

. 分担研究報告

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所属 京都大学再生医科学研究所
研究分担者 田畑 泰彦

研究要旨

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の吸着性を、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価した。その結果、シート状ゼラチンハイドロゲルに含浸させた bFGF の約 89.4% がハイドロゲルに収着し、これは、これまで重傷下肢虚血疾患の再生治療で使用している細粒状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF 収着率の規格値と同等だった。また、逆相カラムを用いて、bFGF 標品とハイドロゲルから脱着させた bFGF とを分析比較したところ、同じ時間に溶出、ピークの変化も見られなかったことから、ハイドロゲルに吸脱着することで bFGF の立体構造が変化しないことを示している。

A. 研究目的

われわれは、これまでに細粒状のゼラチンハイドロゲルから、細胞増殖因子を徐放化することによって、重傷下肢虚血性疾患に対する血管新生療法の先進医療を行ってきた。本研究の目的は、治験薬 GMP に準じて製剤化したゼラチンハイドロゲル徐放技術の末期虚血性心疾患への応用を目的に、ゼラチンハイドロゲルの品質を評価することである。そこで、本研究では、治験薬 GMP に準じて製剤化したシート状ゼラチンハイドロゲルを用いて、*in vitro* における bFGF の吸着率を評価した。

B. 研究方法

シート状ゼラチンハイドロゲルの作製

治験薬 GMP に準じた施設において、シート状のゼラチンハイドロゲルを作製した。すなわち、豚皮由来酸性ゼラチン (等電点 5.0) 水溶液へグルタルアルデヒドを加えた後、4℃にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルを 100 mM グリシン水溶液で 37℃にて 1 時間処理し、未反応のアルデヒド基を不活化した。蒸留水にて 3 回洗浄後、凍結乾燥することでシート状ゼラチンハイドロゲルを得た。

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着の評価

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着を評価するために、ハイドロゲルからの bFGF 脱着試験を行った。すなわち、4.5 mg のシート状ゼラチンハイドロゲルに対して、4 mg/ml の bFGF 水溶液を 0.05 ml 滴下し、室温で 30 分間静置することで bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルに、0.95 ml の脱着溶媒 (10 mM リン酸水素二ナトリウム、10 mM リン酸二水素ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、pH6.0) 加え、転倒混和を 10 分ごとに 6 回繰り返した後、遠心分離した。0.7 ml の上清を回収し、0.7 ml の製剤緩衝液 (4 mM クエン酸、7 mM クエン酸ナトリウム、263 mM 精製白糖) と混和後、ポリプロピレン製サンプルカップに移し替え、逆相カラム (YMC-Pack ODS-A) を用いて bFGF を分離し、ハイドロゲルへの吸着率を算出した。

C. 研究結果

図 1 は、逆相 HPLC のクロマトグラムを示す。bFGF 標品を逆相カラムで分析したところ、bFGF は、25 分で溶出された (図 1A)。一方、ハイドロゲルに脱着させた bFGF を逆相カラムで分析

した場合、標品と同じ 25 分で bFGF が溶出された (図 1B)。さらに、分離された bFGF の濃度から、bFGF のハイドロゲルへの収着率を算出したところ、約 89.4% の bFGF がハイドロゲルに収着していることがわかった (図 2)。

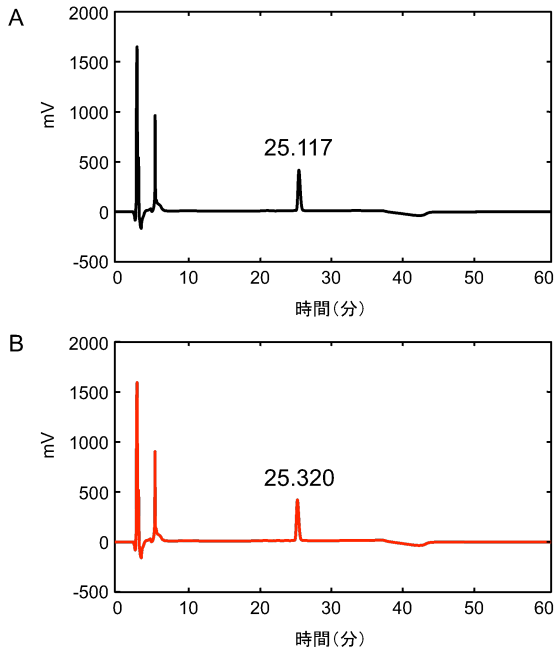


図 1 逆相 HPLC のクロマトグラム

bFGF 標品 (A) とシート状ゼラチンハイドロゲルに脱着させた bFGF (B) とを逆相カラムを用いて分析したクロマトグラム。

試料	ピーク面積値	試料溶液中濃度 (mg/ml)	吸着率		標準偏差 (%)
			%	平均 (%)	
No. 1	1	8070000	0.0868	86.8	89.4
	2	8520000	0.0915	91.5	
	3	8370000	0.0900	90.0	

図 2 bFGF のシート状ゼラチンハイドロゲルへの収着率

シート状ゼラチンハイドロゲルに収着した bFGF の割合。

D. 考察

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の収着率を逆相 HPLC を用いて評価した。その結果、bFGF 標品とハイドロゲルから脱着し bFGF との間で、逆相カラムからの溶出時間が同じであり、また溶出ピークの形からも変化していないことがわかった。このことは、bFGF がハイドロゲルに吸脱着することで、bFGF の立体構造は変化しないことを示している。また、シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の収着率は、約 89.4% だった。これまでに、われわれは、重傷下肢虚血疾患の再生誘導治療で使用

する細粒状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の収着率を 80% 以上として規格化している。したがって、シート状ゼラチンハイドロゲルは、bFGF の収着率において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であると考えられる。

E. 結論

本研究により、末期虚血性心疾患の再生誘導治療に用いるシート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の収着率を明らかにすることができた。さらに、bFGF をハイドロゲルに脱着させることで、bFGF の立体構造が変化しないことを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし