

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591672

研究課題名(和文) 豚を用いた胎仔肺移植の検討—特に気管支鏡下経気道的投与の可能性を探る—

研究課題名(英文) Implantation of fetal pig lung fragments into adult rat lung parenchyma – search for a possibility of transbronchial delivery with a bronchoscope –

研究代表者

先山 正二 (SAKIYAMA SHOJI)

徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60291986

研究成果の概要(和文)：今回はこれまでのラットでの成果をふまえて、豚を用いて胎生期肺組織移植実験を行った。豚胎生期肺組織細切し成体豚に移植した。豚胎生期肺組織は成体肺内に生着し分化した。ただし Allograft combination では、移植組織の生着の継続のためには免疫抑制が必要であった。気管支鏡による肺泡レベルへのデリバリーは可能であったが、肺内への生着は肺表面より穿刺注入した場合より生着は不良であった。

研究成果の概要(英文)：Depending on our results of fetal lung tissue transplantation in the rat, fetal pig lung tissue which were dissected and cut into very fine pieces implanted into adult pig lung parenchyma. The implanted fetal lung tissues lived and matured in adult lungs. Under the situation of allograft combination, immunosuppression was needed to keep the implanted tissues. Fetal lung tissues could be delivered into alveolar space using a bronchoscope, however, fetal lung tissues delivered by this method did not survived easier than by the method of transpleural implantation under thoracotomy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺気腫や肺線維症などの終末的肺疾患にて対しては、肺移植が有用な治療手段として確立されている。しかし、肺移植におけるドナー不足は深刻である。したがって、再生医学的アプローチが考えられるが、現状においては肺の再生は他の組織と比べその構造と構成細胞の多さ故にその困難性が指摘されている。

我々は、胎生期肺組織の i) 肺への分化の方向付けがなされている、ii) 増殖能が旺盛

である、iii) いわゆる“足場”となる間質組織が含まれている点に着し、胎生期肺組織移植による、特に肺泡レベルでの組織再生・修復について検討し、これまでに、胎生17日齢ラット胎仔肺を細切し naïve な成体ラット左肺に移植することにより、次の点を明らかにした (J Thorac Card Surg 2006; 131:1148-53)。

1) 仔肺組織が成体肺内に生着し、分化する。
2) 移植場所として肺という環境が増殖、分化には重要である。3) シピエント肺と移植

肺組織は肺泡レベルで気道、血管系の連絡を有する。4) 胎仔肺は成体自己肺に比し、成体肺内に生着しやすい。5) 換気によるmechanical stretchが強く加わる環境においては、移植胎仔肺の分化が促進される。さらに、ラットブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、病的肺においても移植胎仔肺は生着し分化することを示した(第60回胸部外科学会, 2007)。

今回はこれまでの小動物での成果をふまえて、豚を用いた大動物での胎生期肺組織移植の可能性を検討した。また、胎生期肺組織のレシピエント肺への移植では、肺実質に移植するため、生着までの移植片のviabilityを保つには組織片は大きくできない制約がある。移植する胎仔肺組織量を稼ぐには、頻回かつ容易に注入できる方法が必要となる。それには、気管支鏡を用いて経気道的に胎仔肺組織を末梢組織に注入する方法が考えられる。気管支鏡を用いる方法は、繰り返し行える点と、任意の肺葉にアクセスできる点でメリットが大きいと考える。

2. 研究の目的

今回の検討では、豚を用いて大動物においても胎仔肺組織移植が可能であることを示す。また、レシピエント肺へのデリバリー方法として、気管支鏡を用いた経気道的投与が可能であることを示す。

1) 開胸下でレシピエント肺に、胎仔肺組織を移植し、移植肺が生着することを組織学的に検討する。

2) 気管支鏡を用いて胎仔肺組織を経気道的にレシピエント肺に投与(injection)し、経気道的デリバリーの可能性を検討する。

3) 胎仔肺組織の肺内への投与(開胸による経胸膜的、経気管支的投与)による合併症の有無について観察する。

3. 研究の方法

実験はSPF豚を用いて行った。

- 胎齢96-85日の胎仔肺組織を採取し、DMEM培地内で細切し、14G針を用いて全麻下に成体右肺内および胸部筋肉内に注入した。注入箇所を目印として注入部肺胸膜下に点墨を行った。(Fig. 1, 2, 3)
- 胎仔肺は、一個体の左右肺を10mlの培養液中で細切することで、約15mlの容量となり、そのうち約10mlを肺内に注入した。胎仔肺の気管、中枢側の気管支は可及的に除いた。
- 移植日より免疫抑制剤(サイクロスポリン;CsA, 10mg/kg i.m, 7日間連日, 以降内服連日, 14日以降内服隔日)と抗生物質を継続投与した。

- 術後経時的(POD 0, 7, 14, 23, 30, 32)に胎生期肺組織を注入した右肺と筋肉部分を組織学的に検討した。
- 犠牲死時のCsAの血中濃度を測定した。
- 経気道的投与に関しては、気管支鏡を用いて胎仔肺組織を経気道的にレシピエント肺に投与(injection)し、経気道的デリバリーの可能性を検討した。豚右上葉に気管支鏡の鉗子口より、細切した胎仔肺組織を注入投与した。



Fig.1 豚胎仔肺



Fig.2



Fig.3

Fig.2 細切した胎仔肺組織。胎仔肺組織は含気がないため培養液中で下に沈む。

Fig.3 胎仔肺組織を開胸し、肺内に注入した。

4. 研究成果

移植前の胎仔肺組 (Fig 4)

終末囊期(terminal sac period); 肺野末梢で終末気管支、終末気管支などの形成が認められる。気道の最先端部分に肺泡の原基である終末囊が認められる。

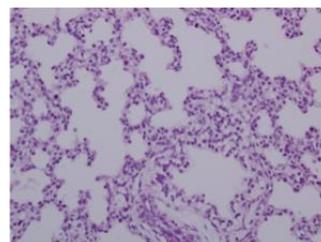


Fig. 4

移植後 0 日 (Fig.5)

移植した胎仔肺組織とレシピエントである成体豚肺組織は既に接着していた。

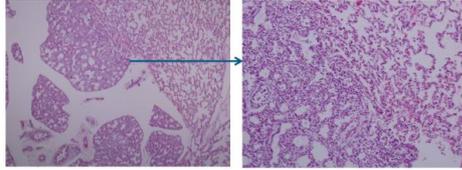


Fig. 5

移植後 7 日 (Fig.6A, 6B)

POD7 では、肺内に移植胎生期肺組織の生着を認め、当該部分は単層立方上皮を有する呼吸細気管支、肺泡道様の構築を示し、胎生期後期の構造ながら胎仔肺組織採取時よりも分化を認めた。一部にはリンパ球浸潤とレシピエント肺との間に線維性変化を認めた。

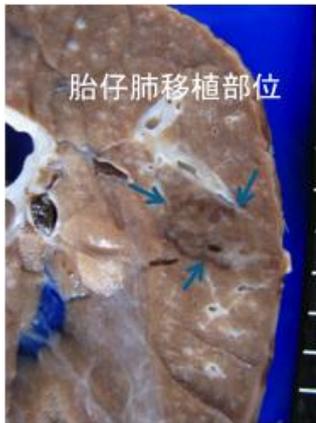


Fig. 6A

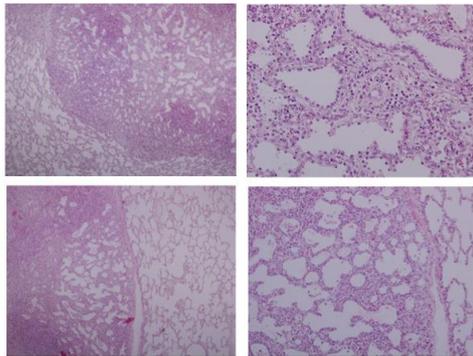


Fig. 6B

移植後 30 日 (Fig.7A, 7B)

POD23 以降では移植部分は拒絶反応によると思われるリンパ球浸潤と移植肺組織の壊死と線維性変化を認めた。筋肉内では、どの時期においても胎生期肺組織の生着は認めなかった。



