

論 文 要 旨

Simple and efficient method for consecutive inactivation-cryopreservation of porcine skin grafts

(簡便で効率的なブタ皮膚移植片の不活化凍結保存法)

関西医科大学形成外科学講座
(指導：楠本 健司 教授)

益 岡 弘

【研究目的】

巨大色素性母斑や熱傷の治療に伴う広範囲皮膚欠損の修復には人工真皮と自家培養表皮が有用であり、現在は保険適用されている。しかし実際に臨床で使用されるにつれ、人工真皮を用いて再生させた組織には自家培養表皮の生着が不良であることがわかってきた。そこで、細胞を死滅させる高圧処理技術に着目し、自己の真皮組織を不活化して足場に再利用し自家培養表皮生着を向上させることを目標にその技術を開発してきた。色素性母斑では 200MPa、10 分間の高圧処理で細胞成分が死滅して表皮は脱落し、その一方で真皮構造は保たれることがわかった。

本研究では、皮膚欠損の治療への応用拡大を目的に、高圧処理して不活化した皮膚の凍結保存が臨床的に品質維持可能かどうかについて検証を行った。保存液には、手術室や臨床の現場で簡便に準備使用できる、10%グリセロールを含むグリセオール注を採用した。ミニブタを使用して、不活化後に凍結保存した皮膚と不活化後即時使用した皮膚の自家移植後の組織変化について検証を行った。

【研究方法】

ミニブタの鼠径部から皮膚採取した。皮膚片は生理食塩水 (NSS 群) またはグリセロール/フルクトース液 (グリセオール注) (Glycerol 群) の入った密封バッグへ封入して高圧処理を行い、引き続き -80°C で凍結保存を行った。5 週間後に対側の鼠径部から同様に皮膚採取して高圧処理を行った皮膚片をコントロール群とし、背部の筋膜上にそれぞれの皮膚片を移植した。各群の移植前皮膚片の電子顕微鏡による観察も行った。移植 1, 4, 11 週間後に各群の皮膚片をそれぞれ摘出し、標本作成を行った。移植時および摘出時の肉眼的表面積、摘出組織切片の血管断面積、組織断面積および組織厚を計測した。

【結果】

電子顕微鏡での検討で、SEM ではコラーゲン線維に明らかな差異は認めなかった。TEM ではいずれも基底膜の構造が保たれていることが確認できた。採取時の皮膚表面積の比較ではいずれも移植時と比べると 11 週間経過時には有意に縮小していた ($p<0.05$)。また、NSS 群のみ移植後 1 週と 11 週の間にも有意差を認めた ($p<0.05$) が、いずれの時点でも 3 群間では有意差はなかった。CD31 抗体による免疫染色では血管面積に有意差はなかった。アザン染色では断面積において減少傾向がみられ、コントロール群で 1 週と 4 週、1 週と 11 週、NSS 群で 1 週と 11 週の間にも有意差を認めた ($p<0.05$) が Glycerol 群では有意差はなかった。組織の厚みにおいても減少傾向を認め、各群の 1 週と 11 週、コントロール群および NSS 群の 4 週と 11 週の間にも有意差を認めた ($p<0.05$)。しかし、いずれの時点でも 3 群間では有意差はなかった。

【考察】

高圧不活化処理を行った皮膚組織の凍結保存の悪影響は認めず、皮膚移植について即時使用とほぼ同等の経過を得ることができた。多重比較検定では有意差を認めなかったが、各群の経過では Glycerol 群での劣化が少なく即時使用に近い経過をたどった。

生理食塩水は冷凍すると結晶化による組織障害を生じる可能性があり、凍結保存においては凍結防止剤としてグリセロールなどが使用される。今回の実験では高圧処理により細胞はすでに死滅しているため細胞内結晶化による細胞障害に配慮する必要はないが、結晶化による何らかの組織障害が培養表皮の移植に影響を及ぼす可能性は否定できない。

広範囲熱傷に使用される同種移植皮膚の保存には高濃度のグリセロールが使用されているが、組織の使用前には生理食塩水などで繰り返し洗い流さなければならぬという煩雑さを伴う。今回、10%グリセロールでは1回生食に浸しただけであるが、凍結保存を経た後の組織移植後経過に悪影響はなかった。

以上の結果から高圧処理皮膚の保存法として10%グリセロール/フルクトース液を使用した簡便で効率的な凍結保存の妥当性が示された。高圧処理には専用の装置が必要であるが、今回の組織保存法の確立により、治療施設を限定せず、手術により採取した皮膚を専門施設で不活化凍結保存を行い、当該の治療施設へのデリバリーにより次の手術時に再利用できるといった臨床的に発展的な応用が可能となった。