

ウサギ尿道狭窄症モデルを用いた  
尿道拡張術後の再狭窄予防に関する研究

おじま けんいちろう  
尾島 健一郎

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度



## 目 次

### 第1章 緒 言

- (1) 尿道狭窄症について 1 頁
- (2) 尿道狭窄症治療の現状について 1 頁
- (3) 本邦における尿道狭窄症に対する経尿道的処置の問題点 2 頁
- (4) 経尿道的処置の有効性を高める手段の開発 3 頁

### 第2章 対象と方法

- (1) ウサギ尿道狭窄症モデルの作製 6 頁
- (2) 光硬化性創傷被覆材の作製 8 頁
- (3) ウサギ尿道狭窄症モデルに対する尿道拡張法 9 頁
- (4) 尿道拡張後の光硬化性創傷被覆材の投与方法 10 頁
- (5) 逆行性尿道造影による評価 11 頁
- (6) 内視鏡による尿道内腔の評価 12 頁
- (7) 尿道摘出検体の組織学的評価 12 頁
- (8) 統計分析 13 頁

第3章 結果	
（1）ゼラチンを用いた光硬化性創傷被覆材の材料学的特性	14頁
（2）ウサギ尿道狭窄症モデルの作製と評価	15頁
（3）尿道内径比の比較	16頁
（4）尿道拡張後の再狭窄状況について	16頁
（5）尿道および陰茎海綿体への影響について	17頁
（6）尿道上皮長の比較	18頁
第4章 考察	19頁
第5章 結論	24頁
謝辞	25頁
引用文献	26頁
図表	37頁

## 第1章 緒言

### (1) 尿道狭窄症について

尿道狭窄症は、外傷、経尿道的手術や尿道カテーテル留置などの尿道内操作や感染症などにより尿道内腔が損傷し、出血や炎症反応を経て組織再生へと創傷治癒が進行し、その過程で、組織再生と瘢痕化の不均衡が生じ、線維化が進み、尿道内腔が狭小化する疾患である[1]。線維化が進む過程にはいくつかの誘因があるとされており、尿道粘膜の損傷に続発する尿道海綿体への尿溢流が狭窄発症の一因と考えられている[2, 3]。

尿道狭窄症は、原因の多様性ゆえ、あらゆる年代で起こりうる疾患である[4]。特に、若年者で問題となるのが、会陰部の騎乗型損傷や、骨盤骨折に伴う尿道外傷に続発する外傷性尿道狭窄である。満足な排尿ができなくなり、カテーテル管理を余儀なくされることから、治療が長期化すると就労への支障が懸念される。尿道内腔の狭小化が進行することにより、尿勢低下や頻尿などの排尿障害の症状が出現する。排尿障害以外にも、会陰部痛や射精障害、男性不妊症の原因になりうる[5]。

### (2) 尿道狭窄症治療の現状について

尿道狭窄症の治療は、開放手術により尿道を再建する尿道形成術と、内尿道切開や尿道ブジーのような狭窄部を尿道内から拡張する経尿道的処置に大別される。尿道形成術の成功率（無再狭窄率）は経尿道的処置に比べて格

段に高く、海外では尿道狭窄症の標準治療と位置付けられている[6]。しかしながら、尿道形成術はほとんどの泌尿器科医にとって馴染みの薄い治療であり、狭窄の状態により柔軟な術式選択をする必要性があることや緻密な操作を要求される難度の高い手術であるため[7]、日常診療の一環として尿道形成術を提供可能な泌尿器科医はごく限られている[8, 9]。一方、経尿道的処置は手技が簡便であるため、全国に広く普及しているが、術後の再狭窄率が50%程度と高いことが大きな欠点である[10-12]。再狭窄例に繰り返して経尿道的処置を施行しても尿道狭窄が治癒することはほとんどなく、それ自体が医原性尿道損傷となり、かえって狭窄を複雑化してしまうことが指摘されている[11, 13, 14]。このような背景から、諸外国の泌尿器科学会は近年相次いで尿道狭窄症診療ガイドラインを発表し、経尿道的処置の適応をごく一部の軽症例に限るよう推奨している[7, 15-19]。

### (3) 本邦における尿道狭窄症に対する経尿道的処置の問題点

海外では尿道形成術の普及にともない、尿道狭窄症の診療を専門とする医療機関への紹介前に経尿道的処置が行われることが少なくなっているが[20]、本邦における専門医療機関の一つである防衛医科大学校病院(以下、「当施設」と記載)を紹介受診する患者の中には依然として不適切な経尿道的処置歴を有する例が多く見受けられる。本来、経尿道的処置の適応がない外傷性尿道狭窄例でさえ経尿道的処置を選択されている症例が多いのが現

状である[21]（参考論文 1）。また、尿道形成術目的で当施設を受診する患者の大半は経尿道的処置を 2 回以上繰り返し施行されており、特に当施設から遠方に居住している患者、尿勢が弱くとも自排尿可能である患者、医原性尿道狭窄症の患者、20 mm 以上の長い狭窄を有する患者は不適切な経尿道的処置が行われやすいことが判明した[22]（参考論文 2）。

これらの結果は尿道形成術を専門的に提供できる泌尿器科医が少ない、さらには尿道再建について体系的な教育体制が十分でないという本邦の現状と尿道狭窄症には経尿道的処置が第一選択で、尿道形成術はそれが不成功に終わった場合の最終手段であるという本邦の泌尿器科医の意識に起因するものと推察する。経尿道的処置は治療効果的にも費用対効果的にも尿道形成術に大幅に劣ることが示されているにもかかわらず、過剰かつ不適切に施行され、繰り返し施行することにより狭窄が複雑化し、後々の尿道形成術の成功率を低下させるリスクがある[23-25]。不毛な経尿道的処置を繰り返すことで、患者は心的外傷を負い、通院の頻度が増すことや就業へ支障を来すことで経済的にも大きな負担を負うことになるが[26]、それらは決して看過できないものである。

#### （4）経尿道的処置の有効性を高める手段の開発

前述のように不適切な経尿道的処置が行われている本邦の現状に対する対策として、診療ガイドラインを策定し、尿道形成術を普及させることが喫

緊の課題である。しかし、ガイドラインが策定され、尿道形成術が適切な治療であることが広く認識されたとしても、尿道形成術を短期間で習得することはほぼ不可能であり、当施設を含む限られた国内施設に患者が集中することが予想される。また、成功率は低いですが、手技の簡便さから経尿道的処置がある程度の割合では行われていくことが予想される。したがって、現実的には広く普及している経尿道的処置の効果を増強する何らかの新たな付加技術を開発し、難易度の高い尿道形成術を行うことなく経尿道的処置のみで尿道狭窄症を治癒できる方法を考えることが望ましい。何らかの手段により経尿道的処置後の再狭窄を予防できれば、簡便性と低侵襲性という経尿道的処置の長所を活かした患者にとって有益な治療を提供できると考える。我々は、この課題に対する解決策を追求するために、尿道狭窄症動物モデルによる基礎的研究を開始した。尿道の再狭窄を予防するためには、尿道組織の再癒痕化が進行する前に上皮組織を再生させ、尿道粘膜下組織の再構築を正常に誘導することが必要である。そこで本研究では、尿道狭窄症動物モデルを用いて、尿道組織を低侵襲に再建することをめざした基礎的研究を行った。

これまでに、上皮組織再生の細胞足場材料として、シート状のコラーゲンやゼラチンを用いた創傷治癒促進材が既に実用化されている[27]。しかし、尿道内腔における治療へ応用するためには、狭い尿道内腔へ適用可能で、組織接着性が高い被覆材が望ましい。すなわち、経尿道的処置後の複雑な形状



をした尿道内創部に適用する際は液体状で、その後に創部において組織密着性の高い被覆材となる材料が理想的である。これまでに我々は、液体状のゼラチン水溶液に光硬化剤を添加し、可視光照射によってオンデマンドで組織密着性の高いハイドロゲルが形成されるような被覆材を作製している[28]。筆者らは、この光硬化性ゼラチンハイドロゲルを尿道内創部に適用して尿道上皮細胞の足場とすることが、上皮組織の再生を促進し、さらには尿道粘膜下組織の再癒痕化を抑制する可能性があると考えた。本研究では、ウサギを用いた尿道狭窄症モデルを確立した上で、光硬化性ゼラチンハイドロゲルを用い、経尿道的処置後の再狭窄を予防することを目的とした。

## 第2章 対象と方法

### (1) ウサギ尿道狭窄症モデルの作製

様々な動物を用いた尿道損傷および尿道狭窄症モデルが報告されているが、その中でもウサギの尿道は、薄い尿道粘膜層を血流が豊富な海綿体が裏打ちしており、ヒトの尿道と類似していることが特徴的である[29]。そのため、ウサギ尿道傷害モデルを用いて尿道狭窄症に関する実験を施行する報告がみられる[30-33]。Meriaらは、内視鏡下で経尿道的に尿道内腔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[30]。しかしながら、電気凝固による尿道傷害に続発した尿道狭窄は18羽中9羽（50%）にとどまった。Faydaciらは、経尿道的に尿道内腔を電気凝固したモデルと、同じく経尿道的に電気切開したモデルを比較した[31]。前者においては電気凝固に伴う合併症はみられなかったものの、電気凝固による尿道傷害に続発した尿道狭窄を1例も認めることがなかった。後者において、電気切開したウサギ全例に尿道狭窄の続発を認めたが、10羽中6羽（60%）に尿道出血を認めた。Fuらは、40羽のウサギに対して経尿道的に電気凝固を行ったが、電気凝固後4羽（10%）が死亡した[32]。これらはいずれも小児用内視鏡下でループ型電極を用いて経尿道的な尿道損傷を作成した方法であるが、再現性や合併症の発生などの課題がみられた。

これまでに我々の研究グループは、ボール型電極を用いてウサギの尿道粘

膜に電気凝固を加えることで急性期尿道損傷モデルを確立していた[33]。ボール型電極は、ヒトの臨床において、電気メスのハンドピースに装着して汎用される電極である。ボール型電極はウサギの尿道内腔に全周性に接する直径をもち、電気凝固を加えることで、尿道内腔全周性に均一な熱変性が認められた。ほぼ全例において、尿道傷害に続発した尿道狭窄を認めたが、その発症時期は尿道傷害後 2 週間であり、ヒトにおける尿道狭窄症を模したような慢性的な癒痕形成などが見られない急性モデルであった[33]。そこで本研究において、電気凝固の出力を 40 W から 10 W に軽減し、凝固時間を 5 秒間から 25 秒間へ延長することで、月単位の長期経過が観察可能な慢性的なウサギ尿道狭窄症モデルを作製した。

