

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462306

研究課題名(和文)薬剤によるマクロファージオートファジー抑制による人工関節長期耐用研究

研究課題名(英文)Long-term survival of total joint arthroplasty by drug inhibition of autophagy

研究代表者

小宮 節郎 (Komiya, Setsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ細胞株にポリエチレン粒子を添加すると炎症性サイトカインの発現が上昇したが、薬剤でサイトカインを阻害してもオートファジーの抑制効果は得られなかった。人工関節後感染に対し二期的再置換術を行い、revision時採取した関節周囲組織の永久病理で感染再燃と好中球陽性は相関しなかった。二期的再置換時の術中迅速病理診断では不要なセメント再置換を行っている可能性が示された。また人工骨頭術後早期にゆるみを生じた症例の術中組織で病理学的には早期破綻例は好中球陽性で感染と評価された。術後9年未満で明らかな他の誘因なく、寛骨臼内migrationを生じる症例では感染の評価が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Polyethylene particle promoted the expression of inflammatory cytokines in macrophage cell lines. But inhibition of cytokine signals could not inhibit the autophagy. Aseptic and septic loosening prevent the long term survival of total joint arthroplasty. We evaluated the accumulation of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in periprosthetic tissues during second-stage revision surgery. There was no statistical relationship between PMNs-positivity and relapse of infection. Intraoperative evaluation of PMNs during second-stage revision surgery promote overdiagnosis of persistent infection. We retrospectively reviewed 18 patients with bipolar hip hemiarthroplasty (BHA) that necessitated revision. Pathological findings showed that several patients with early BHA migration were PMNs-positive, which was indicative of infection. Our findings suggest that some portion of rapid BHA prosthesis migration is caused by mild infection.

研究分野：人工関節

キーワード：人工関節ルーズニング オートファジー 感染

1. 研究開始当初の背景

人工関節置換術は股関節や膝関節の除痛と機能改善に有用な手法である。しかし、術後の無菌性のゆるみや人工関節周囲感染によって生じる septic loosening が問題となる。そこで人工関節のゆるみの原因となる疾患やメカニズムについて解析を行い、loosening の予防や治療法の研究を行った。

2. 研究の目的

無菌性のルーズニングは、人工関節に使用している材料であるポリエチレンや金属などの摩耗粉を、マクロファージが異物として認識して貪食することがきっかけで生じるとされている。活性化したマクロファージの放出するサイトカインが過剰に破骨細胞を分化・刺激して、骨融解・ルーズニングが発生する。

マクロファージのオートファジーを薬剤にて阻害してサイトカイン産生を抑制し、人工関節ルーズニング抑制・人工関節の長期耐用を可能にする新規薬物治療の開発を目的として研究を行った。また、人工関節周囲感染によって生じるゆるみに対しては、人工骨頭後に早期にゆるみを生じた症例の原因解明を目的として研究を行った。さらに人工関節後感染では人工関節抜去後に抗生剤含有セメントスパーサー設置して感染鎮静化後に revision を行う二次的再置換術が行われている。二次的置換術前の感染沈静化の評価法の改善を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

マクロファージオートファジーの研究：マクロファージ培養細胞に摩耗粉を添加し、オートファジーの活性化解析のために western blot, autophagy flux, siRNA による ATG5, 7 ノックダウンの効果, ELISA assay によるサイトカイン産生評価、培養破骨細胞の分化と骨吸収評価などを行う。

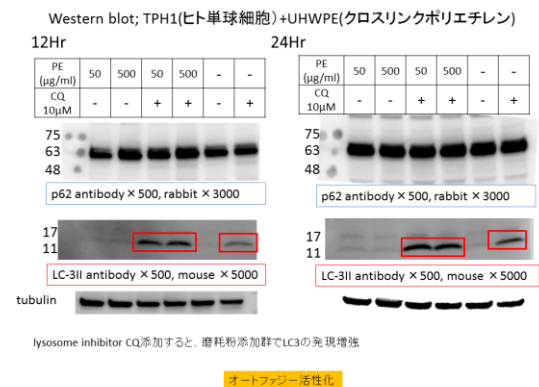
人工骨頭早期ルーズニングの病態研究：2006年より2013年4月までに当科で人工骨頭に revision を行った全例 18 例を対象とした。臨床経過や血液学的データ、病理学的検討を行った。

