

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。

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 ProT α 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。

B-3-4) 組織化学的評価

標本作製: ペントバルビタール 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、凍結マイクロトームで 10 μ m 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。この他、網膜神経節細胞層 (GCL) の Ganglion cell (顆粒細胞)、内顆粒層 (INL) の Bipolar cell (双極細胞)、内網状層 (IPL) の アマクリン細胞を特異的マーカーである NeuN、Chx10、Syntaxin-1 で免疫染色し、外顆粒層 (ONL) の視細胞については、核染色を行うことで、細胞特異的な保護効果について検討を行った。

B-3-5) 網膜機能評価

網膜機能の評価は、網膜電位図を用いた。

(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ると共に、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. 新規方法による ProT α の調製法確立

マウス ProT α は Glutathione-S-transferase (GST) 融合タンパク質として大腸菌株 BL21 (DE3) で発現させ、GST への親和性を利用して抽出した。本タンパク質は GST の下流に Tabacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼ認識部位をもつため、抽出物を TEV プロテアーゼで処理した後、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。さらに精製物を大腸菌由来エンドトキシン親和性クロマトグラフィーで処理し、高純度品として調製した。本リコンビナントタンパク質は細胞で調製される ProT α と同様、1st メチオニンを含まないことから、以前の方法よりも生体内挙動を模倣することが出来ると推測される。ProT α の効果を裏付けるために、1 μ g ProT α に対し、グルタミン酸とアスパラギン酸のカルボキシル基側を特異的に切断する V8 プロテアーゼを 50 μ g 処置したのち硝子体投与を行うと、その保護活性は完全に消失した。

C-2 ProT α 活性フラグメントペプチドの神経細胞死保護効果

ネクローシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProT α の GST 融合部分欠損 ProT α 、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。このペプチド P30 の硝子

体内投与では1-10 pmolにより用量依存性の網膜細胞層の厚さと網膜電位図におけるa波、b波で評価した形態・機能的な保護活性を示し、10 pmol処置では虚血無しと同様であり、完全な保護を示した。P30は顆粒細胞の障害を完全に遮断したが、P30のアラニンスキャンニングから、より短鎖のペプチド(9アミノ酸) P9にも同様な網膜虚血保護活性が確認された。

C-3. ProT α の網膜虚血保護

緑内障モデルである網膜虚血に対してProT α 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/ μ l/eye で用量依存的であり、0.1 pmol/ μ l/eye で十分な保護効果が認められた。

C-4. 活性ペプチドの網膜虚血保護

活性ペプチドP30やP9も上記のC-3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た。ともに用量依存的であり、P30では3 pmol/ μ l/eye、P9では10 pmol/ μ l/eye投与により有意な保護効果を示す最小有効濃度であった。P30の保護効果について特異的のマーカにて細胞特異的な保護効果について検討したところ、顆粒細胞層の完全な保護が観察され、双極細胞層、アマクリン細胞層、視細胞層では50%程度の保護を示した。

C-5. ProT α の先制治療効果機構解明

ProT α 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、ProT α 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ProT α の活性ペプチドを見出した。ProT α 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可能性もある。一方、ProT α 、並びに活性ペプチドは虚血後の24時間投与でほぼ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ProT α 受容体を介する可能性がある。

E. 結論

本研究では、網膜保護新規候補分子としてProT α 、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大いに期待される。

F. 研究発表

【平成23年度】

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease 'Prothymosin alpha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system' March 14-16, 2012, Washington, D.C.

【平成24年度】

1. 論文発表

- 1) Halder SK, Ueda H, Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. *Cell Mol Neurobiol* 32:59-66, 2012.
- 2) Halder SK, Matsunaga H, Ueda H, Neuro n-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. *J Neurochem* 123:262-275. 2012.
- 3) Ueda H, Matsunaga H, Halder SK, Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann N Y Acad S*

ci 1269:34-43,2012.

2. 学会発表

Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease 'Prothymosin alpha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system' March 14-16, 2012, Washington, D.C.

【平成 25 年度】

1. 論文発表

- 1) Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H (2013) Novel neuroprotective action of prothymosin α -derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* 125:713-723.
- 2) Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H (2013) Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* 43:68-75.

2. 学会発表

松永隼人、Sebok Kumar Halder、植田弘師、プロサイモシン α 由来脳梗塞保護ペプチドの創薬研究、第 66 回日本薬理学会西南部会、2013年11月16日、福岡

知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

【平成 23-25 年度】

1. 特許取得

なし

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（障害者対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

網膜保護用デバイスの開発と効果に関する研究

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H23年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた、新規抗血管新生抑制剤Vasohibin-1および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中からPAI-1阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS化を検討した。デバイスの基材となるポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）、トリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDM）、コラーゲン微粒子の組成を適宜調節することによって、Vasohibin-1およびPAI-1阻害剤のゼロ次徐放化条件を確立した。また、レーザー誘発脈絡膜新生血管（CNV）モデルラットにデバイスを移植し従来の硝子体注射法と比較した結果、Vasohibin-1デバイスは注射群と同等にCNVを抑制する結果を得た。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（CLT）の徐放デバイス化を検討した。またCLT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、CLTの徐放化ではH23に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、CLTの薬効では10 μ Mから50 μ M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CLTによって抑制されていることがわかった。H25年度は、CLT-DDSの薬効を動物モデル（ラット網膜光障害）で評価することを目的とした。CLT-DDSをラット強膜上に移植後、1週間後に光障害（8000Lux、24時間）を実施し、4日間暗順応後に網膜電図（ERG）を評価した。その結果、CLT-DDS移植群ではプラセボ移植群対比、ERG振幅値の低下が抑制されていた。ERG後11日目に眼球を摘出し、網膜のウェスタンブロットを実施した結果、CLT-DDS移植群ではプラセボ移植群対比、Cleaved caspase-3およびPshophorylated JNKの発現が抑制されていた。以上より、細胞培養によるスクリーニングによって見出した薬剤をDDS化し動物モデルで薬効を評価した結果、網膜保護する可能性が示唆された。

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H23年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた新規抗血管新生抑制剤Vasohibin-1（VASH）および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中からPAI-1阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS化を検討した。

VASHはヒト臍帯静脈内皮細胞においてVEGFにより誘導される血管新生を抑制する性質を持つサイトカインである。難治性疾患の加齢黄斑変性症（AMD）は、網膜下に起こる脈絡膜新生血管（CNV）が主な病態である。CNVの発生には、血管新生促進因子である血管内皮増殖因子（VEGF）が深く関わっていることがわかっている。最近、AMD患者に対する抗VEGF療法が盛んに行われるようになり比較的良好な結果が報告されている。しかしながら、頻回の硝子体注射が必要なことやその合併症、そして重

要なVEGFの生理的作用の抑制や全ての患者に有効というわけではない、といった多くの課題を抱えている。従って、CNVを有するAMDの治療には、VEGF抑制に頼らない他のタイプの治療法が求められている。我々は最近、VASHがマウスおよびサルレーザー誘発CNVを抑制することを報告した【Invest Ophthalmol Vis Sci 52(2011) 3272-3280、Retina, in press, 2012】。今回の研究では、VASHをDDS化し、ラットレーザー誘発CNVモデルで、その効果をVASH硝子体注射と比較評価した。

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) は血液の凝固線溶や組織線維化などに作用して心疾患と脳血管疾患等の血栓性疾患の病因に深く関わり、また各種の炎症性疾患の発症にも役割を担うことが知られている。PAI-1阻害薬TM5509は、PAI-1のX線結晶構造解析情報を基に最新のSBDD (Structure-based drug design) 技術を駆使して得たヒット化合物TM5007からリード化合物TM5275を経て新規合成された500以上の低分子化合物の中から最適化されたアカデミア発の臨床開発候補化合物である。PAI-1阻害薬は既存の抗血栓薬と同等以上の有効性を示す一方、既存薬とは異なり出血時間を延長しない事がサルを用いた実験で証明されている。また、PAI-1阻害薬TM5509はヒト血漿中での抗血栓作用のみならず、動物モデルで炎症性疾患にも効果があることも確かめられている。PAI-1阻害薬はこれまで開発されておらず、TM5509が臨床で使用できるようになるとPAI-1阻害を作用機序とする世界で初めての新薬となりうる。本研究では、この東北大発となる新規薬剤PAI-1阻害剤をDDS化し、眼疾患治療に応用することを検討した。

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 (CLT) の徐放デバイス化を検討した。また、CLT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。CLTは低分子化合物であるため、H23年度に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。

昨年度のスクリーニングによってCLTを見出したが、薬効は10 μ M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CLT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製成の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。

H25年度は、CLT-DDSの網膜保護エビデンスを検証するためにラット網膜光障害モデルを用いて検討した。光障害モデルは、過剰光 (8000Lux) 下でラットを長時間飼育することで網膜に障害を与えるモデルであり、AMDモデルとして利用されている。この光障害モデルではROSによる酸化ストレスが網膜内で生じている可能性があり、H24年度に細胞培養で示唆されたCLTのROS産生の抑制効果は網膜保護に有効であると期待できる。

B. 研究方法

【H23年度研究】

1. Vasohibin-1 (VASH) のDDS化

1-1. VASHの調製

VASHは既報の方法でEscherichia coliからthioredoxin fusion proteinとして単離した【Am J Pathol 2010;176:1950-1958.】。Fusion proteinを透析し、血液凝固因子Xa(Novagen)を用いて消化した。VASHを溶出し、20mM glycine-HCl buffer(pH3.5)で透析した。VASHを50mM NaCl、5mM tris(2-carboxywthil) phosphine、0.5mM EDTA、5%glycerol、4.4% N-lauroylsarcosine (pH8.0) を含む50mM Tris-HCl bufferで再溶解し、pH8.0の20mM sodium phosphate bufferで透析した。このbufferはvehicleとしても以下の実験で使用した。蛋白濃度は、蛋白アッセイキット (Bio-Rad

Laboratories, Alfred Nobel Drive Hercules, CA, USA) を用いた Bradford 法で決めた。

1-2. デバイスの作製

1-2-1. コラーゲン微粒子の作製

1%(w/v) コラーゲン溶液 10ml に、0.3%(v/v) 界面活性剤を含んだ 50ml の流動パラフィン を混ぜて乳化させ、室温で 5 分間、600rpm で攪拌した。攪拌中に、水で溶かした架橋剤 50%(v/v) WSC を 1ml 加え、コラーゲンを 1 時間 架橋した。50%(v/v) エタノールを加えて、オイル層からコラーゲン微粒子を分離するために 5 分間混ぜ合わせた。混合物は 5 分間 3500rpm で遠心分離し、コラーゲンペレットを残して上清を取り除いた。この作業を二回行った。それからリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え、コラーゲンペレットと混ぜ合わせ遠心分離した (3500rpm, 5 分間)。この作業を 3 回行いエタノールを取り除き、平均粒径 8 μ m のコラーゲン微粒子を作成した。

1-2-2. カプセルデバイスの作製

薬物リザーバーの作成は、CAD (computer 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 MC-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-propiophenone (HMP) 10 μ l 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、ラット移植用が内径、縦 1.5mm \times 横 1.5mm \times 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 \times 横 7mm \times 高さ 2mm、薬剤充填部容量は 9 μ l である。徐放制御膜の作成は、PEGDM 1ml に HMP 10 μ l を混合した PEGDM プレポリマーに、平均粒径 8 μ m のコラーゲン微粒子を混合 (500mg/ml) し、徐放膜用の鋳型へ流し UV 架橋 (25mW/cm², 3min [SEN LIGHTS CORP]) して作製した。薬物リザーバーに薬剤を充填後、PEGDM を接着面に塗布し徐放膜を被せ UV 架橋することによりカプセルを作製した。

1-2-3. 充填薬物の調製

PEGDM が 20%、薬剤が 80% の容積比率となるように混合し 90 秒 UV 架橋しペレット化した。ラット移植用は、薬剤 1.2 μ l に PEGDM 0.3 μ l となり、VASH 含有量は、VASH 原液 DDS (10VDD) では 683.2ng、

VASH1/10DDS (VDD) では 68.3ng、PBS-DDS では 0ng である。In vitro 徐放用は、薬剤 4 μ l に PEGDM 1 μ l となり、VASH 含有量は、VASH 原液 DDS では 2440ng、PBS-DDS (NVDD) では 0ng である。

1-3. ELISA による VASH 徐放量の定量

48well plate (IWAKI Non-treated MICRO PLATE) の中にアッセイバッファー (0.5% BSA (0.5g/100ml), 0.05% Tween80, 10 μ g/ml γ globulin および 0.1% ProClin150 を含む、100mM PBS, pH7.0) 200 μ l を入れ、上記の VASH 原液 DDS あるいは PBS-DDS を入れた (各 n=4)。徐放された VASH を測定するため経時的にバッファーを回収した。回収したバッファーは VASH ELISA kit で測定した。

1-4. 徐放 VASH の生物活性 (血管内皮細胞の Tube formation 評価)

24 ウェルプレートにヒト繊維芽細胞 (NHDF) を播種し、コンフルエントまで培養した後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を NHDF 上に播種した。共培養後、HUVEC が NHDF 上に接着したことを確認したら、徐放 VASH を含有する培地に交換した。この培地は、上述のデバイスを培地に 3 時間浸漬したものである。コントロールとして、2nM VEGF を含む培地に VASH を 0~10nM 添加した培地を使用した。徐放 VASH を含む培地中の VASH 濃度は ELISA の結果から 0.56nM であった。培養後、CD31 の免疫染色を実施し、HUVEC の Tube formation を観察した。Tube 長さを KURABO 血管定量ソフトウェアで定量した。

1-5. 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 Brown Norway 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。

1-6. 実験的 CNV の作製

ブルッフ膜を貫通させるために、ラット角膜にカバーガラスを当て細隙灯 (Ultima 2000SE; Luminus, Yokneam, Israel) に接続されたアルゴングリーンレーザーを使用した。光凝固の設定は、直径 50 μ m、間隔 0.1sec、強度 200mW とした。6 発の光凝固を視神経乳頭か

ら1から2乳頭径の部位に施行した。各光凝固に際して、ブルッフ膜を貫通したことを示す網膜下の気泡が出現したことを確認した。

1-7. 硝子体注射とデバイスの移植

光凝固後4日目に50ng/50 μ lのVASHを硝子体注射した。50 μ lのPBSをvehicleとして使用した。麻酔後実体顕微鏡で観察しながら、角膜輪部より約1mm後方で5 μ lのシリンジのついた32ゲージ針(Hamilton, Reno, NV)を用いて強膜を刺入し硝子体へ注射した。

光凝固直後にVASH原液DDSあるいはVASH1/10DDSあるいはVASH-pelletあるいはPBS-DDSを強膜上に移植した。麻酔後実体顕微鏡で観察しながら、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。

1-8. 免疫組織化学的検査

VASHの免疫組織化学的検査は光凝固後2週目に行った。ラットを頸椎脱臼後眼球を摘出し、余分な結膜や筋などの組織を除去した。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。角膜輪部に切開を切開を入れ、4%PFAに一晩浸し固定した。翌日に角膜、水晶体を除去しスクロース置換(10%から30%)した。翌々日に組織をOCT液に包埋し液体窒素で冷却し凍結ブロックを作成した。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Image-iT FX signal enhancer (Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で30分室温でブロッキング後、抗VASHマウス抗体(1:200)で4 $^{\circ}$ C一晩静置した。翌日Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse IgG (1:100, Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で室温30分静置した。各過程間はPBSで3回洗浄した。VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI (VECTOR)で封入し、蛍光顕微鏡(model FW4000, ver.1.2.1; Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan)で観察した。

1-9. 蛍光眼底造影検査(FA)

CNVの活動性を調べるためFAを光凝固後1、2週目に行った。段階表を用いて盲目的に評価した。Grade1は過蛍光なし、Grade2は過蛍光はあるが漏出はなし、Grade3は早期、中期での過蛍光と後期の漏出、Grade4は経過中の著明な過蛍光と後期の治療域を越えた漏

出とした。

1-10. Choroidal Flat-Mount

CNV部位のサイズはchoroidal flat mount法を用いて評価した。光凝固後14日目に、麻酔後50mg/mlのfluorescein-labeled dextran (FITC-deztran; MW2x10⁶, Sigma Aldrich)を含む2ml PBSを心臓に注入し灌流させた。眼球を摘出し、4%PFAに30分浸し固定した。角膜、水晶体、網膜を眼球から除去し、辺縁から赤道部にかけて4から6か所放射状に切開を入れた。RPE-choroid-sclera complexをフラットに封入した(Permalfluor, Beckman Coulter, Fullerton, CA)。標本は蛍光顕微鏡(model FW4000)で観察した。CNV部位は、蛍光を欠く部位に囲まれた蛍光を示す血管の部位として同定した。CNV部位はimage Jを用いて面積を算出し評価した。

1-11. 統計学的解析

FAでのCNVからの漏出の相違とflat mountでのCNVの容積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。

2. PAI-1阻害剤のDDS化

2-1. デバイスの作製

PAI-1阻害剤をVASHと同様の方法でデバイス化した。

2-2. In vitro徐放性

デバイスをPBSに浸漬し、定期的にPBSを回収・交換した。回収したPBSを高速液体クロマトグラフィーにかけ、PBS中に徐放されたPAI-1阻害剤を定量した。

【H24年度研究】

1. CLTの徐放デバイス化

1-1. デバイスの作製

薬物リザーバーの鋳型は、1-2-2と同様の方法で設計した。鋳型にTEGDM 1mlにHMP 10 μ lを混合したプレポリマーを流しUV架橋して作製した。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9 μ lである。徐放制御システムとして、PEGDM 1mlにHMP 10 μ l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CLT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。

1-2. HPLCによる徐放量の測定

デバイスをPBSに浸漬し、37°C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CLT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CLT量を定量した。

2. CLTの薬効

2-1. 細胞培養

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、CLT含有培地(DMEM)に交換した。CLT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、CLT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。

2-2. ROS assay

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10μL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。

【H25年度研究】

1. CLT徐放デバイスの作製

1-1. デバイスの作製

鋳型にTEGDM 5mLにHMPを0.1mL混合したプレポリマーを流し、UV架橋(11.6mW/cm²、40秒、LC8、浜松ホトニクス)してリザーバーを作製した。作成したリザーバーのサイズは内径、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.5mm、薬剤充填部容量は1.2μLである。

徐放膜および薬物剤形としてPEGDM、Aldrich 5mLにHMPを0.1mL混合したPEGDMプレポリマーに、上記のTEGDMを

混合(0~100%(v/v))したものを使用した。

CLTをPEGDM 40%/TEGDM 60% (P40)に250mg/mlで混合して、リザーバーにキャストし(1.2μL)、UV架橋(11.6mW/cm²、40秒)した。CLTペレット上に、P40もしくは60%/TEGDM 40% (P60)を1μLキャストし、ガラス板を乗せた状態でUV架橋(11.6mW/cm²、4分)した。P40でカバーしたものをCLT-P40、P60でカバーしたものをCLT-P60と略す。剤形としてPBS(リン酸バッファー)を薬物として使用したものをPBS-DDS(Placebo)として使用した。

2. ラット網膜光障害モデル実験

2-1. デバイスの移植

ラットの右眼の結膜を切開し、デバイスを強膜上に留置して、結膜を縫合して軟膏を塗って移植を終了した。左眼は未処理とした。

2-2. 光障害

デバイス移植後1週間目に、ミドリンP点眼で散瞳後に、光障害用のチャンバー(NKシステム)にラットを移動し、22°Cで8000Luxの照度で24時間飼育した。

2-3. 網膜電図(ERG)

光障害後4日間暗順応した後、暗室下でミドリンP点眼で散瞳した。ラットに眼球に角膜電極を当てて固定し、-3.577、-2.577、-1.577、-0.577、0.477(log cd*s/m²)の光刺激でERGを測定した(Mayo)。N=4。

2-4. ウェスタンブロット

ERG測定後、11日目に眼球を摘出し、網膜を慎重に分離した。Lysis bufferで網膜ホモジネートを調製し、SDS-PAGE後、セミドライ式ブロットでPVDF膜に転写し、抗体(Cell signaling)でCleaved caspase-3とPhosphorylated JNK(p-JNK)の検出を行った。

(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

【H23年度研究】

1. VASH-DDS

1-1. In vitro徐放性

カプセル化していないVASH-pellet(Pellet)は試験開始直後から大量放出(初期バースト)が見られ、約1日で充填したVASHのほとんどが放出されていた。一方で、VASH原液DDS

(10VDD)からは、VASHが持続的に徐放され、初期バーストが抑制されていた。VASH1/10DDS (VDD)でも同様に初期バーストが抑制されていたが、VASH充填量が少ない分、放出量は少なかった。Negative controlのPBS-DDS (NVDD)からは、いずれの時期も値は観察されなかった。

過去に報告したモデルドラッグ FITC-dextran 40kDa (FD40)を薬剤として検討した結果では14日後に全体の約1/200徐放されていたが、今回の結果では14日後に充填したVASHの約1/72.5が徐放されており、ほぼ同様の徐放プロファイルを示している事が分かった。

1-2. 徐放VASHの生物活性

HUVECはVEGF濃度に比例して、Tube formationが細長くなることを確認した。徐放VASH培地では、コントロールの徐放PBS培地および2nM VEGFのみの培地と比較して、Tube formationの長さが短い、すなわち管腔形成が抑制されていることを確認した。Tube lengthの平均値も有意に抑制されていた。以上より、徐放VASHは生物活性を維持していることが示唆された。

1-3. 免疫組織化学的検査

10VDDでは、デバイス移植部位から視神経にかけてVASH陽性を示す蛍光が確認できた。拡大像からは蛍光が、強膜、脈絡膜、RPE、網膜内層に認め、VASHが眼内に移行していることが確認された。コントロールのNVDDでは蛍光は検出されなかった。

光凝固後1週目のFAでは、VASH(50ng/5 μ l)硝子体注射群 (Vasohibin-1 iv) は、PBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVからの漏出が減少した ($p=0.049$)。10VDD群とVDD群では、NVDD群に比べてCNVからの漏出が少ない傾向はみられたが有意差はみられなかった。VASH-pellet (Pellet) 群ではNVDD群とCNVからの漏出は同程度であった。

光凝固後2週目のFAでは、1週目の結果と同様の傾向であったが、VASH(50ng/5 μ l)硝子体注射群 (Vasohibin-1 iv) がPBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVからの漏出が減少した ($p=0.001$)のに加え、10VDD群でもNVDD群に比べてCNVからの漏出が有意に減少した ($p=0.027$)。

1-3. Choroidal Flat-Mount

光凝固後2週目にChoroidal flat-mount法にてCNV面積を計測した。VASH(50ng/5 μ l)硝

子体注射群 (Vasohibin-1 iv) は、PBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVサイズが縮小した ($p<0.001$)。Pellet群ではNVDD群に比べてCNVサイズに変化はみられなかったが、10VDD群とVDD群では濃度依存的にCNVサイズが縮小した。10VDD群ではNVDD群に比べて有意差を認めた ($p<0.001$)。Vasohibin-1 iv群のCNVサイズと10VDD群のCNVサイズを比較すると、Vasohibin-1 iv群で有意にCNVサイズが小さかった ($p=0.009$)。

2. PAI-1阻害剤-DDS

デバイスからPBSに放出されたPAI-1阻害剤の量を、高速液体クロマトグラフィー (島津) で測定した。その結果、初期バーストのない一定徐放を確認できた。

【H24年度研究】

1. CLTのIn vitro徐放性

CLT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。カバーなしのサンプル (Pellet) は最初の数日でCLT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。

2. CLT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条件でともにCLT添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、CLTが10 μ Mから50 μ MでDose-dependentに保護効果を示した。また、ODD条件では、5 μ Mから50 μ M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CLT添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、CLTが5 μ Mから50 μ MでDose-dependentに保護効果を示した。また、OGD条件では、5 μ Mか

ら50 μ MでDose-dependentに保護効果を示した。

2-2. ROS assay

RGC5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CLTの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した。また、OD条件においても同様に、CLTの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した。

【H25年度研究】

1. ERG

ERG振幅値はCLT-P40のa波、b波およびCLT-P60のa波、b波のいずれにおいても、Placebo対比高い傾向を示した。

2. ウェスタンブロット

CLT-P40およびCLT-P60移植群ではPlacebo対比、cleavedcaspase-3およびp-JNKの有意に低い発現を示した。

D. 考察

【H23年度研究】

1. VASH-DDS

AMD治療で行われる抗VEGF抗体の硝子体注射は、眼内への副作用が問題であり、安全な眼内への投与方法が望まれる。本研究では、眼内を操作することなく、強膜から網膜へVASHを持続投与できるデバイスの可能性を示した。この経強膜デバイスを用いれば、従来の眼内注射をすることなく、安全にタンパク製剤を投与できる可能性を示している。

タンパク質のような分子量の大きい物質の徐放化はこれまで報告例が少ない。我々のデバイスは、生物活性を維持したまま約1か月にわたってVASHを一定徐放することができる。臨床では、分子量の大きいタンパク製剤が最近利用されており、これらの薬剤の徐放化に寄与できる可能性がある。また、本研究はレーザー誘発CNV動物モデルを用いて、経強膜的にCNVを抑制できる可能性を示した。また、CNV抑制効果は比較対象の硝子体注射とほぼ同等であり、眼内注射に代わる安全な投与方法である可能性が示された。

【H24年度研究】

CLT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 μ Mから

50 μ M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CLT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CLTの徐放が可能であることを示した。これらの結果は、CLT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。

【H25年度研究】

経強膜的に徐放されたCLTが神経網膜または網膜色素上皮細胞に到達し、光障害に伴う酸化ストレス障害を抑制したことが示唆された。この結果はCLT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、投与量を調整して全身性の副作用を抑制しながら、網膜局所の治療ができる可能性を示している。

E. 結論

眼内注射に代わる眼内への安全な薬物投与方法として我々のデバイスが有効である可能性を、レーザー照射CNVモデルラットに対するVASH徐放デバイスの移植検討、および網膜光障害モデルラットに対するCLT徐放デバイスの移植検討によって示した。

F. 研究発表

【平成23年度】

1. 論文発表

1) Ryosuke Wakusawa, Toshiaki Abe, Hajime Sato, Hikaru Sonoda, Masaaki Sato, Yuuichi Mitsuda, Tomoaki Takakura, Tomi Fukushima, Hideyuki Onami, **Nobuhiro Nagai**, Yumi Ishikawa, Kohji Nishida, Yasufumi Sato. "Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(6), 3272-3280 (2011).

2) 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)
- 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)
- 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)

(国内発表)

- 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）

- 6) 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）
- 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）

【平成24年度】

1. 論文発表
 - 1) Hideyuki Onami, † Nobuhiro Nagai, † Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. “Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally induced choroidal neovascularization” PLoS ONE, 8(3), e58580, (2013).
 - 2) 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).
 - 3) 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).
2. 学会発表
(国際学会発表)
 - 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” *RD2012 XV International Symposium on Retinal Degeneration, Bad Gogging, Bavaria, Germany* (July 16-21, 2012)

- 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” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)

- 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” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)

(国内学会発表)

- 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)
- 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)
- 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)
- 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)

- 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)

- 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)

- 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)

【平成 25 年度】

1. 論文発表

- 1) **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. “A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye” *Acta Biomaterialia*, 10, 680-687 (2014).

- 2) **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkoui Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe. “A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats” *Advanced Healthcare Materials*, in press, DOI:10.1002/adhm.201400114 (2014).

2. 学会発表

(国際学会発表)

4. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe “Protective

Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats” 2013 ARVO annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013)

(国内学会発表)

- 1) Zhaleh Kashkouli Nezhad 、 Nagai Nobuhiro、 Yamamoto Kotaro 、 Saya Hideyuki 、 Kaji Hirokazu 、 Nishizawa Matsuhiko 、 Nakazawa Toru 、 Abe Toshiaki : 「Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats」 第35回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀 (2013年11月25日-26日)
- 2) Zhaleh Kashkouli Nezhad 、 Nagai Nobuhiro、 Yamamoto Kotaro 、 Saya Hideyuki 、 Kaji Hirokazu 、 Nishizawa Matsuhiko 、 Nakazawa Toru 、 Abe Toshiaki : 「 Protective effects of Clotrimazole against oxidative stress-induced cell death in RGC-5 cells and preparation of controlled release device」 第29回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ (2013年7月4日-5日)

F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

【平成23-25年度】

1. 特許取得
なし
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（障害者対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

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

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ク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H23年度は、将来的に人に応用するための検討として、DDSの形状を微細加工によって最適化し、サル眼に移植可能なデバイスを作製することを検討した。デバイスは眼球強膜上に移植するため、眼球面に密着する形状、強膜上に固定するための縫合用穴・溝、後眼まで挿入するためのデバイスの長さ、の検討を行った。その結果、直径2cmのボールにフィットするように湾曲させ、かつデバイス長さは約15mm、縫合用にデバイス側面に4つの溝を設けた形状が現状では最適という結果を得た。

H24年度は、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、縫合糸によって強膜上に固定できることがわかった。

H25年度は、臨床データから平均的な眼球サイズを計算し、デバイス先端が黄斑部周辺に届く長さ、と、眼球の曲率にあったデバイスの設計を行った。また、デバイスに複数の溝をつけることで、縫合位置を限定せずに任意の部位に縫合できるデバイス設計を行った。

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クデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。H23年度は、将来的に人に応用するための検討として、DDSの形状を微細加工によって最適化し、サル眼に移植可能なデバイスを作製することを検討した。デバイスは眼球強膜上に移植するため、眼球面に密着する形状、強膜上に固定するための縫合用穴・溝、後眼部まで挿入するためのデバイスの長さ、の検討を行った。H24年度は、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。H25年度は、臨床データから平均的な眼球サイズを計算し、デバイス先端が黄斑部周辺に届く長さ、と、眼球の曲率にあったデバイスの設計を行った。また、デバイスに複数の溝をつけることで、縫合位置を限定せずに任意

の部位に縫合できるデバイス設計を行った。

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。

今回は眼科医（共同研究者）の意見を機器ながらデバイスを試作し、サル眼への移植でデバイス形状を微修正しながら、ヒト眼に移植できるようなデバイスデザインを検討した。

B. 研究方法

【H23年度研究】

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、オーブンで乾燥した。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鑄型が最終形である。

2. デバイス (リザーバー) の作製

PDMS鑄型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone (HMP) 10µlを混合したプレポリマーを流し、UV架橋(25mW/cm², 3min [SEN LIGHTS CORP])した。

3. 移植用デバイスの作製

TEGDMリザーバーにモデルドラッグフルオレセイン (50mg/ml) を充填し、PEGDM/TEGDMプレポリマーで蓋をした。

4. サル眼への移植

ニホンサルの強膜上にデバイスを移植し縫合した。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。

【H24年度研究】

1. デバイス作製用PDMS鑄型の作製

ウサギ用デバイスの形状をCADで設計した。アクリル板にウサギ用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、オーブンで乾燥した。プラズマアッシャーで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鑄型が最終形である。

2. デバイス (リザーバー) の作製

PDMS鑄型にTEGDM 1mlにHMP 10µlを混合したプレポリマーを流し、UV架橋(25mW/cm², 3min)した。

3. ウサギ眼への移植

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

【H25年度研究】

1. デバイス作製用PDMS鑄型の作製

ヒト用デバイスの形状をCADで設計した。

以下、昨年度と同様の方法で鑄型を作成した。

2. デバイス (リザーバー) の作製

PDMS鑄型にTEGDM 5mLにHMPを0.1mL混合したプレポリマーを流し、UV架橋(11.6mW/cm², 40秒, LC8, 浜松ホトニクス)してリザーバーを作製した。

C. 研究結果

【H23年度研究】

1. デバイス鑄型の作製

CADを利用して、サル眼用のデバイス (リザーバー) 鑄型を作製した。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20µL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。プレポリマーをPDMS鑄型①に流したあと、PDMS鑄型②で蓋をしてUV照射することでリザーバーを作製することができる。

2. デバイス形状の最適化

デバイス内のリザーバー (薬物搭載部分) が後眼部へ届く形状を目指した。デバイスの長さを変更したプロトタイプの写真を示す。デバイス後端の穴は縫合用の穴である。また、様座な眼球の局面に対応できるように、デバイスの湾曲角度の変更を検討した。

3. サル眼への移植検討

サル眼へ移植した結果、後眼部に届く長さは約15mm、角度は直径2cmの球にフィットする角度が現状で最適と判断した。

縫合用の形状として、当初は穴を1つ設け

たが、1点で縫合した場合、デバイス先端が動いたり、浮いて強膜に密着しない、という課題があった。そこで、穴ではなく、デバイスの側面に4つの溝を掘り、4点で縫合する形状を採用した。これによって強膜に密着させることができた。密着によって、薬剤が周囲へ漏れることや、Fibrosisが徐放面に侵入することを防ぐ効果があると考えられる。サル眼結膜周囲には、移植直後は軽い炎症を伴うが、約1か月の移植では、眼底にも問題はなく、副作用はないと考えている。

【H24年度研究】

1. デバイス鋳型の作製

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。これは、デバイス後端部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。

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。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。

【H25年度研究】

1. デバイス鋳型の作製

角膜を入れた日本人眼軸長は平均23.8mmと計算された。角膜を考慮し眼球中心から黄斑までを11mm、眼球中心から赤道部までを12mmとした。赤道部から黄斑部まで計算上18mmと考えられ、赤道部から角膜輪部までは10.8mmと計算した。デバイス先端が黄斑でデバイス後端が赤道部とするとデバイスサイズは18mmとなるが、強膜に糸をかける位置とデバイスの縫合糸溝の位置などを考慮するとデバイスの長さは①19mm、②21mm、③23mmの3種類が適切と判断した。臨床で使用されていた黄斑プロンベは長さが21-27mmで21mmは最短となるが、黄斑プロンベそのものが近視の網膜剥離に使用することが多いことを考慮すると妥当な値と考えた。デバイスの縫合溝がデバイス後端

より1.4mmで、溝幅が0.3mmで、もうひとつの糸溝がそこから1.7mmになるので、デバイス後端から奥の縫合溝まで3.4mmになる。

眼球のカーブはこれまでのデータからまず眼球直径24mmを考えた。さらに角膜の突出、眼軸長分布、デバイスフィット状態を考慮して22mmも考慮した。したがってデバイス長①②③に対してそれぞれ24mm、22mmの円を考慮したデバイスカーブを作製することで、平均的な成人の眼球に適応可能なデバイスが準備できると考えられる。

2. 縫合溝の形状検討

デバイスを強膜に固定するための縫合糸を引掛ける溝として、デバイス後端部に側面にそれぞれ2か所の溝を設計した。しかし、眼球モデルにデバイスの固定を検討した結果、縫合で縛る力によって後端部が強膜に押し付けられ、逆に先端側が強膜から浮いてしまう可能性が指摘された。そこで、デバイスの先端部により近い部分に複数の溝を設計した。この形状によって縫合糸を掛ける位置がよりデバイス先端側に移動するため、デバイスの浮きがありを抑制できると期待できる。また、縫合糸のかけ方に自由度が増し、状況に応じて縫合部位を変えることができる。また別のパターンとして、横に溝をつけるのではなく、デバイス上面に横一直線の溝を設計した。突起物がなくなるため、安全に縫合できる可能性がある。

D. 考察

【H23年度研究】

加齢黄斑変性症では、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、デバイスと強膜の隙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。最終プロトタイプでは、強膜への密着が強化され、徐放面が後眼部付近まで届くように設計されており、加齢黄斑変性症の治療に対して有効に働く可能性がある。

