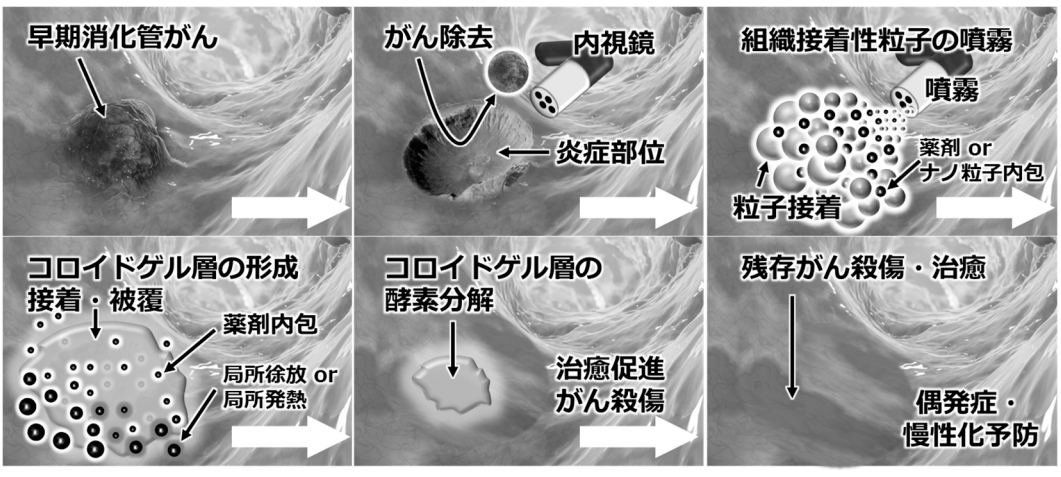
64　薬剤の体内局所徐放を可能にする組織接着性粒子の開発	田口　哲志

【目的】早期消化管がん治療に用いられる内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は、食道、胃、大腸などの消化管の粘膜層に生じた早期消化管がんを内視鏡によって除去する手技であり、我が国が世界をリードしている。ESD は低侵襲で効果的に早期がんを除去できる長所があるものの、がん除去部（粘膜下層剥離部）の治癒制御技術と残存がんの局所治療技術が十分に確立されていないため、狭窄や穿孔等の偶発症、あるいはがんの再発が一定の頻度で生じる。そのため、がん除去後の炎症部位を局所的に接着・被覆して治癒を促進すると共に、薬剤（磁性ナノ材料、抗がん剤）の局所的な徐放や発熱により残存がんを殺傷する生体材料の開発が求められている。そこで本課題では、疎水化タラゼラチンを粒子化し、薬剤（磁性ナノ材料、抗がん剤）と複合化することにより残存がんの体内局所的殺傷を可能にする生体材料を開発し、ブタ大腸組織に対する接着性試験およびマウス担がんモデルを用いたがん殺傷効果について検証した。

【方法】疎水基として炭素数 10 個のデシル基を導入したデシル基導入タラゼラチン（C10-ApGltn）を合成した。得られた C10-ApGltn の水溶液にエタノールを添加することでコアセルベーション溶液を調製し、凍結乾燥・熱架橋を行うことで組織接着性粒子を得た。調製した組織接着性粒子と薬剤を物理的に混合した複合粉体を調製し、生理食塩水で水和させることにより薬剤が内包されたコロイドゲルを調製した。薬剤には、磁性酸化鉄ナノ粒子を用いた。また、得られたコロイドゲルの大腸粘膜下層剥離組織に対する接着性を評価した。また、組織接着性粒子／磁性ナノ粒子コロイドゲルの *in vivo* 磁場印加発熱によるがん殺傷効果をヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。

