

Detection of *Candida* and *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis

Sunao Sugita · Koju Kamoi · Manabu Ogawa · Ken Watanabe · Norio Shimizu · Manabu Mochizuki

Received: 24 June 2011 / Revised: 29 August 2011 / Accepted: 2 September 2011 / Published online: 27 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Background The goal of this work is to establish a broad-range real-time polymerase chain reaction (PCR) diagnostic system for ocular fungal infection and to measure *Candida* and *Aspergillus* DNA in the ocular fluids obtained from unknown uveitis/endophthalmitis patients.

Methods After obtaining informed consent, intraocular fluids (aqueous humor and vitreous fluid samples) were collected from 54 patients with idiopathic uveitis or endophthalmitis. Samples were assayed for *Candida* or *Aspergillus* DNA using broad-range (18S rRNA sequences) quantitative real-time PCR.

Results *Candida* or *Aspergillus* DNA was detected in seven out of 54 patient ocular samples (13%). These PCR-positive samples showed significantly high copy numbers of *Candida* or *Aspergillus* DNA. On the other hand, fungal DNA was not detected in any of the other 46 samples collected from these idiopathic uveitis or endophthalmitis patients. In the one PCR-negative case, PCR did not detect any fungal genome in the sample, even though this patient was clinically suspected of having *Candida* endophthalmitis. Real-time PCR results were negative for fungal DNA in the bacterial endophthalmitis patients and in various uveitis

patients. In addition, fungal DNA was also not detected in patients without ocular inflammation (controls).

Conclusions Analysis of ocular samples by this broad-range real-time PCR method can be utilized for rapid diagnosis of patients suffering from unknown intraocular disorders such as idiopathic uveitis/endophthalmitis.

Keywords Endophthalmitis · Fungal infection · Polymerase chain reaction

Introduction

Fungal endophthalmitis is a sight-threatening disease caused by human pathogenic fungi. Fungal infections are known to cause ocular inflammations such as endophthalmitis, uveitis, and keratitis. However, with the exception of for the *Candida*-associated ocular infection, the association between the fungus and the observed clinical features has yet to be elucidated. The well-known clinical features for *Candida* endophthalmitis include a fungal ball in the retina and vitreous opacity [1]. Fungal endophthalmitis can result from hematogenous dissemination or from a direct inoculation following trauma or surgery to the eye. Risk factors for fungal endophthalmitis include intravascular catheters, diabetes, malignancy, chemotherapeutic agents, and steroids. However, the clinical findings can be very diverse in some cases of ocular inflammatory disorders caused by fungal species. Moreover, fungal infections have been widely associated with keratitis, retinitis, uveitis, retinal/choroidal vasculitis, invasive orbital infection, and endophthalmitis. Because of this diversity, infection diagnosis is both difficult and time-consuming [1–4]. In order to be able to perform adequate treatments that can prevent these infectious agents from causing irreversible ocular damage,

S. Sugita (✉) · K. Kamoi · M. Ogawa · M. Mochizuki
Department of Ophthalmology & Visual Science,
Tokyo Medical and Dental University,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
1-5-45 Yushima,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan
e-mail: sunaoph@tmd.ac.jp

K. Watanabe · N. Shimizu
Department of Virology, Division of Medical Science,
Tokyo Medical and Dental University,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo, Japan

early examinations that correctly identify the etiology of the infection are necessary.

Conventional methods of diagnosis of fungal endophthalmitis include detection and isolation of the fungi from the intraocular fluids (aqueous humor or vitreous). However, since the sensitivity of conventional fungal cultures is not high, and the culture growth rates are slow, longer times are required before final results can be obtained [5, 6]. Thus, an early diagnosis can be important in ensuring there is prompt management of the endophthalmitis. Previous studies have shown that polymerase chain reaction (PCR) can be successfully and reliably used to make a diagnosis of fungal endophthalmitis [7–10]. However, even conventional PCR has yet to be able to determine quantitative information for the fungal genome in ocular samples.

In this study, we used real-time quantitative PCR for detection of *Candida* and *Aspergillus* DNA. We developed a protocol for the rapid detection of fungal DNA in ocular samples that was based on two major species (*Candida* and *Aspergillus*) that commonly cause eye disorders. We designed novel panfungal primers and probes that were complementary to the 18S rRNA sequences present in these species. Our broad-range real-time PCR proved to be an accurate method for quantitating fungal copies of both *Candida* and *Aspergillus* DNA.

Methods

Sample preparation

From 2006 to 2010, we consecutively enrolled endophthalmitis and uveitis patients in a prospective study that was conducted at our hospital (Table 1). After informed consent was obtained in all patients, we collected aqueous humor and vitreous fluid samples. A 0.1–0.2 ml aliquot of aqueous humor (asepsis) was collected in a syringe with a 30-G needle. We also collected non-diluted vitreous fluid samples (0.5–1.0 ml) during diagnostic pars plana vitrectomy (PPV) procedures that were conducted in patients with clinically suspected fungal endophthalmitis/uveitis. All of the patients displayed active intraocular inflammation at the time of sampling. The samples were transferred into a pre-sterilized microfuge tube and used for PCR. To ensure that no contamination of the PCR preparation occurred, the DNA amplification and the analysis of the amplified products were done in separate laboratories, as per a method reported for one of our previous studies [11].

For cultures of fungi, the Bacteria Work Station of the Tokyo Medical and Dental University Hospital processed all specimens (aqueous humor and vitreous fluids) within 1 h after the sample collection, with standard methods followed for the isolation and identification of fungal cultures [11].

In addition to the patient groups, we also analyzed samples from a control group. A total of 40 samples (20 aqueous humor and 20 vitreous fluids) were collected from patients who did not have any type of ocular inflammation (age-related cataract, macular edema, retinal detachment, idiopathic macular hole, or idiopathic epiretinal membrane).

The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki and all study protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of Tokyo Medical and Dental University. This clinical trial was registered, with registration information available at www.umin.ac.jp/ctr/index/htm. The study number attached to this registration is R000002708. The study was begun in April of 2006 and ended in April of 2010.

Polymerase chain reaction

To detect the *Candida* and *Aspergillus* DNA, we designed primers and probes for the broad-range PCR of the 18S rRNA sequences, which we have described in a previous report [10]. Kami et al. [12] developed primers and a probe for real-time PCR and demonstrated that the procedure was highly specific for the *Aspergillus* infection. In this study, we also designed a probe for use in the *Candida* species DNA amplifications (Fig. 1).

DNA was extracted from the samples using a DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) installed on a robotic workstation that was set for automated purification of nucleic acids (BioRobot E21, Qiagen). The real-time PCR was performed using the Amplitaq Gold and the Real-Time PCR 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA) or Light Cycler 480 II (Roche, Switzerland). The paired primers and TaqMan probes used for *Candida* and *Aspergillus* are shown in Fig. 1. Products were subjected to 50 cycles of PCR amplification, with cycling conditions set at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. For PCR assay sensitivity, PCR fragments were amplified from the DNA of *C. albicans* (Strain: ATCC 60193). Amplification of the human β -globulin gene served as an internal positive extraction and amplification control. Copy number values of more than ten copies/ml in the sample were considered to be significant.

Results

Specificity of *Candida* and *Aspergillus* species in broad-range real-time PCR

To evaluate the specificity of the *Candida* and *Aspergillus* species using broad-range real-time PCR of the 18S rRNA sequences, total nucleic acids of six *Candida* species and five *Aspergillus* species were extracted and assayed for 18S

Table 1 Detection of *Candida* and *Aspergillus* 18S rRNA gene by broad-range real-time PCR in unknown uveitis or endophthalmitis patients and control uveitis patients

Initial diagnosis	No. of patients	Sample	Results for real-time PCR	Final diagnosis	Remarks
Idiopathic uveitis/ endophthalmitis	n=46	Aqh, VF	<10 copies	Idiopathic uveitis/ endophthalmitis	
	n=1 (65, male)	VF	<i>Candida</i> 9.2×10^5 copies/ml	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 1; Endogenous endophthalmitis
	n=1 (71, female)	VF	<i>Aspergillus</i> 4.5×10^2 copies/ml	<i>Aspergillus</i> endophthalmitis	Case 2; Endogenous endophthalmitis
	n=1 (73, male)	VF	<i>Aspergillus</i> 1.8×10^3 copies/ml	<i>Aspergillus</i> endophthalmitis	Case 3; Late postoperative endophthalmitis
	n=1 (80, male)	Aqh	<i>Candida</i> 3.4×10^2 copies/ml	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 4; Post-traumatic corneal ulceration
	n=1 (66, female)	VF	<i>Candida</i> 6.5×10^5 copies/ml	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 5; Endogenous endophthalmitis (IFN treatment)
	n=1 (74, male)	VF	<i>Candida</i> 6.2×10^4 copies/ml	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 6; Endogenous endophthalmitis (diabetes)
	n=1 (0, female)	VF	<i>Candida</i> 9.4×10^4 copies/ml	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 7; Endogenous endophthalmitis (normal infant)
	n=1 (60, male)	Aqh	<10 copies	<i>Candida</i> endophthalmitis	Case 8; Endogenous endophthalmitis (IVH use)
Bacterial endophthalmitis	n=7	Aqh, VF	<10 copies	/	
Sarcoidosis	n=4	Aqh, VF	<10 copies	/	
Vogt-Koyanagi-Harada disease	n=1	Aqh	<10 copies	/	
Toxocariasis	n=1	Aqh	<10 copies	/	
Toxoplasmosis	n=3	Aqh, VF	<10 copies	/	
Acute retinal necrosis	n=7	Aqh, VF	<10 copies	/	
Cytomegalovirus retinitis	n=4	Aqh, VF	<10 copies	/	
Herpetic anterior iridocyclitis	n=4	Aqh	<10 copies	/	
Non-inflammatory ocular diseases*	n=40	Aqh, VF	<10 copies	/	Controls for PCR

*Non-inflammatory ocular diseases: age-related cataract, macular edema, retinal detachment, idiopathic macular hole or idiopathic epiretinal membrane

Aqh aqueous humor, IFN interferon, IVH Intravenous hyperalimentation, VF vitreous fluids

rDNA. As seen in Fig. 1, the broad-range real-time PCR detected six *Candida* species, i.e., *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, and *C. krusei*, along with five *Aspergillus* species, i.e., *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, and *A. terreus*. By using several different primers and probes, we were able to separately detect each of these fungal species (Fig. 1).

Sensitivity of the real-time PCR assay

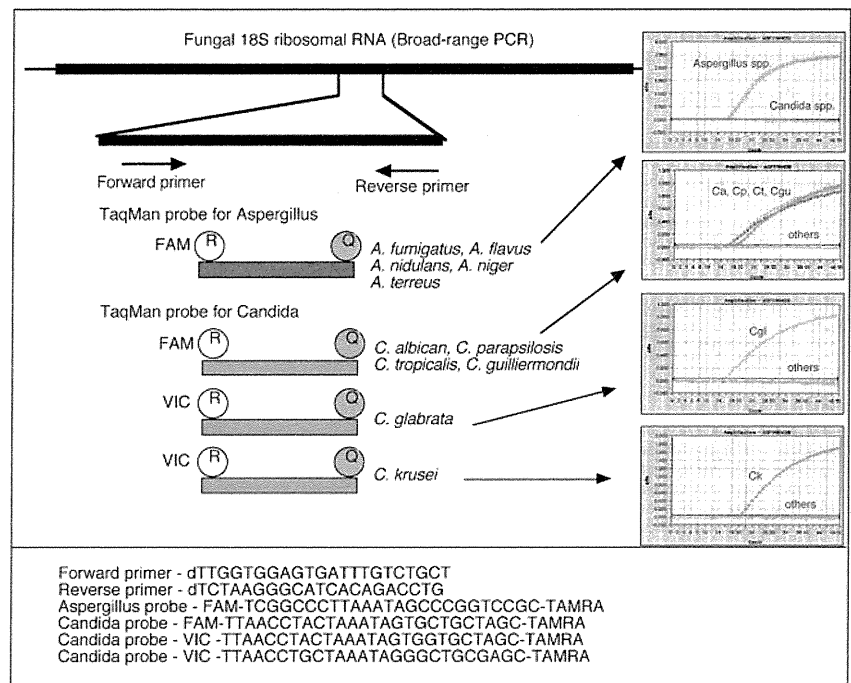
To confirm the broad-range real-time PCR assay sensitivity, PCR fragments were amplified from the DNA of *C. albicans*. The detection limit and standard range of the TaqMan real-time PCR were determined by using serial tenfold dilutions of linearized plasmid. The PCR results for the prepared samples showed that the best sensitivity for detecting *C. albicans* DNA was at a concentration of 10^1 per PCR (Fig. 2). There was no detection of the DNA in the negative control (nuclease-free water).

Detection of *Candida* and *Aspergillus* 18S rRNA gene in unknown uveitis/endophthalmitis patients

PCR results indicated a total of seven ocular fluid samples from the idiopathic uveitis or endophthalmitis patients (7/54, 13% positive, Table 1) were positive for *Candida* or *Aspergillus* DNA. These positive patients had high copy numbers of either *Candida* or *Aspergillus* DNA, with values ranging from 3.4×10^2 to 9.2×10^5 copies/ml. These results indicate the presence of a fungal infection. A representative PCR result is shown in Fig. 3. Conversely, conventional fungal cultures only found two out of the seven PCR-positive samples (both *C. albicans*) to be positive, while the other five samples were negative.

On the other hand, fungal DNA was not detected in any of the other 46 samples collected from these idiopathic uveitis or endophthalmitis patients. In the one PCR-negative case, PCR did not detect any fungal genome in the aqueous humor (<10 copies, case 8 in Table 1), even

Fig. 1 Specific primers and probes for broad-range real-time PCR of the fungal 18S rRNA sequence were designed in order to detect DNA for *Candida* and *Aspergillus* species



though this patient was clinically suspected of having *Candida* endophthalmitis. Real-time PCR results were negative for the *Candida* and *Aspergillus* DNA in the bacterial endophthalmitis patients ($n=7$) and in the various uveitis patients ($n=24$) who had been diagnosed with sarcoidosis, Vogt-Koyanagi-Harada disease, toxocariasis, toxoplasmosis, acute retinal necrosis, cytomegalovirus retinitis, or herpetic anterior iridocyclitis. In addition, fungal DNA was not detected in any of the 40 control samples that were collected from the patients without ocular inflammation.

Of the seven patients who were PCR positive, further examinations led to fungal endophthalmitis diagnoses as follows: five patients had endogenous endophthalmitis (four *Candida* and one *Aspergillus*), one had late postoperative endophthalmitis (*Aspergillus*, case 3), and one had

post-traumatic keratitis-associated endophthalmitis (*Candida*, case 4) (Table 1).

Case reports

Case 1

A 65-year-old man with type II diabetes mellitus was treated for unknown uveitis over a period of a few weeks during 2009. He complained of blurred vision, decreased visual acuity, and pain in his right eye (RE). Ophthalmologic examination demonstrated the presence of characteristics of uveitis, bacterial endophthalmitis and fungal endophthalmitis. Vitreous opacity, including the presence of a fungal ball and yellowish retinal exudates, was seen in the fundus of his RE (Fig. 4a). After vitrectomy of his RE,

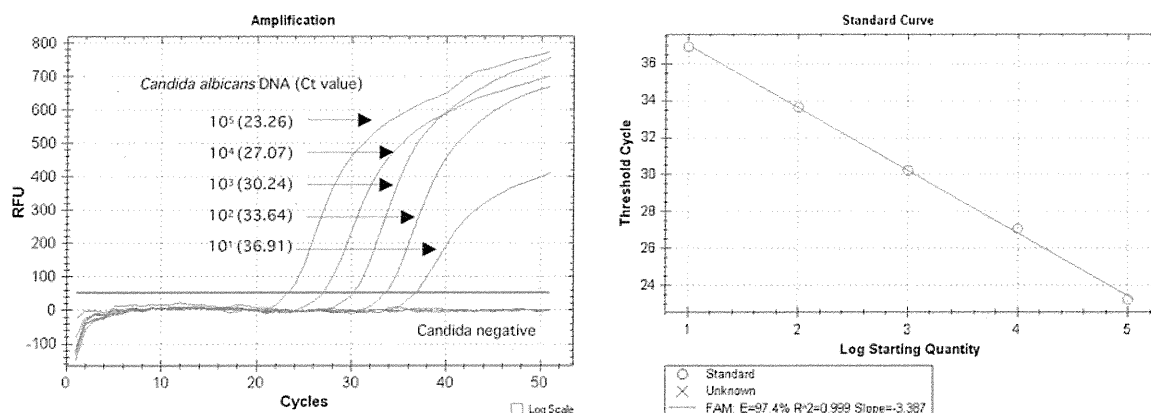
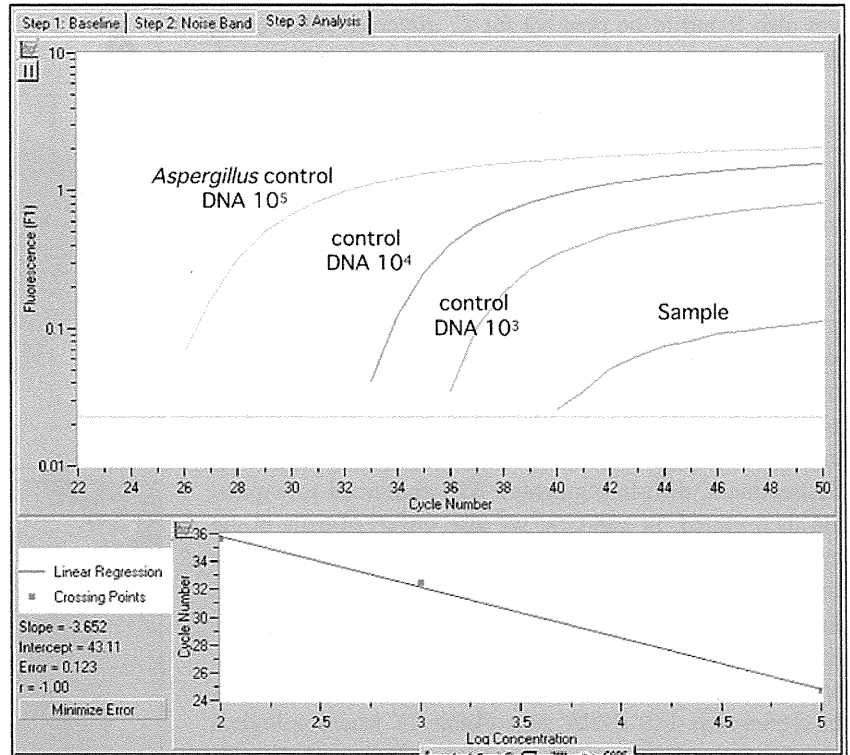


Fig. 2 In order to examine broad-range real-time PCR assay sensitivity for the fungal 18S PCR, the PCR fragments were amplified from the DNA of *C. albicans* (ATCC 60193). The number in parenthesis indicates the cycle threshold (Ct) value in quantitative PCR

Fig. 3 Representative data for the broad-range real-time PCR. *Aspergillus* DNA (4.5×10^2 copies/ml) but not *Candida* DNA was detected in the vitreous sample of case 2



real-time PCR of the vitreous sample obtained during the procedure indicated there were high copy numbers of *Candida* DNA (9.2×10^5 copies/ml, Fig. 4b). Based on

these results, the patient was given systemic fluconazole (Table 1). *Aspergillus* DNA was not detected in this sample. A few days later, fungal culture of his vitreous specimen

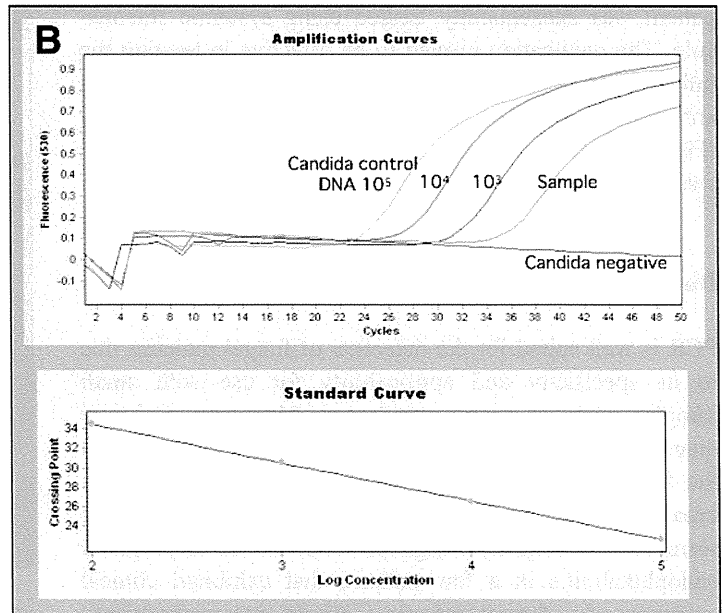
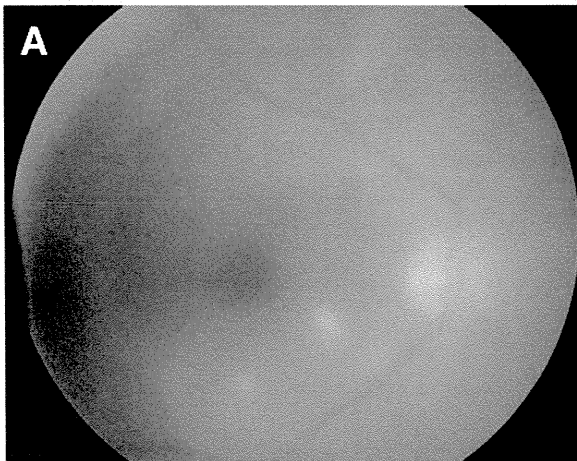


Fig. 4 PCR results for case 1. **a** Fundus photograph of the right eye with a *Candida* infection. Dense vitreous opacity and retinal exudates are seen. **b** This is a graph of the PCR results. We calculated the copy number of fungal genomic DNA in the sample. After we measured both the tested ocular sample and the control DNA (10^5 , 10^4 , and 10^3 copies/ml) using real-time PCR, we then established the standard curve based on the results of the control DNA. Based on this standard

curve, the sample Ct value was used to determine the DNA concentration of the sample. Final copy numbers of genomic DNA in the sample (copies/ml) were calculated based on the obtained sample volume and final dilution volume. High copy numbers of *Candida* DNA (9.2×10^5 copies/ml) were detected by PCR. *Aspergillus* DNA was not detected in the sample

was also found to be positive for *C. albicans*. After being treated, he had complete resolution of his symptoms.

