

Title	高分子物質の細胞内注入法の新しい試み
Author(s)	藤本, 宏四
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35097
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	藤 本 宏 四
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6916 号
学位授与の日付	昭和60年5月8日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	高分子物質の細胞内注入法の新しい試み
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 内田 驍 教授 岸本 忠三

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

HVJによる細胞融合法を利用して生きている細胞に任意の高分子物質を注入する方法がすでに3種類開発され細胞解析に利用されている。その中でヒト赤血球ゴースト内に高分子物質を封印したのちHVJ或はポリエチレングリコールを用いて細胞と融合させる方法がある。赤血球ゴースト法と呼ばれているが、この方法を改良して、赤血球膜にHVJ外膜活性、即ちウィルスレセプターへの吸着及び融合の活性を組み込むことによって、赤血球をあたかも巨大なウィルスのような形で利用してみようというのが本研究の目的である。これが可能になれば、赤血球ゴーストと細胞との間でのみ融合がおり、赤血球ゴースト相互、或は細胞相互の融合がないので、例えば単層培養細胞への高分子物質の注入が極めて容易になるし、また浮遊系細胞でも注入効率が上昇することが期待できる。

(方 法)

2 mM CaCl₂を含むBSS液に2%に浮遊させたヒト赤血球をHVJとmoi=100で混合し氷冷5分ののち37℃温浴中で1時間置く。これで赤血球膜レセプターとHVJの反応は終了し、殆どのレセプターは機能を失うと共に、HVJ外膜は赤血球膜と融合し、その結果として、赤血球膜面にHVJ外膜に存在していたスパイク蛋白質が組み込まれた構造ができあがる。

遠心で遊離HVJを除去したのち、このウィルス赤血球とエールリッヒ腹水癌細胞を混合すると、直ちに赤血球で橋渡しされた腹水癌細胞の凝集が氷冷下で観察される。この混合試料を37℃30分置くと赤血球と腹水癌細胞の間で細胞融合が観察される。即ち赤血球を巨大なHVJのように変えることが可能であった。この方法を利用して、高分子物質の細胞内注入の可能性が確かめられた。

(成 績)

赤血球内に高分子物質を封印する方法としては、1) 低張液処理 2) 凍結融解 3) 表面活性剤処理の3つの方法が可能である。HVJスパイク蛋白質を赤血球ゴースト膜に組込む場合、これ等の封印法が都合の悪い環境を作るかどうかを検討された。上記の1)と2)では、まずヒト赤血球をHVJ処理したのち、高分子物質を封印する処理をしても、赤血球ゴースト表面のHVJスパイク蛋白質の生物活性は安定に保たれることがわかった。

3)の表面活性剤処理の場合には、少し工夫を必要とした。HVJスパイク蛋白質を膜面に組込んだ赤血球を表面活性剤処理をすると膜面のスパイク蛋白質の活性が大きく減衰するのである。そのため表面活性剤処理で高分子物質を封印したのちの赤血球ゴーストにHVJ処理をする方法がとられた。この処理でもHVJスパイク蛋白質は有効に膜系に組込まれることがわかった。この処理で封印した高分子物質のリークが気になったが、これも殆ど影響のないことがわかった。

この処理によって作られた表面にスパイク蛋白質を組込み、内部に表面活性剤法で封印された蛍光標識IgGをもつ赤血球ゴーストとエールリッヒ腹水癌細胞とを混合し、腹水癌細胞へのIgG注入効率が観察された。

膜面に約20コのHVJスパイク蛋白質を組込んだ赤血球ゴーストを腹水癌細胞あたり約60コ与える条件下で、約50%の腹水癌細胞に強い蛍光の獲得が観察された。

(総 括)

HVJと赤血球とを反応させることで、赤血球膜に安定にHVJスパイク蛋白質を組込ますことができる。このように処理した赤血球は細胞に吸着し、37°Cで相互に融合する。この現象を利用して、赤血球ゴースト内に封印した高分子物質を細胞内に容易に注入することが可能である。

論文の審査結果の要旨

HVJと赤血球とを反応させることで、赤血球膜に安定にHVJスパイク蛋白質を組込ますことができる。このように処理した赤血球は細胞に吸着し、37°Cで相互に融合する。この現象を利用して、赤血球ゴースト内に封印した高分子物質を細胞内に容易に注入することが可能となった。即ち、高分子物質を封印した赤血球ゴーストをあたかも巨大なウィルスのような形で利用できることになった。これを用いると赤血球ゴーストと細胞との間でのみ融合がおり、赤血球ゴースト相互、或は細胞相互の融合がないので、例えば、単層培養細胞への高分子物質の注入が極めて容易になるし、また浮遊系細胞でも注入効率の上昇が期待できる。