

「ケラチン材料を用いた

膀胱再建に関する基礎的研究」

東亜大学大学院 総合学術研究科
医療科学専攻
鈴木 理 功

「ケラチン材料を用いた

新規医療材料の開発に関する研究」

「目 次」

I 諸言	1
II 研究目的	3
III 試験方法	
1. 試薬	5
2. 器具・機器	6
3. 試料	
1) カメ甲羅	7
2) ケラチンスポンジ	
a ケラチン粉末作製方法	9
b ケラチンスポンジ作製方法	9
4. 試験動物	14
IV 試験方法	
1. 生体適合性試験	
1) カメ甲羅の皮膚内埋植試験	
a 移植片の調製	15
b 埋植試験	15
c 移植片摘出	15
2) ケラチンスポンジの腹腔内埋植試験	
a 移植片の調製	16
b 埋植試験	16
c 移植片摘出	16

3) カメ甲羅による結石形成試験	
a 移植片の調整方法	17
b 埋植試験	17
c 移植片摘出	17
2. 膀胱再建試験	
1) カメ甲羅による膀胱再建	
a 移植片の調製方法	22
b 埋植試験	22
c 移植片摘出	22
2) ケラチンスポンジによる膀胱再建	
a 移植片の調製方法	22
b 埋植試験	22
c 移植片摘出	22
3. 皮膚修復試験	
1) カメ甲羅による皮膚修復試験	
a 移植片の調製方法	23
b 埋植試験	23
c 移植片摘出	23
4. 形状変化試験	
1) ドーム形状のカメ甲羅	24
2) ロール形状のカメ甲羅	24
5. 組織標本作製法	24
6. アミノ酸組成分析	24
7. 走査型電子顕微鏡を用いた表面、断面分析	25
8. 引張試験	25

V 試験結果

1. 生体適合性試験

1) カメ甲羅の皮膚内埋植試験	26
2) ケラチンスポンジの腹腔内埋植試験	34

3) カメ甲羅による結石形成試験	41
2. 膀胱再建試験	
1) カメ甲羅による膀胱再建	44
2) ケラチンスポンジによる膀胱再建	52
3. 皮膚修復試験	
1) カメ甲羅による皮膚修復試験	54
4. 形状変化試験	
1) カメ甲羅の形状変化	59
5. アミノ酸組成分析	62
6. 走査型電子顕微鏡を用いた表面、断面分析	
1) カメ甲羅の表面分析	64
2) カメ甲羅の断面分析	66
7. 引張試験	68
VI 考察	70
VII 結論	79
引用文献	80
論文要旨	85
謝辞	88

I 諸言

膀胱は、低圧で多量の尿を貯留し必要に応じてこれを排出する器官である。現在、膀胱疾患に悩んでいる人は全世界で約 4 億人いるといわれているが¹⁻⁴⁾、膀胱機能が正常で疼痛がなく保たれていることは QOL (quality of life) の維持に重要なことである。

膀胱機能異常をきたす疾患には、先天性疾患、外傷、炎症、放射線障害、機能的拘縮など様々なものがある³⁾。これらの疾患では尿路感染や尿失禁、ひいては腎不全などを引き起こすため、QOL の改善ならびに尿路感染や腎不全防止を目的とした治療が必要となる。現状ではこのような症例に対しては自己の消化管の一部を用いて行う膀胱拡大術が行われているが⁴⁾、その場合腸を用いた複雑な形成手術が必要となり、それに伴う手術的侵襲や消化管粘膜に起因する結石形成や感染症、代謝異常、癌の発生など様々な合併症なども問題となっている⁵⁾。特に脊椎損傷や先天性二分脊椎などの患者においては、本来的には QOL の改善ならびに腎機能傷害や尿路感染症の防止を目的とした膀胱の拡大手術が必要であるにもかかわらず手術の負担が大きいことからこれを行えず、不便な生活を強いられている患者も多い。自己消化管を用いないその他の治療法としては他の器官を用いた方法や人工材料を用いた方法がある。生体由来の材料では硬膜、大網、腹膜など^{6,7,9-12,13-21)}、人工材料では和紙、シリコン、ポリビニルアルコール、テフロンなど²¹⁻²⁸⁾が検討されてきた。しかしながら、Taguchi ら¹⁹⁾の防水加工した和紙を用いた膀胱再建術を除いて、腎への尿の逆流や尿路閉塞による水腎症、腎盂腎炎、腹膜炎、膿瘍等の感染症、また異物による結石の形成のためいずれも不成功に終わっている^{6-8,29,30)}。

人工材料の種類による合併症の傾向としては非吸収性材料

では物理的な脆弱性や結石の形成、吸収性材料では線維芽細胞の増生やグラフトの萎縮など組織再生の不完全さが問題となる⁴⁾。一方、生体材料ではアルカロースなどの代謝障害や感染、粘液産生などが問題点として指摘されている⁴⁾。

膀胱を再建するためには、長期にわたり尿の貯留が可能なことや尿路外に溢流させないこと、尿中の物質の吸収をせず、生理的な範囲の温度、pHや浸透圧によって影響を受けないことなどが、適正条件としてあげられる。さらに、尿路再建の必要条件としてはその素材が生体内で安定であり、抗原性が低く、結石形成や感染の原因とならず、生体に加えられる種々の外力によって容易に変形するものであってはならない。反面、生体の動きにある程度対応しうる柔軟な構造も要求される。また、その使用にあたっては、生体の尿路との縫合が容易であるなど、取り扱いが簡便であることも重要な条件である。また、多くの研究者が膀胱再建の条件として生体分解性を挙げており、この場合、当然ながら正常の尿路組織が再生するまでの適当な期間、機械的強度を保つことが必要になる。また、長期的な安全性として発癌性のないことが要求される^{31,32)}。

本研究では、膀胱再建の新規医療材料としてケラチンを用い研究をした。ケラチンは羊毛やヒトの毛髪、爪、カメ甲羅などの主成分である硬タンパクの一種であり³³⁾、近年、羊毛から抽出したケラチンスポンジを用いて再生医療の足場材料の研究が進められており、細胞播種した実験では生体適合性においても良好な成績が報告されている^{34,35)}。また、本研究では生体材料としてケラチンスポンジよりも物理的強度や尿の貯留に優れるカメの脱皮した甲羅に着目し、膀胱再建に関する研究を行い、その有用性について知見を得た。

本研究のようにケラチンスポンジ及びカメの甲羅を用いて膀胱再建を行ったのは、国内外を通じて今回が初めてである。

II 研究目的

膀胱疾患に苦しむ患者を救うため、長年にわたり研究者達が膀胱再建に向けて様々な医療材料を用いて研究をおこなっているが、現在においても有効な膀胱再建材料は開発されていない。そのため、近年は膀胱拡大術や膀胱がんなどの悪性腫瘍等に対する膀胱摘出後の膀胱再建術の補填材料に自己の消化管（胃、腸など）の一部を用いて再建する方法が一般的となっている³⁶⁾。しかしながら、これらの再建法は、正常な消化管を失うばかりか、膀胱再建部位において複雑な形成手術が必要となり、患者に対して多大な侵襲を与える。さらに、消化管を膀胱再建材料として用いるため消化管粘膜に起因する結石形成や代謝障害、感染症、癌の発生等、術後の様々な合併症が問題となっている³⁶⁾。従って、膀胱再建に有効な医療材料を用いて再建をおこなうことができれば、自己の正常な器官を失わず、膀胱を再建することができ、患者のQOLは大きく向上すると考えた。そのため、再建の可能性のある新しい素材の医療材料を用いて膀胱再建を実施した。

膀胱再建材料の必要な条件としては生体内で安定であり、結石形成や感染原因とならず、加えられる種々の外力によって容易に変形するものであってはならない。反面、生体の動きにある程度対応しうる柔軟さも要求される。また、その使用にあたっては膀胱と材料との間に尿漏れのない縫合が可能であること、取扱いが簡便であることが挙げられる。さらに近年の研究から生体分解性が挙げられており、その際、正常な膀胱組織が再生するまでの適当な期間、機械的な強度を保つこと、長期的な安全性として発がん性がないことなどが要求される³⁶⁾。著者は、本実験を行う前にコラーゲンフィルムやコラーゲンスポンジなどの医療材料を用いて膀胱再建を試みたが、いずれも移植片の機械的強度不足により亀裂・破損

が生じ、移植片と膀胱との間で密な縫合が行うことができず、その結果尿漏れが生じた。

今回は、新しい膀胱再建材料としてケラチンスポンジとミシシippiaカミミガメ (*Trachemys scripta elegans* (Wied-Newwied,1839))に着目した。

ケラチンスポンジは近年注目されているティッシュエンジニアリング（再生医工学）の足場材料として研究が進められている。ケラチンスポンジは生体内に埋め込まれた後、細胞が増殖しやすいようにスポンジ状に加工されており、近年の研究ではこの材料が生体適合性や細胞接着性、生体分解性を有することが報告されている^{34,35)}。しかしながら、膀胱再建材料としての試みはなされておらず、今回はケラチンスポンジを用いて膀胱再建を実施し、その有用性について検証した。さらに膀胱再建材料にミシシippiaカミミガメの脱皮した甲羅（以下カメ甲羅と略す）を使用した。生体材料であるカメ甲羅はケラチンスポンジと比較して物理的強度に優れる。そのため密な縫合が可能となり、尿の貯留性（水密性）の維持や日常生活での体動による縫合の緩みなどが生じることが少ないことが期待された。

本研究では、これらの材料を用いて生体適合性試験と膀胱再建試験を実施し、物理学的特性から膀胱再建材料として使用可能であるかを検証すること、生物学的特性から膀胱再建材料に必要な機能を有しているかアミノ酸組成分析や引張試験を行い検証することを目的とする。

Ⅲ 実験方法

1. 試薬

- ・ 特級ピロ亜硫酸ナトリウム (Sigma-Aldrich Japan)
- ・ 特級ラウリル硫酸ナトリウム (Sigma-Aldrich Japan)
- ・ 特級塩化ナトリウム (片山化学工業株式会社)
- ・ 特級尿素 (片山化学工業株式会社)
- ・ 特級 70% エタノール (片山化学工業株式会社)
- ・ 特級 99% エタノール (片山化学工業株式会社)
- ・ 一級 99% ジエチルエーテル (Sigma-Aldrich Japan)
- ・ 生理食塩水 (扶桑薬品工業株式会社)
- ・ ネオヨジゲル (岩城製薬株式会社)
- ・ オリーブ油 (タツミ薬品工業株式会社製)
- ・ 4% w/v ホルマリン (Sigma-Aldrich Japan Lot03K4380)

2. 器具・機器

- ・ 透析用セルロースチューブ
(分画分子量：12,000～14,000 ケニス株式会社)
- ・ キムタオル (株式会社クレシア)
- ・ 分解性縫合糸バイクリル J593G
(日本パラメディック株式会社製)
- ・ サランラップ (旭化成ホームプロダクト株式会社)
- ・ スプレードライヤー造粒乾燥装置 Pulvis Mini-Spray GA32
(ヤマト科学株式会社)
- ・ ロータリー式エバポレーター N-11
(東京理科機械株式会社)
- ・ 凍結乾燥機 FLEXI-DRY MP
(株式会社セントラル科学貿易)
- ・ 高圧蒸気滅菌装置 SP500 (ヤマト科学株式会社)
- ・ スクリュー管瓶 20ml (アズワン)
- ・ 全自動アミノ酸分析装置 JLC-500/V (日本電子)
- ・ フィールドエミッション走査電子顕微鏡 JSM-7000F
(日本電子(株))
- ・ ミクロトーム RM2255
(ライカマイクロシステムズ株式会社)
- ・ 引張圧縮試験機 AG-G250kN
(株式会社島津製作所 オートグラフ)

3. 試料

1) カメ甲羅

10年間飼育されたカメの脱皮した甲羅を被検物質として用いた（図1）。試料を採取したカメ（*T. scripta elegans*）は1年に1度脱皮する。その甲羅を採取して乾燥状態で直射日光が当たらない場所で室温にて半年間保管した。

カメ甲羅は使用前に注射用蒸留水で十分に洗浄し、汚れを取り除いた。洗浄した甲羅を一晚注射用蒸留水に浸漬し、軟化させた。

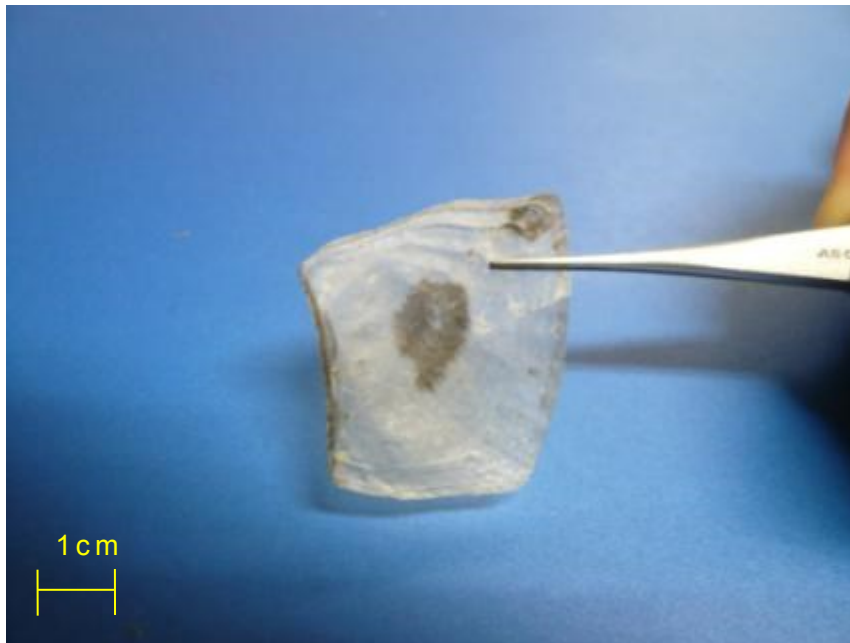


図 1 脱皮したカメ甲羅

移植材料に用いたカメ甲羅である。甲羅中央部に見られる黒い模様はカメの斑紋である。

2) ケラチンスポンジ

a ケラチン粉末作製方法

ピロ亜硫酸ナトリウム 150g、尿素 720g、ラウリル硫酸ナトリウム 75g の混合水溶液 1.5L を作製した。羊毛 150g を加えて 100℃、30 分間還元処理することにより、羊毛からケラチンを抽出した。得られた水溶液を濾過し、ケラチン水溶液と残留不溶物に分画した。ケラチン水溶液を透析用セルロースチューブに充填し 7 日間蒸留水にて透析した後、ロータリー式エバポレーターで濃縮した。精製ケラチン水溶液を 50℃ でスプレードライ乾燥して、粉末状ケラチンを作製した (図 2)。

b ケラチンスポンジ作製方法

塩化ナトリウムをボールミルで粉砕後、100 μ m の標準ふるいを使用し、100 μ m 以下の塩化ナトリウム粒子を回収した。ケラチン粉末 0.2g と尿素 0.4g を乳鉢の中で均一に混合した。ケラチン-尿素混合粉末 0.6g に塩化ナトリウム 3.0g を加えて、均一に混合した。40 \times 40mm の凹金型にアルミホイルを敷き、ケラチン尿素粉末をふるいにかけて調製した塩化ナトリウム粒子で充填し、その上にさらにアルミホイルをかぶせた。凸金型をのせて、140℃ で 5 分間圧縮成型した。成型物を金型からはずし、室温で冷却した後、デシケーター内で保存した (図 3)。

