HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット脊髄におけるMacrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)の発現及び脊髄損傷後急性期のMIF動態
Author(s)	藤本, 真
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第4052号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122210
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51405
Type	doctoral thesis
File Information	000000307401.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ラット脊髄における Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の発現及び脊髄損傷後急性期のMIF動態

北海道大学 脳神経外科

藤本　真

①

ラット脊髄における**Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)** の発現及び脊髄損傷後急性期の**MIF**動態

北海道大学

藤本　真

Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Rat Spinal Cord and its Kinetics on Experimental Spinal Cord Injury

Hokkaido University

Shin Fujimoto

Abstract

Background Among spinal cord injuries, secondary injury is considered to be a "reversible" process and seems to be a key target for the treatment of spinal cord injury. Recently, macrophage migration inhibitory factor (MIF) has been reevaluated as being one of the most important cytokines which act during wound healing, proliferation and differentiation of cells. However, the expression of MIF in the spinal cord has not been investigated yet.

Purpose The purpose of this paper is to demonstrate the MIF expression in normal rat spinal cord and to evaluate the kinetics of MIF after spinal cord injury.

Materials & Methods Female Wistar (280-320 g) rats were studied. Spinal cord injury was made by the clip compression method at the level of C7/Th1 (56 g. For 1 min.). The expression of MIF was examined by immunohistochemistry and northern blot analysis. MIF content in the cerebrospinal fluid (CSF) was measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Furthermore, to examine the MIF function on neuronal cell, cell proliferation assay (MTS assay) was carried out using PC12, pheochromocytoma cell line, and LN444, glioblastoma cell line, in the presence of anti-MIF monoclonal antibody.

Results MIF stain was positive in normal rat spinal cord white matter. The expression of MIF decreased between 1 hour and 6 hours after injury. It was found to have re-appeared 24 hours after injury. The kinetics of MIF mRNA expression showed reverse-correlation with those of the MIF positive stain. MIF content in CSF was found to be elevated soon after injury. MTS assay suggested that MIF had some proliferative function on neuronal cells.

Conclusion MIF exists in the rat white matter. And it's immediately released into the CSF and then re-synthesized 24-hr after injury. MIF shows a cell proliferative function on neuronal cells. These results suggest that MIF plays an

important role for secondary spinal cord injury.

Key Words: MIF, Spinal cord, Spinal cord injury, Secondary injury, Inflammatory response

緒　　言

脊髄損傷の病態は，一次的損傷としての直接外力による非可逆的な神経細胞及び神経伝導路の裂傷，挫滅，過伸展，血管損傷等と，二次的損傷としての組織の損傷に伴うサイトカインネットワークの活性化，神経伝達物質の放出，フリーラジカルの形成，カルシウムイオンのneuron内への流入，髄内血流循環障害等とに分類される．現在，可逆的な二次的損傷における病態解明，可逆的な損傷の進展抑制を目的として多くの実験的研究がなされている[1-7]．

二次的損傷のなかでも，炎症反応(inflammatory response)が注目されている[8]．その概要は，損傷部位に集積する細胞（macrophage，neutrophil，lymphocyte等），及び損傷部位の残存細胞（ependymal cell，microglia，astrocyte等）から放出される種々のサイトカインによる一連の反応である[8]．炎症反応の脊髄損傷に及ぼす影響として，マクロファージによる損傷変性物の除去等，生体防御の為のプラスの作用がある一方で，TNF-αなどの炎症性サイトカインの放出，活性酸素，eicosanoidによる組織損傷の増悪等のマイナスの作用があり，損傷の修復にとって功罪両面の作用を合わせ持っていると考えられ，薬物治療の面等からもその本態の解明は必須である．

MIF (macrophage migration inhibitory factor)はリンパ球，及びマクロファージから放出される炎症性サイトカインとして古くから知られており，文字通りマクロファージを炎症部位に集める免疫機能を有すると考えられてきた[9-11]．最近，MIFがリンパ球のみならず，脳[12-14]，心臓[14]，腎臓[14]，角膜[15]，皮膚上皮[16]，子宮，卵巣[17]骨芽細胞など広範囲の組織において発現する事が示されている．また，胎生早期のchickenの眼球レンズにおいてもMIFの発現が認められ，MIFの細胞分化，増殖との関連が示唆されている[18]．MIFの機能に

ついては，glucocorticoidの刺激によりMIFが誘導されることから，MIFが組織損傷修復や，生体のhomeostasisの維持に関与することが示されている[19]．このことは，現在の脊髄損傷における薬物治療の主体がステロイドであることを考えあわせると非常に興味深い[20,21]．また，MIF刺激によりTNF-αが誘導される現象も示されており[22]，MIFが炎症性TNF-α，IL-1等のいわゆるalarm cytokine[23]などの発現を誘導することが示唆されている．一方，下垂体より放出されるMIFがエンドトキシンショックの増悪因子であるという結果も示され[24-26]，MIFが炎症反応において極めて重要な役割を果たしていることが示唆される．しかしながら，脊髄におけるMIFの存在は，未だ証明されていない．

本研究では，ラット脊髄におけるMIFの発現並びに実験脊髄損傷における動態について検討した．また，in vitroで培養細胞を用いることにより，MIFの神経系細胞に及ぼす機能を併せて検討した．

方　　法

1. 対象及び脊髄損傷モデルの作成

体重300±20gの雌のWistar ratを用いた．5% isoflurane導入麻酔後，stereoラット固定装置を用いて，ratを腹臥位に固定し，2% isofluraneにて持続吸入麻酔を施行した．保温マットを敷き，直腸温モニタリングにて体温を37±0.5 ℃に維持した．後正中切開にて第6頚椎より第2胸椎に至る椎弓を露出し，顕微鏡下に第7頚椎(C7)，第1胸椎(Th1)の椎弓を切除した．横突起除去後，剥離子を用いて腹側硬膜外腔を確保し，C7/Th1レベルにmodified aneurysmal clip[27]を挿入し，急速に閉じることにより，硬膜外 hit & comp-

ression injuryを作成した．clip圧は56g，clip時間は1分間とした．均一な損傷を作成するために，clipのblade内面にマーキングを施し，挿入深度を一定に保つようにした．脊髄損傷後，急性期における検討を加えるために，椎弓切除，硬膜外結合組織剥離のみのcontrol群，損傷後１時間，３時間，６時間，24時間 (ノーザン分析は12時間後を追加) を設定した．(本実験プロトコールは北海道大学医学部の動物実験規約に沿ったものである．)

2. 免疫組織染色

Isoflurane吸入深麻酔下に，開胸した後に右心耳を切開し，左心室より100mlの生理食塩水灌流後，4%パラホルムアルデヒド・0.25Mリン酸緩衝液(pH7.4)を体重量灌流した．脊髄を採取し，同灌流固定液で4℃，14～16時間，後固定した．30%蔗糖/PBS溶液で洗浄後，OCT compound中に包埋し，液体窒素で凍結させた．10μmの切片をPLL (poly-L-lysine) コートしたスライドグラスに載せ，室温で風乾した．5%正常ヤギ血清/PBS溶液で１時間ブロッキングの後，ウサギ抗ラットMIF抗体（500倍希釈）と４℃で14～16時間反応させた．PBSで３回洗浄後．FITC標識ヤギ抗ウサギIgG二次抗体と室温遮光下で１時間反応させ，封入した．免疫組織学的検討には共焦点レーザー顕微鏡 (BioRad, MRC-1024) を用いた．

3. ノーザン分析

損傷部位を中心とする1cmの脊髄（約100mg）《controlは同じ部位を採取》にISOGEN (ニッポンジーン）を加え，ホモジネイションした後に、添付のプロトコールに沿い総RNAを抽出した．TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)に溶解後，分光光度計 (DU7500, BECKMAN)を用いてRNA濃度を算出した。

各グループの総RNA（15 μg）を1% agarose/formaldehyde gelを用いて電気泳動した後に，ナイロンメンブランフィルター (NYTRAN, Schleider & Schnell)にtransferした．Hybridization液 (62.5% foramide, 0.94M NaCl, 1.25 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 25mM Tris-HCl (pH 7.5) 3mM EDTA (etylenediamine tetraacetic acid), 0.625 x Denhardt`s solution)で42℃4時間prehybridizationを行った．続いて，Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa) を用いて作製した[α -^{32}P]dCTP標識 MIF cDNA probe, 10% dextran sulfate,サケ精子DNAを加えたhybridization液中で，42℃　24時間反応させた．2 x SSC (standard saline citrate) で室温5分間 2 回, さらに0.1% SDSを含む0.2 x SSC溶液で65℃,15分 2回の洗浄後，2 x SSCで室温20分間洗浄し，オートラジオグラフィーを行った．

4. 脳脊髄液中のMIF濃度測定

脊髄損傷後の脳脊髄液中のMIF濃度の変動を検討する目的で，富樫ら[28,29]による方法を用いて脳脊髄液を採取してMIF濃度を測定した．Isoflurane吸入麻酔下に環椎後頭膜正中に小切開を加えて，先端を拡げた長さ25mmのポリエチレンチューブ（ SP45, O.D.; 0.96mm, 夏目製作所 ）をくも膜下腔に挿入，

周囲筋群と固定し，24時間経過観察し，麻酔，手術侵襲の影響を取り除いた上で実験に使用した．予め設定した時間に 2% isoflurane吸入麻酔下に側臥位で脳脊髄液を採取した．１回の採取量は50μlとした．凍結保存した脳脊髄液中のMIF濃度をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法を用いて測定した．更に，MIFとの関連で注目されているTNF-αの脳脊髄液中の濃度を同時に測定した．

5. 細胞増殖試験

MIFの神経細胞に及ぼす機能を，in vitroで検討した．神経細胞のモデルとして広く用いられているPC12細胞（褐色細胞腫），及び膠芽腫(glioblastoma)の培養細胞であるLN444を用いた．まず，ウエスタン分析にてPC12及びLN444培養細胞にMIFが存在することを確認した．次に，培養細胞中に，２種の抗MIFモノクローナル抗体である2SC, 9HC（LN444培養細胞に対しては2SCのみ）を添加し，MTS試験を用いて細胞増殖に及ぼす抗MIFモノクローナル抗体の影響を調べた．測定キットにはCell Titer 96™ AQueous Assay (Promega)を使用した．

結　　果

1. 免疫組織染色

はじめに，非特異的IgGを反応させ，後のFITC標識部位が非特異的染色(non-specific stain）ではないことを確認した．(Fig.1)

正常controlの白質表層近傍において，FITC標識のMIFの存在が認められた(Fig.2-a,b,c)．一方，灰白質では明らかなMIFの存在は認められなかった(Fig.2-d,e)．

脊髄損傷を加えた後の経時的変化をみると，前索，後索において損傷後1，3，6時間で，非損傷部に白質表層に認められたMIFの著明な減少がみられた(Fig.3-b,c,d,4-b,c,d)．

損傷後24時間では，controlとは形態を異にするが，再びMIFの発現が白質において認められた(Fig.3-e,4-e)．

以上の変化は白質の前索，後索において顕著であり，側索においてはその変化の程度が軽度であった．(Fig.5)

灰白質では，損傷を加えた後もMIFの発現は認められなかった。(Fig.6)

2. ノーザン分析

正常controlにおいてMIFmRNAの発現が認められた．脊髄損傷後1時間,3時間，6時間の超急性期において正常controlと比較してMIFmRNAの発現の増加が認められたが，12時間後，24時間後では非損傷時の発現レベルまで減少する傾向がみられた．(Fig.7)

3. 脳脊髄液中のMIF濃度

Control群に比較して，損傷後1時間後で有意なMIF濃度の上昇が認められた．その後もcontrol群に比較すると上昇する傾向が認められた．(Fig.8)

一方，脳脊髄液中のTNF-αの濃度は損傷後3時間で上昇し，6時間で一旦減少し，24時間後に再び著明な上昇を示した．(Fig.9)

4. 細胞増殖試験

まずウエスタン分析を用いてPC12，及びLN444培養細胞にMIFの存在が確認された．(Fig.10,11)

引き続き行われた細胞増殖試験ではcontrol IgMを投与した群を100%とすると，9HC，2SCの抗MIFモノクローナル抗体を投与した群では，PC12及びLN444培養細胞何れにおいても抗体の濃度依存性に細胞増殖が抑制された．(Fig.12.13)

考　　察

脊髄損傷急性期において二次的損傷の進展抑制は臨床上の大きな課題となっている[1-5]．二次的損傷の一つである炎症反応 (inflammatory process)と総称される反応には，多くの液性因子（サイトカイン，成長因子等）が関与することが報告されている[8]．

MIFは，最近，Tリンパ球のみならず脳，心臓，腎臓，角膜等広範に存在することが知られてきている[12-17]．また，その機能においては，細胞増殖，分化，損傷修復などに関与することが報告されている[18]．

