

## 脱細胞化角膜の移植用角膜としての有用性

## Availability of decellularized cornea for corneal transplantation

- 橋本良秀 (東医歯大 生材研) 船本誠一 (札医大 第二外科) 佐々木秀次 (広尾病院 眼科)  
 根岸淳 (東医歯大 生材研) 本田貴子 (物材研 MANA) 服部晋也 (物材研 MANA)  
 藤里俊哉 (阪工大 工) 木村剛 (東医歯大 生材研) 小林尚俊 (物材研 MANA)  
 岸田晶夫 (東医歯大 生材研)

Yoshihide HASHIMOTO, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Seiichi FUNAMOTO, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sapporo Medical University

Shuji SASAKI, Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Hiroo Hospital

Jun NEGISHI, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Takako HONDA, International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Shinya HATTORI, International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Toshiya FUJISATO, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Tsuyoshi KIMURA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Hisatoshi KOBAYASHI, International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Akio KISHIDA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

**Abstract:** The purpose of this study is to prepare decellularized cornea to provide a corneal matrix mimicking that of the structure and mechanical property of native cornea and investigate feasibility of deep lamellar keratoplasty (DLKP) with a graft of decellularized corneal matrix obtainable by high hydrostatic pressurization (HHP) method. Complete removal of the cells was confirmed. The decellularized corneal matrix of 300  $\mu\text{m}$  thickness and 6.0 mm diameter was implanted on a 6.0-mm diameter keratectomy wound. The decellularized corneal matrices were opaque immediately after the operation, but became completely transparent after 6 months. Histological section revealed that the implanted decellularized corneal matrix was completely integrated with the receptive rabbit cornea and keratocytes infiltrated into the decellularized corneal matrix 6 months after the operation. Furthermore, no inflammation cells such as macrophages, or vascularization was observed during the implanted period. The decellularized corneal matrix obtained through HHP is useful graft for corneal tissue regeneration.

**Key Words:** Cornea, Decellularization, High-hydrostatic pressure, Xenotransplantation, Deep lamellar keratoplasty

## 1. 緒言

角膜移植は重篤な角膜疾患において最も効果的な治療法である。現在、角膜移植を要する患者は、世界中で 1000 万人以上と推定されているが、実際に角膜移植を受けている患者数は年間 12 万人に不足しており、多くの国で提供角膜不足が大きな問題となっている<sup>1)</sup>。また、全層角膜移植 (PKP) の約 30% で拒絶反応が惹起され、そのうち 5-7% が機能不全に至ることが報告されている<sup>2)</sup>。

このような問題を解決するために、合成高分子材料を用いた人工角膜の開発および再生医療技術による角膜再生が検討されている。前者では、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (PHEMA)、ポリビニルアルコール (PVA) などの透明で生体不活性な素材を用いた試みがなされている。しかしながら、生体組織と人工材料の接着性、形状のミスマッチおよび組織との機械的コンプライアンスが一致していないために生じるメカニカルストレスなどによって、局所のタンパク質分解酵素が活性化し、縫合部での実質融解による人工角膜の脱落が報告されている<sup>3)</sup>。後者では角膜上皮疾患に由来する症例に対する治療として、角膜上皮細胞シート移植や角膜輪部の幹細胞移植などが行われ、良好な成績を収めている。一方、角膜実質の再生に関しては、コラーゲン<sup>4)</sup>やフィブ

リン-アガロースゲル<sup>5)</sup>を用いた研究がなされているが、生体角膜に比べ脆弱かつ構造も大きく異なるなど、未だ臨床応用可能な材料は開発されておらず、人工角膜実質に対する技術開発が望まれている。

近年、角膜移植技術の向上により角膜パーツ移植が可能となり、疾患部位に限定した治療が行われている。特に、角膜実質疾患である角膜白斑や円錐角膜などの症例に対する治療として深層角膜移植 (DLKP) が行われている。DLKP は、自己の角膜内皮が温存できるので、内皮型拒絶反応のリスクがなく、また、全層角膜移植に比べて角膜内皮細胞の減少も抑えられることが期待される。

これまでに我々は、超高压技術により作製した脱細胞化角膜の人工角膜実質としての有用性について検討しており、脱細胞化角膜が正常角膜と同等の組織構造と物性を有していることを明らかにし、日本白色家兎へのポケット移植により透明性の確保および高い組織適合性について確認した<sup>6,7)</sup>。

本研究では、脱細胞化角膜の移植用角膜実質としての有用性を調べるために、脱細胞化角膜の深層角膜移植による角膜再生について検討した。

## 2. 実験

### 2-1 脱細胞化角膜の作製

成体ブタ眼球は東京芝浦臓器株式会社より入手した。眼球の角膜輪部に沿ってサージカルナイフで切開し、角膜を採取した。直ちに 3.5 % w/v Dextran、100 units/ml Penicillin および 0.1 mg/ml Streptomycin を含む PBS (DEX/PBS) で洗浄した。冷間等方加圧装置, *Dr. CHEF* ((株)神戸製鋼所)を用い、10°C 10,000 気圧の超高压印加処理を 10 分間行った後、直ちに 3.5 % w/v Dextran、0.2 mg/ml DNase I、100 units/ml Penicillin および 0.1 mg/ml Streptomycin を含む EGM-2 培地 (DEX/EBM) による振盪洗浄を 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 下にて 72 時間行い、細胞残渣を除去した。得られた脱細胞化角膜を組織学的観察および残存 DNA 定量により評価した。

