

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-98196

(P2016-98196A)

(43) 公開日 平成28年5月30日(2016.5.30)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)	
A61K	41/00	(2006.01)	A61K 41/00	4C076
H05H	1/24	(2006.01)	H05H 1/24	4C084
A61P	27/02	(2006.01)	A61P 27/02	
A61K	47/02	(2006.01)	A61K 47/02	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2014-235675 (P2014-235675)
 (22) 出願日 平成26年11月20日 (2014.11.20)

(71) 出願人 504139662
 国立大学法人名古屋大学
 愛知県名古屋市千種区不老町1番
 (74) 代理人 100087723
 弁理士 藤谷 修
 (74) 代理人 100165962
 弁理士 一色 昭則
 (72) 発明者 寺崎 浩子
 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大
 学法人名古屋大学内
 (72) 発明者 堀 勝
 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大
 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

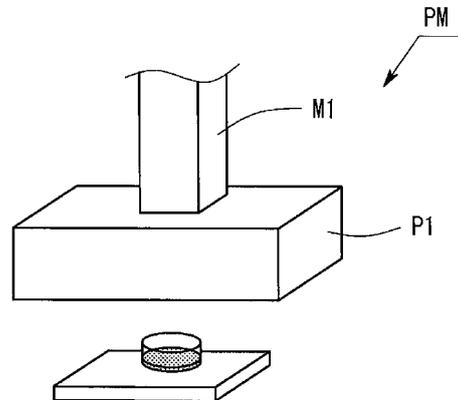
(54) 【発明の名称】 滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 課題は、滲出型加齢黄斑変性を好適に治療することのできる滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法を提供することである。

【解決手段】 滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法は、水溶液準備工程と、プラズマ照射工程と、を有する。水溶液準備工程では、リン酸水素二ナトリウムと、リン酸二水素カリウムと、塩化ナトリウムと、を含有する第1の水溶液を準備する。プラズマ照射工程では、プラズマ照射装置P1によりプラズマ発生領域に発生させた大気圧プラズマを第1の水溶液に照射する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する第 1 の水溶液に大気圧プラズマを照射したものであること

を特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の滲出型加齢黄斑変性治療薬において、

前記第 1 の水溶液は、

リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有することを特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の滲出型加齢黄斑変性治療薬において、

前記第 1 の水溶液は、

リン酸水素二ナトリウムと、リン酸二水素カリウムと、塩化ナトリウムと、を含有すること

を特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬。

【請求項 4】

リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する第 1 の水溶液を準備する水溶液準備工程と、

20

プラズマ発生装置によりプラズマ発生領域に発生させた大気圧プラズマを前記第 1 の水溶液に照射するプラズマ照射工程と、

を有すること

を特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法において、

前記水溶液準備工程では、

前記第 1 の水溶液として、リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する水溶液を準備すること

を特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法。

30

【請求項 6】

請求項 4 に記載の滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法において、

前記水溶液準備工程では、

前記第 1 の水溶液として、リン酸水素二ナトリウムと、リン酸二水素カリウムと、塩化ナトリウムと、を含有する水溶液を準備すること

を特徴とする滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書の技術分野は、滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

プラズマ技術は、電気、化学、材料の各分野に応用されている。そして、近年においては、医療への応用が活発に研究されるようになってきた。プラズマの内部では、電子やイオン等の荷電粒子の他に、紫外線やラジカルが発生する。これらには、生体組織の殺菌をはじめとして、生体組織に対する種々の効果があることが分かっている。

【0003】

例えば、特許文献 1 には、プラズマの照射により、血液凝固（特許文献 1 の実施例 4、段落 [0063] - [0068] 参照）と、組織滅菌（特許文献 1 の実施例 5、段落 [0069] - [0074] 参照）と、リーシュマニア症（特許文献 1 の実施例 6、段落 [0

50

075] - [0077] 参照) といった、効果があることが記載されている。そして、メラノーマ細胞(悪性黒色腫細胞)を死滅させる効果があると記載されている(特許文献1の実施例7、段落[0078]参照)。

【0004】

また、特許文献2には、pHが4.8以下となるように調整された液体にプラズマを照射することにより、液体中の菌を殺菌する技術が開示されている(特許文献2の段落[0020]等参照)。また、スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロペルオキシラジカル等が殺菌効果を担っている可能性がある旨が記載されている(特許文献2の段落[0090] - [0099]等参照)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2008-539007号公報

【特許文献2】国際公開第2009/041049号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ところで、眼科の病気には滲出型加齢黄斑変性というものがある。滲出型加齢黄斑変性とは、網膜の下に位置する脈絡膜から脈絡膜新生血管が網膜に向かって伸び、網膜もしくは黄斑を変形させることにより生じる病気である。また、滲出型加齢黄斑変性は、著しい視力の低下や失明の原因となる。

【0007】

滲出型加齢黄斑変性を治療するための方法として、光線力学治療や薬物治療がある。光線力学治療では、ピスダイン(登録商標)という光感受性物質を脈絡膜新生血管に点滴し、その後にレーザーを病変に照射する。薬物治療では、血管内皮増殖因子を阻害する薬物を硝子体内に注入する。血管内皮増殖因子とは、脈絡膜新生血管を発生させると考えられる因子である。この薬物として、例えば、マクジェン(登録商標)、ルセンティス(登録商標)、アイリーア(登録商標)といったものが挙げられる。

【0008】

上記のような治療方法を用いることにより、患者の視力を維持すること、もしくは視力のある程度改善することはできる。しかし、患者の正常な視力を回復することは非常に困難である。したがって、新たな治療方法が期待されている。

【0009】

本明細書の技術は、前述した従来技術が有する問題点を解決するためになされたものである。すなわちその課題とするところは、滲出型加齢黄斑変性を好適に治療することのできる滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

第1の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬は、リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する第1の水溶液に大気圧プラズマを照射したものである。

【0011】

この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することにより脈絡膜新生血管を抑制する。この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、既存の網膜血管に影響を与えない。また、この滲出型加齢黄斑変性治療薬には網膜毒性もない。

【0012】

第2の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬においては、第1の水溶液は、リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する。

【0013】

第3の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬においては、第1の水溶液は、リン酸水

10

20

30

40

50

素二ナトリウムと、リン酸二水素カリウムと、塩化ナトリウムと、を含有する。

【0014】

第4の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法は、リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する第1の水溶液を準備する水溶液準備工程と、プラズマ発生装置によりプラズマ発生領域に発生させた大気圧プラズマを第1の水溶液に照射するプラズマ照射工程と、を有する。

【0015】

第5の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬においては、水溶液準備工程では、第1の水溶液として、リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素カリウムとの少なくとも一つを含有する水溶液を準備する。

10

【0016】

第6の態様における滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法においては、水溶液準備工程では、第1の水溶液として、リン酸水素二ナトリウムと、リン酸二水素カリウムと、塩化ナトリウムと、を含有する水溶液を準備する。

【発明の効果】

【0017】

本明細書では、滲出型加齢黄斑変性を好適に治療することのできる滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法が提供されている。

【図面の簡単な説明】

20

【0018】

【図1】プラズマ照射装置のガス噴出口を走査するロボットアームの構成を説明するための概念図である。

【図2】図2．Aは第1のプラズマ照射装置の構成を示す断面図であり、図2．Bは電極の形状を示す図である。

【図3】図3．Aは第2のプラズマ照射装置の構成を示す断面図であり、図3．Bはプラズマ領域の長手方向に垂直な断面における部分断面図である。

【図4】図4．Aは実施形態の滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と新生血管細胞の分岐点数との関係を示すグラフであり、図4．Bから図4．Eは顕微鏡写真である。

【図5】実施形態の滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と新生血管細胞の増殖能力との関係を示すグラフである。

30

【図6】図6．Aは滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と脈絡膜新生血管の体積との関係を示すグラフであり、図6．Bはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)をマウスの眼に注入した場合の脈絡膜新生血管を示す顕微鏡写真であり、図6．Cは滲出型加齢黄斑変性治療薬をマウスの眼に1 μ L注入した場合の脈絡膜新生血管を示す顕微鏡写真である。

【図7】図7．Aから図7．Dまではマウスの眼にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を注入した場合を示しており、図7．Eから図7．Hまではマウスの眼に滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合を示す。

【図8】脈絡膜新生血管におけるアポトーシスを誘導された細胞の割合を示すグラフである。

40

【図9】TUNEL染色した細胞およびDAPI染色した細胞を示す顕微鏡写真である。

【図10】マウスの血管内皮増殖因子(VEGF)を測定した結果を示すグラフである。

【図11】図11．AはN-アセチルシステインを用いて活性酸素種の寄与度を測定した結果を示すグラフであり、図11．Bから図11．Dまではレーザーで発生させた脈絡膜新生血管の体積を示す顕微鏡写真である。

【図12】図12．Aは滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合の網膜血管を示す顕微鏡写真であり、図12．Bは図12．Aの領域を部分的に拡大した図であり、図12．Cはある区画された領域内に占める既存の網膜血管の割合を示すグラフである。

【図13】図13．Aは眼底画像であり、図13．Bは滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入したマウスの眼をH&E染色した画像であり、図13．Cは滲出型加齢黄斑変性治療薬を

50

注入した場合とリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を注入した場合における網膜電図写真（ERG）の違いを示すグラフであり、図13・Dは網膜電図写真（ERG）のa波を比較するグラフであり、図13・Eは網膜電図写真（ERG）のb波を比較するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、具体的な実施形態について、滲出型加齢黄斑変性治療薬とその製造方法を例に挙げて図を参照しつつ説明する。

【0020】

1. 治療薬製造装置

10

1-1. 治療薬製造装置の構成

本実施形態の治療薬製造装置PMは、図1に示すように、プラズマ照射装置P1と、アームロボットM1と、を有している。プラズマ照射装置P1は、プラズマを発生させるとともに、そのプラズマを溶液に向けて照射するためのものである。プラズマ照射装置P1には、後述するように、2種類の方式（第1のプラズマ照射装置100および第2のプラズマ照射装置110）がある。そして、いずれの方式を用いてもよい。

【0021】

アームロボットM1は、図1に示すように、プラズマ照射装置P1の位置をx軸、y軸、z軸方向のそれぞれの方向に移動させることができるようになっている。なお、説明の便宜上、プラズマを照射する向きを-z軸方向としている。このアームロボットM1は、溶液の液面と、プラズマ照射装置P1との間の距離を調整することができる。また、この治療薬製造装置PMは、予めプラズマ照射時間を設定することにより、その時間だけプラズマを照射することができるものである。

