

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26420792

研究課題名（和文）マルチレイヤー型in situ架橋ハイドロゲルによる腹腔疾患治療法の開拓

研究課題名（英文）Development of new treatments of peritoneal disorders using multi-layered, in situ cross-linkable hydrogels

研究代表者

伊藤 大知 (Ito, Taichi)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・准教授

研究者番号：50447421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：腹腔鏡下手術の際に、腹腔内で注入と同時に迅速架橋するin situ架橋ハイドロゲルが、術後腹膜癒着防止材として期待されている。しかし腹膜側は組織接着性や止血性を、腹腔側は組織接着阻止性と、材料の裏表でトレードオフとなる機能を要求され、単一素材の開発と適用では性能向上の限界に達している。本研究では化学工学のシステムの発想に基づき、スプレー噴霧によって腹腔内で、複数のゲル化材料がマルチレイヤーに積層一体化したゲルを創傷部に迅速形成させ、各層が適切な機能を分担して発揮することにより、格段に性能が優れた癒着防止材を開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In situ crosslinkable hydrogels are potential to prevent peritoneal adhesions in laparoscopy. However, it is expected that resection side of the gels and peritoneum side of the gels have wound healing function and barrier function, respectively. This is usually a trade-off relationship in medical engineering. We hypothesized that several materials should be suitably assembled in order to break this trade-off based on chemical engineering. In fact, we formed double-layered hydrogels in situ on trauma by a spray device, and the double-layered gel showed better performance to prevent adhesions than single-layered hydrogels.

研究分野：医用化学工学

キーワード：ハイドロゲル スプレー バイオマテリアル 腹膜癒着 癒着防止 中皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

開腹手術に代わり、内視鏡の一種である腹腔鏡を用いた低侵襲な外科手術が、消化器外科や産婦人科等で急速に増加している。これに伴い、スプレーやダブルシリンジなどのアプリケーションを用いて噴霧する in situ 架橋ハイドロゲルが、癒着防止材として期待されている。

腹膜癒着とは、外科手術により形成された創傷面同士がフィブリンにより接着し、腹腔内臓器（肝臓、腸など）と腹膜が半永久的な接着をすることである。全外科手術の9割以上で起こり、腸のねじれによる食物通過障害による緊急手術、卵管のねじれによる不妊、再手術の出血増加などを惹起するため、性能の良い癒着防止材が切望されている。

一方で、手術の創傷面においては、癒着防止と同様に止血も重要である。止血材であるフィブリン糊を肝切モデルに癒着防止材として投与した際に、癒着を増悪化させる場合と、癒着を阻止する場合があることを明らかにしている。このため、次世代癒着防止材では、癒着防止のための組織接着阻止能と、止血のためのフィブリン糊の止血性や創傷部接着性という、相反する特性を両立させる必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、材料に相反する機能である組織接着性と組織非接着性（癒着防止性）を兼ね備えた、マルチレイヤー型 in situ ハイドロゲルを実現する。接着止血効果層（第1層）、癒着防止層（第2層）をスプレーワンショットで形成し、ゲルの腹膜側と腹腔側の性質を非対称に機能分担することにより、重症度の高いラット肝切癒着モデルの創傷部で癒着防止能を示す癒着防止材を世界に先駆けて開発する。

### 3. 研究の方法

癒着防止層としてはアルギン酸とCMC(Alg-CMC)の混合溶液をカルシウムイオンによりイオン架橋したゲルを用いた。接着止血層としてはアルギン酸とゼラチン(Alg-gelatin)の混合溶液をカルシウムイオンとトランスグルタミナーゼ(TG)でダブル架橋したものをを用いた。

スプレーで2層を積層するためには、ガスによる剪断によりできる液滴のサイズが層の均一性に影響するために、正確に評価しなければならない。ガス流速を3,5,7L/min、スプレー距離を5,10,20cmと変化させて液滴径を測定した。さらに操作条件を変えた時のスプレーによる細胞への障害をMTTアッセイとLive/Dead染色により評価した。

次にギャップ幅1mmで中皮細胞のスクラッチアッセイを行い、スプレーを細胞の層の上面から投与した時の細胞の再生速度を評価し、材料群で比較した。

さらにゲルの断面方向への細胞の浸潤挙

動を評価した。厚さ1.2mmのゲルを作製し、ゲルの上層に細胞を播種し、24時間後の細胞の分布を共焦点顕微鏡で観察した。

最後に、ラットの肝臓左葉をペアンで離断し癒着を惹起する動物モデルを用いて、癒着のGradeおよびExtentを、第1層のみ、第2層のみ、ダブルレイヤー（第1層+第2層）の間で比較して、癒着防止効果を評価した。

### 4. 研究成果

スプレーの液滴サイズとスプレー面積の

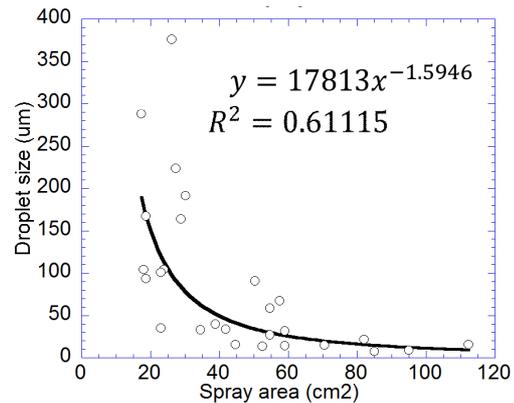


図1 液滴径とスプレー面積の関係

関係に整理し、本研究で用いたスプレーデバイスの場合は、液滴径は操作条件によって10~400μmの間で大きく変化し、液滴径が50μmより小さくなると、スプレー面積が60cm<sup>2</sup>以上まで広がることを示した。

さらにスプレー条件によって細胞に障害が起こるかを、中皮細胞株Met5Aと、線維芽細胞株NIH-3T3を用いて評価した。図2に示すように、3L/minではスプレー距離にかかわらず細胞に影響はないが、7L/minでスプレー距離を10cm以下にすると細胞の生存率に影響があることがわかった。

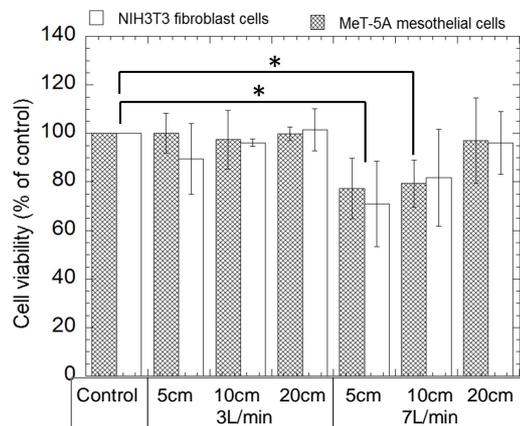


図2 スプレー条件と細胞生存率

さらにガスのみで 7L/min、5cm の距離でスプレーを行っても、細胞生存率の低下がみられなかったことから、細胞は液滴の着弾による物理的な衝撃によって障害を受けているものと考えられる。

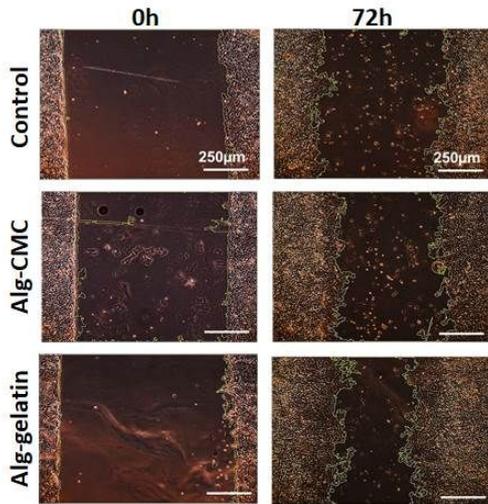


図3 Met5A のスクラッチアッセイの結果

次に図3に中皮細胞のスクラッチアッセイの結果を示す。ゼラチン含有アルギン酸ゲル (Alg-gelatin) は治癒速度が速いことが示唆されている。図4に定量化した結果を示す。回復面積で見ると有意差がみられなかったが、遊走している細胞の数で比較すると、CMC 含有アルギン酸ゲル(CMC-gelatin)より

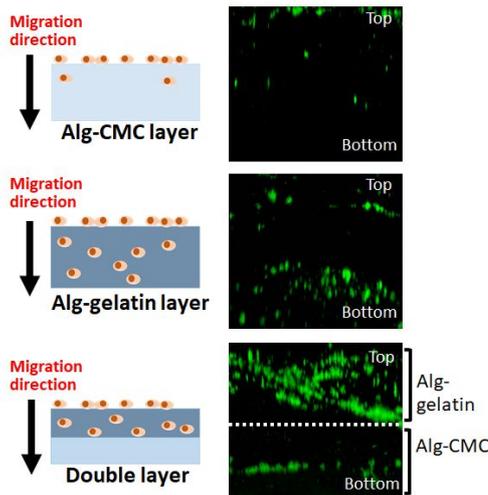


図5 細胞の浸潤アッセイの結果

も Alg-gelatin の方が、活発に細胞が遊走していることが有意差をもって示された。さらにトランスグルタミナーゼ (TG) はグルタミンとリジンを架橋するために、細胞毒性も懸

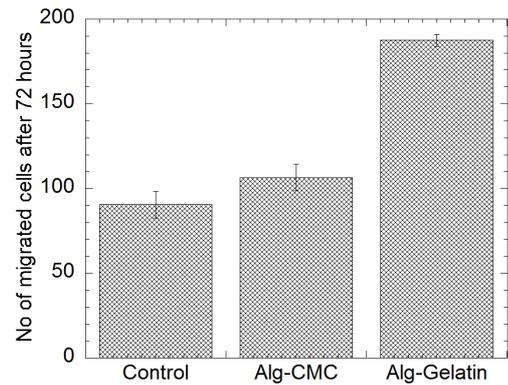
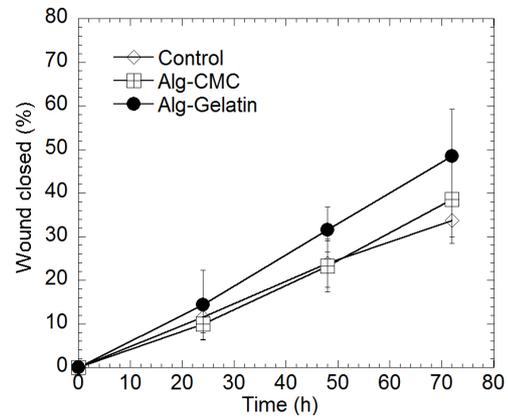


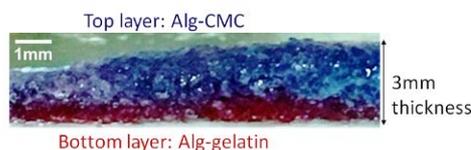
図4 スクラッチアッセイの結果 (上) 創傷治癒面積 (下)

念されたが、1wt%の添加量では毒性の発現は見られていない。これは酸素による失活が速やかに進むことも寄与していると考えられる。

さらに細胞の浸潤アッセイを行った。癒着防止効果を示すためにはバリアになっているゲルは線維芽細胞の浸潤を防止する必要がある。

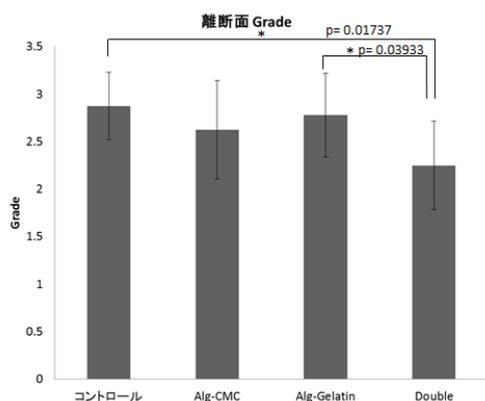
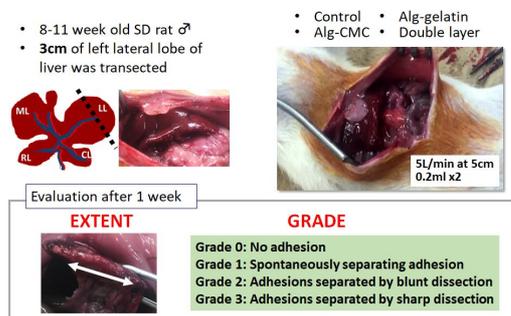
図5に結果を示す。Alg-CMC ゲルの場合、細胞はゲルの中に侵入できない。これはアルギン酸も CMC も細胞接着性をもたないためである。一方で Alg-gelatinゲルの場合は、ゼラチンが細胞接着配列を持ち、線維芽細胞が遊走・接着できるため、細胞はゲルの内部深くまで侵入する。24 時間後には 1.2mm のゲルを縦断し、底面まで到達している。一方で、Alg-CMC ゲルと Alg-gelatin ゲルを積層した場合が下段である。繊維芽細胞は上部 Alg-gelatin ゲル内部に浸潤した後、Alg-CMC ゲル内部は浸潤できず、細胞の浸潤が Alg-CMC ゲル層で阻止できることがわかる。

さらにスプレー操作条件の検討によりダブルレイヤー層の構築が可能になったために、両層を赤色素、青色色素で着色し、確かに 2 層構造のダブルレイヤーゲルが構築できることを確認した。

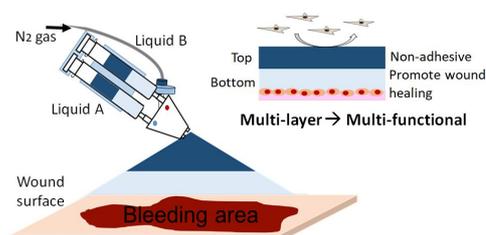


**図6 スプレーで作製した2層構造のダブルレイヤーゲル**

以上の検討をもって、ラット肝臓(左葉)切除癒着モデルに、本材料を適用した。図7に示すように、ラットの肝臓を部分切除し、そこに第1層のみをスプレー、第2層のみをスプレー、ダブルレイヤーでスプレーを行い、比較を行った。癒着 Grade ではダブルレイヤーゲルのみが、癒着防止効果を示し、第1層単独、あるいは第2層単独の群では、コントロール群に対して癒着防止効果を示さなかった。



**図7 ラット肝臓(左葉)部分切除モデル(上)と癒着グレードの各材料の比較(下)**



**図8 本研究で達成されたコンセプト**

以上から当初に構想した通り、図8のように、アルギン酸とCMCの混合癒着防止層と止血が期待されるゼラチン含有アルギン酸層のダブルレイヤーゲルが、双方の材料が相乗効果を発揮して、性能が向上した。

#### 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8件)

1. Seiichi Ohta, Syota Hiramoto, Yuki Amano, Mayu Sato, Yukimitsu Suzuki, Marie Shinohara, Shigenobu Emoto, Hironori Yamaguchi, Hironori Ishigami, Yasuyuki Sakai, Jyoji Kitayama, and Taichi Ito

“Production of cisplatin-incorporating hyaluronan nanogels via chelating ligand-metal coordination”

*Bioconjugate Chemistry*, 2016(27) 504-508  
DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00674

2. Tatsuto Kageyama, Tatsuya Osaki, Junko Enomoto, Dina Myasnikova, Tadashi Nittami, Takuro Hozumi, Taichi Ito, and Junji Fukuda

“In situ cross-linkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures”

*ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2016, 2(6) 1059-1066  
DOI:10.1021/acsbiomaterials.6b00203

3. Yoshiyuki Nakagawa, Yuki Amano, Satoshi Nakasako, Seiichi Ohta, Taichi Ito

“Biocompatible star block copolymer hydrogel cross-linked with calcium ions”

*ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2015(1) 914-918  
DOI:10.1021/acsbiomaterials.5b00249

4. Takuro Hozumi, Seiichi Ohta, Taichi Ito

“Analysis of calcium alginate gelation process using a Kenics static mixer”

*Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015(54) 2099-2107  
DOI:10.1021/ie5044693

5. Andy T.H. Wu, Teruo Aoki, Megumu Sakoda, Seiichi Ohta, Shigetoshi Ichimura, Taichi Ito,

Takashi Ushida, Katsuko S. Furukawa

“Enhancing osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by immobilizing inorganic polyphosphate onto hyaluronic acid hydrogel”

*Biomacromolecules*, 2015(16) 166-173  
DOI:10.1021/bm501356c

6. Yoshiyuki Nakagawa, Satoshi Nakasako, Seiichi Ohta, Taichi Ito

“A Biocompatible calcium salt of hyaluronic acid grafted with polyacrylic acid”

**Carbohydrate Polymers**, 2015(117) 43-53  
[DOI:10.1016/j.carbpol.2014.09.037](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.037)

7. Shigenobu Emoto, Hironori Yamaguchi, Takao Kamei, Hironori Ishigami, Takashi Suhara, Yukimitsu Suzuki, Taichi Ito, Joji Kitayama, Toshiaki Watanabe  
“Intraperitoneal administration of cisplatin via an in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogel for peritoneal dissemination of gastric cancer”

**Surgery Today**, 2014(44) 919-926  
[DOI:10.1007/s00595-013-0674-6](https://doi.org/10.1007/s00595-013-0674-6)

8. Atsushi Shimizu, Takashi Suhara, Taichi Ito, Kiyohiko Omichi, Katsutoshi Naruse, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo  
“A new hepatectomy-induced postoperative adhesion model in rats, and evaluation of the efficacy of anti-adhesion material”

**Surgery Today**, 2014(44) 314-323  
[DOI:10.1007/s00595-013-0530-8](https://doi.org/10.1007/s00595-013-0530-8)

〔学会発表〕(計 39 件)

1. Gelation Process of in Situ Crosslinkable Hydrogels in the Static Mixer Takuro Hozumi, Seiichi Ohta and Taichi Ito The 2016 AIChE (American Institute of Chemical Engineers) Annual Meeting, Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, the United States of America, November 13-18, 2016

2. A Proliferation Switch of Fibroblasts in Alginate Microcapsules By in Situ Conjugation of RGD Peptides Taichi Ito, Katsuhisa Kirita, Seiichi Ohta and Yasuyuki Sakai The 2016 AIChE Annual Meeting, Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, the United States of America, November 13-18, 2016

3. Analysis of the Gelation Mechanism of Star Block Copolymers Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Yuki Amano, Yoshiyuki Nakagawa, Seiichi Ohta, Taichi Ito Biomaterials International 2016, Howard Beach Resort, Kenting, Taiwan, October 30-November 3 2016 #1062

4. A Proliferation Switch of Fibroblasts in Alginate Microcapsules by in Situ Conjugation Taichi Ito, Katsuhisa Kirita, Seiichi Ohta and Yasuyuki Sakai Biomaterials International 2016, Howard Beach Resort, Kenting, Taiwan, October 30-November 3 2016 M105 #1061

5. Ion-responsive star copolymers and their biomedical applications The 2016 KICChE (Korean Institute of Chemical Engineers) Annual Meeting, Korea, Daejeon, Daejeon Convention Center, October 20, 2016

6. Totally Synthetic Hydrogels Cross-linked with Metallic Ions Yoshiyuki Nakagawa, Seiichi Ohta and Taichi Ito The 22nd Symposium of Young Asian Biological

Engineers' Community (YABEC2016), Miyazaki SEAGAIA Resort, Miyazaki, Japan, October 27-29 2016, PA-37

7. イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討 威蟠・天野 由貴・切田 勝久・太田 誠一・伊藤 大知 第 68 回日本生物工学会大会 富山国際会議場 富山 2016 年 9 月 28-30 日 1P-2p137

8. In-situ crosslinkable hydrogels for medical applications Taichi Ito SNU (CBE) -UT (Bioengineering) Workshop The university of Tokyo, Tokyo, Japan July 29 2016

9. Gelation Process of Calcium Alginate Hydrogel Using a Kenics Static Mixer Takuro Hozumi, Seiichi Ohta and Taichi Ito The 10th Conference of Aseanian Membrane Society(AMS10), Nara Kasugano International Forum IRAKA, July 26-29 2016, PO3-109

10. Hemostatic Effect of Hyaluronic Acid-Based In situ Crosslinkable Hydrogels Conjugated with Polyphosphate Megumu Sakoda, Pan Qi, Makoto Kaneko, Seiichi Ohta, Shigetoshi Ichimura, Yutaka Yatomi and Taichi Ito The 10th Conference of Aseanian Membrane Society(AMS10), Nara Kasugano International Forum IRAKA, July 26-29 2016, PO3-110

11. ポリリン酸修飾ヒアルロン酸 in situ 架橋ゲルの止血効果と生体適合性の検討 迫田 龍・威蟠・金子 誠・太田誠一・市村重俊・矢富 裕・伊藤 大知 2016 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー ホテルコンチネンタル府中 東京都府中市 2016 年 7 月 16-17 日 P-79

12. イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討 威蟠・天野 由貴・切田 勝久・太田 誠一・伊藤 大知 2016 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー ホテルコンチネンタル府中 東京都府中市 2016 年 7 月 16-17 日 P-35

13. 腹膜癒着防止のための in situ 架橋マルチレイヤーハイドロゲルのスプレー投与システム Zheng Ying Grace・太田 誠一・伊藤 誠一 2016 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー ホテルコンチネンタル府中 東京都府中市 2016 年 7 月 16-17 日 P-80

14. Ionically cross-linked star block copolymer gel with high biocompatibility, Yoshiyuki Nakagawa, Yuki Amano, Seiichi Ohta and Taichi Ito 10th World Biomaterials Congress (WBC 2016) The Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada May 17-22 2016 #330.5

15. In situ fabrication of multi-layered hydrogels using a spray atomizer Zheng Y.G., Ohta S. and Ito T. 化学工学会第 81 年会 関西大学 千里山キャンパス 大阪 2016 年 3 月 13-15 日 ZAP317

16. 細胞接着ペプチドの dynamic conjugation による繊維芽細胞機能制御 切田勝久・太田誠一・酒井康行・伊藤大知 化学工学会第 81 年会 関西

大学 千里山キャンパス 大阪 2016年3月13-15日 ZAP135

17. イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討 戚 蟠・天野 由貴・切田 勝久・太田 誠一・長谷川 潔・國土 典宏・伊藤 大知 東京大学医学部附属病院 先端医療シーズ開発フォーラム 東京大学 伊藤国際学術研究センター 東京 2016年2月2日 E-3

18. イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討 戚 蟠・天野由貴・切田勝久・太田誠一・伊藤大知 第53回日本人工臓器学会大会 東京ドームホテル 東京 2015年11月19-21日 YP4-5

19. In situ 架橋ゼラチン/ヒアルロン酸ハイドロゲルの架橋点構造制御 穂積卓朗・太田誠一・福田淳二・伊藤大知 第37回日本バイオマテリアル学会大会 京都テルサ 京都 2015年11月9-10日 2E-16

20. Development of in situ crosslinkable hydrogels for anti-adhesion barriers, hemostat, and drug delivery, Taichi Ito 30th Anniversary of Fall Meeting and International Symposium of KSBB Sondo Convensia, Incheon, Korea 2015年10月14日

21. 間葉系幹細胞封入ハイドロゲルを用いた腹膜癒着防止効果の検討 西山徹・戚 蟠・太田誠一・清水篤志・稲垣冬樹・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 化学工学会第47回秋季大会 北海道大学札幌キャンパス 北海道 2015年9月9-11日 F201

22. 生体内 in situ 架橋ハイドロゲルの開発と疾患治療への応用 伊藤大知 『2015年度第1回CACフォーラムセミナー』平成27年度第1回研究会 公益社団法人日本化学会化学会館 東京 2015年7月10日

23. 止血効果を有するポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルの開発 迫田 龍・戚 蟠・金子 誠・太田誠一・矢富 裕・伊藤大知 第15回東京大学生命科学シンポジウム 東京大学本郷キャンパス武田先端知ビル 東京 2015年6月27日 2P-035

24. Analysis of the gelation process of calcium alginate hydrogel using a kenics static mixer Takuro Hozumi, Seiichi Ohta, Taichi Ito Biomaterials International 2015, Kenting, Taiwan, 2015年6月1-5日 No. 1220

25. Synthesis of Hyaluronic Acid Grafted with Polyacrylic Acid and Formation of Its Biocompatible Calcium Salt Yoshiyuki Nakagawa, Seiichi Ohta, Taichi Ito Biomaterials International 2015, Kenting, Taiwan, 2015年6月1-5日 No. 1213

26. 外科用局所止血材のためのポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルの開発 迫田 龍・穂積卓朗・金子 誠・太田誠一・市村重俊・矢富 裕・伊藤大知 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨 2015年5月21-23日 P-012

27. ステロイド系抗炎症薬剤担持不織布の腹膜癒着防止効果の検討 戚 蟠・西山徹・清水篤志・

太田誠一・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 日本膜学会第37年会 早稲田大学 西早稲田キャンパス 東京 2015年5月14-15日 P-52S

28. マウス肝臓出血モデルを用いたポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルの止血効果の検討 迫田 龍・戚 蟠・金子 誠・太田誠一・市村重俊・矢富 裕・伊藤大知 日本膜学会第37年会 早稲田大学 西早稲田キャンパス 東京 2015年5月14-15日 1B-7

29. ゼラチンとヒアルロン酸からなる in situ 架橋ハイドロゲルの分解速度制御 穂積卓朗・太田誠一・福田淳二・伊藤大知 日本膜学会第37年会 早稲田大学 西早稲田キャンパス 東京 2015年5月14-15日 1B-5

30. 新規医用ハイドロゲルの開発と疾患治療への応用 伊藤大知 『次世代バイオ・医療技術研究会』平成26年度第1回研究会 東京大学生産技術研究所 東京 2015年3月23日

31. ラット肝切除モデルにおける間葉系幹細胞封入ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討 西山徹・戚 蟠・太田誠一・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 第14回 日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 神奈川 2015年3月19-21日 P-02-103

32. In situ 架橋ゼラチン/ヒアルロン酸ハイドロゲルの分解速度制御 穂積卓朗・太田誠一・福田淳二・伊藤大知 化学工学会第80年会 芝浦工業大学 豊洲キャンパス 東京 2015年3月19-21日 XA161

33. イオン架橋性スターポリマーの細胞取り込み機構の検討 中川慶之・太田誠一・伊藤大知 化学工学会第80年会 芝浦工業大学 豊洲キャンパス 東京 2015年3月19-21日 XA132

34. ポリリン酸修飾ヒアルロン酸 in situ 架橋ゲルの開発と止血効果の検討 迫田 龍・戚 蟠・清水篤志・金子誠・太田誠一・市村重俊・矢富裕・伊藤大知 化学工学会第80年会 芝浦工業大学 豊洲キャンパス 東京 2015年3月19-21日 XA122

(35-39は略)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 伊藤 大知 (ITO, Taichi) 東京大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号：50447421

(2)研究分担者 太田 誠一 (OHTA, Seiichi) 東京大学・大学院医学系研究科・助教 研究者番号：40723284

(3)連携研究者 北山 丈二 (KITAYAMA, Joji) 自治医科大学・附属病院・教授 研究者番号：20251308

(4)連携研究者 國土 典宏 (KOKUDO, Norihiro) 国立国際医療センター・理事長 研究者番号：00205361