

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591950

研究課題名（和文）石灰化をともなうナノ粒子の各種関節疾患発生への関与に関する研究

研究課題名（英文） Analysis of calcifying nanoparticulates in joint diseases

研究代表者

弦本 敏行（TSURUMOTO TOSHIYUKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60304937

研究成果の概要（和文）：

生体内の石灰化部位に出現するナノサイズの微小粒子は、石灰化過程初期において核となるばかりでなく、局所的な炎症や周囲の細胞死を起こすことが指摘されている。変形性関節症、関節リウマチ、外傷後関節炎の各患者の関節液中には 1000nm 以下の微小粒子が存在することが確認された。とくに変形性関節症の関節液において存在する 100nm 以下の微小粒子は、病態ともに関節周囲で進行する石灰化・骨化に関与している可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that “calcifying nanoparticles (CNPs)” induce local inflammation and cell death around them in the human bodies. This study showed that synovial fluid of patients who suffered from osteoarthritis, rheumatoid arthritis and post-traumatic arthritis contained nanoparticles those sizes were less than 1000nm. The size of nanoparticles from osteoarthritis was less than 100nm, and therefore they were thought to be “calcifying nanoparticles” and they could play significant roles in calcification and ossification around the osteoarthritic joints.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節炎、変形性関節症、関節リウマチ、外傷後関節炎、石灰化、

## 1. 研究開始当初の背景

生体内で進行する石灰化現象は、ヒトに生じる多くの疾患のみならず、加齢現症そのものの背景に大きく関与している可能性があるが、そのメカニズムに関してはいまだ解明が進んでいないのが現状である。これまで、生体内の様々な石灰化部位には Calcifying nanoparticle (CNPs)、あるいは Biological nanoparticle、Nanobacteria と呼ばれるハイドロキシアパタイトを主成分とする 50~300nm 以下の微小粒子が存在し、様々な疾患の病態に関与していることが報告されている。さらに、近年、これらの微小粒子は石灰化を惹き起こすための核になるばかりではなく、粒子の周囲のカルシウムおよびリン酸の濃度を上昇させることによって局所の炎症を引き起こす、という仮説が唱えられている。われわれは変形性膝関節症、関節リウマチ、外傷後関節炎などの各種関節疾患においても、このような微細粒子がその発症および進行に関与しているのでは、という仮説を立て、その検証に取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

変形性関節症、関節リウマチ、および外傷後関節炎患者の膝関節から採取された関節液中におけるナノサイズレベルの微小粒子の存在の有無を検証する。さらに、疾患ごとにそれらの微小粒子の大きさの分布を明らかにすることによって各種関節疾患の膝関節液における微小粒子の疾患別特性を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 対象：長崎大学医歯薬学総合研究科倫理委員会の審査を経たフォームに従い、インフォームドコンセントを取得した以下の内訳の患者から採取された膝関節液を検討対象とした。

- ① OA 群：変形性膝関節症 10 名
- ② RA 群：関節リウマチ 9 名
- ③ 外傷群：外傷性関節炎 9 名

これら試料に対して、以下の検討を実施した。

(2) 関節液 pH の測定：pH メーターを使用。

(3) 関節液中からの微細粒子の回収：関節液約 0.2ml を疎水性のペトリディッシュ上に滴下して関節液滴を形成する。この容器を密封して内部の湿度を保った環境下で緩徐に蒸発させることによって、その辺縁に親水性の微小粒子を集積させた (slow evaporation 法)。

(4) 微小粒子の光顕像および走査電顕像の取得：デジタル実体顕微鏡 (VHX100,

Keyence) を用いてそれらの光顕像を取得、

(5) 走査型電子顕微鏡 (JSM-6700F, 日本電子) を用いて画像を取得、さらに、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDAX-DX-4, Philips) を

用いて微小粒子の含有 元素分析を実施した。  
(6) 各関節液中の微細粒子含有率の測定：OA 群と外傷群のサンプルに対して、Zetasizer Nano (Malvern) を使用して、1nm~1000nm の大きさの微細粒子の含有率計測を実施した。

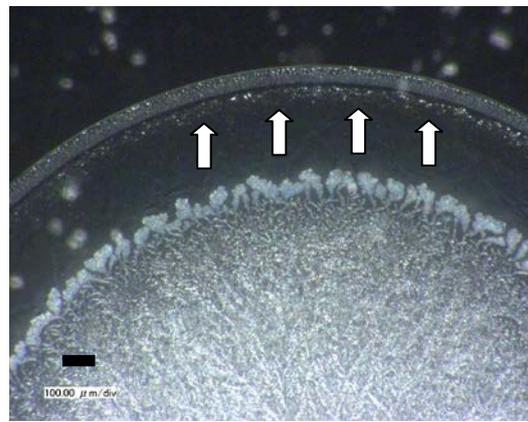
## 4. 研究成果

### (1) 関節液 pH の測定

各群の関節液 pH の平均値はそれぞれ OA 群 9.12、RA 群 8.85、外傷群 8.92 であって、いずれもアルカリ性を示した。有意差は認められなかったが、OA 群の関節液は他群よりもアルカリ性を示す傾向があった。

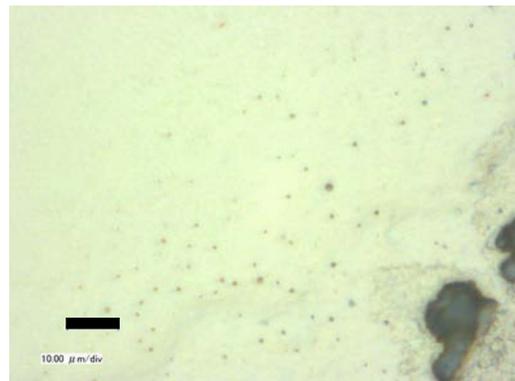
### (2) 関節液中からの微細粒子の回収

緩徐に乾燥させた関節液滴の周辺部に微小粒子が集積した (矢印)。



### (3) 微小粒子の光顕像の取得：

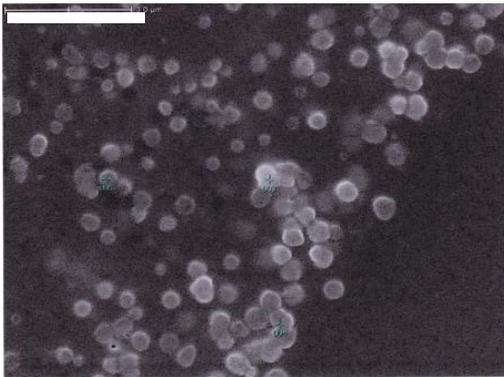
デジタル実体顕微鏡では、ほぼ全例の関節液中におおよそ径 1 μm 以下の微小粒子が多数存在することが確認された (Bar=10.0 μm)。



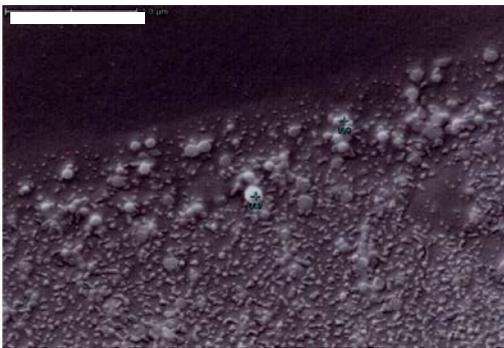
### (4) 走査電顕像の取得および EDAX 元素分析：

各群の代表例の走査電顕像を提示する。

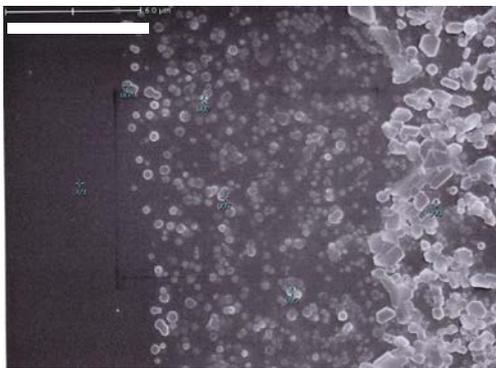
(a) case 20 (OA群) (Bar=3.0 μm)



(b) case 1 (RA群) (Bar=3.0 μm)



(c) case 18 (外傷群) (Bar=5.0 μm)

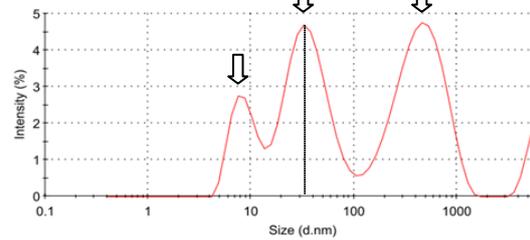


いずれの群に属する症例の関節液からも径1000nm以下の微小粒子の存在が確認された。EDS 元素分析の結果からは、それぞれの微小粒子はいずれもPとCaを含有とすることが確認された。このことから、おそらくこれらはリン酸カルシウムを主成分とした微小粒子であることが示唆された。

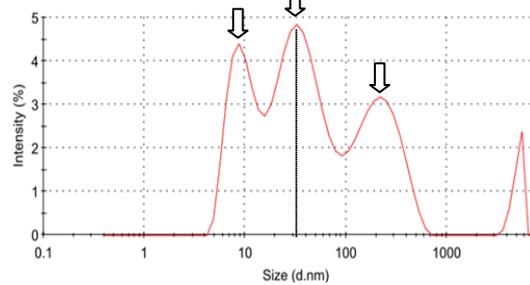
(5) 関節液中の微細粒子含有率の測定：

OA群、外傷群のうち、各4例の測定結果を示す。まず、以下の(a)~(d)の4例はいずれもOA群である。

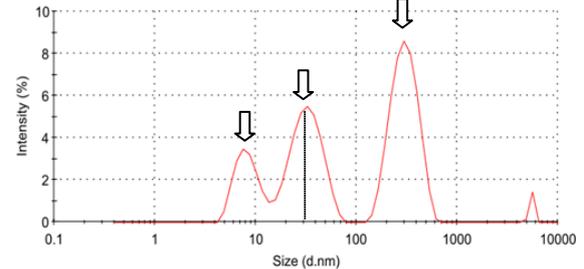
(a) case 15 (OA群)



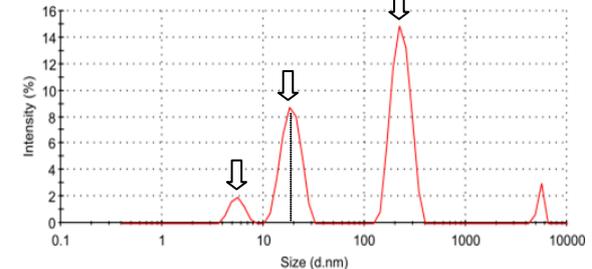
(b) case 16 (OA群)



(c) case 20 (OA群)



(d) case 22 (OA群)

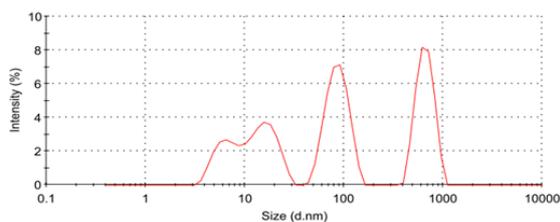


OA群の関節液においては、大きく3つ、すなわち、①10nm以下、②10~100nm、③100~1000nmのピークをもつ3種類の微小粒子が混在していることが示された。これらのうち、とくに②のピークは20~30nmに集中していた。

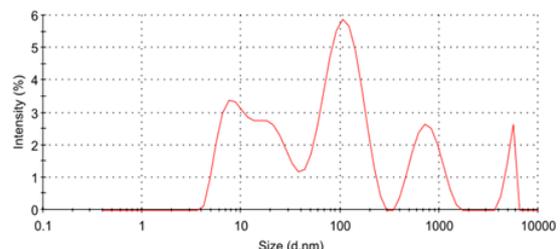
続いて、以下の4例はいずれも外傷群の症

例から得られた関節液の分析結果である。

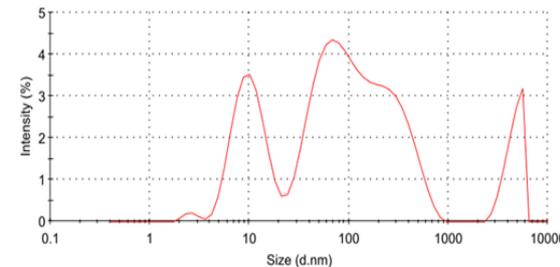
(e) case 17 (外傷群)



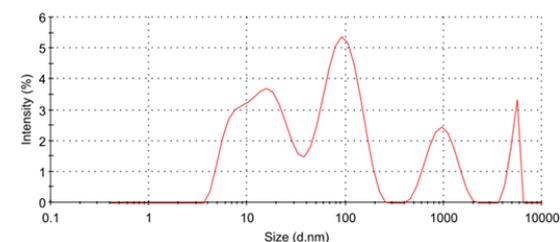
(f) case 18 (外傷群)



(g) case 19 (外傷群)



(h) case 21 (外傷群)



外傷群においては、OA 群の関節液にみられたようなはっきりしたピークの区別はなく、いずれも不規則なパターンを示す傾向があった。

以上の結果から、以下のことが考察される。

①関節液はすべてアルカリ性であって、リン酸カルシウムの微粒子が形成されやすい環境が保たれている。

②われわれの考案した slow evaporation 法を用いて、関節液滴を緩徐に蒸発させた結果、その中の存在するナノレベルの微小粒子を回収することが可能であった。

③変形性関節、関節リウマチ、および外傷性関節炎のいずれの患者の関節液中にも径 1000nm 以下の微小粒子が存在することが確認された。これらには大きさの異なる多様な微小粒子が含まれていることが示された。

④変形性関節症例においては、関節液中に 10nm 以下、10~100nm、および 100~1000nm のそれぞれ 3 つのピークをもつ 3 種類の微小粒子が混在していることが確認された。とくに第 2 番目のピークは 20~30 nm に集中していた。

近年、リン酸カルシウムを主成分とする微小粒子が体内における石灰化、とくに血管壁における石灰化機構に大きく関わっていることを示唆する報告が散見される。これまで、このような微小粒子に関しては、それが石灰化を惹き起こすための核になることが指摘されていたが、近年、それら粒子が周囲の微小環境におけるカルシウムおよびリン酸の濃度を上昇させることによって局所の炎症を引き起こし、さらには周囲の細胞死を惹起するという仮説が唱えられている。関節リウマチのみならず、変形性関節症、あるいは外傷後に生じる関節炎においても、滑膜炎を惹起する一要因としてこれらの微小粒子が関与している可能性もある。

さらに、変形性関節症例の関節液中に確認された 3 種類の微粒子中には、直径が 20~30 nm という特異的なサイズのもが存在することが示された。これらには、生体内で発生するさまざまな石灰化病巣における石灰化機構に大きく関与するという点で病態生理上の意義が指摘されている、いわゆる calcifying nanoparticle (CNPs) が含まれている可能性が高い。すなわち、変形性関節症において進行する骨棘形成をはじめとする石灰化・骨化の過程において、これらの特異的な微小粒子が少なからず関与している可能性が示唆された。これらの微小粒子の出現率に関しては個体間差が存在する可能性もあり、さらなる検討が必要である。

以上の成果をもとに、2 件の論文を現在、作成・投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)  
(現在、2 件を作成・投稿中である)

[学会発表] (計 1 件)

①弦本敏行、進藤裕幸、変形性関節症患者の関節液における biological nanoparticle の存在意義について、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23 日、(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

弦本敏行 (TOSHIYUKI TSURUMOTO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：60304937

### (2) 研究分担者

米倉暁彦 (AKIHIKO YONEKURA)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20380850

### (3) 研究分担者

梶山史郎 (SHIRO KAJIYAMA)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90418822

### (4) 研究協力者

Andrei P. Sommer