

| | | | |
|--|--|-----|----------------|
| 京都大学 | 博士（ 医学 ） | 氏 名 | Pham Hieu Liem |
| 論文題目 | Autologous skin reconstruction by combining epidermis and acellular dermal matrix tissue derived from the skin of giant congenital melanocytic nevi (母斑組織由来表皮および脱細胞化真皮を用いた皮膚再生) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>【背景】 先天性巨大色素性母斑（GCMN）は長径 20cm 以上の巨大な色素性母斑と定義される。母斑に伴う醜形と母斑を母地とした悪性黒色腫の発生（10%程度）という二つの問題があり外科的切除が推奨されている。母斑細胞は表皮には含まれないが真皮全層に存在する。このため、母斑細胞を完全に切除するためには母斑の全層切除が必要である。しかし、母斑切除後に生じる全層皮膚欠損創の再建に利用可能な皮膚の採取がしばしば困難であり、採取できても皮膚採取部分に巨大な癒痕が残るという新たな問題も生じる。本研究は皮膚採取を行わない母斑治療の開発、すなわち切除した母斑自体から母斑細胞を含まない全層皮膚を作製し母斑切除部を再建する治療方法の確立を目的として行った。</p> <p>【方法】 研究に同意を得た患者より手術時に切除した母斑組織を用いて研究を行った。母斑を直径 8mm とし、代表的な化学的処理方法を用いて母斑の無細胞化を検討した。1N NaCl（高張食塩水）、0.05%trypsin、0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、PBS（リン酸緩衝食塩液）を用い母斑組織を各溶液で 37℃48 時間インキュベート後、PBS（4℃）で 14 日間洗浄した。母斑組織中の残存 DNA 量、組織活性（WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)アッセイ)、表皮基底膜及び血管に免疫染色を用い評価した。また、前もって母斑より酵素処理で分離した表皮と各群処理後の母斑真皮を気液界面培養し母斑細胞を含まない全層皮膚を作製した。この再生皮膚をヌードマウス皮下に移植、移植 14 日目に採取し生着を評価した。</p> <p>【結果・考察】 4 群共に 48 時間処理後に細胞活性は認めなかった。PBS 群以外では 48 時間処理時点で表皮が剥離したが、PBS 群では 14 日間の洗浄後も表皮が残存した。DNA 残存量は SDS 処理群のみで有意に減少した。表皮基底膜および真皮内血管構造はすべての群で保持されていた。表皮と処理母斑組織の培養では、PBS、NaCl、trypsin 処理群では表皮が不活化処理母斑に生着し、母斑細胞を含まない全層皮膚が作製された。しかし、SDS 処理群では表皮が接着せず全層皮膚は作製できなかった。</p> <p>ヌードマウスに 14 日間移植した再建皮膚は、PBS、NaCl、trypsin 処理群では、高い細胞活性を認め、表皮-真皮からなる全層皮膚構造が維持できた。しかし、SDS 処理群では表皮が生着せず細胞活性も低かった。以上の結果より、母斑組織を NaCl、trypsin 処理を行うと母斑細胞を含まない全層皮膚が再建できると考えられた。本法による母斑組織不活化方法は 48 時間という短時間での処理可能で臨床応用も可能であると考えられた。</p> <p>【結語】 本研究において、切除したヒト母斑組織から化学処理を行い細胞活性のない不活化皮膚の作製が可能であった。SDS ではほぼ完全な無細胞化真皮が得られたが表皮が生着しなかった。NaCl、trypsin 処理では DNA は完全には除去されないが細胞は不活化しており、母斑より分離した表皮を組み合わせることで母斑組織地自体から母斑細胞</p> | | | |

| |
|--|
| <p>が除去された全層皮膚を作製できた。本方法による皮膚再建は、切除した母斑そのものを用いて切除部位を再建する方法であり、巨大色素性母斑の画期的な治療法になり得ると考えられる。</p> <p>(論文審査の結果の要旨) 本研究は切除した母斑から細胞を含まない真皮組織を作製し、表皮シートと組み合わせることで病変のない皮膚を再構築する可能性を追求することを目的として行われた。 切除した母斑組織を脱細胞化するために1N NaCl, 0.05%trypsin, 0.1%SDS, PBSの各溶液で37℃48時間インキュベート後、PBS（4℃）で14日間洗浄した。各処理後、肉眼的、組織学的観察、残存DNA量、組織活性(WST-8アッセイ)の測定を行った。PBS処理群では表皮が残ったが、他の群では表皮は剥離した。4群共に細胞活性は認めなかったが免疫組織学的観察では基底膜、真皮内血管構造は保持されていた。DNA残存量はSDS処理群のみ減少した。 次に分離した表皮と処理後の母斑真皮を5日間気液界面培養し、再構成全層皮膚を作製した後、これをヌードマウス皮下に移植し14日後評価した。SDS処理群では表皮は生着せず、再構成全層皮膚は作製できなかったが、その他の処理群では、表皮の生着と移植後の高い細胞活性を認めた。 以上の結果より、切除した母斑組織にNaClやtrypsinによる化学処理を行うことで細胞活性のない不活化真皮が作製でき、これに表皮シートと組み合わせた再構成皮膚による母斑切除後の全層皮膚欠損創の再建の可能性が示された。本法は巨大色素性母斑の新しい治療法になり得ると考えられる。 以上の研究は自家組織由来の足場材料を応用した皮膚再生方法の開発に貢献し、巨大色素性母斑の新しい治療法の発展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成26年3月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p> |
| 要旨公開可能日： 年 月 日 以降 |