

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560243

研究課題名(和文) 完全調節機能を有する水晶体囊フィリング材料の創製

研究課題名(英文) Organic-Inorganic Nanocomposite Gel as in Situ Gelation Biomaterial for Injectable Accommodative Intraocular Lens

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：水晶体囊内で安定して人工水晶体を存在させる為に、ゾル状態の2種類の高分子鎖末端に反応性官能基を有するマルチアーム親水性高分子を水晶体囊に注入する直前に注射器内で混合し、注入直後に囊内で高分子末端間化学架橋ゲルを形成させる新たな方法論を開発した。ゲルを無機ナノ粒子と融合化させる、具体的には無機ナノ粒子としてかご型シルセスキオキサンを高分子網目に共重合することで、水晶体の有する屈折率1.43を達成した。さらに、この方法論で形成されたゲルは、細胞毒性がなく、水晶体囊を隙間なく充填するために、後発白内障の発症を抑えることが出来た。白色家兎へのインプラント後6ヶ月の調節力の保持も確認できた。

研究成果の概要(英文)：We focus on the development of a novel injectable accommodative lens for intraocular applications, which is based on a thermosensitive hydrophobically-modified poly(ethylene glycol) containing hydrophilized silica nanoparticles. By injection of elastic polymers into the capsular bag of the eye as a fluid, body temperature transforms the polymer into optically clear gel that has the shape of a full-sized biconvex and completely fills the capsular bag. Under the condition of uniform distribution of silica nanoparticles with small size (2-5 nm) in the gel matrix, an increase in refractive index up to 0.0667 were obtained for nanocomposite compared with native gel matrix without an increase in turbidity. This composite system could be formulated to match the modulus and the refractive index of the natural lens (~1.411). In filling the capsule, it might more closely resemble the action of the young, natural lens, eliminating the possibility of any intracapsular space for cell growth.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：水晶体 調節 ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

毛様体筋およびチン氏小帯によって眼球内に懸架・支持されている水晶体が、毛様体筋の収縮弛緩によって形状（厚さ）を変化させ、屈折力を変えることで光を網膜上で結像させる機能（水晶体変形）であると考えられている。しかしながら、通常若年正常眼では、無限遠から約 6cm 程度の焦点距離程度の広範囲を瞬間的に調節可能であるとされるが、この調節中は水晶体の変形だけでは眼光学的に説明できないため、水晶体変形とは別に水晶体繊維細胞が能動的に関与する**囊内調節**が存在し、水晶体変形と囊内調節の2つのメカニズムにより調節が達成されていると考えられている。この囊内調節は、最近ドイツ Friedrich-Wilhelms 大学の O. Hockwin らによって①調節時に水晶体繊維細胞の内容物のシフトが観測される、②水晶体繊維細胞の代謝は筋肉の代謝と類似している、③Actin等の収縮性・細胞骨格性のフィラメントが水晶体繊維細胞内マトリクスで検出されている、④ATP/ADP 比は調節後低下するが、（筋肉と同様に）迅速に回復することという報告から、その機構の存在が確定しようとしている。本申請課題では、この最新の医学・生理学的知見を取り入れ、水晶体変形と囊内調節の2つのメカニズムにより調節が達成される水晶体囊充填材料（レンズフィリング材料）を創製する。

2. 研究の目的

視覚は人間にとって重要な情報収集手段である。人類の高齢化が急速に進む現在、加齢に伴う視覚機能の変化、疾病による異常を分子レベルで理解し、QOLの向上にフィードバックするという強い社会的要請がある。白内障患者は国内に現在 1000 万人以上おり、現在白内障手術で移植する人工水晶体は、単焦点レンズである。そのため生体が本来有する調節機能を失ってしまっており、特に若年者の白内障手術後に問題となっている。生体が本来有している調節機能をいかに回復するかという段階まで来ている現在、そこで本申請課題では、調節能力の完全な回復を可能とする水晶体囊充填材料（レンズフィリング材料）つまり、水晶体変形と囊内調節の2つのメカニズムにより調節が達成される人工水晶体を開発する。ここでは、最新の医学研究の成果を取り入れ、囊内調節は、細胞の運動(Locomotion)と同様の機構で、水晶体皮質繊維細胞の細胞質のゲル化が起こると考え世界初の人工水晶体の創製を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、「完全調節機能を有するレンズフィリング材料の創製」を目的として下記を検討する。

