

201212005B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと

その徐放システムの開発

平成22～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 大知

平成25（2013）年5月

目次

I. 総括研究報告書

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲル

とその徐放システムの開発に関する研究

伊藤 大知 2

II. 分担研究報告書

1. ナノゲル担体用ヒアルロン酸誘導体 HA-I DA と HA-MA の開発

鈴木 幸光 38

2. シッフ塩基形成HAヒドロゲルとHA-I DA ナノゲルの腹膜播種

抑制に関するマウスモデルによる研究

北山 丈二 49

3. クリックHAヒドロゲルとHA-g-P AAカルシウムイオン架橋ゲ

ルのマウスモデルによる腹腔適合性実証の研究

石神 浩徳 60

4. 新規ヒアルロン酸誘導体及びゲル、クリックHA、HA-g-P AA、

HA-I DA、HA-MAの細胞生存率に与える影響の研究

山口 博紀 75

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 87

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと

その徐放システムの開発

研究代表者： 伊藤 大知（東京大学大学院医学系研究科・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た。

研究期間の3年間で、新たなCDDP担持HA誘導体として、イミノ2酢酸修飾HA（HA-IDA）、マロン酸修飾HA（HA-MA）を開発した。またカルボキシメチルセルロース（CMC）を対照物質として、HA-IDAが腹膜播種細胞に選択的にエンドサイトーシスされることを示した。さらにHA-IDAまたはHA-MAとCDDPからCDDP担持HAナノゲルが合成できることを示した。CDDP/HA-IDAナノゲルとCDDP/HA-MAナノゲルをHAベースの *in situ* 架橋ハイドロゲルであるHAXに封入してハイブリッドゲルとし、CDDP及びHA-IDAまたはHA-MAの徐放挙動を定量した。この結果、CDDPに8員環を形成して錯体を形成するHA-IDAよりも、6員環を形成するHA-MAの方が、優れたCDDP徐放挙動を示すことが示唆された。またナノゲルを封入する新たな *in situ* 架橋ゲルとして、アジド基とシクロオクチン基で修飾したHAから成り銅フリークリック反応で架橋するcHAゲルと、ポリアクリル酸（PAA）をグラフトしたHAから成りCa²⁺イオンでイオン架橋するHA-PAA/Caゲルを合成した。以上の材料の細胞レベル、動物レベルでの腹腔内生体適合性を実証した。CDDP/HA-MAナノゲルを用いたハイブリッドゲルは理想的な徐放挙動が期待され、研究期間終了後も研究を継続し、腹膜播種モデルでの播種抑制効果の検証を行っていく。

研究分担者

鈴木 幸光（東京大学大学院工学系研究科・特任助教）
北山 丈二（東京大学医学部附属病院・准教授）
石神 浩徳（東京大学医学部附属病院・講師）
山口 博紀（東京大学医学部附属病院・助教）

A. 研究目的

A-1にて本研究3ヵ年の目的と達成点・課題を整理し、総括する。次にA-2にて代表者が担当した研究内容につき、詳細を報告する。

A-1. 本研究の総括

本研究開始時の目標を図1に示す。CDDP 担持ヒアルロン酸 (HA) ナノゲルの開発、加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用し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研究を進めた。



図1 本研究の目的：概念図

本研究の達成度の自己評価を図2に示す。①ナノゲル開発・②担体ゲル開発は当初の目標以上を達成した。③ハイブリッドゲルの構築においても、*in vitro* 徐放実験において、CDDP 徐放速度を1週間かけて徐放することに成功した。④ナノゲルの標的性を *in vitro* で示すことにも成功した。ハイブリッドゲルの開発が遅れたため、⑤ハイブリッドゲルの動物実験は、研究期間終了後にスケジュールが遅行した。①、②、③、④は目標を完遂し、⑤は未達であるが、最終

的には目標を達成し、企業との共同研究を開始することを目標とし、鋭意研究を継続していく。

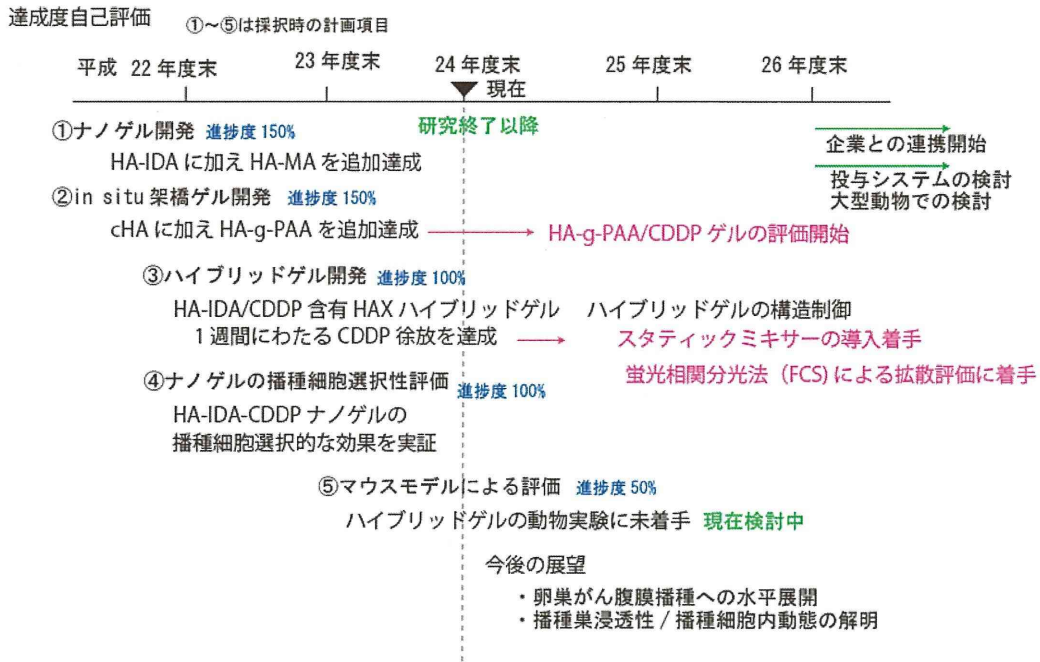


図2 本研究の達成度自己評価

計画項目①の成果：ナノゲル開発

より詳細に総括を述べる。まずナノゲルの開発成果を図3に示す。CDDPの白金に配位する二座配位子を導入したイミノ二酢酸修飾 HA (HA-IDA)、マロン酸修飾 HA (HA-MA) の合成を達成した。また対照物質として市販のカルボ

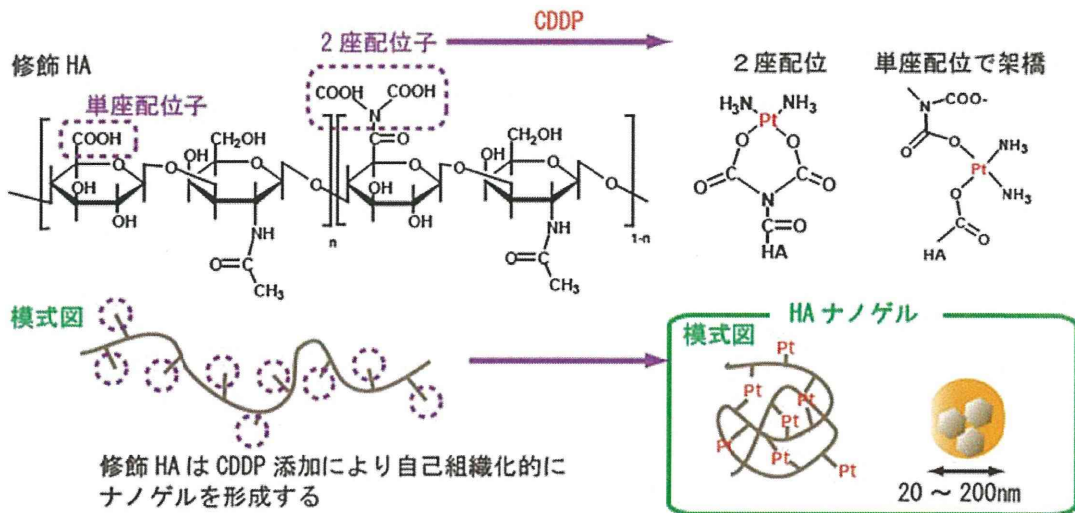


図3 本研究で開発した修飾 HA (HA-IDA、HA-MA) と CDDP から成るナノゲル

キシメチルセルロース (CMC) を CDDP 担持したナノゲルを調製した。図 4 に示すように、分子量約 10 万の HA-IDA と HA-MA は、PBS 中で 20nm (純水中では 200nm、図 4) 程度のナノゲルを構成した。また CMC の 2,3 位の水酸基に修飾されたカルボキシメチル基が CDDP に配位することを見出した。未修飾の HA から作製した HA-CDDP ナノゲルに対し、HA-IDA と HA-MA から作製した HA-IDA-CDDP ナノゲル、HA-MA-CDDP ナノゲルは、徐放速度を著しく遅延し (図 4)、CDDP のうち 40% は HA-IDA 及び HA-MA のリガンドポリマーに非常に強く配位し、PBS 中では放出されないことが明らかになった。

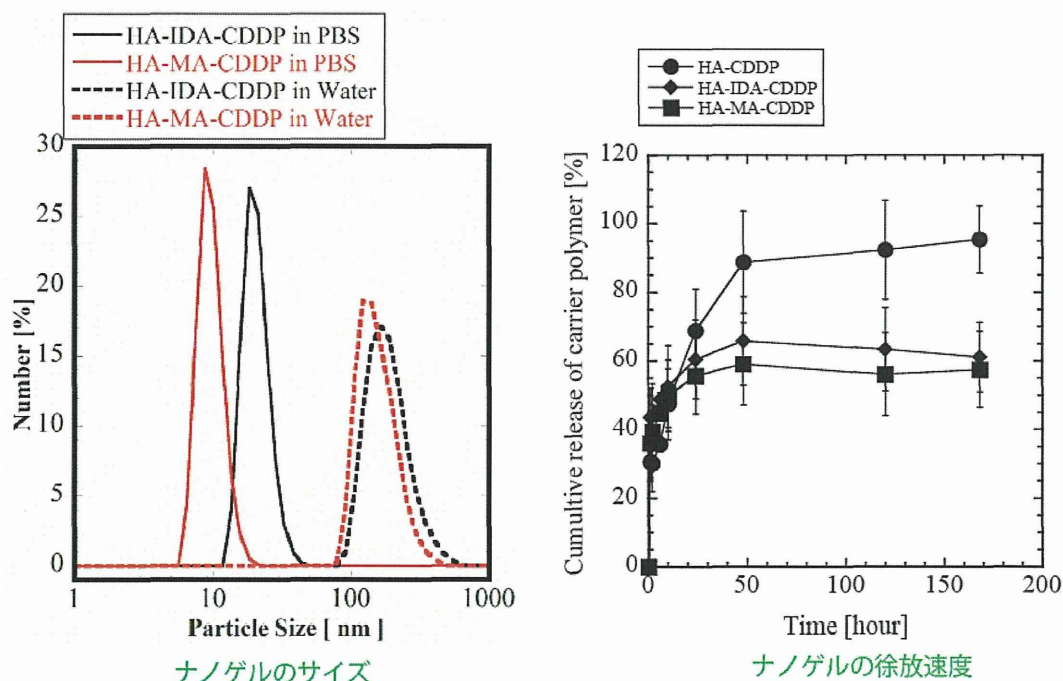


図 4 ナノゲルのサイズ及び CDDP 徐放速度

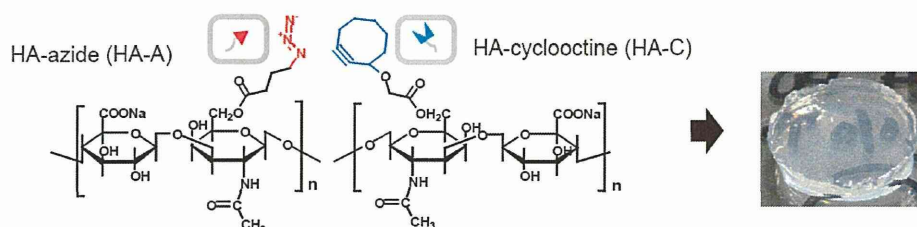
計画項目②の成果：in situ 架橋ゲルの開発

腹腔内でナノゲルを徐放する担体として、新規な in situ 架橋ゲルの開発を行った。研究者らが用いてきたハイドロゲルは、図 6 に示すようにアルデヒド基とヒドラジド基で修飾した HA を混合してシッフ塩基形成により架橋するハイドロゲル (HAX) である。癒着防止効果を持ち、生体適合性にも優れるが、若干の毒性を示すアルデヒド基を用いない、in situ 架橋ハイドロゲルがより理想的な担体となりうる。

近年アジド基とシクロオクチン基が、無触媒／生理環境下で反応することが報告され、銅フリークリック反応と呼ばれ、バイオ用途での利用が研究

成果2：新規 in situ 架橋ハイドロゲルの開発

① cHA ゲル：銅フリークリック反応架橋ゲル



② HA-g-PAA：ポリアクリル酸グラフトヒアルロン酸／カルシウムイオン架橋ゲル

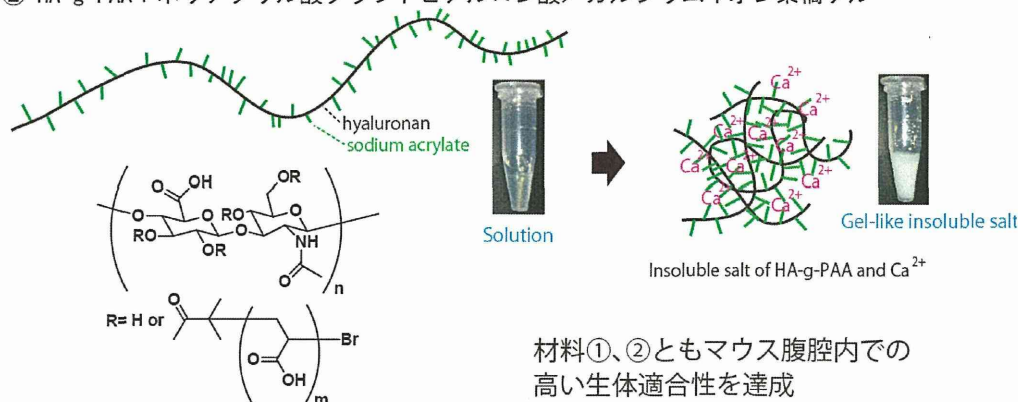


図5 本研究で開発した in situ 架橋ゲル

で加速している。図5に示すように、本研究では銅フリークリック反応で架橋するハイドロゲル cHA の開発に成功した。本材料は論文として国際誌に受理させるとともに (Ito T *et al.* *Biomacromolecules* (in press))、東大 TLO より PCT 出願し、本年度 JST の特許支援制度により、日米欧で審査請求されることとなった。

