

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2007 ～ 2009

課題番号：19791239

研究課題名（和文）

培養細胞シートを用いた中耳粘膜再生の試みー移植用シートの開発とその臨床応用ー

研究課題名（英文）

Middle ear regeneration of grafting of epithelial cell sheet

研究代表者

山本 和央（YAMAMOTO KAZUHISA）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50408449

研究成果の概要（和文）：

中耳真珠腫や癒着性中耳炎などの中耳疾患において術後の再発や鼓膜の再癒着の予防を目的として、温度応答性培養皿を用いて粘膜上皮培養細胞シートを作製し、シート移植による中耳粘膜の再生を試みた。動物実験では良好な結果が得られ、中耳粘膜の再生を促す移植材料として粘膜上皮細胞シートは有用であると考えられ、今後の新たな中耳手術の治療法として期待できた。

研究成果の概要（英文）：

Regeneration of the middle ear mucosa is important for a good prognosis after middle-ear surgery. It prevents renewed retraction of the tympanic membrane and recurrence of the cholesteatoma. To examine whether implantation of autologous mucosal epithelial cell sheet promotes mucosal regeneration, we reconstructed mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dish and assessed its effectiveness for regeneration in middle ear-related diseases. In the animal study, the mucosal epithelial cell sheet grafting is effective for mucosal regeneration. These experimental findings suggest that the mucosal epithelial cell sheet grafting is as an effective treatment for achieving mucosal regeneration after middle ear surgery. The cell sheet might have the potential to be useful as graft material for post operative middle ear mucosal regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	420,000	2,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳粘膜、粘膜再生、中耳真珠腫、温度応答性培養皿、粘膜移植

## 1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫や癒着性中耳炎などの中耳疾患においては、術後に中耳腔及び乳突腔の正常粘膜を保存することが困難な症例も多く、良好なガス換気が失われ、術後鼓膜の再癒着や再発が起りやすい。このような症例に対して術後の露出した骨面上に早期に粘膜を再生させることが癒着や再発の予防になると考え、これまで我々は中耳粘膜の再生を目的とし研究を行ってきた。実験動物として中耳骨胞を有する家兎を用いてその中耳粘膜上皮細胞から三次元人工中耳粘膜を作製し、さらに粘膜の欠損部位に移植を行った。作製した人工粘膜は組織学的に生体に近似しておりさらに移植部位での粘膜再生が良好であるという結果を得ている。しかしながら、今後のヒト臨床応用を考えた場合にこの方法ではいくつかの問題点が生じてくる。人工粘膜の作製までに約1ヵ月以上と長い期間が必要であること、また粘膜の厚さが生体の粘膜に比較してかなり厚いこと、移植の際に生着が不十分であることなどが挙げられる。そこでこのような問題点を克服できる新しい移植用細胞シートの開発に向けて、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に着目した。温度応答性培養皿は温度応答性高分子が表面にコーティングされた特殊な培養皿で、温度変化のみで培養皿表面の親水性、疎水性制御が可能である。すなわち、培養温度である37度では弱い疎水性を示し細胞が接着、進展するのに対し32℃以下では表面が高度に親水化するためトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いるこ

となく細胞が自発的に脱着する。さらに、細胞をコンフルエントな状態にまで培養した後に温度を下げることで、培養細胞全体を一枚の細胞シートとして回収できる。細胞シートの底面には、細胞が培養の間に沈着した細胞外マトリックス（ECM）を保持しているため、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できる。細胞シートを用いた再生医療は皮膚、角膜ではすでにヒト臨床応用に成功しており、心筋、肝臓、血管、食道、膀胱など様々な組織を対象とした新規技術の開発が進んでいる。この方法を中耳に応用し、培養細胞シートの開発及びシート移植による中耳粘膜の再生を期待する。

## 2. 研究の目的

中耳真珠腫や癒着性中耳炎などの中耳疾患においては、術後に中耳腔及び乳突腔の正常粘膜を保存することが困難な症例も多く、良好なガス換気が失われ、術後の再癒着や再発が起りやすい。このような症例に対して術後の露出した骨面上に早期に粘膜を再生させることが癒着や再発の予防になると考えられる。温度変化のみで培養皿表面の親水性、疎水性制御が可能な温度応答性培養皿を用いて、粘膜上皮培養細胞シートを作製し、シート移植による中耳粘膜の再生を目的とする。中耳真珠腫では再発のリスクが高く通常2回に分けて手術が行われてきたが、この細胞シートの移植が可能になれば術後の乳突腔の粘膜が再生され、含気腔が確保されることで再発は著しく低

