

50 ml の保存液 (SHEM) を含む 50 ml のガラスコンテナに移動され、施蓋後、密閉シールが施されて、5℃ の冷蔵庫に移動される。

凍結乾燥されるタイプの羊膜を使用しているグループでは、前述と同様の手順で採取された羊膜を凍結乾燥して無細胞化した後に、フィーダー細胞を培養したディッシュ中にメッシュ構造を中空に持つプラスチック枠をもつ培養器のメッシュ部分に羊膜を乗せ、培養液中に沈める。この結果、羊膜ならびにその後に培養を開始する角膜上皮細胞、または後述の口腔粘膜細胞が直接、フィーダー細胞に接触しない。メッシュ上の羊膜上に角膜上皮細胞、もしくは口腔粘膜細胞を蒔き細胞がコンフルエントに達する 48 時間培養される。これらの培養液については現在、企業秘密となっており正確な情報をつかんでいない。

別のグループでは、コラーゲンを架橋したマテリアルを利用して角膜実質部分を構築している。これらは現状ではウシコラーゲンを利用しているが、国内メーカーでもブタコラーゲンの精製が行われるようになり、純度もウシ同様のレベルになり、ブタコラーゲンにシフトしているグループもある。これらのコラーゲンはメーカーでの無菌証明試験と分子量の測定が行われているが、現状では医療用のもではない。使用するコラーゲンのタイプと、コラーゲンの架橋方法について

は、グループごとに異なっており、タイプⅣのみを架橋しているものからタイプⅡとタイプⅤをミックスした後に、複数の架橋剤により Inter-penetrating Network を形成させるものなど、その構造は研究者により異なっている。

また、角膜上皮を細胞シートとして利用するグループもあり、これらはコラーゲンベースの膜を培養皿上に塗布して、角膜上皮を培養し、温度変化により細胞シートのみを剥離する。その際に細胞上部にアプリケーションとなる膜を置き剥離すると、コラーゲンに接していた側の細胞に細胞接着分子が維持される。これと同様の方法で角膜内皮細胞のシートの研究も進んでおり、内皮の細胞シートが開発されれば、現在、最大の角膜移植対象疾患となっている水疱性角膜角膜症の治療に効果が期待される。

これらに比べて異なったアプローチを行っているのがポリマーを利用した人工角膜である。

コンタクトレンズなどに使用される PMMA、P-HEMA 等原材料としたプラスチックポリマーを機材として、角膜上皮細胞、および口腔粘膜をその表面に培養して、生着させる。このタイプは本来、コラーゲンでできている角膜実質部分での眼球内部からの前房水の吸収による保水性、およびその水分の角膜内皮細胞による前房へのポンプアウト機能、さらには角膜内皮細胞側

からの角膜上皮に対する栄養供給やシグナル物質の供給を絶った形での人工角膜を目指すアプローチとして前述の群と区分される。

移植法

最も簡便な医療用具は、角膜上皮細胞シートである。現状の臨床応用では、角膜上皮細胞の疲弊症に対する治療で、シートを培養した上皮細胞の下面を患部に直接接触すると、当該方法にて採取された上皮細胞は細胞接着分子を有しているため、残された角膜上皮細胞上、もしくは露出したボーマン膜に接着する。その後に応用器具を細胞シートから剥離することで、上皮シートは角膜表面に移植される。羊膜などの基底膜を利用したタイプでは、混濁や変性が疾患部のどの程度深層まで達しているかによって、術式が異なる。角膜実質の表層部（上皮に近い部分）のみの場合や、スチーブンスジョンソン症候群（SJS）などの表層修復用に用いられる場合には、角膜上皮上の他組織（結膜上皮等）を除去した後に、角膜上に乗せ角膜全体を覆い、周辺部の結膜上あるいは強膜上を4箇所、あるいは必要に応じてそれ以上の羊膜等の周辺部を、10-0 ナイロン糸などで縫合する。患部が深層である程度の実質の除去が必要な場合には、角膜移植に用いられるトレパンを使用して、必要な深さまで切開し、ゴルフ刀等を用いて実質のコラーゲン層

を剥離する。その後前述の方法で角膜表面をカバーして縫合する。また、羊膜ベースのものの場合には、翼状片などの抑制や、モーレン潰瘍などの場合にも用いられるため、中央部は健常である場合もあり、その場合には周辺部の角膜に乗せて、瞳孔領以外のポジションで縫合して接着させる。

内皮細胞シートの場合には、現状で試されている方法には2種類あり、臨床的にどちらが有利かは不明であるが、第一の方法は、リング付き開眼器で眼球を4箇所縫合により固定した後に、マイクロケラトームを使用して角膜を一旦、円形に切開してフラップ上にする。前房が露出した形になるが、その状態で粘弾性物質（ヒアルロン酸等）を前房内に注入してから、患部の内皮細胞を除去した後に、内皮細胞シートを装着する。第二の方法は、通常の内眼手術と同様に、角膜の輪部、もしくは角膜の周辺部を切開して、眼球内に入り、内皮細胞をスクレーパーなどで除去した後に創からアプライする必要がある。

これに比べてポリマー等で作成された全層用角膜片は、通常的全層角膜移植と同様に、上皮層から全層をトレパンで打ち抜き、患部の角膜と置き換え、周囲を連続縫合、或いは単々縫合にて縫合して移植する。同一の物質を角膜穿孔等の緊急時に、アイバンクからの角膜供給を待つための一時的な使用として用いようとしているグル

ープでは、角膜実質中にポケットを作成してポリマーを挿入して、穿孔部位を塞ぐ方法も考案されている。

2. 臨床応用実現までの期間

羊膜利用のグループでは、学内の倫理承認を得てすでに臨床研究が開始されている。コラーゲンベースのポリマーを利用しているタイプでは、動物実験段階でブタを使用した結果では良好である。ポリマーのみを利用した角膜穿孔時の緊急使用も倫理審査をへて臨床が始まろうとしている。また、細胞シートに関しては、上皮細胞シートはすでに動物実験を経て、臨床研究が本年中にも開始される予定である。内皮細胞シートに関してはヒト内皮細胞の増殖能が低く、ウイルスベクターを挿入した不死化細胞による動物実験が行われている。アイバンクで献眼されたヒト角膜の使用基準は内皮細胞密度 2000 細胞/mm² 以上となっているが、プライマリー細胞の培養でも現在 3000 細胞/mm² 以上の細胞密度に到達しており、家兎やブタを使った動物実験でも、内皮細胞移植後、最高で1年間の観察期間で生着、ならびにその効果が実証されており、臨床応用も本方法が認められれば、1年～2年以内での臨床応用の可能性は高いものと考えられる。プラスチックポリマーを使用するグループでは、生着性が最大の課題となることが予想され、特に graft と host 間での組織萎

縮等が長期にわたり観察される必要があるため、動物実験によりこれらの検証が実施されて、問題が無ければその後、1年以内に臨床応用となる可能性がある。

人工のバイオポリマーによる角膜実質と角膜上皮細胞の複合体に関しては、現在、素材を選定している状況であるため、開発までには2年以上かかると考えられる。しかし、コラーゲン等を利用したバイオポリマーを、角膜穿孔や裂孔時の緊急用パッチとしての利用は、すでに学内倫理委員会医の承認を得られている機関もあり、すぐにでも臨床応用されるであろう。

3. 臓器あるいは加工法に特異的な安全性確認事項、評価方法

角膜内皮細胞の培養や羊膜製剤に関しては、フィーダー細胞を利用しているため、これらの技法の扱いにより安全確認が必要である。また、グループにより動物血清を使用しているが、臨床応用の際にはヒト血清を使用することであるが、患者本人の血清か否かによりその確認方法、および使用上のとり違い防止策などが必要と思われる。また、角膜内皮細胞では、ヒト内皮細胞では前述のように分裂能が低く、あえて増殖能を高める方策が練られているため、現状では、細胞密度が 3000 細胞/mm² 程度であるが、臨床応用された際には、これらの細胞の異常増殖や癌化がないか等の測定

が必要であろう。セルサイクルの遅い内皮細胞に関しては、少なくとも90日以上サンプルの培養を実施して、形態的に異常な分化をしている細胞の有無を確認する必要があると思われる。培養下での長期観察を実施して、細胞の形状（通常は単層で均一な六角形細胞）や増殖能（正常であれば接触阻害によりコンフルエントで停止）を確認すると同時に、生体内で房水に曝された環境下での、成長因子やサイトカインの豊富な状況での細胞動態を観察する必要がある。

角膜上皮細胞は、高分裂能を有しており、現在、幹細胞を単離して使用することが模索されている。しかし、現時点で使用されている上皮細胞は、培養環境下で Progenitor 細胞、もしくは Primary 細胞とされている。系代されて使用される場合にはこれらの細胞が角膜上皮細胞の characterization を実施する必要がある。角膜上皮細胞については、角膜上皮特異的なケラチンの発現 (AE 5 等) により、正常な状態であるかが測定できる。細胞の活性面では、内皮細胞および上皮細胞の viability も現状では MTT assay および、DNA 合成時に取り込まれる BrdU の定量によって行われている。角膜上皮幹細胞が単離されて医療器具に使用される場合には、これに加えて内皮細胞同様に異常増殖や癌化がないか等の測定が必要であろう。角膜上皮細胞に関しても、最

低60日以上サンプルの培養が好ましいと考えられる。

角膜上皮を構築して臨床応用される医療器具に関しては、基底膜部の上皮が基底細胞としての形状を維持し、かつ基底膜との間に hemi-desmosome の形成などの接着が構築されているか等の確認が必要である。また、上皮の表層になるに従って角化して扁平化して、角膜上皮のバリアー機能が保持されているかを確認する必要がある。眼科的には蛍光色素を使用して、permeability を紫外線光にて実施してバリアー機能の評価が行える。

上皮基底膜を構築している医療器具の場合、羊膜などでは問題は無いが人工ポリマーやバイオマテリアルを使用している場合に、角膜上皮のコラゲナーゼ活性の上昇により、侵食される場合もあり、特に臨床前の動物実験などにおいて、炎症傾向の強いとされる白色家兎などの実験にて、材料の長期耐性を評価することが必要である。角膜の特性上、単に材料が物理的に維持されることのみでなく、光学的透明性が長期間維持されることも重要な要素である。このことは、内皮細胞を構築していないポリマー等により、全層移植される場合には、前房水との直接のコンタクトが生じるため、房水内の蛋白の沈着が生じる可能性があり、長期間の動物実験などが必要となるであろう。また、生体材料でない場合においては特に、ホスト側との

生着性が重要となり、ホスト側の萎縮などにより移植片とレシピエントの角膜輪部間に隙間ができると、房水の漏出や最悪の場合には、感染による眼内炎により重篤な状況を引き起こす可能性がある。これらの生着性も臨床前の動物実験による評価が必要である。

4. 臓器あるいは加工法に特異的な有効性評価方法

角膜の最大の有効性は、その透明性と屈折力にある。角膜上皮層は、透明性を維持する上で正常な涙液からの栄養や成長因子、さらにはラクトフェリン等の供給により、5, 6層の健全な構造を維持して、且つ外界からの物質の permeability を抑制することでのバリアー機能を有しなければならない。感染に関しても上皮の破綻により、基底膜であるボーマン膜が露出すると RGD 蛋白が外界に曝され、細菌感染を誘発することとなる。角膜上皮を利用した医療用具の場合、上皮のバリアー機能の評価をすることが重要である。臨床の場合と同様に通常は、蛍光色素を角膜上皮上に塗布して紫外線光を励起させて上皮細胞層内への浸潤を可視化できる。また、屈折力の点からも上皮層が均一の層構造であることは重要であり、これは形態学的に評価ができる。

角膜実質をバイオポリマー等で作成している医療用具の場合には、実質

のコラーゲンのターンオーバーが起こりうるかが恒久的な生着と透明性の維持には重要である。現在、研究されているバイオポリマーの場合には、ホスト側の角膜実質細胞が移植後に侵入してくることを前提に設計されているものもあり、その場合には進入してくる実質細胞の密度とコラーゲン産生能を動物実験において検証しておく必要があり、その際に産生されたコラーゲンが生態同様の構造、もしくは透明性を維持できるかにより、医療器具の有効性が測定される。逆にプラスチック等を使用する場合には、前述の蛋白の沈着や生体適合性（生着性）の検証が重要である。

細胞シートを利用する場合には、角膜上皮を移植する際に、原疾患の特定が重要である。角膜上皮幹細胞疲弊症では、上皮のみの移植では長期の予後は望めないため、輪部機能の正常な症例で、且つ上皮化が何らかの理由で遅延している場合にのみ有効となる。その場合にも、シートとして移植される上皮細胞が分化過程のどのレベルにあるかにより、生存時間が限定されるため細胞シートを輪部機能不全モデルの動物実験を行い、バリアー機能の維持が可能な期間を特定することが重要である。また、内皮細胞シートの場合には、内皮細胞のポンプ機能が維持されていることが、目的とする水疱性角膜症の治療には不可欠であるため、細胞自体の water transportation

の機能測定、もしくは機能発現の実証が必要である。In vitro で行う場合には、角膜片を使用して内皮細胞移植を行い、air lift した状態で内皮細胞側を培養液中に浸すタイプのチャンバーを利用して、角膜に発生する浮腫により有効性は評価できる。また、water channel (Apol 等) の発現によってもその機能は同様に評価でき、その際には細胞自体の viability が保たれている事が前提条件となる。

5. 臨床応用後の評価方法・評価期間

角膜上皮、角膜上皮+基底膜、あるいは角膜上皮+基底膜+実質の医療用具の場合、臨床応用後の評価は、通常の角膜移植の場合と同様、角膜の上皮化が蛍光染色により細隙灯により紫外線の励起により測定される。特に分化した上皮を利用している医療用具においては、前項でも述べたように生存期間に限定があるため、その有効期間内に評価されなければならない。ホストの輪部からの上皮供給を狙った使用をする場合では、その供給までの維持が可能、もしくは複数回の移植により機能回復がなされることを、同様に蛍光色素を用いて測定しなければならない。

角膜の医療用具において最大の目的である、透明性の維持は光学的に測定可能である。混濁の原因となる上皮細胞の不整、細菌感染、実質内のコラーゲンの不整、内皮細胞のポンプ機

能低下による水疱性角膜症、さらに角膜上への結膜や皮膚上皮の侵入などが上げられるが、視力障害と直結しているため、視力検査、並びに細隙灯による検査で検出可能である。

観察期間は角膜上皮シート等の場合では、術後2週間はほぼ毎日実施し、バリアー機能が良好であると判断されれば、その後、週一回程度を3ヶ月ほど実施すべきであり、初期の急激な変化を読み取ることが必要である。輪部機能が良好な場合では、その後の危険性は非常に低いと予想されるが、安定していれば月一回の観察を術後6ヶ月程延長すべきと考える。逆に輪部機能や涙液機能、或いは瞼板機能の不全な症例で上皮のバリアー機能の失われている症例で実施する場合には、上皮の破綻の可能性を予測して使用するいわゆるテンポラリーな使用となり、全層角膜移植術や表層角膜移植術、或いは角膜輪部移植術などが実施されるまでほぼ毎日の観察が必要と考える。これらは基底膜、あるいは角膜実質を含む角膜表層移植用の医療材料についても同様のことが言える。また、羊膜製品で翼状片など角膜実質のある程度保たれている症例への使用の際には、術後数日間の感染防止や剥離の有無を確認する観察期間以降は、再発の可能性を観察する目的で術後6ヶ月間位は月一回程度、その後は年2、3回程度の観察が望まれる。

一方、内皮細胞シートに関しては、

その機能評価は明快で、機能不全に陥れば水疱性角膜症となり角膜が混濁する。通常の角膜移植の際にも、内皮細胞機能が破綻している場合には、移植直後から角膜に浮腫が起り、術後1ヶ月まで浮腫が消失しない場合には、Graft failure となる。内皮細胞シートでも同様のことが予測されるため、術後、2週間程度の入院観察、透明性が維持されている場合にはその後、約1ヶ月間の週1回程度の観察、その後、月1回程度の観察を約6ヶ月は継続すべきと考える。

角膜実質の含まれる医療用具で、通常の表層角膜移植術、もしくは深層表層移植術として用いられる場合では、その材質により大きく異なる。生体材料では前述のコラゲナーゼ活性の上昇などにより移植された材料が生体の角膜同様、不安定になる可能性もあり、特に移植後の炎症の激しい期間（症例によって異なるが、通常1～2週間）は、入院による経過観察が必要であり、上皮化正常に進行した場合にのみ退院となるべきである。その後も、週1回の外来診察は少なくとも6ヶ月は行う事が望ましいと考える。その後も月に1回の診察を約1年間を行い経過観察を実施する必要があるだろう。

6. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

移植後の問題点で最大のものは、眼

球としての形態維持に破綻がくる場合があげられる。特に危険性の高いのは感染症による眼内炎である。通常の角膜移植術でも、角膜を穿孔した場合や、穿孔して縫合する場合には必ず、その危険性があるので、術後管理としては角膜移植と同様の加療、観察が必要である。全層の医療用具を移植する場合には、生着性が悪い場合に、ホストの萎縮により graft との間隙が生じる可能性があり、その際にも眼内炎の危険性は高くなると同時に、角膜穿孔の症例同様に、前房水の漏出による虹彩癒着等の更なる重篤な合併症への移行も考えられる。また、Allo の上皮細胞、及び内皮細胞を用いる医療材料の場合はクラスIIの発現があるため、拒絶反応の発生の危険性があり、角膜移植の統計からも術後6ヶ月後をピークとして発症しており、最大で術後10年以上を経て拒絶反応を引き起こした例もある。従って、これらの細胞由来医療用具の使用に関しては、角膜移植と同様の拒絶反応に対する警戒を要することとなる。一方、羊膜は抗原提示も弱く、一般的に拒絶反応を惹起しないため、Auto細胞を利用した羊膜由来の医療用具ではその危険性はほぼ無いものと思われる。

また、通常の角膜移植の場合でも術後に眼圧が上昇して緑内障に発展する場合も少なからず報告されており、これら医療用具の使用時にも、特に隅角付近の施術が行われる場合では、十

分な配慮が必要である。緑内障に関しては、閉塞隅角の場合と、前房における細胞などの浮遊物による前房水の排出不全の場合も考えられるため、術後に起り得る炎症や細胞の浮遊などにも通常の前眼部手術同様の合併症への注意は励起しておくべきと考える。

参考文献

1. Kenyon KR, Tseng SC: Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989 96: 709-22
2. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. : Stem cell transplantation of corneal epithelium for the treatment of severe ocular surface disorders. *New Eng J Med* 1999 340: 1697-1703
3. Kim JC, Tseng SCG: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 14: 472-484
4. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-13.
5. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19 (1) :65-71.
6. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119 (2) :298-300.
7. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343 (2) :86-93.
8. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999;286 (5447) :2169-72.
9. Sun L, Sun TT, Lavker RM: CLED: a calcium-linked protein associated with early epithelial differentiation. *Exp Cell Res* 2000 259: 96-106.
10. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. : p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 98: 3156-61.

調査報告（7）

膀胱・尿管

（担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 白柳 慶之）

1. 細胞・組織を用いた膀胱・尿管再生の必要性

膀胱の機能は、低圧で多量の尿を貯留し、必要に応じてこれを排出し膀胱を空にすることである。しかし、膀胱壁の繊維化、膀胱の異常収縮、膀胱を支配する神経の機能不全は低コンプライアンス、高圧の膀胱の原因となる。膀胱機能異常を来す疾患としては、先天性疾患（後部尿道弁、膀胱外反症、尿道上裂）、外傷（損傷、頻回の膀胱内操作）、炎症（慢性膀胱炎、間質性膀胱炎、膀胱結核）、放射線障害、機能的拘縮（神経因性膀胱、特発性不安定膀胱）などがある。そしてこれらの疾患を原因として尿路感染症、尿失禁、腎障害、腎不全等を引き起こすため、膀胱拡大術等の外科的処置が必要となる。また、膀胱の悪性腫瘍等に対する膀胱摘出手術後はQOLが著しく低下するため、最近では代用膀胱の再建が行われるようになって来ている。

現在のところ、膀胱の再建には自己の腸管を使う方法が一般的である。しかし、感染症、結石の形成、代謝異常、

癌の発生など未解決の問題を多く抱えている。これらの合併症の多くは消化管粘膜に起因すると考えられている。これまでに、腸管以外の自己組織（皮膚、腹膜、筋膜、脳硬膜、大網）や合成ポリマー（シリコン、ポリビニル、テフロン）など多くの材料が膀胱再建に用いられてきた¹⁾。しかし、これらの試みは機械的、構造的、あるいは生物学的適合性の問題により失敗に終わっている。したがって、細胞や組織を用いた膀胱の再生は、新たな膀胱再建の方法として近年急速に研究が進んでいる分野の一つである。

1. 2. 細胞、組織ソース

自己の臓器や人工物を用いた膀胱再建の基礎的な研究は1970年代をピークに下火になっていた。1993年、R. Langer と J.P. Vacanti が Tissue Engineering の概念を提唱し²⁾ 再び研究が盛んになった。現在、細胞・組織を用いた膀胱再建の主な方法を以下に示す。1) 小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa; SIS) を用い

る方法³⁾、2) 無細胞性膀胱マトリックス (bladder acellular matrix allograft; BAMA) を用いる方法⁴⁾、3) 生体内で吸収されるポリマーの足場 (scaffold) に細胞を撒く方法⁵⁾、4) 自己の腸管粘膜を体外で培養増殖した膀胱上皮シートで置き換える方法⁶⁾ などがある。SIS はブタの小腸内腔から粘膜を、外壁から漿膜と筋層を取り除いて作製されており、無細胞でコラーゲンに富んでいる。ヒトに移植をするときは Xenograft となる。BAMA は機械的あるいは化学的に膀胱組織から細胞成分を取り除くことにより作製される。ヒトに移植するときはヒトの膀胱から BAMA を作製し、

