



Title	放射線量の異なるビタミンE配合高ポリエチレンライナー摩耗粉における炎症性骨吸収の検討
Author(s)	塩田, 惇喜
Description	配架番号 : 2905
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16413号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16413
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95948
Type	doctoral thesis
File Information	SHIOTA_Junki.pdf



学 位 論 文

放射線量の異なるビタミン E 配合高ポリエチレンライナー摩耗粉に

おける炎症性骨吸収の検討

(Impact of different dosages of e-beam irradiation on mechanical strength
of vitamin E-blended ultra-high-molecular-weight polyethylene and the
osteolytic activities of its wear debris)

2 0 2 5 年 3 月

北 海 道 大 学

塩 田 惇 喜

学 位 論 文

放射線量の異なるビタミン E 配合高ポリエチレンライナー摩耗粉に
おける炎症性骨吸収の検討

(Impact of different dosages of e-beam irradiation on mechanical strength
of vitamin E-blended ultra-high-molecular-weight polyethylene and the
osteolytic activities of its wear debris)

2 0 2 5 年 3 月

北 海 道 大 学

塩 田 惇 喜

目 次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・ ・	1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・	3 頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・	7 頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・	8 頁
実験方法	・ ・ ・ ・ ・	10 頁
実験結果	・ ・ ・ ・ ・	13 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・	17 頁
総括及び結論	・ ・ ・ ・ ・	20 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	21 頁
利益相反	・ ・ ・ ・ ・	22 頁
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	23 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Junki Shiota, Daisuke Takahashi, Chen Liyile, Shunichi Yokota, Tomoyo Yutani, Hend Alhasan, Endo Tsutomu, Tomohiro Sugimoto, Keita Uetsuki, M Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki

Impact of different dosages of e-beam irradiation on mechanical strength of vitamin E-blended ultra-high-molecular-weight polyethylene and the osteolytic activities of its wear debris.

Materialia, Volume 39. 102345, March 2025

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 塩田惇喜、アラー照川、高橋大介、清水智弘、松前元、江畑拓、横田隼一、西田善郎、北原圭太、徳廣泰貴、岩崎倫政

人工関節ポリエチレンライナーにおける放射線架橋線量の検討

第 141 回北海道整形災害外科学会 2022 年 7 月 2-3 日、札幌、口演

2. 塩田惇喜、アラー照川、高橋大介、清水智弘、松前元、江畑拓、横田隼一、西田善郎、北原圭太、徳廣泰貴、岩崎倫政

人工関節置換術後無菌性緩みに対するポリエチレンライナー放射線架橋線量の検討

第 44 回日本バイオマテリアル学会 2022 年 11 月 21-22 日、東京、口演

3. Junki Shiota^{1, 2}, Yasumitsu Okoshi¹, Tomoka Sumiya³, Kota Miura³, Kengo Ukishiro³, Kensaku Kawakami⁴, Koji Iwasaki², Tatsunori Maeda¹, Rikiya Baba⁵, Taiki Tokuhira^{1, 2}, Yuki Suzuki², Tomohiro Onodera², Eiji Kondo⁶, Norimasa Iwasaki

Osteolytic Activities of Polyethylene Liner Wear Debris After Exposure to Different

Dosages of Radiation

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2023 February 10-14, 2023, Dallas, USA, poster

4. 塩田 惇喜, アラー 照川, 清水 智弘, 西田 善郎, 北原 圭太, 徳廣 泰貴, 高橋 大介, 岩崎 倫政

人工関節置換術後無菌性緩みに対する Vit-E 配合ポリエチレンライナー放射線架橋線量の検討

第 39 回日本整形外科基礎学術集会 2024 年 10 月 17-18 日、東京、ポスター

要旨

【背景と目的】

変形性関節症（Osteoarthritis; OA）は、関節軟骨の不可逆的な変性、滑膜の炎症、軟骨下骨の硬化が進行する慢性疾患であり、主に高齢者に多く発症する。OA は、関節腫脹や可動域制限、疼痛を引き起こし、特に膝関節や股関節では歩行障害など、日常生活に深刻な支障をもたらす。近年の平均寿命の延伸と高齢化の進行に伴い、OA の罹患率は世界的に増加しており、2022 年には約 3 億人以上が罹患していると報告されている。初期の OA では薬物療法や理学療法が実施されるが、進行した OA に対しては人工関節置換術が有効な治療法として広く行われている。人工関節置換術は、OA による疼痛を軽減し、関節可動域を劇的に改善するものの、その長期的な安定性や合併症のリスクが依然として大きな課題である。

人工関節置換術後の合併症の中でも、「無菌性緩み」は特に深刻な問題であり、人工関節の寿命を短縮する主な原因となっている。この無菌性緩みは、人工関節の摺動面から産生される摩耗粉が、マクロファージにより異物として認識され、炎症反応を誘発することに起因する。慢性的な炎症は局所の骨吸収を促進し、インプラントの不安定性を引き起こす。この状態が進行すると、患者は強い痛みや関節の可動域低下、歩行能力の低下といった生活の質（Quality of Life; QOL）を著しく損なう障害に苦しむことになる。現行の治療法では、再置換術が唯一の選択肢であり、これに伴うコストや患者負担の軽減を目指した人工関節材料の改良が求められている。

人工関節摺動面に使用される材料の中で、超高分子量ポリエチレン（Ultra-High Molecular Weight Polyethylene; UHMWPE）は、耐摩耗性と生体適合性の観点で広く用いられている。UHMWPE は放射線照射量を増加させることで架橋密度を高め、耐摩耗性を向上させることが可能である。しかし、放射線照射量の増加に伴いフリーラジカルの生成も増加し、これが酸化反応することでポリエチレン鎖の劣化が進み、衝撃強度の低下を招くといった課題が生じる。現在、臨床で広く使用されているのは 300 kGy を照射した UHMWPE であり優れた臨床成績が報告されている。一方で近年の人工股関節においては脱臼率の低下や可動域改善目的として、大きな骨頭径のインプラントが使用されるケースが増加している。その結果、薄くてもより高い衝撃強度を持つ摺動面が求められるようになってきた。さらに、近年の機械試験では、150 kGy を照射した UHMWPE が同等の耐摩耗性を有し、かつ優れた衝撃強度を示すことが明らかになっており、その臨床応用が期待されている。しかし、異なる放射線量で照射された UHMWPE 摩耗粉

が生体内で引き起こす炎症反応や骨吸収能への影響については十分に解明されていない。

本研究の目的は、150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した UHMWPE 摩耗粉が、生体内でどのような炎症反応および骨吸収能を引き起こすかを評価することである。

【対象と方法】

実験 1. 摩耗粉の形態学的評価

UHMWPE 摩耗粉は、ポリエチレンライナーから作成した。放射線照射後の UHMWPE をマルチビーズショッカーで粉砕し、分級を行った。得られた摩耗粉の粒子サイズと分布を粒子画像解析装置および走査型電子顕微鏡で観察した。

実験 2. マクロファージと摩耗粉の共培養モデル

150kGy と 300kGy の放射線を照射した摩耗粉（150kGy 共培養群、300kGy 共培養群）をそれぞれマウスマクロファージと共培養した。培養したマクロファージの、IL-6、IL-1 β 、TNF- α といった炎症性サイトカインの発現を、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Quantify real time Polymerase Chain Reaction; qPCR）を用いて解析した。また、Runx-related transcription factor 2 (RUNX2) および Alkaline phosphatase (ALP) といった骨形成能の発現をウェスタンブロッティング法で観察した。

実験 3. マウス頭頂骨骨吸収モデルを用いた骨吸収能の評価

8 週齢オスの C57BL/6 マウスを用意し、両耳介間に 1cm 程の切開を加えた。そこから骨を傷つけないように愛護的にマウス頭頂骨上の皮下剥離を行った。剥離した頭頂骨上の領域に、摩耗粉 6mg を移植した。切開部はステープラーで縫合した。非移植群は皮下剥離のみで切開部を同様に縫合した。マウスは 9 匹ずつ、疑似手術を行った群 (Sham 群)、150kGy および 300kGy を照射した UHMWPE を移植した群（150kGy 群と 300kGy 群）の 3 群に分けた。短期と中長期での炎症反応を観察するために、移植後 7 日目と 30 日目にマウス頭頂骨を摘出した。摘出した頭頂骨は、Micro Computed Tomography (μ CT) を用いて頭頂骨上の骨吸収域評価を行った。得られた頭頂骨の切片は Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色と Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色をそれぞれ行った。H&E 染色切片については、マウス頭頂骨の上に堆積している浸潤細胞数を定量評価し、TRAP 染色では、赤色に染色される TRAP 染色領域を定量評価した。

統計解析

3 群間の検定では Analysis of Variance (ANOVA) と Tukey の多重比較検定を用いた。有意水準は 5%未満とした。

【結果】

実験 1.

150 kGy および 300 kGy の摩耗粉は、粒子サイズや形状において大きな違いがなかった。

実験 2.

150kGy 共培養群と 300kGy 共培養群において、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現が、マクロファージを単培養した群と比べて有意に増加した。150kGy 共培養群と 300kGy 共培養群の間に有意差はなかった。ウェスタンブロッティング法では、150kGy 共培養群と 300kGy 共培養群の間にマクロファージ単培養群と比べて RUNX2 や ALP の発現が低下した。

実験 3.

μ CT による、移植後 7 日目に採取した頭頂骨表面の骨吸収領域は、疑似手術を行った Sham 群に比べて、150kGy 群と 300kGy 群で有意に骨吸収領域の増加を確認した。150kGy 群と 300kGy 群に有意差はなかった。30 日目に採取した頭頂骨でも同様の結果であった

組織学的評価では、7 日目に採取した頭頂骨上の炎症細胞数は Sham 群に比して、150kGy 群と 300kGy 群で有意に増加し、150kGy 群と 300kGy 群で有意差はなかった。30 日目に採取した頭頂骨では、Sham 群に比して 300kGy 群で有意に増加を認めた。150kGy 群と Sham 群に有意差はなかったが 150kGy 群では細胞数が増加傾向であり、150kGy 群と 300kGy 群に有意差はなかった。TRAP 染色領域を用いた骨吸収領域の評価では、7 日目と 30 日目に採取した頭頂骨ともに、Sham 群に比して 150kGy 群と 300kGy 群で有意に TRAP 染色領域の増加を認めた。150kGy 群と 300kGy 群に有意差はなかった。

【考察】

本研究は、150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉が引き起こす炎症反応および骨吸収能を評価した。摩耗粉は、NF- κ B 経路を通じて炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) の分泌を誘発することが知られており、本研究の結果と一致した。また、摩耗粉が骨形成因子である RUNX2 および ALP の発現を抑制し、骨芽細胞の分化や骨形成能を阻害することが示唆された。

さらに、摩耗粉は RANKL 経路を介して破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進することが示されたが、炎症誘発能や骨吸収能において 150 kGy と 300 kGy の摩耗粉の間に有意な差は見られなかった。この結果は、摩耗粉の炎症応答や骨吸収が放射線量ではなく、粒子サイズや化学的特性に依存する可能性を示唆している。

150 kGy UHMWPE は 300 kGy UHMWPE と同等の炎症誘発能を持ちながらも、優れた機械的特性を示すことから、臨床応用においてより適した材料であると考えられる。一方で、本研究は短期的評価に留まり、長期的な炎症進展や慢性骨吸収の影響を評価していない点が限界である。また、使用したマウスモデルがヒト環境を完全に模倣していないこと、他の炎症性メディエーターの役割が十分に評価されていないことも課題として挙げられる。

【結論】

本研究は、150 kGy および 300 kGy UHMWPE 摩耗粉の炎症誘発能および骨吸収能が放射線照射量に依存しないことを示し、150 kGy VE-UHMWPE が機械的特性と生体適合性の両面で臨床応用に適した材料であることを支持する重要なエビデンスを提供した。本研究の成果は、今後の人工関節材料開発の指針となるものであり、長期的な人工関節の安定性を目指した新たな材料設計や治療戦略の構築に貢献するものと考えられる。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである（アルファベット順）。

ALP	Alkaline phosphatase
cDNA	complementary DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IL	Interleukin
MEM	Minimum essential medium
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRs	Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors
OA	Osteoarthritis
PRRs	Pattern recognition receptors
QOL	Quality of life
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand
RNA	Ribonucleic acid
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SEM	Scanning Electron Microscope
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
UHMWPE	Ultra-High Molecular Weight Polyethylene

緒言

変形性関節症（Osteoarthritis; OA）は、関節軟骨の不可逆的な変性と軟骨下骨の硬化や滑膜の炎症などが進行する慢性疾患である。OA は主に中高年層に多く見られ、関節の腫脹や疼痛、可動域制限といった症状を引き起こし、特に膝や股関節においては、歩行障害などの日常生活動作の制約を伴う。近年の平均寿命の延長と高齢化人口の増加に伴い、OA 患者数は増加傾向にあり、2022 年の報告では、世界で約 3 億人以上の有病率であるとされている(Long et al., 2022)。現行の治療法として、症状が軽度な OA に対しては、薬物療法や理学療法が行われるが、進行した OA に対しては人工関節置換術が有効な治療法として広く行われている。人工関節置換術は、OA による痛みの軽減や関節可動域を劇的に改善する有効な治療法であるが、人工関節の耐用年数や長期使用における合併症、再手術のリスクといった課題が残されており、これらの解決に向けた人工関節の改良が求められている。

人工関節置換術の長期安定性を阻む、代表的な合併症の一つとして「無菌性緩み」がある。これはインプラント周囲の骨吸収によって、インプラントと骨の間に緩みが引き起こされる問題である。緩みが進行すると、人工関節の不安定性を引き起こし、患者は強い痛みや関節の可動域制限、さらには歩行能力の低下など、日常生活に支障をきたす障害に苦しむことになる。その治療法は、再置換術しか存在せず、人工関節の長期的な安定性と患者の生活の質（Quality of Life; QOL）に大きな影響を及ぼし医療分野においても大きな課題となっている(Madry, 2022)。

無菌性緩みは、人工関節摺動面から微細な摩耗粉が長期的に放出され、それを組織内のマクロファージが異物として認識することから始まる。活性化されたマクロファージは、周囲組織に慢性的な炎症反応を引き起こす。この慢性炎症下では、インプラント周囲の血流が阻害され、局所的な低酸素症や壊死が発生し、さらなる炎症反応が誘発される。こうした炎症の悪循環により、局所の骨吸収が徐々に進行し、最終的にインプラントがゆるむ原因となる(Garrigues et al., 2005, Goodman and Gallo, 2019, Terkawi et al., 2022)。

無菌性ゆるみの発生を抑制するためには、人工関節の材料や表面加工の改良が重要である。特に、近年の人工関節置換術に関連する研究は、インプラントの寿命を延ばすために、材料の機械的強度、生体適合性を改善し、生体内での炎症反応を軽減することに焦点が当てられている(Hu and Yoon, 2018, Terkawi et al.,

2019, Matsumae et al., 2021, Matsumae et al., 2022, Alhasan et al., 2022)。現在、人工関節摺動面に用いられる材料には、ポリマー、金属合金、セラミックなどがある。その中でも、高い耐摩耗性と生体適合性を持つ超高分子量ポリエチレン (Ultra-High Molecular Weight Polyethylene; UHMWPE) が、最も広く用いられている (Hu & Yoon, 2018)。この耐摩耗性をさらに向上させるために、電離放射線を照射して UHMWPE のポリエチレン鎖に架橋形成する方法が行われている。放射線線量の増加に伴って耐摩耗性は上昇するが、一方で放射線の照射量が増加に従ってフリーラジカルも増加し、酸素との反応性が高まる。その結果、ポリマー鎖の切断や結晶部分の劣化が引き起こされ、引張強度の低下を引き起こす (Merola and Affatato, 2019, Patil et al., 2020)。

この問題を解決するために、ビタミン E (α -トコフェロール) が UHMWPE に添加されるようになった。ビタミン E は、フリーラジカルと結合し安定化することと、生体内で脂質過酸化反応を抑制することで、安定剤および抗酸化剤として機能し、UHMWPE の機械的特性を向上させている (Oral et al., 2006; Oral et al., 2008)。特に、0.3%のビタミン E を混合した UHMWPE (VE-UHMWPE) が優れた機械的特性を示し、体内での有害な細胞反応を減少させることが報告されており、これらの結果をもとに、現在の人口関節置換術は 300kGy の放射線が照射された VE-UHMWPE が用いられている (Banche et al., 2011, Matsumae et al., 2022)。

VE-UHMWPE の耐摩耗性が向上したことによって、近年の人工股関節置換術では、より大骨頭径の人工関節が用いられるようになった。大骨頭径の使用には、脱臼率の低減と関節可動域の向上といったメリットがある (Tsikandylakis et al., 2018)。一方で摺動面は薄くなり、より強い衝撃強度が求められるようになった。近年の、機械試験では、300kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE と比べて、150kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE が、耐摩耗性は低下させずに、より強い衝撃強度をもつことが明らかにされている。150kGy の放射線を照射した UHMWPE が使用することができれば、より長期での人工関節の安定性向上を望むことができる。しかし、150kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE から産生された摩耗粉の生体内での骨吸収活性や炎症反応について未だ知られていない。そこで本研究では、異なる放射線に照射された VE-UHMWPE の生体内での炎症反応について検討することにした。

実験方法

1 倫理審査の承認

本研究における動物実験は、全て北海道大学大学院医学研究院における動物実験委員会の承認を受けて行った（承認番号：17-0085、24-0118）

2 VE-UHMWPE 摩耗粉の作成

VE-UHMWPE 摩耗粉は、ポリエチレンライナーから作成した(Terkawi et al., 2019)。まず、GUR1050 パウダー（Celanese Japan, Tokyo, Japan）に 0.3wt% の dl- α -トコフェロール（Eisai, Tokyo, Japan）を混合し、圧縮成形を行った後、150 および 300 kGy の γ 線を照射し、135°C以下でアニール処理（Teijin Nakashima Medical, Okayama, Japan）を行い、UHMWPE を作成した。UHMWPE をマルチビーズショッカー（Yasui Kikai, Osaka, Japan）で 3500 rpm、40 秒間粉碎した。摩耗粉はその後、無菌水に再懸濁し、4000 rpm で 5 分間遠心分離後、凍結乾燥し、100 μ m のふるいで分級した。得られた摩耗粉の粒子サイズと分布を粒子画像解析装置（Morphologi G3、Malvern Instruments, Worcester, UK）および走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope; SEM）で測定した。エンドトキシンレベルは Pierce Chromogenic Endotoxin Quant Kit（Thermo Scientific, Illinois, USA）を用いて測定し、エンドトキシンが含まれない摩耗粉のみを下記の実験に使用した。

3 マクロファージと摩耗粉の共培養モデル

3.1 共培養方法

既存の方法によって、RAW 264.7 マクロファージ細胞株（Riken, Tokyo, Japan）を摩耗粉で刺激した(Terkawi et al., 2019)。12-well plate 内にあらかじめ 18 mm カバーガラス（Matsunami Glass, Osaka, Japan）を敷き、その上に、 1×10^5 cell/well でマクロファージを播種し、10% Fetal Bovine Serum（FBS）、5% L-glutamine、25 mg/L penicillin/streptomycin を含む Minimum Essential Medium（MEM）で 24 時間培養した。その後、150kGy と 300kGy を照射した摩耗粉（150-VE、300-VE）および Lipopolysaccharide（LPS）を、新たな 12-well plate の各ウェルに 1 mg/cm^3 になるように播種し、その上にマクロファージを播種したカバーガラスを裏返して置き、24 時間培養した。

3.2 遺伝子発現解析

摩耗粉と共培養した細胞に対して、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Quantitative real-time polymerase chain reaction; qPCR）による遺伝子発

現解析を行った。共培養した細胞を TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で溶解し、NucleoSpin RNA (Takara-Bio, Shiga, Japan) を用いて Total RNA を採取した。500ng の Total RNA から GoScript™ 逆転写酵素キット (Promega, Madison, USA) を使用して逆転写にて complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を合成した。その後、cDNA を Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara-Bio, Shiga, Japan) と、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara-Bio, Shiga, Japan)、遺伝子特異的プライマーを使用して、qPCR で解析した(Matsumae et al., 2021)。各標的遺伝子の定量評価は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて、GAPDH 遺伝子の C_t 値に対して正規化された各遺伝子の C_t 値として表した(Hamasaki et al., 2020, Hamasaki et al., 2021)。使用したプライマーは表 1 のとおりである。

表 1, 本研究で使したプライマー配列

Target	Forward	Reverse
Gapdh	TGCAGCGAACTTTATTGATG	ACTTTGTCAAGCTCATTTCC
mTNF	AGCCGATGGGTTGTACCTT	ATAGCAAATCGGCTGACG
mIL-1 β	GCTTCAGGCAGGCAGTATCA	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
mIL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
mPGE2	CGCAACGACATGGAGACAATC	TATCCAGGCGATCAGAGGGT

3.3 マクロファージと摩耗粉共培養モデルにおける炎症因子と骨形成因子の評価

共培養した細胞を、RIPA lysis buffer (ATTO corporation, Tokyo, Japan) で溶解し、サンプルバッファーを加え、100 度で 5 分間加熱処理した後、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルをメンブレンに転写した後、5%スキムミルクを用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。次に、1 次抗体溶液でメンブレンを 1 時間室温で振盪した後、HRP 標識 2 次抗体を 1 時間室温で反応させた。2 次抗体には Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Cell signaling 社, MA, USA) を希釈倍率 1:1000 で用いた。十分に洗浄した後に、Quantity One software v.4.6.9 (Bio-Rad lab., California, USA) を用いて、標的タンパク質のバンドを検出し、Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA) を用いて標的タンパク質のバンドの定量化を行った。ターゲットタンパク質は、表 2 の抗体を用いた。

表 2,

Antibody	Dilution	Manufaturer
----------	----------	-------------

β -actin	1:2000	Applied Biological Materials
NF- κ B	1:1000	Funakoshi
ALP	1:1000	Cosmobio
RUNX2	1:1000	BioLegend

4 マウス頭頂骨骨吸収モデルにおける摩耗粉の骨吸収能評価

摩耗粉の *in vivo* における骨吸収を評価するために、マウス頭頂骨骨吸収モデルを使用した。8 週齢オスの C57BL/6 マウス (CLEA、Tokyo、Japan) を用意し、100 mg/kg のケタミンと 10 mg/kg のキシラジンを混合したものをマウス腹腔内に注射し麻酔を行った。麻酔の後、両耳介間の毛をシェーバーで剃り、1cm 程の切開を加えた。そこから骨を傷つけないように愛護的にマウス頭頂骨上の皮下剥離を行った。剥離した頭頂骨上の領域に、摩耗粉 6mg を移植した。切開部はステープラーで縫合した。非移植群は皮下剥離のみで切開部を同様に縫合した。マウスは 9 匹ずつ、疑似手術を行った群 (Sham 群)、150kGy-VE もしくは 300kGy-VE を移植した群 (150kGy 群と 300kGy 群) の 3 群に分けた。短期と中長期での炎症反応を観察するために、移植後 7 日目と 30 日目にマウス頭頂骨を摘出した。摘出した頭頂骨は、10% ホルマリンに保存した後、Micro Computed Tomography (μ CT; R-mCT2, Rigaku、Tokyo、Japan) による頭頂骨上の骨吸収域評価を行った。CT 画像を撮影後、10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Wako Pure Chemical Industries, Ltd、Osaka、Japan) で 3 日間脱灰した後、パラフィン包埋を行った。5 μ m 厚の切片を作製し、各々のサンプルに対して Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色と Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色をそれぞれ行った。マウス頭頂骨の骨吸収領域は、R16 mCT2 で 3 次元画像を作成した後、2 次元画像としてダウンロードし、ImageJ で頭頂骨表面における骨吸収域を定量評価した。組織切片については、マウス頭頂骨 1 個につき冠状断を 2 つの部位に分けて取得した。H&E 染色切片については、マウス頭頂骨の上に堆積している浸潤細胞数を ImageJ で定量評価した。TRAP 染色では、赤色に染色される TRAP 染色域を ImageJ で定量評価した。

5 統計分析

全てのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差 (Standard Error of the Mean; SEM) をもって表記した。3 群間の検定では Analysis of Variance (ANOVA) と Tukey の多重比較検定を用いた。本研究における統計解析は、統計解析ソフト GraphPad Software Inc (La Jolla、California、USA) を用いて行い、有意水準は 5%未満とした。

実験結果

1. 架橋 VE-UHMWPE 摩耗粉の形態学的差異

150kGy と 300kGy の放射線を照射した摩耗粉を用いて、ECD および SEM 解析を行い、そのサイズと形態を評価した。粒子のサイズは $<0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\text{--}0.9\ \mu\text{m}$ 、 $1\text{--}9.99\ \mu\text{m}$ 、 $>10\ \mu\text{m}$ の 4 つのカテゴリーに分類した。150kGy と 300kGy を照射した摩耗粉の大部分の粒子は $0.1\text{--}0.9\ \mu\text{m}$ および $1\text{--}9.99\ \mu\text{m}$ に分類された (Figure 1A)。また、SEM による観察では、形態的に類似していることを確認した (Figure 1B)。

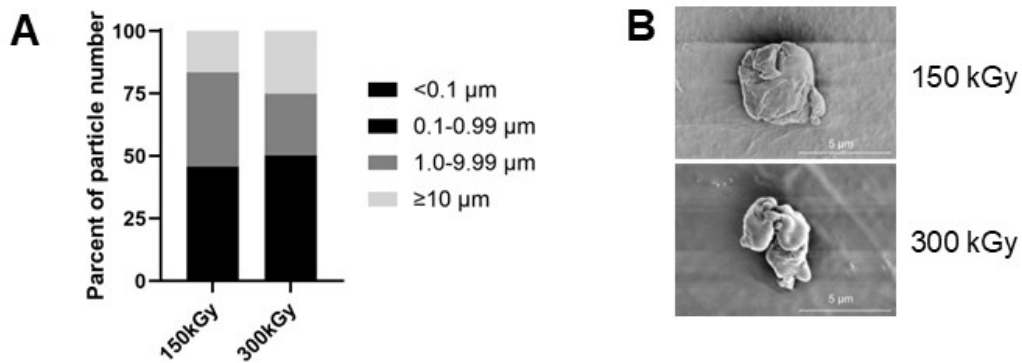


Figure 1. 摩耗粉の形態学的特徴

- A. 摩耗粉粒子のサイズ分布を示した図である。大部分が $0.1\text{--}0.9\ \mu\text{m}$ および $1.0\text{--}9.99\ \mu\text{m}$ に分類された。
- B. 摩耗粉粒子の SEM 解析画像である。150kGy と 300kGy を照射し摩耗粉粒子に形態学的差異は認めなかった。

2. マクロファージと摩耗粉共培養モデルにおける炎症性サイトカインの遺伝子発現結果

異なる放射線を照射された摩耗粉が、炎症反応を誘発する効果を比較するため、RAW 264.7 マクロファージ細胞株を 2 種類の摩耗粉および LPS と共培養した。その結果、150-VE と 300-VE がマクロファージとの共培養において、IL-6、IL- 1β などの炎症性サイトカインの発現を同程度に誘発することを確認した (Figure 2)。

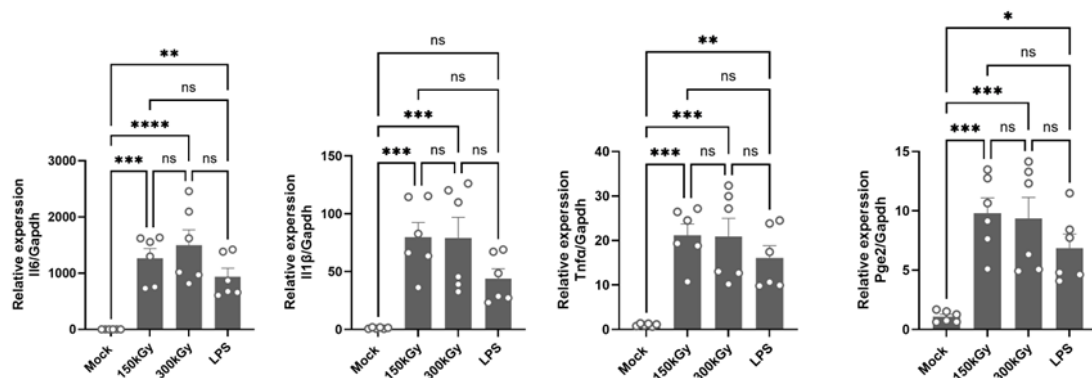


Figure 2. 共培養における qPCR を用いた遺伝子発現解析

摩耗粉および LPS と共培養したマクロファージ中の炎症性サイトカインの遺伝子発現解析結果である。左から Il6、Il1β、Tnfα、Pge2 の発現を示す。Mock がマクロファージ単体で培養した群、150kGy が 150-VE とマクロファージを共培養した群、300kGy が 300-VE とマクロファージを共培養した群、LPS が LPS とマクロファージを共培養した群を示す。

3. マクロファージと摩耗粉共培養モデルにおける炎症因子と骨形成因子の評価

マクロファージと摩耗粉の共培養モデルを用いて、NF-κB の発現上昇をウエスタンブロッティング法で確認した。150-VE と 300-VE どちらの摩耗粉との共培養においても NF-κB の活性化上昇を確認した (Figure 3A)。また同様に、RUNX2 と ALP においても評価を行った。150-VE と 300-VE どちらの摩耗粉との共培養においても RUNX2 と ALP の発現低下を確認した (Figure 3B)。

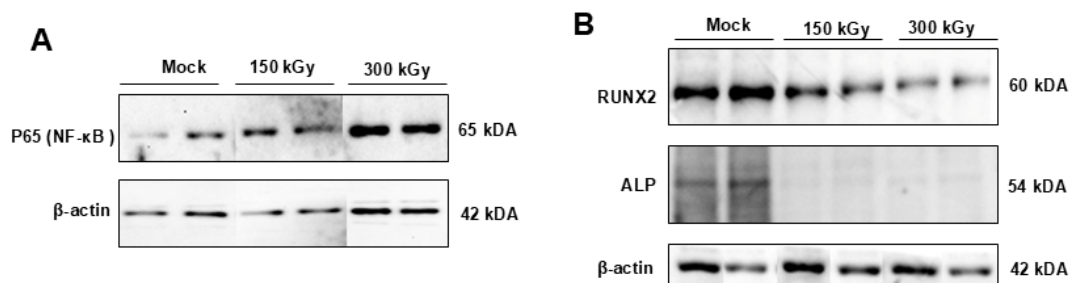


Figure 3. 共培養におけるウエスタンブロッティング法の結果

A. 摩耗粉と共培養したマクロファージ中の NF-κB の活性化評価である。Mock はマクロファージを単培養した条件、150kGy は 150-VE と共培養した条件、

300kGy は 300-VE と共培養した条件である。

- B. 摩耗粉と共培養したマクロファージ中の RUNX2 と ALP の活性化評価である。Mock はマクロファージを単培養した条件、150kGy は 150-VE と共培養した条件、300kGy は 300-VE と共培養した条件である。 μ CT を用いたマウス頭頂骨骨吸収モデルにおける摩耗粉の骨吸収能評価

マウス頭頂骨に摩耗粉を移植させ、骨吸収を引き起こすモデルを用いて、摩耗粉の骨吸収能の評価を行った。 μ CT による、移植後 7 日目に採取した頭頂骨表面の骨吸収領域は、疑似手術を行った Sham 群に比べて、150-VE を移植した 150kGy 群と 300-VE を移植した 300kGy 群で有意に骨吸収領域の増加を確認した。150kGy 群と 300kGy 群に有意差はなかった (Figure 4A, B)。30 日目に採取した頭頂骨でも同様の結果であった。

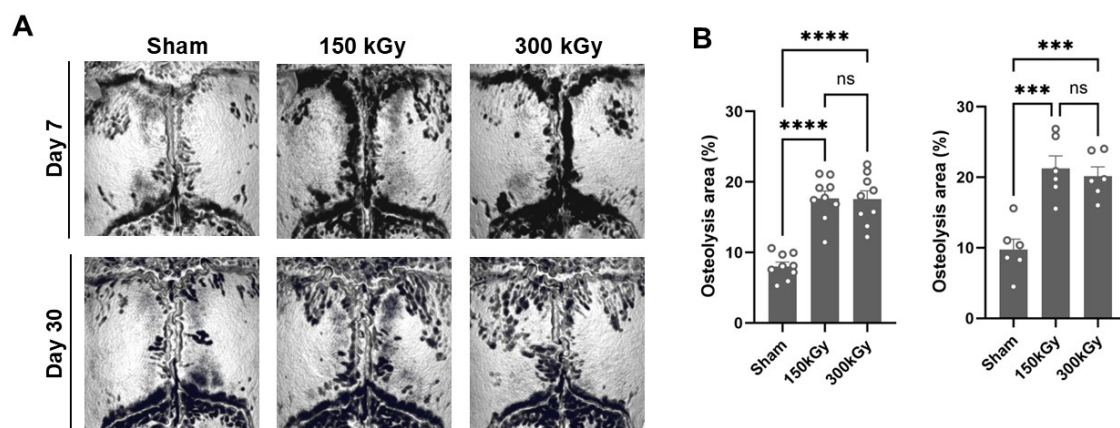


Figure 4. 骨吸収モデル頭頂骨の μ CT 画像と骨吸収領域

- A. 上段は 7 日目に採取した頭頂骨の μ CT 画像、下段は 30 日目の頭頂骨画像を示す。150kGy 群と 300kGy 群で黒く映る骨吸収領域が増加した。
- B. μ CT における骨吸収領域の定量評価を示す。150kGy 群と 300kGy 群で Sham 群に比して骨吸収領域が有意に増加した。マウス頭頂骨骨吸収モデルにおける摩耗粉の骨吸収の組織学的評価

Figure 4.と同様のマウス頭頂骨を用いて、頭頂骨上の炎症細胞数は HE 染色を用いて行い、破骨細胞の評価は TRAP 染色領域を用いて行った。7 日目に採取した頭頂骨上の炎症細胞数は Sham 群に比して、150kGy 群と 300kGy 群で有意に増加し、150kGy 群と 300kGy 群で有意差はなかった。30 日目に採取した頭頂骨では、Sham 群に比して 300kGy 群で有意に増加を認めた。150kGy 群と Sham 群に有意差はなかったが 150kGy 群では細胞数が増加傾向であり、150kGy 群と 300kGy に有意差はなかった。TRAP 染色領域を用いた骨吸収領域の評価では、7 日目と 30 日目に採取した頭頂骨ともに、Sham

群に比して 150kGy 群と 300kGy 群で有意に TRAP 染色領域の増加を認めた。
150kGy 群と 300kGy 群で有意差はなかった。

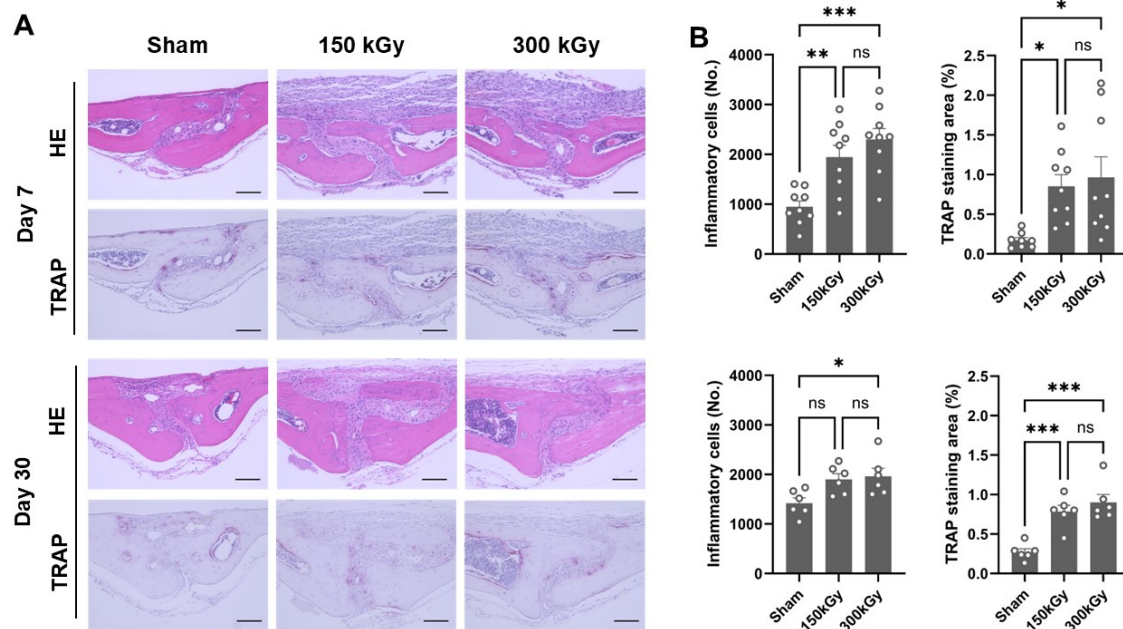


Figure 5. 骨吸収モデル頭頂骨の組織学的評価

- A. 上段から 7 日目に採取した頭頂骨の HE 染色、TRAP 染色、30 日目に採取した HE 染色と TRAP 染色の組織画像を示す。150kGy 群と 300kGy 群で炎症細胞数と TRAP 染色領域が増加した。
- B. 組織画像の定量評価を示す。150kGy 群と 300kGy 群で炎症細胞数と TRAP 染色領域が増加傾向であった。

考察

世界的な人工関節インプラント製造の焦点は、高い機械的強度を持ち、体内での骨吸収活性を抑制する材料の開発および設計にある(Patil et al., 2020)。現在、VE-UHMWPE は、人工関節において広く使用されており、その機械的強度の向上によって再置換率に寄与していることが報告されている(Sharkey et al., 2014)。しかし、照射する放射線線量の増加に伴い、フリーラジカルの生成が促進され、それによる生体内での酸化反応や衝撃強度の低下といった課題が指摘される(Oral et al., 2008, Mulliez et al., 2020)。生体内で生成されたフリーラジカルは、酸化カスケードを引き起こしてインプラントの劣化や、炎症を誘発し、最終的には炎症性骨吸収を伴う無菌性緩みを引き起こす要因となる(Turner et al., 2015, Patil et al., 2020)。近年の人工股関節置換術では、脱臼率の低下や可動域の改善を求めて大骨頭径の摺動面が必要とされている。これに伴い、従来よりも高い衝撃強度がインプラントに必要とされている。現在広く用いられている 300kGy VE-UHMWPE と比較して 150kGy VE-UHMWPE は高い衝撃強度をもつ、優れた機械特性を持つことが知られており、より長期的な安定性を確保できる可能性がある。しかし、異なる放射線量を照射された摩耗粉の生体内での炎症反応や骨吸収能の差異については、これまで十分に明らかにされていなかった。VE-UHMWPE 摩耗粉の生物学的特性は、その臨床応用において極めて重要である。本研究では、150kGy および 300kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉がマクロファージを介した炎症反応や骨吸収能に与える影響を評価した。

摩耗粉の炎症反応誘発能や骨吸収活性能には、粒子のサイズや形状が重要であることがこれまでの研究で示されている。特に、1-10 μm の粒子は、マクロファージの活性化を通じて強い炎症反応を引き起こし、骨吸収を顕著に促進することが報告されている(Goodman and Gallo, 2019, Hallab et al., 2012)。本研究では、150-VE と 300-VE とともに、粒子サイズの大部分が 0.1–0.9 μm に集中していることが確認され、有意差はなかった。また形態に関しても 2 群間で有意差は認めなかった。このような粒子サイズおよび形状の類似性が、150-VE と 300-VE で炎症反応や骨吸収能に顕著な差が見られなかった主な要因の一つであると考えられる。一方で、粒子サイズや形状以外にも、粒子の表面化学特性や荷電状態、さらには摩耗粉の量や局所濃度も炎症反応および骨吸収能に影響を与える可能性がある(Hu and Yoon, 2018)。本研究では摩耗粉の量や分布が均一であることを確認したが、これらの物理化学的特性が生体応答に及ぼす影響については、さらなる研究が必要である。

摩耗粉がマクロファージを活性化し、炎症性サイトカインの発現を誘導するメカニズムには、パターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors; PRRs) を介した異物認識が中心的な役割を果たしていることがこれまでの研究で示されている (Goodman and Gallo, 2019)。PRRs には Toll 様受容体 (Toll-Like Receptors; TLRs) や NOD 様受容体 (NOD-Like Receptors; NLRs) などが含まれ、これらは摩耗粉を感知することでマクロファージを活性化し、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインの分泌を引き起こす。このシグナル伝達経路の中心に位置するのが NF- κ B 経路であり、本研究でも摩耗粉が NF- κ B 経路を活性化することを確認した。この結果は、摩耗粉が人工関節周囲で慢性的な炎症を進行させるメカニズムを裏付けるものである。本研究の新規性は、150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した摩耗粉が、いずれも炎症性サイトカインの発現を同程度に誘導することを示し、摩耗粉による炎症応答が放射線量に依存しないことを明確にした点である。これまでの研究は、摩耗粉が誘発する炎症反応について直接比較した研究は限られており、本研究は、摩耗粉の炎症誘発能が粒子のサイズや形状、化学的性質などの要因によって決定される可能性が高く、放射線量による影響が小さいことを示唆している。

本研究では、摩耗粉が骨形成能に及ぼす影響を評価するために、RUNX2 および ALP の発現を指標とし、150 kGy および 300 kGy の VE-UHMWPE 摩耗粉がいずれも RUNX2 および ALP の発現を低下させることを確認した。RUNX2 は骨芽細胞の分化において主要な転写因子であり、ALP は骨基質形成の初期段階を反映する重要なマーカーとして知られている。これらの結果は、摩耗粉が骨芽細胞の分化および骨形成能を抑制する可能性を示唆している。また、炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) の分泌が骨芽細胞の機能を阻害する可能性がある (Goodman and Gallo, 2019, Purdue et al., 2006)。特に、TNF- α は RUNX2 の活性を抑制し、骨芽細胞の分化を阻害することが報告されており (Osta et al., 2014)、IL-6 は破骨細胞形成を促進する一方で、骨形成を抑制する作用を持つことが知られている。このように、炎症反応の増加によって骨形成能が低下することが示唆された。

摩耗粉が誘発する骨吸収は、RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand) 経路を介して破骨細胞の分化および活性化が促進されることによるものである。この過程は、人工関節周囲で骨吸収を進行させる主要なメカニズムとして広く認識されている (Boyce and Xing, 2007, Purdue et al., 2006)。RANKL は主に骨芽細胞や T 細胞から分泌され、破骨細胞の前駆細胞に結合して NF- κ B 経路を活性化し、破骨細胞への分化とその骨吸収活性を誘導する。本研究では、150

kGy-VE および 300 kGy-VE が、いずれも同程度に骨吸収を促進することが示された。具体的には、マウス頭頂骨モデルにおける骨吸収領域の拡大や、TRAP 染色の染色領域が、両群間で有意な差が認めなかった。この結果からは、放射線量の違いが骨吸収活性に与える影響が小さいことが考えられる。加えて、炎症性サイトカインの発現パターンも両群で一致していたことから、炎症誘発能と骨吸収能が密接に関連していることも示唆される。

本研究の結果は、150 kGy VE-UHMWPE が 300 kGy VE-UHMWPE と同等の炎症誘発能を持ちながらも、機械的特性において優れた性能を示すことから、臨床応用においてより適切な材料であることを示唆しています。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、摩耗粉の炎症誘発能や骨吸収能を主に短期的な評価に基づいて検討したため、長期的な慢性炎症の進展を評価することができなかったことである。第二に、使用したマウス頭頂骨モデルは簡便で再現性が高い一方で、人工関節置換術後のヒト環境を完全に再現するものではなく、臨床的な応用を議論する上では限界がある。最後に、NF- κ B を通した炎症性サイトカインの発現に焦点を当てたが、他の炎症性メディエーターの役割を十分に評価できなかったことも課題として挙げられる。今後、これらの課題を補うためのモデルの作成や研究が求められる。

総括及び結論

- ・ 150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉の形態学的特徴と生体内での炎症反応について検討した。
- ・ 150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉は、0.1–0.9 μm に集中しており、サイズおよび形態学的に両群間で差はなかった。
- ・ 150 kGy および 300 kGy の放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉は、マクロファージの活性化を介して炎症性サイトカイン（IL-6、IL-1 β 、TNF- α ）を誘発したが、両群間の炎症誘発能や骨吸収能に有意差は認めなかった。放射線量の差異が摩耗粉の炎症応答に直接的な影響を及ぼさない可能性が示唆された。
- ・ 本研究は短期的な免疫反応に焦点を当てており、長期的な炎症進展や摩耗粉の蓄積による影響を検討する必要がある。