【結果】組織接着性粒子（疎水化粒子）および磁性酸化鉄ナノ粒子（磁性ナノ粒子）の複合粉体を用いてブタ胃粘膜下組織に対する接着強度を測定した結果、疎水化粒子単独と磁性ナノ粒子含有疎水化粒子では組織間に粘着性の接着層（コロイドゲル層）が形成され高い接着強度が得られたが、未修飾粒子と磁性ナノ粒子含有未修飾粒子では接着層は形成されず接着性はほとんど認められなかった。さらに、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子は、磁性ナノ粒子の混合割合が高くなるにつれて組織接着強度も増加した。得られた磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体の *in vivo* での大腸がん細胞に対するがん殺傷効果は、ヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。交流磁場印加後、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子コロイドゲルを埋め込んだ部分の色がサーモグラフィ画像で緑から赤に変化したことから、磁性ナノ粒子が適用部位で局所的に発熱していることが明らかとなった。担がんモデルに対し磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体を用いて交流磁場を印加した群は、適用後においてがん体積の増加抑制効果が認められたことから、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体と交流磁場を用いた局所発熱効果により、*in vivo* でがん組織を効果的に死滅できることが明らかとなった。

本研究の概念図



64. 薬剤の体内局所徐放を可能にする組織接着性粒子の開発

田口　哲志

物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター バイオポリマーグループ

Key words：組織接着性粒子，局所治療，ゼラチン，疎水化，がん

緒　言

早期消化管がん治療に用いられる内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は、食道、胃、大腸などの消化管の粘膜層に生じた早期消化管がんを内視鏡によって除去する手技であり、我が国が世界をリードしている。ESD は低侵襲で効果的に早期がんを除去できる長所があるものの、がん除去部（粘膜下層剥離部）の治癒制御技術と残存がんの局所治療技術が十分に確立されていないため、狭窄や穿孔等の偶発症、あるいはがんの再発が一定の頻度で生じる。そのため、がん除去後の炎症部位を局所的に接着・被覆して治癒を促進すると共に、薬剤の局所的な徐放や発熱により残存がんを殺傷する材料の開発が求められている。現在、ESD 後のがん除去部は、処置を施すことなく終了することが標準治療であり、狭窄や穿孔が予想される場合、クリップによる閉鎖やステロイド局注に加え、表 1 に示す「シート状」あるいは「粉末状」材料が使用される。これらは一定の効果を有するが、デリバリー性、がん除去部への局所的接着・被覆効果に加え、治癒促進効果および残存がんの局所的殺傷効果が十分ではないという課題がある。

本課題では、組織接着性粒子と薬剤（磁性ナノ材料、抗がん剤）を複合化した生体材料をがん除去後の炎症部位に噴霧することにより、接着・被覆等の物理的機能と薬剤や熱によるがん細胞殺傷等の生物化学的機能を 1 回の噴霧で達成する生体材料の開発を行った（図 1）。得られた生体材料の物理化学的評価および消化管組織に対する接着性・穿孔閉鎖効果の評価に加え、細胞培養による生物学的機能評価およびラット担がんモデルを用いたがん組織殺傷効果について評価した［1］。

表 1. 内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後のがん除去部に使用する被覆材料と特徴

性状	シート状（貼付型）		粉末状（噴霧型）	
被覆材料	ﾎﾟﾘｸﾞﾘｺｰﾙ酸	コラーゲン	アルギン酸 粉末（止血材）	**本研究の 組織接着性粒子**
デリバリー性	×低い	×低い	○高い	**○高い**
処置時間	2～3 時間以上	2～3 時間以上	10 分以内	**10 分以内**
接着・被覆効果	×低い （ﾌｨﾌﾞﾘﾝ糊で固定）	×低い （ｸﾘｯﾌﾟで固定）	×低い	**○高い （組織接着性有）**
がん殺傷効果 （薬剤・温熱）	×なし	×なし	×なし	**○あり （治癒促進・がん殺傷）**
狭窄・穿孔抑制能	×低い （分解に伴う炎症）	○高い	×低い	**○高い**

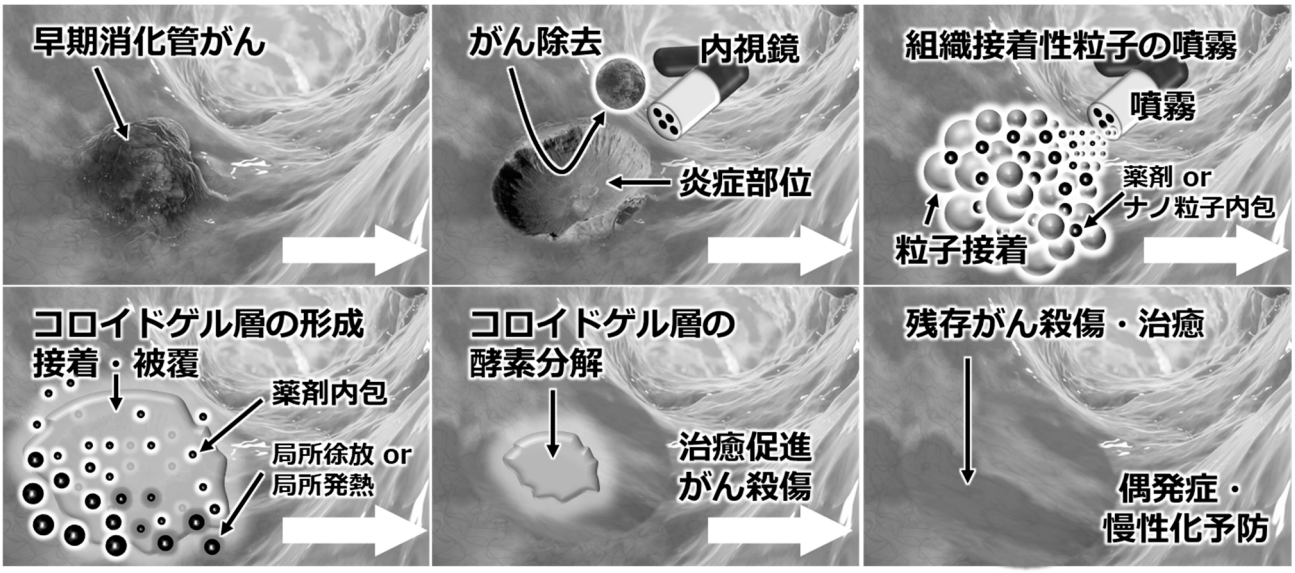


図 1. 本研究の概念図

疎水化タラゼラチンから構成される組織接着性粒子と薬剤（磁性ナノ材料、抗がん剤）との複合化により残存がん組織を局所的に殺傷することができることを実証した。

方　法

1. 疎水化タラゼラチンの合成とキャラクタリゼーション

スケソウダラ由来ゼラチン(ApGltn)中のアミノ基をデカナールで修飾した疎水化タラゼラチン(C10-ApGltn)を合成した［2］。水 - エタノール混合溶媒中でデカナールを中のアミノ基と反応させた後、得られるシッフ塩を 2-ピコリンボランにより還元して合成した。デカナールの仕込み濃度を ApGltn のアミノ基に対し 200 mol%として C10-ApGltn を合成した。得られた C10-ApGltn の核磁気共鳴装置（^{1}H-NMR、^{13}C-NMR)、フーリエ変換赤外吸収スペクトル（FT-IR）および残存アミノ基の定量によりキャラクタリゼーションを行った。

2. 組織接着性粒子の調製

C10-ApGltn を超純水に溶解し、50℃で攪拌しながら 5 w/v%の ApGltn 溶液を得た。ApGltn の貧溶媒であるエタノールを C10-ApGltn 溶液に注意深く滴下し、混合物中にコアセルベートを形成させた。得られたコアセルベートを凍結乾燥後、減圧して熱架橋し疎水化粒子を得た［3, 4］。同様の手技により、未修飾粒子も調製した。

