

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 5月16日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791745

研究課題名（和文） ガラス化法によるヒト皮膚の凍結保存および常温乾燥保存

研究課題名（英文） Cryopreservation and dried preservation at room temperature of human skin by vitrification procedure.

研究代表者

徳山 英二郎（TOKUYAMA EIJIRO）

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90379785

研究成果の概要（和文）：

生体組織の凍結保存は特殊な設備を要する。この問題を解決しうる方法がガラス化法である。ガラス化法により凍結保存された細胞の生存率が高くなることが知られている。ガラス化法を用いてヒトおよびラット皮膚の凍結保存および常温乾燥保存を行った。さらに、ラットで皮膚移植を行った。透過型電子顕微鏡により細胞構造が保たれていることは確認できたが、細胞を生存させることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

Cryopreservation of biological tissue needs special facilities. Vitrification procedure may solve this problem. It is known that vitrification procedure increases cryopreserved cell survival rate. We carried out cryopreservation and dried preservation at room temperature of human and rat skin by vitrification procedure. Besides, we carried out rat skin grafting. We could confirm cell structure maintain by transmission electron microscopy, but cells could not survive.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：形成外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：皮膚移植、スキンバンク、クリプトビオンス

1. 研究開始当初の背景

広範囲熱傷の患者の治療において、同種皮

膚は有効な生体材料として臨床で使用されている。この同種皮膚を長期間保存している

のがスキンバンクである。日本では日本スキンバンクネットワークが中心となって行っており、年間約 50 例の患者に使用されている。遺体から採取された皮膚はグリセオールなどを含む保存液に浸された後、プログラムフリーザーを用いて凍結され、液体窒素タンクや電気式超冷凍庫で保存される。保存可能な期間は最長で 5 年間とされている。このように、皮膚の凍結保存は特殊な設備を要し、保存期間も限定されているのが問題である。

この問題を解決すべく、近年注目されているのがガラス化法である。ガラス状態とは、分子や原子が不規則な空間配置を維持したまま固形になった状態である。細胞をガラス状態にすることで、従来法に比べ細胞の生存率を低下させることなく容易に凍結できることが知られている。ヒト体外受精時の胚凍結では既に臨床応用されており、近年急速に普及してきている。

また、ガラス化法は細胞の凍結耐性のみならず乾燥耐性にも深く関与している。ヒト組織を常温乾燥保存する方法は未だ確立されていない。しかし、細胞をガラス状態にすることで常温乾燥保存できる可能性が近年の研究において示唆されている。ネムリユスリカ幼虫など一部の昆虫は、乾燥耐性を持つことが広く知られている。その乾燥耐性のメカニズムは近年解明が進んでいる。トレハロースが水分の代替物質として細胞膜を保護していることが明らかになった (Sakurai ら, PNAS, 2008)。ヒト筋肉細胞に大腸菌由来のトレハロース合成酵素遺伝子を導入し、乾燥保存できたとの報告もなされている (Ning Guo ら, Nature America Inc, 2000)。

このように、ガラス化法はヒト皮膚の凍結保存のみならず常温乾燥保存への道を開きうる有力な技術であると考えられている。現在、ヒト皮膚をガラス化法により凍結保存

したとの報告はない。また、常温乾燥保存の試みも他に例を見ない。

スキンバンクを始めとする組織バンクの大きな問題は慢性的なドナー不足である。その一因として、前述のように保存にあたって特殊な設備を要することや保存期間が限定されていることが挙げられる。皮膚に関しては近年、自家培養皮膚の研究も盛んであるが、限られた施設のみで行われており培養に時間を要するなど未だ課題が多い。本研究で用いる方法は比較的シンプルであり、実用化されることによってドナー不足の解消に大きくかつ即座に寄与できると期待される。

現在は凍結保存する際に高価なプログラムフリーザーが必要であるが、ガラス化法により不要となることが期待される。そうなれば、液体窒素の保存容器のみで凍結保存が可能となる。また、常温乾燥保存が可能となれば、デシケーター程度の安価な設備で保存が可能となる。このように、高価な設備を持たない多くの医療施設で保存が可能となりドナー不足の解消につながると期待される。

ガラス化法に際して問題となるのが、組織が大きいと試薬が浸透しづらいという点である。そのため、体外受精の際も胚凍結は可能だが卵巣凍結は未だ実用化されていない。しかし、移植に用いる皮膚は厚さが約 0.3~0.5 mm と非常に薄いので、試薬の浸透もしやすく良好な結果が得られると予想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ガラス化法を用いて皮膚の長期乾燥保存および凍結保存を実現することである。

ヒト皮膚をガラス化法および従来法で凍結保存し、保存後の生存率を評価する。また、ヒト皮膚を常温乾燥保存し、保存後の生存率

を評価する。保護液の組成、凍結および乾燥の条件を調整しつつ比較検討し、最適のものを採し出す。

3. 研究の方法

(1) 長期乾燥保存したヒト皮膚の、透過型電子顕微鏡による観察

形成外科では再建手術や腫瘍切除術など様々な手術を行っている。その際、正常組織（皮膚、脂肪、筋肉、血管、神経など）の一部が余剰となりそのまま残しておくも機能面あるいは整容面で不具合が出る場合がある。そういった場合は医療廃棄物として廃棄している。本研究ではこのような形で不要となった皮膚を使用した。本研究は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の許可を得て行った。

ヒト皮膚を小切片に分割しトレハロースを含む保存液に浸漬した後デシケーターを用いて乾燥させ、3ヶ月間常温で保存した。その後生理食塩水等で加水し、乾燥した皮膚を戻した。長期乾燥保存したヒト皮膚の細胞構造を透過型電子顕微鏡で観察した。

また、ヒト皮膚は生理食塩水に浸していれば4℃で2週間程度保存できる。広範囲熱傷の植皮術は手術時間、出血量、採皮面積などの制約から数回に分けることがあり、採取した皮膚を全てその場で移植できない例がしばしばある。その際は採取した皮膚を4℃で保存して次回手術の際に移植している。このように乾燥していない状態でヒト皮膚を保存して比較検討した。

(2) 常温乾燥保存ラット皮膚の移植実験

Green florescence protein-transgenicラット (GFP-LEWラット) を用いて、実際に皮膚移植を行った。GFP-LEWラットから皮膚を採取

し、トレハロースを含む保存液に浸漬した後2ヶ月間常温乾燥保存した。その後、加水して戻し近交系LEWラットの皮下に埋め込み移植した。その際の条件（温度、乾燥させる速度など）を調整した。

2ヶ月経過した後、溶液（生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など）に浸して解凍もしくは加水した。細胞障害の程度をするため、蛍光染色、組織学的検査、代謝測定などで生存率を評価した。

4. 研究成果

コントロール群と比較したところ、保存液を用いた群は、ミトコンドリアなど細胞内小器官の構造が保たれていた。

この結果より、トレハロースが乾燥保存の実現への鍵と考え、動物実験で実際に乾燥保存した皮膚を移植する実験を行った。

移植から1ヶ月後に移植皮膚を摘出し蛍光顕微鏡で観察したが、発光はわずかであった。組織学的検査でも生着していなかった。保存液への抗酸化物質も行ったが、結果はほぼ同様であった。

本研究は皮膚を対象としたが、皮膚に限らず生体組織の乾燥保存は現在も未だ困難である。2008年に血小板のフリーズドライ保存に成功したとカリフォルニア大学より報告された。また、2012年4月、5年間フリーズドライ保存したラット精子で子供を誕生させることに成功したと京都大学より報告された。

本研究期間では期待した結果は得られなかったが、生体組織の乾燥保存は有望かつ重要な研究分野であると考えている。

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には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳山 英二郎 (TOKUYAMA EIJIRO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90379785

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者