

本研究は、体内に摂取されたカーボンナノ物質の移行や排出を明らかにすることを目的に行われた。本年度は、水溶化フラーレンの調整や動物への投与方法、さらに凍結切片の作製方法を試行錯誤しながら決定したために、実際に体内に投与したフラーレンの検出を行うことはできなかった。しかし、水溶化フラーレンを、MALDI-TOF-MSにて分析することにより、非常に明瞭にフラーレンを検出することが可能であった。他のマッピングとは異なり、図に示したようにバックグラウンドとの違いは明確であり、少量のフラーレンであっても十分検出が可能と推察され、MALDI-TOF-MSの有用性が示唆された。今後、静脈注射や経口投与したフラーレンの体内動態を明らかにする予定である。

3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

これまでの研究で、我々は、カーボンナノチューブ上で骨芽細胞様細胞を培養すると、細胞とカーボンナノチューブは強固に接合し、トリプシンでも剥離することが困難であることを明らかにした。本研究においては、このCNTsの生物学的特性を利用した細胞培養用スキャホールドの開発を目的とした。

細胞の形態は、コントロールであるPCと比較し、平坦で全周に伸展している形態を呈していた。SWCNTsとMWCNTsの間では、明確な形態の相違は認められなかったことから、CNTs特有の細い線維状の構造が細胞の形態に影響しているものと推察された。また、強拡大像において、細胞の仮足がCNTsと密に接しており、CNTsの骨芽細胞様細胞に対する優れた適合性が示唆された。

細胞の増殖に関しても、CNTsはPCやGPに比較し有意に優れていることが示された。細胞の増殖には、基質表面の物理的性状や化学的性状が関与することが報告されている。同じ炭素からなるGPに比較してCNTsが高い細胞増殖特性を示したことは、CNTsの持つ特有な細い線維状の構造が関与しているものと考えられた。しかし、同様の線維状構造を持つCNTsにおいてもMWCNTsとSWCNTsの間には差違が認められたことは、物理的な構造のほかにも細胞増殖に関与する因子が推察され、我々は、その一つとしてタンパクの吸着に着目した。

SWCNTsのタンパク吸着量はMWCNTsに比較し多いという結果が得られた。これは、SWCNTsと

MWCNTsの化学的性質の差違を示唆している。SWCNTsは、MWCNTsに比較し、表面活性が高く、バンドルを形成しやすいことが知られており、非特異的なタンパクの吸着が生じたと推察された。また、この結果は、SWCNTsの細胞増殖特性がMWCNTsに比較し高いことにも関係していると考えられる。

ALP活性については、総ALP活性および単位タンパクあたりのALP活性ともに、CNTsは、PC、GPに比較し高い値を示した。この結果は、CNTsの骨芽細胞の骨形成活性の促進を示唆している。

以上からCNTsは、骨芽細胞の増殖および機能を促進することが明らかとなり、骨芽細胞培養用スキャホールドとしての可能性が示唆された。

E. 結論

カーボンナノ物質の皮下組織長期埋入時の生体反応、フラーレンの体内分布およびCNTsの骨芽細胞培養用スキャホールドへの応用についての研究を行い、以下の結論を得た。

1. カーボンナノ物質の生体反応には、サイズや結晶構造が影響する。
2. MWCNTsおよびH-CNFsを皮下組織に長期埋入後も強い炎症反応は観察されなかった。
3. MALDI-TOF-MSを用いることにより、フラーレンの生体内組織における検出の可能性が示唆された。
4. CNTsの骨芽細胞培養用スキャホールドとしての可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari. "Strikingly Extended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes" *Chemistry Letters*, 35, 508-9 (2006)
2. 横山敦郎. "カーボンナノチューブの細胞内挙動" *バイオマテリアル*, 24, 324 - 332, (2006)
3. W. Wang, F. Watari, M. Omori, S. Liao, Y. Zhu, A. Yokoyama, M. Uo, H. Kimura, A. Ohkubo. "Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials" *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*. in press.

4. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, "Carbon Nanotubes Deposited on Titanium Implant for Osteoblast Attachment" Journal of Bionanoscience. in press
5. N. Aoki, T. Akasaka, F. Watari, A. Yokoyama. "Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions" Dental Materials Journal in press.

2. 学会発表

1. 青木尚史, 山本悟, 大堀ことは, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸, 菲澤崇. "カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布—" ナノ微粒子体内動態可視法の開発第1回研究成果発表会. 千歳, 2006
2. 青木尚史, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 佐藤義倫, 田路和幸, 亘理文夫. "単層カーボンナノチューブを用いた細胞培養用スキャホールドと細胞反応" 第2回ナノトキシコロジーと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会. 要旨集15, 札幌, 2006.
3. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, F. Watari. "Biomedical applications of single-walled carbon nanotubes for a scaffold." 84th General Session of International Association for Dental Research Brisbane, Australia, 2006.
4. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, "Response of osteoblastic cells grown on carbon nanotubes scaffold" 31st Fullerene-Nanotubes General Symposium,

Tsu, 107, 2006.

5. N. Aoki, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, A. Yokoyama. "Applications of carbon nanotubes as implant surface modification." 2nd Annual Meetings for Asia Academy of Osseointegration. Osaka, 2006.
6. 横山敦郎. "カーボンナノチューブの細胞内挙動" 第28回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 69, 東京, 2006
7. 青木尚史, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 佐藤義倫, 田路和幸, 亘理文夫. "カーボンナノチューブの細胞培養用担体への応用" 第3回ナノトキシコロジーと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会. 仙台, 2006
8. 横山敦郎, 青木尚史, 山本悟, 大堀ことは, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸, 菲澤崇. "カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布—" ナノ微粒子体内動態可視法の開発第2回研究成果発表会. 鳴門, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

