

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890206

研究課題名（和文） 自家軟骨細胞を用いた気管再生技術の開発

研究課題名（英文） Regeneration of tracheal cartilage using autologous chondrocytes

研究代表者

野本 美香 (NOMOTO MIKA)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：50554416

研究成果の概要（和文）：気管の再生医療において、骨格として機能しうる気管軟骨の効果的な再生を目指し、組織再生誘導型人工気管に軟骨細胞を付加した新規培養気管を開発し、評価を行った。培養軟骨細胞を人工気管に導入し、ウサギの気管欠損部に自家移植した。気管欠損部には軟骨断端と断端を結ぶように橋状の軟骨組織の再生を認めた。橋状の軟骨再生は気管の枠組みとしての機能が期待できる結果であり、自家軟骨細胞を導入した人工気管が小児の気管狭窄病変に利用可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a bio-engineered prosthesis with autologous chondrocytes and evaluate its effects on tracheal regeneration by implantation into the tracheal defects of rabbits. As a result, regeneration of tracheal cartilage with bridge-like formation was observed. Regenerated cartilage with bride-like formation can function as a frame for the trachea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,020,000	306,000	1,326,000
2010年度	920,000	276,000	1,196,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,940,000	582,000	2,522,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：気管軟骨、再生医療、自家軟骨

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、ポリプロピレンの骨格に足場となるコラーゲンスポンジを付加した組織再生誘導型人工気管を用い、気管再

生医療の臨床応用を開始した。成人では安定した成績をおさめている。一方、骨格のポリプロピレンが非吸収性であり成長に応じて大きくなることが無いため小児は適応外としている。

軟骨細胞で人工気管の枠組みを形成できれば小児の気管病変の治療に対しての応用が期待できる。

2. 研究の目的

(1) cell source となる軟骨組織の採取方法と培養方法の確立

(2) 自家培養軟骨細胞を人工気管に導入した新規培養気管の開発

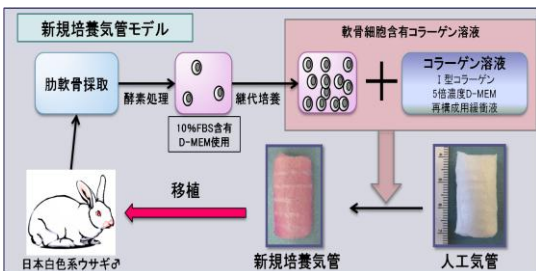
(3) ウサギ気管欠損部への移植による、軟骨再生の組織学的評価

上記の実験にて、気管の枠組みとして機能しうる軟骨組織の再生を目指す。

3. 研究の方法

(1) 軟骨組織の採取方法と培養方法の確立：日本白色系ウサギ(オス・2～3 kg)の耳介軟骨、肋軟骨を前麻酔科に採取。軟骨膜を除去し、酵素処理にて軟骨細胞を回収・培養した。培養細胞をコラーゲンスポンジに注入し、培養を行い軟骨細胞の増殖の状態を評価した。培養液は10%FBS含有D-MEMを用いた。2週間後、4週間後、6週間後の時点で標本を作製し、組織学適評価を行った。

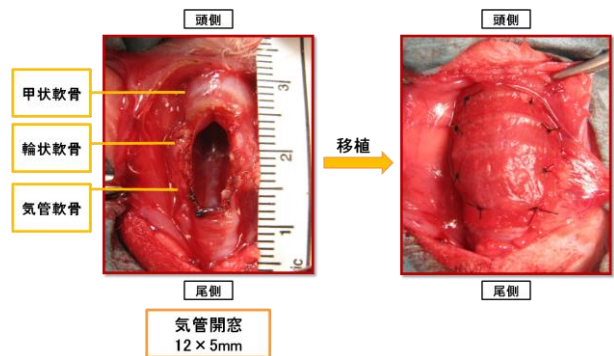
(2) 新規培養気管の作成：全身麻酔下に日本白色系ウサギ(オス・2～3 kg)の肋軟骨を採取し、軟骨膜を取り除いた後、酵素処理し軟骨細胞を回収した。回収した軟骨細胞を10%FBS含有D-MEMを用いて継代培養した。氷冷下でI型コラーゲン溶液に5倍濃度D-MEM、再構成用緩衝液、及び培養軟骨細胞を混合し軟骨細胞含有コラーゲン溶液を作製した。軟骨細胞含有コラーゲン溶液を人工気管に浸透させた後、37℃CO2インキュベーター内に30分静置しゲル化させ新規培養気管を作製した。



(3) ウサギの気管欠損部への自家移植：新規培養気管を気管開窓部に自家移植した。開窓部は12×5mmとした。開窓部に新規培養気管を被覆し、5-0ナイロン糸で縫合した。その後前頸筋・皮下組織を縫合し、さらに表皮を縫合した。

コントロールモデルとしては、ウサギの気管欠損部に組織再生誘導型人工気管のみを移植した。移植後一定期間後気管を摘出し組織学的に評価した。

〔気管開窓と人工気管の移植〕



4. 研究成果

(1) 軟骨組織の採取方法と培養方法の確立：培養した耳介軟骨細胞、肋軟骨細胞をコラーゲンスポンジに注入しさらに培養した。培養液は10%FBS含有D-MEMを用いた。

