

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21391

研究課題名(和文)鼻粘膜における創傷治癒促進因子の解明 及び 細胞シートによる新しい治療法の確立

研究課題名(英文)The wound healing system of nasal epithelial membrane and the effect of transplantation of nasal mucosal epithelial cell sheets

研究代表者

大村 和弘(Omura, Kazuhiro)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：90599713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギにおける鼻粘膜の創傷治癒促進因子の解明および新しい治療法を確立することを目的として、ウサギの粘膜創傷モデル作製、ウサギの鼻副鼻腔内骨削開モデルを作製した。双方のモデルに対して、人工資材としてのアルギン酸カルシウム、温度応答性培養皿を用いた粘膜シート移植、半夏瀉心湯を用いた。ウサギは各モデル5羽ずつ用い、上皮化グレーディング、線毛運動、骨増生の有無を評価CTにて測定した。それぞれの術後の粘膜創傷治癒において、コントロール群と比べて優位に上皮化を促進することに加えて、悪化をさせてしまう可能性も条件によりあることが示唆された。今後ウサギの検体数をさらに増やして、詳細に検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate factors promoting wound healing of nasal mucosa in rabbits and to establish new treatment methods, rabbit mucosal wound modeling and rabbit nasal sinus bone disruption model were prepared. For both models, calcium alginate as an artificial material, membrane sheet transplantation using a temperature responsive culture dish. Rabbits were measured by CT for evaluation of the presence or absence of epithelialized grading, ciliated movement, and bone hyperplasia, using every 5 models. In addition to promoting epithelialization predominantly compared with the control group in each postoperative mucosal wound healing, it was suggested that the possibility of causing deterioration also depends on the condition. It is necessary to conduct a detailed examination further.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：創傷治癒 鼻副鼻腔 粘膜 うさぎ 線毛運動 上皮化 骨増生 粘膜シート

1. 研究開始当初の背景

内視鏡下鼻内手術は、慢性炎症病変、ポリープ病変、嚢胞性病変、腫瘍性病変、外傷に至るまで、幅広く対象とし、病変の再発予防に加えて、鼻腔の形態維持と機能の温存を必要とされるものである。これらの治療の第一選択は手術であるが、術後の粘膜創傷治癒が機能的予後（再発率・繊毛機能の温存・骨増生予防）に大きく関わってくるため、粘膜の創傷治癒を早期に、確実にを行うことは非常に重要である。(Claus Bachert, et al. Am J of Rhinol 2002, Vol. 16, No. 2)

手術治療としての内視鏡下鼻内手術が成功するにあたっては、副鼻腔の単洞化をしっかりと行う手術技術が重要な因子の一つとなるが、腫瘍や嚢胞の除去や、ポリープ病変粘膜の除去した箇所は、粘膜が欠損し、骨が露出してしまふことが多い。加えて、近年の手術技術の発展に伴い、鼻腔内の骨を広範囲にドリルで削ることにより、骨の露出が広範囲に及んだり、組織の切除と止血を同時に行う高エネルギーデバイスの開発、外傷により欠損した骨の代用としての人工物を挿入することもあり、熱変性した粘膜や、露出した骨、人工物の上の粘膜上皮化は非常に難しく、6ヶ月から1年もの間鼻腔内に自浄機能が回復せず、術後感染のリスクの上昇や、痂皮の付着による鼻閉感などで患者の自覚的予後を含めた予後を大きく低下させることにつながる。それらデバイスを使用したことによるウサギによる粘膜創傷治癒モデルの検討 (Laura H. Swibel Rosenthal, et al. Am J Rhinol Allergy 23, 360-363, 2009) や、術後資材による上皮化の促進に関する検討 (Journal of Wound Care February, Vol 9, No2, 2000) (Hwang and Chan Laryngoscope 116: July 2006) も行われており、術後の骨露出や人工物の表面に粘膜の再生を促すことが出来る術後資材の開発が様々な施設で行われている。我々はその資材として、東京女

子医大先端生命医科学研究所で開発された温度応答性培養皿を利用した。



うさぎの鼻腔から採取した鼻粘膜を温度応答性培養皿で培養している様子

2. 研究の目的

移植用の鼻粘膜上皮細胞シートの作製には、東京女子医大先端生命医科学研究所で開発された温度応答性培養皿に着目した。この方法で作製したシートは容易に別の表面や組織に再接着出来る。細胞シートを用いた再生医療は、東京女子医科大学消化器外科、東京女子医科大学先端生命医科学研究所での内視鏡的粘膜切除術(EMR)に伴う人工食道潰瘍の治療において臨床応用に成功している。

また、他にも角膜、心筋、関節軟骨、歯根膜で臨床実現化しているが、耳鼻科領域のヒト臨床応用は、我が教室の行っている鼻粘膜細胞シートの中耳粘膜への移植のみである。先行実験において、ウサギを用いた動物実験では温度応答性培養皿で作製した鼻腔粘膜上皮細胞シートの中耳への移植により非常に良好な粘膜再生がおこり、骨や肉芽の増生は抑制される事を検証し、また大学の倫理委員会の承認を得て、ヒトにおける鼻腔粘膜上皮細胞シートの作成にも成功した。

これまでに我々は、細胞シートを中耳粘膜の再生を目的とし研究を行っており、ウサギを用いた動物実験において、自己培養上皮細胞シートの移植により、中耳粘膜の再生が促進されることを確認している。また、ヒトでの中耳手術における細胞シート移植による中耳粘膜再生の臨床研究を行っており、世界で初めて人への鼻粘膜細胞シートの中耳への移植を成功させた。

そこで、今回、我々は細胞シート技術を用い、ウサギで作製した粘膜欠損モデルを作製し、

鼻腔粘膜欠損部や人工物上にシートを移植し鼻腔粘膜の機能的予後や鼻粘膜における創傷治癒促進因子を解明することを計画した。

3. 研究の方法

研究は、ウサギの鼻中隔粘膜に 8mm の欠損を作製した粘膜欠損モデルと、上顎洞の粘膜を剥離し、上顎骨の骨増生を惹起する骨増生モデルを作製した。

粘膜欠損モデルを使用し、あらかじめウサギより採取した粘膜により培養した細胞シート温度応答性培養皿で作製し、粘膜欠損部に移植。移植後 7 日目・14 日目・21 日目・28 日目の形態的变化を光学顕微鏡で評価した。

術後の創傷治癒を促進する資材の研究として、ウサギの粘膜欠損モデルを使用し、アルギン酸カルシウムを挿入した。挿入したアルギン酸カルシウムは、実臨床と同様、挿入後の抜去洗浄が必要となるので、抜去洗浄に伴う上皮化の影響を調べるため、7 日目・14 日目・21 日目・28 日目で抜去洗浄し上皮化を光学顕微鏡で評価した。

In vitro のモデルとしては、ウサギの鼻粘膜を培養した培養皿に、漢方薬である半夏瀉心湯を用い洗浄を行い、洗浄後 1 日目、3 日目、7 日目で粘膜上皮の線毛運動をハイスピードカメラにて評価、および上皮化を光学顕微鏡で評価し比較した。

ウサギの鼻副鼻腔内骨削開モデルを使用し、あらかじめウサギより採取した粘膜により培養した細胞シート温度応答性培養皿で作製し、粘膜欠損部に移植。移植後 28 日目の骨増生の有無を CT にて評価した。

4. 研究成果

生体のウサギを用いた細胞シート移植モデルで評価が可能であったものは、計 14 体。アルギン酸カルシウム挿入モデルは計 16

体であった。

細胞シートを移植をすることにより、移植しないものに比べて、優位差を持って早期の上皮化を達成した。

アルギン酸カルシウムを挿入したモデルに関しても、していないモデルに比べて優位差を持って上皮化を促進した。光学顕微鏡による上皮化のグレーディングからも生理的機能を向上させる可能性が示唆された。

一方でアルギン酸カルシウムの留置期間によって、上皮化促進を妨げる可能性も示唆された。

漢方の半夏瀉心湯を使用した in vitro のモデルに関しては、濃度と洗浄の日数によって優位差をもって線毛運動が変化することが証明された。上皮化の促進をする可能性も示唆された。

ウサギの鼻副鼻腔内骨削開モデルでは、細胞シートを移植することで骨増生を抑制する可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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：
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

大村 和弘 (Omura, Kazuhiro)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：90599713

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

なし