

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

分担研究者 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

研究要旨

医用材料と炎症系細胞との *in vitro* での相互作用解析を行うことで、その材料が生体内埋植後引き起こす炎症反応の程度を予測可能か検討する。初年度はヒト単球由来細胞を用いて解析を行うための条件設定を行った。また、モデル材料表面として、自己組織化膜を用いた種々の単一官能基表面調製に関する検討を試み、6種類の官能基表面を調製した。

A. 研究目的

体内埋め込み型医療機器による強い炎症反応がいくつか報告されているが、その原因の1つは機器を構成する材料である可能性が示唆されている。生体内の過酷な環境により、機器を構成する材料の分解などに伴う物質や溶出物が炎症を引き起こしている可能性は否定できない。しかしながら、一般に、埋植型医療機器を埋植した場合には、生体と接触する機器の表面特性、例えば化学構造やその表面荒さ、材質に起因した表面自由エネルギー等に応じて、様々な生体反応が生じることが知られている。理想的には、生体内で生体組織と良くなじみ、半永久的に機能を保ち且つ生体に対して何ら障害を引き起こさないことが望ましい。しかしながら、医療機器として必要な機能を保ち、生体内で埋植できるような大きさに整形することが必要であるため、生体に対する影響のみを考慮してその機器を作製

することは、現在の技術では不可能に近い。よって、医療機器として使用する利益とその材質や形状から来る不利益とのバランスを考慮しなければならない。その不利益の1つである埋植初期の炎症反応や、それに引き続いて起こる様々な慢性的な障害などを評価するためには、動物を用いた埋植試験が有効であるが、近年、動物愛護運動の高まりから、社会的にそのような埋植試験の減少が求められていること、また、費用などの観点からも、*in vivo* 試験代替法の開発が急務となっている。

医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用が最大の要因である。まず、埋植直後にはその周囲組織に炎症反応が生じるが、この炎症は様々な不具合の要因となりうるため、材料によって引き起こされる炎症度合を *in vitro* で評価できる方法の開発が必要とされている。そこで、汎用性の

高い種々の医用材料や、特性を様々に変化させたモデル表面上での炎症系細胞の挙動変化を検討すれば、埋植後の炎症反応とその医療機器表面との関連性を明らかにすることが可能になると考えられ、さらには、実際に動物に埋植した後の炎症反応と詳細に比較検討することで、より信頼性の高い *in vitro* での医用材料の炎症リスク評価が可能となると予想される。また、このような研究は数多く存在するにも関わらず、種々の材料を対象として系統的に行われた研究は殆どない。よって、本研究では、*in vitro* で炎症系細胞との相互作用解析を行い、その材料が実際に生体内に埋植された後に引き起こす生体反応、特に炎症反応程度を予測可能な手法の開発することを試みる。それと同時に、炎症などの生体反応と材料特性との関連性の有無や、材料により引き起こされる炎症の機構を明らかにする。

B. 研究方法

本年度は、相互作用検討を行う際に使用する細胞としてヒト単球由来の株化細胞である THP-1 が使用できるかどうかを検討した。炎症の指標としては、簡便に測定ができ、また phorbol ester 刺激による THP-1 からの産生が多く報告されている活性酸素を選んだ。まず、THP-1 からの活性酸素産生を確認すると同時に、その測定のための最適な条件を検討することを目的として、以下の3つの試薬を種々の濃度で添加した際の活性酸素産生量を測定した。

- 1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- 2) lipopolysaccharide (LPS)
- 3) polystyrene microspheres (PS: 0.5 μ m

径)

THP-1 を PMA 0.1 μ g/ml、活性型 vitamin D 0.1 μ M、あるいはこれら両者を添加した FCS 10% を含有する RPMI 1940 培地 (RPMI-10FCS) で 24well マルチプレートに播種し、3日間培養した。この処理で、本来浮遊細胞である THP-1 がマクロファージ様に分化し well 上に付着する。その後、PMA 及び活性型 vitamin D を含まない RPMI-10FCS で所定時間培養した後に、種々の濃度で上記3種類の試薬を含有した 0.08 mM cytochrome-C Hanks Buffered Saline Solution (HBSS) 溶液中で 90 分培養して、試薬刺激に伴う活性酸素産生量を吸光度変化から算出した。刺激剤の添加濃度は

- ・ PMA : 0.1 -10 μ M
- ・ LPS : 0.1 -10 μ g/ml
- ・ PS : 0.25, 0.5, 1 μ g/ml

で検討を行った。

自己組織化膜を用いた各種官能基表面は、以下の方法で作製した。作製用の基材には、マツナミ社製の円形カバーガラス (15mm 径、厚さ 0.1mm) に走査型電子顕微鏡観察試料調製用スパッタコーティング機器で金を 20nm 厚で蒸着させたものを使用した。

この基材を、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることで、特定の単一官能基からなる表面を調製した。市販品から調製できる官能基表面は 1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、の4種類である。また、acetonitrile 中、Ar 気相下で POCl_3 、2,4,6-collidine と水酸基表面試料とを反応させることでリン酸基からなる表面の調製を行った。さらには、DMF 中、Ar 気相下で

DMF-SO₃ complex と水酸基表面試料とを反応させることで、表面への硫酸基導入を試みた。

C. 研究結果

予備実験として、活性化 THP-1 に PMA、LPS、PS を種々の濃度で添加した際の活性酸素産生量を cytochrome-c 溶液の 550 nm での吸光度変化から検討した。刺激剤濃度をいろいろと変化させ、また、3 種類の刺激剤を様々な組み合わせで加えて活性酸素の産生量を測定したが、いずれの場合においても cytochrome-c 溶液の吸光度変化は全く見られなかった。

金蒸着カバーガラスに各種試薬を用いて、4 種類の官能基を持つ表面をそれぞれ調製した。さらに、水酸基表面から硫酸基表面、リン酸基表面を合成し、これらの表面の接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を ESCA で測定した (表 1)。この結果から、6 種類全ての官能基表面が調製できていることが示唆された。

これらの表面に、正常ヒト骨芽細胞を播種すると、細胞が接着伸展していることが確認されたが、メチル基表面では細胞は接着するもののその数が少なく、ほぼ全てが凝集して存在することが確認された (図 1)。1 週間培養した後の細胞数を水溶性 MTT 試薬で確認すると、未処理の金表面と比較してメチル基表面ではその 10% 程度、リン酸基及び硫酸基表面での細胞数は半分程度しか存在していなかった。

