

20000422

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

凍結同種皮膚を用いた皮膚の再生の研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 島崎 修次

平成13(2001)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

凍結同種皮膚を用いた皮膚の再生の研究	1
杏林大学救急医学教室 島崎修次	

II. 分担研究報告書

1. 同種皮膚の採取と保存に関する研究	6
杏林大学救急医学教室 田中秀治	
2. ADM 作成に関する研究	8
杏林大学形成外科学教室 高見佳宏	
3. 複合培養皮膚の作成	10
東海大学救急医学教室 猪口貞樹	
4. 同種皮膚の採取と保存に関する研究	11
防衛医科大学校救急部 岡田芳明	
5. 同種皮膚の採取と保存に関する研究	12
日本医科大学救急医学教室 山本保博	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

主任研究者 島崎修次 杏林大学救急医学教授

研究課題： 凍結保存同種皮膚を用いた皮膚の再生の研究

課題番号： H12-再生-009

研究要旨： 屍体から採取され凍結保存された同種皮膚は Burn index40-70 の重症熱傷患者の救命率を 30%から 68%にまで向上させることができる。しかし、救命上、有効とされている同種皮膚も表皮部分に強い抗原提示細胞を有し、早い場合移植後 2~3 週間遅くとも 2-3 ヶ月で拒絶反応が生じ、同種植皮の永久生着による創被覆は望めない。本研究は凍結保存同種皮膚を物理的、化学的処理によって無細胞化し拒絶反応の起こらない無細胞真皮マトリックスを開発し、培養皮膚と組み合わせたハイブリッド型人工皮膚の作成を行うことを目的とした。本年度は 1) 無細胞真皮マトリックス (ADM) のソースとなる同種死体皮膚の確保、2) 臨床使用可能な培養皮膚シートの作成。そして 1) から得られた皮膚を 3) 無細胞真皮マトリックス (ADM) 化して 5 例の患者に臨床使用を行い、良好な成果をあげた

A. 研究目的

凍結保存同種皮膚は、広範囲熱傷の救命的焼痂切除後の創被覆に使用されており、東京スキンバンクネットワークでは、過去 5 年間に於いて熱傷指数 60-70 の重症熱傷患者の範囲で凍結保存同種皮膚を使用することで救命率を 30%から 68%にまで向上させることができた。しかし、この様に臨床で最も有効とされている同種皮膚も表皮部分に強く抗原提示細胞を有し、早い場合移植後 2~3 週間拒絶反応が生じ月単位では生着による創の被覆が困難である。拒絶の原因は基底細胞層にあるランゲルハンス細胞が抗原性を提示し血管内血栓化による表皮層の虚血にある。ヒト組織中、皮膚上皮と腸管上皮は最も抗原性が高いことが知られ、現時点では免疫抑制剤を用いても、心臓移植や腎臓移植のような永久生着は望めない。

しかし重症熱傷患者の救命のためには同種皮膚をできるだけ長く生着させることが必要である。この目的で、我々は以前から同種皮膚拒絶反応の軽減化・遅延化をはかる方法を検討してきた。具体的には以下の 3 つが解決策として上げられる。

1. 細胞表面の変化：凍結・解凍をコントロールすることで細胞膜抗原性 (Class II 抗原など) の低下、抗原提示細胞の減少をはかる事。2. 細胞機能の変化：抗体導入とくに抗 CD4 抗体、抗 CAM 抗体を結合させた同種皮膚の作成や、免疫抑制性サイトカイン (IL10, IL16) を遺伝子導入した同種皮膚の開発、放射線処理による細胞不活性化した同種皮膚の開発を行う事。3. 細胞の除去：凍結保存同種皮膚を無細胞化することによって拒絶反応の起こらない無細胞真皮マトリックスを作成し、培養皮膚の母床とすること。特にこの無細胞真皮マトリックスには最近の培養技術を用いたケラチノサイトやサイトカイン、組織増殖因子 (EGF, FGF, VEGF, TGF β など) を組み込んだ完全生着型の凍結保存同種皮膚を作成することが可能である。

B. 研究方法

1) 研究へ参加している杏林大学臓器組織移植センターおよび日本医科大学スキンバンク、防衛医科大学スキンバンクでは本研究を行うために日本熱傷学会スキンバンク検討委員会が作成した「日本熱傷学会スキンバンクマニュアル」及び

