

の上皮層形成は不十分であったが、7日では形成を認めた。免疫染色にて術後7日まではシート上に GFP 陽性細胞を認めた（図 5 b, d）が、術後30日では認められなかった。

移植後のコラーゲンスポンジの変化を Type A 移植モデルの HE 染色で観察したところ、術後3日ではスポンジ

周囲に細胞浸潤を認めるものの内部への浸潤は軽度であったが、術後7日では内部への細胞浸潤も増加し血管新生も認められた。術後30日では、スポンジはほぼ吸収されていた（図 6）。

免疫組織化学的には、移植した気管上皮細胞は短期では

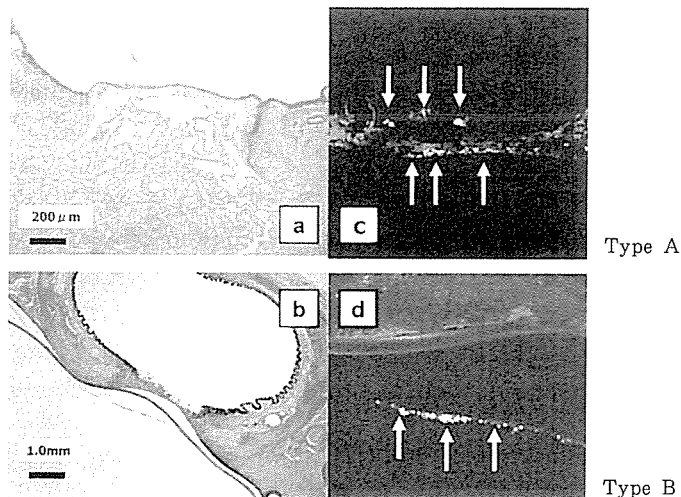


図 5 a. Type A 術後3日目の HE 染色：欠損部に一致して人工材料を認め、上皮形成を認める
 b. Type B 術後7日目の HE 染色：欠損部に一致して人工材料を認め、わずかながら上皮形成を認める
 c. Type A の免疫染色：創部に一致して GFP 陽性細胞を認める（矢印）
 d. Type B の免疫染色：シート上に GFP 陽性細胞を認める（矢印）

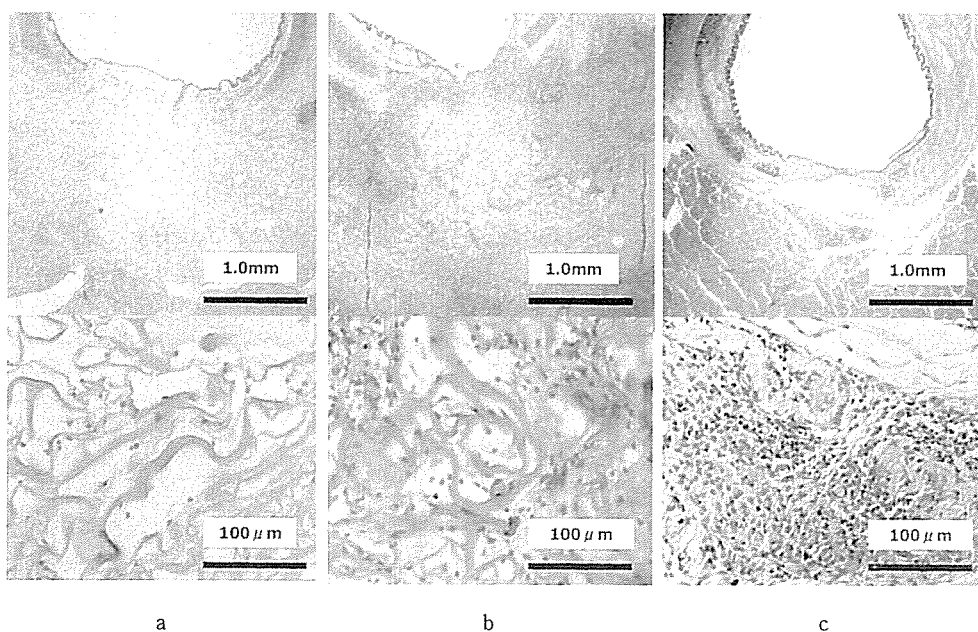


図 6 Type A のコラーゲンスポンジ変化
 a. 術後3日目：スポンジ周囲に細胞浸潤を認めるものの内部への浸潤は極軽度
 b. 術後7日目：内部への細胞浸潤は増加して血管新生を認める
 c. 術後30日目：スポンジはほぼ吸収され器質化を認める