D. 考察

通常、in vitro で材料表面上に接触するのみの刺激では炎症系細胞の活性化は弱く、

細胞が測定可能な量の炎症関連物質を産生しない可能性がある。そこで、実際の実験系では、細胞を材料上で培養した後に、さらに PMA や LPS などの刺激剤を添加して活性酸素や炎症関連サイトカインを測定する。よって、本実験を始める前に、添加する適切な刺激剤の量を決定する必要がある。そこで、種々の濃度の刺激剤を添加した THP-1 からの活性酸素産生量を測定してみたが、今回の条件では全くその産生は確認されなかった。THP-1 からの活性酸素産生に関しては、マクロファージなどと同様に PKC を活性化する PMA により活性酸素を産生することが報告されているため、活性酸素を産生しないとは通常考えられない。しかしながら、THP-1 は継代を重ねることで数々の変異株を生じることも報告されているため、この変異株は外部刺激に対する反応性が変化している可能性は否定できない。事実、今回用いた THP-1 は他の分担研究者から分与されたものであり、IL-6 産生における LPS 感受性が他の THP-1 よりも高いことが明らかになっている。光学顕微鏡観察で、分化した THP-1 が PS を貪食している像も見られたことから、活性酸素産生以外の何らかの指標でその活性化が現れていることは想像に難くない。よって、来年度は、同じ細胞を用いて IL-6 など別の適切な炎症関連メディエータを指標とする、あるいは別の種類の細胞を用いて活性酸素産生量を指標とした検討を行い適切な細胞を選択するなど、本研究の目的に適した実験系の構築を行う。

自己組織化膜を利用した単一官能基表面の構築は、この 10 年強の間に飛躍的に発展してきている。にも関わらず、その均一

な表面を利用したリスク評価に関するレギュラトリーサイエンス研究は行われていない。前述したように、医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用、すなわち生体と材料との界面における現象を捉え、その機構を明らかにすることが非常に重要である。材料表面の特性を決定する要因には様々なものがあるが、その表面の化学構成、すなわち表面官能基もその要因の一つである。様々な官能基に対する生体反応を詳細に検討してその基礎的データを蓄積していくことが、医療機器のリスク評価を行うにあたっては欠かすことができないと考えられる。そこで、本研究では、汎用性の高い医用材料を使用する前に、自己組織化膜を用いたモデル表面を調製し、その上に培養した炎症系細胞の挙動変化を検討することを考えた。本年度は、まず、6種類の官能基からなる表面の調製が可能であることが、主に ESCA 解析から確認できた。

水酸基表面からリン酸基表面及び硫酸基表面を調製する手法は、既に報告されている。しかしながら、既報告の硫酸基表面調製方法では、表面に非常に多くの副生成物が付着し、洗浄の程度によっては蒸着した金属が剥がれてくるなどその除去が困難であった。そこで、多糖の水酸基を硫酸化する際に用いる比較的緩和な手法での硫酸基表面調製を試みた。ESCA のデータからはその調製が可能であることが示唆されたが、緩和な化学反応であることから全ての水酸基が硫酸化しているとは考えにくい。また、将来、複数の官能基を様々な比率で持つ表面を調製して、その上での細胞挙動変化観察を計画しているが、そのような表面を調

製するためには、今回用いた硫酸化及びリン酸化方法は適用できない。これを解決するために、翌年度は、片末端に硫酸基及びリン酸基を持つ decanethiol の合成を行う。

まず今年度は、これらの表面上に正常ヒト骨芽細胞を播種し、その接着及び増殖挙動の観察を行ったが、官能基に応じてその挙動が影響を受けることが示唆された。この官能基による細胞接着挙動への影響がどのような機構によるのかについても、来年度以降に官能基密度を変化させた表面を調製して検討を行いたい。

なお、疎水性表面であるメチル基表面を調製し細胞実験に使用した場合には、その金蒸着状況によっては金属が容易に剥離することが認められた。通常は、金属とガラス面の間にクロムやチタンの蒸着層を介在させて金属の剥離を防ぐことが報告されているが、当所に現在ある機器ではこのような対策が困難ではある。来年度は、予めチタン層を蒸着したカバーガラスを入手するなど何らかの対策を行いたい。

E. 結論

今年度用いた THP-I では、3種類の活性化試薬を添加しても活性酸素産生は認められなかった。活性酸素以外の炎症メディエータを指標に採用するか、他のヒト単球由来の細胞、あるいは新鮮血を用いた実験系の構築が必要であることが明らかとなった。

市販の試薬と合成反応により、6種類の官能基からなる単一官能基表面の調製が可能であることが示された。今後は、この手法をさらに改良して、この研究に適した官能基表面調製方法を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(研究業績「欧文」)

- 1) Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya. Synthesis of novel beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial Organs, 2007, 10, 22-28.
- 2) Shigeyuki Wakitani, Masashi Nawata, Amu Kawaguchi, Takahiro Okabe, Kunio Takaoka, Toshie Tsuchiya, Ryusuke Nakaoka, Hiroyuki Masuda and Kyosuke Miyazaki. Serum keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown. Rheumatology, 2007, 46, 1652-1656.

(研究業績「和文」)

中岡竜介、松本富美子、宗林さおり、柳橋哲夫、土屋利江、視力補正を目的としないおしゃれ用カラーコンタクトレンズの細胞毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告、2007, 125, 61-64.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 中岡竜介、土屋利江「種々の官能基がヒト骨芽細胞に与える影響」、第29回日本バイオマテリアル学会大会、吹田市、2007年11月26、27日
- 2) 松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、齋島由二、伊佐間和郎、久保敬、中平敦、湯田坂雅子、飯島澄男、土屋利江

「ナノ材料の粒度分布と細胞毒性」、第29回日本バイオマテリアル学会大会、吹田市、2007年11月26、27日

- 3) 中岡竜介、鄭徳泳、迫田秀行、土屋利江、「細胞接着性ペプチド修飾アルギン酸ゲルを用いた軟骨再生の可能性」、第7回日本再生医療学会総会、名古屋市、2008年3月13、14日

国際学会

Saori Sourin, Takako Matsumoto, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Atsushi Kanai, Safety of fashion color contact lenses in Japan, CLAO (contact lens association of ophthalmologists) annual meeting in 2007, Las Vegas, USA. 2007.10.5, 6.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

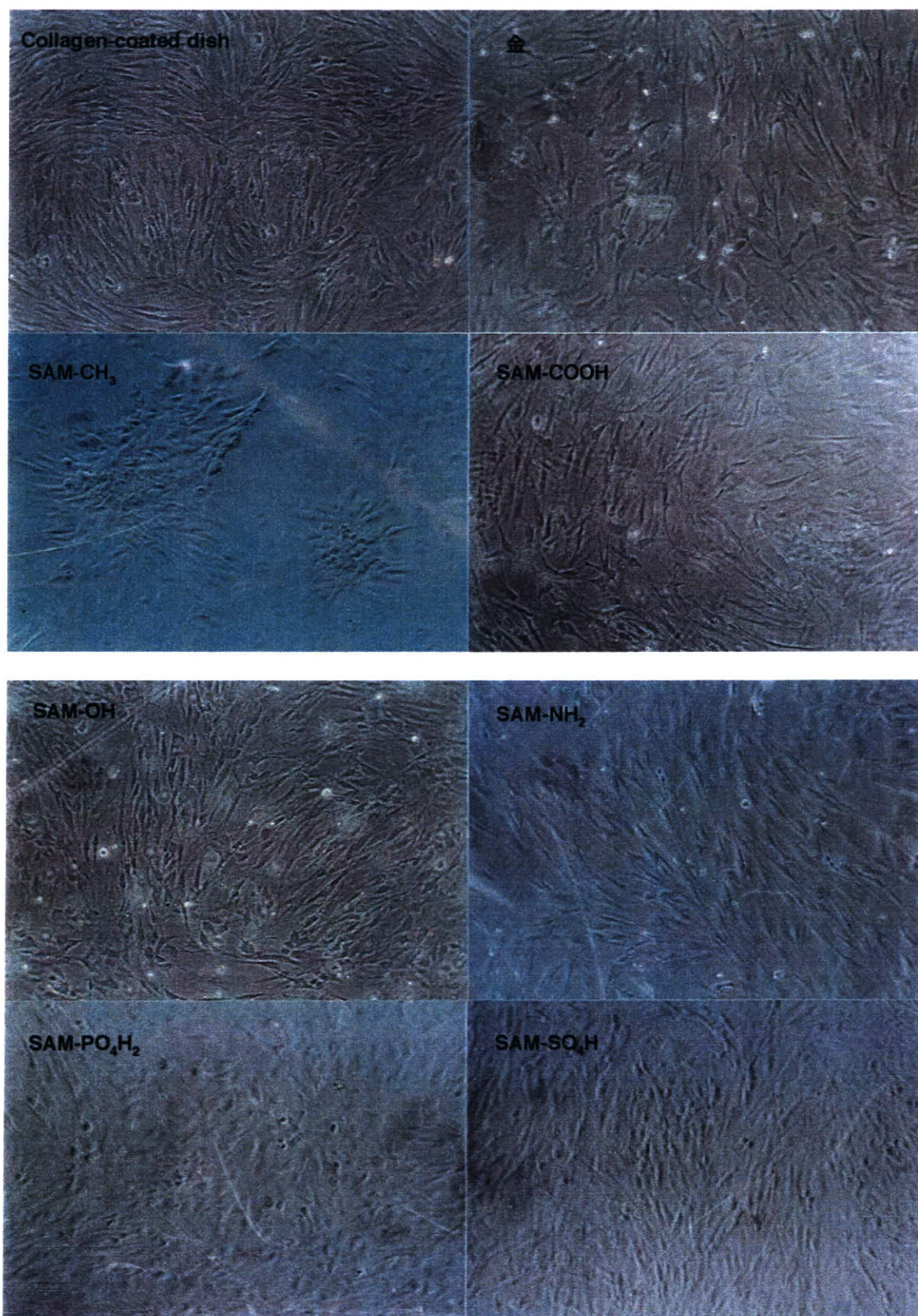
表 1. 調製した自己組織化膜とその接触角及び表面元素組成

	自己組織化膜 (SAM)						
	金表面 (control)	SAM-CH ₃	SAM-COOH	SAM-OH	SAM-NH ₂	SAM-OPO ₃ H ₂	SAM-OSO ₃ H
接触角	64.4±2.1	102.9±3.0†	51.7±14.5	40.1±14.2*†	65.0±9.8	59.0±13.7*	44.3±10.2
元素 シグナル比							
O/C	3.2x10 ⁻³	N.D.	4.6x10 ⁻³	2.9x10 ⁻³	2.2x10 ⁻³	4.8x10 ⁻³	6.8x10 ⁻³
N/C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.8x10 ⁻³	N.D.	N.D.
P/C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.1x10 ⁻³	N.D.
S/C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.2x10 ⁻³

* p< 0.05 between SAM-OH and SAM-OPO₃H₂

† p< 0.01 against Au

図1. 各種自己組織化膜 (SAM) 上に播種した正常ヒト骨芽細胞
培養1日目の光学顕微鏡写真 (撮影倍率: 40倍)



1 3. ラットを用いたフラレン(C60)の中樞神経
への直接投与による脳機能への影響に関する研究

山田 貴史

分担研究報告書

分担研究課題名

ラットを用いたフラレン(C60)の中樞神経への直接投与による 脳機能への影響に関する研究

主任(分担)研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部
協力研究者 山田 貴史 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨：フラレンは、様々な生理作用を有したナノ粒子であり、側鎖に特定のタンパク質を修飾することで、薬剤などを特定の部位に運ぶという作用も期待される。我々は、脳神経系をターゲットとしたフラレンの医療材料としての利用または神経再生医療材料としての利用を考え研究を進めている。フラレンを医療材料として用いるにあたり、その毒性、腫瘍形成、変異原性、発ガン作用などについて精査する必要があるが、これまでにいくつかの報告がされてきたが、脳神経系に関する安全性の評価に関する報告はほとんどない。さらに、中枢神経には血液脳関門があり、脳に入る物質を厳密に制限している。すなわち、フラレンの脳神経系への影響をみることで、さらに中枢神経への直接的な接触時の影響についても調べる必要がある。そこで本実験では、フラレン (fullerene60) を、ラットの側脳室に直接投与し、行動試験による行動の変化や神経伝達の変化などについて測定を行った。

A. 研究目的

フラレン(C60)は、炭素原子 60 個からなるサッカーボール状のナノ粒子のクラスターである。規則正しい面心立方構造をとっており、drug derivation を目的とした、生体機能プローブや医療基盤としての多糖呈示化合物の合成が注目されている。近年では、フラレンと同様に、六員環で構成された一様な平面のグラファイトを丸めて円筒状にしたカーボンナノチューブの研究も進められており、このカーボンナノチューブにフラレンを内包したものなども作成されている⁽¹⁾。

フラレンに関する多くの生理作用、薬理作用も報告されている。フラレンのラジカルスポンジ作用は、ラジカルをトラップ

し、無害化する。また、 β アミロイドタンパクのアミノ酸配列のうち、疎水性部分に結合し、ベータシート化することを抑えることで、 β アミロイドの会合阻害をする。また、DNA を切断する作用があり、フラレンの側鎖の構造に依存し、標的となるDNAの破壊や、制限酵素のような働きをする。一方で、光刺激に反応し、活性酸素種を発生する。HIV 逆転写酵素の活性部位に結合し、この酵素を失活させるなどの報告もされている⁽²⁾。このように、フラレンは生体に、様々な影響を及ぼす可能性が示唆され、生体への多くの利用価値があると考えられるが、それと同時に適切かつ安全に利用する必要がある。

我々は、フラレンが中枢神経の治療、

または神経再生への利用を目的として研究を行ってきた。中枢神経は、いまだその機能の全容が解明されていないが、近年の目覚ましい中枢神経研究の発展により、これまで胎児期にしか存在しないとされてきた神経幹細胞が、大人の脳にも存在していることや、神経幹細胞の増殖・分化のメカニズムや、それに関連する因子が明らかにされてきた⁽³⁾⁽⁴⁾。フラレンに神経の増殖・分化に有効なタンパクを修飾し、中枢神経に導入することで、神経細胞の維持または、神経疾患の回復に利用できるのではないかと考えられる。しかしながら、フラレンの中枢神経に対する毒性に関する資料は現在ほとんどない。Sato^hらは、フラレンを100mg/kgB.W.でマウスに腹腔投与し、痛覚感受性試験、筋力試験、回避試験や情動試験を行ない、急性の影響について評価したが、対照群との差はみられなかった。また、フラレンを30mg/kgB.W.でマウスの腹腔に投与し、4週間後に動試験により、長期的な暴露での影響についても観察したが、対照群との差は観察されなかった⁽⁵⁾。しかしながら、フラレンが中枢神経に取り込まれるのか、また、取り込まれたとしたらその量はどの程度なのかは明らかになっていない。神経中枢神経への物質の取り込みは血液脳関門に制御されている。現在までに、フラレンの血液脳関門の透過性に関する報告はされていないが、バイオマテリアルとして、フラレンを中枢神経に導入する場合には、中枢神経での直接的な毒性を評価しなくてはならない。そこで本試験では、ラットの側脳室にフラレンを直接投与し、フラレンの中枢神経への影響・毒性について検討した。

B. 研究方法

動物

Wistar系雄性ラット体重400g程度を用いた。温度と湿度が調節された部屋(室温24℃、湿度55%、常時12時間ライト点灯、12時間消灯)で、飼育した。試験前および試験測定中は、市販の精製固形飼料および、水道水を自由摂取させた。試験前日に、fullerene60投与群と対照群に分けた。1群を6匹とし測定を行なった。

フラレンの側脳室への投与

ペントバルビタールを腹腔内投与し(3.5mg/100g B.W.)、麻酔をかけ、頭部の毛をバルカンでかり、ステレオタキシク装置に頭部を固定した。頭皮を縦に1.5~2.0cm切り開き頭蓋骨を露出させ、止血剤(エピネフリン剤)で、完全に止血できるまでよく拭き、頭蓋骨を乾燥させた。止血後、BregmaおよびLambdaの位置を確認し、PaxinosとWatsonらのブレインマップ⁽⁶⁾を参考にして側脳室の位置を定め(側脳室の位置は、Bregma-Lambda間が9mmの時、Bregmaより右(左)6mm、後方1.4mm、Dura(硬膜)より深さ4.0mmとした。Bregma-Lambda間が9mmでない時は、上記の位置を比例計算し、ポジションを決めた)、歯科用ドリルで頭蓋骨に穴をあけ、Duraより深さ3.5mmの位置にマイクロシリンジを挿入した。マイクロシリンジポンプを用い、1mg/ratになるようにfullerene60を注入した。注入したfullerene60は、人工脳髄液に懸濁し注入した。対照群には、fullerene投与群と等量の人工脳髄液を注入した。

自発行動測定試験

open field test を行なった。Open field box (70×70×50high) にラットを入れ、5 分間の行動距離を測定した。測定は、DV-Track ビデオ・トラッキングシステム CompACT VAS/DV (MUROMACHI) により記録した。手術の翌日、1, 2, 3 週間後の計 4 回の測定を行った。

神経伝達物質濃度測定

行動試験終了後、断頭により速やかに屠殺し、脳を摘出した。視床下部を分離し、液体窒素により速やかに凍結し、測定まで -80 度で保存した。組織の 10 倍量の 0.2M 過塩素酸を加え組織をホモジナイズし、1 時間 4℃で放置したのち、卓上遠心機を用い遠心分離により上清を得た (4℃、10,000rpm、15min)。上清に 5 分の 1 量の 2M 酢酸を加え、0.45 μ m のセルロースフィルターでフィルターレーションし、測定用サンプルとした。測定は、高速液体クロマトグラフィーにて行なった。カラムは ODS 逆層カラム、作用電極 Gc-Ce、電圧 +650mV、電化検出器 (Eicom)、移動相はクエン酸酢酸バッファーを用いた。

C. 研究結果

Fullerene 60 を 1mg / rat (2.5mg / kg B.W.) で側脳室に投与した後に、ラットの体重の推移を測定した。Fullerene 投与群は、対照群に比べ手術後の体重減少が著しかった (図 1)。対照群が術後 5 日で術前の体重まで回復したのに比べ、fullerene 投与群では、術前の体重に戻るまでにおよそ 12 日を要した (図 1)。

自発行動量試験では、測定を行う 5 分間の、総移動距離 (図 2-1) 及び平均移動速度 (図 2-2) を測定した。Fullerene 投与群では、手術の 1 日後のその移動時間、総移動距離が対照群と比べ低い傾向を示したが、その他については、差は認められなかった。

脳視床下部のドーパミン濃度およびその代謝物濃度 (図 3-1) と、セロトニン濃度およびその代謝物濃度 (図 3-2) の測定を行った。Fullerene60 投与群の、ドーパミン及びその代謝産物である、DOPAC, HVA の濃度は、対照群と比べ差はみられなかった。セロトニンおよびその代謝物である 5HIAA 濃度は、fullerene60 投与群で、対照群と比べ減少した。

