

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 10 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21592285
 研究課題名（和文） 培養真皮臨床試験および複合型培養皮膚の臨床試験に向けた基礎的研究
 研究課題名（英文） Clinical study using cultured dermal substitutes and cultured skin
 研究代表者
 森本 尚樹 (MORIMOTO NAOKI)
 京都大学・医学研究科・講師
 研究者番号：40378641

研究成果の概要（和文）：培養真皮を臨床使用する上で培養過程に用いるウシ血清などの動物由来成分が安全性の点で問題となる。我々は培養過程に動物由来成分を用いない培養法、すなわち 2%患者自己血清添加無血清線維芽細胞増殖培地(HFDM-1)を用いた培養方法を平成 21 年度からの研究で確立した。本法を用い、京都大学医学部附属病院の GMP 準拠培養施設で作製した自家培養真皮の有効性と安全性を確認する臨床試験、第 I - II 相試験「自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍に対する創床形成療法の安全性と臨床効果の検討」を 5 例の患者で行なった。結果の取りまとめの結果、5 例すべてで創傷改善が得られており、培養真皮に起因すると思われる有害事象も認めなかった。複合型培養皮膚の作製方法の改良も行っており、2%ヒト血清添加無血清線維芽細胞増殖培地(HFDM-1)を用いてもウシ血清添加培地と同様に培養皮膚が作成できることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Cultured dermal substitutes have been used for the treatment of chronic skin ulcers; however, the biological risks of animal-derived materials in the culture process such as fetal bovine serum (FBS) have been reported. We prepared an autologous fibroblast-seeded artificial dermis (AFD) using animal product-free medium supplemented with 2% patient autologous serum and without any animal-derived materials such as trypsin in the culturing process. We applied AFD to five diabetic ulcers and investigated the safety and efficacy. As the primary endpoint, we defined, “wound bed improvement” according to the percentage of formed granulation area to the whole wound area. In the evaluation of the primary endpoint, the “wound bed” was improved in all patients. Side effects were not serious. In this study, we tried to use animal product-free medium supplemented with 2% patient autologous serum for the preparation of cultured skin and there was no difference between this medium and the usual medium supplemented with 10% FBS.

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
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：培養真皮、臨床試験、複合型培養皮膚

1. 研究開始当初の背景

皮膚の主要構成細胞として、真皮には皮膚線維芽細胞、表皮には表皮細胞がある。我々は二層性人工真皮を足場として用い、線維芽細胞を播種した培養真皮、さらに表皮細胞も播種した複合型培養皮膚の作製方法も確立しており、これらの臨床使用することを目的として本研究を申請した。

2. 研究の目的

(1)培養真皮について 培養過程にウシ血清などの動物由来成分を用いず、患者自己血清と低血清培地(HFDM-1)を用いて培養真皮を作製する方法を我々は確立した。この方法を用いて培養した自家培養真皮を臨床使用し、安全性と有効性を確認する。

(2)複合型培養皮膚について 人工真皮に用いられているコラーゲンスポンジのポアサイズは $90\mu\text{m}$ であり、表皮細胞を播種すると人工真皮内に落ち込んでしまう。培養早期に表皮細胞の播種が可能となるような培養法あるいは培養表皮も用いることも含めて、臨床使用できる複合型培養皮膚作製の方法を検討する。また、実際に臨床試験を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)培養真皮について 京都大学医の倫理委員会の承認を得て、京都大学医学部附属病院のGMP準拠培養施設で作製した自家培養真皮の有効性と安全性を確認する第I-II相臨床試験「自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍に対する創床形成療法の安全性と臨床効果の検討」を開始した。平成21年度から23年度に試験を行ない、5例の患者の試験を行なった。本試験の培養過程では、ウシ血清、トリプシンなどの動物由来成分は用いていない。培地は2%自己血清添加HFDM-1培地を用い、遊走法(explant法)で線維芽細胞の培養を行うこととした。培養真皮の作成も同じ培地を用いている。品質管理のため、培養真皮貼付当日に出荷検査前としてエンドトキシン測定、細胞数測定を行い、基準を満たした培養真皮を試験に用いることとした

(2)複合型培養皮膚について 複合型培養皮膚の作製方法を改良し、培養真皮の臨床試験で用いた2%ヒト血清添加無血清線維芽細胞増殖培地(HFDM-1)および通常のウシ血清添加培地を用いて培養皮膚を作成した。

4. 研究成果

(1)培養真皮について 培養真皮臨床試験の症例写真を提示する。まず、患者そけい部より、 $1\text{cm}\times 5\text{mm}$ 程度の大きさの皮膚を採取し、採取部は縫合した(図1)。また、同時に20ml程度血液採取を行った。皮膚及び血液を京都

大学医学部附属病院分子細胞治療センター内のCPC(Cell Processing Center)に搬入する。細胞の培養操作や血清の調整はすべてこのCPC内で行った。採取した血液を一晩静置し、患者自己血清を分離した。すべての培養作業は標準作業手順書に従って行い、作業記録はすべて記録されている。二層性人工真皮(ペルナック®)のコラーゲンスポンジ側に線維芽細胞を播種し、10日間培養し、培養真皮を作製した(図2)。



図1. 皮膚採取

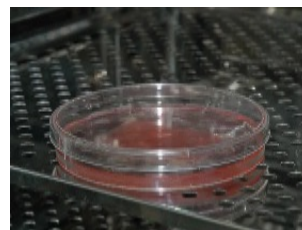


図2.作成した培養真皮



図3. 左足底潰瘍の治療経過

上左: 試験登録時、上右: 培養真皮貼付時、
下左: 貼付3週間後、下右: 貼付3ヶ月後



図4. 左足底潰瘍の治療経過
上左：試験登録時、上右：培養真皮貼付時、
下左：貼付3週後、下右：貼付3ヶ月後

症例の経過を図3および図4に示した。この図3の症例では貼付9週後に上皮化し、貼付3ヵ月後の再発は認めなかった。図4の症例では、培養真皮移植3週後に、創面全体に良好な肉芽形成を認めたため、貼付4週後に全層皮膚移植をおこなった。貼付3ヵ月後の状態では、ごく小さいびらんを認めるのみであった。

試験を行なった5例の患者の結果をとりまとめ、中間解析を行った。この結果、5例すべてで創傷改善（貼付3週時点で良好な肉芽が創面の60%以上で形成される）が得られており、培養真皮に起因すると思われる有害事象も認めなかった。我々の方法で作成した培養真皮の安全性と有効性が確認された。この結果を受けて、本培養真皮による糖尿病性潰瘍治療を先進医療に申請したが承認されなかった。

(2)複合型培養皮膚について 2%ヒト血清添加無血清線維芽細胞増殖培地(HFDM-1)を用いて複合型培養皮膚の作成が可能であった。臨床試験については、培養真皮の臨床試験を平成23年度まで行なったため、複合型培養皮膚の臨床試験準備はできなかった。

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 Morimoto N, Takemoto S, Kanda N, Aivazyanyan A, Taira MT, Suzuki S. The utilization of animal product-free media and autologous serum in an autologous dermal substitute culture. J Surg Res. 2011; 171(1): 339-46. 査読有
- ② 森本尚樹、鈴木茂彦. 自家培養真皮を用いた創床形成療法. PEPARS. 2011;50: 16-21. 査読無
- ③ 森本尚樹、鈴木茂彦. 難治性創傷、治療. 2009;91(2):243-246. 査読無

[学会発表] (計9件)

- ① 森本尚樹、綾梨乃、伊藤蘭、中村陽子、河合勝也、鈴木茂彦、人工真皮、培養真皮の血流評価、第41回日本創傷治癒学会、2011年12月6日、名古屋
- ② 森本尚樹、皮膚-特に真皮再生について、第20回日本形成外科学会基礎学術集会特別セッション、2011年10月7日、東京
- ③ 森本尚樹、神田則和、中村陽子、河合勝也、鈴木茂彦、自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍治療-先進医療化に向けて、第54回日本形成外科学会総会・学術集会、2011年4月14日、徳島
- ④ 森本尚樹、神田則和、中村陽子、河合勝也、鈴木茂彦、自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍臨床試験-先進医療化に向けて、第10回日本再生医療学会総会、2011年3月1日、東京
- ⑤ Morimoto N, Kanda N, Kawai K, Nakamura Y, Aivazyanyan A, Suzuki S. Clinical application of the autologous fibroblasts-seeded dermal substitute cultured using animal product-free media. The 15th International Society of Burn Injuries Congress 2010年6月22日、イスタンブール
- ⑥ Morimoto N, Kanda N, Kawai K, Nakamura Y, Aivazyanyan A, Suzuki S. Preparation and Clinical Application of Autologous Fibroblast-seeded Collagen Sponge using Animal Product Free Medium. The 10th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery 2010年6月20日、プサン
- ⑦ 森本尚樹、神田則和、A. Aivazyanyan、中村陽子、河合勝也、鈴木茂彦、自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍治療、第53回日本形成外科学会総会・学術集会、2010年4月8日、金沢
- ⑧ 森本尚樹、神田則和、中村陽子、河合勝

也、鈴木茂彦、培養真皮および複合型培養皮膚の臨床応用、第19回日本形成外科学会基礎学術集会、2009年9月16日、横浜

- ⑨ 森本尚樹、武本啓、神田則和、河合勝也、鈴木茂彦。培養真皮および複合型培養皮膚の臨床応用。第36回日本熱傷学会総会・学術集会、2009年6月4日

〔図書〕(計1件)

- ① 森本尚樹、鈴木茂彦、メディカルドゥ、患者までとどいている再生誘導治療、2009,242-245

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~keisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 尚樹 (MORIMOTO NAOKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40378641

(2) 研究分担者

鈴木 茂彦 (SUZUKI SHIGEHICO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30187728

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：