

## 熱傷創面に対する培養表皮の移植について

江藤 久志, 岡 博昭, 森口 隆彦, 谷 太三郎, 難波 正義\*

近年, ヒト培養表皮の移植が熱傷創などの広範囲な皮膚欠損創の画期的な治療法として注目されつつある。

私たちも臨床への利用を目標として表皮細胞の培養を行っており, 今回, 熱傷潰瘍の肉芽面に培養表皮を移植する機会を得, その生着をみた。この症例の経過を移植後約7カ月間観察し, 良好な結果を得ているので報告する。 (昭和63年10月21日採用)

### Grafting of Cultured Autologous Epidermis on Burn Wounds

Hisashi Etoh, Hiroaki Oka, Takahiko Moriguchi, Tasaburo Tani and Masayoshi Namba\*

One of most recent exciting developments in the field of plastic and reconstructive surgery has been the attempt to graft cultured human epidermis onto extensive skin wounds such as burns. Recently we succeeded in grafting cultured epidermis onto granulation wounds caused by burns. We describe the results here.

The patient was a 45-year-old woman. On September 30, 1986, she was scalded by boiling water on 30% of her body surface area (face, bilateral arms, and right lower leg). She was treated with fluid and ointment. Since she had still granulation wounds on her left upper arm even after 4 weeks of the treatment, she received split thickness skin grafting. As a result, these wounds were healed. In the meantime, abraded wounds developed on her right calf, where epithelized burn scars had formed. Because of the persistence of the incurable granulation wounds, we grafted cultured epidermis onto these wounds 18 days after operation. Figure 1 shows the residual granulation wounds on her right calf.

We separated epidermal cells for culture from a small piece of split thickness skin obtained during surgery by the method of Takahashi et al. The separated cells were inoculated at a density of  $10^6$  per 60 mm dish. Just before the culture was initiated, these dishes were coated with  $50 \mu\text{g/ml}$  of type IV collagen (Nitta gelatin). The culture medium consisted of amino acids and vitamins of DM-160, minerals and trace elements of MCDB-151, 5% fetal bovine serum

川崎医科大学 形成外科  
〒701-01 倉敷市松島 577

\* 同 実験病理

Department of Plastic and Reconstructive Surgery,  
Kawasaki Medical School: 577 Matsushima, Kurashiki,  
Okayama, 701-01 Japan  
Department of Experimental Pathology

(FBS),  $10^{-6}$ M dexamethasone,  $10 \mu\text{g/ml}$  of insulin,  $10 \text{ ng/ml}$  of epidermal growth factor (EGF) (Takara Shuzo),  $10 \text{ ng/ml}$  of cholera toxin and  $100 \mu\text{g/ml}$  of kanamycin. No calcium was added to this medium, because the concentration of calcium contained in a culture medium supplemented with 5% FBS is sufficient for the growth of epidermal cells. The cultures were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and humidified air. When the cells became confluent in 18 days, they were treated with  $400 \text{ PU/ml}$  of dispase (Godo Shusei Co.) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 hour in order to release the cultured epidermal sheets from the surface of the dish. Dispase was dissolved in Eagle's minimum essential medium (MEM) (Nissui Seiyaku Co.).

Figure 2 shows the epidermal cells after 18 days of cultivation. Figure 3 shows the cultured epidermal sheets released by dispase treatment. We washed the sheets with phosphate buffered saline (PBS) and put them on a piece of Trex-gauze with fine forceps (Fig. 4). Then we grafted these cultured sheets onto the granulation wounds and applied a pressure dressing with gauze and bandage to the wounds. The patient was in bed for one week. Figure 5 shows the epidermal sheets on the wounds at the time of grafting. As shown in the figure, a half-side test was done to determine whether the cultured epidermal sheets would take or not. Figure 6 shows the appearance of the wound 1 week after grafting. A remarkable outgrowth of the epidermis was observed from the grafted epidermal sheets and from the wound edge ten days after grafting (Fig. 7). Figures 8, 9, 10, and 11 show a time course appearance of the grafts at 2, 3, 5, and 7 weeks, respectively. Two weeks after the grafting, the wound was perfectly epithelized, and a little pigmentation was seen (Fig. 8). In 7 weeks pigmentation became diffuse, and redness in the grafted area was reduced. Figure 12 shows the status of the grafts after 10 weeks. After 7 months the grafted epidermis displayed a good texture match as well as a good color match. In addition, no hypertrophic scars were observed around the graft, with the margin of the wound being inconspicuous (Fig. 13).

In summary, we could obtain cultured epidermal sheets from a small piece of skin fragment and succeeded in grafting the sheets onto the burn wounds. Therefore, this technique should possibly provide an aesthetically good result in treating various skin losses. (Accepted on October 21, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15(1): 33-41, 1989

**Key Words** ① Cultured epidermis ② Skin graft ③ Burn

### はじめに

ヒト培養表皮の熱傷治療への応用は、最初に1981年 O'Connor ら<sup>1)</sup>により報告された。その後、1984年 Gallico ら<sup>2)</sup>は  $2 \text{ cm}^2$ の皮膚より得た培養表皮を用い90%以上の広範囲熱傷

患者を救命し得たと報告した。本邦では、1985年熊谷らにより熱傷創面に培養表皮を移植し生着したとの報告がある。また、1986年 Hefton ら<sup>3)</sup>は難治性の潰瘍に培養表皮の移植を行い、疼痛の軽減および潰瘍の上皮化に有効であった

と報告している。このように、ヒト培養表皮の利用は、熱傷創などの広範囲な皮膚欠損創の治療法として近年注目されつつある。

今回、私たちも肉芽創面の残った熱傷患者に培養表皮を移植したところ、良好な生着をみたので若干の考察を加え報告する。

## 症 例

45歳 女性。昭和61年9月30日誤って風呂に転落し、熱湯にて顔面、両上肢、右下肢に30%の熱傷を受けた。当院救急部に入院し保存的治療を受け、10月24日手術目的にて当科に転科した。転科時左上腕に熱傷創が残存していた。この部分に対して、10月30日に全身麻酔下に左大腿部より10×20 cm、厚さ20/1000インチの分層皮膚を採取し左腋窩部、肘関節部に植皮術を施行し、関節部以外の上腕に10/1000インチの patch graft を行った。右下腿の創面は保存的治療により一度上皮化していたが、その後一部表皮が剥脱し3.5×2.5 cm および2.5×2.0 cm の肉芽創となって残存した (Fig. 1)。

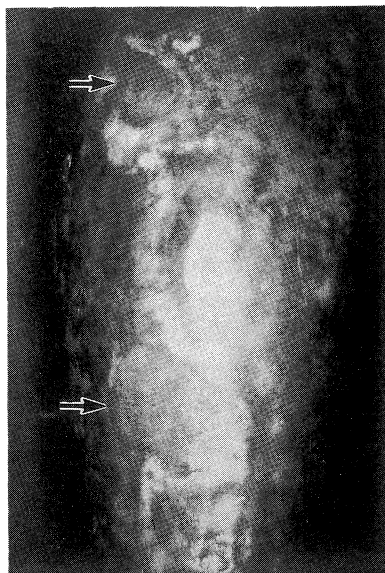


Fig. 1. Granulation wounds on the right calf before grafting the cultured epidermis (arrows).

## 材料および方法

### 1) 表皮細胞の培養

手術の際にわずかに残った分層皮膚を用いて表皮細胞の培養の材料とした。表皮細胞の分離はディスパーゼおよびトリプシンを用いる Takahashi ら<sup>4)</sup>の方法に準じて行った。皮膚を1 cm 角に切り、燐酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄した後メスを用いて表皮側に約3 mm 幅で軽く切れ込みを入れた。この皮膚片を真皮側を下にして滅菌した濾紙に張り付け、さらに皮膚片のカーリングを防ぐために濾紙をもう一枚上から置き、Eagle's minimum essential medium (MEM, 日水製薬) に溶解した1000 PU/ml のディスパーゼ (合同酒精) 溶液中にいれ4°C、24時間静置した。次いで、摂子を用いて表皮シートを真皮より剥離した。この際、表皮側に切れ込みを入れておくことにより、表皮シートは3 mm×10 mm の細片として剥離できた。この表皮シートを0.25% トリプシン (Difco 1:250) 液中に入れ室温にて13分間静置したのち、血清を含む培地中に移しスターラーにて30分間攪拌した。上清を遠沈管に集め1000 rpm、10分間遠沈し沈殿した細胞を新しい培地に浮遊させ、細胞数を数えて、60 mm シャーレ当たり100万個となるように播種した。

培地の作成にあたっては、アミノ酸ビタミン組成は極東DM-160アミノ酸ビタミン培地を用い、塩類組成はMCDB-151培地<sup>5)</sup>の塩類組成よりカルシウムを除いたCa-free培地を調製し、5%ウシ胎児血清 (FBS, Flow Laboratory)、上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor, EGF, 宝酒造) 10 ng/ml、インシュリン (Collaborative Research) 10 μg/ml、デキサメサゾン (Sigma) 10<sup>-6</sup>M、コレラトキシン 10 ng/ml (化血研) を加えて用いた。また、シャーレはFalcon 3002 dishを用い、50 μg/ml のtype IV コラーゲン (新田ゼラチン) でコーティングして用いた。培養は5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37°Cにて行った。

## 2) 培養表皮の移植

培養表皮の回収は、MEMに溶解した400 PU/mlのディスペルゼを用い、37°C、1時間静置して培養表皮をシャーレ表面よりシート状のまま剥離した。ディスペルゼ液を静かに除去し、細胞シートをPBSで十分に洗浄した後、トレックスガーゼを裏打ちとして基底細胞層が上になるように回収した。

肉芽創を生理食塩水で洗浄し、トレックスガーゼ上に回収した培養表皮を基底細胞層が肉芽面に接するように置き、さらにその上からトレックスガーゼおよびガーゼをやや厚めに置いて、通常の植皮術と同様に弾力包帯で軽く圧迫固定した。移植後1週間安静を保たせた。

## 結 果

### 1) 培養経過

播種後24時間目には表皮細胞のコロニーが認められ、培養経過とともにコロニーは細胞の増殖により拡大した。その後、増殖した表皮細胞は特有な敷石状の配列を示した。播種後1週間目より週に2回の割合で培地を交換した。2週目を過ぎる頃には細胞はほぼ confluentで、18日目にはほぼシャーレ全面に細胞の重層化が認められた (Fig. 2)。ディスペルゼ処理により培養表皮は周辺部より剥離し始め、シャーレの底面積よりもやや縮んだ状態で培地中に浮き上がった (Fig. 3)。培養表皮シート

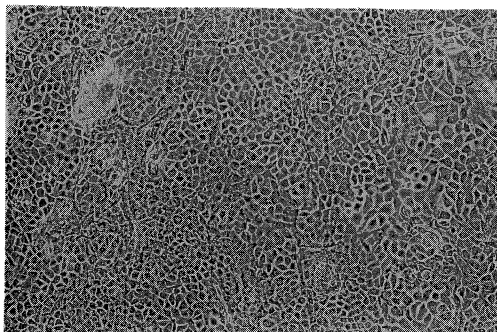


Fig. 2. The appearance of cultured epidermis after 18 days cultivation. The cells had become confluent, and stratification was observed in some part.

は摂子を用いてトレックスガーゼ上に回収できた (Fig. 4)。

### 2) 移植後の経過

移植の際、創面の一部を肉芽面のまま残してハーフサイドテストを行い、培養表皮が生着したかどうか確認できるように配慮した (Fig. 5)。

4日目に最初のガーゼ交換を行った。培養表皮を移植した部分では浸出液は認められず乾燥していたが、肉芽面では浸出液が多く見られた。移植後1週間目に裏打ちのトレックスガーゼを除去した。培養表皮を移植した部分は光沢のある表皮として生着していたが、培養表皮を移植しなかった部分では依然として肉芽創が残っていた (Fig. 6)。移植後10日目に

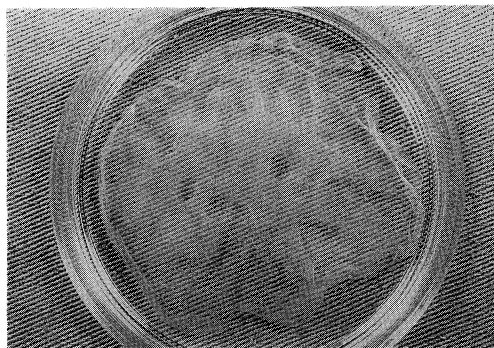


Fig. 3. The cultured epidermal sheets were released from culture dish surface with treatment of 400 PU/ml dispase at 37°C, for 1 hour.

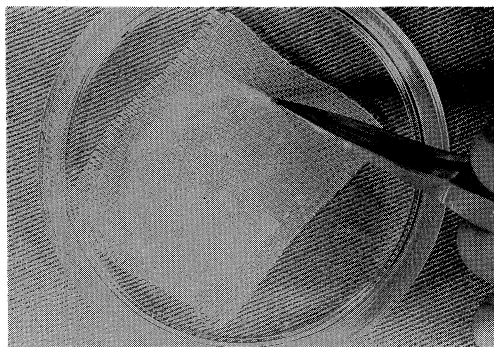
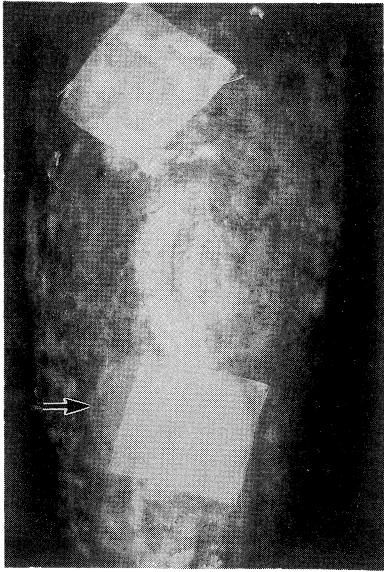


Fig. 4. The released epidermal sheet was put on a piece of Trex-gauze with fine forceps. At this time, the graft was put in such a way that the basal layer faces upward.



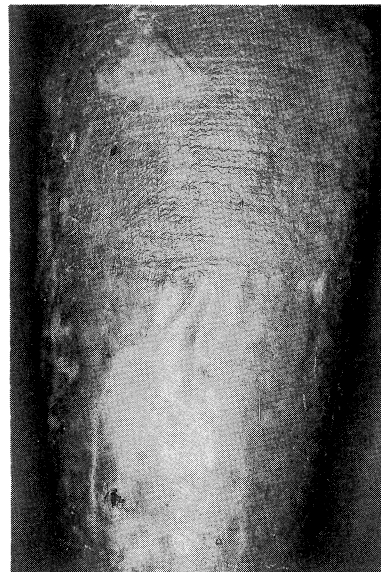
**Fig. 5.** The cultured epidermis was just grafted on the wounds. To determine its take, a small area in the granulation wound was left ungrafted for a half-side test (the raw area is indicated with an arrow).



**Fig. 6.** The appearance of the cultured epidermis at 1 week after grafting. The graft took well on the granulation tissue, and the surface of grafted area was dry. On the contrary the ungrafted area has not been epithelized yet (arrow).

は、培養表皮および創縁からの表皮の伸展が著明で、残存していた肉芽創は上皮化の傾向にあり (Fig. 7), 14日目には完全に上皮化した (Fig. 8). また、移植部には斑点状の色素沈着が認められた. 移植後3週目の状態では、移植部の赤味は減少しやや白味を帯び、周囲との境界は明瞭であった (Fig. 9). 5週目になると、周囲の瘢痕とほぼ同じ色調となり、境界は不明瞭になった (Fig. 10). 7週目の状態では、斑点状の色素沈着は目立たなくなったが、周囲の瘢痕に比べて植皮部全体に軽い色素沈着を認めた (Fig. 11). 10週目の状態では、わずかな色素沈着を認めるのみで、境界は不明瞭になり周囲の瘢痕部との区別はつけ難い状態となった (Fig. 12).

7カ月後の状態は、培養表皮の移植部は柔らかく、色素沈着も減少し周囲の瘢痕部とほとんど同じ色調となり、注意してみるとわずかにその輪郭がわかる程度であった (Fig. 13).



**Fig. 7.** At 10 days after grafting, residual granulation wound was epithelized by extended epidermis from the margin of the wound and the graft.



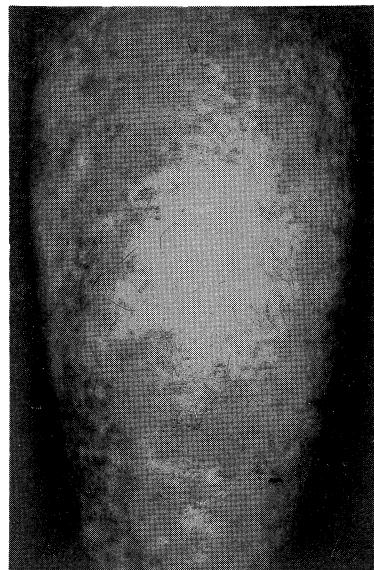
**Fig. 8.** The result at 2 weeks after grafting. The residual wound had epithelized and pigmentation was observed at the grafted area.



**Fig. 10.** The result at 5 weeks after grafting. No difference was observed between the grafted area and the ungrafted area.



**Fig. 9.** The result at 3 weeks after grafting.



**Fig. 11.** The appearance at 7 weeks after grafting. Diffuse slight pigmentation in the grafted area was seen.

## 考 察

培養表皮の移植は、Green ら<sup>6)</sup> による一連の表皮細胞の培養に関する研究に始まり、O'Connor ら<sup>1)</sup> による臨床への応用例の報告により臨床への実用化が開始された。本邦でも近年、熊谷らによる Green type の培養表皮の移植、<sup>7), 8)</sup> 黄金井らによる Bell type の人工皮膚など、<sup>9)</sup> この方面での研究が進んできている。

今回、私たちが作成し1症例ではあるが、その移植に成功したのは Green type の培養表皮である。

## 1) 培養方法について

## a) 細胞分離法

細胞の分離法については、文献的には Rheinwald & Green<sup>10)</sup> のごとく細切皮膚片をトリプシンで処理する方法、ディスパーゼその他のプロテアーゼ処理で表皮のみを剝離して表皮細胞を分離する方法、<sup>4), 7)</sup> また、表皮を剝離した後に真皮側より器械的に基底細胞を分離する方法<sup>11)</sup> などが見受けられる。これらの方法のうち細切皮膚片トリプシン処理法と真皮側より基底細胞を分離する方法は、線維芽細胞が多く混入し、表皮細胞の培養には不適であると私たちは考えた。<sup>12)</sup> したがって、表皮のみを剝離して細胞を分離する方法を用いた。

この際に、トリプシンを用いた表皮の剝離とディスパーゼによる剝離について組織学的に検討した。その結果、トリプシンを用いた場合では基底細胞が真皮側に残存する傾向がみられた。これらに対してディスパーゼでは、Kitano, Y. & Okada, N.,<sup>13)</sup> Takahashi ら<sup>4)</sup> が述べているごとく基底層を含めて表皮を剝離でき、基底細胞は剝離した表皮側によく保たれていた。したがって、私たちは Takahashi ら<sup>4)</sup> の方法に準じて細胞の分離を行った。

## b) 培地について

無血清培地を用いた研究では、ヒト表皮細胞は 0.03 mM のカルシウム濃度で良好に増殖するが、高濃度では clonal growth はおこらな



Fig. 12. The result at 10 weeks after.



Fig. 13. The result at 7 months after grafting. The grafted cultured epidermis was similar to the surrounding skin about its color and texture. No hypertrophic scar was seen around the graft. The margin of the wound was not conspicuous.

かったと報告されている。<sup>5)</sup> すなわち、0.03~0.1 mM 濃度のカルシウムを含む培地で細胞は著明な増殖を示し、0.1~0.3 mM までにはゆっくり増殖する。一方、通常の培地に含まれる1.0 mM 濃度のカルシウムは細胞増殖を劇的に抑制する。<sup>14)</sup> したがって、市販されている培地ではカルシウム濃度が高く表皮細胞が終末分化の方向に進むため、少数の細胞からは十分な増殖が得られない。私たちの症例ではカルシウムを除いた組成の培地を調製して用いた。しかしながら、5%のFBSを添加するとカルシウム濃度は0.33 mM になり、終末分化を防ぐにはまだやや高い濃度で、今後の検討の余地があると思われる。

### c) 培養経過

培養の経過については、細胞の増殖状態はこの培地を用いた場合でも諸家の報告とあまり差はなかった。しかし、移植するまでに18日間の培養期間を要しており、臨床への利用を考えるともう少し培養期間を短縮する必要がある。

## 2) 培養表皮シートの移植

### a) 培養表皮の回収

培養表皮シートの剝離については、ディスプレイによる処理により諸家の報告<sup>1), 2), 6), 7)</sup>と同様に容易に剝離できた。剝離した培養表皮シートは、シャーレの底面積の約1/4程度に縮んだ状態で回収できた。この大きさは、postage stamp graft として用いるのに都合の良い大きさであると考えている。

### b) 移植の手技

回収した培養表皮シートは薄く、そのままでは取り扱い難いため、移植するにはなんらかの裏打ちが必要となる。この際の裏打ちとしては、O'Connor ら<sup>1)</sup> Gallico ら<sup>2)</sup> Hefton ら<sup>3)</sup> はワセリンガーゼを、熊谷ら<sup>7)</sup> はコラーゲン膜を用いている。今回、私たちは通常の植皮の際に用いているトレックスガーゼを用いた。特に移植後の経過では問題となる点はなかったが、トレックスガーゼが撥水性であるため表皮シートの回収時にやや扱い難い欠点があった。

### c) 移植後の経過

熊谷ら<sup>7)</sup>によると、1週間後にガーゼ交換を行い、この際に培養表皮は生着しており移植を行っていない部位に比べて創面よりの浸出液は少ない。その後厚みを増すとともに周囲へ拡大伸展し1カ月半で約2倍の面積に拡大し、12週間後には肉眼的には周囲の表皮と区別がつかなくなったとしている。また Hefton ら<sup>3)</sup>は、難治性潰瘍への培養表皮の移植で、培養表皮は24~48時間で肉芽組織に付着し、3日目には表皮の肥厚が認められ、6例の全例が14日目には上皮化したと述べている。O'Connor ら<sup>1)</sup>は、10日目にはその生着が確認でき、3~4週間にわたり移植した培養表皮は厚さを増し、周囲へ伸展し続けたと報告している。Gallico ら<sup>2)</sup>は、数日で培養表皮は創面に付着し、移植後3~4日目までに植皮部の隙間の創の部分も上皮化し、密生した表皮層を形成したと述べている。

