

研究成果報告書

培養粘膜はどのように口腔粘膜を再生するのか

16390581

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

新潟大学附属図書館

平成19年5月



2080002599

研究代表者 芳澤享子

新潟大学大学院医歯学系助手

はしがき

1975年に Rheinwald and Green らが培養表皮の作製に成功し、1981年に O'Connor らによって世界で初めて培養表皮移植が行われて以来、皮膚欠損に対する培養皮膚の開発とその臨床応用が進んできた。そして口腔粘膜もこれら培養皮膚に準じて研究が進み、1990年頃より培養口腔粘膜上皮シートの開発と臨床応用に関する報告がみられるようになった。しかしながら、これらの報告で用いられている培養方法はウシ胎仔血清と feeder layer が必要とされるため、狂牛病感染や未知の病原体感染の危険性をはらむという問題点が指摘されている。またこれらの培養口腔粘膜シートは薄く脆いために、狭く複雑な形態の口腔領域で扱うには操作性に問題が残る。このような問題を解決するために、私たちはウシ胎仔血清と feeder layer を必要としない培養システムを用いて培養複合口腔粘膜(以下 EVPOME と略す)を開発した。この EVPOME は、ヒト無細胞真皮である AlloDerm[®] (LifeCell 社, USA) の上に培養した口腔粘膜上皮細胞を播種、作製しており、粘膜上皮と上皮下組織に相当する2層構造が得られていることから、組織学的構造が口腔粘膜と類似しているとともに、取り扱いが容易であることが大きな特徴である。新潟大学歯学部倫理委員会の認可を受け、2000年11月より EVPOME の臨床応用を開始し、2002年度から2004年度には文部科学省高度先進医療開発経費(B)の支援のもと、神戸大学、富山大学との三施設共同研究によりさまざまな口腔粘膜欠損症例に対し EVPOME の臨床応用を行っているが、本研究は EVPOME 移植後の皮膚および口腔粘膜の治癒過程を基礎的に検索することで、EVPOME による口腔粘膜再生過程を検討したものである。

研究組織

研究代表者：芳澤享子（新潟大学医歯学系 助手）

研究分担者：小野由起子（新潟大学医歯学総合病院 助手）

研究分担者：寺師浩人（神戸大学・医学部附属病院 助教授）

海外共同研究者：Stephen E Feinberg（ミシガン大学・ヘルスシステム 教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	3,700	0	3,700
平成 17 年度	1,200	0	1,200
平成 18 年度	1,000	0	1,000
総計	5,900	0	5,900

研究発表

(1) 学会誌等

芳澤享子、寺師浩人、他：癌治療への再生医療の応用. 培養複合口腔粘膜(EVPOME)の口腔癌治療への応用. 日本再生医療学会雑誌. 6(2); 203-208, 2007.

寺師浩人、芳澤享子、他：培養複合口腔粘膜の臨床応用. 頭頸部癌 32(3) 276-280, 2006.

(2) 口頭発表

Koyama, T., Iida, A., Yoshizawa, M. et al.: Development and Characterization of Tissue-Engineered Oral Mucosa Using Cryopreserved Oral Keratinocytes. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 86th Annual Meeting, Scientific Sessions, San Francisco, CA USA, Sept 29-Oct 2 2004. J. of Oral and Maxillofacial Surgery 62 (Supplement 1) : 64-65, 2004.

Yoshizawa M, Izumi K, et al.: Clinical evaluation of Oral Mucosa Reconstruction by Using Ex Vivo Produced Oral Mucosa Equivalent (EVPOME). 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. Oct 20-23, 2004. Chiba, Japan.

芳澤享子、小山貴寛、他；動物由来物質を含まない培養システムによる培養口腔粘膜の開発. 第15回日本口腔粘膜学会総会 平成17年7月7,8日 熊本

Yoshizawa M, Koyama T, et al.: Development of a Tissue-Engineered Human Oral Mucosa in an Animal Product-Free Culture System. International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Vienna, Austria Aug 29-Sep 2 2005. Int J Oral Maxillofac Surg 34 suppl :140 2005.

中西義崇、泉健次、芳澤享子、齊藤力：培養複合口腔粘膜における血管内皮細胞成長因子(VEGF)発現. 第50回日本口腔外科学会総会 2005.10.23-25 大阪

Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, et al.: Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Oral Mucosa Substitutes. ADEA/AADR/CADR Meeting & Exhibition, Orlando, Florida, March 8-11, 2006.

Yoshizawa M, Koyama T, et al.: Regeneration of oral mucosa by tissue engineered oral mucosa grafts. 7th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, China, Dec 5-9, 2006.

(3) 出版物

なし

研究の背景と目的

わが国が高齢化社会を迎えるにともない、顎顔面口腔領域では食事や会話のための機能を保つために、腫瘍や外傷の手術によって欠損した口腔粘膜の再建や、義歯、インプラントなどの補綴治療前に不足している口腔粘膜の再生といった治療がこれまで以上に重要視されてきている。口腔粘膜、歯肉は食塊等の様々な刺激から生体を防御すると共に、歯の支持、口腔感覚の受容にもあたっている。口腔は無数の細菌が存在する場であり、この防御機構を再建することは口腔機能のQOLを向上させるにも不可欠である。腫瘍や外傷などによる口腔粘膜欠損は、従来から植皮や人工材料で修復されてきていたが、いずれも採取部位や移植後の表面性状、あるいは扱いやすさの問題で必ずしも満足の行くものはなかった。1990年以降、ティッシュエンジニアリングを応用した培養口腔粘膜上皮シートの開発と臨床応用に関する報告が国内外ともになされており、これらは生着も良好で顕著な機能障害も認めなかったとされている^{1,2,3)}。しかしながらこの培養口腔粘膜シートは非常に脆弱であるため、狭く複雑な形態の口腔領域で扱うには操作性に問題があった。またこの口腔粘膜上皮細胞の培養にはウシ胎仔血清やマウスの細胞(feeder layer)が必要とされるため、狂牛病感染や未知の病原体感染の危険性をはらんでいる。これらの問題を解決するために、私たちは1999年にウシ胎仔血清とマウス細胞を必要としない培養システムを用いて培養複合口腔粘膜(以下 EVPOME と略す)を開発した⁴⁾。口腔粘膜は組織学的に粘膜上皮と上皮下組織からなるが、この EVPOME はヒト新鮮屍体真皮である AlloDerm[®](LifeCell Corp, USA)の上に培養した口腔粘膜上皮細胞を播種し作製しており、粘膜上皮と上皮下組織に相当する2層構造が得られていることから、組織学的構造が口腔粘膜と類似しているとともに、取り扱いが容易であることが大きな特徴である。新潟大学歯学部倫理委員会の認可を受け、私たちは2000年11月より舌や歯肉の前癌病変である白板症や初期癌の症例に対して自家 EVPOME 移植を開始したところ全例生着良好で移植部の疼痛が少なく瘢痕形成も少ない傾向にあった⁵⁾。そし

