

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17760

研究課題名（和文）自律再生軟骨による気管支断端の創傷治癒システムの開発

研究課題名（英文）Development of a Wound Healing System for Bronchial Tears Using Autonomous Regenerated Cartilage

研究代表者

横手 芙美 (Yokote, Fumi)

帝京大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：80868919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ウサギの気管軟骨の新生軟骨実験モデルを確立した。吻合のみ行なったコントロール群と、吻合直前にb-FGF注入した群それぞれの症例で機械的、組織学的、生化学的な評価を行った。b-FGF注入群では気管吻合部に新生気管軟骨が再生され、コラーゲンタイプ2とグリコサミノグリカンの量が有意に増加しており、組織学的・生化学的に有意差を認めた。また、引張試験では、FGF群の吻合部は対照群の吻合部よりも剛性が有意に高いことが示された。さらにb-FGF群では吻合直前に吻合部に1回だけb-FGFを投与することで、軟骨再生が起こることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺切除後の気管支断端瘻は、重篤で治療に難渋する合併症である。気管支断端瘻発生の危険因子は、断端部の虚血が一因と考えられている。これまでの研究では断端部を有茎筋弁などで被覆する予防手術が推奨されているが、線維性肉芽組織による創傷治癒では完全な予防にはならない。本研究からbFGFを単回注入することにより、ウサギの気管軟骨の再生が有意に促進され、再生した軟骨が吻合部を橋渡しすることで吻合部を強化することができた。この技術により将来的に気管吻合部の補強に臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We developed a new model for regenerated rabbit tracheal cartilage. Both the control group and the b-FGF injection group underwent mechanical, histological, and biochemical evaluations. The b-FGF group exhibited regenerated cartilage at the anastomotic site, along with significant increases in collagen type 2 and glycosaminoglycan levels, indicating notable histological and biochemical differences. Tensile test revealed that the b-FGF group had significantly higher rigidity compared to the control group. Additionally, administering a single injection of b-FGF before the anastomosis in the b-FGF group confirmed cartilage regeneration.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：気管軟骨 気管軟骨再生 bFGF 塩基性線維芽細胞成長因子 グリコサミノグリカン II型コラーゲン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

呼吸器外科において肺葉切除後の気管支断端瘻は、患者だけでなく診療する医師をも疲弊させる合併症であり、回避することが必要である。従来の筋弁や心膜脂肪組織による被覆は有効ではあるものの、近年標準的に行われている鏡視下手術では困難な手技であり、簡便で確実な方法が必要である。

従来の予防方法は血液供給を増やすことに着目されており、血流の悪い吻合部に大網などを被覆することが行われてきたが、胸部操作に加えて腹部操作が加わるため、侵襲が大きくなってしまいう欠点があった。別の解決策としてはバイオエンジニアリングがあるが移植材料として3次元の生体適合性人工気管が理想的であり、これらの制作に高度な技術・費用が必要となってしまう。

そこで気道再建のための気管軟骨再生の知見から、適切な抗炎症効果と軟骨膜に局在する軟骨芽細胞を増殖させる環境を作ること、軟骨と再生軟骨が新生軟骨で接合する知見を得た。そこで、肺葉切除後の気管支断端の創傷治癒過程に、軟骨膜からの新生軟骨再生を誘導する環境を作り、気管支断端を周囲組織の線維性肉芽組織で被覆させるのではなく、軟骨で気管支断端を閉鎖できるのではないかと着想した。気道の創傷治癒という全く新しい視点から、簡便で安全かつ信頼性の高い気道吻合術の開発が望まれている。

