

20111029A

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

低侵襲で多剤動態制御可能な薬物徐放デバイスの開発と
網膜疾患治療への応用に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 永井 展裕

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告		
低侵襲で多剤動態制御可能な薬物徐放デバイスの開発と 網膜疾患治療への応用に関する研究	-----	1
永井展裕		
II. 分担研究報告		
1. デバイスの設計と構造評価に関する研究	-----	7
梶弘和		
2. デバイスの移植と網膜機能評価に関する研究	-----	10
阿部俊明		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（総括）研究報告書

低侵襲で多剤動態制御可能な薬物徐放デバイスの開発と
網膜疾患治療への応用に関する研究

研究代表者 永井展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

本研究の目的は、失明疾患の上位を占める網膜疾患の治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、さらに多剤併用療法に対応するために複数の薬物を任意の速度で徐放できるマルチDDSデバイスを開発することである。H23年度は、3色の蛍光色素をモデルドラッグとして使用し、それぞれを異なる速度で徐放するデバイス条件を確立した。さらに、ラット眼に移植し、各色素の網膜移行性を評価した結果、色素の徐放速度と対応して網膜への色素移行量が変化していた。また、網膜保護効果が報告されている臨床薬物のEdaravone（EDV；抗酸化剤）とGeranylgeranylacetone（GGA；Heat shock protein誘導剤）のシングルDDSを作製しラット網膜光障害モデルに移植した結果、徐放されたEDVおよびGGAは光障害から網膜を保護することが示唆された。今後は、EDVとGGAを組み合わせたマルチDDS化を検討し、動物モデルで相乗効果を確認する予定である。

A. 研究目的

本研究の目的は、失明疾患の上位を占める網膜疾患の治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、多剤併用療法に対応するために、複数の薬物を任意の速度で徐放できるマルチDDSデバイスを開発することである。

視覚はヒトの情報の8割を占めるため、視覚障害はQuality of life（生活の質）を著しく低下させる。2006年の厚生労働省難治性疾患克服事業の統計結果では、失明疾患の上位はすべて網膜疾患（1位 緑内障、2位 糖尿病網膜症、3位 網膜色素変性症、4位 黄斑変性症）である。加齢性疾患が多い網膜疾患においては、超高齢化社会を迎え今後さらに増加する可能性がある。

網膜疾患治療において、点眼・点滴・内服では網膜への薬物移行が不十分なため、眼内注射や眼内インプラントなど眼内に直接薬物を投与する方法が行われる。例えば、加齢黄斑変性症治療では、抗VEGF抗体の硝子体注射が成果をあげている（N Engl J Med, 355, 1419-1431, 2006）。しかしこの硝子体注射は月に一度の注射が必要で、眼内への感染症や網膜剥離等の副作用のリスクが報告されている（Am J Ophthalmol, 145, 87

9-882, 2008）。また、ブドウ膜炎やサイトメガロウイルス性網膜炎の治療で使われていた抗炎症剤の眼内インプラント（Vitrasert, Retisert）は硝子体中に移植されるが、眼内移植による網膜剥離等の重大な合併症がほぼ必発であることが報告されており（Ophthalmology, 117, 567-575, 2010）、東北大学眼科では使用が中止されている。従って、現状では眼の最深部にある網膜に低侵襲な方法で安全に効率よく投薬する方法はないと言っても過言ではない。

この問題を解決する方法として、眼内への薬物徐放を指向したDDSが長年研究されてきた。例えばコンタクトレンズ型のOcusept（Arch Ophthalmol, 93, 771, 1975）は前眼部にパッチする扱いやすいDDSであるが、点眼と同様に前眼部から網膜への薬物移行性が悪い。網膜下に注入する微粒子や強膜に穿刺するプラグ（Ophthalmologica, 215, 143, 2001）はいずれもインプラントが眼内に及ぶため、眼内への副作用リスクがある。また、ほとんどのDDSは生分解型ポリマーで作製されており、予想外の担体分解に伴う高濃度薬物バースト問題がある（J Contr ol Release, 37, 143-150, 1995）。また、これまで複数の薬物を徐放するDDSは開発されていない。

このような背景から我々は、デバイスが眼内に及ばない眼外に置くだけの「経強膜DDS」が眼内への副作用をなくし、安全に持続的に眼内へ薬物を投与できる方法であると期待している。すでに複数の研究者がこの経強膜DDSを報告しているがいくつかの問題が残っている。まずDDS担体が生分解型ポリマーで作製されているため、上記した薬物バーストの問題がある (J Pharm Sci, 99, 2219-2239, 2010)。さらに、薬物は強膜側だけではなく反対の結膜側へと全方向に徐放されるため、結膜血流による薬物の吸収が起こり、強膜側への薬物移行が効率的ではないという問題がある (J Control Release, 148, 42-48, 2010)。我々はこれらを解決するために、非分解型ポリマーの光硬化性樹脂ポリエチレングリコールジメタクリレート (Polyethyleneglycol dimethacrylate; PEGDM) を微細加工機によってリザーバー型に成形し、薬物をペレット化してリザーバーに充填し、PEGDM製の徐放膜で蓋をしたカプセル型DDSを考案した (Biomaterials, 32, 1950-1956, 2011)。分子量の短いPEGDM (Tryethyleneglycol dimethacrylate; TEGDM) をリザーバー用樹脂に用いると、薬剤はリザーバーを通過することができず、徐放膜側から一方向性に徐放することが可能である。このデバイスの作製方法は国際雑誌Biomaterials (Impact factor 7.882) にPublishされ、国内・国際特許を出願済みである (PCT/JP2010/63793)。このデバイスの発展系として、リザーバー内に複数の薬物ペレットを充填し、複数の薬物を任意の速度で徐放できるデバイスの開発を目指した。また、経強膜DDSの網膜保護エビデンスはまだ報告されておらず、本研究では網膜光障害モデル動物を用いて経強膜DDSの網膜保護効果を検討した。

本研究はまず3種類の蛍光色素を用いて、多剤動態制御性を検討した。次に臨床薬物としてEdaravone (EDV) とGeranylgeranylacetone (GGA) をシングルDDS化し、網膜光障害モデルに対する網膜保護効果を検討した。EDVは脳保護剤として利用されている抗酸化剤 (ラジカット) である。最近、光障害モデル、網膜剥離モデル、N-メチル-Dアスパラギン酸 (NMDA) 障害モデルに対して網膜保護効果があることが報告されている (光障害: Invest Ophthalmol Vis Res, 52, 7289-7297, 2011、網膜剥離: Invest Ophthalmol Vis Res, 52, 3825-3831, 2011、NMDA: Eur J Pharm Biopharm, 79, 119-125, 2011)。GGAは胃炎治療薬として利用されているHeat shock protein誘導剤 (セルベックス) である。最近、光障害モデル、緑内障モデル、虚血モデルに対して網膜保護効果があることが報告されている (光障害: J Neurosci,

25, 2396-2404, 2005、緑内障: Invest Ophthalmol Vis Res, 44, 1982-1992, 2003、虚血: Mol Vis, 13, 1601-1607, 2007)。これらはいずれも全身投与で行われている。本研究はマルチDDS化の予備実験として、光障害に対して網膜保護効果を示すEDVとGGAのシングルDDSデバイス条件の確立を検討した。

B. 研究方法

(1) デバイスの作製

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。まずリザーバーの鋳型を作成した。鋳型は、3D CAD (computer assisted drawing) で鋳型の設計図を作成し、CADデータを小型NC微細加工機Micro MC-2 (株式会社PMT) へ取り込み、アクリル板に掘り込んで作成した。このアクリル板をフルオロシアンでコートし鋳型Aとした。この鋳型Aにポリジメチルシロキサン (PDMS) をキャストし60°Cで30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートし鋳型Bとした。鋳型BにPDMSをキャストし60°Cで30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバーを作製するための最終鋳型Cとした。このPDMS鋳型Cに、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone 10 μ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋 (25mW/cm², 3min [SE N LIGHTS CORP]) して硬化させた。鋳型CからTEGDMリザーバーを剥がして完成した。作成したリザーバーのサイズは、ラット移植用が内径、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mm、薬剤充填部容量は1.2 μ lとし、in vitro徐放用が内径、縦7mm×横7mm×高さ2mm、薬剤充填部容量は9 μ lである。

薬物ペレットは薬物をPEGDMとTEGDMの混合プレポリマーに混合し、あらかじめ作っておいたペレット用PDMS鋳型にキャスト (1.2 μ L) してUV硬化 (25mW/cm², 1.5min) して作成した。ペレットサイズはリザーバー内にぴったり合うように外径が縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mmで作製した。

薬物は、蛍光色素としてFluorescein (FL、WAKO)、Rhodamine B (Rho、WAKO)、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、WAKO) を使用した。これらの色素は励起波長が重複しないため、個別に評価可能である。薬物としてEdaravone (EDV、WAKO)、Geranylgeranylacetone (GGA、エーザイ(株)から譲渡) を使用した。ペレットに各薬物が250mg/mlになるように調整した。プレポリマー中のPEGDMとTEGDMの比率は0:100から100:0の間で調整した。以下、PEGDM:TEGDM=60:40の場合はP60、PEGDM:TEGDM=100:0の場合はP100、PEGDM:TEGDM=0:100の場合はP0、と略す。

蛍光色素ペレットを各色3分の1に切って、各色1個ずつをリザーバー内に詰めた。このときペレットのPEGDM/TEGDM組成を様々な組み合わせになるように詰めた。EDVとGGAの場合は、シングルDDSとしての検討を行ったので、ペレット1個をそのままリザーバーに詰めた。

徐放膜は、PEGDMとTEGDMを混合したプレポリマーで作製した。上記の薬物ペレットを充填したりザーバー上にプレポリマーを1 μ L滴下し、ガラス板でカバーした後、UV硬化して作成した。この条件で徐放膜の厚みは約100 μ mになることが電子顕微鏡の観察からわかっている。プレポリマー中のPEGDMとTEGDMの比率はP100, P80, P60, P40, P20, P0に調整した。

(2) 徐放薬物のIn vitro定量

デバイスをPhosphate-buffered saline (PBS) 1mLに浸漬し、37°Cでインキュベーションした。定期的なPBSを回収し、新しいPBSに置き換えた。蛍光色素サンプルは、回収したPBSを蛍光プレートリーダーで測定し、あらかじめ測定しておいたスタンダード曲線から、蛍光色素の濃度を算出した。薬物の場合は、回収したPBSにアセトニトリルを1:1で混合し、0.45 μ mフィルターでろ過してから、高速液体クロマトグラフィー (HPLC; 島津、Prominence system) で薬物濃度を測定した。

(3) 動物

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。200から250gの雄のSDラットを使用した。すべての過程においてケタミン塩酸塩 (90mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (10mg/kg) の腹腔内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%tropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride (0.4%) を局所麻酔として使用した。

(4) デバイスの移植

麻酔後、実体顕微鏡で観察しながら、ラットの上方結膜を切開しテノン嚢を鈍的に剥離し強膜を露出させた。デバイスを挿入し強膜上に接着するように固定した。結膜を縫合し、タリビッド眼軟膏を点入し終了とした。

(5) 徐放薬物のIn vivo定量

蛍光色素デバイス移植後、1, 2, 4週目に麻酔の過剰投与および頸椎脱臼によりラットを安楽死し、眼球を摘出した。余分な結膜や筋などを除去し、デバイスを取り外した。角膜、水晶体、硝子体を除去して

アイカップを作製し、網膜を慎重に剥がして回収した。残ったアイカップの強膜から網膜色素上皮/脈絡膜をピンセットで慎重に剥がして回収した。残った組織は強膜として回収した。回収した網膜 (RE) と網膜色素上皮/脈絡膜/強膜 (R/C/S) を1%Triton X-100を含有するPBS 200 μ Lに入れ、超音波破砕機で4°Cでホモジナイズした。ホモジネートを5000gで10分遠心し、上清100 μ Lを回収し、蛍光プレートリーダーで測定した。検量線から各色素の濃度を算出した。

EDVとGGAデバイスについては、ラット用デバイスは小さく、放出量が検出限界値以下のため、HPLCで測定することは困難であった。

(6) 組織学的評価

蛍光色素デバイス移植後、1, 2, 4週目に麻酔の過剰投与および頸椎脱臼によりラットを安楽死し、眼球を摘出した。余分な結膜や筋などを除去し、デバイスを取り外し、同部強膜に目印として10-0ナイロンを縫合した。OCTコンパウンドに目印が側面に来るように浸漬し、液体窒素で凍結した。凍結ブロックをクライオスタットで約10 μ mに薄切し凍結切片を作成した。上記切片を蛍光顕微鏡 (model FW4000, ver. 1.2.1; Leica Microsystems) で観察した。

(7) 網膜光障害モデル

EDVデバイスおよびGGAデバイスを移植したラットに光障害を行った。ラットを2.5%phenylephrinと1%tropicamideで散瞳してから、空調を有するLED光障害装置 (特注モデル) 内で、デバイスを移植したラットを飼育した (22°C, 8000Lux)。予備実験で光障害時間は、18時間が適当と判断した。この条件では、完全に視力を失うわけではなく動物の行動に異常は見られなかった。光照射後、LEDを消灯し、装置内で4日間暗順応した。暗順応後、暗室内でラットをケタミン塩酸塩 (90mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (10mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、2.5%phenylephrinと1%tropicamideで散瞳してから網膜電図 (ERG; Purec, Mayo株) を評価した。

コンタクトレンズ電極 (2.5mmベースカーブ、Mayo) を角膜に当て、Identical reference 電極を口に、Ground電極をしっぽに置いた。Single flash light (20ms) を刺激してERG波形を計測した (Dark-adapted maximal rod response)。a波 (ベースラインからa波の振幅) およびb波 (a波とb波の最大振幅) の振幅を計測した。コントロールとして、PBSを含有するデバイスを移植したラット、および未移植のラットを使用した。

EDVデバイスの移植では、カバー条件の

異なるデバイス (P100からP0) を移植し、移植1週目に光障害を行って、カバー条件と網膜保護効果の関係を調べた。GGAデバイスの移植では、P60カバーデバイスを移植し、移植1週目と4週目に光障害を行い、移植期間と網膜保護効果の関係を調べた。

(8) 統計学的解析

徐放薬物の測定値およびERG波形値の相違はステューデントのtテストを用いて比較した。95%の信頼度 ($p < 0.05$) のときに統計学的に有意差があると判断した。

(倫理面への配慮)

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) デバイスの作製

デバイスの大きさは、ラット強膜上に移植可能でかつ薬物を有効濃度で充填できるように設計した。また、移植する際にセッシーで持ちやすいように取っ手を設けた。さらに強膜上に固定できるように縫合用の穴を1個設けた。コンセプト上は、ペレットのサイズを小さくすればいくつでも薬物を詰めることが可能である。また、各ペレットのサイズや徐放性は自由に変更できる。従って、薬物の種類や量に対応しやすい汎用性の高いデバイスとなっている。

(2) 蛍光色素のIn vitro徐放性

デバイスは、徐放膜を2種類の異なるPEGDM比率のカバー条件で作製した。また、ペレットは、DAPIのPEGDM比率は一定に固定し、FLとRhoのPEGDM比率を2種類の異なるPEGDM比率で作製した。DAPIの放出量を基準にFLとRhoの徐放曲線を見ると、PEGDM比率の異なるFLペレット、Rhoペレットを詰めると、そのPEGDM比率に応じて各色素の放出量を独立に制御できることがわかった。すなわち、DAPIの放出を一定にしながらFLの放出を早くしてRhoの放出を遅くするデバイスや、逆にRhoの放出を早くしてFLの放出を遅くするデバイスを作製することができた。また、放出を抑制するPEGDM比率の徐放膜にすると、各色素の徐放制御性は維持しながら、デバイスからの全体の放出量を約3分の1に抑制することができた。

以上より、ペレット中のPEGDM/TEGDM組成と徐放膜中のPEGDM/TEGDM組成の組合せによって、様々な3種類の薬物の徐放性を制御できることが示唆された。

(3) 蛍光色素のIn vivo徐放性

徐放された蛍光色素の眼内への移行性を、組織中の蛍光強度測定と凍結切片観察から評価した。移植後のデバイスはマイルドなFibrosisで覆われていたが、周辺組織への著大な炎症や眼内への副作用は認められなかった。蛍光カメラで観察した結果、デバイス内のFLが蛍光を発していることが観察された。また、デバイスを除去後、強膜上に蛍光が観察され、デバイスから蛍光色素が徐放されていることが確認できた。また、結膜側では蛍光が観察されず、強膜側に一方向に蛍光色素が徐放されていることを確認した。

次に、デバイス移植1、2、4週目に眼球を摘出し、網膜(RE)と強膜/RPE/脈絡膜(R/C/S)に分けてホモジネートの蛍光強度を測定した。この実験では、FLの放出量を一定にして、RhoとDAPIの放出量を独立制御した2種類のデバイス間でその徐放性の差を見た。まずFLについては常に一定の徐放性にしたため、デバイス間の差はなかった。Rhoの放出が早いデバイスでは、各組織において蛍光強度が高め傾向を示した。一方、DAPIの放出が早いデバイスでは、R/C/SにおいてDAPIの蛍光強度が高め傾向を示したがREでは差が小さかった。

以上より、各色素の徐放特性に対応して眼内へ移行する色素量に変化することが示唆された。

(4) EDVとGGAのIn vitro徐放性

EDVおよびGGAのペレット(PEGDM比率は固定)をリザーバーに詰めて、様々なPEGDM比率を有する徐放膜でカバーしたデバイスを作製し、PBSに浸漬してHPLCにより薬物放出量を定量した。いずれにおいても、カプセル化していないPelletのみでは、1週間以内にバーストしていた。一方、カプセル群では、カバー中のPEGDM比率に応じて徐放速度が変化していた。すなわち、PEGDMの比率が少なくなるほど(TEGDMの比率が高くなるほど)、放出量が抑制されていた。また、TEGDM 100%の徐放膜では、放出はほとんど確認されなかった。

以上より、カバーのPEGDM/TEGDM組成を変えることで、EDVとGGAの徐放性を制御できることがわかった。

(5) 網膜光障害モデル実験

カバー条件の異なるEDVデバイスをラット強膜上に移植し1週間後に光障害を行った後、暗順応4日後にERG検査を行った。コントロールのPBS-DDSでは、光障害によってa波、b波ともに7割以上低下した。一方、EDV-DDSでは、EDV放出の多いカバーのデバイスで有意に波形値の低下が抑制されて

いた。また、EDV放出の少ないカバーのデバイスでは波形値低下の抑制は見られなかった。以上より、EDVデバイスは網膜光障害に対して保護効果があり、その効果はEDVの放出条件と関係があることが示唆された。

次にGGAデバイスをラット強膜上に移植し1週と4週間後に光障害を行った後、暗順応4日後にERG検査を行った。PBS-DDSおよび未処理群では光障害によってa波、b波ともに7割以上低下していた。一方、GGAデバイス群では、波形値の低下が有意に抑制されていた。この抑制効果は移植1週と4週目で確認できた。しかし、抑制効果は4週目の方が小さかった。以上より、GGAデバイスは移植4週にわたってGGAを徐放し、網膜光障害に対して網膜保護効果を示すことが示唆された。

D. 考察

本研究はまず蛍光色素をモデルドラッグとして使用し、デバイス中の薬物ペレットおよびカバー（徐放膜）のPEGDM/TEGDM比率を変えることによって、複数の薬剤を異なる任意の速度でリリースできることを示した。また、リリースされた薬剤はその徐放特性に対応して、眼内へ移行し、網膜まで到達することをラットへの移植実験で確認した。次に、網膜保護効果が報告されているEDVおよびGGAのシングルDDSを作製し、蛍光色素と同様にPEGDM/TEGDM比率で放出量をコントロールできることを確認した。また、網膜光障害モデルを用いてこれらのデバイスが網膜保護効果を示すことを示した。経強膜DDSで網膜を保護する動物実験エビデンスを報告した例はなく、現時点では最初の報告である。

過去に報告されている経強膜DDSは生分解性ポリマーを使ったシンプルなタブレットタイプが多い。しかし、生分解型DDSは放出初期にDDS表面から薬物が一気に溶け出る初期バーストと、放出の最後にDDSが一気に崩壊するファイナルバーストがあり、薬物動態制御に課題があった。我々のデバイスは、非分解性のPEGDMとTEGDMを利用した、リザーバー/薬物ペレット/徐放膜の3つからなるカプセルとなっており、徐放膜から薬物が一定放出されるため、初期バーストやファイナルバーストがなく、薬物動態制御に優れている。また、我々のデバイスのもう1つの利点として、結膜血流による薬物吸収を抑制し、強膜側に一方向に薬物を効率よく徐放できる点がある。過去に報告されているデバイスは、薬物徐放の方向性がなく結膜側など全方向に薬物が放出されるため、約9割が結膜に吸収され、強膜側に浸透する薬物量が制限されていた。

我々のデバイスはリザーバーが薬物非透過性のTEGDM 100%で作製しているため、結膜側に薬物が放出されない仕組みになっている。以上より、過去の経強膜DDSの課題としてあった、薬物動態制御と結膜薬物吸収を改善したデバイスの作製に成功した。

本デバイスの大きな特徴は、複数の薬物をそれぞれ異なる速度で徐放できることである。網膜疾患は多因子関与の病態が多く、1種類の薬物では治療が困難なことが多い。例えば緑内障では、眼圧降下剤として2種類以上の薬剤を併用することが多くなってきた。加齢黄斑変性症では脈絡膜新生血管を抑制する抗VEGF抗体投与治療が大きな成果をあげているが、副作用やノンレスポonderが多く、血管新生抑制に加えて網膜神経を保護する神経保護因子の同時投与が重要になってくる可能性がある。本研究では、EDVとGGAのシングルDDSの検討で網膜保護効果を示したが、次年度はこれらをマルチDDS化して、相乗効果を確認し、多剤併用治療への応用可能性を検討する。

蛍光色素のIn vivo徐放性検討は、色素（薬物）の性質によって網膜への移行性が異なるという重要な結果を示唆していた。すなわち、Rhoは徐放特性と一致して網膜への移行が多くなっていったが、DAPIでは徐放特性が異なるにも関わらず、網膜への移行量に差がなかった。過去の検討で、強膜から浸透していく薬物は網膜色素上皮（RPE）バリアでストックされ、ここを通過した薬物が網膜へ移行するメカニズムが示唆されている。RhoとDAPIの結果の差は、このRPEバリアの通過性に関係している可能性がある。従って、薬物の性質（水溶性、脂溶性、電荷など）によっては、網膜への移行性が変化することを示唆している。RPEでストックされることを考慮すると、網膜下のRPEや脈絡膜で起こる病態、たとえば脈絡膜新生血管や、視細胞のアポトーシスの抑制に対して、経強膜DDSが有効に働く可能性がある。

EDVデバイスを利用した光障害モデル実験では、徐放膜条件によって保護効果が異なる結果を示した。これはある徐放膜条件において、網膜保護に働くEDV有効濃度を放出していたことを示唆している。また、放出量の少ない徐放膜では保護効果が小さかったことから、徐放膜条件によってEDVのIn vivo徐放が制御されていたことを示唆している。また、GGAデバイスの実験では、移植4週目においても保護効果があった。これは、毎日点眼が必要であった病態に対して、デバイスの移植によって毎日の点眼が必要なくなることを示唆している。点眼は面倒で忘れるなど服薬コンプライアンスの問題もあり、本デバイスを用いれば長期間点眼の必要がなくなり、かつ誰が使用して

も同じ効果が得られる便利でユニバーサルなデバイスとしての利用が期待できる。

E. 結論

3種類の蛍光色素の徐放実験から、本デバイスは多剤動態制御可能であることを確認した。また、EDVとGGAのシングルDDSは、網膜光障害に対して網膜保護効果があることをラット移植実験で確認した。次年度はEDVとGGA、および他の薬剤候補を組み合わせてマルチDDS化し、網膜障害モデルに対して相乗効果的治療ができるか検討する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeaki Kawashima, **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. "A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina" *Biomaterials*, 32(7), 1950-1956 (2011)

2. 学会発表

(国際学会発表)

1. **Nobuhiro Nagai**, Toshiaki Abe "Transscleral Sustained Drug Delivery by Novel Device" BIT's 1st Annual Symposium of Drug Delivery System (SDDS-2011), Shenzhen, China (Nov 3-5, 2011), Oral
2. **Nobuhiro Nagai**, Takeaki Kawashima, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe "Evaluation of Ocular Tissue Distribution of Drugs Delivered Transsclerally From A Non-biodegradable Polymeric Capsule Device" 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 1-5, 2011), Poster
3. Toshiaki Abe, Hideyuki Onami, **Nobuhiro Nagai**, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Shigeki Machida, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato "Suppression of Choroidal Neovascularization By Vasohibin-1 in Monkey Eyes" 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 1-5, 2011), Poster

(国内学会発表)

1. **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、中澤徹、西澤松彦、阿部俊明：「網膜光障害モデルに対す

る経強膜DDSの網膜保護効果」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）

2. **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、西澤松彦、阿部俊明：「網膜保護用のマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）
3. **永井展裕**：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜保護」2011年度厚生労働省研究班キックオフミーティング、東北大学医学部（2011年8月25日）
4. **永井展裕**：「網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果」2010年度東北大学視覚先端医療学講座報告会、勝山館（2011年7月15日）
5. **永井展裕**、熊坂典浩、大浪英之、川島文明、梶弘和、西澤松彦、阿部俊明：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜神経保護の試み」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）
6. **永井展裕**、川島文明、梶弘和、熊坂典浩、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明：「多剤動態制御性に優れたマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）
7. 大浪英之、**永井展裕**、熊坂典浩、石川有美、涌沢亮介、佐藤靖史、阿部俊明：「サル脈絡膜新生血管モデルに対するバソヒビンの抑制効果」第115回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2011年5月12日～15日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

(日米欧に国際出願中)

「持続性ドラッグデリバリーシステム」阿部俊明、**永井展裕**、梶弘和、川島文明、西澤松彦、西田幸二、日本特許出願番号：特願2011-527664、米国特許出願番号：13/398,051、欧州特許出願番号：10809937.5

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担）研究報告書

デバイスの設計と構造評価に関する研究

研究分担者 梶弘和 東北大学大学院工学研究科 准教授

研究要旨

本研究の目的は、網膜疾患治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、さらに多剤併用療法に対応するために複数の薬物を徐放できるマルチDDSを開発することである。本分担研究は、ラット眼強膜上に移植可能なサイズのデバイスの設計とデバイスの構造評価を目的とした。CAD-CAMによる微細加工法によって、デザイン自由度の高いデバイス設計が可能である。この微細加工法を用いて薬物リザーバー（2mm×2mm×1mm）、薬物ペレット（1.5mm×1.5mm×0.6mm）用の鋳型をポリジメチルシロキサンを鋳型基材として作成した。鋳型上にDDS基材のポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）をキャストし、UV照射で重合してリザーバーとペレットを作製した。充填する薬物ペレットを小サイズに設計することで、リザーバー内に複数の薬物を詰めることができた。ペレット充填後、PEGDM徐放膜でシールしたデバイスの構造を電子顕微鏡で評価した結果、リザーバーと徐放膜のシール断面は隙間なく密着しており、徐放膜以外からの薬物リークはないと考えられた。

A. 研究目的

本課題の目的は、失明疾患の上位を占める網膜疾患の治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、多剤併用療法に対応するために、複数の薬物を任意の速度で徐放できるマルチDDSデバイスを開発することである。本研究は分担研究として、デバイスの設計および構造評価を目的とした。

本研究のデバイスは微細加工（Microfabrication）法を用いて光硬化性樹脂をカプセル型に成形することを特徴としている。我々は過去に微細加工法によってマイクロ流路を作製し、細胞と細胞のインタラクションを評価する培養系を確立してきた（Biomicrofluidics, 5(2), 22214, 2011、Adv Mater, 22(46), 5276-5281, 2010、Lab Chip, 10(18), 2374-2379, 2010）。微細加工に使用する切削機械（MC-2 micro、PMT.Co）はマイクロニードルによってマイクロオーダーでアクリル板等の鋳型に流路を掘ることができる。CAD（Computer aided design）によって自由に切削できるため、カプセルや球など自由にデザインすることができる。

この微細加工機を用いてデバイスの鋳型を作製し、光硬化性樹脂をキャストして光

重合して薬物カプセルを作製する手法を過去に報告した（Biomaterials, 32, 1950-1956, 2011）。光硬化性樹脂として、ポリエチレングリコールジメタクリレート（Polyethylene glycol dimethacrylate; PEGDM）を使用した。これは歯科材料として利用されている生体材料であり、生体親和性が高いことが報告されている（Acta Biomaterialia, 2, 1-8, 2006、Tissue Eng, 12(6), 1663-1673, 2006）。デバイスは汎用性と移植性、さらに徐放特性を考慮して、リザーバー、薬物ペレット、徐放膜からなるリザーバー型カプセルとした。徐放膜を介することによって、一時的に薬物が大量放出されるバースト現象を抑えることが可能である。また、分子量の短いPEGDM（Triethyleneglycol dimethacrylate; TEGDM）をリザーバー用樹脂に用いると、薬物はこのリザーバーを通過できないため、徐放膜側から一方向性に薬物を放出することが可能である。これまで箱側カプセル（4mm×4mm×2mm）を作製し、ウサギの眼球強膜上に移植した結果、デバイスに充填された蛍光色素が網膜色素上皮へ移行していることが示唆された。今回はラット眼強膜上に移植可能な小型デバイスの設計および構造評価（電子顕微鏡観察）を行った。

B. 研究方法

(1) リザーバー用鋳型の作製

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。まずリザーバーの鋳型を設計した。ラット用デバイスの形状として、過去に報告済のウサギ用デバイス(4mm×4mm×2mm)を参考にして、全体の大きさを縮小したリザーバーの鋳型設計を行った。サイズは外径:2mm×2mm×1mm、内径:1.5mm×1.5mm×0.6mmのリザーバーとした。このリザーバーには約1.2 μ Lの薬物ペレットが充填可能である。PMT.Co.の微細加工機MC-2 microに上記のリザーバーをCADでデザインし、CAM (Computer aided manufacturing) によってアクリル板にリザーバー形状を切削した。また、デバイスには移植する際にピンセットで持つための取っ手(長さ1mm)と、強膜上に縫合するために糸を通すための穴(直径0.4mm)を1個設計した。

次にこのアクリル板をフルオロシアンでコートした。このコートは次の作業で基材と鋳型を剥がしやすくするために処理した。このアクリル板鋳型にポリジメチルシロキサン(PDMS)をキャストし60 $^{\circ}$ Cで30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートしPDMS鋳型とした。このPDMS鋳型に別のPDMSをキャストし60 $^{\circ}$ Cで30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバーを作製するための最終鋳型とした。この最終鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone(硬化促進剤) 10 μ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋(25mW/cm², 3min [SEN LIGHTS CORP])して硬化させた。最終鋳型からTEGDMリザーバーを剥がして完成した。

徐放試験用のリザーバーとして、サイズの大きなリザーバーを設計し、上記と同様の手法で外径:10mm×10mm×4mm、内径:7mm×7mm×2mm、薬剤充填部容量は9 μ lのリザーバーをTEGDMで作製した。

(2) 薬物ペレット用鋳型の作製

ラット用デバイスに充填できるペレットのサイズはリザーバーの内径:1.5mm×1.5mm×0.6mmであり、このサイズの凹型PDMS鋳型を作製した。(1)と同様の手法で、まずCAD-CAMでアクリル板に鋳型を掘り、PDMSに転写し、さらにPDMSに転写して鋳型を作製した。PEGDMとPDMS鋳型が接合しないようにフルオロシランコートを行った。PDMS鋳型に薬物を混合したPEGDM/TEGDM混合プレポリマーをキャストし、90秒UV照射(25mW/cm²)してペレット化した。

(3) 徐放膜の作製

リザーバー内に薬物ペレットを充填した後に、徐放膜となるPEGDM/TEGDM混合プレポリマーをペレット側に滴下し、ガラス板を乗せて、3分間UV照射(25mW/cm²)してリザーバーをシールした。Phosphate-buffered saline (PBS)で余分なPEGDM/TEGDMモノマーを洗浄した。

(4) 電子顕微鏡観察 (SEM)

デバイスのシール面の密着性を評価するために、デバイスの断面をSEM (VE-9800, Keyence)で観察した。切断したデバイスを臨界点乾燥機(HCP-2, 日立工機)で乾燥し、イオンコーター(L350S-C, Anelva)でPtスパッタリングした。5-20kVでSEM観察を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

(1) デバイスの作製

予備検討でデバイスのサイズを検討した結果、リザーバー壁面の強度と薬物充填量を考慮し、外径:2mm×2mm×1mm、内径:1.5mm×1.5mm×0.6mmのリザーバーとした。外径については、有効濃度を徐放するための薬物充填量として、1 μ L以上が必要であり、ラット眼のサイズも考慮し、薬物ができるだけ充填できる最大のサイズとして決定された。またこの外径において、これより内径の大きいリザーバーとした場合、リザーバー壁面が薄くなり、割れる等の強度不足が懸念された。

リザーバー内にペレットを詰める本研究のコンセプトは、マルチDDSを可能にする。すなわち、薬物ペレットを小サイズに分割して、様々な薬物を詰めることが可能である。本研究では、薬物ペレットを3等分に切り刻み、3種類の異なる薬物を詰める検討を行った結果、容易にマルチDDS化することができた。各ペレットのサイズや徐放性は自由に変更できるため、薬物の種類や量に対応しやすい汎用性の高いデバイスとなっている。

In vitro徐放試験用にサイズの大きいデバイスを作製した。これは薬物の定量に行った高速液体クロマトグラフィーの検出限界を考慮した結果である。すなわち、ラット用の小型デバイスでは、徐放薬物が検出限界以下のため定量が困難であったため、徐放試験用に別設計とした。

(2) SEMによる構造評価

SEMによるデバイス断面構造の評価を行った。徐放膜によるシール断面は、徐放膜のPEGDMとリザーバーのPEGDMが一体化

し、隙間なく埋められていた。また、リザーバーにクラックや穴などはなかった。従って徐放膜以外からの薬物のリークはないと推定された。

D. 考察

本研究はラット眼強膜上に移植可能なデバイスの設計とデバイスの構造評価を行った。分担研究の移植評価ではラットへの移植後、炎症や眼内への副作用の報告はなく、網膜保護に有効な薬物の徐放が確認されている。ラット眼に移植可能な経強膜DDSはこれまで報告がなく、現時点で最初の報告と言える。本デバイスを用いて、網膜変性モデルの報告が多いラットで経強膜DDSの検討ができるようになれば、より詳細に経強膜DDSの網膜保護効果が検討可能と期待できる。

過去に報告されている経強膜DDSは生分解性ポリマーを使ったシンプルなタブレットタイプが多いが、我々のデバイスは非生分解性のPEGDMを用いたカプセル型デバイスとした。これは、生分解型DDSは放出初期にDDS表面から薬物が一気に溶け出る初期バーストと、放出の最後にDDSが一気に崩壊するファイナルバーストがあるためである。我々のデバイスは徐放膜を介した徐放メカニズムである。これは徐放膜のナノレベルのPEGDMポリマーメッシュによって薬物の拡散が制御され、バーストを抑制して薬物を一定放出することができると推定している。

徐放膜でシールするカプセルは、シール面からの薬物リークに注意する必要がある。SEM観察ではシール断面は密着しておりリークの問題はないと考えられた。

E. 結論

ラット眼に移植可能な小型デバイスを開発した。また、リザーバー、薬物、徐放膜の3構成とすることで、マルチDDS化に対応できる汎用性の高いデバイスを開発した。CAD-CAMによる微細加工法はデザインの自由度が高く、より移植性や徐放特性に優れたデバイスデザインが可能であると期待できる。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. "A scalable controlled-release device

for transscleral drug delivery to the retina" *Biomaterials*, 32(7), 1950-1956 (2011)

2. 学会発表

(国際学会発表)

1. Nobuhiro Nagai, Takeaki Kawashima, **Hirokazu Kaji**, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe "Evaluation of Ocular Tissue Distribution of Drugs Delivered Transsclerally From A Non-biodegradable Polymeric Capsule Device" 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 1-5, 2011), Poster

(国内学会発表)

1. 永井展裕、大浪英之、**梶弘和**、山田琢也、佐藤真智子、中澤徹、西澤松彦、阿部俊明：「網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）
2. 永井展裕、大浪英之、**梶弘和**、山田琢也、佐藤真智子、西澤松彦、阿部俊明：「網膜保護用のマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）
3. 永井展裕、熊坂典浩、大浪英之、川島丈明、**梶弘和**、西澤松彦、阿部俊明：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜神経保護の試み」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）
4. 永井展裕、川島丈明、**梶弘和**、熊坂典浩、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明：「多剤動態制御性に優れたマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

(日米欧に国際出願中)