あるが局所にとどまっておらず、術後7日目には上皮形成を認めていることから組織再生に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 今後の展望

今回の基礎実験の結果が上皮化促進にどの程度寄与するかの評価については、より大きな気管欠損モデルでの評価と、さらには上皮下層の組織再生についての評価が必要である。

現在までに当該施設の倫理委員会での承認の上で、喉頭・気管領域の再生治療の臨床応用を開始し現時点では良好な術後経過を得ているが、次のステップとして、問題点をあきらかにし、さらにこれを解決するために基礎研究にフィードバックすることが重要である。このような多方面からの臓器再生工学的研究により、より有効で安定した気道の再生治療を実現化することが可能となると考える。

本研究の一部は、平成16年度 厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）の助成を受けて行った。

参 考 文 献

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

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

特集 肺の再生医療—現状と展望

気道の再生*

中村 達雄¹

はじめに

気道は中枢の気管と末梢の気管支・細気管支によって構成されるが、外科的な再生(再建)は気管支までが対象になる。気管支よりさらに末梢の細気管支や肺泡レベルの再生は内科治療の対象である。

外科的な気管再建の対象となる疾患は、悪性腫瘍の気管浸潤や外傷、気管内挿管チューブのカフによる瘢痕狭窄などである。こういった疾患に対して、病変部を切除してゴム管などの人工物で欠損部を再建しようとする試みが1940年代より始まった¹⁾。しかしながら、人工血管の開発成功とは対照的に、人工気管開発は遅れ、現在も市販されている人工気管はないのが現状である。

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

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

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

組織親和性の高いバイオマテリアルの開発

新型の人工気管は人工材料で作ったメッシュを芯に自己組織の筒を作り、それを利用する。そこでステントを再生気管壁に取り込ませるために、生体の細胞外基質 Extracellular Matrix を構成する主要な蛋白であるコラーゲンが用いられる。コラーゲンで合成高分子材料(プラスチック)の表面を修飾することにより、材料の生体親和性を飛躍的に向上させる新しい方法が1977年に開発された。まずプラスチックの表面にプラズマ処理をして、プラスチック表面に反応基を作り、その反応基にコラーゲン分子を付加する方法である。この新しい技術を用いて初めてプラスチック材料を生体に素早く取り込ませることが可能になり、自己組織再生型人工気管の開発に大きく貢献した⁴⁾。