て2002年度から2004年度にかけて文部科学省より高度先進医療開発経費(B)の支援のもと、EVPOME移植の適応拡大について検討するために、神戸大学と富山大学との共同研究を開始、前癌病変や初期癌だけでなく、悪性腫瘍術後の歯槽堤再建症例やインプラント治療に関連して口腔粘膜欠損を補う必要のある症例などに対してもEVPOME移植を応用した。その結果、2000年11月から2005年3月までに三施設において90例のEVPOME移植症例を経験し、全例生着はほぼ良好であった。

しかしながら、口腔の部位によって治癒の早さや瘢痕形成の程度に差がある傾向がみられたため、より早く、より瘢痕を少なく口腔粘膜を再生させるための検討が必要と考えられた。それには、EVPOME移植後の口腔粘膜再生過程を基礎的に解明した上で、より良好な口腔粘膜再生を検討することが必要と考えられたため、今回の研究の目的の一つは、臨床でのEVPOME移植方法に近似した方法によるEVPOMEの動物移植モデルを開発することであり、まずは最もシンプルな動物モデルであるEVPOMEの皮膚欠損創への移植モデルを作製し、それを用いてEVPOMEによる皮膚再生過程を形態学的手法にて観察し、その次の段階として、EVPOMEの口腔内移植モデルを作製し、EVPOME移植後の口腔粘膜再生メカニズムを検討することとした。

材料と方法

(1) ヒト培養複合口腔粘膜の作製 (図1, 2, 3)

新潟大学医歯学総合病院口腔外科外来において、同意の得られた患者より抜歯などの小手術の際に余剰となった5mm角ほどの口腔粘膜を採取し、組織片を0.03%トリプシン液により酵素処理を行い、細胞単離後に血清添加のない培養液を用いて上皮細胞を培養する。予定される移植範囲に十分な細胞数が得られた後、直径10mmの円形にトリミングしたヒト無細胞真皮AlloDerm[®]に細胞を播種、48ウェルプレート内で培養液に浸された状態で4日間培養し、その後トランスウェルインサート上に培養粘膜を移して

air/liquid interface の状況下で1, 2 週間培養を行うと AlloDerm[®]の上に重層化した上皮細胞が認められるようになる。AlloDerm[®]に細胞を播種後およそ 11 日目 (Day 11 equivalent)のものを実験に使用している。

(2) ヌードマウスの背部皮膚に作った皮膚欠損創への移植実験 (図 4)

BALB/c(-)ヌードマウスの背部皮膚に直径10mmの皮膚欠損創を2箇所作製し、以下の群に分けて同部へ移植した。固定はアクロマイシン軟膏含有ガーゼで tie-over固定を行った。移植後3日目で固定は除去した。

実験群(右側):EVPOMEを移植

対照群(左側):AlloDerm[®]を移植

経時的に肉眼的に観察してカメラで撮影後に屠殺、移植部を採取し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリンエオジン染色を施し、光学顕微鏡で組織学的に観察し、創の治癒過程を比較検討した。

(3) ヌードマウスの口腔内に作った口腔粘膜欠損創への移植実験 (図 5)

BALB/c(-)ヌードマウスの右側頬粘膜に3mm²の口腔粘膜欠損創を作製し、以下の群に分けて同部へ移植した。固定はシリコン膜を用いて、移植後5日目で除去した。

実験群:EVPOMEを移植

対照群:AlloDerm[®]を移植

経時的に肉眼的に観察してカメラで撮影後に屠殺、移植部を採取し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリンエオジン染色を施し、光学顕微鏡で組織学的に観察し、創の治癒過程を比較検討した。

結果

(1)ヌードマウスの背部皮膚に作った皮膚欠損創への移植実験

術後 3 日目の固定用ガーゼを除去した時期では、EVPOME 移植部、AlloDerm®移植部ともに生着は良好であり、剥離されることはなかった。組織学的には、EVPOME の上皮細胞はほぼ連続して認められた。(図 6)

術後 7 日目では、肉眼的には EVPOME 移植部は範囲が縮小し、中央部に痂皮形成が認められた。また AlloDerm®移植部は、創の範囲は縮小しないままに盛り上がった痂皮が形成されていた。組織学的には、EVPOME の重層上皮は一部は残存するが大部分は脱落し、創は痂皮で覆われている。(図 7)

術後 28 日目では、肉眼的には EVPOME 移植部は AlloDerm®移植部と同様に、周囲よりやや陥凹してはいるが、表皮で覆われた状態となった。組織学的には、表層に角化層を有する重層扁平上皮で覆われているが、周囲皮膚と比較すると、上皮脚は平坦である。(図 8)

(2)ヌードマウスの口腔内に作った口腔粘膜欠損創への移植実験

移植後 5 日目でシリコン膜を除去したが、肉眼的には EVPOME は脱落することなく生着していた。組織学的には、作製した EVPOME と同様な重層化した上皮層が連続的に AlloDerm®上に観察された。周囲からは肉芽組織の増生が認められた。(図 9)