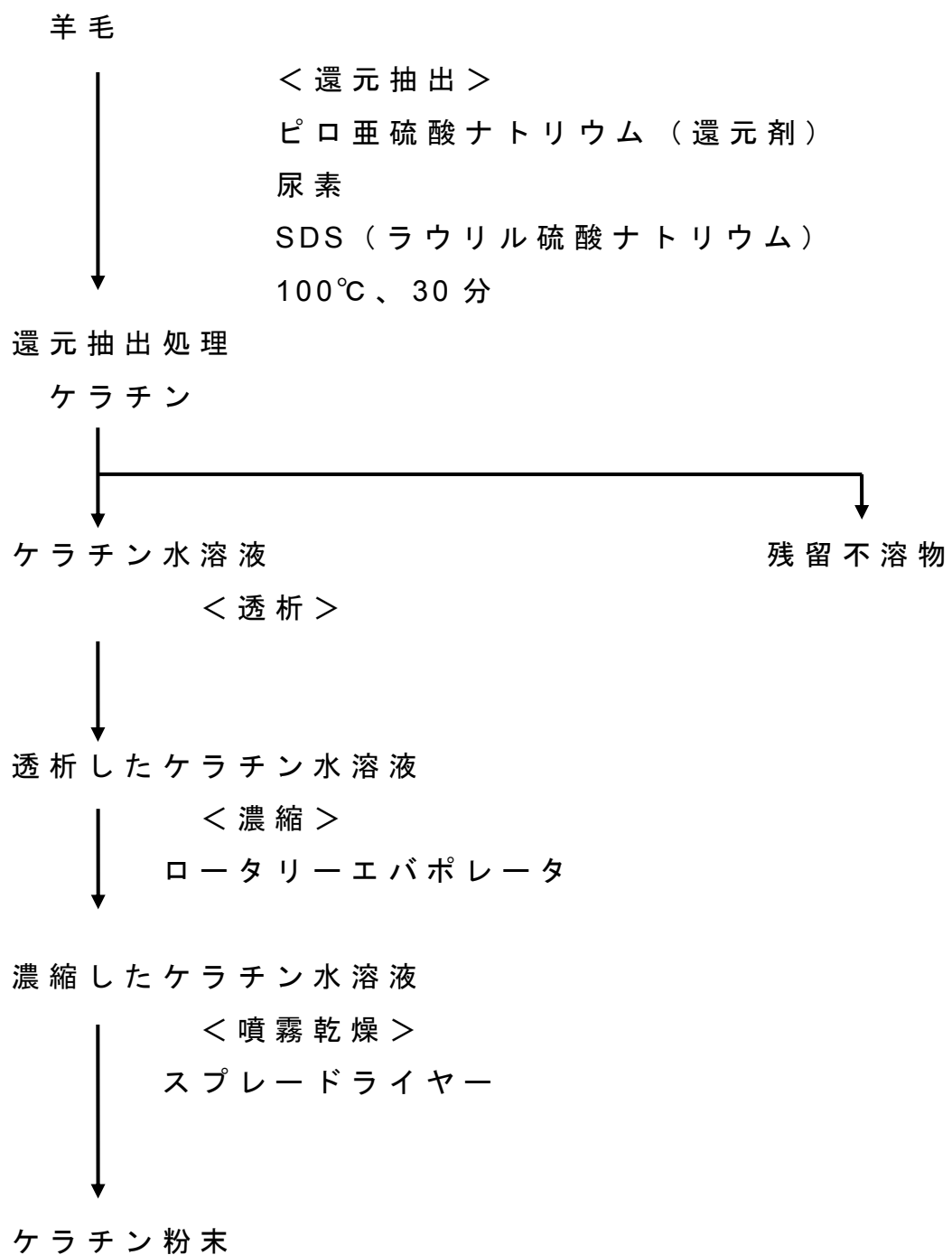


図 2 ケラチン粉末作製方法

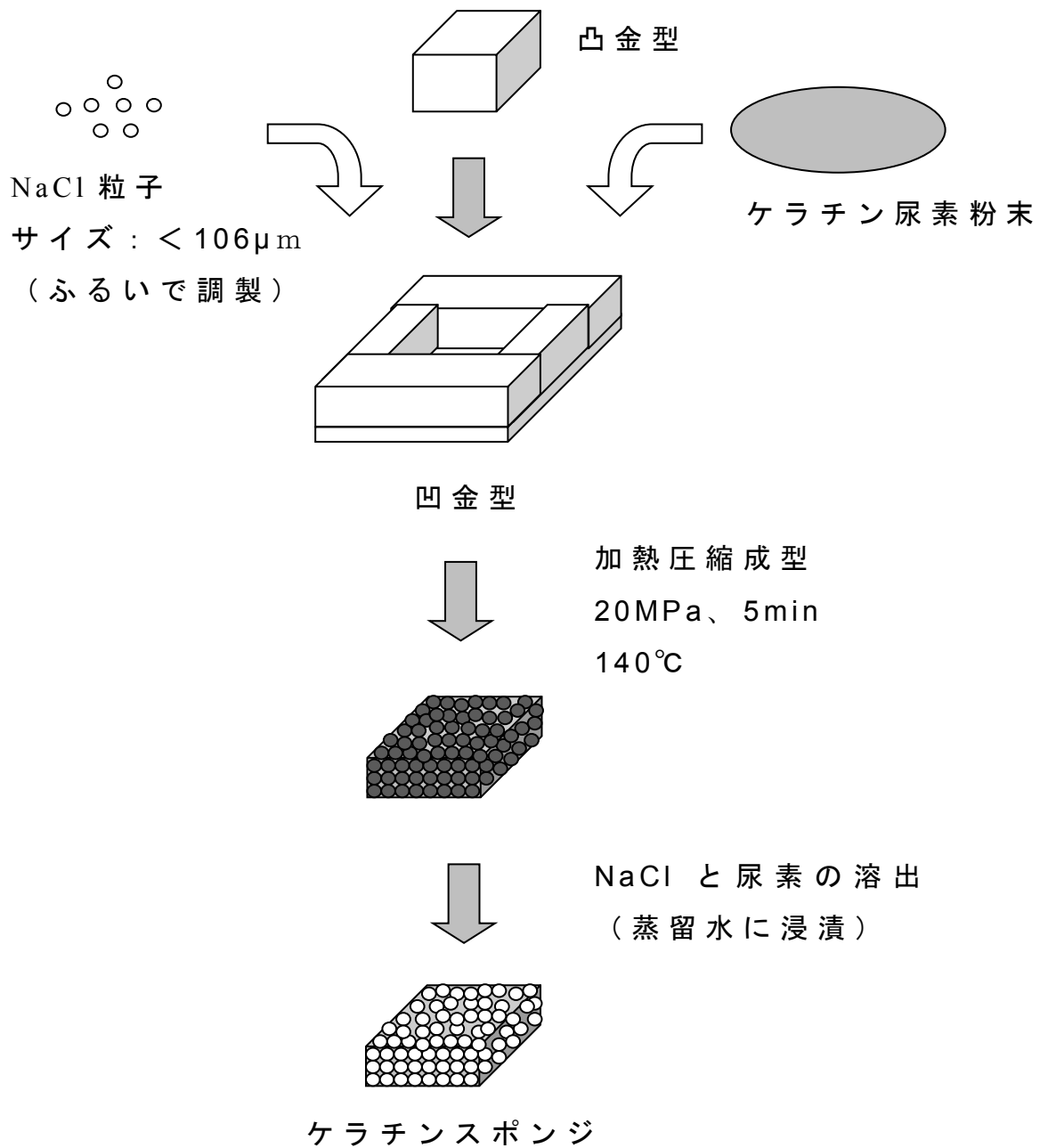


図 3 ケラチンスポンジの作製方法

次に成型物を 99%エタノールに 24 時間浸漬した。アルミホイルを成型物から慎重に剥がし、エタノールと同量の蒸留水を加え 1 時間静置した。つぎに大量の蒸留水(500cc 程度)に成型物を移し、塩化ナトリウムと尿素を溶出させた。1 時間ごとに蒸留水を交換し、24 時間実施した。つぎに、60℃温浴中で 2 日間ゆっくり振とうした。処理後、室温蒸留水に移した。

その後、蒸留水からケラチンスポンジを取り出し、キムタオルの上に置き、ケラチンスポンジの水分を取り除いた。その後、すぐにシャーレに移した。シャーレを -80℃の冷凍庫に移し、約 4 時間ケラチンスポンジを凍結させた。シャーレを凍結乾燥機に移し、一晩減圧乾燥した。乾燥後はデシケータに入れ、使用するまで保存した(図 4)。

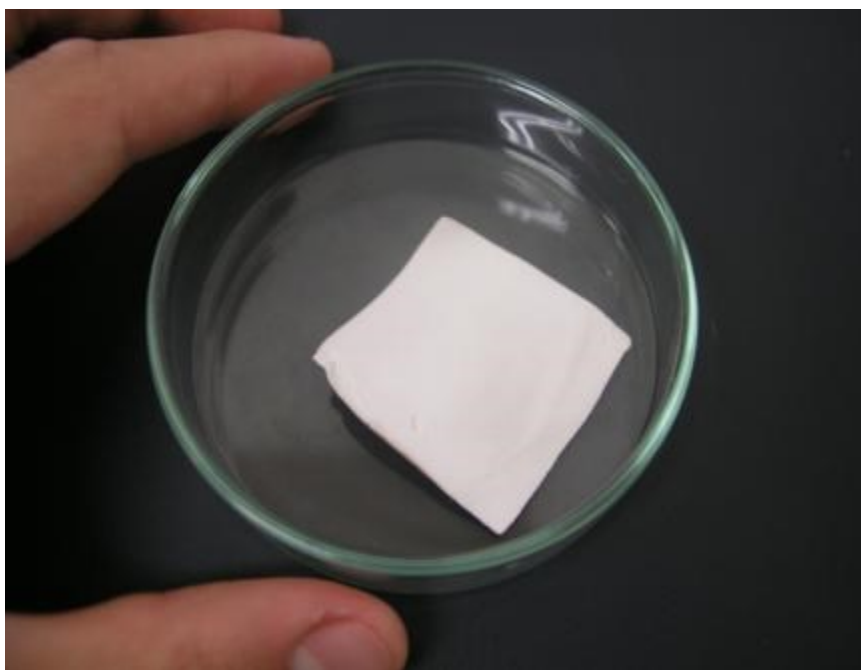


図 4 凍結乾燥後のケラチンスポンジ

4. 試験動物

試験動物は10週齢のSD (Sprague-Dawley) ラット雌 (九動株式会社) を用いた。搬入後、約1週間予備飼育を行って健康に異常のないことを確認した後、使用した。ラットはFRP (Fiber Reinforced Plastics) 製のケージに収容し、照明時間12時間/日に設定した飼育室にて飼育した。飼料はラット用固形飼料を給与し、飲料水は水道水を自由に摂取させた。

また、試験動物は国際的に普及・定着している動物実験の基本理念である「3Rの原則」に基づき試験を実施した。

さらに試験動物の生理、生態、習性などに配慮し、動物に対する愛護の念と責任を持って適正な飼育環境下で管理し飼育した。

IV 試験方法

1. 生体適合性試験

1) カメ甲羅の皮膚内埋植試験

a 移植片の調製

軟化したカメ甲羅をハサミで切り取り、楕円形に成形した後、アルコールランプで熱したピンセットの先を押しあて、直径 1mm の縫合用の穴を 6 箇所あけた。これを 3 枚作成し高圧蒸気滅菌装置を用いて 121℃、20 分間滅菌処理を施した。

b 埋植試験

99%ジエチルエーテルをガーゼに染み込ませ、吸入麻酔にて全身麻酔をかけた後、剃毛機を用いて背部の体毛を剃毛した。つぎに、剃毛部に外用殺菌消毒剤のネオヨジンを塗布した。その後、ハサミを用いてラットの背部表皮を 5cm 縦に切開し、作製したカメ甲羅を皮下組織に分解性縫合糸にて 6 箇所縫合をした。術後、創傷部位にはネオヨジンを塗布した。

c 移植片摘出

移植後、経過観察を続け術後 7 日、14 日、21 日後に 1 匹ずつ移植片を摘出した。移植片を摘出する際はガーゼに 99%ジエチルエーテルを染み込ませ、吸入麻酔にて全身麻酔をかけた後、表皮を剥離し、甲羅を中心に 3cm×3cm の広さの表皮を切断し、移植片を摘出した。

2) ケラチンスポンジの腹腔内埋植試験

a 移植片の調製

メスを用いて 3cm×3cm の正方形にケラチンスポンジを切断した。切断したスポンジを 70%エタノール 100ml に浸し、室温で 2 時間静置してスポンジを消毒した。スポンジを滅菌した生理食塩水 100ml を入れ、1 時間緩やかに振とうした。これを 20 回繰り返した。これによってケラチンスポンジ内のエタノールを洗い流した。この調製方法にて移植片を 3 枚作製した。

b 埋植試験

99%ジエチルエーテルをガーゼに染み込ませ、吸入麻酔にて全身麻酔をかけた後、70%エタノールで腹部を十分に消毒した。つぎにハサミを用いて表皮を 10cm 切断した。その後、ラット腹膜を切開し、腹腔内に作製したケラチンスポンジを埋植し、腹壁の二層縫合を行った。術後、創傷部にはネオヨジンゲルを塗布した。

c 移植片摘出

カメ甲羅移植片摘出と同様に行い、術後 7 日、14 日、21 日後に 1 匹ずつ移植片を摘出した。全身麻酔をかけた後、表皮を剥離、腹膜を切開し、腹腔内の移植片の状態を確認し摘出した。

3) カメ甲羅による結石形成試験

a 移植片の調整方法

カメ甲羅移植片の調整と同様に作製し、移植片の大きさはラット膀胱に移植する部位の大きさ（1cm×1cm）に合わせ、加工した（図 5）。

b 埋植試験

試験動物は全身麻酔をかけた後、ハサミを用いて膀胱直下の腹部表皮を 5cm 開腹した。その後、ラット腹膜を切開し、膀胱を露出させた（図 6）。膀胱の両端をピンセットで固定した後、5mm 切開をし、膀胱内に作成したカメ甲羅の移植片を入れ、分解性縫合糸バイクリルにて膀胱を縫合した（図 7）。膀胱からの尿の溢水がないことを確認し、腹壁の二層縫合を行った。術後、創傷部にはネオヨジンゲルを塗布した。

c 移植片摘出

SD ラットメス 2 匹を 1 年間経過観察したのち、試験動物に全身麻酔をかけ、表皮を剥離、腹膜を切開し恥骨結合をハサミで切断した。その後、オリーブ油を塗布したカテーテルをラット尿道より挿入し、4%w/v ホルマリンを 5ml 注入した（図 8）。ラット膀胱を膨張させ、水蜜性について確認後、ラット膀胱を摘出した。摘出後、膀胱内にあるカメ甲羅を取り出し、膀胱および尿道管腔を観察し、結石の有無を確認した。



図 5 膀胱再建に用いた移植片
脱皮したカメ甲羅を移植部位型に成形したもの。

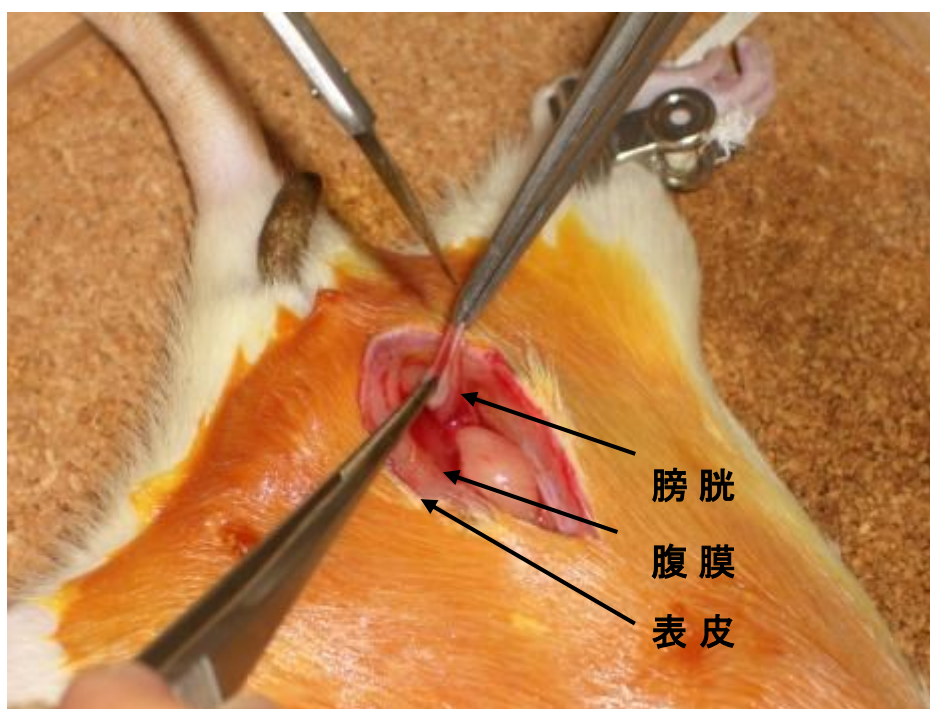


図 6 ラット膀胱の露出
ラット腹膜を切開し、膀胱を露出させている様子。



図 7 移植片の縫合部

カメ甲羅で作製した移植片を分解性縫合糸にて 6 所縫合したもの。

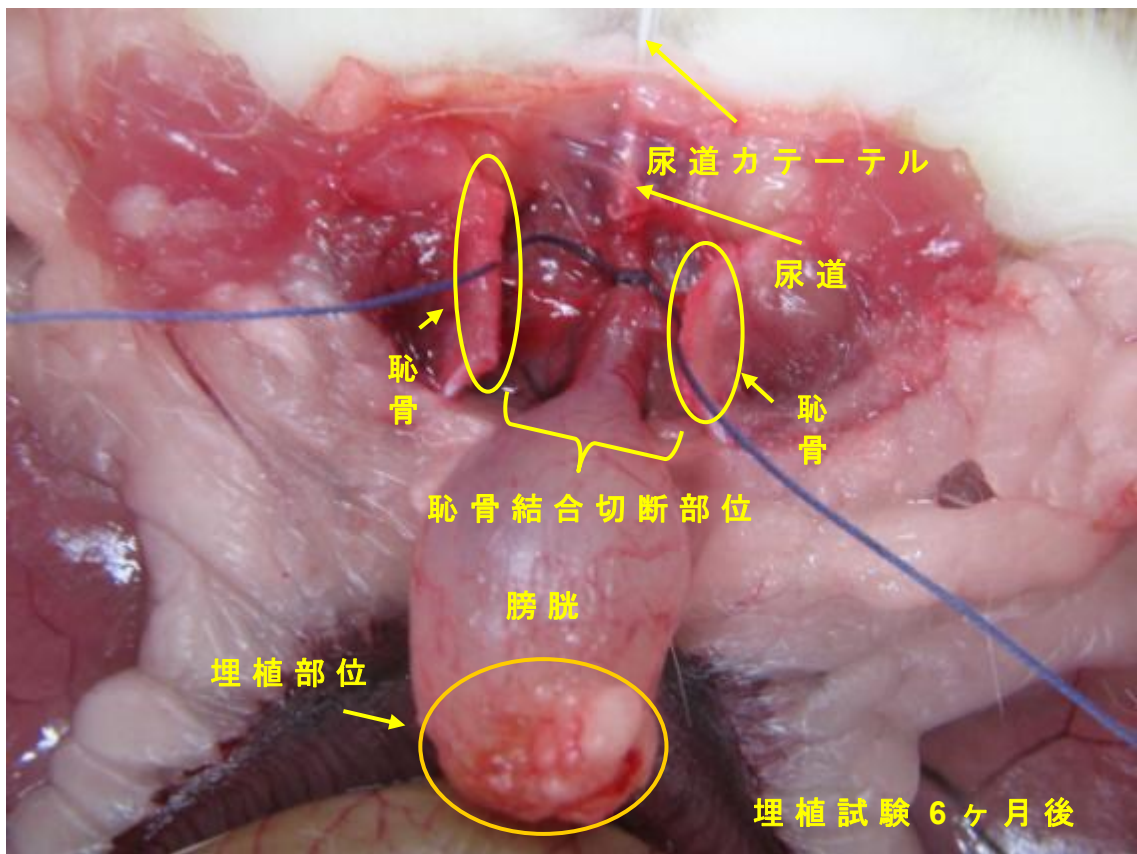


図 8 埋植試験 6ヶ月後の移植片摘出
尿道カテーテルを尿道に挿入し 4%w/v ホルマリンを注入している様子。

2. 膀胱再建試験

1) カメ甲羅による膀胱再建

a 移植片の調製方法

カメ甲羅の皮膚内埋植試験と同様に実施し、移植片はラット膀胱に移植する部位の大きさ（1cm×1cm）にハサミで切り取り、楕円形に成形した。

b 埋植試験

カメ甲羅による結石形成試験と同様に埋植試験を実施した。

c 移植片摘出

SDラットメス 35 匹に移植片を埋植した後、経過観察を続け 1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年ごとに 7 匹ずつ移植片を摘出した。移植片を摘出する際はカメ甲羅による結石形成試験と同様の方法で摘出した。

2) ケラチンスポンジによる膀胱再建

a 移植片の調製方法

ケラチンスポンジをラット膀胱に移植する部位の大きさ（1cm×1cm）に合わせ、ハサミで切り取り楕円形に成形した。

b 埋植試験

カメ甲羅による結石形成試験と同様の方法で実施した。

c 移植片摘出

SDラットメス 5 匹に移植片を埋植した後、経過観察を続けたが尿漏れや感染症により 1～2 日で死亡したため、開腹し移植片の状態を確認後、移植片周囲を摘出した。

3. 皮膚修復試験

1) カメ甲羅による皮膚修復試験

a 移植片の調製方法

カメ甲羅の皮膚内埋植試験と同様に作製し、皮膚欠損部位に移植する部位の大きさ（2cm×2cm）に合わせ、ハサミで切り取り楕円形に成形した。

b 埋植試験

カメ甲羅の皮膚内埋植試験と同様に全身麻酔、剃毛処理後、消毒を行い、ハサミを用いてラット背部の切開し、2cm×2cmの表皮層および真皮層を取り除き、欠損部位とした。欠損部位に作製した甲羅の移植片を分解性縫合糸バイクリルにて6箇所縫合をした。術後、縫合部にはネオヨジンを塗布した。

c 移植片摘出

SDラットメス5匹に埋植した後、経過観察を続け7日、14日、21日、28日、35日後に1匹ずつ摘出した。摘出方法はカメ甲羅の皮膚内埋植試験と同様に実施した。

4. 形状変化試験

1) ドーム形状のカメ甲羅

軟化させたカメ甲羅を 1cm×1cm の大きさにハサミで切断し、直径 1cm のステンレス製の球に覆うようにカメ甲羅を密着させた。さらにカメ甲羅をサランラップで覆い、外れないように輪ゴムで固定した。7 日間後に開封し、ドーム形状のカメ甲羅を取り出した。

2) ロール形状のカメ甲羅

軟化させたカメ甲羅を 3cm×3cm の大きさにハサミで切断した。つぎにステンレス製の棒に密着させるように巻いた後にサランラップでカメ甲羅を覆った。7 日間後に開封し、ロール形状のカメ甲羅を取り出した。

5. 組織標本作製法

埋植試験後に摘出した移植片は、4%w/v ホルマリンで 3 日間固定後パラフィン包埋を行い、3 μ m 切片を作製した後、HE (Hematoxylin-Eosin) 染色を用いて組織学的検討を行った。さらに、カメ甲羅による膀胱再建の移植片は HE 染色とトリパンブルー染色の 2 つの染色法を用いて組織学的検討をおこなった。

6. アミノ酸組成分析

乾燥させたカメ甲羅とケラチンスポンジをそれぞれ 272ng、287ng 計量し、6N 塩酸（フェノール 0.1% 添加）中、110 $^{\circ}$ C、24 時間加水分解を行った後、エバポレーターで乾固し塩酸を除去した。

処理した検体をアミノ酸分析機（全自動アミノ酸分析装置 日本電子 JLC-500/V）を用いて、ニンヒドリンを用いたポストカラム発色法³⁷⁾により、試料中のアミノ酸の定量を行った。

7. 走査型電子顕微鏡を用いた表面、断面分析

カメ甲羅をフィールドエミッション走査電子顕微鏡（日本電子（株）JSM-7000F）を用いて表面、断面について分析した。表面分析は、検体を10mm×10mmに切断後、白金パラジウムでコーティングした上で走査型電子顕微鏡にて分析した。断面分析は、検体をミクロトーム（ライカマイクロシステムズ株式会社 RM2255）を用いて観察断面を調整した後、分析を実施した。

8. 引張試験

引張試験はケラチンスポンジおよびカメ甲羅の試験片を20mm×20mm×1mmに成形し、湿度23℃、相対湿度50%の環境下で約100時間放置して調整した。試験機には引張圧縮試験機（株式会社島津製作所 オートグラフ AG-G250kN）を用いて試験速度を1mm/minに設定し引張試験を実施した。

V 実験結果

1. 生体適合性試験

1) カメ甲羅の皮膚内埋植試験

カメ甲羅が膀胱再建材料の必須条件である生体適合性の有無について確認するため、ラットの皮膚内にて埋植試験を行った。SDラット3匹を用いてラット背部皮膚内にカメ甲羅を移植し、試験期間後に肉眼的観察を行い、その後移植片を摘出した。その結果を表1に示す。今回、試験期間を7日、14日、21日としたが全てのラット(1~3)は試験期間終了まで生存し、感染症や拒絶反応による死亡は認められなかった。試験期間終了後に移植片周囲の表皮を剥離し、肉眼的観察を行ったが全てのラットにおいて移植部周囲に炎症反応や感染症の所見は認められなかった。また、移植した移植片周囲には皮下組織の伸展や血管新生が認められた(図9)。摘出した移植片の組織標本を作製し、組織学的検討を行った結果を図10~図14に示す。図10は埋植14日経過後のカメ甲羅をホルマリン固定したマクロ像、図11はカメ甲羅を埋植した皮膚の組織像埋植組織像である。埋植した甲羅は肉芽組織で覆われ、一部は甲羅内に組織が浸潤している箇所も確認された。また、著しい炎症反応や拒絶反応は確認されなかった。通常、HE染色では細胞、カメ甲羅が共に赤く染色される(図12)が、軟骨組織などを染色する際に用いるトリパンブルー染色を用いたところ、表皮、真皮、皮下組織が染色されず、ケラチンを含むカメ甲羅やラットの毛、毛球部が青く染色された。この染色法を用いることによって移植片をより鮮明に染色することができることがわかった(図13、図14)。

これらの結果より、肉眼的所見、組織学的所見においても移植片は皮膚内において炎症反応や拒絶反応などの所見を呈さないと認められ生体適合性を有していることが確認された。

表 1 埋植試験結果

ラット番号	試験期間	飼育期間	転帰	肉眼的所見
1	7日	7日	生存	炎症・感染なし
2	14日	14日	生存	炎症・感染なし
3	21日	21日	生存	炎症・感染なし

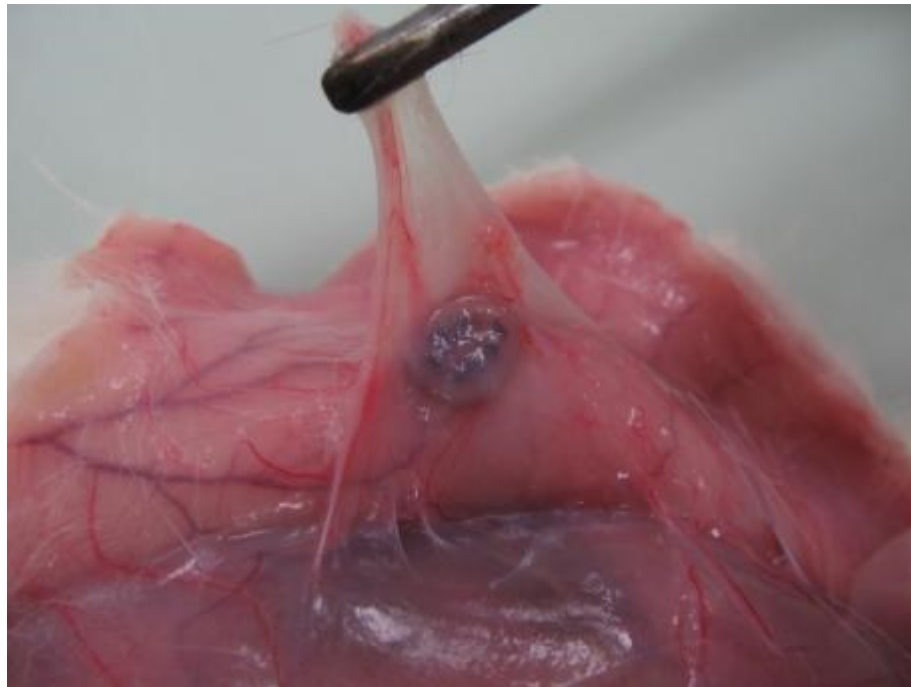


図 9 埋植したカメ甲羅の外観(ラット No.1)
術後 7 日後に開腹し、カメ甲羅を埋植した局所の変
化を確認した様子。

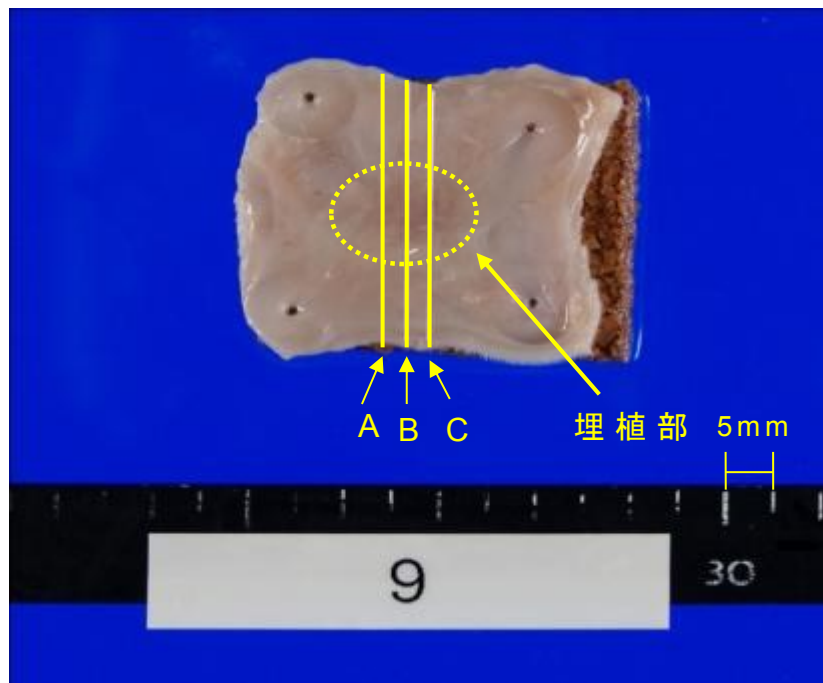


図 10 ホルマリン固定後のカメ甲羅摘出移植片
(ラット No.2)

術後 14 日後のカメ甲羅移植片をホルマリン固定したマクロ像である。

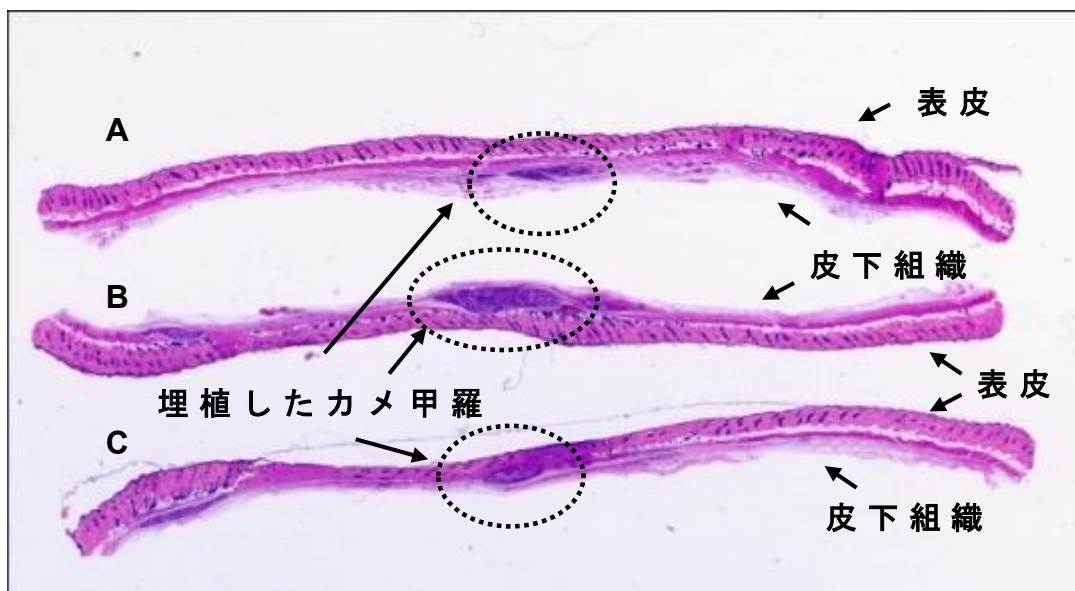


図 11 カメ甲羅を埋植した皮膚の組織像

(HE 染色 術後 14 日後 ラット No.2)

カメ甲羅埋植部を中心に 3 つに切断し (図 10 の A、B、C) HE 染色した組織標本である。各 A、B、C の標本で埋植したカメ甲羅が観察できる。

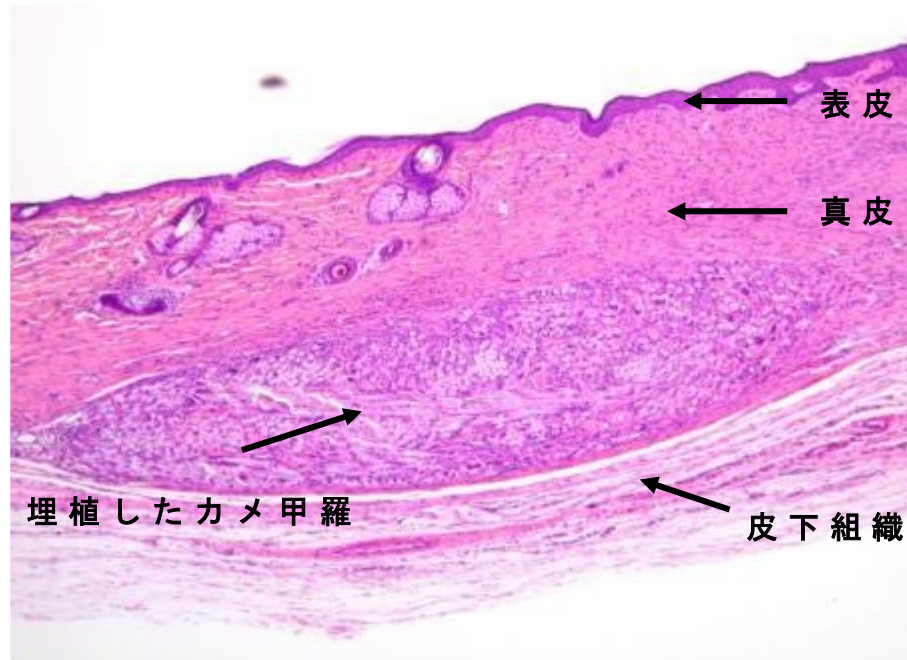


図 12 カメ甲羅を埋植した皮膚の組織拡大像
(HE 染色 ラット No.2 倍率×20)

図 11C の埋植したカメ甲羅部分を拡大した組織像である。
移植片が真皮と皮下組織に埋植されている様子が観察できる。

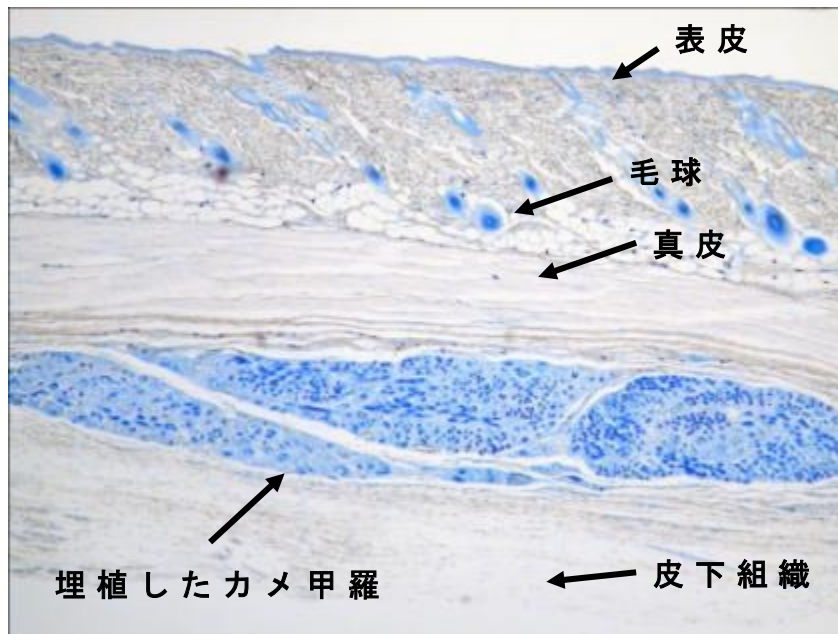


図 13 カメ甲羅を埋植した皮膚の組織像

(トリパンプルー染色 ラット No.2 倍率×20)

図 11A の埋植したカメ甲羅部分をトリパンプルー染色し、拡大した組織像である。トリパンプルー染色では、表皮、真皮、皮下組織が染色されず、ケラチンを含むカメ甲羅やラットの毛、毛球部が染色されることが観察できる。

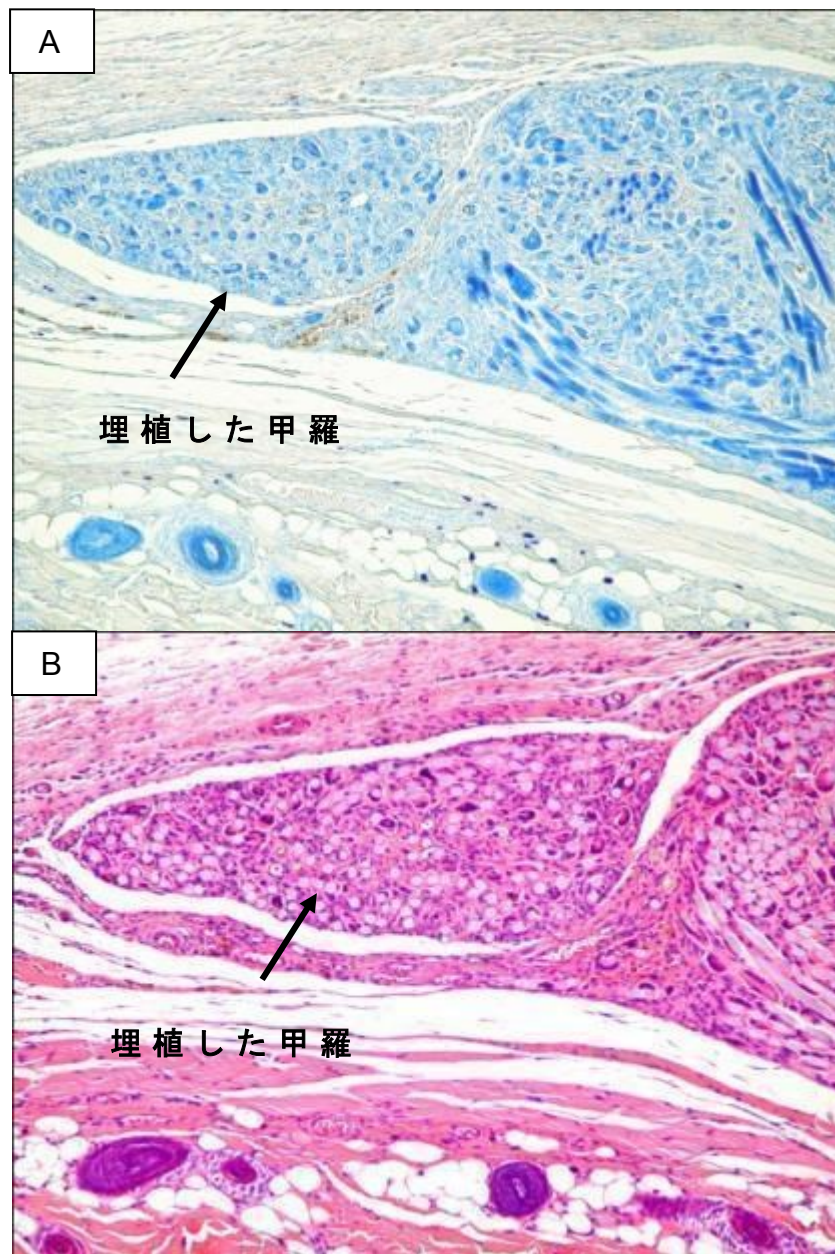


図 14 カメ甲羅を埋植した皮膚の組織像
 (埋植試験 14 日後 倍率×30)

A: トリパングルー染色 B: HE 染色

図 11B の埋植したカメ甲羅部分を HE 染色とトリパングルー染色をしたものである。HE 染色と比べて、トリパングルー染色したものは移植したカメ甲羅が選択的に染色されている。

2) ケラチンスポンジの腹腔内埋植試験

本実験では膀胱再建材料として必要な生体適合性についてケラチンスポンジを用いて腹腔内埋植試験を行い検討した。SD ラット 3 匹を用いてラット腹腔内にケラチンスポンジを移植し、試験終了後に開腹し移植片周囲の状態を肉眼的観察し検討した。その結果を表 2 に示す。カメ甲羅と同様にいずれのラット（1～3）も試験期間終了まで生存し、経過観察時にも特に異常な所見は認められず、開腹後の肉眼的所見においても感染症や拒絶反応による死亡はなかった。7 日目の肉眼的所見では、移植片が腹膜や腹腔内にある大網に癒着しているのが確認された（図 15、16）。14 日目の移植片は、ケラチンスポンジが片側を大網に片側は肝臓に癒着し、大きさも移植前のものと比べて明らかに縮小していた（図 17）。21 日目の移植片は完全に大網に覆われ、さらに移植片の大きさも 14 日後のものに比べて縮小している様子が観察できた（図 18）。14 日目の組織学的所見ではケラチンスポンジが生分解され、スポンジ内に肉芽組織が浸潤している様子や肉芽組織と置き換わっている様子が観察された（図 19）。

今回、皮膚内試験とは異なり臓器損傷や腹膜炎などの問題から腹腔臓器や腹膜などに移植片を縫合固定ができなかったため、検体ごとに移植片が腹腔内で散在して発見された。いずれの移植片においても周囲の組織が移植片内に浸潤している様子が観察され、時間経過と共に移植片は縮小している様子が観察された。組織学的所見においても全てのラットにおいて炎症反応などの所見は認められなかった。

以上の結果より、肉眼的所見や組織学的所見から腹腔内においてケラチンスポンジは移植後に炎症反応や拒絶反応、感染症を呈さず、生体適合性が高い材料であることが確認された。このことにより、ケラチンスポンジは医療材料として使用できる可能性が示唆された。

表 2 埋植試験結果

ラット番号	試験期間	飼育期間	転帰	移植片の状態
1	7日	7日	生存	大網に覆われている様子が観察された
2	14日	14日	生存	生分解が起こり、溶解している様子が観察された
3	21日	21日	生存	移植片の収縮が認められた

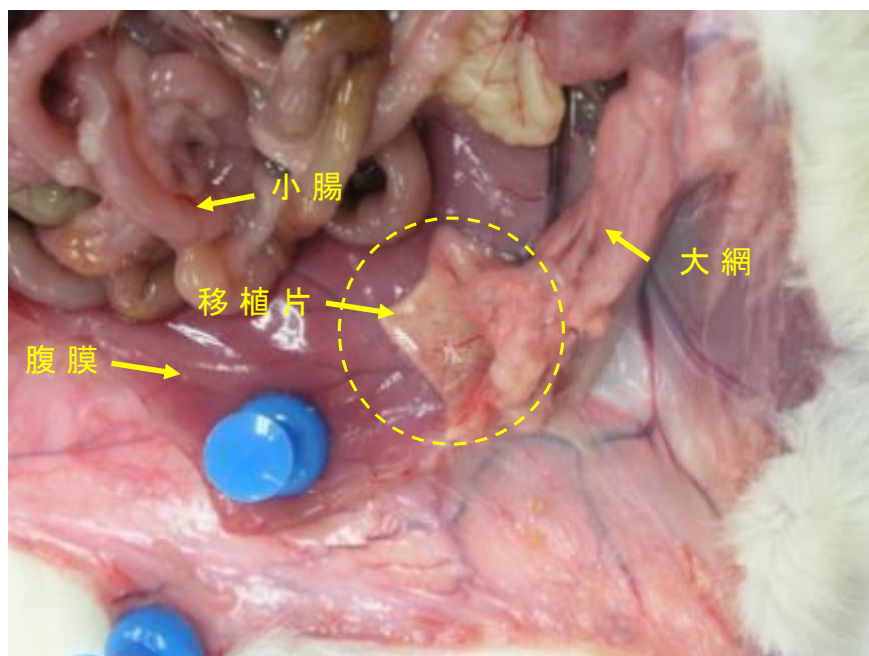


図 15 埋植したケラチンスポンジ（摘出前 7 日後）
移植片は腹膜に癒着し、さらに大網に取り込まれるように覆
われている様子が観察された。

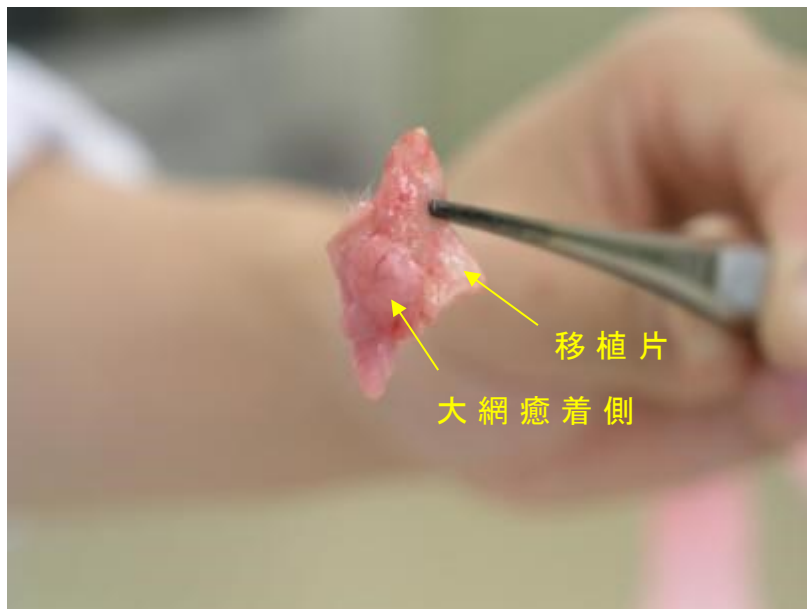


図 16 埋植したケラチンスポンジ（摘出後 7 日後）
移植片に癒着していた腹膜や大網の組織を剥離し、摘出した
もの。

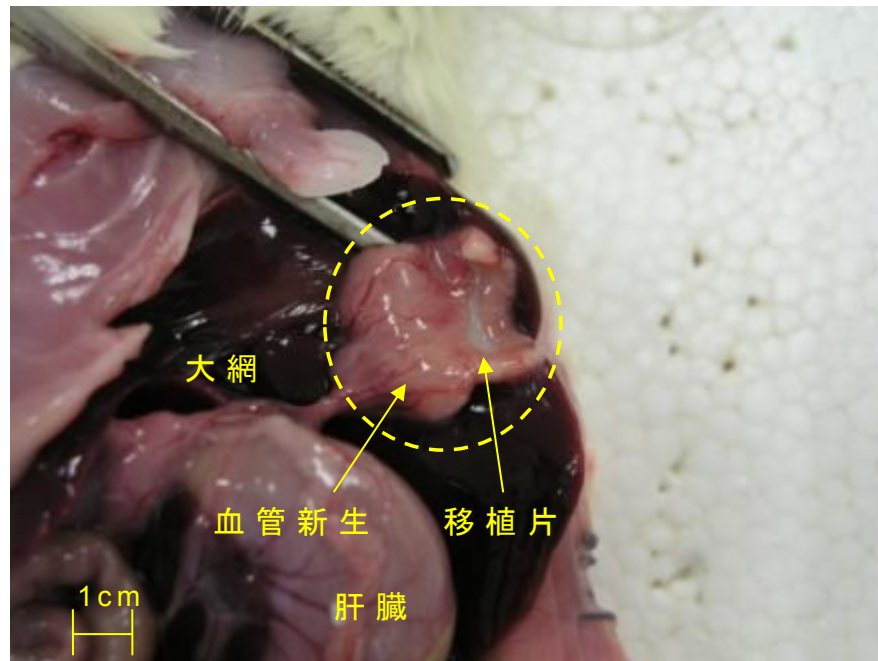


図 17 埋植したケラチンスポンジ（摘出前 14 日後）
移植片は大網に覆われ、一部は肝臓に癒着している。大網の組織が浸潤し、移植片を覆うように血管新生が確認された。

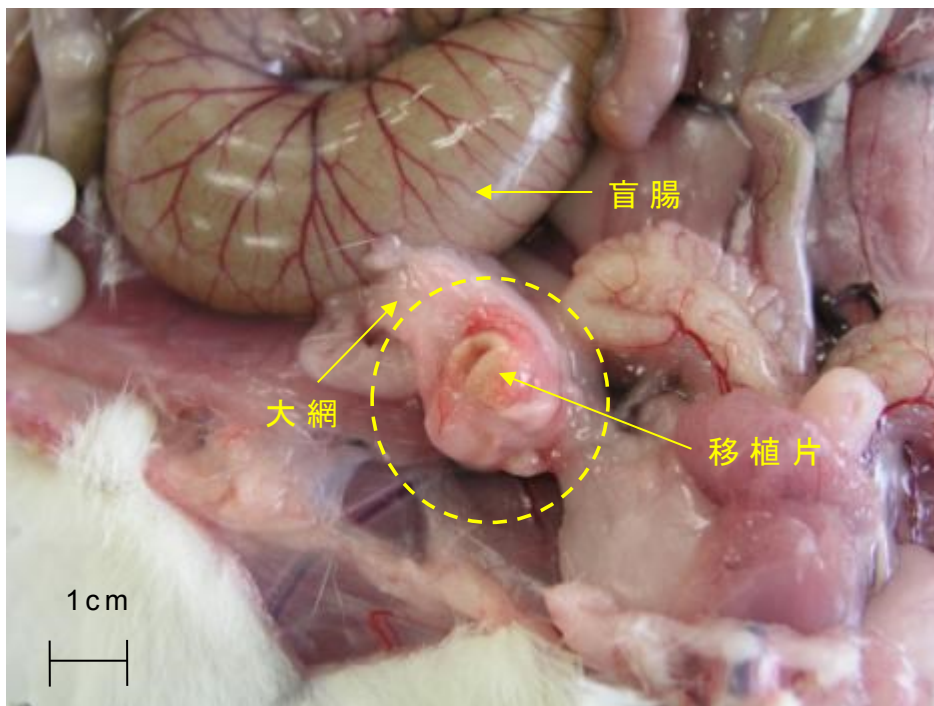


図 18 埋植したケラチンスポンジ（摘出前 21日後）
移植片は盲腸に癒着し、大網に覆われていた。ロール状に屈曲している様子が観察された。

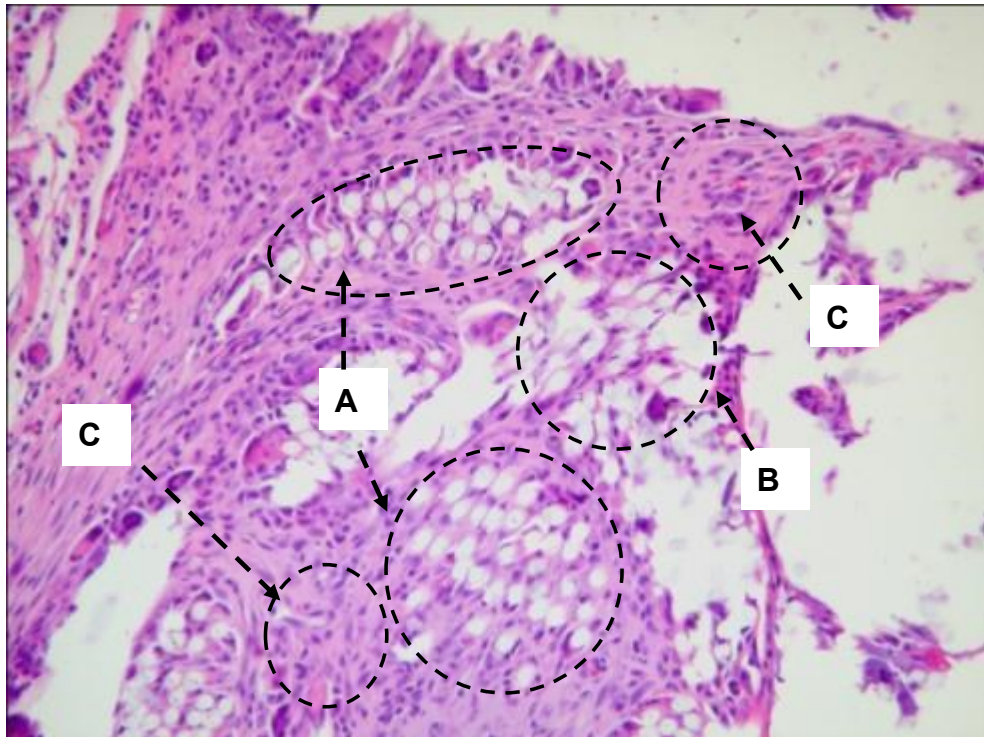


図 19 ケラチンスポンジ組織像

(HE 染色 14 日後 ×30 倍率)

