

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

総合研究報告書

平成12年度～14年度

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15年度～16年度

組織工学を応用した培養皮膚の
実用化に向けた研究

主任研究者 黒柳 能光

平成17年 4月 10日

○はじめに：人工皮膚（培養皮膚代替物）について	1～12
○平成13年度厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要	13～18
○平成14年度厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要	19～23
○平成15年度厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要	24～39
○平成16年度厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要	40～53
○厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクト研究論文一覧	54～56
○厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクト学会発表一覧	57～80
○再生医療ミレニアムプロジェクト多施設臨床研究概要	81～90
○再生医療ミレニアムプロジェクト多施設臨床研究代表症例	91～134
○平成12年度～16年度多施設臨床研究結果まとめ	135～138
○各施設臨床研究報告書まとめ	
1) 北海道大形成外科	139～143
2) 北海道大皮膚科	144～145
3) 秋田大皮膚科	146～153
4) 東京女子医大形成外科	154～162
5) 順天堂大皮膚科	163～168
6) 日本医大形成外科	169～175
7) 慶応義塾大形成外科	176～178
8) 聖マリアンナ医大形成外科	179～186
9) 横浜市立大形成外科	187～192
10) 横浜市立大皮膚科	193～195
11) 北里大形成外科	196～201
12) 北里大皮膚科	202～203
13) 名古屋大形成外科	204～208
14) 愛知医大形成外科	209～213
15) 金沢医大形成外科	214～219
16) 京都大皮膚科	220～225
17) 和歌山県立医大皮膚科	226～231
18) 近畿大形成外科	232～236
19) 大阪医大形成外科	237～243
20) 川崎医大形成外科	244～250
21) 岡山大皮膚科	251

22) 鳥取大皮膚科	252
23) 香川医大形成外科	253~254
24) 福岡大形成外科	255~261
25) 九州大皮膚科	262~274
26) 千葉県救急医療センター	275
27) 湘南鎌倉総合病院形成外科	276~277
28) 国立京都病院皮膚科	278~279
29) 香川県立中央病院形成外科	280~285
30) 北九州総合病院形成外科	286~287

○再生医療ミレニアムプロジェクト関連の主要論文

はじめに：人工皮膚（培養皮膚代替物）について

1 生体を最前線で守る皮膚の構造

新規の組織・臓器を作製するためには、本来の組織・臓器の構造と機能を理解し、これをもとにして材料設計することが重要である。構造的に単純化した見方をすると、皮膚は、表皮と真皮と皮下組織から構成されている。表皮と真皮との境界には特殊なタンパクや多糖類から構成された基底膜とよばれる部分が存在する。基底膜上の角化細胞（分裂能力をもつ表皮細胞）は分裂を繰り返し、形態を変えた細胞は上層へ押し上げられる。死滅した細胞は最上層に達して角質層とよばれるバリアーを形成する。すなわち、表皮は、基底層、有棘細胞層、顆粒層、透明層、角質層の5層からなり、角化細胞の分裂から角質層の脱落まで約1ヶ月かかる。もし、皮膚の最上層の細胞が生きていたら、外界からの細菌の攻撃に対処できない。生体の最前線で生体防御の役割を果たしているものは、生きた細胞層から死滅した細胞層へと移行する表皮である。表皮の下には真皮層とよばれる結合組織がある。真皮には、コラーゲンやグリコサミノグリカンを主成分とした結合組織の骨格成分が存在し、それに接着した状態で線維芽細胞が存在する。そして、線維芽細胞やその他の細胞に栄養分と酸素を供給するために血管網が形成されている。真皮層の下には脂肪細胞を含む皮下組織が存在する。

2 皮膚の再生

皮膚は、外的な要因によって損傷を受けたとき、速やかに創傷部位を閉鎖して組織の機能を回復しようとする「自然治癒力」を備えている。この創傷治癒の過程は、厳密には「再生」と「修復」に分類される。再生とは、失った組織や器官を完全にもとの状態に再現することである。例えば、日焼けして表皮が剥離しても完全に元の状態に復元する。また、口の中に軽度な熱傷をして粘膜が壊死しても完全に元の状態に復元する。このように、本来あった組織が全く元の状態に復元することを再生とよぶ。日焼けや口腔粘膜の軽度な熱傷は、上皮系細胞の増殖と分化により再生が可能となる。

一方、怪我をした後に傷跡が残る経験はよく知られている。この傷跡は瘢痕とよばれるもので、挫滅した組織が完全に元の状態に復元したものではない。

真皮層まで達する損傷を受けた場合には、線維芽細胞が結合組織の骨格成分であるコラーゲンを急速に産生する。しかし、これらの骨格成分の量と配列は、本来の結合組織と同一ではない。応急処置として急いで再建した結果、引きつったり盛り上がった状態が残る。このような瘢痕を伴った組織の再建を修復とよぶ。

3 人工皮膚（培養皮膚代替物）の種類

創傷治癒がどのように進むのか？ その謎を解き明かして、材料設計にフィードバックさせることにより優れた人工皮膚の開発が可能となる。組織工学（Tissue Engineering）の技術を用いて作製される「培養皮膚代替物」には、本人の細胞を使用したものと他人の細胞を使用したものがある。前者は、本人の細胞を使用しているため免疫拒絶反応を起こすことなく生着する。一方、後者は、免疫拒絶反応により徐々に他人由来の細胞は排除されるが、その間に、他人由来の細胞が産生する種々の細胞成長因子により肉芽組織形成と表皮形成が促進される。

角化細胞をフラスコ内で培養して表皮のシートを作製する技術が1979年に、Greenらにより発見された¹⁾。それ以来、細胞を使用した皮膚再生の研究が展開され再生医療の一翼を担う研究分野となった。特に、患者自身の角化細胞から作製した培養表皮の使用により広範囲重症熱傷患者の救命に成功したことが、研究展開に拍車をかけることになった。その後、真皮中に存在する線維芽細胞も研究対象となり、種々のタイプの培養皮膚代替物の研究開発が進められてきた。より厳密な分類として、角化細胞を利用したものを“培養表皮”、線維芽細胞を利用したものを“培養真皮”、角化細胞と線維芽細胞を利用したものを“培養皮膚”とよぶ（図1）。そして、患者自身の細胞を使用したものには“自家”を付け、他人の細胞を使用したものには“同種”を付ける。

3-1 自家培養表皮

Greenらにより開発された培養表皮は、マウス由来の線維芽細胞である3T3細胞を feeder layer（細胞支持層）として用いる培養系において、表皮から採取した角化細胞を急速に培養して薄いシート状に作製するものである¹⁾。この技術は、米国において20年前に企業化された。熱傷センターから輸送された広範囲重症熱傷患者の正常部分の小さな皮膚から3～4週間で自家培養表皮を調

製して患者に供給するシステムが整えられている。全層皮膚欠損創に移植された自家培養表皮は、生着しても真皮に相当する成分が存在しないため術後の皮膚再建が必ずしも満足できるものではないという指摘がある。

3-2 自家培養真皮

線維芽細胞は、角化細胞のように分化重層化して自発的にシート状になる特性をもたないため、適切な細胞の「足場」すなわちマトリックスを利用する必要がある。癬痕や巨大色素性母斑の治療として、患部を切除した創傷面に適切な真皮様組織（移植床）を形成し、この上に、患者自身の正常な部分から切除した薄い皮膚を移植する。この移植床の形成として、患者自身の線維芽細胞を適切なマトリックスに組み込んだ自家培養真皮が有効と考えられる。

3-3 自家培養皮膚

Hansbrough らにより開発された自家培養皮膚は、グリコサミノグリカンを少量含有したコラーゲンスポンジの下層面に線維芽細胞を播種し、上層面に角化細胞を播種して培養したものである 2)。

黒柳らの開発した自家培養皮膚は、貫通孔を有するコラーゲンのスポンジにコラーゲンのゲルを塗布したものをマトリックスとして、この下層面（前面）に線維芽細胞を播種し、上層面（後面）に角化細胞を播種したものある 3)。勿論、皮膚には、汗腺や皮脂腺や毛のうなどの付属器官があり、これらの付属器官の再建はできない。

3-4 同種培養表皮

Green らにより開発された技術を用いて、他人由来の角化細胞から作成された同種培養表皮は、細胞成長因子を産生放出するので生物学的な被覆材として試験的に臨床使用されている。

3-5 同種培養真皮

線維芽細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンなどの創傷治癒に重要な細胞外マトリックス（細胞と細胞の間に存在する物質）を産生する他に、血管新生を促進する細胞成長因子を産生放出する。そこで、マトリックスに線維芽細胞を組み込んだ同種培養真皮が注目され、創傷治癒促進を目的とした生物学的な

創傷被覆材として臨床応用されている。

既に2種類の同種培養真皮が米国で企業化されている。その一つは、生体吸収性の合成高分子からなるネット上に線維芽細胞を播種して培養したものである4)。他の一つは、シリコーン膜にナイロンネットを貼付した創傷被覆材のナイロンネット側に線維芽細胞を播種して培養したものである5)。黒柳らはヒアルロン酸とコラーゲンを使用して凍結真空乾燥法によりスポンジ状のシートを作製し、これをマトリックスとした同種培養真皮を開発した6,7)。現在、厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクトとして、多施設臨床研究を推進している。

3-6 同種培養皮膚

Bellらにより開発された同種培養真皮は、コラーゲンを溶解した培養液に線維芽細胞を浮遊させてゲル化させ、この上に角化細胞を播種して培養したものである8)。米国で企業化され難治性皮膚潰瘍の治療として使用されている9)。

4 北里大学人工皮膚研究開発センターで製造されている同種培養真皮

北里大学人工皮膚研究開発センターでは、10cm x 10cmサイズの同種培養真皮を年間2000枚製造することができる。

ウイルスに感染していないことを確認した患者から提供された皮膚小片を入手し、抗生物質/抗真菌剤で処理した後、コラゲナーゼ処理により線維芽細胞を採取し、これを継代培養してマスターセル(元になる細胞)とワーキングセル(製造に使用する細胞)を作成する。ウイルスに関する安全性を確保するため、ワーキングセルの一部を使用して陰性であることを確認する安全策をとっている。

同種培養真皮のマトリックスは、ヒアルロン酸とコラーゲンを原料として凍結真空乾燥法により作製する(図2)。同種培養真皮は、線維芽細胞をマトリックスに播種して培養する方法で製造する(図3)。同種培養真皮の凍結保存は、培養液を凍結保存液に交換した後、毎分マイナス1℃の速度で4℃から-60℃まで冷却して凍結させ、さらに-152℃の超低温フリーザー内で保存する。同種培養真皮の他施設への供給は、ドライアイスを入れた発泡スチロールの箱に納めて冷凍便で搬送する方法をとっている。同種培養真皮を他施設に搬送する前に、マイコプラズマ検査および生菌数検査を行い陰性であることを確認するシステムをとっている。同種培養真皮を受け取った施設は、-85℃

あるいは -152°C のフリーザー内で保存する。臨床使用する際には、 37°C で急速解凍した後、乳酸リンゲル液でリンスして凍結保存液を除去してから使用する。

同種培養真皮中の線維芽細胞は、VEGF（血管内皮成長因子）、bFGF（塩基性線維芽細胞成長因子）、HGF（肝細胞成長因子）などの血管新生を強力に促進するサイトカインを産生するため、創傷治癒を促進する効果を発現する。一方、マトリックスの素材であるヒアルロン酸分子は、細胞の移動を促進する効果を発現する。また、コラーゲン分子およびコラーゲン由来のポリペプチドは線維芽細胞に対して走化性因子（正常な部位から損傷部位へ細胞を呼び寄せる因子）としての働きもつ。それゆえ、線維芽細胞から産生されるサイトカインの創傷治癒促進効果とマトリックスを構成する生体材料自身の創傷治癒促進効果の相乗作用により、きわめて優れた治療効果が得られる（図4）。

平成12年度～16年度にかけて、厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクトとして、北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターで製造された同種培養真皮は全国の医療機関に搬送され多施設臨床研究が展開された。この間に、4700枚の同種培養真皮が医療機関に搬送され、重症熱傷ならびに難治性皮膚潰瘍などを対象として409症例の臨床研究が行われ、きわめて優れた結果が得られた。

代表例として熱傷を負った患者に同種培養真皮を適用した症例（図5）を示す。重症熱傷の場合、緊急性を要する。そのため、患者自身の皮膚を採取して線維芽細胞や角化細胞を単離して培養する時間的な余裕はない。また、高齢者の場合は、細胞の培養は容易ではない。このような場合、患者自身の皮膚をメッシュ状にして拡大し、その上に同種培養真皮を適用することにより、メッシュ間の細胞増殖を促進して表皮化を可能にできる。すなわち、フラスコの中で患者自身の細胞を培養する代わりに、患者の創傷面で細胞を培養するコンセプトである。

5 DDS としての同種培養真皮の設計

組織工学のキーワードは、「細胞」・「生体材料」・「細胞成長因子」である。上記多施設臨床研究に使用された同種培養真皮は、線維芽細胞を生体材料からなる足場に播種したものであり、線維芽細胞から種々の細胞成長因子が産生される設計である。まさに、3つのキーワードを巧みに組み合わせた組織工学製

品の代表例である。米国で企業化された同種培養真皮の1つは、生体内吸収性の合成高分子を足場とした製品である。生体内吸収性の縫合糸として使用されているグリコール酸と乳酸のコポリマーを足場として使用している。組織工学で使用される「足場」は、細胞の担体であり分解されて害のない材料であれば良いというコンセプトである。しかしながら、生体内で吸収されて害がないという特性のみでは不十分である。より優れた「足場」は、材料自身が創傷治癒を促進するものでなければならない。その意味で、創傷治癒過程において重要な働きをするヒアルロン酸とコラーゲンは、優れた「足場」の設計には必須材料である。

最近、遺伝子工学の手法を応用して幾つかの細胞成長因子が市販されるようになった。bFGFを創傷面に局所投与する治療法が普及しはじめた。また、bFGFを生体材料と組み合わせて徐放する手法も検討されている。しかしながら、創傷治癒は、1種類の細胞成長因子の局所投与では、十分な効果は期待できない。細胞成長因子を除法化することにより、一定期間有効濃度を保持できることはメリットであるが、創傷面は複数の細胞成長因子を必要としている。線維芽細胞をマトリックスに組み込んだ同種培養真皮は、創傷面の治癒過程に合わせて必要とされる複数の細胞成長因子を産生して放出することが可能である。もちろん、他人由来の線維芽細胞は、免疫学的に拒絶される。しかしながら、線維芽細胞の拒絶反応は低いため直ぐには拒絶されない。それゆえ、拒絶されるまでの期間に複数の細胞成長因子を産生して創傷面の治癒を促進することが可能である。このことが、1種類の細胞成長因子を応用することと、1種類の培養細胞を応用することの大きな相違点である（図6）。

文献

- 1) H.Green *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA , 76, 5665 (1979)
- 2) J.F.Hansbrough *et al.*, JAMA, 262. 2125 (1989)
- 3) Y.Kuroyanagi *et al.*, Ann Plast Surg, 31, 340 (1993)
- 4) G.D.Gentzkow *et al.*, Diabetes Care, 19, 350 (1996)
- 5) J.F.Hansbrough *et al.*, J.Burn Care Rehabil, 18, 43 (1997)
- 6) 黒柳能光ほか、日本熱傷学会誌, 29, No1, 28 (2003)
- 7) Y.Kuroyanagi *et al.*, Artif. Organs, 28, 13 (2004)
- 8) E.Bell *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 76, 1274 (1979)
- 9) G.Naughton, Sci Amer, 280, 84 (1999)

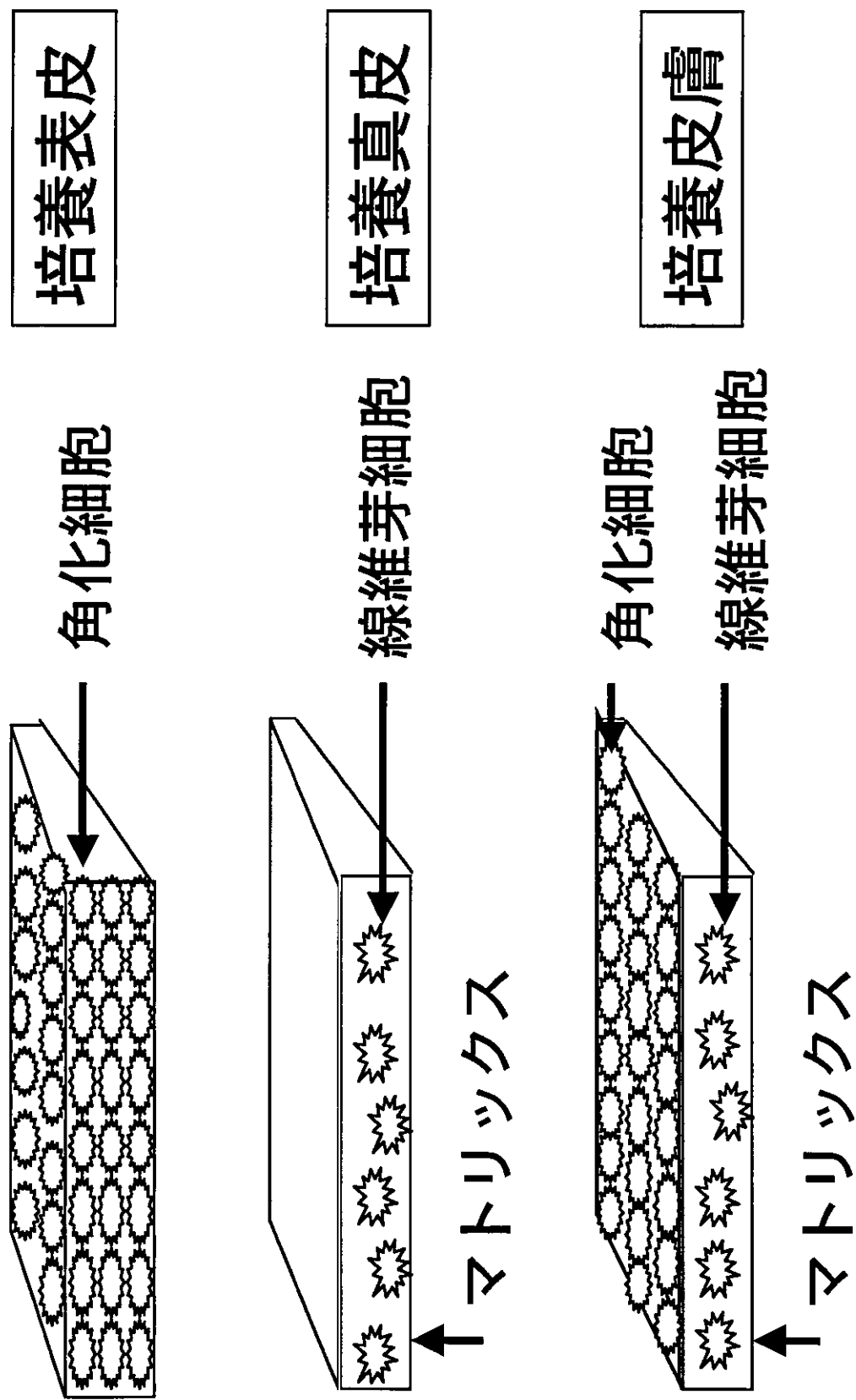


図1 培養表皮・培養真皮・培養皮膚の設計

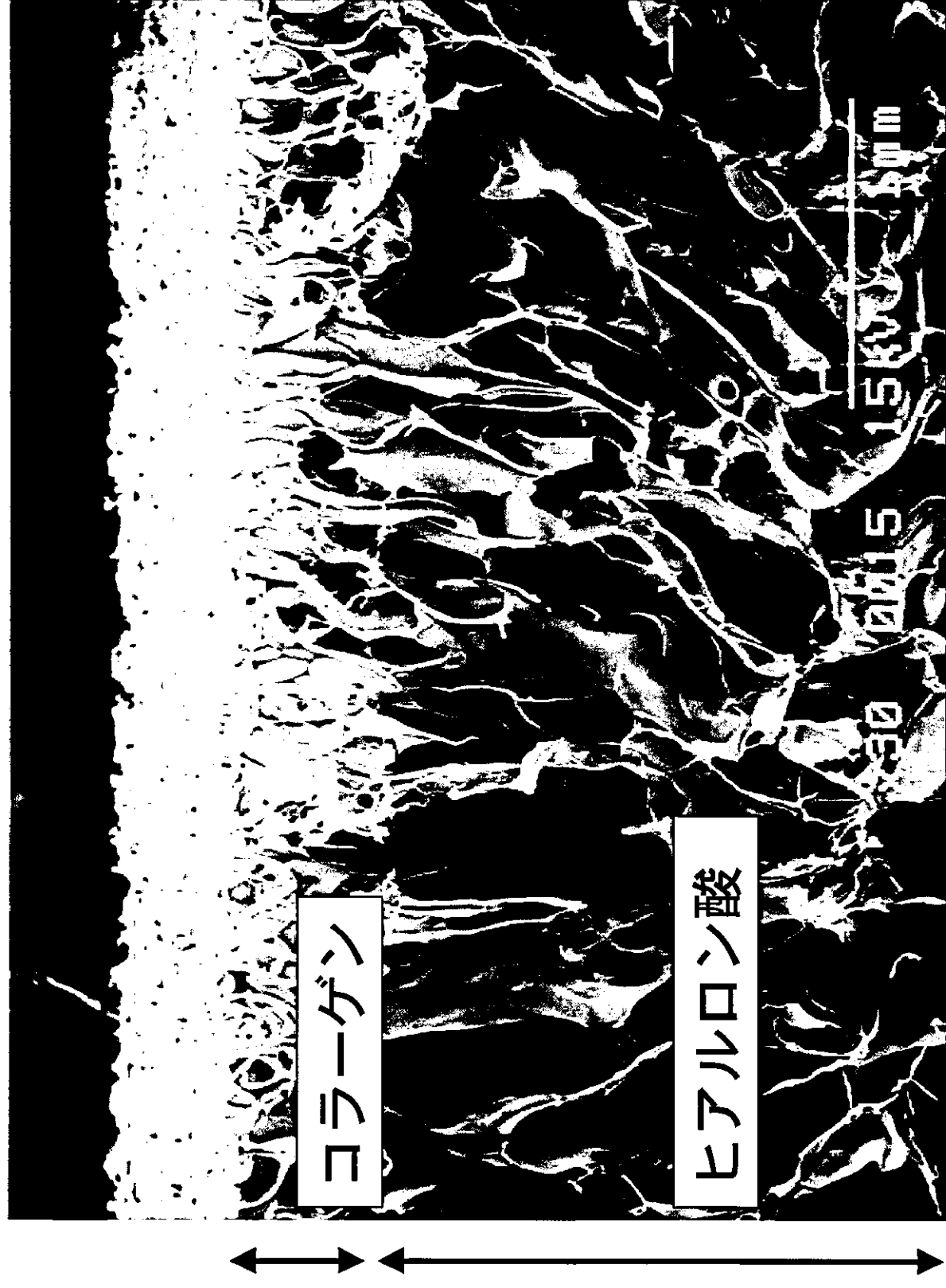


図2 ヒアルロン酸とコラーゲンからなる2層構造のスポンジ状マトリックスの断面：走査型電子顕微鏡写真（x30）

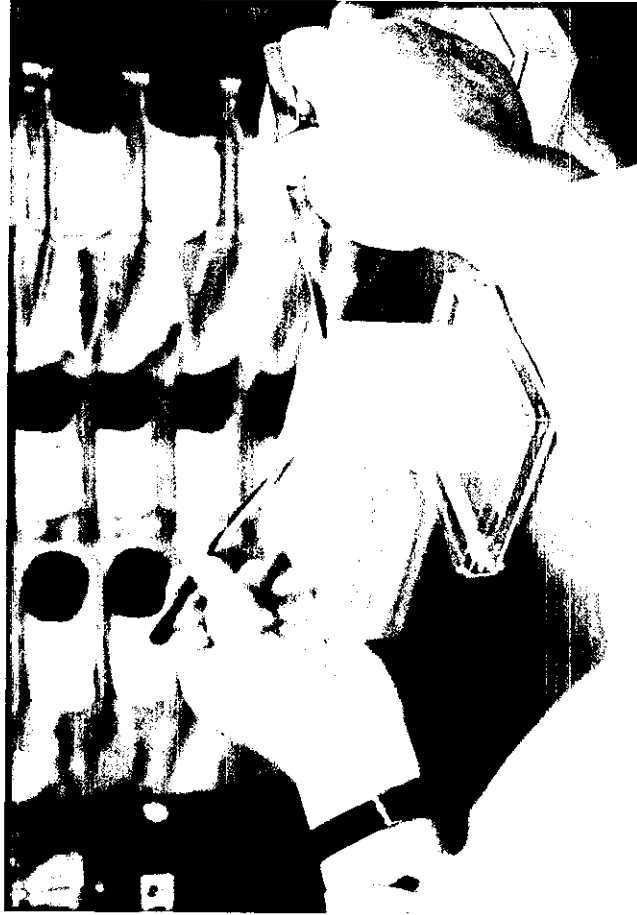
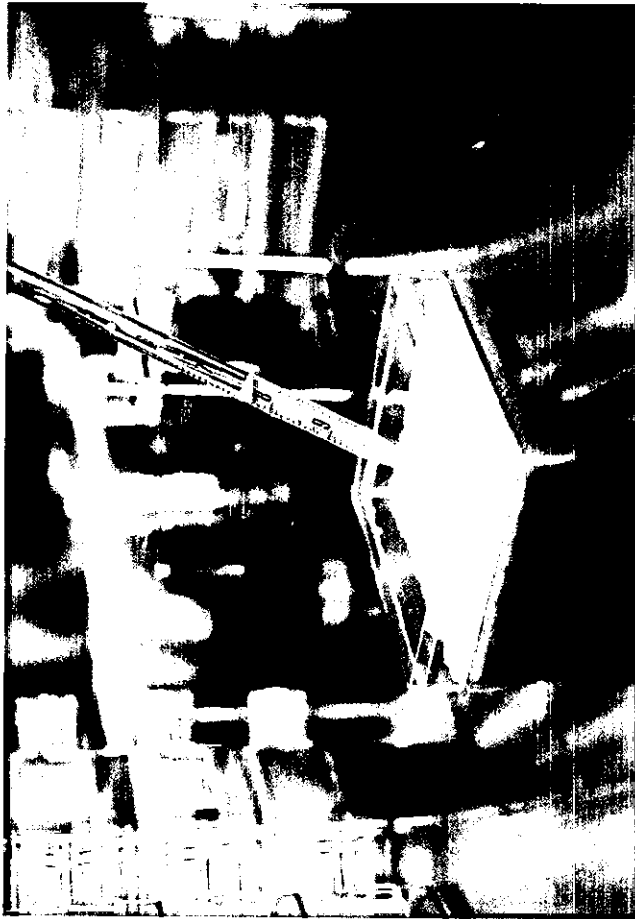


図3 同種培養真皮の製造：マトリックス上に線維芽細胞の浮遊液を滴下（左）、翌日培養液を加えて1週間培養（右）

水溶性エポキシ化合物による分子間架橋

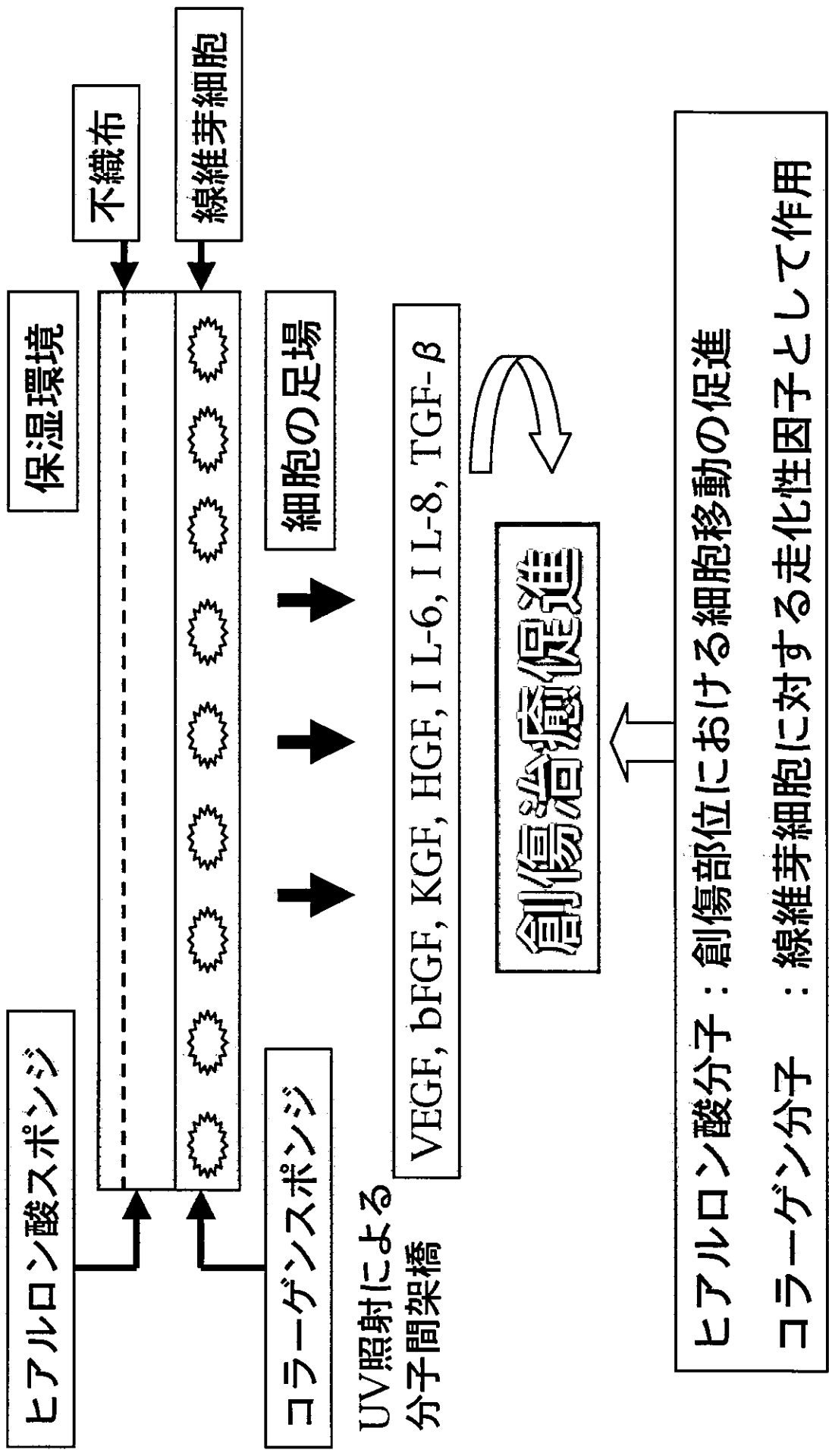


図4 同種培養真皮の機能



Ⅲ度熱傷

1



6倍メッシュ

2



同種培養真皮

3



18日後

4

図5 同種培養真皮の臨床応用：81歳女性、Ⅲ度熱傷創[1]を切除した創面に6倍に拡大したメッシュ状の自家分層皮膚を移植[2]、その上に同種培養真皮を適用[3]、5～7日毎に同種培養真皮を適用して18日後にメッシュ間の表皮化完了[4]

平成13年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

- (1) 研究費の名称= 厚生科学研究費補助金
- (2) 研究事業名= ヒトゲノム・再生医療等研究事業
- (3) 細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究 (H12-再生-010)
- (4) 国庫補助金精算所要額 (円) = 40,000,000
- (5) 研究期間 (西暦) = 2000~2002
- (6) 研究年度 (西暦) = 2002
- (7) 主任研究者名= 黒柳能光

(北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター)

- (8) 分担研究者名= 熊谷憲夫 (聖マリアンナ医科大学医学部形成外科)
- (9) 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ことでスタートした。自家培養表皮に関しては、米国では1987年に企業化に成功しており、数年前から我が国でもベンチャー企業が製造認可に向けて臨床試験を展開している。自家培養表皮については、技術面で特段に進展させる余地は見られない。そこで、米国で市販されている同種培養真皮に対抗する国産品の開発に軸足を移動させることにした。北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターで開発した同種培養真皮の多施設臨床研究を全国規模で推進することにより産業化への基盤づくりを研究の目的とした。本研究は、厚生労働省から発表されたガイドラインに準じて安全性を確保した同種培養真皮の製造と供給体制の確立が基本であり、それを用いた多施設臨床研究の成果を学会発表をとおして医療従事者に情報提供をすることを最終目的とした。

(10) 研究方法

同種培養真皮はヒアルロン酸とアテロコラーゲンから成る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。北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターでは、分担研究機関である聖マリアンナ医科大学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、大量培養してマスターセルを作成する。このマスターセルについて、専門機関に依頼して再度ウイルス検査を行い陰性であることを確認する。マスターセルを順次解凍して継代培養して同種培養真皮を製造する。製造の際、マイコプラ

ズマ検査ならびに細菌・真菌検査を行い陰性であることを確認する。製造した同種培養真皮を一時的に -152°C の超低温フリーザーで凍結保存し、順次、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。実際には発泡スチロールの箱に凍結同種培養真皮を入れドライアイスを入れて冷凍宅急便で輸送する。各医療機関では、 -85°C の低温フリーザーに収納し、適宜、解凍して臨床使用する。ここで、皮膚提供に関しては、聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認を受け、皮膚提供者から文書による同意をうける。一方、同種培養真皮の適用に関しては、各医療機関の倫理委員会の承認を受け、患者から文書による同意をうける。

(11) 結果と考察

米国で製品化された同種培養真皮（ダーマグラフトおよびトランスサイト）と本研究で開発した同種培養真皮の相違点は、マトリックスである。線維芽細胞が産生するサイトカインや細胞外マトリックスは、創傷治癒に有効に作用するので、マトリックス自身の創傷治癒促進能力が相乗的な効果を発揮して同種培養真皮の性能を決定すると考えられる。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優れた生物学的創傷被覆材として期待できる。

(12) 結論

角化細胞を用いた自家培養表皮（エピセル）は米国で製品化されているが再生医療として本格的に普及する情勢ではない。自家培養表皮が再生医療として確立されるためには、良好な移植床の形成が重要なポイントであり、米国では凍結保存屍体皮膚の併用により移植床を形成してから自家培養表皮を適用することが推奨されている。しかし、国内では凍結保存屍体皮膚の入手量に制約がある。それゆえ、本研究の一つの課題である同種培養真皮の適用による移植床の形成は重要である。同種培養皮膚代替物（培養表皮、培養真皮、培養皮膚）は永久生着は不可能であるが、細胞が産生する種々のサイトカインや細胞外マトリックスにより創傷治癒を顕著に促進する。それゆえ、「生物学的創傷被覆材」として分類される。角化細胞は創傷治癒を促進する種々のサイトカインを産生する。一方、線維芽細胞はサイトカインの他に細胞外マトリックスを産生する。それゆえ、浅達性の皮膚欠損創には同種培養表皮、深達性の皮膚欠損創には同種培養真皮が有効である。浅達性皮膚欠損創の治療であれば安価な創傷被覆材が利用できるため同種培養表皮の製品化は現実性に乏しい。実際に、米

国では同種培養表皮の製品化は行われていない。従来の創傷被覆材では治療の困難な深達性皮膚欠損創には、勿論、角化細胞と線維芽細胞の両者を利用した同種培養皮膚が性能的には勝っていると思われるが、製造コストの軽減を考慮すると同種培養皮膚よりも同種培養真皮が実用的と考えられる。以上の分析から本研究で進める同種培養真皮の開発は再生医療としての実現性が最も高いと判断できる。実際に、同種培養真皮に関しては、米国でダーマグラフトとトランスサイトが製品化されている。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。国産初の製品開発においては、知的所有権を取得することが最も重要な問題である。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。そこで、本研究で開発中の同種培養真皮については、線維芽細胞の足場となるマトリックスとして治癒促進能力の高い生体材料を使用し、細胞環境に好適な構造体を設計した。

平成12～14年度再生医療ミレニアムプロジェクト研究組織

主任研究者：北里大学人工皮膚研究開発センター	黒柳能光
分担研究者：聖マリアンナ医科大学形成外科	熊谷憲夫、井上 肇
共同研究者：北海道大学形成外科	杉原平樹、井川浩晴
秋田大学皮膚科	真鍋 求、播摩奈津子
東京女子医科大学形成外科	野崎幹弘、副島一孝
慶応義塾大学形成外科	中島龍夫、貴志和生
日本医科大学形成外科	百束比古、小川 令
順天堂大学皮膚科	小川秀興、長谷川敏男
北里大学形成外科	内沼栄樹、山田直人
北里大学皮膚科	勝岡憲生、中野敏明
横浜市立大学形成外科	鳥飼勝行、前川二郎
横浜市立大学皮膚科	池澤善郎、佐々木哲雄
名古屋大学形成外科	鳥居修平、鳥山和宏
愛知医科大学形成外科	青山 久、横尾和久
金沢医科大学形成外科	川上重彦、石倉直敬
京都大学皮膚科	宮地良樹、立花隆夫
和歌山県立医科大学皮膚科	古川福実、山本有紀
近畿大学形成外科	上石 弘、諸富公昭
大阪医科大学形成外科	上田晃一、大宮有紀
川崎医科大学形成外科	森口隆彦、岡 博昭
岡山大学皮膚科	岩月啓氏、牧野英一
鳥取大学皮膚科	三原基之、大藤 聡
香川医科大学形成外科	鈴木茂彦、川添 剛
福岡大学形成外科	大慈弥裕之、木下浩二
九州大学皮膚科	古江増隆、師井洋一
神奈川県立こども医療センター	小林眞司
国立京都病院皮膚科	松吉徳久
湘南鎌倉総合病院形成外科	山下理絵
香川県立中央病院	柏 尚裕
北九州総合病院形成外科	迎 伸彦

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