

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791796

研究課題名(和文) 線維芽細胞増殖因子を用いた気管再建

研究課題名(英文) Tracheal regeneration using fibroblast growth factor

研究代表者

谷 亜希子 (Tani, Akiko)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：30554430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではbipotential scaffold(vitrigel薄膜をコラーゲンスポンジに付加したもの)にbasic fibroblast growth factor(b-FGF)を含有した新たな人工材料を作成し気管再建における上皮化促進、機能面の改善を確認することを目的としている。3種類の人工材料を作成し評価を行った。

計46匹のラットに移植を行い、移植後7日、14日、28日の評価を行った。上皮層における形態、線毛形成の有無、上皮下層における細胞侵入の程度、血管様構造の有無について評価を行い、今回の材料が気管再建に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effectiveness of our scaffold with application of basic fibroblast growth factor(b-fgf) was investigated. Three types of scaffold were made: no b-FGF, 10ng b-FGF, and 100ng b-FGF. At 7,14 and 28 days after implantation in rats, the trachea were removed and histologically evaluated. The regeneration of mucosal epithelium and the subepithelial layer was evaluated.

Our technique for tracheal reconstruction affords a feasible approach for accelerating the regeneration of the intraluminal surface and subepithelial layer of tracheal tissue.

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：気管粘膜再建 ビトリゲル 線維芽細胞増殖因子 コラーゲンスポンジ

1. 研究開始当初の背景

気管は呼吸、発声、嚥下に関わる部位であり、外傷や悪性腫瘍にともなう欠損はそれらに大きな影響を及ぼす。気管の再建方法は自己組織を用いるもの、人工物を用いるもの、様々な方法が報告されているが生着や手術回数が問題となる。我々はコラーゲンスポンジを付加した自己組織再生型人工気管を用いて臨床応用を進めてきた。臨床では気管再建部内腔の上皮化に2ヵ月要している。気道上皮は気道と生体組織の物理的な隔壁であるとともに、気道浄化作用や免疫機能を有しており、上皮化の遅延はこれらの機能回復の遅延を意味する。

2. 研究の目的

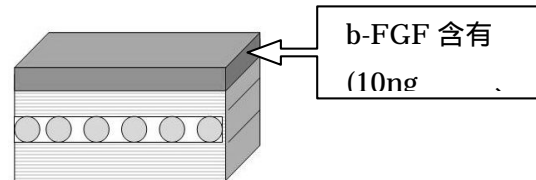
臨床応用で用いている従来の人工気管(ポリプロピレンメッシュで骨格を形成しコラーゲンスポンジが付加された自己組織再生型人工気管)に vitrigel を加えた新たな人工気管:bipotential collagen scaffold を作製した。Vitrigel はコラーゲンから成るが、従来のコラーゲングルと比較し約20倍の強度があり、呼吸や咳などの外的刺激による脱落が回避でき、また表面を平滑にコーティングできるという特色を持つ。この scaffold の作製過程において細胞増殖因子を含有させ、上皮化促進、機能面の改善を確認することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

1)b-FGF 含有 bipotential scaffold の作製

4 型コラーゲンと culture medium を等量混合し(ゾル) dish に 2ml 加える。型コラーゲンと culture medium 混合液する際、さらにラット b - FGF を混合してゾルを作製する。b-FGF の濃度は 10ng、100ng の2種類とする。温度 10℃、湿度 40%以下の恒温器内で 48 時間乾燥させる。PBS を 1dish あたり 2ml ずつ加え 10 分放置後除去する操作

を3回行う。再び 10℃ 40%の条件下で 48 時間乾燥させた後に、室温で保存して硝子化を進行させる。使用する 30 分前に PBS を加え水和させることでコラーゲンスポンジ付き vitrigel を形成させる。(連携研究者: 竹澤)



2)Vitrigel に加えた b-FGF 徐放速度の測定

35mmdish に 2ml の PBS を入れ、それぞれの b-FGF 含有 bipotential scaffold を投入する。Dish は室温で保存し、投入直後、3日後、5日後、7日後の溶液を 5μl ずつ採取する。採取した溶液内の b-FGF を定量するため western blot の手法を用いて測定する。

(研究代表者: 谷)

3)b-FGF 含有 bipotential scaffold を用いた気管再建

SD 系ラット(9週)を用いる。

腹腔麻酔後に頸部切開し、前頸筋を白線で分け気管を露出する。気管前壁に 2×4mm の欠損を作製する。十分に止血を行ったあと、気管欠損部に各濃度の bipotential scaffold で覆い縫合する。(連携研究者: 多田)

4)組織採取

一定の観察期間(移植後7日、14日、28日)の後に気管を摘出する。腹腔麻酔または静脈麻酔で過鎮静の状態とする。前頸部を切開し、前頸筋、食道、反回神経を併せた状態で気管を摘出する。

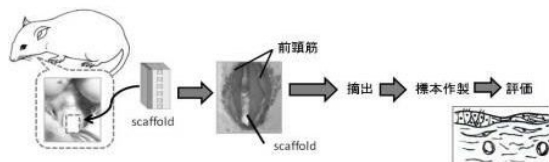
5)標本作製

摘出標本は数日間 10%ホルマリンで固定。気管欠損部を含むよう約 5mm の高さに切除する。カセットに入れギ酸 10%ホルマリンで固定しパラフィン切片を作製する。一部は電子顕微鏡用に標本作製する。

6)組織学的評価

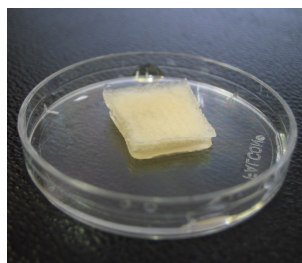
光学顕微鏡を用いて経時的に組織の観察・評価を行う。

コントロール群および b-FGF が 10ng、100ng の各濃度において移植後 7 日、14 日、28 日の状態を評価する。具体的には上皮化の有無、上皮細胞形態、線毛の有無、血管新生の有無、vitrigel 吸収の状態などを評価する。



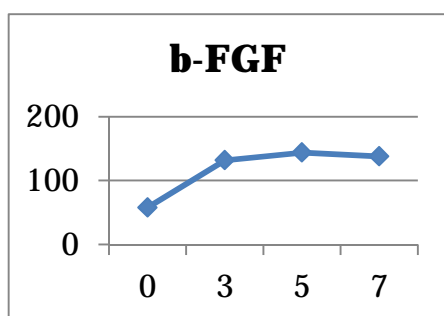
4. 研究成果

1) b-FGF 含有 bipotential scaffold の作製



研究方法のとおり b-FGF の含有濃度を変えた 3 種類の bipotential scaffold を作製した。使用前に PBS を加え再水和を行った。

2) Vitrigel に加えた b-FGF 徐放速度の測定



b-FGF の放出について 0 日、3 日、5 日、7 日後の溶液を採取し、blot 法による定量を行った結果は上記のとおりであった。3 日以降は濃度の変化がなく、3 日以内に b-FGF の放出が行われていると考えられた。作製過程のなかで b-FGF がビトリゲルだけでなくコラーゲンスポンジにも含まれることが要因と判断された。

3) b-FGF 含有 bipotential scaffold を用いた気管再建

Collagen vitrigel sponge	day7	day14	Day28	total
(A)No b-FGF	5	5	8	18
(B)10ng of b-FGF	5	9	7	21
(C)100ng of b-FGF	3	2	2	7

4) 組織採取

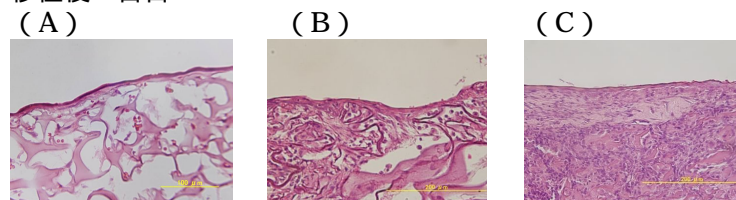
研究方法ととりに施行した。

5) 標本作製

研究方法のとりに施行した。

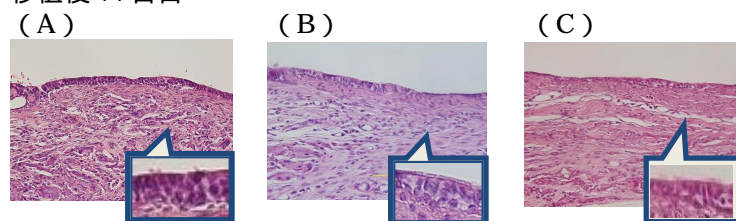
6) 組織学的評価

移植後 7 日目



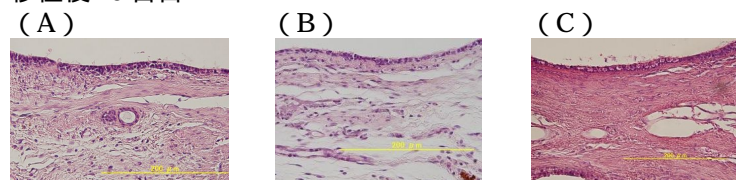
(A) において単層の上皮形成を認め、(B) (C) では上皮形成に加え上皮下層への細胞侵入を多く認めた。

移植後 14 日目



(A) において重層の上皮形成を認め、(B) (C) では線毛が観察できるようになり上皮下層での血管様構造を認めるようになった。(B) に比し、(C) において形成が促進している傾向にあった。

移植後 28 日目



(A) でも線毛形成が確認され、(B) (C) ではすべてに線毛が認められるわけではないが同等の結果が得られた。

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)

Akiko Tani, Yasuhiro Tada, toshiaki Takezawa, ikuo Wada, Mitsuyoshi Imaizumi, Yukio Nomoto, Mika Nomoto, Koichi Omori. Regenerative process of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge scaffold. Laryngoscope 123,p1469-1473, 2013.

[学会発表](計 5 件)

Akiko Tani, Yasuhiro Tada, Toshiaki Takezawa, Mitsuyoshi Imaizumi, Yukio Nomoto, Koichi Omori. Effect of basic fibroblast growth factor for regeneration of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge. Laryngeal Association 2012.

谷亜希子、多田靖宏、竹澤俊明、大森孝一. コラーゲンビトリゲルスポンジを用いた気管粘膜の再生過程. 再生医療学会 2012

谷亜希子、多田靖宏、大森孝一. コラーゲンビトリゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた気管再建. 東北地方部会連合学術講演会 2012

谷亜希子、多田靖宏、大森孝一. 線維芽細胞増殖因子を含有したコラーゲンビトリゲルスポンジによる気管粘膜再生. 日本気管食道科学会 2012

Akiko Tani, Yasuhiro Tada, Toshiaki Takezawa, Mika Nomoto, Yukio Nomoto, Koichi Omori. Evaluation of tracheal epithelium after implantation of a collagen vitrigel spone containing basic fibroblast growth factor. East asia conference of phonosurgery 2012

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

谷 亜希子 (TANI AKIKO)
福島県立医科大学医学部 助手
研究者番号：30554430

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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