



Quality assessment of cellular and tissue-based products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

著者名	富永 絢子
発行年	2019-03-25
URL	http://hdl.handle.net/10470/00032425

学位論文の要約

Quality assessment of cellular and tissue-based products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(細胞プロファイリングシステムを用いた細胞、組織製品の特性解析)

東京女子医科大学大学院
外科系専攻整形外科学分野
(指導：岡崎賢教授)

富永 絢子

Biochem Biophys Res Commun. 496(2):429-435. 2018年2月5日発行

【目的】

我々は細胞シートを使用した軟骨再生研究を行っている。今後シートを製品展開するにあたり品質評価も課題となる。現行の評価はいずれも侵襲的評価であり、全例を検査することは出来なかった。前実験としてウサギ軟骨シートを使用した積層化枚数の違いによる特性の変化を解析し、この結果を元に非侵襲的評価である島津製作所の細胞プロファイリングシステム(LC-MS/MS)によって評価が可能かを考察した。また、ヒト軟骨シートでも同様の結果が得られるか考察した。

【対象および方法】

ウサギ軟骨シートでは日本白色家兎を使用し、膝軟骨・滑膜細胞を採取した。温度応答性培養皿を使用し2種類の細胞を14日間共培養し1層、3層、6層に積層化した。その後7日間培養し評価とした。積層化枚数増減評価は、組織学的評価、ELISA評価(MIA、TGF- β)、細胞数評価を行った。またLC-MS/MS評価として、シート積層化後、培養液交換時に上清の50 μ lを使用して0日、3日、6日で評価を行い前述の実験結果と比較検討した。ヒト軟骨シートでも同様に3層シートを作成し、ELISA、細胞数、LC-MS/MS評価を行った。

【結果】

積層化枚数増減では、3層が最もよい結果であった。ウサギのLC-MS/MSの結果では、Blankより低下を示したのはGlucose、Serine、Glutamineで、上昇した物質はPyridoxalであった。層間での違いが顕著なものはCytidine、Uridine、Guanosine、Xanthine、Hypoxanthine、Uracil、Thymine、Deoxycytidine、Putrescineだった。ヒトのLC-MS/MSの結果もウサギとほぼ

同様であったが、Putrescine の結果のみ異なっていた。

【考 察】

積層化枚数変化で最も良好な結果を得たのは 3 層であった。6 層では拡散栄養の限界からか良好な結果は得られなかった。またウサギの LC - MS/MS の評価では、Glucose と Glutamine からシートの生存、Serine による軟骨細胞の主要 ECM であるプロテオグリカンの生成、Cytidine、Uridine、Guanosine、Xanthine、Hypoxanthine、Uracil、Putrescine による細胞数動態の推定、Glucose、Pyridoxal による MIA の推定が行える可能性が示唆された。ヒトの結果では Glucose、Glutamine、Serine はウサギと同様であった。また Cytidine、Uracil と細胞数間、Pyridoxal と MIA 間に相関があった。この結果から LC - MS/MS が今後非侵襲的な全例の品質評価として利用が可能であることが伺われた。

【結 論】

ウサギ、ヒト両シートでの非侵襲的な製品評価として LC - MS/MS が活用できる可能性が示唆された。