

表1 眼球提供者(ドナー)適応基準

眼球提供者(ドナー)適応基準	
平成12年1月7日(健医発第25号 厚生省健康医療局長発)	
改正平成15年11月12日(健発第1112001号 厚生省健康局長発)	
改正平成22年1月17日(健発0114第2号 厚生省健康局長発)	
1. 眼球提供者(ドナー)となることができる者は、次の疾患又は状態を伴わないこと。	
(1)原因不明の死	
(2)全身性の活動性感染症	
(3)HIV抗体、HTLV-1抗体、HBs抗原、HCV抗体などが陽性	
(4)クロイツフェルト・ヤコブ病及びその疑い、亜急性硬化性全脳炎、進行性多巣性白質脳症などの遅発性ウイルス感染症、活動性ウイルス脳炎、原因不明の脳炎、進行性脳症、ライ(Reye)症候群、原因不明の中中枢神経系疾患	
(5)眼内悪性腫瘍、白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫等の悪性リンパ腫	
2. 次の疾患又は状態を伴う提供者(ドナー)からの眼球的提供があった場合には、移植を行う医師に当該情報を提供すること。	
(1)アルツハイマー病	
(2)屈折矯正手術既往眼	
(3)内眼手術既往眼	
(4)虹彩炎等の内因性眼疾患	
(5)梅毒反応陽性	
付記1	2の(1)のアルツハイマー病については、クロイツフェルト・ヤコブ病と症状が類似していることから、鑑別診断を慎重に行う。
付記2	2の(4)の梅毒反応陽性については、提供者(ドナー)が当該状態であっても、提供された眼球より強角膜移植片が作成された場合であって、かつ、当該移植片が3日以上4℃で保存されたものであるときは、感染力がないことに留意すること。また、その場合は、当該移植片につき当該方法で保存したものである旨を併せて移植を行う医師に情報提供すること。
付記3	全層角膜移植に用いる場合は、角膜内皮細胞数が2000個/mm ² 以上であることが望ましい。
付記4	上記の基準は、適宜見直されること。

いるが、角膜移植ではない。梅毒については、適応基準にあるように強角膜片作成後に3日以上、4℃で保存されたものは、感染力がないと考えられている。このようにB型肝炎以外の病原体では、角膜移植による感染は確認されていないものの、通常の手術時における術前検査基準に準じて血清学的検査を行っている。

その他、Creutzfeldt-Jacob病については、角膜移植による感染例が報告されているが、現時点で有効な検査法がないため、検査対象にはなっていない。また、敗血症などの全身性感染症や眼内悪性腫瘍などは適応基準により除外される。

血清学的検査は、移植可能であるかどうかの

スクリーニング目的で行うものであり、迅速に判定結果が得られる定性的検査を施行する。日本アイバンク協会は株式会社SRLと協議のうえ、表2に示す血清学的検査をセットで実施するよう依頼している。各アイバンクから分離した血清をSRLがセンターに回収し、一括して検査を行っている。当日の夕方回収されれば、翌日(土日、休祝日を除く)の正午ごろに結果が判明する。なお、作製した強角膜片についても、使用に際して微生物学的検査を行うのが望ましい。ドナー作製時におけるドナー表面の擦過物もしくは余剰結膜を微生物学的検査に提出し、感染の有無を確認する。加えて、移植終了時に残存ドナー組織や保存液を採取し、細菌検査に

表2 血清学的検査

疾患	検査法
AIDS(HIV-1, 2 抗体)	PA 法
B 型肝炎(HBs 抗原)	CLEIA 法
C 型肝炎(HCV 抗体)	PA 法
成人 T 細胞白血病 / リンパ腫(HTLV-1 抗体)	PA 法
梅毒	RPR 法, TPHA 法

供することも勧められる。

II. 強角膜片の作製, 検査

ドナー角膜の保存法は全眼球保存と強角膜片保存に分かれるが、現在普及しているのは強角膜片保存である。以前行われていた全眼球保存では、経時的な房水の性状の変化が内皮細胞に影響を与えるため、内皮を健全に維持し得るのはせいぜい2日である。患者の選択や手術準備に要する時間、また微生物学的検査に要する期間を考慮に入れると現実的な保存方法ではない。現在では、房水の死後変化の影響を無視できる強角膜片保存が一般的である。本稿では、強角膜片保存につき述べる。

① 細隙灯顕微鏡による観察

摘出した眼球から強角膜片を作製する際に、手持ち細隙灯顕微鏡を用いて前眼部の状態を観察する。日常診療と同様に角膜では上皮びらんや実質混濁(老人環, 癍痕, 浮腫など), 血管侵入, デスメ膜皺襞, 滴状角膜, 角膜後面沈着物などの有無を観察する。角膜実質に混濁がある場合, 角膜中央の clear zone を計測しておく。加えて, 虹彩切除や切開の有無, 虹彩後癒着, また水晶体の状態(白内障手術既往)を観察する。観察した検眼鏡所見を記録し, 内皮スペキュラーの結果から移植の可否および適応(全層もしくは表層移植)について決定する。

② 強角膜片の作製

以下の手順に沿って強角膜片を作製する。操

作はすべてクリーンベンチ内にて行う。

①クリーンベンチに滅菌した有鉤鑷子(2本), デスポメス, 眼科用剪刀, キャリパー, 抗菌薬点眼, 保存液(Optisol™-GS), 滅菌シャーレを準備する。

②摘出された全眼球をシャーレ上に静置し, 前項の手順に沿って細隙灯顕微鏡にて観察する。角膜が乾燥しないよう適宜抗菌薬を点眼する。

③移植時の人工前房への設置を考慮し, 強角膜片の直径が15mm以上になるようキャリパーでマーキングし, メスにて強膜切開を行い, 作製した切開創から全周性に強膜全層切開を行う。

④切離された強角膜片から虹彩脈絡膜をゆっくり剥離する。この際, 粗雑に操作を行うと角膜内皮細胞が剥離, 損傷する危険があるため, 慎重に行う。眼内レンズ挿入眼では癒着している場合があり, 剥離の際に注意を払う必要がある。

⑤強角膜片を保存液中に入れ4℃で保存する。内皮スペキュラーによる観察のため, 強角膜片の内皮面を保存液瓶の底面側になるように静置する(図1, 2)。

③ 強角膜片の内皮細胞検査

スペキュラーマイクロスコープを用いた内皮細胞数測定は, ドナー角膜の組織学的な質を評価するうえで必須の検査である。強角膜片における角膜内皮細胞検査には, 臨床用のスペキュラーと異なる専用のスペキュラーマイクロスコープが必要である。観察用チャンバーとしては Viewing Chamber®(Chiron社)がある。保存液瓶に専用のアダプターを設置して観察する

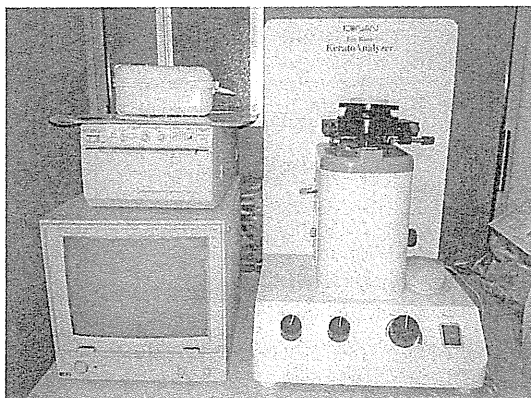


図1 ドナー角膜用スペキュラーマイクロスコープ



図2 ドナー角膜を保存した保存液瓶

ことも可能である。

観察を行う際には、4℃では観察が困難なため、あらかじめ強角膜片を20～30分室温に静置した後に観察する。内皮細胞が観察できる部位は限られているため、観察可能な場所を探す必要がある。内皮細胞が観察できる場所で細胞を40～50個プロットすることにより、自動的に内皮密度が計算される。異なる3～4カ所で観察を行い、内皮密度数を測定する。

