

博士論文（要約）

内視鏡治療後潰瘍に対する
新規ハイドロゲルの創傷保護効果の検討

趙利奈

消化管上皮性腫瘍に対する内視鏡治療は世界中に広く普及してきた。特に内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic Submucosal Dissection: ESD)は本邦で開発された内視鏡治療法で根治性にすぐれ外科的手術と比較し低侵襲かつ同等の根治性を有する。そのためリンパ節転移の可能性が極めて低く、一括切除が見込まれる病変は ESD による治療が推奨されている。しかし ESD は出血や穿孔などの偶発症を伴う。特に遅発性穿孔が発生した場合は重篤な経過を辿る可能性があり、偶発症予防は喫緊の課題である。偶発症の予防のため様々な創部の保護法が検討されている。創部縫縮は後出血ならびに遅発性穿孔の予防効果が期待される方法であるが縫縮困難なケースも存在し、別の方法として創部の被覆法が開発されている。ポリグリコール酸 (Polyglycolic acid: PGA) シート+フィブリン糊併用法は創部被覆法として広く使用されている。その有効性を示唆する報告は多数あるものの、エビデンスは完全には確立されていない。またこの方法の大きな問題点として貼付の難度の高さが挙げられる。そのため再現性を持って完全かつ簡便に創部被覆ができるような方法が望まれており、ゲル製剤などの散布製剤の開発が進んでいる。しかし既報のゲル製剤は単剤のゲルであるため、ゲルの物性は制御できない。そのことにより潰瘍面への残存性に課題があると推察され、現状では完成形と言える散布製剤は存在しない。そこで我々は Sakai らの開発したハイドロゲルに着目した。ハイドロゲルは生体軟組織と類似の構造をしているためバイオマテリアルとしての応用が期待されているが、従来のハイドロゲルはそのゲル化時間やゲルの硬度などの物性をコントロールできないため実用化は困難であった。そこで Sakai らは世界で初めて物性制御可能なハイドロゲルを開発し、Tetra-PEG ゲルと名付けた。Tetra-PEG ゲルはゲル化時間やゲルの硬さを調整できるため、内視鏡治療後潰瘍底においても理想的に潰瘍底を被覆し、潰瘍保護効果に関して期待できると考えられた。Miura らは胃潰瘍モデルラットに Tetra-PEG ゲルを使用した検討で穿孔予防効果を示し、Tetra-PEG ゲルの潰瘍保護効果の可能性を報告した。しかし Tetra-PEG ゲルの潰瘍底への残存性に関してはゲル散布後 48 時間まで十分に確認できたものは無かった。そこでもし残存性をさらに向上させれば散布後より高い潰瘍保護効果を示すことができるのではないかと考えた。ここで私は Sakai らが新たに世界に発表した Oligo-Tetra-PEG ゲルに着目した。Oligo-Tetra-PEG ゲルは理論上 Tetra-PEG ゲルよりもさらに速いゲル化速度、高い粘稠性を特徴とする画期的なハイドロゲルである。その特徴から胃潰瘍底に散布した際の残存性が Tetra-PEG ゲルよりも高くなることを期待した。本研究では Oligo-Tetra-PEG ゲルを用いた、内視鏡治療後潰瘍に対する新規被覆剤の改良・開発を最終目標に設定した。まず最初にハイドロゲルの潰瘍保護機序の検討を行なった。Tetra-PEG ゲルが潰瘍保護効果の可能性を示すことができた要因としてハイドロゲルで潰瘍底を被覆することにより外的刺激から保護されていた可能性が示唆される。しかし胃内には食物などの物理的刺激の他にも胃酸による化学的刺激もあり、酸からの保護効果に関しても検討を追加することとした。シャーレ内に内部をくり抜いたシリコンシートを貼り付け、シリコンシート内部に pH 指示薬を混ぜたハイドロゲルを作成した。そしてシャーレ内を塩酸で満たしハイドロゲルの pH 変化をゲルの色の変化で認識した。その結果数分でハイドロゲルの一部は酸性化し始め、およそ 20-30 分でハイドロゲル全体が酸性化した。すなわちハイドロゲルにより胃潰瘍底は即

座の胃酸暴露からは保護されるものの酸の拡散により 20-30 分後には潰瘍底にも酸が到達すると考えられた。ハイドロゲルは酸暴露よりもむしろ食物などの直接的な物理的刺激から潰瘍底を保護していると考えられる。次に Tetra-PEG-ゲルと Oligo-Tetra-PEG ゲルの物性の差の検証実験を行なった。Oligo-Tetra-PEG ゲルの基本構造は Tetra-PEG ゲルと同一だが、接着性などの物性に advantage があると考えられている。そこで Tetra-PEG ゲルと Oligo-Tetra-PEG ゲルとの物性の差を検証し、また安全性に関して検討するため基礎実験を行うこととした。まずは Tetra-PEG ゲルと Oligo-Tetra-PEG ゲルの細胞障害性と組織障害性を検討した。

(細胞障害性の検討) RGM 1 細胞株を使用。セルカルチャーインサート内に細胞を培養し、上から①コントロール(培地)、②Tetra-PEG ゲル、③Oligo-Tetra-PEG ゲル、④Tetra-PEG ゲルの溶媒、⑤Oligo-Tetra-PEG ゲルの溶媒を充填した各モデル間で細胞活性を比較した。Cell counting kit-8 を用いて呈色、吸光度測定を行いゲル充填直後、6 時間後、24 時間後、48 時間後の cell viability assay を測定した。結果はどの時点においても Tetra-PEG ゲル、Oligo-Tetra-PEG ゲルともコントロールと比較し細胞活性の有意な低下は認めなかった。加えて 48 時間後の時点ではどちらのハイドロゲルもコントロールと比較し細胞活性の上昇を認めた。よってハイドロゲルは細胞障害性を有さないと考えられた。

(組織障害性の検討) ラット背部の皮膚を切除し 2×2cm の切開創を作成した。皮膚欠損部にハイドロゲルを散布し創部を被覆した。ラットはコントロール(被覆しない)群、Tetra-PEG ゲル 2%・4%、Oligo-Tetra-PEG ゲル 2%・4%で被覆する群に分類した。創完全閉鎖までの日数と創傷作成後 4 日、8 日、12 日、創傷完全閉鎖後に形成された肉芽組織を採取し HE 染色、ピクロシリウスレッド染色を行った。結果はハイドロゲルがあることで創傷初期は創部の収縮がやや遅延する傾向があったが最終的な創完全閉鎖までの日数には有意差を認めなかった。病理所見では創傷作成後の初期段階でコントロール群と比べハイドロゲル被覆群では血管新生が良好な傾向を認めた。またハイドロゲルによる明らかな炎症惹起はなく、ハイドロゲル周囲に細胞壊死の所見も認めなかった。そして創完全閉鎖後のサンプルでもコントロール群と比較しハイドロゲルによって再生を妨げる所見は認められなかった。よってハイドロゲルは組織障害性を有さないと考えられた。

次にラット胃潰瘍モデルを用いた Tetra-PEG ゲルと Oligo-Tetra-PEG ゲルの残存性評価と潰瘍保護効果の検討を行なった。胃潰瘍モデルラットを用い、残存性評価個体に関してはハイドロゲルの中に蛍光色素を混ぜておき蛍光イメージングシステムを用いてゲル投与後 48 時間での残存性を確認した。また Oligo-Tetra-PEG ゲルに関しては穿孔率のデータをとるため個体数を追加した。結果は Tetra-PEG ゲルを投与した 2 頭は潰瘍底に残存は認めなかったが、穿孔もしていなかった。一方 Oligo-Tetra-PEG ゲルでは残存評価を行なった 4 頭中 4 頭で潰瘍底に残存を認めたが 13 頭中 6 頭で穿孔を認めた。細胞障害性や組織障害性の検討から Oligo-Tetra-PEG ゲル自体の潰瘍への障害性に関しては否定的であると考えられた。今回のラットの実験系では胃が小さく潰瘍底に薄くゲルを散布することが不可能であった。残存したゲルは胃内に充満し潰瘍底を圧排していた。このことが大きく影響した可能性を考えるが、穿孔理由の検討はラッ

トの実験系ではこれ以上は困難であった。よってブタを用いた実験で潰瘍保護効果を検討することとした。2頭の生体ブタの胃内に消化管内視鏡を用いてESDを行った。1頭のブタあたり4箇所の内視鏡治療後潰瘍を作成した。そしてTetra-PEGゲルまたはOligo-Tetra-PEGゲルで被覆する潰瘍底と無処置の潰瘍底（コントロール）に分けて検討を行なった。治療後7日まで飼育を継続し7日後の潰瘍部の評価を行った。肉眼的所見と潰瘍部の病理学的所見を検討し各群で比較した。結果、1週間後の潰瘍収縮率はコントロール群、Oligo-Tetra-PEGゲル被覆間で差はなかった。また同様にコントロールとTetra-PEGゲル被覆間でも差がなかった。病理学的評価ではいずれのハイドロゲルで被覆した潰瘍底は非被覆の潰瘍底に比べ炎症細胞数の軽減と、ラット皮膚欠損モデルでの結果と同様に血管新生の増加が認められた。胃内は背部と違い食物などの物理的刺激が常に加わっている。ハイドロゲル被覆によって潰瘍底が物理的刺激から保護され、炎症所見が低減した可能性を考えた。つまり今回行ったブタ実験ではハイドロゲルの潰瘍保護効果が示唆される結果を得ることができた。

以上の結果よりOligo-Tetra-PEGゲルはTetra-PEGゲル同様、細胞・組織障害性がなく、ブタ実験の結果からは潰瘍保護に関して期待される結果を得ることができた。そのため今後Oligo-Tetra-PEGゲルを用いた潰瘍被覆材としての使用を目標としさらなる検討を重ねたいと考えている。