3. 磁性ナノ粒子の調製

無水 $FeCl_2$ と無水 $FeCl_3$ を超純水に溶解した溶液を、窒素気流下、1,200 rpm で攪拌しながら、フラスコ中の 1.8 M NaOH 溶液に注意深く滴下し、黒色の磁性ナノ粒子沈殿物を生成させた。超音波処理、pH 調整および超純水での洗浄後、真空乾燥して磁性ナノ粒子黒色粉末を得た。得られた磁性ナノ粒子は、高分解能透過型電子顕微鏡（HRTEM ; JEM2100F、JEOL)、透過型電子顕微鏡（TEM ; JEM-ARM200F、JEOL）で評価した。

4. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の組織接着強度測定

新鮮ブタ摘出胃の粘膜を外科用はさみで切除して粘膜下組織を露出させた。得られた胃組織を正方形（2.5 cm ×2.5 cm）に成型し、粘膜剥離層を露出させて接着強度試験片とした。次に、磁性ナノ粒子含有量の異なる組織接着性粒子／磁性ナノ粒子混合粉末を 2 枚の試験片に散布し、圧着後、プローブを 10 mm／分の速度で持ち上げて測定した［5］。

5. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の磁場印加発熱によるがん殺傷効果の評価

組織接着性粒子／磁性ナノ粒子コロイドゲルの *in vivo* 磁場印加発熱によるがん殺傷効果をヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。担がんマウスモデルは、PBS 中で培養した KM12-Luc 細胞を 2.5×10^6 cells/0.1 mL となるようにヌードマウスの背部皮下組織に注射した。細胞注入後、がんの大きさが 100 mm^3 を超えるまで測定した。がんの体積は $ab^2/2$（a はがんの長さ、b はがんの幅）で算出した。がん体積が約 100 mm^3に達した後、マウスをコントロール（未処置）群と疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体＋磁場印加移植群の 2 群に分類した。両群とも、麻酔後、がんと腹部組織の間に移植用の皮下スペースを作製した。組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体は、最初の 3 日間は毎日、4 日目からは 2 日に 1 回、130 G と 373.35 kHz の磁場印加にマウスを曝露し、皮膚表面の温度はサーモグラフィでモニターした。磁場印加負荷と IVIS 観察を 12 日間繰り返した。がんの長さが 20 mm に達した時点で、人道的エンドポイントとしてマウスを犠牲死させ、生存率を算出した。

結果および考察

1. 組織接着性粒子および磁性ナノ粒子の調製

組織接着性粒子は、コアセルベート形成、凍結乾燥、熱架橋により調製した。SEM 観察の結果から、未修飾粒子および疎水化粒子はともに球状粒子であり（図 2a、b）、平均粒子径はそれぞれ 3.5 μm と 2.3 μm であった。また、調製した磁性ナノ粒子は、HRTEM 観察結果から円形または正方形の粒子（図 2c）であり、（400）格子面に対応する 2.14Åの高度に整列した格子（図 2d）が確認された。サイズ分布の分析から、直径 11.4±2.4 nm のナノ粒子が形成されていることが明らかになった。また、元素分析の結果より、ナノ粒子は酸素原子と鉄原子から構成されていることが確認され、純粋な酸化鉄ナノ粒子が形成されていることが明らかとなった。さらに、X 線回折による結果から酸化鉄の特異的な回折ピークが確認され、格子距離の測定値は報告データ（JCPDS 00-019-0629）に近いことから、酸化鉄ナノ粒子が得られていることが明らかとなった。

