

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

網膜色素変性治療をめざした経強膜ウノプロストン
徐放法の開発に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

平成25（2013）年 5月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告		
網膜色素変性治療をめざした経強膜ウノプロストン徐放法 の開発に関する研究	-----	1
阿部俊明		
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	-----	9
西澤松彦		
2. ウノプロストンの徐放と薬効評価に関する研究	-----	13
永井展裕		
3. 動物実験によるデバイスの評価に関する研究	-----	22
大浪英之		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）研究事業）
（総括）研究報告書

ウノプロストンの徐放と薬効評価に関する研究

研究代表者 阿部 俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

我々は分子量にかかわらず初期バーストなしに安全性が高く、長期間、網膜に薬剤徐放可能なデバイスを開発した。今回はこのデバイスに緑内障薬として点眼で使用されているウノプロストン（UNO）を組み込み、網膜色素変性治療の非臨床 POC 取得を目指す。UNO は BK チャンネル活性化と細胞内カルシウム濃度感知による神経保護が知られており、網膜変性の抑制が報告されている。まず網膜光障害と遺伝性網膜変性動物（S334ter ラット）での効果について検討した。網膜変性原因が異なるが、ともにコントロールに比較して有意に網膜保護効果が見られた。さらに薬剤の眼内移行について、ウサギで専用デバイスを作成して検討した。移植 1、4、8 日後のウサギ眼を摘出し、網膜と血漿から LC/MS/MS で UNO 含有量を測定した結果、UNO 活性体（M1）の網膜内量が測定でき、点眼より多い量が持続的に網膜で確認され、また血漿中の最大量はむしろ点眼より低い傾向であった。In vitro でのデバイス素材の細胞毒性は見られていない。また、局所刺激試験と毒性試験を行ったが、予定デバイスの最大徐放による局所の毒性と全身毒性は見られなかった。今年度の使用でデバイスの歩留まり率 100%の作製条件は、デバイスは TEG100%、薬剤徐放膜・薬剤ペレット化は PEG/TEG40%でウノプロストン濃度は最大 500mg/ml と考えられた。

A. 研究目的

失明疾患の上位は網膜疾患が占める。網膜疾患は高齢者に多いため、超高齢化社会を迎えた日本では有効な治療法のない難治性網膜疾患が更に増加すると考えられる。近年、血管新生を伴う網膜疾患に対し薬剤の硝子体内注射が有効であることが判明し、網膜疾患も薬剤治療の対象と考えられるようになった。しかし頻回な硝子体内（眼内）注射は合併症や眼に注射を受け続けることへの心的負担、高い医療費等が問題となっている。仮に有効な薬剤が発見されても慢性の経過をとる網膜疾患に対して現状の眼内投与方法では実用化が難しい。点眼では網膜に薬物が十分に移行しない

ため網膜への薬剤徐放の工夫がこれまで報告されてきたが実用的なものはない。一方我々は分子量にかかわらず初期バーストなしに長期間、網膜に薬剤徐放可能なデバイスを開発した。デバイス移植は眼内ではなく結膜下（強膜上）であるため安全性も高く、問題が生じた場合はすぐに摘出できる。高齢者は点眼を忘れがちであるなどの問題点も解決し、適切な薬剤さえあれば様々な網膜疾患や眼疾患以外にも利用できる利点がある。特許公開中であり今回はこのデバイスに BK チャンネル活性化による網膜保護の可能性が報告された緑内障薬ウノプロストン（UNO）をデバイス化して、強膜上から安全に持続的に徐放し網膜色素変性の

進行抑制を目指す。網膜色素変性は厚生省特定疾患に指定されている難治性網膜疾患でいまだ治療法がないオーファン病であるが企業アライアンスで非臨床 POC 取得し、治験開始をめざす。

B. 研究方法

全体計画として 24 年度は毒性・局所刺激試験、ADME（吸収・分布・代謝）試験を開始し網膜変性動物モデルで効果を確認し、デバイス規格を決定する。25 年度以降は 24 年度の継続をして非臨床 POC 取得めざし、27 年度は医師（企業）治験を開始する。東北大学内臨床研究推進センターと拠点内専門家、治験センター、倫理委員会、PMDA より評価を受ける。

まず 24 年度は研究機関、分担機関は企業、臨床研究推進センター内プロジェクトマネージャーと研究全体の打ち合わせを行って以下を開始した。

- ① デバイス規格決定（阿部、永井、西澤）：デバイスからのウノプロストンの徐放量等はほぼ決定しているが、歩度まりを 100%にできる条件を探す。
- ② 毒性試験、局所刺激試験、ADME（吸収・分布・代謝）試験：これらの一部は外部委託になり今回の研究費の申請の一部に組み入れた。
- ③ 薬効試験、安全性試験は組織学的検査や網膜機能測定（網膜電図、行動検査）などで評価した。網膜変性抑制の薬効は光障害網膜変性と遺伝子変異網膜変性モデル（S334terSD ラット）で検討した。網膜変性の機序はともに異なると考えられる。さら

に眼球や網膜構造が小動物とは異なる大型動物として遺ウサギでの検討を予定し本デバイスのヒトへの効能確認に近づける。ウサギは 25 年度に予定している網膜変性ウサギでの効果確認にも利用予定である（阿部、永井、大浪）。

（倫理面への配慮）

24 年度内にヒトへの応用はないが動物実験に関しては、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。

C. 研究結果

- 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。3DCAD システム、ポリジメチルシロキサンを利用した鋳型作製から、PEG/TEG を使用したデバイスの作製をおこなった。薬剤 UNO のペレット化は PEGTEG の混合プレポリマーに混合して作製した。これらの PEGTEG の割合は 0 - 100% まで変化させ、薬剤濃度も最大 1000mg まで行った。それぞれの基材濃度、加熱率、薬剤濃度などを考慮・検討した結果、歩留まり率 100% の作製条件は、In vitro での測定であるが、最大徐放量は PEG/TEG40% で UNO 濃度は最大 500mg/ml であると考えられた（動物による違いも考慮して今後も微調整は続く）。

- ② 非臨床試験の推進：

1. デバイスの移植に特殊な手技は必要としなかった。移植後のデバイスは時にマイルドな 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。下記するが検眼鏡的異常や網膜電図での異常も見られなかった。デバイス除去後の強膜はネクロシス等の異常は見られなかった（ラット、ウサギ）。

2. 強膜上から UNO を徐放することによる網膜への影響を確認した。まず正常 SD ラットへの移植では移植 4 週間目まで定期的に網膜電図（ERG）を評価した。ERG 以外に、組織学的検査（光干渉断層）で確認した。その結果、未処理群やプラセボデバイス移植群と比較して、UNO 徐放デバイス群では ERG の a,b 波振幅値や潜時に変化はなく、網膜機能の変化はないと推定された。同様のことはウサギでも確認した。白色ウサギへの移植では移植 5 か月目まで評価したが、ラットと同様に未処理群やプラセボデバイス移植群と比較して、UNO 徐放デバイス群では ERG の a,b 波振幅値や潜時に変化はなく、網膜機能の変化はないと推定された。

3. UNO の細胞保護効果を培養細胞（RGC5 および RPEJ）の低酸素・低栄養負荷培養で検討した。細胞増殖検査（MTS）で検討すると、どちらの細胞も濃度依存性に細胞保護効果が見られた。この時、活性酸素（ROS）濃度測定を行うと有意に ROS 産生が抑制されていた。

4. 網膜光障害モデルでの検討。ERG、組織学的検査、アポトーシス検査で UNO 徐放デバイス移植は非治療群や UNO 非徐放群

と比較して有意に網膜保護効果が確認された。すなわちコントロールの UNO 非徐放デバイス移植群では、光障害によって a 波、b 波ともに 7 割以上低下した。一方、UNO デバイスでは、UNO 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、UNO 放出の少ない徐放膜のデバイスでは波形値低下の抑制は見られなかった。また、ERG 後に摘出した眼球の組織標本を評価した結果、UNO デバイス群では ONL 厚みがコントロールと比較して維持されていた。また、TUNEL 染色の結果、UNO デバイス移植群では、TUNEL-positive（アポトーシス）細胞数が少なかった。

5. 遺伝性網膜障害（S334ter ラット）での網膜保護効果を確認した。光障害モデルと同様の評価項目で検討した。移植後 4 週まで毎週 ERG を測定したが、UNO 徐放デバイス移植群は非治療群や UNO 非徐放デバイス移植群と比較して有意に網膜保護効果が確認された。

すなわち 1 週、4 週後ともに後に、未処置群と比較して UNO デバイス移植群は有意に ERG 振幅値が維持されていた。また、UNO 硝子体注射群も維持されていた。一方、点眼群では保護効果は認めなかった。

③ウサギ網膜へのウノプロストンの薬剤移行確認（7日間デバイス留置による検討で Day2,4,8 に網膜と血漿中の UNO を測定し、点眼最終日のものと比較した）。UNO は LS/MS/MS で網膜と血漿より活性体を直接測定した。網膜内濃度は点眼群で 30 分後が

最大で 16.8ng/g でそれ以外の時間ではほとんど測定できず、デバイス移植は平均最大で 461ng/g (43-1080) で 7 日間持続していた。血漿は点眼を使用した場合、最大 30 分後で 13.0ng/mL、デバイスで最大 8.39ng/mL であった。AUC の検討からウノプロストンの網膜移行 (網膜内 AUC/血漿 AUC : 38.0) は点眼 (0.68) に比較して血漿に対する比が約 56 倍であると考えられた。

④non-GLP 局所刺激試験を行い、28 日間デバイス留置による眼局所毒性と全身毒性検査を行い、毒性のないことを確認した。UNO 徐放デバイスは 1 マイクロ/日 (デバイス-1 群)、11 マイクロ/日徐放 (デバイス-11 群) の 2 種類で UNO 徐放なしのデバイス移植 (0 群)、非治療群 (sham 群) と比較した。その結果、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、それぞれの群とも差は認められなかった。眼科学的検査では、前眼部刺激症状において、Sham 群に留置後 1 週まで、薬物徐放デバイス-0 群及び薬物徐放デバイス-1 群に留置後 2 週まで、結膜の発赤など変化が認められた。一方、薬物徐放デバイス-11 群では、留置後 3 週以降も一部の例で結膜の発赤が認められた。しかし、点眼 (評点 10 点以上、以前に評価されたもの) に比較して軽微 (評点 0-2) であった。また、眼圧の変化は見られなかった。

⑤試験推進センター、アールテックウエノ社とは頻回の連絡を取り (直接会談、電話会談、メール等)、研究機関は PMDA と薬事相談

を行い (2 回)、申請に向けて議論を重ねてきた。

D. 考察

UNO は抗緑内障薬であるが、BK チャンネル活性化による神経保護が動物実験で報告されたために、本薬剤をうまく網膜に作用させることができれば、様々な網膜疾患や神経疾患に適応できると考える。本来点眼で使用されてきた本薬剤は、従来の点眼では十分な量の薬剤を網膜に到達させるのはなかなか困難で、また点眼ができない人がいることや、忘れるなどの問題点も指摘されてきたが、これらの問題を改善できるだけでなく、失明疾患の大部分を占める網膜疾患の新しい治療法になる可能性がある。すなわち本デバイスを使用してこれまで難治性と言われた網膜疾患の治療の選択肢が増え失明予防に貢献できる。また、汎用性のある本デバイスは抗がん剤を含め様々な薬剤の持続徐放が可能のために本研究の先には様々な疾患を対象に考えられる。まず疾患数は少ないが治療法のない網膜色素変性患者で効果を確認し、他疾患にも本デバイスの適応を広げる。

今年度の経過から考察すると、UNO を網膜に送達できれば、さまざまな網膜障害から網膜を保護できる可能性が示された。ADME も 28 日間デバイス留置で毒性が見られていない。デバイス移植後の血漿中濃度も点眼直後 (最も高値の 30 分後) の血漿中よりも低値であり、UNO 点眼のこれまでのデータからも安全性に関しては期待できると考える。今回の結果から臨床適応が広まれば、デバイ

スの作製のために新たな企業(ベンチャー含む)の立ち上げも期待できる。またデバイス移植は、高齢者は点眼を忘れることや、点眼などができない人への対応もできアドヒアランス向上につながる。

本研究は創薬プロセスの革新に眼科領域から取り組むことにもなり、行政施策にも貢献できると考える。

E. 結論

我々のデバイスは本来薬剤が持つ効果を局所で有効・安全に使用でき、これまで治療法のなかった網膜色素変性の新しい治療法開発になりえると改めて考えられた。すなわち本研究は創薬プロセスの革新に眼科領域から取り組むことに成功していると言え、行政施策にも貢献できると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe T, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N. 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. *Adv Exp Med Biol* ;in press.

2. Onami H, Nagai N, Kaji H, Nishizawa M, Sato Y, Osumi N,

Nakazawa T, Abe T. Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally-induced choroidal neovascularization. *PLoS One*. 2013;8(3):e58580

3. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. Ahmed Y Shanab, Toru Nakazawa, Morin Ryu, Yuji Tanaka, Noriko Himori, Keiko Taguchi, Masayuki Yasuda, Ryo Watanabe, Jiro Takano; Saido Takaomi, Naoko Minegishi; Toshio Miyata, Toshiaki Abe, Masayuki, Yamamoto, *Neurobiol Dis*. 2012 Dec;48(3):556-67.

4. Intraocular Concentrations of Cytokines and Chemokines in Rhegmatogenous Retinal Detachment and the Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide” Hiroshi Kunikata, Masayuki Yasuda, Naoko Aizawa, Yuji Tanaka, Toshiaki Abe, and Toru Nakazawa. *AJO*, 2013 Jun;155(6):1028-1037.

5. Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy. Aizawa N, Kunikata H, Abe T, Nakazawa T. *J Cataract Refract Surg*. 2012 Sep;38(9):1602-7.

6. Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report. Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. *Clin Ophthalmol*.

2012;6:1373-6. Epub 2012 Aug 27.

7. 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*. 2012 Jun;32(6):1204-13

8. Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Vasohibin and retinal pigment epithelium" *Adv Exp Med Biol*, 723, 305-310 (2012)

9. 浅野俊一郎、阿部俊明、國方彦志、今留尚人、高橋麻衣、中澤徹：右眼に急性網膜壊死を発症した 16 年後に左眼にも発症した 1 例。

10. 雪田昌克、國方彦志、小林航、小林直樹、阿部俊明、中澤徹：角膜染血を伴う硝子体出血に広角観察システム併用 25G 手術が奏功した一例。臨床眼科。2013。印刷中

11. 相澤奈帆子、國方彦志、岡村知世子、阿部俊明、中澤徹：25G 硝子体手術中の脈絡膜剥離。眼科臨床紀要 5(8)：792-796, 2012.8.

12. 金澤紘子、國方彦志、安田正幸、新田文彦、鬼怒川次郎、阿部俊明、中澤徹：特発性黄斑円孔に対する硝子体手術成績とトリウムシノロンアセトニドの効果。臨床眼科 66(8)：1219-1224, 2012.8.

13. 黄斑円孔術後に発症した脈絡膜新生血管の一例 伊藤梓、國方彦志、阿部俊明、安田正幸、中澤徹 眼科臨床紀要 2012;5(9)855-859.

2. 学会発表
(国際学会発表)

1. Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. An Implantable Drug Delivery Device for Treating Retinal Disorders. 2012 IEEE-EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference
2. Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai. : Intra-scleral transplanation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure. XVth International Symposium on Retinal Degeneration. July 16-21, 2012. Bad Gögging, Bavaria, Germany

3. 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. 2012 ARVO annual meeting, Fort

Lauderdale, Florida.

4. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe. Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device. 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.

(国内学会発表)

1. 相澤奈帆子、國方彦志、新田文彦、阿部俊明、中澤徹 トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼による眼底血流への影響 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
2. 高橋秀肇、阿部俊明、國方彦志、中澤徹 ぶどう膜炎を合併したMPPEから増殖性硝子体網膜症に至った1例 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
3. 前川重人、阿部俊明、國方彦志、中澤徹 急性網膜壊死52眼に対する硝子体硝子体手術後成績 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
4. 新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹 ペガプタニブ硝子体投与の眼循環血流に与える影響 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
5. 萱場寛子、阿部俊明、國方彦志、新田文彦、中澤徹 無光覚に陥った加齢黄斑変性の背景に関する検討 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
6. 新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹 糖尿病黄斑浮腫におけるトリアムシノロン後部テノン嚢下注射前後の眼血流変化の検討 日本臨床眼科学会 2012/10/25
7. 相澤奈帆子、國方彦志、目黒泰彦、

阿部俊明、中澤徹 25G小切開硝子体手術での後囊切開併施トーリック眼内レンズ挿入術の有用性 日本臨床眼科学会 2012/10/25

8. 國方彦志、相澤奈帆子、布施昇男、阿部俊明、中澤徹 線維柱帯切除後眼に対する25G硝子体手術 日本臨床眼科学会 2012/10/25

9. 12. 雪田昌克、國方彦志、小林航、阿部俊明、中澤徹 強い角膜血染混濁を伴う硝子体出血に広角観察系25G手術が奏功した一例 日本臨床眼科学会 2012/10/25

10. 浅野俊一郎、今留尚人、大友孝昭、阿部俊明、中澤徹 右眼にARNを発症した16年後に左眼にも発症した1例 日本臨床眼科学会 2012/10/25

11. 阿部俊明：加齢と眼～眼の病気を知りましょう～ 市民公開講座NTT病院 2012/7/25

12. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、西澤松彦、中澤徹、阿部俊明 プロテインドラッグ眼内徐放デバイスによる加齢黄斑変性治療の試み 日本DDS学会 2012/7/4-5

13. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、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 日本DDS学会 2012/7/4-5

14. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明 分子徐放デバイスと神経保護 東北臨床超微形懇話会

15. 阿部俊明：加齢黄斑変性の予防と治

療 元気健康フェア 2012/4/29

16. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌澤亮介、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116回日本眼科学会総会 2012/4/5-8

17. 新田文彦、國方彦志、永富良一、牛凱軍、玉井洋、相澤奈帆子、志賀由己浩、阿部俊明、中澤徹 健常人でのレーザースペックル(無散瞳タイプ)の眼循環血流の波形解析と年齢の検討第116回日本眼科学会総会 2012/4/5-8

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

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）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 西澤 松彦 東北大学大学院工学系研究科 教授

研究要旨

本研究の目的は、網膜色素変性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）を作製するための、ウノプロストンの経強膜投与デバイスを開発することである。本分担研究は、ウサギ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 基材のトリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDM）をキャストし、UV 照射で重合してリザーバーを作製した。その結果、ウサギ眼強膜上に縫合固定しやすい形状を複数デザインし、移植性を改善した。

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）を開発するために、ウノプロストン（UNO）を任意の速度で徐放できるDDSデバイスを作製することである。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), 2221-2224, 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（Polyethyleneglycol 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（Tryethyleneglycol 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。今回はウサギ眼強膜上に移植可能なデバイスの設計および評価を行った。

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。リザーバー形状をCADでデザインし、PMT.Co.の微細加工機MC-2 microを用いて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。リザーバーデザインの特徴として、移植する際にピンセットで持つための取っ手と、強膜上に縫合固定するための糸を引っ掛けるための溝、ウサギ眼球局面にフィットする曲がり形状、を重点的に検討した。切削した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°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°Cで30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバー作製用の最終鋳型とした。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 (10mW/cm², 3min [浜松ホトニクス、LC8]) 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。

(2) 薬物の充填

薬物の充填量はデバイス形状によるが、今回の検討で最大充填できる量は20 μ Lであった。薬物をPEGDM/TEGDMプレポリマーに懸濁し、上述の方法で作成したリザーバーにキャストし、30秒UV照射 (10mW/cm²) してペレット化した。

(3) 徐放膜の作製

リザーバーに薬物を充填した後に、徐放膜となるPEGDM/TEGDM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 (10mW/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) 薬剤リークの評価

デバイスのシール面の密着性を評価するために、PBSにデバイスを浸漬し、薬剤徐放性を評価した。薬剤として、UNOと同等の分子量を持つフルオレセインを用いた。定期的にPBSを交換し、PBS中の蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1) デバイスの作製

プロトタイプのリザーバーサイズは、リザーバー壁面の強度と薬物充填量を考慮し、幅4.4mm×長さ12mm×厚み1.6mm、薬剤充填量を20 μ Lとした。ウサギ眼のサイズを考慮し、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、ウサギ眼の直径2センチと仮定し、直径2センチの球にフィットする曲がり形状を付与した。また、縫合糸でデバイスを固定するために、リザーバー前眼部側に穴を1つと、リザーバー側面に4つの溝を設けた。他の分担研究で行われたウサギ眼への移植実験の結果、ウサギ眼球運動への影響はなかったが、デバイス移植性と縫合性を改善する必要がある指摘された。そこで改善型リザーバーでは、幅と長さは変更せず、厚みを1mmに変更した。また、縫合の際に穴は必要ないことがわかり、4つの溝だけを残した。また、デバイスの先端および後端を流線型にし、デバイス移植時に後眼部側へなめらかに挿入できるデザインに変更した。他の分担研究で行われたウサギ眼への移植実験の結果、移植性は改善された。一方で、トランスジェニック網膜色素変性ウサギを用いる実験では、ウサギが5週齢で体が小さく眼球径も小さいため、仔ウサギ専用でデバイスを設計しなおした。

仔ウサギの眼球径は約1.5センチと推定されたため、これに合わせた曲がり形状を付与した。また、デバイスの長さを10mmに短縮し、幅を3.6mmに縮小し、厚みを0.7mmに薄くした。他の分担研究で行われたウサギ眼への移植実験の結果、移植性は改善された。以上より、ウサギの週齢 (眼球径) に合わせた複数のデバイスデザインを構築した。

(2) 薬剤リークの評価

フルオレセインを充填したデバイスをPBSに浸漬し、徐放量を蛍光プレートリーダーで測定した。初期のデバイスでは数%の確率で

薬剤リークが発生した。これはリザーバーとカバーの密着不良と推定し、リザーバーのPEGDM/TEGDMとカバーのPEGDM/TEGDMが最終的に重合して密着するデバイス調製方法を検討した。その結果、リザーバーのUV照射時間を短くし（初期検討では3分、改善後は30秒）、リザーバー中にある程度PEGDM/TEGDMモノマーを残すことによって、カバーの際のUV照射でカバー中のPEGDM/TEGDMと重合し、密着が改善することを見出した。この方法によって、徐放期間1か月以上においても、リーク率が0%のデバイスの作製が可能になった。

D. 考察

本研究はウサギ眼強膜上に移植可能なデバイスの設計とリーク評価を行った。他の分担研究の移植評価ではウサギ眼強膜上への移植後、炎症や眼内への副作用の報告はない。本デバイスは、トランスジェニック網膜変性ウサギへの移植を前提としても検討した。プロトタイプは完成し、ウノプロストンの経強膜投与による網膜保護効果の検討が進むと期待できる。

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である。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、薬剤導体制御性に課題がある。一方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可能である。また、リザーバーは薬剤非透過性であるため、強膜側（網膜側）に一方向に薬剤が効率よく徐放される。

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が、デバイス調製条件を改善した結果、1か月以上の長期にわたってリークは見られず、移植中に突然のバーストが起こることはないと考えられる。

E. 結論

ウサギ眼に移植可能なデバイスを開発した。ウサギ週齢（眼球径）に合わせた複数の

デバイスをデザインした。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) An Oxygen Responsive

Microparticles-Patterned Hydrogel Sheet for Enzyme

Activity Imaging

Electrochemistry, 80 (2012) 318-320.

Kuniaki Nagamine, Shuntaro Ito, Mai Takeda, Shingo Otani and Matsuhiko Nishizawa

(2) Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified

Nanoengineered Carbon Fabric

Electrochimica Acta, 82 (2012) 175-178.

Keigo Haneda, Syuhei Yoshino, Takuya Ofuji, Takeo Miyake and Matsuhiko Nishizawa

(3) Conducting Polymer Microelectrodes Anchored to Hydrogel Films

ACS Macro Letters, 1 (2012) 400-403.

Yuichiro Ido, Daisuke Takahashi, Masato Sasaki, Kuniaki Nagamine, Takeo Miyake, Piotr Jasinski and Matsuhiko Nishizawa

(4) Flexible, Layered Biofuel Cells

Biosensors and Bioelectronics, 40 (2013)
45-49.

Takeo Miyake, Keigo Haneda, Syuhei
Yoshino and Matsuhiko Nishizawa

(5) Molecularly Ordered
Bioelectrocatalytic Composite inside a
Film of
Aligned Carbon Nanotubes

Advanced Energy Materials, 3 (2013)
60-64.

Syuhei Yoshino, Takeo Miyake, Takeo
Yamada, Kenji Hata and Matsuhiko
Nishizawa

2. 学会発表

(1) マイクロ電極システムによる培養細胞
運動アッセイ

西澤松彦, 長峯 邦明, 梶 弘和, 神崎 展
第 29 回医用高分子研究会 (つくば)
平成 24 年 11 月 20 日

(2) ハイドロゲルへの電極形成と応用
西澤松彦

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

(3) シート状バイオ発電システム
西澤松彦

日本化学会 93 春季年会 (京都)
平成 25 年 3 月 22 日

(4) Microfabricated Miniature Biofuel
Cells with Nanoengineered Enzyme

Electrodes

M. Nishizawa, K. Nagamine, T. Miyake and H.
Kaji

IUMRS-International Conference on
Electronic Materials (Yokohama)
2012. 9. 24

(5) Enzyme-Carbon Nanotube Ensemble Films
for Biofuel Cells

M. Nishizawa, S. Yoshino, T. Miyake, T.
Yamada and K. Hata

2012 MRS Spring Meeting (San Francisco)
2012. 4. 10

(6) Conducting Polymer Microelectrodes
Printed on Soft, Moist Hydrogels for
Effective Stimulation of Muscular and
Neuronal Cells

M. Nishizawa, Y. Ido, D. Takahashi, T.
Miyake and K. Nagamine

2012 MRS Spring Meeting (San Francisco)
2012. 4. 11

(7) Enzyme-CNT Ensemble Films for
Miniature Biological Fuel Cells

M. Nishizawa, S. Yoshino and T. Miyake
Biosensors 2012 (Mexico)

2012. 5. 18

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

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）研究事業）
（分担）研究報告書

ウノプロストンの徐放と薬効評価に関する研究

研究分担者 永井展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教

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）作製めざし、ウノプロストンを任意の速度で徐放できる DDS デバイスを作製することである。UNO はデバイス基材の PEGDM/TEGDM 組成を変えることで徐放量を制御することが可能であった。網膜神経節細胞および網膜色素上皮細胞の低酸素・低栄養負荷培養モデルに対して UNO は Dose-dependent に保護効果を示すことがわかった。また、UNO 徐放デバイスはラット網膜光障害モデルに対して、保護効果を示すことがわかった。さらに、UNO 徐放デバイスは、網膜色素変性モデルラットに対して、点眼や硝子体注射よりも持続的に保護効果を示すことがわかった。

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、ウノプロストンを任意の速度で徐放できる 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、

網膜疾患の予後を不良にしている原因の 1 つになっている。最近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, 879-882, 2008）。また、ブドウ膜炎やサイトメガロウィ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（Vitraserit, Retiserit）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多く報告されており

（Ophthalmology, 117, 567-575, 2010）、日本では治験が中断されている。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 Ocusert (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 Control Release, 37, 143-150, 1995)。

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、薬物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)。

本研究はアールテックウエノ社と連携して、緑内障治療薬レスキュラ (ウノプロストン: UNO) の DDS 化を検討した。UNO は長年緑内障点眼治療薬として使用されている。イオンチャネル活性化薬としての作用を有し、BK チャネルを活性化することで細胞内 Ca イオン濃度を低下させることにより、繊維柱帯細胞を弛緩させ、房水の繊維柱帯での流出抵抗を軽減し、眼圧を下降させることが示唆されている。また最近、UNO は網膜色素変性を抑制する可能性が報告され、2013 年 3 月に UNO 点眼による第 3 相臨床治験が開始されている。これは点眼によって投与されている。

本研究は UNO の徐放デバイス化、および UNO の薬効評価として、網膜神経節細胞および網膜色素上皮細胞の低酸素・低栄養負荷培養に対する UNO 添加の効果、UNO 徐放デバイスの網膜光障害ラット、および網膜色

素変性ラットへの移植効果を検討した。

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 分加熱して硬化させた。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 (10mW/cm², 3min [浜松ホトニクス、LC8]) 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、幅 4.4mm×長さ 12mm×高さ 1.6mm、薬剤充填部容量は 20 μ l である。

薬物ペレットは UNO を PEGDM と TEGDM の混合プレポリマーに混合し (500mg/ml)、上述のリザーバーにキャストして UV 架橋 (10mW/cm², 3min [浜松ホトニクス、LC8]) して硬化させた。

PEGDM と TEGDM の混合プレポリマーを薬物上にキャストし、ガラス板を置いてから UV 架橋 (10mW/cm², 3min [浜松ホトニクス、LC8]) して硬化させた。これで薬物がシールされ、デバイスが完成する。

薬物ペレットおよびカバーの 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。バーストなしの歩度まりを 100% にできる条件も検討した。

(2) 徐放 UNO の In vitro 定量

デバイスを Phosphate-buffered saline (PBS) 1.5mL に浸漬し、37°C でインキュベーションした。定期的に PBS を回収し、新しい PBS に置き換えた。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) UNO 薬効 (In vitro 細胞培養)

ラット網膜神経節細胞株 (RGC5) およびラット網膜色素上皮細胞株 (RPEJ) の低酸素・低栄養負荷培養における UNO の細胞保護効果を検討した。RGC5 を 0.25×10^4 cells/cm² で 96 ウェルプレートに播種し、2 日間培養した (37 度)。UNO を 0 から 500 μ M で含有した培地 (DMEM、FBS 10%、4.5mM Glucose) で 1 日間培養した。UNO を 0 から 500 μ M で含有した負荷培地 (DMEM、FBS 1%、2.8mM Glucose or 0mM GLucose) に交換し、低酸素インキュベーター (2%O₂) で 1 日培養した。2.8mM Glucose

の負荷培地で培養した条件は OD (Oxygen deprivation)、0mM Glucose の負荷培地で培養した条件は OGD (Oxygen-glucose deprivation) とした。MTS 法 (Promega) によって細胞数を測定した。

さらに RPEJ を 2×10^4 cells/cm² で 96 ウェルプレートに播種し、2 日間培養した (33 度)。UNO を 0 から 500 μ M で含有した培地 (DMEM、FBS 4%、4.5mM Glucose) で 1 日間培養した。UNO を 0 から 500 μ M で含有した負荷培地 (DMEM、FBS 0.4%、0.5mM Glucose or 0mM GLucose) に交換し、低酸素インキュベーター (2%O₂) で 1 日培養した。0.5mM Glucose の負荷培地で培養した条件は OD (Oxygen deprivation)、0mM Glucose の負荷培地で培養した条件は OGD (Oxygen-glucose deprivation) とした。MTS 法によって細胞数を測定した。また、負荷培養後の細胞を回収し、細胞死関連シグナル発現 (p38、MAPK のリン酸化) をウェスタンブロット法で評価した。さらに、回収した細胞を CellROX 試薬で Reactive oxygen-species (ROS) を標識し、ROS 産生量をセルサイトメーター (Tali、Invitrogen) で評価した。

(4) 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。網膜光障害モデルとして、SD ラットを使用した。また、網膜変性モデル動物として、S334ter ラット (Heterozygotes) 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%ttropicamide で拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride (0.4%) を局所麻酔として使用した。

(5) 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。

(6) 網膜光障害

UNO 徐放デバイスを移植した SD ラットに光障害を行った。ラットを 2.5%phenylephrin と 1%ttropicamide 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、24 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、暗室内でラットを麻酔し、2.5%phenylephrin と 1%ttropicamide 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 (2mm 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 (Stimulus 1000cd/m²、Duration 3msec) を刺激に ERG 波形を計測した (Dark-adapted maximal rod/cone

combined 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。

（7）網膜色素変性モデル

生後 2 週目の S334ter ラットに UNO 徐放デバイスを移植した。定期的に ERG を評価した。ERG は上述の方法と同じ方法で行った。コントロールとして、PBS 含有デバイス、UNO 点眼（0.12%、1 日 1 回）、UNO 硝子体注射（6 μ g、5 μ L）を検討した。

