

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理効果に関する研究

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

H24の検討では、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ウノプロストン（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。H25は、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を確認することを目的とした。デバイス移植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、6か月後でもUNOの代謝物（M1体）が網膜内で検出され、点眼2時間後よりも多い量が持続的に網膜組織で確認できた。また血漿中の最大量は点眼より低い傾向であった。網膜変性ウサギに移植後の網膜電図による網膜機能の評価を行った結果、6か月にわたって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た。H26は、デバイス移植後のウサギから定期的に採血し、血漿中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UNO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

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（1位 緑内障、2位 糖尿病網膜症、3位 網膜色素変性症、4位 黄斑変性症）である。加齢性疾患が多い網膜疾患においては、超高齢化社会を迎え今後さらに増加する可能性がある。

網膜疾患治療において、点眼・点滴・内服では網膜への薬物移行が不十分なため、眼内注射や眼内インプラントなど眼内に直接薬物を投与方法が行われる。例えば、加齢黄斑変性症治療では、抗VEGF抗体の硝子体注射が成果をあげている（N Engl J Med, 355, 1419-1431, 2006）。しかしこの硝子体注

射は月に一度の注射が必要で、眼内への感染症や網膜剥離等の副作用のリスクが報告されている (Am J Ophthalmol, 145, 879-882, 2008)。また、ブドウ膜炎やサイトメガロウイルス性網膜炎の治療で使われていた抗炎症剤の眼内インプラント (Vitrasert, Retisert) は硝子体中に移植されるが、眼内移植による網膜剥離等の重大な合併症がほぼ必発であることが報告されており (Ophthalmology, 117, 567-575, 2010)、東北大学眼科では使用が中止されている。従って、現状では眼の最深部にある網膜に低侵襲な方法で安全に効率よく投薬する方法はないと言っても過言ではない。

この問題を解決する方法として、眼内への薬物徐放を指向したDDSが長年研究されてきた。例えばコンタクトレンズ型の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れ、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 (Polyethylene glycol 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 (Tetraethylene glycol dimethacrylate; TEGDM) をリザーバー用樹脂に用いると、薬剤はリザーバーを通過することができず、徐放膜側から一方向性に徐放することが可能である。このデバイスの作製方法は国際雑誌Biomaterials (Impact factor 7.882) にPublishされ、国内・国際特許を出願済みである (PCT/JP2010/63793)。

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は長年緑内障治療薬として使用されている眼圧下降薬である。イオンチャネル開口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。

H24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添加の硬化、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を検討した。

H25は、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を確認することを目的とした。使用するウサギは近藤 (名古屋大学) らにより開発された網膜変性ウサギで、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)。この網膜変性ウサギにUNO徐放デバイスを移植して網膜保護効果を

確認する。また、正常ウサギにUNO徐放デバイスを移植して、移植6か月までの眼内動態をLC/MS/MSによるUNO代謝物（M1体）の定量によって評価した。

H26は、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M1体の定量によって、UNO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。また、サルへのデバイス埋植を行い、網膜内M1濃度を測定した。

B. 研究方法

H24研究

(1) デバイスの作製

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。まずリザーバーの鋳型を作成した。鋳型は、3D CAD (computer assisted drawing) で鋳型の設計図を作成し、CADデータを小型NC微細加工機Micro MC-2 (株式会社PMT) へ取り込み、アクリル板に掘り込んで作成した。このアクリル板をフルオロシアンでコートし鋳型Aとした。この鋳型Aにポリジメチルシロキサン (PDMS) をキャストし60°Cで30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートし鋳型Bとした。鋳型BにPDMSをキャストし60°Cで30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバーを作製するための最終鋳型Cとした。このPDMS鋳型Cに、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone 10 μ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋 (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。

(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UNO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 \times 10⁴cells/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) と略す。MTS法 (Promega) によって細胞数を測定した。

RPEJを2 \times 10⁴cells/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 GL

ucose) 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) と略す。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 (Heterozygote s) 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。

(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 (URD) 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%tropicamideで散瞳してから、空調を有するLED光障害装置 (特注モデル) 内で、デバイスを移植したラットを飼育した (22°C、8000Lux)。予備実験で光障害時間は、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%tropicamideで散瞳してから網膜電図 (ERG; Purec、Mayo株) を評価した。