Fig. 7A

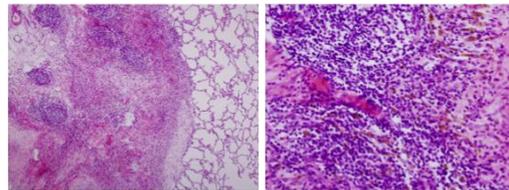


Fig. 7B

- 1) 大動物においても胎生期肺組織は成体肺内に生着し、分化することを示した。ただし Allograft combination では、移植組織の生着の継続のためには嚴重な免疫抑制が必要である。
- 2) 気管支鏡を用いて胎仔肺組織を経気道的にレシピエント肺に投与 (injection) し、経気道的デリバリーの可能性を検討した。豚右上葉に気管支鏡の鉗子口より、細切した胎仔肺組織を注入投与した。肺泡レベルへのデリバリーは可能であったが、その多くの組織が咳とともに喀出され、他の肺葉気管支に散布された。肺内への生着は肺表面より穿刺注入した場合より生着は不良であった。市販の経気管支的生検針ではその内腔径が小さく、細切組織の注入は困難であった。18G ほどの気管支鏡用の注入針の作成が必要であると考えられた。
- 3) 胎仔肺組織の肺内への注入による明らかな合併症は観察されなかった。注入後の全身麻酔からの覚醒もスムーズであった。肺表面からの穿刺により気胸が危惧されたが、特に問題となるような気胸は観察されなかった。肺表面の穿刺口は、注入した胎仔肺組織によりパッキングされることで気胸の発生が少なかったと考えられた。

その他の検討

我々の行ってきたラットでの胎仔肺移植と豚での胎仔肺移植の1週間後の結果を比較した。

ラット (Fig. 8A;胎仔肺組織, 8B;移植部位)

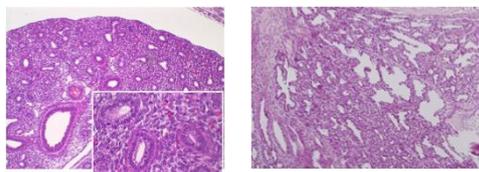


Fig. 8A

Fig. 8B

(Fig. 9A;胎仔肺組織, 9B;移植部位)

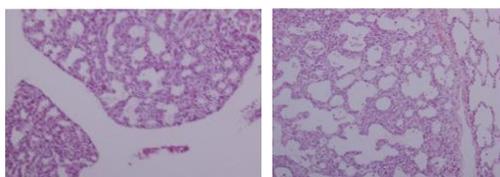


Fig. 9A

Fig. 9B

ラットの場合と比較して、豚の移植肺組織の移植後の分化はゆっくりしており、種本来の当該組織の分化スピードに依存していると考えられる。

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0件)

[学会発表] (計5件)

①豚を用いた胎生期肺組織移植の実験的検討 ラットで得られた知見との比較を含めて

先山正二, 監崎孝一郎, 鳥羽博明,
NarmisheekhKhasag, 宇山 攻, 中川靖士,
滝沢宏光, 近藤和也, 丹黒 章
日本呼吸器外科学会雑誌(0919-0945)24 巻
3号 Page417(2010.04)

②豚を用いた胎生期肺組織移植の実験的検討

先山正二, 監崎孝一郎, 鳥羽博明,
NarmisheekhKhasag, 宇山 攻, 中川靖士,
滝沢宏光, 近藤和也, 丹黒 章
日本外科学会雑誌(0301-4894)111 巻臨増2
Page648(2010.03)

③Sex-mismatch を用いたラット胎仔肺移植モデルのドナー細胞の組織学的検討

監崎孝一郎, 先山正二, 宇山 攻, 鳥羽博明,
中川靖士, 滝沢宏光, 近藤和也,

丹黒 章

日本外科学会雑誌(0301-4894)111 巻臨増2
Page210(2010.03)

④呼吸器外科領域の再生医療 プレオマイシン誘導肺線維症モデルに対する胎仔肺組織移植

鳥羽博明, 先山正二, 監崎孝一郎,
中川靖士, 滝沢宏光, 近藤和也, 丹黒 章
日本呼吸器外科学会雑誌(0919-0945)23 巻
3号 Page350(2009.04)

⑤GFP ラットを用いた胎仔肺移植モデルのドナー組織間再融合の組織学的検討

監崎孝一郎, 先山正二, 宇山 攻,
松岡 永, 鳥羽博明, 滝沢宏光,
広瀬由紀子, 近藤和也, 坂東良美, 丹黒 章
日本外科学会雑誌(0301-4894)109 巻臨増2
Page213(2008.04)

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

先山 正二 (SAKIYAMA SHOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
准教授

研究者番号: 60291986

(2)研究分担者

監崎 孝一郎 (KENZAKI KOICHIROU)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70325265

滝沢 宏光 (TAKIZAWA HIROMITSU)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：90332816

鳥羽 博明 (TOBA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・

助教

研究者番号：40403745

(3)連携研究者

()

研究者番号：