人工関節感染に対する二次的再置換術時の感染持続評価法の研究：2006年-2014年に二次的再置換術を行った症例で血液学的データ、画像所見、局所所見や再置換時に採取した組織の病理を検討した。術後1年以内の感染再燃の有無に相関する因子を解析した。

4. 研究成果

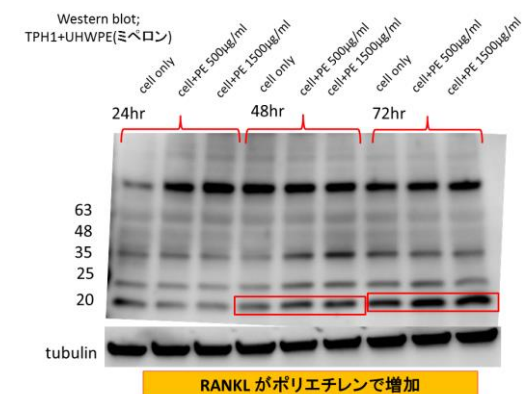
マクロファージオートファジーの研究：ヒト単球細胞 (TPH1) にクロスリンクポリエチレン (UHWPE) を加えるとオートファジーが亢進していることが western blot でしめされた。(Fig. 1)

Fig. 1



さらにヒト単球細胞 (TPH1) にクロスリンクポリエチレン (UHWPE) を加えると Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) が増加することが示された。

Fig. 2



しかし、この後オートファジーを抑制してもサイトカインの発現量の変化や、サイトカインを阻害剤で抑制しても有意な結果は得られなかった。

人工骨頭早期ルーズニングの病態研究：

人工骨頭の破綻形式のひとつとして寛骨臼内 migration がある。寛骨臼軟骨の変性と骨融解が原因とされ、monopolar 型から bipolar 型人工骨頭へと改良されたが、bipolar 型でも早期に寛骨臼内に migration を生じる症例が存在する。当科で行われた骨臼内 migration した bipolar 型人工骨頭の revision 全症例を retrospective に評価した。人工骨頭周囲組織の 400 倍鏡検で 1 視野に好中球が 5 個以上存在した polymorphonuclear leukocyte (PMNs)-positive 群 (感染) と PMNs-negative 群とに分け検討した。さらに PMNs-positive 群の中で CRP 1.0mg/dL 未満の 4 例を asymptomatic PMNs-positive 群として PMNs-negative 群と比較した。PMNs-negative 群/PMNs-positive 群間で有意差があったのは

- ① 抜去までの平均日数：[平均：7255 日/1570 日] (p < 0.01)
- ② 人工骨頭抜去直前 CRP：[0.05mg/dL /1.47mg/dL] (p < 0.01)

③人工骨頭抜去直前 JOA score : [63.0 点 /38.8 点] (p < 0.01)

④ 病理学的に PMNs-negative 群では 7/7 例、PMNs-positive 群 では 0/11 に摩耗粉や巨細胞が存在 (p < 0.01)

PMNs-negative 群 /asymptomatic PMNs-positive 群間で有意差ありは

①抜去までの平均日数 : [平均:7255 日/2635 日] (p < 0.01)

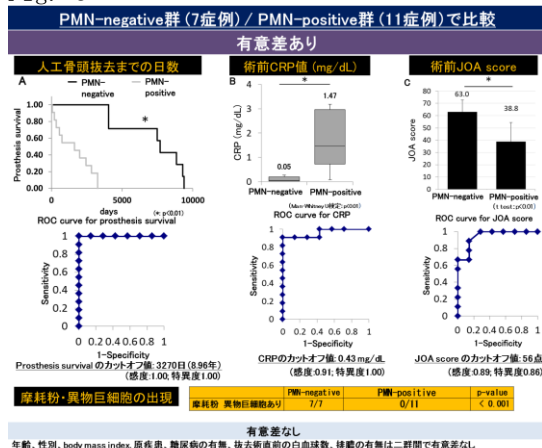
②人工骨頭抜去直前 CRP : [0.05 mg/dL /0.54 mg/dL] (p < 0.05)

③人工骨頭抜去直前 JOA score : [65.0 点 /53.0 点] (p < 0.05)

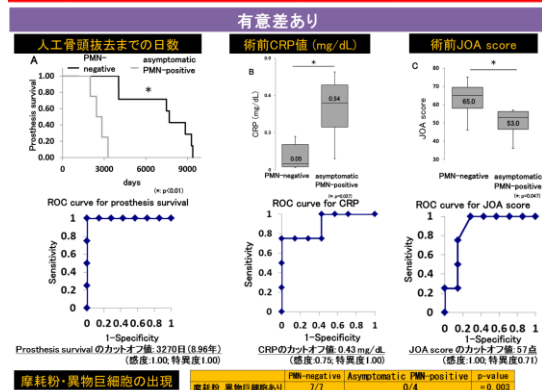
④ 病理学的に PMNs-negative 群では 7/7 例、PMNs-positive 群 では 0/4 に摩耗粉や巨細胞が存在 (p < 0.01)

一方いずれの比較でも有意差がなかったのは年齢、性別、BMI, 原疾患、糖尿病の有無、抜去術直前の白血球数、排膿の有無であった。人工骨頭術後 9 年未満で寛骨臼内 migration を生じる症例で CRP 0.54mg/dL 以上、JOA score が低い症例では病理学的な好中球浸潤と摩耗粉・異物巨細胞出現の評価による感染評価が必要である。

Fig. 3



PMN-negative 群 (7 例) / CRP < 1 未満の asymptomatic PMN-positive 群 (4 例) で比較



人工関節感染に対する二次的再置換術時の感染持続評価法の研究:

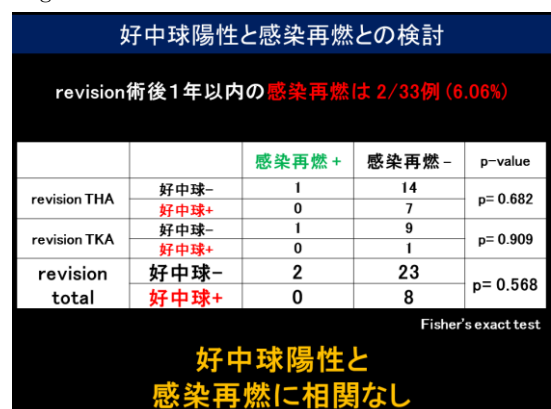
人工関節後発発性感染に対して二次的再置換術を行う治療法が広く行われている。感染が鎮静化しない場合は再度の debridement と

抗生剤含有セメント再置換を行う。感染の鎮静化の評価には術中迅速病理診断による好中球浸潤評価が有効であることが報告されている。二次的再置換術時の感染鎮静化の評価における病理診断の有効性評価のために、永久病理標本の検討を行った。

【方法】人工関節後感染に対して人工関節抜去+抗生剤含有セメント設置し、採血や局所所見より感染が鎮静化したと判断され、二次的再置換術を行った 33 例を対象とした。二次的再置換術時に採取した関節周囲組織の病理結果と再置換術後 1 年以内の感染再燃に相関する因子の解析を行った。人工関節周囲再置換術時に採取した組織の永久病理で High power field (HPF) (400 倍視野) で 5 個以上の好中球陽性群 (PMN ≥ 5) と好中球陰性群 (PMN < 5) の群に分けて感染再燃・起炎菌同定との関連を解析した。【結果】感染再燃は 33 例中 2 例 (6.1%) であった。二次的再置換術の際に採取した関節周囲組織の永久病理では、好中球陽性の病理学的感染症例は 33 例中で 8 例 (24.2%) であった。感染再燃した二例は好中球陰性群で、好中球陽性と感染再燃は相関しなかった。二次的再置換術時の採取組織での起炎菌同定症例は 33 例中 3 例 (9.1%) で全例が好中球陰性症例であり、好中球陽性と起炎菌同定の相関はなかった。

【考察】二次的再置換時の好中球陽性例では感染は軽度ながら持続しているものの、一次的再置換成功例のように比較的感染が鎮静化しやすい状態になっていることが示唆される。二次的再置換時に術中迅速で好中球の評価を行い永久病理と同じ結果が出たと仮定すると、セメント再置換が不要な症例にセメント再置換を行っている可能性がある。抗生剤含有セメントを使用して二次的に再置換を行う際には術中迅速の適応は限られるという結論に至った。

Fig. 4



さらに二次的再置換術時に術中迅速病理診断を行った 25 症例についても同様の研究を行った結果、術中迅速では 25 例中 2 例で好中球陽性で、永久病理では 25 例中 7 例が好中球陽性であった。intraclass correlation coefficient は 0.11 で poor であった。感染再燃は 25 例中 2 例で、2 例とも術中迅速診・

永久病理ともに好中球陰性群で、好中球陽性と感染再燃は相関しなかった。二次的再置換術時の術中病理、永久病理とも好中球陽性と起炎菌同定の相関はなかった。術後永久病理診断で好中球陽性例では感染は持続しているものの血液学的データなどで炎症所見が沈静化していることから、細菌数が減少して一次的再置換成功例に近い状態になっていることが示唆される。術中病理と永久病理の相関は poor であったが、仮に永久病理と同等に判定出来たと仮定しても、セメント設置後の二次的再置換時の術中迅速病理診断ではセメント再置換例が不要な症例にセメント再置換を行っている可能性がある。術中迅速病理診断ではセメント再置換例が不要な症例にセメント置換を行っている可能性がある」と結論付けた。

Fig. 5

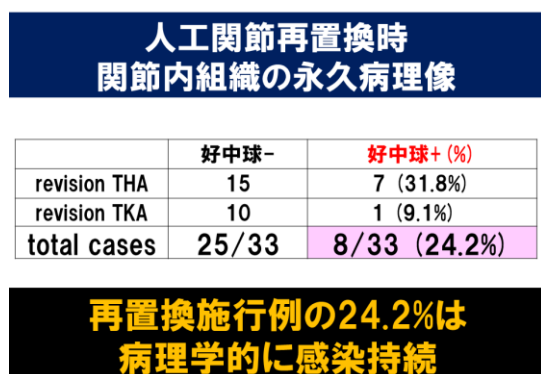
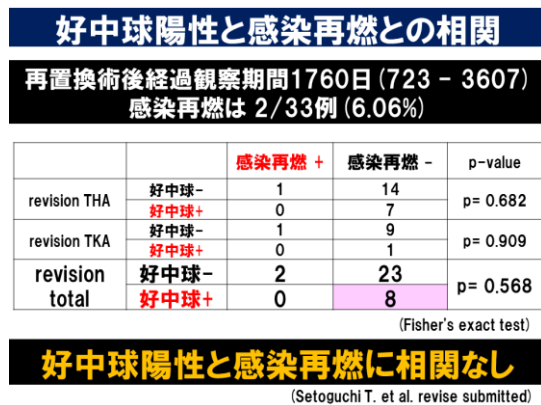


Fig. 6



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Cut-off values of latent infection in patients with rapid migration following bipolar hip hemiarthroplasty.

Setoguchi T, Kawakami H, Ishidou Y, Kawamura H, Nishi J, Yoshioka T, Kakoi H, Nagano S, Yokouchi M, Tanimoto A,

Komiya S. 査読有

BMC Musculoskelet Disord. 2016 Jan 19;17:37.

[学会発表] (計 2 件)

1. 人工関節感染に対する二次的再置換術時の術中病理検査は不要なセメント再設置を増やす可能性がある

Intraoperative histological evaluation during second-stage revision surgery promote overdiagnosis of the infection

瀬戸口啓夫、斎藤嘉信、石堂康弘、今村勝行、泉俊彦、中村俊介、梶博則、砂原伸彦、有島善也、小宮節郎

第 90 回日本整形外科学会学術総会 2017 年 5 月 19 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

2. 人工関節周囲感染で抗生剤含有セメント設置後二次的再置換時の術中病理診断は有用か?

Intraoperative pathological findings of periprosthetic tissues during revision total arthroplasty following periprosthetic infection

瀬戸口啓夫、今村勝行、斎藤嘉信、有島善也、中村俊介、泉俊彦、梶博則、砂原伸彦、永野聡、石堂康弘、小宮節郎

第 47 回人工関節学会 2017 年 2 月 24 日 沖縄国際会議場 (沖縄県・宜野湾市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 小宮節郎 (KOMIYA, SETSURO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178371

(2) 研究分担者 瀬戸口啓夫

(SETOGUCHI, TAKAO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：40423727

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 齊藤嘉信

(SAITOH, YOSHINOBU)