

機関番号：21601

研究種目：若手(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791629

研究課題名(和文) 咽頭再生を目指したウサギ食道の再生-PGAシートによる組織工学-

研究課題名(英文) Regeneration of rabbit's esophagus proposing to pharyngeal regeneration - tissue engineering of using PGA sheet -

研究代表者

三浦 智広(MIURA TOMOHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：423806

研究成果の概要(和文)：

ウサギの食道全層欠損モデルを作製し、PGAシートによる再生研究を行った。術後1週でPGAシート下に結合組織層が形成され、同層を足場として術後2週から粘膜層が伸展することが分かった。PGAシートは4週までには消失することも分かった。粘膜層と異なり筋層は錯綜して再生され、規則的な走行には至らなかった。食道の欠損範囲が横12mmを越えると全例死亡した。これは結合組織層が形成される前にPGAシートが崩壊してしまうためと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

This study was conducted to establish the full-thickness defect model of rabbit esophagus and to examine usability of PGA(polyglycolic acid) sheet to regenerate of rabbit esophagus. One week after the operation, a connective tissue layer formed under the PGA sheet. Two weeks after models showed the extension of the mucosal layer along that connective tissue. It was found that PGA sheet disappeared until four weeks after surgery. The smooth muscle layer regenerated in disarray in contrast to the mucosal layer reconstructing continuously. All models that treated more than 12mm horizontal defect of esophagus died. It was considered that durability of PGA sheet was not enough to regenerate in broad defect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2010年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：気管食道学

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療において、根治切除後の機能障害は依然として大きな問題である。特に咽頭領域の切除による嚥下障害は Quality of life を大きく低下させてしまう。対策として30年程前から前腕皮弁や遊離空腸などの顕微鏡下の血管吻合を伴う再建技術が導

入され、それまで困難であった欠損の被覆や充填に応用されるようになった。しかしながら遊離自家組織移植の場合には、ドナーとなる組織採取部位に新たな欠損や機能障害が生じる。さらには循環機能不全や糖尿病などの全身性の障害を合併している場合や高齢の場合など、大掛かりな再建手術を選択でき

ない場合もある。近年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んでおり、一部の領域ではすでに臨床応用のレベルにまで到達している。遊離組織移植の抱える問題を改善していくために、咽頭組織の再生研究は、重要な研究課題と考えられる。今回、臨床応用への可能性が高い In situ tissue engineering の手法を用いた咽頭組織の再生について、再生材料にPGAシート（ポリグリコール酸シート）を使用し、実験モデルにウサギを用いた研究を行う。

## 2. 研究の目的

咽頭領域の再生研究は、国内・海外を問わず、他の領域に比べて遅れていると言われていた。理由のひとつに、有効な実験動物モデルの作製が困難という問題点がある。具体的には、小型の動物では咽頭へのアプローチや手術操作が困難であることや、唾液により容易に創部感染をきたし致命的になることが挙げられる。本研究では、これらの問題を解決するために、咽頭と連続し同様の粘膜構造をもつ組織として、食道に着目した。食道は下咽頭癌の手術の際、部分的に合併切除される部位であり、粘膜だけでなく筋層を含めた全層欠損となる。食道を再生できれば、その手法はそのまま咽頭再生に応用可能と考えられる。①有効な実験モデルの作製（ウサギ）、②PGAシートで再生可能な食道の欠損範囲と再生までの期間を調べることを目的として本研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物

N I B : J W N L 種のウサギ3ヶ月齢 (2500g 相当) を用いる。

### (2) 手術操作

実験動物への配慮として操作はジエチルエーテルとネンブタールの麻酔下に行う。頸部正中切開にて甲状軟骨・気管を露出し、その外側の頸動脈を損傷しないように剥離し、輪状軟骨外側から下咽頭～食道へのアプローチを行う。輪状咽頭筋を含め下咽頭～食道粘膜を部分切除したモデルを作製し、欠損部はPGAシートを用いて一期的に被覆する。

### (3) 切片作製

術後2週間ごと8週間までのモデルを作成する。ネンブタールおよび放血処置にて苦痛無くウサギを処置し、食道創部の組織標本作製する。固定はホルマリンで行いパラフィン包埋して切片を作製し、H-E染色を行う。2週間以内に絶命した場合は、その時点で標本作製を行う。

### (4) 評価

光学顕微鏡で組織を観察する。組織再生の経過を、粘膜・粘膜下組織・筋層に分けて評価する。それぞれの再生状態に応じて、観察

期間や食道欠損サイズの変更を適宜行っていく。またPGAシートの組織への吸収・消失状態も経時的に評価する。

## 4. 研究成果

### (1) ウサギ食道欠損モデルの作製

下咽頭～食道にアプローチする手法として、頸動静脈・迷走神経を胸鎖乳突筋ごと flap として翻転する方法を確立した。これにより、下咽頭～食道までの広範な領域で欠損させたモデルの作製が可能になった。

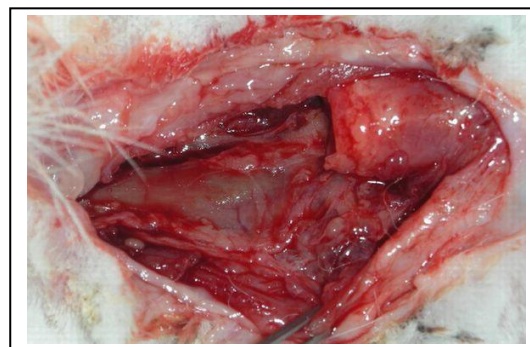


図1 flap 挙上時の写真を示す。下咽頭～頸部食道全体が確認できる。（見易くするため気管は外してある）

### (2) PGAシートで再生可能な食道の欠損範囲と再生までの期間

粘膜層～筋層までの食道全層欠損モデルにおいて、欠損サイズが縦10mm横10mmであれば、PGAシートによる再建で長期生存（1ヶ月以上）が可能であることを証明した。PGAシートによる粘膜再生の過程を調べるため、術後1週間から2・4・6週例の標本作成し、PGAシートの消失過程を調べた。術後1週では粘膜の再生は見られなかったが、PGAシート内に炎症細胞を主とした細胞浸潤が見られ、PGAシートと縫合した周囲筋層との間に、新たな結合組織の層が形成された。

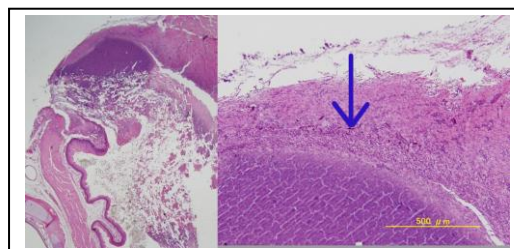


図2 術後1週の標本。矢印部分に結合組織の層が形成されている。（左写真倍率 12.5x 右写真倍率 100x）

術後2週のモデルでは、PGAシートは吸収が進み、徐々に剥離・脱落していく様子が観察された。またPGAシートと筋層の間に形

成された結合組織層に添って周囲から粘膜層が伸展していく像が見られた（下図左矢印）。

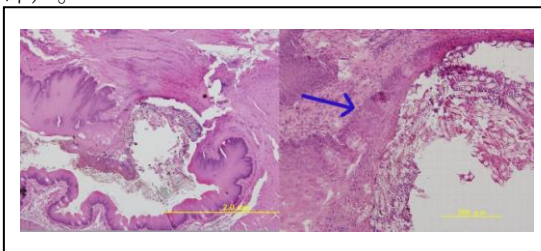


図3 術後2週の標本。断端から連続して粘膜が増生しているのが確認される。（左写真倍率40x 右写真倍率200x）

術後4週以降のモデルでは、PGAシートは脱落および吸収されて完全に消失し、断端と連続した食道粘膜層が形成されていた。粘膜層と異なり、筋層は断端との連続はなく、錯綜する走行で再生されていた（下図矢印）。



図4 術後4週の標本。粘膜の再生は断端から連続しているが、平滑筋層は、縦状層・輪状層いずれとも連続性が無く、錯綜して再生されている。（写真倍率40x）

再生可能な食道欠損の範囲については、縦・横共に10mmの欠損モデルはほぼ全例生存が確認できたが、横方向の欠損が12mmを越えると術後数日で死亡した。死亡例の摘出標本では食物残渣の貯留による食道の著明な膨隆が見られた。顕微鏡下に観察すると、生存例のような、PGAシートへの細胞浸潤と結合組織層形成が成立する前に、PGAシートが崩壊したと推測される所見が見られた（下図矢印）。PGAシートの強度の問題もあると考えられた。

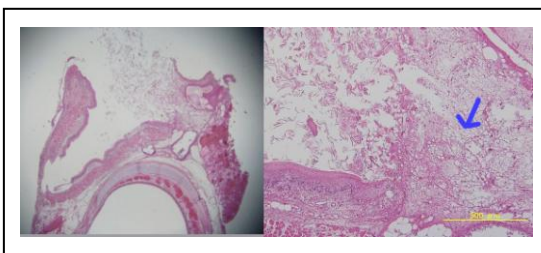


図5 術後5日目に死亡した例。生存例のよ

うに、PGAシート内に炎症細胞が集簇して存在する像が見られない。（左写真倍率12.5x 右写真倍率200x）

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 智広 (MIURA TOMOHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：423806

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし