

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792006

研究課題名（和文）

未熟児網膜症に対する抗 VEGF 抗体の新たな投与方法の効果と安全性を検討する研究

研究課題名（英文）

Novel administration of anti-VEGF antibody for retinopathy of prematurity

研究代表者

齋藤 雄太 (SAITO YUTA)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：70407477

研究成果の概要（和文）：

未熟児網膜症の動物モデルであるラット高酸素負荷虚血網膜症（oxygen-induced retinopathy: OIR）モデルに抗血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）抗体を結膜下または硝子体内投与し、各投与方法での網膜新生血管への効果と薬物動態および網膜毒性を比較検討した。その結果、抗VEGF抗体結膜下投与は硝子体内投与にその効果は劣るものの、OIRの網膜血管新生抑制に効果を示し、薬剤が全身循環を経て片眼へも作用したと考えられた。薬剤の網膜毒性は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated that the effect, pharmacokinetics and toxicity of subconjunctival or intravitreal injections of anti-VEGF antibody for OIR rat model. Subconjunctival injection of anti-VEGF suppressed the retinal neovascularization in OIR rat model; even the effect was smaller than that of intravitreal injection. The antibody escaped into systemic circulation, thus it affected fellow eyes. The toxicity for retinas was not detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：薬理学・未熟児網膜症・血管内皮増殖因子・抗 VEGF 抗体・薬物動態

未熟児網膜症は未熟な状態で出生した超出生体重児に発症する眼内血管新生疾患であり、小児の失明原因の1つである。

未熟児網膜症発症の機序として、発症直後からの高濃度酸素投与による網膜正常血管発達の遅延が起これり (Phase 1)、その後の酸素投与終了に伴い、網膜内の無血管領域が相対的低酸素状態になるため網膜内でVEGFが過剰産生され、眼内血管新生が発症する (Phase 2) と考えられている (Chen J et al. *Angiogenesis* 2007)。

現在、未熟児網膜症の治療として、網膜光凝固術、網膜冷凍凝固術、硝子体手術などがあり (Chen J et al. *Angiogenesis* 2007)、さらに近年では抗ヒトVEGF抗体であるベバシズマブを硝子体内投与することで一定の効果があると報告されている (Kusaka S et al. *Br J Ophthalmol* 2008)。しかしながら、硝子体内投与では硝子体出血、感染性眼内炎、網膜剥離等の重大な合併症の危険性がある。また新生児では眼球体積に対する水晶体体積が大きく、水晶体照射の危険性が高い。一方、硝子体内投与に比べて、結膜下投与は比較的簡便かつ安全であり合併症も少ない。しかし、これまでのところ未熟児網膜症に対して抗VEGF抗体を結膜下投与し、その効果を検討した報告は無い。

## 2. 研究の目的

本研究では未熟児網膜症の動物モデルであるラット OIR モデルに、抗 VEGF 抗体を結膜下または硝子体内投与して、各投与方法での網膜新生血管への効果と薬物動態・網膜毒性を比較検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) **動物モデル**：新生仔Sprague-DawleyラットにOxycycler®を用いて日齢0 (P0) からP12まで高酸素負荷を行った (図1)。P13からP18

まで大気中で飼育した (OIR群)。大気中での飼育群 (RoomAir群) をコントロールとした。

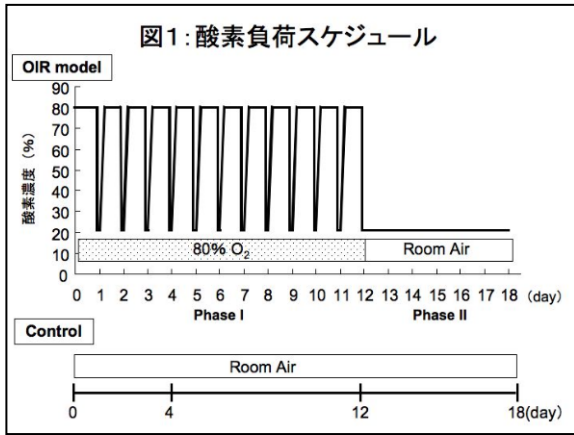
まず、抗VEGF抗体の結膜下投与の至適濃度を決定するため、P12にラットを全身麻酔し、右眼の結膜下に抗ラットVEGF抗体0.1  $\mu$ gまたは1.0  $\mu$ gを投与した (投与眼：injected eye)。Normal Goat IgG 1.0  $\mu$ gをコントロールとして用いた。左眼は非投与眼 (non-injected eye) とした (その結果、濃度依存的に網膜血管新生を抑制したためその後の投与量を1.0  $\mu$ gに決定した)。結膜下投与と硝子体内投与での効果を比較するため、同様に結膜および硝子体内投与を行い比較した。コントロールとして網膜血管新生の評価にはNormal Goat IgG 1.0  $\mu$ g投与群を、抗ラットVEGF抗体の薬物動態・網膜毒性の検討には非投与群を用いた。

(2) **網膜展開標本**：P18のラットを深麻酔下で屠殺し、両眼球を摘出した。4%パラホルムアルデヒドで48時間固定し、実体顕微鏡下で角膜・強膜・水晶体・硝子体を除去し、網膜をADPase染色した。染色された網膜を実体顕微鏡下で4分割して網膜展開標本を作製し、新生血管をスコア化した (NV score) (Hasebe et al. *IOVS* 2000)。また、Image J software (NIH) を用いて網膜全体の面積に占める網膜無血管領域面積の割合を求めた (%AVA)。

(3) **血液採取**：P12 (薬物投与前)、P13、P14、及び P18 でラットを深麻酔し屠殺したあと開胸して左心室より23ゲージ針で血液を採取し、血清を得た。その後の解析まで-80°Cで凍結保存した。

(4) **抗体の血清中濃度測定**：ELISA法を用いて、血清中の抗ラットVEGF抗体濃度を測定した。

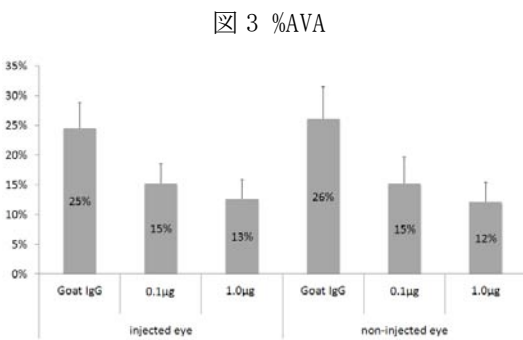
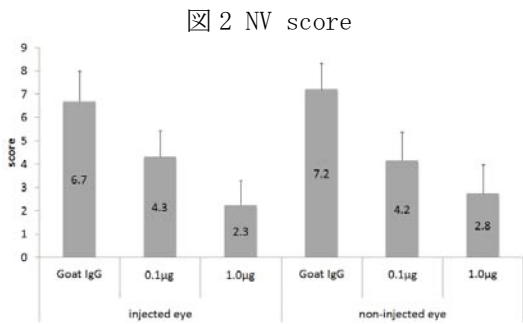
(5) **抗ラット VEGF 抗体投与による副作用の検討**：抗VEGF抗体による網膜内神経障害を検討するため、P18のRoomAir群で採取した網膜から凍結切片標本を作製・染色し、視神経断面を含む網膜切片内の神経節細胞数、内・外顆粒層厚をコントロール群と比較した。



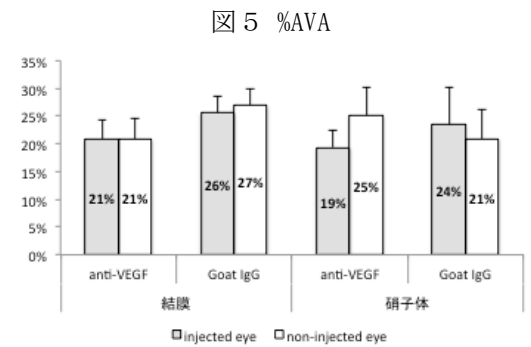
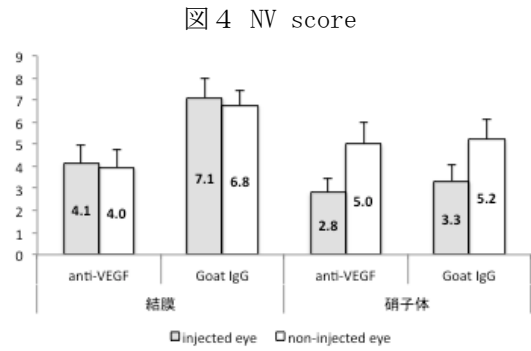
#### 4. 研究成果

OIR 群の NV score と%AVA は、コントロールに比べ抗 VEGF 抗体結膜下投与では濃度依存的に低下したが、各群間に有意差はなかった ( $p=0.07$ ,  $p=0.07$ ) (図 2, 3)。非投与眼においても NV score、%AVA とともに同様に濃度依存的に減少した。RoomAir 群では NV、AVA とともに認められなかった。

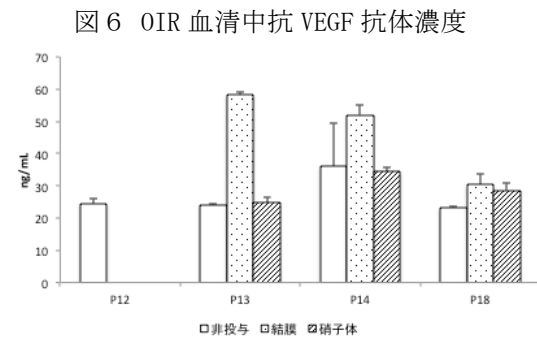
体重は、薬剤投与前 P12 と P18 の両日で各群間に有意差はなかった。



次に抗 VEGF 抗体の結膜下と硝子体内投与の比較を行った結果、P18 の NV score は抗 VEGF 抗体の硝子体投与群の投与眼で最も抑制され、抗 VEGF 抗体結膜下投与群の投与眼と非投与眼でも抑制された (図 4)。%AVA は抗 VEGF 抗体の硝子体内投与眼と結膜下投与群の両眼で低い傾向にあった (図 5)。



OIR における抗 VEGF 抗体の血清中濃度測定の結果は P13 において結膜下投与群で抗体濃度が高く、薬剤が全身へ循環していることが示唆された (図 6)。非投与群での値は測定キットの非特異的反応の結果と考えられた。



抗 VEGF 抗体の網膜毒性の検討した結果、

結膜下投与群の両眼・硝子体内投与群の両眼・非投与群の神経節細胞数・内顆粒層厚・外顆粒層厚で群間差はなく、今回の投与された抗体濃度での網膜毒性は結膜下・硝子体内投与とも低いことが示唆された。

以上の結果より抗 VEGF 抗体結膜下投与は硝子体内投与にその効果は劣るものの OIR の網膜血管新生抑制に効果を示し、薬剤が全身循環を経て片眼へも作用したと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kabayama J, Saito Y, Nakanishi-Ueda T, Ueda T, Matsubara M, Wada Y, Okawada H, Hisamitsu T, Koide R. Effects of Subconjunctival Injection of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody on Oxygen-Induced Ischemic Retinopathy in a Neonatal Rat Model. The Showa University Journal of Medical Sciences 2012; 24(1): 11-9.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Yuta Saito, Takako Nakanishi-Ueda, Toshihiko Ueda, Yoshihiro Wada, Hajime Yasuhara, Ryohei Koide: Effects of Subconjunctival Injection of anti-VEGF Antibody on Oxygen-induced Retinal Neovascularization of the Neonatal Rat Model. ARVO 2011 Annual Meeting 2011. 5. 1-5. Fort Lauderdale
- 2) 蒲山順吉、齋藤雄太、植田俊彦、中西孝子、松原 倫子、和田悦洋、久光正、小出良平：高濃度酸素負荷虚血網膜症ラットに対する抗VEGF抗体結膜下投与の効果の検討. 第31回日本眼薬理学会, 2011. 9. 17-18. 島根県松江市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤雄太 (SAITO YUTA)  
昭和大学・医学部・助教  
研究者番号：70407477