

図1. HE染色像（下右のみ正常部位）

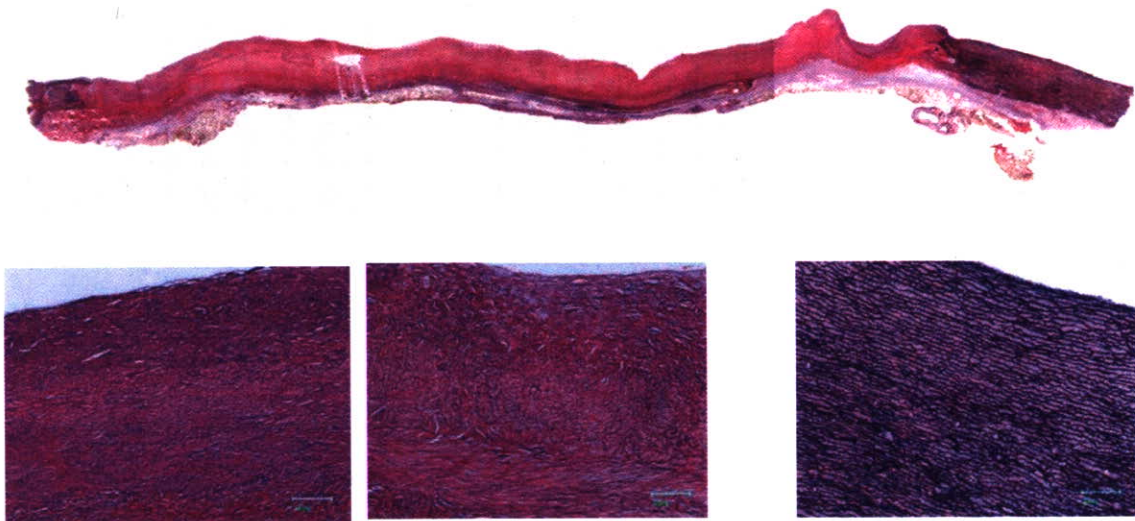


図2. EVG染色像（下右のみ正常部位）

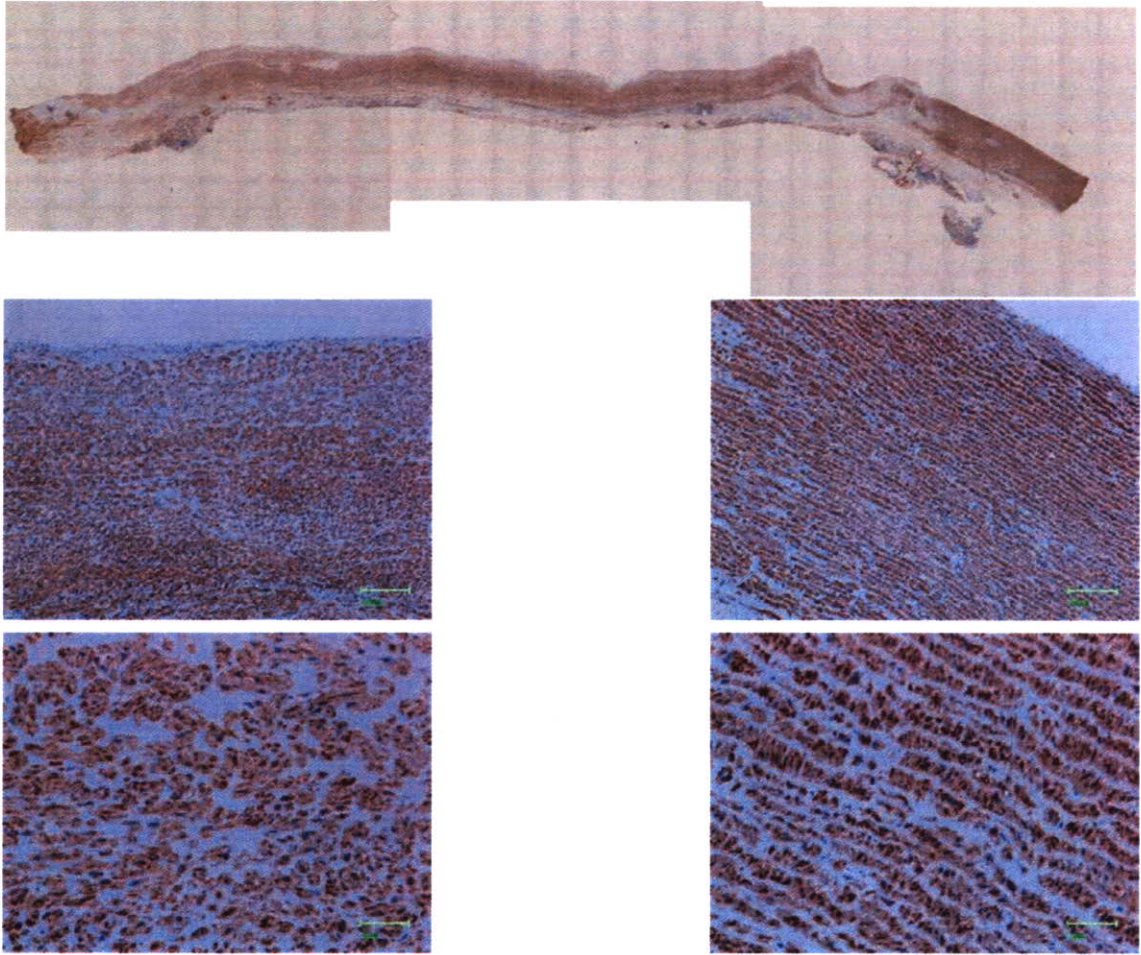


図3. 抗SMA染色像（中右および下右は正常部位）

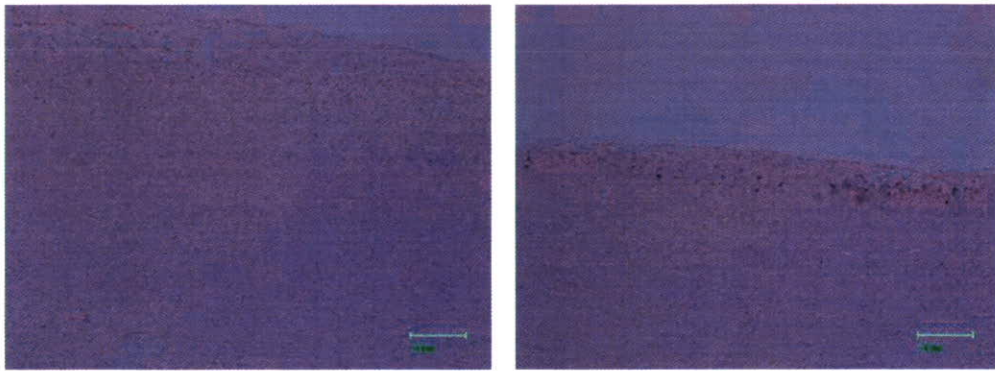
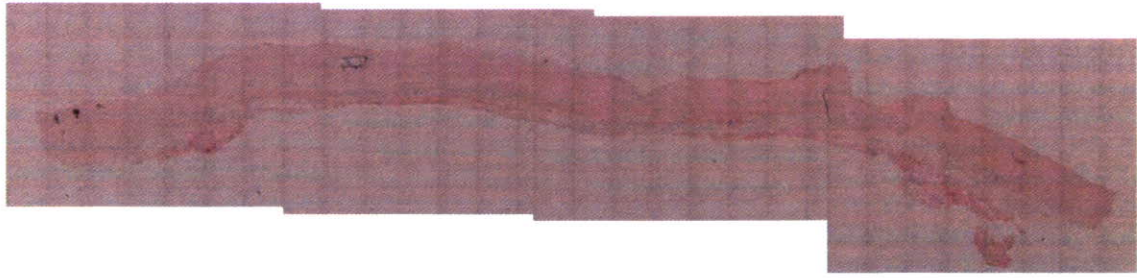


図4. K O S S A染色像

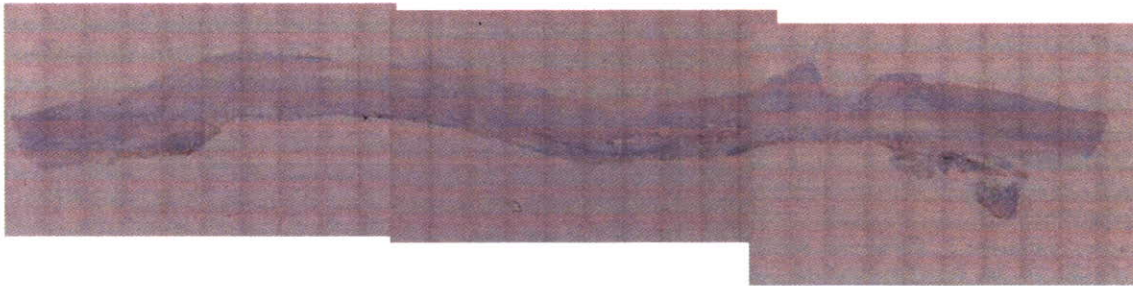


図5. 抗CD3染色像

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

脱細胞化組織の滅菌

分担研究者 白数昭雄 ニプロ株式会社総合研究所部長

研究要旨 本研究事業にて開発する脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の広範な応用のためには、脱細胞化組織の滅菌に関する検討が必要である。本研究課題では、脱細胞化組織の滅菌を一般的な滅菌法である γ 線照射滅菌を用いて、脱細胞化組織の構造及び物性に関する検討を行った。組織学的評価では、 γ 線照射による組織構造の乱れが若干みられたが、力学特性への影響は少なかった。また、凍結乾燥が組織構造・物性に影響することが明らかとなり、凍結乾燥後に γ 線照射した場合において組織構造・力学特性への影響は顕著であった。凍結乾燥法を改良することで生体構造・物性を維持し、 γ 線照射により滅菌できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

循環器系疾患は、先進国における死の最たる原因疾患の1つである。我が国における三大死因である悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の占める割合は、それぞれ31.0%、15.5%、13.3%（平成15年 人口動態統計）、31.1%、15.5%、12.5%（平成16年 人口動態統計）30.1%、16.0%、12.3%（平成17年 人口動態統計）であり、循環器系疾患全体の患者数は悪性新生物の4倍である。今後、生活習慣、高齢化を考慮すると、循環器系疾患の患者数は増加すると考えられる。

循環器系疾患の重篤な場合において、従来の治療法での完治が見込めない疾患に対する治療法の一つとして組織移植による治療が行われている。しかしながら、圧倒的な移植不足により、我が国の移植医療は進んでいない状況にある。この問題に対して、我々は、超高压印加法による脱細胞法を用いた血管・角膜の移植用組織の研究・開発を行っている。脱細胞法による移植用組織の特徴の1つは生体由来の組織構造を維持する点であり、これを広範に利用するためには生体物性（構造）を損なわずに保存し、滅菌する必要がある。本研究では、一般的な滅菌法である γ 線照射における血管の物性変化について検討を行った。

B. 研究方法

生体試料としては、購入した食用ブタの大動脈を用いた。それぞれの組織をトリミングし、ダンベル型の組織片に調製した。本研究では、未処理大動脈および保存を考慮した -80°C にて凍結させた大動脈を凍結乾燥して用いた。その後、25kGyおよび50kGyの γ 線照射を行った。肉眼にて亀裂などの損傷の有無と変形の程度を観察した。同時に色調の変化も観察した。また、PBSに浸漬し復元後に元の状態に戻るかどうか検討した。組織学的評価として、処理後の血管を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィンにて包含し、ヘマトキシリン-ヘオジン染色にて染色を行った。コラーゲン線維の走向や空隙の有無などを観察した。

力学的評価は以下の方法にて行った。新鮮な血管と乾燥後復元させた血管をダンベル状試験片7号（高分子計器株式会社）にて、血管を成形後、負荷をかけて破断させた。本研究では、円周方向のみの力学試験を行った。把持する部位の縦の長さは7mm、把持する部位の横の長さは、6 mm、厚みはノギスにて測定した。また、破断される部位の横の長さは、2mmである。試料をホルダーで固定した後、力学試験機に固定した。力学試験機は、山電のクリープメータを使用した。固定後、前負

荷として0.003N負荷後、毎秒1mmの速さで引張り、破断させた。破断部位は、試料の中心部で破断されることを確認した。

記録されたデータから応力を計算した。応力(σ)は、 $\sigma = F/A$ で表され、単位はMPaである。F(N)は、破断させるのに必要だった力で、A(mm²)は試料の接触面積で、厚み×横である。さらに、応力も計算した。応力(ϵ)は、 $\epsilon = \Delta l/l_0 \times 100$ で表され、単位は%である。 Δl (mm)は、初期長から伸びた長さであり、 l_0 (mm)は、初期長の長さである。個々のStrain-Stressカーブについて、4つのパラメータにて分析を行った。それは、初期弾性率(Modulus of elasticity of the early phase)、後期弾性率(Modulus of elasticity of the late phase)、破断応力(UTS : Ultimate tensile strength)、破断歪率(Failure strain)である。

C. 研究結果

組織学的評価について、凍結乾燥処理を施さない大動脈への γ 線照射群においては、照射による組織間隙の若干の拡大が示された。組織間隙は、25kGy照射大動脈に比べ50kGy照射大動脈にて拡大傾向にあった。凍結乾燥の組織構造への影響については、凍結乾燥による若干の組織間隙拡大が示された。凍結乾燥した大動脈への γ 線照射群においては組織間隙の拡大は顕著であり、25kGy照射においても組織損傷が強く示された。

力学強度評価について、未処理群では γ 線照射群において、生体組織特有のJカーブを示した。25kGyに比べ50kGyの照射により若干のカーブ特性の変化が示された。初期弾性率、後期弾性率、破断応力、破断歪率のいずれのパラメータにおいても γ 線照射による変化は認められなかった。 -80°C の凍結の力学強度への影響については、 γ 線未照射血管は、未処理血管と同様に生体組織特有のJカーブを示した。しかし、 γ 線照射群においては、生体組織特有のJカーブは示されなかった。初期弾性率および破断歪率への変化は示されなかったものの、後期弾性率および破断応力の著しい低下が示された。

D. 考察

湿潤状態では、 γ 線照射の生体組織の構造・物性への影響は比較的低いものであったが、凍結乾燥した大動脈への γ 線照射は、生体組織の構造・

物性に強く影響を与えるものであった。凍結乾燥においては、力学的物性に大きな影響はないものの、組織学的評価にて未処理の生体組織と若干の差異があった。このことから、凍結乾燥法についての更なる検討が必要であり、その後の γ 線照射による滅菌においても、十分な検討が必要と考えられる。

E. 結論

γ 線照射による生体組織構造・物性への影響について、ブタ大動脈を用いて組織学的評価、力学試験により検討した。組織学的評価では、 γ 線照射による組織構造の乱れが若干みられたが、力学特性への影響は少なかった。また、凍結乾燥が組織構造・物性に影響することが明らかとなり、凍結乾燥後に γ 線照射した場合において組織構造・力学特性への影響は顕著であった。凍結乾燥法を改良することで生体構造・物性を維持し、 γ 線照射により滅菌できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

