

超高压印加法による皮膚組織の脱細胞化

Decellularized skin tissue by ultra-high pressure application

○島耕史(大阪工大) Liempham Hieu(京大) 馬原淳(国循) 森本尚樹(関西医大付属滝井病院)

山岡哲二(国循) 鈴木茂彦(京大) 藤里俊哉(大阪工大)

Koji SHIMA, Osaka Institute of Technology

Liempham HIEU, Kyoto University

Atsushi MAHARA, National Cerebral and Cardiovascular Center

Naoki MORIMOTO, Kyoto University, Kansai Medical University Takii Hospital

Tetsuji YAMAOKA, National Cerebral and Cardiovascular Center

Shigehiko SUZUKI, Kyoto University

Toshia FUJISATO, Osaka Institute of Technology

Abstract: The pigmented nevus is currently treated by autologous transplantation. However, the remaining nevus cells may have possibility to transform to cancer cells. Nevus tissue may be decellularized by the ultra-high pressure developed by us and be reimplanted to the same site. In this study, we examined the efficiency of cell removal under various applied pressure. Rat, pig and human skins were applied from 100MPa to 1,000MPa. The cell viability was examined by the WST-8 assay and the cell migration. Also, the degeneration of collagen tissue was observed by SEM. The porcine skin was cell free after the application of 200MPa in water.

Key Words: Skin, Tissue Engineering, Ultra High Pressure

1. 緒言

色素性母斑という疾患がある。出現率は出生 100 人に 1 人の割合である。母斑の大きさが 20cm 以上のものを巨大色素性母斑といい、出現率は 20000 人に 1 人の割合である。また、巨大色素性母斑は悪性腫瘍化しやすく、その平均リスクは 8.2%とも言われている。

我々はこの疾患に対し、病変部を摘出し、自家組織をできるだけ維持したまま悪性腫瘍化する可能性のある細胞のみをすべて破壊し、再び患部に戻す再生治療を目指している。

これまでに、我々は 1000MPa の超高压印加法を用いて、大動脈などの循環器系組織の脱細胞化に成功している。本方法は、同時に滅菌効果も有しており、異種組織であっても安全な組織を作製できる利点がある⁽¹⁾。

しかし、使用する冷間等方圧印加装置は、重量が 2 トンほどあり、容易に設置できないという欠点がある。自家組織では滅菌の必要もなく、細胞の増殖能力のみを失わせればよいことから、より低圧力な処理を小さく安価な装置で代替できれば、臨床の現場で、切除した組織に対してすぐに圧力印加できる可能性がある。

1-1 実験の目的

本研究では、超高压印加法を用いて、より低い圧力の印加処理を用いた臨床応用を目標として、ラット、ブタ、ヒトの各皮膚組織に対して、細胞の生存率とコラーゲン繊維の変性を評価した。

2. 実験方法

ラットおよびブタから摘出した皮膚組織ならびに、患者より提供された皮膚組織を生検トレパンでくりぬき、冷間等方圧印加装置により 100, 200MPa, あるいは 1000MPa を 10 分間印加した。圧力印加時に組織を浸けておく媒体を水、

生理食塩水、生理食塩水に等量の水を加えたもの(以下 50% 生食)の 3 種類とし、圧力印加時間は 5 分、10 分、30 分、60 分とした。

圧力の印加は国立循環器病研究センターの超高压印加装置 Dr.CHEF を用いて処理を行った。まず、組織を媒体で満たされたチャック付きポリ袋にいれた。その後、ホットシーラーを用いて気泡の入らないように注意しながらパッキングした。パッキングしたものを超高压印加装置に入れて大気圧から所定のペースで昇圧、圧力維持、減圧を行った(Figure.1, Table.1)。

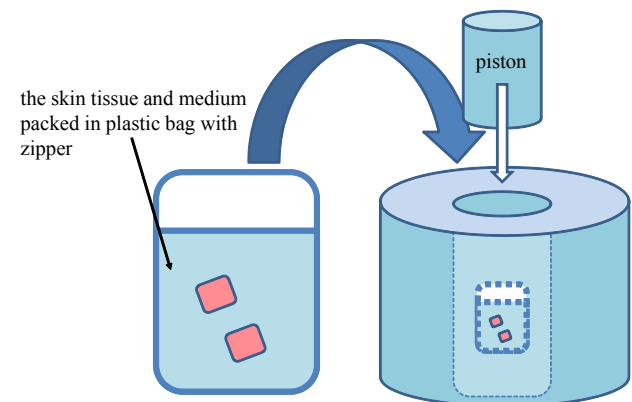


Figure.1 Schematic drawing of the cold isostatic pressing

Table.1 Applied pressure and time

Pressure	Ascending and descending rate	Holding time
100MPa		5min~60min
200MPa	66.67MPa/min	5min~60min
1000MPa		10min

処理後、培養による組織からの細胞の遊走、および WST-8 assay によって細胞の活性を評価した。また、SEM での観察によってコラーゲン線維の変性を評価した。なお、これらの実験は各所属機関の倫理委員会の承認を得て行った。

