

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年04月22日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791440

研究課題名（和文）溶解型ゼラチンスポンジの抗癌剤キャリアとしての有用性の検討

研究課題名（英文）Evaluation of the Role of Cisplatin-conjugated-soluble Gelatin Sponge: Feasibility Study in a Swine Model.

研究代表者

生駒 顕 (Akira Ikoma)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60458065

研究成果の概要（和文）：溶解型ゼラチンスポンジ（RMG）をシスプラチンキャリアーとして使用し、その徐放性及び安全性を確認する基礎的実験を行った。正常豚15頭をTAI（動注療法）群、Transient TACE(120)群、Transient TACE(360)群の各5頭に分配。全身麻酔下に、左肝動脈より、TAI群はシスプラチン；IAC(アイエーコール®)0.80mg/kgを10分間持続動注、Transient TACE(120)群、Transient TACE(360)群は、それぞれRMG-シスプラチン混合液を左肝動脈より10分かけて持続動注した。その後、左肝静脈より総白金濃度、蛋白非結合型白金濃度を測定し、時間濃度曲線を求め、ACU値の比較を行った。24時間後に肝臓を摘出し、肝組織障害体積率を測定した。

RMGが溶解（再開通）するとともに抗癌剤が溶出され、in vivoでもRMGの徐放性が確認できた。約120分、360分で溶解するRMG、いずれの動注においても、24時間後には少ないながらも、有意差をもって組織障害が認められた。

研究成果の概要（英文）：PURPOSE: To evaluate the safety and the delivery function of cisplatin-conjugated-soluble gelatin sponge in a swine model. METHODS: Fifteen healthy young swine were assigned into three groups: transarterial cisplatin infusion group, transarterial chemoembolization (TACE) with cisplatin-conjugated 120-min soluble gelatin sponge (TACE-120) group, and TACE with cisplatin-conjugated 360-min soluble gelatin sponge (TACE-360) group. A total volume of 0.8 mL/kg cisplatin in each group and 8 mg/kg soluble gelatin sponge in TACE-120 and TACE-360 groups were injected from the left hepatic artery in small increments for 10 min. Common hepatic angiography and whole-blood sampling via the left hepatic vein were conducted to explore recanalization immediately after the procedure and again at 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, and 420 min later. The area under the plasma concentration curve (AUC) of non-protein-bound platinum was compared among the three groups. Each liver was removed and cut into 10-cm-thick sections for calculating liver-damaged volume ratio. RESULTS: Sequential angiography depicted gradual recanalization of the occluded hepatic artery and total recanalization at 120 and 360 min after embolization in the TACE-120 and TACE-360 groups, respectively. Of the three groups, AUC(0-30), AUC(30-120), and AUC(120-420) were

significantly highest in the transarterial cisplatin infusion group ($p < 0.001$), the TACE-120 group ($p < 0.001$), and the TACE-360 group ($p < 0.001$), respectively. The liver-damaged volume ratio in the TACE-360 group was small (8.20 %) but significantly higher than that in the TACE-120 group (2.67 %, $p = 0.014$). CONCLUSION: Cisplatin-conjugated soluble gelatin sponge functions as a cisplatin carrier and is associated with tolerable liver damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1700000	510000	2210000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線科学

キーワード：抗癌剤、徐放性、RM-Gelatin、動注療法、IVR

1. 研究開始当初の背景

動注療法は1950年にKloppらにより初めて報告され、1953年にはSeldingerらが選択的抗癌剤動注療法を血管内にカテーテルを挿入して施行し、全身的副作用を生じさせない濃度で、腫瘍病巣に高濃度の薬剤を作用させる効果的な方法として紹介されている。また、1976年には、Goldsteinらは、腫瘍組織を低栄養、低酸素状態にすることで、多くの腹部腫瘍に対し、塞栓療法が効果的であることを報告している。

動注化学療法は現在、さまざまな方法で行われている。動脈内にカテーテルを留置し、1回で注入するsingle shot法があるが、single shot法では注入終了時にカテーテルを抜去するため、長時間の注入は困難である。このため、これまでに、動注の効果増強を目的とした様々な工夫が報告されている。例えば、注入した薬剤を腫瘍内に停滞させて作用させるバルーン閉塞下動注療法、転移性肝がんや多発肝細胞癌に対するリザーバーを留置して長時間持続注入する方法（リザーバー法）などがある。しかし、BOAIに関する有効性の報告はいまだ少なく、さらに、リザーバー法では不必要な時にも体内に異物であるポートを留置しなければならない。このような状況において、近年、薬剤の停滞性を企図したdrug delivery systemとしての薬剤担体を併用することで効果を増強しようとする試みがある。代表的な薬物担体として、マイクロスフェア、リピオドール、可溶性微細でんぷん粒 (degradable starch microspheres; DSM) などがある。マイクロスフェアは現在欧米にて使用されている球状塞栓物質である。さらに、肝腫瘍に対する

肝動脈塞栓術 (TACE) においては、抗癌剤を徐放する薬剤溶出ビーズ (Drug eluting bead: DEB) が実用化され、薬剤担体の役割を果たしている。しかし、実際は、注入後のビーズ内に残留する薬剤量やビーズ周囲組織の薬剤局所濃度、あるいは、その局所濃度が薬効上十分高いレベルに達しているか、など不明な点も多い。リピオドールを薬物担体として併用する方法も、肝細胞癌に対するTACEで一般的に用いられている。腫瘍因子からはTACEが適応となるが、肝機能に不安があるような症例には塞栓術を行わず、抗癌剤とリピオドールのエマルジョンのみの注入にとどめるといったtranscatheter arterial infusion (TAI) が行われることがある。ただし、TACEと比較して腫瘍壊死効果は低い。DSMは、転移性肝癌の経動脈的塞栓術 (transcatheter arterial chemoembolization; TACE) の際の塞栓物質として用いられており、この塞栓物質を用いたTACEは種々の転移性肝腫瘍に対して有効性が報告されている。DSMは、平均直径が45 μ mの球状粒子で、細動脈において塞栓を形成し、血流遮断効果があるが、血中アミラーゼにより分解されるため、15~30分で血流は再開し、組織障害も少なくすむと考えられているが、ごく短時間での再開通のため、抗癌剤の徐放効果には疑問が残る。また、治療効果や安全性、有用性についての報告は少なく、確立された治療法といえないのが実情である。

今回、我々は、動注療法において、さまざまな時間で溶解する溶解型のゼラチンスポンジを抗癌剤のキャリアーとして使用する

ことで、高い徐放性と安全性が証明できれば、抗癌剤治療における様々な分野で臨床応用が可能となり、動注療法における新たな選択肢の一つになるのではないかと考えた。

2007年、ゼライス社 (Central Research Institute, Jellice Co., Ltd) より JIS 規格で認可された低エンドトキシンの液体の可溶性ゼラチンが開発された。もともと再生医療用を目的としたもので、Regenerative medicine (RM) gelatin と命名されている。市販のゼラチンスポンジは液体のゼラチンを摂氏 155 度に加温し、滅菌とエンドトキシンの不活化を維持しているが、強固な熱架橋のため、不溶となる。我々は、ゼライス社と共同研究を行い、溶解型ゼラチンスポンジである RM-Gelatin® に着目し、摂氏温度を変えることで溶解時間が変化することを明らかにした。すなわち、熱架橋温度が 110 度から 135 度までの温度であれば溶解し、温度上昇とともに溶解時間は延長され、また、in vitro と in vivo では後者のほうが溶解時間は短くなった。この際、我々は in vivo で約 120 分、240 分、360 分、1440 分で溶解するゼラチンスポンジも作成した。

今回、我々は、約 120 分、約 360 分で溶解する RM gelatin をシスプラチンキャリアーとして使用し、正常豚を用いて動注療法を行い、シスプラチンの血行動態について、興味ある知見を得たので報告する。

2. 研究の目的

溶解型ゼラチンスポンジ (Regenerative medicine gelatin ;RM-Gelatin®) をシスプラチンキャリアーとして使用し、シスプラチン-RM-Gelatin® 混合液の動注療法での徐放性及び安全性を確認すること

3. 研究の方法

正常豚左肝動脈にシスプラチン (IA-call; Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo, Japan) の動注療法 (TAI 群)、約 120 分で溶解する

RM-Gelatin® シスプラチンの混合液の動注 (Transient-TACE120 群)、約 360 分で溶解する RM-Gelatin® シスプラチンの混合液の動注 (Transient-TACE360 群) を行い、肝静脈血中のシスプラチン濃度の動態を比較し、正常豚肝に及ぼす影響を肉眼的、組織学的に検討した。使用した豚 15 頭の平均体重は 59.5kg (54.0kg ~ 62.0kg) で、TAI 群 5 頭、Transient-TACE120 群 5 頭、Transient-TACE360 群 5 頭とする。前投薬として硫酸アトロピン 0.5ml、テラゾール^R (tiletamine HCL and zolazepam HCL) 1ml を豚に筋注し、5% isoflurane と酸素 2L/ml で全身麻酔下に手技を行った。まず、豚の右大腿動脈を剥離露出して 18G エラスター針を直視下に穿刺し、4Fr ロングシース (Super Sheath, Medikit, Tokyo, Japan) を留置した。次に 4Fr コブラ型カテーテル (Terumo, Tokyo, Japan) を腹腔動脈に留置し、腹腔動脈造影 (iopamidol (Iopamiron 370; Nihon Schering, Osaka, Japan)、4ml/sec、総量 15ml) を行い、2.2Fr マイクロカテーテル (Sirabe, Piolax, Yokohama, Japan) を 0.014 inch ガイドワイヤー (Target, Boston Scientific, USA) を使用して左肝動脈に挿入し、左肝動脈造影を行った (iopamidol (Iopamiron 370; Nihon Schering, Osaka, Japan)、1ml/sec、総量 6ml)。その後、肝静脈からの採血を行うため、左大腿静脈に 5Fr ロングシース (Terumo, Tokyo, Japan) を留置した。その後、5Fr コブラ型カテーテル (Terumo, Tokyo, Japan) を左肝静脈に留置し、左肝静脈に留置したカテーテルからは肝静脈血を採取できるようにした。RMゼラチンはシート状に形成されたゼラチンスポンジ (ゼライス社 (Central Research Institute, Jellice Co., Ltd) にて作成) を当院にて、50kDa の分子量の gelatin を 133°C 20 時間、135°C 20 時間の乾熱滅菌を施し、熱架橋

を施した。正常豚を用いた以前の我々の実験では、133°C20時間の乾熱滅菌を施したものは約120分にて溶解し、135°C20時間の乾熱滅菌を施したものは約360分にて溶解する。動注用のシスプラチン溶液は、IA-call(0.8mg/kg)を生理食塩水50mlに溶解して作成した。各々溶解時間の異なるそれぞれのRM-Gelatin[®] 8mg/kgを用意し、シスプラチンRMゼラチン混合液は、シスプラチン溶液(IA-call 0.8mg/kg)に約50°Cに温めた生理食塩水10mlと造影剤5mlを加える。これを、三方活栓を用いて5分間混和し、常温で約30分間放置する。ただし、今回の実験では、シスプラチン溶液はろ過せず、RM-Gelatin[®]-シスプラチン混合液として使用した。左肝動脈に挿入されたマイクロカテーテルより、TAI群は作成したシスプラチン溶液を10分間持続動注した。Transient TACE(120)群、Transient TACE(360)群は、RM-Gelatin[®]-シスプラチン混合液をそれぞれ10分かけて持続動注を行った。Transient TACE(120)群、Transient TACE(360)群は、豚肝動脈に逆流しないようにX線透視下で確認しながら施行し、術後の造影で左肝動脈の途絶を確認した。また、全例、全量動注を行ったが、動注終了前に血管が閉塞したり、また、バイタルが不安定になり、手技を中断した症例はなかった。その後、左肝静脈に挿入したカテーテルより、直後(動注終了時)、10分後、30分後、60分後、90分後、120分後、180分後、240分後、300分後、360分後、420分後に採血を行い、凍結乾燥され、原子吸光分析(atomic absorption spectroscopy)(NAC Co., Ltd., Tokyo, Japan)により、それぞれ総白金濃度、蛋白非結合型白金濃度を測定した。同時に各採血時に血管の再開通の有無についても血管造影を行い確認している。各抗癌剤の血中濃度より、AUC(Area under the blood concentration-time curve)を算出し、3群間

