

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590498

研究課題名（和文） ヒト乾燥羊膜を用いた再生医療材料の作製に関する研究

研究課題名（英文） Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering.: Physical, morphological properties, and safety as the new biological material.

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・助教

研究者番号：60283066

研究成果の概要(和文):ヒト羊膜は医用材料として使われているが、貯蔵と滅菌に問題がある。我々は遠赤外線、減圧、マイクロ波、γ線滅菌を使用してハイパードライヒト羊膜（HD-AM）を開発した。冷凍乾燥させた AM（FD-AM）と HD-AM の物理学的および組織学的な性質を比較、マウス(in vivo)の系で安全を評価、翼状片における HD-AM 移植の効果を検討した。水の透過性とふるい係数について、HD-AM は FD-AM より有意に低く、上皮と結合組織の形態学的な構造が保たれた。マウスに移植後(18 ヶ月)、HD-AM は腹腔内で吸収された。HD-AM による翼状片の治療では再発が観察されなかった。

研究成果の概要（英文）: Human amniotic membrane (AM) has been used widely as graft biomaterial for a variety of clinical applications. But, there are some persistent problems related to the preparation, storage, and sterilization. To resolve these problems, we developed hyperdry AM (HD-AM) using far-infrared rays, depression of air, and microwaves and then sterilized by γ-ray irradiation. To elucidate the benefit of HD-AM as biological materials, compare with the histological and physical properties of HD-AM with a freeze-dried AM (FD-AM) as typical freeze-dry methods, evaluate the safety of HD-AM in vivo experiment used nude mice, and demonstrate the feasibility of HD-AM transplant in pterygium. HD-AM has kept the morphological structure of epithelium and connective tissues. The water permeability and the sieving coefficient of HD-AM were significantly lower than that of FD-AM. At 18 months after transplanted, single and multilayers of HD-AM in the intraperitoneal cavity was degraded without any infiltrated cells. For clinical treatment, recurrence of pterygium and regrowth of the subconjunctival fibrosis were not observed during the 6-month follow-up periods after the surgery. It was proposed that HD-AM was a safe and effective new biological material for clinical use including treatment for recurrent pterygium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：①ヒト組織利用研究、②ヒト乾燥羊膜、③海洋性コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

ヒト羊膜 (AM) 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<sup>4)</sup>。我々はヒト羊膜の効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により医療用のコラーゲンシート (ヒト乾燥羊膜) として開発してきた。ハイパードライ乾燥法は、減圧により水の沸点を下げ (酸化の少ない、低温での乾燥)、遠赤外線です料表面の水分を除去し、マイクロ波で水の運動エネルギーを上昇させて乾燥させる方法で、凍結乾燥 (FD) と全く異なるメカニズムの乾燥方法である。これは、FD では乾燥し難い物の乾燥や FD に比べて短い時間 (約 1/10) で乾燥できる長所がある。一方、ヒト乾燥羊膜の特徴としては 1) 薄く強度のあるコラーゲンシートである 2) 生食等のバッファーで戻すと元の組織に近い微細構造を示す<sup>5)</sup> などがあげられる。このように生のヒト羊膜を乾燥コラーゲンシートに加工することで保存に優れ、ハンドリングの良い医療用基材が作製できた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)ハイパードライヒト羊膜 (HD-AM) と凍結乾燥ヒト羊膜 (FD-AM) の組織学および物理学的な性質を比較、(2) HD-AM の安全性を評価する、(3)再発性翼状片の場合に HD-AM 移植の有効性を示すことである。

## 3. 研究の方法

### 【採取】

ヘルシンキ宣言を含む富山医科薬科大学倫理委員会の許可のもと、インフォームドコンセントが得られたボランティアの帝王切開適応患者からの羊膜を採取した。すべての提供者は、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス B 型、肝炎ウイルス C 型と梅毒が血清学的に陰性だった。無菌性条件の下で、AM は滅菌された手袋を装着した手で物理的に下にある卵膜から取り外した。AM をクラス 2 安全キャビネットの中で、滅菌生食により数回洗浄し、8 X 8 cm の大きさにカットした。

### 【FD-AM の作製】

形態学的解析用：凍結乾燥装置 (BF-2D; BM Equipment Corp., Tokyo, Japan) を使い、0.75 Torr、-50°C で一晚 (ON: 12hr 以上) 処理した。

その他の解析用：凍結乾燥装置 (DF-05; ULVAC, Kanagawa, Japan) を使い、あらかじめ -40°C にしたチャンバーへ AM を入れ、真空度が 1 Torr になったところで冷却装置のスイッチを OFF にした。コールドトラップを -45°C 以下に設定し、ON 処理した。乾燥中は 0.2 Torr で温度は室温まで上昇した。

### 【HD-AM の作製】

AM をクッキングシートに広げ、ハイパードライ装置 (a prototype from the HD-Lab; Sakura Seiki Co., Tokyo) に入れ、0.4-4.6 kPa の減圧・復圧を繰り返す。遠赤外線、4.6 kPa の時には 0.1 kW の microwaves を 1-3 min、照射した (Fig. 1)。

FD-AM、HD-AM のどちらも  $\gamma$  線照射 (25kGy) で滅菌した。

### 【水の透過性】

膜を挟んで一次相と二次相に水をはり、一次相の水に圧力を変えて、二次相に移動した水の量を測定し、単位時間あたりの移動量を測定した (Fig. 2A)。

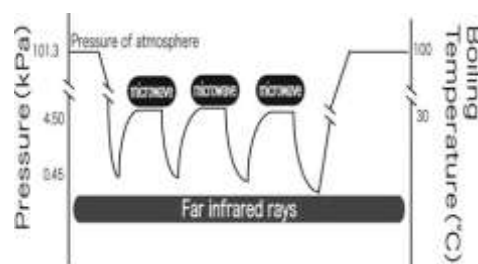


FIGURE 1. Protocol of the hyperdry method. AM samples were dried by the hyperdry device (Sakura Seiki Co., Tokyo) and subjected to repeated pressurization and decompression from 0.4 to 4.6 kPa several times with rest intervals. During the rest intervals, the samples received 0.1-kW microwaves for 1-3 min repeatedly. Far-infrared rays (0.4 kW) maintained the temperature at 50°C and dried up the AM samples. The sublimation temperature under the pressure of 4.50 kPa was 30°C. With the hyperdry method, the AM samples do not freeze. The microwaves and far-infrared rays give kinetic energy to the water of the AM samples, and the water evaporates due to the decrease in pressure.

### 【篩い係数】

#### a. creatinine (低分子化合物)

250 mg/dL creatinine 水溶液を一次相へ入れ、圧力を変えて二次相へ出てきた水溶液中の creatinine 濃度を 90min 毎に測定した (Fig. 2A)。

#### b. BSA (高分子化合物)

2500 lg/L BSA 水溶液を一次相へ入れ、圧力を変えて二次相へ出てきた水溶液中の creatinine 濃度を 90min 毎に測定した (Fig. 2A)。

### 【統計解析】

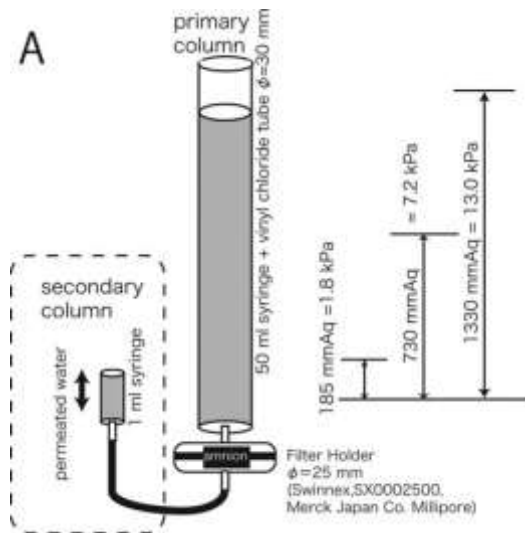


FIGURE 2. Aqueous permeability of HD-AM and FD-AM. A, Scheme of measurement method for permeability. Aqueous permeability: The primary column and the second column were filled with water that flowed across the membrane, and we measured the aqueous quantity that moved to the second column by changing the liquid level and changing the pressure of the primary column. Sieving coefficient of creatinine and BSA: The second column (the dashed line part) was removed and we measured the density of creatinine or BSA solution that passed through the amniotic membrane from a primary column.

3人の患者さんからの羊膜を解析した。1人の患者さんからのデータは3回の繰り返し測定の平均として得た。3人のデータ解析は合計9回分の測定によって行われている。Student's t-testを行った。統計解析ソフト(SPSS Statistics ver. 20 for Mac; IBM, Tokyo, Japan)を用い、両側の検定をした。5% (\*) そして1% (\*\*)と表現した。

#### 【組織学】

実体顕微鏡で観察した。光学顕微鏡用に4%パラホルムアルでヒドで固定後、脱水・包埋し、1-2 $\mu$ mの厚さに切って、ヘマトキシリン・エオジン染色した。

#### 【走査型電子顕微鏡】

8 mm<sup>2</sup> に切ったサンプルを Dotite [Fujikura Kasei (Thailand), Tokyo, Japan] でステージへ固定した。メタルコーティング無しで低真空走査型電子顕微鏡(Miniscope TM-1000; Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて

30 Pa、加速電圧 10 kV で観察した。

#### 【安全性評価】

6週齢のヌードマウスあるいはICRマウスの皮下・腹腔に、単層あるいは重ね合わせたAMを移植し、1、6、18週後にHD-AMが肉眼解剖学によって組織で認められたとき、移植したHA-AMの周囲の組織を摘出し、パラフィンに包埋・病理学的検討を行った。

#### 4. 研究成果

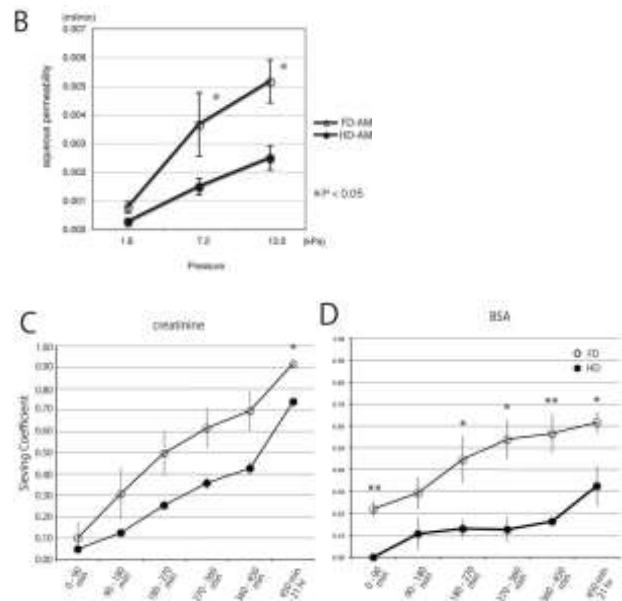


FIGURE 2. Aqueous permeability of HD-AM and FD-AM. B, Aqueous permeability of HD-AM and FD-AM with pressure change. Open circles: FD-AM. closed circles: HD-AM. HD-AM had significantly lower water permeability compared to FD-AM. The values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of triplicate assays. C, The creatinine sieving coefficient of HD-AM was lower than that of FD-AM. The values are mean  $\pm$  SEM of triplicate assays. D, The BSA sieving coefficient of HD-AM was significantly higher than that of FD-AM. The values are mean  $\pm$  SEM triplicate assays.

水の透過性とふるい係数について、HD-AMはFD-AMより有意に低かった(Fig.2B-D)。

HD-AMでは、上皮と結合組織の形態学的な構造が保たれていたが、FD-AMでは保たれていなかった(Fig.3A-C)。

ヌードマウスに移植されたあと、18ヵ月目に、単層と多層に重ねたHD-AMは腹腔内で浸潤細胞が無い状態で分解した(Fig.4A-C)。

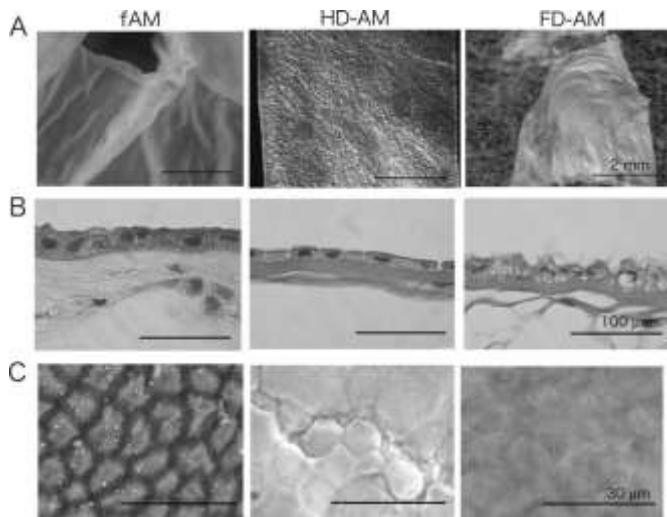


FIGURE 3. The morphological characteristics of fresh human amniotic membrane (fAM), hyperdry human amniotic membrane (HD-AM), and freeze-dried human amniotic membrane (FD-AM). A, Morphology shown by dissecting microscopy. FD-AM was whiter than HD-AM and had white powder on the surface. B, Light micrographs of HE-stained AM samples. HD-AM kept the morphological structure of epithelium and connective tissue. C, SEM photographs of the AMs. HD-AM kept the ultrastructure of epithelium and connective tissue. Left column: fAM. Middle: HD-AM. Right: FD-AM.

