

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2016

課題番号：16H06821

研究課題名(和文) 患児由来羊膜の口唇口蓋裂治療への応用

研究課題名(英文) Application of autogenic amnion for the treatment of cleft lip and palate

研究代表者

津野 宏彰 (Tsunno, Hiroaki)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：70377290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：筆者は口唇口蓋裂患児において自身の羊膜をその治療に応用することを検討している。本研究は健常児由来の羊膜をコントロールとし、口唇口蓋裂患児の羊膜の性質に相違がない(少ない)ことの確認を目的とした。本研究期間内では、患児由来の羊膜は一個体分のみ入手可能であった。同時期に採取した健常児由来羊膜とともに、形態学的観察を行ったが相違点はなかった。また羊膜に乾燥処理を施し、ハイパードライ羊膜の作成を行い、物理的・生物学的性質の比較を行った。引っ張り試験における差も認めないと考えられるが、検体数不足のため統計学的処理には至っていない。今後検体数を確保しながら、物性試験・生理活性試験を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the difference on the amnion between normal babies (control) and babies with cleft lip and palate (CLP), assuming the application of autogenic amniotic membrane for the treatments. During the study period, only one sample of the amnion from CLP baby. There seems no difference on morphological finding of fresh amnion within two groups. Hyper-dry amniotic membranes were also produced and tested by physical examinations. Similar characteristics on mechanical strength were found in two groups, but statistical analysis has not been performed for insufficient number of samples. Further investigations also have been continued with sufficient number of samples.

研究分野：口腔外科学

キーワード：羊膜 口唇口蓋裂 自家組織

## 1. 研究開始当初の背景

現在まで、口唇口蓋裂患者に対する一貫的治療体系が確立され、それに伴い患児とその両親への負担を軽減する工夫がなされてきた。しかしながら、未だ患児が成人に至るまで、複数回にわたる手術が必要である。申請者はこれらの一貫治療において、患児由来の羊膜を応用することにより、その精神的・肉体的負担のさらなる軽減を検討している。具体的には、口蓋裂形成術時に生ずる粘膜欠損部に用いる組織補填材として、乾燥処理を施し保存した患児本人の羊膜（以下：乾燥羊膜）を応用すること。顎裂部骨移植時に必要な移植骨材料として、同じく羊膜より単離した間葉系細胞（以下：羊膜間葉系細胞）による組織工学を応用することを立案し、平成22～23年度科学研究補助金（若手B）の交付により以下の研究を行ってきた。

(1)富山大学附属病院にて施行された帝王切開時に得られた羊膜を母親の承諾の元、提供を受け、羊膜間葉系細胞を単離・培養を行うとともに、その細胞増殖能と骨分化誘導能を確認した。

その結果、現在まで複数の症例において20継代以上の安定した増殖能が確認された。また培養増殖後の細胞で骨分化誘導を行ったところ、すべて症例で、良好な骨芽細胞様分化が認められた。(Tsunoda *et al.* 2012)

(2) (1)と同時に、乾燥羊膜を作製。ラット口蓋粘膜欠損モデルを作成し、粘膜欠損部への乾燥羊膜の応用による創傷治癒への効果および経時的な顎発育への影響をした。

その結果、粘膜欠損部に乾燥羊膜を応用した群では組織学的に粘膜下組織の良好な再構築が確認されるとともに、手術による上顎発育への影響を抑制する効果があることが示された。(Tsunoda *et al.* 2015)

(3)また同時期に申請者らは富山大学医学部倫理委員会の承認のもと、成人患者の口腔粘膜欠損症例に対し、乾燥羊膜を応用し、その臨床的な安全性と有用性を確認してきた。

(Arai *et al.* 2012, Tsunoda *et al.* 2012)

これらの背景により、申請者は羊膜の口唇口蓋裂治療への応用は有用な臨床工夫の一つとなりうると考えている。しかしながら、羊膜の入手の問題もあり、これまでは帝王切開にて出生した健常児由来の羊膜からのデータを得てきた。これらの結果により羊膜の他家移植の有用性も示唆されているが、自己由来組織移植の優位性は疑いの余地はない。現時点で、口唇口蓋裂患者はすべての症例で出生前診断が得られるとは限らず、また多くの症例は帝王切開ではなく経膈分娩での出産が一般的と考えられる。さらに現在まで単離した羊膜間葉系細胞では、その増殖能・分化能に個体差がある可能性も示唆されている。よって本法の臨床応用に先立ち、羊膜

の遺伝的因子もしくは環境的因子による個体差の有無に関して確認が必要であると考えられる。現在、口唇口蓋裂患児由来の羊膜の確保を開始しており、形態学的に健常児との相違がない傾向が確認されているが、未だ検体数が不十分であり、さらなるデータの蓄積が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、自己由来の羊膜を使用するというメリットを最大限に活用するため、これまで研究を行ってきたA)帝王切開で得られた健常児由来の羊膜に加え、B)経膈分娩で得られた健常児由来の羊膜、C)経膈分娩で得られた口唇口蓋裂患児由来の羊膜の3群に関して、3群間もしくは各群内での個体差の有無を確認することで患児由来羊膜の臨床応用への実効性を検証することを目的とする。すなわち(1)患児から得られた羊膜より、体性幹細胞を単離するプロトコルの検証を行ったうえで、健常児の羊膜と比較し、口唇口蓋裂患者由来の羊膜において(2)経膈分娩による羊膜の物理的損傷の程度に有意な差がないことを確認する。(3)乾燥羊膜の物理的性質と生理活性に有意な差がないことを確認する。ことを目的とする。さらに、臨床的には、羊膜細胞を使用する時期が出生時から一定期間を経た後であること、また念のため患児由来の羊膜細胞に生理学的な劣性が認められた場合も想定し、(4)細胞の一定期間の凍結保存の影響や、乾燥羊膜をスカフォールドとして応用した非細胞移植治療の有効性についても確認することも必要と考えている。

## 3. 研究の方法

健常児と口唇口蓋裂患者との間、また羊膜の採取法(帝王切開と経膈分娩)により、羊膜および羊膜由来細胞の性質に関する非劣性を確認し、自己の羊膜を治療へ応用することの実効性を検証するため、A)帝王切開で得られた健常児の羊膜、B)経膈分娩で得られた健常児の羊膜、C)経膈分娩で得られた口唇口蓋裂患児の羊膜を用い、羊膜由来細胞の増殖能・分化能、生羊膜の形態学的性質と乾燥羊膜の物理学的、生理学的性質を比較する。また、羊膜由来細胞の凍結保存による影響や患児由来細胞の劣性がある場合も想定し、非細胞移植治療の応用についても検討した。

(1)羊膜の採取と乾燥羊膜の作製・羊膜間葉系細胞の単離：富山大学医学部倫理委員会に承認されたプロトコルにより、次の3群に分類した患者より提供を受けた羊膜を使用する。A群：帝王切開で得られた健常児の羊膜、B群：経膈分娩で得られた健常児の羊膜、C群：経膈分娩で得られた口唇口蓋裂患児の羊膜。その後富山大学再生医学講座で所有するGMP準拠Cell Processing Room(CPR)で羊膜を細胞採取用と乾燥羊膜作製用、また形態観

察用に三分し、以下の処理を行う。(Toda et al. 2007 を改変) 羊膜間葉系細胞の分離: 羊膜を PBS で洗浄後、1cm 大に細分する。0.25% トリプシン溶液で酵素処理を繰り返し、羊膜上皮細胞を完全に除去後、1% コラゲナーゼ溶液にて処理し、間葉系細胞を分離する。乾燥羊膜の作製: 羊膜を両面シリコン樹脂加工耐油紙上に広げ、マイクロ波、遠赤外線、真空を利用する装置 (Hyper-Dry, 株式会社千代田製所) により乾燥羊膜を作製する。作製された乾燥羊膜を 25KGy の線量で滅菌する。形態・生理活性評価用検体の保存: 臍帯側と胎児側から羊膜の一部を採取し、4% パラフォルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋処理を行って保存する。またタンパク抽出用に冷凍保存を行う。得られた 3 群の羊膜・羊膜由来細胞に関して、以下の方法にて A~C 各群間および各群内個体間での比較検討を行う。

(2) 初代培養プロトコルの検証と幹細胞マーカーの発現量の比較: これまでの研究で、高い増殖能を保つ細胞群での細胞表面マーカーの発現形式を確認している。このマーカー発現傾向をもとに、それぞれの羊膜から得られた細胞に関して、フローサイトメーターにて細胞分画を行う。各分画ごとの細胞と、bulk population の細胞とで細胞増殖の相違を確認し、最適な初代培養プロトコルの条件の検証を行う。その後、得られた羊膜間葉系細胞を -80℃ 冷凍庫と液体窒素内で凍結保存する。