Case 3

A 73-year-old man was referred to the Uveitis Clinic at our hospital in July 2008 because of keratic precipitates (KPs), cells in the anterior chamber, and anterior vitreous opacity in his RE that was associated with recurrent anterior uveitis. In his RE, diffuse pigmented KPs were seen (Fig. 5a). After considering both the clinical features and whole body inspections, we diagnosed this case as idiopathic uveitis. Although he was treated with topical corticosteroid and an antibiotic for 2 months, the KPs expanded (Fig. 5b). During the treatment, diffuse pigmented KPs continued to expand and then united. In addition, we also observed cells in the anterior chamber with hypopyon and dense anterior vitreous opacity. After informed consent was obtained, pars plana vitrectomy was performed in order to obtain a vitreous sample. Although fungi were not detected in a culture test, real-time PCR detected 1.8×10^3 copies/ml of the *Aspergillus* 18S rRNA gene (Table 1). Microbiological investigations performed using both culture and Gram's staining of the vitreous sample proved to be negative. A blood test for β -D-glucan and fungal antigens including *Aspergillus* were also negative. We diagnosed the patient as having *Aspergillus*-associated late postoperative endophthalmitis that was related to his 2007 cataract surgery. The patient was subsequently treated using systemic fluconazole. The medication proved to be effective in treating the infectious endophthalmitis, with the inflammation in the anterior segment of his RE completely disappearing (Fig. 5c). After treatment, *Aspergillus* DNA in his sample was below the PCR detection level.

Discussion

PCR is well suited for the detection of fungal moieties due to its specificity and applicability for use with small samples such as ocular specimens. Moreover, real-time quantitative PCR can be used to determine whether or not the fungus is related to endophthalmitis. By utilizing our broad-range real-time PCR for the 18S rRNA sequence, we were able to rapidly diagnose *Candida* or *Aspergillus* endophthalmitis in a few patients that exhibited clinical evidence of a fungal infection. While our methodology showed both positive and negative results, it was generally more helpful than waiting for culture results, as the culture tests used to detect *Candida* or *Aspergillus* are both difficult to perform and require longer amounts of time due to the slow growth rates for these species [5, 6, 13]. In addition, the specificity of our PCR examination is good enough so

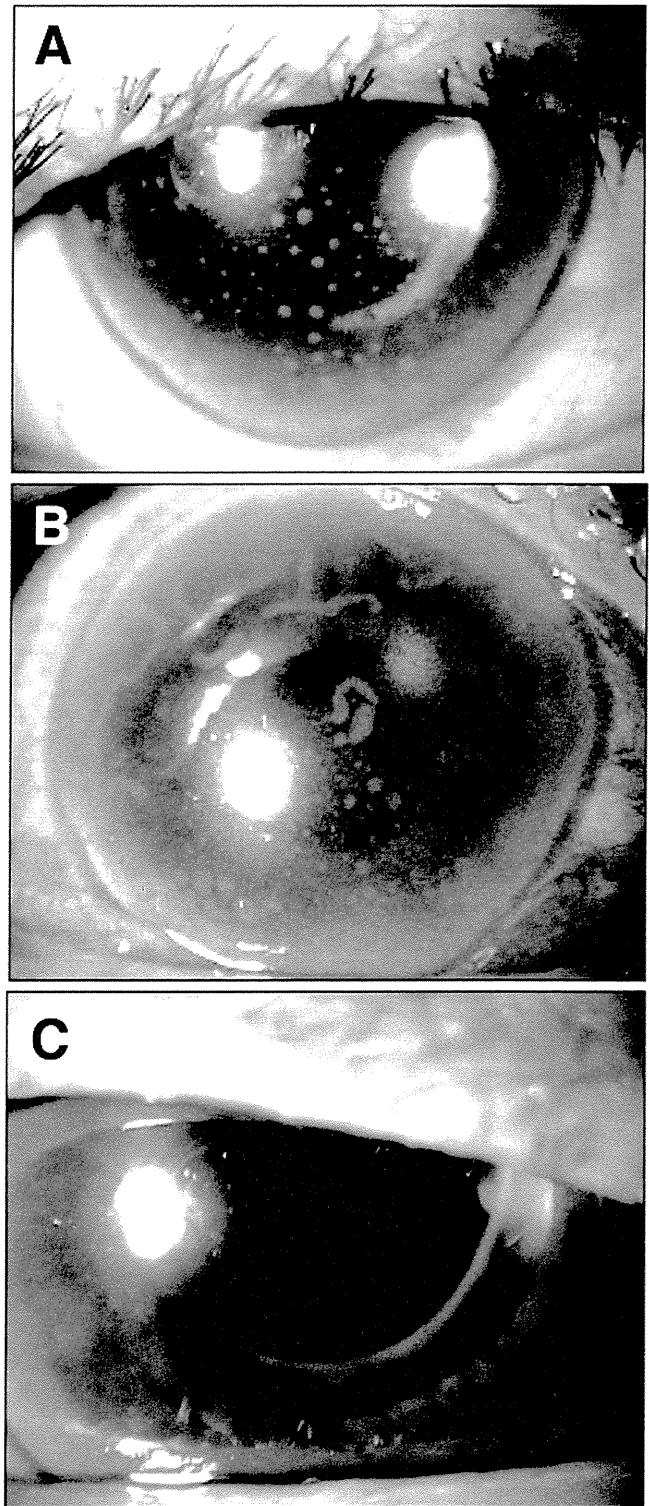


Fig. 5 PCR results for case 3. **a** Slit photograph of the right eye with an *Aspergillus* infection. Diffuse pigmented keratic precipitates (KPs) are seen. **b** The pigmented KPs are expanded and united. Like the previous case, the *Aspergillus* DNA gene (1.8×10^3 copies/ml) but not the *Candida* DNA was detected in the sample. **c** After treatment, the inflammation completely disappeared

that even a negative test is of benefit, as it helps to prevent making an incorrect diagnosis and administering a treatment for an infectious agent that is not present. Thus, this broad-range and real-time PCR system for ocular samples can provide a rapid diagnosis for those patients suffering from an unknown intraocular disorder such as idiopathic uveitis or endophthalmitis.

Fungal endophthalmitis is a sight-threatening disease that is most commonly caused by the *Candida* species. This disease usually accounts for a few percent of all of the cases of culture-proven endophthalmitis. The disease is normally acquired from an endogenous source that is spread by hematogenous dissemination. However, its occurrence may also be secondary to trauma, intraocular surgery, or corneal ulceration.

As confirmation of this suspected clinical disease is often difficult, there is frequently a delay in starting treatments. In the present patients, it was difficult to ascertain whether *Candida* or *Aspergillus* species were the causative agent in the intraocular inflammation. Since, in general, all of the patients were elderly and were immunocompetent, there was no focus area for the fungal infection systemically. As seen in Table 1, however, there were three exceptions. These included one case with a history of trauma (case 4), one case with a history of ocular surgery (case 3), and one case involving a normal infant (case 7), and for whom the case report details have been previously published [14].

In cases of fungal endophthalmitis in immunocompetent patients, specific additional antimycotic therapy has been shown to be effective in controlling the inflammation in the eye. In fact, all of the patients who were rapidly diagnosed by this PCR method were well controlled by the antimycotic treatment. Moreover, our PCR system was not only able to detect the conserved sequence of the fungal 18S rRNA gene, but it was also able to provide quantitative information from the ocular samples.

In recent years, PCR technology has been demonstrated to have a great potential in the detection and identification of low copy numbers of a microorganism's DNA in clinical samples [7–12, 15, 16]. It also holds great promise for being able to identify small numbers of organisms in small sample volumes, a situation that is commonly seen when trying to examine intraocular samples from patients with infectious endophthalmitis. We evaluated these PCR techniques in order to determine a reliable and effective protocol for detecting *Candida* or *Aspergillus* species DNA in ocular samples. Our specific aims were to try and significantly increase the number of intraocular samples from which a confirmed diagnosis could be made and to reduce the time it took to make a mycologic diagnosis. In many previous reports, DNAs of *Candida* and *Aspergillus* species were detected in patients with clinically suspected

fungal endophthalmitis [7–10, 15–20]. For example, *Candida* species such as *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, and *C. krusei* have been increasingly recognized as being capable of causing fungal endophthalmitis. However, *C. albicans* has been shown to be the causative agent in the majority of cases of culture-proven endophthalmitis. Moreover, *Aspergillus* such as *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, and *A. terreus* have also been reported to be the causative species in an unknown ocular infection [17–20]. To detect these fungal species, our present PCR system used paired primers and specific probes that were based upon the 18S rRNA genes of *Candida* and *Aspergillus* (see Fig. 1).

In one patient who was clinically suspected of having *Candida* endophthalmitis, our new PCR method did not detect any fungal genome in the ocular sample (case 8 in Table 1). However, it should be noted that this sample was aqueous humor and not vitreous fluid. Perhaps if a vitreous sample had been obtained, we might have detected *Candida* DNA, as *Candida* endophthalmitis often results from hematogenous dissemination. In fact, this particular patient received intravascular catheters after his initial surgery. Thus, in order to be able to make an accurate diagnosis, the type of sample that is collected may be very important.

Although there are many advantages for using our PCR assay, there is one disadvantage when attempting to diagnose fungal ocular infection. While our PCR examination was able to detect all species of *Candida* and *Aspergillus* DNA, it could not detect other fungi DNA. Recently, Vollmer et al. reported on a novel broad-range real-time PCR assay for the rapid detection of human pathogenic fungi [21]. Their assay targeted a part of the 28S large subunit rRNA (rDNA) gene. Since this PCR assay can examine *Candida* species, *Aspergillus* species, *Cryptococcus* species, among others, we are currently trying to develop a new PCR examination that uses these primers and probes for the diagnosis of fungal ocular infections, including fungal endophthalmitis.

In conclusion, utilization of the PCR assay to examine ocular samples in patients with suspected fungal endophthalmitis and idiopathic uveitis or endophthalmitis appears to be clinically useful for detecting *Candida* and *Aspergillus* DNA. Thus, broad-range PCR for the 18S rRNA sequence is a reliable tool for the diagnosis of fungal endophthalmitis and in screening for fungal infections. Moreover, because real-time PCR is an accurate method of quantitating fungal copies, real-time quantitative PCR can be used to determine whether the fungus is related to the endophthalmitis. Since the sensitivity of conventional culture techniques is not high and these cultures tend to take a long time due to their slow growth, the use of a broad-range and real-time PCR system to analyze ocular samples may be a better way to obtain a rapid diagnosis in

patients suffering from unknown intraocular infectious disorders. As early treatments are also essential for infectious endophthalmitis, this method may help to ensure that patients receive timely and optimal treatments. However, this is currently a limited research tool and not widely available for clinical labs at the present time. As a next step, we will need to work on making these tests widely available to clinical labs as oppose to only having them in research labs. In the near future, it is assumed that a comprehensive PCR system for examining fungi, bacteria, parasites, and viruses will become available, and be able to be used in the diagnosis of ocular infectious disorders.

