

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861179

研究課題名(和文)多層カーボンナノチューブの関節内滑膜反応とケモカイン分泌量

研究課題名(英文) Intraarticular synovial response and secretion of chemokines to multi walled carbon nanotubes

研究代表者

野村 博紀(NOMURA, Hiroki)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40646543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)を生体材料に応用する場合には、使用する部位の組織や細胞によって、その生物学的反応が大きく異なる。本研究は、関節内の主たる生物学的反応の場である滑膜のMWCNTsに対する反応を評価した。その結果、MWCNTsに対して滑膜が特異的な生物学的反応を示すこと、MWCNTsを関節内に使用する際には、一定量以下であれば滑膜に対して大きな問題がないことが明らかになった。本研究の結果は、肺や腹腔の反応とは明確に異なるものであり、今後MWCNTsを生体材料として臨床応用するためには、使用する部位に合致した詳細な生物学的反応評価が必要である。

研究成果の概要(英文)：Biological evaluation of carbon nanotubes (CNTs) is typically performed in the lung or abdominal cavity, however, biological reactions to CNTs are predicted to be markedly different in other tissues. In applications of CNTs as reinforcement for artificial joints and drug delivery systems, including their use in bone regeneration, the intra-articular synovial membrane makes contact with the CNTs. Herein, we analyzed the reaction of the synovial membrane with multiwalled CNTs (MWCNTs). Injection of MWCNTs into rat knee joints revealed their dose-dependent incorporation into deep synovial membranes and the formation of granulation tissue, without long-term inflammation. MWCNTs were incorporated into human fibroblast-like synoviocytes (HFLSs), with less cytotoxicity than that observed in macrophages (RAW264 cells). Moreover, MWCNTs inhibited the release of cytokines and chemokines from HFLSs. The reaction of the synovial membrane with MWCNTs differed from that observed in other tissues.

研究分野：整形外科

キーワード：多層カーボンナノチューブ 関節内滑膜反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の我が国を含めた人口の超高齢化により股関節及び膝関節を始めとする変形性関節症患者は増加傾向にある。末期変形性関節症患者に対しての外科的治療法は人工関節置換術が一般的である。その関節摺動面、いわゆる軟骨の役割を果たすために用いられているのが超高分子量ポリエチレン (ultra-high molecular weight polyethylene、以下 PE) であるが、その摩耗粉が原因による骨溶解を始めとする種々の合併症は未だ解決されていない。

(2) 我々はこの摩耗粉の問題を解決するために、近年その強度や弾性を含めた様々な構造的特徴から急速に生体応用への研究がなされている多層カーボンナノチューブ (multi-walled carbon nanotubes、以下 CNT) を配合させることにより、より低摩耗、高強度な CNT 配合 PE (以下 CNTPE) の開発を行っている。

(3) CNT の生体への影響に関しては肺や腹腔を中心に様々な毒性試験が行われ、その発癌性を報告した論文が散見される。しかし我々は吸入や腹腔内投与などと比較して関節内という局所部位に CNT 複合材料を埋め込むことは全く別であると判断し、その生体反応も異なると予測される。

(4) 関節内の免疫応答が滑膜組織を中心に起こることは種々の報告から明らかである。我々が調べた限りでは、CNT と関節内滑膜組織との反応を調べた報告は過去に例がなく、今回検討の必要性があると判断し本実験を施行した。

2. 研究の目的

(1) 動物実験にて CNT に対する関節内滑膜組織の反応を経時的に評価する。

(2) 細胞実験にて CNT のヒト滑膜細胞に対する影響をその形態を観察し、毒性試験およびサイトカイン、ケモカイン分泌量の変化から総合的に評価する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験には 10 週目の Wister Rat (日本 SLC) を用いた。イソフルラン (アボットジャパン) にて吸入麻酔を施行し、右膝関節に 0.003mg、0.03mg、0.3mg 量の MWNT7 (保土谷化学、以下 CNT) をそれぞれ投与して投与後 1 週、4 週、12 週と経時的に滑膜組織を評価した。

(2) 細胞実験ではヒト滑膜線維芽細胞 (Cell application) を用いて CNT の濃度を 0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml と設定してそれぞれ暴露した。CNT 暴露時の形態観察は 10 μ g/ml の濃度でのみ行い、核、ライソソームを染色して評価した。毒性試験は Alamar blue 法により測定は micro plate reader (バイオテックジャパン) にて行った。

サイトカイン、ケモカイン分泌量測定は Cytometric bead array system (Becton Dickinson) を用いて行った。

(3) コントロール群には生理食塩水、ナノサイズの比較炭素材料には Carbon Black (三菱化学、以下 CB) を用いた。分散剤には polysorbate 80 (日油) を phosphate buffered saline にて 0.1% に希釈したものを用いた。

4. 研究成果

(1) 動物実験

Control 群では注射後 1 週、4 週、12 週全てに時期において、表層の滑膜細胞と内部の脂肪細胞からなる正常な滑膜組織が認められ、炎症反応は認められなかった (a)。CB 群では、注射後 1 週で滑膜表層に CB が浸潤して軽度肥厚し、CB はマクロファージ内に取り込まれ、リンパ球を中心とした軽度の炎症反応が認められた。深部の脂肪組織に CB は認められなかった。4 週後には、CB がマクロファージに取り込まれたまま炎症反応は軽快し、滑膜の肥厚も変わらなかった。12 週後には炎症反応は鎮静化していた (b)。CNT0.003mg 群では、注射後 1 週で滑膜表層に CNT が浸潤しており、軽度の肥厚を認めた。CNT はマクロファージに取り込まれ、リンパ球を中心とする炎症反応が軽度認められた。最表層には正常な滑膜線維芽細胞が認められた。4 週後、CNT がマクロファージに取り込まれたまま炎症反応は軽快し、12 週後では最表層は正常な滑膜組織に覆われていた (c)。CNT0.03mg 群では、注射後 1 週で CNT が滑膜深層に浸潤してマクロファージ、リンパ球などの炎症細胞が認められ、脂肪組織の一部と置き換わっていた。白血球の浸潤などの高度な炎症反応なかった。CNT は凝集し、マクロファージに取り込まれていた。4 週後には、炎症反応を示す領域は徐々に軽快しており、周辺には線維化が認められ、炎症反応は収束傾向であった。またこの時期にはマクロファージが複数融合し、多核化した巨細胞が認められた。12 週後には、炎症反応は沈静化し、正常な滑膜細胞の内部に肉芽組織が形成されていた (d)。CNT0.3mg 群では、1 週後に MWCNT0.03mg 群より広範囲に CNT が浸潤していた。しかし、CNT0.03mg 群と同様に白血球の浸潤はなく、高度な炎症反応は認められなかった。4 週後、12 週後と経時的に炎症反応は鎮静化し、広い範囲の肉芽組織が形成されたが、表層は正常な滑膜組織に覆われていた (e)。

(2) 細胞実験

① 形態観察

HFLS は CNT と CB を細胞内に取り込んだが、細胞の形状は変わらなかった。CNT と CB は細胞内で赤色に染色されたライソソームに存在していた (f)。

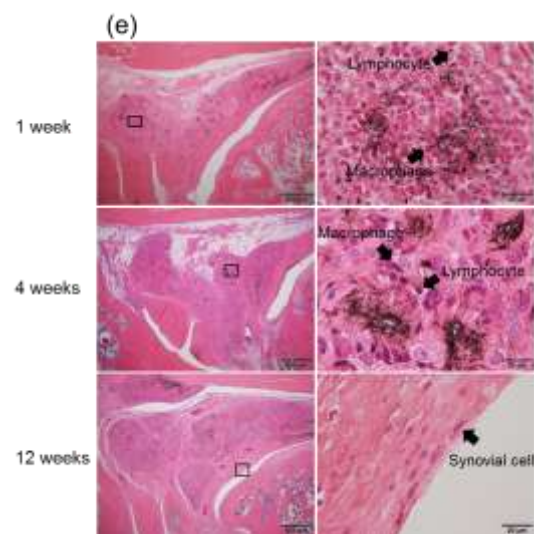
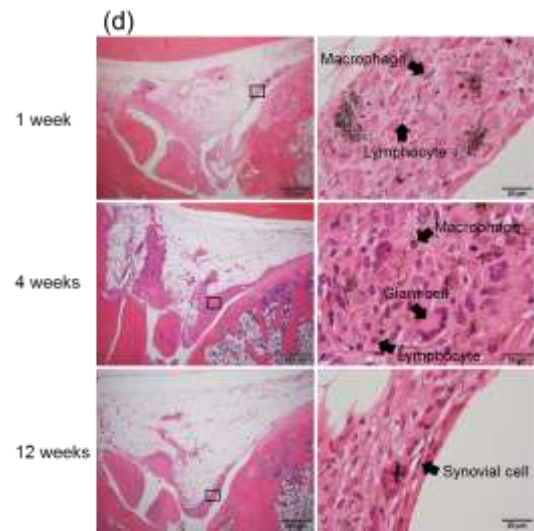
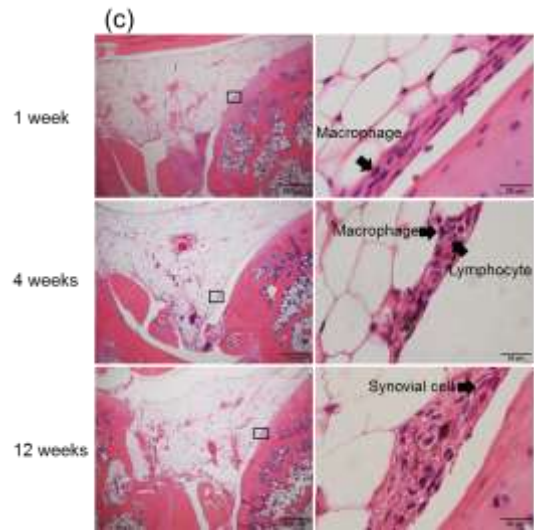
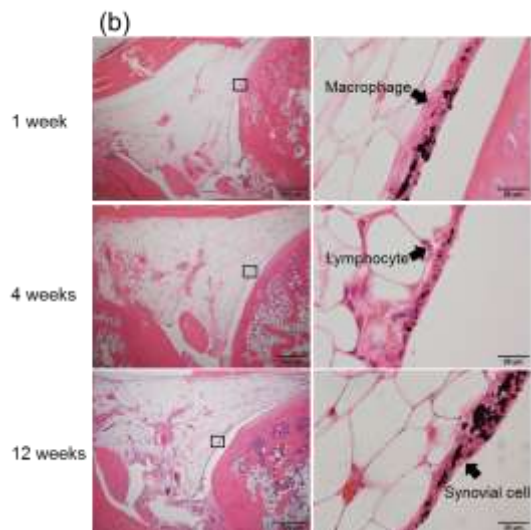
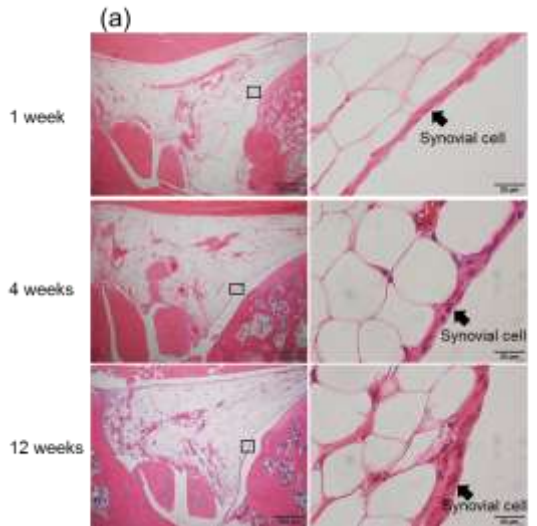
②細胞毒性試験

CB 群では全ての濃度において細胞増殖性の低下は認められなかった。CNT 群では $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ で濃度依存性に細胞増殖の低下が認められ、control 群と比較してそれぞれ 86%、64%と有意に増殖が抑制された (g)。

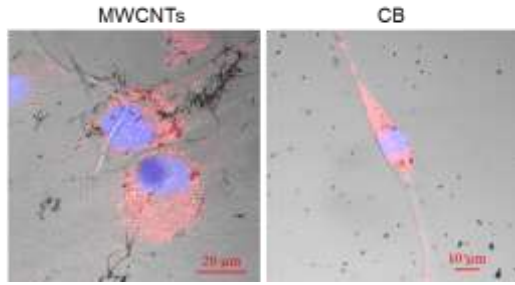
③サイトカイン、ケモカイン分泌量測定

細胞増殖性試験の結果から、CNT の濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ では、増殖抑制が高度であるためにサイトカイン、ケモカインの分泌量の測定が不可能であることと判断して、増殖抑制の低い $10 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で検討した。

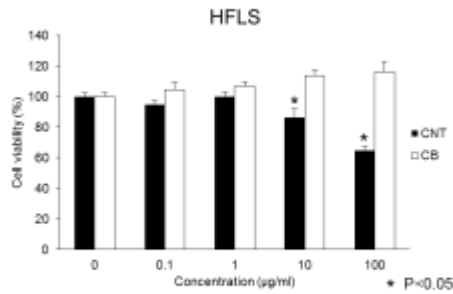
HFLS において、IL-6 は CNTs、CB とともに有意に減少したが、明らかな濃度依存性は認めなかった。IL-8 は CNTs では変化せず、CB では濃度に関係なく減少したが、有意差はなかった。MCP-1 は CNT の $1 \mu\text{g/ml}$ 、CB の $1 \mu\text{g/ml}$ と $10 \mu\text{g/ml}$ で有意に減少したが、濃度依存性はなかった (h)。



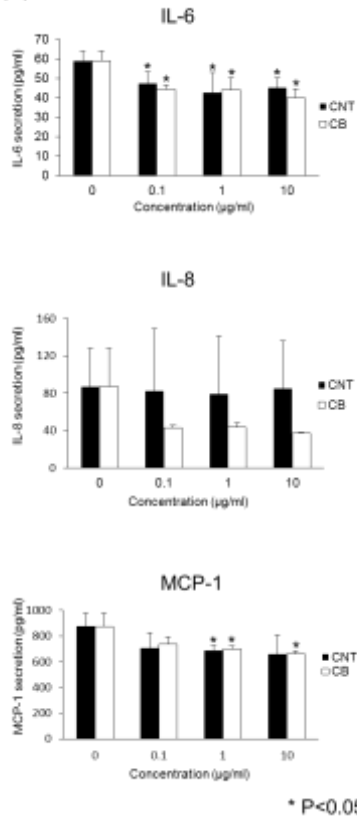
(f)



(g)



(h)



<引用文献>

①Saito N. et al, Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials, Chem Rev, Vol. 11, 2014, 6040-6079

②Goodman SB. Et al, Cellular chemotaxis induced by wear particles from joint replacements, Biomaterials, Vol. 19, 2010, 5045-5050

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Nomura H, Takanashi S, Tanaka M, Haniu H, Aoki K, Okamoto M, Kobayashi S, Takizawa T, Usui Y, Oishi A, Kato H, Saito N. Specific biological responses of the synovial membrane to carbon nanotubes. Sci Rep. Sep 21; 5: 14314. 2015 doi: 10.1038/srep14314. 査読あり

[学会発表] (計1件)

・野村 博紀、MWCNTs のマクロファージに対する影響と骨溶解に関連したケモカイン分泌量の変化の検討、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014 年 10 月 9 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 博紀 (NOMURA, Hiroki)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40646543