

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

重症眼疾患と神経保護治療

研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：

本研究では、ARPE-19 に対して既存薬ライブラリーからスクリーニングを行い、GGA と同等以上の保護効果を示す薬剤がさらに 29 剤あると考えられた。

A．研究目的

本研究では、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドッキングデリバリーシステムを確立することを目的とした。

B．研究方法

すでに臨床薬として承認されている既存薬ライブラリー（1274種：連携研究者の慶應義塾大学、佐谷秀行教授より提供）、および米国でヒト安全性は確立されたが最終的に製薬にならなかった薬剤ライブラリー（1040種：以下US Drug Collection）を用いて、初代培養網膜神経細胞に対して神経保護効果を示す薬剤のスクリーニングを行った。また、ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）を用いて低栄養・虚血負荷に対する保護薬のスクリーニングを行った。

低栄養・虚血負荷に対する網膜色素上皮細胞保護薬の探索

血清、グルコース非含有培地で懸濁した ARPE-19 を 96 ウェルプレートへ播種し、各種薬剤ライブラリーを 10 μ M で投与し、2% 酸素下でインキュベートした。24 時間後に AlamarBlue を用いて細胞増殖アッセイを行った。また、血清、グルコース含有培地を用いて 20% 酸素下でインキュベートしたものをポジティブコントロールとした。

（倫理面への配慮）

本研究で動物実験を行う際は、研究機関内の承認手続きを経てから国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定、ならびに動物の愛護及び管理に関する法律を遵守して厳格に動物実験を行う。また動物実験に関しては、動物の痛みに関する科学的な研究からの認識に加えて倫理的な観点からの苦痛を十分に認識し、その軽減に配慮した。

C．研究結果

低栄養・虚血負荷に対する網膜色素上皮細胞保護薬の探索

低栄養・虚血負荷によって細胞内では小胞体ストレスが誘導されていると推測されるため、小胞体ストレスに有効とされているゲラニルゲラニルアセトン（GGA）を比較対象として用いた。その結果、既存薬ライブラリーの前年度の残り697剤のうち、29 剤がGGAより高い活性を示した。しかし、その中で前年度のヒット化合物であるクロトリマゾールと同等以上の保護効果を示す化合物は見出すことはできなかった。

