

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19750184  
 研究課題名 (和文) 光電変換色素を固定したポリエチレンフィルムの生体適合性の向上  
 -人工網膜への応用-  
 研究課題名 (英文) Biocompatibility of dye-coupled polyethylene film -Application  
 to the retinal prostheses-  
 研究代表者  
 内田 哲也 (UCHIDA TETSUYA)  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・講師  
 研究者番号：90284083

## 研究成果の概要：

我々はこれまでに、網膜中の視細胞と同等の機能を有する膜の作製を目的とし、光を吸収し電気的信号に変換する光電変換色素をポリエチレンフィルム表面に化学固定する方法を確立している。さらに作製した色素固定フィルムが視細胞未発達のマウス受精卵(ヒヨコ)の網膜を刺激し、人工網膜としての機能を有することを明らかにしてきた。人工網膜は眼球の奥に挿入して使用するため、代謝の激しい体内で長期間安定に機能を果たすことが求められる。それに加えて、好ましくない生体反応を起こさず、双極細胞などの神経細胞との親和性に優れ、生体適合性を有することも必須条件である。そこで以下に示す2つの点に着目し、生体内で安定して機能する生体適合性の優れた人工網膜の作製を検討した。

- 1)色素固定基板として用いるポリエチレンフィルム表面の物性と生体適合性の検討
- 2)ポリエチレンフィルム表面の反応性末端基を利用した化学修飾による生体適合性の向上

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：高分子化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維

キーワード：光電変換色素、人工網膜、ポリエチレン、フィルム、生体適合性

## 1. 研究開始当初の背景

眼の網膜は大きく分けると視細胞、双極細胞、神経節細胞の3層の神経細胞からなる (Fig. 1)。角膜から入った光は視細胞で吸収され、視細胞膜面に電位差分布が生じる。この信号が双極細胞、神経節細胞を経て脳に送ら

れ視覚となる。網膜色素変性症などの病気では、視細胞の機能だけが失われており、電気的信号を伝達する双極細胞や神経節細胞は健全である。したがって視細胞と同様の機能を有する人工膜を作製し、視細胞の位置に挿入できれば視力を回復できる。我々はこのよう

な考えのもと、網膜中の視細胞と同等の機能を有する膜の作製を目的とし、光を吸収し電気的信号に変換する光電変換色素をポリエチレンフィルム表面に化学固定する方法を確立した。さらに得られたフィルムが視細胞未発達のニワトリ受精卵(ヒヨコ)の網膜を刺激し、人工網膜としての機能を有することを明らかにしてきた。

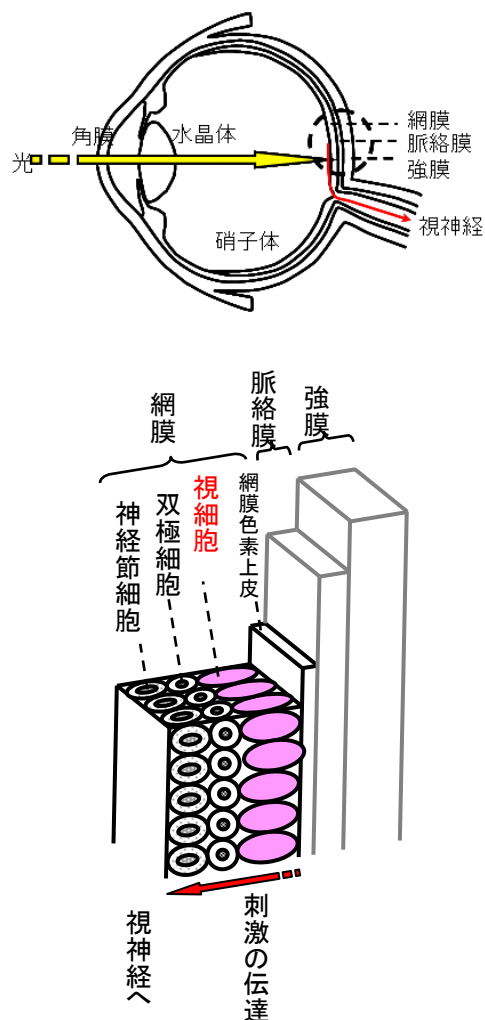


Fig. 1 目と網膜の構造

## 2. 研究の目的

色素固定ポリエチレンフィルムを用いた人工網膜を実用化するには、次のステップとして生体適合性を検討しなければならない。色素固定ポリエチレンフィルムは眼球の奥に挿入して使用されるため、代謝の激しい体内で

長期間安定に機能を果たすことが求められる。それに加えて、好ましくない生体反応を起こさず、双極細胞などの神経細胞との親和性に優れ、生体適合性を有することも必須条件である。そこで本研究では以下に示す2つの点に着目し、生体内で安定して機能する生体適合性の優れた人工網膜を作製する。

- (1) 基盤とするポリエチレンフィルムの表面形態と生体適合性
- (2) ポリエチレン表面の化学修飾による生体適合性の向上

## 3. 研究の方法

(1) 色素固定基板として用いるポリエチレンフィルム表面の形態と生体適合性の検討

### ①フィルム作製と構造解析

熔融状態から急冷あるいは徐冷して得られたポリエチレン(PE)フィルムおよびPEインフレーションフィルム(リング状の口金からポリエチレン熔融物を押し出し、リング中央から空気を送り膨らませながら延伸して作製したフィルム)を基板として用いた。それぞれのフィルムを80°Cの97%発煙硝酸に所定の時間浸漬し、フィルム表面にカルボキシル基を導入した。それぞれのフィルムの構造を走査型電子顕微鏡(SEM)、および走査プローブ顕微鏡(SPM)を用いて検討した。

### ②生体適合性の評価

ラット由来で神経系接着細胞であるPC12細胞を用いPEフィルム表面での細胞培養を行った。培地にはRPMI1640(哺乳類細胞に広く使用される高栄養培地)、馬血清および牛胎児血清の混合物を用いた。37°CでCO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータ内で3日間培養した。細胞培養後、フィルム表面に接着していない細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で注意深く洗浄した後、グルタルアルデヒドで

固定し、再び PBS で洗浄した。続いてエタノールで脱水した後、エタノールを t-ブチルアルコールに溶媒置換し、凍結乾燥を行った。得られた試料の光学顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。また細胞培養の基板に用いたすべての試料について水の接触角を測定した。

(2) PE フィルム表面の反応性末端基を利用した化学修飾による生体適合性の向上

前述した 2 種類の PE フィルムを 97% 発煙硝酸中に浸し 80°C、15 min の条件で反応を行った。この発煙硝酸処理により PE フィルム表面にカルボキシル基を導入した。次に溶媒として chlorobenzene、縮合剤として dicyclohexyl carbodiimide (DCC) を用い、フィルム表面に導入したカルボキシル基に ethylenediamine を反応させた (35°C、24 h)。続いて、フィルム表面に結合した ethylenediamine の末端基 (アミノ基) に光電変換色素 (NK-5962) のカルボキシル基を同様の方法で反応させ、PE フィルム表面に光電変換色素を化学固定した。

次に、生体適合性向上が期待されるコラーゲンや RGDS などのタンパク質の固定反応について検討した。コラーゲン、RGDS の分子構造中には末端基として、カルボキシル基とアミノ基が存在する。したがって縮合剤を用いてカルボキシル基を有する PE フィルムと反応させると、PE フィルム上のカルボキシル基にコラーゲンあるいは RGDS が固定されるだけでなく、それらのタンパク質の末端基を利用した更なる縮合反応が進行してしまう。そのためフィルム表面の修飾を制御することができず、タンパク質が PE フィルム表面に多層固定されてしまう。したがって、続いてその表面上に光電変換色素を固定しても、生体内に存在するコラーゲンやゼラチンなどの分解酵

素により分解されやすくなり、色素が基板表面から脱離する可能性が高くなる。そこで、縮合剤とタンパク質の使用を別々の系にて行うことでコラーゲンや RGDS を単層固定することも試みた。

多層固定には前述の方法と同様に DCC を縮合剤として用い、PE フィルム表面のカルボキシル基にエチレンジアミンを介してフィタンパク質を固定した。

単層固定の場合には、まず 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (WSC) を縮合剤として用い、カルボキシル基を導入した PE フィルムと 35°C、2 h の条件で反応を行い、PE フィルム上のカルボキシル基の反応性を向上させた。続いてタンパク質を加え 35°C、2 h の条件で反応を行った。これらの反応後、作製したタンパク質固定フィルムと光電変換色素を、DCC を縮合剤として用い、蒸留水を溶媒として 35°C、24 h の条件で反応を行った。

得られた試料の生体適合性の評価を前述 (3-1-②) の方法で評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 基盤とするポリエチレンフィルムの表面形態と生体適合性

SEM および SPM 観察により、融液からの結晶化フィルムは球晶構造であり、インフレーションフィルムは板状晶が成形方向に積み重なった構造であることを確認した。また発煙硝酸処理により、フィルム表面にカルボキシル基が導入されたことを IR スペクトルを用いて確認した (1712 $\text{cm}^{-1}$ , Fig. 3(a) 参照)。このカルボキシル基の導入により、フィルム表面は疎水性 (未処理 PE フィルム 95° ~ 110°) から親水性 (発煙硝酸処理フィルム 70° ~ 90°) へと変化した。それぞれのフィルム上で細胞を培養した結果、発煙硝酸処理を施して

いない疎水性フィルム上では、その構造の違いにかかわらず、ほとんど細胞が成長しなかった。これに対して発煙硝酸処理を行ったフィルム上では、比較的多くの細胞が成長した。各フィルムの接触角と光学顕微鏡で観察されたフィルム上の細胞数との関係をFig. 2に示す。接触角が小さく、親水性が高いほどフィルム表面で多くの細胞が成長している。この結果から、PE フィルムの発煙硝酸処理によりカルボキシル基が導入され、フィルム表面が親水性となることで細胞増殖性が向上することが明らかとなった。

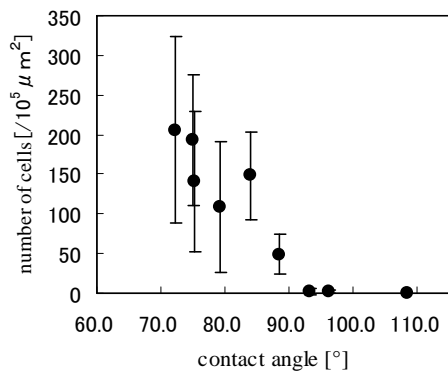


Fig.2 PE フィルム表面の水の接触角とPC12 細胞の細胞増殖数 (培養 3 日後)

(2) PEフィルム表面の反応性末端基を利用した化学修飾による生体適合性の向上

①PEフィルム表面の化学修飾

発煙硝酸処理後のフィルムは $1710\text{ cm}^{-1}$ にカルボキシル基のC=O伸縮のピークが確認できる (Fig. 3(a)) ことから、表面にカルボキシル基が導入されたことがわかる。ジアミン反応後では、このピークは小さくなり (Fig. 3(b))、色素固定反応後では、 $1520\text{ cm}^{-1}$ にNK-5962特有のC=N環伸縮のピークが確認できる (Fig. 3(c))。以上のことから、色素をフィルム表面に固定できたことがわかった。

続いて、RGDSもしくはコラーゲン導入後の色素導入フィルムには $1570\text{ cm}^{-1}$ にペプチド結合の吸収ピーク、および $1520\text{ cm}^{-1}$ に色素のピークが確認できる (Fig. 4)。このことから、作製した試料表面上にRGDS、コラーゲン、光電変換色素を固定できたことがわかった。

クが確認できる (Fig. 4)。このことから、作製した試料表面上にRGDS、コラーゲン、光電変換色素を固定できたことがわかった。

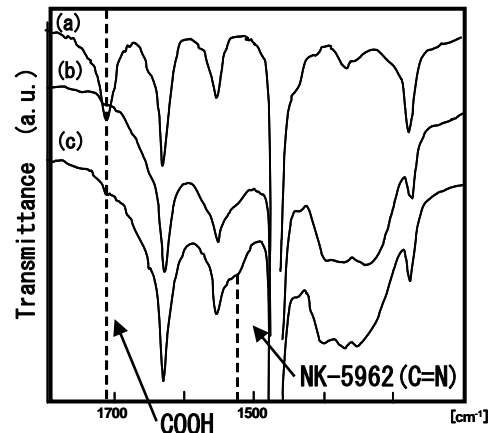


Fig.3 色素固定フィルムの各段階 IR スペクトル (a)発煙硝酸処理、(b)ジアミン反応、(c)色素固定フィルム

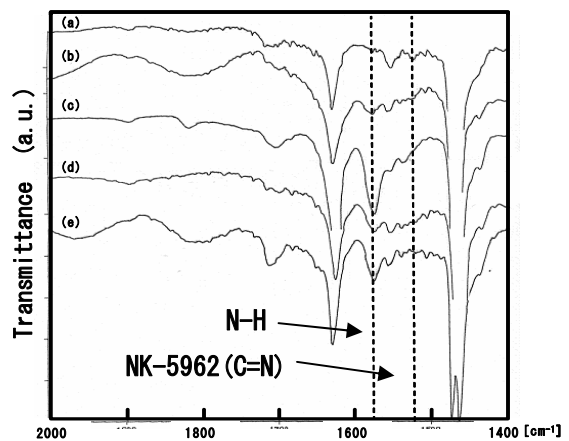


Fig.4 コラーゲン、RGDS と色素固定の各試料の IR スペクトル (a)色素固定フィルム、(b)多層 RGDS+色素固定フィルム、(c)単層 RGDS+色素固定フィルム、(d)多層コラーゲン+色素固定フィルム、(e)単層コラーゲン+色素固定フィルム