D. 考察および結論

今回の試験では、fullerene60 の脳内への直接投与を試み、特に、中枢神経に及ぼす、基本的な行動への毒性および、それに関連する神経伝達物質への影響について観察した。Fullerene の側脳室への直接投与を行った後に、体重の変動を記録したところ、fullerene 投与群の、著しい体重の減少が観察された。今回の試験では、摂食量および摂水量の測定を行っていないため、この体重減少がどのような要因により引き起こされたのかははっきりとした見解はできないが、急激な体重の減少がみられたことから、摂食量、摂水量の減少が要因になったのではないかと考えられる。摂食行動を制御する脳部位として知られている視床下部では、インシュリン、レプチン、ニューロペプチド Y の他、様々な因子により摂食行動、空腹感や満腹感の発現が制御されており、さらにこれらの因子は活性酸素種の影響を受けることが明らかとなっている⁽⁷⁾。

Fullerene60 は、活性酸素種をトラップし、その作用をなくす働きが報告されていることから、fullerene60 がフリーラジカルをトラップすることで、摂食行動に影響を与え、体重の変動をおよぼした可能性がその要因の一つに考えられるが、今後さらに検討する必要がある。また、fullerene 投与群の体重の増加率は、対照群と比べ遅いものの、術後12日 で術前と同程度まで回復し、その後も順調に増加したことから、摂食行動および、エネルギー代謝に関する fullerene60 の慢性的な影響・毒性はないものと考えられた。

Fullerene 60 の投与による、自発行動量を測定した結果、術後1日目で fullerene60 投与群において、対照群と比べ、総移動時間および総移動距離の減少傾向が観察された。また、視床下部のドーパミン、その代謝産物である DOPAC, HVA 濃度およびセロトニン、その代謝産物である 5HIAA を測定した結果、fullerene 投与群においてセロトニン、5HIAA 濃度の減少が観察された。ドーパミンは、黒質で合成され、その大部分が線条体に投射されている。快の神経伝達物質として知られており、ドーパミン作動性神経が働くことにより、行動意欲の向上または行動量の増加が引き起こされる。また、パーキンソン病の原因の一つとされており、同疾患は、ドーパミン神経が選択的に脱落することにより、随意運動障害に陥る。セロトニンは、鬱病のターゲットとしても知られており、情動、ホルモン分泌など、生体の恒常性を保つための様々な役割を担っている。特にストレス刺激に関する応答に重要な働きをし、脳扁桃体の活性化による不安情動の発現や、視床下部から、副腎皮質刺激ホルモンを分泌し、副腎を活性化させ、抗ストレス物質の分泌を放出する⁽⁸⁾。

免疫機能にも関連し、中枢にも多く存在するサイトカインと密接に関連し、それぞれの作用を調節していると考えられている⁽⁹⁾。セロトニンの過剰分泌により引き起こされるセロトニン作動性神経の脱感作により、免疫力の低下が引き起こされることが報告されている。摂食行動にも影響し、食餌摂取にセロトニンの分泌が促されることにより、摂食中枢が刺激されることが示唆されている⁽¹⁰⁾。今回みられたセロトニンの減少の原因については、今後の検討課題であるが、fullerene60 投与の投与により、サイトカインの分泌を促進したことが一つの原因ではないかと考えられた。また、体重の減少も、セロトニン量の減少に起因していることが予想された。今後、fullerene60 投与による脳内サイトカインの変動について調べる必要がある。サイトカインおよびセロトニンは自発行動量やその他様々な行動にも影響を及ぼすことが示唆されている。手術1日後の fullerene60 投与による行動量の変動に関しても、サイトカインの変動が影響した可能性が考えられる。しかしながら、自発行動量の変化に関しても、致命的な影響や慢性的な毒性はみとめられなかった。

以上の結果から、fullerene60 の側脳室への投与は、セロトニンなどの神経伝達物質の変動を及ぼすことが示された。しかしながら、致命的な毒性や自発行動への影響はないものと考えられた。今後、脳内サイトカインの変動を視野に入れ、投与する脳部位、fullerene の濃度や側鎖の違いについてもさらに精査する必要がある。

