

## 色素固定薄膜型人工網膜(岡山大学方式人工網膜) の実用化に向けた医工連携の取り組み

Development of a Retinal Prosthesis by Using Photoelectric Dye-coupled Polyethylene Films  
(Okayama University-type Retinal Prosthesis)

内田哲也<sup>\*1</sup> 松尾俊彦<sup>\*2</sup>

視細胞は目が光を受けたとき脳に伝える電気信号の起点になっている。そのため網膜中の視細胞に障害があると、最悪の場合失明する。失明した人に再び視覚を取り戻すため、視細胞の機能と生体適合性を持つ人工の薄膜(人工網膜)を医工連携で共同開発している。その仕組みはシンプルで、光を電気信号に変換する光電変換色素を生体内でも安定なポリエチレン薄膜に結合させたものである。

### 1. はじめに

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。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

は健常である<sup>1)</sup>。そのため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し、機能が失われていない双極細胞や神経節細胞を電気的に刺激することができれば、視力を回復できると考えられている。

この考えをもとに、近年、アメリカで電極アレイ(電極集合体)を用いた人工網膜が上市されている(Second Sight社, Argus<sup>®</sup> II Retinal Prosthesis System)。その方式は、カメラ撮像を処理した電

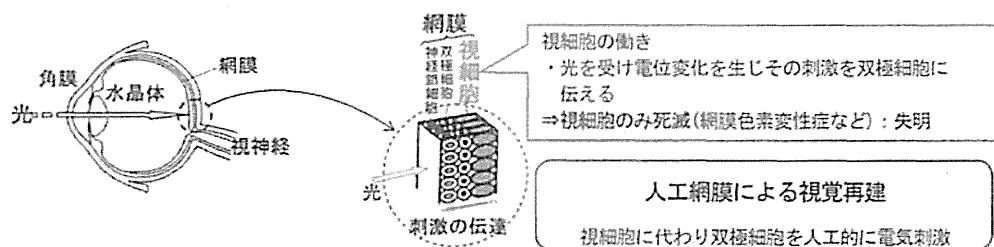


図1 眼の構造と本研究の人工網膜による視覚再建の考え方

<sup>\*1</sup> Tetsuya Uchida <sup>\*2</sup> Toshihiko Matsuo

<sup>\*1,2</sup> 岡山大学 大学院 <sup>\*1</sup> 自然科学研究科 化学生命工学専攻 高分子材料科学研究室 准教授

<sup>\*2</sup> 医歯薬学総合研究科 眼科学分野 准教授

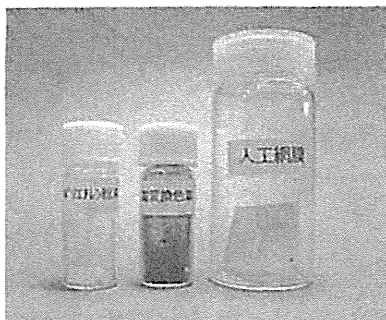


図2 本研究で用いたポリエチレン粉末、光電変換色素および色素固定薄膜型人工網膜

流信号を網膜近傍に埋め込んだ電極集合体から出力し、網膜や視神経を刺激するものである。しかしながらこの方式では、外部起電力が必要なことや、移植手術が難しいこと、生体適合性が悪いこと、分解能が悪い(60電極程度)、価格が高額(約1000万円)などの問題点がある。

一方、筆者らは、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(PE)薄膜表面に化学固定する全く新しいタイプの人工網膜を作製し、その機能を評価してきた(図1, 2)。本稿ではその特徴と作製法、評価結果について、主に材料学的観点から紹介する。

## 2. 色素固定薄膜型人工網膜の特徴

### 2.1 光電変換色素の選定

光電変換色素は、感光色素の一種であり、光を吸収すると色素分子内で電子が励起されて電位差を生じる分子である。我々はカルボキシル基を持つスチリル系有機色素に着目し、人工網膜に適した光電変換色素を検討した。スチリル系有機色素は、色素増感型太陽電池の色素半導体電極として用いると、非常に高い光電変換効率を示すことが報告されている<sup>2,3)</sup>。独自に開発したニワトリ胚網膜神経細胞を使った簡便なスクリーニング法により、人工網膜に適したスチリル系有機色素 NK-5962 (図3) を選定した<sup>4,5)</sup>。この光電変換色素は、比較的弱い光に対しても反応して、双極細胞を刺激するのに十分な電位差を生じることがスクリー

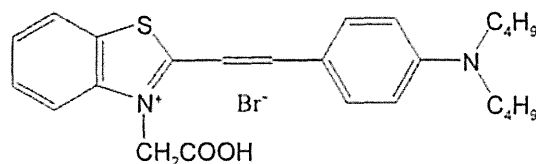


図3 光電変換色素 NK-5962 の化学構造

ニング時に分かっている。また、色素分子は2nmほどの大きさであり、緻密に並べることができれば電極アレイを遥かに凌ぐ分解能が得られると考えられる。

### 2.2 基板薄膜の選定

視覚回復を目的として光電変換色素をそのまま目の中に挿入(注入)しても、すぐに流出してしまい、効果は得られない。色素を目の中に留め人工網膜として機能させるためには、生体内でも安定で柔らかい基板(薄膜)に色素を化学結合させる必要がある。そこで我々はポリエチレン(PE)に着目した。PEは繰り返し単位がメチレン(-CH<sub>2</sub>-)からなる非常に簡単な化学構造を持つ高分子であり、化学的に不活性で生体内でも安定である。また熱可塑性で成形しやすく、軽く、安価である。PEの中でも高密度PEは結晶性が高く、薄膜化したとき優れた力学的性質を有する。そのため高密度PEの薄膜を、光電変換色素を固定する基板として採用した。

### 2.3 色素固定PE薄膜(色素固定薄膜型人工網膜)の作製

PEはその化学的安定性ゆえに、通常の有機化学的な手法では、薄膜表面に光電変換色素を化学結合させることは困難である。そこで我々は、PE薄膜中の固体高次構造を利用して、薄膜表面に選択的に反応性の末端基を導入する方法<sup>6)</sup>を利用した(図4)。

PE薄膜中には厚さ十〜数十nmのラメラと呼ばれる板状晶が存在し、長いPE分子鎖が折りたたまれた構造をしている。この折りたたみ部分はfold部分と呼ばれ、分子の立体障害により大きなスト

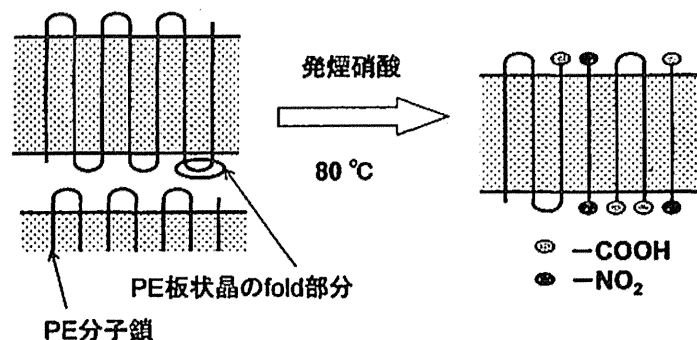


図4 発煙硝酸処理によるポリエチレン薄膜表面への反応性官能基の導入

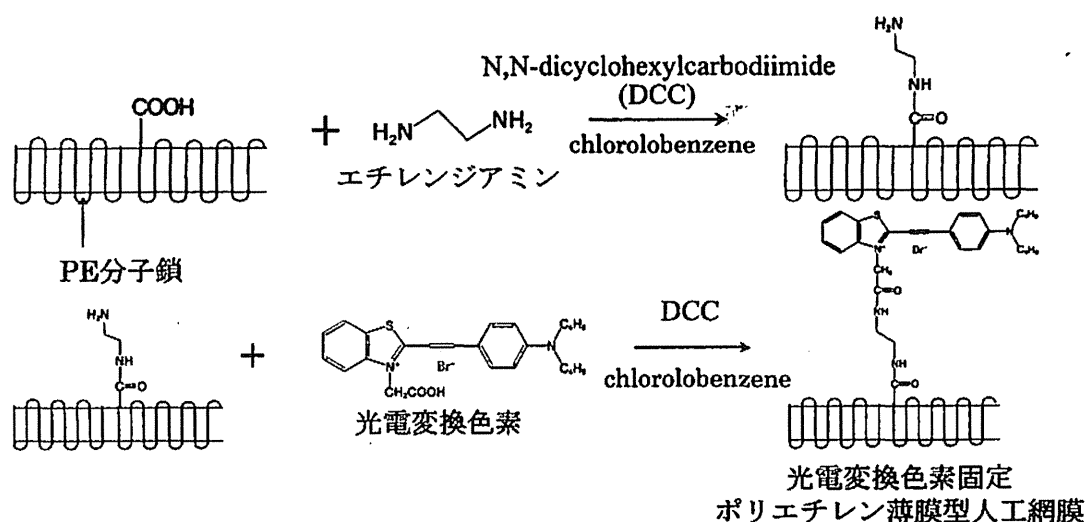


図5 カルボキシル基が導入されたPE薄膜への光電変換色素の導入

レスがかかっている。そのためPE薄膜を適切な時間で発煙硝酸処理すると、薄膜表面に存在するfold部分のみを選択的に切断し、PE薄膜表面に反応性を有するカルボキシル基を導入できる。

続いてPE薄膜表面に導入したカルボキシル基を利用し、アミド結合により光電変換色素NK-5962を化学結合させる方法を確立した(図5)<sup>7,8)</sup>。