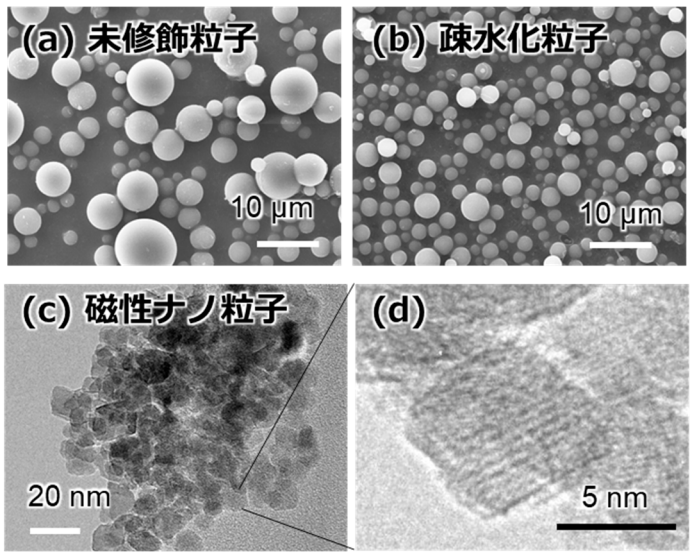


図 2. 未修飾粒子、疎水化粒子、磁性ナノ粒子の形状観察

a) 未修飾粒子の電子顕微鏡像（スケールバー：10 μm）。

b) 疎水化粒子の電子顕微鏡像（スケールバー：10 μm）。

c) 磁性ナノ粒子の透過型電子顕微鏡像（スケールバー：20 nm）。

d) 磁性ナノ粒子の透過型電子顕微鏡拡大像（スケールバー：5 nm）。

2. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の組織接着強度

ブタ胃粘膜下組織間に疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体または疎水化粒子単独粉末を塗布して得られるコロイドゲルの組織接着強度を測定した（図 3a）。疎水化粒子単独と疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体では組織間に粘着性の接着層（コロイドゲル層）が形成されたが、未修飾粒子／磁性ナノ粒子複合粉体では接着層は形成されなかった。図 3b に示すように、疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の組織接着強度は、未修飾粒／磁性ナノ粒子複合粉体の組織接着強度よりも高かった。疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の接着強度が向上したのは、疎水化粒子間および胃粘膜下組織と疎水化粒子との間に疎水性相互作用が形成されたためであると考えられた。さらに、疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体は、磁性ナノ粒子の混合割合が高くなるにつれて組織接着強度も増加した。これらの結果は、磁性ナノ粒子がナノフィラーとして作用し C10-ApGltn 分子と磁性ナノ粒子間で配位結合が形成されていることが示唆された。

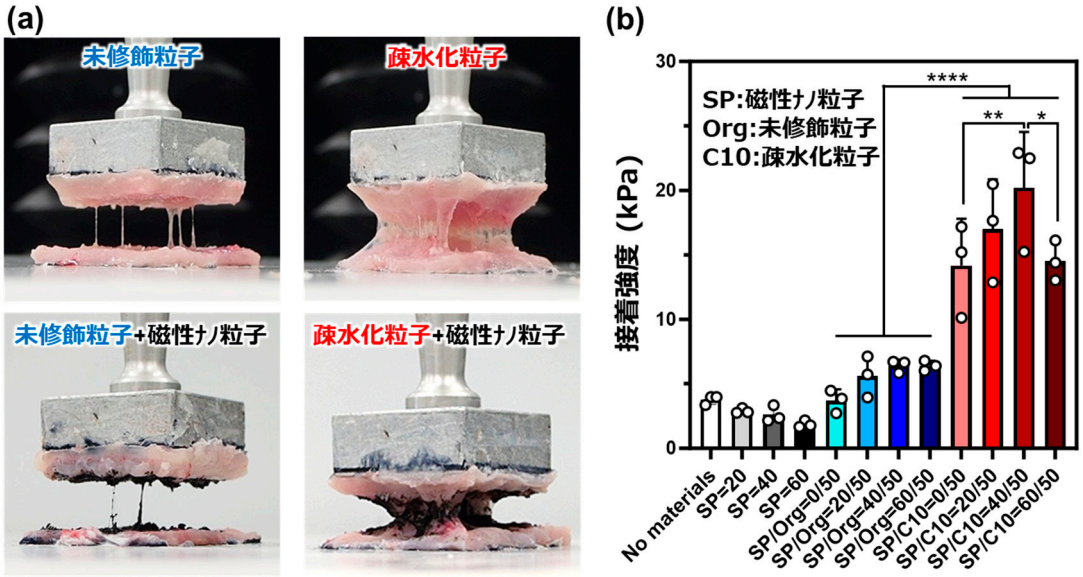


図 3. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の組織接着強度

a） 接着強度測定中のコロイドゲル層とブタ胃組織の画像。

b） 磁性ナノ粒子／未修飾粒子 or 疎水化粒子コロイドゲルの最大接着強度の比較。n＝3；*p＜0.05、**p＜0.01、****p＜0.0001（Tukey 多重比較検定）。

3. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の磁場印加発熱によるがん殺傷効果の評価

疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の *in vivo* での大腸がん細胞に対するがん殺傷効果は、ヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。交流磁場印加後、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子コロイドゲルを埋め込んだマウスの皮膚表面温度は 300 秒以内に 31℃から 43℃に上昇し、その後 600 秒（10 分）まで 43.5℃を維持した（図 4a）。疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体と交流磁場で処理した KM12-Luc がん細胞の切除は、がん細胞の発光を測定することでモニターした（図 4b）。疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体を適用した直後は、対照群と疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体と交流磁場を併用した群で測定した発光強度に差は認められなかった。6 日目と 12 日目には、交流磁場を印加した疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の発光強度は増加しなかったが、対照群の発光強度は高度に増加した。交流磁場を印加した疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体群で測定された平均がん体積は、12 日目に 267±199 mm^3であったのに対し、対照群で測定されたがん体積は 12 日目に 1,656±462 mm^3に達した（図 4c）。注目すべきは、交流磁場を印加した疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体群では、5 匹中 3 匹のマウスのがん体積が実験期間を通じて低かったことである。これは、磁疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体と交流磁場を用いた発熱効果により、がん細胞の増殖が効果的に抑制されたことを示している。両群の

マウスの体重は、実験中に急激に減少しなかったことから、疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体は組織に対して重篤な毒性を示さないことが明らかとなった。また、16 日目の生存率は、対照群と交流磁場印加磁性ナノ粒子含有疎水化粒子群との間で有意差があった。対照群では全マウスが死亡したのに対し、疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体群では 80%のマウスが生存していた。これらの結果から、疎水化粒子／磁性ナノ粒子複合粉体と交流磁場を用いた局所発熱効果により、*in vivo* でがん組織を効果的に死滅できることが明らかとなった。

一方、磁性ナノ粒子に代わり抗がん剤としてパクリタキセルを用い、疎水化粒子／パクリタキセル複合粉体を用いた局所がん殺傷効果についても検討した（未発表）。組織接着性試験において、疎水化粒子／パクリタキセル複合粉体は未修飾粒子／パクリタキセル複合粉体と比較して有意に高い接着強度を示すことが明らかとなった。また、*in vitro* の評価において、疎水化粒子／パクリタキセル複合粉体の水和により形成されるコロイドゲルは、18 日以上に渡りパクリタキセルを徐放できることが明らかとなった。さらに、ヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いた抗がん効果の評価において、がんの増殖を効果的に抑制できることが明らかとなった。

