

尿道狭窄予防を目的とした
薬剤徐放尿道カテーテルの開発

しんち まさゆき

新地 祐介

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

平成 30 年度

目次

第1章 緒言

第1節 目的	1 頁
第2節 尿道狭窄症	1 頁
第3節 尿道狭窄症の治療の課題	2 頁
第4節 組織工学を用いた新しい尿道狭窄症の予防または治療の開発	2 頁

第2章 尿道上皮再生に必要な成長因子の同定

第1節 背景と目的	4 頁
第2節 方法	5 頁
第3節 結果	9 頁
第4節 考察	9 頁

第3章 上皮細胞において IGF-1 がインスリンと同様の細胞増殖活性を示すかどうかの検討

第1節 背景と目的	11 頁
第2節 方法	11 頁
第3節 結果	13 頁
第4節 考察	13 頁

第4章 尿道傷害モデルの作製

第1節 背景と目的	15 頁
第2節 方法	15 頁
第3節 結果	17 頁
第4節 考察	17 頁
第5節 小括	18 頁

第5章 生体内でのコラーゲンチューブからの IGF-1 徐放の確認

第1節 背景と目的	19 頁
第2節 方法	19 頁
第3節 結果	20 頁
第4節 考察	20 頁

第6章 IGF-1 徐放性尿道カテーテルを用いた尿道上皮再生と狭窄予防の検討

第1節 目的	22 頁
第2節 方法	22 頁
第3節 結果	24 頁
第4節 考察	26 頁

第7章 総合討論	28 頁
第8章 結論	31 頁
謝辞	32 頁
引用文献	33 頁
図表	38 頁

第1章 緒言

1.1 目的

本研究の目的は、尿道損傷後の尿道狭窄症の予防と経尿道的手術後の再狭窄予防を目指すものである。

1.2 尿道狭窄症

尿道狭窄症は様々な原因により尿道内腔が狭小化して排尿障害をきたす疾患である。尿道内腔の狭小化が進行すると、排尿障害のみならず、尿閉、尿路感染症、敗血症、膀胱結石症、瘻孔、腎不全を併発して、患者の *quality of life* (QOL) を著しく低下させる原因となる(1)。尿道狭窄症の原因として、外傷、尿路感染症、医原性、特発性などが挙げられ、その多様な原因のためにあらゆる年齢層に起こりうる(2)。先進国で最も多いとされているのが、尿道カテーテル留置、膀胱癌や前立腺肥大症に対する標準術式である経尿道的手術の合併症として発生する医原性尿道狭窄症である(3)。若年者で問題になるのが、会陰部の騎乗型損傷や骨盤骨折に伴う外傷性尿道狭窄症であり、尿道狭窄症に対する治療が長期化すると QOL の低下や就労への影響が大きい。

尿道狭窄症の病態は先に述べた様々な原因により尿道粘膜や尿道海面体に損傷が生じ、出血や炎症を経て再生へと創傷治癒が進み、その治癒過程で再生と線維化の不均衡により線維化が進むと考えられている(4)。組織損傷後に線維化が進む原因にはいくつかのトリガーが提唱されており、尿道狭窄症に関しては尿道粘膜損傷に続発する尿道海綿体への尿溢流がトリガーのひとつと考えられている(5, 6)。

1.3 尿道狭窄症の治療の課題

尿道狭窄症の治療は大きく 2 つに分けられる。1 つは開放手術により根本的に尿道を再建する方法（尿道形成術）、もう一つは内尿道切開術などに代表される経尿道的手術である。

経尿道的手術に比べて尿道形成術の成功率（無再狭窄率）は格段に高く、重篤な尿道狭窄症を根治できる唯一の治療である(7)。しかしながら尿道形成術は内尿道切開術に比べて難易度が高い手術であり(8)、多くの泌尿器科医にとって馴染みの薄い手術である(9, 10)。我々が行った本邦の調査でも経尿道的手術の経験がある医師は 90%以上であったのに対して、尿道形成術の経験のある医師は 36.5%であった。このように尿道形成術はごく一部の施設でしか行われていないのが現状である。経尿道的手術は簡便で多くの施設で施行可能であるが、再狭窄率が 47~61%と高い(11-13)。再狭窄率が高いため経尿道的手術を繰り返し行う場合があるが、経尿道的手術を繰り返しても成功する可能性は限りなく低い(13)。我々が報告した内尿道切開術の成績は、術後 5 年時点で再狭窄率は 79.7%であり、特に内尿道切開術の施行回数が 3 回目以降の再狭窄率は 100%であった(14)。このような背景から、内尿道切開術の適応はごく一部の軽症例に限られてきている(8)。

尿道狭窄症の診療をしていくうえで大事なことは尿道損傷後の瘢痕形成を軽減し、尿道狭窄症の発症をいかに予防するか、そして成功率は低いが広く普及している内尿道切開術の治療成績を向上する付加技術を考慮していくことである。

1.4 組織工学を用いた新しい尿道狭窄症の予防または治療の開発

このような内尿道切開術の治療の問題点を克服するためにいくつかの研究がされている。内尿道切開術における再狭窄の予防、あるいは尿道外傷後の尿道狭窄症の予防に関してはドセタキセル、マイトマイシン C、ボツリヌス毒素、タダラフィルなどの抗線維化作用のある薬物を用いた研究が行われており、一定の効果を認めているが、それら薬物の副作用や安全性の観点から臨床応用には至っていないのが現状である(15-18)。

そこで我々は尿道障害後または内尿道切開後の尿道狭窄症の予防を目的とした

薬剤徐放性尿道カテーテルの開発を行った。まず第2章にてインスリンが上皮細胞増殖に必要な成長因子であることを同定した。第3章ではインスリンよりも徐放に適している insulin-like growth factor 1 (IGF-1) がインスリンと同様の上皮細胞に対する増殖能があることを証明した。第4章では動物モデルとしてウサギ尿道傷害モデルの作製を行った。続いて第5章では IGF-1 のカテーテルからの徐放性能について評価した。最後の第6章にて薬剤徐放性尿道カテーテルの尿道狭窄予防効果をウサギ尿道傷害モデルにて検討した。

第2章 尿道上皮再生に必要な成長因子の同定

2.1 背景と目的

ヒト上皮細胞培養は 1975 年に Rheinwald らが新生児の陰茎包皮にて初めて分離培養に成功している(19, 20)。ヒト口腔粘膜細胞は 1983 年に Muller-Glauser らが初めて分離培養に成功し(21)、その後より他家培養口腔粘膜細胞による臨床応用の報告が散見される(22, 23)。当初は口腔粘膜細胞の培養にはマウスの 3T3 細胞や fetal bovine serum (FBS) の使用が必須であり、臨床使用に関して異種細胞やタンパクの混入が懸念されていた。近年では無血清培地による培養が可能であるが、これらの培養に使用される培地には epidermal growth factor (EGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) に代表される成長因子やインスリン、ヒドロコルチゾンやトリヨードチロニンに代表されるホルモンなどが豊富に含まれている。

現在、上皮細胞を増殖させる汎用培地には、EGF や bFGF などの成長因子、ヒドロコルチゾンやトリヨードチロニン及びインスリンなど多くの添加物が高濃度で含有されているため、*in vitro* での細胞増殖活性は高い。しかしながら、生体内において上皮細胞が増殖し、適切な上皮細胞層を形成するためには、これらの成長因子を必要な期間だけ傷害部位に停留させる必要がある。また、多くの物質を傷害部位に停留させることは困難であるため、尿道上皮細胞増殖に最も関係のある成長因子を同定する必要がある。

尿道上皮細胞は分離、培養が確立していないため、それらの細胞で実験することは困難である。そこで尿道上皮細胞の代替となる細胞種を使用する必要がある。口腔粘膜上皮細胞は尿道上皮細胞と同様の扁平上皮であり、分離培養技術がすでに確立されている(24)。常に液体（唾液）に接触していることなど尿道粘膜上皮細胞と多くの類似点があり、実臨床においても口腔粘膜組織は最も優れた尿道の代用組織

として使用されている(25, 26)。

そこで我々は、口腔粘膜上皮細胞を用いてその増殖に必要な成長因子の同定を行った。当初、*in vitro* での口腔粘膜上皮細胞増殖に関連する様々な因子の中から口腔粘膜上皮細胞の増殖に必須な因子を *colony forming assay* により検討した。また、その適正濃度を *MTT assay* にて評価した。

2.2 方法

本実験プロトコルはすべて防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て行われた。
(承認番号 1171)

2.2.1 口腔粘膜細胞の採取

ヒト口腔粘膜細胞は口腔粘膜を利用した尿道形成術の際に生じた余剰組織より取得した。全例で、手術に先立って患者には文書にて口腔粘膜を実験で利用することに同意を得た。

採取した口腔粘膜を生理食塩水 20 mL にて 2 回洗浄し、抗菌薬入りの生理食塩水に入れ、2 時間静置した。その後、ディスパーゼ I (Godo Shusei Co., Ltd. Japan) が入った生理食塩水に口腔粘膜を 4 °C で 1 晩静置した。鑷子にて口腔粘膜から上皮組織のみを剥離した。その後、鋏にて上皮細胞を細断し細胞混濁液とした。細胞混濁液を遠心分離機にて 1000 rpm、5 分間遠心分離した。マイクロチューブの底に沈んだ細胞塊を取り出してその後、細胞を分散させる目的でプロテアーゼ、コラーゲン分解酵素活性を持つアキュターゼ (NACALAI TESQUE, INC., Japan) 中に 37 °C で 10 分間処理した。アキュターゼを取り除くために *phosphate buffered saline (PBS)* にて洗浄し、再度遠心分離して上澄みを吸引した。この洗浄の作業を 3 回繰り返し、口腔粘膜上皮細胞の混濁液を得た。口腔粘膜上皮細胞の培養は CnT-PR (CELLnTEC,

Bern, Switzerland) を用いた。この培地は上皮細胞専用の培地であり、その中には EGF、bFGF、ヒドロコルチゾン、トリヨードチロニン、インスリンが含まれている。洗浄された口腔粘膜上皮細胞の懸濁液を 10 ml フラスコに入れ、CnT-PR で培養した。培地は 48 時間毎に交換した。70~80%コンフルエントになった時点で、アキュターゼにて細胞を分離し、継代した。実験には 1 継代目の口腔粘膜上皮細胞を使用した。

口腔粘膜は 10 名の患者から採取した。その内、継代までの期間が 7 日以内であった 5 名の口腔粘膜細胞のみを実験に使用した。一連の実験には同一細胞のみを使用した。

2.2.2 培地の作製

成長因子を含まない培地として CnT-BM (CELLnTEC, Bern, Switzerland) を使用した。CnT-BM は前述した CnT-PR から成長因子を除いた培地である。その培地に成長因子としてヒドロコルチゾン 72.4 $\mu\text{g/L}$ 、EGF 10 $\mu\text{g/L}$ 、トリヨードチロニン 5 $\mu\text{g/L}$ 、bFGF 5 $\mu\text{g/L}$ 、インスリン 5 $\mu\text{g/mL}$ を添加したものを control とした。また、それぞれの成長因子を control より 1 種類ずつ除いた培地を作製した。合計 6 つ培地を作製し、実験に使用した。

2.2.3 細胞増殖能の評価

細胞増殖能の評価は Takagi らの実験と同様の手法を用いた(24)。Takagi らは口腔粘膜上皮細胞の培養の際に用いられる成長因子であるインスリンの代替物質としてヒューマリンを、ヒドロコルチゾンの代替物質としてサクシズンを、コレラ毒素の代替物質としてプロテノールを、FBS の代替物質として自己血清を使用し、細胞増殖能の評価を colony forming assay で行っている。その場合でも口腔粘膜上皮細胞

