

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 24 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592538
 研究課題名（和文） 自己培養口腔粘膜上皮シートを用いた口腔顎顔面の再建
 研究課題名（英文） oral maxillofacial reconstruction using oral mucosal epithelial sheets
 研究代表者：
 深田 健治（FUKADA KENJI）
 東京女子医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70266815

研究成果の概要（和文）：

犬の口腔前庭狭窄モデルの作成と頬部より頬粘膜を採取し温度応答性培養皿を用い培養を行い、自己口腔粘膜シートを作成した。口腔前庭拡張後、創面に口腔粘膜上皮シートを移植した。口腔粘膜上皮シートを使用した群は、コントロール群に比較し、創部の治癒が早く、また瘢痕拘縮も若干軽度であった。

研究成果の概要（英文）：

We made dog stricture model of vestibulumoris and oral mucosal epithelial sheets using temperature-responsive culture dishes. Autologous transplantation of these cell sheets was performed after vestibulumoris. The recovery of transplanted group is early compared with the control group, and the contracted scar of transplanted group is slightly smaller.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔粘膜上皮シート、温度応答性培養皿、細胞シート工学、口腔前庭拡張術

1. 研究開始当初の背景

顎顔面外傷や口腔腫瘍切除、加齢による広範囲の付着歯肉の消失による口腔前庭の狭窄は、義歯やデンタルインプラントの使用を困難にさせ、患者の咀嚼機能を低下させる。現在口腔前庭狭窄における顎堤再建は、2次

的上皮化法と遊離口蓋粘膜移植が主流であるが、前者は 瘢痕治癒による再発や上皮化に時間がかかり、後者は採取できる粘膜に制限があることなどが問題である。これら従来の治療法に対し、患者自身の口腔粘膜細胞を培養し、シート状の培養粘膜上皮を作製し移

植を行えば、より低侵襲で、患者のQOLの高い顎顔面の再建が可能である。東京女子医科大学先端生命医学研究所が開発した温度応答性培養皿を用いると、温度降下のみで細胞を培養器より回収できるため、細胞外マトリックス等を維持したままの高い機能を保持した細胞が回収できる。また、細胞間接着も破壊されないため、細胞がコンフルエントまで培養した場合、全細胞が連結した1枚の培養細胞シートとして回収することができる。得られた培養細胞シートは、培養の間に沈着した細胞外マトリックスを底面に保持したまま回収されるため、容易に他の表面に接着することができる。この培養細胞シートの特性を利用して、皮膚や角膜上皮、心筋など、様々な部位の疾患に対する治療の臨床研究が開始されている。

2. 研究の目的

本研究では、フィーダー細胞を使用せず、温度応答性培養皿を用いて作成した自己口腔粘膜上皮シートを使い、口腔粘膜欠損部や口腔前庭拡張部への移植を行う。これにより、従来の方法より安全性が高く、縫合を必要としない低侵襲で短期間での創傷治癒と瘢痕拘縮の軽減を目的とする。

3. 研究の方法

(1) イヌ口腔粘膜採取および口腔粘膜上皮細胞のシート培養

イヌ〔ビーグル (1歳 オス)〕に対し、ケタラル 2 mL、ドミトール 2 mL の混合液を筋肉内投与し、静脈ラインを確保し、プロポフォールによる導入後、セボフルレンによる維持による気管内挿管による全身麻酔で行い、局所麻酔後イヌ頬粘膜部より電気メスを用いて口腔組織を切除し口腔粘膜組織を得た。イソジンにて消毒・滅菌した組織を 1000 U/mL ディスパーゼに浸し、4°C、一晩処理した。ピンセットにて口腔粘膜上皮層を剥離し、0.25% トリプシン-EDTA 溶液で 37°C、20 分処理した。5%FBS 血清入りの培地を加え、トリプシンを抑制した後 40 μm セルストレイナーで細胞塊を取り除いた。細胞数をカウントし、 4×10^4 cells/cm² の初期播種密度にて、温度応答性カルチャーインサートに播種した。その際培地は、KCM を用いた。約 2 週間の培養の後、37°C のインキュベーターから 20°C のインキュベーターへ移し、30 分低温処理した。

培養皿底面に PVDF (or パーチメント紙) をのせ、表面張力で膜に口腔粘膜上皮細胞シート附着させ回収し、移植に用いた。

犬の口腔より頬粘膜を採取した。



(2) イヌ口腔前庭狭窄モデルの作成

全身麻酔下に、局所麻酔後、下顎前歯 (6 歯) の抜歯し、約 20mm × 10 mm の口腔前庭粘膜 (附着歯肉および口唇粘膜) を切除した。



作成したイヌ口腔前庭狭窄モデルへの口腔前庭拡張術を行った後、創面に口腔粘膜上皮細胞シート移植した。上皮シートの移植しないものをコントロールとした。



4. 研究成果

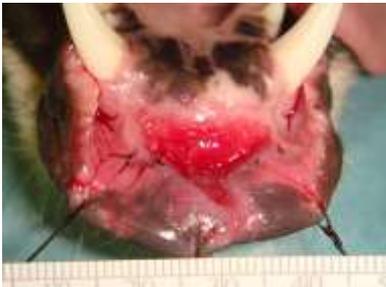
トレパンを用いて、術後4日、1週、2週、4週、7週と再建部粘膜のパンチbiopsyを行い対照群と比較検討した。

(1) 術後の所見

移植後4日後



移植14日後



移植4W後



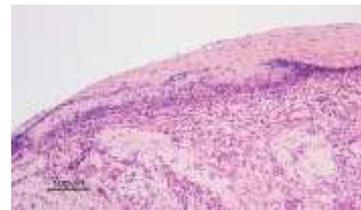
4週後のコントロール
移植群に比較し癒痕拘縮が目立った。



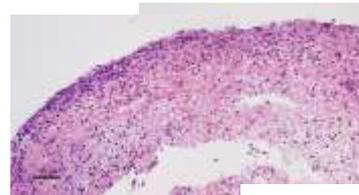
(2) 組織学的所見

口腔粘膜上皮シート移植4日後
移植した細胞シートが生着している。

移植4日：H-E染色



コントロール4日後：H-E染色

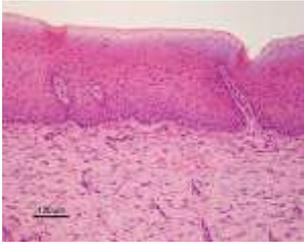


移植群の方がコントロール群に比較し
創面の上皮化が早期に見られた。

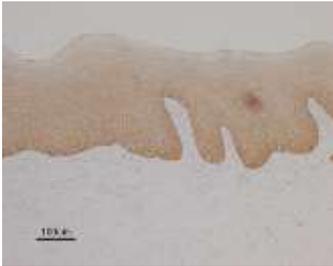
移植2W後：H-E染色



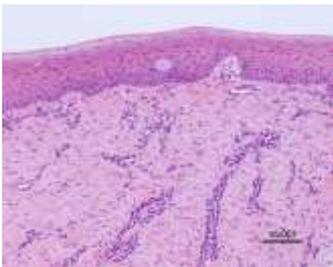
後 4 W : H-E 染色



移植 4 w 後
CK14 染色



移植後 7 w : H-E 染色



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者は
下線)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

深田 健治 (FUKADA KENJI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70266815