

氏名	つじ やす み 辻 泰 美
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3111 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Incorporation of basic fibroblast growth factor into preconfluent cultured skin substitute to accelerate neovascularization and skin reconstruction after transplantation (コンフルエント前の培養皮膚へ線維芽細胞増殖因子を組みこむことは移植後の血管新生と皮膚の再構築を促進する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 地 良 樹 教 授 戸 口 田 淳 也 教 授 開 祐 司

論 文 内 容 の 要 旨

熱傷や外傷、腫瘍切除後などの全層皮膚欠損の再建には自家植皮が行われるが、広範囲欠損の場合、皮膚採取量に限界がある。これに対し20年以上前より培養表皮、培養皮膚(cultured skin substitutes, 以下CSS)が開発されている。しかし、真皮成分を含まない培養表皮は、真皮が残っていない全層皮膚欠損創には生着困難である。一方、表皮と真皮両方を持つCSSは作製に長期間要することや、移植後の血管新生と組織再構築に期間がかかり経過中感染が生じほとんど生着しないため、ほとんど臨床的使用されていない。これらの現状を打開し、臨床応用が可能なCSSを開発するため、細胞播種密度を減量しCSS作製期間短縮を図り、さらに移植後の生着促進を図るため、線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, 以下bFGF)を組み込んだCSSを作製した。

角化細胞と線維芽細胞はヒト皮膚サンプルから採取し、角化細胞は角化細胞用無血清培地を用い、線維芽細胞は10%ウシ胎児血清添加DMEM培地を用いて培養した。さらに足場としてポアサイズ及び架橋の異なる2種類のコラーゲンスポンジを準備した。真皮用コラーゲンスポンジは、人工真皮として臨床使用されているものと同じもので、化学架橋されており2~3週間で分解される。表皮用コラーゲンスポンジは、これよりポアサイズが小さく、熱架橋のみを施したもので、約1週間で速やかに分解され、表皮の重層化を妨げない。まず真皮用コラーゲンスポンジに線維芽細胞を播種し、10%ウシ胎児血清添加DMEM培地を用いて37°C、湿度95%、CO₂濃度5%にて約4時間インキュベーション後、表皮用コラーゲンスポンジを重ね、角化細胞を播種。角化細胞用無血清培地にて、一晚、上記と同条件にてインキュベーションしCSSを作製した。この時点では、足場としたコラーゲンスポンジに細胞が接着しているだけの状態である。bFGFは生物学的半減期が短いため、ゼラチン粒子に含浸することで徐放化し、移植前にCSSに組み込んだ。

移植実験にはSCIDマウスを用い、背部に全層皮膚欠損創を作製しCSSを移植した。まず、CSSの線維芽細胞播種密度を100×10³cells/cm²とし、従来の1,000×10³cells/cm²のCSSと比較した。角化細胞は以前に得られた最小必要密度である100×10³cells/cm²とした。移植4週間後、線維芽細胞を減量したCSSは重層化した表皮層をもち、従来のCSSと表皮および真皮の厚さに有意差がないことを確認した。免疫組織学検査では、抗ヒトサイトケラチンおよび抗ヒトラミン5抗体染色により、分化した表皮層および基底膜構築が明らかとなり、またこの表皮および基底膜がヒト由来細胞からなることが証明された。

次に線維芽細胞、角化細胞ともに100×10³cells/cm²播種したCSSをbFGF徐放群と非徐放群に分けて移植し2週間後に比較した。bFGF徐放群では、厚い表皮および真皮層が得られ、真皮内の細胞成分の増加も見られた。抗マウスαsmooth muscle actin抗体染色にて新生血管と思われる構築を確認し、bFGF徐放群ではその数の有意な増加がみられた。

線維芽細胞数を減量することでCSSの作製期間が短縮され、さらにこれに徐放化bFGFを組み込むことにより、移植したCSSが早期に生着し皮膚の再構築が促進された。コラーゲンスポンジもbFGFも本邦ではすでに臨床使用されている材

料であり、それらを組み合わせたこの方法を用いることで、今後の臨床応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

培養皮膚は作製に長期間必要なことや、生着率が低いことからほとんど臨床使用されていない。申請者らはこのような現状を打開し、広範囲熱傷等への臨床応用を可能にするため、線維芽細胞播種密度を減少し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を組み込んだ培養皮膚を開発した。

空隙の大きさと架橋の異なる 2 種のコラーゲンスポンジを準備した。ヒト皮膚から角化細胞と線維芽細胞を採取培養し、真皮スポンジに線維芽細胞を播種、4 時間後、表皮スポンジを重ね、角化細胞を播種し培養皮膚を作製した。角化細胞播種密度はこれまでの研究で得られた最小必要密度の $100 \times 10^3 \text{cells/cm}^2$ とし、線維芽細胞播種密度を $100 \times 10^3 \text{cells/cm}^2$ と $1,000 \times 10^3 \text{cells/cm}^2$ の 2 群に分けた。SCID マウス背部全層皮膚欠損創に培養皮膚を移植し 4 週間後、両群の表皮と真皮の厚さに有意差がなく、抗ヒトサイトケラチンおよび抗ヒトラミニン 5 抗体染色により、表皮層の分化および基底膜構築を明らかとした。

次に線維芽細胞、角化細胞ともに $100 \times 10^3 \text{cells/cm}^2$ 播種した培養皮膚を bFGF 徐放群と非徐放群に分けて移植し 2 週間後比較した。bFGF 徐放群では、厚い表皮および真皮層が得られ、抗マウス α smooth muscle actin 抗体染色にて新生血管様構築数の増加がみられた。

線維芽細胞数の減量で培養皮膚の作製期間が短縮され、さらにこれに bFGF を徐放化することにより、移植した培養皮膚が早期に生着し皮膚の再構築が促進された。

以上の研究は、培養皮膚の臨床応用の可能性を示しており、今後の治療法進歩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19年2月28日実施の論文内容とそれに関する試問を受け合格と認められたものである。