



Title	Microbubble-Enhanced Ultrasound Exposure Promotes Uptake of Methotrexate Into Synovial Cells and Enhanced Antiinflammatory Effects in the Knee of Rabbits With Antigen-Induced Arthritis
Author(s)	中谷, 宏幸
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46376
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 なか や ひろ ゆき 中 谷 宏 幸

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20134 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学 位 論 文 名 Microbubble-Enhanced Ultrasound Exposure Promotes Uptake of Methotrexate Into Synovial Cells and Enhanced Antiinflammatory Effects in the Knee of Rabbits With Antigen-Induced Arthritis
(家兔膝関節炎モデルにおいて、超音波造影剤を併用した超音波照射により、メソトレキサートの滑膜細胞への取り込みを促進させ、抗炎症効果を高める)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 吉 川 秀 樹

(副査)

教 授 吉 崎 和 幸 教 授 川 瀬 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

近年リウマチ性疾患の治療は急速な発展を遂げ、さらに生物学的製剤の出現により寛解に近い状態になることも予想される。しかし、費用・副作用の問題、また、ノンレスポンダーも少なからず存在することから、全ての患者に投与できる薬剤ではない。また、寛解に近い状態でも部分的な関節腫脹・疼痛を訴える患者も散見される。そのような患者に対して、関節内注入など局所療法が望まれるが、現在一般的に普及している関節内注入では症状の軽快はあっても滑膜炎自体を沈静化させる効果は認められない。一方抗リウマチ薬の中でも中心的な役割を果たしている MTX (Methotrexate) の関節内注入療法はたくさんの報告があるが、効果が不十分であるまたは短期に留まるとの報告がほとんどである。その原因のひとつとしてトランスポーターが欠如していることが考えられ、我々はトランスポーターの代わりに積極的に滑膜細胞に薬剤を導入する方法として超音波遺伝子導入法に着目した。この方法はウィルスベクターを用いず、低侵襲に薬物遺伝子導入可能な方法であるので、近年研究・臨床分野で注目を浴びている。その効果は他の方法よりは劣るが、超音波造影剤を加えることによって導入率が飛躍的に上昇することがわかっている。今回の実験で超音波遺伝子導入法により滑膜細胞への MTX の導入が促進され、抗炎症効果が増強されることを明らかにする。

〔 方法ならびに成績 〕

まず in vitro で初代培養ヒト滑膜細胞に超音波造影剤である optison 存在下に超音波照射し、滑膜細胞に対する導入率を明らかにした。in vitro で MTX (Methotrexate) は超音波照射によって optison 濃度依存的に導入が促進された。その一方で optison 濃度依存的に細胞障害性は上昇した。この実験結果より in vivo での optison の至適濃度を 5% とし、家兔膝関節に蛍光標識した MTX を optison とともに関節内注入し、超音波を照射することで滑膜細胞内に導入されることを明らかにした。

次にこの方法の抗炎症作用を明らかにするため、ovalbumin を用いて感作させ、家兎両膝関節に特異的に関節炎を発症させ、MTX と optison を関節内注入後、超音波を照射した。右膝に超音波を照射する群、左膝は照射しないコントロール群を設定した。検討項目は①12 時間後の滑膜組織内の MTX 濃度を測定すると家兎関節炎の超音波照射群において滑膜細胞内の MTX 濃度は非照射群と比べて約 3 倍と有意に高かった ($p < 0.01$)。②3、7、14、28、56 日後のサンプルで組織学的な滑膜炎の程度、軟骨変性の程度を比較すると、7 日から 28 日までは超音波照射群の方が有意に関節炎の抑制が認められた ($p < 0.05$)。56 日後では自然経過的に滑膜炎が沈静化され、両群で差がなくなったものと考えられる。また、いずれの time-point でも軟骨組織の変性は軽度または認めず、両群で変性の程度には差がなかった。③7、28 日後の滑膜組織を採取し real time PCR 法にて、IL-1 β の発現を定量的に解析すると超音波照射群の方が有意に発現の低下を認めた ($p < 0.01$)。さらに超音波自身の抗炎症効果を明らかにするために別のコントロール群を設定した。生食と optison のみを注入し、右膝には超音波照射し、左膝には非照射群を設定し、超音波自身の抗炎症効果を検証した。7、28 日後の滑膜・骨軟骨組織標本作製し、上記同様に評価を行ったが、両群で有意な差は認めなかった。

[総 括]

家兎関節炎モデルにおいて関節内 MTX 注入後超音波照射によって、細胞内への MTX の導入が促進され抗炎症効果は増強された。長期的な効果、再発などに関しては今後明らかにしていかななくてはならない。この方法は低侵襲でありウィルスベクターを用いないので比較的安全に臨床応用可能であると考ええる。また、今後他の薬剤や遺伝子導入を用いた関節治療への応用も可能な方法である。臨床応用の際には厚い皮膚、他の軟部組織により効果の減弱が予想されるので超音波の出力、薬剤・optison の濃度は検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

この実験で用いた超音波遺伝子導入法という手法は viral vector を用いずに低侵襲に薬物・遺伝子を細胞内に導入可能な方法として近年注目を集めている手法である。

まず前半部分でこの手法を用いることによって MTX がマイクロバブル dose dependent に滑膜細胞に導入されることを明らかにし、超音波及びマイクロバブルの指摘条件を明らかにした。後半部分では関節炎を起こした家兎の膝関節に MTX 及び超音波造影剤を関節内注入し、そこから超音波を照射することによって MTX の滑膜細胞への取り込みを促進させ、抗炎症効果を発揮することを明らかにした実験である。

この方法は局所関節炎のコントロールに臨床応用可能な方法だということに留まらず、今後他の薬物・遺伝子導入による関節炎の治療の可能性を開くのではないかと考え、学位の授与に値すると考える。