

厚生労働科学研究費補助金

長寿総合研究事業

高齢化社会に適応する人工関節の開発
—MPCポリマーによる長寿命人工関節に関する戦略的研究—

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村耕三

平成16（2004）年 4月

目次

I. 総括研究報告

高齢化社会に適応する人工関節の開発

—MPC ポリマーによる長寿命人工関節に関する戦略的研究— …… 1

中村耕三

II. 分担研究報告

1. MPC ポリマー摩耗粉が破骨細胞の形成・活性化に与える
影響に関する研究 ……13

中村耕三

2. 人工関節周囲の骨吸収に MPC ポリマー摩耗粉が与える
影響に関する研究 ……25

高取吉雄・川口浩

3. MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した
PE ライナー表面の耐摩耗特性

—股関節シミュレーターによる評価— ……36

安富義幸・瀧川順庸

4. MPC ポリマー処理した PE の表面解析に関する研究 ……41

石原一彦

5. MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した
PE ライナー表面の耐摩耗特性

—臼蓋ポリエチレンライナーの解析— ……54

松下富春

6. 股関節シミュレーター試験による骨頭表面の変化と

潤滑液の性状の解析 ……65

埴隆夫・丸山典夫

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合 研究事業）

総括研究報告書

高齢化社会に適応する人工関節の開発
—MPC ポリマーによる長寿命人工関節に関する戦略的研究—

主任研究者 中村耕三（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 教授）

研究要旨：長寿命型人工関節の開発のため、人工関節摺動面のポリエチレンライナー表面を MPC ポリマー処理し、その処理効果を①MPC ポリマー処理が PE ライナーの摩耗に与える影響、②MPC ポリマー摩耗粉（微粒子）が骨吸収に与える影響、の両面から検討した。股関節シミュレーター試験を用いた検討では、PE ライナー表面を MPC ポリマー処理することでその摩耗を著明に抑制することができ、その効果は試験終了時まで持続していた。また、この処理効果は、 γ 線滅菌処理の影響を受けなかった。さらに、1 回目のシミュレーター試験終了後 MPC ポリマー処理方法を改善したところ、2 回目のシミュレーター試験ではより強力な摩耗抑制効果がみられた。さらに、人工関節の弛み（loosening）の主因となる直径 500 nm のナノ微粒子を MPC ポリマー処理し、*in vitro* osteolysis model、*in vivo* osteolysis model の実験系に用いると、双方の実験系で、マクロファージによる貪食、破骨細胞形成、osteolysis・loosening の誘導が抑制されていた。今回の研究により、MPC 処理が PE ライナーの摩耗を低減して長期の力学的負荷に耐えられること、MPC ポリマー摩耗粉（微粒子）が骨吸収を誘導しないことが明らかになった。以上の研究により人工関節の寿命を延長することは、高齢者の ADL・QOL 向上や医療費の軽減に多大な貢献をもたらすことが十分に期待できる。

分担研究者

高取吉雄（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 助教授）
川口浩（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 講師）
石原一彦（東京大学大学院工学系研究科バイオマテリアル工学 教授）
安富義幸（財団法人ファインセラミックスセンター 副所長）
瀧川順庸（財団法人ファインセラミックスセンター 副主任研究員）
塙隆夫（独立行政法人物質・材料研究機構 副センター長）
丸山典夫（独立行政法人物質・材料研究機構 主幹研究員）
松下富春（神戸製鋼所医療材料部 理事）

A. 研究目的

人工股関節置換術 (THR) は、高齢者に多い大腿骨頸部骨折・変形性股関節症・関節リウマチ患者に対し、疼痛の改善、ADL・QOL の獲得に大きな役割を果たしている。また、2001 年度我が国では6万件の手術が行われており、手術件数は年率約 8%の割合で増加している。しかしながら、手術後約 10 年で生じる人工関節の弛み (loosening) は、常にその予後を決定する最大の合併症である。Loosening は人工関節周囲の骨吸収を伴い進行性であるため、再置換手術を余儀なくされる。したがって人工関節を受けた患者は再置換術の潜在的な対象であり、人口の高齢化が進む我が国においてはその件数は今後増加し続けると予想される。また、特に高齢者においては再置換手術による歩行能力の低下や全身的な合併症の発症が問題になっている。さらに高齢者の場合、他の全身的合併症により再置換手術が禁忌となって車椅子や寝たきりの生活を余儀なくされることもある。これらは患者自身の QOL のみならず医療費の問題、労働力という社会資本を考えた場合、深刻な社会問題であり、人工関節の寿命を延長することは、医療行政における緊急かつ重要な検討課題である。

Loosening は、関節摺動面を構成するポリエチレン(PE)の摩耗粉をマクロファージ (MΦ) が貪食して液性因子を分泌し、これが破骨細胞の形成・活性化を促進して人工関節周囲の骨

