

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

動物モデルの評価と疾患レジストリー構築準備

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

ウノプロストン徐放デバイスを利用した非臨床POC取得を目的としてきた本研究は、最終段階に来ており、動物でのデバイス埋植安全性評価と治験開始を目指した疾患ライブラリーの構築準備が重要になる1年になった。下記するように動物実験は順調に行われてきており、これまでのところ急性毒性などは眼科的な評価では見られていない。時間的な制約が少しあるが病理の結果を待つのみになった。PMDAから指摘を受けた治験に向けての検討としては、バーストを想定したデバイス移植とサルを用いた薬物動態解析の検討を開始した。一方、治験開始に向けて対象疾患であり網膜色素変性患者のリクルートと眼科的評価項目について研究グループ内で話し合った。慢性の経過をたどる本疾患に対して評価すべき項目は眼科一般検査に加えて、自覚検査の代表として視野検査、視覚感度検査、他覚的検査として局所網膜電図、自発蛍光検査、光干渉断層、網膜血管径測定などが有力候補になった。

A．研究目的

本研究期間の最終目標である非臨床POC取得に向けて、薬物動態評価やGLPデバイス埋植安全性試験の評価を行う。また、本研究終了後の治験開始に向けた疾患レジストリー構築に向けた準備を開始することが目的である。

B．研究方法

(1) 局所薬物動態と眼科的所見の検討：本検討を行うにあたり、まずNon-GLPで薬剤局所注射(テノン嚢内高濃度UNO注射)、あるいは硝子体内注射(眼内高濃度UNO投与(6mg))による眼科的評価を行った。特に硝子体内に高濃度にUNOを投与した場合、眼圧は少なくとも4週間後まで有意に低下することが判明した。一方この硝子体濃度はテノン嚢内でデバイスから薬剤がバーストを起こしても眼内に達しない濃度であった。網膜電図による検査ではどちらの方法でも、検査期間中コントロールとの差は見られなかった。

(2) サルを用いた評価

サル用デバイスを作製しサルに移植し、眼科的評価をおこなった。この評価では特に黄斑機能について検討予定であり、現在経過観察中である。また薬物動態についても同時に検討する。

(3) レジストリー構築準備

我々研究グループは網膜色素変性患者リクルートとデバイス埋植に対する評価方法を検討した。これまでの文献を検討し、慢性に経過する網膜色素変性に対してどのような評価方法が適切か、現在進行中の治験等も参考にしながら考察した。

C．研究結果

(1) 高濃度として使用したUNOは6mgであるが、これはヒト用デバイスに包埋される全UNO量であり、これを硝子体内に投与すると、少なくとも4週間は眼圧が有意に低下することが判明した。しかし、網膜電図に有意差は見られなかった。テノン嚢下に直接注入した場合眼内投与と同様に眼圧の

有意な低下が見られたが、その値は軽度であった。網膜電図にコントロールとの差は見られなかった。

(2) 細胞培養

サル用のデバイスを作製した。必要と同じ徐放量(10-12マイクログラム/日)を持つように調整できた。本デバイスをいサル上耳側居膜上に固定し、現在経過観察中である。サルの検討については、PMDAとの相談により27年度以降にも追加検討する可能性がある。

(3) レジストリー構築準備

我々研究グループは網膜色素変性患者リクルートとデバイス埋殖に対する評価方法を検討した。これまでの文献を検討し、慢性に経過する網膜色素変性に対してどのような評価方法が適切か、現在進行中の治験等も参考にしながら考察した。その結果以下のような項目を現時点では評価項目として考えている。全身検査や眼科一般検査以外に主要な項目は自覚的検査項目としてmicroperimetry (MP-3)、Humphrey static perimetry (10-2)、Goldmann perimetryが候補として考えられ、他覚的検査所見としてはOptic coherence tomography (OCT)、Autofluorescence imaging、Focal electroretinography (fERG)、Field ERG、Pattern electroretinography、Multifocal electroretinography等があげられる。

D . 考察

非臨床POC取得目指した今回の研究で、本分担者は最終的な動物実験の眼科的評価と本研究成果を利用して近い将来行われる予定の治験に対する検討を行った。また、サルを用いた黄斑機能解析や薬物動態も解析中であり、よりヒト眼球に近い状態で評価できると考えられる。治験開始までにレジストリー構築は必須であり、評価項目は引き続き検討予定とする。

E . 結論

デバイスの全身毒性と眼局所毒性がない

ことがGLP試験で明らかになった。疾患レジストリー構築の方向性が決定した。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Yukita M, Machida S, Nishiguchi KM, Tsuda S, Yokoyama Y, Yasuda M, Maruyama K, **Nakazawa T**. Molecular, anatomical and functional changes in the retinal ganglion cells after optic nerve crush in mice. *Doc Ophthalmol* 2015 ;**130**:149-56.
2. Kunikata H, Aizawa N, Kudo M, Mugikura S, Nitta F, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Satoh F, Takahashi H, Ito S, Takahashi S, **Nakazawa T**. Relationship of ocular microcirculation, measured by laser speckle flowgraphy, and silent brain infarction in primary aldosteronism. *PLoS One* 2015; **10**: e0117452.
3. Takada N, Omodaka K, **Nakazawa T**. Regional susceptibility of the optic disc to retinal nerve fiber layer thinning in different optic disc types of eyes with normal tension glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2015;**43**:291-3.
4. Omodaka K, Yabana T, Takada N, **Nakazawa T**. Regional correlation of macular areas and visual acuity in patients with open angle glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2015 ;**43**:279-82.
5. Yokoyama Y, Tanito M, Nitta K, Katai M, Kitaoka Y, Omodaka K, Tsuda S, Nakagawa T, **Nakazawa T**. Stereoscopic analysis of optic nerve head parameters in primary open angle glaucoma: the glaucoma stereo analysis study. *PLoS One* 2014; **9**: e99138.
6. Yokoyama Y, Maruyama K, Yamamoto K, Omodaka K, Yasuda M, Himori N, Ryu M, Nishiguchi KM, **Nakazawa T**. The role of calpain in an in vivo model of oxidative stress-induced retinal ganglion cell damage. *Biochem Biophys Res*