この方法で作製された光電変換色素固定PE薄膜(岡山大学方式人工網膜)は、前述した微細で高い光電変換機能を有する色素分子がPE薄膜表面に緻密に化学結合している。そのため次に示す特徴を有することが期待される。①光電変換色素

の大きさはナノメートルスケールであり、電極方式の人工網膜に比べて飛躍的に分解能が上昇する。

②弱い光でも反応して電位差を生じるため、高感度であり、外部電極も必要としない。③薄膜の基板として用いるPEは化学的に安定であり生体毒性が少ない。また力学的性質にも優れ、柔軟性もあり、手術などでの取り扱いにも優れる。④PE薄膜表面にはPE結晶の構造に由来する微細な凹凸が存在し、その形態は成形条件により制御可能である。薄膜表面の形態と生体適合性には密接な関係があり、この関係を明らかにすることで人工網膜基板に最適な表面構造を有するPE薄膜を作

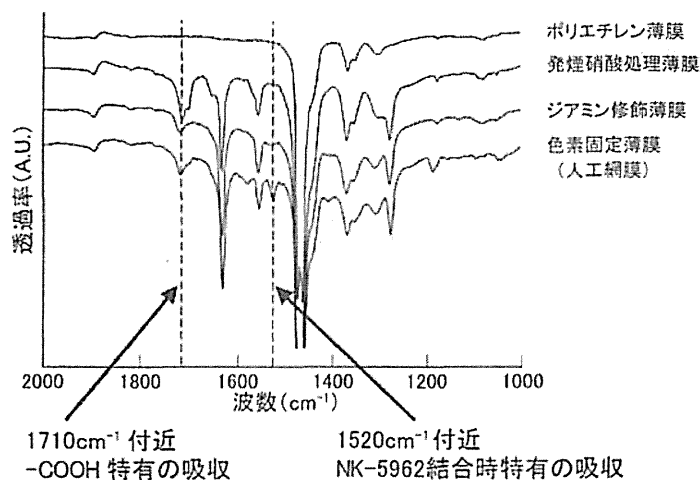


図6 各段階の試料のIRスペクトル

製できる。

### 3. 色素固定薄膜型人工網膜の材料学的評価

#### 3.1 赤外吸収スペクトル (IR) による反応の確認

発煙硝酸処理後のPE薄膜にはカルボキシル基が薄膜表面に導入され、 $1710\text{ cm}^{-1}$  付近にカルボキシル基のピークが存在した。このピークはエチレンジアミンを結合させたジアミン修飾薄膜では減少していた。これはジアミン修飾によりカルボキシル基とエチレンジアミンがアミド結合を形成し、カルボキシル基の量が減少したためである。また、色素固定を行った薄膜では光電変換色素NK-5962に存在するC=N環伸縮に起因する $1520\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収が現れていた。したがって光電変換色素はエチレンジアミンを介しカルボキシル基に選択的に結合していることが分かった(図6)。

#### 3.2 色素固定薄膜表面の微細構造および親水性と生体適合性

前述したようにPE薄膜の基本構造は分子鎖が数十nmの周期で折り畳んで形成した板状晶である。その板状晶の厚みや向き(配向)は成形時の冷却(結晶化)条件により異なるものとなる。そこで板状晶が一定方向に積み重なった構造のインフレーションフィルム(PE-extruded blown 薄膜

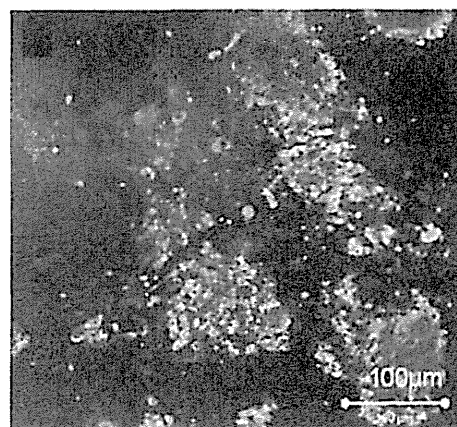


図7 急冷結晶化PE薄膜を利用して作製した人工網膜上での網膜細胞培養結果(明るく見えるものが網膜細胞)

(PE-EB 薄膜))<sup>9)</sup>と、板状晶が結晶核から等方的に、ねじれながら成長する球晶構造を持つ急冷結晶化薄膜の2種類のPE基板を使用して色素固定薄膜を作製した。両者の比較を行うと、急冷結晶化薄膜を用いて作製した色素固定薄膜の方が、その薄膜表面でより多くの細胞が増殖し、接着性も優れていた(図7)<sup>8)</sup>。この細胞増殖性の違いの原因を明らかにするため、水の表面接触角を測定し、親水性の点から評価した(水の接触角が小さいほど親水性が高いことを示す)。PE薄膜の水の接触

角は100°程度で疎水性である。一方、色素固定薄膜（人工網膜）の水の接触角は80°程度であり、比較的親水性であった。これは発煙硝酸処理により導入されたカルボキシル基によるものである。さらに詳細に親水性の違いを検討すると、急冷結晶化薄膜を用いて作製した色素固定薄膜は約77°、PE-EB 薄膜を用いて作製した色素固定薄膜は約82°であった。板状晶が薄膜表面に対し垂直に積層

している PE-EB 薄膜と異なり、急冷結晶化薄膜では板状晶がねじれ、fold 部分が表面に多く露出している。そのため fold 部に導入された未反応カルボキシル基がより多く表面に露出し、高い親水性を有していると考えられる。またこれまでの検討により、細胞増殖には水の表面接触角 75 ~ 80°の条件が最も適していることが分かっている<sup>10)</sup>。これらのことから色素固定急冷結晶化薄膜は細胞増殖に適した高い親水性を有していることが分かった。

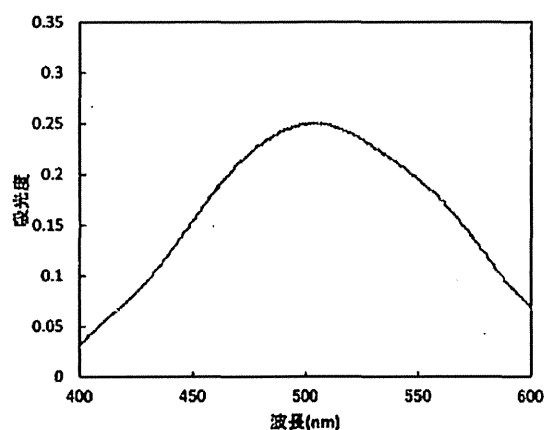


図8 色素固定薄膜の紫外可視光吸収スペクトル

### 3.3 色素固定薄膜表面（人工網膜表面）に化学結合した色素量の検討

色素固定処理の最適化を行い、その方法で得られた色素固定薄膜の表面に化学結合した色素の量を検討した。作製した色素固定薄膜の紫外可視光吸収スペクトル測定結果を以下に示す（図8）。500 nm 付近に吸収が検出された。またその吸光度は約0.25であった。別途作製した検量線により色素固定薄膜表面の色素存在量を算出した結果、1 mm 四方に約10兆個の色素が存在することが分かった。

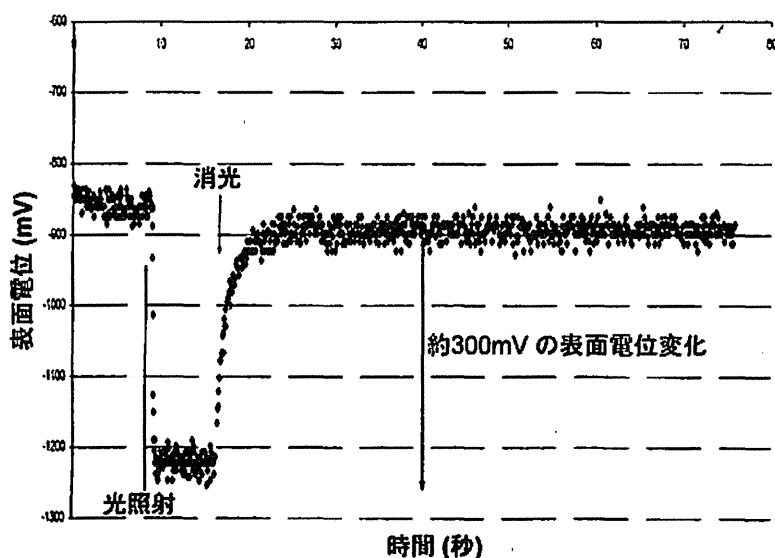


図9 ケルビンプローブ測定法を用いた人工網膜表面に生じた表面電位測定

### 3.4 色素固定薄膜表面（人工網膜表面）に生じる電位と光応答性

光照射により色素固定薄膜（人工網膜）表面に生じる表面電位をスキニングケルビンプローブシステム（KPテクノロジー社製, SKP5050）により測定した（図9）<sup>11)</sup>。光照射により表面電位が発生し、消光するとその電位が素早く消失することが明らかとなった。また、光照射により生じた電位の大きさは、双極細胞や神経節細胞を刺激するのに必要とされている数十 mV 以上の電位（数百 mV 程度）であることが明らかとなった。このことから、作製した色素固定薄膜は人工網膜として必要な表面電位の光応答性を有することが明らかとなった。

## 4. 色素固定薄膜型人工網膜の生物学的評価

### 4.1 網膜組織を用いた人工網膜としての機能評価

色素固定薄膜の人工網膜としての機能を、カルシウムイメージング法によって評価した。カルシウムイメージング法は、カルシウム感受性色素を用いて網膜細胞の挙動を評価する方法である<sup>12)</sup>。

まず視細胞が未発達であるヒヨコ 12 日目胚の網膜細胞にカルシウム感受性色素 Fluo-4 を浸透させた。この細胞を色素固定薄膜の上に乗せ、カルシウムイオンを含んだ緩衝液に入れた状態で蛍光顕微鏡観察を行った。色素固定薄膜が視細胞として機能すれば、他の網膜細胞が刺激されカルシウムイオンが細胞内に流入し、Fluo-4 とキレートを作製することで蛍光が観察される。これによりこの色素固定薄膜が視細胞未発達のニワトリの受精卵の網膜を刺激し、人工網膜としての機能を有することが明らかになった（図10）<sup>7)</sup>。

### 4.2 ラットを用いた人工網膜としての機能評価

実際に視細胞の疾患により失明したラットを用いた行動実験を実施した<sup>11,13)</sup>。このラットの眼球に色素固定薄膜を挿入した。図11に示す装置内にそのラットを入れ、まわりの白黒模様を所定の速度で回転させたところ、回転方向に首を振る動作が増加した。この結果を統計的に解析したところ有意差がみられたため、ラットが光を感じ、視力が回復したことが示唆された。したがって色素固

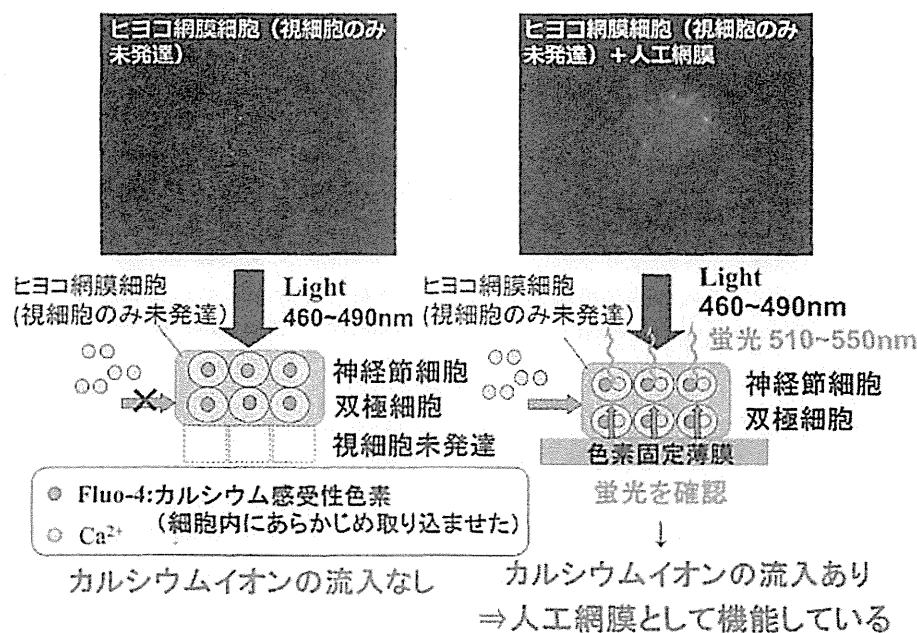


図10 カルシウムイメージング法による人工網膜の生物学的機能性評価

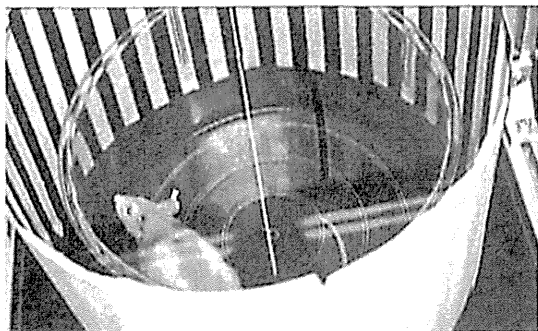


図11 ラットによる行動実験

定薄膜は、生体内で人工網膜として機能していると考えられる。

#### 4.3 非臨床的安全性評価

光電変換色素や人工網膜を使用してその安全性と生体適合性について検討している<sup>14,15)</sup>。誌面の都合上、その詳細を記載することはできないが、これまで行った検討（細胞毒性試験、刺激性試験、感作性試験、遺伝毒性試験、Ames試験、染色体異常試験、埋植試験、全身毒性試験、急性全身毒性試験、亜急性全身毒性試験など）では、毒性がない結果が得られている。

#### 5. おわりに

本稿では、色素とポリエチレン薄膜を使った全く新しいタイプの人工網膜の実用化に向けての取り組みを紹介した。安全性や生体適合性があり、細胞、網膜組織、動物実験で効果が確認されている。しかしながら、人に対する実際の効果は、未だ分かっていない。実用化を目指し、医師主導治療に向けての準備を進めていく。それが実用化に最も近い方法であると筆者らは考えている。困難も多いが、協力してくれる方々、組織も日に日に多くなってきている。失明した患者さんに一日でも早く再び光を取り戻していただけるように、今

後も努力していく所存である。

謝辞：本稿で紹介した人工網膜研究は、岡山大学 島村薫名誉教授のご指導により開始されたものであり、ここに深く感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、ご協力いただきました在籍、卒業の学生諸氏にこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。

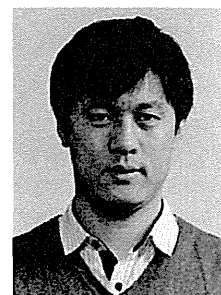
#### 文 献

- 1) A. Santos *et al.*, *Arch. Ophthalmology*, **115**, 511 (1997)
- 2) 特開 2003-234133 (2003)
- 3) Z. S. Wang, F. Y. Li, C. H. Huang, *Chem. Commun.*, 2063 (2000)
- 4) T. Matsuo, *Acta. Med. Okayama*, **57** (5), 57-260 (2003)
- 5) 特許第 5090431 号
- 6) T. Tagawa, K. Shimamura, *J. Electron Microsc.*, **28**, 314 (1979)
- 7) A. Uji, T. Matsuo, S. Ishimaru, A. Kajiura, K. Shimamura, H. Ohtsuki, Y. Dan-oh, S. Suga, *Artificial Organs.*, **29** (1), 53 (2005)
- 8) A. Uji, T. Matsuo, T. Uchida, K. Shimamura, H. Ohtsuki, *Artificial Organs.*, **30** (9), 695 (2006)
- 9) 村上昌三, 鞠谷信三, 内田哲也, 島村薫, 高分子論文集, **56** (12), 828 (1999)
- 10) Y. Tamada, Y. Ikada, *J. Colloid and Interface Science*, **155**, 334 (1993)
- 11) T. Matsuo, T. Uchida, K. Takarabe, *J. Artificial Organs*, **12**, 213 (2009)
- 12) T. Matsuo, N. Matsuo, *British Journal of Ophthalmology*, **80**, 561 (1996)
- 13) Alamus, T. Matsuo, O. Hosoya, K. M. Tsutsui, T. Uchida, *J. Artificial organs*, **16**, 343 (2013)
- 14) T. Tamaki, T. Matsuo, O. Hosoya, K. M. Tsutsui, T. Uchida, K. Okamoto, A. Uji, H. Ohtsuki, *J. Artificial Organs*, **11**, 38 (2008)
- 15) K. Okamoto, T. Matsuo, T. Tamaki, A. Uji, H. Ohtsuki, *J. Artificial Organs*, **11**, 45 (2008)

## Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis

\*<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科眼科学分野, \*<sup>2</sup>同 医歯薬学総合研究科神経ゲノム学分野,  
\*<sup>3</sup>同 自然科学研究科高分子材料学分野

アラ木斯\*<sup>1</sup>, 松尾 俊彦\*<sup>1</sup>, 細谷 修\*<sup>2</sup>, 筒井 公子\*<sup>2</sup>, 内田 哲也\*<sup>3</sup>  
ALAMUSI, Toshihiko MATSUO, Osamu HOSOYA, Kimiko M TSUTSUI, Tetsuya UCHIDA



### 1. 背景と目的

網膜色素変性は、視細胞や網膜色素上皮細胞に発現する遺伝子異常によって視細胞がゆっくり死滅(変性)していく遺伝性疾患である。視細胞変性は通常は網膜周辺部から始まり網膜後極部に及んでいき、最終的に網膜中心部の黄斑に達する。症状としては夜盲があり、視野狭窄が次第に進行して最終的には視力低下を来す。現在のところ治療法はない。治療法の候補としては、1つは視細胞変性の進行を止めるか遅らせる薬物を探すこと、もう1つは失った視細胞の機能を人工物で代替する人工網膜を作ることである。網膜色素変性で失明(光覚なし)した患者の網膜では、脳へと繋がる第2ニューロン(双極細胞)や第3ニューロン(神経節細胞)は相当数が生存している<sup>1),2)</sup>。光を電気信号(電流または電位差)に変換し出力して網膜に残存する神経細胞を刺激できれば、視覚が得られると想定される。これが人工網膜の基本的な考え方である。

世界中で開発中の人工網膜は、視界の映像を眼鏡に取り付けたカメラで捉えて画像処理し数十画素に落とし込み、眼球内の網膜近傍に埋め込んだ電極アレイ(最大64電極ぐらいを一体化した電極集合体)から電流を出力する方式である。電極アレイは、網膜下(硝子体中の神経網膜表面)、網膜下(神経網膜と網膜色素上皮の間)、または、脈絡膜上(強膜と脈絡膜の間)に挿入する。2013年に、網膜上に挿入するカメラ撮像・電極アレイ方式の人工網膜(Argus® II Retinal Prosthesis System, Second Sight社, 米国)が、米国

で、初めて製造販売承認された。

カメラ撮像・電極アレイ方式の問題点は、電極数が少なく画素が少ないので解像度が悪い(つまり見えない)、機器が大掛かりで手術侵襲が大きい、外部起電力が必要であることなどである。10年以上前から私たちは、光を吸収して電位差を出力する光電変換色素分子[2-[2-[4-(dibutylamino) phenyl]ethenyl]-3-carboxymethyl-benzothiazolium bromide (NK-5962), 株式会社林原, 岡山市]をポリエチレン・フィルム表面に共有結合させた新方式の人工網膜(岡山大学方式人工網膜)を開発してきた(図1)<sup>3)~9)</sup>。色素分子なので解像度が高く、さらにポリエチレン・フィルムは柔らかいので大きな面積のものを網膜下に挿入でき、視覚にとって重要な要素である「広い視野」を得られる可能性がある。

今回の研究では、網膜色素変性のモデルラット(RCSラット)の眼球内網膜下に人工網膜を挿入して、ラットの視覚を行動実験で評価し、網膜の状態をアボトース染色や免疫染色で調べることが目的である。

### 2. 方法

6週齢のRCSラットの両眼網膜下に強膜切開創から1×5 mm大の光電変換色素結合ポリエチレン・フィルムを挿入した。対照ラットでは色素を結合していないポリエチレン・フィルムを挿入した。その後2, 4, 6, 8週間目に行動実験を行った。最終の行動実験後、眼球を摘出して凍結切片を作成し、免疫染色とアボトース染色を行った。行動実験は、明所(150ルクス)または暗所(50ルクス)で、透明な円筒容器に入れたラットの周囲で白黒縞模様の円筒を毎分2回転で時計回りに3分間回転させ、3分の休憩を挟んで、さらに反時計回りに3分間回転させて、ラットの行動

#### ■ 著者連絡先

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科眼科学分野  
(〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1)  
E-mail. aramas08@yahoo.co.jp



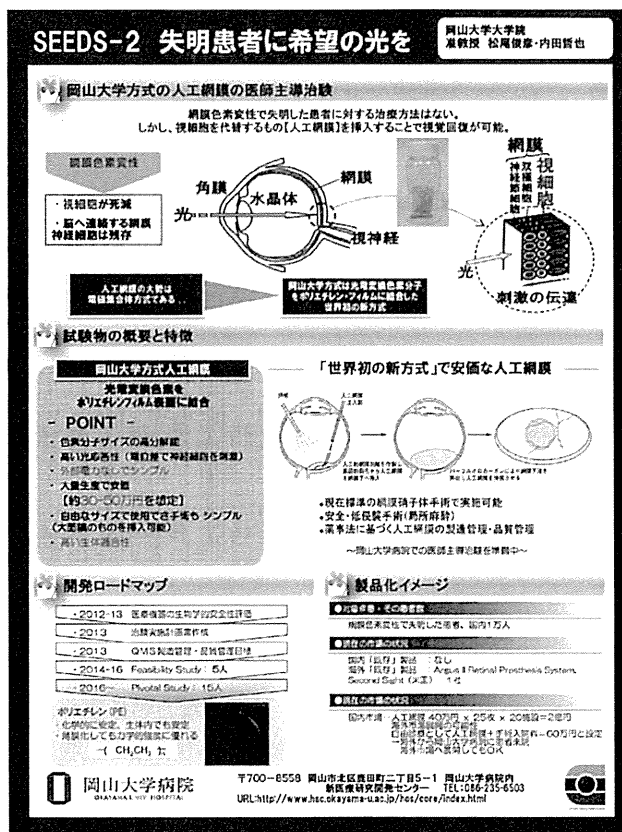


図1 岡山大学方式の人工網膜の医師主導治験の準備

を上方からビデオカメラで撮影した。白黒縞模様の回転方向に一致した頭部運動の回数を数え、その時間を測定した。時計回りと反時計回りでの頭部運動の数と時間を合計して、反復測定ANOVAで検定した<sup>10)</sup>。

### 3. 結果

ただのポリエチレン・フィルムを挿入した対照ラットと比べて、光電変換色素を結合したポリエチレン・フィルムを挿入したラットでは、明所と暗所の両方で、縞模様の回転方向に一致した頭部運動の回数が有意に多く、頭部運動の時間が有意に長かった ( $P < 0.05$ )。光電変換色素を結合したポリエチレン・フィルムに接している網膜では、他の部位の網膜に比べてアポトーシス細胞の数が有意に減少していた ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U検定)<sup>10)</sup>。

### 4. まとめ

網膜下に挿入した光電変換色素結合のポリエチレン・フィルムによって、RCSラットの視覚は回復した。光電変

換色素結合のポリエチレン・フィルムは網膜アポトーシスを抑制した。つまり神経保護効果をもっていた。

### 5. 独創性

光電変換色素分子自体に毒性はなく、また、光電変換色素結合のポリエチレン・フィルムの生物学的安全性評価でも毒性がないことを証明している。現在、製造工程管理、品質管理を行い、薬事戦略相談を進めて、臨床研究中核病院に選定された岡山大学病院において、岡山大学方式人工網膜の医師主導治験を準備している。

本稿の全ての著者には規定されたCOIはない。

### 文 献

- 1) Matsuo T, Morimoto N: Visual acuity and perimacular retinal layers detected by optical coherence tomography in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* **91**: 888-90, 2007
- 2) Tamaki M, Matsuo T: Optical coherence tomographic parameters as objective signs for visual acuity in patients with retinitis pigmentosa, future candidates for retinal prostheses. *J Artif Organs* **14**: 140-50, 2011 Erratum **14**: 385, 2011
- 3) Matsuo T: A simple method for screening photoelectric dyes towards their use for retinal prostheses. *Acta Med Okayama* **57**: 257-60, 2003
- 4) Matsuo T, Dan-oh Y, Suga S (Inventors): Agent for inducing receptor potential. Assignee: Matsuo T. United States Patent. Patent No.: US 7,101,533 B2. Date of Patent: Sep. 5, 2006
- 5) Uji A, Matsuo T, Ishimaru S, et al: Photoelectric dye-coupled polyethylene film as a prototype of retinal prostheses. *Artif Organs* **29**: 53-7, 2005
- 6) Uji A, Matsuo T, Uchida T, et al: Intracellular calcium response and adhesiveness of chick embryonic retinal neurons to photoelectric dye-coupled polyethylene films as prototypes of retinal prostheses. *Artif Organs* **30**: 695-703, 2006
- 7) Tamaki T, Matsuo T, Hosoya O, et al: Glial reaction to photoelectric dye-based retinal prostheses implanted in the subretinal space of rats. *J Artif Organs* **11**: 38-44, 2008
- 8) Okamoto K, Matsuo T, Tamaki T, et al: Short-term biological safety of a photoelectric dye used as a component of retinal prostheses. *J Artif Organs* **11**: 45-51, 2008
- 9) Matsuo T, Uchida T, Takarabe K: Safety, efficacy, and quality control of a photoelectric dye-based retinal prosthesis (Okayama University-type retinal prosthesis) as a medical device. *J Artif Organs* **12**: 213-25, 2009
- 10) Alamusi, Matsuo T, Hosoya O, et al: Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis. *J Artif Organs* **16**: 343-51, 2013

RESEARCH

Open Access

# Glass transition temperature of dried lens tissue pretreated with trehalose, maltose, or cyclic tetrasaccharide

Tetsuhiro Kawata<sup>1\*</sup>, Toshihiko Matsuo<sup>1\*</sup> and Tetsuya Uchida<sup>2</sup>

## Abstract

**Purpose:** Glass transition temperature is a main indicator for amorphous polymers and biological macromolecules as materials, and would be a key for understanding the role of trehalose in protecting proteins and cells against desiccation. In this study, we measured the glass transition temperature by differential scanning calorimetry of dried lens tissues as a model of a whole biological tissue to know the effect of pretreatment by trehalose and other sugars.

**Methods:** Isolated porcine lenses were incubated with saline, 100 or 1000 mM concentration of trehalose, maltose, or cyclic tetrasaccharide dissolved in saline at room temperature for 150 minutes. The solutions were removed and all samples were dried at room temperature in a desiccator until no weight change. The dried tissues were ground into powder and placed in a measuring pan for differential scanning calorimetry.

**Results:** The glass transition temperature of the dried lens tissues, as a mean and standard deviation, was  $63.0 \pm 6.4^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ) with saline pretreatment;  $53.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$  and  $56.3 \pm 2.7^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively, with 100 and 1000 mM trehalose pretreatment;  $56.0 \pm 1.6^\circ\text{C}$  and  $55.8 \pm 1.1^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively, with 100 and 1000 mM maltose pretreatment;  $60.0 \pm 8.8^\circ\text{C}$  and  $59.2 \pm 6.3^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively, with 100 and 1000 mM cyclic tetrasaccharide pretreatment. The glass transition temperature appeared lower, although not significantly, with trehalose and maltose pretreatments than with saline and cyclic tetrasaccharide pretreatments ( $P > 0.05$ , Kruskal-Wallis test). The glass transition temperature of the dried lens tissues with trehalose pretreatment appeared more noticeable on the thermogram, compared with other pretreatments.

**Conclusions:** The glass transition temperature was measured for the first time in the dried lens tissues as an example of a whole biological tissue and might provide a basis for tissue preservation in the dried condition.

