

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09805

研究課題名(和文) 正常唾液腺細胞の機能維持・長期大量培養法と全く新規の自家移植法の展開研究

研究課題名(英文) Development study of normal salivary gland cell function maintenance, long-term mass culture method and completely new autotransplantation method

研究代表者

肥後 盛洋 (HIGO, MORIHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：60724383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究室で口唇腺細胞の培養を移植するまで継続して行った。細胞培養を継続することにより細胞培養液のコンタミネーションのリスクが高まること、線維化のリスクが高まることなど、問題を抽出することができた。また、健常ボランティアに対して、カニューレ挿入および、アテロコラーゲンの投与をすることにより、移植プロトコルの修正を行うことができた。  
千葉大学の特定認定再生医療等委員会にて審議を受け、臨床試験を開始するための準備を行った。そこで指摘された課題について引き続き実験を行い、再度特定認定再生医療等委員会の審議へかける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、千葉大学の特定認定再生医療等委員会の審議を受けることができ、更にCPC内で使用する細胞調製手順書/記録書の準備が整った。出荷時の各試験についての準備も整ったため、特定認定再生医療等委員会での承認を受けることができれば、臨床試験を開始できることとなった。

研究成果の概要(英文)：The human minor salivary gland, labial gland, cells were cultured in our laboratory until the cell transplantation for damaged salivary glands. We recognized problems, such as increase the risk of contamination and fibrosis by culturing for a long period of time. In addition, the transplantation protocol was modified and added the method of catheter insertion with atelocollagen using healthy volunteers. We applied the transplantation protocol for the Specially Certified Committee for Regenerative Medicine, Chiba University, and then obtained revised comments from the committee.

研究分野：再生医療

キーワード：口唇腺 頭頸部放射線治療 唾液腺機能回復 高度滅菌培養 first in human 唾液腺長期安定培養法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は口腔・食道の粘膜免疫に重要な役割を果たすだけでなく、摂食・嚥下などの機能にも大きく関与している。このため、加齢、自己免疫疾患、放射線治療等による唾液腺萎縮による唾液分泌量の低下は様々な障害の原因となり、唾液分泌量は患者の QOL を左右する重要な因子の一つとされている。唾液腺の機能回復を狙った様々な研究が盛んに行われているものの、治療法に発展するデータの獲得には至っていないのが現状である。その最大の理由は、唾液分泌能を維持したままの初代細胞培養と大量培養が困難であることである。申請者グループは、この問題を解決するために従来の研究により、唾液分泌能を保有したままの唾液腺細胞の初代培養と大量培養に成功し、特許も申請・取得している。しかし、実際に患者に移植した場合に、どの程度唾液分泌能を果たすことができるのか、この点が未だ大きな課題となっている。また、生体外で唾液腺機能を有した細胞を大量に培養し、患者に戻し移植する場合、侵襲をできるだけ少なくする術式の開発が求められている。この課題を解決すべく、われわれは顎下腺の Wharton 管を用いて簡便に移植する技術を動物実験で開発した。実際の臨床において、この簡便で侵襲の少ない本手法が有用であるのかが残された課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、頭頸部癌放射線治療前患者の口唇腺を採取し、実験室で我々の開発した「唾液腺長期安定培養法」を用いて細胞増殖させ、放射線治療後の機能低下した唾液腺組織に注入することで唾液腺機能回復を目指している。

## 3. 研究の方法

### (1) 千葉大学内にある高度滅菌細胞培養室(CPC)で Cold Run を行う。

具体的には、高度滅菌培養の一連の流れについて細胞株等を用いてデモンストレーションすることで、外来手術室からCPCへの細胞の移動、CPC内での全身防御服での細胞培養、CPCから外来手術室への細胞の運搬についてデモを行う。審査は千葉大学臨床試験部の試験官と行い、不適正操作がない行程が2回達成された段階で終了とし、特定認定再生医療等委員会に報告する。本研究内容はFirst in Human のため、Cold runは非常に重要という位置付けである。

### (2) 千葉大学内にある高度滅菌細胞培養室(CPC)で Hot Run を行う。

Cold runとは異なり、ヒトの口唇腺細胞を採取し、一連の培養工程を行う。Hot runは細胞移植直前の工程まで、同じ高度滅菌環境で行うものである。具体的には、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に基づき、培養工程および出荷検査、唾液腺細胞培養の際の工程および出荷時のマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、生菌数試験等を行う。本研究は放射線治療前に細胞を採取し、放射線治療終了後に移植する予定のため、Hot runは1症例3か月を要する試験である。

