

图 4-13

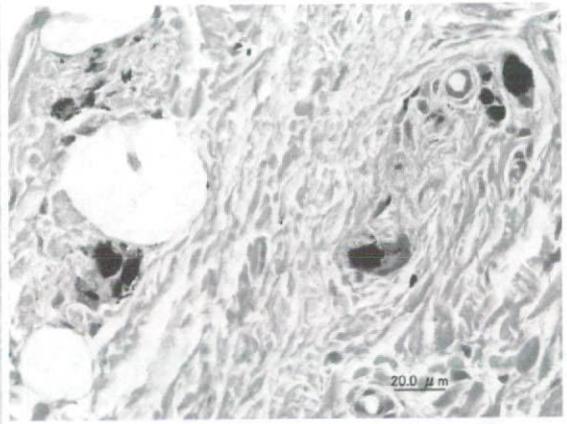


图 4-14

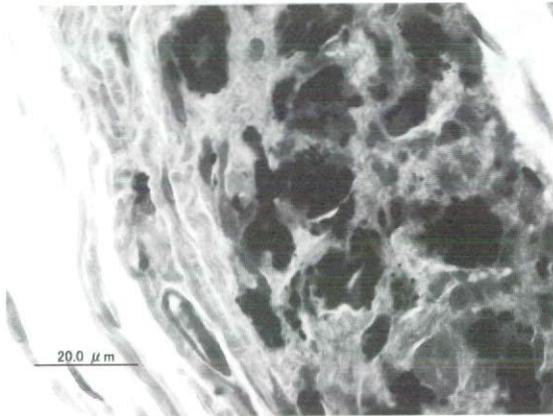


图 4-15

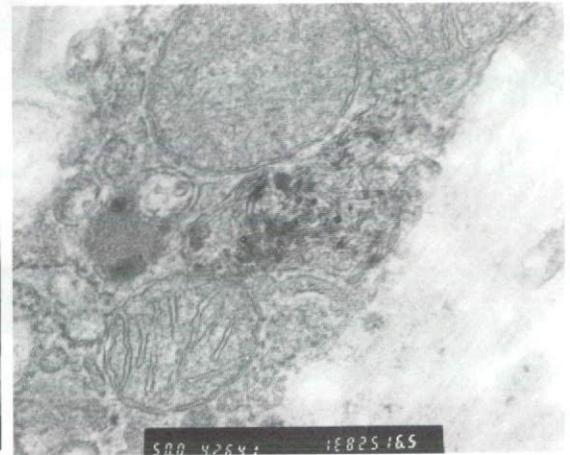


图 4-16

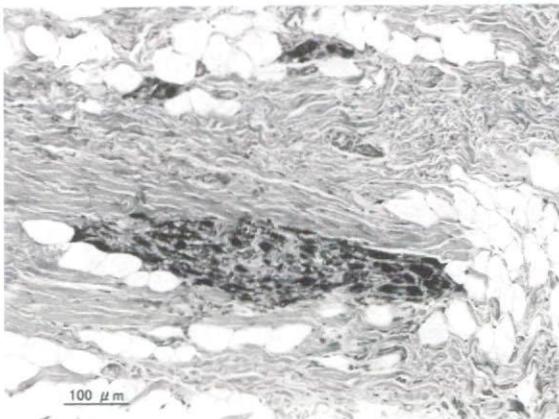


图 4-17

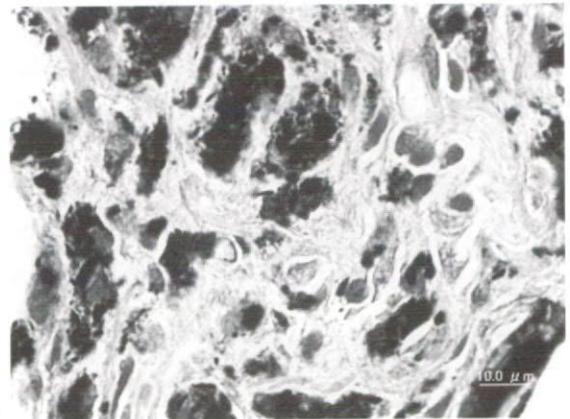


图 4-18

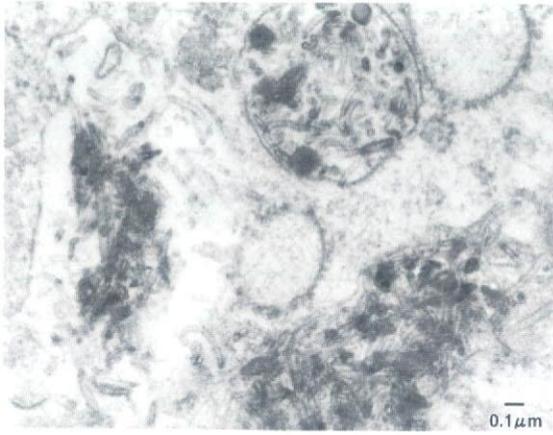


图 4-19

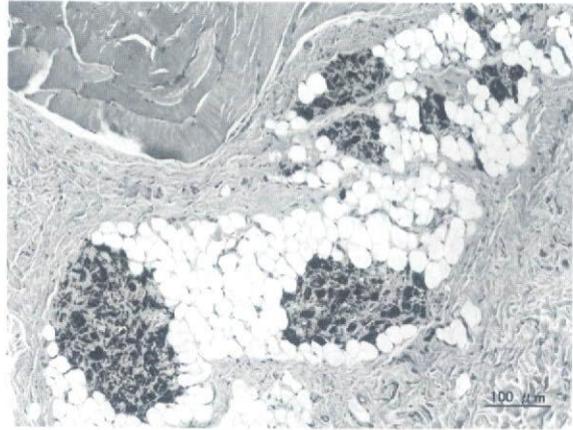


图 4-20

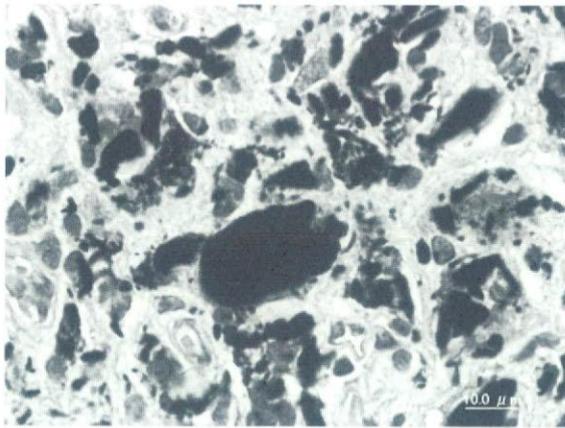


图 4-21

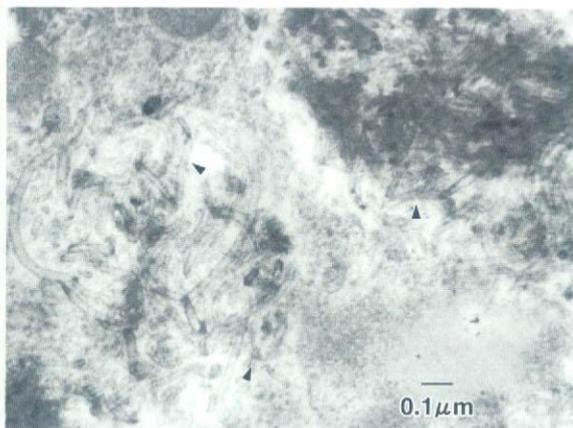


图 4-21

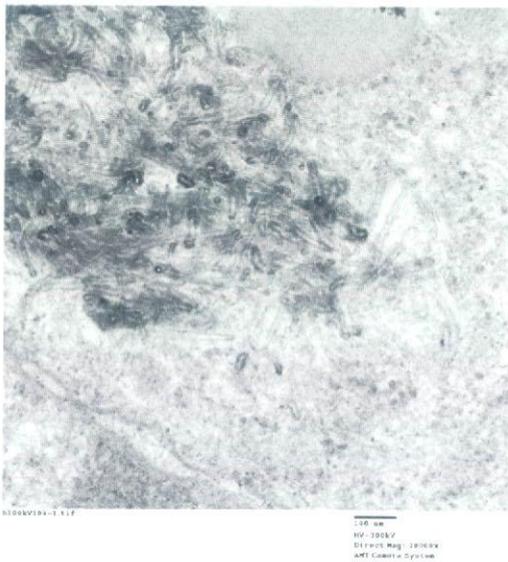


图 4-22

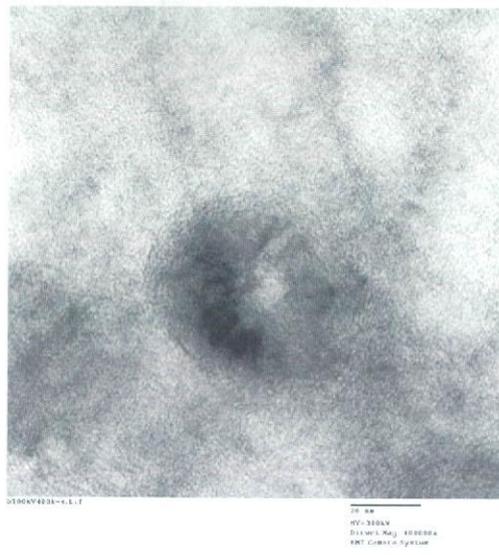


图 4-23

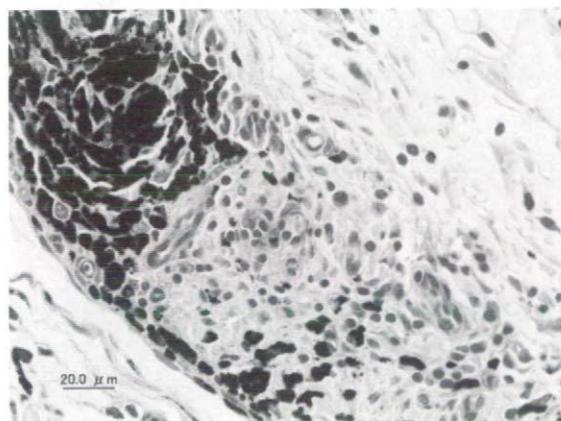


图 5-1

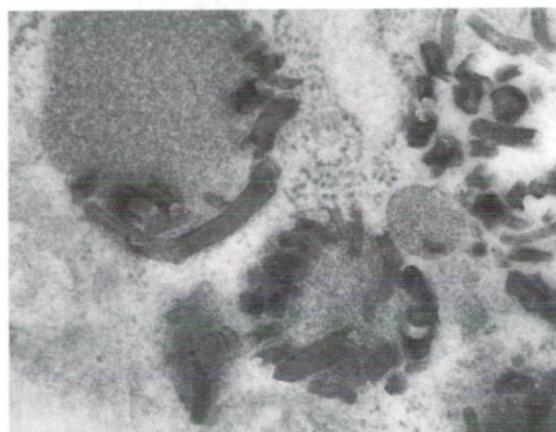


图 5-2

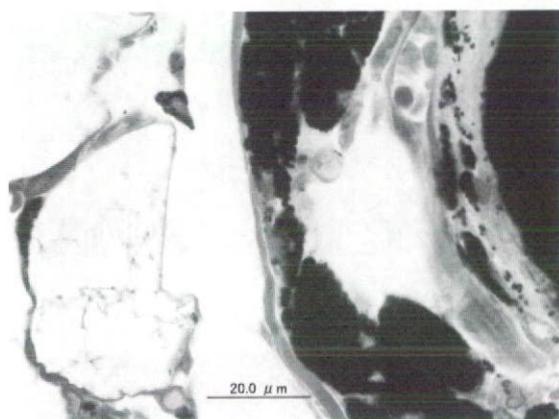


图 5-3

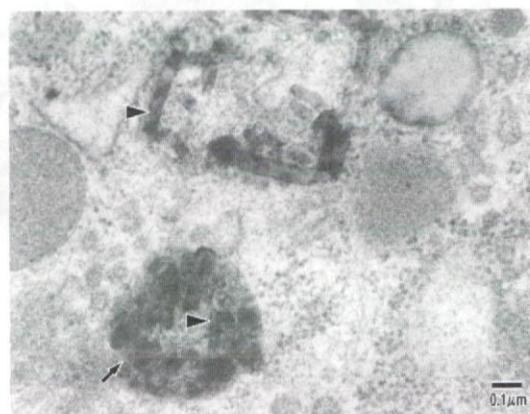


图 5-4

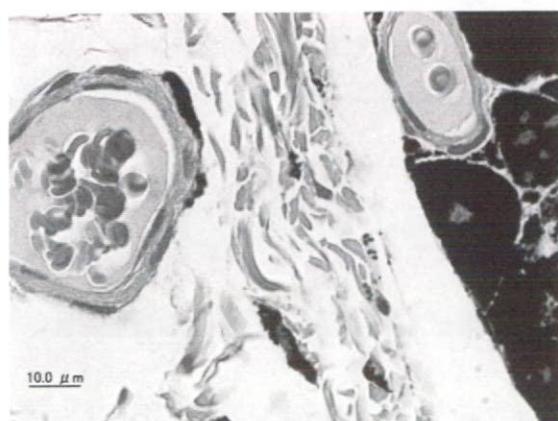


图 5-5

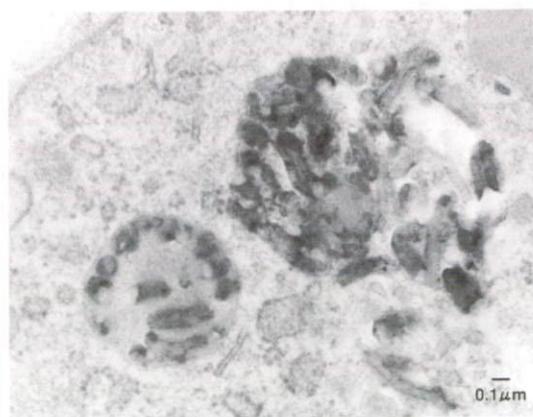


图 5-6

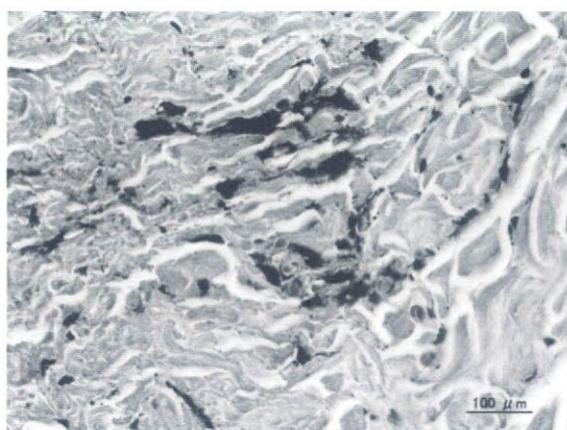


图 5-7

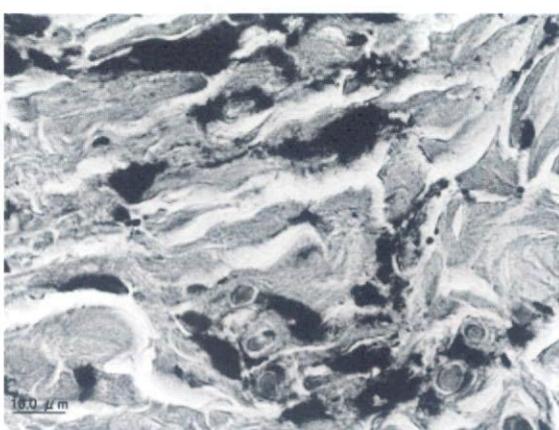
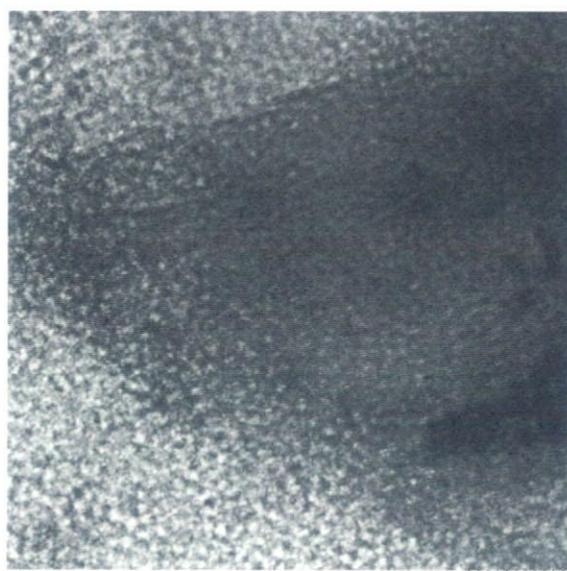
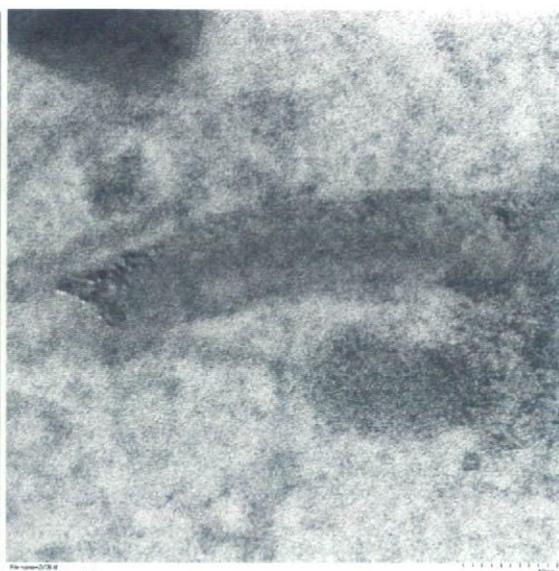


图 5-8



File name: 0706
Image date: 2007/10/26 14:22:08
Image number: 880
Image resolution: 1818 pixels
Calibration: 75 um/pixel at x: 81.9
Magnification: 400.0x
Lens: 10.0mm (2.0mm)
Spot: 4.0mm (1.0mm)
Image: 1024x768
Acq.: onStage (234)
Extensive: 1.0kV
Stage: 7.244 (1.000) 18 um/pixel
Axis: original

图 5-9



File name: 0706
Image date: 2007/10/26 14:16:28
Image number: 885
Image resolution: 1818 pixels
Calibration: 75 um/pixel at x: 81.9
Magnification: 400.0x
Lens: 10.0mm (2.0mm)
Spot: 4.0mm (1.0mm)
Image: 1024x768
Acq.: onStage (234)
Extensive: 1.0kV
Stage: 7.244 (1.000) 18 um/pixel
Axis: original

图 5-10

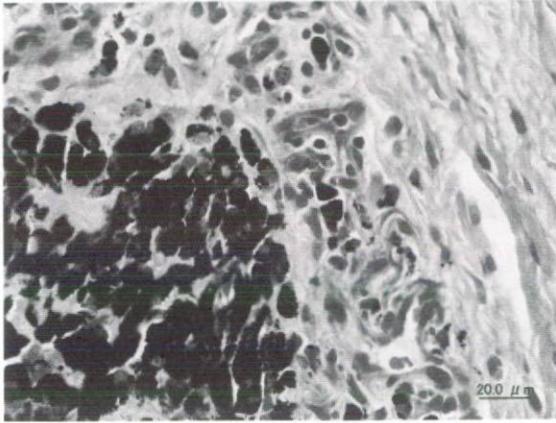


图 5-11

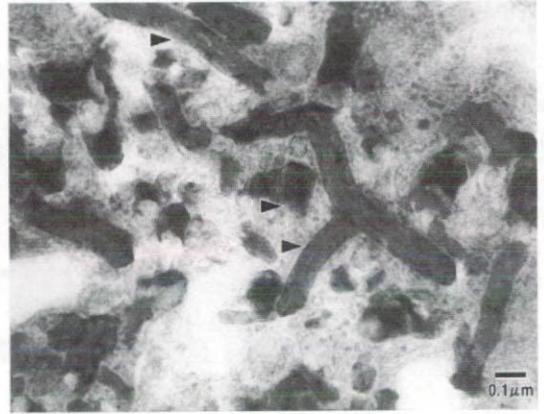


图 5-12

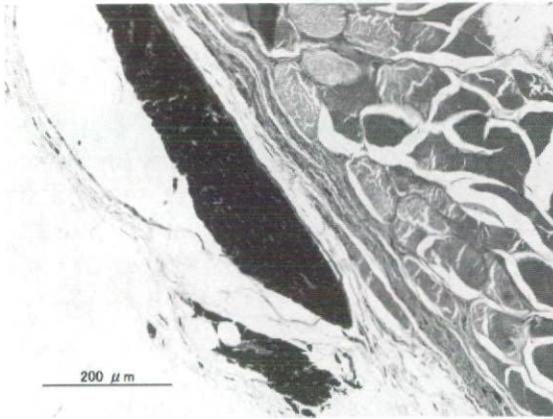


图 5-13

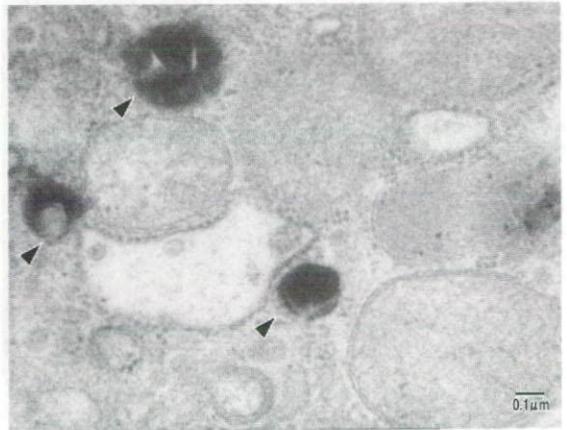


图 5-14

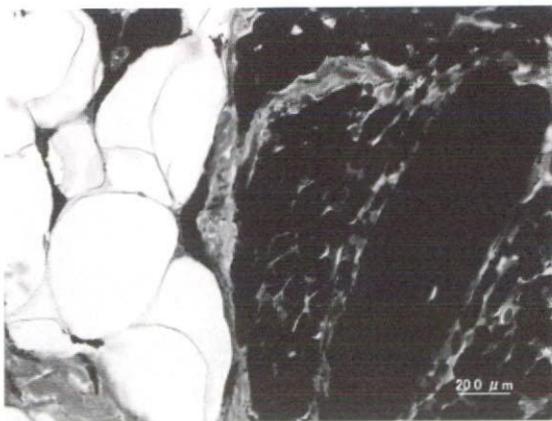


图 5-15



图 5-16

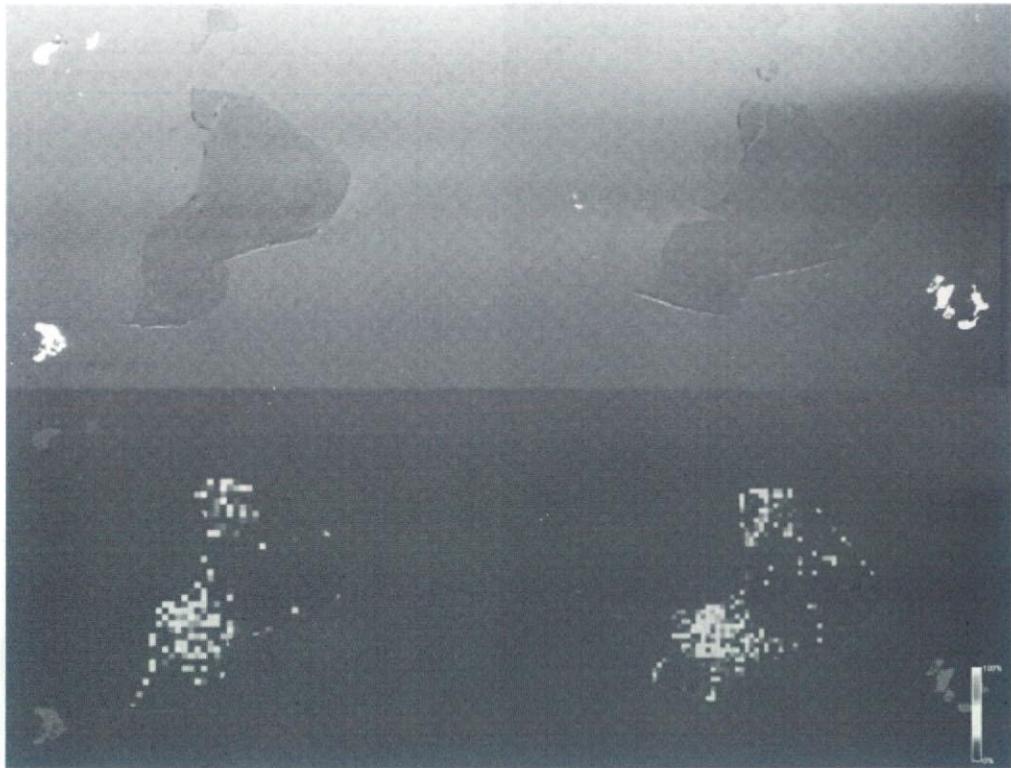


图 6-1

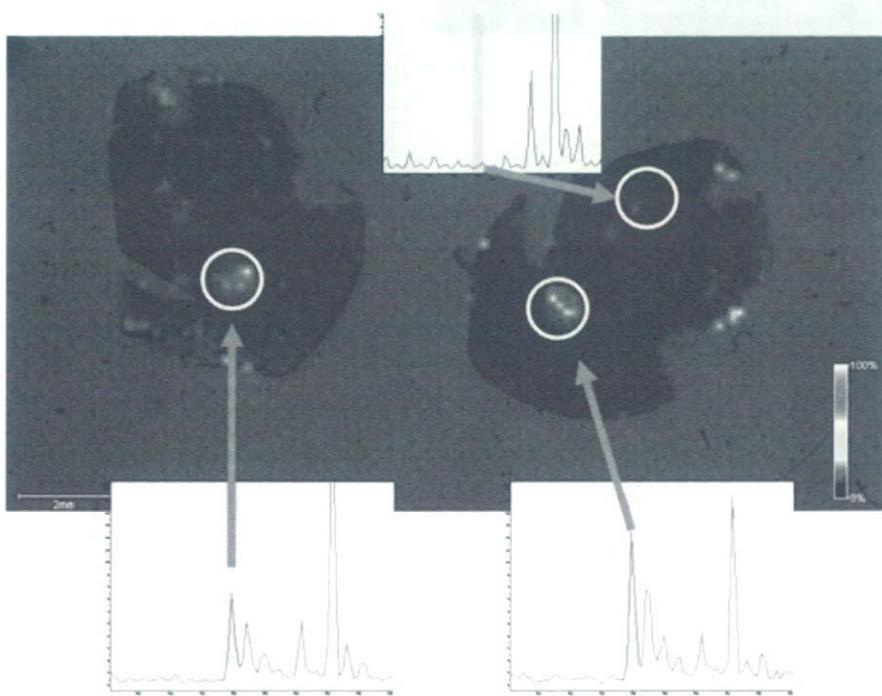


图 6-2

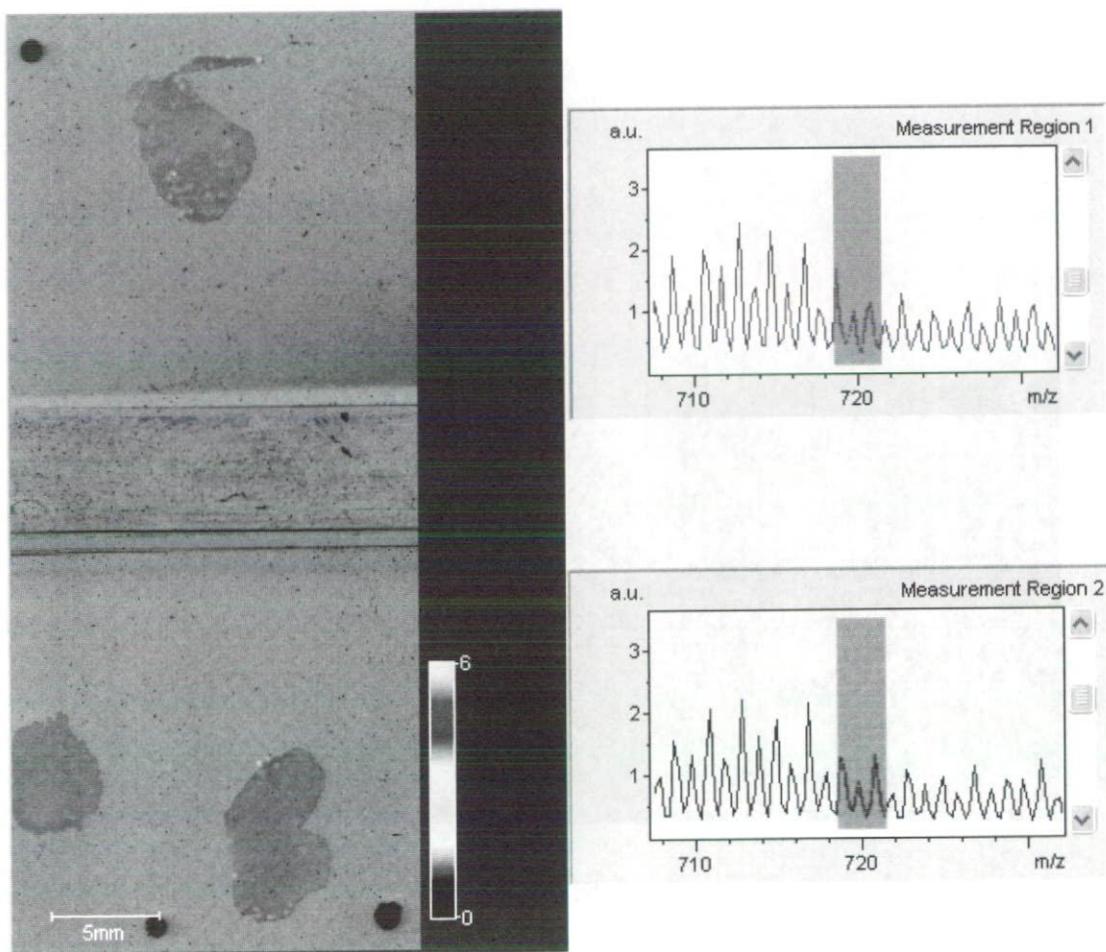


图 6-3

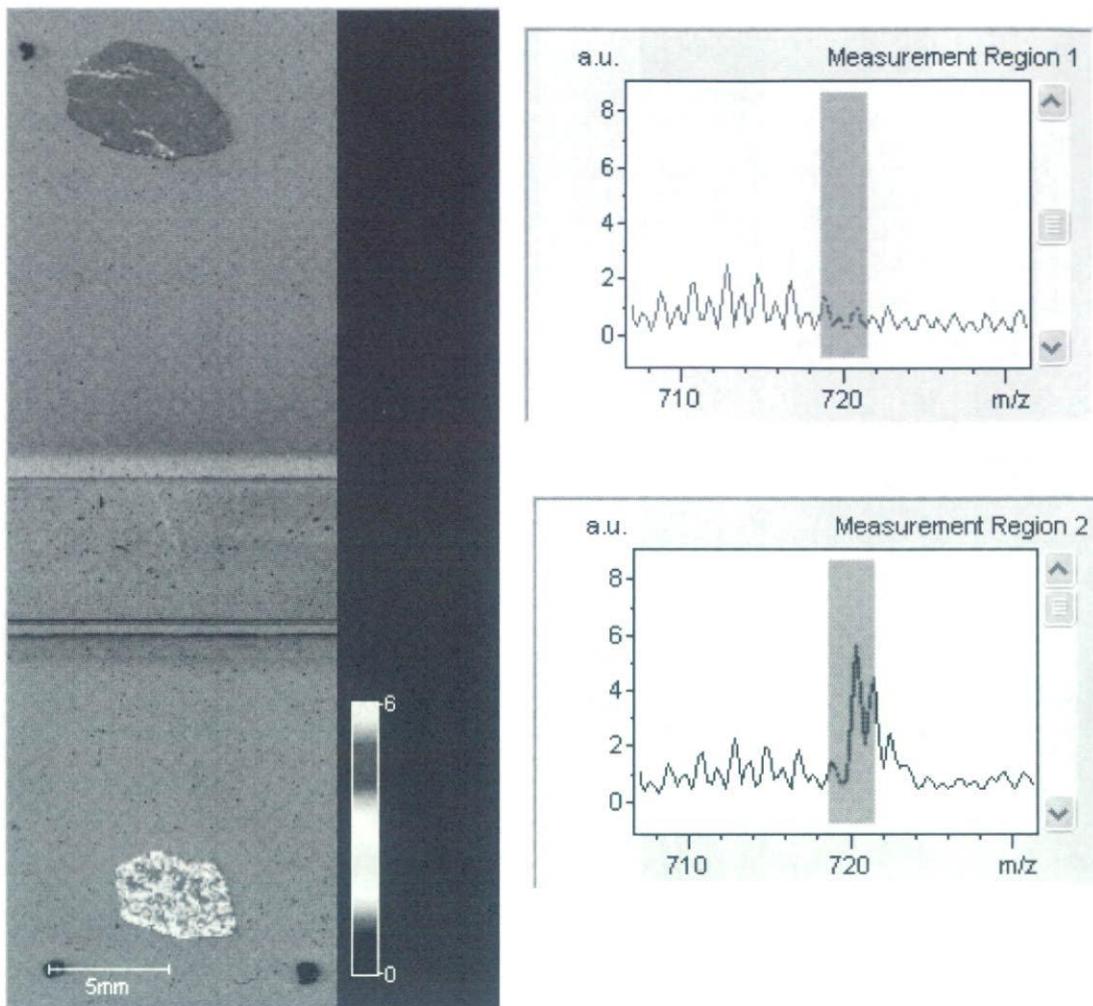


图 6-4

