人工股関節のポリエチレン摩耗粉によるマクロファージ活性化に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9427

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第3号　371－380（1999）

人工股関節のポリエチレン磨耗粉による マクロファージ活性化に関する研究

－特に粒子周囲の付着蛋白に着目して－

金沢大学医学部医学科整形外科学講座（主任：富田勝郎教授）
尾　島　朋　宏

人工関節周囲に生じる骨融解（オステオライシス，osteolysis）の原因として，人工関節慴動面から産出されるポリエチレン摩耗粉を貪食したマクロファージが，炎症性サイトカインを放出して，破骨細胞が誘導される機序が推測されている．一方，生体材料と細胞の反応には，材料表面に付着する蛋白が重要で，その蛋白の種類によって細胞の反応が変化するといわれている．しかしポリエチレン粒子（polyethylene particles）は無血清培養液中では，その比重と表面荷電のために凝集，浮上してしまうため，これまで細胞に曝露する実験系ではほとんど使用することが不可能であった．そこで本研究ではマクロファージとポリエチレン粒子を再現性をもって混合，接触させる方法を確立し，粒子周囲の付着蛋白がマクロファージの粒子貪食，サイトカイン産生に与える影響を明らかにすることを目的とした．まず光散乱法を用いて粒子の凝集について検討を行った．その結果，無血清浮遊液では7.20±6.35μm（平均±標準偏差），血清浮遊液では3.31±0.59μmと，血清浮遊液で粒子径が小さかった．すなわち粒子周囲に血清蛋白を付着させることで，粒子の凝集が抑制されることが判明した．またこのときの粒子周囲に付着する血清蛋白をSDS-PAGEで検討したところ，アルブミンとγ-グロブリンが検出された．さらに，マクロファージの付着したチャンバースライドを粒子浮遊液で充填後，プラスチックシートで密閉，倒立し培養を行う倒立培養法を用いることで，マクロファージとポリエチレン粒子を再現性をもって混合，接触させることが可能となった．この方法を用いることで，ポリエチレン粒子周囲の付着蛋白により，マクロファージの粒子貪食促進，インターロイキン（Interleukin，IL）-6，IL-1βの産生増加が認められた．またポリエチレン粒子周囲にアルブミン，γ-グロブリンをそれぞれ付着させて，マクロファージの粒子貪食及びサイトカインの産生を，培養後12時間で検討した結果，γ-グロブリンを付着させた場合に有意に粒子の貪食促進，IL-1βの産生増加を認めた．以上の成績から，ポリエチレン粒子浮遊液に血清を加えることによって比較的均一な浮遊液が作成可能であり，さらに倒立培養法を用いることでマクロファージに粒子を再現性をもって貪食させることが可能であることが明らかとなった．またマクロファージによるポリエチレン粒子の貪食において，粒子周囲の蛋白付着，特にγ-グロブリンによるオプソニン化が重要であり，それにより粒子の貪食が促進される結果，サイトカインの産生が増加する機序が推察された．

Key words　polyethylene particle, protein, macrophage, phagocytosis

変形性股関節症，リウマチ性股関節炎に対する手術として，臼蓋側にポリエチレンソケット，大腿骨側に金属製ステムを設置する人工股関節置換術が広く普及してきた．大部分の症例で良好な術後成績が報告されているが，一部にインプラントの固定が良好であるにもかかわらず，その周囲に骨融解（オステオライシス，osteolysis）が観察され，その後にインプラントの弛みが起こり，再置換術を余儀なくされる症例が存在することがわかってきた[1]．若年者にも本術式が適応されるようになってきた昨今，人工関節の長期成績をさらに向上させるためにも，オステオライシスの病態の解明は非常に重要な問題となっている．

オステオライシスの原因として，関節慴動面での摩耗により生じたポリエチレン粒子（polyethylene particles）をマクロファージが貪食し，炎症性サイトカインを放出して，破骨細胞が活性化される機序が推測されている[2)-4)]．しかしポリエチレン粒子はその比重と表面荷電のために，特に細胞に曝露する実験に用いることが困難であり，セメント[5)6)]，金属[7)8)]，ラテックス[6)7)]等の他の粒子を用いて一連の反応を再現させているのが現状である．しかしながら他の粒子ではなく，ポリエチレン粒子がオステオライシスに最も重要と考えられていることから，これを用いた実験系を確立し，粒子間の比較を行う必要がある．従来ポリエチレン粒子を用いた実験系として，ゲルを用いた培養法[9)10)]，底面にマクロファージを付着させたシャーレをポリエ

平成11年4月6日受付，平成11年6月4日受理

Abbreviations：IL, interleukin; PVDF, polyvinylidene difluoride; TNF-α, tumor necrosis factor-α; MMP, matrix metalloproteinase; PGE2, prostaglandin E2

チレン粒子浮遊液中に浮かす方法[11]等が考案されてきたが，再現性が不十分であった．そこでまず，再現性の高い実験系を工夫することとした．

一方，固形の生体材料に関する研究から材料と細胞の反応には，材料表面に付着する蛋白が重要で，介在する蛋白によって細胞の反応が変化するといわれている．例えばBrashら[12]は，人工血管に関する検討から，アルブミンを優先的に吸着する材料は血小板を活性化し難いが，フィブリノーゲンやγ-グロブリンを強く吸着する材料は容易に活性化すると報告している．しかし粒子と周囲付着蛋白，その蛋白が細胞に与える影響については報告が少なく，特にポリエチレン粒子に関する報告はない．そこで本研究では，マクロファージがポリエチレン粒子を貪食する際に，粒子表面に付着している蛋白が重要な役割を果たしていると考え，その蛋白の同定を行った．さらに試験管内で粒子周囲の付着蛋白がマクロファージの粒子貪食，サイトカイン産生に与える影響を検討した．

材料および方法

Ⅰ．マクロファージおよびポリエチレン粒子

1．ヒトマクロファージ

正常人末梢血からFicoll法に準じて採取した単核球中，プラスチック付着性を有する細胞を分離し，マクロファージとして用いた[13]．ヒト末梢血10mlに対し，RPMI1640培地（ICN Biomedicals，California，USA）15mlを加え混和し，リンフォセパール溶液（免疫生物研究所，群馬）20mlを下層に重層後，1800回転／分で30分間遠心した．上清を吸引除去し単核球層を採取後，洗浄を3回繰り返した．得られた単核球浮遊液をマクロファージ純粋分離用特殊コーティングプレート（日本抗体研究所，高崎）に添加し，37℃，30分間静置した．上清を取り除き，3回洗浄を繰り返し非付着細胞を除去後，4℃に1時間放置した．ピペッティングにて細胞を回収後，洗浄を2回繰り返した．フローサイトメトリー法により，95％以上の細胞がCD14陽性でマクロファージと同定された．

2．ポリエチレン粒子

ポリエチレン粒子は直径3μmの低分子量ポリエチレン球形粒子（住友精化，大阪）を使用した．50mlコニカルチューブ中で，60℃エチレンオキサイドガス滅菌しておいたポリエチレン粒子を，RPMI1640培地に浮遊させ，超音波ホモジナイザーUR-20P（トミー精工，東京）にて可及的に分散させた．なお使用直前にボルテックス処理し，肉眼的に浮上，凝集していないことを確認後，実験に使用した．

ヒト血清蛋白の有無によるポリエチレン粒子の凝集の違いを比較するため，粒子のRPMI1640培地浮遊液とヒト血清浮遊液を作製し，光学顕微鏡にて観察した．また両浮遊液の浮遊粒子径を光散乱測定装置DLS7000（大塚電子，東京）にて測定した．Nishiyamaら[14]の方法に準じて，粒子の濃度は1.0mg/mlとし，25.0℃で，浮遊液に波長488nmのアルゴンレーザー光を照射し，散乱光の吸光度測定を200回繰り返し行った．

Ⅱ．ポリエチレン粒子周囲に付着する血清蛋白の分離，同定

1．蛋白付着粒子の精製

粒子浮遊液の調製時と同様に，ポリエチレン粒子は直径3μmの低分子量ポリエチレン球形粒子を使用した．ガス滅菌しておいたポリエチレン粒子をヒト血清に浮遊させ，超音波ホモジナイザーにて分散させ，37℃で8時間静置した．径0.45μmのメンブレンフィルター（ミリポア，東京）により，遠心ろ過を2回繰り返して遊離蛋白を除去し，フィルター上に残った粒子を蛋白付着粒子とした．

2．SDS-PAGE

2×SDS試料溶解液（20％SDS，20％グリセロール，0.5M Tris-HCl，pH6.8，0.8％bromphenol blue）と10％2-メルカプトエタノールを9：1の比で混合後，精製したポリエチレン粒子浮遊液とこの溶液を1：1で混合し，95℃で2分間加熱した．この操作により粒子付着蛋白が粒子から分離され，蛋白中のジスルフィド結合が切断される．また4％ヒト血清を対照として使用した．10％のSDSを含んだアクリルアミドゲルを作成し，これらの試料を電気泳動してゲル上に分離した．さらにポリビニリジンジフルオライド（polyvinylidene difluolide，PVDF）膜に転写し，クマシーブリリアントブルー（coomasie brilliant brue）にて膜の染色を行った[15]．

3．付着蛋白の解析

SDS-PAGEによりPVDF膜上に得られたバンドを切りだし，気相プロテインシークエンサーHP G1005A Protein Sequencing System（Hewlettpackard，California，USA）にてN末端アミノ

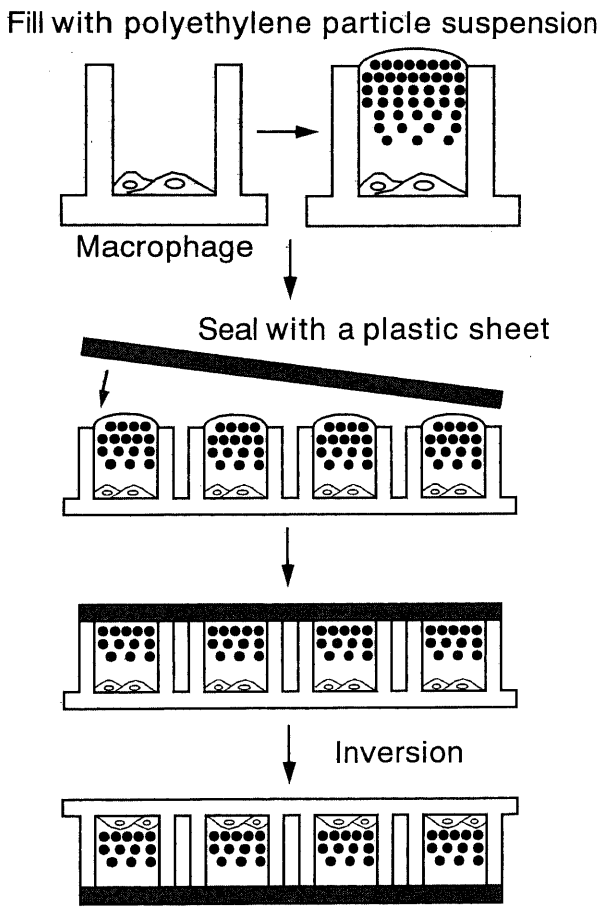

Fig. 1. Inverted culture system. Macrophages are attached onto the bottom of 4-well chamber slides. After complete removal of the culture supernatants, a polyethylene particle suspension is added to the wells. The slide is then sealed with a plastic film, and the incubation takes place in an upside-down position. In this system, cells are in better contact with polyethylene particles that float upward than they are in the usual system.

酸配列を解析した．

Ⅱ．マクロファージとポリエチレン粒子の共存培養

1．正立培養法

ポリエチレン粒子周囲の付着蛋白が，マクロファージの粒子貪食に与える影響をまず通常の正立培養法で検討した．4ウエルチャンバースライド (Nunc, Illinois, USA) 上で1×10^6個/ウエルとなるように細胞を調製し，37℃で8時間培養を行った．非付着細胞を除去後，ポリエチレン粒子の血清蛋白非付着浮遊液，血清蛋白付着浮遊液をそれぞれ濃度1.0mg/mlで加えた．37℃で12時間培養後に細胞を回収し，さらにサイトスピン

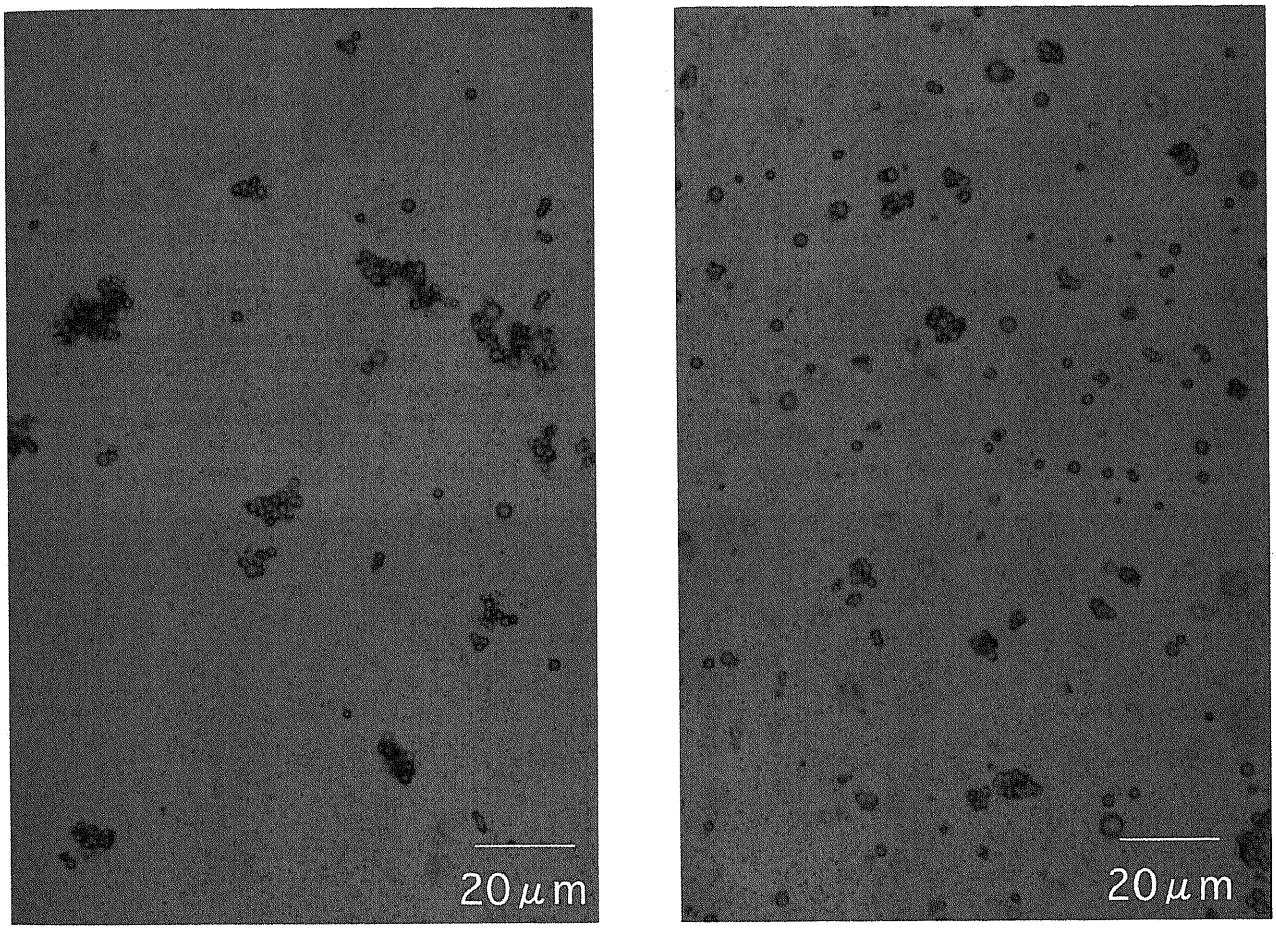

Fig. 2. Light photomicrogram of polyethylene particles with or without adsorbed serum protein. (A) A few large clusters of particles with a diameter of more than 10 μm are seen in a serum-free medium. (B) Many single particles and small clusters of particles with a diameter of less than 10 μm are seen in a medium with serum added. Bar represents 10 μm.

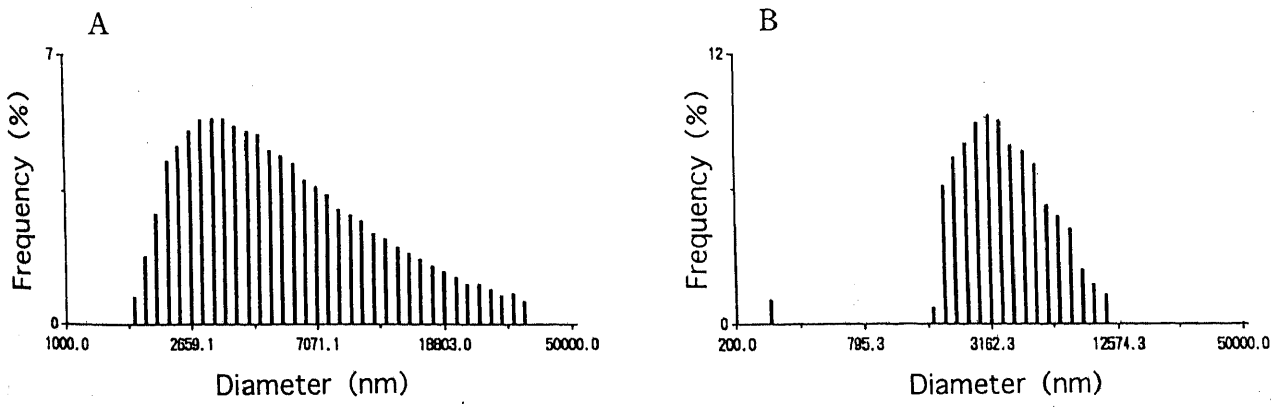

Fig. 3. Size distribution of polyethylene particles with or without adsorbed serum proteins. The size of polyethylene particles in a serum-free medium (A) and in a serum-containing medium (B) was measured by dynamic light scattering (particle concentration, 1.0mg/ml; temperature, 25.0℃).

(Shandon, Chesire, England) にて浮遊している粒子を除去して細胞成分のみとし，偏光顕微鏡で貪食の様子を観察した．

2．倒立培養法

粒子の浮上の影響を最小とし，粒子周囲の付着蛋白の影響のみを正確に反映する実験系として，さらにShirataら[16]の倒立培養法 (図1) を利用した．正立培養時と同様に4ウエルチャンバースライド上で，マクロファージを37℃で8時間培養し，ウエルの底面に細胞を付着させた．非付着細胞を除去後，マクロファージの付着した各ウエルを粒子浮遊液で充填し，プラスチックシートで密閉した．気泡の混入のないことを確認後，チャンバースライドを倒立し，浮遊液の漏出のないことを確かめ，培養を行った．光学顕微鏡にて細胞とポリエチレン粒子が良好に接触していることを確認した．

Ⅳ．粒子周囲付着蛋白によるマクロファージ活性化の評価

1．血清蛋白付着の影響

ポリエチレン粒子の蛋白非付着浮遊液，蛋白付着浮遊液を倒立培養法に使用し，粒子周囲の蛋白付着がマクロファージの粒子貪食に与える影響を検討した．マクロファージがチャンバースライド上で2×10^5個/ウエルとなるように調製し，ポリエチレン粒子濃度は0.1mg/mlとした．培養の3，6，12，24時間後

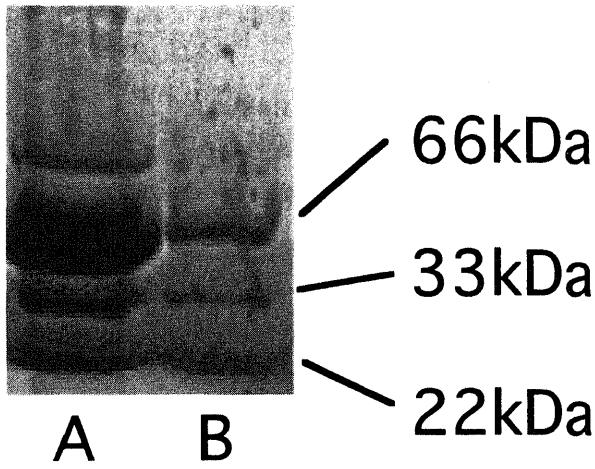

Fig. 4. Serum proteins bound to polyethylene particles. Coomassie blue staining of SDS-PAGE for a profile of human serum protein (A) and of opsonized serum protein binding to polyethylene particles (B). 30μl of the SDS protein sample was used per lane of SDS-PAGE. For comparison, 30μl of 4% human serum was used to fractionate normal serum proteins.

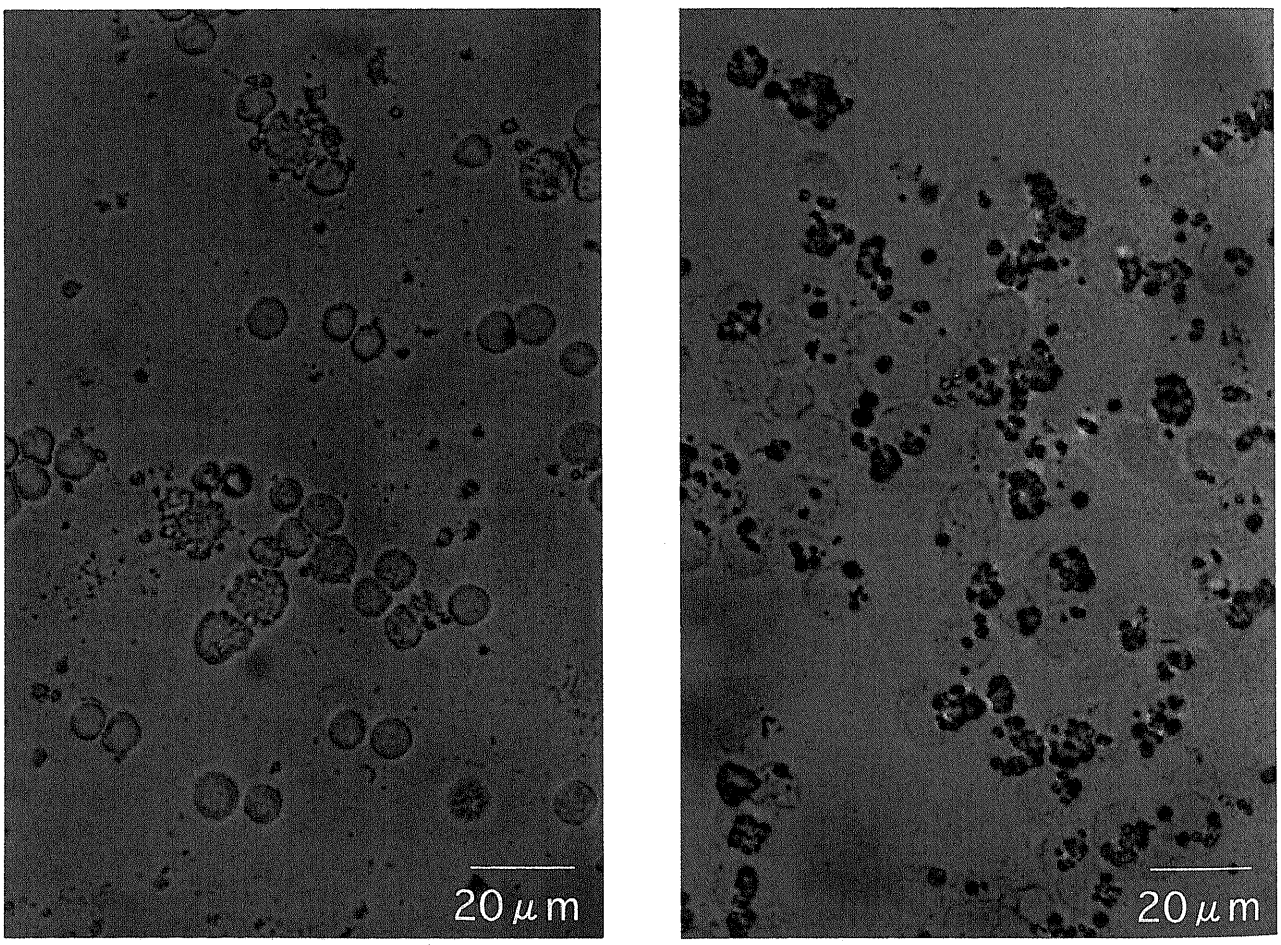

Fig. 5. Polarized light photomicrograph of macrophages phagocytosing polyethylene particles. (A) Macrophages exposed to no coating polyethylene particles in the usual culture system do not phagocytose any particles. (B) Macrophages exposed to protein-coated polyethylene particles in the usual system include many particles in their cytoplasm (cell concentration, 1×10^6 cell/well; particle concentration, 1.0 mg/ml; temperature, 37℃; incubation time, 12 hr). Bar indicates 10μm.

に上清を回収し，ELISA法にて腫瘍壊死因子α (tumor necrosis factor-α，TNF-α)，インターロイキン (interleukin, IL)-6, IL-1βをそれぞれ測定した．

予め96穴マイクロプレート (Costar, Massachusetts, USA) に抗ヒトモノクローナル抗体 (R&D Systems, Minnesota, USA) をコーティングし，オートミニウオッシャーAMW-2 (バイオテック，東京) を用いて各ウエルを4回洗浄後，緩衝液150μlを入れ，4℃で2時間静置した．2回洗浄後，測定サンプルまたは標準液 (0～1000pg/ml) 100μlを各ウエルに加え，室温で8時間反応させた．次に4回洗浄後，抗ヒトポリクローナル抗体 (大日本製薬，大阪) 100μlを入れ，室温で45分反応させた．さらに4回洗浄後，標識抗体100μlを加え，室温で30分間反応させた．その後5回洗浄し，発色液100μlを入れ，イムノリーダーNJ-2300 (ナルジェ・ヌンク・インターナショナル，東京) にて吸光度を測定し，標準曲線をもとにサンプル中の蛋白濃度を算出した．

また細胞は回収後サイトスピンし，粒子を貪食している細胞数を算定した．

2．アルブミンおよびIgGのコーティングの影響

前述の直径3μmのポリエチレン粒子を，5%ヒトアルブミン溶液 (シグマ，東京)，5% IgG溶液 (シグマ) にそれぞれ分散後，37℃で8時間静置した．血清蛋白を付着させる時と同様に，径0.45μmのメンブレンフィルターにより遠心ろ過を2回繰り返し，浮遊蛋白を除去した．これにより得られたアルブミン付着粒子とIgG付着粒子を使用し，粒子周囲のアルブミンおよびIgG付着がマクロファージの粒子貪食に与える影響を検討した．マクロファージは2×10^5個/ウエルに調製し，粒子濃度は0.1mg/mlとした．アルブミンとIgGをコーティングした粒子間で，倒立培養の12時間後のIL-1β産生量を比較検討した．また細胞は回収後サイトスピンし，粒子を貪食している細胞数を算定した．血清蛋白の付着していないポリエチレン粒子をマクロファージに貪食させた場合，およびマクロファージのみ培養した場合を対照とした．

Ⅴ．統計学的検討

測定結果は平均値±標準偏差 ($\bar{x}\pm SD$) で表記した．統計学的有意差は，F検定による等分散の検定を行い，分散が等しい時にはStudentのt検定を，等しくない時にはWelchのt検定を行った．危険率5%をもって有意差ありと判定した．

成　績

Ⅰ．ポリエチレン粒子浮遊液の光学顕微鏡像および粒子径

光学顕微鏡によるポリエチレン粒子の観察において，無血清浮遊液では凝集した大きい粒子が多く，10μm以上の巨大な粒子も存在した (図2A) のに対し，血清浮遊液では粒子径が小さく，数μm程度の粒子が中心の比較的均一な浮遊液であった (図2B)．また光散乱法による粒子径の分布は，無血清浮遊液では数μmから数十μmの広い範囲に分布している (図3A) のに対し，血清浮遊液では10μm以下の粒子が多かった (図3B)．平均粒子径でもそれぞれ7.20±6.35μm，3.31±0.59μmと，有意に血清浮遊液で粒子径が小さかった．これは疎水性のポリエチレン粒子周囲に，血清蛋白が付着してオプソニン化がおこり，粒子の凝集を妨げるためと考えられた．

Ⅱ．ポリエチレン粒子周囲の付着蛋白

SDS-PAGEによる付着蛋白の解析では，3種類の比較的鮮明な太いバンドが得られた (図4)．これらは血清を泳動した場合に得られたバンドと一致し，分子量はそれぞれ66kDa，33kDa，22kDaと推定された．プロテインシークエンスによるN末端アミノ酸配列解析の結果は6残基行ったが，それぞれDAHKSE，

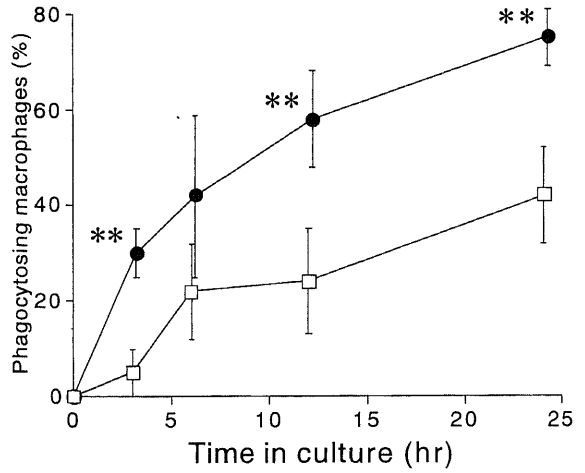

Fig. 6. Time course for percentage of macrophages phagocytosing polyethylene particles when challenged with protein-coated and no coating particles. Cells were placed on chamber slides and incubated in RPMI1640 medium. After 8 hr, the particle suspension was added and the chamber slides were inverted. Cells were gathered after 3, 6, 12, 24 hr of culture in the inverted position. Point represents $\bar{x}\pm SD$ (n = 5). ●, protein-coated particles; □, no coating particles. ** $p < 0.01$ compared to the no coating group, Student's t test.

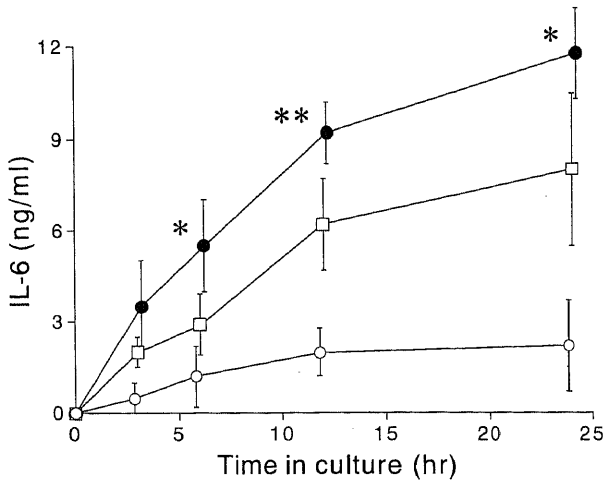

Fig. 7. Time course for IL-6 production by macrophages challenged with protein-coated and no coating polyethylene particles. Cells were placed on chamber slides and incubated in RPMI1640 medium. After 8 hr, the particle suspension was added and the chamber slides were inverted. The supernatants were gathered after 3, 6, 12, 24 hr of culture in the inverted position. Point represents $\bar{x}\pm SD$ (n = 5). ○, control; ●, protein-coated particles; □, no coating particles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the no coating group, Student's t test.

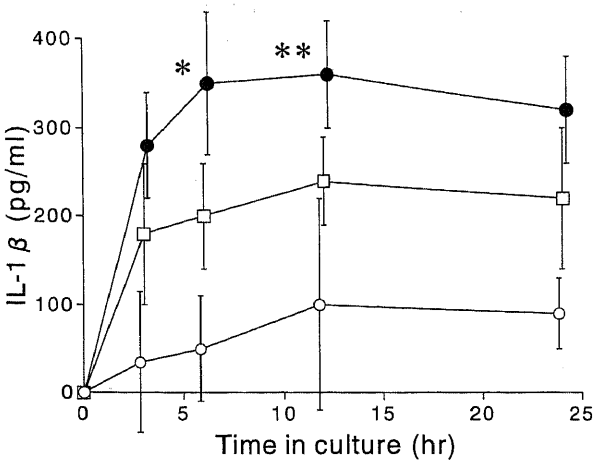

Fig. 8. Time course for IL-1β production by macrophages challenged with protein-coated and no coating polyethylene particles. The experimental protocol was identical to that described for Fig.7. Point represents $\bar{x} \pm SD$ (n = 5). ○, control; ●, protein-coated particles; □, no coating particles. *p < 0.05, **p < 0.01 compared to the no coating group, Student's t test.

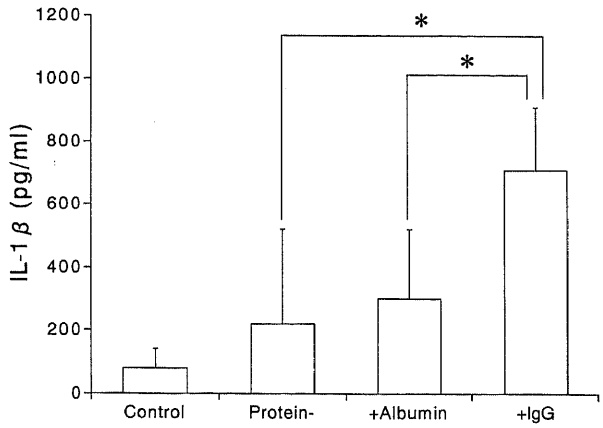

Fig. 9. Effect of albumin and IgG binding to polyethylene particles on the IL-1β production of macrophages stimulated for 12 hr by particles. Production of IL-1β was measured by using albumin-coated particles and IgG-coated particles (cell concentration, 2×10^5 cell/well; particle concentration, 1.0 mg/ml; temperature, 37℃). Columns represent the mean values of IL-1β production; vertical bars show SD (n = 5). *p < 0.05, compared to the values for no coating and albumin-coated particles, Student's t test.

EVQLVE, DIVMTQであった．血清中の蛋白濃度も考慮し，それぞれアルブミン，γ-グロブリンの重鎖，軽鎖と判断した．すなわちポリエチレン粒子周囲の付着蛋白として，アルブミン，γ-グロブリンが検出された．これらの他にも数種類の細いバンドが認められたが，プロテインシークエンスでは解析限界以下であった．

Ⅲ．正立培養法における粒子周囲の付着蛋白の影響

血清蛋白の付着していないポリエチレン粒子の浮遊液の場合では，偏光を有する物質（ポリエチレン粒子）は存在せず，粒子を貪食しているマクロファージをほとんど認めなかった（図5A）．血清蛋白の付着したポリエチレン粒子の浮遊液では，マクロファージと重なって，多数の偏光を有する粒子を認めた（図5B）．サイトスピンにより遊離のポリエチレン粒子は除去されており，粒子はすべて細胞質内に貪食されたものと考えられた．

Ⅳ．倒立培養法における粒子周囲の付着蛋白の影響

粒子周囲の付着蛋白の影響のみを正確に知るため，倒立培養法を利用した．倒立培養法でのマクロファージのポリエチレン粒子貪食は時間依存的に増加しており，血清蛋白付着のない場合に比較して，血清蛋白付着のある場合が全時間経過で大きかった（図6）．培養上清中のIL-6濃度も時間依存的に増加しており，血清蛋白付着のある場合が全時間経過で大きかった（図7）．IL-1β濃度は曝露後12時間が最大で，24時間ではやや減少していた．これも血清蛋白付着のある場合で大きかった（図8）．TNF-αは検出限界以下であった．貪食率，IL-6，IL-1βともに暴露後12時間で有意差を認めたため，以下の実験では暴露後12時間での値を比較した．

Ⅴ．アルブミン，IgG付着によるマクロファージ活性化の違い

IgGをポリエチレン粒子周囲に付着させた場合は，アルブミンを付着させた場合や，蛋白を付着させない場合に比較して，マクロファージの粒子貪食率が大きかった．また培養上清中のIL-1β濃度も粒子周囲にアルブミンを付着させた場合や，蛋白を付着させない場合に比較して，IgGを付着させた場合に有意に大きかった（$p < 0.05$）（図9）．

考　　察

Charnleyら[17]の報告以来，高度に破壊された股関節に対する手術として，臼蓋側にポリエチレンソケット，大腿骨側に金属製ステムを用い，それらをセメントで固定する人工股関節置換術が広く普及してきた．大部分の症例で良好な術後成績が報告されているが，一部にインプラントの固定が良好であるにもかかわらず，インプラント周囲に骨融解を生じる症例が存在することが報告されてきた[1]．レントゲン像上オステオライシスと呼ばれるこの部位を再置換術時に観察すると，偽膜様の組織が認められるが，Willertら[18]はこの組織中に人工関節材料の粒子が存在し，それらが異物性炎症を起こしていると最初に報告した．そしてこのポリエチレン，セメントや金属の粒子の貯留が人工関節の弛みの原因であろうと結論した．一方，Harrisら[19]は膜様組織の組織学的検討から，人工関節周囲に急激に起こるオステオライシスは，骨接合剤であるセメントの破砕粒子に対する組織反応の結果であると推定した[20]．これを避けるためにセメント非使用の人工関節も使用されるようになったが，この場合にもオステオライシスは生じ得ることが報告された[2]．すなわちセメント使用，非使用に関わらず，オステオライシスが起こることが判明し，セメント粒子以外の粒子が原因と考えられるようになった[21]．その後の周囲組織の詳細な検索によりポリエチレン粒子を貪食したマクロファージが多数観察され，現在ではソケットに使用されたポリエチレンの摩耗粉が，オステオライシスの主原因であると考えられている[22]．オステオライシスは時間経過とともに進行し，人工関節の長期成績に大きな影響を与えるため，ポリエチレン粒子によるオステオライシスの病態解明が重要な課題とされている．

近年の分子生物学的検索により，人工関節周囲組織中のポリエチレン粒子を貪食したマクロファージ，多核巨細胞等が産生

するサイトカイン，マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase，MMP) や成長因子が，骨吸収に重要な役割を果たすことが知られるようになった[23)24)]．Chibaら[25)26)]は膜様組織の生化学的，免疫組織学的検討からコラゲナーゼ，プロスタグランディンE2 (prostaglandin E2，PGE2)，IL-1，IL-6，TNF-αの活性亢進を示した．またYokohamaら[27)]はインプラント周囲肉芽組織中の異物巨細胞が，骨基質分解能を有するMMP-9を多量に産生することを示した．一方，人工関節周囲に蓄積されるポリエチレン粒子の大きさや形状に関しては，Horikoshiら[28)]，Shanbhagら[29)]，Campbellら[30)]が人工股関節の再置換術時に得られた膜様組織に含まれる粒子を分析し，大きさは1μm以下で針状のものが多いと述べている．

ところで，弛みをきたした人工関節周囲組織に，ポリエチレン粒子を貪食したマクロファージが存在し，炎症反応が観察されただけでは，ポリエチレン粒子が人工関節の弛みの直接の原因であるとは断定できない．実際にポリエチレン粒子により，炎症が惹起され，それによりオステオライシスが生じることを証明する必要がある．そこでこの現象を生体内で再現させることを目的に，粒子を生体内に注入する実験も行われている．Howieら[31)]，Kimら[32)]はラットの膝関節内にポリエチレン粒子を注入した実験を，Goodmanら[33)34)]はラットの脛骨の骨欠損部に固形のポリエチレンを挿入した実験を行い，ポリエチレン粒子を貪食したマクロファージによって引き起こされる炎症反応を示した．またGoodmanら[35)]は同じポリエチレンを関節に入れても，形状が固形か粒子かで反応が異なるとも述べている．一方，Gelbら[36)]はラットのエアーポーチモデルを用いて，大きさや形の違うセメント粒子に対する反応を調べ，白血球数，MMP，PGE2は大きい粒子の場合に高く，TNFは小さい粒子の場合に高かったと結論した．

一連の反応を詳細に検討したり，材料間の比較を正確に行うためにはさらに試験管内での実験が必要となるが，使用する粒子，細胞，投与方法，評価項目が報告者によって異なるため，結果の比較が非常に困難になっている．使用する粒子に関してはラテックス[7)8)]，セメント[6)7)]，金属[8)9)]が用いられることが多いが，ポリエチレン粒子を用いた実験はほとんどない．これはポリエチレン粒子が培養液中で浮上，凝集する性質を有するため，浮遊液の作製が困難で，粒子の混合濃度，大きさをコントロールすることが難しいからと考えられる．すなわちポリエチレン粒子を実験に用いるための何らかの工夫が求められている．

実験の問題点として第一に，ポリエチレン粒子に様々な状態のものがあり，それらの統一が困難という点がある．再置換術時に得られた組織から抽出したポリエチレン粒子は，いかに厳密に滅菌，洗浄操作を繰り返しても蛋白等の付着した粒子しか得られていない可能性があり，ポリエチレンが変性している危険性もある．すなわち実際の粒子の形や大きさは再現できるものの，他の因子が実験に影響を与え得る欠点を有する．また関節シュミレーターを用いる方法は，回収できる粒子の量が非常に少ない点が問題で，実際の粒子を再現でき，汚染もなく理想的だが，多量の粒子を実験に使用するのは難しい．一方，工業的に作られたポリエチレン粒子は球形で大きさが均一なため，実験誤差が比較的少ないと思われる．粒子径の小さいポリエチレン粒子を高精度で作製するのは困難であるが，平均径が3.0μmの粒子が製品化されており，実際に膜様組織に含まれる粒子と大きさが近く，マクロファージが十分貪食可能と考え，今回の実験ではこれを利用した．

次に，無血清の培養液にポリエチレン粒子を浮遊させようとすると，培養液上面に粒子が凝集，浮上してしまうが，これは0.95という低比重と表面荷電によるとされている．これに対しては血清添加培養液にポリエチレン粒子を浮遊させることで，凝集が抑制されると考えられてきた．そこでまずポリエチレン粒子を浮遊させる際の血清の役割について検討するため，ポリエチレン粒子の無血清浮遊液と血清浮遊液の光学顕微鏡像および粒子径を比較した．その結果，血清浮遊液では凝集が少なく粒子径が小さかった．これは疎水性のポリエチレン粒子周囲に血清蛋白が付着してオプソニン化がおこり，粒子の凝集を妨げるためと考えられた．本研究ではそこで，この粒子周囲に付着する蛋白に注目してさらに検討を進めた．

さて人工生体材料の表面に付着する蛋白については，人工血管に関する研究が進んでいる．材料表面に付着しやすい蛋白としてはアルブミン，IgG，補体やフィブリノーゲン等が知られているが，付着する蛋白によっては，凝固系や血小板を活性化してしまうため，材料表面に関する研究，工夫が行われている．Nordeら[37)38)]は異物表面が血液と接触した時に生じる吸着反応を熱力学的に解析した．Lymanら[39)]は固体表面と血液が接触すると数秒以内に蛋白の吸着が起こり，アルブミンやγ-グロブリンは30分程度で吸着が完成するとした．一方，人工関節由来の粒子に関しては，最近セメントやチタン合金粒子の周囲に付着する蛋白について報告され[40)]，検討され始めているが，ポリエチレン粒子については報告されていない．今回ポリエチレン粒子周囲に付着する蛋白の同定を試みたが，浮遊液中の遊離の蛋白との分離がまず問題となった．セメントや金属のような高比重の粒子であれば，比重差による通常の遠心分離が可能であるが，遠心してもポリエチレン粒子が浮上してしまうため，遠心濾過による分離法を用いた．遊離の蛋白の混入を防ぐため，分離操作は2回繰り返した．その結果，SDS-PAGEにより検出できたのはアルブミンとIgGであり，これらがポリエチレン粒子表面に付着する蛋白であることが判明した．

マクロファージは他の外的刺激に対し容易に活性化される性質を有するため，安定した結果を得ることを目的にセルラインを使う場合が多い[6)41)]．Glantら[42)]は3つのマクロファージのセルラインを同一粒子で刺激したところ，骨吸収活性上全く異なる結果が得られ，セルライン使用上の注意を促している．今回はヒト体内に近い条件を再現するため，ヒトマクロファージを使用した．分離の際にリンパ球の混入が懸念されるが，フローサイトメトリーにより，95％以上の細胞がマクロファージと同定できたプラスチック付着法を用いた．一方，浮上してくるポリエチレン粒子をマクロファージに貪食させる工夫として，血清添加培地を用いて可及的に粒子を分散させたり，浮上の影響を極力小さくするため，培養液をできるだけ少なくする等の努力がなされてはきた．しかし実験の再現性が不十分で，さらに改良が求められている．Changら[9)]はアガロースゲルを用い，常田ら[10)]はコラーゲンゲルを用いて，ポリエチレン粒子とマクロファージを包埋し，粒子が浮上してこないように工夫している．Horowitzら[11)]は2つのシャーレを組み合わせ，小さいシャーレの底面にマクロファージを付着させ，それをポリエチレン粒子の浮遊液が入った大きいシャーレの中に浮かす培養法を行っている．またShirataら[16)]は24穴のプレートを倒立させて行

う培養方法を考案し，ポリエチレン粒子を含めた多種類の粒子間の比較が行い得るとしている．この方法はマクロファージのプラスチック付着性と，ポリエチレン粒子の低比重による浮上の性質を利用したもので，粒子と細胞を常に接触させ，粒子濃度に再現性をもたせ得ると考えられる．今回はこの方法を4ウエルチャンバースライドに応用したが，ゲルを用いる方法に比較して簡便で，貪食したマクロファージの回収が容易であるという利点がある．実際今回の実験でも，粒子を貪食している細胞数のカウントが非常に容易に行い得た．一方，本法は通常の培養法と違い，嫌気的な培養環境になるため，細胞の生存状態が問題となるが，大気と交通のない系においても細胞は72時間程度は生存可能とされており，培養時間が24時間程度の今回の実験では問題ないものと考えた．

粒子による刺激により，マクロファージはPGE2，TNF-α，IL-1，IL-6等のサイトカインや成長因子，ケモカイン，遊走阻止因子等の種々の因子を放出する．固形の材料に関しては，Bonfieldら[43]，Millerら[44]は特にIL-1βの重要性を強調しており，Xuら[45]はTNF-αが重要であるとしている．今回の粒子での実験では，TNF-αよりもIL-1β，IL-6の方が付着蛋白の影響を反映しているという結果を得た．しかしいずれのサイトカインが最も重要かという議論は難しく，TNF-αに関してはアッセイの違いによる差が指摘されていること，試験管内の特殊な環境でのサイトカインネットワーク等も考慮する必要があると思われる．

さて人工生体材料の表面に付着する蛋白と細胞との関係については，生体内での人工血管に関する検討から，アルブミンを優先的に吸着する材料は血小板を活性化し難いが，フィブリノーゲンやγ-グロブリンを強く吸着する材料は容易に活性化すると報告されている[12]．今回粒子周囲に付着している蛋白として検出した，アルブミンとIgGを別々に粒子に付着させ，マクロファージにそれらの粒子を貪食させる実験を行うことで，両者のうちではIgGの方がマクロファージの貪食に与える影響が大きいという結果を得た．これは固形の材料の場合にはNordeら[38]，Chuangら[46]，Bonfieldら[47][48]によりすでに報告されているが，ポリエチレン粒子の場合でも同様であることが証明された．一般に，マクロファージが異物を貪食する際のメカニズムとしては，ジッパーモデルがよく知られている[38][49]．人工生体材料であるポリエチレン粒子の場合も同様に，γ-グロブリンによるオプソニン化が起こり，マクロファージの粒子貪食が促進される結果，IL-1β，IL-6等のサイトカインの産生が増加する機序が示唆された．

本研究により，ポリエチレン粒子に血清加えることによって比較的均一な浮遊液が作成可能であり，さらに倒立培養法を用いることでマクロファージに粒子を再現性をもって貪食させることが可能となった．本法はポリエチレン粒子が原因となるオステオライシスの研究を行う上で，非常に有用と考えた．またマクロファージのポリエチレン粒子貪食においては粒子周囲に付着する蛋白，特にγ-グロブリンが重要な役割を果たしており，それによってマクロファージの粒子貪食が促進される結果，サイトカインの産生が増加する機序が推察された．

結　　論

人工関節周囲のオステオライシスの原因である，マクロファージのポリエチレン粒子貪食，活性化の機序を明らかにする目的で，生体内でポリエチレン粒子周囲に付着していると考えられる蛋白に着目して試験管内で実験を行い，以下の結論を得た．

1．ポリエチレン粒子表面の付着蛋白により，マクロファージの粒子貪食促進，IL-1β，IL-6のサイトカイン産生増加が観察された．

2．ポリエチレン粒子周囲に付着する血清蛋白は，アルブミン，γ-グロブリンが主であった．

3．マクロファージとポリエチレン粒子を，再現性よく混合，接触させる方法として，倒立培養法が有用であった．

4．ポリエチレン粒子周囲にアルブミン，γ-グロブリンをそれぞれ付着させて，マクロファージの粒子貪食，サイトカイン産生を検討した結果，γ-グロブリンを付着させた場合に有意に，粒子の貪食促進，IL-1βの産生増加を認めた．

以上の成績から，マクロファージのポリエチレン粒子貪食において，粒子表面への蛋白付着，特にγ-グロブリンによるオプソニン化が重要であり，マクロファージの活性化に影響を与えていると結論した．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，本研究の機会と御校閲を賜わりました恩師富田勝郎教授ならびに，終始御指導，御鞭撻を頂きました松本忠美助教授に深甚の謝意を捧げます．また，直接御指導を頂きました東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター整形外科井上和彦教授に心から感謝致します．さらに，御支援と御協力を頂きました金沢大学整形外科学教室，東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター，医用工学研究施設の皆様に深く御礼申し上げます．なお，本研究は平成10，11年度文部省科学研究補助金奨励研究A（課題10770731号）の援助を受けたことを付記し，謝意を表します．

本論文の要旨は，第28回日本人工関節学会（金沢，1998），第42回日本リウマチ学会総会（東京，1998），第13回日本整形外科学会基礎学術集会（名古屋，1998）において発表した．

文　　献

1） Jasty M, Floyd W, Schiller A, Goldring SR, Harris WH. Localized osteolysis in stable non-septic total hip replacement. J Bone Joint Surg Am 68: 912-919, 1986

2） Murray DW, Rushton N. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. J Bone Joint Surg Br 72: 988-992, 1990

3） Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. Ann Rheum Dis 56: 414-420, 1997

4） Pandey R, Quinn J, Joyner C. Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. Ann Rheum Dis 55: 388-395, 1996

5） Gonzalez O, Smith RL, Goodman SB. Effect of size, concentration, surface area and volume of polymethylmetacrylate particles on human macrophages *in vitro*. J Biomed Mater Res 30: 463-473, 1996

6） Horowitz SM, Gautsch TL, Frondoza CG, Riley L. Macrophage exposure to polymethylmethacrylate leads to mediator release and injury. J Orthop Res 9: 406-413, 1991

7） Shanbhag AS, Jacob JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle interactions: Effect of size, composition and surface area. J Biomed Mater Res 28: 81-90, 1994

8) Gonzales JB, Purdon MA, Horowitz SM. *In vitro* studies on the role of titanium in aseptic loosening. Clin Orthop 330: 244-250, 1996

9) Chang JD, Harada Y, Jasty M, Harris W, Goldring S. Assessment of the biological activity of ultra high molecular weight polyethylene particles; evidence of a synergistic interaction with metal particles. Trans Orthop Res Soc 21, 511, 1996

10) 常田 剛，井上和彦，斎藤聖二，千葉純司，本荘 茂，富田勝郎，中沢 智．Wear particlesによる，滑膜細胞と末梢血単核球のサイトカイン産生に及ぼす影響ーコラーゲンゲル包埋培養法を用いてー．日整会誌 70: S1494, 1996

11) Horowitz SM, Gonzales JB. Effects of polyethylene on macrophages. J Orthop Res 15: 50-56, 1997

12) Brash JL, Uniyal S. Dependence of albumin-fibrinogen simple and competitive adsorption on surface properties of biomaterials. J Biomater Sci Polym Symp Ed 66, 377, 1979

13) 徳永 徹，吉田 彪，赤川清子．マクロファージの採取と精製，マクロファージ実験マニュアル，第1版，4-5頁，講談社サイエンティフィック，東京，1992

14) Nishiyama N, Yokoyama M, Aoyagi T, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Preparation and characterization of self-assembled polymer-metal complex micelle from cis-dichlorodiammineplatinum (II) and poly (ethylene glycol)-poly (α,β-aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium. Langumuir 15: 377-383, 1999

15) Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem 262: 10035-10038, 1987

16) Shirata K, Ushida T, Tateishi T. *In vitro* activation of macrophages with polyethylene particles. Advances in Polymeric Biomaterials Science.(赤池敏宏，岡野光夫，明石 満，寺野稔，由井伸彦編)，第1版，145-152頁，(株) シーエムシー，東京，1997

17) Charnley J, Cupic Z. The nine and ten year results of the low-friction arthroplasty of the hip. Clin Orthop 95: 9-13, 1973

18) Willert HG, Ludwig J, Semlitsch M. Reaction of bone to methacrylate after hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 56: 1368-1382, 1974

19) Harris WH, Shiller AL, Schaller JM. Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. J Bone Joint Surg Am 58: 612-618, 1976

20) Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. Clin Orthop 225: 193-206, 1987

21) Brown LW, Ring PK. Osteolytic changes in the upper femoral shaft following porus-coated hip replacement. J Bone Joint Surg Br 67: 218-221, 1985

22) Jasty M, Bragdon C, Jiranek W, Chandler H, Maloney W, Harris WH. Etiology of osteolysis around porus-coated cementless total hip arthroplasties. Clin Orthop 308: 111-126, 1994

23) Goldring SR, Schiller AL, Roelke M. 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 Am 65: 575-584, 1983

24) Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH. Production of Cytokines around Loosened cemented acetabular components. J Bone Joint Surg Am 75: 863-879, 1993

25) Chiba J, Schwendeman LJ, Booth RE, Crossett LS, Rubash HE. A biochemical, histologic, and immunohistologic analysis of membranes obtained from failed cemented and cementless total knee arthroplasty. Clin Orthop 299: 114-124, 1994

26) Chiba J, Rubash HE, Kim KJ, Iwaki Y. The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. Clin Orthop 300: 304-312, 1994

27) Yokohama Y, Matsumoto T, Hirakawa M, Kuroki Y, Fujimoto N, Kazushi I, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases at the bone-implant interface in loose total hip replacements. Lab Inves 72: 899-911, 1995

28) Horikoshi M, Macaulay W, Booth RE, Crossett LS, Rubash HE. Comparison of interface membranes obtained from failed cemented and cementless hip and knee prosthesis. Clin Orthop 309: 369-387, 1994

29) Shanbhag AS, Hasselman CT, Rubash HE. Technique for generating submicrometer ultra high molecular weight polyethylene. J Orthop Res 14: 1000-1004, 1996

30) Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TR, Amstutz HC. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. J Biomed Mater Res 29: 127-131, 1995

31) Howie DW, Manthey B, Hay S, Vernon-Roberts B. The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles. Clin Orthop 292: 352-357, 1993

32) Kim KJ, Kobayashi Y, Itoh T. Osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. Clin Orthop 352: 46-52, 1998

33) Goodman SB, Magee FP, Fornasier VL. Radiological and histological study of aseptic loosening using a cemented tibial hemiarthroplasty in the rabbit knee. Biomaterials 14: 522-528, 1993

34) Goodman SB, Fornasier VL, Kei J. The histological effects of the implantation of different sizes of polyethylene particles in the rabit tibia. J Biomed Mater Res 24: 517-524, 1990

35) Goodman SB, Fornasier VL, Kei J. The effect of bulk *versus* particulate polymethylmethacrylate on bone. Clin Orthop 232: 255-262, 1988

36) Gelb H, Schumacher HR, Cuckler J, Baker DG. *In vivo* inflammatory response to polymethyl-methacrylate particulate debris: Effect of size, morphology and surface area. J Orthop Res 12: 83-92, 1994

37) Norde W, Lyklema J. The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negative charged polystyrene surfaces. J Colloid Interface Sci 66: 257-295, 1978

38) Norde W, Lyklema J. Thermodynamics of protein adsorption. J Colloid Interface Sci 71: 350-366, 1979

39) Lyman DJ. Polymers in medicine. Angew Chem Int Ed Engl 13: 108-112, 1974

40) Maloney WJ, Sun DH, Nakashima Y, James R, Smith RL. Effects of serum protein opsonization on cytokine release by titanium-alloy particles. J Biomed Mater Res 41: 371-376, 1998
41) Lazarus MD, Cuckler JM, Schumacher HR, Ducheyne P, Baker DG. Comparison of the inflammatory response to particulate polymethylmethacrylate debris with and without barium sulfate. J Orthop Res 12: 532-541, 1994
42) Glant TT, Jacobs JJ. Response to three murine macrophage populations to particulate debris: Bone resorption in organ cultures. J Orthop Res 12: 720-731, 1994
43) Bonfield TL, Anderson JM. Functional versus quantitative comparison of IL-1β from monocytes/macrophages on biomedical polymers. J Biomed Mater Res 27: 1195-1199, 1993
44) Miller KM, Rose-Caprara V, Anderson JM. Generation of IL1-like activity in response to biomedical polymer implants: A comparison of *in vitro* and *in vivo* models. J Biomed Mater Res 23: 1007-1026, 1989
45) Xu JW, Konttinen YT, Lassus J, Natah S, Ceponis A, Solovieva S, Aspenberg P, Santavirta S. Tumor necrosis-factor alpha (TNF-α) in loosening of total hip replacement (THR). Clin Exp Rheumatol 14: 643-648, 1996
46) Chuang HY, King WF, Mason RG. Interaction of plasma proteins with artificial surfaces: protein adsorption isotherms. J Lab Clin Med 92: 483-496, 1978
47) Bonfield TL, Colton E, Anderson JM. Plasma protein adsorbed biomaterial polymers: Activation of human monocytes and induction of interleukin 1. J Biomed Mater Res 23: 535-548, 1989
48) Bonfield TL, Colton E, Marchant RE. Cytokine and growth factor production by monocytes/macrophages on protein preadsorbed polymers. J Biomed Mater Res 26: 837-850, 1992
49) Griffin FM, Griffin JA, Leiden JE, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow derived lymphocytes. J Exp Med 142: 1263-1282, 1975

Effect of Serum Protein Binding on the Phagocytosis of Polyethylene Particles by Macrophages Tomohiro Ojima, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8641 — J. Juzen Med Soc., **108,** 371 — 380 (1999)

Key words polyethylene particle, protein, macrophage, phagocytosis

Abstract

It is suggested that the first step in osteolysis, a complication occuring in conjunction with total joint arthroplasties, is the phagocytosis of polyethylene wear particles by macrophages, which results in the release of inflammatory cytokines from these cells and the activation of osteoclasts. It is known that the adsorption of proteins to the surface of materials is an important factor in the reaction of cells to their presence, and that this reaction varies according to the kind of proteins adsorbed. In this study, adsorption of proteins to the surface of polyethylene particles was investigated in order to clarify the mechanism of phagocytosis of polyethylene particles by macrophages and the activation of macrophages. It proved to be almost impossible to use polyethylene particles in an *in vitro* study, because they aggregate and tend to float upward in a serum free medium. The first experiments described here showed that the size of the polyethylene particles was $3.31 \pm 0.59 \mu$m when they were dispersed in a serum-containing medium and measured by dynamic light scattering, while it was $7.20 \pm 6.35 \mu$m in a serum free medium. This difference in size clearly indicates the aggregation of the particles. It also means that adsorption and opsonization of serum proteins to the surface of the particles suppresses such aggregation. The adsorbed proteins were identified as albumin and γ-globulin by SDS-PAGE. Secondly, macrophages were able to be incubated in close contact with polyethylene particles by use of an inverted culture system. In this system macrophages were attached to the bottoms of chamber slides, which were then filled with a polyethylene particle suspension, sealed with plastic film and inverted for incubation. This system was used to measure, with the aid of albumin-coated particles and IgG-coated particles, the phagocytosis of said particles and the production of cytokines by the macrophages. Macrophages showed a tendency to phagocytose more particles and to produce more IL-6 and IL-1β when incubated with protein-coated particles than with no coating ones. They also tended to phagocytose more particles and produce significantly more IL-1β when incubated for 12 hr with IgG-coated particles than with albumin-coated ones. In conclusion, we successfully created a polyethylene particle suspension in which the particles were well dispersed as a result of the addition of serum, and the inverted culture system proved to be a useful system for showing the exact effects of phagocytosis of polyethylene particles. It was shown that phagocytosis of particles by macrophages was accelerated by the presence of adsorbed proteins, especially γ-globulin, on the surface of the polyethylene particles, and that the production of cytokines by the macrophages was also increased in this case.