Acknowledgements We thank Ms. Miki Katayama and Shizu Inoue for their technical assistance. We would like to also thank Drs. Hiroshi Takase and Yoshiharu Sugamoto for obtaining the samples used in this study. This work was supported by a Comprehensive Research on Disability, Health and Welfare grant, along with a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

No financial relationships exist in the publishing of this work.

References

- Edwards JE Jr, Foos RY, Montgomerie JZ, Guze LB (1974) Ocular manifestations of *Candida* septicemia: review of seventy-six cases of hematogenous *Candida* endophthalmitis. *Medicine* 53:47–75
- Rao NA, Hidayat AA (2001) Endogenous mycotic endophthalmitis: variations in clinical and histopathologic changes in candidiasis compared with aspergillosis. *Am J Ophthalmol* 132:244–251
- Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI (2000) Fungal and parasitic infection of the eye. *Clin Microbiol Rev* 13:662–685
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF, Infectious Diseases Society of America (2008) Treatment of aspergillosis; clinical practice guidelines of the Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis* 46:327–360
- Kunimoto DY, Das T, Sharma S, Jalali S, Majji AB, Gopinathan U, Athmanathan S, Rao TN (1999) Microbiologic spectrum and susceptibility of isolates: part I. Postoperative endophthalmitis. Endophthalmitis Research Group. *Am J Ophthalmol* 128:240–242
- Puliafito CA, Baker AS, Haaf J, Foster CS (1982) Infectious endophthalmitis. Review of 36 cases. *Ophthalmology* 89:921–929
- Lohmann CP, Linde HJ, Reischl U (2000) Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery. *Ophthalmology* 107:1047–1051
- Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL (2001) Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39:2873–2879
- Anand AR, Madhavan HN, Sudha NV, Therese KL (2001) Polymerase chain reaction in the diagnosis of *Aspergillus* endophthalmitis. *Indian J Med Res* 114:133–140
- Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, Lightman S (2000) Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 38:2902–2908
- Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M (2011) Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 95:345–349
- Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H (2001) Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 33:1504–1512
- Akler ME, Vellend H, McNeely DM, Walmsley SL, Gold WL (1995) Use of fluconazole in the treatment of *Candida* endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 20:657–664
- Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N (2010) Endogenous *Candida* chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol* 54:629–631
- Tarai B, Gupta A, Ray P, Shivaprakash MR, Chakrabarti A (2006) Polymerase chain reaction for early diagnosis of post-operative fungal endophthalmitis. *Indian J Med Res* 123:671–678
- Hidalgo JA, Alangaden GJ, Elliott D, Akins RA, Puklin J, Abrams G, Vazquez JA (2000) Fungal endophthalmitis diagnosis by detection of *Candida albicans* DNA in intraocular fluid by use of a species-specific polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 181:1198–1201
- Shen X, Xu G (2009) Vitrectomy for endogenous fungal endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* 17:148–152
- Moinfar N, Smiddy WE, Miller D, Miller D, Herschel K (2007) Posttraumatic *Aspergillus terreus* endophthalmitis masquerading as dispersed lens fragments. *J Cataract Refract Surg* 33:739–740
- Kramer M, Kramer MR, Blau H, Bishara J, Axer-Siegel R, Weinberger D (2006) Intravitreal voriconazole for the treatment of endogenous *Aspergillus* endophthalmitis. *Ophthalmology* 113:1184–1186
- Kalina PH, Campbell RJ (1991) *Aspergillus terreus* endophthalmitis in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Arch Ophthalmol* 109:102–103
- Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, Dreier J (2008) Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46:1919–1926

強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性膝関節症 モデルの作成

橋本和彦 赤木将男

近畿大学医学部整形外科教室

抄 録

目的：非侵襲的で再現性に優れたマウス変形性膝関節症 (OA) モデルを作製し、その特性を明らかにする。
方法：マウス用走行強制トレッドミルを使用した。①経時的変化観察群：マウスに1回15分、11 m/分の速度、1週間に3回 (2週間当たりの走行距離1 km) で、2, 4, 6, 8週間の走行負荷を加えた (各 n=4)。②走行時間変化群：短時間走行群 (1回7.5分、1週間に3回走行) と長時間走行群 (1回30分、1週間に3回走行) を2週間走行させた (各 n=4)。膝関節の変形はX線的小および組織学的に評価した。関節軟骨変性の評価には国際関節症学会 (OARSI) 評価スケールを用いた。また軟骨変性のマーカーであるII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの発現変化を免疫染色にて評価した。

結果：組織学的変化：半月板骨化、骨棘形成、十字靭帯変性および断裂、関節軟骨変性が認められ、これらの変化の出現頻度は経時的に増加した。OARSIスコア：経時的変化観察群および走行時間変化群の両群において、それぞれ走行週数および一回当たり走行時間に依存してスコアは増加した。また、OA変化は全て膝内側コンパートメントに比較し外側コンパートメントに顕著であった。関節軟骨におけるII型コラーゲンの発現は走行負荷により減少し、X型コラーゲンは発現の増加がみられた。

結論：本モデルの利点として運動負荷が生理的であること、作成方法の単純さと非侵襲性、そして何よりもOAの高い再現性および調節性が挙げられる。そして、遺伝子操作が可能なマウスを使用する本モデルでは、機械的負荷によるOAの発症および進行を、遺伝子レベルにおいて解明できる可能性が大きく示された。

Key words：マウス、変形性膝関節症、非侵襲性、動物モデル、強制走行

結 言

変形性膝関節症 (OA) は関節軟骨変性をはじめ、半月板、靭帯、滑膜、軟骨下骨の変化を含む関節全体の多様な病変を示す¹。OAの病態は依然として十分に解明されていないが、機械的負荷が関節全体の変性の進行において重要な役割を果たしていることは明らかである²。過剰な機械的負荷はOAを増悪させる重要な因子であり、また、機械的負荷の減少により関節痛の軽減および関節機能の改善が報告されているにも関わらず、機械的負荷がどのような機序でOA発症に影響を与えるかについては明らかになっていない²。これは、非侵襲的で再現性に優れ、さらに調節性のある変形性膝関節症 (OA) 動物モデルがなかったことが一つの理由として挙げられ

る^{3,4}。

調節可能な機械的負荷が軟骨細胞におよぼす影響は細胞培養系を用いて広く研究されてきた。すなわち、単層 (二次元) もしくは三次元的軟骨培養細胞系を用いて特定の負荷を加え検討が行われてきた⁵⁻⁷。しかし、これらの実験系では軟骨細胞と細胞外マトリックス (ECM) の相互関係の喪失が問題点として指摘されてきた。関節軟骨片の組織培養を用いれば、この弱点を回避できるが⁸⁻¹⁰、関節軟骨のみを採取するため、半月板、滑膜、軟骨下骨、靭帯の相互関係を再現することができない^{3,4}。一方、生体モデルは細胞と細胞外マトリックスの相互関係、および、軟骨と他の関節構成組織との相互関係の保持が可能である。一般に、生体でのOAモデルでは犬¹¹や家兎¹²の膝関節に前十字靭帯切離および内側側副靭

帯切離,あるいは,半月板切除などの外科的侵襲を加えて関節を不安定化し,OAを発症させる方法が用いられてきた.外科的侵襲によるマウスOAモデルは飼育期間を変化させることにより様々な重症度のもを作製することが可能である¹³.しかし,麻酔下での手術侵襲は軟骨代謝に影響を及ぼす可能性があり,感染の危険もある.さらに,外科的侵襲による過剰な負荷は安定的ではなく,調節性もない.最近,Pouletらは膝関節に加える負荷と時間を各々調節できる装置を用いて新しいマウスOAモデルを開発した¹⁴.これは特定の負荷に対する膝関節の反応を検討するには有用なモデルである.しかし,特殊な装置(加圧カップを有する自動制御小型試験装置)が必要であり,加圧時には麻酔が必要である.さらに,このモデルは膝関節と踵にカップを当て,膝関節に対して垂直方向に負荷を加えるものであり,膝関節に対する機械的負荷は生理的とは言えない.

我々はトレッドミルを用いた強制走行負荷による新しい非侵襲性のマウスOAモデルの作成を試みた.トレッドミルは安価で走行負荷量の調節は容易である.このモデルは極めて単純で,膝関節に対し生理的な負荷を加えることができる.本研究の目的は,強制走行負荷により,非侵襲的で再現性に優れたマウスOAモデルを作製し,X線学的,および,組織学的検討によりその特性を明らかにすることである.

方 法

1. 実験動物と強制走行負荷

実験動物として9週令の雄のC57BL6/Jclマウス(日本クレア社,東京)を用いた.全ての実験は近畿大学医学部実験動物取扱規約を遵守して行なわれた.強制走行負荷にはマウス用トレッドミル(メルクレスト社,富山)を傾斜なしで用いた.トレッドミルの走行レーンの末端には電気ショックをマウスの尻尾に与えることができる金属棒が設置されており,強制走行負荷を確実に行うことができるよう工夫されている(図1A).この研究はマウスを2群に分けて行った.

経時的変化観察群:コントロール群は強制走行させずに0,2,4,6,8週間後に屠殺し,(各n=4),経時的変化観察群は2週間で1km,4週間で2km,6週間で3km,8週間で4km走行負荷をかけた後に屠殺した(各n=4).マウスはトレッドミル上を1回15分,11m/分の速度で1週間に3回強制走行させた.

走行時間変化群:短時間走行群は1回7.5分,11m/

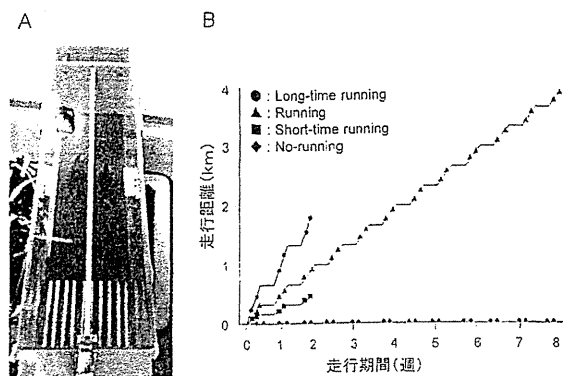


図1 強制走行負荷に用いたマウス用トレッドミル(A)とマウス強制走行負荷図(B). 経時的変化観察群として2群作成した. 走行負荷をかけた群(n=4)と強制走行負荷をかけた群(n=4). マウスにトレッドミル上を1回15分(11m/分)強制走行させた. 週3回(1週間に2km). 走行時間変化群として2群用意した. 短時間走行群(n=4, 1回7.5分, 11m/分, 週3回)と長時間走行群(n=4, 1回30分, 11m/分, 週3回). 走行時間変化群はともに2週間観察した. ※:トレッドミル※ ※:電気ショックをマウス尻尾に与える金属棒

分の速度にて1週間に3回(総距離0.5km/2週間,各n=4)強制走行させた後,中時間走行群(経時的変化観察群)は1回15分,11m/分の速度にて1週間に3回(総距離1km/2週間,各n=4)強制走行させた後,長時間走行群は1回30分,11m/分の速度にて1週間に3回(総距離2km/2週間,各n=4)強制走行させた後それぞれ屠殺した.(図1B).

屠殺する直前に各々のマウスの体重を測定した.コントロール群の平均体重(±標準偏差)は0週,2週,4週,6週,8週においてそれぞれ21.9±0.7,24.0±0.5,26.0±0.2,28.0±1.0,30.1±1.0g(各n=4)であった.経時的変化観察群の平均体重は0週,2週,4週,6週,8週においてそれぞれ21.1±1.0,23.2±1.0,25.0±1.3,26.9±0.7,28.3±1.8g(各n=4)であった.経時的変化観察群においてコントロール群と比較して体重の有意な変化はなかった.

2. X線学的検討

骨棘形成および半月板骨化を評価するため,膝関節正面X線撮影を行った.頸椎脱臼法によるマウスの屠殺後,経時的変化観察群では0,2,4,6,8各週で,走行時間変化群では2週における膝関節正面像を拡大X線にて撮影した.両下肢を膝上で切断し,イメージプレート上に独自に作成した下肢固定フレーム(京都化学,京都)を設置し,膝正面像が撮影できるよう切断肢を固定した.X線撮影は40Kv,100mA,5秒間照射,拡大率10倍の撮影条件で

行なった (μFX-1000, 富士フィルム, 東京). 撮影したフィルムはスキャナー (BAS-2000 IP リーダー, 富士フィルム) にて読み取った.

3. 組織学的検討

X線撮影の後, 両側膝関節は4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を用いて固定された (4°C, 24時間). 組織標本は10%EDTA (pH7.4) にて脱灰した (4°C, 2週間). 脱灰後, 高濃度エタノールにて脱水した. パラフィンブロックとした標本をパラフィン用滑走式マイクロトームにて約4μmの連続切片として切り出した. 切片は脱パラフィン後, HE染色, サフラニンO染色およびトルイジンブルー染色を行い, 組織学的OA様変化および軟骨におけるプロテオグリカン存在の有無を評価した. 軟骨変性の程度は国際関節症学会 (OARSI) の定めたマウス軟骨組織変性評価スコア¹⁵を用いて評価した. 本評価法は平均変性スコアと最大変性スコアからなる. 平均変性スコアとは関節面の最大変性部分のスコアと最小変性部分のスコアの平均値である. 最大変性スコアとは関節面の最大変性部分のスコアを指す.

スコアは以下の如くである.

- 0 = 正常,
- 0.5 = 構造上の破壊なくサフラニンO染色の染色性低下のみ,
- 1 = 軟骨欠損なく, 微細な線維化のみ,
- 2 = 垂直方向の浅層下への亀裂とわずかな表層の欠損,
- 3 = 石灰化軟骨層への表層から25%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,
- 4 = 石灰化軟骨層への表層から25%以上50%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,
- 5 = 石灰化軟骨層への表層から50%以上75%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,
- 6 = 石灰化軟骨層への表層から75%以上の垂直方向への亀裂もしくはびらん.

切片観察は撮影機能付き光学顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, キーエンス, 大阪) を用いて行った.

4. II型コラーゲンおよびX型コラーゲンの免疫組織学的検討

脱パラフィン後の切片を用いてII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの免疫染色を行った. 0.3%過酸化水素による前処理 (室温, 30分) の後, 1%ウシ血清アルブミン (シグマ, セントルイス, ミズーリ, アメリカ) を用いてブロッキングを行った (室温, 1時間). PBSで洗浄後, 一次抗体を反応させた (4°C, 24時間). 一次抗体には抗II型コラーゲン・ラビット IgG ポリクローナル抗体 (LB1297, LSL 東京, 濃度 1:100, 1%BSA 含有 PBS に溶解), およ

び, 抗X型コラーゲン・ラビット IgG ポリクローナル抗体 (LB0092, LSL 東京, 濃度 1:100, 1%BSA 含有 PBS に溶解) を用いた. ネガティブコントロールの一次抗体としては, 非特異的ラビット IgG 抗体を用いた. PBSで洗浄後, 二次抗体を用いて, 反応させた (室温, 30分). 二次抗体としてII型コラーゲン免疫染色には, ドンキー抗ラビット IgG 抗体 (SC2313, サンタクルズバイオテクノロジー, カリフォルニア, 濃度 1:1000) を, X型コラーゲン免疫染色にはフルオレセインイソチオシアン酸含有チキン抗ラビット IgG 抗体を用いた (SC2990, サンタクルズバイオテクノロジー, カリフォルニア, 濃度 1:1000). PBSで洗浄後, II型コラーゲンの免疫染色に対しては, DAB (K4007, ダコ, グロストラップ, デンマーク) にて発色を行った. DAB染色の方法としてまずストレプトアビジン-HRP原液 (K1016, ダコ, グロストラップ, デンマーク) を反応させた (室温, 30分). PBSで洗浄後, DAB色素体液 (K3468, ダコ, グロストラップ, デンマーク, 濃度 1:100, DAB基質緩衝液 1m に溶解) を反応させた (室温, 10分). 最後にヘマトキシリン液 (和光純薬工業, 大阪) を用いて核染色を行い, PBSで洗浄, 透徹, 封入後観察を行った. X型コラーゲンの免疫染色は蛍光染色により行った. 2次抗体反応後, PBSで洗浄, 封入し, 蛍光顕微鏡 (BIOREVO, BZ-9000, キーエンス, 大阪) にて観察を行った. X型コラーゲン以外の全ての組織切片の観察は蛍光顕微鏡 (BIOREVO, BZ-9000, キーエンス, 大阪) の光学顕微鏡機能を用いて行った.

5. 統計解析

結果は平均 (95%信頼区間) ±標準偏差 (SD) (標本数) にて表記した. 統計的な解析はANOVA検定, Scheffe's test, unpaired Student's t-testを用いて行なった. P値については, 0.0001未満は $p < 0.0001$, それ以上は小数点3桁の数値で示した.

結 果

各群におけるX線学的検討

膝関節正面の拡大X線写真撮影を行った. 経時的変化観察群: 強制走行負荷後4週間以降外側半月板部分のX線透過性の低下が認められた. 6週間で内側半月板X線透過性の低下が認められた. 顆間部は骨棘形成による経時的な狭小化の増強が認められた. しかし, ほかの部位での骨棘は認められなかった. コントロール群では特に変化は認められなかった (図2A).

走行時間変化群: 短時間走行群においては半月板部分のX線透過性変化および骨棘形成は認められな

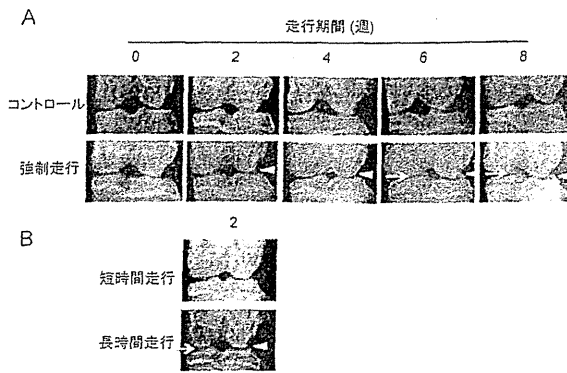


図2 拡大X線撮影による半月板の変性。経時的変化観察群(A)，走行時間変化群(B)。拡大X線撮影を各観察週において行った。(A)外側半月板の骨化が2週間目以降で観察された。内側半月板の骨化は6週間目以降にて観察された。(B)長時間走行群では2週間で外側半月板の骨化が認められたが、短時間走行群において2週間で特徴的な変化は認められなかった。矢印=内側半月板の骨化、矢頭=外側半月板の骨化を示す。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。

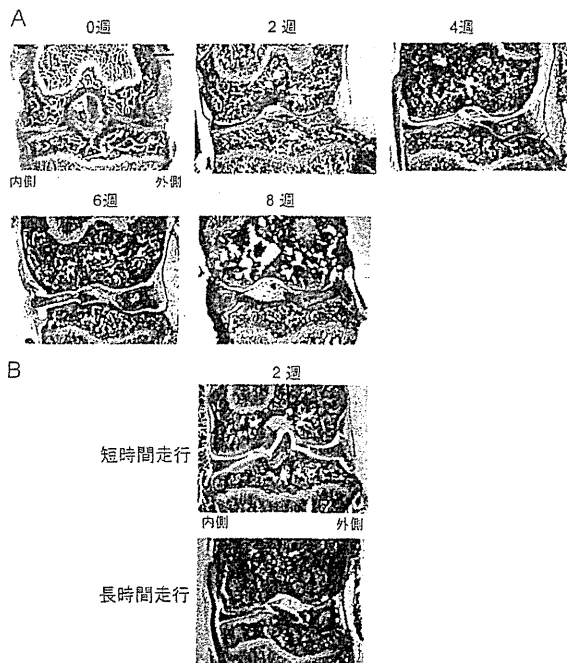


図3 H-E染色による組織学的変化。経時的変化観察群(A)，走行時間変化群(B)。(A)2週間の骨棘形成、外側半月板の肥大化、十字靭帯の変性そして顆間部の狭小化。4週間で変化は進行し、外側半月板は骨化がみられた。6週間で内側半月板の内軟骨性骨化がみられた。(B)短時間走行群では2週間で軽度の外側半月板肥大化がみられた。対照的に長時間走行群では外側半月板骨化、内側半月板の内軟骨性骨化、十字靭帯の変性、顆間部の狭小化がみられた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。スケールバー=300 μm 。

った。一方、長時間走行群においては外側および内側半月板部分のX線透過性の低下が認められた(図2B)。

各群の組織学的検討

HE染色およびトルイジンブルー染色を各実験群の組織標本に対してほどこした。組織学的に主に評価した部分は大腿骨および脛骨の関節部、半月板、十字靭帯および顆間部である。

経時的変化観察群および2週間の強制走行負荷において外側半月板の肥厚および内軟骨性骨化、十字靭帯の変性および断裂、脛骨外側部での骨棘形成が認められた(図3)。骨棘は内軟骨性骨化様変化を示し、トルイジンブルーにて強染される細胞外マトリックスおよび軟骨細胞集塊として認められた(図4)。4週後、この変化はさらに進行し、外側半月板には明らかな骨化が認められた(図3)。6週後には内側半月板の肥厚および内軟骨性骨化が認められた(図3A)。これらの変化はコントロール群には認められなかった。特異的な組織学的変化の発現頻度の経時的変化を表1に示す。内側コンパートメントと比較し、外側コンパートメントで変化の発現頻度が早期から高くなり、十字靭帯変性の発現頻度は顆間部における骨棘形成と平行して高くなっていった。

走行時間変化群では短時間走行群では外側半月板の軽度肥厚と十字靭帯の軽度変性が認められたが、経時的変化観察群の2週間走行負荷マウスと比較し

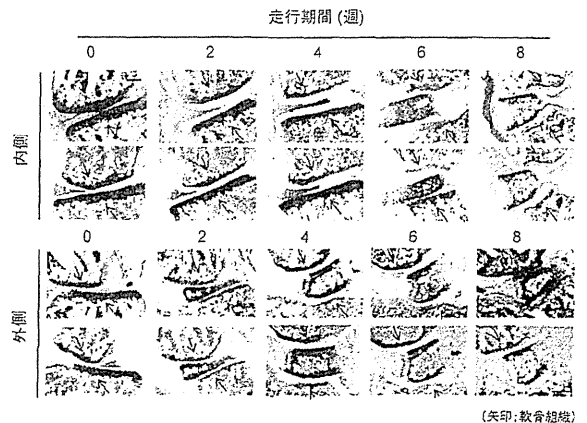


図4 サフラニンO染色およびトルイジンブルー染色における半月板と関節軟骨の変化。膝関節内側コンパートメント(上図)と外側コンパートメント(下図)を示す。サフラニンO染色とトルイジンブルー染色は走行週数の増加に伴い染色性が低下した。染色性の低下は内側コンパートメントより外側コンパートメントでより観察された。半月板の染色性は走行週数の増加と共に増加し、肥大化および血管侵入がみられた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。矢印=軟骨組織。

てOA変化は軽度であった。長時間走行群では外側半月板の肥厚および内軟骨性骨化、内側半月板の肥厚、十字靭帯の変性および断裂、顆間部での骨棘形成、脛骨外側での骨棘形成、大腿骨遠位での骨棘形成などが認められた。これらのOA変化は経時的変化観察群の2週間走行負荷マウスと比較して重度であった(図3B)。すなわち、OA変化は一回当たり走行時間の増加に伴い重度となった。また、特異的な組織学的変化の発現頻度も一回当たり走行時間の増加とともに高くなった(表2)。

経時的変化観察群において各週の関節軟骨におけるサフラニンO染色およびトルイジンブルーによる染色性の低下は内側コンパートメントより外側コンパートメントに著明であった。また、内外側半月板においては肥厚および内軟骨性骨化、血管侵入の進行に伴い軟骨部分のトルイジンブルー染色性は増加した(図4)。

表1 各週数における特異的組織学的変化の出現頻度(特異的組織学的変化をきたした膝数/総膝数)

週数(週)	0	2	4	6	8
総走行距離(Km)	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
骨棘形成					
外側脛骨	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8
外側大腿骨	0/4	4/8	6/8	6/8	8/8
内側脛骨	0/8	0/8	2/8	4/8	4/8
内側大腿骨	0/8	0/8	2/8	2/8	6/8
顆間部	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8
半月板肥大化および骨化					
外側	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8
内側	0/8	2/8	4/8	6/8	6/8
十字靭帯の変性および断裂					
	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8

表2 走行時間変化による特異的組織学的変化の出現頻度(特異的組織学的変化をきたした膝数/総膝数)

走行時間(分)	control (0.0)	short (7.5)	middle (15)	long (30)
総走行距離(Km)	0.0	0.5	1.0	2.0
骨棘				
外側脛骨	0/8	1/8	6/8	8/8
外側大腿骨	0/8	2/8	4/8	6/8
内側脛骨	0/8	0/8	0/8	1/8
内側大腿骨	0/8	0/8	0/8	2/8
顆間部	0/8	4/8	6/8	8/8
半月板肥大化および骨化				
外側	0/8	5/8	6/8	8/8
内側	0/8	0/8	2/8	4/8
十字靭帯の変性および断裂				
	0/8	4/8	6/8	8/8

OARSI 評価スコアによる関節軟骨変性評価

各群における内外側コンパートメントの軟骨変性の程度をOARSI評価法(平均および最大スコア)に従い点数化した。

経時的変化観察群：内外側コンパートメントの軟骨変性平均スコアおよび最大スコアはともに走行負荷の増加に伴い増加した。また、走行負荷を加えないコントロール群のスコアは常に0であった。また2, 4, 6, 8週の走行負荷において平均および最大スコアはともに内側コンパートメントより外側コンパートメントのほうが有意に高値であった(n=8, P<0.01, unpaired t-test, 図5A)。そして8週間の走行負荷後には、外側コンパートメントの平均スコアは3.9(3.6-4.2)±0.4(n=8)、最大スコアは5.0(5.0-5.0)±0.0(n=8)まで上昇したのに対し、内側コンパートメントの平均スコアは1.3(0.9-1.6)±0.5(n=8)、最大スコアは2.3(1.3-3.2)±1.2(n=8)にとどまった(図5A)。

走行時間変化群：いずれも走行負荷2週で評価した。外側コンパートメントでの平均スコアは、コントロール群で0.0(0.0-0.0)±0.0(n=8)、一回当たり7.5分の短時間走行群で0.9(0.5-1.3)±0.5(n=8)、一回当たり15分走行の経時的変化観察群の2週で1.5(1.3-0.7)±0.3(n=8)、一回当たり30分走行の長時間走行群で3.1(2.2-3.8)±0.9(n=8)であった。また、内側コンパートメントの平均スコアは同順に0.0(0.0-0.0)±0.0, 0.2(0.0-0.4)±0.3(n=8), 0.6(0.4-0.7)±0.2(n=8), 1.1(0.3-1.9)±0.9(n=8)であった。平均スコアは各週において内側コンパートメントより外側コンパートメントで有意に高かった(n=8, P<0.01, unpaired t-test, 図

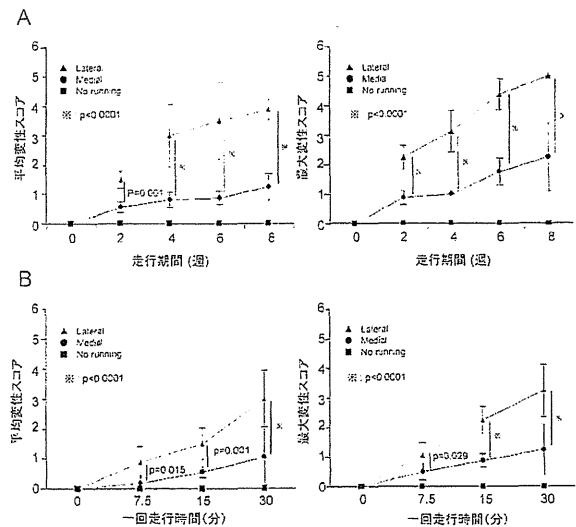


図5 OARSI評価法による軟骨損傷の平均、最大スコア。経時的変化群(A)、走行時間変化群(B)。

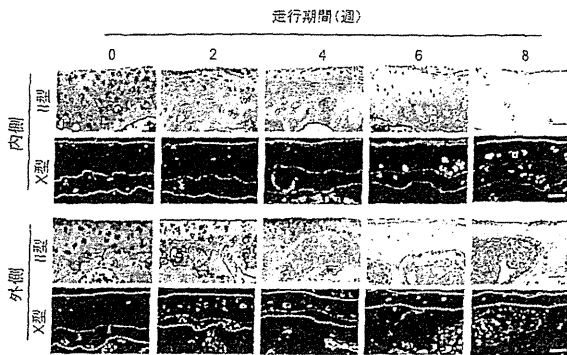


図6 内外側コンパートメントの脛骨関節軟骨でのタイプIIコラーゲン蛋白、タイプXコラーゲン蛋白の免疫染色。タイプIIコラーゲンの染色性は走行週数の増加に伴い低下した。対照的にタイプXコラーゲンの染色性は2週間で、タイドマーク以上の表層から中層（赤矢印先）にかけてみられた。6週間、8週間においてタイプXコラーゲンの外側軟骨の染色性は重度の変性とタイドマーク消失により低下していた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。スケールバー=20 μ m。

5 B). 同様に最大スコアも各週において内側コンパートメントより外側コンパートメントにて有意に高値であった ($n=8$, $P<0.01$, unpaired t-test, 図 5 B).

II型コラーゲン蛋白およびX型コラーゲン蛋白の免疫染色

経時的変化観察群の軟骨変性部におけるII型、X型コラーゲンの発現変化を免疫染色により評価した。II型コラーゲンの発現は走行負荷週数の増加に伴い、内外側コンパートメントともに減少した。走行負荷前の0週においてX型コラーゲンはタイドマーク（図6、矢頭）より下層の石灰化軟骨層の軟骨細胞周囲にのみ染色性が認められた。しかし、2週間の走行負荷後には、外側コンパートメントの関節軟骨でタイドマークより表層の軟骨細胞周囲にも発現が認められた。しかし、6週間、8週間の走行負荷後においては軟骨の損傷が激しく、タイドマークの消失とともに、X型コラーゲンの染色は消失していた（図6）。内側コンパートメントでは、6週間、8週間の走行負荷後においても、X型コラーゲンの染色性は明らかであった。

考 察

本研究では、強制走行により膝関節への機械的負荷を増大させ、非侵襲的にマウス膝OAモデル作成が可能であることを示した。このマウスの強制走行による膝OAモデルにはいくつかの利点がある。すなわち、モデル作成法が単純で安全であること、動

物に対するストレスが低いこと、膝関節に加わる運動が生理的であること、負荷量が調節可能であることなどである。手術や麻酔、薬剤が不要で、トレッドミルのみを使用するため、運動負荷を加える方法としては極めて単純である。実験中、マウスに脱毛や体重減少が生じたり、死亡したりすることはなく、この走行負荷量はマウスにとってストレスは少ないと考えられる。走行はマウスの日常的かつ生理的活動であり、当然、膝関節に加わる運動は生理的である。さらに、今回の実験結果はこのマウスOAモデルを作成するに当たり再現性が極めて高いことを示している。つまり、マウスOAモデルは機械的負荷とOA関連遺伝子の相互関係を検討することができる。すなわち、過剰な機械的負荷の下で特定の遺伝子が軟骨やその他の関節組織の変化にどのような影響を及ぼしているのかを検討することが可能である。また、今回調節性の有無を確認するため、2週間まで走行時間を変化させて組織学的変化の割合の増減を調べた。これは、経時的変化観察群において2週間で早期OA様変化がほとんど全てのマウスに生じており、走行時間を変化させて結果を観察するのに適切であると考えたためである。

経時的変化観察群では外側コンパートメントにおけるOA変化は内側コンパートメントにおける変化より早期に出現した。この結果は、マウスにおいては膝関節への機械的負荷は主に外側コンパートメントに加わることを示していると考えられる。ラットでの膝関節OAモデルにおいても外側コンパートメントが主に変性を起こしていること¹⁶が報告されているが、げっ歯類では外側コンパートメントが荷重に対する主コンパートメントとして生理的な役割を果たしている可能性が高い。これは膝内側コンパートメントが主な荷重関節として機能するヒト¹⁷とは対照的である。特殊な装置（加圧カップを有する自動制御小材料試験装置）を用いて作成されたOAモデルもこの考察を支持する¹⁴。

経時的変化観察群において2週間の走行負荷後に、顆間窩での骨棘形成、脛骨関節面外側縁での骨棘形成を認めた。これらのOA変化はコラゲナーゼを注入¹⁸および関節負荷装置によるマウス膝関節OAモデル¹⁴の変化と類似していた。経時的変化観察群において6、8週走行後には大腿骨と脛骨関節面の辺縁部で骨棘形成を認めた。いくつかの研究で骨棘の形成部位が検討されているが、骨棘形成は動物モデルに依存することが知られている¹⁸。Pouletらによるマウス膝関節OAモデルの研究では、骨棘形成は顆間窩の内側面に局在していた¹⁴。骨棘形成部位はPouletらの報告とは完全には一致しなかつ