②各試料の表面接触角

作製した試料上での接触角測定の結果を平均値±標準偏差でFig. 5に示す。

PEフィルム自体は疎水性であるが、発煙硝酸処理を行うことでフィルム表面にカルボキシル基が導入されるため、フィルム表面が親水性になることがわかった。また、RGDSやコラ

ーゲンを導入したフィルム表面は、さらに親水性になることが認められた。一方、RGDSやコラーゲン導入後に色素導入すると、接触角が数度～十度程度、疎水性へ変化することがわかった。

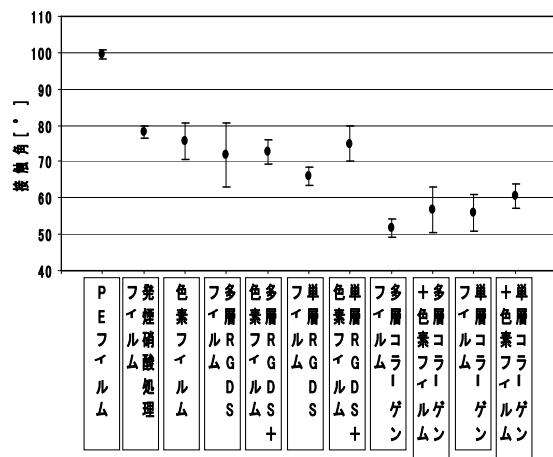


Fig. 5 各サンプル表面の水の接触角

### ③細胞培養後の形態観察

形態観察の結果、色素固定フィルム表面に、ある程度細胞が接着していることが確認された。一方、生体由来の成分を表面上に導入した試料上では色素固定フィルムと比べ、数多くの細胞が観察され、細胞増殖性が優れていることがわかった。そこで各試料の細胞増殖性の違いについてさらに検討するために、 $10^5 \mu\text{m}^2$ 辺りの細胞数を計測し、その結果を平均値±標準偏差でFig. 6に示す。

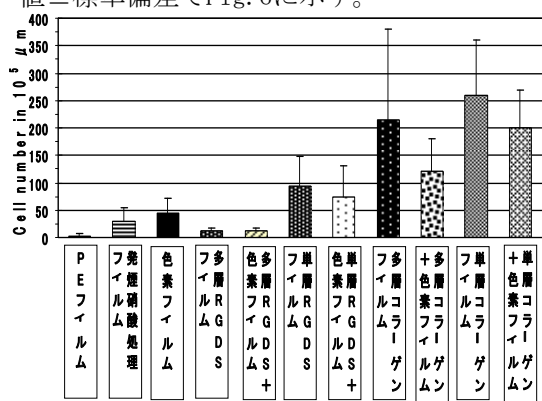


Fig. 6 各フィルム表面でのPC12細胞の増殖数 (培養3日後)

この結果から、PEフィルム上では細胞はほと

んど増殖しないことがわかった。一方、その表面にカルボキシル基を有する発煙硝酸処理フィルム、および色素を固定したフィルム上では、ある程度細胞が育っていた。これはフィルム上にあるカルボキシル基により、フィルム表面が親水性になったためと考えられる。また、色素固定後の試料でも細胞が増殖していることから、色素自体に毒性がないこともわかった。一方、RGDSやコラーゲンを固定した試料上では、RGDSを多層固定した試料を除き、細胞増殖に適した基盤となることがわかった。その中でも、コラーゲンを単層固定したフィルム上で最も細胞が増殖していた。また、RGDSを単層固定したフィルムも比較的高い細胞増殖性が見られた。生体内での安定性はこの2つのタイプが比較的優れていることが予想され、人工網膜に用いる新たなタイプの基板として期待される。また、コラーゲンやRGDS固定後、色素を固定したフィルムについてはいずれの場合においても細胞増殖が減少していた。これは、色素がフィルム表面に存在しているために、コラーゲンやRGDSの細胞に対する影響が低下したためと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① T. Tamaki, T. Matsuo, O. Hosoya, K. M. Tsutsui, T. Uchida, K. Okamoto, A. Uji, H. Ohtsuki, Glial reaction to photoelectric dye-based retinal prostheses implanted in the subretinal space of rats, Journal of Artificial Organs, 11(1) 38-44 (2008)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 哲也 (UCHIDA TETSUYA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・講師

研究者番号：90284083