- Commun* 2014;**451**:510-5.
7. Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, **Nakazawa T**. RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. *PLoS One* 2014; **9**: e93258.
 8. Aizawa N, Kunikata H, Yokoyama Y, Nakazawa T. Correlation between optic disc microcirculation in glaucoma measured with laser speckle flowgraphy and fluorescein angiography, and the correlation with mean deviation. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2014 ;**42**:293-4.
 9. Doi H, Kunikata H, Kato K, Nakazawa T. Ophthalmologic Examinations in Areas of Miyagi Prefecture Affected by the Great East Japan Earthquake. *JAMA Ophthalmol* 2014;**132**:874-6.
 10. Aizawa N, Nitta F, Kunikata H, Sugiyama T, Ikeda T, Araie M, Nakazawa T. Laser speckle and hydrogen gas clearance measurements of optic nerve circulation in albino and pigmented rabbits with or without optic disc atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;**55**:7991-6.
 11. Aizawa N, Kunikata H, Shiga Y, Yokoyama Y, Omodaka K, Nakazawa T. Correlation between structure/function and optic disc microcirculation in myopic glaucoma, measured with laser speckle flowgraphy. *BMC Ophthalmol* 2014; **14**: 113.
 12. Aizawa N, Kunikata H, Omodaka K, Nakazawa T. Optic disc microcirculation in superior segmental optic hypoplasia assessed with laser speckle flowgraphy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2014; **42**:702-4.
 13. Aizawa N, Kunikata H, Nitta F, **Nakazawa T**. The relationship between laser speckle flowgraphy-measured optic disc microcirculation and postoperative visual recovery in rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmol* 2014. **42**:702-4
 14. Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Shiga Y, Morin R, **Nakazawa T**. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **55**: 7126-36.
 15. Tsuda S, Kunikata H, Shimura M, Aizawa N, Omodaka K, Shiga Y, Yasuda M, Yokoyama Y, **Nakazawa T**. Pulse-Waveform Analysis of Normal Population using Laser Speckle Flowgraphy. *Curr Eye Res* 2014.;**39**:1207-15.
 16. Tanaka Y, Tsuda S, Kunikata H, Sato J, Kokubun T, Yasuda M, Nishiguchi KM, Inada T, **Nakazawa T**. Profiles of Extracellular miRNAs in the Aqueous Humor of Glaucoma Patients Assessed with a Microarray System. *Sci Rep* 2014; **4**: 5089.
 17. Takayama S, Shiga Y, Kokubun T, Konno H, Himori N, Ryu M, Numata T, Kaneko S, Kuroda H, Tanaka J, Kanemura S, Ishii T, Yaegashi N, **Nakazawa T**. The traditional kampo medicine tokishakuyakusan increases ocular blood flow in healthy subjects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; **2014**: 586857.
 18. Suzuki N, Kunikata H, Aizawa N, Abe T, **Nakazawa T**. Predicting visual outcomes for macula-off rhegmatogenous retinal detachment with optical coherence tomography. *J Ophthalmol* 2014; **26**:9837.
 19. Shiga Y, Sato M, Maruyama K, Takayama S, Omodaka K, Himori N, Kunikata H, **Nakazawa T**. Assessment of Short-Term Changes in Optic Nerve Head Hemodynamics in Hyperoxic Conditions with Laser Speckle Flowgraphy. *Curr Eye Res* 2014: 1-8.
 20. Omodaka K, Yokoyama Y, Shiga Y, Inoue M, Takahashi S, Tsuda S, Maruyama K, **Nakazawa T**. Topographical Correlation Between Macular Layer Thickness and Clockwise Circumpapillary Retinal Nerve Fiber Layer Sectors in Patients with Normal Tension Glaucoma. *Curr Eye Res* 2014: 1-8.
 21. Omodaka K, Takada N, Takahashi H, **Nakazawa T**. Regional structural vulnerability of the macula in patients with normal tension glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2014. **43**:89-90
 22. Omodaka K, Nishiguchi KM, Yasuda

- M, Tanaka Y, Sato K, Nakamura O, Maruyama K, **Nakazawa T**. Neuroprotective effect against axonal damage-induced retinal ganglion cell death in apolipoprotein E-deficient mice through the suppression of kainate receptor signaling. *Brain Res* 2014;**1586**:203-12
23. Omodaka K, Kurimoto T, Nakamura O, Sato K, Yasuda M, Tanaka Y, Himori N, Yokoyama Y, **Nakazawa T**. Artemin augments survival and axon regeneration in axotomized retinal ganglion cells. *J Neurosci Res* 2014. **92**:1637-46
24. Nitta F, Kunikata H, Aizawa N, Omodaka K, Shiga Y, Yasuda M, **Nakazawa T**. The effect of intravitreal bevacizumab on ocular blood flow in diabetic retinopathy and branch retinal vein occlusion as measured by laser speckle flowgraphy. *Clin Ophthalmol* 2014; **8**: 1119-27.
25. Maekawa S, Shiga Y, Kawasaki R, **Nakazawa T**. Usefulness of novel laser speckle flowgraphy-derived variables of the large vessel area in the optic nerve head in normal tension glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2014;**42**:887-9
26. Kobayashi W, Kunikata H, Omodaka K, Togashi K, Ryu M, Akiba M, Takeuchi G, Yuasa T, **Nakazawa T**. Correlation of optic nerve microcirculation with papillomacular bundle structure in treatment naive normal tension glaucoma. *J Ophthalmol* 2014; **2014**: 468908.
27. Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, Yasuda M, Ryu M, Omodaka K, Shiga Y, Tanaka Y, **Nakazawa T**. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014 ;**92**:1134-42
2. 学会発表
(国際学会発表)
1. **Nakazawa T**. The Current Status of Neuroprotection in the Treatment of Glaucoma. World Ophthalmology Congress (WOC) 2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
2. Maruyama K, Inaba T, Kunikata H, **Nakazawa T**. Vitreous fluid sample analysis is high diagnostic value same as bronchial alveolar lavage fluid for sarcoidosis. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
3. Himori N, Maruyama K, Taguchi K, Yamamoto M, **Nakazawa T**. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
4. Tanaka Y, Tsuda S, Kokubun T, Kunikata H, **Nakazawa T**. Detection of Glaucoma-Related Circulating miRNAs in Aqueous Humor with a Microarray System. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
5. Yabana T, Omodaka K, Togashi K, Yuasa T, **Nakazawa T**. Correlation between average vessel area measured with OCT and glaucoma severity. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
6. Ryu M, Yokoyama Y, Yamamoto K, Himori N, **Nakazawa T**. Activation of calpain and oxidative stress in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
7. Nitta F, Kunikata H, Aizawa N, Abe T, **Nakazawa T**. The effect of intravitreal ranibizumab on ocular blood flow in age-related macular degeneration ,measured with laser speckle flowgraphy. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology

- (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
8. Onami H, Kunikata H, Abe T, **Nakazawa T**. Short-term outcomes of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in eyes previously treated with ranibizumab. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 9. Shiga Y, Iwase A, Kato K, Yasui T, **Nakazawa T**. Waveform analysis of ocular blood flow in preperietic glaucoma. World Ophthalmology Congress (WOC) 2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 10. Tsuda S, Tanaka Y, Kunikata H, Hanaoka K, **Nakazawa T**. In Vivo Imaging of Hypoxic Retinal Tissue in a Retinal Artery Occlusion Model with Bioactive Fluorescence Probe. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 11. Yukita M, Omodaka K, Maruyama K, Machida S, **Nakazawa T**. Early electrophysiological andmolecular biological investigation of axotomized rat retinas. World Ophthalmology Congress (WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 12. Aizawa N, Kunikata H, Tsuda S, Ryu M, **Nakazawa T**. Effect of topical prostaglandin analogues on optic nerve head blood flow in preperimetric glaucoma. World Ophthalmology Congress (WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 13. Shimizu A, Nihori T, Maruyama K, Fuse N, **Nakazawa T**. A exploration of novel glaucoma gene using next-generation sequencing. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 14. Yokoyama Y, Omodaka K, Matsumoto A, Akiba M, **Nakazawa T**. Reproducibility of swept-source optical coherence tomography parameters of the optic nerve head. World Ophthalmology Congress (WOC) 2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 15. Yasuda M, Tanaka Y, Tsuda S, **Nakazawa T**. Assessment of retinal transcriptome changes early after axonal injury with RNA sequencing. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 16. Omodaka K, Shiga Y, Tsuda S, Yokoyama Y, **Nakazawa T**. Regional vulnerability of macular structure in patients with normal tension glaucoma. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 17. Takahashi M, Takahashi H, Shiga Y, Iwase A, **Nakazawa T**. Waveform analysis of blood flow of optic nerve head in patients with open angle glaucoma. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 18. Konno H, Omodaka K, Yokoyama Y, Maruyama K, **Nakazawa T**. Setting the Visual Field sectors based on the test points which were detected progression using the guided progression analysis software of standard automated perimetry. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 19. Kokubun T, Tsuda S, Yasuda M, Kunikata H, **Nakazawa T**. Association of Proinflammatory Cytokines in Aqueous Humor with the Bleb Structure and Function after Trabeculectomy in Eyes with Glaucoma. World Ophthalmology Congress(WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
 20. Takada N, Omodaka K, **Nakazawa T**. Optic disc morphology and regional suscep

- tibility to circumpapillary retinal nerve fiber layer atrophy in normal tension glaucoma. World Ophthalmology Congress (WOC)2014 , 29th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)2014 ,Tokyo, Japan, 2014/4/2-6
21. Shiga Y, Maruyama K, Sato M, Takayama S, Kunikata H, **Nakazawa T** Effect of systemic hyperoxia on optic nerve head blood flow in normal subjects, as measured by laser speckle. ARVO 2014 Orlando, USA 2014/5/4-8
 22. Yukita M, Machida S, Omodaka K, Maruyama K, **Nakazawa T**, Brimonidine Enhances Electrophysiological Activity of Retinal Ganglion Cells through Trk-PI3K Pathway.. ARVO 2014 Orlando, USA 2014/5/4-8
 23. Omodaka K, Shiga Y, Tsuda S, Yokoyama Y, **Nakazawa T**, Topographical correlation between macular layer thickness and clockwise circumpapillary retinal nerve fiber layer in patients with normal tension glaucoma. ARVO 2014 Orlando, USA 2014/5/4-8
 24. Maruyama K, Keino H, Yamamoto K, Moritoh S, **Nakazawa T** Prevention of Experimental Autoimmune Uveities by Inhibition of the Cyclooxygenase-2-Linked Pathway in a Rodent Model. ARVO 2014 Orlando, USA 2014/5/4-8
 25. **Toru Nakazawa**: Comprehensive analysis of early retinal transcription changes following optic nerve crush. Glaucoma Research Society Meeting Jackson Hole, USA 2014/8/27-30
 26. Koji Nishiguchi, Kosuke Fujita, Satoru Tsuda Yusuke Fujii, Kotaro Yamamoto, Kota Sato, Masayuki Yasuda, **Toru Nakazawa**: In vivo imaging of stress responses in retinal ganglion cells using AA V2-mediated delivery of pathway-specific promoter driven reporters . Asia ARVO, Yokohama, 2015/2/16-2/19
 27. Yusuke Fujii, Koji Nishiguchi, Toshinori Furukawa, Fumiko Ono, Nobuhiro Shimozawa, Mutsumi Togo, Michihiro Suzuki, Toru **Nakazawa**: The result of an analysis of fundus photos taken from 1,443 monkeys at Tsukuba Primate Research

Center during 2011-2013. Asia ARVO, Yokohama 2015/2/16-2/19

(国内学会発表)

1. 中澤 徹：失明ゼロを目指して．第118回 日本眼科学会総会、東京 2014/4/2-6
 2. 高橋秀肇、志賀由己浩、面高宗子、高橋麻衣、相澤奈帆子、國方彦志、中澤徹：レーザースペックル眼底血流検査による血流動態が緑内障に与える影響．第118回 日本眼科学会総会、東京 2014/4/2-6
 3. 雪田昌克、面高宗子、町田繁樹、丸山和一、中澤徹：Brimonidineによるラット網膜神経節細胞のNeuroactivation．第118回 日本眼科学会総会、東京 2014/4/2-6
 4. 佐藤茉莉華、竹下孝之、城田祐子、前川重人、中澤徹：感染との鑑別に苦慮し、臨床経過から極限型Wegener肉芽腫と診断した一例．第67回 日本臨床眼科学会、東京 2014/11/13-11/16
 5. 今留尚人、國方彦志、浅野俊一郎、**中澤徹**：糖尿病黄斑浮腫に対するトリアムシノロンアセトニド局所投与の効果比較．第67回 日本臨床眼科学会、東京 2014/11/13-11/16
- H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許
 1. 中澤徹：蛍光測定装置および蛍光測定方法 整理番号WO13P013SZ 受付番号51400928048 提出日 2014/4/30
 2. 中澤徹：血流障害の治療方法、治療装置および治療システム整理番号 040A2262A1 提出日 2014/04/3
 3. 中澤徹：眼底解析装置及び眼底観察装置 発明整理番号 P20140150 提出日2014/7/22
 4. 中澤徹：眼底解析装置及び眼底観察装置 発明整理番号 P20140151 提出日2014/7/22
 5. 中澤徹：眼底解析装置及び眼底観察装置 発明整理番号 14P00058 特願2014-1

82326 提出日2014/09/08

6. 中澤徹: 仮)神経保護材 発明整理番号
P20140261提出日 2014/10/31

7. 中澤徹: 眼内移行性の高い眼疾患治療
用ナノ粒子製剤発明整理番号 P20140
284特願2015-006212出願日2014/1/15

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（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

ウノプロストン徐放デバイスの安定性に関する研究

研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

ウノプロストン徐放デバイス（URD）にエチレンオキサイドガスを実施し、6か月間加速保存後の徐放性、薬剤含量を評価した。その結果、コントロール（加速なし）と比較して徐放性、含量に変化はなかった。埋植後のデバイス中のUNO含量を測定した。その結果、埋植期間とUNO含量に相関がみられ、埋植中持続的にUNOが放出されて含量が低下していることが示唆された。

A．研究目的

医薬品・医療機器開発において滅菌法の選択とデバイスの安定性は重要である。熱に対する安定性を考慮するとオートクレーブ等の加熱滅菌は適用が難しく、また電子線やガンマ線はウノプロストンを分解する可能性が示唆されたため、エチレンオキサイドガス（EOG）を選択し、滅菌後デバイスを加速条件で保存した後の徐放性とUNO含量を評価した。

B．研究方法

（1）加速試験用デバイスの作製

ヒト用PDMS鋳型（ $\phi 22\text{mm}$ 曲率/21mm長）でTEGDMリザーバーを作成し、500mg/mlのウノプロストン/P40混合ポリマーをリザーバー内にキャスト（12 μL ）して、P40ポリマーでカバーした。（P40：40%PEGDM + 60%TEGDM）

（2）滅菌法の検討

デバイスを滅菌用バッグに入れて下記の条件で滅菌を実施した。
EOG：480mg/L、40 /40%、4時間

（3）ウノプロストン含量測定

滅菌後デバイスを粉々した後、ガラスバイアルに入れて、アセトニトリルを正確に10mL加えた。超音波処理を3時間行って、UNOを抽出した。高速液体クロマ

トグラフィ（HPLC）でウノプロストン濃度の測定を行った。

（4）徐放性の測定

滅菌後のデバイスをリン酸バッファ（PBS）1.5mLに浸漬し、37 でインキュベーションした。定期的にPBSを回収し、HPLCでPBS中のウノプロストン濃度を定量した。

（5）加速試験

デバイスを恒温恒湿機に入れて、40 /75%で保管した。1か月後、3か月後、6か月後に取り出し、上記に記載の方法で含量、徐放性を評価した。

C．研究結果

（1）加速試験後の徐放性

加速前デバイスと比較して、徐放性に大きな変化はなかった（図1）。

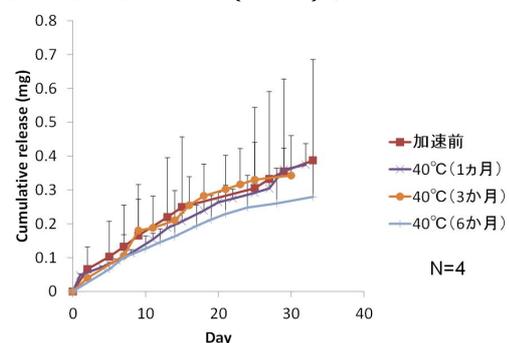


図1．加速試験後のUNO徐放性

(2) UNO含量

加速前デバイスと比較して、UNO含量に大きな変化はなかった(図2)。

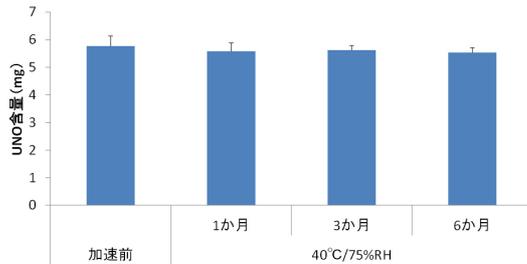


図2 . 加速試験後のUNO含量

(3) 摘出デバイスのUNO含量

ウサギ用URD(含量2.85mg)を正常ウサギに2週(N=12), 13週(N=12), 24週(N=22)間埋植後にデバイスを摘出し、UNO含量を測定した(図3)。その結果、埋植期間が長いほどUNO含量は低下していた。またUNO含量低下と埋植期間に高い相関性が見られた。

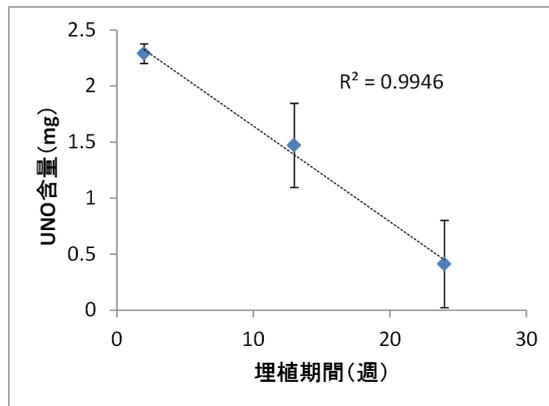


図3 .

D . 考察

6か月間加速試験後においてもURDの徐放性や含量に影響はなく、6か月間の保存が可能であることがわかった。また、摘出URDの含量は埋植期間とともに低下しており、埋植中に持続的にUNOが放出されていることが示唆された。

E . 結論

EOG滅菌デバイスは6か月間の保存が可能であることがわかった。また、埋植中にUNOは持続的に放出されていることが示唆された。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

(1) 論文発表

1. **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, Yukihiro 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*, 3(10), 1555-1560 (2014).
2. **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).
3. Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Hojae Bae, **Nobuhiro Nagai**, Hideyuki Onami, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji. "Micropatterned Polymeric Nanosheets for Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer" *Advanced Materials*, 26(11), 1699-1705 (2014).

(2) 学会発表

(国際学会発表)

1. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe "Episclera Implantable Device fabricated with PDMS mold-based UV curing" BIT's 1st Annual W

- orld Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)
2. Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, Matsuhiro Nishizawa, Toru Nakazawa, Yukihiro Mashima, **Nobuhiro Nagai** “Polymeric Device for Transscleral Multi-drug Delivery” BIT’s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)
 3. Aya Katsuyama, **Nobuhiro Nagai**, Hideyuki Onami, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Fabrication of a Capsule Device using Polyethyleneglycol Dimethacrylates for Extended Release of Ranibizumab” BIT’s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)
 4. **Nobuhiro Nagai** “Polymeric device for transscleral drug delivery to the posterior segment” Asia-Arvo 2015, Yokohama, Japan (February 16-19, 2015)
 5. Hirokazu Kaji, Yoshinori Fujie, Yoshihiro Mori, **Nobuhiro Nagai**, Khadmhosseini Ali, Toshiaki Abe “Cell delivery system using micropatterned polymeric nanosheets” Society for biomaterials, 2014 annual meeting, Denver, Colorado (April 16-19, 2014)
 6. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiro Mashima, Toshiaki Abe “Controlled Transscleral Dual-drug Delivery by a Polymeric Device Reduces Light-induced Retinal Damage” 2014 ARVO annual meeting, 446, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)
 7. Zhaleh Kashkouli Nezhad, **Nobuhiro Nagai**, Kotaro Yamamoto, Hideyuki Saya, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats” 2014 ARVO annual meeting, 483, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)
 8. Hirokazu Kaji, Toshinori Fujie, **Nobuhiro Nagai**, Toshiaki Abe “Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer by Micropatterned Polym

eric Nanosheets” 2014 ARVO annual meeting, 1449, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)

(国内学会発表)

1. **永井展裕**, 泉田泰子, 梶弘和, 西澤松彦, 中澤徹, 眞島行彦, 阿部俊明:「ウノプロトン徐放デバイスの強膜上投与による眼内薬物動態と埋植毒性評価」第36回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(2014年11月17日-18日) Oral
2. 網嶋 俊一, 森 好弘, 藤枝俊宣, **永井展裕**, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和:「圧力負荷機構を用いた上皮細胞の力学的評価システムの開発」化学とマイクロ・ナノシステム学会第30回研究会、北海道大学(2014年10月2日-3日) Poster
3. 森好弘, 藤枝俊宣, **永井展裕**, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶弘和:「ラット眼球網膜下への細胞担持ナノシートデリバリー」第36回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(2014年11月17日-18日) Poster
4. **永井展裕**, 梶弘和, 西澤松彦, 中澤徹, 眞島行彦, 阿部俊明:「光硬化性樹脂を利用した網膜ドラッグデリバリーシステムの開発」第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(2014年9月9日~11日)
5. 森好弘, 藤枝俊宣, **永井展裕**, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶弘和:「ナノシートを用いる眼内への細胞送達システムの開発」第30回日本 DDS 学会学術集会、慶應義塾大学薬学部(2014年7月30日~31日)
6. **永井展裕**, 梶弘和, 岩田悟, 泉田泰子, 西澤松彦, 眞島行彦, 阿部俊明:「光硬化性 PEG ジメタクリレートで作成した網膜 DDS の実用化に向けた開発と評価」第30回日本 DDS 学会学術集会、慶應義塾大学薬学部(2014年7月30日~31日)
7. **永井展裕**, 梶弘和, 西澤松彦, 中澤徹, 阿部俊明:「経強膜持続投与デバイスによる網膜保護の可能性」第118回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム(2014年4月2日~6日) Symposium

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

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

デバイスの調整と動物実験

研究分担者 梶 弘和 東北大学大学院工学系研究科 准教授

研究要旨

ウノプロストン徐放デバイス（URD）の規格化と埋植毒性試験（Non-GLP）、およびURDのバーストを想定したバーストURD埋植毒性試験（Non-GLP）を評価した。URDは動物実験に使用するウサギ用、サル用のURDを作成し規格化した。ウサギ用URDの正常ウサギ埋植毒性試験では、54週間埋植中の網膜電図（ERG）、局所ERG、光干渉断層計（OCT）による網膜機能と網膜組織の評価を実施した結果、54週間の埋植中に毒性が認められないことを確認した。また、URDの徐放膜（カバー）をなくしたバーストURDの埋植毒性試験では、眼圧は低値を示すものの、ERGとOCTで異常は認められず、毒性は認めなかった。これらの結果を考慮し、治験での使用を想定したヒト用URDを規格化した。

A．研究目的

GLP試験および治験で使用するためにデバイスの規格化を検討する。また規格化したデバイスでGLP試験を実施するに当たり、予備試験として54週間の埋植毒性試験（Non-GLP）とバーストデバイスの埋植毒性試験（Non-GLP）を検討した。

B．研究方法

(1) デバイスサイズの規格化

ウサギ眼球とサル眼球の平均的サイズからデバイスの長さ、幅、厚み、曲率直径、リザーバー容積、徐放面積を下記の通り設定した。

ウサギ用

長さ：10mm
幅：3.6mm
厚さ：0.7mm
曲率直径：12mm
リザーバー容積：5.7 μ L
徐放面積：11.55cm²

サル用

長さ：17mm
幅：4.4mm
厚さ：1mm

曲率直径：18mm

リザーバー容積：12 μ L

徐放面積：17.3cm²

(2) デバイス調製方法の規格化

下記の方法をStandard operation procedure (SOP)とした。

準備

試薬は室温に戻してから使用する。UV強度を毎回調整する。

試薬

- Polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDM)：新中村化学工業 (NK 14G) Lot No. 0701S
- Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDM)：新中村化学工業 (NK 3G) Lot No. 0606S
- 2-Hydroxy-2-methylpropiophenone (HMP)：東京化成工業 (H0991) Lot No. B055H-ML
- ウノプロストン (UNO) Lot No. DB0018
- UV照射機の照射強度 (UVメータ測定値) 11.6mW/m²

100%PEGDMプレポリマー (P100) の調製

1) 15mLのプラスチック容器にPEGDMをマイクロマンを使って正確に5mL採取する。

- 2) 上記のPEGDMに、マイクロマンを使ってHMPを正確に100 μ L添加する。
 3) 蓋をしっかりと閉めて20回転倒混和する。

4) 蓋をゆるめてデシケーターに入れて減圧度0.08MPaで10分脱気する。

100%TEGDMプレポリマー (T100) の調製

5) 15mLのプラスチック容器にTEGDMをマイクロマンを使って正確に10mL採取する。

6) 上記のTEGDMに、マイクロマンを使ってHMPを正確に200 μ L添加する。

7) 蓋をしっかりと閉めて20回転倒混和する。

8) 蓋をゆるめてデシケーターに入れて減圧度0.08MPaで10分脱気する。

40%PEGDM/60%TEGDMプレポリマー (P40) の調製

9) 15mLのプラスチック容器にP100をマイクロマンを使って正確に0.8mL採取する。

10) 上記のP100に、マイクロマンを使ってT100を正確に1.2mL添加する。

11) 蓋をしっかりと閉めて20回転倒混和する。

12) 蓋をゆるめてデシケーターに入れて減圧度0.08MPaで10分脱気する。

ウノプロストン含有P40 (UNO-P40) の調製

13) 5mlのエッペンチューブにウノプロストンを正確に300mgを採取する(測定記録貼付すること)。

14) 上記のウノプロストンにP40をマイクロマンで正確に300 μ L添加する。

15) ボルテックスミキサーで5分以上攪拌する。

16) エアダスターでリザーバー用鋳型の埃を飛ばす

17) リザーバー用鋳型にT100を50 μ Lキャストする。

18) エアダスターで埃を飛ばした凸鋳型を泡が入らないようにリザーバー用鋳型に慎重に乗せる。

19) 40秒間 UV照射する。

20) 鋳型から慎重にリザーバーを取り、大きなバリをハサミで切り取る。鋳型は70%エタノールで拭く。

UNO-P40の充填

21) リザーバーの薬剤充填部位に、UNO-P40を正確にウサギ用は5.7 μ L、サル用は12 μ Lキャストする。

22) 40秒間 UV照射する。

リザーバーのカバー

23) 薬剤充填部位にP40を正確にウサギ

用は3 μ L、サル用は10 μ Lキャストする。

24) エアダスターで埃を飛ばしたカバー用鋳型をP40上に泡が入らないように慎重に乗せる。

25) デバイスをピンセットで優しく押しつけて鋳型に密着させる。

26) 240秒間 UV照射する。

27) 鋳型からデバイスを外す。鋳型は70%エタノールで拭く。

バリ取りと拭き取り

28) 70%エタノールでデバイスのPEGDM/TEGDM残渣をふき取る。

29) 小さなバリを電動ヤスリで研磨する。

30) 70%エタノールでデバイスの研磨残渣をふき取る。

(3) UNO徐放量の測定

デバイスを1%Tween80水溶液 (PS80) 1.5mLに浸漬 (37) し静置し、2日おきにPS80を全回収し、新しいPS80 1.5mLを入れて再静置をする。サンプルは測定まで-30 で保存する。測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC、島津、Prominence) で実施した。

(4) UNO含量の測定

デバイスを乳鉢で粉々にすりつぶし、アセトニトリルでUNOを抽出した。UNO量をHPLCで測定した。

(5) パーストURDの作製

ウサギに埋植可能な最大サイズでUNO含量はサルや治験で使用するものと同じ量になるように、下記のサイズのリザーバーを作成した。

パーストURD用

長さ：12mm

幅：4.4mm

厚さ：1mm

曲率直径：12mm

リザーバー容積：12 μ L

徐放面積：17.3cm²

(6) 埋植試験

URDおよびパーストURDを上鼻側強膜上に移植した。デバイス移植は上直筋に4-0糸で制御糸をかけ、眼球を下方回旋させ12時付近

の球結膜を露出した。眼科剪刀を用いて、約4×4 mmの鍵状球結膜切開を作製し、セッシンを用いてデバイスを球結膜と強膜の間に挿入した。デバイスの位置は先端が眼球赤道部から視神経の間とし、7-0縫合糸で強膜の上に固定した。デバイス固定後、球結膜の切開部を9-0縫合糸にて縫合した。クラビット点眼液を1～2点眼後タリビット眼軟膏を点入した。

(7) ERG

1時間暗順応した後、暗室下でミドリンP点眼で散瞳した。ウサギ眼球に角膜電極 (Mayo) 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Rod (杆体細胞) ERGを測定した。

1時間明順応後、通常の照明下でミドリンP点眼で散瞳した。ウサギ眼球に角膜電極 (Mayo) を当てて固定し、-1.000、-0.050、0.950、1.477、2.000 (log cd*s/m²) の光刺激でCone (錐体細胞) ERGを測定した。

局所ERGはKOWA ER-80を使用した。刺激は30cd/m²で実施した。

(8) OCT

ミドリンP点眼で散瞳した。ウサギ眼球にコンタクトレンズ (ユニコン) を装着後、OCT (RS-3000 Advance、ニデック) の黄斑ラインモードで測定した。Inner limiting membran(ILM) からRetinal pigment epithelim (RPE) までの厚みを網膜全層に渡って測定 (1000点) し平均化した。

(9) 眼圧測定

トノベッド (アイケア) で測定を行った。4回測定を行い、その平均値を眼圧とした。

C . 研究結果

(1) デバイスの規格化

規格化した方法で作成したウサギ用URDおよびサル用URDの徐放性はそれぞれ、約10 μg/dayおよび約12 μg/dayとなった。また、UNO含量はウサギ用は2.85mg、サル用は6mgと規格化した。

(2) ERG (URD54週間埋植試験)

図1に54週間埋植中のCone-ERG (0.950log cd*s/m²)、およびRod-ERG (1.477log cd*s/m²) の振幅値平均を示す。URD埋植群、Placebo、埋植群、未処置群の3群間でいずれの時点においても有意差を認めなかった。眼圧は埋植54週目において群間で有意な差は見られなかった。

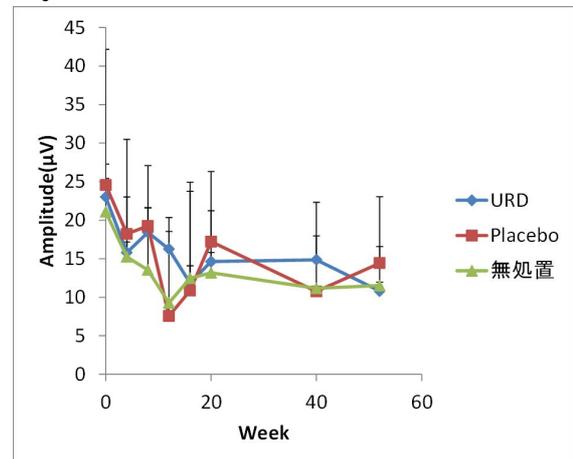


図1 - 1 . Cone-ERG a波

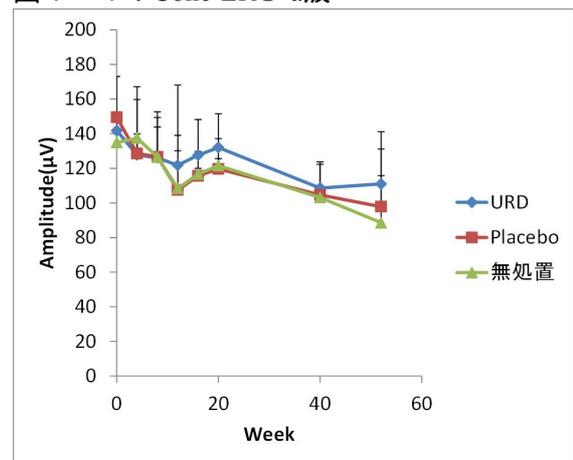


図1 - 2 . Cone-ERG b波

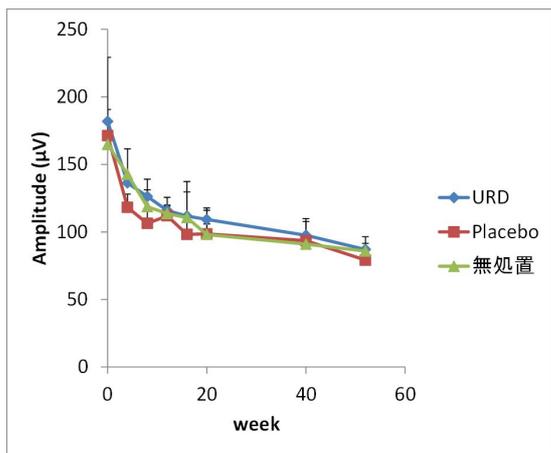


図 1 - 3 . Rod-ERG a波

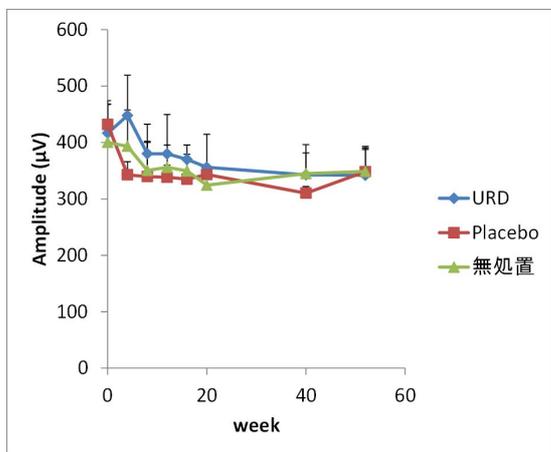


図 1 - 4 . Rod-ERG b波

(3) 局所ERG (URD埋植54週間試験)

