

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19119

研究課題名(和文) 水晶体は加齢により硬くなるのか？ 生きたままの状態で水晶体の硬さを測る

研究課題名(英文) Does the crystalline lens become harder with aging?

研究代表者

安中 雅彦 (MASAHIKO, ANNAKA)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：40282446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ブリルアン散乱法は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的測定可能な方法として有用であり、水晶体の力学物性の観測にも有用である。本研究では、ブリルアン散乱系にVIPA etalonをタンデム型で導入し、高速・高分解能で深さ方向の情報を取り込み可能な共焦点ブリルアン顕微鏡システムした。高速・高分解能で3次元弾性イメージングを行い、眼球組織の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現した。水晶体の硬化は、加齢による調節力の低下と密接に関連していると考えられる。そこで豚正常眼の摘出水晶体を試料として、0.1mmステップで3次元弾性イメージング計測を行い、水晶体ゲルの粘弾性情報の空間分布を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、調節機能を水晶体ゲルの物性を分子レベルで明らかにすること、すなわち、力学物性の3次元空間分布を非侵襲的に測定する方法論の確立、力学物性と調節との相関解明、特に老視に観られる水晶体硬化への水晶体皮質と水晶体核それぞれの寄与を明らかにすることにある。「水晶体ゲルの分子物理化学」から得られる知見を基に、バイオハイドロゲルが関わる様々な生命現象の分子レベルでの理解を深化させる。人類の高齢化が急速に進む現在、加齢現象に伴う生体機能の変化、疾病による異常を分子レベルで理解することの重要性は益々高まっている。その中で、視覚は人間にとって重要な情報収集手段のひとつであり、本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Presbyopia is closely associated with the loss of accommodation, and hence with a decline in the viscoelastic properties of the human eye lens. In this study we describe a method for obtaining spatially resolved in vivo measurements of the rheological properties of the eye lens, based on the spectroscopic analysis of spontaneous Brillouin scattering using a virtually imaged phased array (VIPA). Confocal scanning was used to perform Brillouin elasticity imaging of the corneas of whole porcine eyes. The multi-pass configuration enhances resolution to the extent that measurements are possible in elastic biological tissue characterized by intense scattering. We also present spatially resolved measurements obtained in extracted animal eyes and lenses. The results yield entirely new insights into the aging process of the eye lens. This novel technique has the potential for use in clinical diagnostics and treatment monitoring.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：水晶体 弾性率 ブリルアン散乱

1. 研究開始当初の背景

本研究の基本的な構想は、人類の高齢化が急速に進む現在、加齢に伴う生体機能の変化、疾病による異常を分子レベルで理解することにある。生体機能場として重要なバイオハイドロゲルが関わる生体現象を、構造・物性・ダイナミクスの観点から総合的に理解する。本研究では、バイオハイドロゲルとして眼球組織である水晶体に焦点を当てる。水晶体の持つ機能のうちで最も重要な機能であるピント調節機能、すなわち調節は、水晶体の力学物性に大きく依存しており、また加齢により低下する(老眼)。これまで、水晶体の力学物性は、摘出試料を用いて侵襲的に検討されてきたが、房水と水晶体上皮細胞との間の代謝が遮断されることによる水晶体の構造、形状の変化は、水晶体物性に対して大きな影響をもたらすと考えられる。そのため「生きたままの状態」で水晶体の力学物性を解明することは極めて重要である。そこで、本研究では「生きたままの状態」で水晶体調節機能の解明を目的とする。目的達成のために、以下の検討を実施する。①高速かつ高空間分解能な3次元弾性イメージングを *in situ* かつ *in vivo* 条件で実現するブリルアン散乱光学系に VIPA エタロンを用いた分光器を組み合わせた共焦点ブリルアン顕微鏡システムを作成し、ソフトマターの弾性率の空間分布測定を実現する。②新たに開発した光学系を用いて、個体年齢の異なる豚水晶体および白色家兎水晶体を試料として、生きたままの状態の水晶体の力学物性の観測の実現、さらに調節機能、老視のメカニズムを解明する。検討により得られた結果から、加齢、疾病など眼内環境の変化による水晶体の分子レベルでの挙動を明らかにする。本研究では、調節機能を角膜ゲルの物性の観点から分子レベルで明らかにすること、すなわち、(1)角膜の力学物性の3次元空間分布を非侵襲的に測定する方法論の確立、(2)架橋による角膜ゲルの物性変化を非侵襲的に明らかにする方法論を確立することで、(3)角膜の構造・物性から円錐角膜等の疾患を分子レベルで理解すると同時に(4)円錐角膜等の疾患への新たな治療法を提案することを目的としている。「角膜ゲルの分子物理化学」から得られる知見を基に、バイオハイドロゲルが関わる様々な生命現象の分子レベルでの理解を深化させる。人類の高齢化が急速に進む現在、加齢現象に伴う生体機能の変化、疾病による異常を分子レベルで理解し、QOL (quality of life)の向上のためにフィードバックすることの重要性は益々高まっている。その中で、視覚は人間にとって重要な情報収集手段のひとつであり、本研究の意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では「生きたままの状態」で水晶体力学特性の解明を目的とする。目的達成のために、以下の検討を実施する。①高速かつ高空間分解能な3次元弾性イメージングを *in situ* かつ *in vivo* 条件で実現するブリルアン散乱光学系に VIPA エタロンを用いた分光器を組み合わせた共焦点ブリルアン顕微鏡システムを作成し、ソフトマターの弾性率の空間分布測定を実現する。②新たに開発した光学系を用いて、個体年齢の異なる豚水晶体および白色家兎水晶体を試料として、生きたままの状態の水晶体の力学物性の観測の実現、さらに調節機能、老視のメカニズムを解明する。ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 共焦点ブリルアン顕微鏡システムの作成

本研究では、目的達成のために、以下の検討を実施した。(1)高速かつ高空間分解能な3次元弾性イメージングを *in situ* かつ *in vivo* 条件で実現するブリルアン散乱光学系に VIPA エタロンを用いた分光器を組み合わせた共焦点ブリルアン顕微鏡システムを作成し、ソフトマターの弾性率の空間分布測定を実現した。(2)新たに開発した光学系を用いて、個体年齢の異なる豚角膜および白色家兎角膜を試料として、角膜の力学物性の観測を実現した。

ブリルアン散乱法(図1a)は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的に直接測定可能な方法として有用であり、物質の特性解析に広く用いられてきたが従来の Fabry-Perot 干渉計あるいは光ビート法を用いる従来の光学系では、計測に長時間を有するため、計測を point sampling からイメージングへ拡張することは実用上不可能であった。そこで、本研究では、ブリルアン散乱系からの散乱光の分光に高速かつ高

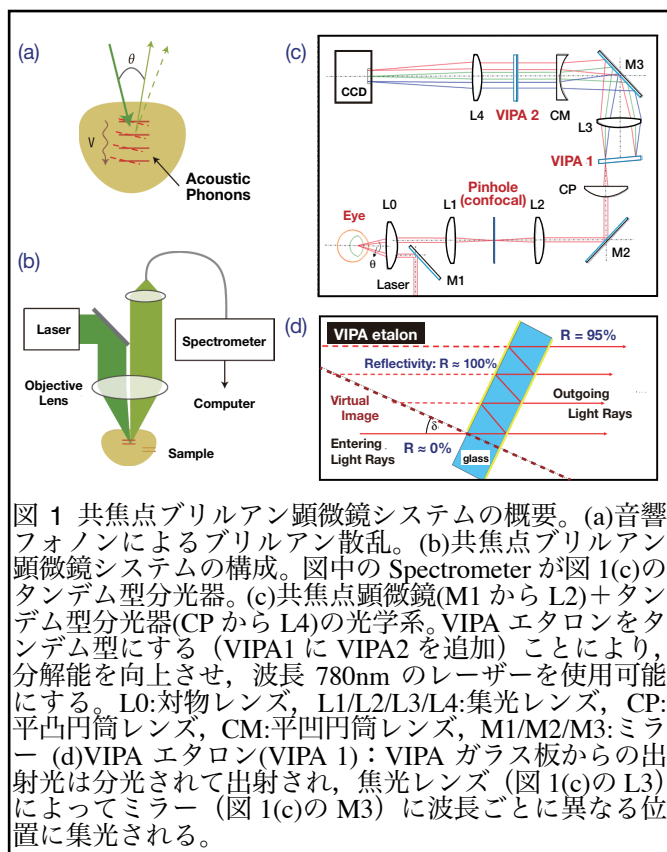


図1 共焦点ブリルアン顕微鏡システムの概要。(a)音響フォノンによるブリルアン散乱。(b)共焦点ブリルアン顕微鏡システムの構成。図中の Spectrometer が図1(c)のタンデム型分光器。(c)共焦点顕微鏡(M1からL2)+タンデム型分光器(CPからL4)の光学系。VIPA エタロンをタンデム型にする (VIPA1にVIPA2を追加) ことにより、分解能を向上させ、波長780nmのレーザーを使用可能にする。L0:対物レンズ、L1/L2/L3/L4:集光レンズ、CP:平凸円筒レンズ、CM:平凹円筒レンズ、M1/M2/M3:ミラー (d)VIPA エタロン(VIPA 1): VIPA ガラス板からの出射光は分光されて出射され、焦点レンズ(図1(c)のL3)によってミラー(図1(c)のM3)に波長ごとに異なる位置に集光される。

空間分解能計測が可能な VIPA etalon(図 1d)をタンデム型で導入した分光器(図 1c)を用いた。サンプルからの散乱光を、シングルモード光ファイバーを用いて分光器に導入することで、深さ方向の情報の取り込み可能な共焦点ブリルアン顕微鏡システム(図 1b)構築し、高速・高分解能で3次元弾性イメージングを行い、試料の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現した。分光器の性能確認は、ブリルアン周波数シフト、スペクトル幅が既知の試料(水、メタノール等)の測定で実施し、ノイズレベル、周波数感度を確認した。さらに、高速計測性能の確認は、紫外線硬化樹脂の硬化(化学架橋)過程の観測により行った。

(2) 水晶体の3次元弾性イメージング(摘出水晶体の測定)

水晶体線維は新旧の形成に応じ、周辺部の水晶体皮質と中心部の水晶体核に分けられる。水晶体皮質には水晶体線維が形成するラメラ構造が確認されるのに対して、水晶体核では水晶体線維が古く明確なラメラ構造は消失したコア・シェル構造を有する。水晶体の硬化は、加齢による調節力の低下と密接に関連していると考えられる。そこで、研究計画1で作成したブリルアン散乱システムを利用して、豚正常眼の摘出水晶体を試料として、右図2中の矢印で示すように水晶体表面方向100 μm ステップ、さらに共焦点光学系を利用して光軸方向100 μm ステップで3次元弾性計測を行い、水晶体ゲルの粘弾性情報の空間分布を明らかにする。特に水晶体皮質と水晶体核の力学物性の違いを非侵襲的に明らかにする。測定では、個体差を顧慮し、それぞれの条件で $n=20$ 程度の測定を行った。

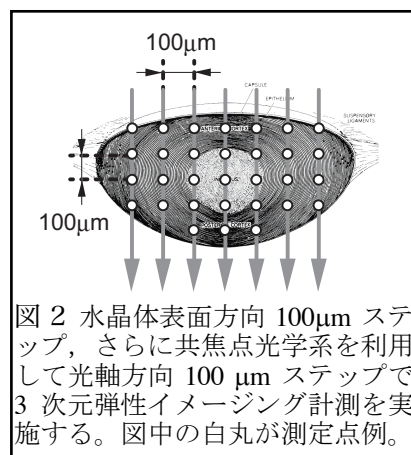


図2 水晶体表面方向100 μm ステップ、さらに共焦点光学系を利用して光軸方向100 μm ステップで3次元弾性イメージング計測を実施する。図中の白丸が測定点例。

4. 研究成果

(1) 水晶体の力学物性の非侵襲的評価法の確立

生体組織の「生きたままの状態」の力学物性を非侵襲的に計測することを目標として、高速かつ高空間分解能計測が可能なブリルアン散乱光学系を用いて、in situ かつ in vivo 条件で弾性率が測定できるブリルアン顕微鏡システムの構築を行った。非弾性散乱法であるブリルアン散乱法は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的に直接測定可能な方法として有用であり、物質の特性解析に広く用いられてきた(図 1a)。ブリルアン散乱法は本申請で研究対象とする角膜の力学物性の観測にも有用であるが、しかしながら、Fabry-Perot 干渉計をはじめとする従来の光学系は、計測に長時間を有するため、計測を point sampling から角膜全体へ拡張することは実用上不可能であった。この問題を解決するために、申請者らは、ブリルアン光学系に高速かつ高空間分解能計測が可能な仮想的な回折格子(VIPA etalon)をタンデム型で導入したブリルアン分光器(図 1dのCPからL4の光学系)の開発を検討してきた。光学顕微鏡(図 1dのM1からL2の光学系)にこの分光器を組み込むことで、ブリルアン光学顕微鏡を新たに開発し、高速・高分解能で弾性マッピングを行い、試料の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現した。

測定結果の例を図3に示す。図3(a)は豚水晶体断面の弾性率イメージングを示しており、水晶体表面から深さ方向に中心部に向けて弾性率が増加していることを示している。図3(b)は全眼のブリルアンシフトの光軸方向の変化を示しており、角膜、房水、水晶体の弾性率変化を示している。以上の様に、新たに開発したブリルアン顕微鏡システムにより、非侵襲的に角膜の弾性率の測定が可能になった。システムにより、非侵襲的に水晶体の弾性率の測定が可能になった。

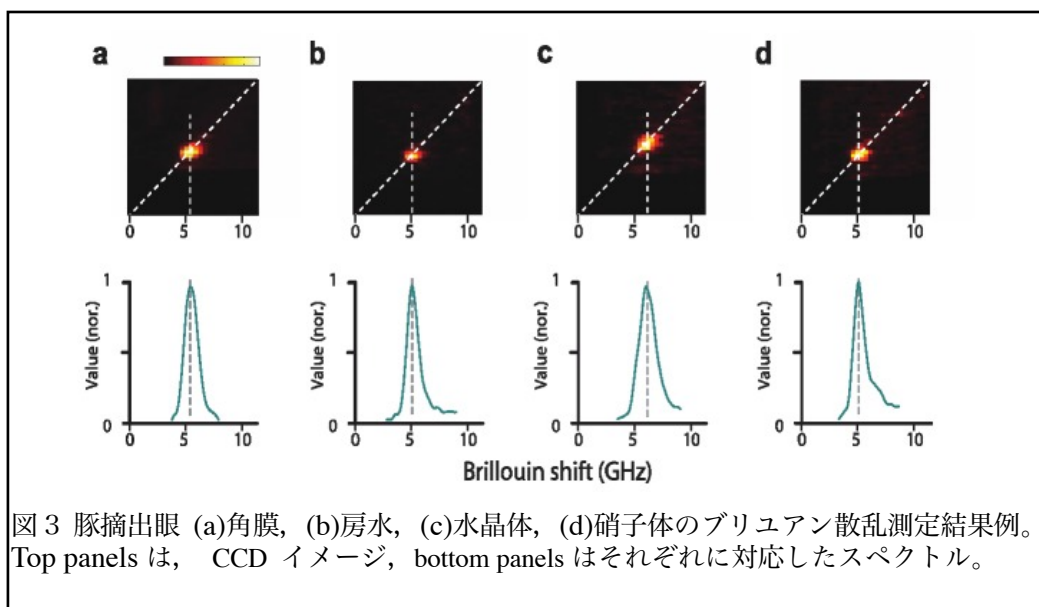


図3 豚摘出眼 (a)角膜, (b)房水, (c)水晶体, (d)硝子体のブリルアン散乱測定結果例。Top panels は、 CCD イメージ, bottom panels はそれぞれに対応したスペクトル。

(2) 水晶体の力学物性評価

測定結果の例を図4に示す。図4(a)は豚水晶体断面の弾性率イメージングを示しており、水晶体表面から深さ方向に中心部に向けて弾性率が増加していることを示している。図4(b)は全眼のブリュアンシフトの光軸方向の変化を示しており、角膜、房水、水晶体の弾性率変化を示している。以上の様に、新たに開発したブリルアン顕微鏡システムにより、非侵襲的に角膜の弾性率の測定が可能になった。システムにより、非侵襲的に水晶体の弾性率の測定が可能になった。

更に本研究では、ブリルアン弾性率とレオメーターを用いた測定から得られた弾性率との比較検討を行い、ゲル水分量をパラメータとした相関関係を見出した。これまで水晶体の力学物性は、摘出試料を用いてレオメーターにより侵襲的に検討されてきたが、眼内の代謝が遮断されることによる水晶体の構造、形状の変化は、水晶体物性に対して大きな影響をもたらすと考えられる。これは、この方法論を将来的に臨床に応用展開する上でも重要であり、今後解明すべき重要な課題である。

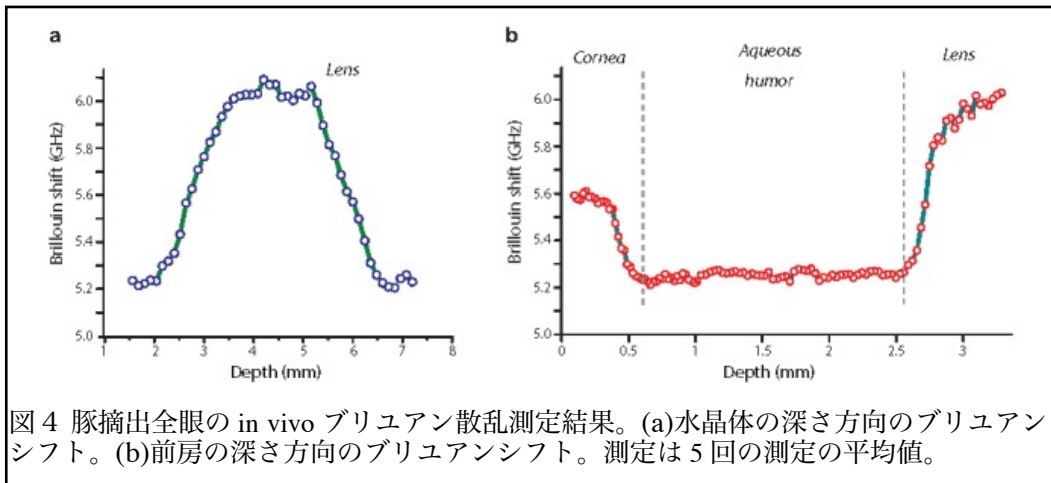


図4 豚摘出全眼の in vivo ブリュアン散乱測定結果。(a)水晶体の深さ方向のブリュアンシフト。(b)前房の深さ方向のブリュアンシフト。測定は5回の測定の平均値。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kell Mortensen and Masahiko Annaka | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Stretching PEO-PPO Type of Star Block Copolymer Gels: Rheology and Small-Angle Scattering | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 ACS Macro Letters | 6. 最初と最後の頁 1438-1442 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.8b00792 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|---|----|
| 研究 分 担 者 | 松浦 豊明 (Toyoaki Matsuura) (10238959) | 奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師 (24601) | |