防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認のもと、動物モデルの作製および実験を実施した（承認番号 19011 及び 19066）。10 羽の Japanese White rabbit のオス（2.5 - 3.6 kg）を実験に用いた。ウサギはすべて北山ラベス社（Ina, Nagano, Japan）より購入した。ケタミン（Daiichi Sankyo Pharmaceutical, Tokyo, Japan）35 mg/kg およびキシラジン（Bayer, Leverkusen, Germany）5 mg/kg を大腿部に筋肉内注射し麻酔を導入した。

十分な鎮痛および鎮静が得られたところで、ウサギを仰臥位の姿勢にし、尿道造影検査と尿道内視鏡検査を行い、尿道に明らかな異常所見がないことを確認した。尿道造影検査は、外尿道口から 8 Fr 径のネラトンカテーテル

(Terumo, Tokyo, Japan)を挿入し、造影剤（イオパミドール、Bayer, Leverkusen, Germany)を注入して逆行性に尿道を造影した。尿道内視鏡検査は、10 Fr 径の細径動物用内視鏡（AVS、Tokyo, Japan)を外尿道口から逆行性に挿入し、モニター画面に映しながら尿道内腔の観察を実施した。尿道内視鏡検査に続いてウサギの尿道にボール型電極を挿入し、ウサギの坐骨末端部が凝固位置となるように X 線透視下で調整し、尿道内腔を電気凝固（10 W、25 秒間）させた。その直後に、再度、逆行性尿道造影を行い、凝固部位の狭窄が認められることを確認し、さらに細径動物用内視鏡で尿道粘膜全周性に熱変性の所見と狭窄がみられることを確認した。電気凝固直後の尿閉予防を目的としたカテーテル留置は行わなかった。電気凝固から1か月経過した時点で、尿道造影検査および尿道内視鏡検査を行い、ボール型電極による電気凝固域に尿道狭窄が形成されていることを確認した（図 1）。以上の手技はすべて単一術者（筆者）により施行された。

## （2）光硬化性創傷被覆材の作製

Pentamethylcyclopentadienyl triphenylphosphine ruthenium chloride (Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA, USA) および sodium persulfate (Advanced BioMatrix) を、37.4 mg/mL および 119 mg/mL の濃度となるように、それぞれ 37 °C でリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた。37 °C に保った 10wt% の濃度のブタの皮膚由来のゼラチン水溶液 (beMatrix®; Nitta

Gelatin, Osaka, Japan) 1 mL に対して、先に用意したそれぞれの溶液を 20  $\mu$ L ずつ混合した。この混合溶液に、波長 455 nm の LED 光を照射することにより、光硬化性創傷被覆材として光硬化性ゼラチンハイドロゲルを得ることができる (図 2) [28]。ゼラチン水溶液や光重合開始剤の濃度、可視光の照射強度がハイドロゲルの形成にどのように影響するのか、種々の条件設定を行い (表 1)、ハイドロゲルが形成されるまでの時間とその硬さを dynamic time-sweep rheological analyzer with photo-rheometer (HAAKE MARS photo-rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)) を用いて測定した。

### (3) ウサギ尿道狭窄症モデルに対する尿道拡張法

尿道狭窄症に対して、内視鏡下で経尿道的に切開を行う方法やブジーにより盲目的に尿道を拡張する方法がヒトの実臨床で汎用されている。しかしながら、ヒトの臨床でも大きな懸念となっていることであるが、ブジーによる拡張法は狭窄部以外の正常な尿道粘膜を損傷して尿道狭窄の複雑化を招き、実験動物モデルの症状の再現性を低下させると考えられた。これらの要因から本実験においては、尿道拡張をより確実に実施するため次の方法を採用した。

ウサギの尿道腹側を、尖刃メス (11 番) を用いて 7 mm ほど正中切開した。その際、尿道内腔に先が丸いデュベキー鑷子を挿入することで尿道の背

側を損傷しないように保護し、さらには、その切開が切開部の中枢側にある狭窄部に及ばないように細心の注意を払った。切開縁は海綿体からの出血がみられるため、出血量を最小限に抑え、操作視野を良好に保つべく、5-0 PDS糸で切開縁を左右それぞれ 2 針縫合した。開窓部より尿道内腔にモスキートペアンを挿入し、狭窄部で丁寧に開いて、10 Fr 径の内視鏡が十分に通過可能となるまで尿道を拡張した。狭窄部を拡張することにより尿道粘膜が欠損した上皮層を露わにした (図 3)。

#### (4) 尿道拡張後の光硬化性創傷被覆材の投与方法

尿道拡張部に 8 Fr 径のネラトンカテーテルを外尿道口から膀胱まで挿入した。尿道拡張操作のために開窓した創部から、LED 光 (波長 455 nm、50 mW/cm<sup>2</sup>) を照射しながら 1 mL の光硬化性創傷被覆材を尿道拡張部に塗付した (図 4)。LED 光の照射は 1 分間実施した。この条件は、事前実験によって見出された最も効果的に光硬化を得られるものであった。8 Fr 径のネラトンカテーテルは挿入したまま、先の 5-0 PDS 縫合糸を丁寧に抜糸し、あらためて切開創を 5-0 PDS を用いて連続縫合を施すことにより、図 5A に示すように閉創した。その際、運針マージンを必要最小限とし尿道内腔を狭小化させないようにすること、運針ピッチを細かくし尿道長の短縮を抑えること、尿道粘膜どうしが確実に密着することの 3 点に注意をはらった。予備実験において、この要領による尿道腹側の切開・縫合操作を実施した結果、同部位

における尿道狭窄の形成は認められなかった（図 5B-E）。8 Fr 径のネラトンカテーテルが抜けないように、外尿道口部において 3-0 絹糸 1 針で固定した。事前の検討において、光硬化性創傷被覆材をこの方法で塗付すると、少なくとも 4 日間は尿道拡張部に残存することを内視鏡下で確認している（図 6）。

10 羽のウサギ尿道狭窄症モデルは、尿道拡張後に光硬化性創傷被覆材の処置を施す A 群（n = 5）と、尿道拡張のみ施す B 群（n = 5）に無作為に割り当てられた。いずれの群においても、処置後 3 日目に 8 Fr 径のネラトンカテーテルを抜去した。この実験の観察期間において、飼育ケージ内において身体抑制せず、食餌、飲水へのアクセスに制限を設けなかった。

#### （5）逆行性尿道造影による評価

ボール型電極による尿道電気凝固処置後に続発した尿道狭窄部の尿道拡張処置を施してから 2 か月経過したところで、処置部の状態を逆行性尿道造影と内視鏡検査により評価した。

逆行性尿道造影は、処置前と同様に、外尿道口から 8 Fr 径のネラトンカテーテル（Terumo）を挿入し、造影剤（イオパミドール、Bayer）を注入して逆行性に尿道を造影した。造影剤の過度な圧入により狭窄部を損傷しないよう細心の注意を払いながら造影を実施した。逆行性尿道造影画像から、尿道の狭窄部と正常部位の内径を Image J（National Institutes of Health,

Bethesda, MD, USA) を用いて数値化し、その比率を算出した。造影剤注入時の圧力による尿道幅への影響を可能な限り除外するために過去の論文を参考にした[32, 34]。狭窄部から 2 cm 遠位の部位を正常内腔とし、尿道内径比(%) = 狭窄部の内径(mm) / 正常部位の内径(mm) × 100 で算出した (図 7)。尿道拡張処置直前と、処置後 2 か月経過した時点での尿道内径比を算出し両群間で比較した。

#### (6) 内視鏡による尿道内腔の評価

逆行性尿道造影による狭窄部の状態の評価と並行し、尿道内視鏡による尿道内腔の観察を行った。尿道狭窄部の狭窄や組織の癒痕化の程度を観察することに加えて、過去の報告[35]に基づいて 10 Fr 径の細径動物用内視鏡 (AVS) が通過するか否かをもって、拡張処置後の再狭窄の有無を判定した。

#### (7) 尿道摘出検体の組織学的評価

尿道拡張処置後 2 か月の時点で、逆行性尿道造影と尿道内視鏡検査を実施した後に、ウサギの耳介静脈よりペントバルビタール (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) を大量投与して安楽死させた。その後、ウサギ尿道を摘出し、尿道腹側を尿道の走行に沿って縦切開し、尿道粘膜面を肉眼的に観察し、尿道拡張処置を施した部位を同定した (図 8)。肉眼的観察終了直後に摘出した尿道を 10%ホルマリン溶液で固定した。尿道拡張処置を施した部位におい



て、肉眼的に見て最も尿道内腔が狭小化している位置で尿道を横断するように切り出し、パラフィン包埋ブロックを作製した。薄切後に hematoxylin-eosin 染色 (以下、「HE 染色」と記載) と Masson' s trichrome 染色を行い、尿道拡張処置を施した部位を組織学的に観察した。

組織学的評価として、ボール型電極による電気凝固により損傷をうけた尿道および陰茎海綿体組織の割合と、尿道拡張処置を施した部位における尿道上皮の長さを Image J (National Institutes of Health) を用いて数値化した。

#### (8) 統計分析

尿道内径比、尿道上皮長、損傷をうけた尿道及び陰茎海綿体の割合の比較には、正規分布に従わない、対応がない 2 群間での比較であると考え、Wilcoxon 順位和検定を用いた。尿道狭窄改善例の比較には Fisher 直接確率検定を用いた。解析は JMP15 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

### 第3章 結 果

#### (1) ゼラチンを用いた光硬化性創傷被覆材の材料学的特性

今回使用した光硬化性創傷被覆材のハイドロゲルとしての材料学的特性について検討した結果を示す(表1、図9)。種々のゼラチン水溶液濃度、光重合開始剤濃度、LED 光照射強度の条件下で光硬化性ゼラチンハイドロゲルを作製した。光硬化性創傷被覆材を作製するにあたり、7つの条件に付してハイドロゲルの特性を検討した。ゼラチン水溶液の濃度、光重合開始剤の濃度、LED 光照射強度の条件は表1に示す通りである。光照射によるゲル化プロセスを HAAKE MARS photo-rheometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて観察したところ、ハイドロゲルが形成されるまでの時間は、ハイドロゲル #1 は  $3.79 \pm 0.18$  秒、ハイドロゲル #2 は  $4.25 \pm 0.31$  秒、ハイドロゲル #6 は  $3.94 \pm 0.19$  秒であり、他の4つのハイドロゲルゲル (#3:  $7.15 \pm 0.46$  秒, #4:  $8.84 \pm 0.04$  秒, #5:  $10.58 \pm 0.32$  秒, #7:  $18.35 \pm 0.55$  秒) よりも短時間であった(図9)。以上の結果より、 $30 \text{ mW/cm}^2$  の強度で照射することで、より短時間にハイドロゲルが形成されることが観察された。同じ装置を用いてハイドロゲルの弾性係数を計測したところ、ハイドロゲル #1 で  $224.36 \pm 21.65 \text{ Pa}$ 、ハイドロゲル #3 で  $246.10 \pm 24.24 \text{ Pa}$  と他の5つのハイドロゲル (#2:  $78.97 \pm 5.52 \text{ Pa}$ 、#4:  $62.03 \pm 0.19 \text{ Pa}$ 、#5:  $7.19 \pm 0.11 \text{ Pa}$ 、#6:  $55.92 \pm 0.28 \text{ Pa}$ 、#7:  $2.16 \pm 0.11 \text{ Pa}$ ) より高か

った。光重合開始剤の濃度が 0.25 mM (ハイドロゲル#5)、ゼラチン濃度が 5wt% (ハイドロゲル#6、#7) のものでは、30 mW/cm<sup>2</sup>の光を照射しても十分な硬さをもったハイドロゲルが形成されなかった。#5-7については、ゲル化はするものの、ハイドロゲルが形成されるまでの時間が長く、弾性係数も低かった。以上の結果から、ゼラチンと光重合開始剤の濃度が低いゲルは強度に劣ることが観察された。これらの検討結果を総合し、光照射後に速やかに硬化し十分な硬さを有するハイドロゲル#1の条件が本研究に適しているものと考えられた。その上で、ウサギの尿道狭窄拡張部という狭い局所への投与であることから、確実に光硬化させるために、50 mW/cm<sup>2</sup>で1分間照射することとした。

## (2) ウサギ尿道狭窄症モデルの作製と評価

実験開始時のウサギ体重に両群間で有意な差を認めなかった。ボール型電極による電気凝固後1か月の時点で、逆行性尿道造影および尿道内視鏡検査を実施した結果、全例で有意な尿道狭窄が形成されていることが確認された。尿道拡張処置後に光硬化性創傷被覆材を投与したA群の代表的な逆行性尿道造影及び内視鏡検査結果を図10A及び図10Bに示す。尿道拡張処置のみを実施したB群におけるそれらの代表的な結果を図11A及び図11Bに示す。また、尿道の完全閉塞や瘻孔形成を認めなかった。尿道拡張処置直後に留置した8Fr径のネラトンカテーテルは、ウサギ自身による抜去をみ

ることなく、全例で処置後 3 日目まで留置されていた。全例において、ボール型電極で形成された狭窄を認めるのみであり、尿道拡張のために切開した尿道腹側切開創部において尿道狭窄の形成は認められなかった。

### (3) 尿道内径比の比較

ボール型電極による電気凝固後 1 か月の時点、つまりは尿道拡張処置を施す直前に施行した逆行性尿道造影で、電気凝固に続発して形成された尿道狭窄についての尿道内径比（平均値）は A 群で 25.8%（最小値 22.2%、最大値 30.3%）、B 群で 23.4%（最小値 19.4%、最大値 28.0%）であり、両群間で有意な差は認められなかった（ $p = 0.40$ ）（表 2）。

尿道拡張処置を施してから 2 か月が経過した時点で、A 群の尿道内径比（平均値）は 65.5%（最小値 51.7%、最大値 78.5%）、B 群の尿道内径比（平均値）は 27.3%（最小値 15.4%、最大値 57.5%）であり、A 群において有意に内径比が大きかった（ $p = 0.03$ ）（表 2）。

### (4) 尿道拡張後の再狭窄状況について

ボール型電極による電気凝固後 1 か月の時点、つまりは尿道拡張処置を施す直前に施行した尿道内視鏡検査では、図 10A 及び図 11A に示した逆行性尿道造影所見のように、全例で電気凝固に続発する尿道狭窄が認められた。狭窄部では、尿道内腔全周性に白色調変化がみられ、肉眼的に組織が癒痕化している様子が観察された。全例において 10 Fr 径の細径動物用内視

鏡は通過しなかった。

A 群にふり分けられた 5 羽全例を尿道拡張処置後 2 か月の時点で評価できた。A 群の全例において、尿道内視鏡検査で、尿道拡張処置部において尿道正常粘膜面と同程度の色調を呈し、10 Fr 径の細径動物用内視鏡が抵抗なく通過可能な尿道内腔が観察された（5 例中 5 例、100%）（表 2）。

B 群にふり分けられた 4 羽を尿道拡張処置後 2 か月の時点で評価できた。1 羽は衰弱のため人道的エンドポイントに従い、尿道拡張処置後 30 日目の時点で評価した。A 群の全例において尿道再狭窄が認められなかったのに対し、B 群では、それが 5 例中 1 例（20%）であった（表 2）。再狭窄した尿道内腔は、尿道拡張処置前と同様、尿道内腔全周性に白色調変化がみられた。

尿道拡張処置後に尿道狭窄が改善したウサギの数について、両群間で有意な差が認められた（ $p = 0.04$ ）（表 2）。

#### （5）尿道および陰茎海綿体への影響について

A 群、B 群いずれの HE 染色標本において、明らかに急性炎症を示唆する所見は認められなかった。Masson' s trichrome 染色では、尿道上皮と尿道海綿体の弾性線維が変性し、癆痕化が認められた（図 10E 及び図 11E）。さらには、尿道における電気凝固による損傷は、尿道のみならず、尿道海綿体から陰茎海綿体にまで及んでいることが両群の組織で認められた（図 10E 及び図 11E）。癆痕化した尿道海綿体および陰茎海綿体の割合（平均値）は、A

群で 46.3% (最小値 41.6%、最大値 55.4%)、B 群で 46.7% (最小値 32.1%、最大値 65.1%) と有意な差が認められなかった ( $p = 0.92$ ) (表 2)。

#### (6) 尿道上皮長の比較

HE 染色標本において、尿道内腔側を観察し、尿道上皮の長さを両群で比較した (図 10F、G 及び図 11F、G)。尿道上皮長 (平均値) は A 群で 14.0 mm (最小値 9.8 mm、最大値 23.2 mm)、B 群で 6.6 mm (最小値 2.6 mm、最大値 12.6 mm) であり、有意な差は認められなかった ( $p = 0.06$ ) ものの、A 群において長い傾向が観察された (表 2)。

## 第4章 考 察

尿道狭窄症に対する経尿道的処置の治療成績を向上させるために、尿道上皮の再生を促進する生体材料が待ち望まれてきた。口腔粘膜組織を用いた尿道形成術は標準的な術式であり、培養した口腔粘膜細胞を経尿道的に尿道狭窄部位へ投与する治療法も近年報告されている[36, 37]。しかしながら、生体組織を採取することは患者にとってさらなる負担を強いることとなるので、口腔粘膜など代用組織を用いた手術は多くの場合で忌避される。最近の生体組織材料工学の進歩により、フィブリン、ゼラチン、コラーゲン、セルロース、ハイドロゲルなど、迅速な創傷治癒が見込める多くのバイオマテリアルの評価がなされてきた[38-43]。コラーゲンは人体の主要な構成成分であり、コラーゲンシートは創傷に対する組織再生を促進させる目的で日常診療においても広く使用されている。例えば、真皮欠損用グラフトとして熱傷や手術創の骨、腱、筋肉等が露出した重度の真皮・軟部組織欠損創の修復に用いられる PELNAC<sup>®</sup> (Smith & Nephew, Tokyo, Japan) はコラーゲンを使用した人工真皮である。尿道狭窄症治療においても、コラーゲンをを用いた動物実験の成果が報告されている [33, 44]。尿道狭窄症治療モデルにおいて組織再生の細胞足場材料を用いる際に問題となることは、内尿道切開や尿道拡張などの処置後の尿道は凸凹した傷となっており、それらの傷を適切に被覆することは難しいということである。それゆえに、液体の状態で投与して

創傷の形状に浸透させ、その後、被覆材として固形化する材料を使用することが望ましいと考えられる。今回我々が用いたゼラチンは人体の体温程度では液体として存在するため、損傷を受けた人体組織に液体状で投与でき、凹凸のある部位にも浸透させることができ、目的の部位において光硬化させハイドロゲルを形成させ一定期間定着させることが可能である。我々の知る限り本研究は、光硬化性ゼラチンが尿道の再狭窄を予防することを示した最初の報告である。

尿道内における創傷治癒促進を目指す上で液体状のゼラチンをどのようにゲル化させるかが当初の課題であった。ゼラチンは、それ自体、ゲル化が遅く、濡れた組織の表面での粘着性が乏しいためである。様々な人工ポリマーを用いることで濡れた組織表面にも粘着させる方法が報告されている。しかし、それらの人工ポリマーはゲル化に長い時間を要し、柔軟性を欠き、生体安全性が低いことから、実臨床へ応用することは難しい[45-48]。今回、我々は、可視光を照射することで分子間架橋する光重合開始剤を用いて、尿流が存在する条件下においてもゼラチンの特性を保持できる光硬化性ゼラチンを活用するに至った。光硬化に用いる光源として、紫外線の過剰照射は日焼けや、フリーラジカルや酸化ストレスの形成による DNA へのダメージによる 2 次的な悪性黒色腫の発症などが懸念されるため、本研究では紫外線よりも安全性が高い可視光を使用した[49]。また、本研究では、可視光を短時



間照射するだけで十分な強度をもってゲル化させることができるため、光照射による生体障害性は低いと考えられる。ルテニウムは水溶性の光重合開始剤であり、400-450 nm の波長の可視光を照射することでゼラチン分子に存在するチロシン残基の水酸基がラジカル反応を起こし、ゼラチン分子間で架橋反応が起こる。ルテニウム光重合開始剤は、ヒト細胞の3D培養において毒性を示すことなく使用されている[50, 51]。それゆえ、ルテニウム自体の毒性とフリーラジカルの形成は限定的であり、ルテニウム光重合開始剤は医療用途に適合すると考える。

光硬化性創傷被覆材が尿道拡張処置後の再狭窄を予防することを検討するために、本研究では、ヒトの尿道狭窄症の臨床経過に近似した動物モデルを作製した。これまでに我々のグループが行った研究では、40 W の出力で5秒間の電気凝固により尿道損傷モデルを作製していたが、この条件では凝固直後から狭窄や潰瘍形成がみられるなどの急性期における組織のダメージが大きく、長期的な尿道狭窄症の経過観察が困難であった[33]。そこで本研究では、10 W の出力で25秒間の電気凝固条件とすることで、1か月後に10 Fr の内視鏡が通過しない尿道狭窄を形成し、その後も数か月にわたって観察が可能な慢性的なウサギ尿道狭窄症モデルを作製することができた。さらに、対象となった10羽全例に慢性的な尿道狭窄がみられ、再現性の高い実験動物モデルを作製することができた。

光硬化性創傷被覆材を用いることで、尿道狭窄部における尿道拡張処置後の尿道上皮組織再生のための足場を構築することができた。A群のすべてのウサギにおいて尿道内腔の開存、尿道内径比の改善がみられ、尿道上皮長においても、光硬化性創傷被覆材を使用していないB群より長い傾向が観察された。今回の実験で用いたウサギ尿道狭窄症モデルは、熱変性により作製され、尿道はもとより、尿道海綿体や陰茎海綿体まで損傷が及ぶほど高度な尿道狭窄が形成されていたと考えられる。今日の実臨床においては、尿道狭窄症に対する経尿道的処置の適応は、わずかな尿道海綿体の癒痕化を伴う軽度の尿道狭窄に限定される[15]。しかしながら、我々が用いたウサギモデルにおいて、光硬化性創傷被覆材の経尿道的投与によって尿道上皮再生が促進されたという結果は、高度な癒痕化を伴う尿道狭窄に対しても経尿道的処置の適応となる可能性があることを示唆している。さらには、我々の方法は、口腔粘膜などの代用組織を用いるよりも簡便でありかつ費用が抑えられるものである。

今回の研究の課題として、光重合開始剤であるルテニウム化合物を生体に使用する際の安全性が挙げられるが、臨床実用化前に、生体安全性を調べることが必須であり、細胞毒性は低い事を明らかにしている[28]。また、本研究では、光硬化性創傷被覆材の投与と可視光照射を経尿道的に実施できていない。今後、狭窄部の内尿道切開から光硬化性創傷被覆材の投与まで全て

の工程を経尿道的に実施できるデバイスを用い、ヒトの臨床に即した状況下  
で実験を展開することが、経尿道的処置の有用性向上に資するものと考える。  
我々の研究結果は、尿道狭窄症に対する経尿道的な尿道内腔拡張後の再狭窄  
予防として新しい低侵襲治療の可能性を示唆するものであると考える。

## 第5章 結 論

ヒトの臨床経過に近いウサギ尿道狭窄症モデルを作製し、それ対して尿道拡張処置を施したのち、新規に開発したゼラチンを基質とする光硬化性創傷被覆材を処置部に投与し、その後2か月間という長期にわたって観察することに成功した。光硬化性創傷被覆材を使用することで、尿道拡張処置後の尿道内腔が保たれ、再狭窄が予防されることが観察された。組織学的検討を行ったところ、ウサギ尿道狭窄症モデルにおいて、ボール型電極による電気凝固の影響が尿道にとどまらず、尿道海綿体さらには陰茎海綿体にまで及んでいたことが観察された。陰茎海綿体まで影響が及ぶような重度な尿道狭窄についても、経尿道的処置後に光硬化性創傷被覆材を用いることで再狭窄が予防される可能性が示唆された。

本研究は、ヒトの尿道狭窄症に対する内尿道切開術や尿道拡張術といった経尿道的処置後の再狭窄予防に資するものと考えられる。なお、本研究の内容を2022年にInternational Journal of Urology誌で報告した[52]（参考論文3）。

## 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、防衛医科大学校泌尿器科学講座 教授 伊藤敬一先生、同校医用工学講座 教授 石原美弥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校外傷再建部 部長 堀口明男先生、同校医用工学講座 准教授 櫛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校泌尿器科学講座、同校医用工学講座の皆さまに謝意を表します。

## 引用文献

- [1] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18(7): 1028-40.
- [2] Mundy AR. Urethral strictures. *BJU Int.* 2011; 107(1): 6-26.
- [3] Wong VW, Paterno J, Sorkin M, Glotzbach JP, Levi K, Januszyk M, Rustad KC, Longaker MT, Gurtner GC. Mechanical force prolongs acute inflammation via T-cell dependent pathways during scar formation. *FASEBJ.* 2011; 25(12): 4498-510.
- [4] McMillan A, Pakianathan M, Mao JH, Macintyre CC. Urethral stricture and urethritis in men in Scotland. *Genitourin Med.* 1994; 70(6): 403-405.
- [5] Santucci RA, Joyce GF, Wise M. Male urethral stricture disease. *J Urol.* 2007; 177(5): 1667-74.
- [6] Zimmerman WB, Santucci RA. A simplified and unified approach to anterior urethroplasty. *Nat Rev Urol.* 2010; 7(7): 386-91.
- [7] Wessells H, Angermeier KW, Elliott S, Gonzalez CM, Kodama R, Peterson AC, Reston J, Rourke K, Stoffel JT, Vanni AJ, Voelzke BB, Zhao L, Santucci RA. Male Urethral Stricture: American Urological Association Guideline. *J Urol.* 2017; 197(1): 182-90.

- [8] 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.
- [9] van Leeuwen MA, Brandenburg JJ, Kok ET, Vijverberg PL, Bosch JL. Management of male anterior urethral stricture disease: nationwide survey among urologists in the Netherlands. *Eur Urol.* 2011; 60(1): 159-66.
- [10] 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.
- [11] Pansadoro V, Emiliozzi P. Internal urethrotomy in the management of anterior urethral strictures: long-term followup. *J Urol.* 1996; 156(1): 73-5.
- [12] 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.

- [13] Lumen N, Campos-Juanatey F, Greenwell T, Martins FE, Osman NI, Riehardt S, Waterloos M, Barratt R, Chan G, Esperto F, Ploumidis A, Verla W, Dimitropoulos K. European Association of Urology Guidelines on urethral stricture disease (Part 1): management of male urethral stricture disease. *Eur Urol.* 2021; 80(1): 190-200.
- [14] Riehardt S, Waterloos M, Lumen N, Campos-Juanatey F, Dimitropoulos K, Martins FE, Osman NI, Barratt R, Chan G, Esperto F, Ploumidis A, Verla W, Greenwell T. European Association of Urology Guidelines on urethral stricture disease Part 3: management of stricture in female and transgender patients. *Eur Urol Focus.* 2021 Aug 12; S2405-4569(21)00193-0.
- [15] Buckley JC, Heyns C, Gilling P, Carney J. SIU/ICUD consultation on urethral strictures: dilation, internal urethrotomy, and stenting of male anterior urethral strictures. *Urology.* 2014; 83: S18-22.
- [16] Latini JM, McAninch JW, Brandes SB, Chung JY, Rosenstein D. SIU/ICUD consultation on urethral strictures: epidemiology, etiology, anatomy, and nomenclature of urethral stenoses, strictures, and pelvic fracture urethral disruption injuries. *Urology.* 2014; 83: S1-7.



- [17] Lumen N, Kuehhas FE, Djakovic N, Kitrey ND, Serafetinidis E, Sharma DM, Summerton DJ. Review of the current management of lower urinary tract injuries by the EAU trauma guidelines panel. *Eur Urol.* 2015; 67(5): 925-9.
- [18] Martínez-Piñeiro L, Djakovic N, Plas E, Mor Y, Santucci RA, Serafetinidis E, Turkeri LN, Hohenfellner M; European Association of Urology. EAU guidelines on urethral trauma. *Eur Urol.* 2010; 57(5): 791-803.
- [19] Morey AF, Brandes S, Dugi DD 3rd, Armstrong JH, Breyer BN, Broghammer JA, Erickson BA, Holzbeierlein J, Hudak SJ, Pruitt JH, Reston JT, Santucci RA, Smith TG 3rd, Wessells H; American Urological Association, Urotrauma: AUA guideline. *J Urol.* 2014; 192(2): 327-35.
- [20] Moynihan MJ, Voelzke B, Myers J, Breyer BN, Erickson B, Elliott SP, Alsikafi N, Buckley J, Zhao L, Smith T, Vanni AJ. Endoscopic treatment prior to urethroplasty: trends in management of urethral stricture disease. *BMC Urol.* 2020; 20(1): 68.

- [21] Ojima K, Horiguchi A, Shinchi M, Masunaga A, Kimura F, Takahashi E, Asano T, Ito K, Azuma R. Is primary realignment appropriate for the initial management of straddle injuries to the bulbar urethra? *Urology*. 2020; 136: 251-6.
- [22] Ojima K, Horiguchi A, Shinchi M, Hirano Y, Hamamoto K, Kimura F, Takahashi E, Asano T, Ito K, Azuma R. Is pre-referral management of anterior urethral strictures prior to urethroplasty appropriate? *Int J Urol*. 2021; 28(4): 404-9.
- [23] Horiguchi A, Shinchi M, Masunaga A, Ito K, Asano T, Azuma R. Do transurethral treatments increase the complexity of urethral stricture? *J Urol*. 2018; 199(2): 508-14.
- [24] Hudak SJ, Atkinson TH, Morey AF. Repeat transurethral manipulation of bulbar urethral strictures is associated with increased stricture complexity and prolonged disease duration. *J Urol*. 2012; 187(5): 1691-5.
- [25] Breyer BN, McAninch JW, Whitson JM, Eisenberg ML, Mehdizadeh JF, Myers JB, Voelzke BB. Multivariate analysis of risk factors for long-term urethroplasty outcome. *J Urol*. 2010; 183(2): 613-7.

- [26] Buckley JC, Patel N, Wang S, Liss M. National trends in the management of urethral stricture disease: a 14-year survey of the nationwide inpatient sample. *Urol Pract.* 2016; 3: 315-20.
- [27] Obagi Z, Damiani G, Grada A, Falanga V. Principles of wound healing: a review. *Surg Technol Int.* 2019; 35: 50-7.
- [28] Kushibiki T, Mayumi Y, Nakayama E, Azuma R, Ojima K, Horiguchi A, Ishihara M. Photocrosslinked gelatin hydrogel improves wound healing and skin flap survival by the sustained release of basic fibroblast growth factor. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 23094.
- [29] Kempainen E, Talja M, Riihelä M, Pohjonen T, Törmälä P, Alfthan O. A bioresorbable urethral stent. An experimental study. *Urol Res.* 1993; 21(3): 235-8.
- [30] Meria P, Anidjar M, Brouland JP, Teillac P, Le Duc A, Berthon P, Cussenot O. An experimental model of bulbar urethral stricture in rabbits using endoscopic radiofrequency coagulation. *Urology.* 1999; 53(5): 1054-7.

- [31] Faydaci G, Tarhan F, Tuncer M, Eryildirim B, Celik O, Keser SH, Ozgül A. Comparison of two experimental models for urethral stricture in the anterior urethra of the male rabbit. *Urology*. 2012; 80(1): 225. e7-11.
- [32] 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.
- [33] Shinchu M, Kushibiki T, Mayumi Y, Ito K, Asano T, Ishihara M, Horiguchi A. Insulin-like growth factor 1 sustained-release collagen on urethral catheter prevents stricture after urethral injury in a rabbit model. *Int J Urol*. 2019; 26(5): 572-7.
- [34] 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.
- [35] 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.

- [36] Chapple C, Andrich D, Atala A, Barbagli G, Cavalcanti A, Kulkarni S, Mangera A, Nakajima Y. SIU/ICUD Consultation on urethral strictures: the management of anterior urethral stricture disease using substitution urethroplasty. *Urology*. 2014; 83(3 Suppl): S31-47.
- [37] Vaddi SP, Reddy VB, Abraham SJ. Buccal epithelium expanded and encapsulated in scaffold-hybrid approach to urethral stricture (BEES-HAUS) procedure: a novel cell therapy-based pilot study. *Int J Urol*. 2019; 26(2): 253-7.
- [38] Gaspar-Pintilieșcu A, Stanciuc AM, Craciunescu O. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: a review. *Int J Biol Macromol*. 2019; 138: 854-65.
- [39] Kanikireddy V, Varaprasad K, Jayaramudu T, Karthikeyan C, Sadiku R. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: a review. *Int J Biol Macromol*. 2020; 164: 963-75.
- [40] Miller R, Wormald JCR, Wade RG, Collins DP. Systematic review of fibrin glue in burn wound reconstruction. *Br J Surg*. 2019; 106(3): 165-73.

- [41] Naomi R, Ratanavaraporn J, Fauzi MB. Comprehensive review of hybrid collagen and silk fibroin for cutaneous wound healing. *Materials (Basel)*. 2020; 13(14): 3097.
- [42] Negut I, Dorcioman G, Grumezescu V. Scaffolds for wound healing applications. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(9): 2010.
- [43] Tavakoli S, Klar AS. Advanced hydrogels as wound dressing. *Biomolecules*. 2020; 10(8): 1169.
- [44] Kanatani I, Kanematsu A, Inatsugu Y, Imamura M, Negoro H, Ito N, Yamamoto S, Tabata Y, Ikada Y, Ogawa O. 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.
- [45] Annabi N, Zhang YN, Assmann A, Sani ES, Cheng G, Lassaletta AD, Vegh A, Deghani B, Ruiz-Esparza GU, Wang X, Gangadharan S, Weiss AS, Khademhosseini A. Engineering a highly elastic human protein-based sealant for surgical applications. *Sci Transl Med*. 2017; 9(410): eaai7466.

- [46] Brennan MJ, Kilbride BF, Wilker JJ, Liu JC. A bioinspired elastin-based protein for a cytocompatible underwater adhesive. *Biomaterials*. 2017; 124: 116-25.
- [47] Chang EI, Galvez MG, Glotzbach JP, Hamou CD, El-ftesi S, Rappleye CT, Sommer KM, Rajadas J, Abilez OJ, Fuller GG, Longaker MT, Gurtner GC. Vascular anastomosis using controlled phase transitions in poloxamer gels. *Nat Med*. 2011; 17(9): 1147-52.
- [48] Li J, Celiz AD, Yang J, Yang Q, Wamala I, Whyte W, Seo BR, Vasilyev NV, Vlassak JJ, Suo Z, Mooney DJ. Tough adhesives for diverse wet surfaces. *Science*. 2017; 357(6349): 378-81.
- [49] Yang DH, Chun HJ. Visible light-curable hydrogel systems for tissue engineering and drug delivery. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1249: 85-93.
- [50] Lim KS, Klotz BJ, Lindberg GCJ, Melchels FPW, Hooper GJ, Malda J, Gawlitta D, Woodfield TBF. Visible light cross-linking of gelatin hydrogels offers an enhanced cell microenvironment with improved light penetration depth. *Macromol Biosci*. 2019; 19(6): e1900098.

- [51] Sakai S, Ohi H, Hotta T, Kamei H, Taya M. Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking. *Biopolymers*. 2018; 109(2): e23080.
- [52] Ojima K, Kushibiki T, Mayumi Y, Miyai K, Shinchi M, Hirano Y, Azuma R, Ito K, Ishihara M, Horiguchi A. Ability of photocurable gelatin to prevent stricture recurrence after urethral dilation in rabbits. *Int J Urol*. 2022; 29(2): 170–5.



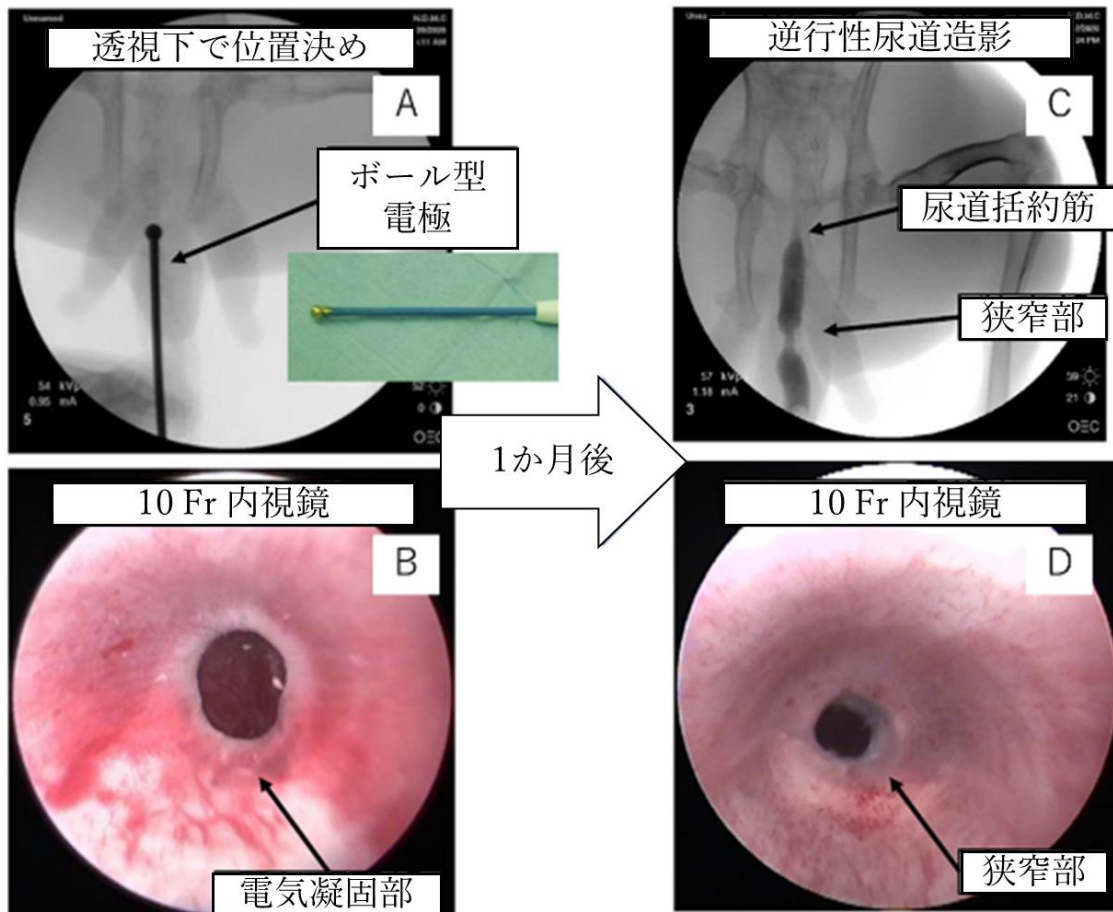


図 1：ウサギ尿道狭窄症モデルの作製過程

Aは、ウサギに仰臥位をとらせ十分に開脚させたのち、ボール型電極を用いた電気凝固部位が坐骨末端にくるように透視下で調整している様子を示す。Bは、ボール型電極で電気凝固を加えた直後に尿道内腔を観察した様子を示している。電気凝固部では白色調変化を伴う尿道内腔の狭小化が認められた。電気凝固による尿道損傷を加えてから1か月後の逆行性尿道造影を示したものがC、その尿道内腔の様子を示したものがDである。逆行性尿道造影において尿道に損傷を与えた部位に尿道内腔の狭小化が認められ、内視鏡でも、白色調変化を伴った、10 Fr 径の細径動物用内視鏡が通過不可能な尿道内腔狭小化を来している様子が観察された。

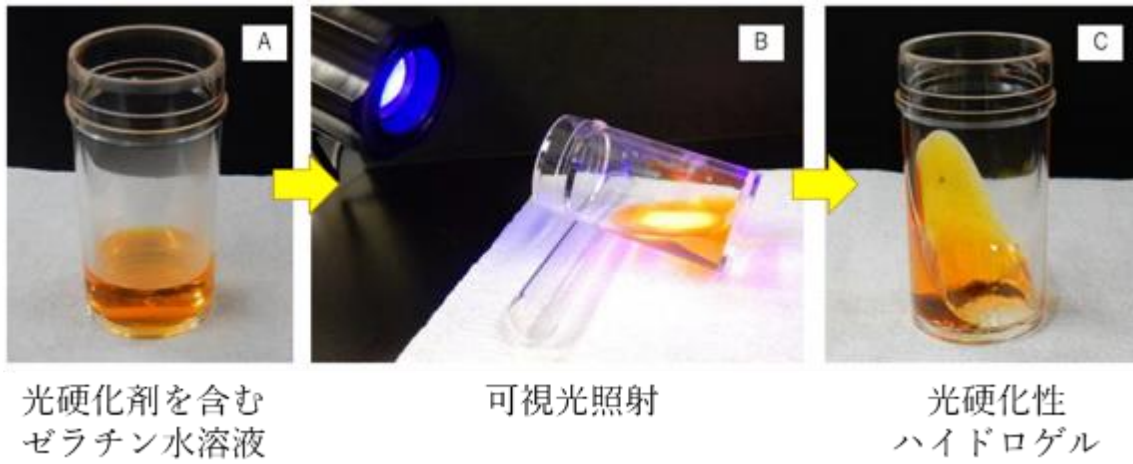


図 2：光硬化性ハイドロゲルの作製

ゼラチンを基質とした光硬化性創傷被覆材を作製し (A)、可視光を照射することで (B)、ハイドロゲルを形成する様子 (C) を示す。(文献[28]より引用)

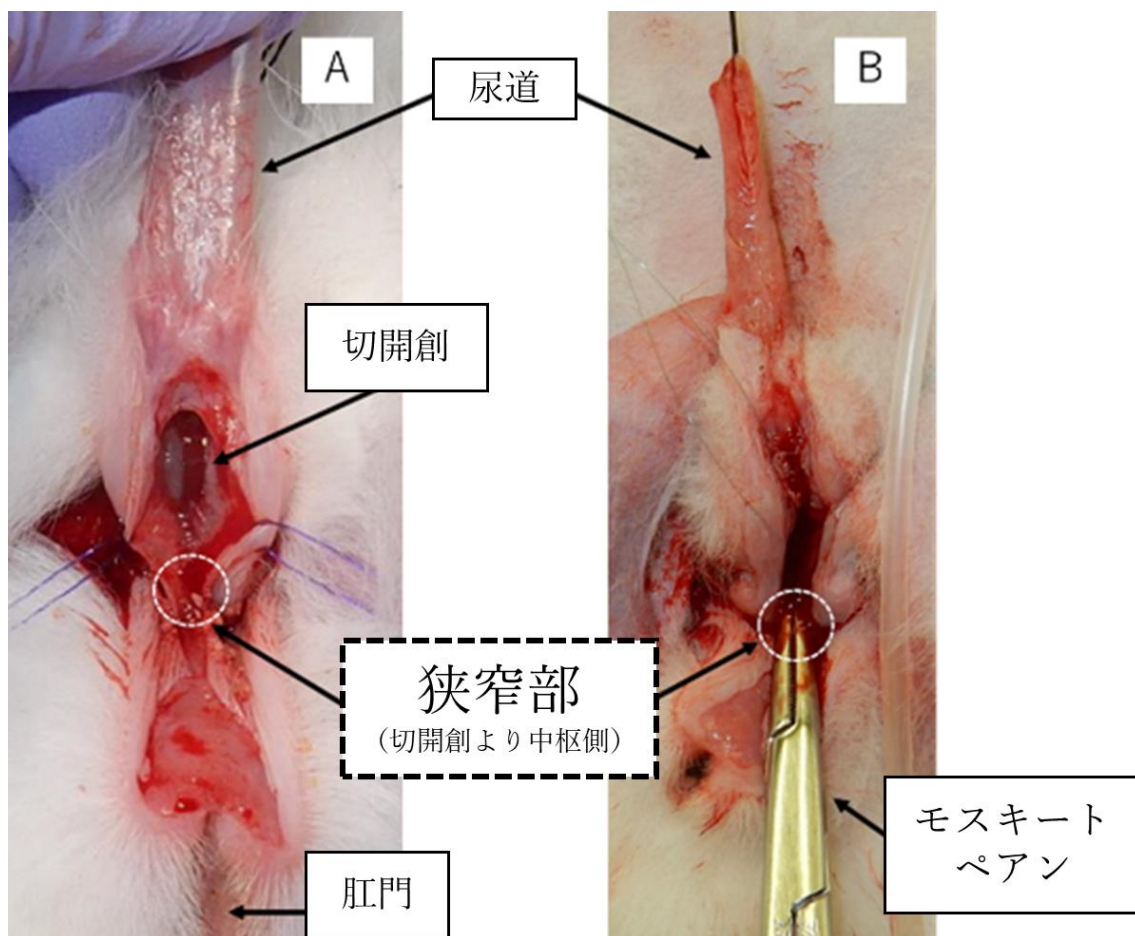


図 3：ウサギ尿道狭窄症モデルに対する尿道の切開と拡張の実際

A は、狭窄部より遠位で、狭窄部に至らないよう注意しながら尿道腹側を切開し、尿道内腔に到達した様子を示したものである。外尿道口より先端が鈍な鑷子を挿入しスペースを作り、切開縁は 5-0 PDS 吸収糸で尿道粘膜と包皮を一塊に確保し、視野を展開した。B は、モスキートペアンを用いて、切開創より奥（中枢側）にある狭窄部を拡張している様子を示している。

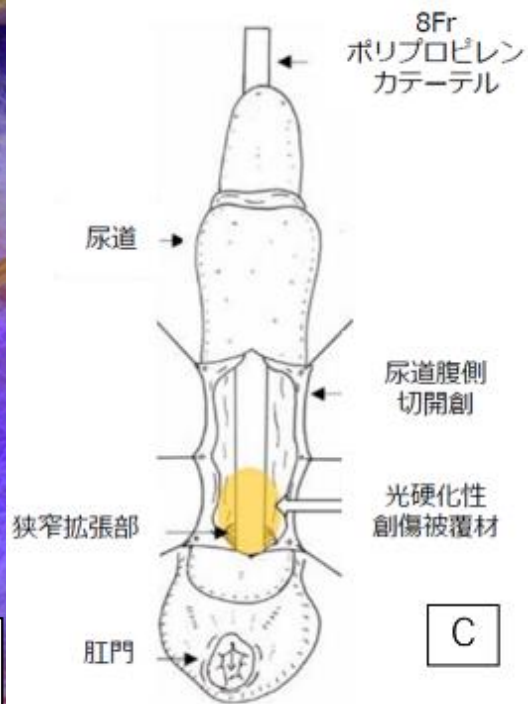
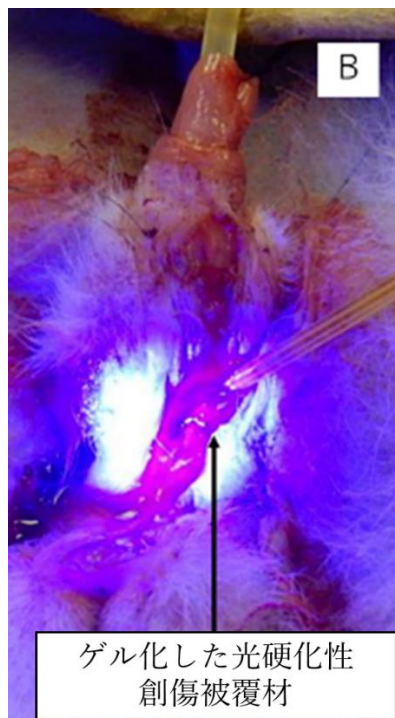
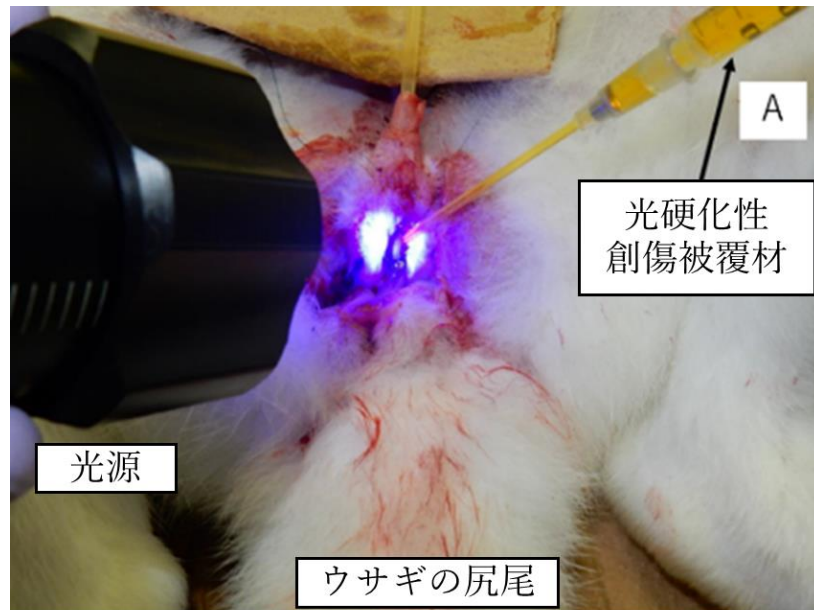


図 4：尿道拡張処置を施した後の光硬化性創傷被覆材投与の実際と模式図

A は、尿道拡張後の尿道に 8 Fr 径ネラトンカテーテルを留置したうえで、液体状の光硬化性創傷被覆材溶液を狭窄部へ注入し、可視光を照射してゲル化を行っている様子を示している。B は光硬化性創傷被覆材を投与し終えた状態であり、その模式図を C において示す。

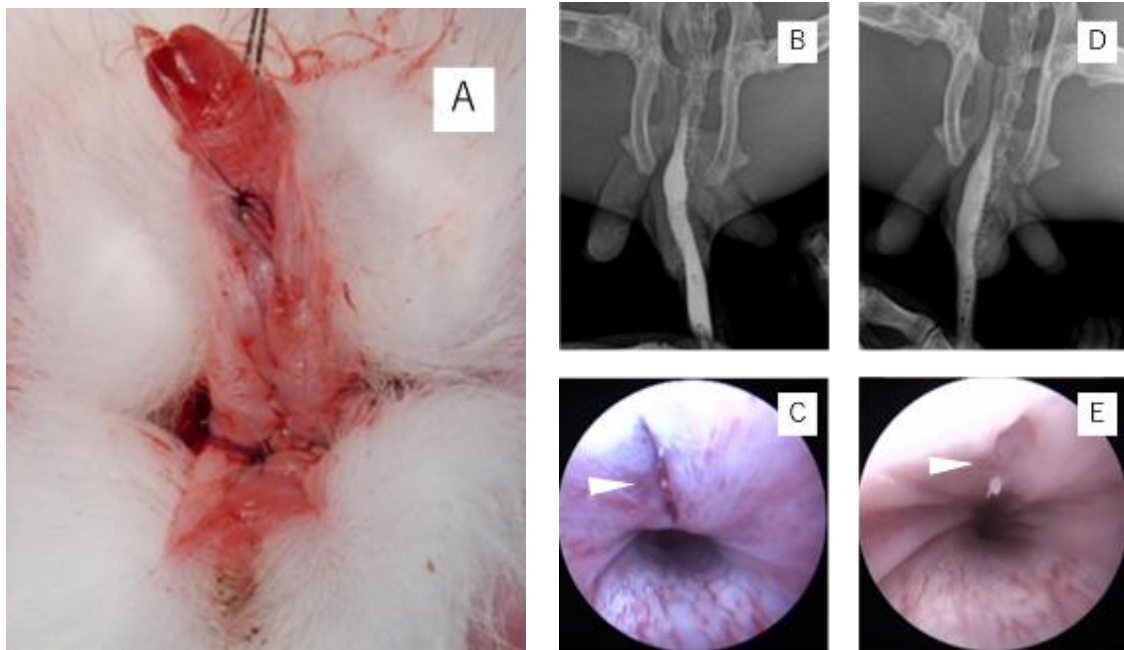


図 5：尿道腹側切開創部の閉創後の尿道内腔評価（予備実験）

ウサギの尿道腹側を切開してそのまま閉創した際に、同部位に尿道狭窄が形成されるかを検討した予備実験の代表的な結果を示す。A は尿道腹側を切開し、5-0 PDS 吸収糸で縫合し、閉創した状態を示す。閉創直後の逆行性尿道造影と尿道内視鏡の結果を B 及び C にそれぞれ示す。C において、矢頭は切開・縫合部を示す。ネラトンカテーテル等の留置は、カテーテル留置に伴う狭窄の可能性を排除するため実施していない。処置後 1 か月の逆行性尿道造影と尿道内視鏡の結果を D 及び E にそれぞれ示す。図 5E において、矢頭は切開・縫合部を示す。切開・縫合部において尿道狭窄の形成は認められない。

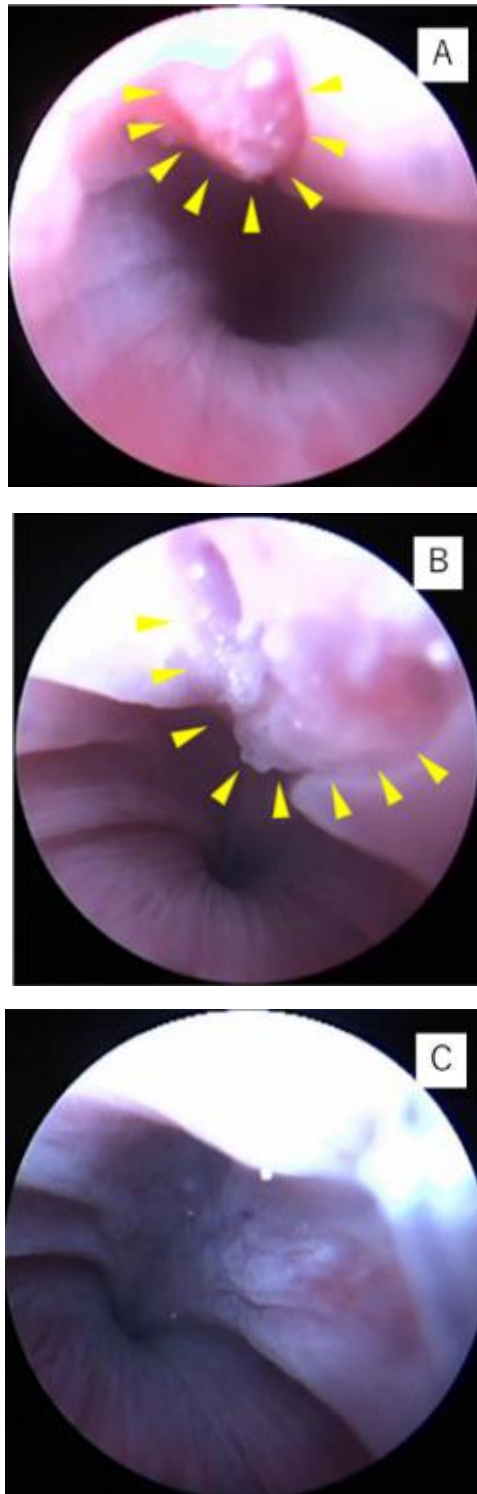


図 6：尿道内腔における光硬化性創傷被覆材残存の内視鏡評価

Aは投与後3日目、Bは投与後4日目、Cは投与後7日目の内視鏡結果である。

黄色い矢頭は光硬化性創傷被覆材が残存している範囲を示す。少なくとも4日間は尿道内腔に残存している様子が観察された。



図 7：逆行性尿道造影画像上における尿道内腔比の算出法

正常部位の内腔 (B [No. 11] で示される位置) を狭窄部 (A [No. 10] で示される位置) から 2 cm 遠位の地点と定め、Image J で径を数値化し、尿道内径比 (%) = 狭窄部の内径 (mm) / 正常部位の内径 (mm) × 100 で算出した。No. 10 および No. 11 は実際に Image J で数値化した位置を示している。

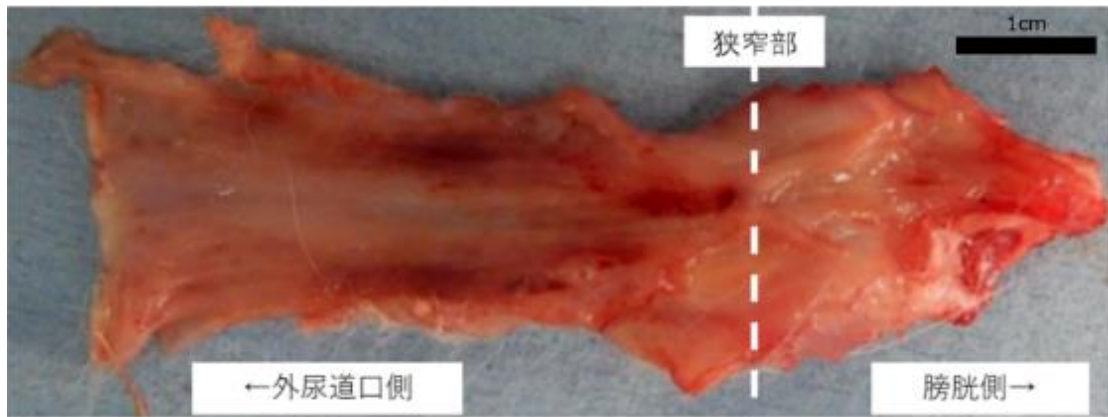


図 8：尿道拡張処置 2 か月後に摘出した尿道の一例

尿道の走行に沿って腹側で切開した様子である。点線部が肉眼的に最も尿道が狭窄した部位であり、ホルマリン固定後、点線部で組織を切り出し、病理切片標本を作製した。



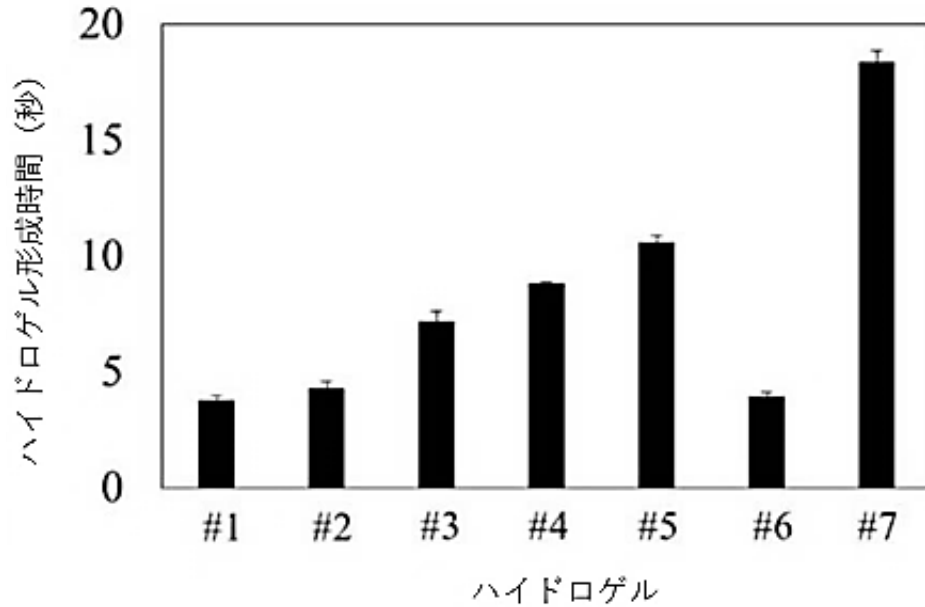
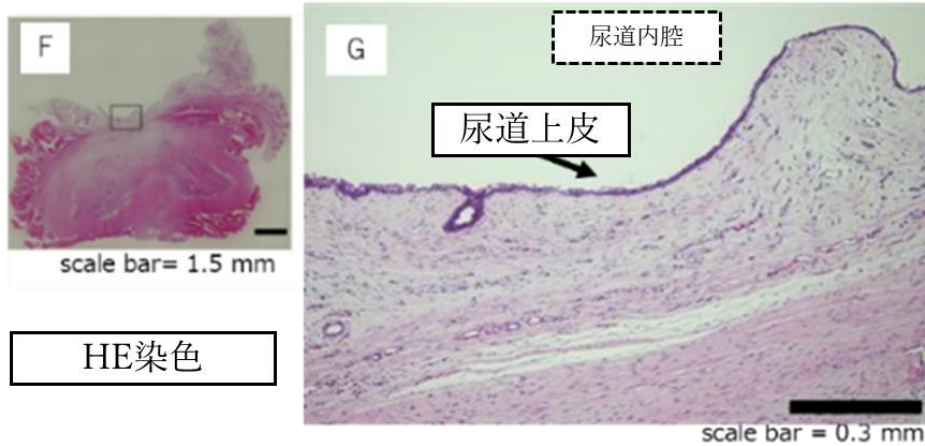
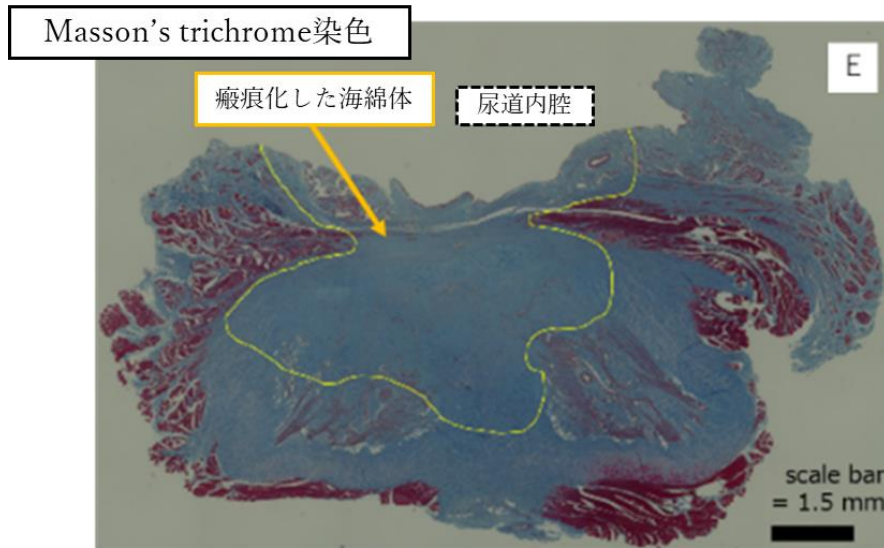
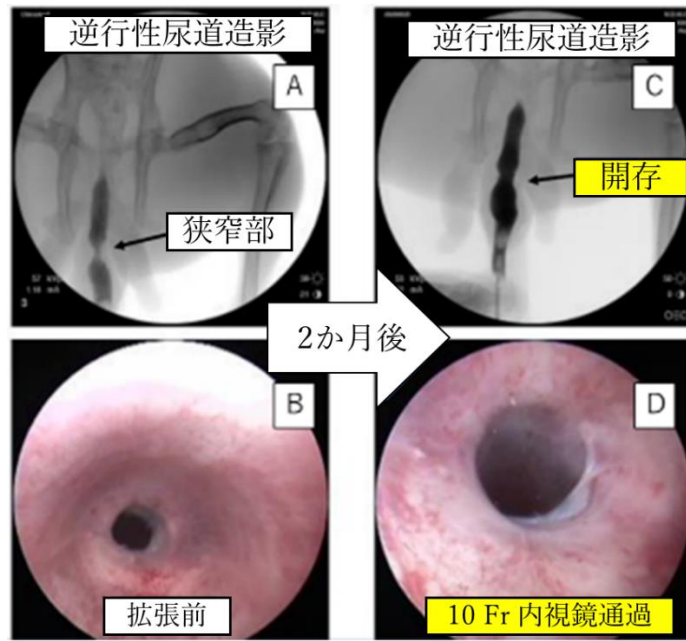


図9：ハイドロゲルを形成するまでの時間

ゼラチン水溶液や光重合開始剤の濃度、可視光の照射強度がハイドロゲルの形成にどのように影響するのか、種々の条件設定を行い、光照射によるゲル化プロセスを dynamic time-sweep rheological analyzer with photo-rheometer を用いて観察した。#1は  $3.79 \pm 0.18$  秒、#2は  $4.25 \pm 0.31$  秒、#6は  $3.94 \pm 0.19$  秒であり、他の4つのハイドロゲルゲル（#3:  $7.15 \pm 0.46$  秒、#4:  $8.84 \pm 0.04$  秒、#5:  $10.58 \pm 0.32$  秒、#7:  $18.35 \pm 0.55$  秒）よりも短時間でハイドロゲルが形成されていることがうかがえる。（文献[28]より引用）



HE染色

図 10：光硬化性創傷被覆材群（A 群）の尿道造影、内視鏡、組織評価の代表例

(図 10 の説明)

尿道拡張後に光硬化性創傷被覆材を投与した群における代表的な結果を示す。尿道拡張を施す直前の逆行性尿道造影および内視鏡検査結果を図 10A と図 10B にそれぞれ示す。尿道拡張し光硬化性創傷被覆材を投与後、2 か月が経過した時点での逆行性尿道造影および内視鏡検査結果を図 10C と図 10D にそれぞれ示す。尿道内腔が再狭窄することなく開存している様子が観察された。図 10E は尿道摘出標本に Masson' s trichrome 染色を施したものである。図 10E において、黄色線より尿道内腔側が瘢痕化した尿道および海綿体である。図 10F は尿道摘出標本に HE 染色を施したものであり、図 10G は図 10F の一部を強拡大し、尿道上皮の様子を示したものである。

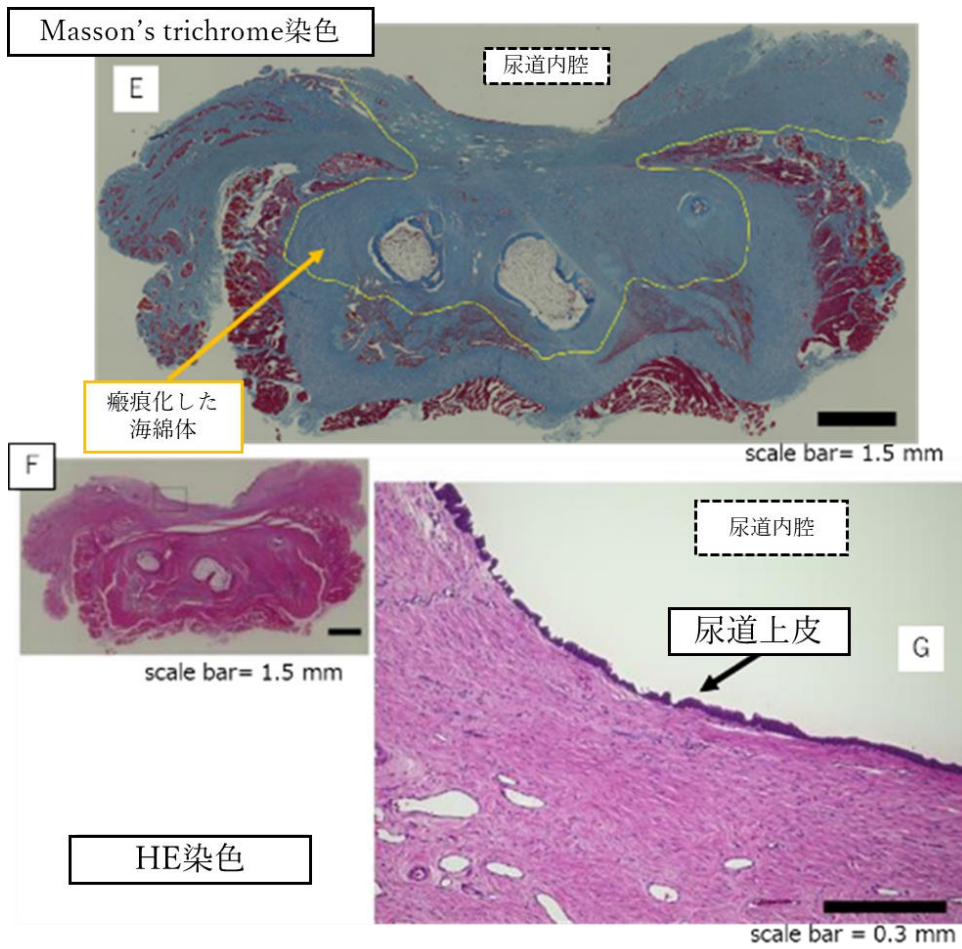
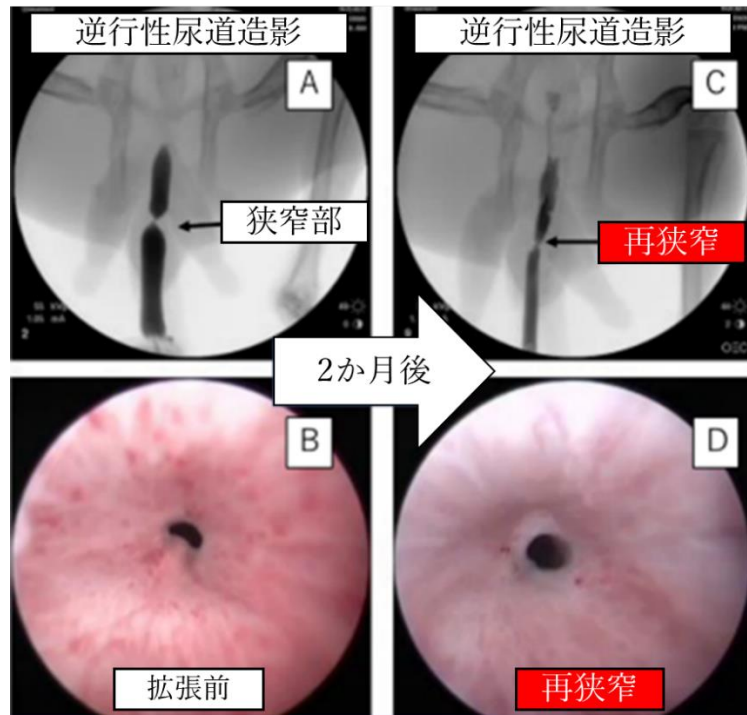


図 11 : コントロール群 (B 群) の尿道造影、内視鏡、組織評価の代表例

(図 11 の説明)

尿道拡張のみを施した群における代表的な結果を示す。尿道拡張を施す直前の逆行性尿道造影および内視鏡検査結果を図 11A と図 11B にそれぞれ示す。尿道拡張後、2 か月が経過した時点での逆行性尿道造影および内視鏡検査結果を図 11C と図 11D にそれぞれ示す。尿道内腔が再狭窄している様子が観察された。再狭窄は5例中4例にみられている。図 11E は尿道摘出標本に Masson' s trichrome 染色を施したものである。図 11E において、黄色線より尿道内腔側が癒痕化した尿道および海綿体である。図 11F は尿道摘出標本に HE 染色を施したものであり、図 11G は図 11F の一部を強拡大し、尿道上皮の様子を示したものである。

表 1：各ハイドロゲルの組成と照射光強度の一覧（文献[28]より引用）

ハイドロゲル	ゼラチン濃度 (wt%)	光重合開始剤濃度 (mM)	LED光強度 (mW/cm <sup>2</sup> )
#1	10	1	30
#2	10	0.5	30
#3	10	1	10
#4	10	0.5	10
#5	10	0.25	30
#6	5	1	30
#7	5	0.5	30

\*LED: Light Emitting Diode, 発光ダイオード

表 2：尿道狭窄の状態と尿道拡張処置後の状態について光硬化性創傷被覆材群（尿道拡張後に光硬化性創傷被覆材を投与したウサギ 5 羽、A 群）とコントロール群（尿道拡張のみを施したウサギ 5 羽、B 群）の比較

	光硬化性創傷被覆材群	コントロール群	p 値
ウサギ数 (羽)	5	5	
体重 (実験開始時) (kg) *	2.9 (2.6 - 3.3)	2.9 (2.5 - 3.6)	1.00
尿道内径比 (%) *			
拡張前	25.8 (22.2 - 30.3)	23.4 (19.4 - 28.0)	0.40
拡張後	65.5 (51.7 - 78.5)	27.3 (15.4 - 57.5)	0.03
無再狭窄率 (%)	100 (5/5)	20 (1/5)	0.04
尿道上皮長 (mm) *	14.0 (9.8 - 23.2)	6.6 (2.6 - 12.6)	0.06
損傷を受けた海綿体の割合 (%) *	46.3 (41.6 - 55.4)	46.7 (32.1 - 65.1)	0.92

\* 数値は、平均値 (最小値 - 最大値) を示している。

体重、尿道内径比、再生上皮長、損傷を受けた海綿体の割合についての比較には Wilcoxon 順位和検定を用いた。狭窄改善例の比較については Fisher 直接確率検定を用いた。