本実験で，免疫組織染色，ノーザン分析の結果から，正常脊髄におけるMIF蛋白質の存在と，MIFmRNAの発現が示された．免疫組織染色では，正常脊髄の白質表層に多く存在し，灰白質には殆ど存在しないという結果が得られた．脊髄損傷後，1，3，6時間後に白質にみられたMIF染色が著明に減弱し，24時間後に形態が膨化して変化しているものの，再びその出現が認められた．損傷後のMIFの発現部位として白質の内，前索，後索で著明で，側索でその変化の程度が軽いのはclip injuryにおける損傷の特異性（脊髄の前後

を挟みつける損傷）を反映しているものと考えられた．何れにせよ，脊髄損傷急性期で得られたMIF動態の結果は，松田ら[30]によるラット角膜穿通損傷モデルにおいて，正常角膜基底上皮細胞に認められたMIFが損傷後3時間で減弱し，6時間で再び発現を認めた結果とほぼ一致する．ノーザン分析で認められた損傷後1，3，6時間でのMIFmRNAの発現の増加は，刺激（侵襲）によって細胞外にMIFが放出された為，細胞内でのMIFの再合成が促進されたものと考えられる．Bernhagenら[24]は，LPS （lipopolysaccharide)刺激による培養下垂体細胞中のMIFの免疫組織染色の減弱とMIFmRNAの発現の増加を確認している．以上のことから，MIFは，無刺激の状態では細胞内に貯蔵されているが，物理的侵襲やエンドトキシン刺激等により細胞外へ放出され，再合成される動態をとるものと考えられる．

放出されたMIFの作用の場として，脳脊髄液に着目し，経時的に脳脊髄液中のMIF濃度を測定したところ，損傷後1時間で明らかに上昇し，その後も持続して高値の傾向を示した．Nishiboriら[13]は，ウシの脳室上衣細胞にMIFの発現を報告しており，脳脊髄液を介しての侵襲に対するMIFの役割を示唆し，MIFが脳脊髄液中に放出されるのか否かが，MIF機能解明の上で重要であると考察している．MIFが局所病変にとどまらず視床下部-下垂体系レベルで機能し，homeostasisの維持にホルモンとして機能する可能性が示唆されている[19]ことを考えあわせると，本実験での脳脊髄液中のMIF濃度の損傷後早期の上昇は，局所損傷により白質表層に存在していたMIFが損傷軟膜を介して脳脊髄液中に放出されたことに加えて，更に全身への強い侵襲に対する反応としての視床下部-下垂体系を含む中枢神経系におけるMIFの放出を反映した結果と考えられる．　Endotoxin shockにおいて，少量のLP S刺激で誘導されたMIFが TNF-α，IL-1等他の炎症性サイトカインを刺激し炎症反応を進展させること，さらに抗MIF抗体投与により生存率の改善が得られることが報告されている[25]．このことは，炎症性サイトカインネットワークにおいて

MIFがTNF-α，IL-1の上位に位置し，炎症を惹起するproinflammatory factorとして働く可能性を示唆している．また，Calandraら[19]は glucocorticoid投与時に，glucocorticoidの抗炎症作用によってTNF-α，IL-1等の産生が抑制された状態で，MIFの産生が促進されることを報告している．彼らはこの現象をMIFがglucocorticoidの過剰な抗炎症作用を制御することにより，炎症反応を調節していると考察している[19]．ステロイドによる治療で，至適濃度を超えた大量投与では損傷回復効果がむしろ減弱することが報告されている[3,31,32]．この現象は高濃度のステロイドで刺激されたMIFが炎症反応を惹起し，MIFがステロイドの抗炎症作用に拮抗することが関与するのではないかと推察される．脊髄損傷に対する薬物治療の実験では，Guthらは，cytokineの分泌を増強するLPS, cyclooxygenase inhibitorであるindomethacin, 及び内因性ステロイドの起源であり抗炎症作用を有するpregnenoloneの3剤併用でラット脊髄損傷後の回復の促進が認められ，組織学的にも損傷が軽度であったと報告している[8,33]．この併用療法の薬理作用にはLPS, glucocorticoid刺激により誘導されるMIFが深く関与していると考えられる．

また，MIFの神経細胞に及ぼす機能を検討する上で行ったMTS試験で，抗MIFモノクローナル抗体投与により細胞増殖が濃度依存性に抑制されることから，MIFは神経細胞増殖因子としての機能を有すると考えられる．最近，anti-senseを導入した細胞の増殖が抑制されることを確認している（投稿準備中）．このことは，MIFが組織損傷後の修復に細胞増殖因子として関与する可能性を強く示唆している．

MIFの臨床応用という観点からみると，今後は抗MIF抗体の投与等によって，過度な炎症反応を抑制し，且つMIFの細胞修復，細胞増殖の機能を促進する生体内，及び局所のMIFの至適濃度を調節，維持することにより，特に二次的損傷の進展抑制の面から脊髄損傷の治療に大きく貢献するものと考え

られる.

結　　語

1. ラット脊髄白質におけるMIF (macrophage migration inhibitory factor) の発現の証明，並びに脊髄損傷後のMIFの動態について検討した.
2. 正常脊髄白質表層においてMIF蛋白の発現を認めた.
3. MIFは脊髄損傷後，早期に細胞外に放出され，損傷24時間後に再び合成されるという動態を示した.
4. MIFは神経系細胞に対して増殖に関与することが示唆された.
5. MIFは脊髄損傷，特に二次的損傷において極めて重要な役割を果たすと考えられた.

謝　　辞

稿を終えるに当たり，終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました北海道大学医学部脳神経外科学講座　阿部　弘教授に深甚なる謝意を表します．懇切に直接に実験の御指導を賜りました北海道大学医学部中央研究部　西平順講師に心より感謝申し上げます．本実験を御指導，御助言頂きました北海道大学医学部脳神経外科学講座　岩崎喜信助教授，飛騨一利助手に深く感謝いたします．種々の御助言と御指導を頂きました北海道大学医学部眼科学講座大学院生　松田　彰医師に心より感謝いたします．実験の施行にあたり，終始御助言，御協力いただきました北海道大学医学部中央研究部　栗山武志氏，藤長真美氏，刀根そま子氏に厚く御礼申し上げます.

文　　献

(1) Hall ED, Wolf DL (1986) : The pathophysiological response to spinal cord injury. J. Neurosurg. **64** : 951-961

(2) Young W (1988) : Secondary CNS injury. J. Neurotrauma **5** : 219-221

(3) Hall ED (1991) : Inhibition of Lipid Peroxidation in CNS Trauma. J. Neurotrauma **8** : S31-S41

(4) Tator CH, Fehlings MG (1991) : Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J. Neurosurg. **75** : 15-26

(5) Faden AI (1993) : Experimental neurobiology of central nervous system trauma. [Review] Critical Review in Neurobiol. **7** : 175-86

(6) Lawrence I, Leslie P (1995) : Secondary Mechanisms of Spinal Cord Injury. Surg. Neurol. **43** : 484-485

(7) Harat M, Radek A, Kochanowski J (1996) : [The physiopathology of acute spinal cord injury and a hope for a successful treatment] [Review] Neurologia Neurochirurgia Polska. **30** : 123-135

(8) Guth L, Zhang Z, Roberts (1994) : Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes after spinal cord injury Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 12308-12312

(9) Bloom BR, Bennett B (1966) : Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity . Science **153** : 80-82

(10) David JR (1966) : Delayed hypersensitivity in vitro : Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **56** : 72-77

(11) Weiser WY, Pozzi LAM, David JR (1991) : Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill Leishmania

donovani. J. Immunol. **147** : 2006-2011

(12) Galat A, Riviere S, Bouet F (1993) : Purification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) from bovine cytosol. FEBS Lett. **319** : 233-236

(13) Nishibori M, Nakaya N, Tahara A, Kawabata M, Mori S, Saeki K (1996) : Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma astrocytes and neurons in the bovine brain. Neurosci. Lett. **213** : 193-196

(14) Sakai M, Nishihira J, Hibiya Y, Koyama Y, Nishi S (1994) : Glutathione Binding Rat Liver 13k Protein is the Homologue of theMacrophage Migration Inhibitory Factor Biochem. Mol. Biol. Int. **33** : 439-446

(15) Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. (1996) : Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. FEBS Lett. **385** : 225-228

(16) Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W (1996) : Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immuno-histochemical localization. FEBS Lett. **381** : 199-202

(17) Suzuki H, Kanagawa H, Nishihira J (1996) : Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. Immunol. Lett. **51** : 141-147

(18) Wistow GJ, Shaughnessy MP, Lee DC, Hodin J, Zelenka PS (1993) : A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eyelens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** : 1272-1275

(19) Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R (1995) : MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. Nature **377** : 68-70

(20) Hall ED (1993) : Neuroprotective actions of glucocorticoid and nongluco-corticoid steroids in acute neuronal injury [Review] Cellular & Molecular Neurobiol. **13 :** 415-432

(21) 今村博幸 (1994) : ラット脊髄損傷モデルにおけるメチルプレドニゾロン大量療法の効果に関する実験的検討．北海道医誌 **69** : 236-248

(22) Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. (1994) : The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J. Exp. Med. **179** :1895-1902

(23) Baumann H, Gauldie J (1994) : Acute phase response. Immunol. Today **15** : 74-80

(24) Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter KR, Cerami A, Bucala R (1993) : MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. Nature **365** : 756-759

(25) Bucala R (1994) : MIF, a Previously Unrecognized Pituitary Hormone and Macrophage Cytokine, Is a Pivotal Mediator in Endotoxic Shock Circulatory Shock **44** : 35-39

(26) Bernhagen J. Calandra T. Cerami A. Bucala R. (1994) : Macrophage migration inhibitory factor is a neuroendocrine mediator of endotoxaemia. [Review] Trends in Microbiol.**2** : 198-201

(27) Rivlin AS, Tator CH (1978) : Effect of Duration of Acute Spinal Cord Compression in a New Acute Cord Injury Model in the Rat. Surg. Neurol. **10** :39-43

(28) 富樫広子、斎藤秀哉 (1992)：ラット脳脊髄液を用いた中枢機能評価法とその病態生理学及び薬理学研究への応用．病態生理 **11** : 953-956

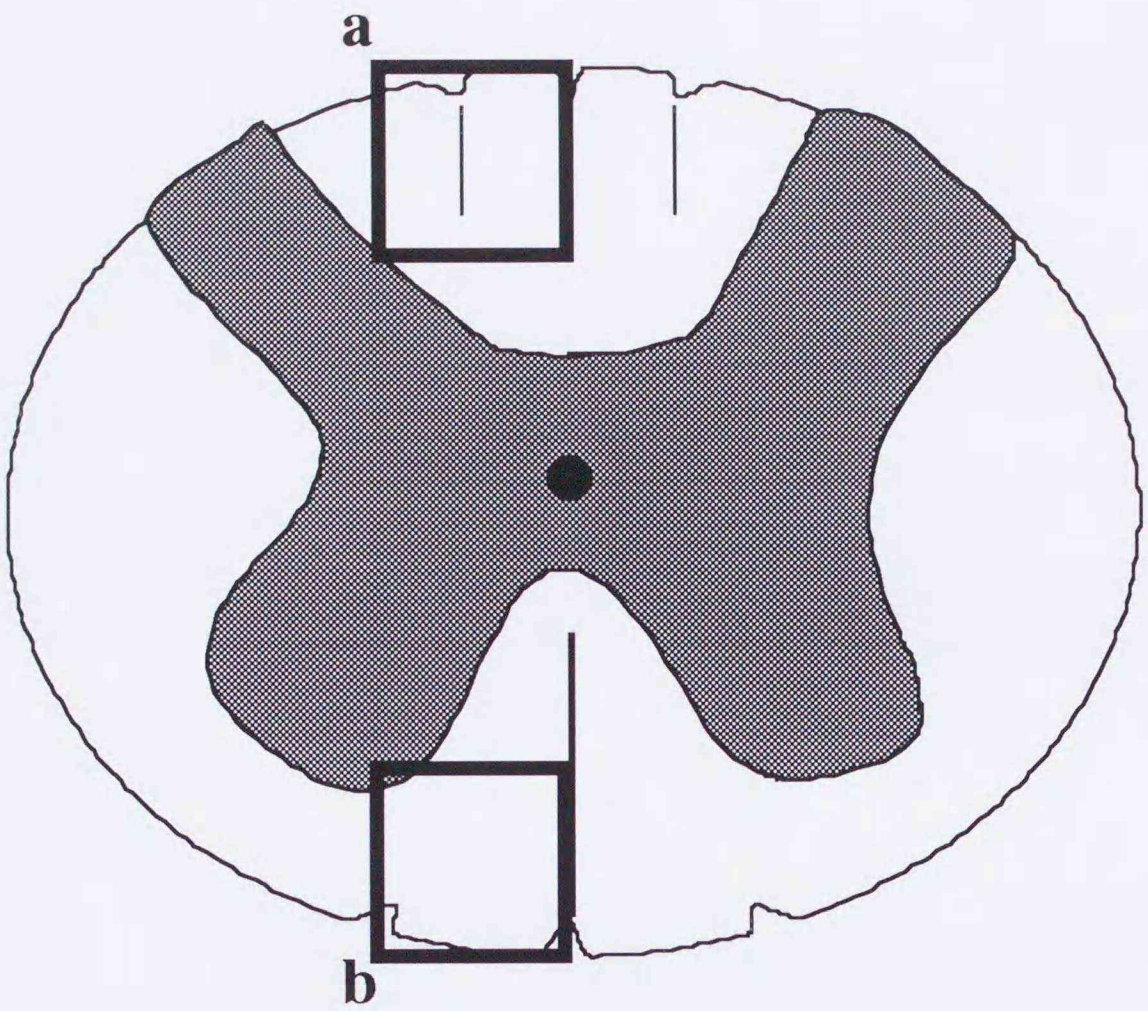
(29) 松本真知子，富樫広子，吉岡充弘，斎藤秀哉 (1991)：脳脊髄液中セロトニン濃度測定とその前臨床薬理への応用 Jpn., J. Clin. Pharmacol. Ther. **22** : 401-405