臨床での治療で、手術の後6ヵ月の追跡調査期間の間に翼状片の再発と結膜下の線維形成の再発は観察されなかった。HD-AMは

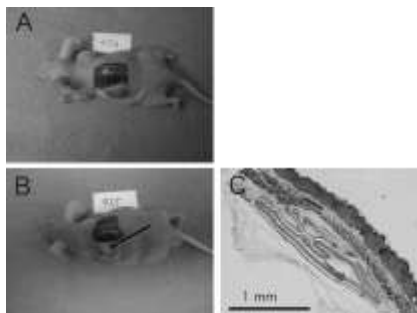


FIGURE 4. Single and multiple layers of HD-AM transfected in the subcutaneous tissues and intraperitoneal cavities of nude mice. A, A multilayer of HD-AM was transplanted in subcutaneous tissues. Note that some material is present (arrow). B, A single layer of HD-AM was transplanted in the subcutaneous tissues. No residual materials were observed after 18 months. C, The paraffin-embedded samples of (A) stained with H-E. They were surrounded by thin connective tissues after 18 months. No infiltration cells remained around the HD-AM.

再発性翼状片のための治療を含む臨床使用に安全かつ有効な新しい生物由来材料であった(Fig.5A-B)。

## Recurrent Pterygium

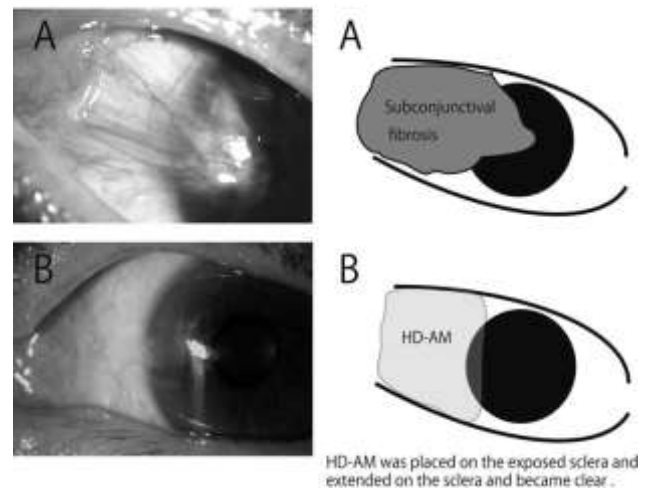


FIGURE 5. Clinical application. Photographs of recurrent pterygium treated with an HD-AM patch. A, Before treatment. Note the subconjunctival fibrosis; it covered the front of the patient's cornea. B, The subconjunctival fibrosis was controlled by attaching HD-AM; this photograph was taken at 6 months after the surgery.

## 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 17 件)

- 1) Okabe M., Kitagawa K., Yoshida T., Koike C., Katsumoto T., Fujihara E., Nikaido T., Application of 2-octyl-cyanoacrylate for corneal perforation and glaucoma filtering bleb leak., *Clinical Ophthalmology*, 7, 649-653, 2013 査読有り DOI: 10.2147/OPHT.S43106
- 2) Tomita T., Hayashi N., Okabe M., Yoshida T., Hamada H., Endo S., Nikaido T., New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery., *J Neurol Surg B*, 302-307, 2012 査読有り DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1321506>.
- 3) Tsuno H., Arai N., Sakai C., Okabe M., Koike C., Yoshida T., Nikaido T., Noguchi M., Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface., *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, S2212-4403(12), 00399-9, 2012 査読有り DOI: 10.1016/j.oooo.2012.05.014
- 4) Arai N., Tsuno H., Okabe M., Yoshida T., Koike C., Noguchi M., Nikaido T., Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa., *J Oral Maxillofac Surg*, 70(9), 2221-8, 2012 査読有り DOI:

10.1016/j.joms.2011.09.033  
5) Kanazawa Y., Shojaku H., Okabe M., Fujisaka M., Takakura H., Tachino H., Tsubota M., Watanabe Y., Nikaido T., Application of hyperdry amniotic membrane patches without fibrin glue over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty., *Acta Otolaryngol*, 132(12), 1282-7, 2012 査読有り DOI: 10.3109/00016489.2012.701329  
6) Tsuno H., Yoshida T., Nogami M., Koike C., Okabe M., Noto Z., Arai N., Noguchi M., Nikaido T., Application of human amniotic mesenchymal cells as an allogenic transplantation cell source in bone regenerative therapy., *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 32, 2452-2458, 2012 査読有り DOI: Doi 10.1016/J.Msec.2012.07.021  
7) Higuchi O., Okabe M., Yoshida T., Fathy M., Saito S., Miyawaki T., Nikaido T., Stemness of human Wharton's Jelly mesenchymal cells is maintained by floating cultivation., *Cellular Reprogramming*, 14, 448-445, 2012 査読有り DOI: 10.1089/cell.2012.0020  
8) Zhou, K., Koike, C., Yoshida, T., Okabe, M., Fathy, M., Kyo, S., Kiyono, T., Saito, S., Nikaido, T., Establishment and characterization of immortalized human amniotic epithelial cells., *Cellular reprogramming*, 15, 2012-0021, 2012 査読有り DOI: 10.1089/cell.2012.0021  
9) Teng, Z., Yoshida, T., Okabe, M., Toda, A., Higuchi, O., Nogami, M., Yoneda, N., Zhou, K., Kyo, S., Kiyono, T., Nikaido, T., Establishment of immortalized human amniotic mesenchymal stem cells., *Cell Transplant*, 22(2), 267-78, 2013 査読有り DOI: 10.3727/096368912X655055  
10) Nogami M., Tsuno H., Koike C., Okabe M., Yoshida T., Seki S., Matsui Y., Kimura T., Nikaido T., Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation., *Transplantation*, 93(12), 1221-8, 2012 査読有り DOI: 10.1097/TP.0b013e3182529b76  
11) Kitagawa K., Okabe M., Yanagisawa S., Zhang Xue-Yun., Nikaido T., and Hayashi A., Use of a hyper-dried cross-linked amniotic membrane as initial therapy for corneal perforations., *Jpn. J. Ophthalmol.*, 55, 16-21, 2011 査読有り DOI: 10.1007/s10384-010-0903-0  
12) Shojaku H., Takakura H., Okabe M., Fujisaka M., Watanabe Y., and Nikaido T., Effect of hyperdry amniotic membrane patches attached over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty., *Laryngoscope*, 121, 1953-1957, 2011 査読有り DOI: 10.1002/lary.22082  
13) Ito M., Nakasima A., Hidaka T., Okabe M., Bac ND., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tuneyama K., Nikaido T., Saito S., A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour., *J Reprod Immunol*, 84, 75-85, 2010 査読有り DOI:

10.1016/j.jri.2009.09.005  
14) H. Ohara, H. Iida, K. Ito, Y. Takeuchi, Y. Nomura, Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis in a guinea pig model of osteoarthritis., *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 2096-2099, 2010 査読あり DOI: Doi 10.1271/Bbb.100193  
15) G. Subash, K. Hayashi, K.P. Kumar, Aptamer that binds to the gD protein of herpes simplex virus 1 and efficiently inhibits viral entry., *Journal of Virology*, 86, 6732-6744, 2012 査読あり DOI: 10.1128/JVI.00377-12  
16) K. Hayashi, M. Inuma, K. Sasaki, T. Hayashi, In vitro and in vivo evaluation of a novel flavonoid, 4'-phenylflavone, and its synergistic action with acyclovir., *Archives of Virology*, 157, 1489-1498, 2012 査読あり DOI: 10.1007/s00705-012-1335-6  
17) Mizuta S., Asano C., Yokoyama Y., Taniguchi M: Molecular species of collagen in muscular and vertebral parts of white sturgeon *Acipenser transmontanus*., *Fisheries Science*, 78(2), 399-406, 2012 査読あり DOI: Doi 10.1007/S12562-011-0443-7

[学会発表] (計 7 件)

