

図 6 試験前のコバルトクロム合金骨頭表面 SEM 写真 (対合ライナー: MPC 処理 CL_PE)

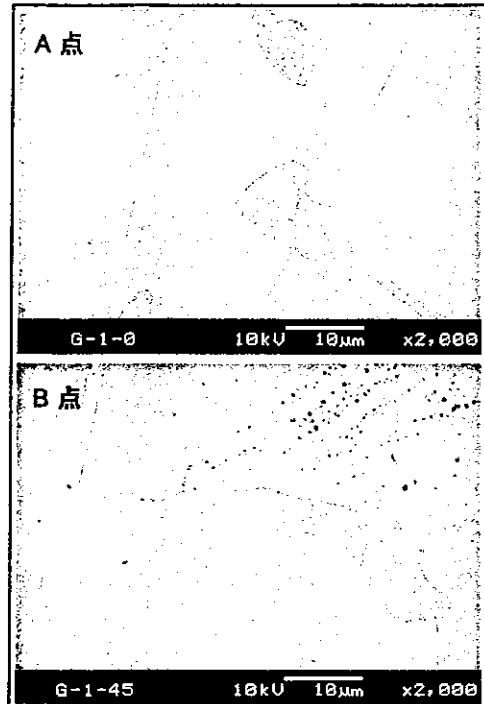


図 8 1000 万回試験後のコバルトクロム合金表面 SEM 写真 (対合ライナー: CL_PE)

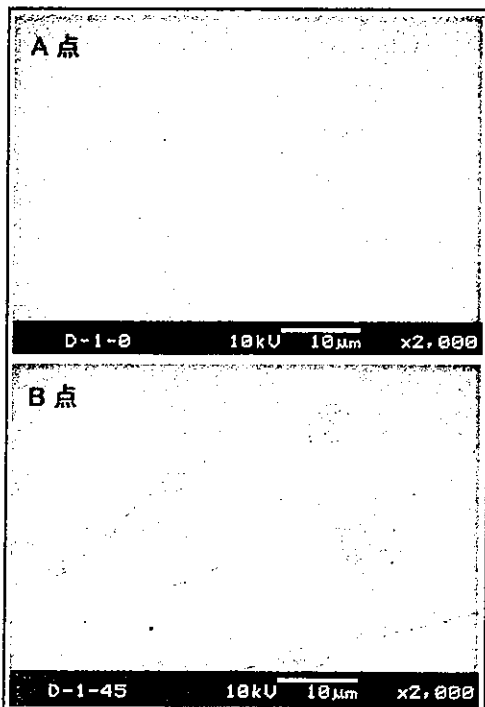


図 7 1000 万回試験後のコバルトクロム合金表面 SEM 写真 (対合ライナー: MPC 処理 CL_PE)

3. 潤滑液の性状の検討

分析の結果、MPC に由来する P 成分の検出は無く、溶出が無いことを確認した。この解析結果からも、MPC ポリマー処理ライナーの摩耗がほとんどみられなかったことが確認できた。

D. 考察

MPC ポリマー処理により、コバルトクロム合金骨頭-CL_PE ライナー間の摩擦トルクは顕著に改善し、その効果を発揮した。われわれは分担研究者の研究により、疎水性の PE ライナー表面に親水性の MPC ポリマーをグラフトさせることで、表層に自由水の層が形成されることを明らかにしたが、この結果、ライナー表面の潤滑機構が改善し、摩擦トルクが改善されている可能性があり、今後検討を続けていく必要がある。

人工股関節シミュレーター試験 1000 万サイクル後のコバルトクロム合金骨頭は、対合する CL_PE ライナーの MPC ポリマー処理の有無に関わらず、良好な表面性状を示した。また、1000 万回におよぶ試験中においても異物混入による異常摩耗 (Third Body Wear) も認められなかった。

シミュレーター試験の潤滑液の解析では、液中への MPC ポリマー成分の溶出は見られなかった。この結果は、1000 万サイクルという長期の歩行負荷をかけても、摩耗がほとんど生じず、かつ MPC ポリマー処理が PE ライナー表面に残存することを示唆している。分担研究者らの、質量変化、三次元解析、SEM、XPS の解析結果と考え合わせると、人工関節摺動面の MPC ポリマー処理は、人工関節の弛みを長期にわたり阻止する画期的な新技術として期待することができる。

E. 結論

MPC ポリマー処理はポリエチレンライナーの摩耗の要因となる摩擦トルクを低減させる技術であり、長期摩耗試験においても対合する骨頭に対しても攻撃性を認めないことから、長寿命型人工股関節の実現を期待できる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. D. Kuroda, S. Takemoto, T. Hanawa, and K. Asami: Characterization of the surface oxide film on an Fe-Cr-Mo-N system alloy in environments simulating the human

body. *Materials Transaction*, 44, 2671-2677 (2003).

2. D. Kuroda, S. Takemoto, T. Hanawa, and K. Asami: Characterization of the surface oxide film on an Fe-Cr-N system alloy in environments simulating the human body. *Materials Transaction*, 44, 2664-2670 (2003).
3. S. Hiromoto, T. Hanawa, and K. Ogawa: Thermodynamic structural stability and polarization behavior of cast amorphous alloy. *Materials Transaction*, 44, 1824-1829 (2003).
4. S. Nakajima, T. Tsukamoto, S. Suzuki, M. Iwaki, T. Hanawa, and A. Yamamoto: Improvement of blood compatibility of titanium with helium ion-beam irradiation. *Transactions of Materials Research Society of Japan*, 28, 499-502 (2003).
5. S. Suzuki, K. Kurotobi, M. Iwaki, A. Yamamoto, and T. Hanawa: Mechanical adhesive strength, XPS and AES studies of ion beam immobilized collagen. *Materials Research Society of Japan*, 28, 495-498 (2003).
6. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, and M. Kobayashi: Mechanical properties of thin wires

- of nickel-free austenitic stainless steel with nitrogen absorption treatment. *Materials Transaction*, 44, 1577-1582 (2003).
7. K. Asami, K. Saito, N. Ohtsu, S. Nagata, and T. Hanawa: Titanium-implanted CaTiO₃ films and their changes in Hanks' solution. *Surface and Interface Analysis*, 35, 483-488 (2003).
 8. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi, and T. Kobayashi: Mechanical properties and microstructures of a thin plate of nickel-free stainless steel with nitrogen absorption treatment. *Materials Transaction*, 44, 1363-1369 (2003).
 9. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi, and T. Kobayashi: New manufacturing process of nickel-free stainless steel with nitrogen absorption treatment. *Materials Transaction*, 44, 414-420 (2003).
 10. K. Nakazawa, N. Maruyama, and T. Hanawa: Effect of contact pressure on fretting fatigue of austenitic stainless steel. *Tribology International*, 36, 79-85 (2003).
 11. T. Hanawa: Reconstruction and regeneration of surface oxide film on metallic materials in biological environments. *Corrosion Review*, 21 (2-3), 161-181 (2003).
 12. A. Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda and T. Hanawa: Cytotoxicity evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment. *Mater. Sci. Eng.*, C24, 737-743 (2004).
 13. A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, and T. Hanawa: Cytotoxicity evaluation of ceramic particles with different sizes and shapes, *J. Biomed. Mater. Res.*, 68A, 244-256 (2004).
 14. S. Hiromoto, and T. Hanawa: pH near Cells on Stainless Steel and Titanium, *Electrochemical and Solid State Letters*, 7, B9-B11 (2004).
 15. S. Hiromoto, T. Hanawa, and K. Asami: Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929, *Biomaterials*, 25, 979-986 (2004).
 16. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, and M. Kobayashi: Torsion and Tensile Properties of Thin Wires of Nickel-Free Stainless Steel with Nitrogen Absorption Treatment,

