

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19186

研究課題名（和文）ヒト唾液腺細胞の機能維持培養法と新規自家移植法の開発研究

研究課題名（英文）Development and research of function maintenance culture method and new autologous transplantation method of human salivary gland cells

研究代表者

福島 玲雄（FUKUSHIMA, REO）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00833576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：高度滅菌細胞培養室（CPC）内で使用する細胞調製手順書の準備が整い、細胞の運搬や操作の手順の確認をCPC内で行った。我々の研究室において、口唇腺の細胞培養を継続して行い、移植に使用できる細胞数の確認等を行うことができた。健常ボランティア3人に対して、カテーテルの挿入およびアテロコラーゲンの投与を行い、プロトコルを修正することができた。

放射線治療終了後の患者1人に対しても、Cold Runとしてカテーテルの挿入を行った。放射線治療終了後の患者では、開口障害が生じている上、唾液流出量が少ないため、唾液腺開口部がわかりづらく、カテーテル挿入操作が困難になることなど、問題点を抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、健常ボランティア3名と放射線治療終了後の患者1名にカテーテル挿入を行うことができた。それにより、カテーテル挿入の手技の確立やプロトコルの修正を行うことができ、カテーテル挿入時の問題点などを抽出することができた。また、CPC内で使用する細胞調製手順書/記録書が整い、CPCでの細胞培養を行う準備が整った。この結果をもとに今後、自己唾液腺細胞を用いた、唾液腺機能再生療法の研究をさらに進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：After completion of our cell preparation protocol, optimal procedures of cell transportation and cell culture were examined in the Cell Processing Center (CPC) of Chiba University Hospital. We determined the appropriate cell number from labial glands for the transplantation, and then performed the transplantation with atelocollagen into human submandibular gland via catheter device for not only three healthy volunteers but also one patient after radiation therapy (RT) for oral cancer. Since we obtained problems of catheter insertion procedure for the patient with RT, such as trismus and small amounts of saliva, we will improve them for the First in Human study of transplantation of labial gland cells.

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、申請者グループは顎下腺の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

先行研究では長期安定培養法を用いた唾液腺細胞の安全性やCPCにおける培養法など品質保持および法律遵守の観点から研究が行われてきた。現在、ヒトへの細胞移植が現実化しているため、適切に唾液腺に移植する方法の確立が重要となる。

そのため、

- (1) 安全性が確認された細胞をCPC内で細胞製品(アテロコラーゲンと移植細胞の混合液)として調整し、混合後の細胞生存率を計算することで適切な混合比率を設定する。
 - (2) (1)と同様に混合後、細胞生存率からCPC出発から移植までの適切な時間を設定する。
 - (3) 健常ボランティアだけでなく、頭頸部放射線治療を受けた患者のWharton管からカテーテルを挿入し、開口部の処置について検討する。また、造影剤や生理食塩水を注入して移植可能な容積を検討する。
- ことを本研究の目的とした。

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)で唾液腺細胞培養のHot Runを行い、その後アテロコラーゲンと混合し、適切な混合率、適切な移植までの時間について細胞生存率を用いて計測する。

特定認定再生医療等委員会に提出したCPCでの高度滅菌培養を行い(約3か月培養)、実際の移植の際と同様にGMPグレードのアテロコラーゲンと混合する。細胞生存率は口腔科学研究室の細胞培養室で行う。

(2) 千葉大学医学部附属病院歯科・顎・口腔外科外来に設置されている細胞移植手術室(全身麻酔対応可)にて健常ボランティアおよび頭頸部放射線治療後の患者に対してCold Runとして3Frの専用カテーテルを挿入する。

(3) 唾液腺細胞とアテロコラーゲンとの混合率、カテーテル操作によって判明した移植プロトコルの修正

CPCと外来細胞移植手術室にて行われている工程について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。(本研究の結果が最終的な移植プロトコルの構築に必須であると考える。)

4. 研究成果

(1) 千葉大学内にある高度滅菌細胞培養室(CPC)で唾液腺細胞培養のHot Runを行い、その後アテロコラーゲンと混合し、適切な混合率、適切な移植までの時間について細胞生存率を用いて計測する。

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) 図1. CPC内での作業の様子
口腔科学の研究室で口唇腺の細胞培養を継続して行い、移植に使用できる細胞数の確認等を行うことができた。



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

(2) 千葉大学医学部附属病院歯科・顎・口腔外科外来に設置されている細胞移植手術室(全身麻酔対応可)にて健常ボランティアおよび頭頸部放射線治療後の患者に対してCold Runとして3Frの専用カテーテルを挿入する。

(3) 唾液腺細胞とアテロコラーゲンとの混合率、カテーテル操作によって判明した移植プロトコルの修正

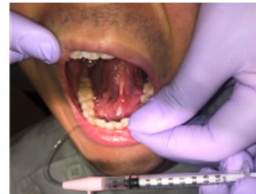
健常ボランティア3人に対して、Cold Runとしてカテーテルの挿入を行うことができた。そこで、カテーテル挿入の手技の確認を行い、カテーテル挿入のプロトコルを修正することができた。また、カテーテルからアテロコラーゲンを実際に投与することで、混合率を実際に決め、プロトコルを修正することができた。(図2)



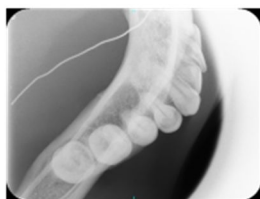
ブジー(000)を右側ワルトン管に挿入。



ブジー(000)を2個用いて開口部を拡大。



ブジー(000)をカテーテルの中に入れガイドとして使用しカテーテルを挿入



ブジー(000)を挿入して撮影



ブジー(000)を抜去して撮影



カテーテル抜去時

図2. 健常ボランティアに対するカテーテル挿入

放射線治療終了後の患者1人に対しても、Cold Runとしてカテーテルの挿入を行うことができた。放射線治療終了後の患者では、放射線治療の影響により開口障害が生じている上、唾液流出量が少ないため、唾液腺開口部がわかりづらく、カテーテル挿入操作が困難になることなど、問題点を抽出することができた。(図3)



放射線治療の影響により開口障害を生じていたため、唾液腺開口部を確認するのは困難であった。



ブジー(000)をワルトン管に挿入。

図3. 放射線治療後の患者に対するカテーテル挿入

(まとめ)

今回、健常ボランティア3名と放射線治療終了後の患者1名にカテーテル挿入を行うことができた。それにより、カテーテル挿入の手技の確立やプロトコルの修正を行うことができ、カテーテル挿入時の問題点などを抽出することができた。また、CPC内で使用する細胞調製手順書/記録書が整い、CPCでの細胞培養を行う準備が整った。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------