

が最適で、頸部のみの操作で安全な切除範囲は4 cm 以下とされている。これを超える場合は、喉頭リリースや気管リリースが必要となる。輪状軟骨弓部にも病変が及ぶ場合は、輪状軟骨と気管を切除して、気管甲状軟骨吻合を行う。

気管切除後の端々吻合術は外科領域で標準的な術式となってきた²⁾、縫合部離開のリスクや創部安定のため頤部と胸部を縫合して頸部前屈体位をとるなど患者への侵襲が大きい。術後1～2日挿管したまま観察してから抜管することが多いが、気管切開孔をあけてTチューブを入れる方法もある。

3) 生体内組織再生誘導型の人工気管

人工気管については1960年代から数多くの研究が行われてきたが、満足する臨床成績は報告されてこなかった。1995年、中村らは生体内で自己組織の再生を誘導する*in situ* Tissue Engineeringの手法で、ポリプロピレンメッシュ管にコラーゲンスポンジを付加した人工材料を再生の足場として開発し、これを犬に移植し最長5年の経過観察で良好な内腔上皮再生が得られ安全性が確認された。

2002年より施設内倫理委員会の承認の上、著者らは本技術を用いた気道の再生医療を行っている。甲状腺癌の気管浸潤例に対する頸部気管即時再建と喉頭・頸部気管狭窄例に対する病変切除後の二期的再建を行い、現在まで経験した10例において最長6年の経過観察で再狭窄をきたしていない³⁾。代表例を示す (Fig. 2)。管状にしたポリプロピレンシートにコラーゲンスポンジを付加した人工材料を輪状軟骨から頸部気管の欠損部に縫合した。術後4年では肉芽増生や再狭窄はなく順調に経過している。

本法は移植材料のトリミングが容易で安定した気道再建が可能であるとともに、他の部位からの組織採取が不要で手術回数を減らすことができる。今後は、頸部気管の全周性欠損への適用、胸部気管への応用が期待されるとともに、吸収性の材料からなる新規人工気管の開発が望まれる。

V. おわりに

声門・声門下・頸部気管狭窄症には、瘢痕性狭窄症や悪性腫瘍の浸潤があり、病変の切除範囲と再建方法の選択がポイントである。病変が広範囲である場合は切除後に喉頭気管溝を形成し、二期的に欠損部を再建するのが安全な方法である。その際に、耳介軟骨や肋軟骨などが用いられるが、多くの場合、複数部位の操作や複数回の手術が必要である。著者が開発した人工気管は、生体内で自己組織の再生を誘導する*in situ* Tissue Engineeringの考え方をもとにしたもので、これを利用した気道再生医療についても紹介した。

文 献

- 1) 大森孝一：頸部気管再建術. 日本気管食道科学会専門医通信 39 : 6-11, 2009.
- 2) Grillo HC : The history of tracheal surgery. Chest Surg Clin N Am 13 : 175-189, 2003.
- 3) Omori K, Tada Y, Suzuki T, et al : Clinical application of *in situ* tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol 117 : 673-678, 2008.

Surgical Treatments for Glottic, Subglottic and Cervical Tracheal Stenosis : Laryngotracheal Trough Method and Airway Reconstruction

Koichi Omori, M.D.¹⁾, Yasuhiro Tada, M.D.¹⁾, Yukio Nomoto, M.D.¹⁾, Akiko Tani, M.D.¹⁾,
Shin-ichi Kanemaru, M.D.²⁾, and Tatsuo Nakamura, M.D.³⁾

¹⁾*Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima,*

²⁾*Department of Otolaryngology, Kitano Hospital, Osaka, and*

³⁾*Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Science,
Kyoto University, Kyoto*

The etiology of glottic, subglottic and cervical tracheal stenosis includes congenital, inflammatory, traumatic and neoplastic diseases. The area of the stenotic lesion should be evaluated circumferentially and longitudinally. Endoscopy and CT scan present effective diagnostic information of the stenosis.

In a case with slightly stenotic lesion, T-tube insertion or transoral surgery is applied. In a case with severe stenosis, a cervical approach, either laryngotracheal trough method or cricotracheal resection, is applied. In the laryngotracheal trough method, scar tissue is removed and a stent is set into the groove. From three to six months after, reconstructive surgery using the auricle or costal cartilage is performed.

We developed an artificial trachea made of polypropylene mesh and collagen sponge which induced natural tissue regrowth and also elucidated the efficacy and safety of the method in an animal model. Based on approval of the Institutional Review Board (IRB), regenerative medicine of the cricoid and cervical trachea was clinically applied. There has been no re-stenosis in ten cases since 2002.

Key words : glottic, subglottic, cervical trachea, stenosis, laryngotracheal trough method

侵襲と免疫 2012; 21 (2) : 7-12

— Key Words —

■
再生

■
組織工学

■
人工気管

■
in situ Tissue Engineering
(生体内再生)

■
iPS細胞

京都大学再生医科学研究所
臓器再建応用分野
中村 達雄

肺に対する 再生医療応用の可能性

はじめに

再生医療は再生医学の臨床応用として1990年代より組織工学(Tissue Engineering)の手法を用いて始まった。培養室のシャーレの中で人体のパーツをつくるという従来の組織工学の手法でつくられた軟骨や皮膚や角膜はすでに臨床で使われ始めている。しかしながら肝臓・腎臓といった実質臓器の再生研究はまだ始まったばかりである。特に肺胞上皮と毛細血管が複雑な三次元構造を織り成す肺実質の再生に至っては、現在でもその糸口さえみえていない。

本稿では肺に対する再生医療研究の現状と、臨床応用への期待が高まる新しい*in situ* Tissue Engineeringの概念について説明するとともに、呼吸器再生医療の将来について展望する。

I. 肺の再生医療

肝臓は部分的に切除されると、残った肝臓は肥大成長する。全体の1/5残っていればこの代償性の成長によって肝機能が補充される。しかし成人の肺を部分切除した場合はこのような代償性の成長はみられない。ただ

し2~8歳の幼児では肺の代償性成長がみられたという報告はある¹⁾。ラットでは成長した個体でも肺の代償性成長が認められる²⁾。これがイヌやネコになると、成長した個体では肺の代償性成長は認められない³⁾。この肝臓と肺の差、そしてラットと人間の差はいったい何が原因なのだろう。

このような疑問を解明しつつ、再生医学の手法を用いて障害を受けた肺を再生して治療しようとする試みが始まっている⁴⁻⁶⁾。

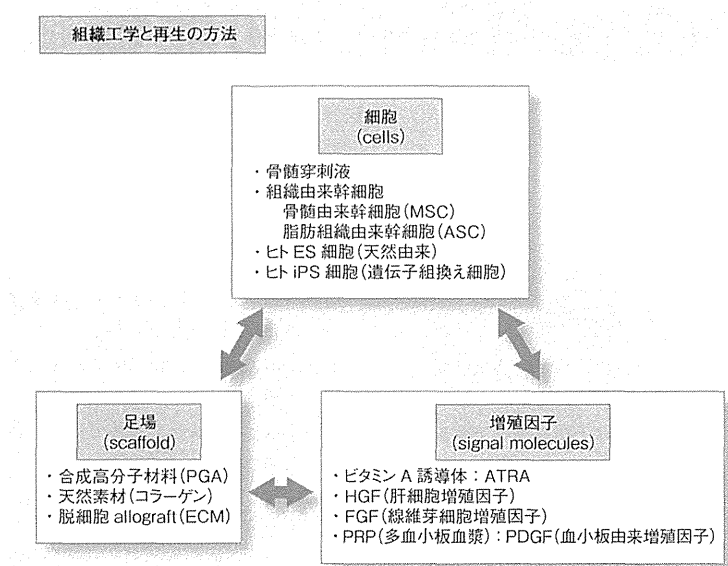
・肺再生の手法

組織工学では、①細胞、②足場(scaffold)、③増殖因子(signal molecules)を組み合わせて組織をつくり出すが、この3つの要素をどのように組み合わせるかが再生研究の鍵となる(図1)。

組織工学の手法を用いて組織や臓器を再生させる方法はさらに大きく2つに分類できる。

一つは古典的な組織工学の手法を用いて培養室の中で肺をつくり、それを移植するという方法である。皮膚や角膜、軟骨など、ほぼ均質な構造をもつ組織ではこの手法で移植用の組織が作成可能であった。しかしながら、肺胞上皮と毛細血管が複雑な立体構造をなす肺臓はこの手法では作成できない。

