人工関節の摩耗粉形態がサイトカイン産生に与える影響

Influence of morphological aspect of wear particle from artificial joint on production of cytokine.

正 徳永 和明・熊本大学発生医学研究所

Kazuaki TOKUNAGA, Kumamoto Univ.

正 ○中西 義孝・熊本大学大学院

Yoshitaka NAKANISHI, Kumamoto Univ.

学 松浦 達己・熊本大学大学院

Tatsuki MATSUURA, Kumamoto Univ.

非 三浦 裕正・愛媛大学大学院

Hiromasa MIURA, Ehime Univ

非 斉藤 典子・熊本大学

Noriko SAITOH, Kumamoto Univ.

学 南部 拓也・熊本大学

akuya NANBU, Kumamoto Univ.

正 日垣 秀彦・九州産業大学

Hidehiko HIGAKI, Kyushu Sangyo Univ.

非 中尾 光善・熊本大学

Mitsuyoshi NAKAO, Kumamoto Univ.

非 水田 博志・熊本大学大学院

Hiroshi MIZUTA, Kumamoto Univ.

非 岩本 幸英・九州大学

Yukihide IWAMOTO, Kyushu Univ.

Key Words: Surface profile, UHMWPE, Wear particle, Cytokine, Artificial joint

1. はじめに

人工関節の耐用年数を延長するためには軸受材料である超高分子量ポリエチレン(Ultra-High Molecular Weight Polyethylene; UHMWPE)の摩耗を抑制しつつ、発生する摩耗粉のサイズは大きくする必要がある。

著者ら¹⁾は UHMWPE の相手面となる Co-Cr-Mo 合金の表面粗さを $0.001\ \mu\text{m}$ (Ra) まで平滑化し、さらに 50nm 程度の孔や溝を 3% ほど付与することで、UHMWPE の摩耗抑制と摩耗粉肥大が同時に起こることを実験的に確認した。

本報では、摩耗試験により回収された摩耗粉観察と摩耗粉がマクロファージ細胞株に与える影響について調査を行ったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 摩耗試験 試験装置の概略を図 1 に示す。直径 12mm の UHMWPE(平均分子量 600 万)ピンを接触面圧 6.0MPa で Co-28Cr-6Mo 合金ディスクに接触させ、多方向滑りを行った。

実験に供する Co-28Cr-6Mo 合金表面を光学式表面粗さ解析装置(WYKO)により解析した結果を図 2 に示す。ディスクの表面プロファイルとして一般的な表面状態のもの(Surface A)と、表面粗さを 1/10 にし、基準面 50nm レベルの溝と孔を面積占有率としてそれぞれ 3% ずつ付与したもの(Surface F)を準備した。潤滑液はタンパク質、脂質などの血清由来成分を含んだものを使用した。総滑り距離は 15km とした。実験後の UHMWPE の摩耗重量計測より総摩耗量を算出した。

2. 2 摩耗粉観察 図 2 の Surface A および F にて摩耗試験を行った潤滑液より関節液成分を除去した。フィルター処理により摩耗粉を回収し、電子顕微鏡による観察を行った。摩耗粉を単純形態のもの(Simple type)と、複雑な形状を有しているもの(Complicated type)の二種類に大別した。また、長手方向(LI)と短軸方向(Ls)を定め(図 4), Aspect ratio ($=\text{LI}/\text{Ls}$)および摩耗粉サイズ(LI)を計測し、度数分布を求めた。

2. 3 細胞試験 2.2 のフィルター処理上の摩耗粉を蒸留水にて遊離させ、オートクレーブによる滅菌処理を行った。

Fig.1 Schematic illustration of pin-on-disc tester.

Fig.2 Surface profiles of Co-Cr-Mo alloy disc.

マウス由来 RAW246.7 細胞を 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium で 5% CO_2 , 37°C で継代培養し, 2×10^6 cell/ml に調製した。12 穴プレートデイスに細胞懸濁液 2ml を加え, 24 時間培養した。各ウェルを UHMWPE 摩耗粉を含む培養液で充填し, プラスチックシールで密閉した。気泡の混入がないことを確認し, 24 時間倒立培養した。倒立培養後の細胞の位相差画像を取得するとともに, 各細胞から TRIzol を用いて RNA を回収した。2 μg

Fig.3 Morphology classification of wear debris.

Fig.4 Definition of long axis (Ll) and short axis (Ls).

total RNA から ReverTra Ace® を用い逆転写反応を行い, cDNA を合成した. その後, $TNF-\alpha$, IL-6 プライマーと SYBR Green I を用いて定量的 PCR (Applied Biosystems) を行い, $TNF-\alpha$ および IL-6 の発現を解析した.

3. 結果および考察

3. 1 摩耗試験 UHMWPE の総摩耗量を図 5 に示す. 提案する Co-Cr-Mo 合金の表面テクスチャリング (Surface F) は総摩耗量の抑制に効果的であることが再確認された.

Fig.5 Wear of UHMWPE, N=5.

3. 2 摩耗粉観察 実験結果を図 6 ~ 8 に示す. 提案する表面テクスチャリング (Surface F) は, UHMWPE の摩耗粉形態に影響を与えないが, 生体反応性が活発化すると指摘されている $0.2\mu m$ 以下の摩耗粉数を減少させ, 摩耗粉を肥大化させることが再確認された.

3. 3 細胞試験 培養液中の摩耗粉濃度は Surface A が $1.0mg/ml$, F が $0.27mg/ml$ となった. 細胞形態を図 10 に示す. Surface A の摩耗粉を添加した細胞では, 細胞数の減少 (一部がディッシュよりはがれた可能性) が観察された. 遺伝子

Fig.10 Alteration of cellular morphology.

Fig.6 Ratio between simple type and complicated type of wear debris. 150 particles in each condition.

Fig.7 Distributions as a function of aspect ratio for wear debris. 150 particles in each condition.

Fig.8 Distributions as a function of particle size for wear debris. 150 particles in each condition.

Fig.11 Genetic expression of TNF and IL-6 in each condition.

発現パターンを図 11 に示す. Surface A の摩耗粉を添加した細胞では IL-6 の発現量が約 2 倍となり, 炎症反応の誘導の可能性が示唆された.

参考文献

- 1) 中西ら: 日本臨床バイオメカニクス学会誌 28:205-209, 2007