

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658269

研究課題名(和文)犬で臨床応用可能な角膜実質の再生法の確立

研究課題名(英文)Development of methods to regenerate corneal stroma applicable to canine medicine

研究代表者

永延 清和 (Naganobu, Kiyokazu)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：40264353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：角膜潰瘍治療への応用を目指して、角膜実質の再生法、欠損部の充填法を検討した。兎角膜の上皮全層と実質を部分的に剥離した部分に豚由来市販材料を縫合して充填すると、移植片上に上皮が進展しその下で角膜実質が再生する場合と、移植片の下に上皮が侵入し実質の再生が生じる場合の2パターンを認めた。角膜の透明性は経時的に増加したことから角膜潰瘍に対して、角膜実質欠損部を今回の移植片で充填することは1つの治療法となる可能性が示唆された。一方で移植片が縫合後3～4日で消失する場合も認められたため、必要に応じて瞬膜被覆術あるいは結膜被覆術を組み合わせることも有用と思われた。

研究成果の概要(英文)：I evaluated methods treating corneal ulceration by filling the defective part of the cornea and regenerating the corneal stroma. In a rabbit corneal ulcer model, a commercially available product derived from pigs was sutured in place to fill the defective part of the corneal epithelium and stroma. Corneal transparency increased as time went by. Stromal regeneration may have occurred by the epithelium covering the product and then stroma regenerating underneath the epithelium; alternatively, the epithelium may have grown under the product, then the stroma regenerated underneath the epithelium. Because in some cases the product disappeared after several days, it would be useful to apply a nictitating membrane or conjunctival flap after the product was sutured in place.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：獣医臨床 角膜実質

1. 研究開始当初の背景

犬の角膜潰瘍などでみられる角膜実質の部分的欠損は、欠損が広汎で深部におよぶ場合は角膜穿孔の危険を伴い、また、獣医臨床で用いられている一般的な治療法では角膜実質が菲薄したままの状態では上皮が実質欠損部を被覆して治癒過程が終息する場合がある。こうした病態に対する他の治療法は犬では限られている。例えば同種角膜移植は犬ではドナー角膜の入手が困難なため、ほとんど行われていない。培養細胞の移植は現在のところ角膜上皮に限られている。これまでの予備的検討において、ラット角膜で、上皮全層と角膜実質の一部を機械的に除去した部分に豚膀胱由来の材料を充填するように縫合すると、移植部は当初は不透明であるが、経時的に透明性が増加したという結果を得た。組織学的には1週間後には移植片内に細胞浸潤が確認され、3カ月後には移植片を明瞭には区別できない状態となった。さらに、角膜上皮も移植部を覆っていた。そこで、こうした材料を角膜実質欠損部を充填するように移植することで、欠損部を保護しながら角膜実質を再生させ、角膜潰瘍等を治療することが可能か検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は前述の背景をもとに、(1)まず角膜実質の部分的欠損モデルに前述の豚膀胱由来の市販の材料を充填するように縫合した時に、角膜実質が再生し得るかを評価すること、またその有効な使用法を検討することを、(2)次ぎに豚角膜実質の脱細胞化を行い、角膜実質の再生に使用可能な材料を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 角膜の部分的欠損モデルを用いた検討

全身麻酔下で兎およびラットの角膜の上皮全層および角膜実質の一部を直径3~5mm(兎)および3mm(ラット)の大きさに機械的に除去し角膜の部分的欠損モデルを作成した。この欠損部に、それと同一径に切った市販の豚膀胱由来製品を、欠損部を充填するように10-0ナイロン糸で縫合した。その後経時的に最大112日間観察した。

