

. 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
分担研究者 田畑 泰彦

研究要旨

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、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とこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。その結果、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGF の徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることがわかった。

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指して、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、*in vitro* における bFGF の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、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とこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。

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。

細粒状ゼラチンハイドロゲルの作製

上述したシート状ゼラチンハイドロゲルを 8000 rpm で 10 分間粉碎後、凍結乾燥することによって、細粒状ゼラチンハイドロゲルを作製した。

in vitro における bFGF の徐放性

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro* における bFGF の徐放性について比較するために、ゼラチンハイドロゲルからの bFGF 徐放試験を行った。すなわち、2 mg のゼラチンハイドロゲルに対して、クロラミン T 法により ¹²⁵I 放射ラベル化した bFGF 水溶液を 20 μl 滴下し、室温で 3 時間静置することで、¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた ¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、37℃で浸漬し、経時的に上清に対する放射活性を測定することによって、bFGF の徐放性を評価した。さらに、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを 10 μg/ml のコラゲナーゼ水溶液中、37℃で浸漬することによって、ゼラチンハイドロゲルを分解させ、bFGF の徐放性の変化について評価した。

ゼラチンハイドロゲルの分解性

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro*における分解性について比較するために、コラゲナーゼを用いたハイドロゲルの分解試験を行った。すなわち、5 mgのゼラチンハイドロゲルをPBS中、37℃で浸漬させ、一晚静置することにより、ゼラチンハイドロゲルを膨潤させた。次に、膨潤させたゼラチンハイドロゲルを10 µg/mlのコラゲナーゼ水溶液中、37℃で浸漬させ、上清を経時的に回収した。上清に対して、260 nmの吸光度を測定することによって、ゼラチンハイドロゲルから溶出したゼラチンを定量した。得られたゼラチンの溶出量を用いて、ゼラチンハイドロゲルの分解性を評価した。

C. 研究結果

*in vitro*におけるbFGFの徐放性

図1にシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルからの*in vitro*におけるbFGFの徐放性を示す。図から明らかなように、コラゲナーゼ添加前では、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、30%程度のbFGFが初期に徐放化されるが、それ以降、徐放化されることがなかった。一方、ゼラチンハイドロゲルをコラゲナーゼ水溶液に浸漬したところ、いずれのゼラチンハイドロゲルについても、吸着したbFGFが徐放化されることがわかった。

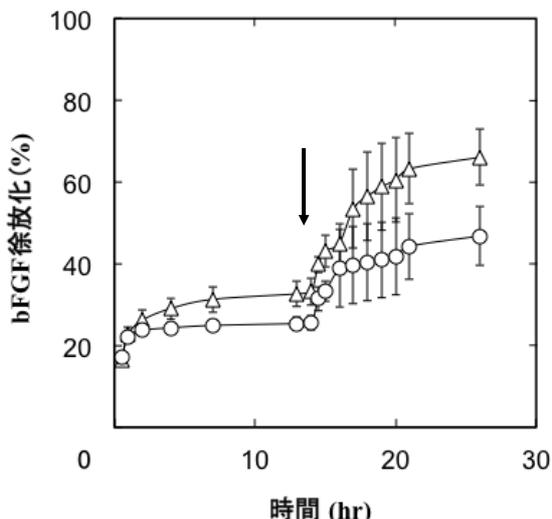


図1 *in vitro*におけるゼラチンハイドロゲルからのbFGFの徐放性

シート状(○) 細粒状(△)
コラゲナーゼ水溶液の添加(矢印)

ゼラチンハイドロゲルの分解性

図2にコラゲナーゼによるシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルの分解性を示す。

図から明らかなように、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、コラゲナーゼを添加することによって2時間程度でゼラチンハイドロゲルが分解されることがわかった。

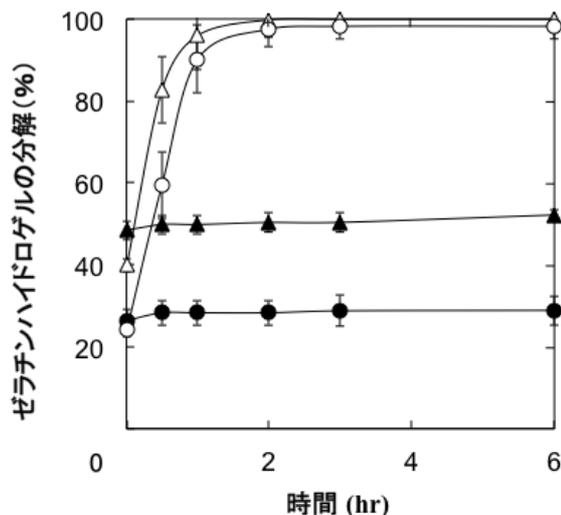


図2 ゼラチンハイドロゲルの分解性
シート状(○) 細粒状(△)
コラゲナーゼ水溶液(●) PBS(▲)

D. 考察

シート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルに対して、bFGFの徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について評価した。その結果、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、bFGFは、ゼラチンハイドロゲルの分解とともに徐放化されることがわかった。これまでに、われわれは、細粒状ゼラチンハイドロゲルからbFGFを徐放化することによって、重傷下肢虚血疾患の再生誘導治療に成功している。本研究結果は、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGFの徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることを示している。

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して、bFGFの徐放性ならびにその分解性を明らかにすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルから徐放された多血小板血漿の生物活性の評価。第14回日本再生医療学会総会(2015年3月19日~21日、横浜)

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