

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号： 14202
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009 ~ 2011
 課題番号： 21592255
 研究課題名 (和文) 血管内皮増殖因子の眼内動態に関する研究

研究課題名 (英文) Pharmaokinetics of intravitreally injected vascular endothelial growth factor

研究代表者

大路 正人 (OHJI MASAHIRO)
 滋賀医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 90252650

研究成果の概要 (和文)：適応外使用として硝子体注射に用いられている bevacizumab の薬物動態をカニクイザルを用いて検討した。硝子体内に投与された通常使用量 (1.25mg) の bevacizumab の効果持続期間は4週間から6週間であった。一方、通常使用量の1/200である 6.25 μ g であっても短期的には効果があった。無硝子体眼では硝子体内投与された bevacizumab の半減期が1.5日であり、正常眼での半減期2.8日に比べ著しく短縮していた。これらの結果は適応外使用されている bevacizumab の安全で効率的な使用に有益な治験であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We evaluated the pharmacokinetics of intravitreally injected bevacizumab which is widely used as an off-label drug. Intravitreal injection of regular dose of bevacizumab (1.25mg) inhibited VEGF for 4-6 weeks. Minimum effective dose of bevacizumab to suppress VEGF was 6.25 μ g which is 1/200 of the regular dose. The half-life of intravitreally injected bevacizumab was 1.5 days in a-vitreous eyes while it was 2.8 days in normal eyes. These findings would be useful information for the safe and effective use of bevacizumab.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： VEGF, VEGF 阻害薬, 薬物動態, 硝子体注射, サル

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性に代表される血管新生黄斑症、糖尿病や静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫などの黄斑疾患は、黄斑の視機能を障害し社会的失明に至る重篤な病態である。また社会の高齢化や生活の欧米化に伴い、患者数も急激に増加しており、大きな社会問題になっている。加齢黄斑変性や黄斑浮腫の発生の病態には血管内皮増殖因子（VEGF）が大きく関与していることが報告され、VEGFを標的とした眼局所の治療（硝子体内投与）が注目されている。加齢黄斑変性には光線力学的療法（PDT）が唯一認可された治療法であったが、最近、血管内皮増殖因子（VEGF）を標的とした2種類の抗VEGF薬が加齢黄斑変性に対して認可され治療の第一選択となっている。同様に黄斑浮腫に対しても硝子体手術やレーザー凝固による治療が行われてきたが十分な成果が得られず、VEGFを標的とした治療が試みられつつある。VEGFを標的とした治療薬の中でも bevacizumab（アバスタチン®）は、結腸癌に対して静脈内投与が承認されている薬剤であるが、眼科領域では海外・国内を問わず、加齢黄斑変性や黄斑浮腫に対して硝子体内投与が適応外使用として広く使用されている。しかしながら bevacizumab の開発においては硝子体内投与が想定されたものではなく、動物実験を含めて効果と安全性に関してはデータがほとんどないのが現状である。この薬物を安全に効率よく使用していくために、その薬剤の薬理学的な効果や安全性を検討するとともに、最適な投与量と投与間隔を決定する必要がある。そのためには眼内の薬物動態を動物実験を用いて解明していくことが必須である。

われわれの施設でも倫理委員会の承認を得た上で bevacizumab の硝子体内投与を加齢黄斑変性や難治性の黄斑浮腫の治療に用いている。その際に眼内の VEGF 濃度と病態の関係を

解明するために倫理委員会の承認と患者の同意を得た上で、bevacizumab の硝子体注射直前に前房水を採取し、眼内 VEGF 濃度を測定し、報告してきた（Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, Sawada T, Ohji M. Vascular endothelial growth factor in aqueous before and after intravitreal Avastin in diabetic retinopathy. Archives of Ophthalmol 2007;125(10):1363-1366.）。また、全身を介しての対側眼への影響も懸念されている bevacizumab の対側眼への影響についても報告しており、本分野における先駆的研究組織である。（Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, Sawada T, Ohji M. Vascular endothelial growth factor in fellow eyes of eyes injected with intravitreal bevacizumab. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246:1379-1381, 2008）