2週間後、4週間後、6週間後で標本を作製し軟骨細胞の数を比較した。両者の細胞数に大きな差はなかった。また、2週間後と比べ6週間後でも軟骨細胞の著名な増殖はなかった。

以上より耳介軟骨細胞と肋軟骨細胞の増殖の程度は大きな差がなく、気管軟骨の再生の細胞源としては気管軟骨と同じ硝子軟骨である肋軟骨が適当であると考えられた。また、足場となるコラーゲンに細胞を注入後培養しても、細胞の著名な増殖は認めなかったため、注入後の培養は効果的ではないことが示唆された。

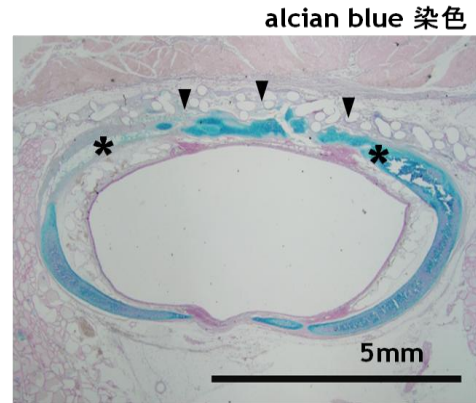
(2) 新規培養気管の作成：

全身麻酔下に肋軟骨を採取した後に問題の起こったウサギはおらず、前例生存した。自家移植の細胞源として肋軟骨を採取する手技を確立できた。肋軟骨細胞は2回の経代で十分量培養することが可能であった。培養肋軟骨細胞を含有したコラーゲン溶液は37℃でゲル化するため、移植に適当な新規培養気管を作製することができた。

(3) ウサギの気管欠損部への自家移植：

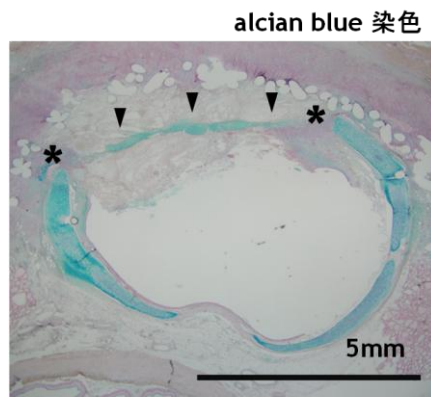
移植2週間後、新規培養モデルでは気管軟骨欠損部に一層の軟骨組織を認めた。コントロールモデルでは軟骨の再生は認めなかった。移植8週間後、新規培養モデルでは2週間後と比べさらに軟骨組織が増殖し、気管軟骨断端と、対側の断端をつなぐように橋状の軟骨再生を認めた。コントロールモデルでは軟骨の再生は認めなかった。

[新規培養気管モデル、移植8週間後]



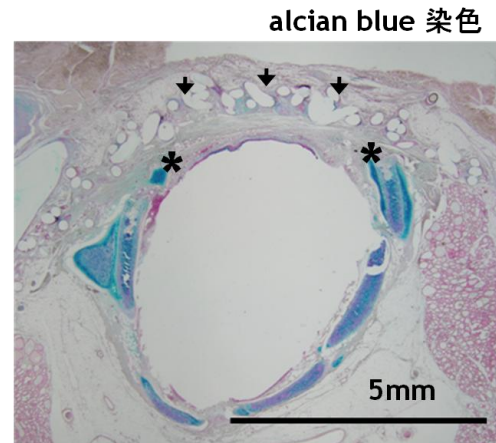
- ▼ 気管欠損部：
橋状に軟骨様組織再生
- * 気管軟骨断端

[新規培養気管モデル、移植2週間後]



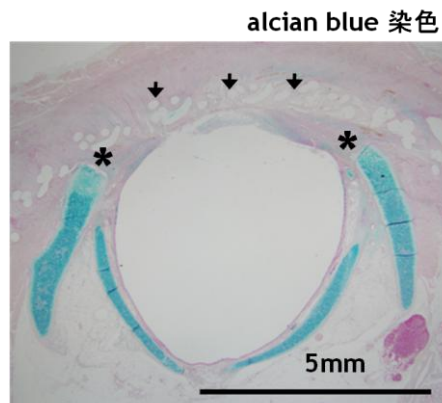
- ▼ 気管欠損部：
一層の軟骨様組織形成
気管軟骨断端

[コントロールモデル、移植8週間後]



- ↓ 気管欠損部：
軟骨再生は認めない

[コントロールモデル、移植2週間後]



- ↓ 気管欠損部：
軟骨再生は認めない

自家肋軟骨細胞を人工気管に導入した新規培養気管を開発し、ウサギの気管欠損部への移植実験を行い、軟骨組織の再生を認めた。橋状の軟骨再生は気管の枠組みとして機能することができると考えられる。自家軟骨細胞を導入した人工気管が小児の気管狭窄病変に利用可能となることが期待される。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 野本 美香、自家軟骨細胞を用いたウサギの気管再生、第10回日本再生医療学会総会、平成23年3月2日、東京
- ② 野本 美香、組織再生誘導型人工気管によるウサギの気管軟骨の再生、第31回日本炎症・再生医学会、平成22年8月5日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 美香 (NOMOTO MIKA)
福島県立医科大学・医学部・助手
研究者番号：50554416

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

野本 幸男 (NOMOTO YUKIO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70508811