

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791391

研究課題名(和文) 生体吸収性ポリマーシートを用いた膀胱再生療法

研究課題名(英文) Regeneration of the bladder wall for the treatment of a bioabsorbable polymer sheet

研究代表者

岡田 克也 (OKADA, Katsuya)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：60364775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回、独自に開発した生体吸収性ポリマーシート(BAPS)を用い、膀胱壁が再生可能かを検討した。ブタの膀胱を様々な大きさに部分切除した後に、同等にトリミングしたBAPSを移植し、肉眼的、組織学的に評価した。その結果、膀胱壁部分切除後にBAPSの移植により膀胱壁を良好に再生させることが可能であった。しかし、より広範囲の欠損ではBAPSの著しい収縮のため、膀胱容量の確保が問題となった。しかし移植後の膀胱の形状を維持する工夫を施したところ、早期に良好な膀胱再生が得られた。本素材を用いることにより、膀胱壁欠損分に代替素材をパッチ状に移植するという新規治療開発の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the renovation of the bladder wall using bio absorbable polymer sheet (BAPS) which we developed originally. After having excised the bladder of the pig partially to various size, we transplant BAPS which we trimmed to the same size, and it was evaluated it macroscopically and histologically. As a result, BAPS repaired the defective bladder wall after partially bladder wall excision site. However, there was a problem for the remarkable shrinkage of BAPS in the bladder capacity by a more extensive loss. To avoid this shrinkage, we placed a stent to maintain the shape of the bladder after implantation, and this method was successfully to repair the bladder. It is suggested that this model which use BAPS for the defective tissue should approach the goal of clinical surgical use in future.

研究分野：消化器外科、移植外科

キーワード：膀胱再生 生体吸収性ポリマー ブタ

1. 研究開始当初の背景

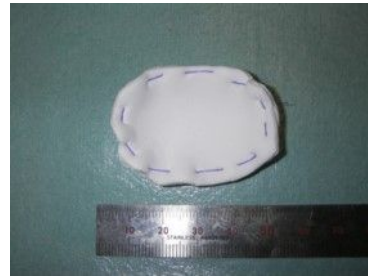
直腸癌の膀胱壁浸潤など膀胱壁の部分切除を必要とする場合、現在その修復は吸収系での直接縫合がほとんどである。しかし膀胱を直接縫合した場合、膀胱容量の減少が懸念される。膀胱はある程度まで進展・拡張するが、容量が 100-200cc 程度にまで至らない場合は頻尿を来し、長期間の尿道カテーテル留置を余儀なくされることもある。膀胱欠損部に対し有茎の腸管壁を用いた膀胱拡大術 (augmentation) を施行する場合もあるが、稀なケースであり、手術に伴う侵襲も大きい。また、mucus product や、感染症等も問題となる。膀胱容量の減少を防ぐ最も理想的な方法は、欠損部を代替素材で置換することだと考えられる。しかし、膀胱欠損部にポリプロピレンなどの既存の生体非吸収性素材を移植した場合、結石の形成を認めるため、現在そのような手法は用いられていない。この問題を解決するためには、置換する材料として生体吸収性素材を用いることが望ましい。現在までの研究において、吸収性素材を用いた膀胱壁再生の実験として、acellular dermal biomatrix、porcine small intestinal submucosa、latex biomembrane などを用いた実験が試みられている。しかしこれらは、人畜共通感染症、異種抗原や未知なる感染症、また加工が複雑であるなどの問題があり、現在でも膀胱欠損部を代用可能な材料は無いのが現状である。

2. 研究の目的

我々はこれまで生体吸収性ポリマーシート; bioabsorbable polymer sheet (BAPS) を用い、ブタの肝内胆管、胃壁、腹壁など様々な臓器の再生を試み、成功してきた。上記背景の中で、膀胱壁を生体吸収材料で置換・再生が可能となれば、新規治療法開発の一助となる可能性がある。本研究では大動物(ブタ)を用いて、膀胱壁を異なる大きさに欠損させ、同部に BAPS を代替素材として移植し、膀胱壁がどのように再生するかを肉眼的、組織学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 我々が血管、胆管用に開発した BAPS は、ポリ乳酸とポリカプロラク톤の 50:50 共重合体で作製した繊維をポリグリコール酸の繊維で補強したものである。この補強により針系を刺入にしても裂けにくく、外科的に扱いやすい素材となっている。この BAPS は、生体内において約 8 週間で完全に加水分解される。BAPS の Air porosity は 95%以上となっており細胞が繊維間に入りやすく、scaffold に適した素材として設計されている。この BAPS は厚さ 1mm で、これを欠損部に応じた大きさの楕円形に形作って使用した (図 1)。