A : ケラチンスポンジ空隙部 B : 生分解されている部位

C : 移植片内に組織浸潤し置換された部位

ケラチンスポンジが生分解され、スポンジ内に肉芽組織が浸潤している様子。

3) カメ甲羅による結石形成試験

本実験ではカメ甲羅を膀胱内に1年間留置させ、膀胱内および尿道内に結石が形成されるかどうかを検討した。術後、1年経過したカメ甲羅は、肉眼的所見ではほぼ留置した状態の大きさを分解されず膀胱内に残存していた(図20)。甲羅の周囲には膀胱の上皮細胞が付着していたが、甲羅の表面および膀胱内、尿道管腔には結石などは確認できなかった。組織学的所見では、肉眼的所見では生分解させている様子が観察されなかったが、顕微鏡下では甲羅が生分解されている様子が観察された(図21)。膀胱内腔面は炎症反応、拒絶反応も確認されなかった。

このことから、カメ甲羅が膀胱再建材料として使用できる可能性が示唆された。

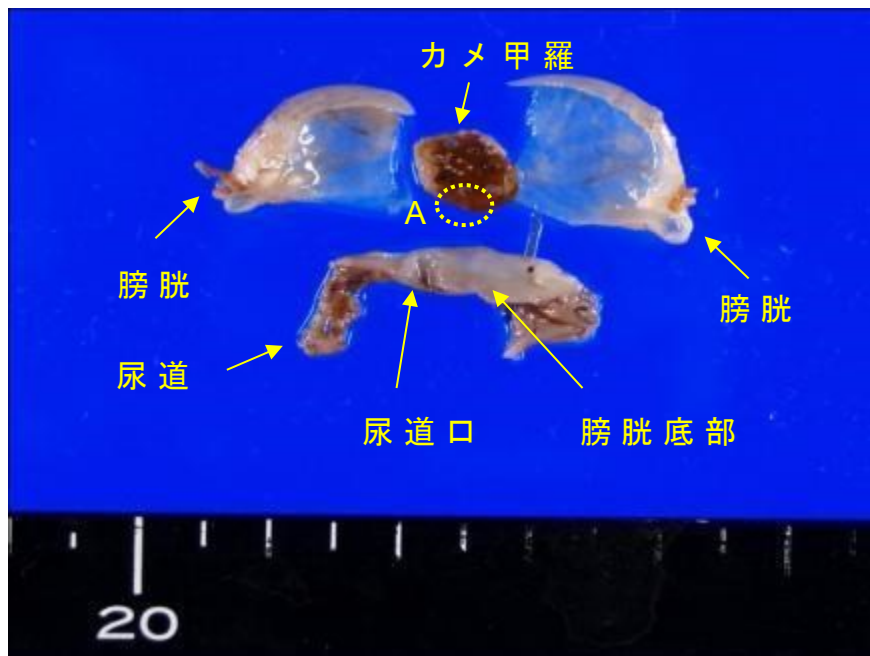


図 20 膀胱内および尿道の結石確認（術後 1 年）
1 年間膀胱内に留置した移植片を膀胱ごと摘出、ホルマリン
固定後に肉眼的観察した写真である。移植片に膀胱上皮細胞
が表面に浸潤している。膀胱内および尿道内に結石は認めら
れなかった。

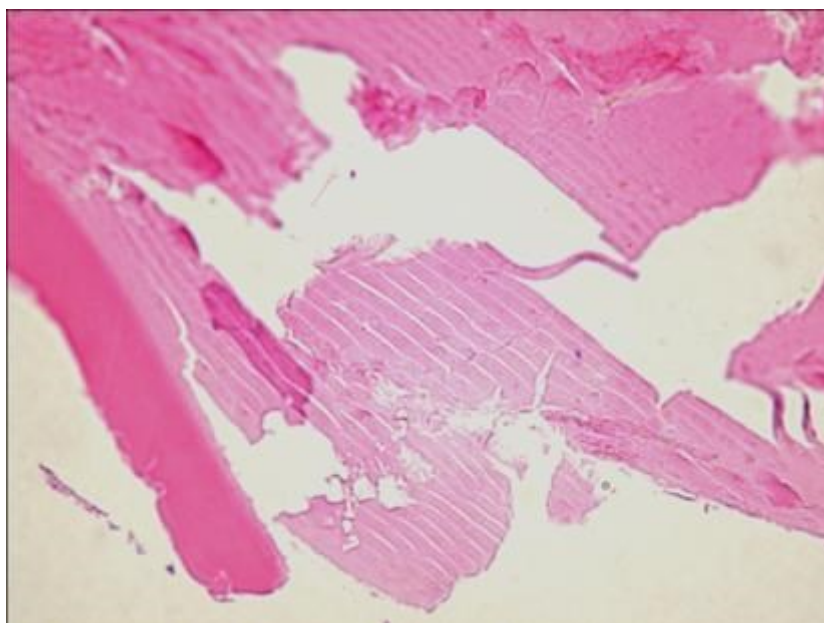


図 21 膀胱内に留置したカメ甲羅の組織像 (倍率×30)
1年間留置した亀甲羅の図 20A 部分を HE 染色し、顕微鏡
的観察したものである。結石は付着しておらず、甲羅が生
分解されている様子が観察できる。

2. 膀胱再建試験

1) カメ甲羅による膀胱再建

カメ甲羅が皮膚埋植試験において生体適合性が確認されたため、膀胱再建材料となり得ると考え膀胱再建術を行い長期に渡り水密性を保ちつつ、かつ適度な物理的強度を持ち、過度な感染症や拒絶反応を呈することなく膀胱移植片として使用できることかどうかについて検討した。その結果を表 3 に示す。SD ラットメス 35 匹に膀胱再建試験を行い、水密性を保ったまま脱落や感染および拒絶反応などの副作用がなく、22 匹が膀胱再建に成功した。膀胱再生に至らなかった例としては 3 匹が細菌感染、8 匹が移植片の縫合不全やラットの体動による移植片への亀裂による尿漏れ、2 匹が麻酔による死亡が確認された。1 週間以内に死亡した主な原因である尿漏れ細菌感染は、No.8 以降に膀胱再建術を行うたびに縫合を綿密に行い、体内へ戻す際にも再度、亀裂、破損および移植片と膀胱との間隙がないかどうか確認すること、膀胱再建術後に抗生物質を投与することとしたところ、それ以降は死亡例が減少した。移植後、1 週間目のラット (No.1-2) はともに肉眼的観察でカメ甲羅が分解されず完全に膀胱部に残っていたが縫合部からの炎症、感染は特に観察されなかった。30 日目 (No.8-11)、60 日目 (No.15-19) のものは、個体差はあるものの時間を経るごとに徐々にカメ甲羅自体が融解・吸収され、膀胱自体の組織がカメ甲羅自体を覆い始め、組織学的にもカメ甲羅が置換していく様子がいずれも観察された。180 日目 (No.22-26) に摘出した組織では、ほとんどのカメ甲羅が融解されており、移植部位の修復がなされている様子が観察された。365 日目 (No.29-34) 経過したものは、完全にカメ甲羅が融解・吸収され周囲の膀胱組織と一体化し修復がなされていた。カメ甲羅を膀胱内に 6 ヶ月間長期間留置し摘出した膀胱を図 22 に示す。肉眼的観察では移植した部位に肉芽組織

が発達し、かつその肉芽組織を覆うように幾重にも血管新生が観察された。膀胱再建を成しうるためには移植片の生分解促進や移植片の栄養供給のため、移植部位に十分な血流を確保することが必須であることが報告されている^{14,15)}が、摘出後の移植部付近には肉眼的所見により幾重にも血管新生が観察された。図 23 は移植片を 3 日間ホルマリンに浸漬させたマクロ像である。図 24、25、26 は移植片を摘出後、ホルマリン固定を行い、組織学的観察を行うため HE 染色を施したものである。ラット膀胱に長期間留置することによりカメ甲羅の大部分が融解し、その周囲は肉芽組織に囲まれ、膀胱内腔面は欠損なく再生上皮で被覆されていた。

以上の結果より、カメ甲羅が長期にわたり水密性を保ちつつ、かつ適度な物理的強度を持ち、膀胱移植片として使用できることが確認された。

表 3 埋植試験結果

ラット No.	試験期間 (日)	飼育期間 (日)	転帰	死亡原因
1	7	7	生存	
2	7	7	生存	
3	7	0	死亡	手術中の深麻酔による呼吸停止
4	7	1	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
5	7	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
6	7	3	死亡	感染症による敗血症
7	7	4	死亡	感染症による敗血症
8	30	30	生存	
9	30	30	生存	
10	30	30	生存	
11	30	30	生存	
12	30	0	死亡	手術中の深麻酔による呼吸停止
13	30	1	死亡	感染症による敗血症
14	30	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
15	60	60	生存	
16	60	60	生存	
17	60	60	生存	
18	60	60	生存	
19	60	60	生存	
20	60	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
21	60	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
22	180	180	生存	
23	180	180	生存	
24	180	180	生存	
25	180	180	生存	
26	180	180	生存	
27	180	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
28	180	3	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
29	365	365	生存	
30	365	365	生存	
31	365	365	生存	
32	365	365	生存	
33	365	365	生存	
34	365	365	生存	
35	365	2	死亡	移植片の脱落による尿漏れ

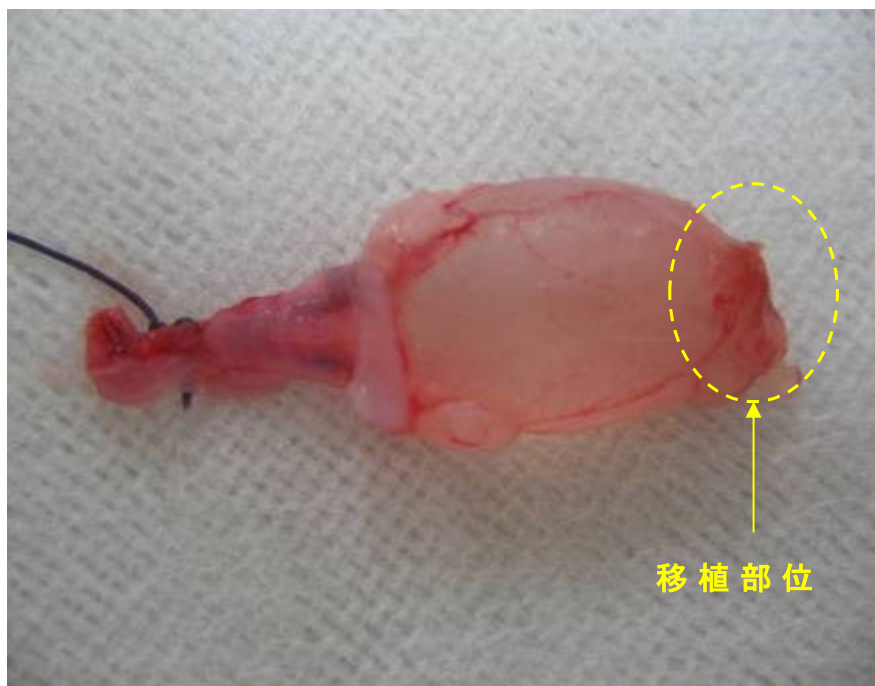


図 22 カメ甲羅を埋植したラット膀胱（ラット No.25）
カメ甲羅移植片を膀胱に 6 ヶ月間留置し、摘出したもの。

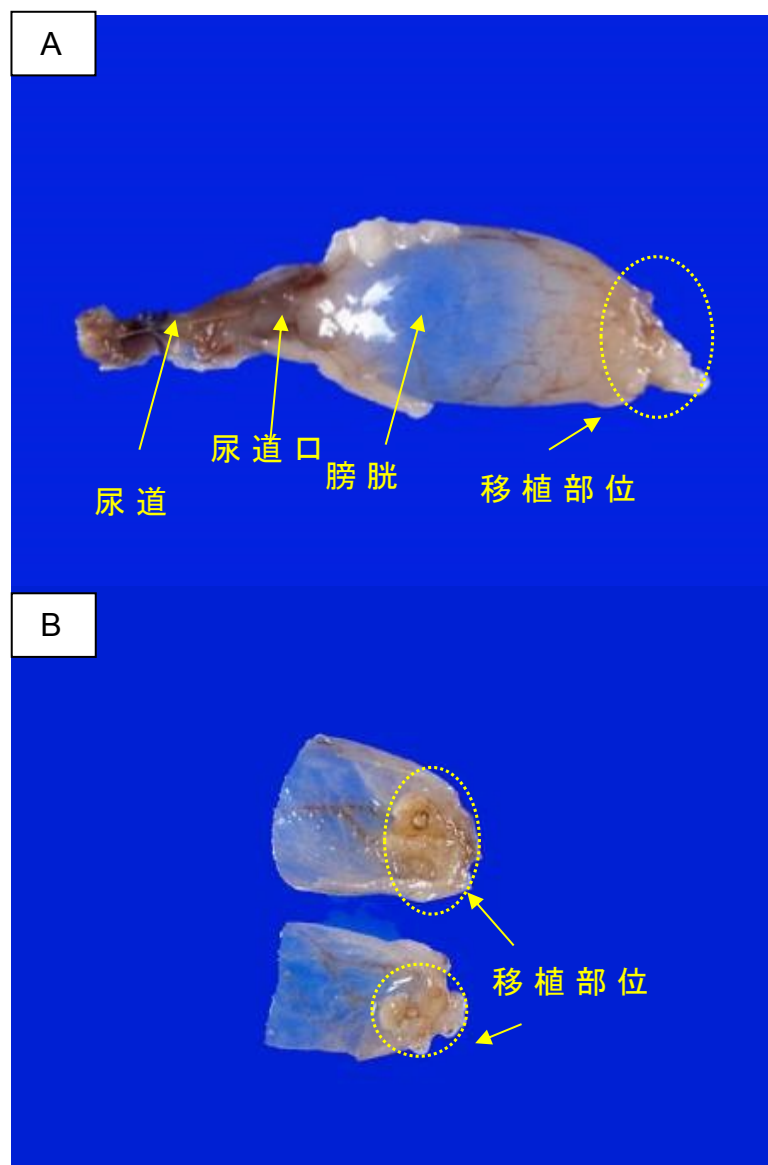


図 23 ラット膀胱（ラット No.25 6ヶ月後）

A：全体像 B：半切標本

摘出後、ホルマリン固定した移植片である。移植部位は再生した組織（肉芽組織）に覆われている様子が観察できる。

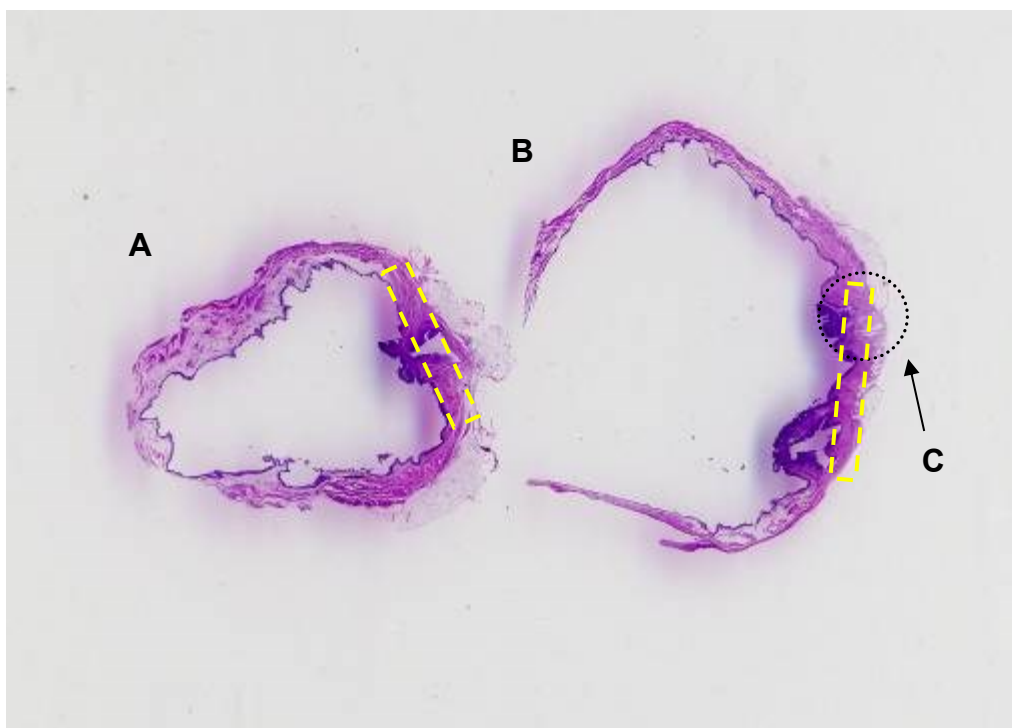


図 24 移植後のラット膀胱断面図（HE 染色 6 ヶ月後）

A：近位移植部位 B：遠位移植部位

カメ甲羅移植部：黄点線部

埋植した移植片は一部を除いてほとんど残存しておらず、肉芽組織に置換されている様子が観察できる。

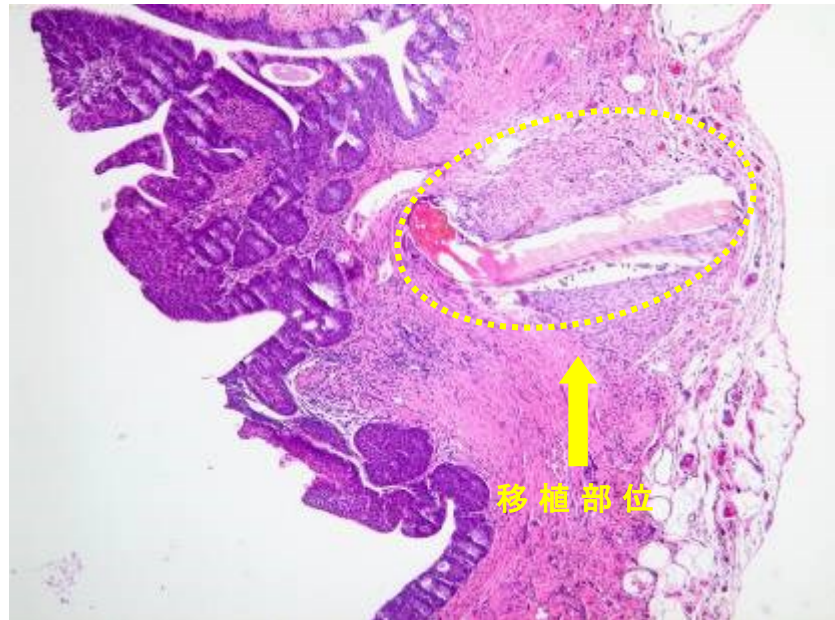


図 25 移植後のラット膀胱の組織像 6ヶ月後 (倍率×10)
図 24C の黒点線部を組織学的観察した像である。カメ甲羅移植片の一部が残存し、周囲は肉芽組織に囲まれ、膀胱内腔面は再生した上皮に被覆されている。しかし、カメ甲羅移植部位における筋層再生は見られない。

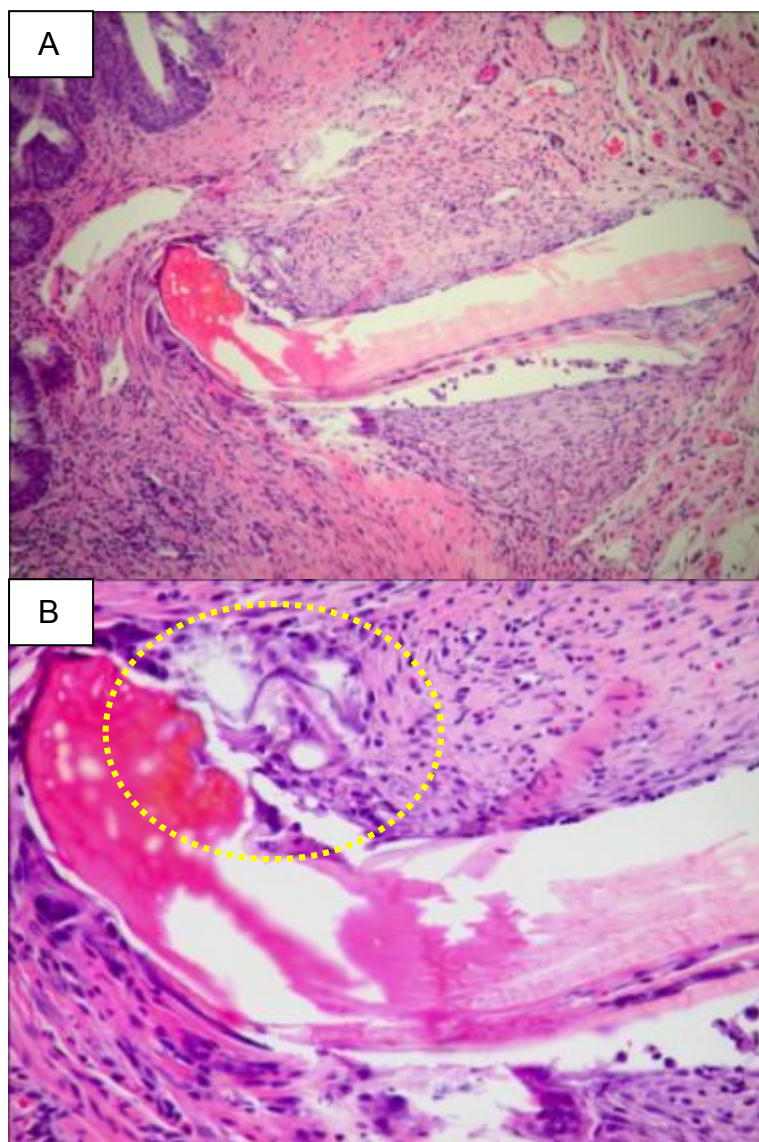


図 26 移植部位の修復部位

A: 倍率×30 B: 倍率×50 6ヶ月後

黄点線内では、カメ甲羅が徐々に融解し、移植部位の修復がなされている様子が観察された。

2) ケラチンスポンジによる膀胱再建

本実験において SD ラットメス 5 匹にケラチンスポンジを移植したが、移植片への亀裂による尿漏れ、感染症などにより 1~2 日の間に全ての実験動物が死亡した。その結果を表 4 に示す。ケラチンスポンジは、細胞を浸潤しやすいように空隙をあけているために物理的強度がカメ甲羅と比べて非常に弱く、縫合の固縛する際に生じる力により亀裂が生じたり、ラットの体動により移植片に亀裂が入ることによって尿漏れを生じ、腹膜炎を引き起こすことによって死亡した。

以上の結果より、ケラチンスポンジは膀胱再建材料としては適していないことが判明した。

表 4 埋植試験結果

ラット番号	飼育期間（日）	転帰	死亡原因
1	1	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
2	1	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
3	2	死亡	感染症による敗血症
4	0	死亡	移植片の脱落による尿漏れ
5	1	死亡	移植片の脱落による尿漏れ

3. 皮膚修復試験

1) カメ甲羅による皮膚修復試験

本実験においてカメ甲羅が皮膚欠損修復被覆材料として長期にわたり感染症や拒絶反応を呈することなく皮膚欠損修復被覆材料として使用できるかどうか、また長期間留置することによってカメ甲羅が生分解され、自己の細胞が浸潤し、皮膚損傷部位が再建されるかどうかについて検討した。

SD ラットメス 5 匹を用い、2cm×2cm の表皮層および真皮層を取り除き、その部位にカメ甲羅を移植し、試験期間まで経過観察した。その後、移植片を摘出し組織標本を作製した。その結果を表 5 に示す。カメ甲羅を移植したいずれのラット (No.1~5) も試験期間終了まで生存し、経過観察時も著しい感染症や拒絶反応などのような異常な所見は認められなかった。また、試験期間後の肉眼的所見においても炎症反応や感染症は認められなかった。図 27 はラット皮膚欠損部位にカメ甲羅を被覆し縫合した直後のものである。図 28、29 は、ラット皮膚欠損部位に皮膚欠損修復被覆材料としてカメ甲羅を移植し、7 日後、21 日後のものである。7 日後のものは移植した甲羅が残存しており、欠損部位の一部は修復がなされていた。日数が経過するにつれて、甲羅を覆うように表皮細胞が浸潤し、次第に表皮が修復され、移植後 21 日以降のものは肉眼的所見において移植片は確認できなかった。試験期間終了後に移植部分を切開して皮下部分を確認したが移植 21 日以降のものは移植片の残存が確認できなかった。また、すべてのラットにおいて移植部に著しい炎症反応や感染症、拒絶反応は認められなかった。

以上の結果より、カメ甲羅が皮膚欠損修復材料として長期にわたり感染症や拒絶反応を呈することなく皮膚欠損修復被覆材料として使用できることが確認された。

表 5 埋植試験結果

ラット番号	試験期間	飼育期間	転帰	修復部位
1	7日	7日	生存	甲羅は残っているが 炎症・感染なし
2	14日	14日	生存	ほぼ甲羅の残存なし
3	21日	21日	生存	甲羅の残存なし 炎症・感染なし
4	28日	28日	生存	甲羅の残存なし 炎症・感染もなし
5	35日	35日	生存	甲羅の残存なし 炎症・感染もなし



図 27 カメ甲羅を被覆した皮膚欠損部
ラット皮膚欠損部位にカメ甲羅を被覆材料として用い、縫合した
もの。



図 28 移植後 7 日間経過したラット
ラット皮膚欠損部位にカメ甲羅を移植し 7 日間経過したものである。欠損部位が徐々に修復されている様子が観察できる。



図 29 移植後 21 日間経過したラット
欠損部位が一部を除いてほぼ修復されている様子が観察できる。カメ甲羅は肉眼的には確認することができない。

4. 形状変化試験

1) カメ甲羅の形状変化

通常、カメ甲羅は平坦な形状をしているが、ステンレス製の球状や棒状の鋳型を用いることによってドーム状やロール状に形状を変えることに成功した（図 30）。

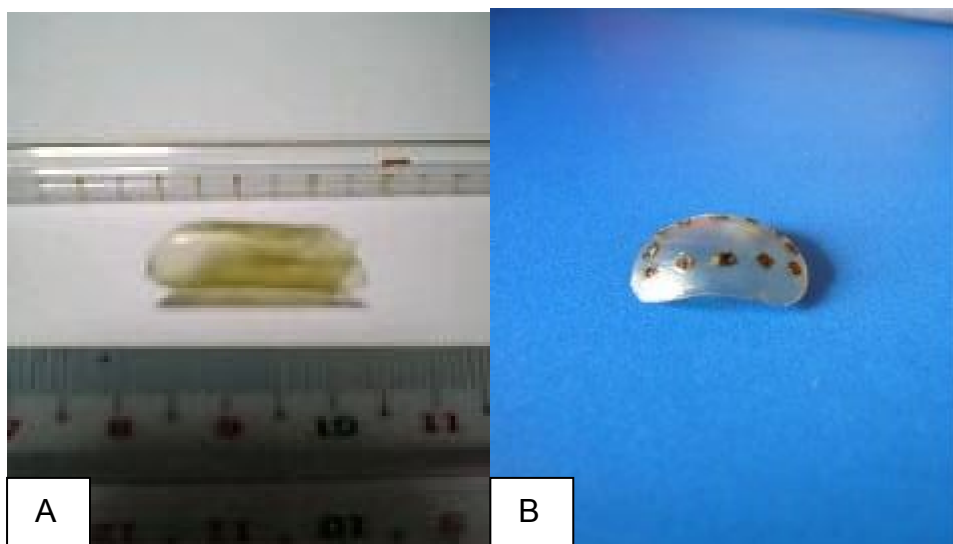


図 30 カメ甲羅の形状変化

A : ロール状 B : ドーム状

カメ甲羅を加工し、形状変化させたもの。

5. アミノ酸組成分析

表 6 にケラチンスポンジとカメ甲羅のアミノ酸分析結果を示す。ケラチンスポンジでは、アミノ酸の中でグルタミン酸が最も 12.3% と高値を示し、ついでセリンが 11.4% と高値を示した。一方、カメ甲羅ではグリシンが 29.9% と最も高く、ついでチロシンが 11.0% と高い結果となった (図 31)。

表 6 ケラチンスポンジとミシシッピアカミミガメ甲羅の
アミノ酸組成の比較 (1)

アミノ酸	ケラチン スポンジ (mol%)	ミシシッピ アカミミガメ甲羅 (mol%)
チロシン	3.8	11.0
アラニン	0.3	3.1
バリン	4.2	7.6
ロイシン	7.5	7.2
イソロイシン	3.5	2.1
メチオニン	0.4	0.5
プロリン	8.6	9.3
フェニルアラニン	2.7	2.8
グリシン	8.6	29.9
セリン	11.4	6.3
トレオニン	7.6	2.5
システイン	6.2	1.7
リジン	0.9	0.7
アルギニン	7.9	4.2
ヒスチジン	0.7	2.6
アスパラギン酸	6.2	3.3
グルタミン酸	12.3	5.0

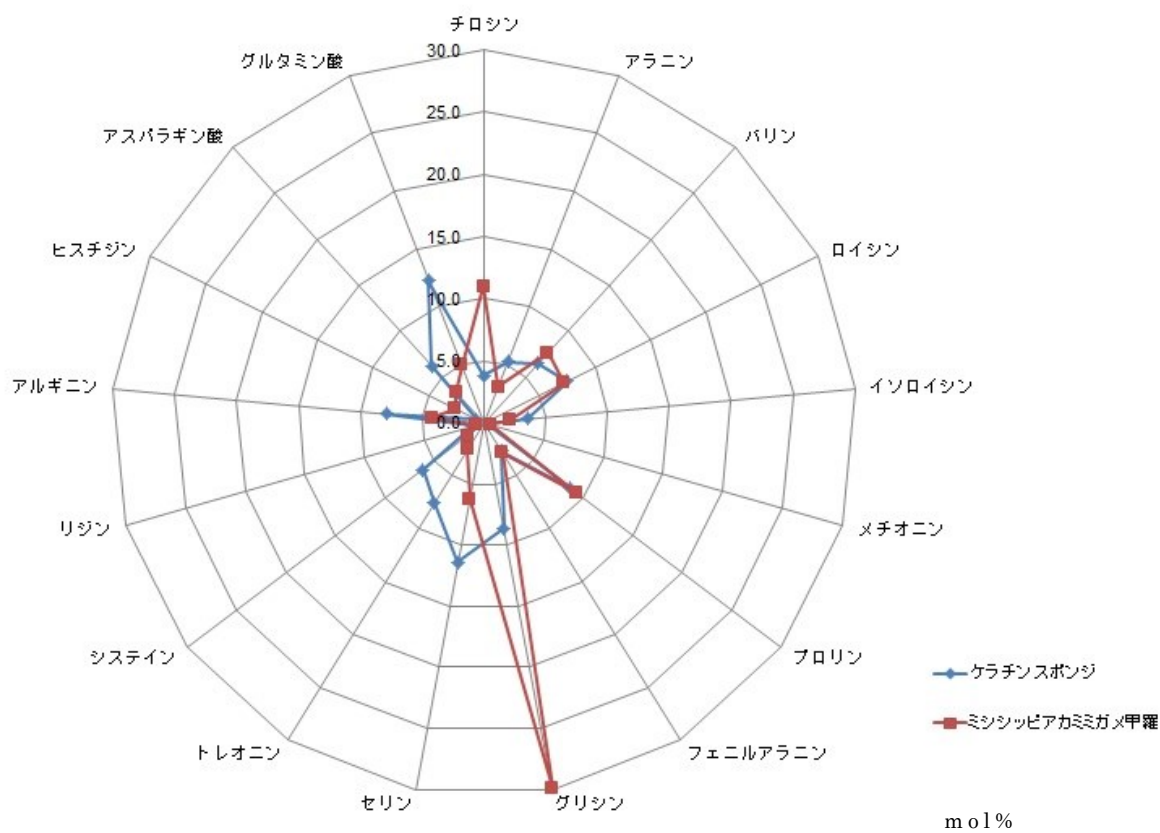


図 31 ケラチンスポンジとミシシippアカミミガメ甲羅の
アミノ酸組成の比較 (2)

6. 走査型電子顕微鏡を用いた表面、断面分析

1) カメ甲羅の表面分析

図 32 はカメ甲羅の表面をフィールドエミッション走査型電子顕微鏡で観察したものである。低倍率（A:×30 及び B:×200）では天然由来の材料のため、表面には無数の傷及び陥没箇所が確認された。また、高倍率のもの（A:×500 及び B:×5000）では甲羅表面の一部が剥離している箇所や隆起している部分が観察された。

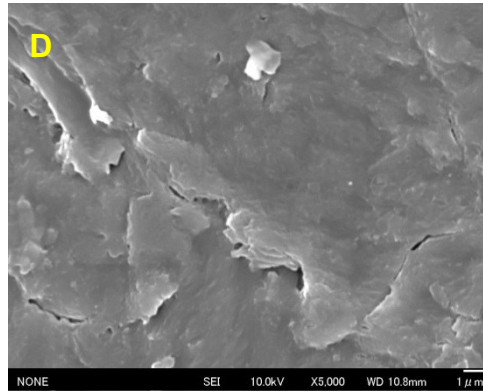
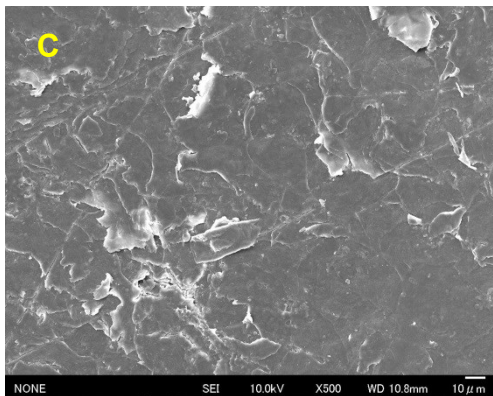
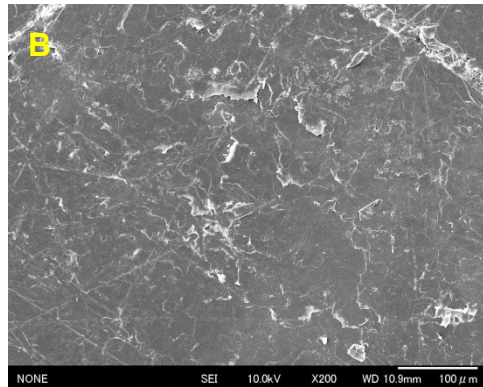
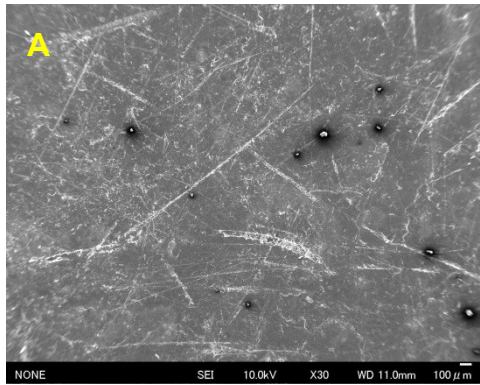


図 32 走査型電子顕微鏡を用いたカメ甲羅の表面分析
A:カメ甲羅表面 (×30) B:カメ甲羅表面 (×200)
C:カメ甲羅表面 (×500) D:カメ甲羅表面 (×5000)

2) カメ甲羅の断面分析

図 33 はカメ甲羅の断面をフィールドエミッション走査型電子顕微鏡で観察したものである。低倍率 (A: $\times 200$ 及び B: $\times 400$) では一枚の板状に形成されている様子が観察されたが、高倍率 (C: $\times 2000$ 及び D: $\times 5000$) にすることによって、カメ甲羅が層状を成して形成し、その間隙にわずかな空隙があることが観察された。

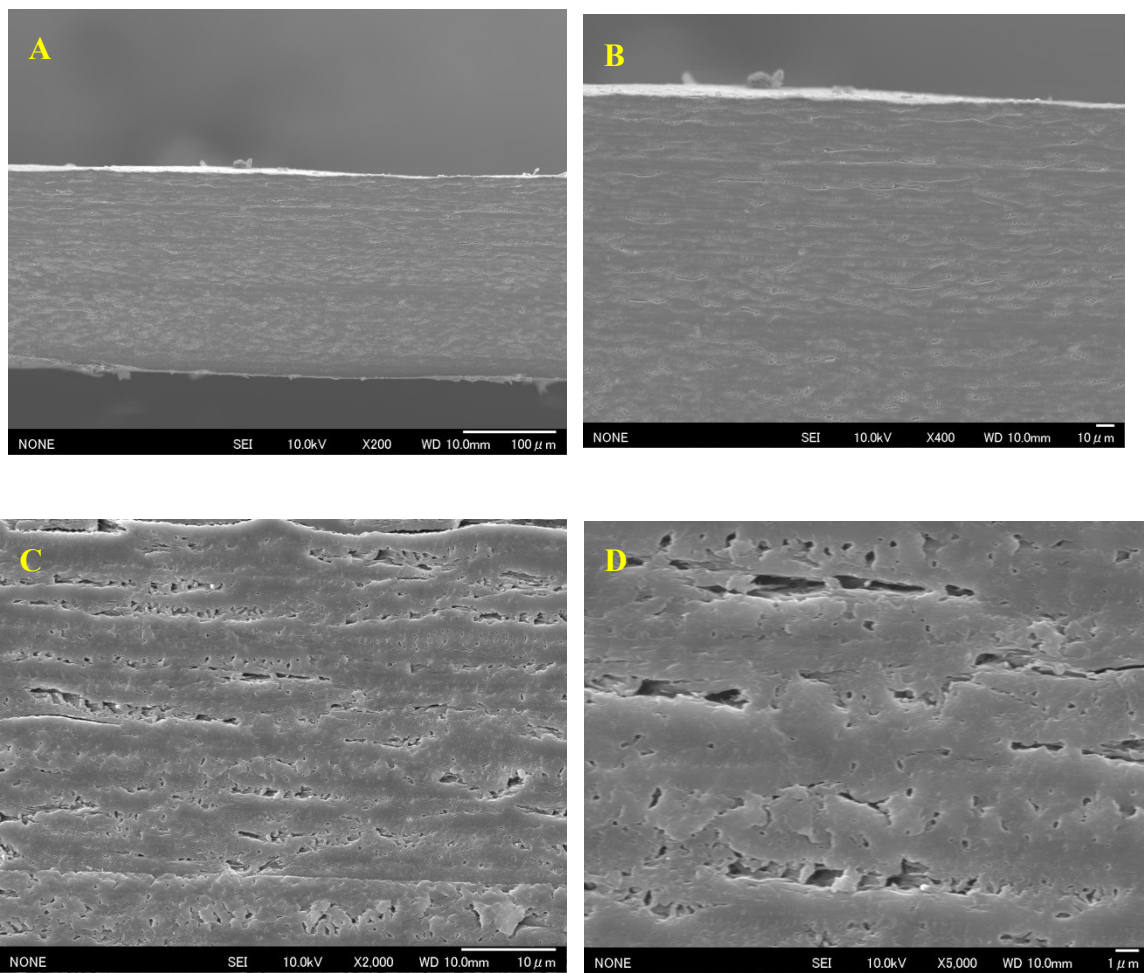


図 33 走査型電子顕微鏡を用いたカメ甲羅の断面分析

A:カメ甲羅断面 (×200)

B:カメ甲羅断面 (×400)

C:カメ甲羅断面 (×2000)

D:カメ甲羅断面 (×5000)

7. 引張試験

図 34 はカメ甲羅とケラチンスポンジの引張試験のグラフである。カメ甲羅は最大点荷重 45.55N、最大引張変位は 2.7 mm であった。一方、ケラチンスポンジは最大点荷重 0.92N、最大引張変位は 0.05mm であった。このように、カメ甲羅とケラチンスポンジを比較した場合、最大点荷重では 49.51 倍、最大引張変位では 54 倍、カメ甲羅の方が高い数値を示した。

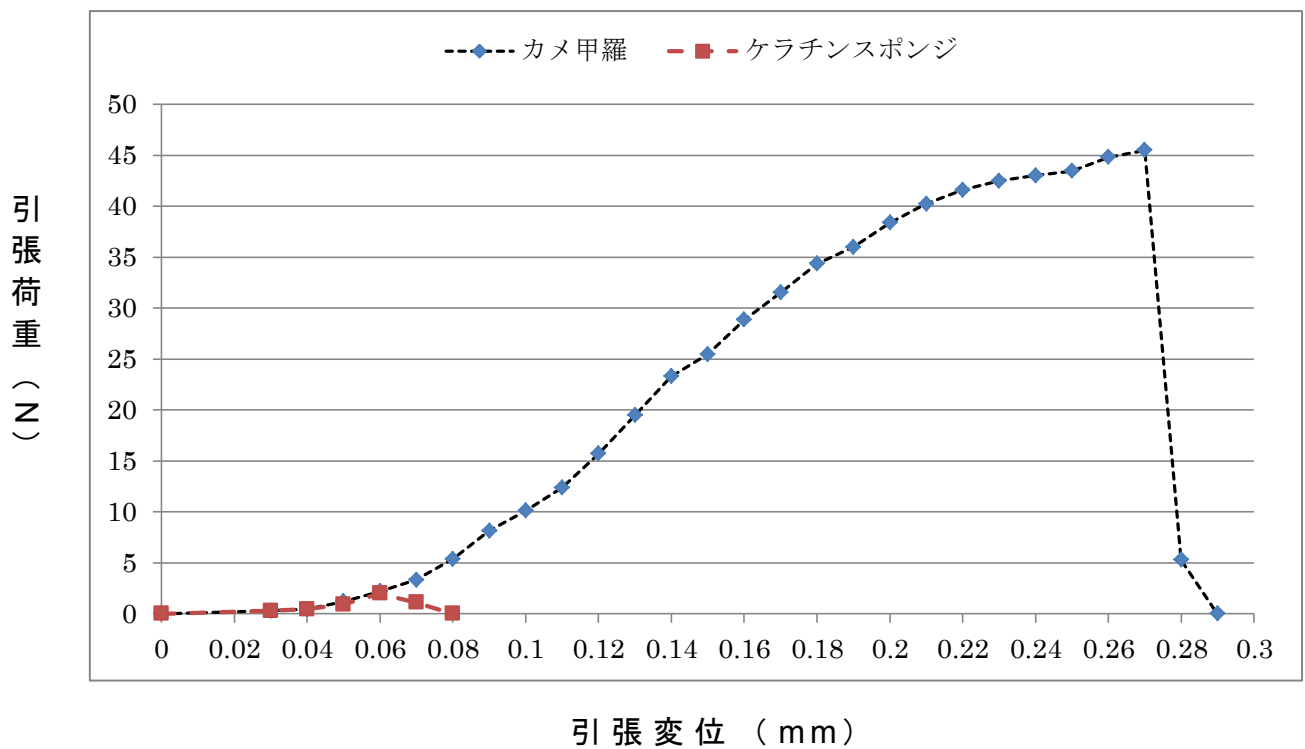


図 34 カメ甲羅とケラチンスポンジの引張試験の比較

カメ甲羅は引張荷重を加えていくとそれに応じて材料が伸展し、0.27mmまでは伸張した後、破断した。ケラチンスポンジは引張荷重を加えていくと 0.06mmのみ伸展して破断した。

VI 考察

これまでに人工材料と生体材料を用いて多くの研究者が膀胱再建を試みてきた。表 7 に人工材料を用いた膀胱再建に関する研究を示す。ポリアミドやポリビニールアルコールスポンジ、ポリエチレンなどの人工材料は物理的強度や異物反応が問題となり、腎への尿の逆流や尿路閉塞による水腎症、腎盂腎炎、腹膜炎、腫瘍等による感染症、また移植片を起因とする結石形成のため、いずれも失敗に終わっている³⁸⁾。一方、生体材料では筋膜、皮膚、保存膀胱、大網などを用いた研究が行われ、一時的置換が可能なことが報告されている(表 8)。現在においても膀胱再建術には自己の消化管を用いた再建法が最も臨床応用されているが、この再建法は正常な消化管を失うばかりか、複雑な形成手術が必要となり、それに伴う手術的侵襲や消化管粘膜に起因する結石形成や感染症、代謝異常、癌の発生など様々な合併症を伴うことが問題となっている³⁶⁾。そのため、これらの膀胱を再建する材料には長期にわたり尿の貯留が可能なことや尿路外に溢流させないこと、尿中の物質の吸収をせず、生理的な範囲の温度、pH や浸透圧によって影響を受けないことなどが、必要条件としてあげられる。さらに、素材が生体内で安定であり、抗原性が低く、結石形成や感染の原因とならず、生体に加えられる種々の外力によって容易に変形しないことや生体の動きにある程度対応しうる柔軟性も要求される。また、その使用にあたっては、生体の尿路との水密な縫合が容易であるなど、取り扱いが簡便であることも重要な条件である(表 9)。また、多くの研究者が膀胱再建の条件として生体分解性を挙げており、この場合、当然ながら正常の膀胱組織が再生するまでの適当な期間、機械的強度を保つことが必要になる。また、長期的な安全性として発癌性ないことが要求される^{31,32)}。

本研究では、人工材料であるケラチンスポンジと生体材料であるカメ甲羅を用いて生体適合性試験や膀胱再建試験を実施し、膀胱再建材料としての可能性を検証した。その結果、ケラチンスポンジでは生体適合性試験（腹腔内埋植試験）において膀胱再建に必要な生体適合性や生体分解性が確認され、膀胱再建材料として使用できる可能性が示唆された。しかしながら、つぎに実施した膀胱再建試験では移植片の物理的脆弱性から縫合不全や移植片のひび割れが生じ、尿の貯留を保つことができず尿漏れを頻発することがわかり、テトロン膜やゼラチンスポンジ等の人工材料と同様に物理的脆弱性の問題により膀胱再建材料としては適していなかった。一方、カメ甲羅はケラチンスポンジと同様に生体適合性試験の皮膚内埋植試験において炎症反応や拒絶反応を示さず、かつ生体分解性を有することが確認された。さらに結石形成試験においても長期間膀胱内に移植片を留置したにもかかわらず、移植片や膀胱、尿管などに結石は確認されないという良好な成績を得ることができた。この結果に基づいて膀胱再建試験を行ったところ、尿漏れなく移植片と膀胱組織を縫合することができ、移植後長期間にわたって多くの検体で炎症や感染症状を呈せず膀胱再建を行うことができた。

成功に至った理由としてカメ甲羅は今回使用したケラチンスポンジや過去に試みられてきた人工材料よりも物理的強度が高く、長期間にわたり膀胱内圧を保持し尿漏れも低く抑えることで水密性を維持できたことや生体分解性を有しかつコラーゲンスポンジやゼラチンスポンジなどの医療材料よりも生体分解性が遅いため生体内で支持組織としての役割を果たすことで自己の肉芽組織や上皮組織、血管新生の発育期間を十分に確保することができたことなどが考えられた。これらの結果から、膀胱再建材料には良好な生体適合性を有し、密な縫合に耐えうる物理的強度を備え、長期に渡り尿の保持

し、膀胱の再建速度に適した生体分解性を有し、また生体内で結石を形成しない材料でなければならぬと考えられてきた再建条件をカメ甲羅は全て満たすものであると考えられる。

現在、医療材料として使用されているポリ乳酸やポリプロラク톤などの多くの生分解性材料はフィラメント糸や多孔体などに加工されて検討されているが、いずれも疎水性の材料のため、生体との馴染みが良好とはいえない状況である³⁹⁾。一方、ケラチン材料は親水性や疎水性の両方の特徴を持ち合わせていることから、他の医療材料よりも生体浸潤性が高いと考えられ、そのため生体と移植片が早期に接着することにより膀胱再建に頻発する尿漏れや腹膜炎などの合併症を防ぎ、かつ蓄尿機能を維持することによって、膀胱再建を可能にしたものと考えられた。また、ケラチンスポンジの材料に用いた軟ケラチンである羊毛ケラチンと硬ケラチンであるカメ甲羅のアミノ酸組成には、特にグリシンとチロシンの含有量に違いがあることがわかった(表 10)。他のケラチン材料にも同様の違いが見られたことから、ケラチン材料の物理的強度や生体接着性を決める因子にはこれらの因子が影響していることが示唆された。

カメ甲羅の膀胱再建術が成功したことから、追加実験として皮膚修復試験や形状変化試験を実施した。この実験結果によって膀胱以外の様々な器官に使用できる可能性を示唆したとともに移植部位の形状に合わせた移植片を作製できることを示した。これにより膀胱だけではなく血管、尿道、尿管などの再建材料として用いることが可能になるとともに現在の平板型よりも様々な形状に合った形で縫合、修復ができるようになり、再建後の形状がより元の形に類似した形で修復できると考えられる。

将来的には患者本人から人毛や人爪を採取しケラチンを抽出し加工することができれば、無侵襲でかつ低抗原性を実現

した今までにない医療材料が作製できると考えている。

今後、さらに研究、開発を進めていくことでケラチン材料が新しい医療材料として活用され、現在、多くの疾患に苦しんでいる患者の治療に役立つことを切に願っている。

表 7 人工材料を用いた膀胱再建とその合併症

材質	報告年	報告者	対象	合併症
ポリアミド (Acrylic mold)	1955	Bohne ら ⁹⁾	イヌ	腹膜炎 膿腎症 狭窄
	1961	Swinney ら ⁶⁾	イヌ	水腎症 瘻孔
ポリビニール -アルコールスポンジ (Polyvinyl -alcohol sponge)	1957	Kudish ³⁰⁾	イヌ	グラフト萎縮 腹膜炎
	1961	Swinney ら ⁶⁾	イヌ	水腎症 グラフト排出
	1962	McDonald ら ⁷⁾	イヌ	グラフト萎縮
ポリエチレン (Polyethylene)	1957	Bohne ら ⁸⁾	ヒト	水腎症 尿路感染症
	1964	Tsulukidze ら ¹⁰⁾	ヒト	膀胱尿管逆流
ポリテトラ -フルオロエチレン (Polytetra -fluoroethylene)	1961	Swinney ら ⁶⁾	イヌ	グラフト移動
	1970	Kelami ら ¹¹⁾	イヌ	水腎症 グラフト外被化
ポリテレフタレート -エチレングリコール (Polyterephthalate ethylene glycol)	1963	Uhlir ¹²⁾	ウサギ	記載なし
ナイロン (Nylone velour)	1969	Dressler ら ¹³⁾	イヌ	記載なし
テترون膜 (Tetron membrane)	1967	Tsuji ら ¹⁴⁾	イヌ	グラフト排出
		Tsuji ら ¹⁴⁾	ウサギ	グラフト外被化
ゼラチンスポンジ (Gelatin sponge)	1967	Tsuji ら ¹⁴⁾	イヌ	水腎症
		Tsuji ら ¹⁴⁾	ウサギ	瘻孔
		Tsuji ら ¹⁴⁾	ヒト	狭窄
	1970	Orikasa ら ¹⁵⁾	ヒト	記載なし
シリコンゴム (Silicone rubber)	1967	Askhar ら ¹⁶⁾	イヌ	グラフト外被化 水腎症

材質	報告年	報告者	対象	合併症
ポリプロピレン (Monofilament knitted polypro- -pylene)	1972	Stanley ら ¹⁷⁾ Stanley ら ¹⁷⁾ 1971 Rigotti ら ¹⁸⁾	ヒツジ イヌ イヌ	膀胱尿管逆流 記載なし 腫瘍
和紙 (Paper)	1977	Taguchi ら ¹⁹⁾	ヒト	記載なし
ポリテトラ -フルオロエチレン (Expanded polytetra- -fluoroethylene)	1986	Goya ²⁰⁾	イヌ	グラフト脱落
ポリグラクチン 910 (Polyglactin 910)	1988	Youssef ら ²¹⁾	マウス	結石

