

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	齊 芳 芳
論文審査担当者	主 査 本田 孝行 教授 副 査 塩沢 丹里 教授 ・ 宇佐美 真一 教授
論文題目	Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry Amniotic membrane as a matrix (ヒト乾燥羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用に関する研究)
(論文の内容の要旨)	
[背景と目的] 顎口腔領域では、再生医療として口腔粘膜などの上皮欠損に用いる培養上皮の研究が進歩しており、組織培養の足場として種々の材料が使用されている。ヒト羊膜は抗原性に乏しく、また、腫瘍形成能が低く、倫理的な問題が少ないなどの利点があり、広く臨床に用いられており、基底膜としての有用性も報告されている。羊膜には、新鮮羊膜と保存羊膜の2種類があるが、保存羊膜は新鮮羊膜と比較して、サイトカイン等をよく保持していること、滅菌が可能であること、室温での保存が可能であること、容易に整形が可能であるなどの利点がある。近年、保存羊膜として乾燥 (Hyper-dry) 羊膜が開発され、長期間の室温保存が可能になった、さらに乾燥羊膜は種々のサイトカインや成長因子を含み、高い生体適合性と整形性を持つなど生体材料として優れた利点を有している。 今回は、このような背景に注目して、ヒト乾燥羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの作製および有用性に関する研究を計画した。	
[対象と方法] 1. 口腔上皮角化細胞の培養 ボランティアから採取した生体歯肉組織を生理塩水で洗浄した後、トリプシン溶液に浸漬し、メスで細切し単個細胞にした後、シャーレに入れて、血清を含まない培養液で培養した。 2. 粘膜上皮シートの作製 乾燥羊膜を PBS で 1 時間浸漬させる。その後、1. で培養した上皮角化細胞を、羊膜およびコントロールとしてのポリカーボネート (PC) 膜の表面へ播種し、気相下培養条件下で 2 週間培養した。得られた培養上皮シートは、HE 染色および CK10, CK16, IVL 免疫染色を行い、形態学的、免疫学的な検討を行った。 3. 動物実験 マウス (n=25) の背部に 10×10mm 大の上皮欠損を 3 箇所作成し、培養上皮シート (羊膜上皮シート、PC 膜上皮シート) を貼付した。コントロールは移植片の無いものとした。その後、移植部のサイズ変化 (萎縮率) を経時的に計測した。 移植 3 週間後に細胞上皮シートを含む組織を摘出し、HE 染色および CK10, CK16, IVL 免疫染色による形態学的、組織学的検討を行った。	

[結果]

1. 血清を使用しない特殊な条件下（気相下培養）で口腔粘膜上皮の培養が行えた。乾燥羊膜上では、重層扁平上皮が形成された。一方、PC膜上では、培養細胞は数層になるが、構造は一樣ではなかった。また、羊膜上の培養上皮シートは移植可能な強度を有していたが、PC膜上の上皮シートは脆く、扱いが難しかった。
2. 組織学的には、乾燥羊膜を用いた培養上皮シートは、正常上皮組織に類似した分化を示した。免疫染色では、CK10はsuper basal layersで陽性を示し、IVLは上皮全層で陽性を示した。CK16は上皮のupper layersで陽性を示した。これらの所見は正常口腔粘膜と同様であった。
3. マウス背部における移植部のサイズ変化は、羊膜上皮シートでは $63.90 \pm 0.87 \text{ mm}^2$; PC膜上皮シートでは $77.13 \pm 5.75 \text{ mm}^2$; 移植無しでは $87.02 \pm 2.27 \text{ mm}^2$ であり、羊膜上皮シートで有意に収縮率が少なかった ($P < 0.05$) .
4. 移植部位の組織学的観察では、羊膜上皮シートはマウス背部に良好に生着しており、口腔粘膜の形態を示し、羊膜は消失していた。CK10はall super basal layersで陽性を示し、IVLは顆粒層で陽性を示した。またCK16はマウスの扁平上皮では染色されなかったが、移植した上皮の棘細胞層と顆粒層に陽性を示した。

[考察]

1. 乾燥羊膜上では、口腔上皮角化細胞の増殖が良好で、かつ、細胞の遊走能力も優れていた。2週間後、正常上皮組織に近い重層化した培養上皮シートが形成された。乾燥羊膜は口腔粘膜培養上皮作製の足場として有用であった。
2. 皮膚欠損部の被覆剤として、羊膜を用いた口腔粘膜上皮シートは良好な創傷治癒をもたらした。乾燥羊膜は抗菌/抗炎症作用、優れた組織再生促進機能、異物反応を生じない特徴がみられた。CK16染色において、移植部上皮では棘細胞層と顆粒層で陽性を示したのに対し、周囲のマウスの皮膚では陽性所見は認められず、培養上皮シートは本来の性質を残したままで生着していた。形態学的にも口腔粘膜上皮の形態を示していた。
3. 培養上皮シートは、歯周病により破壊された歯肉の再生や唇顎口蓋裂治療、腫瘍切除後の口腔粘膜再建、また、熱傷治療など様々な医療分野で新たな再生医療への応用が期待される。