最近のトピックス

よりクリーンな培養複合口腔粘膜の開発
Ex vivo production of a composite human oral mucosa equivalent in a serum-free culture system without a feeder layer

新潟大学歯学部口腔外科学第1講座
泉　健次
大分医科大学皮膚科学講座形成外科診療班
寺師浩人
First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Niigata University School of Dentistry
Kenji Izumi
Department of Dermatology, Section of Plastic and
Reconstructive surgery, Oita Medical University
Hiroto Terashi

もし不幸にもあなたの口腔内に粘膜欠損が生じ，なんらかの上皮組織を移植する必要があると口腔外科医に告げられたとしたら？いくつ選択肢が考えられるであろうか。

まず自家皮膚移植術が選択肢に上がることは間違いないが，欠点としては皮膚採取部にもう一つ傷ができること，皮膚と口腔粘膜の表面性状の違いから硬くざらつき感があり，毛が生えてくる可能性がある。

最近では，ウシやブタの抽出コラーゲンとシリコン膜とを一体化させ，抗原性のほとんどない創面被覆材がよく用いられるようになってきた。これならば新たな傷もできず，毛も生えてこない。材料中には細胞成分がないために滅菌操作，保存なども非常に簡便である。しかし，この材料の欠点は上皮細胞がないことである。創辺縁の上皮細胞の移動・増殖により，治癒までには被覆材料表面がすべて上皮化される必要がある。

近年の細胞工学，培養技術の進歩は第3の選択肢を作ってくれた。口腔粘膜の上皮細胞を培養系に移すと，細胞が短期間に増殖し，上皮細胞をシート状に増殖させることができるようになった。すなわちフラスコ中で増えた自分の上皮細胞を粘膜欠損部へ移植することが可能になった。この人工臓器の一簞を担う人工口腔粘膜は構造上2種類存在する。上皮細胞だけを培養した上皮細胞シートおよびコラーゲンゲル中に線維芽細胞を混ぜて培養した粘膜下組織様組織上に培養上皮細胞を播いて複合体としたものである。[1] 共にすでに口腔外科領域で実用化されている。

人工口腔粘膜は，皮膚上皮細胞から作成したいわゆる“人工皮膚”の作成法をコピーしたもので，開発・臨床応用とも人工皮膚の方が早い。同じ人工“上皮”だが患者へ応用する場合に皮膚と口腔粘膜の取り扱い基準は当然議論されるべき問題である。なぜなら形成外科，皮膚科で火傷の手術で扱う場合と口腔外科領域で扱う場合では手術の性格が異なるからである。口腔外科手術は選択手術であって救急救命手術ではない。上記2つの人工口腔粘膜作成過程には，2つ問題点があると我々は考えている。

ひとつは，放射線をかけたマウスの細胞とヒト上皮細胞が同じフラスコの中で培養されるということである。マウスの細胞（feeder layer）といっしょに培養すると上皮細胞はよく増える。その理由はマウスの細胞が放出するなんらかの成長因子によるが，正体は不明である。もうひとつは，ウシの血清を培養液中に加えるということである。マウスの細胞（feeder layer）もヒト線維芽細胞も血清がないと増えず，血清はこれらの培養方法には不可欠であるが，血清は狂牛病をはじめとして外来性の汚染やウイルスの感染源となり得，細胞増殖に必要とはいえ未知因子が多い。

つまり，最終的に口の中へ戻されるのは自分の細胞とはいえ，培養中に得体の知れない細胞や汚染物質かもしれないものと一時的にしろいっしょに培養された細胞である。喜んで「是非それを私の口の中へ移植して下さい」という気持ちになれるであろうか。実用化された人工口腔粘膜に関して現在まで臨床上問題があった報告はないが，選択的手術である口腔外科の手術に用いる以上，過去に問題ないから大丈夫というレベルで論じるのではなく，あらゆる患者に不利益な可能性の有無を考えた上での議論が重要ではないだろうか。この基準におけるヨーロッパ諸国の対応は寛容，アメリカは厳重である。日本でも施設によっては，火傷の患者に対する救命処置においてでさえも，ウシ血清を用いて培養した皮膚上皮シートは患者には移植しないという方針の施設もある。

今後当教室では，マウスの細胞とウシ血清を用いないクリーンな方法で上皮細胞を培養し新たな人工口腔粘膜を作成し，[1,2] 外傷，腫瘍術後の粘膜欠損，口蓋裂手術および補綴前処置等の臨床に用いていく予定である。この方法には粘膜の強度というもうひとつ大きな利点がある。上皮シートも複合体もこんにゃくより軟らかく，脆い。口腔内のような複雑な形態をもつ組織に移植する場合周囲組織との縫合は不可欠であるが，こんにゃく以下の強度では，縫合は困難であると言わざるを得ない。私たちの開発した人工口腔粘膜は上皮細胞の増殖，分化の