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療	
研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>D . 考察 今年度は既存薬ライブラリーからのスクリーニングをすべて完了させ、GGAより強い活性を示す薬剤を29剤見出すことができた（昨年までに約200剤あることを報告した）。これらの薬剤の中には前年度のヒット化合物であるクロトリマゾールと同等以上の保護効果を示す化合物は含まれていなかったが、他の網膜細胞に対する毒性試験を行うことでより最適な薬剤が選択できると考えられる。</p> <p>E . 結論 本研究では、2つの化合物ライブラリー（2314剤）からGGAを上回るRPE保護薬を314剤見出した。次年度は、これらの化合物による保護メカニズムの詳細な解明を進めることが重要であると考えられる。</p> <p>F . 健康危険情報 該当なし</p> <p>G . 研究発表 1. 論文発表 Takahashi H, Sugiyama T, Tokushige H ,Maeno T, Nakazawa T, Ikeda T, Araie T Comparison of CCD-equipped laser speckle flowgraphy with hydrogen gas clearance method in the measurement of optic nerve head microcirculation in rabbits Experimental Eye Research. Exp Eye Res. 2013 ;108.</p> <p>Toshio Hisatomi, Shintaro Nakao, Yusuke Murakami, Kousuke Noda, Toru Nakazawa, Shoji Notomi, Edward Connolly, Haicheng She, Lama Almulki, Yasuhiro Ito, Demetrios G. Vavvas, Tatsuro Ishibashi, Joan W. Miller.: The Regulatory Roles of Apoptosis-Inducing Factor in the Formation and Regression Processes of Ocular Neovascularization. The American Journal of Pathology. 2012 ;181(1):53-61.</p>	<p>Shin Takayama, Masashi Watanabe, Hiroko Kusuyama, Satoru Nagase, Takashi Seki, Toru Nakazawa, Nobuo Yaegashi: Evaluation of the Effects of Acupuncture on Blood Flow in Humans with Ultrasound Color Doppler Imaging. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012:513638.</p> <p>Ai Shimizu, Yoshimasa Takano, Dong Shi, Shunji Yokokura, Yu Yokoyama, Xiaodong Zheng, Atsushi shiraishi, Yuichi Ohashi, Toru Nakazawa, Nobuo Fuse. Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. Molecular Vision. 2012;18:1395-1401.</p> <p>Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report. Clin Ophthalmol. 2012;6:1373-1376.</p> <p>Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y, Himori N, Taguchi K, Yasuda M, Watanabe R, Takano J, Saido T, Minegishi N, Miyata T, Abe T, Yamamoto M.. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: The role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. Neurobiol Dis. 2012 Dec;48(3):556-567.</p> <p>Aizawa N, Kunikata H, Abe T, Nakazawa T. Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy. J Cataract Refract Surg. 2012;38(9):1602-1607.</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療	
研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, Fuse N. Association of Toll-like Receptor 4 Gene Polymorphisms in Japanese Subjects With Primary Open-Angle, Normal-Tension, and Exfoliation Glaucoma. <i>Am J Ophthalmol.</i> 2012 ;154(5):825-832.</p> <p>Fuse N, Aizawa N, Yokoyama Y, Nakamura M, Omodaka K, Sado K, Nakazawa T. Analysis of retinal nerve fiber layer thickness in superior segmental optic hypoplasia (SSOH) <i>Nihon Ganka Gakkai Zasshi.</i> 2012 ;116(6):575-580</p> <p>Fukuda M, Yamada M, Kinoshita S, Inatomi T, Ohashi Y, Uno T, Shimazaki J, Satake Y, Maeda N, Hori Y, Nishida K, Kubota A, Nakazawa T, Shimomura Y. Comparison of corneal and aqueous humor penetration of moxifloxacin, gatifloxacin and levofloxacin during keratoplasty. <i>Adv Ther.</i> 2012;29(4):339-49.</p> <p>Maruyama K, Nakazawa T, Cursiefen C, Maruyama Y, Van Rooijen N, D'Amore PA, Kinoshita S.: The maintenance of lymphatic vessels in the cornea is dependent on the presence of macrophages. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2012;53(6):3145-3153.</p> <p>Nakazawa T, Shimura M, Ryu M, Himori N, Nitta F, Omodaka K, Doi H, Yasui T, Fuse N, Nishida K: Progression of visual field defects in eyes with different optic disc appearances in patients with normal tension glaucoma. <i>J Glaucoma.</i> 2012;21(6):426-430.</p>	<p>Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab AY, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, Nakazawa T.: Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. <i>J Neurosci Res.</i> 2012 ;90(4):802-815.</p> <p>Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, Abe T and Nakazawa T. Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. <i>J Cataract Refract Surg.</i> 2012;38(9):1602-1607.</p> <p>Shimura M, Yasuda K, Yasuda M, Nakazawa T. Visual Outcome After Intravitreal bevacizumab depends on the optical coherence tomographic patterns of patterns with diffuse diabetic macular edema. <i>Retina.</i> 2012 Dec 5.</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療 研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>2. 学会発表</p> <p>IMFIA 2012 (International Forum on Medical Imaging in Asia) Fast Registration Algorithm of 3D Optical Coherence Tomography Images Based on En-Face Projection Image</p> <p>韓国老化学会(AACL) The molecular mechanism of glaucomatous optic neuropathy: learning from a mouse model of axonal damage-induced RGC death</p> <p>The 1st Asia-Pacific Glaucoma Congress (APGC2012) Advances in basic sciences: implications for clinical management of glaucoma</p> <p>Expectation of blood flow modification for the treatment of glaucoma: Increased effect of Tafluprost on the ocular circulation</p> <p><u>第116回日本眼科学会総会</u> ・宮城被災地での眼科医療～その後～ ・緑内障と活性酸素 ・眼虚血をターゲットにした緑内障神経保護治療 ・緑内障酸化ストレス仮説</p> <p><u>第29回日本眼循環学会</u> ・強度近視の眼循環 ・眼循環の新しい未来 ・網膜疾患と眼循環の検討</p> <p><u>第23回日本緑内障学会</u> ・The molecular mechanism of GON: learning from a mouse model of axonal damage-induced RGC death ・緑内障進行予測に役立つ基礎知識</p> <p><u>第66回日本臨床眼科学会</u> ・酸化ストレスと眼病態</p>	<p>H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得 ・眼疾患治療用ナノ粒子化製剤 特願2012-213621 出願日：2012年9月27日 ・眼疾患治療に使用する薬剤スクリーニング方法 特願2012-95693 出願日：2012年4月19日</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他 なし</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究

研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授

研究要旨：マウス個体網膜虚血モデルにおいて、内在性神経保護因子 Prothymosin α (ProT α)とその活性フラグメントペプチドの保護効果を組織化学・機能解析にて明らかとした。また、ProT α 受容体の1つである Toll-like Receptor-4 の関与も明らかとした。

A . 研究目的

早期臨床応用を目指した網膜神経保護治療を開発のため、新規候補薬剤の探索を行い、機能評価とその機構を解明することで、新規創薬シーズを提示することを目的とする。

B . 研究方法

B - 1 . 網膜神経保護薬

ProT α は、マウスProT α 遺伝子由来組換えタンパク質を大腸菌株BL21 (DE3)に発現させ、酸性フェノール法で抽出した。抽出物をイオン交換クロマトグラフィーで精製し、大腸菌由来エンドトキシンを親和性クロマトグラフィーで除去した高純度品として調製した。ProT α 活性フラグメントペプチドは、外注にて依頼合成した。

B - 2 . ProT α 活性フラグメントペプチドの同定

ラット17日胚大脳皮質由来神経細胞の初代培養を無血清条件下で培養を行い、急速にネクローシスを誘発するセルベースアッセイを使用した。本モデル実験において、GST融合ラットProT α 、部分欠損変異体による生存活性を評価することで、ProT α の活性ドメイン(30アミノ酸)を同定した。さらに、30アミノ酸のアラニンスキャンニングを行い、活性重要アミノ酸を同定した。

B - 3 . 個体における神経保護効果解析

B - 3 - 1) 実験動物

本実験で使用したC57/BL6J系雄性マウス6~9週齢(19~28 g)は、恒温(22 \pm 2 $^{\circ}$ C)の部屋で12時間毎の昼夜自然管理下において飼育し、水道水及び一般動物用固形飼料を自由に摂取させた。以下に示す全ての実験は、長崎大学動物実験指針で定める方法に準じて行った。

B - 3 - 2) 網膜虚血モデルマウス作製

ペントバルビタール75 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。37 $^{\circ}$ Cの恒温台の上にマウスを置き、体温を維持する。硝子体を1%の硫酸アトロピンで散瞳させ、無菌眼内灌流溶液の容器を予め水面がマウスの眼より135.5 cmの高さになるようにつり上げておき(100 mmHg)、灌流溶液を小児用輸液セットに接続した33Gの注射針を針先から少し垂らしながら前眼房に刺入し固定する。前房に針を刺入した後、灌流系を解放することにより前眼房内に圧力(100 mmHg)を45分間負荷する(マウス正常眼圧は15 mmHg程度)。これらの操作は実体顕微鏡下で行い、眼圧の上昇により網膜虚血が惹起されていることを網膜内血流の遮断を指標に目視にて確認する。虚血負荷終了後に注射針を抜き、眼圧を低下させることにより網膜を再灌流させる。本モデルは虚血-再灌流法を用いた一般的緑内障モデルである。

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究

研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授

B-3-3) 視神経挫滅モデルマウス確立
様々な網膜病態モデルにおいてProTαとその活性フラグメントペプチドの活性を評価することを目的として、視神経挫滅モデルの作製法を確立した。次年度以降に、本モデルにおける活性評価を行う。

B-3-4) 組織化学的評価
標本作製：ペンタバルビタール50 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。心臓からのK⁺ free PBS 40 ml灌流にて脱血し、4% PFA 30 ml灌流にて固定した。眼球を取り出し、室温で3時間、4% PFAで浸漬固定した後、25% スクロース溶液に置換を行った。OCTコンパウンドで包埋後、凍結ミクロトームで10 μM 切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色解析：検体の細胞核をギルヘマトキシリン液にて染色し、組織をエオジン・フロキシリン液にて対比染色を行った。染色網膜組織の厚みを指標として組織障害を評価した。

B-3-5) 網膜機能評価
網膜機能の評価は、網膜電位図 (Electroretinogram: ERG) の測定を用いた。マウスを暗室にて3時間暗順応させた後、ペンタバルビタール50 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。1% アトロピン点眼にて瞳孔を開かせた後、コンタクト電極を角膜先端に設置し、鉄電極を眼近傍に設置した。皮下プラチナ針電極は、腹部に設置した。ERGは日本光電製のSLS-3100にて20 Jの閃光にて誘発させ、MEB-9104 (日本光電) にて2分ごとに30分間計測した。バックグラウンド補正は、通常時の明時における反応を2分ごとに20分間計測したものを使用した。計測されるα、β波の増幅は、Neuropack (日本光電) にて定量した。

(倫理面への配慮)
本申請研究は、その計画内に遺伝子組み換え実験、並びに動物実験を計画している。遺伝子組み換え実験においては、本研究の遂行に必要な十分な遺伝子封じ込めが可能な実験室 (P1、P2レベル) を有しており、安全対策は十分である。動物実験においても、実験動物の適切な飼育環境を整えたと共に、逃亡防止措置など安全対策は万全である。これらの対応に基づき、本研究は、長崎大学組み換えDNA実験安全委員会、及び長崎大学動物実験委員会における承認を得ている。

C. 研究結果

C-1. ProTα活性フラグメントペプチドの神経細胞死保護効果
ネクロトーシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProTαのGST融合部分欠損ProTα、活性ペプチドの保護効果を検討したところ、活性ドメイン (30アミノ酸) を同定することに成功した。さらには、本活性が、より短鎖のペプチド (9アミノ酸) で保持されることを明らかとした。また、網膜虚血モデルにおいても効果を有することを明らかとした。

C-2. ProTαの網膜虚血保護
緑内障モデルである網膜虚血に対してProTαは虚血後24時間後の硝子体内単回投与で組織化学的、網膜機能保護効果を有していることを明らかとした。また、本保護効果は、0.01-1 pmol/μl/eyeで用量依存的であり、0.1 pmol/μl/eyeで十分な保護効果が認められた。

C-3. 活性ペプチドの網膜虚血保護
活性ペプチドも上記のC-2と同様に虚血後24時間後の硝子体内単回投与で保護効果を有していた。本効果も用量依存的であり、10 pmol/μl/eyeでProTα 0.1-1.0 pmol/μl/eye投与と同等の保護効果を有することを見出した。

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究

研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授

C - 4 .ProTαの先制治療効果機構解明

ProTαの先制医療の活用を目的として、網膜虚血2日前単回投与による保護効果を検証した。虚血後投与と比較して部分的ではあるが、有意な保護効果を見出した。本保護効果は、ProTαの細胞膜受容体の1つであるToll-like Receptor-4 (TLR-4)を介することをTLR-4の抗体による機能吸収実験により明らかとした。

D . 考察

マウス網膜虚血モデルにおいて 神経保護効果を有するProTαの活性ペプチドを見出した。ProTα は虚血処置の前投与でも部分的保護効果を有しており、標的受容体がTLR-4である可能性を明らかにした。網膜疾患の多くが加齢に伴い慢性の経過をとることから、本保護機構の応用は疾患の予防と慢性化を防ぐ先制医療に繋がると考える。一方、ProTα、並びに活性ペプチドは虚血後の24時間投与で完全な保護効果を示した。本保護効果は、TLR-4とは異なる新たなProTα受容体を介する可能性がある。平成24年度からは、この詳細なメカニズム解析を行うとともに、ProTαによる神経新生との関連を検討し、併せて視神経挫滅モデルや細胞レベルでの加齢性黄斑変性症に関連したモデル実験を行い、効果が確認されたときには強膜への薬物送達デバイスを用いた研究に発展させる。

E . 結論

本研究では、網膜保護新規候補分子としてProTα、並びに活性ペプチドの有効性を見出した。また、網膜虚血モデルにおける先制治療において、TLR-4が創薬標的となる可能性を提示した。これらの研究成果は、新規の網膜保護候補薬剤の開発に繋がることが大いに期待される。

F . 健康危険情報
該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, **Ueda H** (2013) Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* in press.

Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, **Ueda H** (2013) Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* in press.

Halder SK, **Ueda H**, Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. *Cell Mol Neurobiol* 32:59-66,2012.

Halder SK, Matsunaga H, **Ueda H**, Neuron-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. *J Neurochem* 123:262-275,2012.

Ueda H, Matsunaga H, Halder SK, Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1269:34-43,2012.

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究</p> <p>研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授</p>	
<p>2. 学会発表 <u>Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease</u> ‘Prothymosin alha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system’ March 14-16, 2012, Washington,D.C.</p> <p>H . 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得 該当無し</p> <p>2. 実用新案登録 該当無し</p> <p>3. その他 該当無し</p>	

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教</p>	
<p>研究要旨： 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。分担研究として H24 年度は、既存薬ライブラリーで網膜保護効果の可能性を示したクロトリマゾールの徐放デバイス化を検討した。また、クロトリマゾールの薬効および細胞保護メカニズムをラット不死化網膜細胞の培養によって検討した。その結果、クロトリマゾールの徐放化では、昨年度報告したタンパク質等の高分子薬物の徐放制御に用いた PEGDM/コラーゲン粒子システムを改良した PEGDM/TEGDM システムで徐放制御できることを見出した。また、クロトリマゾールの薬効では、10 μM から 50 μM において Dose-dependent に低酸素・低栄養培養に対して保護効果を示すことがわかった。また、メカニズムについては、Reactive oxygen species（ROS）の産生がクロトリマゾールによって抑制されていることがわかった。</p>	
<p>A . 研究目的 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。分担研究として H24 年度は、既存薬ライブラリーで網膜保護効果の可能性を示したクロトリマゾールの徐放デバイス化を検討した。また、クロトリマゾールの薬効および細胞保護メカニズムをラット不死化網膜細胞の培養によって検討した。 クロトリマゾールは低分子化合物であるため、昨年度報告したタンパク質等の高分子化合物の徐放制御システム（PEGDM/コラーゲン微粒子）では薬物透過が早く、別の制御システムを検討した。TEGDM が低分子化合物を透過させない性質を利用し、PEGDM と TEGDM の混合システムによって、低分子化合物を徐放制御する方法を検討した。</p>	<p>昨年度のスクリーニングによってクロトリマゾールを見出したが、薬効は 10 μM のみで検討していたため、薬効の詳細な検討を行った。細胞はラット不死化網膜神経節細胞（RGC5）とラット不死化網膜色素上皮細胞（RPE-J）を使用した。 さらにクロトリマゾールの細胞保護メカニズムの検討として、Reactive oxygen species（ROS）の産生を評価した。ROS 産生の増加は虚血性疾患に見られる細胞反応の 1 つである。酸化ストレスとして細胞を障害し、細胞をアポトーシスに誘導することが知られている。この ROS 産生を薬剤が抑制していれば、細胞保護のメカニズムとして評価できる。今回は ROS の評価として、Tali システムを利用した。Tali は In vitro 製剤の Image-based cytometer である。ROS 検出液で処理した細胞懸濁液を専用のスライドにキャストし、分散した細胞の画像を取得し、ROS-positive の蛍光標識細胞数を Hemocytometer の要領で自動的にカウントする。ROS-negative の細胞数と比較して、ROS 産生細胞の割合を測定した。</p>
<p>- 16 -</p>	

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教	
<p>B . 研究方法</p> <p>1 . クロトリマゾールの徐放デバイス化</p> <p>1 - 1 . デバイスの作製</p> <p>薬物リザーバーの作成は、3D CAD(comp uter assisted drawing)で鋳型の設計図を作成し、それを「小型NC微細加工機Micro M C-2(株式会社PMT)」へ取り込み、アクリル樹脂に掘り込んだ。それからその型を、フルオロシアンでコートし実際に使用する鋳型とした。その鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone 10μlを混合したプレポリマーを流しUV架橋(25mW/cm² - 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。作成したリザーバーのサイズは内径、縦7mm×横7mm×高さ2mm、薬剤充填部容量は9μlである。徐放制御システムとして、PEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone 10μlを混合したPEGDMプレポリマーに、TEGDMを混合(0~100%(v/v))したものを使用した。リザーバーにクロトリマゾールをPEGDM/TEGDMでペレット化したものを充填後、薬剤上にPEGDM/TEGDMをキャストし、UV架橋によって薬剤をカバーしてカプセルを作製した。</p> <p>1 - 2 . HPLCによる徐放量の測定</p> <p>デバイスをPBSに浸漬し、37 でインキュベートした。定期的にPBSを回収し、新しいPBSに置換した。回収のタイミングはクロトリマゾールがPBSに飽和しないように行った。HPLCは島津のProminenceシステムを用いた。あらかじめ検量線を作成し、PBSに放出されたクロトリマゾール量を定量した。</p>	<p>2 . クロトリマゾールの薬効</p> <p>2 - 1 . 細胞培養</p> <p>96ウェルプレートにRGC5およびRPE-Jを播種し、2日間培養した後、クロトリマゾール含有培地 (DMEM) に交換した。クロトリマゾールはあらかじめ0.03% DMSOに溶解して培地に添加した。1日培養後、クロトリマゾール含有の低酸素 (2% O₂) ・低栄養 (グルコース0~2.8mM) 培地に交換し、低酸素インキュベーター(2% O₂) で培養した。1日後、MTS法によって細胞数を評価した。</p> <p>2 - 2 . ROS assay</p> <p>6センチ培養皿にRGC5を播種し、2日間培養した後、2 - 1 と同様の低酸素負荷培養を行った。細胞をトリプシン処理で回収し、CellROX orange (In vitrogen) を添加し30分インキュベーションした。Taliシステム専用スライドプレートに10 μLの細胞懸濁液をアプライし、TaliシステムでROS-positive細胞の検出を行った。コントロールとして、低酸素負荷を行っていないRGC5を準備し、TaliシステムでROS-positive細胞のスレショールドラインを引いた。これより高い蛍光値を示した細胞をROS-positiveと決めた。</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教

C . 研究結果

1 . クロトリマゾールのIn vitro徐放性
クロトリマゾールをPEGDM/TEGDM = 60%/40% (P60と略す) でペレット化し、リザーバーに充填し、PEGDM/TEGDM=40%/60% (P40と略す) とP60の2種類でカバーをした。コントロールとして、カバーなしを作成した。放出量を累積したグラフをFig.1に示す。カバーなしのサンプル (Pellet) は最初の数日でクロトリマゾールが大量に放出され (初期バースト)、その後一定の放出を認めた。一方、カバーをしたサンプルは初期バーストが抑制され、常に一定の放出量を保っていた。また、1日当たりの放出量は、P60>P40となり、カバー中のPEGDM比の減少と対応して、放出量が減少していた。

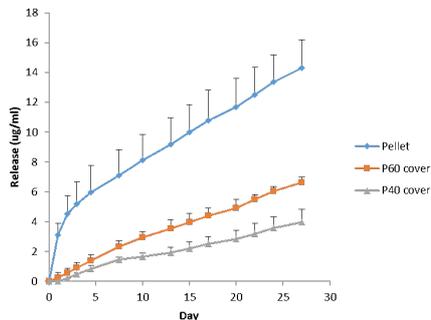


Fig.1 クロトリマゾールの放出曲線

2 . クロトリマゾールの薬効

2 - 1 . 増殖アッセイ (MTS法)

RGC5への低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD)、2.8mM : Oxygen-glucose deprivation (ODD)) を使用した。RGC-5の増殖アッセイの結果、ODとODD条件とともに、クロトリマゾール添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、クロトリマゾールが10 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。また、ODD条件では、5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。

RPE-Jへの低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD)、0mM : Oxygen-glucose deprivation (OGD)) を使用した。RPE-Jの増殖アッセイの結果、RGC-5と同様にクロトリマゾール添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、クロトリマゾールが5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。また、ODD条件では、5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。

2 - 2 . ROS assay

RGC-5の低酸素・低栄養培養 (ODDおよびOD) におけるROSアッセイを行った。その結果、ODD条件では、クロトリマゾールの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した (Fig2A)。また、OD条件においても同様に、クロトリマゾールの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した (Fig2B)。

