

| | |
|---------|---|
| 氏 名 | 土屋 桂子 |
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 博士 甲第 681 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 2 5 年 3 月 7 日 |
| 学位論文題目 | Evaluation of atherosclerotic lesions using dextran- and mannan-dextran-coated USPIO: MRI analysis and pathological findings (デキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子及びマンナンデキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子を用いた動脈硬化病変の評価:核磁気共鳴画像及び組織学的評価) |
| 審査委員 | 主査 教授 犬伏 俊郎 副査 教授 三浦 克之 副査 教授 遠山 育夫 |

論文内容要旨

| | | | |
|--|---|--------------|------------------|
| *整理番号 | 686 | (ふりがな) 氏名 | つちや けいこ 土屋 桂子 |
| 学位論文題目 | Evaluation of atherosclerotic lesions using dextran- and mannan-dextran-coated USPIO: MRI analysis and pathological findings (デキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子及びマンナンデキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子を用いた動脈硬化病変の評価：核磁気共鳴画像及び組織学的評価) | | |
| <p>研究の目的：動脈硬化症は急性冠症候群や脳血管障害の原因となり、これらの発症に強く関連する不安定な動脈硬化病変を事前に検出して治療を始めることが重要になる。粒子径が 50nm 未満の微小超常磁性酸化鉄粒子 (USPIO=Ultrasmall superparamagnetic iron oxide) は肝や脾の単核食細胞系に認識され難く、血中滞留時間が長い。その為、リンパ節や動脈硬化病巣のマクロファージにも分布し、内腔狭窄をきたす前の早期動脈硬化病変の画像診断において有用性が注目されている。我々は通常酸化鉄粒子のコア鉄の周りを被覆しているデキストランに、マンナンを添加、加熱合成した酸化鉄粒子に着目した。動脈硬化病巣の M2 マクロファージは mannose receptor を発現しており (Bouhlef et al., Cell Metab. 2007; 6(2):137-143, 本文参考文献 26)、マンナン添加により病巣のマクロファージへの取り込み増加の可能性が期待された。本研究の目的は通常のデキストラン被覆 USPIO (D-USPIO) とマンナンデキストラン被覆 USPIO (DM-USPIO) を用いてウサギの動脈硬化病変への取り込みを MRI 及び組織学的に比較検討することである。</p> | | | |
| <p>方法：月齢 9-12 ヶ月の 12 羽の動脈硬化ウサギ (WHHLMI) を用い、2 羽を対照とし、10 羽に微小超常磁性酸化鉄粒子を投与した。(D-及び DM-USPIO 投与群、それぞれ 5 羽) 投与量は①0.08mmol/kg、②0.4mmol/kg、③0.8mmol/kg とする。(①②各 1 羽、③各 3 羽) ③群は投与 5 日後に in vivo 造影 MRA を施行。①～③群全て投与 5 日後に犠牲死させ、大動脈を摘出。摘出標本にて in vitro MRI 撮影を施行した。また、③群では一定量 (300 μg) の胸部下部大動脈標本を用いて、NMR 測定を行い、鉄含有量を定量した。In vivo 及び in vitro 画像解析は冠状断の異なる 3 スライスにおいて、3\times20pixel の関心領域を設定し、SNR を各 3 ヶ所ずつ測定し、平均を算出した。組織学的評価においては、酸化鉄の局在の確認にはベルリンブルー染色を、マクロファージの同定には免疫組織化学染色 (RAM11) を用いて鉄染色陽性部位と免疫組織化学染色陽性部位を対比した。定量評価では胸部下部大動脈標本を 200 倍、1 視野におけるベルリンブルー染色陽性面積を画像解析ソフト Image-Pro Plus にて解析。1 標本につき 3 視野で測定し、平均値を算出した。また、マウスマクロファージ細胞株 (J774.1) を用いて一定時間、一定量の D-及び DM-USPIO と反応させ、取り込みを比較した。統計学的解析には Student's t-test を用い、P 値 0.05 以下を統計学的有意差とした。</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。

結果：In vivo 造影 MRA で血管壁の SNR は D-及び DM-USPIO 投与前後の比較ではいずれも投与後有意に低下していた。2 粒子間の比較では、DM-USPIO で投与前後の SNR は有意に多く低下していた。(p<0.05) In vitro 血管標本 MRI では、D-及び DM-USPIO 投与群で血管壁の信号は低く、その信号は投与量に比例して低下していた。対照ウサギの血管は酸化鉄投与群に比べて高い信号を呈していた。投与量③で、標本血管壁の SNR は DM-USPIO 投与群で D-USPIO 投与群と比較して低値を呈す傾向にあった。(p<0.1)投与量②では、標本血管壁の SNR は DM-USPIO 投与群で有意に低値を示した。(p<0.05)投与量①では、2 種の製剤間で有意差はみられなかった。(p>0.1)ベルリンブルー染色標本ではいずれの製剤投与群も動脈硬化病変部に鉄の取り込みが観察された。対照ウサギの血管では、鉄の取り込みは認めなかった。鉄の取り込みは投与量に比例して増加していた。鉄染色陽性部位とマクロファージ免疫染色陽性部位は一致していた。鉄陽性面積の定量評価では、いずれの投与量も DM-USPIO 投与群の鉄陽性面積が有意に高値を呈した。(p<0.05) 投与量③群で、一定容量の標本血管内の鉄含有量を NMR で測定し比較したところ、2 種の製剤間で有意差は認められなかった。J774.1 培養細胞内の鉄取り込み量を比較したところ、DM-USPIO 投与群で有意に高値を呈した。(p<0.05)

考察：我々の研究では、WHHL ウサギにおいて、D-及び DM-USPIO はいずれも動脈硬化血管壁のマクロファージに食食され、T1 強調グラジエントエコー像において血管壁の信号低下所見を呈した。これらの鉄剤投与前の血管は平滑で、狭窄なく動脈硬化病変の描出は困難であった。USPIO を使用し、同様の実験を行った既存の論文 (Ruehm et al., *Circulation*. 2001; 103(3):415-422,本文参考文献 5)では鉄粒子は活動性食食細胞内に観察され、非活動性の泡沫細胞には認められなかったことが電子顕微鏡で確認されている。これらの結果から D-及び DM-USPIO は狭窄を来す前の活動性動脈硬化病変の診断において、有用であると考えられる。また、スタチンなどの動脈硬化治療薬の効果判定においても有用性が期待される。マンナンを付加したナノ粒子はマクロファージや樹状細胞を標的とした様々な薬物ターゲティング目的で研究されている。動脈硬化病変においても M2 マクロファージが mannose receptor を発現しており (Bouhlef et al., *Cell Metab*. 2007; 6(2):137-143,本文参考文献 26)、DM-USPIO は D-USPIO より選択的に動脈硬化病変に分布すると仮定した。本研究の組織学的評価では、ウサギの血管の動脈硬化病変において DM-USPIO は D-USPIO に比べより多く取り込まれ、MRI でもより強い信号低下が観察された。結合マンナンの安定性や適性投与量については更なる研究が必要であるが DM-及び D-USPIO の取り込みにおける差は結合マンナンに起因すると考える。

結論：ウサギの動脈硬化血管壁に取り込まれた D-及び DM-USPIO は血管信号低下を引き起こした。本研究の画像及び組織学的評価では、DM-USPIO は D-USPIO よりウサギの動脈硬化血管壁に多く取り込まれており、動脈硬化の診断においてより優れていると考える。

学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|--|-----|----|-------|
| 整理番号 | 686 | 氏名 | 土屋 桂子 |
| 論文審査委員 | | | |
| <p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>微小超常磁性体酸化鉄 (Ultrasmall Superparamagnetic iron oxide:USPIO) は動脈硬化病変に集積するマクロファージ (Mϕ) を可視化する MR 造影剤としての有用性が期待されている。また、動脈硬化巣では、M1 のみならず、M2 Mϕ への分化や、M2 Mϕ 由来のマンノースレセプターの発現が報告されている。本論文では、従来のデキストラン被覆 USPIO (D-USPIO) にマンナンを導入したマンナン・デキストラン被覆 USPIO (DM-USPIO) を合成し、ウサギの動脈硬化病変への取り込みを MRI 及び組織学的に比較検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) D-及び DM-USPIO 投与 5 日後に血管壁の in vivo 及び in vitro MRI を行ったところ、製剤投与前後での信号雑音比 (SNR) の差において DM-USPIO 投与群でより大きな変化が見られた。 2) 大動脈標本のベルリンブルー染色による鉄陽性面積は、DM-USPIO 投与群で有意に高値を呈した。 3) MRI 及び組織学的評価から DM-USPIO は従来の D-USPIO に比べて、動脈硬化病変でより優れた診断能を有する可能性が示唆された。 <p>本論文は、動脈硬化症の診断、治療効果の判定に有用な MR 造影剤について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 598 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25 年 2 月 1 日)</p> | | | |