下することが予想され、一期的手術が可能となり、手術における患者への侵襲の軽減、さらに再発率の低下なども期待できる。

### 3. 研究の方法

家兎の中耳骨胞より粘膜を採取し、explant culture 法にて培養を行い、中耳粘膜上皮細胞を分離する。分離した細胞を温度応答性培養皿上で約二週間培養し細胞シートを作製する。作製したシートの構造を組織学的、超微形態学的 (TEM, SEM) に評価し、生体の粘膜に近いこと確認する。作製した細胞シートを同一家兎の反対側の中耳骨胞に移植を行う。移植の際には粘膜を可及的に除去した部位にシートを移植する。対象を粘膜除去のみ行い細胞シートの移植を行わない粘膜単独除去群とする。約8週間後に機能的検討として中耳腔全圧最大値を測定し、さらに粘膜再生に関して組織学的検討を加える。特に骨増生、繊維化、肉芽増生について正常群、粘膜単独除去群と比較検討を行う。さらに鼻粘膜を用いた細胞シートの作製及び移植も同様の方法にて行う。

倫理委員会承認及び本人の同意を得たうえでヒト中耳粘膜、鼻粘膜を術中に採取し、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製する。主に中耳真珠腫の症例で緊張部に病変がない症例を対象とする。作製したシートの構造を組織学的、超微形態学的 (TEM, SEM) に評価し、生体の粘膜に近いこと確認する。免疫組織学的手法により上皮系細胞の存在及び細胞間接着、基底膜、tight junction、adherence junction などの解析を行う。

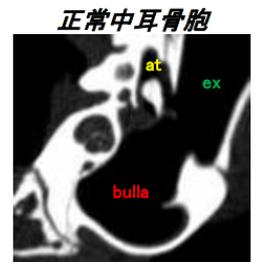
### 4. 研究成果

家兎を用いた動物実験では、動物実験委員

会の承認のもと温度応答性培養皿を用いて家兎の鼻粘膜上皮細胞シートを作製し、同一家兎の中耳骨胞へ移植を行った。対象を粘膜除去のみ行い、細胞シートの移植を行わない粘膜単独除去群とし、約8週間後に機能的検討として中耳腔全圧最大値を測定し、さらにCTでの骨増生の評価と粘膜再生に関して組織学的検討を加えた。粘膜除去群に比しシート移植群においてはCTおよび組織学上、骨増生が抑えられた。

### ウサギ冠状断CTの比較 (術後8週)

ex : 外耳道  
bulla : 中耳骨胞  
at : 上鼓室

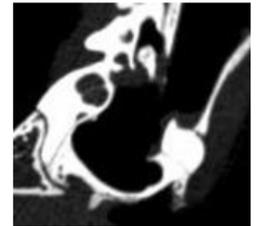


#### 粘膜除去



骨増生 著明  
中耳腔 狭小化 著明

#### 鼻粘膜上皮細胞シート移植

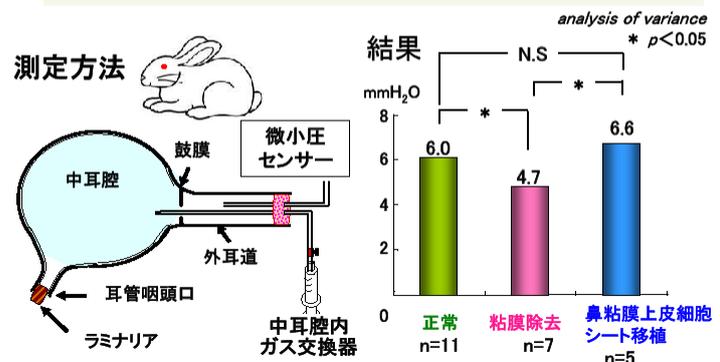


骨増生 抑制  
中耳腔 狭小化 抑制

また中耳腔全圧最大値も高値であり、ガス換気能も良好と考えられた。

### 機能的評価: 中耳腔全圧測定による比較

中耳腔全圧測定は粘膜の病態を推測する手法の一つ  
粘膜におけるガス交換能を評価する上で重要



動物実験では良好な結果が得られ、今後の臨床応用に向け我々は倫理委員会の承認及び本人の同意を得たうえで、ヒト下甲介粘膜を術中に採取し、温度応答性培養皿を用いた鼻粘膜上皮細胞シートを作製した。ヒト下甲介粘膜を術中に採取し、同様に細胞シートの作製を行った。H-E 染色ではほぼ単層の上皮様構造が認められ、走査型電子顕微鏡 (SEM) では微絨毛はほとんど観察できなかったが、多角型の細胞配列を認め、透過型電子顕微鏡 (TEM) では tight junction、desmosome などが認められ、細胞間接着の存在を確認した。

#### 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 2 件)

##### 1) 山本 和央

鼻粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生～  
家兔を用いた移植実験～  
第 19 回日本耳科学会総会  
2009 年 10 月 10 日  
東京

##### 2) Kazuhisa Yamamoto

Middle ear mucosa regeneration by  
grafting of three-demensional middle  
ear mucosal organ.  
8<sup>th</sup> International conference on  
cholesteatoma and ear surgery  
2008 年 6 月  
トルコ

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 和央 (YAMAMOTO KAZUHISA)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50408449