

内因性サイトカイン活性型代用尿管の開発：
bFGFによる尿管上皮再生促進の可能性

(課題番号 10671498)

平成10, 11年度科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書



平成12年3月

研究代表者 合谷信行

(東京女子医科大学泌尿器科学講座 助教授)

内因性サイトカイン活性型代用尿管の開発：
bFGFによる尿管上皮再生促進の可能性

(課題番号 10671498)

平成10, 11年度科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 合谷 信行

(東京女子医科大学泌尿器科学講座 助教授)

目次

はしがき	1
1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表	3
2. 研究成果	
1. この度の研究計画及び成果の概要	7
2. 内因性サイトカイン誘導による代用尿管の基礎的実験および Metallic stent尿管内留置後の尿路上皮再生に関する検討	1 1
3. 参考論文	
1. 前立腺肥症の最近の治療法	2 7
2. Ethanol injection therapy of the prostate for benign prostatic hyperplasia Preliminary report on application of a new technique	3 5
3. Preventive effect of oral antimicrobial agent levofloxacin on infection after transurethral resection of the prostatae	3 9
4. Autotransfusion supported by erythropoietin therapy in transurethral resection of the prostate	4 7
5. 小児ドナーからの献腎移植についての検討—成績、適応、 問題点	5 3
6. Effect of interferon-alfa treatment in renal transplant recipients with chronic hepatitis C	6 1
7. Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation, A single-center experience	6 5
8. 慢性透析患者に発生した膀胱腫瘍の臨床的検討	7 1
9. Inducible nitric oxide synthase localization in acquired cystic disease of the kidney	7 9
10. Metabolic characteristics of the elderly with recurrent calcium oxalate stones	8 1
11. Detection and quantification of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICUM-1) in the serum and urine of patients with bladder cancer	8 7
12. 下大静脈腫瘍塞栓を伴う腎細胞癌に対する腎動脈塞栓術後 肺動脈塞栓にて急死した1例	9 3
13. 右心房内腫瘍塞栓を有する腎血管筋脂肪種の1例	9 7
14. 慢性透析患者に対するCABG周術期の循環管理、 77例の経験から	1 0 3

不全臓器の機能を補うための医療のひとつとして移植医療がある。腎臓に対する腎移植、心臓に対する心移植、肝臓に対する肝移植はすでに臨床レベルで確立した治療法である。尿管は腎臓で生成された尿を膀胱まで運搬する管状の臓器である。尿管は実質臓器ではなく機能的に不全状態に陥ることはないが、先天性疾患、炎症、悪性腫瘍などのため通過が傷害されると、水腎・水尿管症を引き起こし、腎機能に重大な影響を及ぼす。この尿管の通過障害が外科的に修復されることが不可能な場合、尿管の移植は行われておらず、代用尿管が必要となる。現在のところ理想的な人工尿管はなく、実際には尿路変向術または自己腎移植術が必要となる。

以上の背景のもとに、われわれは人工尿管の基礎実験とともに尿管上皮再生の経時的観察を行ってきた。この結果をさらに発展させ、metallic stent の尿管補填材料としての可能性を検討した。

1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

内因性サイトカイン活性型代用尿管の開発：

bFGF による尿管上皮再生促進の可能性

研究課題番号 10671498

【研究組織】

研究代表者 合谷信行（東京女子医科大学泌尿器科学助教授）

研究分担者 富澤康子（東京女子医科大学循環器外科助手）

【研究経費】

平成 10 年度 2,300 千円

平成 11 年度 1,200 千円

計 3,500 千円

【研究発表】

学会誌

1. Huang XB, Ito F, Nakazawa H, Ryoji O, Okuda H, Goya N, Toma H: Inducible nitric oxide synthase localization in acquired cystic disease of the kidney. Nephron, 81:360-1. 1999
2. Yagisawa T, Hayashi T, Yoshida A, Okuda H, Kobayashi H, Ishikawa N, Goya N, Toma H: Metabolic characteristics of the elderly with recurrent calcium oxalate stones. BJU Int, 83:924-8. 1999
3. Goya N, Ishikawa N, Ito F, Ryoji O, Tokumoto T, Toma H, Yamaguchi Y: Ethanol injection therapy of the prostate for benign prostatic hyperplasia: preliminary report on application of a new technique. J Urol, 162:383-6. 1999
4. Goya N, Ishikawa N, Tokumoto T: Preventive effect of oral antimicrobial agent levofloxacin on infection after transurethral resection of the prostate. J Tokyo Wom Med Univ, 69:669-676, 1999
5. 戸田房子, 奥田比佐志, 近藤典子, 合谷信行: 右心房内腫瘍塞栓を有する腎血管筋脂肪種の 1 例、日泌尿会誌、90:745-749、1999
6. 奥田比佐志、戸田房子、伊藤文夫、合谷信行: 下大静脈腫瘍塞栓を伴う腎細胞癌に対する腎動脈塞栓術後 肺動脈塞栓にて急死した 1 例、泌尿紀要、45:49-51、1999
7. 西田博、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁: 緊急冠状動脈バイパス術における動脈グラフトのみによる多枝バイパス手術、胸部外科、52:688-692、1999
8. 富澤康子、鈴木進、遠山憲康、岡本美樹、平山芽衣、菊池千鶴男、田中佐登司、西田博、遠藤真弘、小柳仁: 医療用具の使用状況: IABP バルーンの使用におけるヒューマンエラーと不具合、人工臓器、28:566-569, 1999
9. 野一色泰晴、山根義久、大越隆文、富澤康子、殿倉英次: 超極細繊維交絡型人工血管の開発、人工臓器、28:278-283, 1999
10. 西中知博、西田博、遠藤真弘、富澤康子、椎川彰、佐藤志樹、佐藤渉、小柳仁: 冠動脈バイパス手術後に上部消化管出血を合併した症例の検討、冠疾患誌、5:46-49, 1999
11. 古川博史、遠藤真弘、西田博、富澤康子、八田光弘、小柳仁: 虚血性僧帽弁閉鎖不全症の外科的治療の検討、当院における 20 年間、45 例および低心機能例を中心とした検討、冠疾患誌、5:50-54, 1999

12. 富岡秀行、西田博、迫村泰成り、富澤康子、北村昌也、遠藤真弘、小柳仁
：動脈グラフトの病理組織蔵とグラフト材としての限界、グラフト材としてどこまで利用できるのか、冠疾患誌、5:110-115, 1999
13. 西田博、田中佐登司、富岡秀行、広田潤、田鎖治、野々山真樹、新浪博、平田欽也、富澤康子、川合明彦、青見茂之、八田光弘、遠藤真弘、小柳仁
：慢性透析患者に対する CABG 周術期の循環管理、77 例の経験から、循環制御、20:30-33,1999
14. 西田博、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁：Laser による Transmyocardial revascularization、呼と循、47:455-463、1999
15. 西田博、菊池千鶴男、小澤英樹、田中佐登司、新浪博、廣田潤、平田欽也、富澤康子、川合明彦、遠藤真弘、小柳仁：多枝病変への動脈グラフトのみによる多枝 CABG の早期および遠隔成績；多枝 PTCA や MIDCAB + PTCA 併用療法の Golden Standard として、脈管学、39:367-371, 1999
16. 西田博、赤澤年正、島村吉衛、西中知博、上部一彦、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁、押山広明、城戸隆行、野尻千里：人工心肺回路における開放式回路と閉鎖式回路の生体適合性の比較、医工学治療、11:274-278, 1999
17. 西田博、赤澤年正、近沢元太、西中知博、上部一彦、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁、桑名克之、菊池腎、大平善之、青木正人：シリコンコーティング中空糸の高度生体適合性非コーティング中空糸との比較、医工学治療、11:428-429, 1999
18. 日比野成俊、遠藤真弘、西田博、富澤康子、平田欽也、新浪博、田中佐登司、小澤英樹、菊池千鶴男、福本淳、小柳仁：TMLR 後に左室冠状動脈瘻を認めた 1 例、胸部外科、52:488-491,1999
19. 上杉英之、青見茂之、国井佳之、斎藤典彦、富澤康子、橋本明政、小柳仁、石塚尚子：多発性硬化症を合併した僧帽弁狭窄症に対し人工弁置換術を施行した 1 例、胸部外科、52:569-571、1999
20. 石田徹、西田博、富澤康子、上部一彦、前田朋大、丁毅文、滝口信、鮎澤慶一、遠藤真弘、小柳仁：家族性高コレステロール血症を基礎疾患に持つ兄弟再 CABG 例 2 組の検討、Coronary、16:163-166、1999
21. 村田明、遠藤真弘、西田博、富澤康子、廣田潤、上杉英之、富岡秀行、依田真隆、斎藤聡、篠田尚克、鶴見由起夫、小柳仁：脊柱管狭窄症を合併した虚血性心疾患患者に対する冠動脈バイパス手術、冠疾患学会雑誌、5:149-151、1999
22. 島袋高志、西田博、富澤康子、依田真隆、村田明、廣田潤、遠藤真弘、小柳仁：急性心筋梗塞に対する冠動脈形成術-22 時間後に心タンポナーデ症状を呈した冠動脈穿孔の一救命例-冠疾患学会雑誌、5:145-148,1999
23. Tomizawa Y, Endo M, Nishida H, Niinami H, Tanaka S, Tomioka H, Ozawa H, Kikuchi C, Koyanagi H: Use of arterial grafts for coronary revascularization; Experience of 2987 anastomoses, Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 47:325-329, 1999
24. Nishida H, Aomi S, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H, Nojiri C, Oshiyama H, Kido T, Yokoyama K: Comparative study of biocompatibility between the open circuit and closed circuit in cardiopulmonary bypass, Artificial Organs, 23(6):547-551, 1999
25. Toda F, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Yamazaki Y, Goya N, Nakazawa H, Toma H: Renal transplantation in patients with lower urinary tract dysfunction. Transplant Proc, 30:3007-9. 1998

26. Shi BB, Goya N, Okuda H, Ryoji O, Nakazawa H, Toma H: Detection and quantification of soluble intercellular adhesion molecule- 1 (sICAM-1) in the serum and urine of patients with bladder cancer. *Int J Urol*, 5:324-8. 1998
27. Goya N, Toda F, Nishino S : Autotransfusion supported by erythropoietin therapy in transurethral resection of the prostate、*Scand J Urol Nephrol*, 32 : 383-387、1998
28. Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, Goya N : Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation, A single-center experience、*Transplantation*, 65:224-228、1998
29. 石川暢夫、田辺一成、八木沢隆、合谷信行：小児ドナーからの献腎移植についての検討—成績、適応、問題点、移植、33:359-366、1998
30. 石冰冰、中沢速和、龍治修、合谷信行：腎癌患者における尿中インターロイキン 1 β 、インターロイキン 6 腫瘍壊死因子- α の検討、*泌尿紀要*、44:143-147、1998
31. 合谷信行、東間紘：前立腺肥症の最近の治療法、*日本医師会雑誌*、119:623-629、1998
32. Tomizawa Y, Takanashi Y, Noishiki Y, Nishida H, Endo M, Koyanagi H: Evaluation of small caliber vascular prostheses implanted in small children; Activated angiogenesis and accelerated calcification, *ASAIO J*, 44:M496-M500, 1998
33. 富澤康子：細胞と組織移植によるバイオ人工血管、人工臓器、27:708-714、1998
34. 富澤康子、北村昌也、小柳仁：日本における長期植え込み型人工臓器のインプラント・データ・システム設立の可能性、*人工臓器*、27:92-96、1998
35. 富澤康子、遠藤真弘、小柳仁：ミズオオトカゲとグリーンイグアナの心臓の観察からの Transmyocardial perfusion に関する一考案、*冠疾患学会雑誌*、4:71-74、1998
36. 富澤康子、遠藤真弘、西田博、古川博、華山直二、安原清光、小柳仁、中村光司、羽生富士夫、高崎健:急性胆嚢炎により胆嚢摘出術または経皮経肝的穿刺ドレナージを必要とした虚血性心疾患に対する冠動脈バイパス術、*Coronary*, 15:165-170、1998
37. 坂本貴彦、遠藤真弘、西田博、富澤康子、木原信一郎、小柳仁：術前左室造影施行不能例に対する冠動脈バイパス手術の検討、*日胸外会誌*、46:966-970、1998
38. 古川博史、遠藤真弘、西田博、富澤康子、平田欽也、川合明彦、小柳仁:冠動脈内血栓が疑われ術中造影及び PTCR を施行した MIDCAB の 1 治験例、*Coronary*, 15:113-117、1998
39. 上部一彦、遠藤真弘、西田博、富澤康子、小柳仁、大西哲、笠貫宏:III群治療薬 MS-551 が著効した致死性不整脈(VT, Vf)による人工心肺離脱困難例の経験、*胸部外科*、51:108-111、1998
40. 佐藤志樹、西田博、遠藤真弘、富澤康子、椎川彰、赤沢俊政、佐々木英樹、小柳仁:呼吸機能障害を伴った症例に対する冠動脈バイパス術の検討、*日胸外会誌*、46:145-149、1998
41. 鮎沢慶一、遠藤真弘、西田博、富澤康子、上部一彦、前田朋大、丁毅文、滝口信、石田徹、小柳仁：左中大脳動脈に高度狭窄を伴う狭心症例に対する 1 手術治験例;術中脳血流モニタリングの有用性、*胸部外科*、51:731-734、1998

42. 小林健介、遠藤真弘、西田博、富澤康子、佐藤宏明、小柳仁:
Extramammary Paget's Disease で植皮施行後に労作性狭心症に対する冠状動脈バイパス術を施行した 1 例、日胸外会誌、46:878-881, 1998
43. 岡徳彦、遠藤真弘、西田博、川合明彦、富澤康子、小柳仁: T M L R 術 1 時間後の左室造影で心筋へのチャンネルを認めなかった 1 例、Coronary, 15:171-175, 1998
44. Noishiki Y, Yamane Y, Okoshi T, Tomizawa Y, Satoh S: Choice, isolation, and preparation of cells for bioartificial vascular grafts, Artif Organs, 22:50-62, 1998
45. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H: Multiple CABG with only In Situ Arterial Conduits, Cardiovascular Engineering, 3:22-25, 1998

この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学泌尿器科 合谷信行

はじめに

この度の研究計画及び成果のエッセンスについて簡単に解説しておきたい。それを理解しておくことで、本件級の全貌がだまかに理解できるであろうし、いかに津づく研究成果論文、参考論文を読むに当たっても、一層深い理解が得られるであろう。また同時に、この研究を始めるに当たった背景についても解説しておくので、それを知ることによって、この度の研究成果の意味を浮き彫りにすることができると思う。

研究背景

生殖泌尿器の欠損部に対して、一般的には体の中の他の部分から組織を採取して利用するが、もともとの器官が持つ機能を完全に保持させることは不可能に近い。今回は特に泌尿器の中でも尿管に注目し、組織工学的手法を用いて生体親和性の良好な代用尿管の開発にあたる。また、尿管の移行上皮に関しては分裂能が低く、老化しやすいため培養は困難とされているため、移行上皮の再生についてはほとんど研究されていない。我々は代用尿管を開発する上で生体内における尿管の上皮再生を観察した。この基礎研究においては尿管にステントを留置したときに、植え込み直後は移行上皮が剥離・損傷されていても、良好に再生し、再生した移行上皮の下層には豊富な細小血管が形成されていた。すなわち生体内の血管新生をつかさどる生理的活性物質の中では basic fibroblast growth factor (bFGF) が最も強いとされており、これが同時に尿管壁の上皮の再構築にも関与している可能性があると考えている。以上のような状況のもと、耐久性、耐水性に優れた代用尿管の開発およびそれに関わる生理的活性物質の研究にかかる期待はきわめて大きい。

研究目的

生体内において欠損部を埋め、機能する代用尿管を開発するのを目的にしている。この代用尿管において、内因性サイトカインを活性化することにより、治癒を促進し、さらにその尿管の壁内および周囲の bFGF の推移と移行上皮の再生の状態から生理的活性物質の関与状態を追求する。さらに外因性にサイトカインを利用することによりさらに治癒が加速することが可能か検討する。

本研究期間内には代用尿管の開発、この代用尿管における bFGF の役割、尿管の移行上皮の再生に関与するサイトカインを中心に研究する。また余裕があれば、外因性 bFGF の影響を recombinant bFGF を用いるところまで到達する予定である。この研究は、尿路の再建に貢献するばかりでなく、将来の泌尿器科における高機能型人工臓器への発展をも目指している。

学術的な特色と独創的な点

- ① **Tissue engineering** の手法を用いた内因性サイトカイン活性型人工臓器である。
- ② ホモジナイザーの使用では細胞活性が低下するため組織を細切するという刺激で内因性サイトカインを活性化している。
- ③ 自己の組織を移植するので、異物反応、拒絶反応などが問題にならない。
- ④ 人工材料を基礎構築とし、生きた細胞を含有する生体材料を合わせて利用するように代用尿管を設計した、ハイブリッド人工臓器である。
- ⑤ 細胞外マトリックスを化学処理なしに生の状態で組み込んでいるので移植された細胞の培地としての至適条件がそろっている。
- ⑥ 代用尿管の開発は世界でも少ない。
- ⑦ 移行上皮の再生時に血管新生が豊富であ

ったため bFGF の強い関与が疑われるが、泌尿器系の移行上皮の再生に bFGF が関係するのを観察した報告はない。

⑧ recombinant bFGF が尿管の移行上皮再生に影響するという研究はされていない。

これらの各点を活かすことにより、最先端のデバイスに発展させることが可能である。昔から自己組織は用いられてきたが、細胞を傷害することにより内因性サイトカインを活性化し、それによって分裂能を高め尿管の上皮の再生を目指すというように、発想を転換することにより独創的な研究になっているといえる。

予想される結果と意義

このような研究が重要かつ緊急性を有することは明白な事実であり今まで人工臓器の開発に成功してきた我々の実績から考えて困難はなく本研究は必ずや実用化されると考える。また、現在代用尿管がないために漏孔を作成してきた患者の ” 生活の質 ” を向上させることに充分に貢献する考える。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

泌尿器学において growth factor の研究はほとんど行われておらず、膀胱の移行上皮に EGF は必要ないとさえいわれている。そのため bFGF の研究は興味を持たれるはずである。代用尿管においては donor cell を効果的に用いること、細胞の長期生存、成長のために良好な環境を作ることが重要であるが、膀胱の平滑筋細胞を利用した(Langer, 1990)り、管状にしたコラーゲン製スポンジを尿管として用いた(Mooney, 1994)が失敗しており、細胞のみより我々の用いる組織片の方が有利である可能性がある。吸収性ポリマーを用いた報告(Olsen, 1992)や吸収性ポリマーに膀胱の平滑筋細胞を播種して培養した報告がある(Atala, 1992)が、我々の行ったように培養の手間がいらず、手術台の上で行える方が優れていると考える。

本研究の着想に至った経緯・準備状況等について

現在まで、人工臓器とサイトカインについての研究を行ってきたが、内皮細胞での被覆が遅延する人工血管においてもサイトカインの働きにより血管新生を増強させ、それを内腔面に誘導することに成功した。尿管の移行上皮も分裂が遅延していることに注目し、これを内因性サイトカインの働きにより無理なく促進すれば良いと考えた。I-①で代用血管の開発を開始し、基礎実験は順調に進んだ。動物実験にても移行上皮の再生と血管新生の関係も明らかになりつつあり十分に準備されている。

研究計画

平成 10 年度に 1 ～ 5 を、平成 11 年度に 5 ～ 7 を予定した。

1. 代用尿管の設計

基礎構築の選択(吸収性ポリマー、非吸収性ポリマー、高有孔性布製人工血管)、生体材料の選択(自己の皮下結合組織、静脈、血管、膀胱壁、尿管、大網)、処理法の検討(細切方法、圧力注入法)、性状および形態の検討、recombinant bFGF の賦与方法の検討

2. 代用尿管の作成

basic material に細切した生体材料(自己)を圧力をかけて壁内に播種する。

3. 代用尿管の in vitro 安全性評価

in vivo 評価をするために

水漏れ試験：代用尿管からのリークを調べる。basic material, 生体材料、細切条件、壁内注入条件を変えても漏れるようならば吸収性ポリマーで内側から被覆することも考える。

組織培養：作成した代用尿管を培地の条件を尿に近いように pH を低く設定しておく。細胞の増加が好ましい条件を材料面から求める。培地中の bFGF を測定する。

4. 皮下植え込み in vivo 実験

動物(雑種成犬)の皮下に作成した代用尿管をクーボン状にして 2 週間、植え込み組織学的に免疫組織学的に細胞の増殖、遊走能を観察する。また周囲化からの血管新生

状況を見る。bFGF を抗体を用いて染色し、陽性になる細胞の種類、血管新生の部位との関係、治癒の状態と bFGF との関係を観察する。

5. 急性動物実験

雑種成犬の尿管を作成した代用尿管で置換し、植え込み後の尿漏れ、適合性を24時間観察する。24時間後に標本を摘出し観察する。

6. 慢性動物実験

雑種成犬に全身麻酔下に清潔に作成した代用尿管を長さ5cmに植え込み、3ヶ月間観察する。コントロールとして同じ太さ、長さのテフロングラフトを対側に植え込む。

- a. 腎盂尿管造影的機能評価：慢性犬の造影を毎月1回行い、形態(腎盂の拡大、尿管の吻合部狭窄)および機能を評価する。
- b. 超音波的検査：腎臓および尿管の状態を毎月1回検査する。
- c. 血液生化学的検査：赤血球数、白血球数、BUN、Cr、GOT、LDH、等を検査する。
- d. 尿検査：尿中の細胞を植え込み直後、1日目、1週間目、2週間目、1ヶ月目、2ヶ月目、3ヶ月目を検査する。
- e. 血中サイトカイン測定：ELISA法にて検査時に同時に行う。
- f. 尿中サイトカイン測定：ELISA法にて

7. 病理学的検査

摘出した試料を顕微鏡的に観察する。また走査電顕で移行上皮の被覆過程の観察を行う。また免疫組織学的にbFGFを染色し線維芽細胞、平滑筋細胞および移行上皮の増殖及び遊走の状態を観察する。

研究成果と参考論文

今回の研究では内因性サイトカイン活性化型代用尿管の開発を目的としたが、最初に検討したTF (Tissue fragmented) polyesterグラフト、アルコール保存頸動脈グラフトは、人工尿管の材質として適当でないことが判明した。しかしメタリックステントを用いた留置尿管部の開存状態および移行上皮の再生過程の観察においては、十分な成果が得られた。すなわちステント留置時の操作で、上皮は完全に脱落し尿管壁にも障害が

生じ、約1週後の所見でも強い炎症所見が残っていた。2カ月以降では、炎症はすでに消失しており、6カ月、7カ月においては、良好な再生上皮の存在が確認された。この成果を元にまとめた、第一の成果論文『内因性サイトカイン誘導による代用尿管の基礎的実験およびMetallic stent尿管内留置後の尿路上皮再生に関する検討』は、この度の研究成果として、学術的に評価されるに十分であると考えている。

また参考論文の2番目には『Ethanol injection therapy of the prostate for benign prostatic hyperplasia: preliminary report on application of a new technique.』を示したが、これは無水エタノールを肥大した前立腺組織に直接注入して得られた臨床効果をまとめたものであり、世界で最初の臨床報告である。われわれはイヌ前立腺に無水エタノールを注入して、経時的に組織変化を検討した。その結果、注入直後には強い機械的障害の所見や炎症による変化がみられるが、次第に治癒過程をとり、6カ月後には、間質の線維化と腺管の萎縮が観察されている。さらに、腎移植にまつわる最近の話題、癌患者の尿中のインターロイキンに関して、また、血中および尿中のsoluble intercellular adhesion molecule-1にも注目した。参考論文の最後には慢性透析患者は虚血性心疾患で失うことが多いが、透析患者の冠動脈バイパス術の周術期の循環管理にも考察を加えた。

まとめ

我々が最初に検討した生体及び人工適合性材料は、人工尿管として使用された場合内因性サイトカインを遊走させる可能性は否定できないが、内腔の保持、尿の非漏出性という点での問題が指摘された。次に可能性を検討したメタリックステントの尿管留置実験では、7カ月という比較的長期において良好な移行上皮の再生が観察された。しかし再生上皮の過形成のために水腎症を来した症例もあり、この原因を解明しつつ、今後の人工尿管の開発を行うことが必要であることが示唆された。

内因性サイトカイン誘導による代用尿管の基礎的実験および Metallic stent 尿管内留置後の尿路上皮再生に関する検討

東京女子医科大学 泌尿器科
合谷信行・石川暢夫
同 循環器外科
富澤康子

【要旨】

われわれは、メタリックステントの代用尿管としての可能性を検討した。胆道用に開発された、アキュフレックスステント (ACCUFLEX, Medi-tech, Boston Scientific Corporation 社製) をイヌの尿管内に留置し、経時的に肉眼的及び組織学的観察を行った。その結果6カ月後の長期観察例において良好な組織親和性と内腔通過性の確保及び炎症や異型性の無い上皮の再生が確認された。しかし症例によっては、再生上皮過形成のために尿管が狭窄を起し、水腎症をきたす可能性も判明した。このメタリックステントが、今後尿管狭窄の治療法の1つとして臨床応用の可能性を充分有していると考えられたが、狭窄を生じたケースではそのメカニズムを解明することが残された課題である。

index words: 代用尿管・移行上皮・人工臓器・サイトカイン・bFGF・再生上皮・メタリックステント

はじめに

尿管は腎臓で生成された尿を膀胱まで運搬する管状の臓器である。尿管の閉塞性疾患は、腎機能に重大な影響を及ぼすため、早急に外科的治療が必要とされる。

尿管の修復不能の障害に対し、自己尿路以外の補填材料として、多くの材質が検討されてきた。検討された材質は多岐に及び、まず生体材料としては、動脈、静脈、筋膜、腱、皮膚、卵管、腸管などの使用が試みられた。また人工的合成材料として、glass, rubber, silber, vitallium¹⁾, tantalum²⁾, polyethylene³⁾⁴⁾⁵⁾, polyvinyl⁶⁾, teflon⁷⁾⁸⁾⁹⁾, silicone¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ が人工尿管としての適合性を動物実験で検討された。しかし現在臨床的使用に耐えうる代用尿管を、われわれは持ち合わせていないというのが実状であろう。

われわれは E-PTFE (Expanded polytetrafluoroethylene) 人工尿管の実験結果を基礎とし、TF (Tissue fragmented graft)

グラフト、アルコール保存頸動脈グラフト、膀胱壁グラフトの人工尿管としての可能性を検討した。その結果少なくとも TF (Tissue fragmented) polyester グラフトおよびアルコール保存頸動脈グラフトは、人工尿管としては実用的でないことが判明したが、この実験において尿管の再生の経過が観察された。

今回は、metallic stent (メタリックステント) の尿管への応用についてイヌを用いて実験を行い、尿管の再生状況を含めた狭窄尿管への適応を、短期的及び長期的な経過で検討したので報告する。

対象と方法

用いたメタリックステントは、アキュフレックス胆管用ステント (ACCUFLEX, Biliary Stent System; Self-expanding for biliary malignant structures: Medi-tech, Boston Scientific Corporation 社製) である。実験動物としては、体重 20 ~ 26kg の雑種成犬を

用いた。麻酔はペントバルビタールによる静脈麻酔を使用した。

実験方法であるが、イヌ腹部正中切開で入り、経腹的に後腹膜腔に達し中部から末梢の尿管を露出した。次に中部尿管にメスで1~2mmの小切開を入れ、この部位より尿管の中枢側に向かってmetallic stent deviceを挿入した。ステントの位置を確認後、支持カテーテルを引き抜き、ステントのみを尿管内に残した。尿管の切開部位は、3-0 vicryl 縫合糸を用いて閉鎖した。これらの操作が終わった後、創を3層に閉鎖し、手術を終了した。摘出した標本は、ホルマリン処理し、HE染色およびMasson染色を行った。ステント部、上方および下方の尿管、腎臓の肉眼的、組織学的検討を、6日、3週、2カ月、5カ月(N=2)、6カ月(N=2)、7カ月で行った。

術後の検査としては、静脈麻酔下に点滴静注腎盂造影検査(DIP)を行い、人工尿管の通過性および腎盂の形態を検索した。

結果

(1) 6日後(ステントサイズ、長さ4cm、径10mm) :

ステント(図1)は尿管内に留まっており、尿管内腔に露出していた。ステント内腔は開存しており、ステントそのものに変化はみられなかった(図2)。尿管組織は発赤を示し浮腫状であった。組織学的には、尿管上皮は脱落しており、皮下組織および筋層内に出血を主とした強い炎症所見がみられた(図3)。ステント部位の周囲組織には炎症所見はみられなかった。腎臓には糸球体の変化や尿細管の拡張など病的変化はなかった。

(2) 3週後(長さ4cm、径10mm) :

ステント内腔は開存しているが、まだ再生上皮は認められない(図4)。組織学的にもステント部尿管組織の炎症所見は落ちてきており、赤血球、白血球の浸潤は軽度である。上部尿管及び腎臓にも尿のうっ滞を疑わせる所見はみられなかった(図5)。

(3) 2カ月(長さ4cm、径10mm) :

ステント内腔は一部薄い膜状の組織に覆われていたが、炎症所見は認められなかった。上部尿管の拡張や水腎症はみられず、腎臓も組織学的にほぼ正常と考えられた。

(4) 5カ月-1(長さ4cm、径10mm) :

ステント内腔は薄い平滑な組織に覆われており、炎症所見はみられなかった、上部尿路の拡張もなく、腎臓もほぼ正常な所見を呈していた。

(5) 5カ月-2(長さ4cm、径10mm) :

ステントは腎盂尿管移行部に跨って位置しており、先端は腎盂内にあった(図6)。ステント内面は粗く不整な組織に覆われており、この部分の尿管は狭窄になっていた。腎臓は高度な水腎症を呈していた(図7)。腎実質内には出血及び浮腫、白血球の浸潤が認められた。

(6) 6カ月-1(長さ4cm、径10mm) :

X線検査(DIP)が施行されたが、メタリックステントは十分開いており、造影剤の漏れはみられなかった。ステントの直上及び直下の尿管は拡張していたが、上部尿管、腎盂、下部尿管に変形、拡張はなかった。造影剤の排泄も良好で、腎機能もほぼ正常であると考えられた。摘出標本では、ステント部の外側は本来の尿管と同様の組織で覆われており、内側面は尿管上皮と区別のつかない表面平滑な組織がみられ、ステントが露出している箇所はなかった。ただ吻合部に軽い組織の隆起が観察された。ステント部分の組織学的検討では、ステント内側に異型性のない移行上皮が低層に再生しており、上皮下には筋層もみられた(図8)。ステント外側は、血管新生を伴った結合組織で包まれていた(図9)。腎臓の組織所見であるが、糸球体はほぼ正常所見を示しており、尿細管も拡張はなく浸潤細胞もみられなかった(図10)。少なくとも尿路に起因する病変は指摘できなかった。

(7) 6カ月-2(長さ6cm、径8mm) :

肉眼的所見では、グラフトは周囲組織と癒着していた。グラフトの内側には、表面が粗い再生組織に覆われていたが、上部の

尿管は拡張しており、すなわち水腎症、水尿管症を呈していた。

(8) 7カ月(長さ6cm、径8mm) :

6カ月-1)とほぼ同様であり、ステントの外側及び内腔に炎症所見はみられなかった。ステント内面は平滑な組織に覆われており、上部尿管の拡張や水腎症はみられなかった。

考察

尿管は腎臓で生成された尿を膀胱まで運搬する管状の臓器である。尿管は実質臓器ではなく機能的に不全状態に陥ることはないが、先天性疾患、炎症、悪性腫瘍などのため通過が傷害されると、水腎・水尿管症を引き起こし、腎機能に重大な影響を及ぼす。この尿管の通過障害が局所において外科的に修復されることが不可能な場合、代用尿管が必要とされるが、現在のところ理想的な人工尿管はない。このような場合には、実際には尿路変向術または自己腎移植術が行われることになる。

尿管の修復不能な障害に対し、自己尿路以外の補填材料として、まず種々の生体材料の使用が試みられた。しかし臨床的に使用されたのはもっぱら腸管だけであり、それも現在ではほとんど使用される機会のないのが実状である。これに対し人工的合成材料も、多くの材質が人工尿管としての適合性を動物実験で検討されたが、良好な結果が得られたものは少ない。失敗の原因としては、尿漏、吻合部の痂皮の形成および狭窄、さらにグラフトの移動などが問題とされてきた。

人工尿管の備えるべき資質としては、1)耐水性および耐久性にすぐれていること、2)内腔が保持されること、3)良好な尿流が保持されること、4)生体適合性が良好なこと、があげられる。われわれはすでに長さ4cmのE-PTFEグラフトを、人工尿管として、自己移植したイヌの腎盂と膀胱の間に移植し、9頭において最長21カ月観察した結果、次の結論を得ている¹⁹⁾⁶⁾。すなわち、1)いずれの時期においても尿瘻はみられなかった。1例においてグラフトが脱落したために膀胱結石が形成されたが、他の8例

では結石形成はみられなかった。

2)9例のうち5例において、腎臓の組織学的所見は正常であった。残り4例は水腎症を示したが、このうち器質的尿路通過障害が存在したのは2例で、原因はグラフトの屈曲およびグラフト脱落後の肉芽組織による狭窄であった。

3)E-PTFEグラフト自体はほとんど変化を示さず、エオジン好性の無構造物質の新入がみられるのみであった。

4)E-PTFEグラフトは、ある一定期間において人工尿管として機能するが、やがて脱落する。これは、グラフト周囲に再生上皮を伴った肉芽組織が発達するためであろう。しかし、この新生尿管ともいべき管状構造物が、尿を運搬する機能を示すことが示唆された。

E-PTFEグラフトを人工尿管として用いた Dreikomら、Varady等、および三輪らは、E-PTFEグラフトそれ自体が人工尿管として機能する可能性を示唆している。しかしわれわれは実験結果より、長さ約4cmのE-PTFE尿管は、生理的に最終的には尿路より排除される運命にあるが、ある一定期間においては尿漏、結石形成、重篤な感染症がなく尿路における適合性は良好で、腎機能を保全しつつ尿を通過させることが可能である、という結論を得た。

上記のように尿路において異物として認識される物質は、結局排除される機転にあると考えられる。この機転には、上皮の再生がグラフトの外側に起こるという現象に合致する。例えばE-PTFEが人工血管として用いられた場合、移植後3~4週で、E-PTFE内腔表面の全長にわたり薄いneointimaが新生する。この頃、E-PTFE壁内には線維芽細胞の侵入がみられる。さらに4~5カ月後には、E-PTFEの壁全層において線維化が進む。このように管状構造をもった人工的補填物質が生体内で機能を保持するためには、管腔の内面に上皮の再生がみられ、壁自体は何らかの器質的変性により組織内に埋没することが必要であろう。

次にわれわれはサイトカインの誘導を図ることにより、人工尿管の組織への親和性、

再生過程の増進が起こるのではないかと推測し、さらなる尿管補填実験を行った。検討した人工尿管としての材料は、①管腔状の polyester に細切した自己組織を自家移植した TF(Tissue fragmented)ポリエステル、②アルコール加橋処理して抗原性を落としたアルコール保存同種頸動脈、③フリーグラフトとして採取後筒状にした自家膀胱壁である。これらの人工尿管としての材料を、イヌ欠損尿管に補填し人工尿管としての可能性を検討した。実験件数は少ないが、TFポリエステル、アルコール保存頸動脈ともに内腔の通過性が保持できず材質の改善が求められた。膀胱壁グラフトは、7日後において内腔は保たれておりグラフトの外側に血管新生がみられたが、基礎実験のみで終わった¹⁷⁾。

今回はメタリックステントの尿管狭窄への有用性を検討するために、アキュフレックスステント (ACCUFLEX, Medi-tech, Boston Scientific Corporation 社製) の尿管内留置実験を行った¹⁸⁾¹⁹⁾。

このアキュフレックス胆管用ステント (ACCUFLEX, Biliary Stent System; Self-expanding for biliary malignant structures: Medi-tech, Boston Scientific Corporation 社製) は、永久型ステント(permanent stent)とされており、すでに胆管用として臨床的に使用されている。ACCUFLEX は、狭窄部をかなりの拡張力により広げ、内腔を確保できる機能を有する。

われわれは、イヌ尿管内に ACCUFLEX を留置することにより、留置部位の尿管及びステント自身、ステントより上方の尿管、さらには腎臓の肉眼的、組織学的変化を経時的に観察した。6日後ではステントは尿管内に留まっており、炎症所見とともに上皮の脱落がみられた。これはステント挿入時の操作による機械的障害とその修復機転を表していると思われた。2カ月後では上皮の再生が起こり始め、治癒機転が働いている所見が観察された。比較的長期の所見では、6カ月後の1例及び7カ月後の例で、尿の通過性が保たれているのが確認された。このステント部位の4~6 cm の adynamic

portion が、上部尿路における尿のうっ滞を招くのではないかと心配されたが、上部尿管の拡張も腎盂の拡大も認められなかった。さらに腎実質の組織学的所見もきわめて良好であった。すなわち短い部分の尿管の尿運搬運動の欠如は、その上下の尿管の蠕動が正常に保たれていれば尿を導管として通過させる機能を果たしていることが示唆された。さらに驚くべきことは、ステント内腔が再生上皮により被覆されていたことである。通常異物が存在する場合の再生組織は、異常に炎症性の反応を示し多少とも乳頭状の変化を示すものと予想されたが、われわれの実験結果では、再生上皮はきわめて低層で異形性もなく、ほとんど正常の上皮に近かった。

ここでステント留置6日後の尿管の組織が、ステント挿入時の操作に起因する尿管上皮の脱落を示していたことを考えると、この再生上皮は、ステントの外側に存在した尿管の組織が、ステントの強い外側への圧迫によりステントの内腔に進展してきたものか、あるいはステント両端から上皮が再生し延長してきたものかは現時点では不明であり、今後の検討に解答を委ねなければならない。

