

論文の要旨

申請者 瀧 川 真 人

研究論文題目

ラット後肢挫滅症候群におけるフラグミン・プロタミンナノ粒子を担体に用いた Fibroblast Growth Factor-2 の有効性に関する研究

1 目 的

挫滅症候群 (Crush Syndrome; CS) は身体の一部、特に四肢が長時間挟まれるなどして圧迫され、圧迫からの解放後に生じる一連の症候群である。急性期 CS の標準治療は確立しているが、急性期に運動機能維持のために四肢へ積極的な治療を行うと合併症が増加するという報告があるため、急性期からの傷害部局所の治療に関する報告はない。本研究では CS における傷害部局所の再生に着目した。急性期救命が可能なラット CS モデルを用いて、傷害部において低下した血流量を改善することにより運動機能回復を図る早期治療の開発を目指した研究を計画した。

再生医学の発展に伴い、細胞増殖や組織再生、血管新生に関わる Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) や Hepatocyte Growth Factor 等の増殖因子の重要性が注目されている。しかしながら、多くの増殖因子は活性半減期が短く、単独投与ではその持続的な効果を得ることが難しい。そのため、担体を使用して増殖因子を有効活用する研究が広く行われている。我々のグループではフラグミン・プロタミンマイクロ／ナノ粒子を担体に用いた FGF-2 を開発し、応用をめざしての治療実験を進めてきた。本研究ではその簡易な調製法および特性について検討し、次いでラット CS モデルに投与した際の傷害部位における運動機能回復、血流改善の効果および筋組織修復について検討した。

2 対象並びに方法

(1) ラット CS モデル

SD ラットを用いて、麻酔下に片肢 3.6 kg の圧迫負荷を両後肢に 6 時間かけるラット CS モデルを研究対象とした。採用した CS モデルは重篤な筋組織破壊を伴うものの、他の CS モデルより生存率が高いことが示されている。

(2) 増殖因子担体の簡易調製法の検討

先行研究のマイクロ／ナノ粒子調製法のうち、フラグミンとプロタミンを攪拌しつつ滴下する以外の手順を省略して簡略化した。調製したフラグミン・プロタミンナノ粒子 (Fragmin/Protamine Nanoparticles; F/P NPs) および F/P NPs を担体に用いた FGF-2 (FGF-2 + F/P NPs) の粒径と粒子の分散・凝集性を粒径・ゼータ電位計を用いて評価した。

(3) CS に対する FGF-2 + F/P NPs 投与の効果

両後肢圧迫解除直後に局所注射する薬剤の違いにより以下の 4 群に分けた。

A 群: FGF-2 + F/P NPs 投与群、B 群: F/P NPs 単独投与群、C 群: FGF-2 単独投与群、D 群: 生食投与群

薬剤投与後に圧迫解除環境で 1~28 日間の観察を行った。評価方法として Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) スコアを用いた運動機能、2 次元レーザードップラーを用いた後肢皮膚

表面血流量を使用した。また、腓腹筋横断面において全横断面積に占める骨格筋領域面積率を算出して骨格筋組織治癒の評価とした。さらに腓腹筋横断面の HE 標本から血管を全て同定した後、小血管、中血管、大血管に分類して計数し、血管新生の評価とした。

3 成 績

(1) 増殖因子担体の簡易調製法の検討

簡易に調製した F/P NPs は粒径が約 300 nm とナノ粒子であることが確認でき、ゼータ電位が約 50 mV と粒子が安定していることが確認できた。

(2) CS に対する FGF-2 + F/P NPs 投与の効果

圧迫解除 1 日後にはいずれの評価方法においても有意差は認めなかった。3 日後から BBB スコアおよび後肢皮膚表面血流量は A 群が他の群より有意に高く、運動機能の早期回復および血流の改善を認めた。7 日後から 14 日後にかけて、骨格筋領域面積率は A 群が他の群より優位に高く、骨格筋の治癒促進を認めた。血管数は A 群が他の群より有意に多く、血管新生効果を認めた。

4 考 察

簡易に調製した F/P NPs は従来法で調製したものよりも粒径が小さく安定しているため、同量から調製すると粒子の表面積が大きくなり、増殖因子をより有効に活用できる可能性がある。A 群が他の群と比較して有意に運動機能の早期回復を認めた背景には、投与した FGF-2 + F/P NPs により、血管数の増加と共に傷害部の血流が早期から回復したことや、肉芽組織形成促進の効果が骨格筋組織の治癒促進に結び付いたことがあったと考えられる。FGF-2 単独では短期間で失活したあるいは拡散したために運動機能の回復はさほど促進されなかったと考えられる。

5 結 論

従来の増殖因子担体の調製法を簡易化し、安定なナノ粒子担体である F/P NPs を作製した。ラット CS モデルの傷害筋肉に FGF-2 + F/P NPs を局所投与することにより、運動機能の回復促進に寄与した。既存の医薬品から簡単に調製できる FGF-2 + F/P NPs は傷害筋組織治療に有用な材料と成り得る。