

機関番号：32651

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591990

研究課題名(和文) 人工中耳粘膜移植とドラッグデリバリーシステムの融合による新しい鼓室形成術式の研究

研究課題名(英文) Development of modified tympanoplasty combined with transplantation of artificial middle ear mucosa and drug delivery system

研究代表者

小島 博己 (KOJIMA HIROMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60234762

研究成果の概要 (和文)：

家兔の中耳粘膜から三次元中耳粘膜細胞シートを作成することに成功した。動物実験で、中耳粘膜細胞シートは中耳腔粘膜削開後の露出した骨面に移植することにより、早期の粘膜再生が生じた。さらにヒト鼻粘膜より作成した粘膜細胞シートは組織学的にヒト中耳粘膜に類似しており、多層の上皮細胞と上皮下の結合組織から構成された。電子顕微鏡による所見では敷石状の上皮細胞が規則正しくなっており、微絨毛を有していた。またタイトジャンクションとデスモゾーム、細胞接着因子を有する基底膜も観察された。この鼻粘膜細胞シートは正常ヒト中耳粘膜に近似しており、中耳手術後に生じた粘膜の欠損部位の粘膜再生に有用であると思われ、将来の臨床応用に期待ができる。

研究成果の概要 (英文)：

We have developed successfully middle ear mucosal epithelial cell sheets with three-dimensional structure, analogous to normal middle ear mucosa. Furthermore, we found it clear that a rapid mucosal regeneration is boosted by transplanting cell sheet created with autologous cells on to the rabbit's middle ear mucosa missing area. In addition, autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert was made successfully. By histologically studying artificial human nasal epithelial cell sheets, we confirmed the presence of epidermal cell-like cells in the cortex and fibroblast-like cells in the substratum. The sheets consisted of multi-layered mucosal epithelia and lower connective tissue and were similar to normal middle ear mucosa. Scanning electron microscopy revealed a cobblestone-like pattern of cells with innumerable microvilli and a cilium-like configuration. We also confirmed the basal membrane configuration that included tight junctions, desmosomes, and cell adhesion structures among the epidermal layers.. This artificial mucosa had a similar configuration to that of normal middle ear mucosa.

For these reasons, middle ear mucosal cell sheet is considered as an effective transplantation material for mucosal regeneration in otitis media surgery, and it is expected to apply for human clinical use in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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, 再生, DDS

1. 研究開始当初の背景

中耳炎に対する手術（鼓室形成術）の大きな目的は聴力の改善である。このためには鼓膜の裏面に含気腔が存在し、鼓膜の振動がロスなく耳小骨を経由して内耳まで伝わる必要がある。すなわち中耳腔に肉芽が存在したり、鼓膜が癒着した病態での聴力は不良となる。術後に正常な中耳腔を形成するためには中耳粘膜の再生および生理的なガス換気能の回復と鼓膜の癒着防止がなされることが最も重要である。しかし中耳炎を伴った症例では中耳粘膜機能は元来障害されているため術後の中耳粘膜上皮の再生は遅延し、有効な含気腔を作ることが困難なことが多い。特に鼓膜が陥凹し中耳腔の内側壁と癒着した癒着性中耳炎症例では手術時に上皮を剥離除去した時に中耳の骨面が露出してしまうため、中耳粘膜の温存が困難となる。このため癒着性中耳炎は他の中耳疾患と比較して手術成績が非常に悪い。癒着性中耳炎の手術に関しては、緒家らにより様々な手術手技が実践され、我々も行なってきたが、術後鼓膜の再陥凹や癒着防止に対して十分に効果を発揮している決め手となる手術法は現時点ではなく、現在広く普及している鼓室形成術を行うだけでは術後成績に限界がある。