本研究では、150 kGy および 300 kGy 放射線を照射した VE-UHMWPE 摩耗粉の形態学的差異と炎症誘発能、骨吸収能を比較し、両者に有意差がないことを確認した。150 kGy VE-UHMWPE は、優れた機械的特性を持ち、臨床応用に適している可能性が示唆された。一方で、長期的な炎症反応の検討が今後の課題である。本研究は、人工関節の改良に向けた基礎的な知見を検討し、最終的な患者の QOL に寄与することが期待される。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野教授 岩崎倫政先生、同助教 照川アラー先生に心より感謝申し上げます。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- ALHASAN, H., TERKAWI, M. A., MATSUMAE, G., EBATA, T., TIAN, Y., SHIMIZU, T., NISHIDA, Y., YOKOTA, S., GARCIA-MARTIN, F., M. ABD ELWAKIL, M., TAKAHASHI, D., YOUNIS, M. A., HARASHIMA, H., KADOYA, K. & IWASAKI, N. 2022. Inhibitory role of Annexin A1 in pathological bone resorption and therapeutic implications in periprosthetic osteolysis. *Nature Communications*, 13, 3919
- BANCHE, G., BRACCO, P., BISTOLFI, A., ALLIZOND, V., BOFFANO, M., COSTA, L., CIMINO, A., CUFFINI, A. M. & DEL PREVER, E. M. B. 2011. Vitamin E blended Uhmwpe may have the potential to reduce bacterial adhesive ability. *Journal of Orthopaedic Research*, 29, 1662-1667.
- BOYCE, B. F. & XING, L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, 9, S1.
- GARRIGUES, G. E., CHO, D. R., RUBASH, H. E., GOLDRING, S. R., HERNDON, J. H. & SHANBHAG, A. S. 2005. Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials*, 26, 2933-45.
- GOODMAN, S. B. & GALLO, J. 2019. Periprosthetic Osteolysis: Mechanisms, Prevention and Treatment. *J Clin Med*, 12, 1-8.
- HALLAB, N. J., MCALLISTER, K., BRADY, M. & JARMAN-SMITH, M. 2012. Macrophage reactivity to different polymers demonstrates particle size- and material-specific reactivity: PEEK-OPTIMA(R) particles versus UHMWPE particles in the submicron, micron, and 10 micron size ranges. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100, 480-92.
- HAMASAKI, M., TERKAWI, M. A., ONODERA, T., HOMAN, K. & IWASAKI, N. 2021. A Novel Cartilage Fragments Stimulation Model Revealed that Macrophage Inflammatory Response Causes an Upregulation of Catabolic Factors of Chondrocytes In Vitro. *CARTILAGE*, 12, 354-361.
- HAMASAKI, M., TERKAWI, M. A., ONODERA, T., TIAN, Y., EBATA, T., MATSUMAE, G., ALHASAN, H., TAKAHASHI, D. & IWASAKI, N. 2020. Transcriptional profiling of murine macrophages stimulated with cartilage fragments revealed a strategy for treatment of progressive osteoarthritis. *Scientific Reports*, 10 (1), p. 7558.
- HU, C. Y. & YOON, T.-R. 2018. Recent updates for biomaterials used in total hip arthroplasty. *Biomaterials Research*, 22, Article 33.
- LONG, H., LIU, Q., YIN, H., WANG, K., DIAO, N., ZHANG, Y., LIN, J. & GUO, A. 2022. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis & Rheumatology*, 74, 1172-1183.
- MADRY, H. 2022. Surgical therapy in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 30, 1019-1034.
- MATSUMAE, G., KIDA, H., TAKAHASHI, D., SHIMIZU, T., EBATA, T., YOKOTA, S., ALHASAN, H., ALY, M. K., YUTANI, T., UETSUKI, K., TERKAWI, M. A. & IWASAKI, N. 2022. Determination

- of optimal concentration of vitamin E in polyethylene liners for producing minimal biological response to prosthetic wear debris. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 110, 1587-1593.
- MATSUMAE, G., SHIMIZU, T., TIAN, Y., TAKAHASHI, D., EBATA, T., ALHASAN, H., YOKOTA, S., KADOYA, K., TERKAWI, M. A. & IWASAKI, N. 2021. Targeting thymidine phosphorylase as a potential therapy for bone loss associated with periprosthetic osteolysis. *Bioengineering & Translational Medicine*, 6(3): e10232.
- MEROLA, M. & AFFATATO, S. 2019. Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations. *Materials*, 12, 495.
- MULLIEZ, M. A., SCHILLING, C. & GRUPP, T. M. 2020. Influence of Irradiation Temperature on Oxidative and Network Properties of X-Ray Cross-Linked Vitamin E Stabilized UHMWPE for Hip Arthroplasty. *BioMed Research International*, 2020, 1-9.
- ORAL, E., GODLESKI BECKOS, C., MALHI, A. S. & MURATOGLU, O. K. 2008. The effects of high dose irradiation on the cross-linking of vitamin E-blended ultrahigh molecular weight polyethylene. *Biomaterials*, 29, 3557-3560.
- OSTA, B., BENEDETTI, G. & MIOSSEC, P. 2014. Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 5, p48.
- PATIL, N. A., NJUGUNA, J. & KANDASUBRAMANIAN, B. 2020. UHMWPE for biomedical applications: Performance and functionalization. *European Polymer Journal*, 125, 109529.
- PURDUE, P. E., KOULOUVARIS, P., NESTOR, B. J. & SCULCO, T. P. 2006. The Central Role of Wear Debris in Periprosthetic Osteolysis. *HSS Journal®: The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery*, 2, 102-113.
- SHARKEY, P. F., LICHSTEIN, P. M., SHEN, C., TOKARSKI, A. T. & PARVIZI, J. 2014. Why are total knee arthroplasties failing today--has anything changed after 10 years? *J Arthroplasty*, 29, 1774-8.
- TERKAWI, M. A., EBATA, T., YOKOTA, S., TAKAHASHI, D., ENDO, T., MATSUMAE, G., SHIMIZU, T., KADOYA, K. & IWASAKI, N. 2022. Low-Grade Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Cellular and Molecular Mechanisms and Strategies for Future Therapeutic Intervention. *Biomedicines*, 10(5), p1109.
- TERKAWI, M. A., KADOYA, K., TAKAHASHI, D., TIAN, Y., HAMASAKI, M., MATSUMAE, G., ALHASAN, H., ELMORSY, S., UETSUKI, K., ONODERA, T., TAKAHATA, M. & IWASAKI, N. 2019. Identification of IL-27 as potent regulator of inflammatory osteolysis associated with vitamin E-blended ultra-high molecular weight polyethylene debris of orthopedic implants. *Acta Biomater*, 89, 242-251.
- TSIKANDYLAKIS, G., MOHADDES, M., CNUDE, P., ESKELINEN, A., KÄRRHOLM, J. & ROLFSON, O. 2018. Head size in primary total hip arthroplasty. *EFORT Open Reviews*, 3, 225-231.

TURNER, A. C., SUGIMOTO, T., UETSUKI, K., HYON, S.-H. & TOMITA, N. 2015. Mechanical and oxidative performance of high-dose electron-beam irradiated, dl- α -tocopherol (vitamin E) blended UHMWPE. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 10, 14-00238-14-002.