吸収が生じる結果として発生する。そこで、loosening の対策手法は従来、1) 摩耗粉を減少させる、2) 骨吸収を抑制する、の2つの方向性で検討されてきた。

摩耗粉を減少させる試みとしては、1) PE の性質の改良、2) PE を使わない人工関節の開発、などがなされてきた。PE の硬化させる試みは実用化に至ったものの短期間に弛みが生じ失敗に終わった。金属対金属の関節面を持つ人工関節は長期成績の不良例が報告されており金属イオンの毒性の問題も指摘されている。セラミックスの人工関節はセラミックス特有の脆弱性が問題となっており体内での破損例も報告されている。この一方で、テフロン、カーボンなどで PE 表面を被覆する試みも行われてきたが、これらには、1) 結合力が弱くすぐに脱落してしまう、2) 結合により PE を改質・損傷してしまう、3) PE 表面より摩擦特性が高く摩耗をおこしやすい、4) 材料自体の摩耗粉が骨吸収を強力に誘導する、などの問題があり、実用化には至らなかった。また、骨吸収を抑制するためには抗サイトカイン抗体などを用いた試みがなされているが、全身への影響による副作用が避けられない問題として残っている。

我々は、摺動面に潤滑性を付加し、かつ摩耗粉が発生した際の破骨細胞の活性化を阻止すれば loosening を抑制できると考えた。この目的で、生体適合性ポリマーである MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した PE 表

面を創製した（MPC ポリマー処理・特許申請中）。MPC ポリマーは分担研究者の石原によって開発・合成された全くオリジナルな日本発の高分子生体材料であり、医用材料として認可を受けて臨床応用されている。MPC ポリマーが他の人工関節材料と比較して期待される点は、1) 潤滑特性に優れ、関節面の摩擦係数をさげて摩耗粉を減少させる、2) 生体適合性に優れ、摩耗粉がMΦに貪食されず、破骨細胞性の骨吸収を誘導しない、3) PE表面に分子間で結合するため、結合力が強く本質的にPEを改質しない、という3点である。また、早期の臨床応用ということ考えた場合、MPC ポリマーが新規の材料でなく、既に人工関節と同等のクラスⅢの医療材料として認可を受けた材料であることも利点と考えている。

本研究の目的は、人工関節のPEライナー表面をMPCポリマー処理することで人工関節のlooseningを抑制する、長寿命型人工関節を開発することである。本研究により、MPCポリマー処理がPEライナーの摩耗を低減して長期の力学的負荷に耐えられること、MPCポリマー摩耗粉（微粒子）が骨吸収を誘導しないことを明らかにし、人工関節の寿命を延長することは、高齢者のADL・QOL向上や医療費の軽減に多大な貢献をもたらすことが十分に期待できる。

B. 研究方法

① MPCポリマー処理がPEライナ

一の摩耗に与える影響

ファインセラミックスセンターの股関節シミュレーターを使用した。ライナーはPEライナーとクロスリンクポリエチレンライナー（CL-PE）を用いた。これらはいずれも市販品である。ライナー表面をMPCポリマー処理し、直径22mmのコバルトクロムモリブデン合金製骨頭との間で300万サイクルの連続試験を行った。50万サイクル毎にライナーを回収し、試験開始前のライナーと対比し、下記の検討を行った。

- 1) MPCポリマー処理群と未処理群における関節摺動面での摩擦係数とその経時的変化を調べた（分担研究者 松下富春）。
- 2) 臼蓋ライナーの摩耗量を質量変化から計測した（分担研究者 安富義幸・瀧川順庸）。また三次元解析装置を用い、その形状変化を計測した（分担研究者 松下富春）。
- 3) シミュレーター試験終了後の臼蓋ライナー表面を走査型電子顕微鏡にて観察し、摩耗の程度を観察した（分担研究者 松下富春）。
- 4) X線光電子分光法を用い、臼蓋ライナー表面のMPCポリマー処理の残存の有無を判定した（分担研究者 石原一彦）。
- 5) 走査型電子顕微鏡を用い、股関節シミュレーター試験前後における骨頭表面の性状及び表面粗

さの変化を観察した（分担研究者 塙隆夫・丸山典夫）。

- 6) シミュレーター摺動面の潤滑液を 50 万サイクル毎に回収してリン濃度を計測し、MPC ポリマーの脱落について検討した（分担研究者 塙隆夫・丸山典夫）。
- 7) 臨床応用された場合を想定し、MPC ポリマー処理に与える影響を検討するため、MPC ポリマー処理したライナー表面に 2.5 Mrad の γ 線を照射して滅菌し、その表面性状を X 線光電子分光法を用いて判定した（分担研究者 石原一彦）。さらに、先に示した条件で 300 万サイクルの股関節シミュレーター試験を行い、臼蓋ライナーの質量変化で摩耗量を計測した（分担研究者 安富義幸・瀧川順庸）。