なし

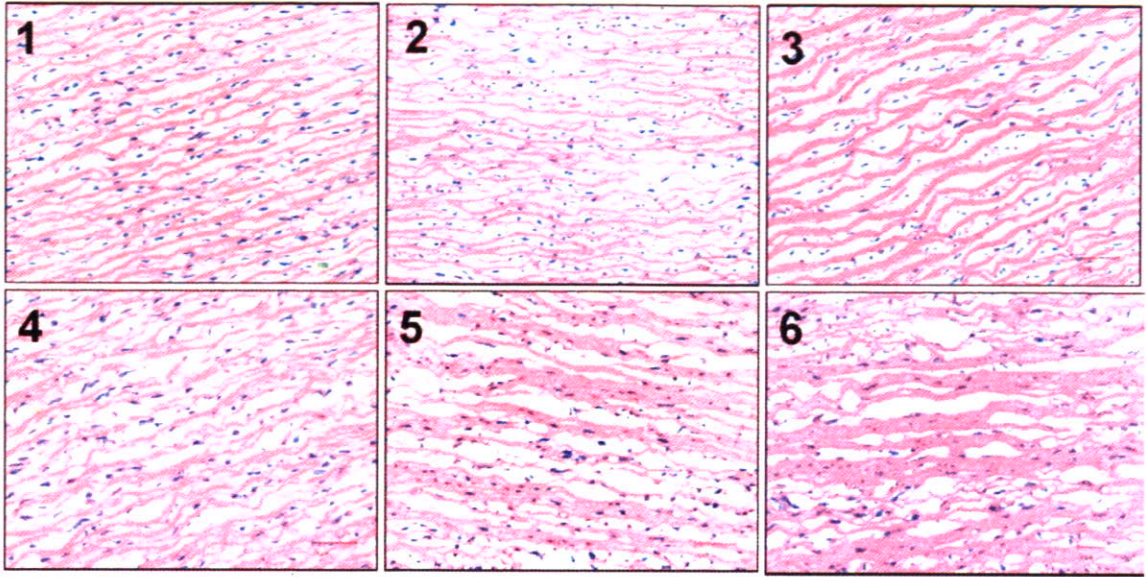


図1. γ 線照射後のブタ大動脈のHE染色

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

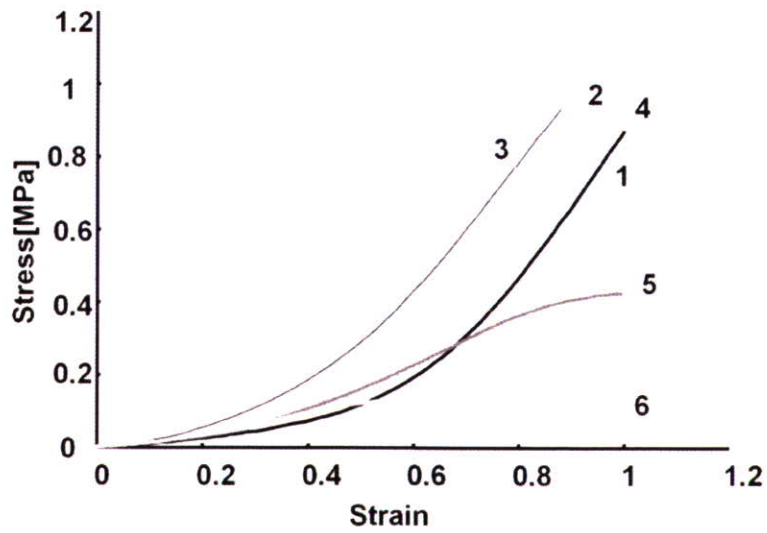


図2. γ 線照射後のブタ大動脈のS-Sカーブ

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

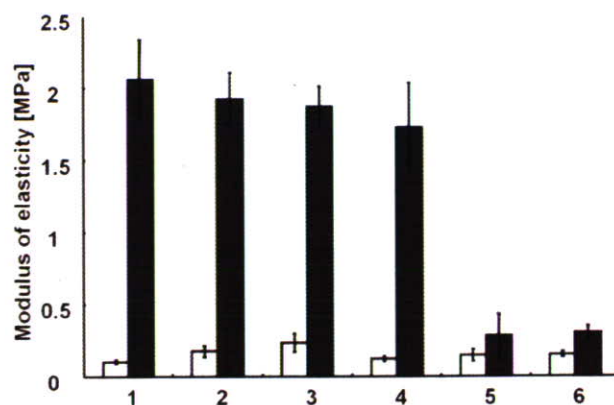


図3. γ 線照射後のブタ大動脈の弾性率

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

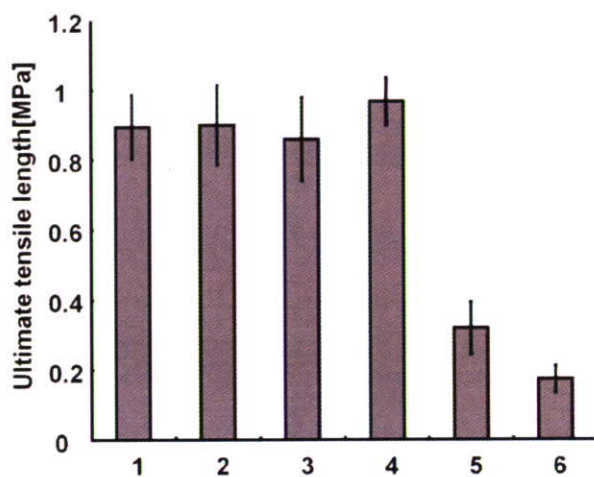


図4. γ 線照射後のブタ大動脈の破断応力

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

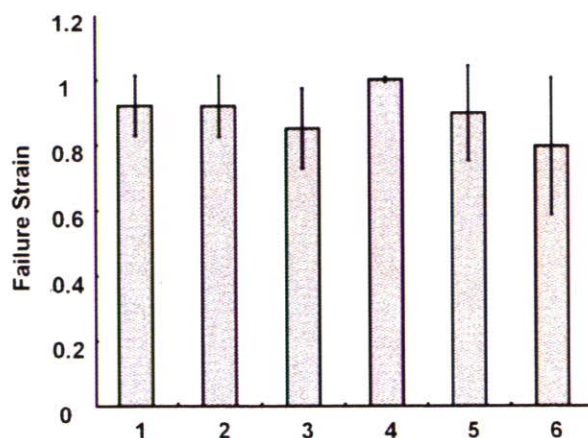


図5. γ 線照射後のブタ大動脈の破断歪率

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

再生型角膜の物性・in vitro評価

分担研究者 小林尚俊 物質材料研究機構生体材料センター グループリーダー

研究要旨 現在の人工角膜は、生体角膜との接合部での融解に伴う脱落や感染症などが重要課題となっている。この要因の一つとして、生体角膜と人工角膜との物性の相違が挙げられる。そこで我々は、より生体組織の物性に類似する脱細胞化角膜の調製について検討した。界面活性剤法、超高压処理法により脱細胞化を行った結果、界面活性剤では角膜の融解や高度の膨張が認められ、脱細胞化も不十分であったが、超高压処理法では十分な脱細胞化とある程度の構造の維持が示された。以上の結果により、超高压脱細胞化角膜の人工角膜実質部としての応用可能性が示された。

A. 研究目的

現在、角膜移植術を要する患者は、全世界で100万人以上と見積もられている。しかしながら、角膜移植を受けている患者数は年間約6万人に不足しており、多くの国で提供眼不足が大きな問題となっている。我が国においては、日本アイバンク協会に登録されている待機患者数が約5000人であるに対し、献眼者数が約1000人、利用眼は約1500個に留まっている。また、現在の角膜移植医療では、他人の角膜を移植する同種移植であるため、原疾患による拒絶反応が課題となる。このような問題の抜本的な解決として、人工角膜の開発が待望されている。人工角膜としては、合成高分子であるポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) やポリビニルアルコール (PVA) などが試みられている。最近では、AlphaCore (PMMA製) が米国FDAにて承認され、臨床知験の集積段階にあるものもある。しかしながら、これらの材料と角膜組織との適合性は十分とは言えず、その結果、レシピエント細胞の基材上へのマイグレーションが十分になされず、人工角膜接合部での融解に伴う脱落や感染症などが重要課題となっている。この要因の一つとして、生体角膜と人工角膜との物性の相違が挙げられる。角膜は、コラーゲン線維が格子状に高次に配列することにより透明性を維持している組織で

あり、角膜実質部としては高次の組織構造が要求される。そこで我々は、より生体組織の物性に類似する脱細胞化角膜の調製について検討した。脱細胞化組織とは、異種組織から細胞を除去し、残存する生体支持組織を指す。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素などの薬液による化学的手法と、最近我々が開発した物理的手法である超高压処理法がある。後者は、超高压印加により細胞を破壊し、細胞残渣を洗浄により除去する手法である。これまで、血管、心臓弁、靭帯、骨などの種々の組織における脱細胞化に成功している。本研究では、界面活性剤法および超高压処理法による脱細胞化について検討し、得られた脱細胞化角膜の力学特性について検討した。

B. 研究方法

成体ブタ眼球は東京芝浦臓器株式会社より入手した。眼球の角膜輪部に沿ってサージカルナイフで切開し、角膜を採取した。その後3.5 % w/v Dextran、100 units/ml Penicillinおよび0.1 mg/ml Streptomycinを含むPBS (DEX/PBS) で洗浄した。

界面活性剤による角膜の脱細胞化は以下の手順で行った。1 % w/v TritonX-100およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を調製した。角膜を

浸漬し、37℃にて24時間の振盪処理を行った。続いて、DEX/PBSによる振盪洗浄を48時間行った。超高压処理による角膜の脱細胞化は以下の手順で行った。冷間等方加圧装置、Dr. CHEF ((株) 神戸製鋼所)を用い、10℃または30℃にて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行った後、直ちに3.5 % w/v Dextran、0.2 mg/ml DNase I、100 units/ml Penicillin および 0.1 mg/ml Streptomycinを含むEGM-2培地 (DEX/EBM)による振盪洗浄を37℃、5 % CO₂下にて72時間行い、細胞残渣を除去した。

組織学的評価は以下の手順で行った。未処理および脱細胞化角膜を10 %中性緩衝ホルマリン液で常温にて24時間固定した後、PBS(-)で数回洗浄した。続いて、上昇アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、マイクロトームを用いて厚さ4μmの薄切片を作製した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色し、光学顕微鏡による観察を行った。

残存DNA定量は、凍結乾燥した脱細胞化角膜20mgに組織溶解液 (50 mM Tris-HCl, 50 μg/ml Proteinase K, 1 % w/v SDS, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA-2Na)を加え、55℃にて12時間消化した。フェノール/クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出を行い、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて260 nmの吸光度を測定し、残存DNA量を算出した。

残存GAG定量は以下の手順で行った。組織中に残存するGAGを定量するために、アルシアンブルー結合アッセイを行った。凍結乾燥した脱細胞化角膜20mgにパパイン溶液(100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, 0.5 mg/ml Papain, 0.5 mM EDTA-2Na)を加え、65℃にて24時間消化した。アルシアンブルーを添加し、グリコサミノグリカン-アルシアンブルー複合体を形成させ、マイクロプレートリーダーを用いて600 nmの吸光度を測定した。コンドロイチン硫酸標準液の検量線から残存GAG量を算出した。

力学特性評価は以下の手順で行った。脱細胞化処理による力学強度の変化を調べるために、クリープメータを用いて、圧縮試験を行った。脱細胞化角膜に対して、0.01Nの荷重を加え厚み測定を行った後、さらに0.1mm/minの速度で20Nの荷重を加えた。得られた応力-歪曲線から弾性率を算出した。

膨潤度測定は以下の手順で行った。超高压印加後の洗浄処理では、角膜が膨張する可能性がある。未処理角膜および超高压印加角膜をPBSおよびPBS/デキストランにて72時間浸漬した後、角膜の膜厚を計測した。

C. 研究結果

国内外での脱細胞化組織研究の主流である界面活性剤を用いた脱細胞化法について、種々の界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。界面活性剤としては、Triton X-100、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、コール酸ナトリウムを用いた。ブタ眼球より採取した全層角膜を各1w/v%溶液中に浸漬し、24時間37℃下にて静置した後、PBS洗浄を24時間行った。また、我々が開発した超高压処理法による角膜の脱細胞化を行った。超高压処理法は、超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する方法である。印加圧力を4000、10000気圧として高压印加処理を施した。

各脱細胞化処理法にて処理した角膜を図1に示す。Triton X-100では、周辺部の溶解はなかったものの、著しい膨張・白濁化がみられた(図1(B))。SDS処理では、角膜の円周部の溶解と中央部での膨張がみられ、白濁化した(図1(C))。コール酸ナトリウム処理では、ほとんど角膜の膨張は認められなかったものの、白濁角膜が得られた(図1(D))。一方、超高压印加処理においては、4000気圧の圧力印加では半透明の角膜が得られ(図1(E))、10000気圧の超高压印加により、白濁角膜が得られた(図1(F))。

標本角膜片をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色にて組織学的な検討を行った(図2)。Triton X-100、コール酸ナトリウムにおいては、上皮層、角膜実質層において青色に染色された細胞核が確認され、ほとんどの細胞が除去されていなかった(図2(B)、(D))。コール酸ナトリウム、Triton X-100による脱細胞化処理では、用いる組織により脱細胞化効率が異なることが報告されており、何らかの角膜特性が脱細胞化に影響したと考えられる。SDS処理では、上皮層部の細胞がほとんど除去されていたが、実質層では細胞の残存が示された(図2(C))。浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であった可能性もある。一方、超高压処理では、4000、10000気圧の印加圧力に

においても青色に染色された細胞核は観察されず完全な細胞の除去が示された(図2(E)(F))。コラーゲン繊維の配向については、図2(A)の正常な角膜実質層では、コラーゲン繊維は高密度に配向していることが観察された。コール酸ナトリウムにて処理した未膨張の角膜では、コラーゲン繊維間の配向はほぼ正常に保たれていた(図2(D))。Triton X-100処理により膨張した角膜では、拡大した繊維間の空隙が観察された(図2(C))。Triton X-100は、タンパク質(生体組織)変性を誘起しない非イオン性界面活性剤として知られており、コラーゲン繊維へのダメージが認められなかったことに一致する。SDS処理では、コラーゲン繊維の配向は大きく乱れ、コラーゲン繊維の切断および空隙の拡大が観察された(図2(B))。イオン性界面活性剤であるSDSは、細胞質、核膜を溶解し、強力な脱細胞化試薬として血管、弁、腱等の脱細胞化処理に用いられている。しかし、タンパク質-タンパク質相互作用の破壊によるタンパク質変性の誘起およびグリコサミノグリカン(GAG)の溶解傾向が報告されている。このことから、SDS処理による角膜の脱細胞化では、SDSによるGAG溶解によってコラーゲン繊維間の空隙の拡大が示されたと考えられる。血管、弁等の組織に比べて角膜はGAG含有率が高いことから構造に強く影響したと考えられる。一方、超高压処理においては、いずれの印加圧力の場合でもコラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった(図2(E)、(F))。

これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤の場合、浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であったと考えられるが、コラーゲン繊維配向の乱れが示されていることから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられ、界面活性剤のみでの角膜の脱細胞化は困難であると考えられる。一方、超高压処理法では、十分な脱細胞化とコラーゲン構造の維持が示されたことから、角膜の脱細胞化に適した手法と言える。

脱細胞化角膜の膨潤制御については、4000、10000気圧の超高压処理法による脱細胞化では、上記の界面活性剤法に比べて低いものの、いずれの場合も超高压処理による角膜の膨潤が示され、未処理角膜の約3倍の膜厚であった。(図3)この膨潤により角膜透過性が減少しているものと考えられ、角膜機能の一つである透過性を獲得する

ためには解決すべき問題である。そこで、デキストランを添加することで角膜の膨潤抑制を試みた。超高压印加、洗浄操作後の膜厚は約1.5倍の増加に留まり、デキストラン添加による十分な膜厚抑制が示された。

脱細胞化角膜の力学特性については、クリープメータを用いて、圧縮試験を行った結果を図4に示す。未処理の角膜は生体組織特有のs-s曲線(Jカーブ)が得られた。72時間のPBSへの浸漬により弾性率は低下した。超高压処理を施した場合、シグモイド状のs-s曲線が得られた。これは、洗浄液に含有するデキストランの粘性によると考えられる。また、未処理角膜に比して若干の弾性率の低下が認められた。生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節されていることが知られている。そこで、脱水モデル実験として、超高压処理により得られた脱細胞化角膜を高張液であるグリセロールに浸漬し、透明性の回復について検討した。浸透圧による強制的脱水である。100%グリセロール溶液に1時間浸漬された脱細胞角膜の力学試験を行った。グリセロール浸漬後の脱細胞化角膜では、未処理角膜とほぼ同程度の弾性率を示した。以上の結果により、超高压脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

D. 考察

近年、組織工学的手法によりコラーゲンやフィブリンから角膜に類似した構造を有する角膜代替材料を構築する試みが多くなされている。しかしながら、生体材料から構築した角膜は、生体角膜と同程度の力学特性を再現することは困難であり、また、透明性の確保も困難であることが多い。このことから本研究では、人工角膜実質部としての応用を目指した生体角膜より細胞のみを除去した脱細胞化角膜を開発について検討した。脱細胞化角膜は、生体角膜に類似した構造を有しており、かつ、ドナー細胞を完全に除去することにより免疫反応の惹起を抑制することが可能であり、問題解決のアプローチの一つであると考えられる。

まず、一般的な脱細胞化法である界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。界面活性剤法では、細胞破壊はなされるものの、完全な細胞除去は成されず細胞の残渣が観察された。浸漬時間が

短いため脱細胞化が不十分であったと考えられるが、膨潤に伴うコラーゲン線維間隙の拡大や配向の乱れおよび断片化が観察されたことから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられる。角膜の透明性はI型およびV型コラーゲン線維が高密度に配列し、かつ、角膜内皮細胞のNa⁺-K⁺ポンプによって含水率が約78%に保持されることによって維持されている。従って、角膜実質において不可逆的な構造変化が生じた場合、角膜は混濁し、透明には戻らない。界面活性剤による脱細胞化角膜をグリセロールにて浸透圧の調節を行ったが、透明性は回復しなかった。これは、GAG-コラーゲン相互作用が破壊およびタンパク質の変性により、不可逆的な構造変化が生じたため考えられる。以上より、角膜の脱細胞化において界面活性剤法は不適であると考えられる。

一方、超高压処理法では、完全な細胞の除去が示され、コラーゲン線維配向の大きな乱れは認められなかった。一般には、高压印加によりタンパク質の変性が生じることが知られているが、超高压処理による白濁が生じた。我々は、超高压処理による角膜の白濁はコラーゲン線維の変性によるものではなく、角膜内皮細胞のポンプ機能破壊による膨潤に起因すると考え、グリセロールによる浸透圧の調節について検討した。100%グリセロールへの浸漬により透明性の回復が認められたことから、変性による不可逆的な構造変化は生じていないことが示された。

以上より、超高压処理による脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

E. 結論

超高压処理法では、十分な脱細胞化が示され、また、処理後は白濁するものの、浸透圧調整により透明化することが明らかとなった。以上の結果により、超高压脱細胞化角膜の人工角膜実質部としての応用可能性が示された。

F. 研究発表

- 1) 木村 剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月 學、岸田晶夫、小林尚俊. 脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価. 東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報 2008; 41: 15-7.
 - 2) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. High Press Biosci Biotech 2007; 1(1): 161-5.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
 - 2) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kishida A. Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea. Tissue Eng 2007; 13(7): 1709-10.
 - 3) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1746-7.
 - 4) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南 広祐、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高压研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.
 - 5) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea. J Artif Organs 2007; 36(2): S-86.
 - 6) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 組織工学的的手法による人工角膜の開発. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 126.
 - 7) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Characterization of acellular porcine

cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 149.

- 8) Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 263.
- 9) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kobayashi H, Fujisato T. Preparation and Characterization of Decellularized Porcine Corenea for the Corneal Tissue Engineering. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium 2008; 63.
- 10) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 脱細胞化角膜の組織適合性評価. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 260.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
なし

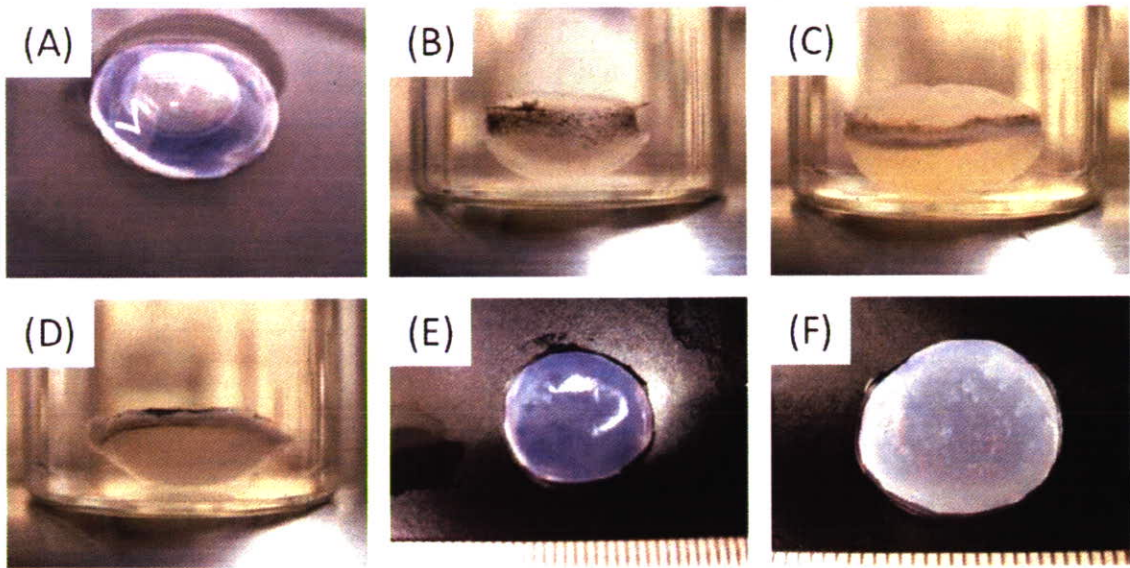


図1. 種々の脱細胞化処理法にてブタ角膜を脱細胞化処理した写真

(A) 未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) コール酸ナトリウム, (E) 4000気圧, (F) 10,000気圧

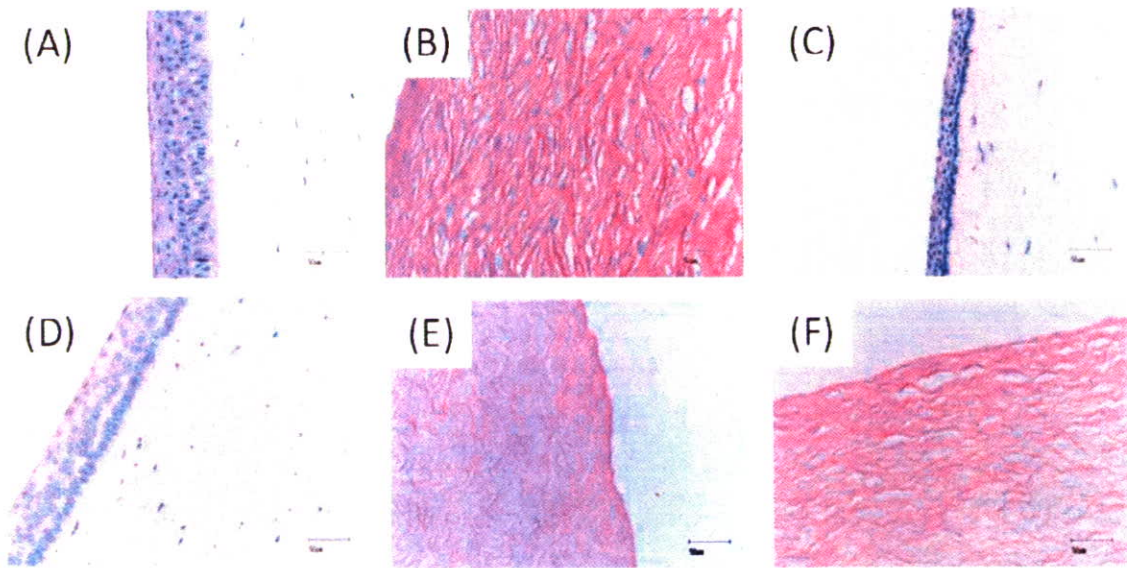


図2. 種々の脱細胞化処理法脱細胞化したブタ角膜のHE染色

(A) 未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) コール酸ナトリウム, (E) 4000気圧, (F) 10,000気圧

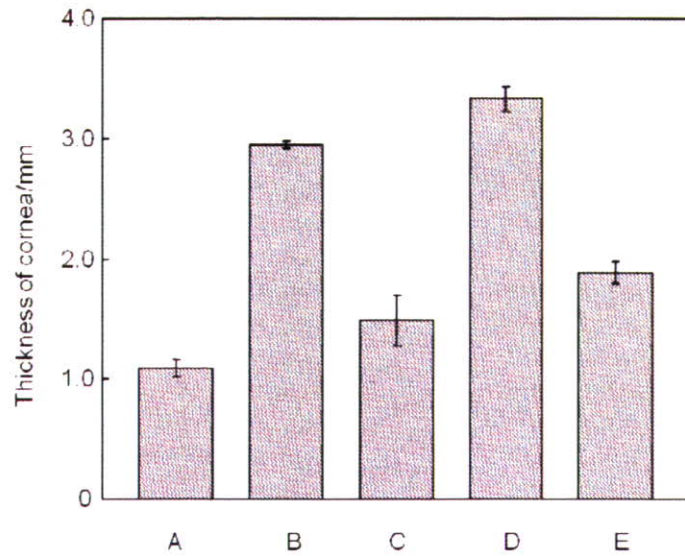


図3. 種々の脱細胞化処理法脱細胞化したブタ角膜の膜厚測定

(A) 未処理、(B) PBS浸漬 (72時間)、(C) DEX/PBS浸漬 (72時間)、(D)超高压処理 (10,000気圧、10℃、10分間)後に培養液浸漬 (72時間)、(E) 超高压処理 (10,000気圧、10℃、10分間)後にDEX含有培養液浸漬 (72時間)

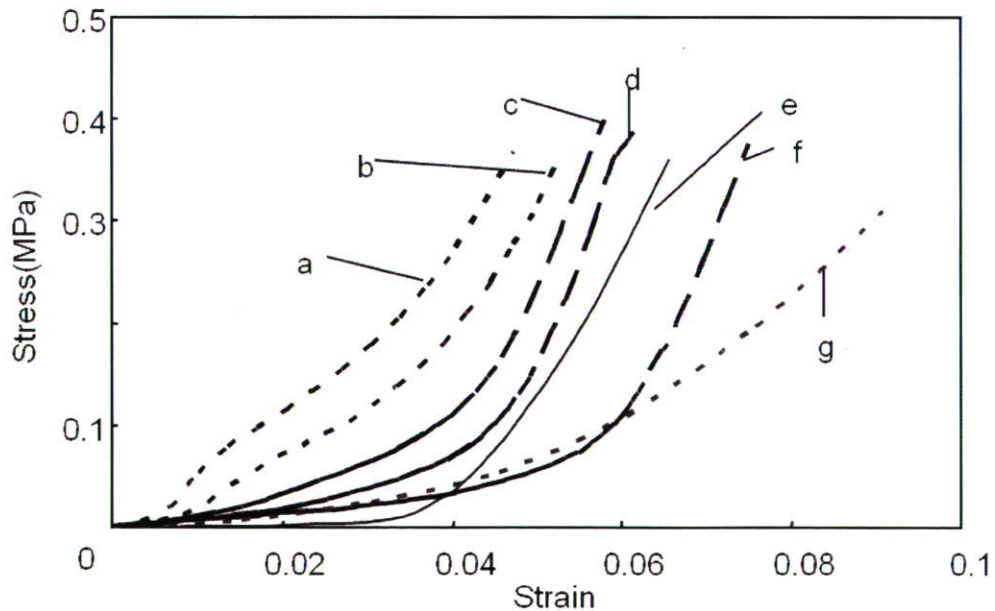


図4. 種々の脱細胞化処理法脱細胞化したブタ角膜の圧縮試験

(a) 超高压処理 (10,000気圧、10℃、10分間)後に培養液浸漬 (72時間)、(b) 超高压処理 (10,000気圧、30℃、10分間)後に培養液浸漬 (72時間)、(c) (a)の脱細胞化角膜を100%グリセリンに1時間浸漬、(d) (b)の脱細胞化角膜を100%グリセリンに1時間浸漬、(e) 未処理、(f) 未処理角膜を PBS浸漬 (72時間)、(g) (f)を100%グリセリンに1時間浸漬

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

再生型角膜のin vivo評価

分担研究者 佐々木秀次 東京都立広尾病院眼科医長

研究要旨 本研究では、超高压処理法により得られた脱細胞化角膜のin vivo異種移植実験を行い、人工角膜としての有効性について検討した。生体組織から細胞を除去した脱細胞化角膜を超高压処理法により調製し、物性および生体適合性について検討した。これによりほぼ完全な細胞除去と生体角膜に類似する力学特性を有する脱細胞化角膜が得られた。また、ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。以上の結果から、生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

A. 研究目的

角膜白斑、角膜変性や水疱性角膜症などの角膜混濁や高度の角膜乱視を、ヒトより採取した正常な角膜で置換する「角膜移植」術が行われている。日本国内では年間2万人以上の患者が待機しているが、角膜移植が行われるのは年間1600人程度である。世界的には、角膜の障害による失明は少なくとも10万人以上存在すると推定されている。また、現在の角膜移植医療では、他人の角膜を移植する同種移植であるため、原疾患による拒絶反応が課題となる。このような状況を打開するために、人工角膜あるいは角膜再生医療の開発が強く望まれている。移植用角膜の代替材料の研究として、透明な高分子系材料を用いた人工角膜の研究が行われており、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）やポリビニルアルコール（PVA）などが試みられている。しかし、現状では、移植に応用可能な人工角膜は未だ開発されていない。ここでは、人工角膜と生体角膜の適合性が不十分であることから、レシピエント細胞の基材上へのマイグレートが十分でなく、人工角膜との接合部での融解に伴う脱落や感染症などが重要課題となっている。一因としては、生体角膜と人工角膜との物性の相違が挙げられる。一方、最近では、再生医療の側面からの研究が行われている。再生医療技術によっ

て、角膜上皮および角膜内皮が臨床応用されており、再生医療技術の角膜再生への有効性が示され、角膜全層の再生が期待されている。角膜上皮および角膜内皮の再生は、細胞のみを用いた細胞シートや羊膜を用いた基本的には細胞層のみの再生であり、角膜のほぼ90%を占める実質部分の再生に関しては、未だ臨床応用にいたる再生技術は開発されていない。この角膜実質部の再生については、コラーゲンゲル・スポンジを用いた研究が大部分であり、組織構造、強度などの物性は生体組織に類似しない。そこで我々は、生体組織の物性に類似する人工角膜として、脱細胞化角膜の調製について検討している。脱細胞化組織とは、異種組織から細胞を除去し、残存する生体支持組織を指す。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素などの薬液による化学的手法と、最近我々が開発した物理的手法である超高压処理法がある。後者は、超高压印加により細胞を破壊し、細胞残渣を洗浄により除去する手法である。これまで、血管、心臓弁、靭帯、骨などの種々の組織における脱細胞化に成功している。本研究では、超高压処理法により得られた脱細胞化角膜のin vivo異種移植実験を行い、人工角膜としての有効性について検討した。

B. 研究方法

超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する超高压処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10℃、10000気圧、10分間の超高静水圧を施圧した後、細胞培養液中での72時間の浸透洗浄により行った。得られた脱細胞化角膜の細胞除去を確認するため、組織切片のヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色による組織学的観察およびDNA残存量を検討した。また、角膜組織はコラーゲンおよびグリコサミノグリカン (GAG) を主成分とし、特有のゲル様物性はGAGに寄るところが大きいため、GAGの残存についても定量的に検討した。ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った。日本白色家兎の角膜を一部切開し、角膜実質層に約4mm辺のポケットを作製し、直径約2mm×厚み0.16mmの脱細胞化角膜を挿入した(図1)。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成17年6月22日公布)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示)、実験動物の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日日本学術会議)等に基づき、当施設の実験動物委員会承認された方法で行った。具体的には、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するように努めた。

C. 研究結果

超高压処理法にて得られた脱細胞化角膜のH-E染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。DNA残存量の定量では検出限界程度のDNAが定量され、破壊された細胞の残渣がほとんど除去された。これらの結果より、ほぼ完全な脱細胞化が達成されたと考えられる。また、GAG残存量を定量した結果、超高压脱細胞化処理後においても、未処理角膜と同程度のGAG量が示された。さらに、圧縮試験にて脱細胞化角膜の力学特性を検討した結果、脱細胞化直後では若干の弾性率の低

下が示されたが未処理角膜とほぼ同等であった。生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節されていることが知られている。そこで、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水による収縮により物性が回復するかどうかについて検討した。グリセロール溶液に浸漬することで浸透圧を調整し、その後の弾性率を測定した。脱細胞化角膜の弾性率は、未処理角膜の約1.3倍に上昇し、移植後の角膜内皮細胞のポンプ機能により力学特性が回復される可能性が示された。

ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った(図1)。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。移植直後および1週間後では、脱細胞化角膜は白濁しており、未処理角膜は透明であった。移植2週間後においては、脱細胞化角膜に変化は認められず白濁状態にあったが、一方の未処理角膜では炎症反応が示され若干の浮腫が認められた。移植4週間後には、脱細胞化角膜は透明になっていたが、移植部周辺にて若干の炎症が認められた。一方の未処理角膜では強い炎症による浮腫と血管の遊走が認められた。さらに、移植8週間後では、脱細胞化角膜の透明状態は維持されており、移植部周辺の炎症反応認められなかった(図2)。一方、未処理角膜では強い免疫応答が続いており、炎症に伴う血管の遊走が認められた。試料標本のH-E染色では、未処理角膜においては多数の炎症細胞が観察され、埋入試料の確認ができなかった。一方の脱細胞化角膜においては、炎症細胞はほとんど観察されず脱細胞化角膜の残存が示された。以上の結果から、超高压脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

D. 考察

超高压処理法にて角膜を脱細胞化した結果、ほぼ完全な細胞除去と生体角膜に類似する力学特性を有する脱細胞化角膜が得られた。従来の界面活性剤・酵素等の薬液への浸漬による脱細胞化では、角膜が膨潤・白濁することから、超高压処理法の有効性が示されたと言える。また、コラーゲンゲル・スポンジを角膜実質部として用いて角膜再生に関する研究がなされており、本研究の生体角膜実質に類似する超高压脱細胞化角膜を用いることで、新たな知見が期待出来る。ブタ脱細胞

化角膜のウサギへの移植試験では、約8週間後においても炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。今後、長期間の移植を検討し、臨床応用に展開する。

E. 結論

生体組織から細胞を除去した脱細胞化角膜を超高圧処理法により調製し、物性および生体適合性について検討した。これによりほぼ完全な細胞除去と生体角膜に類似する力学特性を有する脱細胞化角膜が得られた。また、ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。以上の結果から、生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 木村 剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月 學、岸田晶夫、小林尚俊. 脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価. 東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報 2008; 41: 15-7.

2. 学会発表

- 1) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
- 2) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kishida A. Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea. Tissue Eng 2007; 13(7): 1709-10.
- 3) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1746-7.
- 4) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南 広祐、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高圧処理技術を応用した人工角膜の

作製と評価. 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.

- 5) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea. J Artif Organs 2007; 36(2): S-86.
 - 6) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 組織工学的手法による人工角膜の開発. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 126.
 - 7) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Characterization of acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 149.
 - 8) Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 263.
 - 9) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kobayashi H, Fujisato T. Preparation and Characterization of Decellularized Porcine Corenea for the Corneal Tissue Engineering. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium 2008; 63.
 - 10) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 脱細胞化角膜の組織適合性評価. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 260.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)なし

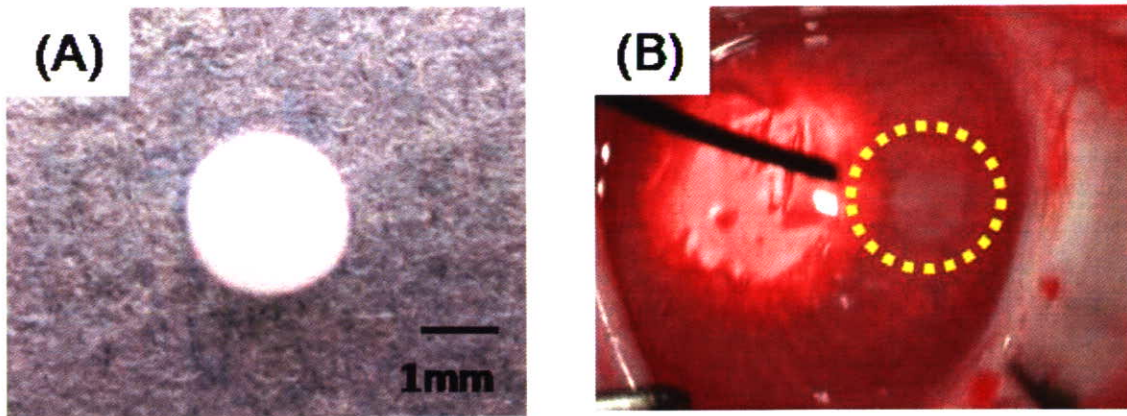


図 1. (A)ブタ脱細胞化角膜, (B)ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植

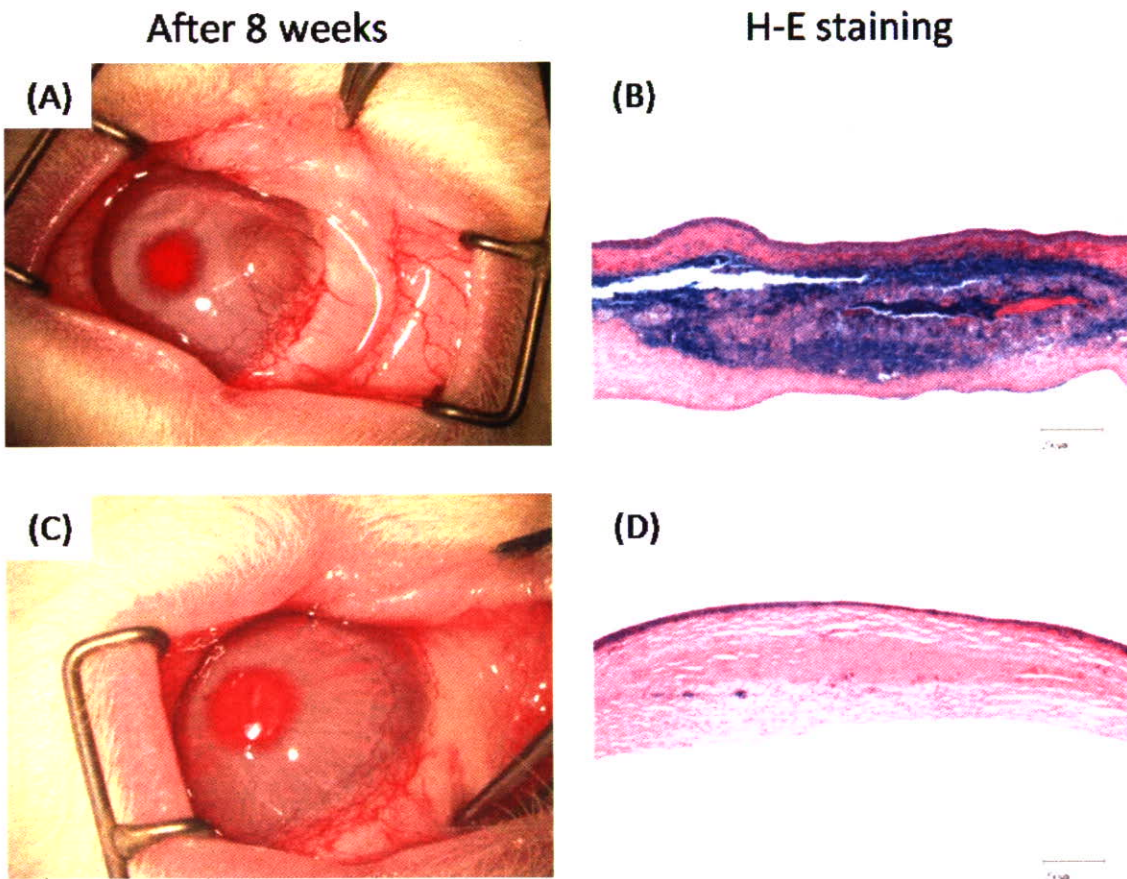


図 2. ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植結果 (8週間後).
 (A, B)未処理ブタ角膜, (C, D)超高压脱細胞化角膜

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

再生型角膜の作製

分担研究者 木村 剛 東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教

研究要旨 角膜は、コラーゲン線維が格子状に高次に配列することにより透明性を維持している組織であり、角膜実質部としては高次の組織構造が要求される。そこで、生体に類似した物性と構造を有する脱細胞化組織に着目し、種々の手法による脱細胞化角膜の作製について検討した。超高压処理により完全な細胞除去と生体角膜に類似した力学特性と微細構造を有する脱細胞化角膜の開発に成功した。また、グリセロールへの浸漬により超高压脱細胞化角膜の透明性が回復したことから、角膜内皮細胞によるポンプ機能により透明性が回復する可能性が示めされた。以上より、脱細胞化角膜の移植用角膜組織としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

角膜移植は重篤な角膜疾患において効果的な治療法の一つである。現在、角膜移植術を要する患者は、世界中で1000万人以上と推定されているが、実際に角膜移植を受けている患者数は年間12万人足らずであり、多くの国で提供眼球不足が大きな問題となっている。また、全層角膜移植の約30%で拒絶反応が惹起され、そのうち5-7%が機能不全に至ることが報告されている。

このような問題の抜本的解決策として、高分子材料を用いた人工角膜の開発および再生医療技術による角膜再生が検討されている。前者は、従来、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、ポリビニルアルコール (PVA) などが試みられているが、生体角膜との物性の相違から接合部での実質融解による人工角膜の脱落が報告されている。一方、角膜再生においては、in vitroでの角膜上皮・実質・内皮細胞からなる角膜様組織の構築が報告されている。また、上皮細胞シートによる角膜上皮再生が臨床応用されており、細胞工学からのアプローチによる再生医療技術の有用性が示されつつある。しかしながら、これら細胞の足場となる角膜実質部としては、コラーゲングルやフィブリンゲルなどが用いられており、生体角膜に比べ脆

弱かつ構造も大きく異なる。

角膜は、コラーゲン線維が格子状に高次に配列することにより透明性を維持している組織であり、角膜実質部としては高次の組織構造が要求される。そこで、生体に類似した物性と構造を有する脱細胞化組織に着目した。脱細胞化組織は、生体組織から細胞を除去した後、残存する細胞外マトリックスを指す。脱細胞化組織の作製法としては、界面活性剤や酵素による化学的手法、超高压技術による物理的手法がある。本研究では、種々の手法による脱細胞化角膜の作製について検討した。

B. 研究方法

角膜の採取：成体ブタ眼球は東京芝浦臓器株式会社より入手した。眼球の角膜輪部に沿ってサージカルナイフで切開し、角膜を採取した。その後3.5 % w/v Dextran、100 units/ml Penicillin および 0.1 mg/ml Streptomycin を含む PBS (DEX/PBS) で洗浄した。

界面活性剤による角膜の脱細胞化：1 % w/v TritonX-100 およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を調製した。角膜を浸漬し、37℃にて24時間の振盪処理を行った。続いて、DEX/PBSによる振盪洗浄を48時間行った。

超高压処理による角膜の脱細胞化:冷間等方加圧装置, Dr. CHEF ((株)神戸製鋼所)を用い、10°C または30°Cにて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行った後、直ちに3.5% w/v Dextran、0.2 mg/ml DNase I、100 units/ml Penicillinおよび0.1 mg/ml Streptomycinを含むEGM-2培地(DEX/EBM)による振盪洗浄を37°C、5% CO₂下にて72時間行い、細胞残渣を除去した。

組織学的評価:未処理および脱細胞化角膜を10%中性緩衝ホルマリン液で常温にて24時間固定した後、PBS(-)で数回洗浄した。続いて、上昇アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、マイクロトームを用いて厚さ4μmの薄片を作製した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色し、光学顕微鏡による観察を行った。

残存DNA定量:凍結乾燥した脱細胞化角膜20mgに組織溶解液(50 mM Tris-HCl, 50 μg/ml Proteinase K, 1% w/v SDS, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA-2Na)を加え、55°Cにて12時間消化した。フェノール/クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出を行い、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて260 nmの吸光度を測定し、残存DNA量を算出した。

残存GAG定量:組織中に残存するGAGを定量するために、アルシアンブルー結合アッセイを行った。凍結乾燥した脱細胞化角膜20mgにパパイン溶液(100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, 0.5 mg/ml Papain, 0.5 mM EDTA-2Na)を加え、65°Cにて24時間消化した。アルシアンブルーを添加し、グリコサミノグリカン-アルシアンブルー複合体を形成させ、マイクロプレートリーダーを用いて600 nmの吸光度を測定した。コンドロイチン硫酸標準液の検量線から残存GAG量を算出した。

電子顕微鏡観察:脱細胞化角膜を2.5%グルタルアルデヒドで常温にて8時間固定し、0.1M-Sorensen-Gomoriリン酸緩衝液で数回洗浄した。続いて、上昇アルコール系列による脱水後、t-ブチルアルコール凍結乾燥を行った。断面をAuコーティングし、SEMによる観察を行った。

透明性の回復試験:脱細胞化処理により角膜内皮細胞のポンプ機能が崩壊し、膨潤するため透明性が低下する。in vitroにおけるポンプ機能モデルとしてグリセロールによる浸透圧の調節を行い、透過性を評価した。

C. 研究結果

国内外における脱細胞化組織研究の主流は、界面活性剤やタンパク質分解酵素等の薬液処理による脱細胞化法である。そこで、種々の界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、Toriton X-100、コール酸ナトリウムを用いた。ブタ眼球より採取した全層角膜をそれぞれの1 w/v%溶液中に浸漬し、37°C下にて24時間静置した後、PBSにて24時間洗浄した。それぞれの溶液にて処理した角膜を図1に示す。SDS処理では、角膜の円周部の溶解と中央部での膨張がみられ、白濁化した(図1(B))。Triton X-100においても、周辺部の溶解はなかったものの、著しく膨張・白濁化がみられた(図1(C))。一方、コール酸ナトリウム処理では、角膜膨張はほとんど認められなかったが、白濁した角膜が得られた(図1(D))。処理角膜片をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色にて組織学的な検討を行った(図2)。Toriton X-100、コール酸ナトリウムでは、角膜実質層、上皮層のいずれの層においても青色に染色された細胞核が確認され、ほとんどの細胞が除去されていないことが明らかとなった(図2(C)、(D))。角膜実質層のコラーゲン繊維について、正常な角膜実質層では図2(A)のような高密度に配向したコラーゲン繊維として観察され、膨張しなかったコール酸ナトリウム処理角膜でも、コラーゲン繊維間の配向はほぼ正常に保たれていた。しかし、膨張したTriton X-100では、繊維間の空隙の拡大がみられた(図2(C))。SDSの場合、上皮層部のほとんどの細胞は除去されていたが、実質層では細胞の残存が示された。また、コラーゲン繊維の配向は大きく乱れ、コラーゲン繊維の切断および空隙の拡大が観察された(図2(B))。イオン性界面活性剤であるSDSは、細胞質、核膜の溶解が可能であり、強力な脱細胞化試薬として血管、弁、腱等の脱細胞化処理に用いられ、ほぼ完全な脱細胞化が報告されている。しかし、タンパク質-タンパク質相互作用の破壊によるタンパク質変性の誘起およびグリコサミノグリカン(GAG)の溶解傾向も報告されている。このことからSDSによる角膜脱細胞化では、ある程度脱細胞化されるものの完全な脱細胞化は達成されず、また、コラーゲン繊維間の空隙の拡大が示されたと考えられる。浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であっ