

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791918

研究課題名(和文) 自家軟骨細胞を用いた喉頭の軟骨欠損部の再生

研究課題名(英文) Regeneration of laryngeal 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・助教

研究者番号：50554416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：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に肋軟骨から採取し培養した、軟骨細胞を導入し新規人工気管を作製した。ウサギの輪状軟骨欠損部に自家移植を行い組織学的評価を行った。コントロールモデルでは輪状軟骨欠損部には軟骨組織の再生は認めなかった。新規人工気管モデルでは輪状軟骨欠損部に軟骨様組織の再生を認めた。再生した軟骨様組織は喉頭の枠組みとしての機能が期待できる。

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

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医療 喉頭軟骨 人工気管

1. 研究開始当初の背景

我々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開発・臨床応用を行い概ね良好な結果を得ている。しかし骨格として用いられているポリプロピレンが非吸収性であり成長にあわせて大きくなることが無いため、小児は適応外としている。軟骨細胞で骨格を形成することができれば小児への応用が期待できる。

これまでにウサギの肋軟骨から採取した自家軟骨細胞を培養、人工気管に播種し気管軟骨欠損部に移植する研究を行い、軟骨様組織の再生を確認した。今回の研究では自家軟骨細胞を用い喉頭の軟骨の再生をめざす。

2. 研究の目的

(1) 自家軟骨組織を採取し、十分量の軟骨細胞を培養する技術、組織再生誘導型人工気管や生分解性ポリマーなどの足場材料に培養軟骨細胞を導入する技術を開発する。

(2) 自家軟骨細胞を導入した人工気管の移植実験を行い、生体内での軟骨再生を評価する。

3. 研究の方法

(1) In vitro での軟骨細胞を有する新規人工気管の作製。

〔対象〕 日本白色系ウサギ♂

〔細胞の採取〕 軟骨細胞の採取：全身麻酔下に、ウサギの肋軟骨を採取し、軟骨膜を取り除いた後コラーゲナーゼ処理し浮遊する軟骨細胞を濾過、回収した。

〔培養〕 10%FBS 含有 D-MEM 細胞培養液を用いて回収された細胞の継代培養を行った。

〔培養喉頭の作製〕 I型コラーゲン溶液に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。コラーゲン溶液は 37℃でゲル化するものを用いた。

ウサギ用に作製した自己組織再生型人工気管を足場材料とし、軟骨細胞含有コラーゲン溶液を足場材料に浸透させゲル化させ軟骨細胞付加工気管を作成した。

(2) In vivo で、ウサギの喉頭軟骨欠損部への軟骨細胞含有新規人工気管の移植実験。

〔対象〕 日本白色系ウサギ♂

〔喉頭欠損モデルの作製〕 全身麻酔下に喉頭・頸部気管を露出させ、輪状軟骨を開窓した。喉頭欠損の大きさは約 5.0×10.0mm とし

た。

〔喉頭再建〕 半筒状の軟骨細胞含有新規人工気管が喉頭欠損部を覆うよう留置し 6-0 ナイロン糸で喉頭と縫合した。

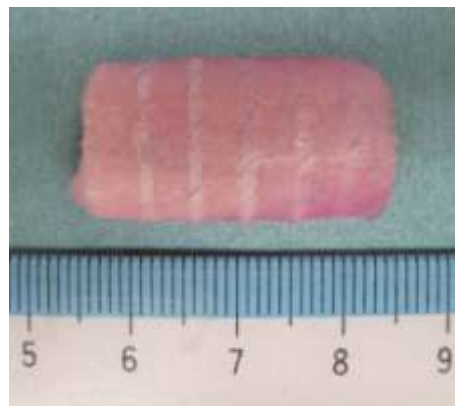
〔標本採取〕 観察期間（移植後 2 週、8 週）の後にネブタール過剰投与により安楽死させた後、喉頭を摘出した。

〔標本作製・評価〕 摘出した喉頭の標本を作製し、H-E 染色やアルシアンブルー染色での形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) In vitro での軟骨細胞を有する新規人工気管の作製：

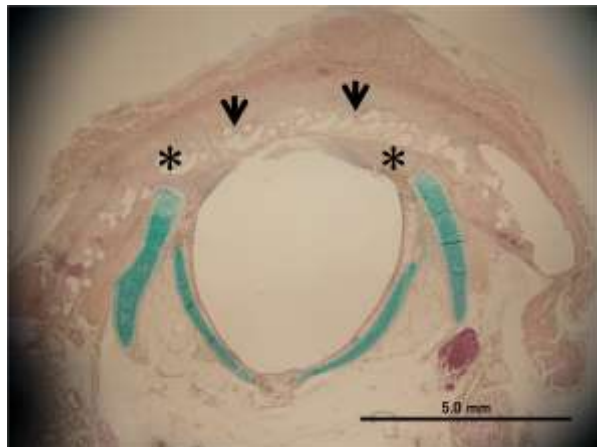
肋軟骨を採取し、軟骨細胞の継代培養を行った。2~3 週間で移植に十分量の軟骨細胞を回収することが可能であった。培養軟骨細胞含有コラーゲン溶液を人工気管の足場であるコラーゲンスポンジに注入し 37 度でゲル化させた。ゲル化しているため軟骨細胞はコラーゲンスポンジから脱落することなく、移植に適する形態であると考えられた。



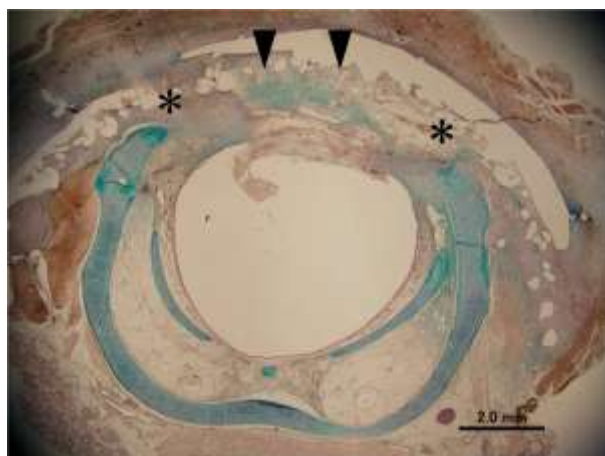
〔軟骨細胞含有新規人工気管〕

(2) In vivo で、ウサギの喉頭欠損部への軟骨細胞含有新規人工気管の移植実験：

人工気管の移植により喉頭気管狭窄、窒息をきたしたウサギは認めず、全例生存した。移植2週間後、新規人工気管モデルでは輪状軟骨の欠損部に一部軟骨様組織が確認された。コントロールモデルでは軟骨様組織は認めなかった。



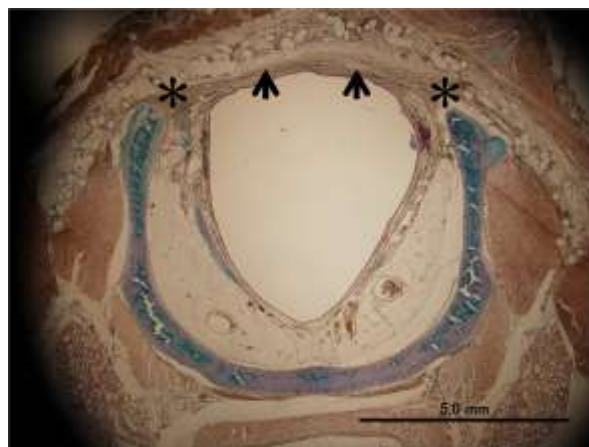
[移植2週間後 コントロールモデル]
アルシアンブルー染色
* : 輪状軟骨断端
矢印：輪状軟骨欠損部に軟骨再生は認めない



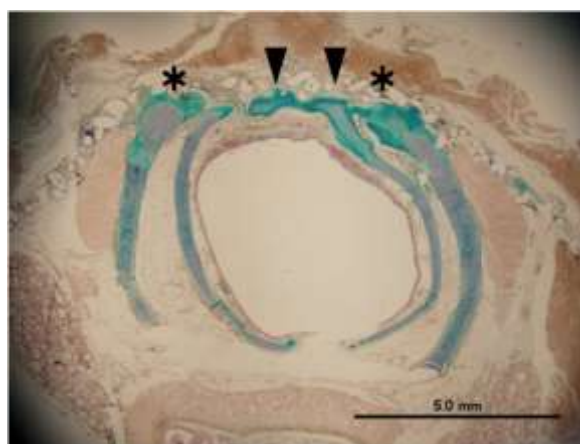
[移植2週間後 新規人工気管モデル]
アルシアンブルー染色
* : 輪状軟骨断端
矢頭：軟骨様組織を認めた

移植8週間後では、新規人工気管モデルで輪状軟骨欠損部に軟骨組織の再生が確認された。再生軟骨は輪状軟骨の切除断端から反対側の切除断端をつなぐように存在しており、気管軟骨の欠損部に再生した軟骨組織と連続し、結果的に輪状軟骨と気管軟骨が癒合するような形態が確認された。強拡大像では軟

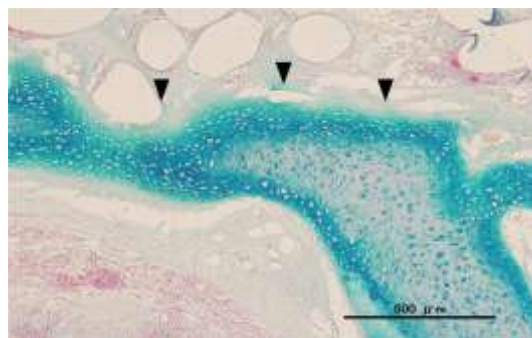
骨細胞、軟骨基質など軟骨組織に特有な形態が確認された。



[移植8週間後 コントロールモデル]
アルシアンブルー染色
* : 輪状軟骨断端
矢印：輪状軟骨欠損部に軟骨再生は認めない



[移植8週間後 新規人工気管モデル]
アルシアンブルー染色
* : 輪状軟骨断端
矢頭：再生軟骨を認めた



[移植8週間後 新規人工気管モデル
強拡大]
アルシアンブルー染色
矢頭：再生軟骨を認めた

我々の過去の研究で、軟骨細胞含有新規人工気管を気管軟骨欠損部に移植し、気管軟骨の再生を確認している。今回の実験では、軟骨細胞含有新規人工気管を用いて喉頭軟骨の再生を確認することができた。自家軟骨を導入した人工気管は気管軟骨の再生のみならず喉頭軟骨の再生にも有用であることが確認された。

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 1 件)

(1) Mika Nomoto, Yukio Nomoto, Yasuhiro Tada, et al. Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of cartilage in a rabbit model. Laryngoscope, 123 (9), 2013, 2195-2201

[学会発表] (計 7 件)

(1) Nomoto Mika, Regeneration of tracheal cartilage by bio-engineered trachea with autologous chondrocytes, American Broncho-Esophagological Association, 2011年4月28日, アメリカ イリノイ州 シカゴ

(2) 野本 美香, 自家軟骨細胞を用いた気管再生の試み、第112回日本耳鼻咽喉科学会、2011年5月20日、京都府

(3) Nomoto Mika, Regeneration of tracheal cartilage using autologous chondrocytes in a rabbit model, 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2011年12月8日, 神戸市

(4) Nomoto Mika, Bio-Engineered Trachea using Autologous Chondrocytes for Regeneration of Tracheal Cartilage in a Rabbit Model, American Laryngological Association, 2012年04月19日, アメリカ サンディエゴ

(5) 野本 美香, 自家軟骨細胞を導入した新規人工気管の開発、第113回日本耳鼻咽喉科学会総会、2012年05月12日, 新潟

(6) Mika Nomoto, Tracheal cartilage regeneration using autologous chondrocytes, The 8th East Asian Conference on Phonosurgery, 2012年12月01日, 韓国

(7) 野本 美香, 自家軟骨細胞付加工気管を用いた気管軟骨の再生、第12回日本再生医療学会、2013年03月23日, 横浜

[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
なし

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・助教
研究者番号：50554416

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし