

厚生労働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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 島崎 修次

平成 15 (2003) 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、無細胞真皮マトリックスの作成         | 7  |
| 杏林大学救急医学教室 田中秀治                      |    |
| 2. 無細胞真皮マトリックスの作成に関する研究              | 10 |
| 杏林大学形成外科学教室 高見佳宏                     |    |
| 3. ヒト複合型培養皮膚の安全な培養法に関する研究            | 13 |
| 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                  | 15 |
| 日本医科大学救急医学教室 山本保博                    |    |
| 5. 同種皮膚の採取と保存に関する研究                  | 17 |
| 防衛医科大学校救急部 岡田芳明<br>(資料) ドナーアセスメントシート |    |

|                     |    |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 19 |
|---------------------|----|

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

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：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臨床的に使用され、重症熱傷患者の救命率を著しく改善させることができるようになった。皮膚はヒト組織中、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。このため、われわれは以前から拒絶反応を極力軽減するために改良・加工した同種皮膚すなわち同種真皮マトリックス（以下 ADM と略）の開発を行ってきた。本年度は 1）同種死体皮膚の安定した確保の為の方策（山本分担研究者、岡田分担研究者）2）種々の方法による無細胞真皮マトリックス（ADM）の作成と臨床使用（高見、田中両分担研究員）3）安全かつ臨床使用可能な培養皮膚シートの作成と臨床使用（猪口分担研究者）を行った。開発した種々の培養皮膚は積極的に臨床導入され、いずれも良好な成績を確認できた。これらの技術の開発が、広範囲熱傷の救命率の改善に大きく貢献する事が明らかとなりつつある。

#### 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必須のものとして使用されている。現在活動している東京スキンバンクネットワークでは、過去 10 年間に於いて 300 例以上の重症熱傷例に同種皮膚を提供してきた。その結果熱傷指数 50-80 の重症熱傷患者において凍結保存同種皮膚を使用することで救命率を 50%以上まで向上させることができたことが報告されている。しかし、同種皮膚がこうした臨床的効果を有する一方で、同種皮膚の表皮部分には強い抗原性有し、移植後 2~3 週までには免疫学的拒絶反応が生じるため、長期的な創の被覆は困難である。ヒト組織中、皮膚や腸管などの上皮細胞は極めて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。しかるに重症熱傷患者の救命のためには最も生体親和性の高い同種皮膚をできるだけ長く生着させることが必要なのである。本研究は、広範囲熱傷患者の救命と皮膚の再生に欠かせない同種皮膚を確保するとともに、Tissue Engineering や細胞培養の技術を用いて同種皮膚を永久生着可能な被覆材へと改良する事を目的として行われた。

まず、田中、山本、岡田分担研究者は、同種皮膚をより多く採取するための方策や今後全国的にスキンバンクを拡大するための実効性のある方策を検討した。また、高見分担研究者は、現在最も現実的な ADM の臨床適応として以下の二方法、(1) 自家植皮と同時に無細胞のまま移植し、創部に真皮成分を付加することで、厚い植皮と同様の整容的および抗癒痕拘縮的效果を得ることおよび (2) Tissue Engineering Skin（複合型培養皮膚）の Scaffold として用い（同種皮膚の自家皮膚化）、培養皮膚移植の生着性と安定性を高めることについて検討した。猪口分担研究者は、自家複合培養皮膚の安全な作成方法を確立し、临床上でその効果を確認した。

#### B. 研究方法

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組織移植学会で作成された「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン」及び「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」、また日本熱傷学会の「スキンバンクマニュアル」「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についてインフォームドコンセントを行い、文書にて承諾書を取得し、皮膚の採取を行った。

高見分担研究者は、倫理委員会の許可の下、ADM作成の為、凍結保存同種皮膚を高張食塩水、トリプシンおよびトリトンX100による処理により完全に無細胞化したADMを作成した。作成したADMをそのまま、あるいは自家皮膚化し、その臨床的効果を検討した。

さらに田中分担研究者は、皮膚提供者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その一部を従来通り保存（但し凍結はせず）し、倫理委員会の許可の下、30 kGyのガンマ線照射によりGamma Allo Skin:GASを作成した。

また、猪口分担研究者は、安全性の高い複合型自家培養皮膚の作製方法を開発し、広範囲熱傷に対して臨床効果を確認した。

#### （倫理面への配慮）

倫理面は、日本組織移植学会倫理委員会編「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に対するガイドライン」や「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口頭ならびに文書でご理解いただいた。また、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以下の3つである。すなわち1) 同種死体皮膚の安定した確保の為の方策（山本分担研究者、岡田分担研究者）2) 無細胞真皮マトリックス（ADM）の作成と臨床使

用（高見、田中両分担研究者）3) 安全かつ臨床使用可能な培養皮膚シートの作成と臨床使用（猪口分担研究者）である。

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）の作成と複合型培養皮膚の開発である。

この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・確保しているのが、スキンバンクを有する（あるいは東京スキンバンクネットワークの中核施設である）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の各分担研究者であり、無細胞真皮マトリックス（ADM）の作成と臨床結果の検討を行っているのが杏林大学田中秀治分担研究者と同大学形成外科高見佳宏分担研究者である。一方、安全性の高い複合型自家培養皮膚を作成しているのは東海大学、猪口貞樹分担研究者である。

山本分担研究者は、昨年度、同種皮膚の採取と保存におけるシステムの改善を目的に関東近郊におけるドナー発生に対して採皮分担制を検討したが、今年度はこれを一歩進めて、全国を各北海道・東北・南東北・関東・甲信越・東海・中部・近畿・中国・四国・北九州・南九州のブロックごとに分け、スキンバンク参画医療機関を抽出、基幹医療機関とした。これらの基幹医療機関から抽出医師を派遣する全国型のネットワーク作りの基礎を検討した。

山本研究者は、皮膚提供の際に抽出医師やスタッフを教育するために、日本熱傷学会や日本組織移植学会と連携し、スキンバンク講習会あるいは組織移植コーディネーター講習会を開催し、100人近くのスキンバンク抽出医師に養成とコーディネーターの育成に成功した。

この結果、昨年の21例の提供事例のうち、18例でこのブロック担当制を導入し、計25人の新

規採皮手技経験医師を育成することが可能となった。

今まで、日本のスキンバンクの現状は、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った。このため今後は全国的なネットワークの構築と施設の充実、技術者の教育や環境整備を行うことが本研究を通じて可能となった。今回のブロック分坦制を全国に導入することで、講習会を受講した医師や組織採取経験医師らの指導下に新たに皮膚組織採取を経験する医師を増加させ、多施設でスキンバンクに対応できる医師を増やすことが可能となった。今後は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、我々は1人でも多くの採取技術を有する医師を育成する必要がある。その点でも、今回のブロック分坦制はクオリティを維持しつつ、経験者を増員できる方法として有用であると考えます。

次に、岡田分坦研究者は、同種皮膚採取時の工夫によって、少ないドナーから多くの皮膚の供給を行えるよう、採取法の再検討を行った。岡田分坦研究員らの検討は従来の後背面からの皮膚採取に加え体幹前面からの皮膚採取法を確立することである。患者家族に十分なインフォームドコンセントを行い、採皮面積を増やすことが可能となった。

平成14年に東京近郊で提供された21例の同種皮膚提供のうち、15例から体幹前面からの採皮の承諾を得た。これらのドナーからは平均73.7枚、合計1106枚の皮膚の採取を行う事が出来た。前年に比べ、ドナー数の低下に伴い、皮膚採取総枚数が減少したが、従来の平均採取枚数が33.4±14.1枚であったことを考えると、体幹前面からの採皮はドナーの少ない現在、効率的な方法であると言える。採取にかかる時間も平均して32

分延長するのみであり、コストも一部の消耗品を追加するだけで対応できた。ご家族の承諾を得られた症例では体幹からのみならず可能な限り、多くの部分からの皮膚採取を実行すべきと考える。

また、ドナーからの採皮の際にDONOR SUTABILITYを検討するために、ドナーアセスメントシートを考案し、提供患者の間診、医学的情報取得の強化、理学的所見の強化を図ったが、このドナーアセスメントシートを用いることにより、ドナー情報を詳細にかつシステムティックに集められること、またあわせて感染症とくにHIVのウィンドウピリオドや変異型CJDなど疾患の伝達を未然に防ぎうるものと思われた。

次に、これら採取された皮膚のうち、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にのっとり、本研究に承諾いただけた方からのみ研究への転用がなされた。研究転用の承諾は得られた同種死体皮膚は杏林大学に集められ、新しい創傷治療材となりうる種々の無細胞真皮マトリックス(ADM)に変換された。その内容は以下の如くである。

高見分坦研究者は、同種皮膚の永久生着を可能とするために、同種皮膚を構成する細胞と真皮マトリックスから細胞成分のみを全て除去した無細胞真皮マトリックス(ADM)を作成した。その作成法を詳細に検討した結果、同種皮膚を高張食塩水、トリプシンおよびトリトンX100によって処理することが最も効率的であることを確認した。

次いでADMの臨床応用を行った。臨床応用の適応として、自家植皮と同時に無細胞のまま移植し真皮成分を付加すること、およびTissue Engineering Skin(複合型培養皮膚)のScaffoldとして用いることとした。まず自家植皮と同時に無細胞のまま移植し真皮成分を付加する方法として、杏林大学倫理委員会のガイドラインに従っ

て、4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網状植皮でカバーした。移植ADMは全て良好に生着し、真皮の鑄型として機能した。付加された真皮は移植後少なくとも4週まで移植部に残存した。さらにADMにより、網状植皮の醜状癒痕が改善され、厚めの分層植皮に近似した外観が得られた。

一方Tissue Engineering Skin（複合型培養皮膚）のScaffoldとして用いる方法としては、ADMに培養細胞を組み込むことを試みた。すなわちADMに重症熱傷患者の残存皮膚から分離培養した自家表皮細胞と線維芽細胞を組み込み（同種皮膚の自家皮膚化）、数日間の気相培養によって表皮層を重層化させた。この培養皮膚を同患者の創部に移植し（約325cm<sup>2</sup>）、移植部の経時的変化を観察した。その結果、移植した培養皮膚の生着はADMを用いない従来の培養皮膚移植に比べ良好で、外観上も分層植皮に類似した皮膚層を形成することが認められた。以上の事からこれらのADMの臨床的適応が現実的な有効性を有するものと考えられた。

一方、田中分担研究員は、凍結保存同種皮膚を物理的（ガンマ線処理：30 k Gy）を用いて同種皮膚を無細胞化し、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た。今年度は、作成された無細胞真皮マトリックス（GAS）を実際に重症熱傷患者8例のⅢ°熱傷創面及び採皮創に貼付された。貼付された後GASは拒絶されることなく、1ヶ月または2ヶ月近く長期生着をすることが確認された。創面にはガンマ線の残存等、明らかな有害事象はなく、また感染の媒介も認めなかった。

また、30 k Gyのガンマ線照射後の皮膚にHCV,HBVは全く検出されず、また残存するFGF,VEGFなどの測定を行なったところ、2つの組織サイトカインの残存は極めてわずかであった。残余ガンマ線量については認めなかった。

また猪口分担研究者は安全性の高い複合型培養皮膚の作製方法の開発に成功し、34歳男性、92%BSA（うちⅢ度84%BSA）の致死熱傷に対して、熱傷創切除、同種皮膚移植を行い、さらに自家複合型培養皮膚を移植した。46病日から9回、総計11,700cm<sup>2</sup>の自家複合型培養皮膚移植を行った。生着率は当初70%程度と高く、60病日以降は低下し20%程度となった。軀幹の大半を被覆しえたが、266病日に肺炎のため死亡された。病理組織学的検討により、皮膚全層欠損創における皮膚再生が確認された。

安全性を高めた複合型培養皮膚も、従来のもの以上に、皮膚全層欠損創に生着することで失われた皮膚を再生できることが判明した。

## E. 結論

ヒト同種死体皮膚の効率的な採取法を開発し、効果的な地域スキンバンクネットワークを確立するとともに、そのネットワークを全国的に拡大するための試案を作成した。この試案を基に一部の地域では新たなスキンバンクネットワークの導入が始まった。

採取保存した同種皮膚のうち、研究転用のインフォームドコンセントが取得できたものは、新しい創傷治療材となりうる種々の無細胞真皮マトリックス（ADM）に変換された。その結果、自家植皮と同時に無細胞のまま移植し真皮成分を付加するADM、Tissue Engineering Skin（複合型培養皮膚）のScaffoldとして用いるADM（同種皮膚の自家皮膚化）、ガンマ線処理により拒絶反応を抑制したADMの3種を開発し、ともに臨床応用にてその有用性が確認された。

また臨床的により安全性の高い複合型自家培養皮膚を開発し、広範囲熱傷に対する臨床効果を確認した。

## 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) Shimizu S, Tanaka H, Sakaki S, Yukioka T, Matsuda H, Shimazaki S, Tjostlv Lund and Rolf K. Reed: Burn depth affects dermal interstitial fluid pressure, Freeradical production, and Serum histamine levels in rats. *J Trauma* 52:683-687, 2002.
- 2) 和田貴子、田中秀治、島崎修次：広範囲熱傷。救急集中治療 14：395-404, 2002.
- 3) 田中秀治：広範囲熱傷。Emergency nursing 2002 夏期増刊 179：155-171, 2002.
- 4) 島崎修次、北村惣一郎、有賀 徹、糸満盛憲、篠崎尚史、田中秀治、寺岡 慧、藤井千穂、町野翔：ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 1：35-44, 2002.
- 5) 北村惣一郎、島崎修次、糸満盛憲、太田宗男、塩野 茂、篠崎尚史、田中秀治、寺岡 慧、中谷武嗣、庭谷和夫：ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 45：59, 2002.
- 6) 和田貴子、島崎修次：スキンバンク。救急医学 第27巻第1号：79-82, 2003.
- 7) 和田貴子、鈴木智絵、青木大、今川理映子、渡辺さと子、田中秀治、島崎修次：2001年東日本組織移植ネットワークの現況と活動。日救急医会関東誌 23：102-104, 2003.
- 8) 田中秀治、島崎修次：同種皮膚移植の現状について。成人病と生活習慣病 33：87-91, 2003.
- 9) Min Yao, Xiong Zhang, Yoshihiro Takami et al: Identification, Isolation and

Sorting of Human Keratinocyte Stem Cells, WOUND REPAIR AND REGENERATION, Vol. 10, NO. 2, March/April 2002

- 10) Y. TAKAMI, M. ENOKI, Y. TANAKA et al: GENE EXPRESSION OF FIBROBLASTS DERIVED FROM HYPERRETROPHIC SCAR USING DNA CHIP ANALYSIS, WOUND REPAIR AND REGENERATION, Vol. 10, NO. 2, March/April

### 2. 学会発表

- 1) 島崎修次、他：同種皮膚を用いた皮膚再生プロジェクト。第1回日本再生医療学会総会、京都、平成14年4月18日-19日。
- 2) 田中秀治、島崎修次：熱傷治療におけるクリニカルパス。第5回日本臨床救急医学会総会、東京、平成14年4月25日-27日。
- 3) 後藤英昭、田中秀治、小泉健雄、今川理映子、鈴木智絵、青木 大、渡辺さと子、榊 聖樹、和田貴子、高見佳宏、島崎修次：Gannm a allo skin の作成とその使用経験。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日。
- 4) 榊 聖樹、田中秀治、後藤英昭、小泉健雄、福島秀起、和田貴子、高見佳宏、島崎修次：Digestive Decontamination の是非。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日, 2002.
- 5) 樋口良平、小林国男、野崎幹弘、島崎修次、山本保博、相川直樹、黒川 颯、前川和彦、菅又 章、岩瀬博之、井砂 司、濱邊祐一、桜井裕之：熱傷患者の死亡率と年齢について-17年間5548例における検討-。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日。
- 6) 田中秀治、榊 聖樹、和田貴子、島崎修次、

- 鈴木智絵, 今川理映子, 青木 大, 渡辺さと子: スキンバンクの臨床効果. 第28回日本熱傷学会総会・学術集会, 大阪, 平成14年6月6日-7日.
- 7) 高見佳宏<sup>1</sup>, 田中秀治, 和田貴子, 榎 美香<sup>2</sup>, 榊 聖樹, 後藤英昭, 小泉健雄, 尾郷 賢<sup>1</sup>, 島崎修次 (<sup>1</sup>杏林大・医・形成外科, <sup>2</sup>(株)BCS): 表皮細胞と線維芽細胞からなる混合培養細胞シートの創傷治癒における効果. 第28回日本熱傷学会総会・学術集会, 大阪, 平成14年6月6日-7日.
- 8) 和田貴子, 田中秀治, 鈴木智絵, 青木 大, 今川理映子, 渡辺さと子, 島崎修次: 2001年の東京スキンバンクネットワークの活動と今後の展望. 第28回日本熱傷学会総会・学術集会, 大阪, 平成14年6月6日-7日.
- 9) 田中秀治, 鈴木智絵, 青木 大, 今川理映子, 渡辺さと子, 高見佳宏<sup>1</sup>, 島崎修次 (<sup>1</sup>杏林大・医・形成外科): 凍結同種皮膚移植の臨床成績と長期の保存. 第23回日本炎症・再生医学学会, 東京, 平成14年7月2日-3日.
- 10) 渡辺さと子, 田中秀治, 和田貴子, 鈴木智絵, 青木 大, 今川理映子, 島崎修次: スキンバンクの普及啓発活動. 第1回日本組織移植学会・学術集会, 東京, 平成14年8月2日.
- 11) 島崎修次: 「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン」について. 第1回日本組織移植学会・学術集会, 東京, 平成14年8月2日.
- 12) 浅水智絵, 田中秀治, 和田貴子, 青木 大, 今川理映子, 渡辺さと子, 島崎修次: 2002年における東京スキンバンクネットワーク. 第11回日本熱傷医学会巻乙地方会, 東京, 平成15年2月22日.
- 13) 高見佳宏<sup>1</sup>, 田中秀治, 和田貴子, 山口 亮, 尾郷 賢, 島崎修次 (<sup>1</sup>杏林大・医・形成外科): 同種無細胞真皮マトリックスの適応とその特性. 第11回日本熱傷学会関東地方会, 東京, 平成15年2月22日.
- 14) 樋口良平, 小林国男, 野崎幹弘, 島崎修次, 山本保博, 相川直樹, 黒川 頤, 菅又 章, 岩瀬博之, 矢作直樹, 仲沢弘明, 濱邊祐一, 桜井裕之: 東京都熱傷救急連絡協議会のデータにおける scald burn と flame burn の比較検討. 第11回日本熱傷学会関東地方会, 東京, 平成15年2月22日.
- 15) Yoshihiro Takami: Acellular Dermal Matrix as a Clinically Acceptable Dermal Substitute. Memorial Lecture at Shanghai Second Medical University. Shanghai, China May, 2002.
- 16) 高見佳宏、他: 同種無細胞真皮マトリックスの適応とその特性. シンポジウム、熱傷治療における Skin Substitute 研究最前線. 第11回日本熱傷学会関東地方会、平成15年2月22日、東京.
- 17) 齋藤大蔵: 熱傷の超早期植皮は是か非か. 第30回日本救急医学会総会 ワークショップ、2002年10月9日-11日
- 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について以下のように特許出願済みである。  
平成14年9月20日、特願2002-276048  
皮膚の無細胞化方法、該方法による無細胞化真皮マトリックス及びその製造方法ならびに該マトリックスを用いた複合培養皮膚。



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（平成 14 年度）

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、真皮マトリックスの作成

課題番号：H12-再生-009

研究要旨：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の工夫および凍結保存同種皮膚を物理的（ガンマ線処理：30 k Gy）を用いて同種皮膚を無細胞化し、拒絶反応の起こらない真皮マトリックスを開発した。本年度は実際に臨床患者 8 例に使用し、良好な成果をあげた。今回は、細菌・ウイルスやプリオンなど感染組織に対する In situ PCR の実施、またガンマ線処理後の FGF, EGF 等の皮膚残余量を検討した。

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拒絶反応の起こらない真皮マトリックスを作成すること。

B. 研究方法

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本学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、家族ヘ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、細胞培養液で一時保存されたのちにその一部を従来通り保存（但し凍結はせず）し、30 k Gy のガンマ線照射により Gamma Allo Skin: GAS を作成した。

（倫理面の配慮）

杏林大学医の倫理委員会許可のもと、日本熱傷学会スキンバンクマニュアル、スキンバンク運営設置基準、日本組織移植学会により作成された「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン、及びヒト組織を利用する医

療行為の安全性の確保・保存・使用に関するガイドラインに準拠し、同種皮膚の研究応用の承諾を得た。

C. 研究結果

作成された真皮マトリックス（GAS）は杏林大学の重症熱傷患者 8 名の三度熱傷創面及び採皮創に貼付された。貼付された GAS は拒絶されることなく、1 ヶ月近く長期生着をすることが確認された。創面にはガンマ線の残存等、明らかな有害事象はなく、また感染の媒介も認めなかった。

また、30 k Gy のガンマ線照射後の皮膚については HCV, HBV は全く検出されず、また残存する FGF, VEGF などの測定を行なったところ、2 つの組織サイトカインの残存は極めてわずかであった。経皮的残余放射線については認めなかった。

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、生体親和性が極めて高いものの、その問題点は現在知りうる方法で検査して異常が認められなくても、将来的には感染を媒介する危険は（輸血程度）存在する。

今回我々の検討した方法では、この危険性を 100% 排除でき、安全性を高めた同種マトリックス（GAS）を作成することが可能となった。さら

に、この真皮マトリックスが、プリオンや細菌、ウイルス含有を全て死滅させる事が判明し、安全性の高い同種マトリックスの作成が可能となる事が判明した。

## E. 結論

ヒト同種死体皮膚を家族の了解の下、ガンマ線の処理による真皮マトリックスを作成した。本マトリックス (GAS) は安全でかつ十分臨床使用に耐えうるものと考えられる。今後さらなる安全性の確認を行う予定である。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1) Shimizu S, Tanaka H, Sakaki S, Yukioka T, Matsuda H, Shimazaki S, Tjostlv Lund and Rolf K. Reed: Burn depth affects dermal interstitial fluid pressure, Freeradical production, and Serum histamine levels in rats. *J Trauma* 52:683-687, 2002.
- 2) 和田貴子、田中秀治、島崎修次：広範囲熱傷。救急集中治療 14:395-404, 2002.
- 3) 島崎修次、北村惣一郎、有賀 徹、糸満盛憲、篠崎尚史、田中秀治、寺岡 慧、藤井千穂、町野朔：ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 1:35-44, 2002.
- 4) 北村惣一郎、島崎修次、糸満盛憲、太田宗男、塩野 茂、篠崎尚史、田中秀治、寺岡 慧、中谷武嗣、庭谷和夫：ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 45:59, 2002.
- 5) 和田貴子、島崎修次：スキンバンク。救急医学 2:79-82, 2003.
- 6) 和田貴子、鈴木智絵、青木大、今川理映子、渡

辺さと子、田中秀治、島崎修次：2001 年東日本組織移植ネットワークの現況と活動。日救急医学会関東誌 23:102-104, 2003.

- 7) 田中秀治、島崎修次：同種皮膚移植の現状について。成人病と生活習慣病 33:87-91, 2003.

### 学会発表

- 1) 田中秀治、島崎修次：熱傷治療におけるクリニカルパス。第5回日本臨床救急医学会総会、東京、平成14年4月25日-27日。
- 2) 後藤英昭、田中秀治、小泉健雄、今川理映子、鈴木智絵、青木 大、渡辺さと子、榊 聖樹、和田貴子、高見佳宏、島崎修次：Gannma allo skin の作成とその使用経験。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日。
- 3) 榊 聖樹、田中秀治、後藤英昭、小泉健雄、福島秀起、和田貴子、高見佳宏、島崎修次：Digestive Decontamination の是非。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日, 2002.
- 4) 田中秀治、榊 聖樹、和田貴子、島崎修次、鈴木智絵、今川理映子、青木 大、渡辺さと子：スキンバンクの臨床効果。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日。
- 5) 高見佳宏<sup>1</sup>、田中秀治、和田貴子、榊 美香<sup>2</sup>、榊 聖樹、後藤英昭、小泉健雄、尾郷 賢<sup>1</sup>、島崎修次 (<sup>1</sup>杏林大・医・形成外科, <sup>2</sup>(株)BCS)：表皮細胞と線維芽細胞からなる混合培養細胞シートの創傷治癒における効果。第28回日本熱傷学会総会・学術集会、大阪、平成14年6月6日-7日。
- 6) 和田貴子、田中秀治、鈴木智絵、青木 大、今川理映子、渡辺さと子、島崎修次：2001

年の東京スキンバンクネットワークの活動  
と今後の展望. 第28回日本熱傷学会総会・  
学術集会, 大阪, 平成14年6月6日-7日.

の特許申請を考慮中。

- 7) 田中秀治, 鈴木智絵, 青木 大, 今川理映子,  
渡辺さと子, 高見佳宏<sup>1</sup>, 島崎修次(杏林大・  
医・形成外科): 凍結同種皮膚移植の臨床成  
績と長期の保存. 第23回日本炎症・再生医  
学会, 東京, 平成14年7月2日-3日.
- 8) 渡辺さと子, 田中秀治, 和田貴子, 鈴木智絵,  
青木 大, 今川理映子, 島崎修次: スキンバ  
ンクの普及啓発活動. 第1回日本組織移植学  
会・学術集会, 東京, 平成14年8月2日.
- 9) 島崎修次, 田中秀治: 「ヒト組織を利用する  
医療行為の倫理的問題に関するガイドライ  
ン」について. 第1回日本組織移植学会・学  
術集会, 東京, 平成14年8月2日.
- 10) 浅水智絵, 田中秀治, 和田貴子, 青木 大,  
今川理映子, 渡辺さと子, 島崎修次: 200  
2年における東京スキンバンクネットワー  
ク. 第11回日本熱傷医学会巻乙地方会, 東  
京, 平成15年2月22日.
- 11) 高見佳宏<sup>1</sup>, 田中秀治, 和田貴子, 山口 亮,  
尾郷 賢, 島崎修次(杏林大・医・形成外  
科): 同種無細胞真皮マトリックスの適応と  
その特性. 第11回日本熱傷学会関東地方会,  
東京, 平成15年2月22日.
- 12) Zhiqun Long, Tanaka T: An Effort Towards  
the Commercialization of Cultured Skin  
Autograft in Japan, Tuesday, March 18, 2003

#### 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

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（平成14年度）

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を開発し、以下の二つの方法で臨床応用が可能であることを明らかにした。(1) 薄い植皮と同時に移植し、創面に真皮成分を付加することで厚い植皮と同様の効果を得ることが可能である。(2) Tissue Engineering Skin (複合型培養皮膚) の Scaffold として用い (同種皮膚の自家皮膚化)、培養皮膚移植の生着性と安定性を高めることが可能である。

分担研究者 高見佳宏  
杏林大学形成外科助教授

1. 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 (Acellular Dermal Matrix: ADM) を開発した。本年度はヒトゲノム・再生医療研究補助事業の最終年度であることから、これまでの研究を踏まえてその臨床応用に着手した。現在最も現実的なADMの臨床適応として以下の二方法につき検討した。(1) 自家植皮と同時に無細胞のまま移植し、創部に真皮成分を付加することで、厚い植皮と同様の整容的および抗癒痕拘縮的效果を得ることは可能か。

(2) Tissue Engineering Skin (複合型培養皮膚) の Scaffold として用い (同種皮膚の自家皮膚化)、培養皮膚移植の生着性と安定性を高めることは可能か。

2. 研究方法、3. 結果および考察：

研究の倫理面に対しては、杏林大学倫理委員会の許可のもと、日本熱傷学会のスキンバンク運営設置基準および日本組織移植学会のガイドラインに従った。

(1) 無細胞真皮マトリックス (ADM) の作成：  
凍結保存同種皮膚を高張食塩水およびトリプシンとトリトンX100による処理により完全に無細胞化したADMを作成した。

(2) ADMの臨床応用：

(2) - (1) 自家植皮と同時に無細胞のまま移植し真皮成分を付加する方法：杏林大学倫理委員会のガイドラインに従って、4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網状植皮でカバーした。移植ADMは全て良好に生着し、真皮の鑄型として機能した。付加された真皮は移植後少なくとも4週まで移植部に残存した。さらにADMにより、網状植皮の醜状癒痕が改善され、厚めの分層植皮に近似した外観が得られた。

(2) - (2) Tissue Engineering Skin (複合型培養皮膚) の Scaffold として用いる方法： これまでに種々の Tissue Engineering Skin (複合型培養皮膚) が開発されてきたが、移植後の安定した生着性は得られていない。こうした移植成績不良の原因のひとつに培養細胞を支える Scaffold の問題があると考えられている。本研究ではADMを Scaffold とした複合型培養皮膚を作成し、その臨床応用を検討した。

ADMに重症熱傷患者の皮膚から分離培養した自家表皮細胞と線維芽細胞を組み込み、数日間の気相培養によって表皮層を重層化させ

た。このことは、無細胞化された同種皮膚に自家細胞を組み込むことによって、同種皮膚の主要な細胞成分が自家の細胞で置換されたこと（同種皮膚の自家皮膚化）を意味している。こうして作成した自家培養皮膚を同患者の創部に移植し（約325cm<sup>2</sup>）、移植部の経時的变化を観察した。その結果、移植した培養皮膚の生着はADMを用いない従来の培養皮膚移植に比べて良好で、外観上も分層植皮に類似した皮膚層を形成することが認められた。

以上の事からADMの臨床的適応として以下の二点が考えられた。まず、ADMを薄い植皮と同時に移植し、創面に真皮成分を付加することで厚い植皮と同様の効果を得ることが可能であることが考えられた。またADMは、Tissue Engineering Skin（複合型培養皮膚）の Scaffoldとして用い（同種皮膚の自家皮膚化）、培養皮膚移植の生着性と安定性を高めることが可能であると考えられた。

#### 4. 評価：

- 1) 達成度：本研究によってADMの臨床応用への道が開かれたと考えられる。これは、ヒトゲノム・再生医療研究事業の一環として行った本研究の目的が達成されたことを意味している。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：本研究は、皮膚のTissue Engineeringと皮膚の再生医療を現実化する新しい一歩となるものと考えられた。特に同種皮膚の自家皮膚化の臨床的成功例は本研究以外には見られていない。本研究の要旨は、早速本年3月の日本再生医療学会で報告すると共に、今後国際学会や論文などで発表していく所存である。
- 3) 今後の展望について：

ADMの役割が、スキンバンクを基礎とした同種皮膚の新しい臨床的使用方法として確立していくものと考えられる。そのためにはADMの安全性を高め、複合型培養皮膚の質をさら

に高めていく必要があろう。

#### 5. 結論：

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を開発し、以下の二つの方法で臨床応用が可能であることが明らかとなった。(1) 薄い植皮と同時に移植し、創面に真皮成分を付加することで厚い植皮と同様の効果を得ることが可能である。(2) Tissue Engineering Skin（複合型培養皮膚）の Scaffoldとして用い（同種皮膚の自家皮膚化）、培養皮膚移植の生着性と安定性を高めることが可能である。

#### 6. 研究発表：

##### 1) 国内

|      |     |
|------|-----|
| 口頭発表 | 10件 |
| 原著論文 | なし  |
| それ以外 | 1件  |

##### 主なもの（学会発表）

1. 高見佳宏、他：表皮細胞と線維芽細胞からなる混合培養細胞シートの創傷治癒における効果。28回日本熱傷学会総会、平成14年6月6日、大阪。
2. 高見佳宏、他：同種無細胞真皮マトリックスの適応とその特性。シンポジウム、熱傷治療における Skin Substitute 研究最前線。第11回日本熱傷学会関東地方会、平成15年2月22日、東京。

##### 2) 海外：

|          |    |
|----------|----|
| 口頭発表（講演） | 1件 |
| 原著論文     | なし |
| その他（抄録）  | 1件 |

##### 主なもの（講演）

1. Yoshihiro Takami: Acellular Dermal Matrix as a Clinically Acceptable Dermal Substitute. Memorial Lecture at Shanghai Second Medical University, Shanghai, China

May, 2002.

7. 知的所有権の出願状況：

無細胞真皮マトリックスについて以下のように特許出願済みである。

平成 14 年 9 月 20 日、特願 2002-276048

皮膚の無細胞化方法、該方法による無細胞化真皮マトリックス及びその製造方法ならびに該マトリックスを用いた複合培養皮膚。

研究要旨：昨年度までに、より安全性の高い複合型培養皮膚の作製方法を開発し、本年度は従来の治療方法では救命不可能な重症熱傷への臨床応用を行った。46病日から9回、総計11,700cm<sup>2</sup>の自家複合型培養皮膚移植を行い、病理組織学的検討により、皮膚全層欠損創における皮膚再生が確認され、皮膚全層欠損創に生着して皮膚を再生できることが判明した。

分担研究者：所属施設 東海大学医学部

氏名 猪口 貞樹

### 1. 研究目的

昨年度までに、より安全性の高い複合型培養皮膚の作製方法（フィーダー細胞、ウシ下垂体抽出物などを使用せず、血清使用量を最小限度とした培養法）を開発し、動物実験にて良好な成績が得られた。本年度は従来の治療方法では救命不可能な重症熱傷への臨床応用を行った。

### 2. 研究方法

34歳男性、92%BSA（うちⅠⅠⅠ度84%BSA）の致死性熱傷に対して、熱傷創切除、同種皮膚移植を行い、さらに自家複合型培養皮膚を移植した。

（倫理面への配慮）

重症熱傷に対する自家複合型培養皮膚移植は、“東海大学医の倫理委員会”の承認を受けている。インフォームド・コンセントを得て実施した。

### 3. 研究結果及び考察

46病日から9回、総計11,700cm<sup>2</sup>の自家複合型培養皮膚移植を行った。生着率は当初70%程度と高く、60病日以降は低下し20%程度となった。軀幹の大半を被覆しえたが、266病日に肺炎のため死亡された。病理組織学的検討により、皮膚全層欠損創

における皮膚再生が確認された。

安全性の高い複合型培養皮膚も、従来のものと同様に、皮膚全層欠損創に生着して皮膚を再生できることが判明した。

### 4. 評価

#### 1) 達成度について

目的通りに達成された。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

皮膚全層欠損創に高い生着率を示す自家培養皮膚は国内外に存在せず、また本研究によって安全性が一層向上したことから、臨床的・社会的意義は極めて高い。

#### 3) 今後の展望について

さらに改良を行って複合型培養皮膚の生着率向上を図るとともに、重症熱傷の治療戦略を検討して、致死性重症熱傷の救命を目指す。また、知的所有権、研究発表にも重点を置く。

### 5. 結論

本研究は当初の計画通りに進行して良好な成果が得られている。さらに研究をすすめることによ

て、当初の目的は全て達成されるものと考えられる。

それ以外（レビュー等）の発表 0件

## 6. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表 2件

原著論文による発表 1件

それ以外（レビュー等）の発表 件

### 2) 海外

口頭発表 0件

原著論文による発表 1件

## 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

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（平成14年度）

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:昨年度我々は、関東近郊におけるドナー情報に対して、24時間対応型の輪番担当制を確立し、効果的な同種皮膚の採取を行うことを検討したが、本年は、基幹医療機関から摘出医師を派遣する全国型のネットワーク作りの基礎を検討した。今後スキンバンクが全国展開する上ではさらなる努力が必要であるが、組織化したネットワーク作りと人材教育の開発が本法で行うことが実証できた。

全国型のネットワーク作りの基礎を検討した。

A. 研究目的

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を参考とし、我が国独自のスキンバンクシステムが発展してきた。しかし、米国と異なり、OPO(organ procurement organization)などの臓器・組織の摘出・採取を専門とする組織は我が国には存在しない。従って、バンクがコーディネーションと保存作業の双方を担うことになる。当然、採取に関わる医師の増加が今後のシステム拡大のかぎとなっている。

我が国唯一の広域バンクである東京スキンバンクネットワーク（分担研究者らが事務局を担当）では、皮膚提供の際に摘出医師やスタッフを現場で育成する方法の1つとして、輪番担当制を導入してきた。同種皮膚の採取と保存におけるシステムの改善を検討し、全国展開可能な方法を模索する事を目的とし、研究を行った。

B. 研究方法

昨年度は、同種皮膚の採取と保存におけるシステムの改善を目的に関東近郊におけるドナー発生に対して採皮分担制を検討したが、今年度はこれを一歩進めて、全国を各北海道・東北・南東北・関東・甲信越・東海・中部・近畿・中国・四国・北九州・南九州のブロックごとに分け、スキンバンク参画医療機関を抽出、基幹医療機関とした。これらの基幹医療機関から摘出医師を派遣する

C. 研究結果

昨年 21 例の提供事例のうち、北海道と秋田県の 2 例で遠隔地での採皮が行われ、従来患者の組織提供の意思をかなえられなかった地域での採皮に成功した。このことは、今後全国で提供数が増加しても、スキンバンクが対応し、その結果、皮膚保存枚数も増え、熱傷患者への救命にも繋がると考えられる。

また、皮膚のクオリティに関しては、毎年行なわれている日本熱傷学会のスキンバンク講習会へ参加し、技術を学習し、習得した医師により採皮が行なわれた。

D. 考察

日本のスキンバンクの現状は、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った。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。

今回、東京スキンバンクネットワーク事務局より離れた遠隔地採皮制度を導入したことで、経験医師の指導下に新たに採皮を経験した医師を増やすことが可能となった。

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、学会における講習会が有効であり、今後我々は 1 人でも多くの摘出医師を育成す

る必要があると考えられる。

#### E. 結論

今後スキンバンクが全国展開する上ではさらなる努力が必要であるが、組織化したネットワーク作りと人材教育の開発が本法で行いうことが実証できた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

今年度は特になし。

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（平成 14 年度）

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：従来、同種皮膚のドネーションは関東地区において約 20 名程度であり、1 人から 30～40 枚（7.5×15 cm：約 100cm<sup>2</sup>）の皮膚の供給をうけており、年間計 600～800 枚の保存がなされていた。ドナー数がなかなか増加しない現在では、家族からの提供の承諾時に家族の許容する範囲で採皮する事が唯一の方法と考える。今回我々は従来の後背面に加え体幹前面からの皮膚採取法を確立し、少ないドナーから多くの皮膚の供給を行えるよう、採取法の再検討を行った。この結果、従来の倍近くの面積の皮膚の供給が可能となり、スキンバンクの保存枚数は約 1.8 倍に増加した。また、ドナーアセスメントシートを作成し、提供患者の問診強化や医療情報の取得を強化する事が可能となった。

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、少ないドナーからさらに効率よく採取する方法の確立を目的とする。また、ドナー評価について書式を作成し、提供患者の対応時に用い、問診の強化と医療情報の取得強化を図った。

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効率的確保を目指した。今回は、体幹前面からの追加採皮を行う事で効率よく皮膚採取ができるか検討した。ドナーからの採皮の際に DONOR SUTABILITY を検討するために、ドナーアセスメントシートを考案し、提供患者の問診、医学的情報取得の強化、理学的所見の強化を図った（表 1）。

（倫理面への配慮）

皮膚の採取には「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」に準拠し、御遺体からの採皮、保存を行っている。

また、日本組織移植学会「ヒト組織を利用する医療行為に関するガイドライン」に基づき、倫理面の配慮を行った。

C. 研究結果と考察

平成 14 年に東京近郊で提供された 21 例の同種皮膚提供のうち、15 例から体幹前面からの採皮の承諾を得た。これらのドナーからは平均 73.7 枚、合計 1106 枚の皮膚の採取を行う事が出来た。前年に比べ、ドナー数の低下に伴い、皮膚採取総枚数が減少したが、従来の平均採取枚数が 33.4 ±14.1 枚であったことを考えると、体幹前面からの採皮はドナーの少ない現在、効率的な方法であると言える。採取にかかる時間も平均して 32 分延長するのみであり、コストも一部の消耗品を追加するだけで対応できた。ご家族の承諾を得られた症例では体幹からのみならず可能な限り、多くの部分からの皮膚採取を実行すべきと考える。

また、ドナーアセスメントシートを用いることにより、ドナー情報を詳細にかつシステムティックに集められる。あわせて感染症とくに HIV のウィンドウピリオドや変異型 CJD など疾患の伝達を未然に防ぎうるものと思われた。

#### D. 結論

まだ少ないドナーからの効率のよい採取は、提供するもの、また提供をうけるもの双方に大きな効果を認めた。

#### 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

なし

##### 2. 学会発表

##### 1) 齋藤大蔵：熱傷の超早期植皮は是か非か。

第30回日本救急医学会総会 ワークショップ、

2002年10月9日-11日

#### 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