た。これは運動負荷の加わり方が異なるためであると考えられる。今後も骨棘を形成する生体力学および分子生物学的メカニズムを解明すべく研究の継続が必要である。

十字靭帯切離による膝関節不安定化は多くの動物で膝関節 OA を引き起こす。一方、我々のモデルでは 2 週間の強制走行負荷後には、顆間窩の骨棘形成とともに十字靭帯変性および断裂という著しい変化を生じた。これらは強い機械的負荷が一つの発症要因であるヒト OA 膝における変化によく似ている^{19,20}。顆間窩の骨棘形成と十字靭帯の変性および断裂は相互に影響を及ぼす可能性がある^{21,22}。我々のモデルでは、これらの変化の相互作用をより詳細に観察することが可能である。

半月板の骨化はげっ歯類^{14,23}、犬²⁴、ギニアピッグ²⁵、そしてヒト^{26,27}でも報告されており、加齢と変性変化に関連していると考えられている。ヒトにおける半月板骨化の報告は稀であるが、半月板への過剰な負荷、微細な外傷、変性、断裂が関与しているとされている^{26,27}。半月板骨化は内軟骨性骨化と考えられ^{28,29}、ヒトにおける骨棘形成も同様に内軟骨性骨化と考えられている¹。我々のモデルでも同様に、2 週後には外側半月板の軟骨化を伴う肥厚、および血管侵入がみられた。4 週後の骨化半月板周囲には軟骨組織が認められ、内軟骨性骨化による骨棘形成と同様の形態を示した。内軟骨性骨化による骨棘形成と関節軟骨変性とともに、走行負荷による半月板骨化は我々の OA モデルを特徴づけている。さらに、これらの OA 変化が負荷開始後早期から出現することは過剰な機械的負荷が OA 発症に極めて重要な役割を果たしていることを示している。そして、半月板の骨化および顆間窩の骨棘形成の OA 様変化が X 線写真で観察できるということは OA モデルとして有利な点であるといえる。

この OA モデルの有用性は関節軟骨における II 型コラーゲン発現の減少および X 型コラーゲンの発現の亢進でも示された。これらの結果はこのモデルがヒト OA における軟骨変性に極めて類似していることを示している³⁰。II 型コラーゲンは正常関節軟骨を構成する主なコラーゲンで軟骨変性の進行に伴い減少し、X 型コラーゲンは変性関節軟骨における肥大軟骨細胞周囲に発現する軟骨変性のマーカーである³⁰。X 型コラーゲンの発現は走行負荷前の 0 週ではタイドマークより深層の石灰化軟骨層の軟骨細胞にのみ発現を認めたが、走行負荷を加えるとタイドマークより表層の軟骨細胞に発現を認めた。これは、OA 軟骨に特徴的な所見であり、軟骨組織が軟骨細胞の肥大化を伴って軟骨変性を生じるという考

え方の根拠となりうる所見である。また、十字靭帯切離マウス OA モデルでも同様に関節軟骨における II 型コラーゲン発現の減少および X 型コラーゲンの発現の増加が報告されている¹³。

このマウス OA モデルにはいくつかの問題点があり、本研究結果の解釈には注意が必要である。すなわち、すべての動物モデルに共通する弱点として、身長、体重、解剖、そして膝関節の生体力学的环境がマウスとヒトとは大きく異なる点が挙げられる。当然のことながら、遺伝的背景もヒトとマウスでは異なる。さらに OA 発症の感受性はマウス系統間で異なり³、どの系統のマウスを用いるかで実験結果が大きく変化する可能性がある。STR/ORIT マウスは 12 週令の早期において膝 OA を自然発症し、CBA マウスは 24 週令において膝 OA を発症すること³¹、膝関節 OA は週令とともに進行することが知られている。我々は今後の研究の発展性を考慮し、遺伝子操作に頻用される C57BL6/Jcl マウスを用いたが、通常の飼育環境では 24 週令までは OA を発症していないことを確認している。

結 語

強制走行負荷によるマウス膝 OA モデルを開発した。このモデルの利点として生理的な運動負荷であること、作成方法の単純さと非侵襲性、そして何よりも変形性膝関節症の高い再現性と調節性が挙げられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた浜西千秋教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたり終始御助言を頂いた国立循環器病センター研究所脈管生理部の中野厚史先生、高度先端総合医療センター再生部門の寺村岳士先生、小野寺勇太先生、並びにご協力頂いた教室内の皆様、実験助手の皆様から感謝申し上げます。

文 献

1. Hough AJ Jr (2007) Pathology of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp51-72
2. Poole AR, Guilak F, Abramson SB (2007) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp27-49
3. Smith MM, Little CB (2007) Experimental models of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz

- RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp107-125
4. Brandt KD (2007) Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 39: 221-235
 5. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, Lee DA (2008) Dynamic compression counteracts IL-1 β induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. *Arthritis Res Ther* 10: R35.
 6. Chano T, Tanaka M, Hukuda S, Saeki Y (2000) Mechanical stress induces the expression of high molecular mass heat shock protein in human chondrocytic cell line CS-OKB. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 115-119
 7. Akagi M, Nishimura S, Yoshida K, Kakinuma T, Sawamura T, Munakata H, Hamanishi C (2006) Cyclic tensile stretch load and oxidized low density lipoprotein synergistically induce lectin-like oxidized ldl receptor-1 in cultured bovine chondrocytes, resulting in decreased cell viability and proteoglycan synthesis. *J Orthop Res* 24: 1782-1790
 8. Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ (2000) A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech* 33: 1523-1527
 9. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD (2002) Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 20: 1265-1273
 10. Jeffrey JF, Aspden RM (2007) Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. *Arthritis Res Ther* 9: R129
 11. Pond MJ, Nuki G (1973) Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-388
 12. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH (1973) Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 16: 397-405
 13. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H (2005) Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 632-641
 14. Poulet B, Hamilton RW, Shefelbine S, Pitsillides AA (2011) Characterizing a novel and adjustable noninvasive murine joint loading model. *Arthritis Rheum* 63: 137-147
 15. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB (2010) The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 3: S17-23
 16. Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, Mochizuki T, Sekiya I (2008) Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats; protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther* 10: R13
 17. Hsu RW, Himeno S, Coventry MB, Chao EY (1990) Normal axial alignment of the lower extremity and load-bearing distribution at the knee. *Clin Orthop Relat Res* 215-227
 18. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM (2007) Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor β -induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 56: 4065-4073
 19. Hill CL, Seo GS, Gale D, Totterman S, Gale ME, Felson DT (2005) Cruciate ligament integrity in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 52: 794-799
 20. Benjamin M, McGonagle D (2007) Histopathologic changes at "synovio-entheseal complexes" suggesting a novel mechanism for synovitis in osteoarthritis and spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 56: 3601-3609
 21. Stein V, Li L, Guermazi A, Zhang Y, Kent Kwok C, Eaton CB, Hunter DJ; OAI Investigators (2010) The relation of femoral notch stenosis to ACL tears in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 192-199
 22. Quasnicka HL, Anderson-MacKenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham ME, Bailey AJ (2005) Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52: 3100-3109
 23. Pearson K (1921) On the sesamoids of the knee joint. *Biometrika* 13: 133-175
 24. Weber NA (1998) Apparent primary ossification of the menisci in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 212: 1892-1894
 25. Kapadia RD, Badger AM, Levin JM, Swift B, Bhattacharyya A, Dodds RA, Coatney RW, Lark MW (2000) Meniscal ossification in spontaneous osteoarthritis in the guinea-pig. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 374-377
 26. Liu SH, Osti L, Raskin A, Merlo F, Bocchi L (1994) Meniscal ossicles: two case reports and a review of the literature. *Arthroscopy* 10: 296-298. Review
 27. Mine T, Taguchi T, Ihara K, Tanaka H, Moriwaki T, Kawai S (2003) Meniscal ossification. *Arthroscopy* 19: E11
 28. Kugler JH, Tomlinson A, Wagstaff A, Ward SM (1979) The role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification. *J Anat* 129: 493-506
 29. Rivas R, Shapiro F (2002) Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study

- in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 85-100
30. Sandel LJ, Heinegard D, Hering TM (2007) Cell Biology, Biochemistry, and Molecular Biology of Articular Cartilage in Osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Forth Edition, Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds) : Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 73-106
31. Sarukawa J, Takahashi M, Doi M, Suzuki D, Nagano A (2010) A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62: 463-471

レニン・アンジオテンシン系コンポーネントの軟骨組織 における発現：軟骨細胞の増殖と分化への関与

井上 紳司 墳本 一郎 赤木 将男

近畿大学医学部整形外科教室

抄 録

目的 レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は生体の脈圧・電解質調節機構として重要であるが、近年局所性 RAS がさまざまな組織で同定されている。RAS の存在は、筋骨格系である骨や滑膜組織に示され、骨代謝や炎症に関与することが報告された。軟骨組織は骨に隣接し、成長軟骨板で軟骨から骨へ置換されること、滑膜組織の一部から分化することが認められているため、本研究は軟骨組織における RAS の存在を検討し、その役割を考察した。

方法 8週齢のマウス脛骨近位部、鼻中隔、気管、椎骨、胎生期四肢原基、脛骨骨折仮骨にてアンジオテンシン変換酵素 (ACE)、アンジオテンシノーゲン (Ang)、アンジオテンシン II 1型 (AT1R)・2型受容体 (AT2R) を免疫組織法により評価した。またウシ培養軟骨細胞を用いて real-time PCR、蛍光免疫染色、western blot で RAS コンポーネントの発現を観察し、炎症性サイトカインによる影響を評価した。

結果 長管骨および椎骨成長軟骨板における増殖層から肥大層軟骨細胞、また、骨折仮骨の肥大軟骨細胞は、これら RAS コンポーネントの染色を認めた。ウシ培養軟骨細胞で AT1R, AT2R の発現が確認され、IL-1 β および TNF- α の添加でそれらの発現は亢進した。

考察と結語 RAS は、成長や骨化に関わる軟骨や、変性に向かう軟骨における生理的・病的機能に関与することが示唆され、長管骨や脊椎の成長制御や変形性関節症の病態解明・治療に新たな展開をもたらす可能性を示すものであった。

Key words: 局所性 RAS, 軟骨組織, 成長軟骨帯, 軟骨細胞, 増殖, 分化

緒 言

従来、レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS) は血圧や体液電解質の調節にかかわる循環内分泌系として見いだされた¹。この系の最終活性ペプチドはアンジオテンシン II (Ang II) であり、Ang II はアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme; ACE) によって、アンジオテンシン I (Ang I) から形成される。従って、ACE はこの系での鍵となるコンポーネントである。この前駆体 Ang I は、腎の傍糸球体装置によって産生され循環血液中に入るレニンによって肝臓で産生されるアンジオテンシノーゲンから切り出される。活性体リガンドである Ang II の生物学的作用は細胞表面のアンジオテンシン II 1型受容体 (Angiotensin II type 1 receptor; AT1R)、お

よび2型受容体 (type 2 receptor; AT2R) に結合することにより発揮される²。近年この全身性 RAS とは別に、局所性組織特異的 RAS が様々な臓器、すなわち、心臓、腎臓、骨髄、血管、そして脂肪織などで同定されており、その生理的機能や様々な病態への関与について検討されている¹。現在では、様々な組織において局所性 RAS により、細胞増殖、炎症、血管新生、そしてアポトーシスによる細胞死を生じることが明らかになっている³。

近年、骨代謝における局所性 RAS の役割が注目を集めている^{4,5}。すなわち、いくつかの RAS コンポーネントが骨芽細胞や破骨細胞において発現し機能していることが報告されている⁶⁻⁸。Hatton⁶らは骨芽細胞と破骨細胞との共培養系において、Ang I 及び Ang II の刺激は骨吸収を促進すること、その作用は ACE 阻害剤によって減弱することを示した。す

なわち、骨芽細胞または破骨細胞が局所性に発現する ACE により Ang II は Ang I から変換されて生成することを示している。これらの結果は、局所性 RAS が骨組織に存在し骨代謝の制御に関与することを示唆する。最近の研究では、RAS コンポーネントが vivo でも発現していることが示されており⁸、骨代謝における RAS の役割が注目を浴びている。

関節組織では、Price⁹ らが、急性および慢性ラット滑膜炎モデルを用いて、炎症を生じた滑膜組織に AT1R および Ang I/II の発現が亢進していることを報告した。彼らは、AT1R の阻害剤であるアンジオテンシン II 受容体ブロッカー (ARB) が用量依存的に関節炎を抑制し、炎症滑膜での TNF- α 産生を抑制する作用も示した。滑膜組織には間葉系細胞が存在することが示されており、滑膜間葉系細胞は軟骨へ分化することが知られている^{10,11}。従って、滑膜細胞は軟骨細胞に比較的近い細胞種であると考えられている。

以上より、我々は軟骨細胞において局所性 RAS が発現している可能性を考えた。生体には様々な軟骨組織が存在する。また、軟骨組織には成熟後の正常関節軟骨や気管軟骨のようにほとんど静止状態にある組織から、成長軟骨帯や骨折仮骨に見られる軟骨組織のごとく軟骨細胞が生理的あるいは機能的に分裂・増殖して骨化方向へと分化するもの、また、変形性関節症軟骨のごとく軟骨細胞が病的に分裂し、分化を生じてアポトーシスに陥る病的組織まで様々な状態がある。本研究の目的は軟骨組織における局所性 RAS コンポーネントの発現状況を検討し、さらに、ウシ培養軟骨細胞における発現と誘導を検討することで、局所性 RAS の機能的な意義を考察することである。

材料と方法

1. 使用動物

組織学的検索のための動物としては、8週齢の雄の C57BL6/Jcl マウス (日本クレア社、東京) を用いた。また、胎児の四肢原基を得るため同系の 14.5 日妊娠雌マウスを同社より購入した。全ての実験は近畿大学医学部実験動物取扱規約を遵守して行なわれた。また、軟骨細胞の分離・培養のための軟骨組織には、生後 10 ヶ月のウシ前足部 MP 関節軟骨を用いた (阪南畜産株式会社 (大阪) のご好意により提供)。

2. 骨折モデルマウスの作成方法

8週齢のマウス 4 個体にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬株式会社 東京) 40 mg/kg を腹腔内投与し、全身麻酔下にマウス膝関節 5 mm 遠位で 10 mm の皮膚切開を行い、皮下を

剝離し脛骨を露出した。脛骨中央部内側骨皮質のみを外科剪刃にて切断後、用手的に不全骨折させた。脛骨外側と腓骨で下腿の連続性が保たれていることを確認し、ステイプラーにて閉創した。ゲージ内で 9 日間経過観察し、麻酔覚醒後も自立歩行が保たれていることを確認した。術後 9 日目に頸椎脱臼法にて屠殺し、膝関節から下腿の組織を採取した。

3. 組織学的検討

頸椎脱臼法によるマウス 4 個体の屠殺後、膝関節、鼻中隔、気管軟骨、椎骨を採取した。また、4 個体の脛骨骨折モデルマウスの膝から下腿を採取した。さらに、妊娠雌マウスより胎生 15 日の胎児を摘出、顕微鏡下に四肢原基を採取した。10%ホルマリン (マイルドホルム 10N, 和光純薬工業、大阪) にて固定した (4°C, 24時間)。骨を含む組織は Morse 溶液 (10% (w/v) クエン酸ナトリウム + 22.5% (v/v) ギ酸) を使用して脱灰した (4°C, 24時間)。高濃度エタノールによる脱水後、パラフィンブロックとした標本をパラフィン用滑走式マイクロームにて約 4 μ m の切片として切り出した。切片はアルコールとキシレンにて脱パラフィン後、HE (hematoxylin-eosin) および、アルシアン青/アリザリン赤 S による重複染色を行なった。組織学的にアルシアン青で染色される部位をプロテオグリカンの存在部位と考え、軟骨組織とした。

1) HE 染色

ヘマトキシリンで 4 分間染色後、水洗を 10 分間施行し、エオジンで 4 分間染色した。数秒水洗し、アルコールとキシレンで脱水、封入した。

2) アルシアン青染色とアリザリン赤 S による重複染色

軟骨に存在するプロテオグリカン (コンドロイチン硫酸) の酸性ムコ多糖物質検出のため、アルシアン青で染色を行った。3%酢酸水で 5 分間固定し、アルシアン青で 30 分間染色した。3%酢酸水で十分に洗浄し、蒸留水で水洗した。続いて、組織内に沈着した Ca を検出するため、アリザリン赤 S で 5 分間染色し、蒸留水で十分に水洗した。その後、アルコールとキシレンで脱水、封入した。

4. 免疫組織化学的検討

骨折モデルマウスの下腿、8週齢マウスの膝関節、鼻中隔、気管軟骨、椎骨、および、胎生 15 日のマウス四肢を採取し、上記と同様に固定、脱灰後、パラフィン切片を作成した。アルコールとキシレンで脱パラフィンを施行し、RAS コンポーネントである ACE, Ang, AT1R, および AT2R の免疫染色を行った。

10% TTBS (Tween Tris-HCl Buffer Solution

(TBS, pH7.6), MB-013, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) にて20分間マイクロウェーブ加熱 (100度) し, 抗原を賦活化した. 内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのため80%メタノールと30%過酸化水素を9:1で混合した溶液にて室温で10分間した後に1時間のブロッキングを施行した. ブロッキング溶液には10% Block Ace を加えた50 mM TBS (雪印乳業, 札幌) を使用した. 次に一次抗体 (ブロッキング溶液にて溶解, 濃度1:100) を散布し, 4°C over night したのち PBS で3回洗浄した. ネガティブコントロールの一次抗体としては, 非特異的ラビット IgG 抗体を用いた. その後, 2次抗体 (ブロッキング溶液にて溶解, 濃度1:1000) を散布し, 2時間室温で留置したのち PBS で3回洗浄した. DAB 色素体液 (K3468, DAKO, グロストラップ, デンマーク, DAB 基質緩衝液 1 m に溶解, 濃度1:100) で着色し, ヘマトキシリン (和光純薬) を用いて核染色を行い, アルコールとキシレンで脱水, 封入した.

ACE の免疫染色一次抗体には, ヤギ抗 ACE ポリクローナル IgG 抗体 (Angiotensin Converting Enzyme 1 Antibody, sc-12187, Santa Crus Biotechnology, CA, 濃度1:100) を使用した. Ang の免疫染色一次抗体にはラビット抗 IgG モノクローナル抗体 (Anti-angiotensinogen Antibody, EPR2931, abcam, Cambridge, UK, 濃度1:100) を使用した. AT1R の免疫染色一次抗体にはラビット抗 AT1R ポリクローナル IgG 抗体 (Anti-AT1 Receptor, AB15552 Millipore, MA, 濃度1:100) を使用した. AT2R の免疫染色一次抗体にはラビット抗 AT2R IgG ポリクローナル抗体 (Anti-AT2, sc9040, Santa Crus, 濃度1:100) を使用した. 二次抗体には, 抗マウス IgG horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体 (SC2313, Santa Cruz, 濃度1:1000) を使用した. 染色後 BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) にて検鏡した.

5. ウシ軟骨細胞の分離と培養

分離, 培養の方法については, 岸本¹² らの報告を参照し, 同様の手法でおこなった.

6. Real-time polymerase chain reaction (real-

time PCR) による ACE, Ang, AT1R および AT2R 遺伝子発現の解析

1) mRNA の抽出と逆転写反応

mRNA の抽出と逆転写反応は, 岸本³³ の報告を参照にして, 同手法を用いた.

2) Real time PCR 法による遺伝子発現の定量化

本研究では, real time PCR 法を用いて培養ウシ軟骨細胞における ACE, Ang, AT1R および AT2R の培養軟骨細胞における発現と誘導に関しての検討を行った. Real time PCR は, 上記にて作成した cDNA を鋳型とし, SYBR Green を使用したインターカレーター法にて実施した. インターカレーター法は, 2本鎖 DNA に結合する色素 SYBR Green を PCR 反応液に混ぜ, ポリメラーゼによって合成された2本鎖 DNA を検出する方法であり, 単位サイクル後の蛍光の強さからサンプル中の mRNA 量を計算, 定量する方法である. 同法では, primer 同士の結合による primer-dimer, ゲノム DNA の混入, 非特異反応による DNA の増幅も蛍光の強さに反映しうするため, 予め forward primer, reverse primer をそれぞれ異なる exon 上に設計し, さらにコントロールサンプルを用いた反応にて乖離曲線を計測し, 非特異反応が生じない事を確認した. 使用した primer を表 1 に示す. SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 滋賀, 大津) 10 μ l, PCR Forward Primer 0.8 μ l, PCR Reverse Primer 0.8 μ l, 滅菌蒸留水 7.4 μ l, 逆転写反応液 1 μ l で計20 μ l の混合液を作製し, Thermal Cycler Dice Real Time Syatem II (タカラバイオ) にて反応および検出を行った. 初期変性は95°C20秒とし, その後 PCR 反応として95°C 5秒, 60°C30秒を40サイクル行った. なお, 遺伝子発現の定量化は, β -アクチン遺伝子の発現を内在性コントロールとし, 未処理培養軟骨細胞をキャリブレーターサンプルとした $\Delta\Delta Ct$ 法にて行った.

7. ウシ培養軟骨細胞免疫染色

培養ウシ軟骨細胞における AT1R および AT2R の発現と誘導に関して, 蛋白レベルでの定性的観察を行うため, 細胞免疫染色を行った.

培養液を24穴 well から吸引し, 室温で15分間10%

表 1 本研究で用いた real time PCR primer 塩基配列

gene	Forward primer	Reverse primer
ACE	GACAGATACATCAACCTCAGG	ATCGGTAACATCAAGATTGG
Ang	TCAATGCCTACGTCCACTTC	TCCACCCAGAACTCCTTGAG
AT1R	TCTGAGACTGACTAACCCAAG	ATGTAATTGTGCCTTCCAGC
AT2R	ACTTCTCCCTTGCCACCATC	ATGCTTATCCGATGGCTTATG
Actin	AGGTCATCACCATCGGCAAT	GAATGCCGCAGGATTCCAT