移植後 7 日目では、肉眼的には EVPOME 移植部は周囲とのステップがなくなり平坦化していた。組織学的には、AlloDerm®上の上皮表層が剥離、脱落する部分も認められたが、数層の連続した上皮層が観察された。(図 10)

移植後 14 日目では、肉眼的にはやや白いが周囲粘膜と同様な性状を示し、上皮化が観察された。組織学的には、周囲と同様の厚みを有した重層上皮層が AlloDerm®上に観察された。AlloDerm®上の上皮は隣接する上皮とは違い、基底層と上皮下層との間に

裂隙が認められた。(図 11)

移植後 21 日目では、肉眼的には前方部には痂皮が認められるが、その後方は上皮化した粘膜が周囲よりもやや白いが周囲粘膜と同様な性状で認められた。組織学的には、さらに厚みを増し周囲と同様の厚みを有した重層上皮層が AlloDerm[®]上に観察された。上皮表層には角化層も認められる。しかしながら、AlloDerm[®]上の上皮は隣接する上皮とは違い、基底層と上皮下層との間に裂隙が認められた。(図 12)

AlloDerm[®] 移植群では、術後 14 日目でも周囲組織より浮かび上がった状態で、白色で脆弱な組織として認められる。組織学的には移植部分の上皮層は認められず、AlloDerm[®] 下層に炎症性細胞浸潤が多数認められた。(図 13)

考察

私たちが開発し、臨床応用している EVPOME は、これまでの研究より上皮細胞は増殖活性が高く、移植材料には有利な性質を有していると考えられている^{6, 7)}。また EVPOME をマウス皮下へ移植し、EVPOME の生体内における動態を観察した研究では、AlloDerm[®]単独を移植した対照群に比べ、EVPOME 移植群では上皮下に多数の血管が新生されることを報告した⁸⁾。さらに EVPOME 培養液中の創傷治癒を促進する成長因子放出量を測定することで EVPOME 上皮細胞の増殖活性をモニタリング可能かどうかについて検討する目的で、培養上清中の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を測定した結果、AlloDerm[®]上に上皮細胞が重層化した状態が最も VEGF 量の放出量が多いことも明らかになっている。以上の研究から、EVPOME は口腔粘膜再生を促進させる材料であると考えられる。

EVPOME のもう一つの特色は、スローウィルスや狂牛病感染の危険性があるウシ由来物質とヒト細胞へ異種動物 DNA が導入される危険性のあるマウス細胞との共培養を培養システムから除外したことである⁴⁾が、足場に無細胞性ヒト真皮組織を粘膜上皮細胞の用

いたため、操作性が良好なことも特徴の一つである⁹⁾。口腔は狭いうえに複雑な構造を有し、唾液に曝された湿潤な環境であるために、口腔内移植材料は良好な操作性を有する必要があるが、従来報告されてきた培養粘膜シートはそれ単独では非常に脆弱で操作性に問題があり、それに対しEVPOMEはその問題点を解決したものである。しかしながら、実際にさまざまな症例に対して臨床応用した結果、これまでのex vivoやin vivoの実験レベルでは予想していなかった部位別、症例別の口腔粘膜再生過程の違いを認めた。そのため本研究では、臨床でのEVPOME移植方法に近似した方法による動物移植モデルを作製し、EVPOMEによる皮膚あるいは口腔粘膜再生過程を観察した。

皮膚欠損部への培養皮膚移植モデルでは、移植後4週目で正常皮膚にほぼ近い状態の皮膚になることが報告されている⁹⁾が、今回の結果では、術後3日目には確認できた上皮細胞が術後7日目には大部分が脱落し、痂皮形成が進み、術後4週目には周囲皮膚と肉眼的には同様な性状を呈してはいるものの、重層上皮の上飛脚は平坦化していた。これは、EVPOMEを皮膚へ移植後、同部は痂皮形成した後脱落し、周囲から表皮が伸びだしてくるのではないかと考えられた。

口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植では、術後EVPOMEが乾燥や痂皮の形成をすることなく生着した。これは口腔内が湿潤した環境であることが影響していると思われた。また組織学的には、移植後5日目で観察される重層上皮は術後7日目で表層が脱落してはいたが、術後14日目には周囲上皮と同様の厚さの重層扁平上皮を形成していた。術後21日ではさらに厚さの増した重層扁平上皮が観察された。しかしながら、EVPOME移植部と思われる上皮の基底膜には、標本作製時に断裂したと思われる裂隙が認められ、周囲の粘膜上皮より脆弱であると思われた。しかし一方で、この所見はEVPOMEの基底膜が残存していることを示していると考えられるため、EVPOMEが生着する過程において、EVPOMEの基底膜の存在は重要であると思われた。EVPOME移植症例について、術後に同意の得られた患者より、EVPOME移植部の細胞診あるいは生検を行った検討では、

固定除去後に上皮細胞が細胞診で確認され、術後18日目ではAlloDerm[®]が周囲組織より吸収されつつあり、その上方の上皮は重層化した扁平上皮を示していた。術後28日目ではAlloDerm[®]はほぼ吸収され、上皮は周囲と同様の組織像が得られた¹⁰⁾(図14)。このようにAlloDerm[®]は術後28日ではほぼ吸収されることがわかっているが、本研究の結果から、AlloDerm[®]の成分である基底膜は残存し、上皮再生に関与していることが示唆された。また、AlloDerm[®]を移植した群は、EVPOME移植後よりも炎症性細胞の浸潤が著しく、生体からより排除される傾向にあり、EVPOMEはAlloDerm[®]と比較し、口腔粘膜再生に有利であることが示唆された。今後はAlloDerm[®]ではない材料を用いた培養口腔粘膜を作製し、本モデルを用いた移植後の組織再生についてEVPOMEの場合と比較検討を行うことで、口腔粘膜の再生における基底膜の関与とその重要性についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