私たちの症例では4日目には浸出液が認められず乾燥しており、1週間目には培養表皮の生着が確認できた。その後の経過では、移植部から周囲への伸展が予想以上に速く、10日目には肉芽創全体が上皮化した。この周囲への伸展の速さから考えると、広範囲の皮膚欠損創に対しても培養表皮による patch graft を行うことによって十分に対応できる可能性がある。14日目ごろより移植部に色素沈着が認められたが、これは他の報告<sup>3), 6)</sup>と同じくメラノサイトが混合培養の形で培養表皮中に存在しているためであろう。その後、経過とともに色素沈着も軽減し、7カ月後には、color, texture とともに周囲の皮膚とほとんど区別できなくなった。この症例のような肉芽創を保存的に治療した場合には、肥厚性瘢痕となりやすい傾向がある。また、patch graft を行った場合でも、辺縁の瘢痕が肥厚性瘢痕となる症例をしばしば経験することがある。これに関して Hefton らは、培養表皮の移植により瘢痕形成が軽減される可能性があるとして述べており、<sup>3)</sup> この症例でも移植した培養表皮の生着を確認するために、肉芽創として残した部分も移植表皮細胞の良好な増殖伸展のた



め肥厚性癬痕とはならず、辺縁の癬痕も目立たなかった。もしこのようなことが一般に認められるとすれば、培養表皮移植の利点のひとつであるといえることができる。この方法は、採皮部の少ない患者の植皮片面積の拡大にとどまらず、整容的にも形成外科領域では有用であると思われる。

### ま と め

今回、熱傷潰瘍の肉芽面に培養表皮を移植す

る機会を得、その生着をみた。この症例の経過を移植後約7カ月間観察し、良好な結果を得た。まだ1症例目ではあるが今後さらに症例を増やして検討を加えていきたいと考えている。

本論文の要旨は、第13回日本形成外科学会中国四国地方会例会（昭和62年2月1日、於高松）において発表した。

### 文 献

- 1) O' Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. and Green, H.: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cell. *Lancet* 10: 75—78, 1981
- 2) Gallico, G. G., O' Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O. and Green, H.: Permanent coverage of large burn wound with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 311: 448—451, 1985
- 3) Hefton, J. M., Caldwell, D., Biozes, D. G., Balin, A. K. and Carter, D. M.: Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cell. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14: 399—405, 1986
- 4) Takahashi, H., Sano, K., Yoshizato, K., Shioya, N. and Sasaki, K.: Comparative studies on methods of isolating rat epidermal cells. *Ann. plast. Surg.* 14: 258—266, 1985
- 5) Peehl, D. M. and Ham, R. G.: Clonal growth of human keratinocytes with small amount of dialyzed serum. *In Vitro* 16: 526—538, 1980
- 6) Green, H., Kehinde, O. and Thomas, J.: Growth of cultured human epidermal cell into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 76: 5665—5668, 1979
- 7) 熊谷憲夫, 仁科博道, 保坂登美子, 荻野洋一: ヒト培養表皮移植に関する研究—自家培養表皮移植による広範囲熱傷創の治療—。日形会誌 5: 463—474, 1985
- 8) 熊谷憲夫: 培養表皮移植の臨床応用。日形会誌 6: 617—618, 1986
- 9) 黄金井康巳: 再構成培養皮膚移植。日形会誌 6: 611—612, 1986
- 10) Rheinwald, J. G. and Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell* 6: 331—344, 1975
- 11) Laerum, O. D.: Oxygen consumption of basal and differentiating cells from hairless mouse epidermis: A new method for obtaining almost pure selections of basal and differentiating cells respectively. *J. invest. Dermatol.* 52: 204—211, 1969
- 12) 江藤久志: ヒト培養表皮の移植に関する基礎的検討—培養条件について—。川崎医会誌 14: 317—327, 1988
- 13) Kitano, Y. and Okada, N.: Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br. J. Dermatol.* 108: 555—560, 1983
- 14) Boyce, S. T. and Ham, R. G.: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. invest. Dermatol.* 81: 33s—40s, 1983