埋植8週目に局所ERGを実施した。URD埋植眼のデバイス埋植部位(上鼻側)と非埋植部位(上耳側)をそれぞれ測定した結果(図2)、振幅値の平均値に有意差はなく、デバイス埋植部位局所の網膜機能低下はないことが確認された。

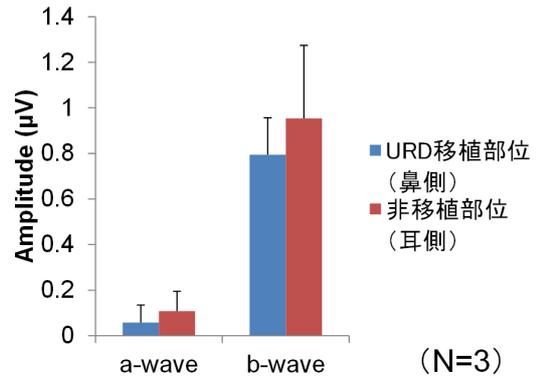


図 2 . 局所ERGの振幅値

(4) OCT (URD埋植54週間試験)

埋植54週目にOCTを実施した。デバイス埋植部位の上鼻側と非埋植部の下耳側の網膜断層像を取得し、網膜層厚みの平均値を測定した結果(図3)、いずれの部位においてもURD埋植群、Placebo、埋植群、未処置群の3群間でいずれの時点においても有意差を認めなかった。

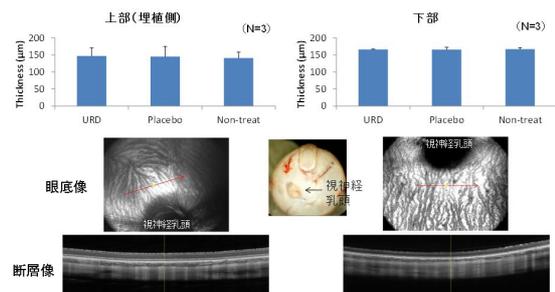


図 3 . OCT像と網膜層厚みの平均

(5) パーストURD埋植毒性

パーストURDの徐放特性を図4に示す。約3週間、約160 µg/dayでパースト徐放が続き、その後は含量の低下とともに徐放性は低下した。7週目以降はサル(ヒト)用規格化URDの12 µg/dayを下回った。

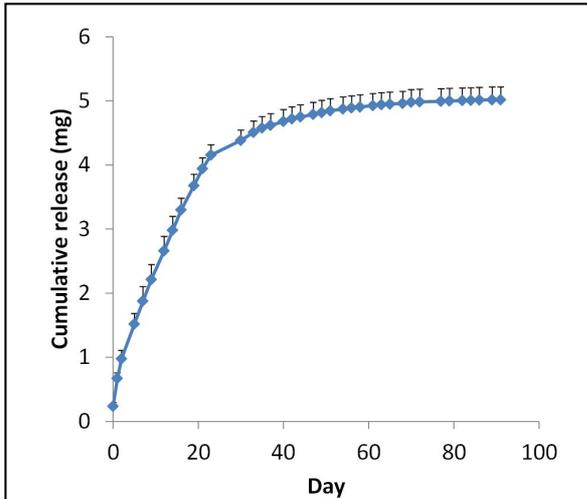


図4 . バーストURDのUNO徐放性

(6) ERG (バーストURD埋植試験)

図5に12週間埋植中のCone-ERG (1.477log cd*s/m²)、およびRod-ERG (1.477log cd*s/m²)の振幅値平均を示す。その結果、バーストURD埋植群とプラセボ埋植群で有意な差は認められなかった。

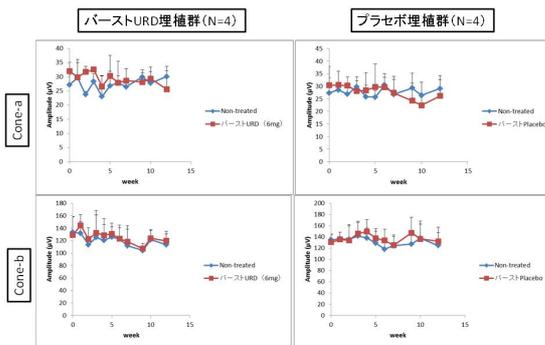


図5 - 1 . Cone-ERG

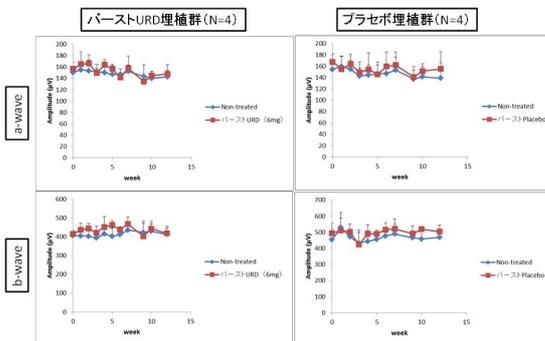


図5 - 2 . Rod-ERG

D. 考察

規格化URDで正常ウサギに対する埋植毒性を実施した結果、54週間埋植中にERG振幅値や網膜層厚みに変化はなく、埋植に伴う毒性はないと考えられた。プラセボ埋植においても同様の結果であり、デバイスからの溶出物やデバイス自体の眼周囲組織に対する物理的影響はなかった、もしくは小さかったと推定される。バーストURD埋植では規格化URDの約13倍の投与量となっていたが、毒性は認められなかった。埋植中にデバイスに不具合が生じてバーストした場合でも安全性が担保されると示唆される。

E. 結論

54週間のURDの埋植毒性はないと考えられた。また、万が一バーストした場合でも毒性はないと考えられた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampaie, 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*, 3(10), 1555-1560 (2014).
2. Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. "A polymeric device for controlled transcleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye" *Acta Biomaterialia*, 10, 680-687 (2014).
3. Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Hojae Bae, Nobuhiro Nagai, Hideyuki O

nami, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, **Hirokazu Kaji**. “Micropatterned Polymeric Nanosheets for Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer” *Advanced Materials*, 26(11), 1699-1705 (2014).

2. 学会発表

(国際学会発表)

1. Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Episclera Implantable Device fabricated with PDMS mold-based UV curing” *BIT's 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea* (March 23-25, 2015)
2. Toshiaki Abe, **Hirokazu Kaji**, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Yukihiko Mashima, Nobuhiro Nagai “Polymeric Device for Transscleral Multi-drug Delivery” *BIT's 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea* (March 23-25, 2015)
3. **Hirokazu Kaji**, Yoshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Nobuhiro Nagai, Khademhosseini Ali, Toshiaki Abe “Cell delivery system using micropatterned polymeric nanosheets” *Society for biomaterials, 2014 annual meeting, Denver, Colorado* (April 16-19, 2014)
4. Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Zahleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe “Controlled Transscleral Drug Delivery by a Polymeric Device Reduces Light-induced Retinal Damage” *2014 ARVO annual meeting, 446, Orlando, Florida* (May 4-8, 2014)
5. **Hirokazu Kaji**, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe “Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer by Micropatterned Polymeric Nanosheets” *2014 ARVO annual meeting, 1449, Orlando, Florida* (May 4-8, 2014)

ual meeting, 1449, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)

(国内学会発表)

1. 永井展裕、泉田泰子、**梶弘和**、西澤松彦、中澤徹、眞島行彦、阿部俊明：「ウノプロトン徐放デバイスの強膜上投与による眼内薬物動態と埋植毒性評価」第36回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀（2014年11月17日-18日）
2. 網嶋俊一、森好弘、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明、**梶弘和**：「圧力負荷機構を用いた上皮細胞の力学的評価システムの開発」化学とマイクロ・ナノシステム学会第30回研究会、北海道大学（2014年10月2日-3日）
3. 森好弘、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明、**梶弘和**：「ラット眼球網膜下への細胞担持ナノシートデリバリー」第36回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀（2014年11月17日-18日）
4. 永井展裕、**梶弘和**、西澤松彦、中澤徹、眞島行彦、阿部俊明：「光硬化性樹脂を利用した網膜ドラッグデリバリーシステムの開発」第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター（2014年9月9日～11日）
5. 森好弘、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明、**梶弘和**：「ナノシートを用いる眼内への細胞送達システムの開発」第30回日本DDS学会学術集会、慶應義塾大学薬学部（2014年7月30日～31日）
6. 永井展裕、**梶弘和**、岩田悟、泉田泰子、西澤松彦、眞島行彦、阿部俊明：「光硬化性PEGジメタクリレートで作成した網膜DDSの実用化に向けた開発と評価」第30回日本DDS学会学術集会、慶應義塾大学薬学部（2014年7月30日～31日）
7. 永井展裕、**梶弘和**、西澤松彦、中澤徹、阿部俊明：「経強膜持続投与デバイスによる網膜保護の可能性」第118回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2014年4月2日～6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

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

ウノプロストン徐放デバイスの薬物動態と薬理に関する研究

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

臨床に使用するものに近い形のデバイスの確認をするために、網膜変性ウサギに対する薬理効果と薬物動態を確認することを目的とした。デバイス移植後のウサギから定期的に採血し、血漿中のUNO代謝物（M1体）をLC/MS/MSで測定した結果、埋植初期はやや高値を示すが24週間にわたって持続的にウノプロストン徐放をモニタリングすることができた。また、徐放量を抑制したデバイスでは血漿中M1濃度も低下していたことから、徐放量とUNO移行量に相関が見られた。また、サル眼に対するM1体濃度を測定した結果、埋植3、6か月目において網膜内に持続的なM1体を認めた。網膜変性ウサギに対する薬理効果の再現性を評価した結果、プラセボデバイス対比、UNO徐放デバイスでは有意な網膜機能低下の抑制を認め、再現性を確認した。

A．研究目的

臨床に使用するものに近い形のデバイスの確認をするために、正常ウサギに対する薬物動態と、網膜変性ウサギに対する薬理効果を確認することを目的とした。

正常ウサギにUNO徐放デバイスを移植して、埋植中定期的に採血し、血漿中のUNO代謝物（M1体）の定量によって、ウノプロストン徐放の持続性をモニタリングした。また、規格化したデバイスよりも徐放量を抑制したデバイスを作成して埋植し、徐放量と血漿中M1体濃度の相関性を評価した。

薬理試験では近藤（名古屋大学）らにより開発された網膜変性ウサギを使用した。これはヒト網膜変性患者で報告された視細胞に発現するロドプシンの変異（Pro347Leu）を持つ。その網膜変性過程は近藤らにより詳細に報告されている（参考文献：Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50:1371- 1377）。昨年度にUNO徐放デバイスの網膜変性抑制効果を網膜電図を中心に確認したが、今回は同様の試験を実施して再現性を確認する。

B．研究方法

（1）UNO徐放デバイス（URD）の作製

ウサギ用およびサル用の薬物リザーバーの形状をCADで設計し、CAM切削加工機でアクリル板に切削した。アクリル板にポリジメチルシロキサン（PDMS）をキャストし鋳型を転写した。PDMS鋳型にトリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDM）1mlに硬化剤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ウサギ用は外径、幅3.6mm×長さ10mm×厚さ0.7mm（曲率直径12mm）、サル用は幅4.4mm×長さ17mm×厚さ1mm（曲率直径18mm）、で眼球の曲率に合わせた形状を持っている。薬剤充填部容量は5.7 μ L（ウサギ用）、12 μ L（サル用）である。徐放制御システムとして、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）1mlに硬化剤10 μ lを混合したPEGDMプレポリマーに、TEGDMを混合したものを使用した。リザーバーにUNOを40%PEGDM/60%TEGDM（P40）でペレット化したものを充填後、薬剤上にP40をキャストし、UV架橋によって薬剤をカバーしてデバイスを作製した。

(2) 徐放量を抑制したデバイスの作成

上記方法でTEGDMLリザーバー(ウサギ用)を作成した。UNOを20%PEGDM/80%TEGDML(P20)でペレット化したものを充填後、薬剤上にP20をキャストし、UV架橋によって薬剤をカバーしてデバイス(P20-URDと略す)を作製した。

(3) デバイス移植

UNO徐放デバイス(URD)およびP20-URDを上鼻側強膜上に移植した。デバイス移植は上直筋に4-0糸で制御糸をかけ、眼球を下方回旋させ12時付近の球結膜を露出した。眼科剪刀を用いて、約4×4mmの鍵状球結膜切開を作製し、セッシンを用いてデバイスを球結膜と強膜の間に挿入した。デバイスの位置は先端が眼球赤道部から視神経の間とし、7-0縫合糸で強膜の上に固定した。デバイス固定後、球結膜の切開部を9-0縫合糸にて縫合した。クラビット点眼液を1~2点眼後タリビット眼軟膏を点入した。

(4) 血漿中M1体濃度モニタリング

日本ウサギに上記方法でURDとP20-URDを埋植した。定期的にウサギ耳静脈から採血し、血漿中のUNO代謝物M1体濃度をLCMSMS(新日本科学 薬物代謝分析センター)で定量した。

(5) サル眼内動態

日本サルに上記方法でURDを埋植した。3か月後および6か月後に眼球を摘出し、網膜、脈絡膜、硝子体、水晶体、毛様体、虹彩のM1体濃度をLCMSMSで測定した。

(6) 網膜変性ウサギに対する薬理

網膜変性ウサギ(TGウサギ)にURDを上記方法で埋植した。

網膜機能測定は網膜電図(ERG)、網膜組織の評価は光干渉断層計(OCT)を使用した。ウサギは組織構造は髄翼を持つなど、ヒトと違うことが知られているが、杆体機能と錐体機能の両方がERGで評価可能で、眼球の大きさはヒトに近いいため、実用に近い評価が可能と推測できる。

(7) ERG

1時間暗順応した後、暗室下でミドリンP点眼で散瞳した。ウサギ眼球に角膜電極(Mayo)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Rod(杆体細胞)ERGを測定した。

1時間明順応後、通常の照明下でミドリンP点眼で散瞳した。ウサギ眼球に角膜電極(Mayo)を当てて固定し、-1.000、-0.050、0.950、1.477、2.000(log cd*s/m²)の光刺激でCone(錐体細胞)ERGを測定した。

(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) 血漿中M1体モニタリング

徐放量を抑制したP20-URDでは血漿中M1濃度はURDよりも低値を示していた(図1)。一方で、URDは24週間を超えるとUNO含量が半分を切るために徐放量が低下するため、それと一致して血漿中M1体濃度も低下していた。P20-URDは24週を超えても徐放量は一定しているため、埋植48週まで持続して血漿中M1体を認めた。

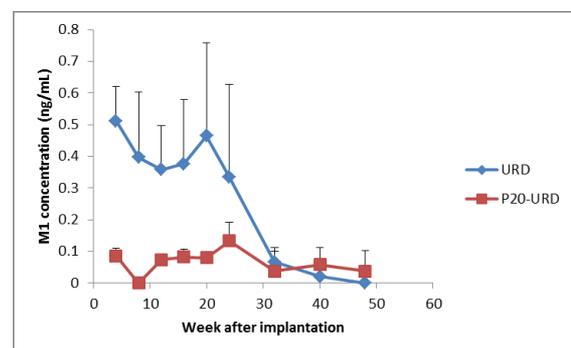


図1. ウサギ血漿中M1体濃度

(2) サル眼内動態

サル用URDを埋植後3か月目、および6か月目の前房水、硝子体、網膜、脈絡膜、水晶体、

毛様体、虹彩中のM1体濃度を表1に示す。脈絡膜は他の組織に比べて高値を示していた。これは徐放UNOが血中にクリアランスされているためと推定される。また、網膜内では3, 6か月目ともに4.6、8.4ng/gのM1体濃度を認めた。前房水ではM1体を認めなかったが、毛様体および虹彩では1.1~7.6ng/gのM1体を認めた。徐放UNOの一部は前眼へ移行していることが推定された。

表 1 . サル眼内動態

	(ng/g or mL)	3か月 (N=4)	6か月 (N=3)
平均	前房水	0	0
	硝子体	0.905	0.798
	網膜	4.61	8.42
	脈絡膜	59.5	243.2
	水晶体	0.0960	0.830
	毛様体	4.92	7.66
	虹彩	1.13	3.13
STD	前房水	0	0
	硝子体	1.36	0.0736
	網膜	7.33	4.49
	脈絡膜	65.3	187.2
	水晶体	0.192	1.44
	毛様体	3.49	9.39
	虹彩	0.587	3.20

(3) TGウサギ薬理

生後 5 週目の網膜変性 (TG) ウサギに対する URD 埋植の網膜保護効果の再現性試験を行った。埋植 24 週間の Cone-ERG b 波 (1.477log cd*s/m²)、および Rod-ERG b 波 (1.477log cd*s/m²) の ERG 振幅値平均を図 2、および図 3 に示す。いずれにおいても Placebo 埋植群対比、URD 埋植群では有意に振幅値が高値を示していた。

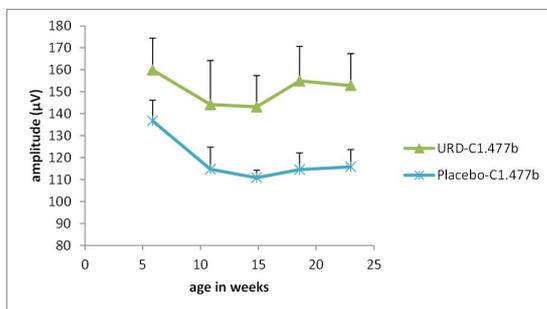


図 2 . Cone-ERG b 波振幅値

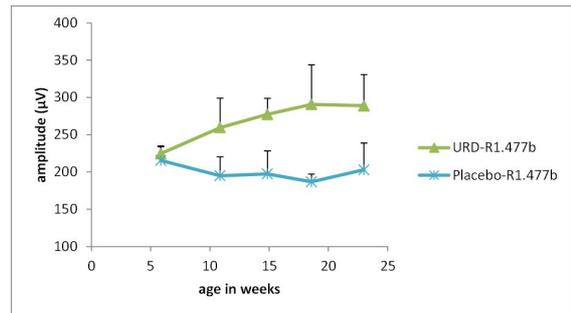


図 3 . Rod-ERG b 波振幅値

D . 考察

ウサギ血漿中MM1 体濃度モニタリング試験では、徐放量と血漿中 M1 体濃度に相関性があることが認められ、採血によって UNO 徐放性をモニタリングすることが可能であることが示唆された。

サル眼内動態試験では、6 か月間、持続して網膜へ UNO を送達できていることを確認した。現在、12 か月目を評価中である。

TG ウサギに対する薬理試験では、前回と同様に ERG 振幅値評価で、Placebo 埋植群対比 URD 埋植群で有意に高値を示し、TG ウサギの網膜変性に対する網膜保護効果の再現性が確認された。

E . 結論

URD埋植によって6か月間持続的に網膜内へUNOを送達することができ、さらに遺伝的網膜変性に対して網膜保護効果があることが示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

(1) 論文発表

1. **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*, 3(10), 1555-1560 (2014).

2. **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).
3. Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Hojae Bae, **Nobuhiro Nagai**, Hideyuki Onami, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji. “Micropatterned Polymeric Nanosheets for Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer” *Advanced Materials*, 26(11), 1699-1705 (2014).

(2) 学会発表

(国際学会発表)

9. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Episclera Implantable Device fabricated with PDMS mold-based UV curing” BIT’s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)
10. Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Yukihiko Mashima, **Nobuhiro Nagai** “Polymeric Device for Transscleral Multi-drug Delivery” BIT’s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)
11. Aya Katsuyama, **Nobuhiro Nagai**, Hideyuki Onami, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Fabrication of a Capsule Device using Polyethyleneglycol Dimethacrylates for Extended Release of Ranibizumab” BIT’s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)

12. **Nobuhiro Nagai** “Polymeric device for transscleral drug delivery to the posterior segment” *Asia-Arvo* 2015, Yokohama, Japan (February 16-19, 2015)

13. Hirokazu Kaji, Yoshinori Fujie, Yoshihiro Mori, **Nobuhiro Nagai**, Khademhosseini Ali, Toshiaki Abe “Cell delivery system using micropatterned polymeric nanosheets” Society for biomaterials, 2014 annual meeting, Denver, Colorado (April 16-19, 2014)
14. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Zhalieh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe “Controlled Transscleral Dual-drug Delivery by a Polymeric Device Reduces Light-induced Retinal Damage” 2014 ARVO annual meeting, 446, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)
15. Zhaleh Kashkouli Nezhad, **Nobuhiro Nagai**, Kotaro Yamamoto, Hideyuki Saito, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats” 2014 ARVO annual meeting, 483, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)
16. Hirokazu Kaji, Toshinori Fujie, **Nobuhiro Nagai**, Toshiaki Abe “Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer by Micropatterned Polymeric Nanosheets” 2014 ARVO annual meeting, 1449, Orlando, Florida (May 4-8, 2014)

(国内学会発表)

8. **永井展裕**, 泉田泰子, 梶弘和, 西澤松彦, 中澤徹, 眞島行彦, 阿部俊明 : 「ウノプロトン徐放デバイスの強膜上投与による眼内薬物動態と埋植毒性評価」第 36 回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀 (2014 年 11 月 17 日-18 日) Oral
9. 網嶋 俊一, 森 好弘, 藤枝俊宣, **永井展裕**, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和 : 「圧力負荷機構を用いた上皮細胞の力学的評価システムの開発」化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会、北海道大学 (2014 年 10 月 2 日-3 日) Poster
10. 森好弘, 藤枝俊宣, **永井展裕**, 西澤松彦,

阿部俊明、梶弘和：「ラット眼球網膜下への細胞担持ナノシートデリバリー」第36回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(2014年11月17日-18日) Poster

11. **永井展裕**、梶弘和、西澤松彦、中澤徹、眞島行彦、阿部俊明：「光硬化性樹脂を利用した網膜ドラッグデリバリーシステムの開発」第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(2014年9月9日~11日)
12. 森好弘、藤枝俊宣、**永井展裕**、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「ナノシートを用いる眼内への細胞送達システムの開発」第30回日本DDS学会学術集会、慶應義塾大学薬学部(2014年7月30日~31日)
13. **永井展裕**、梶弘和、岩田悟、泉田泰子、西澤松彦、眞島行彦、阿部俊明：「光硬化性PEGジメタクリレートで作成した網膜DDSの実用化に向けた開発と評価」第30回日本DDS学会学術集会、慶應義塾大学薬学部(2014年7月30日~31日)
14. **永井展裕**、梶弘和、西澤松彦、中澤徹、阿部俊明：「経強膜持続投与デバイスによる網膜保護の可能性」第118回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム(2014年4月2日~6日) Symposium

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