

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08905

研究課題名(和文) スーパー・ヒト乾燥羊膜を利用した新しい再生医療材料の作製と臨床応用

研究課題名(英文) Manufacture and clinical application of new regenerative therapy materials using super human dried amniotic membrane

研究代表者

岡部 素典 (Okabe, Motonori)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：60283066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先進医療Bが2016年に認可され、現在までに11症例が登録された。HD羊膜の採取部分を胎盤部とその周囲(辺縁部)に分け、引っ張り強度(N/mm<sup>2</sup>、弾性率)、厚さ、透過試験、無菌試験、エンドトキシン試験、安定性試験を行った。

1) 腱断裂修復モデルを作成し、HD羊膜の癒着の抑制効果および安全性について検証した結果、HD羊膜は安全で腱癒着防止膜として臨床への利用が可能であると考えられた。2) 露出腸管を伴う開放創モデルを作成し、癒着の抑制効果および安全性について検証した結果、HD羊膜は腸管露出を伴う開放創の被覆材として非常に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在治療不可能な疾患や移植治療の必要な患者へ新たな治療方法を提供し、患者のQuality of lifeを高めるための基礎的な開発研究となった。

HD羊膜を製品として開発する際(医師主導治験や企業治験につなげていく場合)には、基礎的なその物性等を詳細に調べておく必要があり、引っ張り試験、残存サイトカインの検出、透過試験、等の基礎データを揃えることが出来た。また、減圧下におけるマイクロウエーブの滅菌効果については日本薬局方でも詳細がなく、そのメカニズムの検証は滅菌技術の基礎となり、意義深いものといえる。

研究成果の概要(英文)：Advanced medicine B was approved by Ministry of Health, Labour and Welfare in 2016, and a 11 case was enrolled until now. The sampling part of the HD-AM were distinguished a placental site from the surroundings (marginal region); , pulling intensity (Performed N/mm<sup>2</sup>, Modulus of elasticity), thickness, transmission study, sterility test, endotoxin test, stability test.

1) We made "a tendon rupture repair model", and got results about desmoplastic depression effect of the HD-AM and safety, and found it for a clinical use to be possible as a prevention of tendon adhesion membrane. 2) We made "the open wound model with the exposure intestinal tract," and got results about desmoplastic depression effect and safety, and found it for a clinical use to be possible as a prevention of a covering material of the open wounds with the intestinal tract exposure.

研究分野：再生医学

キーワード：ハイパードライヒト乾燥羊膜(HD羊膜) モデル動物 腱断裂修復 慢性瘻孔(EAF) 癒着防止 肉芽形成 scaffold 臨床応用(先進医療B)

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト羊膜はコラーゲンと弾性線維で構成される強靱な生体膜で、その抗炎症作用や上皮化促進効果が創傷治療に古くから利用されてきている。我々は、ヒト羊膜の機能を最大限に引き出し細胞増殖の足場として利用すべく、ハイパードライ乾燥法(HD 法)により、保存に優れ、安全でハンドリングの良い医療用のコラーゲンシート(ハイパードライヒト乾燥羊膜:HD 羊膜)として国内外の特許を取得してきた。また、HD 羊膜による治療法について富山大学倫理委員会の承認を得て、眼科学、皮膚科学、脳神経外科学、耳鼻咽喉科学、歯科口腔外科学、第二外科学(消化器外科学)が良い結果を得ており、特に眼科領域では、先進医療Bとして認可された。

### 2. 研究の目的

ヒト乾燥羊膜(コラーゲンシート)の強度を高めるための技術を構築する。ヒト羊膜を利用して気管を意識したパイプ状の管腔構造物を作製する。羊膜に新たな機能(細胞の接着を抑制し足場をコントロールする効果、保湿の効果、薬物を徐放させる効果)を持たせる技術を構築する。減圧下のマイクロウェブによる滅菌効果を検討する。HD 羊膜で治療を行う現場での抗生物質削減を目指す。以上のことから、バイオコンジュゲート材料はもとより、HD 羊膜の弱点を補うより良いデバイス(生体材料)を作製し、眼科、脳外科、耳鼻科、呼吸器外科領域の新たな医療材料を作製する。研究期間中に、HD 羊膜を適応・応用できる疾患の開拓についても考えるようになり、*enteroatmospheric fistula* (EAF) と呼ばれる慢性瘻孔(救急医療の領域)の治療へ応用するために、EAF モデル動物を作成し、HD 羊膜の効果を検討した。

### 3. 研究の方法【EAF モデル動物の作成および HD 羊膜による治療効果の検討】

8 週齢雄の ICR マウス(体重 32-37g, 日本 SLC 株式会社)を体重 1g 当たり 7  $\mu$ L の用量で 6.48mg / mL に調整したペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射により全身麻酔して脊柱位に固定した。皮膚を剃毛してヨウ素で消毒した後、腹部の中心に 15mm  $\times$  20mm の大きさに全層皮膚欠損を作製した。白線を 15mm で切開して開腹した。盲腸をそのままの自然な位置で腹部から持ち上げ、7-0 ナイロン糸で腹壁筋膜と 6 点縫合固定した (Fig 1a, b)。

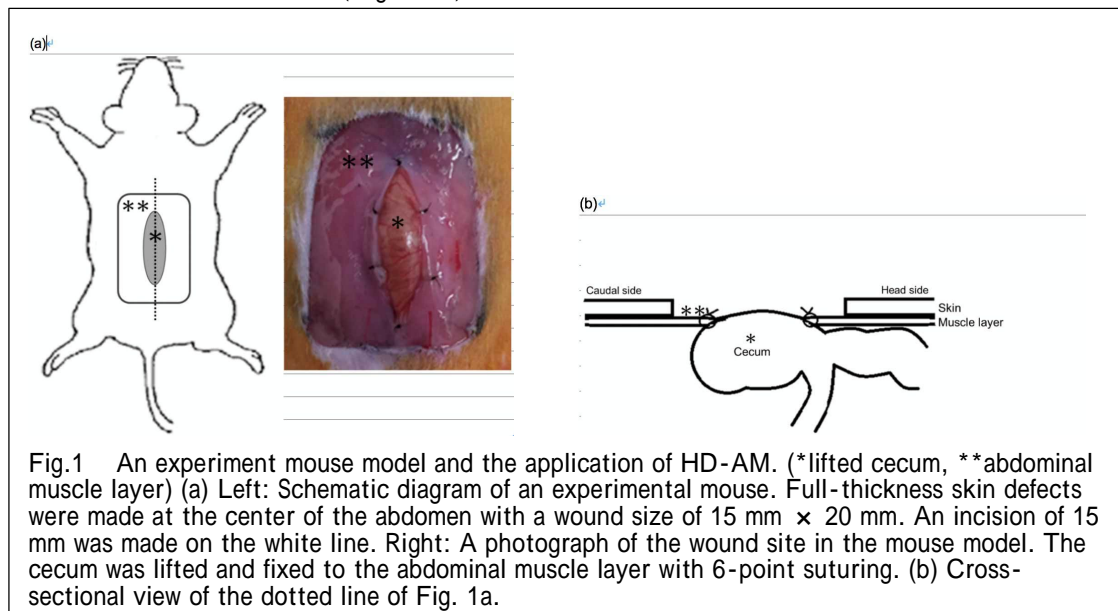


Fig.1 An experiment mouse model and the application of HD-AM. (\*lifted cecum, \*\*abdominal muscle layer) (a) Left: Schematic diagram of an experimental mouse. Full-thickness skin defects were made at the center of the abdomen with a wound size of 15 mm  $\times$  20 mm. An incision of 15 mm was made on the white line. Right: A photograph of the wound site in the mouse model. The cecum was lifted and fixed to the abdominal muscle layer with 6-point suturing. (b) Cross-sectional view of the dotted line of Fig. 1a.

### 露出した腸における肉芽組織の厚さ測定方法

肉芽組織の観察のため、アザン染色でコラーゲン繊維とフィブリンとの区別を容易にした。コラーゲン繊維を含有する肉芽組織の厚さは、Olympus CellSens イメージングプログラム(バージョン 1.7; Olympus Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した。測定部位は、露出腸管が左右の筋層に固定された位置から中心および、中心から両側 5mm とし、測定された 3 点の平均値を計算した (Fig 2)。

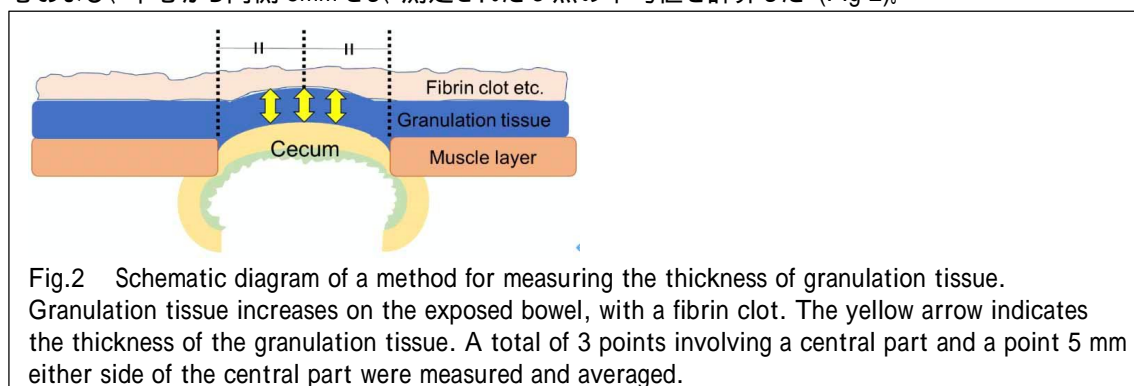


Fig.2 Schematic diagram of a method for measuring the thickness of granulation tissue. Granulation tissue increases on the exposed bowel, with a fibrin clot. The yellow arrow indicates the thickness of the granulation tissue. A total of 3 points involving a central part and a point 5 mm either side of the central part were measured and averaged.

#### 4. 研究成果

##### 実験モデルマウスにおける EAF の発症

本モデルで露出腸管をガーゼだけ被覆したところ、POD14 で 3 匹中 1 匹に EAF が発生した。瘻孔は挙上した腸管の頭側に位置し、直径 0.5mm であった。瘻孔の周囲は唇のように盛り上がっており、臨床で見られる EAF と肉眼上は同様の形態であった (Figure 3, 左)。組織学的には、皮下の盲腸壁の構造は正常に保たれているようであるが、露出部分の腸壁は破裂していた (Fig 3 右、矢印)。

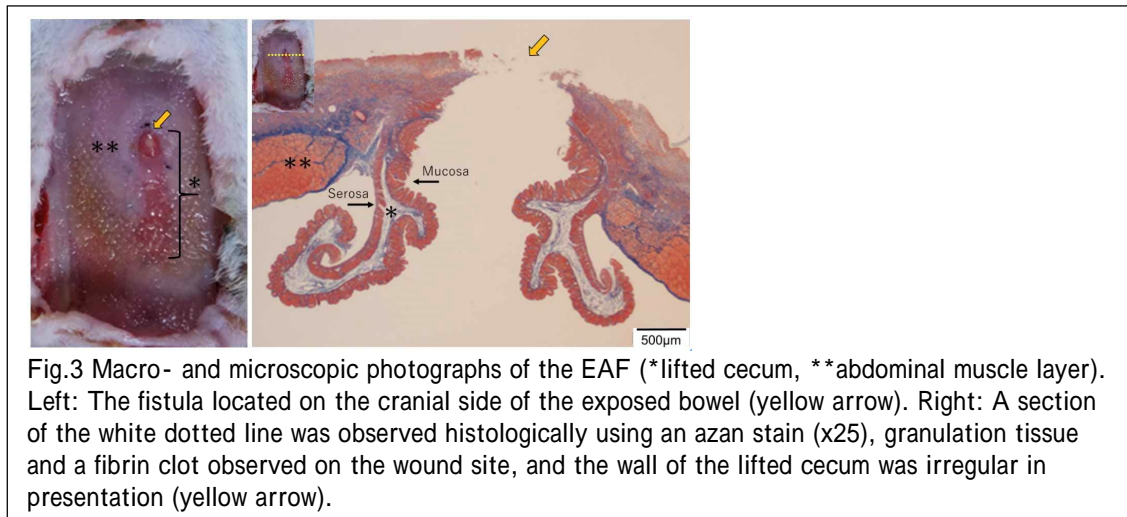


Fig.3 Macro- and microscopic photographs of the EAF (\*lifted cecum, \*\*abdominal muscle layer). Left: The fistula located on the cranial side of the exposed bowel (yellow arrow). Right: A section of the white dotted line was observed histologically using an azan stain (x25), granulation tissue and a fibrin clot observed on the wound site, and the wall of the lifted cecum was irregular in presentation (yellow arrow).

