

の形成を促進することを示していた。しかし、皮膚線維芽細胞によって誘導された上皮層は、二層構造を呈しており、上層は気管上皮層の特徴を示し、下層は *in vivo* 皮膚と同様に発達した基底層と扁平上皮層を有していた。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. 気管再生に用いる自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

各線維芽細胞が気管上皮細胞の移動、増殖、分化に及ぼす影響ならびに誘導する上皮層の形態および機能について、気管線維芽細胞を基準として比較した結果、鼻腔粘膜に由来する線維芽細胞は、上皮細胞に対する増殖および移動促進効果が低く、誘導された上皮細胞の形状も円柱上皮ではなく立方上皮であった。水・イオンチャネル分子の局在、発現パターンはコントロールと大差はなかったが、上皮層表面の線毛が被覆した面積と粘液分泌量は気管線維芽細胞の半分ほどであり、鼻腔粘膜に由来する線維芽細胞によって誘導される上皮層は形態的機能性も低いことがわかった。皮膚線維芽細胞は気管上皮細胞に対して気管線維芽細胞と同程度の増殖、移動、粘液分泌量および線毛被覆に関する促進作用を示した。しかし、皮膚線維芽細胞によって誘導された上皮層は、二層構造を呈しており、上層は気管上皮層の特徴を示し、下層は *in vivo* 皮膚と同様に発達した基底層と扁平上皮層を有していた。水・イオンチャネル分子は上皮層の構造変化を反映した局在パターンを示し、特に発達した基底層における aquaporin 3 と $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ の局在から、皮膚線維芽細胞が誘導する上皮層は水・イオンの輸送を適切に行えないことが示唆された。

3. 歯肉線維芽細胞を用いた気管再生組織

移植した歯肉線維芽細胞は移植部位に生着していることが細胞標識法によって確認された。気管上皮層の再生を経時的に観察した結果、歯肉線維芽細胞は人工材料表面への気管上皮細胞の被覆を促進するとともに線毛細胞への分化を促進し、機能的な気管上皮層の再生を促進することがすることが明らかになった。

4. 志望由来細胞を用いた気管再生組織

脂肪組織から得られた細胞の血管新生能を調べるため、マトリゲルの皮下移植法を行った結果、移植一週間後に新生血管が高密度で存在していた。また、脂肪組織由来細胞の血管新生能は、人工材料に組み込んだ再生組織を気管欠損モデルに自家移植した場合においても認められた。

5. 脂肪由来細胞を用いた気管再生組織

移植後、歯肉線維芽細胞は気管上皮細胞の遊走、増殖および分化を促進し、機能的な上皮層の形成を促進しており、脂肪組織由来細胞は血管新生を促進していた。さらに、両細胞を組み込んだ気管再生組織の気管上皮層再生能と血管新生能は単独の細胞種を用いた再生組織の場合よりも強くなっていた。

D. 考 察

歯肉由来線維芽細胞が気管上皮の機能的な再生を促進し、脂肪組織由来細胞が血管新生を促進することがわかった。両細胞を同一の人工材料に組み込んだ再生組織を作製すると、両細胞の長所を示す再生組織になることがわかった。これは線維芽細胞を移上皮層に隣接することになる人工材料の上部層に、脂肪組織由来細胞を新生血管が伸長してくる下層に配置することによって、上皮層再生と血管新生が効果的に行われ、相加的な効果をもたらしたと考えられた。

E. 結 論

歯肉線維芽細胞と脂肪組織由来細胞が気管再生組織に用いる自家移植用の細胞として有能であり、両細胞を用いた気管再生組織が気管欠損の再構築に効果的であることが示された。この再生組織は、既に臨床応用されている人工材料に自己由来の細胞を組み込んだものであり、今後、大動物での移植実験を経て臨床応用されると予想される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration *in vitro*. *Tissue engineering* 12, 2619-2628, 2006
- 2) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T and Omori, K: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 115, 501-506, 2006
- 3) 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: 気管の再生と臨床応用, 分子呼吸器病, 第10巻, 216-219, 2006

2. 学会発表

- 1) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S: The effects of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. The 86th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association Chicago, Illinois, USA. May, 2006
- 2) 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8回日本組織工学会 (2005. 9. 8, 京都)
- 3) 鈴木輝久, 小林 謙, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 自家脂肪組織由来の細胞群を用いたハイブリッド人工材料の被覆 第27回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12, 東京都)
- 4) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久,

- 三宅将生, 狭間章博, 和田郁夫, 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, 東京)
- 5) 小林 謙, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏,
狭間章博, 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回日本再生医療会総会
(2006.3.8, 岡山)
- 6) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙,
小川洋, 三宅将生, 狭間章博, 中村達雄,
金丸眞一, 田畑泰彦, 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総会 (2005.
11.18, 京都)
- 7) 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: 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
科学会総会 (2005.11.18, 京都)
- 8) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙,
小川 洋, 三宅将生, 狭間章博, 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.
9.2, 東京)
- 9) 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: 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.
9.2, 東京)
- 10) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙,
小川 洋, 三宅将生, 狭間章博, 金丸眞一,
大森孝一: ラット気管損傷モデルヘラット気管上
皮細胞組織の移植 第26回日本炎症・再生医学会
(2005.7.12, 東京)
- 11) 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: 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, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

- I. 総合研究報告
- II. 分担研究報告
- 1. 基礎研究

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）
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）
小林 謙（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

共同研究者の大森はポリプロピレンメッシュ製の骨格に足場としてコラーゲンスポンジを付加した自己再生型人工気管をはじめ臨床例に応用し、良好な結果を得た。しかしその報告おなかで気管内腔面上皮化遅延を指摘している。今回我々は自己再生型人工気管を用いた気管再建後の内腔面上皮化促進を図る工夫として、人工気管表面をコラーゲンを介して気管上皮細胞層で被覆したモデル、気管由来線維芽細胞を含有したコラーゲンを介して被覆したモデルをそれぞれ作製し、ラットへの移植実験でその効果を評価した。気管上皮細胞付加モデルではコラーゲンスポンジ、コラーゲンゲル、上皮細胞層の3層構造をもった移植片を作製できた。また上皮細胞層は気管上皮細胞の免疫組織学的な特徴を保持していた。気管上皮細胞付加モデルの移植実験では、観察期間を通じて上皮による人工材料表面の被覆が確認できた。気管由来線維芽細胞付加モデルの移植実験ではコントロールに比べ上皮細胞の分化が早かった。ゲル層の移植線維芽細胞は、経時的に上皮への遊走・配列した後に消失した。線維芽細胞は淘汰される以前の早い段階で人工気管内腔面上皮化促進に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

共同研究者の大森らは、中村らが開発したポリプロピレンメッシュ製の骨格に足場としてコラーゲンスポンジを付加した自己再生型人工気管の初めて臨床応用例を報告した。概ね良好な結果であったが、その報告のなかで、気管内腔面上皮化に約2ヶ月を要したと指摘している。上皮化遅延は現在のところ臨床例において大きな問題には至っていないが、今後、感染や瘻孔形成などの原因になる可能性は否定できない。そこで我々は自己再生型人工気管を用いた気管再建後の内腔面上皮化促進を図る工夫として、人工気管表面を気管上皮細胞層で被覆したモデル（実験Ⅰ）、気管由来線維芽細胞を付加したモデル（実験Ⅱ）をそれぞれ作製し、ラットへの移植実験でその効果を評価した。

B. 研究方法

実験Ⅰ

Sprague-Dawley (SD) 系ラットの気管を採取し、酵素処理によって気管上皮細胞を採取した。自己再生型人工気管に用いられているものと同じコラーゲンスポンジの小片を用意し、その上にⅠ型コラーゲンからなるコラーゲンゲルを重層した。さらにその表面に採取した気管上皮細胞を播種・培養した。こうして得られた材料を組織学的に検討した。次に GFP 遺伝子導入ラットの気管から気管上皮細胞を採取し先と同様の方法で移植材料を作製した。全身麻酔下に SD 系ラットの気管を開窓し、そ

の気管欠損部に作製した移植片を充てた。観察期間を経て気管を採取し、気管再建部の組織学的な評価を行った。実験Ⅱ

SD 系ラットの気管を採取し、線維芽細胞を採取・継代培養した。さらに蛍光蛋白である monomeric yellow fluorescent protein (m-YFP) の遺伝子導入した。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、先の移植片 (A)、(B)、(C) を欠損部に充て閉鎖した。観察期間を経て気管を摘出し、気管再建部の組織学的な検討を行った。

C. 研究結果

実験Ⅰ

作製された材料の組織像を観察したところコラーゲンスポンジ層、コラーゲンゲル層、気管上皮細胞層の3層構造が確認できた。免疫染色での評価では上皮細胞のマーカーである cytokeratin14 や cytokeratin18、tight junction の成分である occludin が陽性を示した。ラット気管欠損モデルへの移植後の組織学的検討では、観察期間を通じて人工材料上の上皮細胞層の存在が確認できた。上皮細胞層は3日目では1～2層の扁平上皮であっ

たが、7日目では重層化し、14日目以降では円柱線毛上皮が確認された。移植した GFP 陽性細胞は移植後3日目には移植材料内腔面に残存していたが、7日目以降は消失していた。

実験Ⅱ

3日目では、(A)、(B) は単層扁平上皮が認められた。(C) はコラーゲンスポンジが露出した状態であった。蛍光顕微鏡での観察では (A) のコラーゲンゲル層には、分散したままの m-YFP 陽性細胞が認められた。

7日目では、(A)、(B) は重層扁平上皮が、(C) は単層の扁平上皮が認められた。蛍光顕微鏡での観察では (A) のコラーゲンゲル層には遊走して上皮下に配列した m-YFP 陽性細胞が認められた。

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。蛍光顕微鏡での観察ではゲル層の m-YFP 陽性細胞がほぼ消失しており、宿主由来線維芽細胞と思われる細胞が多数浸潤していた。

D. 考 察

気管上皮細胞を用いた実験Ⅰではコラーゲンスポンジ上にコラーゲンゲルを介して気管上皮細胞層を作ることができた。免疫組織学的には、作製した気管上皮細胞層は本来の気管上皮細胞層の性質を有していると考えられた。移植実験からは、培養上皮細胞層による人工材料の被覆が可能であると考えられた。また人工材料上の未熟な上皮細胞が経時的に正常な気管上皮へ分化していくさまが観察された。移植した気管上皮細胞が比較的短時間で消失した理由としては、上皮層-コラーゲンゲル層間結合の脆弱性、同種移植であるがための拒絶反応が考えられた。

気管上皮細胞の増殖・分化に対する気管由来線維芽細胞の影響については、共同研究者の小林が in-vitro での評価を行い、線維芽細胞の存在下では気管上皮細胞の増殖・分化、基底膜の形成が促進されることを明らかにした。実験Ⅱにおいて線毛の有無、上皮細胞の形態などといった上皮層の分化は気管由来線維芽細胞含有モデル(A)が最も早く、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)が最も遅れていた。この結果は、小林の報告と同様、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。また培養基質として優れた性質を有するⅠ型コラーゲンゲルを用いたことも、上皮化促進に寄与していると考えられた。実験Ⅱは実験Ⅰと同種移植の範疇に入ると考えられ、術後14日目に移植した細胞が消失したのは、宿主からの緩い免疫拒絶反応によるものと推測された。術後14日目で上皮化に差が生じたことは、移植された同種線維芽細胞が淘汰される以前の早い段階で、人工材料上の上皮化に促進的な効果を発揮した結果と考えられた。

E. 結 論

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に気管上皮細胞あるいは気管由来線維芽細胞を付加したハイブリッド型人工気管モデルを作製し、in-vivo でその効果を評価した。

気管上皮細胞付加モデルではコラーゲンスポンジ、コラーゲンゲル、上皮細胞層の3層構造をもった移植片を作製できた。上皮細胞層は気管上皮細胞の免疫組織学的な特徴を保持していた。

気管上皮細胞付加モデルの移植実験では、観察期間を通じて上皮による人工材料表面の被覆が確認できた。

気管由来線維芽細胞付加モデルはコントロールに比べ上皮細胞の分化が早かった。

ゲル層の移植線維芽細胞は、上皮下への遊走・配列した後に消失した。

線維芽細胞は淘汰される以前の早い段階で人工気管内腔面の上皮化促進に寄与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 Tracheal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115:501-506, 2006

2. 学会発表

1) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Tissue Engineering for Regeneration of Tracheal epithelium.. the Eighty-Fifth Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Boca Raton, Florida, May 13-14, 2005

2) Nomoto Y, Kobayashi K, Suzuki T, Tada Y, Sato S, Masao Miyake, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K: The effect of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. the Eighty-Sixth Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Chicago, Illinois, May 19-20, 2006

3) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 狭間章博, 金丸眞一, 大森孝一: 組織工学的的手法による気管上皮細胞組織の作製 第56回気管食道科学会総会ならびに学術講演会 (2004.11.25-26, 東京)