E. 研究発表、

なし

F. 特許関係
特になし。

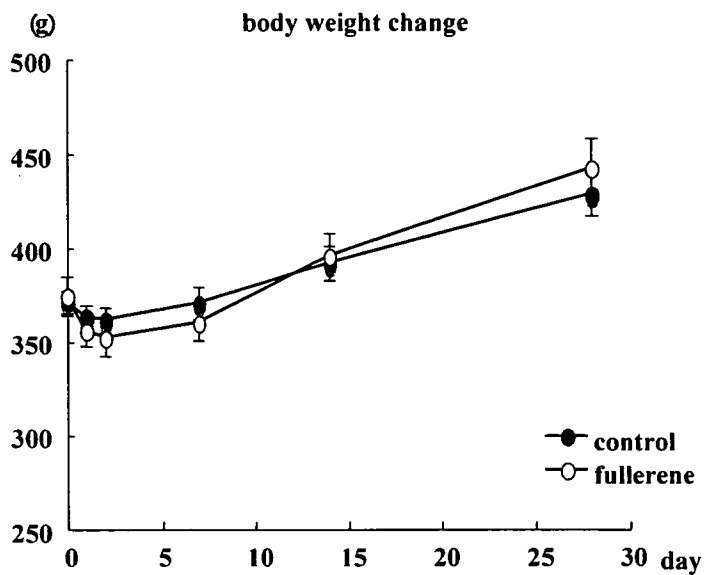
G. 参照論文

- 1) Polizu S, Savadogo O, Poulin P, Yahia L. ;
Applications of carbon nanotubes-based
biomaterials in biomedical nanotechnology.
J. Nanosci. Nanotechnol.; 6 p.1883-1904
(2006)
- 2) Satoh M and Takayanagi I. ; Pharmacological
studies on fullerene(C60), a novel carbon
allotrope, and its derivatives. J.
Pharmacol. Sci.; 100 p.513-518. (2006)
- 3) Doetsch F. ; The glial identity of neural
stem cells. Nature Neurosci.; 6
p.1127-1134 (2003)
- 4) Shetty KA, Hattiangady B, Shetty AG. ; Stem
/ Progenitor cell proliferation factors
FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early
decline during the course of aging in the
hippocampus: role of astrocytes. 51
p.173-186 (2005)
- 5) Satoh M, Matsuo K, Takanashi I. ; Effects
of acute and short-term repeated
application of fullerene C60 on
agonists-induced responses in various
tissues of guinea-pig and rat. Gen.
Pharmacol. 327 p.1533-1538 (1995)
- 6) Paxinos G, Watson C. ; The rat brain in
stereotaxic coordinates. Academic Press,
New York (1986)
- 7) Tassone F, Broglio F, Gianotti L, Arvat E,
Ghigo E, Maccario M. ; Ghrelin and other
gastrointestinal peptides involved in the
control of food intake. Mini. Rev. Med.
Chem. 7 p.47-53 (2007)
- 8) Asakura M, Tsukamoto T. ; Antidepressant
drugs and central monoaminergic receptors.
Yakubutsu Seishin Kodo 5 p.303-19 (1985)
- 9) O'Brien SM, Scott LV, Dinan TG. ; Cytokines:
abnormalities in major depression and
implications for pharmacological

treatment. Hum. Psychopharmacol. 19
p.397-403 (2004)

- 10) Emson RB, Morabito MV. ; Food fight: the
NPY-serotonin link between aggression and
feeding behavior. Sci. Stke. 29 p.12 (277)

(A) 脳内投与



(B) 腹腔投与

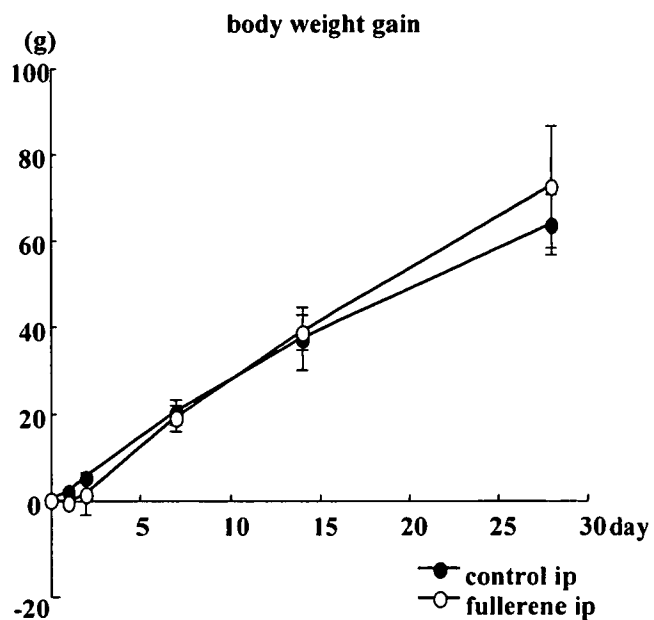
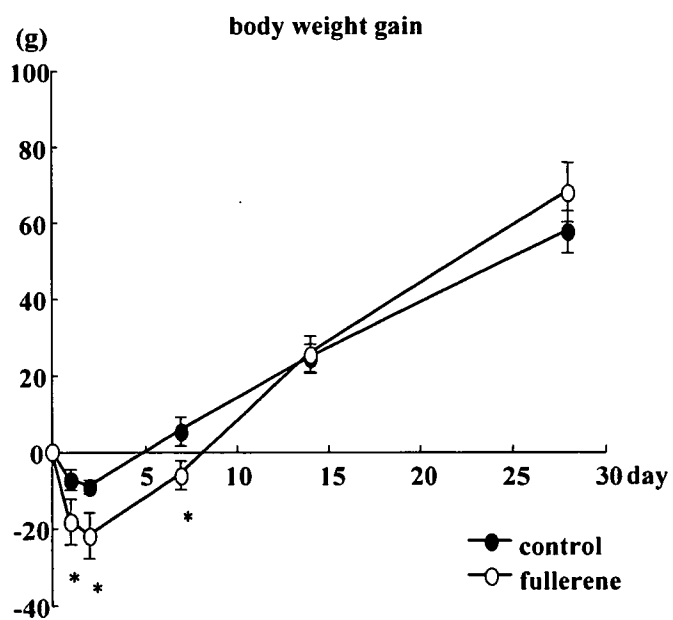
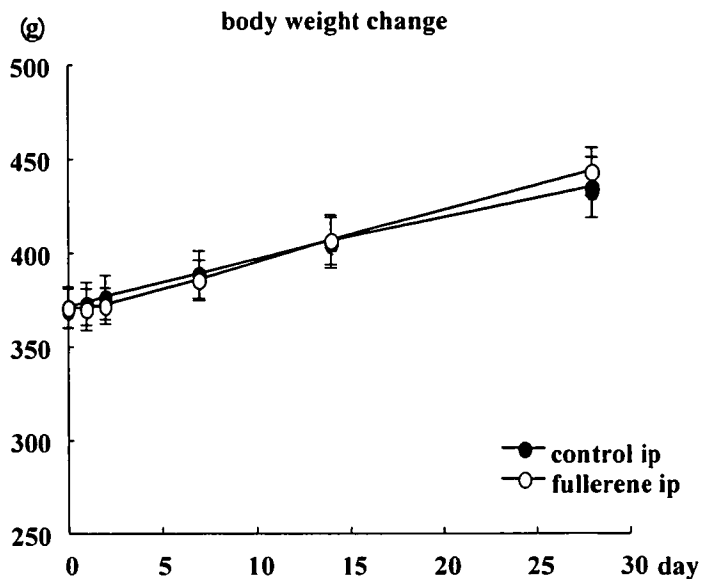


