

一方、PMBV-PBNDはPVA1000との混和時にのみゲル形成を確認した。得られたMPCポリマーゲルを凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてゲル内部の微細構造を観察した。形成したMPCポリマーゲルはいずれも三次元構造を形成しており、そのネットワークサイズは約20 μm 前後であった(図3)。ポリマー溶解時の溶媒として純水、リン酸緩衝溶液(PBS)または細胞培養液を用いてゲル化の確認を行った。その結果、溶媒の種類に依存することなく、純水中でゲル化を確認できたポリマー組み合わせは全てゲル化できることを確認した。

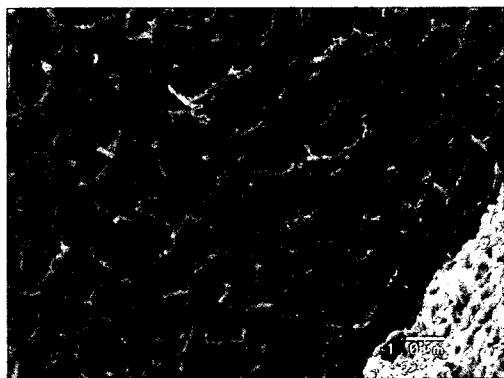


図3. MPCポリマーゲル断面のSEM像

2) ゲル調製の至適条件の決定

MPCポリマー(5 wt%)とPVA1000(5 wt%)との混合比を1:1または2:1として形成したMPCポリマーゲルをラット筋組織内に埋植した。埋植14日後にゲルを回収し、重量変化を測定することでゲル解離試験を行った。その結果、全てのゲルで解離による重量減少を認めた。混合比として2:1で形成したMPCポリマーゲルは14日間の埋植後において約40%が残存していることを確認した。

また、埋植領域における局所刺激性

評価、病理評価を行った。ラット大腿筋組織内にMPCポリマーゲルを留置して7日後の病理組織評価を行った。その結果、MPCポリマーゲルは筋線維間組織まで入り込んで存在しており、高い溶質透過性を有することがわかった。また、局所刺激性についても極めて低いことがわかった。異物反応として異物巨細胞の出現頻度について検討したところ、MPCポリマーゲルに対する出現頻度は極めて低く、生体親和特性に優れていることが見出された。

D. 考察

1) MPCポリマーの合成

当該年度は水溶性MPCポリマーの分子設計パラメーターとして組成および分子量に着目した。MPCポリマー組成としては親水性ユニットであるMPCを50 mol%以上含ませることで水溶性とすることに成功した。また、分子量制御についてはMPCポリマー合成時の重合開始剤の種類を検討した。AIBNを用いたMPCポリマー(PMBV-AIBN)は $M_n=34,000$ 、 $M_w=94,000$ であったのに対して、PBNDを用いたMPCポリマー(PMBV-PBND)は $M_n=12,000$ 、 $M_w=30,000$ であった。これらの結果、MPCポリマー合成時に水溶性を確保するためにはMPCユニットとして50 mol%以上、望ましくは60 mol%以上必要であることが判明した。重合開始剤の種類によって得られるポリマーの分子量を容易に制御することに成功した。これにより、MPCポリマーゲルを変形性関節症、骨折後の関節拘縮、外傷・手術後の組織癒着の治療法として臨床応用するために必要な基礎的検討のひとつ(MPCポリマー組成・MPCポリマー分子量)の制御を

満足したと考えられる。

2) ゲル調製の至適条件の決定

ポリオール化合物である PVA との混合による MPC ポリマーゲルは三次元ネットワーク構造を形成しており、癒合に必要なサイトカインをはじめとする液性因子の透過を妨げないことが期待できた。また、MPC ポリマーゲルは形成時の混合比を変化させることで力学特性に変化を持たせられること、および解離過程の制御が可能であることを見出した。

また、ラットへの埋植後、異物巨細胞の出現も認められずに極めて高い生体親和特性を有することが証明されたと考えられる。

今後の検討課題として、MPC ポリマーゲルの生体内からの排泄を考慮して、分子量の低い MPC ポリマーによるゲル化の最適化、より精査な *in vivo* 試験を行うことで MPC ポリマー構造の最適化と同時に本研究の目的である臨床応用に供するに必要な工学的パラメーターの制御基盤技術を確立することが必要と考えられる。

