

生し、そのほかの細胞である線維芽細胞などの細胞も血管壁を埋め尽くすように生存していた（図6）。したがって、血管壁部分は完全に再構築されていることが考えられた。また、脱細胞化心臓弁の筋組織部内部にも多数の細胞が生存しており、筋細胞か否かについては不確定ではあるものの、大動脈の血圧に耐えうる組織を形成していることがわかった。

本年度内に脱細胞化心臓弁の移植実験を行なった例数は合計4頭であった。しかしながら、いずれの場合も手術中の動物の死亡により、データを取得することはできなかった。手術中の、循環呼吸器系の機能を人工心肺装置に移行する際や、移植片の縫合後の人工心肺装置からの離脱時の、動物の管理が困難であることが問題であった。各手術において、条件や使用する器具の検討を重ね、手術成功率の向上を目指している。

C-2. 脱エラスチン血管移植実験

脱エラスチン血管移植実験では、本年度、移植12ヵ月後の摘出が2件行われた。これまで、同移植片は、移植期間3、6、12ヵ月間の3条件で10頭の手術が行なわれ、石灰化の程度と血管組織の再構築について評価を行ってきた。前年度までの結果では、石灰化の形成が認められず、組織再構築が良好であった例が6件あった一方で、移植6ヵ月後に血管壁の中膜部分に激しい石灰化

が認められた例が2件あった。

本年度、移植12ヵ月後に摘出した2頭は、いずれも体重10kgの時点で移植したものの、そのうち1頭目は摘出時体重が30kgしかなく、2頭目は54kgのまで成長していた。摘出した移植片は、いずれも激しく石灰化しており、さらに完全に血管内腔が狭窄していた。摘出時の外観像を図7および図9に示す。

これまでの組織学的評価やカルシウム量の測定に加え、本年度より、X線CT画像から骨塩量を測定して石灰化の程度として示す試みと、移植片における石灰化部分の検討を開始した（図8、10）。その結果、1頭目では、主に血管壁部分に石灰化が観察され、2頭目では狭窄部に激しい石灰化が認められた。

組織染色を行なった結果、CT画像にて検出された石灰化部分は、von Kossa染色と一致していた（図10、11）。しかし、組織内の細かい石灰化部分に関しては、von Kossa染色で検出されていても、CT撮影では検出できないこともわかった。Elastica van Gieson染色の結果、血管の内腔が保たれていた部分の血管壁には良好にエラスチン繊維が再生していたのに対し、狭窄部にはほとんど存在していないことがわかった。狭窄部のほとんどは線維化組織と石灰化であった（図12）。

免疫染色によりT細胞の指標であるCD3陽性細胞は、いずれの箇所にも確認されな

かったことから、移植片は宿主動物の免疫活性を惹起しない、抗原性の低い組織であることがわかった(図12)。血管内皮細胞、平滑筋細胞と線維芽細胞の染色の結果、石灰化の周辺には、平滑筋細胞や線維芽細胞がランダムに混在し、狭窄部でない血管壁でも内腔側に血管内皮細胞は存在していなかった(図10)。

D. 考察

本研究は、等方静水圧印加処理法による脱細胞化心臓弁または脱エラスチン血管といった、生体由来脱細胞化組織の移植片としての利用の可能性を探るために、1年間までのミニブタ移植実験により評価を目指している。人工材料による心臓弁、血管の移植用組織において未解決の課題である、生体組織との置換による成長性の獲得と石灰化の抑制のためには、生体由来組織を移植片として利用することは不可欠であるが、国内ではヒト以外の生体由来組織の利用は未だ認められていない。欧米で既に市販されているブタやウシ由来の移植片でも、抗原性や石灰化の問題が未解決なのが現状である。

われわれはこれまでに、ミニブタから摘出した血管や心臓弁を、等方静水圧印加処理を利用して脱細胞化し、同種移植により評価を続けてきた。これまでに、石灰化抑制のために作製方法を検討し、当初は圧力印加とバッファーによる洗浄のみであった

が、その後、石灰化の原因の一つであるリン酸が細胞膜に多く含まれていて、脱細胞化処理後にも組織内に残存している可能性が考えられたため、アルコールによる洗浄も行なった。個体差はあるものの、アルコール洗浄を行うことにより、石灰化の程度はかなり抑制され、スポット状の石灰化が血管壁内部に存在する程度に留まった。

石灰化の原因としてリン酸以外にもいくつか候補が考えられている。候補のひとつであるエラスチン繊維も除去するため、等方静水圧印加処理後にエラスチン除去工程を経てからアルコールとバッファーによる洗浄を行なう脱エラスチン血管のプロトタイプを開発した。移植実験では、移植半年以内の初期における石灰化が激しく、12ヶ月まで観察すると、程度が緩和されたものの、作製条件の最適化が必要と考えられたため、本年度は等方静水圧印加処理を除き、脱エラスチン処理とその後のバッファーによる洗浄のみで作製した脱エラスチン血管の移植実験を試みた。これまでに合計10頭の移植実験を行ない、3ヶ月から12ヶ月までの間にて移植片を評価してきたが、そのうち4例が石灰化を形成してしまう結果となった。原因は特定できないものの、一般的に石灰化の形成に関してエラスチン繊維が原因であるという考え方は、必ずしも適当ではない可能性が示唆された。脱エラスチン処理後の移植片保存溶媒にこれまでリン酸緩衝液を用いてきたため、この溶液に

含まれるリン酸塩が石灰化を招く可能性も考えられる。今後の改良点として、臨床の場でも利用されている生理食塩水など、必要最低限の塩しか含まれない水溶液中に保存することが、石灰化の低減に大きく貢献できると考えられた。

脱細胞化心臓弁に関しては、移植成功例が極めて少ないものの、これまでに移植12ヵ月後の結果が2頭分、得られている。いずれの場合にも、心臓弁としての機能を十分果たしており、動物も健常であった。移植前と移植後の弁から遠位側の血管部分の内径および長さも成長が認められ、弁葉3枚とも、ネイティブの弁葉と同様に大きさが異なる、健常の心臓弁と変わらない成果を得られた。組織学的検討からも、ネイティブと同等の組織を再構築しており、石灰化も認められず、良好な結果を得ているため、今後、移植性効率の向上を目指すことが課題として残っている。また、本研究は、低圧力環境である、肺動脈弁で検討している。石灰化は高圧化により誘導されやすいといわれていることから、手術の成功率とともに、大動脈弁置換術の検討を進めていく必要がある。

