

## 総括研究報告書

課題番号：27-8

課題名：組織工学人工気管による小児気道再建と呼吸器系疾患児の QOL の向上に関する研究

主任研究者名 大野 通暢

(所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属・職名) 臓器・運動器病態外科部外科・医師

(研究成果の要約) 小児気道再建を可能とする成長する再生気管の作製のためにブタを用いて、1. 脱細胞気管の作製ならびにパッチ移植 2. インプラント型気管の作製ならびにパッチ移植を行った。1. 脱細胞気管をブタに他家パッチグラフト移植(同種移植)を行った。5週、11週でサンプリングを行ったところ外観所見、内腔所見ではわずかに内腔が狭小化していた。しかし非脱細胞同種移植(コントロール)よりも狭窄の程度は明らかに少なかった。病理組織検査では自家気管移植に比較して気管周囲組織への単核球浸潤が見られたが、非脱細胞気管移植と比較して明らかに単核球浸潤は少なかった。また11週では非脱細胞移植では気管の内部の骨化が著しく構造の破壊がみられたが、脱細胞気管では気管軟骨は自家軟骨とほとんど同じで構造変化は見られなかった。更に興味深いことに移植後11週のモデルで新生気管軟骨が認められた。今年度は6か月、12か月の長期モデルを作製して経過観察中を行った。内視鏡での観察では著明な狭窄の進行は認めず、更なる軟骨の新生が認められた。2. インプラント型気管では耳軟骨より2週間培養した軟骨細胞をポリ乳酸による足場に播種して自己皮下に徐放性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)とともに6週間移植すると皮下に平板状の軟骨再生がみられ、現在その軟骨を自家パッチ移植した。内視鏡観察では内腔の狭窄の程度は軽度であり、病理では軟骨と膠原繊維の混合した像が認められ、強度してはまだ検討の余地があることが示唆された。

## 1. 研究目的

近年、気管疾患(重症新生児疾患の長期気管挿管や気管切開管理による合併症としての気道狭窄、気管切開後の症状改善例に対して気管閉鎖を行った際の気管狭窄、先天性気道狭窄症の治療後の再発や合併症)などにより治療が長期化している患児が多いことが最近の全国調査で明らかとなってきた。このような症例に対し、近年研究の進展がめざましい組織工学気管の応用はきわめて期待のできる治療と考えられる。

具体的には再生気管パッチグラフトを使用して気道狭窄部の拡張を図り、気管切開孔を塞ぐことにより生命の危険を防ぐとともに、患児の生活の質(QOL)を著

しく改善する可能性を高めることである。しかしながら、小児気管の欠損修復の場合、発育に伴う気管の成長を十分に勘案する必要がある。現在までに足場素材として1) 非吸収性素材、2) 吸収性素材、3) 脱細胞化素材が挙げられるが、まだ満足のいく方法はなく、再生気管が児の成長とともに成長するかは重要な課題である。また脱細胞化気管の臨床応用が海外から報告されているが小児例はほとんどない。更に最近開発された吸収性素材を足場にしたインプラント型再生軟骨は成長が期待できる方法である。そこで本研究では脱細胞化気管を体重、体格的に小児に近いと知られている幼若ブタを用いて、脱細胞化気管の他家移植を行

い、気管の再生を観察、臨床応用が可能かどうかを目標とした。

本研究結果から再生気管の成長が確認できれば、気管切開孔の閉鎖、声門下・気管狭窄の内腔拡大へと臨床試験を上げていく予定である。ブタの実験においては厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い研究を進める。

以上より再生工学医療を利用して気道系異常をもつ患児の生命予後の改善ならびに QOL の向上、そして在宅医療・社会復帰への移行を目指す。

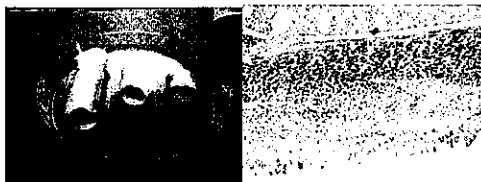
## 2. 研究組織

研究協力者	所属施設
淵本康史	国立成育医療研究センター
絵野沢伸	国立成育医療研究センター
古村 眞	埼玉医科大学
山岡哲二	国立循環器病研究センター
樋口昌孝	国立成育医療研究センター
黒田達夫	慶應義塾大学医学部

## 3. 研究成果

### (1) 脱細胞化気管パッチグラフトの移植ならびに生着後の内視鏡的評価、病理観察

脱細胞化気管の作製：家畜ブタ（芝浦臓器より購入）の気管を 1000MPa で 10min 高処理（ドクターシェフ、神戸製鋼）後、洗浄液①（DNase40000U/L、4gMgCl<sub>2</sub>/L、所定量ペニシリン、in 生食）および洗浄液②（1%SDS in 生食）にて 1, 2, 3, 4, 5, 7 週間洗浄（洗浄液は 3 日おきに交換）。570mg/L の EDTA を添加し脱細胞化した。以下に外観と病理を示す。

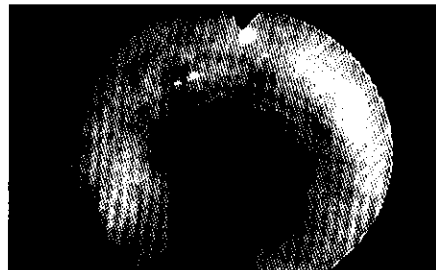


脱細胞化により組織の色素がなくなり、病理所見では変性した核と細胞質が認められた。

作製した脱細胞化気管による同種気管パッチ移植を行い、観察を行った。



11 週で気管支鏡による内腔の維持、狭窄の有無を評価した。



上段は脱細胞化気管移植後の内腔、下段は非脱細胞気管移植後の内腔である。非脱細胞気管の内腔が著明に狭窄していた。

観察後豚を犠牲死させ、病理検査にて上皮細胞や軟骨細胞の変化を観察した。病理所見を示す。

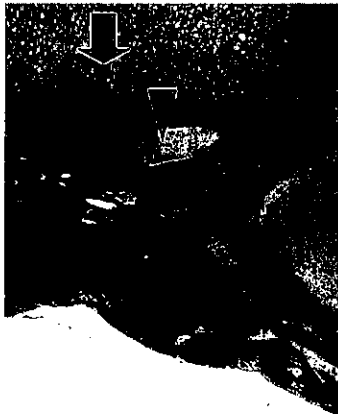


HE 染色所見。脱細胞化気管（左矢印）

はレシピエントの組織よりも好塩基性が淡い。コントロールの非脱細胞気管（右矢印）では他家気管移植片に対しての拒絶反応が強く出現し、移植片の破壊が進んでいた。下図に破壊された軟骨細胞の拡大を示す。



興味深いことに脱細胞化気管移植片（矢印）断端および周囲から軟骨の新生（矢頭）が認められた。



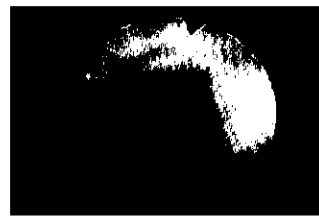
このような現象は下図の非脱細胞気管移植後 11 週の病理所見でも認められた。



図の矢印では一部軟骨が形成されているような所見があるが、同時に内部の骨化がすすんでいる。つまり軟骨の新生が生じる過程で拒絶も生じるので、結局破壊されてしまうと考えている。

以上の結果から脱細胞他家気管は非脱細胞他家気管と比較して拒絶反応が少なかった。また理想的な足場となることで欠損部分の軟骨細胞の再生を促し、広い内腔の気管構造を保つことに寄与していることが推測された。

臨床応用には長期モデルが必要不可欠であり、現在 6 か月、12 か月の長期モデルを作製して経過観察中である。途中経過ではあるが、下図に脱細胞化気管移植後 6 か月の内視鏡、病理所見を載せる。