4) 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: 気管上皮細胞組織による人工気管表面被覆の試み 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13, 東京)

5) 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: 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)

- 6) 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: 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回気管食道科学会総会ならびに学術講演会 (2005.11.17-18 京都)
- 7) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 三宅将生, 狭間章博, 和田郁夫, 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)
- 8) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 岡野 渉, 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)
- 9) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 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)
- 10) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 岡野 渉, 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回気管食道科学会総会ならびに学術講演会 (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

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（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者 鈴木 輝久（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

小林 謙（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

研究要旨

気管の再建方法として共同研究者の大森らは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気管による再建を行い臨床応用に至っている。問題点は露出したコラーゲンスポンジ上での上皮化の遅延が挙げられる。気管再建部の上皮化促進を図るため自家細胞を利用したハイブリッド人工材料を作製した。自家細胞は線維芽細胞と脂肪組織由来細胞を使用し、移植を行った結果、コントロールに比べハイブリッド人工材料を使用した方が上皮化の促進がみられた。線維芽細胞単独よりも脂肪組織由来の細胞をあわせて使用した方が、結果が良好であり、免疫染色でも血管の新生・誘導が確認された。

A. 研究目的

気管は呼吸機能を維持する上で生体に必要不可欠な部位であり、癌や外傷などにより気管の一部を切除した場合、呼吸の他、発声、嚥下など様々な機能障害を生じ、Quality of lifeの低下を来す。その再建法として研究代表者の所属する研究チームは、コラーゲンを被覆した自己組織再生型の人工材料の移植による気管組織の再生を試みている。しかし、再建部の上皮化に課題があり、改善法として自家細胞を用い、人工材料表面ではなく、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を、自家細胞を含有したコラーゲンゲルで包埋したハイブリッド人工材料を作成した。そのハイブリッド人工材料について気管損傷モデルで検討した。

自家細胞は線維芽細胞と脂肪組織由来の細胞とした。その理由として、まず線維芽細胞は、皮膚、角膜あるいは口腔粘膜組織において、線維芽細胞が上皮細胞と相互作用し、機能的な上皮層の形成を促進することが報告されており、また、共同研究者の小林らは、気管由来の線維芽細胞は、気管上皮細胞の移動、増殖および分化を有意に促進し、歯肉粘膜に由来する線維芽細胞は、気管線維芽細胞と同等以上の気管上皮促進作用を有することと報告しているからである。今回は、臨床応用を考え、採取が容易な歯肉粘膜の線維芽細胞を用いた。

また、上皮化促進には血管新生を早める必要があり、血管新生を促進する細胞の供給組織として、皮下の脂肪組織に着目した。組織の再生において効率的に再生を促進するためには生体からいかに血管新生を誘導するかが重要であると多くの研究者が報告している。以前から血管新生を促す細胞として骨髄由来の幹細胞が注目され、

その有用性が報告されている。近年、骨髄以外に幹細胞を供給できる組織として、皮膚、唾液腺などが報告されはじめたが、中でも末梢脂肪組織由来の幹細胞に注目が集まっている。その理由として脂肪組織由来幹細胞（Adipose Derived Stem Cells:ASC）は骨髄由来の幹細胞と比較して同等の多分化能を有し、採取自体が容易に行え、しかも採取できる幹細胞数が多いからである。いずれの点も細胞移植において倫理的に問題の少ない自家移植に最適の条件である。また、ASCはその血管新生という間接的な働きだけではなく、直接的な働きを持つ。すなわち、気管ではASCが血管新生のほか上皮層の形成を形態学的、機能的に正常に誘導することが予想されるが、ASCが気管の血管新生、上皮層の形成に及ぼす影響を調べた報告はないが、脂肪組織は、成体において特異的に体積の増減が激しい組織であり、体積増加に伴って血管新生も活発に認められる。ラット脂肪組織を酵素処理し、遠心後に培養すると、細胞の接着能の差により血管と間質の画分（vascular and stromal fraction）が得られる。血管画分には血管内皮細胞が存在し、間質画分には間質系の細胞、脂肪前駆細胞およびCD54陽性の幹細胞が存在していることが確認されている。間質系の細胞は血管周囲を支持し、脂肪前駆細胞は血管新生を誘導する多種類のサイトカインを分泌することが知られており、血管間質画群の細胞を利用することで血管新生が期待できるものと考えた。

B. 研究方法

1. 細胞採取

a) ノーマルラットの歯肉粘膜下層から組織片培養にて線維芽細胞を単離、3週間培養し、細胞数として4.8か

ら 7.5×10^5 /mlとした。

b) ノーマルラットの腹部皮下脂肪を2ml採取し、0.25%コラゲナーゼIIで酵素処理し、脂肪組織を分解する。それによって得られた細胞懸濁液を70 μ mポアサイズのセルストレーナーで濾過。濾過後の細胞懸濁液を遠心分離して得られた細胞をディッシュ上に播種。3時間後、ディッシュに接着した細胞群を3週間培養した(ASC)。

c) 上記b)と同様な手法で得られた細胞をディッシュ上に播種することなく、回収した細胞群(VSF:vascular stromal fraction)として培養せず移植に利用した。細胞数はいずれも 3.0×10^6 /mlとした。

2. 脂肪由来細胞(ASC、VSF)の血管新生

血管新生の研究で頻用されるマトリゲル中にASC、VSFを播種し、脂肪組織を採取したラットの背部に自家移植を行う。同時にコントロールとしてマトリゲルのみを移植する。形態的に評価する。

3. ハイブリッド人工材料の作成

コントロールを含め、上記により得られた細胞を含む4種類のハイブリッド人工材料を作製した。尚、採取した自家細胞は移植前にDiIで細胞標識を行った。

①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0.2%コラーゲンゲルを重層化したもの

②fibroblast

0.2%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

③fibroblast+ASC

0.2%コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものと方法1)-b)で得られたASC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

④fibroblast+ VSF

0.2%コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものと方法1)-c)で得られた細胞群(VSF:vascular stromal fraction)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

4. 次に下記の手順で気管損傷モデルを作成した。

- ノーマルラットにペントバルビタール(ネプタール®)25mg/kgを尾静脈より注射し、全身麻酔を行う。
- 頸部正中切開にて気管を露出。第2, 3, 4気管輪に5×7mm大の電気メスを用い気管損傷を作成(図4)。
- 同気管損傷モデルに方法2)で作製した自家細胞由来のハイブリッド人工材料を自家移植する再建モデルを作成。前頸筋群、皮膚をそれぞれ縫合し、感染予防に大腿筋にABPC100mg/kgを筋注。

5. 標本作製

- ペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)を25mg/kgを尾静脈より静注し4%パラホルムアルデヒドで還流固定にて死亡させ、喉頭気管を摘出し4%パラホルムアルデヒドにて固定。
- 摘出喉頭気管を凍結標本とし組織切片を作成する。
- ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、顕

微鏡下に観察し病理組織学的に評価する。

4) 血管のマーカーとなる抗vWF抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察し病理組織学的に評価する。

6. 評価項目

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。

C. 研究結果

脂肪由来の細胞群を移植した場合、ASC、VSFいずれにおいてもコントロールと比較して多数の新生血管が確認された。

ハイブリッド人工材料移植後7日目のHE染色結果では、

①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。

②fibroblast例は、気管欠損部位に2から3層の上皮層が認められた。

③fibroblast+ASC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。

④fibroblast+VSF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。

③、④の免疫染色ではいずれも気管欠損部と気管残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。

D. 考察

コントロールと比較して②fibroblast例は上皮層の形成がなされており、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の単独移植・気管再建より上皮化を早めるものと思われた。③fibroblast+ASC例、④fibroblast+VSF例はいずれも形態学的に正常気管に近い上皮層の形成が認められた。②fibroblast例と比較しても、上皮層の細胞層が厚く、偽多列円柱上皮細胞による上皮層が形成されていた。脂肪組織由来の細胞を線維芽細胞にくわえたハイブリッド人工材料は、①コントロール例、②fibroblast例よりも気管の上皮化促進に有利に働いていることが示された。免疫染色でも移植細胞が血管新生を誘導または分化したことが示唆され、上皮化が促進された理由の大きな一因と思われる。③fibroblast+ASC例、④fibroblast+VSF例間に形態学的には大きな差異は認められず、今後、移植において脂肪組織由来の細胞使用法についてはさらなる検討が必要である。いずれにしても、気管再建において人工材料単独移植よりも線維芽細胞、脂肪組織由来の細胞群(VSF, ASC)を用いハイブリッド化させることは気管の上皮化促進に大いに有効

である結果であった。臨床応用に向けて、線維芽細胞は歯肉粘膜からの採取であり、また、脂肪組織も腹部からの採取であるため手技的にも容易であり患者への侵襲が少なく、また自家細胞を利用するため安全でありヒトへの臨床応用が期待できる。

E. 結 論

歯肉粘膜から線維芽細胞を採取・培養し、また、腹部脂肪組織から細胞を抽出した。得られた自家細胞を利用しハイブリッド人工材料を作製、気管欠損モデルに移植した結果、細胞を用いないコントロールと比べいずれのハイブリッド人工材料も欠損部の上皮化が認められた。線維芽細胞を単独で使用したものより、脂肪組織由来の細胞群をあわせて使用したものの方が、正常気管に近い上皮層が形成され、免疫染色でも移植細胞が血管新生を誘導または分化したことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. *Tissue engineering* 12, 2619-2628, 2006
- 2) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 115, 501-506, 2006
- 3) 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: 気管の再生と臨床応用, 分子呼吸器病, 第10巻, 216-219, 2006

2. 学会発表

- 1) 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: 第18回日本喉頭科学会総会・学術講演会(2006.4.17, 熊本)
- 2) 鈴木輝久, 小林 謙, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 自家脂肪組織由来の細胞群を用いたハイブリッド人工材料の被覆 第27回日本炎症・再生医学会(2006.7.12, 東京)
- 3) 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8回日本組織工学会(2006.9.8, 京都)

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

I. 総合研究報告

II. 分担研究報告

1. 基礎研究

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）

中村 達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再生応用分野）

主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究協力者 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究要旨

傷害声帯に対する決定的な治療法は現在のところない。これに対してわれわれは再生医学的手法による声帯再生を試みた。すなはち、アテロコラーゲン内で3次元培養した自己骨髄由来間葉系細胞（BSCs）の移植による声帯の再生である。犬を用いた実験で声帯を構成する上皮層、粘膜固有層、筋層がそれぞれ良好な形で再生された。続いてFACSを用いた分析結果から、移植細胞は間葉系幹細胞を含む複数の系列の細胞であることを示した。さらに、BrdUで標識したBSCsは移植2週間後でも生体内で確認できることから、移植細胞が分裂していない可能性を見出した。いっぽう、移植細胞の一部は複数の系列の細胞に分化していることも確認されたが、細胞分化のみならずhostへのparacrineなどの働き掛けによる再生寄与の可能性が示唆された。加えて、自己血清による細胞培養法でも十分な細胞数を得ることができることを確認し、臨床応用への安全な細胞培養法を見出した。

A. 研究目的

1. 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生

自己間葉系細胞移植による声帯の再生状況の観察と組織学的検討を行う。

2. 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 -

傷害声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞がどのような細胞に分化増殖してゆくのかの検討を行う。

3. 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

声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来細胞の声帯内動態の検討を行う。

4. 細胞移植による声帯再生のための通常の培養液を用いない細胞培養条件の検討

細胞移植療法を目的とした安全な細胞培養液の検討

B. 研究方法

1. 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生

ビーグル成犬10頭を用いて、大腿骨より採取した骨髄を培養、このうちシャーレの底面に張り付いた細胞のみを選択増殖させた。別の実験系によってこれらの培養細胞が中胚葉系細胞のうちの大半が造血系細胞を含まない間葉系幹細胞であることを確認した。さらに、この細胞を1% HCl アテロコラーゲン内で3次元培養を試みた。うち8頭は、左声帯に1% HCl アテロコラーゲン+間葉系細胞を、右声帯には1% HCl アテロコラーゲンのみを注入し両者をそれぞれI群、II群として比較した。

注入4日後および14日後に両側声帯正中を横切開し、声帯粘膜表層から内筋層に至る障害を加えた後、I群、II群の声帯の再生状況を喉頭ファイバーにより観察するとともに、摘出喉頭の声帯の組織学的検討を行った。

2. 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 -

GFP トランスジェニックマウスより採取した骨髄由来細胞を約2週間培養しFACSによる分析を行った。さらに、ヌードラットの声帯および周辺組織に同細胞を移植し2ヶ月後に屠殺、上皮系細胞のマーカーであるpancyto keratine および筋系細胞のマーカーであるdesmineでの蛍光組織学的検討を行った。

