

人工股関節置換術患者の末梢血中マクロファージ に対するポリエチレン摩耗粉の影響

実施責任者：京都大学大学院 整形外科助教授 川那辺 圭一
分担研究者：京都大学大学院 医学研究科博士課程 伊勢 健太郎
京都大学大学院 整形外科助手 清水 基行
京都大学大学院 医学研究科博士課程 松崎 尚志
京都大学大学院 医学研究科博士課程 梁 鉞

研究計画書

1. 研究の目的

人工股関節置換術患者の成績は概ね良好なものとなっているが、長期成績を左右する因子として骨融解や人工関節のゆるみは重要な問題であり、その原因として人工関節材料の摺動面から生じる金属摩耗粉、セメント粉、ポリエチレン摩耗粉などが考えられている。(参考資料①、②)

最も重要なポリエチレン摩耗粉に関しては、骨融解の発生頻度はポリエチレンの年間摩耗量に比例して高くなるとの報告が多い。(参考資料③、④)

しかし、実際の臨床ではポリエチレン摩耗が非常に多いものの骨融解をほとんど認めない症例、またポリエチレン摩耗が少ないものの著しい骨融解を認め、人工関節の弛みを生じてしまう症例があるなど、はっきりとは解明されていないのが現状である。

当教室では、[ポリエチレン摩耗量]とそれに対する生体の感受性として[レントゲン写真上での骨融解の範囲]との相関関係を検討したが、有意な相関関係は認められず個人差と考えられるばらつきを認めた。(2004年1月、日本人工関節学会で発表)

その結果、我々は[ポリエチレン摩耗量]と[レントゲン写真上での骨融解の範囲]との関係には個々の感受性が存在しているのではないかと考えている。

本研究では、人工股関節置換術患者の末梢血中からマクロファージを分離、培養し、ポリエチレン摩耗粉に作用させた影響についてinterleukinやtissue necrotizing factorなどの炎症性サイトカインの測定を行い、臨床上の骨融解の程度と比較することにより、個体間の感受性の有無に関して比較、検討してみる予定である。

2. 研究の意義

今回、これらのはっきりとしないポリエチレン摩耗粉に対する細胞の感受性を測定し諸問題を明らかとすることとしたいと考えている。ひいては人工関節置換術患者の末梢血を用いた実験系を確立し、もし、このような傾向が本当に存在するのであれば、ポリエチレン摩耗粉に対して細胞の作用が強くなってしまふことが予想される患者には、人工関節の材料を変更するなどの対策が可能になるのではないかと考えている。

3. 対象、材料および方法

0) インフォームドコンセント

外来あるいは病棟において研究実施責任者もしくは分担担当者、主治医から別紙説明用紙および同意書を用いて書面で意思を確認する。(別紙研究の説明書、研究同意書を参照)

1) 人工関節周囲組織からのポリエチレン摩耗粉の分離

患者から人工股関節再置換術の際、不要になった人工関節周囲組織の提供を受け、これをホルマリン保存しておく。Minovicらの方法(参考資料⑤)に準じた方法でポリエチレン摩耗粉を分離する。概略は以下の通りである。人工関節周囲組織を約5mm大のサイの目状とし、これをクロロホルムとメタノールの2:1溶液中で24時間浸漬し、脂肪成分を溶出する。蒸留水で洗浄後、キシレンに浸漬し、骨セメントの成分であるPMMA(polymethylmethacrylate)を溶解させる。蒸留水で洗浄後、1gの組織に対して5Nの水酸化ナトリウム溶液を5ml加え65℃で3時間加温し、タンパクを分解する。これにショ糖溶液を加え毎分3000回転で1時間遠心を行う。この結果、液の表面に薄いバンドを形成しているのをこれを回収し、蒸留水を加えて超音波発生器でultrasonicateする。80℃で1時間加温した後、密度0.96g/ml、0.90g/mlのイソプロパノールを静かに加え層形成し、毎分3000回転で2時間遠心を行う。密度0.96g/ml、0.90g/mlのイソプロパノールの上に白いポリエチレン摩耗粉の浮遊するバンドが観察され、これを0.22 μ mのフィルター上に回収する。

2) 対象とする人工関節置換術後患者

人工関節置換術を行った原疾患は変形性関節症に限定する。術後の長期追跡が可能であった患者を対象とする。その中で「人

工関節置換後のポリエチレン摩耗が著明で人工関節の骨融解や弛みを認めない群」と「人工股関節置換後のポリエチレン摩耗が著しくないものの、人工関節の骨融解や弛みをはっきりと認める群」から、それぞれ患者教名を対象とする。但し、貧血(血中ヘモグロビン値で12.0g/ml以下)があるもの、担癌患者等は対象から除外とする。

