

論文名 : In-process monitoring of a tissue-engineered oral mucosa fabricated on a micropatterned collagen scaffold: Use of optical coherence tomography for quality control (マイクロパターン化コラーゲン足場材で作製した培養口腔粘膜のインプロセスモニタリング : 品質管理のための光干渉断層撮影の使用) (要約)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 SUEBSAMARN ORAKARN

【緒言】 ティッシュエンジニアリング技術の発達により、培養皮膚はすでに製品化に至っているが、培養口腔粘膜の開発は後塵を拝している。国民の口腔 QOL の向上、口腔機能維持のために培養口腔粘膜の製品化も加速する必要がある。我々は既存の培養皮膚との差別化を図るため生体模倣に着目し、上皮細胞播種面にマイクロパターンという真皮表皮接合部 (Dermal Epidermal Junction, DEJ) を模した凹凸微細構造を付すために、MEMS 技術を用いて魚うるこコラーゲン足場材を開発し、上皮脚構造をもつ培養口腔粘膜作製に成功した。

報告では、PDMS 鋳型からコラーゲン足場材表面にマイクロパターンを付与したが、より生体模倣させた培養口腔粘膜を作製するために、曲線で構成されたマイクロパターン作製法を求め、私はレーザー加工による金型鋳型に着目した。

一方、ヒトの細胞が組み込まれた再生医療製品の作製に当たっては、製品の質が移植後の治療効果に影響を及ぼすため、製品製造中のモニタリングと評価などの品質管理が必須である。製品の品質管理はリアルタイムで無菌的、かつ非侵襲的に製品をモニタリングしなければならないにも関わらず、これまで 3 次元構造をもった再生医療製品に対して利用可能なツールがほとんど存在しないことは、再生医療の発展を大きく損ねていた。今回私は、眼科の診断などで汎用されている薄い組織内部構造を高解像度でリアルタイムに撮影できる光干渉断層撮影 (Optical Coherence Tomography, OCT) イメージングシステムに着目し、培養口腔粘膜の品質管理に利用できるのではないかと考えた適用を試みた。

以上より、私の研究チームが目指す培養口腔粘膜の臨床応用実現に向け、レーザー加工した金型鋳型から、より生体に類似したマイクロパターン構造を作製すること、および、非侵襲的培養口腔粘膜品質管理法として、OCT イメージングシステムの利用可能性を検証することの 2 点を本研究の目的とした。

【材料と方法】 足場材に湾曲したマイクロパターン構造を付与するために、DEJ 構造を模倣した曲面で構成された凹凸構造デザインをピコ秒レーザーでステンレス鋼の上に表面加工した。これを陰性金型として 1.1%魚うるこコラーゲン溶液を流し込み、線維化させマイクロパターン付きコラーゲン足場材を作製した。一方、培養口腔粘膜の作製は、これまでの方法に準じ、インフォームドコンセントを得た患者歯肉から単離した口腔クセラチノサイトを無血清培地で培養した後、マイクロパターン化されたコラーゲン足場材の表面に播種

して作製した。

作製した培養口腔粘膜は Cell3 Imager Estier (SCREEN Holdings, Inc.) を用い OCT 画像を取得した。同一部位を 8 日目と 11 日目に撮影するため培養口腔粘膜にマーキングした後、中央部の 1×1 mm のエリアを選択し、Z 軸方向は 200 μm 以上の厚さまで、1 μm / ピクセルの解像度で撮影した。11 日目の OCT 画像を取得した後、培養口腔粘膜は 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋し、組織学的分析のためにヘマトキシリンおよびエオシン (HE) で染色した。さらに、培養口腔粘膜の上皮層の厚さを定量評価するため OCT 画像解析により上皮層の厚さも算出した。

【結果】 SEM によりコラーゲン足場材には湾曲したマイクロパターンが複製、転写されていた。OCT 画像では 8 日目、11 日目ともに、足場材のマイクロパターンとその上に形成された上皮細胞層が明瞭に識別できた。また、足場材と上皮層の界面も描出できることで、製品の欠陥になり得る足場材と上皮層間のギャップも検出できた。さらに、深層学習を応用し上皮層を抽出したことで、8 日目と 11 日目の培養口腔粘膜の上皮層の厚さの増加や分布も解析でき、上皮層の厚さに関する定量評価も可能であった。HE 観察により上皮脚構造も観察できた。

【考察】 ピコ秒レーザーで表面加工した陰性ステンレス製鋳型から、DEJ を模倣した曲面で構成されるマイクロパターンが付与されたコラーゲン足場材を作製できたことと、この鋳型が何度でも繰り返し使用できることを考えると、本法を用いれば様々なマイクロパターン形状を付与したコラーゲン足場材の作製が可能で、かつ足場材の大量生産も可能となるので、画期的な工程であることが示唆された。

そして、OCT 画像により培養口腔粘膜の上皮層とマイクロパターン化した足場材は明瞭に可視化でき、かつ、上皮層とその下にあるマイクロパターン足場との間のギャップも描出できた。これは、これまでの解析方法では決して検出できない、培養口腔粘膜作製途中で培養口腔粘膜の内部に発生した欠陥の発見につながり、不良品を除去できることにつながる有用な非侵襲的ツールとなり得る。また本イメージングシステムに深層学習を応用することで、培養口腔粘膜の上皮層の厚みなどの品質管理に応用できる定量評価も可能となり、OCT イメージングシステムの利用価値が高いことも明らかとなった。

【結論】 ピコ秒レーザー表面加工されたステンレス製鋳型は、コラーゲン足場材にマイクロパターンを付与する陰性鋳型として使用可能であることが示唆された。さらに、OCT イメージングシステムが再生医療製品の品質管理ツールとして、培養口腔粘膜を非侵襲的かつ定量的にモニタリング、評価することが可能であることが示唆された。