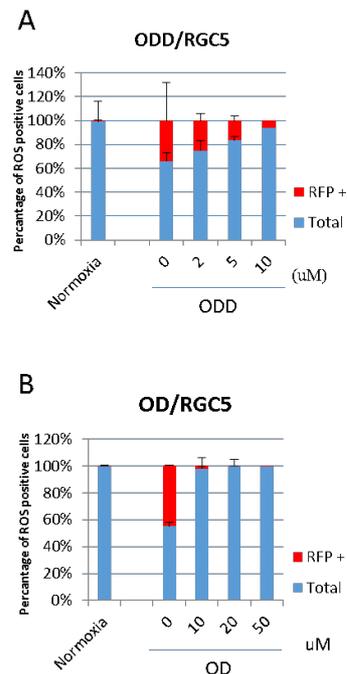


Fig.2 ROS assay

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教	
<p>D．考察 クロトリマゾールはイミダゾール系の抗真菌薬であり、皮膚真菌症の治療に使われている。今回、網膜神経節細胞と網膜色素上皮細胞の低酸素・低栄養負荷培養に対して、10 μMから50 μMの範囲でDose-dependentに細胞保護作用を示すことがわかった。さらにクロトリマゾールは低酸素・低栄養負荷培養で産生するROSを抑制する可能性を示した。また、デバイス化によってクロトリマゾールの徐放が可能であることを示した。</p> <p>これらの結果は、クロトリマゾールの網膜保護剤としての新規薬効を示しており、さらに徐放デバイス化によって、投与量を調整して副作用を抑制できる可能性があり、眼疾患への適用可能性を示している。</p> <p>E．結論 クロトリマゾールの網膜保護剤としての可能性を示した。</p> <p>F．健康危険情報 該当なし</p>	<p>G．研究発表</p> <p>1. 論文発表</p> <ol style="list-style-type: none"> Hideyuki Onami,[†] Nobuhiro Nagai,[†] Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe ([†]equal contribution). "Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally induced choroidal neovascularization" PLoS ONE, 8(3), e58580, (2013). Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes" RETINA The Journal of Retinal and Vitreous Diseases, 32(6), 1204-1213 (2012). Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium" Adv Exp Med Biol, 723, 305-310 (2012).

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教</p>	
<p>2. 学会発表 (国際学会発表)</p> <p>1. Toshiaki Abe, Yumi Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Nobuhiro Nagai “Intra-scleral transplantation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure” <i>RD2012 XV International Symposium on Retinal Degeneration, Bad Gogging, Bavaria, Germany</i> (July 16-21, 2012)</p> <p>2. Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Machiko Sato, Yumi Ishikawa, Toru Nakazawa, Matsuhiko Nishizawa, and Toshiaki Abe “Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Light-induced Retinal Damage in Rats” <i>2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida</i> (May 6-10, 2012)</p> <p>3. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Ryosuke Wakusawa, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Toru Nakazawa, and Toshiaki Abe “Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device” <i>2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida</i> (May 6-10, 2012)</p>	<p>(国内学会発表)</p> <p>1. 永井展裕:「薬剤徐放デバイスの作製と経強膜投与による網膜保護」第 5 回 RRM (Retina Research Meeting) 東京医療センター (2012 年 12 月 8 日)</p> <p>2. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、阿部俊明:「経強膜マルチドラッグ徐放デバイスの作製と網膜保護効果の検討」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター (2012 年 11 月 26-27 日)</p> <p>3. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、阿部俊明:「薬物徐放デバイスの作製と網膜光障害モデルに対する網膜保護効果の検討」第 32 回日本眼薬理学会学術集会、ピアザ淡海 (2012 年 9 月 15 日 ~ 16 日)</p> <p>4. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、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 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター (2012 年 7 月 4 日 ~ 5 日)</p> <p>5. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明:「分子徐放デバイス作製と網膜保護」第 63 回東北臨床超微形態懇話会、東北大学医学部 (2012 年 6 月 28 日)</p> <p>6. 永井展裕:「経強膜ドラッグデリバリーによる網膜保護の試み」2011 年度視覚先端医療学講座報告会 (2012 年 4 月 9 日)</p>
<p>- 20 -</p>	

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教	
7. 永井展裕 、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、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ドラッグデリバリーデバイスの網膜保護効果」第16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012年4月5日～8日） 8. 大浪英之、 永井展裕 、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：「経強膜 vasohibin 徐放デバイスによるラット脈絡膜新生血管抑制」第16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012年4月5日～8日） H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。） 1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし	

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授</p>	
<p>研究要旨： 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。分担研究として H24 年度は前年度から引き続き、将来的に人に応用するための検討として、微細加工法によるデバイス形状の最適化方法を検討した。また、網膜変性モデル動物としてウサギを使用するため、ウサギ眼用デバイスの作成を検討した。また、強膜上に固定するデザインを検討した。その結果、ウサギ眼に移植可能なデバイスを作成し、薬剤徐放部分が黄斑部まで届いていることを確認した。また、デバイスに溝をつけることで、縫合系によって強膜上に固定できることがわかった。</p>	
<p>A．研究目的 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。将来的に人に応用するための検討として、微細加工法によってデバイス形状を最適化する方法を検討した。また、網膜変性モデル動物としてウサギを使用するため、ウサギ眼用デバイスの作成を検討した。また、強膜上へのデバイス固定方法を検討した。 微細加工は切削装置のMicroMC-2(PMT Co.)を使用した。これはマイクロ単位でアクリル板上にCAD(Computer aided design)でデザインした設計図を切削することができる。デバイスの形状をCADで作製し、アクリル板に掘って鋳型を作製し、これをもとにPDMS（ポリジメチルシロキサン）に鋳型を転写し、この2次鋳型を用いて、DDSの基材であるPEGDM(ポリエチレングリコールジメタクリレート)を光重合し、デバイスを作製している。</p>	<p>B．研究方法 1．デバイス作製用PDMS鋳型の作製 アクリル板にデバイスのリザーバー形状を切削した。このアクリル板にPDMSを乗せ、60℃でPDMSを硬化し、リザーバー形状をPDMSに転写した。このPDMSをシラン化処理した。以下、シラン化処理を示す。PDMSをエタノール、蒸留水の順で10分間ずつ超音波洗浄し、オープンで乾燥した。プラズマアッシャー（YHS-R）で30秒間酸素プラズマ処理を施した。プラズマ処理したPDMSをシャーレに置き、ドラフト内でシラン（1H,1H,2H,2H-PERFLUOROCTYLTRICHLOROSILANE、WAKO）を2ヶ所に2 μlずつPDMSに付かないように垂らし、ふたをして1時間以上静置した。 シラン化処理したPDMS上に別のPDMSを乗せて、60℃で硬化した。このPDMS鋳型が最終形である。</p> <p>2．デバイス（リザーバー）の作製 PDMS鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone 10μlを混合したプレポリマーを流し、UV架橋(25mW/cm² - 3 min [SEN LIGHTS CORP])した。</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授

3. ウサギ眼への移植

白色ウサギの強膜上にデバイス移植し縫合した。定期的に眼底検査を行い、眼内への副作用を検討した。

（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. デバイス鋳型の作製

CADを利用して、デバイス(リザーバー)鋳型を設計した。直径2センチの球にフィットするようにデザインした。リザーバーは20 μ Lの薬剤ペレットが詰めることができるようにデザインした。また、強膜上に挿入する際に周囲の組織に傷をつけないように、デバイス先端は角のないサークル形状にデザインした。また、デバイスを強膜上に固定するために、縫合糸を引っ掛けるための溝を設計した。昨年度からのデバイス形状の変更点として、眼球周囲組織により影響の少ない流線型デザインを設計した (Fig.1A)。これは、デバイス後端部 (Fig.1A左側) が徐々に厚みが薄くなる形状を有している。また、縫合糸を引っ掛ける構造として、横に4つの溝を設けるデザイン (Fig.1A) と、デバイス後端上方に2本の溝を設けるデザインを設計した (Fig.1B、赤矢印)。

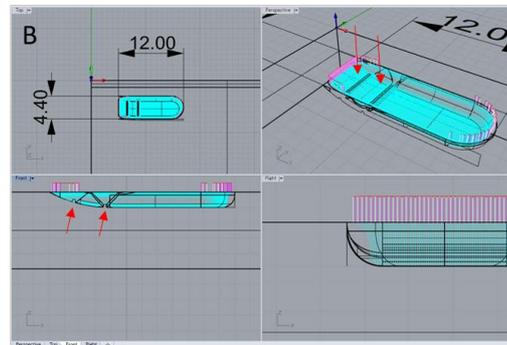
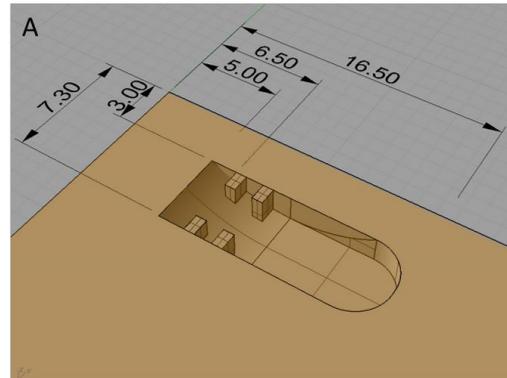


Fig.1 デバイスのCADデザイン (A:流線型デザイン、B:新規縫合溝デザイン)

2. ウサギ眼への移植検討

ウサギ眼へ移植した結果、リザーバーの薬剤徐放部分は後眼部に届いていることがわかった (Fig.2)。また、ウサギ眼の局面にしっかりフィットしていることを確認した。

また、強膜への固定用にデザインした2本の溝に縫合糸がしっかり引っかかり、デバイスが強膜上に固定されていた (Fig.2B、矢印)。

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授

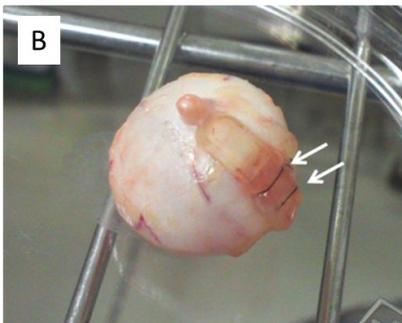
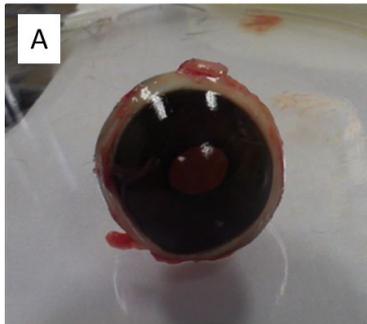


Fig.2 . デバイス移植後のウサギ眼

D . 考察

網膜疾患治療では、黄斑部周囲に薬剤を届ける必要があるため、できるだけ後眼部へデバイスのリザーバー部位を挿入する必要がある。また、徐放面が強膜に密着しなければ、Fibrosisが徐放面に侵入し薬剤が吸収されたり、デバイスと強膜の間から薬剤が逃げて結膜へ吸収され、薬剤送達効率が悪くなる可能性がある。今回のプロトタイプでは、縫合糸による強膜上への固定が可能となり、強膜への密着が強化された。