* Regeneration of Airway

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

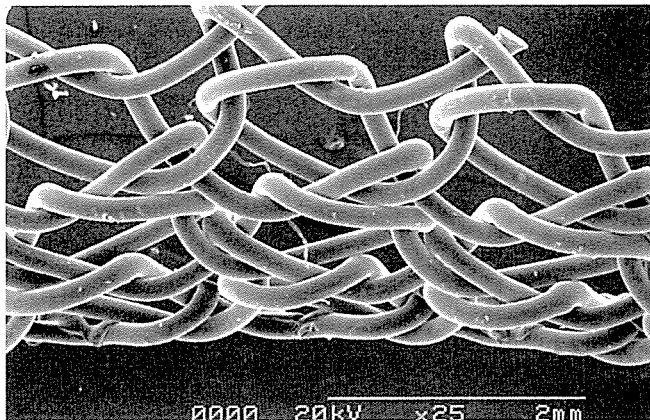


図1 人工気管に用いられるポリプロピレン製のメッシュ (Marlex® Mesh) の走査電子顕微鏡 (SEM) 写真

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

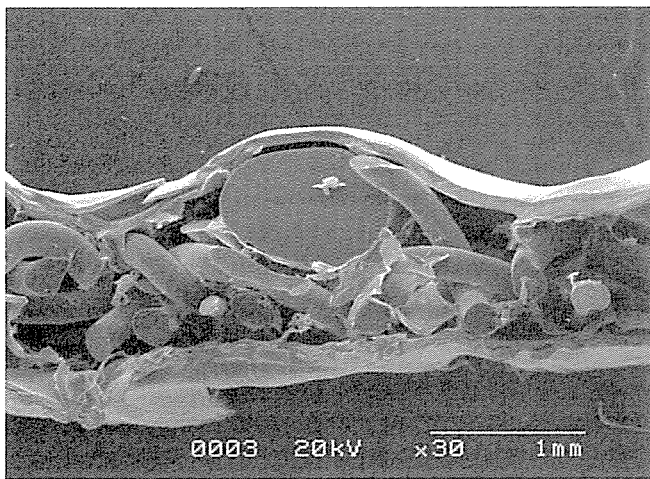


図3 コラーゲンコーティングと風乾を10回繰り返した人工気管壁断面のSEM所見

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

新しいメッシュ型の人工気管の構造

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

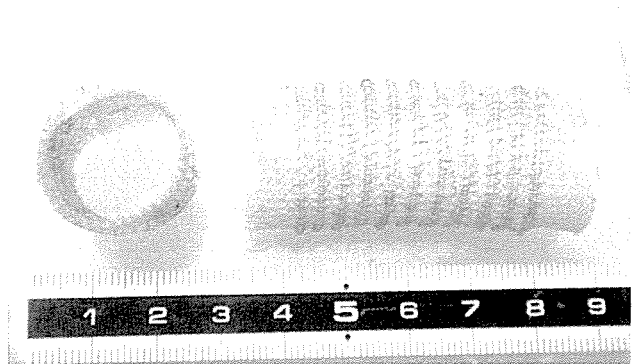


図2 人工気管の芯を構成するメッシュチューブスパイラルに巻き付けたポリプロピレンモノフィラメント繊維で補強してある。メッシュとモノフィラメント繊維は熱融着させ、さらに7-0プロリン糸で縫合されている。

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

気道の力学強度と人工気管による再建

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

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

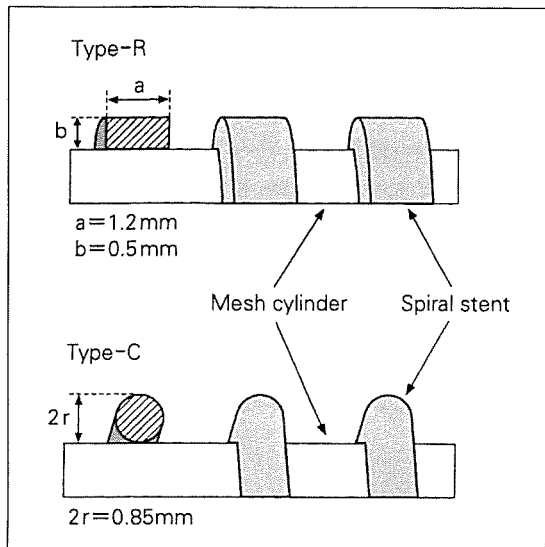


図4 スtent材の形状と耐圧縮力学強度を調べる実験に使った人工気管断面シェーマ
Type-Rは断面が矩形，Type-Cは断面が正円のstentである。(文献¹⁴⁾より引用)

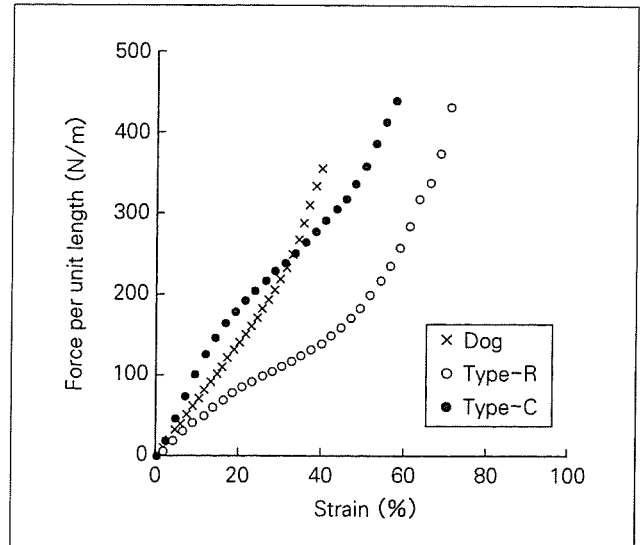


図5 人工気管の耐圧縮力学強度
オートグラフ下で長軸に垂直な方向より圧縮して単位長さ当たりの力をひずみに対して測定した。断面が正円形のstentを用いると生体気管に近い物性になる。