② MPC ポリマー処理摩耗粉（微粒子）が骨吸収に与える影響

- 1) 人工関節の弛みの主因となる直径 500nm の MPC ポリマー処理微粒子を作製した（主任研究者 中村耕三）。
- 2) 1) で作成した MPC ポリマー処理微粒子を、マウス腹腔内マクロファージに暴露し、貪食試験を行った（主任研究者 中村耕三）。
- 2) J774.1 細胞（マウス・M ϕ 細胞株）を培養した後、上記の MPC ポリマー処理微粒子と未処理微粒子に暴露して、conditioned medium を作成した。

conditioned medium 中の、破骨細胞の形成・活性化を促進して骨吸収を誘導する液性因子（TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、プロスタグランジン E₂）の濃度を測定した（主任研究者 中村耕三）。

3) *In vitro* osteolysis model

2) で作成した conditioned medium の存在下でマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養を行い、破骨細胞数を計測した。また、この *in vitro* osteolysis model の実験系に抗サイトカイン抗体、OPG、COX-2 抑制剤を用いた抑制実験を行い、どの因子が骨吸収誘導に関与しているかを検討した（分担研究者 高取吉雄・川口浩）。

4) *In vivo* osteolysis model

MPC ポリマー微粒子または未処理微粒子をマウスの calvaria 上に移植した。7 日後に屠殺し、頭蓋骨を採取し、これを固定・脱灰した後、破骨細胞数を計測した。（分担研究者 高取吉雄・川口浩）。

（倫理面への配慮）

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

① MPC ポリマー処理が PE ライ

ナーの摩耗に与える影響

- 1) MPC ポリマー処理群と未処理群における関節摺動面での摩擦係数とその経時的変化を調べた。処理群では未処理群の約 1/10 に低下していた。
- 2) PE ライナーの摩耗量を質量で計測した。MPC ポリマー処理した臼蓋ライナーの摩耗量は著明に抑制されていた。また三次元解析装置を用いた計測で、MPC ポリマー処理した臼蓋ライナーは、ほとんど摩耗がみられなかった。
- 3) 300 万サイクル終了後の走査型電子顕微鏡にて観察すると、MPC ポリマー処理した臼蓋ライナーは、製品加工時にライナー表面に刻まれるマシンマークが残存しており、ほとんど摩耗がみられなかった。
- 4) X線光電子分光法を用い、PE ライナー表面の MPC ポリマー処理の残存を確認した。
- 5) 試験終了後のコバルトクロムモリブデン骨頭を走査型電子顕微鏡にて観察すると、試験前後でその表面粗さに変化はみられず、試験中の third body 等の混入は否定できた。
- 6) シミュレーター摺動面の潤滑液を 50 万サイクル毎に回

収してリン濃度を計測し、MPC ポリマーの脱落について検討したところ、リン濃度は測定感度以下であった。

- 7) MPC ポリマー処理したライナー表面を γ 線で滅菌処理し、X線光電子分光法でその表面性状を観察すると、MPC ポリマー処理効果に変化はみられなかった。また、このライナーを用いたシミュレーター試験では、MPC ポリマー処理したライナーの摩耗がみられなかった。

② MPC ポリマー摩耗粉 (微粒子) が骨吸収に与える影響

- 1) 人工関節の弛みの主因となる直径 500nm の MPC ポリマー微粒子を作製した。
- 2) MPC ポリマー処理微粒子を暴露したマクロファージは、粒子を貪食しなかった。
- 3) MPC ポリマー処理微粒子を暴露した conditioned medium 中の TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、プロスタグランジン E₂ の濃度は、未処理微粒子を暴露したものと比較し 1/4~1/20 に抑制されていた。
- 4) *In vitro* osteolysis model の実験系に、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した conditioned medium を用いると、破骨細胞の形成は著しく抑制されていた。また、この実験において、さらに抗 TNF- α ・IL-1 α ・IL-6 抗体、OPG、

COX-2 抑制剤を用いた抑制実験を行ったところ、全ての抗体において破骨細胞形成が抑制された。

- 5) *In vivo* osteolysis model の実験系に MPC ポリマー処理微粒子を用いると、未処理の微粒子を用いた場合と比較して破骨細胞形成が著明に抑制された。

D. 考察

長寿命型人工関節の開発のため、人工関節摺動面のポリエチレンライナー表面を MPC ポリマー処理し、その処理効果を①MPC ポリマー処理が PE ライナーの摩耗に与える影響、② MPC ポリマー摩耗粉（微粒子）が骨吸収に与える影響、の両面から検討した。

股関節シミュレーター試験を用いた検討では、PE ライナー表面を MPC ポリマー処理することで、ライナーの摩耗を著明に抑制することができ、その処理効果は試験終了時まで持続していた。また、この処理効果は、 γ 線滅菌処理の影響を受けなかった。さらに、1 回目のシミュレーター試験終了後、MPC ポリマー処理方法を改善したところ、2 回目のシミュレーター試験では、より強力な摩耗抑制効果がみられた。

人工関節の弛み (loosening) の主因となる直径 500 nm のナノ微粒子を MPC ポリマー処理し、*In vitro* osteolysis model、*In vivo* osteolysis model の実験系に用いると、双方の実験系で、マクロファージによる貪食、

