

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 架橋ゲル

PCT 出願へ移行

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

新規CDDP担持高分子HA-g-PAAとそのカルシウムイオン架橋ゲルの腹腔適合性に関する研究

研究分担者： 北山 丈二（東京大学医学部附属病院・准教授）

【研究要旨】

我国の死亡原因の上位を占める胃がんの死亡原因で最も多いのが腹膜播種である。腹膜播種の効果的な治療法を確立することは、国民が希望を持って、充実した健康な生活を送る上で極めて重要な国家的課題である。近年胃がん腹膜播種に対し、タキソール腹腔投与の静脈投与に対する有効性が臨床試験で示された。しかしセカンドラインとして期待されるシスプラチン（CDDP）は動物実験レベルでも腹腔からのクリアランスが速く、投与方法が課題である。さらに診断には非侵襲的な腹腔鏡の使用が標準となり、腹腔鏡と連動した投与方法が期待されている。そこで我々は、新たにCDDP担持ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの作製を行っている。加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用した、腹腔鏡で注入しながら、生体内で迅速架橋する新規in situ架橋ゲルを開発する。最終的に両者を融合し、HAナノゲルを含有したin situ架橋ゲルをマウス腹膜播種モデルに適用し、腹腔中で1週間に渡りCDDPを徐放し、3回投与で播種巣数を5%以下まで消失させ、臨床検討への基盤を作ることを目標としている。

本年度は、疾患生命工学センターグループが、疾患生命グループが開発した新たなナノゲル、及びin situ架橋担体となりうるポリアクリル酸(PAA)をグラフト重合したHA-g-PAA及びそのカルシウムイオンゲルのマウス腹腔投与によって、腹腔適合性を検証した。

A. 研究目的

本研究では HA-g-PAA を新たに合成し、Ca²⁺によって迅速ゲル化することを示した。前述のように CDDP 担持担体として有望である。

PAA (ポリアクリル酸) は生体内分解性を持たないが、癒着防止材 Seprafilm® で HA とともにカルボキシメチルセルロース (CMC) が用いられていることや、Interceed® が酸化セルロースであるように、体内で分解されない材料であっても

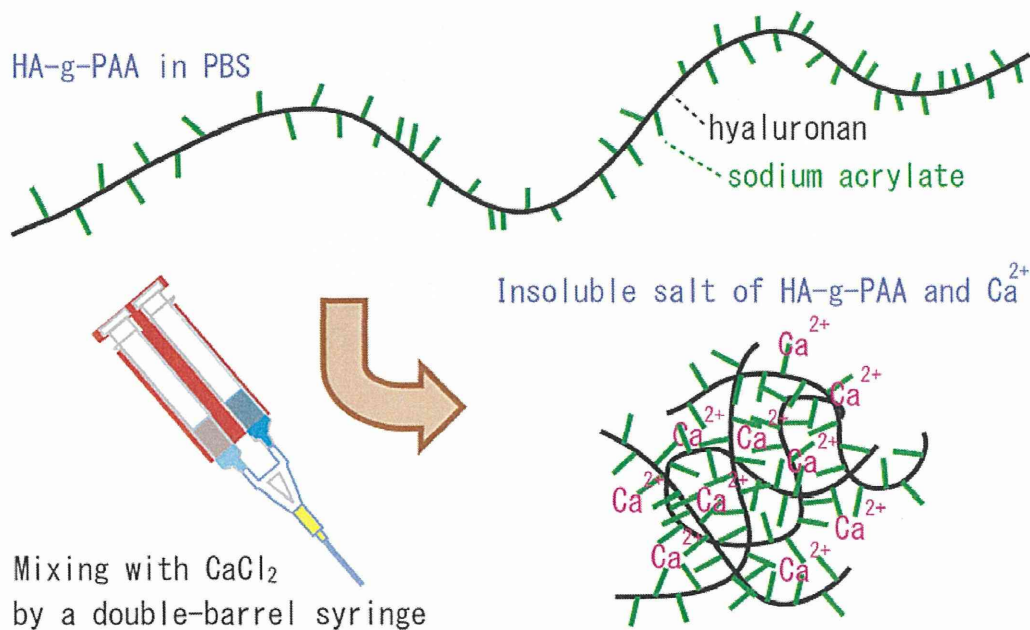


図1 HA-g-PAA/Ca²⁺ゲルの腹腔投与

溶解排泄されるアニオン性なポリマーは臨床での体内投与の可能性はある。例えばスマンクス®は、ポリマレイン酸とスチレンの共重合体を担体として用いているが、抗がん剤として臨床使用されている。また動物実験レベルでは、アクリル酸の粘着性を生かした癒着防止材が複数検討されており、キトサンのようなカチオン性物質と異なり、生体適合性も良好であることが報告されている。

本研究では、HA-g-PAA の PBS 溶液 (0.5mL、2wt%) を A 液、CaCl₂ の PBS 溶液 (0.5mL、2wt%) を B 液として、ダブルバレルシリンジで 2 液を混合しつつ、腹腔投与を行い、その生体適合性を検証することを目標とした。

B. 研究方法

分子量 2MDa の HA の水酸基を開始剤修飾し、ATRP（原子移動ラジカル重合法）によって分子量 7~8kDa の PAA でグラフト修飾された HA-g-PAA を用いた。

ICR マウス（♂、3 週齢、20g）を購入（日本クレア）、1 週間馴化の後、エーテル呼気麻酔下で、腹腔投与を行った。HA-g-PAA の投与量は 0.5mL(in PBS)、2wt%とし、CaCl₂ 1wt%(inPBS)とダブルシリンジで混合しつつ、23G 針により投与した。また同組成の HA-g-PAA 単体を通常のシリンジで腹腔投与を行った（各 N=3）。1 週間後に開腹し、癒着惹起の有無を目視により判定した。



図2 HA-g-PAA/Ca²⁺皮下投与直後

同様の材料組成とマウスで、ペントバルビタール腹腔投与麻酔後、マウス後背部に皮下投与を行い、1,3,7 日後に安楽死後解剖を行った（各 N=1）。

いずれも、安楽死前に体重測定を行い、解剖組織をホルムアルデヒド水溶液で固定後、HE 染色（ヘマトキシリン・エオジン染色）によって病理学的評価を行った。

HA-g-PAA は同重量濃度の未修飾 HA に比べて、極めて低粘度で投与は容易であった。

（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。

C. 研究結果

C-1. 体重変化

表 1 に示す様に、材料を投与した系で、全てのマウスの健康状態は良好であった。体重増加は材料未投与の場合と同様の増加曲線上に一致する。またカルシウムイオンでゲル化することの有無に関わらず、体重変化にも有意差は見られなかった。

表 1 ip 投与と sq 投与： 癒着判定と材料残留

Material	Administration route	Post-operative day [days]	Body weight gain postoperatively [%]	Material residue	Peritoneal adhesion
HA-g-PAA	Intraperitoneally	7	17.0 ± 1.8	0/3	0/3
Insoluble salt of HA-g-PAA and CaCl ₂	Intraperitoneally	7	17.0 ± 1.9	3/3	0/3
Insoluble salt of HA-g-PAA and CaCl ₂	Subcutaneously	1	0.3	1/1	-
Insoluble salt of HA-g-PAA and CaCl ₂	Subcutaneously	3	9.4	1/1	-
Insoluble salt of HA-g-PAA and CaCl ₂	Subcutaneously	7	13.9	1/1	-

また腹腔投与を行ったマウスでいずれも腹膜癒着は認められなかった。多くの材料で、投与により癒着を惹起してしまうことを考慮すると、非常に腹腔内生体適合性が高い材料であるといえる。