「持続性ドラッグデリバリーシステム」阿部俊明、永井展裕、**梶弘和**、川島丈明、西澤松彦、西田幸二、日本特許出願番号：特願2011-527664、米国特許出願番号：13/398,051、欧州特許出願番号：10809937.5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担）研究報告書

デバイスの移植と網膜機能評価に関する研究

研究分担者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

本研究の目的は、網膜疾患治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、さらに多剤併用療法に対応するために複数の薬物を徐放できるマルチDDSを開発することである。本分担研究は、ラット眼強膜上へのデバイス移植と網膜電図（ERG）による網膜機能評価を目的とした。E daravone（EDV）およびGeranylgeranylacetone（GGA）のデバイスを移植し、1週間後および4週間後に網膜光障害（8000Lux、18h）を実施し、暗順応4日間後にERG検査を行った。その結果、コントロールのPhosphate-buffered saline（PBS）デバイスでは、光障害によってa波、b波ともに7割以上低下したが、EDVデバイスでは、EDV放出の多いデバイスで有意に波形値の低下が抑制されていた。また、EDV放出の少ないデバイスでは波形値低下の抑制は見られなかった。また、GGAデバイス群でも同様に波形値の低下が有意に抑制されていた。この抑制効果は移植1週と4週目で確認できた。以上より、本デバイスは持続性のある眼内薬物投与デバイスとして有用であることが示唆された。

A. 研究目的

本課題の目的は、失明疾患の上位を占める網膜疾患の治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、多剤併用療法に対応するために、複数の薬物を任意の速度で徐放できるマルチDDSデバイスを開発することである。本研究は分担研究として、デバイスの移植および網膜機能評価を目的とした。

視覚はヒトの情報の8割を占めるため、視覚障害はQuality of life（生活の質）を著しく低下させる。2006年の厚生労働省難治性疾患克服事業の統計結果では、失明疾患の上位はすべて網膜疾患（1位 緑内障、2位 糖尿病網膜症、3位 網膜色素変性症、4位 黄斑変性症）である。加齢性疾患が多い網膜疾患においては、超高齢化社会を迎え今後さらに増加する可能性がある。網膜は主に視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞からなる神経組織である。一般に神経細胞は再生が難しく、一度障害されると治療が難しい場合が多い。

眼から入った光は光受容細胞である視細胞で神経信号へ変換され、神経節細胞から視神経を経て脳中枢で情報が伝えられる。この神経信号は活動電位という生体電気パ

ルスとして伝達される。眼球には角膜側をプラス、網膜側をマイナスとする静止電位が存在するが、光を受容すると活動電位が生じて電位変化が生じる。この変動を記録したものが網膜電図（Electroretinogram：ERG）である。一般にコンタクトレンズ型の電極を角膜に装着して、電極から強い光を網膜に当て、心電図のように電位波形を記録する。ERGは白内障など眼底検査が行えない場合に有効な網膜機能評価方法である。

本分担研究では、ERGを用いてデバイスの網膜保護効果を評価することを目的とした。ERGは動物実験用に開発されたMayo Co.のPuRECを使用した。

B. 研究方法

（1）デバイスの作成

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。CAD-CAMでリザーバーと薬物ペレットのデザインを作製し、小型NC微細加工機Micro MC-2（株式会社PMT）でアクリル板に鋳型を作製した。このアクリル板をフルオロシアンでコートし鋳型Aとした。この鋳型Aにポリジメチルシロキサン（PDMS）をキャストし60℃で30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートし鋳型Bとした。鋳型Bに

PDMSをキャストし60°Cで30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバーを製作するための最終鋳型Cとした。このPDMS鋳型Cに、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone 10μlを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋 (25mW/cm², 3min [SEN LIGHTS CORP]) して硬化させた。鋳型CからTEGDMリザーバーを剥がして完成した。作成したリザーバーのサイズは、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mm、薬剤充填部容量は1.2μlである。

薬物ペレットは薬物をPEGDMとTEGDMの混合プレポリマーに混合し、あらかじめ作っておいたペレット用PDMS鋳型にキャスト (1.2μL) してUV硬化 (25mW/cm², 1.5min) して作成した。ペレットサイズはリザーバー内にぴったり合うように外径が縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mmで作製した。

薬物はEdaravone (EDV, WAKO)、Gerganylgeranylacetone (GGA、エーザイ(株)から譲渡) を使用した。ペレットに各薬物が250mg/mlになるように調整した。プレポリマー中のPEGDMとTEGDMの比率は0:100から100:0の間で調整した。

EDVおよびGGAのペレット1個をリザーバーに詰めて徐放膜で蓋をした。徐放膜は、PEGDMとTEGDMを混合したプレポリマーで作製した。上記の薬物ペレットを充填したリザーバー上にプレポリマーを1μL滴下し、ガラス板でカバーした後、UV硬化して作成した。プレポリマー中のPEGDMとTEGDMの比率は0:100から100:0の間で調整した。

(2) 動物

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。200から250gの雄のSDラットを使用した。すべての過程においてケタミン塩酸塩 (90mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (10mg/kg) の腹腔内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%tropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride (0.4%) を局所麻酔として使用した。

(3) デバイスの移植

麻酔後、実体顕微鏡で観察しながら、ラットの上方結膜を切開しテノン嚢を鈍的に剥離し強膜を露出させた。デバイスを挿入し強膜上に接着するように固定した。結膜を縫合し、タリビッド眼軟膏を点入し終了とした。

(4) 網膜光障害モデル

EDVデバイスおよびGGAデバイスを移植したラットに光障害を行った。ラットを2.5%phenylephrinと1%tropicamideで散瞳して

から、空調を有するLED光障害装置 (特注モデル) 内で、デバイスを移植したラットを飼育した (22°C, 8000Lux)。予備実験で光障害時間は、18時間が適当と判断した。この条件では、完全に視力を失うわけではなく動物の行動に異常は見られなかった。光照射後、LEDを消灯し、装置内で4日間暗順応した。暗順応後、暗室内でラットをケタミン塩酸塩 (90mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (10mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、2.5%phenylephrinと1%tropicamideで散瞳してから網膜電図 (ERG ; Purec, Mayo株) を評価した。

(5) 網膜電図 (ERG)

コンタクトレンズ電極 (2.5mmベースカーブ、Mayo) を角膜に当て、Identical reference 電極を口に、Ground電極をしっぽに置いた。Single flash light (20ms) を刺激にERG波形を計測した (Dark-adapted maximal rod response)。a波 (ベースラインからa波の振幅) およびb波 (a波とb波の最大振幅) の振幅を計測した。コントロールとして、Phosphate-buffered saline (PBS) を含有するデバイスを移植したラット、および未移植のラットを使用した。

EDVデバイスの移植では、カバー条件の異なるデバイスを移植し、移植1週目に光障害を行って、カバー条件と網膜保護効果の関係を調べた。GGAデバイスの移植ではカバー条件を固定し、移植1週目と4週目に光障害を行い、移植期間と網膜保護効果の関係を調べた。

(6) 統計学的解析

ERG波形値の相違はステューデントのtテストを用いて比較した。95%の信頼度 (p<0.05) のときに統計学的に有意差があると判断した。

(倫理面への配慮)

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) デバイスの移植

デバイスの移植性に問題はなかった。移植後のデバイスはマイルドなFibrosisで覆われていたが、周辺組織への著名な炎症や眼内への副作用は認められなかった。デバイス除去後の強膜はネクロシス等の異常は全く見られなかった。

(2) 網膜光障害モデル

EDVデバイスをラット強膜上に移植し、1

週間後に光障害を行った後、暗順応4日後にERG検査を行った。コントロールのPBS-DDSでは、光障害によってa波、b波ともに7割以上低下した。一方、EDV-DDSでは、EDV放出の多いカバールのデバイスで有意に波形値の低下が抑制されていた。また、EDV放出の少ないカバールのデバイスでは波形値低下の抑制は見られなかった。以上より、EDVデバイスは網膜光障害に対して保護効果があり、その効果はEDVの放出条件と関係があることが示唆された。

次にGGAデバイスをラット強膜上に移植し1週と4週間後に光障害を行った後、暗順応4日後にERG検査を行った。PBS-DDSおよび未処理群では光障害によってa波、b波ともに7割以上低下していた。一方、GGAデバイス群では、波形値の低下が有意に抑制されていた。この抑制効果は移植1週と4週目で確認できた。しかし、抑制効果は4週目の方が小さかった。以上より、GGAデバイスは移植4週にわたってGGAを徐放し、網膜光障害に対して網膜保護効果を示すことが示唆された。

D. 考察

本研究はデバイスの移植とERGによる網膜機能評価を行った。デバイス移植に伴う炎症や眼内への副作用はなく、網膜光障害モデルではデバイスの網膜機能保護効果が確認された。これまで経強膜DDSの網膜保護エビデンスの報告はなく、現時点で最初の報告と言える。

網膜光障害モデルは、過剰光に曝すことによって網膜にダメージを与えるモデルである。光によるダメージの蓄積は、加齢黄斑変性症などの網膜障害に関与することが指摘されている。そのためマウスやラットで網膜光障害モデルが利用されている。過去にEDVおよびGGAの全身投与が光障害に対して保護効果があることが報告されている (EDV : *Invest Ophthalmol Vis Res*, 52, 7289-7297, 2011, *Eur J Pharm*, 642, 77-85, 2010, GGA : *J Neurosci*, 25, 2396-2404, 2005)。いずれも約1週間毎日2回以上の全身投与を続けたときに網膜保護効果を報告している。一方、我々のデバイスは一度の投与で薬物を持続投与し、移植1週間後と4週間後において網膜保護効果を示した。この結果は、本デバイスを使用することで点眼や静脈投与の反復投与の必要がなくなり、かつ網膜に局所的に投与できるため全身性の副作用を抑えることができることを示唆している。

