

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 6月 6日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592535

研究課題名（和文） 羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートの多様な臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） The various clinical applicability of cultured oral epithelial cells sheet on amniotic membrane

研究代表者

金村 成智（KANAMURA NARISATO）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70204542

研究成果の概要（和文）：羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートを作成し、多様な口腔外科手術後（9例：粘液嚢胞、口腔白板症、多形性腺腫、口唇腫瘤、頬粘膜線維腫）の口腔粘膜欠損へ自己移植を行った。内7症例は、移植部位の異常所見なく生着し、新しい口腔粘膜が獲得され、移植術は一定の成功を収めた。しかし、病変切除の実質欠損が大きい症例（2例）は、移植術が施行できず、症例の選択ならびに移植術における外科術式の検討が今後の課題と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Autologous oral mucosal epithelial sheets, which were cultivated on amniotic membrane, were used for the transplantation of oral mucosa after oral surgery (9 cases: mucocele; oral leukoplakia; pleomorphic adenoma; lip neoplasm; and fibroma of buccal mucosa). In 7 of these cases, a favorable post-transplant course was obtained with reproduced oral mucosa without abnormalities at the transplantation site. On the other hand, transplant approaches were not applicable in the remaining 2 cases, in which the diseased portion was removed, involving a substantial loss, suggesting the necessity of examining the appropriate selection of patients and surgical procedures for transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科一般（含病態検査学）

1. 研究開始当初の背景

近年歯科口腔外科領域において、腫瘍や口腔粘膜病変切除といった口腔外科手術後における口腔再建に、患者の口腔粘膜上皮細胞を採取し、生体外で増殖・分化させ培養口腔粘膜上皮を作製し自己移植する報告が散見される。そこでわれわれは、京都府立医科大学における人間を対象とする医学研究審査委員会の承認（平成 14 年 11 月 28 日付 MCHS-234、平成 16 年 2 月 4 日付 MCHS-438）を受け、羊膜を基質とした口腔粘膜上皮細胞の培養を行い、培養口腔粘膜上皮シートの作成が可能であることを確認した。

この羊膜とは、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織であるため倫理的、技術的に入手が容易である。発生学的に ES 細胞から 3、4 段階分化した段階であると考えられ、羊膜組織中には多機能幹細胞が含まれている可能性がある。さらには血管成分を含まないため、移植後の免疫反応を軽減することが可能であるという大きな利点がある。各種細胞の培養基底膜として適し、抗炎症作用、感染抑制作用、瘢痕抑制作用などを有することより、生物学的材料として皮膚移植、臍形成術、腹部手術の際の癒着・瘢痕防止、皮膚熱傷後などの創部の被覆による上皮修復促進、さらには眼表面の再建などの手術療法に用いられ、高い有用性および有効性が報告されてきた。すでに難治性角膜・結膜疾患患者に対して、羊膜および自己口腔粘膜上皮細胞を用いた眼表面再建術の臨床使用を行っており良好な治療成績を得ている。さらに、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可（平成 17 年 7

月 1 日付 R-1、平成 20 年 8 月 5 日付 R-19）を得、科学研究費補助金・平成 18 年度基盤研究（C）（研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度、研究課題名：羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用、課題番号：18592192）の研究代表者として、口腔外科手術後等の各種の口腔粘膜上皮欠損を有した患者に対しての羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シート（以下；培養上皮シート）の臨床応用を行っている。培養シートの強度や術中操作は問題なく、また術後の拒絶反応や培養上皮シートの脱落等の異常所見なく生着し、新しい口腔粘膜上皮が獲得された。また、術後経過観察においても、移植部位の組織拘縮や二次感染、病変の再発等なく極めて経過良好であり、この培養上皮シートは、新たな自己移植材料として臨床使用可能であることが示された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既に臨床応用可能である羊膜を基質とした培養上皮シートを、広範囲な口腔粘膜欠損症例や実質欠損の大きい症例など、個々の症例に応じた移植方法を検討することで多様な症例に対しての羊膜を用いた再生医療的手術療法を確立することである。さらには、移植後において培養上皮シートが正常組織の構造や性質を保持しているかを確認するためのデータ集積を行うことを目的とした。

なお、当該研究期間における培養上皮シートの臨床応用については、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可（平成 20 年 8 月 5 日付 R-19、平成 23 年 7 月 4 日付 R-29）を受けている。

