

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	神野 千鶴
論文題目	Inactivation of Human Nevus Tissue Using High Hydrostatic Pressure for Autologous Skin Reconstruction: A Novel Treatment for Giant Congenital Melanocytic Nev (高圧処理による母斑組織不活化および再移植：巨大色素性母斑の新規治療)		
【背景】			
<p>巨大色素性母斑は悪性黒色腫発症のリスクがあり、早期の外科的切除が推奨されているが、病変部面積が広くなるほど機能性、整容性を満たした再建は難しくなるため、皮膚の再生治療が望まれる。自家培養表皮は 1980 年代より臨床使用されているが、自家培養表皮を生着させるためには真皮を残すか再構築する必要がある。真皮下層を残して母斑上層の組織を剝削する手技(キュレティング)は、母斑が残存するため悪性黒色腫発症予防にはならない。一方、真皮の再構築には同種皮膚あるいは人工真皮が用いられるが、本邦における自家培養表皮の使用後調査の結果ではこれら二者のどちらを用いても培養表皮の生着率は不良であった。したがって自家培養表皮を用いて皮膚再生を行う場合、自家真皮の再生が望まれる。</p> <p>高圧処理は物理的に組織内の細胞を不活化（死滅処理）する方法である。高圧処理を用いれば、組織のマトリックスに損傷を与えず組織内に存在する細胞を短時間で均一に不活化でき、薬品を用いる方法に比べ安全性が高いと考えられる。本研究では通常は切除後廃棄される母斑組織から細胞を不活化処理した真皮を母斑切除部位の皮膚全層欠損創の真皮再生に用いる方法を考案し、高圧処理で母斑組織内の細胞が完全に不活化される条件、組織構造の確認、および培養表皮が生着する条件を検討した。</p>			
【方法】			
<p>母斑組織をコントロール群及び 10 分間の加圧処理群（100、200、500、1,000MPa）に分けた。不活化評価として、加圧直後の WST-8 活性(4-[3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-[4-nitrophenyl]-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt assay)を測定した。さらに、14 日間培養後の細胞遊走性および組織 WST-8 活性を評価した。また、加圧組織をヌードマウス皮下へ移植、6 か月埋入後のヒト細胞残存の有無を抗ヒトビメンチン免疫染色で評価した。次に、200、500、1000MPa 群の加圧組織に培養表皮を移植後、ヌードマウス皮下に 2 週間埋入し、培養表皮の生着を HE 染色で確認した。また、加圧母斑組織の状態を、コラーゲンタイプ IV、サイトケラチン 14、インボルクリン染色で評価した。</p>			
【結果・考察】			
<p>200MPa 以上の処理群で処理直後の WST-8 活性が消失した。培養後も 200MPa 以上の処理群で細胞が遊走せず、組織 WST-8 活性もなかった。6 か月埋入組織では、コントロール群、100MPa 群ではヒト細胞が残存したが、200MPa 以上の処理群ではヒト細胞の残存はなかった。培養表皮 200MPa 及び 500MPa 群で生着、1000MPa 群では生着しなかった。表皮基底膜（コラーゲンタイプⅣ免疫染色）、真皮コラーゲンは 1000MPa 群でも明らかな変性は認められなかった。以上より、200MPa～500MPa の高圧処理で母斑内の細胞は完全に不活化され、培養表皮が生着することが示された。</p>			
【結語】			
<p>10 分間 200MPa～500MPa の高圧処理で母斑組織内の細胞が不活化され、培養表皮が生着した。通常は廃棄される母斑組織を高圧処理後再移植し、培養表皮を併用する方法は、培養表皮作製のための小皮膚採取以外は健常皮膚に犠牲が生じない新しい巨大母斑根治療法になりうると思われた。</p>			

(論文審査の結果の要旨) 巨大色素性母斑は悪性黒色腫発症のリスクがあり、早期の外科的切除が推奨されているが、病変面積が広くなるほど機能性、整容性を満たした再建は難しくなるため、新規治療法の開発が望まれる。本研究では通常は切除後廃棄される母斑組織を高圧処理により細胞を死滅させ不活化して母斑切除部位の真皮再生に用いる方法を検討した。 母斑切除手術患者 7 名から得た母斑組織をコントロール群及び加圧処理群（100、200、500、1,000MPa）に分け、in vitro およびヌードマウス皮下移植の条件下で母斑組織内の細胞が完全に死滅し組織が不活化される条件および高圧による組織の変化を検討した。ついで培養表皮を不活化組織上に移植後ヌードマウス皮下に埋入し、培養表皮が生着する条件を検討した。 200MPa 以上の処理群では処理直後および 2 週間培養後も WST-8 活性が消失し、細胞遊走を認めず、6 か月埋入組織でもヒト細胞の残存はなかった。培養表皮は 200MPa、500MPa 群で生着、1000MPa 群では生着しなかった。表皮基底膜（コラーゲンタイプⅣ）、真皮コラーゲンは全群で明らかな変性は認められなかった。これらの結果、200MPa～500MPa の高圧処理により母斑組織は完全に不活化され、培養表皮は生着することが示された。 以上の研究は母斑組織の高圧処理による不活化および再移植による真皮組織再生の可能性を示唆し、巨大色素性母斑の新規治療法開発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 2 9 年 2 月 8 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			