しかし5カ月後および6カ月後の1例で再生上皮が過形成を示し、ステント内腔を閉塞せしめた結果、水腎症を来したことについては十分な注意が必要である。この原因としては、まず感染が挙げられる。

ステント植え込み術は開腹操作で行われており、イヌにとってみれば過大なストレスを与えたことになる。化学療法としては手術当日に抗生物質を全身投与するのみであり、より長期の化学療法が必要であったのかもしれない。用いたステントは最小のものを選んだが、それでも長さ4~6 cm、径8~10mmのサイズであった。イヌの大きさもできるだけ体重が25kg以上としたが、結局実験に用いたイヌ尿管の大きさに比べステントのサイズが大きすぎたことは否定できない。ステントが大きすぎると、ステント挿入時に尿管へのダメージが強くなり、強い炎症が生じる可能性がある。また尿管

の障害のため尿管壁からの尿の漏出が生じ、それが尿嚢腫を生じるような明らかに病的なものでなくとも、なんらかの異常な局所反応を引き起こしてしまったのかもしれない。また長期生存犬では十分な健康状態が保たれず、何らかの原因で全身状態が不良となり、局所における過剰反応をおこしたことも否定できない。ヒトに応用することを想定した場合、適応したサイズのステントを選ぶこと、侵襲の少ない方法で留置すること、十分な化学療法を行うこと、が重要であろう。また過剰な局所反応が疑われる場合にはステロイドの投与なども有効かもしれない。

悪性腫瘍が原因の尿管狭窄では、患者の予後が通常数カ月、長くても1年前後と短いことを考えれば、アキュフレックス尿管ステントが留置7カ月後にも良好な組織親和性と、十分な内腔の保持、さらには異物反応のきわめて少ない内膜再生が得られたことは重要なことである。すなわち症例を選べば、アキュフレックス尿管ステントは、腎後性腎不全に対する尿管内留置材料として、十分臨床応用する価値のあることが確認された。

この尿管ステントの7カ月以降のさらに長期の変化を検討することにより、適応がより広がる可能性を有している。すなわち先天性の原因または炎症による尿管通過障害においては、手術的療法を余儀なくされている場合が大部分である。もしこのステントが、いわれているように permanent stent として使用可能であれば、すなわちきわめて長期に腎機能に影響を与えることなく尿の通過が達成されれば、患者に与える恩恵はこの上ないものとなる。尿管ステントは内視鏡的手技により留置可能であり、minimally invasive treatment として臨床使用されるであろう。

われわれは7カ月後の長期観察例において、メタリックステントが良好な組織親和性と内腔通過性の確保及び炎症や異型性の無い上皮の再生を示すことを確認した。しかし再生上皮の過形成のため腎機能に悪影響を生じる症例があることも経験した。こ

の再生上皮の過形成の原因を解明すること、良好な再生機転が得られた場合にはより長期の成績を検討することが必要である。このような問題点が残されてはいるが、このような問題点が残されてはいるが、このメタリックステントが、今後さまざまな原因による尿管狭窄の治療法の1つとして、地位を確保する可能性を充分有していると考えられた¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。

文献

1. Lord JW, Jr, Stefko PL, Stevens AR: On bridging a gap in the ureter by means of a free fascial transplant over a strighth vitallium tube. A experimental study. J Uol, 49:249-254, 1943.
2. Lubash S: Experiences with tantalum tubes in the reimplantation of the ureters in the sigmoid in dogs and humans. J Uol, 57:1010-1027, 1947.
3. Herdman JP: Polyethylene tubing in experimental surgery of the ureter. Brit J Surg, 37:105-106, 1949.
4. Tulloch WS: Restoration of the continuity of the ureter by means of polyethylene tubing. Brit J Urol. 24:42-45, 1952.
5. Scher AM, Erickson RV, Scher M: Polyethylene as partial ureteral prosthesis in dogs. J Urol, 73:987-989, 1955.
6. Ulm AH, Lo MC: Total bilateral polyvinyl ureteral substitutes in the dogs. Surgery, 45:313-320, 1959.
7. Ulm AH, Krauss L: Total unilateral teflon ureteral substitutes in the dogs. J Urol, 83:575-582, 1960.
8. Kocavara S, Zak, F: Ureteral substitution with dacron and teflon prosthesis. J Urol, 88:365-376, 1962.
9. Warren JW, Jr, Coomer T, Fransen, H: The use of teflon grafts for replacement of ureters. II, J Urol, 89:164-166, 1963.
10. Blum JA, Skemp C, Reiser, M: Silicone rubber ureteral prosthesis. J Urol, 90:276-280, 1963.
11. Stern A, Apoil A, Thony H et al: A silicone polyester prosthesis for ureteral replacement.

- Trans Amer Soc Artif Int Organs, 19:370-375, 1973.
12. Dufour B, Blodel P: The prosthetic replacement of the ureter. *Eur Urol*, 1:134-139, 1975.
 13. Sculmann CC, Vandendris M, Vanlanduyt, et al: Total replacement of both ureters by prosthesis. 2:89-91, 1976.
 14. Auvert J: Review; Trends in alloplastic replacement of segments of the urinary tract. *Urol Res*, 4:143-145, 1976.
 15. 尿路における E-PTFE グラフト補填に関する研究 ; 第 1 報 欠損膀胱壁における E-PTFE および膀胱壁の変化について、日泌尿会誌、77:813-821, 1986.
 16. 尿路における E-PTFE (Expanded-polytetrafluoroethylene. グラフト補填に関する研究; 第 2 報 E-PTFE 人工尿管、日泌尿会誌、78:1923-1922, 1987.
 17. 合谷信行: 組織片のサイトカインにより細胞増殖・遊走が促進し上皮化が速やかな代用尿管の開発(課題番号 08671849、平成 8,9 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)研究成果報告書
 18. Pauer W, Lugmayr H: Metallic wallstents; A new therapy for extrinsic ureteral obstruction. *J Urol*, 148:281-284, 1992.
 19. Lugmayr H, Pauer W: Self-expanding metal stents for palliative treatment of malignant ureteral obstruction. *AJR*, 159:1091-1094, 1992.
 20. Flueckiger F, Lammer J, Klein GE, Hausegger K, Lederer A, Szolar D, Tamussino: Malignant ureteral obstruction; Preliminary results of treatment with metallic self-expandable stents. *Radiology*, 186:169-173, 1993.
 21. Thijssen AM, Millward SF, May KT: Ureteral response to the placement of metallic stents; An animal model. *J Urol*, 151:268-270, 1994.
 22. von Sonnenberg E, D'Agostino HB, O'Laoide R, Donaldson J, Sanchez RB, Hoyt A, Pittman CC: Malignant ureteral obstruction: Treatment with metal stents; Technique, results and observations with percutaneous intraluminal US. *Radiology*, 191:765-768, 1994.
 23. Reinberg Y, Ferral H, Gonzales R, Manivel JC, Hulbert J, Mayner M, Pulido-Duque JM, Hunter D, Castaneda-Zuniga WR: Intra-ureteral metallic self-expanding endoprosthesis (Wallstent in the treatment of difficult ureteral strictures. *J Urol*, 151:1619-1622, 1994.
 24. Barbalias GA, Siablis D, Liatsikos EN, et al: Metal stents: A new treatment of malignant ureteral obstruction. *J Urol*, 158:54-58, 1997.
 25. Lopes-Martines RA, Singireddy S, Lang EK: The use of metallic stents to bypass ureteral strictures secondary to metastatic prostate cancer: Experience with 8 patients. *J Urol*, 158:50-53, 1997.
 26. Leveillee RJ, Pinchuk L, Wilson GJ, Block NL: A new self-expanding lined stent-graft in the dog ureter; Radiological, gross, histological and scanning electron microscopic findings. *J Urol*, 160:1877-1882, 1998.