図1 組織工学の三角型と肺再生への戦略



3つの因子の組み合わせで組織を再生してゆく。このうち増殖因子が分子生物学の進歩により、大量につくれるようになったことが、組織工学の発展につながったと言われている。

MSC ; mesenchymal stem cell, ASC ; adipose-derived stem cell, ECM ; extracellular matrix, ATRA ; all trans retinoic acid, HGF ; hepatocyte growth factor, FGF ; fibroblast growth factor, PRP ; platelet rich plasma, PDGF ; platelet-derived growth factor

もう一つの考え方は欠損したり障害を受けた組織をその場 (*in situ*) で再生させる手法である。従来の組織工学がシャーレの中で組織をつくるのに対して、この新しい手法では生体内で組織を再生させるために *in situ* Tissue Engineering (生体内再生) とよばれている。生体内にはその場の維持する力が働いているが、*in situ* Tissue Engineeringはそういった「場の力」を利用して、組織や臓器を再生させようという考え方である。

Ⅱ. 具体的な肺再生の試み

1. ビタミンAとその関連物質を用いた肺再生

代償性成長(肥大)を誘導して肺の再生治療をしようという研究が進められた。ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸 (all trans retinoic acid ; ATRA) は肺の再生に関与する^{7,8)}。そこで米国で肺気腫患者に対してATRAの臨床試験が行われた。しかし予想されたような効果は、結局みられなかった⁹⁾。引き

続きレチノイド γ 受容体選択的アゴニストの二重盲検ランダム臨床試験がオランダのライデン大学のグループが中心になって行われた。しかしこれも有意な効果は認められなかった¹⁰⁾。

2. 増殖因子を用いた肺再生

増殖因子であるHGF (肝細胞増殖因子 : hepatocyte growth factor) やG-CSF (顆粒球コロニー刺激因子 : granulocyte-colony stimulating factor) も肺再生に関与していることが判明し、肺再生への応用が検討されている¹¹⁻¹³⁾。将来、もし肺胞におけるこのような因子による再生制御が可能になれば、薬物を用いた肺気腫治療への道が拓けると期待されている。

3. 幹細胞・前駆細胞を用いた肺再生

患者数の多いCOPDなど慢性閉塞性肺疾患に対しては、幹細胞を使った再生治療も検討されている。米国のベンチャー企業Osiris Therapeutics社はCOPD患者62名に成人由来の間葉系幹細胞 (adult mesenchymal stromal cells) を静脈内投与する第Ⅱ相試験を行った。しかし2009年6月の報告では肺機能改善は認められず、同社は研究を打ち切った。こういった間葉系の幹細胞は、脊髄損傷や心筋梗塞の治療にも臨床応用が開始されているが、いまだに明らかな治療効果は報告されていない⁶⁾。未分化な細胞は分化能をもっているが、単に静脈投与するだけでは期待した効果をもたらさないことがわかる。

4. 脱細胞allograft足場を用いた肺再生の研究

2010年に脱細胞化した肺のallograftを肺再生の足場 (scaffold) として応用する新たな肺組織再生の報告が注目を集めた¹⁴⁾。成長したラットの肺から

図2 人工気管の外観

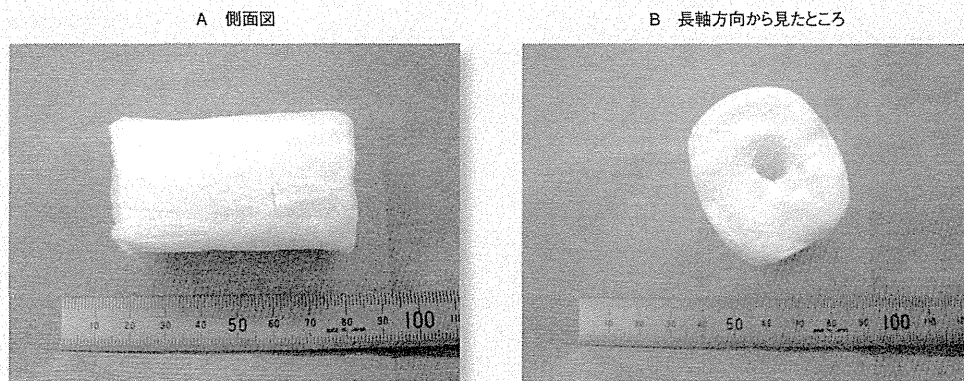


図3のポリプロピレン製のフレームを芯に、その内外に凍結乾燥コラーゲンを重層して、その部分に自己結合組織が新生するように設計されている。内腔が狭く見えるが、実際は術中コラーゲンに自己血液を含漬させると内腔がフレームの位置まで広がる。

細胞成分を除去し、これを再生の足場 (scaffold) に用いる。ラット新生児から分離培養した肺上皮細胞と血管内皮細胞を、それぞれその足場の気道系と血管系から注入してバイオリアクターの中で培養することにより肺組織をつくったものである。

この再生肺をラットに移植したところ45分から2時間にわたって肺のガス交換が確認された。導入した胎児由来の未分化細胞が足場のもつ「場の情報」を認識することにより、その場にふさわしい組織構造をつくり出したことになる。臨床応用までには未分化細胞の確保など克服すべき大きなハードルが予想されるが、これまで端さえ見えなかった肺組織再生研究に新たな一つの可能性を示した点が評価される。今後の発展が期待される。

5. iPS細胞研究への期待と不安

iPS (induced pluripotent stem) 細胞は体細胞を4つの転写因子を用いてリプログラミングすることにより多分化能を復活させた細胞で、患者本人から採取した細胞から作成したiPS細胞は、組織工学の手法で肺を作成する強力な道具になる。しかしながら、現在のiPS細胞作製法では細胞にさまざまな人工操作を加えて遺伝子を改変しているため、将来に何が起きるかわからない¹⁵⁾。人為的に未分化な状態を取り戻させたiPS細胞は多能性をもつゆえに、がん化の危険と背中合わせの状態であることを忘れてはならない。

Ⅲ. 気道の再生医療

肺の再生医療がいまだに動物実験の段階であるのとは対照的に、気管・気

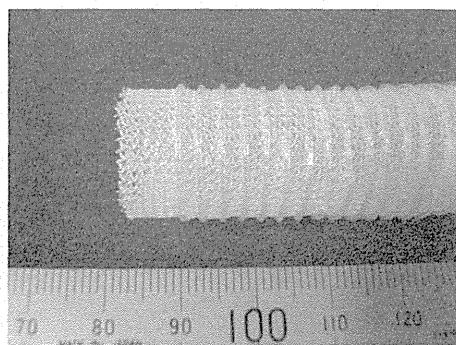
管支の再生医療では、すでに臨床応用が進んでいる。

甲状腺がん・肺がんや外傷、気管支結核、さらには気管切開後の癒痕狭窄などで外科的に気管病変部を切除したあと、人工物で気道を再建しようとする試みが1940年代より行われている¹⁶⁾。しかし、人工血管の開発成功とは対照的に、人工気管開発は困難で、現在も市販されている人工気管はないのが現状である。しかし近年*in situ* Tissue Engineeringに基づく人工気管が開発され臨床応用が進んでいる。以下にその概要を紹介しよう。

1. 自己組織再生型の人工気管の構造

この新しく日本で開発された自己組織再生型の人工気管は、円筒状に成形したポリプロピレン製メッシュ (fine Marlex® mesh) にコラーゲンを重層コーティングしたものである (図2)。

図3 人工気管のフレームを構成するメッシュチューブ



ポリプロピレンモノフィラメント繊維をメッシュに巻いて補強してある。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 prolene糸で縫合固定されている。

コラーゲンを複合化することにより人工気管のフレームを生体に取り込ませる設計である¹⁷⁾。内腔保持力をもたせるため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メッシュ筒の外側に巻き付けてある(図3)。切除した気管欠損部を、自己血液を浸み込ませた人工気管で再建すると、自己の結合組織と内面には気管上皮が再生して気道が再生する¹⁸⁾。

2. 気管再建部の上皮と線毛の再生

再生した気管壁を組織学的に観察すると、埋入したコラーゲンに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。そうしてできた粘膜下組織の表面に気管上皮が伸展する¹⁹⁾。

3. 日本における組織再生型人工気管の臨床応用

この自己組織再生型の人工気管は5

年にわたる長期動物実験で安全性が確認され²⁰⁾、2002年より京都大学医学部附属病院、福島県立医科大学、大阪北野病院において倫理委員会の審査を経て、臨床使用が始まっている。2012年4月現在で20例の頸部気管壁欠損(甲状腺腫瘍の気管浸潤)や瘢痕性気管狭窄症例に使用されているが、良好な組織再生と内腔面の上皮化が観察されている²¹⁾。

さらに気管の組織再生を促進させるためには穿刺骨髓液や、骨髓から分離培養した間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)を併用する方法も動物実験で検討されている。ビーグル犬頸部気管における評価では、自己のMSCは気管壁の粘膜下組織に分化することが判明した²²⁾。細胞を併用することにより臨床へのハードルは高

まるが、将来はこういった手法も使用できればと考えている。

4. 欧州におけるtissue-engineered airwayの臨床応用

また2008年にはallograftを用いた気道再建の臨床報告が、スペインのMacchiariniらによりされ注目を集めている。これは死体気管の軟骨構造を用い、そこに組織工学的手法で患者由来の上皮細胞と軟骨細胞を播種したものである。このtissue-engineered airwayを30歳女性患者の気管支に移植したところ、4ヵ月後にも内腔を保持していた²³⁾。こういった手法は長期に気道内腔を保持できる軟骨組織の再生が成否を握る鍵であろう²⁴⁾。

おわりに

幹細胞研究、とりわけiPS細胞を代表とする再生医学研究は急速に進められている。遺伝子組換え型の幹細胞であるiPS細胞に比べて天然型のES細胞は臨床研究へのハードルが低い。しかし、ES細胞はヒトの受精卵を使っており欧米では倫理面の問題を指摘する声が強い。さらに2011年10月には欧州司法裁判所が、間接的であってもヒトES細胞株を用いた特許はすべて、道徳上の理由において違法であると言明し、ヒトES細胞を用いた研究もすべて同様に道徳に反すると判決した。この判決は上訴できないものであり、ES細胞研究には今後さらにブレーキがかかる予想されている²⁵⁾。一方、倫理的問題の少ないiPS細胞に対する期待は高いが、実際にiPS細胞が臨床に応用され、期待された成果が得られているものは2012年4月時点において皆無に等しい。対照的に、本稿後半で紹

介した*in situ* Tissue Engineeringを用いた気道の再生治療はすでに臨床応

用が始まっており、多くの患者が救われている。今後の普及でさらに成果を

あげるのは明らかでその発展に大きな期待が寄せられている。

参考文献

- 1) Cagle PT, Thurlbeck WM. Post-pneumonectomy compensatory lung growth. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1314-26.
- 2) Cohn R. Factors affecting the post-natal growth of the lung. *Anat Rec* 1939; 75: 195-205.
- 3) Takeda S, Hsia CC, Wagner E, Ramanathan M, Estrera AS, Weibel ER. Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1301-10.
- 4) Whitsett JA, Haitchi HM, Maeda Y. Intersections between pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 401-6.
- 5) Stewart DJ, Mei SH. Cell-based therapies for lung vascular diseases: lessons for the future. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8: 535-40.
- 6) Bhatia SK. Tissue engineering for clinical applications. *Biotechnol J* 2010; 5: 1309-23.
- 7) Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 1997; 3: 675-7.
- 8) Roth MD, Connett JE, D'Armiento JM, Foronjy RF, Friedman PJ, Wise RA, et al. Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study. *Chest* 2006; 130: 1334-45.
- 9) Hind M, Gilthorpe A, Stinchcombe S, Maden M. Retinoid induction of alveolar regeneration: from mice to man? *Thorax* 2009; 64: 451-7.
- 10) Stolk J, Stockley RA, Stoel BC, Cooper BG, Piitulainen E, Rames A, et al. Randomized controlled trial for emphysema with a selective agonist of the gamma type retinoic acid receptor. *Eur Respir J* 2012. [Epub ahead of print]
- 11) Hegab AE, Kubo H, Yamaya M, Asada M, He M, Nakamura T, et al. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. *Mol Ther* 2008; 16: 1417-26.
- 12) Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Ohta M, Matsuda H, et al. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation* 2005; 111: 1407-14.
- 13) Yoshimatsu A, Nan-ya K, Miki I. Effect of nartogristim, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on elastase-induced emphysema in rats. *Arzneimittelforschung* 2009; 59: 248-53.
- 14) Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Niklason LE, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010; 329: 538-41.
- 15) Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* 2010; 77: 2.
- 16) Daniel RA Jr. The regeneration of defects of the trachea and bronchi; an experimental study. *J Thorac Surg* 1948; 17: 335-49.
- 17) Teramachi M, Okumura N, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Shimizu Y, et al. Intrathoracic tracheal reconstruction with a collagen-conjugated prosthesis: evaluation of the efficacy of omental wrapping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 701-11.
- 18) Teramachi M, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Takimoto Y, Shimizu Y. Porous-Type tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 965-9.
- 19) Sekine T, Nakamura T, Matsumoto K, Liu Y, Ueda H, Shimizu Y, et al. Carinal reconstruction with a Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 1162-8.

- 20) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Shimizu Y, et al. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs* 2000; 23: 718-24.
- 21) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magruff A, Shimizu Y, et al. Cricoid regeneration using in situ tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113: 623-7.
- 22) Nakamura T, Sato T, Araki M, Ichihara S, Nakada A, Hayakawa K, et al. *In situ* Tissue Engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138: 811-9.
- 23) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Birchall MA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023-30.
- 24) Sato T, Nakamura T. Tissue-engineered airway replacement. *Lancet* 2008; 372: 2003-4.
- 25) Abbott A. Stem cells: The cell division. *Nature* 2011; 480: 310-2.

シンポジウム 2 ● 医療機器の臨床研究の現状と今後

未承認医療機器を用いた臨床研究

京都大学大学院医学研究科 社会健康医学系専攻 薬剤疫学分野

川上 浩 司

1 日本における医療機器の開発、薬事環境

医療機器には大変に多様な種類¹⁾、用途があり、その安全性や有効性の評価は単一的なものではない。現在の改正薬事法では、医療機器のリスクに応じたクラス分類制度、低リスクの医療機器に係る第三者認証制度の導入、高リスク医療機器等の販売業・賃貸業への許可制の導入がなされている。また、法制上の名称が「医療用具」から「医療機器」になっている。表1に医療機器のクラス分類を示す。

医療機器の臨床試験には、医療上、および薬事環境上の特有の問題が存在している。医療上の問題としては、医療機器の使用に際しては手術手技を伴うことがあるため、施設・術者の違いによるバイアスや、ラーニング・カーブ（学習曲線）の影響を受けやすいことや、比較試験を実施する際に無作為化は可能でも盲検化が難しいということ、さらに、医薬品と異なり、植え込まれて治験実施期間終了後も生命維持に直接関連するものが存在するということがある。したがって、臨床試験の計画、実施、解析にあたっては、個々の医療機器の特性を考慮する必要がある。なお、植え込み型の医療機器に対する特定医療用具としてのトラッキング制度は、承認前の治験には適用されない。しかしながら、治験期間終了後の安全性確保について、同様の注意が必要と思われる。また、治験を実施し、被験者が存在するにもかかわらず何らかの理由で当該医療機器の開発が中止された場合、被験者の安全性担保や医療機器のメンテナンスなどをどのようにするのかという問題が生じうる。

表1 医療機器のクラス分類

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ●一般医療機器（クラスⅠ）
人の生命および健康に影響を与えるおそれがほとんどないもの〔例〕メス、ピンセットなど ●管理医療機器（クラスⅡ）
人の生命および健康に影響を与えるおそれがあるもの〔例〕MRI、電子式血圧計など ●高度管理医療機器（クラスⅣおよびクラスⅢ）
人の生命および健康に重大な影響を与えるおそれがあるもの〔例〕透析器、ペースメーカーなど |
|--|

薬事上の問題とは、クラス分類によって審査と承認の制度が異なっているということである。クラスⅠあるいはⅡの医療機器の場合、第三者認証の機関において審査を受け、認証を受ける。この場合、薬事法上の治験ではなく、臨床研究のデータをもとに申請されることとなる。一方、新規性の高いクラスⅡの医療機器や、クラスⅢあるいはⅣの医療機器の場合には、独立行政法人医薬品医療機器総合機構において承認申請の審査を受けることになる。そのため、データの質、治験の結果に基づくものとなる。この制度的乖離、すなわち薬事承認をとるための申請のために臨床研究を実施するのか、あるいは治験を実施するのかという差異は、開発企業やアカデミアなど医療機関における研究者に大きな戸惑いとなっている。

その他、医療機器の開発環境としてよく取り沙汰されるものに、医療機器の部材提供における Product Liability (PL) 法の誤解がある。米国では、製造者の責任に関する判例としての PL 法によって損害賠償請求がなされる可能性がある医療機器メーカー

は、複数社で保険会社を 1979 年に設置し、支払いに対する備えをするようになった。しかし、1980 年代には医療機器関連訴訟で、メーカー側の複数の敗訴、巨大な連鎖倒産という事態が起きた。そのため、1989 年には Biological Assurance Act (BAA) が制定され、医療機器メーカーの設計したとおりに発注を受けて部材などを供給する企業には、PL 法が除外されることになった。日本では、PL 法が設置されたおりに、免責事項として米国の BAA に相当する規定（開発危険の抗弁、部品・原材料、製造業者の抗弁）が盛り込まれている。そのため、「日本には BAA がないために、PL 訴訟を恐れて、材料・部品メーカーが医療機器メーカーに材料・部品を提供しない」という考えは誤っている。それにもかかわらず、日本においては医療機器メーカーに対する部材提供の環境が悪いとされており、これは、PL 法の誤解というよりも、風評被害を恐れる文化性に起因しているものと考えられる。

2 医療機器における臨床研究実施にかかる問題とその解決に向けて

前述のように、薬事認証が行われるもの、すなわち臨床研究のデータの取得が必要であり治験が実施されないようなもの（おおむねクラス I, II）の場合、Good Clinical Practice (GCP) を遵守して実施される治験ではなく、臨床研究の実施が不可欠である。しかしながら、これまで、薬事法の解釈上は、臨床研究において用いられる未承認医療機器を企業からアカデミアなどの医療機関に提供するに際して多くの混乱があり、医療機器開発企業としては、薬事法違反を恐れて臨床研究が実施されにくいという問題が起きていた。企業側は、臨床研究段階における薬事法の適用範囲についての解釈に慎重になっており、医師から要望された如何にかかわらず、未承認機器は提供できないと考える例がある。また、臨床現場（医師）から、医療機器開発企業に寄せられる改良要望に基づいて機器を改良し、臨床研究として評価を実施し、その評価結果に基づいて、最善の仕様、使用手順にて承認（認証）取得しようとしても、そのための未承認医療機器の提供ができないという報告もあった。そのため、現状では、医療機器は改善、改良のたびに承認（認証）申請をし、承認（認

証）取得後に臨床研究が実施され評価している。このサイクルが製品開発遅れの要因となっている。

このため、2010 年には、「臨床研究において用いられる未承認医療機器の提供等に係る薬事法の適用について²⁾」が発出された。しかしながら、具体的な事例や、臨床研究の実施上の注意点についてはいまだ不明瞭であり、どのようにすればよいのかという意見が多く出ている。また、昨今改訂された「臨床研究に関する倫理指針」は医薬品を用いた臨床応用研究を念頭にされた記載が多く、医療機器を用いた臨床研究においては解釈困難の場合がある³⁾。

産業界（日本医療機器産業連合会）、アカデミア研究者、関係政府省庁のメンバーによって構成される医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）においては、第 4 期 METIS 計画として、10 年先を見据えたシーズ発掘と実用化・事業化、医療機器産業の基盤整備のための提言と推進、啓発活動を掲げているが、このなかで、特に重要な基盤整備として、昨今、「未承認医療機器の臨床研究」の戦略会議が設置された。本組織では、産業界側の委員、アカデミアからの委員によって未承認医療機器を用いた臨床研究の基盤整備に取り組み、「医療機器の臨床研究実施の手引き（仮称）」を策定することになっている。第 1 版は 2011 年春に発表され、2012 年春までに改訂版を作成するという計画である。本手引き（仮称）においては、アカデミア医療機関の研究者が、医療機器を用いた開発や改良に携わる場合に、治験を実施すればよいのか、臨床研究を実施すべきなのか、どのような規制あるいはガイドラインなどを遵守すべきか、企業とアカデミア研究機関との間にどのような契約を結べばよいのかということについて、時系列を追って詳しく記載がされる予定である。

文 献

- 1) 昌子久仁子. 医療機器をめぐる現状と展望<7> 医療機器（特定保険医療材料）の保険償還制度について考える. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 ; 41 (7) : 525-8.
- 2) 厚生労働省医薬食品局長. 臨床研究において用いられる未承認医療機器の提供等に係る薬事法の適用について. 薬食発第 0331 第 7 号, 平成 22 年 3 月 31 日.
- 3) 厚生労働省医政局長. 臨床研究に関する倫理指針の改正等について. 医政発第 0731004 号, 平成 20 年 7 月 31 日.

患者まで届いている

再生医療

生体内組織再生誘導型の人工気管を用いた気道再建

Airway reconstructive surgery with artificial trachea using in situ tissue engineering

大森 孝一¹⁾ 多田 靖宏¹⁾ 野本 幸男¹⁾ 谷 亜希子¹⁾ 金丸 眞一²⁾ 中村 達雄³⁾

Omori, Koichi¹⁾/Tada, Yasuhiro¹⁾/Nomoto, Yukio¹⁾/Tani, Akiko¹⁾/Kanemaru, Shin-ichi²⁾/Nakamura, Tatsuo³⁾

1) 福島県立医科大学医学部 耳鼻咽喉科学講座

2) 北野病院 耳鼻咽喉科

3) 京都大学再生医科学研究所 再生医学応用研究部門 臓器再建応用分野

1) Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University School of Medicine

2) Department of Otolaryngology, Kitano Hospital

3) Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University

E-mail : omori@fmu.ac.jp

Key words

気道再建／喉頭・気管／生体内組織再生誘導／人工気管

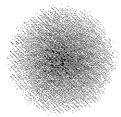
Summary

After resection of inflammatory lesions or malignancies, airway reconstructive surgery remains a difficult challenge as treatment. An artificial trachea made of polypropylene mesh and collagen sponge which induced natural tissue regrowth was developed and implanted into the defect of the cricoid and trachea in dogs. Postoperative endoscopy during the observation period from 3 to 60 months showed no airway obstruction with good epithelized mucosa. With informed consent based on approval of IRB, the artificial trachea was implanted for repair of the airway defect in 10 patients with subglottic and tracheal stenosis or with thyroid cancer invasion. Postoperative endoscopy and CT scan showed well epithelized airway lumen without obstruction during the observation period from 9 to 60 months. As translational research from animal experiments to clinical applications, our concept “in situ tissue engineering” will afford a feasible approach for regenerative medicine of the larynx and trachea in patients with airway lesions.

気道再建を要する疾患

気道は鼻腔、口腔、咽頭、喉頭、気管、気管支、細気管支によって構成される。喉頭、気管、気管支は管状の枠組みを軟骨が保持しており、内腔面は外界に接している。気管は空気の通り道であると同時に、線毛

運動と咳反射により下気道分泌物や異物を除く排泄路として機能している。したがって、気管を再建する際には、気道としての管腔を保持する硬度をもった枠組みと内腔面に線毛機能をもった粘膜を同時に再建することが理想的である。また、喉頭の下部を構成する輪状軟骨は、気管より管腔が狭く癒着性狭窄を起こしや



すいことから、以前は安易に外科的に触ってはいけない部位とされてきた。

気管や輪状軟骨の気道再建を要する疾患としては、狭窄性疾患や悪性腫瘍などがある¹⁾。狭窄性疾患の原因としては、外傷、炎症性、先天性などがある。外傷としては内損傷と外損傷があり、内損傷には気管挿管チューブや気管カニューレによる損傷、異物、熱傷や化学的腐食剤による損傷がある。外損傷には交通外傷、刃物による裂傷、銃創、気管切開術後などがある。炎症としては再発性多発軟骨炎や結核などがあり、いわゆる Wegener 肉芽腫やアミロイドーシスなど特殊な疾患も気道の変形や狭窄をきたす。悪性腫瘍で気管や輪状軟骨に浸潤をきたすものとしては甲状腺癌や肺癌があり、その他に気管原発腫瘍などがある。

気道再建外科の歴史と現状

頸部気管から胸部気管の外科治療として、病変切除後の気管端々吻合術がある。1970年代から Grillo のグループが6 cm 以下の気管切除では端々吻合が可能であることを報告してきた²⁾。しかし広範囲の切除では気管の広範囲剥離や肺門の授動が必要であり、端々吻合ができない症例も少なくない。吻合部への緊張や血流不全による縫合不全、感染などの合併症を縦隔に生じると重篤になる。さらに1カ月にわたり患者は苦しい頸部前屈姿勢を保持する必要がある、患者への負担が大きく術後管理は容易ではない。

輪状軟骨から頸部気管の外科治療として、病変切除後に一次的に再建する方法と喉頭気管溝を形成しておいて3～6カ月後に二期的に再建する方法がある。狭窄性疾患に対して1980年代から Cotton らにより多数例の報告がされてきた³⁾。硬性再建には骨、軟骨、人工材料が用いられ、内腔面には皮膚や粘膜が用いられる。主な再建材料は耳介軟骨や肋軟骨などであるが、自家遊離移植では複数部位や複数回にわたる手術侵襲が必要であるうえに、移植片の移動や吸収の問題があり気道の枠組みとしての長期的安定性を保持するのが

難しい。悪性腫瘍に対しては、進行甲状腺癌の気管浸潤例では十分な安全域をとった治癒切除が望まれるが、大きく切除すれば再建は難しくなり、自家遊離移植は欠損部の大きさによって制限される⁴⁾。

気道再建外科は着実に発展してきたものの、現状では手術侵襲、長期的安定性、再狭窄、合併症対策など克服すべき課題が多く、最も難しい外科治療の1つである。

場の理論と生体内組織再生誘導

傷害された組織・臓器は、本来、自己再生能力を有しているが、生体組織が大きく欠損した場合や急激な組織修復により組織再生の場が奪われてしまうと、瘢痕化などにより元の組織が再生しない。組織再生の適切な場が適切な組織再生を促進するという考え方を場の理論という。

生体内で組織の再生を誘導する手法は *in situ* Tissue Engineering あるいは *in vivo* Tissue Engineering とも言われる。1995年以降、中村らは場の理論に基づいて、コラーゲンスポンジを主体とした足場を移植して気管、食道、胃、小腸、末梢神経などの組織再生を報告した⁵⁾。筆者らは輪状軟骨弓部の組織再生に成功し⁶⁾、2002年より本技術を用いた喉頭・気管の再生医療を行っている⁷⁾⁸⁾。

生体内組織再生誘導型の人工気管の開発

1960年代から人工気管についての数多くの研究が行われ、シリコン、チタン、マーレックスメッシュなどの材料が用いられたが安定した成績を上げることができなかった⁹⁾。

1995年、中村らは生体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の手法で、ポリプロピレンメッシュで管状の枠組みを作りその内側と外側にコラーゲンスポンジを再生の足場として付加した人工材料を開発した⁵⁾。気道としての管状の枠組みを保持するため、ポリプロピレン製メッシュを管状にし、同素

材のリングで補強した。ポリプロピレン製メッシュは特定保険医療材料として従来から胸壁や腹壁の補強に臨床に使われている。組織再生の足場として、ポリプロピレン管の表面にコラーゲンスポンジをグラフト化、重層コーティングして厚く付着させた。コラーゲンスポンジは医療用のブタ皮膚由来のⅠ型、Ⅲ型コラーゲンを用いた(図1)。

頸部気管について、イヌの頸部気管を切除した後に人工材料を移植した。この際、再建気管の気密性を保つことと血液内の環境調節因子の働きを期待して、自己の血液で人工材料のコラーゲンを湿潤させてから用いた。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た。組織学的評価では、ポリプロピレンメッシュ内に結合織が入り込み、内腔面は再生した上皮で覆われ線毛の再生を確認した。再生気管の強度は機械的圧縮試験で正常気管と同程度であった。正常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^{5) 10)}。胸部気管については、血流と組織保護を期待して大綱で人工材料を被覆して移植した。

輪状軟骨については、イヌの輪状軟骨の前半部約1/2周切除し、人工材料を欠損範囲に応じて1/2周から2/3周をトリミングして移植した(図2)。術後4カ月から4年の内視鏡による観察で再狭窄を認めていない。少数例で肉芽、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⁶⁾。喉頭・頸部気管の内視鏡所見を示す(図3)。術後2カ月で上皮化し、術後約1年で気道狭窄を認めていない。術後4カ月で摘出した標本の組織像を示す(図4)。ポリプロピレンは組織内に取り込まれており、特に炎症所見を認めない。内腔面に線毛上皮の再生がみられる。なお、動物の愛護および管理に関する法律および所属施設の動物実験委員会の指針に従って実験を行った。

臨床症例

大型動物への移植実験で最長5年の経過観察で良

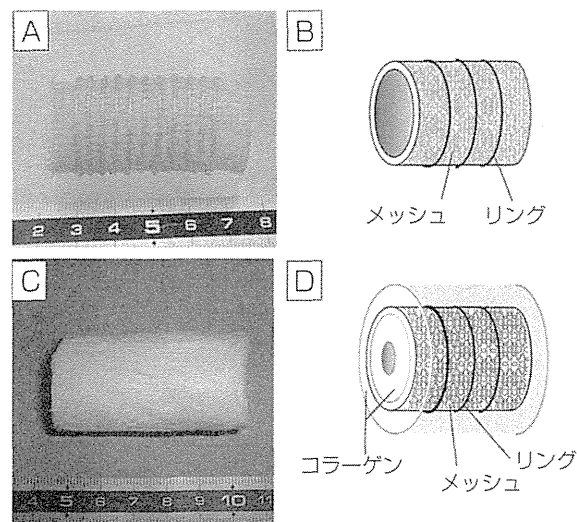


図1 人工気管

A: 骨格, B: 骨格のシェーマ, C: 外観, D: 外観のシェーマ

好な内腔上皮再生が得られ安全性が確認されたことから、施設内倫理委員会の承認の上、2002年より筆者らは本技術を用いた気道の再生医療を世界に先駆けて行っている。甲状腺癌の気管浸潤例に対する気管再建と喉頭気管狭窄例に対する病変切除後の二期的再建を行い、現在まで経験した成人10例において最長6年の経過観察で再狭窄をきたしていない^{7) 8)}。

声門下・頸部気管の狭窄例を呈示する。術前の内視鏡所見では声門下から頸部気管に高度の狭窄を認めた(図5A)。まず狭窄性病変切除の手術を行った。頸部外切開で喉頭から気管を露出した。輪状軟骨から頸部気管の前壁を切開し、瘢痕を切除し、粘膜欠損部に口腔粘膜を移植した。両側より皮膚を剥離し残存内腔粘膜の断端と縫合して喉頭気管溝を形成した。最後に、喉頭気管溝にシリコンパテ入りの手袋をステントとして留置した。ステントをTチューブに交換して6カ月間観察し、Tチューブを抜去しても再狭窄のないことを確認した上で、人工気管による気管再建術を行った。再建手術所見を示す(図6)。頸部外切開で喉頭気管を露出し、人工材料に患者の血液を湿潤させて、前方か

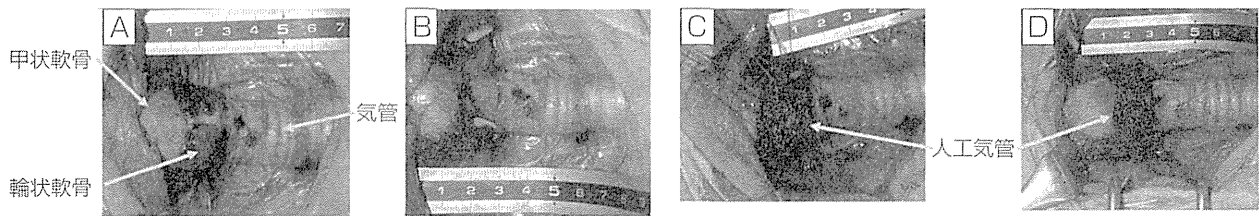


図2 手術所見(動物実験)

