

平成 19 年度「角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究」

第 1 回 角膜実質グループミーティング

議事録

出席者：（東北大学）西田幸二

（大阪大学）明石満、松崎典弥、本郷千鶴

日時：平成 19 年 5 月 25 日（金） 11：00～13：30

場所：大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 明石研究室

書記：松崎典弥

[ミーティング内容]

研究進捗状況報告（1 演題）

1. 明石グループ（発表者：本郷千鶴、松崎典弥）

「角膜実質への応用を目的とした高濃度コラーゲンゲルの調整とその物性評価」

- ・ シリンジ法を用いた高濃度コラーゲンゲル（10 wt%）の調整。
- ・ コラーゲン溶液の pH 調整時に添加する NaOH の量と UV 測定によるゲルの透明度の依存性。
 - … UV 測定時のゲル保水量を一定に保つため、水中もしくは蒸発を防ぐために密閉状態での測定が望ましい。コントロールとして用いるウサギ角膜については切り出して直後のものを用いる。
- ・ ゲル化剤（EDC：NHS）の濃度とゲルの強度の依存性。
- ・ X 線回折測定によるコラーゲンゲル中の分子配向について。
- ・ 引っ張り強度試験によるゲル強度と分子配向の関係について。
- ・ 新たなゲル作製法としてコラーゲン分子の配向を制御した「直行シェアゲル化法」に成功（2 層）。
 - … 複数層を直行させながら積層することにより、引っ張り強度の改善を試みる。
- ・ 特許取得に向けて基礎データの収集。

平成 19 年度「角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究」

第 2 回 角膜実質グループミーティング

議事録

出席者： (東北大学) 西田幸二、中澤徹、久保田享、劉孟林、大家義則、田中佑治
(大阪大学) 明石満、松崎典弥、本郷千鶴、赤木隆美

日時：平成 19 年 9 月 4 日 (月) 17:00-20:00

場所：東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

書記：田中佑治

[ミーティング内容]

研究進捗状況報告 (2 演題)

1. 明石グループ (発表者：本郷千鶴、松崎典弥)

「角膜実質再生を目的とした配向性コラーゲンの創製」

報告内容

- ・ 積層化ゲルの作製法の検討と再現性
- ・ SEM によるコラーゲンの観察
- ・ 蛍光顕微鏡観察による積層化ゲルの観察
- ・ 配向、無配向コラーゲンの引張試験

ディスカッション

- ・ 積層化時の温度、湿度等の条件の検討が必要
- ・ 積層数の増加
- ・ コラーゲン線維の配向度の定量化が必要
- ・ 引張試験の方法、評価法の検討が必要

ヒトコラーゲンによるゲル作製の検討 (ヒトコラーゲンの入手先)

2. 西田グループ (発表者：田中佑治、久保田享)

「配向性コラーゲンの観察について」

報告内容

- ・ シェアゲルの AFM、SEM 観察

ディスカッション

- ・ 液中 AFM 観察の必要性
- ・ 滅菌方法の検討
- ・ 長期経過観察の必要性

平成 19 年度「角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究」

第 3 回 角膜実質グループミーティング

議事録

出席者： (東北大学) 西田幸二、久保田享、劉孟林、大家義則、田中佑治
(大阪大学) 明石満、松崎典弥、本郷千鶴
(AC バイオ) 石塚保行

日時：平成 19 年 12 月 10 日 (月) 16:00~19:30

場所：大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 明石研究室

書記：大家義則、田中佑治

[ミーティング内容]

研究進捗状況報告 (3 演題)

1. 明石グループ (発表者：本郷千鶴、松崎典弥)

「角膜実質再生を目的とした配向性コラーゲンゲルの創製」

報告内容

- ・ 目的：縫合に耐えうる強度と、透明性を併せ持つゲルを調製
- ・ ゲルの作製条件の最適化
 - バッファーを用いた pH 制御、酢酸バッファーの利用
 - 架橋濃度の効果
 - 架橋剤時間の効果、インキュベーターの利用
- ・ UV による透過率測定、引張り強度測定の確立
 - 透過率 85% 以上、破断強度 1.5MPa 以上の調製条件を決定

ディスカッション

- ・ 分子配向の証明が必要
- ・ コラーゲン繊維構造のイメージングが必要
- ・ ヒト角膜の透過率の測定方法についての検討が必要 (なるべく新鮮な角膜を使用)
- ・ ゲルを通した見え方の評価が必要

2. 西田グループ (発表者：田中佑治)

「生体角膜と配向性ゲルの比較」

報告内容

- ・ 走査型電子顕微鏡観察：家兎角膜上皮、内皮、ブタ角膜実質、配向性ゲル (透明、白濁)
 - 家兎角膜上皮、角膜内皮→電顕手技の確認
 - ブタ角膜→コラーゲン繊維およびコラーゲン細繊維の確認
 - 配向性ゲル→コラーゲンゲルでは細繊維構造は観察できず。
- ・ 白濁したゲルと透明なゲルの比較
 - 光学顕微鏡観察→白濁したゲルに数 10 μm 程度のコラーゲン凝集体

ディスカッション

- ・ TEM 観察が必要
- ・ 磁場を用いた配向

平成 19 年度「角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究」

第 4 回 角膜実質グループミーティング

議事録

出席者： (東北大学) 久保田享、田中佑治
(酪農学園大学) 竹花一成、永易彩

日時：平成 19 年 12 月 14 日 (金) 10:00~17:00

場所：酪農学園大学 獣医解剖学教室

書記：田中佑治

[ミーティング内容]

議事録：研究進捗状況報告 (2 演題)

1. 竹花グループ (発表者：永易彩、竹花一成)

「人工コラーゲンの形態学的観察」

報告内容

- ・ 070731 送付積層型コラーゲンの顕微鏡観察
 - 光顕観察：3%GA/0.1M リン酸バッファー、1%オスミウム、エタノール脱水、QY-1 置換、Quetol 812 包埋、厚切り切片、トルイジン・ブルー染色
 - 透過型電顕：包埋まで同上、超薄切、銅グリットに搭載、0.2%タンニン酸・10%エタノール分媒染色、1%ウラン・2%クエン酸鉛二重染色
 - はっきりとした線維構造は観察できなかった。
- ・ 071210 送付異方性コラーゲン及び等方性コラーゲンの透過型電子顕微鏡観察
 - 観察条件：3%GA/0.1M リン酸バッファー、1%オスミウム、エタノール脱水、QY-1 置換、Quetol 812 包埋、包埋まで同上、超薄切、銅グリットに搭載、0.2%タンニン酸・10%エタノール分媒染色、1%ウラン・2%クエン酸鉛二重染色、透過型電子顕微鏡 (JEM-1220, 80kV)
 - 線維構造らしき像が観察できている。
 - 等方性、異方性の差は明瞭ではない。
- ・ 正常な犬角膜像
 - 酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色→コラーゲンが白く、周辺が黒くなる。
 - タンニン酸・酢酸ウラン・クエン酸鉛三重染色→コラーゲンが黒く、周辺が白くなる
 - 三重染色の方が二重染色よりもコントラストが高い。
- ・ 熱変性コラーゲンとの比較
 - 熱変性コラーゲンは D バンドが観察できるがコラーゲンの線維にはない

ディスカッション

- ・ ゲル作製条件に関する確認
- ・ 電子顕微鏡観察前処理の確認
- ・ 犬角膜とゲルとの比較：ゲルのコラーゲン繊維はコントラストが低い
- ・ コラーゲン細線維構造の確認

2. 西田グループ（発表者：田中佑治、久保田享）

「角膜実質再生グループの研究経過」

報告内容

- ・ 臨床応用が行われている人工角膜について
- ・ May Griffith らのクロスリンクコラーゲン人工角膜開発について
- ・ 角膜実質グループが目指す人工角膜について
- ・ シリンジを用いたコラーゲンゲルの作製法について
- ・ コラーゲンゲルの光学特性と強度について
- ・ 異方性ゲルの作製について
- ・ 異方性ゲルの解析に関する現状について
- ・ 異方性ゲルの力学特性について
- ・ 積層ゲルの力学特性について
- ・ ブタ角膜実質の吸水性について

ディスカッション

- ・ コラーゲンの原料について
- ・ 臨床応用に向けた課題：強度、保湿性、形状、
- ・ 必要とされる積層数について：生体角膜では 200～400 層だが、十分な力学強度が得られれば数が足りなくても OK。
- ・ 内皮ポンプ機能と角膜実質吸水性のバランス：吸水性のないクロスリンクコラーゲンゲルは移植後に収縮している可能性がある。
- ・ 熱架橋コラーゲンの利用に関する可能性：部分的なゼラチン化によるゼラチナーゼ耐性の低下が懸案事項

平成 19 年度「角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究」

第 5 回 角膜実質グループミーティング

議事録

出席者： (東北大学) 西田幸二、久保田享、大家義則、田中佑治
(大阪大学) 明石満、松崎典弥、本郷千鶴
(酪農学園大学) 竹花一成

日時：平成 20 年 2 月 15 日 (金) 17:00~20:00

場所：東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

書記：田中佑治

[ミーティング内容]

議事録：主に引っ張り強度定量試験、動物実験の結果、および前日までに行った電子顕微鏡観察結果を踏まえてプロジェクトの方向性とクロスリンクコラーゲンゲル改善方法について議論を交わし、今後の方針の確認を行った。

1. 西田グループ (発表者：田中佑治、久保田亨)

「角膜実質グループの研究計画と動物実験結果報告」

報告内容

- ・ 厚生労働科研 H20 年度更新について
 - プロジェクト全体の進行状況について
 - 角膜実質再生に関する進行状況と H20 年度の研究計画について

2. 明石グループ (発表者：本郷千鶴、松崎典弥、明石満)

「積層型線維配向コラーゲンゲルの作製と力学特性評価」

報告内容

- ・ コラーゲンゲル作製と力学特性評価の進行状況
 - シリンジ法について
 - 線維配向方法について
 - 作製条件と可視光透過率・力学特性の関係について
 - 家兎角膜との力学特性の比較について

破断時の応力 (引張強度) はゲルの方がやや高い (同等から 5 倍近く高い)。しかしゲルの伸び率 (引張伸度) が非常に低い。

→脆さ (耐縫合性) の改善のため、その要因である可能性が高い伸び率 (引張伸度) と粘弾性の改善に焦点を絞る。

-今後の方針

- コラーゲンゲルおよび生体角膜の残存アミノ基、カルボキシル基の定量による架橋度の定量
- 透明性のさらなる改善 (線維径を細くする (pH 調整、添加剤))
- 引張伸度の改善 (添加剤による粘弾性の改善)
- 層間の接着性の改善 (希薄コラーゲン溶液内での再架橋)
- モールド (型) を用いた湾曲ゲルの作製

3.竹花グループ（発表者：竹花一成）

「電子顕微鏡によるコラーゲンゲルの形態学的解析」

報告内容

- ・ コラーゲンゲルの電子顕微鏡観察

ディスカッション

- ① 透明性、力学特性向上のための添加物の検討
 1. 添加物の候補
 - ・ 生体親和性高分子
 2. 添加物を絞り込む際のファクター
 - ・ 安全性（由来）
 - ・ 価格
 3. 架橋方法の検討
- ② 力学特性向上のための新規作成法の検討
- ③ 新規移植方法の検討
 - ・ ノリがあれば可能だが現状では困難