

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591922

研究課題名（和文）

光電変換色素を使った人工網膜（岡山大学方式人工網膜）の安全性および機能性評価

研究課題名（英文）

Safety and efficacy of photoelectric dye-coupled polyethylene films (Okayama University-type retinal prostheses)

研究代表者

松尾 俊彦 (MATSUO TOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90211565

研究成果の概要：光電変換色素をポリエチレン・フィルムに結合した人工網膜（岡山大学方式人工網膜）の試作品は、網膜神経細胞や網膜組織を刺激し、人工網膜として機能することを示してきた。この研究では、人工網膜の機能と安全性について検討した。人工網膜表面に培養した網膜神経細胞は、光刺激に反応して、細胞内カルシウムイオンの上昇をきたすことを明らかにした。また、素材として、ポリエチレン・フィルムの結晶状態を変えると、グリア細胞が付着しにくい人工網膜を作成することが可能になった。安全性としては、人工網膜の素材として使っている光電変換色素は、光照射下でも網膜神経細胞や網膜色素上皮細胞に対して毒性がないことを証明した。また、人工網膜をラット眼球の網膜下へ埋め込む手術方法を開発し、その組織反応を調べた。その結果、グリアの増殖反応はみられるが、網膜神経細胞に対しては悪影響を及ぼさないことが判明した。網膜色素変性症のモデルラット（RCSラット）の眼球内の網膜下に人工網膜を埋め込むと、失明状態から視覚を回復させることを、ラットの行動実験から明らかにした。

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：眼科学、網膜硝子体手術

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：人工網膜、光電変換色素、ポリエチレン・フィルム、安全性、網膜神経細胞、網膜色素上皮細胞、光、ラット

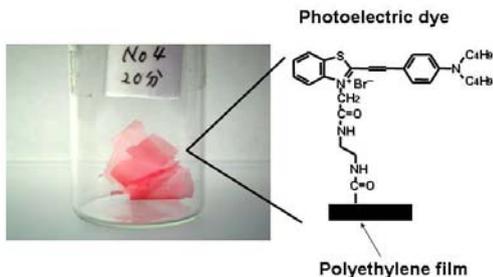
1. 研究開始当初の背景

他施設で開発されている人工網膜は、光ダ

イオード集合体を網膜下へ埋め込む方式、あるいは、カメラの撮像を出力する先として電

極集合体を眼球内に埋め込む方式がとられている。私たちは、新しい方式の人工網膜として、光電変換色素をポリエチレン・フィルムの表面に結合させたものを、網膜下へ埋め込む方式を開発した。

この光電変換色素結合のポリエチレン・フィルム（岡山大学方式の人工網膜）は、薄く柔らかく、大きな面積のものを小さな切開創から網膜下へ埋め込むことができるので、低侵襲手術に対応できる。また、光エネルギーを吸収して電位差として出力し、神経細胞を刺激するので、感度もよい。



2. 研究の目的

この研究では、岡山大学方式の人工網膜の機能と安全性について調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光電変換色素を結合したポリエチレン・フィルム（岡山大学方式人工網膜）の表面で、ニワトリ胚由来の網膜神経細胞とグリア細胞を培養した。光を当てたときの細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、蛍光顕微鏡で観察した。また、ポリエチレン・フィルムの素材として、従来品と融解再結晶品の両方を使って、グリア細胞と神経細胞の付着の違いを免疫染色および電子顕微鏡で観察した。

(2) 光電変換色素の安全性を調べるため、網膜神経細胞および網膜色素上皮細胞を、光電変換色素の存在下で、光を照射した場合、

照射しない場合に分けて、培養した。各条件下での細胞の生存率を調べた。

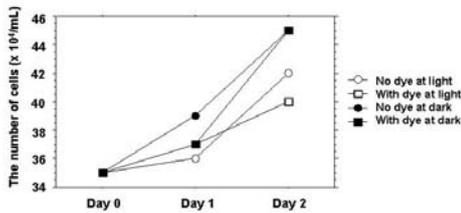
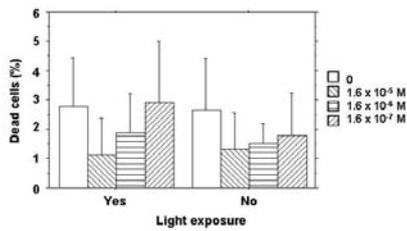
(3) 人工網膜をラットの眼球に埋め込む手術方法を開発し、ラット網膜の組織反応について免疫染色を使って調べた。

(4) 人工網膜を網膜色素変性症のモデルラット（RCSラット）の網膜下に埋め込み、失明した視覚が回復するかどうかを、ラットの行動実験によって調べた。ラット視覚を調べる行動実験として、ラットの周りを白黒の縞模様が描かれた円筒を回す装置を作成した。ラットの行動は、ビデオカメラで録画し、ラットの頭部運動を解析した。

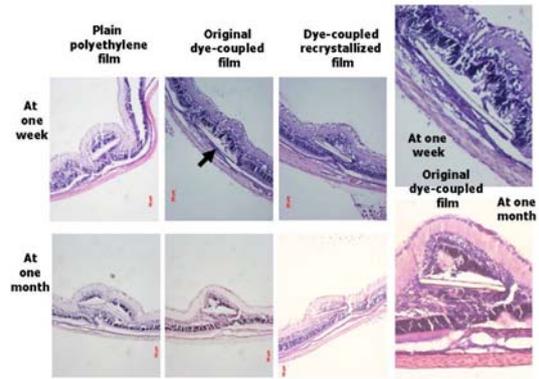
4. 研究成果

(1) 人工網膜の表面で培養した網膜神経細胞は、光刺激に反応して、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をきたした。また、従来品のポリエチレン・フィルムを使った人工網膜と比べて、融解再結晶のポリエチレン・フィルムを使った人工網膜の方が、表面に付着するグリア細胞の数が有意に少なかった。融解再結晶ポリエチレン・フィルムの方が、グリア細胞の付着を防ぎ、神経細胞との接着を維持する観点から、人工網膜として適している。

(2) 光電変換色素の存在下でも、培養した網膜神経細胞の増殖は阻害されなかった。光を照射して培養した場合でも、光電変換色素の存在は、網膜神経細胞の生存に影響を及ぼさなかった。網膜色素上皮細胞も、光電変換色素の存在下で、細胞膜の障害をきたさなかった。以上から、人工網膜に使っている光電変換色素は、細胞毒性がないことが明らかになった。

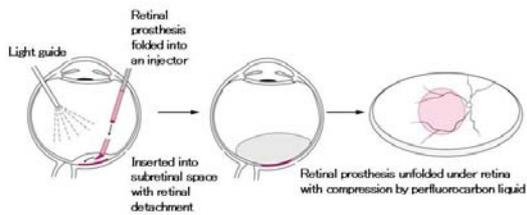


(3) 正常ラットの網膜下に人工網膜を埋め込んで1週間目、1か月目の網膜組織を観察した。網膜神経細胞のアポトーシスは見られず、グリア細胞のマーカーであるGFAPの発現が増加していた。人工網膜を取り囲むグリア細胞が見られたが、1か月の時点で人工網膜の全周には及んでいなかった。グリア細胞の取り囲みは、従来品のポリエチレン・フィルムを使った人工網膜と比べて、融解再結晶ポリエチレン・フィルムを使った人工網膜では、有意に軽度であった。培養細胞で示されたことと同様に、融解再結晶ポリエチレン・フィルムが人工網膜の素材として適していることが明らかになった。



(4) 光電変換色素を結合したポリエチレン・フィルム（岡山大学方式の人工網膜）の機能をみるため、網膜色素変性症のモデルラット（RCSラット）の網膜下に人工網膜を埋め込んだ。ラットの視覚測定方法としては、十分広さのある透明な容器に入れたラットの周りを、毎分2回転あるいは4回転のゆっくりした速度で、黒白の縞模様を描いた円筒を回し、ラットの行動をビデオで録画し、縞模様の回転方向と同じ向きへのラットの頭部運動を数えた。回転しない場合、回転する場合、反対方向に回転する場合の頭部運動を解析した。その結果、人工網膜を埋め込む手術をしていないラット、および、切開などの手術のみを行ったが人工網膜は埋め込んでいないラットと比べて、人工網膜を埋め込んだラットでは、縞模様に対する反応が見られ、岡山大学方式の人工網膜は、失明したラットの視力を回復させることが明らかになった。

(5) 全体のまとめとして、岡山大学方式の人工網膜は、機能があり、安全であることを明らかにできた。この研究の結果に基づいて、岡山大学方式の人工網膜の臨床研究の準備を進める予定である。



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 5 件)

1. Tamaki T, Matsuo T, Hosoya O, Tsutsui KM, Uchida T, Okamoto K, Uji A, Ohtsuki H Glial reaction to photoelectric dye-based retinal prostheses implanted in the subretinal space of rats. *Journal of Artificial Organs* 2008;11:38-44. 査読有り
2. Okamoto K, Matsuo T, Tamaki T, Uji A, Ohtsuki H Short-term biological safety of a photoelectric dye used as a component of retinal prostheses. *Journal of Artificial Organs* 2008;11:45-51. 査読有り
3. 松尾俊彦. 視機能再生工学. 光電変換色素をポリエチレン・フィルムに固定した人工網膜(岡山大学方式人工網膜)の開発. *BRAIN and NERVE* 2007;59:331-338. 査読なし
4. Uji A, Matsuo T, Uchida T, Shimamura K, Ohtsuki H Intracellular calcium response and adhesiveness of chick embryonic retinal neurons to photoelectric dye-coupled polyethylene films as prototypes of retinal prostheses. *Artificial Organs* 2006;30:695-703. 査読有り

5. 松尾俊彦. 岡山大学方式の人工網膜の試作品. 光電変換色素をポリエチレン・フィルムに固定した人工網膜の開発. *画像ラボ* 2006;17:36-40. 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

1. 松尾俊彦. 第 114 回日本解剖学会総会. シンポジウム「網膜を材料にした多角的アプローチにより組織細胞の姿を知る」. 人工網膜からみた網膜神経細胞の機能. 2009 年 3 月 29 日. 岡山市.
2. 松尾俊彦. 第 46 回日本人工臓器学会大会. スペシャルセッション「日本発 人工臓器」. 光電変換色素を使った人工網膜(岡山大学方式人工網膜)の評価方. 法 2008 年 11 月 28 日. 東京.
3. 松尾俊彦. 第 47 回日本生体医工学学会大会. オーガナイズドセッション「ニューロエンジニアリング」. 光電変換色素を使った人工網膜(岡山大学方式人工網膜)の安全性および機能性評価. 2008 年 5 月 9 日. 神戸市.

[その他]

ウェブサイト 2008 年作成

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/opth/retina/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 俊彦 (MATSUO TOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 90211565

(2) 研究分担者

内田 哲也 (UCHIDA TETUYA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・講師

研究者番号 : 90284083

(3) 連携研究者

該当なし