

氏 名	金 炳 黙
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1685 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes (線維芽細胞と表皮細胞の同時培養による短期間での培養人工皮膚の作製と移植) (主査)
論文調査委員	教 授 宮 地 良 樹 教 授 清 水 慶 彦 教 授 西 村 善 彦

論 文 内 容 の 要 旨

広範囲熱傷、外傷や手術後の広範囲皮膚欠損に対しては皮膚移植が必要になるが、採皮部の制限と皮膚採取後の採皮部の醜形が問題になる。自家植皮に替わるものとして1975年Rheinwaldらは表皮細胞の培養方法を開発した。その後、培養表皮は広範囲熱傷の治療に用いられているが、真皮成分を全く含まないため、3度熱傷など深い皮膚欠損に対する生着性に難があり、直ちに臨床応用に結びつかなかった。しかし、1981年にはBellらは線維芽細胞をコラーゲングルの中で培養し、その上に表皮細胞を播種して培養する皮膚モデルを発表し、つづいて1988年Boyceらは上面を膜状にしたコラーゲンスポンジ内で線維芽細胞を培養し、その上面で表皮細胞を培養する方法を報告した。しかし、これらの方法では作製に日数を要するほか、表皮細胞への栄養供給に難がある。今回、ポアサイズおよび架橋の異なる2層のコラーゲンスポンジに線維芽細胞と表皮細胞をほぼ同時に播種する新しい方法を開発し、ヌードマウスに移植して生着性を検討した。

〔一方法〕

(1) コラーゲンスポンジの作成

(a) 真皮部スポンジ：3 mg/mlのtype 1 コラーゲン溶液を-40℃で凍結乾燥し、熱架橋、グルタルアルデヒド架橋を加えた後、再び凍結乾燥してポアサイズ90 μm、厚さ2 mmのコラーゲンスポンジを得た。

(b) 表皮部スポンジ：3 mg/mlのtype 1 コラーゲン溶液を-135℃で凍結した後凍結乾燥し、熱架橋のみを加え、ポアサイズ15 μm、厚さ1 mmのコラーゲンスポンジを得た。

(2) 培養人工皮膚の作成

真皮部スポンジ上に1.5mlのMEM+10%FCSに懸濁した線維芽細胞を播種し、2～3時間後にこの上に表皮部スポンジを重ね0.2mlのKGMに懸濁した表皮細胞を播種し、DMEM+5%FBSにて3日間気液界面培養した。

(3) 移植実験

56匹のヌードマウスの背部にpanniculus carnosus上で、直径12mmの全層皮膚欠損部を作成した後、線維芽細胞、表皮細胞播種後3日目の培養人工皮膚を移植した。移植後生着し、biopsyを行うまでマウスの皮膚欠損創が辺縁からのマウスの表皮細胞で表皮化するのを防ぐため、薄い透明なポリウレタンフィルムを移植片とマウスの皮膚の間に挿入した。固定には接着剤の付いた一時的創傷被覆材にて固定し、さらにナイロン糸で縫合した。術後3日から4週間観察し、HE-stainにて生着の有無と真皮層、表皮層の組織像を調べた。

〔結果〕

(1) 培養人工皮膚：気液界面培養3日目には表皮スポンジは消失する一方、表皮細胞は重層化しはじめた。5日目には表皮細胞は10層前後に増殖し、免疫組織化学染色でも正常皮膚とほぼ同様の分化が認められた。また、線維芽細胞は真皮スポンジの中で3次元方向に伸展していた。

(2) 移植実験：培養人工皮膚は56匹中、43匹が生着した。移植1週間後の組織所見では一部表皮突起の形成が認められた。4週間後にははっきりした基底層が形成され、真皮コラーゲンスポンジもほとんど消失し真皮組織に置き換わっていた。

〔結論〕ポアサイズ15 μ mの化学架橋を加えていない表皮コラーゲンスポンジをポアサイズ90 μ mの真皮コラーゲンスポンジと組み合わせることによって線維芽細胞と表皮細胞をほとんど同時に播種することが可能になり、培養人工皮膚作製期間が短縮された。この培養人工皮膚はマウスへの移植に成功し、広範囲皮膚欠損の症例や重傷熱傷症例の治療に役に立つものと期待される。

論文審査の結果の要旨

体表面を広く被覆するための代替皮膚は、真皮相当部と表皮部をあわせ持つ複合培養皮膚として開発報告されているが、表皮細胞ターノーバーに限界があること、作製に相当の日数を要することから確立した臨床材料として完成していない。そこで、作製日数を短縮したヒト表皮細胞から成る複合培養皮膚を開発し、その皮膚をヌードマウスに移植して生着後の細胞動態を検討した。

分解の遅い真皮部コラーゲンスポンジと、分解が早くポアサイズ15 μ mの薄い表皮部コラーゲンスポンジを準備し、先ずヒト線維芽細胞懸濁液を前者に播種したのち後者を重ね、その上へヒト表皮細胞懸濁液を播種し、DMEM+5%FBSにて3日間気液界面培養した。表皮細胞は3日間でおおよそ10層となり、免疫組織化学染色でも正常皮膚とほぼ同様の分化であることを確かめた。

次に、56匹のヌードマウスの背部に全層に亘る皮膚欠損創を作製し、培養3日目の上記複合培養皮膚を移植し、経時的に形態観察と免疫染色によるヌードマウス皮膚内でのヒト表皮細胞層の変化を観察した。その結果、移植した複合培養ヒト表皮細胞は生着し、5日目には基底膜成分が免疫蛍光抗体法で染色され、4週間後には基底層が形成されたことが観察された。

以上の研究は、複合培養皮膚の作製日数の大幅な短縮を可能にし、移植培養表皮細胞の長期生存を確認した。

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11年3月2日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。