

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591824

研究課題名(和文) 抗癌剤を組み込んだ溶解型ゼラチンマイクロスクエアの抗癌剤徐放性の基礎的研究

研究課題名(英文) Synthesis of 24-hour-soluble gelatin sponge particles and their effect on liver necrosis following hepatic artery embolization.

研究代表者

佐藤 守男 (Sato, Morio)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50154109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常豚を用いた基礎実験で、低エンドトキシン性ゼラチン(RMG)にシスプラチンを含有させると、溶解とともに抗癌剤が溶出されることが判明している。今回200-500 μ m、500-1000 μ mのパウダー状の溶解型ゼラチンスポンジ(溶解型ゼラチンマイクロスクエア；RMP)を作製した。生食内での溶解時間は、120 $^{\circ}$ C熱架橋RMP200-500 μ mで159.2 \pm 12.4h、500-1000 μ mで168.8 \pm 15.9hであった。125 $^{\circ}$ C以上は不溶性であった。120 $^{\circ}$ C RMPを用いた豚肝動脈塞栓術では、肝辺縁に壊死、塞栓物質残存があり、より細径の粒子で壊死率が高く、より細径の動脈に塞栓物質が分布していた。

研究成果の概要(英文)：Soluble gelatin sponge particles formed from gelatin sheets adsorb cisplatin, the release of which was found to be proportional to the dissolving time of the particles in an in vitro study. These particles were also shown to function as cisplatin carriers in vivo. The particles prepared at 110-122 $^{\circ}$ C were soluble. The mean dissolution time of the particles increased with increasing temperature. Arteriography confirmed that recanalization was complete 24h after embolization. Pathologic tests 48h after embolization revealed coagulation necrosis but least damage to the biliary tract. The liver necrosis rate (mean \pm standard deviation) was significantly greater in the 200-500 μ m group than in the 500-1000 μ m group (9.89% \pm 4.04% vs 4.44% \pm 0.67%, respectively; P = .0027). A significantly greater proportion of arteries with a diameter of 100-200 μ m had residual particles in the 200-500 μ m group than in the 500-1000 μ m group (P < 0.002).

研究分野：IVR

キーワード：soluble gelatin TACE

1. 研究開始当初の背景

欧米では非溶解性のポリメチルメタクリル酸、ポリビニルアルコールビーズマイクロカプセルが作成されている。本邦では、肝細胞癌に対する動脈塞栓術の塞栓材料として2013年にマイクロスフェア(球状剤)が保険承認された。しかしながら、保険承認されたマイクロスフェアはいずれも、不溶性であり塞栓後、動脈枝の再開通の程度が低い。

我々はすでに低エンドトキシ性ゼラチン(RMゼラチン)を用い溶解型ゼラチンスポンジ製剤を開発し、基礎的、動物実験的検討を報告した。我々がこれまでに開発したゼラチンスポンジ製剤には、不溶性(市販のゼラチンスポンジ粒子と同様の不溶性のもの;止血用)、数日溶解型(数日で動脈枝が再開通するもの;肝細胞癌塞栓用)、半日溶解型(約12時間で動脈枝が再開通するもの;持続動注用、数時間溶解型(数時間で動脈枝が再開通するもの;持続動注用)がある。その作製方法、溶解時間、肝動脈塞栓後の再開通については、学術雑誌に報告してきた¹⁻²。

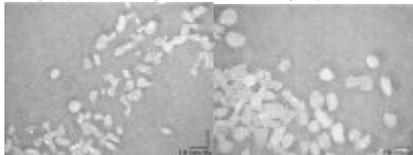


また、当院倫理委員会の許可を得てRMゼラチンスポンジ細片を用いた臨床研究も現在進行中である³。

また、このゼラチンはシスプラチンを等電機構で接合することで、ゼラチンの溶解とともにその徐放性の作用も確認されている⁴。

我々はRMゼラチンを用いて溶解性ゼラチン粒子(球状剤)(Soluble RM-gelatin microspheres); を作製した(Fig.1a,1b)。

200-500 μm (386.5 ± 96.5 μm) 500-1000 μm (706.0 ± 123.4 μm)



(a) (b)

(Fig.1) Soluble gelatin sponge particles at 45×magnification.

当初、シスプラチン以外の抗癌剤を組み込んだ溶解型ゼラチン粒子の徐放性の検討を行う目的であったが、この溶解型ゼラチン粒子にシスプラチン以外の抗癌剤を組み込むことを様々試みるも、現時点で困難であった。しかし、ゼラチン溶解とともに、シスプラチン徐放作用は確認されているため、溶解性ゼラチン粒子における溶

解時間を確認することが本研究においては急務となる。また、それを肝動脈塞栓術の臨床で応用する際には、その安全性が担保されなければならない。

2. 研究の目的

溶解性ゼラチン粒子(球状剤)の作成と溶解性ゼラチン粒子の溶解時間の確認及び豚肝動脈用いた溶解性ゼラチン粒子による肝動脈塞栓後の血管の再開通時間、安全性を基礎的に明らかにすること。

3. 研究の方法

< 検討項目と方法 >

(1) in vitro

溶解性ゼラチン粒子の熱架橋温度の違いによる生理食塩水内での溶解時間を測定する。

200-500 μm、500-1000 μmのRMパウダー(7%濃度、50kDa)をそれぞれ110 ~ 125 で24時間熱架橋したものを、生理食塩水を満たした試験管内にいれ37 恒温槽振盪下で溶解するまでの時間を測定した。

(2) in vivo

溶解性ゼラチン粒子による豚肝動脈塞栓で、血管撮影による血管再開通性、病理学的評価を行う。

生後3か月の正常豚8頭を、120 で熱架橋したRMパウダー(7%濃度、50kDa)の200-500 μm粒子径群4頭、500-1000 μm粒子群4頭に分ける。4Frコブラ型カテーテルで腹腔動脈造影後、マイクロカテーテル(Renegade high flow, Boston Scientific)を左右肝動脈に先進させそれぞれ完全に溶解性ゼラチン粒子で塞栓する。肝動脈の血管撮影を塞栓前、塞栓直後、1時間、2時間、3時間、24時間、48時間後に行い、血管再開通性の経時的評価を行う。2日後とさつし、肝臓を摘出し10%ホルマリン液で固定。肝標本を10mm厚にスライスしExcelソフトで断面の総面積と壊死面積を測定し、壊死率 = 壊死面積/総面積で近似的に算出して粒子径による壊死範囲の差を比較する。その後、HE染色標本作製し、壊死部と正常部組織で100倍率、30視野でそれぞれ肝動脈の総血管数、肝動脈内にゼラチン粒子が残存している血管数を計測。粒子残存率(%) = 粒子残存血管数/総血管数を算出し、残存粒子の分布の差を比較する。

4. 研究成果

< 結果 >

(1) in vitro

溶解性ゼラチン粒子(7%濃度、50kDa)の熱架橋温度と生食内での溶解時間の関係は、以前のシート状のRMGS(2%濃度、50kDa)より低い架橋温度で溶解が得られた(Table.1)。120熱架橋のRMパウダーは200-500 μm粒子径で159.2 ± 12.4時間、500-1000 μm粒子径で168.8 ± 15.9時間であった。Takasakaらのシート状のRMGS細片は生食内溶解時間が57.7 ± 9.8時間、249.0時間 ± 7.0時間のものは、血管撮影上

の肝動脈再開通時間はそれぞれ24時間、48時間であったとしている¹。120 熱架橋RMパウダーは24~48時間で肝動脈の再開通が得られると推測され動物実験に使用した。

Table 1. Dissolution times of gelatin sponge particles in saline

Temperature for cross-linking (°C)	Solubility time (h), mean ± SD		P value*
	200-500 μm GSP	500-1000 μm GSP	
110	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.52
115	3.9 ± 1.4	4.6 ± 1.6	0.53
118	99.8 ± 10.8	92.4 ± 12.6	0.52
120	159.2 ± 12.4	168.8 ± 15.9	0.47
122	264.5 ± 20.4	280.4 ± 18.3	0.41
125	Insoluble for 14 days	Insoluble for 14 days	-

SD = standard deviation, GSP = gelatin sponge particles. *Student's t test.

(2) in vivo

200-500 μm 粒子群 4 頭、500-1000 μm 粒子群 4 頭ともに24時間後の血管撮影で左右肝動脈の再開通が認められた (Fig.2a,2b)。

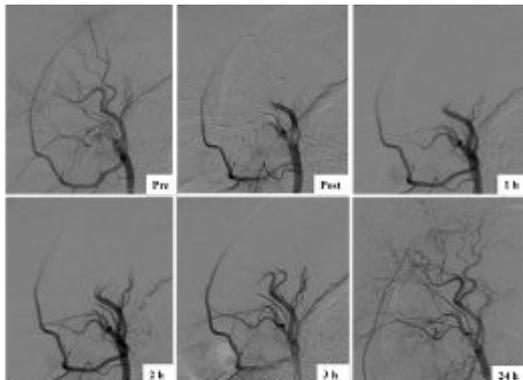
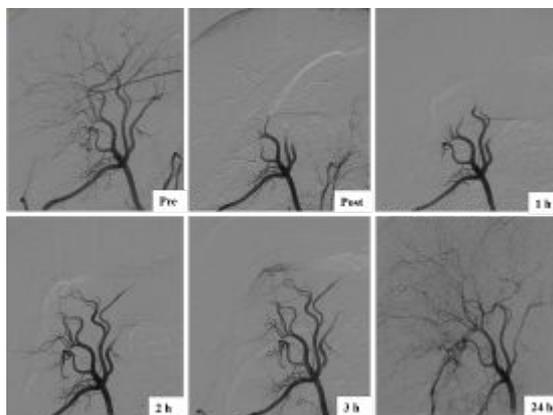
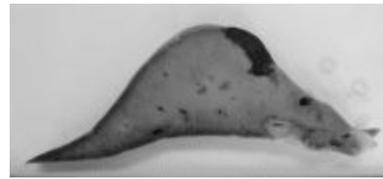


Fig. 2a



(Fig.2b) 200-500 μm (a) と 500-1000 μm (b) 粒子を用いた肝動脈塞栓の血管造影。8 頭とも24時間後に再開通がみられた。

肝標本の肉眼像では両群ともに肝末梢の辺縁に壊死と考えられる色調変化が見られた (Fig. 3)。



(Fig.3) 塞栓2日後のホルマリン固定後肝切離標本。肝辺縁に壊死と考えられる色調変化あり (arrow)。

肝壊死率は200-500 μm 群で平均 9.89 ± 4.04%、500-1000 μm 粒子群で平均 4.44 ± 0.67% で、200-500 μm 粒子群で高く有意差が見られた (p < 0.05) (Table.2)。

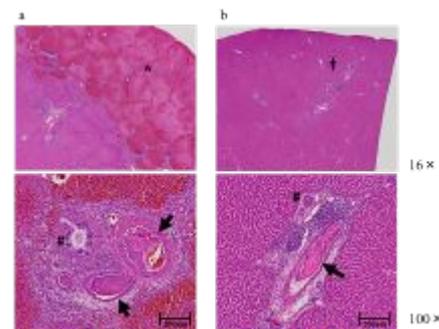
Table 2. Comparison of the area of coagulation necrosis as percentage of the whole liver area after hepatic artery embolization with 200-500 or 500-1000 μm soluble gelatin sponge particles

200-500 μm SGSPs		500-1000 μm SGSPs		P value
Pig number	Value	Pig number	Value	
1	7.62	1	4.19	0.0027*
2	10.8	2	3.68	
3	8.68	3	5.26	
4	7.36	4	4.62	
Mean ± SD	9.89 ± 4.04	Mean ± SD	4.44 ± 0.67	

SGSPs = soluble gelatin sponge particles, SD = standard deviation.

*Student's t test.

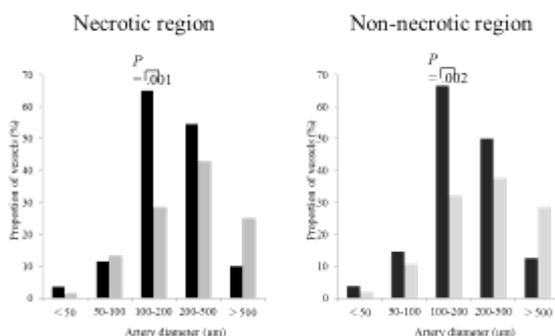
肝組織 HE 染色標本では両群ともに肝末梢に虚血壊死 (一部出血を伴う) がみられ、それぞれの壊死部、正常部ともに末梢門脈域の 100 ~ 500 μm の小中動脈、50 μm 以下の細動脈にも異物反応を伴う塞栓物質の残存がみられた (fig.4)。



(Fig.4) Micrograph of the liver specimen stained with hematoxylin and eosin.

(a) non-necrosis part at 16× magnification and at 80× magnification (†), (b) necrosis part at 16× magnification and at 80× magnification (#). coagulation necrosis (*), remaining embolic material in the hepatic artery (arrow)

肝動脈内の粒子の残存率は、壊死部、正常部ともに、200-500 μm 粒子群は100-200 μm 径の動脈で残存率が最も高く(残存率 65.1%、66.7%)、500-1000 μm 粒子群は200-500 μm 径の動脈で最も残存率が高かった(残存率 42.9%、37.5%)(Fig.5)。壊死部、正常部ともに100-200 μm 径の動脈での粒子残存率に有意差がみられた($p < 0.05$)。



(Fig.5) 壊死部と非壊死部における肝動脈径毎の塞栓物質の残存率(%)のグラフによる比較
* chi-square test

< 考察 >

我々は今回作製したRMゼラチンのパウダー製剤はシート状製剤より高濃度のゼラチンを用いたことで架橋が強まったと考えられ、以前と同等の熱架橋の温度では溶解しなかった。そこでより低い温度で熱架橋することで、シート状のRM製剤と同様に生理食塩水内での溶解時間をコントロール出来た。

in vivoの実験では120熱架橋の溶解性ゼラチン粒子は200-500 μm 、500-1000 μm の粒子共に血管撮影上は24時間で血管再開通が得られたが、塞栓2日後の病理標本では肝末梢に塞栓物質の残存がみられ、肝辺縁壊死が生じた。200-500 μm 粒子群のほうが500-1000 μm 粒子群より肝壊死率が高く、また、100-200 μm 径の動脈内では200-500 μm 粒子の残存率の方が高かったことより、細径の粒子がより末梢の血管に分布し、塞栓効果が高くなった可能性がある。Sonomura Tらは、犬の肝動脈塞栓ではあるが1-2mm非溶解性ゼラチン粒子で肝壊死が生じなかったと報告している⁵。また、Takasakaらも、溶解性ゼラチン粒子1-2mmの豚の肝動脈塞栓では肝壊死は生じなかったと報告している¹。溶解性、非溶解性のいずれでも粒子1-2mmでは肝組織に影響を及ぼさないが今回のstudyで1mm以下の溶解性ゼラチン粒子では塞栓後肝壊死をみた。溶解性といえども末梢の塞栓能力は1mm以下の溶解性ゼラチン粒子の阻血能力は高いと考えられた。

一方、今回の研究では胆管障害や胆嚢絵師の所見はみられなかった。非溶解性の1mm以下のbeadsを用いた臨床例では広範に塞栓した場合、胆管壊死や胆嚢壊死が報告されており、溶解性ゼラチン粒子を使用する場合の利点であると考えられる。

今回のstudyは豚を用いた実験であり、実際の臨床での結果は定かではない。粒子径が細かいものが肝細胞癌に対する抗腫瘍効果が高まる可能性はあるが、肝壊死や胆管障害といった合併症の増加の有無について今後臨床研究での検討が必要である。

今後の将来性と検討課題

RMGは、乾熱滅菌を施す温度、ゼラチンの分子量(kDa)に比例して、溶解時間は長くなり、架橋の強度は強くなる¹。このため、熱架橋温度を変えることにより、様々な溶解時間のゼラチン粒子が作成可能となった。このことから、虚血が危惧される組織出血への一時的塞栓が可能となるなど、さまざまな領域に応用可能となる。これと同時に、溶解性ゼラチン粒子に接合するシスプラチンの高い徐放性を示せば、drug delivery system(DDS)として、腫瘍の動注療法への活用も期待される。特に、シスプラチンは様々な癌の治療に広く使用されている白金製剤であり、その抗腫瘍効果は、濃度及び時間依存性である。したがって薬剤の徐放時間を延長させることでDDSとしてより効果的な抗癌剤になると考えられる。