今後はモデルドラッグで眼内への移行性、薬物分布を評価し、移行が確認できたら、実際の薬物で網膜変性動物に移植し、治療効果を確認していく。

E . 結論

ウサギ眼用のデバイス形状を作成した。今後は網膜変性ウサギへ移植し、治療効果を見る検討を行う。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, **Matsuhiko Nishizawa**, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe (†equal contribution). “Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally induced choroidal neovascularization” *PLoS ONE*, **8(3)**, e58580, (2013).
2. Takeo Miyake, Keigo Haneda, Syuhei Yoshino and Matsuhiko Nishizawa, Flexible, Layered Biofuel Cells. *Biosensors and Bioelectronics*, **40** (2013) 45-49.
3. Syuhei Yoshino, Takeo Miyake, Takeo Yamada, Kenji Hata and Matsuhiko Nishizawa. Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes *Advanced Energy Materials*, **3** (2013) 60-64.
4. Nagamine K, Kawashima T, Sekine S, Ido Y, Kanzaki M, **Nishizawa M**. Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet. *Lab Chip*;11:513-517, 2012.
5. Ido Y, Takahashi D, Sasaki M, Nagamine K, Miyake T, Jasinski P, **Nishizawa M**. Conducting Polymer Microelectrodes Anchored to Hydrogel Films. *ACS Macro Let*;1:400-403, 2012.
6. Haneda K, Yoshino S, Ofuji T, Miyake T, **Nishizawa M**. Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified Nanoengineered Carbon Fabric. *Electrochim. Acta*;82:175-178, 2012.
7. Nagamine K, Ito K, Takeda M, Otani S, **Nishizawa M**. An Oxygen Responsive Microparticles Patterned Hydrogel Sheet for Enzyme Activity Imaging. *Electrochemistry*;80:318-320, 2012.

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
<p style="text-align: center;">新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p style="text-align: center;">研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授</p>	
<p>2. 学会発表 (国際学会発表)</p> <p>1. M. Nishizawa, K. Nagamine, T. Miyake and H. Kaji “Microfabricated Miniature Biofuel Cells with Nanoengineered Enzyme Electrodes” IUMRS-International Conference on Electronic Materials, Yokohama (Sept.24.2012)</p> <p>2. Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Machiko Sato, Yumi Ishikawa, Toru Nakazawa, <u>Matsuhiko Nishizawa</u>, and Toshiaki Abe “Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Light-induced Retinal Damage in Rats” 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 6-10, 2012)</p> <p>3. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Ryosuke Wakusawa, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yumi Ishikawa, <u>Matsuhiko Nishizawa</u>, Yasufumi Sato, Toru Nakazawa, and Toshiaki Abe “Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device” 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida (May 6-10, 2012)</p> <p>4. M. Nishizawa, S. Yoshino and T. Miyake, “Enzyme-CNT Ensemble Films for Miniature Biological Fuel Cells” Biosensors 2012, Mexico (May 18.2012)</p> <p>5. M. Nishizawa, Y. Ido, D. Takahashi, T. Miyake and K. Nagamine, “Conducting Polymer Microelectrodes Printed on Soft, Moist Hydrogels for Effective Stimulation of Muscular and Neuronal Cells” 2012 MRS Spring Meeting, San Francisco (April 11, 2012)</p>	<p>6. M. Nishizawa, S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada and K. Hata, “Enzyme-Carbon Nanotube Ensemble Films for Biofuel Cells”, 2012 MRS Spring Meeting, San Francisco (April 10, 2012)</p> <p>(国内学会発表)</p> <p>1. <u>西澤松彦</u>: 「シート状バイオ発電システム」日本化学会 93 春季年会 (京都) 平成 25 年 3 月 22 日</p> <p>2. <u>西澤松彦</u>: 「ハイドロゲルへの電極形成と応用」第 27 回エレクトロニクス実装学会 (仙台) 平成 25 年 3 月 15 日</p> <p>3. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、<u>西澤松彦</u>、阿部俊明: 「経強膜マルチドラッグ徐放デバイスの作製と網膜保護効果の検討」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター (2012 年 11 月 26-27 日)</p> <p>4. <u>西澤松彦</u>、長峯 邦明、梶 弘和、神崎展: 「マイクロ電極システムによる培養細胞運動アッセイ」第 29 回医用高分子研究会 (つくば) 平成 24 年 11 月 20 日</p> <p>5. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、<u>西澤松彦</u>、阿部俊明: 「薬物徐放デバイスの作製と網膜光障害モデルに対する網膜保護効果の検討」第 32 回日本眼薬理学会学術集会、ピアザ淡海 (2012 年 9 月 15 日 ~ 16 日)</p> <p>6. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、<u>西澤松彦</u>、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 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター (2012 年 7 月 4 日 ~ 5 日)</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授	
<p>7. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：「分子徐放デバイス作製と網膜保護」第63回東北臨床超微形態懇話会、東北大学医学部（2012年6月28日）</p> <p>8. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、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ドラッグデリバリーデバイスの網膜保護効果」第16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012年4月5日～8日）</p> <p>9. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：「経強膜 vasohibin 徐放デバイスによるラット脈絡膜新生血管抑制」第16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012年4月5日～8日）</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得 なし</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他 なし</p>	