引用文献

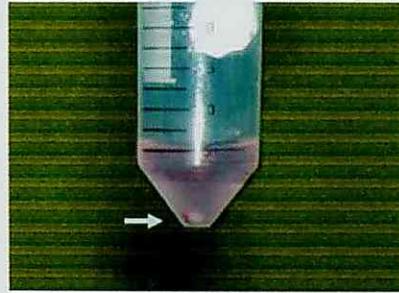
1. Luca M., Albance E. et al : Evidense that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplant* 50 : 454-459, 1990.
2. Ueda M., Hata K. et al : Peri-implant soft tissue management through use of cultured mucosal epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86 : 393-400, 1998.
3. Lauer G : Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium Method and clinical application. *J Craniomaxillofac Surg* 22 : 18-22, 1994.
4. Izumi K, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE: Ex Vivo Development of a Composite Human Oral Mucosal Equivalent. *J Oral & Maxillofac Surg* 57(5):571-577, 1999.
5. Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M: Intraoral Grafting of An Ex Vivo Produced Oral Mucosa Equivalent: A Preliminary Report. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32:188-197 2003.
6. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE: Development and Characterization of A Tissue Engineered Human Oral Mucosa Equivalent Produced In A Serum-free Culture System. *J Dent Res* 79(3); 798-805, 2000.
7. 泉健次, 寺師浩人, 芳澤享子: ヒト培養複合口腔粘膜上皮層における Glucose transporter 1 (GLUT1)発現. *日本口腔外科学会雑誌* 47(5): 289-292 2001.

8. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE; Evaluation of Transplanted Tissue-engineered Oral Mucosa Equivalents to SCID Mice. *Tissue Eng.*, 9: 163–174, 2003.
9. Smiley AK, Klingenberg JM, Boyce ST. et al; Keratin expression in cultured skin substitutes suggests that the hyperproliferative phenotype observed in vitro is normalized after grafting. *Burns* 32: 135-138, 2006.
10. 芳澤享子、泉健次、飯田明彦、他； 癌治療への再生医療の応用 培養複合口腔粘膜 (EVPOME)の口腔癌治療への応用. *日本再生医療学会雑誌*. 6(2); 203-208, 2007.

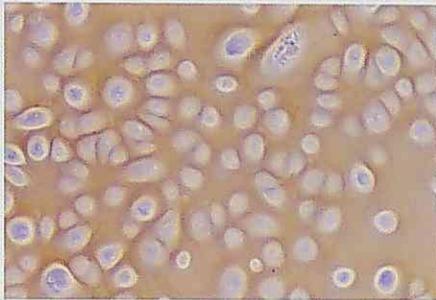
培養複合口腔粘膜(EVPOME)の作製法



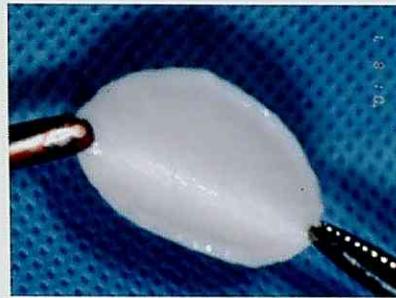
口腔粘膜採取



口腔粘膜組織片



上皮細胞培養(無血清培地)



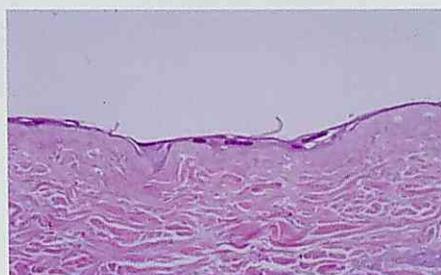
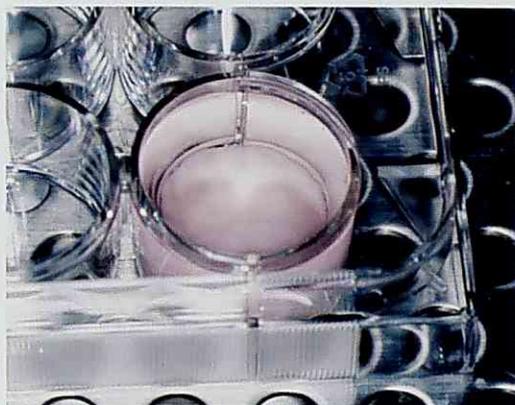
AlloDerm®

図1:培養複合口腔粘膜(EVPOME)の作製法

約5mm角の口腔粘膜を採取し、組織片を0.03%トリプシン液により酵素処理を行い、細胞単離後に血清添加のない培養液を用いて上皮細胞を培養する。予定される移植範囲に十分な細胞数が得られた後、直径10mmの円形にトリミングしたヒト無細胞真皮AlloDerm®に細胞を播種する。

培養複合口腔粘膜(EVPOME)の作製法

AlloDerm®上に細胞を播種し、4日間培養液内で培養



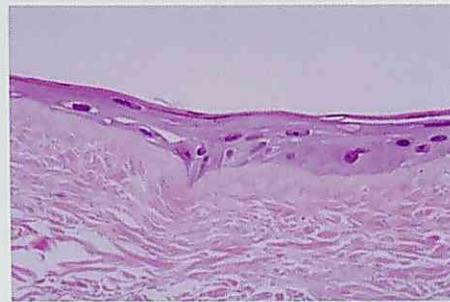
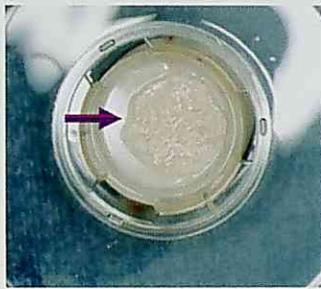
Day 4 equivalentのHE染色像

図2: 培養複合口腔粘膜の作製法

AlloDerm®に細胞を播種してから4日間は48ウェルプレート内で、培養液に浸された状態で培養する。組織学的にはAlloDerm®の上に1、2層の上皮細胞が認められるようになる。

