

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16612

研究課題名（和文）自己幹細胞及び組織工学による新規肺瘻治療法の開発

研究課題名（英文）Creation of new material for pulmonary fistula by cell technology

研究代表者

宮本 詩子（MIYAMOTO, UTAKO）

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10794638

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）： ラットを用いた気胸モデルを作成し、同モデルを用いて、既存の肺漏閉鎖法（フィブリン糊、ポリグルコール酸（PGA）シート）使用後の術後変化を評価した。ほぼ全例において胸腔内癒着を認め、フィブリン糊でより強かった。

続いて、新規肺漏閉鎖デバイスとしての細胞パッチの作成を行った。同モデルラットの皮膚より採取した繊維芽細胞を採取・培養し、Molding法による自己由来の細胞シート形成を行った。シート状にはなるものの移植可能な組織強度を得られず、移植に至らなかった。同様の方法で、市販のラット繊維芽細胞を用いて十分な強度の細胞パッチを作成出来ており、今後は自己線維芽細胞シートの強度改善が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の肺瘻閉鎖法である生体糊、PGAシートでの治療法では高確率で胸腔内に癒着を伴うことが懸念される。そのため、臨床現場での繰り返す気胸症例においては治療を重ねることで治療侵襲が大きくなってしまうと言える。

今回、Molding法を用いて比較的簡便に細胞シート作成することが出来たが、その強度を得ることが出来なかった。その原因をさらに検索し、新規治療法の開発に繋げることが出来るのではないかと考える。

研究成果の概要（英文）： First We made the model rats with pulmonary fistula, and we operated on them to close the pulmonary fistula with using fibrin glue or polyglycolic acid sheet. After a certain period of time after surgery we observed changes in the chest cavity. We could see adhesion in their chest cavity of almost all cases, especially in fibrin glue cases.

Second we tried to create the new cell sheet that was made of autologous fibroblast for treatment of pulmonary fistula. We gathered the fibroblast from skin of rat. We cultured the fibroblast and made the cell sheet using Molding method. The sheet was too weak to be grafted on the pulmonary fistula, then to increase strength of the sheet is still an issue in the future.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺瘻 細胞シート 肺瘻閉鎖

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

呼吸器外科領域の手術症例は増加の一途を辿っており、特に肺癌症例はこの12年間でほぼ倍増し(2000年：約18000件、2012年：約35000件)、この傾向が今後20年間は続き、症例が飛躍的に増加する領域と言われている(胸部外科学会報告)。その中で呼吸器外科手術における肺瘻は一般的であるものの、ときに重篤な合併症となり得る。

肺瘻に対する予防および治療法として、閉胸前に吸収用組織補強材(ポリグルコール酸：PGA)と血液製剤(フィブリン糊：フィブリノゲン加第13因子)を組み合わせ使用するのが一般的であり、当科では総手術の半数以上にこの処置を施してきた。しかしこの治療法は20年以上前の文献に基づくものであり(中村ら 人工臓器 18(1),101-104(1989))、生物製剤を使用する点や吸収に伴う強度の低下、緊張が加わることに伴う創傷支持不全、外来異物を使用することに伴う炎症反応やアレルギー反応など数々の問題を有しており、これまでにない安全かつ有効な肺瘻に対する治療法の開発が期待されている。

一方、私たちの教室ではこれまで自己の細胞のみで任意の形状の立体細胞構造体を構築する組織工学の新技术を開発してきた。その技術を用いて新規肺瘻デバイスの作成を検討したい。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、新規組織工学技術および幹細胞研究を肺損傷モデルに応用し、足場(scaffold)となるコラーゲンや生体溶解性素材すらも含まない自己細胞のみで構成した組織による次世代型肺瘻治療法の開発を目指し、現行の治療法と比較し、その安全性及び有効であることを証明することである。

## 3．研究の方法

### 動物肺瘻モデルの作成

使用するラットの大きさ、麻酔量の調整、麻酔管理、手術方法の検討を行う。

### 対照群の作成

肺瘻に対する既存の方法である、フィブリン糊群、PGAシート群に分け、各々n=3ずつ作成する。その後、それぞれの群で4週、8週、12週と術後変化を肉眼的、病理学的に評価する。

### 細胞パッチの作成

実験に用いたラットの皮膚より採取した線維芽細胞を用いてSpheroidを作成、細胞パッチを作成する。作成するにあたり、より簡便に作成可能な方法を検討する。

### 細胞パッチの移植

作成した細胞パッチを実際に肺瘻モデルラットに移植、移植後合併症のほか、他群と同様に移植後4、8、12週で肉眼的・病理学的評価を行う。

## 4．研究成果

### 肺瘻モデルの作成

動物モデルはSDラットを用いた。挿管のしやすさより9週齢前後、体重は360～400gのラットを用いて実験を行った。

当初、経口気管内挿管による人工呼吸器管理を行っていたが、術中の痰詰まり、食道挿管による換気不全、挿管チューブの入れすぎによる片肺換気からの換気不全などが発生し、実験を継続できなかった。そのため、気管切開の上、気管内挿管管理下に人工呼吸器管理とした。挿管には18Gyサーフ口針の外筒(長さ1,5cm程度)を使用した。

視野確保、術操作の観点から左第4～5肋間レベル、視野確保のため開胸肋間での肋骨は1本離断する方法とした。

開胸後、18Gyの先端を屈曲させて鉤爪状にしたものでひっかくようにして左臓側胸膜を損傷し、損傷の深さ、幅が可能な限り統一されるようにした。損傷後は生食で気漏があることを確認した。

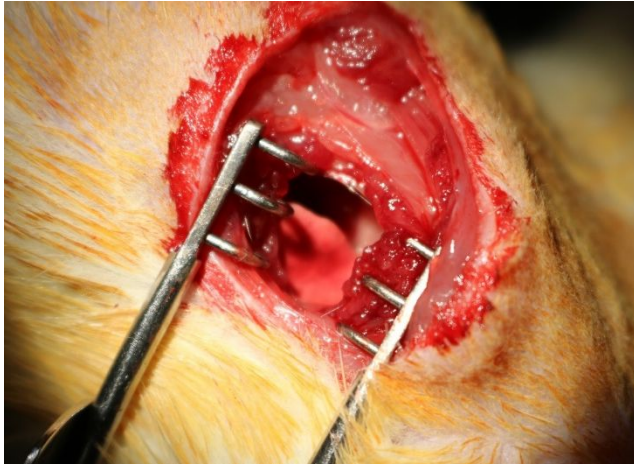


図 1) 開胸した様子

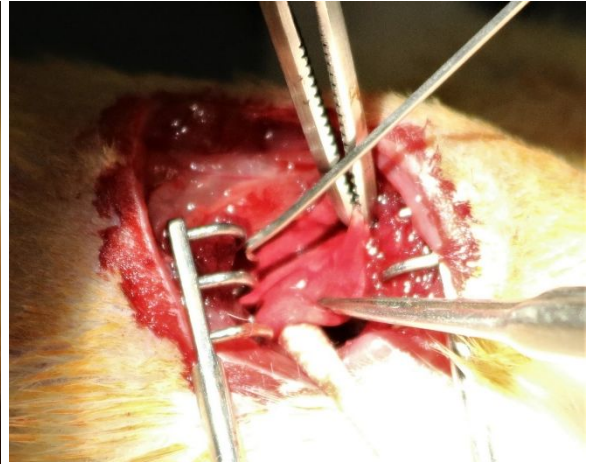


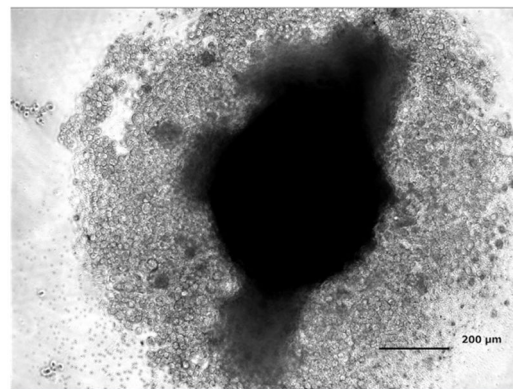
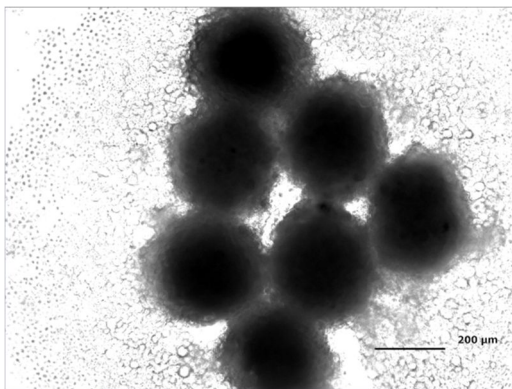
図 2) 肺損傷の様子

損傷部をそれぞれ、既存の治療法である フィブリン糊群、PGA シート群にわけて肺瘻閉鎖術を施行した(それぞれ  $n = 3$  ずつ)。フィブリン糊群、PGA シート群をそれぞれ 4 週、8 週、12 週で再開胸し、患側肺を摘出し治癒過程を評価した。胸壁と癒着していた場合には癒着部の胸壁合併切除を行った。

結果、PGA シート群(8 週目)以外はすべて肺門部もしくは胸壁と癒着しており、PGA シート群が軽度の索状癒着に留まっていたが、フィブリン糊は肥厚を伴う比較的強固な癒着となっていた。また、初回手術閉胸後に死亡した症例はフィブリン糊群で 1 例(術後 2 日目に死亡)のみであった。

#### ラット線維芽細胞の分離

ラットの左腋窩より 1 cm 大の皮膚断片を採取し、線維芽細胞を分離、15 × FBS、1 × ペニシリン / ストレプトマイシン、非必須アミノ酸含む EMEM を培養基液として線維芽細胞のみ培養した。ラット線維芽細胞(以下、ラット FB)をシングルセルとして EMEM+10%FBS+1 × PC/STM で培養した。ラット FB が Spheroid を形成するのを確認し、その Spheroid 同士が融合することは確認できた(下図)。



3) Spheroid の融合 (左: day0 右: day2)

#### 細胞パッチの作成

より簡便な方法を確認すべく、大量培養したラット FB を Sphere ring の浮遊培養にて Spheroid 作成を試みるも、もともと線維芽細胞が接着系細胞であることから Spheroid 作成には至らなかった。

次に、ハンギングドロップ法による Spheroid 作成を行い、作成された Spheroid を Molding 法を用いてパッチ作成を行った。

ラットの自己 FB より作成した場合、肉眼的には細胞パッチ状になるものの強度がなく、把持した際に容易に崩れ落ちてしまう状態であったため移植には至らなかった。市販されているラット FB で同様の手順にて作成した場合、移植できるだけの強度は保たれており、原因としては不純物の混在が影響したと考えているが、今後、原因を検索するとともに自己 FB からの細胞パッチ作成、また移植手順を検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----