A: 喉頭, 頸部気管を露出, B: 輪状軟骨弓部を切除, C: 人工気管を血液で湿潤させて前方から被覆するように断端と縫合, D: 再建後

(文献6より引用改変)

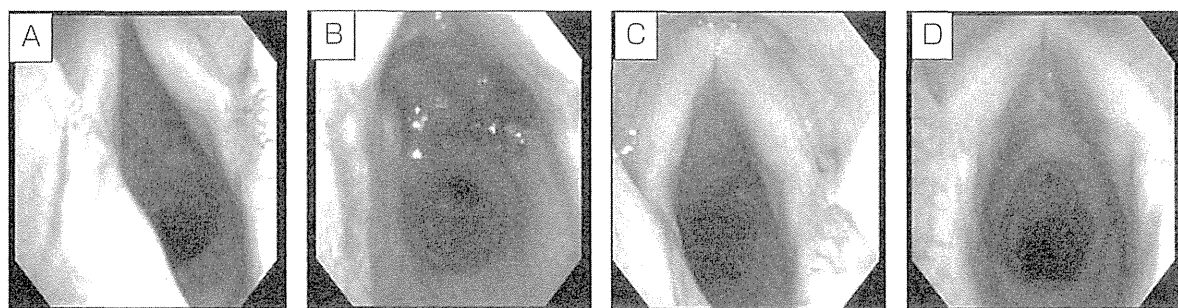


図3 喉頭・頸部気管内腔の内視鏡所見(動物実験)

A: 術前, B: 術直後, C: 術後2ヵ月(上皮化している), D: 術後1年(内腔は上皮で覆われ再狭窄を認めない)

(文献6より引用改変)

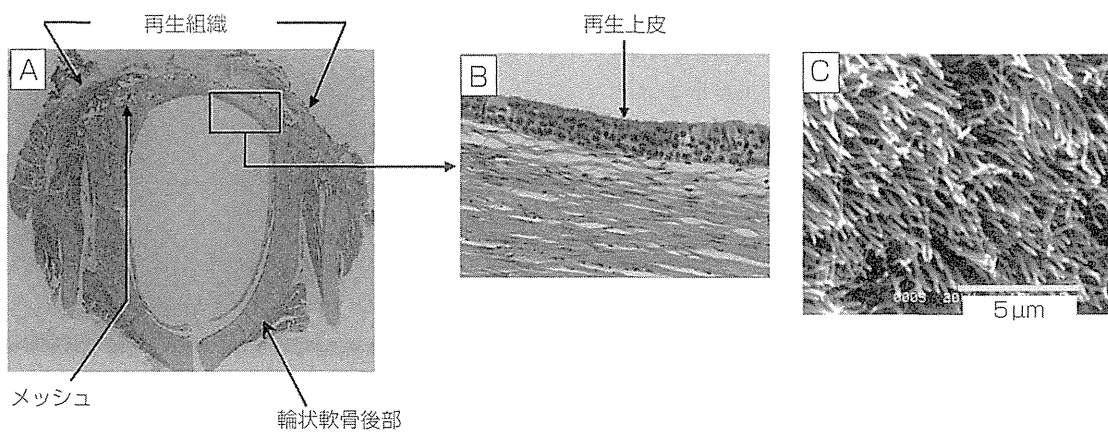


図4 摘出喉頭の組織像(動物実験)

A: H.E. 染色, B: 拡大像, C: 走査型電子顕微鏡像(線毛上皮の再生を認める)

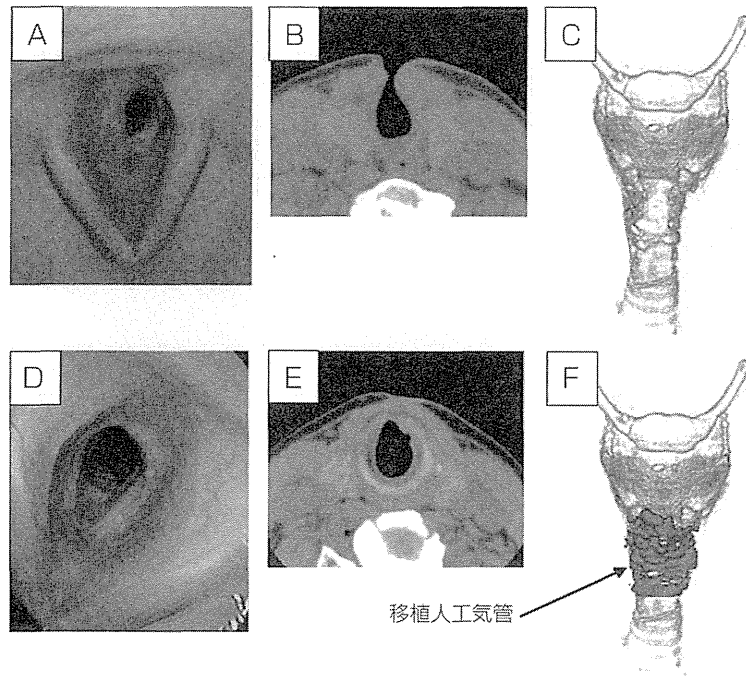


図5 術前術後の画像所見

A：初診時の内視鏡所見(声門下から頸部気管の高度狭窄を認め呼吸困難がある)，
B：瘢痕切除後，再建術前のCT所見，C：瘢痕切除後，再建術前の3D-CT所見，
D：再建術後4年の内視鏡所見(再狭窄を認めず十分呼吸が可能である)，E：再建術後のCT，F：再建術後の3D-CT

ら被覆するようにして縫合した。再建術後の内視鏡所見は，人工材料移植後2ヵ月では内腔面は上皮化し管腔が保たれており，移植後4年でも内腔面は上皮で覆われ管腔は十分保たれていた(図5 D, E)。

本法は移植材料のトリミングが容易で安定した気道再建が可能であるとともに，他の体の部位からの組織採取が不要で手術回数を減らすことができる。現時点では頸部気管，輪状軟骨の部分欠損の再建に用いているが，頸部気管の全周性欠損への適用は可能と考えられる。人工気管が一般医療として広く用いられることが期待されており，医療機器としての実用化に向けて，製造環境の整備，製造工程の手順書作成，品質管理の精度向上などに取り組んでいる。

海外での動向

1993年，LangerとVacantiは工学的手法により細胞を三次元的に組み上げ，臓器や組織に近いものを再生させるTissue Engineeringという概念を提唱した¹¹⁾。彼らの方法は体外で細胞を培養して組織を作り体内に移植するもので(ex vivo Tissue Engineering)，移植後に組織が吸収されるなどの問題があり臨床応用へのハードルは高い。彼らのグループは羊の気管再生を試みたが術後の気道閉塞などの問題があり，臨床応用には至っていない¹²⁾。

2008年にはallograftを用いた気管再建がMacchiariniらにより報告された。死体気管の軟骨構造を用い，患者由来の上皮細胞と軟骨細胞を播種したものを

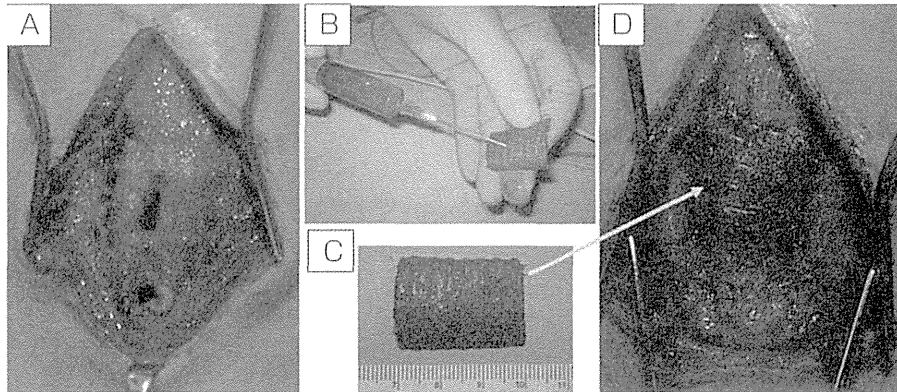


図6 人工気管を用いた再建手術

A：輪状軟骨・頸部気管の欠損部，B：人工気管を半周分にトリミングし血液を湿潤，C：移植前の人工気管，D：前壁を被覆するように人工気管を縫合固定

移植したところ，術後4カ月で内腔を保持していた¹³⁾。2011年には骨髄単核球と人工気管を移植し術後5カ月で内腔を保持していたと報告した¹⁴⁾。これらの技術は，長期的に気道内腔を保持できるかが今後評価されるであろう。

おわりに

気管を再建する際には，気道としての管腔を保持する硬度をもった枠組みと内腔面に線毛機能をもった粘膜を同時に再建することが理想的である。生体内組織再生誘導型の人工気管は両者を同時に再生することが可能で，最長6年の観察で管腔が保持されており，長期間の臨床に使用できることがわかっている。足場のみを用いるため細胞移植のように細胞の品質管理は不要である。頸部気管と輪状軟骨においては人工気管の安全性，有効性は検証されており，製造方法は完成しているといえ，医療機器としての実用化が待たれるところである。

さらに筆者らは気管再生の基礎研究として，上皮化を加速するための線維芽細胞や脂肪組織由来幹細胞の付加技術¹⁵⁾，ゲル薄膜を用いた人工材料¹⁶⁾，声帯隆起の再生に取り組んでいる。また，将来的には小児例へ

適用できるような吸収性の材料からなる新規人工気管の開発が望まれる。これらの研究開発により気道再建の外科治療がさらに発展するものと考えられる。

●文 献

- 1) 大森孝一：気管の再建．耳喉頭頸 81：118-125，2009
- 2) Grillo HC：The history of tracheal surgery. Chest Surg Clin N Am 13：175-189，2003
- 3) Cotton R：Management of subglottic stenosis. Otolaryngol Clin North Am 33：111-130，2000
- 4) 大森孝一，中村達雄，多田靖宏，他：甲状腺癌における気道の再生医療．再生医療 5：89-93，2007
- 5) Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y, et al：A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. ASIO J 41：306-310，1995
- 6) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, et al：Cricoid regeneration using in situ tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. Ann Otol Rhinol Laryngol 113：623-627，2004
- 7) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, et al：Regenerative medicine of the trachea：The first human case. Ann Otol Rhinol Laryngol 114：429-433，2005
- 8) Omori K, Tada Y, Suzuki T, et al：Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol 117：673-678，2008

- 9) Neville WE, Bolanwski JP, Kotia GG : Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. J Thorac Cardiovasc Surg **99** : 604-613, 1990
- 10) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, et al : Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. Int J Artificial Organs **23** : 718-724, 2000
- 11) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science **260** : 920-926, 1993
- 12) Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al : Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes. J Thorac Cardiovasc Surg **123** : 1177-1184, 2002
- 13) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al : Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet **372** : 2023-2030, 2008
- 14) Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, et al : Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite : a proof-of-concept study. Lancet **378** : 1997-2004, 2011
- 15) Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, et al : A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. Biomaterials **31** : 4855-4863, 2010
- 16) Tada Y, Takezawa Y, Suzuki T, et al : Regeneration of tracheal epithelium utilizing a novel bi-potential collagen scaffold. Ann Otol Rhinol Laryngol **117** : 359-365, 2008

Manufacture of a weakly denatured collagen fiber scaffold with excellent biocompatibility and space maintenance ability

A Nakada¹, K Shigeno¹, T Sato², T Kobayashi¹, M Wakatsuki¹, M Uji¹ and T Nakamura^{1,3}

¹ Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan

² Department of Thoracic Surgery, Kyoto University, Japan

E-mail: nakada@frontier.kyoto-u.ac.jp

Received 5 March 2013

Accepted for publication 12 June 2013

Published 27 June 2013

Online at stacks.iop.org/BMM/8/045010

Abstract

Although collagen scaffolds have been used for regenerative medicine, they have insufficient mechanical strength. We made a weakly denatured collagen fiber scaffold from a collagen fiber suspension (physiological pH 7.4) through a process of freeze drying and denaturation with heat under low pressure (1×10^{-1} Pa). Heat treatment formed cross-links between the collagen fibers, providing the scaffold with sufficient mechanical strength to maintain the space for tissue regeneration *in vivo*. The scaffold was embedded under the back skin of a rat, and biocompatibility and space maintenance ability were examined after 2 weeks. These were evaluated by using the ratio of foreign body giant cells and thickness of the residual scaffold. A weakly denatured collagen fiber scaffold with moderate biocompatibility and space maintenance ability was made by freezing at -10°C , followed by denaturation at 140°C for 6 h. In addition, the direction of the collagen fibers in the scaffold was adjusted by cooling the suspension only from the bottom of the container. This process increased the ratio of cells that infiltrated into the scaffold. A weakly denatured collagen fiber scaffold thus made can be used for tissue regeneration or delivery of cells or proteins to a target site.

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Various materials have been developed as 'scaffolds' for regenerative medicine. A typical scaffold of synthetic polymers may contain poly-glycolic acid (PGA), poly-L-lactic acid (PLLA) and poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), and scaffolds of natural polymers contain collagen and gelatin. These scaffolds have been used in clinical practice and yield adequate results [1–7]. However, PGA, PLLA and PLGA scaffolds may cause needless adhesion or toxicity because they may reduce the pH of the surrounding tissue [8–10].

We found that a collagen fiber scaffold manufactured at physiological pH was biocompatible and yielded no adhesion. However, it dissolved before tissue regeneration was complete. Various modifications may therefore be needed [11–14]. Glutaraldehyde (GA) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) are well-known chemical cross-linkers. Although defects may make chemical cross-linkers cytotoxic [15], EDC has a relatively low cytotoxicity and is useful as a cross-linker [12, 14, 16]. UV is used for physical cross-linking; it does not involve toxic chemicals [15], but cannot provide sufficient stiffness in a collagen scaffold [16]. We examined thermal processing as a simple physical cross-linking method. We made a collagen

³ Author to whom any correspondence should be addressed.

fiber scaffold by freeze drying a collagen fiber suspension with a physiological pH of 7.4. This was followed by heating under negative pressure. Heating formed cross-links between the collagen fibers, providing sufficient strength to maintain a space for tissue regeneration against the pressure of surrounding tissue or collagenase [17]. In this study, mechanical strength is defined as the ability to maintain space for tissue regeneration, rather than mere physical strength; this characteristic is important for regenerative medicine. The scaffold was embedded under the back skin of a rat to determine if it had sufficient biocompatibility and space maintenance ability to be used as a scaffold for regenerative medicine.

Collagen forms a molecular structure under acidic conditions, but forms fibers under neutral conditions, and the modes shift reversibly. Furthermore, it can be denatured by exposure to heat (denatured collagen, which contains 0% superhelix structure, is called gelatin). The temperature by which half of the collagen molecules have lost their superhelix structure is called the 'denaturation temperature'. The denaturation temperature in the dehydrated state is around 112 °C [18]. The collagen fiber scaffold evaluated in this study was freeze dried and heated under negative pressure. Thermal processing above the denaturation temperature introduced various chemical changes including cross-linking [19, 20] and provided mechanical strength [21, 22]. However, as denaturation and mechanical strength of the scaffold increases, the host's foreign-body reaction also increases. As a result, the scaffold is no longer suitable for use in the body. Therefore, it is important to create a scaffold with moderate mechanical strength to minimize foreign-body reaction. In addition, collagen fiber becomes a barrier with increased mechanical strength, and the number of cells invading the scaffold decreases (figure 1(a)). Therefore, our scaffold was designed to promote cell infiltration by orienting the collagen fibers (figure 1(b)). As an icy crystal is formed perpendicular to a cooling surface, orientation was achieved by cooling a collagen fiber suspension only from the bottom of the container.

To determine the optimal denaturing conditions to create an ideal scaffold with excellent space maintenance ability and biocompatibility, various types of denatured collagen fiber scaffolds with orientation were embedded under the back skin of rats. The optimal observation period was determined to be 2 weeks because it was important to maintain the scaffold at least during the acute or subacute phase of trauma for tissue regeneration. The *in vivo* behavior of these implants was evaluated by determining their space maintenance and biocompatibility scores.

2. Materials and methods

2.1. Manufacturing of a denatured collagen fiber scaffold

The collagen used in this study was atelocollagen extracted from young porcine skin by enzymatic treatment with pepsin (NMP collagen PS, provided by Nippon Meatpackers, Ibaraki, Japan) and consisting of type I (70–80%) and type III collagen.