兎角膜にと同様の処置を行い、引き続き、瞬膜被覆術あるいは結膜被覆術を行い、移植部をカバーした。

兎角膜の上皮を残存させたまま実質内に水平なポケット状の切開部を作成して上記材料を挿入し経時的に観察した。

(2) 豚角膜の脱細胞化の試み

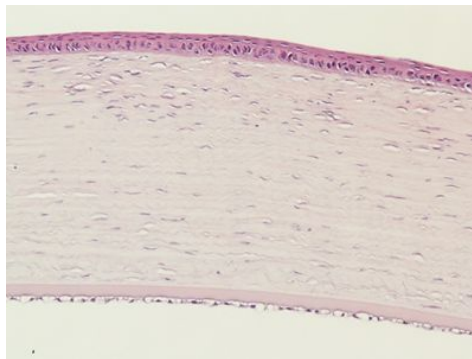
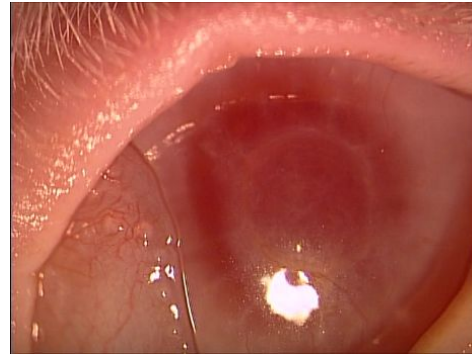
角膜移植あるいは人工角膜の材料として、脱細胞化した豚角膜の使用が試みられてきた。脱細胞化には幾つかの方法がこれまでに試されている。今回従来の方法を含めた、

様々な方法を試みた。

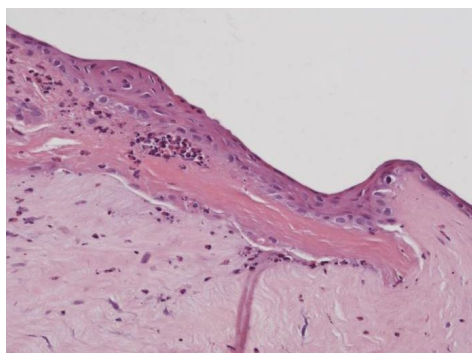
4. 研究成果

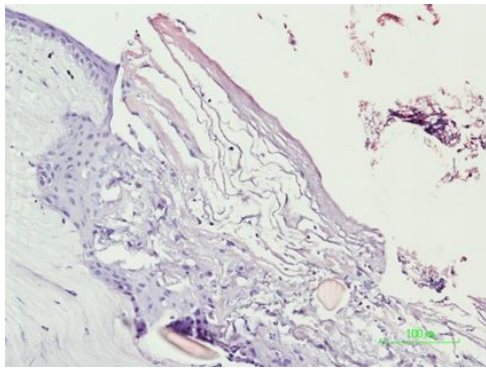
(1) 角膜の部分的欠損モデルを用いた検討

今回用いた移植片は兎の30%で移植後3~4日で消失した。移植片は当初は不透明であったが、移植片が4日以内に消失せず残存したものは移植片および移植部の透明性が経時的に徐々に増加した。下図は兎で移植後49日目の写真および移植後84日目の組織像である。組織検査では移植片は確認できなかった。



移植片の変化を見るために兎に移植後3, 7, 14日目に組織標本作製した(下図)。移植後3および7日目には角膜上皮が移植片の表面を覆うパターンと、移植片の下側で角間実質欠損部表面に向かって侵入するパターンの2つが認められた。また移植後14日目の評価では移植片に相当する位置に部分的にビメンチン陽性細胞が認められた。





以上より今回の角膜の修復のパターンとして、まず移植片の表面に角膜上皮が進展し、その上皮の下側で角膜実質が再生していくパターンと、移植片が角膜欠損部を覆いその下に上皮が進展して実質の再生が生じるパターンの2つがあると思われた。生体では、移植片上の上皮の有無はフルオレセイン染色で判断可能であった。移植後3日目の検査でフルオレセインにほとんど染まらず、移植片が上皮で覆われていると判断された例も認められた。

