

論 文 要 旨

Exploration of the pressurization condition for killing human skin cells and skin tumor cells by high hydrostatic pressure

(高静水圧によるヒト皮膚細胞と皮膚悪性腫瘍細胞を死滅させるための圧力条件の検討)

関西医科大学形成外科学講座
(指導：楠本 健司 教授)

光 井 俊 人

【目的】

関西医科大学、形成外科学講座では、臨床研究として巨大色素性母斑の治療に対して、高圧処理をした母斑組織を再利用した皮膚再生医療を進めている。この臨床研究は、巨大色素性母斑を切除して、切除した組織を 200MPa (2000気圧)、10 分間の高圧処理で不活化（細胞の死滅）し、不活化した真皮を切除部位に再移植する。その後、不活化した真皮に血管新生が見られる 2~6 週目に培養表皮を移植することで皮膚を再生する再生医療の研究である。これまでの文献で、200MPa、10 分間の高圧処理で皮膚及び母斑組織内の細胞が死滅することを示されてきた。しかし、より低圧である 150MPa から 200MPa での高圧処理や、高圧処理時間を 10 分以下での検討はまだ不十分であり、皮膚細胞および、皮膚悪性腫瘍細胞で検討をおこなってきた。今回、従来よりも低圧、短時間での加圧処理で皮膚細胞および皮膚悪性腫瘍細胞が死滅するか、また、細胞は圧力によりどのように死滅するかを検討した。

【方法】

今回の検討では、ヒト角化細胞、ヒトメラノサイト、ヒト線維芽細胞、ヒト脂肪組織由来幹細胞、ヒト悪性黒色腫細胞株の 5 種類の細胞を用いた。圧力をかけた機械は、越後製菓株式会社の研究・開発用圧力処理装置を用いた。この圧力処理装置は間接加圧により加圧できる機械で、数秒で至適圧力まで加圧することができ、減圧も数秒で可能である。それぞれの細胞に対して、150MPa、160MPa、170MPa、180MPa、190MPa の圧力、加圧時間は 1 秒、2 分、10 分の 3 群とした。加圧後の LIVE/DEAD assay および、3 時間後、1 日後、3 日後、7 日後の細胞培養後に CCK-8 を用いた細胞増殖 assay を行った。さらに細胞が圧力処理によってどのような死滅経路をたどっているのかを考察した。それぞれの細胞株に対し、それぞれの条件での圧力処理後に 7-AAD と Annexin V を用いた apoptosis assay を施行した。さらに、ヒト線維芽細胞では、190MPa で 1 秒、2 分、10 分の圧力処理後の透過電子顕微鏡による観察を行った。

【結果】

それぞれの細胞で、加圧時間が 1 秒の群ではどの圧力でも完全に細胞が死滅することはなかった。ヒト角化細胞は 2 分間および 10 分間で、150MPa より高い加圧で不活化（死滅）されていた。ヒト線維芽細胞、ヒト脂肪幹細胞、ヒト悪性黒色腫細胞は、170MPa より高い圧力で 10 分間加圧すれば不活化された。しかし、ヒトメラノサイトでは、180MPa より高い圧力で 10 分間の処理で不活化されていた。今回検討した 5 種類の細胞では、180MPa より高い圧力を 10 分間持続すればどの細胞でも死滅していた。加圧処理後すぐに施行した apoptosis assay では、10 分間の圧力処理で、圧力を上げていくと、Late apoptosis/Dead の群がどの細胞株でも増加した。Late apoptosis/Dead の群は、190MPa で 10 分間の圧力処理で、ヒト角化細胞で 86.02%、ヒト線維芽細胞で 79.56%、ヒト脂肪幹細胞で 84.10%、ヒトメラノサイトで 40.69%、ヒト悪性黒色腫で 69.14%を示した。

また、ヒト線維芽細胞の圧力処理後の透過電子顕微鏡観察では 2 分でヒト線維芽細胞の樹状の突起が消失し、10 分間の加圧で細胞壁の破裂が確認された。

【考察】

高圧処理による細胞やヒト皮膚組織や豚皮膚組織は、150MPa での不活化は不完全で、200MPa では完全に不活化できると報告されていた。今回検討したヒト皮膚細胞では、ヒト角化細胞が他の 4 種の細胞と比べ、圧に関する感受性が高いと考えられる。検討した 5 種類の細胞は、180MPa より高い圧力を 10 分間持続すれば、どの細胞でも死滅することが確認された。高圧処理による細胞死の経路は apoptosis が主な経路であると報告されているが、今回検討した圧力処理条件では、apoptosis、necrosis が混在しているが、細胞壁が破裂することによる necrosis が主体であった。