さらにポリアクリル酸(PAA)は Ca^{2+} と不溶化錯体を形成し、沈殿することが知られている。 Ca^{2+} はフィブリン糊でも用いられており、生体内で安全に用いることができる架橋剤である。原子移動ラジカル重合法 (ATRP) を用いて、HA に PAA をグラフト重合した HA-g-PAA の合成に成功し、 Ca^{2+} で迅速にゲル状不溶化コンプレックスを形成することに成功した。今後ナノゲル封入担体としても、CDDP と PAA を直接錯体形成することが可能となった。

計画項目③の成果：ハイブリッドゲルの開発

HA-IDA-CDDP ナノゲル、あるいは HA-MA-CDDP ナノゲルを in situ 架橋
 ハイドロゲル (HAX) に封入して、ハイブリッドゲルの作製を行った。図 6 に
 示すように、ハイブリッドゲルを作製後、徐放実験を行うことによって、HAX
 に CDDP を直接封入した系が 1 日で 70%以上の CDDP を徐放してしまうのに
 対して、ハイブリッドゲルの徐放率は 1 日で 40%に止まり、1 週間かけて 70~
 80%の CDDP を徐放した。本研究目標である 1 週間の停留時間を実現した。さ
 らに詳細を後述するが、徐放された CDDP はナノゲルとして徐放されたことが
 示唆された。

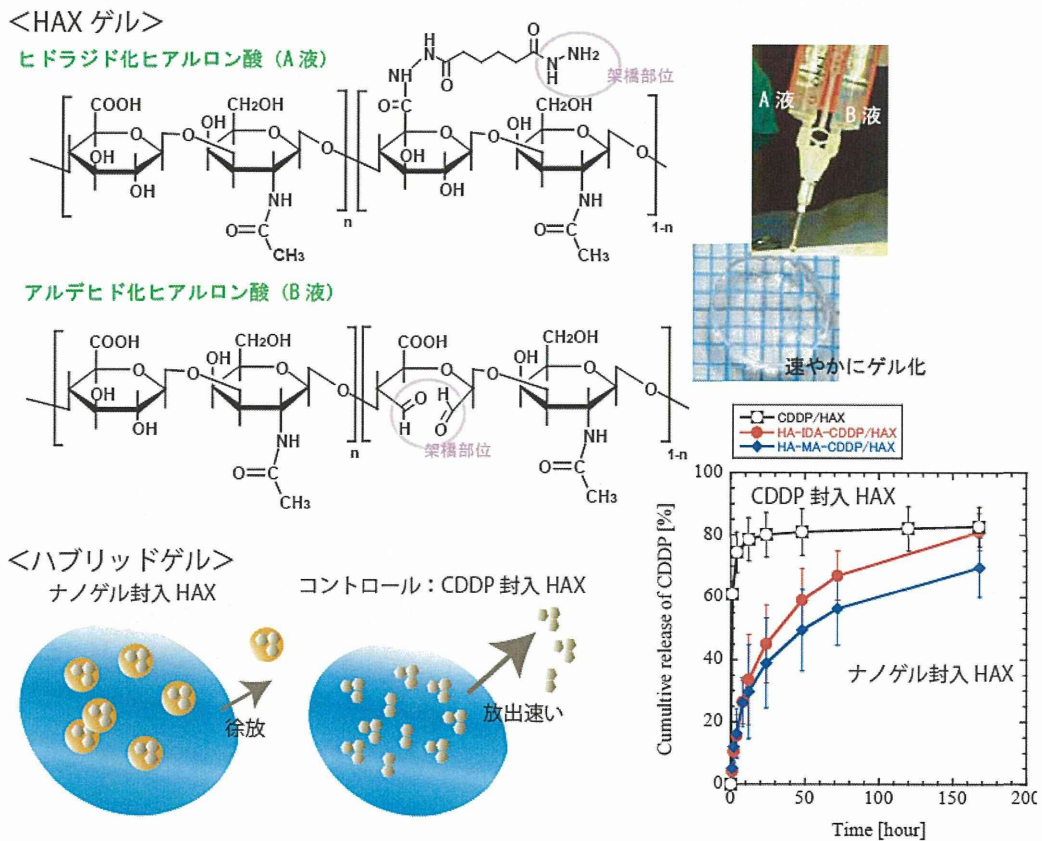
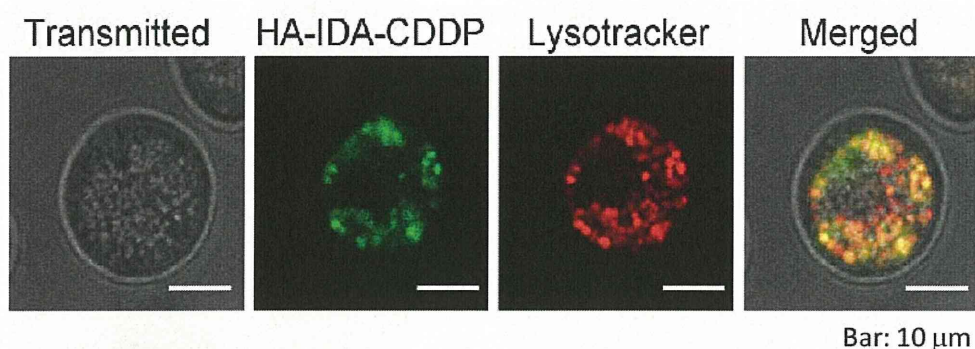


図 6 本研究で開発したハイブリッドゲル

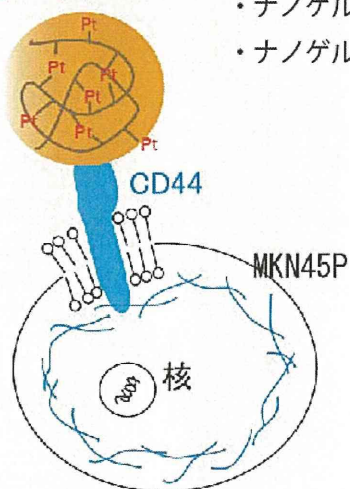
計画項目④の成果：ナノゲルの播種細胞選択性の評価

新たに合成したナノゲル担体ポリマーである HA-IDA、HA-MA は CD44 陽
 性の細胞株に対して、HA に比べ取りこまれ能は低下するものの、CMC に比べ
 て有意に効率的に取り込まれることを確認した。

さらに図7に示すように、HA-IDA だけでなく CDDP と反応させて作製したナノゲル HA-IDA-CDDP が、播種細胞株に対して、エンドサイトーシスされることを示した。加えて腹腔中に本システムを投与した際に、濃度 0.5mg/mL の CDDP を投与しても、標的となる播種細胞に対しては殺細胞効果を示すのに対し、腹腔を覆っている中皮細胞に対しては著しく毒性を低減することが示された。これは CD44 を介した播種細胞への選択的取り込みが起こったためと予想



HA ナノゲル



- ・ナノゲル化によっても HA と CD44 の相互作用は起こる
- ・ナノゲルは播種細胞に選択的に取り込まれる

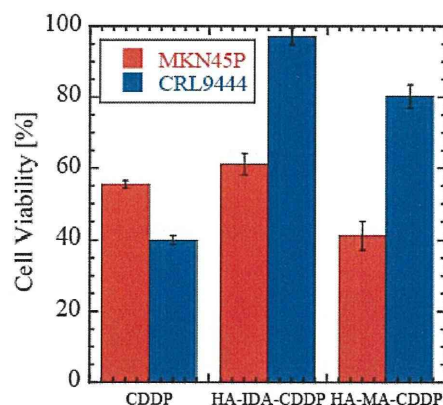


図7 HA ナノゲルポリマー：HA-IDA-CDDP の播種細胞株標的性の検証
(胃がん播種細胞株：MKN45P、中皮細胞株：CRL9444)

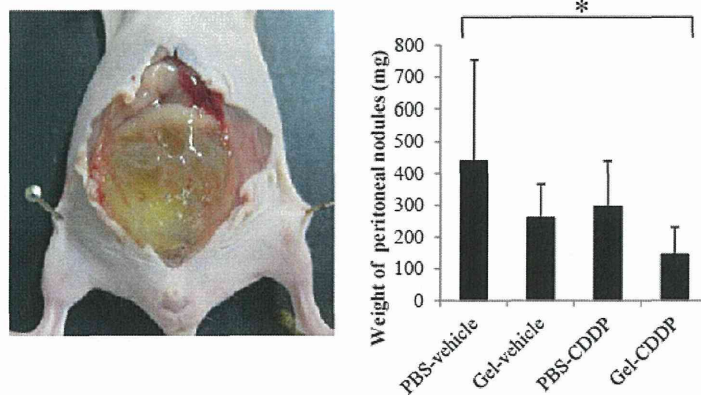
される。

計画項目⑤の成果：マウスモデルによる評価

さらにマウス腹膜播種モデルに対して、ナノゲル化していない CDDP を in situ ハイドロゲル(HAX)に封入し腹腔投与、また HA-IDA-CDDP ナノゲルを in situ ハイドロゲルに封入せず腹腔投与を行った。図8に示すように、CDDP 封入

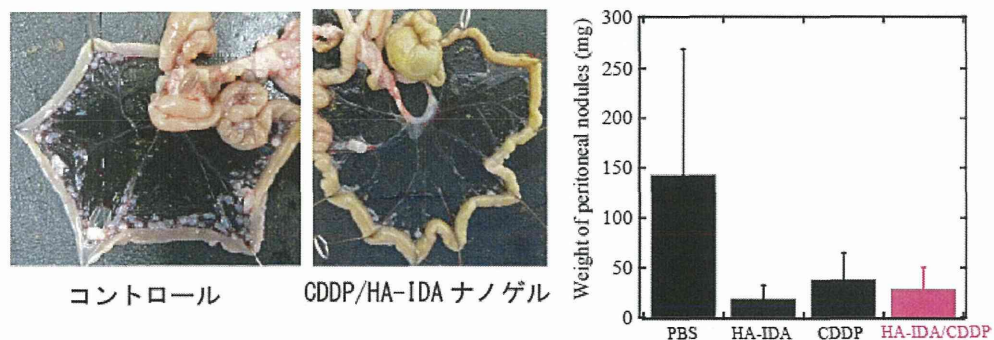
HAX ゲル投与では、CDDP の腹腔投与よりも有意な播種抑制効果が見られた。一方で、HA-IDA-CDDP ナノゲルを HAX に封入せず投与した系では、CDDP 単独投与とほぼ同様の播種抑制効果を示すにとどまった。これは HA-IDA-CDDP ナノゲルが速やかに腹腔から除去されてしまうためと考えられる。このためにハイブリッドゲルを用いてナノゲルの徐放速度を制御すること

① CDDP 封入 HAX ゲル (ナノゲル化なし)



CDDP の単独投与よりも播種抑制効果が見られた

② CDDP/HA-IDA ナノゲル (ハイブリッド化なし)



HA-IDA ナノゲルは CDDP と同レベルの播種抑制効果のみ示した

図8 マウスモデルへの適用結果

で目標を達成することが可能と予測され、研究期間終了次年度に、引き続き検討を行っている。

さらに研究を進め、動物実験で高い性能を示し、臨床に到達するための、今後の課題と展望を図9に要約する。

今後の課題と展望

① 新たなハイブリッドゲルへの発展

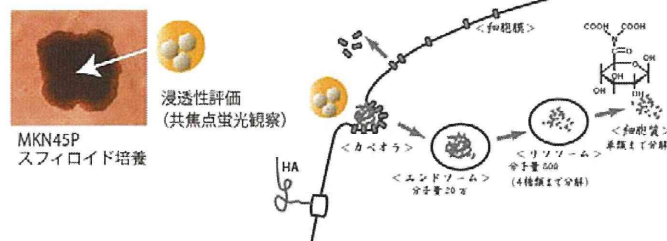
- HA-MA、cHA、HA-g-PAA 等を組み合わせたハイブリッドゲル群の検討
 - HAX に代わり、新たに開発した材料群を用いて徐放挙動や標的性を自由自在に制御する
- 拡散挙動に着目した徐放速度の制御
 - FCS (蛍光相関分光法) を用いたハイブリッドゲルの評価

② 2液混合プロセスの検討によるゲル構造の制御



拡散や分解挙動は、材料組成のみでなく2液の反応混合プロセスに依存
 ▶ スタティックミキサーを用いた検討に着手

③ ナノゲルの播種巣への浸透性と播種細胞内動態の解析



播種動物モデルでの実証

図9 本研究の今後の展望

今後複合化するためのナノゲル/*in situ* 架橋ゲルの材料群の開発に成功したため、これらを組み合わせて最良のハイブリッドゲルシステムを構築し、さらに性能を引き出すことが次の展望である。また開発した HA-IDA、HA-MA、HA-g-PAA の細胞内外での CDDP キレート挙動と、ナノゲル状態での CD44 との相互作用を解明し、材料の特性を向上していく余地がある。またナノゲルの *in situ* 架橋ゲル中の拡散現象をさらに解明するべく、FCS (蛍光相関分光) 等を用い、拡散機構を解明することが重要である。

ハイブリッドゲルの構造は、2液混合プロセス特有の不均一な構造になっていることが判明している。この点に関してはスタティックミキサーを用いたゲル化プロセスの検討に着手している。

さらに *in vitro* と *in vivo* をつなぐ鍵が、腹腔から播種巣へのナノゲルの浸透性である。胃癌細胞を用いた播種巣モデルとしてのスフィロイドを用いた実験、*ex vivo* での播種巣への浸透実験に着手しており、本研究成果を土台に、効果的な腹膜播種治療法の確立に向け、研究を発展させていく予定である。

A-2. 研究の目的（代表者分担）

A-2-1. カッパーフリークリックゲル（cHA、cCMD）の開発

CDDP ナノゲルを封入するための新規 *in situ* 架橋ハイドロゲルとして、カッパーフリークリック反応で架橋する、2液性 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発を

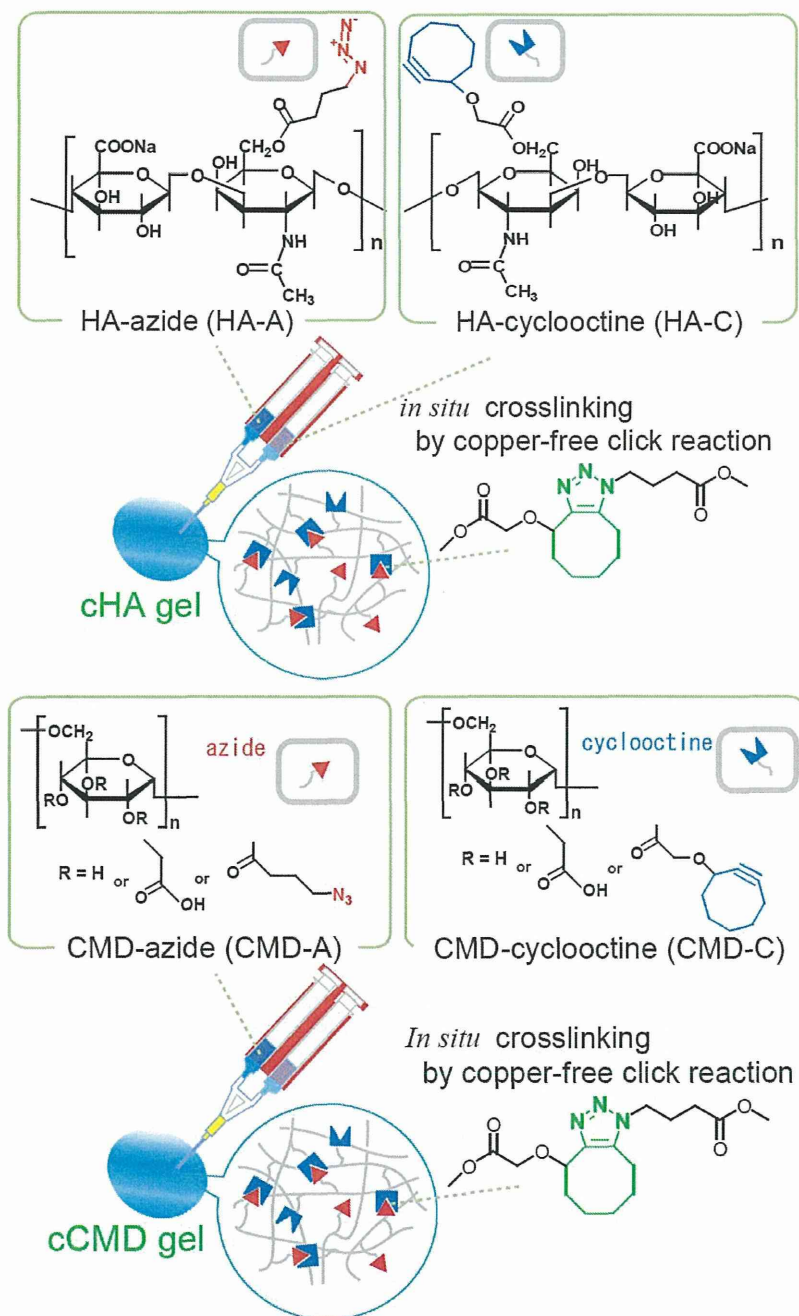


図10 cHA及びcCMDゲルの開発：カッパーフリークリック反応で架橋する *in situ* 架橋ハイドロゲル

行った。アジド基とシクロオクチン基がトリアゾール環を形成する反応は、特異性が高く、生体内でも高い特異性が維持されることが期待される。骨格としては癒着防止材として臨床使用実績を豊富な HA、及び体内に代用血漿剤として臨床実績が豊富なデキストランをカルボキシメチル化したカルボキシルメチルデキストラン (CMD) の両者を用い、ゲルの分解性も考慮してエステル結合を介し、アジド基とシクロオクチン基を固定する分子設計とした。

A-2-2. カルシウムイオン架橋 HA ゲル (HA-g-PAA) の開発

in situ 架橋様式として、共有結合を用いる他に、イオン架橋や水素結合を用いる方法がある。アクリル酸 (AA) が重合したポリアクリル酸 (PAA) は Ca^{2+} と不溶化錯体を形成し、沈殿することが知られている。さらにカルボン酸を豊富に持つ PAA は将来的に CDDP と錯体形成することが期待できる。一方で HA は保水性に富み、腹腔内で生体適合性も高い。このため、新たに HA に PAA をグラフト重合した HA-g-PAA を合成することができれば、生体適合性に優れた Ca^{2+} で迅速にゲル状不溶化コンプレックスを形成するとともに、HA の高い含水率によって一定量の水和水を保持できると期待できる。

HA に Br 開始剤をエステルリンカーを介して修飾し、水中原子移動ラジカル

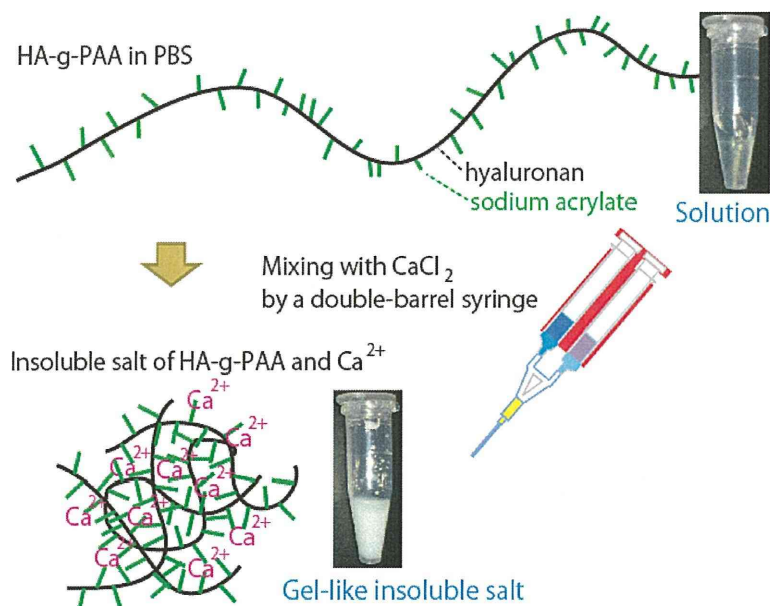


図 1 1 HA-g-PAA/ Ca^{2+} ゲル：カルシウムイオンと混合することでゲル化

重合法 (ATRP) を用いて、HA-g-PAA の合成を行った。エステルリンカーが加水/酵素分解して、生体内で PAA が排泄される分子設計とした。

A-2-3. ハイブリッドゲル (HA-IDA-CDDP ナノゲル封入 HAX) の *in vitro* 徐放挙動評価

ナノゲルそのものは腹腔停留性を大きく向上させることはなく、ハイブリッド化による徐放速度の制御が必要である。ナノゲルはサイズが PBS 中で直径 10nm~20nm となり、遊離 CDDP に比べ著しくサイズが大きくなるために、ゲル網目によって拡散定数が低下し、ハイブリッド化によって徐放速度が低下することが期待される。

HA-IDA 及び HA-MA に FTSC(Fluorescein-5-thiosemicarbazide)修飾を施し、ナノゲルを蛍光顕微鏡下で可視化可能とした。さらに HA-IDA-CDDP ナノゲル、及び HA-MA-CDDP ナノゲルを *in situ* 架橋ハイドロゲル中 (HAX) に封入して、CDDP 徐放特性を検討し、ハイブリッドゲルのナノゲル徐放特性を明らかにすることを目標とした。

A-2-4. ナノゲル標的性の評価

ハイブリッドゲルから徐放されたナノゲルは、腹腔中を移動し、最終的に播種巣中の播種細胞に浸透・取り込まれることが期待される。この時ナノゲルは HA と播種細胞上の CD44 レセプターの結合を介して、CD44 発現量の高い播種細胞に選択的に送達されることが期待される。しかしながら HA に IDA や MA 修飾を施すと、CD44 との結合性が損なわれる可能性がある。さらに CDDP を架橋・担持してナノゲル化することで、CD44 との結合性がさらに低下することが考えられ、ナノゲルの細胞取り込み効率を実際に検証することは非常に重要である。

ナノゲルの播種細胞特異的な送達を実証するべく、FTSC 修飾を施した HA-IDA-CDDP ナノゲルをヒト胃がん腹膜播種細胞株 MKN45P に処置し、2 時間後に共焦点蛍光顕微鏡によって観察した。さらに Lysotracker を用いてリソソームとの局在を検討した。

さらにヒト中皮細胞株である CRL9444 と、MKN45P に対して、異なる CDDP 濃度の CDDP、HA-IDA-CDDP ナノゲル、HA-MA-CDDP ナノゲルを処置して、2 日後に MTT assay を行った。

以上の検討によって、ナノゲルが傷害を与えない中皮細胞には毒性を緩和し、播種細胞に選択的に毒性を発現することを示すことを目的とした。

B. 研究方法

B-1. cHA、cCMD ゲルの合成と評価

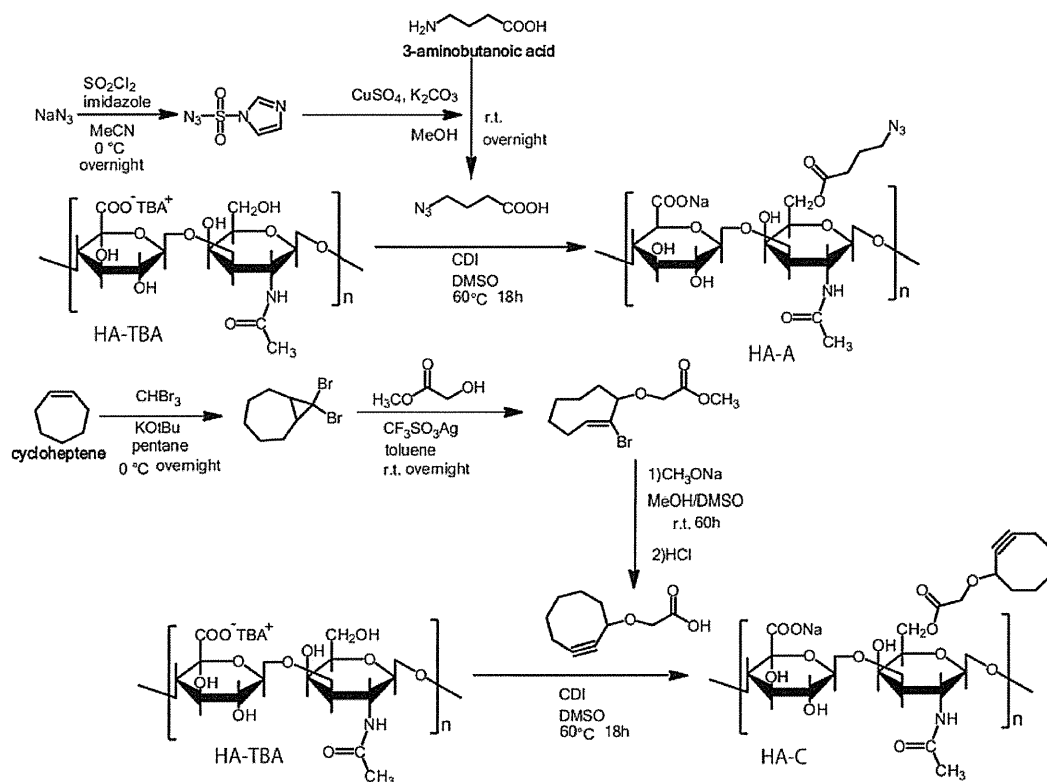


図1 2 cHA ハイドロゲルのプレカーサーポリマー：HA-A と HA-C の合成経路

図1 2に 2 液性ハイドロゲルのプレカーサーポリマーとなるアジド化 HA (HA-A) とシクロオクチン化 HA (HA-C) の合成経路を示す。得られた HA-A と HA-C を透析で精製し凍結乾燥後、FT-IR、NMR によって合成を確認した。cCMD ゲルに関しても、同様の合成と評価を行った。

得られた HA-A と HA-C の 1~5wt% PBS 溶液を調製し、スターラー攪拌停止法でゲル化時間の測定を行った。さらにダブルシリンジでモールドにゲルを注入してディスク状ゲルを作製し、PBS、PBS+Hase 10unit/mL (ヒアルロン酸分解酵素)、DMEM+10% FBS に浸漬することで、ゲルの膨潤・分解実験を行った。なおゲル重量はゲルの初期重量に対する重量%で表記した。

B-2. HA-g-PAA の合成と評価

図 1 3 に示す合成スキームにて、ヒアルロン酸 (分子量 200kDa) に原子移動ラジカル重合法 (ATRP) によって、Na 型アクリル酸のグラフト重合を行った。HA に開始剤を修飾するために、TBA(tert-butyl amine)でイオン交換を行い、

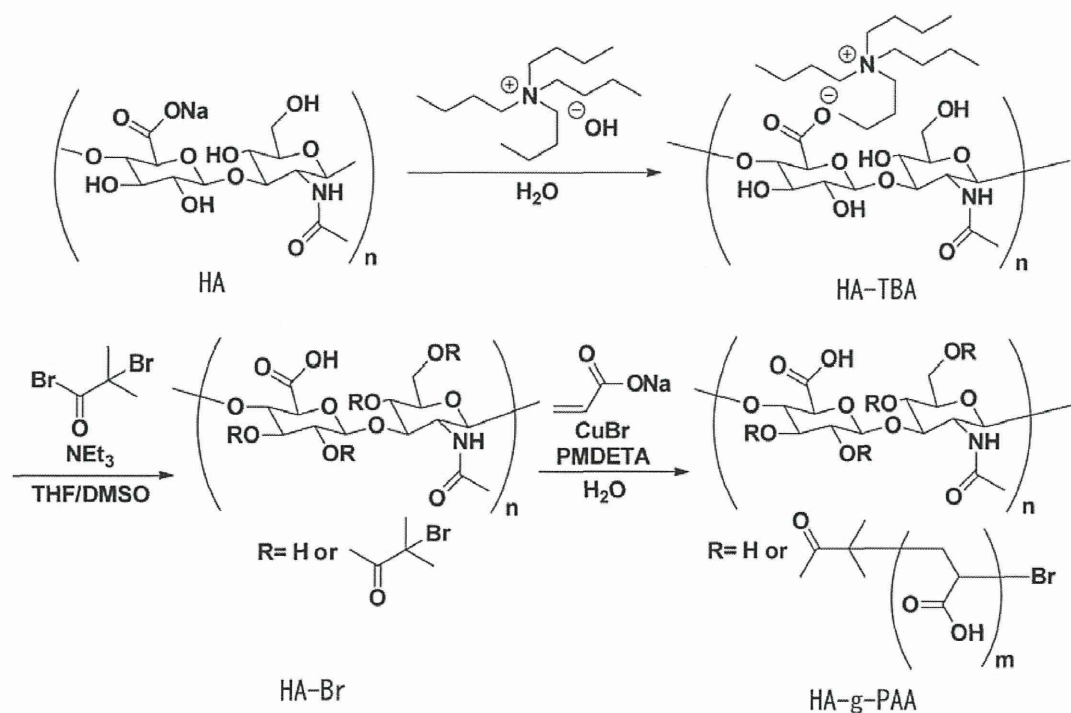


図 1 3 HA-g-PAA の合成経路

極性溶媒中でブロモ化を行い、HA を開始剤 HA-Br とした。さらに PMEDTA (N,N,N',N'',N'''-Pentamethyldiethylenetriamine) をリガンドとして銅触媒下で、近年報告された水中 ATRP によってグラフト重合を行った。モノマー濃度は開始剤に対して 100 当量とし、最大分子量が 10kDa 以下になるように重合を行った。得られた HA-g-PAA を透析で精製後、FT-IR、NMR によって合成を確認した。

HA は腹腔内で HAse (ヒアルロン酸分解酵素) により迅速分解される。一方で PAA は生体内では分解されない。このため HA-g-PAA では PAA 固定部にエステル結合を用いて、HA と PAA が切断される設計としている。HAse または Lipase、あるいは両者の混合メディア (いずれも $\text{pH}=7.4$ 、PBS) の中で HA-g-PAA をインキュベートし、HA-g-PAA の分子量変化をゲル濾過クロマトグラフィー(GPC)で測定した。

B-3. ハイブリッドゲルからの CDDP 徐放速度の測定

ナノゲル担体ポリマーである HA-IDA (イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸) 及び HA-MA (マロン酸修飾ヒアルロン酸) の合成と評価に関しては、鈴木の本章で詳述する。

HA-IDA と CDDP を混合し加熱後、未反応の CDDP を透析によって除去し、凍結乾燥することによってナノゲル粉末を得る。2012 年度報告書に記載の合成スキームに則り、HA-IDA 及び HA-MA には FTSC 修飾を行うことによって緑色蛍光を付与した。HA-FTSC-IDA (または MA) は CDDP を錯形成して、ナノゲルを形成し、またナノゲル化時の加熱でも褪色が見られなかったために、ポリマーと CDDP の徐放量の同時測定が可能になった。

さらに、代表者がこれまで研究してきたシッフ塩基によって *in situ* 架橋する HA ゲル (HAX) に、HA-IDA-CDDP ナノゲル又は HA-MA-CDDP ナノゲルを封入したハイブリッドゲル (図 1 4) を作製した。HAX のポリマー濃度は 2wt% とし、ナノゲル担持量は、マウスモデルにおいてハイブリッドゲル 1mL 投与で CDDP が 3mg/kg となるために、0.02wt% とした。

ハイブリッドゲルを PBS 5mL に浸漬し、所定時間毎に徐放メディアのサンプリングを行い、原子吸光により CDDP 濃度を、蛍光測定により HA-IDA の濃度を定量した。またハイブリッドゲルの重量変化を測定した。

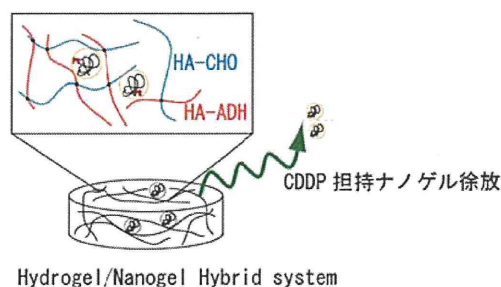


図 1 4 ハイブリッドゲルからの徐放

B-4. ナノゲル標的性の評価

上記の検討でナノゲルの蛍光可視化が可能になった。まず CMC-IDA を対照物質として、HA-IDA を各種細胞株に処置し、細胞株に取り込まれる量を測定した。さらに FTSC 修飾を施した HA-IDA-CDDP ナノゲルをヒト胃がん腹膜播種細胞株 MKN45P に処置し、2 時間後に共焦点蛍光顕微鏡によって観察した。さらに Lysotracker を用いてリソソームとの局在を検討した。

さらにヒト中皮細胞株である CRL9444 と、MKN45P に対して、異なる CDDP 濃度の CDDP、HA-IDA-CDDP ナノゲル、HA-MA-CDDP ナノゲルを処置して、2 日後に MTT assay を行った。

C. 研究結果

C-1. cHA、cCMD ゲルの合成と評価

図15にHA-A及びHA-Cの¹H NMRを示す。アジド基由来、シクロオクチン基由来のピークを矢印で示す。同様にFT-IRの測定結果を図16に示す。NMRのピークの積分値からそれぞれ修飾率が10.8%、14.6%と求められた。今後コンジュゲイション反応の当量比を、現在の3倍から10倍まで増やすことで、修飾率50%程度も実現可能と考えられる。

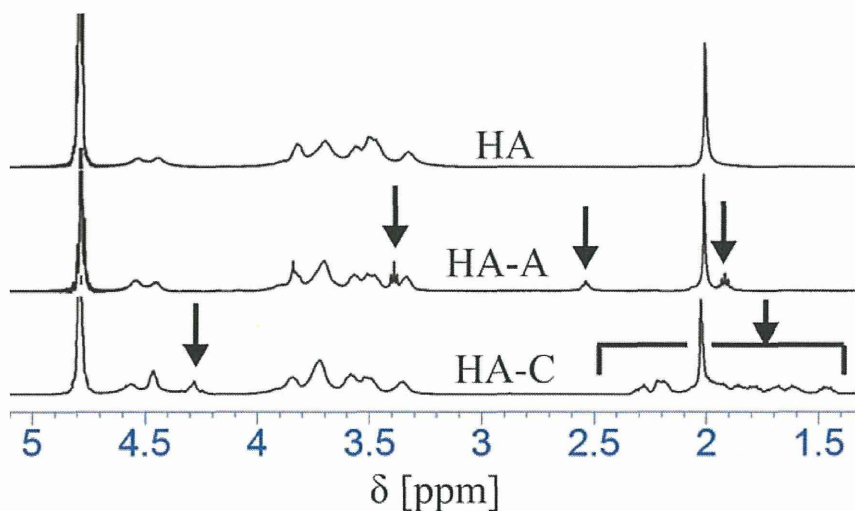


図15 HA-A及びHA-Cの¹H NMR スペクトル

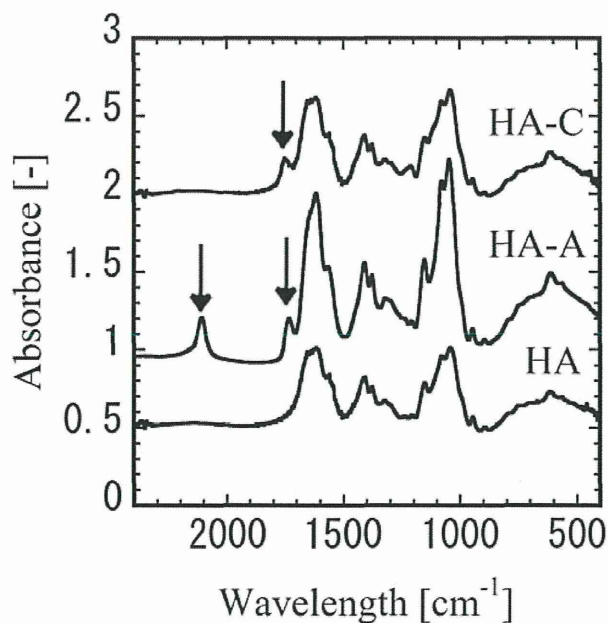


図16 HA-A及びHA-CのFT-IR スペクトル

図 1 7 に CMD-A 及び CMD-C の ^1H NMR を示す。アジド基由来、シクロオクチン基由来のピークを矢印で示す。同様に FT-IR の測定結果を図 1 8 に示す。cHA と同様に cCMD のプレカーサーポリマーを合成することに成功した。本研究の *in situ* 架橋ハイドロゲルの合成スキームは、他の多糖類やポリペプチド等に水平展開が可能である。

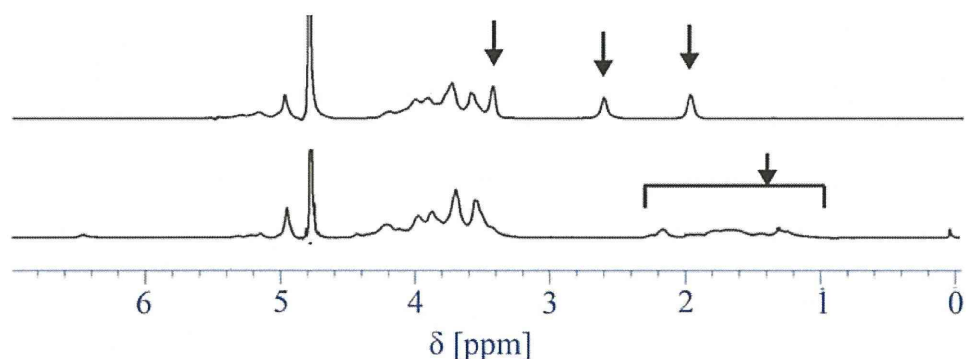


図 1 7 CMD-A (上) 及び CMD-C (下) の ^1H NMR スペクトル

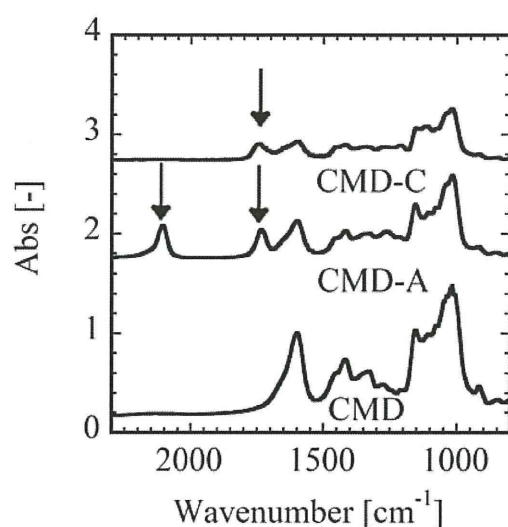


図 1 8 CMD-A 及び CMD-C の FT-IR スペクトル

次に作製した cHA 及び cCMD ゲルを図 1 9 と図 2 0 に示す。2 液をダブルシリンジで混合ゲル化することによって、
 モールド成型可能なハイドロゲルが得られることがわかる。さらに PBS で浸漬すると、ゲルの透明度が増していくことがわかる。ゲルの重量変化を後述するように、アジドやシクロオクチンをコンジュ

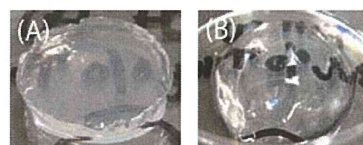


図 1 9 cHA ゲル (A) ゲル化直後
 (B) PBS 浸漬 1 週間後

ゲイトしたエステルリンカーが加水分解することによって、プレカーサーポリマーの親水性が増すとともに、ゲルが加水分解しているものと考えられる。

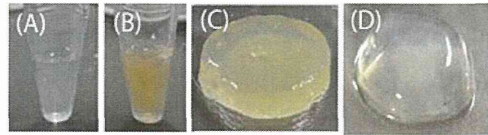


図 2.0 cCMD ゲル (A) CMD-A (B) CMD-C (C) ゲル化直後 (D) PBS 浸漬 2 日後

スターラー法による cHA ゲル化時間のプレカーサーポリマー濃度依存性を図 2.1 に示す。HAX ではポリマー濃度が 2wt% でも 1 分以内にゲル化する。しかし、cHA ゲルでは、HA-A のアジド基修飾率及び HA-C のシクロオクチン基修飾率が低いためにゲル化に時間がかかる。ポリマー濃度を 5wt% まで向上させることによって 1 分以内のゲル化が可能になる。

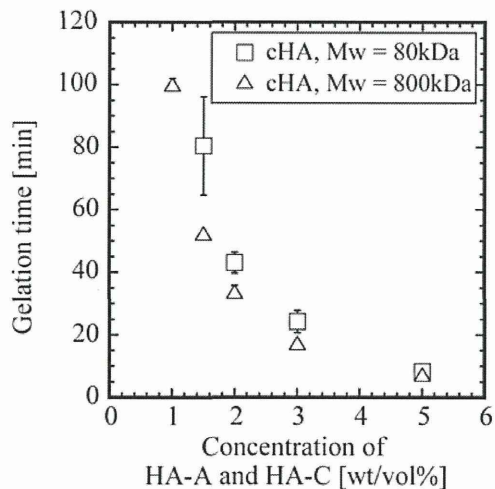


図 2.1 cHA ゲルのゲル化時間

さらに cHA ゲルの液中での膨潤・分解挙動を示す。浸漬するメディアによって分解速度が大きく異なることがわかる。PBS 中では 2 週間程度かけてゆっくり分解していくのに対して、ヒアルロン酸分解酵素 (HAse) によってゲルの分解は加速される。一方で血清を含む培地中では 4 日で急速に分解する。これは血清中に含まれるカルボキシエステラーゼによるエステルリンカーの加水分解か、血清アルブミ

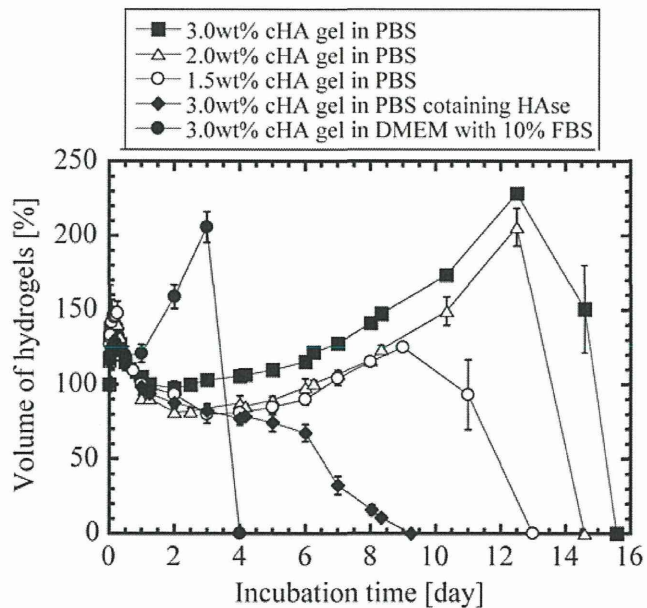


図 2.2 cHA ゲルの重量変化