E. 結論

EDVおよびGGAデバイスの移植は、網膜光障害から網膜を保護する可能性を示唆し

た。また、その効果は4週間持続することが示唆された。本デバイスは持続性のある眼内薬物投与デバイスとして有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, **Toshiaki Abe**. "A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina" *Biomaterials*, 32(7), 1950-1956 (2011)

2. 学会発表

(国際学会発表)

1. Nobuhiro Nagai, **Toshiaki Abe** "Transscleral Sustained Drug Delivery by Novel Device" BIT's 1st Annual Symposium of Drug Delivery System (SDDS-2011), Shenzhen, China (Nov 3-5, 2011), Oral
2. Nobuhiro Nagai, Takeaki Kawashima, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Matsuhiko Nishizawa, **Toshiaki Abe** "Evaluation of Ocular Tissue Distribution of Drugs Delivered Transsclerally From A Non-biodegradable Polymeric Capsule Device" 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 1-5, 2011), Poster

(国内学会発表)

1. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、中澤徹、西澤松彦、**阿部俊明** : 「網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ (2011年11月21日~22日)
2. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、西澤松彦、**阿部俊明** : 「網膜保護用のマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ (2011年11月21日~22日)
3. 永井展裕、熊坂典浩、大浪英之、川島文明、梶弘和、西澤松彦、**阿部俊明** : 「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜神経保護の試み」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス (2011年6月9日~10日)
4. 永井展裕、川島文明、梶弘和、熊坂典

浩、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明：
「多剤動態制御性に優れたマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）

5. 大浪英之、永井展裕、熊坂典浩、石川有美、涌沢亮介、佐藤靖史、阿部俊明：
「サル脈絡膜新生血管モデルに対するバソヒビンの抑制効果」第115回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2011年5月12日～15日）

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

（日米欧に国際出願中）

「持続性ドラッグデリバリーシステム」阿部俊明、永井展裕、梶弘和、川島文明、西澤松彦、西田幸二、日本特許出願番号：特願2011-527664、米国特許出願番号：13/398,051、欧州特許出願番号：10809937.5

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

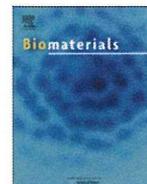
研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai , Hirokazu Kajiwara, Norihiro Kumashiro, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe.	“A scalable controlled-release device for transcleral drug delivery to the retina”	<i>Biomaterials</i>	32(7)	1950-1956	2011



A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina

Takeaki Kawashima^{a,1}, Nobuhiro Nagai^{b,1}, Hirokazu Kaji^{a,c}, Norihiro Kumasaka^b, Hideyuki Onami^d, Yumi Ishikawa^b, Noriko Osumi^e, Matsuhiko Nishizawa^{a,c}, Toshiaki Abe^{b,*}

^a Department of Bioengineering and Robotics, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-01 Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^b Division of Clinical Cell Therapy, Center for Advanced Medical Research and Development, ART, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

^c JST, CREST, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

^d Department of Ophthalmology, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan

^e Division of Developmental Neuroscience, Center for Neuroscience, ART, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2010

Accepted 3 November 2010

Available online 26 November 2010

Keywords:

Drug-delivery system

Transscleral delivery

Controlled release

Retinal neuroprotection

Polyethylene glycol

ABSTRACT

A transscleral drug-delivery device, designed for the administration of protein-type drugs, that consists of a drug reservoir covered with a controlled-release membrane was manufactured and tested. The controlled-release membrane is made of photopolymerized polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDM) that contains interconnected collagen microparticles (COLs), which are the routes for drug permeation. The results showed that the release of 40-kDa FITC-dextran (FD40) was dependent on the COL concentration, which indicated that FD40 travelled through the membrane-embedded COLs. Additionally, the sustained-release drug formulations, FD40-loaded COLs and FD40-loaded COLs pelletized with PEGDM, fine-tuned the release of FD40. Capsules filled with COLs that contained recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rhBDNF) released bioactive rhBDNF in a manner dependent on the membrane COL concentration, as was found for FD40 release. When capsules were sutured onto sclerae of rabbit eyes, FD40 was found to spread to the retinal pigment epithelium. Implantation of the device was easy, and it did not damage the eye tissues. In conclusion, our capsule is easily modified to accommodate different release rates for protein-type drugs by altering the membrane COL composition and/or drug formulation and can be implanted and removed with minor surgery. The device thus has great potential as a conduit for continuous, controlled drug release.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The design of drug-delivery systems targeting the retina is a most challenging ophthalmological task. The principal delivery route currently in use is topical eye drop administration, but it delivers only low drug levels to the retina, and systemic drug delivery, e.g., intravenous delivery of Cytovene, a ganciclovir-type antiviral agent for cytomegalovirus [1], can produce toxic side effects. Although intravitreal delivery allows for high concentrations of a drug to be delivered directly to the retina, the necessary surgical procedure often requires repeated injections that can cause cataracts, retinal detachment, infection, and/or vitreous hemorrhage [2]. Therefore, transscleral delivery has emerged as a more attractive method for treating retinal disorders because it can deliver a drug locally and is less invasive [3,4]. Because of its large

surface area and high degree of hydration, the sclera is permeable to drugs of different sizes (up to ~70 kDa) [5]. Transscleral drug-delivery systems that range in size from microparticles to polymeric implants have been tested [6]. However, most of these systems are made of biodegradable polymers. Drug release profiles for biodegradable devices generally have a tri-phasic release profile, i.e., an initial burst, a diffusional release phase, and a final burst [7]. This complex profile occurs because the polymers erode with time and, by doing so, affect drug dissolution. Thus, a non-biodegradable device that contains a drug reservoir sealed with a semipermeable membrane allows for sustained release and reduces the sizes of the bursts [8].

Neuroprotection from retinal degenerative diseases by neurotrophic factor delivery to the retina remains a challenge for ophthalmology [9]. Intraocular administrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [10], ciliary neurotrophic factor [11], and basic fibroblast growth factor [12], have been shown to rescue degenerating photoreceptor cells in animals. Additionally, we have demonstrated that the implantation of genetically modified iris pigment epithelial cells that secrete BDNF to the subretinal space

* Corresponding author. Tel./fax: +81 (0) 22 717 8234.

E-mail address: toshi@oph.med.tohoku.ac.jp (T. Abe).

¹ Equal contribution to this work.

protect photoreceptors against phototoxicity [13]. However, suitable devices that specifically deliver neurotrophic factors continuously to the retina and with minimal invasiveness have yet to be developed. Therefore, we aimed to develop a membrane-based capsule that is implantable on the sclera (Fig. 1A) and would prolong the controlled delivery of BDNF or other protein-type drugs to the retina with zero-order kinetics. The designed capsule consists of two parts, a molded triethylene glycol dimethacrylate (TEGDM) reservoir to contain the drug and a new type of controlled-release membrane sealed around the top of the reservoir (Fig. 1B). TEGDM is a biomedical material that has been clinically used as a dental filler for the restoration of teeth [14]. The controlled-release membrane was produced by photopolymerizing a mixture of polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDM) and collagen microparticles (COLs) (PEGDM/COL membrane). PEGDM has been successfully used by us [15] and several other groups [16,17] both *in vitro* and *in vivo* as a bio-inert scaffold material that can be easily molded into different substrate shapes and then annealed by UV crosslinking. The COLs are hydrogels containing a chemically crosslinked 0.8% (w/v) collagen network [18], which is permeable to molecules with molecular weights of <200 kDa. Drugs diffuse through the interconnected COLs embedded in the membrane. Additionally, the capsule can contain various formulations and dosages of a drug so that it can be used for many different biomedical applications. Herein, we report the fabrication, characterization, and implantation on rabbit sclerae of this transscleral

drug-delivery device and demonstrate its applicability for the administration of protein-type drugs to the retina.

2. Materials and methods

2.1. Fabrication of the PEGDM/COL membrane

Mixtures (900 μ l) of PEGDM prepolymer (M_n 750, Aldrich), 1% 2-hydroxy-2-methylpropiophenone, and COLs at concentrations of 0, 100, 300, or 500 mg/ml were poured individually into acrylic molds ($3 \times 3 \times 0.1$ cm) and photopolymerized with UV light that had an intensity of 11.5 mJ/cm² for 90 s (Lightningcure LCS, Hamamatsu Photonics) to produce membranes with thicknesses of 100 μ m. COLs (average diameter, 8.7 μ m) were prepared as described [18]. Briefly, 10 ml of a 1% (w/v) collagen solution (Nippon Meat Packers) was emulsified in 50 ml of liquid paraffin containing 0.3% (v/v) surfactant and stirred (600 rpm) at room temperature for 5 min. To crosslink the collagen, 1 ml of 50% (v/v) water-soluble carbodiimide (Dojindo) in water was added to the emulsified mixture and stirred (600 rpm) for 1 h. Then, 50 ml of 50% (v/v) ethanol was added into the mixture and mixed for 5 min to separate the COLs from the oil phase. The mixture was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min, and the supernatant was discarded. Ethanol (50% v/v) was mixed with the COL pellet, and then the suspension was centrifuged ($3000 \times g$ for 5 min). After removing the supernatant, phosphate-buffered saline (PBS) was mixed with the COL pellet and then the suspension was centrifuged ($3000 \times g$ for 5 min). This procedure was repeated 3 times to remove residual ethanol.

2.2. Preparation of drug formulations

Three formulations that contained the drug mimic, 40-kDa fluorescein isothiocyanate dextran (FD40) plus PBS (F_{sol}), in COLs (F_{col}), or in COLs pelletized with PEGDM (F_{pel}) were prepared. For the preparation of F_{sol} , FD40 (Sigma) was dissolved in PBS at a concentration of 10 mg/ml. For the preparation of F_{col} , PBS solutions of

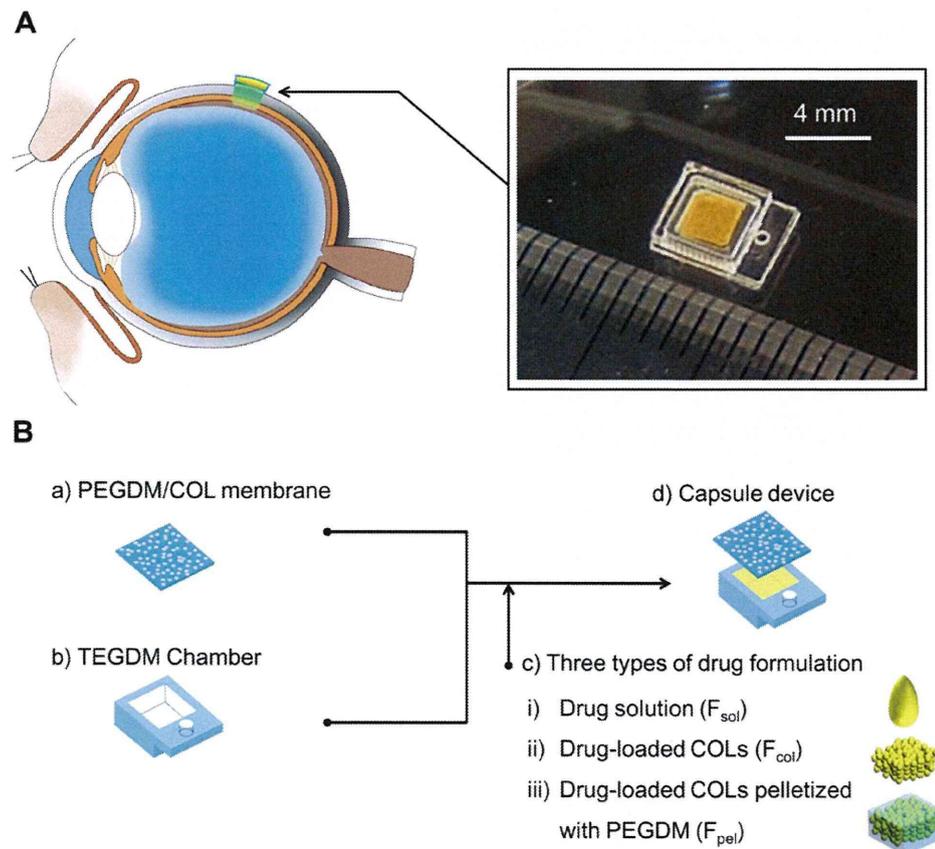


Fig. 1. (A) A transscleral drug-delivery device, designed for the administration of protein-type drugs. The photograph shows a capsule that contained FD40-loaded COLs pelletized with PEGDM and has a hole for suturing the capsule onto the sclera. (B) The capsule consists of a drug reservoir made of TEGDM and a controlled-release membrane made of photopolymerized PEGDM that contains COLs (PEGDM/COL membrane), which are the route for drug permeation. The capsule was designed so that various drug formulations could be contained in the reservoir.

COLs, which were obtained by centrifugation at $3000 \times g$ for 30 min, were stirred in an equal volume of PBS that contained FD40 (20 mg/ml) for 24 h, and then the COLs were washed and centrifuged ($3000 \times g$ for 5 min) three times with PBS. For the preparation of F_{pel} , the FD40-loaded COLs in PBS (20 mg/ml FD40) were mixed with an equal volume of the PEGDM prepolymer and UV cured for 3 min. All drug formulations had the same amount of FD40 (10 mg/ml).

2.3. Fabrication of the capsule

A schematic of the capsule fabrication is shown in Fig. 1B. A polydimethylsiloxane master mold for the reservoir was first fabricated via a micro-fabrication technique that used an AutoCAD design and a micro-processing machine (Micro MC-2, PMT Co.). TEGDM prepolymer (M_w , 286.3; Aldrich) was UV cured in the mold for 3 min and peeled off to obtain a TEGDM reservoir. After loading a drug, the membrane was sealed to the reservoir by UV curing TEGDM prepolymer, which in polymerized form served as the adhesive, for 3 min.

2.4. SEM analysis

Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and dehydrated first with ethanol and, subsequently, with isoamyl acetate. The samples were then dried fully in a critical point dryer (HCP-2; Hitachi Koki), coated with Pt using an ion coater (L350S-C; Anelva), and subjected to SEM. The SEM apparatus (VE-9800; Kyence) was operated at 5–20 kV.

2.5. In vitro release study

Modified Transwells were prepared by replacing their original porous membranes with PEGDM/COL membranes of various compositions (Fig. S2). Each drug formulation (100 μ l) was placed in a Transwell and the complete systems were incubated in 400 μ l of PBS at 37 °C. To estimate the amounts of FD40 that had diffused out of the Transwells, the fluorescent intensities of the PBS solutions were measured spectrofluorometrically (Fluoroscan Ascent; Thermo). For the release study that used recombinant human BDNF (rhBDNF), the capsules (reservoir interior, $5 \times 5 \times 2.2$ mm; capsule exterior, $10 \times 10 \times 2.4$ mm) were each filled with 40 μ l of rhBDNF-loaded COLs in PBS and sealed with a membrane with a COL concentration of 0, 100, 300, or 500 mg/ml, and incubated in 1 ml of PBS at 37 °C. The amount of released rhBDNF was measured using the reagents of a BDNF-ELISA kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Each test result is reported as the mean \pm SD of three samples.

2.6. Western blotting

Immortalized retinal ganglion cells (RGC5 cells; a generous gift from Dr. N. Agarwal, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, TX) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (1 g glucose/l, Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), L-glutamine (4 mM, Gibco), and a penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 mg/ml) solution (Sigma). RGC5 cells were plated into culture dishes (diameter; 60 mm, TPP) at a density of 1×10^4 cells/cm² and incubated in DMEM for 24 h. After starving the cells in DMEM that did not contain FBS (DMEM-f) for 12 h, the cells were exposed to conditioned DMEM-f that contained rhBDNF that had been released from a capsule into the medium (see below) or that had been spiked with rhBDNF (0, 0.1, 1, and 10 ng/ml) for 1 h. Cells were then scraped from the culture support and lysed with the reagents of a ProteoJET Cell Lysis kit (CosmoBio). Protein concentrations were determined using BCA protein assay kit reagents (Pierce). Electrophoresis was performed using 4–15% Tris-glycine gels (Biorad). Proteins were transferred to PVDF membranes using a semidry transferring system (Biorad). The membranes were blocked with 5% ECL blocking agent (GE Healthcare) and then incubated with a primary antibody against phosphorylated MAPK (1:1000; Cell Signaling) and subsequently with the secondary antibody, horseradish peroxidase-linked IgG (1:5000; Cell Signaling). After stripping the membranes of the antibodies for 10 min using the reagents of a Western Re-Probe kit (Jacksun Biotech), the membrane was probed, in a similar manner, for total MAPK (anti-MAPK antibodies, 1:1000; Cell Signaling). Bands were visualized using an enhanced chemiluminescence system (ECL Plus, GE Healthcare). Conditioned media were prepared as follows. Capsules that contained rhBDNF-loaded COLs were incubating in DMEM-f at 37 °C. The medium was replaced with fresh DMEM-f at day 3 and at week 1, 2, 3, and 4.

2.7. Implantation study

We used the eyes of six rabbits, each of which weighed between 1.8 and 2.5 kg. All animals were handled in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research after receiving approval from the Institutional Animal Care and Use Committee of the Tohoku University Environmental & Safety Committee (No.22MdA-220). The rabbits were anesthetized with ketamine hydrochloride (35 mg/kg) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg). Their ocular surfaces were anesthetized with a topical instillation of 0.4% oxybuprocaine hydrochloride. A paralimbal conjunctival incision was made 5–8 mm from the

temporal limbus. The capsules, which were loaded with F_{pel} , were sutured onto the left eyes at the sclerae with 10-0 nylon. The right eyes served as controls. At the third day of implantation, fluorescent images were captured using a handheld retinal camera for fluorescein angiography (Genesis-D, Kowa) to document the fluorescence distributions around the capsules and the sclerae. After implantation for 1 month, capsules from three rabbits were carefully removed and subjected to SEM. For histological examination, the other three rabbits were killed with an overdose of pentobarbital sodium 3 days after implantation, and their eyes were enucleated and frozen immediately in liquid nitrogen. After mounting the cryostat sections in a medium that contained 4,6-diamidino-2-phenylindole (Vectashield, Vector Lab), the distribution of FD40 was observed by fluorescent microscopy (DMI6000B, Leica).

2.8. Statistical analysis

Experimental data are presented as means \pm SDs. The results were evaluated by the Student *t*-test. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Device fabrication

The capsule consists of a separately fabricated PEGDM/COL membrane and a TEGDM reservoir (Fig. 1B). The membrane was prepared by UV curing a mixture of PEGDM and COLs. PEGDM is almost impermeable to macromolecules with molecular weights >40 kDa (see below); therefore, the COLs provide the route for drug permeation. Scanning electron microscopy (SEM) images were acquired to visualize the surfaces of membranes with different COL concentrations. The COLs are the round particles seen in Fig. 2A–C, and the surface density of these particles is proportional to the concentration of COLs in the corresponding unpolymerized PEGDM/COL mixture (Fig. S1). Additionally, cross-sectional SEM images showed the presence of interconnecting COLs when the COL concentration was >300 mg/ml (Fig. 2D–F). The interconnecting COLs increased in density with the concentration of the COLs. Therefore, we assumed that the drug-release rate could be controlled by changing the COL density in the membrane. Because, conventionally, semipermeable membranes are made by forming pores within the membrane i.e., solvent casting/salt leaching [19], phase separation [20], emulsion freeze-drying [21], and bubble formation [22], our method is different and therefore pioneering. For this type of membrane, there is no need to remove remaining porogens (COLs) after polymerization because the COLs act as the route for drug release.

The TEGDM reservoir was microfabricated using a polydimethylsiloxane master mold. Because photopolymerized TEGDM is impermeable to macromolecules (see below), the reservoir is a barrier that forces unidirectional drug release. After loading the drug, the membrane was placed over the reservoir and TEGDM prepolymer was UV cured along the reservoir/membrane intersection to provide a seal. Cross-sectional SEM images indicated that a tight seal was formed (Fig. 2G). The drug mimic, FD40 in PBS, did not leak from a capsule that consisted of a standard TEGDM reservoir and a PEGDM membrane that lacked COLs; therefore, the capsule had been completely sealed. The capsule was designed to contain various drug formulations and dosages. In this study, sustained-release drug formulations were encapsulated to prolong drug release by limiting the rate of drug dissolution within the reservoir (see below).

3.2. Release controllability

To demonstrate that drug release could be controlled by both the membrane and the drug formulation, modified Transwell inserts were each fitted with a membrane of defined COL concentration (Fig. S2) and loaded with one of three formulations: FD40 in PBS (F_{sol} , Fig. 3A), FD40 in COLs (F_{col} , Fig. 3B), or FD40 in COLs

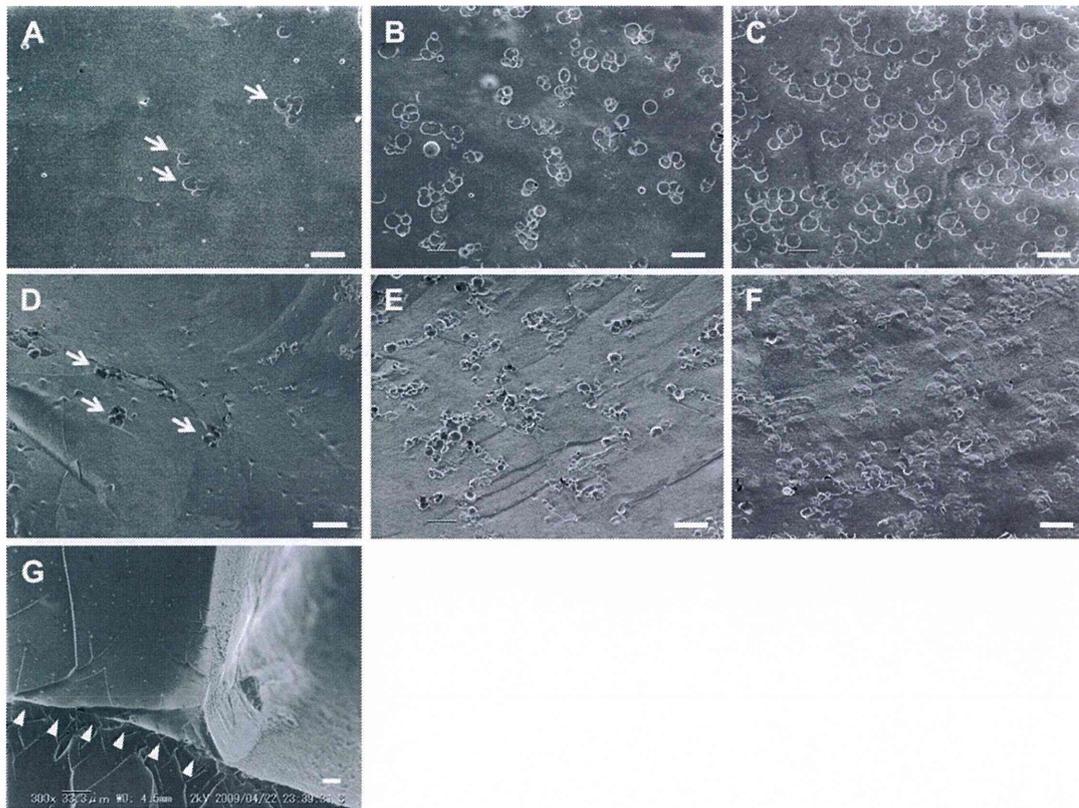


Fig. 2. Representative SEM images of (A–C) the surface and (D–F) cross sections of PEGDM/COL membranes that had COL concentrations of (A, D) 100 mg/ml, (B, E) 300 mg/ml, and (C, F) 500 mg/ml. The COLs are the round particles that form interconnecting structures throughout the membrane. Arrows point to COLs embedded in the membranes. (G) A cross-sectional SEM image of the capsule seal site that shows the formation of a tight seal. Arrowheads point to the seal site between the membrane and the capsule exterior. Bars: 20 μ m.

pelletized with PEGDM (COL/PEGDM pellet) (F_{pel} , Fig. 3C). The COLs and the COL/PEGDM pellets, designed to be sustained-release drug formulations, were suspended in PBS. After placing the Transwells in PBS, FD40 release was monitored by assessing the increase in fluorescence in the external PBS solution with time. The results showed that the release of FD40 was always dependent on the COL concentration (Fig. 3A–C), which indicated that FD40 travelled

through the membrane-embedded COLs. At the COL concentration of 100 mg/ml, the release kinetics was almost the same as the control (0 mg COL/ml). As shown by SEM analysis, almost no interconnected COLs existed in the 100 mg COL/ml membrane. When the membranes had been prepared with a COL concentration of 300 mg/ml, drug release followed zero-order kinetics. Additionally, F_{col} and F_{pel} behaved as sustained-release drug

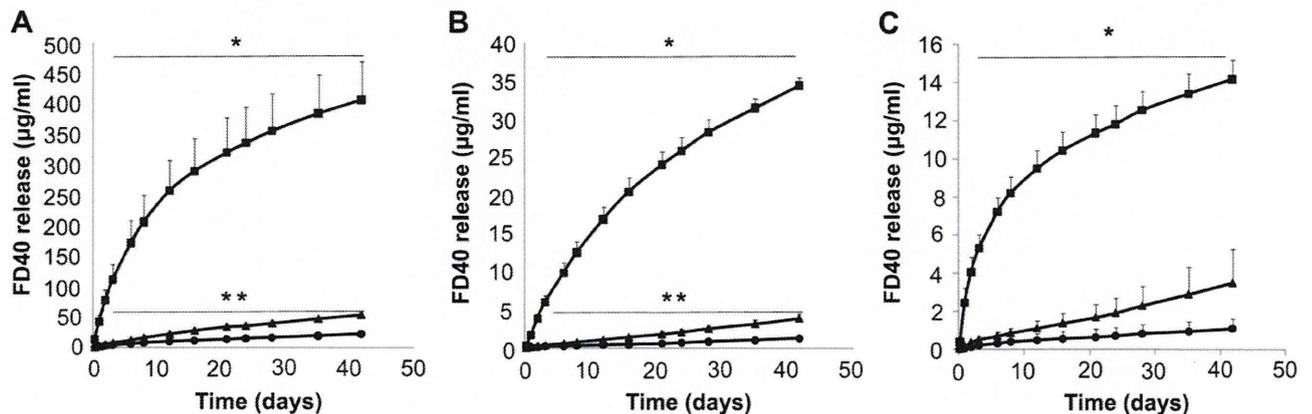


Fig. 3. Release of FD40 *in vitro*. The permeability of FD40 through PEGDM/COL membranes was studied using modified Transwells for which the PEGDM/COL membranes replaced the original Transwell membranes. The dependence of the release kinetics on the initial COL concentration for (A) FD40 in PBS (F_{soi}), (B) FD40-loaded COLs in PBS (F_{col}), and (C) FD40-loaded COLs pelletized with PEGDM in PBS (F_{pel}). The concentrations of the COLs were 100 mg/ml (circles), 300 mg/ml (triangles), and 500 mg/ml (squares). The release rate for FD40 through a membrane that did not contain COLs was almost the same as one that contained COLs at a concentration of 100 mg/ml. Error bars represent the standard deviations of three samples (error bars that are not visible are smaller than the symbols). The Means \pm SDs are shown. * $P < 0.05$ for 300 mg/ml vs. 500 mg/ml ** $P < 0.05$ for 100 mg/ml vs. 300 mg/ml.