1) 岡部素典, 鈴木拓馬, 吉田淑子, 小池千加, 野村義宏, 齋藤 滋, 二階堂敏雄, 新規ヒト乾燥羊膜(HyperDry ヒト羊膜)の抗炎症作用, 再生医療学会, 横浜, 2013年03月21-24日  
2) Okabe M., Yoshida T., Koike C., Hayashi N., Fujisaka M., Shojaku H., Arai N., Tsuno H., Kitagawa K., Endo S., Watanabe Y., Noguchi M., Hayashi A., Saito S., Nikaido T., The clinical application of the new dried human amniotic membrane. (Hyper-Dry amnion : HD-AM)., ISSCR The 10th Annual Meeting, Yokohama, 2012年06月13-16日  
3) 岡部素典, 吉田淑子, 小池千加, 齋藤 滋, 二階堂敏雄, 不死化羊膜細胞の樹立と解析., 第29回日本ヒト細胞学会学術集会, 富山, 2011年8月20-21日  
4) 岡部素典, 荒井健一, 吉田淑子, 小池千加, 杉本 潤, 戸田英樹, 後藤光昭, 中村真人, 二階堂敏雄, バイオプリンティングロボットの次世代化: 血管自動認識ロボット., 第49回日本人工臓器学会大会, 東京, 2011年11月25-27日  
5) 岡部素典, 新規コラーゲンシートを用いた再生医療材料の作製に関する研究 (富山大学 未来技術研究支援ファンド 成果報告)., 国立大学法人富山大学 コラボフェスタ, 富山, 2011年12月13-16日  
6) 岡部素典, 新規コラーゲンシートを用いた再生医療材料の作製に関する研究, とやま産学官金交流会 2011, 富山, 2011年11月25日  
7) 岡部素典, 吉田淑子, 小池千加, 林 央周, 藤坂実千郎, 将積日出夫, 新井直也, 津

野宏彰、北川清隆、遠藤俊郎、渡邊行雄、野口 誠、林 篤志、齋藤 滋、二階堂敏雄、新規ヒト乾燥羊膜 (Hyper-Dry 羊膜) の臨床における有用性、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1-2 日

〔図書〕(計 1 件)

1) 吉田淑子、岡部素典、小池千加、二階堂敏雄、ヒト羊膜由来細胞を用いた糖尿病治療。「ケミカル エンジニアリング 特集=社会基盤を支えるライフサイエンス」、化学工業社、6 頁、2010 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

1) 名称：羊膜間葉系幹細胞の調整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、竹田祐治  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-257419  
出願年月日：2011 年 11 月 25 日  
国内外の別：国内

2) 名称：ハイブリッドスキヤホールドおよびそれを用いた生体組織再生方法  
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  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2012-125770  
出願年月日：2012 年 06 月 01 日  
国内外の別：国内

3) 名称：羊膜幹細胞の選択的増幅方法  
発明者：二階堂敏雄、吉田淑子、岡部素典、小池千加、遠藤俊郎  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-039341  
出願年月日：2013 年 02 月 28 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 3 件)

1) 名称：乾燥羊膜及び羊膜の乾燥処理方法  
発明者：二階堂敏雄、吉田淑子、岡部素典、戸田文香、荒川雅彦  
権利者：国立大学法人富山大学、サクラ精機株式会社  
種類：特許  
番号：特許第 4977345 号  
取得年月日：2012 年 04 月 20 日  
国内外の別：国内

2) 名称：乾燥羊膜からなる眼表面の再建用医

療材料

発明者：二階堂敏雄、北川清隆、岡部素典  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特許第 5092119 号  
取得年月日：2012 年 09 月 28 日  
国内外の別：国内

3) 名称：培養重層上皮シートの作製方法  
発明者：二階堂敏雄、岡部素典、齋藤 滋、倉科憲治、小池剛史  
権利者：国立大学法人富山大学、国立大学法人信州大学  
種類：特許  
番号：特許第 5181172 号  
取得年月日：2013 年 01 月 25 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/saiseiigaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・助教  
研究者番号：60283066

(2) 研究分担者

二階堂 敏雄 (NIKAIDO TOSHIO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：50180568  
吉田 淑子 (YOSHIA TOSHIKO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：00171421  
野村 義宏 (YOSHIHIRO NOMURA)  
東京農工大学・農学部・准教授  
研究者番号：10228372

(3) 連携研究者

水田 尚志 (SYOUSHI MIZUTA)  
福井県立大学・生物資源学・准教授  
研究者番号：30254246  
林 京子 (KYOUKO HAYASHI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・講師  
研究者番号：60110623  
土岐 善紀 (YOSHINORI DOKI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・講師  
研究者番号：90303221