3) 患者末梢血の採取とマクロファージの誘導と選別

患者の末梢血を20ml採取する。直ちにこれを50ml遠心管に取っておいた抗凝固剤CPD液2mlに加え、よく混和する。RPMI-1640 (fetal bovine serum(-), 1% pyruvate, 1% streptomycin/penicillin) 20mlで希釈する。別の50ml遠心管2本にFicoll-Paque PLUS 15mlを取っておき、この上にこれを21mlずつ静かに積層する。遠心(1600rpm、15分間)を行うとdensity gradient centrifugationにより、単球の層をはっきりとする。上清を吸引除去した後、この層をピペットでそれぞれ別の15ml遠心管2本に回収する。それぞれRPMI-1640を10ml加え、遠心(1600rpm、8分間)を行う。ピペットで上清を吸引しベレットのみを残し、再びRPMI-1640を10ml加え、遠心(1200rpm、5分間)する。ピペットで上清を吸引し、残ったベレットをRPMI-1640 (10% fetal bovine serum, 1% pyruvate, 1% streptomycin/penicillin) 10mlでサスペンドする。径150mmのポリスチレン製ディッシュ2枚にRPMI-1640 (5ng/ml M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) 10mlを取っておく。これにベレットをRPMI-1640にサスペンドした液をそれぞれ5ml加える。37℃、5%CO₂の存在下にインキュベートする。

培養第3日ごろから一部にディッシュへの接着が始まり、培養第5日にはマクロ

ファージ様の核および細胞質の増大を認める。

培養第7日に0.05%トリプシン5mlを用いて接着系細胞のみを回収し、RPMI-1640を10ml加え、遠心(1200rpm、5分間)する。ピペットで上清を吸引し、残ったペレットをRPMI-1640 (10% fetal bovine serum, 1% pyruvate, 1% streptomycin/penicillin) 10mlでサスペンドし、細胞数をカウントする。

4) マクロファージ培養用ディッシュの準備

培養用のディッシュは径100mmのポリスチレン製のものを用い、mediumのみのコントロールのディッシュ、あらかじめディッシュにポリエチレン摩耗粉を付着させておいたディッシュの2系統とする。ディッシュにポリエチレンを付着させるために、100%エタノールにサスペンドした溶液をディッシュ上に撒き、自然乾燥で固定したものとする。これにRPMI-1640 (10% fetal bovine serum, 1% pyruvate, 1% streptomycin/penicillin) 10mlをそれぞれ加えておく。

5) ポリエチレン摩耗粉存在下でのマクロファージの培養

上記の過程で用意したディッシュ上にマクロファージをサスペンドした溶液を等分して加える。37°C、5%CO₂の存在下にインキュベートし、培養第9日(マクロファージのみを分離後第3日)にmedium (RPMI-1640 (10% fetal bovine serum, 1% pyruvate, 1% streptomycin/penicillin) を交換する。培養第11日(マクロファージのみを分離後第5日)に溶液を回収し、遠心(1200rpm、5分間)して、上清のみをクライオチューブに保存する。

6) 結果測定

上清中のinterleukin-1 α 、1 β 、6、TNF- α についてELISAキット(Quantikine, R and D

systems, Minneapolis USA)を用いて測定する。

7) 臨床所見との比較

ポリエチレン摩耗量の測定は、レントゲン正面像からTanakaらの方法(参考資料⑥)でHashimotoの式を用いて算出する。つまり、レントゲン正面像をイメージスキャナ(GT-500, Epson, Tokyo Japan)で300dpiで取り込み、パーソナルコンピュータ上でImage-Pro PULS ver.4 (Media Cybernetics, Inc. MD)を用いて、白蓋側コンポーネントと骨頭を中心を10点の円弧から算出し、線摩耗量と摩耗角を測定する。

また、ポリエチレン摩耗粉に対する感受性の結果と考えられる臨床における骨溶解の程度の評価は、レントゲン正面像での骨透亮像について測定する。つまり、イメージスキャナ(GT-9500, Epson, Tokyo Japan)で72dpiで取り込み、NIH image ver1.61(Free ware, Scion soft)を用いて、白蓋側はDeLee⑦、大腿骨側はGruen⑧の分類に従い、それぞれのareaについての骨融解の範囲をデジタルで測定する。

4. 本実験系での問題点と考察

- ・人工関節再置換術における関節周囲組織の提供は、もともと他に用途のない部分であり通常廃棄の手続きがとられている。患者の負担としてはまったく無いと考えている。
- ・20mlの末梢血の採取をお願いする予定としている。採取する量としては通常健康診断程度の量であり、貧血の急激な悪化や循環虚脱につながるものではないと考えるが、対象としては貧血(血中ヘモグロビン値で12.0g/ml以下)があるもの、担癌患者等は対象から除外とした上で、かつ十分な注意観察下で行わなければ

ならない。

- ・プライバシーの保護については、この試験で得られた結果は、これからの人工関節の方法と成績を向上させるための資料として使用する以外には用いない。専門の学会や学術雑誌に発表されることが目的であるが、患者さんのプライバシーは十分に尊重する。結果発表の際には慎重に配慮し、患者さん個人に関する情報(氏名など)が外部に公表されないように注意する。
- ・結果として、ポリエチレン摩耗粉に対する感受性が個々で違ったものとなり、対象とした患者が、非常に感受性が強く骨融解や弛みにより人工関節の早期の弛みが予想される場合でも告知は行わない。

5 評価

以上の諸問題と結果を踏まえ、上記の実験系で得られたポリエチレン摩耗粉に対する末梢血 20ml 由来のマクロファージの感受性を測定し、画像上の骨融解の評価と合わせて総合的に判断する。

ポリエチレン摩耗粉に対する感受性が個々で違ったものとなり、非常に感受性が強く骨融解や弛みにより人工関節の早期の弛みが予想される場合の閾値を可能なら算出してみたい。

参考文献

- ① SH Lee, FR Bremann JJ Jacobs et al Human monocyte/macrophage response to Cobalt-Chromium corrosion products and Titanium particles in patients with total joint replacements. Journal of Orthopaedic Research 15: 40,9 1997
- ② H.Warashima, S.Sakano, S.Kitamura et al Biological reaction to alumina, zirconia, titanium and polyethylene par-

ticles implanted onto murine calvaria. Biomaterials 24: 3655-61, 2003

- ③ Z.Wan, LD Dorr Natural history of femoral focal osteolysis with proximal ingrowth smooth stem implant Journal of arthroplasty 11(6) 718-25, 1996
- ④ JH Dumbleton, MT Manley, AA Edidin A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. Journal of arthroplasty 17(5): 649-61, 2002
- ⑤ A Minovic, I Milosev, V pisot et al Isolation of polyacetal wear particles from periprosthetic tissue of isoelastic femoral stems. Journal of Bone and Joint surgery 83-B(8) 1182-90, 2001
- ⑥ K Takana, J Tamura, K Kawanabe, et al Effect of alumina femoral heads on polyethylene wear in cemented total hip arthroplasty. Old versus current alumina. Journal of Bone and Joint Surgery 85(5): 655-60, 2003
- ⑦ JC Delee, J Chamley. Radiological demarcation of cemented sockets in total hip arthroplasty. Clinical orthopaedics and related research 121 : 20-32, 1976
- ⑧ TA Gruen, GM McNeice, HC Amstutz. "Modes of failure" of cemented stem-type femoral components. A radiographic analysis of bosehgL Clhloal orthopaedics and rebted research 141 : 17-27, 1979

以上

研究報告書：

人工股関節置換術患者におけるポリエチレン摩耗粉に対する感受性の検討

伊勢健太郎、川那辺圭一、濱水 基行、松崎 尚志、大西英次郎、中村 孝志

京都大学大学院医学研究科筋骨格系病態学(整形外科学)

[背景と目的]

osteolysisと引き続く loosening はなお、人工関節の長期成績を左右する因子である。一般的にはポリエチレン摩耗の量が多くなるほど osteolysis の頻度は高くなるとされるが、個々のポリエチレン摩耗粉に対する感受性の検討はあまり行われていない。本研究の目的は、人工股関節置換術 (THA) 後の長期経過観察が可能であった症例において、ポリエチレン摩耗に対する感受性が存在するかどうかについて検討することである。

[対象と方法]

医学部倫理委員会の承認(別紙参照)の下、変形性関節症に対してTHAが施行され、緩みの生じていない患者25例(手術時平均年齢52.0歳、平均追跡期間13.7年(最低7.1年))について検討した。X線評価は、両股正面写真におけるosteolysisの範囲(mm²)を画像解析ソフト(Scion Image)を用いて測定し、ポリエチレン摩耗量(mm³)を画像解析ソフト(Image Pro PLUS)を用いて Hashimoto の式にて算出した(Eq.1)。これらの比を sensitivity index と定義した(Eq.2)。

Equation1.

$$\text{sensitivity index} = \frac{\text{area of osteolysis (mm}^2\text{)}}{\text{volumetric wear (mm}^3\text{)}}$$

Equation2.

$$\text{volumetric} = \frac{r^2 h}{2} (\pi + 2\beta + \sin 2\beta)$$

(r, radius of the femoral head; h, linear wear; β , direction of wear)

一方、患者末梢血20mlを採取し、in vitro の実験系を行った。密度勾配により単球分画を分離し、M-CSFの存在下に7日間培養してマクロファージに分化させ回収した。

また、ポリエチレン摩耗が原因で再置換が行われた別の症例の関節周囲組織から分離したポリエチレン摩耗粉を、Minovicらの方法に従い分離した。この分離されたポリエチレン摩耗粉を以下の比率で共培養を行い、マクロファージに食させた。

Macrophage 1.0 × 10⁶ cells, Polyethylene particles 1.0mg
Medium(RPMI-1640)4.0ml

コントロールはマクロファージのみでポリエチレン摩耗粉を加えずに培養したものとした。48および96時間後の培養上清を回収し、ELISAでIL-1 β 、IL-6、TNF- α の値を測定し、ポリエチレン摩耗粉の共培養による各種サイトカインの産生増加を算出した。個々の sensitivity index とポリエチレン摩耗粉の共培養による各種サイトカインの産生増加についての相関を検討した。

【結果】

ポリエチレン摩耗量は毎年ほぼ一定の割合で生じていた(Fig.1)。一方osteolysisの面積は症例によりその進展が異なっていた。つまり、初期からosteolysisの発生が著しいもの、教年経過してから進展してゆくものがあり、また、撮影肢位等に影響されることもあった。しかし、数年の経過で観察すると、全て統計学的に有意な直線に近

似可能であった(Fig.2)。これらの結果から、sensitivity indexを算出した(平均1.06, 0.09-4.25)。

in vitroにおいてマクロファージにポリエチレン摩耗粉との共培養による各種サイトカインの増加は個体間での差が大きかった(Table)。

Figure 1. Results of radiological analysis of the annual total volumetric wear in each patient are shown.

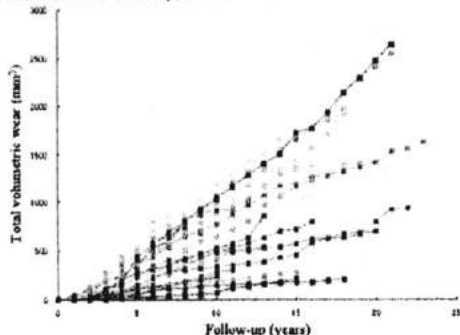


Figure 2. Results of radiological analysis of the annual area of osteolysis in each patient are shown.

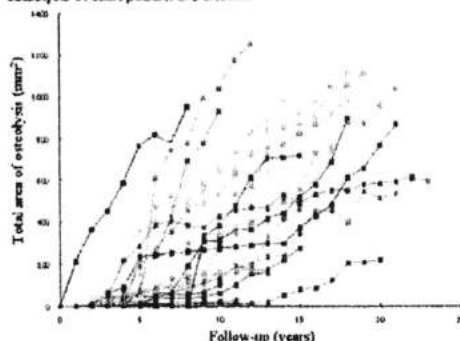


Table. The increase of concentrations of cytokines in supernatants from cells with polyethylene particles.

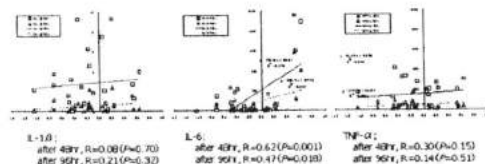
Cytokine	Time (after 48 hours)		Time (after 96 hours)	
	Mean	Range	Mean	Range
IL-1 β	2.82	0.08-9.29	0.58	0.00-2.38
IL-6	294.7	6.88-1916.2	148.2	1.22-1174.7
TNF- α	204.8	6.48-799.0	56.0	0.00-211.6

(pg/ml)

画像上の sensitivity index と in vitro におけるマクロファージとポリエチレン摩耗粉との共培養による各種サイトカインの増加についての相関係数とその統計学的有意さは、IL-1 β ; 48時間後、 $R=0.08(P=0.70)$ 、96時間後、 $R=0.21(P=0.32)$ 、IL-6; 48時間後、 $R=0.62(P=0.001)$ 、96時間後、 $R=0.47(P=0.018)$ 、TNF- α ; 48時間後、 $R=0.30(P=0.15)$ 、96時間後、 $R=0.14(P=0.51)$ であった(Fig.3)。

以上、IL-6のみ統計学的有意差を認めた。

Figure 3. The relationship between the log(sensitivity index) and the increase of concentration of (A) IL-1 β , (B) IL-6 and (C) TNF- α following polyethylene particle stimulation after 48 (\square) and 96 (Δ) hours.



(考察) ポリエチレン摩耗量あたりの osteolysis の面積から算出される sensitivity index は、末梢血由来のマクロファージに対してポリエチレン摩耗粉を作用させる in vitro の実験系における IL-6 の値から推測可能と思われ、緩みが予想される患者の人工関節手術適応の検討に際して有用となる可能性が示唆された。