本研究は、ドナー、レシピエントともにクラウン系ミニブタを用いて検討した。ドナー患者の圧倒的な不足を考慮すると、同種移植よりも、異種移植が期待される。したがって、免疫拒絶のハードルを少しずつ高くするという目的で、今後は、同種同系

統移植よりも、同種異系統移植の検討を進めることも考慮する必要がある。

E. 結論

本研究は、重篤な心・循環器系疾患の治療のための生体由来組織による移植片の開発を目指して、動物を利用した心臓弁および血管の再生を目的とした。等方静水圧印加処理法や酵素処理による脱エラスチン化により、生体組織の細胞を除去し、生体組織と同等の力学特性を保持できる移植片を作製し、1年間までの移植実験を行なった。心臓弁の移植では、移植が成功した場合には、動物は長期間生存し、犠牲死時の移植片の状態も極めて良好であった。一方、脱エラスチン血管移植結果は、個体差が激しく、完全に狭窄してしまった実験例もあった。作製および保存条件の検討が必須である。

しかしながら、これらの脱細胞化組織は、これまでの人工材料や、欧米で市販されている動物由来組織よりも力学特性を保持し、手術が成功すれば、1年後には完全に患者の組織と同等な組織構造が再生された。さらに、移植片部分の組織の成長性も認められたことから、今後、石灰化や狭窄の大幅な低減を目指すことにより、小児患者にも利用可能な移植片が完成するであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawamura M, Ogino H, Sasaki H, Matsuda H, Minatoya K, Tanaka H and Kitamura S. Spinal cord malperfusion caused by using the segmental clamp technique during descending aortic repair for chronic type B aortic dissection. *Interactive Cardiovasc & Thorac Surg* 2008;7(1):146-8; discussion 8.

Nakamura Y, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H and Kitamura S. Hemolytic anemia after operation for aortic dissection using teflon felt strips. *Ann Thorac Surg* 2008;85:1784-7.

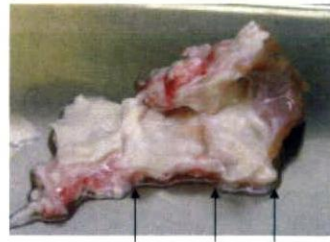
Ogino H, Sasaki H, Minatoya K, Matsuda H, Tanaka H, Watanuki H, Ando M and Kitamura S. Evolving arch surgery using integrated antegrade selective cerebral perfusion: Impact of axillary artery perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:641-9.

Tsunekawa T, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Kobayashi J, Yagihara T and Kitamura S. Composite valve graft replacement of the aortic root: Twenty-seven years of experience at one Japanese center. *Ann Thorac Surg* 2008;86:1510-7.

Watanuki H, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Fukuda T and Kitamura S. Dilation of the aneurysmal sac after total arch replacement. *Ann Thorac Surg* 2008;85:639-41.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



大動脈血管 弁葉 基部(心筋部分)

図1. 移植12ヵ月後に摘出した脱細胞化肺動脈弁(切開後). 内腔には血栓は認められず, 目立った内膜肥厚や石灰化は認められなかった.

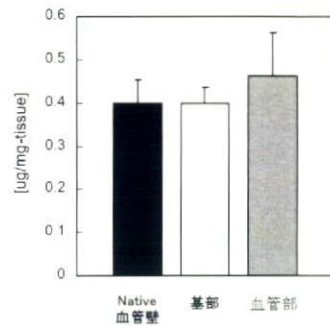


図2. 移植12ヵ月後に摘出した脱細胞化肺動脈弁基部および血管部の組織内 DNA 量. 脱細胞化肺動脈弁を移植したことにより, ホスト動物の細胞が侵入し, 未処理の血管と同等の細胞数が生存していたことがわかった.

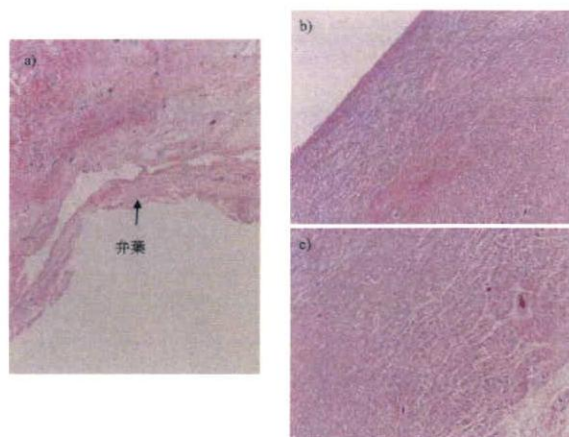


図3. 移植12ヵ月後の脱細胞化肺動脈弁のHE染色像. a) 弁葉. 2) 血管部. 3) 筋組織部分. 移植組織全体に細胞が浸潤し, 生体組織とほぼ同様の構造が認められた.

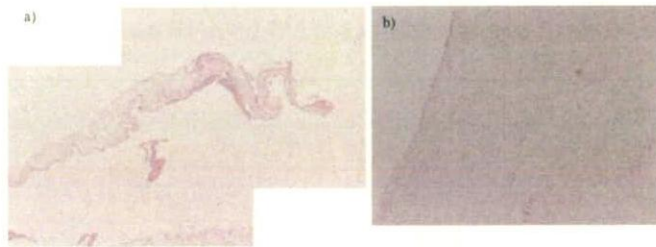


図4 移植12ヵ月後の脱細胞化肺動脈弁の von Kossa 染色像 a) 弁葉 2) 血管部
移植組織のいずれの部分にも石灰化は認められなかった。

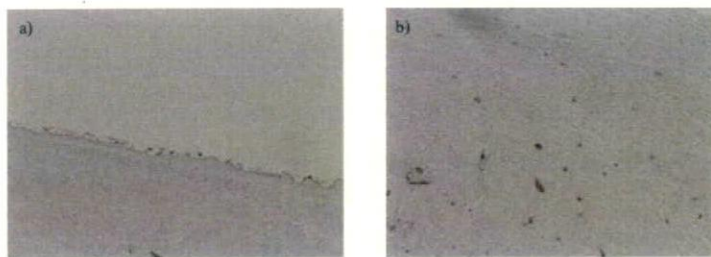


図5 移植12ヵ月後の脱細胞化肺動脈弁の von Willebrand Factor 染色像
a) 血管壁内腔側 2) 血管壁内部
血管内腔表面は、一層の血管内皮細胞に覆われていた。

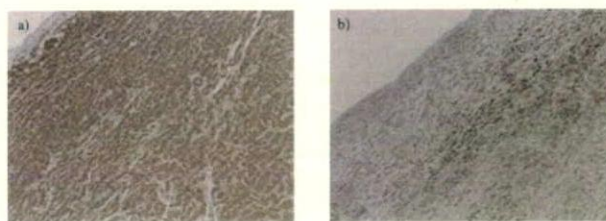


図6 移植12ヵ月後の脱細胞化肺動脈弁の血管壁部分の smooth muscle
actin (a) および vimentin 染色像
正常な血管壁と同様の組織構造を再建していた。



図7. 移植12ヵ月後の脱エラスチン血管の抽出時外観(1例目).
グラフト部分は硬く、狭窄しており、太さも移植時から成長していなかった。

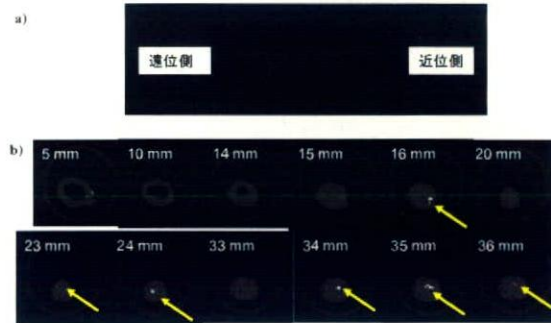


図8. 移植12ヵ月後の脱エラスチン血管の抽出時における血管断面のX線画像の一部(1例目). グラフト縦断面(a)および横断面像(b). 最外郭の輪は装置付属品。数値はグラフト近位側からの距離。矢印は石灰化の部分を示す。



図9. 移植12ヵ月後の脱エラスチン血管の抽出時外観。グラフト部分は他の部分よりも硬く、全般にわたって石灰化が激しかった。

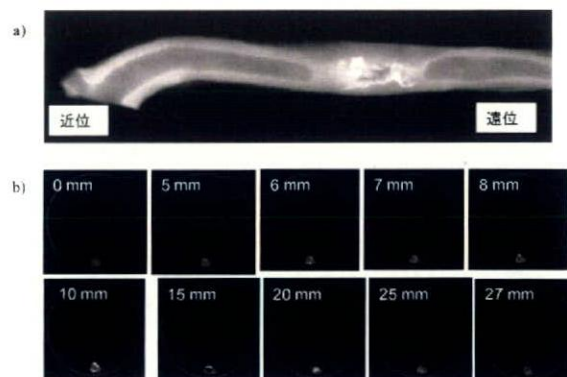


図10. 移植12ヵ月後の脱エラスチン血管の抽出時における血管断面のX線画像(2例目). 縦断面(a)および横断面像(b). 数値は近位側のグラフト閉塞部からの距離。矢印は石灰化部分を示す。

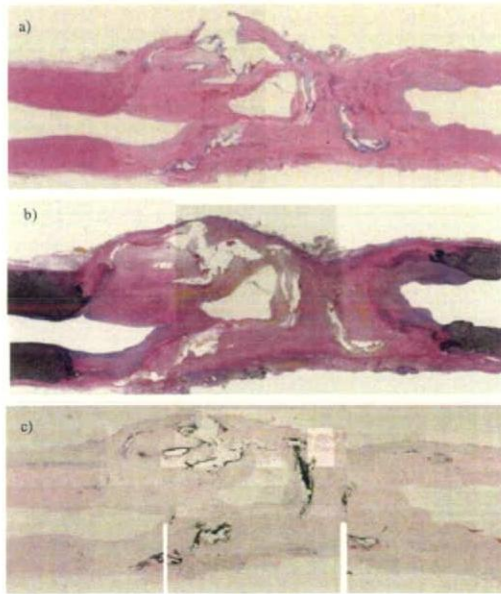


図11. 移植12ヵ月後に摘出した脱エラスチン血管のHE (a), elastica van Gieson(b), von kossa (c) 染色像。狭窄部分にエラスチン繊維は再生せず、大きな石灰化病変が認められた。

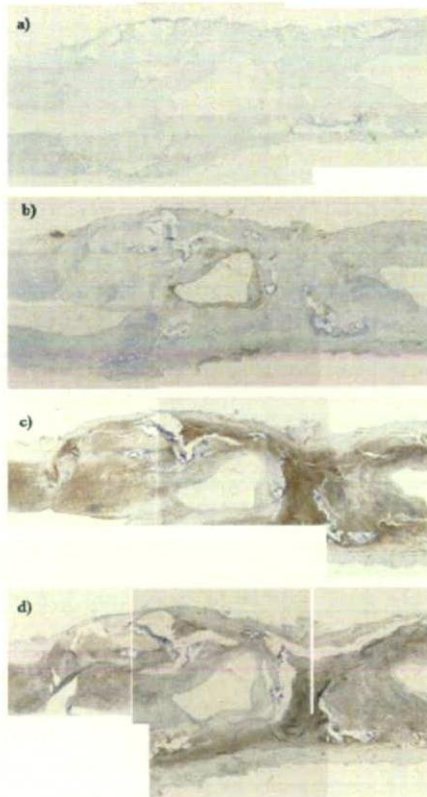


図12. 移植12ヵ月後に摘出した脱エラスチン血管の免疫染色結果。CD3 (a), von Willebrand factor (b), alpha smooth muscle actin (c), and vimentin (d)

脱細胞化組織の滅菌に関する研究

分担研究者 白数 昭雄 ニプロ株式会社

研究要旨 本研究事業で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。本年度は、脱細胞化組織の滅菌方法について、新たな方法として組織の脱細胞化時に使用する超高压処理を用いることで、超高压による滅菌の可能性について表在細菌を用いて検討した。表在細菌を用いた実験では、5000 気圧以上の超高压を30℃で印加することにより常在細菌の死滅が、圧力印加後の培養試験で確認された。また、圧力印加の時間増加により常在細菌の死滅効果が高まる傾向が見られた。低温で超高压を印加する場合においては、過度の加温を行わないため、組織構造・力学特性への影響は少なく滅菌することが可能である事から、超高压の印加条件を改良することで生体構造・物性を維持し、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が、医療に用いられるオートクレーブやエチレンオキシドガス（EOG）等の従来から行われている滅菌方法では、生体由来の材料の特性を失わずに滅菌することができないのが現状である。一方で、食品加工領域の殺菌・滅菌技術で超高压処理

が用いられている。これまでに超高压処理を用いた菌類の死滅・減少の報告がなされているが、処理条件により死滅度合いが異なり、研究報告数も少なく、菌の死滅の機構についてもまだ明らかにはなっていない。しかし、大腸菌である *E. coli* は6000 気圧の条件下で大半が死滅することや、緑膿菌やブドウ球菌においても6000 気圧の条件下で死滅することが報告されている。そこで本研究では、新たな方法として生体組織の脱細胞化時に使用する超高压処理条件の最適化を図ることで超高压による滅菌の可能性について表在細菌を用いて検討した。

B. 研究方法

生体試料としてブタ腹大動脈を清潔下で取り出し、5 x 5 mm の血管試料を作製した。作製した試料に口腔内在菌である *Str. Lactis* を付着させた不潔状態とした。不潔状態になった血管組織をPP製の容器に、PBS とともに入れ、空気が残らないようにヒートシールにより封入した。封入後、神戸製鋼社製のドクターシェフを使用し、1000、5000、7000、10000 気圧の超高压を昇圧時間5分、圧力維持時間10、20、30分で減圧時間5分、圧力印加時の温度30℃で圧力印加処理を行なった。圧力印加後は、清潔下でPP製の容器内から血管組織を取り出し10%FBS含有MEM培地に投入し、37℃下で1週間の培養を行なった。

C. 研究結果

培養試験の結果について、昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 1000 気圧で超高压処理した組織と昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 3000 気圧において超高压処理した組織では、圧力印加による滅菌の効果が培養試験では見られず、培地の観察結果では培養液が混濁した。しかし、昇圧時間 5 分、圧力維持時間 20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件で 3000 気圧で超高压処理した組織と昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10、20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 7000、10000 気圧で超高压処理した組織においては、培養後の培養液の観察結果で培養液の混濁は見られなかった。

D. 考察

昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 3000 気圧において超高压処理した組織条件では、圧力印加による滅菌の効果が培養試験では見られず、培地の観察結果では培養液が混濁し、昇圧時間 5 分、圧力維持時間 20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件で 3000 気圧で超高压処理した組織では、培養後の培養液の観察結果で培養液の混濁は見られなかった結果から、圧力の印加時間を増加すると殺菌効果があることが確認された。さらに、昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10、20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 7000、10000 気圧下で超高压処理した組織では、処理時間 10 分でも培養液の混濁が確認されなかったことから、印加圧力を上げることによっても殺菌・滅菌効果が現れることが確認された。これらの結果は、高压下での現象において、3000 気圧でタンパクや酵素の不可逆的不活性化や 4000 気圧では細菌や酵母の不活性化、死滅効果があることが食品加工の領域で知られているが、生体由来材料の滅菌にもこの技術が応用可能であることを示唆している。しかし、芽胞や枯草菌類の一部では 10000 気圧以上の圧力が必要であることが知られているが、低圧力においても圧力の印加時間や圧力印加時の温度を変化させることで、これらのような細菌や酵母も殺菌・滅菌できる可能性が今回の研究結果から考えられる。このことより、超高压を用いた滅菌につい

てさらなる検討が必要であると考えられる。

E. まとめ

超高压を用いた生体由来試料の滅菌作用の効果について、生体血管と表在細菌を用いて圧力印加後の培養試験により検討した。昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 1000 気圧で超高压処理した組織と昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 3000 気圧において超高压処理した組織では、滅菌の効果は得られなかったが、圧力印加時間を増加した昇圧時間 5 分、圧力維持時間 20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 3000 気圧で超高压処理した組織では、殺菌・滅菌効果が確認された。さらに、印加圧力を上げた昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10、20、30 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 30℃の条件において 7000、10000 気圧下で超高压処理した組織においては、培養後の培養液の混濁は見られなかったことから、印加圧力上げることによっても殺菌・滅菌効果が現れることが確認された。これらのことから超高压を用いた滅菌の可能性が確認された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

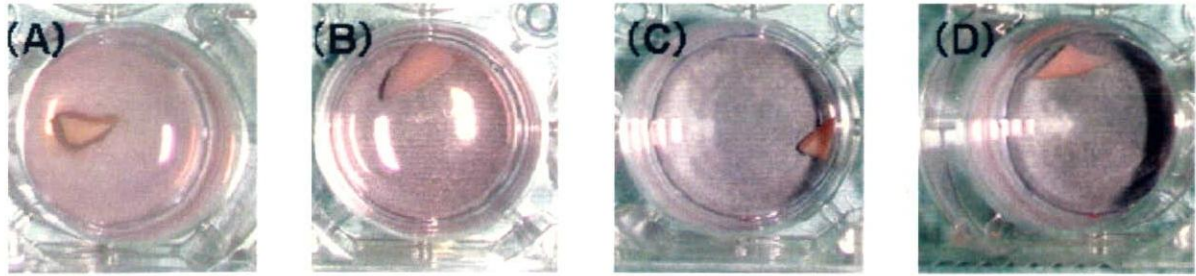


図1. 超高压処理後の細菌培養試験結果

条件 昇圧時間 5 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分 温度 30℃

(A) 1000 気圧での超高压処理 (B) 5000 気圧での超高压処理

(C) 7000 気圧での超高压処理 (D) 10000 気圧での超高压処理

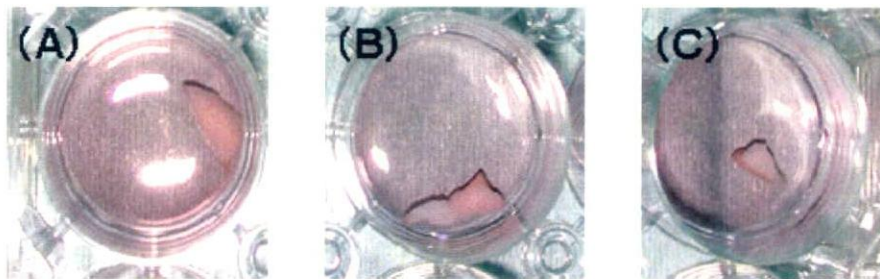


図2. 超高压処理後の細菌培養試験結果

条件 圧力印加 5000 気圧、昇圧時間 5 分、減圧時間 5 分 温度 30℃

(A) 圧力印加時間 10 分 (B) 圧力印加時間 20 分

(C) 圧力印加時間 30 分

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 角膜再生足場材料として、脱細胞化角膜を利用する際の利点としては、人工的に作成することの困難な複雑で精密な微細構造をもつ角膜実質に類似した構造をもつ材料が得られる可能性があることとともに、細胞を組織から排除することにより、免疫拒絶のリスクが非常に低く抑えられるところにある。そこで我々は、超高压印加処理法により作成した脱細胞化角膜の超微細構造を調査した。その結果、超高压印加により作成した脱細胞化角膜は、界面活性剤を用いた脱細胞化角膜よりもコラーゲン線維束の配列構造が正常の角膜に近い構造を保持したまま、脱細胞化が達成できることが明らかとなった。以上の結果から超高压印加処理による脱細胞角膜の角膜再生足場材料としての有用性が高まった。

A. 研究目的

角膜混濁および重度な角膜乱視をきたした患者に対しては、角膜移植術が施される。しかしながら、角膜移植に際しても免疫拒絶による移植物の脱落など課題が残る。その上、角膜移植におけるドナー不足は日本のみならず世界中で問題になっている。それらの問題を解決するべく人工角膜の開発が待ち望まれている。人工角膜としては合成高分子または合成高分子とコラーゲンなどの天然高分子を複合化した材料等から角膜類似構造体を作成する試みがなされている。しかしながら現在までに開発されている人工角膜には、組織と材料の機械強度の相違や完全に材料が透明化しないなどの問題があり、なかなか臨床応用にまでは達していない。

角膜は角膜上皮、ポーマン膜、角膜実質、デスメ膜および角膜内皮の 5 層よりなる透明な組織である。角膜実質は線維の走行角度が異なるコラーゲン線維束が整然と交互に配列し、その線維間に角膜実質細胞が存在する特殊で精密に構築さ

れた組織構造をとっている。この精密な構造と角膜内皮細胞のナトリウム-カリウムポンプによる角膜内の含水圧の調整により角膜は透明性を維持していると考えられており、角膜再生を達成するためにはこの実質部の精密構造を再生することが必要不可欠である。

そこで我々は、正常組織より細胞成分を排除し、得られた細胞外基質成分を再生医療足場材料として用いる脱細胞化法に着目し、角膜再生足場材料としての 1 つのアプローチになりえるのではないかと考えた。この方法の利点は脱細胞化処理による角膜組織の構造変化を軽度抑えることができれば前述したような複雑な構造をもつ角膜実質の細胞外基質が得られ、且つ細胞成分を取り除くことにより免疫拒絶反応のリスクを抑えることができることである。

我々は前年度の報告で我々の行っている超高压印加による脱細胞化角膜は、従来の脱細胞化法である界面活性剤を用いた脱細胞角膜よりも角膜組織からの脱細胞化の達成度、組織のマクロ構

造の保持、力学特性および透明性の回復などが優れていることを示した。本年度では超高压法による脱細胞化角膜の超微細構造変化の程度を確認するために、界面活性剤を用いて脱細胞化させた角膜と比較することにより、高压印加処理法を用いて作成した材料が角膜実質足場材料としてふさわしいものであるかを評価した。

B. 研究方法

東京芝浦臓器株式会社よりブタの眼球を入手し、眼科用メスを用いて角膜輪部に沿って切開し、角膜を切離した。得られた角膜は 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。界面活性剤による脱細胞化法として採取した角膜を 1 % w/v TritonX-100 およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液に 37°C、24 時間振盪浸漬を行った。その後、DEX/PBS による振盪洗浄を 48 時間行った。超高压印加処理による脱細胞化法として、採取した組織を冷間等方加圧装置 Dr. Chef((株)神戸製鋼所)を用いて、10°C または 30°C において 10000 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。

脱細胞化処理した組織およびコントロールとして用いる正常ブタ角膜組織は透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察するために以下の手順でエポキシ樹脂に包埋した。2.5% グルタルアルデヒド・PBS 溶液に 4°C、2 時間浸漬し固定した。その後、PBS にて 4°C、3 回洗浄を施し、1 % 四塩化オスミウム溶液に組織を浸漬し、氷浴中で 2 時間後固定した。後固定終了後、組織を PBS にて 4°C、3 回洗浄した。その後、組織の脱水のために 50、60、70、80、90、95% エタノールに氷浴中でそれぞれ 10 分間、順次浸漬し、100% エタノールに室温で 20 分間、3 回浸漬した。脱水が終了した組

織は、プロピレンオキシドに室温で 20 分間、2 回浸漬、プロピレンオキシドとエポキシ樹脂の等量混合液に室温で 1 時間浸漬、プロピレンオキシドとエポキシ樹脂の混合比が 1 : 3 の溶液をローテーターを用いて転倒攪拌しながら室温で 1 晩浸漬、エポキシ樹脂にローテーターを用いて転倒攪拌しながら室温で 3 時間攪拌し、樹脂を組織内に浸透させた。樹脂浸透が終了した組織は、平板包埋板に移し、エポキシ樹脂を流し込み、真空デシケーター内で脱気を行った後、重合させるために 37°C で 12 時間、45°C で 24 時間、60°C で 48 時間加熱し、エポキシ樹脂に脱細胞化角膜を包埋した。

包埋が終了したサンプルから TEM 観察をするためにウルトラマイクローム (RMC Boeckeler) を用いて厚さ 70nm の超薄切片を作成し、銅グリッドに回収した。切片を回収したグリッドは真空デシケーターにて脱水を行った後、透過型電子顕微鏡 LEO-922 (カールツァイス社製) にて加速電圧 200KV にて観察した。

C. 研究結果

TEM での観察結果は以下のようになった。正常組織においては角膜実質部の特徴であるコラーゲン線維の直径及び走行方向のそろった線維束および紡錘形の角膜実質細胞が観察された (図 1) 界面活性剤である Triton-X 100 を用いて脱細胞化を施した角膜実質部ではコラーゲン線維の直径は均一であったが同一線維束内でのコラーゲン線維の走行方向の乱れおよび細胞残渣のような構造物が確認され、脱細胞化が十分に達成されないままに組織構造が破壊されていた (図 2)。同じく界面活性剤である SDS を用いての脱細胞化では同一線維束内でのコラーゲン線維自体の変性が生じ、且つ細胞残渣の残存が観察された (図 3)。一方の超高压法で脱細胞化を施した角膜実質においては処理時の温度の差異に関わらず、同一線維束内でのコラーゲン線維束の走行方向の乱れは界面活性剤を用いて脱細胞を施した

組織よりも軽度で正常組織に近い組織構造を呈し、且つ細胞残渣のような構造物は観察されなかった(図4、5)。

D. 考察

以上の結果から、超高压処理法による脱細胞化角膜は界面活性剤を用いた脱細胞化よりも組織構造の破壊を抑えながら脱細胞化を成しえることが超微細レベルで証明された。界面活性剤を用いた脱細胞化では、イオン性界面活性剤である SDS を用いた場合も非イオン性界面活性剤を用いた Triton-X を用いた場合でも超微細レベルでのコラーゲン線維束の間隙増大が顕著であった。特に、蛋白質の構造を破壊する SDS を用いた脱細胞化処理では、コラーゲン線維自身の著しい破壊も生じていた。高压印加処理においても蛋白質の変性が報告されているが、著しいコラーゲン線維の破壊およびコラーゲン線維束の間隙増大にはならず、脱細胞化がなされていた。一般的に繊維状蛋白質は球状蛋白質よりも圧力に対する構造変化に耐性があるとされており、本研究で用いた処理条件では角膜実質内のコラーゲン線維の構造に著しい変化を与えないことが判明した。角膜実質層のコラーゲン線維の配列構造は角膜内皮細胞のポンプ機能とともに角膜の透明性に深く関与しており、脱細胞化処理後の角膜内にコラーゲンの配列構造が残存していることは生体内に移植したのちの透明性の回復を容易に達成できることにつながる可能性がある。また、超微細レベルにおいても脱細胞化組織内の細胞残渣が残存していなかったことは超高压法にて作成した脱細胞化角膜は免疫反応を惹起し、移植手術後の移植物脱落などのリスクが低く抑えられる可能性を示している。それゆえに超高压処理法による脱細胞化角膜は人工角膜として臨床応用できる可能性があると考えられる。

E. まとめ

超高压印加処理法を用いて作成した脱細胞化膜

は、脱細胞化処理後も角膜実質の微細構造の破壊があまり起こらず、正常組織に類似した構造を維持していた。このことより、高压印加処理用いた脱細胞が角膜の臨床応用への可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、服部晋也、本田貴子、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成と評価. 第15回生物関連高压研究会20周年記念シンポジウム, 横浜, 2008年7月.

2. 学会発表

1) Kobayashi H. Research activities of biofunctional materials group. Workshop nanomaterials for tissue engineering, Warsaw, Poland, April, 2008

2) Kobayashi H. Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea. 6th NIMS-MPI workshop, Aioi, Japan, May, 2008.

3) Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Novel decellularization technique of the cornea using ultra high hydrostatic pressure. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.

4) Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam K, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A, Honda T, Kobayashi H. Ultra-structure analysis of decellularization of cornea using ultra-high hydrostatical

- pressurization treatment. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
- 5) Kobayashi H, Hattori S, Yoshilawa C, Honda T. Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
 - 6) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、本田貴子、服部晋也、望月學、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫。脱細胞化角膜を用いた眼科用足場材料の研究。第37回医用高分子シンポジウム、東京、2008年7月。
 - 7) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Hattori S, Mochizuki M, Honda T, Fujisato T, Kishida A. Structure evaluation of porcine cornea decellularized by ultra high hydrostatical pressurization. E-MRS, Warsaw, Poland, September, 2008.
 - 8) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月學、服部晋也、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫。角膜再生用スキャホルドの開発と機能評価。第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
 - 9) 服部晋也、木村剛、吉川千晶、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月學、南広祐、藤里俊哉、北村総一郎、岸田晶夫、本田貴子、小林尚俊。脱細胞化処理による角膜実質の微細線維構造の変化に関する研究。第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
 - 10) Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Honda T, Kishida A, Kobayashi H. Structural features of decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressurization method. TERMIS-AP, Taipei, Taiwan, November, 2008.
 - 11) Honda T, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Fujisato T, Hattori S, Kishida A, Kobayashi H. Evaluation of decellularized cornea made by ultra high hydrostatic pressurization method as a scaffold for corneal stroma. TERMIS-AP, Taipei, Taiwan, November, 2008
 - 12) 服部晋也、本田貴子、木村剛、船本誠一、橋本良秀、岸田晶夫、佐々木秀次、望月學、藤里俊哉、吉川千晶、小林尚俊。高圧印加処理を用いた脱細胞化による人工角膜開発の試み。日本バイオマテリアルシンポジウム、東京、2008年11月。
 - 13) 本田貴子、服部晋也、吉川千晶、小林尚俊。ナノファイバーを用いた人工角膜開発の試み。日本バイオマテリアルシンポジウム、東京、2008年11月
 - 14) Kobayashi H. Challenge to develop reliable corneal stroma through tissue engineering approaches. BTEB-2008, India, November, 2008.
 - 15) 服部晋也、木村剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月學、藤里俊哉、本田貴子、岸田晶夫、小林尚俊。高圧印加処理を用いての脱細胞化角膜の構造解析。つくば医工連携フォーラム、つくば、2009年1月
 - 16) 本田貴子、服部晋也、吉川千晶、小林尚俊。

高分子ファイバーを用いた人工角膜開発の
試み、つくば医工連携フォーラム、つくば、
2009年1月

17) 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、
本田貴子、望月学、藤里俊哉、木村剛、小林
尚俊、岸田晶夫、脱細胞化技術を用いた移
植・再生医療用角膜の開発、第8回日本再生
医療学会総会、東京、2009年3月

18) 根岸淳、船本誠一、木村剛、藤里俊哉、樋上
哲哉、岸田晶夫、超高压を利用した脱細胞化
小口径血管グラフトの作製と評価、第8回日
本再生医療学会総会、東京、2009年3月

19) 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、本
田貴子、藤里俊哉、望月学、木村剛、小林尚俊、岸
田晶夫、脱細胞化技術を用いた異種角膜組織
からの移植・再生医療用角膜の開発、第12
回日本異種移植研究会、2009年3月

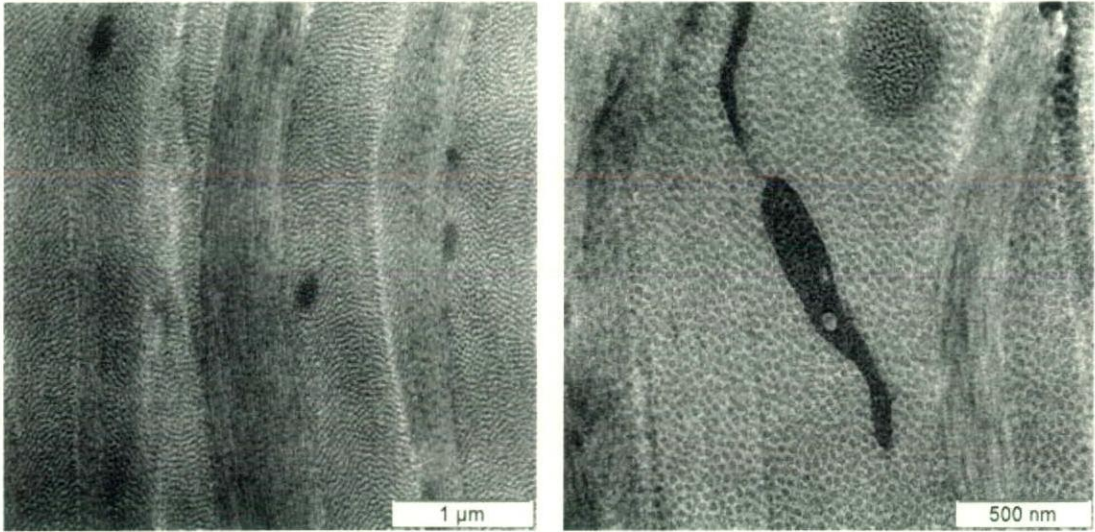


図1. 正常ブタ角膜実質部の TEM 像

同一方向に走行するコラーゲン線維束が交互に直行する特殊で精密な構造をとっており、角膜実質細胞はコラーゲン線維束内に存在する。

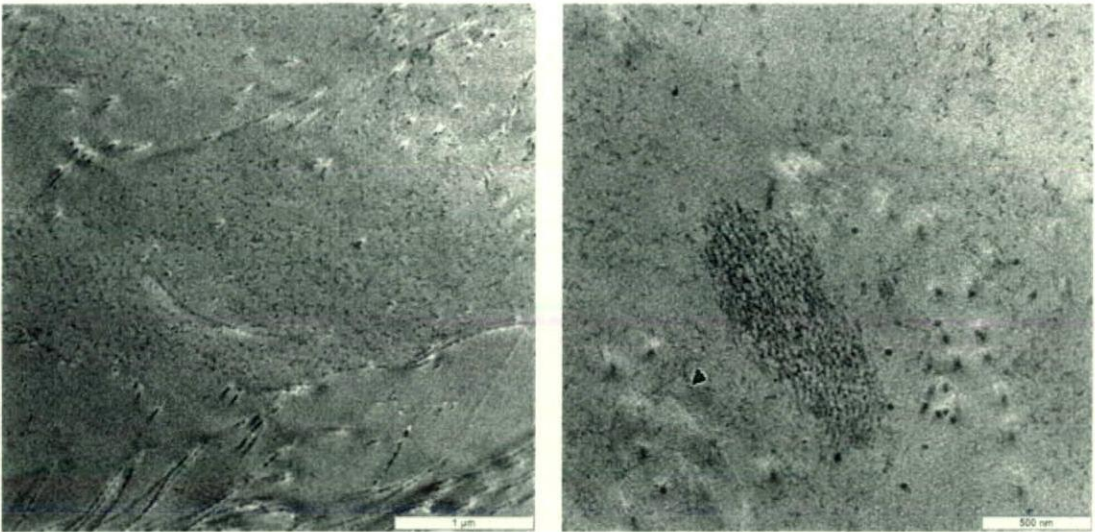


図2. Triton-X 100 による脱細胞化処理を行ったブタ角膜実質の TEM 像

同一コラーゲン線維束内でのコラーゲン線維の間隙が著しく増大している。細胞残渣のような構造物も観察される。

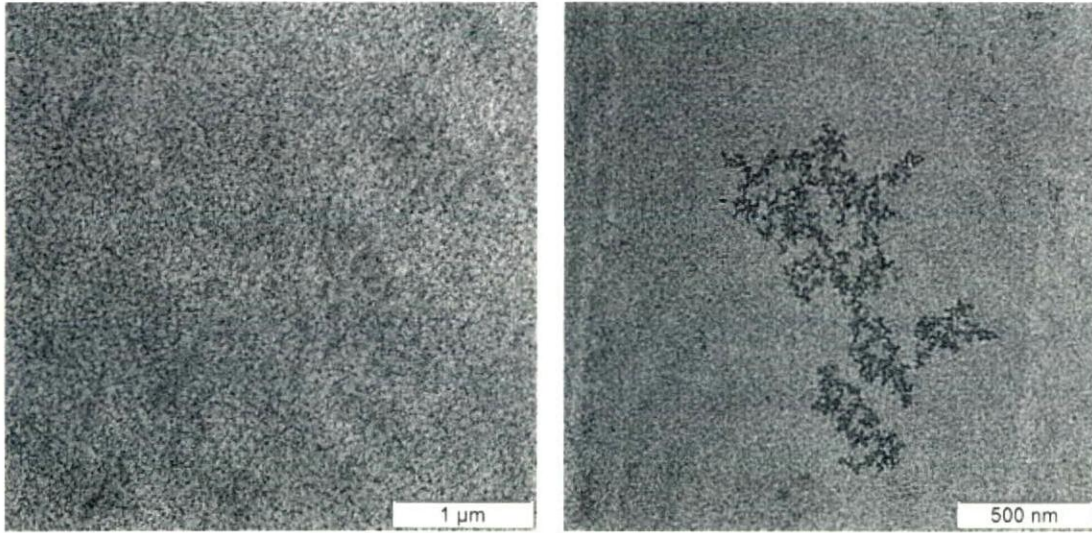


図 3. SDS による脱細胞化処理を行ったブタ角膜実質の TEM 像
 コラーゲン線維束の構造は著しく破壊されている上に、細胞残渣のような構造物が認められる。

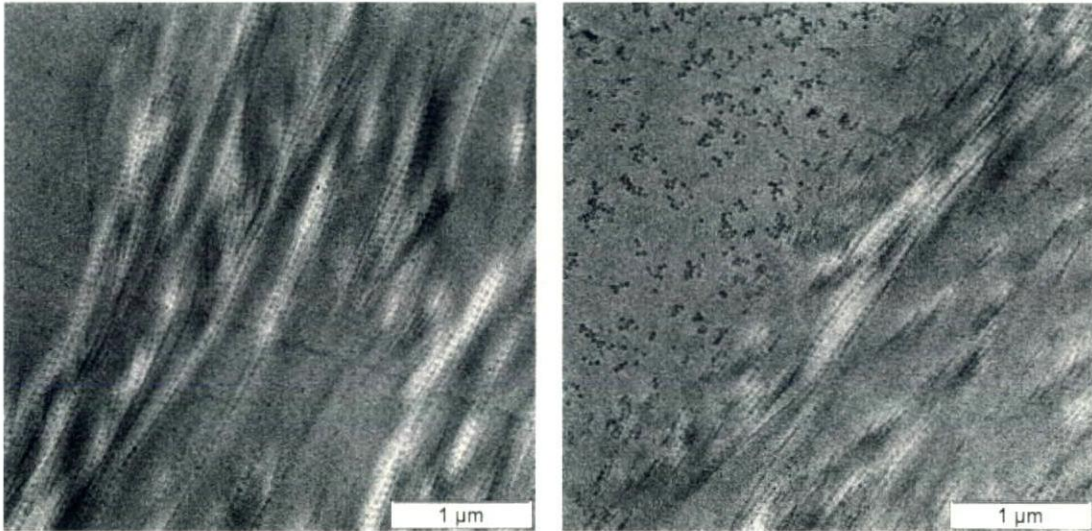


図 4. 10°C、10000 気圧の高圧印加による脱細胞化処理を行ったブタ角膜実質の TEM 像
 コラーゲン線維束内およびコラーゲン線維束間での著しい構造変化は生じておらず、正常ブタ角膜実質に類似した組織構造を呈している。

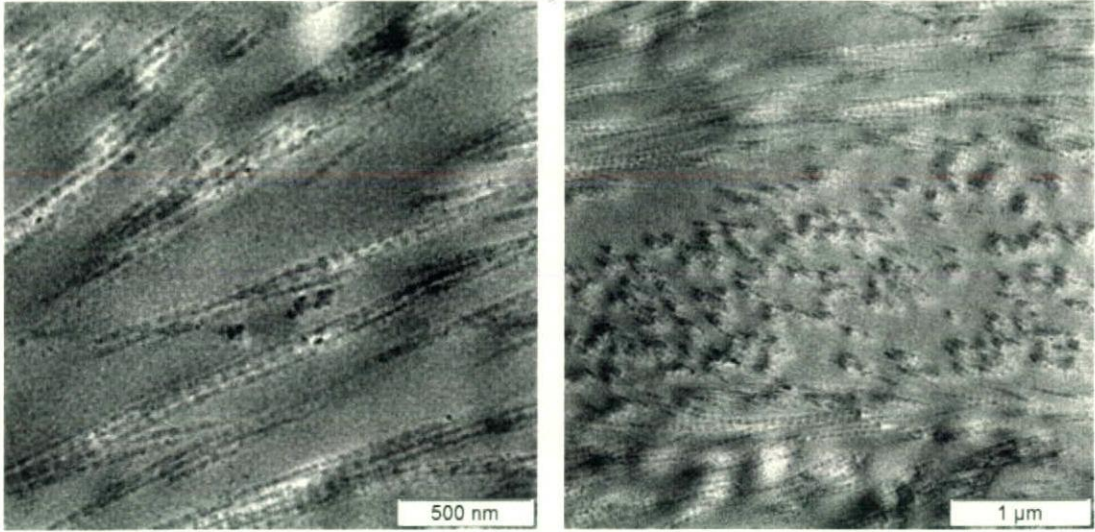


図 5. 30℃、10000 気圧の高圧印加による脱細胞化処理を行ったブタ角膜実質の TEM 像
処理時の温度に依存せず、高圧印加処理による脱細胞化では、正常ブタ角膜類似の組織構造を維持したまま脱細胞が達成されている。

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長・東京医科歯科大学眼科臨床准教授

研究要旨 本研究では、超高压処理法により調製したブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への *in vivo* 異種移植実験を行い、ブタ脱細胞化角膜の人工角膜としての有効性を検討した。異種移植実験では、上皮欠損モデルとしてウサギ角膜の上皮側を直径 2mm の円形で欠損させ、欠損下部にブタ脱細胞化角膜（直径 6mm）を移植した。移植後は、目視観察、蛍光色素を用いた上皮欠損・再生観察、組織染色により評価した。超高压処理により調製した脱細胞化角膜は白濁していたが、移植後には透明性が獲得された。また、炎症反応が認められず、さらに、上皮再生がしめされ、脱細胞化角膜の良好な生体適合性が示された。

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。角膜実質部の再生に関する研究は、コーラゲンゲル・スポンジを用いた研究が大部分を占めており、組織構造、強度などの物性は生体組織に類似せず、臨床応用への応用は困難なものとなっている。このことから、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の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おり、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ている。

昨年度の本研究事業では、超高压処理による脱細胞化角膜の調製を報告した。脱細胞角膜は、超高压処理により白濁したが、浸透圧を調整することで透明化した。生体適合性を検討するため、ウサギ角膜内にポケットを作製し、ブタ脱細胞化角膜を埋入した。経過観察を行ったところ、免疫反応は確認出来ず、また、約 4 週間後には白濁していた脱細胞化角膜の透明化が確認された。今年度