

图 5-1

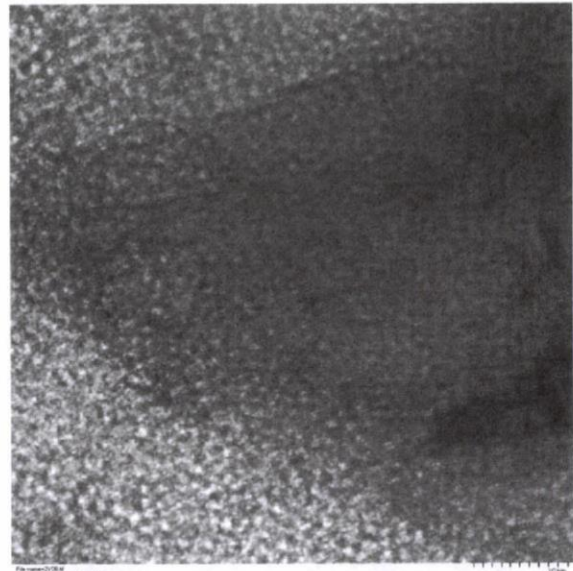


图 5-2

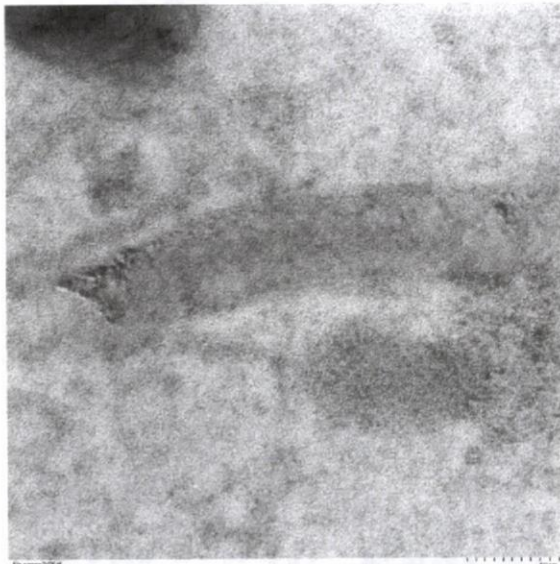


图 5-3



图 5-4

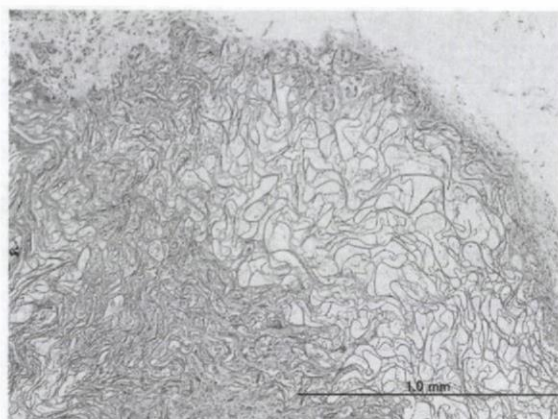


图 6-1



图 6-2

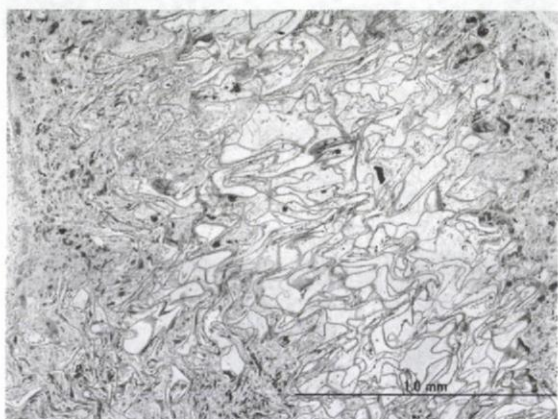


图 6-3

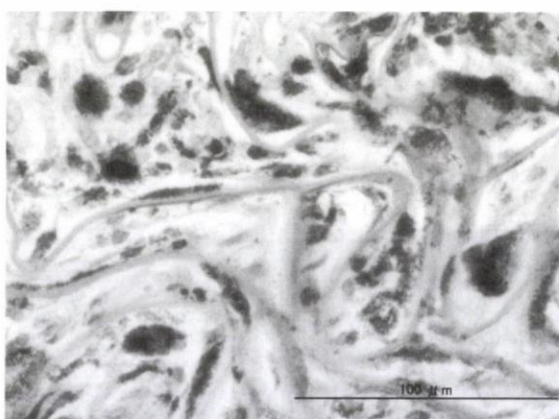


图 6-4

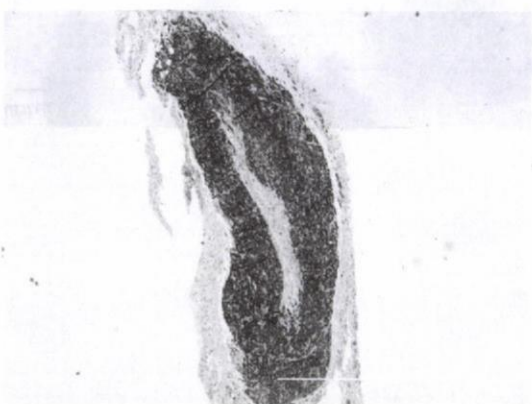


图 6-5

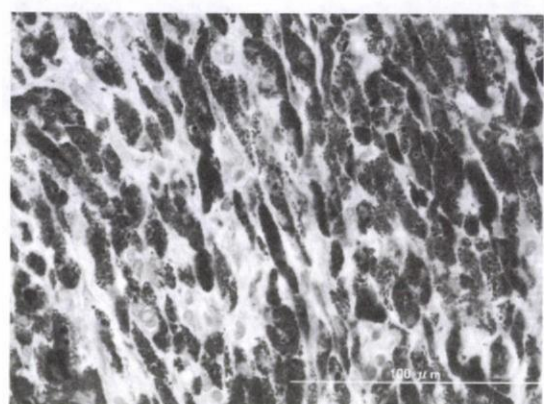


图 6-6

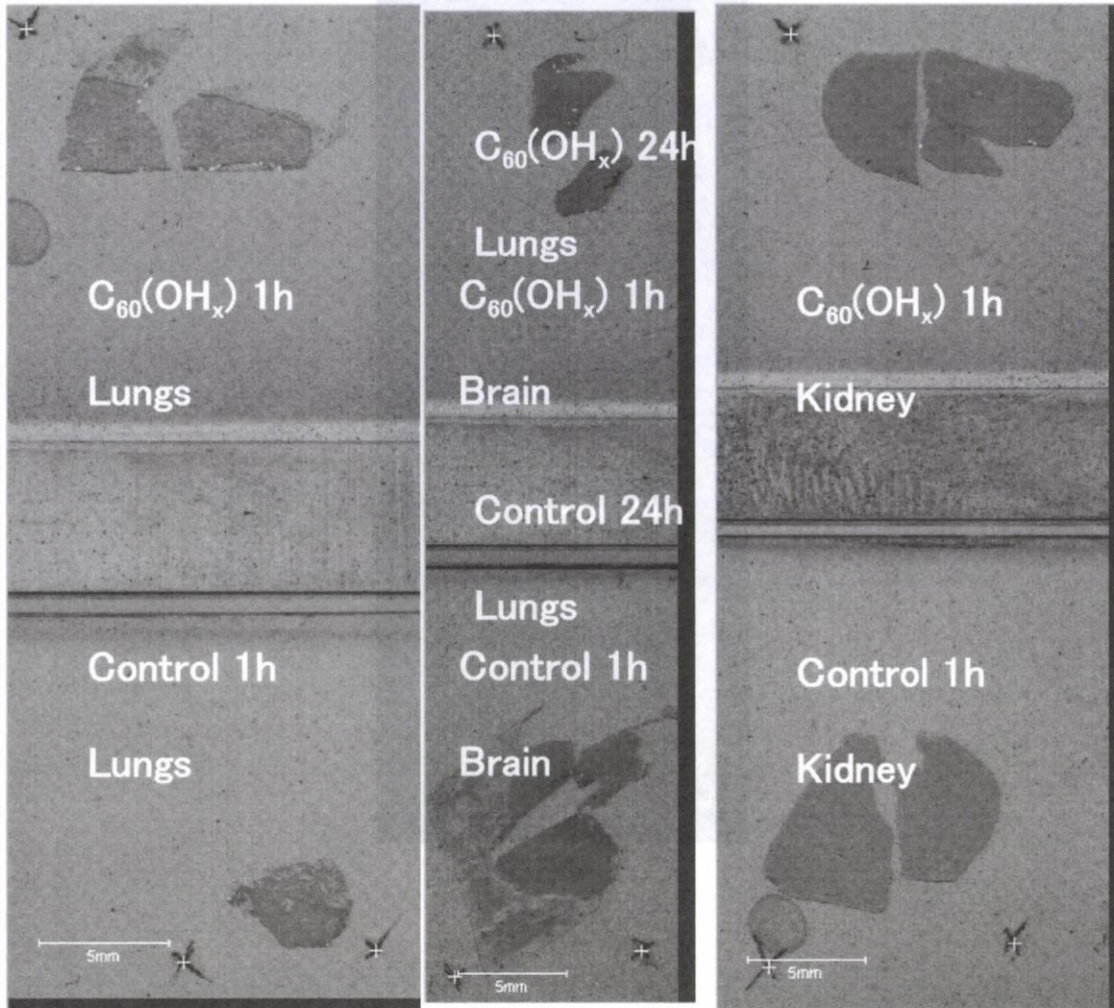


图 7-1

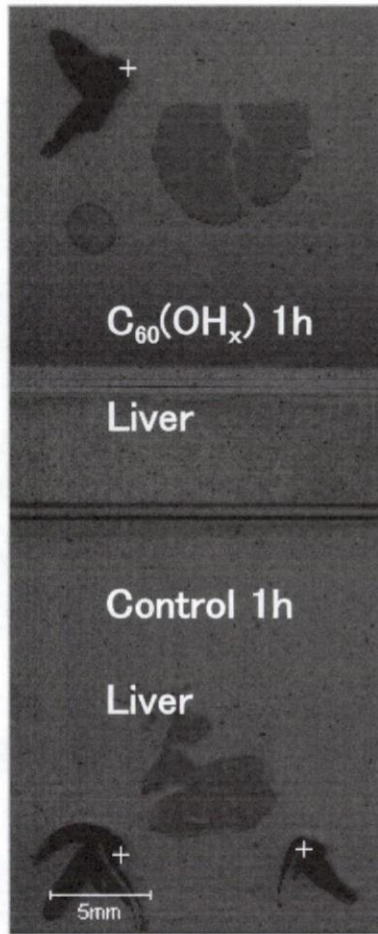


图 7-2

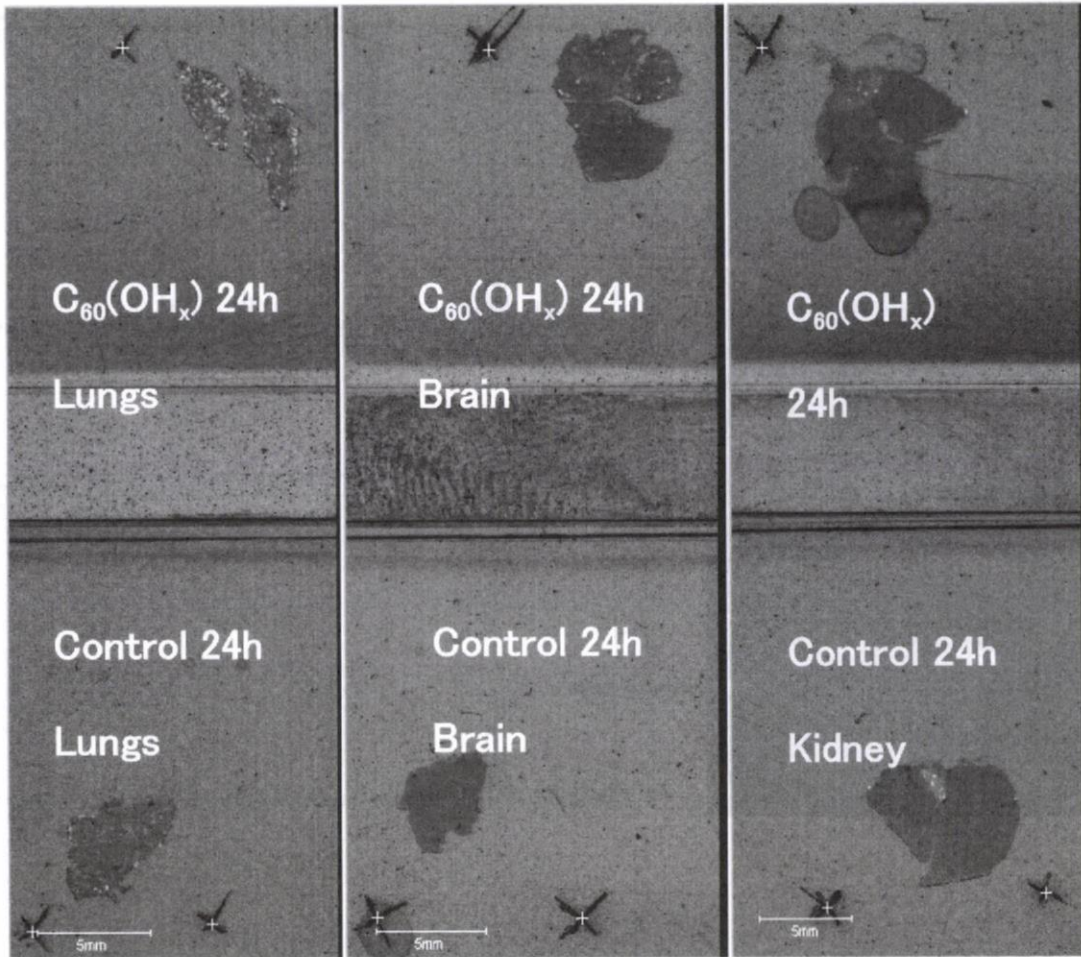


图 7-3

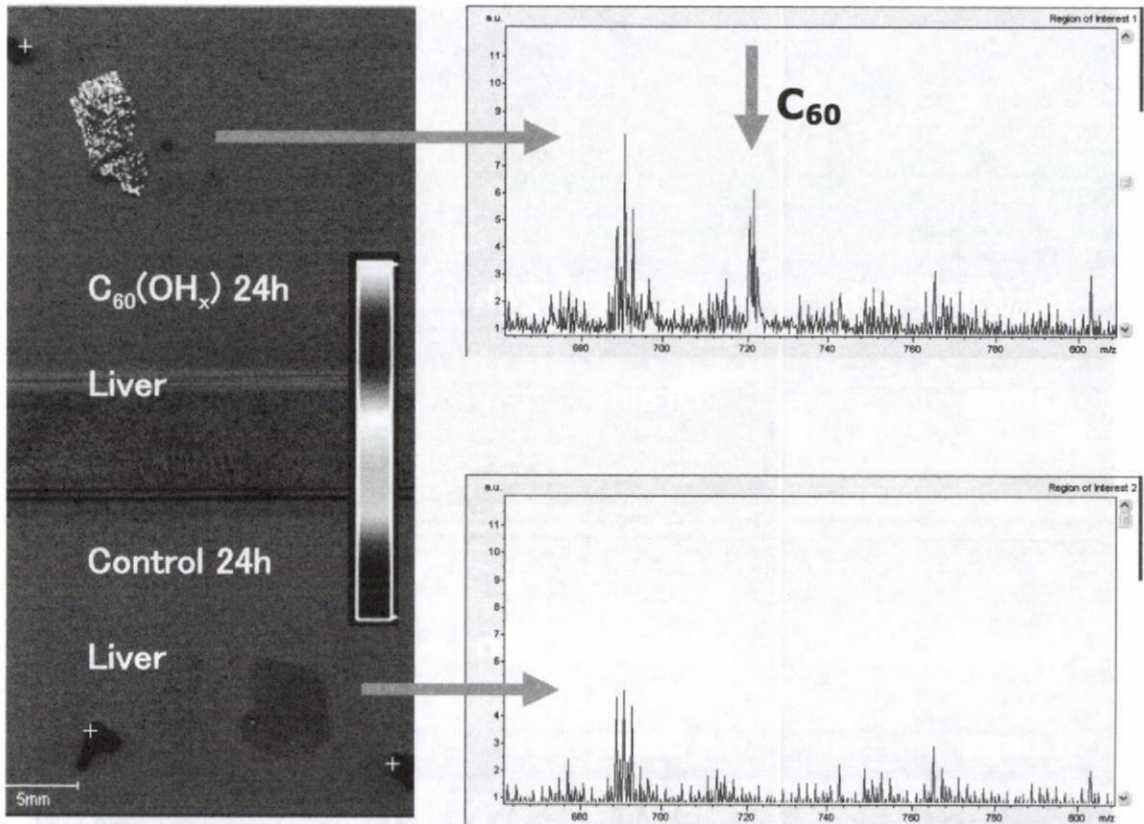


图 7-4

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 年後の TEM 像

図 4 - 2

220MWCNTs 埋入 2 年後の TEM 像

図 4 - 3

825MWCNTs 埋入 1 年後の TEM 像

図 4 - 4

825MWCNTs 埋入 1 年後の超高压超高分解能 TEM 像

図 4 - 5

825MWCNTs 埋入 2 年後の TEM 像

図 4 - 6

825MWCNTs 埋入 2 年後の高分解能 TEM 像)

図 5 - 1

600H-CNFs 埋入 1 年後の TEM 像

図 5 - 2

600H-CNFs 埋入 1 年後の高分解能 TEM 像

図 5 - 3

600H-CNFs 埋入 1 年後の高分解能 TEM 像

図 5 - 4

1200H-CNFs 埋入 1 年後の TEM 像

図 6 - 1

コラーゲンスポンジ埋入 1 週後の光顕像 (HE 染色)

図 6 - 2

コラーゲンスポンジ埋入 1 週後の光顕像 (HE 染色) 強拡大

図 6-3

多層カーボンナノチューブコートコラーゲンスポンジ埋入 1 週後の光顕像 (HE 染色)

図 6-4

多層カーボンナノチューブコートコラーゲンスポンジ埋入 1 週後の光顕像 (HE 染色)

強拡大

図 6-5

多層カーボンナノチューブコートコラーゲンスポンジ埋入 4 週後の光顕像 (HE 染色)

図 6-6

多層カーボンナノチューブコートコラーゲンスポンジ埋入 4 週後の光顕像 (HE 染色)

強拡大

図 7-1

フラレン静注 1 時間後の肺, 脳, 腎のマッピング像

上段: フラレン

下段: コントロール

図 7-2

フラレン静注 1 時間後の肝のマッピング像

上段: フラレン

下段: コントロール

図 7-3

フラレン静注 2 4 時間後の肺, 脳, 腎のマッピング像

上段: フラレン

下段: コントロール

図 7-4

フラレン静注 2 4 時間後の肝のマッピング像とスペクトル

上段: フラレン

下段: コントロール

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

バイオ微粒子により惹起される異物性炎症反応による
骨吸収の可視化評価モデルの開発に関する研究

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、ポリエチレン磨耗粉が滑膜マクロファージを刺激して TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカインが放出され、破骨細胞の分化が促進されるというカスケードが提唱されている。こうした骨吸収性サイトカイン産生や破骨細胞の分化において、転写調節因子 NF κ B は重要な役割を果たす。本研究では、磨耗粉刺激により生じる NF κ B の活性化を、バイオイメージングにより可視化することを試みた。NF κ B/luciferase トランスジェニックマウスの頭頂骨上にポリエチレン磨耗粉を負荷し、NF κ B 活性化によって生じる化学発光をバイオイメージングアナライザーにより検出・定量化した。負荷後7日目における化学発光量が最大であり、またこの化学発光量はルシフェラーゼ活性および各種の骨吸収性サイトカイン mRNA 発現量と有意な正の相関を示した。本システムは磨耗粉により生じる炎症性反応をマウスを生かしたまま検出することが可能であり、磨耗粉の材質や粒径による起炎性の違いや、磨耗粉誘発性骨溶解の薬剤による治療・予防効果のスクリーニング等に有用であると思われる。

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（オステオライシス）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ン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、人工関節の主として摺動面より生じた磨耗微粒子が滑膜の細胞（主にマクロファージ）を刺激して、TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカインや、COX-2 の誘導を介してのプロスタグランジン E₂ の産生をうながし、これらは骨芽細胞・ストローマ細胞の RANKL 発現を介した破骨細胞分化を促して、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。

Nuclear factor kappa B (NF κ B) は炎症をつかさどる転写調節因子として知られている。炎症性サイトカインやフリーラジカル等に代表される炎症刺激シグナルが細胞に入ると、細胞内シグナル伝達経路をへて核外にある NF κ B complex より I κ B が遊離し、遊離した NF κ B は核内に移行して、たとえば炎症性サイトカインのゲノム DNA のプロモーター領域にある NF κ B 結合領域に結合し、下流の配列の mRNA への転写を促す。現在ほとんどの炎症性サイトカインは NF κ B により何らかの転写制御を受けることが判明しており、またマクロファージが磨耗粉刺激に応じて炎症性サイトカインを産生・分泌するメカニズムにも NF κ B は必須であると報告されている。さらに、これら炎症性サイトカインの刺激を受けて骨芽細胞やストローマ細胞が RANKL を産生する機序、および

単球・マクロファージ等の破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化す機序にもNF κ Bは大きく関与しているとされており、摩耗粉によって生じるオステオライシスのカスケードのあらゆる段階においてNF κ Bは重要な役割を果たすと言える。

一方、

近年、GFPの蛍光やluciferaseによる化学発光を高感度で検出可能な装置の開発が進み、またマウスの遺伝子改変技術の普及により、マウスを屠殺することなくin-vivoでこうした発光を検出・定量するイメージング技術が急速な進歩を遂げている。NF κ B/luciferaseトランスジェニックマウス(以下NF κ B/lucマウス)はNF κ Bの結合サイトを5回繰り返した配列の下流にluciferase cDNAを結合したconstructをtransgeneとしこれを過剰発現させたマウスで、炎症性疾患モデルの発症に伴い炎症部位が化学発光する性質を有し、関節炎や敗血症の評価が可能である。われわれは、摩耗粉に誘発されるオステオライシスにおいてNF κ Bが重要な役割を果たすことに着目し、このマウスに摩耗粉を負荷することにより、生じる炎症反応を可視化する可能性を着想した。本研究の目的はNF κ B/lucマウスおよびポリエチレン粉を用い、摩耗粉誘発性の炎症反応を可視化できるかどうか、また可視化した発光の定量値が実際の炎症反応を反映するかを検討することである。

B. 研究方法

1. マウス

NF κ B/lucマウスは米国Caliper Lifesciences社より購入した。本実験はすべて北海道大学医学研究科動物実験プロトコールに準拠し施行された。

2. マウス頭頂骨摩耗粉負荷モデル

ポリエチレン摩耗粉として、ceridust 3615 (Clariant Japan, 平均粒径7 μ m)を、75%エタノールにて48時間処理後真空乾燥させて用いた。

生後7-8週齢のNF κ B/lucマウスを用い、腹腔内ネンブタール麻酔(50mg/kg)後、頭部に5mm長の縦切開を加えたのち骨膜を剥離して、ポリエチレン摩耗粉5mgを散布後、5-0ナイロン糸にて皮膚を縫合した。皮切・骨膜剥離のみ行い摩耗粉負荷を行わないマウスをSHAM群とした。

マウスはd-ルシフェリン溶液(10mg/ml)を200

μ l尾静脈より注射後、2分にてIVIS imaging system (200 series, XENOGEN)により頭部の化学発光の検出を行った。イメージングした発光領域をカバーするROI (range of interest)を設定し付属ソフトにより発光量の定量を行った。

化学発光検出後、マウスを安楽死させ頭頂骨を摘出し、HE染色及びTRAP染色により組織学的検討を行った。また頭頂骨の一部はルシフェラーゼ活性検出キット(Piccagene)によりルシフェラーゼ活性を、一部は全RNAを抽出後リアルタイムPCRにより骨吸収性因子(TNF- α , IL-1 β , RANKL, COX-2)およびGAPDHのmRNAを定量した。mRNA相対量はGAPDH値により補正した。

統計学的には群間の比較にはANOVAを用い、相関の検討には相関分析を用いた。いずれもp<0.05をもって有意差ありとした。

C. 研究結果

ポリエチレン粒子負荷によるマウス頭部化学発光

ポリエチレン粒子5mg負荷後7日目のマウスの頭頂骨を組織学的に検討したところ、中央部前額断面像において矢状縫合部を中心とした線維性の肉芽組織の形成を認め、これは主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴っていた(図1)。ポリエチレン摩耗粉負荷後7日目にバイオイメージングで検討したところ、頭部に化学発光を認めた。定量評価では2mg以上の負荷により発光量は有意に増加し、5mg投与群が最も発光量が多かった(図2)。また5mg負荷後経時的に発光量を追跡したところ、sham群と比べ負荷後3日目より発光量は有意に増加し、発光量は負荷後7日目で最大であった(図3)。

次に、経時的に化学発光を定量した後、頭頂骨を摘出し、矢状縫合にて縦に2分割し一方よりルシフェラーゼ活性を検出、また一方より全RNAを抽出して骨吸収性サイトカインmRNA定量を行った。IVISによる化学発光の定量値と実際の頭頂骨のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認め($r=0.833, n=19, p<0.0001$)、イメージング定量値はルシフェラーゼ活性を反映していることが確かめられた(図4)。

骨吸収性因子のmRNAは、すべて経時的に有意な上昇を示した(図5)。発現量のピークは、TNF- α で負荷後10日であり、IL-1 β , RANKL, およびcox-2では負荷後8日目であった。これら骨吸収因子のmRNA発

現量と化学発光のイメージング定量値の相関を検討したところ、相関係数および p 値は TNF- α ($r=0.842$, $p<0.0001$), IL-1 β ($r=0.855$, $p<0.0001$), RANKL($r=0.694$, $p<0.001$), および COX-2 ($r=0.712$, $p<0.0005$)と、いずれも正の相関を認め、化学発光の強さは骨吸収因子 mRNA 発現量を反映することが示された (図6)。

D. 考察

摩耗粉により生じるオステオライシスに関する評価実験系として、in-vitro ではマクロファージなどの培養細胞に摩耗粉を添加して培養上清中の骨吸収性サイトカイン濃度を計測するなどの手法が主である。また小動物を用いた in-vivo のモデルではマウスやラットを用い、皮下エアパウチに骨片及び摩耗粉を置く、ないしは頭頂骨上に摩耗粉を負荷するなどして、骨に生じた溶解を組織学的に評価する系が主流である。近年オステオライシスを予防すべく摺動面の素材をポリエチレン以外の材料 (セラミックや金属など) に替える、また予防薬としてビスホスホネート製剤や炎症性サイトカインに対するインヒビター (抗体やデコイレセプターなど) 等を用いるなどの検討が in-vivo レベルで盛んになされている。こうした実験の評価は主として組織学的ないしは分子生物学的解析を行うのが一般的であり、たとえば経時的解析を行うにあたり、実験動物は多数屠殺せざるを得ず、また同一個体における経時的変化をリアルタイムに観察するのは困難であった。

In-vivo バイオイメージングは、生体内で起こる炎症・再生・血管新生そのほかあらゆる現象に関し、レポーター遺伝子の反応を応用して生きたままリアルタイムで可視化する技術であり、今日、各種疾患モデルの評価に、多岐にわたって用いられている。NF κ B/luc マウスは 2002 年に初めて報告されたが、関節炎、敗血症、紫外線誘発皮膚炎、腸炎などの評価に用いられた実績があり、炎症の評価系として極めて有用であると思われる。本研究ではポリエチレン摩耗粉を用いて化学発光を検出できたが、これには、たとえば炎症部位の体内深度に伴う減衰や、摩耗粉の色・量による減衰などの考慮も必要である。たとえば白色は減衰に比較的抵抗性であるが黒色では減衰が生じやすいとされ、マウス頭頂骨オステオライシスモデルで汎用されるチタン粉等はこの系での評価には不適當であろうと推測される。またポリ

エチレン負荷量 5mg に比べ 10mg では発光が弱かったが、文献的にはこの量では実際の炎症には差はないと思われ、おそらくポリエチレン粉の過剰負荷による厚みで減衰が生じたのではないかと推測される。このように、摩耗粉の種類や負荷量と、実際のルシフェラーゼ活性や炎症性サイトカイン発現量との比較により、この評価系の限界に関する検討も必要である。

摩耗粉負荷の結果実際に生じる骨吸収の量と化学発光量との相関の検討は現在進行中である。また、たとえば炎症性サイトカインに対する抗体を用いてオステオライシスを抑制することは実験的には可能とされているが、このような薬物治療効果をイメージングにて観察することが可能かどうか未だ検討中の段階である。今後さらに研究を進め、この系が摩耗粉誘発性オステオライシスの評価・スクリーニングにどの程度有用であるか見極める必要がある。

E. 結論

摩耗微粒子によって生じるオステオライシスのモデルにおいて、摩耗粉負荷により生じる炎症反応の可視化を目指し、NF κ B/luciferase トランスジェニックマウスを用いたバイオイメージングを行った。ポリエチレン摩耗粉負荷により同マウスの頭部は経時的に化学発光を呈し、この発光は 7 日をピークに漸減した。この発光はルシフェラーゼ活性と正の相関を示し、実際のルシフェラーゼ活性を反映していることが示された。さらにこの発光は各種の骨吸収因子 (TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、COX-2) の mRNA 発現量とも正の相関を示し、この系において検出される化学発光の強さは骨吸収因子の mRNA 発現量をも反映することが示された。バイオイメージングはマウスを殺すことなく生体反応や各種薬剤による予防・治療効果などをモニターできる優れたシステムである。この系を用いることで、摩耗粉誘発性オステオライシスにおける分子メカニズムの解析や予防・治療効果の検討への応用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) Hayashi R, Kondo E, Tohyama H, Saito T, Yasuda K.: In vivo local administration of osteogenic protein-1 increases structural properties of the

overstretched anterior cruciate ligament with partial midsubstance laceration: a biomechanical study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Oct;90(10):1392-400.

2) Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Mizue Y, Hamasaka A, Abe R, Koyama Y.: A novel DNA vaccine-targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis. *Gene Ther.* 2008 Dec;15(23):1513-22.

3) Hayashi R, Kitamura N, Kondo E, Anaguchi Y, Tohyama H, Yasuda K: Simultaneous anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in chronic knee instabilities: surgical concepts and clinical outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Aug;16(8):763-9.

4) Onodera S, Oshima S, Nishihira J, Yasuda K, Tohyama H, Irie K, Koyama Y.: Active immunization against macrophage migration inhibitory factor using a novel DNA vaccine prevents ovariectomy-induced bone loss in mice. *Vaccine.* 2008 Feb 6;26(6):829-36.

5) Miyatake S, Tohyama H, Kondo E, Katsura T, Onodera S, Yasuda K.: Local administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration

of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. *J Biomech.* 2008;41(4):884-9.

6) 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.

7) Okamoto S, Tohyama H, Kondo E, Anaguchi Y, Onodera S, Hayashi K, Yasuda K.: Ex vivo supplementation of TGF-beta1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Mar;16(3):333-9.

8) 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

1) Hayashi R, Kondo E, Tohyama H, Saito T, Yasuda K.: In vivo local administration of osteogenic protein-1 increases structural properties of the

patellar tendon. *J Biomech.* 2008;41(4):884-9.

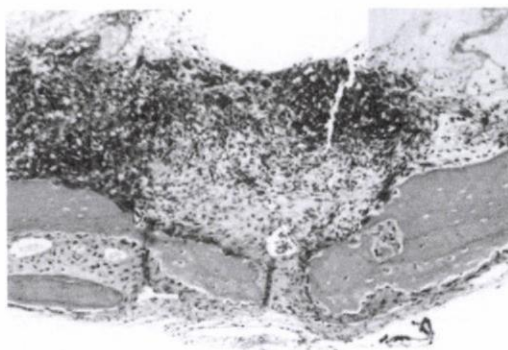


図 1-A

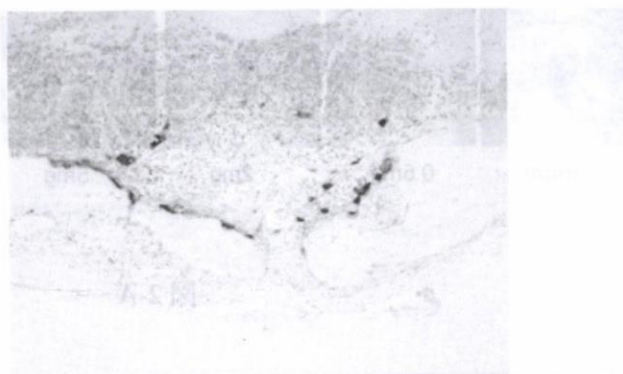


図 1-B

図 1 ポリエチレン粒子 5mg 負荷後 7 日目のマウスの頭頂骨の組織学的検討。A. HE : 矢状縫合部を中心とした線維性の肉芽組織の形成を認める。B. TRAP 染色 : この肉芽組織は主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴う。

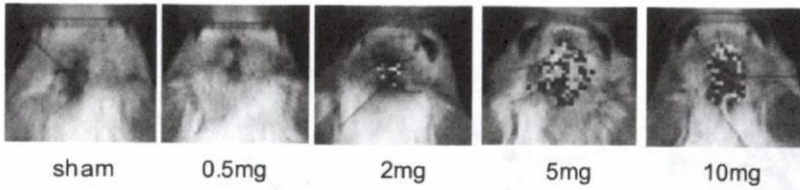
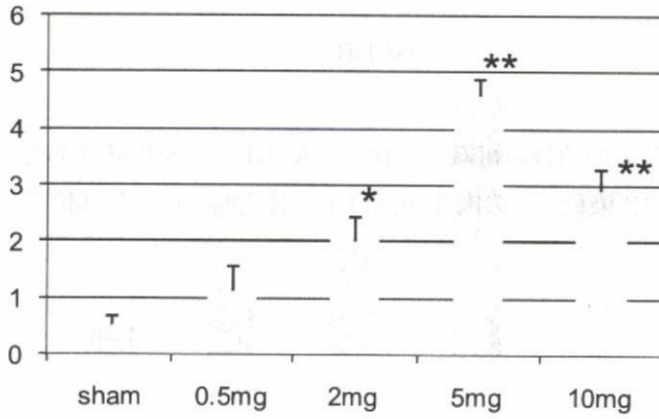


図 2-A



*p=0.0005
**p<0.0001

図 2-B

図 2 ポリエチレン摩耗粉負荷後7日目におけるバイオイメージングでの検討。A.ポリエチレン2mg以上の負荷により頭部に明瞭な化学発光を認める。B. ポリエチレン2mg以上の負荷により有意な発光量の増強を認め、5mg負荷群で発光量が最大である。

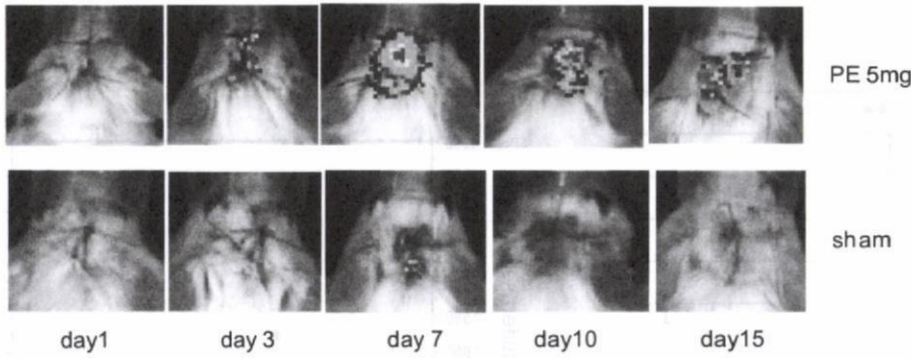


図 3-A

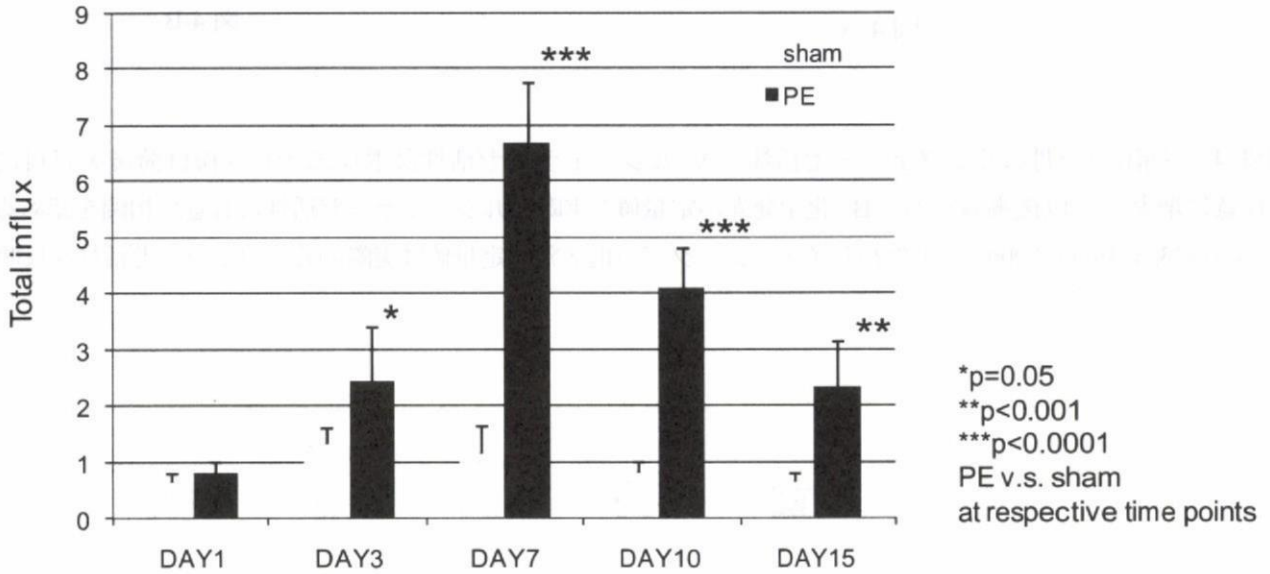


図 3-B

図 3 ポリエチレン摩耗粉 5mg 負荷後の経時的変化のバイオイメージングによる検討。A. 負荷後 3 日より明瞭な化学発光を認め、7 日目で最大に達し、以後漸減する。Sham 群では 7 日目にわずかな発光を認めるのみである。B. sham 群と比べ負荷後 3 日より有意な発光量の増強を認め、発光量は負荷後 7 日目で最大に達し、以後漸減するが、15 日目でも有意な増強を示す。

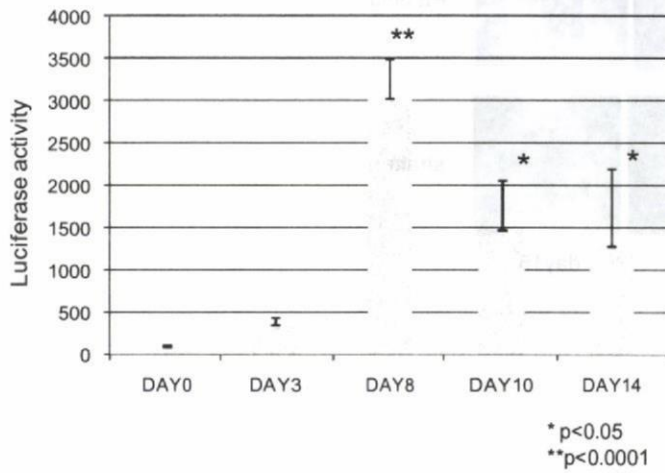


図 4-A

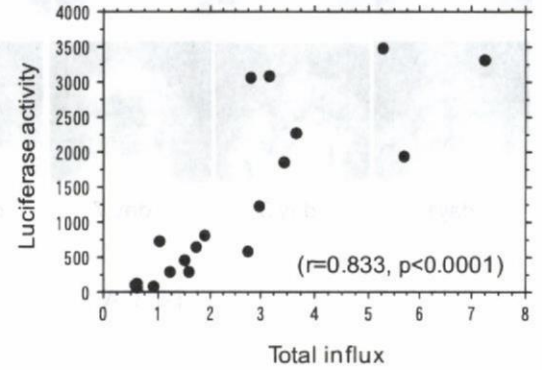


図 4-B

図 4 摘出頭頂骨のルシフェラーゼ活性。A. ルシフェラーゼ活性はポリエチレン粉負荷後 8 日目に有意に増大し、以後漸減する。B. 化学発光の定量値と実際のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認める ($r=0.833, n=19, p<0.0001$)。すなわちイメージングでの化学発光定量値は実際のルシフェラーゼ活性を反映している。

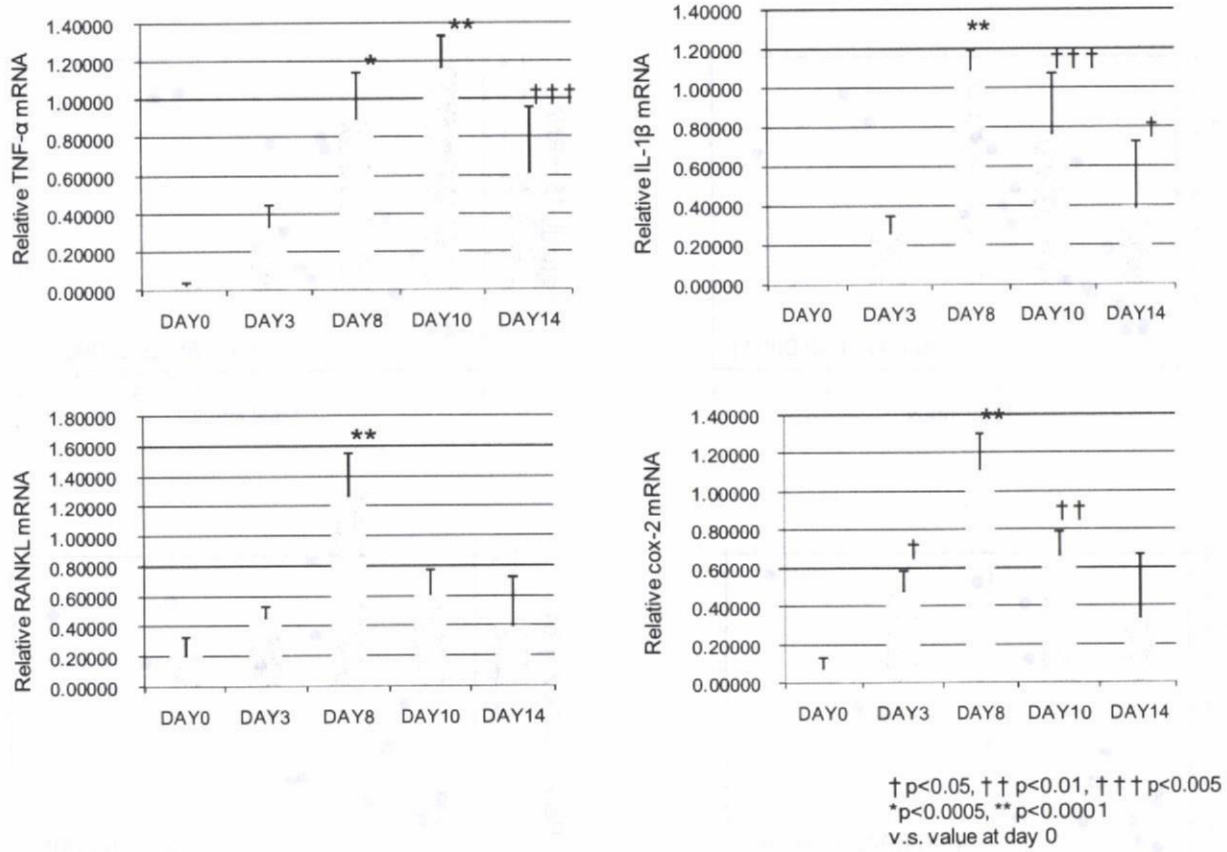


図 5

図 5 ポリエチレン 5mg 負荷後の頭頂骨における骨吸収性因子の mRNA の経時的変化。測定した骨吸収因子はすべて経時的に有意な上昇を示す。発現量のピークは、TNF- α で負荷後 10 日であり、IL-1 β 、RANKL、および COX-2 では負荷後 8 日目である。

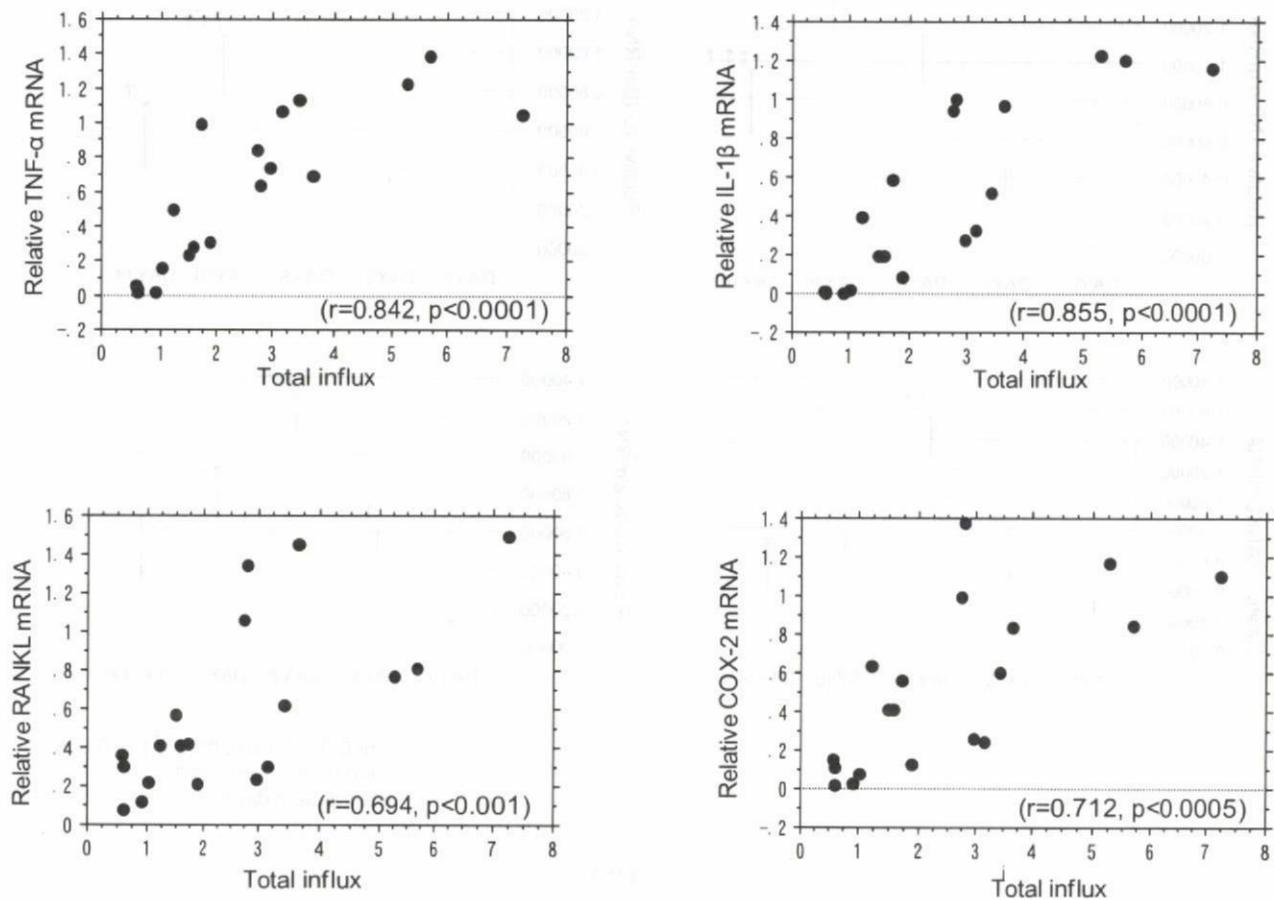


図 6

図 6 骨吸収因子の mRNA 発現量と化学発光のイメージング定量値の相関。相関係数および p 値は TNF- α ($r=0.842, p<0.0001$)、IL-1 β ($r=0.855, p<0.0001$)、RANKL ($r=0.694, p<0.001$)、および COX-2 ($r=0.712, p<0.0005$)であり、いずれも正の相関を認める。すなわち化学発光の強さは骨吸収因子 mRNA の発現量を反映している。

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

チタン合金の腐食生成物とその生体為害性に関する研究

分担研究者 浅岡憲三 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部教授
研究協力者 日浅雅博 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部助教
研究協力者 宇尾基弘 北海道大学歯学研究科准教授

研究要旨 歯科治療、骨代替材料、脈管系治療材料・機器にチタンおよびチタン合金が利用され、低侵襲医療に不可欠の材料になっている。しかし、その寿命、合金機能の劣化が指摘され、その克服と材料劣化にともない生じる微粒子と微粒子の生体安全性に対する指針の構築が課題になっている。チタンおよびチタン合金の腐食機構は応力腐食であり、水素が腐食速度を決める因子であることが知られている。すなわち、金属腐食による、溶出金属イオンや、これに付随して生じる金属微粒子が金属アレルギーをはじめとする粘膜疾患や発癌の原因因子となりうると考えられている。しかし、その詳細な分子機序やチタン合金の腐食により生じる金属微粒子の免疫疾患に係る安全性については不明な点が多い。そこで本研究では疑似体液下で電気化学的手法により Ni-Ti 合金に水素が関与する応力腐食の加速試験を行い、生成微粒子の状態分析、ならびに、その生体に対する為害性について評価を行った。その結果、生理食塩水中で Ni-Ti 合金から得られた腐食生成物微粒子は、 TiO_2 と $\text{Ni}(\text{OH})_2$ より構成されていた。この Ni-Ti 合金腐食微粒子はマクロファージにより貪食され TNF- α の産生を促進した。マクロファージは異物処理後細胞死が誘導されるが、Ni-Ti 合金腐食微粒子は骨芽細胞に対しても細胞増殖を阻害しアポトーシスを誘導した。

本研究により、チタンおよびチタン合金が利用できる化学的環境、安全性の評価法に関するガイドラインの構築の重要性が示された。今回用いた金属腐食の加速試験と腐食微粒子は、金属腐食による生体への為害作用の評価モデルとして非常に有効であると考えられた。

A. 研究目的

口腔内、皮下、脈管系器官内など生体内環境は pH や化学種が多様である。同時に、矯正用線、歯冠補綴物、人工歯根（インプラント）、脈管系器官のステント、カテーテルなどの歯医用器材は応力やひずみがかわった状態で利用されることが多い。こうした条件の下では、耐食性に優れるチタンおよびチタン合金も応力腐食割れによる遅れ破壊が問題になり、その克服法あるいは材料使用のガイドラインの構築が課題になっている。とくに、Ni-Ti 合金は、超弾性

や形状記憶機能をもつことから、医用材料として注目されているが、水素吸蔵により腐食が進行することが示唆されている。そして合金の腐食により生じる溶出金属イオンと、それに付随して生成される微粒子は、金属アレルギーをはじめとする粘膜疾患や発癌の原因因子となりうる。そこで本研究では、Ni-Ti 合金より得られた腐食生成物微粒子の状態分析を行い、その生体に対する為害性について検討した。

B. 研究方法

1 Ni-Ti 腐食生成物の作製

表面研磨した Ni-Ti 線 (0.5mmf) を陰極とし 100ml の 0.9%NaCl 水溶液中で 10V の電圧を負荷し電気分解を行い水素チャージし、発生した腐食生成物を遠心分離にて回収後、リン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し 121°C20 分でオートクレーブし以下の実験に使用した。

2 マクロファージ貪食試験

α -MEM 10%FBS で維持したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に、細胞数に対し 1:100 となるよう腐食生成物数を調整し培地中に添加した。24 時間培養後、Wright-Giemza 染色を行い顕微鏡下で観察を行った。

3 Ni-Ti 腐食生成物の細胞増殖への効果

RAW264.7 細胞、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に対し腐食生成物を培地中に添加し 48 時間培養を行い MTT assay にて細胞数の計測を行った。

4 フローサイトメトリー

腐食生成物を添加し 24 時間培養後、培養細胞を回収した。回収した細胞は PBS で 2 回洗浄後、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (abcam) にて Annexin V 陽性細胞の検出を行った。

5 ウェスタンブロット

腐食生成物を添加し 24 時間培養後、培養細胞を PBS で 2 回洗浄後、RIPA buffer にてタンパク質を抽出、以下通法に従いバンドの検出を行った。

C. 研究結果

Ti 及び Ni K-edge XANES スペクトルより、生理食塩水中での Ni-Ti 合金の電気分解により得られた腐食生成物微粒子は主として、TiO₂ と Ni(OH)₂ より構成されるものと推察された (図 1)。

マクロファージ (Macrophage, M Φ) は白血球の一つであり死に至った細胞を消化するだけでなく、生体内に侵入した細菌、ウイルス等の異物を補食し抗原提示を行い、炎症をはじめとする免疫機能の中心的役割を担う細胞である。そこで腐食性生物をマクロファージ cell line RAW264.7 が貪食するかの検討と炎症性サイトカインの一つである TNF の産生への影響を ELISA 法で検討した。結果チタン合金腐食粉末の貪食像が確認され (図 2)、また粒子数の用量

依存的に TNF の産生が増加することが確認された (図 3)。このことからチタン合金腐食粉末がマクロファージによる炎症の惹起に関与しうることが考えられた。また、マクロファージによる貪食のみならず、腐食生成物微粒子はマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に対し、細胞表面に接着する像が確認された。

次にチタン合金腐食粉末の細胞増殖への影響について、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞と骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞で MTT assay を用い検討した。その結果、興味深いことに RAW264.7 細胞において、添加する腐食粉の用量依存的に細胞増殖を抑制した (図 4 左) のと同様に、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞においても腐食粉の添加で、添加する腐食粉末数の用量依存的に細胞増殖を障害した (図 4 右)。この結果からチタン腐食粉はマクロファージのみならず骨芽細胞に対しても何らかの細胞増殖への障害活性を有することが考えられた。

以上の結果を踏まえ、チタン腐食が細胞に対し細胞死を誘発するか否かを、フローサイトメトリーにて Annexin V の発現を解析することで検討した。その結果 RAW264.7 細胞では 14.9% から 19.3% へ腐食粉末の添加により Annexin V 陽性細胞の増加が認められ (図 5 上)、さらに MC3T3-E1 細胞においても同様に、10.5% から腐食粉末添加によって、18.7% と Annexin V 陽性細胞の増加を認めた (図 5 下)。すなわち、チタン腐食粉は、マクロファージによる貪食後の細胞死のみならず、骨芽細胞に対してもそのアポトーシスを誘導することが予測された。

D. 考察

細胞障害因子により誘発される細胞死アポトーシスを決定する過程にはおもに 2 つの経路が主要な役割を担う。1 つはミトコンドリアを介する経路で Bcl-2 ファミリーがこのミトコンドリアを介する経路の主要な担い手である。Bcl-2 ファミリーには Bcl-2, Bcl-xL 等の抗アポトーシス因子、Bad, Bax, Bid 等のアポトーシス誘導因子がありこれらが複雑にクロストークすることで制御されている。もうひとつは FASL TRAIL TNF などのリガンドに対する受容体 デスレセプターから caspase の自己および、その下位の caspase の限定分解経路であり caspase についてもその分解活性を阻害する FLIP, XIAP, Mcl-1 等の抗アポトーシス因子により調節されている。そこで