「スキンバンクの運営設置基準」に基づき、皮膚組織を研究に利用することを文書によるインフォームドコンセントを行い、承諾書を取得し、皮膚の摘出を行った。

同時に東海大学および杏林大学臓器組織移植センターでは複合培養皮膚を開発した。ADM作成の為の凍結保存同種皮膚の物理的処理、化学的処理は杏林大学救急医学、臓器組織移植センターで行った。

又、サイトカイン組み込み型ADM、低抗原型の凍結保存同種皮膚の臨床評価を杏林大学、日本医科大学、防衛医科大学、の3施設ならびに東京スキンバンクネットワークの参加施設で多施設臨床評価として以下のスケジュールで研究を行ってきた。

【研究スケジュール】

2000年（1年目）

- ・同種死体皮膚の確保
- ・凍結保存同種皮膚の細胞表面の変抗原性を低下させるための新しい凍結・解凍方法、放射線処理の検討、またその安全性の確認。
- ・無細胞マトリックス（ADM）の臨床使用の確立
（物理的処理、化学的処理）

2001年（2年目）

- ・凍結保存同種皮膚への抗体導入、遺伝子導入した低抗原化
- ・複合培養皮膚の開発
- ・ADM及びサイトカイン組み込み型ADMの開発

2002年（3年目）

- ・低抗原型の凍結保存同種皮膚の臨床評価
- ・複合培養皮膚の多施設臨床評価

・サイトカイン組み込み型 ADM の多施設臨床評価

（倫理面への配慮）

倫理面は、「日本熱傷学会スキンバンクマニュアル」及び「スキンバンクの運営設置基準」を準拠し、組織提供時に研究用として転用する事を文書でご理解いただくと共に、ご遺体からの採皮、保存の段階は日本熱傷学会スキンバンクマニュアルを順守して行った。

C. 研究結果及び考察

本年度の成果は大きく分けて3つである。研究計画書に基づき本年度は1)同種死体皮膚の確保、2)臨床使用可能な培養皮膚シートの作成をおこなった。さらに1) 2)の研究を基礎として3)無細胞真皮マトリックス（ADM）の臨床使用を行った。

本研究は主任研究者島崎を中心に、主に凍結保存同種皮膚を用いた皮膚の再生の研究を行っているが、その骨子となるのが真皮マトリックス（ADM）の作成と培養上皮細胞シートの作成である。

無細胞真皮マトリックス（ADM）を作成するために使用する同種死体皮膚を採取しているのが、杏林大学田中秀治、防衛医科大学岡田芳明、日本医科大学の山本保博分担研究員であり、無細胞真皮マトリックス（ADM）の臨床使用の確立（物理的処理、化学的処理いずれも）を行っているのが杏林大学田中秀治分担研究員と同大学形成外科高見佳宏分担研究員である。一方、無細胞真皮マトリックス（ADM）のための培養表皮細胞や複合培養表皮を作成しているのが東海大学、猪口貞樹分担研究員である。

2000年の研究では、まず杏林大学、防衛医科大学、日本医科大学の3つの皮膚組織提供施設の倫理委員会に本研究のための同種死体皮膚を

得る旨の許可とその皮膚を研究に転用する許可を申請した。

さらに日本熱傷学会スキンバンク委員会で作成されたスキンバンクマニュアルやスキンバンクの運営設置基準ののっとり、インフォームドコンセント用紙が作成され、この新しい承諾用紙にて承諾いただいた方からのみ本研究に用いられる同種死体皮膚約20枚(10×7.5cm)の確保を行った。

この同種死体皮膚は杏林大学に集められ、細胞培養液で一時保存されたのちに酵素的に又は物理的処理により、無細胞真皮マトリックスを作成した。このようにして作成された、無細胞真皮マトリックスは杏林大学の重症熱傷患者5名の三度熱傷創面に貼付された。自家皮膚層の下に挿入されたADMは拒絶されることなく、3ヶ月以上の長期生着をすることが確認された。

併行して、東海大の猪口らは重症熱傷患者から摘出された皮膚から培養表皮細胞や複合培養表皮を作成することに成功した。この複合培養表皮はドナーとなった熱傷患者に15枚以上の培養皮膚として同種真皮マトリックスの上に貼付され長期に生着することが確認された。

以上のように本年度の研究目標である、同種死体皮膚の確保や種々の無細胞真皮マトリックスの作成、臨床使用については、初年度としては十分な臨床成績が上げられ、初年度研究スケジュールとしてはほぼ100%達成できたと思われる。

海外では、ヒト同種皮膚をリソースとした製品よりむしろ牛コラーゲンをリソースとした人工真皮がさかんに臨床利用されている(インテグラ人工真皮)。

また培養皮膚もまた米国では民間企業が作成、販売している(Apligraf, Dermagraft TCなど)。しかし、その双方を組み合わせたより生着性の高いハイブリッド型の皮膚の研究は現在もおこな

われていない。さらにインテグラ社の人工真皮は我が国では現在治験中であり、研究レベルでも培養上皮との組み合わせによっても一期的に生着する事は確認されていない。その理由は十分判明していないが、同種皮膚がもたらす生物学的な効果は未だ人工物では及ばないものであると考えられる。今後、培養皮膚の生着率を高めるためにも同種皮膚は必須の材料と考えられる。

本研究で目標とする一期的生着が可能な上皮-真皮マトリックスはやはりヒト同種皮膚リソースとティッシュエンジニアリングで安全性を高めて作成することが临床上極めて重要と考えられる。

次年度研究としては、無細胞真皮マトリックスの臨床導入を行い、多施設間での効果を検討する予定である。

併行して我々は凍結保存同種皮膚の細胞表面の変化を増強する新しい凍結と放射線処理による同種皮膚の作成について更に検討し、ADM作成方法のサブタイプとしていきたい。また、同種皮膚の根本的な問題である未知ウィルスに対する感染対策として種々のウィルスの不活性化をはかる研究を行うとともに、ウィルス感染をきたした皮膚の *in situ* PCRによるウィルス検査法の確立や不活化の確認など、今後の同種皮膚の安全性を高める意味でも重要な研究を行うことを計画している。

E. 結論

ヒト同種死体皮膚を用いた無細胞真皮マトリックスは、十分臨床使用に耐えうるものと考えられる。今後培養皮膚と組み合わせにより臨床導入する予定である。

F. 健康危険情報

とくに記載すべき情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中秀治：皮膚移植とスキンバンク。ドナー・脳死・臓器移植（単行本）。166-171, 2000
- 2) 田中秀治、高見佳宏：広範囲熱傷。
Emergency Nursing 24-33, 2000
- 3) 田中秀治：熱傷、化学損傷、電撃傷。
標準集中医療医学 344-378 2000.
- 4) 田中秀治、榊聖樹：皮膚欠損創の処置。救急医学 1462-1471 2000.
- 6) 田中秀治：被ばく事故による放射線皮膚障害と治療。JAMMRA 第8号5-9, 2000
- 7) 田中秀治：皮膚欠損創の処置。救急医学 1462-1471, 2000
- 8) 田中秀治：スキンバンクネットワークの現状。
形成外科 1103-1110, 2000
- 9) 島崎修次、田中秀治：スキンバンクの運営設置基準。日本熱傷学会会誌 286-294, 2000
- 10) 島崎修次、田中秀治：救急医学
Vol.24 No.13 2000
- 11) 榊聖樹、田中秀治、島崎修次：熱傷患者における微量元素（とくに亜鉛）の意義。
JJPEN(輸液栄養). 22巻 333-336. 2000
- 12) 高見佳宏、田中秀治、島崎修次：人工真皮と自家植皮の同時移植の試みと問題点。形成外科 21-26, 2001
- 13) Yoshihiro Takami, Hideharu Tanaka :
Characterization of an Acellular Allogenic Dermal Matrix and its Clinical Application.
日本熱傷学会機関誌 261-267, Vol.26 No.5 2000

2. 学会発表

- 1) 田中秀治、山口芳裕、和田貴子、榊聖樹、

- 島崎修次：放射線被爆事故による中性子線皮膚損傷の一例。日本臨床救急医学会総会。2000.4.27
- 2) 高見佳宏、田中秀治、尾郷賢、島崎修次：無細胞真皮マトリックスに対するコラーゲン架橋の効果。日本熱傷学会。2000.6.1
- 3) 田中秀治、山口芳裕、和田貴子、榊聖樹、島崎修次、猪口貞樹：高線量中性子被爆によって皮膚障害をきたした一例。日本熱傷学会。2000.6.1
- 4) 田中秀治、和田貴子、榊聖樹、高見佳宏、島崎修次：50%以上の広範囲熱傷患者に対する治療戦略。日本熱傷学会。2000.6.1
- 5) 和田貴子、田中秀治、榊聖樹、三島史郎、肥留川賢一、島崎修次：熱傷患者治療スタンダード化の試み。日本熱傷学会。2000.6.1
- 6) 新井聖一、田中秀治、和田貴子、榊聖樹、高見佳宏、島崎修次：INTEGRA™人工皮膚を用いた熱傷患者12例の検討。日本熱傷学会。2000.6.1
- 7) 武田多一、田中秀治、島崎修次、松田博青：酸素を使わない自家培養表皮移植法の臨床経験。日本熱傷学会。2000.6.1
- 8) 田中秀治：日本におけるSKIN BANKの現状と将来。日本熱傷学会信州地方会特別講演。2000.7.15
- 9) 田中秀治：熱傷治療におけるストラテジー、特に代謝と栄養管理。日本熱傷学会・学術集会。2000.12.15
- 10) Tanaka.H : Skin grafting. 国際シンポジウム「東海村における臨界事故」。2000.12.15
- 11) Shimazaki.S : TREATMENT OF SKIN INJURIES. 国際シンポジウム「東海村における臨界事故」。2000.12.15

12)H. Tanaka, MD, T. Tokunaga, MD, H. Matsuda, MD, S. Shimazaki, MD : High Dose Vitamin C Reduces Lung Damage after Inhalation Injury. American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

13)S. Sakaki, MD, H. Tanaka, MD, T. Wada, MD, Y. Takami, MD, T. Yukioka, MD,

14)H. Matsuda, MD, S. Shimazaki, MD: A Clinical Comparison Between Cryopreserved Allograft Skin and Artificial Skin Graft. American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

14)H. Goto, MD, H. Tanaka, MD, A. Murata, MD, T. Yukioka, MD, S. Shimazaki, MD : Cytokine Imbalance in Patients With Severe Thermal Injury. American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

15)S. Sakaki, MD, H. Tanaka, MD, T. Wada, MD, Y. Takami, MD, S. Shimazaki, MD : Clinical evaluation of intermingled application of artificial dermis(TERUDERMIS^R). American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
無細胞真皮マトリックスの作成についての特許申請を考慮中。

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

分担研究者 田中秀治 杏林大学救急医学客員教授

研究課題：同種皮膚の採取と保存、無細胞真皮マトリックスの作成

課題番号：H12-再生-009

研究要旨：近年、凍結同種皮膚は広範囲熱傷患者の救命率を改善することができるバイオリジカルドレッシングとして広く認識されている。しかし、早い場合移植後2～3週間遅くとも2-3ヶ月で拒絶反応が生じ永久生着による創の被覆が困難である。本研究班においては凍結保存同種皮膚を用いた皮膚の再生の研究のうち、同種皮膚の採取と保存および凍結保存同種皮膚を物理的、化学的処理によって無細胞化し拒絶反応の起こらない無細胞真皮マトリックスを開発することを目標とした。本年度は同種死体皮膚の確保ならびに無細胞真皮マトリックス（ADM）化して5例の患者に臨床使用を行い良好な成果をあげた。今後は、多施設における無細胞真皮マトリックスの臨床試験と無細胞真皮マトリックスのサブタイプ作成、ウイルス感染組織に対するIn situ PCRなどの安全性確率を検討する予定である。

分担研究者 田中秀治
杏林大学救急医学客員教授

A. 研究目的

研究用に使用できる凍結保存同種皮膚を確保し、並行して同種皮膚を物理的処理して無細胞化し拒絶反応の起こらない無細胞真皮マトリックスを作成すること。

B. 研究方法

1) 杏林大学臓器組織移植センターでは提供皮膚組織を研究に使用することを倫理委員会に提出し、本研究のための同種死体皮膚を得る旨の許可とその皮膚を研究に転用する許可を受けた。つぎにドナーが発生し、家族へインフォームドコンセントがなされたのちに皮膚の摘出を行った。この同種死体皮膚は杏林大学に集められ、細胞培養液で一時的に保存されたのちに物理的処理により、無細胞真皮マトリックスを作成した。

C. 研究結果

作成された無細胞真皮マトリックスは杏林大学の重症熱傷患者5名の三度熱傷創面に貼付された。自家皮膚層の下に挿入されたADMは拒絶され

ることなく、3ヶ月以上の長期生着をすることが確認された。

D. 考案

本研究で目標とする同種皮膚をベースとした真皮マトリックスはやはりヒト同種皮膚リソースとティッシュエンジニアリングで安全性を高め作成することが臨床上極めて重要と考えられる。次年度研究としては、多施設における無細胞真皮マトリックスの臨床試験と無細胞真皮マトリックスのサブタイプ作成、ウイルス感染組織に対するIn situ PCRなどの安全性確率を検討する予定である。

E. 結論

ヒト同種死体皮膚を家族の了解のもと無細胞真皮マトリックスを作成した。十分臨床使用に耐えるものと考えられる。今後培養皮膚と組み合わせにより臨床導入する予定である。

F. 研究発表

論文発表

- 1) 田中秀治：皮膚移植とスキンバンク。ドナー・脳死・臓器移植（単行本）。166-171, 2000
- 2) 田中秀治、高見佳宏：広範囲熱傷。

Emergency Nursing 24-33, 2000

3)田中秀治、榊聖樹：皮膚欠損創の処置. 救急医学 1462-1471 2000.

4)田中秀治：スキンバンクネットワークの現状. 形成外科 1103-1110, 2000

5)島崎修次、田中秀治：スキンバンクの運営設置基準. 日本熱傷学会会誌 286-294, 2000

2. 学会発表

1)高見佳宏、田中秀治、尾郷賢、島崎修次：無細胞真皮マトリックスに対するコラーゲン架橋の効果. 日本熱傷学会. 2000.6.1

2)田中秀治、和田貴子、榊聖樹、高見佳宏、島崎修次：50%以上の広範囲熱傷患者に対する治療戦略. 日本熱傷学会. 2000.6.1

3)新井聖一、田中秀治、和田貴子、榊聖樹、高見佳宏、島崎修次：INTEGRA™人工皮膚を用いた熱傷患者12例の検討. 日本熱傷学会. 2000.6.1

4)田中秀治：日本におけるSKIN BANKの現状と将来. 日本熱傷学会信州地方会特別講演. 2000.7.15

5)H. Tanaka, MD, T. Tokunaga, MD, H. Matsuda, MD, S. Shimazaki, MD : High Dose Vitamin C Reduces Lung Damage after Inhalation Injury. American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

5)S. Sakaki, MD, H. Tanaka, MD, T. Wada, MD, Y. Takami, MD, T. Yukioka, MD,

6)H. Matsuda, MD, S. Shimazaki, MD : A Clinical Comparison Between Cryopreserved Allograft Skin and Artificial Skin Graft. American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

7)S. Sakaki, MD, H. Tanaka, MD, T. Wada, MD, Y. Takami, MD, S. Shimazaki, MD : Clinical evaluation of intermingled application of

artificial dermis(TERUDERMIS^R). American Burn Association 32nd Annual Meeting 2000.3.14-17

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

物理的無細胞真皮マトリックスの作成についての特許申請を考慮中。

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）

分担研究報告書

分担研究者 高見佳宏 杏林大学形成外科助教授

研究課題：無細胞真皮マトリックスの作成に関する研究

課題番号：H12-再生-009

研究要旨：凍結同種皮膚から細胞成分を除去した無細胞真皮マトリックスは、同時皮膚移植可能な代用真皮であり、皮膚全層欠損創の治療に有用であることが示された。

分担研究者 高見佳宏

杏林大学形成外科助教授

A. 研究目的：皮膚全層欠損創に真皮成分を構築するために種々の代用真皮が開発されてきたが臨床的により信頼の高いものとなるためには、移植後のより速やかな血管新生と安定性が求められる。研究者は代用真皮の中で最も生理的な真皮マトリックス構造を有する同種真皮マトリックスを無細胞化し、その血管新生に与える影響について検討した。

B. 研究方法および C. 結果：(1) 無細胞真皮マトリックスの作成：ヒト同種皮膚をデイスパーゼとトリトンX100で処理して細胞成分を完全に除去した無細胞真皮マトリックス (Acellular Dermal Matrix: ADM) を作成した。作成したADMは完全に無細胞であったが、基底膜部分にIV型コラーゲンなどの基底膜構成成分が残存していた。

(2) 無細胞真皮マトリックスの基本的な移植特性：細菌学的試験および細胞毒性試験にてADMの安全性を確認した後、ADMをラット背部皮下に作成した開放創に移植した。その結果ADMは免疫学的に拒絶されることなく速やかに生着することを確認した。皮下閉鎖創に移植したADMの血管新生は乏しいものの長期間にわたって創部に残存する事が認められた。

(3) 種々の被覆方法による無細胞真皮マトリックスの血管新生の差異：ADMをラットの背部に作成した3個所の全層皮膚欠損創に移植し、その上を分層植皮、培養表皮シート、シリコンシートで被覆した。移植後5日目に

生検しADMの血管新生を組織学的に検討した。その結果、表皮シートでカバーしたADMにおいて最も豊富な血管新生が認められた。また培養表皮シートからIL8などの血管新生促進因子が分泌されることが示された。

(4) ADMの臨床応用：以上の結果からADMの血管新生は主にその被覆方法に影響される事が示され、現時点でのADMの最も効果的な利用方法は、自家植皮との同時移植であると考えられた。

この事から、ADMの臨床応用を試みた。杏林大学倫理委員会のガイドラインに従って、5例の重症熱傷例の創の一部にADMを移植し同時に自家分層植皮でカバーした。移植ADMは全て良好に生着し、真皮の鑄型として機能することが示された。

D. 考察および E. 結論：移植されたADMの血管新生は、生きた表皮成分で被覆される時に最も促進された。ADMと自家植皮の同時移植はこうしたADMの移植特性に合致した方法であり、臨床的にも信頼性の高い方法であると考えられた。本研究は今後ADMの臨床的有用性の検討を進める上での基盤となるものであると同時に、ADMを基質とした複合培養皮膚の開発に向けた基礎研究ともなるものと考えられた。

F. 健康危険情報：特記すべきこと無し。

G 研究発表

1 論文発表

1) Yoshihiro Takami, et al. : Characterization of an acellular dermal matrix and its clinical application. Japanese Journal of Burn Injuries,

26(5):261-267, 2000.

2) 高見佳宏、他：人工真皮と自家植皮の同時移植の試みと問題点. 形成外科, 44(1):21-26, 2001.

3) 高見佳宏、他：グルコシルセラミド合成阻害剤によるコラーゲンゲル収縮の抑制。ケロイド・肥厚性瘢痕研究会記録、メデイカルトリビューン社。P9-14, 2000.

2 学会発表

1) 高見佳宏、田中秀治、尾郷賢、島崎修次：無細胞真皮マトリックスに対するコラーゲン架橋の効果. 第26回日本熱傷学会総会. 東京, 平成12年6月2日.

2) 高見佳宏、田中秀治、Yao Min, Guo Jin-Ping, Zhao Xiao Yu, 島崎修次、尾郷賢：無細胞真皮マトリックスの皮下移植. 第9回日本形成外科学会基礎学術集会. 名古屋、平成12年10月6日.

H. 知的財産権の出願・登録状況：現在検討中である。

ヒト表皮細胞の安全な培養法に関する研究
分担研究者 猪口 貞樹 東海大学医学部助教授

研究要旨：少量の放射線照射血清とヒト線維芽細胞膜分画を用い、培地を最適化することによって、ヒト表皮細胞の大量増殖培養が可能であることが明らかになった。

分担研究者 猪口 貞樹
東海大学医学部
助教授

A. 研究目的

ヒト培養皮膚に実用化にあたっては、細胞培養に伴う潜在的な感染症の危険を出来る限り回避することが重要である、

ヒト表皮細胞の大量増殖培養法としては、無血清培養法と支持細胞・血清を用いた培養法の2者が知られている。無血清培養では、BSE 感染の可能性があるウシ下垂体抽出物や各種サイトカインを添加する必要があり、潜在的な感染症の危険を回避できない。一方、支持細胞を用いた共培養法では、支持細胞に同種または異種線維芽細胞を用いるため、これに由来する潜在的感染症伝播のリスクが存在する。そこで、より安全性の高いヒト表皮細胞培養法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) ヒト表皮細胞初代培養培地、増殖培地の最適化

ヒト線維芽細胞を破碎し、膜分画を精製、これを用いてヒト表皮細胞培養のための培地の最適化を行った。

2) 放射線照射血清の検討

15-25kgy 程度の放射線照射を施した血清を用いて、大量増殖培養法を検討した。

C. 研究結果

1) ヒト表皮細胞初代培養培地、増殖培地の最適化

血清濃度 2%、ヒト粗替えインスリン、EGF を添加し、それ以外にサイトカイン等蛋白成分を用いずに、ヒト表皮細胞の大量増殖培養が可能な培地を最適化した。また、培養当初の血清濃度を 20%にする以外、上記と同

等の条件でヒト表皮細胞の初代培養を行うための培地を最適化した。

2) 放射線照射血清の検討

放射線照射を施した血清を用いても、上記培養条件で大量増殖培養が可能であることを確認した。

D. 考案

本研究により、ヒト線維芽細胞膜分画と少量の放射線照射血清を用いることによって、ウシ下垂体抽出物や各種サイトカイン、支持細胞など潜在的感染症伝播の危険の高いものを用いずにヒト表皮細胞の大量増殖培養を行うことが可能となった。

今後ヒト線維芽細胞膜分画の放射線照射、熱処理等による、微生物の不活性化法について検討中を行う予定である。これが完了すれば、格段に安全なヒト表皮細胞培養が行えるものと考えられ、臨床応用の適応範囲が格段に広がるものと考えている。

E. 結論

ヒト線維芽細胞膜分画と少量の放射線照射血清を用いることによって、ヒト表皮細胞の大量増殖培養を行うことが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

本年度はなし

H. 知的財産権の出願登録情報

本年度はなし

分担研究報告書

分担研究者 岡田芳明 防衛医科大学校教授・救急部長

研究課題：凍結保存同種皮膚を用いた皮膚の再生に関する研究

課題番号：H12-再生-009

研究要旨：近年我々が行ってきた同種皮膚移植は重症熱傷患者の救命率を向上させてきた。しかし、この同種皮膚も表皮部分に強い抗原提示細胞を有し、通常では移植後2～3週間で拒絶反応のため脱落し、永久生着は期待できない。そこで、保存同種皮膚を物理的・化学的処理によって無細胞化した拒絶反応の起こらない無細胞真皮マトリックスを開発し、培養皮膚と組み合わせたハイブリッド型人工皮膚を作成することを本研究の目的とした。本年度は1)同種死体皮膚の確保、2)臨床使用可能な培養皮膚シートの作成、3)無細胞真皮マトリックス(ADM)の臨床使用を行い、班全体としては十分な成果をあげた。しかし、初年度防衛医科大学校に課された分担研究は同種死体皮膚の確保であったが、防衛医科大学校倫理委員会を通して研究の準備を整えるにとどまった。

A. 研究目的

広範囲熱傷患者の救命のために使用している凍結保存同種皮膚を、臨床上さらに有用な加工皮膚にすることを目的とする。

B. 研究方法

班全体で計画している3か年の研究スケジュールに則って、防衛医科大学校では本研究の分担研究を行うために、当校倫理委員会に同種死体皮膚を得る旨の許可とその皮膚を研究へ転用可能とするための許可申請を行った。その上で、研究に用いられる同種死体皮膚の確保を目指した。

(倫理面への配慮)

「日本熱傷学会スキンバンクマニュアル」及び「スキンバンクの運営設置基準」に準拠し、組織提供時に研究用として転用する事を文書で御遺族にご理解頂いた場合にのみ、御遺体からの採皮、保存を行う。

C. 研究結果と考察

防衛医科大学校倫理委員会の許可を平成13年2月13日に得たが、期間的な問題から研究のための皮膚確保はできなかった。

D. 結論

今後は、班全体の計画に従い、防衛医科大学校

において本研究の分担研究を積極的かつ確実に
行う必要がある。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 島崎修次、田中秀治、齋藤大蔵、他：スキンバンクの運営設置基準. 日本熱傷学会会誌 26, 286-294, 2000

2. 学会発表

1) 齋藤大蔵、岡田芳明、他：アログラフトの急性期の成績と長期経過. 第8回日本熱傷学会関東地方会. 2000.1.29
2) 齋藤大蔵、第1回スキンバンク抽出・保存講習会：スキンバンクドナーの適用とアセスメント. 第26回日本熱傷学会総会・学術集会. 2000.6.1-2

G. 知的所有権の出願・登録状況

(特許取得、実用新案登録、その他)
なし

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

分担研究者： 山本保博 日本医科大学高度救命救急センター、教授

研究課題： 同種皮膚の採取と保存に関する研究

課題番号： H12-再生-009

研究要旨：同種皮膚の採取と保存におけるシステムの改善および採取皮膚の生体活性を維持する最善策を明らかにするため諸外国における同種植皮の採取と保存システムの現状を把握し、日本のシステムに適合するように改善策を模索した。同種皮膚採取における問題としては、採取技術の均一化・採取技術者の人員確保が早急に望まれる課題であるが、今回遠隔地におけるドナー発生に対して、24時間輪番体制を確立し、人的不足を補うことが可能となった。今後、同種皮膚の採取と保存における組織化したネットワークの作成と設備の充実、人材の確保と教育が重要である。

分担研究者 山本保博 日本医科大学救急医学
教授

A. 研究目的

同種皮膚の採取と保存におけるシステムの改善および採取皮膚の生体活性を維持する最善策を明らかにする。

B. 研究方法

1. American Burn Association の Skin Bank Manual などの、諸外国における同種植皮の採取と保存システムの現状を把握し、日本のシステムに適合する改善策を模索する。

2. 遠隔地におけるドナー発生時における採皮チームの役割を、東京スキンバンクネットワークとの連携の立場から検討する。

3. 同種植皮の確保

C. 研究結果

1. 諸外国における同種皮膚の保存方法はそれぞれ異なる。現在、我が国においてスタンダードとしているスキンバンクマニュアルにおける保存方法は、諸外国のそれと比較して遜色のないものである。しかし専門施設の充実や専門技術者の育成、品質管理維持などの面においては多くの検討が必要である。

2. 今年度より遠隔地におけるドナー発生に対し

て、24時間輪番体制を確立し、人的不足を補うことが可能となった。

3. 同種植皮施行患者における植皮後の状態を長期調査するために情報ファイルの整備および外来におけるフォローアップを行った。

4. 日本熱傷学会スキンバンク委員会で作成させたスキンバンクマニュアルやスキンバンクの運営設置基準にのっとったかたちで、インフォームドコンセントされ、承諾された方からのみ本研究に用いられる同種死体皮膚約5枚（10×7.5 cm）の確保し杏林大学に搬送した。

D. 考察

日本の現状は、同種皮膚の採取と保存においては個人および一施設の努力に負うことが大きいのが現状である。このため今後、施設の充実、技術者の教育や環境整備を行うことが重要と考える。また同種皮膚採取における問題としては、採取技術の均一化・採取技術者の人員確保が早急に望まれる課題である。同種皮膚の品質を向上させるために、採取時間の短縮やプログラムフリーザーなどの保存機器整備、感染症に対する厳格なチェックが必要であると考えます。

E. 結論

同種皮膚の採取と保存における組織化したネットワークの作成と設備の充実、人材の確保と教育が重要である。

文献

- 1) 島崎修次、田中秀治：スキンバンクの運営設置基準. 日本熱傷学会会誌 286-294, 2000

研究成果の刊行一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中秀治	皮膚移植とスキンバンク	トナー・脳死・臓器移植	株式会社 メディックス	東京	2000	166-171

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
田中秀治	被爆事故による放射線皮膚障害と治療	JAMMRE放射線事故医療研究会報	8号	5-9.	2000
田中秀治、高見佳宏他	広範囲熱傷	エマージェンシー・ナース(メイバ出版)	13巻13号	24-33	2000
田中秀治、榊聖樹	皮膚欠損創の処置	救急医学(へるす出版)	24巻10号	1462-1471	2000
Yoshihiro Takami, Hideharu Tanaka, Syuji Shimazaki.	Characterization of Acellular Allogenic Dermal Matrix and its Clinical Application	Japanese Journal of Burn Injuries	25巻5号	261-267	2001
高見佳宏、田中秀治、和田貴子、島崎修次、尾郷賢	人工真皮と自家植皮の同時移植の試みと問題点	形成外科	44巻1号	21-26	2001
島崎修次、田中秀治、川井真、斉藤大蔵他	スキンバンクの運営設置基準	日本熱傷学会誌	26巻5号	286-294	2000

20000422

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.14の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。