

## 厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

### 分担研究報告

#### 印加ブタ皮膚の生着確認、印加ヒト皮膚・母斑皮膚への培養表皮の生着確認

研究分担者 京都大学大学院医学研究科 形成外科 教授 鈴木茂彦

研究協力者 京都大学医学研究科 形成外科 大学院生 神野千鶴

#### 研究要旨

巨大色素母斑は巨大な母斑が存在し治療に難渋する疾患である。本研究では、母斑組織を廃棄せず、手術室内で切除した母斑組織内の細胞を完全に不活化し、得られた自家不活化母斑組織そのものを用いて患者の真皮再生を行い、表皮の再生は患者の自家培養表皮を用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発することを目的としている。本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討、及び不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するか検討し、200MPa以上で印加した不活化ブタ皮膚が印加していない皮膚と同様に生着することを確認した。ヒト正常皮膚を不活化し、この不活化皮膚組織上にヒト培養表皮を移植しても200MPaで印加した組織には培養表皮が生着した。

#### A. 研究目的

本研究は平成23年より母斑組織の自家移植にも応用する研究を開始した。平成25年度までの研究で、細胞および皮膚の不活化に必要な加圧条件をある程度まで特定し、この加圧処理を病院手術室で使用可能な小型加圧機器のプロトタイプを企業と共同で開発している。本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討を行う。次に、不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するかどうか検討し、本研究で開発する治療法が実施可能であるか、大型動物モデルとして検討する。次に、ヒト正常皮膚、ヒト母斑皮膚を不活化し、この不活化組織上にヒト培養表皮が生着するかどうか検討する。これは実際に行う治療に準じた移植方法であり、臨床試験実施前には非必要な非臨床試験である。

#### B. 研究方法

ブタ正常皮膚(Göttingenミニブタ)を腹部より採取し、母斑組織の不活化確認と同様

に0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した後、WST8アッセイ、組織培養を行い、不活化を確認する。次に、1辺1.5cmの正方形のブタ皮膚を準備し、0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した。印加後、ブタ背部に筋膜上に自家移植し、移植4週後に生着を確認した。

また、ヒト正常皮膚、母斑組織を印加する(0, 100, 200, 500, 1000MPa)。印加皮膚の上にJTEC社が臨床使用条件と同じ方法作製、提供する培養表皮を移植する。免疫不全マウス(ヌードマウス)背部皮下に埋入し、2週後に不活化組織、培養表皮の生着を確認する。

#### (倫理面への配慮)

ヒト正常皮膚検体、ヒト母斑検体を用いた検討を行うため、ヒト検体の採取および動物への移植実験、細胞培養実験については、関西医科大学、京都大学の倫理委員会でのヒト検体採取についての承認、関西医科大学、京都大学、国立循環器病研究センター、大阪工業大学でヒト検体を用いた研究計画(動物実験計画を含む)の承認を各

施設で得て研究を実施した。ブタを用いた実験については国立循環器病研究センター研究書で実験計画の承認後実施した。

### C. 研究結果

ミニブタ正常皮膚(Göttingenミニブタ)に0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した。WST8アッセイの結果、200MPa以上で皮膚は不活化されていた(図1)。

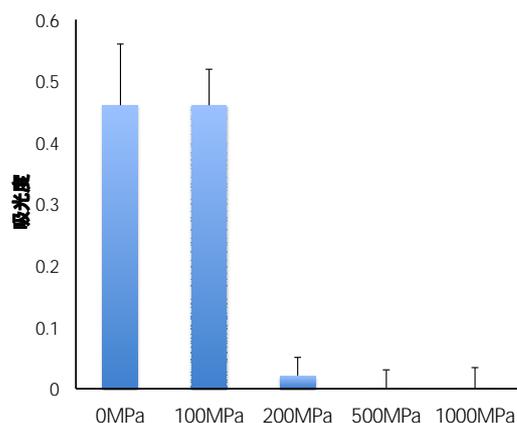


図1. 印加圧力と組織 WST-8 活性 (吸光度)

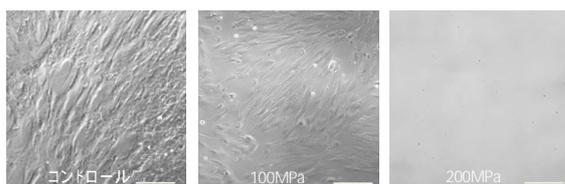


図2. 遊走細胞を示す。200MPa 以上では遊走細胞は観察されなかった(bar=50 μm)

また、母斑での検討と同様に200MPa以上で遊走細胞は観察されなかった(図2)。これらの所見からブタ皮膚も200MPa以上の印加で不活化していると考えられた。

次に、1.5cmの正方形のブタ皮膚を印加後移植死4週後の肉眼写真を示すが、肉眼的にはすべての群で生着していた(図3)。

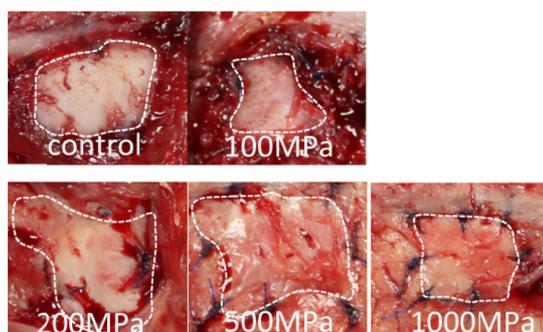


図3. 移植4週後の各群の印加皮膚

ヘマトシキリンエオジン切片では、コントロール、100MPaの不活化されていない移植片では表皮が存在していたが、200MPa以上では真皮組織は生着しているのが観察されたが、表皮は観察されなかった(図4)。

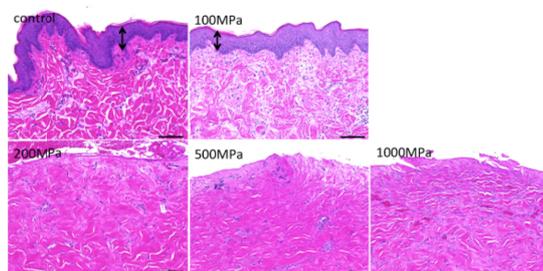


図4. 移植4週後の各群のHE組織切片

ヒト正常皮膚を200MPaで印加後、培養表皮を移植し、ヌードマウス背部皮下に埋入した組織の2週後のヘマトシキリンエオジン切片を図5に示す。200MPa処理では表皮は生着していた。他群についても検討を行っている。

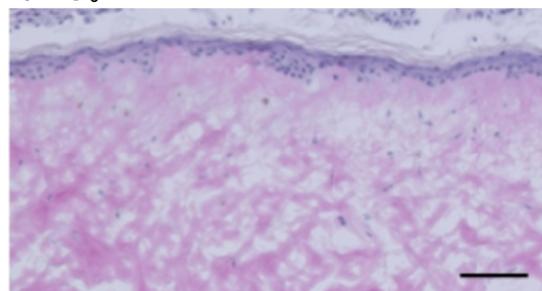


図5. 移植2週後の200MPa印加皮膚

物モデル（ミニブタ）で確認された。

#### **D . 考察**

本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討、及び不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するか検討し、200MPa以上で印加した不活化ブタ皮膚が印加していない皮膚と同様に生着することを確認した。ヒト正常皮膚を不活化し、この不活化皮膚組織上にヒト培養表皮を移植しても200MPaで印加した組織には培養表皮が生着した。現在母斑組織への培養表皮移植実験も行っているが、これらの結果は本治療法が実際に臨床使用できる治療法であることを示していると考えられた。

#### **E . 結論**

高圧処理によって不活化された皮膚を生体に移植した場合、生着することが大型動

#### **F . 健康危険情報**

該当なし

#### **G . 研究発表**

1. 論文発表  
.研究総括報告書に記載
2. 学会発表  
.総括研究報告書に記載

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許申請  
.総括研究報告書に記載