

## 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

### 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

本研究期間においては、主としてデバイスの安全性試験と動物モデル評価の共同研究ならびに疾患レジストリー構築の試みを行ってきた。デバイスの安全性試験と動物モデル評価は、ウノプロストン徐放デバイスを利用して非臨床POC取得を目的としてきた本研究の重要検討項目であり、治験開始を目指した疾患ライブラリーの構築準備は近い将来予定している治験開始に向けても重要課題であった。下記するように動物実験は順調に行われてきており、これまでのところ眼科的評価で毒性などは見られていない。安全性試験については、時間的な制約が少しあるが最終的な病理の結果を待つのみになった。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ると考えられた。

#### A．研究目的

失明疾患の上位は網膜疾患が占める。本研究チームは、難治性網膜疾患治療目的で作製した薬剤徐放デバイスを強膜上に設置する低侵襲な方法で強膜ドラッグデリバリーシステム（DDS）を確立し、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で難治性網膜疾患の代表である網膜色素変性の治療法を開発することである。我々は分担研究として、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った。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した。

視覚はすべての情報の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。網膜疾患は加齢に伴い増えるため、超高齢化社会を迎え今後さらに増加する可能性がある。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。本研究を通して、難治性網膜疾患治療の選択肢の1つにできるようにしたい。

#### 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) 網膜変性ウサギにデバイス埋植効果の検討

他の研究分担者と合同で網膜変性早期のウサギと網膜変性が進行してからのウサギにデバイスを移植して効果を評価した。

#### (3) 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。特に黄斑機能解析に利用した。また薬物動態も同時に検討中である。

#### (4) 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) 網膜変性ウサギにデバイス埋植効果の検討については他の研究分担者(永井展裕)の項目を参照。

#### (3) サルを用いた評価

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。これまでのところコントロールと比較して差

は見られていない。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。

#### (4) 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。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 electror etinography (fERG)、Fell 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。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**. Pro

files 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; 269837.
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 Hypertensive Conditions with Laser Speckle Flowgraphy. *Curr Eye Res* 2014; **4**: 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 Opt

- halmology (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 in 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, Yusa 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 preperimetric 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 and molecular 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 for 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 susceptibility 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, Takaya

ma 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 AAV2-mediated delivery of pathway-specific promoter driven reporters . Asia ARVO、横浜 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、横浜 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18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2014-182326 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

## 研究報告書

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

### ウノプロストン徐放デバイスの滅菌法と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

本分担研究は、ウサギ眼強膜上に移植可能なサイズのデバイスの設計とデバイスの構造評価を目的とした。CAD-CAMによる微細加工法によって、デザイン自由度の高いデバイス設計が可能である。H24はこの微細加工法を用いて薬物リザーバーの鋳型をポリジメチルシロキサンを鋳型基材として作成した。鋳型上にDDS基材のトリエチレングリコールジメタクリレートキャストし、UV照射で重合してリザーバーを作製した。その結果、ウサギ眼強膜上に縫合固定しやすい形状を複数デザインし、移植性を改善した。H25は、ウノプロストン（UNO）徐放デバイスの滅菌法として、エチレンオキサイドガス（EOG）、電子線、ガンマ線の3種類を実施し、滅菌後の性状、徐放性、薬剤含量、無菌性を評価した。その結果、いずれの滅菌法においても、未滅菌デバイスと比較して徐放性に変化はなかった。電子線と線滅菌後は、デバイスが赤味を帯びる変色が認められた。線滅菌後はUNO含量が若干低下した。EOG滅菌はいずれの評価においても問題がなかったため、EOG滅菌がデバイスの滅菌法として適切と結論した。リン酸バッファ中で4、25、37、42で保存中の徐放性を評価した結果、25以下では徐放を認めず、42では徐放が早くなる傾向が見られた。H26は、EOG滅菌したUNO徐放デバイスの6か月間加速保存（40/75%）後の徐放性、UNO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

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DDSデバイスを開発することである。本研究は分担研究として、デバイスの設計および構造評価を目的とした。

本研究のデバイスは微細加工（Microfabrication）法を用いて光硬化性樹脂をカプセル型に成形することを特徴としている。我々は過去に微細加工法によってマイクロ流路を作製し、細胞と細胞のイン

タラクションを評価する培養系を確立してきた（Biomicrofluidics, 5(2), 22214, 2011、Adv Mater, 22(46), 5276-5281, 2010、Lab Chip, 10(18), 2374-2379, 2010）。微細加工に使用する切削機械（MC-2 micro, PMT.Co）はマイクロニードルによってマイクロオーダーでアクリル板等の鋳型に流路を掘ることができる。CAD（Computer aided design）によって自由に切削できるため、カプセルや球など自由にデザインすることができる。

この微細加工機を用いてデバイスの鋳型を作製し、光硬化性樹脂をキャストして光重合して薬物カプセルを作製する手法を過去に報告した（Biomaterials, 32, 1950-1956, 2011）。光硬化性樹脂として、ポリエチレン

リコールジメタクリレート (Polyethyleneglycol dimethacrylate ; PEGDM) を使用した。これは歯科材料として利用されている生体材料であり、生体親和性が高いことが報告されている (Acta Biomaterialia, 2, 1-8, 2006, Tissue Eng, 12(6), 1663-1673, 2006)。デバイスは汎用性と移植性、さらに徐放特性を考慮して、リザーバー、薬物ペレット、徐放膜からなるリザーバー型カプセルとした。徐放膜を介することによって、一時的に薬物が大量放出されるバースト現象を抑えることが可能である。また、分子量の短いTryethyleneglycol dimethacrylate (TEGDM) をリザーバー用樹脂に用いると、薬物はこのリザーバーを通過できないため、徐放膜側から一方向性に薬物を放出することが可能である。H24はウサギ眼強膜上に移植可能なデバイスの設計および評価を行った。

医薬品・医療機器開発において滅菌法の選択は重要である。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いため、エチレンオキサイドガス (EOG)、電子線、ガンマ線の3種類を検討することとした。EOGの滅菌条件は、EOG濃度480mg/L以上で40%の条件下、4時間暴露する。デバイス内にガスが行き届かない場合は内部が滅菌できない可能性がある。電子線の滅菌条件は、照射量22kGyである。電子線によってUNOが分解する可能性やデバイス基材が劣化、変色する可能性がある。線の滅菌条件は、照射量25kGyである。電子線と同様にUNOや基材の劣化、変色の可能性がある。そこでH25、H26は、滅菌後のUNO含量、徐放性、性状、無菌性を評価し、適切な滅菌法の選択を検討した。また、デバイスの安定性として、保存温度の影響、加速試験後のUNO含量、徐放性、性状、無菌性を評価した。

## B. 研究方法

### H24研究

#### (1) リザーバー用鋳型の作製

デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。まずリザーバーの鋳型

を設計した。リザーバー形状をCADでデザインし、PMT.Co.の微細加工機MC-2 microを用いてCAM (Computer aided manufacturing) によってアクリル板にリザーバー形状を切削した。リザーバーデザインの特徴として、移植する際にピンセットで持つための取っ手と、強膜上に縫合固定するための糸を引っ掛けるための溝、ウサギ眼球局面にフィットする曲がり形状、を重点的に検討した。

切削したアクリル板をフルオロシアンでコートした。このコートは次の作業で基材と鋳型を剥がしやすくするために処理した。このアクリル板鋳型にポリジメチルシロキサン (PDMS) をキャストし60℃で30分加熱した硬化させた。このPDMS鋳型をフルオロシアンでコートしPDMS鋳型とした。このPDMS鋳型に別のPDMSをキャストし60℃で30分加熱して硬化させた。このPDMS鋳型をリザーバー作製の最終鋳型とした。この最終鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone (硬化促進剤) 10 $\mu$ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋 (10mW/cm<sup>2</sup>、3min [浜松ホトニクス、LC8]) して硬化させた。最終鋳型からTEGDMリザーバーを剥がして完成した。

#### (2) 薬物の充填

薬物の充填量はデバイス形状によるが、今回の検討で最大充填できる量は20 $\mu$ Lであった。薬物をPEGDM/TEGDMプレポリマーに懸濁し、上述の方法で作成したリザーバーにキャストし、30秒UV照射 (10mW/cm<sup>2</sup>) してペレット化した。

#### (3) 徐放膜の作製

リザーバーに薬物を充填した後に、徐放膜となるPEGDM/TEGDMプレポリマーをペレット側に滴下し、ガラス板を乗せて、3分間UV照射 (10mW/cm<sup>2</sup>) してリザーバーをシールした。Phosphate-buffered saline (PBS) で余分なPEGDM./TEGDMモノマーを洗浄した。

#### (4) 薬剤リークの評価

デバイスのシール面の密着性を評価するために、PBSにデバイスを浸漬し、薬剤徐放性

を評価した。薬剤として、UNOと同等の分子量を持つフルオレセインを用いた。定期的にPBSを交換し、PBS中の蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。

#### H25-26研究

##### (1) デバイスの作製

ヒト用PDMS鋳型(φ22mm曲率/21mm長)でTEGDMリザーバーを作成し、500mg/mlのUNO/P40混合ポリマーをリザーバー内にキャスト(12μL)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

電子線:22kGy

線:25kGy

##### (3) UNO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UNO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UNO濃度を定量した。

##### (5) 性状

デバイスの色、欠けの有無などを目視で確認した。

##### (6) 無菌性

滅菌後のデバイスの無菌性評価を日本食品分析センターに依頼した。

##### (7) 保存温度の影響

デバイスをPBS 1.5mLに浸漬し、4、25、37、42 でインキュベートした。定

期的にPBSを回収し、HPLCでPBS中のUNO濃度を定量した。

##### (8) 加速試験

デバイスを恒温恒湿機に入れて、25 /60%、および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性状、UNO含量、徐放性、無菌性を評価した。

##### (倫理面への配慮)

該当なし。

#### C. 研究結果

#### H24研究

##### (1) デバイスの作製

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

仔ウサギの眼球径は約1.5センチと推定されたため、これに合わせた曲がり形状を付与した。また、デバイスの長さを10mmに短縮し、幅を3.6mmに縮小し、厚みを0.7mmに薄くし

た。他の分担研究で行われたウサギ眼への移植実験の結果、移植性は改善された。以上より、ウサギの週齢（眼球径）に合わせた複数のデバイスデザインを構築した。

## (2) 薬剤リークの評価

フルオレセインを充填したデバイスをPBSに浸漬し、徐放量を蛍光プレートリーダーで測定した。初期のデバイスでは数%の確率で薬剤リークが発生した。これはリザーバーとカバーの密着不良と推定し、リザーバーのPEGDM/TEGDMとカバーのPEGDM/TEGDMが最終的に重合して密着するデバイス調製方法を検討した。その結果、リザーバーのUV照射時間を短くし（初期検討では3分、改善後は30秒）、リザーバー中にある程度PEGDM/TEGDMモノマーを残すことによって、カバーの際のUV照射でカバー中のPEGDM/TEGDMと重合し、密着が改善することを見出した。この方法によって、徐放期間1か月以上においても、リーク率が0%のデバイスの作製が可能になった。

## H25-26研究

### (1) 滅菌後の性状

EOG滅菌では、未滅菌と比較して色の変化はなかったが、EB滅菌、線滅菌ではデバイスがピンク色に変色していた（図1）。

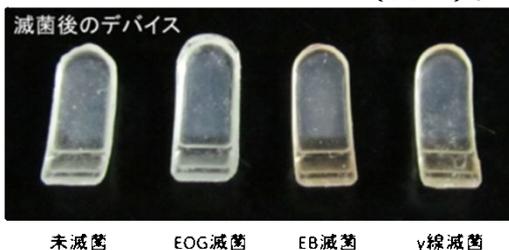


図1．滅菌後のデバイスの写真

### (2) 滅菌後のUNO含量

電子線滅菌、EOG滅菌ではUNO含量低下がほとんどなく、線滅菌では若干のUNO含量低下が見られる結果であった。

### (3) 滅菌後のUNO徐放性

未滅菌デバイスと比較して、UNO徐放性に大きな変化はなかった（図2）。

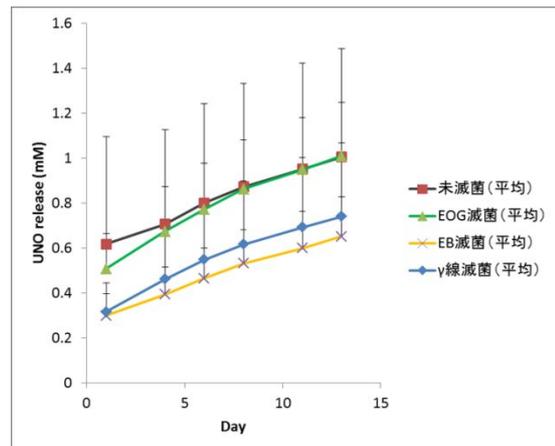


図2．滅菌後デバイスのUNO徐放性

### (4) 無菌性

いずれの滅菌法でも微生物の増殖を認めない結果であった

### (5) 保存温度の影響

保存温度4℃では徐放が認めなかった。4℃から37℃に戻すと徐放が元に戻った。さらに4℃に戻すと徐放が認められず、37℃に戻すとやや徐放量は低下したが元に戻った。

42℃では37℃よりも徐放量が多くなった。以上より、温度と徐放速度に相関性があることがわかった。25℃では4℃と同様にほとんど放出を認めないため、室温保存も可能と考えられた。

### (6) 加速試験の影響

1か月、3か月、6か月後加速試験後のEOG滅菌デバイスは、性状、徐放性（図3）、UNO含量（図4）、無菌性いずれも問題なかった。

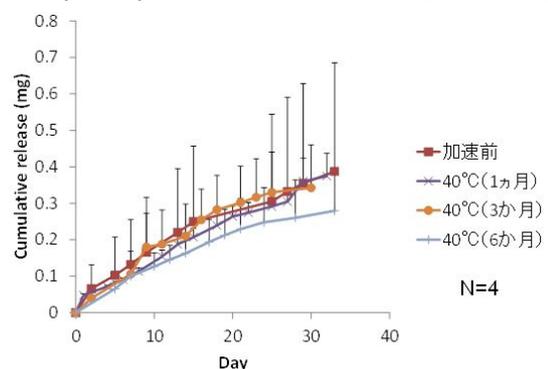


図3．加速試験後のUNO徐放性

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, 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 Baee, 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).
4. 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 )

- 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 . 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)
- 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)
- 5 . 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)
- 6 . Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, **Matsuhiko Nishizawa**, Toshiaki Abe "A controlled-release capsule device for transscleral drug delivery to the retina" Proceedings of  $\mu$ TAS 2012 Conference, Okinawa, Japan (Oct 28-Nov 1, 2012)
- 7 . 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)

- 8 . 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)
- 9 . 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：「ウノプロス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
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、綱島俊一、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、綱島俊一、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、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)
25. 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)
26. 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）

27. 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）
28. 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）
29. 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）
30. 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）
31. 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）
32. 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（2012 年 4 月 5 日～8 日）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし
- E. 結論
- F. 健康危険情報  
該当なし

## 研究報告書

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

### 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 梶 弘和 東北大学大学院工学研究科 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した。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、サル眼球、ヒト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 $\mu$ L

徐放面積：11.55cm<sup>2</sup>

##### 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 $\mu$ L

徐放面積：17.3cm<sup>2</sup>

##### ヒト用

長さ：19mm

幅：4.4mm

厚さ：1mm

曲率直径：21mm

リザーバー容積：12 $\mu$ L

徐放面積：17.3cm<sup>2</sup>

##### （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（PEG

DM) : 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)  $11.6\text{mW}/\text{cm}^2$

#### 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 $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$ 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鑄型の埃を飛ばす

17) リザーバー用鑄型にT100を50 $\mu\text{L}$ キャストする。

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

19) 40秒間 UV照射する。

20) 鑄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。鑄型は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 $\mu\text{L}$ 、サル用は12 $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$ 、サル用は10 $\mu\text{L}$ キャストする。

24) エアダスターで埃を飛ばしたカバー用鑄型を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鑄型に密着させる。

26) 240秒間 UV照射する。

27) 鑄型からデバイスを外す。鑄型は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IPS80 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）バースト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。

バーストURD用

長さ：12mm

幅：4.4mm

厚さ：1mm

曲率直径：12mm

リザーバー容積：12 $\mu$ L

徐放面積：17.3cm<sup>2</sup>

#### （６）埋植試験

URDおよびバースト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/m<sup>2</sup>）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/m<sup>2</sup>）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/m<sup>2</sup>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 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。

#### （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。

#### （倫理面への配慮）

動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。

### C．研究結果

#### （１）デバイスの規格化

規格化した方法で作成したウサギ用URD、サル用URD、ヒト用URDの徐放性はそれぞれ、約10 $\mu$ g/day、約12 $\mu$ g/day、約12 $\mu$ g/dayとなった。また、UNO含量はウサギ用は2.85mg、サル用とヒト用は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/m<sup>2</sup>）、およびRod-ERG（1.477log cd\*s/m<sup>2</sup>）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。