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

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

て再建部の気管は生体気管とほぼ等しい耐圧性を保持することもわかった。

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

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

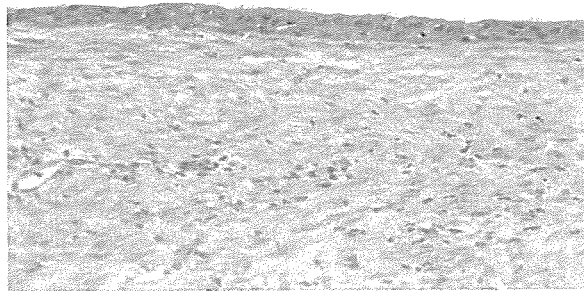


図6 人工気管の内面に再生した上皮の病理組織
(H-E染色, 倍率×400)
埋入2カ月後には形成した粘膜下組織の表面に扁平上皮が伸展し, 一部には線毛が生えている。

再建部の上皮と線毛の再生

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

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

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

組織再生の足場となるコラーゲンのスポンジによる気管壁の重層も試みられた。これは人工食道に応用されていたコラーゲンスポンジの技術で, このスポンジを用いると食道欠損部では自己組織が3週間以内に再生した。しかもそこには平滑筋や食道腺など高度に分化した構造までみられることが確かめられていた。イヌの頸部気管にこのスポンジ状コラーゲンを重層した人工気管(図11)を用いると, 6~24カ月に屠殺するまで全頭経過良好に生存した。気管壁はスポンジに自己の血液を含漬させることにより手術時にはリークが起これず十分気密となった。また, 組織の再生もそれ

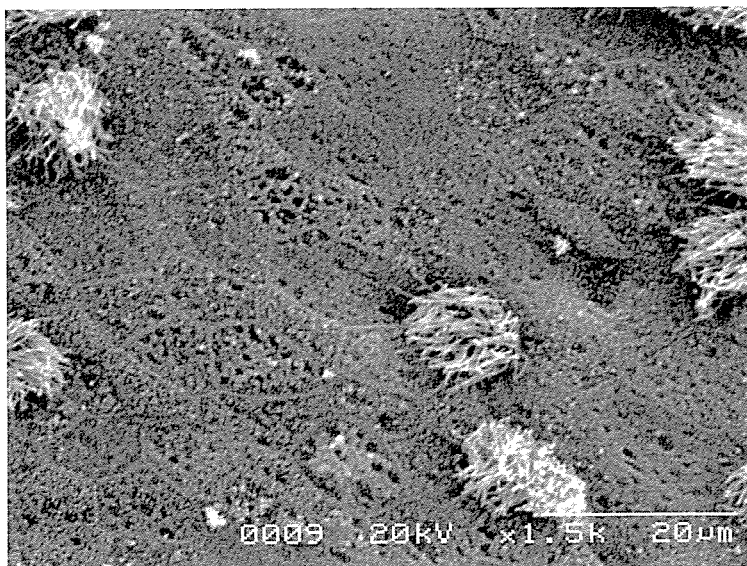


図7 人工気管内腔面の走査電子顕微鏡所見
再生した上皮は五角~六角形の細胞で構成され, 気管内面を敷石状に覆う。そのうち一部には島状に線毛上皮が再生していく。線毛は縫合部近くに多く, 中央部が少ない傾向にある。図6と同じ標本。

図8 再生過程にある気管上皮のSEM所見
($\times 5,000$)

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

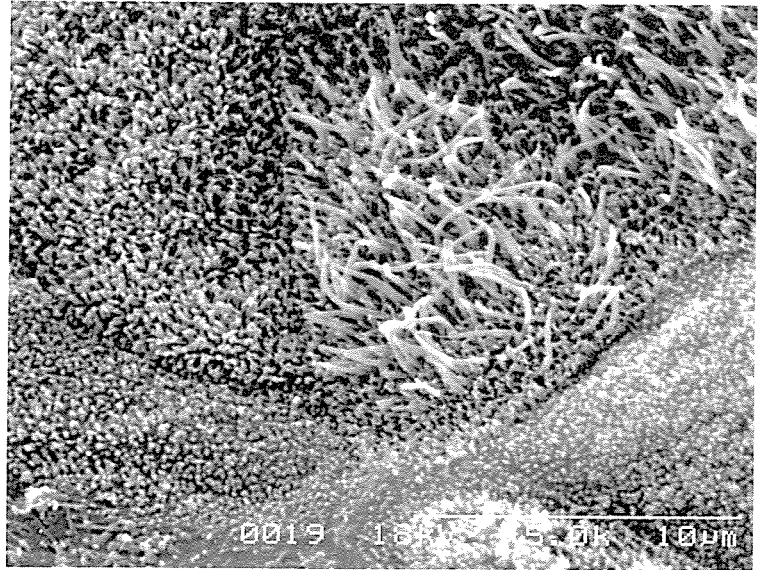


図9 線毛上皮の再生が進んだ人工気管内面の走査電子顕微鏡写真($\times 1,500$)

丈の長い線毛の生えた内皮の数が次第に増加していく(3カ月目)。

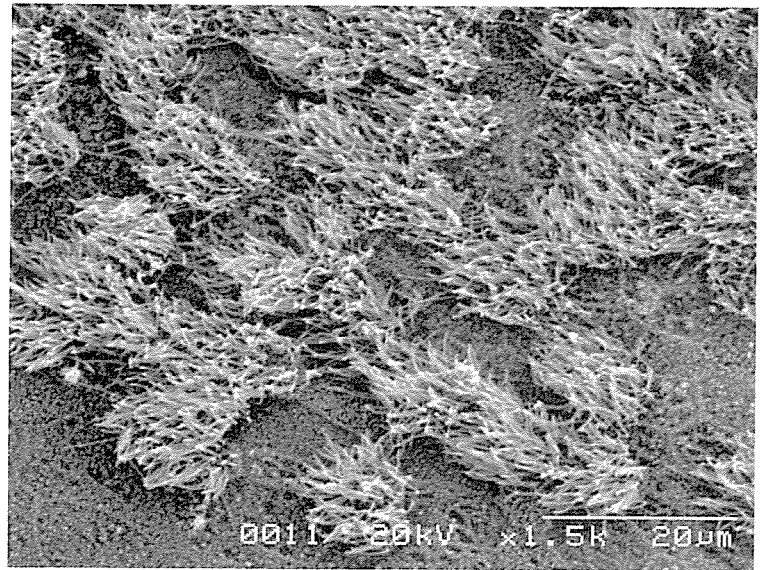
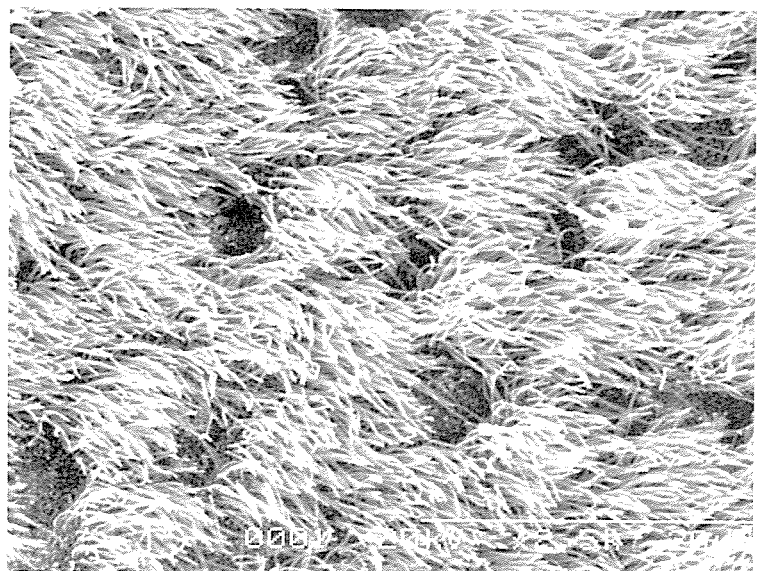


図10 再生した気管内皮は最終的には線毛上皮になる。気管支鏡下に内皮をサンプリングして線毛の運動を測定すると、10~12 Hzの拍動をしていることが判明した。この値は正常のほぼ80%程度の振動数に相当し、再建部上皮は機能的にも良好な再生をしていることが示された。



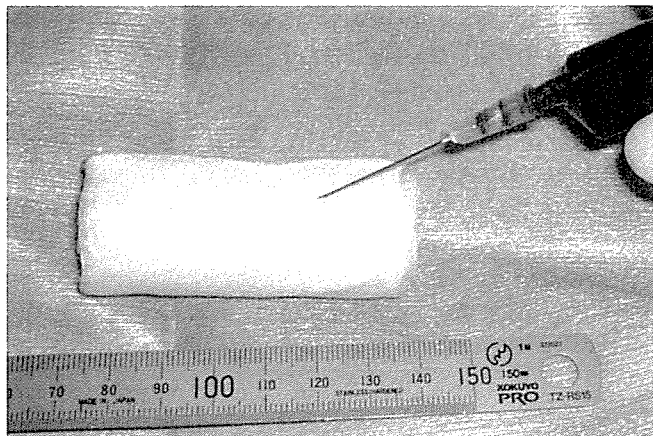


図11 コラーゲンスポンジを表面に重層した人工気管に自己血を含漬させるところ

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

までのアモルファスコラーゲンに比べ良好であった⁹⁾。

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

現状と今後の展望

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

生体の気管には内腔を支えるためにU字型の気管軟骨が存在する。近年、組織工学の技法を用いた種々の軟骨再生の試みが行われている。しかしながら、長期に気道を支えるに足る軟骨の再生は未だに報告がない。関節軟骨と異なり、気管軟骨の場合は力学的強度が低下した場合、気道が虚



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

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

脱し直ちに生命に関わる。

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

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

再生医学研究は急速に進められているものの、臨床に応用されているものはまだまだ数が少ない。この *in situ* Tissue Engineering を用いた気道の再生は日本で世界に先駆けて実用化されたものである。今後一般医療として普及するように研究をさらに積み重ねていくことが大切であろう。

文献

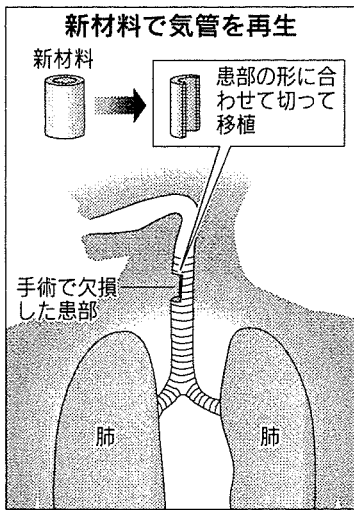
- 1) Daniel RA Jr: The regeneration of defects of the trachea and bronchi: an experimental study. J Thorac Surg 17: 335-349, 1948
- 2) 松原義人, 畠中陸郎, 小鱈 寛, 他: 人工気管による気道再建術. 日外会誌 88: 478-482, 1987
- 3) 清水慶彦, 田村康一, 加藤弘文, 他: meshによる人工気管における創傷治療に関する検討. 人工臓器 12: 486-489, 1982
- 4) Hirai K, Shimizu Y, Hino T: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

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

医療材移植、気道を再生

福島県立医大・京大

福島県立医科大学の大森孝一教授と京都大学の中村達雄・助教らはがんの手術で失った気道の一部を再生する治療法を開発した。コーラゲン製の医療材料を気道の患部に移植するもので、患者の細胞が医療材料の表面を覆う。がんの手術の際に移植できるので、一回の手術で済む。体の別の組織を切り取って移植する方法に比べ患者の負担が軽くなる。



手術1回、治癒力活用 患者負担軽く

開発した医療材料は円筒形で、医療用プラスチックの骨組みの上にスポンジ状のコーラゲンを付けた。血液を含ませてから気道の患部に移植する。時間が経過すると、上皮細胞などが医療材料

を覆い、最終的にはコーラゲンと置き換わる。新材料は最適な硬さに調節しており、軟らかすぎると気道がしぼんで呼吸ができなくなる危険性などを取り除いた。犬で実験した後、甲状腺がんや気管狭さくなどの患者計七人の治療に使った。ある甲状腺がんの手術を受けた患者の場合は、直径約一・五センチの気道が一部欠損しており、そこに新開発の医療材料を移植した。二カ月後には上皮細胞が表面を覆っていた。

甲状腺がんの患者は国内で年間七千人。新技術の手術対象となるのは気管狭さくの患者も含めて国内で数百人規模。さらに胸部気管の治療にまで利用できるようになれば、肺がんの手術後に欠損した患部を再生するのに役立つ。対象患者は十倍以上になるとみている。

甲状腺がんの手術で気管を切開すると、体の別の組織を使ってふさぐのが複数回の手術が必要。これまでは気管を再生させるような医療材料はなかった。

新開発の材料ならば一回の手術で済み、患者の負担を軽減して早期の社会復帰に役立つ。

にも利用できるよう、肺に近い胸部気管の再生にも適応範囲を広げるのが目標。犬の実験ではすでに成功している。