

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655103

研究課題名(和文)硝子体ダイナミクスと物性のその場観察への挑戦

研究課題名(英文)Real-time Observation of Dynamics of Vitreous Body

研究代表者

安中 雅彦(ANNAKA, MASAHIKO)

九州大学・理学(系)研究科(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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：動的光散乱法による豚硝子体のダイナミクスの検討から、硝子体ゲル中には速いモードと遅いモードの2つの拡散モードが観測された。硝子体ゲルはコラーゲンおよびヒアルロン酸からなる複合ゲルであるため、DLSでは、それぞれのダイナミクスがカップリングしたモードを観測することになる。そこで構造モデルとしてコラーゲン繊維の形成するネットワーク中をヒアルロン酸が充填しているモデルを考え、コラーゲンの動きがヒアルロン酸のダイナミクスとカップリングしていることを記述する理論を構築した。理論は、実験結果を良く再現し、硝子体中のコラーゲンの協同拡散係数が、水中での拡散係数に非常に近い値であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：From the observations of the dynamics of light scattered by the pig vitreous body, intensity autocorrelation functions that revealed two diffusion coefficients,  $D(\text{fast})$  and  $D(\text{slow})$ , were obtained. We developed the theory for describing the density fluctuation of the entities in the vitreous gel system with Na-hyaluronate polymers filled in the meshes of collagen fiber network. The dynamics of collagen and Na-hyaluronate explains two relaxation modes of the fluctuation. The diffusion coefficient of collagen obtained from  $D(\text{fast})$  and  $D(\text{slow})$  is very close to that in aqueous solution, which suggests the vitreous body is in the swollen state. The diffusion coefficients were found to be dependent on the position (surface or central part) of the vitreous body from which the scattered light sampled. The inhomogeneous distribution of Na-hyaluronate and collagen and the shell structure of the vitreous body were suggested.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：硝子体 ダイナミクス 動的光散乱

### 1. 研究開始当初の背景

硝子体はゲル状の物質であり、光学的に透明性を維持し、周囲の眼組織の機械的な支持に加え、その高い粘弾性により外力から眼組織を保護している。治療方法の進歩により、これまで治療が困難であった増殖性糖尿病性網膜症、巨大裂孔原性網膜剥離等の治療が可能になってきた。正常な状態にない硝子体は、混濁の発生、炎症細胞の進入、あるいは収縮して網膜を牽引するため切除の必要性がある。しかしながら、正常な硝子体が有する、ゲル構造を維持、網膜を正常な位置に押さえる機能が失われてしまう。また、眼球中の硝子体は、加齢(Aging)による眼内環境の変化と共に、液状化および収縮が進行し、後部硝子体剥離にいたることが臨床的に知られている。以上のように、疾患あるいは加齢現象に伴う眼球機能の変化に対して、臨床的には、硝子体変性部位を外科的に除去が対症療法的に行われているが、根本療法のためには、これら現象を分子レベルでの理解し、患者への負担を最小限にするために早期診断可能な非侵襲的な診断法の開発は急務である。一方、硝子体変性部位を外科的に除去した場合、正常硝子体の働きを補う人工硝子体が手術後には必要となるが、現行ではヒアルロンン、シリコンオイル、パーフルオロカーボン等が使用され、治療効果の上昇をもたらしたものの、それらの物性・生体適合性は不完全であり、新たな置換材料が求められている。置換材料を用いた場合、置換後の硝子体の状態をリアルタイムにモニターできる非侵襲的な診断法の開発は必須である。しかしながら、硝子体は眼球組織の中で、その構造・物性と病態変化の分子レベルでの関連の理解が最も遅れている組織である。最近、申請者らは、豚硝子体を用いて *in vitro* での相挙動について動的な光散乱法を用いて詳細な検討を行い、生理条件下における硝子体ゲルの相転移現象を世界で初めて観測した。疾病により引き起こされる硝子体ゲルの様々な変化の物理化学的原理の追求に必須である構造および動的性質に対して、新たな光を与えたものであり、この方法論をさらに発展させれば、*in vivo* で非侵襲的に硝子体の状態に関する生きたままの情報を得る手段を確立できると確信するに至った。

### 2. 研究の目的

硝子体ゲルはコラーゲン繊維とヒアルロンンから構成されるバイオハイドロゲルであるが、固体成分が約 1%の希薄な多成分ゲルであるが、*in vivo* で非侵襲的に硝子体の状態に関する生きたままの情報を得る手段が確立されていないのが現状である。そこで、本研究では、①*in vivo* で非侵襲的に硝子体のみ状態解析（ダイナミクス・力学物性）方法論の確立、②他の測定方法の結果との整合性、③医学的所見（病態変化）と測定結果の相関と新規診断法への展開を目的として検討を

実施する。視覚は人間にとって重要な情報手段である。疾患・加齢に伴う眼球機能の変化分子レベルで理解し、QOLの向上のために診断・治療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。本研究の成果は、バイオハイドロゲルの基礎科学の発展だけではなく、人工硝子体の開発、さらに置換人工硝子体の生体適合性の *in vivo*・非侵襲的（生きたままの）評価に対する貢献も大いに期待される。

### 3. 研究の方法

硝子体ゲルはコラーゲン繊維とヒアルロンンから構成されるバイオハイドロゲルであるが、固体成分が約 1%の希薄な多成分ゲルである、また、生きたままの状態でも非侵襲的に硝子体のみからの必要とする情報を得る手段が確立されていない、構造・物性を理解するための解析的な理論が構築されていないなどの困難があった。そこで、本研究では、①生きたままの状態でも非侵襲的に硝子体のみ状態解析（ダイナミクス・力学物性）方法論の確立、②他の測定方法による力学特性結果との整合性、③臨床現場で使用可能な光散乱装置の試作・開発を目的として検討を実施した。

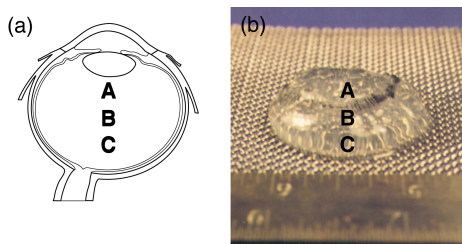
### 4. 研究成果

(1)生きたままの状態でも非侵襲的に硝子体の状態解析（ダイナミクス・力学物性）方法論の確立：硝子体の構造は、コラーゲン繊維の3次元ネットワーク中に、コイル状態のヒアルロンンが均一に分布していると考えられているが、硝子体がゲルネットワーク構造を有するという明確な証明すらないのが現状である。この硝子体の複雑な構造の変化は、ある種の疾病を誘発すると考えられ、硝子体のゲルとしての物性、ダイナミクスを明らかにすることは、疾病の分子レベルでの解明に重要な意味を持つ。硝子体ゲルはコラーゲンおよびヒアルロンンからなる複合ゲルであるため、動的な光散乱実験(DLS)では、それぞれのダイナミクスがカップリングしたモードを観測することになる。しかしながら、これまでの研究は観測される2つの成分は、それぞれコラーゲン、ヒアルロンンからの独立した寄与であるとする考えが主流であったため、測定結果を定量的に説明することは出来なかった。動的な光散乱法(DLS)を用いて豚硝子体の構造およびゲルを構成する高分子のダイナミクスに関する検討を行った。散乱光の解析から、硝子体ゲル中には速いモードと遅いモードの2つの拡散モードが観測された。硝子体ゲルはコラーゲンおよびヒアルロンンからなる複合ゲルであるため、DLSでは、それぞれのダイナミクスがカップリングしたモードを観測することになる。そこでコラーゲン繊維の形成するネットワーク中をヒアルロンンが充填しているモデルを想定し、コラーゲンの動きがヒアルロ

ナンのダイナミクスとカップリングしていることを記述する理論を構築した。理論は、実験結果を良く再現し、硝子体中のコラーゲンの協同拡散係数が、水中での拡散係数に非常に近い値であることが明らかとなった。このことは、硝子体が膨潤状態にあることを示唆するものである。さらに、算出された拡散係数(表 1)および弾性率(表 2)には位置依存性が確認され、硝子体外縁部と中心では、外縁部の方が速いダイナミクスを示しており、硝子体内部に構造不均一性が存在することが新たに明らかとなった。Swann と Constable(1972)は、生化学的な検討から、硝子体内のコラーゲンおよびヒアルロナンの不均一な分布を報告しており、本検討の結果は、不均一性を非侵襲的に確認できたといえる。

生理条件下の眼圧は、通常 1300-2600 Ps ( $\approx 10\text{-}20\text{ mmHg}$ ) 程度であり、これは眼内房水流により維持されている。表 2 に示す値は、生理条件下の眼圧に比べて小さい値を示しているが、本研究では摘出眼を用いているために、これら値は妥当なものと考えられる。

表 1 硝子体ダイナミクスの位置依存性



Sampled Position	$D_{fast}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	$D_{slow}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
A	$10 \pm 0.98 \times 10^{-8}$	$4.0 \pm 0.66 \times 10^{-9}$
B	$5.9 \pm 0.83 \times 10^{-8}$	$3.0 \pm 0.78 \times 10^{-9}$
C	$7.8 \pm 1.5 \times 10^{-8}$	$3.8 \pm 0.60 \times 10^{-9}$

表 2 体積弾性率  $M$  の位置依存性

Sampled Position	$M$ (Pa)
A	510
B	250
C	380

(2) 臨床現場において診断で使用するためには、硝子体の様々な局所部位をプローブできることが重要である。そこで、2本のシングルモード光ファイバーと2個のGRINレンズからなる光学系を用いたコンパクト動的散乱装置を設計・試作した。具体的には1本の光ファイバーで測定対象に半導体レーザーから光を導き、もう1本の光ファイバー

で散乱光を検出器に導き、また硝子体内の測定位置の確認は、内視鏡の原理を利用した光ファイバー顕微鏡を併設することによって行った。本 DLS 装置では、従来型 DLS の散乱体積  $2\text{ mm}^3$  を、 $2\text{ }\mu\text{m}^3$  程度に小さくすることが可能であるため、硝子体内のより局所的な状態を観測することができる特徴を有しており、病態変化のより初期段階の診断、人工硝子体と組織界面での局所的な状態を非侵襲的に観測が可能となる。

多分散系では相関関数の緩和時間は各成分の重ね合わせになり、対応する緩和時間は分布を持つ。従って、散乱光の電場相関関数  $g^{(1)}(\tau)$  は

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{+\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma$$

で表され、ここで  $G(\Gamma)$  は緩和速度  $\Gamma$  の分布関数である。図 1a に生理食塩水中、 $37^\circ\text{C}$  における硝子体(表 1, 位置 B)からの散乱光の規格化した電場相関関数  $g^{(1)}(\tau)/g^{(1)}(0)$  の角度依存性、また図 1b に  $\Gamma q^2$  の  $q^2$  依存性を示す。全ての散乱角で速いモードと遅いモードが観測され、図 1b から両モード共に  $\Gamma q^2$  の値はほぼ  $q$  値に依存せず一定値を取ることから、拡散モードであることが明らかとなった。この時、速いモードおよび遅いモードの拡散係数は、それぞれ  $D_{fast} = (5.6 \pm 0.71) \times 10^{-12}\text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $D_{slow} = (3.1 \pm 0.97) \times 10^{-13}\text{ m}^2\text{s}^{-1}$  であった。以上の結果から、試作機の臨床現場の使用可能性が示されたと考えられる。

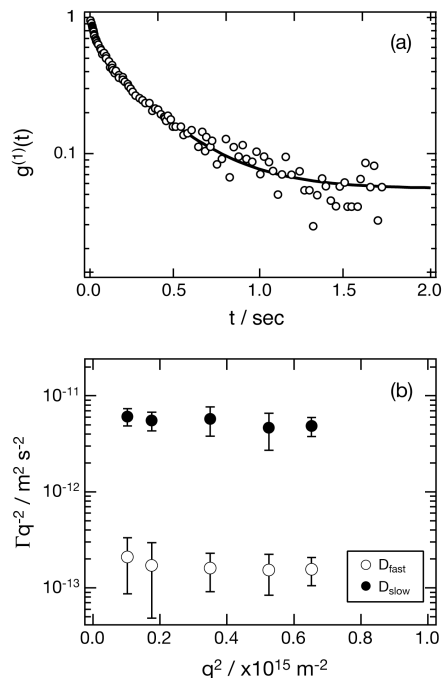


図 2 (a)生理食塩水中  $37^\circ\text{C}$  における硝子体からの散乱光の規格化し電場相関関数  $g^{(1)}(\tau)/g^{(1)}(0)$  の角度依存性、および(b)  $\Gamma q^2$  の  $q^2$  依存性

## 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 10 件）

- ① A. Shundo, K. Hori, David P. Penaloza Jr., K. Yoshihiro, M. Annaka: Nonsolvents-induced swelling of poly(methylmethacrylate) nano-particles, Phys. Chem. Chem. Phys., 査読あり, Vol. 15, 2013, 16574-16576, DOI: 10.1039/C3CP52673A

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① 辻聡一郎, 安中雅彦: 両末端を疎水化した感温性高分子のダイナミクス, 高分子ゲル研究討論会, 2014 年 1 月 22 日, 東京
- ② 辻聡一郎, Kell Moetensen, 安中雅彦: 有機-無機ハイブリッドゲルの眼科領域バイオマテリアルへの応用, 高分子討論会, 2013 年 9 月 12 日, 金沢
- ③ 辻聡一郎, 安中雅彦: 有機-無機ハイブリッドゲルの眼内レンズへの展開, 高分子ゲル研究討論会, 2013 年 1 月 16 日, 東京
- ④ 辻聡一郎, Kell Moetensen, 安中雅彦: 有機-無機ハイブリッドゲルの中性子散乱・レオロジー同時測定による構造・物性相関に関する研究, 高分子ゲル研究討論会, 2013 年 1 月 16 日, 東京
- ⑤

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安中 雅彦 (ANNAKA, MASAHIKO)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：40282446

### (2) 研究分担者

松浦 豊明 (MATSUURA, TOYOAKI)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10238959