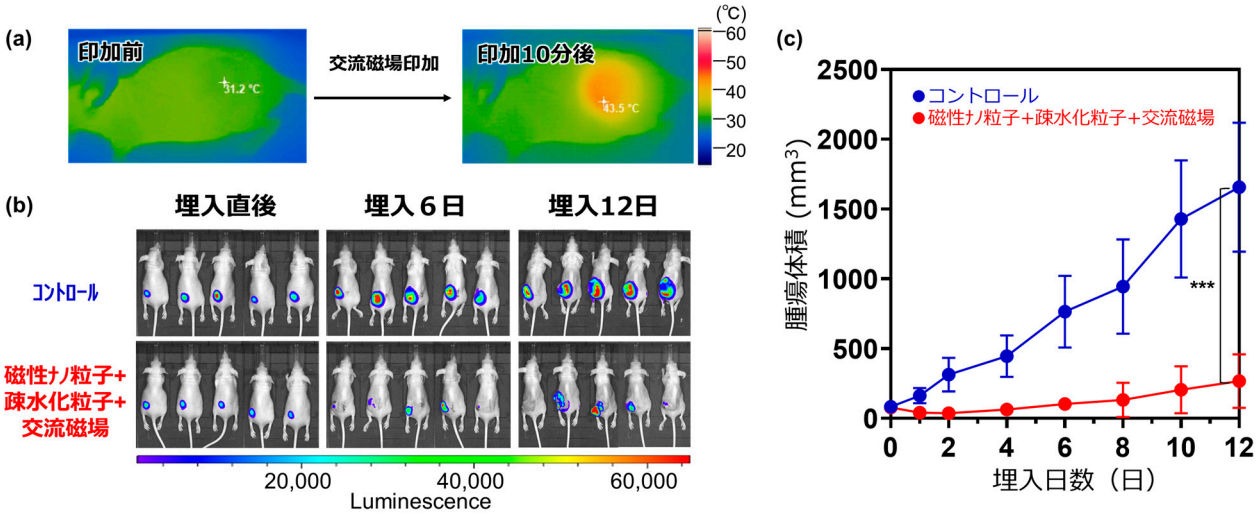


図 4. 組織接着性粒子／磁性ナノ粒子複合粉体の磁場印加発熱によるがん殺傷効果の評価

a) 交流磁場を 600 秒間印加する前後のマウス背部のサーモグラフィ画像。

b) 担がんマウスの磁場印加開始直後、6、12 日後の IVIS 発光画像。

c) 磁場印加直後、6、12 日後の担がんマウスのがん平均サイズ。$n=5$；$^{***}p<0.001$（両側スチューデント t 検定）。

文　献

1) Ito S, Nagasaka K, Komatsu H, Mamiya H, Takeguchi M, Nishiguchi A, Taguchi T. Sprayable tissue adhesive microparticle-magnetic nanoparticle composites for local cancer hyperthermia. Biomater Adv. 2024;156: 213707. PMID: 38043335 DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213707

2) Komatsu H, Watanabe S, Ito S, Nagasaka K, Nishiguchi A, Taguchi T. Improved swelling property of tissue adhesive hydrogels based on alpha-cyclodextrin/decyl group-modified Alaska pollock gelatin inclusion complexes. Macromol Biosci. 2023;23(7): 2300097. PMID: 37102468 DOI: 10.1002/mabi.202300097

3) Ito S, Nagasaka K, Komatsu H, Palai D, Nishiguchi A, Taguchi T. Improved hydration property of tissue adhesive/hemostatic microparticle based on hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin. Biomater Adv. 2024;159: 213834. PMID: 38518390 DOI: 10.1016/j.bioadv.2024.21383

4) Ito S, Nishiguchi A, Ichimaru H, Nagasaka K, Hirade H, Taguchi T. Prevention of postoperative adhesion with a colloidal gel based on decyl group-modified Alaska pollock gelatin microparticles. Acta Biomaterialia. 2022;149:139-49. PMID: 35697199 DOI: 10.1016/j.actbio.2022.06.014.
5) Ito S, Nishiguchi A, Taguchi T. Effect of particle size on the tissue adhesion and particle floatation of a colloidal wound dressing for endoscopic treatments. Acta Biomaterialia. 2023;159:83-94. PMID: 36706853 DOI: 10.1016/j.actbio.2023.01.041