

学位研究紹介

凍結培養細胞を用いた培養複合口腔粘膜作製に関する基礎的研究

Basic study of an ex vivo produced oral mucosa equivalent by cryopreserved oral keratinocytes

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻  
口腔健康科学講座顎顔面口腔外科学分野

小山 貴寛

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Health Science, Course for Oral Life Science, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Takahiro Koyama

【目的】

近年、組織工学の手法を用いて培養口腔粘膜上皮が開発され、口腔外科領域においても粘膜欠損創への臨床応用により良好な結果が得られたという報告がみられる。われわれは、feeder layer とウシ胎仔血清を使用せず、ヒト他家新鮮屍体真皮である AlloDerm®上に培養口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化させた培養複合口腔粘膜 (ex vivo produced oral mucosa equivalent) を開発し、その臨床応用を行ってきた。しかしながら 現在行っている培養複合口腔粘膜の作製方法では、手術の3~4週間前に組織採取を行い上皮細胞の培養をする必要があり、手術時期が限定されてしまうことや、長期間にわたる培養状態において、培養口腔粘膜上皮細胞の増殖活性を維持することが困難であり、1回の組織採取では複数回の手術に応用できないなどの問題点があった。そこで、培養複合口腔粘膜移植の適応拡大を図ることを目的に、培養口腔粘膜上皮細胞 (培養細胞) の凍結保存を行い解凍後の細胞増殖活性を検索するとともに、その細胞を用いて培養複合口腔粘膜 (培養粘膜) の作製を行い、凍結保存を行わなかった培養細胞による培養粘膜と組織学および免疫組織化学的に比較し検討した。

【材料と方法】

材料は同意の得られた患者より抜歯時の余剰歯肉を採取し、上皮細胞の培養を行い、2回目の継代時に凍結保存 (-80℃, -196℃) した。細胞の増殖活性を検討するため、3か月および6か月間保存後に解凍した培養細胞と、

対照群として凍結保存を行っていない培養細胞の増殖曲線を描出し population-doubling time (PDT) を求め、同時に細胞数の差を統計的に検討した。さらに、各実験群の培養細胞を AlloDerm®上に播種し培養粘膜の作製を行い、細胞播種後4日目、11日目、18日目でパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン - エオジン染色により組織学的検索を行うとともに、細胞増殖マーカーである抗 PCNA 抗体と上皮細胞の分化マーカーである抗 filaggrin 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。対照群として、凍結保存を行っていない細胞を用いて培養粘膜を作製し、同様に組織学的、免疫組織化学的検索を行い、実験群と比較した。

【結果】

増殖曲線の分析 (図1, 図2)

各実験群における増殖曲線の形態はほぼ同様であった。-80℃で6か月間凍結保存を行った培養細胞の細胞数は、対照群と比較して4日から7日まで統計的に有意に低い値を示した (\* : p<0.05)。さらに、-80℃, 6M群では PDT が48時間とその他の実験群の36時間と比較して延長していた。