**Keywords:** Trehalose; Glass transition temperature; Lens; Differential scanning calorimetry; Desiccation; Maltose; Cyclic tetrasaccharide; Biological tissue; Tissue preservation; Regenerative medicine

## Background

Tissue preservation in a dry condition is an ideal option for tissue storage in a long term for regenerative medicine. One key element to achieve this goal would be trehalose which is a disaccharide, formed by  $\alpha$ -1,1 linkage of two D-glucose molecules. Trehalose plays a pivotal role in anhydrobiosis, biological survival under dryness, exhibited by organisms such as yeasts and seeds

(Crowe et al. 1992, 1998). Trehalose has been used as food additives and medicinal additives to stabilize and hence to preserve food and drugs in a better state for a longer period of time (Richards et al. 2002). We have shown that trehalose could be used as an eyedrop to protect the corneal epithelium from dryness, caused by dry eye syndrome, including Sjogren syndrome (Matsuo 2001, 2004; Matsuo et al. 2002; Izawa et al. 2006). A current dream about the use of trehalose would be to preserve a whole tissue or cells, such as red blood cells and platelets, in the dried condition until the demand in the future (Wolkers et al. 2002).

\* Correspondence: tetuhiro1129@yahoo.co.jp; matsuo@cc.okayama-u.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School and Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

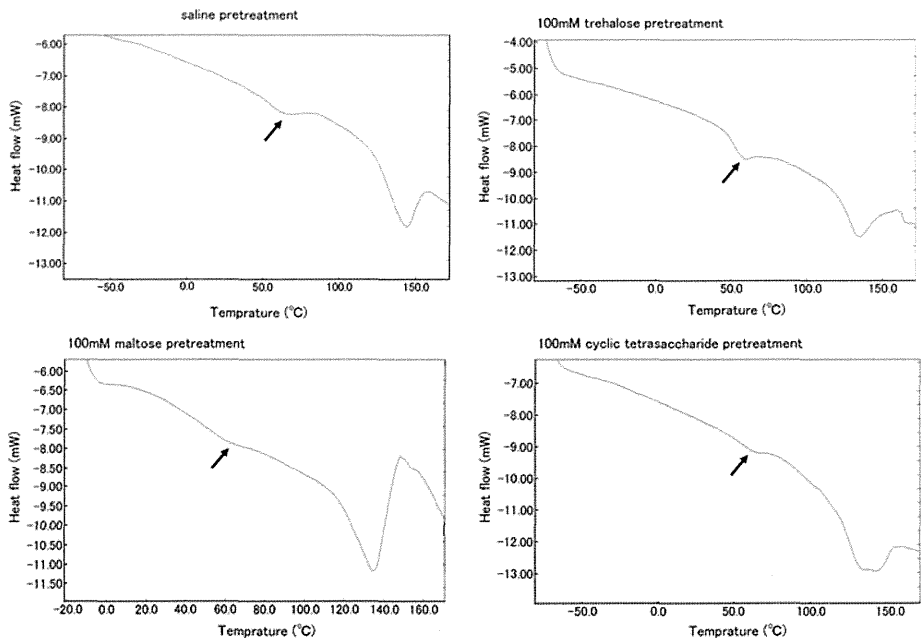
At present, it remains basically unknown why trehalose protects cells and tissues from death under dryness. One key for explaining the effect of trehalose on the biological protection is glass transition temperature (Chen et al. 2002; Kaushik and Bhat 2003; Jain and Roy 2009). The glass transition temperature ( $T_g$ ) is a temperature at which a material changes from a solid state to a glassy state. In the field of materials science, the glass transition temperature is a main indicator for polymers such as polymethylmethacrylate and acryl which are used, for example, for intraocular lenses, implanted inside the eyeball at cataract surgery. Thermal analysis was applied to the characterization of isolated proteins to measure the glass transition temperature as well as the melting temperature (Chen and Oakley 1995; Bell and Hageman 1996; Lee and Wand 2001; Hinz and Schwarz 2001; Brownsey et al. 2003; Ciesla and Vansant 2010). The biological tissues consist of many kinds of macromolecules, in other words, biopolymers such as proteins, lipids, and glycosaminoglycans. In theory, each biopolymer has its own glass transition temperature, and thus, glass transition temperature of a biological tissue is assumed to be measured to some extent as the collection of these biopolymers.

The stabilizing effect of trehalose on isolated proteins has been studied by thermal analysis, using differential scanning calorimetry (Mazzobre and Buera 1999;

Attanasio et al. 2007; Hedoux et al. 2009). So far, however, no preceding study exists to measure the glass transition temperature of a biological tissue as a whole. In this study, we tried to measure the glass transition temperature of dried lens tissues by differential scanning calorimetry (Giancola 2008) in the presence or the absence of trehalose, maltose, or cyclic tetrasaccharide (Matsuo 2005) to know the effects of these sugars on the glass transition temperature.

### Results

Thermograms (Figure 1) are shown for dried lens tissues with saline pretreatment, and pretreatment with 100 mM trehalose, 100 mM maltose, or 100 mM cyclic tetrasaccharide. The glass transition temperature of the dried lens tissues with saline pretreatment was  $63.0 \pm 6.4^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ) as a mean and standard deviation; the glass transition temperature of the dried lens tissues after pretreatment with 100 mM and 1000 mM trehalose was  $53.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$  and  $56.3 \pm 2.7^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively; the glass transition temperature of the dried lens tissues after pretreatment with 100 mM and 1000 mM maltose was  $56.0 \pm 1.6^\circ\text{C}$  and  $55.8 \pm 1.1^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively; the glass transition temperature of the dried lens tissues after pretreatment with 100 mM and 1000 mM cyclic tetrasaccharide was  $60.0 \pm 8.8^\circ\text{C}$  and  $59.2 \pm 6.3^\circ\text{C}$  ( $n = 3$ ), respectively. The glass transition temperature appeared lower, although not



**Figure 1** Differential scanning calorimetric curve (thermogram) of dried porcine lens tissues, pretreated with saline, 100 mM trehalose, 100 mM maltose, or 100 mM cyclic tetrasaccharide for 150 minutes. An arrow on each curve indicates a point of glass transition. Note that the point of glass transition, namely, glass transition temperature, appears lower, although not significantly, and more noticeable on the thermogram, obtained with trehalose pretreatment.

significantly, with trehalose and maltose pretreatments than with saline and cyclic tetrasaccharide pretreatments ( $P > 0.05$ , Kruskal-Wallis test). The glass transition temperature of the dried lens tissues with trehalose pretreatment appeared more noticeable on the thermogram, compared with other pretreatments (Figure 1).

## Discussion

The goal of this study is to measure the glass transition temperature of a biological tissue as a whole and to analyze the effect of trehalose and other sugars on the measurement of the glass transition temperature. The effect of trehalose on isolated proteins was studied by differential scanning calorimetry from the viewpoint of glass transition temperature (Mazzobre and Buera 1999; Attanasio et al. 2007; Hedoux et al. 2009). Those studies demonstrated that trehalose raised the melting temperature of lyophilized proteins but showed ambiguous results regarding the glass transition temperature (Mazzobre and Buera 1999; Attanasio et al. 2007; Hedoux et al. 2009). To the best of our knowledge, there has been no preceding report to measure the glass transition temperature of a biological tissue as a whole. We chose porcine lens as a model biological tissue to measure the glass transition temperature since the lens is an isolated small tissue in the eyeball and can be easily removed from the other surrounding tissues.

As a first step to understand the mechanism underlying the protection of a biological tissue by trehalose, we measured the melting temperature of the dried lens tissue under the presence or the absence of trehalose or cyclic tetrasaccharide in our previous study (Sun et al. 2011). That study was unique in that the melting temperature of a biological tissue as a whole, even in the dried condition, was measured by differential scanning calorimetry (Sun et al. 2011). In that study, the presence of trehalose, but not cyclic tetrasaccharide, led to an elevation of the melting temperature of the dried lens tissue (Sun et al. 2011). As an ideal condition of experiments, the melting temperature should be measured in the natural state of a biological tissue with water. However, the presence of water leads to the evaporation of water in the process of rising temperature, and hence, the evaporation hinders the measurement of the melting temperature in an accurate manner.

In the present study, we tried to measure the glass transition temperature of a biological tissue as a whole. The glass transition temperature is more difficult to measure than the melting temperature because of the subtlety of the glass transition. To overcome this limitation of the subtlety in measuring the glass transition temperature, the amount of the dried lens tissue, placed in a platform pan for the measurement, was increased about twice, compared with the amount used for the

measurement of the melting temperature in the previous study (Sun et al. 2011). We could successfully measure the glass transition temperature of the dried lens tissue under this condition for the first time.

We chose maltose as a control ingredient for the pretreatment before drying of the lens tissue since maltose is another disaccharide with different bonding sites between two glucose molecules, compared with trehalose. We also chose cyclic tetrasaccharide as the pretreatment because we used this substance in the measurement of melting temperature of the dried lens tissue in the previous study (Sun et al. 2011). The pretreatment with trehalose did not lead to significant changes in the glass transition temperature, compared with saline pretreatment or pretreatment with maltose or cyclic tetrasaccharide. No significant change in the glass transition temperature of the dried lens tissue with trehalose pretreatment in the present study is in marked contrast with the elevation in the melting temperature by trehalose pretreatment in the previous study (Sun et al. 2011).

The concentration of trehalose and other sugars was set at 100 mM, based on the preceding studies to show the protective effect on cells in culture (Matsuo 2001) and also on the isolated lens tissues (Matsuo 2005). We also tested 10-times higher concentration of trehalose and other sugars, set at 1000 mM, as the pretreatment to expect better detection of the glass transition temperature. Trehalose at 1000 mM concentration was also used in thermal analysis of isolated proteins (Attanasio et al. 2007). The present study showed no difference between the different concentrations of the pretreatment with the sugars. As far as the results in this study were concerned, we could not prove the hypothesis that the stabilizing effect of trehalose on a biological tissue under the dried condition be underlain by changes in the glass transition temperature of the tissue.