- Mater. Trans.*, 45, 112-118, (2004).
17. S. Aoyagi, S. Hiromoto, T. Hanawa, and M. Kudo: TOF-SIMS Investigation of Metallic Material Surface After Culturing Cells, *Appl. Surf. Sci.*, 231/232, 470-474 (2004).
 18. T. Hanawa, Y. Kohyama, S. Hiromoto, and A. Yamamoto: Effects of biological factors on the repassivation current of titanium, *Mater. Trans.*, 45, 1635-1639 (2004).
 19. N. Ohtsu, K. Sato, K. Saito, T. Hanawa, and K. Asami: Evaluation of degradability of CaTiO₃ thin films in simulated body fluids, *Mater. Trans.*, 45, 1778-1781 (2004).
 20. N. Maruyama, S. hiromoto, M. Ohnuma, and T. Hanawa: Fretting properties of Zr-Base bulk amorphous alloys in phosphate-buffered saline solution, *Mater. Trans.*, 45, 12333-1238 (2004).
 21. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hirabu, S. Kuroda, M. Kobayashi, and T. Kobayashi: Designing , processing and properties of advanced engineering materials, *Materials Science Forum*, 449, 1085-1088 (2004).
 22. T. Hanawa: Metal ion release from metallic implants, *Mater. Sci. Eng.*, C24, 745-752 (2004).
 23. M. Sumita, T. Hanawa and D. H. Teoh: Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials -review, *Mater. Sci. Eng.*, C24, 753-760 (2004).
 24. 塙隆夫: 生体用金属材料の開発・評価の現状と将来戦略, *日本金属学会会報* 43 (3), 176-181 (2004).
2. 学会発表
 1. T. Moro, Y. Takatori, K. Ishihara, H. Takadama, T. Hanawa, N. Maruyama, K. Nakamura and H. Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総合）研究報告書

MPCポリマー摩耗粉が骨吸収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）
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）
分担研究者 川口浩（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 助教授）

研究要旨：人工関節の最大の合併症である弛み (loosening) の阻止のため、MPCポリマーを関節摺動面の PE ライナー表面に光学的にグラフトとする手法を創案した (MPC ポリマー処理)。本研究では、この技術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・活性化および骨吸収に与える影響を検討した。弛みの主因となる、直径約 500 nm のナノ微粒子表面を MPC ポリマーを光学的にグラフト (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なかった。また、これらの培養上清中の TNF- α 、IL-1、IL-6、PGE₂ 濃度は、MPC ポリマー処理微粒子暴露群では未処理微粒子暴露群の 1/4～1/20 に抑制されていた。次にこれらの培養上清をマウス骨芽細胞培養系に添加して破骨細胞分化因子・receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の mRNA の発現を、マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系に添加して破骨細胞形成能を観察したところ、未処理微粒子暴露群では RANKL の発現、破骨細胞の形成・活性化とも強力に誘導したが、MPC ポリマー処理微粒子暴露群ではこれらの誘導がみられなかった。さらにこれらの微粒子を、マウスの calvaria 上に移植し、骨吸収の有無を観察したところ、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が、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群では、骨吸収の誘導が見られなかった。以上の結果は、MPC ポリマーが生体内で摩耗粉となっても、摩耗粉はマクロファージの貪食を受けず、破骨細胞の形成・活性化および骨吸収を誘導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。

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 (PE)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。そこで本研究ではMPCポリマーの摩耗粉が人工股関節周囲の骨吸収、弛み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 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

摩耗粉による骨吸収から弛みに至る一連の過程は、人工関節摺動面から生じた PE 摩耗粉を生体内のマクロファージが異物として認識し、食食することにより始まる。そこで、MPC ポリマー摩耗粉が骨吸収・弛みに与える影響を検討するため、食食試験を行った。

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食食の有無を観察した。

③ in vitro osteolysis model における検討

・conditioned medium の作製

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 の微粒子溶液を暴露、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。これらを conditioned medium として、以下の研究に使用した。

・骨吸収を誘導する液性因子の濃度
マクロファージは人工関節摺動面からの摩耗粉を食食した後、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。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- α , IL-1, IL-6) とプロスタグランジン (PGE₂) を測定した。TNF- α , IL-1, IL-6 濃度の測定には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Endogen, Wobrun, MA) を、PGE₂ 濃度の測定には enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) を用いた。

・RANKL の発現の検討

骨髓細胞を 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 にて破骨細胞分化因子・receptor activator of NF- κB ligand

(RANKL)の発現を検討した。

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。

・破骨細胞形成能の検討

マウス骨芽細胞 (2×10^4 cells/well)、マウス骨髄細胞 (1×10^6 cells/well) を①で作製した conditioned medium 中で共存培養し、破骨細胞の形成能を検討した。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。マウス骨髄細胞は、8週齢の ddy マウスの脛骨髄腔を flush out して回収したものを使用した。培養後6日目で tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、3核以上が TRAP 染色陽性を示す細胞を破骨細胞と判定し、その数を計測した。

さらに、上記の共存培養を、抗 TNF- α 抗体 (5 μ g/ml)、抗 IL-1抗体 (5 μ g/ml)、抗 IL-6抗体 (5 μ g/ml)、celecoxib (1 μ M)、osteoprotegerin (10 ng/ml) の存在下で行い、同様に6日後に破骨細胞数を計測した。

④ in vitro osteolysis model 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 ± 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 ± 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 (図 1)。

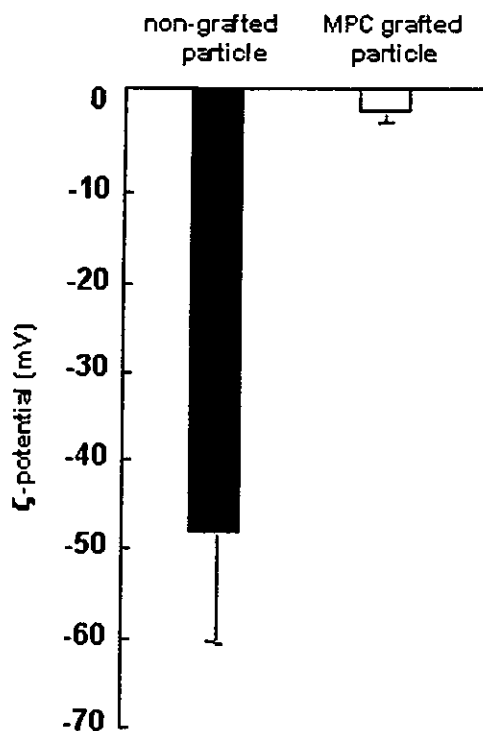


図1 微粒子表面のゼータ電位

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食食を受けなかった(図2-c,d)。

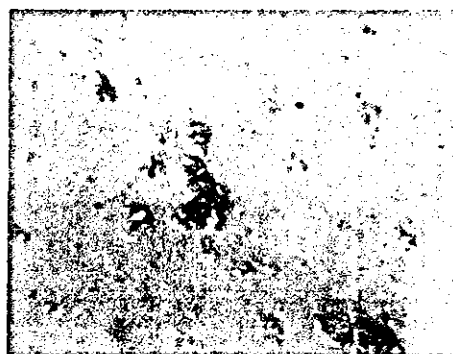


図2-a 未処理群の位相差像

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食食されていた(図2-a,b)。

一方、MPC ポリマー処理したナノ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

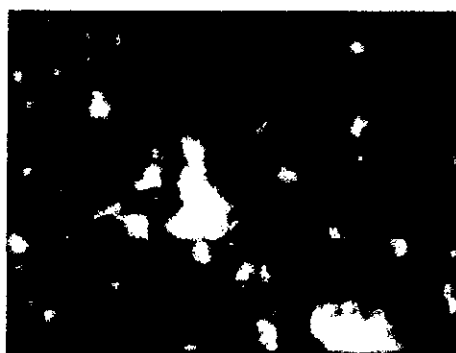


図2-b 未処理群の蛍光像

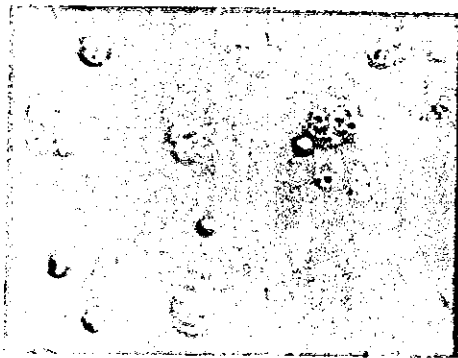


図 2-c MPC 群の位相差像



図 2-d MPC 群の蛍光像

③ in vitro osteolysis model における検討