(1)完全調節機能を有するレンズフィリング材料の分子設計・合成：人工水晶体を構成す

る高分子は、水晶体囊内で安定して存在させる為に、高分子鎖末端に反応性官能基を有する2種類のマルチアーム親水性高分子溶液を水晶体囊に注入する直前に注射器内で混合し、注入直後に囊内で化学架橋ゲルを形成するように設計する（インジェクタブルゲル）。また、屈折率はゲルを無機ナノ粒子と融合化させることにより調整する。さらに、調節時に毛様体の張力に応答して人工水晶体全房部の屈折力を可逆的なゲルの微細構造変化により制御することで囊内調節機構を実現させる。この方法論で形成されるゲルは、水晶体囊を隙間なく充填するために、後発白内障の発症を抑える効果も期待できる。

(2)生体適合性検討・ゲルインプラント後の調節作用の評価：ゲルの細胞毒性、さらに白色家兎へのインプラントを行い、炎症反応、後発白内障から生体適合性を確認する。さらに、調節作用の発現の評価、約半年の調節力の保持の評価を実施する。

平成 26 年度

(1) 完全調節機能を有するレンズフィリング材料の分子設計・合成

水晶体が有する構造および機能の特徴を再現するために、各特徴を以下に示す戦略で分子の創製を行った。

①水晶体囊を充填する化学的に安定なゲルの合成：レンズフィリング材料を構成する高分子は、水晶体囊内で安定して存在させる為に、ゾル状態の2種類の高分子鎖末端に反応性官能基（高分子 A:アミノ基、高分子 B:活性エステル）を有するマルチアーム親水性高分子を水晶体囊に注入する直前に注射器内で混合し、注入直後に水晶体囊内で反応し、高分子末端間化学架橋ゲルを形成できるように設計した（インジェクタブル人工水晶体）。

ゲル骨格には、ブロック共重合体 PPO-b-PEO(Pluronic)を4本のアームを持つ Tetronic を用いた。Pluronic は、PEO が単独では酸化的分解を受けやすいのに比べて、PPO ブロックの存在により Tetronic は化学的に安定であり、また末端の水酸基は様々な反応性官能基に容易に変換できる。さらに、化学架橋ゲルであるために力学的にも安定である利点を有する。

②屈折率 1.43 の再現：ハイドロゲルの屈折率は、高濃度でも通常 1.4 まで到達することは不可能である。水晶体では、クリスタリンタンパク質が高濃度で存在することで、屈折率 1.43 を達成している。本研究では、ゲルを無機ナノ粒子と融合化させることにより調整する。具体的には、無機ナノ粒子としてかご型シルセスキオキサン(POSS)を用いた。

③囊内調節機能の再現：正常眼の調節中は水晶体の変形だけでは眼光学的に説明できな

いため、水晶体変形とは別に水晶体繊維細胞が能動的に関与する**囊内調節**が存在し、水晶体変形と囊内調節の2つのメカニズムにより調節が達成されていると考えられている。調節時に毛様体の張力に応答して人工水晶体全房部の屈折力を可逆的なゲルの微細構造変化により制御することで囊内調節機構を実現させる。具体的には、ゲル中で屈折率を調整する成分である PEO-POSS (図 4) を人工水晶体中心部から前房方向に高濃度になるように濃度勾配を持たせることにより、毛様体の緊張、弛緩に応じて前房部の屈折力を可逆的に制御する (図 5)。適切な濃度勾配は、Gullstrand の模型眼を用いてシミュレーションを行い決定した。

平成 27 年度

(2) **レンズフィリング材料の生体適合性検討**：有機-無機ハイブリッドゲルの細胞毒性、さらに白色家兎へのインプラントを行い、炎症反応、後囊白内障から生体適合性を確認する。水晶体の形状、後囊白内障およびゲルの変化は、シャインプルーフカメラ、前眼部 OCT (断層撮影) を用いて、動的な形状変化の解析も実施した。

(3) **ゲルインプラント後の調節作用の評価**：調節作用の発現の発現は、副交感神経刺激薬剤ピロカルピン点眼薬を用い、点眼前と点眼 1 時間後の等価屈折度数の差と、前房深度の変化を指標として行う。その後、さらに約半年の調節力の保持を、病理組織と共に確認を行う。さらに、インプラント状態での高次収差を確認する。高次収差は Hartmann-Shack 波面センサーを用い、角膜、水晶体、さらに眼球全体の高次収差を測定し、総合的に判断した。

4. 研究成果

(1) **完全調節機能を有するレンズフィリング材料の分子設計・合成**

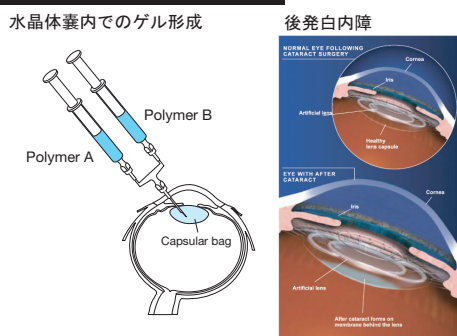
① **水晶体嚢を充填する化学的に安定なゲルの合成**：ゲル骨格には、ブロック共重合体 Pluronic を 4 本のアームを持つ Tetronic を用いた。Pluronic は poly(propylene-oxide)-block-

poly(ethylene oxide) (PPO-b-PEO) で構成されるブロック共重合体であり、PEO が単独では酸化的分解を受けやすいのに比べて、PPO ブロックの存在により Tetronic は化学的に安定である。我々は末端の 4 つの水酸基を 1 級アミノ基の変換した TA、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性エステルに変換した TS を調製した。これをリン酸緩衝液中で混合することにより、化学架橋ゲル Tetronic Gel を得た。Tetronic Gel は化学架橋ゲルであるために水晶体嚢内の房水の流れに対して、そのネットワーク構造を壊すことなく力学的にも安定である利点を有した。さらに、化学架橋点間を結ぶ Pluronic 鎖は体温付近で PPO 由来の疎水性相互作用で自己集合し物理架橋点を形成するため、さらなる構造の安定化が観測された (図 1)。実際には、高分子 TA および高分子 TS のリン酸緩衝液をダブルシリンジのそれぞれに充填し、水晶体嚢に注入する直前に注射器内で混合し注入することで、直後に水晶体嚢内で反応し、高分子末端間化学架橋ゲルを形成できる (インジェクタブル人工水晶体) こと、さらに現在行われている超音波水晶体吸引術で残った水晶体嚢に、ゾル状態の高分子溶液をシリンジで注入し、ゲル化させるために、手術手技は極めて容易であり、また水晶体嚢内でゲル化するために栓をする必要がない利点を有することが明らかとなった (図 1)。

毛様体の収縮力は、白内障で失われることは無く、さらに老化によっても変化が少ないために、本研究で開発する人工水晶体は、**生体と同様に人工水晶体を素早く変形させ調節能を得ることはこれまで達成されておらず特筆すべき点である**。またこの方法論で形成されるゲルは、水晶体嚢を隙間なく充填するために (endocapsular gelation)、後発白内障の発症を抑える効果も従来の眼内レンズ使用時と比べて飛躍的に向上した。

② **屈折率 1.43 の再現**：ハイドロゲルの屈折率は、高濃度でも通常 1.4 まで到達することは不可能である。水晶体では、クリスタリタンパク質が高濃度で存在することで、屈折率 1.43 を達成している。本研究では、ゲルを無

(a) Endocapsular Gelation



(b) Gelation

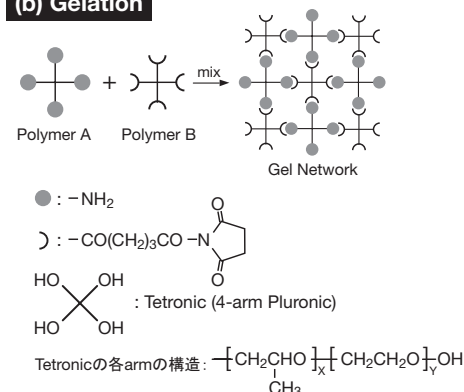


図 1 レンズフィル法によるインジェクタブル水晶体

機ナノ粒子と融合化させることにより調整した。具体的には、無機ナノ粒子としてかご型シルセスキオキサン(POSS)を用いる。POSSは一辺が0.3nmのシリカの立方体構造を中心に、各頂点に有機官能基を持つ化合物の総称であり、特に溶媒や他の媒質中において高い分散性を示すことから、分子レベルで無機成分と有機高分子をハイブリッドさせることが容易である。本研究では、各頂点に1級アミノ基を末端に有する PEO が結合した PEO-POSS を用いる。PEO-POSS を用いることで、図 1 の Tetronic 化学架橋ゲル中に高分子 TA と同様に組み込むことが可能であることが明らかとなった(図 2)。POSS がネットワークに共有結合で固定されているために、水晶体囊中の房水の流れに対して安定である結果を得た。さらに、可視光の光透過率は約 95%、屈折率は PEO-POSS 添加量調製可能であることが明らかとなった(図 3)。

(2) レンズフィリング材料の生体適合性検討: 有機-無機ハイブリッドゲルの細胞毒性は、murine catecholaminergic cells を用いて、図 3

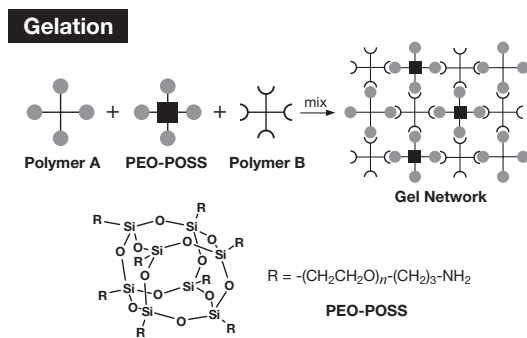


図 2 TA-TS-POSS 共重合ゲル

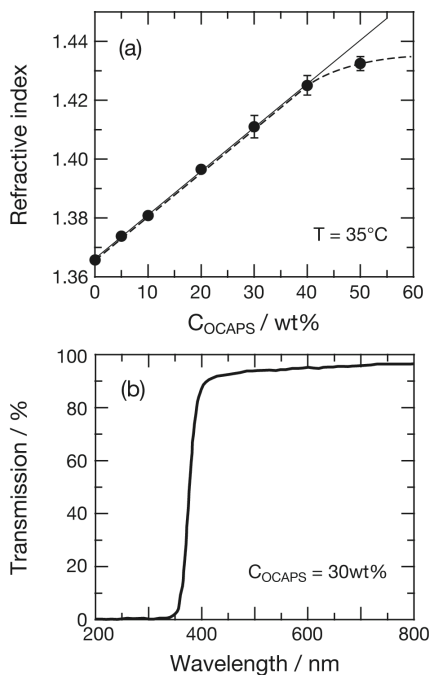


図 3 TA-TS-POSS 共重合ゲルの(a)屈折率の POSS 添加量依存性と(b)光透過率

TA-TS-POSS 濃度に対する viability 評価を行い、良好な結果を得た(図 4)。さらに白色家兎へのインプラントを行い、炎症反応、後囊白内障を抑える効果も従来の眼内レンズ使用時と比べて飛躍的に向上することが明らかとなった。

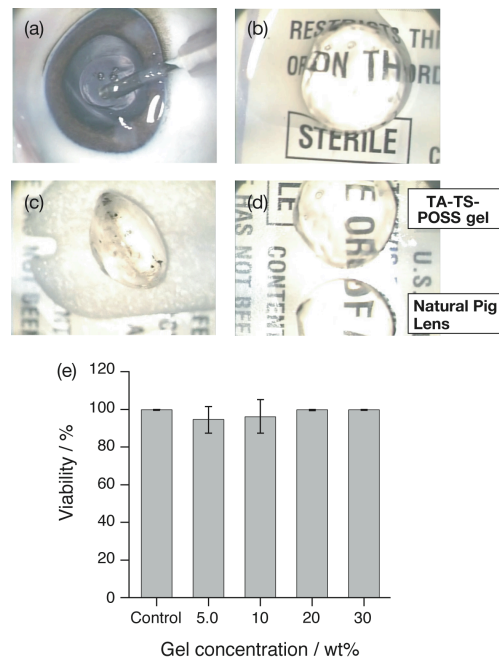


図 4 (a) & (b)豚水晶体囊への TA, TS, POSS PBS 溶液のインジェクションとゲル化, ゲル化後に水晶体囊かた取り出したゲルの(c)side view および(d) top view, (e) 細胞毒性の図 3 TA-TS-POSS ゲル濃度依存性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

[1] K. Mortensen, M. Annaka, Structural Study of Four-Armed Amphiphilic Star-Block Copolymers: Pristine and End-Linked Tetronic T1307, *ACS Macro Lett.*, **5**, pp.224–228 (2016). DOI: 10.1021/acsmacrolett.5b00936

[2] M. Fujiki, K. Mortensen, S. Yashima, M. Tokita, M. Annaka, Friction Coefficient of Well-Defined Hydrogel Networks, *Macromolecules*, **49**, pp.634–642 (2016). DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01997

[3] K. Mortensen, M. Annaka, Silsesquioxane nano-particles used for modifying properties of polymer hydrogels, and used to control X-ray contrasts. A combined X-ray and neutron scattering study, *Colloid and Polymer Science*, **293**, pp. 3353-3360 (2015). DOI 10.1007/s00396-015-3716-3

[図書] (計 1 件)

[1] Rheology of Bio-related Soft Matter: Fundamentals and Applications, Springer, 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

安中 雅彦 (MASAHIKO ANNAKA)
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 (TOYOAKI MATSUURA)
奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10238959