このように Bevacizumab に代表される抗 VEGF 薬は広く臨床に用いられているものの、眼内の薬物動態はほとんど明らかになっていない。眼内の薬物動態を解明するには ELISA などを用いた測定方法が確立されていること、ヒトに近い薬物動態であることを考えると、サルを用いた動物実験が最も望ましい。われわれの施設は、サルを用いた動物実験施設として国内有数の施設であり、眼科手術を含めてサルを用いた動物実験を十分な支援体制の下に行える国内では数少ない施設である。動物実験用の眼科手術用顕微鏡および硝子体手術装置は施設内に既に保有し稼働しており、動物実験施設外に生化学的解析のために検査機器を有しており、本研究に最も適している組織である。さらに予備実験として、健常カニクイザルの前房水中の VEGF を ELISA を用いて測定し、ヒト正常値と同程度の濃度であることを確認している。今回の研究により、bevacizumab の眼内 VEGF に与える効果と持続

期間が明らかになり、臨床上非常に重要な意義を有するものと確信している。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性や黄斑浮腫などの主原因と考えられている VEGF および抗 VEGF 薬である bevacizumab の眼内での薬物動態について明らかにする。

(1) カニクイザルにおける前房水 VEGF 濃度の検討

カニクイザルの正常眼における前房水中 VEGF 濃度の報告はないので、基本的な値として前房水 VEGF の正常値を決定する

(2) bevacizumab 硝子体内注射の効果とその持続性の検討

VEGF に対する抗体である bevacizumab を硝子体腔内に投与し、その後の前房水中 VEGF 濃度および bevacizumab 濃度を経時的に測定し、bevacizumab の効果持続期間を明らかにする。

(3) 硝子体内投与された bevacizumab の対側眼への影響の検討

硝子体腔に投与された抗 VEGF 薬が血液を介して対側眼の眼内にも影響を与えるという報告がある。bevacizumab の硝子体内投与をされた対側眼においても前房水中の VEGF 濃度および bevacizumab 濃度を経時的に測定し、bevacizumab 硝子体内投与の対側眼に与える影響を明らかにする。

(4) bevacizumab 硝子体内注射の最適な濃度の検討

臨床的に用いられている投与量の効果を検討するのに加えて、効果を認める最少量の検討および通常量以上を投与した場合における効果持続期間について検討する。

(5) 無硝子体眼における bevacizumab の薬物動態の検討

硝子体手術を受けた眼（無硝子体眼）では薬物の消失速度が速いことが報告されている。

消失速度は薬剤によっても異なるが、bevacizumab の無硝子体眼における効果の持続期間は報告されていない。カニクイザルに硝子体手術を行い、無硝子体眼とする。手術による炎症が十分に消退した後に、上記と同様の実験を行い、カニクイザルの無硝子体眼における VEGF 濃度および bevacizumab 濃度の推移を検討し、無硝子体眼における bevacizumab の効果の持続期間を検討する。

3. 研究の方法

(1) カニクイザルにおける前房水 VEGF 濃度の検討

VEGF 濃度と bevacizumab 濃度を測定するために ELISA による測定系を確立した。カニクイザル 3 匹の片眼から前房水を採取し、両眼の前房水の bevacizumab 濃度、VEGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

(2) bevacizumab 硝子体内注射の効果とその持続性の検討

bevacizumab (1.25mg/50 μ l) をカニクイザル 3 匹の片眼の硝子体内に投与し、投与直前および投与後 1, 3, 7 日、2, 4, 6, 8 週に投与眼の前房水を採取し、投与眼の前房水の bevacizumab 濃度、VEGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

(3) 硝子体内投与された bevacizumab の対側眼への影響の検討

bevacizumab (1.25mg/50 μ l) をカニクイザル 3 匹の片眼の硝子体内に投与し、投与直前および投与後 1, 3, 7 日、2, 4, 6, 8 週に対側眼の前房水を採取し、投与眼の前房水の bevacizumab 濃度、VEGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

(4) bevacizumab 硝子体内注射の最適な濃度の検討

カニクイザル 3 匹の片眼に通常の 5 倍量にあたる bevacizumab (6.25mg/ml) を硝子体内注

射し、注射前、注射後1日、3日、1週、2週、4週、6週に投与眼の前房水を採取した。前房水中のVEGF濃度とbevacizumab濃度をELISAを用いて測定した。

カニクイザル3匹の片眼に、通常の1/1000量にあたるbevacizumab (1.25 μ g/ml)を硝子体内注射し、注射前、注射後1日、3日、1週、2週に投与眼および非投与眼の前房水中VEGF濃度を測定した。有意なVEGFの低下が無ければ効果なしと判定し、投与量を5倍ずつ上げて再度同様の実験を行い、有意な低下が認められるまで行った。

(5) 無硝子体眼におけるbevacizumabの薬物動態の検討

無硝子体眼におけるVEGFおよびbevacizumabの薬物動態を検討した。カニクイザルの片眼に硝子体切除術および水晶体切除術をおこなった。3匹3眼では水晶体嚢を温存し、別の3匹3眼では水晶体嚢も完全に除去した。硝子体手術の影響を除去するために手術から3か月間観察し、安定していることを確認した上で、カニクイザル6匹の無硝子体眼に臨床で通常用いられている投与量であるbevacizumab (1.25mg/0.05ml)を硝子体内投与した。投与前、投与翌日、3日目、1週目、2週目、4週目、8週目に投与眼の前房水を採取し、VEGFならびにbevacizumabの濃度を測定し、眼内の薬物動態を検討した。

4. 研究成果

1) カニクイザルにおける前房水VEGF濃度の検討

前房水中VEGF濃度は投与前、平均80.0 \pm 22.6pg/mlであった。

(2) bevacizumab硝子体内注射の効果とその持続性の検討

投与眼における前房水中VEGF濃度は投与前、平均80.0 \pm 22.6pg/mlであり、いずれの個体

においても投与翌日から4週目までは検出感度(31.2 pg/ml)以下となり、6週目で投与前のレベルにもどった。一方、bevacizumab濃度は投与眼では投与翌日にピーク(平均49,500 \pm 10,900 ng/ml)に達し、次第に減少していった。

(3) 硝子体な投与されたbevacizumabの対側眼への影響の検討

bevacizumabを投与されたカニクイザルの対側である非投与眼においては実験期間を通して前房水中VEGF濃度に有意な変化はみられなかった。一方、bevacizumab濃度は非投与眼においても3日目をピークにごくわずかの移行を認めた(平均18.5 \pm 25.5 ng/ml)が、2週間後には検出感度以下となった。また、血清中のbevacizumabのピーク(平均1,430 \pm 186 ng/ml)は投与1週間後であった。

(4) bevacizumab硝子体内注射の最適な濃度の検討

通常の5倍量のbevacizumab投与では注射翌日には前房水VEGF濃度は測定感度以下に低下し、投与後4週まで測定感度以下であり、以前に報告した通常量bevacizumab投与と比べ効果期間の有意な延長はみられなかった。投与眼の前房水中のbevacizumabの半減期は5倍量で2.9日、以前報告した通常量の2.8日と変わりなかった。bevacizumabの硝子体内投与において量を5倍に増やしても効果期間の大きな延長は期待できないと考えられた。

bevacizumabの効果発現の必要最少量を検討するために通常より低用量のbevacizumabを硝子体内注射したところ、有意なVEGFの低下が見られたのは、通常の1/200量

(6.25 μ g/ml)の濃度からであった。術前投与でbevacizumabを使用する場合には通常の1/200量である6.25 μ g/mlの濃度までは減量することができる。

(5) 無硝子体眼における bevacizumab の薬物動態の検討

眼内 VEGF 濃度および bevacizumab 濃度の薬物動態に水晶体囊の有無により 2 群間での差を検討したが、両群間に差を認めなかったため、両群を合わせた 6 匹 6 眼について解析した。硝子体手術前には前房水 VEGF 濃度は 81.7 ± 27.0 pg/ml であったが、硝子体手術 3 か月後の bevacizumab 投与直前には 51.4 ± 20.5 pg/ml と有意に低下していた。bevacizumab 投与 7 日目まで VEGF 濃度は測定下限未満に低下していた。投与 2 週後には前房水で検出できるようになり、4 週後には 40.4 ± 28.4 pg/ml となり、投与前と有意な差を認めなくなった。無硝子体眼における bevacizumab の半減期は 1.5 ± 0.6 日であり、以前に報告したカニクイザルの正常眼での bevacizumab の半減期 2.8 ± 0.6 日に比べ、有意に短縮していた。

無硝子体眼では正常眼に比べ、前房水 VEGF 濃度が低下しており、硝子体手術が黄斑浮腫に有効である原因のひとつである可能性を示した。また、無硝子体眼では硝子体内に投与された bevacizumab の半減期が短く効果の期間が短縮されることが判明した。

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)

- ① Miyake T, Sawada O, Kakinoki M, Sawada T, Kawamura H, Ogasawara K, Ohji M. Pharmacokinetics of bevacizumab and its effect on vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of bevacizumab in Macaque eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 51 巻、1606-1608、2010、査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Miyake T, Kakinoki M, Sawada O, Sawada T, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M. Pharmacokinetics of ranibizumab and its effect on vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of ranibizumab in macaque eyes. 第 50 回日本網膜硝子体学会 東京 2011.12.3
- ② 柿木雅志、三宅太一郎、澤田智子、西信良嗣、川村肇、大路正人 カニクイザルの水晶体囊温存無硝子体眼へのベバシズマブ投与における VEGF 濃度の解析 第 50 回日本網膜硝子体学会 2011.12.2 東京
- ③ 柿木雅志、三宅太一郎、澤田修、澤田智子、川村肇、大路正人 カニクイザルを用いた高濃度ベバシズマブ硝子体内投与における薬物動態の検討 第 115 回日本眼科学会総会 2011.5.13 東京
- ④ 三宅太一郎、柿木雅志、澤田修、澤田智子、川村肇、大路正人 カニクイザルを用いたベバシズマブ硝子体内投与における必要最小量の検討 第 115 回日本眼科学会総会 2011.5.13 東京
- ⑤ Kakinoki M, Miyake T, Sawada O, Sawada T, Kawamura H, Ohji M. The clearance of intravitreal bevacizumab in vitrectomized macaque eyes. ARVO 2011.5.2, Fort Lauderdale, 米国
- ⑥ Miyake T, Kakinoki M, Sawada O, Sawada T, Kawamura H, Ohji M. The minimum dose of intravitreal injection of bevacizumab effective against vascular endothelial growth factor in macaque eyes. ARVO 2011.5.2, Fort Lauderdale, 米国
- ⑦ 柿木雅志、三宅太一郎、澤田修、澤田智

子, 川村肇, 大路正人 カニクイザルを用いた無硝子体眼へのベバシズマブ投与における VEGF 濃度の解析 第 49 回日本網膜硝子体学会 2010. 11. 27 大阪

- ⑧ Miyake T, Sawada O, Kakinoki M, Sawada T, Kawamura H, Ohji M. Pharmacokinetics of bevacizumab and its Effect on vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of bevacizumab in Macaque eyes ARVO 2010. 5. 3, Fort Lauderdale, 米国
- ⑨ 三宅太一郎、澤田 修、柿木雅志、澤田智子、川村 肇、大路正人 カニクイザルを用いたベバシズマブ硝子体内投与における薬物動態の解析 第 114 回日本眼科学会総会 2010. 4. 15 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大路 正人 (OHJI MASAHIITO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号： 90252650

(2) 研究分担者

川村 肇 (KAWAMURA HAJIME)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号： 50294814

澤田 修 (SAWADA OSAMU)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号： 00378465