

# 森山正章 論文内容の要旨

## 主 論 文

Successful use of bio plugs for delayed bronchial closure after pneumonectomy in experimental settings

実験モデルにおける細胞構造体（バイオプラグ）を用いた  
肺切除後気管支断端瘻閉鎖に対する新たな治療法の確立

森山正章, 松本桂太郎, 谷口大輔, 町野隆介, 土谷智史, 中山功一, 永安 武

Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery, 2021, doi: 10.1093/icvts/ivab306

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員: 永安 武 教授)

## 緒 言

気管支断端瘻 (Bronchopleural fistula; BPF)は呼吸器外科手術における重篤な合併症の一つであり、その治療は大きく手術療法と気管支鏡下治療に分けられる。手術療法に比べて気管支鏡下治療はより低侵襲であり、瘻孔部への充填剤の挿入を含め様々な手法が報告されているが、未だ確立された方法はない。

中でも自家幹細胞を気管支鏡下に気管支断端瘻へ注入する治療法は、再生医療を応用し瘻孔閉鎖を促進する理想的な方法とされているが、注入した細胞が局所に留まることができず、胸腔内に流出する不安定さが問題となる。

今回我々はこれまで行ってきたバイオ 3D プリンター技術による管腔臓器再生研究を応用し、独自に作製した細胞構造体 (バイオプラグ)を瘻孔に挿入する方法を考案した。

本研究では、ラット BPF モデルを新たに作成し、バイオプラグの最適な細胞ソースの検討を行うとともに、その効果および閉鎖のメカニズムを検討した。

## 対象と方法

ラット (F344、3 週齢)から骨髓由来間葉系幹細胞 (MSCBM)、線維芽細胞 (Fibroblast)を単離、正常ラット肺毛細血管内皮細胞 (RLMVEC)の細胞株は購入して使用した。それぞれの細胞を培養後、細胞塊 (スフェロイド)を作製し、バイオ 3D プリンターを用いて、スフェロイドを融合・固形化させ、細胞混合比の異なる 3

系統のバイオプラグ (MSCBM、MSCBM+ Fibroblast、MSCBM+ RLMVEC) を作製した。そのバイオプラグを別個体の同系統ラット (F344、8-12 週齢) の気管支に挿入し、短期間の観察期間 (2 週) をおいた後に、犠牲死させ、プラグを挿入した気管支を摘出し、評価を行った。Control 群は上記の細胞構造体を挿入しない群とした。さらに MSCBM+ RLMVEC 群については、長期 (6, 8, 12 週) の観察期間をおき、評価を行った。

#### 気管支内腔の閉鎖率

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色にて気管支を染色し、バイオプラグが気管支内腔に占める割合を算出し、閉鎖率を評価した。

#### 組織学的評価

HE 染色のほか、Masson's trichrome 染色、Elastica van Gieson (EVG) 染色、免疫染色 (抗 CD31 抗体、抗 CD68 抗体) にて評価を行った。

#### 長期観察

MSCBM+ RLMVEC 群について、6, 8, 12 週の観察期間をおき、HE 染色で気管支内腔の評価を行った。短期モデルと同様、Masson's trichrome 染色、EVG 染色、免疫染色で評価を行った。

## 結 果

#### 気管支内腔の閉鎖率

気管支内腔の閉鎖率は、MSCBM 群 (0.34)、MSCBM+ Fibroblast 群 (0.27)、MSCBM+ RLMVEC 群 (0.69) であった。Control 群と比較し、MSCBM+ RLMVEC 群で有意に閉鎖率が高かった ( $p < 0.05$ )。

#### 組織学的評価

MSCBM+ RLMVEC 群で CD31 陽性細胞が観察され、CD68 陽性細胞はほとんど観察されなかった。同群では Masson's trichrome 染色、EVG 染色において線維化が確認できた。MSCBM 群および MSCBM+ Fibroblast 群では CD31 陽性細胞はほとんど観察されず、CD68 陽性細胞が観察された。線維化は確認されなかった。

#### 長期観察

術後 12 週まで問題なく生存が確認できた。内腔にはバイオプラグが残存しており、一部に線維化を認めたが、気管支内腔にはスペースができていた。

## 考 察

本研究では、バイオ 3D プリンターによる Scaffold free の充填剤を使用することで、従来の気管支鏡下治療の欠点である異物反応や充填剤の流出等を軽減することができた。しかし、線維芽細胞または間葉系幹細胞で構成されたバイオプラグの場合、マクロファージの貪食が短期間で起こることで閉鎖率が低下した。一方、血管内皮細胞を追加することで閉鎖率が増加した要因として、間葉系幹細胞との相互作用により、成長因子やサイトカインなどのパラクリン因子が分泌され、局所的な血管新生と組織修復が促進されたことでマクロファージによる貪食を抑制できたためと考えられる。

今回の研究において、バイオプラグが気管支断端癒閉鎖の新たな治療手段になる可能性が示唆された。

今後は、バイオプラグの長期生着等の課題を含め、大型動物モデルなど臨床に近いモデルでの検証が必要である。