(図 1)

この BAPS において、水が透過して移植後に腹腔内へ尿が浸透することが懸念されたが、この表面に水を浮かべても簡単には水が浸透しない。これは pore が極めて小さいこと、また組成物質が疎水性であることなどが原因と考えられる。よって clistaroid である尿に浸されても、BAPS は容易に破綻しない。この BAPS は泌尿器系の上皮成分などの細胞成分を播種しないで用いている。

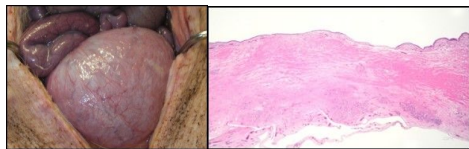
(2) 本研究では体重 25 - 30Kg のブタ(雌)を使用した。雌ブタを用いた理由は、雄より気性がおとなしく扱いやすいからである。すべての animal は術前 12 時間の禁食を行った。すべての処置は、Ketamine hydrochloride (10mg/Kg) 筋注により premedication を行い、気管内挿管後、Sevoflurene (2-3%) 吸入で維持、mechanical ventilation による全身麻酔下に行った。まずブタの下腹部正中に約 15cm の縦切開を加え、膀胱を露出する。膀胱の頂部をそれぞれ一定の大きさに部分切除し、切除した膀胱壁と同等の大きさに形作った BAPS を、4-0 吸収系を用いて連続縫合した。BAPS は 1mm の厚さで、そのままの状態を利用した。縫合終了時点において、BAPS 表面からの尿の漏出は全例において認めなかった。最後に腹壁を 1-0 吸収系で連続縫合し手術終了とする。

(3) それぞれの大きさに形作った BAPS 移植 4 週後、BAPS を移植する際と同等の方法でブタに全身麻酔を施行し犠牲死させ、膀胱を摘出した。移植部の破綻の有無、外観を観察した後、BAPS 移植部の収縮率を測定、また摘出した膀胱に生理食塩水を注入しそれぞれの膀胱容量を計測した。更に、BAPS 移植部を HE 染色、EVG 染色、免疫組織化学的染色により組織学的に検討した。

4. 研究成果

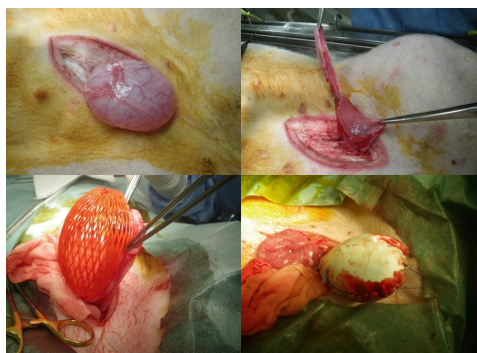
(1) 初歩的実験: まず初歩的な実験として、吸収性材料である BAPS が膀胱壁の代替材料として代用可能かを確かめる実験を行った。初膀胱壁の部分切除を 5×4cm 大に欠損させ、BAPS を移植する実験を試みた。4 週後、BAPS 移植部の破綻は認められなかったがやや収縮を認め、組織学的にも膀胱壁の良好な再生は認めなかった。しかし 20 週後、移植部やや収縮した状態は変わらなかったが、組織学的には native に類似した膀胱壁が良好に再生していた。BAPS は破綻や瘤の形成などの大きな問題を生じることなく、長期

的には native 同様の良好な再生が得られ、膀胱壁の部分的再生に利用可能であることが分かった。よって、この BAPS の膀胱壁再生に対する更なる有用性を確認するために、様々な追加実験を計画するに至った(図2)。



(図2)