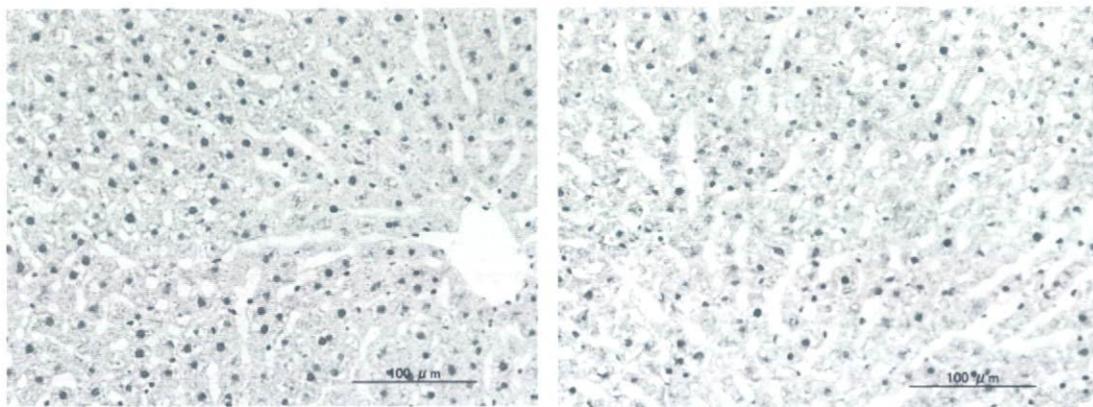


图 6-5

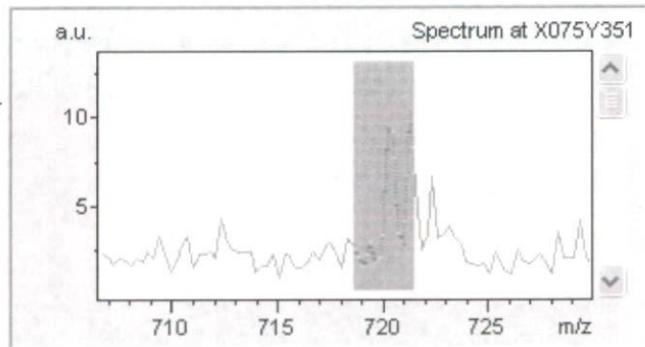
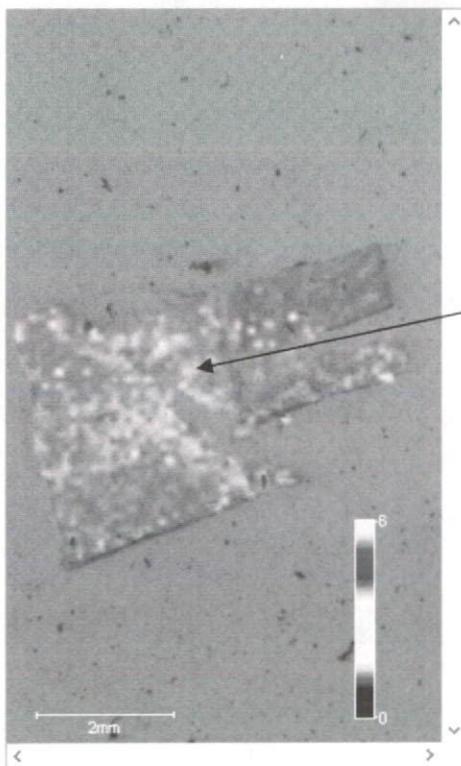
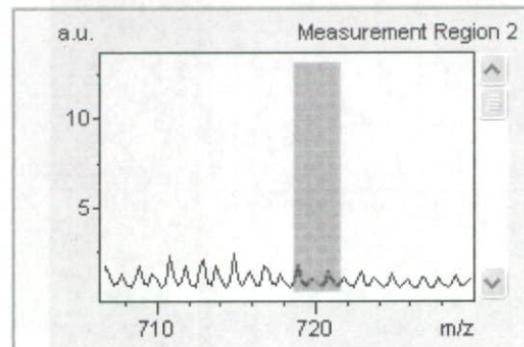
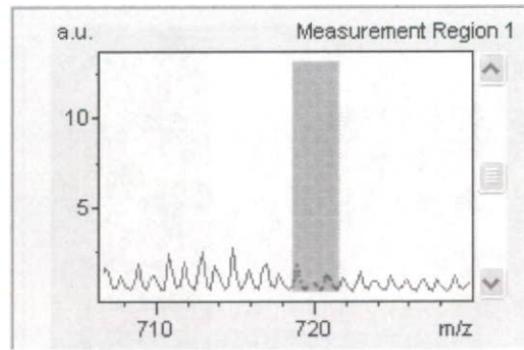
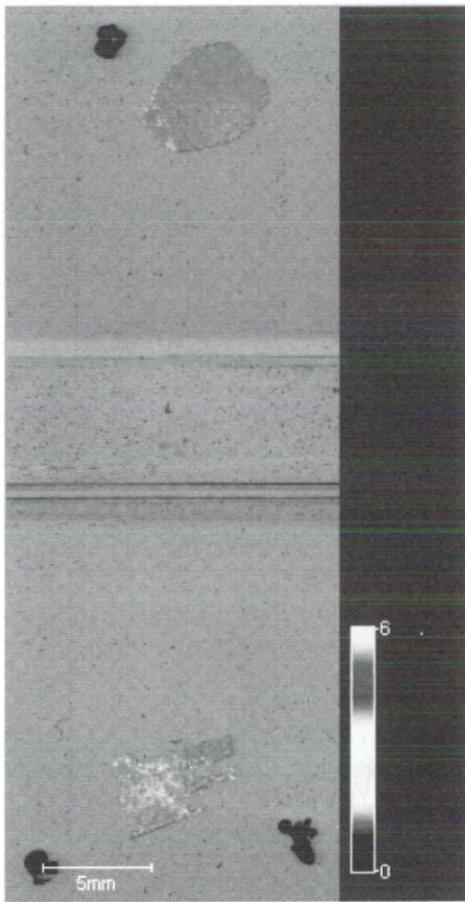