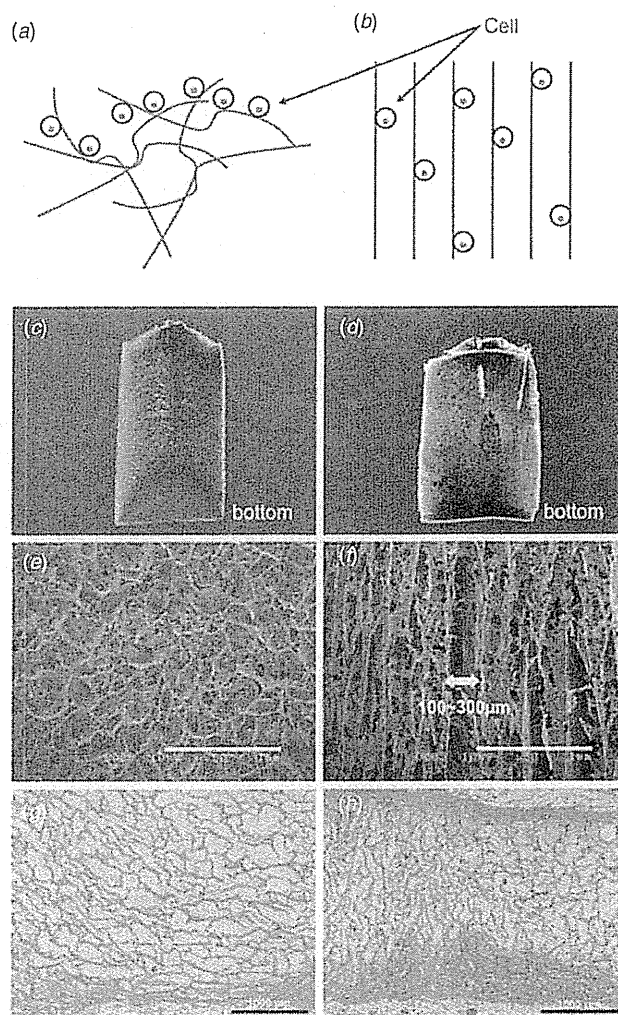


Figure 1. Difference between scaffolds with and without collagen fiber orientation, (a) schematic illustration of the collagen fiber without orientation, (b) schematic illustration of the collagen fiber with orientation (cases a and b demonstrated cell infiltration into the scaffold, parallel to the collagen fiber), (c) macroscopic image of a vertical section of the collagen fiber scaffold without orientation, (d) macroscopic image of a vertical section of the collagen fiber scaffold with orientation. (The contrast between figures (c) and (d) is coordinated to show the direction of collagen fiber in the scaffold.) (e) Electron-microscopic image of the collagen fiber scaffold without orientation, (f) electron-microscopic image of the collagen fiber scaffold with orientation, (g) scaffold without orientation of the collagen fiber (H–E image, 1 week after the operation), (h) scaffold with orientation of the collagen fiber (H–E image, 1 week after the operation), scale bars represent 1000 μm in e–h.

From this, the collagen mass (pH 7) was made according to the protocol provided with the product. Briefly, 30 g NMP collagen PS was added to 5 l distilled water (0.6% w/v) and the mixture was stirred in the refrigerator overnight to make a collagen solution. After adjusting the pH to 7 with 1N NaOH, the solution was centrifuged to collect the deposit, which was freeze dried to yield a collagen mass. Next, the mass was crushed with a grater to yield particles of approximately $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ and 6 g was added to 200 ml sterilized Milli-Q water. The mixture was stirred in a Hybrid Mixer (HM-500,

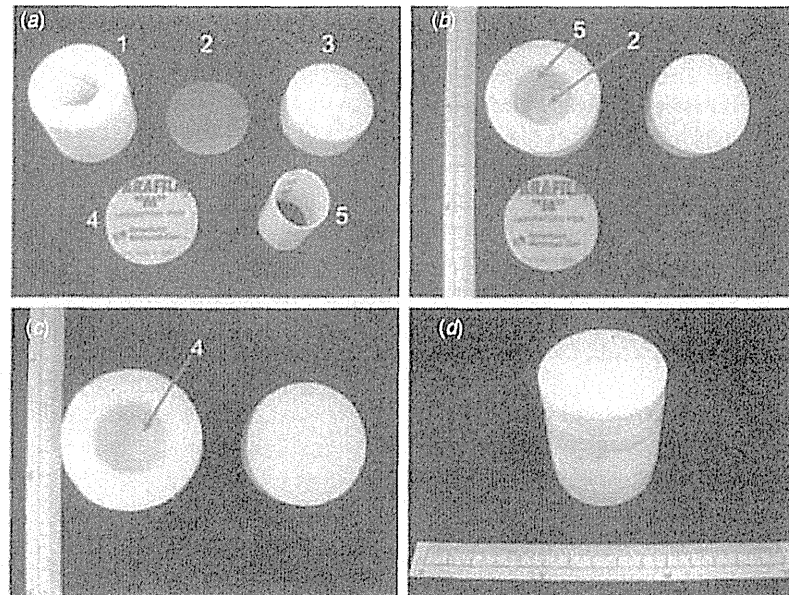


Figure 2. Containers that provide collagen fiber orientation, (a) 1. The outer frame is made of styrene foam; 2. Aluminum board; 3. Lid made of styrene foam; 4. Parafilm; 5. The inner frame is a measuring cup made of paper. (b) An aluminum board is attached to the bottom of the outer frame with vinyl tape, and the inner frame is installed. (c) The volume of the collagen fiber suspension expands as it freezes and may touch a lid made of styrene foam. Parafilm is used to prevent mixing of the styrene foam with the collagen. (d) The suspension is covered with a lid made of styrene foam and fixed with vinyl tape. Cooling is applied from the lower side of the container, thus providing orientation to the collagen fiber scaffold.

Keyence, Osaka, Japan) for 2 min, then cooled at 4 °C for more than 30 min. This process was repeated 5 times to yield a 3% w/v uniform collagen fiber suspension. The suspension was stored at 4 °C for 12 h to create a uniform suspension. The pH of the collagen fiber suspension was adjusted to 7.4 with 1N NaOH and stirred in an Ace Homogenizer (HM-500, Nissei, Tokyo, Japan) at 5000 rpm for 30 min. This allowed the internal structure of the collagen fiber scaffold to become uniform. The suspension, which became paste-like, was poured into a container (figure 2) and frozen at −10 °C. Since an icy crystal forms perpendicular to a cooling surface, orientation can be achieved by cooling the collagen fiber suspension only from the bottom of the container (the fibers will orient perpendicular to the bottom). After 12 h, the frozen suspension was freeze dried for 3 days and was heat denatured under low pressure (1×10^{-1} Pa) to form a denatured collagen fiber scaffold. Manufacturing conditions are shown in table 1. Since the pore size of the collagen fiber scaffold within about 5 mm from the cooling surface is too small and the ratio of cell infiltration is small, only that portion of the scaffold >5 mm from the bottom was used. To investigate the internal structure of the scaffold, scanning electron microscopy was performed prior to placement in the experimental animals. After being cut into 1 cm × 1 cm × 5 mm sections (figure 3(a)), the collagen fiber scaffold was sterilized with ethylene oxide gas prior to implantation.

2.2. Animal and surgical procedures

Male Wistar rats (500 g, Shimizu Laboratory Supply, Kyoto, Japan) were used for this study. Under anesthesia induced by

Table 1. Manufacturing conditions for the denatured collagen fiber scaffold.

pH	P-temp (°C) ^a	P-time (hours) ^b
7.4	50	6
7.4	100	6
7.4	100	24
7.4	110	6
7.4	120	6
7.4	120	12
7.4	120	18
7.4	120	24
7.4	130	6
7.4	140	0 (no denaturation)
7.4	140	6
7.4	140	9
7.4	140	12
7.4	140	24
7.4	170	5
7.4	170	6

^a P-temp, processing temperature.

^b P-time, processing time.

intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (3 mg/100 g body weight), each rat was placed in a prone position. Next, six incisions, measuring about 15 mm in length, were made on the back skin of each rat, and pockets to embed collagen fiber scaffolds were made using Pean forceps. Then the collagen fiber scaffolds were inserted into the pockets. Three pockets on three individual rats were used for each scaffold. That is, three scaffolds were used for each manufacturing condition. After embedding the scaffolds, the skin was closed with