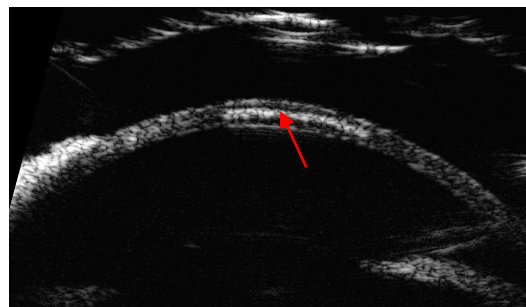
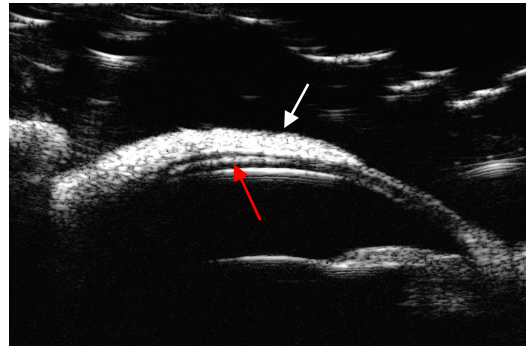
移植後の角膜の透明性を、本研究の内容を知らない10名に細隙灯顕微鏡で撮影した角膜の写真を提示して5段階スコア（術前の透明な角膜のスコアを5とした）を用いて評価した。その結果、移植後56日目までは透明性スコアは経時的に有意に増加していったが（56日目のスコアは3.4）、56日目以降は変化しなかった。

なおラットにおいて、移植片の縫合糸の抜糸は移植後28日目よりも7日目に行ったほうが角膜の透明性は早期に高まった。したがって移植片上の上皮の被覆が確認されたら、早期に抜糸すると角膜の透明性をより高めることができる可能性がある。

次に、移植片が早期に消失する例が認められたため、兎3例で瞬膜被覆術あるいは結膜被覆術を併用して14日間観察した。これらの中では移植片の早期の消失は生じなかった。しかし、瞬膜被覆術あるいは結膜被覆術が移植片の早期の消失を防いだのかは不明である。

ここで、瞬膜被覆術あるいは結膜被覆術を併用した場合、移植片の有無の観察が困難となる。そこで超音波生体顕微鏡で移植片の存在が確認可能か確かめた。下図の赤矢印で示

す通り、超音波生体顕微鏡では移植片は、瞬膜被覆の有無にかかわらず周辺の角膜に比べて高いエコーレベルで示された（白矢印が瞬膜）。



（2）豚角膜脱細胞化の試み

豚角膜の脱細胞化はこれまで様々な方法を用いて行われている。できるだけ透明性を維持して脱細胞化を得ようとする報告が多い。今回従来の方を含めて、次のような様々な方法を試みた。高濃度（1.5 M～飽和）塩化ナトリウム溶液に24～48時間浸漬しその後0.05%トリプシン / 0.02% EDTA 処理、高濃度（1.5 M～飽和）塩化ナトリウム溶液に24～48時間浸漬のみ、高濃度（1.5 M～飽和）塩化ナトリウム溶液に24～48時間浸漬後オートクレーブ処理、チューブ内で液体窒素に浸漬後、液体窒素を気化させ低酸素状態で密封し1週間保存、低圧（-0.08 MPa）処理、グリセリン保存、さらに以上の方法から複数の組み合わせ等を試みた。その結果、脱細胞できたのは高濃度塩化ナトリウム溶液に浸漬後オートクレーブ処理した場合だけであった。しかし角膜実質は脆弱で混濁が著しく、角膜への移植材料としては満足できるものではなかった。

（3）以上より角膜潰瘍等の角膜実質の部分的欠損を伴う状態に対して、今回用いた豚膀胱由来の市販の材料を、欠損部を充填するように縫合する方法は、1つの治療法となる可能性が示唆された。特に深部にまでおよぶ角膜潰瘍では穿孔の危険もあるため、欠損部を充填するような処置は有用と思われた。しかし移植片が、短期間で消失する可能性もあるため、瞬膜被覆術や結膜被覆術を併用することは有効である可能性がある。しかし結膜被覆術を併用する場合は当該部分の角膜の混

濁が強く残る可能性があることを留意する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永延清和 (NAGANOBU KIYOKAZU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：40264353

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：