は従来の培地と同様の細胞増殖効果を示すということを明らかにしたものである。

2.2.1 にて採取した口腔粘膜細胞を 6 ウェルプレートに 1.0×10^3 細胞/ウェルで control である培地にて 24 時間前培養し、プレートに接着させた。その後、control である培地、インスリンを除いた培地、トリヨードチロニンを除いた培地、ヒドロコルチゾンを除いた培地、EGF を除いた培地、bFGF を除いた培地に交換し、1 週間培養した。colony は PBS で洗浄した後、10%中性ホルマリンで固定した。メチレンブルー染色を行い、それぞれの処理群の colony 数を計測した。実験は、各条件で 5 ウェルずつ行い、colony 数の平均値を評価した。

2.2.4 インスリンの最適濃度の検討

2.2.3 にて同定したインスリンの細胞増殖に必要な最適濃度を MTT assay にて評価した。口腔粘膜上皮細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^2 細胞/ウェルで control である培地にて 24 時間前培養してプレートに細胞を接着させた。その後、control のインスリン濃度を 0~1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した培地に交換し、48 時間培養した。その後、生細胞測定試薬 (NACALAI TESQUE, INC., Japan) を加えてから 1 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて、450 nm の波長で吸光度を計測した。それぞれのグループにおいて 32 ウェルずつ使用し、吸光度の平均値を評価した。

2.2.6 統計学的分析方法

Colony forming assay、MTT assay の実験では one-way ANOVA test を用いた。さらに colony forming assay の実験では control の培地と他の 5 つの培地の 2 群間の比較に Tukey's honestly significant difference test を用いた。MTT assay の実験ではインスリンを含まない培地を control として各培地で培養した吸光度の平均値を Tukey's honestly significant difference test を用いて比較検討した。

解析は JMP 13 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、 $p < 0.05$ をもって有意な差とした。

2.3 結果

2.3.1 インスリンは上皮細胞増殖に不可欠である

Control より各種成長因子を除いた培地で培養し、その後 colony forming assay を行った実験においては、インスリンを除いた培地で培養した上皮細胞の群のみ control と比較して有意に colony 形成が低下していた (図 1AB、 $p = 0.0008$)。このことよりインスリンは上皮細胞増殖に不可欠であることが証明された。

2.3.2 インスリンは 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で有意に上皮細胞増殖を促進する

細胞増殖に必要なインスリンの最適濃度を MTT assay にて評価した(図 2)。インスリン濃度を 0~1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で調整した培地別の検討においては control であるインスリンなしと比べてインスリン濃度が 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に細胞増殖能が高かった ($p < 0.001$)。

2.4 考察

第 2 章では口腔粘膜上皮細胞を使用して、上皮細胞増殖に不可欠な成長因子の同定を行った。まず、種々の成長因子を含有する完全培地から 1 種類の成長因子を除いた培地で口腔粘膜を培養し colony forming assay で評価する実験から、インスリンは上皮細胞増殖に必須であることを証明した。また MTT assay の結果、上皮細胞増殖能はインスリン濃度が 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で上昇し、定常状態となることを突き止めた。

インスリンの代表的な作用としては骨格筋において糖取り込みの増加、グリコーゲンの合成促進などが挙げられる。このような代謝作用に加えて mitogen-activated protein kinases (MAPK) 経路を介した細胞増殖作用が知られている(27)。しかしな

がら口腔粘膜上皮細胞においてインスリンの有用性を示した研究は調べた限りでは報告されていない。

Takagi らは既存の培地に含まれる成長因子をすでに臨床応用されている薬剤に変更することで口腔粘膜上皮細胞の増殖効果を検討した。具体的にはインスリンの代替物質としてヒューマリンを、ヒドロコルチゾンの代替物質としてサクシゾン、コレラ毒素の代替物質としてプロテノールを、FBS の代替物質として自己血清を使用しても口腔粘膜細胞の増殖効果は同等であったと報告しているが、それぞれの因子の必要性については検討していない。今回、我々は成長因子やホルモンを1つずつ除いた培地を用いることで、ヒドロコルチゾン、EGF、トリヨードチロニン、bFGF、インスリンの中でインスリンが口腔粘膜細胞に重要な物質であることを証明した。

第3章 上皮細胞においてIGF-1がインスリンと同様の細胞増殖活性を示すかどうかの検討

3.1 背景と目的

第2章において我々はインスリンが上皮細胞の増殖に必須であることを示した。薬物や成長因子などのタンパク質を目的の場所で徐放させるためには徐放させるための基材が必須である。近年、インスリンを徐放させるための基材として poly lactic-glycolic acid (PLGA) (28)やナノ粒子化された poly acrylic acid (PAA) (29)を用いる研究が報告されている。NandaらはPLGAナノ粒子内にインスリンを封入し、多孔性コラーゲン内に凍結乾燥技術にて PLGA を固定することでインスリンの徐放に成功している(28)。また Lin らは PAA にインスリンを結合させ、多重シートを作製することで経皮的なインスリンの徐放に成功した(29)。しかしながらどちらも高度なナノレベルでの高い技術が必要である。その一方、インスリンと同様の生物学的活性を示す IGF-1(30, 31)は滴下するだけでコラーゲンやゼラチンなどのハイドロゲルと電荷的な結合(ポリイオンコンプレックス)を形成し、徐放が可能である(32, 33)。よって IGF-1 がインスリンと同様の上皮細胞増殖効果を認めることが確認できれば、より簡便な徐放方法が選択可能と考えた。

以上より、第3章では第2章と同様の手法を用いて IGF-1 がインスリンと同様に上皮細胞増殖活性を示すかどうかを colony forming assay を用いて確かめ、適正濃度を MTT assay を用いて検討した。

3.2 方法

本実験プロトコルはすべて防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て行われた。

(承認番号 1171)

3.2.1 口腔粘膜細胞の採取

2.2.1 と同様の手法にて口腔粘膜細胞を採取し、1 継代目の口腔粘膜上皮細胞を実験に使用した。

3.2.2 IGF-1 がインスリンの代替となりうるかどうかの検討

細胞を 6 ウェルプレートに 1.0×10^3 細胞/ウェルで control である培地にて 24 時間前培養し、プレートに接着させた。その後、第 2 章で使用した control の培地（インスリン 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有）、control からインスリンを除いた培地、インスリンの代替として IGF-1 を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加えた培地に交換し、1 週間培養した。colony は PBS で洗浄した後、10%中性ホルマリンで固定した。メチレンブルー染色を行い、それぞれの処理群の colony 数を計測した。実験は、各条件で 5 ウェルずつ行い、colony 数の平均値を評価した。

3.2.3 IGF-1 の最適濃度の検討

3.2.2 にて同定した IGF-1 の細胞増殖に必要な最適濃度を MTT assay にて評価した。口腔粘膜上皮細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^2 細胞/ウェルで control である培地にて 24 時間前培養してプレートに細胞を接着させた。その後、control の IGF-1 濃度を 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した培地に交換し、48 時間培養した。その後、生細胞測定試薬（NACALAI TESQUE, INC., Japan）を加えてから 1 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて、450 nm の波長で吸光度を計測した。それぞれのグループにおいて 16 ウェルずつ使用し、吸光度の平均値を評価した。

3.2.4 統計学的分析方法

Colony forming assay、MTT assay の実験では one-way ANOVA test を用いた。さら

に colony forming assay の実験では control の培地とインスリンを含む培地、IGF-1 を含む培地との比較に Tukey's honestly significant difference test を用いた。MTT assay の実験では IGF-1 を含まない培地と各培地で培養した吸光度の平均値を Tukey's honestly significant difference test を用いて比較検討した。

解析は JMP 13 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、 $p < 0.05$ をもって有意な差とした。

3.3 結果

3.3.1 上皮細胞において IGF-1 はインスリン同様に細胞増殖に必須である。

インスリンの代替として IGF-1 を添加 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ し、インスリンを含む control との間の細胞増殖能を colony forming assay で評価した (図 3)。

インスリンを含まない群は control と比較して有意に colony 形成が低下していた ($p < 0.001$)。一方、IGF-1 を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した群 ($p = 0.135$)、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した群 ($p = 0.986$) は control と比較してともに有意差を認めなかった。

3.3.2 IGF-1 は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で有意に上皮細胞増殖を促進する

細胞増殖に必要な IGF-1 の最適濃度を MTT assay にて評価した(図 4)。インスリンの代替の成長因子として IGF-1 を使用し、0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で調整した培地別の検討においてはコントロールである IGF-1 なしと比べて IGF-1 濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に細胞増殖能が高かった (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs control : $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$)。

3.4 考察

第3章ではまず colony forming assay を用いて IGF-1 とインスリンの口腔粘膜上皮細胞に対する増殖活性の比較をした。インスリンの代替物質として IGF-1 を含む培地を作製し、インスリンを含む control との比較を colony forming assay にて実施した。その結果、IGF-1 を含む培地はインスリンを含む control である培地と比較して有意差を認めず (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs control : $p = 0.135$ 、 $p = 0.986$)、同等の上皮細胞増殖効果が示された。また同時にインスリンや IGF-1 を含まない培地と比較して有意に上皮細胞増殖効果を示すことも証明した ($p < 0.001$)。

骨格筋細胞において、インスリンは細胞表面のインスリン受容体に結合し、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate: IRS) をリン酸化する。さらに、下流シグナル分子である Akt の活性化を介して細胞増殖に寄与すると考えられている (27, 34)。IGF-1 も細胞表面のインスリン様成長因子 1 受容体 (insulin like growth factor 1 receptor: IGF1R) に結合しシグナルを伝達する。IRS も IGF1R も共通部位を持ち、シグナル伝達分子も多く共通しているといわれている (30, 31)。このことより上皮細胞においても IGF-1 はインスリン同様、上皮細胞増殖効果を示すと考えられる。

第4章 尿道傷害モデルの作製

4.1 背景と目的

第4章の研究目的は、尿道傷害モデルを確立することにある。

尿道傷害の動物モデルにはすでにいくつかの報告がある。ウサギの尿道のサイズは1歳の男児と同じであり、薄い上皮層を血流豊富な海綿体が裏打ちしているという組織の特徴があり、ヒトと類似している(35)。その為、近年はウサギを用いた尿道実験が多く行われている(15, 18, 36-40)。近年、報告されているウサギ尿道傷害モデルは、尿道内視鏡を用いて経尿道的に尿道粘膜を電気凝固させ、狭窄を作製するというものであるが、その方法は小児用尿道膀胱内視鏡が必要であること、再現性に乏しいこと、合併症が多いことが難点である(37, 39)。そこで我々はより簡便で合併症の少ない新しい尿道傷害モデルの手法の開発を試みた。

ボール型電極は実臨床において汎用される電極であり、全周性に均一のエネルギーを加えることができる電極である。また、電気メスのハンドピースに装着可能である。このボール型電極を外尿道口から挿入し尿道を電気凝固すれば、内視鏡システムなどの特殊な器具は不要であるため、尿道内視鏡を用いた経尿道的な電気凝固より簡便に電気凝固が可能である。そこで我々はこのボール電極を用いて簡便な新しいウサギ尿道傷害モデルの作製を試みた。

4.2 方法

一連の実験は防衛医科大学校動物倫理委員会の承認を得て行われた。(承認番号14104)

4.2.1 電気メスの出力の検索

予備実験として、鶏ささみ肉を用いてさまざまな条件下（時間・出力）で電気凝固を行い、モデル作製条件を設定した。電気メスの電極を鶏ささみ肉に接触させ、それぞれの出力下で1~10秒間電気凝固させ、熱変性を評価した。

4.2.2 ウサギ尿道傷害モデルの作製と評価

2羽の Japanese White rabbit の雄（3.5、3.6 kg）を実験に用いた。雄ウサギはすべて北山ラベス社（長野県）から購入した。

麻酔はケタミン（Daiichi Sankyo Pharmaceutical Ltd., Japan）35 mg/kg およびキシラジン（Bayer, Germany）5 mg/kg を大腿部に筋肉内注射することにより行った。麻酔下、仰臥位にしたウサギの尿道にボール電極を挿入し、尿道を電気凝固（40 W、5秒間）させた。直後に逆行性尿道造影にて凝固部位の狭窄が認められることを確認した。その後、細径動物用内視鏡（TESARA ; Olympus, Japan）にて尿道粘膜に熱変性があることを確認した。凝固直後に尿閉予防のため8 Frのネラトンカテーテル（Terumo, Japan）を挿入した。麻酔覚醒後のウサギ自身によるカテーテル抜去防止のため、エリザベスカラーを装着し飼育した。2週間後にネラトンカテーテルを抜去し、尿道造影、尿道内視鏡にて尿道障害モデルの評価を行った。尿道造影は外尿道口から8 Frのネラトンカテーテルを挿入し、逆行性に尿道を造影した。造影剤はイオパミドール（Bayer, Germany）を使用した。内視鏡検査は外尿道口から逆行性に内視鏡を挿入し、傷害部の性状を観察した。以上の手技はすべて単一術者（著者）にて施行された。