図1 メタリックステント (ACCUFLEX)、術後6日目
ステントは本来有する拡張力により十分開いている。



図2 ステント留置術後6日目
ステントは良好に開存しており、尿管壁には尿漏を起こさせるような損傷はない。

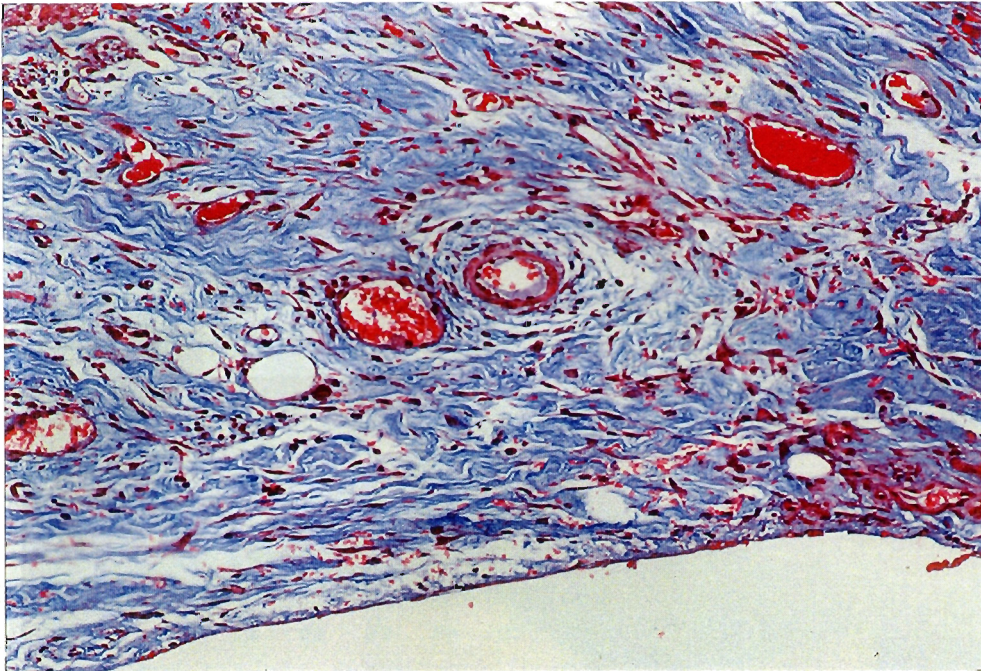


図3 スtent留置6日目尿管組織学的所見
尿管上皮は脱落しており、粘膜下組織および筋層内に出血を主とした強い炎症所見がみられる。(Masson染色、×50)



図4 スtent留置2ヶ月目摘出標本 (Stent部)
Stent内腔は開存しているがまだ再生上皮は認められない。



図5 ステント留置2ヶ月目摘出標本（腎臓および上部尿管）
上部尿管及び腎臓にも尿のうっ滞を疑わせる所見はみられない。

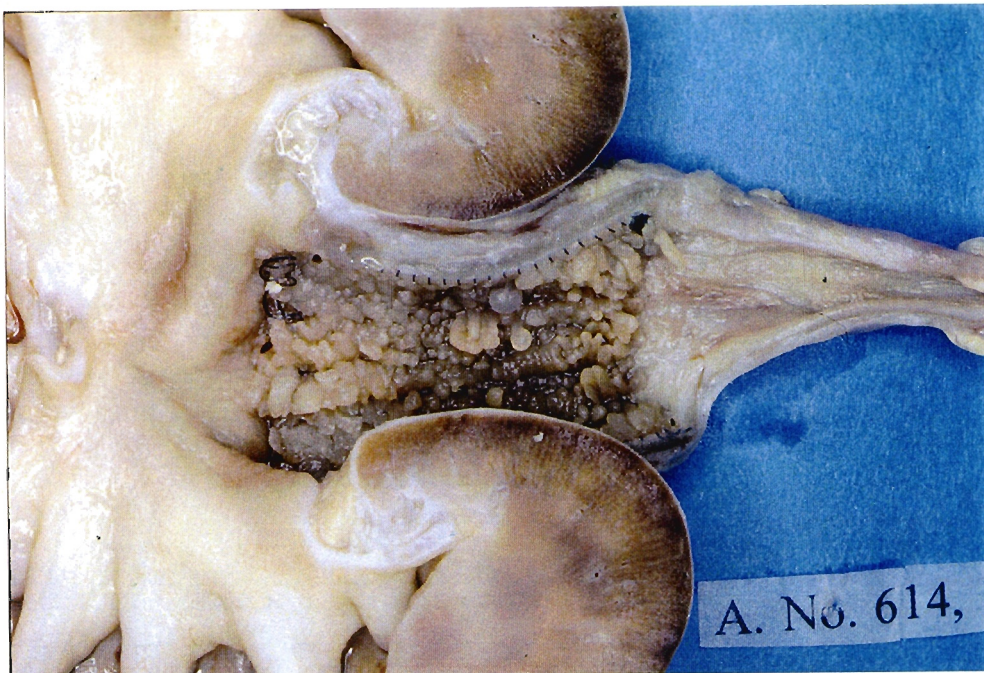


図6 ステント留置5ヶ月目摘出標本
ステントは腎盂尿管移行部に跨って位置しており、先端は腎盂内に達している。ステント内面は粗く不整な組織に覆われており、この部分の尿管は狭窄している。