培養複合口腔粘膜(EVPOME)の作製法

細胞播種後5日目からair/liquid interfaceの状況下で培養



Day 11 equivalent のHE染色像

図3: 培養複合口腔粘膜の作製法

トランスウェルインサート上に培養粘膜を移し、air/liquid interfaceの状況下で1週間培養を行う(Day 11 equivalent)。AlloDerm®の上に重層化した上皮細胞が認められるようになる。

マウス皮膚欠損創へのEVPOME移植実験

材料と方法

- 1、ヒト口腔粘膜よりEVPOME (Day 7-10 equivalent) を作製
- 2、ヌードマウス(オス4, 5週齢)の背部皮膚欠損創にEVPOMEを移植

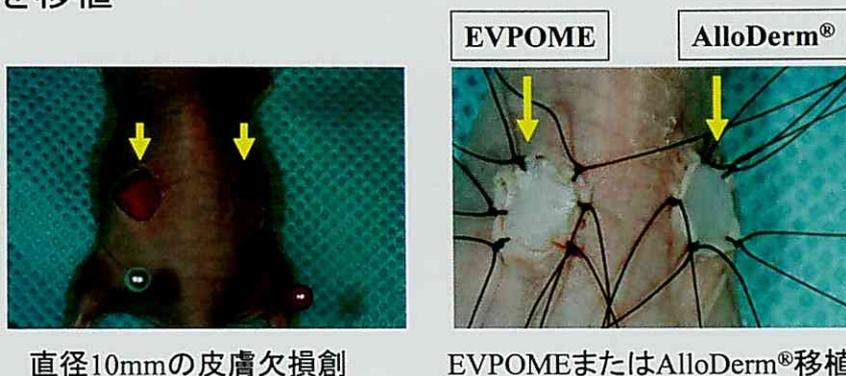


図4: マウス皮膚欠損創へのEVPOME移植実験

BALB/c(-)ヌードマウスの背部皮膚に直径10mmの皮膚欠損創を2箇所作製し、以下の群に分けて同部へ移植した。

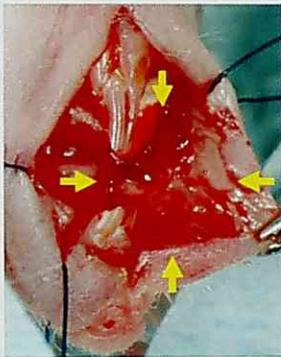
実験群(右側): EVPOMEを移植

対照群(左側): AlloDerm®を移植

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

材料と方法

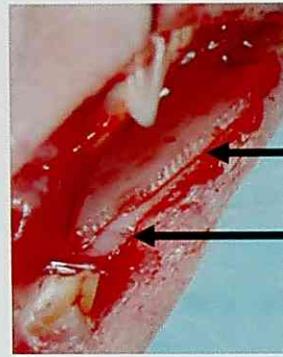
- 1、ヒト口腔粘膜よりEVPOME (Day 7-10 equivalent) を作製
- 2、ヌードマウス(オス4, 5週齢)の右側頬粘膜にEVPOMEを移植



3mm × 3mmの粘膜欠損創



EVPOME移植



シリコン膜

EVPOME

図5: マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

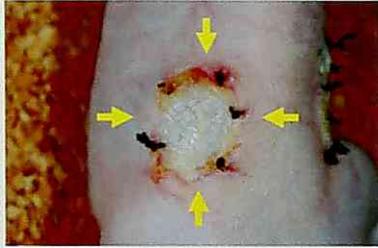
BALB/c(-)ヌードマウスの右側頬粘膜に3mm²の口腔粘膜欠損創を作製し、以下の群に分けて同部へ移植した。

実験群: EVPOMEを移植

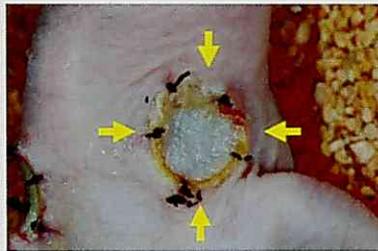
対照群: AlloDerm®を移植

マウス皮膚欠損創へのEVPOME移植実験

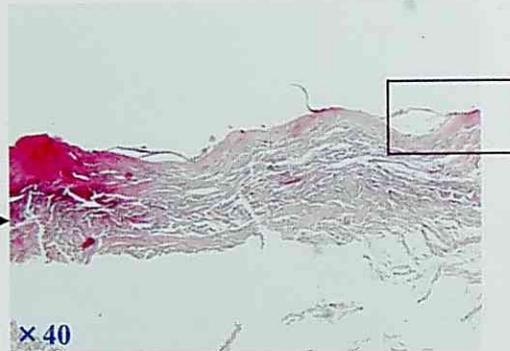
移植後3日目(ガーゼ除去)