なし

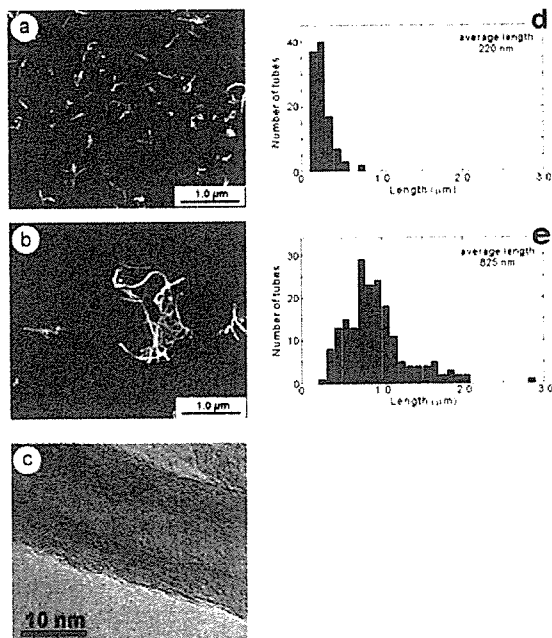


图 1

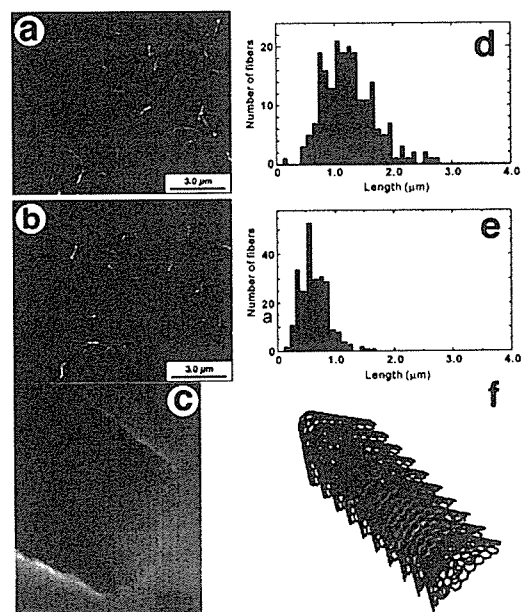


图 2

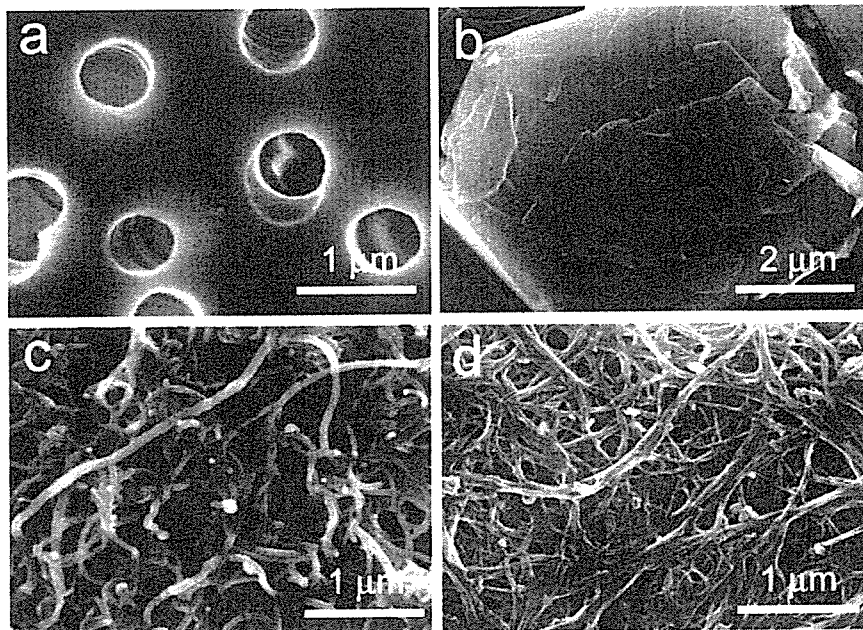


图 3

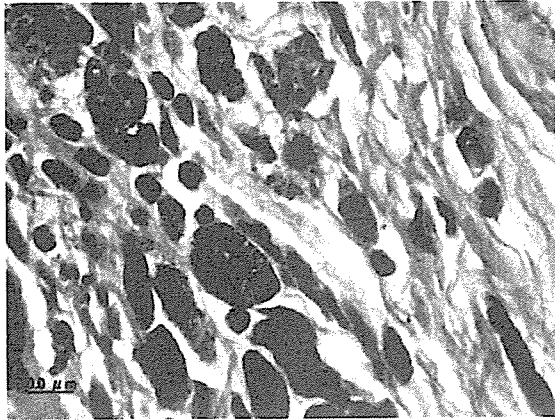


图 4-1



图 4-2

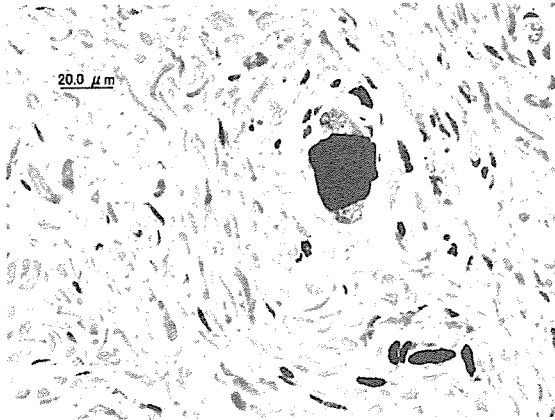


图 4-3

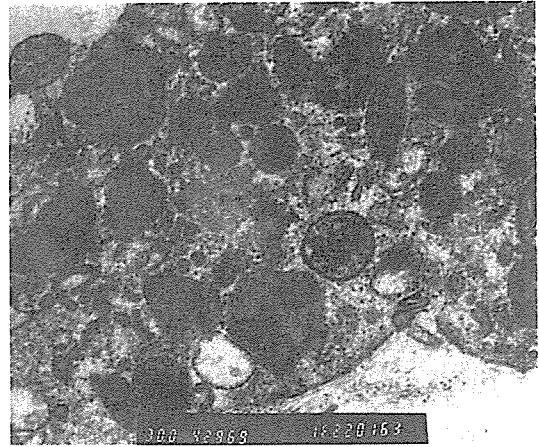


图 4-4

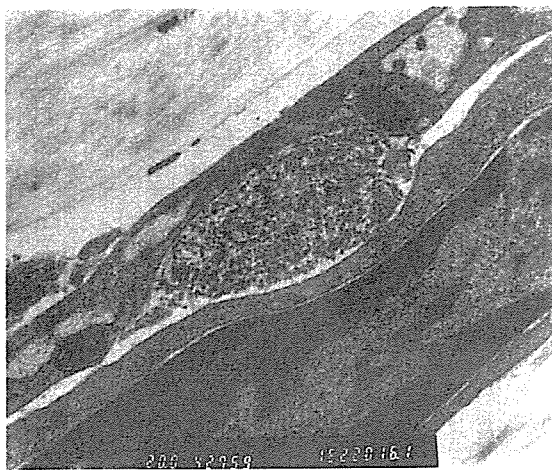


图 4-5

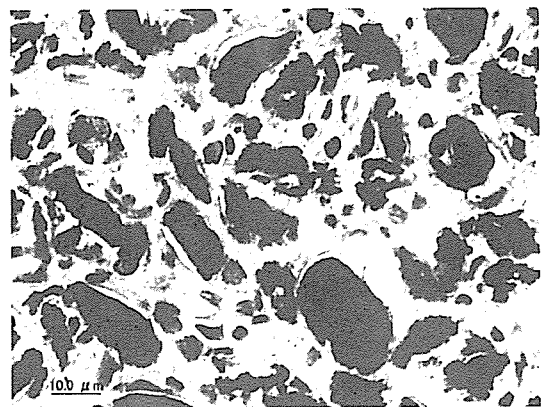


图 4-6

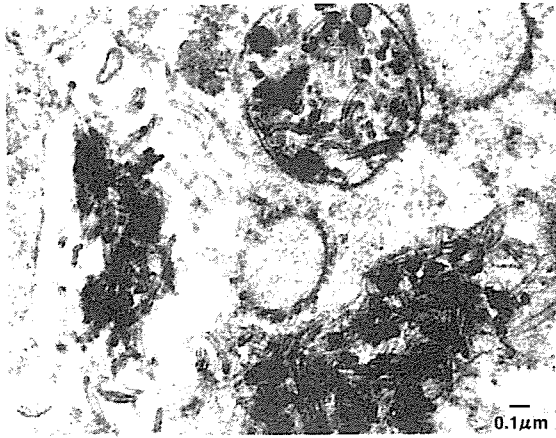


图 4-7

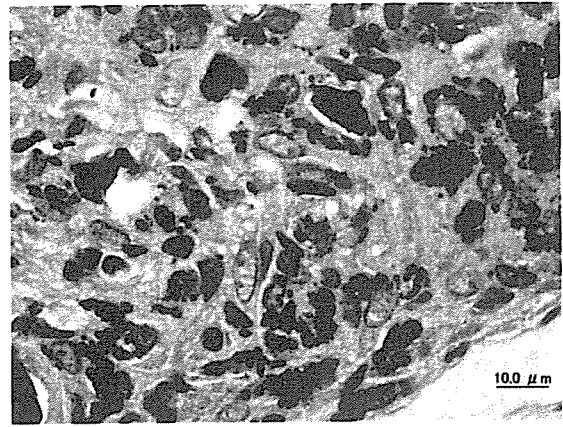


图 4-8

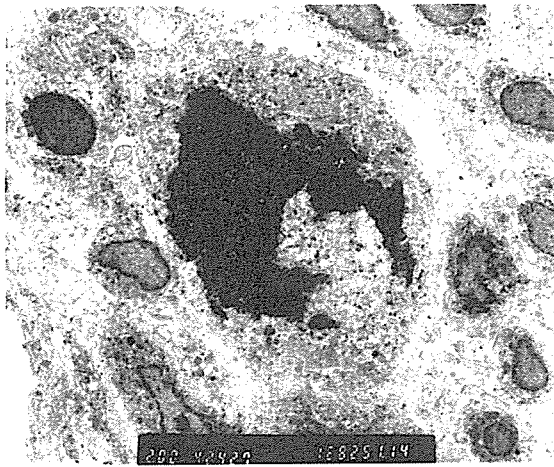


图 4-9

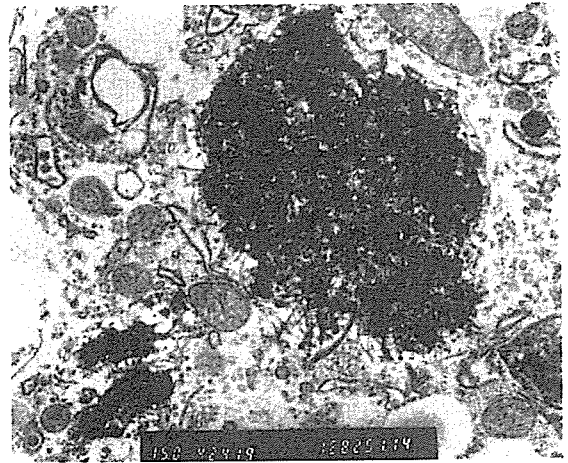


图 4-10

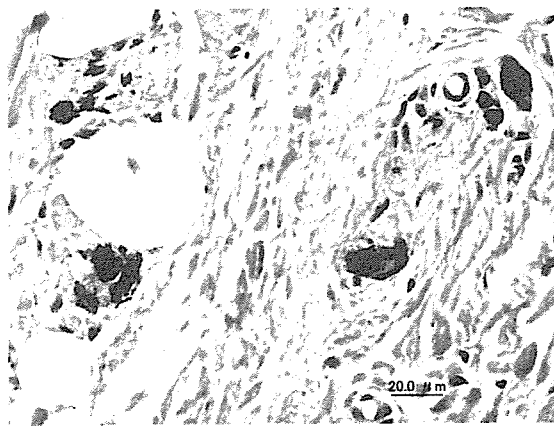


图 4-11

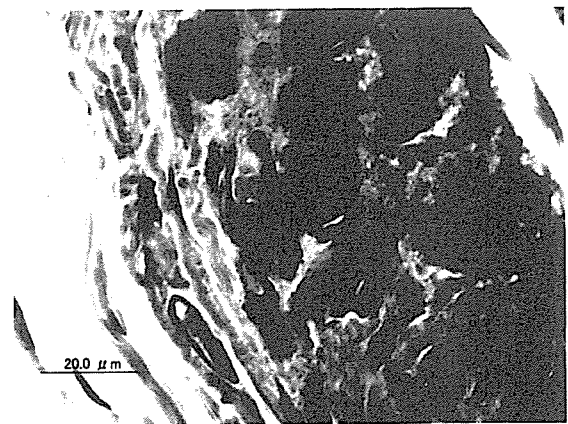


图 4-12

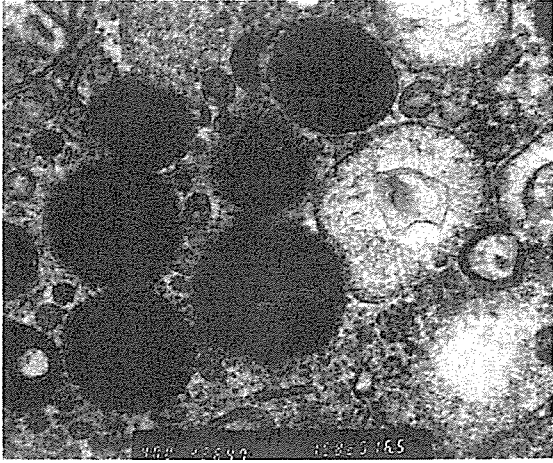


图 4-13

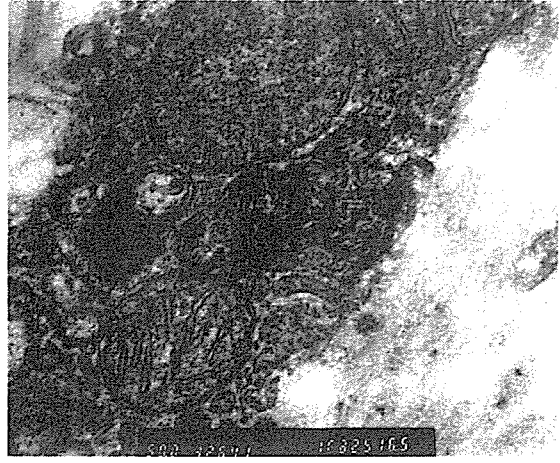


图 4-14

