

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18556

研究課題名（和文）光干渉式断層撮影を利用した培養口腔粘膜の非侵襲的、定量的品質評価方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a noninvasive and quantitative quality evaluation method of a tissue-engineered oral mucosa fabricated using optical coherence tomography

研究代表者

鈴木 絢子（Suzuki, Ayako）

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：70869916

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：上皮形成の定量解析や培養口腔粘膜の品質管理に応用可能なプロトコルの策定を目的とするため、非侵襲的にライブイメージングでき、定量評価も可能な光干渉式断層撮影(OCT)を使用し、3次元画像と完成後の組織像を比較検証した。結果的に、培養口腔粘膜に付与した凹凸構造が3次元画像と組織像とでそれぞれ一致し、品質管理ツールとしてのOCTイメージングの適用性と実現性を実証した。さらに、培養7日目と培養終了日にそれぞれ上皮細胞層の厚さを定量的に評価することにも成功した。よって、自家細胞を含む再生医療製品における経時的かつ非侵襲的な定量的評価のための品質評価ツールを可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療等製品に限らず、3次元培養された細胞・構造体の変化を測定する解析手法は、乏しいのが現状である。生体に無害なOCT技術に着目し、培養口腔粘膜作成プロトコルと関連させ、品質管理ツールとしての利用可能性についてアプローチする本課題は独自性が高い。本課題で得られた基礎的知見や定量的評価法は、他の細胞を用いた再生医療用製品でも細胞品質管理に活用可能で、今後、移植用3次元構造体の非侵襲評価法のロールモデルとなり得るので、再生医療・レギュラトリーサイエンスに対し大きな貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a protocol that can be applied to quantitative analysis of epithelialization and quality control of cultured oral mucosa, we used optical coherence tomography (OCT), which enables non-invasive live imaging and quantitative evaluation. The three-dimensional image and the tissue image after completion were compared and verified. As a result, the uneven structure given to the cultured oral mucosa was consistent between the three-dimensional image and the tissue image, respectively, demonstrating the applicability and feasibility of his OCT imaging as a quality control tool. Furthermore, we succeeded in quantitatively evaluating the thickness of the epithelial cell layer on the 7th day of culture and on the day of the end of culture. Thus, it enabled a quality assessment tool for longitudinal and non-invasive quantitative evaluation of regenerative medicine products containing autologous cells.

研究分野：再生医療

キーワード：光干渉式断層撮影 培養口腔粘膜 非侵襲的評価 品質管理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自家細胞を含み、3次元構築が多い再生医療等製品の品質は、治療効果に大きな影響を与えるため、適正な品質管理と評価が不可欠で、その品質評価法は非侵襲的であることが必須である。非侵襲的にライブイメージングでき、定量評価も可能な光干渉式断層撮影(OCT)は3次元培養に利用可能なので、再生医療等製品の品質評価ツールとしての条件を満たす。臨床応用されている培養口腔粘膜研究に携わってきた申請者は、OCT技術が3次元培養されている培養口腔粘膜の経時的モニタリングや品質管理に応用可能と考え本課題を計画した。本研究では、足場材と重層扁平上皮から成る培養口腔粘膜のOCT画像から得られる情報を明らかにし、上皮形成の定量解析からの確かなパラメータを設定し、培養口腔粘膜の品質管理に応用できるプロトコルの策定を目的とする。本課題の方法論や基盤情報は、再生医療における品質評価技術のロールモデルとなり、レギュラトリーサイエンスの発展に貢献する。

### 2. 研究の目的

1) OCT撮像の実用性：完成した同一の培養口腔粘膜サンプルで、HE染色や免疫染色の破壊的解析とOCT撮像の比較により、OCT撮像の特徴と異なる成分の鑑別能を把握する。  
2) OCT撮像の有用性：同一サンプルを経時的にタイムラプス観察し、試料全体の上皮重層化をモニタリングすると同時に、上皮細胞層の平均厚さと厚さの分布を定量的に解析する。

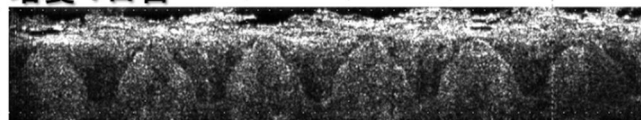
### 3. 研究の方法

1) HE・免疫染色による破壊的解析とOCT撮像を比較し、OCT画像の特徴を把握  
患者様からご提供頂いた歯肉から角化細胞を単離し、表面に微細凹凸構造を付したうろこコラーゲン製の足場材に培養口腔粘膜角化細胞を播種し、ヒト培養口腔粘膜作成プロトコルに準じて、11日間培養した培養口腔粘膜を作成する。  
(A) 試料固定前の培養口腔粘膜にタトゥーインクで定点を設定し、OCT撮影装置を使用して撮像を行う。  
(B) その後パラフィン包埋し、マーク部分で組織切片を作成、通法に従いHE染色により組織学的観察、免疫組織化学的観察を行う。免疫染色は、口腔粘膜上皮の分化マーカー、ケラチン4/13、インポルクリン。増殖マーカーとしてPCNAを用いる。  
(C) OCT技術によって、培養口腔粘膜の断層撮像から、設定した定点部位の2D画像の抽出が可能である。これらのOCT画像とHE染色、免疫染色像を比較し、増殖能のある細胞層、分化した細胞層がOCT画像でどのように描出されるか、足場材と形成された口腔粘膜上皮層が緊密に接着しているか、について検討し、OCT画像で描出されるコラーゲン足場材とその上で形成される口腔粘膜上皮を鑑別し、特徴を把握する。  
2) 試料全体の上皮重層化をモニタリングし、上皮厚さを定量的に解析  
(D) 形成される上皮の定量測定を行う。撮影後に断層撮像から構築した培養口腔粘膜全体の3D画像から、足場領域を除外した上皮層のみを抽出し、ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を使用して培養口腔粘膜の上皮層の形態的特徴を評価する。2次元情報から決して算出できない数値を定量解析のパラメータとして、品質評価方法として利用できるように基盤データを蓄積する。

### 4. 研究成果

OCTを使用し、培養途中のサンプルであっても経時的に非侵襲的・無菌的にサンプル内部の状態を観察できた。具体的には、上皮基底層部分の細胞の分化程度、本サンプル特有の足場材の凹凸構造の製品管理、凹凸構造への細胞の伸展、上皮層の形成状態を確認することができた。それにより、細胞播種前にサンプルの不良品をあらかじめ選別することや、成長の悪い細胞の使用の中止など、あらかじめ選別することが可能となり、品質管理ツールとしてのOCTイメージングの適用性と実現性を実証した。定点を設定し、同じ部位や方向での撮影が可能であり、位置の再現性も高い。足場材表面に付与した凹凸に基底細胞層が形成されていることが確認できる。また、培養7日目に比較し培養11日目は上皮層の厚みが増加していることが確認できる。(図1)

#### 培養7日目



#### 培養11日目

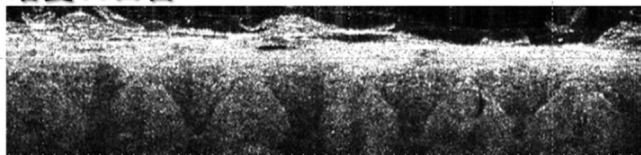


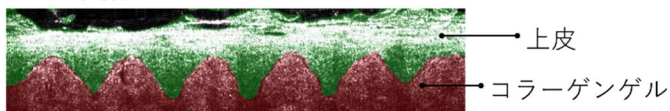
図1:設定した定点において足場材と上皮基底層の境界やOCTでの経時的な上皮形成が観察できる。

そして、培養終了後の組織像と OCT 画像の比較においては、概ね同様の組織所見を認めた。(図 2)

さらに、培養 7 日目と培養終了日(培養 11 日目)それぞれ上皮細胞層の厚さを定量的に評価することに成功した。

上皮細胞層の平均厚さと厚さの分布を定量評価のパラメータとした。平均厚さでは、培養 11 日目で 7 日目より厚くなっており、厚さ分布では、11 日目のヒストグラムが厚い方向にシフトしていた。(図 3, 4) このことから、上皮が一様に 11 日目で 7 日目より厚くなっていることを示していた。

### OCT画像



### HE 染色

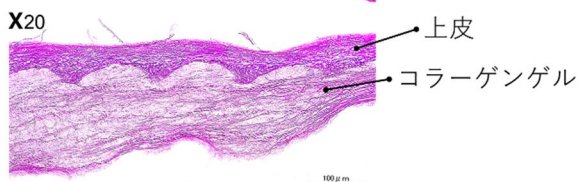


図 2 : 完成した培養口腔粘膜の OCT 画像と組織像との比較

### 上皮細胞層の平均厚さ

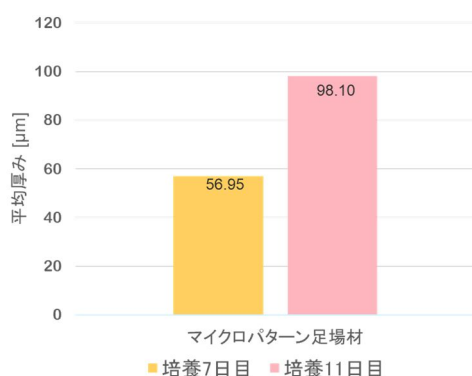


図 3 : 上皮細胞層の平均厚さ

### 上皮細胞層の厚さの分布

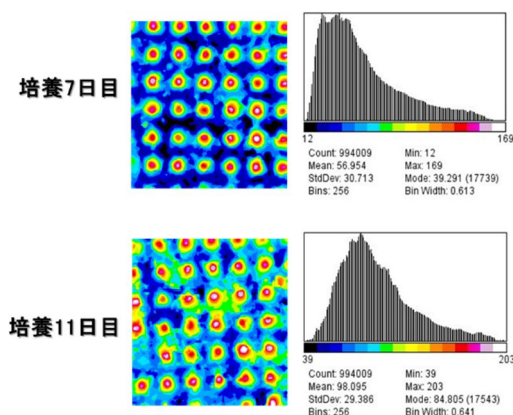


図 4 : 上皮厚さの分布のヒートマップおよびヒストグラム

以上のことから、OCT 撮影により、培養口腔粘膜を非侵襲的に観察でき、OCT 画像は足場材と上皮層の境界の区別が可能である。また、OCT 解析結果から、上皮層の厚みを経時的かつ定量的に評価可能であった。OCT 撮影は、培養口腔粘膜の非侵襲的な品質評価ツールとして応用可能であることが示唆された。

本課題で得られた定量的評価法は、他の細胞を用いた再生医療用製品でも細胞品質管理に応用可能であり、今後、再生医療分野における移植用 3 次元構造体の非侵襲評価法の 1 つの選択肢を生み出したと言え、大きな貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Ayako, Kodama Yoshihiro, Miwa Keito, Kishimoto Kazuma, Hoshikawa Emi, Haga Kenta, Sato Taisuke, Mizuno Jun, Izumi Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Manufacturing micropatterned collagen scaffolds with chemical-crosslinking for development of biomimetic tissue-engineered oral mucosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79114-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suebsamarn O., Kamimura Y., Suzuki A., Kodama Y., Mizuno R., Osawa Y., Komatsu T., Sato T., Haga K., Kobayashi R., Naito E., Kida M., Kishimoto K., Mizuno J., Hayasaki H., Izumi K.	4. 巻 8
2. 論文標題 In-process monitoring of a tissue-engineered oral mucosa fabricated on a micropatterned collagen scaffold: use of optical coherence tomography for quality control	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e11468 ~ e11468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e11468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 絢子
2. 発表標題 培養口腔粘膜の品質管理ツールとしての光干渉式断層撮影法の有用性の検討.
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木絢子
2. 発表標題 表面をマイクロパターン化した魚うるこコラーゲン製材のヒト上皮組織の欠損再建材としての利用可能性の検証
3. 学会等名 日本歯科医学会 第36回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マイクロパターン化コラーゲンゲル作製用ステンレス製モールド.	発明者 泉 健次, 鈴木絢子, 水野 潤, 岸本一真, 小松隆史, 大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-054133	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------