##### 露出腸管上の肉芽組織の厚さの測定

HD-AM 群は、HD-AM(-)群よりも POD7 および 14 の両方で肉芽組織が有意に厚かった (Fig 4a-b)。

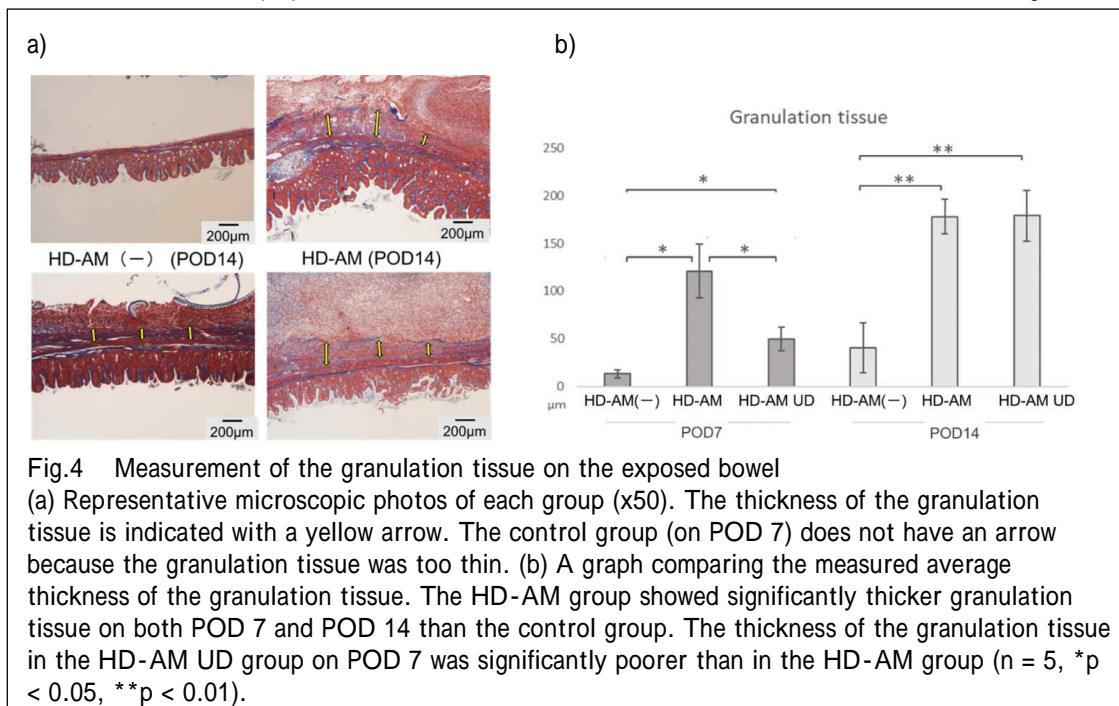


Fig.4 Measurement of the granulation tissue on the exposed bowel

(a) Representative microscopic photos of each group (x50). The thickness of the granulation tissue is indicated with a yellow arrow. The control group (on POD 7) does not have an arrow because the granulation tissue was too thin. (b) A graph comparing the measured average thickness of the granulation tissue. The HD-AM group showed significantly thicker granulation tissue on both POD 7 and POD 14 than the control group. The thickness of the granulation tissue in the HD-AM UD group on POD 7 was significantly poorer than in the HD-AM group (n = 5, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

以上より、肉眼的に臨床現場で見られるものと同様の EAF を発症するモデルを作成することが出来た。また、HD 羊膜は腸管露出を伴う開放創の被覆材として非常に有用であることが示された (特願 2019-092187 より引用)。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

- 1) Qi F, Yoshida T, Koike T, Aizawa H, Shimane T, Li Y, Yamada S, Okabe M, Nikaido T, Kurita H., Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry amniotic membrane as a matrix., Archives of Oral Biology.,65,26-34,2016, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.011
- 2) Nogami M, Kimura T, Seki S, Matsui Y, Yoshida T, Koike-Soko C, Okabe M, Motomura H, Gejo R, Nikaido T., A human amnion-derived extracellular matrix-coated cell-free scaffold for cartilage

repair: In vitro and in vivo studies., Tissue Engineering Part A.,22,680-688,2016, DOI: 10.1089/ten.TEA.2015.0285

- 3) Motonori Okabe, Michiko Suzuki, Mitsuaki Goto, Toshiko Yoshida, Masahiro Omori, Masato Taguchi, Ayaka Toda, Takuma Suzuki, Kazuaki Nakagawa, Fumitaka Hiramoto, Toyohiko Ushijima, Hiroki Waki, Etsuko Furuichi, Kenichi Arai, Kaixuan Zhou, Moustafa Fathy Omar, Makoto Nakamura, Yoshihiro Nomura, Toshio Kasama, Kiyoshi Katou, Shigeru Saito, and Toshio Nikaido, Hyperdry human amniotic membrane (HD-AM) is supporting aciclovir included device of poly-N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide (PVLA) sphere for treatment of HSV-1 infected rabbit keratitis model., J Biotechnol Biomater,6,1-9,2017, DOI: 10.4172/2155-952X.1000251
- 4) Fang Wang, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, Moustafa Fathy, Yi Sun, Chika Koike, Shigeru Saito and Toshiko Nikaido, CD24+SSEA4+ cells in Ovarian Carcinoma Cells Demonstrated the Characteristics as Cancer Stem Cells., J Cancer Sci Ther,9,343-352,2017, DOI:10.4127/1948-5956.1000440
- 5) Yi Sun, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, Keixuan Zhou, Fang Wang, Chika Soko, Shigeru Saito and Toshio Nikaido, Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4., Translational Oncology,10,976-987,2017, DOI: org/10.1016/j.tranon.2017.07.007

[学会発表] (計 32 件)

- 1) 岡部素典・吉田淑子・二階堂敏雄、羊膜バンク設立までの経緯 - 先進医療B認可とともに - 、日本組織移植学会総会、2016年08月26日～2016年08月28日、富山
- 2) 岡部素典・吉田淑子・周凱旋・古市恵津子、富山大学羊膜バンク設立の経緯と眼科領域での利用、日本解剖学会 第76回中部支部学術集会、2016年10月08日～2016年10月09日、長野
- 3) 岡部素典、ハイパードライヒト乾燥羊膜(HD羊膜)の臨床における有用性、第16回日本再生医療学会総会、2017年03月07日～2017年03月09日、仙台
- 4) 岡部素典・吉田淑子・周凱旋・古市恵津子・二階堂敏雄、HD羊膜の再発翼状片への利用と羊膜バンクの設立、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年03月28日～2017年03月30日、長崎
- 5) 吉田淑子・岡部素典・周凱旋・二階堂敏雄、羊膜移植の有用性、日本組織移植学会総会、2016年08月26日～2016年08月28日、富山
- 6) 富田隆浩・岡部素典・吉田淑子・黒田敏・二階堂敏雄、ヒト乾燥羊膜の頭蓋硬膜再建材料としての有用性、日本組織移植学会総会、2016年08月26日～2016年08月28日、富山
- 7) 吉田淑子・荒井健一・岡部素典・周凱旋・古市恵津子・孫鴻・齋藤滋・二階堂敏雄、羊膜間葉系細胞のサブクラスの特性、日本解剖学会 第76回中部支部学術集会、2016年10月08日～2016年10月09日、長野
- 8) 周凱旋・吉田淑子・吉田一晴・十勝人・岡部素典・古市恵津子、スカイフルーツの抗酸化作用について、日本解剖学会 第76回中部支部学術集会、2016年10月08日～2016年10月09日、長野
- 9) Yi Sun・Toshiko Yoshida・Motonori okabe・Kaixuan Zhou・Fan Wang・Chika Soko・Shigeru Saito・Toshio Nikaido, CD133 and CXCR4 positive endometrial cancer cells possess cancer stem-like cell characteristics., 日本解剖学会 第76回中部支部学術集会、2016年10月08日～2016年10月09日、長野
- 10) 吉田淑子、羊膜由来細胞を用いた自己免疫疾患治療への試み、第16回日本再生医療学会総会、2017年03月07日～2017年03月09日、仙台
- 11) 吉田淑子、間葉系幹細胞のサブクラスの線維化抑制に対する効果、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年03月28日～2017年03月30日、長崎
- 12) 吉田淑子・岡部素典・周凱旋・李華麗・齋藤滋・二階堂敏雄、羊膜間葉系幹細胞のサブクラスの特徴、第37回日本炎症・再生医学会、2016年06月16日～2016年06月17日、京都
- 13) 吉田淑子・吉田聡・周凱旋・荒井健一・岡部素典・齋藤滋・二階堂敏雄、羊膜間葉系幹細胞サブクラスの肝線維化抑制に対する効果., 第30回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2016年11月25日～2016年11月26日、富山
- 14) 吉田淑子・吉田一晴・周凱旋・岡部素典・十勝人、スカイフルーツは、抗酸化作用を増強する、第17回日本抗加齢学会総会、2017年6月2日～2017年6月4日、東京
- 15) 宮腰晃央・岡部素典・吉田淑子・二階堂敏雄・林篤志、ハイパードライヒト乾燥羊膜の有用性と安全性の検討、第71回日本臨床眼科学会、2017年10月12日～2017年10月15日、東京
- 16) 吉田淑子・孫毅・岡部素典、子宮内膜癌組織に存在するCD133+CXCR4+細胞の性質、第77回日本解剖学会中部支部学術集会、2017年10月7日～2017年10月8日、名古屋
- 17) 岡部素典・吉田淑子、ヒト由来の新しい生体吸収性材料の開発における安全性・分解性の評価、第77回日本解剖学会中部支部学術集会、2017年10月7日～2017年10月8日、名古屋
- 18) 吉田淑子・孫毅・岡部素典・相古千加・吉田聡・齋藤滋・二階堂敏雄、子宮内膜癌組織に存在するCD133+CXCR4+細胞の性質、第123回日本解剖学会総会、2018年3月28日～2018年3月30日、東京

- 19) 岡部素典・吉田淑子・周 凱旋・古市恵津子・相古千加・二階堂敏雄、ハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD 羊膜)の安全性および生体内での分解について、第 123 回日本解剖学会総会、2018 年 3 月 28 日～2018 年 3 月 30 日、東京
- 20) 吉田淑子・孫 毅・岡部素典・相古千加・齋藤 滋、子宮内膜癌に存在する CD133+CXCR4+細胞の特性、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年 3 月 21 日～2018 年 3 月 23 日、横浜
- 21) 岡部素典・吉田淑子・古市恵津子・相古千加・天野浩司・齋藤 滋、ハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD 羊膜)の安全性・分解性の評価、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年 3 月 21 日～2018 年 3 月 23 日、横浜
- 22) Lu Guang Han・QingLi Zhao・Toshiko Yoshida・Motonori Okabe・Chika Soko・Mati Ur Rehman・Takashi Kondo・Toshio Nikaido., Differential Response of Immortalized Human Amnion Mesenchymal and Epithelial Cells against Oxidative Stress.,第 78 回日本解剖学会中部支部学術集会、2018 年 10 月 13 日～2018 年 10 月 14 日、富山
- 23) 岡部素典・吉田淑子・山崎 穰・桑原浩輔・石川浩介、クリーンルーム除染作業の細胞増殖に対する効果、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年 3 月 21 日～2019 年 3 月 23 日、神戸
- 24) 吉田淑子・吉田一晴・岡部素典・下 勝人、羊膜間葉系幹細胞の抗酸化作用に対するスカイフルーツの効果、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年 3 月 21 日～2019 年 3 月 23 日、神戸
- 25) 岡部素典・頭川峰志・長田龍介・木村友厚・吉田淑子、腱断裂修復モデルにおけるハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD 羊膜)の癒着防止効果、第 124 回日本解剖学会総会、2019 年 3 月 27 日～2019 年 3 月 29 日、新潟
- 26) 吉田淑子・岡部素典、羊膜由来幹細胞が組織再構築に及ぼす影響、第 124 回日本解剖学会総会、2019 年 3 月 27 日～2019 年 3 月 29 日、新潟

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 岡部素典・吉田淑子・米田徳子・富田隆浩・鈴木拓馬・脇 博樹・古市恵津子・野村義宏・宇治義則・加藤 潔・將積日出夫・林 篤志・齋藤 滋・二階堂敏雄、事例から学ぶ～外科材料を利便化する原料の開発と作製 / 加工 / 評価「14 章 生体機能材料としての羊膜と被覆材への応用展望」、P.93-103、(株)技術情報協会
- 2) 岡部素典・吉田淑子・米田徳子・米田 哲・脇 博樹・塩崎有宏・富田隆浩・鈴木拓馬・古市恵津子・相古千加・野村義宏・加藤 潔・將積日出夫・林 篤志・齋藤 滋・二階堂敏雄、生体吸収性材料の開発と安全性評価：1 章 期待されている生物由来、単一、複合材料研究と生体吸収性材料応用、9 節ヒト由来生体材料としての羊膜と再生医療等への応用(生体内での分解について)、P.60-67、(株)技術情報協会

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

- 1) 名称: 羊膜間葉系幹細胞の抗腫瘍薬としての使用  
 発明者: 吉田淑子、吉田 聡、周 凱旋、岡部素典  
 権利者: 国立大学法人富山大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2018-62511  
 出願年: 2017 年 10 月 10 日  
 国内外の別: 国内
- 2) 名称: 腱・腱鞘の再生・修復材およびその使用  
 発明者: 頭川峰志、長田龍介、吉田淑子、岡部素典、荒川雅彦  
 権利者: 頭川峰志、長田龍介、吉田淑子、岡部素典、サクラ精機株式会社  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2018-174244  
 出願年: 2018 年 8 月 30 日  
 国内外の別: 国内

取得状況(計 2 件)

- 1) 名称: 羊膜間葉系幹細胞の調製方法および単離された羊膜間葉系幹細胞集団  
 発明者: 二階堂敏雄、吉田淑子、岡部素典、小池千加、野上真紀子、木村友厚、野口 誠、津野宏彰、竹田裕治  
 権利者: 国立大学法人富山大学  
 種類: 特許  
 番号: 特許第 6243738 号、WOA12013077428  
 取得年: 2017 年 11 月 17 日  
 国内外の別: 国内取得、PCT 申請中

2) 名称: バイオコンジュゲートデバイス

発明者: 岡部素典、二階堂敏雄、吉田淑子、小池千加、葭田隆治、古米 保

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特許第 6327622 号

取得年: 2018 年 4 月 27 日

国内外の別: 国内取得

[その他]

ホームページ等: <http://www.med.u-toyama.ac.jp/saiseigaku/staff/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 吉田 淑子

ローマ字氏名: Yoshida Toshiko

所属研究機関名: 富山大学

部局名: 大学院医学薬学研究部(医学)

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00171421

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名: 野村 義宏

ローマ字氏名: Nomura Yoshihiro

所属研究機関名: 東京農工大学

部局名: 農学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10228372

### (3) 研究分担者

研究分担者氏名: 相古 千加

ローマ字氏名: Souko Chika

所属研究機関名: 富山大学

部局名: 大学院医学薬学研究部(医学)

職名: 助教

研究者番号(8桁): 10523889

### (4) 研究分担者

研究分担者氏名: 北島 勲

ローマ字氏名: Kitajima Isao

所属研究機関名: 富山大学

部局名: 大学院医学薬学研究部(医学)

職名: 理事(副学長)

研究者番号(8桁): 50214797

### (5) 研究分担者

研究分担者氏名: 玄 丞然

ローマ字氏名: HYON Suong-hyu

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 共同獣医学部

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): 90283655

### (5) 研究分担者

研究分担者氏名: 林 京子

ローマ字氏名: Kyouko Hayashi

所属研究機関名: 中部大学

部局名: 大学院工学研究科

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): 60110623

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。