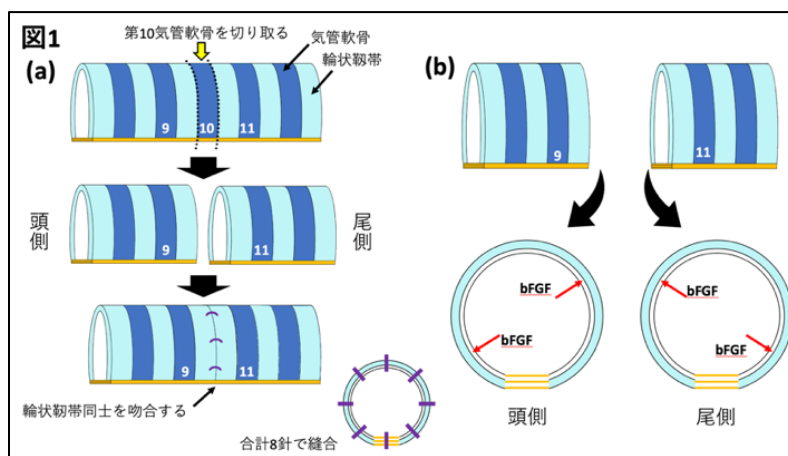
2. 研究の目的

気管吻合部の緊張を和らげるため、再生軟骨を用いて気管吻合部を補強する方法の新規かつ簡便な方法の開発を目的とし、ウサギモデルを用いて、気管吻合部に塩基性線維芽細胞成長因子(b-FGF)を吻合直前に1回だけ注入することで気管吻合部の軟骨の再生が促進されるかどうか、再生軟骨が気管吻合部に橋渡し構造を形成するかどうか、再生された軟骨が吻合部を補強する効果があるかどうかを再生軟骨の接合部の形態学的、組織学的、力学的、生物学的特徴を調査することに主眼を置いて、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ニュージーランド白色家兎12羽を用い、コントロール群(n=6)とb-FGF群(n=6)の2群に分類した。全身麻酔下に頸部正中

切開し、頸部気管を露出させ、両群とも第10気管軟骨輪を円周方向に切除し、第9気管軟骨輪と第11気管軟骨輪を吻合した。気管吻合はすべて非吸収性モノフィラメントのネスピレン6-0を8針でおこなった(図1a)。b-FGF群は気管吻合直前に27G針を用いて頭側(第9気管軟骨輪)と尾側(第11気管軟骨輪)の赤矢印



の部分の気管軟骨の粘膜下層にb-FGFをそれぞれ12.5 μ g(50 μ lずつ) $\times$ 4か所=合計50 μ g投与した。注入位置は吻合部の頭側と尾側で90度ずれるように設定した(図1b)。

手術の4週間後全てのウサギを犠牲にした。

形態学的評価 甲状軟骨～気管分岐部直上まで全長に気管を採取し、気管の膜様部の中央を全長にわたって切断した。目的にこの長方形の組織標本の吻合部を 中心に直径 3mm の正円にくり抜き(図 2)、標本の厚さと重さを測定した。

組織学的評価 全体像の評価目的にヘマトキシリン・エオジン (HE)、軟骨成分の観察目的にトルイジンブルー(TB)とサフラニン O (SO)、膠原繊維の観察目的にマッソントリクローム(MT)染色を行った。