(3) 羊膜の形態学的評価と乾燥羊膜の物理学的、生理学的評価:

経膈分娩による膜の 3 次元構造の損傷についての評価: パラフィン包埋された羊膜から組織切片を作製し、羊膜の部位による機械的損傷の相違を含めて形態観察を行う。

作製した乾燥羊膜の物性試験による評価  
a: 引っ張り試験: 2cmX2cm の正方形に切った試料を 5min 以上生理的食塩水に浸し、ろ紙に挟み、引っ張り試験機のエアジョウヘ取り付け。引張開始距離を 10mm、幅を 20mm、引張速度を 10mm/min として引っ張り強度を測定する。  
b: コラゲナーゼ耐性試験: デルマパンチ (皮膚生検用の医療器具) を用いて直径 = 5mm の試料を作製する。0.1% コラゲナーゼ溶液 1ml 中に試料を入れ、37℃ でインキュベートする。試料が溶ける時間を測定する。  
c: 水透過性試験: 直径 = 35mm の円形に試料を切り、濾過滅菌ホルダーにセットする。0.74 kPa の圧力 (水面の高さ = 75cm) がかかるように水を入れたチューブに取り付け、単位時間あたりの水の通過量を測定する。

#### 4. 研究成果

(1) 口唇口蓋裂患児由来の羊膜検体の入手: 本研究期間では口唇口蓋裂患児由来の羊膜は帝王切開にて得られた一検体のみであった。同時期に得られた健常児由来羊膜と共に形態観察用の検体、羊膜間葉系細胞採取用の

検体 (以上生羊膜) を採取したのち、上記方法でハイパードライ羊膜を作成し、保存した。(2) 生羊膜の形態学的観察と比較: (1) で得られた口唇口蓋裂患児由来の羊膜と健常児の羊膜 (生羊膜) を部位別 (辺縁部および臍帯付近部) に分けて、光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察を行ったところ、現時点で明らかな差は認められなかった。経膈分娩にて得られた羊膜の観察は未実施で、羊膜の採取法による機械的損傷に関しては、今後の検討課題である。

(3) 作成したハイパードライ羊膜の物性および、羊膜間葉系細胞の生理活性評価: 患児由来および健常児由来羊膜より作成したハイパードライ羊膜で引っ張り試験を行い、継続的な物性変化についても比較した。現時点でハイパードライ羊膜作成後、6ヶ月までの比較が行われ、患児由来羊膜の劣勢は認められていない (図 1)。

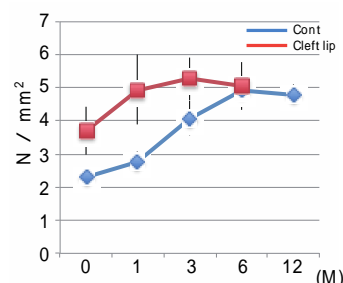


図 1: 引っ張り試験結果

しかしながら、患児由来の検体数が不十分であり、統計学的処理を伴う比較には至っていない。また羊膜由来間葉系細胞における、細胞表面マーカーおよび EGF、PDGF などの成長因子の発現についても確認中であるが、同様に検体数が不十分のため、統計学的処理を伴う比較に至っていない。今後の研究継続により、検体数を重ねたうえで、最終的な評価を行う予定である。現時点では、当施設のみでは十分な検体数の確保が容易でない可能性があるため、今後、当施設のみならず、連携各施設で検体の入手が可能となる体制づくりが必要と考えられ、その対応をすすめている。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hiroaki TSUNO, Kumiko FUJIWARA, Shuichi IMAUE, Makoto NOGUCHI, Katsuhisa SEKIDO, Kei TOMIHARA. Clinical application of hyper-dried amniotic membrane for surgical repair of oral mucosal defect. 12<sup>th</sup> Asian

congress on oral and maxillofacial surgery. 2016 年 11 月 9 日-12 日, Manila, Philippines

津野宏彰, 野口 誠. ヒトハイパードライ羊膜の口腔内手術創への応用. 第 15 回日本組織移植学会総会・学術大会. 2016 年 8 月 27 日, 富山国際会議場, 富山県, 富山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津野 宏彰 (TSUNO, Hiroaki)

富山大学附属病院・講師

研究者番号: 70377290