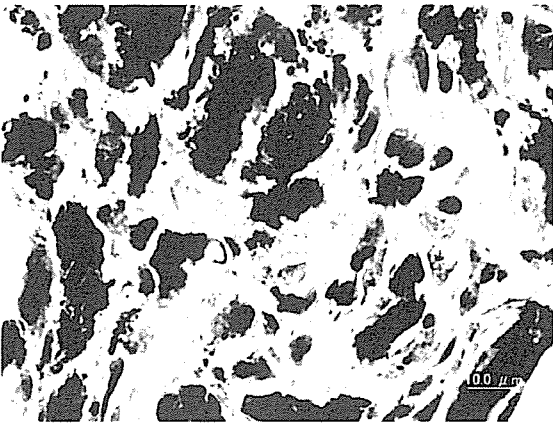


图 4-15

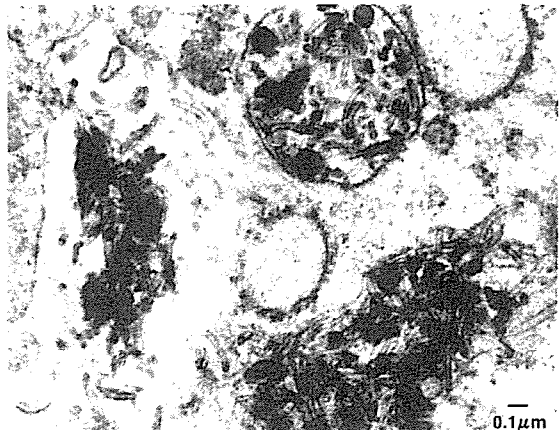


图 4-16



图 5-1

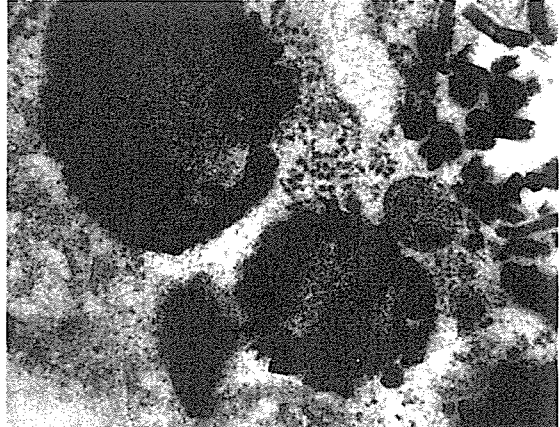


图 5-2

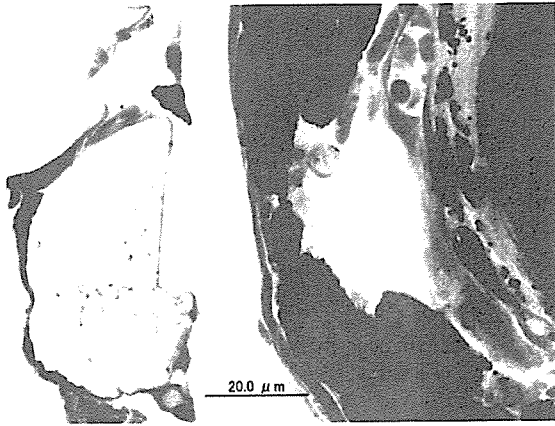


图 5-3

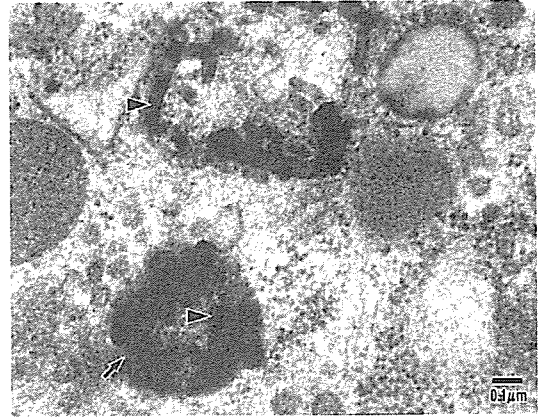


图 5-4



图 5-5

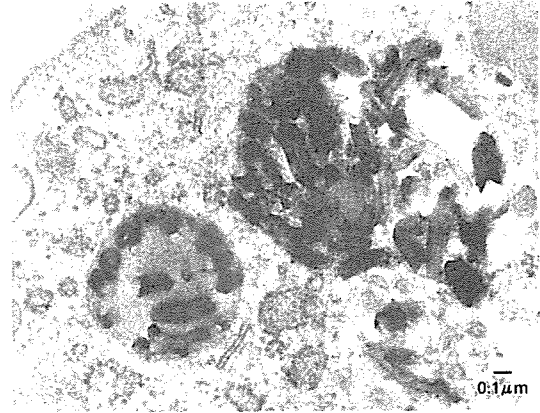


图 5-6

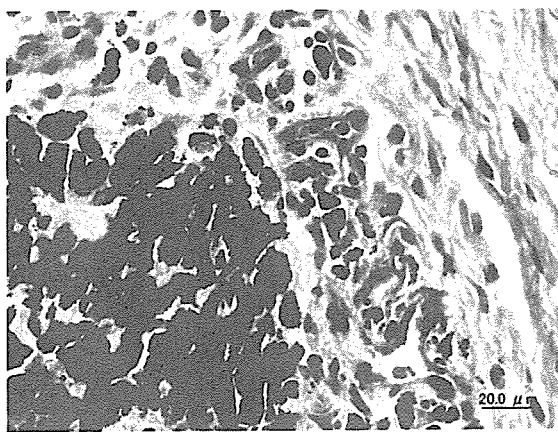


图 5-7

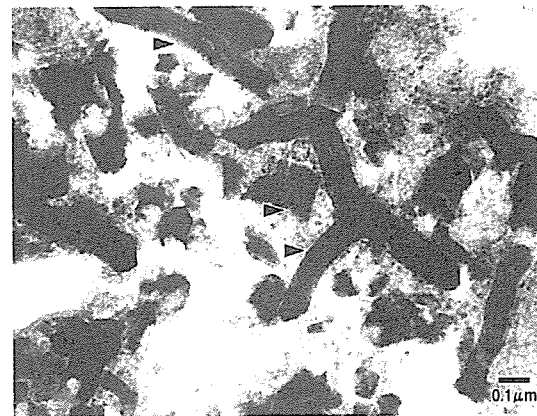


图 5-8

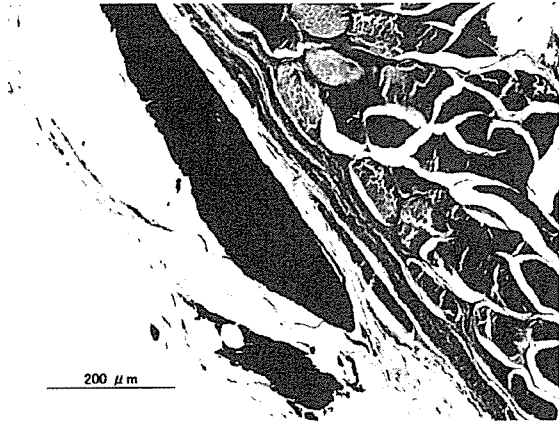


图 5-9

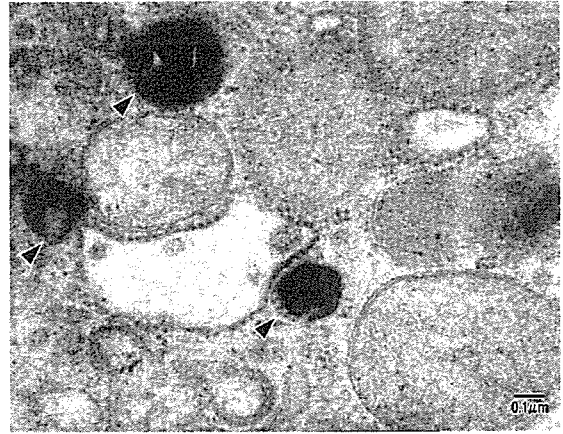


图 5-10



图 5-11

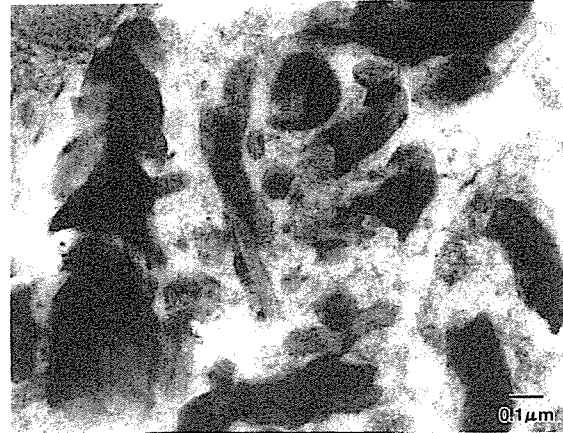


图 5-12



图 6 - 1

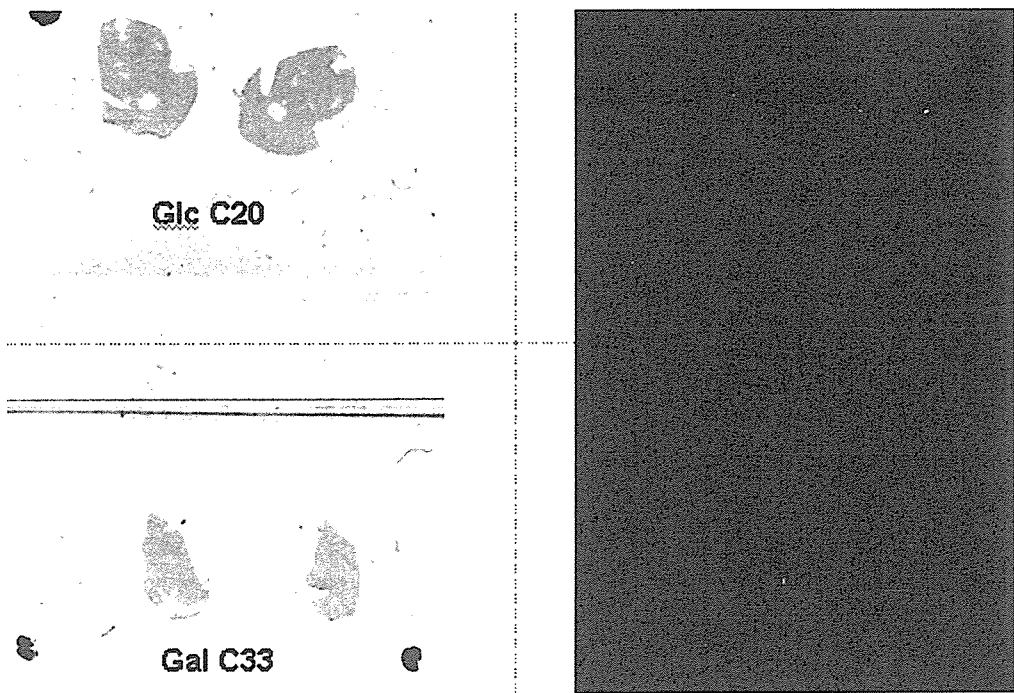


图 6 - 2

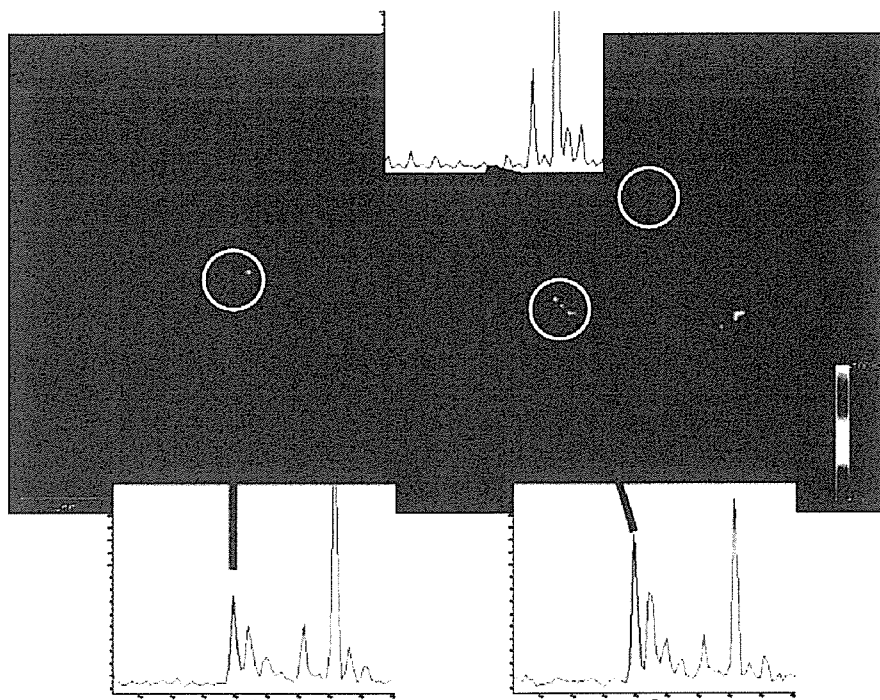


图 6 - 3

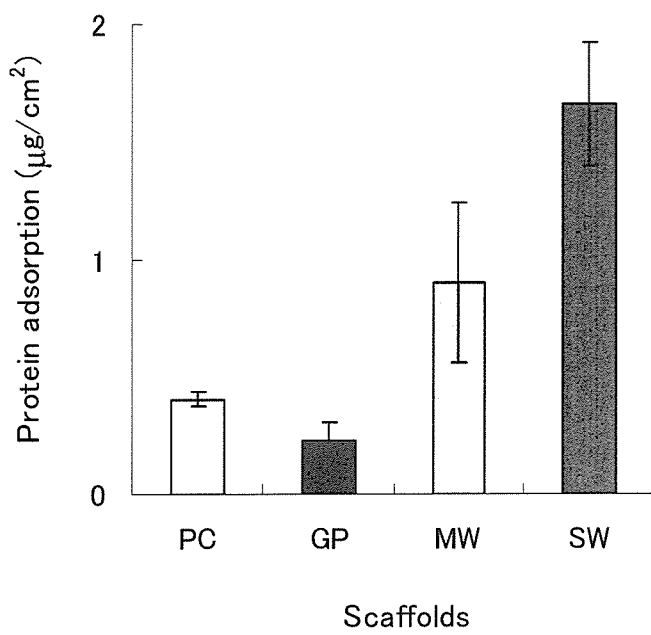


图 7 - 1

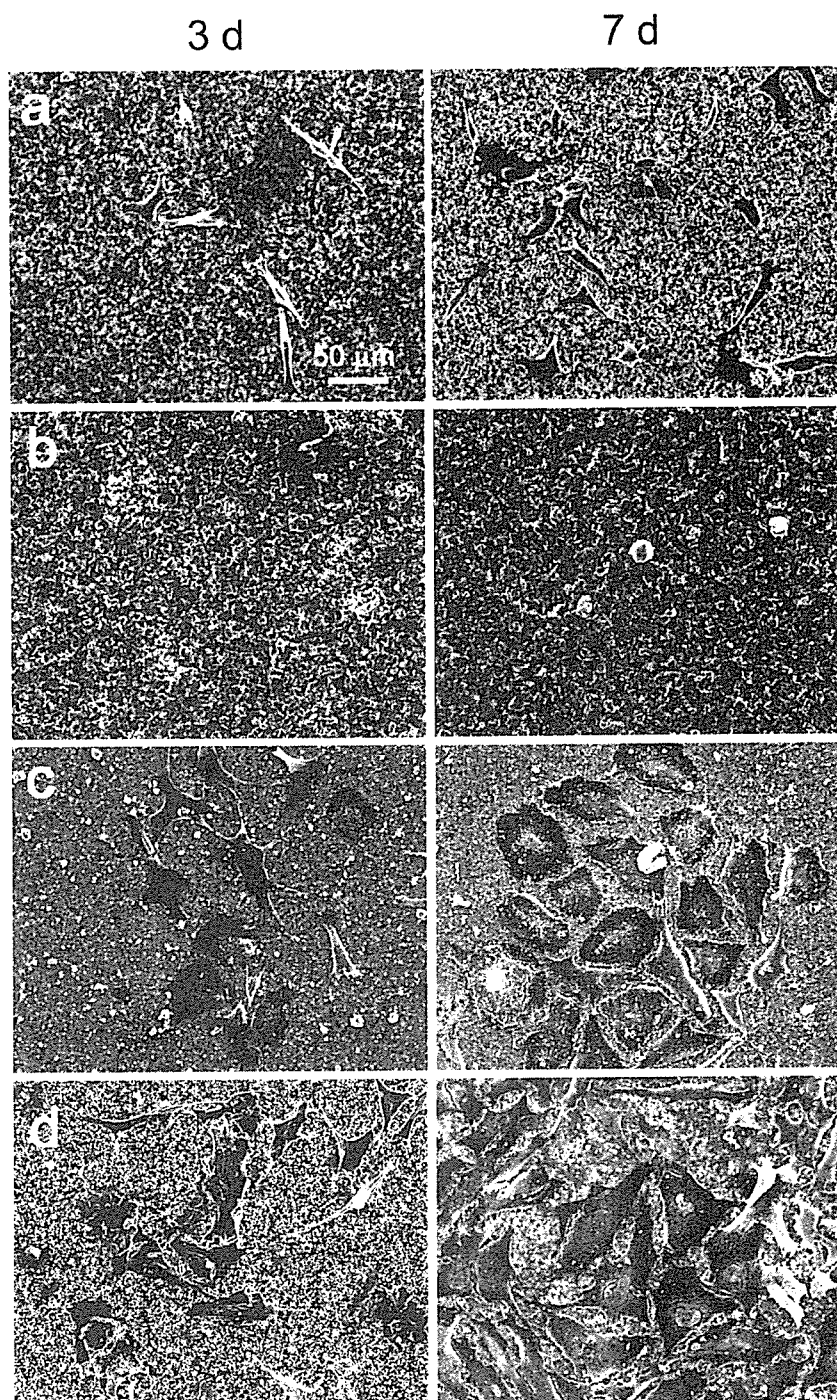


图 7-2

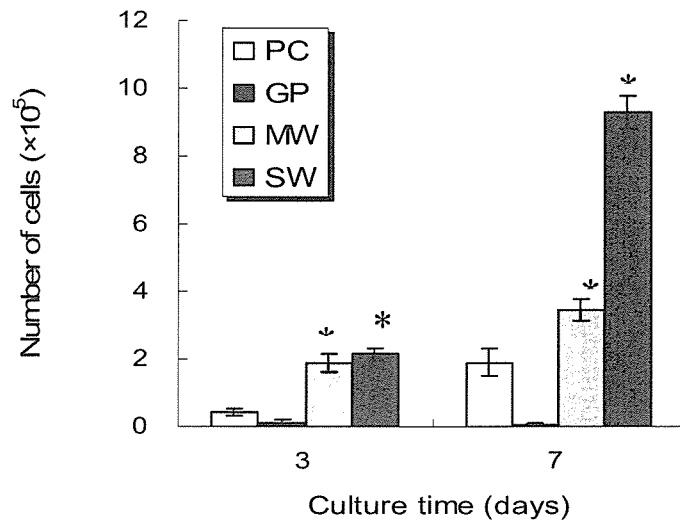


图 7-3

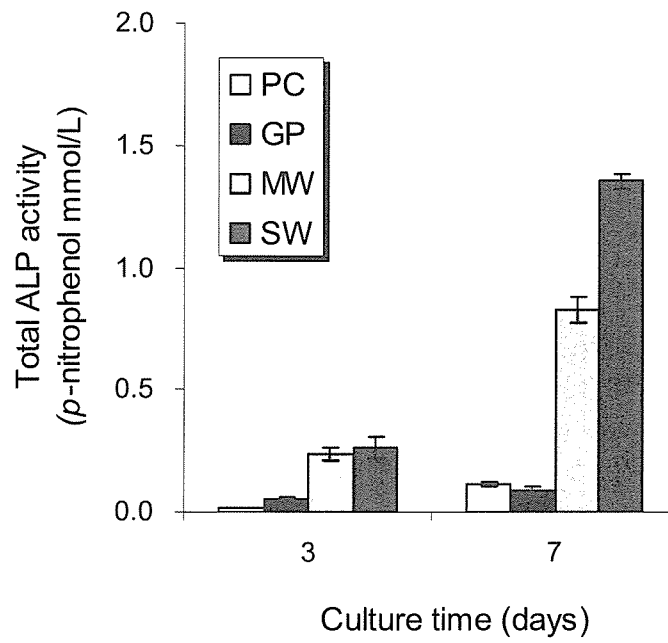


图 7-4

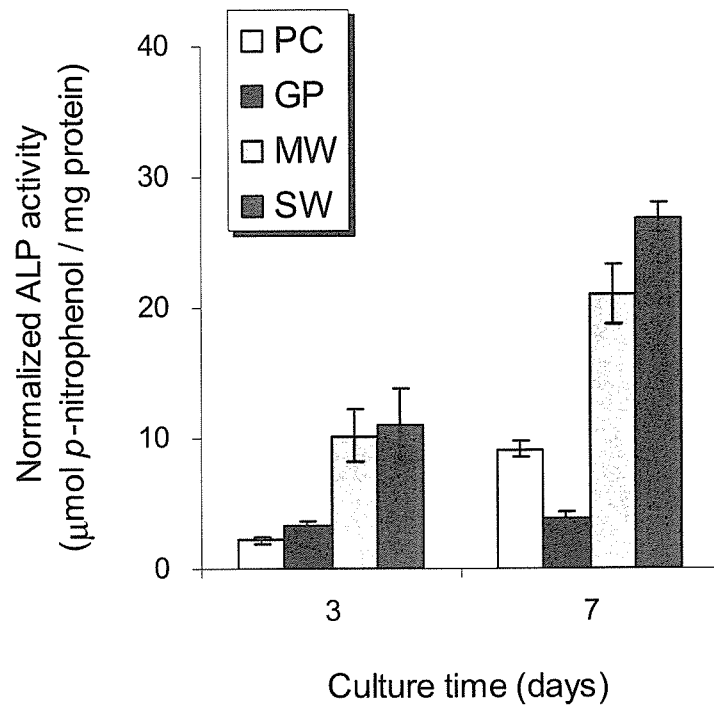


图 7-5

付図説明

図 1

MWCNTs

a: 220MWCNTs b: 825MWCNTs c: TEM 像 d: 220MWCNTs の粒度分布 e: 825MWCNTs の粒度分布

図 2

H-CNFs

a: 600H-CNFs b: 1200H-CNFs c: TEM 像 d: 600H-CNFs の粒度分布 e: 1200H-CNFs の粒度分布 f: H-CNFs のシェーマ

図 3

各種スキャホールドの SEM 像

a: PC 膜 b: GP c: MWCNTs d: SWCNTs

図 4 - 1

220MWCNTs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 2

220MWCNTs 埋入 1 週後の TEM 像

図 4 - 3

220MWCNTs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 4

220MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 5

220MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 6

220MWCNTs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 7

220MWCNTs 埋入 1 年後の TEM 像

図 4 - 8

825MWCNTs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 9

825MWCNTs 埋入 1 週後の TEM 像

図 4 - 1 0

825MWCNTs 埋入 1 週後の TEM 像

図 4 - 1 1

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 2

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 3

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 1 4

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 1 5

825MWCNTs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 6

825MWCNTs 埋入 1 年後の TEM 像

図 5 - 1

600H-CNFs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 2

600H-CNFs 埋入 1 週後の TEM 像

図 5 - 3

600H-CNFs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 4

600H-CNFs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 5 - 5

600H-CNFs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 5 - 6

600H-CNFs 埋入 1 年後の TEM 像

図 5 - 7

1200H-CNFs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 8

1200H-CNFs 埋入 1 週後の TEM 像

図 5 - 9

1200H-CNFs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 1 0

1200H-CNFs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 5 - 1 1

1200H-CNFs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 5 - 1 2

1200H-CNFs 埋入 1 年後の TEM 像

図 6 - 1

MALDI-TOF-MS 像

上 : フラーレン注入ラット肝臓の凍結切片光顕像

下 : フラーレンの TOF-MS 像

図 6 - 2

左上：グルコース鎖結合フラーレン注入ラット肝臓の凍結切片光顕像

右上：グルコース鎖結合フラーレンの TOF-MS 像

左下：ガラクトース鎖結合フラーレン注入ラット肝臓の凍結切片光顕像

右下：ガラクトース鎖結合フラーレンの TOF-MS 像

図 6 - 3

グルコース鎖結合フラーレンの TOF-MS 像とハイライト部位の積算スペクトル

図 7 - 1

各種スキャホールドに対するタンパク吸着試験

図 7 - 2

各スキャホールド上で培養した細胞の形態

3 d : 3 日後 7 d : 7 日後

a : PC b : GP c : MWCNTs d : SWCNTs

図 7 - 3

各スキャホールド上での細胞数

図 7 - 4

総 ALP 活性の各スキャホールドの比較

図 7 - 5

単位タンパク量あたりの ALP 活性の各スキャホールドの比較

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノ微粒子の *in vitro*, *in vivo* 生体適合性評価に関する研究