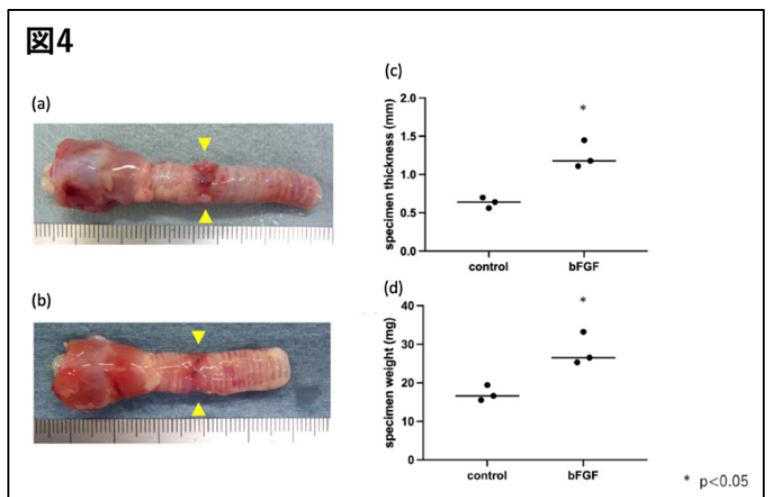
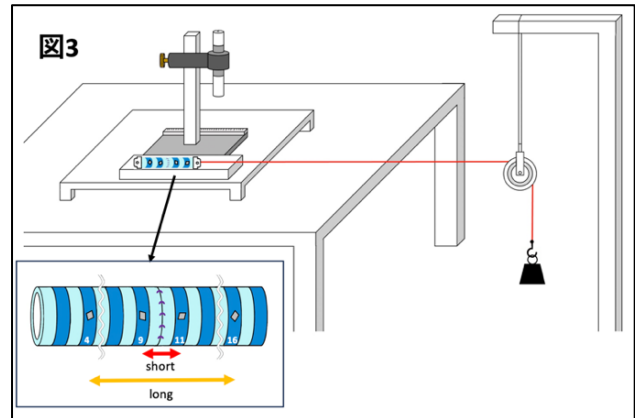
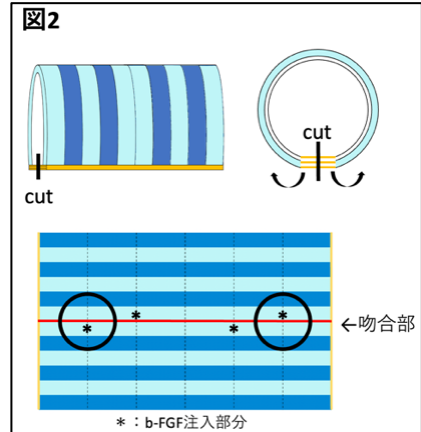
力学的評価 機械的な強度を計測するために、引張試験を行った (図 3)。吻合部のデータは、第 9・第 11 気管軟骨リングの間を short として測定し、対照として第 4・16 気管軟骨リングの間を long として測定した。荷重は最大で long の距離を 1.2 倍の長さに牽引するのに十分な強さまで引張荷重をかけた。

生物学的評価 蛋白定量を行い、標本をそれぞれ適正な濃度に希釈し、市販の ELISA キットを用いて、総コラーゲン (Col T)、I 型コラーゲン (Col I)、II 型コラーゲン(Col II)、グリコサミノグリカン(GAG)を測定した。Col I、Col II、GAG の濃度は、個々のサンプル間のサイズ差の影響を最小限にするために、各サンプルを Col T の質量の濃度で割った商で表した。

4. 研究成果

12 匹のウサギは予定通り犠牲になるまで合併症なく生存し、生存期間中に呼吸状態の変化も認められなかった。

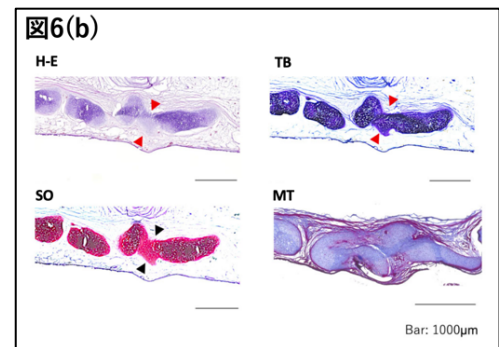
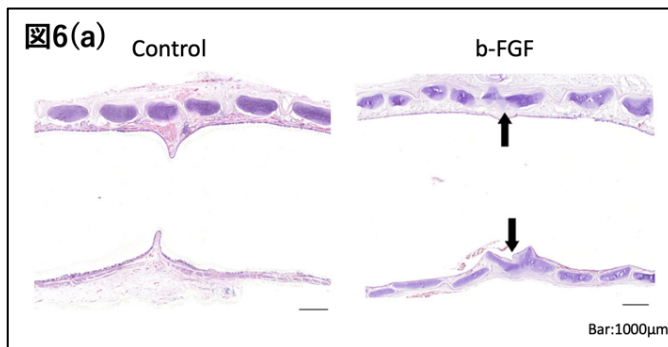
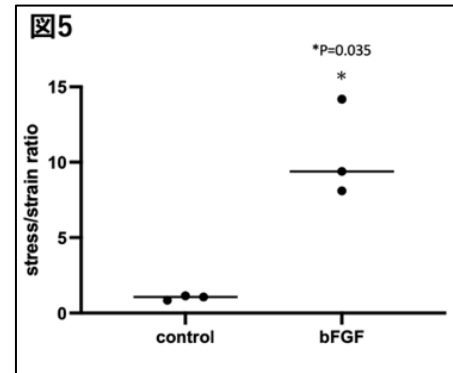
形態学的評価 マクロ標本では、対照群の吻合部は先細りの形状をしていたが (図 4a)、FGF 群の吻合部は紡錘形で、注入部位で最大径となっていた (図 4b)。気管壁の厚さとその重さを比較すると FGF 群の標本は、対照群の標本より有意に厚く ($p=0.017$)、有意に重かった ($P=0.029$) (図 4c,d)。



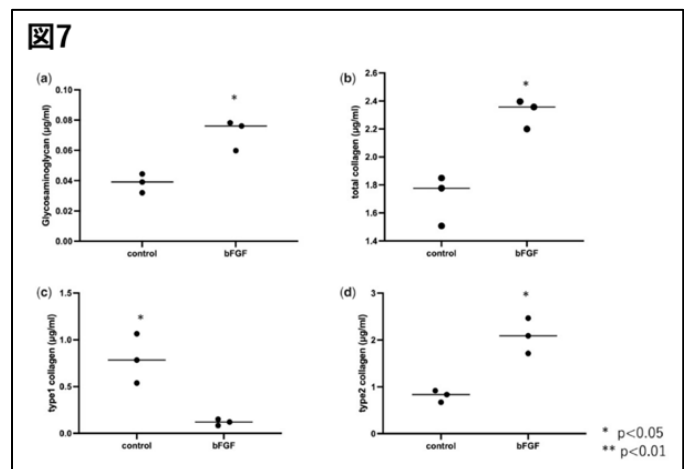
力学的評価 引っ張り試験では、対照群と比較して FGF 群の吻合部は、有意に高いひずみ対応力比 ($P=0.035$) を示し、FGF 群の吻合部は対照群の吻合部よりも剛性が高いことが示された (図 5)。

組織学的評価 気管の断面の組織学的評価では、FGF 群では第 9 気管軟骨輪と第 11 気管軟骨輪の間に新生軟骨組織が再生されていた (図 6a)。軟骨の存在は、H&E、トルイジンブルー、

サフラニン O 染色で確認できた。(図 6b) 再生された軟骨組織は、第 9 気管軟骨輪と第 11 気管軟骨輪の間に架橋構造を形成していた。対照群では逆に、第 9 気管軟骨輪と第 11 気管軟骨輪の間は肉芽組織で満たされており、軟骨の再生は認めなかった。また、吻合部を囲む膠原繊維については、マッソントリクローム染色で膠原繊維を染色して比較、両群間に有意な差は認められなかった。



生物学的評価 蛋白定量で行った ELISA の結果では、GAG 濃度は対照群に比べて FGF 群が有意に増加しており ($p=0.013$)、FGF 群の Col II の濃度も対照群に比べて有意に増加していたが ($p=0.019$)、逆に b-FGF 群の Col I の濃度は、対照群に比べて有意に低かった ($p=0.045$)。 (図 7)



本研究では、吻合直前に b-FGF を 1 回だけ注入することで、気管吻合部の軟骨再生が促進され、再生軟骨が隣接軟骨と連結して隙間を埋め、気管吻合部を補強することを証明した。この結果は、気道吻合の新しい創傷治癒の概念を提供しうるものである。我々の知る限り、被覆剤の代わりに再生軟骨を用いて気管吻合部の補強を実証した *in vivo* モデルの報告は世界でこれが初めてであり、本技術のさらなる検討により、気管吻合部補強のための b-FGF 注入の臨床応用の可能性が開かれると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fumi Yokote, Yoshikane Yamauchi, Hiroko Komura, Tadashi Tanuma, Yukinori Sakao, Masafumi Kawamura, Makoto Komura	4. 巻 61
2. 論文標題 A novel method of tracheal anastomosis healing using a single submucosal injection of basic fibroblast growth factor: initial report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Cardio-Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 917-924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ejcts/ezab542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横手美美
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)による軟骨再生能を活用した気管吻合技術の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横手美美
2. 発表標題 再生気管軟骨を用いた気管吻合部への塩基性線維芽細胞成長因子（basic fibroblast growth factor）の粘膜下注入による補強術
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	古村 眞 (Komura Makoto) (10422289)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山内 良兼 (Yamauchi Yoshikane) (30445390)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

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
---------	---------