

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462615

研究課題名(和文)新たに開発した人工気管による気管上皮再生促進効果の解明

研究課題名(英文)The study of the tracheal reconstruction effect using a new artificial trachea

研究代表者

多田 靖宏(Tada, Yasuhiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70363760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンスポンジとポリプロピレンから成る人工材料にビトリゲルを付加した新しい人工気管を開発した。動物への移植実験を行う準備として、ウサギの気管欠損モデルの作成に取り組み、10×5ミリの欠損を安定して作ることができた。次に開発した人工気管を欠損部に移植する方法を検討した。検討の結果、上皮の再生には人工気管と気管の縫合方法はそれほど影響を受けない結果であったが、比較的密に縫合した方が、気管の変形が少なくなることが判った。

研究成果の概要(英文)：The study of the tracheal reconstruction effect using a new artificial trachea. A study of the tracheal reconstruction. We developed a new artificial trachea. Material is collagen sponge and polypropylene and Vitrigel. Made the trachea defect model of the rabbit to transplant it. We were able to make a defect of 10\*5 millimeters to a tracheal. We studied a method to transplant an artificial trachea. Results: It was recognized that an artificial trachea and the tracheal suture method did not influence epithelial reproduction. A good suture method is to sew up an artificial trachea and the trachea at short distance. Because the trachea does not transform it.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：再生医療 気管食道科 人工気管

### 1. 研究開始当初の背景

組織工学的手法を用いた各種組織の再生についての研究が進み、気管、食道、胃、小腸、声帯、輪状軟骨の再生に成功している。気管の再生に関しては Nakamura, Shimizu らは、骨格として汎用プラスチックであるポリプロピレン製メッシュを用い、この骨格の両面に細胞の足場となるコラーゲンスポンジを付加した自己再生型人工気管を開発した。イヌを用いた動物実験で良好な結果が得られたことをふまえ、我々の研究グループでは京都大学倫理委員会の承認を得て 2002 年より臨床応用を開始した。

その後福島県立医科大学倫理委員会の承認も得られ、この 2 施設において症例が重ねられた。2010 年 9 月までに 9 例の臨床例を経験し、概ね良好な結果を得ている。一方大森らは報告の中で気管内腔面の完全な上皮化に約 2 ヶ月を要したことを記載している。気管上皮は、気道と生体組織の間の物理的な隔壁であるとともに、気道浄化作用や免疫機能を有しており、上皮化の遅延はこれらの機能回復の遅延を意味する。また今後症例が増えた場合に、瘻孔形成、感染巣の形成、気管内腔面の肉芽形成などの原因になってくる可能性も考えられる。基礎研究に立ち戻る translational research の概念にのっとり、機能的な気管上皮層の再生を促進する再生組織の研究に着手した。

これまでに Kobayashi らは培養した線維芽細胞を用いた基礎研究で上皮化の促進効果を報告しているが、我々は、将来の臨床応用を視野に入れて移植細胞を用いない方法の研究に着手した。その 1 つの方法として Takezawa らが開発したコラーゲンゲル薄膜：ビトリゲル薄膜に着目した。作成行程を工夫することでビトリゲル内に細胞や各種環境因子を含有することが可能で、更に従来のゲルの約 20 倍の強度を有することが判っている。また、ビトリゲルでコラーゲンスポンジ表面を平滑にコーティングできれば、宿主側の気管上皮の伸展を容易にし、結果的に気管上皮の再生を促進する可能性があると考えられた。従来のコラーゲンスポンジの表面をビトリゲルでコーティングした bipotential collagen scaffold (BPCS) (図 5) を作成し、ラットの気管欠損モデルにたいする移植実験の結果、従来のコラーゲンスポンジと比較し上皮層の形成は BPCS の方が早く、より厚く形成される結果が得られ、上皮化の促進効果が示唆された。H25 年までの研究成果として、ウサギの気管欠損モデルの作製方法は確立し、従来の人工気管をウサギの気管形状 (外径 8mm) に合わせたサイズにして作成することが可能となり基本的な移植操作も確立した。

本研究では、neoBPCS をウサギの気管欠損モデルに移植し、その吸収過程を組織学的に評価し、さらに上皮化促進効果のみならず再生された気管上皮が生理的機能を有する

かについて免疫組織学的に評価することが目的である。

### 2. 研究の目的

ポリプロピレンメッシュとコラーゲンスポンジからなる人工気管を用いた気道の再生医療は 2002 年より臨床応用が開始されている。現時点では比較的良好な結果を得ているが、移植早期の感染防止の観点からは内腔の上皮化の促進が望まれる。そこでわれわれは Takezawa らが開発したコラーゲンゲル薄膜 (ビトリゲル) に着目した。従来のコラーゲンスポンジの表面をビトリゲルでコーティングし、さらに気管の形態にあわせトンネル状に形態を変更した neoBPCS の作製に成功した。本研究で安全性が確立されればヒトへの応用が可能となる可能性が高いと考えている。本研究の目的は、neoBPCS を移植した際の吸収過程の評価と、機能的な上皮再生が得られているかについて評価し、最終的には臨床応用を目指すことにある。

### 3. 研究の方法

ウサギの気管欠損モデル用い、neoBPCS を移植する際の固定方法を確立する。移植した気管を摘出し、neoBPCS の吸収までの過程を経時的に評価する。neoBPCS 内腔面の上皮化について、通常の光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、走査電子顕微鏡にて内腔の線毛上皮の形態を評価し、上皮化促進効果のみならず、機能的な上皮再生について観察・評価する。

#### (1) Neo Bipotential collagen scaffold (neoBPCS) の移植の検討

気管欠損モデルの作製と気管再建方法の確立：ウサギに対しネブタール静脈投与による麻酔下に頸部気管を露出させ、気管前壁を 10 × 5mm サイズに開窓する。neoBPCS のビトリゲル面を内腔面に向け、気管欠損部に被覆する。この際、気管との固定法を実際に行って比較検討する。

固定方法は、無縫合、2 点縫合、4 点縫合とする。比較検討項目は、操作の難易度、操作の再現性、密閉性とする。最終的に決定した縫合法を安定して行えるように習得する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科) 上記の条件で良好な結果が得られない場合は、ビトリゲル層の条件を再検討する。(竹澤：農業生物資源研究所)

neoBPCS 移植後の観察：固定方法によって術後経過に差があるかを検証する。neoBPCS の移植実験を行い、術翌日、7 日、14 日の全身状態および創部の状態を観察する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科)

NeoBPCS の移植方法を確立する：1. および 2. の結果を評価し、移植法として安全な方法を確立し、決定した移植操作を安定して行えるように習得する。(多田：福島県

立医科大学耳鼻咽喉科)

(2) neoBPCS を用いた移植実験

BPCS の移植実験：ウサギに対しネブタール静脈投与による麻酔下に頸部気管を露出させ、気管前壁を 10×5mm サイズに開窓する。neoBPCS のビトリゲル面を内腔面に向け、気管欠損部に被覆する。-3 で決定した方法をもちいて固定する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科)

BPCS の標本採取：観察期間別に移植後 7 日モデル、14 日モデル、28 日モデルを複数作製する。それぞれ観察期間後にネブタール過剰投与による安楽死をさせた後、気管を摘出する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科)

(3) 摘出気管の固定および観察

標本作製：凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製。必要に応じ各種染色(免疫染色を含む)を行う。また走査電子顕微鏡用の標本も作製する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科)

組織学的評価：通常の光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて各実験モデルについて経時的に組織を観察・評価する。(多田：福島県立医科大学耳鼻咽喉科)

#### 4. 研究成果

(1) Neo Bipotential collagen scaffold (neoBPCS) の移植の検討

気管欠損モデルの作製と気管再建方法の確立：ウサギに対しネブタール静脈投与による麻酔下に頸部気管を露出させ、気管前壁を 10×5mm サイズに開窓することができた。neoBPCS のビトリゲル面を内腔面に向け、気管欠損部に被覆し、気管との固定法について比較検討した。結果は、操作の難易度は無縫合と有縫合の差はあるもおののそれほど難しくなかった。操作の再現性は良好であった。密閉性は無縫合で最も低く、4 点縫合で高かった。

neoBPCS 移植後の観察：固定方法によって術後経過に差があるかを検証した。neoBPCS の移植実験を行い、術翌日、7 日、14 日の全身状態および創部の状態を観察した。結果は、活動性変化、食欲、呼吸音、皮下気種の有無、感染の有無に有意な差は生じなかった。また、耳用細径硬性鏡を経口腔的に挿入し、移植後の気管内腔面上皮化を評価した結果、縫合方法によらず 7 日程度で上皮化は得られることが分かった。

(2) neoBPCS を移植実験

BPCS の移植実験：移植に適している条件は、縫合無しより縫合有りが有用で、粗よりは比較的密な固定が望ましいと判断した。

BPCS の標本採取：観察期間別に移植後 7 日モデル、14 日モデル、28 日モデルを複数作製した。それぞれ観察期間後にネ

ブタール過剰投与による安楽死をさせた後、気管を摘出した。

(3) 摘出気管の固定および観察

標本作製：凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製した。

組織学的評価：neoBPCS 移植後の内腔の上皮化は縫合方法の違いによって、時期や成熟度に大きな差を認めなかった。しかし、縫合方法によって移植後の気管形態には差が認められ、無縫合の場合は気管の狭小化が著明であった。縫合することで、移植後の気管変形を予防できる可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

1. Yuta Nakaegawa, Ryosuke Nakamura, Yasuhiro Tada, Ryo Suzuki, Toshiaki Takezawa, Tatsuo Nakamura & show all. Effects of artificial tracheal fixation on tracheal epithelial regeneration and prevention of tracheal stenosis. Acta Oto-Laryngologica, 627-634, Received 26 Sep 2016, Accepted 30 Oct 2016, Published online: 25 Nov 2016.

[学会発表](計 6 件)

1. 多田靖宏：気管を再生する医療技術の開発状況. 第 87 回日本組織培養学会, 5 月 31 日, 2014. 東京都
2. 多田靖宏：コラーゲンスポンジにコラーゲンビトリゲル膜を重層化した人工気管による喉頭気管再生の試み. 第 13 回日本再生医療学会, 3 月 19 日~3 月 21 日, 2014. 横浜市
3. 多田靖宏：人工気管の臨床応用と実用化. 第 67 回日本気管食道科学会, 11 月 19 日~11 月 20 日, 2015. 福島市
4. Tada Yasuhiro, Yuta Nakaegawa, Ryosuke Nakamura, Akiko Tani, Koichi Omori: The examination of the fixed method of the artificial trachea. Est Asia Comferance on Phonosurgery. March.14-March.16, 2015. Kumamoto
5. 多田靖宏：外傷性気管狭窄症に対する人工気管を用いた気管再建術. 第 68 回日本気管食道科学会, 11 月 7 日~11 月 8 日, 2016. 東京都
6. Yuta Nakaegawa, Tada Yasuhiro, Ryosuke Nakamura, Akiko Tani, Koichi Omori: Effect of artificial tracheal fixation on tracheal epithelium and prevention of tracheal stenosis. American Laryngological Association, May.18-May.19, 2016. Chicago

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 特に無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

多田靖宏 (TADA YASUHIRO)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70363760

##### (2) 研究分担者

竹澤俊明 (TAKEZAWA TOSHIAKI)

国立研究開発法人農業生物資源研究所

上級研究員

研究者番号：50301297

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )