

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09290

研究課題名(和文)凍結および真空乾燥ヒト羊膜を利用した新規呼吸器外科領域被覆材の創製

研究課題名(英文)Development of a Novel Respiratory Surgical Coating Material Using Freeze- and Vacuum-Dried Human Amniotic Membranes

研究代表者

永安 武(Nagayasu, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80284686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、当施設の羊膜バンク(カテゴリーI)との共同研究により、羊膜の抗炎症、組織修復、癒着防止作用に着目し、呼吸器外科領域での有効性を検証した。ラットの壁側胸膜を焼灼して開胸胸膜癒着モデルを作成し、肺表面に-80℃で保存されたヒト羊膜を張って癒着防止効果を調べたが、癒着防止効果はなかった。羊膜付着部には強い炎症性癒着があり、異物反応による癒着の可能性も考えられた。次に呼吸運動による肺表面の移動距離の大きな大型動物である、ブタを開胸した胸膜癒着モデルを作成したが、やはり強い癒着が起きた。この結果から、異種の羊膜は、異物反応あるいは炎症反応を誘起するという仮説と逆の結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸膜の癒着防止が可能となれば、悪性胸膜中皮腫での胸膜剥皮術後に起こる胸膜の広範欠損、骨髄移植後や肺移植待機患者に起きる致死的なair leak syndromeへの全肺被覆用材として、さらには気胸を含む通常の呼吸器外科手術時の胸膜損傷に対する部分的な胸膜被覆、気管・気管支吻合部の創傷治癒促進など、呼吸器外科分野における再生医療への臨床応用が可能となる。しかしながら、本研究では異種の凍結羊膜は、異物反応あるいは炎症反応を誘起するという仮説と逆の結果が得られた。癒着防止にはやはり中皮細胞が必要であると考えられ、現在は羊膜の絨毛側に中皮細胞を播種することで、胸膜癒着防止医用材料を開発している。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with our amnion bank (Category I), we focused on the anti-inflammatory, tissue repair, and anti-adhesion effects of amniotic membrane and tested its efficacy in the field of respiratory surgery. They cauterized the rat wall pleura to create an open pleural adhesion model, and stretched human amnion stored at -80°C over the lung surface to examine its anti-adhesive effect, but found no anti-adhesive effect. There was strong inflammatory adhesion at the amniotic membrane attachment site, suggesting the possibility of adhesion due to foreign body reaction. Next, a porcine model of pleural adhesion was created using an open chest, which is a large animal with a large lung surface that moves a large distance due to respiratory movement, and again, strong adhesions occurred. This result contradicts the hypothesis that amniotic membranes of different species induce foreign body or inflammatory reactions.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：羊膜 胸膜 癒着防止 中皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

羊膜は出産後に通常廃棄されるが、再生医療分野での新しい生体由来の素材として応用され始めている。一方で、呼吸器外科領域での使用を目的とした研究や報告はほぼ皆無である。本研究では、当施設の羊膜バンク(カテゴリーI)との共同研究により、羊膜の抗炎症、組織修復、癒着防止作用に着目し、呼吸器外科領域での有効性を検証する。その結果、近年増加している悪性胸膜中皮腫に対する胸膜剥皮術後に起こる胸膜の広範欠損のみならず、骨髄移植後や肺移植待機患者に起きる致死的な air leak syndrome への全肺被覆用材として、さらには気胸を含む通常の呼吸器外科手術時の胸膜損傷に対する部分的な胸膜被覆、気管・気管支吻合部の創傷治癒促進など、呼吸器外科分野における再生医療への臨床応用が可能となる。

2. 研究の目的

本研究は、廃棄されるヒト羊膜を使用して、肺被覆用材、気管・気管支吻合部の創傷治癒促進など、呼吸器外科分野における再生医療への医用材の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癒着防止を目的とした胸膜被覆用材の開発；開胸胸膜癒着モデルの作成

F344 ラットを左開胸し、開胸壁を電気メスで焼灼し、重度の胸壁癒着モデルを作成した。同肺表面に-80℃で保存されたヒト羊膜を静置し、癒着防止モデルとした。(n=5 for each) 癒着スコアを7日目、28日目に評価した。

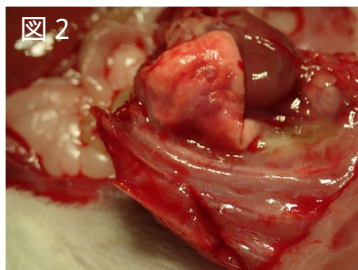
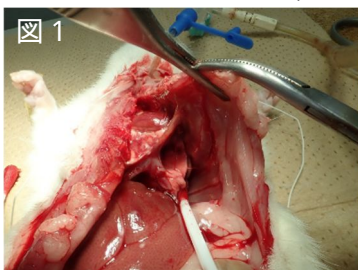
(2) 羊膜へ中皮細胞を播種した人工胸膜の作成

F344 ラット腹膜を1.5×1.5cmで筋層ごと剥離
生食洗浄2回、PBS洗浄1回施行し、シャーレ内に腹膜を上側にして静置した。
(乾燥を防ぐため、生食を腹膜が完全に浸らないようにシャーレ内に少量滴下)
直径7mlのクローニングチューブを腹膜1枚に対し、2個準備し、腹膜上に静置した。
クローニングチューブ内にセレースを100-200µl注入後、37℃インキュベータ内で30分静置後、セレースを吸引した。
各クローニングチューブより、中皮細胞を含むセレースを回収、セレースの5倍のDMEM基本培地を加え、1500回転5分遠沈。遠沈後10cmシャーレにDMEM基本培地で培養した。
チャンバースライドで、Vimentin染色を施行した。
週1回の培地交換を施行し、約4週後、トリプシンで細胞をはがした。
羊膜4隅をシャーレ上にクローニングチューブで4隅を固定中皮細胞を 1.15×10^6 個羊膜直上に播種した。

4. 研究成果

(1) 癒着防止を目的とした胸膜被覆用材の開発

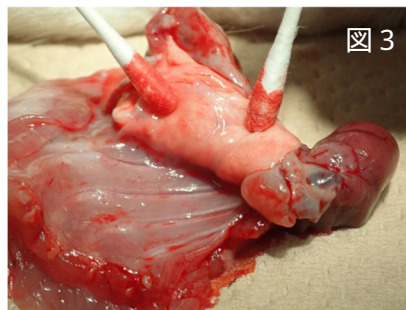
ラットを用いて動物実験計画書の通りに壁側胸膜焼灼モデルで癒着モデルを作製し、良好に癒着モデルができた(図1、2)。



ヒト羊膜を静置した癒着防止モデルでも、同様に癒着が生じた(図3)。羊膜には羊膜面、絨毛膜面があり、肺側に羊膜面、絨毛膜面静置しても病理学的に差を認めず、いずれも強い炎症性反応を認めた(図4)。その結果、ヒト羊膜を被覆しても癒着防止効果はなかった。

ラットの呼吸運動による胸膜のスライドの距離が短いことから、ラットモデルでは癒着の防止効果は少ないと判断した。

そのため呼吸運動による肺表面の移動距離の大きな大型動物である、ブタを開胸した胸膜癒着モデルを作成した。そのモデルでヒト羊膜を開胸部の癒着発生部分に貼り付けて置き、経時的な変化をみたが、より強い癒着が起きた。この結果から、異種の凍結羊膜は、異物反応あるいは炎症反応を誘起するという仮説と逆の結果が得られた。

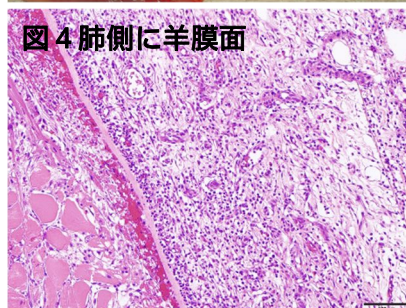


(2) 羊膜へ中皮細胞を播種した人工胸膜の作成

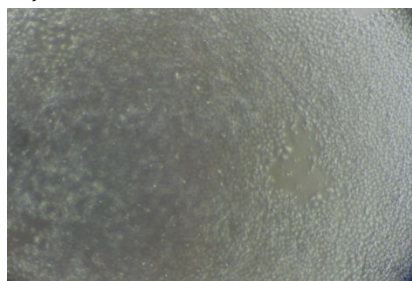
直接開胸部あるいは損傷肺(臓側胸膜損傷部位)に貼付する実験では、明らかな癒着防止能力を確認できなかった。原因の一つとして絨毛膜側の脱細胞後の骨格は複雑に入り組んでおり、同組織中に炎症細胞が容易に浸潤できる可能性が示唆された。

そのことから、我々は、羊膜絨毛膜側に中皮細胞を播種し、人工胸膜を作成することを開始した。

ラット中皮細胞は、培養で敷石状の特異的形態をとり、本実験でも同様に、形態学的(敷石状)に明らかに中皮細胞であることが確認できた(図5)。



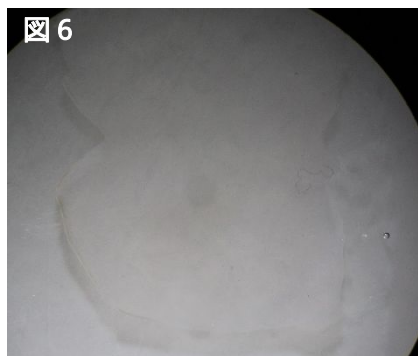
2 週後



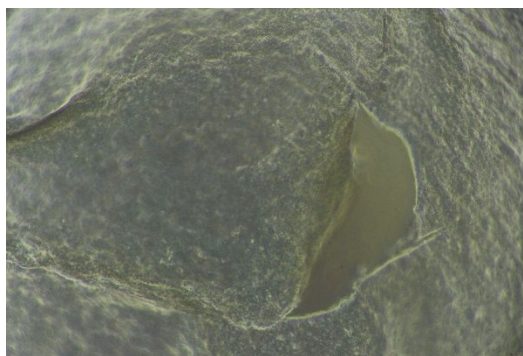
4 週後

Vimentin 陽性であることから、間葉系細胞であることが確かめられた。

倒立顕微鏡上では、羊膜(絨毛側)上で中皮細胞が密に増殖している像がみられた(図6)。



播種前



播種後

今後は、中皮細胞を播種した羊膜で癒着防止効果を評価する予定である。

成果のまとめ

本研究は、廃棄されるヒト羊膜を使用して、肺被覆用材、気管・気管支吻合部の創傷治癒促進など、呼吸器外科分野における再生医療への医用材の開発を目的としたが、予想に反して我々のラットやブタモデルでは、ヒト羊膜を被覆しても癒着防止効果はなかった。これは、凍結羊膜でも同様の結果であった。そのため、今後は中皮細胞を播種した羊膜で癒着防止効果を評価する予定である。

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	土肥 良一郎 (Doi Ryoichiro) (00817786)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	長井 一浩 (Nagai Kazuhiro) (30304942)	長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	上松 聖典 (Uematsu Masahumi) (30380843)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi) (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	北岡 隆 (Kitaoka Takashi) (80234235)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	高木 克典 (Takagi Katsunori) (90635856)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------