

## ラット骨髄由来初代培養マクロファージの チタン顆粒貧食能の検討

玉木 康信<sup>1)</sup> 高木 理彰<sup>1)</sup> 佐々木 幹<sup>1)</sup>  
佐々木明子<sup>1)</sup> 長谷川浩士<sup>1)</sup> 荻野 利彦<sup>1)</sup>  
後藤 薫<sup>2)</sup>

### 抄 録

【目的】チタン顆粒に対する骨髄マクロファージの貧食能について検討した。

【方法】ラット大腿骨骨髄細胞を培養し、チタン顆粒貧食能とRT-PCR法によるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)とmatrix metalloproteinase (MMP)-9, cathepsin Kの解析を行った。

【結果】培養開始後72時間まで骨髄由来初代培養細胞では99%以上の細胞がED1陽性でチタン顆粒貧食能を有していた。チタン顆粒貧食によりDGKの発現は抑制され、MMP-9, cathepsin Kの発現は増強された。

【考察】初代培養骨髄マクロファージは、摩耗粉に対するin-Vitroの評価に有用でインプラント周囲組織の病的なモデリングや骨吸収に関与するメディエーターや蛋白分解酵素の産生に寄与していた。今回、チタン顆粒を貧食した骨髄マクロファージにDGKの発現を初めて確認した。チタン顆粒の貧食によりDGKの経時的な発現の抑制が認められ、虚血心筋壊死組織周囲マクロファージのDGK発現亢進の報告と比較すると、病態の違いによってDGK-DGシグナル伝達系の反応に差異があると思われた。

\*Analysis on phagocytic activities of titanium particles by macrophages derived from rat bone marrow.

Key words : osteolysis オステオライシス, bone marrow macrophages 骨髄マクロファージ, diacylglycerol kinase ジアシルグリセロールキナーゼ

### 緒 言

人工股関節全置換術は末期変形性股関節症や炎症性股関節疾患に対する有効な治療手技の一つとなった。しかし、人工股関節全置換術後に生じるインプラントの非感染性の弛みは、多くの病理的、臨床的研究にもかかわらず、いまだ未解決の問題である。弛みに伴って発生し進展するインプラント周囲の骨溶解現象(オステオライシス)

および病的骨吸収による広範な骨欠損は、再置換術の際に大きな障害因子となっている。

人工股関節の弛みについては多くの研究報告がある。インプラントの材質<sup>3,9)</sup>や形状、固定方法などの物理工学的な問題と骨・インプラント境界面に生じる生体反応<sup>4,8,11,14,16,18,20,21)</sup>は弛みのメカニズムを理解するうえで重要であり、Goldring S.R.ら

による介在肉芽組織の解析<sup>8)</sup>に始まり、Kim K.J.らに続くin-vivo, in-vitroの解析<sup>18-22)</sup>が盛んに行われてきた。そのなかで、われわれはインプラントに対する生体反応機構に着目し、以前よりインプラント周囲の摩耗粉による炎症性の異物肉芽反応について検討してきた<sup>22,34-36,38)</sup>。弛みのメカニズムに関与する生物学的因子の検索は、骨・インプラント間の炎症性介在肉芽組織を用いて多くの研究がなされ、手術時に得られる介在肉芽組織や再生関節包を用いてさまざまな検討が行われてきた<sup>29,32,33,47)</sup>。弛みを生じた人工股関節周囲の炎症性介在肉芽組織では、種々の大きさのインプラント摩耗粉とそれを貪食した多数のマクロファージが観察され、摩耗粉に対する宿主マクロファージの貪食に始まる異物肉芽反応が生じている<sup>8,11,12,14)</sup>。また、これら炎症性介在肉芽組織における核酸および蛋白質レベルの検討によりinterleukin (IL)-1 $\beta$ <sup>8,16,52)</sup>、IL-6<sup>52)</sup>、prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)<sup>8,18,19)</sup>、macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)<sup>50)</sup>、matrix metalloproteinases (MMPs)<sup>32,45,47)</sup>、cathepsin K<sup>23)</sup>の病的産生が報告されている。

マクロファージに着目したインプラント摩耗粉に対する細胞性反応に関する研究はin-Vitroでも盛んに行われてきた。これまでの報告は、マクロファージ系の細胞株を用いた実験系<sup>13,30,40)</sup>や、末梢血単球を使用したもの<sup>227,28,39)</sup>に限られていた。

人工股関節のインプラントは骨髄、骨組織と接しており、本研究では、人工股関節における弛みのメカニズムを解明するために、初代骨髄由来マクロファージに着目し、分離・培養した細胞にチタン顆粒を添加することにより病的骨吸収とオステオライシスに関与するとされる因子の検討を行った。病的な細胞外基質の分解亢進や骨

吸収に関与するMMP-9<sup>45)</sup>と酸性条件下の破骨細胞刷毛縁で類骨基質の分解に関与するcathepsin K<sup>17,23,51)</sup>、さらにジアシルグリセロール(DG)をリン酸化しホスファチジン酸に変換し、protein kinase C (PKC)を間接的に制御し<sup>9,10)</sup>シグナル伝達系に関与する<sup>9,10)</sup>とされている、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)<sup>9,10)</sup>のなかで貪食細胞機能への関与が示唆されている<sup>49)</sup> DGKの動態をmRNAレベルで経時的に検討した。

## 方 法

### 1. 細胞培養

8週齢、雌Wistarラットから、両側大腿骨を無菌的に採取した。大腿骨の近位および遠位端を切除し、18G針を付けたシリンジからDulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Ltd., NY, USA)を用いて骨髓腔を洗い流した。得られた細胞浮遊液を200G、7分間遠沈し、上清を吸引除去した。沈殿した細胞に10%ウシ胎児血清(Gibco, Ltd.)含有DMEM25mlを添加懸濁し、2枚重ねにしたレンズペーパー(Olympus Optical, Co., Ltd, Tokyo, Japan)を用いて細胞浮遊液を濾過した。濾過した細胞懸濁液にM-CSF (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, Tokyo, Japan)を10ng/ml添加し<sup>41)</sup>、75cm<sup>2</sup>のフラスコ(Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA)に播種後、37°C、5%二酸化炭素含有大気、湿度100%で培養した。72時間後、上清を吸引除去して4°Cリン酸緩衝液(Gibco, Ltd.)でフラスコを3回洗浄後、0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich, Co., Ltd., Irvine, UK)を添加し、壁吸着性細胞分画を回収した<sup>37,43)</sup>。得られた壁吸着性細胞分画を4×10<sup>5</sup>/mlの密度で再び播種し、細胞機能について解析した。

## 2. 培養細胞の表現形質

壁吸着性細胞分画を24,48,72時間後に単球・マクロファージマーカーED1(mouse anti rat CD68 antibody, Serotec, Oxford, UK)を用いて免疫細胞化学的に検討し、ED1陽性率を算定した<sup>43)</sup>。

壁吸着性細胞における墨汁およびチタン顆粒に対する貪食能を検討した。

墨汁は墨汁添加後、24,48,72時間で、貪食能を観察した。貪食した細胞数を計算して%表示とした。

平均粒子径5.59  $\mu\text{m}$ 、比表面積0.72m<sup>2</sup>/mlのチタン顆粒(Kyocera Co., Ltd., Osaka, Japan)を使用した。今回、エンドトキシンに対して処理を行わなかった<sup>1,15)</sup>。

チタン顆粒は135°C、15分間オートクレーブ処理後、DMEMで0.15%(weight%)に濃度調整した。添加直前に30分間超音波破碎処理により均等に顆粒を分散し壁吸着性細胞分画に添加した。貪食した細胞数を計算して%表示とした。チタン顆粒添加群では、チタン顆粒添加後0.5,1,3,6,12時間で観察した。

## 3. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)および定量的real-time polymerase chain reactio (PCR)

チタン顆粒添加後0.5,1,3,6,12時間でISO-GEN Kit (Nippon Gene, Co., Ltd., Toyama, Japan)を用いtotal RNAの抽出を行った<sup>38)</sup>。Super Script™ III First-strand synthesis system (Invitrogen Corp. California, USA)を使用してRNAを逆転写しcDNAライブラリーを作成した<sup>38)</sup>。

Light Cycler\* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用し、特異的プライマーを用いてPCRを行った(表1)。内部標準としてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、外部標準としてhuman  $\beta$ -actinを使用して標準化した<sup>38)</sup>。

表1 特異的プライマー

GAPDH	5'-ATGGAAGCTGGTCATCAAC-3' 3'-GTGGTrCACACCCATCACA-5'
MMP-9	5'-CCACCGAGCTATCCACTCAT-3' 3'-GTCCGGTTTCAGCATGT $\pi$ T-5'
cathepsin K	5'-CAGCTTCCCAAGATGTGAT-3' 3'-GGACTCCAGCGTCTATCAGC-5'
DGK- $\zeta$	5'-CTGCCCCAAGGTGAAGAGCTZ-3' 3'-GCTGTCTCTGGTCTCAGT-5'

## 結 果

### 1. 培養細胞の表現形質

壁吸着性細胞分画は、ED1陽性率99.55  $\pm$  0.14%であり培養72時間まで維持されていた(図1)。

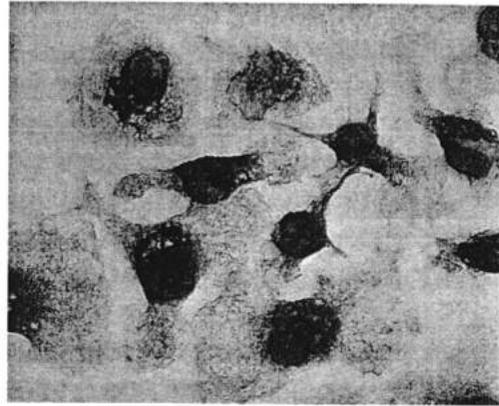


図1 マクロファージマーカーBD1陽性細胞像・72時間(X1000)



図2 墨汁貪食像・72時間(X1000)

表2 培養細胞の表現形質

播種後 24,48,72 時間における ED1 陽性率と墨汁添加後 24,48,72 時間後における墨汁貧食細胞の % 表示

	24 時間	48 時間	72 時間
ED1	99.55 ± 0.36	99.39 ± 0.44	99.72 ± 0.39
墨汁	99.23 ± 0.77	99.51 ± 0.50	99.27 ± 0.74

チタン顆粒添加後 0.5,1,3,6,12 時間におけるチタン顆粒貧食細胞の % 表示					
	0.5 時間	1 時間	3 時間	6 時間	12 時間
チタン	99.51 ± 0.85	99.55 ± 0.79	99.67 ± 0.58	99.58 ± 0.72	99.29 ± 1.2214

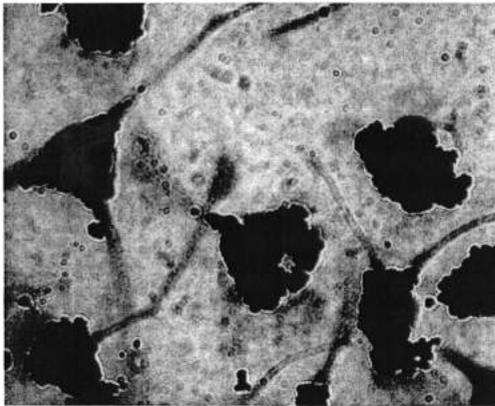


図3 チタン顆粒貧食像・12時間(×1000)

貧食能では、99.34 ± 0.12%が墨汁貧食能を有し、添加後 72 時間まで貧食能が維持されていた(図2)。

チタン顆粒貧食では、99.52 ± 0.13%に貧食を認め、添加後 12 時間まで維持されていた(表2、図3)。24 時間以後、細胞融解が認められ、生細胞数の減少が認められた。

## 2. RT-PCR および定量的 mal-timePCR

生細胞数の維持されていたチタン顆粒添加後 12 時間までについて解析を行った。

チタン顆粒添加群/コントロール群の比で検討すると、骨髄由来初代培養細胞において MMP-9 の mRNA は、チタン顆粒添加後 6 時間をピークとして最大 6.7 ± 6.7 倍まで、cathepsin K の mRNA は 5.8 ± 2.1 倍まで

経時的に発現の亢進が認められた(図4、5)。チタン顆粒添加後 12 時間では MMP-9 は 3.4 ± 1.0 倍、cathepsin K は 4.8 ± 2.2 倍と減少傾向が認められた(図4、5)。また、DGK Ⅱ の mRNA は、チタン顆粒添加後 0.5 時間の 0.86 ± 0.28 倍から経時的に抑制されチタン顆粒添加後 12 時間で 0.42 ± 0.093 倍まで低下していた(図6)。

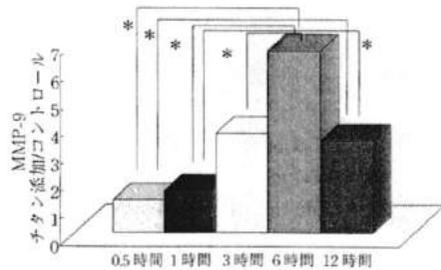


図4 mRNA レベルでの MMP-9 の発現(チタン顆粒添加群/コントロール群) \* < 0.05

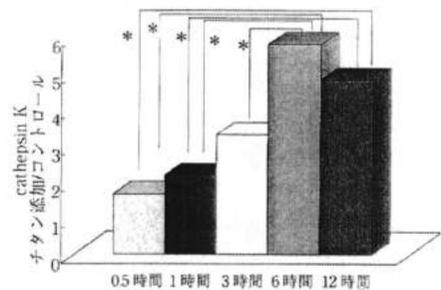


図5 mRNA レベルでの cathepsin K の発現(チタン顆粒添加群/コントロール群) \* < 0.05

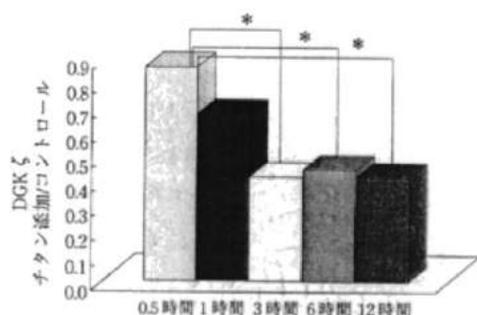


図6 mRNAレベルでのDGK $\zeta$ の発現(チタン顆粒添加群/コントロール群) \* $\lt$ 0.05

### 考 察

本研究の骨髄由来初代培養細胞は、マクロファージマーカーED1が陽性で72時間の培養期間中、ED1に対する陽性反応が維持されていた。

また、墨汁およびチタン顆粒の異物貪食能も維持されていた。本培養系ではM-CSFを添加し、単球・マクロファージ系細胞を誘導し、壁吸着能、フィルター濾過を用いることにより、骨髄マクロファージを高率に純度よく分離・培養・維持することが可能であった<sup>37,41,43</sup>。

骨インプラント間の炎症性介在肉芽組織に親、マクロファージと比較するとマクロファージに類似した細胞株は、腫瘍細胞が起源であるその表現形質が正常の生体反応と異なる一見あり<sup>7,25,42</sup>、また、in-Vitroの実験系でチタン顆粒を添加することによりMMP-9の発現亢進<sup>27</sup>が報告され、組織マクロファージの前駆細胞として使用される末梢血単球は、小型で細胞質に乏しく、細胞の分化、形態、機能の面<sup>27,28,43,44</sup>、およびin-vitroでの回収率において、インプラント周囲の大型で細胞質に富み旺盛な異物貪食能を有すマクロファージとは性質が異なると思われる。マクロファージは、M-CSFを用いることにより高率かつ容易にin-vitroの実験に用いることで有用な培養系であると考えられる。

これまでin-Vitroでのチタン顆粒添加によるマクロファージのcathepsin Kの発現動態に

ついては不明であった。cathepsin Kは、破骨細胞に局在し、酸性条件下で骨基質を分解し骨吸収に関与するとされている<sup>17,51</sup>。

一方、オステオリシスを生じた介在肉芽組織のマクロファージにもcathepsin Kの局在が報告され、マクロファージcathepsin Kがインプラント周囲の骨吸収に関与する可能性が指摘されている<sup>23</sup>。本研究では初代培養骨髄マクロファージにチタン顆粒を添加することにより経時的にcathepsin Kの発現が亢進しており、in-vitroの実験系で初めて顆粒添加による骨髄マクロファージのcathepsin Kの動態が明らかになった。

また、弛みを生じたインプラント周囲の病的な細胞外気質の分解亢進と骨吸収に関与するMMP-9の発現が、インプラント周囲の介在肉芽組織内とマクロファージで報告されている<sup>45,46</sup>。

今回の培養骨髄マクロファージにチタン顆粒を添in-vitroの研究でも、MMP-9のmRNAの発現が亢進していた。

弛みを生じたインプラント周囲組織のpH測定インプラント周囲環境の酸性変化、インプラントに接した炎症性介在肉芽組織内のマクロファージにcathepsin Kの発現が確認されている<sup>23</sup>。

またMMP-9の発現が確認され、脱灰され脆弱化したオステオリシス周囲骨組織に接して異物を貪食したマクロファージ、骨組織の形態学的、機能的検討<sup>23,45,48</sup>、さらには、Mudy C.R.らによる末梢血単球による骨吸収の検討<sup>26</sup>、Blair H.C.らによる酸性条件下におけるマクロファージの骨吸収<sup>3</sup>といったin-vitroでの検討も報告されている。in-vivo, in-vitroの報告から病的な細胞外基質の分解に始まる高回転型のインプラント周囲組織の病的なリモデリングを引き起こし、インプラント周囲の組織、骨質の脆弱化を引き起こし<sup>45,46,48</sup>、マクロファージによる直接的な骨吸収、結合組織の脆弱化が行

われ、インプラント周囲オステオライシス、弛みの発生や進展に關与する可能性が考えられた。

これまでインプラント周囲オステオライシスに關連したDGKの報告はなく、本研究では、初代培養骨髓マクロファージにチタン顆粒を添加することにより経時的にDGKの発現が抑制されておりin-vitroの実験系で初めてチタン顆粒添加による骨髓マクロファージのDGKの動態が明らかになった。

DGKのアイソザイムであるDGK $\alpha$ は、虚血心筋壊死組織周囲に集まるマクロファージに発現の亢進が認められ、ホスファチジン酸を介したスカベンジャーとして働き<sup>49)</sup>、線維性および癒痕性の組織治癒過程を促進し、硬い組織を形成していると考えられる。

一方、骨髓マクロファージによるチタン顆粒貧食では、経時的にDGK $\alpha$ の発現が抑制され、DGKによりリン酸化される細胞内のDGの濃度が相対的に上昇している可能性が示された。DGはconventional PKCやnovel PKCの活性化に働き細胞外基質蛋白分解酵素MMP-9とMMP-2の発現亢進に關与する可能性が指摘されている<sup>24,53)</sup>。

オステオライシスにおける脆弱な人工関節周囲の炎症性肉芽組織形成の場面でDGK $\alpha$ の抑制に連動したDGの相対的細胞内濃度の上昇が細胞外基質の病的分解を助長し、人工関節周囲のオステオライシスの病態形成と關与している可能性があると思われた。

今後、マクロファージの摩耗粉貧食におけるtranscription factors nuclear factor  $\kappa$ B NF- $\kappa$ B)<sup>6,31,40)</sup>、receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)<sup>5,31)</sup>と合わせて、DGK-DGのシグナル伝達系の詳細な解析も必要と考えられた。

## 結 語

1. ラット大腿骨骨髓細胞をフィルター濾過

し、M-CSF添加、壁吸着能を利用する本培養系は、骨髓マクロファージを純度よく分離・培養可能であった。

2. 骨髓由来初代培養マクロファージは、マクロファージマーカーED1の発現と旺盛な異物貧食能を維持しており、in-vitroの系としてインプラント摩耗粉に対する貧食細胞機能評価に有用であった。

3. チタン顆粒貧食によりインプラント周囲の骨吸収や結合組織の病的改變に關与すると考えられるMMP-9, cathepsin Kの発現が亢進し、組織治癒過程に關与すると考えられるDGK $\alpha$ の発現は抑制されていた。

本研究は平成16年度財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成による。

## 文 献

- 1) Biondi, A., Peri, G., Lorenzet, R., et al. : Role of endotoxin in the expression of human monocyte cytotoxicity. J. Reticuloendothel. Soc., 33: 315-327, 1983.
- 2) Blaine, T.A., Rosier, R.N., Puzas, J.E., et al. : Increased levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. J. Bone Joint Surg., 78-A: 1181-1192, 1996.
- 3) Blair, H.C. and Ghandur-Mnaymneh, L. : Macrophage-mediated bone resorption occurs in an acidic environment. Calcif. Tissue Int., 37: 547-550, 1985.
- 4) Charnley, J., Follacci, F.M. and Hammond, B.T. : The long-term reaction of bone to self-curing acrylic cement. J. Bone Joint Surg., 50-B: 822-829, 1968.
- 5) Clohisy, J.C., Frazier, E., Hirayama, T., et al. : RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate par

- ticle-induced osteoclastogenesis. *J. Orthop. Res.*, 21 : 202 - 212, 2003.
- 6) Clohisy, J.C., Hirayama, T., Frazier, E., et al. : NF-1cB signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. *J. Orthop. Res.*, 22 : 13-20, 2004.
- 7) Glant, T.T. and Jacobs, J.J. : Response of three murine macrophage populations to particulate debris : bone resorption in organ cultures. *J. Orthop. Res.*, 12 : 720-731, 1994.
- 8) Goldring, S.R., Schiller, A.L., Roerke, M., et al. : The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J. Bone Joint Surg.*, 65-A : 575 -584, 1983.
- 9) Goto, K. and Kondo, H. : Diacylglycerol kinase in the central nervous system - molecular heterogeneity and gene expression. *Chem. Phys. Lipids.*, 98 : 109 - 117, 1999.
- 10) 後藤 薫, 近藤尚武 : 脳内における脂質性二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼの分子・発現局在の多様性と機能的役割. *電子顕微鏡*, 37 : 183 - 187, 2002.
- 11) Harris, W.H., Schiller, A.L., Scholler, J.M., et al. : Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *J. Bone Joint Surg.*, 58-A : 612-618, 1976.
- 12) Heilmann, K., Diezel, P.B., Rossner, J.A., et al. : Morphological studies in tissues surrounding alloarthroplastic joints. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 366 : 93 - 106, 1975.
- 13) Huk, O.L., Znkor, D.J., Antoniou, J., et al. : Effect of pamidronate on the stimulation of macrophage TNF-a release by ultra-high-molecular-weight polyethylene particles : a role for apoptosis. *J. Orthop. Res.*, 21 : 81-87, 2003 .
- 14) Jasty, M.J., Floyd, W.E., Schiller, A.L., et al. : Localized osteolysis in stable, non-septic total hip replacement. *J. Bone Joint Surg.*, 68-A : 912-919, 1986.
- 15) Jeannin, J.F., Reisser, D., Lagadec, P., et al. : Synergistic effect of liposomes and endotoxins on the activation of rat macrophage tumoricidal activity. *Immunobiology*, 170 : 211 -231, 1985.
- 16) Jiranek, W.A., Machado, M., Jasty, M., et al. : Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J. Bone Joint Surg.*, 75-A : 799-801, 1993.
- 17) Kamiya, T., Kobayashi, Y., Kanaoka, K., et al. : Fluorescence microscopic demonstration of cathepsin K activity as the major lysosomal cysteine proteinase in osteoclasts. *J. Biochem. (Tokyo)*, 123 : 752-759, 1998.
- 18) Kim, K.J., Chiba, J. and Rubash, H.E. : In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. *J. Bone Joint Surg.*, 76-A : 172- 180, 1994.
- 19) 金 強中 : オステオライシスにおける骨吸収性サイトカインの発現 In Vitro 及び In Vivo Study. *日本人工関節学会誌*, 28:101-102, 1998.
- 20) Kim, K.J., Kobayashi, Y. and Itoh, T. Osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. *Clin. Orthop.*, 352 46- 52, 1998.

- 21) 金 強中: ポリエチレン摩耗粉に対する生体反応osteolysisの生物学的メカニズム. 関節外科, 18:1398-1404.1999.
- 22) Kim, K.J., Kotake, S., Udagawa, N., et al. : Osteoprotegerin inhibits in vitro mouse osteoclast formation induced by joint fluid from failed total hip arthroplasty. *J. Biomed. Mater. Res.*, 58 : 393 - 400, 2001.
- 23) Konttinen, Y.T., Takagi, M., Mandelin, J., et al. : Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *J. Bone Miner. Res.*, 16 : 1780- 1786, 2001 .
- 24) Liu, J.F., Crepin, M., Liu, J.M., et al. : FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293 : 1174- 1182, 2002 .
- 25) 三井洋司、高木良三郎、市原 明、ほか : 機能細胞の分離と培養、丸善出版、68-80.1987.
- 26) Mundy, C.R., Altman, A.J., Gondek, M.D., et al. : Direct resorption of bone by human monocytes. *Science*, 196 : 1109-1111, 1977
- 27) Nakashima, Y., Sun, D.H., Maloney, W.J., et al. : Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J. Bone Joint Surg.*, 80-B : 694 - 700, 1998.
- 28) Nakashima, Y., Sun, D.H., Trindade, M.C., et al. : Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J. Bone Joint Surg.*, 81-B : 155-162, 1999.
- 29) Nordstrom, D., Santavirta, S., Gristina, A., et al. : Immune-inflammatory response in the totally replaced hip : a review of biocompatibility aspects. *Eur. J. Med.*, 2 : 296-300, 1993 .
- 30) Palmbo, P.L., Sytsma, M.J., DeHeer, D.H., et al. : Macrophage exposure to particulate titanium induces phosphorylation of the protein tyrosine kinase lyn and the phospholipases C y-1 and C y-2. *J. Orthop. Res.*, 20 : 483-489, 2002.
- 31) Ren, W., Li, X.H., Chen, B.D., et al. Erythromycin inhibits wear debris-induced osteoclastogenesis by modulation of murine macrophage NF- $\kappa$ B activity. *J. Orthop. Res.*, 22 : 21 -29, 2004.
- 32) Santavirta, S., Konttinen, Y.T., Bergroth, V., et al. : Aggressive granulomatous lesions associated with hip arthroplasty. Immunopathological studies. *J. Bone Joint Surg.*, 72-A : 252-258, 1990.
- 33) Santavirta, S., Konttinen, Y.T., Hoikka, V., et al. : Immunopathological response to loose cementless acetabular components. *J. Bone Joint Surg.*, 73-B : 38-42, 1991.
- 34) Santavirta, S., Gristina, A. and Konttinen, Y.T. : Cemented versus cementless hip arthroplasty. A review of prosthetic biocompatibility. *Acta Orthop. Scand.*, 63 : 225 -232, 1992.
- 35) Santavirta, S., Sorsa, T., Konttinen, Y.T., et al. : Role of mesenchymal collagenase in the loosening of total hip prosthesis. *Clin. Orthop.*, 290 : 206-215, 1993.
- 36) Santavirta, S., Nordstrom, D., Metsarinne, K., et al. : Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin. Orthop.*, 297 : 100 -110, 1993.

- 37) Saotome, K., Takagi, M., Hoshino, T., et al. Harvesting method for macrophages derived from bone marrow. *Dokkyo J. Med. Sci.*, 14 : 155- 162, 1987.
- 38) Sasaki, K., Takagi, M., Mandelin, J., et al. Quantitative analysis of mRNA expression of TIMPS in the periprosthetic interface tissue of loose hips by real-time PCR system. *J. Biomed. Mater. Res.*, 58 : 605 - 612, 2001.
- 39) Sethi, R.K., Neavyn, M.J., Rubash, H.E., et al. : Macrophage response to cross-linked and conventional UHMwPE. *Biomaterials*, 24 : 2561 - 2573, 2003.
- 40) Soloviev, A., Schwarz, E.M., Kuprash, D.V., et al. : The role of p105 protein in NF- $\kappa$ B activation in ANA-1 murine macrophages following stimulation with titanium particles. *J. Orthop. Res.*, 20 : 714 - 722, 2002.
- 41) Sorimachi, K., Okazaki, M., Akimoto, K., et al. : Preferential multinucleation of macrophages at low TNF- $\alpha$  secretion with lipopolysaccharide (LPS). *Dokkyo J. Med. Sci.*, 23 : 179- 183, 1996.
- 42) 鈴木利光、関口守正、野澤志朗：ヒト癌細胞株とその特性、中外医学社、1992.
- 43) Takagi, M., Suda, A., Watanabe, Y., et al. : A harvesting method of monocytes/macrophages derived from bone marrow and their characteristics - special reference to the effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on monocytes/macrophages. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 64 : 89-98, 1990.
- 44) 高木理彰、山川光徳、今井 大、ほか：培養ヒト皮膚線維芽細胞の形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的検討。日本網内系学会誌、30 : 63-77.1990.
- 45) Takagi, M., Konttinen, Y.T., Lindy, O., et al. : Gelatinase/type IV collagenases in the loosening of total hip replacement endoprostheses. *Clin. Orthop.*, 306 : 136-144, 1994.
- 46) Takagi, M., Konttinen, Y.T., Santavirta, S., et al. : Extracellular matrix metalloproteinases around loose total hip prostheses. *Acta Orthop. Scand.*, 65 : 281 -286, 1994.
- 47) Takagi, M., Santavirta, S., Ida, H., et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in loose artificial hip joints. *Clin. Orthop.*, 352 : 35~45, 1998.
- 48) Takagi, M., Santavirta, S., Ida, H., et al. High-turnover periprosthetic bone remodeling and immature bone formation around loose cemented total hip joints. *J. Bone Miner. Res.*, 16 : 79-88, 2001.
- 49) Takeda, M., Kagaya, Y., Takahashi, J., et al. Gene expression and in situ localization of diacylglycerol kinase isozymes in normal and infarcted rat hearts : effects of captopril treatment. *Circ. Res.*, 89 : 265~272, 2001.
- 50) Takei, I., Takagi, M., Ida, H., et al. : High macrophage-colony stimulating factor levels in synovial fluid of loose artificial hip joints. *J. Rheumatol.*, 27 : 894 - 899, 2000.
- 51) Tezuka, K., Tezuka, Y., Maejima, A., et al. Molecular cloning of a possible cysteine protease predominantly expressed in osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, 269 : 1106-1109, 1994.
- 52) Umehara, S., Kim, K.J., Itoh, T., et al. Biochemical, immunohistochemical, and enzyme histochemical analyses of interface

- bone and membrane around loose threaded acetabular components. *J. Tokyo Wom. Med. Univ.*, 69 : 579-588, 1999.
- 53) Xie, B., Laouar, A. and Huberman, E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type *rv* collagenase/ gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, 273 : 11576-11582, 1998.