3. 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

自己骨髄由来間葉系細胞を含む細胞を約4週間培養した後、細胞増殖S期にのみDNA取込まれるBromodeoxyuridine (BrdU) というチミジンのアナログを用いて細胞をラベルし、声帯を含む組織に移植して2週間後に組織採取を行い、BrdU陽性細胞の有無を検討した。また、レンチウイルス感染による自己骨髄由来細胞へのGFPの導入を行いこれをイヌ声帯に移植。移植2ヶ月後に屠殺のうえ声帯を上皮系細胞のマーカーであるpancyto keratine および筋系細胞のマーカーであるdesmineで染色を行い各組織の分化傾向を免疫組織化学的手法で検討した。

4. 細胞移植による声帯再生のための通常の培養液を用いない細胞培養条件の検討

3種類の培養液として、通常培地としてのDMEM + 10% FBS、コントロールとしての修飾基本培地 α MEM、自己血清添加培地としての α MEM + 15%血清を用意し

た。自己骨髄由来細胞を通常培地としての DMEM + 10% FBS 内で 2 週間培養し、培養フラスコ内でコンフルエントになった状態で回収。50 万個ずつに分け上記 3 種の培養液を含む 100ml のフラスコ各 2 個ずつで培養。フラスコの底面に 5 か所の測定点を設け、倍率 100 倍の視野で確認できる細胞数を培養開始 1、3、7、10、14 日目にカウントし、各培養液で細胞数を比較した。

C. 研究結果

1. 自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生

I 群は II 群と比較して肉眼的にも組織学的にも良好な治癒機転が観察された。

2. 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 -

骨髄由来培養細胞は、マウス幹細胞の指標といわれる CD29, CD44, Sca-1 が強陽性を示すとともに、CD34, CD45, CD49e が軽度陽性となり、移植細胞は間葉系幹細胞以外の細胞系列をも含んでいることが示唆された。またこれらの細胞は、移植した組織内で上皮系細胞や筋系細胞など複数の系統の細胞に分化している可能性が示された。

3. 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 陽性細胞は声帯内移植された 2 週間後でも確認することができた。また、GFP 導入された移植細胞は傷害部位に応じて pancyto keratine および desmine 陽性細胞として確認できた。

4. 細胞移植による声帯再生のための通常の培養液を用いない細胞培養条件の検討

表 1 に示すように、各測定ポイントの平均細胞数 DMEM + 10% FBS には及ばないものの、 α MEM + 15% 血清でも十分な細胞増殖が可能であることを見出した。

D. 考 察

1% HCl アテロコラーゲンは間葉系細胞増殖に適切な足場となり、この中で増殖した間葉系細胞は、障害された声帯再生に有効に働くと考えられた。

幹細胞は、多分化能を有する未分化な細胞で、生体内に広く分布するといわれている。これまで高度に分化した組織や臓器には、一般に再生能がないと考えられてきたが、近年、適切な場と条件が与えられると、高度に分化した臓器であっても、幹細胞による再生が可能であることが報告された。これを受けて、われわれはイヌの幹細胞を含む間葉系細胞の選択的培養とこの培養細胞を用いた傷害声帯の再生を試み、形態的、機能的に良好な結果を得た。一方、臨床応用を目的とした細胞療法がなされるためには、細胞移植の安全性の確立とともに、移植細胞がどのような細胞集団に属し、それが衣装腐れた声帯内でどのような分化傾向をしているのかを確かめる必要がある。本研究により骨髄由来細胞のうち付着系細胞細胞のみの培養によっても単一の細胞集団ではなく、間葉系幹細胞を含む複数の細胞集団からなり、これが移

植声帯内で複数の系統の細胞に分化していることが判明した。

BrdU はチミジンのアナログで細胞分裂における S 期に DNA 内に取り込まれるという特性がある。したがって、BrdU を取り込んだ細胞は細胞分裂を行っている細胞ということになる。一方、いったん BrdU を取り込んだ細胞が分裂を繰り返すと、BrdU 濃度が薄まるため BrdU を確認できなくなる。本研究では、声帯内に移植した BrdU 陽性細胞は 2 週間後でも確認することができた。このことは移植細胞が生体内で分裂していないことを意味する。また、GFP 導入細胞が傷害部位に応じたかたちで上皮系、筋系細胞などの複数の系列の細胞に分化していることを確認した。これらから移植細胞の多くは、細胞増殖することなく組織分化を行い、声帯再生に寄与している可能性を見出した。また、欠損部の大きさと移植細胞の数との関連から、移植細胞自身が単に分化するだけではなく、Paracrine の作用により host に働きかけ、host が自己再生を果たしている可能性を見出した。

本研究では、これらの移植細胞の動態を解明することを目的に、臨床応用を見据え大型動物であるイヌによる実験を行った。

これまでわれわれは、細胞移植による声帯再生を試み良好な結果を報告してきた。しかし、これを臨床応用する段階では細胞移植の安全性が問われることとなり、現時点ではその安全性が確立されておらず動物実験の段階でとどまっている。すなわち、採取した骨髄から間葉系幹細胞含む間葉系細胞を選択的に増殖させるための培養に大きな問題がある。通常、細胞移植では細胞を一定数まで増殖させ、それを特定の細胞系列の分化誘導する必要がある。しかし、工業的に作られた最低栄養素のみを含む基本培地では、細胞が増殖しない。したがって、この基本培地に血清やさまざまな成長因子などを添加して用いるのが一般的である。

これまでわれわれは培養液として、ダルベッコ修正イーグル培養液 (DMEM; Gibco 社製、米) に 10% ウシ胎児血清 (FBS) と抗菌剤を添加したものを使用してきた。これは細胞培養に一般的に研究で使用されているものである。しかし、臨床応用を行う場合にこの培養液で増殖させた細胞の安全性は確立されておらず、BSE を発症するプリオンや未知の病原体が混入していないという保障はない。本研究では、細胞移植による声帯再生の臨床応用を勧めるに当たって、より安全で効果的な細胞培養を目指した培養液の選定につき検討した。結果として DMEM + 10% FBS には及ばないものの、 α MEM + 15% 血清でも十分な細胞増殖が可能であることを見出した。

今後この結果を踏まえ、自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生の臨床応用を目指してゆきたいと考えている。

E. 結 論

自己血清を用いた細胞培養法により安全性が確立され

た自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯再生は、有効な治療法として臨床応用が期待できる。

F. 参考文献

- 1) Hirano S, Thibeault S, Bless D, Ford C, Kanemaru S: Hepatocyte Growth Factor and its receptor (c-Met) in Rat and Rabbit Vocal Folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111:661-6, 2002
- 2) Kanemaru S, Nakamura T, Kojima H, Omori K, Hiratsuka Y, Magruffov A, Ito J, and Shimizu Y: Regeneration of the recurrent laryngeal nerve using in situ tissue engineering. *Proceedings of the 12th World Congress for Bronchology and the 12th World Congress for Bronchoesophagology Scientific Free Paper* 303-6, 2002

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 金丸眞一：頭頸部領域の再生医療，日耳鼻 109, 1-7, 2006
- 2) Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Iguchi F, Tae Soo Kim, Kishimoto M, Omori K, Ito J: Destiny of the Autologous Bone Marrow Derived Stromal Cells Implanted in the Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 114:907-912, 2005
- 3) 金丸眞一 頭頸部領域の再生医療，頭頸部癌. 31:402-407, 2005
- 4) 金丸眞一. 声帯麻痺 Up to date; 声帯麻痺に対する再生医療は可能か? *JOHNS* 21 (久育男 編) 5: 797-800頁, 東京医学社, 東京, 2005
- 5) 金丸眞一. 頭頸部領域の再生医療. 専門医通信 (村上信五 編) 28-29頁, 日耳鼻, 東京, 2005

2. 学会発表

- 1) Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Ono 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. Philadelphia, Dec 4-6, 2006.*
- 2) Kanemaru S, Omori K, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Kishimoto M, Asato R, Nakamura T, Ito J: The Destiny of the Autologous Bone Marrow Derived Stromal Cells Implanted to the Vocal Fold. *COSM* 2005.5.13
- 3) Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Omori K, Ito J: Regeneration of the vocal fold by implantation of bone marrow derived stromal cells TESI and ETES Lausanne, Switzerland 2004.10.13
- 4) Panel. Vocal fold regeneration. Hirano S, Thibeault SL, Dailey SJ, Kanemaru S, Hess M. *7th International Association of Phonosurgeons, Madrid, Feb 26-17,*

2005.

- 5) ワークショップ 金丸眞一：自己骨髄由来間葉系幹細胞移植による声帯再生 第58回日本気管食道科学会総会 (2006.10.5, 札幌)
- 6) シンポジウム 金丸眞一：耳鼻咽喉科疾患治療の最前線「頭頸部領域における再生医療」第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.20, 大阪)
- 7) シンポジウム 金丸眞一：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 (2005.6.17, 東京)
- 8) 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 第18回日本喉頭科学会 (2006.4.13 熊本)
- 9) 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：生体際背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. 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 10) 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, 京都)
- 11) 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, 京都)
- 12) 金丸眞一, 山下 勝, Akhmar Magruffov, 喜多知子, 玉木久信, 井口福一郎, 田村芳寛, 大森孝一, 中村達雄, 伊藤壽一：骨髄由来間葉系幹細胞移植による声帯の再生 第7回 日本組織工学会 (2004.7.1, 東京)
- 13) 金丸眞一, 山下 勝, Akhmar Magruffov, 喜多知子, 井口福一郎, 金 泰秀, 大森孝一, 中村達雄, 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－移植細胞の所属と行方－ 第56回 日本気管食道科学会 (2004.11.25, 東京)

H. 知的財産権の手願・登録状況

1. 特許取得

No. US7,011,829 B2

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1

| | 1 日 | 3 日 | 7 日 | 10 日 | 14 日 |
|-------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| α MEM | 47 | 50 | 73 | 92 | 134 |
| α MEM + 15%血清 | 81 | 103 | 224 | 265 | 473 |
| DMEM + 10% FBS | 90 | 188 | 321 | 497 | 685 |

I. 総合研究報告

II. 分担研究報告

1. 基礎研究

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）

中村 達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再生応用分野）

主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究協力者 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究要旨

ポリグリコール酸を主成分とした管状構造物にコラーゲンを被覆し、さらにコラーゲンスポンジを内部に入れた人工神経管（PGA チューブ）を用いて、動物実験を行い再生が難しいといわれている反回神経の再生に成功し、これを背景にこのチューブを用いて臨床応用を開始した。反回神経、顔面神経、鼓索神経、副神経などで良好な成績を上げているが、自家神経移植より本人工神経が良好な成績であることのメカニズムを探求するために、イヌを用いた実験でPGA チューブと自家神経移植で再生途中の組織学的検討の比較から、移植した自家神経が再生軸索などの障害物になるのに対して、PGA チューブはその内部のコラーゲンとともに良好な神経再生環境を提供していることが判明した。またコラーゲンスポンジを封入したPGA チューブと封入していないチューブとの比較で、神経栄養因子などの保持能力に差があるかどうかを検討し、前者に保持能力があることを証明した。

A. 研究目的

1) PGA チューブと自家神経移植との神経再生過程における比較検討

2) PGA チューブコラーゲンスポンジ封入（I型）、封入なし（II型）との神経栄養因子の保持能力の比較検討

B. 研究方法

1) ビーグル犬の両側 peroneal nerve を 1 cm 切除し、1 側は PGA チューブ、他側は反対側から採取した自家神経を移植し 1 週、2 週、8 週間後に標本を採取し、両者の組織学的検討を行った。

2) 上記二つのタイプの径 2 mm 長さ 10 mm の PGA チューブ内に BDNF（脳由来神経成長因子）（50 µg/ml × 5 µL）を封入。いずれも両端をフィブリン糊で密閉し PBS 内に沈め自動シェーカーで揺らしながら、PGA チューブ外に漏れ出てくる BDNF の量を 10 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間後に測定した。

C. 研究結果

1) PGA チューブでは、2 週までは中枢側からの再生線維が抵抗なく PGA チューブ内を伸長していることが確認され、8 週後には PGA チューブ内の再生が完了していた。一方、自家神経移植では、2 週目には両側の神経末端ではすでに神経腫瘍様の組織がみられるものが多く、8 週目には約 60% の症例で神経腫瘍の形成が認められた。

2) I 型 PGA チューブは 6 時間後でも 80% 以上の BDNF を保持していたが、II 型 PGA チューブは 1 時間

以内に 80% 以上が流出。3 時間後にはほぼ全量が流出していた。

D. 考察

傷害された神経再建に最も有効な手段とされているのは、直接吻合か自家神経移植である。前者は吻合に際して神経に余分な張力がかからないことが前提となり、そのギャップが非常に小さいごく少数の症例に限られる。後者では、再建の対象となる神経の多くは運動神経で、移植の材料として採取される神経の多くは感覚神経であり、適切な太さの神経を選択する必要がある。再建材料としての感覚神経の切除によって、支配領域の感覚脱出という後遺症は必発である。また、複数の神経を再建する場合、採取する神経の範囲とそれに伴う後遺症も広範囲に及ぶ。さらに、移植吻合部位に神経腫瘍が発症することもあり、疼痛のために再度神経切除術を施行する場合すらある。これに加えて、自家神経移植による、運動機能の回復成績はさほど良好とは言えず、特に過誤支配の予想される反回神経や顔面神経などでは、良好な再生はほとんど望めない。したがって、これらの神経で再建が行われる場合も、機能回復というよりは支配筋の萎縮防止を目的にしているのが現状である。