コンタクトレンズ電極 (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 3 msec) 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 (プラセボ) 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URD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 (プラセボ)、UNO点眼 (0.12%、1日1回)、UNO硝子体注射 (6 μg、5uL) 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。

H25研究

(1) デバイスの作製

ウサギ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 $10\mu\text{l}$ 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外径、幅 4.4mm ×長さ 10mm ×厚さ 1mm 、でウサギ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 $5.7\mu\text{L}$ 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 $10\mu\text{l}$ 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) デバイス移植

UNO徐放デバイス (URD) をウサギ上鼻側強膜上に移植して、網膜機能を経時的に評価した。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 $4\times 4\text{mm}$ 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。網膜機能測定は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ため、実用に近い評価が可能と推測できる。

(3) 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 ($\log\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) 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 ($\log\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) の光刺激でCone (錐体細胞) ERGを測定した。

(4) 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 membrane (ILM) からRetinal pigment epithelium (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。

(5) 正常ウサギ

日本白色ウサギ (2kg) にデバイスを移植した。移植後、血漿と眼球を摘出した。眼球から網膜を分画し、凍結後、新日本科学 薬物代謝分析センターでLC/MS/MSによってUNO濃度を測定した。

H26研究

(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 $10\mu\text{l}$ 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 $5.7\mu\text{L}$ (ウサギ用)、 $12\mu\text{L}$ (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 $10\mu\text{l}$ 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TEGDMリザーバー（ウサギ用）を作成した。UNOを20%PEGDM/80%TEGDM (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4×4 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。

(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(再現性)

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ERG、網膜組織の評価はOCTを使用した。

(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。

(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

H24研究

(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 (2 mm×2 mm×1 mm、UNO充填量1.2 μL)。

(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放出を認めしたが、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 μgのUNO放出が可能であった。UNO充填量は10 mgであるため (500 mg/ml×20 μL)、推定の最大徐放日数は10 mg/0.01 mg=1000 day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。

(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添加によってMAPKのリン酸化が上昇することがわかった。

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。

以上より、UNO徐放デバイスは網膜光障害に対して保護効果があり、その効果はUNOの放出条件と関係があることが示唆された。

(5) 網膜色素変性モデル実験

P40カバーのUNO徐放デバイスをラット強膜上に移植し、1週間後と4週間後にERG検査を行った。1週間後においては、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。4週間後においては、未処置群と比較してUNOデバイス移植群はERG振幅値が維持されていたが、他の群では維持が認められなかった。

以上よりUNO徐放デバイスは持続的に網膜変性を抑制する可能性が示唆された。

H25研究

(1) 網膜変性ウサギ

生後5週目の網膜変性ウサギに対する移植では、移植12週目までUNO徐放による網膜変性の抑制効果が見られた。生後38週の網膜変性ウサギに対する移植では、移植24週目までUNO徐放による網膜変性の抑制効果が見られた。24週後では統計的に有意にUNO徐放デバイス移植にa波の低下抑制効果が見られた。OCTによる網膜の厚み評価の結果、有意な差を認めることはできなかった。

(2) 正常ウサギ眼内動態

図1に網膜内UNO濃度の測定結果を示す。点眼後30分で網膜内UNO代謝物濃度が平均16.8ng/gで最大値を示した。一方、UNO徐放デバイスでは2, 4, 8日目で持続的にUNO代謝物が検出でき、8日目で最大値の54.7ng/gを示した。

図2に血漿中UNO濃度の測定結果を示す。血漿中の濃度は点眼後30分で最大を示し、その値は13.0ng/mlであった。一方、UNO徐放デバイスでは、4日目に最大を示し、その値は8.39ng/mlであった。

UNO徐放デバイスでは点眼より55倍高いAUC (area under the blood concentration-time curve、血中濃度-時間曲線下面積) の値を示し、血漿よりも網膜への移行が高いことがわかった。

移植3か月後においては22.6ng/g、移植6か月後においても1.27ng/gのUNO代謝物が検出できた。

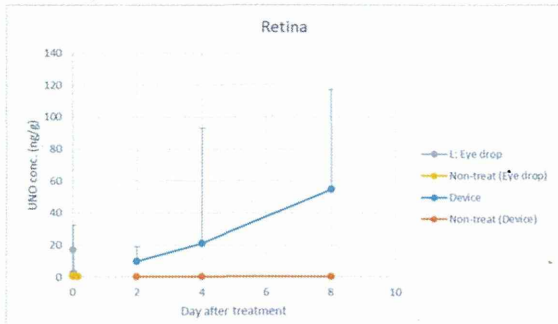


図1. 網膜内UNO濃度の結果

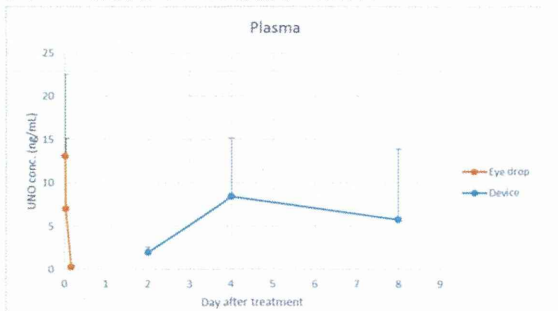


図2. 血漿中UNO濃度の結果

H26研究

(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3)。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。

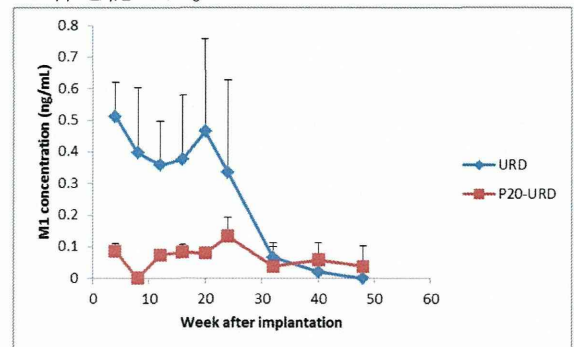


図3. ウサギ血漿中M1体濃度

(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4、および図5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。

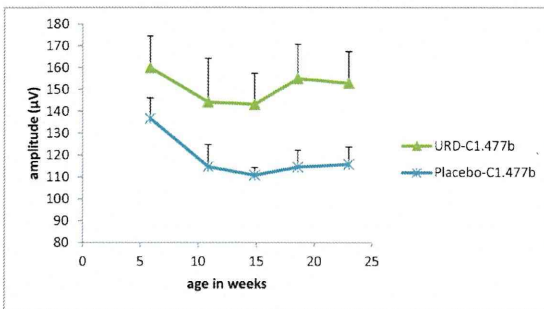


図4. Cone-ERG b波振幅値

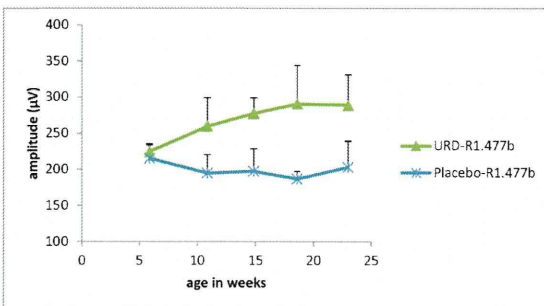


図5. Rod-ERG b波振幅値

D. 考察

H24は、デバイス中の薬物ペレットおよびカバー(徐放膜)のPEGDM/TEGDM比率を変えることによって、UNOを異なる任意の速度でリリースできることを示した。また、UNO徐放デバイスは網膜光障害ラットおよび網膜色素変性ラットに対して網膜保護効果を示すことが示唆された。このUNOの網膜保護効果はIn vitro網膜細胞培養でも確認することができた。

UNOの薬理作用は不明な点が多かったが、最近になってイオンチャネル開口の作用が

報告され、Ca²⁺イオンの細胞内濃度を下げることによって細胞死を抑制することが示唆されている。本研究において、UNOは細胞死マーカーであるp38のリン酸化を抑制した。今回の研究において網膜細胞内のCa²⁺イオン濃度については不明であったが、イオンチャネル開口による細胞関連シグナルの抑制が網膜保護効果に寄与している可能性がある。Ca²⁺イオン濃度の測定は今後の課題の1つである。また、本研究において、UNOによってROS産生が抑制されることが示唆された。ROSは酸化ストレスの1つであり、細胞障害性を有するため、ROS産生抑制が網膜保護に寄与している可能性がある。

S334terラットの研究では、UNO徐放デバイスの薬効持続性が示唆された。従来の点眼では網膜へ十分なUNOが届いていない可能性があり、本デバイスによる経強膜投与は効果的な網膜保護投与方法として期待できる。また、硝子体注射では1週間の薬効を示したが、4週間後には効果が認められず、再注射が必要と考えられる。しかし、頻回の眼内注射は眼内感染症等の重篤な眼内副作用を惹起する可能性があるため、本デバイスによる経強膜投与は安全で持続的な投与方法として期待ができる。

H25は、UNO徐放デバイスは6か月にわたって、ウサギ網膜内にUNOを持続的に送達することがわかった。点眼と比較して血中への移行が少ないため、眼局所にUNOを送達できている可能性が示された。また、網膜変性ウサギに対する移植では、6か月にわかって遺伝性の網膜変性を抑制することが示唆された。また、変性が初期の個体(5週齢)や後期の個体(38週齢)のいずれにおいても保護効果を示した。また、Cone(錐体細胞)由来のa波のERG信号が有意に維持されていたことは、視覚の維持に対する効果が期待できる。また、このウサギはヒトの網膜色素変性症のモデルとなっており、ヒトに対する網膜変性抑制効果が期待できる。

H26は、ウサギ血漿中MM1体濃度モニタリング試験において、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

UNO 徐放デバイスを作製し、網膜変性モデル動物でその薬効を評価した。また、UNO の細胞保護作用として、細胞死関連シグナルと ROS 産生の抑制が示唆された。また、点眼や硝子体注射よりも持続的に網膜変性を抑制する可能性が示唆された。また、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。今後は治験に使用できるデバイスの GMP 製造を計画し、早期の臨床試験を目指す。

2009;50:1371-1377)。この網膜変性ウサギに UNO 徐放デバイスを移植して網膜保護効果を確認する。また、正常ウサギに UNO 徐放デバイスを移植して、移植 6 か月までの眼内動態を LC/MS/MS による UNO 代謝物 (M1 体) の定量によって評価した。

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

2. Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, **Nobuhiro Nagai**. "Intrasceral Transplantation of a Collagen Sheet with Cultured Brain-Derived Neurotrophic Factor Expressing Cells Partially Rescues the Retina from Damage due to Acute High Intraocular Pressure" *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801, 837-843 (2014).
3. **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).
4. 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).
5. 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).
6. Hideyuki Onami, **Nobuhiro Nagai**, Shigeaki 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).

7. Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hiroyuki 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. 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. 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, Khademhosseini Ali, Toshiaki Abe "Cell delivery system using micropatterned polymeric nanosheets" *Society for biomaterials, 2014 annual meetin*

g, Denver, Colorado (April 16-19, 2014)

6. Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Zhaleh 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)
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 Polymeric Nanosheets" *2014 ARVO annual meeting, 1449, Orlando, Florida* (May 4-8, 2014)
9. Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hiroyuki 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)
10. Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe "An implantable drug delivery device for treating retinal disorders" *IEEE-EMBS Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference, Hawaii* (Dec 3-7, 2012)
11. Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe "A controlled-release capsule device for transscleral drug delivery to the retina" *Proceedings of*

- μTAS 2012 Conference, Okinawa, Japan (Oct 28-Nov 1, 2012)
12. Hirokazu Kaji, Syuntaro Ito, **Nobuhiro Nagai**, Kuniaki Nagamine, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe “Development of a cell-based model of the retina within a microfluidic device” Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Tokyo, Japan (Dec 10, 2012)
 13. 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)
 14. **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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. **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)
 18. 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**、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）
 8. 梶弘和、藤枝俊宣、伊藤俊太郎、森好弘、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明：「眼科領域におけるマイクロ・ナノ技術応用」日本機械学会：第26回バイオエンジニアリング講演会、東北大学（2014年1月11日-12日）
 9. 梶弘和、藤枝俊宣、伊藤俊太郎、永井展裕、長峰邦明、西澤松彦、阿部俊明：「マイクロ流体デバイスを用いる眼底組織培養モデルの開発」日本動物実験代替法学会第26回大会、京都テルサ（2013年12月19日-21日）
 10. 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細胞送達システムの開発」化学とマイクロ・ナノシステム学会第28回研究会、イーグレ姫路（2013年12月5日-6日）
 11. 網嶋俊一、伊藤俊太郎、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「バルジ試験器機構を利用した上皮細胞への力学的負荷システムの開発」化学とマイクロ・ナノシステム学会第28回研究会、イーグレ姫路（2013年12月5日-6日）
 12. 梶弘和、藤枝俊宣、森好弘、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明：「高分子ナノ薄膜を用いる細胞送達システムの開発」化学工学会細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、東京大学（2013年11月25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：「経強膜ウノプロストン徐放デバイスの作製と網膜保護」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）
 14. 岩田悟、永井展裕、泉田泰子、梶弘和、西澤松彦、眞島行彦、阿部俊明：「光硬化性生体材料によるウノプロストン徐放デバイスの作製とIn vitro薬効評価」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）
 15. 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）
 16. 伊藤俊太郎、網嶋俊一、藤枝俊宣、永井展裕、長峰邦明、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「眼底組織モデル構築に向けたマイクロ流路デバイスの開発」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）
 17. 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細胞送達システムの開発」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）
 18. 伊藤俊太郎、網嶋俊一、藤枝俊宣、永井展裕、長峰邦明、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「バルジ試験器機構を用いた網膜色素上皮細胞評価システムの構築」電気学会：バイオ・マイクロシステム研究会、東京大学（2013年10月8日）
 19. 森好弘、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「自己支持性ナノシートによる細胞輸送システムの開発」電気学会：バイオ・マイクロシステム研究会、東京大学（2013年10月8日）

20. 永井展裕、梶弘和、小柳恵理、勝山綾、西澤松彦、眞島行彦、阿部俊明：「網膜変性モデル動物に対するウノプロストン徐放デバイスの網膜保護効果」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）
21. 梶弘和、森好弘、藤枝俊宣、永井展裕、西澤松彦、阿部俊明：「自己支持性ナノ薄膜を用いた細胞デリバリー療法の開発」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）
22. 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）
23. 永井展裕、梶弘和、大浪英之、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、眞島行彦、中澤徹、阿部俊明：「ウノプロストン徐放デバイスの作製と網膜保護効果」第117回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2013年4月4日-7日）
24. 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）
25. 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）
26. 伊藤俊太郎、永井展裕、長峰邦明、西澤松彦、阿部俊明、梶弘和：「マイクロ流路デバイスを用いる眼底組織培養モデルの開発」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）
27. 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）
28. 藤枝俊宣、森好弘、伊藤俊太郎、西澤松彦、永井展裕、阿部俊明、Khademhosseini Ali、梶弘和：「マイクロパターン化高分子ナノシートを用いた細胞デリバリー担体の開発」第42回医用高分子シンポジウム、産業技術総合研究所 臨海副都心センター（2012年7月29日-30日）
29. 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）
30. 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」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）
31. 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）
32. 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）招待講演
33. 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116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）
34. 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116回日
本眼科学会総会、東京国際フォーラム(2
012年4月5日～8日)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

動物実験によるデバイスの評価に関する研究

研究分担者 大浪英之 東北大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

H24は、ウノプロストン徐放デバイスの眼局所毒性についてSDラットおよび白色ウサギを用いて検討した。また、ウノプロストンの眼内移行量を白色ウサギを用いて評価した。眼毒性評価として、SDラットに移植後4週目まで定期的に網膜電図を評価した結果、未処理群やプラセボ群（PBS含有デバイス）と比較してUNO徐放デバイスによる網膜機能の変化はなかった。また、ウサギに移植後5か月目まで定期的に網膜電図を評価した結果、ラットと同様に未処理群、プラセボ群と比較して網膜機能に変化はなかった。H25は、ウノプロストン徐放デバイスの毒性評価を実施した。デバイスからのモノマー溶出試験の結果、PEGDMは溶出がないため毒性は無視でき、TEGDMと硬化剤は毒性示す濃度の400分の1以下の量しか溶出していないため、一度洗浄すれば毒性は全く無視できると考えられた。またデバイスのウサギ28日間留置では全身毒性は認められなかった。