1984年から2004年までに当施設で行われた初回手術例【癒着性中耳炎102耳、中耳真珠腫308耳（うち鼓膜緊張部に癒着があるもの260耳、ないもの48耳）】の術後聴力に関する手術成績を検討した結果は、癒着性中耳炎症例全体で50.0%と満足できる成績ではなかった（小島博己. Otol Jpn 16: 2-12, 2006.）。一方、中耳真珠腫症例では鼓膜の癒着をともしない症例は73.1%とまずまずの成績であったが、鼓膜の癒着をともしない症例では45.8%と癒着性中耳炎と同様に成績が不良であった。術後の聴力成績が満足すべき結果でない主な原因は、耳管機能不全の他、癒着鼓膜の剥離により鼓室岬部の骨面が広く露出され、そのために術後の中耳腔の上皮化が著しく遅延し、中耳粘膜の線毛機能や粘膜からの換気が遅れることに起因していると考えられる。これらの結果から手術のポイントは癒着上皮を剥離した後の中耳腔の骨露出した部分における粘膜上皮化をいかに促進するかということになる。

2. 研究の目的

前述のように術後の中耳粘膜を早期に再生させることが可能になれば、手術方法そのもの

が大きく変わり、手術成績が向上すると思われる。一方で中耳粘膜は非常に薄く、側頭骨の骨面上に生着しており、通常の移植では移植後の血流が悪く、生着率が低い。本研究では移植に上皮と上皮組織を含む人工的に作成した三次元中耳粘膜を使用して、術後粘膜の再生を目的とする。さらに、より簡便に移植が可能となる人工粘膜の開発を目的とする。

3. 研究の方法

A. 家兔を用いた動物実験では乳突腔粘膜および鼻粘膜から温度応答性皿により作製した粘膜細胞シートを、それぞれ粘膜を削開した後の中耳腔に移植して、移植片の生着、中耳腔の変化などを観察した。

B. 実際の臨床応用に向けて、ヒトの三次元人工中耳粘膜（中耳粘膜細胞および鼻粘膜細胞から作成した粘膜細胞シート）を作成し、組織学的に単層上皮と上皮下の組織を確認する。さらに粘膜上皮由来であるムチン産生に関して、免疫染色やRT-PCRにてMUC1~4、MUC5ACの発現などを確認する。また電顕的にも正常中耳粘膜との相違の有無につき観察を行う。

C. 将来の移植に備えて移植に必要な粘膜組織の採取量についての検討をおこなう。すなわち採取量と三次元人工粘膜の作製に要する時間および作製される大きさなどについて条件を変えながら詳細に検討し、最適な条件を決定する。

4. 研究成果

A. 動物モデル（家兔）における温度応答性培養皿を用いて作成した中耳粘膜細胞シートの移植実験

乳突洞粘膜および鼻粘膜で作成した粘膜シートを移植し、その効果を検討した。その結果、シート移植群において明らかに骨増生および中耳腔の狭小化を抑制することが確認できた。小動物の頭部を撮影することが可能なCT装置にて、生存下に経時的に撮影を行ったところ、同様に中耳腔の狭小化は粘膜細胞シートの移植により抑制され、良好な含気化が得られた。

B. 臨床応用に向けたヒト細胞を用いた粘膜シートの検討

ヒト鼻粘膜から鼻粘膜細胞シートを製作した。下鼻甲介粘膜より採取した粘膜組織片を継代・培養し、生体の中耳粘膜組織に非常に近似した三次元構造を有する鼻粘膜細胞

シートの作成に成功した。電子顕微鏡下の観察でも単層の粘膜細胞と微絨毛が観察され、正常中耳粘膜と類似していた。また上皮および上皮組織に発現する pancyokeratin, vimentin, laminin, beta-catenin の発現パターンは鼻粘膜細胞シート、正常中耳粘膜、正常鼻粘膜でほぼ同じであった。一方で鼻粘膜細胞シートでは正常鼻粘膜に存在する鼻腺は認められず、中耳腔に移植するに適していると考えられた。

C. 移植に必要な粘膜組織の採取料と粘膜細胞シートの作成期間の検討

下鼻甲介粘膜は3mm四方の粘膜採取で分量の粘膜細胞シートを作成することが可能であることが判明した。また粘膜採取から再生シート回収までは約3週間を要した。

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7件)

