

コラーゲン・ゲル包埋培養法を用いたポリエチレン  
粒子による滑膜細胞のサカイン産生に関する研究  
-人工股関節置換術後の弛みとの関連について-

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9484">http://hdl.handle.net/2297/9484</a>

## コラーゲン・ゲル包埋培養法を用いたポリエチレン粒子による 滑膜細胞のサイトカイン産生に関する研究

—人工股関節置換術後の弛みとの関連について—

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)

常 田 剛

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) や変形性股関節症に対する人工股関節置換術 (total hip arthroplasty, THA) 後の人工関節周囲の骨溶解 (osteolysis) ならびに人工関節の弛み (loosening) は、人工関節摺動面から産出されるポリエチレンの粒子が重要な原因と考えられている。これは、ポリエチレン粒子を異物として、マクロファージ、線維芽細胞や異物巨細胞が反応し、サイトカインや化学伝達物質を放出し、破骨細胞が活性化される機序と推察されている。またRAに対するTHAの問題点として、長期の機能障害に起因する骨萎縮や薬剤性の骨粗鬆症だけでなく、滑膜から多量に放出されるインターロイキン (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6などのサイトカインの関与が挙げられる。これらのサイトカインは滑膜自体に対しても作用し、滑膜の活性化や増殖に関わるだけでなく、破骨細胞の活性化による関節破壊の役割もあることが指摘されている。そこで、RAに対するTHA後の弛みの機序として、これまでに検討されてきたマクロファージ、線維芽細胞や異物巨細胞のポリエチレン粒子に対する反応だけでなく、滑膜細胞のポリエチレン粒子に対する反応という機序も関わるのではないかと考えた。更に、弛みの著しい人工股関節では磨耗ポリエチレン粒子量が多いという臨床結果から、滑膜細胞に混合したポリエチレン粒子の濃度が増加するとサイトカイン濃度も上昇するのではないかと考えた。しかし、ポリエチレン粒子は低比重のため培養液に浮遊してしまい満足のいく実験系が得られていなかった。そこで本研究では、まず浮遊性の高密度ポリエチレン (high density polyethylene, HDP) 粒子を、RAの滑膜細胞とともにコラーゲン・ゲルの中に包埋して培養するコラーゲン・ゲル包埋培養法を確立した。更に、この方法を用い、ポリエチレン粒子の濃度を変えて、培養上清中に放出されるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ およびIL-6の濃度を経時的に測定した。その結果、各サイトカインの濃度は、ポリエチレン粒子の濃度依存性に変化する傾向を示した。IL-1 $\beta$ の濃度はポリエチレン粒子混合後24時間で最高となり、48時間後では減少し、72時間後には対照群と有意差を認めなかった。TNF- $\alpha$ もポリエチレン粒子混合後24時間で最高となり、直ちに減少し、48時間後には対照群と有意差を認めなかった。IL-6濃度は、遅れて48、72時間後と徐々に増加した。以上の成績から、コラーゲン・ゲル包埋培養法を用いることで滑膜細胞にポリエチレン粒子を再現性をもって反応させることが可能であることが明らかとなり、また、RA患者のTHA後の弛みの原因の一つとして、マクロファージや異物巨細胞だけでなく滑膜細胞がポリエチレン粒子に対して反応を起こし、サイトカイン産生を促すという経路が重要な役割を示すと考えられた。

**Key words** loosening, cytokines, collagen gel embedded culture method, high density polyethylene

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) や変形性股関節症などの疾患により股関節が著しく破壊された場合、人工股関節置換術 (total hip arthroplasty, THA) は極めて有用な治療方法であり、広く普及している。特にRAによる股関節破壊例において、THAは、唯一かつ不可欠な治療法である<sup>1)~3)</sup>。しかしその長期成績があまりかくなるにしたがって、人工関節に隣接した骨組織が限局性に溶解、吸収されて弛みが発生する症例の報告が増加してきた<sup>4)~8)</sup>。これは、骨セメント充填技術の稚拙、荷重による人工関節の微小な動きという生体力学的な問題が原因と考えられていたが、近年では、生体力学的に問題のない例

においても人工関節の弛みが発生するという報告から生化学的な原因が注目されてきている<sup>9)</sup>。

弛みが生じた人工関節周囲の膜様組織での分析によると、この組織は人工関節構成物の磨耗粉を取り込んだマクロファージや異物巨細胞が充満した組織であると報告されている<sup>10)</sup>。また、この組織中には、インターロイキン (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6などのサイトカインやマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinases, MMP) -1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, コラーゲナーゼ、プロスタグランジンE2が存在することが確認さ

平成12年6月14日受付, 平成12年8月4日受理

Abbreviations: FCS, fetal calf serum; HDP, high density polyethylene; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; RA, rheumatoid arthritis; THA, total hip arthroplasty; TNF, tumor necrosis factor

れている<sup>10)11)</sup>。このような報告から、現在人工関節の弛みの原因として以下のような仮説が提唱されている。すなわち、人工関節の磨耗によって生じた磨耗粉を異物として、マクロファージ、線維芽細胞や異物巨細胞が反応し、サイトカインや化学伝達物質が放出される。そして、これらのサイトカインにより骨組織の破骨細胞が活性化され、人工関節周囲に骨溶解が起こり人工関節に弛みが生じるとするものである<sup>12)13)</sup>。そして近年では、この磨耗粉の中で、金属粒子よりも人工関節の摺動面であるポリエチレンの粒子が、骨溶解に重要な関連性をもつことが臨床的<sup>14)~17)</sup>、病理学的<sup>18)19)</sup>、実験的検討<sup>20)</sup>から明確となってきた。しかし、ポリエチレン粒子は浮遊性のため、細胞との混合培養実験に用いることが困難であった<sup>21)22)</sup>。そのため、ポリエチレン粒子を用いた再現性の高い混合培養法でしかも金属粒子と同条件が得られる実験系の確立が必要と考えた。

一方、RAに対するTHAには、RA自体と薬剤性の骨粗鬆症<sup>23)</sup>の問題点に加えて、滑膜から放出されるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ そしてIL-6などの関与が指摘されている<sup>24)</sup>。これらのサイトカインは滑膜自体の活性化や増殖に関与し、さらに破骨細胞の活性化による骨、関節破壊にも関与することが報告されている<sup>25)</sup>。そこで、RAに対するTHA後の弛みの機序として、滑膜から放出されるサイトカインの影響や、マクロファージや異物巨細胞のポリエチレン粒子に対する反応だけでなく、滑膜細胞のポリエチレン粒子に対する反応も関わるのではないかと考えた。さらに、弛みの著しい人工股関節では磨耗ポリエチレン粒子量が多いという臨床結果から、滑膜細胞に混合したポリエチレン粒子の濃度が増加すると、培養上清中のサイトカイン濃度も上昇するのではないかと考えた。そこで本実験では、滑膜細胞と濃度を変えたポリエチレン粒子との混合培養による培養上清中のIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6の濃度変化を検討した。

#### 材料および方法

##### I. 滑膜細胞の調製

アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology, ACR) の基準<sup>26)</sup>を満たすRA患者の滑膜を人工関節置換術時に採取した。採取した滑膜を、RPMI 1640培地 (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) 中に浮遊させ、1000回転/分で3分間、遠心して洗浄した。さらにこの洗浄をもう一度行った。次に、RPMI 1640培地 50 ml に対してコラーゲンナーゼ (collagenase, Sigma chemical, St. Louis, USA) 25 mg とデオキシリボヌクレアーゼ (deoxyribonuclease, Sigma chemical) 7.5 mg を溶解し、径0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (ミリポア, 東京) に通した酵素液を調製した。そして洗浄した滑膜と酵素液を混合し、37 $^{\circ}$ C のウォーターバス内で攪拌しながら1時間反応させた。反応後、滑膜組織の細片をフィルターで取り除き、10% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 入り RPMI 1640培地を加えて2倍希釈し、1200回転/分で10分間、2回遠心洗浄した。さらにこの洗浄を二度行った。洗浄後、10% FCS入り RPMI 1640培地を加えて2倍希釈し、これを滑膜細胞懸濁液とした。この滑膜細胞懸濁液の一部をトリパンブルーで染色し、血球計算板にて細胞数を求めた。そして滑膜細胞数を培養ウェルあたり  $1 \times 10^6$  に調製した。

##### II. 高密度ポリエチレン (high density polyethylene, HDP) 粒子の調製

ポリエチレン粒子は、住友精化株式会社 (大阪) より供与さ

れた。ポリエチレン粒子は、密度0.958 g/cm<sup>3</sup>であり、その粒子径は  $15 \pm 5 \mu$ m で真球形である (図1)。最初にポリエチレン粒子を0.5 ml ずつ計量し、エチレンオキシド・ガス滅菌処理した後に、RPMI 1640培地を加え総量10 ml のポリエチレン懸濁液を作成し、これを基準濃度 ( $\times 1$ ) とした。この基準濃度のポリエチレン懸濁液を RPMI 1640培地で希釈し、10倍濃度 ( $\times 10$ )、100倍濃度 ( $\times 100$ )、1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) のポリエチレン懸濁液に調製した<sup>27)</sup>。

##### III. コラーゲン・ゲル包埋培養法<sup>28)29)</sup>

ポリエチレン粒子は、金属粒子と異なり密度が培養液より低い溶液に浮遊してしまうので、培養実験中、滑膜細胞に充分接触することが手技上難しい。そこで、両者が十分に接触するようにコラーゲン・ゲル包埋培養法を用い混合培養を行った。

コラーゲン・ゲル包埋培養法には、組織培養用コラーゲン・ゲル (Cellmatrix) 培養キット (新田ゼラチン株式会社, 大阪) を使用した。最初に、Cellmatrix Type I - A液 8 ml と5倍濃縮の RPMI 1640培地 1 ml を冷却しながらよく混合し、続けて再構成用緩衝液 1 ml を加えコラーゲン・ゲル混合溶液とした。この混合溶液を容量 2 ml の Chamber Slide 177380 (Nunc, Naperville, USA) に0.5 ml ずつ分注した。コラーゲン・ゲル層を作成するために、Chamber Slide を37 $^{\circ}$ C で30分間加温し、基底層とした。次に、基底層とは別途に滑膜細胞懸濁液と、基準濃度 ( $\times 1$ )、10倍濃度 ( $\times 10$ )、100倍濃度 ( $\times 100$ )、1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) の各濃度のポリエチレン懸濁液をコラーゲン・ゲル混合溶液中に

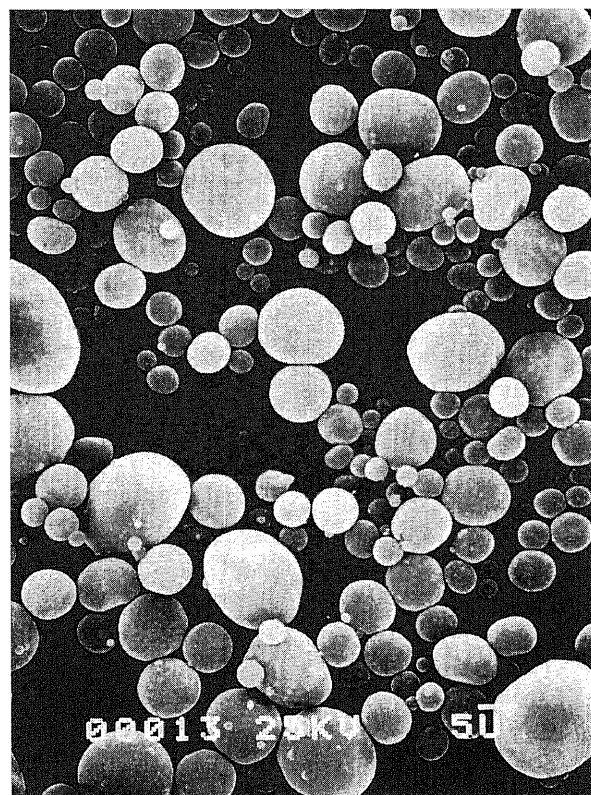


Fig. 1. Scanning electron micrographs of HDP particles. HDP fine particles were provided by Sumitomo Seika Chemicals. HDP fine particles were in the form of perfect spheres having a size of 5 to 20  $\mu$ m. Original magnification,  $\times 1000$ .

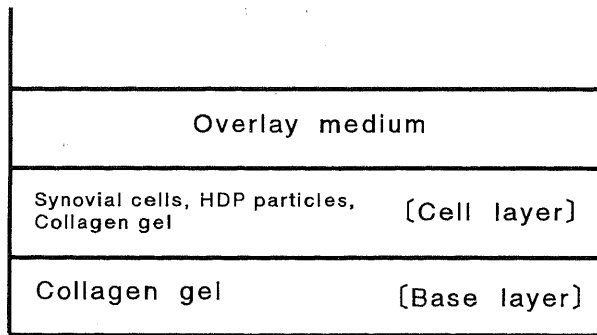


Fig.2. Schematic illustration of the collagen gel embedded culture method. A collagen gel layer is formed in the bottom of the well to create a base layer. A layer consisting of a mixture of each concentration of HDP fine particles and synovial cells is then formed over the base layer to create the cell layer. A layered culture medium was prepared by adding RPMI1640 culture medium over the cell layer.

加え冷却しながらよく混合した。滑膜細胞懸濁液と各濃度のポリエチレン懸濁液とのコラーゲン混合溶液を基底層上に0.5 mlずつ分注し、直ちに37℃で30分加温しゲル化させ細胞層とした。対照群は、ポリエチレン粒子を混合せず、滑膜細胞懸濁液のみのものとした。コラーゲン・ゲルの形成後、RPMI 1640培地を1 mlずつ重層し、これを重層培養液とし、包埋培養を行った(図2)。

#### IV. HE染色

滑膜細胞によるポリエチレン粒子の取り込みを確認するため、HE染色を行った。コラーゲン・ゲル包埋培養の24時間後、Chamber Slideからゲルを取出し、PBSでゲルを充分洗浄し、10%ホルマリン中に一晩浸け、ゲル及び細胞を固定した。固定後、流水中でホルマリンをよく洗い流し、HE染色を行った。

#### V. ELISA

重層培養液中のサイトカインとその濃度の変動を調べるため、ELISA法にて分析した。測定は、重層培養液を12, 24, 48, 72時間後に採取し、ELISA法により、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6を測定した。測定には、ELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, USA)を用いた。重層培養液を各々のサイトカインの抗体で覆われているウェルに2  $\mu$ lずつ加えた。2時間反応させた後、オートミノウォッシャー-AMW-2(バイオテック, 東京)を用いて洗浄し、アビジン-ペルオキシダーゼで標識された各々のポリクローナル抗体と反応させた。室温で1時間反応させた後、緩衝液で洗浄し、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)を用いて414 nmの吸光度で計測した。

#### VI. 免疫組織化学染色

滑膜細胞の抗IL-6抗体による免疫組織化学染色を行った。ポリエチレン粒子が混入していない対照群と100倍濃度( $\times 100$ )のポリエチレン懸濁液を含むChamber Slideからゲルを取出し、PBSでゲルを充分洗浄し、10%ホルマリン中に一晩浸け、ゲルおよび細胞を固定した。次に、70%アルコール、100%アルコール、キシレンの順に各々2時間浸した。その後パラフィン包埋切片を作成し、アビジンビオチンペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex)による免疫組織化学染色をABCキット(Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いて行

った。すなわち、常法により脱パラフィン薄切後、アセトン固定し、0.3%過酸化水素水添加PBS中に20分間静置し、組織切片中の内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。次いで、50倍希釈の正常ヤギ血清(Dako, Glostrup, Denmark)を湿室で30分間反応させ、非特異的反応を抑制した。そして、500倍希釈のマウス抗ヒトIL-6モノクローナル抗体(Biosource, Camarillo, USA)を室温で15分間反応させた。次いで、50倍希釈のビオチン標識抗マウス・ヤギ抗体を、室温で15分間反応させ、ABC溶液(Vector Laboratories, Burlingame, USA)中で1時間反応させた後、0.03%過酸化水素水を加えた0.2% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩(diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Sigma Chemical Company)で発色させた。なお、各々の反応は、0.01 MのPBSで充分に洗浄後に行った。次いで、ヘマトキシリンで淡く核を染色した後、脱水封入し検鏡した。

#### VII. 統計学的検定法

測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6の変化は、重複測定一分散分析法(repeated measure of ANOVA)を用いて検定し、ポストホックテストとしてシェフイの多重比較法を用いた。全ての統計処理で有意水準は危険率5%で有意差ありとした。

### 成 績

#### I. HDP粒子と滑膜細胞のコラーゲン・ゲル包埋培養法

HE染色標本により、滑膜細胞にポリエチレン粒子が取り込まれていることが確認された(図3)。この結果、コラーゲン・ゲル包埋培養法により、浮遊性のポリエチレン粒子と滑膜細胞との混合培養が可能であることが判明した。

#### II. ポリエチレン粒子量と滑膜細胞によるサイトカイン産生の変化

##### 1. IL-1 $\beta$ の変化

IL-1 $\beta$ の変化は、12時間後は対照群平均147.4 $\pm$ 14.7 pg/ml、基準濃度( $\times 1$ )群平均127.3 $\pm$ 14.3 pg/ml、10倍濃度( $\times 10$ )群平均117.2 $\pm$ 10.7 pg/ml、100倍濃度( $\times 100$ )群平均114.3 $\pm$ 13.7 pg/ml、1000倍濃度( $\times 1000$ )群平均115.2 $\pm$ 13.0 pg/mlで、5群間に有意差は無かった(図4-A)。24, 48, 72時間後と経時的にそれぞれ対照群は、平均425 $\pm$ 22.5 pg/ml、427 $\pm$ 21 pg/ml、197.3 $\pm$ 43.8 pg/ml、基準濃度( $\times 1$ )群は、平均2056 $\pm$ 409 pg/ml、1850 $\pm$ 426 pg/ml、245.8 $\pm$ 51.5 pg/ml、10倍濃度( $\times 10$ )群は、平均1208 $\pm$ 194 pg/ml、935 $\pm$ 109 pg/ml、67.0 $\pm$ 6.4 pg/ml、100倍濃度( $\times 100$ )群は、平均917 $\pm$ 124 pg/ml、747 $\pm$ 55 pg/ml、61.1 $\pm$ 3.7 pg/ml、1000倍濃度( $\times 1000$ )群は、平均667 $\pm$ 72 pg/ml、456 $\pm$ 30 pg/ml、26.2 $\pm$ 3.0 pg/mlと推移した。24, 48時間後の対照群と基準濃度( $\times 1$ )群、10倍濃度( $\times 10$ )群の間に有意差を認めた( $p < 0.05$ )(図4-A)。これらの結果から、ポリエチレン粒子の濃度が、基準濃度( $\times 1$ )と10倍濃度( $\times 10$ )の場合、混合培養24, 48時間後において滑膜細胞から放出されるIL-1 $\beta$ は高くなり、希釈濃度依存傾向があることが示された。

##### 2. TNF- $\alpha$ の変化

TNF- $\alpha$ の変化は、12時間後は対照群平均7.7 $\pm$ 2.1 pg/ml、基準濃度( $\times 1$ )群平均33.1 $\pm$ 12.9 pg/ml、10倍濃度( $\times 10$ )群平均27.5 $\pm$ 10.8 pg/ml、100倍濃度( $\times 100$ )群平均26.1 $\pm$ 9.6 pg/ml、1000倍濃度( $\times 1000$ )群平均25.2 $\pm$ 9.8 pg/mlで、5群間に有意差は無かった(図4-B)。24, 48, 72時間後と経時的

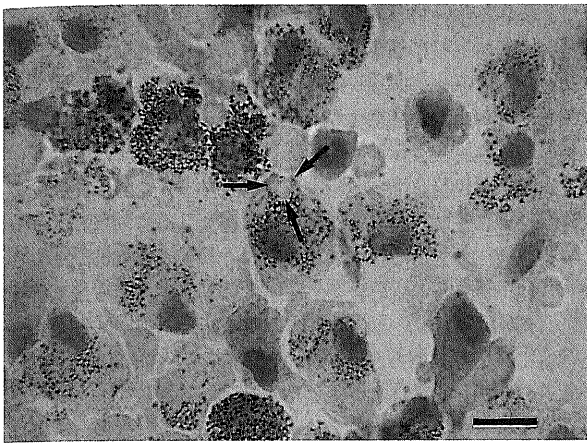


Fig. 3. Pathological findings of the synovial cells that phagocytosed HDP fine particles. The arrow heads denote HDP fine particles that have been incorporated into synovial cells. HE,  $\times 400$ . Scale bar indicates  $10 \mu\text{m}$ .

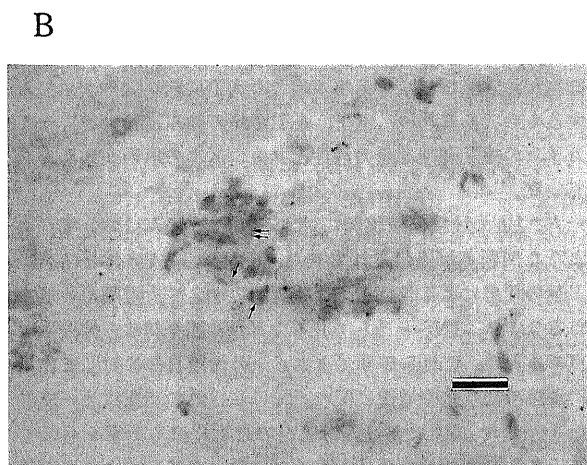
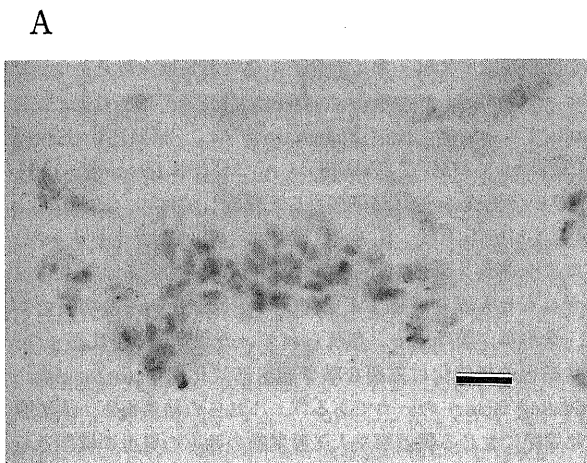


Fig. 5. Immunohistochemical staining of the synovial cells using anti-IL-6-positive antibody. Some anti-IL-6-positive synovial cells are visible (A). Numerous anti-IL-6-positive synovial cells are visible. HDP particles are shown denoted by arrow heads in the field (B). Scale bar indicates  $100 \mu\text{m}$ .

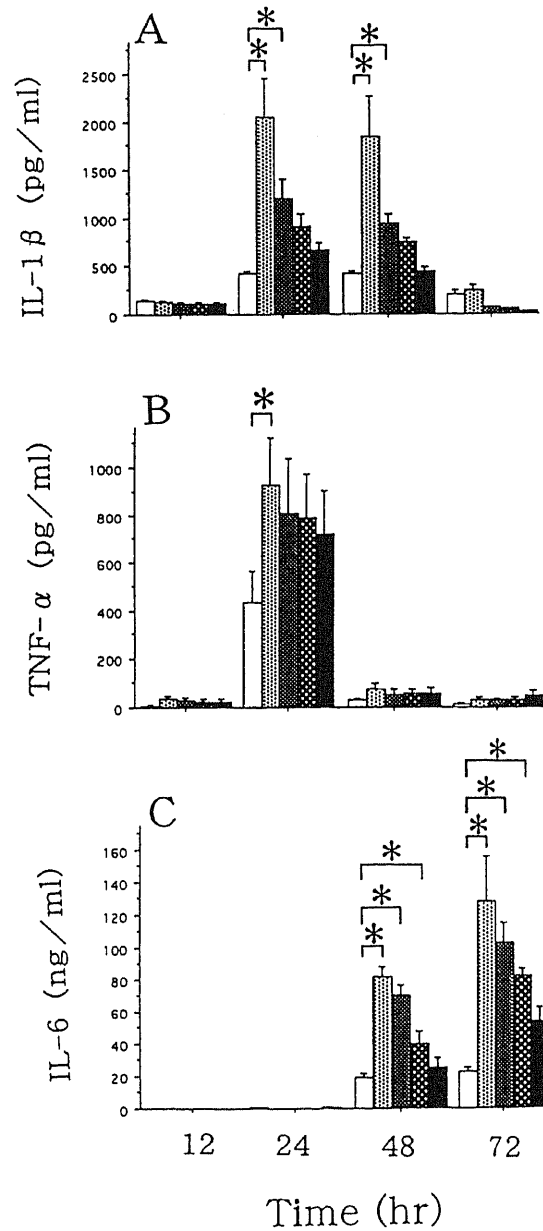


Fig. 4. Concentration of cytokines in the overlay medium. Each bar shows the  $\bar{X} \pm \text{SD}$ .  $\square$ , control;  $\square$ ,  $\times 1$ ;  $\square$ ,  $\times 10$ ;  $\square$ ,  $\times 100$ ;  $\square$ ,  $\times 1000$ . (A) Dose response for IL-1 $\beta$  to increasing HDP particle concentrations at 24 and 48 hr. (B) Dose response for TNF- $\alpha$  to increasing HDP particle concentrations at 24 hr. (C) Dose response for IL-6 to increasing HDP particle concentrations at 72 hr. \* $P < 0.05$  vs control group, by repeated measure ANOVA.

にそれぞれ対照群は、平均 $433 \pm 137$  pg/ml,  $26.5 \pm 8.5$  pg/ml,  $11.1 \pm 4.7$  pg/ml, 基準濃度 ( $\times 1$ ) 群は、平均 $935 \pm 196$  pg/ml,  $74.5 \pm 26.8$  pg/ml,  $28.0 \pm 11.3$  pg/ml, 10倍濃度 ( $\times 10$ ) 群は、平均 $811 \pm 230$  pg/ml,  $51.2 \pm 22.9$  pg/ml,  $26.1 \pm 10.0$  pg/ml, 100倍濃度 ( $\times 100$ ) 群は、平均 $793 \pm 188$  pg/ml,  $55.8 \pm 21.0$  pg/ml,  $28.5 \pm 10.5$  pg/ml, 1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) 群は、平均 $724 \pm 185$  pg/ml,  $59.5 \pm 22.5$  pg/ml,  $48.1 \pm 20.2$  pg/mlと推移した。24時間後の対照群と基準濃度 ( $\times 1$ ) 群の間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (図4-B)。これらの結果から、統計学的に有意差を認めたのは、ポリエチレン粒子の濃度が基準濃度 ( $\times 1$ ) の場合だけであったが、24時間後滑膜細胞から放出されるTNF- $\alpha$ は、希釈濃度依存傾向であった。

### 3. IL-6の変化

IL-6の変化は、12時間後は対照群、基準濃度 ( $\times 1$ ) 群、10倍濃度 ( $\times 10$ ) 群、100倍濃度 ( $\times 100$ ) 群、1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) 群とも検出限界以下であった (図4-C)。24, 48, 72時間後と経時的にそれぞれ対照群は、平均 $0.6 \pm 0.1$  ng/ml,  $19 \pm 2$  ng/ml,  $23 \pm 2$  ng/ml, 基準濃度 ( $\times 1$ ) 群は、平均 $0.4 \pm 0.1$  ng/ml,  $82 \pm 5$  ng/ml,  $128 \pm 28$  ng/ml, 10倍濃度 ( $\times 10$ ) 群は、平均 $0.4 \pm 0.3$  ng/ml,  $70 \pm 6$  ng/ml,  $104 \pm 12$  ng/ml, 100倍濃度 ( $\times 100$ ) 群は、平均 $0.4 \pm 0.2$  ng/ml,  $40 \pm 8$  ng/ml,  $83 \pm 4$  ng/ml, 1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) 群は、平均 $0.5 \pm 0.1$  ng/ml,  $25 \pm 6$  ng/ml,  $54 \pm 9$  ng/mlと推移した。48, 72時間後の対照群と基準濃度 ( $\times 1$ ) 群、10倍濃度 ( $\times 10$ ) 群、100倍濃度 ( $\times 100$ ) 群、1000倍濃度 ( $\times 1000$ ) 群の間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (図4-C)。これらの結果から、ポリエチレン粒子の濃度が高くなるほど、48, 72時間後と滑膜細胞から放出されるIL-6は、希釈濃度依存傾向があることが示された。

### Ⅱ. 免疫組織化学染色

100倍濃度 ( $\times 100$ ) 群のポリエチレン懸濁液を混合した滑膜細胞 (図5-A) は、対照群の滑膜細胞単独 (図5-B) に比較して明らかにより多くの滑膜細胞が抗IL-6抗体で染色されていた。

## 考 察

RAや変形性関節症により股関節が著しく破壊された場合、THAは欠くことのできない手術方法となっている。そのうち、RA患者の股関節罹患率は10%から17%程度<sup>30)</sup>だが、主要な荷重関節のためADL障害は特に重大となる。破壊された股関節を再建する方法として、THAは、唯一かつ不可欠な治療方法である。しかしながらTHAが普及するに従い、一部のインプラント周囲に骨溶解が生じ、人工関節に弛みが生じる症例が報告されるようになってきた<sup>4)~8)</sup>。変形性関節症に対するTHA後の弛みの発生頻度はMulroyら<sup>31)</sup>によると約10%と報告されているが、一方、RAにおけるTHA後の弛みの発生頻度は、Severtら<sup>32)</sup>によれば平均7.4年の追跡調査で25%と高頻度であると報告されている。

人工股関節の弛みは、インプラントの固定に用いる骨セメントと骨組織や、インプラントと骨組織の間で生じる<sup>33)</sup>。その原因として、まず骨セメント充填技術の稚拙や、荷重による人工関節の微小な動きという生体力学的原因が考えられた<sup>9)</sup>。しかし、セメント使用THAの症例が増加するにつれて、生体力学的な弛みを来したインプラント周囲に生じる骨吸収像とは異なった透亮像がX線像に認められ、これが弛みにつながる事が明らかになってきた。このX線透亮像部には、骨セメント

粒子を貪食した異物巨細胞やマクロファージを主体とした肉芽組織が増殖していたと報告されており<sup>12)</sup>、そのため人工股関節の弛みは、骨セメント自体の毒性や骨セメント粒子が原因であると考えられるようになった<sup>34)35)</sup>。これらの経緯から、セメントを使用しない人工股関節が開発されてきた。だが、それでも同様の弛みが生じる症例が徐々に報告されたことより<sup>36)</sup>、人工股関節の構成材料である金属粒子が原因として疑われ、コバルト・クロム・モリブデン合金やチタン合金等の金属粒子が異物反応を助長して、このようなX線透亮像を生じると考えられた<sup>37)</sup>。これに対して、人工股関節の摺動面であるポリエチレンの粒子が骨溶解に重要な関連性をもつという臨床的<sup>14)~17)38)</sup>、病理学的<sup>18)19)</sup>、実験的<sup>20)39)</sup>報告が増えてきた。これは、ポリエチレン粒子を含む関節液がインプラントと骨組織との隙間に流入すると、局所の破骨細胞が活性化され骨溶解が進行し人工股関節の弛みが生じる、というものである。そして近年では、金属粒子よりもポリエチレンソケット部から生じるポリエチレン粒子が異物反応を引き起こしやすいと指摘されるようになってきた<sup>12)</sup>。

さて、このX線透亮像部には膜様組織が存在するが<sup>36)</sup>、この膜様組織は、生体材料の微細片を取り入れたマクロファージや異物巨細胞が充満した組織であり<sup>34)35)</sup>、機械的な弛みにおける膜様組織と病理学的に鑑別可能だと報告されている<sup>12)</sup>。さらにこの膜様組織中には、サイトカインやマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinases, MMP) が存在すると報告されている<sup>40)~42)</sup>。Yokohama<sup>11)</sup>は、MMP-1 (tissue collagenase), MMP-2 (gelatinase A), MMP-3 (stromelysin-1), MMP-9 (gelatinase B)が存在すると報告しており、また、Kimら<sup>41)</sup>、Chibaら<sup>42)</sup>は、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6やコラゲナーゼ、プロスタグランジンE2が存在すると報告している。これらはいずれも骨吸収を誘導するサイトカインや化学伝達物質であり、骨溶解に関与すると考えられている<sup>43)44)</sup>。またIL-1 $\beta$ は、破骨細胞の活性化に重要な破骨細胞活性化因子 (osteoclast-activating factor) の一つである<sup>45)</sup>。これらの結果から、人工股関節周囲に生じる骨溶解や人工股関節の弛みの発生の機序として以下のような説が提唱されている。すなわち、人工股関節構成物から発生したポリエチレン粒子を中心とした異物に対して、マクロファージ、線維芽細胞や異物巨細胞が反応し、サイトカインや化学伝達物質を放出する。これらにより骨組織の破骨細胞が活性化され、骨溶解が起こり人工関節に弛みが生じるとするものである<sup>12)13)</sup>。現在、人工関節の弛みにおいて、サイトカインの相互関与とその活性化メカニズムの解明が重要視されている。

一方、RAの股関節破壊例に対するTHAの弛みにおいて、次のような問題点が提起されてきた。それは、RA自体とステロイド剤の使用による骨粗鬆症<sup>23)</sup>の問題に加えて、滑膜から放出されるIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ そしてIL-6などが重要な関与を持つという点である<sup>24)</sup>。これらのサイトカインは滑膜自体に対して作用し、滑膜の活性化や増殖に関わっている。この現象はオートクリンと呼ばれ、RAにおける滑膜炎の遷延化にも影響を与えている。さらにこれらのサイトカインには、前述したように破骨細胞の活性化による関節破壊の役割もあることが指摘されている<sup>25)</sup>。そこで、RAに対するTHA後の弛みの機序として、RA滑膜から放出されるサイトカインや、これまでに検討されてきたマクロファージや異物巨細胞のポリエチレン粒子に対する反応

だけでなく、滑膜細胞のポリエチレン粒子に対する機序も関わるのではないかと考えた。更に、弛みの著しい人工股関節では磨耗ポリエチレン粒子量が多いという臨床結果から、滑膜細胞に混合したポリエチレン粒子の濃度が増加すると培養上清中のサイトカイン濃度も上昇するのではないかと考えた。しかしながら、ポリエチレン粒子は低比重なため、再現性のある適当な実験系が無かった。そこで本実験では、滑膜細胞とポリエチレン粒子との混合培養を可能にする実験系を確立し、更に濃度を変えたポリエチレン粒子との混合培養による培養上清中のIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6の濃度変化を検討した。

まず実験系の確立についてであるが、Maloney<sup>20)</sup>が細胞培養による検討は直接生体内の状態を反映するものではない、と報告しているものの、種々の粒子の細胞に対する反応性を評価することが容易に可能となるため様々な検討がなされてきた。金属粒子については、混合培養が容易であることから、コバルト、クロム、チタン、チタン合金粒子等を用いた多くの報告がある<sup>46)47)</sup>。一方、臨床上人工股関節の弛みの原因として重要なものは、ポリエチレン粒子と考えられている<sup>48)49)</sup>、金属粒子と異なり、ポリエチレン粒子と細胞の混合培養実験の報告は少ない<sup>21)22)</sup>。実験を困難にした理由は、ポリエチレン粒子の密度が培養液より低いため溶液に浮遊してしまい、培養細胞に充分接触することが技術的に難しいからであった。そのため、現在までポリエチレン粒子の生体内の実験として、Allenら<sup>50)</sup>Howieら<sup>51)</sup>によるラット膝関節にポリエチレン粒子を注入する方法、骨孔にポリエチレン粒子を注入する方法が報告されてきた<sup>19)</sup>。一方、試験管内の実験としては、Horowitzら<sup>21)</sup>が逆にした培養シャーレ上にマクロファージを接着させる手技を用いて、ポリエチレン粒子とマクロファージ、さらにポリエチレン粒子とマクロファージと骨芽細胞を混合培養した実験を報告している。しかし、この手技では、ポリエチレン粒子の実験と金属粒子の実験を同条件下で行うことが不可能である。これを解決すべくChangら<sup>22)</sup>は、アガロース・ゲル中でマクロファージとチタン粒子、マクロファージとポリエチレン粒子、さらにマクロファージとチタン、ポリエチレン粒子の二種粒子という混合培養を行っている。一方、著者はアガロース・ゲルでなく、コラーゲン・ゲル包埋培養法を用いた。この培養法は、生体に存在するコラーゲンを用いる方法なので、Changの方法より生体に近い実験系になると考えたためである。またコラーゲン・ゲル中で細胞は、基底膜を作る能力を障害されず、元来の細胞形、体積を保つことができ、細胞分化や細胞増殖が障害されないという利点がある。しかも、コラーゲン・ゲルの抗原決定部位は主にテロペプチド中に存在するが、酵素可溶性コラーゲンではこのテロペプチドが除去されているために、抗原性が他のタンパク質に比較して非常に低く、ほとんど問題にならない利点もある<sup>28)29)</sup>。今回の実験において、ポリエチレン粒子を取り込んだ滑膜細胞を確認することができた結果から、この培養法は、ポリエチレン粒子と滑膜細胞とを十分に接触させることが可能であることが判った。また、培養上清の回収も容易に可能であった。さらに、この培養法を用いれば、ポリエチレン粒子と同条件で金属粒子との比較実験が可能になると考えている。

次いで、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ とIL-6の滑膜細胞による産生を検討したところ、これらのサイトカインは滑膜単独時よりもポリエチレン粒子と混合した場合に有意に上昇した。更に、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6の濃度はポリエチレン粒子の濃度依存性に変化し

た。また、滑膜細胞が放出したサイトカインの経時的変化は、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ においては24時間を頂点とし以後減少し、IL-6は経時的増加を示していた。これらの結果から、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ のmRNAの生成とタンパクの形成は24時間より以前に発現していると示唆された。また、IL-6に先んじてIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 濃度が上昇したが、Isshikiら<sup>52)</sup>は、IL-1やTNF- $\alpha$ がIL-6を誘導すると報告していることから、本実験におけるIL-6の産生は、ポリエチレン粒子の混合による直接的な効果と、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ を介した間接的な効果という両者の可能性が考えられた。48時間後には、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ の濃度は減少したが、これは、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ が滑膜細胞の表層レセプターに結合し、負のフィードバックが生じた可能性や、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ の可溶性レセプターアンタゴニスト<sup>53)</sup>が上清に放出されたために濃度が減少していった可能性が推察された。さて、人工関節周囲の骨溶解は、サイトカインや化学伝達物質によって破骨細胞が活性化され、これが直接の骨吸収を行なうと考えられているが、今回の結果からは、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ が直接破骨細胞を活性化する経路、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ によって誘導されたIL-6を介した経路、IL-6が直接破骨細胞を活性化する経路等が考えられた。さらに、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ は、接着分子の発現を増加させ、マクロファージの走化性を誘導する性質を持つ<sup>54)</sup>。その結果マクロファージによる粒子への反応という影響が加わると考えられる。また、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ やIL-6は、RA滑膜のオートクリン現象に関わり、滑膜細胞自身を刺激し滑膜細胞の増殖、人工関節周囲の肉芽組織形成を助長する<sup>24)40)</sup>。肉芽組織に磨耗粒子を含んだ関節液が浸入すると、磨耗粒子に対する各種細胞の反応が高まる機会が増え、より一段と骨溶解が進行する可能性も考えられた。

本実験によって、ポリエチレン粒子と滑膜細胞を再現性良く接触させるコラーゲン・ゲル包埋培養法の有用性が確認された。更にこの実験系を用いることにより、滑膜細胞とポリエチレン粒子との混合培養によってIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6の更なる上昇が確認された。この結果から、RA患者の人工股関節の弛みの原因として、滑膜細胞から通常産生されるサイトカインだけでなく、滑膜のポリエチレン粒子への反応によって産生されるサイトカインも重要であると考えた。臨床においては、RAのTHA後の弛みを少なくするには、人工関節置換の手術手技面だけでなく、磨耗粉が滑膜に接する機会を軽減させるため、滑膜を可能なかぎり除去する必要があると考えた。

## 結 論

RAによる股関節破壊に対するTHA後、インプラント周囲に生じる骨溶解と人工関節の弛みの機序を明らかにするために、滑膜細胞のポリエチレン粒子に対する反応に着目して実験を行い、以下の結論を得た。

1. 浮遊性のポリエチレン粒子と滑膜細胞を、再現性よく混合し、接触させる方法としてコラーゲン・ゲル包埋培養法は有用であった。
2. 滑膜細胞単独と比較して、ポリエチレン粒子を混合することにより、滑膜細胞より産生されたIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6は増加した。
3. 滑膜細胞により産生されたIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6は、混合したポリエチレン粒子の濃度依存傾向を示した。
4. 滑膜細胞により産生されたIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ は、混合後24時間で最高となり、IL-6は時間依存で増加を示した。

以上の成績から, RA患者の人工股関節の弛みの原因として, 滑膜細胞から通常産生されるサイトカインだけでなく, 滑膜のポリエチレン粒子への反応によって産生されるサイトカインも重要であると結論した。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部整形外科学講座恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を賜りました金沢医科大学医学部整形外科学講座松本忠美教授に心より謝意を表します。さらに, 研究遂行にあたり貴重な御意見を賜りました東京女子医科大学第二病院整形外科学講座井上和彦教授に厚く御礼申し上げます。また, 多大なる御協力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の諸先生方に心から感謝いたします。なお, 本論文の要旨の一部は, 第11回日本整形外科学会基礎学術集会(1996, 鹿児島), 第23回日本股関節学会(1996, 東京)において発表した。

### 文 献

- 1) 浅井富明, 坪井声示, 長屋郁郎. リウマチ股関節. 関節外科10: 122-133, 1991
- 2) 松野丈夫, 金田清志. 慢性関節リウマチにおける人工股関節置換術 - Hybrid型THAの適応と成績 -. 関節外科12: 39-45, 1993
- 3) Severt R, Wood R, Cracchiolo A. Longterm follow-up of cemented total hip arthroplasty in rheumatoid arthritis. Clin Orthop 265: 137-145, 1990
- 4) Harris WH, Schiller AL. Extensive localized bone reaction in the femur following total hip replacement. J Bone Joint Surg Am 58: 612-618, 1976
- 5) Anthony PP, Gie GA. Localised endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented total hip arthroplasties. J Bone Joint Surg Br 72(6): 971-979, 1990
- 6) Zicat B, Engh CA. Patterns of osteolysis around total hip components inserted with and without cement. J Bone Joint Surg Am 77(3): 432-439, 1995
- 7) Mohler CG, Callaghan JJ. Early loosening of the femoral component at the cement-prosthesis interface after total hip replacement. J Bone Joint Surg Am 77(9): 1315-1322, 1995
- 8) Havelin LI, Espehaug B. Early aseptic loosening of uncemented femoral components in primary total hip replacement. J Bone Joint Surg Br 77(1): 11-17, 1995
- 9) Schmalzried TP, Kwong LM, Jasty M, Sedlacek RC, Haire TC, O'Conar DO, Bragdon CR, Kabo JM, Malcolm AJ, Path MRC, Harris WH. The mechanism of loosening of cemented acetabular components in total hip arthroplasty. Clin Orthop 274: 60-78, 1992
- 10) Horikoshi M, Macaulay W, Booth RE, Crossett LS, Rubash HE. Comparison of interface membranes obtained from failed cemented and cementless hip and knee prostheses. Clin Orthop 309: 69-87, 1994
- 11) Yokohama Y, Matsumoto T. Production of matrix metalloproteinases at the bone-implant interface in loose total hip replacements. Lab Invest 72(6): 899-911, 1995
- 12) 鳥巢岳彦. 人工関節の限局性骨溶解. リウマチ35 (1): 112-122, 1995
- 13) 黒木良克, 平川一美, 林 淳慈, 今里有紀彦, 平川 誠. 人工股関節置換術後に生じる骨透亮像の検索. 日整会誌69: 927-937, 1995
- 14) Lombardi AV, Mallory TM, Vaughn BK, Drouillard AP. Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads. J Bone Joint Surg Am 71(9): 1337-1342, 1989
- 15) Sochart DH, Brewood AFM. High density polyethylene wear debris from a Charnley-Hastings bipolar hemiarthroplasty causing gross femoral osteolysis. J Ortop Rhumatology 9, 173-176, 1996
- 16) Cotteril P, Hunter GA, Tile M. A radiographic analysis of 166 Charnley-Muller total hip arthroplasties. Clin Orthop 163: 120-126, 1982
- 17) Linder L, Lindberg L, Carlsson A. Aseptic loosening of hip prostheses. Clin Orthop 175: 93-104, 1983
- 18) Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O'Neill DA, Harris WH. 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(5): 575-584, 1983
- 19) Goodman SB, Fornasier VL, Lee J, Kei J. The histological effects of the implantation of different of polyethylene particles in the rabbit tibia. J Biomed Mater Res 24: 517-524, 1990
- 20) Maloney WJ, Smith R. Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate wear debris. J Bone Joint Surg Am 77(9): 1448-1461, 1995
- 21) Horowitz SM, Gonzales JB. Effects of polyethylene on macrophages. J Orthop Res 15: 50-56, 1997
- 22) Chang JD, Harada Y. Assessment of the biological activity of ultra high molecular weight polyethylene particles; Evidence of a synergistic interaction with metal particles. Orthopaedic research society, 42nd annual meeting: 511, 1996
- 23) 田辺 学, 後藤 眞. 副腎皮質ステロイド薬. New Mook 整形外科1 (越智隆弘, 菊地臣一編) 第一版, 144-151, 金原出版社, 東京, 1997
- 24) 土井田稔, 水野耕作. 慢性関節リウマチの病理組織像. New Mook 整形外科1 (越智隆弘, 菊地臣一編) 第一版, 97-106, 金原出版社, 東京, 1997
- 25) Butler DM, Piccoli DS, Hart PH. Stimulation of human synovial fibroblast DNA synthesis by recombinant human cytokines. J Rheumatol 15: 1463-1470, 1988
- 26) Arnett FC, Edworthy S, Block DA. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31: 315-324, 1988
- 27) Maloney WJ, Smith RL, Castro F, Schurman DJ. Fibroblast response to metallic debris in vitro. J Bone Joint Surg Am 75(6): 835-844, 1993
- 28) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橋 陽一, 草間良恵, 古閑睦好. コラーゲン・ゲル培養法 (I). 組織培養 13 (1): 26-30, 1987
- 29) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橋 陽一, 草間良恵, 古閑睦好. コラーゲン・ゲル培養法 (II). 組織培養 13 (2): 64-68, 1987
- 30) Ranawat CS. Surgery of the hip. Curr Orthop 3: 146-149,



- 1989
- 31) Mulroy RD, Harris WM. The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 72: 757-760, 1990
  - 32) Severt R, Wood R, Cracchiolo A. Longterm follow-up of cemented total hip arthroplasty in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 265: 137-145, 1990
  - 33) Johanson NA, Bullough PG, Wilson PD, Salvati ED, Ranawat CS. The microscopic anatomy of the bone-cement interface in failed total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 218: 123-135, 1987
  - 34) Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. *Clin Orthop* 225: 192-206, 1987
  - 35) Willert HG, Ludwig J, Semlitsch M. Reaction of bone to methacrylate after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 56: 1368-1382, 1974
  - 36) Santavirta S, Hoikka V, Eskola A, Kontinen YT, Paavilainen T, Tallroth K. Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 72(6): 980-984, 1990
  - 37) Witt JD, Swann M. Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br* 73(4): 559-563, 1991
  - 38) Brinkmann KE, Heilmann K. Klinische röntgenologische und feingewebliche Untersuchungen an ausgelockerten Hüftgelenksprothesen. *Arch Orthop Unfall-Chir* 80: 333-342, 1974
  - 39) Willert HG, Ludwig J, Semlitsch M. Reaction of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 11:157-164, 1977
  - 40) Kontinen YT, Xu JW, Patiala H, Imai S, Waris V, Li TF, Goodman SB, Nordsletten L, Santavirta S. Cytokines in aseptic loosening of total hip replacement. *Current Orthopaedics* 11:40-47, 1997
  - 41) Kim KJ, Rubash HE, Wilson SC, D'antonio JA, McClain EJ. A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop* 287: 142-152, 1993
  - 42) 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
  - 43) Goldring SR, Goldring MB. Cytokines and skeletal physiology. *Clin Orthop* 324: 13-23, 1996
  - 44) Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. *Clin Orthop* 231: 239-271, 1988
  - 45) Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell RGG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306(24): 378-380, 1983
  - 46) Rae T. The toxicity of metals used in orthopaedic prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 57(4): 444-450, 1975
  - 47) Manlapaz M, Maloney WJ, Smith RL. *In vitro* activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *J Orthop Res* 14: 465-472, 1996
  - 48) Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. *Clin Orthop* 258: 95-107, 1990
  - 49) Sychterz CJ, Moon KH, Hashimoto Y, Terefenko KM. Wear of polyethylene cups in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 78(8): 1193-1200, 1996
  - 50) Allen M, Brett F, Millett P, Rushton N. The effects of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface. *J Bone Joint Surg Br* 78(1): 32-37, 1996
  - 51) Howie DW, Roberts BV, Oakeshott R, Manthey B. A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J Bone Joint Surg Am* 70(2): 257-263, 1988
  - 52) Isshiki H, Akira S, Tanabe O. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol* 10:2757-2764, 1990
  - 53) 本荘 茂. 急性期炎症蛋白産生調節におけるインターロイキン1リセプター-アンタゴニストの役割に関する研究. *金沢大学十全医学会雑誌* 104: 492-504, 1995
  - 54) Maloney WJ, James RE, Smith RL. Human macrophage response to retrieved titanium alloy particles in vitro. *Clin Orthop* 322: 268-278, 1996

**Synovial Cell Response to High Density Polyethylene Particles in vitro - Analysis by Collagen Gel Embedded Culture Method -** Tsuyoshi Tokita, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Juzen Med Soc., **109**, 240 - 248 (2000)

**Key words** loosening, cytokines, collagen gel embedded culture method, high density polyethylene

#### **Abstract**

The involvement of polyethylene particles produced from the artificial joints is thought to be an important factor in periprosthetic osteolysis and loosening following THA for treatment of RA. This is presumed to occur by means of a mechanism involving the reaction of macrophages, fibroblasts and foreign body giant cells to the presence of particles resulting in the release of cytokines such as IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, that lead to activation of osteoclasts. Therefore, we proposed the hypothesis that the mechanism of loosening following THA with respect to RA not only involves the reaction of macrophages, fibroblasts and foreign body giant cells to particles that has been discussed in previous studies, but also a mechanism involving the reaction of synovial cells to particles. Moreover, since clinical results have been obtained indicating that there are high levels of particles in the hip joints exhibiting marked loosening, we also proposed the hypothesis that as the concentration of particles mixed with synovial cells increases, there is also a corresponding increase in cytokine concentration. However, due to the low specific gravity of polyethylene particles, it has not been possible to obtain a satisfactory experimental system since these particles end up being suspended in culture medium. Thus in this study, we first established a collagen gel embedded culture method in which floating HDP particles were cocultured in the collagen gel with synovial cells. Moreover, the concentrations of IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 released into the culture medium were measured over time while changing the concentration of particles. As a result, the concentration of each cytokine tended to change dependently with the concentration of particles. The concentration of IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  reached a maximum at 24 hours after mixing with particles, decreased after 48 hours and there were no significant differences with a control group after 72 hours. The concentration of IL-6 demonstrated a delayed increase, rising gradually at 48 and 72 hours after mixing. On the basis of these results, the use of the collagen gel embedded culture method was clearly shown to be able to allow synovial cells to react to particles with good reproducibility. In addition, it was also suggested that, not only macrophages and foreign body giant cells, but also a pathway that promotes the production of cytokines by causing synovial cells to react to particles, plays an important role as one of the causes of loosening following THA in RA patients.