E. 結論

当該年度は MPC ポリマーの合成とゲル調製の至適条件の決定を中心に行った。ゲル形成能を有する MPC ポリマーを水溶性とするためには、MPC モノマーユニットとして 50 mol% 以上で満足することを見出した。また、重合開始剤の種類を最適化することで任意の分子量の MPC ポリマーを得ることができた。

ゲル調製の至適条件の検討は、解離特性を制御することに主眼を置き、PVA500 または PVA1000 との混合比によって制御できることを見出した。

予備試験として検討した MPC ポリ

マーゲルによるラットアキレス腱の癒合過程における癒着防止効果は極めて高く、本ゲルの癒着防止材としての効果を認めた。また、本ゲルに対する生体異物反応の惹起を抑制することに成功した。

当該年度の研究成果によって臨床応用するための基礎的検討項目を制御することができたと結論できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① 和文

1) 石原一彦: ナノバイオインターフェイス. *医療ナノテクノロジー—最先端医学とナノテクの融合—* 片岡一則監修, 杏林図書, p109-126, 2007.

2) 金野智浩、石原一彦: 細胞培養環境を可逆的に固体化するリン脂質ポリマーハイドロゲル. *医療用ゲルの最新技術と開発—バイオミメティックゲルの応用* 216-225, 2008.

② 英文

1) Kyomoto M, Iwasaki Y, Moro T, Konno T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: High lubricious surface of cobalt-chromium-molybdenum alloy prepared by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 28: 3121-3130, 2007.

2) Kimura M, Konno T, Takai M, Ishiyama N, Moro T, Ishihara K: Prevention of tissue adhesion by a spontaneously formed phospholipid

- polymer hydrogel. *Key Engineering Materials* 342-343: 777-780, 2007.
- 3) Konno T, Ishihara K. Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety. *Biomaterials* 28: 1770-1777, 2007.
 - 4) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Yamawaki N, Ishihara K: Effects of photo-induced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on physical properties of cross-linked polyethylene in artificial hip joints. *J Mater Sci Mater Med* 18: 1809-1815, 2007.
 - 5) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Yamawaki N, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of modified cross-linked polyethylene by grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *J Biomed Mater Res A* 82: 10-17, 2007.
 - 6) Choi J, Konno T, Takai M, and Ishihara K: Biocompatible phospholipid polymer hydrogel layer on metal surface for releasing bioactive agents. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 32(4): 1243-1246, 2007.
 - 7) Konno T, Ishihara K: Cell-Container prepared with cytocompatible phospholipid polymers for cell and tissue engineering. *ACS Symposium Series* 977, 336-345, 2007.
 - 8) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effect of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine concentration on photo-induced graft polymerization of polyethylene in reducing the wear of orthopaedic bearing surface. *J Biomed Mater Res A* in press.
 - 9) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Yamawaki N, Ishihara K: Effects of photo-induced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on physical properties of cross-linked polyethylene in artificial hip joints. *J Mater Sci Mater Med* in press.
 - 10) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of orthopaedic bearing due to the cross-linking of poly (MPC) graft chains induced by gamma-ray irradiation. *J Biomed Mater Res B* in press.
 - 11) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effects of mobility/immobility of surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on the durability of polyethylene for artificial joints. *J Biomed Mater Res A* in contribution.
 - 12) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Super-lubricious surface mimicking articular cartilage by grafting

- poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A* in contribution.
- 13) Liu G, Ogasawara T, Watanabe J, Ishihara K, Asawa Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* in contribution.
- 14) Choi J, Konno T, Matsuno R, Takai M, and Ishihara K: Surface immobilization of biocompatible phospholipid polymer multilayered hydrogel on titanium alloy. *Biomaterials* in contribution.
- 2.学会発表
- ① 国内学会
- 1) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、京本政之、山脇昇、山本基、荻田達郎、中村耕三、川口浩: ポリエチレン表面の MPC グラフト処理による長寿命型人工関節の開発—処理密度の制御と対摩耗効果—。第 80 回日本整形外科学会学術総会。神戸, 2007.5.24-27
- 2) 金野智浩、河手由美子、石原一彦: 細胞の活性を保持するシグナル解離性リン脂質ポリマーハイドロゲル。第 56 回高分子学会年次大会。京都, 2007.5.29-31
- 3) 金野智浩、石原一彦: 細胞培養環境を可逆的に固体化するリン脂質ポリマーゲル“セルコンテナ”。第 56 回高分子討論会。名古屋, 2007.9.19-21
- 4) 金野智浩、石原一彦: “リン脂質ポリマーハイドロゲル”セルコンテナ”による細胞保持技術。第 29 回日本バイオマテリアル学会大会。大阪, 2007.11.26-27
- 5) 京本政之、岩崎泰彦、茂呂徹、宮路史明、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 長寿命人工関節のためのリン脂質グラフとポリマーによる高潤滑性 Co-Cr-Mo 合金の創製。第 29 回日本バイオマテリアル学会大会。大阪, 2007.11.26-27
- 6) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、伊藤祥三、金野智浩、吉河美都奈、大山但、中村耕三、川口浩、石原一彦: 生体内解離性リン脂質ポリマーハイドロゲルによる組織癒着防止材の開発。第 29 回日本バイオマテリアル学会大会。大阪, 2007.11.26-27
- 7) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、京本政之、山本基、荻田達郎、伊藤英也、中村耕三、川口浩: 長寿命型人工股関節の開発—生体適合性ポリマーによるポリエチレンライナーのナノ表面処理—。第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会。東京, 2007.12.7-8
- 8) 京本政之、茂呂徹、宮路史明、上野勝、橋本雅美、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 高密度生体適合性リン脂質ポリマー表面による長寿命型人工関節。第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会。東京, 2007.12.7-8
- 9) 北野和彦、松野亮介、金野智浩、高井まどか、石原一彦: ナノ構造制

- 御したリン脂質ポリマーブラシのバイオ特性. **第18回日本MRS学術シンポジウム**. 東京, 2007.12.8
- 10) 京本政之、茂呂徹、宮路史明、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 超耐久性高潤滑インターフェイスの構築による長寿命型人工関節. **第56回高分子討論会**. 名古屋, 2008.3.2-5
- 11) 金野智浩、石原一彦: 常温・常圧で細胞機能を保持管理する自発形成一解離性高分子ハイドロゲル「セルコンテナ」. **第7回日本再生医療学会総会**. 名古屋, 2008.3.13-14
- ② 国際学会
- 1) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Ishihara K: High density grafting of nano-polymer makes ultra-longevity for artificial joints. **The 2007 Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition**. Chicago, USA, 2007.4.18-21
- 2) Ishihara K, Konno T: Cell recoverable polymer hydrogel matrix composed of phospholipid polymers. **7th International symposium on frontiers in biomedical polymers 2007 (FBPS2007)**. Ghent, Belgium, 2007.6.24-27
- 3) Ishihara K: Spontaneous forming hydrogels composed of phospholipid polymers for biomedical application. **7th international gel symposium**. Tokyo, 2007.8.6-8
- 4) Konno T, Ishihara K: Cell encapsulation hydrogel matrix "cell-container" prepared by spontaneous reversible gelation between water-soluble phospholipid polymer bearing phenylboronic acid moiety and polyols. **234th ACS National Meeting**. Boston, USA, 2007.8.19-23
- 5) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Nano-scale modification with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer brings to ultra-longevity for orthopaedic bearing. **3rd UHMWPE International Meeting**. Madrid, Spain, 2007.9.14-15
- 6) Konno T, Ishihara K: Cytocompatible phospholipid polymer hydrogel "cell-container" for reversible entrapment of stem cells. **45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs**. Osaka, 2007.10.28-31
- 7) Choi J, Konno T, Matsuno R, Takai M, and Ishihara K: Regulation of cell response by multilayered phospholipids polymer hydrogels capable of controlling bioactive agents release. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials)**. Tsukuba, 2007.12.6-8
- 8) Konno T, Ishihara K: Cytocompatible phospholipid polymer hydrogel "Cell-Container" for preservation of cells. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of**

