

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462748

研究課題名(和文)透明化羊膜を用いた眼表面疾患新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel device for ocular surface treatment with transparent amnion membrane

研究代表者

横倉 俊二 (Yokokura, Shunji)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30400378

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)：我々は羊膜を透明化したものを積層化することによって、角膜実質と同程度の強度と透明性を有した代替角膜実質を作成することに成功した。同材料を家兔角膜に移植した所、長期間安定して生着することが確認された。同材料は強膜の代替材料(強膜菲薄部位の被覆材、緑内障インプラントの被覆材)としても有用であることが、家兔での実験でも確認できた。同材料を用いて強膜コンタクトレンズを作成し、眼表面炎症モデル家兔に装用した所、炎症が著明に改善した。同コンタクトレンズは熱傷等の難治性眼表面炎症疾患の治療に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We made alternative corneal stroma having strength and transparency the same as normal corneal stroma with transparent human amniotic membrane laminates. When these laminates were transplanted to rabbit cornea, these membranes survived for a long time. These laminates were useful for filling scleral defect and covering glaucoma shunt device. We manipulated scleral contact lens with these laminates. When this contact lens was worn on chemical injured rabbit cornea, inflammation on the ocular surface was reduced significantly. This contact lens might be effective for severe ocular surface inflammation.

研究分野：眼科学

キーワード：透明化積層化羊膜 組織工学

1. 研究開始当初の背景

角膜疾患に対する治療として、一般にはアイバンク眼を用いた同種角膜移植が施行されてきたが、しばしば起こる拒絶反応を回避できないため、その長期予後は十分でない。また、ドナー角膜の絶対的不足は、従来から世界の眼科医療の大きな問題点である。このような角膜移植医療の技術的・社会的問題点を抜本的に解決しうるため、再生医療を用いた角膜移植パーツ(大別すると角膜上皮・角膜実質・角膜内皮)の作製とその移植が目されるに至った。角膜上皮の再生に関しては、既に培養口腔粘膜を代用角膜上皮として用いる方法が確立され、ヒトへの臨床応用が可能となっている(Nishida K et al, N Engl J Med 2005)。また角膜内皮の再生に関してもサルでの移植実験が成功しており(Koizumi N et al, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007)ヒトへの臨床応用も間近である。

一方でコラーゲンの束がその大部分を占める角膜実質に関しては、未だ決定的な代替技術が開発されていないのが現状である。近年アテロコラーゲンゲルを代替実質としてヒトに移植した報告(Griffith M et al, Sci Transl Med 2010)でも、残念ながら十分な視力が維持されているとは言い難い。これは使用されているアテロコラーゲンゲルが直接縫合に耐えうる十分な強度を有していないため、対角線上にあるホスト角膜同士に糸をかけてゲルを支える方法を取っているため、糸とゲルがこすれる部分への角膜上皮進展が遅く、ゲルの混濁をきたすためである。また、この縫合では物理的な外傷に非常に弱いので、万が一移植片が脱落するような事態になれば失明に至るリスクを孕んでいる。即ち、直接縫合にも耐えられる強度を有した代替実質の開発が急務である。我々の施設ではこれまで、積層化アテロコラーゲン(Tanaka Y et al. Biomaterials 2011)・透明化強膜(Tanaka Y et al. Biomaterials 2011)・透明化皮膚(Biomaterials 2011)・透明化羊膜(Tanaka Y J Tissue Eng Regen Med 2011)を代替実質として用いる研究を行ってきた。いずれもが十分な透明性を有していることが確認できたが、このうち透明化羊膜を積層化させたものが、直接縫合に対しては最も強度的に優れていることが予備実験で判明してきた。本材料は架橋回数を変えることで硬さを任意に調節することが可能であり、更に常温での長期保存が可能であるため、角膜実質の代用として以外にも、強膜菲薄化部位被覆材・強膜コンタクトレンズ(角膜よりもサイズが大きいハードコンタクトレンズで、角膜上皮幹細胞疲弊症患者にみられる眼表面の不整を矯正して視力の向上を図る)・緑内障インプラント(眼圧を規定している前房水を眼内に排出する器具)手術時にインプラントを被覆する材料等への使用も可能であると考えられる。羊膜は帝王切開時に本来廃棄されるものを使用し、1枚の羊膜から例えば数