分担研究者 遠山 晴一 北海道大学病院助教授
研究協力者 小野寺 伸 北海道大学医学研究科助手

研究要旨 人工関節置換術後に磨耗微粒子によって誘発されるインプラント周囲の骨溶解の原因として、TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカインの最も上流で制御する因子と目されるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）が関与する可能性がある。したがって、本 MIF を標的とすることにより磨耗微粒子によって生じる骨溶解を制御することが有望であると予想される。そこで我々は MIF に対する自己抗体を産生させる目的でヘルパー T エピトープをコードしたオリゴヌクレオチドをマウス MIF の cDNA シークエンスに導入した MIF デオキシリボ核酸（Th 修飾 MIF-DNA）ワクチンを開発した。In vivo でエレクトロポレーション法により投与したマウスでは LPS 投与により惹起される血清中の TNF- α の上昇が抑制された。したがって、本 Th 修飾 MIF-DNA は種々の MIF が主座となる病態解明の解析に有用と考えられ、磨耗微粒子によって生じる骨溶解モデルに対する応用の可能性が期待できるものと考えられた。

A. 研究目的

人工関節置換術後に磨耗微粒子によって誘発されるインプラント周囲の骨溶解は最も重要な合併症の一つであり、インプラントの耐用年数や臨床成績に大きな影響を及ぼす。この骨溶解（オステオライシス）の原因として、従来インプラントのアライメントなどバイオメカニカルな因子が重視されてきたが、近年、バイオリジカルな機序が注目されている。すなわち、インプラントの主として摺動面より生じた磨耗微粒子が滑膜の細胞を刺激して TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）などのタンパク分解酵素の産生をうながし、特に前者は破骨細胞の分化を促して、インプラント周囲の、関節液・磨耗粉がアクセスしうる部位でのオステオライシスを生じさせるというものである。

マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカインをこれらの最も

上流で制御する因子と目される。Morand らのグループは、MIF が TNF- α の産生を促進すること、MIF ノックアウトマウスでは LPS 刺激により炎症を惹起しても TNF- α 等の産生が抑制されることなどより、MIF が TNF- α をさらに上流で制御するサイトカインである可能性を提唱している (Morand EF, Arthritis Rheum 2003)。したがってインプラント周囲の骨溶解の病態に骨吸収性サイトカインのネットワークが関与する各種の疾患において MIF が関与することは合理性がある。事実、各種の炎症性疾患モデル（肝炎モデル、関節炎モデル、敗血症モデルなど）に対する抗 MIF 中和抗体投与による抗炎症効果や MIF ノックアウトマウスでの炎症の低減は数多く報告されている (Morand EF, Int Med J 2005)。さらに我々は MIF が滑膜繊維芽細胞の MMP 産生を促進する知見を得た (Onodera S, JBC 2000)。

一方、我々はこれまでの研究において、人工股関節ゆるみ滑膜組織においてポリエチレン磨耗粉を食

食・内包化した多核巨細胞が免疫組織学的にMIF陽性であること、in-vitroでマクロファージにparticleを添加するとその食食に伴い容量依存性にMIFをタンパクおよびmRNAレベルで産生することを報告した(Onodera S, Immunology 1996)。これはオステオライシスにおけるMIFの関与を示す重要な知見と思われる。上記の事実とあわせて考えると、磨耗微粒子によって生じるオステオライシスにMIFが関与し、本MIFを標的とすることにより磨耗微粒子によって生じるオステオライシスを制御することが有望であると予想される。MIFを標的として抑制するには抗MIF抗体の投与が実験では通常一般的であるが、抗-抗体が産生され効果が減弱するなどまだ問題が多い。そこで我々はMIFに対する自己抗体を産生させる目的でMIF-DNAワクチンの開発を行った。

B. 研究方法

1. MIF-破傷風毒素発現プラスミドの作製

マウスMIFの第2ループ領域を既知のThエピトープで置換した改変マウスMIFを以下のように設計し作成した。マウスMIF cDNAをpCAGGS哺乳動物発現ベクターにクローニングした[免疫学的に活性のあるMIF抗原を作成するため、第2ループ領域を破傷風毒素のTヘルパー(Th)エピトープの配列に置換した。まず、マウスMIFの第2ループをコードする領域、則ちアミノ酸32-37(GKPAQY)、を取り除いてここにEcoRIサイトを導入した。次にこれらをEcoRIで消化して連結反応を行い、これを鋳型としてプライマーMIF(U)とMIF(L)を使ってPCRを行った。得られたDNAをpCAGGSにクローニングしMIFの第2ループ領域をEcoRIサイトに置換した変異MIF発現ベクターを得た。このサイトにEcoRI認識配列を両端に持つ破傷風毒素P30のcDNAを挿入した。TTXを組み込んだ改変MIF発現プラスミド(pMIF/TTX)の精製はアルカリ融解法と2度のCsCl密度勾配超遠心法により行った。

2. MIF/TTXの試験管内での発現

野生型MIFあるいはpMIF/TTXをCOS-7細胞にトランスフェクション試薬Effecten(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて導入した。24時間後の細胞のライセートをSDSポリアクリルアミド電気泳動してPVDF膜にブロッティングし、ウサギ抗MIF抗体と反応させ、

ケミルミネッセンス・システムを用いてMIFタンパク質を検出した。

3. DNAの筋肉注射とエレクトロポレーション

エレクトロポレーション(電気穿孔法)による筋肉への遺伝子導入は基本的にAiharaらの方法にて行った。各マウスは、合計50 μ gの裸のプラスミドを投与し、血中の抗MIF抗体価および抗体の抗原特異性をELISAおよび競合的ELISAにて評価した。

また、pMIF/TTX DNAワクチン投与によりマウス内で産生された抗MIF抗体が同様の抑制効果があるかを調べた。Balb/cマウス(4週齢, ♀)にpMIF/TTXワクチンもしくはpCAGGS(コントロール)を一回投与して6週後、それぞれのマウスはLPS(0111:B4, 1 μ g/ml)とD-ガラクトサミン(60mg/ml)の混合物200 μ lを静脈内投与した。1.5時間毎に尾静脈から血液サンプル(5 μ l)を採取し、TNF- α の血清中濃度をELISAにて測定した。

C. 研究結果

1. pMIF/TTXワクチンの構築とその試験管内発現

マウスMIFの第二ループ領域を破傷風毒素(TTX)P30の外来性Thエピトープで置換したDNAワクチンを作製した(図1A)。MIFの3次元構造に基づいて[21]第二ループ領域(アミノ酸番号32のGlyから37のTyr)をTTXエピトープの挿入箇所を選んだ。その理由としては、この領域の置換は他のループに比べて三量体MIF複合体の4次構造と抗原性にあまり影響しないと考えられたからである。MIFとTTXのキメラcDNAを作成して発現プラスミドpCAGGSにクローニングした。このコンストラクトが一時的にトランスフェクトされたCOS-7細胞で正しい蛋白を作り出すかどうか調べた。図1Bに示すようにMIF/TTXキメラ蛋白はSDS電気泳動上で野生型MIFと似た移動度を示した。しかも、それは野生型MIFに対して作られたウサギ抗体により認識した。このように、外来性Thエピトープの挿入は、その分子の発現あるいはそのMIFドメインの抗原性に変化を与えなかった。

2. pMIF/TTXワクチン接種による抗MIF抗体の産生とLPSによる血清TNF- α の増加抑制

pMIF/TTX DNAワクチンが正常なMIFを認識するポリクローナル抗体を誘導するか否かを調べた。この

ために、Balb/c マウスの両足の前頸骨筋に 0.9%生理的食塩水に溶解した 50 μ g の野生型 MIF, pMIF/TTX, あるいはベクター-DNA をエレクトロポレーション法で接種した。図 2A に示すようにワクチン接種から 4 週後に pMIF/TTX 接種マウスは正常 MIF に反応する自己抗体を持つようになった。これとは対照的に、野生型 MIF ワクチンとベクターのみのワクチンは 12 週後でも MIF に反応する抗体を産生しなかった。これらの差は、導入した外来性 TTX Th エピトープは T 細胞が自己蛋白を認識するように組み込んであることによる。そのため、pMIF/TTX ワクチンを導入したマウスにおいては MIF 自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができたと考えられる。

次に、pMIF/TTX DNA ワクチンによって産生された抗 MIF 抗体が正常マウス MIF との結合に関して中和活性を持つ抗 MIF モノクローナル抗体と競合するかどうかを調べた。競合的 ELISA の結果、ワクチン接種を受けたマウス血清のポリクローナル抗体をリコンビナントマウス MIF と前もって反応させておくと、抗 MIF 中和モノクローナル抗体 XIV14.3 のリコンビナントマウス MIF への結合を阻害した (図 2B)。従ってワクチン接種により誘導された抗体は確かに MIF に対する特異性を持つこと、さらにこの抗体が中和活性を持つという可能性が示唆された。

抗 MIF ポリクローナル抗体でマウスを前処置しておくと、後で LPS を静脈注射して誘導される血清 TNF- α のレベルが効果的に抑制されることが報告されている [18]。そこで pMIF/TTX ワクチン誘導抗 MIF 抗体が同様の効果を持つかを調べた。pMIF/TTX で一度ワクチン接種を受けたマウスにその 6 週後に LPS を静脈注射した時、血清 TNF- α のレベルはベクター-DNA を前処置した LPS 投与マウスよりも有意に低かった (図 2C)。これらの結果から、pMIF/TTX DNA による免疫は正常 MIF を特異的に認識する抗体を産生し、MIF の生物活性を中和している可能性が考えられた。

D. 考察

本研究で用いた Th 修飾ワクチン法は、疾患の発症に関わる自己蛋白に対して免疫反応を惹起する手法としての可能性を証明している。T 細胞が自己蛋白を認識するように外来性 Th エピトープを組み込むことによって、自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができる。DNA ワクチンは、生体内

で抗原を発現させて液性および細胞性免疫反応を引き起こす新しい手段で、前臨床の動物モデルにおいて DNA ワクチンの有効性はよく証明されている。DNA ワクチンは、構築と精製が比較的簡単であることから組み換え蛋白ワクチンより有利である。さらにこのアプローチは、有望な蛋白免疫物質を速くスクリーニングするのに有用である。

Th エピトープを持たない C-C ケモカインをコードするネイキド cDNA が自己抗体を産生させ、実験的アジュバント脳炎の発症を効果的に阻止することが知られている [1]。Th エピトープの助けなしに自己抗体が産生されるのは、そのプラスミド内の非メチル化 CpG モチーフのようなオリゴヌクレオチド配列が免疫アジュバントとして働き、それが抗原特異的免疫反応を促進するためと考えられる。しかし、Hertz らは、修飾されていないマウス野生型 IL-5 cDNA は抗体を産生させないと報告しており [2]、これは本研究でもマウス野生型 MIF cDNA は自己抗体を作り出さないことと一致している。このように、Th エピトープの適切な選択と cDNA の適切な箇所への挿入は効果的な DNA ワクチンの構築を成功させる鍵となったものと考えられた。さらに、DNA の運搬と DNA ワクチンの効果はエレクトロポレーションで増強される。Selby らは筋肉内にプラスミドを注射されたマウスは、免疫にエレクトロポレーションが使われた時、ルシフェラーゼの発現で 7.3 倍、抗体価で 8-20 倍増加することを示した。ワクチンマウス由来抗血清が抗 MIF 中和抗体を用いて行った MIF との競合的 ELISA において活性を示したことから、ワクチンによって MIF 活性を中和する抗体が誘導されたこと、さらに LPS 刺激による血清 TNF- α レベルに対するワクチンの抑制効果はこの抗体誘導によってもたらされたことが考えられた。

結論として、Th 修飾 MIF-DNA は種々の MIF が主座となる病態解明の解析に有用となるものと考えられた。したがって、磨耗微粒子によって生じるオステオライシスモデルに対し、Th 修飾 MIF-DNA を接種し、このモデルによるオステオライシスが回避されるかを今後、検討する予定である。

E. 結論

抗 MIF 自己中和抗体を誘導することを目的とし

た能動免疫について実験を行い、ヘルパーT エピトープをコードしたオリゴヌクレオチドをマウスMIFのcDNAシーケンスに導入したMIFデオキシリボ核酸(DNA)ワクチンを開発した。In vivo でエレクトロポレーション法によりMIFデオキシリボ核酸(DNA)を投与したマウスではLPS投与により惹起される血清中TNF- α の上昇が抑制された。これらの結果よりTh修飾MIF-DNAはMIFが主座となる種々の病態解明に有用と考えられ、磨耗微粒子によって生じるオステオライシスモデルに対しする応用の可能性が期待できるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Onodera S, Ohshima S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Iwakura Y, Matsuda I, Minami A, Koyama Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Jan 30;56(2):521-530 [Epub ahead of print]
2. Onodera S, Sasaki S, Ohshima S, Amizuka N, Li M, Udagawa N, Irie K, Nishihira J, Koyama Y, Shiraishi A, Tohyama H, and Yasuda K: Transgenic Mice Overexpressing Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Exhibit High-Turnover Osteoporosis. *J Bone Min Res* 21, 876-885, 2006
3. Oshima S, Onodera S, Amizuka N, Li M, Irie K, Watanabe S, Koyama Y, Nishihira J, Yasuda K, and Minami A: Macrophage Migration Inhibitory Factor-Deficient Mice Are Resistant to Ovariectomy-Induced Bone Loss. *FEBS Lett* 580(5):1251-6, 2006
4. Yoshikawa T, Tohyama H, Katsura T, Kondo E, Kotani Y, Matsumoto

H, Toyama Y, Yasuda K. Effects of Local Administration of Vascular Endothelial Growth Factor on Mechanical Characteristics of the Semitendinosus Tendon Graft After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. *Am J Sports Med.* 2006 Nov 7; [Epub ahead of print]

5. Ikema Y, Tohyama H, Yamamoto E, Kanaya F, Yasuda K. Ex vivo infiltration of fibroblasts into the tendon deteriorates the mechanical properties of tendon fascicles but not those of tendon bundles. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2006 Nov 1; [Epub ahead of print]

6. Tohyama H, Yasuda K, Uchida H, Is the increase in type III collagen of the patellar tendon graft after ligament reconstruction really caused by "ligamentization" of the graft? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Jun 21; [Epub ahead of print]

7. Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Minami A, Tohyama H. The effect of intraosseous graft length on tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction using flexor tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Nov;14(11):1086-93. Epub 2006 Jul 15.

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し