3. 研究の方法

本研究に先立ち、羊膜を加工処理しコラーゲンシートを作製する方法を確立している。このコラーゲンシートを用いた培養口腔粘膜上皮シートの作成法はほぼ確立しており、培養上皮シートの臨床応用については、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可（平成17年7月1日付R-1、平成20年8月5日付R-19）を受け、すでに臨床応用を開始している。本研究にて、多様な口腔外科手術後における口腔粘膜再建に羊膜および自己口腔粘膜上皮細胞を用いた再建術の臨床使用を行い、新たな手術療法としての検討を加えた。

(1) 研究対象者について

基本的に、歯科口腔外科手術後などにおける口腔粘膜欠損、外科的補綴前処置や歯周外科手術（歯肉歯槽粘膜手術）等、各種の粘膜上皮欠損を有した患者を対象とした。また、研究対象者の年齢については成人以上に限る、口腔内悪性腫瘍疾患罹患患者は対象外とした。

(2) 方法について

① 培養基質となる羊膜の採取および保存方法について

帝王切開予定の妊婦から羊膜を採取した。羊膜提供者は、全身的に合併症のない帝王切開予定の妊婦で、3ヶ月以内の血清検査で感染症（B型・C型肝炎、梅毒、ヒト免疫不全ウイルス、クロイツフェルト・ヤコブ病、ウエストナイル熱など）が陰性であるものを対象とした。具体的には、産科分娩室にて帝王切開時に取り出された胎盤から無菌的に羊膜を採取し、抗生剤を含む洗浄液で洗浄した後、保存液中に浸した状態で -80°C の冷凍庫

で保存し、研究に供した。なお、採取後から保存までの過程は、すべてクリーンベンチ内で清潔操作にて行った。

対象となる妊婦に対しては、われわれの研究内容、羊膜採取にあたっての安全性について十分な文書を用いた説明を行った上で、文書による同意を得た。羊膜の臨床使用に際しては、京都府立医科大学医学倫理審査委員会にて許可（平成20年8月5日付R-19、平成23年7月4日付R-29）を受けている。

② 該当患者からの口腔粘膜の採取について

手術約2週間前に、該当患者より $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ の口腔粘膜を採取および培養に用いる自己血清を調製するための50mlの血液を採取した。すなわち、清潔操作下に被験者の下顎臼歯部歯肉頬移行部粘膜もしくは頬粘膜より、炎症性病変等を認めない健常粘膜組織を採取部位として選定し、採取相当部周囲組織に2%塩酸リドカイン（1/8万エピネフリン含有）の浸潤麻酔を行った。そして採取相当部粘膜にメスにて $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ の切開を加え、粘膜下結合組織とともに採取した。絹糸にて切開部を縫合した後、止血確認を行った。術後管理として、感染予防に抗菌薬の内服投与（必要に応じて消炎鎮痛剤も投与）し、次日以降、二次感染等の異常所見がないか、慎重な経過観察および洗浄処置を行い、採取日より約1週間後に抜糸を行った。

③ 口腔粘膜上皮細胞の羊膜上培養について

採取した口腔粘膜の培養は、培養液成分として、自己血清、インシュリン、EGF、抗菌薬を含む標準的な口腔粘膜上皮培養液を用いた。羊膜上にてこれら幹細胞を含む口腔粘膜上皮を培養し、培養液、3T3 feeder cell

の調整、上皮の分化、重層化をさせる air lifting 法の併用など、われわれがすでに確立している作製法を用いて培養上皮シートの作成を行った。

④ 羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートの臨床応用について

培養口腔粘膜移植術は、口腔粘膜組織欠損部に培養口腔粘膜上皮を移植し、羊膜ごと 7-0 ナイロン糸で縫着させた。なお、口腔粘膜欠損部が広範囲に及ぶ場合は、複数の培養上皮シートを縫着させた。さらに移植した培養上皮シートの固定および保護するために歯周包帯、抗菌薬軟膏付きガーゼやセルロイド・シーネなどを適宜用いた。術後管理として、感染予防に抗生剤の内服投与（必要に応じて消炎鎮痛剤も投与）し、次日以降、二次感染等の異常所見がないか、慎重な経過観察および洗浄処置を行い、採取日より約 1 週間後に抜糸を行った。

4. 研究成果

当該研究に文書による同意が得られた口腔外科手術予定患者（9 名）に対して、手術約 2 週間前に口腔粘膜上皮細胞の採取を行った。なお、細胞培養に添加する血清は、あらかじめ該当患者より採血を行い、得られた自己血より分離・精製した自己血清を用いた。上記より作成された培養上皮シートを、各種口腔外科症例に対して自己移植を行い、慎重な術後経過観察処置を行った。

全症例にて、口腔粘膜上皮の採取および自己血採血時におけるトラブル等なく、培養上皮シート作成においても、問題なく施行することができた。なお、培養した口腔粘膜上皮細胞は羊膜上にて 5-7 層に重層化しており、免疫染色性では、粘膜分化型 keratin 4/13

および、基底膜構成成分である integrin alpha 6、laminin (alpha5-chain) の発現も認め、これらはわれわれの過去の報告（科学研究費補助金、平成 18 年度基盤研究 (C)、研究課題名：羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用、課題番号：18592192）と同様であった。

培養上皮シートの移植術を実施した臨床症例の内訳については、粘液嚢胞 3 例、口腔白板症 3 例、多形性腺腫 1 例、口唇腫瘍 1 例、頬粘膜線維腫 1 例の 9 症例であった。内、7 症例については、術後 1-4 年の経過観察にて移植部位における拒絶反応や感染、培養シートの脱落などの異常所見なく生着した。さらに肉眼的に創部の癒痕を抑制しており、新しい口腔粘膜が獲得された。培養上皮シートによる口腔粘膜の再建は新たな再生医療的治療法として可能であることが示された。しかしながら、病変切除後の実質欠損が大かった口腔白板症（2 症例）については、培養上皮シートの縫着固定が困難であり移植術が施行出来なかった。

以上より、多様な外科症例への培養上皮シートの口腔粘膜の再建は一定の成功を収めた。しかしながら今後の課題として、培養上皮シート移植術の術前における慎重な症例の選択ならびに、移植術式のさらなる検討・改良が必要かつ重要であることが考えられる。

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）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- ① Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura, Toshiro Yamamoto, Shigeru Kinoshita,

Narisato Kanamura,
Immunohistochemical study of oral
epithelial sheets cultured on
amniotic membrane for oral mucosal
reconstruction, Biomed Mater Eng, 査
読有, 20 卷, 1 号, 2010, pp.37-45,
DOI: 10.3233/BME-2010-0613.

- ② Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura,
Toshiro Yamamoto, Shigeru Kinoshita,
Narisato Kanamura, Tissue
engineering by transplantation of
oral epithelial sheets cultivated on
amniotic membrane for oral mucosal
reconstruction, Inflammation and
Regeneration, 査読有, 30 卷, 3 号,
2010, pp.176-180,
[http://www.jsir.gr.jp/past_journal/
3003/0176-0180.pdf](http://www.jsir.gr.jp/past_journal/3003/0176-0180.pdf)
- ③ Narisato Kanamura, Takeshi Amemiya,
Toshiro Yamamoto, Kenji Mishima,
Masahiro Saito, Takashi Tsuji,
Takahiro Nakamura. Dental
regenerative therapy using oral
tissues, Web Journal Anti-Aging
Medicine, 査読有, Vol.9, No.1, 2012,
pp.14-23,
[http://www.anti-aging.gr.jp/english
/pdf/2012/9\(1\)1423.pdf](http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2012/9(1)1423.pdf)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura,
Keiji Adachi, Toshiro Yamamoto,
Shigeru Kinoshita, Narisato Kanamura,
Tissue engineering with using of
cultured oral epithelial sheets on
amniotic membrane, The 9th World
Congress on Inflammation (第 30 回日
本炎症・再生学会、第 9 回国際炎症学会

合同開催), 平成 21 年 7 月 8 日, 東京.

- ② Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura,
Keiji Adachi, Toshiro Yamamoto,
Shigeru Kinoshita, Narisato Kanamura,
Long-term results of oral mucosal
reconstruction using cultured
epithelial sheets, The 88th General
Session and Exhibition of the
International Associations for
Dental Research (IADR), 平成 22 年 7
月 16 日, Barcelona, Spain.
- ③ 雨宮 傑、中村 隆弘、足立 圭司、山
本 俊郎、木下 茂、金村 成智、ヒト
羊膜を用いた新たな歯周組織再生法の
開発、第 27 回歯科医学を中心とした総
合的な研究を推進する集い(日本歯科医
学会)、平成 23 年 1 月 8 日、東京.
- ④ 金村 成智、口腔組織を用いた再生医療
アンチエイジングをめざした新たな歯
周組織再生法の開発、第 11 回日本抗加
齢医学会総会、平成 23 年 5 月 27 日、京
都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 成智 (KANAMURA NARISATO)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口
腔科学・准教授
研究者番号 : 70204542

(2) 研究分担者

山本 俊郎 (YAMAMOTO TOSHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口
腔科学・講師
研究者番号 : 40347472

雨宮 傑 (AMEMIYA TAKESHI)

京都府立医科大学・医学研究科・歯科口
腔科学・助教

研究者番号：90398389

赤松 佑紀 (AKAMATSU YUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・歯科口
腔科学・助教

研究者番号：40580733