で比較検討した。AUCは台形法(trapezoidal rule)により算出した値を用いた。術後1日後に豚をと殺し、摘出肝を1cmごとに切離した。10%ホルマリン液で固定したあと、色調の変化を認めた領域に注目し、肝障害部位と推定した。各切断面での肝障害部位の大きさを検索し、全肝に対する組織障害単体積率を測定し、3群間で比較検討した。肝組織障害体積率の測定は、佐原らの報告と同様に、デジタルカメラで撮像された画像をコンピューターにuploadし、Lenaraf 200(Excel; Microsoft, Redmond, Washington)という測定ソフトを使用することで障害部位を曲線で囲み、その面積を算出した。組織障害体積率(%)は、組織障害体積/全肝体積×100で算出し、全肝体積は、Hepatic cross sectional area×Slice thickness×Slice number。組織障害体積は、Necrotic area×Slice thickness×Slice numberでそれぞれ算出した。その後、HE染色を行い、同部位の組織学的変化を観察した。

4. 研究成果

- Pharmacokinetics study-

3群の時間濃度曲では、TAI群はすみやかに血中濃度が低下し、約120分で血中濃度が低値となった。一方、TAI群はすみやかに血中濃度が低下し、約90分で血中濃度が低値となった。Transient-TACE 120群は、ゼラチンが溶解(120分で溶解)後も流出し、約180分まで測定可能であった。Transient-TACE 360群は、ゼラチンが溶解(360分で溶解)後も流出し、約420分で低値となった。

Transient-TACE 120群では、動注約30分後に再開通がみられ始めるが、AUC₀₋₃₀は、それぞれTAI群(2.70±0.25 µg/mL・min)、Transient-TACE 120群(1.83±0.33 µg/mL・min)、Transient-TACE 360群(1.27±0.24

µg/mL·min) となり、3 群間では有意差がみられた ($p < 0.01$)。また、Transient-TACE 360 群では、動注約 90 分後に再開通がみられ始めた。その間の AUC_{30-90} は、それぞれ TAI 群 (1.05 ± 0.18 µg/mL·min)、Transient-TACE 120 群 (1.59 ± 0.25 µg/mL·min)、Transient-TACE 360 群 (0.91 ± 0.22 µg/mL·min) であり、Transient-TACE 120 群が TAI 群より有意に高く ($p = 0.005$)、Transient-TACE 120 群が Transient-TACE 360 群より有意に高くなった ($p = 0.0019$)。TAI 群と Transient-TACE 360 群では有意差はなかった ($p = 0.30$)。動注約 90 分後以降での AUC_{90-420} では、それぞれ TAI 群 (0 ± 0 µg/mL·min)、Transient-TACE 120 群 (1.14 ± 0.43 µg/mL·min)、Transient-TACE 360 群 (3.05 ± 0.11 µg/mL·min) であり、3 群間では有意差がみられた ($p < 0.01$)。

- Macroscopic and pathological study -
TAI 群では組織障害は明らかではなかった。Transient-TACE 120 群の固定後標本では、肝辺縁優位に色調の変化がみられた。また、同部位を HE 染色にて観察したところ、肝細胞の壊死は明らかではなかったが、うっ血を伴った肝細胞の好酸性変性がみられた。Transient-TACE 360 群の固定後標本では、肝辺縁優位に色調の変化が目立ち、HE 染色では、うっ血像が Transient-TACE (120) と比較して強かった。また、ごく一部に核が脱落し壊死性変化を認めたが、観察しうるほとんどの領域で壊死は認められなかった。また、肝組織障害体積率は、Transient-TACE 360 群が Transient-TACE 120 群に比し有意に高値であった ($p = 0.014$)。

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 1 件)

1. Evaluation of the Role of Cisplatin-conjugated-soluble Gelatin

Sponge: Feasibility Study in a Swine Model. Ikoma A, Kawai N, Sato M, Minamiguchi H, Nakata K, Nakai M, Sanda H, Sonomura T, Kanayama Y, Sakai Y. Cardiovasc Intervent Radiol. 2013 Aug;36(4):1097-104. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. Evaluation of soluble gelatin sponge as a role of cisplatin-carrier: basic study in a swine model. M.Sato. SIR (SanFrancisco) (2012/3/27-3/30) .

2. 溶解型ゼラチンスポンジのシスプラチンキャリアーとしての有用性の検討.
生駒 顕. 日本 IVR 学会総会 (青森) (2011/5/20)

[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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生駒 顕 (Akira Ikoma)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60458065

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：