

国立京都病院皮膚科：No. 1 既往歴：胃潰瘍

患者：O.H.	性別：女	年齢 79歳	開始 02/09/27	適用 23回	終了 02/12/07
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	83点	A	極めて有用

適用までの処置：プロスタンディン軟膏、プロメライン軟膏 ほか

合併症：？

部位：左下腿

適応創傷面積：4.0 cm x 3.5 cm

難治性皮膚潰瘍の創閉鎖

国立京都病院皮膚科：No. 2 既往歴：足潰瘍

患者：N.A.	性別：男	年齢 57歳	開始 03/04/28	適用 12回	終了 03/06/06
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	100点	A	極めて有用

適用までの処置：ステリロン消毒、ゲーベンクリーム塗布 (3/10~4/13)

ステリロン消毒、プロスタンディン軟膏塗布 (4/14~4/27)

合併症：糖尿病、慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー

部位：右かかと

適応創傷面積：2 cm x 1.5 cm

国立京都病院皮膚科：No. 3 既往歴：糖尿病

患者：D.I.	性別：男	年齢 59歳	開始 04/01/09	適用 6回	終了 05/01/09
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	90点	A	極めて有用

適用までの処置：ユーパスタ、オルセノン

合併症：糖尿病

部位：背中（肩甲骨谷間）

適応創傷面積：13.5 cm x 7.0 cm

植皮：040128 観察終了：04/02/19

国立京都病院皮膚科：No. 4

既往歴：C型肝炎、肝細胞癌

患者：Y.T.	性別：男	年齢 77歳	開始 04/10/13	適用 14回	終了 04/11/26
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
2	無	/	88点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲーベンクリーム

合併症：C型肝炎、肝細胞癌

部位：右わき腹

適応創傷面積：3.5 cm x 2.5 cm

香川県立中央病院形成外科：No.1 既往歴：老人性痴呆

患者：T.H.	性別：女	年齢 81歳	開始 01/10/31	適用 8回	終了 01/12/12
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	/	96点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、トレックスガーゼ

合併症：肺水腫、肺炎

部位：右下腿内面

適応創傷面積：18.0 cm x 9.0 cm

3度熱傷壊死組織切除創／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No.2 既往歴：老人性痴呆

患者：T.H.	性別：女	年齢 81歳	開始 01/11/07	適用 7回	終了 01/12/19
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	/	96点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、トレックスガーゼ

合併症：肺水腫、肺炎

部位：左大腿前面

適応創傷面積：15.0 cm x 9.0 cm

深達性2度熱傷壊死組織切除創／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No.3 既往歴：慢性心不全

患者：I.T.	性別：女	年齢 88歳	開始 01/12/05	適用 7回	終了 02/01/21
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	/	88点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲーベンクリーム、オルセノン軟膏

合併症：敗血症、急性心不全ショック、急性腎不全、肺水腫、肺炎

部位：背部

適応創傷面積：27.0 cm x 13.0 cm

壊死性筋膜炎壊死組織切除創／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No. 4 既往歴：なし

患者：T. H.	性別：女	年齢 39歳	開始 01/12/21	適用 7回	終了 02/02/05
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	/	88点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、ソルラチュール

合併症：なし

部位：右肘及び右前腕

適応創傷面積：14.0 cm x 7.0 cm

7.0 cm x 6.0 cm

深達性2度熱傷壊死組織切除創／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No. 5 既往歴：鬱病

患者：I. T.	性別：男	年齢 44歳	開始 02/01/04	適用 7回	終了 02/02/01
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	中程度	感染	75点	C	普通

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、トレックスガーゼ

合併症：なし

部位：両腕

適応創傷面積：右 30.0 cm x 10.0 cm

左 40.0 cm x 10.0 cm

深達性2度熱傷壊死組織切除創／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No. 6 既往歴：糖尿病、腎不全

患者：K. M.	性別：男	年齢 54歳	開始 02/02/22	適用 7回	終了 02/03/20
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無し	/	82点	A	極めて有用

適用までの処置：洗浄、ゲーバンクリーム

合併症：MRSA 感染

部位：右下腿後面

適応創傷面積：27.0 cm x 10.0 cm

熱傷部の二次感染による皮膚及び軟部組織の壊死の拡大／6倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No. 7 既往歴：なし

患者：M. Y.	性別：女	年齢 18 歳	開始 02/03/18	適用 3 回	終了 02/04/01
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
1	無し	/	88点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、リンデロンVG軟膏、トレックスガーゼ

合併症：なし

部位：右足

適応創傷面積：8.0 cm x 8.0 cm

熱傷 DDB/深達性 2 度熱傷の上皮化

香川県立中央病院形成外科：No. 8 既往歴：なし

患者：K. T.	性別：男	年齢 79 歳	開始 02/03/20	適用 13 回	終了 02/04/12
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無し	/	98点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタシン軟膏、ソフラチュール

合併症：なし

部位：両臀部

適応創傷面積：左 24 cm x 17 cm

右 23 cm x 10 cm

深達性 2 度熱傷壊死組織切除創 / 6 倍自家メッシュグラフトの被覆保護

香川県立中央病院形成外科：No. 9 既往歴：高血圧

患者：M. T.	性別：男	年齢 58 歳	開始 02/04/04	適用 4 回	終了 02/04/15
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	軽度	02/04/15	判定不能		判定不能

適用までの処置：イソジン消毒、ゲンタシン軟膏

合併症：一酸化中毒

部位：左腰部

適応創傷面積：18 cm x 10 cm

3 度熱傷壊死組織切除創 / 6 倍自家メッシュグラフトの被覆保護

壊死組織残存のため中止、適用 2 週間以内の中止のため ----- (参考症例)

香川県立中央病院形成外科：No. 1 0 既往歴：乳癌

患者：K. H.	性別：女	年齢 7 9 歳	開始 02/11/14	適用 7 回	終了 02/12/19
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	8 8 点	A	極めて有用

適用までの処置：ゲンタンシン軟膏

合併症：なし

部位：左鎖骨上

適応創傷面積：6.0 cm x 5.5 cm

難治性皮膚潰瘍の上皮化

香川県立中央病院形成外科：No. 1 1 既往歴：慢性関節リウマチ

患者：N. J.	性別：男	年齢 5 4 歳	開始 02/11/19	適用 8 回	終了 03/01/06
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	8 0 点	A	極めて有用

適用までの処置：カデックス軟膏、ユーパスタ、デブリードマン

合併症：なし

部位：左下腿

適応創傷面積：7.0 cm x 4.5 cm

難治性皮膚潰瘍の上皮化

香川県立中央病院形成外科：No. 1 2 既往歴：慢性関節リウマチ

患者：N. J.	性別：男	年齢 5 4 歳	開始 02/11/19	適用 8 回	終了 03/01/14
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	8 0 点	A	極めて有用

適用までの処置：カデックス軟膏、ユーパスタ、デブリードマン

合併症：なし

部位：左大腿部

適応創傷面積：開口部 2.5 cm x 1.5 cm

ポケット部分 6.0 cm x 6.0 cm

難治性皮膚潰瘍の上皮化

香川県立中央病院形成外科：No.13 既往歴：慢性関節リウマチ

患者：N.J.	性別：男	年齢54歳	開始02/11/27	適用6回	終了03/01/06
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	80点	A	極めて有用

適用までの処置：カデックス軟膏、ユーパスタ、デブリードマン

合併症：なし

部位：右下腿

適応創傷面積：17.0 cm x 8.0 cm

難治性皮膚潰瘍の移植床形成

香川県立中央病院形成外科：No.14 既往歴：なし

患者：I.H.	性別：女	年齢87歳	開始04/03/09	適用17回	終了04/06/11
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
5	無	/	75点	B	有用である

適用までの処置：イソジン消毒、ゲータシン軟膏、アクトシン軟膏、ソフラチュール等にて包交

合併症：

部位：頭部

適応創傷面積：11 cm x 10 cm

植皮：040622 観察終了：04/09/07

香川県立中央病院形成外科：No.15 既往歴：なし

患者：S.H.	性別：男	年齢52歳	開始04/07/15	適用2回	終了04/07/20
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
1	無	/	98点	A	極めて有用

適用までの処置：洗浄、クロスイP軟膏、ニュージェル、トレックス、ソフラチュールにて包交

合併症：

部位：右手 右I指

適応創傷面積：4 cm x 3 cm

右I指

8 cm x 3.5 cm

右II指

10 cm x 3 cm

右III指

7 cm x 1.5 cm

観察終了：04/09/02

香川県立中央病院形成外科：No. 1 6 既往歴：胆石（55歳）

患者：F.K.	性別：男	年齢 7 1 歳	開始 04/09/14	適用 1 3 回	終了 04/11/17
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	04/11/24	9 8 点	A	極めて有用

適用までの処置：イソジン消毒、デブリードマン（9/5）

合併症：

部位：右大腿

適応創傷面積：42 cm x 32 cm

植皮：04/09/22 観察終了：05/01/07

香川県立中央病院形成外科：No. 1 7 既往歴：緑内障（70歳頃）

患者：T.T.	性別：女	年齢 8 1 歳	開始 04/12/07	適用 4 回	終了 04/12/21
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	無	/	9 6 点	A	極めて有用

適用までの処置：消毒、デブリードマン（11/26）、イソジン消毒による包交

合併症：

部位：陰部

適応創傷面積：23 cm x 20 cm

植皮：041207（4倍メッシュ）

観察終了：04/10/28



北九州総合病院形成外科：No. 1 既往歴：なし

患者：Y.A.	性別：男	年齢 30 歳	開始 02/03/12	適用 5 回	終了 02/04/19
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
2	無	/	88 点	A	極めて有用

適用までの処置：自分で消毒

合併症：なし

部位：左下腿前面

適応創傷面積：6.0 cm x 6.0 cm

3 度熱傷壊死組織切除創（移植床形成目的）植皮 02/03/29 観察終了 02/04/19

北九州総合病院形成外科：No. 2 既往歴：なし

患者：K.K.	性別：男	年齢 56 歳	開始 02/03/18	適用 7 回	終了 02/04/23
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
3	有	/	92 点	A	極めて有用

適用までの処置：軟膏ガーゼ処理

合併症：なし

部位：胸部左、左上腕前面

適応創傷面積：22.0 cm x 26.0 cm

自家パッチグラフトの被覆保護

16.0 cm x 8.0 cm

北九州総合病院形成外科：No. 3 既往歴：なし

患者：H.N.	性別：男	年齢 77 歳	開始 02/04/10	適用 4 回	終了 02/05/16
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
2	無	/	92 点	A	極めて有用

適用までの処置：近医にて消毒

合併症：なし

部位：胸部左

適応創傷面積：7.0 cm x 5.0 cm

3 度熱傷壊死組織切除創（移植床形成目的）植皮 02/05/01 観察終了 02/05/16

北九州総合病院形成外科：No. 4 既往歴：なし

患者：Y. Y.	性別：男	年齢 19 歳	開始 02/07/26	適用 4 回	終了 02/09/03
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
6	無	/	9 2 点	A	極めて有用

適用までの処置：生理食塩水ガーゼ

合併症：なし

部位：右上腕後面

適応創傷面積：10.0 cm x 8.0 cm

8.0 cm x 6.0 cm

外傷性皮膚欠損（移植床形成目的）

観察終了 02/09/03

北九州総合病院形成外科：No. 5 既往歴：なし

患者：K. O.	性別：男	年齢 31 歳	開始 02/09/27	適用 6 回	終了 02/10/18
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
6	無	/	9 2 点	A	極めて有用

適用までの処置：生食ガーゼ

合併症：なし

部位：右手

適応創傷面積：6.0 cm x 8.0 cm

外傷性皮膚欠損の移植床形成

植皮 02/10/18 観察終了 02/11/05

北九州総合病院形成外科：No. 6 既往歴：なし

患者：K. M.	性別：男	年齢 47 歳	開始 02/12/25	適用 1 回	終了 03/01/03
適応	不具合	中止	有効性	安全性	総合評価
6	有	03/01/03	5 7 点	D	-----

適用までの処置：生食ガーゼによるドレッシング

合併症：なし

部位：右手

適応創傷面積：4.0cm x 7.0 cm

適用 1 回、2 週間以内で中止-----（参考症例）

# 同種培養真皮の製造と供給システム

(厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクト)

黒柳 能光 ・久保健太郎 ・松井 宏道 ・加川志津子  
森 さと子 ・Hyun Jung Kim ・馬淵 洋

日本熱傷学会会誌  
第29巻第1号別刷  
2003年3月発行

&lt;原著&gt;

## 同種培養真皮の製造と供給システム

(厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクト)

黒柳 能光\*・久保健太郎\*・松井 宏道\*・加川志津子\*  
森 さと子\*・Hyun Jung Kim\*・馬淵 洋\*

厚生労働省は、2000年度から厚生科学研究（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）をミレニアムプロジェクトとして展開している。再生医療に関連する研究のなかでわれわれは、「細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究」を推進している。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シートに線維芽細胞を組み込んだ新規の同種培養真皮を製造して全国規模の多施設臨床研究に提供するシステムを構築した。

当該プロジェクト分担研究機関の聖マリアンナ医科大学において倫理委員会の承認を受けてHIV, HBV, HCV, HTLVおよびTPHAについて陰性の患者から皮膚片を入手し、増殖速度の高い線維芽細胞を選び、提供者3名の皮膚由来の線維芽細胞をおのおの継代培養して3系列のマスターセルとワーキングセルを作成した。作成したマスターセルを使用したウイルス検査においてHIV, HBV, HCV, HTLVおよびパルボウイルスについて陰性であることを確認した。

2001年4月～2002年9月までに3系列のワーキングセルを順次解凍して継代培養して同種培養真皮を約2,700枚製造し、当該プロジェクトに参加している医療施設に凍結状態で搬送した。約1 cm<sup>2</sup>の皮膚小片から採取した線維芽細胞を継代培養することにより100 cm<sup>2</sup>の同種培養真皮を約1,000枚製造することが可能であった。

凍結・解凍操作による細胞生存率および血管内皮成長因子（VEGF）の産生量を調べた。37°Cで急速解凍することにより細胞生存率およびVEGFの産生量は高く維持されることが明らかとなった。

**Key Words** : 同種培養真皮, ヒアルロン酸, コラーゲン, 線維芽細胞, 血管内皮成長因子

### はじめに

厚生労働省は、2000年度から厚生科学研究（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）をミレニアムプロジェクトとして展開している。再生医療に関連する研究のなかで、皮膚部門としてわれわれは、「細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究」を推進している。すでに、黒柳らは、コラーゲンのスポンジ状シートに線維芽細胞を組み込んだ同種培養真皮を開発し、動物実験および150症例に及ぶ臨床試験において創傷治癒促進効果を報告した<sup>1-5)</sup>。この研究成果をもとに、本プロジェクトでは、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

状シートに線維芽細胞を組み込んだ新規の同種培養真皮を開発し、30の医療施設に提供するシステムを構築して臨床研究を推進している。本論文では、同種培養真皮に関する安全性の確保と凍結・解凍操作における性能の確保および多施設への供給システムについて報告する。

### 材料と方法

#### 1) 線維芽細胞の安全性確保

厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクト研究の分担研究機関である聖マリアンナ医科大学において、HIV, HBV, HCV, HTLVおよびTPHAについて陰性の皮膚提供者（3ヵ月～1歳）から約1 cm<sup>2</sup>サイズの皮膚小片を入手した。提供に際しては、当医大の倫理委員会の承認に基づき患者の親に同意書の作成を依頼し

\*北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター  
(受理日 2002.10.21)

た。提供された皮膚片は、生理食塩水を含んだ滅菌ガーゼに包んで宅配便（クール）で北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターへ搬送された。皮膚小片を抗生物質／抗真菌剤で処理したのち、ディスパーゼ処理により表皮と真皮を剥離し、得られた真皮をコラゲナーゼで処理して線維芽細胞を採取し、これを継代培養してマスターセルとワーキングセルを作成した。ウイルス感染に関する安全性を確保するため、マスターセルの一部を使用して、HIV、HBV、HCV、HTLV およびパルボウイルスについて、外部機関にウイルス検査を依頼して陰性であることを確認した。

### 2) ウシ胎児血清の安全性確保

当センターでは、線維芽細胞培養用のウシ胎児血清の安全性を確保するために米国 JRH 社製の血清を使用している。これは、ウシ伝達性海綿状脳症 (BSE) が発症していない米国およびオーストラリア産のウシ由来の製品である。この企業は、FDA に登録されており、米国およびオーストラリア農務省承認施設で厳格な管理下で飼育されたウシの胎児から採取した血清を製品化しており、トレーサビリティ（牛の誕生から屠殺までのすべての記録）が保証されている。同社は、アメリカ国内の大学および医薬品製造企業などへ供給する実績をもっている。当センターでは、最も高い安全性を確保するため、米国およびオーストラリア産のウシ由来の血清で、さらにガンマ線照射処理した製品を使用している。これにより、未知のウイルス感染の危険性を極力軽減させることが可能である。当製品は、厚生労働省のガイドラインの基準をクリアーしたものである。

### 3) ウシ由来コラーゲンの安全性確保

当センターでは、同種培養真皮のマトリックス作製用コラーゲンの安全性を確保するため高研社製のアテロコラーゲンを使用している。同社は、ウシ伝達性海綿状脳症 (BSE) が発症していない米国産の生後5ヵ月の仔ウシの皮の真皮を原料として輸入し、酵素処理によりアテロコラーゲンを製造しており、国内で市販されている人工真皮のコラーゲンを供給する実績を

もっている。原料を供給している企業は、FDA に登録されており、米国農務省承認施設で厳格な管理下でウシを飼育し、トレーサビリティ（牛の誕生から屠殺までのすべての記録）が保証されている。当製品は、厚生労働省のガイドラインの基準をクリアーしたものである。

### 4) ヒアルロン酸とコラーゲンの2層構造スポンジの製造

発酵法で製造した分子量200万のヒアルロン酸（資生堂）20gを蒸留水2lに攪拌しながら溶解し、1N塩酸を用いて水溶液をpH3.5に調整した。分子間架橋剤である水溶性エポキシ化合物のEX810（ナガセ化成工業）を4g計り、これを40mlの蒸留水に混合した。この水溶液を上記のヒアルロン酸水溶液に激しく攪拌しながら添加した。ポリスチレン製の容器（10.5cm×9.5cm）にあらかじめ同じサイズの不織布（旭化成工業：ペンリーゼTS507）を敷き、少量の蒸留水で濡らして容器の底に接着させた。この不織布を敷いた容器に、分子間架橋剤を混合したヒアルロン酸水溶液を50ml添加して、50°Cの乾燥機に5時間静置して架橋反応と水溶液の濃縮を行った。架橋反応と濃縮を行ったヒアルロン酸水溶液を-85°Cで急速凍結し、真空凍結乾燥機で乾燥してスポンジを作成した。このヒアルロン酸スポンジを1枚あたり100mlの蒸留水を使用して3回リンスして未反応の分子間架橋剤の除去とヒアルロン酸に含有されていたエンドトキシンの除去を行った。含水したスポンジをポリスチレン製容器に入れ、再度、-85°Cで急速凍結し、真空凍結乾燥機で乾燥して精製したスポンジを作成した。コラーゲンスポンジ層との一体化構造を構築するため、ヒアルロン酸スポンジに3mm間隔で貫通穴をあけた。アテロコラーゲンの粉末（高研）8gを蒸留水1.6lに攪拌しながら分散し、1N塩酸を用いてpH3.5に調整してコラーゲン水溶液を調製した。この水溶液を上記と同様のポリスチレン製の容器に40ml入れ、この上に架橋ヒアルロン酸スポンジを不織布側を上にして置き、コラーゲン水溶液をスポンジ内に吸収させ4°Cで1日間静置した。コ

ラーゲン水溶液を吸収したヒアルロン酸スポンジを、 $-85^{\circ}\text{C}$ で急速凍結して、真空凍結乾燥機で乾燥して2層構造のスポンジを作成した。2層構造体のスポンジ表面に20 cmの距離から15ワットの紫外線ランプで30分間照射して分子間架橋を導入した。反対側も同様に紫外線照射した。得られたスポンジを滅菌袋に入れて $121^{\circ}\text{C}$ 、2時間の条件で乾熱滅菌した<sup>6)</sup>。

#### 5) 同種培養真皮の製造と安全性確保

乾熱滅菌したスポンジをエチレンオキシドガスで滅菌したポリスチレン容器に移し、カラーゲンスポンジ層を上にして培養液を40 ml加えてインキュベータに1時間静置した。過剰な培養液を吸引除去して培養液で湿潤したスポンジを準備した。凍結保存した線維芽細胞を順次解凍して継代培養し、細胞浮遊液を調製してスポンジ表面に滴下した。この際、スポンジ1枚あたりに滴下する細胞浮遊液5 ml中には、 $100 \times 10^5$ 個の線維芽細胞が含まれており、スポンジ1 cm<sup>2</sup>あたり $1 \times 10^5$ 個の播種密度になるように調製した。細胞を播種して、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ のインキュベータに1日静置し細胞をスポンジに接着させたのち、培養液を50 ml加え、インキュベータ内で1週間培養して同種培養真皮を製造した。線維芽細胞を播種する際に、細胞浮遊液の一部を使用して専用の容器に播種してマイコプラズマ検査に使用した。また、同種培養真皮を製造した際の培養液をサンプリングして生菌数検査に使用した。

同種培養真皮の凍結保存は、培養液を凍結保存液(10%DMSOと20%ウシ胎児血清含有培養液)に交換したのち、大型温度下降制御フリーザー(荏原社製:AIR BLASTER)を使用して毎分 $-1^{\circ}\text{C}$ の速度で $4^{\circ}\text{C}$ から $-60^{\circ}\text{C}$ まで冷却して凍結させ、さらに $-152^{\circ}\text{C}$ の超低温フリーザー内で保存した。

安全性を確保した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宅配便(冷凍)で搬送する方法をとっている。同種培養真皮を受け取った施設は、 $-85^{\circ}\text{C}$ あるいは $-152^{\circ}\text{C}$ のフリーザー内で保存する。臨床使用する際には、 $37^{\circ}\text{C}$ で急速解凍

したのち、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。

#### 6) マイコプラズマ検査

測定は、Hoechst Stain Kit (ICN Biomedical Inc.)を用いて、DNA蛍光染色法によって行った。培養真皮作製時の細胞浮遊液の一部を用いて、 $0.5 \sim 2.5 \times 10^4$ 個/ウェルの密度で4ウェルチャンバースライド(Nalge Nunc International Corp.)に細胞を播種し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ のインキュベータ内で1~3日間培養して、50~80%コンフルエント状態の細胞を被検細胞とした。培養液を除去したのち、固定液(酢酸:メタノール=1:3)を加えて約10分間処理した。固定液を除去し、室温で30分間以上風乾して固定標本作製した。ヘキスト#33258溶液(500  $\mu\text{g}/\text{l}$ )を加えて30分間染色したのち、蒸留水で2回洗浄し、室温で30分間以上風乾した。染色した標本を蛍光顕微鏡で観察し(対物レンズ20倍、および40倍)、Mycoplasma hyorhinisと共培養したVero細胞の陽性コントロール標本と比較して、汚染の有無を判定した。

#### 7) 生菌数検査

測定はMilliflex-100 (Millipore Corp.)装置を用いて、メンブランフィルター法によって行った。同種培養真皮(10.5 cm $\times$ 9.5 cm)を製造した際の培養液を約5~10 mlずつ遠沈管にサンプリングし、被検体とした。同一ロットの培養液は、まとめて同一の遠沈管にサンプリングした。測定開始時には、70%消毒用エタノールを用いて、装置および装置内のチューブを滅菌した。被検体を0.22  $\mu\text{m}$ フィルター(直径47 mm)で吸引ろ過した。さらに、約30 mlのDPBS(-)(Invitrogen Corp.)溶液で2回吸引ろ過することにより、フィルターを洗浄した。フィルターをソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地上で、 $37^{\circ}\text{C}$ で5日間以上培養した。培養後、フィルター全面を目視で観察し、コロニーが検出されない被検体を陰性とし、出荷可能と判定した。

#### 8) 同種培養真皮の解凍条件の検討

プロトコル作成のために、基礎研究とし

て、解凍条件と細胞の生存率ならびに血管内皮成長因子 (VEGF) の産生能を調べた。超低温フリーザー内で保存した同種培養真皮を直接37°Cの条件に置くと著しい温度差により、凍結した保存液に亀裂が生じ、同種培養真皮のスポンジにも亀裂が生じ、場合によっては同種培養真皮に組み込まれた不織布も切断されてしまう。そこで、-152°Cのフリーザーに保存されている同種培養真皮は、いったん、発泡スチロールの箱に入れ、60分後に37°Cの条件に置いて解凍した。解凍は、臨床現場で簡単に操作できる方法を採用した。37°Cの温浴に同種培養真皮の入った容器を10~15分間浮かべて解凍する条件で生存細胞数ならびに VEGF の産生量を調べた。

生存細胞数の測定は MTT アッセイを用いた。解凍後、容器から保存液を除去し、乳酸リンゲル液 50 ml を容器に入れ軽く震盪させてから除去した。この乳酸リンゲル液によるリンス操作を5回繰り返したのち、MTT アッセイにより生存細胞数を測定した。一方、VEGF の産生量の測定は ELISA 法を用いた。上記と同様にしてリンス操作を終了したのち、容器に培養液 50 ml を入れ軽く震盪してから除去し、この操作を2回繰り返してスポンジ内の乳酸リンゲル液を除去した。新たに、培養液 50 ml を加えて 37°C・5%CO<sub>2</sub> のインキュベータ内で1週間培養し、培養液をサンプリングして VEGF の量を ELISA 法により測定した。解凍後、1週間培養した同種培養真皮中の線維芽細胞数は MTT アッセイにより測定した。比較として、凍結保存する前の同種培養真皮についても細胞数と VEGF 産生量を調べた。同種培養真皮を製造した際の培養液をサンプリングして ELISA 法により VEGF を測定し、一方、MTT アッセイにより細胞数を測定した。

#### 9) MTT アッセイによる生存細胞数の測定

同種培養真皮 (10.5 cm×9.5 cm) の一部を切り取り (4 cm×3 cm)、直径 60 mm のディッシュに移した。3 mg の MTT (Research Organics Inc.) を含有した 6 ml の培地を加えて 37°C のインキュベータ内で 2 時

間静置した。培地を吸引除去したのち、約 1 cm 角片に細切して遠沈管に移し、5 ml の DMSO を加えて 10 分間静置したのち、ボルテックスミキサーで細胞内から青紫色のホルマザンを抽出した。96 ウェルプレートに 200  $\mu$ l ずつサンプリングし、マイクロプレートリーダーを用いて 570 nm の吸光度を測定した。あらかじめ所定量の細胞を使用して吸光度を測定し、これと対比して細胞数を算出した。

## 結 果

### 1) マスターセルとワーキングセルの作成

聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認を受けて口唇裂の手術で余剰となった皮膚片および多指症の手術で切除した皮膚片を入手した。真皮から採取した線維芽細胞の浮遊液を培養フラスコ (75 cm<sup>2</sup>) 1 個に播種して培養を開始した。コンフルエント状態になった時点で、培養フラスコ (150 cm<sup>2</sup>) 2 個に継代培養し、さらに、培養フラスコの数 を 4 個、8 個、16 個に増やして継代培養した。この 4 継代目の線維芽細胞をトリプシン処理により回収して約 3/4 をマスターセルとして凍結保存し、残りの約 1/4 を 16 個の培養フラスコに戻して継代培養した。5 継代目以降も同様にして、回収した線維芽細胞の約 3/4 を凍結保存し、残りの約 1/4 を 16 個の培養フラスコに戻して継代培養を繰り返しながら、5 継代目以降、順次、ワーキングセルとして凍結保存した。ここで、増殖速度の高い線維芽細胞を選び、提供者 3 名の皮膚由来の線維芽細胞をおのおの継代培養して 3 系列のマスターセルとワーキングセルを作成した (表 1)。細胞の凍結保存は、チューブ 1 本中、4×10<sup>6</sup> cells/2 ml とした。作成したマスターセルを使用したウイルス検査において HIV、HBV、HCV、HTLV およびパルボウイルスについて陰性であることを確認した。

### 2) 同種培養真皮の製造

ワーキングセルを順次解凍して培養フラスコ (150 cm<sup>2</sup>) 20 個を 1 セットとして継代培養した。コンフルエント状態の線維芽細胞をトリプシン処理により回収して、線維芽細胞の約 3/4

表1 マスターセル (4 継代目) とワーキングセル (5 継代目以降) の作成結果

セル番号	提供者	性別	年齢	採皮部位	継代数 (*)	凍結保存合計本数
No 1	T.N.	男	6 ヶ月	口唇裂	4~13	125 本
No 2	U.I.	女	3 ヶ月	多指症	4~8	66 本
No 3	U.N.	女	1 歳	多指症	4~10	124 本

(\*)

継代	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
No 1	8	8	10	11	11	16	14	15	14	18
No 2	14	13	15	10	14					
No 3	12	14	14	20	18	14	32			

4 継代目：マスターセル      5 継代目以降：ワーキングセル

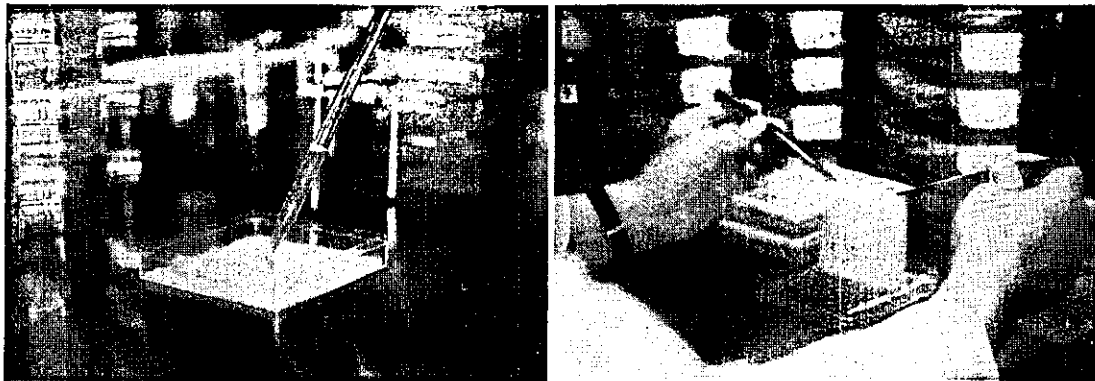


図1 同種培養真皮の製造

所定量の細胞浮遊液をスポンジに播種 (左) し、翌日培養液を追加して1週間培養 (右)

をスポンジに播種し、残りの約1/4を培養フラスコに戻して培養を継続する方法で、毎週、1セットあたり同種培養真皮を6~7枚製造した (図1)。

細胞の形態を位相差顕微鏡で撮影して形態異常のないことを確認し、さらに毎週得られる細胞数に大きな変化のないことを確認して同種培養真皮を製造した。この操作を約8~10回繰り返して、最終回は細胞を使い切る方法をとった。同種培養真皮の製造記録を各ロットごとに作成して保存した。製造記録には、培養フラスコから回収された細胞数、製造枚数、線維芽細胞の位相差顕微鏡写真、凍結保存時の温度制御記録、マイコプラズマ検査の結果、生菌数検査の結果を記載し、臨床研究におけるトレーサビ

リティ (細胞の採取から同種培養真皮の製造までのすべての記録) に対応できるシステムを構築した (図2)。

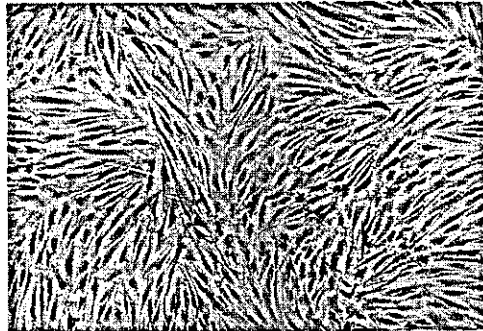
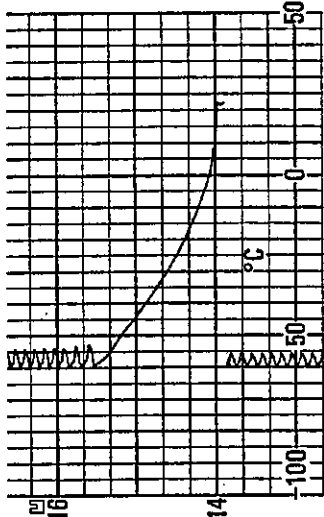
2001年4月~2002年9月までに3系列のワーキングセルを順次解凍して継代培養して同種培養真皮を約2,700枚製造し、厚生科学再生医療プロジェクトの多施設臨床研究に参加している医療施設に搬送した。1回の搬送は、発泡スチロールに約30枚ほど入れドライアイスを入れて宅配便 (冷凍) で搬送した。約1cm<sup>2</sup>の皮膚小片から採取した線維芽細胞を継代培養することにより100cm<sup>2</sup>の同種培養真皮を約1,000枚製造することが可能であった。



### 同種培養真皮製造記録書

製造者氏名：  
 スポンジ滅菌年月日：                      同種培養真皮製造年月日：  
 ワーキングセルの凍結保存年月日：  
 ワーキングセルの解凍後の継代数：  
 培養フラスコ数：                      細胞浮遊液の量：  
 細胞浮遊液中の細胞密度：  
 1枚ありの細胞浮遊液量：                      凍結保存年月日：  
 同種培養真皮の製造枚数：                      凍結保存記録紙添付

同種培養真皮製造時の培養フラスコ内の線維芽細胞の位相差顕微鏡写真

生菌数検査実施年月日：  
 生菌数検査結果：陰性/陽性  
 生菌数検査責任者：久保健太郎 印  
 マイコプラズマ検査実施年月日：  
 マイコプラズマ検査結果：陰性/陽性  
 マイコプラズマ検査責任者：久保健太郎 印  
 製造責任者：黒柳能光 印

図2 同種培養真皮製造記録書  
 各製造ロットごとに作成して臨床研究のトレーサビリティに対応

### 3) 凍結保存同種培養真皮の細胞生存率と VEGF 産生能

凍結・解凍操作における同種培養真皮の温度変化を調べた。凍結する際には、4°Cから-3.4°Cの領域では、-0.5°C/分の速度で温度変化した。-3.4°Cから-4.7°Cの水結する領域で

は、-0.05°C/分の速度で温度変化した。-4.7°Cから-49°Cの領域では、-1°C/分の速度で温度変化した(図3)。解凍する際には、-60°Cから-11°Cの領域では、12°C/分の速度で温度変化した。-11°Cから-0.5°Cの領域では、2°C/分の速度で温度変化した。0.5°Cから20°Cの領域で

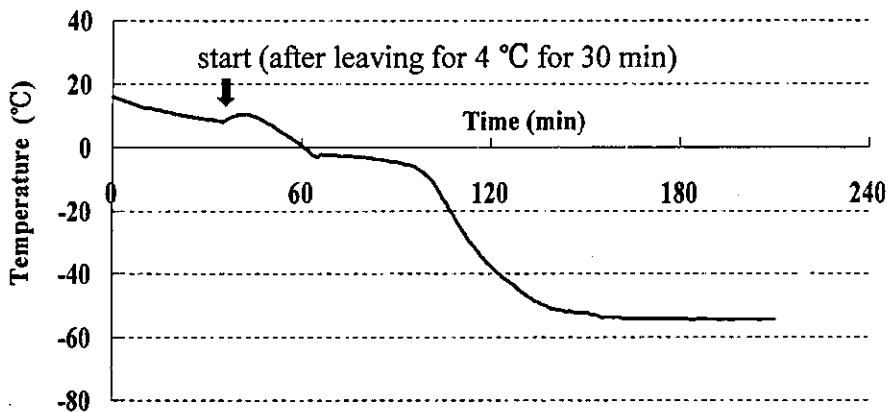


図3 同種培養真皮の凍結過程の温度変化

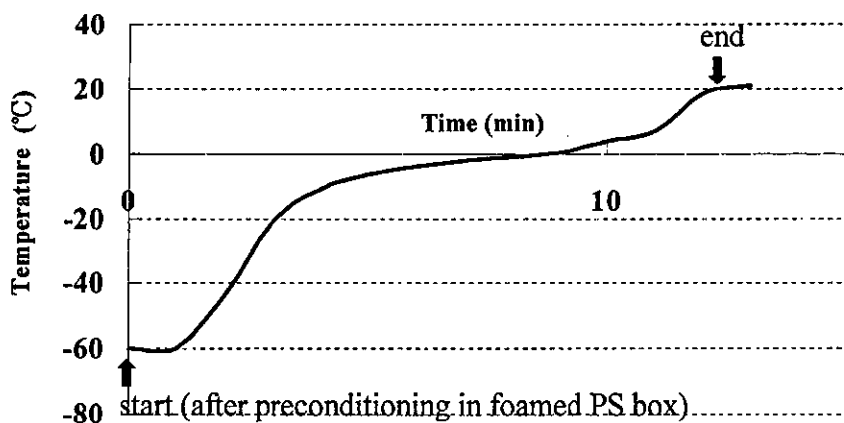


図4 同種培養真皮の解凍過程の温度変化

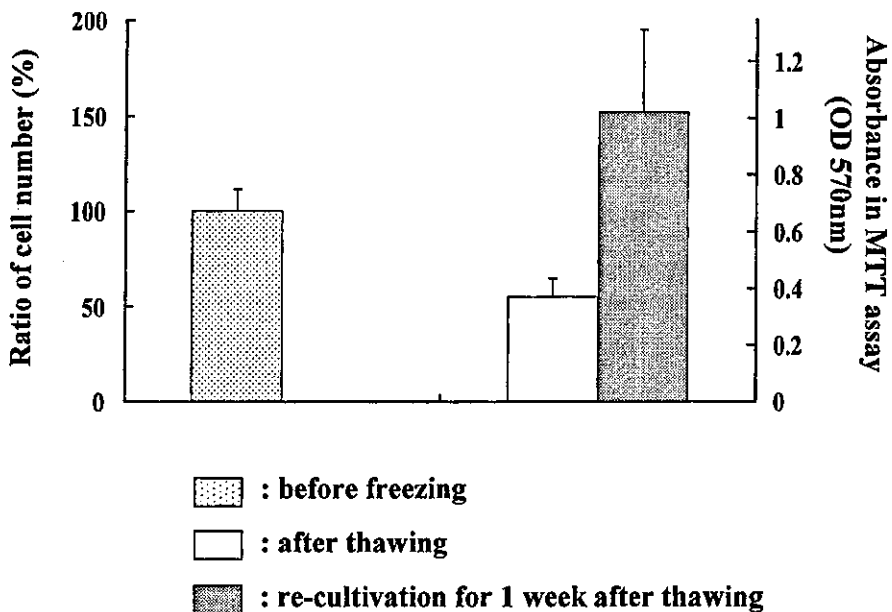


図5 凍結前と解凍後の同種培養真皮中の細胞数比率および解凍後1週間培養後の細胞比率

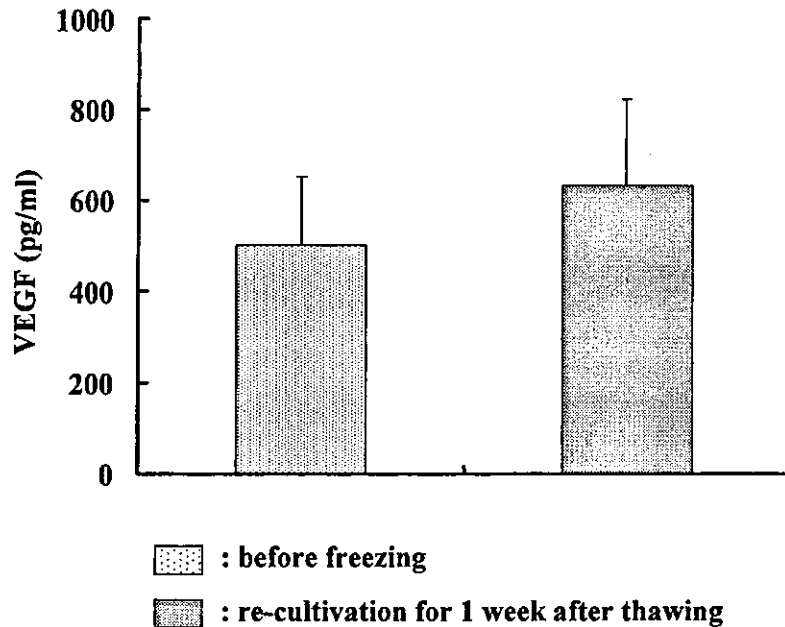


図6 凍結前と解凍後1週間培養後の同種培養真皮の VEGF の産生量

は、5.5°C/分の速度で温度変化した (図4)。

凍結・解凍操作による細胞数変化の結果を図5に示した。生存細胞数は約50%であり、1週間培養後には凍結前の約1.5倍に増えた。VEGF産生量の結果を図6に示した。VEGFの測定濃度はpg/mlで表示した。実際には、同種培養真皮を作成する際、細胞を播種する前にスポンジに含有されている培養液の量は25mlであり、そこに細胞浮遊液を5ml加え、さらに翌日50mlの培養液を加えて培養するため、実質的な培養液の量は80mlとなる。それゆえ、同種培養真皮の産生したVEGFの実質量は、図6に示された量の80倍となる。解凍後、1週間の培養では、VEGFの産生量は、凍結前の約120%に達した。37°Cの温浴で急速解凍する条件は、細胞の生存率ならびにVEGFの産生量も高く維持することが可能であった。

## 考 察

すでに米国では、ヒトの組織や細胞由来の医療製品に関するガイドラインが米国食品医薬品局 (FDA) により発表され、自家培養表皮 (Epicel)<sup>7-11)</sup>、同種培養真皮 (Dermagraft,

TransCyte)<sup>12-16)</sup>、ならびに同種培養皮膚 (Apligraf)<sup>17-21)</sup>が製品化された。

同種培養表皮、同種培養真皮、同種培養皮膚などは、いずれも創傷治癒促進を目的とした医療用具である。角化細胞は種々のサイトカインを産生する。一方、線維芽細胞は種々のサイトカインならび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角化細胞を利用した同種培養表皮が有効と考えられる。しかし、深達性の皮膚欠損創には、細胞外マトリックスが必要不可欠であり、線維芽細胞を利用した同種培養真皮あるいは、線維芽細胞と角化細胞を利用した同種培養皮膚が有効と考えられる。

細胞を利用した医療用具は、コストが高いため、従来の創傷被覆材との差別化を行うことが必要不可欠である。同種培養表皮は、従来の創傷被覆材と機能的に大きな相違が認められないため製品化の対象にならない。実際に、米国では、同種培養表皮の製品はなく、同種培養真皮と同種培養皮膚が製品化された。

将来的には、どのタイプの製品が総合的に判断して有用であり普及するかを念頭において研究開発を進める必要がある。線維芽細胞を利用

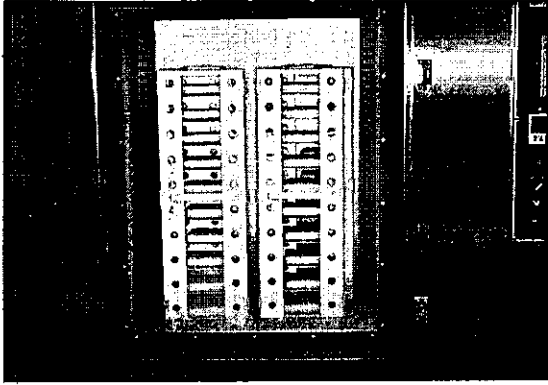


図7 大型温度下降制御フリーザー  
同種培養真皮(容器 11 cm×10.5 cm×2.5 cm)  
を40枚凍結可能

した同種培養真皮よりも角化細胞と線維芽細胞の両者を利用した同種培養皮膚のほうが、機能的には優れている。しかし、両者の細胞を利用することでコストが高くなることが問題である。最近、同種培養皮膚である Apligraf の販売がストップした理由は、高いコストの問題も一因となっていると考えられる。そのほかに、Apligraf は凍結保存せずにフレッシュな状態で製品として販売されていたことも一因となっていると考えられる。使用日程の予定が立たない同種培養皮膚などは、凍結保存することが前提であり、その際、凍結解凍操作により性能が保持されることが重要である。さらに、コスト面を考慮する必要がある。

わが国では、これまでヒト組織細胞の取り扱いに関する基本法律が整備されていなかったためヒト組織細胞の医療技術への利用を展開する場合の最大の弱点となっていた。このような状況を打破するため、厚生労働省からガイドラインが発表された(ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針; 2000年12月26日)。再生組織工学の技術を駆使して新しい医療を慎重に、そして遅延なく推進するためのガイドラインが国内において整備されたことは、きわめて重要な意義をもつ。

厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクトの一つとして、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した同種培養真皮を用いて多施設臨床研究を推進している<sup>22,23)</sup>。大学機

関における研究開発ならびに臨床研究においても「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関するガイドライン」に記載された項目を念頭において自主基準とマニュアルを整備し、それを遵守して研究を推進する必要がある。

本研究では、ウイルス検査に関しては、皮膚提供者の血液による検査で陰性を確認し、さらにマスターセルを用いた検査で陰性を確認した。同種培養真皮の製造においては、各ロットごとにマイコプラズマ検査および生菌数検査で陰性を確認した。さらに、各ロットごとに同種培養真皮の製造記録を作成して保管することにより、臨床研究のトレーサビリティに対処するシステムを確立した。これにより、各医療施設において作成された臨床研究記録書と当センターで作成した製造記録書を対比させることにより、どの患者に対して、いつ使用された同種培養真皮は、いつ、だれが製造し安全性を保証したものであるのかを確認することができる。

実際には、同種培養真皮は凍結保存しておき、必要に応じて解凍して臨床使用する。解凍した同種培養真皮中の線維芽細胞が生存していることが重要であり、その生存している線維芽細胞が実際に VEGF を産生する能力を維持していることが重要である。解凍した同種培養真皮を創面に適用した際には、培養真皮中の線維芽細胞から産生される VEGF が創面に放出される。しかし、創面においては、実際の VEGF 産生量を定量的に測定することは不可能である。また、創面の状態を *in vitro* で厳密に再現することも不可能である。そこで、本研究では、類似した状態を再現する唯一の手段として、同種培養真皮を解凍後、1週間培養する方法を採用した。解凍した同種培養真皮中の線維芽細胞の生存率は MTT アッセイにより確認できる。一方、解凍した同種培養真皮中の線維芽細胞が VEGF を産生する能力は、実際に、解凍後一定期間培養することにより培養液中に放出される VEGF の積算量を ELISA 法で測定して確認できる。

細胞の凍結には、氷結温度領域で液体窒素を過剰に送り込み一定速度で温度降下を可能にす