20

【0022】

1-2. 第1のプラズマ照射装置

図2・Aはプラズマ照射装置100の概略構成を示す断面図である。ここで、プラズマ照射装置100は、プラズマを点状の噴出口から噴出する第1のプラズマ照射装置である。図2・Bは、図2・Aのプラズマ照射装置100の電極2a、2bの形状の詳細を示す図である。

【0023】

30

プラズマ照射装置100は、筐体部10と、電極2a、2bと、電圧印加部3と、を有している。筐体部10は、アルミナ（ Al_2O_3 ）を原料とする焼結体から成るものである。そして、筐体部10の形状は、筒形状である。筐体部10の内径は2mm以上3mm以下である。筐体部10の厚みは0.2mm以上0.3mm以下である。筐体部10の長さは、例えば、10cm以上30cm以下である。筐体部10の両端には、ガス導入口10iと、ガス噴出口10oとが形成されている。ガス導入口10iは、プラズマを発生させるためのガスを導入するためのものである。ガス噴出口10oは、プラズマを筐体部10の外部に照射するための照射部である。なお、ガスの移動する向きは、図中の矢印の向きである。

【0024】

40

電極2a、2bは、対向して配置されている対向電極対である。電極2a、2bの対向面方向の長さは、筐体部10の内径より小さい。例えば1mm程度である。電極2a、2bには、図2・Bに示すように、対向面のそれぞれに凹部（ホロー）Hが多数形成されている。そのため、電極2a、2bの対向面は、微細な凹凸形状となっている。なお、この凹部Hの深さは、0.5mm程度である。

【0025】

電極2aは、筐体部10の内部であってガス導入口10iの近傍に配置されている。電極2bは、筐体部10の内部であってガス噴出口10oの近傍に配置されている。そのため、プラズマ照射装置100では、電極2aの対向面の反対側からガスを導入するとともに、電極2bの対向面の反対側にガスを噴出するようになっている。そして、電極2a、

50

2 b間の距離は、例えば、8 cm以上28 cm以下である。

【0026】

電圧印加部3は、電極2 a、2 b間に交流電圧を印加するためのものである。電圧印加部3は、商用交流電圧である、60 Hz、100 Vを用いて9 k Vに昇圧するとともに、電極2 a、2 b間に電圧を印加する。

【0027】

ガス導入口10 iからアルゴンを導入するとともに、電圧印加部3が電極2 a、2 b間に電圧を印加すると、筐体部10の内部にプラズマが発生する。図2 . Aの斜線で示すように、プラズマが発生する領域をプラズマ発生領域Pとする。プラズマ発生領域Pは、筐体部10に覆われている。

10

【0028】

1 - 3 . 第2のプラズマ照射装置

図3 . Aはプラズマ照射装置110の概略構成を示す断面図である。ここで、プラズマ照射装置110は、線状に発生させたプラズマを噴出する第2のプラズマ照射装置である。図3 . Bは、図3 . Aのプラズマ照射装置110のプラズマ領域Pの長手方向に垂直な断面における部分断面図である。

【0029】

プラズマ照射装置110は、筐体部11と、電極2 a、2 bと、電圧印加部3と、を有している。筐体部11は、アルミナ(Al_2O_3)を原料とする焼結体から成るものである。筐体部11の両端には、ガス導入口11 iと、多数のガス噴出口11 oとが形成されている。ガス導入口11 iは、図3 . Aの左右方向を長手方向とするスリット形状をしている。ガス導入口11 iからプラズマ領域Pの直上までのスリット幅(図3 . Bの左右方向の幅)は、例えば、1 mmである。

20

【0030】

ガス噴出口11 oは、プラズマを筐体部11の外部に照射するための照射部である。ガス噴出口11 oは、円筒形状もしくはスリット形状である。円筒形状の場合のガス噴出口11 oは、プラズマ領域の長手方向に沿って一直線状に配置されている。ガス噴出口11 oの内径は1 mm以上2 mm以下の範囲内である。また、スリット形状の場合には、ガス噴出口11 oのスリット幅を1 mm以下とすることが好ましい。これにより、安定したプラズマが形成される。ガス導入口11 iは、電極2 aと電極2 bとを結ぶ線と交差する向きにガスを導入するようになっている。

30

【0031】

電極2 a、2 bおよび電圧印加部3については、図2に示したプラズマ照射装置100と同じものである。そして、同様に、商用交流電圧を用いて、電極2 a、2 b間に電圧を印加する。これにより、プラズマを一直線状に噴出することができる。

【0032】

また、この一直線状にプラズマを噴出するプラズマ照射装置110を図3 . Bの左右方向に列状に並べて配置すれば、プラズマをある長方形の領域にわたって平面的に噴出することができる。

【0033】

2 . プラズマ照射装置により発生されるプラズマ

プラズマ照射装置100、110により発生されるプラズマは、非平衡大気圧プラズマである。ここで、大気圧プラズマとは、0 . 5気圧以上2 . 0気圧以下の範囲内の圧力であるプラズマをいう。

