

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592536

研究課題名(和文) 組織工学的手法を用いた気管再生における上皮形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism in the tracheal epithelial regeneration using technique of tissue engineering

研究代表者

多田 靖宏 (Tada, Yasuhiro)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70363760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンスポンジに付加するビトリゲルの素材を、ウシ由来のネイティブコラーゲンからブタ由来のアテロコラーゲンに変更することができた。ネイティブコラーゲンと比較してアテロコラーゲンは組織に吸収されるのが早いことから、上皮再生に適したアテロコラーゲン量は2.2mg/cm<sup>2</sup>であると判断した。移植した人工材料を気管内腔より観察する方法として、耳用の硬性内視鏡を経口的に用いる方法を確立した。これによって、摘出することなく内腔の上皮化を評価することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We changed material of vitrigel to add to collagen sponge in atero collagen derived from a pig from native collagen derived from a cow. As for the tissue rate of absorption, atero collagen is faster than native collagen. We took the quantity of effective atero collagen as 2.2mg/cm<sup>2</sup> for epithelium regeneration. The quantity of atero collagen which was necessary for epithelial regeneration was 2.2mg/cm<sup>2</sup>.

The observation of the post transplantation trachea lumen used rigid endoscope for ears. Hereby, an evaluation of the epithelization was possible without resecting trachea.

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：再生医療

キーワード：気管食道科学 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、人工気管を用いた気道の再生医療を 2002 年より臨床応用しており、現時点では良好な結果を得ているが、移植早期の感染防止の観点からは内腔の上皮化の促進が望まれる。そこで Takezawa らが開発したビトリゲルに着目した。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 bi-potential collagen scaffold(BPCS)を作製し、ラットの気管欠損モデルに対し移植実験を行った結果、従来のコラーゲンスポンジのみと比較し上皮化の促進効果が示唆された。培養細胞のヒトへの臨床応用は、現時点では困難であるが、培養細胞を用いない本研究は安全性が確立されればヒトへの応用が可能となる可能性が高いと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)ラットより大型の動物(ウサギ)を用いての移植実験を行い、ラット同様に気管欠損モデルを安定して作成できるかどうかを検証し、移植によって同様の上皮化が得られるのかどうかを評価すること。(2)将来的な臨床応用を視野に入れると、人工気管の素材は、感染症対策の観点から、より安全なブタ由来に変更する必要がある、ウシ同様の上皮促進効果が得られるかどうかについて評価すること。(3)移植した人工気管の内腔面を直接観察する方法を確立すること。

## 3. 研究の方法

(1)ウサギの気管欠損モデル作成と移植方法の確立

ウサギに対しネブタール静脈投与による麻酔下に頸部気管を露出させる。電気メスにて気管前壁を非管状に切除し、適当なサイズに開窓する。同じ開窓サイズの欠損モデルを安定して作製できるようにする。BPCS のビトリゲルを重層した側を内腔面に向け、パッチ状に気管欠損部に被覆し縫合固定する。縫合後閉創する。この一連の操作を安定して行えるように習得する。

### (2)ビトリゲルの素材変更の検討

ブタアテロコラーゲンを用いたビトリゲルの作製：ビトリゲル作製に用いるコラーゲンをウシ由来ネイティブコラーゲンからブタ由来アテロコラーゲンに変更し、かつ希釈する溶剤を PBS もしくは生理食塩水に変更する。

ネイティブコラーゲンとアテロコラーゲンの比較：従来のウシ由来ネイティブコラーゲンビトリゲルと比較し、強度や表面の性状について評価する。

移植する際に付加するビトリゲルの適切な量を確認：欠損サイズの増大にとともに、移植する BPCS のサイズも大きくなるが、BPCS 作製工程のビトリゲル量が適当かを実際の移植操作で判断する。必要に応じて組織学的評価を追加する。最終的に移植操作上有利な条件を確立する。

BPCS の移植実験と標本採取：作製したブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル付き人工材料の移植実験を行う。観察期間別に移植後 7 日モデル、14 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、気管を摘出する。

標本作製と組織学的評価：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。また走査電顕用の標本も作製する。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。

### (3)気管内腔観察方法の検討

超音波検査による内腔の観察：ポータブル型超音波検査機のヒト用の小プローブを用いる。塩酸メドトミジン(0.2mg/kg)、ミダゾラム(1.0mg/kg)、酒石酸ブトルフェノール(0.2 mg/kg)を混合して臀筋への筋肉内投与による全身麻酔を行ったうえで、未移植と移植済みのウサギの前頸部から頸部構造を観察し、気管形態を評価する。

硬性内視鏡による経口的気管内腔の観察：耳用の細径2mmで30度斜視の硬性内視鏡(OLYMPUS)を用いる。塩酸メドトミジン(0.2mg/kg)、ミダゾラム(1.0mg/kg)、酒石酸ブトルフェノール(0.2 mg/kg)を混合して臀筋への筋肉内投与による全身麻酔を行ったうえで、直接経口的に硬性鏡を挿入し、声門を越えて気管内腔まで挿入する。気管欠損部を確認して、内腔の状態をモニター下に評価する。

## 4. 研究成果

### (1)ウサギの気管欠損モデル作成と移植方法の確立

ウサギの気管を露出させるまでの行程は、ラットでの操作に準じて行うことができた。ウサギの気管外径は約8mmであり、1/2周切除は移植後の窒息の危険性が高くなるため5mmとし、縦は気管軟骨3リング切除が妥当と判断し10mmとした。結果的に5×10mmの開

窓を行った。気管前壁の切開には電気メスは用いずメスで鋭的に切除した方が出血は少ないことが判った。操作は安定して行うことができた。BPCSのビトリゲルを重層した側を内腔面に向け、パッチ状に気管欠損部に被覆し縫合固定することができた。BPCSを前頸筋で覆うように正中で縫合し皮膚を閉創する。この一連の操作を安定して行うことができた。

### (2)ビトリゲルの素材変更の検討

ブタアテロコラーゲンを用いたビトリゲルの作製：ビトリゲル作製に用いるコラーゲンゲルをウシ由来ネイティブコラーゲンからブタ由来アテロコラーゲンに変更してBPCSを作製することができた。ビトリゲルを作製する際の希釈液をPBSに変更した。

ネイティブコラーゲンとアテロコラーゲンの比較：従来のウシネイティブコラーゲンビトリゲル(1.1mg/cm<sup>2</sup>)と同量のブタアテロコラーゲンにて作製したBPCSを、それぞれウサギの頸部皮下に移植した。2週間後に摘出して病理組織学的にビトリゲルを観察したところ、ウシネイティブは残存していたが、ブタアテロは既に吸収されていた。ブタアテロでウシネイティブと同程度の強度を得るにはコラーゲン量を増す必要があると判断した。

移植する際に付加するビトリゲルの適切な量を確認と移植実験：ウシネイティブの倍量(2.2mg/cm<sup>2</sup>)と4倍量(4.4mg/cm<sup>2</sup>)でBPCSを作製した。従来と同じ方法でビトリゲル面を気管内腔に向けるようにウサギの気管欠損部に被覆して前頸筋で覆って固定した。

標本作製と組織学的評価：移植後14日に摘出して観察したところ、どちらもビトリゲル層は残存していたが、

2.2mg/cm<sup>2</sup> では連続した上皮層が確認され、4.4mg/cm<sup>2</sup> では欠損部中央付近は上皮層の形成が無く、連続した上皮層は確認できなかった。よって、2.2mg/cm<sup>2</sup> の方が上皮形成には有利な可能性が示唆された。

### (3)気管内腔観察方法の検討

超音波検査による内腔の観察：ポータブル型超音波検査機のヒト用の小プローブを用いて頸部構造を確認したが、気管のフレームは確認できたが、内腔の状況（肉芽形成の有無など）は観察できなかった。今回用いた小プローブではウサギの気管内腔の観察には不向きであると判断した。

硬性内視鏡による経口的気管内腔の観察：耳用の細径 2mm で 30 度斜視の硬性内視鏡（OLYMPUS）を用いた。経口的に硬性内視鏡は挿入可能であり、声門を越えて気管内腔に入り、移植し BPCS の内腔面は観察することができた。今回の実験結果と照らし合わせると、移植後 14 日の 2.2mg/cm<sup>2</sup> のモデルでは BPCS の内腔面には上皮化がみられたが、4.4mg/cm<sup>2</sup> の内腔面には白苔を認め十分な上皮化は確認できなかった。このように、気管内腔を硬性内視鏡下に観察する方法は有用であることが判った。

### 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 10 件)

1. Tani A, Tada Y, Takezawa T, Wada I, Imaizumi M, Nomoto Y, Nomoto M, Omori K : Regenerative Process of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge scaffold. Laryngoscope 123(6): 1469-1473, 2013.

2. Tada Y, Takezawa T, Tani A, Nakamura T, Omori K: Collagen vitrigel scaffold for regenerative medicine of the trachea: Experimental study and quantitative evaluation. Acta Oto-Laryngologica, 132, 447~452, 2012.
3. Tani A, Tada Y, Takezawa T, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T, Omori K: Regeneration of Tracheal Epithelium Using a Collagen Vitrigel-Sponge Scaffold Containing Basic Fibroblast Growth Factor. Ann Otol Rhinol Laryngol, 121(4), 261~268, 2012.
4. 多田靖宏, 鈴木輝久, 岡野渉, 今泉光雅, 谷亜希子, 大森孝一 : 喉頭・気管狭窄症 . 喉頭 , 24(2) : 85-88 , 2012 .

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Tani A, Tada Y, Takezawa T, et al. : Tracheal regeneration using a collagen vitrigel sponge scaffold containing basic fibroblast growth factor. The International Bronchoesophagology Society, Kyoto, April 12-16, 2014.
2. Tani A, Tada Y, Takezawa T, Wada I, Imaizumi M, Nomoto Y, Nomoto M, Omori K : Regenerative Process of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge scaffold. The 133th American Laryngological Association, San Diego, USA, April 18-19, 2012
3. 多田靖宏, 仲江川雄太, 谷亜希子, 他 : プラズマ由来コラーゲンビトリゲルを用いた喉頭気管の再建 . 第26回日本喉頭科学会 , 沖縄県 , 3月6日 ~ 7日 , 2014 .

〔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 特に無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

多田靖宏（TADA YASUHIRO）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70363760

### (2)研究分担者

竹澤 俊明（TAKEZAWA TOSHIAKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝

子組み換え家畜研究センター・主任研究

員

研究者番号：50301297

### (3)連携研究者

（ ）

研究者番号：