

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 年度～2008 年度
課題番号：19592058
研究課題名（和文） 小児重症気管狭窄症に対するハイブリッド型気管移植法の開発
研究課題名（英文） Development of the hybrid type tracheal transplantation for the treatment of severe tracheal stenosis in children
研究代表者 氏名：前田 貢作 (MAEDA KOUSAKU) 自治医科大学・医学部・教授 研究者番号：60332756

研究成果の概要：

冷凍保存した同種気管グラフトを脱細胞化し、無細胞・多構造の新しい足場（スカフォールド）を作成した。これに組織工学的的手法を加えることにより、自己組織に近いハイブリッド型気管グラフトを作製する実験を行なった。作成したグラフトによる気管内腔の変化、グラフトの生着・成長および変化を検討したが、従来の凍結保存のみの手法との間に有意な差は確認できなかった。また、脱細胞化したグラフトは強度面で従来法より劣る事が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小児呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

小児外科領域において、気道狭窄の外科治療は未だ解決されていない重要な領域である。特に、先天性気管狭窄症に対する外科治療は最も治療が困難で解決すべき問題が山積している。1980 年代に自家肋軟骨グラフト移植による治療成功例が報告されて以来、種々の自家組織によるグラフトが狭窄部の内腔を拡大する目的で用いられてきたが、未だ確立した成績を呈するものは現れていない。

我々は凍結保存した同種気管グラフトを小児例に応用すべく実験的研究を行なって

きた。凍結保存したグラフトはレシピエントに移植すると生着することは可能であるが、十分には発育せず、レシピエントの発育に伴って結果的に狭窄となることが判明した。また、これらは免疫学的問題から発生する拒絶反応の表現ではないかと考え、動物実験モデルにて検討したが、明確な解答は得られていない。そこで、新たな移植手技を開発し、これらの問題の解決を試みた。

先天性気管狭窄症の外科治療において、成長する動物モデルを用いた気管グラフト移植に関する研究はほとんどなく、新しい知見が得られる可能性が大きい。また、さらに組

織工学的手法を併用する事により、無細胞化や多構造の新しい足場（スカフォールド）を作成できる可能性がある。良好な結果が得られれば臨床応用が期待される。

2. 研究の目的

組織保存手技の確立は組織移植に関する最近の進歩を大きく支えてきたが、成長する動物モデルにおける同種グラフト移植の研究はほとんど見られない。冷凍保存した同種気管グラフトを脱細胞化し、無細胞・多構造の新しい足場（スカフォールド）を作成する。これに組織工学的手法を加えることにより、自己組織に近いハイブリッド型気管グラフトを作製する。さらに、種々の血流維持の手法を比較検討し、このグラフトが気管狭窄症に対して有効な治療手段となりうるのかを確認する。

具体的には

- 1) 気管組織の凍結保存法について再検討する
- 2) 凍結組織の脱細胞化による多構造の足場（スカフォールド）作成と、これを用いた組織工学的手法の開発
- 3) 免疫組織学的な検討
- 4) 血流を維持するための種々の工夫とその比較検討により、ハイブリッド型グラフトが他の生体グラフトがもつ欠点（壊死による脱落、萎縮、吻合部の肉芽形成による再狭窄、成長しないなど）を排除できるかどうかを検証する事にある。

3. 研究の方法

日本白色家兎から採取した気管組織を急速凍結し一定期間凍結保存した後、解凍し他の家兎の気管に部分グラフトとして間置移植した。

凍結保存した組織の無細胞化をはかるため、あらかじめ蒸留水中にて保存を行なった。さらに組織工学的手法を加えるために、レシピエント家兎の末梢血より採取した幹細胞が豊富であるとされる PRP (Platelet Rich Plasma: 血小板豊富血漿) を加えグラフトと共に一定期間培養した後移植した。

検討は以下の群に分けて行なった。

- I. コントロール（未処置）群、
- II. 凍結グラフト移植群、
- III. 脱細胞化凍結グラフト移植群
- IV. III+組織工学群、

これらと、凍結をせず新鮮な自己気管組織を用いて移植した群とを比較検討した。

移植手技は静脈麻酔剤による全身麻酔下に行い、適時局所麻酔を付加した。グラフトの移植については完全に間置する目的で、端々吻合を 6-0 吸収糸を用いて、結節縫合に

て行なった。

これらの移植されたグラフトの性状を確認するために、4 週および 8 週目または動物の死亡時に気管を摘出し病理学的に検討した。検討項目としては

- 1) 移植気管の内腔の開存性、狭窄の程度の肉眼的評価
 - 2) 病理組織学的検査：グラフトの生着、血管新生、異物反応の有無
 - 3) 免疫染色による気管壁の変化、連続性、新生の検討
- 以上の実験により、各グラフトによる気管内腔の変化、グラフトの生着・成長および変化を検討し、移植された気管グラフトの状態を評価した。

