

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791625

研究課題名（和文） 正常機能を有する外耳道皮膚の再生：温度応答性培養皿を用いた人工外耳道皮膚の作製

研究課題名（英文） External auditory meatus keratinocyte sheets harvested from temperature-responsive culture dishes.

研究代表者：

土屋 克之（TSUCHIYA KATSUYUKI）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：30468045

研究成果の概要（和文）：外耳道の皮膚は特別な皮膚で、一度骨面が露出すると外耳道の皮膚が再生するには時間がかかり、他部位の皮膚を移植するも、本来の外耳道皮膚としての機能は損なわれていることが多い。これらの問題点を解決するために、特殊な細胞培養皿を用いて外耳道表皮細胞シートを作製した。今後この細胞シートを用いることにより、正常な外耳道皮膚機能を損なうことなく外耳道の再生を行うことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：External auditory meatus is important skin, and having self-purification ability, a substitute does not work with other skin. When we operate on the ear, we treat external auditory meatus skin very carefully. When external auditory meatus skin suffers a loss once, it takes time so that skin reproduces and causes the trouble. I manufactured an external auditory meatus epidermic cell sheet using a temperature-responsive culture dish to solve these problems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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

キーワード：外耳道、細胞培養、細胞シート

1. 研究開始当初の背景

耳は3つのパーツ，外耳・中耳・内耳にわけられ、外側 1/3 の軟骨部と、内側 2/3 の骨

部(深部)からなる。外耳道の皮膚は常に新陳代謝を繰り返しており、自浄作用によってごみや耳垢を奥の方から、ベルトコンベアー式

に外耳道の入り口へと排出されるように出来ている。外耳炎や外耳道湿疹の存在、あるいは外耳道皮膚が欠損した場合には、その自浄機能が障害され耳垢が蓄積しやすくなる。外耳道の皮膚は、その生理的機能からも他の皮膚とは異なった性質を有する特殊な皮膚と言え、我々は慢性中耳炎や中耳真珠腫症例に対して鼓室形成術を行う際、聴力だけでなく、外耳道の機能温存を考慮しながら、手術するよう心がけている。

2. 研究の目的

外耳道の皮膚とは異なった性質を有する特殊な皮膚と言え、臨床の場において外耳道皮膚が必要となる疾患には、先天性外耳道閉鎖症、後天性外耳道閉鎖症（外耳道深部繊維性閉鎖症）、外耳道狭窄症、外耳道真珠腫、鼓室形成術後の浅在化鼓膜などがある。また耳科手術の際、外耳道の皮膚が欠損する場面には少なからず遭遇する。一度骨面が露出すると外耳道の皮膚が再生するには時間がかかり、他部位の皮膚を移植するも、本来の外耳道皮膚としての機能は損なわれていることが多い。これらの問題点を解決するために、特殊な細胞培養皿を用いて外耳道皮膚細胞シートを作製し、この細胞シートにより将来的に移植可能な外耳道皮膚の作製が可能かを検討することが今回の研究目的である

3. 研究の方法

(1) 生後3~4週のSPFラットを深麻酔下に断頭し、骨部および軟骨部の外耳道皮膚を摘出した。ディスペーゼで処理することにより表皮と真皮を分離し、それぞれを1型コラーゲンがコートされた細胞培養皿で培養した。約3週間後、これらの細胞を0.25%のトリプシンで処理し回収し、温度応答性培養皿で約2週間培養した。

(2) 温度応答性培養皿は東京女子医科大学・先端生命医科学研究所で開発され、2007年より株式会社セルシードより市販化されている。温度応答性高分子であるポリイソプロピルアクリルアミドを通常の培養皿の表面にグラフトしたもので、培養温度(37℃)では疎水性の表面となり細胞が接着するのに対して、低温(20℃)では高度に親水化するため細胞が培養皿表面から、その構造と機能を失うことなく分離が可能である。細胞を密な状態に培養すると、細胞シートとして回収することが可能であり、回収した細胞シートは細胞外マトリクスを保持しているため、移植の際に縫合が一切不要である。また、細胞外に発現しているタンパク質なども低損傷なため、細胞シート同士を重ねた3D培養も容易である。この培養皿を用いて肝細胞、角膜内皮細胞、心筋細胞、口腔粘膜など様々な細胞シートの作成が行われており、一部臨床応用が進められ、臨床利用が近い状況になってきている。

4. 研究成果

ラットの外耳道皮膚を採取後、ディスペーゼで処理することにより表皮と真皮を分離した。得られた組織を抗菌剤、培養液で洗浄後、それぞれを1型コラーゲンをコートした細胞培養皿で培養した。表皮由来の培養系では、多角形の細胞が相互に密に接着し敷石状に配列し、形態学的に上皮細胞由来の模様を呈した(図1)。免疫染色ではpan-cytokeratin陽性であり、外耳道表皮由来の表皮細胞培養に成功したと考えた。また真皮由来の培養系では、細胞は紡錘形をして、密度の低い時にはバラバラに存在し、密度が高くなると互いに接着して流れ模様を呈し、外耳道真皮由来の線維芽様細胞の培養に成功したと考えた(図2)。これらの細胞は温度応答性培養皿を用い

て培養され、低温処理（20℃）に加え、少量のトリプシンで処理することにより、シート状に細胞を回収することが可能であった（図4）。

現在、真皮由来線維芽細胞シートを用いた鼓膜形成術を検討している。鼓膜は中耳と外耳の境目にある、直径8～9mm、厚さ0.1mmの膜で、耳小骨に音を伝える。外耳側から順に、皮膚層、固有層、粘膜層の3層からなる。鼓膜も、皮膚と同じく再生することが可能である。臨床現場では、慢性中耳炎や外傷による鼓膜穿孔に対しては鼓膜穿孔閉鎖術または鼓膜形成術が行われる。従来は1週間以上の入院を要していた鼓膜形成術であるが、湯浅によるフィブリン糊を用いた鼓膜形成術（接着法）の開発により、侵襲の少ない術式での鼓膜穿孔閉鎖が可能になった。これにより、鼓膜形成術における日帰り手術の適応が大幅に拡大した。現在鼓膜形成術は、耳後部に皮膚切開を加え皮下結合組織を採取し行われている。また、近年人工材料の進歩も、外傷性鼓膜穿孔や慢性中耳炎小穿孔症例における外来処置用顕微鏡下の鼓膜閉鎖処置を可能にしてきた。再建に用いる人工材料の一つとして、本研究で作製した真皮由来線維芽細胞シートが使用できないかを検討中である。

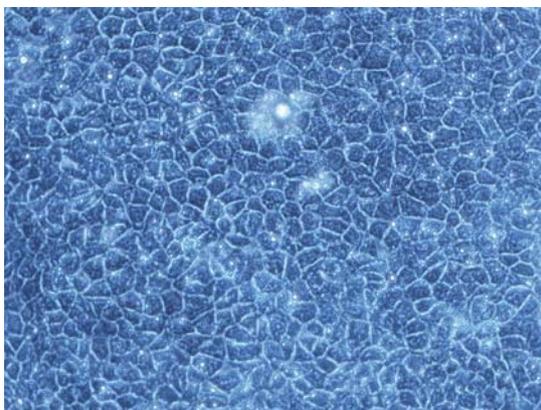


図1 ラット外耳道表皮由来の培養細胞
（多角形の細胞が密に接着し敷石状に配列）

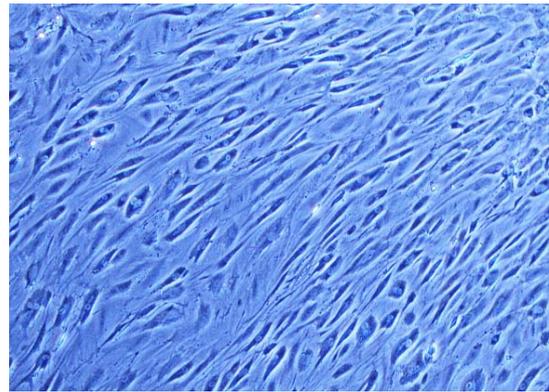


図2 ラット外耳道真皮由来の培養細胞
（細胞は紡錘形に接着し流れ模様を呈した）

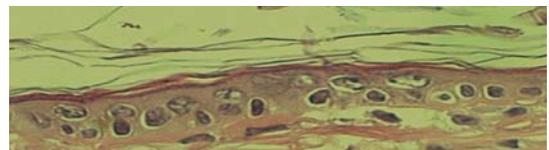


図3 ラット外耳道皮膚（HE染色）



図4 外耳道表皮細胞シート（HE染色）

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1件）
- 1) Kerschner J, Lin J, Tsuchiya K, Khampang P: Mucin gene expression and mouse middle ear epithelium. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 74:864-868, 2010 4月

- 〔学会発表〕（計15件）
- 1) 河野浩万, 土屋克之, 福留真二, 東野哲也: ツチ・キヌタ骨の可動性障害を伴ったアブミ骨固着症の1例. 第110回日本

- 耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会，2009年5月14-16日，東京
- 2) 植木義裕，東野哲也，河野浩万，外山勝浩，松田圭二，土屋克之：外耳道閉鎖術施行症例の検討．第110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会，2009年5月14-16日，東京
 - 3) 東野哲也，長井慎成，河野浩万，松田圭二，土屋克之：顔面神経鼓室内分岐を伴うアブミ骨奇形症例の手術所見．第71回耳鼻咽喉科臨床学会総会および学術講演会，2009年7月2-3日，北海道旭川市
 - 4) 外山勝浩，土屋克之，東野哲也：CTによる上顎亜全摘術後の眼球陥凹に関する評価．第48回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会，2009年10月1-3日，島根
 - 5) 土屋克之：マウス中耳粘膜由来温度感受性上皮細胞株の確立．第112回日耳鼻宮崎県地方部会学術講演会，2009年12月12日，宮崎
 - 6) 直野秀和，松田圭二，土屋克之，河野浩万，植木義裕，東野哲也：中耳真珠腫の合併症 上鼓室型と緊張部型の比較．第111回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会，2010年5月20-22日，宮城県仙台市
 - 7) 河野浩万，松田圭二，土屋克之，東野哲也：当科における鼓室硬化症の術後聴力成績．第111回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会，2010年5月20-22日，宮城県仙台市
 - 8) 土屋克之，河野浩万，東野哲也：耳下腺 Sarcomatoid Salivary Duct Carcinoma の1例．第72回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会，2010年7月2-3日，岡山県倉敷市
 - 9) 直野秀和，外山勝浩，長井慎成，土屋克之，東野哲也：異時性に顎下腺に移転した乳癌症例．第72回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会，2010年7月2-3日，岡山県倉敷市
 - 10) 佐藤伸矢，外山勝浩，土屋克之，奥田 匠，直野秀和，東野哲也：慢性砒素中毒における嗅覚の検討．第49回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会 2010年8月26-28日，北海道札幌市
 - 11) 奥田 匠，松田圭二，佐藤伸矢，外山勝浩，直野秀和，土屋克之，東野哲也：鼻腔内反性乳頭腫に紡錘細胞癌を合併した1例．第49回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会，2010年8月26-28日，北海道札幌市
 - 12) 土屋克之，外山勝浩，東野哲也：口腔上顎洞瘻を形成した血瘤腫の1例．第23回日本口腔・咽頭科学会総会・学術講演会，2010年9月16-17日，東京
 - 13) 東野哲也，河野浩万，松田圭二，中西 悠，後藤隆史，土屋克之：浅在化鼓膜症に対する手術．第20回日本耳科学会総会・学術講演会，2010年10月7-9日，愛媛県松山市
 - 14) 直野秀和，松田圭二，土屋克之，植木義裕，河野浩万，東野哲也：中耳真珠腫Stage 症例の検討．第20回日本耳科学会総会・学術講演会，2010年10月7-9日，愛媛県松山市
 - 15) 奥田 匠，松田圭二，平原信哉，外山勝浩，土屋克之，東野哲也：若年性鼻咽腔血管線維腫により急性副鼻腔炎から脳膿瘍を来たした1例．第115回日耳鼻宮崎県地方部会学術講演会，2010年12月11日，宮崎県宮崎市
- 〔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；
出願年月日；
国内外の別；

取得状況（計0件）

名称；
発明者；
権利者；
種類；
番号；
取得年月日；
国内外の別

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 克之 (TSUCHIYA KATSUYUKI)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：30468045

(2) 研究分担者

研究者番号

(3) 連携研究者

研究者番号