

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：稲垣 太朗

専攻分野：耳鼻咽喉科学

指導教授：肥塚 泉

主論文の題目：

Transplantation of Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets Inhibits the Development of Acquired External Auditory Canal Atresia in a Rabbit Model (家兎の自己由来口腔粘膜上皮細胞シート移植による外耳道閉鎖の抑制効果)

共著者：

Tsunetaro Morino, Ryo Takagi, Masayuki Yamato, Izumi Koizuka, Yuichiro Yaguchi

緒言

聴覚器は主に音の入り口である外耳、音の振動を伝える鼓膜や耳小骨が存在する中耳、そして音を受容する内耳に分別される。中でも外耳道における疾患は日常診療でしばしば遭遇する。特に我々が着目した後天性外耳道閉鎖症は感染や外傷、手術などによって外耳道に線維性閉鎖が生じる疾患で、外耳道軟骨部または外耳道入口部が閉鎖の好発部位として知られている。その代表的な症状は慢性的な耳漏と高度伝音難聴であり、患者の著しいQOL低下をきたす。本疾患の治療としては手術が主に選択されるが、術後の外耳道の再閉鎖の頻度は非常に高く未だに確立された手術法はない。点耳薬やステロイドの局所投与も満足のいく治療成績が得られていないのが現状である。しかし、これまでに外耳道閉鎖症に対する治療成績の向上を目的とした動物実験は報告されてはいない。今回、我々はこの疾患に対する新し

い治療方法の可能性として、温度応答性培養基材を用いて作成した自己由来口腔粘膜上皮細胞シート移植が外耳道皮膚剥離後の創傷治療に効果があるかについて家兎外耳道皮膚剥離モデルを用いて検討した。

方法・対象

家兎 5 羽において、頬粘膜(5 mm×5 mm)を採取し、ディスパーゼ処理をおこない、上皮組織をトリプシン処理で分散させて 10×10^4 cells/cm² の播種密度で温度応答性培養基材に播種した。培養開始1週間後、同一家兎の両側外耳道皮膚を内視鏡下で全周性に耳科手術で用いられるメスで剥離した。剥離範囲は外耳道骨-軟骨移行部より外耳道入口部方向へ 6 mm の部位とした。外耳道皮膚を剥離した後、片側には低温処理して回収した自己由来口腔粘膜上皮細胞シートを内視鏡下で剥離部位に移植し、移植群とした。もう片側は外耳道皮膚の剥離のみを行いコントロール群とした。また、家兎 4 羽に対しては両側外耳道皮膚を剥離した後、片側に臨床において創部処置に用いられるポリグリコール酸 (polyglycolic acid: PGA) シートにて創部を被覆し、PGA 群とした。対側は同様に外耳道皮膚の剥離のみを行い、こちらもコントロール群とした。さらに、家兎6羽に対して両側外耳道皮膚を同様に剥離のみを行い、両側ともコントロール群に加えた。以上移植群(n=5)、PGA 群(n=3)、コントロール群(n=21)に対して、内視鏡を用いて処置後1週、2週、4週後の外耳道を観察し、内視鏡で鼓膜を観察できない場合を外耳道閉鎖とした。全例において処置後4週間で犠牲死させ、外耳道を矢状断に切開し、HE染色、免疫組織化学染色で評価をした。移植群、PGA群、コントロール群における外耳道皮膚の厚みを計測し、それらに対応のあるt検定を用いて統計解析した。p<0.05を有意差ありとした。さらにCTスキャンによる外耳道の形態評価を行った。

なお、本研究は東京女子医科大学動物実験委員会(承認 AE18-57号)の承認を得たものである。

結果

移植群 5 例においては 1 例のみ処置後 1 週間で外耳道閉鎖は確認されず、他 4 例においても処置後 2 週目より外耳道閉鎖は認められなかった。移植群全 5 例において処置後 4 週間で外耳道が再閉鎖することはなく、正常の外耳道所見が認められた。一方コントロール群では 21 例中 20 例で処置後 1 週の時点で外耳道閉鎖がみられ、4 週まで外耳道閉鎖が自然治癒することはなかった。PGA 群 3 例では、1 週目の時点で全例に外耳道閉鎖を認め、コントロール群と同様に 4 週まで自然治癒は認められなかった。4 週目における組織学的評価では、細胞シート移植群において HE 染色で正常の外耳道皮膚と同様の組織学的所見を認めた。PGA 群、コントロール群では外耳道の肉芽増殖による閉鎖を認めた。さらに各群においてパンサイトケラチンによる免疫染色を行い、パンサイトケラチン陽性細胞を認めたことから上皮細胞の存在が認められた。さらにビメンチンによる免疫染色を行い、ビメンチン陽性細胞を上皮組織と軟骨部の間に認め、間葉系細胞の存在が示された。このことから外耳道閉鎖が過剰に分泌された耳垢による外耳道の塞栓や、骨増生が原因ではないことが示された。また移植群、コントロール群における外耳道軟骨部から上皮組織までの厚みを組織学的に定量評価したところ、移植群において外耳道の肉芽増殖が有意に抑制されていた ($p=0.003$)。CT スキャンによる評価ではコントロール群での外耳道の閉鎖を 21 例中 20 例で確認でき、PGA 群も 3 例全例で閉鎖を認めた。一方、シート移植群では外耳道の閉鎖や狭窄は認められなかった。

考察

今回家兎を用いた外耳道閉鎖症モデルの作製に成功した。さらに細胞シートを作成し、外耳道に移植する動物実験は前例がなかった。今回、外耳道皮膚欠損部位に対して、早期に上皮が被覆することで、外耳道に形成される肉芽組織を抑制できると考えられる。しかしながら本研究では口腔粘膜由来の細胞シートが外耳道皮膚の再生にどのように寄与しているかは評価ができ

なかった。この点に関しては、口腔粘膜由来の細胞シートが移植後外耳道皮膚へ分化した可能性、細胞シートが 4 週間後も移植部に生着している可能性、もしくは外耳道皮膚剥離直後に細胞シートを移植することで感染を抑制した可能性が考えうる。移植した細胞シートがいつまで生着しているか、また細胞シートの肉芽組織の抑制機序について明らかにすることは今後の課題と考えられる。温度応答性培養基材を用いることで細胞のみを移植することができる本培養法は、後天性外耳道閉鎖症の再生医療に役立つ可能性が示唆された。

結論

本研究結果から外耳道皮膚剥離後に細胞シートを移植することで肉芽の増殖や炎症を抑制できることが明らかになった。今後、これまでは根治治療が困難であった外耳道閉鎖症に対して、低侵襲である内視鏡下での自家細胞シート移植が本疾患の新規治療法へと発展することが期待される。