内視鏡では正常部分と比較するとわずかに狭いが、内腔がしっかり保たれている。



HE 染色では脱細胞化気管の内腔に新生軟骨が認められた（矢頭）。

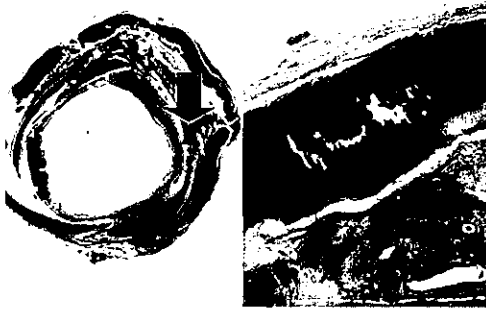
長期のモデルでの気管軟骨の新生が確立されれば臨床応用への道が開けることが予想されたため、引き続き 6 か月、12 か月でのモデルを作製して観察した。



内視鏡では左が脱細胞気管移植 1 年、右が非脱細胞気管移植 1 年である。両者とも内腔の変形が認められたものの、著明な狭窄は進行していなかった。



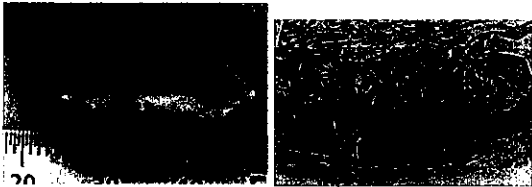
脱細胞気管 1 年の病理を示す。左、レシピエント気管から伸長した新生気管軟骨が脱細胞気管パッチグラフトの内腔を裏打ちしている像が観察できた（矢印）。右、新生気管軟骨の拡大像。



左、非脱細胞気管6か月の病理を示す。こちらレシピエント気管から伸長した新生気管軟骨は認められた(矢印)。右、しかし非脱細胞気管パッチグラフトの破壊は進行していた。

#### (2)インプラント型気管の作製と移植

アテロコラーゲンハイドロゲルとポリ乳酸多孔体によって構成される再生医療用の特殊な素材(足場素材、東京大学ティッシュエンジニアリング部の共同研究)にブタの耳介からの培養軟骨細胞を投与してインプラント型再生軟骨を作成した(下図)。



それを脱細胞化気管と同様にパッチとしてレシピエント気管に吻合した。外観および病理所見を示す。



外観は脱細胞化気管や非脱細胞気管と比較して大きな狭窄はなさそうであった。病理所見では気管特有の輪状形状はあまり保っていないことがわかる。自家組織であり拒絶反応はほとんど認められなかった。



拡大図。連続した構造が保てていない。インプラント型はブタの軟骨細胞をまいた人工足場を皮下から採取するのが、その際軟骨のみを分けて採取することが難しいという難点がある。今後はその形状の維持と長期の経過を評価していくことが重要である。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

全ての動物実験は、科学的かつ倫理的基盤となる3R(Replacement(代替法を考慮)、Reduction(使用数の削減)、Refinement(苦痛・不安の軽減))を念頭に置き、「動物の愛護及び管理に関する法律」と「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、適正に実施する。

1 動物を科学上の利用に供することは、生命科学の進展、医療技術等の開発等のために必要不可欠なものであるが、その科学上の利用に当たっては、動物が命あるものであることにかんがみ、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限り利用に供される動物の数を少なくすること等により動物の適切な利用に配慮すること、並びに利用に必要な限度において、できる限り動物に苦痛を与えない方法によって行うことを徹底するために、動物の生理、生態、習性等に配慮し、動物に対する感謝の念及び責任をもって適正な飼養及び保管並びに科学上の利用に努める。また、実験動物の適正な飼養及び保管により人の生命、身体又は財産に対する侵害の防止及び周辺的生活環境の保全に努めること。2 動物の選定 管理者は、施設の立地及び整備の状況、飼養者の飼養能力等の条件を考慮して飼養又は保管をする実験動物の種類等が計画的に選定されるように努める。