1. 小島博己. 癒着性中耳炎の診断と治療 (ビデオセッションII). 第36回日耳鼻夏期講習会 テキスト, 2010: 103-116.
2. 田中康広, 小島博己, ほか. 鼓膜緊張部癒着に対するcartilage tympanoplastyの有用性. 耳展 2009; 52: 16-22.
3. 小島博己. 中耳真珠腫の手術適応と手術法について. 都耳鼻会報, 2009: 130: 42-46.
4. Yamamoto K, Hiromi Kojima, et al. Middle ear mucosa regeneration by grafting of three-dimensional middle ear mucosal organ. Proceedings of 8th International Conference of Cholesteatoma and Ear Surgery. Antalya (turkey), 2008: 97-99.
5. Yamamoto K, Hiromi Kojima, et al. Middle ear mucosa regeneration by grafting of three-dimensional middle ear mucosa organ. Mediterranean Journal of Otolaryngology 4; 2008: 104.
6. Kojima H. Middle ear regeneration using transplantation of tissue-engineered cell sheet. Mediterranean Journal of Otolaryngology 4; 2008: 27.
7. Ibrahim Hizalan, Mehmet Ada, Maurizio Amadori, Ghazi Besbes, Hiromi Kojima, Alec Fitzgerald O' Conner, Eyal Raveh, Jens Thomsen. Early retraction pockets; how to manage? Workshop. Mediterranean Journal of Otolaryngology 4; 2008: 5.
8. 小島博己. 癒着性中耳炎に対する手術適応. JOHNS 2008; 24: 95-98.
9. 小島博己. 中耳炎・いつ手術にふみきるかー私の決断ー. 癒着性中耳炎 ENTONI 2008; 101: 30-34.

10. 小島博己. 癒着性中耳炎の手術と長期成績. ENTONI 2007; 76: 45-50

[学会発表] (計9件)

1. 山本和央, 小島博己ほか. 家兔を用いた鼻粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生-小動物CTによる中耳含気腔の検討-. 第20回日本耳科学会. 2010年10月9日(愛媛).
2. 濱孝憲, 小島博己ほか. 自己由来粘膜再生シートを用いた鼓室形成術に対する再生医療の応用-ヒト鼻粘膜を用いた臨床応用にむけて-. 第20回日本耳科学会. 2010年10月9日(愛媛).
3. 小島博己. 癒着性中耳炎の診断と治療 (ビデオセッション). 第36回日本耳鼻咽喉科学会夏期講習会. 2010年7月10日(東京).
4. 小島博己. 中耳粘膜の再生に向けてー人工粘膜を利用した研究を中心にー. 長崎大学長買う・平衡センター講演会(特別講演). 2010年6月10日(長崎).
5. Hiromi Kojima. Middle ear regeneration using transplantation of tissue-engineered cell sheet. 12th Mediterranean Society of Otolaryngology and Audiology Meeting. Marseille (France) May 15, 2010.
6. 山本和央, 小島博己ほか. 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. 2009年10月8日(東京).
7. 小島博己. 中耳粘膜再生に向けて-粘膜上皮細胞シートによる検討-. 第110回日本耳鼻咽喉科学会総会(シンポジウム). 2009年5月14日(東京).
8. 小島博己. 中耳真珠腫の手術適応と手術法について. 招待講演 東京都耳鼻科医会(東京). 5月10日 2009.
9. 小島博己. 中耳手術ー真珠腫に対する手術法についてー 招待講演 第1回栃木県耳鼻咽喉科手術手技研究会(栃木). 7月28日 2008.
10. Hiromi Kojima. Middle ear regeneration using transplantation of tissue engineered cell sheet. 8th International conference of Cholesteatoma and Mastoid Surgery. antalya (Turkey). June 15, 2008.
11. Kazuhisa Yamamoto, Hiromi Kojima, et al. Middle ear mucosa regeneration by grafting of three-dimensional middle ear mucosa organ. 8th International conference of Cholesteatoma and Mastoid Surgery. antalya (Turkey). June 15, 2008.
12. Hiromi Kojima. Early retraction pockets - How to manage (Panel). 8th International Conference of Cholesteatoma and Mastoid

Surgery. Antalya (Turkey). June 15,
2008.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島博己 (KOJIMA HIROMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60234762