（8）組織学的評価

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。4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作製した。HE 染色および TUNEL 染色によって、網膜外貨竜操（ONL）厚みの測定および細胞死の評価を行った。

（9）統計学的解析

測定結果はエクセル統計 2012 を用いて、One-way ANOVA with Tukey test による有意差検定を行った。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

UNO 徐放試験用のデバイスはウサギ眼用のデバイスを使用した。一方ラット移植用のデバイス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（2mm \times 2mm \times 1mm、UNO 充填量 1.2 μ L）。

（2）UNO の In vitro 徐放性

徐放膜（カバー）を P40、P30、P20、P10、P0、カバーなしの条件でデバイスを作製し、徐放量を HPLC で測定した。UNO ペレットは P40 で統一した。その結果、カバーなしでは数日で大量の UNO 放出を認めたが、カバー条件では大量放出は抑制され、常に一定の放出量を示していた。また、カバー中の PEGDM 比率が高いほど UNO 放出量が早かった（P40 > P30 > P20 > P10）。また、P0 カバー条件では UNO 放出を認めなかった。TEGDM ポリマーは低分子を透過しない性質を有しているためと考えられた。一方、TEGDM よりも長鎖の PEGDM は低分子の透過性を有している。従って、PEGDM と TEGDM の比率によって徐放量を制御できた。P40 カバー条件では、1 日当たり約 10 μ g の UNO 放出が可能であった。UNO 充填量は 10mg であるため（500mg/ml \times 20 μ L）、推定の最大徐放日数は 10mg / 0.01mg = 1000day と期待できる。すなわち、約 3 年にわたって一定量を徐放できる可能性がある。次にカバーを一定条件（P40）とし、薬物ペレットの PEGDM/TEGDM 組成を P40 から P0 に変更したときの徐放特性を検討した。その結果、カバー条件変更と同様に UNO 放出量を制御することが可能であった。

以上より、ペレットもしくはカバー中の PEGDM/TEGDM 組成を変えることによって、UNO の徐放性を制御できることがわかった。

一方、これらの PEGTEG の割合は 0 - 100% まで変化させ、薬剤濃度も最大 1000 mg/ml まで変化させて検討した。それぞれの基材濃度、加熱率、薬剤濃度などを考慮・検討した結果、バーストなしの歩留まり率 100% の作製条件は、最大徐放量はデバイスが TEGDM100%、徐放膜、薬剤ペレット濃度は PEGDM/TEGDM40% で UNO 濃度は最大 500mg/ml であると考えられた（動物による違いも考慮して今後も微調整を継続予定）。

(3) UNO 薬効 (In vitro 細胞培養)

UNO の細胞保護効果を RGC5 および RPEJ の低酸素・低栄養負荷培養で検討を行った。その結果、OD 負荷における RGC5 に対して、UNO が 50 μ M から 300 μ M を添加したときに Dose-dependent に細胞数 (MTS 吸光度) の維持が認められた。特に 300 μ M で極大を示した。一方、400 μ M 以上では保護効果を認めなかった。また、OGD 負荷では、UNO の細胞保護効果は認めなかった。RPEJ に対しては OD 負荷において、UNO が 50 μ M から 200 μ M を添加したときに Dose-dependent に細胞数 (MTS 吸光度) の維持が認められた。特に 200 μ M で極大を示した。一方、300 μ M 以上では保護効果を認めなかった。また、OGD 負荷では、UNO が 10 μ M から 400 μ M を添加したときに

Dose-dependent に細胞数 (MTS 吸光度) の維持が認められた。

次に細胞保護効果のメカニズムとして、細胞死関連シグナル (p38、MAPK) のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で評価した。その結果、負荷培養によって p38 のリン酸化レベルは上昇するが、UNO 添加によって p38 のリン酸化が抑制されることがわかった。また、負荷培養によって MAPK のリン酸化レベルは下降するが、UNO 添加の条件によっては MAPK のリン酸化が上昇する可能性があることがわかった。

また、負荷培養後の ROS 産生量を Tali によって評価した。Tali によって ROS 標識した細胞の ROS-Positive 細胞と ROS-Negative 細胞の比率を測定することが可能である。負荷培養によって ROS-positive 細胞は約 50% を示したが、UNO 添加によって ROS-positive 細胞は約 30% に低下することがわかった。

(4) 網膜光障害モデル実験

カバー条件の異なる UNO 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、UNO デバイスでは、UNO 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、UNO 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。また、ERG 後に摘出した眼球の組織標本を評価した結果、UNO デバイス群では ONL 厚み