

論文の内容の要旨

論文題目 角膜再生医療用新素材による水疱性角膜症の
治療法開発に関する研究

氏名 吉田 絢子

背景

角膜混濁による失明者は世界中で160万人に上るとされ、角膜疾患は世界の主要な失明原因となっている。角膜は眼球の中で、眼球壁としての生体防御の役割および光を通し収束させるレンズの役割を果たす。角膜の内皮細胞は角膜の最内層で前房水と接し、前房水の実質への流入を防ぐバリア機能と実質から水をくみ出すポンプ機能を持ち、角膜の透明性を保つ役割がある。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では再生されないため、眼手術、外傷などである程度傷害されると、内皮機能不全をおこす。内皮機能の低下により角膜浮腫が進行し視力低下した病態を水疱性角膜症と呼ぶ。水疱性角膜症の根本的治療法は角膜移植のみである。角膜移植の問題点として世界的にドナーが不足していること、ドナー角膜の使用期限が約一週間と限られていることなどが挙げられる。角膜移植に代わる方法として培養ヒト角膜内皮細胞 (HCEC; human corneal endothelial cells) 移植を試みる研究がなされてきている。HCEC 移植にはキャリアが必要であると考えられるが、現在までのところ専用のものは開発されていない。本研究においては HCEC 移植用キャリア CV-CERT (collagen vitrigel for corneal endothelial regenerative

treatment) を開発し、CV-CERT を用いて開発された人工角膜内皮グラフトによる治療効果をウサギ眼において検討した。

目的

角膜内皮細胞移植のためのキャリアを開発し、培養ヒト角膜内皮細胞と組み合わせて人工角膜内皮グラフトを作製し、水疱性角膜症の治療研究を行う。

方法および結果

ブタ由来アテロコラーゲンを用いて平坦型の再生医療用コラーゲンビトリゲル膜 CV-RM (collagen vitrigel for regenerative medicine) を作製し、紫外線照射量の違いによる吸収スペクトルを測定したところ総紫外線量 2400 mJ/cm^2 ($600 \text{ mJ/cm}^2 \times 4$) のものが最も透明性が高かった。CV-RM と同様のビトリゲル薄膜を鋳型を用いて作製し上記の紫外線量を照射することで、半球面形状の角膜内皮細胞移植用コラーゲンビトリゲル薄膜 CV-CERT を作製した。膜透過性試験において CV-CERT はアルブミンを透過させた。ウサギ眼角膜実質層間と内皮面に CV-CERT を移植したところ炎症を惹起しなかった。CV-RM と CV-CERT をウサギ角膜後面にエアタンポナーデで付着させたところ、平坦型の CV-RM は術後角膜後面から脱落したのに対し、半球面形状の CV-CERT は付着したままであった。

CV-CERT 上に HCEC を播種する方法を考案した。この方法により HCEC 細胞密度 $2650 \pm 100 /\text{mm}^2$ の人工角膜内皮グラフトを作製した。デスメ膜を直径 8 mm の大きさに剥離したウサギ角膜に、直径 6 mm の人工角膜内皮グラフト移植、直径 6 mm の CV-CERT 単独移植、移植なしの 3 群にわけて手術を行った。それぞれ治療群、対照群、無治療群として術 14 日後まで観察をした。治療群においては術後軽度の角膜浮腫が残存したが、対照群・無治療群においては強度の浮腫がみられた。術後中央部角膜厚は治療群が、有意に他の 2 群よりも薄かった。観察期

間終了後摘出したグラフト上、治療群においては HCEC の生存は良好、また全群においてホスト内皮細胞の侵入は見られなかった。

考察

本研究で新規開発した CV-CERT の特徴として、ブタ由来アテロコラーゲンを用いていること、紫外線照射により透明性と強度を両立させたこと、角膜の湾曲に合うよう半球面形状をもつことがあげられる。キャリアの透明性と強度は内皮移植を成功させるのに必須でありそのための最適な紫外線照射量を検討した。CV-CERT は可視光の透過は良好な半面、紫外線吸光度は非常に高く、人工角膜として非常に適していると考えられた。その他 CV-CERT の良好な膜透過性、ウサギ眼における生体適合性、角膜後面の湾曲への良好な付着能が示された。CV-CERT 上に HCEC を播種する方法を考案し、内皮細胞密度が十分と考えられる人工角膜内皮グラフトを作製した。これにおいてバリア機能、ポンプ機能の指標である ZO-1、Na, K-ATPase の染色も確認された。本研究の主要評価項目は人工角膜内皮グラフト移植後の中央部角膜厚である。術後 14 日目までの観察期間において、治療群は対照群・無治療群に比べ有意に角膜厚を改善させた。これにより CV-CERT が角膜内皮細胞移植用キャリアとしての役割をはたし、作製された人工角膜内皮グラフトが一定の治療効果を持ったと言える。本研究の一番の問題点は治療後のウサギ角膜厚が対照に比べ有意差を持って改善したものの、正常角膜厚の 2 倍以上の厚み残り浮腫が完全に解消されなかった点である。この原因は作製した動物モデルによると考える。水疱性角膜症の治療実験として、過去の実験結果も踏まえ、ウサギ角膜内皮をデスメ膜ごとはぎとり、デスメ膜剥離面より径の小さいグラフトを移植する方法を用いた。このモデルにより生じた前房水の実質中への流入過多の状態は、流入量がほぼ不変で排出量が小さくなることで生じる水疱性角膜症のモデルとしては必ずしも臨床病態を十分に反映したも

のではなかった。今後、より長期間観察可能かつ水疱性角膜症の病態を確実に再現できる動物モデルの作製が必要である。

結論

新規開発したコラーゲン薄膜 CV-CERT は培養 HCEC 移植用キャリアとして有用で、これに培養ヒト角膜内皮細胞を組み合わせることで作製された人工角膜内皮グラフトは動物眼移植において治療効果を示した。