

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告

主任研究者 黒柳 能光

平成14年（2002）年 4月

目 次

I 総括研究報告

細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究

黒柳能光

II 分担研究報告

細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究

熊谷憲夫

III 研究成果の刊行に関する一覧表

IV 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）研究報告書
細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究
主任研究者 黒柳能光 北里大学人工皮膚研究開発センター教授

研究要旨：同種培養真皮の性能は線維芽細胞の産生するサイトカインや細胞外マトリックスが重要であるが、それと同様に線維芽細胞の足場となるマトリックス自身の創傷治癒能力が重要である。国産初の製品開発を目指して、13年度から全国規模の臨床研究を展開した。18の大学病院と4つの総合病院において倫理委員会の承認をえて臨床研究を行った。熱傷や難治性皮膚潰瘍などを対象として87症例中80症例において優れた結果が得られた。

分担研究者 熊谷憲夫
聖マリアンナ医科大学形成外科教授

A. 研究目的

本研究は、同種（他家）培養真皮の臨床研究を展開してきた黒柳研究班と自家培養表皮の臨床研究を展開してきた熊谷研究班のこれまでの技術的な実績を基盤として新しい治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

同種培養真皮はアテロコラーゲンとヒアルロン酸から成る2層構造のスポンジ状シートに線維芽細胞を播種して培養する方法により製造する。北里大学人工皮膚研究開発センターでは、他の医療機関から輸送されたウイルス検査陰性の皮膚小片から線維芽細胞を採取し、大量培養して同種培養真皮を製造し、これを一時的に -152°C で冷凍保存し、当該医療機関に冷凍状態で供給するシステムを確立している。自家培養表皮および自家分層皮膚移植のための移植床形成や難治性皮膚潰瘍治療などを対象として同種培養真皮の性能評価を行う。なおHIV, HBV, HCV, HTLV について陰性であることを確認した。

C. 研究結果

聖マリアンナ医科大学形成外科から送られた皮膚小片から線維芽細胞を採取して、大量培養しマスターセルとして液体窒素中で保存した。マスターセルの一部を解凍し大量培養して同種培養真皮を製造し超低温フリーザ内に凍結保存した。順次、全国の

共同研究機関に冷凍状態で輸送して臨床研究を展開した。同種培養真皮は、解凍して臨床使用する。適切な解凍条件下では解凍後も血管内皮成長因子（VEGF）を産生することを基礎研究において確認した。

D. 考察

熱傷や難治性皮膚潰瘍などを対象にして87症例に同種培養真皮を適用して80例において「有用」あるいは「極めて有用」の結果が得られた。早期の新生組織の形成は同種培養真皮から産生されるVEGFが大きく影響していることが示唆される。

E. 結論

細胞を利用する手法に関しては、その多くが公知であり、焦点となるのは細胞の足場となるマトリックスの特性と製法である。コラーゲンやヒアルロン酸は、創傷治癒を促進する生体材料であり本研究で開発した同種培養真皮は、材料自身の創傷治癒促進効果と線維芽細胞が産生するVEGFなどのサイトカインによる創傷治癒促進効果が相乗的に発揮される優れた生物学的創傷被覆材として期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuroyanagi et al: Tissue-engineered product; Allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. Artificial Organs 25 (3) :180-186,2001.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請

黒柳能光：組織再生用基材、移植用材料及びそれらの製法 特許願提出 12, 2000

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）研究報告書
細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究
分担研究者 熊谷憲夫 聖マリアンナ医科大学形成外科教授

研究要旨：同種培養真皮の最も大きな特徴はその真皮内に培養された線維芽細胞が持続的に血管内皮成長因子などの各種成長因子やサイトカインを放出出来ることにある。これによって、創部周囲からの血管新生を促し従来と比較にならない良好な肉芽増生を可能とし、当教室において確立した培養表皮の移植効率を上げ、創傷の早期治癒が望める可能性を有している。そこで、北里大学で開発した同種培養真皮を利用した培養表皮移植を試み、その有用性を評価した。

A. 研究目的

当研究班が長年臨床研究を展開してきた自家培養表皮移植術の移植効率の向上を目的とし、創傷の早期治癒を実現するための新規治療法の確立を、北里大学黒柳研究班と目指す。

B. 研究方法

同種培養真皮は北里大学人工皮膚研究開発センターで作成されたものを、聖マリアンナ医科大学に於いて-152℃で保存し、用時解凍し用いた。自家培養表皮は、患者から得られた皮膚の小片を定法に従って培養し、平均約2週間で臨床に供せられるだけの培養表皮を得ることが出来た。なお本研究は聖マリアンナ医科大学倫理委員会承認のもと、患者ならびに患者家族に十分な説明と同意を得た上で同種培養真皮と自家ならびに同種培養表皮移植術を実施した。

C. 研究結果

北里大学人工皮膚研究開発センターよりドライアイス梱包され搬送された同種培養真皮は、聖マリアンナ医科大学形成外科研究室に於いて-152℃に使用時まで保存された。

足踵部の糖尿病性皮膚潰瘍および糖尿病性の熱傷潰瘍患者など11例に用時解凍、洗浄後患者創部への移植を行い、抗菌剤入り皮膚欠損用一時緊急被覆材を用いて同種培養真皮を保護しその後定法に従った創部保護と管理を行った。移植約7日後には良好な肉芽の増生が認められ、培養表皮移植が可能となり約1ヶ月で創は完全治癒した。同時に移植直前に解凍された同種培養真皮の一部を採取し、解凍直後の真皮内線維

芽細胞の生存性についてMTS法を用いて検討し、その生存も確認された。

D. 考察

糖尿病性の皮膚潰瘍は、従来良好な肉芽形成に難渋することが多く、これが創傷治癒遅延の原因と考えられている。今回この同種培養真皮を用いることで、良好な肉芽の増生が得られ、その後の創部管理を容易にした。また、創部環境が整うことで、炎症指標も好転し患者の全身状態が改善でき、同時に困難であった血糖コントロールをも可能とするという報告が糖尿病センターより得られた。以上から、同種培養真皮の有用性が推察される。

E. 結論

従来型の無細胞系の真皮マトリクス製材に比べ、同種培養真皮は創治癒期間の短縮を含め極めて有効と言える。これは、同種培養真皮の材料自身による創傷治癒促進効果と線維芽細胞から産生される血管内皮成長因子などのサイトカインによる創傷治癒促進効果の相乗効果と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

松崎恭一他：形成外科領域におき自家培養表皮の有用性について、形成外科 43:533-540,2000

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--------------------|---------------------------------|------------------|-------|-----------|------|
| 黒柳能光 | 厚生科学再生医療プロジェクト：同種培養真皮の開発 | 医学のあゆみ | 200 巻 | 247-251 | 2002 |
| 黒柳能光 | 再生医療の現状：培養皮膚代替物の開発現状 | Medicina | 39 巻 | 468-470 | 2002 |
| 中野敏明 黒柳能光 ほか | 同種培養真皮の適応が奏功した難治性皮膚潰瘍の1例 | 皮膚の科学 | 1 巻 | 91-96 | 2002 |
| 黒柳能光 | 厚生科学研究再生医療ミレニアムプロジェクト：同種培養真皮の開発 | 治療 | 83 巻 | 3064-3065 | 2001 |
| 黒柳能光 | 再生組織工学による皮膚の再建：培養皮膚代替物の開発現状 | 生体材料 | 19 巻 | 166-176 | 2001 |
| 黒柳能光 | 皮膚の再建を可能にする Tissue Engineering | 遺伝子医学 | 5 巻 | 594-598 | 2001 |
| 黒柳能光 | 組織工学を応用した最初の製品：培養皮膚代替物 | 最新医学 | 56 巻 | 2707-2712 | 2001 |
| 黒柳能光 | 再生組織工学を応用したバイオ人工皮膚の開発 | 分子心血管病 | 2 巻 | 79-85 | 2001 |
| 高柳健二、 熊谷憲夫 | 再生医療の実際と展望；移植臓器 vs 細胞移植（皮膚再生） | 総合臨床 | 50 巻 | 104-109 | 2001 |
| 黒柳能光 | 培養皮膚開発の現状と展望 | 形成外科 | 43 巻 | 571-580 | 2000 |
| 黒柳能光 | 創傷治癒と再生医療 | バイオサイエンスとインダストリー | 58 巻 | 22-25 | 2000 |
| 高柳健二、 熊谷憲夫 | 再生医学と生命科学；再生医療、皮膚 | 蛋白質核酸酵素 | 45 巻 | 2283-2288 | 2000 |
| 松崎恭一、 熊谷憲夫 | 形成外科領域における自家培養表皮の有用性について | 形成外科 | 43 巻 | 533-540 | 2000 |
| 長瀬健彦、 熊谷憲夫 | 培養表皮移植による熱傷治療 | 形成外科 | 43 巻 | 1091-1096 | 2000 |

| | | | | | |
|---|---|-------------------|------|---------|------|
| Y.Kuroyanagi N.Yamada R Yamashita E.Uchinuma | Tissue-engineered product;Allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts | Artificial Organs | 25 卷 | 180-186 | 2001 |
|---|---|-------------------|------|---------|------|

200104783

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。