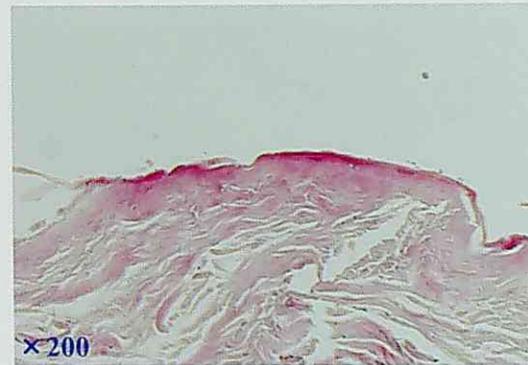
EVPOME移植



AlloDerm®移植



×40



×200

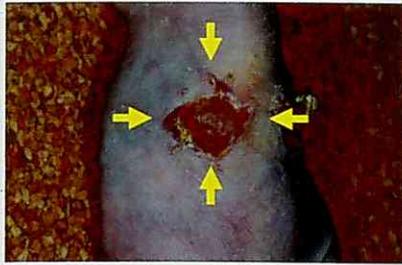
図6:マウス皮膚欠損創へEVPOME移植後3日目

術後3日目の固定用ガーゼを除去した時期では、EVPOME移植部、AlloDerm®移植部ともに生着は良好であり、剥離されることはなかった。

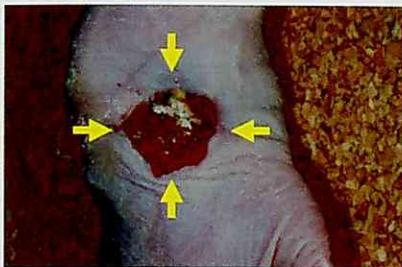
組織学的には、EVPOMEの上皮細胞はほぼ連続して認められた。

マウス皮膚欠損創へのEVPOME移植実験

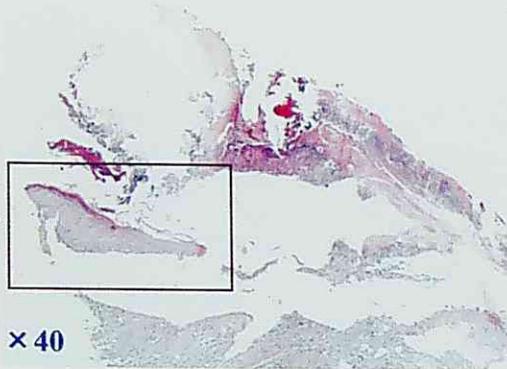
移植後7日目



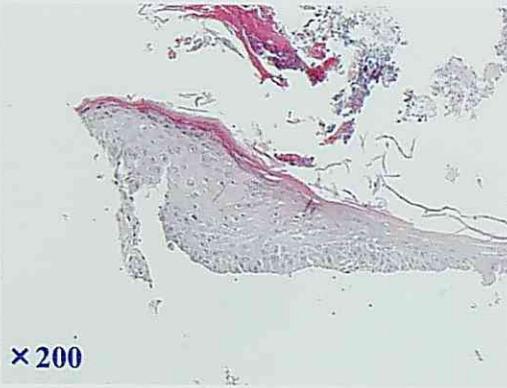
EVPOME移植



AlloDerm®移植



×40



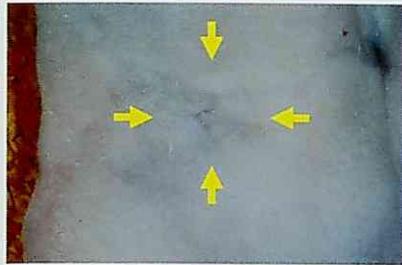
×200

図7:マウス皮膚欠損創へEVPOME移植後7日目

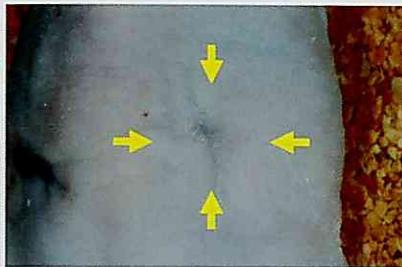
肉眼的にはEVPOME移植部は範囲が縮小し、中央部に痂皮形成が認められた。またAlloDerm®移植部は、創の範囲は縮小しないままに盛り上がった痂皮が形成されていた。組織学的には、EVPOMEの重層上皮は一部は残存するが大部分は脱落し、創は痂皮で覆われていた。

マウス皮膚欠損創へのEVPOME移植実験

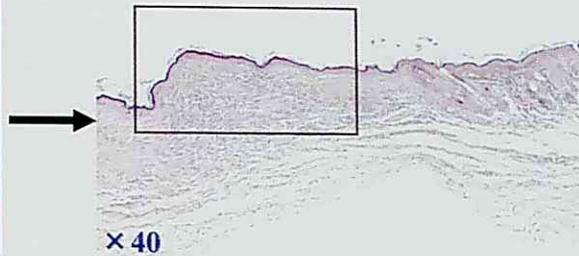
移植後28日目



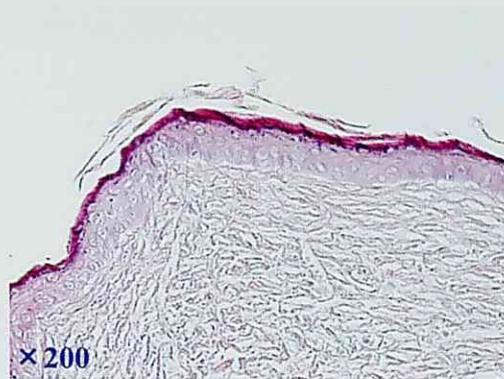
EVPOME移植



AlloDerm®移植



×40



×200

図8: マウス皮膚欠損創へEVPOME移植後28日目

肉眼的にはEVPOME移植部はAlloDerm®移植部と同様に、周囲よりやや陥凹してはいるが、表皮で覆われた状態となった。組織学的には、表層に角化層を有する重層扁平上皮で覆われているが、周囲皮膚と比較すると、上皮脚は平坦である。

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

移植後5日目

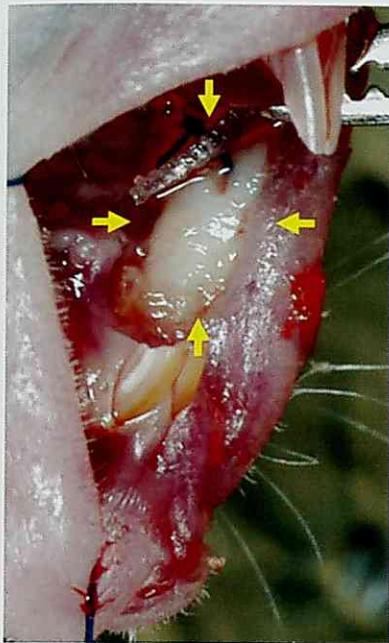


図9: マウス口腔粘膜欠損創へEVPOME移植後5日目

移植後5日目でシリコン膜を除去した。肉眼的にはEVPOMEは脱落することなく生着していた。組織学的には、作製したEVPOMEと同様な重層化した上皮層が連続的にAlloDerm®上に観察された。周囲からは肉芽組織の増生が認められた。