これに対してわれわれは、これまで *in situ tissue engineering* の基本概念に立脚して PGA（Poly-glycolic acid）チューブという人工神経を用いて、切除した犬の反回神経が機能的に再生しうることを報告してきた。PGA チューブは、ポリグリコール酸を主成分とした管状構造物の表面を豚皮由来の I 型、III 型コラーゲンをそれぞれ 70%、30% の比率で混合したもので被覆し、さらに管腔内に同

じコラーゲンのスポンジを充填したものである。ポリグリコール酸は、最も簡単な構造式を持つ高分子化合物で、生体内で加水分解され約4ヶ月で完全に消失する一方で、一定期間その形状を保持している。これまでにわれわれは、数種類のPGAチューブを作成し実験を重ねてきたが、臨床応用を念頭に置き、大量生産が可能でかつ物理的強度にすぐれたものとして現在のタイプに至った。

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

これまで、犬を用いた動物実験のデータから、自家神経移植では非常に高率に再建部分に神経腫瘍が形成されることがわかってきた。これは、移植神経がwaller変性を起こして再生軸索の通路を提供する以前に中枢側神経切断端からの再生が開始されるため、移植神経が再生軸索の伸長の通路を塞ぐ障害物となるためではないかと考えられる。すなわち、行き場を失った再生軸索やそれに続くschwann細胞、神経線維はその周囲で腫瘍を形成する。このような環境の下では、標的臓器に到達できる神経線維は非常に少なく、遅く到達できてもそれまでに非常に時間がかかり、標的臓器の萎縮や過誤支配のために機能的回復が不可能となることも予想される。とくに反回神経などは、①径が非常に小さい、②中枢から標的臓器までの距離がながい、③一束の神経内に声帯の開閉という拮抗する運動を支配する神経線維が混在する、④標的臓器である筋が非常に小さい、といった再生に不利な条件がそろっている。

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

さらに、神経切除後に末梢標的臓器に正確な神経の再支配が行われることが、機能的神経再生にとって重要な要因である。これまでの研究で、PGAチューブによる神経再建で、過誤支配が少ないという結果を得ていることから、末梢標的臓器より何らかの誘導因子が産生され

ている可能性が示唆され、コラーゲンスポンジを入れたPGAチューブがBDNF (神経成長因子) をより長時間保持する能力があることが分かった。このことは、末梢標的臓器より放出された何らかの誘導因子が、PGAチューブに保持されることにより、過誤支配が減少する可能性のあることを意味している。

E. 研究結論

コラーゲンスポンジ封入型PGAチューブは、神経再生に良好な再生環境を提供するとともに、神経栄養因子などの長時間の保持能力によって、過誤支配を防いでいる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magruffov A, Yamashita M, Ito J: Functional regeneration of tissue engineered recurrent laryngeal nerve and the mechanism of this process studied on the peroneal nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol*.2007 (in press)
- 2) 金丸真一：人工神経チューブによる神経再生医療，喉頭 17:72-75, 2005
- 3) 金丸真一：再生医療を支える基本概念 耳鼻臨床 98:519-527, 2005
- 4) 金丸真一：声帯麻痺 Up to date; 声帯麻痺に対する再生医療は可能か？ *JOHNS* 21 (久育男 編) 5:797-800頁，東京医学社，東京，2005

2. 学会発表

- 1) Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Umeda H, Tamura Y, Okano T, Hirano S, Inada Y, Omori K, Ito J: Tissue-engineered regeneration of recurrent laryngeal nerve by two types of artificial nerve conduits. The 2006 annual meeting of the American Laryngological Association. Chicago, IL, USA. May 19-22, 2006.
- 2) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magruffov A, Yamashita M, Tamura Y, Tamaki H, Ito J, Shimizu Y: Functional regeneration of tissue engineered Recurrent laryngeal nerve and the mechanism of this process studied on the peroneal nerve. *COSM Phoenix AZ* 2004.4.30
- 3) シンポジウム 金丸真一：耳鼻咽喉科疾患治療の最前線「頭頸部領域における再生医療」第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.20, 大阪)
- 4) シンポジウム 金丸真一：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, 名古屋)
- 5) シンポジウム 金丸真一：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 (2005.6.17, 東京)

G. 知的財産権の手願・登録状況

1. 特許申請

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究要旨

気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再生させることを目的として、組織工学的手法による気管再生のトランスレーショナルリサーチを行ってきた。本研究では動物実験による気管再生に関する長年の研究成果の蓄積をふまえて、「喉頭・気管の再生治療」について倫理委員会の承認を得て、主任研究者らは本再生治療を世界に先駆けて臨床応用を始め、現在までに7例に行っている。自己組織再生型的人工材料、手術手技について、またそれぞれの術後経過を述べ、今後の課題を明らかにする。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 人工材料の開発

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

2. 動物実験の概要

ビーグル犬を用いた動物実験で、本人工材料を気管欠

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

（倫理面への配慮）

以上の動物実験の結果をふまえ、「喉頭・気管の再生治療」は京都大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則り本人工材料のヒトへの応用を開始した。さらに本再生治療は福島県立医科大学医学部倫理委員会でも承認された。

C. 研究結果

これまでに甲状腺癌気管浸潤例で病変切除後の即時再建3例、気管狭窄の病変（瘻痕・肉芽）切除後の再建4例（声門から声門下1例、声門下から気管3例）の計7例に対し臨床応用を実施しており、最長観察期間4年2ヵ月経過した現在も全例再狭窄などを認めず経過良好である。

症例5について詳細を呈示する。

症例5：特発性気管狭窄症

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たが、再狭窄をきたしたため、再度喉頭截開を受け、Tチューブ挿入となった。CT上、輪状軟骨と第1～3気管輪レベルで内腔の狭小化を認めた。手術は、先に全身麻酔下に声門下瘢痕切除、右頬粘膜移植を行い喉頭気管溝を作製した。6ヵ月後にTチューブを抜去し再狭窄が起きないことを確認した。その3週間後に、全身麻酔下に喉頭気管溝閉鎖術を施行した。欠損部は気管軟骨3リングを1/3周で、そこに本人工材料を25×24mmにトリミングしパッチする形で縫合した。喉頭内視鏡所見として、術後2週間ではコラーゲンスポンジの一部露出と白苔の付着がみられていたが、術後2ヵ月で人工材料内腔面はほぼ上皮化し、術後1年4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。術後CTでは、気管軟骨欠損部を被覆する人工材料が確認され、内腔の再狭窄や気腫などの合併症も認めていない。

D. 考 察

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

我々の研究グループでは、体内の、再生を目的とする臓器の場所で組織を再生させる *in situ* Tissue Engineering という新しい概念に基づいて、1997年以後、動物実験で自己組織再生型の人工材料を移植し気管、食道、胃、輪状軟骨などが再生することを報告してきた¹⁾⁻⁴⁾。これらの実験では細胞移植や増殖因子は使わずに足場の移植のみでの組織再生を行ってきた。Vacantiらのように体外で組織を再生してから移植する方法や、自己由来であっても細胞移植を行うと、生きた細胞や組織を取り扱うので、感染症対策や細胞の品質管理など臨床応用へのハードルが高い。これらの方法に比べて、我々の行っている *in situ* Tissue Engineering により足場のみを移植する手法は安全性が高く臨床応用に近いといえる。気管、輪状軟骨までは、この方法である程度満足する成績が得られるものと思われる。

臨床応用の経過から被覆した人工材料内腔面上皮化には最低でも2ヵ月を要することが判ってきた。さらに喉頭レベルの症例では一旦肉芽形成がみられ、その消退に伴い上皮化が起こる傾向にあることも判った。上皮化の遅延は創部感染を惹起する危険性があり、次のステッ

プとして解決すべき問題点は、上皮化を加速する方法の開発であり、さらには形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生などがあげられる。これらの臨床的問題点をフィードバックさせ、本研究グループでは気道の上皮再生を加速するために、気管上皮細胞の培養、気管上皮細胞と人工材料からなるハイブリッド型の足場材料を開発し、その細胞の性質を免疫組織化学的手法で解析している。また、声帯の隆起を再生するために、喉頭内腔を型どりの材料で作製した。これらの結果は別項目に述べたが、問題点を克服することで、より多くの患者により安定した喉頭・気管の再生治療を実現できると考えられる。

E. 結 論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omori K, Nakamura T, Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, Shimizu Y: Cricoid regeneration using *in situ* tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113:623-627, 2004.
- 2) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration *in vitro*. *Tissue engineering* 12, 2619-2628, 2006
- 3) 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
- 4) 大森孝一：耳鼻咽喉科と再生医学。星総合病院年報 17：1～7，2004
- 5) 大森孝一，中村達雄，金丸眞一，Magruffov Akhmar，山下 勝，安里 亮，清水慶彦：喉頭・気管の形成手術：再生医学的アプローチ。日本気管食道科学会会報55(2)：145～152，2004
- 6) 多田靖宏，野本幸男，鈴木輝久，大森孝一：気道の再生。喉頭17:84-88, 2005
- 7) 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：気管の再生と臨床応用，分

子呼吸器病, 第10巻, 216-219, 2006

- 8) 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
- 9) 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

2. 学会発表

- 1) Omori K, Nakamura T, Magruffov A, Shimizu Y: Regenerative medicine of the tracheal tissue. 2004 COSM; American Laryngological Association, Phoenix, USA, April 30-May 1, 2004
- 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) 大森孝一, 中村達雄, 金丸眞一, Magruffov Akhmar, 山下 勝, 安里 亮, 田中信三, 伊藤壽一: 〈シンポジウム〉気管の再生医療. 第42回日本癌治療学会 (2004. 10. 27-29, 京都)
- 5) 大森孝一, 中村達雄, 金丸眞一, 安里 亮, 田中信三, 山下 勝, Magruffov Akhmar, 伊藤壽一, 清水慶彦: 気道の再生治療. 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2004.5. 13-15, 広島)
- 6) 大森孝一: 〈特別講演〉喉頭・気管領域の外科治療: デイ・サージャリーと再生医療について. 第53回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会 (2004. 7. 24-25, 秋田)
- 7) 大森孝一: 〈シンポジウム〉再生医療について. 第22回呼吸器・免疫シンポジウム (2004. 10. 23, 東京)
- 8) 大森孝一: 〈講座〉頭頸部領域の組織再生. 神戸大学工学部バイオテクノロジーコース「再生医療と工学」(2004. 11. 6, 神戸)
- 9) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magruffov A, Yamashita M, Asato R, Shimizu Y: 〈Special Lecture〉Regeneration of the laryngeal and tracheal tissue using in situ tissue engineering. The 4th East Asian Conference on Phonosurgery (2004. 12. 4, Kyoto)
- 10) 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)
- 11) 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙,

金丸眞一, 大森孝一: 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学術講演会 (2006. 10. 5-6, 札幌)

- 12) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 三宅将生, 挾間章博, 和田郁夫, 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, 東京)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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: 第18回日本喉頭科学会総会・学術講演会 (2006. 4. 17, 熊本)
- 17) 鈴木輝久, 小林 謙, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 自家脂肪組織由来の細胞群を用いたハイブリッド人工材料の被覆 第27回日本炎症・再生医学会 (2006. 7. 12, 東京)
- 18) 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8回日本組織工学会 (2006. 9. 8, 京都)

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

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|---|------------|---------------------------------|------------------|-----|------|---------|
| 森野茂行, 永安 武, 中村達雄 | 細胞増殖因子と再生医療 | 松本邦夫, 田畑泰彦 | 肺気腫 | メディカル レビュー社 | 大阪 | 2006 | 101~105 |
| 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 | 光嶋 勲 | PEPARS 末梢神経再建 - up date - | (株)全日本病院出版会 | 東京 | 2005 | 12~17 |
| 中村達雄, 茂野啓示 | 確立した再生医療の基本コンセプト | 茂野啓示 | 新・一から学ぶ 歯周外科の手技 | 医歯薬出版 | 東京 | 2005 | 356~361 |
| 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 - | 小川節郎 | 痛み治療のアップ ローチ | 真興交易(株) 医書出版部 | 東京 | 2005 | 94~112 |
| 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 | 福田 修, 荻野洋一 | 耳介の形成外科 | 克誠堂出版 | 東京 | 2005 | 25~35 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------------------|--------------|---------|------|
| 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 |
| Yamashita M, Omori K, Kanemaru S, Magrufov 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 Suppl | 66~72 | 2007 |
| Yamashita M, Kanemaru S, Hirano S, Magrufov 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 |
| 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 | | | 2007 |
| 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 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------------|--------|---------------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 中村達雄 | 末梢神経の再生 | 治療 | 88 | 3028 ~3032 | 2006 |