

処理が弛みの阻止に与える影響を検討した。

方 法

1. 耐摩耗特性の評価

耐摩耗特性の評価は股関節シミュレーター試験で行った(表1)。ライナーには架橋PE (cross-linked polyethylene: CLPE) を用い、紫外線を用いてライナー表面に MPC ポリマーをグラフト重合した。この後、市販品と同様に2.5Mradの γ 線照射滅菌を行い、その表面性状をX線光電子分光分析装置(X-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS)、電界放射型透過電子顕微鏡(Field Emission Transmission Electron Microscope: FE-TEM)で観察した。骨頭には径26mmのコバルトクロムモリブデン合金を用いた。50万サイクルごとにライナーの重量を測定し、摩耗量を定量した。また、試験終了後にライナーを回収し、ライナーの形状の三次元解析と、ライナー表面のXPS、FE-TEMによる解析を行った。さらにシミュレーターの潤滑液から摩耗粉を回収し、走査電子顕微鏡(Scanning Electron Microscopy: SEM)にて解析した。

2. MPC 微小粉が骨吸収に与える影響の評価

弛みの主因となるのは粒径がサブミクロンサイズ

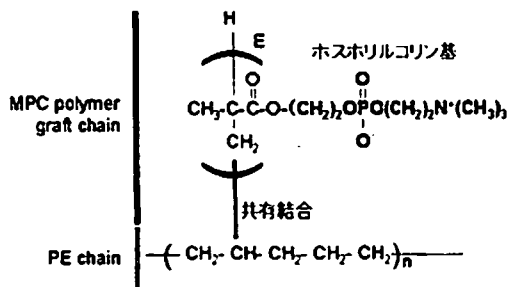


図1 MPCの構造およびMPCポリマー処理

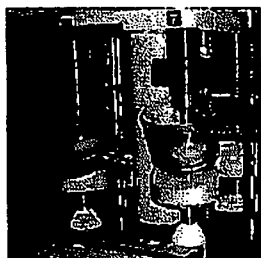
の摩耗粉である。そこで平均粒径約500nmのMPCナノ微粒子を作製し⁷⁾、*in vitro/vivo*のマウス骨吸収モデルに用いてMPC微小摩耗粉が骨吸収に与える影響を検討した。まず、MPC微粒子あるいは未処理微粒子をマウスM Φ 様細胞株・J774.1細胞に暴露して24時間後に培養上清を回収し、上清中の骨吸収を誘導する液性因子濃度(TNF- α , IL-1, IL-6, PGE₂)を測定した。つぎに、これらの培養上清をマウス骨髓細胞と骨芽細胞の共存培養系に添加し、破骨細胞形成を調べた。さらに、マウス頭蓋骨上にMPC微粒子あるいは未処理微粒子を移植し、7日後に標本を作製した後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)で染色を行い、単位面積あたりの破骨細胞数(Oc. N/B. Pm)および骨吸収面(ES/BS)を計測した。

結 果

1. 耐摩耗特性の評価

まず、試験開始前のMPC-CLPE表面をXPSで解析するとMPCユニット特有のリン(P)・窒素(N)のスペクトルが観察できた(図2a)。また、FE-TEMでもライナーの表層に厚さ約100~150nmのMPCポリマーの層が観察でき(図2b)、MPCポリマー処理は γ 線滅菌の影響を受けないことが明らかになった。次に、人工股関節摺動面の摩擦トルクを計測すると、MPC-CLPEのトルクはCLPEの約1/10に改善されていた(図3a)。ライナーの摩耗量を重量変化で計測すると、CLPEでは開始直後こそ含水による重量増加を示したが、100万サイクル以降は摩耗量が含水量を上回り、総計8.5 \pm 1.3mgの重量減少を示した。一方、MPC-CLPEでは開始直後から終了時まで含水による重量増加を続け、総計5.8 \pm 0.6mgの重量増加を示し、摩耗は著

表1 股関節シミュレーターの試験条件



Liner : Cross-linked Polyethylene (ϕ 26mm)
Head : CoCrMo alloy (ϕ 26mm)
Force curve : Double-peak Paul
Maximum load : 280kgf
Test frequency : 1.0Hz
Cup inclination : 23°
Lubricant : 25% bovine serum
Cycles : up to 3 million

(ISO 14142-1)

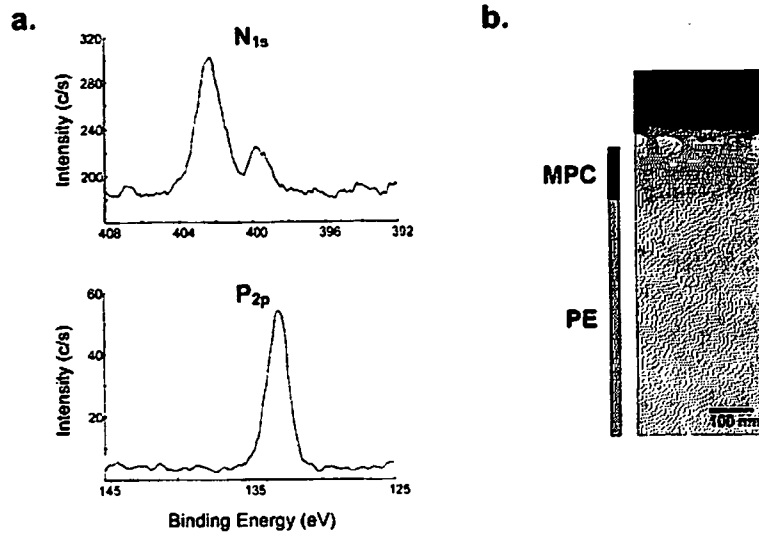


図 2

a. XPSの結果：MPCユニットのスペクトルが観察できた
 b. FE-TEM像：PE表面に約100～150nmのMPCポリマーの層が観察できた
 (表層の空胞は、標本作製時のものである)

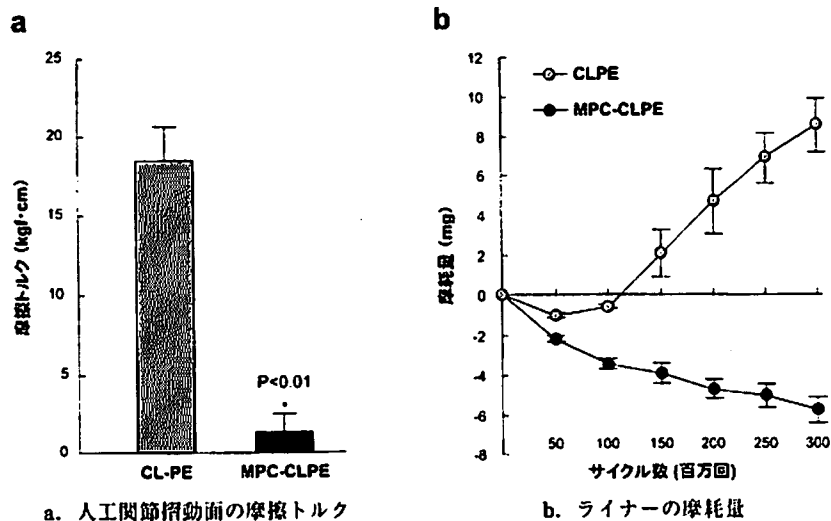


図 3

明に抑制された (図 3b)。また、試験終了後のライナーの三次元解析でも未処理 CLPE では顕著な摩耗が観察できたのに対し、MPC-CLPE はほとんど摩耗していなかった (図 4)。さらに、試験終了後の MPC-CLPE ライナー表面を XPS、FE-TEM で解析すると、前者では試験開始前の解析結果と同様、表面に MPC ユニット特有のリン (P)・窒素 (N) のスペクトルが観察でき、後者でも MPC ポ

リマー処理層が残存していることが確認できた。また、股関節シミュレーター試験の潤滑液から抽出した摩耗粉を SEM で観察すると、MPC-CLPE、未処理 CLPE とも、摩耗粉の 95% 以上はサブミクロンのサイズであり、摩耗粉の粒径分布・形状に明らかな差は見られなかった (図 5)。

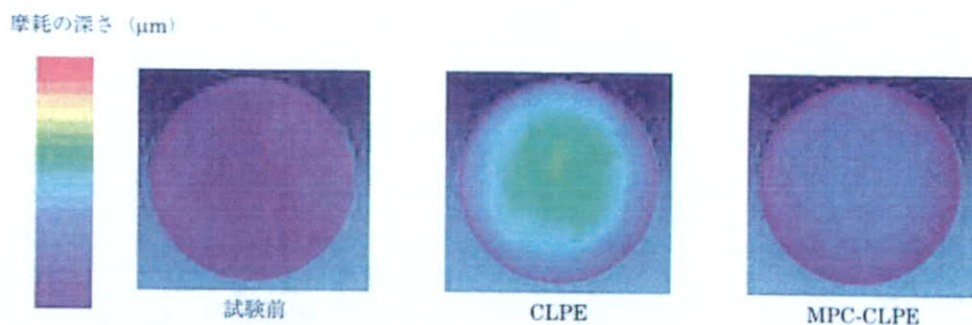


図4 ライナーの三次元解析

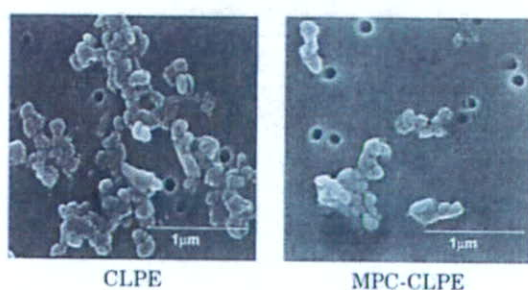


図5 摩耗粉のSEM像

2. MPC微小粉が骨吸収に与える影響の評価

未処理微粒子をJ774.1細胞に暴露した培養上清中の骨吸収を誘導する液性因子濃度 (TNF- α , IL-1, IL-6, PGE₂) を測定すると、溶液のみを暴露したコントロール群と比べ、すべての因子において4~46倍高値を示したが、MPC微粒子暴露群ではこれらの濃度上昇が見られず、コントロール群と有意な差が見られなかった (表2)。さらに、これらの培養上清中でのマウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系における破骨細胞形成能を計測すると、未処理微粒子暴露群ではコントロール群に比し7倍の破骨細胞が形成されたが、MPC微粒子暴露群ではコントロール群と有意な差がみられなかった (図6)。また、*in vivo* マウス骨吸収モデルにおいて、未処理微粒子を頭蓋骨上に移植した群ではTRAP染色陽性の破骨細胞が形成され、骨吸収が強力に誘

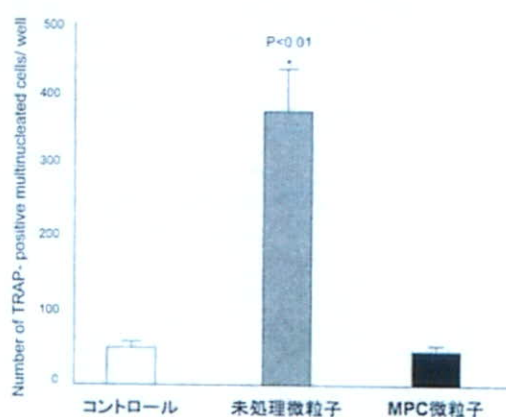


図6 微粒子をJ774.1細胞に暴露した培養上清中の破骨細胞形成能

導されたが、MPC微粒子を移植した群ではこれらが誘導されなかった (表3)。

考 察

MPCポリマーは、石原らが合成・開発した高分子材料である¹⁾。MPCポリマーは生体細胞膜と同様ホスホリルコリン基を有するため、生体内で異物として認識をうけず、優れた生体適合性を発揮する (図1)。また、MPCポリマー上では生体との相互作用も抑制されるため、ポリマー表面ではタンパ

表2 微粒子をJ774.1細胞に暴露した培養上清中の液性因子濃度

	コントロール	未処理微粒子暴露群	MPC微粒子暴露群
TNF- α (ng/ml)	12.1 \pm 1.2	45.3 \pm 6.7*	13.1 \pm 1.2
IL-1 (pg/ml)	88.9 \pm 16.8	661.8 \pm 65.8*	110.1 \pm 16.9
IL-6 (pg/ml)	367.3 \pm 25.5	3842.2 \pm 85.1*	428.8 \pm 17.5
PGE ₂ (pg/ml)	43.9 \pm 4.5	2028.9 \pm 91.3*	69.1 \pm 7.3

*P<0.01

表3 *In vivo* マウス骨吸収モデルにおける骨形態計測の結果

	コントロール	未処理微粒子移植群	MPC 微粒子移植群
Oc. N/Pm (per 100nm)	26.1 ± 10.1	117.6 ± 11.8*	31.5 ± 11.5
ES/BS (%)	2.8 ± 1.8	21.9 ± 4.8*	4.3 ± 0.6

Oc. N/Pm : number of mature osteoclasts in 100 nm of bone perimeter
 ES/BS : percentage of eroded surfaces/bone surfaces

*p<0.01

ク吸着や血栓形成が抑制される²⁾。これらの優れた特性を活かし、医療分野への応用を目指した様々な研究開発が行われており、ステント、カテーテル、コンタクトレンズ等の医用材料は国内外で認可を受けて実用化されており、生体内の安全性は確立されている^{5,6)}。今回の研究では、これらの特性に加え、MPC ポリマー表面が優れた潤滑特性を有することが明らかになった。生体の関節軟骨表面にはナノスケールのリン脂質の層が形成されており、関節面の潤滑機構の改善に寄与している⁶⁾。関節摺動面をMPC ポリマー処理した人工股関節においても、疎水性のPE ライナー表面を親水性のMPC ポリマーで処理することでPE 表面の水の接触角が低下し、「水なじみ」が改善する³⁾。この結果としてPE 表面にリン脂質ポリマーであるMPC ポリマーの層と自由水の層が形成され、関節面の潤滑機構が改善されるものと考えている。

これまでの弛みの抑制のための研究は、摩耗粉を減少させること、あるいは、骨吸収を抑制すること、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PEの改質やPEを使わない人工関節の開発などが、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の研究などが行われてきたが、摩耗と骨吸収のどちら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いない。我々の今回の研究成果により、人工関節摺動面のMPC ポリマー処理が、弛みの主因となるPE 摩耗粉の産生を著減させること、さらにMPC ポリマーが摩耗粉となっても骨吸収を誘導しないこと、が明らかになり、従来の人工関節における課題が同時に解決できることが示された(図7)。また、最近では研究を重ねてMPC ポリマー処理方法を改善し、連続1000万サイクル以上の歩行負荷をかけても著明な摩耗抑制効果がみられ、その処理効果も維持されるという結果を得ている。以上の成果は、関節摺動面のMPC ポリマー処理が人工関節の寿命を飛躍的に延長させる可能性を示唆しており、高齢社会をむかえた我が国

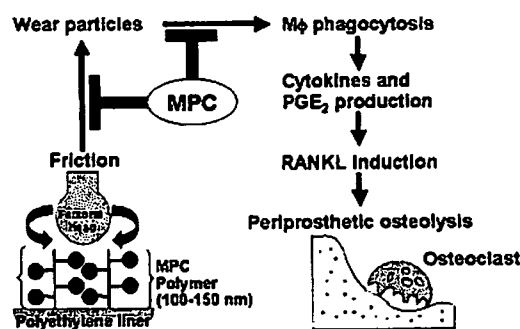


図7 人工関節摺動面のMPC ポリマー処理による弛みの抑制機序

において、関節の機能、ADL、QOLの改善に貢献するばかりでなく、従来手術の適応になり難かった若年の症例でも積極的に人工関節手術を行えるなど、治療方法の選択自体を根本的に変える大きな可能性を秘めている。

おわりに

人工関節摺動面のMPC ポリマーによるナノ表面処理は、人工関節の弛みを阻止し、寿命を飛躍的に延長する画期的な新技術となる可能性が強く示唆された。現在、臨床試験の準備を進めている。

謝辞

本研究の一部は、財団法人 日本股関節研究振興財団の研究助成により行われました。深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Ishihara, K. et al.: Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym J*, 22: 355-360, 1990.
- 2) Ishihara, K. et al.: Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res*, 39: 323-330, 1998.
- 3) Ishihara, K. et al.: Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on poly-

ethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 18 : 325-335, 2000.

- 4) Jacobs, J. J. et al. : Osteolysis : basic science. *Clin Orthop*, 393 : 71-77, 2001.
- 5) Kihara, S. et al. : In vivo evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs*, 27 : 188-192, 2003.
- 6) Kirk, T. B. et al. : The morphology and composition of the superficial zone of mammalian articular cartilage. *J Orthop Rheumatol*, 6 : 21-28, 1993.
- 7) Konno, T. et al. : Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *Biomaterials*, 22 : 1883-1889, 2001.
- 8) Lewis, A. L. et al. : Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials*, 23 : 1697-1706, 2002.

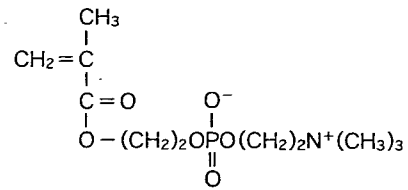
Vocabulary

MPC ポリマー

疾患や外傷の治療のため、さまざまなバイオマテリアルが実用化されている。しかしながら、これらは生体にとっては異物にほかならず、とくに体内に長期留置されるものについてはマテリアルと生体との界面で引き起される生体側の反応が問題となっている。

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーは、生体適合性表面として細胞膜表面のリン脂質極性基が配列した構造に着目して合成・開発された、側鎖にホスホリルコリン基を有する材料である¹⁾。MPC ポリマーは生体内で異物として認識を受けず、生体との相互作用も抑制されるため、ポリマー表面のタンパク質吸着や血栓形成が抑制される。またさまざまな溶媒に可溶であるため、既存のバイオマテリアルを容易にコーティングすることができる。これらの特性をいかし、人工血管、人工腎臓、血糖値センサーなどさまざまな医療分野への応用をめざした研究開発が行われており、そのうち血管拡張ステント、人工肺など循環器系医療デバイスやコンタクトレンズおよびその関連分野で実用化されている。

整形外科の分野においては、人工関節の最大の合併症である弛み (loosening) を阻止するため、MPC ポリマーで表面処理した人工関節が研究開発されている。この人工関節は、関節摺動面の超高分子量ポリエチレンライナーの表面にナノメートルオーダーで MPC ポリマーをグラフト結合するもので、この処理により関節面からの摩耗粉の産生の抑制と、摩耗粉による異物反応の阻止を同時に達成することができる²⁾。股関節シミュレータを用いた耐摩耗性試験では、20年分に相当する歩行負荷をかけても摩耗を著明に抑制することが、明らかになった。また、摩耗粉の引き起す異物反応についても、*in vitro/vivo* のマウス骨溶解 (osteolysis) モデルを用いた検討により、



ホスホリルコリン基

図 1. MPC の構造

MPC ポリマー微粒子が骨溶解を誘導しないことが明らかになっている^{3,4)}。MPC ポリマーによりナノ表面処理された人工関節は、弛みをきたさない画期的な長寿命型人工関節として、近く臨床試験が開始される予定である。

近年バイオマテリアルの分野においては従来の力学的特性のみならず、より生体適合性が求められるようになってきている。MPC ポリマーは基材となるマテリアル自体の特性を残したまま生体適合性を改善するポリマーとして、今後もさまざまな医療デバイスとして臨床応用されるであろう。

文献

- 1) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N: Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym J* 22: 355-360, 1990
- 2) Moro T, Takatori Y, Ishihara K et al: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing peri-prosthetic osteolysis. *Nat Mater* 11: 829-836, 2004
- 3) Moro T, Takatori Y, Ishihara K et al: Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. *Proc Annu Meet Am Acad Orthop Surg* 72: 318, 2005
- 4) Moro T, Takatori Y, Ishihara K et al: Nano-grafting of biocompatible polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial joint. *Proc Annu Symp Int Soc Tech Arth* 18: 87, 2005

(東京大学大学院医学系研究科

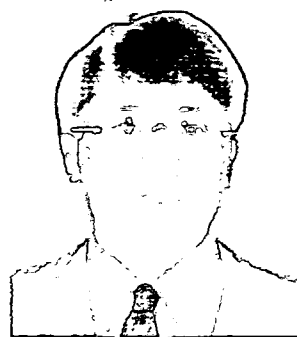
疾患生命工学センター・茂呂 徹,

東京大学大学院工学系研究科

マテリアル工学専攻・石原一彦)

★ "Vocabulary" に掲載希望の用語 (解説者) を募集いたします。巻末のハガキをご利用のうえお知らせください。
「整形外科」編集室

生体適合性ポリマーのナノ表面処理による人工股関節の弛みの阻止



茂 呂 徹*

JJSB

Surface nano-grafting of artificial hip joints with a biocompatible polymer for preventing aseptic loosening

弛みの阻止を目指し、溶解性と生体適合性にすぐれた MPC ポリマーをナノオーダーでポリエチレン表面にグラフトした人工関節を開発した。MPC 微小粉が骨吸収に与える影響を *in vitro/vivo* mouse osteolysis model を用いて検討したところ、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。MPC ポリマーでナノ表面処理した人工関節褶動面が、弛みの主因となる PE の摩耗粉の産生を抑制すること、その処理効果は長期の歩行負荷をかけても持続することと考えあわせると、人工関節の寿命を延長する新技術として実用化が期待できる。

Toru Moro*

Key words : aseptic loosening, artificial joint, osteolysis, wear, biocompatible polymer

人工関節置換手術は、関節の一部あるいは全部を高分子材料、金属、セラミックスなどで構成される人工関節に置き換える手術である。現在行われている人工関節手術のほとんどが股関節、膝関節の手術であるが、このほかに肘関節、肩関節、足関節、指関節などの人工関節も実用化されており、関節の可動域の改善と除痛をほぼ確実に獲得できるすぐれた手術として、わが国で年間12万件以上の手術が行われている。

人工関節手術は19世紀ごろより行われていたとされているが、股関節に関しては1961年、膝関節に関しては1971年に発表されたものが、現在使用されている人工関節の原型となっている¹⁾²⁾。これまでに、材料、デザイン、手術手技、術後管理などの面でさまざまな改良がなされ、その臨床成績も安定してきている一方で³⁾、手術後に人工関節のインプラント周囲に生じる骨吸収(osteolysis)とこれに続発す

る弛み(loosening)は、いまなお根本的な解決策が得られておらず、人工関節の長期予後を決定する深刻な合併症である⁴⁾。インプラント周囲の骨吸収のみで症状が出ることはまれであるが、骨吸収の範囲の拡大と荷重などのメカニカルストレスにより、インプラントは固定性を失い、疼痛や可動域制限のため、再置換手術が必要となる。このため、人工関節の弛みを阻止し、その耐用年数(寿命)を延長することは重要な課題である。

人工関節の弛みの原因

弛み原因についてはこれまでに数多くの研究が行われてきたが、インプラント周囲から生じる微小摩耗粉に対する生体の異物反応が惹起する、いわゆる“particle disease”であることが明らかになっている。これらの摩耗粉には、関節褶動面から生じる超高分子量ポリエチレン(ultra high molecular weight polyethylene: UPMWPE、以下 PE)、金属(コバルトクロム合金、チタン)、セラミックス(アルミナ、ジルコニア)、そして、ときに人工関節の固定に用いられる骨セメント(polymethyl-methacrylate: PMMA)などがある。おのおのの微粒子が骨吸収に与える影響については諸説があるものの、微粒子のなかでは PE

* Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo 東京大学大学院医学系研究科疾患生化学センター
【略歴】1992年 東京大学医学部整形外科教授兼入局、1998年 東京大学医学部附属病院整形外科助手、2004年 東京大学大学院医学系研究科外科専攻修了(医学博士)。同年 東京大学大学院医学系研究科疾患生化学センター医療ナノテクノロジー人材養成ユニット特任教員、現在に至る。日本整形外科学会専門医、日本整形外科学会認定リウマチ医、日本整形外科学会スポーツ医、日本整形外科学会脊椎脊髄医、日本医師会健康スポーツ医、専門：整形外科学、生体材料学、分子生物学、趣味：野球、読書

の微小摩耗粉が圧倒的に多く、弛みの主因と考えられている⁶⁾。

人工関節の手術後には関節包が形成され、関節液が存在する。関節摺動面から生じたPE摩耗粉は、関節運動や荷重に伴う関節液の圧の上昇によりインプラントと骨の界面に侵入する⁷⁾。PE摩耗粉の大部分は1 μ m以下のsubmicron sizeであるが⁸⁾、10~25 μ m以下の微小摩耗粉はマクロファージ(M Φ)の貪食をうけ、M Φ はtumor necrosis factor- α (TNF α)、interleukin-1(IL-1)、IL-6などのサイトカインやプロスタグランジン(PG)を分泌する。これらの生体活性物質は周囲の間葉系細胞に作用し、破骨細胞分化因子(receptor activator of NF- κ B ligand: RANKL)の発現を誘導する。その結果、破骨細胞の形成・活性が促進され、人工関節周囲の骨吸収に至る⁹⁾。

人工関節の弛みの阻止を目指した研究

人工関節の弛みの阻止を目指した研究は、PEの摩耗粉による破骨細胞の形成、活性化および骨吸収の誘導を抑制すること、あるいはPEの摩耗粉の産生量を抑制することを目指して行われてきた。

骨吸収の誘導を抑制する試みとしては、抗サイトカイン抗体や破骨細胞形成抑制因子(osteoprotegerin: OPG)を用いた薬物療法、遺伝子治療が研究開発されている^{9,10)}。これらのなかには、*in vitro/vivo*で良好な結果を得ているものもあるが、全身への副作用をいかに抑制するかが今後の課題であると考えられる。

人工関節手術を受けた患者のretrospectiveな検討によれば、PEの年間線摩耗量が0.1~0.3 mm程度が¹¹⁾、再置換手術時のインプラント周囲の解析によれば、組織1g当たり 1×10^{10} 個の摩耗粉の産生が骨吸収を生じる境界値とされており¹²⁾、骨吸収はPEの摩耗粉の量に依存した現象である。したがって、PEの摩耗粉の量を抑制することも弛みの阻止のための有効な手段であり、この目的で、PEを用いない人工関節の開発あるいはPEの改質が行われてきた。

PEを用いない人工関節としては金属対金属、セラミックス対セラミックスの関節面を持つ人工関節が実用化されている。金属対金属の関節面を持つ人工関節は良好な長期成績が報告されている一方で、金

属イオンの溶出も報告されており、毒性や発がん性など全身的な影響も考慮する必要がある¹³⁾。また、セラミックス対セラミックスの関節面を持つ人工関節は、すぐれた耐摩耗効果が報告されているが¹⁴⁾、セラミックス特有の脆弱性の問題があり、1万例に1例程度と少数ではあるが、体内での破損例も報告されている¹⁵⁾。したがって、今日においても、金属あるいはセラミックス製の摺動面の相手として圧倒的にPEが用いられているのが現状である。PEは、摩耗粉の問題はあるものの、溶出物もなく、化学的に安定な材料であり、相手の形状に応じて変形する柔軟性を有し、成形しやすいという特質を有することも利点である。

PEの結晶化率を高める試みなど、PEの改質に関する多くの研究開発が失敗に終わったなかで、100 Mradという高線量の 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、基礎実験で摩耗量を減らすことに成功し、臨床的にも人工股関節において線摩耗量を減らすなど、良好な長期成績が報告されている¹⁶⁾。当初は、 γ 線照射時に発生するfree radicalによる機械的強度の低下が問題とされていたが、熱処理方法の改良などでこの問題は解決されつつあり、現在では5~10 Mrad程度の γ 線を照射したCLPEが人工股関節の関節摺動面に実用化されている。

一方、架橋によりPEの柔軟性が低下するため、人工膝関節の分野への応用は積極的には進んでおらず、摩耗粉自体が骨吸収を誘導するという根本的な問題も解決されていない¹⁷⁾。また、最近になり、架橋により体積摩耗量は減少するものの、submicron sizeの摩耗粉の割合が大きくなり、摩耗粉自体の骨吸収誘導能はむしろ上昇するという報告もあり、摩耗量のみならず、摩耗粉の量、粒径分布、形状などを総合的に検討していく必要がある¹⁸⁾。

以上のように、人工関節の弛みの抑制を目指し、すぐれた研究開発が数多く行われているものの、摩耗粉の産生と骨吸収の抑制といういずれかを目指した研究開発では決定的な解決策を得られていないのが現状であり、関節摺動面の潤滑性と生体適合性を同時に改善する技術が求められている。

生体の関節軟骨は少なくとも数十年にわたり生体

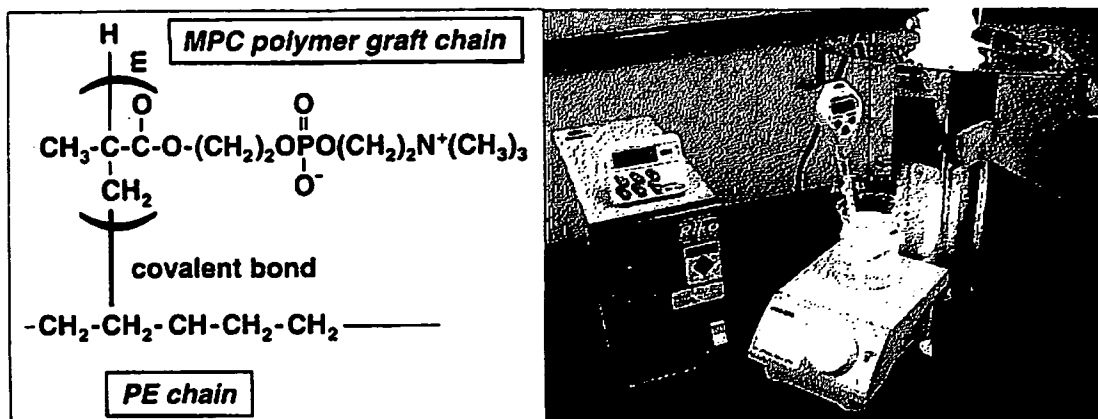


図1 MPCポリマー処理

紫外線を用いてMPCポリマー鎖とPEの炭素原子同士に安定な共有結合をさせるもので、ナノオーダーの表層のみの処理であり、基材であるPE自体には影響を及ぼさない。

の運動を支えているが、関節軟骨表面にはナノオーダーのリン脂質の層が存在し、関節表面の保護と関節の潤滑特性の改善という役割を果たしている¹⁹⁾。そこで筆者らは、生体適合性のあるリン脂質で人工関節の関節摺動面を覆うことができれば関節面に軟骨表面と同様の構造を構築し、弛みを阻止できると考え、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)という生体適合性リン脂質ポリマーに着目した。

MPCポリマーによる人工関節摺動面のナノ表面処理

MPCポリマーは、生体適合性表面として生体細胞膜表面のリン脂質極性基が配列した構造に着目して合成・開発された高分子材料である²⁰⁾。

MPCポリマーは、さまざまな溶媒に可溶であるため、既存の医療デバイス表面を容易に被覆することができる。被覆された医療デバイス表面は細胞膜と類似する構造となるため、蛋白吸着や血栓形成が抑制されるなどすぐれた生体適合性を発揮する²¹⁾。これらのすぐれた特性を活かし、医療分野への応用を目指したさまざまな研究開発が行われており、血管拡張ステント、人工肺など循環器系医療デバイスや、コンタクトレンズおよびその関連分野で実用化されている²²⁾。

筆者らは、人工関節の弛みの抑制のため、PEライ

ナー表面へMPCポリマーを光学的にグラフト重合させる手法を創案した(MPCポリマー処理、図1)。この処理は、紫外線を用いてMPCポリマー鎖とPEの炭素原子同士に安定な共有結合をさせるもので、表層のみの処理であり、基材であるPE自体には影響を及ぼさない²³⁾。具体的には、光増感剤であるベンゾフェノンにPEライナー上に吸着させ、これをMPCモノマー溶液に浸漬した。これに波長350nm程度の紫外線を照射させることにより、ベンゾフェノンを活性化し、水素引き抜き反応を誘起させた。これによりPE表面にラジカルが生じ、これを開始点としてMPCの重合が進行し、MPCポリマー鎖がグラフトされる。電界放射型透過電子顕微鏡(FE-TEM)による表面観察により、その処理厚みは100~200nmと、ナノオーダーであることが明らかとなっている²⁴⁾。

筆者らは、人工関節のPEライナー表面の、MPCポリマーによるナノ表面処理が弛みの阻止に与える影響を、耐摩耗性と摩耗粉が骨吸収に与える影響の観点から検討してきた。股関節シミュレーターを用いた耐摩耗性の評価では、MPCポリマーのナノ表面処理により摩耗量が顕著に抑制されること、15~20年分以上の歩行負荷をかけても表面処理効果が残存することを明らかにした^{25,26)}。

本稿では、MPCの微粒子が骨吸収に与える影響に関して検討した結果を報告する。

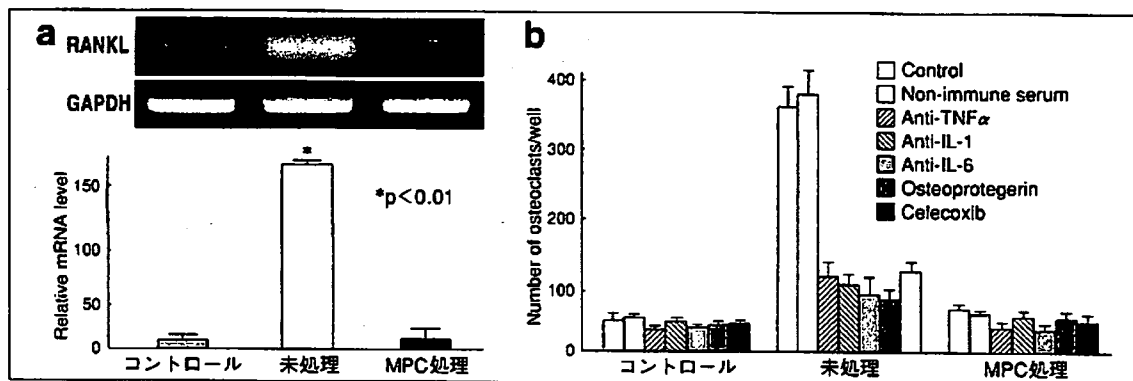


図2 *In vitro* osteolysis model (Moro T et al., 2004²⁴⁾より一部改変)

a: RT-PCR, realtime PCRの結果、未処理微粒子曝露群ではRANKLのmRNAの発現を強力に誘導したが、MPC処理微粒子曝露群では誘導されなかった。

b: 骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養の結果、未処理微粒子曝露群では破骨細胞の形成が亢進されたが、MPC処理微粒子曝露群ではコントロール群と有意な差がみられなかった。未処理微粒子曝露群による破骨細胞形成は、TNF α 、IL-1、IL-6おのこの抗体、cyclooxygenase-2(COX-2)阻害剤、OPGの添加により抑制されたが、これらの抑制効果は、微粒子のMPC処理による抑制効果と有意な差がみられなかった。



図3 *In vivo* osteolysis model (Moro T et al., 2004²⁴⁾より一部改変)

未処理微粒子を移植した群ではTRAP染色陽性の破骨細胞が多数形成され、骨吸収が強力に誘導されたが、MPC処理微粒子を移植した群ではこれらが誘導されなかった。

(Scale bar: 100nm)

MPC微小粉の生体適合性²⁴⁾

骨吸収の主因となるのは粒径が submicron の微粒子である。そこで、平均粒径約0.5 μm のMPC微粒子を作製し、以下の *in vitro/vivo* particle-induced mouse osteolysis model に用いて微粒子の生体適合性を検討した。

まず、マウス腹腔内M Φ 培養系に曝露して食食実験を行うと、未処理の微粒子はM Φ に大量に食食されたが、MPC処理微粒子はM Φ に異物として認識されず、ほとんど食食を受けなかった。

つぎに、MPC処理/未処理の微粒子溶液(0.1%)または微粒子を含まない溶液(コントロール群)をマウ

スM Φ 様細胞株・J774.1細胞に曝露して、24時間後に培養上清を回収し、これらを conditioned medium として以下の実験に用いた。まず、破骨細胞の形成・活性化を促進する液性因子濃度として TNF α 、IL-1、IL-6、PGE₂の濃度を計測した。未処理微粒子曝露群の濃度は、コントロール群とくらべ、おのこの4倍、7倍、10倍、46倍高値を示したが、MPC処理微粒子曝露群ではこれらの濃度上昇がみられず、コントロール群と有意な差がみられなかった。つぎに、マウス骨芽細胞培養系に conditioned medium を添加してRANKLのmRNAの発現を検討すると、未処理微粒子曝露群ではRANKLの発現を強力に誘導したが、MPC処理微粒子曝露群では誘導されなかつ

た(図2a)。さらに、マウス骨髓細胞と骨芽細胞の共存培養系に conditioned medium を添加して破骨細胞形成能を検討すると、未処理微粒子曝露群では、溶液のみを加えたコントロール群に比し7倍の破骨細胞が形成されたが、MPC処理微粒子曝露群ではコントロール群と有意な差がみられなかった。また、未処理微粒子曝露群による破骨細胞形成・活性化は、TNF α 、IL-1、IL-6のおおのの抗体、cyclooxygenase-2(COX-2)阻害剤、OPGの添加により抑制されたが、これらの抑制効果は微粒子の MPC 処理による抑制効果と有意な差がみられなかった(図2b)。

さらに、*in vivo* particle-induced mouse osteolysis modelでは、マウス頭蓋骨上にMPC微粒子あるいは未処理微粒子を移植し、7日後に標本を作製した後、骨吸収を観察し、単位面積当たりの破骨細胞数(Oc.N/B.Pm)および骨吸収面(ES/BS)の計測を行った。未処理微粒子を移植した群では、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色陽性の破骨細胞が多数形成され、骨吸収が強力に誘導されたが、MPC処理微粒子を移植した群ではこれらが誘導されなかった。また、未処理微粒子を移植した群では破骨細胞数、骨吸収面がコントロール群のおおの5倍、8倍を示したのに対し、MPC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3)。

おわりに

以上の研究成果により、MPCポリマーの微粒子は骨吸収を誘導しないことが明らかとなった。MPCポリマーによる人工関節摺動面のナノ表面処理が、人工関節の弛みの主因となるPEの摩耗粉の産生を抑制すること、その処理効果は長期の歩行負荷をかけても持続することと考えあわせると、人工関節摺動面の潤滑性と生体適合性を同時に達成することができた。この新しいナノ表面処理は、弛みを阻止し、寿命を延長する画期的な新技術として、現在臨床試験の準備を進めている。

本稿で紹介した内容は、東京大学医学部整形外科・脊椎外科の中村耕三教授、高取吉雄助教授、川

口浩助教授、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻の石原一彦教授をはじめ、研究室の諸先生方との共同研究の成果です。この場を借りて感謝の意を表します。

文 献

- 1) Charnley J: Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet* 1961, 1: 7187-1129-1132.
- 2) Coventry MB, Finerman GA, Riley LH, Turner RH, Upshaw JE: A new geometric knee for total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1972, 83: 157-162.
- 3) Gunston FH: Polycentric knee arthroplasty. Prosthetic simulation of normal knee movement. *J Bone Joint Surg Br* 1971, 53: 272-277.
- 4) Wroblewski BM, Fleming PA, Siney PD: Charnley low-frictional torque arthroplasty of the hip. 20-to-30 year results. *J Bone Joint Surg Br* 1999, 81: 3: 427-430.
- 5) Harris WH: Wear and periprosthetic osteolysis: the problem. *Clin Orthop* 2001, 393: 66-70.
- 6) Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, Schurman DJ, Woolson ST, Masada MP: A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 1989, 244: 182-187.
- 7) Schmalzried TP, Jasty M, Harris WH: Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* 1992, 74: 849-863.
- 8) Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D, Rubash H: Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am* 1995, 77: 1301-1310.
- 9) Kim KJ, Kotake S, Udagawa N, Ida H, Ishii M et al.: Osteoprotegerin inhibits *in vitro* mouse osteoclast formation induced by joint fluid from failed total hip arthroplasty. *J Biomed Mater Res* 2001, 58: 4: 393-400.
- 10) Goater JJ, O'Keefe RJ, Rosier RN, Puzas JE, Schwarz EM: Efficacy of *ex vivo* OPG gene therapy in preventing wear debris induced osteolysis. *J Orthop Res* 2002, 20: 169-173.
- 11) Manley MT, D'Antonio JA, Capello WN, Edidin AA: Osteolysis: a disease of access to fixation interfaces. *Clin Orthop* 2002, 405: 129-137.
- 12) Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H: Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998, 278: 1-16.
- 13) Bullough PG: Metallosis. *J Bone Joint Surg Br* 1994, 76: 687-688.
- 14) Dorlot JM, Christel P, Meunier A: Wear analysis of retrieved alumina heads and sockets of hip prostheses. *J Biomed Mater Res* 1989, 23, A3 (Suppl.): 299-310.
- 15) Callaway GH, Flynn W, Ranawat CS, Sculco TP: Fracture of the femoral head after ceramic-on-polyethylene total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 1995, 10: 855-859.
- 16) Oonishi H, Kadoya Y, Masuda S: Gamma-irradiated cross-linked polyethylene in total hip replacements—analysis of retrieved sockets after long-term implantation. *J Biomed Mater Res* 2001, 58: 167-171.
- 17) Fisher J, McEwen HM, Tipper JL, Galvin AL, Ingram J et al.: Wear, debris, and biologic activity of cross-linked polyethylene in the knee: benefits and potential concerns. *Clin Orthop Relat Res* 2004, 428: 114-119.
- 18) Ingram JH, Stone M, Fisher J, Ingham E: The influence of molecular weight, crosslinking and counterface roughness on TNF α production by macrophages in response to ultra high molecular weight polyethylene particles. *Biomaterials* 2004, 25: 3511-3522.

- 19) Hills BA, Butler BD : Surfactants identified in synovial fluid and their ability to act as boundary lubricants. *Ann Rheum Dis* 1984, 43 : 641-648.
- 20) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N : Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym J* 1990, 22 : 355-360.
- 21) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N : Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res* 1998, 39 : 323-330.
- 22) Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW : Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials* 2002, 23 : 1697-1706.
- 23) Ishihara K, Iwasaki Y, Ebihara S, Shindo Y, Nakabayashi N : Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000, 18 : 325-335.
- 24) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y et al. : Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 2004, 3 : 829-836.
- 25) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H : New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing aseptic loosening. *Proceedings of 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society* 2005, 408.
- 26) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Nakamura K, Kawaguchi H : Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. *Proceedings of 72nd Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2005, 318.



話題

ナノ表面制御による 新しい人工股関節の開発*

茂 呂 徹**

Key Words : artificial hip joint, total hip arthroplasty, osteolysis, wear, nano technology

はじめに

人工股関節全置換手術は、関節リウマチなどで機能を喪失した関節を人工関節におき換え、関節機能の再建と除痛をはかる手術である。人工股関節手術は1890年代から行われていたとされているが、1961年にCharnleyが発表したlow friction arthroplastyが、寛骨臼側に超高分子量ポリエチレン (ultra high molecular weight polyethylene ; PE)、大腿骨側に金属あるいはセラミックス骨頭を用いるという現在の人工股関節の原型とされている¹⁾。以後、デザインや材質などさまざまな改良が行われてきたが、人工股関節手術は実用化から40年以上が経過し、重症の股関節症に悩む患者の疼痛を寛解し、よりよいADL (activities of daily living) ・ QOL (quality of life) を改善する優れた治療法として確立されており、たとえば2003年にわが国では7万件以上の手術が行われている²⁾。

その一方で、人工股関節周囲の骨吸収とこれに続発する弛みは、その長期予後を決する最大かつ深刻な合併症である。弛みの過程は、関節摺動面を構成するPE製ライナーが骨頭との摩擦により摩耗し、微小摩耗粉を生じることから始まる。この摩耗粉はマクロファージ(MΦ)に貪食され、MΦはTNF- α 、IL-1、IL-6などのサイトカインやプロスタグランジンE₂(PGE₂)を分泌する。

これらの生体活性物質は周囲の間葉系細胞に作用し、破骨細胞分化因子・receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の発現を誘導する。その結果、破骨細胞の形成・活性化が促進され、人工股関節周囲に骨吸収を生じ、弛みに至る³⁾。弛みを生じた人工股関節は加速的に周囲の骨を吸収し、疼痛や可動域制限を生じ、再置換手術が必要となる。

したがって、弛み抑制のための研究開発は、「摩耗粉を減少させること」あるいは「骨吸収を抑制すること」の2つの方向性でこれまで検討されてきた。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⁴⁾、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も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⁵⁾、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⁶⁾。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

* Nano-grafting of biocompatible polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial hip joints.

** Toru MORO, M.D., Ph.D.: 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター(☎113-8655 東京都文京区本郷7-3-1); Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, JAPAN

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⁷⁾⁸⁾。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。

生体の関節軟骨は数十年にわたり関節表面を保護し、優れた潤滑特性を發揮し続けているが、この表面潤滑の改善には、関節軟骨の表層に存在するナノオーダーのリン脂質層が重要な役割を果たしている⁹⁾。そこで、われわれは、人工股関節の関節摺動面表面を生体になじみやすいリン脂質で覆うことができれば、摩耗粉の産生と骨吸収の抑制を同時に達成することが可能となり、人工股関節の弛みを阻止できると考え、生体適合性リン脂質ポリマーである2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーに着目した¹⁰⁾。

MPCポリマー処理

石原らは生体細胞膜表面のリン脂質極性基が配列した構造に着目し、側鎖にリン脂質極性基(ホスホリルコリン基)を有するメタクリル酸エステル、MPCを合成・開発した¹¹⁾。このMPCポリマーは生体細胞膜類似構造を有するため、生体内で異物として認識を受けず優れた生体適合性を發揮するほか、生体との相互作用も抑制されるためMPCポリマー表面の蛋白質吸着や血栓形成が抑制される(図1)¹²⁾¹³⁾。したがって、MPCポリマーは医用材料自体の機能を低下させることなく材料表面の性質を改善できる。これらの優れた特性を活かし、MPCポリマーで表面処理したさまざまな医用材料の研究開発が行われており、その一部はすでに認可を受け国内外で実用化されるなど、生体内の安全性は確立されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

われわれは、光開始ラジカル重合法を適用し、PEライナー表面をMPCポリマーでナノ表面処理する手法を創案した(MPCポリマー処理)¹⁶⁾¹⁷⁾。この処理は、紫外線を用いてPEとMPCポリマーの炭素原子同士を結合させるものであり、安定した共有結合を有するだけでなく、ナノオーダーの表面処理(100~150nm)であるため関節摺動面以外のPEの性質に影響を与えない(図2)。

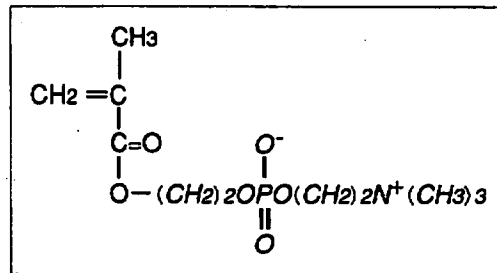


図1 MPCの構造

MPCポリマーは、生体細胞膜類似構造を有するため、生体内で異物として認識を受けず優れた生体適合性を發揮する。

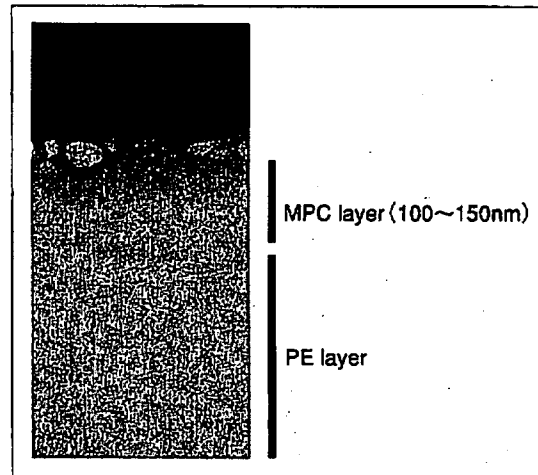


図2 ポリエチレンライナー表面のFE-TEM像
ポリエチレンの表層に厚さ100~150nmのMPCポリマー層が形成される(表層の空孔は標本作製時のもので、実際のライナー表面には存在しない)。

われわれは、人工股関節摺動面のナノ処理が弛みの阻止に与える影響をMPCポリマー処理したPEライナー表面の耐摩耗性とMPC摩耗粉が骨吸収に及ぼす影響の観点から検討してきたが、今回人工股関節の寿命を飛躍的に延長し得る知見を得たので報告する^{16)18)~20)}。

MPCポリマー処理したPEライナー表面の耐摩耗性の評価

まず、PE表面をMPCポリマー処理し、その潤滑特性を観察した。PE表面は疎水性であり、表面の水の接触角を測定すると85.0°であるが、親水性のMPCポリマーで表面処理して接触角を測定すると15.1°と、「水なじみ」が著明に改善した。ま

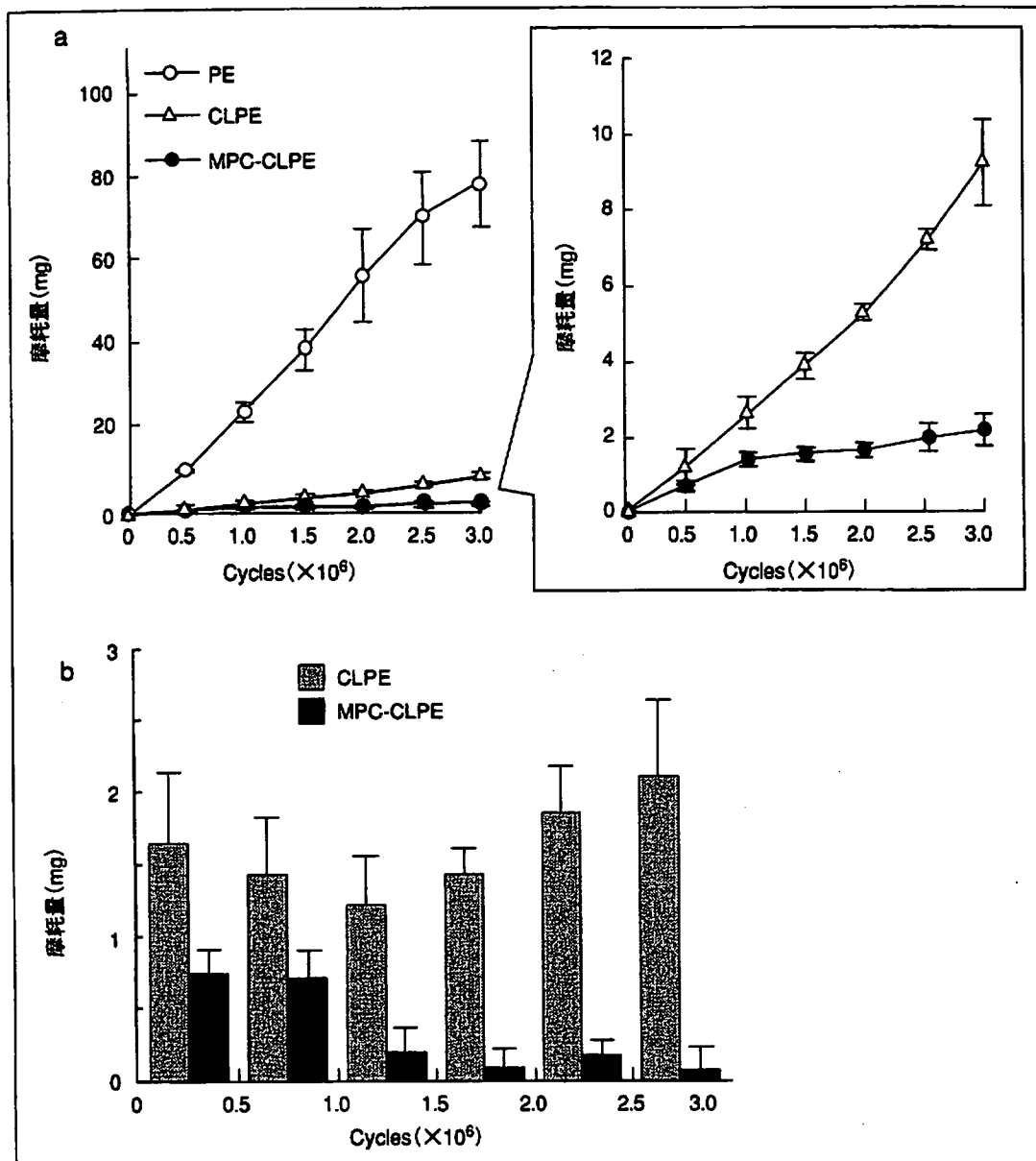


図3 股関節シミュレーター試験の結果
MPC-CLPEの摩耗量はPEの1/40, CLPEの1/4と、著明に抑制された。(文献¹⁶より一部改変)

た、摩擦係数も未処理群の約1/7に改善していた。
次いで、人工股関節手術を受けた関節により近い環境下での耐摩耗効果を観察するため、生体の歩行周期を再現する股関節シミュレーターを用いて連続300万サイクル(片足連続300万歩分)の試験をISO 14242-1の条件に準じて行った。骨頭には市販品のコバルトクロムモリブデン合金骨頭(径22mm)を用いた。ライナーは同じく市販品のCLPE

表面をMPCポリマー処理したもの(MPC-CLPE)を用い、PEおよび未処理のCLPEと比較した。まず関節摺動面の摩擦トルクを測定すると、MPC-CLPEのトルクは未処理群の約1/10と改善していた。次に50万サイクルごとにPEライナーの重量を計測し、ライナーの摩耗量を検討すると、MPC-CLPEの摩耗量はPEの1/40、未処理CLPEの1/4と著明に抑制されていた(図3)。また、試験終了

曝露群ではこれらの誘導がみられず、コントロール群と有意な差はみられなかった。未処理微粒子曝露群における破骨細胞形成・活性化は、TNF- α 、IL-1、IL-6それぞれの抗体、cyclooxygenase-2阻害剤、破骨細胞形成抑制因子(osteoprotegerin; OPG)の添加により抑制されたが、これらの抑制効果は微粒子のMPC処理による抑制効果と有意な差がみられなかった。

次に*in vivo*マウス骨吸収モデルにおいて、微粒子をマウス頭蓋骨上に移植して7日後に頭蓋骨を採取し、標本作製して酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)で染色を行った。顕微鏡において標本を観察すると、未処理微粒子を移植した群ではTRAP染色陽性の破骨細胞が多数形成され骨吸収が強力に誘導されたが、MPC処理微粒子を曝露した群ではこれが誘導されなかった(図5)。

以上の*in vitro/in vivo*マウス骨吸収モデルを用いた検討により、MPCポリマーは生体細胞膜類似構造を構築し異物としての認識を受けないため、MPCの微小粉はM Φ の食食を受けず、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になった。

おわりに

これらの研究成果により、人工股関節摺動面の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーによるナノ表面処理は、弛みの主因となる超高分子量ポリエチレン(ultra high molecular weight polyethylene; PE)摩耗粉の産生を著減させること、仮に摩耗粉を生じても骨吸収を誘導しないこと、が明らかになり、従来の人工股関節における課題が同時に解決できることが示された。また、MPCポリマー処理した医用材料がすでに国内外で認可を受け臨床応用されていること、MPCポリマー処理がナノオーダーの処理で表層以外のPEの性質に影響を与えないことも利点と考えている。本研究は、人工股関節の寿命を飛躍的に延長する長寿命型の人工股関節の開発につながり、従来手術の適応になりにくかった若年の症例でも人工股関節手術を選択肢に加えられるなど、治療方法の選択を変える可能性を秘めている。これまでの人工股

関節は、生体の股関節構造により近づけることで可動域などの性質の向上をはかってきたが、その表面構造を生体に近づける試み、つまり人工股関節の関節摺動面に生体軟骨表面に類似した構造を付加する試みは行われてこなかった。こうした画期的な試みとして、現在臨床試験の準備を進めている。

また、今回の研究開発は、体重の数倍という厳しい荷重を受け、臨床上もっとも再置換手術の頻度の高い人工股関節のモデルを用いて行ったが、MPCポリマーのナノ表面処理による弛みの抑制機構はすべての人工関節に臨床応用できるものと考えており、現在基礎検討を進めている。

文 献

- 1) Charnley J. The long-term results of low-friction arthroplasty of the hip performed as a primary intervention. *J Bone Joint Surg Br* 1972; 54: 61.
- 2) 茂呂 徹, 高取吉雄. 生体材料. In: 中村耕三・監. 整形外科クルズス. 第4版. 東京: 南江堂; 2003. p. 82.
- 3) Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, et al. Osteolysis: basic science. *Clin Orthop* 2001; 393: 71.
- 4) McKellop H, Shen FW, DiMaio W, et al. Wear of gamma-crosslinked polyethylene acetabular cups against roughened femoral balls. *Clin Orthop* 1999; 369: 73.
- 5) Black J. Metal on metal bearings. A practical alternative to metal on polyethylene total joints? *Clin Orthop* 1996; 329: 244.
- 6) Callaway GH, Flynn W, Ranawat CS, et al. Fracture of the femoral head after ceramic-on-polyethylene total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 1995; 10: 855.
- 7) Childs LM, Paschalis EP, Xing L, et al. *In vivo* RANK signaling blockade using the receptor activator of NF-kappaB: Fc effectively prevents and ameliorates wear debris-induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 192.
- 8) Goater JJ, O'Keefe RJ, Rosier RN, et al. Efficacy of *ex vivo* OPG gene therapy in preventing wear debris induced osteolysis. *J Orthop Res* 2002; 20: 169.

- 9) Kirk TB, Wilson AS, Stachowiak GW. The morphology and composition of the superficial zone of mammalian articular cartilage. *J Orthop Rheumatol* 1993 ; 6 : 21.
- 10) 茂呂 徹, 高取吉雄, 石原一彦, ほか. 生体膜類似構造を持つMPCの人工関節への応用に関する検討 MPCポリマーはポリエチレンライナーの摩耗を低減する[会]. *日整会誌* 2002 ; 76 : 150.
- 11) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym J* 1990 ; 22 : 355.
- 12) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, et al. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res* 1998 ; 39 : 323.
- 13) Ishihara K, Miyazaki H, Kurosaki T, et al. Improvement of blood compatibility on cellulose dialysis membrane. III. Synthesis and performance of water-soluble cellulose grafted with phospholipid polymer as coating material on cellulose dialysis membrane. *J Biomed Mater Res* 1995 ; 29 : 181.
- 14) Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, et al. *In vivo* evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs* 2003 ; 27 : 188.
- 15) Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW. Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials* 2002 ; 23 : 1697.
- 16) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al. Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 2004 ; 3 : 829.
- 17) Ishihara K, Iwasaki Y, Ebihara S, et al. Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000 ; 18 : 325.
- 18) 茂呂 徹. 人工関節 新素材採用で長寿命化に成功. *治療* 2005 ; 87 : 1642.
- 19) 茂呂 徹, 高取吉雄, 中村耕三, ほか. 新素材による人工股関節の開発. *整・災外* 2005 ; 48 : 245.
- 20) 茂呂 徹, 高取吉雄, 中村耕三, ほか. 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* 2005 ; 56 : 170.
- 21) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al. New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing aseptic loosening [abstract]. *ORS* 2005 ; 51 : 406.
- 22) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al. Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation [abstract]. *AAOS* 2005 ; 72 : 318.
- 23) 茂呂 徹, 高取吉雄, 石原一彦, ほか. 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[会]. *日整会誌* 2004 ; 78 : 944.
- 24) Konno T, Kurita K, Iwasaki Y, et al. Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *Biomaterials* 2001 ; 22 : 1883.

* * *

総説

人工細胞膜表面構築による超機能人工関節の開発

石原一彦*, 茂呂 徹**, 金野智浩*

1. はじめに

生体組織の機能が低下したり、不全になったりした場合には、その機能を代替する医療デバイス、いわゆる人工臓器が適用される。完全な生体機能の修復が達成できない場合も多いが、中には成功して患者のQOLの改善の役割を十分に果たしている場合も少なくない。

人工股関節置換術は、変形性関節症、突発性大腿骨頭壊死、関節リウマチ、外傷などで喪失した関節の機能を再建し、疼痛を寛解する優れた治療法であり、高齢社会を迎えた我が国においては、手術件数が年々増加している。しかし、手術後に生じる弛みはその長期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り、疼痛や歩行障害を引き起こすため、再置換手術が必要になる。したがって、人工股関節手術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。弛みの過程は、関節摺動面を構成する超高分子量ポリエチレン製ライナーが骨頭との摩擦により摩耗し、微小摩耗粉を生じることから始まる。この摩耗粉はマクロファージ(Mφ)に貪食される。このために、Mφが活性化しサイトカインやプロスタグランジンなどを分泌する。これらの生体活性物質は周囲の間葉系細胞に作用し、破骨細胞分化因子やNF-κB リガンド受容体活性化因子(RANKL)の発現を誘導する。その結果、破骨細胞の形成・活性が促進され、人工股関節周囲の骨吸収に至る²⁾。したがって、現在までの弛み抑制のための研究は、摩耗粉を減少させること、あるいは、骨吸収を抑制すること、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、ポリエチレンの

改質やポリエチレンを使わない人工関節の開発などが進められてきている。ポリエチレンを高温・高圧で処理し、結晶化率を高め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。γ線照射をすることでポリエチレンの非晶部分を架橋させた架橋ポリエチレンは、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全く解決されていない。金属/金属の摺動面を持つ人工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。また、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いる。以上のように、弛みの抑制のため、数多くの研究開発が行われてきたが、摩耗と骨吸収のどちら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いない。したがって、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の開発研究が強く求められている。

筆者らは、人工股関節摺動面の潤滑性を改善し、かつ摩耗粉による細胞系の活性化を抑制すれば弛みを阻止できると考えた。生体の関節軟骨表面にはナノスケールのリン脂質の層が存在し、表面潤滑の改善の役割を果たしている³⁾。そこで、リン脂質極性基を側鎖に担持した2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC:図1)を創製し、このポリマーを利用して人工細胞膜表面を関節摺動面に作成することによる表面機能化を目指した⁴⁾。

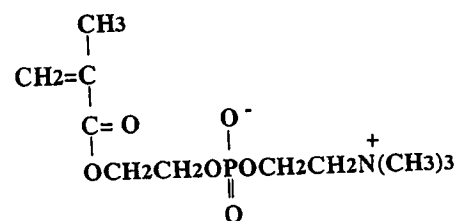


図1 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)の化学構造。

平成17年5月20日受付

- * 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻: 東京都文京区本郷7-3-1
The University of Tokyo, School of Engineering, Department of Materials Engineering, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan
- ** 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター: 東京都文京区本郷7-3-1
The University of Tokyo, School of Medicine, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

2. 人工細胞膜表面の機能

金属, セラミックスのような硬い材料は, 人工関節など運動系人工臓器や人工歯根, 人工骨あるいは欠損部を補填する補綴材として歯科, 整形外科治療に利用されてきた。これらは強度や加工性が主たる選択の理由となってきたが, 最近では循環器系人工臓器として金属が利用されるようになり, 力学的特性以外にも表面における血液凝固反応の阻止や, 埋め込み部位によっては軟組織との適合性が強く求められている。これら生体環境において役割を果たすことができ, かつ生体に悪影響を与えない材料は医療デバイスを開発する際に不可欠である¹⁾。

生体適合性表面として理想的で, 模範となるものは血管内皮細胞表面と考えられる。正常な血管内表面では, 細胞はもとよりタンパク質の吸着, 活性化は生起しない。一方, 材料が血液と接触すると血液凝固反応や免疫反応など生命防御のために生体反応が引き起こされる。そこで細胞膜表面の構造あるいは性質をうまく材料に組み込めばこの生体反応の制御が可能と考えるのは至極当然である。細胞膜表面はリン脂質分子の二分子膜中にタンパク質がモザイクのようにはめ込まれ, また表面から外側に向かって親水性の多糖が出ている(図2)。細胞膜での生体反応のほとんどはタンパク質が関与し, その構造変化や分布状態の変化により外部からの信号が細胞内に伝達される。多糖も外部の信号を受容するアンテナ分子として働いている。これらに対して, リン脂質分子は機能分子であるタンパク質を一定の空間位置に配置する役割, すなわちマトリックスとして働いているにすぎない。リン脂質分子の極性基が細胞内外で大きく異なっていることが知られている。他の分子や組織と接触する機会の多い細胞外側では中性の極性基であるホスホリルコリン(PC)基を持つリン脂質(ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリン)が多い。一方, 細胞膜内面に存在する

リン脂質はホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンで, いずれも酸性脂質である。すなわち, 細胞膜の外表面は中性のリン脂質分子を配列させて, 明らかに生体反応の不活性化場を作り出している。

細胞膜構造を材料表面に構築することは分子の高度な配向, 組織化を実現することである。そこで“人工細胞膜バイオインターフェイス”といえるリン脂質分子を集積化した材料表面を提案する。すなわち, 21世紀の高度先端医療を支える高機能医療デバイスを開発するために不可欠な表面のポリマーナノ処理を考えたい。

著者らはいち早く人工細胞膜構造の優れた血液適合性に着目し, バイオマテリアルとしての適用について研究をしてきた^{5,6)}。まず効果的に医療デバイスの表面処理ができるようにPC基を有するMPCの大量合成法を開発し, 材料特性を高めることを考慮しながら分子構造やシーケンスを変化させて様々なMPCポリマーを合成した。さらにMPCポリマーが, 抗凝固剤を添加していない血液と接触しても血栓形成が効果的に抑制され, 予想通り極めて優れた血液適合性を示すことを報告してきた。

なぜ人工細胞膜構造表面では優れた血液適合性を発現するのであろうか? また最近の結果では表面へのタンパク質吸着量が処理前後で1/1000程度になることも見いだしているが⁷⁾, このタンパク質吸着を阻止する性質は何に起因するのであろうか? MPCポリマーの場合, MPCユニットの増加に伴い含水率が増加するが, その水中の自由水分率は他のポリマーに比較して高いことが明らかとなった。この結果をタンパク質吸着量と相関させて考えてみると, 自由水分率の増加に伴い明らかにタンパク質吸着量が低下する傾向となった⁸⁾。特に, 80%以上が自由水で占められているMPCポリマー上ではタンパク質吸着量が単分子吸着層形成までも至っていないことが認められた。

これまでMPCポリマーのように親水性にもかかわらず自由水分率の高いポリマーは全く知られておらず, MPCポリマーの特異性が示された。MPCポリマーの表面電位は-0.4mVと, 電気的にも中性である。細胞膜表面でも生体反応の選択性の向上にホスファチジルコリンが重要な役割を果たしているが, おそらく表面近傍の水の構造と深く関わっていると考えられる。この特異的な水の構造を持つMPCポリマーが, 関節摺動面においても極めて特徴的な振る舞いを起こす。

3. 人工関節への人工細胞膜構造の適用

筆者らは人工股関節の弛みの抑制のため, ポリエチレンライナー表面へMPCポリマーをグラフト重合させる手法

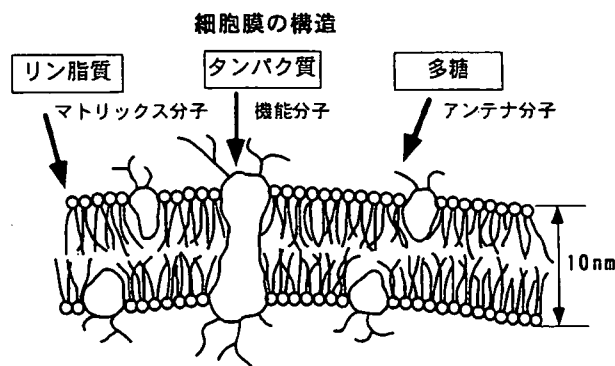


図2 細胞膜を構成する分子群

を創案した (MPC ポリマー処理)。この処理は、紫外線を用いて、MPC ポリマー鎖とポリエチレンの炭素原子同士に安定な共有結合をさせるもので、表層のみの処理であり、基材であるポリエチレン自体には影響を及ぼさない⁹⁾。

具体的には、光増感剤であるベンゾフェノンを用いて、MPCモノマー溶液に浸漬した。これに350nm程度の紫外光を照射することにより、ベンゾフェノンを活性化し、水素引き抜き反応を誘起させた。これによりポリエチレン表面にラジカルが生じ、これを開始点としてMPCの重合が進行する。結果として、MPCポリマー鎖がグラフトされる。電界放射型透過電子顕微鏡 (FE-TEM) による表面観察で、その処理厚みが約100-200nmと、ナノスケールであることが明らかになっている (図3)。

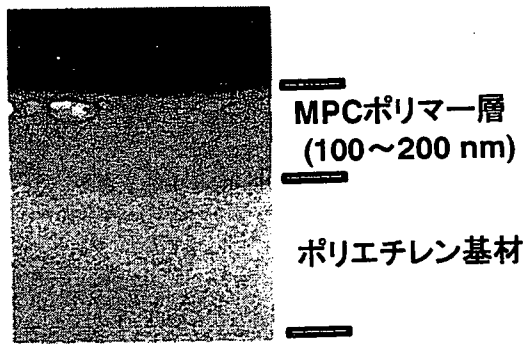


図3 MPCポリマーをグラフトしたポリエチレンライナーの表面 (FE-TEMによる断面像)

筆者らは人工股関節のポリエチレンライナー表面のMPCポリマーによるナノ表面処理が弛みの阻止に与える影響を、耐摩耗性と摩耗粉が骨吸収に与える影響の観点から検討し、人工股関節の寿命を飛躍的に延長し得る知見を得た¹⁰⁾。

生体の股関節は、その歩行周期の中で様々な方向から体重の数倍の負荷を受ける。そこで、より生体内に近い環境下での耐摩耗効果を観察するため、連続300万サイクルの股関節シミュレーター試験を行った。骨頭にはコバルトクロムモリブデン合金骨頭 (径22mm) を用いた。ライナーは架橋ポリエチレン表面をMPCポリマー処理したもの (MPCポリマー処理架橋ポリエチレン) を用い、ポリエチレンおよび未処理の架橋ポリエチレンと比較した。

ポリエチレン表面は疎水性であるが、親水性のMPCポリマーでナノ表面処理することにより、表面の「水なじみ」が改善し、関節摺動面の潤滑機構が向上する。このため、関節摺動面の摩擦トルクを測定すると、MPCポリマー処理

架橋ポリエチレンのトルクは未処理群の約1/10と改善していた。経時的にライナーの重量変化を計測すると、MPCポリマー処理架橋ポリエチレンの摩耗量はポリエチレンの1/40、架橋ポリエチレンの1/4であった (図4)。試験終了後のライナー表面をSEMで観察すると、未処理群では、製品加工時のマシンマークが摩耗により消失していたが、MPCポリマー処理架橋ポリエチレンでは残存しており、摩耗が著明に抑制されていた。また、ライナー表面を微小粗さ測定した三次元解析でも、未処理群では顕著な摩耗が観察できたのに対し、MPCポリマー処理架橋ポリエチレンはほとんど摩耗していなかった (図5)。ライナー表面のMPCポリマー処理効果の残存の有無は、X線光電子分光分析装置 (XPS)、FE-TEMにより検討した。試験終了後のMPCポリマー処理架橋ポリエチレンライナー表面をXPSで解析すると、試験開始前の解析結果と同様、表面にMPCユニット特

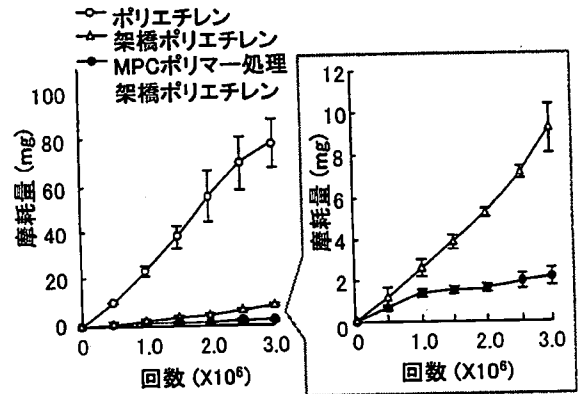


図4 シミュレーターによる摩耗試験結果 (右図は拡大して表示)

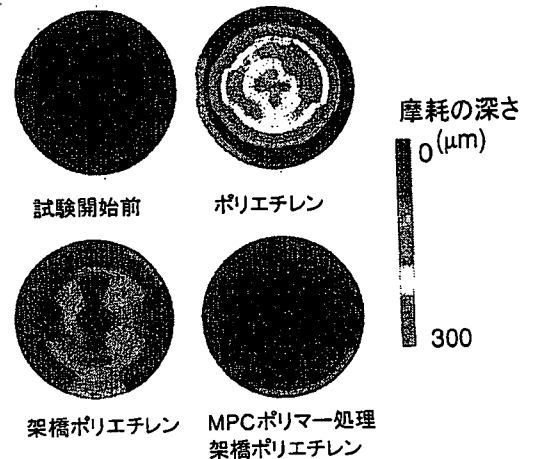


図5 表面荒さ測定による三次元解析結果