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

移植後7日目

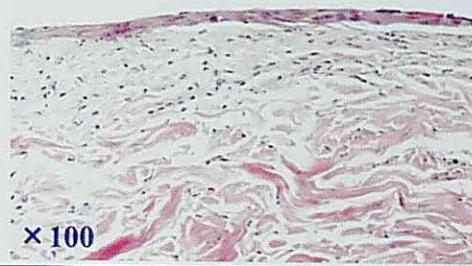
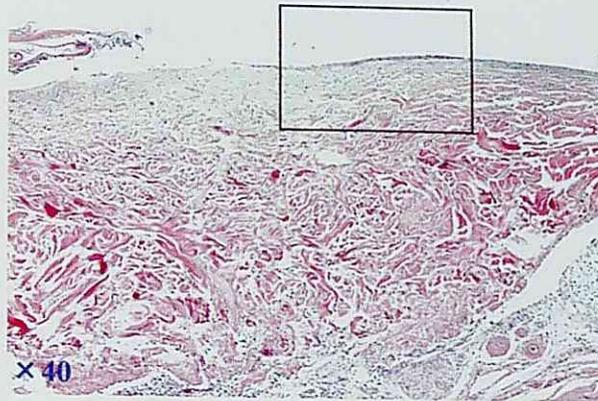
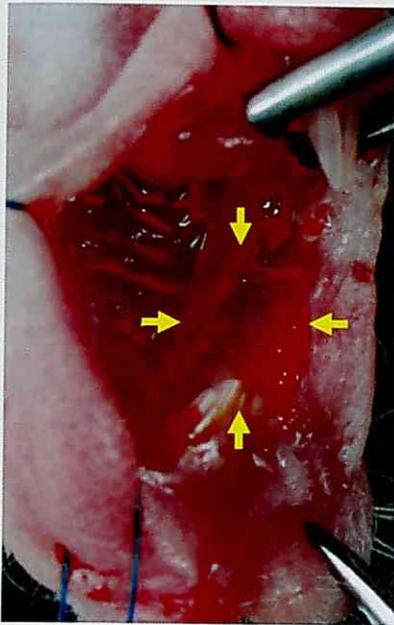


図10: マウス口腔粘膜欠損創へEVPOME移植後7日目

移植後7日目では、肉眼的にはEVPOME移植部は周囲とのステップがなくなり平坦化していた。組織学的には、AlloDerm®上の上皮表層が剥離、脱落する部分も認められたが、数層の連続した上皮層が観察された。

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

移植後14日目

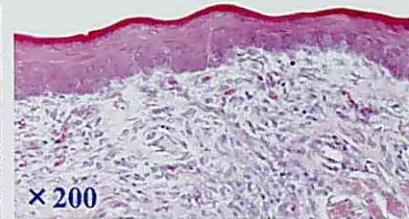
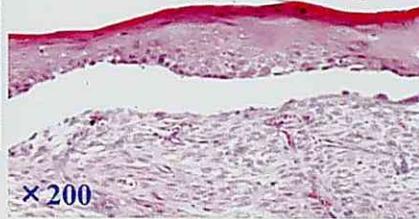
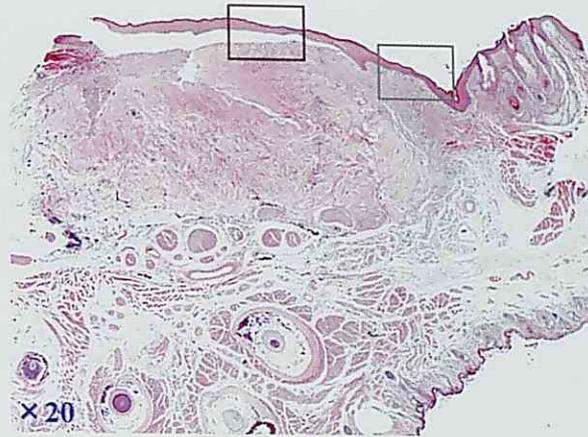
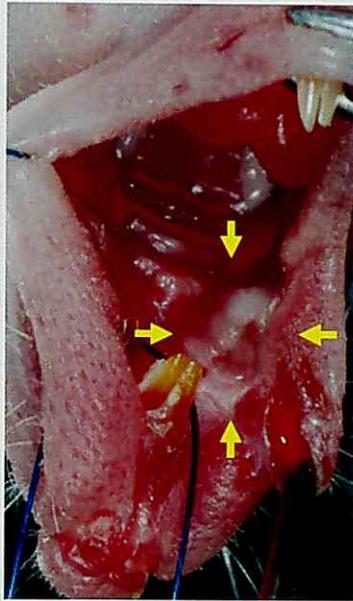


図11:マウス口腔粘膜欠損創へEVPOME移植後14日目

移植後14日目では、肉眼的にはやや白いが周囲粘膜と同様な性状を示し、上皮化が観察された。組織学的には、周囲と同様の厚みを有した重層上皮層がAlloDerm®上に観察された。AlloDerm®上の上皮は隣接する上皮とは違い、基底層と上皮下層との間に裂隙が認められた。

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

移植後21日目

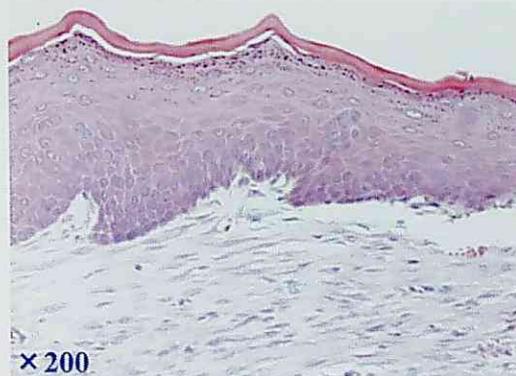
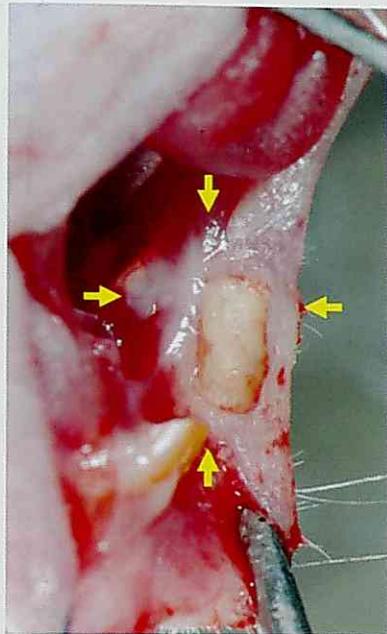


図12: マウス口腔粘膜欠損創へEVPOME移植後21日目

移植後21日目では、肉眼的には前方部には痂皮が認められるが、その後方は上皮化した粘膜が周囲よりもやや白いが周囲粘膜と同様な性状で認められた。組織学的には、さらに厚みを増し周囲と同様の厚みを有した重層上皮層がAlloDerm®上に観察された。上皮表層には角化層も認められる。しかしながら、AlloDerm®上の上皮は隣接する上皮とは違い、基底層と上皮下層との間に裂隙が認められた。

マウス口腔粘膜欠損創へのEVPOME移植実験

AlloDerm®移植後14日目

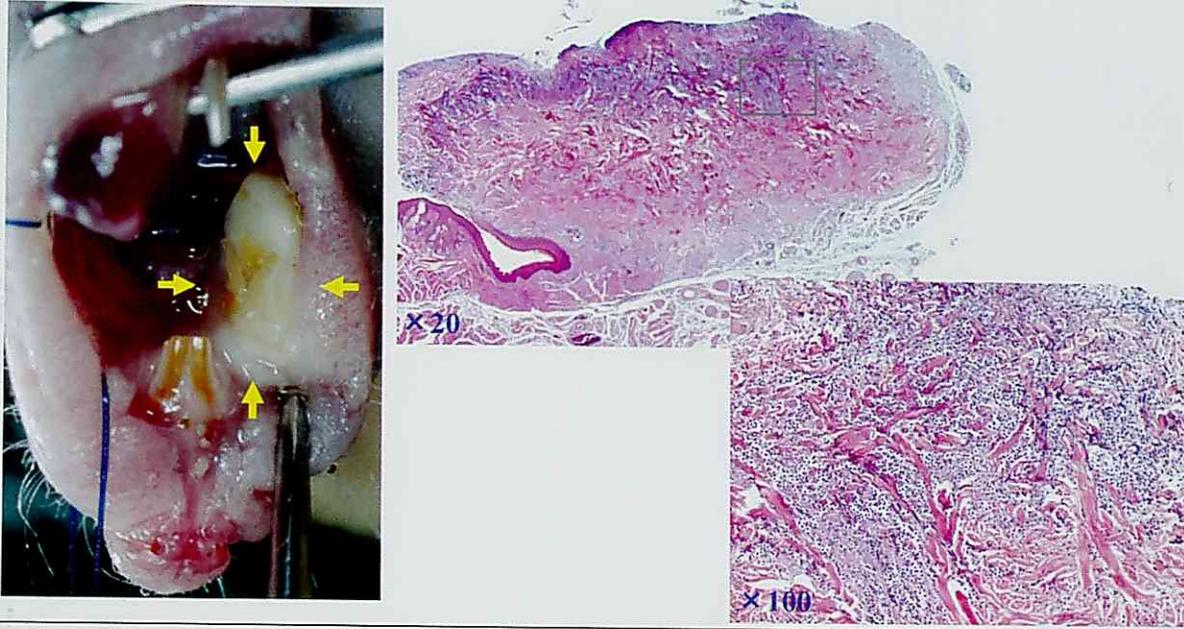


図13: マウス口腔粘膜欠損創へAlloDerm®移植後14日目

AlloDerm® 移植群では、術後14日目でも周囲組織より浮かび上がった状態で、白色で脆弱な組織として認められる。組織学的には移植部分の上皮層は認められず、AlloDerm® 下層に炎症性細胞浸潤が多数認められた。

EVPOME移植後の口腔粘膜治癒過程

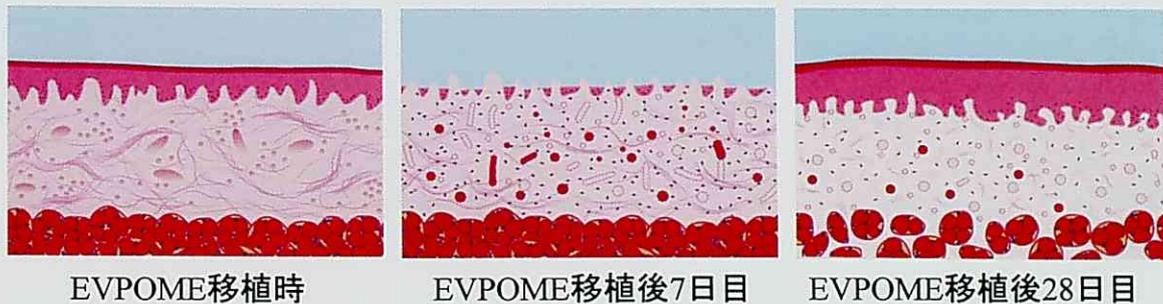


図14: EVPOME移植症例における治癒過程(模式図)

EVPOME移植後7日目では上皮表層は脱落するが、上皮基底層と基底膜は残存する。術後28日目には上皮は周囲と同じ厚みの重層扁平上皮となり、AlloDerm[®]は吸収される。