十個分の代替実質が作成可能であるため倫理的問題は極めて少なく、かつ大量生産も可能である。即ち単なる代替角膜実質としてだけでなく、幅広い眼表面疾患の手術・治療材料が安定的に供給できる体制の構築が可能となる。即ち単なる代替角膜実質としてだけでなく、幅広い眼表面疾患の手術・治療材料が安定的に供給できる体制の構築が可能となる。

2. 研究の目的

積層化透明化羊膜は角膜実質の代用物としてのみならず、広く眼表面疾患の手術材料として用いることができる可能性が高いため、以下の4項目に関し、主に動物実験を通して臨床応用可能な手術材料の開発を目指すこととした。

- (1) 代替角膜実質
- (2) 強膜菲薄化部位被覆材
- (3) 強膜コンタクトレンズ
- (4) 緑内障インプラント被覆材料

積層化透明化羊膜は積層化数・架橋回数を変えることで、任意に強度を変えることができ、また積層化などの処理を行う前に大きさを決める必要はあるが、代用実質としてのサイズ(直径8mm以下)から、眼表面全体を覆うサイズ(約直径30mm)まで任意に大きさを変更することができる。このため、直接縫合に対する強度が求められる代替角膜実質、更にハードコンタクトレンズ並みの硬さをもつ強膜コンタクトレンズの作成も可能である。また、従来緑内障インプラントを被覆するために保存強膜を用いてきたが、白色が強いためインプラントにトラブルがあっても内部の様子がわからないことが最大の問題となっていた。積層化透明化羊膜は強膜と同等の強度を持ちつつも透明であるため、このような被覆材としての応用も可能であると考えられる。更にいずれの応用を考えた場合でも、常温で長期間の保存が可能であることも利点となる。

(1)に関しては、予備実験(家兎への角膜表層移植)で既に積層化透明化羊膜が角膜縫合針による直接縫合に耐えうるということが判明しているが、積層数・架橋条件を更に詳細に検討することで、強度的に十分でかつ臨床応用可能な代替実質を世界に先駆けて開発することが可能である。

(2)に関しては、リウマチなどをベースとした重症の強膜炎では炎症そのもの、あるいは治療に使用するステロイドの副作用により緑内障をきたしたり、硝子体混濁をきたしたりすることによって大幅な視力低下に至ることがある一方で、遷延する眼表面の炎症によって強膜が広範に菲薄化してしまうため、緑内障手術(線維柱体切除術等)や硝子体切除術等の、強膜切開を伴う手術ができ

ず、失明に至ることがある。積層化透明化羊膜を強膜菲薄化部位の被覆材として用いることで、このような患者でもこれらの手術ができる環境を作り、失明を防ぐことができると考えられる。

(3) に関しては、Stevens-Johnson 症候群などの重症眼表面炎症性疾患では元々角膜上皮幹細胞が少ないうえに、瘢痕化した眼瞼や乱生する睫毛との接触により、角膜中央部実質に瘢痕が生じてしまうと、大幅な視力低下につながる。海外ではこのような症例に対して角膜径よりも大きなサイズの ScCL を用いることで角膜上皮を保護し、かつ角膜の変形を防ぐことで良好な視力を維持している報告がみられる(Tougeron-Brousseau B et al. Am J Ophthalmol 2009)。本研究では羊膜から作成することにより、それ自体が消炎効果を有した世界初の重症眼表面炎症性疾患治療用コンタクトレンズの開発が可能であると考えられる。

(4) に関しては、現在の緑内障インプラント手術では、表面を被覆している保存強膜ごしにはインプラントを観察することができないため、インプラントに問題があると考えられる場合は強膜を除去し、インプラントを観察した後再度強膜を移植せねばならないため、患者の負担は大である。これに対して積層化透明化羊膜でインプラントを被覆することができれば、被覆材ごしにインプラントの観察、更に必要に応じてインプラントを直視しながらの処置が可能であるため、患者の負担が軽減されるばかりでなく、世界的に問題となっているインプラントに関する合併症の大幅な軽減につながるものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では積層化透明化羊膜を用いて以下の4項目に関し、主に動物実験を通して臨床応用可能な手術材料の開発を目指すこととした。

- (1) 代替角膜実質
- (2) 強膜菲薄化部位被覆材
- (3) 強膜コンタクトレンズ
- (4) 緑内障インプラント被覆材料

(1) 代替角膜実質

予備実験で、代替角膜実質は一般的な角膜縫合針での縫合が可能であることが判明しているが、十分な強度を有する反面、透明度を十分に確保する必要があるため、積層化数と架橋回数を更に詳細に検討し、最適な条件を決定し、更に長期間の移植片安定性についても検討することとした。

平成25年度

予備実験で十分な強度が得られている積層化数から更に積層化数を増やした場合の透明度を比較し、最適な積層化数を決定する。次に架橋回数を数種類ふって比較し、縫合に

十分な強度を有しつつ、かつ透明性が高い条件を決定する。

平成26年度

家兔を深麻酔し、ヒト移植用の角膜トレパンを用い径6mmで角膜を半層切開する。ここに最適な条件で作られた積層化透明化羊膜を径6.5mmで打ち抜いたものをはめ込んで縫合する。移植後1・2・3・4週間後に、細隙灯顕微鏡装置で縫合不全・移植片脱落・移植片-ホスト角膜間炎症・代替実質上の上皮化について観察する。安楽死後眼球を摘出して角膜凍結切片を作成し、H-E染色・免疫染色・電子顕微鏡での形態学的評価を詳細に行う。

平成27年度

同様の手法により積層化羊膜を移植した家兔を移植6ヶ月まで経過観察し、1ヶ月毎の縫合不全・移植片脱落・移植片-ホスト角膜間炎症・代替実質上の上皮化について観察する。最終的に安楽死させ、前年度の短期観察同様の形態学的評価を行う。

(2) 強膜菲薄化部位被覆材

積層化透明化羊膜が強膜被覆材として使用可能であるかについての検討を行うこととした。強膜被覆材としては角膜に準じた強度があれば十分であると考えられるため、(1)の代替実質作成の条件検討で得られる代替実質をそのまま強膜菲薄化部位被覆材として用いることとした。

平成26年度

家兔を深麻酔して1/4象限の結膜を切開し、強膜を露出させる。眼科用メスで1cm×1cm四方の強膜を半層切開して除去する。ここに代替角膜実質と同条件で作成した積層化透明化羊膜を、強膜菲薄化部位被覆材としてはめ込んで縫合する。積層化透明化羊膜への結膜上皮の進展をみるため、切開した結膜は積層化透明化羊膜の上には被せない。移植後1・2・3・4週間後に、細隙灯顕微鏡装置で縫合不全・移植片脱落・移植片-ホスト強膜間炎症・積層化透明化羊膜上の上皮化について観察する。安楽死後眼球を摘出して移植片を含んだ強膜凍結切片を作成し、H-E染色・免疫染色・電子顕微鏡での形態学的評価を行う。

平成27年度

同様の手法により積層化羊膜を移植した家兔を移植6ヶ月まで経過観察し、1ヶ月毎の縫合不全・移植片脱落・移植片-ホスト角膜間炎症・積層化透明化羊膜上の上皮化について観察する。最終的に安楽死させ、前年度の短期観察同様の形態学的評価を行う。更に積層化透明化羊膜移植部分で緑内障濾過手術における強膜フラップ、硝子体切除術における強膜創がそれぞれ作成可能であるかにつき検討する。

(3) 強膜コンタクトレンズ

代替実質よりも架橋数を増やすことで硬さを増やすことが可能であるため、市販のハードコンタクトレンズに近い強度が得られるかをまず確認し、さらに炎症性眼表面疾患モデルにおいて、角膜上皮欠損の予防と消炎効果について検討することとした。

平成25年度

1・3・5・10層に各々積層化させた羊膜をそれぞれ回数をふって架橋したものと、市販品のハードコンタクトレンズとでひっぱり試験を行い、市販品に近い強度が得られているかを確認し、透明度と合わせて最適な積層化・架橋条件を決定する。

平成26年度

最適な条件で得られた積層化透明化羊膜を、角膜用の径12mmのトレパンで打ち抜き強膜コンタクトレンズとし、これを既報(Shahriari et al. Cornea 2008)に従って作成した眼表面炎症疾患モデル家兔に装用する。未装用群5匹と装用群5匹を装用開始から1・2・3・4週毎に細隙灯顕微鏡で観察し、コンタクトレンズ脱落の有無、角膜上皮欠損の面積、角膜混濁の面積、血管侵入の程度を比較する。また、各時点での炎症マーカー(TNF- α , IL-6等)・血管新生因子(VEGF等)の発現をreal-time PCR法で測定し、強膜コンタクトレンズが消炎作用を有するかにつき解析する。

平成27年度

強膜コンタクトレンズ作成時にステロイドまたはAvastin等の抗血管新生予防因子に浸漬したものを作成し、薬物徐放型コンタクトレンズとしての使用が可能であるかにつき検討を行う。

(4) 緑内障インプラント被覆材料

積層化透明化羊膜が緑内障インプラントの被覆材として適切であるか検討を行うこととした。(2)と同様、(1)で得られた代替角膜実質を被覆材として用いた。

平成26年度

既報により作成した緑内障モデル家兔に対して、緑内障インプラント手術を行う。その際に保存ウサギ強膜で被覆を行う群と積層化透明化羊膜で被覆する群それぞれを1・2・3・4週間毎に細隙灯顕微鏡で観察し、縫合不全・インプラント装置の視認性・眼圧について比較を行う。安楽死後眼球を摘出してインプラントを除去し、移植片を含んだ強膜凍結切片を作成し、H-E染色・免疫染色・電子顕微鏡での形態学的評価を詳細に行う。

平成27年度

同様に移植後6ヶ月までの長期検討を行う。最終的に安楽死させ、前年度の短期観察同様の形態学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) 縫合に十分な強度を有しつつ、かつ透明性が高い羊膜の積層化条件を決定した。これを代用角膜実質として家兔角膜を半層切開した部分に直接縫合して移植した。移植後1・2・3・4週間後に、細隙灯顕微鏡装置で縫合不全・移植片脱落・移植片-ホスト角膜間炎症・代替実質上の上皮化について観察した所、4週間後でも移植片の融解はみられず、良好な上皮化が観察された。組織学的検討では、移植された積層化羊膜への炎症細胞浸潤は軽微であった。更に移植後6か月後まで経過観察を行ったが、同様に移植片は安定した状態を保持していた。

(2) 同じ積層化羊膜を、家兔の強膜を半層切開した部分に直接縫合して移植した。代用角膜実質の実験と同様に、移植4週間後でも移植片の融解はみられず、上皮化も良好であった。組織学的検討でも、積層化羊膜への炎症細胞浸潤は軽微であった。同様に移植6か月後でも、移植片は安定した状態にあった。

(3) 強度が市販のコンタクトレンズに近く、透明度が最適な積層化・架橋条件を決定した。これを角膜移植用トレパンで打ち抜き強膜コンタクトレンズとし、眼表面炎症疾患モデル家兔に移植した所、4週後の時点で非装用の家兔に比べて角膜上皮欠損の面積が縮小し、炎症マーカー(TNF- α , IL-6等)・血管新生因子(VEGF等)の発現が抑制されたことが確認された。

(4) 既報により作成した緑内障モデル家兔に対して、緑内障インプラント手術を行った。その際に保存ウサギ強膜でインプラントの被覆を行う群と、積層化透明化羊膜で被覆する群それぞれを手術後1・2・3・4週間毎に細隙灯顕微鏡で観察した所、術後4週の時点で縫合不全はみられず、インプラント装置の視認性は積層化透明化羊膜移植群で良好であった。また術後6か月の時点でも同様にインプラント装置の視認性は良好であった。

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3件)

針谷威寛、丸山和一、杉田直、横倉俊二、外丸靖浩、清水則夫、中澤徹 角膜感染症におけるMultiplex PCRによる病原体の検索とその有用性について 2016年2月20日 第40回日本角膜学会・第31回日本角膜移植学会 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県軽井沢町)

横倉俊二、丸山和一、杉田直、針谷威寛、外丸靖浩、清水則夫、中澤徹 Multiplex PCRを用いた角膜保存液及びドナー・レシピエント角膜における微生物解析 2016年2月19日 第40回日本角膜学会・第31回日本角膜

移植学会 軽井沢プリンスホテルウエスト
(長野県軽井沢町)

針谷威寛、田中佑治、横倉俊二、中澤徹 化学架橋積層化ヒト羊膜の光学的、力学的特性の解析 2015年2月12日 第39回日本角膜学会・第30回日本角膜移植学会 高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市)
〔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：
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

横倉 俊二 (YOKOKURA, SHUNJI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：30400378

(2) 研究分担者

田中 佑治 (TANAKA, YUJI)

国立研究開発法人理化学研究所・情報基盤センター・常任研究員

研究者番号：40625513

渡邊 亮 (WATANABE, RYO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70625293

(3) 連携研究者

()

研究者番号：