The reason why the pretreatment with trehalose did not change the glass transition temperature of the dried lens tissue remains unknown at present. Based on our previous study to determine the melting temperature, the ratio of glass transition temperature over melting temperature ( $T_g/T_m$ ) of the dried lens tissue falls in the range between 0.5 and 0.75 of the ratio of  $T_g/T_m$  of most polymers, as a rule of thumb in materials science. In our previous study, the melting temperature of the dried lens tissue was elevated by about 10°C with trehalose pretreatment (Sun et al. 2011). The elevation of melting temperature, combined with no change in glass transition temperature of the dried lens tissue with trehalose pretreatment in this study, indicates that the tissue would stay in the glassy state for a wider range of temperature under the presence of trehalose. These facts might explain the protective effect of trehalose on the tissues or cells in desiccation. A rise in melting temperature

by trehalose for lyophilized proteins in a preceding study also supports this line of reasoning (Attanasio et al. 2007).

One possible limitation in this study would be that the residual water content in each dried tissue might show trivial difference among the samples even under the circumstances that the lens tissues were dried thoroughly in a desiccator until no weight change. The larger standard deviation for glass transition temperature of saline or cyclic tetrasaccharide-pretreated samples was noted in contrast with the smaller standard deviation for glass transition temperature of trehalose or maltose-pretreated samples. The large variation of the glass transition temperature, measured in the condition of saline or cyclic tetrasaccharide pretreatment, might be attributed to the difference in residual water content among the dried tissue samples. Preceding studies on thermal analysis of isolated proteins also mentioned that trehalose would keep moisture in lyophilized proteins and might influence the measurement of glass transition temperature (Mazzobre and Buera 1999; Hedoux et al. 2009).

## Conclusions

The glass transition temperature of isolated porcine lens as a biological tissue in the dried condition could be measured by differential scanning calorimetry. We could not detect any significant change in the glass transition temperature of the dried lens tissues with pretreatment by different sugars in the different concentrations. However, trehalose pretreatment appeared to make the glass transition temperature more noticeable on the thermogram, compared with other sugar treatment. The presence of trehalose in the drying condition might lead to more regular alignment of biological macromolecules, and thus, would result in more apparent detection of the glass transition temperature. Thermal analysis of the whole tissue, such as the lens in this study, by differential scanning calorimetry, would lead to the elucidation of mechanism for cataract formation (Biro et al. 2006) and also to the development of methods to preserve cells and tissues in the drying or frozen condition (Wolkers et al. 2001, 2002; Li et al. 2007; Orlie et al. 2003; Lynch et al. 2011).

## Methods

Enucleated porcine eyes were obtained from a local slaughterhouse, stored at 4°C, and used within 6 hours. A 10-mm-wide incision at the midperiphery of the eyeball was made to extract the lens. The vitreous gel and the lens were squeezed out of the eyeball by being pushed with fingers gently. The released lenses were placed in saline (0.9% sodium chloride) without direct touching and washed for 10 min. The lenses were transferred with a spoon to wells of a 24-well multidish containing either saline, trehalose (Hayashibara, Inc.,

Okayama City, Japan), maltose, or cyclic tetrasaccharide (Hayashibara) at 100 mM or 1000 mM concentration dissolved in saline (Matsuo 2005; Sun et al. 2011). The lenses were incubated for 150 minutes at room temperature, and then, all solutions were removed out of the wells by aspiration. The lenses were dried at room temperature in a desiccator until the weight showed no change. It took about eight days to reach this state of dryness (Sun et al. 2011).

Before proceeding to differential scanning calorimetric measurements, the dried lenses were ground into fine powder on a workbench with a metal bar in order to make samples have close contact with the bottom of an aluminum platform pan. Each sample with the weight around 20 mg was transferred onto an aluminum platform pan by a medicine spoon, and then the pan was sealed by a sample press kit. We used an empty aluminum pan as a reference for differential scanning calorimetric measurements. The measurements were carried out on a Seiko DSC-220, assembled with an SSC-5300 thermal controller (Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan). The samples were cooled at a scan rate of 10 K/min to -80°C, held for two minutes at -80°C, and then heated at a scan rate of 10 K/min from -80°C to 180°C, under the atmosphere of nitrogen at a flow rate of 50 mL/min to stabilize the temperature in measurements (Sun et al. 2011).

The glass transition temperature was identified as a changing point of the slope of curvature on the thermogram. For statistical analysis, the significance was analyzed with Kruskal-Wallis test and a significant level was set at less than 0.05.

## Competing interests

No author had any financial or non-financial competing interests in this study.

## Authors' contributions

All authors made substantial contributions to conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data, and were involved in drafting the manuscript, and approved the final version of the manuscript.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School and Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan. <sup>2</sup>Division of Polymer Materials Science, Faculty of Engineering and Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama, Japan.

Received: 4 June 2014 Accepted: 10 June 2014  
Published: 25 June 2014

## References

- Attanasio F, Cascio C, Fisichella S, Nicoletti VG, Pignataro B, Savarino A, Rizzarelli E (2007) Trehalose effects on  $\alpha$ -crystallin aggregates. *Biochem Biophys Res Commun* 354:899–905
- Bell LN, Hageman MJ (1996) Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. *J Food Sci* 61:372–375
- Biro Z, Nemes V, Molnar GA, Wittmann I, Ludany A, Lorinczy D (2006) DSC examinations on cataractous lens materials obtained by phacoemulsification. *J Therm Anal Calorim* 85:261–265



- Brownsey GJ, Noel TR, Parker R, Ring SG (2003) The glass transition behavior of the globular protein bovine serum albumin. *Biophys J* 85:3943–3950
- Chen T, Oakley DM (1995) Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. *Thermochim Acta* 248:229–244
- Chen T, Bhowmick S, Suttekk A, Fowler A, Toner M (2002) The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 44:301–306
- Ciesla K, Vansant EF (2010) Physico-chemical changes taking place in gamma irradiated bovine globulins studied by thermal analysis. *J Therm Anal Calorim* 99:315–324
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60:73–103
- Giancola C (2008) A convenient tool for studying the stability of proteins and nucleic acids: differential scanning calorimetry. *J Therm Anal Calorim* 91:79–85
- Hedoux A, Willart JF, Paccou L, Guinet Y, Affouard F, Lerbret A, Descamps M (2009) Thermostabilization mechanism of bovine serum albumin by trehalose. *J Phys Chem B* 113:6119–6126
- Hinz HJ, Schwarz FP (2001) Measurement and analysis of results obtained on biological substances with d.s.c. *J Chem Thermodyn* 33:1511–1525
- Izawa Y, Matsuo T, Uchida T, Shimamura K, Ohtsuki H (2006) Atomic force microscopic observation of trehalose-treated and dried corneal epithelial surface. *Cell Preserv Technol* 4:117–122
- Jain NK, Roy I (2009) Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* 18:24–36
- Kaushik JK, Bhat R (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem* 278:26458–26465
- Lee AL, Wand J (2001) Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins. *Nature* 411:501–504
- Li MW, Biggers JD, Elmoazzen HY, Toner M, McGinnis L, Lloyd KCK (2007) Long-term storage of mouse spermatozoa after evaporative drying. *Reproduction* 133:919–929
- Lynch AL, Chen R, Slater NKH (2011) pH-responsive polymers for trehalose loading and desiccation protection of human red blood cells. *Biomaterials* 32:4443–4449
- Matsuo T (2001) Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Br J Ophthalmol* 85:610–612
- Matsuo T (2004) Trehalose versus hyaluronan or cellulose in eyedrops for the treatment of dry eye. *Jpn J Ophthalmol* 48:321–327
- Matsuo T (2005) Cyclic tetrasaccharide delays cataract formation in the lens in vitro. *Cell Preserv Technol* 3:238–243
- Matsuo T, Tsuchida Y, Morimoto N (2002) Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology* 109:2024–2029
- Mazzobze MF, Buera MDP (1999) Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of  $\beta$ -galactosidase in freeze-dried systems. *Biochim Biophys Acta* 1473:337–344
- Orlien V, Risbo J, Andersen ML, Skibsted LH (2003) The question of high- or low-temperature glass transition in frozen fish: construction of the supplemented state diagram for tuna muscle by differential scanning calorimetry. *J Agric Food Chem* 51:211–217
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M (2002) Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* 40:871–98
- Sun J, Matsuo T, Uchida T (2011) Denaturation temperature of dried lens tissue rises with trehalose pretreatment. *J Therm Anal Calorim* 103:387–391
- Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH (2001) Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* 42:79–87
- Wolkers WF, Tablin F, Crowe JH (2002) From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp Biochem Physiol Part A* 131:535–543

doi:10.1186/2193-1801-3-317

**Cite this article as:** Kawata *et al.*: Glass transition temperature of dried lens tissue pretreated with trehalose, maltose, or cyclic tetrasaccharide. *SpringerPlus* 2014 **3**:317.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:**

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)

## ■ Intellectual Property and Enterprise

### Photoelectric dye-coupled thin film as a novel type of retinal prosthesis

Eye doctor Dr. Toshihiko Matsuo and polymer science engineer Dr. Tetsuya Uchida have been developing a new type of retinal prosthesis that is based on a photoelectric dye. The photoelectric dye is an organic molecule that absorbs light and converts light energy into electric potentials. The dye molecules are coupled to the surface of a film made of polyethylene. The polyethylene film (or polymer) is a biologically safe and stable material which is used, for example, as a component of artificial joints. The photoelectric dye-coupled polyethylene film, called Okayama University-type retinal prosthesis or OURePT<sup>TM</sup>, can be implanted beneath the retina as a substitute for photoreceptor cells.

The photoreceptor cells in the retina absorb light and generate membrane potential changes as an initial process in sight. Patients with a hereditary disease called retinitis pigmentosa, gradually lose the photoreceptor cells in their lifetime and become totally blind. These vision-impaired patients are known to maintain other retinal neurons that connect to the brain. Thus, the implantation of something artificial called retinal prosthesis to replace the lost photoreceptor cells, would lead to the recovery of vision in blind patients.

A prevailing type of retinal prosthesis is the so-called “camera-image-capture and electrode-array output system”. The image is captured by a digital video camera attached to glasses, and converted to electric signals. These signals are transmitted to a receiver implanted in the body, and finally, electric currents are outputted from an electrode array that is



Figure 1. Photoelectric dye-coupled polyethylene film (OURePT<sup>TM</sup>): a novel type of retinal prosthesis.

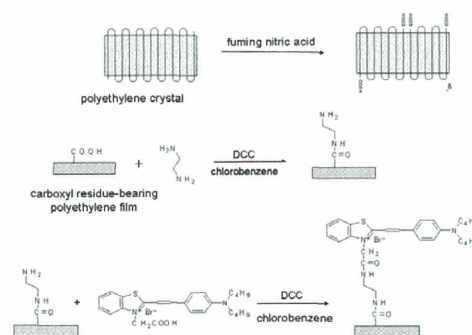


Figure 2. Manufacturing process of photoelectric dye-coupled polyethylene film (OURePT<sup>TM</sup>): a novel type of retinal prosthesis.

implanted around the degenerated retina. In 2013, Argus II™ Retinal Prosthesis System, by Second Sight, Inc., which uses this camera-capture and electrode-array system, was approved by the US Food and Drug Administration (FDA).

Okayama University-type retinal prosthesis—OUReP™—would provide the following advantages over the Argus II™ Retinal Prosthesis System. First of all, OUReP™ does not require a camera or data processing system, or wiring to the retina. A single sheet of OUReP™ would be implanted into the subretinal space by currently-used standard vitreous surgery, just as to treat retinal detachment. A large size of the thin film, up to 10 mm in diameter, could be implanted in the eye, which would provide a wide visual field. Dye molecules in high density on the polyethylene surface work as both an image (light)-receiver and a neuron-stimulator, leading to high resolution of images. In contrast, the Argus II™ System with 60 electrodes provides low resolution of images.

The biological safety of OUReP™ has been already proven by standardized tests, based on ISO 10993, “Biological evaluation of medical devices”. In addition, the photoelectric dye, used for OUReP™, has no toxicity at all. Rats with retinitis pigmentosa, called RCS rats, had their vision restored by subretinal implantation of OUReP™. Manufacturing and quality control has been established at the laboratory of Polymer Materials Science in a Faculty-of-Engineering Building. Dr. Matsuo and Dr. Uchida are now preparing a first-in-human clinical trial at Okayama University Hospital, in consultation with Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA, counterpart of US FDA), based on the Pharmaceutical Affairs (Pharmaceuticals and Medical Devices) Act in Japan.

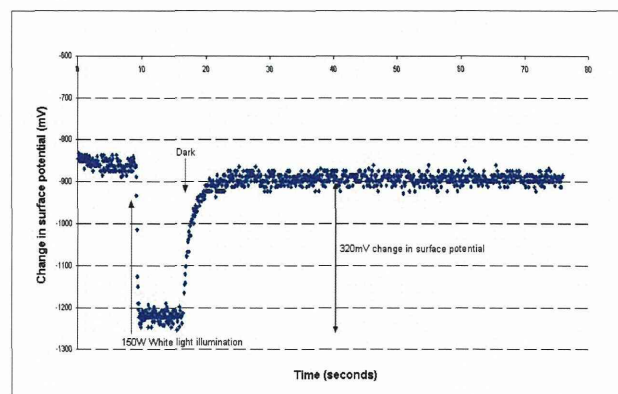


Figure 3. Fast on-off response to light of electric potentials on the surface of photoelectric dye-coupled polyethylene film (OUReP™): a novel type of retinal prosthesis.

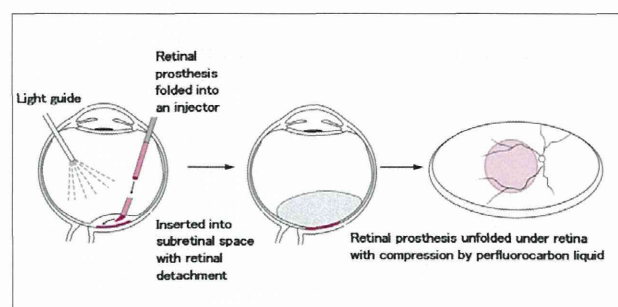


Figure 4. Schematic drawing of vitreous surgery to implant a sheet of photoelectric dye-coupled polyethylene film (OUReP™), a novel type of retinal prosthesis, beneath the retina.



- 1.Matsuo T, Dan-oh Y, Suga S (Inventors). Agent for inducing receptor potential. Assignee: Okayama University. United States Patent. Patent No.: US 7,101,533 B2. Date of Patent: Sep. 5, 2006.
- 2.Matsuo T, Uchida T, Takarabe K. Safety, efficacy, and quality control of a photoelectric dye-based retinal prosthesis (Okayama University-type retinal prosthesis) as a medical device. J Artif Organs 2009;12:213-225.
- 3.Alamusi, Matsuo T, Hosoya O, Tsutsui MK, Uchida T. Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama University-type retinal prosthesis. J Artif Organs 2013;16 :343-351.

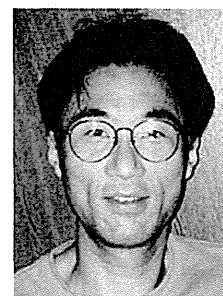
★Contact: Mototaka Senda, Ph.D.,  
US & EU Representative of Intellectual Property Office,  
Okayama University, 2450 Peralta Blvd. #119, Fremont,  
CA 94536, USA  
Email: takasenda@okayama-u.ac.jp

## 色素結合薄膜型の人工網膜 (OUReP™) の医師主導治験を目指して

\*<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科眼科学分野, \*<sup>2</sup>同 自然科学研究科高分子材料学分野

松尾 俊彦\*<sup>1</sup>, 内田 哲也\*<sup>2</sup>

Toshihiko MATSUO, Tetsuya UCHIDA



### 1. はじめに

本稿では、世界初的方式である「色素結合薄膜型」(岡山大学方式)の人工網膜 (OUReP™) の開発経緯を紹介する。現在、世界の主流となっている「カメラ撮像・電極アレイ型」の人工網膜については、本雑誌「人工臓器」に掲載された総説を参照されたい<sup>1),2)</sup>。

### 2. 人工内耳と人工網膜

1990年代、実用化された人工内耳に触発されて<sup>3),4)</sup>, 人工網膜の研究が世界中で始まった。感音性難聴では、振動を細胞膜の電位変化に変換する有毛細胞が死滅しているの、蝸牛内に挿入した電極から電流を出力することによって、脳に繋がる螺旋神経節の双極細胞(その軸索が蝸牛神経)を刺激する。同様に、網膜色素変性では、光を細胞膜の電位変化に変換する視細胞が死滅しているの、電極を眼内に挿入して脳に繋がる神経網を形成する網膜の双極細胞や神経節細胞(その軸索が視神経)を刺激すれば見えるようになるのではないかという発想である(図1)。

空気の振動である音は、鼓膜・耳小骨を介して蝸牛の中の液体の振動に変換されて有毛細胞に伝わる。光は眼球の透明な光学系を透過して視細胞に伝わるだけなので、視覚の方が単純に見える。人工内耳では蝸牛の中に十数本の電極が挿入され、これらは蝸牛の中の各部位で音声の波長に合わせて電流を出力する。人工網膜でも数十個の小型電極を組み合わせて面状(電極アレイ)にして、画像を処理して電極から出力すればよいという考えである。当初その中で

異彩を放ったのは、光を吸収して電流を出力する光ダイオードを集積し、円盤にして網膜下に埋め込む方式であった<sup>5)</sup>。しかし、通常の強度の光では光ダイオードから出力される電流は微弱すぎて神経細胞を刺激できないことが分かり、この方式は消えていった。

2013年アメリカで初めて、電極60個を組み合わせた電極アレイを眼内に埋め込み、眼鏡に装着した外部カメラからの情報を処理して網膜に電流を出力する方式の人工網膜が、米国食品医薬品局 (FDA) によって製造販売承認された<sup>6)</sup>。

### 3. 視野の大切さ

見えるということはどういうことを考えたとき、見える範囲、つまり、視野が大切であると分かる。私たちの視覚では、視力でいうと0.1程度の解像度が悪い広い視野があるからこそ私たちは行動できる。そこに人がいるのが分かってその顔もおぼろげに判別でき、机や椅子も見える。視力1.0という高解像度を持つ部位は、中心窩と呼ばれる網膜中心のごく狭い範囲にすぎない。さらにいえば、視力が0.1あれば、たとえばカメラ付きのiPadなどで拡大すると字を読むこともできる。

人工網膜で見えるようにするには、できるだけ大きな面積のものを網膜に接触させる必要がある。これは広い視野に繋がるからである。そして、解像度を上げるためには個々の画素面積を小さくして画素数を増やす必要がある。電極や光ダイオードを素子として使うかぎり、これら2つの目標(画素数が多く大面積の人工網膜)を同時に達成するのは難しいと考えられる。

### 4. 光電変換色素

世の流れを横目で見ながら、電極でもない、光ダイオー

#### ■ 著者連絡先

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(医学系)眼科学分野  
(〒700-8558 岡山県岡山市北区鹿田町2-5-1)

E-mail. matsuo@cc.okayama-u.ac.jp

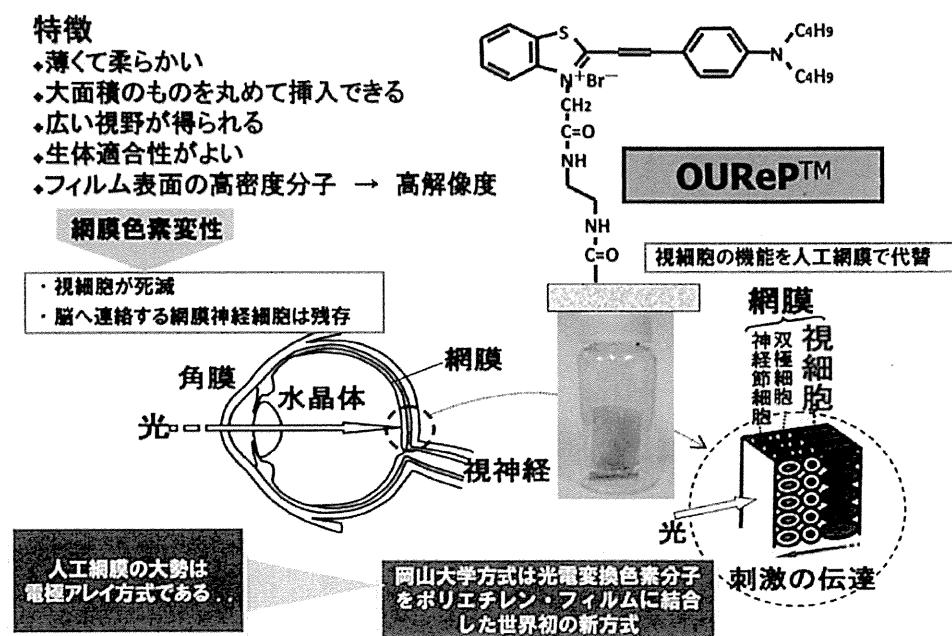


図1 色素結合薄膜型の人工網膜 (OUReP™)

ドでもない人工網膜は作れないかと考えていた。ちょうどその2000年頃、岡山市の企業(株)林原が作っているトレハロースが乾性角結膜炎(ドライアイ)の点眼薬に使えるかどうかを研究していた<sup>7)~9)</sup>。(株)林原は感光色素も製造していることを知り、感光色素が人工網膜に使えるのではないかと思いついた。(株)林原生物化学研究所で感光色素を統括する菅貞治先生に面会し、光を電位差に変換する光電変換色素の中で分子構造的に安定で可視光域に吸収波長をもつ色素候補を挙げてもらった(図1)。光電変換色素が光照射下で神経細胞を刺激することを検証し、特許を出したのが2002年である<sup>10)~13)</sup>。2006年にアメリカ特許<sup>11)</sup>、2012年に日本特許が成立し<sup>12)</sup>、2014年に両特許は岡山大学の帰属となった。

## 5. ポリエチレン・フィルム

人工網膜を作るためには、光電変換色素を何か薄くて柔らかく安定性のある膜に結合させる必要があると当然ながら考えた。岡山大学工学部の島村薫教授によるポリエチレンの話題を偶然見つけて早速面会に伺うと、「これですよ」と見せられたのが、ポリエチレン・フィルムであった。「これは何か知っていますか、あのレジ袋ですよ」と言われた<sup>14),15)</sup>。

2003年には光電変換色素を化学的に結合したポリエチレン・フィルムが島村先生によって作られ、人工網膜の試作品(プロトタイプ)が完成した(図1)<sup>16),17)</sup>。この試作品

を使って、培養神経細胞や摘出網膜での反応を調べ、網膜色素変性のモデルラット(RCSラット)での視覚の回復を証明した<sup>18)</sup>。一方、グリア異物反応を起こさないようにポリエチレン・フィルム表面の性状を変えて<sup>19)</sup>、さらには光電変換色素分子を高密度に結合させる改良を本稿の著者、内田哲也が中心となって進めていった<sup>18)</sup>。

## 6. ケルビン・プローブ

色素結合薄膜型の人工網膜によって生物学的反応が起こることは検証できたが、光を当てたときにどのくらいの電位差が人工網膜の表面に発生するかを測定する方法がなく、様々な専門家に聞いても方法が見つからなかった。あるとき、岡山県工業技術センターマイクロものづくりセンターの高野和潔コーディネータから、「半導体ネットおかやま」を主宰する半導体専門家の岡山理科大学理学部の財部健一教授を紹介された。半導体の表面電位を測定するケルビン・プローブを使って人工網膜の表面電位を実際に測定できることが財部先生によって証明された<sup>20)</sup>。色素結合薄膜型人工網膜では細胞膜電位の変動と桁に近い100~300 mVの電位差が出ていたのである(図2)。さらに内田は、原子間力顕微鏡でも表面電位を測定できることを示した。

## 7. 企業化

医療機器としての人工網膜の治験に向けて企業を探した

## ケルビン・プローブによる人工網膜表面の光誘起電位の測定 光応答速度と回復

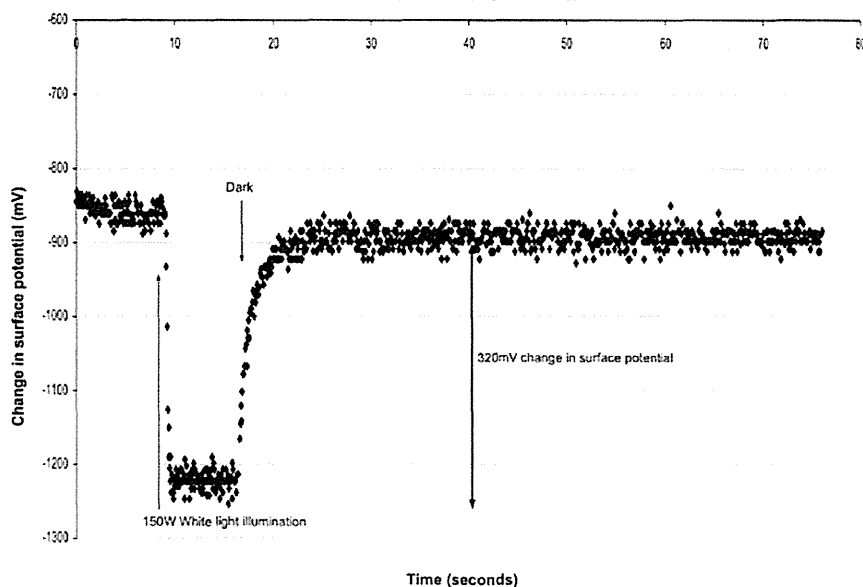


図2 色素結合薄膜型の人工網膜 (OUReP™) の光誘起表面電位

が見つからない中で、ベンチャー企業を自ら起こすことを真剣に考えた時期もあった。結局、ベンチャー企業を起こさずにきた理由は、臨床試験を臨床研究として行うか治験として行うかの二者択一の問題があったためである。当時の理解では、ベンチャー企業を起こして人工網膜を生産すれば企業製造品となり臨床試験は治験として行う必要があった。これに対して、工学部製造品の場合は臨床研究で検証できる利点があった。しかしその後、下記に述べるように状況が大きく変わっていった。

### 8. 臨床研究か治験か

新規の医薬品や医療機器の安全性や効果を評価する方法として、日本では臨床研究を行うか治験を行うかの選択肢がある。企業が製造したものは治験を行わないといけないという当時の常識があった。治験は薬事法に基づく臨床試験であり、一方、臨床研究は厚生労働省の指針「臨床研究に関する倫理指針」に基づく法律外の行為である。当初は、私たちも人工網膜は臨床研究で行おうと考えていた。2002年に薬事法が改正され、治験といえば企業治験に決まっていたことが変更されて、新たに医師主導治験という仕組みが2003年から導入された。当初この医師主導治験は、海外で承認された医薬品や医療機器を国内に早く導入するために、企業がしない(したくない)治験を医師に担当させようという趣旨であった。ところがそのうち、日本発の医薬

品や医療機器を世界に先駆けて世に出す手段として、医師主導治験が再定義された。

しばらく臨床研究で始めるべきか治験で始めるべきか迷っていた。2012年になって人工網膜の臨床試験を臨床研究としてではなく、最初から医師主導治験を始めようと決心した。治験は法律に基づくので患者の安全や利益も確保され、また、世の中の流れが治験を求めているという感触があったからであった。最初から治験で始めるうえでの最大の引っ掛かりは、「企業製造品でない」と治験はできない」と思っていたことである。つまり、製造企業が見つからない場合には、ベンチャー企業を立ち上げる必要があると思っていた。(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)での薬事戦略相談で、企業製造品ではない工学部製造品でも医師主導治験ができることを知り、ベンチャー企業を立ち上げる必要がなくなった。また、医師主導治験では、医師がベンチャー企業に関与していたり、特許権者である場合、利益相反規準に基づいて治験責任医師を務めることができなくなるのである。

### 9. 色素結合薄膜型の人工網膜の医師主導治験に向けて

こうして工学部製造品で医師主導治験を行う方向が定まった。PMDAでの薬事戦略相談では、治験準備と並行して製造企業を探すようにと言われた。治験結果に基づいて