3. 結果と考察

WST-8 assay による細胞の活性については、100MPa を印加した組織よりも 200MPa を印加した組織の方が細胞の活性が低下しており、予備検討におけるラット皮膚への 1000MPa 印加ではほぼ 0 であった (Figure.2)。

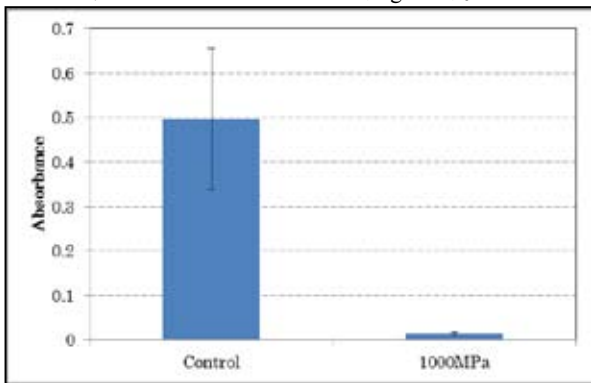


Figure.2 WST-8 assay in rat skin after application of 1000MPa(Medium: saline)

媒体の違いに着目すると、生理食塩水に比べて、水では細胞の活性が下がることが示された。これは浸透圧の影響によると考えられる。一方、圧力印加時間の影響は見られなかった (Figure.3)。

細胞遊走による細胞の活性についても、WST-8 assay と同様に圧力印加時間の影響は見られなかった (Table.2, Table.3)。

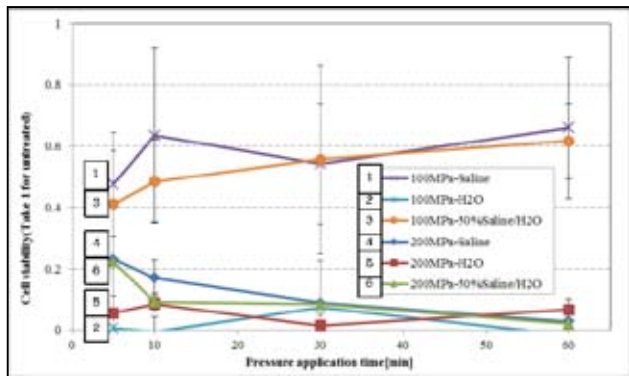


Figure.3 Results of WST-8 assay in porcine skin after puressure application

Table.2 Cell migration after application of 100MPa (+: migrated -: not migrated)

Holding time [min]	Porcine skin			Human skin	
	H ₂ O	Saline	50%Saline	H ₂ O	Saline
5	+	+	+		
10	-	+	+	+	+
30	-	+	+		
60	-	+	+		

Table.3 Cell migration after application of 200MPa

Holding time [min]	Porcine skin			Human skin	
	H ₂ O	Saline	50%Saline	H ₂ O	Saline
5	-	-	-		
10	-	-	-	-	-
30	-	-	-		
60	-	-	-		

SEM 観察によるコラーゲンへの影響については、200MPa 以下では、媒体、印加時間、種差による違いはなく、ほぼ正常な状態を保っていた (Figure.4)。

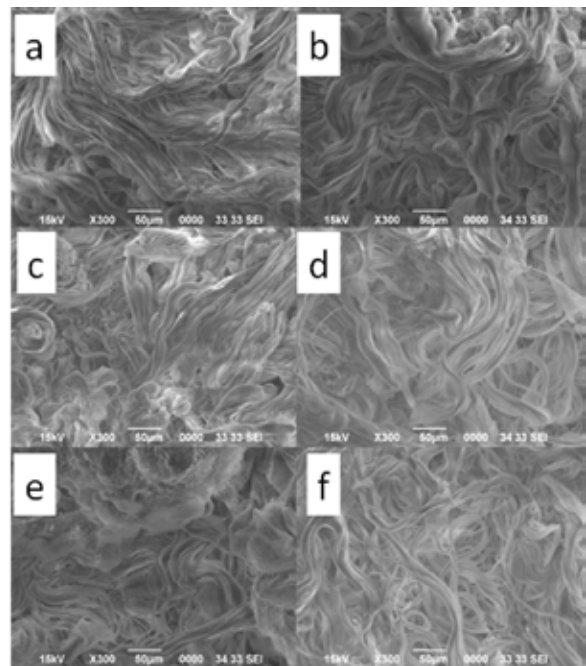


Figure.4 Observations of human skin tissue by SEM. (a)H₂O - 0MPa, (b)Saline - 0MPa, (c)H₂O - 100MPa, (d)Saline - 100MPa, (e)H₂O - 200MPa, (f)Saline - 200MPa

4. 結論

自家組織を対象として 200MPa の低圧で脱細胞できる可能性が示唆された。圧力印加時の媒体は生理食塩水よりも水の方が適していることが示された。また、圧力印加によるコラーゲン繊維の変性はみられなかった。

5. 参考文献

(1) Seiichi FUNAMOTO, Kwangwoo NAM, Tsuyoshi KIMURA, Ayako MIRAKOSHI, Yoshihide HASHIMOTO, Kazuo NIWAYA, Soichiro KITAMURA, Toshiya FUJISATO, Akio KISHIDA, The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, Biomaterials, vol.31, pp.3590-3595, 2010.