III. ドナー角膜の保存

前述のように、現在では強角膜保存法が主流である。本法には4℃での強角膜保存とさらに保存期間が長い室温～34℃での強角膜器官培養法があり、前者は本邦や米国、後者はヨーロッパの一部の地域で行われている。器官培養法では施設投資や保存中の角膜厚の増大、感染例の増加などが問題として挙げられている。本稿では4℃での強角膜保存について述べる。

強角膜保存液は、内皮細胞に適した環境を組織培養液により与え、膠質を加えて角膜の膨潤を阻止するという発想で開発されてきた。1974年に、M-K medium®(Chiron)と呼ばれる、組織培養液であるTC-199に5%デキストランを

加えた保存液が開発された。その後、TC-199に2.5%コンドロイチン硫酸を加えたK-Sol®やMEMをベースとして1.35%コンドロイチン硫酸と1%デキストランを含むDexSol®が開発された。現在、最も使用されている保存液はOptisol™-GSである。これはK-Sol®とDexSol®の利点を組み合わせた保存液であり、抗生剤としてゲンタマイシンとストレプトマイシンを含む。

強角膜片は、角膜実質中のグリコサミノグリカンの吸水性により、電解質のみの保存液中では膨潤し、透明性を失っていく。これは4℃の保存条件では角膜内皮のポンプ機能が低下することとも関係している。Optisol™-GSに含まれるデキストランやコンドロイチン硫酸などの膠質は高浸透圧を生じさせる高分子化合物であるため、長時間にわたって実質の吸水を制御できる。実際、Optisol™-GSで強角膜片を保存した場合、2週間の保存においても、内皮細胞の健全性および角膜の透明性が保たれている。

おわりに

水疱性角膜症をはじめとする角膜疾患では、角膜移植が唯一の治療方法であるが、本邦にお


ける待機患者数は 2,600 人以上 (2009 年度) と、ドナー不足が大きな課題である。このような現状において、限られたドナー角膜の最大限有効な活用と手術成績の向上をはかるため、ドナーの検査法および保存法についてさらなる研究、開発を続けていくことが重要である。

文献

- 1) 横井則彦：強角膜片保存. あたらしい眼科 12：1693-1699, 1985
- 2) 澤 充：アイバンクドナー角膜の検査の実際. 眼科手術 11：413-418, 1998


*

*



アツザワ義眼

国産義眼の元祖
我が国最古の歴史
「手仕事の名人」に選



<新刊>

義眼の事典 完成!!

著者：厚沢弘陳・厚沢正幸

● 突然の『義眼』症例にも即時対応

● 『義眼』のことならなんでも分かる

● 巻末に『義眼Q&A』50問掲載

● 便利な索引付きで、内容も充実

● 『義眼』の百科事典完成!

定価 1,200円

外来に常備されると便利です

株式会社 **アツザワ・プロテーゼ**

URL http://www.medweb.ne.jp/atsuzawa_prosthesis

E-mail atsuzawa-p@medweb.ne.jp

<p>(本社) 東京 〒 113-0033 東京都文京区本郷4-2-1</p> <p>北海道 〒 060-0042 札幌市中央区大通西11-4</p> <p>仙台 〒 981-3212 仙台市泉区长命ヶ丘3-28-1</p> <p>横浜 〒 231-0064 横浜市中区野毛2-101</p> <p>静岡 〒 420-0033 静岡市葵区昭和町3-1</p> <p>名古屋 〒 460-0008 名古屋市中区栄2-1-12</p> <p>大阪 〒 532-0011 大阪市淀川区西中島5-1-4</p> <p>岡山 〒 700-0901 岡山市北区本町2-4</p> <p>広島 〒 732-0807 広島市南区荒神町5-5</p> <p>九州 〒 812-0011 福岡市博多区博多駅前4-31-1</p>	<p>芙蓉堂第2ビル6F (本郷三丁目交差点角)</p> <p>半田ビル4F (地下鉄11丁目駅前)</p> <p>(株)トラストメディカル内</p> <p>ネオキャッスル野毛4F</p> <p>静岡昭和町ビル9F</p> <p>ダイヤパレス伏見11F</p> <p>栄豊建設興業ビル7F</p> <p>若林ビル1F 光めがね内</p> <p>ライプタウン荒神町703号</p> <p>グランピア博多駅前3F</p>	<p>フリーダイヤル 0120-606-039</p> <p>TEL. 011(271)3591</p> <p>フリーダイヤル 0120-606-039</p> <p>TEL. 045(243)0322</p> <p>TEL. 054(273)3632</p> <p>TEL. 052(201)8692</p> <p>フリーダイヤル 0120-140-296</p> <p>フリーダイヤル 0120-140-296</p> <p>フリーダイヤル 0120-140-296</p> <p>TEL. 092(475)5621</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DSAEK のドナー挿入法

相馬剛至* 西田幸二*

DSAEK における内皮グラフト挿入法は大きく3つに分けられる。最初に報告されたのがドナーを2つに折り曲げて前房内に挿入する2つ折り法であるが、内皮損傷が大きいのが問題である。現在、主流になっているのが引き込み法であり、創口の対側のサイドポートから挿入した鑷子を用いて、内皮グラフトを前房内に引き込む。2つ折り法と比較して、内皮損傷が少なく、前房深度が浅い症例でも挿入が容易になったが、挿入時の前房許諾が課題である。近年、開発が進んでいるのがドナー角膜を装填したインジェクターによって挿入するインジェクター法である。今後、より安全で内皮損傷の少ない挿入法の開発が期待される。

はじめに

角膜内皮移植術を大きく2つの手技に分けると、レシピエント角膜の準備とグラフトの挿入に分かれる。レシピエントの準備については、初期の近代内皮移植である PLK (posterior lamellar keratoplasty)¹⁾ では宿主角膜実質後部の除去が必要であり、技術的な課題であったが、その後術式の改良が進められ、現在主流である DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty)²⁾ ではホストの Descemet 膜を除去するのみと技術的ハードルが大きく下げられた。一方、ドナー角膜の挿入については、強角膜創もしくは角膜創という狭い創口から接触や伸展により容易に損傷を受ける角膜内皮層を挿入するため、簡便な手技でいかに内皮層へのダメージを少なくするかを課題に開発、改良が進められてきた。

DSAEK に対するグラフト挿入方法は大きく3つに分かれる。最初に報告されたのがドナーを2つに折り曲げて前房内に挿入する2つ折り法。次に、創口の対側のサイドポートから挿入した鑷子を用いて、内皮グラフトを前房内に引き込む「引き込み法」。3つめが、ドナー角膜を装填したインジェクターによって挿入するインジェクター法である。本稿では、これらの3方法を中心に、DSAEK のドナー挿入法の現状と今後の展望について説明する。



