

### 反応速度定数の導出

$$[\text{azide}]_0 = [\text{yne}]_0 = 5\text{M}$$

$$[\text{azide}] = [\text{yne}]$$

$$\frac{d[\text{azide}]}{dt} = -k[\text{azide}][\text{yne}]$$

$$\frac{1}{[\text{azide}]} - \frac{1}{[\text{azide}]_0} = kt$$

転化率を X とすると

$$[\text{azide}] = [\text{azide}]_0(1-X) \text{ より、代入して}$$

$$\frac{1}{[\text{azide}]_0} \frac{X}{1-X} = kt$$

上式は反応時間と転化率のみの関数となり、傾きが反応速度定数を示す。実際の測定値を代入したところ、右図のようになった。

線形近似できる範囲 ( $t=0\sim 300$  s) で近似したところ、

$$y=0.0006x+0.0117 \quad R=0.9934 \quad \text{となり、}$$

$$k = 6.0 \times 10^{-4} \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]}$$

$$\text{半減期は } t_{1/2} = \frac{[\text{azide}]_0}{k} = 333.333 \dots \text{ (s)}$$

この測定における反応は岩塩板に挟まれた溶媒中で生じたものであり、理想的な分子拡散状態ではない。加えて正規の反応速度測定ではないため、算出された反応速度定数はあくまで過小評価された見かけの速度定数である。

しかしながら、既往のデータと非常に近い値であり、本研究で合成したアジドとシクロオクチンが理想的な[3+2]付加環化反応を生じていることが明らかとなった。

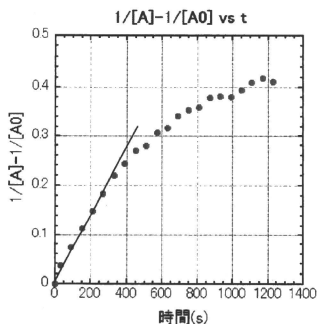
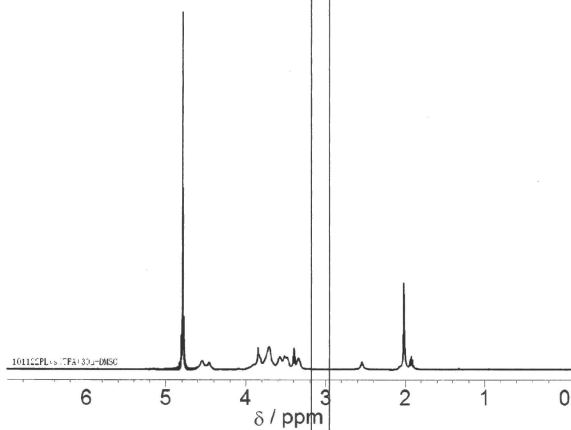


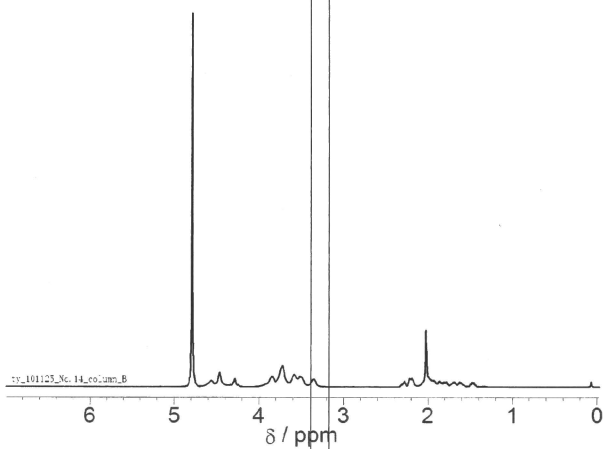
図 13 反応時間-転化率

## 2. プレカーサーポリマーの合成

下記のように $^1\text{H-NMR}$ によって合成を確認した。



また $^{13}\text{C-NMR}$ でも合成を確認した。



### 3.ゲル化速度の測定

等濃度、等分子量の FCH-アジド、FCH-シクロオクチンを等量ずつ混合した結果を表 4 にまとめる

表 1 ゲル化時間

ポリマー濃度(wt%)	FCH-SU	FCH-80
	Mw = 80,000	Mw = 800,000
5.0	8min19sec	7min25sec
3.0	24min18sec	17min28sec
2.0	43min7sec	33min51sec
1.5	1h20min31sec	52min34sec
1.0	no gelation	1h40min8sec
0.5	-	no gelation