A. 研究目的

本課題の目的は、失明疾患の上位を占める網膜疾患の治療デバイスとして、強膜上に置くだけの低侵襲な方法で移植できる経強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を作製し、ウノプロストン（UNO）を任意の速度で徐放できる徐放デバイスを開発することである。分担研究として、動物実験によるUNO徐放デバイスの眼局所毒性評価およびUNO眼内移行性を評価した。

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

からなる神経組織である。一般に神経細胞は再生が難しく、一度障害されると治療が難しい場合が多い。

眼から入った光は光受容細胞である視細胞で神経信号へ変換され、神経節細胞から視神経を経て脳中枢で情報が伝えられる。この神経信号は活動電位という生体電気パルスとして伝達される。眼球には角膜側をプラス、網膜側をマイナスとする静止電位が存在するが、光を受容すると活動電位が生じて電位変化が生じる。この変動を記録したものが網膜電図（Electroretinogram : ERG）である。一般にコンタクトレンズ型の電極を角膜に装着して、電極から強い光を網膜に当て、心電図のように電位波形を記録する。ERGは白内障など眼底検査が行えない場合に有効な他覚的網膜機能評価方法である。

H24は、ERGを用いてデバイスの眼局所毒性を評価することを目的とした。ERGは動物実験用に開発されたMayo. Co.のPuRECを使用した。また、眼内へのUNO移行量をLC/MS/MS法によって網膜組織中のUNOの代謝産

物 (M1体) を定量することによって評価した。

H25は、UNO徐放デバイス (URD) の医薬品・医療機器としての毒性試験として、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)、硬化剤2-hydroxy-2-methyl propiophenoneの溶出性を評価した。また各基材の毒性評価として、ラット網膜神経節細胞株 (RGC-5) とラット網膜色素上皮細胞 (RPE-J) を用いた細胞培養を検討した。また、ウサギ結膜下にデバイスを28日間埋植後の眼科学的検査を実施し、眼毒性試験を行った。

B. 研究方法

H24研究

(1) デバイスの作成

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。CAD-CAMでリザーバーと薬物ペレットのデザインを作製し、小型NC微細加工機Micro MC-2 (株式会社PMT) でアクリル板に鋳型を作製した。このアクリル板をフルオロシアンでコートし鋳型Aとした。この鋳型Aにポリジメチルシロキサン (PDMS) をキャストし60℃で30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートし鋳型Bとした。鋳型BにPDMSをキャストし60℃で30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバーを作製するための最終鋳型Cとした。このPDMS鋳型Cに、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone 10 μ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋 (25mW/cm², 3min [SEN LIGHTS CORP]) して硬化させた。鋳型CからTEGDMリザーバーを剥がして完成した。作成したリザーバーのサイズは、ウサギ用は幅4.4mm×長さ12mm×高さ1.6mm、薬剤充填部容量は20 μ l、ラット用は幅2mm×長さ2mm×高さ0.6mm、薬剤充填部容量は1.2 μ lである。

UNOをPEGDMとTEGDMの混合プレポリマー (PEGDM 40%/TEGDM 60% : P40) に混合し、リザーバーにキャストしてUV硬化

(10mW/cm², 0.5min) して作成した。

徐放膜は、PEGDMとTEGDMを混合したプレポリマーで作製した。上記のUNOを充填したリザーバー上にプレポリマーを滴下し、ガラス板でカバーした後、UV硬化して作成した。

プラセボデバイスとして、Phosphate-buffered saline (PBS)を充填したデバイスを作製した。

(2) 動物

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。200-250gの雄のSDラット、1.5-2kgの日本白色ウサギを使用した。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) の筋肉内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%tropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride (0.4%) を局所麻酔として使用した。

(3) デバイスの移植

麻酔後、実体顕微鏡で観察しながら、ラットおよびウサギ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縫合固定した。結膜を縫合し、タリビッド眼軟膏を点入し終了とした。

(4) ERG

コンタクトレンズ電極 (ラット : 2mmベースカーブ、ウサギ : 7.8mm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 (1000cds/m², 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。

(5) UNO眼内量測定

UNO徐放デバイスとして、3種類の徐放膜 (P60, P40, P20) でカバーしたデバイスを移植し、UNO徐放性とUNO眼内移行性の関係を

評価した。移植1日、8日目に動物を過剰麻酔で安楽死後、血液と眼球を摘出した。血液は遠心して血しょうをサンプリングした。眼球は前房水を採取後、角膜、水晶体、硝子体、網膜、脈絡膜、強膜に分離し、網膜、脈絡膜のホモジネートをLC/MS/MS測定に供した。測定は共同研究者のアールテックウエノ社で実施された。

(6) 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。

H25研究

(1) デバイスからもモノマー溶出性

ヒト用デバイス (Ø22/21mm, 500mg/ml, 6 mg UNO) を作成し、PBS 1.5mlに浸漬し (37°C)、定期的にPBSを回収し、新しいPBSでインキュベートした。回収したPBSをアセトニトリルと等量混合し、HPLCでPEGDM、TEGDM、硬化剤の溶出濃度を測定した。

(2) 細胞培養

- ①細胞播種 (96-well culture plates (BM equipment Co.) at a density of 1×10^4 cells/cm²)
- ②培養 (RGC-5 : DMEM, 48h, 37°C, RPE-J : DMEM, 48h, 33°C)
- ③モノマー添加 (PEGDM, TEGDM, 硬化剤を所定濃度混合したDMEMで培養、24 h)
- ④細胞数測定 (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega)を用いて、吸光度を用いて測定)

(3) ウサギ眼毒性試験

UNO徐放デバイスの非臨床試験の一環として、デバイスをウサギの球結膜下に28日間留置する眼毒性試験を行った。URD-0 (0µg/day)、URD-1 (1µg/day)、URD-11 (11µg/day)、を結膜下に留置する群に加えて、切開及び縫合のみを行うSham群を設定した。各群とも4例とした。

(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

H24研究

(1) デバイスの移植

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

(2) ERG

SDラットへの移植では移植4週間目まで定期的にERGを評価した。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。

白色ウサギへの移植では移植5か月目まで定期的にERGを評価した。その結果、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眼内移行性

3種類の徐放性の異なるデバイスを移植し、UNO眼内移行性を評価した結果、放出が多いデバイスほど、網膜へUNOが移行していることがわかった。また、過去の点眼によるUNO眼内移行データと比較した結果、P40カバーデバイスが点眼と同等量が網膜へ移行していることがわかった。この移行は移植8日目にも観察され、本デバイスは点眼と同じ薬効濃度を持続的に維持できることが示唆された。

また、血しょう中のUNO量は点眼と比較して低いことがわかった。さらに、前房水へのUNO移行はほとんどなく、反対眼への移行もほとんど確認できなかった。すなわち、投与部位周辺に局所的にUNOを持続的投与できる可能性が示唆された。

H25研究

(1) デバイスからのモノマー溶出性

PEGDMは初日からまったく溶出を認めなかった。TEGDMと硬化剤は1日目に溶出を認めたが、その後は溶出を認めなかった。最大溶出量はPEGDMはゼロ、TEGDMは 0.45 ± 0.25 ($\mu\text{g/ml}$)、硬化剤は 0.22 ± 0.09 ($\mu\text{g/ml}$)であった。

(2) 細胞培養

結果を図1に示す。PEGDMはRGC-5に対して、 0.391mg/ml 以上、RPE-Jに対して 0.781mg/ml 以上で有意に毒性を示した。TEGDMはRGC-5に対して、 0.195mg/ml 以上、RPE-Jに対して 0.391mg/ml 以上で有意に毒性を示した。硬化剤はRGC-5に対して、 0.391mg/ml 以上、RPE-Jに対して 0.391mg/ml 以上で有意に毒性を示した。