上記の実験に引き続いて日本白色家兎およびラットを用いて、以下の実験を追加した。

各気管移植グラフトを端々吻合し、長期の生存と機能を評価する。各群は前項と同様であるが、それぞれに血流維持のため、胸鎖乳突筋を巻き付けて新たな血流を維持させる群、及び胸腺組織を巻き付けて血流を維持させる群を追加した。それぞれの移植後の観察期間を 180 日以上とした。移植手技は同様に行なった。また、180-240 日の間に気管を摘出し同様の検討を行なった。

これらの移植されたグラフトの性状を確認するために、移植気管の内腔の開存性、狭窄の程度の肉眼的評価を行なった

さらに

- 1) 病理組織学的検査：グラフトの生着、血管新生、異物反応の有無
- 2) 免疫染色による気管壁の変化、連続性、新生の検討
- 3) グラフトの強度の測定

を行なった。

以上の実験により、各グラフトによる気管内腔の変化、グラフトの生着・成長および変化を検討し、移植された気管グラフトの状態を評価した。

4. 研究成果

以上の研究結果より、

- 1) 各グラフトによる気管内腔の変化、グラフトの生着・成長および変化を検討した。
- 2) いずれのグラフトも移植後生着することが確認されたが、レシピエントの発育に伴って成長することは確認されなかった。
- 3) 脱細胞化したハイブリッド型の気管グラフトは移植後も生着することが判明したが、従来の凍結保存のみの手法との間に有意な差違は確認できなかった。
- 4) グラフトに対して血流を増加させる手技を追加したが、その効果は明らかではなかった。

- 5) 脱細胞化したグラフトは強度面で従来法より劣る事が示唆された。
6) 今後、さらなる手技の開発が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1) 前田貢作、田辺好英、久田正昭馬場勝尚、河田政明、窪田昭男：大血管奇形を伴った先天性気管狭窄症の手術 査読あり、小児外科 (41) 233-236、2009

2) 前田貢作：胸部疾患：気道の先天性疾患：査読無し、小児科診療 (71) 601-607、2008

3) 牟禮岳男 森岡一朗 親里嘉展 高寺明弘 柄川剛 高野洋一 片山義規 森沢猛 田場隆介 山川勝 横山直樹 前田貢作 松尾雅文：術前の気管支鏡検査により気管食道瘻を確認し、合併症なく管理し得た B 型先天性食道閉鎖症の極低出生体重児の 1 例、査読有り、日本周産期・新生児医学会雑誌 (44) 104-107、2008

4) 馬場勝尚 前田貢作 久田正昭 柳澤智彦 田辺好英：呼吸障害を呈さなかった喉頭気管異物の 1 例、査読あり 日本小児外科学会雑誌 (44)：158-161、2008

5) 港 敏則、加地倫子、田口和裕、吉田真策、島栄恵、久松千恵子、前田貢作、査読あり、日本小児呼吸器疾患学会雑誌 (19)：154-163、2008

6) 前田貢作：小児の気道病変と在宅医療、査読なし、小児科 (48)：59-66、2007

[学会発表] (計5件)

1) 前田貢作、久松千恵子、高野洋一：先天性気管狭窄症に対する凍結保存気管移植の可能性、第 46 回日本小児外科学会総会、2009 年 6 月 3 日、大阪市

2) 前田貢作：先天性気管狭窄症に対する Slide Tracheoplasty ー肺動脈スリング合併例に対する気管分岐部形成の工夫、第 28 回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、2008 年 11 月 22 日、大阪市

3) 馬場勝尚 前田貢作 久田正昭 柳澤智彦 田辺好英 河田正明 多賀直行 西村淳：重症心身障害児に発症した気管腕頭動脈婁の 1 救命例 第 22 回日本小児救急医学会 2008 年 6 月 21 日、奈良市

4) 前田貢作 安福正男 田辺好英 柳澤智彦 久田正昭 馬場勝尚 小児気管切開患者における気管腕頭動脈婁に対する外科治療 第 108 回日本外科学会総会 2008 年 5 月 16 日、長崎市

5) 前田貢作、在間 梓、高野洋一：気管腕頭動脈瘻に対する外科治療の検討 第 44 回日本小児外科学会総会 2007 年 6 月 2 日、東京都

[図書] (計3件)

1) 前田貢作 (共著) 金原出版、小児耳鼻咽喉科診療指針：気管狭窄 2009 年 5 月、総 423 ページ (P 319-323)

2) 前田貢作 (共著) 照林社、ナースのための術前・術後マニュアル 2008 年、総 311 ページ (P119-121)

3) 前田貢作 気管狭窄 電子教科書 (My Med) インターネット：2007 年

[その他]

記載すべきこと無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 貢作(MAEDA KOUSAKU)
自治医科大学・医学部・教授
60332756

(2) 研究分担者

大北 裕(OOKITA YUTAKA)
神戸大学・医学研究科・教授
40322193

(3) 連携研究者

該当なし