・骨吸収を誘導する液性因子の濃度

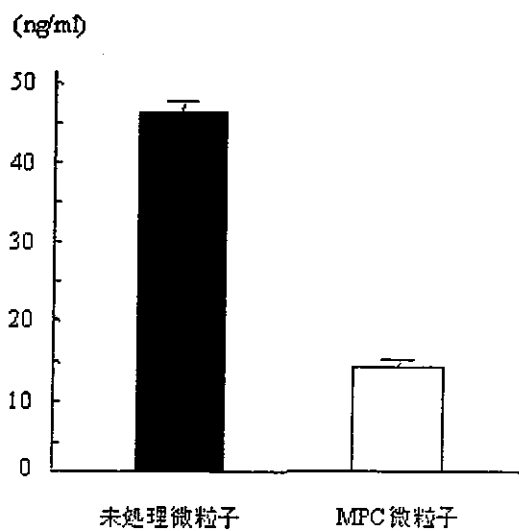


図 3-a TNF-α 濃度

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)。

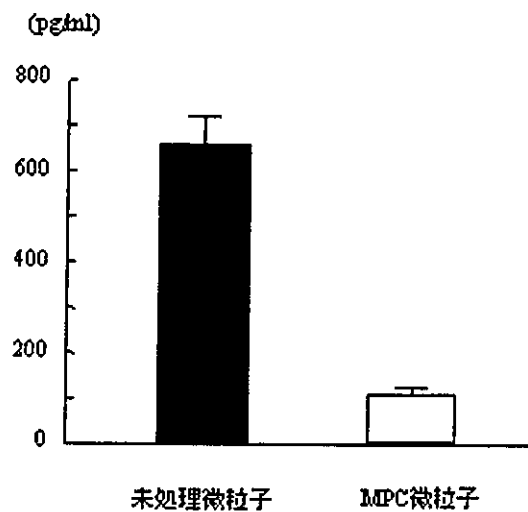


図 3-b IL-1 濃度

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-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)。

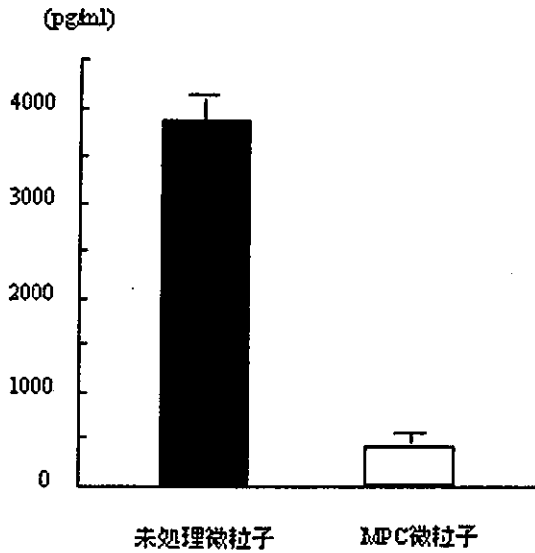


図 3-c IL-6 濃度

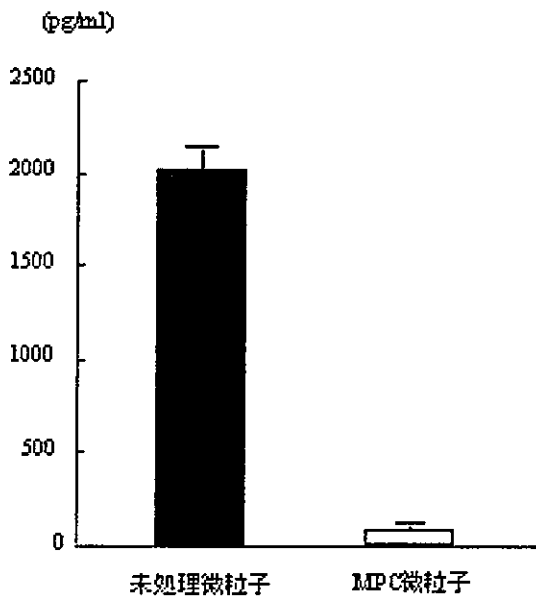


図 3-d PGE₂ 濃度

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

った (図 3-c)。

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)。

・RANKL の発現の検討

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 4)。

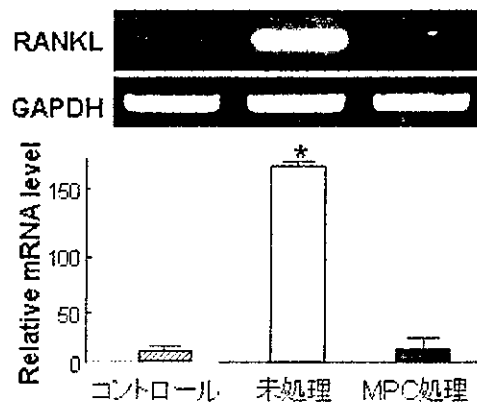


図 4 骨芽細胞における RANKL の発現 (上段: RT-PCR、下段: real-time PCR)

・破骨細胞形成能の検討

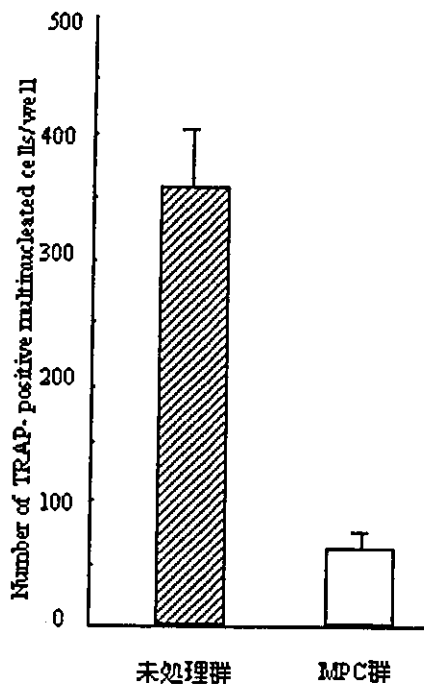


図5 破骨細胞形成能-1

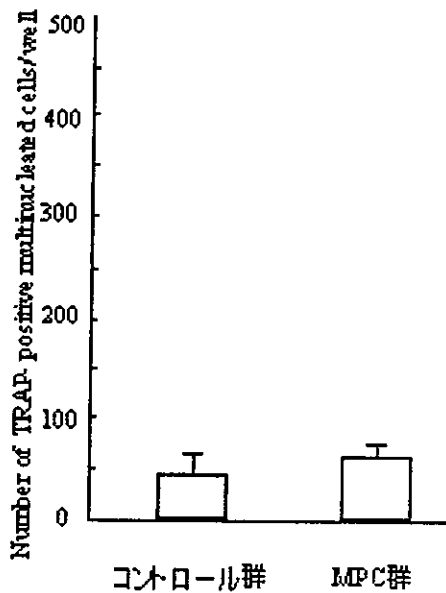


図6 破骨細胞形成能-2

MPC ポリマー処理ナノ微粒子を暴露した conditioned medium を用いた共存培養では、未処理のナノ微粒子を

暴露した群と比して破骨細胞の形成を約 1/7 に抑制した (図 5)。また、MPC ポリマー処理微粒子暴露群の破骨細胞形成能を、溶液のみを暴露した conditioned medium を用いた共存培養と比較して有意な差が見られなかった (図 6)

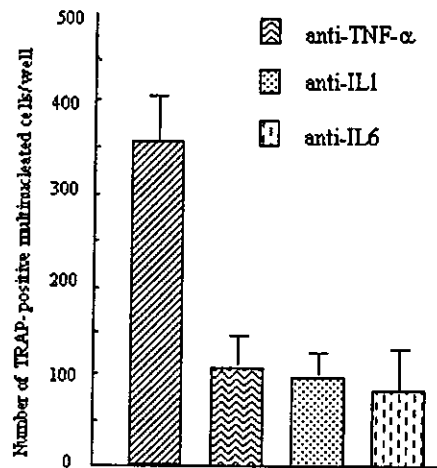


図7 抗サイトカイン抗体の効果

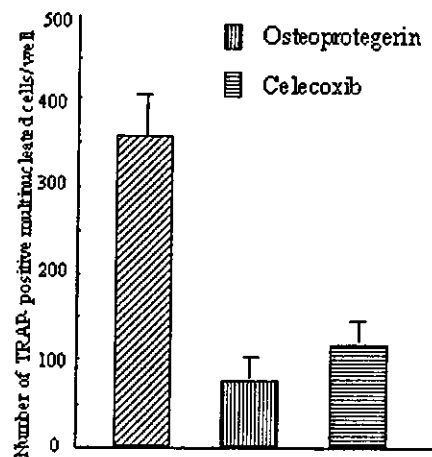


図8 阻害剤の効果

Conditioned medium に抗 TNF-α 抗体、抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、celecoxib、osteoprotegerin をそれぞれ

れ添加して行った共存培養においては、全ての抗体・抑制剤で破骨細胞の形成が抑制されたが、この抑制効果は、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した conditioned medium を加えた場合と有意な差が見られなかった(図7,8)。

④ in vitro osteolysis model 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9)。



図9 未処理微粒子を移植した calvaria の TRAP 染色像

一方 MPC ポリマー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10)と同様、骨吸収が誘導されなかった(図11)。

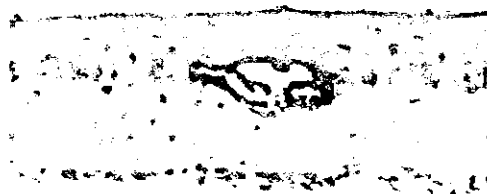


図10 コントロール群の calvaria の TRAP 染色像

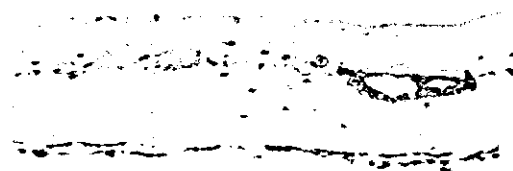


図11 MPC ポリマー処理微粒子を移植した calvaria の TRAP 染色像

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12)。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13)。

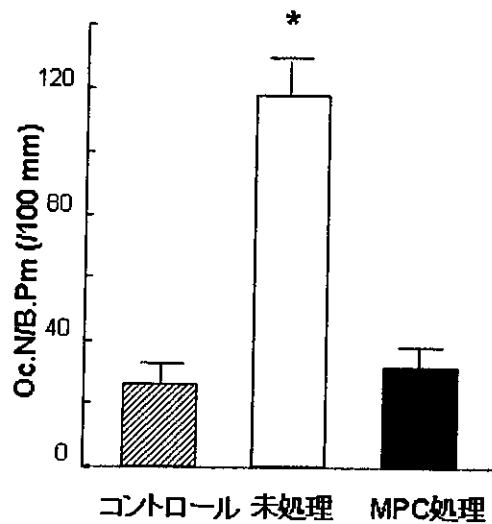


図12 *in vivo* マウス骨吸収モデルにおける破骨細胞数

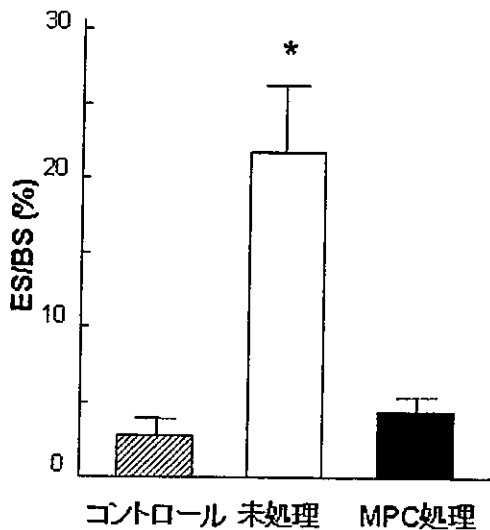


図13 *in vivo* マウス骨吸収モデルにおける吸収窩の面積

D. 考察

MPCポリマー摩耗粉が人工関節の弛み (loosening) 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食食を受けず、MPCポリマーの生体適合性という特質により、MPCポリマー微処理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、骨吸収を誘導する液性因子の産生は著明に抑制されていた。さらに、培養上清中でマウス骨芽細胞の培養を行い、RANKLのmRNAの発現を、マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養を行い破骨細胞の形成能を観察すると、未処理の微粒子を暴露した群ではRANKLの発現、破骨細胞形成とも強力に誘導されたのに対し、MPCポリマー微処理粒子を暴露した群では、これらの誘導が全く見られなかった。また、マウスのcalvaria上に

MPC ポリマー微処理粒子を移植しても、骨吸収は惹起されなかった。以上の研究成果により、MPC ポリマーは、生体内でかりに摩耗粉になっても、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。

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、人工関節の弛みを惹起しない可能性を強く示唆するものである。関節摺動面のMPC ポリマー処理が摩耗粉の産生を抑制する結果と考え合わせると、長寿命型人工関節の実用化が強く期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
 7. 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.
 8. 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
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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
 12. 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
 13. 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.
14. Shoda N, Takeshita K, Seichi A, Akune T, Nakajima S, Anamizu Y, Nakamura K: Measurement of occipitocervical angle. *Spine* 29: 204-208, 2004
 15. 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.
 16. 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
 17. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF- κ B-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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.
27. 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.
28. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, and Nakamura K: Distinct osteogenic mechanisms of bone of distinct origins. *J Orthop Sci* 9: 410-414, 2004.
29. 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.
30. 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)。
31. 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).

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 髄内変化の拡大 - 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 4 7 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