今後、RMG開発企業と合議し、共同実験を重ね、溶解性ゼラチン粒子の臨床応用を行う予定である。

< 結語 >

我々は溶解性ゼラチン粒子(球状剤)(Soluble RM-gelatin particles)を開発し、シート状と同じように熱架橋温度により溶解時間をコントロールできた。

120溶解性ゼラチン粒子の中で、200-500 μm 粒子は500-1000 μm 粒子より胆管障害を伴うことなく塞栓効果が高まると考えられた。

(引用文献)

1. Takasaka I, Kawai N, Sato M et al. A new soluble gelatin sponge for transcatheter hepatic arterial embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33: 1198-1204.
2. Kanayama Y, Aoki C, Sakai Y. Development of low endotoxin gelatin for regenerative medicine. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 237-241.
3. Kawai N, Sato M, Minamiguchi H et al. Clinical evaluation of transcatheter arterial chemoembolization with 2-day-soluble gelatin sponge particles for hepatocellular carcinoma-comparison with insoluble gelatin sponge particles. *J Vasc Interv Radiol* 2013; 24: 1383-1390.
4. Ikoma A, Kawai N, Sato M et al. Evaluation of the role of cisplatin-conjugated-soluble gelatin sponge: feasibility study in a swine model. *Cardiovasc Interv Radiol* 2013; 36: 1097-1104.
5. Dependency of tissue necrosis on gelatin sponge particle size after canine hepatic

artery embolization. Sonomura T, Yamada R, Kishi K, Nishida N, Yang RJ, Sato M. Cardiovasc Intervent Radiol. 1997 Jan-Feb;20(1):50-3.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Sanda H, Kawai N, Sato M, Ikoma A, Nakai M, et al. Synthesis of 24-hour-soluble gelatin sponge particles and their effect on liver necrosis following hepatic artery embolization: Results of in vitro and in vivo studies. Hepatol Res. 2015 in press. (査読有)
2. Kawai N, Sato M, Minamiguchi H et al. Clinical evaluation of transcatheter arterial chemoembolization with 2-day-soluble gelatin sponge particles for hepatocellular carcinoma-comparison with insoluble gelatin sponge particles. J Vasc Interv Radiol 2013; 24: 1383-1390. (査読有)
3. Ikoma A, Kawai N, Sato M et al. Evaluation of the role of cisplatin-conjugated-soluble gelatin sponge: feasibility study in a swine model. Cardiovasc Interv Radiol 2013; 36: 1097-1104. (査読有)

(学会発表)(計 1 件)

三田裕記、河合信行、竹内比奈子ら。溶解型 RM パウダーによる肝動脈塞栓術の動物実験的検討 - 粒子サイズによる比較 - .日本 IVR 学会第 36 回中部・第 35 回関西合同地方会平成 26 年 2 月 1 日。愛知県がんセンター中央病院 国際医学交流センター

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 1 件)

名称: 架橋ゼラチン、塞栓剤および架橋ゼラチンの製造方法
発明者: 酒井康夫、金山徳孝、青木千鶴、高坂功、河合信行、佐藤守男
権利者: ゼライス株式会社
種類: A61K9/16

番号: 4422191

出願年月日: 平成 20 年 9 月 30 日

取得年月日: 平成 21 年 12 月 11 日

国内外の別: 米国

(その他)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守男 (Sato, Morio)

和歌山県立医科大学 医学部 教授

研究者番号: 50154109

(2) 研究分担者

河合 信行 (Kawai, Nobuyuki)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号: 90405423

生駒 顕 (Ikoma, Akira)

和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号: 60458065

園村 哲朗 (Sonomura, Testuo)

和歌山県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号: 60264892

南口 博紀 (Minamiguchi, Hiroki)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号: 90364091

中井 資貴 (Nakai, Motoki)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号: 30464671

(3) 連携研究者

()

研究者番号: