

110 MIF ノックアウトマウスのアキレス腱引張強度評価

Tensile Strength Evaluation in Achilles' tendon of MIF K.O. Mouse

○石川 拓 (室蘭工大院)
正 臺丸谷政志 (室蘭工大)

正 藤木 裕行 (室蘭工大)
塩崎 修 (室蘭工大)

Taku ISHIKAWA, Muroran Institute of Technology, Mizumoto-cho, Muroran, Japan

Hiroyuki FUJIKI, Muroran Institute of Technology, Muroran, Japan

Masashi DAIMARUYA, Muroran Institute of Technology, Muroran, Japan

Osamu SHIOZAKI, Muroran Institute of Technology, Muroran, Japan

Keywords : MIF, Achilles' tendon, Tensile test

1. 緒言

近年、医療や製薬の分野で注目されているサイトカインはあらゆる生命現象の理解に不可欠なタンパク分子である。また、サイトカインの一種であるマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor: MIF) は 1966 年に発見された細胞組織の修復機能に関わる重要なサイトカインであり、特に遅延型アレルギー反応に関与する因子として注目を集めた^{1), 2)}。当初、MIF は種々の組織の細胞において恒常的に発現し tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-8 など炎症性サイトカインの発現を惹起することから、炎症の初期の段階で機能するサイトカインであると考えられた。しかしその後、MIF は皮膚の基底細胞層で強く発現して創傷治癒を促進することや、レンズ細胞や脳の発生過程で発現して臓器形成に関与することなどが報告され、MIF は炎症性サイトカインとしての機能を有するのみならず、細胞の分化や増殖においても重要な役割を示し、組織損傷の修復や形成にも関与する多様な機能を有する重要なタンパク分子であることが明らかとなった。しかしながら、腱損傷治癒と MIF の関連性は報告されておらず、いまだ明らかではない。そこで本研究において、MIF 遺伝子の欠損が腱損傷治癒部位に与える影響の調査を行なった。

2. 試験片ならびに試験・評価方法

2.1 試験片 試験試料として雌 8-10 週齢の BALB/c マウス 60 匹を用い、そのうち wild-type マウス 30 匹を Control 群、MIF 遺伝子をノックアウトした MIF K.O. マウス 30 匹を K.O. 群とした。Control 群、K.O. 群それぞれ 20 匹ずつ右脚アキレス腱中央部をメスにより鋭的に切断し、その後皮膚のみを縫合した。切断後、その治癒過程である 3 週ならびに 6 週において、Control 群、K.O. 群それぞれ 10 匹ずつを屠殺してアキレス腱を含む両脚を採取した。その後筋肉と骨を取り除いてアキレス腱と踵骨周辺部位を摘出し、滑り止めとして紙やすりを貼り付けたアクリル板に挟み込む形で瞬間接着剤によりアキレス腱を接着した。その際アキレス腱の有効長さを 5mm 程度とし、また試験片は乾燥を防ぐため試験を行なうとき以外は生理食塩水に浸した。また、損傷治癒過程がない初期状態での Control 群と K.O. 群の比較のため、未切断のサンプルについても Control 群、K.O. 群共に 10 匹ずつアキレス腱と踵骨周辺部位を摘出し、試験片を作成し

た。作成した試験片の例を Fig.1 に示す。

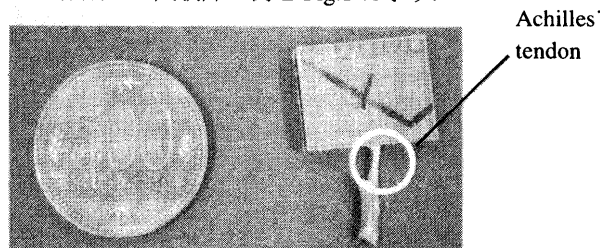


Fig. 1 Specimen of Achilles' tendon

2.2 試験・評価方法 力学特性の測定には引張試験を採用した。試験には汎用引張試験機 (TENSILON RTC-1210) を用い、クロスヘッド速度 0.5mm/min で引張試験を行なった。なお試験片の引張試験機への固定方法として、試験片上部は上記のアキレス腱を接着したアクリル板をチャックで固定し、また下部は試験片の踵骨部分を直径 15mm のアルミ円管内に樹脂埋めし、そのアルミ円管を専用のチャックを用いて把持した。Fig.2 に試験片の固定状況を示す。

力学特性の評価方法としては、引張試験より得られた荷重-伸び曲線から最大荷重と荷重-伸び曲線の傾き (Stiffness) を求め、これらを統計学的に比較・評価した。統計学的比較には ANOVA を用い、有意水準は 5% とした。

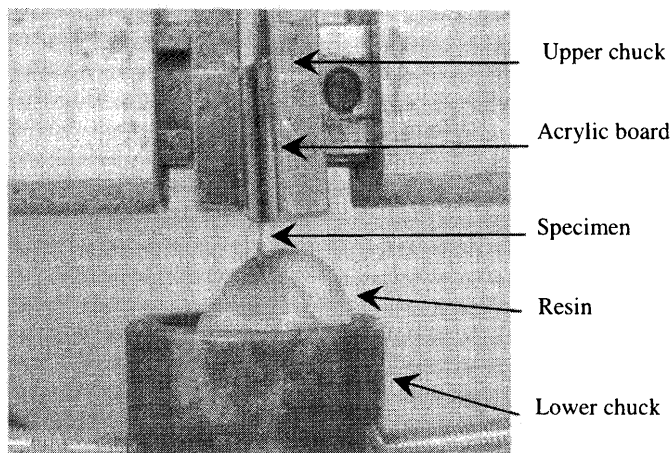


Fig. 2 Experimental setup for static tensile test

3. 試験結果

3.1 未切断サンプルの比較 未切断サンプルの結果を

Fig.3 に示す。縦軸は荷重(N), 横軸は伸び (mm)を、また●印が Control 群, ▲印が K.O.群の結果を示し、それぞれの結果は伸び0.2mm, 0.4mm, 0.6mm, および最大伸び(平均値)についての平均荷重と標準偏差を示している。Control 群, K.O.群両サンプルの最大荷重, Stiffness 共に有意差は認められなかった。

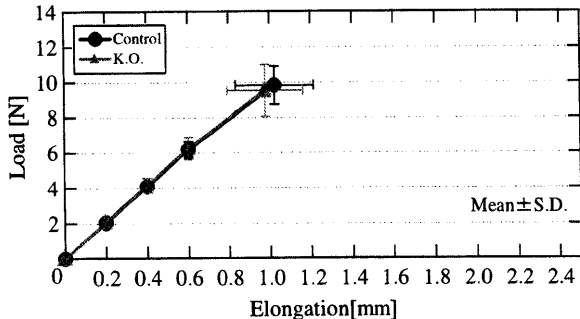


Fig. 3 Load-Elongation curves of initial state samples

3.2 切断後 3 週および 6 週サンプルの比較 Control 群および K.O.群の切断後 3 週, 6 週の試験結果を Fig.4 に示す。また, Control 群および K.O.群の切断後 6 週の各サンプルの結果より求めた最大荷重と Stiffness の平均値および標準偏差を Fig.5 に示す。

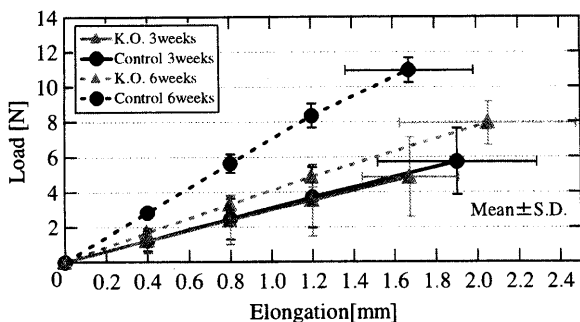


Fig. 4 Load-Elongation curves of 3 and 6 weeks after abscission

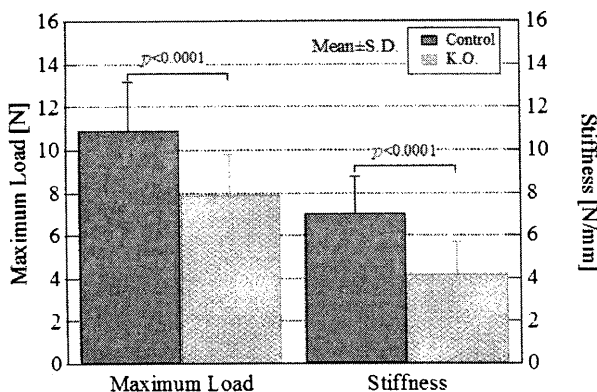


Fig. 5 Maximum load and stiffness of 6 weeks after abscission

Fig.4 は伸びが 0.4mm, 0.8mm, 1.2mm, および最大伸び(平均値)についての平均荷重と標準偏差を示している。切断後 3 週の Control 群および K.O.群両サンプルの最大荷重, Stiffness 共に有意差は認められなかった。しかし, Fig.5 において切断後 6 週の最大荷重, Stiffness 共に有意差が認められ, いずれのパラメータも Control 群が有意に大きい

値を示した。

3.3 切断後の経時的比較 Control 群, K.O.群それぞれの試験結果の経時変化において, 両サンプルとも, 最大荷重, Stiffness 共に腱切断後 3 週では初期値より大幅な低下がみられるが, 6 週後には有意な回復がみられる。また, Control 群の最大荷重のみは 6 週で初期値まで回復しているが, その他は 3 週よりは回復しているが 6 週でも初期値より有意に小さな値になっており, まだ十分な回復となっていない。

4. 考察

未切断サンプルに関する Control 群と K.O.群の比較では最大荷重, Stiffness 共に有意差が認められなかった。この事実は, MIF 遺伝子の欠損は個体の発生から成熟において, アキレス腱の形成には有意な影響を及ぼしていない可能性を示唆し, したがって切断後の損傷治癒過程における力学的データを Control 群と K.O.群間で直接比較することが可能であることを示した。

Control 群, K.O.群のいずれにおいても切断後 3 週と 6 週の最大荷重および Stiffness には有意差があり, 経時的な増加が認められた。この事実は, 両群ともに切断された後のアキレス腱には治癒が進行していることを示している。切断後 6 週において, 最大荷重, Stiffness のいずれのパラメータにも有意差が認められ, Control 群が有意に大きい値を示した。この結果は, MIF 遺伝子の欠損により K.O.群の腱切断部位の繊維組織の修復が遅れ, その力学特性が有意に低下していることを示していると考えられる。これらの結果は, MIF 遺伝子が腱損傷治癒過程における切断部位繊維組織の構造特性向上に寄与している可能性を示唆した。しかし切断後 3 週では両群に有意差はみられなかった。この結果の原因は不明であるが, 生体力学的比較を行うには観察時期が早期過ぎたために, 力学的強度が両群ともに低すぎた結果, MIF 遺伝子の欠損の効果が発見できなかった可能性も考えられる。

5. 結言

本研究では, MIF 遺伝子の欠損が腱損傷治癒過程における繊維組織の構造特性にどのような影響があるのか調べるため, Control 群と K.O.群のアキレス腱の力学特性を評価し, 以下の結果を得た。

- (1) 未切断サンプルでは Control 群と K.O.群の力学特性に差は認められず, 損傷のない状態では MIF の有無による力学的特性への影響はない。
- (2) 腱切断後 3 週では両群の力学特性に有意差はみられなかったが, これは有意差を示すレベルまで力学特性が回復していなかったためと思われる。
- (3) 腱切断後 6 週において両群の力学特性に有意差が認められ, MIF 遺伝子が腱損傷治癒過程における切断部位の繊維組織の構造特性向上に寄与している可能性を示唆した。

参考文献

- 1) Bloom BR, Bennett B., Science 153, 80-82, 1966.
- 2) David JR., Proc Natl Acad Sci USA 56, 72-77, 1966. etc.