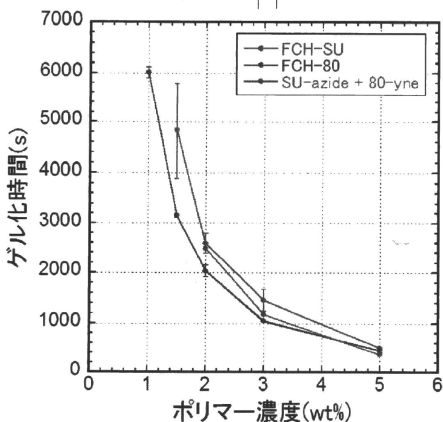


図 14 ゲル化時間

ポリマー濃度5%で数分でゲル化し、今後修飾率を向上することやスペーサーの導入等分子構造の最適化で、ゲル化速度が低濃度でも十分に早くなる見通しを得た。

#### 4. ゲル膨潤度・分解挙動評価

##### 4.1. 膨潤度の濃度依存性

同一分子量のゲルを比較した場合、高濃度で作製したゲルほど、最大膨潤度は低く、分解速度は遅いという傾向が見られた。それぞれゲルの架橋密度に依存するため、架橋点数の絶対数の減少が速く分解され易いと考えられる。

##### 4.2. 膨潤度の分子量依存性

分子量間で比較した場合、高分子量のゲルの方が全体的に高い膨潤度を示した。エステルが分解されて低架橋密度となっても、尚3次元的強度を保ちやすいためであると考えられる。

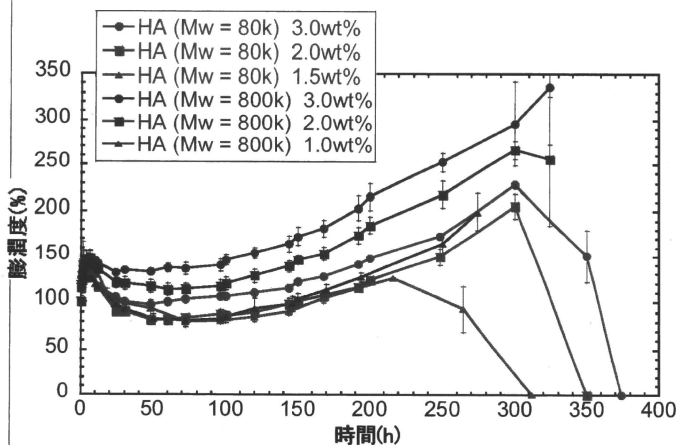


図 15 ゲルの膨潤度

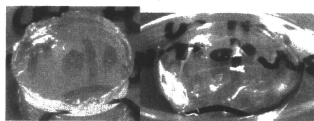


図 16 ゲル (左:ゲル化直後 右:250時間後)

#### 4.3. ゲルの分解挙動

生体内で用いられる医用ゲルは、速やかに分解され、体外へ排出されることが望ましい。

本研究で作製したゲルはヒアルロン酸を主鎖に用いているため、ヒトの体内に多量に存在するヒアルロン酸分解酵素(Hyaluronidase)によって徐々に分解されることが期待できる。

また前述のように側鎖からの分解も可能である。

ヒトの腎臓においては、分子量約5万以下の溶質については血中から尿への濾過移行が可能である。生体内と近い条件下での分解挙動を観察するため、ウシ胎仔血清(カルボキシルエステラーゼが含まれる)添加下、およびHase 添加下での分解挙動も観察した。メディア中でのHaseの濃度は10units/mLとした。

①PBS…純粋なPBS溶液。いかなる分解酵素も存在せず、エステルは緩やかな分解のみ

②PBS + Hase…PBSに10 units/mLのヒアルロン酸分解酵素を添加したものの

エステルの穏やかな分解に加え、主鎖のヒアルロン酸の分解も生じる

③Serum…ウシ胎仔血清入り培地。カルボキシルエステラーゼが存在し、エステルの速やかな分解が生じる

④Serum + Hase…エステルの速やかな分解に加え、主鎖の分解も生じる。生体に最も近い環境下と考えられる。

結果、①ではおよそ400時間前後で分解が進行した。エステル結合は可逆的であるが、本実験では常にメディアを交換しているため、分解反応が一方的に進行していると考えられる。②の環境下では、約半分の200時間で完全に分解された。

③は、更にその半分、約100時間で分解が完了した。④では72時間後に分解が完了した。

これは、主鎖のヒアルロン酸の分解より、側鎖のエステルの分解の方が優先的に生じていることを示している。

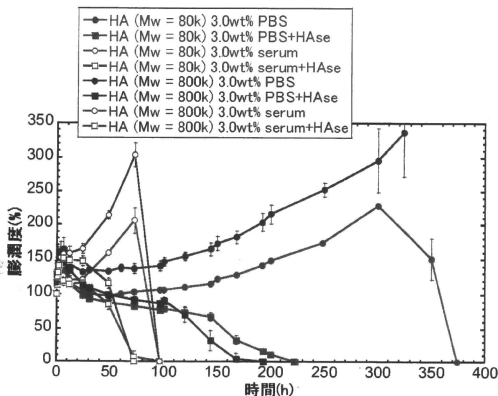


図 17 クリック in situ ハイドロゲルの分解挙動

5. ゲルの生体適合性評価  
(Live/Dead Assay)

図 18 一日後の生細胞の蛍光

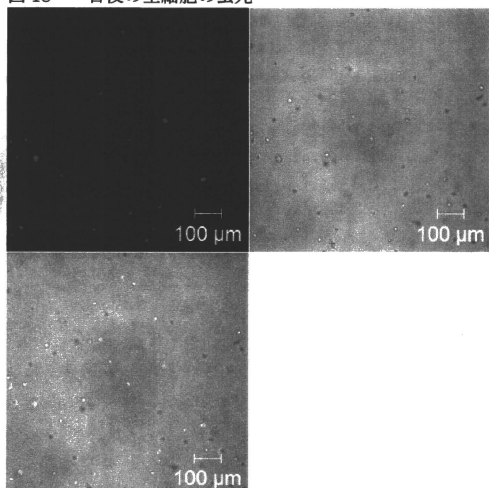


図 19 一日後の死細胞の蛍光

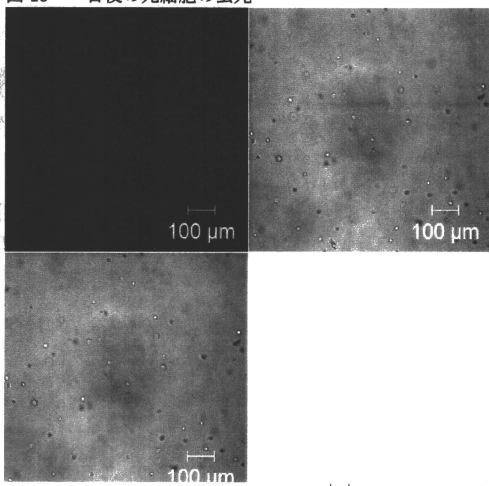


図18、19からハイドロゲルに封入した緑色蛍光と赤色蛍光の比より、高い細胞生存率が確認された。下図のように2日目でも同様に高い生存率が確認できた。

図20 二日後の生細胞の蛍光

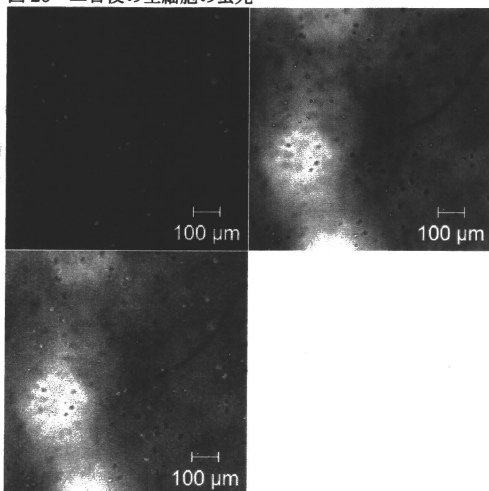
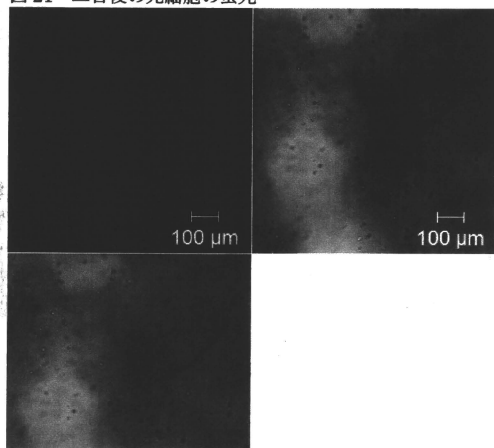


図21 二日後の死細胞の蛍光



## D. 考察

実験の方法と結果では、本合成系に至るまでの試行錯誤については報告せず、研究の検討結果の最終的な成功結果のみを報告した。

アジド修飾ヒアルロン酸は、実験開始時はバラ安息香酸アジドを用いたが、疎水性が高く多糖類が不溶化して、有機溶媒中での合成には成功したが、水溶性がなかった。これを $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)をアジド化してコンジュゲイトすることにより、本報告のように成功へと至った。

血清中のゲルの分解速度は早く、アジドやシクロオクチンとヒアルロン酸結合部位のエステル結合が、血清中のカルボキシエステラーゼで高速分解されていることが示唆された。リンカー部分の設計により分解速度やゲル化速度は、今後さらなる制御が可能になると思われる。

## E. 結論

世界で初めて、ヒアルロン酸ベースのカッパーフリークリック反応架橋による、生体内in situ架橋ハイドロゲルの創製に成功した。

アジド修飾ヒアルロン酸、シクロオクチン修飾ヒアルロン酸のそれぞれのプレカサマーポリマーも初めての合成であり、2液性ハイドロゲルだけでなくその他のメディカル応用用途も見込まれる。

本材料を用いて(後述のように)、パイロット的に皮下投与を行い、動物実験でも良好な結果を得ている。2・3年度、腹腔内適用材料として本格的な適用検討を行うことができる基盤が整った。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

伊藤大知、鈴木幸光、膜 ”体内でのフィルム形成—腹膜癒着防止膜と薬物送達膜—” (in press, 2011)

### 2. 学会発表

情報技術協会・招待講演

(2010/8/27)

癒着防止開発事例 ～癒着防止ゲル～  
伊藤大知

化学工学会 第42回秋季大会 L209

(2010/9/3)

in situ 架橋ゲルからの水溶性抗がん剤徐放挙動の解明と腹膜播種への応用

(東大院工) ○(学)須原 宜史・(正)

鈴木 幸光・(東大院医) 亀井 隆雄・

山口 博紀・石神 浩徳・北山 丈二・

(東大院疾患セ) (正)伊藤 大知

東京大学 第7回医工連携研究会

(2011/2/2)

医療応用を目指した新規in situ架橋ハイドロゲルの開発

鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、国土典宏、伊藤大知

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

本研究の新規クリックin situ架橋ハイドロゲルを5/31に東大TL0より下記特許出願。

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、

清水篤志

発明の名称：ハイドロゲル及び

その製造方法

特願2011-122183

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
（分担）研究報告書

ヒアルロン酸ナノゲル開発に関する研究

研究分担者 鈴木 幸光 東京大学大学院工学系研究科

研究要旨

本研究提案では、CDDPを二座配位した担持したヒアルロン酸ナノゲルを創製し、正常細胞よりもがん細胞に発現量が多いCD44を標的として、ヒアルロン酸とCD44の相互作用を利用して、腹膜播種細胞特異的にCDDPを送達することを目指している。

3ヵ年計画初年度は、イミノ二酢酸を導入したヒアルロン酸の合成(HA-IDA)に成功し、さらにCDDP存在下で、直径が約100nmのヒアルロン酸ナノゲルを作製することに成功した。さらにこのHA-IDAナノゲルは、未修飾HAから作ったナノゲルと異なり、24時間経過後も、半分以上のCDDPを担持し続けた。

さらにHAナノゲル、HA-IDAナノゲルのコントロールとして、CDDPを担持したCMCナノゲルの作製にも成功した。CMCのカルボキシメチル修飾率が高く、ランダムに水酸基に入ったカルボキシル基が二座配位子となって、徐放速度がHA-IDAと同等程度になった。

研究2年度目は、MKN45Pに発現しているCD44とナノゲルの相互作用の検証、腹腔投与、新規に創製したin situ架橋ハイドロゲルへのナノゲルへの封入を検討する。

## A. 研究目的

がん細胞に特異的なレセプターは、上で挙げたようにがん細胞の種類によって異なる。胃腺がんの細胞であるMKN45を同期化すると、CD44が多様な種類のスプライシングを受けてできるCD44v4、CD44v5、CD44v7が多く発現することが分かっている。

このことから、胃がんの腹膜播種細胞株であるMKN45PにおいてもCD44が多く発現することが期待される。よって、HAとCD44の特異的な相互作用を用いたドラッグデリバリーシステムを考案することは有効であると考えられる。

(倫理面への配慮)  
特段の必要はない

胃がんの腹膜播種細胞に選択的に抗がん剤を送達するシステムを創製する。具体的には、HAとCDDPからなるナノゲルを作製して用いる。HAと同じく生態適合性に優れるが、CD44と特異的に結合する性質を持たないカルボキシメチルセルロースを対照実験として用いることで、胃がんの腹膜播種細胞に選択的に抗がん剤が送達されることを検証する。また、徐放挙動が緩やかになると考えられる新規の二座配位を形成するポリマーを合成する。これを用いてCDDPを担持したナノゲルを作製し、徐放挙動を観察する。(図1)

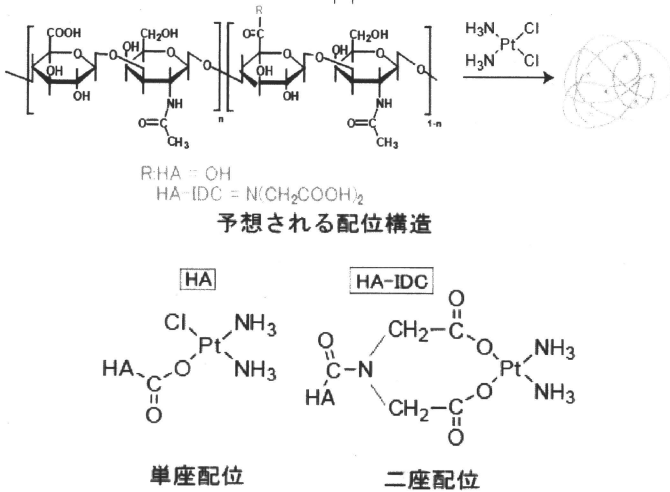


図1 HA および HA-IDA と CDDP の結合によるナノゲルの作製

## B. 研究方法

### 1. HA-IDAの合成

CDDP の徐放を緩やかにするために二座配位子を持つヒアルロン酸を新たに合成した。HA のカルボン酸にイミノ二酢酸 (IDA) を修飾するという手段を利用した。

#### 〔試薬〕

ヒアルロン酸 (HA) …分子量 100,000  
イミノ二酢酸 (IDA) …  
カルボジイミド塩酸塩 (EDCI) …  
ジメチルスルホキシド (DMSO) …  
NaOH  
NaCl