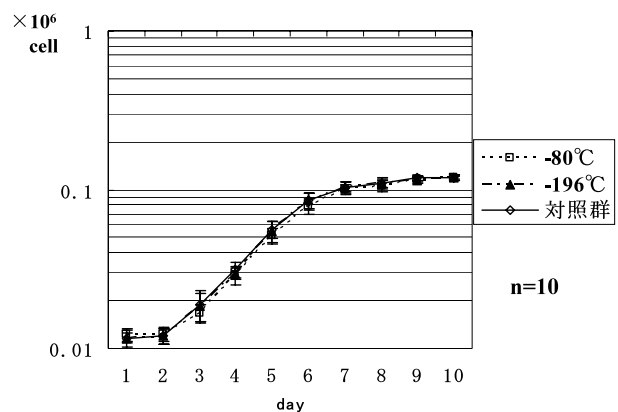


図1 3M群の増殖曲線

-80℃, -196℃で保存したものの曲線は対照群の曲線とほぼ同様であった。

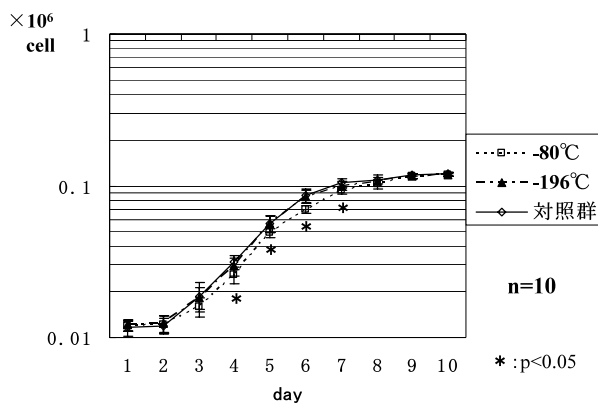


図2 6M 群の増殖曲線

曲線はほぼ同じだったが、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存したものの細胞数は対照群と比較し4日から7日まで統計学的に有意に低い値を示した (\*:  $p<0.05$ )

#### 凍結培養細胞を用いた培養粘膜の組織学的観察

各群の凍結培養細胞を用いた培養粘膜は対照群と同様に、細胞播種後4日目では連続した単層上皮が認められ、11日目では4~6層の上皮の重層化を呈し表層の細胞はエオジン好性を示した(図3)。さらに18日目では8層以上の上皮の重層化を呈し、表層の細胞はエオジン好性を示した。

#### 凍結培養細胞を用いた培養粘膜の免疫組織化学的観察

PCNA 陽性反応は、各群の凍結培養細胞を用いた培養粘膜では対照群と同様に、細胞播種後4日目では、ほ

ぼすべての上皮細胞に、11日目(図4)、18日目では基底層、傍基底層の細胞に認められた。

filaggrin 陽性反応は、各群の凍結培養細胞を用いた培養粘膜では対照群と同じように、細胞播種後4日目、11日目には認められなかったが、18日目においては、上皮層の中央から表層にかけて顆粒状の陽性反応が認められた。

#### 【考 察】

本研究では、 $-80^{\circ}\text{C}$ 、6か月間凍結保存を行った培養細胞において、他の実験群や、対照群と比較して細胞数が培養8日目まで低い値を示し、PDTが延長していた。この結果から、 $-80^{\circ}\text{C}$ の保存温度では化学反応が静止状態に至っておらず、6か月間の保存期間中において、細胞の変性や障害が進行した可能性が推察された。しかしながら、組織学的、免疫組織化学的検索から、6か月間凍結保存した培養細胞を用いた培養粘膜の上皮においても、凍結保存をしない細胞を用いた培養粘膜の上皮と同様の増殖能、分化能が認められた。このことから、凍結保存を行った培養細胞を用いて作製した培養粘膜は凍結保存をしない細胞で作製した培養粘膜と同様の性質を持つことが示唆され、臨床応用の可能性が拡大したと考えられた。

#### 【参考文献】

小山貴寛, 飯田明彦, 芳澤享子, 齊藤 力, 高木律男: 凍結培養細胞を用いた培養複合口腔粘膜作製に関する基礎的研究. 日口科誌 54(2): 253-263. 2005.

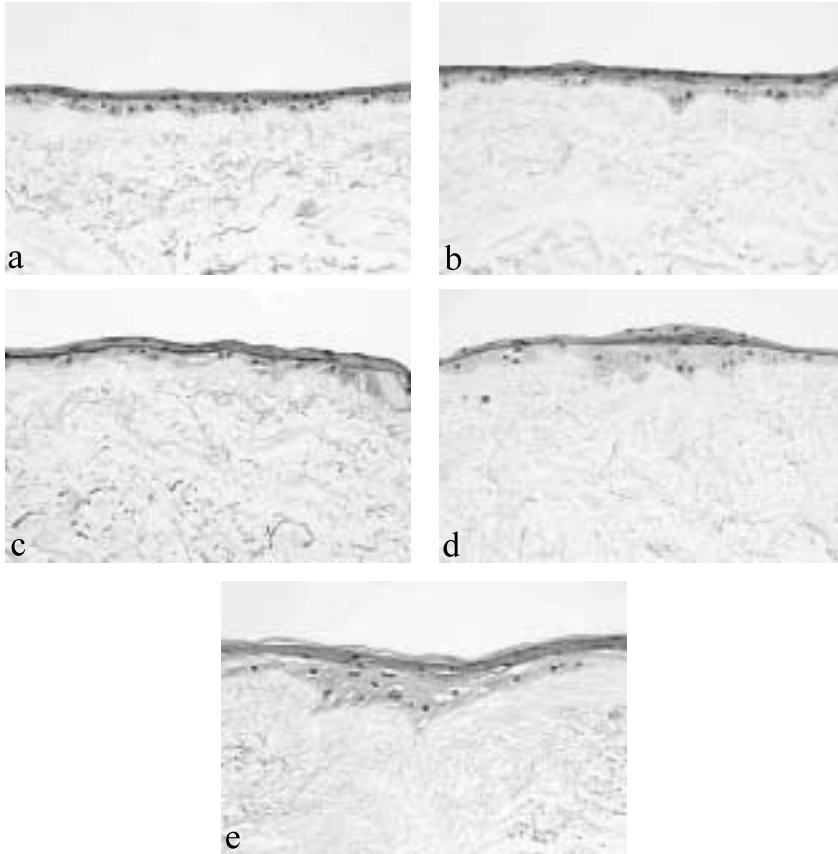


図3 凍結培養細胞を用いた培養粘膜と培養粘膜 (D11E)(HE 染色) (× 200)

- a : - 80 ℃,3M 群
- b : - 196 ℃,3M 群
- c : - 80 ℃,6M 群
- d : - 196 ℃,6M 群
- e : 対照群

凍結培養細胞を用いた培養粘膜は、培養粘膜と同様に4から6層の上皮の重層化を呈した。

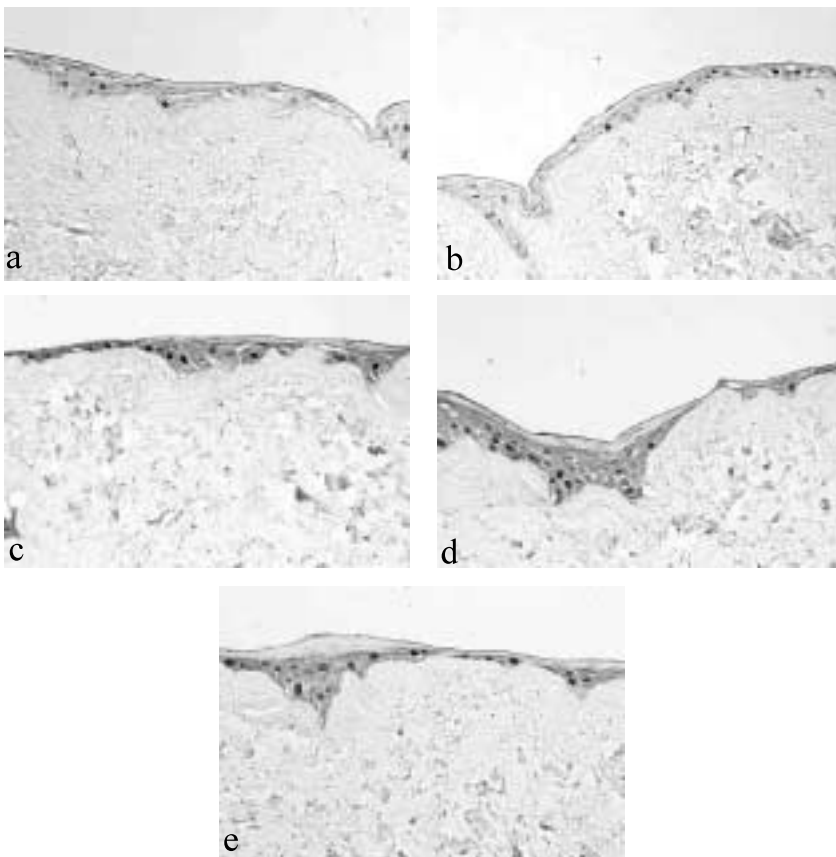


図4 抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学像 (D11E)(× 200)

- a : - 80 ℃,3M 群
- b : - 196 ℃,3M 群
- c : - 80 ℃,6M 群
- d : - 196 ℃,6M 群
- e : 対照群

凍結培養細胞を用いた培養粘膜は、培養粘膜と同様に基底層、傍基底層の細胞において陽性反応が認められた。