图 6-6

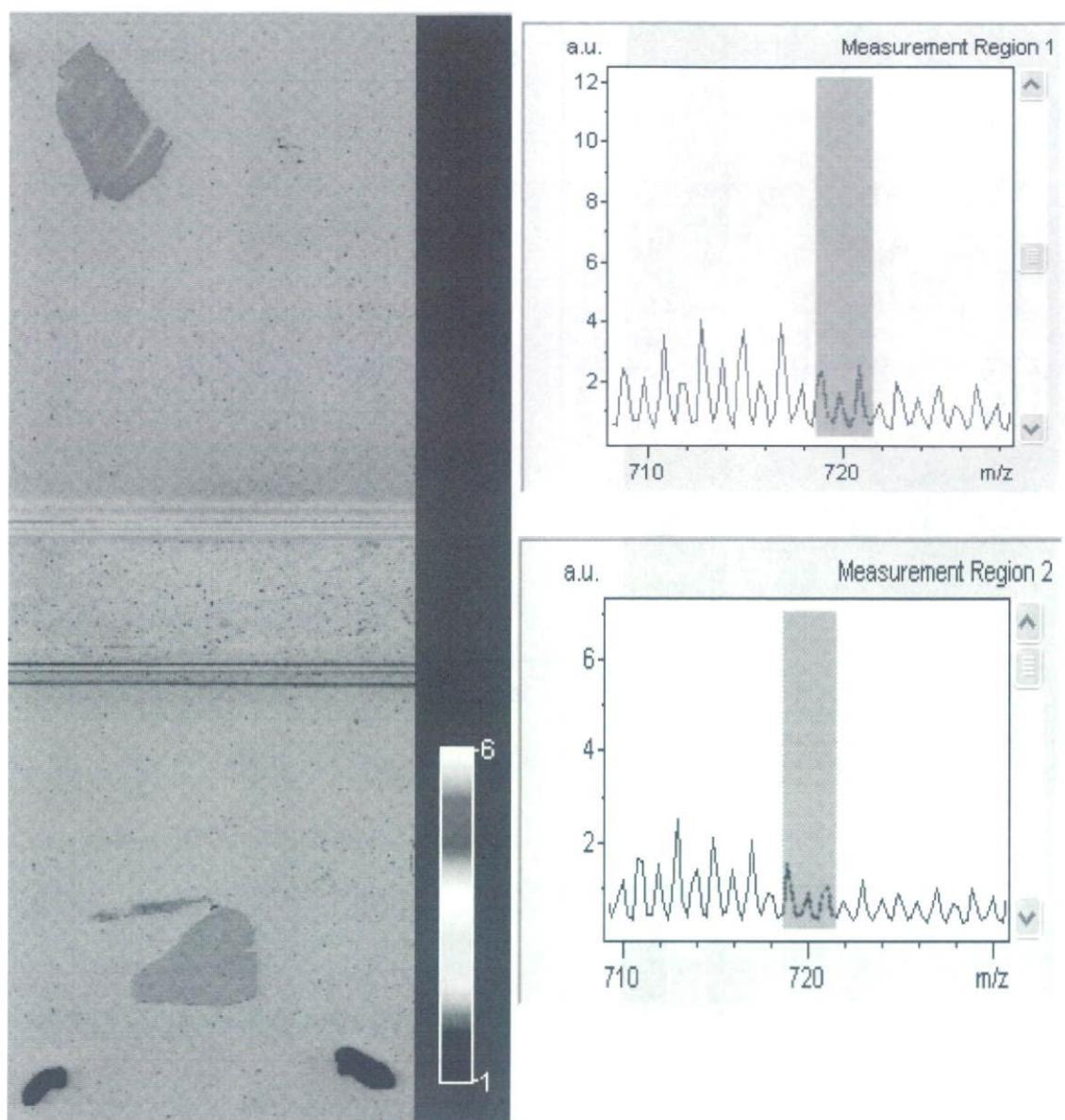


图 6-7

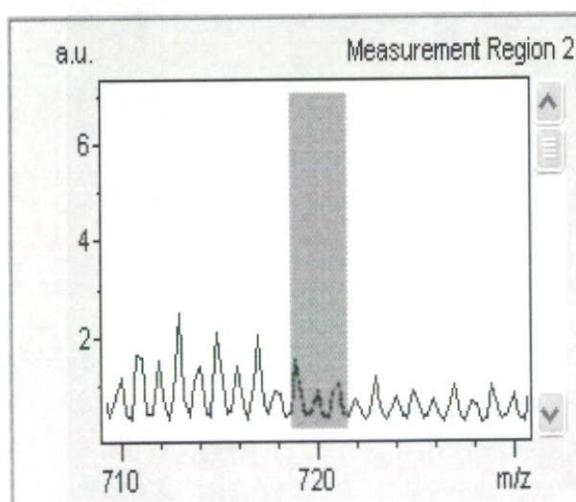
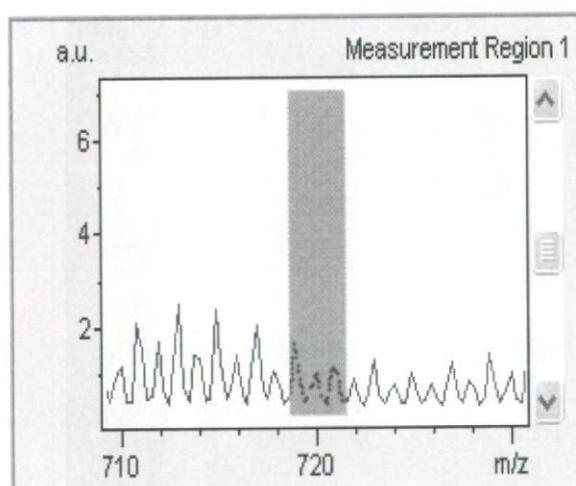


图 6-8

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

埋入手術

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 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 6

220MWCNTs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像 (強拡大)

図 4 - 7

220MWCNTs 埋入 1 年後の TEM 像

図 4 - 8

220MWCNTs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 9

220MWCNTs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像 (強拡大)

図 4 - 1 0

825MWCNTs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 1

825MWCNTs 埋入 1 週後の TEM 像

図 4 - 1 2

825MWCNTs 埋入 1 週後の TEM 像

図 4 - 1 3

825MWCNTs 埋入 1 週後の高分解能 TEM 像

図 4 - 1 4

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 5

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像 (強拡大像)

図 4 - 1 6

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 1 7

825MWCNTs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 4 - 1 8

825MWCNTs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 1 9

825MWCNTs 埋入 1 年後の TEM 像

図 4 - 2 0

825MWCNTs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像

図 4 - 2 1

825MWCNTs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像 (強拡大)

図 4 - 2 2

825MWCNTs 埋入 2 年後の高分解能 TEM 像

図 4 - 2 3

825MWCNTs 埋入 2 年後の高分解能 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

600H-CNFs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像

図 5 - 8

600H-CNFs 埋入 2 年後の光学顕微鏡像 (強拡大)

図 5 - 9

600H-CNFs 埋入 1 年後の高分解能 TEM 像

図 5 - 1 0

600H-CNFs 埋入 1 年後の高分解能 TEM 像

図 5 - 1 1

1200H-CNFs 埋入 1 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 1 2

1200H-CNFs 埋入 1 週後の TEM 像

図 5 - 1 3

1200H-CNFs 埋入 1 6 週後の光学顕微鏡像

図 5 - 1 4

1200H-CNFs 埋入 1 6 週後の TEM 像

図 5 - 1 5

1200H-CNFs 埋入 1 年後の光学顕微鏡像

図 5 - 1 6

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

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

図 6 - 3

フルラーレン静注 1 時間後の脳のマッピング像

上段 : コントロール (生食)

下段 : フラーレン

図 6 - 4

フルラーレン静注 1 時間後の肝臓のマッピング像

上段 : コントロール (生食)

下段 : フラーレン

図 6 - 5

肝臓の HE 染色像. 左 : 生食, 右 : フラーレン

図6-6

フラレン静注1時間後の腎臓のマッピング像

上段：コントロール（生食）

下段：フラレン

図6-7

フラレン静注24時間後の肝臓のマッピング像

図6-8

フラレン静注24時間後の脳のマッピング像

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

バイオ用ナノ微粒子の生体適合性における
マクロファージ遊走阻止因子（MIF）の関与に関する研究

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

研究要旨 本研究においては、チタニウム粒子の生体適合性におけるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の関与を明らかにするために以下の *in vivo* 実験を行なった。まず、正常マウスの頭頂骨にマイクロサイズのチタニウム粒子を埋入し、1週後に骨吸収の程度、破骨細胞数、および各種骨吸収性サイトカインの遺伝子発現を検討した。その結果、sham手術を行った群に比し、破骨細胞の増加を伴った骨吸収の亢進が認められた。また、MIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLという骨吸収性サイトカインの遺伝子発現が増加した。以上の結果はMIFが人工関節後に生じる微粒子に由来する骨破壊における炎症性サイトカインカスケードに重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

A. 研究目的

超高齢化社会が到来し、運動器疾患を伴う高齢者においても高い生活の質（Quality of Life）を維持したまま、社会的参加するが社会的欲求となっている。人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチ（RA）などで関節軟骨が破壊され、関節の疼痛ならびに機能障害により社会的参加が困難となった人々に即時的に疼痛の消失および機能改善をもたらす治療の方法として広く行なわれ、生体材料分野の発展に伴い、人工関節の耐久性も向上してきた。しかしながら、人工関節置換術後に生じる磨耗微粒子に由来する骨破壊現象は大きな問題として、運動器医療分野の解決しなければならぬものの1つとなっているにもかかわらず、その発生機序および防止法は十分に解明されているとはいえない。

マクロファージならびに異物巨細胞は磨耗微粒子を貪食し、インプラント・骨界面における骨吸収を誘発する種々の炎症性サイトカインを産生・放出することが知られている。そこで我々はマクロファージならびに異物巨細胞のランダム遊走を阻止し、これら細胞の炎症性反応を制御する液性因子であるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）に着目し、種々の病態における骨吸収への本因子の関与に関する一連の研究を行ってきた。本研究の目的はチタニウム微粒子がもたらす骨吸収におけるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の *in vivo* 関与を検討することである。

B. 研究方法

1. 実験材料

Johnson Matthey Chemicals (Ward Hill, MA, USA)よりチタニウム微粒子を入手し、滅菌済みPBS液で洗浄後に2時間乾燥後に紫外線滅菌を2時間施行し、使用した。

2. マウス頭頂骨骨吸収モデル

全身麻酔下にて6-7週齢の雌Balb/Cマウスの頭頂骨の骨膜を剥離し、同皮質骨上に30mgチタニウム微粒子を1-cm x 1-cmに散布し、5-0 nylon糸にて骨膜および皮下組織、皮膚を閉創した。対照として別の動物にチタニウム微粒子を散布せず同処置を行ないSham手術とした。

3. 評価

処置後1週間にて以上の動物を屠殺し、ホルマリン固定標本をhematoxylin/eosin染色、酒石酸フォスファターゼ (TRAP) 染色、MIFに対する免疫染色を行なった。また、頭頂骨の総RNAを抽出し逆転写した後にMIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLに関して、real time PCRによる遺伝子発現を検討した。内部コントロールとしてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。

なお、すべての動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認後、同ガイドラインに従い施行された。

C. 研究結果

チタニウム微粒子を散布7日において、炎症性線維組織の過形成がチタニウム微粒子と頭頂骨の間に観察された(図1A, B)。これら炎症性線維組織内にはMIF陽性細胞(図1C, D) およびTRAP陽性である破骨細胞が多数認められた(図1E, F)。

炎症性サイトカインのmRNAの発現に関してはsham手術後の標本と比較し、チタニウム微粒子投与後の頭頂骨ではMIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLの遺伝子発現が有意に亢進していた増加した(図2)。

D. 考察

本研究はin vivoマウス頭頂骨骨吸収モデルを用いて、チタニウム微粒子投与による骨破壊誘発時にMIFの過剰発現が出現していることを初めて報告した。Lindらはpolymethylmethacrylateおよびチタニ

ウム微粒子投与によりヒトマクロファージにおけるin vitroでのMIFの発現が亢進することを報告している。また、我々は種々の炎症性の病態においてMIFはIL-1やTNF- α などのサイトカインカスケードの上流に位置することを明らかにしている。したがって、以上のin vivoならびにin vitroの所見はMIFが人工関節後に生じる微粒子に由来する骨破壊における炎症性サイトカインカスケードに重要な役割を担っていることを示唆するものであった。今後、MIFノックアウトマウスあるいは我々が前年度に報告したMIF-DNAワクチンの投与により、微粒子に由来する骨破壊を抑制することが可能かを検討する予定である。

E. 結論

チタニウム微粒子によるマウス頭頂骨骨吸収モデルを用いて、MIFが微粒子に由来する骨破壊における炎症性サイトカインカスケードに重要な役割を担っていることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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). 2007 Jan;22(1):120-6.
- Maeda E, Noguchi H, Tohyama H, Yasuda K, Hayashi K. The tensile properties of collagen fascicles harvested from regenerated and residual tissues in the patellar tendon after removal of the central third. Biomed Mater Eng 2007;17(2):77-85.
- 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 Feb;56(2):521-30.
- Azuma C, Tohyama H, Nakamura H, Kanaya F, Yasuda K. Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration of collagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. J Biomech. 2007;40(10):2184-90.
- Tohyama H, Yasuda K, Uchida H, Nishihira J. The responses of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalised patellar tendon to IL-1beta

are different from those of normal tendon fibroblasts.J Bone Joint Surg Br.

2007 Sep;89(9):1261-7.

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

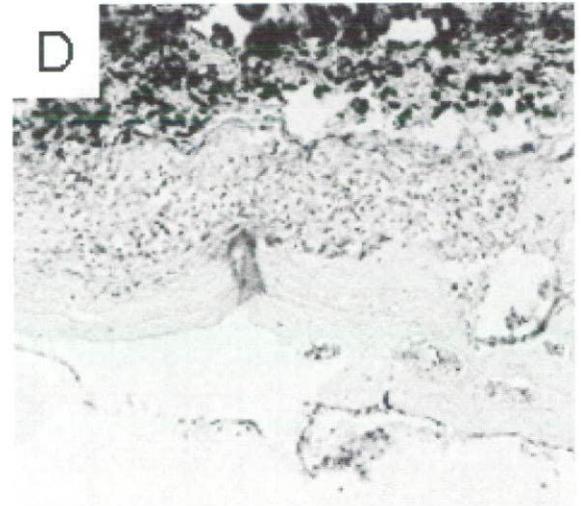
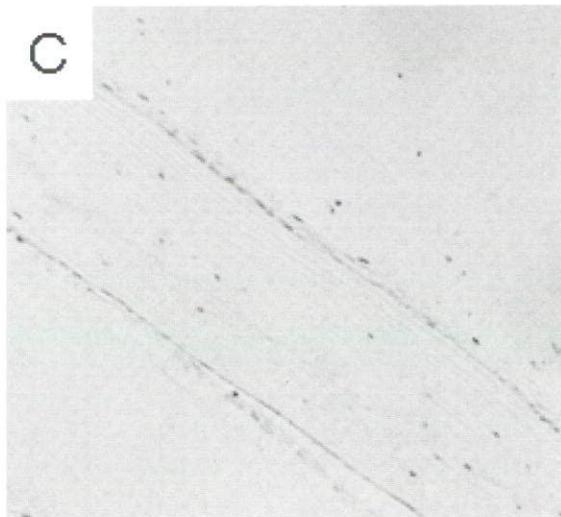
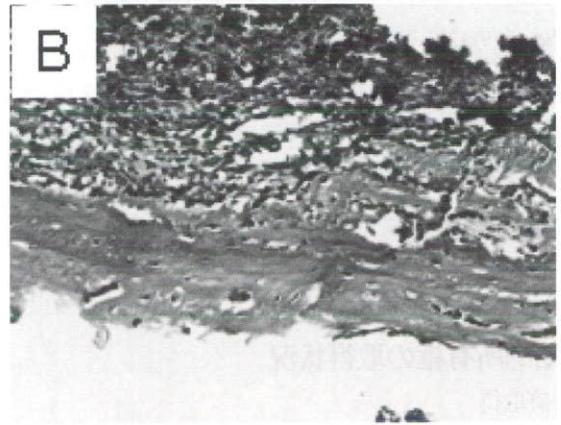
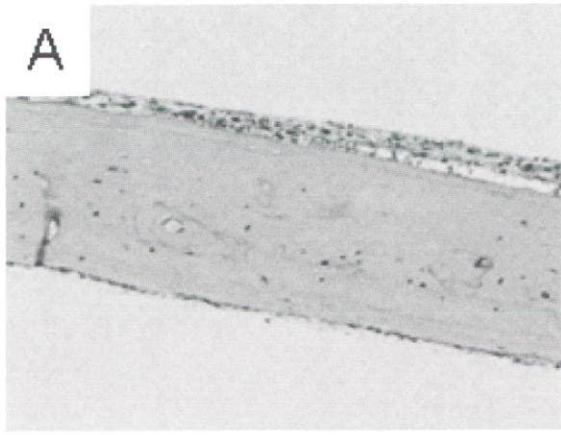


図1 チタニウム微粒子を散布7日におけるラット頭頂骨における組織像 (A) Sham手術後 (HE 染色 x100)、(B) チタニウム微粒子散布後 (HE 染色 x100)、(C) Sham手術後 (MIF 免疫染色 x100)、(D) チタニウム微粒子散布後 (MIF 免疫染色 x100)、(E) Sham手術後 (酒石酸フォスファターゼ染色 x100)、(F) チタニウム微粒子散布後 (酒石酸フォスファターゼ染色 x100)

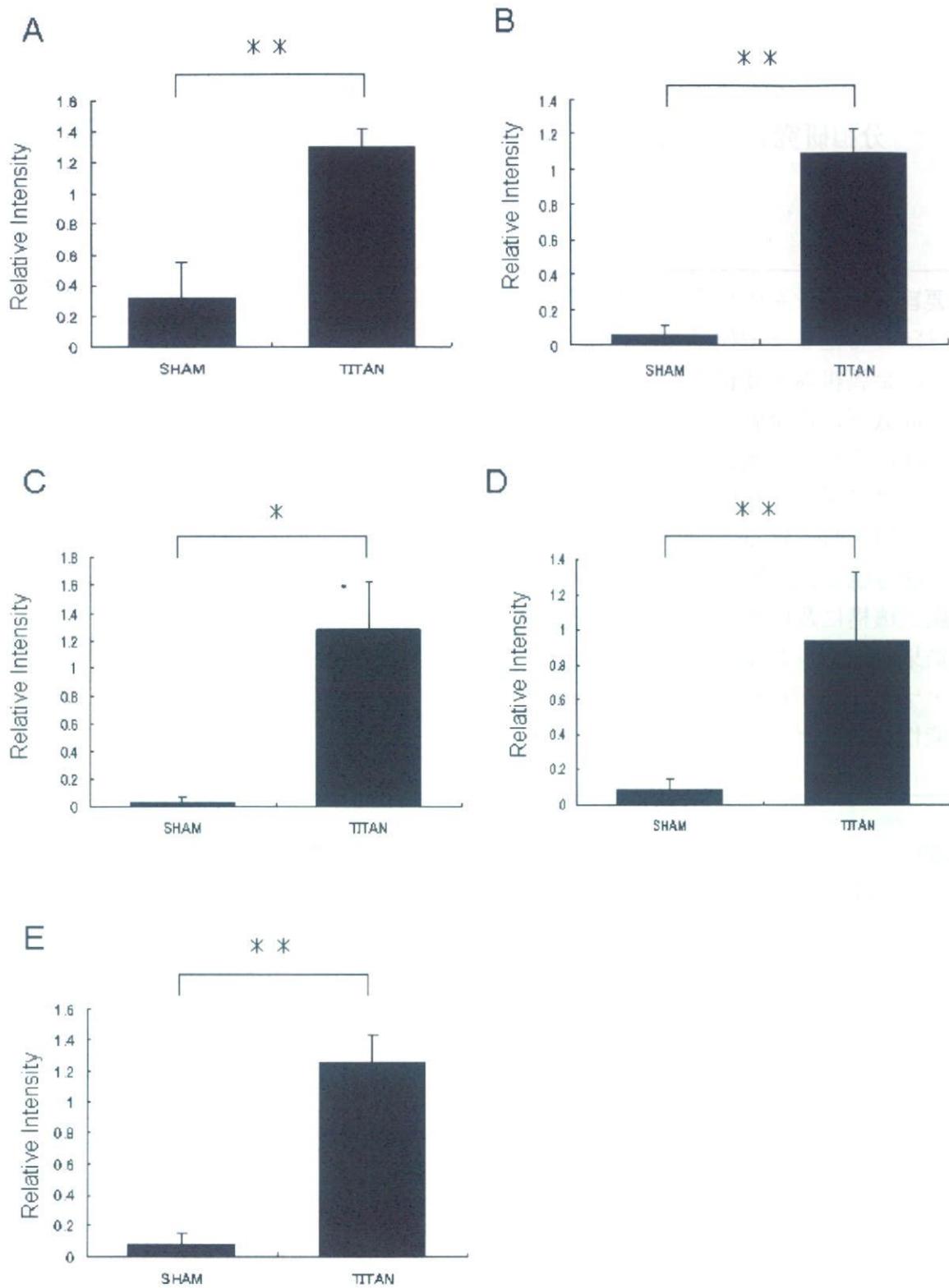


図2 Real time PCR によるチタニウム微粒子を散布7日におけるラット頭頂骨における炎症性サイトカインの遺伝子発現の定量的検討。(A) MIF, (B) TNF- α , (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) RANKL (n=4-6 per each bar, Mean \pm SD, * p<0.05, ** p<0.01).