【H24年度研究】

改良したデバイス形状は縫合糸による強膜上への固定が可能となり、ウサギ強膜への密着が強化された。

【H25年度研究】

改良したデバイス形状は縫合糸による強膜上への固定が可能となり、ヒト強膜への密着

が強化されると推定される。

E. 結論

ウサギ眼、サル眼、ヒト眼の後眼部に薬剤をデリバリーできる形状のデバイスを開発した。実際の薬物で前臨床試験を評価する準備ができたと考えている。

F. 研究発表

【平成23年度】

1. 論文発表

1. Biofuel cell anode: NAD⁺/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, H. Kaji, **M. Nishizawa**, Chem. Phys. Lett., 480 (2009) 123-126..
2. Micropatterning Contractile C2C12 Myotubes Embedded in a Fibrin Gel K. Nagamine, T. Kawashima, T. Ishibashi, H. Kaji, M. Kanzaki, **M. Nishizawa** Biotechnol. Bioeng., 105 (2010) 1161-1167
3. Transfer of Two-Dimensional Patterns of Human Umbilical Vein Endothelial Cells into Fibrin Gels to Facilitate Vessel Formation T Kawashima, T Yokoi, H Kaji, **M Nishizawa** Chem. Commun., 46 (2010) 2070-2072
4. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, **M. Nishizawa**, T. Abe J Mater Sci: Mater Med., 21 (2010) 1891-1898
5. Electrodes Combined with an Agarose Stamp for Addressable Micropatterning S Sekine, S Nakanishi, T Miyake, K Nagamine, H Kaji, **M Nishizawa** Langmuir, 26 (2010) 11526-11529
6. Directing the flow of medium in controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells with a microfluidic device H. Kaji, T. Yokoi, T. Kawashima, **M. Nishizawa** Lab Chip, 10 (2010) 2374-2379.
7. Electrically Induced Contraction of C2C12 Myotubes Cultured on a Porous Membrane-Based Substrate with Muscle Tissue-Like Stiffness H. Kaji, T. Ishibashi,

K. Nagamine, M. Kanzaki, **M. Nishizawa** Biomaterials, 31 (2010) 6981-6986

8. Monitoring Impedance Changes Associated with Motility and Mitosis of a Single Cell L. Ghenim, H. Kaji, Y. Hoshino, T. Ishibashi, V. Haguët, X. Gidrol, **M. Nishizawa**, Lab Chip, 10 (2010) 2546-2550
9. Automatic, Sequential Power Generation for Prolonging the Net Lifetime of a Miniature Biofuel Cell Stack T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, **M. Nishizawa** Lab Chip, 10 (2010) 2574-2578
10. Conducting Polymer Electrodes Printed on Hydrogel S. Sekine, Y. Ido, T. Miyake, K. Nagamine, **M. Nishizawa** J. Am. Chem. Soc., 132 (2010) 13174-13175
11. Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet K. Nagamine, T. Kawashima, S. Sekine, Y. Ido, M. Kanzaki, **M. Nishizawa** Lab Chip, 11 (2011) 513-517
12. A Scalable Controlled-release Device for Transscleral Drug Delivery to the Retina T. Kawashima, N. Nagai, H. Kaji, N. Kumasaka, H. Onami, N. Osumi, **M. Nishizawa**, T. Abe, Biomaterials, 32 (2011) 1950-1956
13. Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, **M. Nishizawa** J. Am. Chem. Soc., 133 (2011) 5129-5134

2. 学会発表

(国際学会発表)

該当なし

(国内学会発表)

該当なし

【平成24年度】

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 Lett*;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.
2. 学会発表
(国際学会発表)
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)
 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” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)
 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” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)
 4. M. Nishizawa, S. Yoshino and T. Miyake, “Enzyme-CNT Ensemble Films for Miniature Biological Fuel Cells” *Biosensors 2012, Mexico* (May 18.2012)
 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)
 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)
- (国内学会発表)
1. 西澤松彦:「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
 2. 西澤松彦:「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
 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:「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)
 4. 西澤松彦、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
 5. 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)

6. 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)
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)
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)
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)

【平成 25 年度】

1. 論文発表
 - 1) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. "A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye" Acta Biomaterialia, 10, 680-687 (2014).
 - 2) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe. "A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats" Advanced Healthcare Materials, in

press, DOI:10.1002/adhm.201400114 (2014).

2. 学会発表 (国際学会発表)
 1. Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe "Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats" 2013 ARVO annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013) (国内学会発表)
 - 1) Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nagai Nobuhiro, Yamamoto Kotaro, Saya Hideyuki, Kaji Hirokazu, Nishizawa Matsuhiko, Nakazawa Toru, Abe Toshiaki : "Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats" 第 35 回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀 (2013 年 11 月 25 日-26 日)
 - 2) Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nagai Nobuhiro, Yamamoto Kotaro, Saya Hideyuki, Kaji Hirokazu, Nishizawa Matsuhiko, Nakazawa Toru, Abe Toshiaki : "Protective effects of Clotrimazole against oxidative stress-induced cell death in RGC-5 cells and preparation of controlled release device" 第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ (2013 年 7 月 4 日-5 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

【平成 23-25 年度】

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別紙 4

【平成 23 年度】研究成果の刊行に関する一覧表（阿部俊明）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kunikata H, Nitta F, Meguro Y, Aizawa N, Hariya T, Chiba N, <u>Abe T</u> , Nishida K	Difficulty in Inserting 25- and 23-gauge Trocar-cannula during Vitrectomy	Ophthalmologic	226(4)	198-204	2011
Kunikata H, <u>Abe T</u> , Nishida K	Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments	Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging	4	12-14	2010
Miyake T, Haneda K, Nagai N, Yatagawa Y, Ohnami H, Yoshino S, <u>Abe T</u> and Nishizawa M	Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms.	Energy & Environmental Science	4	5008-5012	2011