Allograft となる。細胞を撒いた足場によって膀胱を再生する場合は、自己の膀胱から上皮細胞と平滑筋細胞を単離し、*in vitro* で培養し増殖させ、これを膀胱の形をした足場に撒くといった方法をとる。培養膀胱上皮シートを用いた膀胱再建法も同様に自己の尿路上皮細胞を用いる。*in vitro* で上皮細胞を培養、増殖させたのち細胞シートとして回収し、従来の消化管を用いた膀胱再建の方法に準じ、その粘膜だけを膀胱上皮細胞シートで置換して利用する⁶⁾。以下、表 1 にまとめる。

表 1

再建方法・材料	ソース	移植種類
SIS: small intestinal submucosa	ブタの小腸	異種移植
BAMA: Bladder acellular matrix graft	同種の膀胱	同種移植
Biodegradable scaffold + cells	生体吸収性のポリマー + 自己の尿路から採取した細胞	自家移植
Cell sheet engineering	自己の消化管 + 自己の尿路から採取した細胞	自家移植

1. 3. 培養・移植法

SISはブタの小腸組織から回収される。小腸組織から粘膜層、漿膜層、平滑筋層を機械的に除去する。その結果、コラーゲン成分に富んだ粘膜下層が約0.1mmの厚さで回収できる。すでにSISはCook Biotechnology社よりSurgisis™として市販されており、膀胱再建以外に大動脈、大静脈、心臓、靭帯、皮膚などの再生に利用されている⁷⁾。BAMAは膀胱組織から機械的あるいは化学的に細胞成分を取り除くことによって作製される。すでにラット、イヌ、ブタなどの動物実験モデルにて、30-75%の膀胱部分切除を行い、これをSISやBAMAで置き換えると粘膜、漿膜、平滑筋層の3層すべてが再生した^{3), 4), 8), 9)}。

生体吸収性の足場に自己の膀胱細胞を播種して膀胱を再生する方法では、やく1cm²の膀胱生検検体から分離した膀胱の上皮細胞と平滑筋細胞を*in vitro*で培養し増殖させる。次にこれらの細胞を膀胱の形をしたポリマー(polyglycolic acid; PGA)上に播種した後、宿主ですでに膀胱三角部以外を切除したイヌに再度移植する。移植後11ヶ月までに、移植された新膀胱は尿を貯留するための正常の容量とコンプライアンス、宿主由来の神経組織の増生、そして正常な組織学的構造を有していた⁹⁾。

細胞シート工学的手法を用いた方法では、まず自己の尿路より少量の膀胱上皮細胞を採取し、培養増殖する。

次に細胞をシート状に回収し粘膜を除去した消化管上に移植する。シート状の細胞の作成には温度応答性高分子であるイソプロピルアクリルアミドを表面にグラフトした培養器材が用いられ、低温処理のみで細胞および細胞外マトリックスからなる細胞シートの回収を可能にしている⁶⁾。

2. 臨床応用実現までの期間

上記方法のいずれもすでに大動物実験のレベルで有効性が確認されているので、慎重に対象症例を選択すれば臨床応用することは可能と考えられている。しかしながら、いずれの実験データも短、中期の結果であり、長期の成績に関してはよくわかっていない。また、ほとんどのデータは疾患モデルではなく正常の動物モデルを用いていることから、病的な膀胱に対して使用した場合、新膀胱として正常に作用するかどうか、さらに検討する必要がある。従って、臨床への応用には今しばらく時間がかかるものと思われるし、臨床応用後も限られた症例の中で問題点を改善しながら、本格的な臨床応用へのデータを蓄積していく必要がある。

3. 安全性の確認

SISは上述のようにすでに市販され、手術時の補強材料として米国を始めいくつかの国で使われている。よって医療材料としての安全性に関しては

現在の時点で問題ないと考えられている。しかしながら、現在わかっていない病原性タンパク等に関しては評価されていないことはもちろん、長期わたる SIS の影響については慎重に検討する必要がある。BAMA は他の臓器移植と同様に提供されたヒトの膀胱をソースとして加工される。加工の過程において細胞成分をすべて除去するため拒絶反応を起こす可能性は低く、また病原体の持ち込みも他の臓器移植より比較的少ないと思われる。しかし、臨床応用されても他臓器と同様にドナー不足となる可能性がある。

細胞を用いた方法の場合、拒絶反応の問題から自己の細胞を用いることが基本となる。細胞を自己の組織、臓器から単離し、何らかの方法で増殖、加工した後に治療に用いるが、この過程で使用される血清等に関しては十分に注意が必要である。また、効率的に加工するために遺伝子等を導入することも考えられるが、膀胱に関してまだあまり行われていないのが現状である。膀胱に限らず、細胞や組織を用いた再生治療の場合、再生臓器における悪性腫瘍発生の問題があげられる。しかし、悪性腫瘍の発生には種々の因子が関係し、発生までに時間を要することから、その因果関係を明らかにするのは非常に難しいと思われる。

4. 臨床応用後の評価方法、評価期間

膀胱尿管の再生治療における最終目標は QOL の改善にある。従って、臨

床応用後の評価の方法、評価期間、問題点の抽出もそれに準じて行われるべきである。すなわち、再生された膀胱や尿管の組織状態や生理的機能を評価するだけではなく、その結果 QOL がどの程度良くなったか、悪くなったかを的確に評価していかなければいけない。膀胱の再生治療は、長期にわたって QOL を維持することが現行の治療法では困難な小児泌尿器科領域での臨床応用が最も重要と考えられている。小児期に行われた再生治療が有効かどうかを判断するには成人するまでの期間、少なくとも十年から二十年間は評価期間が必要であろう。成長という要素が加わる分、成人を対象とした治療よりも評価期間が長く必要である反面、細胞、組織を用いた治療法への期待も大きいと言える。

5. 参考文献

1. Kim BS, Mooney DJ, Atala A: Genitourinary system. in: Lanza RP, Langer R, Vacanti JP, editor. Principles of tissue engineering second edition. San Diego: Academic Press: 655-667, 2000
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* ; 260:920-926, 1993.
3. Kropp BP, Rippy MK, BadyrakSF, et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long term canine bladder augmentation. *J Urol* ;155:2098-2104, 1996.
4. Piechota HJ, Dahms SE, Probst M, Gleason CA, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. *Br J Urol* ;81: 548-559, 1998.
5. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. *De novo* reconstruction of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* ;17:149-155, 1999.
6. Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al. Multilayered urothelium regeneration by grafting cultured urothelial cell sheets on to a demucosalized gastric flap. *Tissue Eng* ;8 (6) : 1126, 2002
7. Park KD, Kwon IK, Kim YH. Tissue engineering of urinary organs. *Yonsei Med J* ;41 (6) :780-788, 2000
8. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *Br J Urol* ; 85: 362-371, 2000
9. Reddy RP, Barrieras DJ, Wilson G, Bagli DJ, et al. Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allograft in a porcine model. *J Urol* ; 164: 936-941, 2000

膵臓

（担当：東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター外科 寺岡 慧）

はじめに

糖尿病治療の主流はインスリン治療であり、種々の投与方法、超速効性インスリンの開発により、インスリン治療法は進歩したが、リアルタイムの血糖調節は困難であり、長期的には網膜症、神経障害、腎症、血管病変などが進行することは避けられない。欧米ではこれを克服する治療法として膵臓移植が普及しつつあり、わが国においても、1997年「臓器の移植に関する法律（臓器移植法）」の施行により、脳死下での臓器提供が可能となり、膵臓移植/膵腎複合移植がスタートした。現在までに9例の膵腎同時移植および1例の腎移植後膵移植が実施され、1例において血栓形成のため移植膵が摘出されたが、他の9例においては良好な移植膵機能が得られ、インスリン離脱に至っている。

膵臓移植は、内分泌細胞のみの移植であり、血管吻合等の手術を必要とせず、侵襲もより少なく、より生理的かつ合理的な治療法と考えられたが、その成績についてはインスリン離脱が8%前後と不良であり、実験的検討の域を出ないというのが実状であった。しかし最近になって、カナダのエドモントン・グループは脳死下で提供された新鮮膵臓を門脈内に移植し、抗IL-2単抗体、少量のtacrolimus、sirolimusというsteroid-freeのregimenにより、短期の成績ながら、1年生着率85%という優れた成績を報告した。

これを契機として、わが国でも膵臓移植の機運が高まり、膵・膵臓移植研究会の中に組織されたワーキング・グループの膵臓移植班により、わが国における膵臓移植の体制づくりのための検討が開始された。

現時点ではドナー適応基準、レシピエント適応基準、レシピエント選択基準、膵臓移植実施施設が決定され、膵臓移植希望者の登録が開始されている。膵臓移植実施施設は、現時点で福島県立医科大学、筑波大学、千葉大学/国立佐倉病院、東京女子医科大学、豊橋市民病院、名古屋第2赤十字病院、京都大学、京都府立医科大学、神戸大学、福岡大学の7施設である。

1. 法的要件

臓器移植法および関連諸規則では、死後における臓器移植のための臓器の摘出には、「脳死判定に従い、死後、移植のために臓器を提供する」旨の、本人の生前の意思の書面による表示が不可欠と規定されている。この場合の臓器とは、心、肺、肝、膵、腎、眼球（角膜移植のための）とされている。心臓が停止した死後の腎および角膜の提供については、当分の間、「角膜及び腎臓の移植に関する法律（角腎法）」が適用され、本人の提供意思の表示は必要なく、家族の書面による承諾が得られれば可能とされている。

上記のように、角膜移植のための眼球の摘出については臓器移植法により規定されているが、それ以外の組織

移植のための死後における臓器あるいは組織の摘出については触れていない。組織移植については、「臓器の移植に関する法律の運用に関する指針（ガイドライン）」の第11の6「組織移植の取り扱い」において、以下のように規定されているのみである。

「法が規定しているのは、臓器の移植等についてであって、皮膚、血管、心臓弁、骨等の組織の移植については対象としておらず、また、これら組織の移植のための特段の法令はないが、通常本人又は遺族の承諾を得た上で医療上の行為として行われ、医療的見地、社会的見地から相当と認められる場合には許容されるものであること。

したがって、組織の摘出に当たっては、組織の摘出に係わる遺族等の承諾を得ることが最低限必要であり、遺族等に対して、摘出する組織の種類やその目的等について十分な説明を行った上で、書面により承諾を得ることが運用上適切であること。」

したがって角膜以外の組織の提供および移植については特段の法律は存在せず、それが治療として、すなわち医療行為として、医療的にも、社会的見地からも適切になされてるかぎり、十分な説明の上で、遺族から書面による承諾を得た場合には、組織の移植のために組織を摘出することは可能とされているのが実状である。

しかし膵島移植においては、膵臓が臓器として摘出された後に、膵島が組織として分離採取され移植されるこ

とから、他の組織の摘出と本質的に異なり、法令の解釈上、臓器移植法に規定されざるをえない側面が存在すると考えられた。また臓器移植法では、死後摘出された臓器を移植に使用しない場合は焼却するよう定めており、組織移植など他の目的に転用することは禁じられている。

厚生労働省保健医療局疾病対策課臓器移植対策室では、膵島移植のために膵臓を摘出することに家族が書面で同意した場合に、心臓が停止した死後に、膵島移植のために膵臓を摘出し、膵島を分離採取し、これを移植に用いることは法律に抵触しない旨の法令解釈を行っている。脳死ドナーにおいても、心、肺、肝などの臓器が摘出された後においてはすでに心臓が停止しており、脳死ドナーからの膵臓の摘出であっても心停止後の摘出と解釈されている。脳死ドナーからの提供の場合、膵臓の摘出は、移植のために臓器が摘出された後に行われることを原則としており、他の臓器が摘出されない場合、膵島移植のための膵臓摘出のみが行われることは現時点では認められていない。また移植目的で摘出した膵臓が、何らかの理由で膵移植に用いることがなくなった場合に、当該膵臓を膵島移植に転用することはできないとしている。

したがって、膵島移植のために、死後、膵臓を摘出することを、家族が書面で同意した場合、膵島移植のために死後、膵臓を摘出して膵島を分離・採取して移植することは現時点では可

能とされている。

2. ドナー適応基準

家族から膵島移植のための膵臓の提供について、書面による承諾が得られた場合に、法的脳死判定により法的に死亡とされた提供者から、他の移植のための臓器が摘出された後、あるいは心臓が停止した死後の提供者から、膵臓の提供を受けることができる。

医学的な基準としては、日本移植学会ワーキンググループ6「組織移植」によって以下のように規定されている（一部修正）。

- 1) 年齢は原則として70歳以下
- 2) 循環停止から膵臓摘出まで6時間以内
- 3) 除外項目

①全身性の活動性感染症の合併、腹腔内臓器の感染症の合併

腹腔内以外の臓器あるいは局所性の感染症の場合は慎重に検討

②HBs 抗原陽性、HCV 抗体陽性、HTLV-1 抗体陽性、HIV 抗体陽性

Creutzfeld-Jakob 病、あるいは Creutzfeld-Jakob 病の疑いがある場合

③悪性腫瘍の合併

原発性脳腫瘍、皮膚基底細胞癌、治療後一定期間の経過観察により完治したと判断される固形癌の場合は可能

④膠原病などの自己免疫疾患

⑤原因不明の死亡

⑥アルコール依存症

⑦急性・慢性膵炎、糖尿病などの膵島移植に適さないと判断される膵疾患

の存在

3. レシピエント適応基準

膵・膵島移植研究会ワーキンググループで作成され、Edmonton protocol を加味して改訂された（一部修正）。

- 1) 内因性インスリン分泌が著しく低下し、インスリン治療を必要とする
- 2) 糖尿病専門医の治療努力によっても、血糖コントロールが困難
- 3) 原則として75歳以下
- 4) 本人・家族の同意が得られている
- 5) 主治医が膵島移植に同意している
- 6) 禁忌

①重症の心疾患、肝疾患（心移植または肝移植と同時に行う場合は考慮する）

②アルコール中毒

③感染症

④悪性腫瘍（治療後一定期間の経過観察により完治したと判断される場合を除く）

⑤重症肥満

⑥未処置の網膜症

⑦その他移植に適さないと判断される場合

膵・膵島移植研究会ワーキンググループ膵島移植班の中に、膵島移植適応検討委員会を設置し、個々の症例の適応について検討の上、決定する。適応検討委員会の構成は以下の通りである。

石田 均 杏林大学第3内科

谷口 洋 神戸大学保健学科

馬場園哲也 東京女子医科大学糖尿病センター

安波洋一 福岡大学第1外科

剣持 敬 国立佐倉病院

4. レシピエント選択基準

膵・膵島移植研究会ワーキンググループの膵島移植適応検討委員会で下記のように決定されている（一部修正）。

レシピエント選択の手順は、膵島移植希望登録者の中から下記の基準の順で選択し、膵・膵島移植研究会内に設置されたレシピエント選択委員会の承諾を得て決定される。

- 1) ABO 血液型適合（一致が優先）
- 2) 既に膵島移植を受け、インスリン離脱が得られていない症例*
- 3) 待機日数の長い順
- 4) 血糖の不安定性

*膵島移植の目的はインスリン離脱であるため、とくに最初の数例は再移植、再々移植を優先する。

5. 膵島移植実施施設基準（一部修正）

- 1) 膵・膵島移植研究会ワーキンググループ膵臓移植班・膵島移植班合同会議のメンバーがいる施設であること
- 2) 当該施設内の倫理委員会の承認を受けていること
- 3) 糖尿病専門医、神経内科医、眼科医等の支援が得られること
- 4) 臓器移植の経験を持つ医師がいること
- 5) 免疫抑制法の経験を持つ医師がいること
- 6) 膵臓移植班・膵島移植班合同会議のマニュアルに沿って膵島移植を実施できること

以上の基準に基づいて、現時点で福島県立医科大学、国立佐倉病院、東京

女子医科大学、の7施設が膵島移植実施施設となっている。

6. 膵島分離凍結施設の条件

- 1) 膵島分離に必要な施設および薬剤が使用可能であること
- 2) 膵島分離・凍結に習熟した医師がいること
- 3) 24時間体制で連絡が可能であること

以上の基準に基づいて、現時点で福島県立医科大学、千葉大学・国立佐倉病院（合同チーム）、東京女子医科大学、神戸大学、福岡大学の5施設が膵島分離凍結施設となっている。

6. 膵島移植の実際の手順

- 1) ドナー発生から承諾手続きまで

①ドナー情報と初期情報への対応

実際にはドナー情報は、ドナー発生施設から日本臓器移植ネットワークを経由して、ドナー候補者発生施設の所在する日本臓器移植ネットワークの支部内に連絡がはいる。脳死下での提供の場合は、臨床的脳死診断により臨床的に脳死の状態であることが確認された後に、日本臓器移植ネットワークに連絡される。

日本臓器移植ネットワークの移植コーディネーターがドナー候補者発生施設に派遣され、膵島提供の可能性、一次評価について検討する。

②一次評価

一次評価については原則として移植コーディネーターが行う。膵島移植ドナー適応基準に基づいて、その適応条件を満たしているか否かについて検討する。

③承諾手続き

臓器提供の承諾手続きの一環として、移植コーディネーターはドナー候補者の家族に対して腓島移植のための臓器提供の意思の有無について確認する。この際、臓器移植のための臓器提供の意思表示がある場合は、これを優先する。臓器移植が医学的理由、あるいはその他の理由で不可能な場合、または臓器移植のための臓器提供の意思がない場合に、腓島移植のための臓器提供の意思の有無についてインフォームド・コンセントを行い、その意思がある場合に、所定の書式の同意書に署名捺印を得る。承諾手続きの過程で、より専門的な説明を家族が希望する場合は、移植コーディネーターがその家族の要望に基づいて腓島移植医に家族への説明を依頼し、その上で腓島移植医が家族に対して説明を行うこともある。

脳死ドナーからの心停止後の提供の場合は、同時に脳死判定に従い、死後、移植のために臓器を提供する意思を書面で表示していることを確認後、脳死判定承諾書および臓器摘出承諾書に署名捺印を得る。

④検査からレシピエント選択まで

承諾が得られた時点でHLA検査、リンパ球交差試験、HBs抗原陽性、HCV抗体陽性、HTLV-1抗体陽性、HIV抗体陽性など感染症関連検査のうち実施されていないもの、その他医学的評価のための諸検査が行われる。これらの検査のうち全てが腓島移植のドナー適応評価に不可欠のものではないが、

同時に提供される可能性のある臓器の評価、あるいはレシピエント選択に必要な検査とともに実施される。

⑤レシピエント選択

すでに述べたレシピエント選択基準により、腓島移植希望登録者の中から腓島移植候補者が選択される。日本臓器移植ネットワークは心、肺、肝、膵、腎の臓器の斡旋のための機関であり、組織移植のための組織の斡旋は行わないことになっているため、腓島移植のレシピエント選択は、膵・膵島移植研究会ワーキンググループ膵島移植班の事務局において行われる。

脳死ドナーからの心停止後の提供の場合は、選択結果はドナー候補者の死亡確認までは、候補者本人にも当該膵島移植施設にも連絡されず、法的に死亡と判定された時点で連絡され、候補者本人の意思確認が行われる。

心臓が停止した死後の提供の場合は、選択結果が候補者本人および当該膵島移植施設にも連絡され、候補者本人の意思確認が行われる。

2) 死亡判定から臓器摘出まで

①脳死ドナーからの提供

(1) 死亡判定

脳死ドナーからの提供の場合は、すでに臨床的に脳死の状態であることが確認され、脳死判定承諾書および臓器摘出承諾書を得た上で、2回にわたる法的脳死判定が実施され、脳死と判定された時点（2回目の法的脳死判定の終了時）で、法的に死亡とされる。

(2) 臓器摘出

脳死下提供の場合は、法的に死亡と

判定された後に摘出チームに連絡され、各臓器の摘出チームがドナー発生施設に来院し揃った時点で摘出手術が開始される。心、肺、肝、腎などの臓器が摘出された後に、膵臓が摘出される。

②心臓が停止した死後の提供

(1) 死亡判定

心拍停止、呼吸停止、瞳孔散大・対光反射消失の三徴候が確認され、担当医が死亡と診断した時点で、死亡とされる。

(2) 膵臓摘出

心臓が停止した死後の提供の場合は、死亡判定前に臓器（腎）摘出チームがドナー発生施設に来院しており、死亡判定直後に臓器（腎）摘出が開始される。その後に膵臓の摘出が行われる。通常の脳死診断あるいは臨床的脳死診断によりドナーが脳死の状態にあることが確認されており、家族および担当医の承諾が得られている場合は、摘出前に死体内灌流および脱血用のカテーテルを大腿動静脈からそれぞれ腹部大動脈、課題静脈内に留置することもある。

3) 膵臓分離・凍結

摘出臓器は University of Wisconsin (UW) 液中に保存、あるいは二層法（神戸大学方式）により保存して搬送し、膵臓を分離する。膵臓分離は原則として、collagenase または liberase による膵消化、COBE2991 などを用いた膵臓純化を基本とする。

分離・純化された膵臓は十分な収量が確保され、医学的に適切と判断され

るレシピエント候補者が存在する場合は直ちに移植されるが、十分な収量が確保されない場合、あるいは適切なレシピエント候補者が存在しない場合は凍結保存される。

4) 膵臓移植

新鮮膵臓あるいは凍結解凍膵臓は最終的にヒトアルブミン添加の生理食塩液に suspend し、門脈内に注入する。門脈注入は、超音波誘導下に経皮的門脈穿刺により、あるいは手術的に門脈内に挿入したカテーテルから行う。

Islet Transplant Registry (Vol. 8, 2001) のデータによれば、冷保存時間が 8 時間以内、移植膵臓数が 6000IEQ/kg 以上などが基準とされている。

また、新鮮膵臓あるいは凍結解凍膵臓を移植に用いる条件としては以下の基準が示されている。

①新鮮膵臓のみの移植

十分な新鮮膵臓数が確保された場合、またはすでに膵臓移植が実施されているがインスリン離脱が得られていないため同一レシピエントに追加の膵臓移植を行う場合。

②新鮮膵臓および凍結解凍膵臓の移植

十分な新鮮膵臓数が不十分な場合、同血液型の凍結保存した膵臓を解凍し、これを新鮮膵臓に加えて移植する。

5) 移植後免疫抑制法

基本的には Edmonton protocol に準ずる。以下にその regimen を示す。

Daclizumab 1mg/kg 移植当日お