C-2. 皮下投与の結果

下図に皮下投与後の様子を示す。1週間後、HA-g-PAAの体積は減少し、ペレ

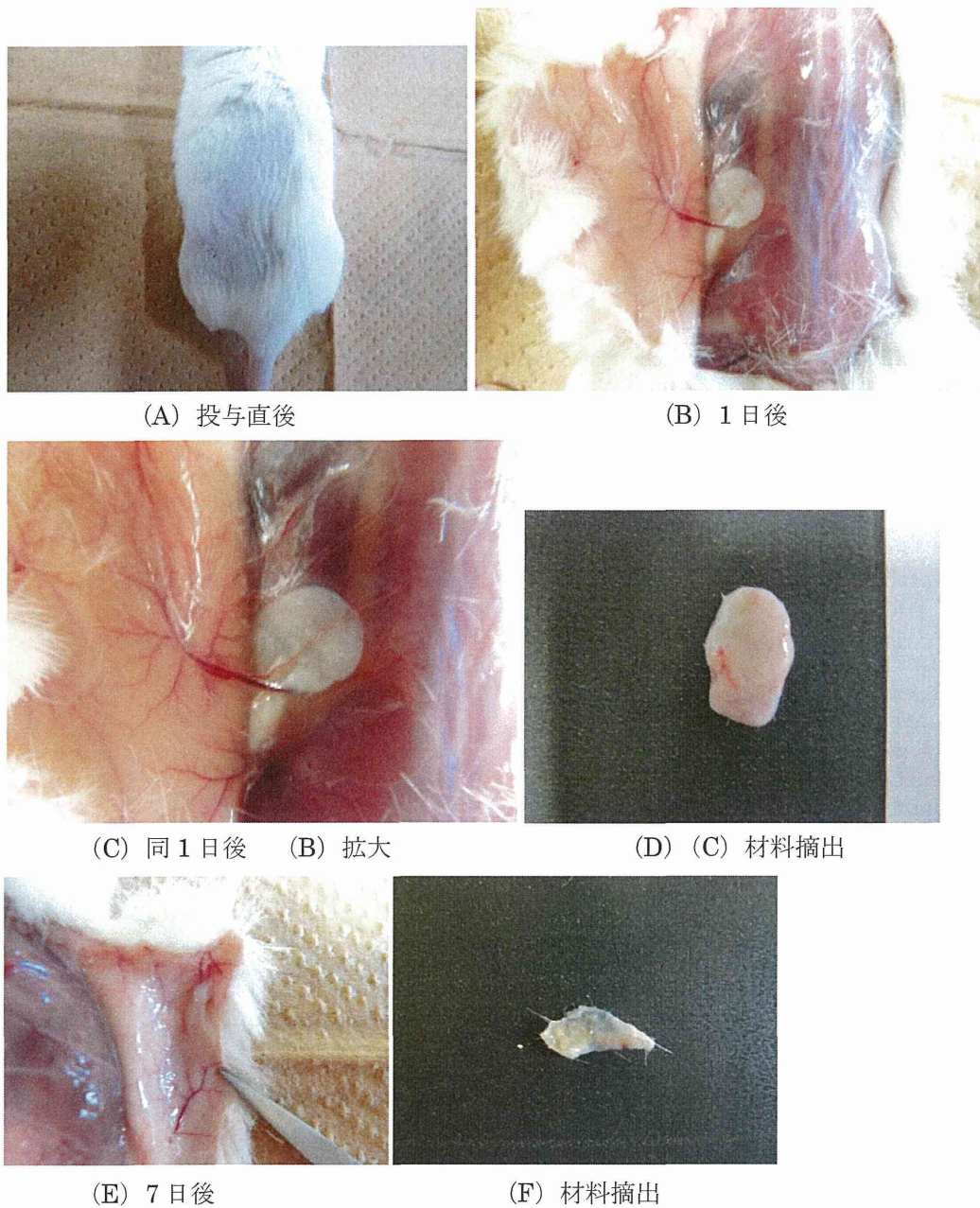


図3 HA-g-PAA/Ca²⁺の皮下投与解剖結果（1日後）

ット状となって皮下に包埋されている。ゲルは被膜とともに切り出すことがで

きる。1日後はかなり大きな残留物を確認できたが、7日後にはわずかな残留物が見られるだけであった。これはキレートされたカルシウムイオンが少しずつ放出されて、HA-g-PAA が溶解して投与部より排出されていったためと考えられる。

さらに、図4に HE 染色図を示す。1日後はクリアな HA-g-PAA ハイドロゲルが見られ、周囲にリンパ球等の免疫細胞が浸潤している。炎症程度は、過去の HAX と同程度であった。