(2) 本実験：まず BAPS による膀胱壁の部分的な再生の再現性を確認するために、初歩的実験と同時に 5×4cm 大と小さく欠損させた例を複数行った (small:S 群)。次に、膀胱の約 1/2 の大きさの 9×8cm 大と、より大きく欠損させ同等の BAPS を移植した群を作った (large:L 群)。より大きく欠損させた群を作った理由は、膀胱を部分切除する場合小さな欠損では膀胱容量はそれほど増加しないため、より大きな欠損に対する移植の方が graft を用いた膀胱壁補強の臨床的意義が大きいと考えたからである。更に、膀胱壁を 9×7cm 大に切除した後に、膀胱内へプラスチックの球形に形成した網状の支柱を挿入し、その上から覆うように同様に BAPS を移植し (補強 reinforcement:R 群)、膀胱の形状を保持する工夫を施した。このプラスチックは、ガラス瓶を割れないように保護する目的で用いられているもので、弾力性に富んでいる。BAPS はこれにより内側から支えられ折りたたまれることなく十分に伸展した状態である(図3)。



(図3)

これら BAPS 移植部の四方向の端に、収縮の程度を明らかにする目印として 5-0prolyne でマーキングした。また、L 群と同じ大きさに切除し直接縫合閉鎖した群 (control:C 群) を作り、大きな部分切除において膀胱容量がどの程度増加したかを検討する対象とした。BAPS 移植後に、膀胱内へ尿道カテーテルの挿入、留置はしない。

(3) 手術を施したブタは、全例犠牲死させるまで生存し、食事の摂取は良好で体重減少などは認めなかった。

S 群 (5×4cm) ;

4 週 肉眼所見：開腹所見で、BAPS 移植部の癒着はほとんど無く、移植部の破綻や腹

腔内の尿の貯留などは認められなかった。しかし移植部は約 10mm 幅に厚みを増して外表所見上は膨隆しており、同部は硬く触知された。移植部の内腔面は漿膜面同様に隆起していたが、中心部は陥凹し深い潰瘍を形成していた。また移植部は平均 70% に収縮していた。膀胱容量は中央値 350cc で、native の容量のおよそ 95% であった。

4 週 組織所見：HE 染色において、移植部の中心は好中球などの炎症細胞の塊として認められ、著しい炎症反応を認めた。炎症細胞に混じりコラーゲン線維がまばらに増生していたが、筋肉の再生はほとんど認められなかった。移行上皮は、移植部の辺縁に一部再生がうかがわれる部分を認めたが、連続した再生は認めなかった。

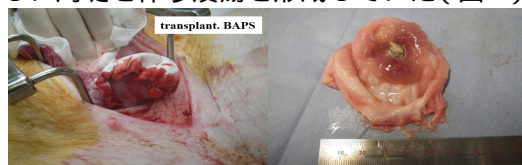
20 週 肉眼所見：BAPS 移植部の癒着はほとんど無く、移植部の破綻や瘤の形成、また腹腔内の尿の貯留などは認められなかった。外観所見から移植部の境界を判断するのは困難であり、内腔面の観察でやや白色調に変化した領域として同定可能であった。移植部の厚さは、4 週の段階に比べ著明に減少しており、native の膀胱壁と比較し中央値 92% の厚さで、わずかに薄い程度であった。移植部の中心に潰瘍形成は認められず、収縮は中央値 83% であり 4 週の段階に比べてやや少ない収縮であった。膀胱容量は平均 500cc で、同時期の native の膀胱容量とほぼ同等であった。

20 週 組織所見：好中球などの炎症性細胞浸潤はほぼ消失し、中央にはコラーゲンなどの線維性組織が散在していた。筋組織は native に比べまだ若干厚さが少ないが、native と比較して中央値 90% の厚さに再生していた。また、4 週では認めなかった移行上皮が native に類似した形で連続して再生していた。

これらの結果から、5×4cm 程度の大きさの膀胱壁への BAPS 移植においては、4 週後には炎症細胞死浸潤のみで膀胱壁の再生はほぼ認められなかったが、20 週後には収縮を認めるものの、ほぼ native に近い形で再生することが分かった。

L 群 (9×8cm) ;

4 週 肉眼所見：BAPS 移植部は中等度の癒着を認めたが、破綻や尿漏は認めなかった。また厚さが約 15mm に厚さを増し、同部を固く触知した。膀胱容量は非常に小さく、移植部の収縮率は中央値 70% で著しく収縮していた。内腔面を観察すると、中心部は著しい周堤を伴う潰瘍を形成していた(図4)。

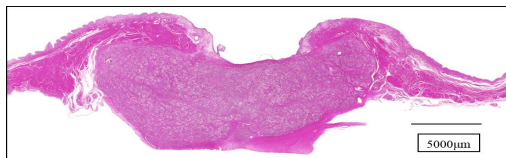


(図4)

また膀胱壁を 9×7cm 大に切除した後に直接縫合した C 群の膀胱最大容量は平均 290cc

であったが、L 群は平均 378cc で、膀胱容量の増加はわずかであった。

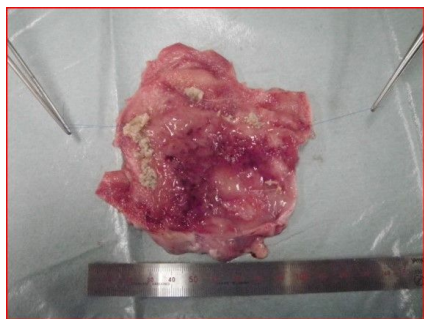
4 週 組織所見: S 群と同様に、移植部は炎症細胞の塊を形成し、より厚みを増していた。繊維成分の増生はわずかであったが、移行上皮、筋肉組織などの膀胱壁成分の再生は認められなかった(図 5)。



(図 5)

R 群 (L 群 + 支柱) ;

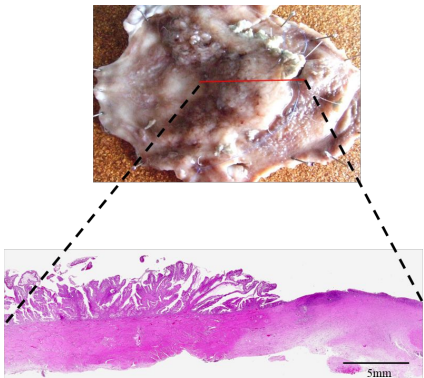
4 週 肉眼所見: BAPS 移植部の外側は、大網などが広範囲に癒着していた。癒着を剥離し観察すると、移植部に破綻は認められなかった。内腔を観察すると、プラスチックの支柱は BAPS に迷入することなく、膀胱壁との癒着や結石形成も認められなかった。非吸収系によるマーキングの計測から、BAPS 移植部の収縮はほぼ認められないことが分かった(図 6)。



(図 6)

移植部の収縮率は中央値 5%、膀胱容量は中央値 489ml で、L 群の中央値 378ml と比較して有意に増加がみられた。

4 週 組織学的所見: これまでの他の実験において 4 週で認められた炎症性細胞浸潤はごくわずかしが認めなかった。移行上皮はやや厚く hyperplastic な再生を認めたが、連続して良好に再生していた。また筋層も連続して一定の厚みのある良好な再生を認めた(図 7)。



(図 7)

この段階で BAPS の遺残はほとんど無く、線維組織の増生もごくまばらで、全層性に native に類似した良好な膀胱壁の再生結果が得られた。更に、膀胱機能との関連性は不明だが、一部には神経組織の再生も散見された。

(4)我々の作製した BAPS の膀胱壁への移植により、肉眼的、組織学的に良好な再生結果が得られた。本材料を移植した際、膀胱の形状を維持する工夫を施すことで、収縮を予防し、より早期に、より広範囲の膀胱壁の再生が可能であることが示された。今後、より長期的に経過したモデルを作成し、膀胱壁再生に対する BAPS の更なる有用性を示したい。

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 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

岡田克也、生体吸収性ポリマーシートを用いた膀胱壁の再生、第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 12 日、横浜

岡田克也、生体吸収性ポリマーシートによる膀胱壁の再生、第 50 回日本人工臓器学会大会、2012 年 11 月 24 日、福岡

岡田克也、生体吸収性ポリマーシートを用いた膀胱壁の再生-第二報-、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、横浜

岡田克也、生体吸収性ポリマーシートを用いた膀胱壁の再生-第二報-、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 12 日、福岡

岡田克也、生体吸収性ポリマーシートによる膀胱再生療法の開発、第 49 回日本移植学会総会、2013 年 9 月 6 日、京都

岡田克也、Regenerative of the bladder wall for the treatment of a bioabsorbable polymer sheet、UEGW2013(第 21 回欧州消化器病週間)、2013 年 10 月 15 日、ベルリン(ドイツ)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 克也 (OKADA, Katsuya)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：60364775

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：