#### 〔HA-IDA 合成手順〕

- (1) HA 0.5 g を 100 mL の純水に冷蔵下で 2 時間溶解
- (2) 1M HCl で pH を 6.8 に調整
- (2) EDCI 0.78 g を、DMSO 3 mL と純水 3 mL を混合させたものに溶解させ、添加。これを 4 時間攪拌
- (3) IDC1.2 g と 1M NaOH 10 mL をそれぞれ添加し、一晩攪拌
- (4) Spectra/Por MWCO=6000 ~ 8000 の透析膜を用いて、純水で透析

(5)凍結乾燥

(6)得られた固体を 5 wt% の NaCl 水溶液に溶解させ、Spectra/Por MWCO=6000~8000 の透析膜を用いて純水で透析

(7)凍結乾燥

(8)重水中、NMR にて合成確認

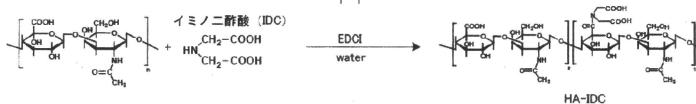


図2 HA-IDAの合成経路

## 2. ナノゲルの作製

HA, HA-IDC, CMC と CDDP を用いて、CDDP を配位したナノゲルを作製した。このナノゲルは2種類の方法で作製した。第一の方法では、ポリマー 100 mg と CDDP 10 mg を純水に加え、暗所・4℃で1日攪拌した後、暗所・常温で2日間攪拌した。これを Spectra/Por-6 MWCO=1,000 の透析膜を用いて透析し、その後凍結乾燥する事によりナノゲルを作製した。第二の方法では、ポリマー濃度 5 mg/mL 溶液 (母液 A) と CDDP 濃度 15 mg/mL (母液 B) 溶液をマイクロチューブ内で混合し、ヒートブロック上で 95℃加熱した。これを20分間氷上で冷却し、純水で透析した後凍結乾燥する事によりナノゲルを作製した。本研究では、第二の方法を用いて作製したナノゲルで実験を行った。

第二の方法の最適化を行うため、まずポリマーと CDDP の重量比が 4:3 になるように溶液を混合し、加熱時間を変化させて以下のような手順で作製した。

### 〔作製手順〕

- (1)ポリマー100 mg を純水 20 mL に溶解 (母液 A の作製)
- (2)CDDP15 mg をマイクロチューブに秤量し、純水 1 mL を加えてヒートブロックで 95℃に加熱・溶解 (母液 B の作製)  
(母液 A・B は場合に応じて必要量作製)
- (3)ヒートブロックにマイクロチューブを置き、母液 A を 800  $\mu$ L、母液 B を 200  $\mu$ L 添加
- (4)氷上にマイクロチューブを置き、純水を 1 mL ずつとっておく
- (5)各 サンプルング 時間 (10,20,30,60,120,180 分後) ごとに 15  $\mu$ L ずつサンプルングを行い、(4)のマイクロチューブにそれぞれ加えて氷上で静置
- (6)3 時間加熱後、20 分間氷上で静置 (写真 1)
- (7)Spectra/Por-6 MWCO=1,000 の透析膜を用いて 4 時間純水で透析
- (8)凍結乾燥

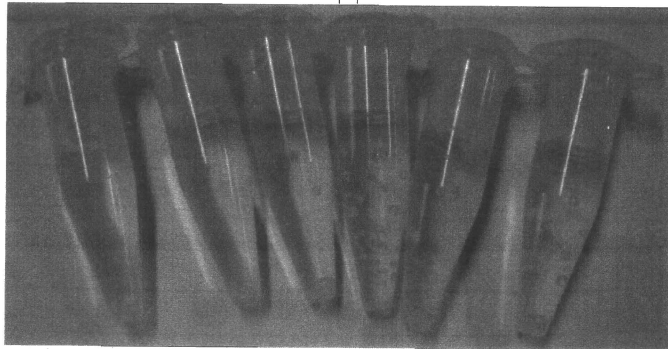


写真 1 加熱直後の HA-IDA ナノゲル

### 3. 動的光散乱 (Dynamic Light Scattering:DLS) による粒子径測定

合成したナノゲルの粒子径を DLS により測定した。これは粒子のブラウン運動から起こる、入射した光の散乱光の時間変化から粒子の大きさを求める方法である。ブラウン運動している粒子に光を照射すると、そのブラウン運動の速度に対応したゆらぎが生じる、その際のゆらぎを観測し、自己相関係数を算出する。自己相関関数は時間の関数であり、ある時間のときの粒子の重なり具合を表す。時間の経過により粒子はブラウン運動で移動するため、粒子同士の重なりは小さくなる。そのため、 $\tau=0$  より  $\tau=\tau$  の方が自己相関係数は小さくなる、小さい粒子ほどブラウン運動が激しいので、自己相関関数は時間と共に速く減少する特徴がある。それにより自己相関関数から自己拡散係数を求め、それからさらに粒子径を求めることができる。

### 4. 徐放実験

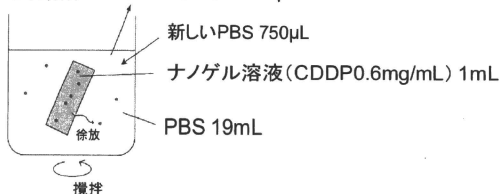
作製したナノゲルを用いて、徐放実験を行った。

〔実験手順〕

- (1)CDDP0.6 mg/mL 溶液の作製
  - 1.各ナノゲルの担持率から必要量を計算し、純水 4.5 mL に溶解
  - 2.一日暗所で攪拌
  - 3.実験開始直前に 10 倍の濃度の PBS を 0.5 mL 添加し攪拌
- (2)実験前日から、Spectra/Por-6 MWCO=1,000 の透析膜を 6 cm に切り、良く洗浄の上、純水に浸して膨潤平衡にしておく
- (3)所定時間おきに、サンプリングし白金濃度を原子吸光で測定

Spectra/Por-6 MWCO=1,000 の透析膜を使用

37°C、暗所 サンプリング 750 $\mu$ L



各サンプリング時間ごとにサンプリング  
? 原子吸光にて白金量を測定

図3 徐放実験方法

### C. 研究結果

#### 1. HA-IDAの合成

凍結乾燥後に得られたポリマー約 10 mg を約 1 mL の重水に溶解させ、 $^1\text{H}$  NMR の測定を行うことにより、各ポリマーの修飾率を算出した。しかし、スペクトルから不純物が存在していることが分かったので、凍結乾燥後のポリマーを 5 wt% の NaCl 水溶液に溶解させ、再び純水で外液の伝導度が 0.1~0.2 になるまで透析することで不純物を取り除いた。この後再び  $^1\text{H}$  NMR スペクトルから修飾率を算出した。

しかし、この合成方法では 5 種類すべてにおいて低修飾率の HA-IDC しか得られなかったため、合成手順および条件を以下のように変え、再び合成を行った。

- (1) HA 1.0 g を 200 mL の純水に冷蔵下で 2 時間溶解
- (2) EDCI 1.55 g を純水 6 mL に溶解させたものを添加し、4 時間攪拌
- (3) IDC と 1M NaOH を以下の量それぞれ添加し、一晩攪拌
- (4) 溶液が 5 wt% の NaCl 水溶液となるように NaCl を加えて溶解
- (5) Spectra/Por MWCO=6000~8000 の透析膜を用いて、純水で透析
- (6) 凍結乾燥

下記のように 5~10% で IDA を修飾した HA-IDA の合成に成功した。

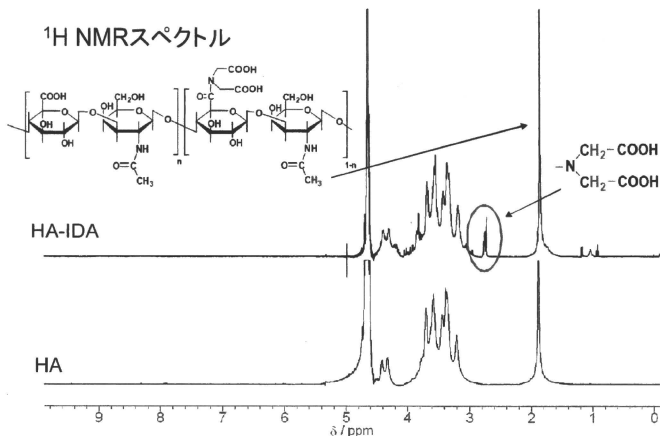


図 4 HA-IDA  $^1\text{H}$ -NMR

## 2. ナノゲルサイズの評価

合成した HA-IDA を用いて CDDP と共に加熱することでナノゲルを合成した。加熱時間を変えて DLS にてサイズを測定した結果、図5のようにほぼ 100nm 程度のゲルが得られることがわかった。

未修飾 HA、CMC でも同様にナノゲルを作製することに成功して、加熱時間と粒子径サイズの関係を明らかにして、ナノゲル作製条件を確定した。(図6)

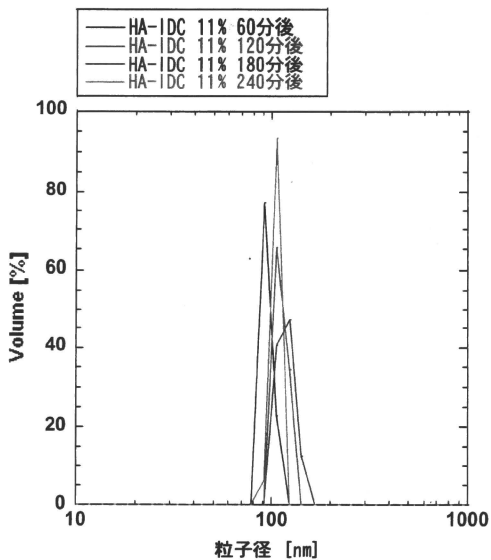


図5 CDDP 恒持 HA-IDA ナノゲルの DLS 測定結果  
(ナノゲル作製加熱時間： 60,120,180,240 分)

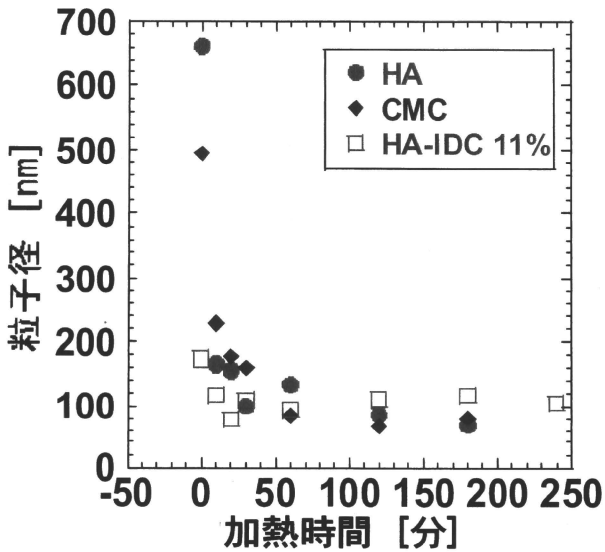


図5 CDDP 担持 HA-IDA ナノゲルの DLS 測定結果  
 (ナノゲル作製加熱時間： 60,120,180,240 分)



### 3. 徐放挙動

得られたナノゲルからの CDDP を徐放した結果を未修飾 HA ナノゲルでは徐放速度が速く 24 時間で、ほぼ 100% が放出されていることがわかる。

一方で HA-IDA ナノゲルでは徐放速度が低減され、かつ強固に配位して、

いることが明らかになった。予想外の結果であったが CMC ナノゲルも徐放速度が遅く、これは図 7 に示すようにセルロースのカルボキシメチル化率が高く、HA-IDA と同様に二座配位子が形成されているためと推測された。

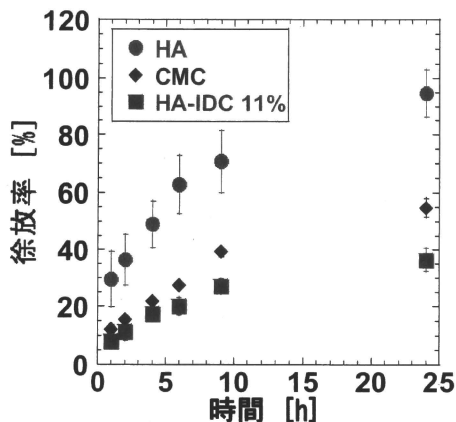


図 6 CDDP 担持 HA-IDA、HA、CMC ナノゲルの CDDP 徐放挙動

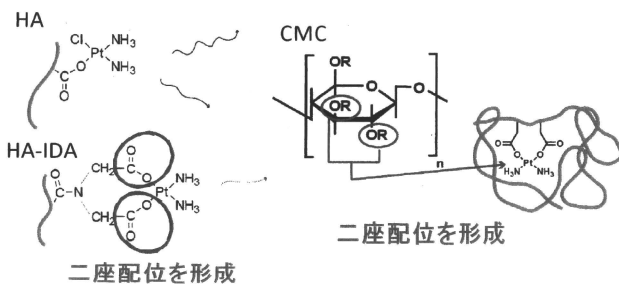


図 7 予測される CDDP 配位状態

#### D. 考察

二座配位子を持つヒアルロン酸HA-IDAの合成に初めて成功した。初期合成条件では修飾率が上がらなかったが、合成条件を最適化することによって、徐放挙動を制御するに十分な修飾条件を見出した。

さらにナノゲル合成条件を検討することによって、未修飾HA、HA-IDA、CMCを用いてサイズが100nm程度のCDDP担持ナノゲルの作製に成功した。

HAやCMCは腹膜癒着防止材料として用いられており、腹腔内では非常に安全な物質である。

予期せぬことであったが、CMCナノゲルでもCDDPの徐放遅延効果が得られた。腹腔での細胞群との相互作用や分解挙動は、HAとCMCでは大きく異なるために、次年度以降興味深い研究展開が得られるものと考えている。

#### E. 結論

疾患生命工学センターグループにて、二座配位子を持つヒアルロン酸HA-IDAの合成に初めて成功した。さらに未修飾HA、HA-IDA、CMCを用いてサイズが100nm程度のCDDP担持ナノゲルの作製に成功した。

次年度以降の、封入ナノゲル、及び封入担体たるin situ架橋担体ハイドロゲル製剤の作製に成功し、ハイブリッド化の材料創製に全て成功した。さらに腫瘍外科グループとのin vivo検討の基盤ができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### 1. 論文発表

伊藤大知、鈴木幸光、膜”体内でのフィルム形成—腹膜癒着防止膜と薬物送達膜—”(in press, 2011)

#### 2. 学会発表

化学工学会 第42回秋季大会 L204  
(2010/9/3)

腹膜播種細胞への抗がん剤投与を目指したヒアルロン酸ナノゲルの開発  
(東大院工) ○(学)佐藤真優・(正)鈴木幸光・(東大院医疾患セ) (正)伊藤大知

東京大学 第7回医工連携研究会  
(2011/2/2)

医療応用を目指した新規in situ架橋ハイドロゲルの開発  
鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、國土典宏、伊藤大知

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、清水篤志  
発明の名称：ハイドロゲル及びその製造方法  
特願2011-122183

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
（分担）研究報告書

腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ゲル投与に  
関する研究に関する研究

研究分担者 北山 丈二 東京大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨

ヒドラジド基で修飾したヒアルロン酸と、アルデヒド基で修飾したヒアルロン酸から成る2液性のin situ架橋ハイドロゲルにCDDPを担持し、ヌードマウスに胃がん播種細胞NKM45Pを腹腔注入した腹膜播種モデルに投与を行った。

1週間おきにCDDPゲル製剤を3回投与し、同濃度のCDDPをPBSに溶解させて投与した場合よりも、有意に播種巣が低減することを見出した。

初年度、疾患生命工学センターグループが開発したナノゲル製剤・クリックin situ架橋ハイドロゲル製剤を投与する上で基盤が整った。

### A. 研究目的

腹腔内投与の利点は高い濃度の薬剤を投与でき、かつ全身への薬剤以降が低いために副作用がおきにくいことである。

研究分担者らのグループはマウスにおいて腹膜播腫モデルをつくり、疎水性の抗癌剤であるバクリタキセルの腹腔内投与が有効であることを見出し、2009年11月に高度医療の認定を受けている。

さらにマウス腹膜播腫モデルにおいて、ヒアルロン酸+バクリタキセル(PTX)の投与は、PTX単剤に比べて、有意に播腫巢の成長を抑えることを見出している。

一方でCDDPはPTXに比べて腹腔からのクリアランスが早く、治療効果を挙げるためには、製剤技術の改善によって、CDDPを長時間腹腔内に停留させる必要がある。

本研究では、腹膜癒着防止材料として開発されたアルデヒド修飾ヒアルロン酸とヒドラジド修飾ヒアルロン酸の2液からなる腹腔内 *in situ* 架橋ハイドロゲル(図1)にCDDPを担持させて、腹腔中からのCDDPの徐放を行い、腹膜播腫に対して効果的な治療法の基礎検討を行った。

### B. 研究方法

～動物への投与～

以下、P2レベル施設で行った。

4) あらかじめ5週齢のBALB/CヌードマウスにMKN45Pを $3 \times 10^6$ 個/1mlPBS腹腔内投与し、播腫を形成する。(Day 1)

5) 1週おきにBALB/Cヌードマウスの腹腔中に各サンプル溶液を1mLずつ注入する。

その際、飼育用のゲージを新しくかえ、エサと水を補充する。

～解剖～

6) 28日目にマウスを安楽死後、開腹し腹膜播腫の量を調べる。

(倫理面への配慮)

なお本研究は動物実験は東京大学医学部倫理委員会により承認を受け、実施した。

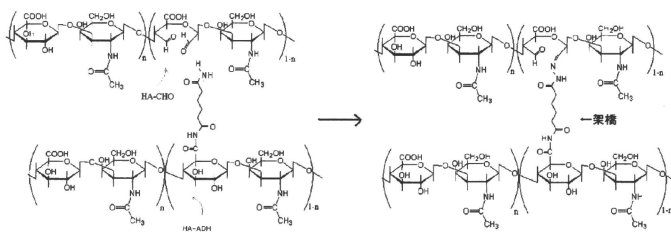


図1 ヒドラジド修飾HA+アルデヒド修飾HA *in situ* 架橋ゲル