

学 位 論 文 要 旨

氏 名 甲斐 成彦

論 文 名 嗅覚障害モデルの嗅上皮再生に対する CGF 鼻腔内投与の効果

学位論文要旨

はじめに

匂いの情報を感知できない嗅覚障害は QOL に多大な影響を与える。嗅覚障害患者は人口の約 1~3%と報告されているが、食品の腐敗、ガス漏れや煙に気づかないといった日常生活の危険にもさらされている。臨床において感冒後に代表される嗅覚障害に対し、亜鉛製剤やビタミン A など様々な薬剤の有用性が示唆されているが、プラセボ対照盲検試験で有意差を示すデータはない。嗅上皮において嗅神経細胞は生理的状态、傷害時とも継続した神経新生を繰り返すという特異な再生能力を有している。嗅神経細胞の再生は、神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) などのニューロトロフィンや、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、インスリン様成長因子 (IGF) などの成長因子によって誘導される。これらの因子の投与による嗅覚障害の治療法開発が期待されているが、いまだ確立された方法はない。最近の COVID-19 の世界的流行により、嗅覚障害の罹患率は増加しており、嗅上皮の再生能を活性化させるような治療法の開発が望まれている。

近年、嗅覚障害モデル動物に対し、複数の成長因子を含有する多血小板血漿 (PRP) を投与することで、嗅上皮が再生することが証明された。また COVID-19 罹患後の嗅覚障害に対して、PRP の局所注射による複数の臨床治療研究が行われ、嗅覚評価スコアや VAS スコアの改善が報告されている。しかしながら PRP の投与には鼻内への局所注射が必要であり、その際には疼痛や出血が生じる。

そこで、我々は concentrated growth factors (CGF) に着目した。CGF は PRP を改良した血漿分画であり、PRP と同様に多くの成長因子を含んでいるが、特殊な遠心分離機で抗凝固剤を用いずに作製することができる。また作製された CGF はゲル状であり、含有する成長因子を徐放化して放出する特性があることから、PRP のように局所注射を必要としない。CGF の嗅裂への投与による嗅上皮再生治療は、新たな治療法として期待できる。

本研究では嗅覚障害モデル動物に対して、CGF の鼻腔内投与が嗅上皮再生にどのような

氏名 甲斐 成彦

影響を与えるのかを検証した。

方法

本研究は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

実験には 12 週齢の Wister/ST ラット (male) を使用した。3-methylindole (3-MI) を腹腔内投与することにより、すべてのラットに嗅覚障害を誘発させた。嗅覚を評価するための行動試験として、バニリンを用いた 2 瓶嗜好性試験を実施した。1 週毎のバニリンの匂いがついた水の飲水量を忌避率として算定し CGF の鼻腔内投与後で比較を行った。3-MI の投与後 5 週間にわたり行動評価を継続した。

3-MI を投与して嗅覚障害を誘発させた 1 週間後に、健全なラットの血液から生成した CGF を、ラットの両側鼻腔内にマイクロピペットを用いて $50 \mu\text{l}$ ずつ投与した。比較対照群では、同様の手法により生理食塩水を両鼻腔に投与した。

CGF/生理食塩水投与後 4 週に組織学的観察のために、鼻腔組織を EDTA で脱灰し、パラフィン包埋切片を作成した。切片はヘマトキシリン・エオジンで染色し、嗅上皮の厚さ測定を行った。同時に成熟した嗅神経細胞が発現する嗅覚マーカータンパク質 (OMP) に対する免疫組織染色を行い、OMP 陽性細胞数をカウントした。

統計解析には EZR を使用し、グループ間の比較を Mann-Whitney U 検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

行動評価において両群ラットとも 3-MI 投与前には 80% 以上の忌避率を示していたが、3-MI の投与により忌避率の低下を認め、嗅覚障害が引き起こされることが証明できた。しかし、CGF 及び生理食塩水投与後 4 週まで、両群ともに忌避率は低下したまま経過し、忌避率の改善を示すことはなかった。

組織学的には 3-MI 投与後 5 週の時点で、正常ラットと比較すると嗅上皮の傷害は持続していた。一方、投与後 4 週の時点で CGF 群における嗅上皮の厚さは、生理食塩水群に対し有意に増加していた。また、OMP 陽性細胞数も CGF 群では、生理食塩水群に対し有意に増加していた。

考察

CGF 群では生理食塩水群と比較し、嗅上皮の厚さ及び OMP 陽性細胞数の改善を認めたことにより、傷害された嗅上皮に CGF を投与することで、嗅上皮の再生誘導が可能であることが明らかとなった。嗅覚障害の改善が行動して示されなかったことは、正常ラットと比較すると嗅上皮内の嗅神経細胞量が少なかったことに起因すると考えられる。今後、長期的な観察が必要と考える。

CGF の作成に必要なのは自己血のみであり、そのゲル状の性質からそのままの状態でも鼻腔内に投与が可能である。また約 1 週間にわたり含有する成長因子を嗅上皮に供給することが期待できる。PRP の局所注射と比較すると簡便かつ安全に施行できるため、CGF の鼻腔内投与は嗅覚障害の新たな治療法となり得る可能性が本研究にて示された。

キーワード (3~5)

concentrated growth factors、CGFs

olfactory dysfunction、intranasal administration