(30) Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J (1996) : Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rat Corneal Wound Healing. (Submitted)

(31) Hall ED, Braughler JM (1982) : Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury : A review and therapeutic rationale. Surg. Neurol. **18** : 320-327

(32) Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS (1994) : Modeling of Acute Spinal Cord Injury in the Rat : Neuroprotection and Enhanced Recovery with Methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. Exp. Neurol. **126** : 61-75

(33) Guth L, Zhang Z, DiProspero NA, Joubin K, Fitch MT (1994) : Spinal Cord Injury in the Rat : Treatment with Bacterial Lipopolysaccharide and indomethacin Enhances Cellular Repair and Locomotor Function Exp. Neurol. **126** : 76-87



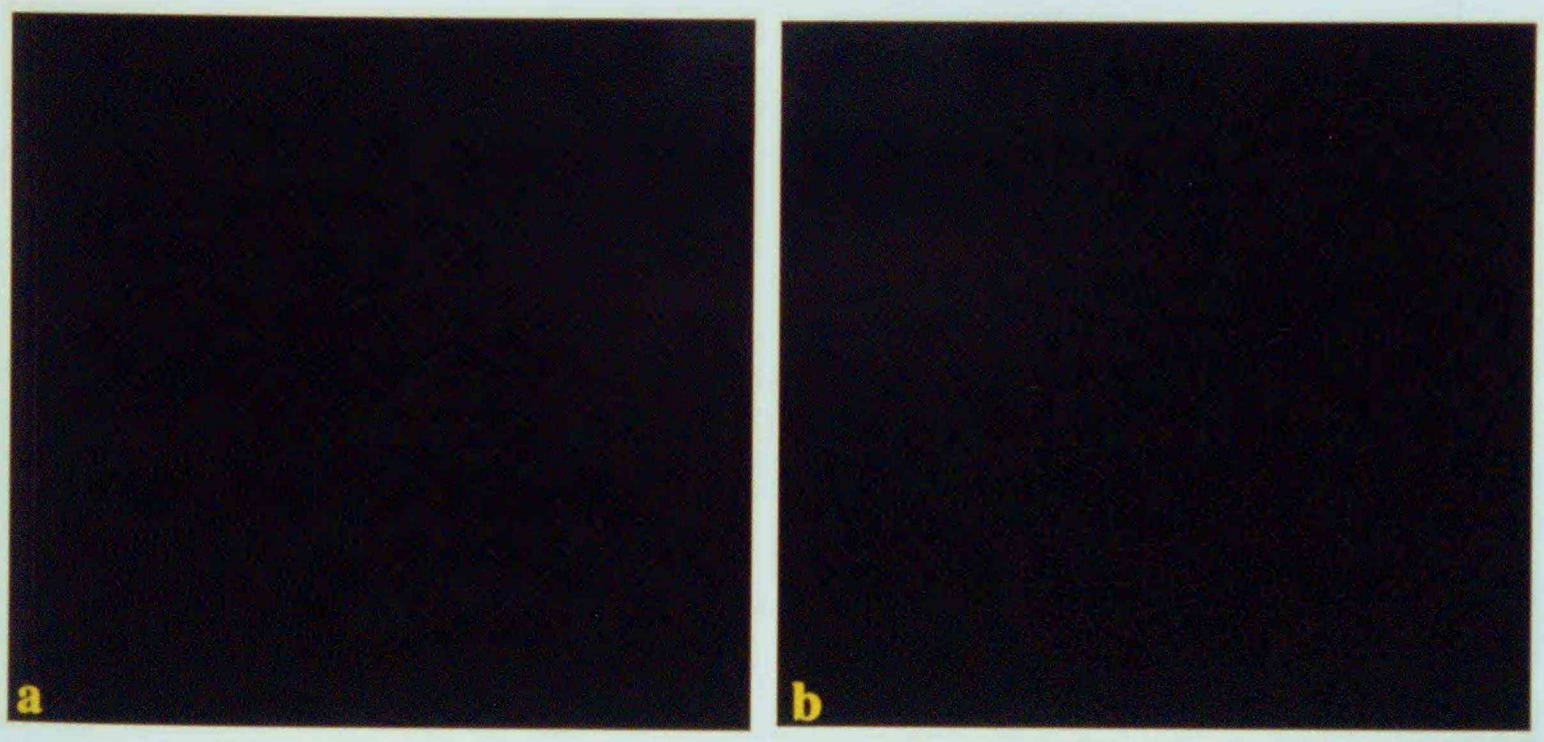
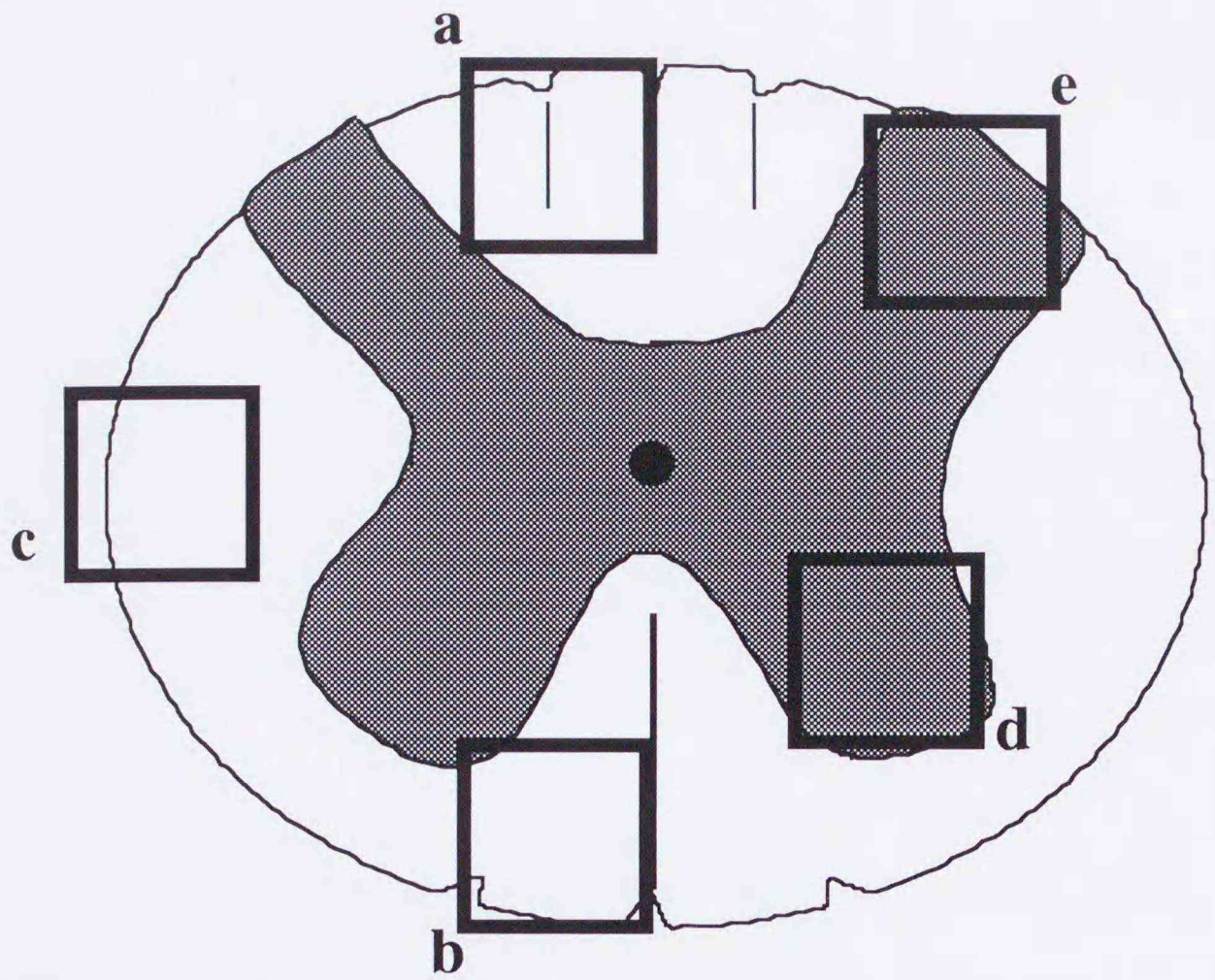


Fig.1 Immunohistochemistry. Schema shows the investigated region.(black frame)
a : posterior funiculus **b** : anterior funiculus (x 400) Nonspecific IgG reaction showed no positive staining. So nonspecific stain can be ignored



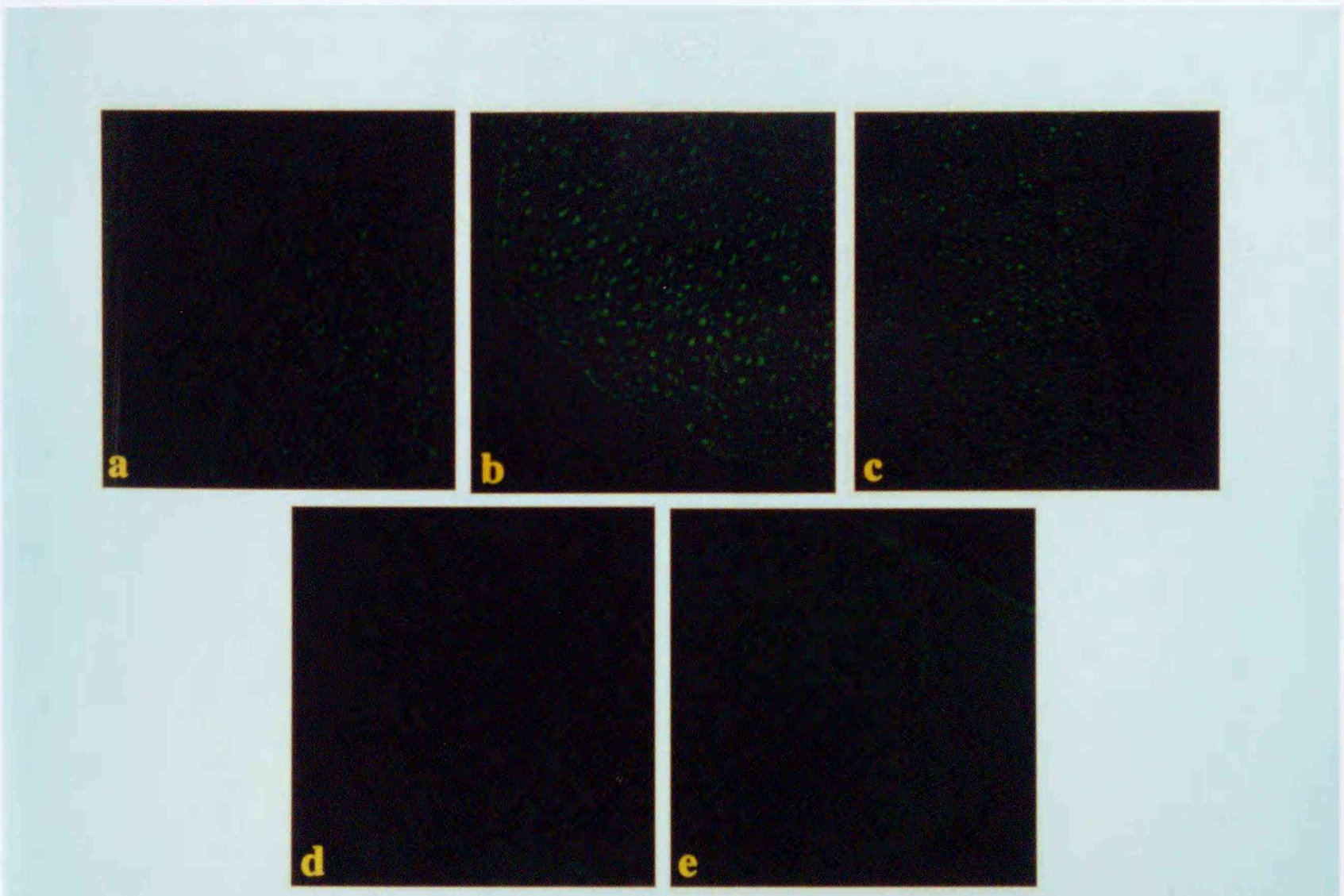
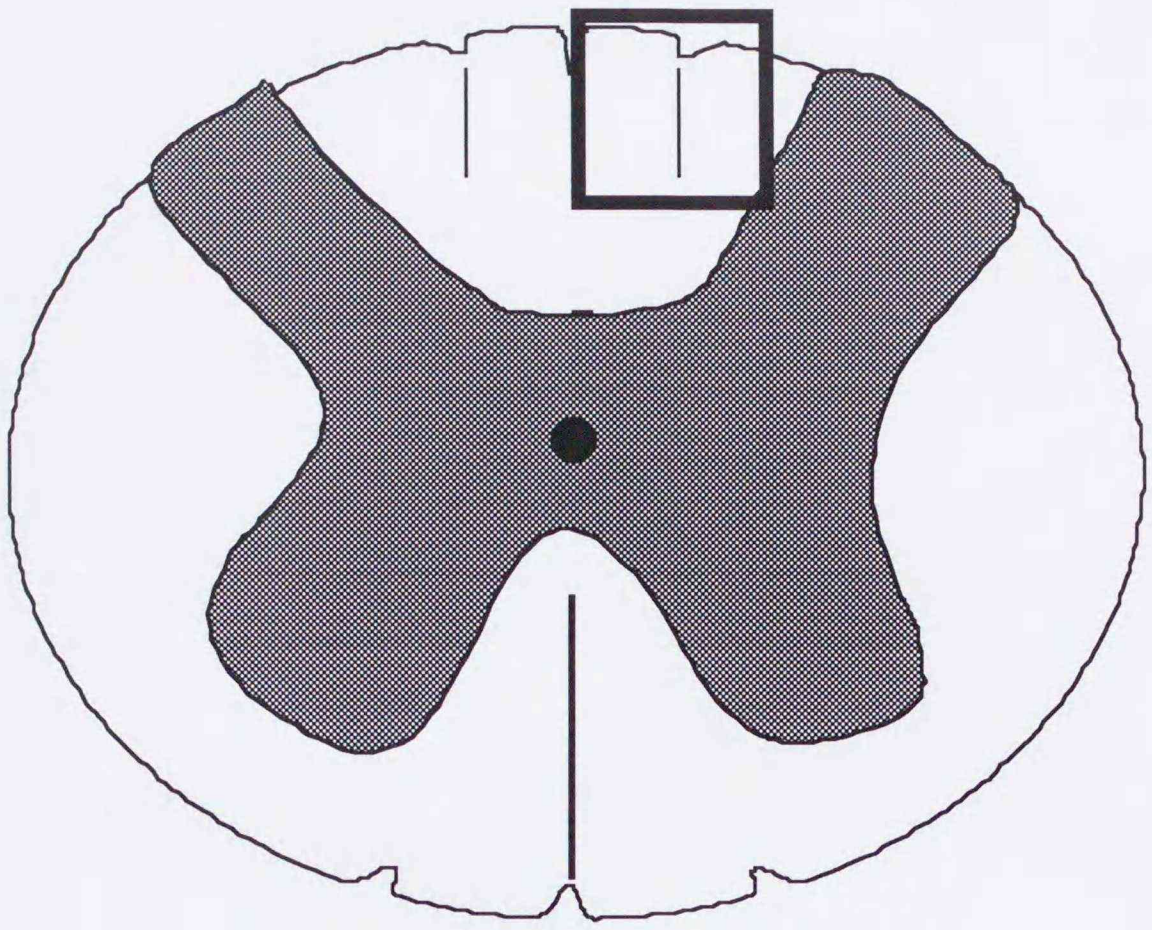


Fig.2 Immunohistochemistry of MIF. Normal control study. Schema shows the investigated region (black frame). **a** , posterior funiculus; **b** , anterior funiculus ; **c** , lateral funiculus; **d** , anterior column ; **e** , marginal zone (x 400)



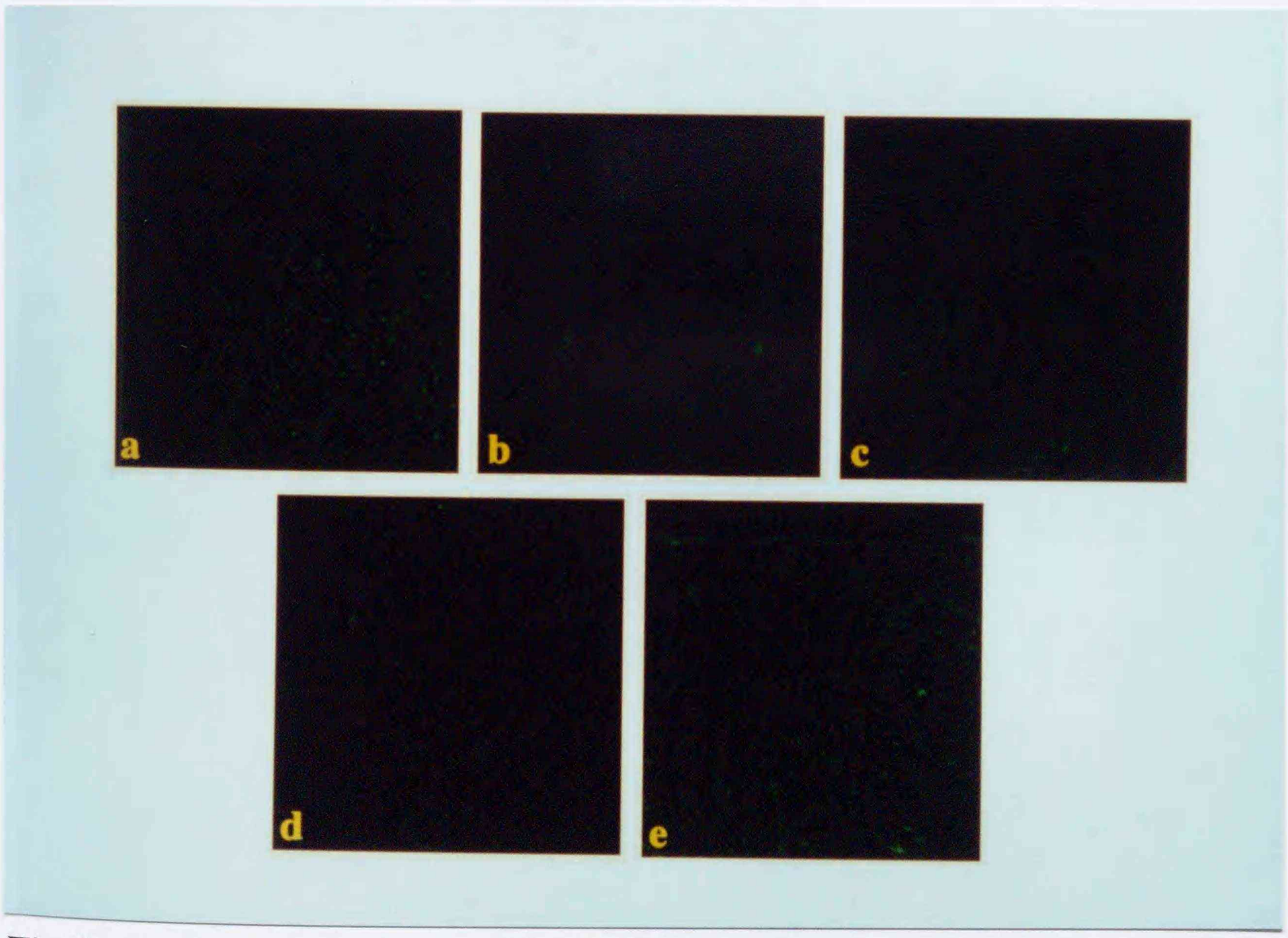
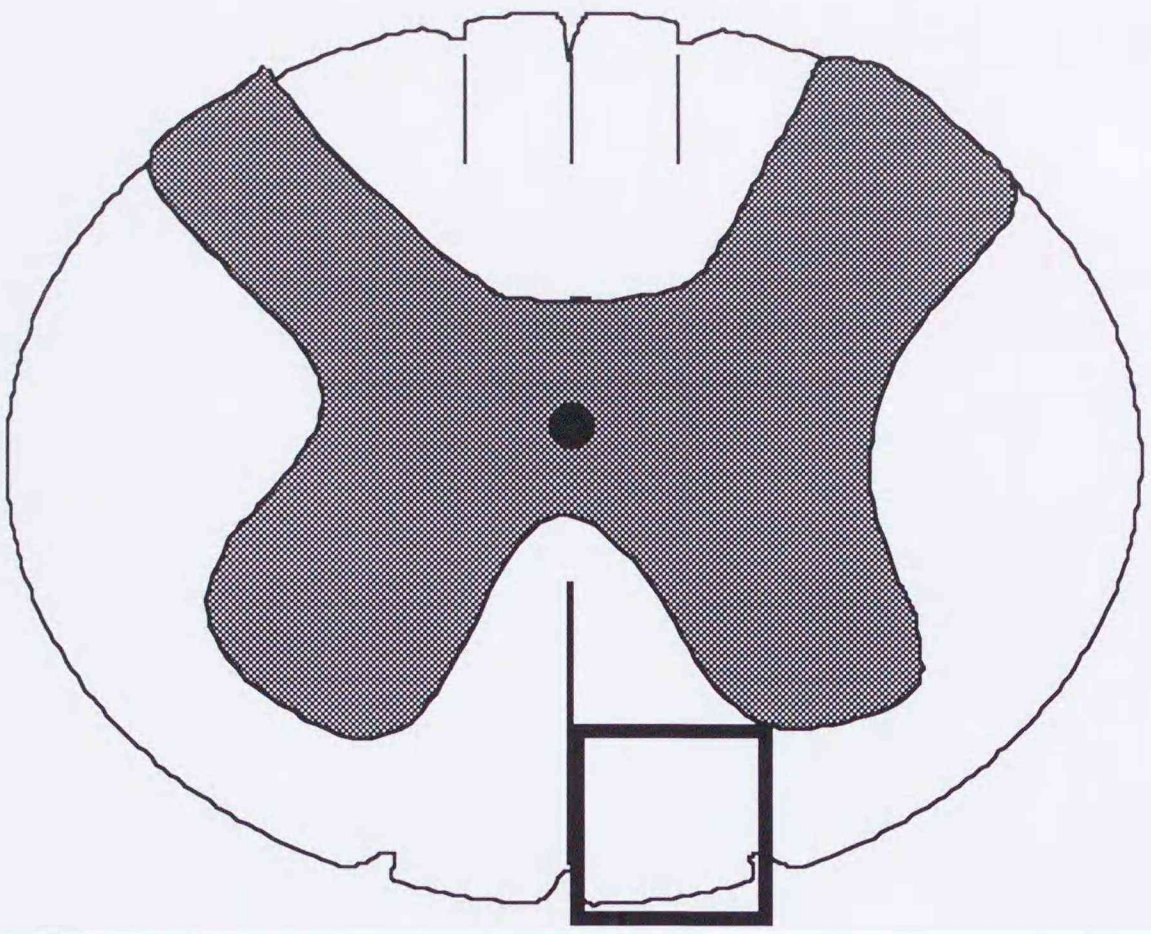


Fig.3 Immunohistochemistry of MIF. At the area of posterior funiculus (schema, black frame), the kinetics of MIF stain after spinal cord injury were demonstrated. **a** , Control (Non-traumatized); **b** , 1 hr after spinal cord injury. (SCI) ; **c** , 3 hr after SCI; **d** , 6 hr after SCI; **e** , 24 hr after SCI (x400)



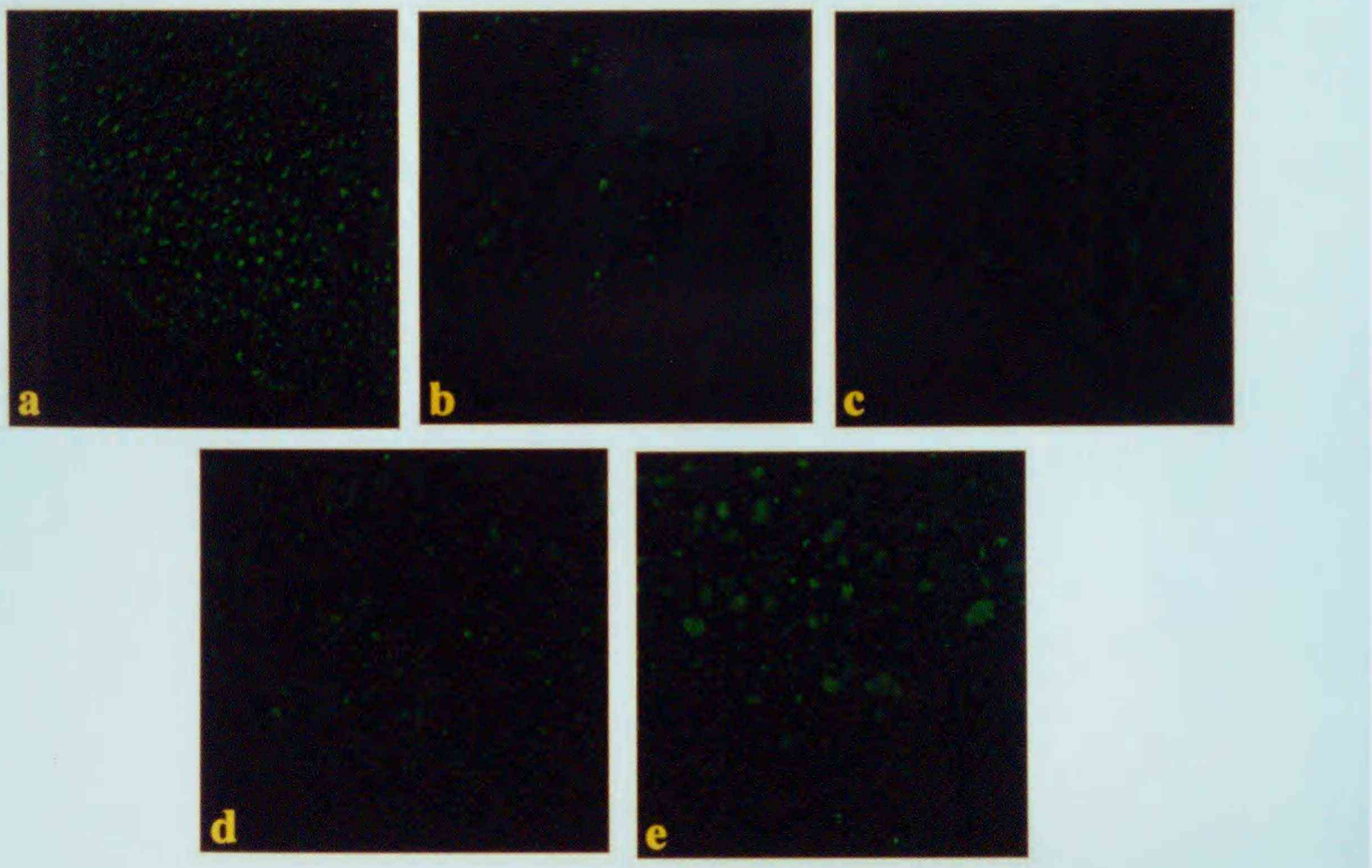
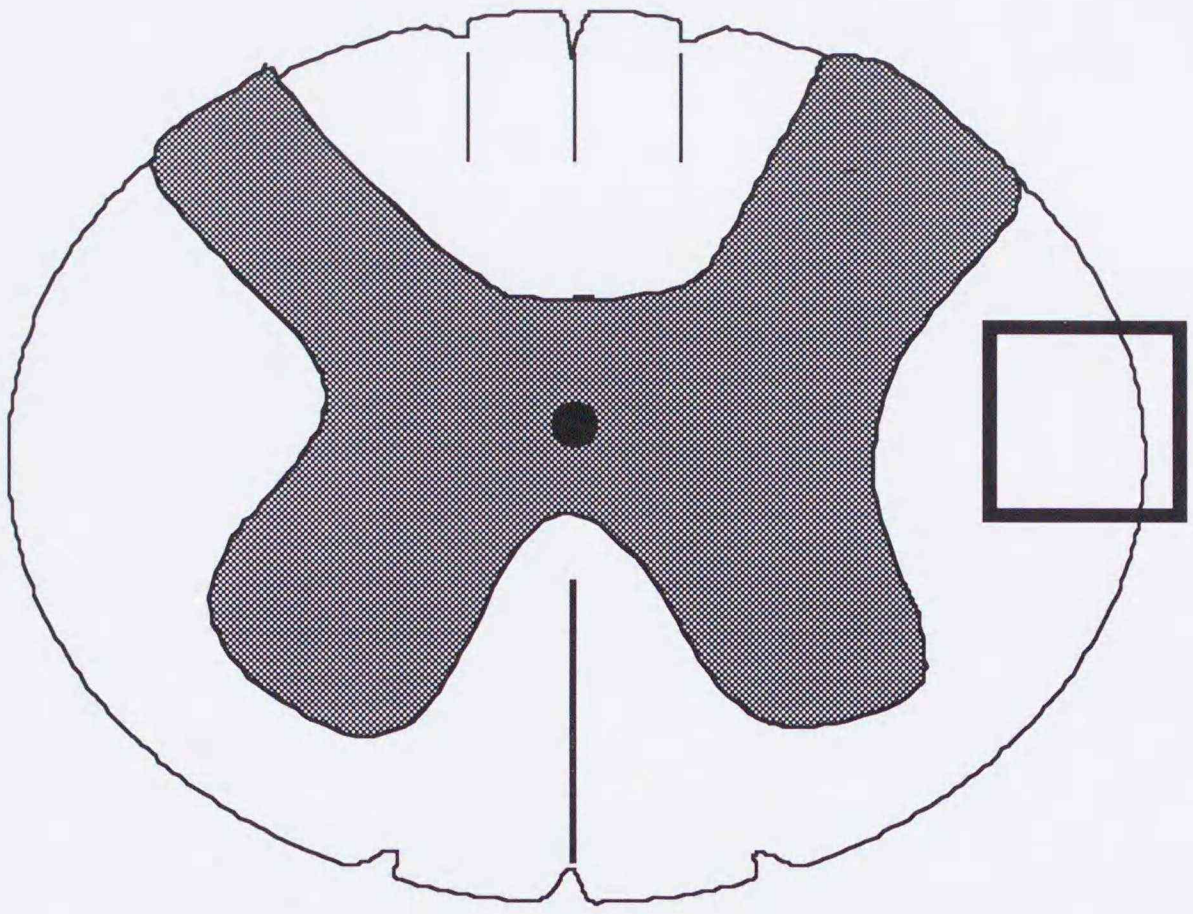


Fig.4 Immunohistochemistry of MIF. At the area of anterior funiculus (schema, black frame), the kinetics of MIF stain after spinal cord injury were demonstrated. **a** , Control (Non-traumatized); **b** , 1 hr after spinal cord injury (SCI) ; **c** , 3 hr after SCI; **d** , 6 hr after SCI; **e** , 24 hr after SCI (x 400)



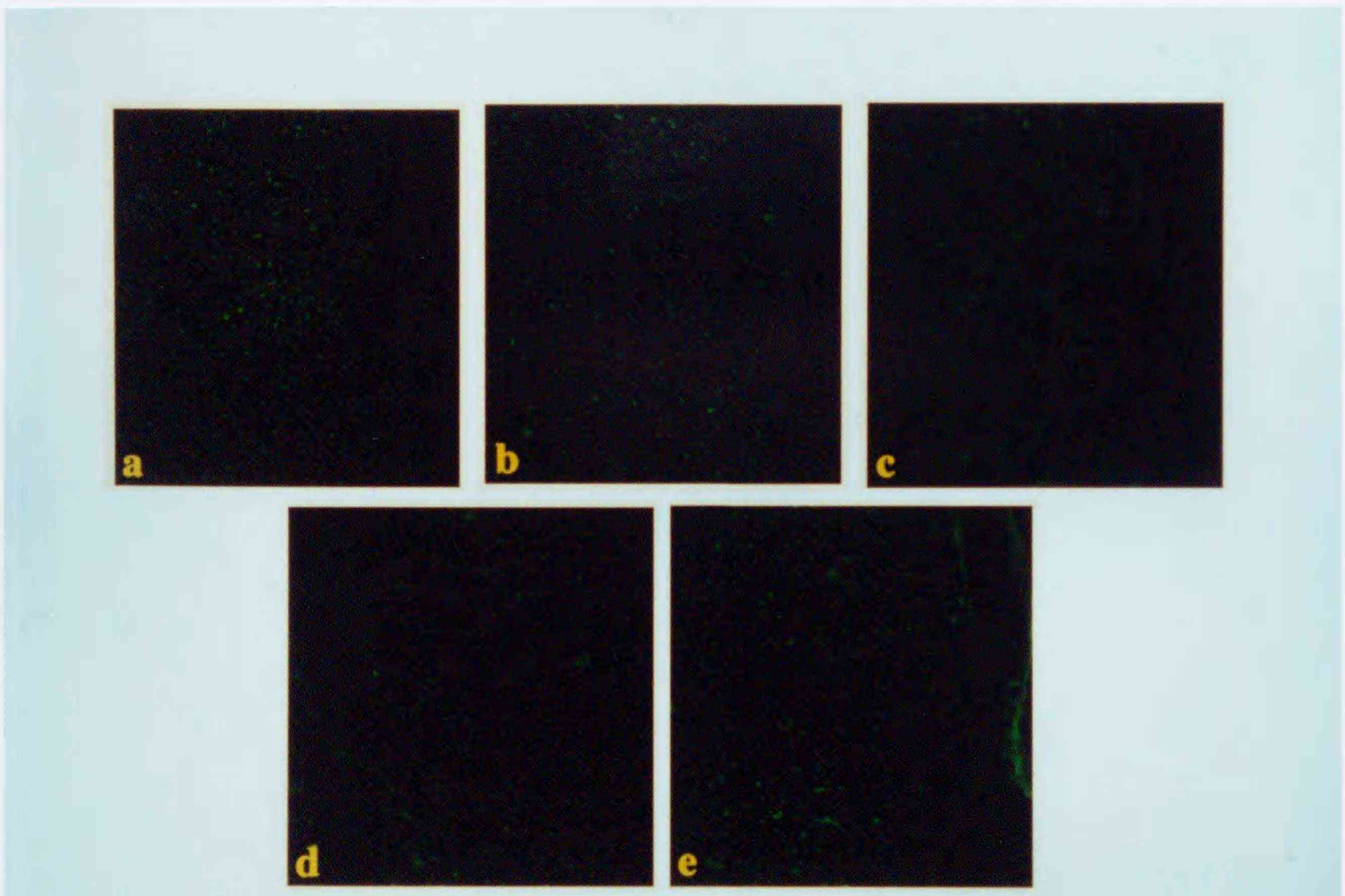
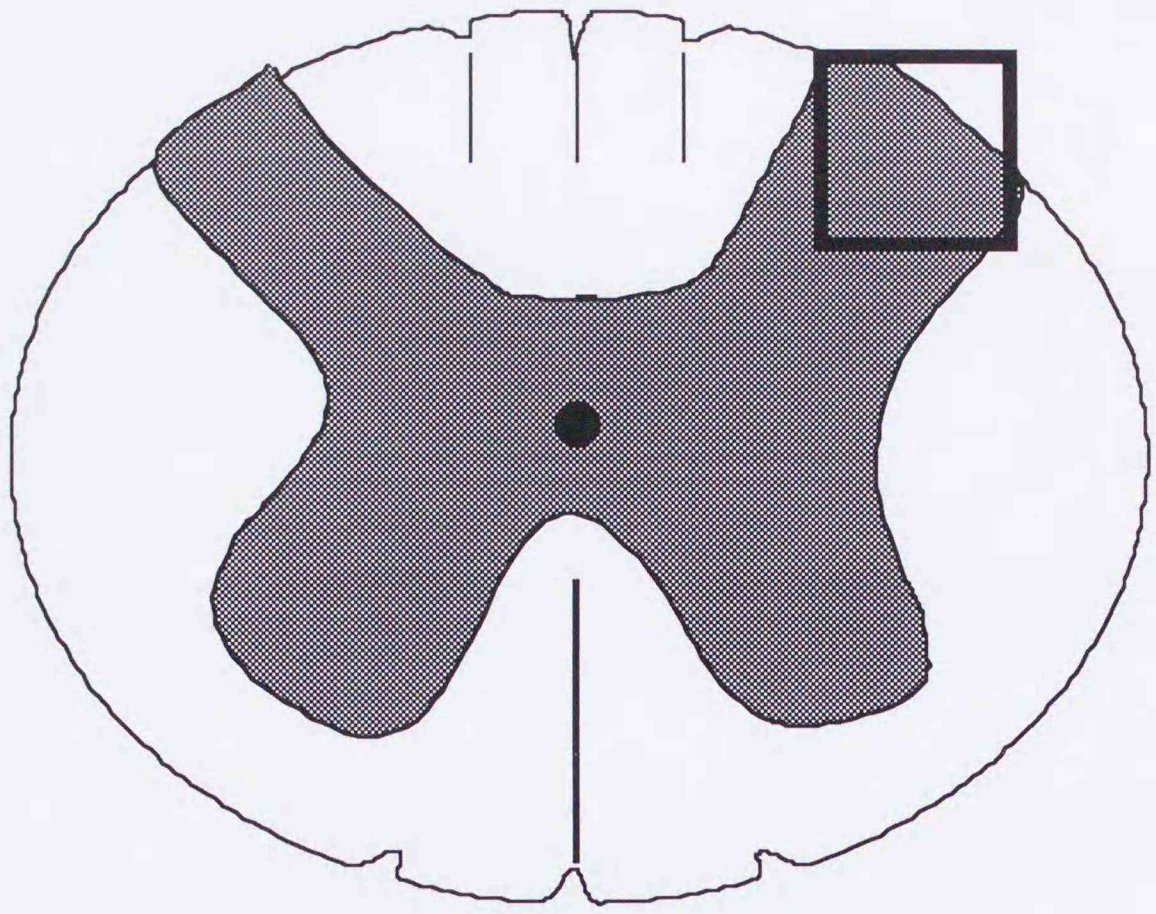


Fig.5 Immunohistochemistry of MIF. At the area of lateral funiculus (schema, black frame), the kinetics of MIF stain after spinal cord injury were demonstrated. **a** , Control (Non-traumatized); **b** , 1 hr after spinal cord injury (SCI) ; **c** , 3 hr after SCI; **d** , 6 hr after SCI; **e** , 24 hr after SCI (x 400)



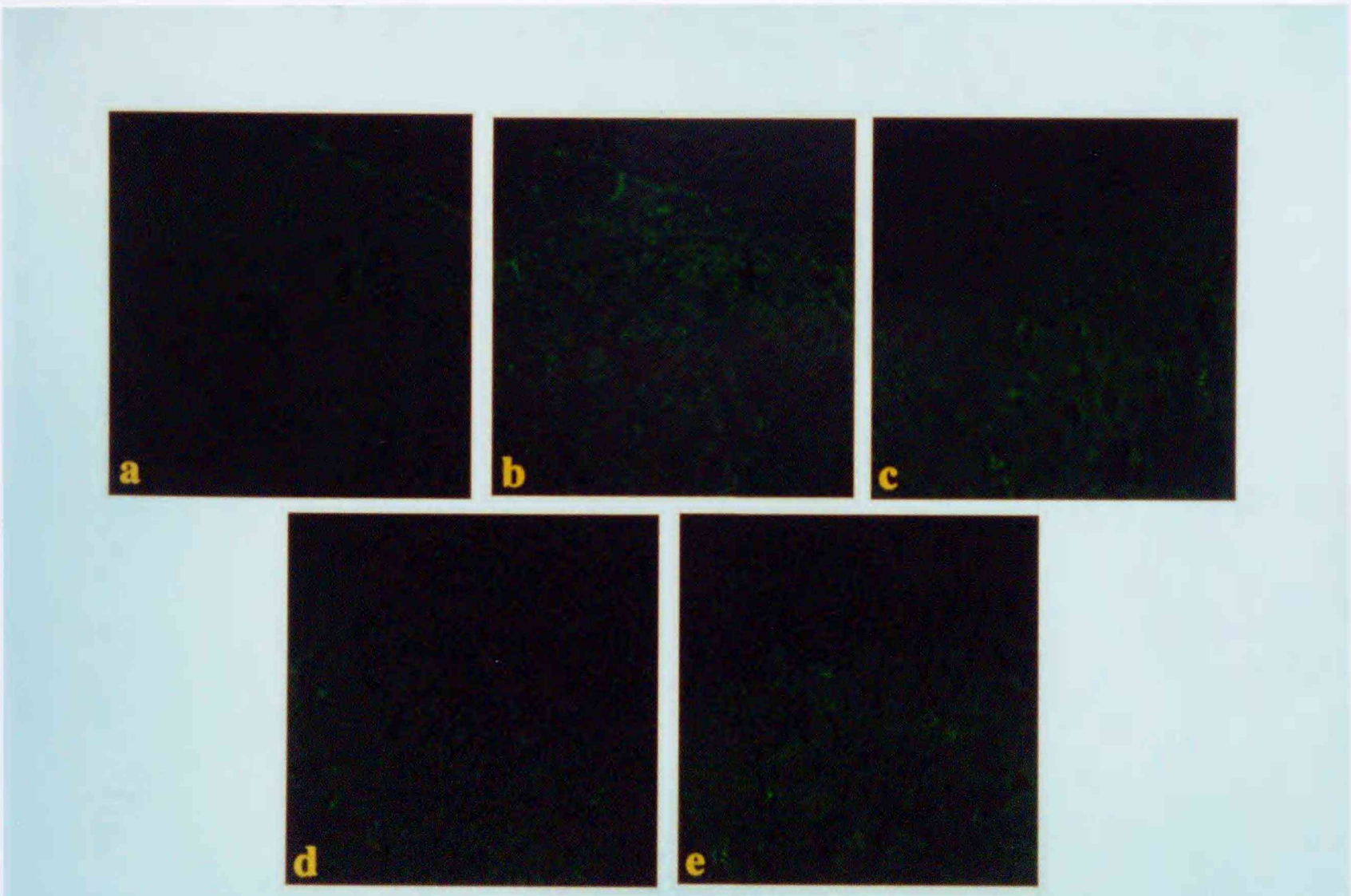


Fig.6 Immunohistochemistry of MIF. At the area of marginal zone (shema, black frame), the kinetics of MIF stain after spinal cord injury were demonstrated. **a** , Control (Non-traumatized); **b** , 1 hr after spinal cord injury (SCI) ; **c** , 3 hr after SCI; **d** , 6 hr after SCI; **e** , 24 hr after SCI (x 400)

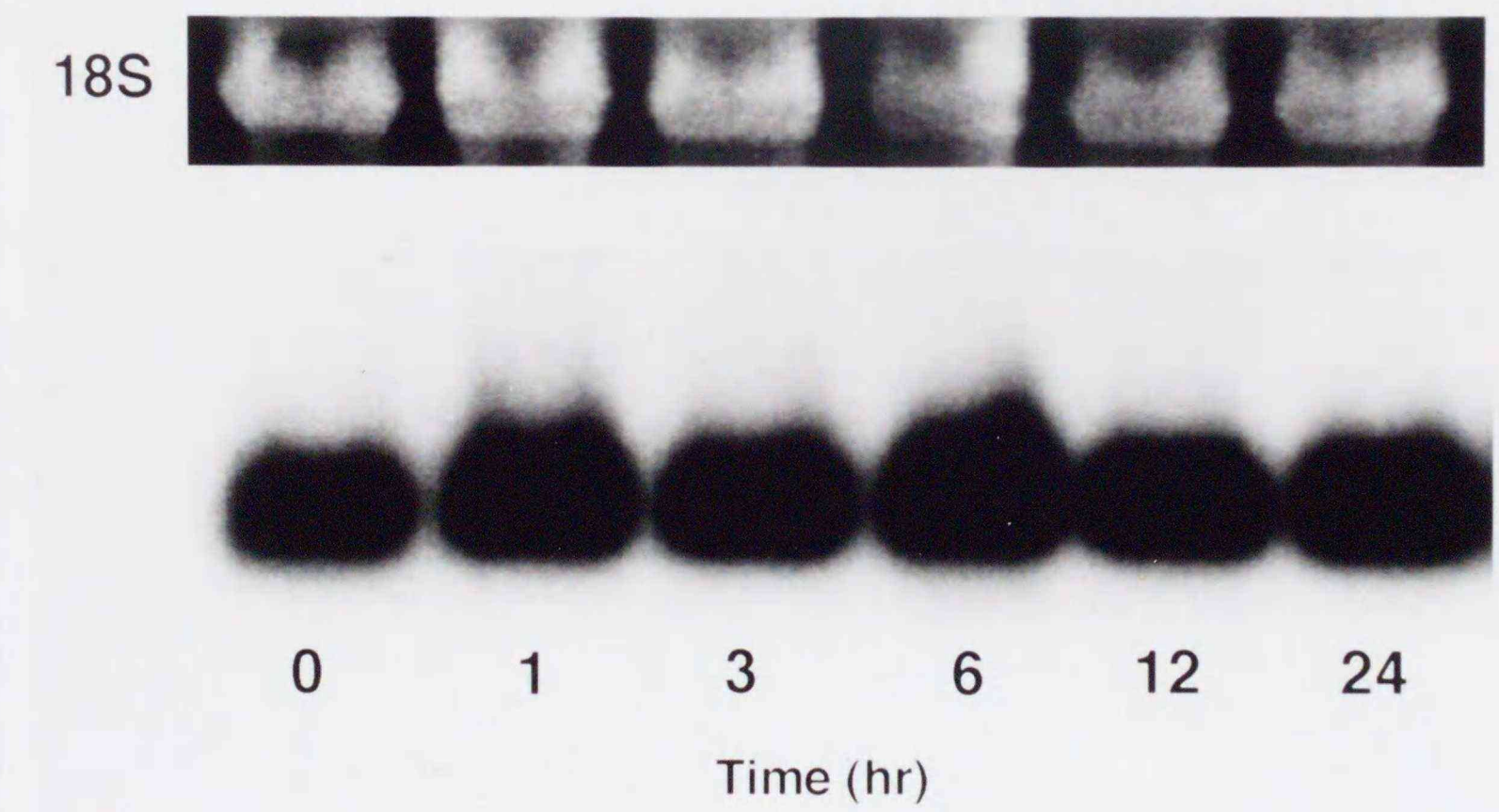


Fig.7 Expression of MIFmRNA on rat spinal cord injury by northern blot analysis. Total RNA was extracted from rat spinal cord, and radiolabeled. The left lane showed that of control (non-traumatized)

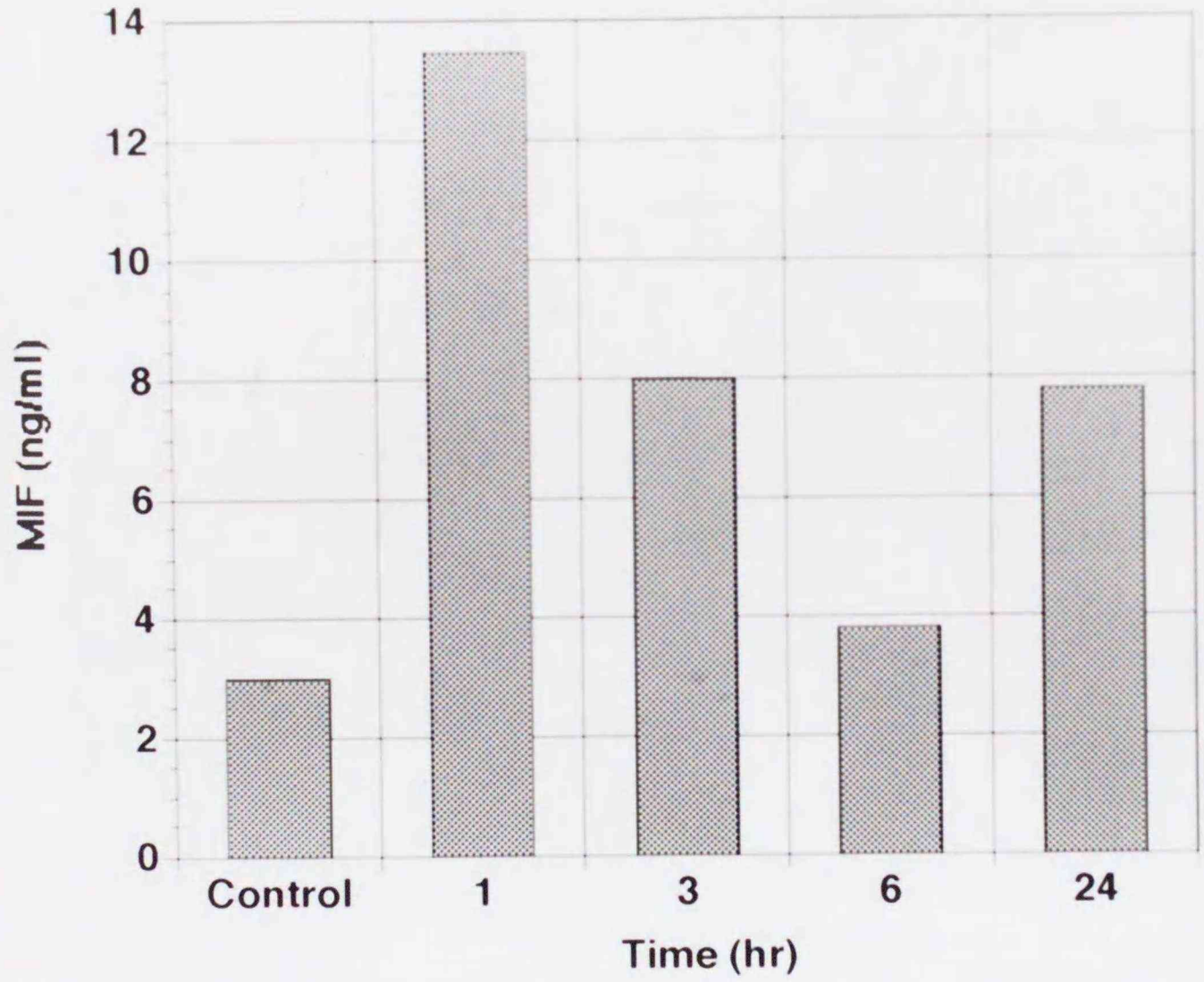


Fig.8 MIF content in cerebrospinal fluid after spinal cord injury by ELISA.

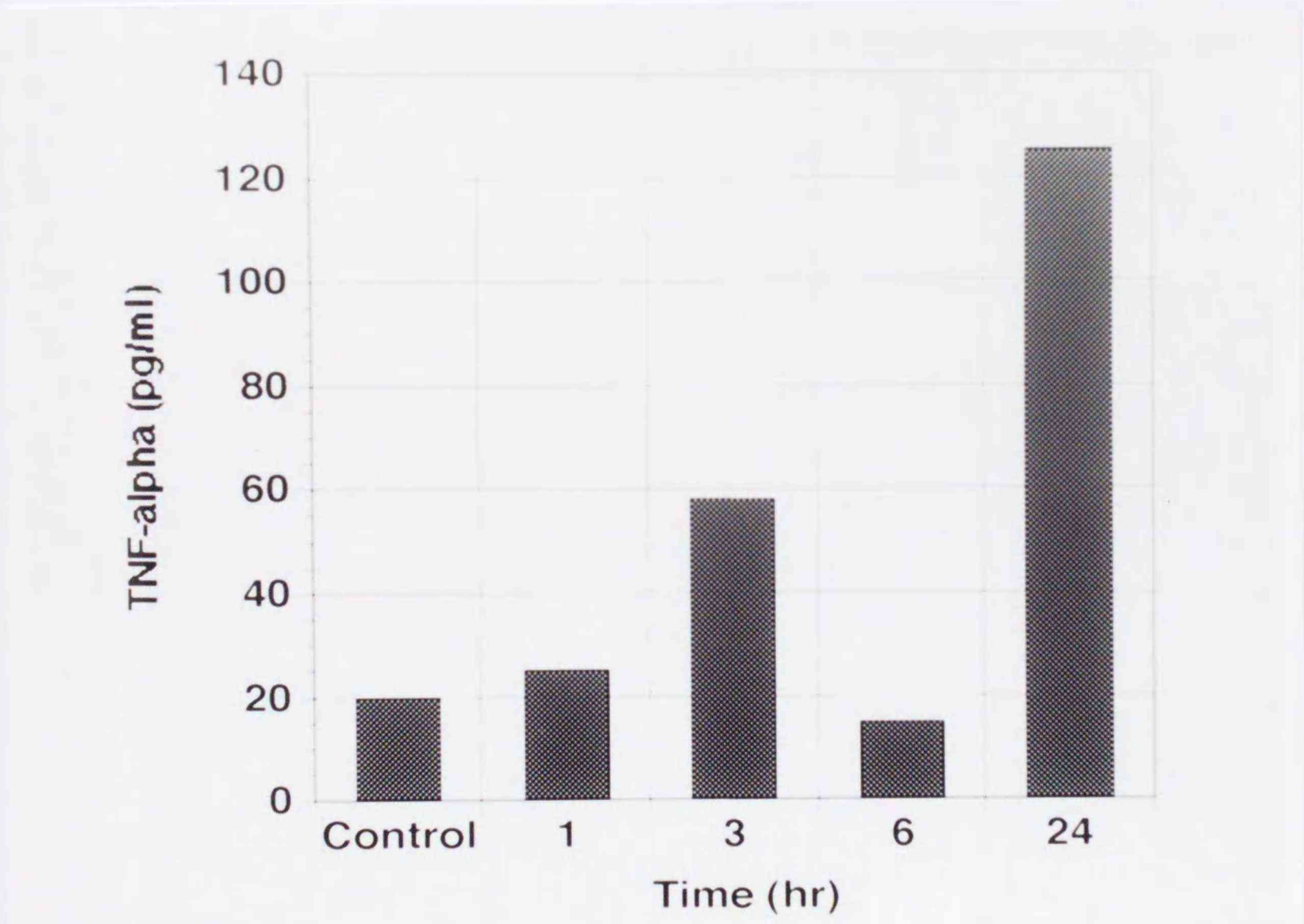


Fig.9 TNF-alpha content in cerebrospinal fluid after spinal cord injury by ELISA.

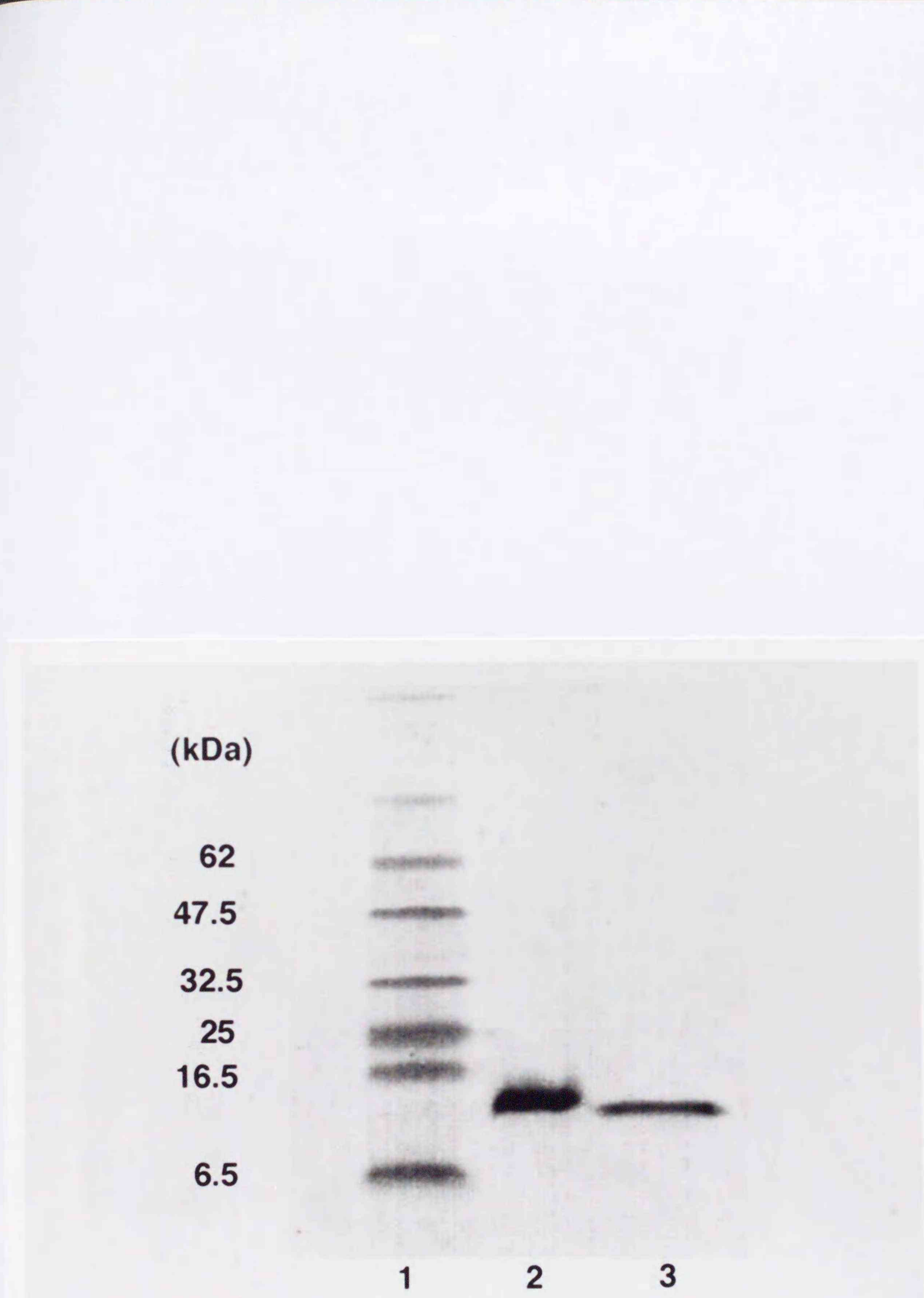


Fig.10 Western blot analysis of PC12 (pheochromocytoma) cultured cell for MIF. The cell sample was cultured and collected, electrophoresed, transferred to a nitrocellulose membrane and visualised using Konica immunostaining HRP-1000. Lane **1**, pre-stained molecular marker ; **2**, PC12 cells ; **3**, recombinant human MIF.

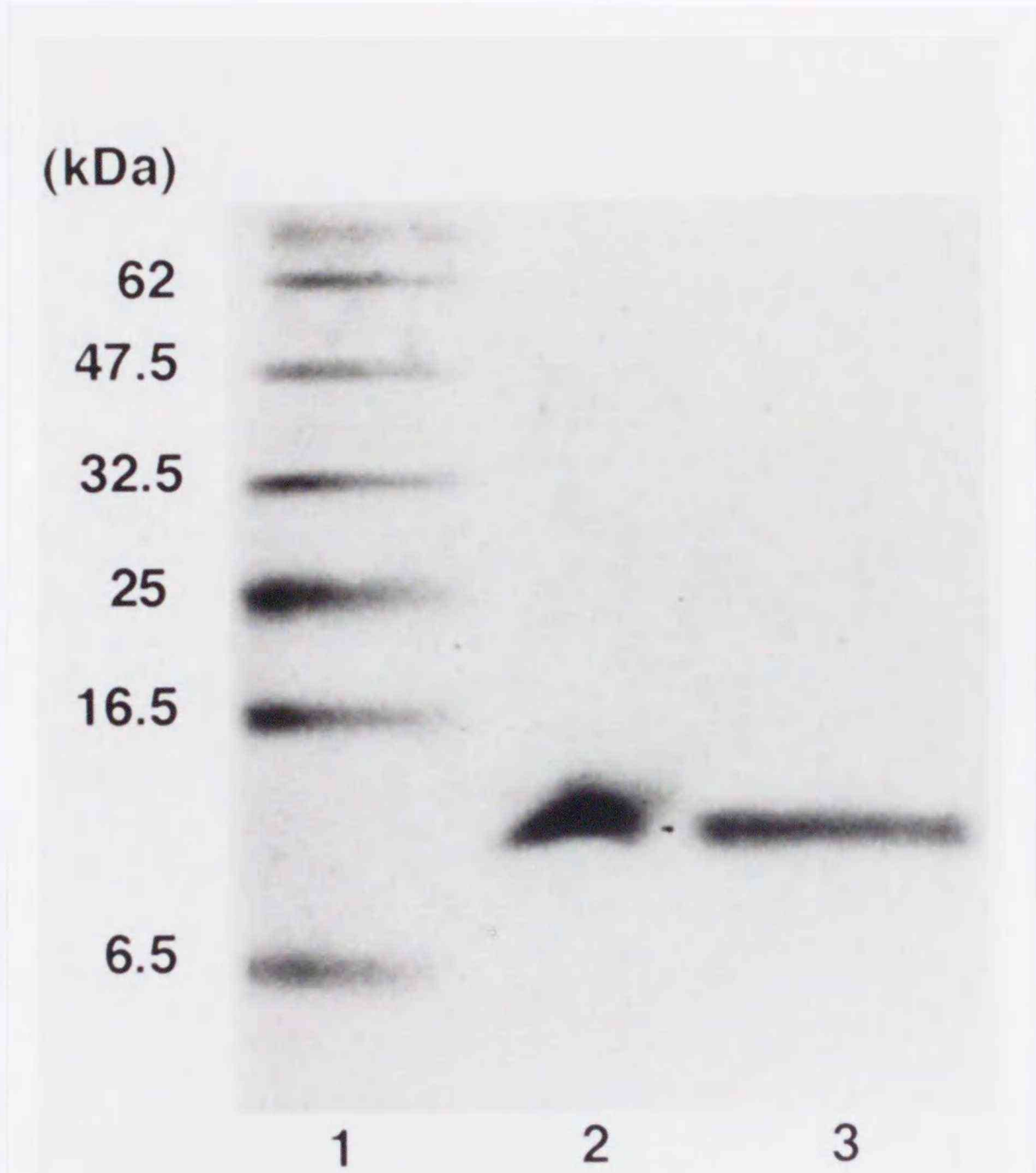


Fig.11 Western blot analysis of LN444 (glioblastoma) cultured cell for MIF. The cell sample was cultured and collected, electrophoresed, transferred to a nitrocellulose membrane and visualised using Konica immunostaining HRP-1000. Lane **1**, pre-stained molecular marker ; **2**, LN444 cells ; **3**, recombinant human MIF.

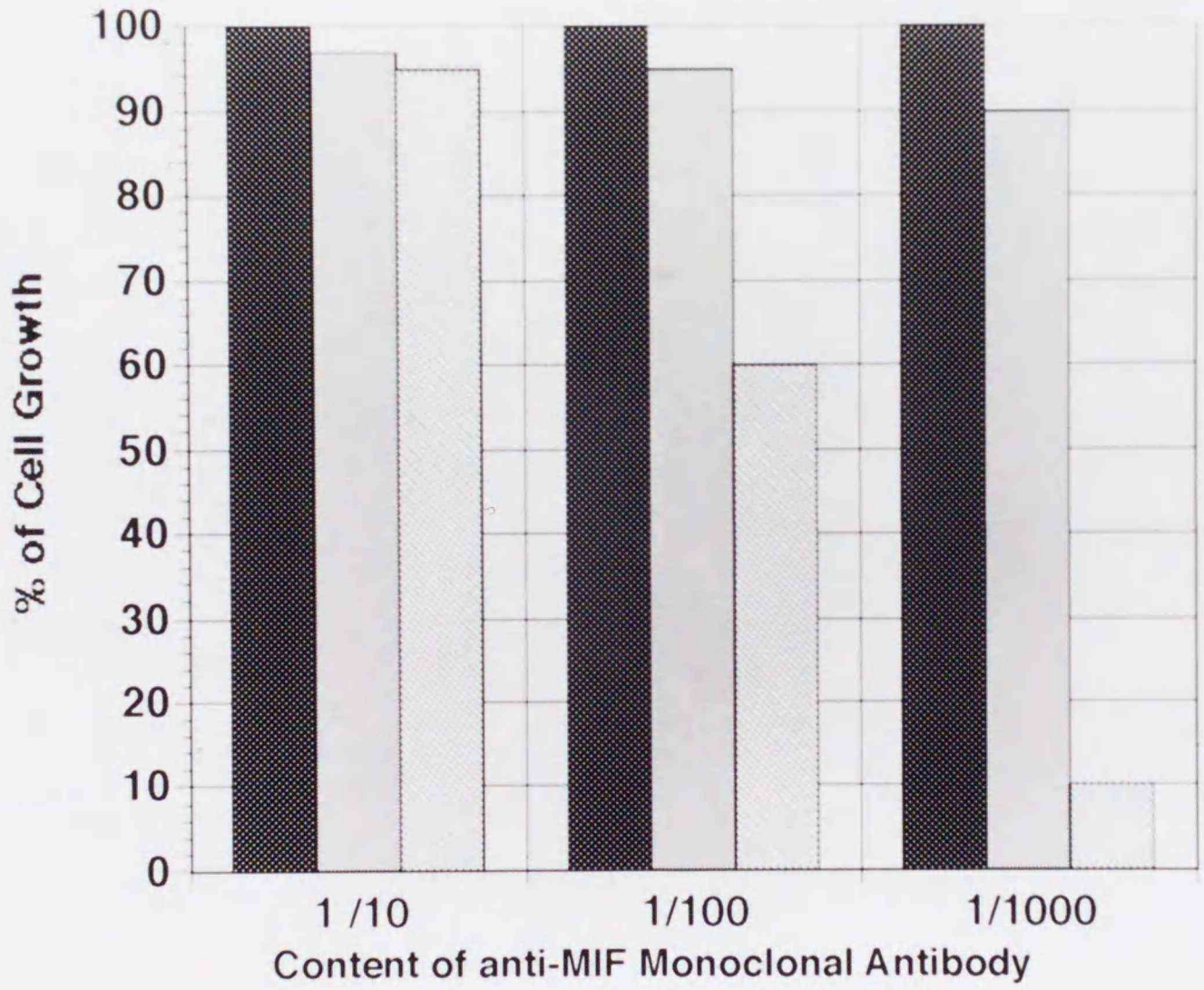


Fig.12 Effect of anti-MIF monoclonal antibody on cell growth of PC12 by MTS assay. Vertical axis showed the rate of cell growth when control IgM-injected cell growth was set up100%.
, control IgM injected into PC12 culture cell;
, anti-MIF monoclonal antibody, 9HC injected into PC12 culture cell ; , anti-MIF monoclonal antibody, 2SC injected into PC12 culture cell
Horizontal axis showed the content of anti-MIF monoclonal antibody.
1/1000, 0.005 ng/ml, ; **1/100**, 0.05 ng/ml, ; **1/10**, 0.5 ng/ml

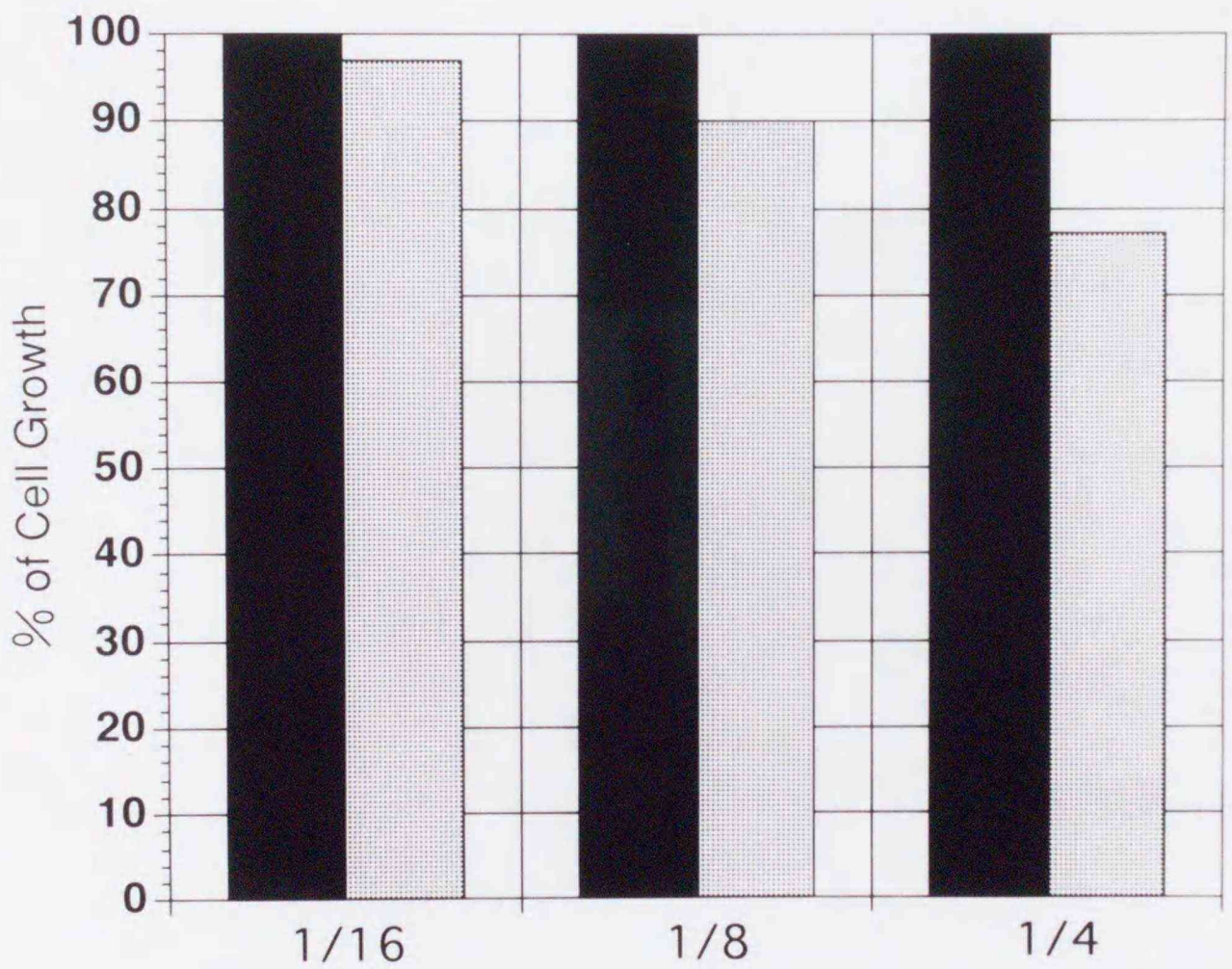
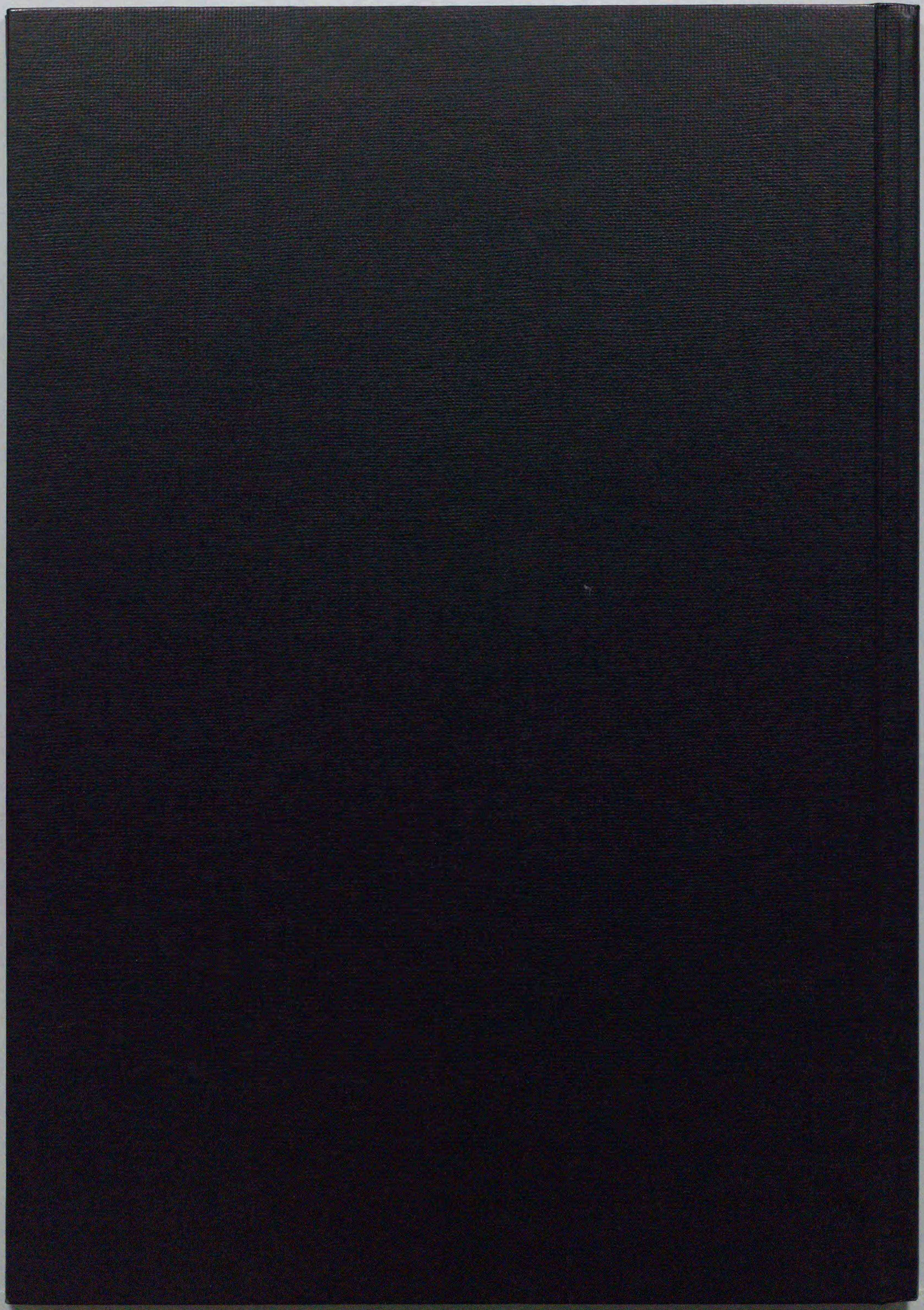


Fig.13 Effect of anti-MIF monoclonal antibody on cell growth of LN444 by MTS assay. Vertical axis showed the rate of cell growth when control IgM-injected cell growth was set up100%.
■, control IgM ; ▒ , anti-MIF monoclonal antibody 2SC injected into LN444 culture cell. Horizontal axis showed the content of anti-MIF monoclonal
antibody, **1/16** , 6.25 μ g/ml, ; **1/8** , 12.5 μ g/ml, ; **1/4** , 25 μ g/ml



inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19