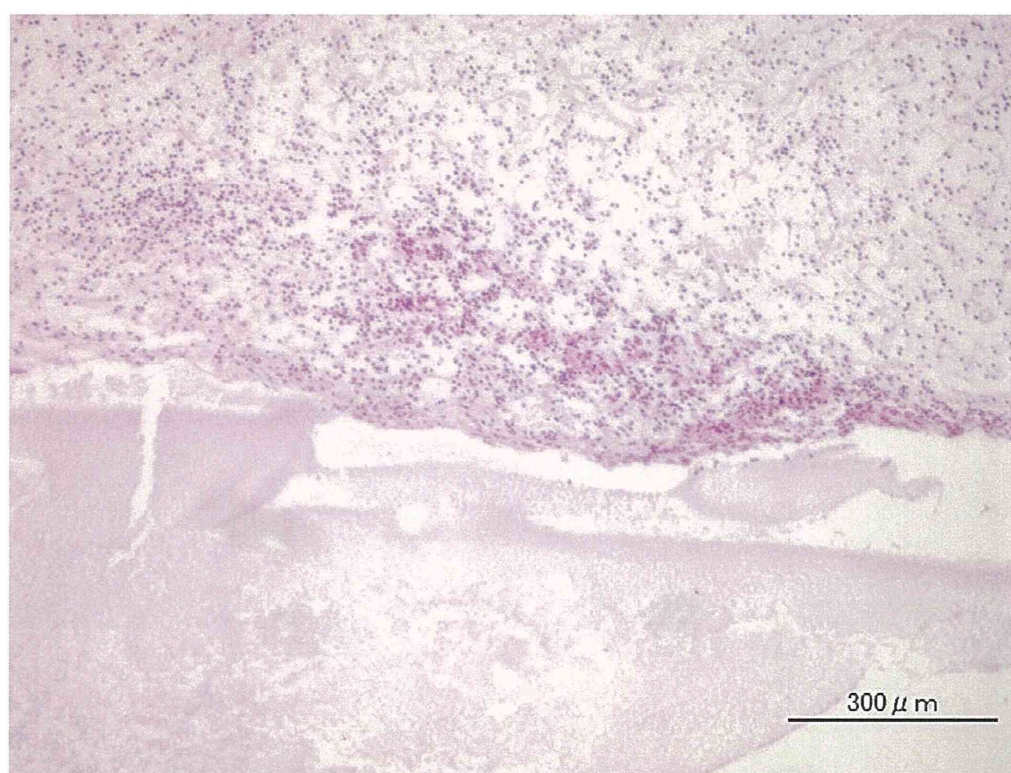


図4 HA-g-PAA の皮下投与 HE : 1 日後

1 週間後にはゲルが大分排泄されており、わずかに残った材料の周囲に軽微な炎症が見られるが、生体適合性は良好である。

C-2. 腹腔投与の結果

腹腔投与の結果を図6に示す。N=3 で全ての固体に材料残存物が見られた。

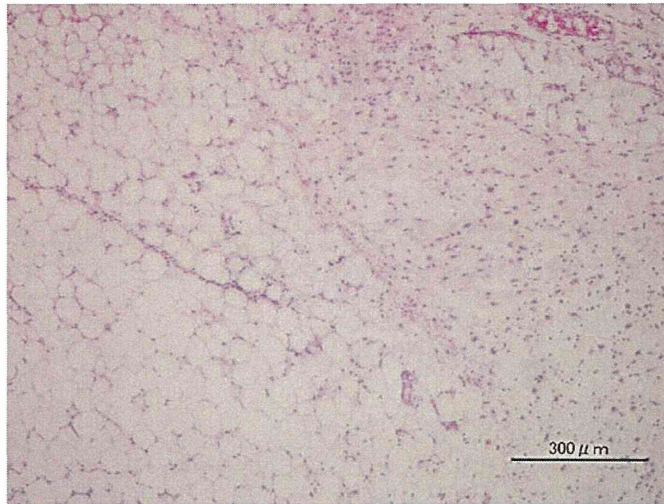


図5 HA-g-PAA の皮下投与 HE : 7日後



(A) 開腹



(B)癒着は見られない



(C) 脾臓表面に付着した残留物



(D)脾臓表面に付着した残留物

図6 HA-g-PAA/Ca²⁺ゲルの腹腔投与：開腹評価

しかし材料が腹膜癒着を引き起こすこともなく、腹腔内で高い生体適合性が示唆された。さらに HE 染色図を図 7 に示す。

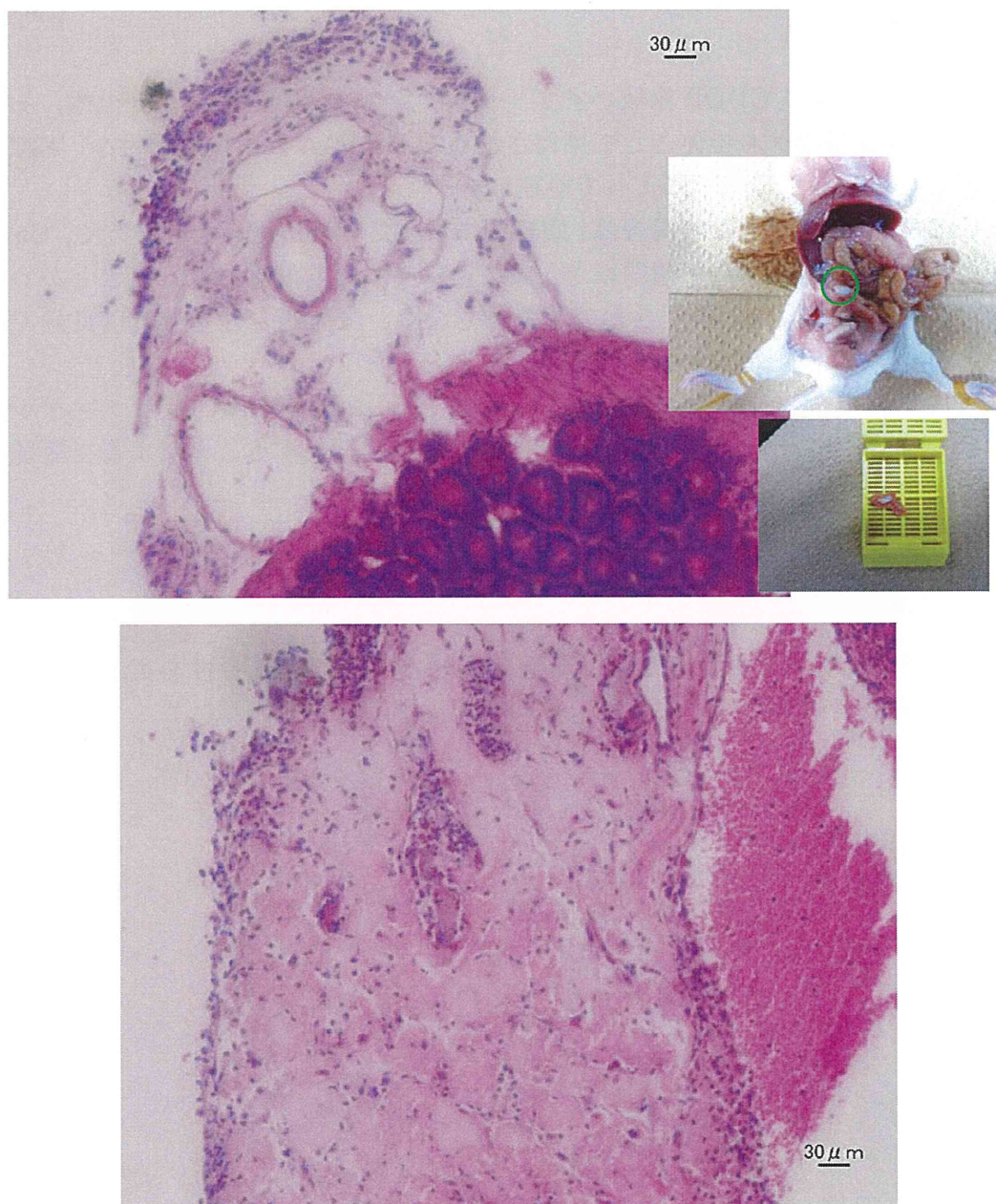


図 7 HE-g-PAA ゲル腹腔残留物の HE 染色図

炎症反応は軽微であり、腹腔内での生体適合性も非常に高いことが示された。癒着防止材としてかつて臨床適用された HA/Fe³⁺架橋ハイドロゲル (Intergel®)

は腹腔内で 1 日以内にクリアランスされることに比べ、材料停留時間が延長された。

D. 考察

本研究で目指す CDDP 徐放ハイブリッドゲルシステムのナノゲル担体、あるいは *in situ* 架橋ゲル担体として期待される HA-g-PAA の生体適合性を、実際に材料を腹腔投与することによって検証した。

Ca²⁺でゲル化させない場合は、腹腔内にまったく残留物がない一方で、Ca²⁺でゲル化させた場合は、1 週間以上かけてゆっくりと溶解排泄されることがわかった。さらに腹膜癒着を引き起こすこともなく、生体適合性も非常に良好であった。

今後には CDDP を HA-g-PAA に担持する、あるいは HA-IDA/CDDP ナノゲルを混合して Ca²⁺でゲル化を行い、腹膜播種モデルに投与することによって播種抑制効果を検討していくことへと発展させる。

E. 結論

疾患生命工学センターで作成した HA-g-PAA の腹腔内適合性を実証した。今後 CDDP との錯体形成によって、その有用性を実証していく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai Y, Ishigami H, Isayama H, Sasaki T, Kawakubo K, Kogure H, Emoto S, Yamaguchi H, Kitayama J, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tada M, Koike K. Role of intervention for biliary and gastric/intestinal obstruction in gastric cancer with peritoneal metastasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 27 (121) 1796-800, 2012

2. Emoto S, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Kaisaki S, Kitayama J. Clinical significance of CA125 and CA72-4 in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer.* 15(2):154-161. 2012

3. Emoto S, Yamaguchi H, Kishikawa J, Yamashita H, Ishigami H, Kitayama J. Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination. *Cancer Science.* 103(7): 1304-1310. 2012

4. Emoto S, Ishigami H, Hidemura A, Yamaguchi H, Yamashita H, Kitayama J, Watanabe T. Complications and management of an implanted intraperitoneal access port system for intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 42(11): 1013-1019.2012

5. Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Emoto S, Kaisaki S. S-1 plus intravenous and intraperitoneal Paclitaxel for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Gastrointest Cancer Res.* 3(Suppl1). S10-3. 2012

2. 学会発表

国際学会

1. Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Emono S. S-1 plus intravenous and intraperitoneal paclitaxel for gastric cancer with peritoneal

metastasis. World Congress of gastroenterology and Urology. 16-Mar. 2012. Omaha

2. Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Emono S. Intraperitoneal chemotherapy for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. World Congress of gastrointestinal cancer, Asian perspective. 16-Aug. 2012. Shanghai

国内学会

1. 江本成伸,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,北山丈二,渡邊聡明. 胃癌腹膜播種に対するナノミセル化抗癌剤 NK105 の腹腔内投与による治療効果. 第112回日本外科学会定期学術集会. 2012年4月14日.千葉.

2. 江本成伸,山口博紀,北山丈二,渡邊聡明. ナノミセル化パクリタキセルの腹腔内投与の腹膜播種への抗腫瘍効果と薬物動態. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19日.札幌.

3. 江本成伸,北山丈二,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,渡邊聡明. 胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法における Drug delivery system (DDS)の工夫. 第20回日本消化器関連学会週間. 2012年10月12日.神戸.

4. 江本成伸,山口博紀,亀井隆雄,須原宜史,鈴木幸光,伊藤大知,石神浩徳,北山丈二,渡邊聡明. 腹膜播種に対するシスプラチン担持 in situ 架橋ゲルを用いた腹腔内化学療法. 第50回日本癌治療学会学術集会. 2012年10月26日.横浜.

5. 北山丈二,石神浩徳,山口博紀,江本成伸,花房規男,伊佐山浩通,佐々木隆,渡邊聡明. 胃癌腹膜播種症例に対する緩和処置としての CART(Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy)と消化管ステントの有用性. 第74回日本臨床下外科学会総会 2012年12月1日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

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

新規CDDP担持高分子HA-g-PAAとそのカルシウムイオン架橋ゲルの細胞株による生体適合性に関する研究

研究分担者： 石神 浩徳 （東京大学医学部附属病院・講師）

【研究要旨】

我国の死亡原因の上位を占める胃がんの死亡原因で最も多いのが腹膜播種である。腹膜播種の効果的な治療法を確立することは、国民が希望を持って、充実した健康な生活を送る上で極めて重要な国家的課題である。近年胃がん腹膜播種に対し、タキソール腹腔投与の静脈投与に対する有効性が臨床試験で示された。しかしセカンドラインとして期待されるシスプラチン（CDDP）は動物実験レベルでも腹腔からのクリアランスが速く、投与方法が課題である。さらに診断には非侵襲的な腹腔鏡の使用が標準となり、腹腔鏡と連動した投与方法が期待されている。そこで我々は、新たにCDDP担持ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの作製を行っている。加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用した、腹腔鏡で注入しながら、生体内で迅速架橋する新規in situ架橋ゲルを開発する。最終的に両者を融合し、HAナノゲルを含有したin situ架橋ゲルをマウス腹膜播種モデルに適用し、腹腔中で1週間に渡りCDDPを徐放し、3回投与で播種巣数を5%以下まで消失させ、臨床検討への基盤を作ることを目標としている。

本年度は、疾患生命工学センターグループが、疾患生命グループが開発した新たなナノゲル、及びin situ架橋担体となりうるポリアクリル酸(PAA)をグラフト重合したHA-g-PAA及びそのカルシウムイオンゲルの、腹膜中皮細胞株、繊維芽細胞株による細胞毒性を検証した。

A. 研究目的

本研究では HA-g-PAA を新たに合成し、Ca²⁺によって迅速ゲル化することを示した。前述のように CDDP 担持担体として有望である。

PAA (ポリアクリル酸) は生体内分解性を持たないが、癒着防止材 Seprafilm® で HA とともにカルボキシメチルセルロース (CMC) が用いられていることや、Interceed® が酸化セルロースであるように、体内で分解されない材料であっても

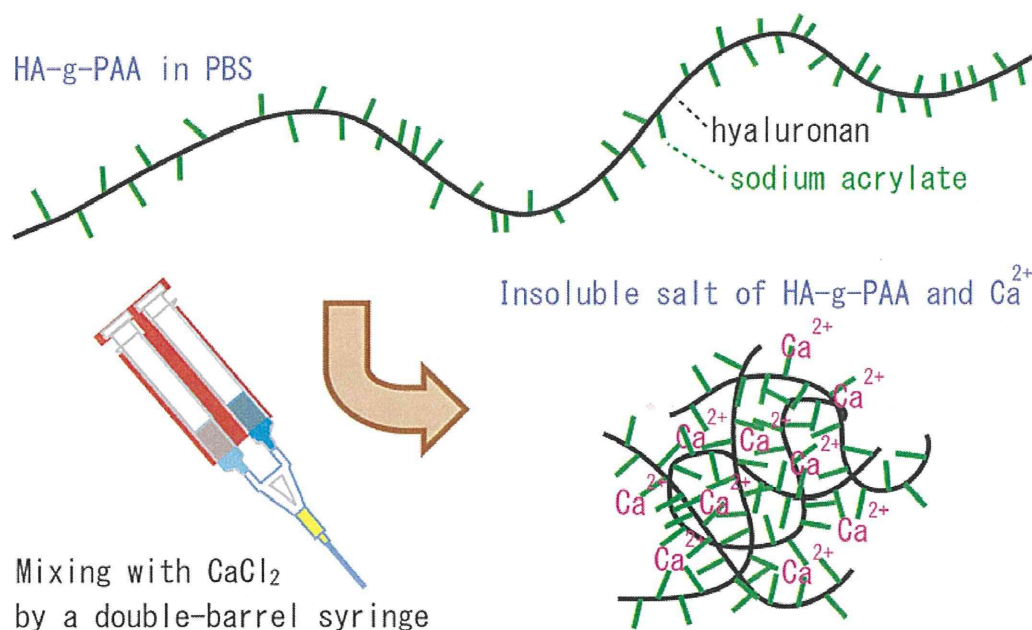


図1 HA-g-PAA/Ca²⁺ゲルの腹腔投与

溶解排泄されるアニオン性なポリマーは臨床での体内投与の可能性はある。例えばスマンクス®は、ポリマレイン酸とスチレンの共重合体を担体として用いているが、抗がん剤として臨床使用されている。また動物実験レベルでは、アクリル酸の粘着性を生かした癒着防止材が複数検討されており、キトサンのようなカチオン性物質と異なり、生体適合性も良好であることが報告されている。

一方で HA-g-PAA 及びそのゲルは全く新しく合成されたもので、その生体適合性は未知数である。本研究では、HA-g-PAA 及び CaCl₂ 架橋ゲルを、腹膜中皮細胞株(CRL9444)、及び胃癌腹膜播種細胞株 (MKN45P) により、生体適合性を評価をすることを目的とする。

B. 研究方法

分子量 2MDa の HA の水酸基を開始剤修飾し、ATRP（原子移動ラジカル重合法）によって分子量 7~8kDa の PAA でグラフト修飾された HA-g-PAA を用いた。これを以下の手順でアプライし、MTT assay によって生存率を評価した。

●用いた細胞株と培地

CRL-9444 (RPMI-1640 + 10% FBS, hydrocortisone, EGF, insulin)

NIH3T3 (D-MEM+10% FBS) ,

●培養及びアッセイ手順

細胞をコンフルエントな状態になるまで 75cm² のフラスコで培養

- (1) 培地をパスツールピペットで吸引した。
- (2) PBS 10 mL を加え、洗浄・吸引。浮遊細胞や死細胞を除去した。
- (3) トリプシン 5 mL を加え、5 分間 37 °C 恒温槽でインキュベート。細胞を剥離させた。
- (4) 培地を加え、剥離した細胞をトリプシngoと 50 mL ファルコンチューブに回収した一部を取り分け、トリパンブルーで染色して細胞数をカウントした。
- (5) 1000 rpm, 3 min で遠心分離を行い、細胞をチューブ底に集めた
- (6) 上澄み液をアスピレーターで除去し、新しい培地を加え、細胞濃度を 1×10⁵ 個/mL とする。よくサスペンドして細胞分布を均一にする
- (7) この溶液を、8 連結マルチピペッターを用いて、96 穴マイクロプレートに 50 μL ずつ分注。各 well には 5000 個の細胞が存在している状態
- (8) 37 °C、5 % CO₂ 恒温槽に入れ、24 時間インキュベート
- (9) 24 時間後、UV 滅菌した材料を含む培溶液を、各 well に 50 μL ずつ加えた (n=8)

★この時材料として

- ・濃度が異なる HA-g-PAA 0.1~1wt%
- ・HA-g-PAA+CaCl₂ペレット：ペレットポリマー濃度変化
各終濃度が
ポリマー混合後終濃度：1,0.5,0.25,0.1wt%
Ca²⁺混合後終濃度：0.5wt%
ゲル化物を遠心（10000rpm、3min）によりペレット化し、

細胞にアプライ。

- ・ HA-g-PAA + CaCl₂ ペレット：ペレットポリマー枚数変化
ポリマー混合後終濃度：1wt%
Ca²⁺混合後終濃度：0.5wt%
培地中の HA-g-PAA 濃度が最大 5wt% の超高濃度までアプライ。

(10) 再び 37 °C 恒温槽に入れ、48 時間インキュベート

(11) 48 時間後、Dye solution を各 well に 15 μL ずつ加え、37°C 恒温槽で 1~4 時間インキュベート

以降の操作は無菌状態下で行わなくてもよい。

(12) 1~4 時間後、プレートを取り出し Solubilization solution を各 well に 100 μL ずつ加えた。

(13) 気泡を除去するため、振とう機にプレートに乗せ 1 時間ほど振とう。

(14) マイクロプレートリーダーを用いて各 well の 570 nm における吸光度を測

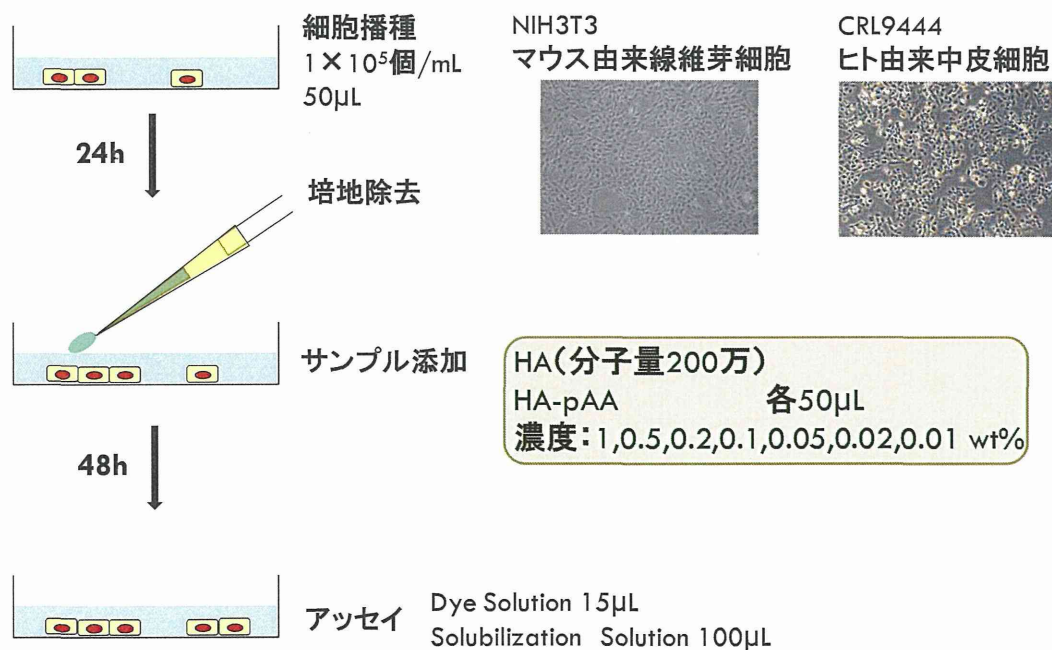


図1 HA-g-PAA/CaCl₂ の細胞生存率評価

定。

すぐに測定を行わない場合は、4 °C冷蔵庫で保存する。溶液の蒸発を防ぐために粘着シールを貼るとよい。

(15) コントロール well とサンプル添加 well の吸光度の比より、各 well の細胞生存率を算出した。

(倫理面への配慮)

特に必要なし。

C. 研究結果

C-1. HA-g-PAA の生体適合性

下図に繊維芽細胞株(NIH-3T3)、中皮細胞株(CRL-9444)に対する HA-g-PAA の MTT assay 結果を示す。中皮細胞株に対して、未修飾の HA でも中皮細胞に対する毒性が見られる濃度 1wt%程度で、HA-g-PAA は高い生体適合性を示した。一方で繊維芽細胞に対しては、0.2wt%までは高い生体適合性を示した。

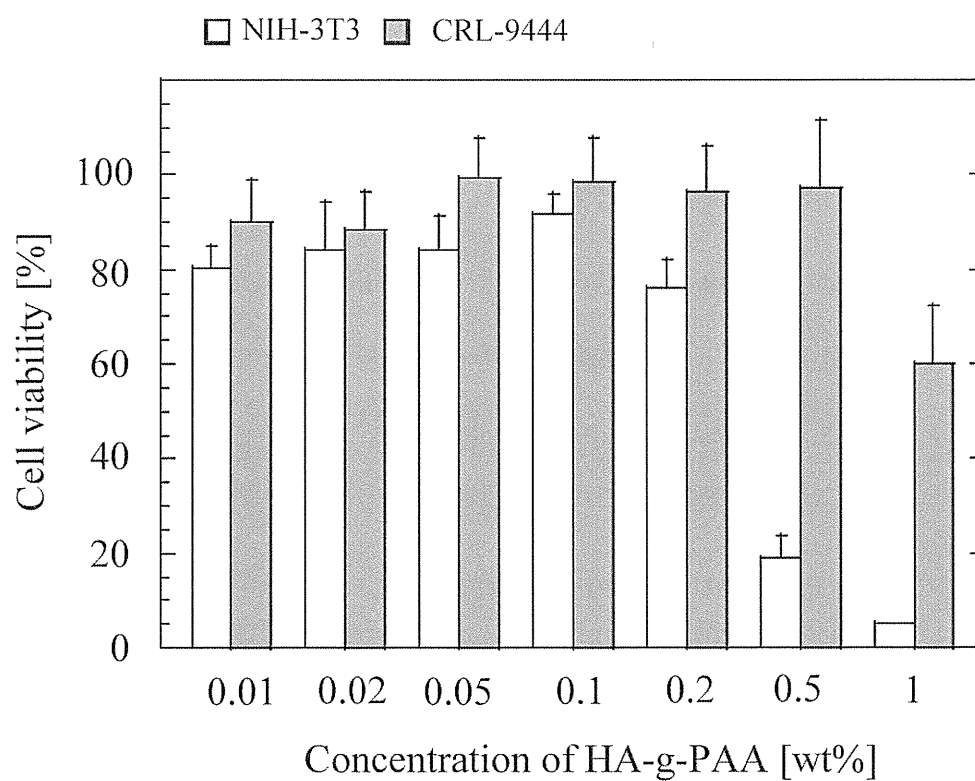


図1 HA-g-PAA の細胞毒性

C-2. HA-g-PAA/Ca²⁺ゲルの生体適合性

下図に HA-g-PAA/CaCl₂ ゲルの MTT assay 結果を示す。

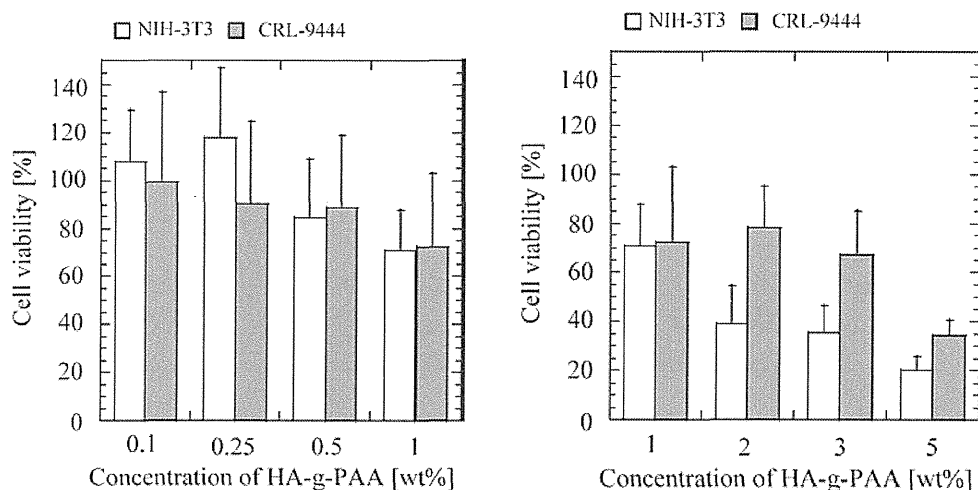


図3 HA-g-PAA/Ca²⁺の皮下投与解剖結果（1日後）

濃度は各 well 中のポリマー終濃度である。Ca²⁺と混合してゲル化を行った系の方が、細胞生存率が向上することがわかる。これはイオンキレートによって不溶化しているため、ポリマーが暴露されている事実上の濃度が低下するためと考えられる。また 1wt%以下では、中皮細胞株と繊維芽細胞株に毒性の大きな差は見られない。

さらに HA-g-PAA と CaCl₂ の比率を固定して、ポリマー投与量をさらに増加させると、細胞生存率は低下した。しかし 5wt%と超高濃度ゲルを、培地の浸透圧補正を行わずアプライしても、極端に生存率が低下することなく、非常に高い生体適合性が示された。

D. 考察

本研究で目指す CDDP 徐放ハイブリッドゲルシステムのナノゲル担体、あるいは *in situ* 架橋ゲル担体として期待される HA-g-PAA の生体適合性を、中皮細胞株と繊維芽細胞株の MTT assay によって検証した。特に、1%以上の高濃度でも中皮細胞に対して高い生体適合性を示した。