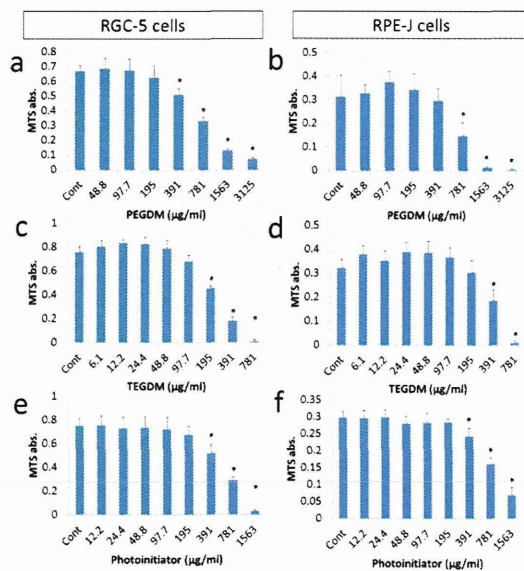


図1. PEGDM (a, b)、TEGDM (c, d)、硬化剤 (e, f) の細胞毒性

(3) ウサギ眼毒性試験

一般状態、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、URD-0 ($0\mu\text{g/day}$)、URD-1 ($1\mu\text{g/day}$) 群及びURD-11 ($11\mu\text{g/day}$) 群とも異常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、URD-0 ($0\mu\text{g/day}$) 群及びURD-1 ($1\mu\text{g/day}$) 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、URD-11 ($11\mu\text{g/day}$) 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。

D. 考察

H24は、UNO徐放デバイスの眼局所毒性評価としてERGの評価を行った。プラセボデバイスおよびUNO徐放デバイスいずれにおいても網膜機能の低下は認められず、デバイス自体の毒性およびUNOの持続徐放の毒性はないことが示唆された。デバイス中にはPEGDMおよびTEGDMモノマーがわずかに残留することがわかっているが、その量は別研究のIn vitro細胞培養毒性実験の結果、毒性を示す濃度の1万分の1であり、さらに1週間後には残留モノマーは完全に溶出するため、長期の移植において毒性を示す可能性は低かったと考えられる。実際に5か月間移植していたウサギのERGにおいて、デバイスの毒性は認められなかった。また、UNOは点眼において結膜の発赤が見られることがあるが、デバイス移植群ではこれは見られなかった。また、UNOに伴う眼圧の変化もデバイス群では認められなかった。UNO眼内移行のデータから、本デバイスは移植部位への局所移行性が高く、前眼部への移行がほとんどなかったことから、結膜周囲への影響が小さかったと推定される。これはデバイスのリザーバーがUNOを透過しない仕組みになっており、結膜側への放出はなく、強膜側一方向性の徐放を示すことが寄与していると考えられる。

H25は、デバイスからの基材モノマー溶出毒性を評価した。PEGDMは溶出がないため毒性は無視できると考えた。TEGDMは細胞毒性を示す濃度の433分の1の濃度がデバイスから1日目だけ溶出する。硬化剤は細胞毒性を示す濃度の1777分の1の濃度がデバイスから1日目だけ溶出する。以上から溶出モノマーの毒性は非常に低く、一度洗浄すれば全く無視で

きると考えられた。

UNO徐放デバイスのウサギ球結膜下28日間留置は、URD-11 (11 μ g/day) においても全身毒性は認められなかった。一方、留置局所の結膜では、デバイス留置の影響はごくわずかであった。URD-1 (1 μ g/day) 留置の影響は、デバイスのみ留置した場合と変わらなかった。URD-11 (11 μ g/day) 留置は、デバイス留置の影響に加えて徐放薬物の結膜への影響が示唆されたが、軽微と考えられた。

E. 結論

SDラットおよび白色ウサギのいずれにおいても、デバイス移植に伴う網膜機能の低下は認められず、また移植部位周辺に炎症や眼内への副作用はなく、局所毒性は低いことが示唆された。また、本デバイスは点眼と同程度の薬効濃度を持続的に網膜へ投与できる可能性が示された。また、基材からのモノマー毒性はほぼ無視できると考えられた。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shige ki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes" *RETINA The Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, 32 (6), 1204-1213 (2012).
- Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium" *Adv Exp Med Biol*, 723, 305-310 (2012).
- 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).

- 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).
- Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, **Hideyuki Onami**, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai. "Intrascleral Transplantation of a Collagen Sheet with Cultured Brain-Derived Neurotrophic Factor Expressing Cells Partially Rescues the Retina from Damage due to Acute High Intraocular Pressure" *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801, 837-843 (2014).

2. 学会発表

(国際学会発表)

- 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)
- 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