40

【0034】

本実施の形態では、プラズマ発生ガスとして、主にArガスをを用いる。プラズマ照射装置100、110により発生されるプラズマの内部では、もちろん、電子と、Arイオンとが生成されている。そして、Arイオンは、紫外線が発生させる。また、このプラズマは大気中に放出されている。そのため、このプラズマが大気中の分子等と反応して、酸素ラジカルや窒素ラジカル等が発生する。

50

【 0 0 3 5 】

このプラズマのプラズマ密度は、 $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。なお、誘電体バリア放電により発生されるプラズマにおけるプラズマ密度は、 $1 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ 以下の程度である。したがって、プラズマ照射装置100、110により発生されるプラズマのプラズマ密度は、誘電体バリア放電により発生されるプラズマのプラズマ密度に比べて、3桁程度大きい。したがって、このプラズマの内部では、より多くのArイオンが生成する。そのため、ラジカルや、紫外線の発生量も多い。なお、このプラズマ密度は、プラズマ内部の電子密度にほぼ等しい。

【 0 0 3 6 】

そして、このプラズマ発生時におけるプラズマ温度は、およそ1000 K以上2500 K以下の範囲内である。また、このプラズマにおける電子温度は、ガスの温度に比べて大きい。しかも、電子の密度が $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内の程度であるにもかかわらず、ガスの温度はおよそ1000 K以上2500 K以下である。このプラズマの温度は、プラズマの発生しているプラズマ領域Pでの温度である。したがって、プラズマの条件や、ガス噴出口から水溶液までの距離を異なる条件とすることにより、水溶液の位置でのプラズマ温度を室温程度とすることができる。

10

【 0 0 3 7 】

また、酸素ラジカル密度は、 $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1.6 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。アルゴンガスに対して混入する酸素ガスの量を調整することにより、この酸素ラジカル密度を調整することができる。

20

【 0 0 3 8 】

3. 滲出型加齢黄斑変性治療薬

本実施形態の滲出型加齢黄斑変性治療薬は、原材料である第1の水溶液に大気圧プラズマを照射して第2の水溶液としたものである。この第2の水溶液が、滲出型加齢黄斑変性治療薬である。第1の水溶液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。第1の水溶液は、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)とリン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)とリン酸水素二カリウム(K_2HPO_4)とリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)との少なくとも一つを含有する。または、第1の水溶液は、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)とリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)との少なくとも一つを含有する。例えば、第1の水溶液は、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)と、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)と、塩化ナトリウム(NaCl)と、を含有する。また、これらの溶質の水和物を用いてもよい。

30

【 0 0 3 9 】

4. 滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法

本実施形態の滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造方法は、水溶液準備工程と、プラズマ照射工程と、を有する。水溶液準備工程では、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)とリン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)とリン酸水素二カリウム(K_2HPO_4)とリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)との少なくとも一つを含有する第1の水溶液を準備する。プラズマ照射工程では、プラズマ発生装置によりプラズマ発生領域に発生させた大気圧プラズマを第1の水溶液に照射して第2の水溶液とする。

40

【 0 0 4 0 】

4-1. 水溶液準備工程

まず、第1の水溶液を準備する。第1の水溶液とは、プラズマを照射する前の水溶液のことをいう。この第1の方法では、第1の水溶液として、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を準備する。第1の水溶液は、例えば、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)と、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)と、塩化ナトリウム(NaCl)と、を含有する。

【 0 0 4 1 】

4-2. プラズマ照射工程

次に、治療薬製造装置PMにより大気圧プラズマを第1の水溶液に照射する。プラズマ

50

を照射する際における液面とプラズマ噴出口との間の距離は、例えば、1 cmである。また、この距離は、例えば、0.5 cm以上3 cm以下の範囲内で変えてもよい。このプラズマのプラズマ密度は、 $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。そして、このプラズマにおけるプラズマ温度は、およそ1000 K以上2500 K以下の範囲内である。ただし、このプラズマ温度は、液面では、室温程度(300 K程度)まで下げることができる。また、酸素ラジカル密度は、 $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。これらのプラズマ条件を表1に示す。これらの条件は、あくまで一例である。

【0042】

[表1]

条件	数値範囲	
液面 - 噴出口距離	0.5 cm以上	3 cm以下
プラズマ密度	$1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上	$1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下
プラズマ温度	1000 K以上	2500 K以下
酸素ラジカル密度	$2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上	$5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ 以下

10

【0043】

このように、第1の水溶液にプラズマを照射することにより、第1の水溶液を第2の水溶液にする。この第2の水溶液は、滲出型加齢黄斑変性治療薬である。プラズマ照射前の第1の水溶液のpHは、7に近い。例えば、5.5以上8.5以下の範囲内である。

【0044】

20

5. 滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた治療

治療に際して、この滲出型加齢黄斑変性治療薬を患者の硝子体内に一定量注入する。この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することにより脈絡膜新生血管を抑制する。後述するように、この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、既存の網膜血管に影響を与えない。また、この滲出型加齢黄斑変性治療薬には網膜毒性もない。

【0045】

6. 変形例

リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は、塩化カリウム(KCl)を含有してもよい。また、MgまたはCaを含有してもよい。

【0046】

30

7. 本実施形態のまとめ

以上詳細に説明したように、本実施形態における滲出型加齢黄斑変性治療薬は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に大気圧プラズマを照射したものである。この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、血管内皮細胞にアポトーシスを誘導することにより脈絡膜新生血管を抑制することができる。この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、既存の網膜血管に影響を与えない。また、この滲出型加齢黄斑変性治療薬には網膜毒性もない。

【実施例】

【0047】

ここで、実施形態における滲出型加齢黄斑変性治療薬について行った実験について説明する。

40

【0048】

1. 滲出型加齢黄斑変性治療薬の製造

実施形態で述べた治療薬製造装置PMを用いて第2の水溶液、すなわち、滲出型加齢黄斑変性治療薬を製造した。そのために、第1の水溶液として、リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)と、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)と、塩化ナトリウム(NaCl)と、を含有するものを用いた。表2に示すように、第1の水溶液は、超純水1Lに塩化ナトリウム9g、リン酸水素二ナトリウム0.795g、リン酸二水素カリウム0.144gを混合したものである。

【0049】

[表2]

50

塩化ナトリウム	9.0 g
リン酸水素二ナトリウム	0.795 g
リン酸二水素カリウム	0.144 g
超純水	1 L

【0050】

プラズマの条件を、表3に示す。プラズマを発生させるためのガスとしてアルゴンガスのみを用いた。ガスの流量は、2.0 slmであった。また、プラズマ噴出口と液面との間の距離は、13 mmであった。電極間距離は8 mmであった。そして、プラズマ照射時間は、10分であった。また、プラズマ発生領域におけるプラズマ密度は、 $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ であった。

10

【0051】

[表3]

ガスの流量	2.0 slm
プラズマ噴出口と液面との間の距離	13 mm
プラズマ照射時間	10分
プラズマ密度(発生時)	$2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$

【0052】

また、実験によっては、比較のために、プラズマを照射していない単なるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いた。また、図中、「PAM」とあるのは、プラズマを照射したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)等を注入した場合であることを示している。なお、PAMとは、プラズマにより活性化された溶媒(Plasma Activated Medium)であることを意味する。「Ctrl」とあるのは、プラズマを照射していない通常のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)等を注入した場合であることを示している。

20

【0053】

2. 細胞

細胞を用いた実験をするに際して、ヒト網膜血管内皮細胞を用いた。細胞の培養にEGM-2培地(Lonza社製CC-3162)を用いた。PAMとして、EBM-2培地(Lonza社製CC-3156)にプラズマを照射したのを用いた。このように、培養した細胞に対しては、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にプラズマを照射したPAMではなく、培地にプラズマを照射したPAMを用いた。

30

【0054】

3. マウス

生物実験として、生後6週間から8週間の雄のマウス(C57BL/6J)を用いた。マウスの眼底にレーザーを照射することにより、マウスの眼底に脈絡膜新生血管を発生させた。

【0055】

4. 実験1(生体外)

図4は、血管形成を調べた図である。図4では、それぞれの濃度の水溶液中でヒト網膜血管内皮細胞を4時間培養した後の結果が示されている。図4.Aは、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と網膜血管内皮細胞の分岐点数との関係を示すグラフである。図4.Bは、滲出型加齢黄斑変性治療薬を含まない場合、すなわち滲出型加齢黄斑変性治療薬が0%のときの網膜血管内皮細胞の顕微鏡写真である。図4.Cは、滲出型加齢黄斑変性治療薬が4%のとき(25倍に希釈)の網膜血管内皮細胞の顕微鏡写真である。図4.Dは、滲出型加齢黄斑変性治療薬が10%のとき(10倍に希釈)の網膜血管内皮細胞の顕微鏡写真である。図4.Eは、滲出型加齢黄斑変性治療薬が25%のとき(4倍に希釈)の網膜血管内皮細胞の顕微鏡写真である。

40

【0056】

このように、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度が高いほど、ヒト網膜血管内皮細胞の分岐点数は少ない。つまり、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度が高いほど、新たな血管の形成が抑制されていることを示している。

50

【 0 0 5 7 】

また、図 5 に示すように、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度が高いほど、ヒト網膜血管内皮細胞の増殖は抑制される。

【 0 0 5 8 】

5 . 実験 2 (生体内)

図 6 は、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と脈絡膜新生血管量との関係を示す図である。図 6 . A は、滲出型加齢黄斑変性治療薬の濃度と脈絡膜新生血管の体積との関係を示すグラフである。図 6 . B は、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) をマウスの眼に注入した場合の脈絡膜新生血管を示す顕微鏡写真である。図 6 . C は、滲出型加齢黄斑変性治療薬をマウスの眼に 1 μ L 注入した場合の脈絡膜新生血管を示す顕微鏡写真である。

10

【 0 0 5 9 】

図 6 . A に示すように、滲出型加齢黄斑変性治療薬をマウスの眼に注入する量が多いほど、脈絡膜新生血管量は少ない。また、図 6 . B および図 6 . C についても、同様の傾向を示している。このように、生体内であっても、滲出型加齢黄斑変性治療薬は、脈絡膜新生血管の成長を抑制する。

【 0 0 6 0 】

6 . 実験 3 (アポトーシス)

図 7 は、マウスの眼を横方向から視た断面写真である。図 7 . A から図 7 . D までは、マウスの眼にリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合を示している。図 7 . E から図 7 . H までは、マウスの眼に滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合を示している。

20

【 0 0 6 1 】

図 7 . D に示すように、マウスの眼にリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合には、脈絡膜新生血管が網膜色素上皮細胞を貫いている。図 7 . H に示すように、マウスの眼に滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合には、脈絡膜新生血管が網膜色素上皮細胞を貫いていない。

【 0 0 6 2 】

一方、図 7 . F および図 7 . G に示すように、マウスの眼に滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合には、緑色に染色された帯状の領域が生じている (図中中央付近) 。すなわち、脈絡膜新生血管でアポトーシスが強く生じている。なお、図 7 . B および図 7 . C に示すように、マウスの眼にリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合には、脈絡膜新生血管でアポトーシスがわずかに生じている。

30

【 0 0 6 3 】

また、図 8 に示すように、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合には、アポトーシスを誘導された細胞の割合は、15 . 2 % 程度であった。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を用いた場合には、アポトーシスを誘導された細胞の割合は、11 . 5 % 程度であった。

【 0 0 6 4 】

図 9 に示すように、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合には、ヒト網膜血管内皮細胞のアポトーシスが生じている (P A M 、 T U N E L の写真) 。

【 0 0 6 5 】

このように、滲出型加齢黄斑変性治療薬は、ヒト網膜血管内皮細胞のアポトーシスを誘導している。

40

【 0 0 6 6 】

7 . 実験 4 (血管内皮増殖因子との関係)

滲出型加齢黄斑変性において血管内皮増殖因子 (V E G F) が、脈絡膜新生血管を悪化させる主要な因子であると考えられている。そこで、血管内皮増殖因子の発現の状態について調べた。

【 0 0 6 7 】

図 10 に示すように、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いなかった場合の血管内皮増殖因子 (V E G F) を 100 % とした。滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合には、血管内

50

皮増殖因子 (V E G F) は、 8 4 % であった。このように、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いることにより、血管内皮増殖因子 (V E G F) は、抑制された。

【 0 0 6 8 】

8 . 実験 5 (活性酸素種)

水にプラズマを照射した場合には水中に活性酸素種が発生することが知られている。そこで、活性酸素種の寄与度を調べた。活性酸素種は、N - アセチルシステイン (N A C) により中和される。

【 0 0 6 9 】

図 1 1 は、N - アセチルシステインにより活性酸素種の効果調べた図である。図 1 1 . A の縦軸は、マウスの脈絡膜新生血管の体積である。図 1 1 . A の左側では、滲出型加齢黄斑変性治療薬も N - アセチルシステインも用いなかった。この場合のマウスの脈絡膜新生血管の体積を 1 0 0 % とした。図 1 1 . A の真ん中では、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用い、N - アセチルシステインを用いた。この場合のマウスの脈絡膜新生血管の体積は、8 3 % であった。図 1 1 . A の右側では、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いたが、N - アセチルシステインについては用いなかった。この場合のマウスの脈絡膜新生血管の体積は、6 4 % であった。

10

【 0 0 7 0 】

図 1 1 . A に示すように、N - アセチルシステインにより活性酸素種の影響を打ち消した場合には、マウスの脈絡膜新生血管を減少させる効果は約半分に減少した。つまり、脈絡膜新生血管の成長を抑制する要因の一つは、活性酸素種である。また、活性酸素種以外にも要因となる原因物質がある。活性酸素種以外の要因は、活性酸素種と同程度に脈絡膜新生血管の成長を抑制する。

20

【 0 0 7 1 】

なお、図 1 1 . B は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いず、N - アセチルシステインを用いなかった場合の脈絡膜新生血管の顕微鏡写真である。図 1 1 . C は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用い、N - アセチルシステインを用いた場合の脈絡膜新生血管の顕微鏡写真である。図 1 1 . D は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用い、N - アセチルシステインを用いなかった場合の脈絡膜新生血管の顕微鏡写真である。

【 0 0 7 2 】

9 . 実験 6 (既存の網膜血管への影響)

図 1 2 は、滲出型加齢黄斑変性治療薬について、既存の網膜血管への影響を調べた図である。マウスの硝子体内に滲出型加齢黄斑変性治療薬もしくはリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を硝子体内に注入して 3 日後にテトラメチルローダミンイソチオシアネートで染色した。図 1 2 . A は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合の網膜血管を示す顕微鏡写真である。図 1 2 . B は、図 1 2 . A の領域を部分的に拡大した図である。

30

【 0 0 7 3 】

図 1 2 . C に示すように、ある区画された領域内に占める既存の網膜血管の割合は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を用いた場合とリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を用いた場合とで同程度であった。

【 0 0 7 4 】

このように、滲出型加齢黄斑変性治療薬は、正常な既存の網膜血管を退化させるおそれはほとんどない。そして、滲出型加齢黄斑変性治療薬は、病気の原因である脈絡膜新生血管のみを選択的に攻撃すると考えられる。

40

【 0 0 7 5 】

1 0 . 実験 7 (網膜毒性の有無)

図 1 3 . A は、眼底画像である。図 1 3 . B は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入したマウスの眼を H & E 染色した画像である。図 1 3 . C は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合とリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合における網膜電図写真 (E R G) の違いを示すグラフである。図 1 3 . D は、網膜電図写真 (E R G) の a 波を比較するグラフである。図 1 3 . E は、網膜電図写真 (E R G) の b 波を比較するグラフであ

50

る。

【 0 0 7 6 】

図 1 3 . C から図 1 3 . E までに示すように、網膜電図写真 (E R G) の a 波および b 波について、滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合とリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合とでほとんど差異は見られなかった。つまり、フラッシュに対する電氣的応答は、滲出型加齢黄斑変性治療薬を注入した場合とリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を注入した場合とでほとんど差異はない。したがって、滲出型加齢黄斑変性治療薬では、網膜に対する毒性はほとんどない。

【 0 0 7 7 】

1 1 . 実験のまとめ

以上の実験で説明したように、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) にプラズマを照射した滲出型加齢黄斑変性治療薬は、脈絡膜新生血管を抑制した。この滲出型加齢黄斑変性治療薬は、血管内皮細胞にアポトーシスを誘導した。また、血管内皮増殖因子 (V E G F) を抑制した。滲出型加齢黄斑変性治療薬は、既存の網膜血管を退化させることはなかった。また、網膜に対する毒性もなかった。つまり、滲出型加齢黄斑変性の病原である新生血管のみを標的とすることができる。したがって、滲出型加齢黄斑変性治療薬は、滲出型加齢黄斑変性の治療に有効であると推測される。

【 符号の説明 】

【 0 0 7 8 】

1 0 0、1 1 0 ... プラズマ照射装置

1 0、1 1 ... 筐体部

1 0 i、1 1 i ... ガス導入口

1 0 o、1 1 o ... ガス噴出口

2 a、2 b ... 電極

P ... プラズマ領域

H ... 凹部 (ホロー)

P 1 ... プラズマ照射装置

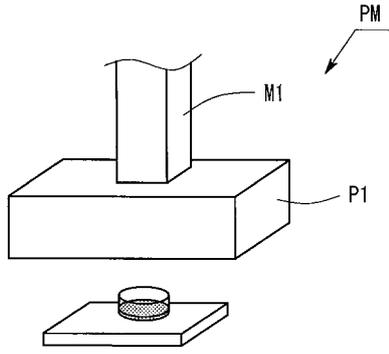
M 1 ... ロボットアーム

P M ... 治療薬製造装置

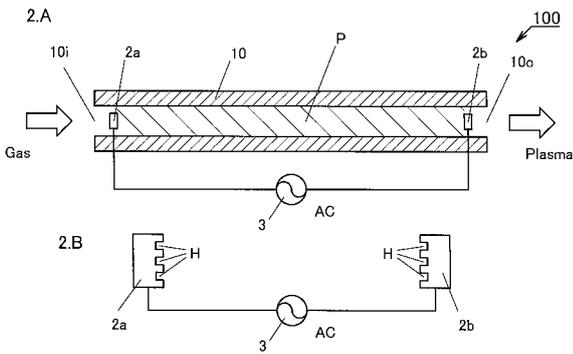
10

20

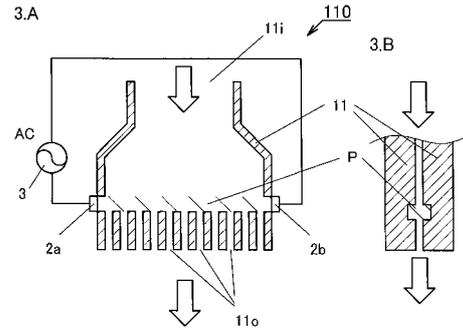
【 図 1 】



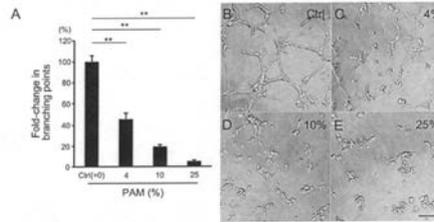
【 図 2 】



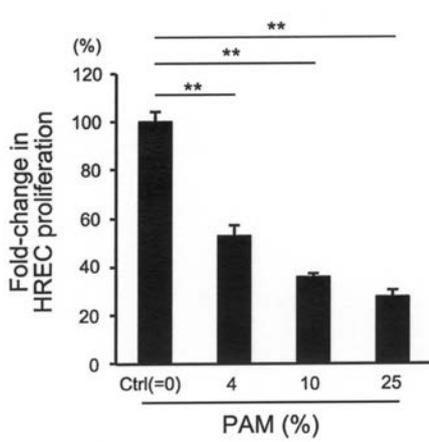
【 図 3 】



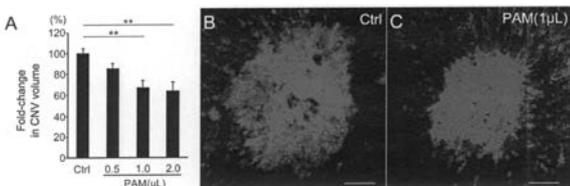
【 図 4 】



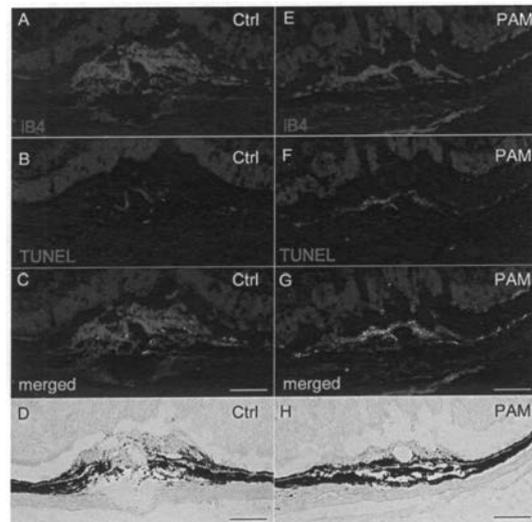
【 図 5 】



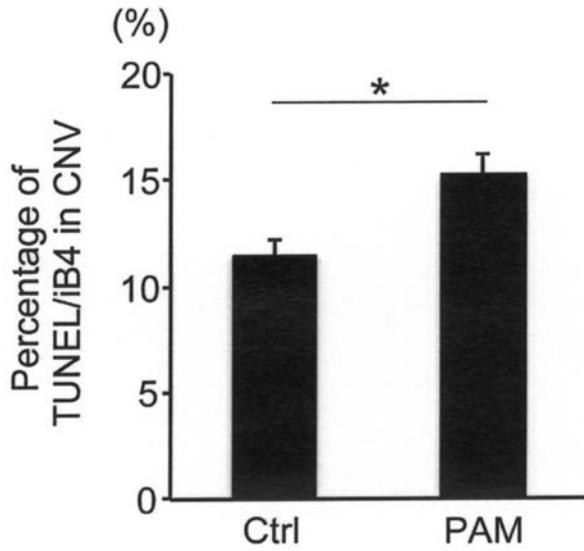
【 図 6 】



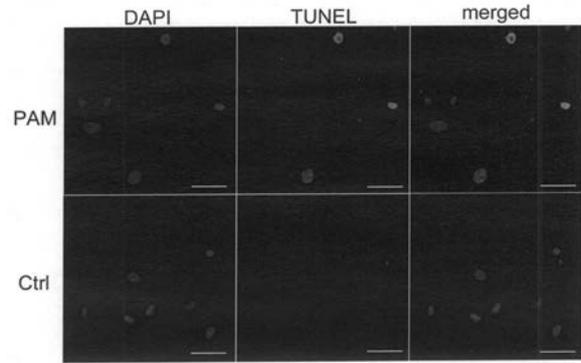
【 図 7 】



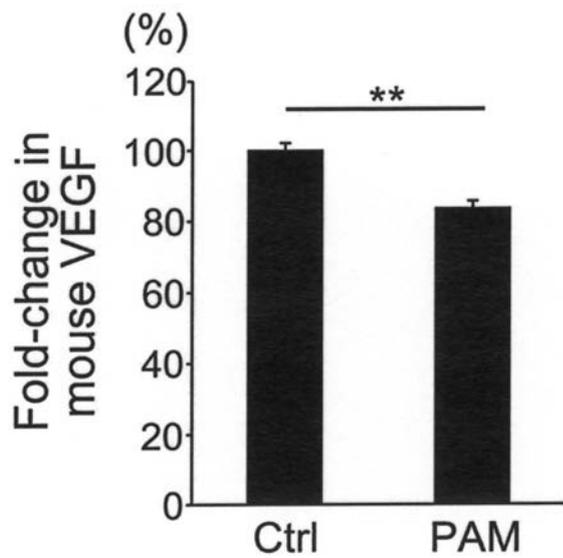
【 図 8 】



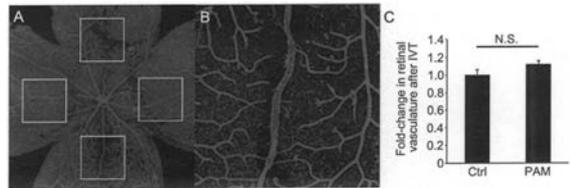
【 図 9 】



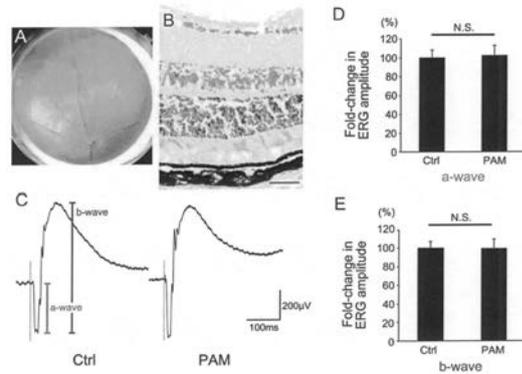
【 図 1 0 】



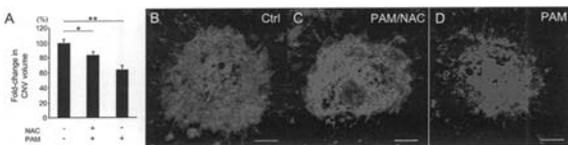
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 1 】



フロントページの続き

- (72)発明者 吉川 史隆
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 水野 正明
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 兼子 裕規
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 田中 宏昌
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- Fターム(参考) 4C076 AA12 BB24 DD26Z
4C084 AA11 MA17 MA58 NA14 ZA331