

氏 名 (本 籍)	槇 純 一 (滋 賀 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 3 7 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	The MR tracking of transplanted ATDC5 cells using fluorinated poly-L-lysine-CF ₃ (フッ素を用いた核磁気共鳴画像用の陽性造影剤の開発と移植軟 骨細胞のMR追跡法への応用)
審 査 委 員	主 査 教 授 村 田 喜 代 史 副 査 教 授 谷 徹 副 査 教 授 山 路 昭

論文内容要旨

*整理番号	542	(ふりがな) 氏 名	まきじゅんいち 槇 純一
学位論文題目	<p>The MR tracking of transplanted ATDC5 cells using fluorinated poly-L-lysine-CF₃</p> <p>(フッ素を用いた核磁気共鳴画像用の陽性造影剤の開発と移植軟骨細胞の MR 追跡法への応用)</p>		
<p>[目的] ここ数年、幹細胞等を移植する再生医療の研究が進められており、整形外科領域では骨軟骨疾患の再生医療研究が盛んである。再生医療において、移植した幹細胞等をヒトや動物を傷つける事無く外部から観察する事は重要である。その手段のひとつに MR 追跡法がある。MR 追跡法で移植細胞を経時的に追跡する為には、細胞を標識する必要がある。現在 MR 標識剤としてよく用いられているのは、超常磁性酸化鉄 (Super-paramagnetic iron oxides : SPIOs)である。しかしこの標識剤は陰性造影剤で MR シグナルを減衰させる為、元来 MR シグナルが低信号である骨軟骨系には適さない。そこで今回、骨軟骨系に適した陽性標識剤の開発を試み、MR 追跡法に用いた。</p> <p>[方法]</p> <p>1) 試薬の合成</p> <p>N-4-(trifluoromethoxy)-benzylated poly-L-lysine (PLK-CF₃) を合成し、分子量が 1000 ~ 4000、4000 ~ 15000、15000 ~ 30000 の3つのグループを NMR にて測定した。さらに蛍光顕微鏡で観察出来るように、蛍光色素 FITC あるいは Cy5.5 で標識した。</p> <p>2) 最適な標識条件の検討</p> <p>FITC-PLK-CF₃ を培養液に種々の濃度で溶解し、軟骨系の幹細胞のひとつである ATDC5 細胞と 24 時間反応させた。その後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフト Meta Morph を用いて PLK-CF₃ が効率良く細胞に取り込まれる濃度を検討した。つぎに ATDC5 細胞の培養液中の PLK- CF₃ の濃度を 40 μg/ml と一定にし、反応時間を 2~48 時間に変化させ後、上記の方法で解析を行い、PLK-CF₃ が効率良く細胞に取り込まれる時間を検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

3) 細胞毒性の検討

PLK-CF₃ の毒性について、2種類の方法で検討した。第一に、PLK-CF₃ を種々の濃度で培養液に溶解し、ATDC5 細胞と 24 時間反応させた後、細胞を回収して methylene blue 染色を行い、生細胞と死細胞を数え、生存率から短期細胞毒性について検討した。第二に、PLK-CF₃ を種々の濃度で培養液に溶解し、ATDC5 細胞と 24 時間反応させた後、継体を行いながら長期にわたり培養を続けた。継体時に細胞数を数えて、長期にわたる毒性評価を行った。

4) MR 画像化の検討

PLK-CF₃ と反応させた ATDC5 cell をコラーゲンゲルに包埋してマウスの頭蓋骨に移植し、MR にて経時的に撮影した。Cy5.5-PLK-CF₃ と反応させた ATDC5 細胞をゲルに包埋してマウスの頭蓋骨に移植し、MR と光イメージングにて撮影した。頭蓋骨移植後 1 日と 7 日にマウスを屠殺し移植部位を組織にして観察した。

[結果] PLK の分子量を 1000~4000 としたものが、NMR 上で最も感度が良かった。最も効率よく細胞に PLK-CF₃ が取り込まれた時間は、24 時間であった。培養液中の PLK-CF₃ 濃度は 80 $\mu\text{g/ml}$ で一番効率良く ATDC5 に取り込まれた。また 160 $\mu\text{g/ml}$ までは有意な毒性は無かった。PLK-CF₃ と反応させて頭蓋骨に移植した ATDC5 cell は 1 週間後まで MRI で追跡できた。¹⁹F-MRI の信号強度は 1 週間後では減少していた。Cy5.5-PLK-CF₃ を用いると光イメージングでも観察できた。組織学的には 7 日後のものでも細胞核が染色されており ATDC5 cell は生存していたと考えられた。

[考察] PLK の分子量が大きいと分子内でのフッ素の自由度が減少するため信号の幅が広がると思われる。PLK-CF₃ の濃度は 160 $\mu\text{g/ml}$ まで細胞毒性は無く、80 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間培養すると効率良く細胞に取り込まれる。移植 7 日後では MR の信号は減少しそれ以後では有効な画像は得られなかった。これは細胞内の PLK-CF₃ が代謝されたり細胞死したりする為と思われる。

[結論] 陽性造影剤 PLK-CF₃ を用いて MR にて経時的に移植 ATDC5 cell を観察できた。今後、造影剤の感度を良くしたり細胞内から代謝される時間を延ばす必要がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	542	氏名	榎 純一
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>MR 画像法で移植細胞を体外から観察する方法は、再生医療にとって有用である。現在、移植細胞の MR 追跡試薬として鉄粒子が用いられているが、陰性造影剤のため骨軟骨系への応用は困難である。そこで本研究では、フッ素 MR 画像用の陽性造影剤 poly-L-lysine-CF₃ (PLK-CF₃)を開発し、ATDC5 細胞を用いて有用性を検討した。</p> <p>その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) PLK の分子量 1000-4000、アミノ基の 50%に CF₃を結合させたものが最適であった。 2) 80 µg/ml で 24 時間培養するのが最も効率良く標識できた。 3) 160 µg/ml までは毒性がなかった。 4) 標識した ATDC5 細胞をマウス頭蓋骨に移植して、移植当日、7 日後に画像化できた。 5) 移植当日と比べ 7 日後の MR 信号は約半分に減少していた。 6) Cy5.5 を結合させた PLK-CF₃ は蛍光画像法でも画像化できた。 <p>本論文は、骨軟骨系に応用可能なフッ素 MR 画像用試薬を開発したものであり、医学の発展に寄与すると考えられ、博士 (医学) の学位論文に値するものである。</p>			
(平成 19 年 2 月 19 日)			