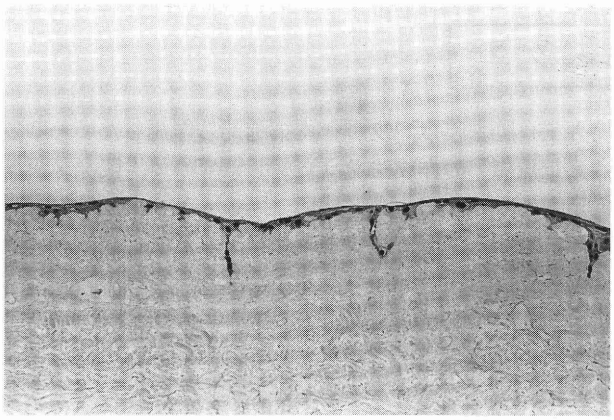


写真1 培養4日目の単層培養複合口腔粘膜。

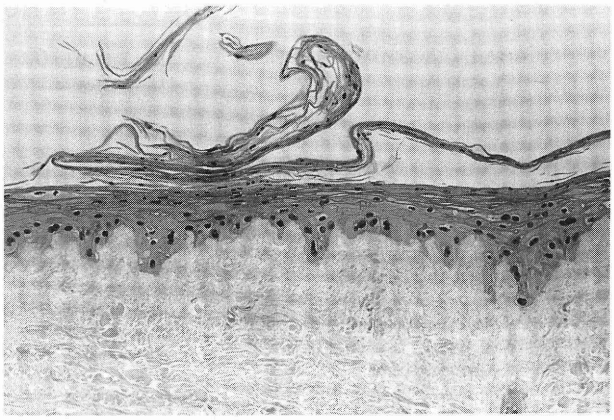


写真2 培養18日目の重層化した培養複合口腔粘膜。

足場としてヒト新鮮屍体真皮を用いている。真皮組織ゆえ非常に強靭であり口腔内への運搬も周囲粘膜との縫合も容易である。

実際の作成法は，まず細胞培養に関しては，患者の口腔粘膜（角化，非角化）からpunch biopsyを行う。採取した粘膜をトリプシンに一晩つけておき，翌朝単離した上皮細胞を初代培養に移す。使う培地は血清を含まないMCDB153培地（カルシウム濃度0.15mM)。この培地にはハイドロコーチゾン，インスリン，EGFおよびウシ下垂体抽出物を加えてある。継代は細胞が70-80%コンフルエントになった状態で行なう。培養上皮細胞は癌と違って無限には増えない。たいてい7回前後の継代が限度である。継代1－3代目の細胞が最もよく増殖し，人工口腔粘膜作成に適すが，4代目以降は使いづらくなる。また年齢による増殖率の差は若い患者の方がよく増えるという印象はあるが，データ的に有意差はなく年齢に関係なく増殖する。

次のステップは人工口腔粘膜の作成である。タイプIVコラーゲンに浸したヒト新鮮屍体真皮（LifeCell, TX, AlloDerm®）上に培養上皮細胞を125,000/cm²の割合で播種する。培地のカルシウム濃度を1.8mMに上げ4日間liquid interfaceで培養すると1層の上皮層がAlloDerm®上に形成される（写真1)。この後，この材料をair-liquid interfaceに移し，さらに14日間培養を続ける。4日めで1層だった上皮は重層化し始め計18日間で錯角化を伴う上皮をもった人工口腔粘膜が完成する（写真2)。

千円札大（115cm²）の人工口腔粘膜を作るシミュレーションをしてみる。AlloDerm®上に播種する培養上皮細胞は1500万あれば十分である。約20mm²のpunch biopsyから採取できる上皮細胞は約100万である。このうちフラスコ内で定着，増殖するのは10%以下であるが，早ければ2回の継代，遅くとも3回の継代で1500万の細胞が得られる。ここまでの培養日数は平均約20日で，この後粘膜作成に18日を要するので合計38日で千円札大の人工口腔粘膜ができあがる。通常口腔内の移植術では100cm²もあれば十分であるから，所要日数は若干少なくて約1ヶ月あれば作成可能な計算になる。すなわち手術の約1ヶ月前にpunch biopsyを行なえば手術に使える人工口腔粘膜ができあがり，punch biopsyの傷も小さく縫合可能ゆえ手術時には治癒している。移植面積が小さければもっと少ない日数で済むであろう。

ところで，紹介してきたクリーンな方法による人工口腔粘膜作成法であるが，ウシ下垂体抽出物を培地に加えているため，完璧なクリーンさまでには至っていない。しかし，このレベルのクリーンな条件であれば十分患者に応用しても許されるクリーンさである。現在よりクリーンな条件を得るためには不使用がベストであるが，そうなると上皮細胞の増殖が鈍り培養期間が長くなりすぎる。対策としてブタ下垂体抽出物での代替が可能である。最近ウシ下垂体抽出物中の何が上皮細胞の増殖因子となっているのか解明されつつあるので，その研究に期待している。

稿を終えるにあたり，この研究の機会を与えて下さり，親切な御指導を頂いた米国ミシガン大学口腔外科Dr. Feinbergおよび外科Dr. Marceloに厚く謝意を表します。また御協力頂いた口腔解剖学第2講座星野正明文部技官に深謝致します。

引 用 文 献

1) Izumi, K. Takacs G. et al.: Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. J Oral Maxillofac Surg 57, 571-577, 1999.
2) Izumi, K. Terashi H. et al.: Development and Characterization of A Tissue Engineered Human Oral Mucosa Equivalent Produced In A Serum-free Culture System. J Dent Res 1999.（in press）