

学位論文要旨

氏名

池田 信介



論文題目

「Double-layered antibiotic-loaded cement spacer as a novel alternative
for managing periprosthetic joint infection: an in vitro study」

(人工関節周囲感染に対する新規代替治療としての
二重構造抗菌薬含有セメントスペーサー：in vitro の検証)

指導教授承認印

高相 潤士



「Double-layered antibiotic-loaded cement spacer as a novel alternative
for managing periprosthetic joint infection: an in vitro study」

(人工関節周囲感染に対する新規代替治療としての
二重構造抗菌薬含有セメントスペーサー：in vitro の検証)

氏名 池田 信介

<背景>

人工関節周囲感染症 (periprosthetic joint infection, 以下 PJI) は、人工関節置換術の最も深刻な術後合併症の 1 つであり、人工関節置換術に対し 1~2% の確率で発生する。抗菌薬を含有したセメントスペーサーの使用は、抗菌薬の局所伝達の標準的手順と考えられている。黄色ブドウ球菌は PJI で最も一般的な病原体であり、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 以下 MRSA) の割合は約 50% である。以前の研究では、抗菌薬を含有したリン酸カルシウムセメント (calcium phosphate cement, 以下 CPC) が長期間にわたって大量の抗菌薬を放出することが報告されており、PJI の治療に効果的と考えられた。以前は PJI の治療に対し Polymethylmethacrylate 骨セメント (以下 PMMA) のみのスペーサーが使用されていたが、その高い抗菌薬放出を期待して、PJI の治療に対し CPC のみのスペーサーが使用されたことがあった。しかし、CPC のみで構成されるスペーサーは機械的に弱く、待機中にスペーサーの破損が発生し、破損し散在した CPC の破片の除去が困難であった。そのため、PMMA スペーサーの機械的強度を備え、かつ CPC スペーサーの高濃度で長時間の抗菌薬溶出を実現するために、CPC を PMMA でコーティングした二重構造のスペーサー (Double-layered antibiotic-loaded cement spacer, 以下 D-L スペーサー) が開発された。D-L スペーサーは、2008 年から当院で使用されている。D-L スペーサーは、これらの材料のそれぞれの利点が組み合わせられており、PMMA および CPC 単独と比較し、治療に有利であると考えられている。しかし、D-L スペーサーの実際の強度と抗菌薬の溶出特性は現在までのところ明らかとなっていない。この研究の目的は、D-L および PMMA スペーサーの抗菌薬の放出、抗菌活性、および機械的強度を比較することであった。

<方法>

この研究では、球状スペーサーモデルを使用して、2 種類のスペーサーのバンコマイシン (Vancomycin, 以下 VCM) 溶出量と機械的強度を比較した。

球状大腿骨頭スペーサーモデルの作成

シリコン樹脂製の 2 つの異なる直径 (40 mm と 29 mm) の型を用いて、VCM 含有 D-L スペーサー (5 サンプル) および PMMA スペーサー (5 サンプル) を清潔野で作成した。さらに、D-L スペーサーと PMMA スペーサーの両方に、直径 5 mm の 12 個の穴を開けた。

VCM 溶出液の採取

各サンプルを滅菌リン酸緩衝液 (PBS) (スペーサー 1 グラムあたり 1.5 mL の PBS) に

入れ、37℃で84日間インキュベートした。PBSは24時間ごとに交換した。1、3、7、14、28、56、84日目にそれぞれ溶液を採取した。

溶液中 VCM 濃度の測定

採取した溶液の VCM 濃度は、高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography, 以下 HPLC) を使用して測定された。

抗菌活性の評価

採取した溶液の抗菌活性を、微量希釈法を使用して評価した。ミュラーヒントンブイオンを培地として使用し、MRSA 株 (N315 株) を使用した。微量希釈法は、ディスク拡散法とは異なり、抗菌活性の定量的測定を可能である。また、この手法を用いて MRSA に対する VCM の最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration, 以下 MIC) を決定した。溶液の菌の発育を阻止する最小の希釈率に、MRSA の MIC を掛けることにより、抗菌活性を VCM 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に変換して HPLC の結果と比較した。

圧縮強度試験

すべてのスパーサーを PBS で 37℃、84 日間インキュベートした後、圧縮強度試験を実施した。試験直前にサンプルを PBS から取り出し、濡れた状態ですぐに圧縮強度試験を施行した。Universal Testing Machine により、各スパーサーに一軸圧縮荷重が加えられた。スパーサーの破損が発生するまで圧縮され、スパーサーの破損直前の荷重が最大荷重として記録された。

統計解析

溶液の VCM 濃度と圧縮強度について、Mann-Whitney U テストを使用して D-L および PMMA スパーサーで比較した。

<結果>

VCM 濃度

D-L および PMMA スパーサー溶液の両方について、VCM 濃度は 1 日目に最大であり、徐々に減少した。7 日目以降 84 日目まで D-L スパーサー溶液の VCM 濃度は、PMMA スパーサー溶液の VCM 濃度と比較し有意に高かった。

抗菌活性

MRSA に対する VCM の MIC は $0.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。次に、溶液の抗菌活性を VCM 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に変換して、HPLC 結果と比較した。HPLC および微量希釈法の結果は、D-L および PMMA スパーサー溶液の両方でほぼ同等であった D-L スパーサー溶液の抗菌活性は、7 日目以降から 84 日目まで PMMA スパーサー溶液の抗菌活性を有意に上回っていた。

圧縮強度試験

D-L スパーサーの圧縮強度 (平均 7.3 kN) は、PMMA スパーサーの圧縮強度 (平均 15.1 kN) よりも有意に低かった ($P=0.0079$)。しかし、最も弱いスパーサーでも圧縮強度の値は 5.64 kN であり、575 kg の荷重に耐えることができた。

<考察>

D-L スペーサーは、抗生物質の高濃度および長期溶出を達成するために開発された。この研究において、D-L スペーサーに関して、(1) 多くの抗菌薬を放出し、(2) MRSA に対する抗菌活性を維持し、(3) 高い機械的強度を維持していることがわかった。

D-L スペーサー溶液の VCM 濃度は PMMA スペーサー溶液の VCM 濃度を大幅に上回っていた。これは、PMMA が含有された抗菌薬を部分的にのみ放出するが、CPC は含有された抗生物質のほとんどを放出することを示した以前の研究の結果と一致していた。本研究では、7 日目の D-L スペーサーからの VCM 溶出量は PMMA スペーサーの 2.3 倍であり、その比率は、84 日目の 11.9 倍まで増加し続けた。これは CPC を PMMA で覆うことにより、VCM をゆっくりと長期間にわたって放出できることを示している。

試験前に我々は、材料の重合が VCM の活性に影響を与える可能性があるかと予測した。具体的には、CPC は PMMA 重合で観察される実質的な量の熱を生成しないため、発生する可能性のある熱による抗菌薬の変性を引き起こさない。また、一部の有機溶媒は VCM 複合体とペプチドリガンドの安定性に影響することが報告されており、PMMA に含まれる有機溶媒が VCM の抗菌活性に何らかの影響を与える可能性があると考えた。そこで、HPLC と抗菌活性試験の結果を比較したが、それらが同等であり、本研究において抗菌薬の不活性化や変性を生じていないことがわかった。

最後に、研究期間を通じて D-L スペーサーが高い機械的強度を保持していることがわかり、機械的に弱い CPC をより強い PMMA でコーティングすると、CPC のみよりも優れた機械的特性を持つスペーサーが得られるという仮説を確認した。セメントの機械的特性が主要な臨床的問題であるため、これは重要なことである。PJI のためにセメントスペーサー留置を含む 2 回の関節置換術を受ける患者は、スペーサーが体に残っている間は (通常 2 週間から数ヶ月間) スペーサーを含む患肢に機械的負荷をかけないように指示される。しかし、患肢に無意識に負荷がかかる可能性もあり、例えば患者がつまずくと、体重の 7.2 倍の股関節力が発生する可能性があることが報告されている。D-L スペーサーの最大圧縮荷重は PMMA スペーサーよりも低いことがわかったが、最も弱いスペーサーでも 5.64 kN または 575 kg の荷重に耐えることができた。これは、80 kg の患者が立ち上がったときの股関節力に耐えることができる値である。ただし、球形の D-L スペーサーが 80 kg の人のつまずきに耐えることができたとしても、臨床的に適用したときに D-L スペーサーの強度が十分であるという保証は無く、今後さらなる研究が必要である。

本研究では D-L スペーサーと PMMA スペーサーの特性を比較し、D-L スペーサーは抗菌薬溶出量と抗菌活性の維持の点で PMMA スペーサーよりも優れていることを見出した。また D-L スペーサーは、高い機械的強度を維持していた。D-L スペーサーは有益な生体力学的特性および薬物溶出特性を有しており、PJI 治療に対し有望な生体材料であると考えられる。