### 2-2 深層角膜移植

日本白色家兎(2.5-3kg, 12 週令)を用いた。日本白色家兎の角膜中央に、真空トレパンを用いて直径 6mm の深層欠損(角膜上皮+角膜実質の全てを除去)を作製した。その後、欠損部位に脱細胞化角膜を移植し、10-0 ナイロンにて 16 針縫合した。移植片の透明化および再上皮化を経時的に観察し、6 ヶ月間後、HE、CD68、 $\alpha$ -SMA 染色により組織学的に評価した。

## 3. 結果と考察

日本白色家兎に対する脱細胞化角膜の深層角膜移植結果を Fig.1 に示す。移植直後では、脱細胞化角膜は白濁しているが、徐々に透明化した。移植後 3 ヶ月では、移植片とホスト角膜の境界部において若干の白濁が観察されたが、移植後約 4 ヶ月で完全に透明化した。この透明性は移植後 6 ヶ月においても維持された。

移植片の再上皮化は、フルオレセイン染色により評価した。移植直後では、移植片全体が黄色く染色されていることが分かる。その後は、移植片の上皮化が進行するに従い、フルオレセインにより染色される面積が減少した。移植片の再上皮化は、約 3 ヶ月の期間を要した。

移植後 6 ヶ月間の経過観察を行い、組織学的に評価した。HE 染色像において、血管新生および角膜上皮細胞のダウングロースは観察されず、移植片上に重層化したケラチン陽性の角膜上皮様構造が観察された。移植片とホスト角膜の境界部近傍においては、角膜上皮の過形成が認められたが、免疫染色の結果、核内増殖抗原(PCNA)が陰性であったことから、正常な角膜上皮が形成されたと考えられた。また、移植片内部では、角膜実質細胞の浸潤が認められ、移植した脱細胞化角膜とホスト角膜との明瞭な境界が見られないことから、移植片のリモデリングが行われていることが示唆された。移植用角膜としての有用性が示唆された。

### 謝辞

本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金、JST-CREST、JST-若手研究者ベンチャー創出事業および日本学術振興会科学研究費補助金により行われた。

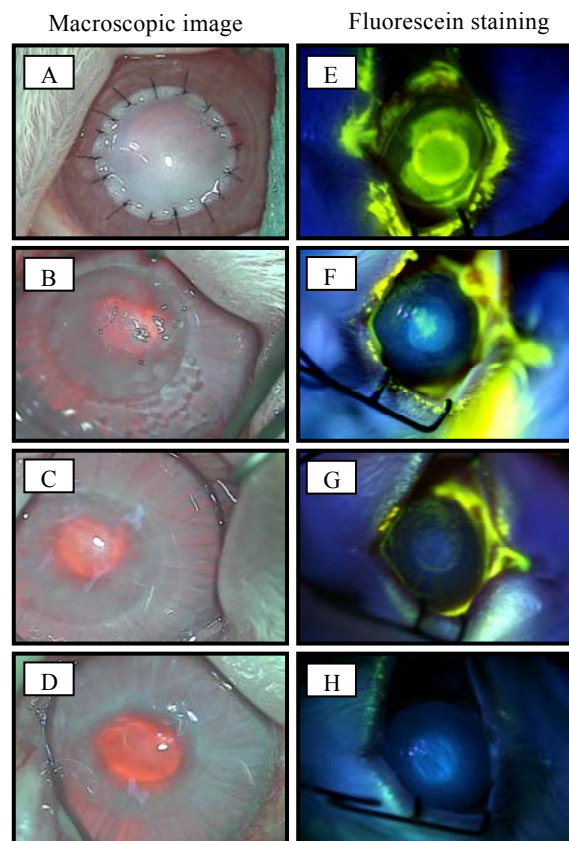


Fig.1 Representative images (left column) and fluorescein staining (right column) of transplanted decellularized cornea. (A, E) just after transplantation, (B, F) 1 month, (C, G) 2 months, (D, H) 6 months.

### 参考文献

- (1) World Health Organization. Report of Consultation Meeting on Transplantation with National Health Authorities in the Western Pacific Region. 2005: 1-63.
- (2) A. Panda, M. Vanathi, A. Kumar, et al. Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol* 2007; 52: 375-396.
- (3) Japan Eye Bank Association. Annual number of registrants, donors, transplants and patients awaiting transplants [in Japanese]. *Eye Bank J* 2005; 9(3): 137.
- (4) Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34: 2316-2324.
- (5) Miguel Alaminos, Maria Del Carmen Sanchez-Quevedo, Jose Ignacio Munoz-Avila, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 3311-3317.
- (6) S Sasaki, S Funamoto, Y Hashimoto, et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultra-high hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis.* 2009; 15: 2022-2028.
- (7) Y Hashimoto, S Funamoto, S Sasaki, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31: 3941-3948.