

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11393

研究課題名（和文）組織工学的手法を用いた新規人工気管の開発と生理的気管上皮再生機序の解明

研究課題名（英文）Development of the new artificial trachea using Tissue Engineering, elucidation of the trachealepithelium reproduction mechanism

研究代表者

多田 靖宏（Tada, Yasuhiro）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70363760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：気管欠損の治療に用いる新たな人工気管の開発に取り組んだ。既存のシリコンメッシュとビトリゲルを組み合わせる構造とした。最適な材料としての3つのシリコンメッシュを選定した。メディコン社 Bard Mesh、メディコン社 Bard Soft Mesh、ジョンソンエンドジョンソン社 ウルトラプロメッシュとした。それぞれの形状、硬さ、メッシュの目の細かさを評価した結果、ウルトラプロメッシュが適していると判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：現時点では保険適応の人工気管は存在しておらず、安全性が確立している材料を組み合わせることで臨床応用への認可試験項目を減らすことが可能となり、よりスピーディな実用化が期待される。
社会的意義：この人工気管が完成すれば、気管再建のために自己組織を採取したり、複数回の手術を行う必要がなくなり、患者の身体的精神的負担をかなり軽減できる。

研究成果の概要（英文）：We developed a new artificial trachea to use for treatment of trachea deficiency. The structure of the artificial trachea combined vitrigel with silicon mesh. We chose three silicon mesh, Bard Mesh and Bard Soft Mesh and Ultrapromesh. We evaluated a shape, hardness, the fineness of the mesh. Results, we judged that ultra pro mesh was suitable.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：再生医療 人工気管 気管狭窄症 気管食道科 ビトリゲル シリコンメッシュ

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。2016 年 9 月までに 11 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、Takezawa らが開発した、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 倍の強度を有するコラーゲンゲル薄膜：ビトリゲル薄膜に着目した。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、上皮化促進効果が示唆された。これまでの研究成果より、ビトリゲルを付加することで気管内腔の上皮再生を促進する効果が得られることは明らかになった。しかし、従来のコラーゲンスポンジにビトリゲルを付加する方法だと、ビトリゲルを付加するスポンジ層を一定した厚みで作製することが困難なため、統一した規格で大量生産し商品化することは現時点では難しい可能性があると考えた。そこで、コラーゲンスポンジを用いず、気管軟骨の代替として支持体とビトリゲルだけで構成される全く新しい人工気管 (Neo artificial trachea with Vitrigel: NATV) の開発に取り組むことにした。ビトリゲルは、コラーゲン密度を調整することで生体内での吸収速度を調整することが可能である。この特性を利用し、人工気管として移植後数ヶ月は吸収されず機密性を有し欠損部を被覆するが、上皮化が完了した後でゆっくり吸収され消失させることも可能と考えており、全く新しい人工気管が開発出来る。

2. 研究の目的

われわれは、2002 年より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の臨床応用を開始している。気管内腔の上皮化促進を目指して、これまで人工気管の内腔面にビトリゲルを付加した研究を行ってきた。その結果、上皮化促進効果が示され、臨床試験を行うための準備を進めている段階まで来た。しかし、これまでの人工気管の作製は手作業でおこなわれており安定供給される環境は確保されていない。これまでの研究成果を活かしつつ、安定供給が可能となる新たな人工気管の開発が望まれる。本研究目的は、気管軟骨の代替として人工素材の支持体を配置しビトリゲルで被服した、新規人工気管を開発し、移植した際の安全性、吸収過程、機能的な上皮再生の有無について評価する。

3. 研究の方法

. Neo artificial trachea with Vitrigel: NATV の作製

1. 支持体の作製:

人工気管の内腔を保つための支持体として、既に臨床で用いられていて、生体適合材料であり安全性が確立しているハイドロキシアパタイトを用いる。ウサギの気管を CT 撮影して 3 次元再構築し気管軟骨の大きさや幅などを詳細に観察し、人工気管に最適な形態を評価する。支持体となる硬性物質の形状は 2 パターン検討する。形状 はアーチ型、形状 はブロック型とする。それぞれの安定した製造方法を確立する。

(多田：福島県立医科大学)

2. 支持体の内外腔をビトリゲル膜でコーティングする方法の確立：

先に作製したハイドロキシアパタイトの支持体を形状は等間隔に配列し、内と外にビトリゲル薄膜を貼り付ける。形状は並べて配列してからビトリゲル薄膜で覆い、それを巻いて環状にする。アパタイトを挟んでビトリゲル薄膜を貼り付ける糊にはコラーゲンをを用いる。安定して作成可能かについて評価する。(竹澤：農業・食品産業技術総合研究機構)

. NATV の安全性評価

ウサギの生体気管を摘出し、強度試験(引張・圧縮・曲げ試験)を行う。NATV に対しても同様の試験を行う。それぞれの結果を比較検討する。NATV の強度は生体気管と同等もしくは同等以上に設定する。(多田：福島県立医科大学)(竹澤：農業・食品産業技術総合研究機構)

. NATV の移植実験 【対象：日本白色ウサギ】

1. 気管欠損モデルの作製と気管再建方法の確立：

ウサギに対し塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェノールの筋肉内注射による麻酔を行う。前頸部に約 40mm の縦切開を加え頸部気管を露出させ、気管前壁を 10×5mm サイズに開窓する。NATV を気管欠損部の 1.5 倍の大きさにトリミングして被覆する。人工気管と気管をナイロン糸で 4 点縫合固定する。検討項目は、操作の難易度 操作の再現性 密閉性とする。(多田：福島県立医科大学)

2. NATV 移植後の観察：

NATV 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。観察項目は、活動性変化 食欲 呼吸音 皮下気種の有無 感染の有無 内視鏡による気管内腔の状態(多田：福島県立医科大学)

3. NATV 移植気管の標本採取：

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、NATV で再建した気管を摘出する。摘出した気管はホルマリン固定とする。(多田：福島県立医科大学)

. 摘出気管の組織学的評価

1. 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)

2. 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。

観察項目としては

- ・ 上皮層の形態 (H-E 染色)
- ・ 上皮細胞の形質 - サイトケラチン、オクルディンなど (蛍光免疫染色)
- ・ 線毛の有無 (H-E 染色、走査電顕)
- ・ 杯細胞の有無 (H-E 染色、PAS 染色)

- ・ 基底膜形成の有無 - ラミニン（蛍光免疫染色）
- ・ 上皮下組織中の血管新生の有無（H-E 染色、蛍光免疫染色）
- ・ ビトリゲルの吸収状態（H-E 染色）

を想定している。（多田：福島県立医科大学）

PCR での評価：上皮分化の指標となるサイトケラチンやムチンなどの各種蛋白の発現の有無を検索する。（多田：福島県立医科大学）

4 . 研究成果

ハイドロキシアパタイトをブロック状に配置して支持体を作成する方法を検討したところ、人工気管としての強度を全く保てないことが判明して断念した。それに変わる方法として、既存のポリプロピレンメッシュを支持体とする方法を検討することとした。メッシュをコラーゲンビトリゲルで挟む構造の人工気管モデルを作成した。A~C の特徴については以下に記す。A:メディコン社 Bard Mesh15.0×15.0cm (0112720)メッシュは平行で目は細かい、B メディコン社 Bard Soft Mesh 7.5×15.0cm (0117009)、メッシュはひし形で目は粗い、今回の3種のメッシュで一番柔らかい、C ジョンソンエンドジョンソン社 ウルトラプロメッシュ7.6×15cm(UMR3)メッシュはひし形でメッシュの目は粗い、白色・青色のストライプ状のシート状 今回の3種のメッシュで一番硬い。それぞれのモデルに対しHE染色標本作製して観察した。染色されるビトリゲルの間にシリコンメッシュが存在しているが、メッシュ自体は染色されないため管腔様に観察されてしまい、材料同士の接着の程度などを含め各モデル間の差異は確認できなかった。電子顕微鏡での観察を行った。それぞれのモデルにおいて肉眼で確認できるようなメッシュ構造が確認できたが、モデルAに関してはややメッシュの構造が不明瞭な印象があった。モデルの切断面においてメッシュとビトリゲルとの間にずれが生じることから、各材料の接着に関しては強固に接着しているわけではないと思われた。切断面以外の部分に関しては3つのモデルで接着の程度にも有意な差はないと思われた。モデルの硬さに関してはメッシュの硬さに依存するため、いずれのモデルも比較的柔らかい印象があったが、気管への移植を考えた場合の強度を考慮すると、今回のモデルの中ではより硬いモデルCが妥当であると思われた。

以降の動物実験については研究代表者の異動などの理由から遂行不能となった。

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
研究分担者	竹澤 俊明 (Takezawa Toshiaki) (50301297)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員 (82111)	
研究分担者	川瀬 友貴 (Kawase Tomotaka) (10761968)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	