### (3) Cold run、Hot runによって判明した移植プロトコールの修正。

口腔科学講座の実験室での細胞培養をもとに移植プロトコールが作成されているため、CPCにおける細胞培養の条件で最適なものがあれば適宜修正を行い、特定認定再生医療等委員会に報告する。(Cold run、Hot runにて明らかになったポイントが本研究の最も重要なデータのの一つと考える。)

### (4) 患者登録開始および臨床試験開始。

千葉大学病院にて頭頸部放射線治療を施行する患者に対し、千葉大学病院広報部を通じてアナウンスし、症例リストを作成する。除外基準等と照らし合わせ、患者の選定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 千葉大学内にある高度滅菌細胞培養室(CPC)でCold Runを行う。

### (2) 千葉大学内にある高度滅菌細胞培養室(CPC)でHot Runを行う。

研究期間内にCPC内で使用する細胞調製手順書/記録書の準備が整い、CPCでの培養を行う準備が整った。CPCでの培養を行うにあたり、細胞の運搬や操作の手順の確認をCPC内で行った。(図1) 出荷時のマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、無菌試験に関して、SRLメディサーチと契約をし、プロトコールを作製した。



1次ガウン装着時



2次ガウン装着時



CPC内のクリーンベンチ

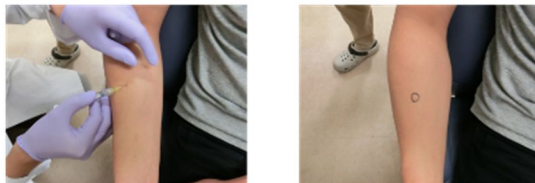
図1. CPC内での作業の様子

### (3) Cold run、Hot runによって判明した移植プロトコルの修正。

我々の研究室で口唇腺細胞の培養を移植するまで継続して行った。そこで、細胞培養を継続することによりコンタミネーションのリスクが高まること、線維化のリスクが高まること、CPCの利用を極力控えたいことなど、問題点を抽出することができた。

また、健常ボランティアに対して、カニューレーション挿入および、アテロコラーゲンの投与をすることにより、移植プロトコルの修正を行うことができた。(図2)

#### ①アテロコラーゲン皮内投与によるアレルギーの有無の確認



アテロコラーゲンに対するアレルギー反応は認めなかった。

#### ②アテロコラーゲンとリピオドール（造影剤）の混合液の作製



アテロコラーゲン (900μl) とリピオドール (300μl) の混合液を作製した。

#### ③右側舌下小丘よりワルトン管へアトムチューブを挿入



プジー (000) を  
右側ワルトン管に挿入。

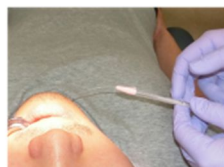


プジー (0.7) を  
右側ワルトン管に挿入。



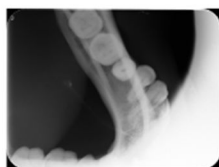
アトムチューブを  
右側ワルトン管に挿入し  
歯牙と固定。

#### ④アテロコラーゲンとリピオドールの混合物の投与 (200μl)



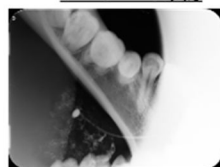
ワルトン管からの漏出は認めず投与できた。

#### ⑤投与直後にデンタルで確認



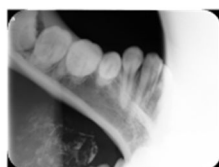
右側顎下腺の一部に造影効果を認めた。

#### ⑥リピオドールを追加投与 (200μl) し デンタルで確認



右側顎下腺に造影効果を認めた。

#### ⑦投与30分後に再度デンタルで確認



造影剤の残留を認めた。

#### ⑧アトムチューブの抜去



アトムチューブ挿入部の軽度腫脹を認めた。

図2. 健常ボランティアに対するHot run

#### (4) 患者登録開始および臨床試験開始。

研究期間内に千葉大学の特定認定再生医療等委員会にて審議を受け、臨床試験を開始するための準備を行った。そこで指摘された課題について引き続き実験を行い、再度特定認定再生医療等委員会の審議へかける予定である。

#### (まとめ)

今回、千葉大学の特定認定再生医療等委員会の審議を受けることができ、更にCPC内で使用する細胞調製手順書/記録書の準備が整った。出荷時の各試験についての準備も整ったため、特定認定再生医療等委員会での承認を受けることができれば、臨床試験を開始できることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鷗澤 一弘  (UZAWA KATSUHIRO)  (30302558)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授   (12501)	
研究分担者	笠松 厚志  (KASAMATSU ATSUSHI)  (60375730)	千葉大学・医学部附属病院・講師   (12501)	
研究分担者	小池 一幸  (KOIKE KAZUYUKI)  (10618060)	千葉大学・医学部附属病院・助教   (12501)	削除：2020年7月8日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関