

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	野村博紀
論文審査担当者	主査 森泉哲次 副査 中山淳・菅野祐幸
論文題目  Specific biological response of the synovial membrane to carbon nanotubes (カーボンナノチューブに対する滑膜の特異的な生物学的反応)	
<b>【研究の背景】</b> これまでカーボンナノチューブ (Carbon nanotubes、以下 CNTs) に対する生物学的反応の評価は、吸い込みを対象として肺や腹腔にある組織や細胞で行われることがほとんどであった。しかし、CNTs 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と考えられる。近年 CNTs を骨再生医療の足場材に用いる研究、人工関節の強化剤 filler に用いる研究、関節リウマチの薬剤伝達系に用いる研究等が進んでおり、これらの場合には、CNTs を応用した生体材料を関節内に使用する可能性が高い。本研究は、関節内の主たる生物学的反応の場である滑膜組織の多層カーボンナノチューブ (Multi-walled CNTs、以下 MWCNTs) に対する反応を評価した。	
<b>【研究の方法】</b> (動物実験) 10 週雄のウィスターラットの片側膝関節内に MWCNTs を注射し滑膜組織を評価した。MWCNTs 投与量は 0.003mg、0.03mg、0.3mg の 3 群に分け、分散剤には生体安全性が証明されているポリソルベートを用いた。コントロール群として生食、ネガティブコントロール群としてのナノサイズ比較炭素材料には刺青に使われているカーボンブラック (Carbon Black、以下 CB) を用いた。投与後 1 週、4 週、12 週と経時的に評価した。さらに MWCNTs が関節内に単回ではなく複数回にわたり断続的に暴露された状況を考慮して、0.003mg を 1 週間隔で 3 回に分けて分割投与し最終投与日から 1 週後、4 週後と経時的に評価した。さらにその組織を単回投与の 1 週、4 週後とそれぞれ比較した。 (細胞実験) ヒト正常滑膜線維芽細胞 (Human Fibroblast Like Synoviocytes、以下 HFLS) に 10 $\mu$ g/ml の MWCNTs と CB を暴露後 24 時間での形態観察を行った。比較対象として、これまで MWCNTs の細胞試験で一般的に使用されているマウスマクロファージである RAW264 を用いた。核、ライソソームを染色して MWCNTs と CB の取り込み状態を比較した。細胞毒性評価には Alamar blue 法、炎症性サイトカイン、ケモカイン分泌量測定には Cytometric Bead Array System を用いて 0.1、1、10、100 $\mu$ g/ml の濃度で測定した。	
<b>【結果】</b> (動物実験) コントロール群では投与後 1 週、4 週、12 週後と全てに時期において、正常な滑膜組織が認められた。CB 群では、投与後 1 週で滑膜表層に CB が浸潤して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。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 12 週後に炎症反応は鎮静化していた。MWCNTs 0.003mg 群では、投与後 1 週で滑膜表層に MWCNTs が浸潤しており、軽度の肥厚を認めたが最表層には正常な滑膜線維芽細胞が認められた。4 週後、MWCNTs 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 週の時点でも明らかな炎症反応の増悪は認められなかった。MWCNTs 0.03mg、0.3mg 群では投与後 1 週で MWCNTs 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おりその反応領域の大きさは濃度依存性であった。	

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、経時的に炎症反応は収束傾向であった。12週の時点でも明らかな炎症反応の増悪は認められなかった。

(細胞実験) MWCNTs と CB それぞれの取り込み状態に関しては、線維芽細胞である HFLS よりも貪食細胞である RAW264 の方が多かった。細胞毒性試験において HFLS は CB 群では全ての濃度において毒性は認められなかったが、MWCNTs 群では  $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $100\ \mu\text{g/ml}$  で濃度依存性に細胞毒性が認められた。RAW264 も同様に MWCNTs 群の  $100\ \mu\text{g/ml}$  でのみ細胞毒性が認められた。サイトカイン、ケモカイン分泌量に関して HFLS は IL-6, IL-8, MCP-1、RAW264 は TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、RANTES を測定した。HFLS で有意に増加したサイトカイン、ケモカインはなかった。RAW264 では MIP-1 $\alpha$  以外は MWCNTs 群で濃度依存性に増加し、その増加量は CB 群より大きかった。

#### 【考察】

中等度から多量の MWCNTs を関節内投与した場合に滑膜深層部への浸潤したことによりやや強い炎症反応が引き起こされた原因としては滑膜組織が柔らかい絨毛構造であり個々の細胞間結合が非常にゆるいことから粒子状で表面が滑らかである CB と比べて繊維状である MWCNTs は非常に引っかかりやすく、さらには関節運動による外的ストレスなどにより深層部へ浸潤したと推測される。高濃度の MWCNTs 暴露で強い細胞毒性が引き起こされた原因としては、完全にライソソームに吸収されないことによる frustrated phagocytosis などが挙げられ、それによってサイトカイン、ケモカイン分泌量が増加したと推測される。

#### 【結語】

本研究結果より 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、少量であれば CB と同等に滑膜組織に対して大きな炎症反応を引き起こさないことが明らかになった。中等度以上の MWCNTs は一過性に強い炎症反応を引き起こすため、その安全性確認にはさらなる長期的な評価が必要である。今後 CNTs 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生物学的反応評価が必要であると結論する。