図1 2つ折り法

I 2つ折り法

ドナー角膜の内皮面に粘弾性物質をのせ、内皮面を内側に2つ折りにし(“taco fold”), 中央を鑷子で把持した状態で、foldable 眼内レンズ挿入の要領で創口から挿入する方法である(図1)。2つ折りと把持による物理的内皮損傷が大きく³⁾、加えてアジア人などの前房深度が浅い症例では挿入が困難な場合が多く、挿入できた場合でも内皮層へのダメージが大きな問題となる。

II 引き込み法

現在、主流となっている挿入法である。創口の対側のサイドポートから挿入した鑷子を用いて、内皮グラフト

* Takeshi Soma & Koji Nishida : 大阪大学大学院医学系研究科眼科学講座
 [別刷請求先] 相馬剛至 : 〒565-0871 吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院医学系研究科眼科学講座
 e-mail : soma@ophthal.med.osaka-u.ac.jp

■いずれの挿入法においても、グラフトが完全に挿入されていない状態で前房灌流を再開すると、創口よりグラフトが脱出するので注意が必要である。

■引き込み法では、挿入時の前房虚脱がグラフトの内皮損傷、挿入不全の原因となる。

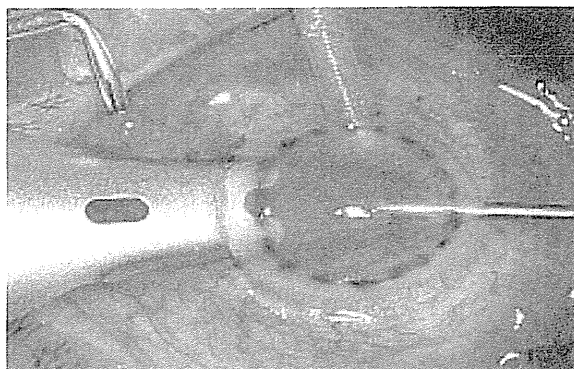


図2 引き込み法

を前房内に引き込む方法である(図2)。引き込み法専用の器具(Busin グライド, モリア社)が開発されている(図3)。以下, Busin グライドを用いた方法を説明する。Busin グライドに眼内灌流液を数滴滴下して滑りを良くした後に, 作製した角膜内皮ドナーをグライドの体部にのせ, 内皮保護の目的で内皮面を高粘弾性物質(ビスコート®)で覆う。Busin グライド開口部から挿入した引き込み鑷子でドナーのエッジをつまみ, グライド先端部にまで位置をずらして, 内皮ドナーの装填を完成させる。このとき, グラフトがわずかにグライド先端より突出していることを確認する。次に顕微鏡を術野に移動させ, 引き込み鑷子を鼻側角膜ポートより挿入して, 反転したBusin グライド(ドナー内皮面は下向き)からわずかに突出するドナー内皮の端をつまんで, Busin グライドと平行移動させながら, 前房内にBusin グライド先端部を挿入する。この際, 前房灌流をいったんoffにする。その後ドナー内皮をゆっくりと前房内に引き込みながら挿入する。なお, Busin グライドの単独使用では角膜創からの虹彩および硝子体脱出のリスクがあるため, 眼内レンズグライド(アルコン社)を併用するダブルグライドテクニックが報告されている⁴⁾。また, このほか Tan エンドグライド(Network Medical 社)などが引き込み法専用器具として開発されている(図4)。

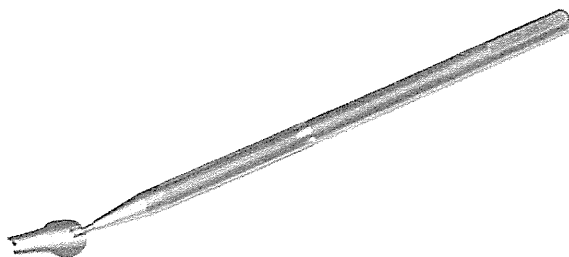


図3 Busin グライド

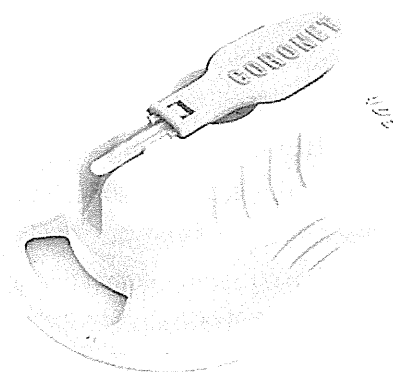


図4 Tan エンドグライド

本法に伴う内皮損傷については, 人工前房への挿入実験の結果, 2つ折り法では平均32%であったのが, Busin グライドによる引き込み法では平均9%であり, 大幅に内皮層へのダメージが軽減されると報告されている³⁾。

III インジェクター法

内皮グラフトをインジェクター内に装填して, インジェクター先端を前房内に設置しグラフトを挿入する方法である。現在, 種々のインジェクターが相次いで開発されているが(図5~7), 前房スペースで内皮グラフトの保持シートを開く操作が必要であったり, 保持シートから内皮グラフトが離れ難いなどまだまだ課題が多いのが現状である。内皮障害が少なくより簡便, 安全な器具の開発が望まれる。

■インジェクターは、グラフト挿入時の安定した前房保持に有利なデバイスである。

■グラフトを押し出すのみで挿入できるインジェクターであれば、グラフトへの機械的ストレスは軽減されるであろう。



図5 Neusidl Corneal Inserter (Fischer Surgical 社)

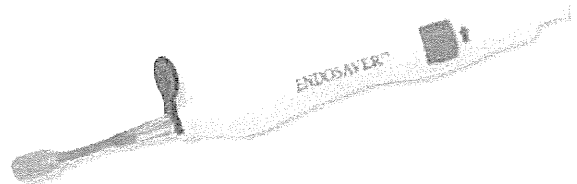


図6 Neusidl Corneal Inserter (Fischer Surgical 社)

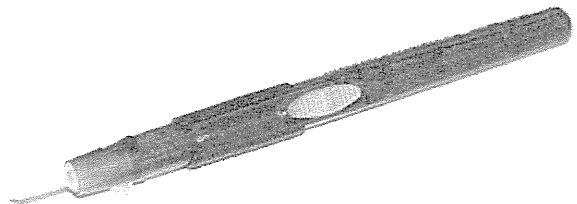


図7 Endoinjector (KeraMed 社)

おわりに

DSAEK は、PKP (penetrating keratoplasty) と比較して合併症が少なく、乱視が少ないことで良好な視力が得られるため、水疱性角膜症に対する治療法の第一選択となりつつある術式である。DSAEK の克服すべき課題は早期からの内皮細胞減少であるが、これはグラフト挿入時の内皮損傷によるところが大きい。今後、より安全かつ簡便で内皮へのダメージが少ない挿入法が開発されることが、さらなる DSAEK の普及に重要であると考えられる。

【文 献】

- 1) Melles GR, Eggink FA, Lander F, et al : A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea*, **17** : 618-626, 1988
- 2) Gorovoy MS : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*, **25** : 886-889, 2006
- 3) Mehta JS, Por YM, Poh R, et al : Comparison of donor insertion techniques for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol*, **126** : 1383-1388, 2008
- 4) Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K : Descemet stripping with automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathies secondary to argon laser iridotomy : preliminary results and usefulness of double-glide donor insertion technique. *Cornea*, **27**(Suppl 1) : S62-S69, 2008

上皮幹細胞

Epithelial stem cell

林 竜平

大阪大学大学院医学系研究科
脳神経感覚器外科学（眼科学）



林 竜平（はやし りゅうへい）
2000年神戸大学農学部生物機能化学科卒業。'02年神戸大学大学院自然科学研究科修了。'02年より民間企業研究所勤務を経て、'09年東北大学にて医学博士取得、同年東北大学大学院医学系研究科助教。'10年より大阪大学大学院医学系研究科助教として勤務。研究テーマ：上皮幹細胞の維持機構の解明、角膜再生医療研究

■ Abstract ■

上皮組織は体表や内臓など至るところに存在しており、その機能・形態・発生は各組織で大きく異なっている。一方、これらの上皮組織においてはその組織再生を担っている幹細胞や前駆細胞が存在しているが、それら未分化状態にある上皮細胞の性質については少なからず共通点も認められる。上皮組織の幹細胞や前駆細胞は古くより研究されている分野の一つであり、特に表皮分野における上皮幹細胞・前駆細胞を用いた細胞治療法は、現在の再生医療のさきがけとなり、他の上皮組織をはじめ様々な臓器の再生治療法の開発へ多大な影響を与えた。本項においては、前半では、上皮組織と各組織に存在している幹細胞や前駆細胞の性質や局在について、後半には、それら上皮幹細胞・前駆細胞を用いた再生医療研究について述べる。

■ 上皮組織と上皮幹細胞

上皮組織の分類としては、大きく重層上皮と単層上皮に分別され、さらにそれらを形態的特徴から扁平上皮、円柱上皮、立方上皮と分類される（表）。また、単層円柱上皮では繊毛の有無や、重層上皮では角化上皮、粘膜（非角化）上皮などに分類されることがある。これらの上皮組織では組織ごとにそれぞれ異なるケラチン発現パターンを示し、単層上皮ではケラチン8、18、19、重層上皮ではケラチン5、14を主に発現している。重層上皮においても基底部ではK15、19などを発現しており、また表皮ではK1、10、角膜

Key Words: 上皮, 幹細胞・前駆細胞, 表皮, 角膜上皮, 再生医療

上皮ではK3、12などの組織特異的なケラチン発現を示す。上皮組織は発生的起源も様々であり、表皮、口腔粘膜上皮、角膜上皮などの体表を覆っている重層上皮細胞は表面外胚葉、眼内に存在する網膜色素上皮は神経外胚葉、腸管上皮や気道上皮など消化管や呼吸器に存在する単層円柱上皮の大部分は内胚葉に由来している。

骨髄や神経などに造血幹細胞や神経幹細胞が存在するように、上皮組織にも各組織の修復を担う幹細胞・前駆細胞が存在している。上皮組織に存在する幹細胞（組織幹細胞）自体は細胞分裂の緩やかなslow-cycling cellと考えられているが、それらがさらに分化することでより激しく分裂するtransient amplifying (TA) 細胞を生じ、このTA細胞が組織への細胞供給を担っている。さらに、TA細胞が分化・成熟し、機能を有した種々の細胞群を作り出すことにより組織の恒常性・機能が維持されると考えられている。上皮系組織の中においても、表皮、腸管上皮、角膜輪部上皮などは幹細胞の局在や性質に関して数多くの研究がなされており、幹細胞研究のモデルとして幅広く利用されている。

表皮は表層細胞が脱核し、角質化する角化扁平

■Ryuhei Hayashi
Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

表 上皮組織の分類, 発生およびケラチン発現

単層・重層	形態	その他の分類	代表的な上皮組織	発生	ケラチン発現
単層	扁平		中皮、血管内皮	中胚葉	
	円柱		腸管上皮 胃粘膜上皮	内胚葉 内胚葉	K8, 18, 19 K8, 18, 19
	立方		網膜色素上皮	神経外胚葉	K8, 18
多列 (単層細胞で 隣接とも)	円柱	絨毛 絨毛 -	鼻腔上皮 気道上皮 精巣上体管	外胚葉 内胚葉 中胚葉	
重層	扁平上皮	角化 非角化 非角化	表皮 角膜上皮・輪部上皮 口腔粘膜上皮	表面外胚葉 表面外胚葉 表面外胚葉	K1, 5, 10, 14 (K15, 19)* K3, 5, 12, 14 (K15, 19)* K4, 5, 13, 14 (K15)*
	円柱上皮		尿道上皮 (一部) 結膜上皮	内胚葉 表面外胚葉	K4, 5, 13, 14
	立方上皮		典型例なし	-	(*括弧内は基底部)

重層上皮である。マウスの表皮幹細胞は毛包のバルジ(bulge)と呼ばれる特異的な領域に存在していることが知られている。バルジに存在する幹細胞は細胞分裂の緩やかなslow-cycling cellであることや、高いコロニー形成能(自己複製能)、また、表皮以外の皮膚付属器官である毛包、皮脂腺、汗腺などへ分化可能な多能性幹細胞であると考えられている¹。ヒトの場合は、表皮幹細胞(前駆細胞)は表皮層内にも存在しているが、マウスと同様にバルジに存在する幹細胞からも表皮細胞が供給されると考えられている。腸管上皮は表皮とは異なり単層の円柱上皮である。腸管の構造は絨毛と陰窩に大きく分けられており、腸管上皮の幹細胞は陰窩の底部に存在していると考えられている。腸管上皮幹細胞は表皮幹細胞と同様に細胞分裂が緩やかなslow-cycling cellで、陰窩から絨毛へ向かって、腸管を構成する種々の細胞群(パネート細胞、杯細胞、腸管上皮内分泌細胞、絨毛細胞)へ分化する能力を有している²。

一方、角膜上皮は表皮と同様に表面外胚葉由来する扁平重層上皮であるが、表層細胞の角化を伴わない非角化扁平重層上皮である。角膜上皮の幹細胞・前駆細胞は、前述した表皮幹細胞や腸管上皮幹細胞と同様に、明確に幹細胞と分化細胞の局在が分かれていることから、幹細胞研究モデルとして古くから利用されている。

■角膜上皮幹細胞・前駆細胞

角膜は角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の3層からなる透明な無血管組織である(図1a)。角膜上皮は角膜の最表層に存在し、タイトジャンクション形成やムチン産生により外界とのバリア機能を担っている。角膜上皮の幹細胞・前駆細胞は、角膜と結

膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1b)。角膜上皮幹細胞・前駆細胞は、未分化マーカー(p63, ケラチン15, integrin α_6 など)を発現し、角膜上皮型分化マーカー(ケラチン3, 12)を発現しておらず、また、他の上皮幹細胞と同様に細胞分裂が緩やかなslow-cycling cellであるなどの性質を有している³⁻⁵⁾。角膜上皮幹細胞は、他の上皮幹細胞と同様に、それらの分裂により生じたTA細胞が角膜中央部に遊走し、さらに分化した角膜上皮細胞を供給していると考えられている。角膜上皮幹細胞・前駆細胞は個体の一生を通じて輪部に局在し、角膜上皮を供給し続けていると考えられることから、幹細胞を長期間維持するための微細環境、すなわち「幹細胞ニッチ」の存在が示唆されている。

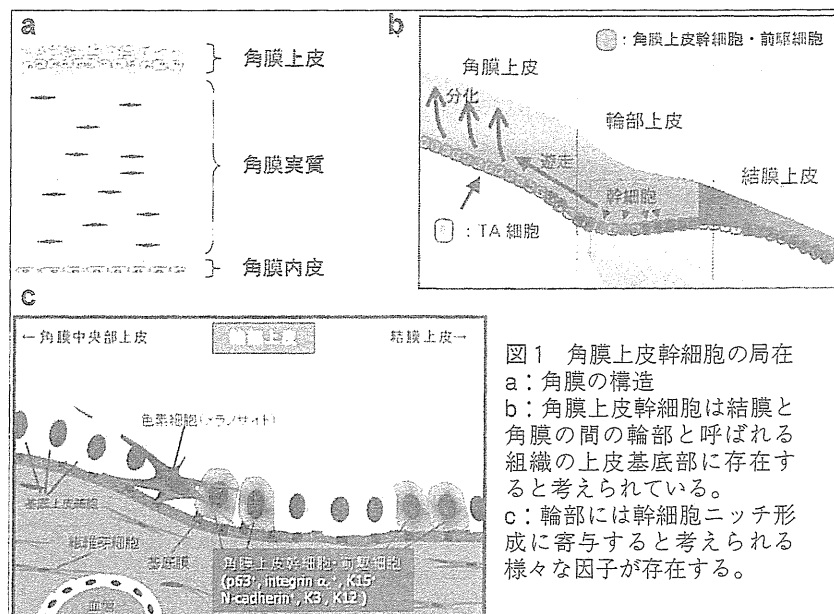


図1 角膜上皮幹細胞の局在
a: 角膜の構造
b: 角膜上皮幹細胞は結膜と角膜の間の輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている。
c: 輪部には幹細胞ニッチ形成に寄与すると考えられる様々な因子が存在する。

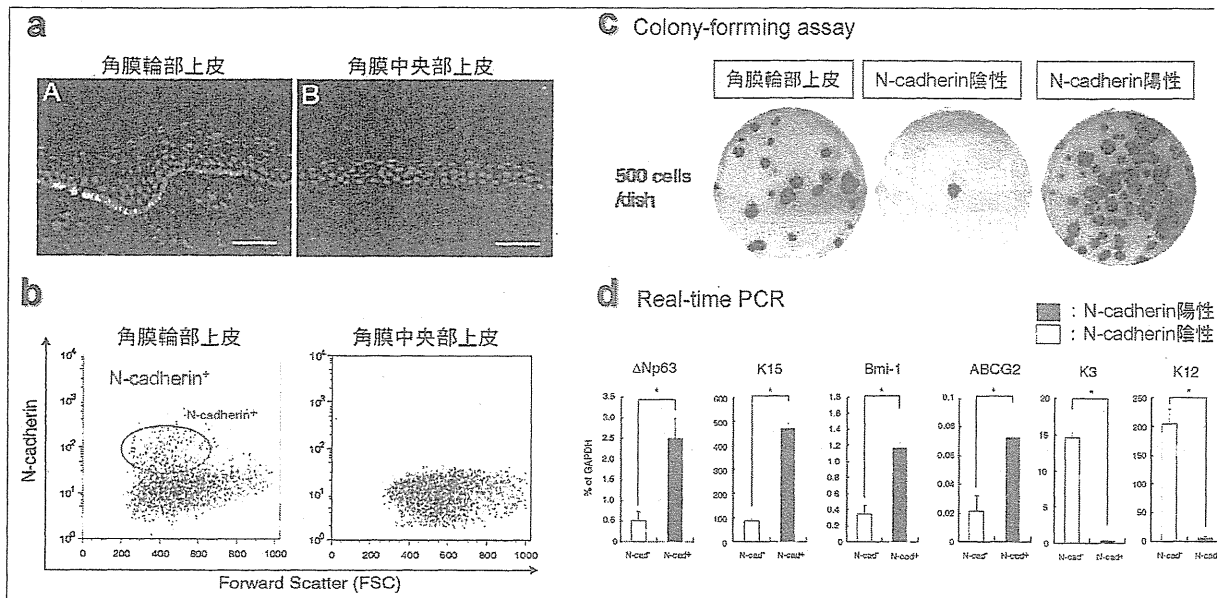


図2 角膜上皮幹細胞・前駆細胞の性質

a: N-cadherinは幹細胞の局在している輪部上皮の基底部にのみ散発的に存在していた。b: FACSによるN-cadherin発現解析の結果、免疫染色同様に輪部上皮にのみ、比較的細胞サイズの小さいN-cadherin陽性細胞が認められた。c: FACSにより単離したN-cadherin陽性細胞は高いコロニー形成能を示した。d: N-cadherin陽性細胞は、上皮幹細胞マーカーを高発現している一方で、角膜上皮型ケラチンのK3, 12を発現していなかった。

組織幹細胞のニッチを形成する因子として、基底膜、血管由来因子、細胞間接着分子、間質細胞などの因子の関与が考えられているが、輪部においてもこれらの因子が存在している (図1c)。

我々はその中でも細胞間接着分子に着目し、検討を行ってきたが、角膜上皮幹細胞が存在する輪部上皮基底部においては細胞間接着分子のN-cadherin発現が散発的に認められ、一方、幹細胞の存在しない角膜中央部ではN-cadherin発現が全く認められないことを見出した⁵⁾ (図2a)。FACSにより単離したN-cadherin陽性細胞は、未分化上皮細胞に特徴的な高いコロニー形成能および幹細胞マーカー発現、低い分化マーカー発現が認められたことから、角膜上皮幹細胞・前駆細胞を含む細胞集団であると考えられる (図2b-d)。N-cadherinは角膜上皮幹細胞・前駆細胞の特異的細胞表面マーカーとして有用であると同時に、幹細胞ニッチにおける細胞接着機構の関与が示唆される。

■ 上皮幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法

上皮組織の再生医療は、1975年に米国ハーバード大学医学部のGreenらが、ヒトの表皮細胞を培養

し増幅させる技術を開発したことにより、大きく前進した。彼らは表皮幹細胞・前駆細胞を特殊な細胞株 (3T3-J2細胞) と共培養することにより、効率よく増幅可能であることを見出した⁶⁾。さらに、培養した表皮幹細胞・前駆細胞は、*in vivo*組織と同様に重層上皮を形成し、*in vitro*で表皮組織を再構築することが可能であった。Greenらはこの技術を用いて、1984年には米国の重症熱傷患者に対して、僅かに残った正常皮膚の表皮幹細胞・前駆細胞より作製した培養表皮を作製し、移植に成功した。

本技術は他の重層上皮組織への応用も進められ、1997年にPellegriniらにより患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた培養角膜上皮移植法が報告された⁷⁾。彼女らは片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、患者の健常眼より輪部に存在する角膜上皮幹細胞・前駆細胞を少量採取し、培養皿上で培養した後に疾患眼へ移植した。本手法では、患者自身の幹細胞を補充することが可能となり、片眼性角膜上皮疾患に対する治療法として有効であることが示された⁸⁾。

一方、両眼性の疾患に対しては細胞源が無いために、自家の再生治療法の実施が出来なかった。

この問題を解決するために、我々は、角膜上皮と同様の非角化扁平重層上皮の1つである口腔粘膜上皮に着目し、その上皮幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法の開発に取り組んできた。口腔粘膜上皮組織は、重層扁平上皮であるが、表皮のように角化を伴わず、比較的透明性も高い。口腔粘膜上皮の幹細胞・前駆細胞の局在について正確には知られていないが、我々は、口腔粘膜上皮においても上皮層の基底部に角膜上皮と同様にケラチン15、p63などの未分化細胞マーカーを発現し、コロニー形成能を有する細胞が存在することを確認した(図3a)。

そこで口腔粘膜より少量の組織を採取し、上皮組織の再構築を試みたところ、表皮や角膜上皮と同様に4-5層に重層化した培養口腔粘膜上皮を*in vitro*で作製することに成功した。口腔粘膜上皮前駆細胞・幹細胞より再構築した上皮層の基底部に*in vivo*口腔粘膜上皮と同様に未分化細胞が保持され、また、*in vivo*口腔粘膜では発現せず、眼表面で特異的に発現している膜結合型ムチンMUC16が発現していた(図3b)。

一方、培養角膜上皮および培養口腔粘膜上皮はいずれも重層上皮型ケラチンのK14を発現し、角化上皮型ケラチンのK1を発現していなかった。これらの知見に基づき、これまでに多数の施設において、培養口腔粘膜上皮シートを用いた角膜上皮疾患に対する再生治療法が既に実施されており、良好な成績が報告されている^{9, 10)}。培養口腔粘膜上皮細胞は角膜上皮細胞とは完全に同一の性質を有しているわけではないが、培養や移植後環境により一部では角膜上皮と近い性質を示しており、機能的に補完しうると考えられた。

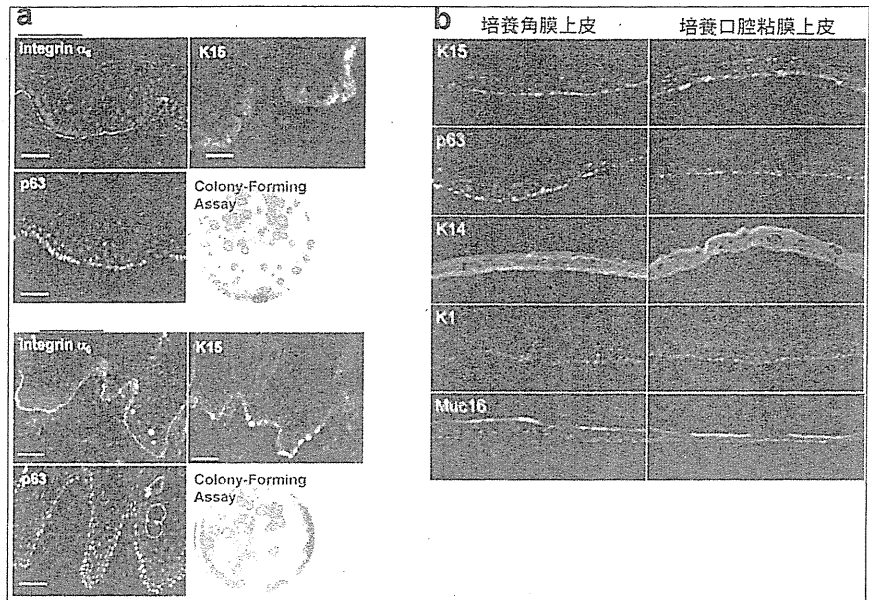


図3 口腔粘膜上皮の幹細胞・前駆細胞

a: 上皮幹細胞が存在している角膜輪部上皮基底層と同様に、口腔粘膜上皮の基底層にはK15、p63などの上皮幹細胞マーカーを発現する細胞が局在している。口腔粘膜上皮より単離した細胞中にも、角膜輪部上皮と同様にコロニー形成可能な未分化上皮細胞が含まれていた。b: 角膜輪部および口腔粘膜上皮より単離した上皮幹細胞・前駆細胞を用いて作製した培養上皮細胞シートの免疫染色像を示す。両培養上皮細胞シートの基底層にはケラチン15やp63陽性の未分化上皮細胞が保持されており、表皮マーカーのケラチン1を発現していなかった。また、眼表面に特異的な膜結合型ムチンのMUC16は両培養上皮細胞シートの表層部に発現していた。

長期的な移植細胞の生着には、より質のいい幹細胞を用いることが重要であるが、培養後さらには移植後にどの程度の幹細胞機能が保持されているかについて、不明な部分が多く、まだ検討の余地が残されている。上皮幹細胞の維持機構の詳細な理解がこれらの再生医療研究の課題解決には必須であると考えている。今後、再生医療を発展させていくためには、さらに基礎研究を積み重ねていくことが重要である。

文 献

- 1) Cotsarelis G, Sun TT. Cell. 1990 Jun 29; 61(7): 1329-37.
- 2) Winton, D. J. & Ponder, B. A. Proc. Biol. Sci. 241, 13-18.
- 3) Schermer A, Galvin S, Sun TT. J Cell Biol 1986, 103: 49-62.
- 4) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Cell 1989, 57: 201-209.
- 5) Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, et al. Stem Cells. 2007 Feb; 25(2): 289-96.
- 6) Rheinwald JG, Green H. Cell. 1975 Nov; 6(3): 331-43.
- 7) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Lancet 1997, 349: 990-993.
- 8) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Ophthalmology 2001, 108: 1569-1574.
- 9) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. N Engl J Med 2004, 351: 1187-1196.
- 10) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Br J Ophthalmol. 2004 Oct; 88(10): 1280-4.

幹細胞を用いた角膜再生医療

林 竜平, 西田 幸二

大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学 (眼科学)

はじめに

角膜は角膜上皮, 角膜実質, 角膜内皮の3層からなる透明な無血管組織である。角膜疾患のために失明など重篤な視覚障害に至った患者に対して, 現在, ドナー角膜を用いた角膜移植法が実施されている。現在の角膜移植は献眼に依存しているが, わが国における提供数は絶対的に少なく, 多くの患者に対し直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに, Stevens-Johnson症候群などの重篤な角結膜疾患では, 拒絶反応などのため術後成績は良好ではない。これらのドナー不足および拒絶反応の問題を解決する手段として, 患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法の開発が進められている。本稿では, 筆者らが開発し, すでに臨床応用を開始している自家細胞による角膜上皮再生治療法と, 現在, 研究開発中である角膜内皮再生医療についても述べる。

角膜上皮再生

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 μ mの非角化扁平重層上皮である(図1 a)。角膜上皮は, 表層細胞のタイトジャンクション形成やムチン産生により外界とのバリア機能を担っている。角膜上皮幹細胞は, 角膜と結膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1 b)。角膜上皮幹細胞は, 角膜上皮型分化マーカー(ケラチン3, 12)を発現せず, p63やN-cadherinなどの幹細胞・前駆細胞マーカーを発現し, また細胞分裂が緩やかであるなどの特性を有している^{1)~3)}。外傷や角膜上皮疾患により, 輪部の角膜上皮幹細胞が機能不全に陥ると, 幹細胞からの角膜上皮細胞の供給ができなくなり, 角膜混濁などの重篤な視力障害が起きると考えられる(角膜上皮幹細胞疲弊症)。これら角膜上皮幹細胞疲弊症に対して, ドナー眼を用いた角膜移植法が実施されてきたが, 拒絶反応などのため術後成績は良好ではない。

拒絶反応の問題を解決する方法として, 1997年に患者自身(自家)の細胞を用いた培養角膜上皮移植法が初めて報告された⁴⁾。本手法は, 片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して, 患者の健常眼より採取した角膜上皮幹細胞の培養により, 培養角膜上皮シートを作製し, 疾患眼へ移植する方法である。この報告以降, 角膜上皮疾患に対して再生医療的アプローチによる治療法の開発が進められ, 拒絶反応の問題解決に寄与してきた^{5)~7)}。しかし一方で, 両眼性疾患には適応できないこと, および培養上皮細胞シートの回収方法が課題となっている。つまり, ディスパーゼなどの酵素を用いて培養上皮細胞シートを回収する場合は, 酵素処理によるシート自体の脆弱化, 細胞接着装置の破壊, また, 羊膜やフィブリンゲルなどの基質を用いる場合は安全性, 生体適合性などの問題が危惧されている。

幹細胞を用いた角膜再生医療

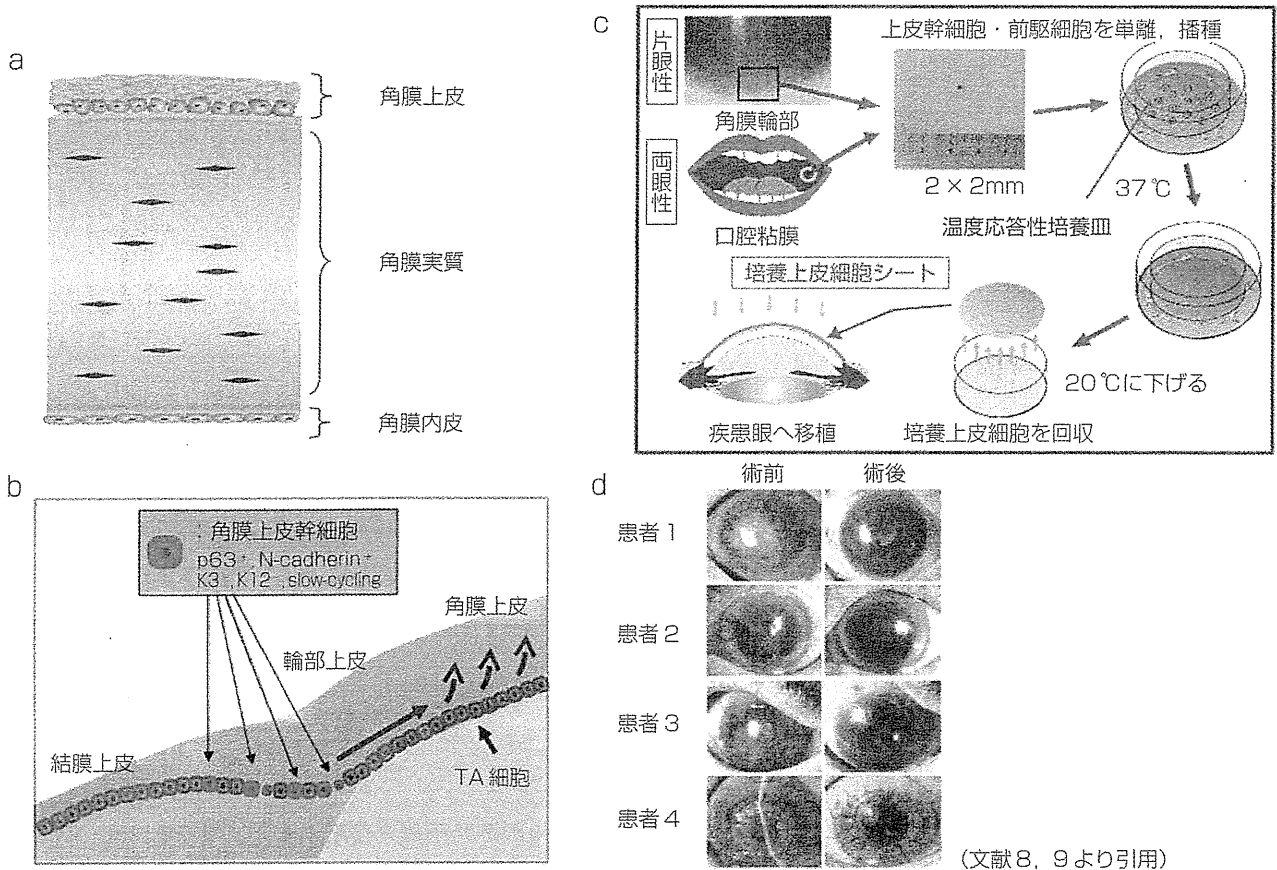


図1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症

- a: 角膜は上皮、実質、内皮の3層からなる。
- b: 角膜上皮幹細胞は輪部組織の上皮基底部に局在している。
- c: 自家培養上皮細胞シートによる角膜上皮再生治療法の概要; 2 × 2 mmの輪部組織(片眼性)あるいは口腔粘膜組織(両眼性)を患者自身から採取→酵素処理で幹細胞・前駆細胞を含む上皮細胞を単離→上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養(37℃)→温度を下げて(20℃)培養上皮細胞シートを剥離→疾患眼へ移植
- d: 自家培養上皮細胞シート移植による臨床成績; 培養上皮細胞シート移植術後の眼表面像(左:術前, 右:術後)

これらの問題を解決すべく筆者らは基質や酵素処理を必要としない、独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した⁸⁾(図1c)。片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部上皮、両眼性疾患の場合には口腔粘膜上皮より上皮幹細胞・前駆細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養する。この温度応答性培養皿は、37℃では培養皿表面が疎水性となるため細胞が接着するが、32℃以下では、相転移により表面が親水性となり細胞が接着できない。このため、この培養皿上で培養した細胞は酵素処理を必要とせず、温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により、細胞接着装置を保持したまま培養上皮細胞シートを回収することが可能である。回収した培養上皮細胞シートは、*in vivo*角膜上皮組織と同様に重層化しており、基底部には上皮幹細胞・前駆細胞が保持されている。また、細胞接着分子が保持されているため、移植後に短時間で無縫合でも眼表面に接着することが可能である。筆

者らはStevens-Johnson症候群，眼類天疱瘡，化学腐食などの角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対して，温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植の探索的な臨床研究をすでに開始しており，良好な成績を得ることに成功している⁹⁾ (図1 d)。これまでに治療法がなかった難治性角結膜疾患に対して，本再生治療法は新たな選択肢になりうると考えている。

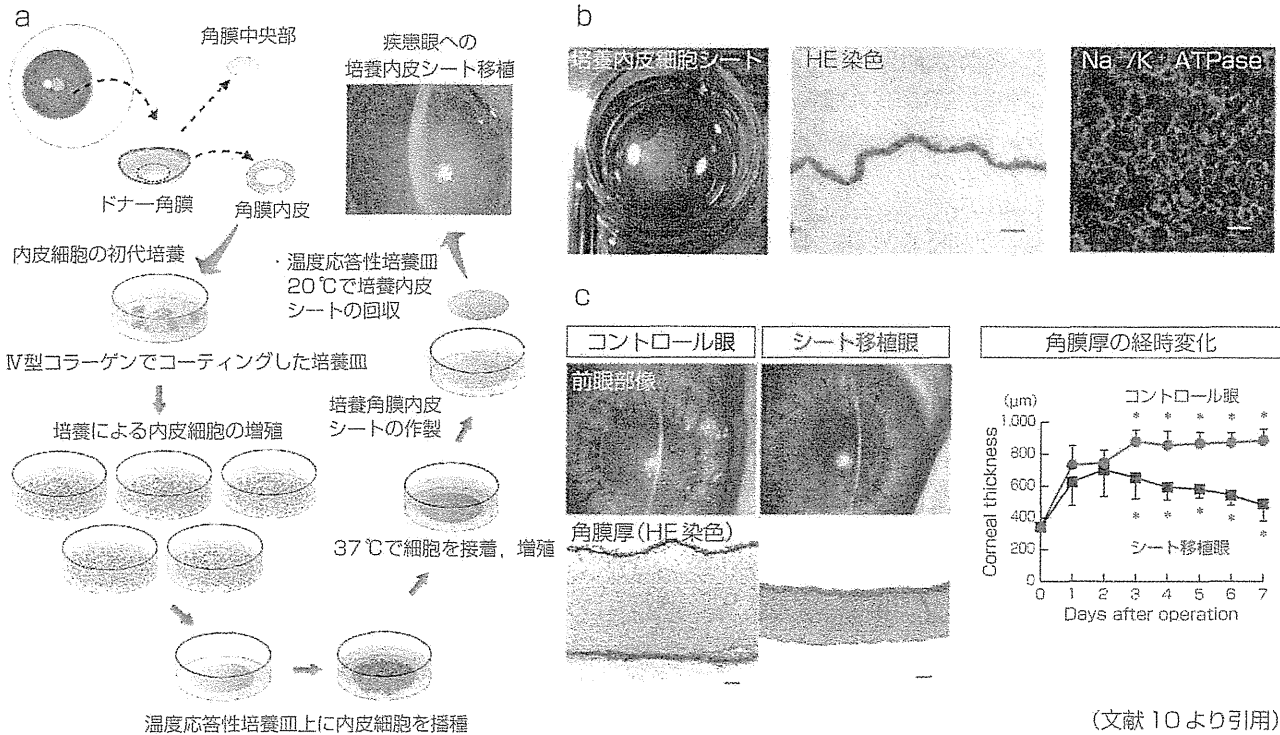
角膜内皮の再生

角膜内皮は角膜の最内層に存在する単層の組織であり，実質側から前房内に水を能動輸送する機能(ポンプ機能)およびバリア機能により，実質内の含水率を一定に維持し，角膜の透明性を維持している(図1 a)。ヒト角膜内皮細胞は一度障害を受けると，不可逆的に角膜内皮細胞数が減少し，角膜が混濁する水疱性角膜炎と呼ばれる病態となる。水疱性角膜炎は角膜移植対象疾患中で最も症例数の多い疾患であり，ドナー不足の問題が深刻である。

この問題に対処するため，筆者らは培養細胞シート移植技術を用いた角膜内皮再生治療法の開発を行っている(図2 a)。ヒト角膜内皮細胞は*in vivo*では増殖しないが，*in vitro*で増殖することが知られている。筆者らはこれまでに，研究用輸入アイバンク角膜より採取したヒト角膜内皮を温度応答性培養皿上で培養することで，ヒト培養角膜内皮細胞シートを作製，回収することに成功している(図2 b)。回収した培養角膜内皮細胞シートは，*in vivo*角膜内皮同様の機能を有しており，さらに家兎水疱性角膜炎モデルへの移植により，角膜厚および角膜透明性の有意な改善を認めている¹⁰⁾ (図2 c)。この方法を用いて角膜内皮細胞をある程度増幅することは可能であるが，1つのドナー角膜から多数の培養角膜内皮シートを作製することは現時点では困難である。その理由の1つとして，角膜上皮の場合とは異なり，ヒト角膜内皮幹細胞・前駆細胞の特性，あるいはその存在自体が不明であることが挙げられる。そのため，現在，角膜内皮幹細胞・前駆細胞の存在を検証し，それらを増幅・分化させるためのさまざまなアプローチを試みている。一方で，拒絶反応の問題を完全に克服するために，自家細胞源を用いた角膜内皮再生治療法の開発が必要である。そのためには，自家細胞源として角膜内皮疾患患者自身の角膜内皮細胞を採取することは不可能であるため，角膜内皮以外の(幹)細胞源を探索することが急務である。これまでに我々は，成体の虹彩実質中に角膜内皮と同様に神経堤より由来し，多分化能を有する細胞が存在することを見出している¹¹⁾。この虹彩実質中に存在する多能性の織幹細胞を用いて，角膜内皮細胞へ分化誘導あるいは再プログラムすることが可能であれば，自家移植も可能になると考えられ，現在さらに詳細な解析を行っている。

おわりに

筆者らは再生医学に基づいて，基質を用いない角膜上皮再生治療法の開発に取り組んできた。角膜上皮再生医療については，世界に先駆けて温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法の臨床応用に成功し，拒絶反応とドナー不足という2つの問題を同時にクリアすることができたことに大きな意義がある。今後，移植された幹細胞がどのような状態で保持されているのか，またどの程度の期間保持されているのかなどを検証していくことで，本治療法のさらなる改良に繋がたいと考えている。一方で，角膜内皮の再生医療はまだ研究段階であり，臨床応用されるに至っていない。角



(文献 10 より引用)

図2 培養角膜内皮シート移植法の概要

- a: 輸入アイバンク角膜の周辺部より角膜内皮を採取→IV型コラーゲンコーティング培養皿上で初代培養→細胞継代により細胞数を増幅→生体と同密度で温度応答性培養皿に播種, 37°Cで培養→20°Cに温度を下げて培養角膜内皮細胞シートを回収→疾患眼へ移植
- b: 温度応答性培養皿より回収した培養角膜内皮細胞シートのHE染色像およびNa⁺/K⁺ ATPaseの免疫染色。回収した培養角膜内皮細胞シートは *in vivo* 角膜内皮組織同様に単層構造を呈し, ポンプ機能を担うNa⁺/K⁺ ATPaseの発現も認められた。(Bar: 20μm)
- c: 家兎水疱性角膜症モデルへの培養角膜内皮細胞シート移植後の眼表面観察像およびHE染色像。非移植眼に比較して移植眼では角膜透明性及び角膜厚の改善が認められた。また経時的な角膜厚測定の結果, 移植後3日以降で統計学的に有意な角膜厚の改善が認められた(グラフ)。

膜内皮再生医療の実現のためには, 角膜内皮の発生やその幹細胞・前駆細胞の存在・特性に関する基礎研究がまだまだ必要であると考えており, 我々も日夜その研究に取り組んでいるところである。

●文 献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103: 49-62, 1986
- 2) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201-209, 1989
- 3) Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, et al: N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25: 289-296, 2007
- 4) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349: 990-993, 1997
- 5) Tsai RJ, Li LM, Chen JK: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* 341: 1506-1512, 1999

THE COMMENTARY

- J Med **13** : 86-93, 2000
- 6) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* **108** : 1569-1574, 2001
 - 7) Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* **72** : 1478-1485, 2001
 - 8) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77** : 379-385, 2004
 - 9) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351** : 1187-1196, 2004
 - 10) Sumide T, Nishida K, Yamato M, et al : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* **20** : 392-394, 2006
 - 11) Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, et al : Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes to Cells* **16** : 273-281, 2011