図1 fullerene60投与による体重の変化

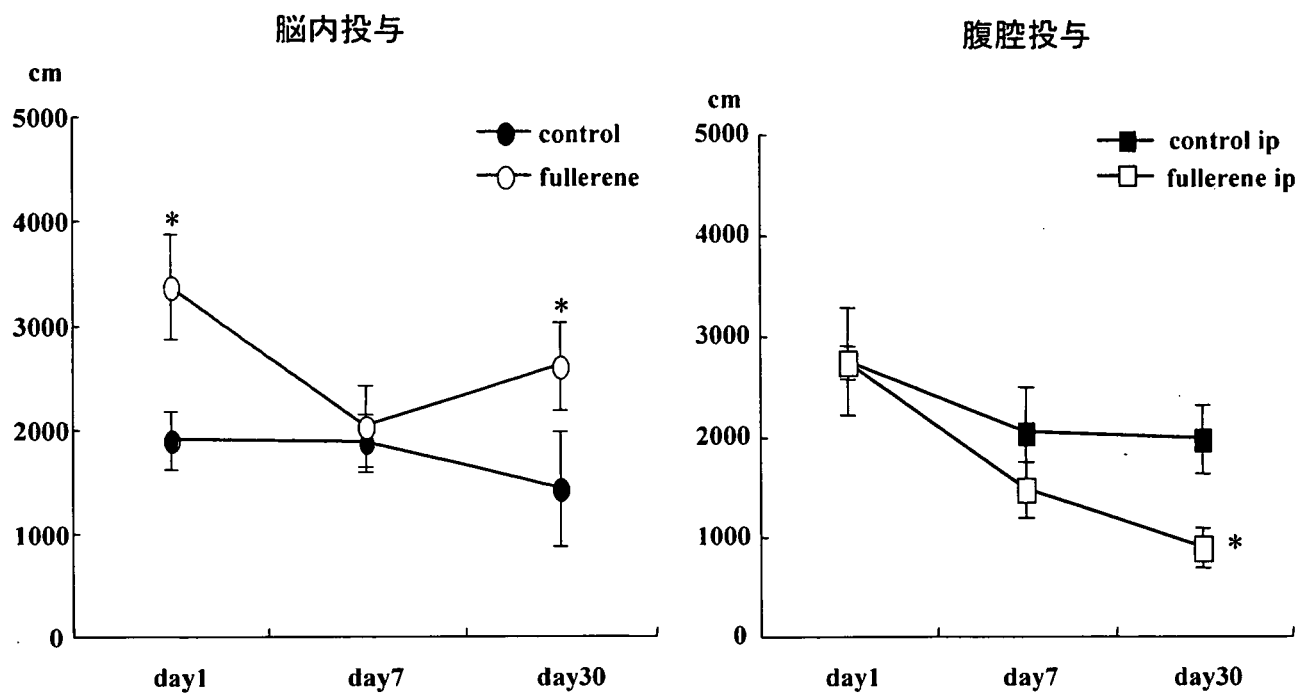


図2-1 fullerene60投与による自発行動(総移動距離)への影響

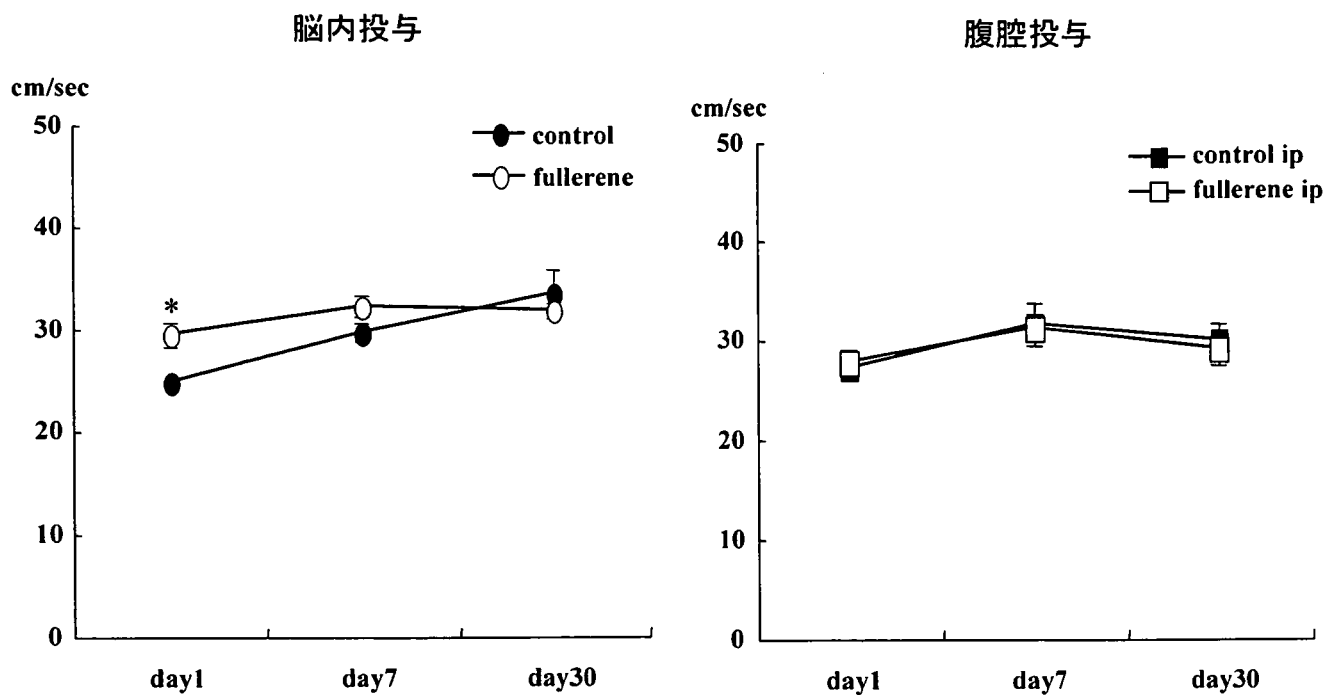


図2-2 fullerene60投与による自発行動(平均移動速度)への影響

		脳内投与		腹腔投与	
		serotonine	5HIAA	serotonine	5HIAA
視床下部	control	9.98 ± 1.38	12.79 ± 1.15	14.07 ± 0.89	12.09 ± 1.72
	[60]fullerene	11.68 ± 0.88	16.00 ± 0.88	13.18 ± 1.22	18.73 ± 2.32*
大脳皮質	control	1.35 ± 0.08	1.56 ± 0.08	1.21 ± 0.06	1.70 ± 0.16
	[60]fullerene	1.02 ± 0.06	* 1.57 ± 0.12	1.25 ± 0.09	1.98 ± 0.14
線条体	control	0.59 ± 0.01	1.27 ± 0.04	0.58 ± 0.05	1.31 ± 0.07
	[60]fullerene	0.54 ± 0.05	1.88 ± 0.25	0.87 ± 0.09*	1.47 ± 0.10
海馬	control	1.39 ± 0.11	2.25 ± 0.13	1.16 ± 0.11	2.28 ± 0.21
	[60]fullerene	0.87 ± 0.04*	2.00 ± 0.09	1.08 ± 0.07	2.20 ± 0.10

ng / mg tissue

図3-1 fullerene投与による脳内セロトニン量の変動

		脳内投与			腹腔投与		
		Dopamine	DOPAC	HVA	Dopamine	DOPAC	HVA
視床下部	control	6.21 ± 0.53	2.57 ± 0.23	0.55 ± 0.04	5.74 ± 0.33	3.58 ± 0.51	0.97 ± 0.06
	[60]fullerene	7.10 ± 0.64	3.68 ± 0.44*	0.79 ± 0.07*	8.75 ± 0.75	9.78 ± 0.78	0.78 ± 0.06
大脳皮質	control	0.30 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.07 ± 0.02
	[60]fullerene	0.29 ± 0.01	0.20 ± 0.02*	0.11 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.09 ± 0.02
線条体	control	14.2 ± 0.96	5.62 ± 0.55	1.26 ± 0.10	16.5 ± 1.28	8.10 ± 0.49	1.64 ± 0.11
	[60]fullerene	18.2 ± 1.86	10.57 ± 1.45*	2.10 ± 0.21*	15.5 ± 1.28	8.37 ± 0.49	1.82 ± 0.11
海馬	control	0.17 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.19 ± 0.03
	[60]fullerene	0.20 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.16 ± 0.03

ng / mg tissue

図3-2 fullerene投与による脳内ドーパミン量の変動

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土屋利江	粒子特性評価法及び毒性評価法—in vitro、「ナノ粒子・微粒子の毒性評価研究の動向と暴露対策の	黒田 哲司	ナノ粒子の有害性評価とリスク対策	技術情報協会	東京	2007	371-380
土屋利江、俵木登美子	スペシャル対談日本の医療機器の研究開発と制度の動向		バイオテクノロジージャーナル	羊土社	東京	2007	198-203
土屋利江	再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について	岡野光夫編	再生医療技術の最前線	CMC出版	東京	2007	
土屋利江	ティッシュエンジニアリングとガイドライン	岡野光夫、田畑泰彦編	ティッシュエンジニアリング2007	日本医学館	東京	2007	241-244
土屋利江	再生医療の現状	土屋利江	再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル=開発から臨床まで	培風館	東京	2007	

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takashi Yamada, Rumi Sawada and Toshie Tsuchiya	The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes.	Biomaterials		in press	
Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka, and Toshie Tsuchiya	Different effects of [60] fullerene brain injection and i.p. injection on the brain monoamine and behavior in the rats.	J. of Nanoscience and Nanotechnology		in press	
Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Misao Nagahata-Ishiguro, Rumi Sawada, Nasreen Banu and Tsutomu Nagira	Remarkable enhancing action by sulfated hyaluronan on Connexin-26,-32, and -43 gene expressions during the culture of normal human astrocytes	Journal of Biomedical Materials Research: Part A		in press	
Tomomi Ito, Rumi Sawada, Yoko Fujiwara, Toshie Tsuchiya	FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- β signaling.	Cytotechnology	56	1-7	2008
Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Toshie Tsuchiya	Intracerebral microinjection of stannous 2-ethylhexanoate affects dopamine turnover in cerebral cortex and locomotor activity in rats. : accepted	Journal of Biomaterials Research: Part B- Applied Biomaterials		in press	
Kumada H., Haishima Y., Watanabe K., Hasegawa C., Tsuchiya T., Tanamoto K., Umemoto T.:	Biological properties of the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide.	Oral Microbiology Immunology	23	60-69	2008
Matsuoka A., Haishima Y., Hasegawa C., Matsuda Y. and Tsuchiya T.:	Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the in vitro chromosome aberration test.	J. Biomed. Mater. Res. Part A		Oct. 16	2007
中岡竜介、松本富美子、宗林さおり、柳橋哲夫、土屋利江	視力補正を目的としないカラーコンタクトレンズの細胞毒性	衛研報告	125	61-64	2007
Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya	Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture	J. Biomed. Mater. Res.	80	257-267	2007
土屋利江	細胞組織医療機器開発総論	薬学雑誌	127	847-850	印刷中
澤田留美、伊藤友美、土屋利江	細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について	薬学雑誌	127	851-856	印刷中
D.Y. Jung, Y.B. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi	A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues	Key Engineering	342-343	853-856	2007

Tsutomu Nagira, Misao Nagahata-Ishiguro and Toshie Tsuchiya	Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression.	Biomaterials	28	844-850	2007
山越葉子、中澤憲一、土屋利江	原子間力顕微鏡(AFM)による蛋白質のイメージング	日本臨床	2号	270-277	2007
Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka ,Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya	Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties.	J. Artificial Organs.	10	22-28	2007
Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M.	Autologous bone marrow stromal cell implantation for an athlete: a case report.	Osteoarthritis Cart	In press		
Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, Wakitani S.	High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells.	J Biosci Bioeng	In press		
Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties	Journal of Artificial Organs	10	22-28	2007
M. Todo R. Nagamine S. Yamaguchi	Stress Analysis of PS Type Knee Prostheses under Deep Flexion	Journal of Biomechanical Science and Engineering	2	237-245	2007
東藤 貢, 長嶺隆二, 山口勝太	PS型人工膝関節の動作状態における応力状態の解析	日本臨床バイオメカニクス学会誌	28	233-239	2007
Makoto Ohta, Naoko Fujimura, Luca Augsburger, Krisztina Barath, Hasan Yilmaz, German Abdo, Karl-Olof Lovblad, Daniel A. Rüfenacht,	Subtracted Vortex Centers Path Line Method with Cinematic Angiography for Measurement of Flow Speed in Cerebral Aneurysms,	Neurological Research			2008(掲載予定)
Toshio Nakayama, Makoto Ohta, Daniel A.Rufenachat Akira Takahashi	The Effect to Hemodynamics of an Intracranial Aneurysm by a Difference of Stent Struct Design	The 4th International Intracranial Stent Meeting I CS07 PROGRAM&ABSTRACTS		35-36	2007
K. Srinivas, M Ohta, T. Nakayama, S. Obayashi, T. Yamaguchi	Optimisation of Stents for Aneurysm	The 4th International Intracranial Stent Meeting I CS07 PROGRAM&ABSTRACTS		38	2007
Nakayama,T. Ohta,M. Rufenachat,D.A. Takahashi,A.	Effect of Stenting Rotational Positions on Hemodynamics in a Cerebral Aneurysm	AMERICAN SOCIETY OF NEURORADIOLOGY2007: PROCEEDINGS		158	2007

IV 研究成果の刊行物・別刷