(注) 上記膀胱再建術の実施においては、すべて人工材料を膀胱の一部に補填する部分置換を行っている。

表 8 生体材料を用いた膀胱再建の試み

材質	報告者	報告年	対象
筋膜	Neuhof ら ²¹⁾	1917	ヒト
皮膚	Draper ら ²²⁾	1956	イヌ
保存膀胱	Tsuji ら ²³⁾	1961	イヌ
大網	Goldstein ら ²⁴⁾	1967	ウサギ
硬膜	Kelami ら ²⁵⁾	1971	イヌ
消化管	Leong ら ²⁶⁾	1972	イヌ
腹膜	Hutschenreiter ら ²⁷⁾	1978	ウサギ
心外膜	Kambic ら ²⁸⁾	1992	イヌ

表 9 膀胱再建に必要な機能 2)

- ・ 水密性
 - ・ 尿中物質に対する非透過性
 - ・ 種々の物理的、化学的条件に対する耐久性、可塑性
 - ・ 非抗原性
 - ・ 非感染性
 - ・ 尿路結石形成の原因とならない
 - ・ 感染に対する抵抗性
 - ・ 取り扱いの簡便性
-

表 10 軟ケラチンと硬ケラチンのアミノ酸組成(%)

疎水性・親水性	極性・非極性	酸性・塩基性	アミノ酸	軟ケラチン材料					硬ケラチン材料		
				人髪ケラチン ⁴³⁾	ラット毛 ⁴⁰⁾	羊毛ケラチン ⁴⁰⁾	ケラチンスポンジ	ヒト表皮 ⁴⁰⁾	フロリダアカハラガメ甲羅 ⁴¹⁾	ミシシッピアカミミガメ甲羅	ヤマアラシ棘 ⁴⁰⁾
				(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
疎水性	極性	中性	チロシン	24	3.9	22	3.8	3.4	10.3	11.0	22.5
	非極性	中性	アラニン	28	6.3	6	5.3	0	2.8	3.1	1.0
		中性	バリン	5.6	4.2	6.2	6.5	4.2	8.3	7.6	1.4
		中性	ロイシン	6.5	6.7	7.2	7.5	8.3	6.9	7.2	6.7
		中性	イソロイシン	4.8	2.3	3	3.5	6.8	1.8	2.1	0.3
		中性	メチオニン	0.9	0.0	0.7	0.4	2.1	0.9	0.5	0.0
		中性	プロリン	6.7	0.0	7.4	8.6	3.2	8.9	9.3	3.8
		中性	フェニルアラニン	2.5	2.6	1.6	2.7	2.8	2.5	2.8	9.1
中性	トリプトファン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
親水性	極性	中性	グリシン	4.1	10.9	8.4	8.6	6	28.0	29.9	36.2
		中性	セリン	6.9	13.1	11.6	11.4	16.5	7.4	6.3	6.8
		中性	トレオニン	7.6	6.2	7.6	7.6	3.4	2.4	2.5	1.6
		中性	アスパラギン	-	-	-	-	-	-	-	-
		中性	グルタミン	-	-	-	-	-	-	-	-
		中性	システイン	17.2	12.3	8.7	6.2	3.4	3.2	1.7	1.4
		塩基	リジン	2.5	3.4	3	0.9	5.9	0.2	0.7	0.3
		塩基	アルギニン	9.1	0.0	6.3	7.9	10.1	0.0	4.2	0
		塩基	ヒスチジン	0.9	1.3	1.1	0.7	1.4	2.1	2.6	0.3
		酸性	アスパラギン酸	4.9	7.0	6.1	6.2	7.5	0.9	3.3	3.8
		酸性	グルタミン酸	13.8	12.6	12	12.3	13.7	2.1	5.0	1.3

VII. 結論

膀胱再建材料としてカメ甲羅とケラチンスポンジを被検物質として用いて生体適合性試験や膀胱再建試験、皮膚修復試験、形状変化試験を実施し、下記のことが示唆された。

1) カメ甲羅とケラチンスポンジは、生体適合性、生体分解性を有しており、医療材料として使用できる可能性があることが示唆された。

2) カメ甲羅は膀胱再建材料として使用することができることがわかった。しかし、ケラチンスポンジは物理的強度の問題から膀胱再建材料としては適してないことが確認された。

3) 皮膚欠損部位にカメ甲羅を留置することによって移植片が生分解され、自己の細胞が浸潤し、皮膚損傷部位が再建されることにより皮膚修復材料としても使用できる可能性が示唆された。

4) カメ甲羅は形状変化試験において、ドーム状やロール状にカメ甲羅を形状変化させることに成功した。これにより膀胱再建材料だけではなく尿管や尿道等の再建、さらには泌尿器科分野に限らず、血管など様々な部位に置換することが可能であることが示唆された。

引用文献

- 1) Watanabe E, Yamato M, Okano T: Regenerative medicine of bladder. *Journal of the Japanese Society for Regenerative Medicine*, Vol. 7: p 61- 65, 2008
- 2) Atala A: Tissue engineering for bladder substitution. *J Urol* 18: 364- 370, 2000
- 3) Shiroyanagi Y, Yamato M, Okano T, Toma H: Bladder regeneration using tissue engineering. *Organ Biol* 11: 968- 77, 2004
- 4) Elbahnasy AM, Shalhav A, Hoenig DM, Figenshau R, Clayman RV: Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. *J Urol* 159: 628- 637, 1998
- 5) Hensle TW, Dean GE: Complications of urinary tract reconstruction. *Atlas Urol Clin* 18: 755- 764, 1991
- 6) Swinney J, Tomlinson BE, Walder DN: Urinary tract substitution *brit. J Urol* 33: 414, 1961
- 7) McDonald JH, Deniz E: Ivalon Cystoplasty. *J Urol* 88: 511, 1962
- 8) Bohne AW, Urwiller KL: Experience with urinary bladder regeneration. *J Urol* 77: 725, 1957
- 9) Bohne AW, Osborne RW, Hettle PJ: Regeneration of the urinary bladder in the dog, following total cystectomy *Surg. Gynec & Obst* 100: 259, 1955
- 10) Tsulukidze A, Murvanidze D, Dvali R, Ivashchenko G: Formation of a "bladder" by a plastic shell after total cystectomy. *Br J Urol* 36: 102, 1964
- 11) Kelami A, Dustmann HO, Ludtke HA, Carcamo V, Herold G: Experimental investigations of bladder

- regeneration using teflon-felt as a bladder wall substitute, J Urol 104: 693, 1970
- 12) Uhlir K: Substitution of the urinary bladder by means of an artificial prosthesis. Urologia 30: 396, 1963
 - 13) Dressler DP, Many M: A new concept in prosthetic urinary bladder material, Am Soc Artif Intern Organs Trans 15: 25- 28, 1969
 - 14) Tsuji I, Shiraishi Y, Kassai T, Kunishima K, Orikasa S, Abe N: Further experimental investigations on bladder reconstruction without using the intestine, J Urol 97: 1021, 1967
 - 15) Orikasa S, Tsuji I: Enlargement of contracted bladder by use of gelatin sponge bladder patch, J Urol 98: 679, 1967
 - 16) Ashkar L, Heller E: The silastic bladder patch, J Urol 98: 679, 1967
 - 17) Stanley TH, Feminella JG.Jr, Priestley JB, Lattimer JK: Subtotal cystectomy and prosthetic bladder replacement, J Urol 107: 783, 1972
 - 18) Rigotti E, Randonne D.F, Tizzani A, Frea B, Borgno M: Total substitution of the bladder with a prosthesis, experimental research, preliminary result: Minerva Urol 28: 1- 5, 1976
 - 19) Taguchi H, Ishizuka E, Saito K: Cystoplasty by regeneration of the bladder. J Urol 118: 752, 1977
 - 20) Goya N: E-PTFE graft as a urinary tract prosthesis, first report, the change of the E-PTFE graft and bladder wall after partial replacement of the bladder wall. J Urol 77: 813- 821, 1986
 - 21) Youssef M, Chopin D, Leandri J, Auvert J, Loisanche D,

- Abbou C: Cystoplastie utilisant une rothese resorbable depolyglactine doublee dun lambeau libre peritoneal. Ann.d' Urol 22: 263, 1988
- 22) Neuhof H: Fascia transplantation into visceral defects, an experimental and clinical study, Surg Gynec. & Obst 3: 647, 1917
- 23) Draper JW, Stark RB: End results in the replacement of mucous membrane of the urinary bladder with thick-split grafts of skin. Surgery 39: 434- 440, 1956
- 24) Tsuji I, Ishida H, Fujieda J: Experimental cystoplasty using preserved bladder graft, J Urol 85: 42- 44, 1961
- 25) Goldstein MB, Dearden LC, Gualtieri V: Regeneration of subtotally cystectomized bladder patched with omentum, an experimental study in rabbits. J Urol 97: 664- 668, 1967
- 26) Kelami A: Lyophilized human dura as a bladder wall substitute, experimental and clinical results: J Urol 105: 518- 522, 1971
- 27) Leong CH, Ong GB: Gastrocystoplasty in dogs. Aust New Zeal J Surg 41: 272- 279, 1972
- 28) Hutschenreiter G, Rumpelt HJ, Klippel KF, Hohenfellner R: The free peritoneal transplant as substitute for the urinary bladder wall. Investig Urol 15: 375- 379, 1978
- 29) Bohne AW, Osborne RW, Hettle PJ: Regeneration of the urinary bladder in the dog, following total cystectomy Surg. Gynec & Obst 100: 259, 1955
- 30) Kudish HG: The use of polyvinyl sponge for experimental cystopasty. J Urol 33: 232, 1957
- 31) Elbahnasy AM, Shalhav A, Hoenig DM, Figenshau R,

- Clayman RV: Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. J Urol 159: 628-637, 1998
- 32) Gleeson MJ, Griffith DP: The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. J Urol 148: 1377-1382, 1992
- 33) 赤堀四朗 : タンパク質化学 .4 構造と機能 .1. p763- 773, 共立出版, 1978
- 34) Katoh K, Tanabe T, Yamauchi K: Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. Biomaterials 25, 4255- 4262, 2004
- 35) Tachibana A, Kaneko S, Tanabe T, Yamauchi K: Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblastic cultivation and differentiation. Biomaterials 26, 297- 302, 2005
- 36) 垣添忠生, 新島端夫, 熊澤淨一, 吉田修, 塚本泰司, 鳶巢賢一 : 先端医療シリーズ 7・泌尿器科 診断と治療の最前線 . p82- 89, 先端医療技術研究所, 2000
- 37) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore: Anal. Chem. 30, 1190, 1958
- 38) Kambic H, Kay R, Chen JF, Matsushita M, Harasaki H, Zilber S: Biodegradable pericardial implants for bladder augmentation, a 2.5-year study in dogs. J Urol 148, 539- 543, 1992
- 39) 岩井茂彦, 吉村裕, 藤田浩文: ウールケラチンを使用した複合材料の開発. 愛知県産業技術研究所研究報告, 5, p174-177, 2006
- 40) 田尾有一, 井上潔, 村林茂 : SCIENCE of WAVE , 新美容出版株式会社, p165, 2002
- 41) Alibardi L, Dalla Valle L, Toffolo V, Toni M: Scale

Keratin in Lizard Epidermis Reveals Amino Acid Regions Homologous With Avian and Mammalian Epidermal Proteins. *Abat Rec A Disciv Mol Cell Evol Biol*, 288, 7, 734-752, 2008

論文要旨

ケラチンは羊毛や甲羅などを構成する主要なタンパク質である。主成分がケラチンで構成される生体材料の中からカメ甲羅を新規医療材料として選び、膀胱の再建に利用するための研究を行った。

現在、膀胱に疾病を抱えている患者は約4億人がいるといわれているが、膀胱再建材料として自己の消化管を用いることが多く、消化管粘膜に起因する合併症や自己の消化管を使用するため、大きな侵襲を伴うことなど様々な問題を抱えている。そのため、膀胱を再建するための自己消化管に代わる新しい材質の医療材料が求められている。

自己の臓器を用いずに膀胱機能を修復できる医療材料の開発については、動物実験モデルにおいて膀胱の部分的置換、または膀胱の全置換を目標とした研究が多く行われてきた。

しかしながら、これらの動物実験の多くでは種々の合併症が報告され、動物実験での結果が比較的良好であった人工材料では、少数例ながら臨床応用されたものがあるが、現在に至るまで未だ実用化されているものはない。

そこで予備実験としてミシシッピアカミミガメ (*Trachemys scripta elegans*) の脱皮した甲羅をラット皮下において埋植試験を実施し、生体適合性や拒絶反応について検討をおこなった。その結果、肉眼的所見および組織学的所見においても著しい炎症反応や拒絶反応は確認されず、カメ甲羅が医療材料として使用できる可能性が示唆された。

つぎに、カメ甲羅を用いて膀胱再建を試み、膀胱再建用にカメ甲羅を加工後、膀胱再建術を実施した。

組織学的検討の結果、6ヶ月目には一部分の移植材料を残して、移植部位は肉芽組織に囲まれ、膀胱内腔面は再生した尿路上皮細胞で被覆され膀胱が再建されている様子が観察さ

れた。成功に至った理由としてカメ甲羅は物理的強度が高く、長期間にわたり膀胱内圧を保持し、尿漏れを低く抑えることにより水密性を維持できたこと、生体吸収性が遅いため、支持組織としての役割を果たすことによって自己の肉芽組織や上皮組織、血管新生の発育期間を十分に確保することができたことなどが考えられた。

さらにカメ甲羅が膀胱再建材料として長期間にわたって膀胱内の尿に曝された場合に結石形成の原因になる可能性を検討するべく、ラット膀胱内にカメ甲羅を長期間留置する実験をおこなった。その結果、1年後に摘出した膀胱および尿道からは膀胱内および尿道管腔、移植片からも結石が確認されなかった。このことから膀胱再建材料としてのカメ甲羅の優位性が確認された。

つぎにカメ甲羅が膀胱再建材料としてだけでなく、皮膚欠損修復被覆材料としても使用できることを検討した。ラット表皮下に欠損部位を作り、カメ甲羅を皮膚修復被覆材料として用いて埋植実験をおこなった。その結果、脱落や感染および拒絶反応などの副作用がなく、皮膚欠損修復に成功した。

さらに、カメ甲羅よりも大量に入手しやすい天然高分子材料である羊毛を用いて化学的にケラチンを抽出し、生体吸収性のあるケラチンをスポンジ状に加工し移植後、カメ甲羅材料よりも自己の肉芽組織や上皮組織がさらに浸潤しやすいように加工することで膀胱の再建修復時間が短縮できるのではないかと考え、羊毛から主成分であるケラチンを抽出、粉末化し、ケラチンスポンジを作製した。

予備実験として作製したケラチンスポンジを用い、ラット腹腔内において埋植試験を実施し、膀胱再建材料の可能性を検討した。その結果、どのラットにおいて腹腔内に著しい炎症反応や拒絶反応は確認されなかったが、カメ甲羅材料とは異なりケラチンスポンジでは早期の段階で組織浸潤を生じ、

同時に生分解が起こることが確認された。この結果より、ケラチンスポンジが医療材料として使用できる可能性が示唆された。

つぎにケラチンスポンジを膀胱再建材料として用い、カメ甲羅材料よりも早期膀胱再建がなされるかどうかを検討した。

その結果、カメ甲羅材料よりも物理的強度に劣るため、膀胱と移植片を縫合する際や実験動物の日常生活による体動によりケラチンスポンジに亀裂が生じ、術後に尿漏れによる腹膜炎をおこし死亡するケースが多発した。このことから、ケラチンスポンジは物理的脆弱性のために膀胱再建材料として適してはいないことがわかった。

本研究では、ケラチン材料を用いて膀胱再建を中心に様々な角度からケラチン材料の新規医療材料化を目的として研究を実施した。その結果、カメ甲羅では、膀胱再建医療材料、皮膚欠損修復医療材料として良好な結果を得ることができた。

謝辞

本論文を書き上げるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を頂きました、山口大学名誉教授中澤淳先生、東亜大学大学院医療科学専攻高上僚一先生、東亜大学医療学部医療栄養学科村上桌夫先生、社会医療法人共愛会戸畑共立病院の加藤達治先生に謹んでお礼を申し上げます。

外科的技術のご指導を頂きました健和会大手町病院泌尿器科の池田英夫先生に深く感謝の意を表します。

組織標本作製にご指導、ご協力頂きました健和会大手町病院臨床検査部病理科の山田博先生に深く感謝の意を表します。

ミシシippアカミミガメの試料をご提供頂きました栗倉医院の大石三千代氏に心から御礼申し上げます。

また、技術提供および数々のご助言を頂きました愛知県産業技術研究所尾張繊維センター加工技術室加藤一徳先生、山口県産業技術センター稲田和典先生、田村智弘先生に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究にご協力を頂きました埼玉医科大学国際医療センターME サービス部の小田昌典様、学校法人新井学園赤門会日本語学校の八杉倫先生に深く感謝の意を表します。

最後に本研究を行うにあたり、長期にわたり多大なるご指導と励ましを頂きました栗倉医院院長大石賢二先生に心からお礼を申し上げます。