

W00400290 A

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村耕三

平成17(2005)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. 主任・分担研究報告	
1. MPCポリマー摩耗粉が人工関節の弛みに与える影響に関する研究	-----11
中村耕三	
2. MPC ポリマー処理した PE ライナーの耐摩耗特性に関する研究	
—股関節シミュレーターによる評価—	-----21
水野峰男・瀧川順庸・高玉博朗	
3. MPC ポリマー処理した PE ライナーの解析	
—ライナー表面の SEM 観察と三次元形状測定による評価—	-----29
松下富春	
4. MPC ポリマー処理した PE の表面解析に関する研究	
—1000 万サイクル摩耗試験後ライナー表面の XPS—	-----41
石原一彦	
5. MPC ポリマー処理した関節摺動面の摩擦トルクと	
金属骨頭の解析	-----47
埴隆夫・丸山典夫	
6. MPC ポリマーの生物学的安全性に関する検討	-----53
高取吉雄・川口浩・茂呂徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----69
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----72

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、関節摺動面のポリエチレン（PE）ライナー表面を MPC ポリマー処理する手法を創製した。この技術が人工関節の寿命延長に与える効果を、① 摩耗粉産生の抑制に与える影響、② MPC ポリマー摩耗粉が骨吸収に与える影響、③ 生体内の安全性、の点から検討した。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、骨頭径、MPC ポリマー処理のための紫外線照射の影響を受けなかった。さらに、骨頭にセラミックスを使うことで、より強力な摩耗抑制効果がみられた。MPC ポリマーのナノ微粒子を *in vitro* / *vivo* osteolysis model の実験系に用いると、RANKL の発現、破骨細胞の形成・活性化、骨吸収の誘導が抑制された。また、MPC ポリマーの生体内での安全性も確認できた。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 ポリマー摩耗粉が骨吸収を誘導しないことが明らかになった。これらの研究成果により、長寿命型人工関節の開発を達成できるという強い確信を得ることができた。

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 助教授）  
茂呂徹（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター 助手）  
石原一彦（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 教授）  
水野峰男（財団法人ファインセラミックスセンター 室長）  
高玉博朗（財団法人ファインセラミックスセンター 副主任研究員）  
瀧川順庸（大阪府立大学大学院工学系研究科 助教授）  
塙隆夫（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授）  
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（日本メディカルマテリアル株式会社 顧問）

## 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、よりよい ADL (activities of daily living) ・ QOL (quality of life) の獲得に大きな役割を果たしている。また、2003 年度我が国では 7 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、常にその予後を決する最大の合併症である。弛み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。

弛みは、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、弛みの対策手法は従来、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 を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。一方、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弛み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を考えた場合、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弛みを抑制する、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 (CLPE) 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 26 mm のコバルトクロムモリブデン合金製骨頭との間で 1000 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トルクとその経時的変化を調べた (分担研究者 松下富春)。
- 2) PE ライナーの摩耗量を質量変化からで計測した (分担研究者 水野峰男・高玉博朗・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 PE ライナー表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) 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 (XPS) を用い、PE 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) 股関節シミュレーター試験の潤滑液を 50 万サイクル毎に回収して摩耗粉の抽出操作を行い、その形状を検討した（分担研究者 水野峰男・高玉博朗・瀧川順庸）。
- 7) 臨床応用された場合を想定し、MPC ポリマー処理の際の紫外線照射が基材の PE ライナーに与える影響を検討するため、PE ライナー表面に紫外線を照射して、①に示した条件で 1000 万サイクルの股関節シミュレーター試験を行い、PE ライナーの質量変化で摩耗量を計測した。また、骨頭に直径 26 mm のジルコニアセラミックスを用い、MPC ポリマー処理した CLPE ライナーとの間で 1000 万サイクルの股関節シミュレーター試験を行い、PE ライナーの質量変化で摩耗量を計測した（分担研究者 水野峰男・高玉博朗・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 500 nm 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) *In vitro* osteolysis model  
J774.1 細胞（マウス・M $\phi$ 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 を作製した。これらの conditioned medium の存在下でマウス骨芽細胞の培養を行い、RT-PCR、realtime PCR にて、破骨細胞分化因子・receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の mRNA の発現を検討した。（主任研究者 中村耕三）。

## 3) *In vivo* osteolysis model

MPC ポリマー処理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 日後に頭蓋骨を採取し、これを固定、脱灰した後、イメージアナライザーにて破骨細胞数、吸収窩の面積、を計測した。また、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP）染色を行い、骨吸収の有無を観察した（主任研究者 中村耕三）。

## ③ 生体内の安全性の評価

MPC ポリマー処理した PE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、細菌を用いた復帰突然変異試験、培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験、染色体異常試験、感作性試験及びラットにおける骨内埋植試験を行った。これらの試験は、「医療器具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価の

ための試験法について」に基づいて実施した（分担研究者 高取吉雄・川口浩・茂呂徹）。

（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

#### ①MPCポリマー処理がPEライナーの摩耗に与える影響

- 1) MPCポリマー処理したPEライナー表面の摩擦トルクは、未処理PEライナー表面の約1/10と改善していた。
- 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PE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PEライナーは、ほとんど摩耗がみられなかった。
- 3) 1000万サイクル終了後のPEライナー表面を走査型電子顕微鏡にて観察すると、MPCポリマー処理CLPEライナーは、MPCポリマー処理無しCLPEライナーと比較して摺動部／非摺動部の境界が不明瞭であり、摺動による摩耗は低減されていることが示唆された。
- 4) 1000万サイクル終了後のPEライナー表面をX線光電子分光法で解析した。MPCポリマー由来のN元素を有する結合エネルギーが摩耗試験後においても確認され、MPCポリマー処理層が残存していることが確認できた。
- 5) 金属骨頭は、人工股関節シミュレーター試験前後で、その表面粗さに変化は無く、良好な表面性状を示した。また、金属組織観察より、対合するPEライナーのMPCポリマー処理の有無に関わらず、金属骨頭表面は同様の形態であることが確認された。以上から、MPCポリマー処理によってPEライナーは、長期に渡る摩耗試験においても良好な摩擦特性を有し、対合する金属骨頭への攻撃性も認められないことが確認された。
- 6) PEライナーから発生した摩耗粉では、他2種と比べると、顆粒状のものはやや少なく、ねじれた繊維状のものが多く、比較的大きい繊維状の摩耗粉も混在していた。CLPEライナーから発生した摩耗粉では、PEに比べると繊維状のものはやや少なく、顆粒状の集合体が多数を占めていた。MPC-CLPEライナーから発生した摩耗粉でも、顆粒状と繊維状のものが混在しており、CLPEライナーから抽出した摩耗粉と形状の上で有意な差が見られなかった。
- 7) MPCポリマー処理効果は、骨頭径による影響をうけなかった。また、PEライナーは、MPCポリマー処

理過程の紫外線照射の影響を受けなかった。相手材の骨頭としては、ジルコニアの方がコバルトクロム合金に比べて優れた摩耗特性を示した。

## 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/未処理微粒子を暴露した conditioned medium をマウス骨芽細胞培養系に添加し RANKL の mRNA の発現を比較したところ、未処理微粒子暴露群では RANKL の発現を強力に誘導したのに対し、MPC ポリマー処理粒子暴露群では、コントロール群と同様、これらを全く誘導しなかった。
- 3) マウス calvaria 上に微粒子を移植する *in vivo* osteolysis model の実験系の結果、未処理の微粒子を移植した群では強力に骨吸収が誘導されたのに対し、MPC ポリマー処理微粒子ではこれらがみられなかった。また、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群では、破骨細胞形成・吸収窩の形成も抑制されていた。

## ③ 生体内の安全性の評価

細菌を用いた復帰突然変異試験、培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験、染色体異常試験、感作性試験及び

ラットにおける骨内埋植試験の試験結果は全て陰性であり、MPC ポリマーのナノ表面処理による生物学的安全性への影響はないと判断された。

## 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 PE ライナー表面を MPC ポリマー処理し、その処理効果を、① 摩耗粉産生の抑制に与える影響、② MPC ポリマー摩耗粉が骨吸収に与える影響、③ 生体内の安全性、の点から検討した。

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、骨頭径、MPC ポリマー処理のための紫外線照射の影響を受けなかった。さらに、骨頭にジルコニアセラミックスを使うことで、より強力な摩耗抑制効果がみられた。

MPC ポリマーのナノ微粒子 (径 500 nm) を *in vitro* / *vivo* osteolysis model の実験系に用いると、RANKL の発現、破骨細胞の形成・活性化、骨吸収の誘導が抑制された。

また、MPC ポリマーの生体内での安全性も確認できた。

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. Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI,

Nakamura K, Okayama H, and Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* in press.

2. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩、石原一彦：新素材による人工股関節の開発。 *整・災外* 48: 245-250 (2005).
3. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節のナノ表面処理による人工股関節の弛みの阻止。 *整形外科* 56: 170 (2005).
4. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 3: 829-836, 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. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, H Ozawa H, Nakamura K, 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.
7. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H,

- Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *BBRC* 313: 503-508, 2004
8. Goto T, Motoi N, Motoi T, Okuma T, Kawano H, Yamamoto A, Nakamura K: Spindle cell lipoma of the knee: a case report. *J Orthop Sci* 9: 86-89, 2004
  9. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H: PPAR-gamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.
  10. Shoda N, Takeshita K, Seichi A, Akune T, Nakajima S, Anamizu Y, Nakamura K: Measurement of occipitocervical angle. *Spine* 29: 204-208, 2004
  11. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279: 15314-15322, 2004.
  12. Goto T, Kawano H, Yamamoto A, Yokokura S, Iijima T, Motoi T, Nakamura K: Simple curettage without bone grafting for enchondromas of the foot. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 301-305, 2004
  13. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kB-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004
  14. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19: 1452-1461, 2004
  15. 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, Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* 113: 718-726, 2004
  16. Oohori Y, Seichi A, Kawaguchi H, Tajiri Y, Oda H, Nakamura K: Retroodontoid pseudotumor resected by a high cervical lateral approach in a rheumatoid arthritis patient: a case report. *J Orthop Sci* 9: 90-93, 2004
  17. Saito T, Anamizu Y, Nakamura K, Seichi A: Case of idiopathic thoracic spinal cord herniation with a chronic history. *J Orthop Sci* 9: 94-98, 2004
  18. Kawanishi M, Ushida T, Kaneko T, Niwa H, Fukubayashi T, Nakamura K, Oda H, Tanaka S, Tateishi T: New Type of biodegradable porous scaffolds for tissue-engineered

- articular cartilage. *Materials Science and Engineering C* 24: 431-435, 2004
19. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, Okayama H: Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires smad-mediated down-regulation of cdk6. *Mol Cell Biol* 24: 6560-6568, 2004
  20. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Nakajima S, Akune T, Nakamura K: Postoperative expansion of intramedullary high-intensity areas on T2-weighted magnetic resonance imaging after cervical laminoplasty. *Spine* 29: 1478-1482, 2004
  21. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung U, Kawaguchi H: Cyclic GMP-dependent kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18: 2418-2429, 2004
  22. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Jang WD, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, and Kataoka K: Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationic polymer carrying diamine side-chain distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126: 13612-13613, 2004.
  23. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, and Chung UI: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 50: 3561-3573, 2004.
  24. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, and Nakamura K: Distinct osteogenic mechanisms of bone of distinct origins. *J Orthop Sci* 9: 410-414, 2004.
2. 学会発表
1. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner. 7<sup>th</sup> World Biomaterial Congress. 2004.5.17-21 (Sydney, Australia)
  2. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による関節摺動面の人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回PCサーフェステクノロジー研究会. 2004.7.23 (東京ドームホテル、東京)
  3. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、鄭雄一、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回医工連携研究会. 2004.9.3 (東京大学医学部附属病院、東京)
  4. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Hiroaki Takadama, Kozo Nakamura, Hiroshi

- Kawaguchi: Biocompatible phospholipid polymer nano-grafting onto articular surface of the artificial hip joint prevents aseptic loosening. Nano-technology to prolong the longevity of the artificial joint. 17<sup>th</sup> Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA). 2004.9.23-25 (Roma, Italy)
5. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩: ポリエチレンライナーの MPC 処理は 1000 万サイクルまで摩耗を抑制する—ナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発—。第 31 回日本股関節学会学術集会. 2004.10.15-16 (長崎ブリックホール、長崎)
  6. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、中村耕三、川口浩: 整形外科における医工連携の課題 MPC ポリマーを用いたナノテクノロジーによる人工股関節の弛みの抑制 耐摩耗性と生体適合性に優れた長寿命型人工股関節の開発. 日本整形外科学会基礎学術集会. 2004.10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
  7. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Takao Hanawa, Norio Maruyama, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4<sup>th</sup> Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)
  8. Toru Moro, Kazuhiko Ishihara, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Nano-grafting of biocompatible MPC polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial hip joints. Opening Seminar of “The Nano-Bioengineering Education Program, The University of Tokyo”. 2004.11.19 (Faculty of Engineering, The University of Tokyo, Japan)
  9. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing aseptic loosening. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2005.2.20-23 (Washington D.C., USA)
  10. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2005.2.23-27 (Washington D.C., 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ポリマー摩耗粉が人工関節の弛み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：人工股関節摺動面の MPC ポリマー処理による長寿命型人工股関節の開発のため、MPC ポリマー摩耗粉が破骨細胞の形成・活性化および人工股関節周囲の骨吸収に与える影響を検討した。人工股関節の弛み（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（MPC ポリマー処理）し、MPC ポリマーナノ微粒子を作製した。これらのナノ微粒子を、*in vitro*/*in vivo* のマウス骨吸収モデルの実験系に導入して研究を行った。*in vitro* マウス骨吸収モデルを用いた研究では、まず、MPC ポリマー処理/未処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株に暴露し、24 時間後にその培養上清を回収して conditioned medium を作製した。この conditioned medium をマウス骨芽細胞の培養系に用い、破骨細胞分化因子・receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の mRNA の発現を検討すると、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した群では、発現が著しく抑制された。*in vivo* のマウス骨吸収モデルを用いた研究では、MPC ポリマーナノ微粒子をマウス頭蓋骨上に移植し、7 日後に破骨細胞の形成・活性化および骨吸収の有無を判定した。この結果、未処理の微粒子を移植した群では強力に骨吸収が誘導されたのに対し、MPC ポリマーナノ微粒子ではこれらがみられなかった。本研究により、MPC ポリマーのナノ微小粉は破骨細胞の形成・活性化および骨吸収を誘導しない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、人工股関節の弛みを誘導しない可能性を強く示唆しており、長寿命型人工関節の達成の可能性を支持するものである。

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な原因の

ひとつであり、人工関節手術は優れた治療法として確立されている。一方、手術後約 10 年で生じるとされる人工関節の弛み（loosening）は、最大か

つ深刻な合併症であり、その抑制は不可避の課題である。弛みは、人工股関節の関節摺動面から生じるポリエチレンの摩耗粉により惹起される骨吸収が主因とされている。このため、この対策手法は従来、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。このうち摩耗粉を減少させる試みとしては、PEの改質やPEを使わない人工股関節の開発などがなされてきた。この一部は実用化され、良好な長期成績が報告されているものもあるが、それぞれに未解決な問題が残されている。たとえば、γ線照射をすることでPEの非結晶部分の架橋(crosslink)を増加させたクロスリンクポリエチレン(CLPE)は、摩耗の抑制には有効であるものの、摩耗粉が骨吸収を誘導するという問題は解決していない。金属対金属の関節面を持つ人工股関節は金属イオンの毒性の問題が指摘されており、セラミックスの人工股関節は少数ではあるが体内での破損例も報告されている。一方、骨吸収を抑制する試みとしては、抗サイトカイン抗体などを用いた薬物治療や遺伝子治療が研究されているが、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おり、実用化には至っていない。以上のように、摩耗粉の産生と骨吸収のいずれかの抑制を目指した研究では決定的な解決策を得るには至っておらず、その双方の抑制を同時にかなえることができる人工股関節が求められている。

今回我々は、生体適合性に優れたバ

イオマテリアル、MPCポリマーを人工股関節の関節摺動面に導入する方法を考案し(MPCポリマー処理)、本研究において、摩耗粉の産生抑制効果、骨吸収の抑制効果、生体内での安全性について検討してきた。このうち、摩耗粉抑制効果、生体内安全性については主任・分担研究者の研究により優れた結果を獲得している。また、骨吸収の抑制効果については、昨年の本研究開発で*in vitro*のマウス骨吸収のモデルを用い、MPCポリマーの摩耗粉が生体内で異物として認識されずマクロファージによる貪食を受けないこと、MPCポリマーの摩耗粉が、破骨細胞の形成・活性化および破骨細胞形成を活性化しないことを明らかにし、かりにMPCポリマーが生体内で摩耗粉になっても骨吸収が惹起されないことが示唆された。そこで今年度の本研究では、MPCポリマーの摩耗粉が人工股関節周囲の骨吸収

(osteolysis)、弛み(loosening)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、*in vitro*/*in vivo*マウス骨吸収モデルの実験系に導入して、研究を行った。

## 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、骨吸収および人工関節の弛み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 in vitro マウス骨吸収モデルにおける検討

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)。上記①で作製した MPC ポリマー処理ナノ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  $\mu\text{m}$  のフィルターを通し (Corning Corster Japan, 東京)、培養上清を回収し、これらを conditioned medium として、以下の研究に使用した。

マウス骨芽細胞は、1~4 日齢のマウス calvaria より、コラゲナーゼ処理 (Sigma, type 7) にて採取した。

骨髄細胞を conditioned medium

の存在下に 24 時間培養した後、培養細胞から RNA を抽出し、Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)、real-time PCR にて RANKL の発現を検討した。

### ③ in vivo マウス骨吸収モデルにおける検討

*in vivo* マウス骨吸収モデルの実験系は、各群 10 匹ずつの 6 週齢の ddy マウスを用いて行った。70-80 mg/kg の Ketamine と 5-7 mg/kg の xylazine で麻酔後、マウスの calvaria 上に、①で作製した MPC ポリマー処理/未処理のナノ微粒子を移植した。7 日後に calvaria を採取し、固定、脱灰 (EDTA) 処理後、冠状断の標本を作製した。この標本を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) で染色し破骨細胞の形成と骨吸収の有無を、さらにトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡下に、イメージアナライザー (System Supply Co., 長野) を用いて骨形態計測を行った。形態計測は midsagittal suture から 2.4 mm 外側の部位で行い、破骨細胞数 (Oc.N/B.Pm) および吸収窩の面積 (OS/BS) を測定した。

#### (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」に従い、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 ポリマー微粒子の作製

未処理ナノ微粒子の表面電位を測定すると、 $-50.0 \pm 10.5$  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 $-2.5 \pm 0.8$  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。

#### ② *in vitro* マウス骨吸収モデルにおける検討

MPC ポリマー処理/未処理微粒子を暴露した conditioned medium をマウス骨芽細胞培養系に添加し RANKL の mRNA の発現を比較したところ、未処理微粒子暴露群では RANKL の発現を強力に誘導したのに対し、MPC ポリマー処理粒子暴露群では、コントロール群と同様、これらを全く誘導しなかった (図 1)。

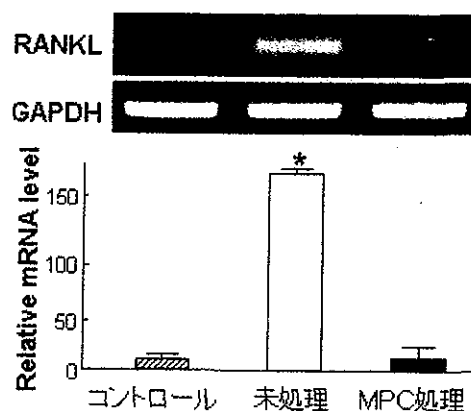


図 1 骨芽細胞における RANKL の発現

(上段: RT-PCR、

下段: real-time PCR)

#### ② *in vivo* マウス骨吸収モデルにおける検討

未処理の微粒子を移植したマウス calvaria では TRAP 染色陽性の破骨細胞が多数形成され、強力に骨吸収が誘導された (図 2)。



図 2 未処理微粒子を移植した calvaria の TRAP 染色像

一方 MPC ポリマー処理微粒子を移植したマウス calvaria では破骨細胞の形成が殆ど観察できず、溶液のみを移植したコントロール群 (図 3) と同



様骨吸収が誘導されなかった(図4)。



図3 コントロール群の calvaria の TRAP 染色像



図4 MPC ポリマー処理微粒子を移植した calvaria の TRAP 染色像

さらに、イメージアナライザーを用いて破骨細胞数を観察すると、未処理微粒子を移植した群では、コントロール群の4倍の破骨細胞を形成したが、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群ではコントロール群と有意な差がみられなかった(図5)。また、破骨細胞による吸収窩の面積を測定する

と、未処理微粒子を移植した群では、コントロール群の8倍の吸収窩を形成したが、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群ではコントロール群と有意な差がみられなかった(図5)。

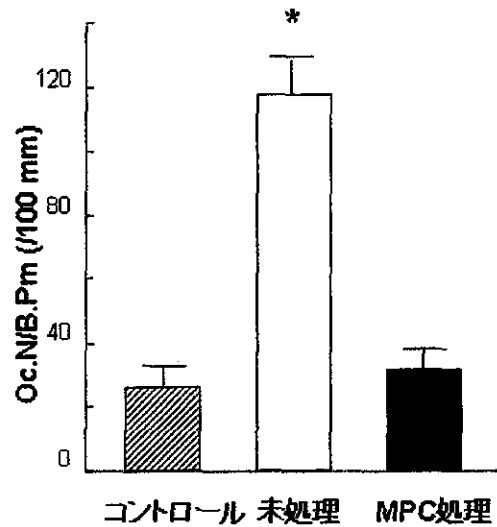


図5 *in vivo* マウス骨吸収モデルにおける破骨細胞数

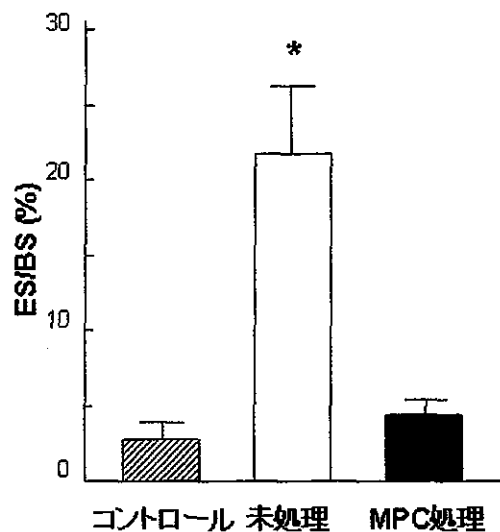


図6 *in vivo* マウス骨吸収モデルにおける吸収窩の面積

#### D. 考察

MPC ポリマー摩耗粉が人工股関節の弛みに与える影響を検討するため、弛みの主因となる、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 ポリマー処理微粒子を作製した。この MPC ポリマー処理微粒子を *in vivo* のマウス骨吸収モデルに用いて検討すると、MPC ポリマー処理微粒子は、破骨細胞の形成・活性化および骨吸収を誘導しないことが明らかとなった。昨年度の *in vitro* のマウス骨吸収モデルを用いた実験結果とあわせると、MPC ポリマーの微小摩耗粉は、生体内で異物として認識されないためマクロファージの貪食を受けず、これに続発する液性因子の産生、RANKL の発現、破骨細胞の形成・活性化、骨吸収を誘導しないことが明らかとなった。以上の結果は、MPC ポリマーが生体内で摩耗粉となっても、人工関節の弛みを惹起しないことを意味しており、人工関節の長寿命化の可能性を強く示唆するものである。

#### 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、人工関節の弛み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. Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, and Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* in press.
2. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩、石原一彦：新素材による人工股関節の開発. *整・災外* 48: 245-250 (2005).
3. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節のナノ表面処理による人工股関節の弛みの阻止. *整形外科* 56: 170 (2005).
4. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 3: 829-836, 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. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu

- S, Chung U, H Ozawa H, Nakamura K, 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.
7. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *BBRC* 313: 503-508, 2004
  8. Goto T, Motoi N, Motoi T, Okuma T, Kawano H, Yamamoto A, Nakamura K: Spindle cell lipoma of the knee: a case report. *J Orthop Sci* 9: 86-89, 2004
  9. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H: PPAR-gamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.
  10. Shoda N, Takeshita K, Seichi A, Akune T, Nakajima S, Anamizu Y, Nakamura K: Measurement of occipitocervical angle. *Spine* 29: 204-208, 2004
  11. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279: 15314-15322, 2004.
  12. Goto T, Kawano H, Yamamoto A, Yokokura S, Iijima T, Motoi T, Nakamura K: Simple curettage without bone grafting for enchondromas of the foot. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 301-305, 2004
  13. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kB-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004
  14. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19: 1452-1461, 2004
  15. 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, Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* 113: 718-726, 2004
  16. Oohori Y, Seichi A, Kawaguchi H, Tajiri Y, Oda H, Nakamura K: Retroodontoid pseudotumor resected by a high cervical lateral approach in a rheumatoid arthritis patient: a case report. *J Orthop Sci* 9: 90-93, 2004
  17. Saito T, Anamizu Y, Nakamura K,

- Seichi A: Case of idiopathic thoracic spinal cord herniation with a chronic history. *J Orthop Sci* 9: 94-98, 2004
18. Kawanishi M, Ushida T, Kaneko T, Niwa H, Fukubayashi T, Nakamura K, Oda H, Tanaka S, Tateishi T: New Type of biodegradable porous scaffolds for tissue-engineered articular cartilage. *Materials Science and Engineering C* 24: 431-435, 2004
  19. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, Okayama H: Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires smad-mediated down-regulation of cdk6. *Mol Cell Biol* 24: 6560-6568, 2004
  20. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Nakajima S, Akune T, Nakamura K: Postoperative expansion of intramedullary high-intensity areas on T2-weighted magnetic resonance imaging after cervical laminoplasty. *Spine* 29: 1478-1482, 2004
  21. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung U, Kawaguchi H: Cyclic GMP-dependent kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18: 2418-2429, 2004
  22. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Jang WD, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, and Kataoka K: Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationer carrying diamine side-chain distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126: 13612-13613, 2004.
  23. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, and Chung UI: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 50: 3561-3573, 2004.
  24. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, and Nakamura K: Distinct osteogenic mechanisms of bone of distinct origins. *J Orthop Sci* 9: 410-414, 2004.
2. 学会発表
    1. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner. 7<sup>th</sup> World Biomaterial Congress. 2004.5.17-21 (Sydney, Australia)
    2. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による関節摺動面の人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回PCサーフェイステクノロジー研究会. 2004.7.23 (東京ドームホテル、東京)
    3. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、鄭雄一、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による人工