破骨細胞形成、osteolysis・loosening の誘導が抑制されていた。

以上の結果は、高齢者の ADL・QOL の向上を達成する長寿命型人工関節の開発に確信を得るに十分な結果であった。この他、MPC ポリマーは PE 表面に分子間で結合するため結合力が強く本質的に PE を改質しないこと、MPC ポリマーは新規の材料でなく既に人工関節と同等のクラスⅢの医療材料として認可を受けた材料であること、も臨床応用を考えた場合の利点と考えている。また、我が国の人工関節の市場規模は 2001 年度で 625 億円であるが、その 80%以上が海外製品で占められている。一方で高齢者には小柄な体型が多く、これら海外製品では適合が困難な症例もみられ、日本人の体型に合った日本独自の人工関節の開発が期待されている。MPC ポリマーは分担研究者の石原が開発した日本独自の材料であり、本研究により海外製品に勝る性能を獲得する事は確実であり、この分野の産業育成と貿易不均衡の是正に大きな貢献を果たす。

E. 結論

今回の研究により、MPC ポリマー処理が PE ライナーの摩耗を低減して長期の力学的負荷に耐えられること、MPC ポリマー摩耗粉（微粒子）が骨吸収を誘導しないことを明らかにした。以上の研究により人工関節の寿命を延長することは、高齢者の ADL・QOL 向上や医療費の軽減に多大な貢献をもたらすことが十分に期待でき

る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* (in press).
2. Seto H, Fujii T, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, and Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* (in press).
3. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, and Kawaguchi H: PPAR insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* (in press).
4. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, Ozawa H, Nakamura K, and Kawaguchi H: Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19: 214-223, 2004.
5. Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6: 76-84, 2004.
6. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, and Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 503-508, 2004.
7. Koshizuka Y, Yamada T, Hoshi K, Ogasawara T, Chung U, Kawano H, Nakamura Y,

- Nakamura K, Ikegawa S, and Kawaguchi H: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, may promote the last steps of the chondrocyte differentiation pathway. *J Biol Chem* 278: 48259-48266, 2003.
8. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, and Tanaka S: Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J* 22: 6653-6664, 2003.
 9. Saegusa M, Murakami M, Nakatani Y, Yamakawa K, Katagiri M, Matsuda K, Nakamura K, Kudo I, and Kawaguchi H: Contribution of membrane-associated prostaglandin E₂ synthase (mPGES) to bone resorption. *J Cell Physiol* 197: 348-356, 2003.
 10. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24: 4495-4506, 2003.
 11. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, and Shigeaki Kato: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9416-9421, 2003.
 12. Seichi A, Nakajima S, Takeshita K, Kitagawa T, Akune T, Kawaguchi H, and Nakamura K: Image-guided resection of the thoracic ossification of the ligament flavum. *J Neurosurg* 99: 60-63, 2003.
 13. Ogihara S, Seichi A, Iwasaki M, Kawaguchi H, Kitagawa T, Tajiri Y, and Nakamura K: Concurrent spinal schwannomas and meningiomas. Case illustration. *J Neurosurg* 98: 300, 2003.
 14. Seichi A, Nakajima S, Kitagawa T, Takeshita K, Iwasaki M, Kawaguchi H, Oda H,

Nakamura K: Image-guided surgery for cervical disorders in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 12: 329-332, 2002.

2. 学会発表

1. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勸、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三: 頸椎椎弓形成術後にみられる MRI 髓内変化の拡大 - 前向き研究. 第 32 回日本脊椎脊髄病学会. 2003. 4. 4-6 (福岡).
2. 星地亜都司、中島勸、北川知明、竹下克志、阿久根徹、筑田博隆、川口浩、中村耕三: コンピューターナビゲーションシステムを用いた頸椎インストルメンテーション再手術. 第 32 回日本脊椎脊髄病学会. 2003. 4. 4-6 (福岡)
3. 川口浩、亀倉暁、池田敏之、池川志郎、中村耕三: Reverse & forward genetics を用いた変形性関節症の病態解明へのアプローチ. 第 47 回日本リウマチ学会総会 (シンポジウム: 変形性関節症の発症機序と治療). 2003. 4. 24-25 (京王プラザホテル、東京).
4. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則: fluorescence resonance energy transfer (FRET)を用いた polyethylenimine/DNA polyplex の細胞内挙動の観察. 第 3 回遺伝子・デリバリー研究会. 2003. 5. 9 (KKR ホテル東京、東京).
5. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勸、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三: 頸椎椎弓形成術後の上肢麻痺 - MRI による検討. 第 76 回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
6. 竹下克志、星地亜都司、岩崎元重、阿久根徹、川口浩、中村耕三: 頸椎砂時計腫に対する片側椎弓・椎間関節切除に固定は必要か. 第 76 回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
7. 阿久根徹、川口浩、緒方直史、星地亜都司、大西五三男、中村耕三: 脊椎後縦靭帯骨化症の骨化傾向と糖代謝関連因子の検討. 第 76 回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
8. 松田浩一、井上耕一、阿久根徹、星和人、河野博隆、山川聖史、中村祐輔、中村耕三、川口浩: メカニカルストレスに反応して骨量維持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc transporter 5) の単離と機能解析 (学会奨励賞受賞). 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
9. 池田敏之、馬淵昭彦、亀倉暁、福田明、平岡久忠、鄭雄一、川口浩、高取吉雄、滝川正春、木村友厚、須藤啓広、内田淳正、中村耕三、池川志郎: Sox9 による IX 型コラーゲン α 3 鎖遺伝子の転写誘導は変形性膝関節症の発症に関与する (学会奨励賞受賞). 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7

- (大阪国際会議場、大阪).
10. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、中村耕三、川口浩：マウス変形性関節症(OA)誘発モデルの確立とこれを用いたOA発症におけるMMP-13の関与. 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
 11. 池田敏之、亀倉暁、馬淵昭彦、関庄二、黄郁代、筑田博隆、鄭雄一、木村友厚、川口浩、中村耕三、池川志郎：軟骨再生医療を目指したSOX9/SOX5/SOX6の遺伝子同時導入による軟骨誘導. 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
 12. 大庭伸介、池田敏之、矢野文子、釘宮典孝、筑田博隆、高戸毅、中村耕三、Alex Lichter、川口浩、鄭雄一：COL1-GFP マーカー遺伝子導入による幹細胞から骨芽細胞への分化モニタリングシステムの開発. 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
 13. Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Toru Akune, Hirotaka Kawano, Ken-ichi Kawano, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of cGMP-dependent protein kinase 2 causes dissociation of proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in Minature rat Ishilawa (Travel Award 受賞). IBMS-JSBMR 2003. 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
 14. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則：Linear ポリエチレンイミンの高遺伝子発現メカニズム- FRET を用いた細胞内観察. 第19回日本DDS学会. 2003. 6. 19-20 (国立京都国際会館、京都).
 15. Koichi Matsuda, Koichi Inoue, Kiyofumi Yamakawa, Hirotaka Kawano, Toru Akune, Kazuto Hoshi, Yusuke Nakamura, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Zinc transporter 5 (Znt5) is an essential molecule for mechanical stress signaling in bone (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
 16. Takashi Yamada, Hirotaka Kawano, Toru Fukuda, K. Yoshimura, Takashi Nakamura, Satoru Kamekura, Ung-il Chung, Yu Koshizuka, Kozo Nakamura, Shigeaki Kato, Hiroshi Kawaguchi: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, contributes to pathogenesis of osteoarthritis and ectopic

- ossification through chondrocyte calcification (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
17. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Ung-il Chung, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Establishment of novel experimental osteoarthritis models in mice. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
18. Toshiyuki Ikeda, Akihiko Mabuchi, Akira Fukuda, Satoru Kamekura, Ikuko Kou, S. Seki, Hisatada Hiraoka, Alira Kawakami, Seizo Yamamoto, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, M. Takigawa, Hiroya Sakai, A. Sudo, A. Uchida, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Shiro Ikegawa: Transcriptional induction of the gene encoding $\alpha 3$ chain of type IX collagen (*COL9A3*) by SOX9 contributes to the susceptibility of knee osteoarthritis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
19. Toshiyuki Ikeda, Hiroshi Kawaguchi, Satoru Kamekura, Akihiko Mabuchi, I. Kou, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Shiro Ikegawa, Ung-il Chung: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 is sufficient for chondrogenesis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
20. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：生体適合性に優れた人工材料・MPCによるナノ表面処理を用いた人工関節の弛緩防止—耐摩耗特性と摩耗粉に対する生体反応の評価—。第18回日本整形学会基礎学術集会。2003.10.16 (北九州国際会議場、小倉)。
21. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：ライナー表面のMPCポリマー処理は人工股関節のlooseningを抑制する。第30回日本股関節学会学術集会。2003.10.31-11.1 (ホテル日航東京、東京)。
22. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇：ポリエチレンライナー表面のMPCポリマー処理による人工関節の長寿命化。第25回バイオマテリアル学会。2003.

12. 16・17 (大阪国際会議場、大阪) .
23. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇: MPC ポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する—長寿命型人工股関節の開発—. 第34回 日本人工関節学会. 2004.1.30-31 (幕張メッセ国際会議場、千葉)
24. Moro, T; Takatori, Y; Ishihara, K; Kawaguchi, H; Konno, T; Takigawa, Y; Matsushita, T; Yamawaki, N; Nakamura, K : Grafting of biocompatible polymer on the polyethylene liner for improving longevity of the artificial joints. 50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2004.3.6-10 (Moscone West Convention Center, San Francisco, California, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
主任研究報告書

MPCポリマー摩耗粉が破骨細胞の形成・活性化に与える影響に関する研究

主任研究者 中村耕三（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 教授）

研究要旨：人工関節摺動面の MPC ポリマー処理による長寿命型人工関節の開発のため、MPC ポリマー摩耗粉が破骨細胞の形成・活性化に与える影響を検討した。人工関節の弛み（loosening）の主因となる、直径約 500 nm のナノ微粒子表面を MPC ポリマーにて光学的にグラフト・被覆（MPC ポリマー処理）し、MPC ポリマー処理ナノ微粒子を作製した。この MPC ポリマーナノ微粒子をマウス腹腔内マクロファージに暴露すると、微粒子はマクロファージによる貪食を受けず、MPC ポリマーの生体適合性という特質により、MPC ポリマー処理微粒子がマクロファージに異物として認識されないことが示唆された。また、MPC ポリマー処理微粒子を、マウスマクロファージ細胞株に暴露し、その培養上清中の破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子の濃度を計測すると、その濃度は溶液のみを暴露したコントロール群と有意な差がみられず、液性因子の産生は著明に抑制されていた。本研究により、MPC ポリマーのナノ微小粉はマクロファージによる貪食をうけず、破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子の産生を抑制することが明らかになった。これらの結果は、MPC ポリマーが生体内で摩耗粉となっても、人工関節の loosening を誘導しない可能性を強く示唆するものである。

A. 研究目的

変形性関節症(OA)、関節リウマチによる関節破壊、関節の骨折、は高齢者の QOL を低下させている主要な要因のひとつであり、人工関節置換手術はその関節機能を再建する有効な治療法としてすでに確立されている。一方、人工関節の弛み（loosening）は、そ

の長期経過における最大の合併症であるが、その有効な解決策は未だ見いだされていない。今回我々は人工関節の弛みを抑制し、長寿命型人工関節を開発する手法として、生体適合性医用高分子ポリマーである MPC ポリマーを関節摺動面に使用する方法を考案した。本研究では、この MPC ポリマ

ーが生体内で摩耗粉となった際、破骨細胞の形成→骨吸収→loosening という一連の経過に与える影響を検討するため、MPC ポリマー処理したナノ微粒子を作製し、解析を行った。

B. 研究方法

① MPC ポリマー微粒子の作製

人工関節摺動面からは、様々な大きさの摩耗粉が生じるが、人工関節全置換術を施行した症例の retrospective な研究により、osteolysis および loosening の主因となるのは直径 500 nm 前後の微粒子とされている。そこで、平均粒径 468 nm の polystyrene ナノ微粒子 (Polysciences Inc. Warrington, PA) 表面を MPC ポリマー処理し、MPC ポリマー微粒子を作製した。MPC ポリマー処理には、すでに確立された光グラフト重合法を用いた。Polystyrene ナノ微粒子の表面はマイナスに荷電しているが、MPC ポリマー処理により表面の電位はゼロに近づく。この性質を利用して、粒子表面のゼータ電位で MPC ポリマー処理の効果を判定した。

② マウス腹腔内マクロファージによる MPC ポリマー処理微粒子の貪食試験

摩耗粉による osteolysis から

loosening に至る一連の過程は、人工関節摺動面から生じた摩耗粉を生体内のマクロファージが異物として認識し、貪食をすることにより始まる。そこで、MPC ポリマー摩耗粉が osteolysis、loosening に与える影響を検討するため、貪食試験を行った。マクロファージは 6 週齢のメス ddy マウス腹腔内から採取したものを使用した。ナノ微粒子は①で作製した MPC ポリマー微粒子を蛍光物質で標識して使用し (MPC 群)、コントロール群として未処理の微粒子を使用した (コントロール群)。回収した腹腔内マクロファージを 10% の牛血清 (FBS, Sigma, MO) を含む RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis) 中で 1 時間培養後、0.1% wt/vol の微粒子溶液 0.5 ml に暴露した。さらに 1 時間培養後、暴露溶液を吸引し、マクロファージを phosphate buffer solution (PBS) にて洗浄、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡にて貪食の有無を観察した。

③ MPC ポリマー処理微粒子による骨吸収を誘導する液性因子の産生

マクロファージは人工関節摺動面からの摩耗粉を貪食した後、破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子を分泌する。そこで、マクロファージに

MPC ポリマー処理微粒子を暴露した際の液性因子濃度を測定した。マクロファージは、マウスマクロファージ細胞株・J774.1 細胞を使用した (Riken Cell Bank, 埼玉)。ナノ微粒子は①で作製した MPC ポリマー微粒子と未処理微粒子を用い、溶液のみを暴露した群をコントロール群とした。J774.1 細胞を 10% の牛血清を含む RPMI-1640 medium 中で培養後、(0.1% wt/vol)。微粒子溶液を暴露、24 時間後に 0.22 μm のフィルターを通し (Corning Corster Japan, 東京)、培養上清を回収した。破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子としては、サイトカイン (TNF $\cdot\alpha$ 、IL-1、IL-6) とプロスタグランジン (PGE $_2$) を測定した。TNF $\cdot\alpha$ 、IL-1、IL-6 濃度の測定には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Endogen, Woburn, MA) を、PGE $_2$ 濃度の測定には enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) を用いた。

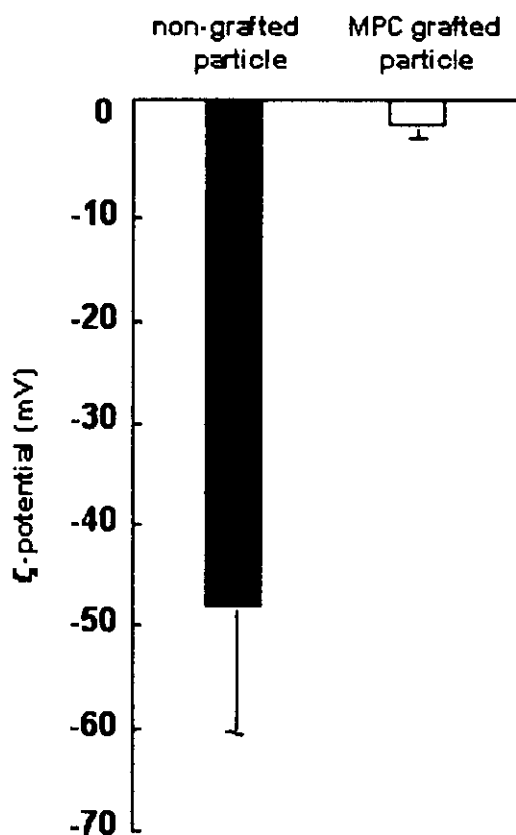
(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

① MPC ポリマー微粒子の作製

図 1 微粒子表面のゼータ電位



未処理ナノ微粒子の表面電位を測定すると、 $-50.0 \pm 10.5 \text{ mV}$ と、大きく負に帯電していた。一方、MPC ポリマー処理を施したナノ微粒子表面の電位は $-2.5 \pm 0.8 \text{ mV}$ と、0 (ゼロ) に近づいており、ナノ微粒子表面が均等に MPC ポリマーで被覆 (光学的グラフト) されたことが確認できた (図 1)。

② マウス腹腔内マクロファージによる MPC ポリマー処理微粒子の食食試験

未処理ナノ微粒子をマウス腹腔内マクロファージに暴露した群では、蛍光顕微鏡にて、位相差顕微鏡で確認されたマクロファージに一致して蛍光標識した微粒子を観察することができ、未処理ナノ微粒子はマクロファージに貪食されていた（図 2-a,b）。

一方、MPC ポリマー処理ナノした微粒子を暴露した群では、位相差顕微鏡でマクロファージの存在が確認できるものの、蛍光顕微鏡では微粒子が観察できず、MPC ポリマー処理したナノ微粒子は、マウスマクロファージによる貪食を受けなかった（図 2-c,d）。

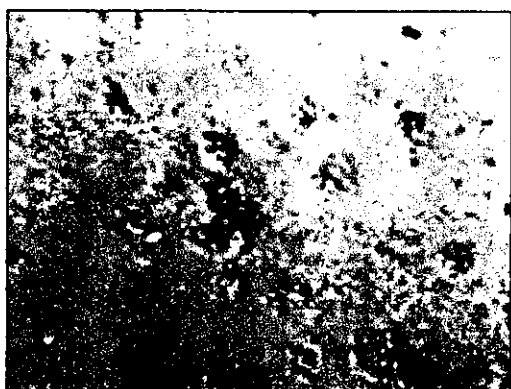


図 2-a 未処理群の位相差像

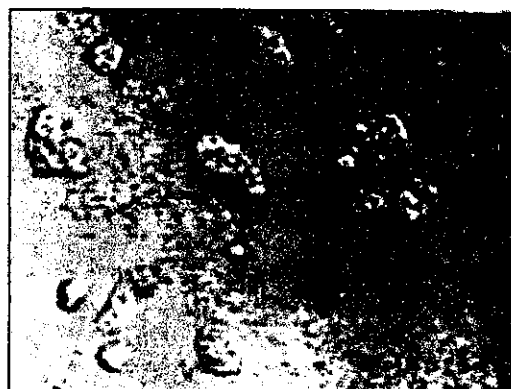


図 2-c MPC 群の位相差像



図 2-b 未処理群の蛍光像



図 2-d MPC 群の蛍光像

③ MPC ポリマー処理微粒子による骨吸収を誘導する液性因子の産生

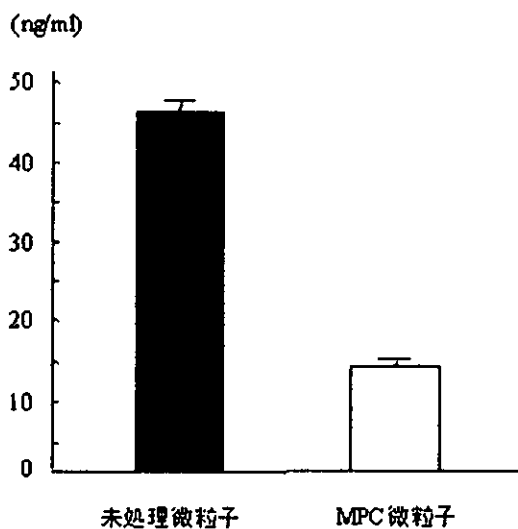


図 3-a TNF-α 濃度

MPC ポリマー処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株 J774.1 に暴露した培養上清中の TNF-α 濃度は、未処理微粒子暴露培養上清中の濃度の約 1/4 であり、溶液のみを暴露したコントロール群と、有意な差はみられなかった (図 3-a)。

MPC ポリマー処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株 J774.1 に暴露した培養上清中の IL-1 濃度は、未処理微粒子暴露培養上清中の濃度の約 1/7 であり、溶液のみを暴露したコントロール群と、有意な差はみられなかった (図 3-b)。

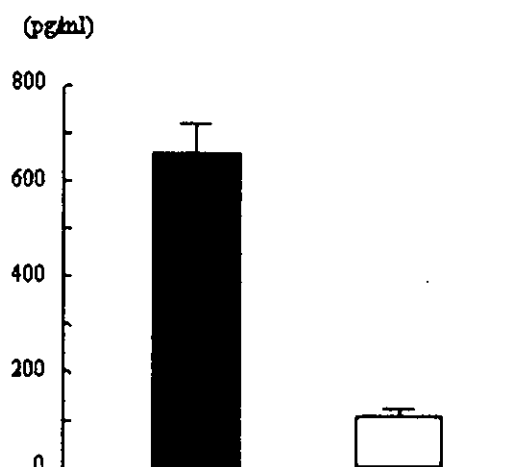


図 3-b IL-1 濃度

MPC ポリマー処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株 J774.1 に暴露した培養上清中の IL-6 濃度は、未処理微粒子暴露培養上清中の濃度の約 1/8 であり、溶液のみを暴露したコントロール群と、有意な差はみられなかった (図 3-c)。

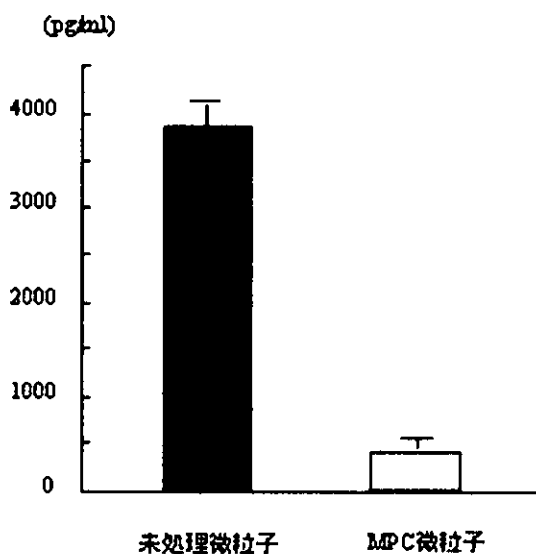


図 3-c IL-6 濃度

MPC ポリマー処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株 J774.1 に暴露した培養上清中の PGE₂ 濃度は、未処理微粒子暴露培養上清中の濃度の約 1/20 であり、溶液のみを暴露したコントロール群と、有意な差はみられなかった (図 3-d)。

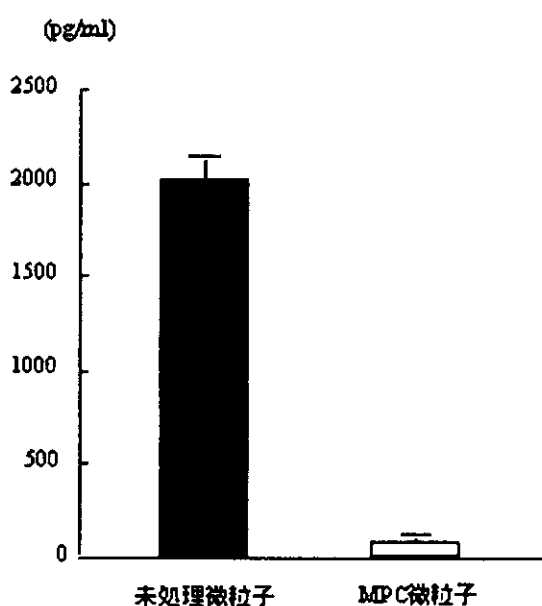


図 3-d PGE₂ 濃度

D. 考察

MPC ポリマー摩耗粉が人工関節の弛み (loosening) に与える影響を検討するため、loosening の主因となる、直径約 500 nm のナノ微粒子表面を MPC ポリマーにて光学的にグラフトし、MPC ポリマー処理ナノ微粒子を作製した。この MPC ポリマー処理ナノ微粒子をマウス腹腔内マクロファージに暴露すると、微粒子はマクロファージによる貪食を受けず、MPC ポ

リマーの生体適合性という特質により、MPC ポリマー微粒子がマクロファージに異物として認識されないことが示唆された。また、MPC ポリマー微粒子を、マウスマクロファージ細胞株に暴露し、その培養上清中の破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子の濃度を計測すると、その濃度は溶液のみを暴露したコントロール群と有意な差がみられず、液性因子の産生は著明に抑制されていた。本研究により、MPC ポリマーのナノ微小粉はマクロファージによる貪食を受けず、破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子の産生を抑制することが明らかになった。

E. 結論

本研究の成果は、MPC ポリマーが生体内で摩耗粉となっても、人工関節の loosening を誘導しない可能性を強く示唆するものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: