Yamasaki M, Waki H, Katahira K, Katsuda S, Nielsen S, Ijiri K, Hazama A, Shimizu T: Expression of renal aquaporins and sodium transporters in neonatal rats after spaceflight. The Physiological Society of Japan (The 82nd Annual Meeting)(2005. 5. 18-20, Sendai)
 - 8) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magruffov A, Yamashita M: In situ tissue engineering of the cricoid and trachea in canine model. The American Broncho-Esophagological Association (85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 9) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. The American Broncho-Esophagological Association (85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 10) Kanemaru S, Omori K, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Kishimoto M, Asato R, Nakamura T, Ito J: The destiny of the autologous bone marrow derived stromal cells implanted to the vocal fold. The American Broncho-Esophagological Association (85th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 11) Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magruffov A, Ito J: A trial for the framework regeneration of the larynx using tissue engineering techniques-a preliminary report. American Laryngological Association (126th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 12) Yokoyama S, Kano M, Watanabe M, Ogawa H, Omori K: Morphological and histological examination of the epiglottis: Implications for improving the epiglottic closure technique. American Laryngological Association (126th Annual Meeting)(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 13) Yamashita M, Kanemaru S, Omori K, Magruffov A, Kishimoto M, Ito J: A Study for tracheal regeneration after partial resection using a tissue engineering technique. The Triological Society (108th Annual Meeting)(2005. 5. 13-16, Boca Raton, Florida)
 - 14) Tamura Y, Kanemaru S, Yamashita M, Magruffov A, Tamaki H, Ito J: Regeneration of the palatal bone by in situ tissue engineering. The Triological Society (108th Annual Meeting)(2005. 5. 13-16, Boca Raton, Florida)
 - 15) Ogawa H, Baba Y, Suzuki Y, Suzuki T, Sato H, Omori K: Value of multiplanar reconstruction (MPR) images for cochlea implant. 2005 COSM (Combined Otolaryngological Spring Meetings); The Triological Society (2005. 5. 13-16, Phoenix)
 - 16) Kanemaru S: Regeneration of the vocal fold by implantaion of autologous bone marrow stromal cells. The 7th Symposium of the International Asociation of Phonosurgeons (2005. 2. 26, Madrid)
 - 17) 小林 謙, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 挾間章博, 大森孝一: 線維芽細胞が気管上皮層の再構築に及ぼす影響. 第5回日本再生医療学会 (2006.3.8-9, 岡山)
 - 18) 中村達雄: 感覚器再生と組織工学. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29, 京都)
 - 19) 中村達雄, 稲田有史, 茂野啓示, 早川克己, 堀 義生, 遠藤克昭, 福田正順, 田尾裕之, 荒木政人, 佐藤寿彦, 中田 顕, 上田寛樹, 糸井真一, 市原理司: 再生医療の臨床とバイオマテリアル. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29, 京都)
 - 20) 上田寛樹, 中村達雄, 福田正順, 田畑泰彦: 骨組織再生に用いるコラーゲンスポンジのポアサイズの影響. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29, 京都)
 - 21) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 松塚 崇, 金丸眞一, 山下 勝, 安里 亮, 田中信三:〈ワークショップ〉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)
 - 22) 金丸眞一, 山下 勝, 梅田裕生, 田村芳寛, 玉木久信, 安里 亮, 大森孝一, 伊藤壽一: 自己間葉系細胞移植による声帯の再生-移植細胞の所属と行方-. 第57回日本気管食道科学会 (2005.11.17-18, 京都)
 - 23) 山下 勝, 大森孝一, 金丸眞一, 田村芳寛, 岸本正直, 玉木久信, 伊藤壽一: 声帯隆起再生を目指した組織工学的アプローチ. 第57回日本気管食道科学会 (2005.11.17-18, 京都)
 - 24) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 小林 謙, 中村達雄, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有するハイブリッド人工材料の作製. 第57回日本気管食道科学会 (2005.11.17-18,

- 京都)
- 25) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: ラット気管損傷モデルへの気管上皮細胞層を有する人工気管移植の試み. 第57回日本気管食道科学会 (2005.11.17-18, 京都)
 - 26) 松塚 崇, 大森孝一: 多血小板血漿 (PRP) を使用した甲状腺手術創の治癒促進. 第38回甲状腺外科研究会 (2005.10.27-28, 神戸)
 - 27) 森野茂行, 鳥羽紀成, 田尾裕之, 荒木政人, 永安 武, 高橋 充, 宮崎拓郎, 松本桂太郎, 山崎直哉, 中村昭博, 田川 努, 中村達雄: 肺気腫に対する Growth Factor を使用した呼吸機能再生. 第58回日本胸部外科学会定期学術集会 (2005.10.5-7, 岡山)
 - 28) 田村芳寛, 金丸眞一, 山下 勝, 玉木久信, 安里 亮, 岸本正直, 大森孝一, 松野智宣, 中村達雄, 伊藤壽一: 組織再生工学的的手法による上顎 (口蓋) の骨再生. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2, 東京)
 - 29) 山下 勝, 金丸眞一, 大森孝一, 玉木久信, 田村芳寛, 岸本正直, 中村達雄, 伊藤壽一: 犬気管部分欠損モデルにおける組織工学的再生の試み. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2, 東京)
 - 30) 小林 謙, 中村富美男, 大森孝一: VI型コラーゲンによる皮膚および皮膚付属器官形成の促進. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2, 東京)
 - 31) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有する人工気管作製の試み. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2, 東京)
 - 32) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有する人工気管移植の試み. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2, 東京)
 - 33) 多田靖宏: 〈Research Forum 1〉 気道上皮の再生. 第54回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会 (2005.7.23-24, 仙台)
 - 34) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: ラット気管損傷モデルへラット気管上皮細胞組織の移植. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 35) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挾間章博, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞組織による人工気管表面の被覆の試み. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 36) 中村達雄, 早川克己, 茂野啓示, 稲田有史, 堀 義生: *In situ tissue engineering* と医用材料. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 37) 中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一, 糸井真一, 遠藤克昭, 茂野啓示, 吉谷 信, 中田 顕, 福田正順: *In situ tissue engineering* と末梢神経の再生医療の現状. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 38) 田尾裕之, 中村達雄, 森野茂行, 福田正順, 中田 顕, 市原理司: ラット肺実質への自己骨髄培養細胞移植. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 39) 森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 橋爪 聡, 松本桂太郎, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 荒木政人, 田尾裕之, 中村達雄: 肺気腫に対する FGF-2 の経気道的投与による呼吸機能再生に関する検討. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)
 - 40) 高橋 充, 木村雅一, 鳥羽紀成, 森野茂行, 梶原直央, 内田 修, 宮島邦治, 長東美貴, 鈴木明彦, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄, 加藤治文: 呼吸器外科領域に関する再生医工学の応用. 第30回日本外科系連合学会学術集会 (2005.6.24-25 東京)
 - 41) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 山下 勝, 安里 亮: 〈シンポジウム〉 頭頸部癌治療における再生医療「気道の再生医療」. 第29回日本頭頸部癌学会 (2005.6.16-17 東京)
 - 42) 金丸眞一: 〈シンポジウム〉 頭頸部癌治療における再生医療「頭頸部領域における再生医療」. 第29回日本頭頸部癌学会 (2005.6.16-17, 東京)
 - 43) 森野茂行, 鳥羽紀成, 永安 武, 高橋 充, 國崎真己, 松本桂太郎, 中村昭博, 田川 努, 東 高志, 堤 定美, 田尾裕之, 中村達雄: 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた肺機能再生に関する検討. 第28回日本呼吸器内視鏡学会総会 (2005.6.9-10, 東京)
 - 44) 金丸眞一: 〈シンポジウム〉 耳鼻咽喉科疾患治療の最前線「頭頸部領域の再生医療」. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.19-21, 大阪)
 - 45) 山下 勝, 大森孝一, 金丸眞一, 岸本正直, 田村芳寛, 玉木久信, 伊藤壽一: 組織工学的的手法を用いた喉頭声帯隆起再生の試み. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.19-21, 大阪)
 - 46) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小川 洋, 三宅将生, 挾間章博, 金丸眞一, 大森孝一: ラット気管上皮細胞付人工材料のラット気管損傷モデルへの移植. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.19-21, 大阪)
 - 47) 大森孝一: 〈シンポジウム〉 喉頭・気管領域のトランスレーショナルリサーチ. 第17回日本喉頭科学会 (2005.3.18-19, 名古屋)
 - 48) 金丸眞一: 〈シンポジウム〉 喉頭・気管領域のトランスレーショナルリサーチ「人工神経チューブを用いた神経再生医療」. 第17回日本喉頭科学会 (2005.3.18-19, 名古屋)