

IP1-1

塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた血管新生療法のための新規薬剤キャリアの開発

○岸本聡子^{1,2}, 原田恭治², 多川政弘², 石原雅之¹

¹ 防衛医科大学校防衛医学研究センター, ² 日本獣医生命科学大学獣医外科学

【背景・目的】我々は末梢血流障害等の虚血性疾患の治療として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を使用した血管新生療法について検討を行っている。FGF-2 は動物実験で血管新生を引き起こすことが確認されているが、構造が不安定で失活し易い。本研究では、FGF-2 の活性を保護する薬剤キャリアの作製を試み、血管新生療法のための基礎的な検討を行った。また、作製した薬剤キャリアが移植細胞のキャリアとしても有用であるか検討した。【方法】既存の汎用医薬品であるフラグミンとプロタミンを使用し、平均粒子径が約 0.5 μ m のマイクロ粒子 (F/P MPs) を作製した。作製した F/P MPs の FGF-2 に対する親和性及び FGF-2 活性の保護効果を様々な失活条件下で検討した。また、脂肪組織由来間葉系細胞 (ATSCs) を用いて ATSCs 凝集体を形成させ、浮遊培養条件下で凝集体の細胞保護効果を検討した。さらに、FGF-2 を保持した F/P MPs あるいは ATSCs / F/P MPs 凝集体をマウスの背部皮下に移植し、血管新生効果を病理組織学的に検討した。【結果】F/P MPs は FGF-2 と高い親和性を示し、FGF-2 活性を種々の不活化要因から保護して長期間維持した。ATSCs / F/P MPs 凝集体は、浮遊培養条件下で細胞の生存性を維持した。マウスを用いた移植実験では、FGF-2 を保持した F/P MPs あるいは ATSCs / F/P MPs 凝集体のいずれにおいても血管新生の促進と肉芽組織の形成が観察された。【結論】F/P MPs は FGF-2 のみならず移植細胞のキャリアとしても使用できる可能性が示唆された。F/P MPs は既存の医薬品のみを用いて迅速に作製できることから、虚血性疾患治療への応用が早期に期待できる。

IP1-3

先天性片側性腎欠損ラットの残存腎における細胞増殖活性の評価

○甘粕晃平, 鈴木浩悦, 鈴木勝士
日本獣医生命科学大学 獣医生理学教室

【目的】片側性泌尿生殖器異常 (UUA) 系統は、左側の腎欠損と同側の副生殖器官の形成不全を特徴とするミュータントラットである。発症動物の残存する右側腎臓では 10 週齢で腎重量の増加 (正常の約 1.6 倍) と糸球体数の増加 (正常の約 1.2 倍) が示されている (第 134、136 回学会)。今回我々は、残存する右側腎臓の成長に対する先天的な片側腎無形成の影響を確認するため、哺育期の動物の腎臓における細胞増殖活性を調べた。【方法】10 および 21 日齢の雄ラットに BrdU を皮下投与し、2 時間後にエーテル麻酔により安楽死させた。後大静脈から採血し、血漿を分離し、UN および Cre を測定した。腎臓を摘出し、秤量後、ホルマリン固定した。常法に従ってパラフィン切片を作成し、免疫組織化学により BrdU 陽性細胞を検出した。組織標本を顕微鏡下で観察し、BrdU 陽性細胞をカウントした。【結果】右側腎重量は 10 および 21 日齢の発症動物で有意に増加していた (10 日齢、正常 108.6 \pm 12.3 vs 発症 144.1 \pm 30.9, $p < 0.05$; 21 日齢、正常 221.2 \pm 50.1 vs 発症 340.1 \pm 58.3 mg, $p < 0.01$)。血漿中の Cre および UN 濃度は発症動物で上昇しており、発症動物の腎機能の低下が示された。正常動物の右側腎臓と比較すると、発症動物の残存腎における BrdU 陽性細胞数は 10 日齢の皮質および 21 日齢の髓質で増加していた。【総括】今回の実験から、UUA 系統の発症動物の残存する右側腎臓では 10 日齢から既に代償性腎成長が生じていることが明らかとなった。また BrdU 陽性細胞は主に未熟な糸球体と尿細管に局在しており、今回観察された細胞増殖はネフロン成長を示唆すると考えた。

IP1-2

犬赤血球の D2 抗原に対するモノクローナル抗体の開発

○池田正英, 間瀬比加里, 西尾義行, 平野 真
シゲタ動物薬品工業株式会社

犬の赤血球型は 1940 年に日本の科学者によって D1 型、D2 型、D1D2 型の 3 つの型に分けられた。それ以来、D2 型、D1D2 型は日本でのみ報告されてきただけで、まだ D2 抗原の生化学的特性はほとんどわかっていない。D1 型に関しては、犬血液型判定システムの 1 つである DEA システムの DEA3 (+) と同一であることが 1980 年に証明され、D1 抗原に関する報告もされている。我々は、D2 型の赤血球で感作したマウスから D2 型、D1D2 型の赤血球を凝集させ、D1 型の赤血球は凝集させない抗体を産生するハイブリドーマを 2 つ得た。ウェスタンブロットではこれらのモノクローナル抗体は D2 型、D1D2 型の赤血球の膜分画の 2 つの蛋白質に特異的に結合した。また、DEA システムと比較試験を行った結果、DEA システムには D2 型に相当するものはなかった。今回、我々が開発したマウス抗 D2 モノクローナル抗体は、従来犬の血液型判定用ウサギ抗 D2 血清に代わり、犬の安全な輸血に欠かせないものとなるだろう。

IP1-4

敗血症マウスモデルでの急性腎不全進行における血栓性病変と尿細管トランスポーター Na Pi T2a の発現変化

○神元 幸, 水野信哉, 大西浩之
大阪大学 医学系研究科 分子再生医学

【序論】敗血症初期病態では全身性炎症反応症候群 (SIRS) の一端として TNF- α や IL-6 などのサイトカインの産生が急増する。これらのサイトカインは炎症を引き起こし、多臓器不全を誘発する。とりわけ急性腎不全は敗血症死因の大きなウエートを占めており、腎不全に至る分子機構解明は病態制御の観点から重要な意義を持つ。今回、私達は LPS 投与マウスを用い、腎臓での血栓性変化と尿細管刷子縁に存在するトランスポーター (Na-PiTP2a) の発現動態を解析した。

【方法】C57B/6 マウスに LPS を投与し、36 時間まで血液と腎を採取した。血中 TNF- α , IL-6 および腎不全の指標として BUN 値を測定した。ホルマリン固定した腎は常法に従い、PAS 染色を実施した。次いで血栓性変化を明らかにする目的で P-selectin, fibrin, ハイポキシマーカである pimonidazole の発現を組織学的に解析した。さらに Na-PiTP2a の発現変化を酵素抗体法により調べた。

【結果】LPS 投与後 12 時間以内に血中 TNF- α 値, IL-6 値は一過性に上昇した。以上の病態下では腎糸球体での P-selectin の発現が亢進するとともにフィブリン沈着が著明となった。このような血栓性変化とともに BUN 値は上昇し、24 時間目にピークに達した。この時期の腎では刷子縁が広範に脱落しており、pimonidazole 陽性の実質領域も拡大していた。このような低酸素状態では尿細管 Na-PiTP2a の発現は低下していた。

【総括】SIRS の病態では TNF- α などの炎症性サイトカインの作用により糸球体内皮に P-selectin が誘導され、血栓形成・低酸素症に基づき腎不全が進行したと考えられる。敗血症患者に好発する低リン血症の分子機構は不明であるが、本トランスポーターの発現低下が敗血症性低リン血症の病理発生に関与した可能性がある。