

## 第 37 回日本小児外科学会秋季シンポジウム

# プログラム・抄録集

会長：金森 豊（国立成育医療研究センター小児外科系専門診療部外科）

会期：2021 年 10 月 30 日（土）

会場：第 1 会場

（ベルサール神田 2F HALL A）

# プログラム

10月30日(土) 第1会場 (2F HALL A)

再生医療総論

8:30~9:00

座長：藤野 明浩 (国立成育医療研究センター小児外科系専門診療部外科)

## 教育講演 小児外科分野における再生医療

梅澤 明弘 国立成育医療研究センター

## シンポジウム 1 [ 気道系再生 ]

9:00~10:35

(発表 8分×4名・教育講演 30分・ディスカッション 30分) 座長：古村 眞 (東京大学大学院医学系研究科組織幹細胞・生命歯科学講座)  
 淵本 康史 (国際医療福祉大学小児外科)

### SY1-1 気道再建における新たな創傷治癒の概念創出のための基礎研究

古村 眞 東京大学大学院医学系研究科組織幹細胞・生命歯科学講座/東京大学大学院医学系研究科小児外科

### SY1-2 気管様組織体の作製と気管再生の未来 独自の細胞自己凝集技術と生体内組織形成術の融合

樋渡 勝平 浜松医科大学病院医学部附属病院小児外科

### SY1-3 幼若豚を用いた脱細胞化気管による気道再建

大野 通暢 さいたま市立病院小児外科

### SY1-4 ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来軟骨を用いた小児気道狭窄に対する新規治療法の開発

淵本 康史 国際医療福祉大学医学部小児外科/国立成育医療研究センター研究所再生医療センター

## 教育講演 気管の再生医療

大森 孝一 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

## シンポジウム 2 [ 泌尿器・多能性幹細胞 ]

10:35~11:55

(発表 10分含質疑×5名・教育講演 30分) 座長：黒田 達夫 (慶應義塾大学小児外科)  
 山高 篤行 (順天堂大学小児外科・小児泌尿生殖器外科)

### SY2-1 膀胱上皮オルガノイド培養における増殖・分化機構の検討

須田 一人 順天堂大学小児外科・小児泌尿生殖器外科

### SY2-2 biosheet と direct reprogramming による誘導筋芽細胞による骨格筋シートの開発～腹壁欠損モデルマウスを用いて～

長野 心太 京都府立医科大学小児外科学教室/京都府立医科大学免疫学教室

### SY2-3 胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞の樹立と胆管細胞への誘導

鈴木 完 獨協医科大学第一外科 (小児外科)/東京大学小児外科

### SY2-4 胎仔脊髄髄膜瘤モデルに対する細胞スフェロイドを用いた再生医療

渡邊 美穂 大阪大学大学院医学系研究科

### SY2-5 iPS 細胞由来培養皮膚による脊髄髄膜瘤の胎児治療法の開発

梶原 一紘 国立成育医療研究センター周産期母性診療センター

**教育講演** ヒト iPS 細胞から腎臓を創る

西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

**シンポジウム 3 [ 消化器再生 ]**

13:00~15:20

(教育講演 30 分・発表 8 分×6 名・教育講演 30 分・ディスカッション 30 分) 座長：奥山 宏臣 (大阪大学大学院医学系研究科小児成育外科)  
中村 哲也 (順天堂大学オルガノイド開発研究講座)

**教育講演** オルガノイド利用腸上皮置換による再生医療

中村 哲也 順天堂大学オルガノイド開発研究講座

**SY3-1** 羊水中幹細胞による虚血再灌流腸管障害モデルラットに対する治療効果メカニズムに関する検討 (続報)

小池 勇樹 三重大学医学部附属病院消化管・小児外科/Division of General and Thoracic Surgery, The Hospital for Sick Children, University of Toronto

**SY3-2** 肝細胞増殖因子 (HGF) による腸粘膜上皮再生への試み—完全静脈栄養ラットモデルを用いた小腸粘膜上皮へ与える効果に関する検討—

杉田 光士郎 鹿児島大学学術研究院医歯学域医学系小児外科学分野

**SY3-3** 無血清培地による切除腸組織由来小児小腸オルガノイド培養方法の確立

松本 有加 順天堂大学小児外科

**SY3-4** In vitro 共培養モデルを用いたマウス腸管神経幹細胞の発生過程の検証

藤原 なほ 順天堂大学医学部小児外科学・小児泌尿生殖器外科

**SY3-5** hypoganglionosis に対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞移植による新規治療法開発

吉丸 耕一郎 九州大学大学院医学研究院小児外科学分野

**SY3-6** 先天性食道閉鎖症術後難治性吻合部狭窄に対する自己口腔粘膜由来シート移植術の臨床研究

渕本 康史 国際医療福祉大学医学部小児外科/国立成育医療研究センター外科

**教育講演** オルガノイド医学が開く新しい小腸再生医療の外科的手法の展開

小林 英司 東京慈恵会医科大学腎臓再生医学講座/慶應義塾大学医学部臓器再生医学寄附講座

**シンポジウム 4 [ 皮膚再生 ]**

15:30~17:05

(発表 5 分×7 名・教育講演 30 分・ディスカッション 30 分) 座長：金森 豊 (国立成育医療研究センター小児外科系専門診療部外科)  
田尻 達郎 (九州大学大学院医学研究院小児外科学分野)

**SY4-1** 抗菌性創傷被覆保護剤により臍帯羊膜の上皮化を得た後に待機的腹壁閉鎖術を行った巨大臍帯ヘルニアの 2 例

南 洋輔 福島県立医科大学附属病院小児外科

**SY4-2** 複数のストマが存在した肝臓脱出を伴う巨大臍帯ヘルニアに対する上皮化の工夫

山田 洋平 慶應義塾大学外科学 (小児)

**SY4-3** 巨大臍帯ヘルニアの保存加療中に予想外の経過を辿ったものの皮膚で被覆し得た一例

出家 亨一 北里大学病院小児外科

**SY4-4** ヘルニア嚢を上皮化させた巨大臍帯ヘルニアの 3 例

吉田 真理子 東京大学医学部附属病院小児外科

- SY4-5** 脱出臓器還納困難に加えて様々の合併症を認めたが人工真皮を用いることで腹壁閉鎖に成功した 1 例  
堀池 正樹 日本赤十字社和歌山医療センター小児外科
- SY4-6** 段階的手術での可及的腹壁筋層形成後の人工真皮による完全腹壁上皮化が有効であった巨大臍帯ヘルニアの一例  
森 禎三郎 国立成育医療研究センター外科
- SY4-7** 巨大臍帯ヘルニアの上皮化促進を目指した biosheet による皮膚再生の研究  
鈴木 啓介 東京大学大学院医学系研究科小児外科学
- 教育講演** 広範囲皮膚欠損に対する治療：人工真皮・培養表皮・その他の再生医療  
彦坂 信 国立成育医療研究センター形成外科

## 再生医療総論

### 教育講演

## 小児外科分野における再生医療

国立成育医療研究センター

梅澤 明弘

再生医療を支える幹細胞技術は発生学、工学によって培われ、幹細胞技術のひとつひとつの要素を必要なものと組み合わせることで再生医療は完成する。再生医療における製剤は細胞であり、このような細胞組織医薬品は、細胞や組織から構成された生物製剤であり、開発が著しく進展している。再生医療・遺伝子治療は欧州・米国・韓国を中心に複数品目が承認されている。承認された再生医療等製品は細胞移植（自家、他家）、ex-vivo 遺伝子治療、in-vivo 遺伝子治療、in-vivo ウィルス治療があり、欧州は 44 製品、韓国 23 製品、カナダ 3 製品、シンガポール 3 製品、オーストラリア 3 製品、ニュージーランド 3 製品、カナダ 3 製品、米国 29 製品となり、多くの製品が米欧を中心に上市されている。自家の細胞移植が目立ち、米国では他家の細胞移植も多い。我が国で承認されている再生医療製品は 7 製品であり、最大約 3,300 万円の薬価がついている。いわゆるキレの良い製品を利用した再生医療が一気呵成に進むと予想しており、今後の展開が楽しみである。

## SY1-1 気道再建における新たな創傷治癒の概念創出のための基礎研究

- 1) 東京大学大学院医学系研究科組織幹細胞・生命歯科学講座
- 2) 東京大学大学院医学系研究科小児外科
- 3) 帝京大学先端総合研究機構
- 4) 帝京大学医学部外科

○古村 眞<sup>1,2)</sup>、横手 芙美<sup>2,4)</sup>、藤代 準<sup>2)</sup>、  
田沼 唯士<sup>3)</sup>、渡邊 智博<sup>4)</sup>、山内 良兼<sup>4)</sup>、  
坂尾 幸則<sup>4)</sup>、川村 雅文<sup>4)</sup>

【はじめに】手術創の一次創傷治癒は、出血凝固期、炎症期を経て、線維芽細胞の遊走にて細胞外マトリックス構築による肉芽組織が形成され治癒する。我々は、家兎の気道壁を再生軟骨にて再建する際、本来の気管軟骨と再生軟骨が軟骨で接合することを報告した (Laryngoscope. 2013)。また、軟骨細胞を増殖させる線維芽細胞成長因子 (b-FGF) を気管に投与すると、気管軟骨再生による成長促進が誘導され、維持されることを報告した (J Pediatr Surg. 2018)。再生過程の軟骨を伴う気道再建術は、縫合部位が肉芽組織による接合ではなく軟骨で接合する創傷治癒が可能なのではと考えた。本研究では、b-FGF を投与し再生過程の軟骨を誘導し軟骨吻合を行い、軟骨によって接合する創傷治癒が可能か検討することを目的とした。

【方法】体重 2kg ニュージーランド白色家兎を全身麻酔下に頸部正中切開し、第 10 軟骨輪を全周性に切離して、b-FGF 合計 25 $\mu$ g を気管軟骨断端の粘膜下層に局注し、6-0 非吸収糸にて 7 針で気管-気管吻合した (n=6)。コントロール群は、同様の気管-気管吻合のみを行った (n=6)。移植 4 週後に気管を摘出し、組織学的検討、タンパク定量、強度測定を行った。

【結果】組織学的には、コントロール群は第 9 軟骨輪と第 11 軟骨輪が肉芽組織で接合するが、FGF 投与群では軟骨組織で接合した。引張強度試験では、FGF 投与群の吻合部強度が有意に増大した (p=0.0488)。吻合部のコラーゲンタイプ 2 とグリコサミノグリカンは、有意に増加しており (p=0.0050、p=0.0086)、コラーゲンタイプ 1 は有意に減少していた (p=0.0115)。

【まとめ】気管軟骨の吻合部へ b-FGF の局注は、肉芽組織ではなく新生軟骨による新たな創傷治癒形態を誘導し、従来の創傷治癒よりも力学的強度を増大させることを示した。

## SY1-2 気管様組織体の作製と気管再生の未来 独自の細胞自己凝集技術と生体内組織形成術の融合

- 1) 浜松医科大学病院医学部附属病院小児外科
- 2) 大阪大学大学院医学系研究科小児成育外科学
- 3) 岡山理科大学フロンティア理工学研究所
- 4) バイオチューブ株式会社

○樋渡 勝平<sup>1)</sup>、岩崎 駿<sup>2)</sup>、出口 幸一<sup>2)</sup>、  
岩井 良輔<sup>3)</sup>、中山 泰秀<sup>4)</sup>、奥山 宏臣<sup>2)</sup>

生体気管を模した管腔構造と強度を有する scaffold-based tissue engineered trachea の気管再生への応用が期待され、すでに臨床応用例も報告されている。しかしこれまで scaffold に起因する異物反応による再狭窄や逸脱などの問題がある。また、scaffold-free の気管様組織体が得られれば理想的であるが、その場合は強度に加えて機能する毛細血管網が無ければ組織は変形と同時に壊死してしまう。本研究では対象動物をラットとし、まず独自の細胞自己凝集化技術 (cell-self aggregation technology ; CAT) を用いて、リング形状の軟骨組織体を培養皿ベースで簡便に構築した。これを円筒形のシリコーン材と組み合わせラットの皮下に埋入することで、生体内において組織を形成するといった技術 (in-body tissue architecture ; iBTA) を用い、軟骨リングが毛細血管網を有する fibroblast produced collagen fiber membrane を介して連結した in-body tissue engineered trachea (iTET) を得ることに成功した。この iTET は、内包した軟骨リングにより、ラット生体気管と同等の管腔保持力を有していた。これを全周性に自家移植すると、組織壊死を生じることなく生着し、8 カ月後には軟骨リングは分解されず維持された状態で、線毛上皮や粘液産生を伴う杯細胞・腺細胞が移植部位全長に渡り内腔表面を覆っており、全ての構造機能成分を含む気管の再生が達成された。このような scaffold-free の組織において再生された組織は組織の成長をも可能とする、真の再生医療を切り開くと期待される。

### SY1-3 幼若豚を用いた脱細胞化気管による気道再建

- 1) さいたま市立病院小児外科
- 2) 国際医療福祉大学小児外科
- 3) 国立成育医療研究センター先端医療研究室
- 4) 東京大学大学院医学系研究科
- 5) 国立循環器病研究センター
- 6) 慶應義塾大学小児外科

○大野 通暢<sup>1)</sup>、瀧本 康史<sup>2)</sup>、許 懐哲<sup>3)</sup>、  
絵野沢 伸<sup>3)</sup>、古村 眞<sup>4)</sup>、古村 浩子<sup>4)</sup>、  
山岡 哲二<sup>5)</sup>、黒田 達夫<sup>6)</sup>

**【目的】** 先天性気管狭窄症や気管切開後の気道狭窄に対する治療は構造や機能面での問題から、非常に修復が難しい。近年様々な人工器官が開発されており、今回我々は高圧処理による同種脱細胞気管を用いた研究を行ったので、その効果を評価する。

**【方法】** 5 週齢の豚を使用して全身麻酔下に気管約 1/2 周、約 1.5cm 切除した。そこに同種気管をパッチグラフトとして縫合移植した。同種気管パッチグラフトは高圧脱細胞気管、非脱細胞気管を用いて比較対照を行った。生存週数は非免疫抑制下で移植後 5 週、11 週、1 年で犠牲死させサンプリングした。サンプリング時に気管支鏡ならびに病理組織学的検査を行い評価した。

**【結果】** 移植後 5 週、11 週、1 年とも全ての豚は気道症状の増悪を認めなかった。気管内腔所見は、非脱細胞気管、脱細胞気管ともに移植後内腔の狭窄が認められた。病理組織学的所見では脱細胞化気管は移植気管周囲組織に単核球浸潤が少なかったが、非脱細胞気管は移植気管組織への著しい単核球浸潤を認めた。また非脱細胞気管は移植後 5 週からその軟骨の中心部に骨化がおこり、11 週になると更に破壊が進み消失してしまう所見が認められた。また脱細胞気管、非脱細胞気管とも気管パッチグラフトに沿ってその内腔に新たな線毛上皮、膠原繊維が見られた。更に脱細胞気管では気管パッチグラフトに沿って新しい軟骨芽細胞の再生が認められた。

**【まとめ】** 我々の使用した高圧脱細胞化気管は拒絶が少なく、自家気管の軟骨や組織の再生を促すことが認められた。臨床応用が可能な人工気管として、今後の研究が期待される。

### SY1-4 ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来軟骨を用いた小児気道狭窄に対する新規治療法の開発

- 1) 国際医療福祉大学医学部小児外科
- 2) 国立成育医療研究センター研究所再生医療センター
- 3) 東京大学医学部附属病院ティッシュエンジニアリング部

○瀧本 康史<sup>1,2)</sup>、絵野沢 伸<sup>2)</sup>、伊藤 怜<sup>2)</sup>、  
陳 俊龍<sup>2)</sup>、古村 眞<sup>3)</sup>、梅澤 明弘<sup>2)</sup>

先天性声門下狭窄症は輪状軟骨の形成異常によって気道内腔の狭小化が認められる原因不明の希少性疾患である。また新生児医療の予後改善により長期気管内挿管による抜管困難症や後天性声門下狭窄症も問題となっている。両疾患とも狭窄部に十分な大きさおよび強度を持ったパッチグラフトを移植することにより狭窄部を拡げ、内腔を確保することが一つの解決方法である。

我々は先行研究として、ブタを用いて超高圧力処理を経て、脱細胞化同種気管を作製した。全身麻酔下にてブタの気管の約半周を切除し、脱細胞化気管を同種パッチグラフトとして縫合した。術後、有害事象は出現せず、6 か月、12 か月後において非脱細胞 (新鮮) 同種気管では気管内腔の狭小化ならびにグラフト気管の破壊像がみられたのに対して、脱細胞同種気管では内腔の狭小化もほとんど認められず、病理組織においても自己再生軟骨が進展している所見を得た。しかし、同種気管グラフトを入手にはヒト死体気管からの採取が必要であり、本邦では解決すべき問題が多い。多能性幹細胞から軟骨細胞に分化させる方法が確立してきた現在では、胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来軟骨は iPS 細胞由来軟骨と同様に軟骨のソースとして注目されている。近年、我々はヒト ES 細胞から軟骨細胞へ効率的に分化誘導するのみでなく、気管パッチグラフトに使用可能な三次元的なヒト ES 細胞由来軟骨組織の構築に成功した。従来、軟骨細胞は核外マトリックスに覆われ、免疫原性が弱いと報告されている。現在、ヒト ES 細胞由来軟骨組織が臨床応用できるかを確認するために免疫不全ラット気管にパッチ移植をして気管壁としての機能評価をおこなっているので報告する。

## 教育講演 気管の再生医療

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

○大森 孝一

喉頭・気管は呼吸、嚥下、発声という生命維持や社会生活に必須の機能を担っている。悪性腫瘍、炎症性疾患、先天異常、外傷やその治療後には、組織の欠損や機能障害を生じる場合がある。従来、様々な外科的気道再建法やステントによる管腔保持手法が開発されてきたが、多段階手術やドナー組織の必要性、移植組織の不安定さ、術後管理の困難さなどから、広く普及する方法は確立していない。

京都大学ウイルス・再生医科学研究所の中村らは、目的とする組織を生体内で再生させる手法 (*in situ* tissue engineering) を用い、足場をイヌに移植して気管、食道、胃、小腸、末梢神経などの組織再生を報告してきた。生体内組織再生誘導型の人工気管は、気道としての管状の枠組みを保持するため非吸収性のポリプロピレン製メッシュを管状にして同素材のリングで補強し、組織再生の足場として管の内外表面に吸収性コラーゲンスポンジを架橋して付着させた。この人工気管を用いてイヌの気管や輪状軟骨弓部の置換手術を実施し、安全性と有効性を確認した。

2002年、施設内倫理委員会の承認を得て、輪状軟骨部・頸部気管再生医療としてヒトへの臨床応用を開始した。観察期間は8ヵ月から最長12年10ヵ月で、気道の枠組みは保持され、組織再生はほぼ良好な経過であった。広く臨床応用する目的で薬機法承認と保険収載を目指し、Class IV 医療機器として GLP 準拠の生物学的安全性試験を行い、QMS 準拠の製造体制を構築し、GCP 準拠で2017年3月より医師主導治験を行った。現在は製販企業が医療機器としての薬機承認を目指して準備を進めている。

本人工気管の課題として、内腔の上皮化に約2ヵ月を要する点、基本骨格のポリプロピレンは非吸収性であり成長する小児への適応がない点がある。上皮化促進や軟骨再生など、より効果的な気道再生技術開発を目指した探索的研究についても紹介する。

## SY2-1 膀胱上皮オルガノイド培養における増殖・分化機構の検討

- 1) 順天堂大学小児外科・小児泌尿生殖器外科  
2) 順天堂大学医学研究科オルガノイド開発研究講座

○須田 一人<sup>1)</sup>、松本 有加<sup>1)</sup>、越智 崇徳<sup>1)</sup>、古賀 寛之<sup>1)</sup>、山高 篤行<sup>1)</sup>、中村 哲也<sup>2)</sup>

【目的】二分脊椎や膀胱尿管逆流症において、膀胱上皮の分化・増殖異常が病態に関わることが示唆されている。近年、正常な膀胱上皮を3次的に培養するオルガノイド技術が進み、膀胱上皮機能やヒト疾患病態解析のツールとして期待される。本研究では、マウス膀胱上皮を安定してオルガノイド培養する系を確立し、培地への添加因子である fibroblast growth factor (FGF) 10 及び FGF7 が増殖と分化に及ぼす作用を検討した。

【方法】C57BL/6 マウスの膀胱上皮を単離し条件検討を行った。既報に沿って FGF10、FGF7、及び A83-01 を上皮細胞集団に添加してオルガノイド培養が可能となった。次に、FGF10 と FGF7 の両者 (FGF10+FGF7)、FGF10 のみ (FGF10 単独)、あるいは FGF7 のみ (FGF7 単独) を加えて培養を行った。これら3条件での培養を一週間継続してオルガノイド数および含まれる生細胞数を評価し、さらに mRNA を抽出し qPCR で増殖・分化関連分子発現を解析した。

【結果】FGF10 単独と FGF7 単独では FGF10+FGF7 に比して増殖が低下し、増殖因子である Pcn1 と Ccne の発現が有意に低下していた。興味深いことに、膀胱上皮バリア機能に関連する分化因子である Cldn3 や Upk ファミリー分子の発現は、FGF10 単独群では変化がないものの、FGF7 単独群では有意に上昇した。3条件でのオルガノイド培養を4週継続した実験、或いは FGF10 と FGF7 を単独で添加する濃度を変えた実験でも同様の結果であった。

【結語】膀胱オルガノイド培養系を構築し、FGF10 と FGF7 が共に膀胱上皮細胞増殖を促進するものの、FGF10 に比べ FGF7 が高い分化促進能を有することを明らかにした。本研究をさらに進めることは、膀胱上皮増殖・分化異常を伴う泌尿器疾患の病態解明に重要と考える。

## SY2-2 biosheet と direct reprogramming による誘導筋芽細胞による骨格筋シートの開発～腹壁欠損モデルマウスを用いて～

- 1) 京都府立医科大学小児外科学教室  
2) 京都府立医科大学免疫学教室

○長野 心太<sup>1,2)</sup>、文野 誠久<sup>1)</sup>、廣畑 吉昭<sup>1)</sup>、高山 勝平<sup>1)</sup>、金 聖和<sup>1)</sup>、東 真弓<sup>1)</sup>、青井 重善<sup>1)</sup>、古川 泰三<sup>1)</sup>、岸田 綱郎<sup>2)</sup>、松田 修<sup>2)</sup>、田尻 達郎<sup>1)</sup>

【目的】先天性腹壁欠損や横隔膜ヘルニアの補填材料として、成長性のある自己組織由来シートの開発が望まれている。我々はヒト線維芽細胞 (HDF) への遺伝子導入による高効率なヒト筋芽細胞 (dMBs) への direct reprogramming 技術を開発し、SCID マウス皮下での生着を報告した (Wakao, et al : Biochem Biophys Res Commun, 2017)。今回、dMB およびマウス由来筋芽細胞 (mouse-dMBs) と、生体内組織形成による biosheet を用いた骨格筋シート作成を試みたので報告する。

【方法】dMBs は HDF に MyoD と L-myc を共導入し作成し、Myogenin と CK-M を強発現する多核細胞形成を確認した。また、MyoD をマウス未分化線維芽細胞 (MEF) に導入し mouse-dMBs を作成した。Biosheet はマウス皮下にシリコン鑄型を埋没し作成した。これらの筋芽細胞の Biosheet 上での生着を検証し、マウス腹壁欠損モデルへの移植を行った。

【結果】dMBs を Biosheet 上に播種し、SCID マウス腹壁欠損部へ移植したところ、術後 14 日に筋線維様構造物がまばらに生着していることが確認された。ついで、コラーゲンコーティングを施した Biosheet 上に MEF を播種し、レトロウイルスを用いて transfection して biosheet 上で遺伝子導入を行い、形質誘導された mouse-dMBs がシート上に生着することを確認した。さら GFP を共導入して作成したシートを C57BL/6 マウス腹壁欠損部に移植したところ、14 日後に Biosheet 辺縁に生着した細胞が確認された。

【考察】今回の研究から、筋芽細胞への direct conversion と Biosheet による自家組織による骨格筋シート開発の可能性が示唆された。今後、臨床応用できるような改良を目指す。

### SY2-3 胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞の樹立と胆管細胞への誘導

- 1) 獨協医科大学第一外科 (小児外科)
- 2) 東京大学小児外科
- 3) 理化学研究所バイオリソースセンター
- 4) 東京大学定量生命科学研究所

○鈴木 完<sup>1,2)</sup>、藤代 準<sup>2)</sup>、林 洋平<sup>3)</sup>、木戸 丈友<sup>4)</sup>、  
山口 岳史<sup>1)</sup>、荻野 恵<sup>1)</sup>、松寺 翔太郎<sup>1)</sup>、  
渡邊 峻<sup>1)</sup>

胆道閉鎖症 (以下 BA) の原因に関して、先天的要素、遺伝的要素、感染、免疫異常、アポトーシスなどが示唆されているが現段階で不明である。BA 患者から樹立した iPS 細胞を用いて BA の病態解明を目指し研究倫理審査にて承認を得たうえで BA 特異的 iPS 細胞を用いて病態解明を目指している。現時点での進捗状況を報告する。

BA 患者の末梢血から単核球を遠心分離、培養を行い、リプログラム因子 (エピソームプラスミド DNA ベクター) を導入して iPS 細胞化し、iPS 細胞様コロニーを単離し、細胞株凍結保存ストック作製、ゲノム DNA 抽出を経て、現在までに 6 症例で iPS 細胞樹立を行った。iPS 細胞特性解析/選抜試験として、①エピソームプラスミド残存試験 (選抜試験)、②核型検査、③自己複製確認、④多能性確認を行った。一方で、①にて選抜した 4 症例 (4 株) について胆道閉鎖特異的 iPS 細胞由来肝前駆細胞の誘導実験を行った。iPS 細胞株に ActivinA を加え 5 日培養し内胚葉系に誘導し、BMP4、FGF2 を加えて 5 日で肝細胞系に誘導、HGF を加えて 5 日 immature hepatocyte へ、さらに OSM を加え 5 日間で mature hepatocyte へ誘導した。誘導した BA 特異的 iPS 細胞由来肝前駆細胞を増幅させたところ、増幅率に症例による差がみられたが、現時点ではもともとの iPS 株によるものか、実際の誘導効率の差なのかは検討できていない。さらに、増幅した CPM 陽性肝前駆細胞をゲル内培養し、胆管上皮細胞へ誘導したところ、4 症例由来の 4 株とも胆管上皮細胞の誘導は可能であった。

BA 特異的 iPS 細胞の樹立は可能であり、選別した iPS 細胞から肝前駆細胞の樹立、胆管上皮細胞への誘導も可能であることは確認できているが株 (クローン) 間の差など検討事項は解決できておらず、これまでの課程で BA の病態解明に関わるような成果は得られていない。今後は樹立した iPS 細胞を用いて遺伝子変異解析や胆管樹形成過程の異常の有無について研究を進めていく予定である。

### SY2-4 胎仔脊髄髄膜瘤モデルに対する細胞スフェロイドを用いた再生医療

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科
- 2) The Department of Surgery and Children's Center for Fetal Research, Children's Hospital of Philadelphia
- 3) 立命館大学理工学部機械工学科

○渡邊 美穂<sup>1)</sup>、W Alan Flake<sup>2)</sup>、小西 聡<sup>3)</sup>

【目的】脊髄髄膜瘤は神経管閉鎖不全が原因で発生する二分脊椎の重症型である。神経損傷は、胎生期に化学的・物理的・刺激により徐々に非可逆的に進行することが知られており、現在妊娠中期の胎児手術が施行されているが十分な神経温存を得られていない。より早期の胎児治療により神経予後のさらなる改善が期待でき、胎児早期にも適応できる低侵襲な胎児再生医療が次世代治療として期待される。我々はこれまでゼラチンハイドロゲルを用いた再生誘導により髄膜瘤閉鎖が可能であることを示した。今回脊髄神経をより早く温存できる方法として細胞スフェロイドを用いて脊髄髄膜瘤の露出脊髄上に組織のカバーを作成することを試みた。

【方法】細胞スフェロイドは EZ SPHERE culture dish を用いて作成した。レチノイン酸誘導ラット胎仔脊髄髄膜瘤短期モデルでは、In vitro で細胞スフェロイドブロックを作製し髄膜瘤部分に貼布したグループと、細胞スフェロイドを髄膜瘤に直接注入したグループを作成し比較検討した。又、手術的に作成した羊胎仔脊髄髄膜瘤長期モデルでは、細胞スフェロイドを脊髄髄膜瘤部分上に注入固定し評価を行った。

【結果】ラットモデル、羊モデル両方において、細胞スフェロイドは低酸素低栄養の羊水環境内においても、生存し一塊となった組織として認められた。スフェロイドブロック、注入した細胞スフェロイド共に、胎児組織との融合や新生血管再生を伴う表皮細胞の進展を認め、脊髄髄膜瘤は新生組織で覆われていた。羊モデルにおいても、髄膜瘤上に新生表皮を伴う厚みのある新生組織と、より厚みのある残存脊髄を認めた。

【考察】本研究は、胎仔脊髄髄膜瘤の露出脊髄上に細胞スフェロイドを用いて組織再生を誘導することが出来、残存脊髄を温存できる可能性を示した。現在は、胎児鏡下に注入するためのデバイスを開発中である。

## SY2-5 iPS 細胞由来培養皮膚による脊髄髄膜瘤の胎児治療法の開発

- 1) 国立成育医療研究センター周産期母性診療センター
- 2) 国立成育医療研究センター再生医療センター
- 3) 東京慈恵会医科大学産婦人科学講座

○梶原 一紘<sup>1)</sup>、高橋 有希子<sup>2,3)</sup>、阿久津 英憲<sup>2)</sup>、  
左合 治彦<sup>1)</sup>、梅澤 明弘<sup>2)</sup>、岡本 愛光<sup>3)</sup>

**【目的】** 脊髄髄膜瘤では脊髄が羊水中に暴露されるため、生後に不可逆的な神経障害をきたす。胎児期に欠損部を縫合し脊髄を保護する直視下胎児手術が行われ、神経障害は低減された。しかし直視下胎児手術は子宮を大きく切開するため、早産や破水、常位胎盤早期剥離など健康な母体に重篤な合併症をきたした。そのため、我々は低侵襲的に脊髄を保護できる skin graft を用いた新規胎児治療法を開発することを目標とした。

**【方法】** 双胎間輸血症候群患者から得られた羊水由来細胞から iPS 細胞を樹立した。羊水由来 iPS 細胞から短期間に機能的なケラチノサイトを回収する分化誘導法の構築のため詳細な条件検討を行った。さらに iPS 細胞由来ケラチノサイトを人工真皮上で約 2 週間 3D 培養し、iPS 細胞由来 3 次元培養皮膚を作製した。得られた iPS 細胞由来培養皮膚をレチノイン酸誘導ラット胎仔脊髄髄膜瘤モデルの皮膚欠損部に移植し、生後に組織切片で皮膚の再生を評価した。

**【結果】** 羊水由来細胞から樹立された iPS 細胞は *in vitro* および *in vivo* で分化多能性を有していた。至適分化誘導条件検討の結果、Epithelial growth factor と Rock inhibitor の両者の併用が分化誘導効率を著しく向上させることを発見した。iPS 細胞由来 3 次元培養皮膚は正常皮膚に類似した積層化構造を呈し、KRT 14、P63 や Laminin-5 を発現していた。脊髄髄膜瘤ラット胎仔モデルに移植したところ、培養皮膚は羊水中であっても出生後まで皮膚欠損部を保護し、さらに皮膚欠損部のラット表皮が伸長している所見が得られた。

**【結語】** iPS 細胞を用いた iPS 細胞由来培養皮膚移植が脊髄髄膜瘤の有効な胎児治療法になり得る可能性が示された。

## 教育講演 ヒト iPS 細胞から腎臓を創る

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

○西中村 隆一

腎不全による人工透析患者数は 33 万人、その医療費は年間 1.5 兆円を越えている。腎臓を作るにはネフロン前駆細胞と尿管芽の二つが必須であり、前者からは糸球体と尿細管が、後者からは集合管・尿管が形成される。我々は腎臓の正しい起源を同定することによって、ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を経由して糸球体および尿細管を誘導できることを報告した (Cell Stem Cell 2014)。ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞をマウスに移植すると、ヒト糸球体がマウス血管と接続して糸球体上皮の成熟が進む。これらの技術を応用することによって、先天性ネフローゼ症候群の患者由来 iPS 細胞からネフロンオルガノイドを誘導して糸球体の異常を再現した (Stem Cell Rep 2018)。さらに、もう一つの腎臓前駆組織である尿管芽の誘導にも成功し、分岐する集合管の周囲にネフロンが配置された腎臓本来の構造をマウスでは再構築できることを示した (Cell Stem Cell 2017)。また多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞から作ったヒト尿管芽オルガノイドを用いて嚢胞形成を再現した (J Am Soc Nephrol 2020)。一方で、間質前駆細胞という 3 つ目の前駆細胞の重要性が判明したため、これを誘導することで高次構造をもったヒト腎臓の作製を目指している。本講演ではこれらの知見に加えて世界の研究情勢をわかりやすく解説する。

## 教育講演 オルガノイド利用腸上皮置換による再生医療

順天堂大学オルガノイド開発研究講座

○中村 哲也

腸上皮を細胞外基質に包埋し適切な環境で培養すると、細胞集団の自己組織化で3次元的に構築される腸上皮オルガノイドを作成できる。本法では小腸上皮、大腸上皮、あるいは胎児腸上皮など元来の性質を保持したまま上皮の体外維持増幅が可能となる。一方多能性幹細胞から、腸上皮に加え非上皮成分を含む混合タイプの腸オルガノイドも作成可能となり、目的により種々のオルガノイドが利用できる状況にある。

オルガノイドを用いる腸再生医療研究が進みつつある。以前にわれわれは、大腸炎を誘導したマウスに大腸上皮オルガノイドを注腸移植すると移植細胞で上皮修復・再生できることを示した(Nat Med 2012)。その後慶應大と共同で、ヒト大腸上皮オルガノイドも動物個体内で腸上皮構築能をもつことを示した(Cell Stem Cell 2018)。これを受け、内視鏡検査で得る生検検体からヒト大腸オルガノイドを培養し、炎症性腸疾患治療に用いる臨床研究が進みつつある。小腸上皮再生研究も進んだ。面白いことに、小腸上皮オルガノイドを大腸に移植したマウスでは、移植細胞が長期にわたり異所性に小腸形質を維持した(Genes Dev 2014)。この結果は、重篤な短腸症候群患者に対し、小腸切除の時点で本人の小腸上皮を採取し保存し、いずれかの時点で残存大腸を小腸オルガノイドで置換することが新しい機能再生治療となる可能性を示しており、世界的にも研究が進みつつある。

重篤な腸管不全に対するオルガノイド利用再生医療開発にはさまざまなアプローチがある。上記残存大腸の小腸上皮置換により小腸機能再生を図る方法以外にも、多能性幹細胞から作成したオルガノイドを成熟させ腸管に吻合する試みなどもある。異なるアプローチで進むこれら再生研究の進展により、多様な腸疾患に対し多様なオルガノイド利用再生医療が開発されることが強く期待される。

## SY3-1 羊水中幹細胞による虚血再灌流腸管障害モデルラットに対する治療効果メカニズムに関する検討 (続報)

1) 三重大学医学部附属病院消化管・小児外科

2) Division of General and Thoracic Surgery, The Hospital for Sick Children, University of Toronto

○小池 勇樹<sup>1,2)</sup>、Bo Li<sup>2)</sup>、三宅 啓<sup>2)</sup>、Carol Lee<sup>2)</sup>、佐藤 友紀<sup>1)</sup>、長野 由佳<sup>1)</sup>、松下 航平<sup>1)</sup>、内田 恵一<sup>1)</sup>、問山 裕二<sup>1)</sup>、Agostino Pierro<sup>2)</sup>

【目的】我々はこれまでに羊水中幹細胞(Amniotic fluid stem cell, AFSC)は、虚血再灌流により惹起される腸管障害(IR injury)に対して治療効果が得られることを報告してきた。今回、その治療効果がみられるメカニズムに対し、Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 protein (TSG-6)に着目して検討したので報告する。

【方法】動物実験プロトコル(n.32239)に従って、IR injuryモデルを作成(SMAを90分間クランプ後に解除)した。再灌流後48時間経過時に屠殺し、回腸におけるTSG-6 mRNAの発現量をSham群、PBS群(再灌流直後にPBSをIV)、AFSC群(再灌流直後にAFSCをIV)でqPCR法により比較した。次にTSG-6発現をsiRNAによりKnockdownさせたAFSC<sup>ΔTSG-6</sup>を作成し、その治療効果をSham群/PBS群/AFSC群/AFSC<sup>ΔTSG-6</sup>群の4群間で検討した。さらに、AFSC投与の代わりにTSG-6を再灌流直後にIVするTSG-6群を作成し、Sham群/PBS群/TSG-6群間で比較した。治療効果に関しては、1:腸管の組織学的障害(H&E染色)、2:腸管の炎症(myeloperoxidase/IL-6/TNF-α)でそれぞれ評価した。データはone-way ANOVA法で比較検討した。

【結果】TSG-6 mRNA産生はAFSC群でのみ上昇しており(AFSC群 vs. Sham群/PBS群、 $p < 0.05$ )、AFSC<sup>ΔTSG-6</sup>群では、治療効果の減弱(組織障害の増悪、炎症の上昇)がみられた。またTSG-6群ではPBS群と比べ、AFSC群と同等の治療効果がみられた。

【結語】IR injuryにおいて、AFSCから産生されるTSG-6を静脈投与することで、AFSC投与と同等の治療効果がみられた。TSG-6は中腸軸捻転などのIR injuryに類似した病態に対して、治療オプションとなりうることを示唆された。

## SY3-2 肝細胞増殖因子 (HGF) による腸粘膜上皮再生への試み—完全静脈栄養ラットモデルを用いた小腸粘膜上皮へ与える効果に関する検討—

- 1) 鹿児島大学学術研究院医歯学域医学系小児外科学分野  
 2) 鹿児島大学病院総合臨床研修センター  
 3) 鹿児島大学学術研究院医歯学域医学系消化器疾患・生活習慣病学分野

○杉田 光士郎<sup>1)</sup>、加治 建<sup>2)</sup>、矢野 圭輔<sup>1)</sup>、松久保 眞<sup>1)</sup>、祁答院 千寛<sup>1)</sup>、松井 まゆ<sup>1)</sup>、村上 雅一<sup>1)</sup>、春松 敏夫<sup>1)</sup>、大西 峻<sup>1)</sup>、山田 耕嗣<sup>1)</sup>、山田 和歌<sup>2)</sup>、武藤 充<sup>1)</sup>、熊谷 公太郎<sup>3)</sup>、井戸 章雄<sup>3)</sup>、家入 里志<sup>1)</sup>

**【目的】** 完全静脈栄養 (TPN) は腸管粘膜の萎縮を引き起こし、bacterial translocation による血流感染症や静脈栄養関連肝障害などの致命的な合併症につながるとされ、腸粘膜萎縮の予防・再生は予後改善につながると期待される。我々はこれまで GLP-2/Ghrelin/脂肪乳剤の腸粘膜萎縮の予防・再生効果を検討してきた。一方、肝細胞増殖因子 (HGF) は組織の再生や保護を担う重要な細胞増殖因子である。本研究では、TPN ラットモデルを用いて腸粘膜上皮に及ぼす HGF の効果について検討した。

**【方法】** 8 週齢雄性ラットを用いて、経口摂取群 (OF)、TPN 群 (TPN)、TPN+低用量 HGF 群 (0.3 mg/kg/day : TPNLH)、および TPN+高用量 HGF 群 (1.0 mg/kg/day : TPNHH) の 4 群に分けた。完全静脈栄養管理 7 日目にラットを安楽死、小腸を採取し、組織学的に評価した。c-MET (HGF のレセプター)、および糖トランスポーターとして SGLT1、GLUT2、GLUT5 の発現を qPCR で評価した。

**【結果】** TPNHH 群の空腸絨毛高と吸収面積は、TPN 群よりも有意に高く ( $p < 0.05$ )、OF と同等レベルを維持していた。回腸の絨毛高は、統計的有意性はないものの TPNHH 群でのみ同じ傾向を示した。HGF 投与群における空腸の陰窩細胞増殖率は、TPN 群よりも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。TPN 群における c-MET と SGLT1、GLUT2、GLUT5 の発現量は、OF 群と比較して低かった。

**【考察】** TPN で観察された小腸粘膜の萎縮は、HGF 投与により絨毛高を増加させ、回腸より空腸において顕著であった。また、HGF 投与両群の糖トランスポーターの発現量は TPN 群よりも上昇しており、吸収面においても再生・保護効果の可能性が示唆された。HGF の腸管粘膜上皮に対する成長促進作用が期待され、現在、短腸症候群モデルラットにおける腸管順応への有効性も検討している。

## SY3-3 無血清培地による切除腸組織由来小児小腸オルガノイド培養方法の確立

- 1) 順天堂大学小児外科  
 2) 順天堂大学医学部附属浦安病院小児外科  
 3) 順天堂大学医学研究科オルガノイド開発研究講座

○松本 有加<sup>1)</sup>、古賀 寛之<sup>1)</sup>、須田 一人<sup>1)</sup>、三上 敬文<sup>2)</sup>、服部 信孝<sup>3)</sup>、岡崎 任晴<sup>2)</sup>、山高 篤行<sup>1)</sup>、中村 哲也<sup>3)</sup>

**【目的】** 小児腸の成熟機構や病態解析への腸上皮オルガノイド利用が期待されている。本研究では、手術切除検体から得る乳児腸上皮を、馴化培地 (conditioned medium ; CM) を含まず無血清で、かつ添加因子濃度が明確な defined medium (DM) で培養する条件を検証した。また術後一定時間保存した組織からでもオルガノイド作製が可能かを検討した。

**【方法】** 当院で切除された乳児腸組織から単離した上皮細胞を検討に用いた。腸上皮幹細胞維持に必須の Wnt 3a と R-spondin1 (Rspo1) を異なる濃度で組み合わせて無血清培地に添加し、オルガノイド培養を試みた。オルガノイドのサイズ、qPCR での幹細胞・分化細胞マーカー発現を解析するとともに、継代操作を経た長期培養が可能かを評価した。さらに、切除後に増殖因子非含有培地で冷蔵保存した腸組織の変性過程や幹細胞・増殖細胞の経時的変化を解析するとともに、保存後組織からオルガノイド培養を試みた。

**【結果】** 乳児小腸上皮オルガノイド培養にも Wnt3a と Rspo1 (WR) の併用が必須であった。ヒト成人腸オルガノイド培養で頻用される、より低濃度の WR 併用でもオルガノイド増大を認め、継代操作を繰り返す長期培養が可能であった。また、切除後保存した組織は経時的な変性を示すものの、術後 2 日までは OLFM4+幹細胞と KI67 発現増殖細胞がある程度残存することも確認できた。これを反映し、術後 2 日後組織からも、継代を繰り返す増幅可能なオルガノイドの作製が可能であった。

**【結語】** 小児小腸外科切除検体から腸上皮オルガノイドを既知因子のみを含む無血清培地で培養できること、切除後 2 日間保存した組織からもオルガノイド培養ができることを示した本成果は、小児腸上皮研究に有用な技術になると考える。

### SY3-4 In vitro 共培養モデルを用いたマウス腸管神経幹細胞の発生過程の検証

- 1) 順天堂大学医学部小児外科学・小児泌尿生殖器外科  
2) 順天堂大学医学部附属練馬病院

○藤原 なほ<sup>1)</sup>、宮原 克<sup>1)</sup>、田中 奈々<sup>2)</sup>、  
山高 篤行<sup>1)</sup>

**【背景・目的】**近年、Hirschsprung 病 (H 病) に対して、幹細胞を用いた移植治療に関する基礎研究の報告が多数され、根本的治療としての再生医療の進展が望まれている。移植細胞が無神経節腸管に生着し、正常な神経ネットワークを形成することが蠕動機能には重要である。我々は神経堤細胞の遊走・分布に関連する遺伝子である SOX10 に緑色蛍光タンパクである VENUS を標識し、腸管神経ネットワークをはじめとする神経堤由来の細胞を生きたままの状態を観察できる SOX10-VENUS Tg マウスをドナーとして、正常及び H 病モデルマウス腸管細胞と共培養を行い、移植細胞の腸管神経形成過程の観察を行った。**【方法】**胎生 13.5 日 (E13.5) の SOX10-VENUS Tg マウス胎仔腸管を採取し、浮遊培養によりドナーとなる神経細胞塊を作成。その細胞塊を、E13.5 の正常マウス (WT) および H 病モデルマウスであるエンドセリン B 受容体ノックアウトマウス (EDNRB-KO) 胎仔腸管を酵素処理した細胞と共培養を行った。共培養 6 日目まで固定し、DAPI および神経細胞マーカー TuJ1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。**【結果】**WT 腸管細胞と共培養した SOX10 陽性の細胞塊からは、放射状に TuJ1 陽性の太い軸索束が直線的に伸びる様子が観察された。さらには、SOX10 陽性細胞が細胞塊周囲にも観察されることから培地内を遊走していることがわかる。一方、KO 細胞の細胞塊からは、蛇行した軸索束が不均一に伸びる様子が確認された。細胞塊周囲には SOX10 陽性細胞は認めなかった。**【結語】**ドナー細胞の軸索の形成は、KO 腸管においては WT 腸管に比べ不均一な形状であることから、正常な神経ネットワーク形成にはレシピエント腸管内の微小環境が大きく関与していることが示唆された。グリア系の分化傾向や分子生物学的解析についてもさらなる検証を行う予定である。本実験系は、今後薬剤投与等による検証実験にも有用なツールとなることが期待される。

### SY3-5 hypoganglionosis に対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞移植による新規治療法開発

- 1) 九州大学大学院医学研究院小児外科学分野  
2) 九州大学大学院歯学研究院分子口腔解剖学分野  
3) 九州大学病院口腔画像診断科  
4) 九州大学大学院医学研究院形態機能病理学分野  
5) 福岡医療短期大学

○吉丸 耕一郎<sup>1)</sup>、園田 聡一郎<sup>2)</sup>、山内 恵利佳<sup>3)</sup>、  
河野 淳<sup>1)</sup>、松浦 俊治<sup>1)</sup>、山座 孝義<sup>2)</sup>、  
小田 義直<sup>4)</sup>、田尻 達郎<sup>1)</sup>、田口 智章<sup>5)</sup>

**【はじめに】**腸管神経節細胞僅少症 (Hypoganglionosis, Hypo) は腸管神経節細胞の数的異常を有する難治性疾患であり、Hirschsprung 病類縁疾患 (H 類縁) に属し、生存例の QOL はきわめて低い。そこでわれわれは幹細胞を用いた再生医療に新規治療法として着目した。今回、われわれの行っているヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (SHED) を用いた Hypo モデルマウスに対する研究成果を報告する。

**【方法】**Wild type マウス・Hypo モデルマウス (JF1)・SHED 移植 Hypo モデルマウス (JF1-SHED) の 3 群に対し、表現型評価、病理組織化学的評価、腸管電気生理学的評価、栄養学的評価、分子生物学的評価、安全性評価 (臓器形態学的・機能的評価、免疫学的評価) を行った。

**【結果】**正常マウスに比較し JF1 は、飼料摂取量は同様にもかかわらず、栄養吸収能も低く、体重増加や糞便数が有意に少なかった。さらに薬剤刺激や電気刺激において電気生理学的腸管蠕動能が有意に乏しいことが判明した。JF1-SHED において、移植した幹細胞が腸管に遊走し、神経節細胞増加や電気生理学的腸管蠕動の改善を認め、栄養学的パラメータの改善も認めた。SHED が罹患腸管に遊走したメカニズムとして、腸内フローラの異常や局所の炎症性変化の関与に加え、SHED 上の kit の発現が重要であることが判明した。幹細胞移植における明らかな他臓器障害や免疫学的変化は認められなかった。

**【まとめ】**今回われわれは、Hypo における SHED 移植の有効性を証明し、そのメカニズムの一部を明らかにした。加えて、SHED 移植は臓器機能的免疫学的安全性を有すると思われる。現在われわれは、本治療法の適応疾患拡大にむけた研究および自家細胞移植実現にむけた準備を進めている。

## SY3-6 先天性食道閉鎖症術後難治性吻合部狭窄に対する自己口腔粘膜由来シート移植術の臨床研究

- 1) 国際医療福祉大学医学部小児外科
- 2) 国立成育医療研究センター外科
- 3) 国立成育医療研究センター消化器科
- 4) 国立成育医療研究センター歯科口腔外科
- 5) 東京女子医科大学先端生命医学研究所
- 6) 岡山大学病院消化器内科
- 7) 東京都立長寿医療センター
- 8) 国立成育医療研究センター研究所再生医療センター

○ 瀨本 康史<sup>1,2)</sup>、藤野 明浩<sup>2)</sup>、新井 勝弘<sup>3)</sup>、  
五十川 伸嵩<sup>4)</sup>、高木 亮<sup>5)</sup>、安部 真<sup>6)</sup>、  
金井 信雄<sup>7)</sup>、梅澤 明弘<sup>8)</sup>

先天性食道閉鎖症の約 40% に術後吻合部狭窄を生じる。その中でも非常に難治性の吻合部狭窄となる症例もある。自己口腔粘膜食道シート移植術は成人食道癌に対して行われる内視鏡的粘膜下層切除術後の症例に対して狭窄の予防が報告されている。我々はこの技術を先天性食道閉鎖症術後吻合部狭窄の患児にバルーン拡張後の再狭窄予防に応用する試みを行った。特定認定再生医療等委員会の承認を得て現在 2 症例に 3 回の食道シート移植術を行った。

症例 1 は B 型先天性食道閉鎖症にて生後 11 か月時に食道吻合術を受ける。吻合部狭窄に対して、タッカーブジー、バルーン拡張術を施行。その後、ステロイド局注法、磁石圧迫吻合術(山内法)、ステロイド大量静脈内投与 (25mg/kg からパルス療法) を受けるも、次第に食道拡張術の必要性の頻度が 2 週間毎となった。16 歳時に自己口腔粘膜由来シート移植術を施行した。シート移植後、拡張術の必要頻度が 2 週間毎から 4 週間毎に延長され、症状の軽減もみられたが、7 か月後には拡張術の必要頻度が 2 週間毎に戻った。シート移植術 1 年後に再度、シート移植術を行うも、ほぼ 1 回目と同様な結果であった。

症例 2 は A 型先天性食道閉鎖症に対して 6 か月時に食道吻合術を受けるも縫合不全などから 2 歳時に Collis-Nissen 法による食道吻合術。その後から吻合部狭窄を認め、バルーン拡張術を施行。その後は経過順調であったが、11 歳時より再度、拡張術が必要となり、次第に拡張後 3 か月前にゼリー状の食事しか通過しなくなるので 16 歳からは 2~3 か月毎にバルーン拡張術を定期的に行っていた。19 歳時に自己口腔粘膜由来食道シート術を施行したところ、シート移植術を受けて約 10 か月経過するも、現在まで拡張術は必要なく、食事形態も変えることなく食事摂取可能である。

症例を選択すれば自己口腔粘膜由来食道シート移植術は難治性吻合部狭窄に対する治療の一つのオプションになる可能性が期待される。

## 教育講演 オルガノイド医学が開く新しい小腸再生医療の外科的手法の展開

東京慈恵会医科大学腎臓再生医学講座/慶應義塾大学医学部臓器再生医学寄附講座

○ 小林 英司

大腸は有茎のまま部分的に食道等の再建に古くから使われてきた。しかし短腸症候群の患児の残存大腸は、栄養吸収の機能を補完するかのように拡張はするが、本来の小腸の機能を持つことはない。現在は残存する小腸が拡張した場合に SPEP などの腸管延長術を用いることができる。演者は、慶應義塾大学医学部の佐藤俊郎教授らが開発した腸管オルガノイド技術を応用し、有茎大腸グラフトの上皮のみ小腸化する外科的技術を編み出し、そのハイブリッド腸管が本来の終末回腸の場所に置換させる外科的手法で脂肪吸収等の栄養改善に寄与できることを突き止めた。

ラットモデルを用いて Colon interposition の手術技術が利用できないかを考え、上行結腸から横行結腸に至る部分を小腸オルガノイドの移植する場所と選び、まず 4cm の有茎グラフトとし、残存する大腸を端端吻合して大腸の再建を行う。次にこの大腸グラフトの粘膜面をはぎ、同系のラットから樹立した小腸オルガノイドを移植し、両端をストーマ状態としてオルガノイドの生着を待った。後日この小腸化大腸グラフトを本来の小腸を全切除した状態に interposition した(同所性置換)。このオルガノイド移植は、小腸オルガノイドと大腸オルガノイドをブラインドで移植し、前者のみが栄養改善に貢献できることを示した。このメカニズムを子細に見るために、大腸と小腸のオルガノイドをシート状に培養し、細胞が平面的に広がった状態で培養液を人工的に攪拌して「流れ」を作り、この環境下でさらに培養した。すると、小腸オルガノイドは管腔側に突出する絨毛様の構造を形成したが、大腸オルガノイドではそのような変化はみられず平面のままであり、「流れ」に依存する小腸上皮に特有の絨毛形成メカニズムが存在することが判明した。

本外科手技は、これまで開発された腸管延長術のようにブタ等の大型動物モデルでの検証が必要であるが、オルガノイド医学という基礎研究が外科手術手技に応用される可能性を秘めている。

## SY4-1 抗菌性創傷被覆保護剤により臍帯羊膜の上皮化を得た後に待機的腹壁閉鎖術を行った巨大臍帯ヘルニアの 2 例

福島県立医科大学附属病院小児外科

○南 洋輔、角田 圭一、清水 裕史、山下 方俊、  
田中 秀明

【症例 1】肝臓・小腸・結腸の脱出を伴う巨大臍帯ヘルニアで、出生時のヘルニア門は 7cm であった。抗菌性創傷被覆保護剤（アクアセル Ag<sup>®</sup>、ConvaTec 社）で臍帯羊膜を覆い、防水フィルムで被覆する処置を開始。日齢 1 で経腸栄養を開始し、日齢 11 で十分量に達した。2~3 日毎に処置を行い、日齢 50 に退院。日齢 55 で臍帯羊膜は完全に上皮化。ヘルニア嚢をフィルム剤で圧迫し、脱出臓器を還納しつつ腹腔内容積を増大させた。月齢 7 で腹壁閉鎖術を施行。腹腔内癒着はなく、components separation technique (CST) を用いずに腹壁を閉鎖し、棍川法で臍形成した。現在術後 4 年半で、臍の高さは良好だが正中よりやや右側に位置し、縦長の浅い臍となっている。

【症例 2】肝臓・脾臓・胃・小腸が脱出し、ヘルニア門は 8cm であった。日齢 3 で経腸栄養を開始し、日齢 9 で十分量に達した。症例 1 同様に処置を継続し、日齢 66 に退院。月齢 5 で臍帯羊膜は完全に上皮化。圧迫療法を継続し、月齢 8 で腹壁閉鎖術を施行。経過中に臍帯羊膜が感染したが腹腔内への波及はなく、術中に腹腔内癒着を認めなかった。腹壁閉鎖後の膀胱内圧が 20cmH<sub>2</sub>O を越えたため、CST を要した。同時に棍川法で臍形成し、現在術後 1 ヶ月であるが、中央が陥凹した円形の臍を保っている。術中、ヘルニア嚢とともに余剰皮膚を切除したが、組織学的には角化扁平上皮・真皮・腹膜で構成されていた。

【考察】巨大臍帯ヘルニアは、ヘルニア門が 5cm 以上で肝臓脱出を伴うものと定義されるが、腹壁閉鎖までのアプローチは施設によって異なる。Bauman らの systematic review では、死亡率および経腸栄養確立までの期間の観点から、銀製剤による局所療法を初期治療として行い、待機的に腹壁閉鎖術を行う delayed closure が推奨された。本法は、先行手術によるヘルニア嚢の開放がないため腹腔内癒着を予防でき、かつ圧迫療法により脱出臓器を段階的に還納するため腹部コンパートメント症候群を回避できる。

## SY4-2 複数のストマが存在した肝臓脱出を伴う巨大臍帯ヘルニアに対する上皮化の工夫

慶應義塾大学外科学（小児）

○山田 洋平、山岸 徳子、城崎 浩司、  
梅山 知成、金森 洋樹、高橋 信博、  
加藤 源俊、黒田 達夫

症例は出生前に肝臓脱出の臍帯ヘルニアを指摘されていた男児。帝王切開にて 36 週 2 日 2,367g で出生。臍帯ヘルニア内に肝臓のみ脱出を認め、ヘルニア門は約 6×6cm、出生後に C 型食道閉鎖と鎖肛が判明した。生後 0 日で、食道閉鎖に対しては下部食道バンドリングと左上腹部に胃瘻を造設し、鎖肛に対しては S 状結腸で左下腹部にストマを造設した。臍帯ヘルニアについては、腹壁閉鎖を試みたがのちに離開し、さらには術後 12 日目に多発小腸穿孔を認めため、穿孔部近位の空腸で右下腹部にストマを造設し、近傍に遠位小腸への注入様にチューブストマを作成した。手術当日は組織の浮腫が高度であったため、腸管を肝臓で被覆して、残りは下腹部に収納し Alexis<sup>®</sup> Wound Retractor にて一時的なサイロを形成した。48 時間後に下腹部の腹壁を閉鎖し、肝臓の表面に直接ネオベールシート<sup>®</sup>を置き、アクアセル Ag<sup>®</sup>とテガダーム TM にて被覆し約 2 ヶ月かけて上皮化を達成した。途中ストマ周囲からの蜂窩織炎を発症したが、保存的にコントロール可能であった。

巨大臍帯ヘルニアに合併した多発奇形と腹壁欠損部位に近接する腸瘻管理に難渋した症例であるが、臍帯ヘルニアに対する上皮化方法に関して文献的考察を含めて報告する。

### SY4-3 巨大臍帯ヘルニアの保存加療中に予想外の経過を辿ったものの皮膚で被覆し得た一例

北里大学病院小児外科

○出家 亨一、田中 潔、渡部 靖郎

症例は2歳女児。妊娠18週の胎児超音波検査で臍帯ヘルニアを指摘された。在胎37週2日、体重2,912g、帝王切開で出生した。ヘルニア門は約4cm、脱出臓器は胃、小腸、大腸などの消化管や肝臓、脾臓であった。また、ヘルニア嚢内に多量の腹水を認めたが、壁は薄く、分娩時や出生後に破裂しないよう留意する必要があった。以上から脱出臓器の腹腔内還納は困難と判断し保存的加療を開始した。嚢内の腹水を穿刺吸引し、嚢全体を創傷被覆保護材(アクアセル®Ag)で被覆した。Wound Retractorや市販のプラスチック容器で、ヘルニア嚢の保護および湿潤環境の保持を行った。徐々にヘルニア嚢の上皮化が得られたが、一部に帯状の不良肉芽を認めたため、日齢56からスルファジアジン銀(ゲーベン®)塗布に変更した。不良肉芽は改善したが、臍基部の皮膚と表皮化したヘルニア嚢との間で全周性の狭窄が進み、腸閉塞を発症し、保存的加療を要した。術前に十分な鎮静期間を設け、腸管の減圧を行った後、腸閉塞予防と不良肉芽切除のため日齢107にヘルニア嚢の形成術を行った。不良肉芽を含む表皮化したヘルニア嚢の切除が必要であったが、臍基部の皮膚で脱出臓器を被覆し得た。その際、広範囲の腹壁皮下の剥離や皮膚のストレッチを要した。その後は、日齢220に原因不明の小腸穿孔を発症したため、ヘルニア嚢皮膚を切開し、穿孔部縫合閉鎖術を行った。被覆した皮膚は腸管の拡張により伸展し、ほとんどの腹腔内臓器が皮膚のみで覆われているものの、在宅療養が可能となり1歳9ヶ月で退院となった。肝臓が完全脱出する巨大臍帯ヘルニアは、腹壁閉鎖に難渋することがある。段階的な外科的治療や、ヘルニア嚢の上皮化を図る保存的加療後に外科的治療を行うなど、アプローチは様々である。今回そのような巨大臍帯ヘルニアに対してヘルニア嚢の表皮化を図るも最終的には本来の皮膚で被覆せざるをえなかった症例を経験したので報告する。

### SY4-4 ヘルニア嚢を上皮化させた巨大臍帯ヘルニアの3例

東京大学医学部附属病院小児外科

○吉田 真理子、高澤 慎也、沓掛 真衣、小俣 佳菜子、小川 祥子、横川 英之、藤代 準

新生児期の腹壁閉鎖が不可能であった巨大臍帯ヘルニアの3症例に対し、ヘルニア嚢の上皮化を促す保存的治療を行ったので報告する。

症例1は現在18歳の女児で、胎児期にbody stalk anomaly(巨大臍帯ヘルニア、側弯、肺低形成)と診断された。生後蘇生に反応したため破裂型臍帯ヘルニアに対して人工布による被覆を行った。その後創傷被覆材(カラヤヘッシブ®)によりヘルニア嚢の上皮化を誘導し、4ヶ月で完全に上皮化した。現在も気管切開、人工呼吸管理を要し、腹壁閉鎖は未施行であるが大きな問題は生じていない。症例2は現在3歳の男児、胎児期に肝臓の脱出を伴う巨大臍帯ヘルニアと診断された。肺低形成を合併し、生後人工呼吸管理を要したため、早期の腹壁閉鎖は不可能と判断され、スルファジアジン銀(ゲーベン®)クリーム塗布によりヘルニア嚢の上皮化を促した。3ヶ月時に退院し、呼吸状態の安定、ヘルニア脱出の縮小、ヘルニア嚢の完全な上皮化を得た後、10ヶ月時に腹壁閉鎖術を行った。症例3は現在1歳7ヶ月の女児、出生前後の経過は症例2と概ね同様であり、ゲーベン®クリーム塗布を行い、2ヶ月時に退院した。8ヶ月時にほぼ完全に上皮化した。ヘルニア脱出の縮小を認めなかったため、10ヶ月時に陰圧閉鎖療法を2週間行った。ヘルニア脱出は軽度縮小、腸管の用手還納が容易となる効果を認めた。1歳時にゴアテックス®パッチを用いた腹壁閉鎖術を施行した。巨大臍帯ヘルニアにおいては、呼吸障害、腹部コンパートメント症候群等のリスクが高く、早期の腹壁閉鎖が困難であるが、ヘルニア嚢の上皮化は、全身状態安定化後に腹壁閉鎖を目指す症例、また重篤な合併症により腹壁閉鎖が行えない症例に対しても有用であった。上皮化の方法、陰圧閉鎖療法やcomponents separation techniqueとの併用等、よりよい治療につき今後さらに検討したい。

## SY4-5 脱出臓器還納困難に加えて様々の合併症を認めたが人工真皮を用いることで腹壁閉鎖に成功した 1 例

- 1) 日本赤十字社和歌山医療センター小児外科
- 2) 泉大津市民病院小児外科
- 3) 大阪市立総合医療センター小児外科
- 4) 大阪市立大学医学部附属病院
- 5) 大阪市立大学大学院医学研究科小児科学

○堀池 正樹<sup>1)</sup>、北田 智弘<sup>2)</sup>、三藤 賢志<sup>3)</sup>、橋本 拓朗<sup>4)</sup>、大西 聡<sup>5)</sup>

【はじめに】巨大臍帯ヘルニアは外科的処置の困難さと高い致死率が知られている。現在さまざまな治療方法が報告されているが、最適な治療方針は確立されていない。今回我々は脱出臓器還納困難に加えて様々の合併症を併発したが人工真皮を用いることで腹壁閉鎖に成功した一例を経験したので報告する。

【症例】日齢 0、女児。胎児期より巨大臍帯ヘルニアを指摘。38 週 0 日で出生、出生体重 3,047g。肝臓、消化管、膀胱の一部の脱出を認める臍帯ヘルニアを認めた。ヘルニア嚢は有茎性。合併奇形なし。出生当日に wound retractor を用いてサイロ形成を行い、その後サイロの縫縮を行ったが肝臓の還納困難のためヘルニア門を観察したところ肝静脈と筋膜の癒着が判明した。そこで Gore-Tex patch を用いてサイロ形成を行ったが感染のため抜去、感染した脱出臓器を洗浄し感染をコントロールした。臓器還納から腹壁の上皮化をめざす治療戦略に変更し、NPWT を開始した。その後上皮化は進行したが日齢 71 に消化管穿孔が判明し、NPWT を中断し腸管穿孔部の管理を継続した。日齢 178 には穿孔部周囲まで上皮化の進行あり腸瘻閉鎖と同時に腹壁欠損部に人工真皮を縫合固定し管理を行った。日齢 247 には腹壁の上皮化は完成し日齢 328 に軽快退院した。

【考察】本症例は 3 つの外科的課題が含まれていた。一つは肝静脈と筋膜の癒着による臓器還納困難である。2 つめはサイロ感染である。本症例ではサイロ感染により抜去を余儀なくされた。3 つめは腸管穿孔である。薄い線維性被膜を土台とし NPWT を行った結果、消化管穿孔に至った。この危機的状況を変えたのが人工真皮であり、腸瘻化した穿孔部を切除し腸管吻合した後、腹壁欠損部に人工真皮を縫合固定することで最終的に腹壁の上皮化を完成しえた。

上記のような多数の合併症を認めた本症例の治療経験は今後巨大臍帯ヘルニアの治療に難渋した症例において最適な治療戦略の手がかりになると考える。

## SY4-6 段階的手術での可及的腹壁筋層形成後の人工真皮による完全腹壁上皮化が有効であった巨大臍帯ヘルニアの一例

国立成育医療研究センター外科

○森 禎三郎、金森 豊、古金 遼也、小林 完、橋詰 直樹、狩野 元宏、渡辺 栄一郎、高橋 正貴、米田 光宏、藤野 明浩

症例は妊娠初期より臍帯ヘルニアを指摘されて当院産科紹介となり、在胎 36 週 1 日に予定帝王切開で出生した女児。出生時体重 2,640g、身長 46cm であった。ヘルニア門は 7×6cm と巨大で、脱出臓器は全肝臓、胃、小腸、結腸であった。一次的閉鎖は不可能と判断し出生当日に羊膜を残したまま wound retractor を用いてサイロを造設した。術翌日よりサイロ縫縮による臓器還納を試みるも困難であり、日齢 7 に皮膚による腹壁閉鎖手術を試みた。しかし広範囲に皮下剥離するも皮膚による完全閉鎖は不可能であったため人工布 (Gore-tex<sup>®</sup>) を筋層に逢着する形でサイロ形成を施行した。その後再度皮膚による閉鎖を目指してヘルニア周囲皮膚の大きな減張切開を行い、かろうじてサイロごと臓器の被覆が行えたが皮膚の血流障害による壊死が進行し完全な被覆には至らなかった。日齢 42 に撮像した CT 検査で腹壁の側部を覆うに十分な筋層発育が確認されたため、日齢 48 に Gore-tex<sup>®</sup> の可及的除去と皮膚欠損部への人工真皮 (terudermis<sup>®</sup>) 装着を施行した。人工真皮装着後は急速に上皮化が進み、術後 2 か月 (生後 4 カ月) で完全な上皮化が得られた。

臍帯ヘルニアにおける腹壁閉鎖では、筋層と皮膚との両方で臓器を被覆することが望ましいが、そのような腹壁閉鎖が困難な巨大臍帯ヘルニアでは、画一された治療戦略はなく、段階的な手術的閉鎖療法と欠損部の上皮化を促す保存的閉鎖療法による治療が報告されている。これまでの様々な治療報告を検討したレビュー解析では保存的閉鎖療法が優れていると結論付けられている。しかし、本症例のようにまず手術的に可及的筋層形成を施行し、残った非閉鎖部分を人工真皮により上皮化を促す 2 段階の治療法は、本疾患に対する治療期間の短縮や合併症の低減に有効であり、今後の治療戦略の一つとして提案しうると考え、その詳細を報告する。

## SY4-7 巨大臍帯ヘルニアの上皮化促進を目指した biosheet による皮膚再生の研究

- 1) 東京大学大学院医学系研究科小児外科学
- 2) 東京大学医学部附属病院組織幹細胞・生命歯科学講座
- 3) バイオチューブ株式会社

○鈴木 啓介<sup>1)</sup>、藤代 準<sup>1)</sup>、吉田 真理子<sup>1)</sup>、  
高澤 慎也<sup>1)</sup>、古村 浩子<sup>2)</sup>、浅輪 幸世<sup>2)</sup>、  
金澤 三四朗<sup>2)</sup>、中山 泰秀<sup>3)</sup>、古村 眞<sup>2)</sup>

【はじめに】巨大な臍帯ヘルニアでは出生後早期の腹壁閉鎖が困難なために、ヘルニア嚢を上皮化させた後に、乳幼児期に待機的な根治術を行うことが選択肢となる。しかし、上皮化には1ヶ月以上を要することが多く、長期の局所管理や入院加療が必要である。生体内組織形成術 (in-body tissue architecture, iBTA) は生体の皮下に非吸収性の鋳型を埋入し、周囲に様々な形状の線維性結合組織体を作成する技術である。この組織体は血管、横隔膜、気管などで移植した臓器の組織を自律再生させることが報告されている。我々はシート状の組織体である biosheet により皮膚再生を誘導して巨大臍帯ヘルニアの治療へ応用することを目指し、マウスの皮膚欠損を用いて検討した。

【方法】EGFP トランスジェニックマウスの背部皮下にシリコン製の板状の鋳型を埋入し、2週後に鋳型周囲に形成された GFP 陽性の biosheet を採取した。続いて C57BL/6J マウスの背部に径 6mm の皮膚全層欠損を作成し、biosheet を創面に移植した。創部はハイドロサイトプラス<sup>®</sup>で被覆して2週後まで経過観察し、biosheet を移植した群と非移植群で肉眼所見および組織学的所見により皮膚再生を比較検討した。

【結果】移植2週後に biosheet 移植群では肉眼的に創傷部全体に表皮の再生を認めたが、非移植群では上皮化していない領域が残存した。組織学的にも移植群でのみ創中央まで再生表皮を認め、皮下には非移植群と比較して有意に厚い組織が形成され、密な膠原線維や細胞から構成された。この皮下の再生組織には biosheet 由来の GFP 陽性の細胞が存在し、免疫組織化学染色により新生血管を有することを確認した。

【考察】biosheet が皮膚欠損部に生着して新生血管を有する組織を形成し、表皮再生を促進することが確認された。巨大臍帯ヘルニアにおいても biosheet の移植により、上皮化が完了するまでの期間を短縮させる効果が期待される。

## 教育講演 広範囲皮膚欠損に対する治療：人工真皮・培養表皮・その他の再生医療

国立成育医療研究センター形成外科

○彦坂 信

臍帯ヘルニアの治療においては、silo 法などによる腹腔内容の還納と皮膚の伸展により、腹壁の閉鎖が試みられる。しかし皮膚の不足により閉鎖が困難な症例が、一定程度存在する。本発表では広範囲の皮膚欠損に対して、人工真皮を含めた形成外科的なアプローチに加えて、すでに実用化されている再生医療として自家培養表皮のほか、現在研究段階にあるその他の再生医療技術について言及する。

腹部の広範囲な皮膚欠損に対する形成外科的なアプローチとして、側腹部の減張切開により皮弁を正中へ前進させる皮弁形成術が考えられる。また皮膚欠損を残す場合には、創部の上皮化を促進するために、陰圧閉鎖療法により肉芽増生を促し分層植皮により上皮化を図る方法も考えられる。

人工真皮はコラーゲンを主成分とするスポンジ状の素材であり、皮膚の全層欠損創に対して保険適用となっている。創底部に血流のある組織があれば、2週間程度で真皮様組織と表現される肉芽組織に置換され、分層植皮により伸展性に富む良質な皮膚による閉創が可能となる。欠点としては感染に弱いこと、下床に血流のある組織がなければ肉芽組織に置換されないこと、表皮成分がないために閉創には植皮などを要することがあげられる。

これらの限界を克服する技術として、再生医療に期待が寄せられている。自家培養表皮が実用化されており、1~2平方 cm の全層皮膚を採取後、約3週間で利用可能となる。利点として小範囲の犠牲で広範囲の創閉鎖が可能ながあるが、表皮であるために生着には創面に真皮が残っているか、人工真皮による真皮様組織の形成や分層メッシュ植皮との併用が必要な欠点がある。また保険適用が重症熱傷、先天性巨大色素性母斑、表皮水疱症に限られ、培養に時間を要するデメリットがある。

今後は、表皮と真皮からなる皮膚全層の構築や、最終的には毛包脂腺系などの皮膚付属器も含む皮膚の作成などの再生医療技術が期待されている。