

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20256

研究課題名(和文) 培養口腔粘膜上皮細胞シートによる涙道再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of lacrimal canalicular regenerative therapy using cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet

研究代表者

藤本 雅大 (Fujimoto, Masahiro)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：90737983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：年間約10万人に処方されているTS-1(経口抗癌剤)による不可逆的な涙小管閉塞が知られている。現在治療法として、ガラス管を眼の内側に挿入して眼表面から鼻腔内へと涙が流れるようにする手術が行われているが、合併症が多く、成功率は高くない。我々は今回の研究で口腔粘膜上皮細胞シートを利用して、涙道を再建する手術を確立するために、ウサギを用いた研究を行った。今回の研究成果として、ウサギより口腔粘膜上皮細胞シート作成可能であること、術式としてシート縫合は可能であること、既存のステント素材は吻合孔の保持には不適であることが言えた。再建術の確立のために、ステント素材と形状を今後新たに考案する必要がある。

研究成果の概要(英文)：It is reported that S-1, which is administered to about a hundred thousand people a year in Japan, is capable of inducing refractory canalicular obstruction. At present, a specific surgery, which secure tear flow using glass tube, is performed to cure the refractory canalicular obstruction, but it have many complication and low success rate. We performed the study about development of lacrimal canalicular regenerative therapy using cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet. The results of this study were as follows: firstly, we produced cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet by aseptically harvesting and cultivating oral mucosal epithelial cell of rabbit. Next, the cell sheet could sutured to the subcutaneous tissue. Finally, an existing stent wasn't appropriate for the preservation of anastomosis site. We conclude that invention of a new stent is needed in order to establish the regenerative therapy.

研究分野：眼形成

キーワード：口腔粘膜上皮細胞シート ステント 涙道再建

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤、特に TS-1 内服症例における涙道障害が近年認知され報告が相次いでいる。TS-1 は本邦で開発された経口抗癌剤であり、胃癌、膵癌、胆道癌、大腸癌などの消化器癌を中心に頭頸部癌、非小細胞肺癌、再発乳癌にも適応があり年間約 10 万人に処方されている。術後補助化学療法の有用性も報告されており、今後も使用される頻度の高い抗癌剤の一つであると考えられる。TS-1 による涙道障害は、TS-1 投与症例の約 10% に認められると報告されている [Sasaki T et al. JJO2012;56:214-218]。その機序についてはまだ結論はでていないが、抗癌剤を含んだ涙液が涙道を通ることにより涙道粘膜の炎症、涙道扁平上皮の肥厚と間質の線維化を来し、狭窄そして閉塞へ至ると考えられている [Brink HMA et al. Doc Ophthalmol 1995;90:1-6]

涙小管閉塞の原因としては抗癌剤の占める割合が多いが、その他にもウイルス性結膜炎や外傷例、もしくは原因不明のまま涙小管閉塞が引き起こされることもある。また先天性涙小管形成不全ではその他の顔面奇形に伴うものと、単独で存在するものがある。涙小管閉塞もしくは、先天性涙小管形成不全によって引き起こされる症状として、流涙、眼脂が挙げられる。一日中流涙、眼脂を伴うことになるが、流涙により角膜表面の涙液層が不安定となって霧視を自覚したり、眼瞼周囲が涙で濡れた状態が持続し、擦過による眼瞼炎を繰り返すこととなり、手術を希望するに至る事が多い。涙小管が広範囲に渡って閉塞している場合や、先天性涙小管形成不全に対して、涙管チューブ挿入術などの一般的な涙道手術では涙道再建は困難であり、治療法として結膜涙嚢鼻腔吻合術が標準となっている。

結膜涙嚢鼻腔吻合術とは、眼表面に貯留した涙を結膜側から鼻内へと排出するために、結

膜から鼻腔内を目指して切開を加え、一方鼻内からは上顎骨をドリルで削開して、pyrex-glass 製の Jones tube を結膜側から鼻内へと挿入する手術である。Jones tube は半永久的に留置されるのだが、Jones tube 自体は FDA には認可されているものの厚生労働省では認可されておらず、日本では個々の病院における倫理委員会での認可のもと使用されているのが現状である。今までにも、眼表面から鼻腔内までの涙液の導出を確保するものとして、動脈、静脈、結膜弁、人工血管、人工皮膚、シリコンチューブなどと種々用いられてきたが、いずれも結膜鼻腔間の開存を得るに満足できるものではなく、現時点では Jones tube を用いる方法が最も涙液の導出機構の再建に適しているとされている。しかし、その Jones tube を使用した結膜涙嚢鼻腔吻合術においても、手術の合併症として tube の埋没、脱出、閉塞、破砕が報告されており、初回成功率は 50% ~ 80% とばらつきがあり、再手術が必要とされることも多く、満足度も決して高くはない。

Jones tube に代わる術式として口腔粘膜を利用した手術が数件論文報告されている [Can I et al. Ophthalmic Surg Lasers. 1999;30:98-104. Leone CR Jr. Arch Ophthalmol. 1995;113:113-5.]. 口腔粘膜を一定面積採取し、そのまま tube に巻き付け、眼瞼結膜から鼻内へと切開・骨削開後に挿入し、術後一定期間後に tube を抜去し、吻合孔の開存を計るという手術である。口腔粘膜を採取する際、上皮下組織も含めて採取しているが、どのレベルの層まで含めているかは組織学的には検討せず、肉眼的に確認した後、そのまま移植を行っている。術後結果は一定しておらず、術式として標準化していない。また、吻合孔の開存を最終的に粘膜で行うことを考えるのであれば、Jones tube を利用して眼瞼結膜から鼻内までをつなぐ必要はなく、閉塞している涙小管の代わりとして、

結膜から涙嚢までをつなぐことで必要十分である。

今回の我々の研究では、採取した口腔粘膜をそのまま移植するのではなく、培養口腔粘膜上皮シートを作成・移植することにより、眼瞼結膜から涙嚢までの吻合孔を上皮化させ涙道の再建を試みるというものである。口腔粘膜を直接移植した場合、術後6ヵ月を経ても吻合孔への生着を認めないことがあると報告されているが、培養口腔粘膜上皮シートでは温度応答性培養皿を使用することにより、生体組織に容易に接着でき、縫合の必要なしでの移植が可能とされている。ガラス製の Jones tube を半永久的に留置する結膜涙嚢鼻腔吻合術に代替しうる手術法の確立は、患者に生じる利益は非常に大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性涙小管閉塞に対して、自家培養口腔粘膜上皮シートを移植することにより涙道を再建する事である。涙道は眼表面を潤した涙液を鼻内へと排出する排水管の役割をはたし、涙道が閉塞すると涙液が眼瞼から常にあふれでることとなる。涙道病変に対する手術は種々あるが、広範囲の涙小管閉塞や先天性涙小管形成不全は非常に難治な病態であり、より有効性の高い手術の構築が必要と考える。

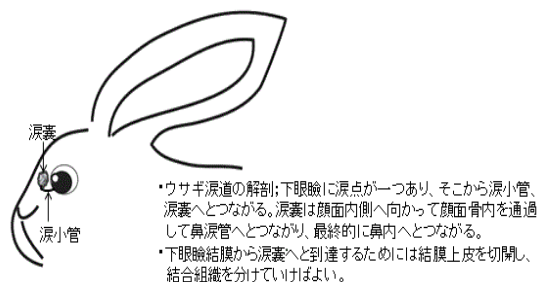
3. 研究の方法

研究 1. 正常ウサギを用いた口腔粘膜上皮細胞シートの作成

ウサギは涙道粘膜がヒトと類似している最小の動物であり、涙道の動物モデルとして最適とされている。まず正常ウサギを使用し、過去の報告を参考にして、口腔粘膜上皮細胞シートを作成する。

研究 2. 眼瞼結膜から涙嚢への吻合孔作成と上皮シートの挿入

全身麻酔下で、まず涙点から通水を行い、涙道に閉塞がない事を確認する。涙点を焼灼、縫合することにより閉鎖させ、眼瞼結膜から涙嚢に向けて切開を入れ吻合孔を作成する。眼瞼結膜側から涙嚢へのアプローチに関しては、間に骨は存在せず結合組織のみであり、ヒトと同様に容易である。作成した吻合孔に上皮シートを挿入する。上皮シートを挿入する際、同時に吻合孔を保つためにステントも挿入する。

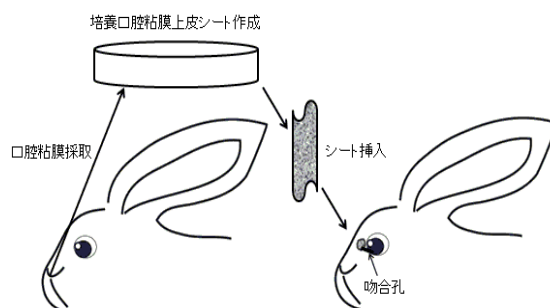


研究 3. 術後一定期間後の吻合孔開存の確認と組織評価

術後1ヶ月に通水することにより吻合孔の開存の有無を評価し、また組織切片を採取して組織病理学的に上皮が生着しているかを確認する。

研究 4. 抗癌剤を投与したウサギを用いて研究 1-3 を遂行

平成26年度の当院でのウサギの研究により、涙道障害モデルとしてのウサギへの TS-1 至適投与量は決定している。TS-1 投与により涙点閉鎖を認めたウサギに対して、研究 1-3 で確立した方法により涙道再建と評価を試みる。正常ウサギと涙道障害モデルのウサギとで涙道再建後の吻合孔について機能的、組織病理学的に比較検討する。



4. 研究成果

我々は正常ウサギを用いてまず口腔粘膜上皮シートの作成を行った。上皮細胞が重層化しながら配列している HE 染色像を観察し、ウサギの口腔粘膜上皮から上皮細胞シートの作成が可能であることを確認した。次に、ウサギの眼瞼内眼角に切開を加え、眼瞼結膜から涙嚢へと至る、本来の涙小管の走行とは異なる部位を切開、展開し、作成した口腔粘膜上皮細胞シートを敷き、シート上にポリエチレン製のチューブ(実際にヒトの涙道手術に使用されるもの)を留置し、皮下組織・皮膚をそれぞれ縫合し終了した。チューブはシートが皮下組織に生着する前に脱出したため、今回の研究期間中には涙道再建を成功させることはできなかった。シートが皮下組織に生着するまでの期間、管腔を保持するための留置物として、既製品ではなくウサギの顔面解剖により則したものを作成する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Fujimoto M, Ogino K, Matsuyama H, Miyazaki C. Success rates of dacryocystoscopy-guided probing for recalcitrant congenital nasolacrimal duct obstruction. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60;274-9. 査読有

2. Murakami T, Uji A, Suzuma K, Dodo Y, Yoshitake S, Ghashut R, Yoza R, Fujimoto M, Yoshimura N. In Vivo Choroidal Vascular Lesions in Diabetes on Swept-Source Optical Coherence Tomography. *PLoS One*. 2016;11;e0160317. 査読有

3. Miwa Y, Murakami T, Suzuma K, Uji A, Yoshitake S, Fujimoto M, Yoshitake T,

Tamura Y, Yoshimura N. Relationship between Functional and Structural Changes in Diabetic Vessels in Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep*. 2016;6;29064. 査読有

4. Yoza R, Murakami T, Uji A, Suzuma K, Yoshitake S, Dodo Y, Ghashut R, Fujimoto M, Miwa Y, Yoshimura N. Characterization of Inner Retinal Spots With Inverted Reflectivity on En Face Optical Coherence Tomography in Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57;1862-70. 査読有

[学会発表](計 1 件)

(1)藤本雅大、荻野顕、糸口直江、大西智己、吉村長久。ウサギを用いた TS-1 投与に伴う涙道組織障害の再現と予防に関する研究。2016 年 4 月 7 日。仙台国際センター。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

藤本 雅大(Fujimoto, Masahiro)
京都大学医学部附属病院眼科・医員
研究者番号：90737983

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

吉村 長久(Yoshimura Nagahisa)
京都大学医学部附属病院眼科・教授
荻野顕(Ogino, Ken)
京都大学医学部附属病院眼科・助教
池田華子(Ikeda, Hanako)
京都大学臨床研究総合センター 網膜神経
保護治療プロジェクト准教授
吉川宗光(Yoshikawa, Munemitsu)
京都大学医学部附属病院眼科・大学院生
宮崎千歌(Miyazaki, Chika)