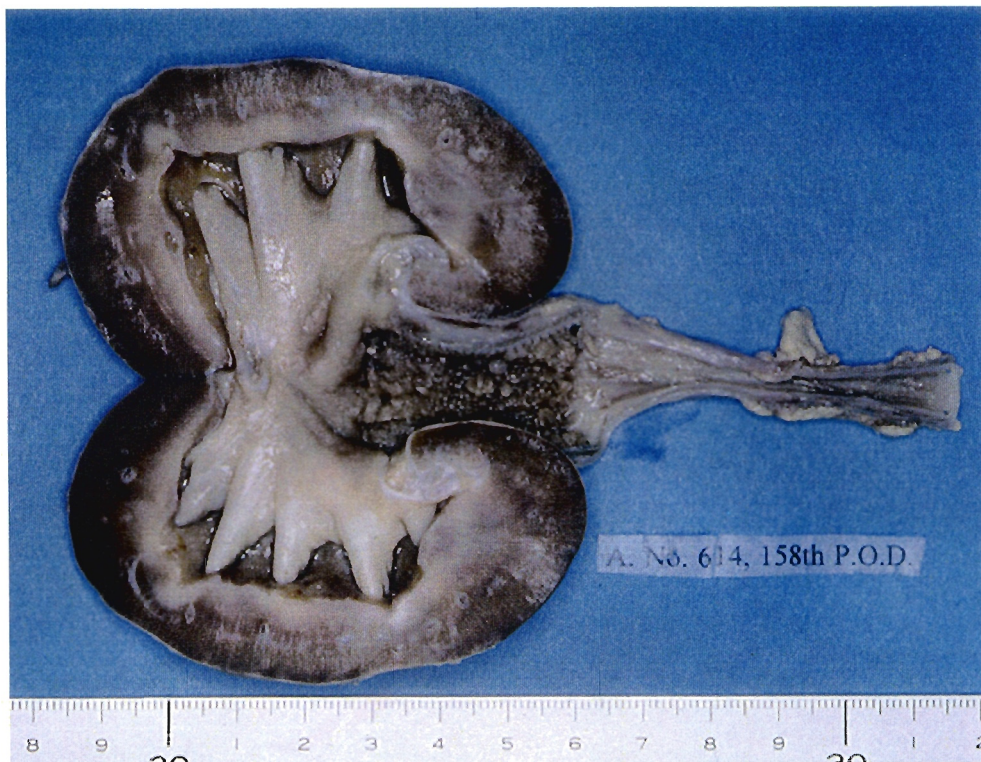


図7 スtent留置5ヶ月目摘出標本
腎臓は高度な水腎症を呈しており、腎実質は薄くなっている。

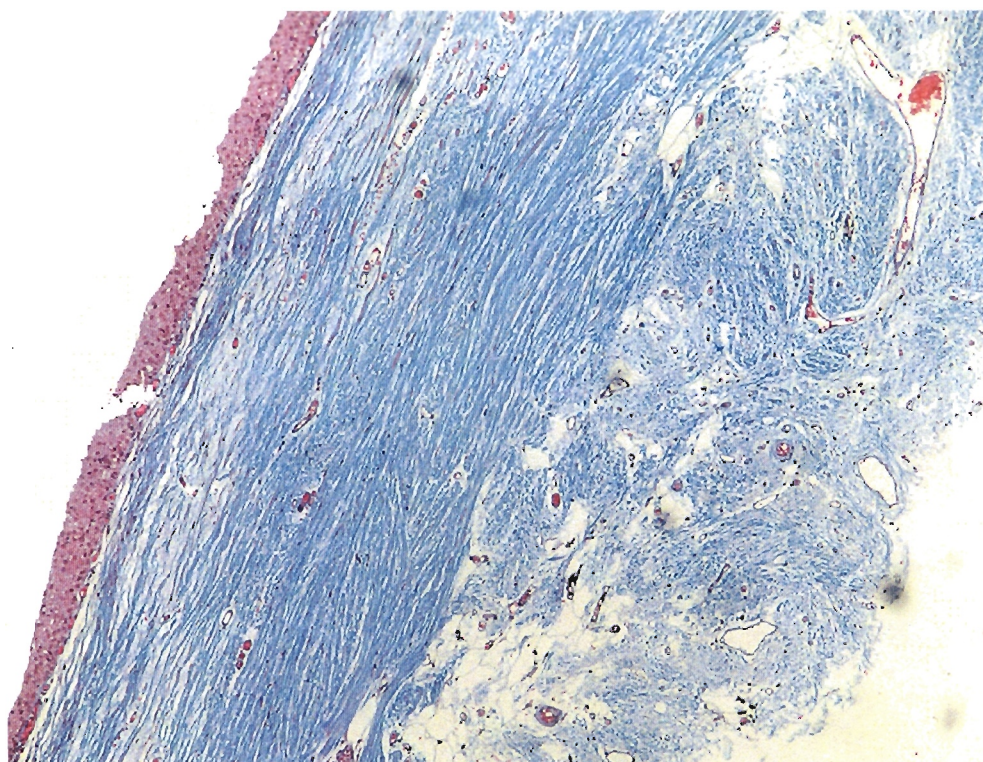


図8 留置6ヶ月目、stent部内側再生上皮の組織学的所見
stent内側に異型性のない移行上皮が低層に再生しており、
上皮下には筋層もみられる。(Masson染色、×20)

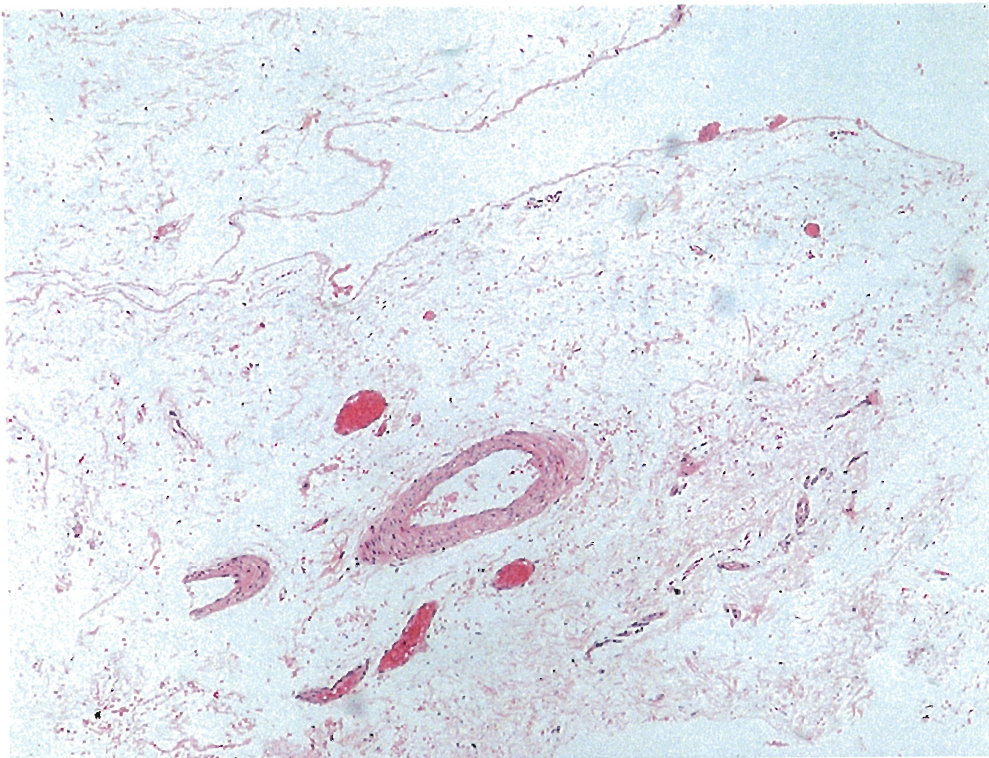


図9 スtent留置6ヶ月目、stent部外側の組織学的所見
stent外側は、血管新生を伴った結合組織で包まれている。
(Masson染色、×20)

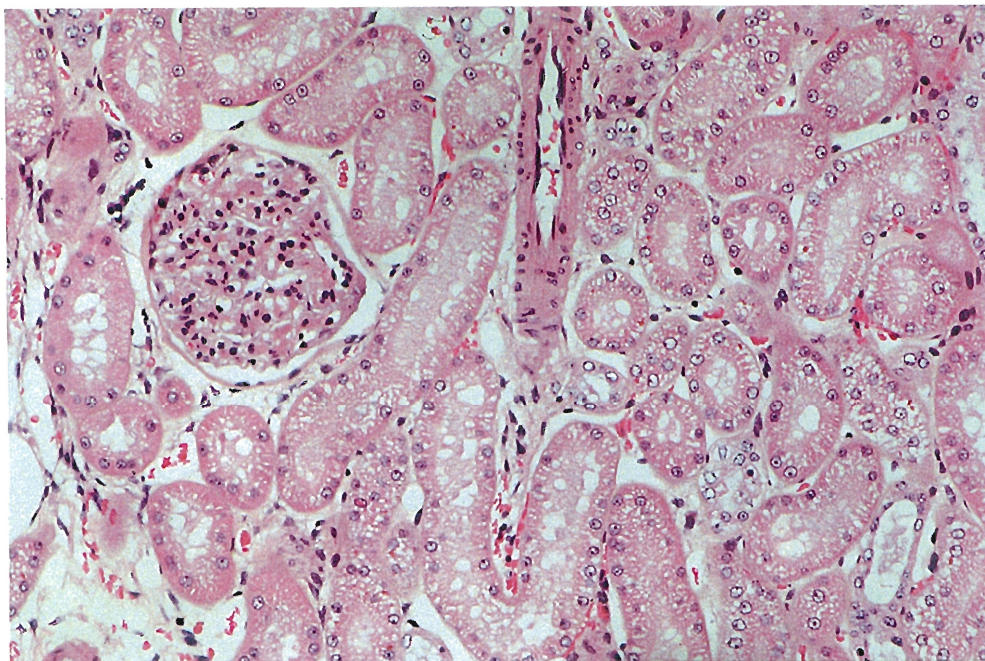


図10 スtent留置6ヶ月目、腎臓の組織学的所見
糸球体、尿細管の構造は保たれており、水腎症および炎症所見
はみられない。(HE染色、×50)