4.3 結果

4.3.1 出力は 40 W が最も秒数によるタンパク変性の変化が大きかった

電気メスの出力を 20～50 W まで 10 W 毎に変化させ、それぞれの出力下で 1～10 秒間電気凝固した (図 5)。20 W と 30 W の条件下では 10 秒間電気凝固しても鶏ささみ肉の熱変性は軽度であった。50 W では 1 秒間の電気凝固において高度の熱変性が認められた。一方、40 W においては 1 秒間の電気凝固で軽度の熱変性が認められ、電気凝固時間が延びるにつれてより高度の熱変性を認めた。

4.3.2 ボール電極にて安定した尿道障害モデルが作製可能であった。

40 W、5 秒間の電気凝固にて 2 羽とも凝固直後の尿道造影にて凝固部位の狭窄を認め、尿道内視鏡検査にて尿道粘膜に熱変性を確認した (図 6A)。2 週間後の逆行性尿道造影で同部位の狭窄を確認した。尿道内視鏡所見でも同部位の狭窄と粘膜面の欠損を認めた (図 6B)。

4.4 考察

第 4 章ではボール電極を用いたウサギ尿道傷害モデルの作製を行った。尿道傷害動物モデルは未だ確立されたものはなく、それぞれの研究者が独自に作製したモデルを使用している。しかしながら多くのモデルは再現性や合併症の面で課題がある (41, 42)。Meria らは尿道内視鏡下に尿道を電気凝固することでウサギ尿道傷害モデルを作製した (39)。しかしながら、尿道狭窄を続発したウサギは 18 羽中 9 羽 (50%) のみにとどまり、モデルの再現性に課題が残った。Faydaci らは尿道内視鏡下に電気凝固したモデルと電気切開したモデルを比較し、電気凝固したモデルは合併症を認めなかったものの尿道狭窄は 1 例も続発せず、電気切開したモデルは全例におい

て尿道狭窄を続発したが、10羽中6羽(60%)に尿道出血を認めたと報告した(37)。我々のモデルは2羽と症例数が少ないが経過中に合併症なく、2週間後に2羽とも狭窄を認めた。

小児内視鏡下に電気傷害するにはループ電極が用いられており、術者が内視鏡を見ながら限局した場所を傷害させるため、術者ごとに凝固範囲や凝固深度が異なる可能性がある。しかしながら我々が使用したボール電極は尿道内を全周性に同じ出力で凝固できるため、術者によるバイアスを軽減できると考えられる。実際に凝固直後の尿道内視鏡の内腔の観察では全周性に均一な熱変性を認めた。

過去の2つの報告(37, 39)では小児内視鏡を使用して経尿道的にウサギの尿道を損傷させているが、小児内視鏡は特殊な機器で高額であるため、これらのモデルは限られた施設でしか作製できない。今回、我々が用いたボール電極は臨床診療の場面で多く使用されている安価で、汎用性の高い機器であり、どの施設でも導入しやすい機器と考える。

4.5 小 括

第4章において我々は、ボール電極を用いた簡便で再現性の高いウサギ尿道障害モデルの作製に成功した。

第5章 生体内でのコラーゲンチューブからの IGF-1 徐放の確認

5.1 背景と目的

第2章、第3章においてわれわれは上皮細胞増殖にはインスリンまたは IGF-1 が必須であることを証明した。これらの結果からインスリンまたは IGF-1 を必要な期間だけ尿道上皮損傷部位に停留させることで、欠損部位周辺に存在する尿道上皮前駆細胞の増殖を活性化させ、尿道粘膜上皮組織の欠損部位の再生を促す可能性がある。

近年、I型コラーゲンは様々な成長因子を徐放させる基材として注目されている(43, 44)。そこで我々は IGF-1 を局所徐放させる生分解性コラーゲンを装着した尿道カテーテルの開発を試みた。第5章では IGF-1 徐放性尿道カテーテルの作製と生体内での IGF-1 の徐放について検討した。

5.2 方法

本実験プロトコルはすべて防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。(承認番号 16012)

5.2.1 IGF-1 徐放性コラーゲンカテーテルの作製

IGF-1 として Mecasermin (商品名:ソマゾン) (OrphanPacific, Inc., Japan) を使用した。IGF-1 を徐放させる生体材料としてチューブ型のブタ I 型コラーゲン (tubular collagen : TC) (Atree Inc., Japan) を用いた。IGF-1 を 1 mg/mL となるように生理食塩水に溶解した。2 cm の TC に 200 μ L の IGF-1 溶液を滴下し、37°C の条件下で 60 分静置した (図 7A)。その後、8 Fr ネラトンカテーテルに 4-0 吸収糸にてコラーゲンを固定した。

5.2.2 生体内での IGF-1 の徐放期間の検討

ICG Labeling Kit (DOJINDO, Japan) を用いて IGF-1 に蛍光物質であるインドシアニンググリーン (ICG) をラベル化した。ICG ラベル化 IGF-1 を生体分解性コラーゲンチューブに滴下し、37 度で 1 時間静置しコラーゲンチューブに含浸させた。前述と同様の手順で IGF-1 徐放性コラーゲンカテーテルを作製した (図 7B)。

このコラーゲンカテーテルをウサギ尿道に挿入し、ICG の蛍光を観察できる PDE カメラ (Hamamatsu Photonics Co., Hamamatsu, Japan) を用いて尿道部位の蛍光を観察し、コラーゲンチューブに残存している ICG ラベル化 IGF-1 を経時的に観察した。ICG は赤外光 (760 nm) によって励起され波長の異なる近赤外蛍光 (830 nm) を発する。この蛍光を PDE カメラで測定することによりコラーゲン内に残存する IGF-1 を測定するというものである。

実験は、6 羽のウサギで行い、蛍光輝度の平均値を評価した。蛍光輝度の測定は Image J software を使用した。尿道から PDE カメラの距離は 20 cm と一定にして実験を施行した。

5.3 結 果

5.3.1 ICG の蛍光は 1 週間は観察可能であった

ウサギ尿道に挿入直後より蛍光輝度は徐々に低下していくが、全例において 7 日までは蛍光は確認できた (図 7C)。

5.4 考 察

近年、さまざまな研究の蓄積により細胞増殖や細胞維持に関して細胞外マトリックス (Extracellular matrix, ECM) の重要性が明らかになってきている。単純な構造

体としての役割だけではなく細胞の機能維持や細胞間の情報の伝達や分化制御の役割を担っている(45, 46)。生体内 ECM の代表である I 型コラーゲンは細胞培養基材として非常に一般的である。実際に I 型コラーゲンは古くから足場材料として皮膚欠損や軟骨欠損に対して臨床応用されている(47, 48)。また、細胞増殖因子のリザーバーとしても注目されている。Kanematsu らはヨウ化ナトリウムを標識した bFGF、HGF、PDGF、VEGF、EGF、IGF-1 をそれぞれ I 型コラーゲンに含有させ、マウスの皮下に植え込み、その放射能を測定することで生体内での徐放性について評価している。その結果、すべての成長因子で 10 日以上の徐放能が確認されている(44)。徐放速度や徐放期間についてはコラーゲンの架橋強度を変化させることでコントロールも可能と言われている(49)。実臨床でも bFGF 徐放性コラーゲンスポンジを用いることによって皮膚の再生能力が促進されることが報告されている(50)。

我々の実験においても I 型コラーゲン内の IGF-1 の量は最低 1 週間は残存していることが確認できたが、3 日目では約 1/10、7 日目では約 1/100 となっていた。前述の Kanematsu らの報告においても IGF-1 は 10 日以上の徐放は確認されていたものの、最初の 3 日間にて当初の約 10 %まで IGF-1 の量は低下してしまっている。今回の我々の実験では最初に 200 μg の IGF-1 をコラーゲンに結合させているため、7 日目でも 2 μg が残存していると考えられる。我々は 3 章において上皮細胞は IGF-1 が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上において細胞増殖が活性化することを証明しているが、これは *in vitro* でのデータであるため生体内での効果については不明である。生体内では培地中とは異なり細胞周囲からの成長因子の影響やコラーゲンそのものによる足場作用の影響などが組織再生に関わると考えられる。今回の実験で得られた IGF-1 の量が生体において尿道損傷からの再生に寄与するかどうかは今後の検討が必要である。

第 6 章 IGF-1 徐放性尿道カテーテルを用いた尿道上皮再生と狭窄予防の検討

6.1 目的

第 2 章、第 3 章において我々は上皮細胞増殖にはインスリンまたは IGF-1 が必須であることを証明した。そして第 5 章において IGF-1 は我々が作製した IGF-1 徐放性尿道カテーテルから 1 週間は IGF-1 の徐放が可能であることが確認できた。

Kanatani らはコラーゲンチューブのみで 1.5 cm のウサギの尿道の欠損を回復できたことを報告しているが、6 ヶ月の長期間の観察であり、急性期の創傷治癒については評価されていない。また彼らは尿道狭窄についても尿道造影および尿道内視鏡にて評価しているが、「狭窄」の定義が記載されておらず客観性に欠ける。

本章では第 4 章で確立したウサギ尿道障害モデルを用いて、*in vivo* において IGF-1 徐放性尿道カテーテルは尿道障害の尿道上皮再生および尿道狭窄を予防できるかを検討した。

6.2 方法

本実験プロトコルはすべて防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。(承認番号 16012)

6.2.1 IGF-1 徐放性尿道カテーテルによる尿道上皮再生および狭窄予防の実験

計 12 羽の Japanese White rabbit の雄 (2.5~3.0 kg) を実験に用いた。雄ウサギはすべて北山ラベス社から購入した。第 3 章のごとくウサギ尿道をボール電極にて 40 W で 5 秒間、電気凝固後にランダムに 3 群に分け、下記の尿道カテーテルをそれぞれ挿入した (図 8)。group 1 (n = 7、IGF+ コラーゲン+) では電気凝固後に

第4章のごとく IGF-1 (ソマゾン 200 μ g) 水溶液を 37 °C で 1 時間含浸させた生体分解性コラーゲンチューブ (2 cm) を尿道カテーテルに装着したものを挿入した (図 8AB) 。 group 2 (n = 7、IGF- コラーゲン+) では電気凝固後に IGF-1 を含まない生体分解性コラーゲンチューブを尿道カテーテルに装着して挿入した。 group 3 (n = 5、IGF- コラーゲン-) では尿道カテーテルのみを挿入した。挿入した 2 週間後に尿道カテーテルを抜去し、尿道造影、尿道内視鏡、肉眼的所見および組織学的所見から狭窄部の状態と尿道上皮組織の再生について評価した。尿道造影では最も狭窄が強い箇所尿道幅を測定した。造影剤注入時の圧力による尿道幅のバイアスを除外するため、最も狭窄が強い箇所の尿道幅と直近の正常な尿道幅の比を開存率と定義し (15, 16)、狭窄の程度を評価した。尿道内視鏡では損傷粘膜の状態を観察し、外径 2.7 mm の内視鏡が抵抗なく通過するか試し、通過した割合を通過率と定義した (51)。

尿道造影、尿道内視鏡検査後にウサギの耳介静脈よりペントバルビタール (Kyoritsu Seiyaku Co., Ltd., Japan) を大量投与し安楽死させた。その後、ウサギ尿道を摘出し、尿道腹側を縦切開して尿道粘膜面を肉眼的に観察した。Image J software により尿道粘膜の欠損面積を測定し、各群で比較した。肉眼的観察後に摘出尿道を 10%ホルマリン溶液で 3 日間固定し、パラフィン包埋ブロックを作成、薄切後に hematoxylin-eosin 染色を行い、損傷部を組織学的に観察した。尿道海綿体への損傷の波及を各グループ間で評価した。AE1/AE3 染色により keratinocyte の発現を確認し、尿道粘膜上皮細胞を評価した。

6.2.2 統計学的解析手法

尿道幅、開存率、欠損面積の比較には one-way ANOVA test を用いた。それぞれの各 group 間の比較には Tukey's honestly significant difference test を用いた。通過率、

海綿体への損傷の有無の比較はカイ二乗検定を用いた。解析は JMP 13 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、 $p < 0.05$ をもって有意な差とした。

6.3 結果

ボール電極による電気凝固直後の尿道造影および内視鏡にて、全例で尿道粘膜の損傷が確認された。実験期間内にウサギの合併症や死亡は認めなかった。また全例において2週間尿道カテーテルは留置されていた。各群の術前の体重や凝固直前と直後の尿道幅はそれぞれ有意な差を認めなかった (表 1)。

6.3.1 尿道造影所見

各 group の尿道造影所見を図 9 に示す。全例とも狭窄は認められたが、尿道の完全閉塞や瘻孔は認められなかった。狭窄部の平均尿道幅は group 1 が 5.4 ± 0.6 mm、group 2 が 3.9 ± 0.9 mm、group 3 が 1.9 ± 1.0 mm で3群間に有意な差を認めた ($p < 0.0001$)。また2群間における解析では group 3 に比べて group 1 と group 2 の尿道幅が有意に改善していた (group 1 vs group 3、group 2 vs group 3 : $p < 0.0001$ 、 $p = 0.004$)。また、group 2 に比べて group 1 で尿道幅の有意な改善を認めた ($p = 0.009$)。平均の開存率は group 1 が $50 \pm 6.9\%$ 、group 2 が $35 \pm 7.2\%$ 、group 3 が $21 \pm 13\%$ で3群間に有意な差を認めた ($p = 0.0002$)。また2群間における解析では group 3 に比べて group 1 と group 2 の開存率が有意に改善していた (group 1 vs group 3、group 2 vs group 3 : $p < 0.0001$ 、 $p = 0.04$)。また、group 2 に比べて group 1 で開存率も有意な改善を認めた ($p = 0.01$)。

6.3.2 尿道内視鏡所見

各 group の尿道内視鏡所見を図 10 に示す。group 1 では大部分の尿道表面は粘膜で被覆されていた。その一方、group 2 では一部の粘膜の欠損を認めた。group 3 では粘膜の大部分に損傷を認めた。通過率は group 1 が 71.4% (5/7 羽)、group 2 が 57.1% (4/7 羽)、group 3 が 20% (1/5 羽) で 3 群間に有意な差を認めなかった ($p = 0.19$)。

6.3.3 尿道肉眼的所見

各 group の尿道肉眼的所見を図 11 に示す。平均粘膜欠損面積は group 1 が $22.0 \pm 7.7 \text{ mm}^2$ 、group 2 が $32.0 \pm 7.6 \text{ mm}^2$ 、group 3 が $36.0 \pm 7.6 \text{ mm}^2$ で group 1 < group 2 < group 3 の傾向を認めたが 3 群間に有意差はなかった ($p = 0.46$)。

6.3.4 組織学的所見

各 group の組織学的所見を図 12 に示す。group 1 では尿道の損傷は軽度であり、cytokeratin 陽性の上皮細胞が表面を覆っていた。また、group 1 のみに粘膜下に SMA 陽性である平滑筋を認めた。その一方、group 2、3 では全例で上皮細胞の欠損を認めた。海綿体まで損傷が及んでいた割合は group 1 が 28.6% (2/7 羽)、group 2 が 57.1% (4/7 羽)、group 3 が 80% (4/5 羽) で group 1 で少ない傾向があったが、3 群間に有意な差を認めなかった ($p = 0.19$)。

6.4 考 察

尿道狭窄症は一旦発症すると治療が困難であるため、予防が重要である。尿道障害後の予防の動物実験についてはいくつかの報告がある。Andersen らは抗線維化作用のある lanreotide によりウサギの尿道障害後の線維化が予防されたと報告した。ウサギの尿道を外科的に損傷後、ポンプにより lanreotide を持続的に注入したところ、尿道造影での改善は認めないものの、組織学的に線維化が改善していることを示した(36)。Sahinkanat らはラットの外科的尿道障害後のボツリヌス毒素による狭窄予防効果について報告している。尿道障害後にボツリヌス毒素を尿道周囲に注射することで組織学的な線維化の程度が改善することが示された(40)。近年では 2015 年に dexpanthenol を 1 日 2 回で 15 日間の経尿道的投与にてラットの尿道障害後の組織的な炎症所見と線維化所見が改善したと報告されている(52)。しかしながら、こ

これらの研究のほとんどは組織学的な評価のみしか行われておらず、実臨床で尿道狭窄症の診断に必要な尿道造影や尿道内視鏡を施行されていない。今回の実験においても group 1 は内視鏡所見では大部分のウサギの尿道内腔は粘膜で覆われているように見えたが、実際の摘出尿道の上皮欠損面積の測定では上皮組織は一部欠損を認めていた。このように評価手法の違いにより結果も若干異なるため、多くの方法で評価を行うことは重要である。今回の研究では組織学的な評価に加え、実臨床と同様に尿道造影、尿道内視鏡を用いて尿道狭窄を評価した。両者とも IGF-1 薬剤徐放性カテーテル挿入群に尿道狭窄の有意な改善を認めた点において、本研究は有意義であると考ええる。さらに、上皮細胞の再生を *cytokeratin* のマーカーである AE1/AE3 染色を用いた組織学的な面でも評価した点は本研究の特長のひとつと言える。

本研究の最大の独自性は尿道カテーテルから薬剤を徐放させることに成功し、その技術により尿道狭窄を改善させた点である。前述の動物実験は薬剤を全身投与、組織内局注あるいはポンプを植え込むことにより投与するという手法をとっている。薬剤の全身投与は副作用の懸念があり、組織内への局所注入や人工物の植え込みなどは組織へのダメージや感染のリスクなどを内包する。尿道カテーテルから必要最小限の薬剤を局所的に徐放させる手法は全身への副作用や組織へのダメージのリスクを限りなく低減させうると言う点で大きな利点があると考えられる。また尿道造影における尿道幅や開存率がコラーゲンのみの尿道カテーテルを挿入した group 2 と比べて有意に改善したことからも IGF-1 の徐放により尿道傷害後の尿道狭窄のさらなる予防効果も示すことができた。

第7章 総合討論

今回我々は第2章において多くの成長因子の中からインスリンとIGF-1が上皮細胞増殖に必要な因子であることを同定した。今回我々が使用したIGF-1であるMecaserminはヒト遺伝子組換えソマトメジン製材である。その有効性と安全性はすでに臨床試験にて証明されている(53)。本邦でも、Mecaserminはインスリン受容体異常に対する高血糖や高インスリン血症、成長ホルモン抵抗性の成長ホルモン単独欠損症による成長障害に対して保険収載されている。

IGF-1はすでに肝臓、軟骨、角膜、内耳の分野において抗線維化作用や創傷治癒促進作用が認められている(54-59)。その中でも軟骨や内耳においてはゼラチンやコラーゲンからIGF-1を徐放させることにより軟骨再生の促進や突発性難聴の改善などの効果が認められている。しかしながら尿道において薬剤徐放性カテーテルの報告はされていない。今回我々はIGF-1を、コラーゲンを基材として徐放させる尿道カテーテルの開発を行った。さらに、IGF-1徐放性尿道カテーテルを用いて尿道の上皮再生および尿道狭窄の予防効果を示した。我々が知る限り、本研究はIGF-1徐放性尿道カテーテルによる尿道狭窄予防の世界初の報告である。

第5章の実験において、コントロールであるgroup 3と比較してIGF-1を徐放させているgroup 1のみではなくコラーゲンのみのgroup 2も狭窄幅、開存率において有意に尿道狭窄を改善していた。このことはコラーゲンのみでも尿道狭窄が改善することを示唆するものである。実際に小腸を脱細胞化した生体由来のマトリックスを用いて膀胱損傷の再建手術を施行した動物実験も報告されている(60, 61)。また尿道でもKanataniらはコラーゲンチューブのみで1.5 cmのウサギの尿道の欠損を回復できたことを6ヶ月間の長期の観察にて報告している(62)。しかしながら彼らの研究は「狭窄」についての定義が明らかでなく、尿道損傷における急性期における創傷治癒については評価されていない。我々の研究では尿道造影については

狭窄幅や開存率、内視鏡所見においては内視鏡通過率にて尿道狭窄所見を客観的に評価している。またコラーゲンのみの group と IGF-1 を徐放させる group を比較することで IGF-1 による効果も評価している。実際に尿道損傷後、2 週間という早期の段階においても、コラーゲンのみでも尿道の組織再生効果は認められているが、我々はそこに IGF-1 を徐放させることによりさらなる尿道狭窄予防効果を証明した。

尿道損傷後の尿道再生技術の開発は近年盛んにおこなわれている。特に細胞を生物学的足場材料（スキャホールド）に含有させたものは高い効果を上げており、骨髄細胞、脂肪幹細胞、上皮細胞、平滑筋細胞など種々の細胞が使用されている(63-66)。これらの文献では細胞を使用したスキャホールドは組織再生を促し、尿道再建の成績も良好であったと報告されている。しかしながら、細胞を使用した再生医療にはいくつかの問題点が指摘されている。1 つ目は細胞を採取されるドナーサイトへの侵襲の問題である。免疫拒絶を予防するために多くは自己の細胞が必要となるため、正常の組織から細胞を採取しなければならない。そのため、ドナーサイトの出血や感染などの 2 次的な合併症の危険性がある。2 つ目は安全性と費用面での問題である。細胞を採取した後、分離・培養・加工などの工程が必要となるが、その過程で細菌やウイルスなどの混入の危険性がある。それを回避するためにヒト細胞加工製品は good tissue practice (GMP) に準拠した細胞プロセッシングセンター (CPC) で作製されなければならない。このため、細胞を使用するスキャホールドは細胞を使用しないスキャホールドと比べて約 6 倍の費用がかかると言われている(67)。最後に細胞の癌化の問題がある。スキャホールドに使用される細胞は幹細胞や前駆細胞であるのでドナーサイトと異なる部位に移植された場合の分化のメカニズムや癌化の懸念などは未だに解決されていない(68)。

もちろん我々の研究には今後への課題も残されている。それは経過観察期間の問題である。我々は尿道傷害後、2週間後に評価を行っている。この時期の尿道の組織標本では出血壊死が主体であり、まだ創傷治癒の初期段階と考えられる。尿道狭窄症の病態の主体は尿道の線維化である(5)。Kurtらはウサギの尿道傷害後にタダラフィルを全身投与することで30日目の尿道の粘膜下組織の線維化がプラセボ群と比較して改善したことを示している(16)。我々の研究では尿道傷害後2週間目の評価であり、線維化が起こる前に評価をしてしまっている可能性が否定できない。我々も今後長期モデルにてIGF-1やコラーゲンによる線維化の改善効果の有無を検討する必要がある。

以上のような解決すべき課題は残されているが、当研究においてコラーゲンから徐放可能であるIGF-1が上皮細胞増殖に有効であることが示され、IGF-1徐放性尿道カテーテルによりウサギの尿道狭窄予防効果を確認することができた。

第 8 章 結 論

尿道外傷後の IGF-1 徐放性尿道カテーテルの開発とその効果についての研究を行った。本研究は、今後の尿道損傷後の狭窄および内尿道切開後の再狭窄の予防に寄与するものとする。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学学校病院長 浅野友彦先生、防衛医科大学学校泌尿器科学講座 教授 伊藤敬一先生に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切に多大なる直接の御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学学校泌尿器科学講座 准教授 堀口明男先生、医用工学講座 准教授 榎引俊宏先生に感謝の意を表しますとともに、多岐にわたってご助力頂きました防衛医科大学学校泌尿器科学講座、医用工学講座の皆さまに謝意を表します。

引用文献

1. Santucci RA, Joyce GF, Wise M. Male urethral stricture disease. *J Urol.* 2007;177(5):1667-74.
2. McMillan A, Pakianathan M, Mao JH, Macintyre CC. Urethral stricture and urethritis in men in Scotland. *Genitourin Med.* 1994;70(6):403-5.
3. Palminteri E, Berdondini E, Verze P, De Nunzio C, Vitarelli A, Carmignani L. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. *Urology.* 2013;81(1):191-6.
4. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-40.
5. Mundy AR, Andrich DE. Urethral strictures. *BJU Int.* 2011;107(1):6-26.
6. Wong VW, Paterno J, Sorkin M, Glotzbach JP, Levi K, Januszyk M, et al. Mechanical force prolongs acute inflammation via T-cell-dependent pathways during scar formation. *FASEB J.* 2011;25(12):4498-510.
7. Zimmerman WB, Santucci RA. A simplified and unified approach to anterior urethroplasty. *Nat Rev Urol.* 2010;7(7):386-91.
8. Wessells H, Angermeier KW, Elliott S, Gonzalez CM, Kodama R, Peterson AC, et al. Male Urethral Stricture: American Urological Association Guideline. *J Urol.* 2017;197(1):182-90.
9. Bullock TL, Brandes SB. Adult anterior urethral strictures: a national practice patterns survey of board certified urologists in the United States. *J Urol.* 2007;177(2):685-90.
10. van Leeuwen MA, Brandenburg JJ, Kok ET, Vijverberg PL, Bosch JL. Management of adult anterior urethral stricture disease: nationwide survey among urologists in the Netherlands. *Eur Urol.* 2011;60(1):159-66.
11. Greenwell TJ, Castle C, Andrich DE, MacDonald JT, Nicol DL, Mundy AR. Repeat urethrotomy and dilation for the treatment of urethral stricture are neither clinically effective nor cost-effective. *J Urol.* 2004;172(1):275-7.
12. Heyns CF, Steenkamp JW, De Kock ML, Whitaker P. Treatment of male urethral strictures: is repeated dilation or internal urethrotomy useful? *J Urol.* 1998;160(2):356-8.
13. Pansadoro V, Emiliozzi P. Internal urethrotomy in the management of anterior urethral strictures: long-term followup. *J Urol.* 1996;156(1):73-5.
14. Isono M, Horiguchi A, Tasaki S, Kuroda K, Sato A, Asakuma J, et al. [The efficacy of direct vision internal urethrotomy for male urethral stricture]. *Nihon Hinyokika Gakkai zasshi The japanese journal of urology.* 2012;103(6):691-6.
15. Fu D, Chong T, Li H, Zhang H, Wang Z. Docetaxel inhibits urethral stricture formation, an initial study in rabbit model. *PloS one.* 2014;9(11):e112097.
16. Kurt O, Yesildag E, Yazici CM, Aktas C, Ozcaglayan O, Bozdemir Y. Effect of Tadalafil on Prevention of Urethral Stricture After Urethral Injury: An Experimental Study. *Urology.* 2016;91:243 e1-6.
17. Mazdak H, Meshki I, Ghassami F. Effect of mitomycin C on anterior urethral stricture recurrence after internal urethrotomy. *Eur Urol.* 2007;51(4):1089-92; discussion 92.
18. Nagler A, Gofrit O, Ohana M, Pode D, Genina O, Pines M. The effect of halofuginone, an inhibitor of collagen type i synthesis, on urethral stricture formation: in vivo and in vitro study in a rat model. *J Urol.* 2000;164(5):1776-80.
19. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal

- keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-43.
20. Rheinwald JG, Green H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. 1975;6(3):317-30.
 21. Muller-Glauser W, Preisig E. The effect of cholera toxin and epidermal growth factor on the in-vitro growth of human oral epithelial cells. *Archives of oral biology*. 1983;28(8):765-71.
 22. de Luca M, Albanese E, Megna M, Cancedda R, Mangiante PE, Cadoni A, et al. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation*. 1990;50(3):454-9.
 23. Hata K, Ueda M. Fabrication of cultured epithelium using oral mucosal cells and its clinical applications. *Hum Cell*. 1996;9(1):91-6.
 24. Takagi R, Yamato M, Murakami D, Kondo M, Yang J, Ohki T, et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(4):e63-73.
 25. Horiguchi A. Substitution urethroplasty using oral mucosa graft for male anterior urethral stricture disease: Current topics and reviews. *Int J Urol*. 2017;24(7):493-503.
 26. Palminteri E, Lumen N, Berdondini E, Di Pierro GB, Cucchiarale G, Tenti G, et al. Two-sided dorsal plus ventral oral graft bulbar urethroplasty: long-term results and predictive factors. *Urology*. 2015;85(4):942-7.
 27. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):85-96.
 28. Nanda HS, Chen S, Zhang Q, Kawazoe N, Chen G. Collagen scaffolds with controlled insulin release and controlled pore structure for cartilage tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2014;2014:623805.
 29. Lin X, Choi D, Hong J. Insulin particles as building blocks for controlled insulin release multilayer nano-films. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;54:239-44.
 30. Beguinot F, Kahn CR, Moses AC, Smith RJ. Distinct biologically active receptors for insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II in cultured skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 1985;260(29):15892-8.
 31. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology*. 1999;29(6):1743-51.
 32. Tabata Y, Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials*. 1999;20(22):2169-75.
 33. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, Matsumoto D, Shigeura T, Sato T, et al. Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair Regen*. 2007;15(4):511-20.
 34. Kadowaki T, Ueki K, Yamauchi T, Kubota N. SnapShot: Insulin signaling pathways. *Cell*. 2012;148(3):624, e1.
 35. Kempainen E, Talja M, Riihela M, Pohjonen T, Tormala P, Alftan O. A bioresorbable urethral stent. An experimental study. *Urol Res*. 1993;21(3):235-8.
 36. Andersen HL, Duch BU, Gregersen H, Nielsen JB, Orskov H. The effect of the somatostatin analogue lanreotide on the prevention of urethral strictures in a rabbit model.

Urol Res. 2003;31(1):25-31.

37. Faydaci G, Tarhan F, Tuncer M, Eryildirim B, Celik O, Keser SH, et al. Comparison of two experimental models for urethral stricture in the anterior urethra of the male rabbit. *Urology*. 2012;80(1):225.e7-11.
38. Guo H, Sa Y, Huang J, Wang Z, Wang L, Xie M, et al. Urethral Reconstruction with Small Intestinal Submucosa Seeded with Oral Keratinocytes and TIMP-1 siRNA Transfected Fibroblasts in a Rabbit Model. *Urol Int*. 2016;96(2):223-30.
39. Meria P, Anidjar M, Brouland JP, Teillac P, Le Duc A, Berthon P, et al. An experimental model of bulbar urethral stricture in rabbits using endoscopic radiofrequency coagulation. *Urology*. 1999;53(5):1054-7.
40. Sahinkanat T, Ozkan KU, Ciralik H, Ozturk S, Resim S. Botulinum toxin-A to improve urethral wound healing: an experimental study in a rat model. *Urology*. 2009;73(2):405-9.
41. Castiglione F, Dewulf K, Hakim L, Weyne E, Montorsi F, Russo A, et al. Adipose-derived Stem Cells Counteract Urethral Stricture Formation in Rats. *Eur Urol*. 2016;70(6):1032-41.
42. Sievert KD, Selent-Stier C, Wiedemann J, Greiner TO, Amend B, Stenzl A, et al. Introducing a large animal model to create urethral stricture similar to human stricture disease: a comparative experimental microscopic study. *J Urol*. 2012;187(3):1101-9.
43. Jia W, Tang H, Wu J, Hou X, Chen B, Chen W, et al. Urethral tissue regeneration using collagen scaffold modified with collagen binding VEGF in a beagle model. *Biomaterials*. 2015;69:45-55.
44. Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Noguchi T, Kanatani I, Ogawa O, et al. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials*. 2004;25(18):4513-20.
45. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*. 2003;160(2):267-77.
46. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.
47. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24(14):2497-502.
48. Murray MM, Martin SD, Spector M. Migration of cells from human anterior cruciate ligament explants into collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Orthop Res*. 2000;18(4):557-64.
49. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng*. 2003;9 Suppl 1:S5-15.
50. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials*. 2000;21(5):489-99.
51. LaBossiere JR, Cheung D, Rourke K. Endoscopic Treatment of Vesicourethral Stenosis after Radical Prostatectomy: Outcomes and Predictors of Success. *J Urol*. 2016;195(5):1495-500.
52. Yardimci I, Karakan T, Resorlu B, Doluoglu OG, Ozcan S, Aydin A, et al. The effect of intraurethral dexamethasone on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral trauma. *Urology*. 2015;85(1):274 e9-13.

53. Khwaja OS, Ho E, Barnes KV, O'Leary HM, Pereira LM, Finkelstein Y, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecasermin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(12):4596-601.
54. Aburto MR, Magarinos M, Leon Y, Varela-Nieto I, Sanchez-Calderon H. AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors. *PloS one*. 2012;7(1):e30790.
55. Fiore E, Malvicini M, Bayo J, Peixoto E, Atorrasagasti C, Sierra R, et al. Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I-overexpressing mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):172.
56. Mullen LM, Best SM, Brooks RA, Ghose S, Gwynne JH, Wardale J, et al. Binding and release characteristics of insulin-like growth factor-1 from a collagen-glycosaminoglycan scaffold. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2010;16(6):1439-48.
57. Mullen LM, Best SM, Ghose S, Wardale J, Rushton N, Cameron RE. Bioactive IGF-1 release from collagen-GAG scaffold to enhance cartilage repair in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(1):5325.
58. Nakagawa T, Ogino-Nishimura E, Hiraumi H, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J. Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids. *Otol Neurotol*. 2012;33(6):941-6.
59. Nakamura M, Kawahara M, Nakata K, Nishida T. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(7):2937-40.
60. Portis AJ, Elbahnasy AM, Shalhav AL, Brewer A, Humphrey P, McDougall EM, et al. Laparoscopic augmentation cystoplasty with different biodegradable grafts in an animal model. *J Urol*. 2000;164(4):1405-11.
61. Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol*. 1996;156(2 Pt 2):571-7.
62. Kanatani I, Kanematsu A, Inatsugu Y, Imamura M, Negoro H, Ito N, et al. Fabrication of an optimal urethral graft using collagen-sponge tubes reinforced with Copoly(L-lactide/epsilon-caprolactone) fabric. *Tissue Eng*. 2007;13(12):2933-40.
63. Li H, Xu Y, Xie H, Li C, Song L, Feng C, et al. Epithelial-differentiated adipose-derived stem cells seeded bladder acellular matrix grafts for urethral reconstruction: an animal model. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(3-4):774-84.
64. Mikami H, Kuwahara G, Nakamura N, Yamato M, Tanaka M, Kodama S. Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells. *J Urol*. 2012;187(5):1882-9.
65. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011;377(9772):1175-82.
66. Wang K, Guan Y, Liu Y, Zhu M, Li T, An D, et al. Fibrin glue with autogenic bone marrow mesenchymal stem cells for urethral injury repair in rabbit model. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(23-24):2507-17.
67. Mangera A, Chapple CR. Tissue engineering in urethral reconstruction--an update. *Asian J Androl*. 2013;15(1):89-92.
68. Fu Q, Cao YL. Tissue engineering and stem cell application of urethroplasty: from

bench to bedside. *Urology*. 2012;79(2):246-53.

表 1 各 Group の背景

	Group 1	Group 2	Group 3	<i>p</i> 値
実験数 (羽)	7	7	5	
体重 (kg) mean ± SD	2.8 ± 0.20	2.9 ± 0.23	2.9 ± 0.18	0.84
凝固直前の尿道径 (mm) mean ± SD	8.9 ± 0.70	9.1 ± 1.7	9.4 ± 1.5	0.83
凝固直後の尿道径 (mm) mean ± SD	2.3 ± 0.62	2.1 ± 0.83	2.6 ± 0.51	0.54

(A)

	control	インスリン(-)	トリョートチロン(-)	ヒト ^α コルチゾン(-)	EGF(-)	bFGF(-)
インスリン	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
トリョートチロン	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
ヒト ^α コルチゾン	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
EGF	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
bFGF	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

(B)

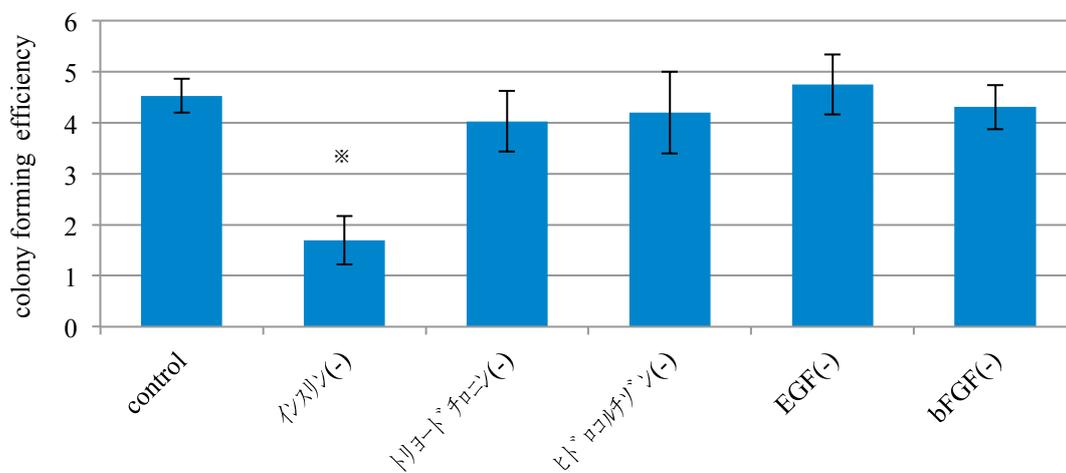


図 1 Colony forming assay を用いた増殖因子の検討

口腔粘膜上皮細胞を用いて各種成長因子の増殖能を colony forming assay にて行い (A)、colony forming efficiency (mean ± SD, n = 5) にて評価した (B)。成長因子を全て含む培地を control として、そこから各種成長因子を除いた培地との比較を行った。その結果、インスリンを除いた培地で培養した上皮細胞の群のみ control と比較して有意に colony 形成が低下した (* $p < 0.05$ vs control)。

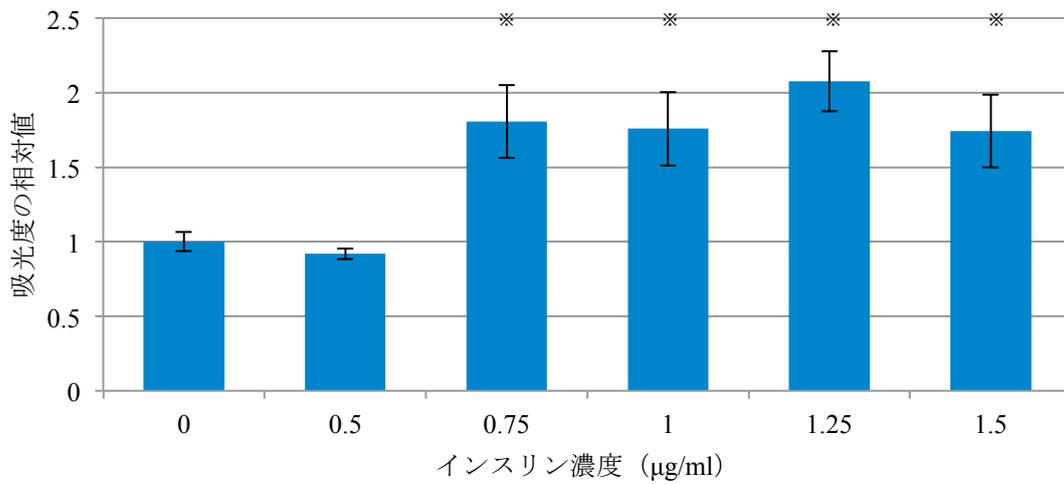
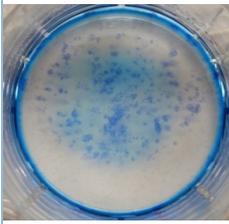
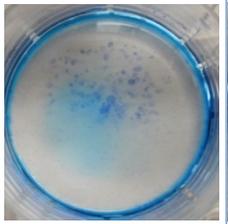
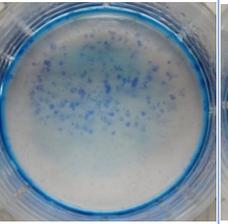
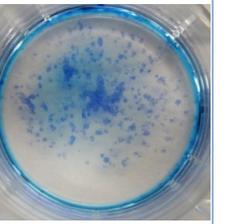


図 2 MTT assay を用いたインスリン最適濃度の検討

口腔粘膜細胞を用いた各インスリン濃度における MTT assay (mean ± SD, n = 32) の結果。口腔粘膜上皮細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^2 細胞/ウェルで完全培地にて 24 時間前培養してプレートに細胞を接着させた。その後、完全培地のインスリン濃度を 0~1.5 µg/mL に調整した培地に交換し、48 時間後に MTT assay を行った。その結果、control であるインスリンなしと比べて培地中のインスリン濃度が 0.75 µg/mL 以上の時で有意に細胞数が多かった (* $p < 0.05$ vs インスリンなし)。

(A)

				
	control			
インスリン	5 μg/mL	(-)	(-)	(-)
IGF-1	(-)	(-)	1 μg/mL	10 μg/mL

(B)

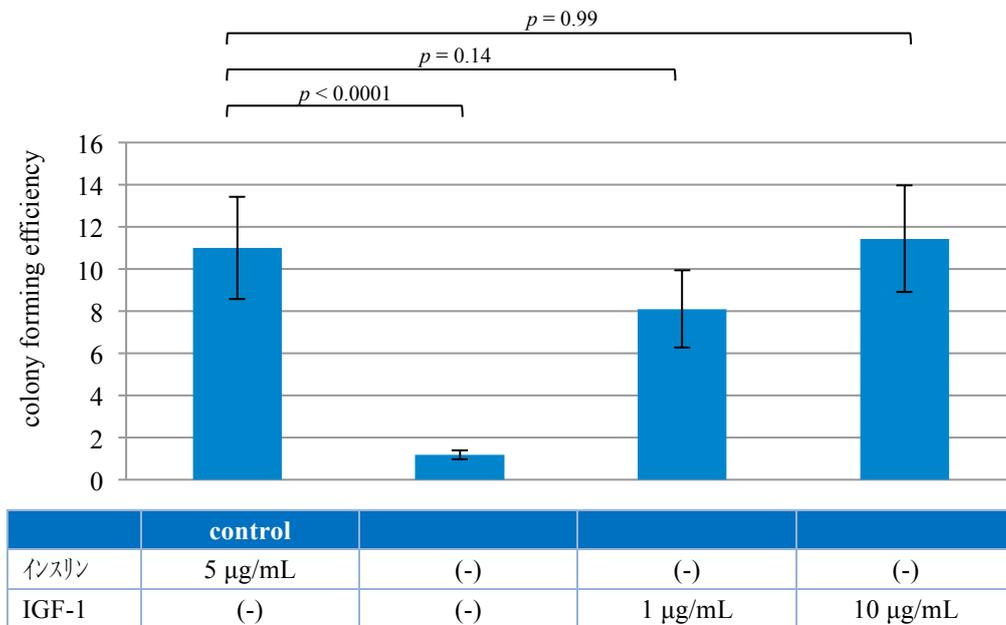


図 3 IGF-1 を培地に添加した際の colony forming assay の結果

インスリン 5μg/mL を含む培地を control として、インスリンを含まない培地とインスリンの代替として IGF-1 (1、10 μg/mL) を添加した培地で colony forming assay を行った (A)。またその結果を colony forming efficiency (mean ± SD, n = 5) で評価した (B)。その結果、IGF-1 を 1 μg/mL または 10 μg/mL 添加した培地では control と同様の細胞数であった。

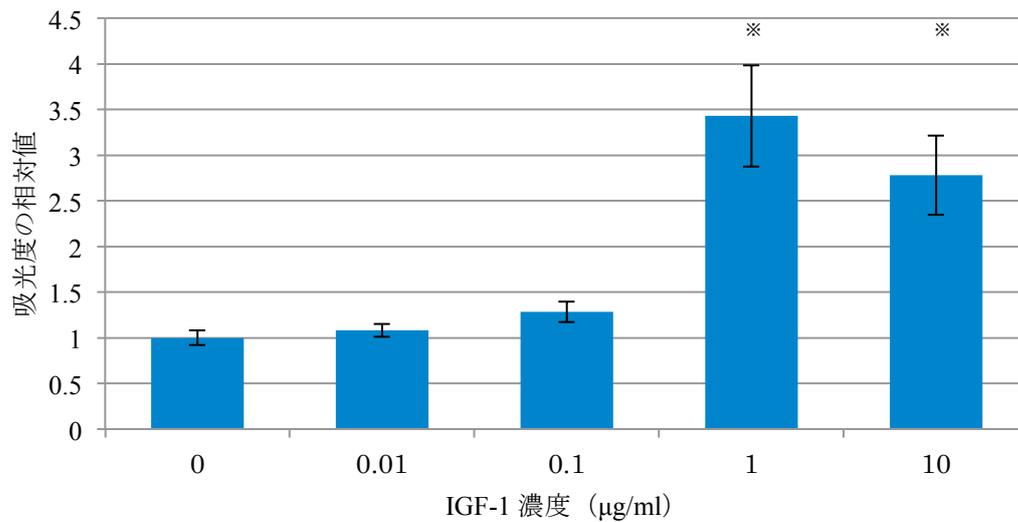
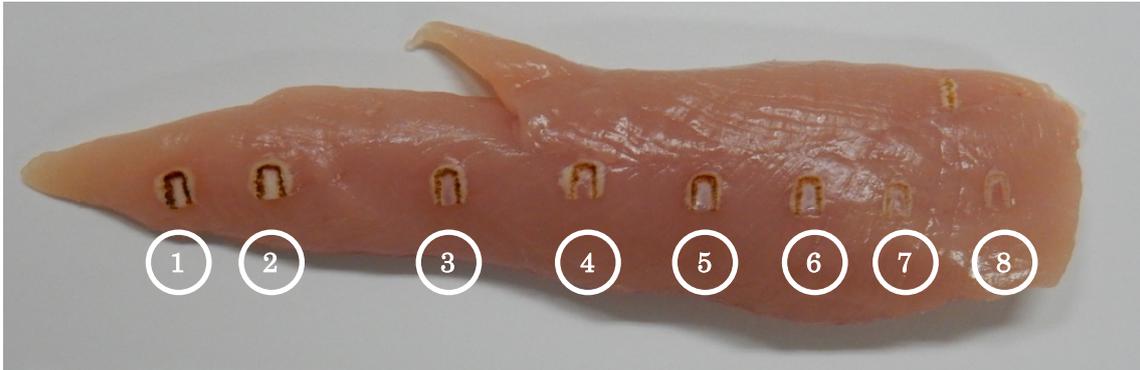


図 4 MTT assay を用いた IGF-1 最適濃度の検討

口腔粘膜細胞を用いた各 IGF-1 濃度の培地を用いた MTT assay (mean ± SD, n = 16) の結果。口腔粘膜上皮細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^2 細胞/ウェルで control の培地にて 24 時間前培養してプレートに細胞を接着させた。その後、control 培地の IGF-1 濃度を 0~10 μg/mL に調整した培地に交換し、48 時間培養した。その結果、IGF-1 なしと比べて IGF-1 濃度が 1 μg/mL 以上の濃度で有意に細胞数が多かった (* $p < 0.05$ vs IGF-1 なし)。

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
出力	40 W	40 W	40 W	40 W	30 W	30 W	30 W	30 W
秒数	10 s	5 s	3 s	1 s	10 s	5 s	3 s	1 s



	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯
出力	50 W	50 W	50 W	50 W	20 W	20 W	20 W	20 W
秒数	10 s	5 s	3 s	1 s	10 s	5 s	3 s	1 s

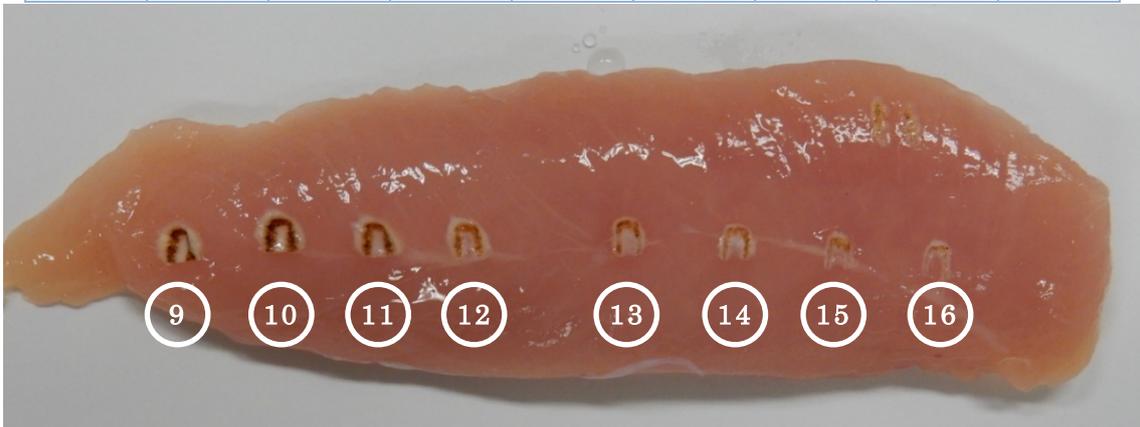


図 5 電気メスで鶏ささみ肉を凝固する際の出力、時間の検討
 電気メスの出力を 20～50 W まで変化させ、それぞれの出力下で 1～10 秒間鶏ささみ肉を電気凝固した。その結果、40 W が最も秒数に依存したタンパク変性が見られた。

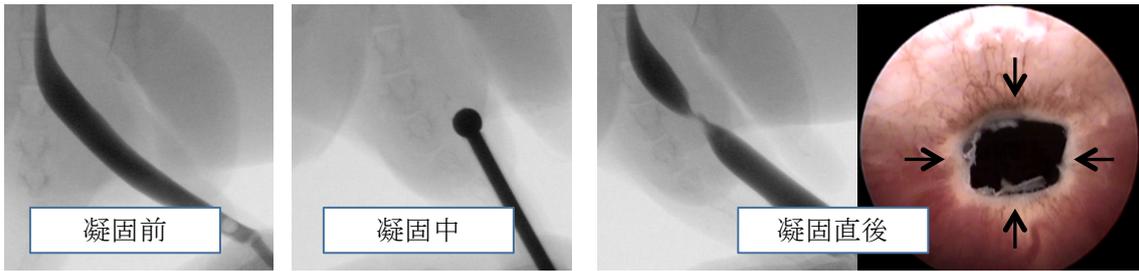


図 6A ボール電極によるウサギ尿道傷害モデルの作製

外尿道口よりボール電極を挿入し、透視下に球部尿道を 40 W、5 秒間で電気凝固を施行した。凝固直後に尿道造影にて尿道狭窄があることと尿道内視鏡検査にて尿道粘膜に熱変性（矢印）を認めることを確認した。

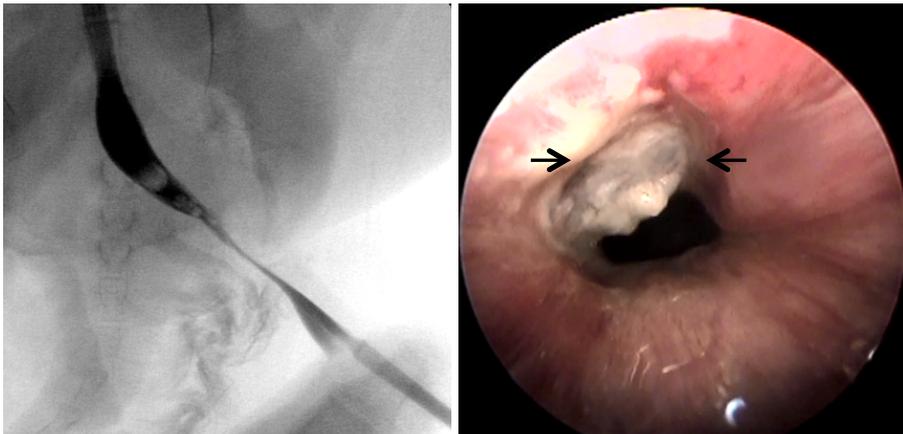


図 6B 尿道障害後、2 週間目の逆行性尿道造影と尿道内視鏡所見

凝固部位に一致して尿道狭窄を認め、粘膜面の損傷（矢印）を認めた。

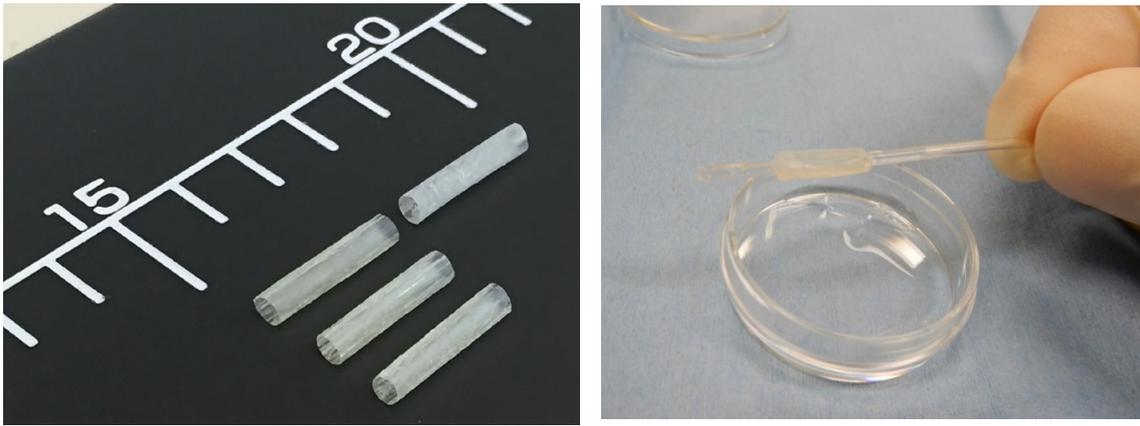


図 7A ブタ I 型コラーゲンと IGF-1 徐放性尿道カテーテルの作製
2 cm のチューブ型の I 型コラーゲンに 200 μ L の IGF-1 溶液 (1 mg/mL) を滴下した。

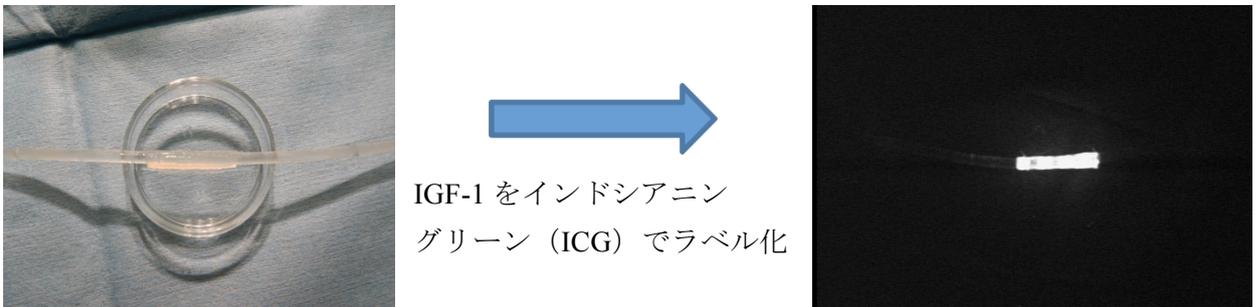
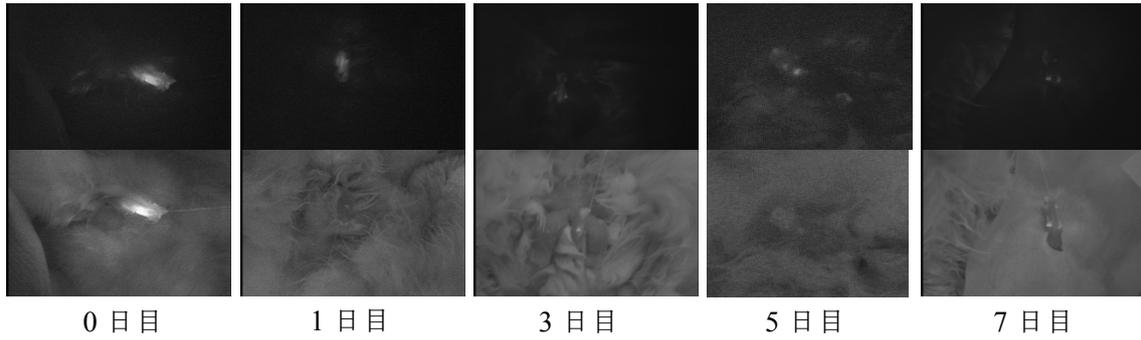


図 7B IGF-1 への ICG ラベル化
ICG Labeling Kit を用いて IGF-1 に蛍光物質である ICG をラベル化した。PDE カメラを用いて蛍光強度を観察することでコラーゲンに残存する IGF-1 を測定した。



ICGの経時的変化

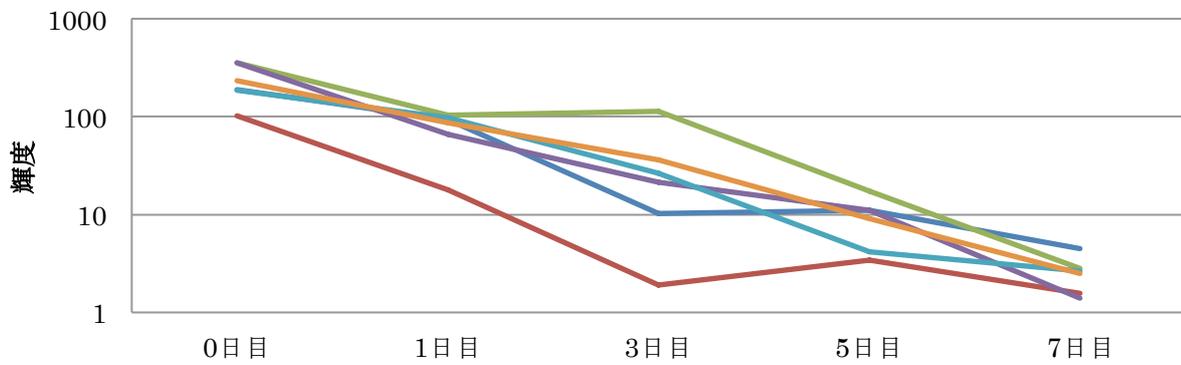


図 7C ICG ラベル化 IGF-1 徐放性コラーゲンカテーテルの蛍光測定

ICG を標識した IGF-1 徐放性コラーゲンカテーテルを挿入し尿道内の残存蛍光を経時的に観察した (n = 6)。尿道から PDE カメラの距離は 20 cm と一定にして実験を施行した。写真の上段は暗視野、下段は明視野。徐々に蛍光輝度は低下したが、全例において 7 日目までは蛍光は観察可能であった。

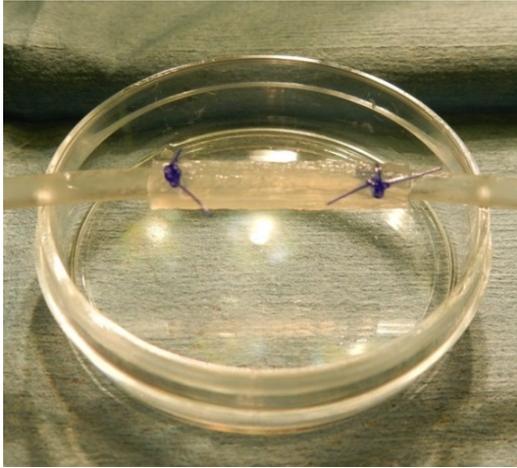


図 8 IGF-1 徐放性尿道カテーテル

I 型コラーゲンは 4-0PDS にて 8 Fr 尿道カテーテルに固定した。ウサギ尿道を電気凝固後、尿道カテーテルを外尿道口から挿入した。

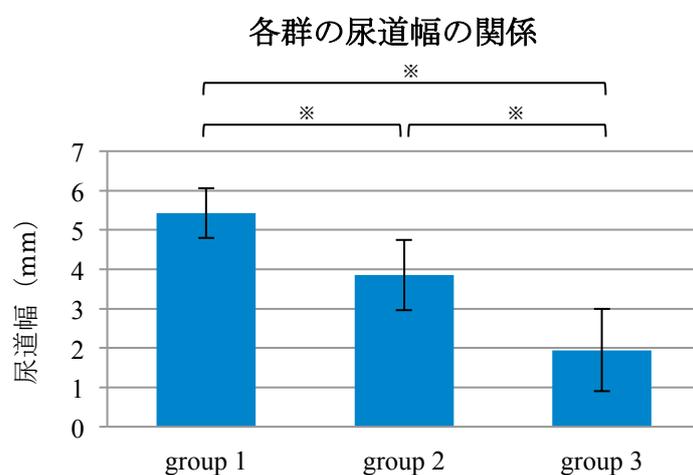
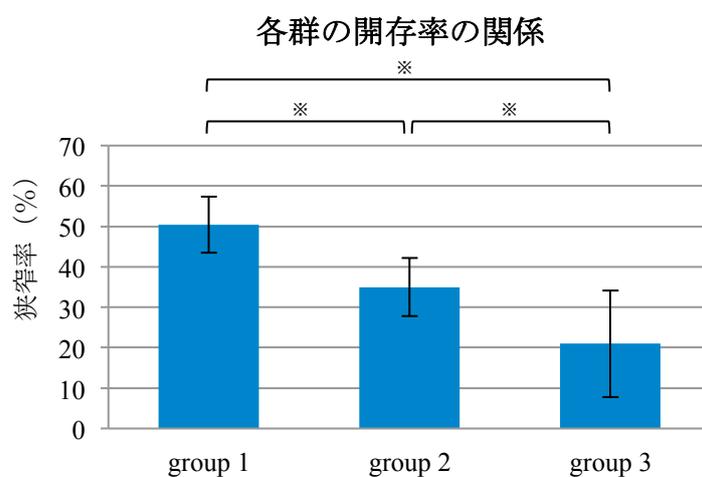
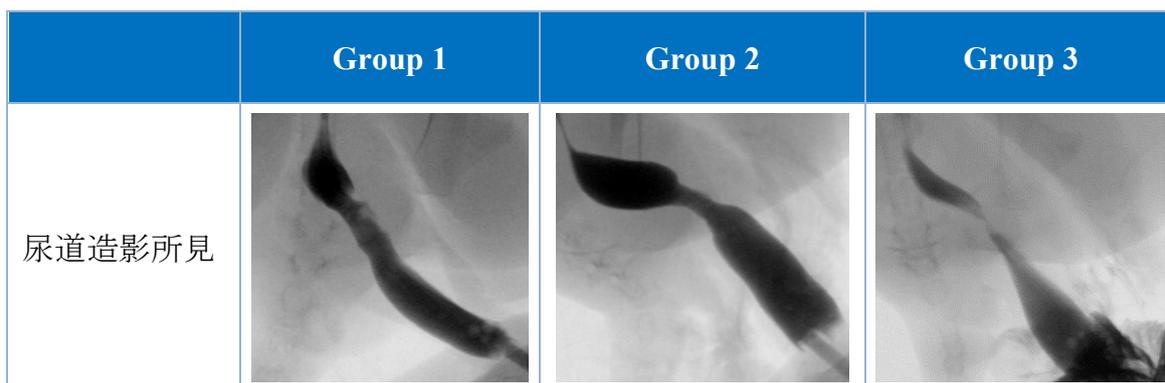


図9 各実験 group の尿道造影所見と尿道幅、開存率の比較
尿道造影において最も狭い部位の尿道幅と開存率は group 1 が最も改善していた ($p < 0.0001$)。また 2 群間の比較において尿道幅では全ての group 間で有意差を認めた。開存率では group 3 と比べて group 1 と 2 は有意に改善していた (* $p < 0.05$)。

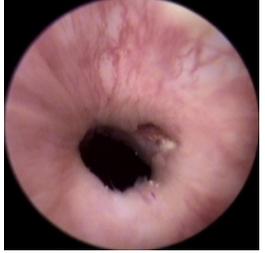
	Group 1	Group 2	Group 3
尿道内視鏡所見			
通過率	71.4%	57.1 %	20 %

図 10 各 group の尿道内視鏡所見と内視鏡通過率の比較

group 1 の尿道内腔は大部分が粘膜に被覆されていたが、group 2 と 3 では大部分の粘膜が損傷を受けていた。尿道内視鏡の通過率は group 間で有意差は認めなかった ($p = 0.19$)。

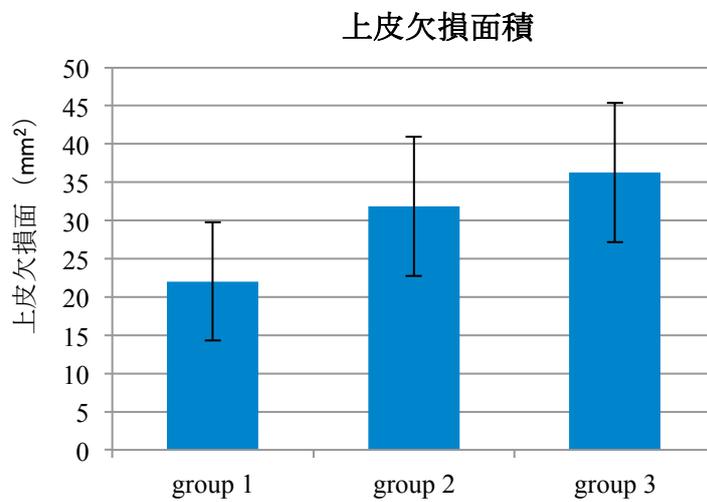
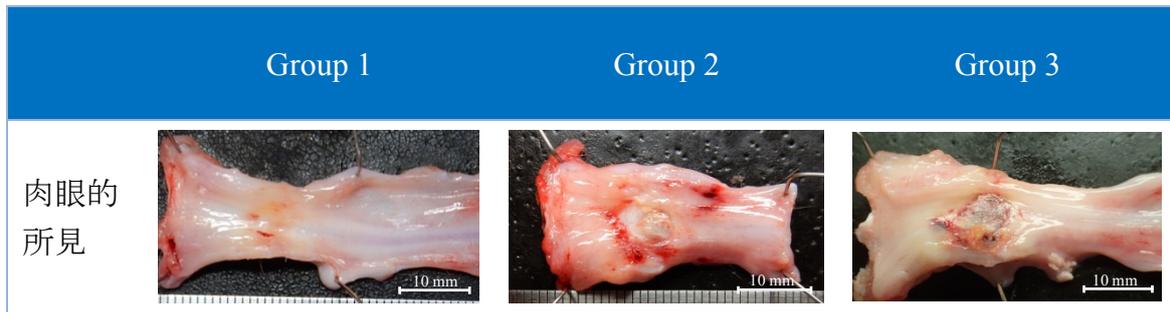


図 11 各実験 group の肉眼的所見と上皮欠損面積の比較(bar = 10 mm)。
 粘膜の平均欠損面積は group 1 が最も小さい傾向があったが 3 群間で有意差は認めなかった($p = 0.46$)。

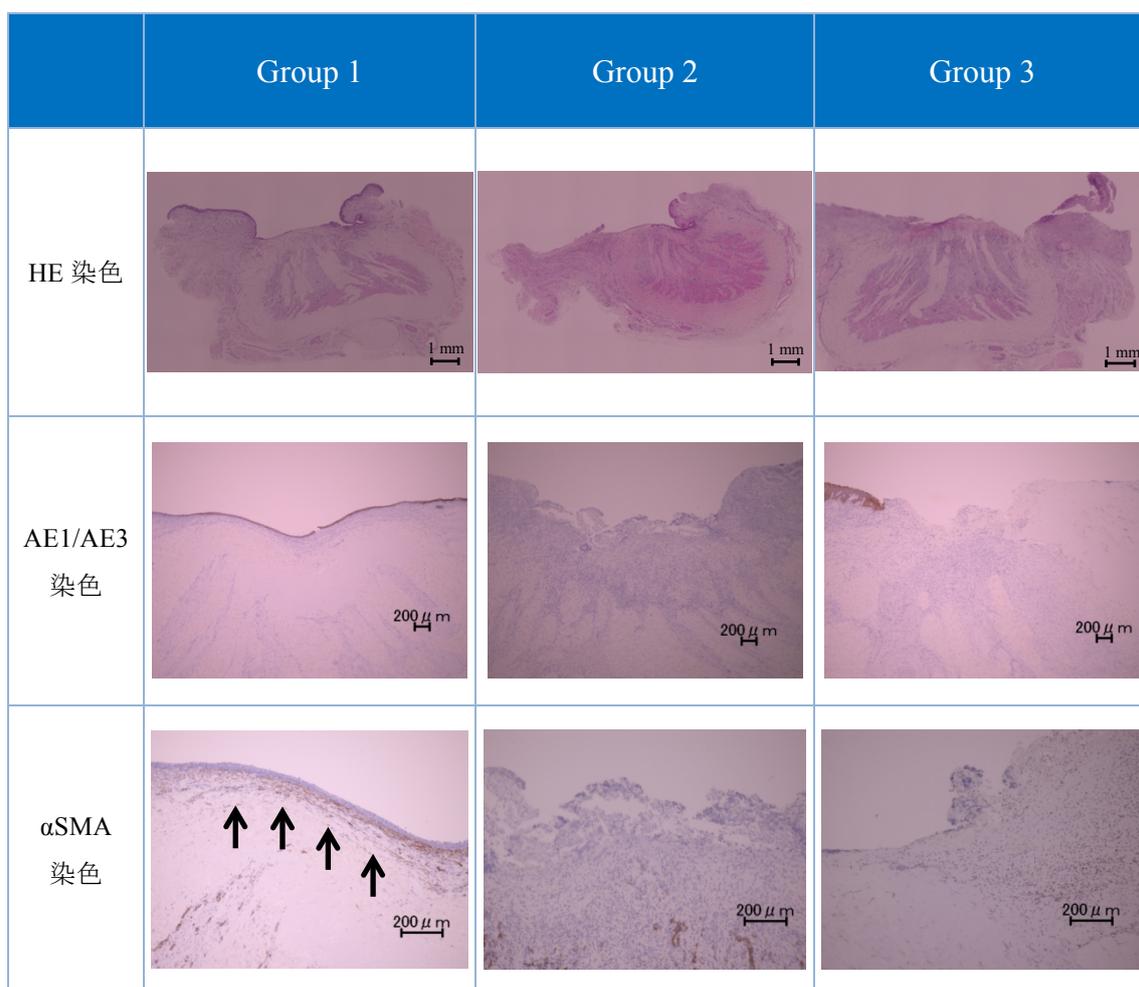


図 12 各実験 group の組織学的所見の比較

HE 染色において尿道海綿が尿道内腔に露出している割合は group 1 が最も小さい傾向であったが 3 群間に有意差は認めなかった ($p = 0.19$)。AE1/AE3 染色では group 1 に上皮細胞が再生していることが確認できたが、group 2、group 3 では全例において上皮細胞は欠損していた。αSMA 染色では group 1 のみに粘膜下に平滑筋 (矢印) を認めた。