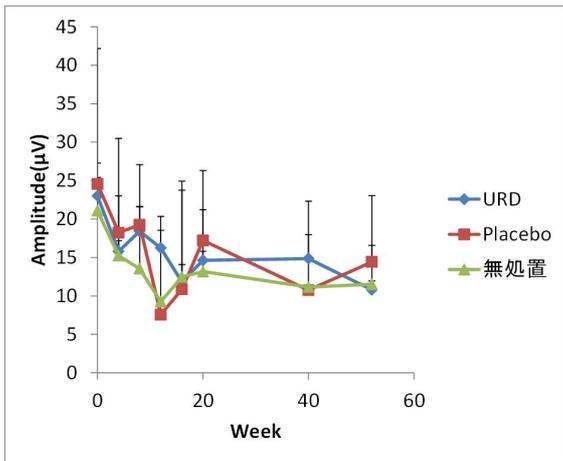


図 1 - 1 . Cone-ERG a波

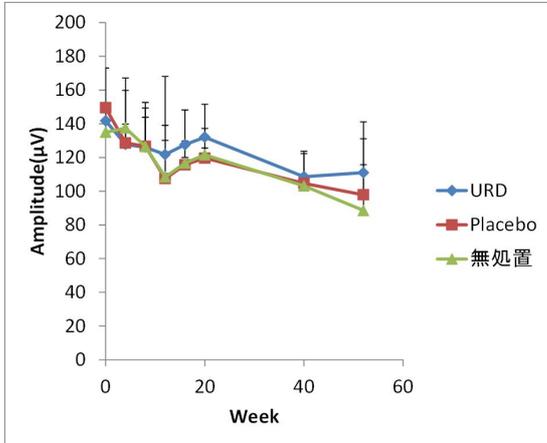


図 1 - 2 . Cone-ERG b波

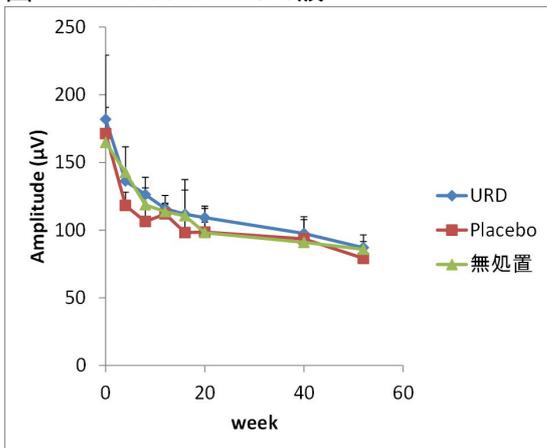


図 1 - 3 . Rod-ERG a波

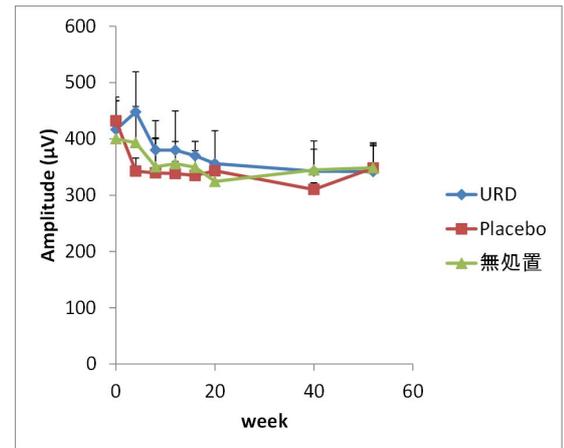


図 1 - 4 . Rod-ERG b波

( 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。

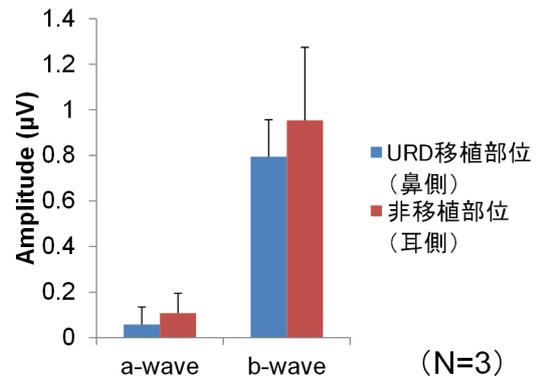


図 2 . 局所ERGの振幅値

( 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。

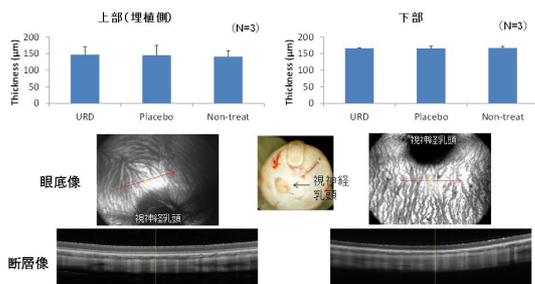


図3 . OCT像と網膜層厚みの平均

### (5) バーストURD埋植毒性

バーストURDの徐放特性を図4に示す。約3週間、約160 $\mu\text{g}/\text{day}$ でバースト徐放が続く、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 $\mu\text{g}/\text{day}$ を下回った。

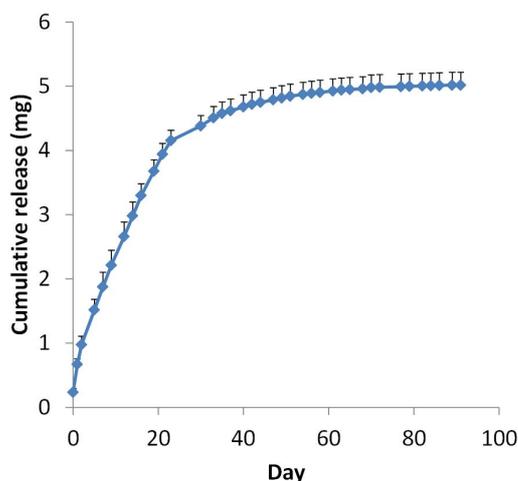


図4 . バーストURDのUNO徐放性

### (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  $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ )、およびRod-ERG (1.477log  $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ )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。

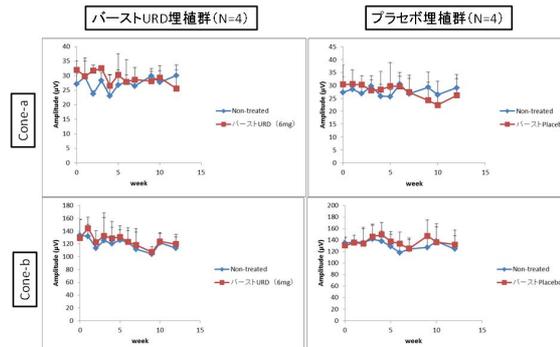


図5 - 1 . Cone-ERG

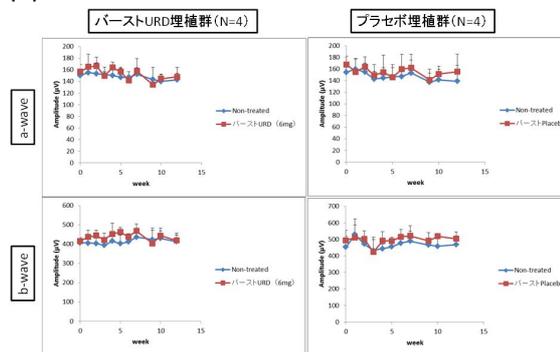


図5 - 2 . Rod-ERG

### 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

UNO徐放デバイスを規格化し、眼毒性評価を行った。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。また、54週間のURDの埋植毒性はないと考えられた。さらに、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  
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, 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)

1. Nobuhiro Nagai, **Hirokazu Kaji**, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe "Episclera Implantable Device fabricated with PDMS m

old-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**, 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)
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)
6. 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)
7. **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)

8. **Hirokazu Kaji**, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe “A controlled-release capsule device for transscleral drug delivery to the retina” Proceedings of  $\mu$ TAS 2012 Conference, Okinawa, Japan (Oct 28-Nov 1, 2012)
9. **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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Ryosuke Wakusawa, **Hirokazu Kaji**, Takuya

a 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:「ウノプロス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. 綱嶋俊一、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、綱嶋俊一、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、綱嶋俊一、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、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)
25. 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)
26. 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)
27. 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)
28. 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)
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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 (2012 年 4 月 5 日~8 日)

H . 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 研究報告書

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

### ウノプロストン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カ月後でも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する方法が行われる。例えば、加齢黄斑変性症治療では、抗VEGF抗体の硝子体注射が成果をあげている（N Engl J Med, 355, 1419-1431, 2006）。しかしこの硝子体注

射は月に一度の注射が必要で、眼内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孔するプラグ (Ophthalmologica, 215, 143, 2001) はいずれもインプラントが眼内に及ぶため、眼内への副作用リスクがある。また、ほとんどのDDSは生分解型ポリマーで作製されており、予想外の担体分解に伴う高濃度薬物バースト問題がある (J Control Release, 37, 143-150, 1995)。

このような背景から我々は、デバイスが眼内に及ばない眼外に置くだけの「経強膜DDS」が眼内への副作用をなくし、安全に持続的に眼内へ薬物を投与できる方法であると期待している。すでに複数の研究者がこの経強膜DDSを報告しているがいくつかの問題が残っている。まずDDS担体が生分解型ポリマーで作製されているため、上記した薬物バーストの問題がある (J Pharm Sci, 99, 2219-2239, 2010)。さらに、薬物は強膜側だけではなく反対の結膜側へと全方向に徐放されるため、結膜血流による薬物の吸収が起こり、強膜側への薬物移行が効率的ではないという問題がある (J Control Release, 148, 42-48, 2010)。我々はこれらを解決するために、非分解型ポリマーの光硬化性樹脂ポリエチ

レングリコールジメタクリレート (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 (Triethyleneglycol 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相臨床試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) 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℃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 $\mu$ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋(10mW/cm<sup>2</sup>, 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 $\mu$ 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/cm<sup>2</sup>, 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/cm<sup>2</sup>, 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℃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 $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>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 $\mu$ 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 $\mu$ 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%O<sub>2</sub>)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 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>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 $\mu$ 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 $\mu$ 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%O<sub>2</sub>) 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 (Heterozygotes) を使用した。すべての過程においてケタミン塩酸塩 (90mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (10mg/kg) の腹腔内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%ttropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride (0.4%) を局所麻酔として使用した。

#### (5) デバイスの移植

麻酔後、実体顕微鏡で観察しながら、ラットの上方結膜を切開しテノン嚢を鈍的に剥離し強膜を露出させた。デバイスを挿入し強膜上に接着するように固定した。結膜を縫合し、タリビッド眼軟膏を点入し終了とした。

#### (6) 網膜光障害

UNO徐放デバイス (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%ttropicamideで散瞳してから、空調を有するLED光障害装置 (特注モデル) 内で、デバイスを移植したラットを飼育した (22、8000Lux)。予備実験で光障害時間は、24時間が適当と判断した。この条件では、完全に視力を失うわけではなく動物の行動

に異常は見られなかった。光照射後、LEDを消灯し、装置内で4日間暗順応した。暗順応後、暗室内でラットを麻酔し、2.5%phenylephrinと1%ttropicamideで散瞳してから網膜電図 (ERG; Purec、Mayo株) を評価した。

コンタクトレンズ電極 (2mmベースカーブ、Mayo) を角膜に当て、Identical reference 電極を口に、Ground電極をしっぽに置いた。Single flash light (Stimulus 1000cd/m<sup>2</sup>, 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 (6μg、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) をキャストし鑄型を転写した。PDMS鑄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  $\mu$  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  $\times$  長さ10mm  $\times$  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  $\mu$  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  $\mu$  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 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 ( $\log \text{cd}^* \text{s/m}^2$ ) 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 ( $\log \text{cd}^* \text{s/m}^2$ ) 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) をキャストし鑄型を転写した。PDMS鑄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  $\mu$  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  $\times$  長さ10mm  $\times$  厚さ0.7mm (曲率直径12mm)、サル用は幅4.4mm  $\times$  長さ17mm  $\times$  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  $\mu$  L (ウサギ用)、12  $\mu$  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  $\mu$  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4×4mmの鍵状球結膜切開を作製し、セッシ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/m<sup>2</sup>)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/m<sup>2</sup>)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(2mm×2mm×1mm、UNO充填量1.2μL)。

##### (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10μgのUNO放出が可能であった。UNO充填量は10mgであるため(500mg/ml×20μL)、推定の最大徐放日数は10mg/0.01mg=1000dayと期待できる。すなわち、約3年にわたって一定量を徐放できる可能性がある。

次にカバーを一定条件（P40）とし、薬物ペレットのPEGDM/TEGDM組成をP40からP0に変更したときの徐放特性を検討した。その結果、カバー条件変更と同様にUNO放出量を制御することが可能であった。

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

### （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  $\mu$ Mから300  $\mu$ 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  $\mu$ Mで極大を示した。一方、400  $\mu$ 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  $\mu$ Mから200  $\mu$ 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  $\mu$ Mで極大を示した。一方、300  $\mu$ 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  $\mu$ Mから400  $\mu$ 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週間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。

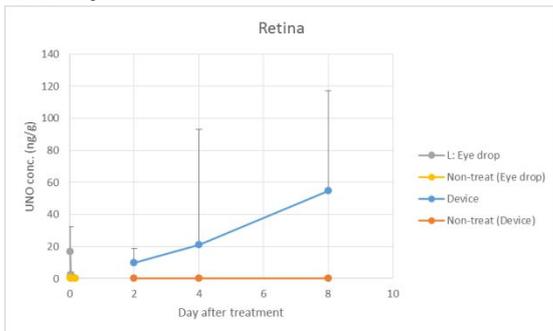


図1 . 網膜内UNO濃度の結果

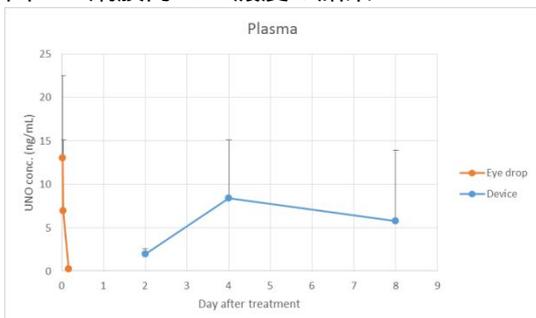


図2 . 血漿中UNO濃度の結果

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。

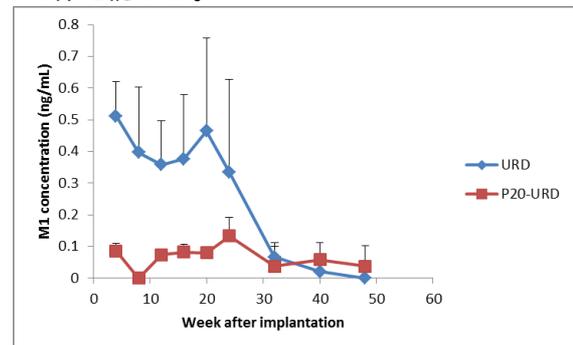


図3 . ウサギ血漿中M1体濃度

(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/m<sup>2</sup>)、およびRod-ERG b波(1.477log cd\*s/m<sup>2</sup>)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。

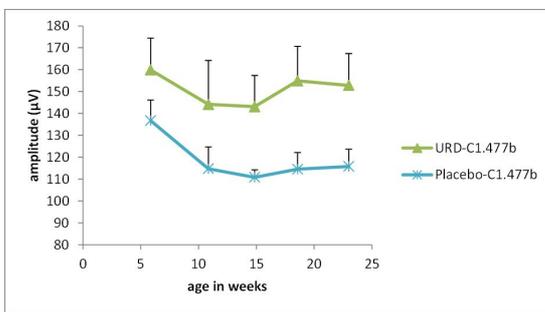


図4 . Cone-ERG b波振幅値

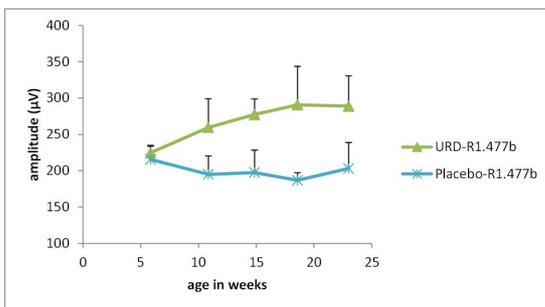


図5 . Rod-ERG b波振幅値

#### 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、Ca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Ca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。Ca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 Kashkouli Nezhad, Kaori Sampa, 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**. "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).
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 Khademhossaini, Hirokazu Kaji. "Micropatterned Polymeric Nanosheets for Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer" *Advanced Materials*, 26(11), 1699-1705 (2014).
5. Hideyuki Onami,<sup>†</sup> **Nobuhiro Nagai**,<sup>†</sup> 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**, 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. **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 meeting, 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, 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)
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. 綱嶋俊一、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、綱嶋俊一、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、綱嶋俊一、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 $\mu$ lを混合したプレポリマーをキャストし、UV架橋（25mW/cm<sup>2</sup>、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 $\mu$ 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 $\mu$ 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/cm<sup>2</sup>、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/m<sup>2</sup>、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 ( $\phi 22/21\text{mm}$ 、500mg/ml、6 mg UNO) を作成し、PBS 1.5mlに浸漬し(37)、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

細胞播種 (96-well culture plates (BM equipment Co.) at a density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) 培養 (RGC-5 : DMEM、48h、37、RPE-J : DMEM、48h、33)

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)

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 (0 $\mu\text{g/day}$ )、URD-1 (1 $\mu\text{g/day}$ )、URD-11 (11 $\mu\text{g/day}$ )、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 $0.45 \pm 0.25$  ( $\mu\text{g/ml}$ )、硬化剤は $0.22 \pm 0.09$  ( $\mu\text{g/ml}$ )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、 $0.391\text{mg/ml}$ 以上、RPE-Jに対して $0.781\text{mg/ml}$ 以上で有意に毒性を示した。TEGDMはRGC-5に対して、 $0.195\text{mg/ml}$ 以上、RPE-Jに対して $0.391\text{mg/ml}$ 以上で有意に毒性を示した。硬化剤はRGC-5に対して、 $0.391\text{mg/ml}$ 以上、RPE-Jに対して $0.391\text{mg/ml}$ 以上で有意に毒性を示した。

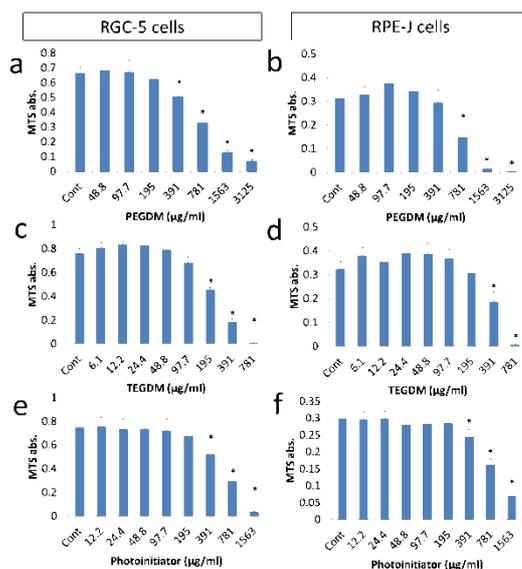


図1. PEGDM (a, b)、TEGDM (c, d)、硬化剤 (e, f) の細胞毒性

### (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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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-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

1. 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).
2. 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).
3. **Hideyuki Onami**,<sup>†</sup> Nobuhiro Nagai,<sup>†</sup> 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).

4. 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).
  5. 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)
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)
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)
5. 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)
6. **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)
7. 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)

8. **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)
9. Nagai N, Kaji H, **Onami H**, Yamada T, Katsukura Y, Ishikawa Y, Nishizawa M, Mashima Y, Abe T “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. 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）
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：「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）
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：「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）
4. **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）

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、**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）
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：「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（2012年4月5日～8日）
8. 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）

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