- 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials).** Tsukuba, 2007.12.6-8
- 9) Ishihara K and Konno T: Cell Function Controllable Polymer Hydrogel System by Highly Cytocompatible Phospholipid Polymers. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials).** Tsukuba, 2007.12.6-8
- 10) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Ito S, Konno T, Yoshikawa M, Ohyama T, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible Anti-adhesion Effect of Biodissociated Phospholipid Polymer Hydrogel. **54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.** San Francisco, USA, 2008.3.2-5
- 11) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Yamawaki N, Ishihara K: Advanced wear resistance of MPC grafted surface with various phosphate density on cross-linked polyethylene. **54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.** San Francisco, USA, 2008.3.2-5
- 12) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Kyomoto M, Yamamoto M, Karita T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H: Advanced wear resistance of artificial hip joints by nano-scaled grafting with biocompatible phospholipid polymers. **54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.** San Francisco, USA, 2008.3.2-5
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称: 「組織癒着および関節拘縮防止材」
- 発明者: 石原一彦、金野智浩、茂呂徹、石山典幸、川口浩、中村耕三、大山但、吉河美都奈
- 出願番号: 特願 2007-303389
- 出願日: 平成 19 年 11 月 22 日

分担研究報告書

MPCポリマーゲル合成の至適条件の決定
— 性状変化と解離速度の検討 —

分担研究者 金野智浩（東京大学大学院工学系研究科 助教）

研究要旨：本研究の目的は、新しいマテリアル・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)ポリマーゲルの至適条件を検討することである。このため、今年度は MPC ポリマーゲルを構成する PMBV ポリマー溶液濃度を変化させ、生体内での経時的な性状変化と解離速度について検討した。

ラット皮下埋植モデルを用いた体内での経時的な性状変化と解離速度の検討では、MPC ポリマーゲルは、創傷治癒に必要とされる2週間の時間経過後も生体内環境下で一部は解離せずに残存することが明らかとなった。また、残存したゲルを観察すると、投与前のゲルと同様、組織修復に必要な液性因子の透過が期待できる蜂巢状の三次元微細構造を保持していることが明らかとなった。さらに、混合する PMBV 溶液の濃度により解離速度が制御できることも明らかとなった。生体内の湿潤環境下をもした PBS 内での解離速度を検討する実験においても同様の結果が得られており、MPC ポリマーゲルは使用方法に応じた解離速度をポリマー溶液濃度により調節でき、関節軟骨保護材や組織癒着防止材および関節潤滑材としての臨床応用が期待できることが明らかとなった。

以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうる結果と考えられる。

A. 研究目的

日本人の平均寿命は男性・女性共に世界一となっているが、運動器による意図的な身体活動が制限されているのであればQOLを保つことはできず、長寿とQOLの維持・改善の両立が求められている。支援や介護を要する高齢者の中で「関節疾患」・「骨折・転倒」の運動器疾患が原因となる要支援・軽度の要介護高齢者が多くを占めており、変形性関節症(OA)等の慢性疼痛による廃用症候群として徐々に自立喪失に陥る場合と、骨折等の外傷や手術、その後の関節拘縮・組織癒着により急激に自立喪失に陥る場合

がある。そこで我々はこれらの問題の解決のための新規治療法として、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮する高分子材料・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)を用いた生体内解離性ハイドロゲル(MPCポリマーゲル)を創出した。MPCポリマーゲルは、MPC・メタクリル酸・ブチルメタクリレート・ビニルフェニルボロン酸の共重合体(PMBV)溶液(A液)とポリビニルアルコール(PVA)溶液(B液)を混合して形成するものである。MPCポリマーは生体細胞膜類似構造を有するため生体親和性も高く、様々な医療材料に臨床応用されてい

る。また、今回の MPC ポリマーゲルは、ナノメートル単位の小孔を持つ蜂巢状の三次元微細構造を有するため、組織の修復に必要な液性因子の透過が期待できる一方、表面へのタンパク吸着や細胞接着を抑制するため拘縮・癒着防止効果も期待できる。さらにこのゲルは、生体内で A 液と B 液の 2 剤に解離する。これらの性質は運動器疾患の新規治療法への応用を考えた場合、優れた特質といえる。

一方、疾患治療方法への応用を考えた場合、疾患や投与部位により、様々な解離速度を求められることとなる。たとえば関節軟骨保護効果を発揮するためには生体内で長期間解離しない必要あり、癒着防止効果を発揮するためには組織修復が進んだ時点で解離することが望ましい。そこで、本研究では、MPC ポリマーゲルを臨床応用するため、ラットの皮下とリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 内での性状維持期間および解離速度を検討した。

B. 研究方法

1) ラット背部皮下での性状変化の観察による合成条件の検討

MPC ポリマーゲルを構成する、MPC ポリマー・メタクリル酸[?]・ブチルメタクリレート・ビニルフェニルボロン酸の共重合体 (PMBV) ポリマーの溶液濃度を変化させて、至適 MPC ポリマーゲル合成条件を検討した。PMBV 溶液はポリビニルアルコール (PVA) 溶液と混合すると、ゲル化して MPC ポリマーゲルを形成する。今回の研究では、表 1、図 1 に示す、3 種類の PMBV/PVA 濃度の組合せを用いた。

No.	PMBV (%)	PVA (%)
1	2.5	2.5
2	5.0	2.5
3	5.0	5.0

表 1 実験に用いた溶液濃度の組み合わせ

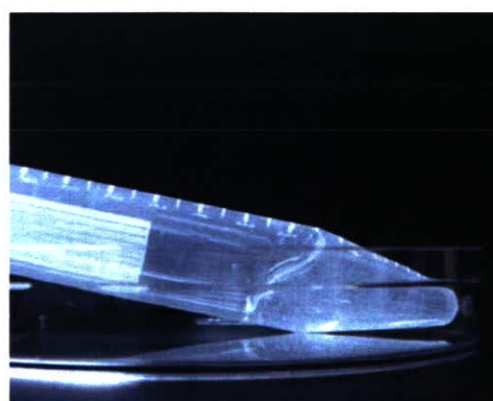


図 1-a. MPC ポリマーゲル (2.5:2.5)



図 1-b. MPC ポリマーゲル (5.0:2.5)

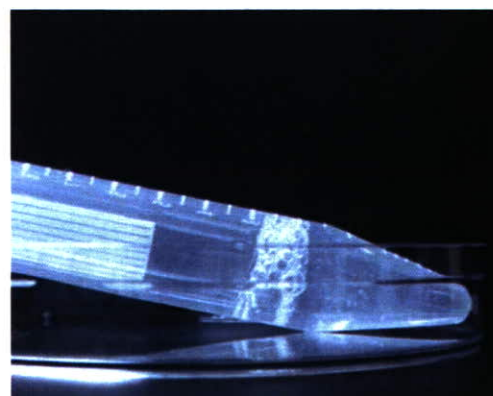


図 1-c. MPC ポリマーゲル (5.0:5.0)

ラットを用いた解離速度および微細構造変化の検討を行うため、まず、チャンバーを用意した(図2)。これは14 mm 径、2 mm 厚のプラスチックリングの両面に、体液の交通が許される孔径0.22 μm の多孔性メチルセルロース膜を貼付したものであり、ゲルが解離して水溶液に戻ると小孔からチャンバー外へ漏出することとなる。

上記3種類のMPCポリマーゲルをそれぞれチャンバー内に封入し、濃度ごとに別々のラット背部の皮下へ埋植する手術を行なった(n=3)。術後1週および2週でチャンバーを摘出してゲルを回収し、表面の肉眼性状の観察、走査型電子顕微鏡(SEM)による微細構造の観察を行なった。



図2. チャンバー

2) PBS 内での重量変化率の測定による解離速度の検討

解離速度を検討するため、水性媒体としてPBS(pH=7.4)を選択した。上記3種類のMPCポリマーゲル(表1)を上記1)と同様のチャンバーに封入し、細胞培養dishにいったPBS 32 ml 内に浸漬した(n=6)。PBSは

37 $^{\circ}\text{C}$ で持続震盪し、24 時間ごとに交換した(図3)。

経時的(1日、3日、7日、14日後)に各チャンバー(n=6)の重量を測定し、重量減少率を解析することで解離速度の評価を行い、統計学的に検討した。



図3. PBS 内のチャンバー

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) ラット背部皮下での性状変化の観察による合成条件の検討

図4に、術後1週および2週におけるゲルの写真を示す。肉眼の観察では、各群のMPCポリマーゲルとも経時的に体積が減少したものの、ゲルとしての固体状態であることが確認された。また、PMBV溶液濃度が高いゲルほど体積変化が小さく、解離速度が低いと考えられた。



図 4-a. 2.5:2.5 (1 W)



図 4-b. 5.0:2.5 (1 W)



図 4-c. 5.0:5.0 (1 W)

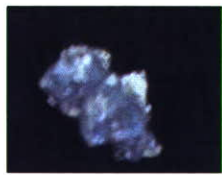


図 4-c. 2.5:2.5 (2 W)

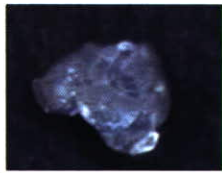


図 4-e. 5.0:2.5 (2 W)

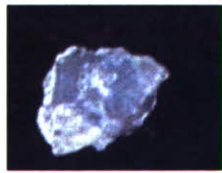


図 4-f. 5.0:5.0 (2 W)

図 5 に、術後 1 週および 2 週における SEM の写真を示す。SEM による観察では、術後 1 週および 2 週においてもナノメートル単位の小孔を有する蜂巢状の三次元構造を保持しており、微細構造に大きな変化はみられなかった。

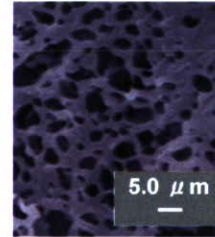


図 5-a. 2.5:2.5 (2 W)

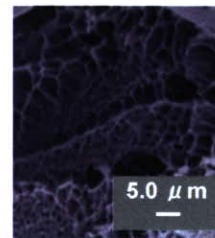


図 5-b. 5.0:2.5 (2 W)

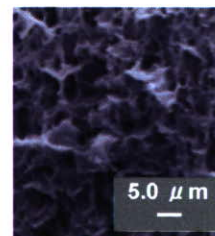


図 5-c. 5.0:5.0 (2 W)

2) PBS 内での重量変化の測定による 解離速度の検討

図 6、図 7 に MPC ポリマーゲルの経時的な重量減少率の結果を示す。いずれのゲルも経時的に重量が減少し、解離が進んでいることが示された。2 週目では 30~40%程度の減少がみられたが、溶液濃度が高い

ゲルほど解離速度は低値であった。特に、PMBV:PVA[%]=2.5:2.5 のゲルに対し、PMBV:PVA[%]=5.0:5.0 のゲルは測定の時点で有意 (P<0.05) に重量減少率が小さく、解離速度が低速であり、濃度依存性がみられた。

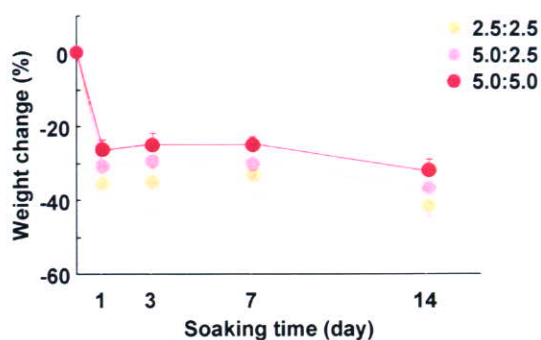


図 6. PBS 内での重量減少率

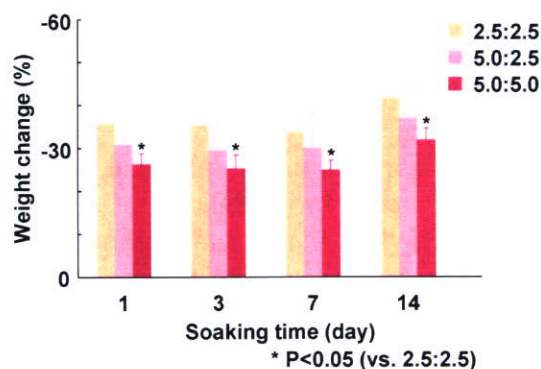


図 7. 重量減少率の統計学的解析
* P<0.05 (vs. 2.5:2.5)

D. 考察

今年度の本研究では、MPC ポリマーゲルの至適合成条件を検討するため、生体内での性状変化と解離速度について検討を行った。

ラットの皮下埋植モデルを用いた検討では、MPC ポリマーゲルは、創傷治癒に必要なとされる2週間の時間経過後も生体内環境下で一部は解離せずに残存することが明らかとなった。また、残存したゲルを観察すると、投

与前のゲルと同様、組織修復に必要な液性因子の透過が期待できる蜂巢状の三次元微細構造を保持していることが明らかとなった。さらに、混合する PMBV 溶液の濃度により解離速度が制御できることも明らかとなった。生体内の湿潤環境下をもした PBS 内での解離速度を検討する実験においても同様の結果が得られており、MPC ポリマーゲルは使用方法に応じた解離速度をポリマー溶液濃度により調節でき、関節軟骨保護材や組織癒着防止材および関節潤滑材としての臨床応用が期待できると考えられた (特願 2007-303389)。なお、次年度以降も本研究の評価方法を利用した至適合成条件の検討を、PMBV ポリマー濃度、PVA との混合比等に変更を加えて継続する予定である。また、分担研究者らの関節機能改善材、組織癒着防止材等への応用研究に至適条件で合成したゲルを提供し、その結果からさらに至適な条件を検索するなど、新規運動疾患治療法の開発に向け、よりいっそう連携を深めていく予定である。

E. 結論

今年度の研究により、MPC ポリマーゲルはその構成要素である PMBV の濃度により解離速度の制御が可能であることが明らかとなった。以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうる結果と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

① 和文

1) 金野智浩、石原一彦: 細胞培養環

境を可逆的に固体化するリン脂質ポリマーハイドロゲル. *医療用ゲルの最新技術と開発—バイオミメティックゲルの応用* 216-225, 2008.

② 英文

- 1) Kyomoto M, Iwasaki Y, Moro T, Konno T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: High lubricious surface of cobalt-chromium-molybdenum alloy prepared by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 28: 3121-3130, 2007.
- 2) Kimura M, Konno T, Takai M, Ishiyama N, Moro T, Ishihara K: Prevention of tissue adhesion by a spontaneously formed phospholipid polymer hydrogel. *Key Engineering Materials* 342-343: 777-780, 2007.
- 3) Konno T, Ishihara K. Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety. *Biomaterials* 28: 1770-1777, 2007.
- 4) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Yamawaki N, Ishihara K: Effects of photo-induced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on physical properties of cross-linked polyethylene in artificial hip joints. *J Mater Sci Mater Med* 18: 1809-1815, 2007.
- 5) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Yamawaki N, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of modified cross-linked polyethylene by grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *J Biomed Mater Res A* 82: 10-17, 2007.
- 6) Choi J, Konno T, Takai M, and Ishihara K: Biocompatible phospholipid polymer hydrogel layer on metal surface for releasing bioactive agents. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 32(4): 1243-1246, 2007.
- 7) Konno T, Ishihara K: Cell-Container prepared with cytocompatible phospholipid polymers for cell and tissue engineering. *ACS Symposium Series* 977, 336-345, 2007.
- 8) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Yamawaki N, Ishihara K: Effects of photo-induced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on physical properties of cross-linked polyethylene in artificial hip joints. *J Mater Sci Mater Med* in press.
- 9) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of orthopaedic bearing due to the cross-linking of poly (MPC) graft chains induced by gamma-ray irradiation. *J Biomed Mater Res B* in press.
- 10) Choi J, Konno T, Matsuno R, Takai M, and Ishihara K: Surface immobilization of biocompatible phospholipid polymer multilayered hydrogel on titanium alloy. *Biomaterials* in contribution.

2.学会発表

① 国内学会

- 1) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、京本政之、山脇昇、山本基、苅田達郎、中村耕三、川口浩: ポリエチレン表面の MPC グラフト処理による長寿命型人工関節の開発—処理密度の制御と対摩耗効果—. **第80回日本整形外科学会学術総会**. 神戸, 2007.5.24-27
- 2) 金野智浩、河手由美子、石原一彦: 細胞の活性を保持するシグナル解離性リン脂質ポリマーハイドロゲル. **第56回高分子学会年次大会**. 京都, 2007.5.29-31
- 3) 金野智浩、石原一彦: 細胞培養環境を可逆的に固体化するリン脂質ポリマーゲル“セルコンテナ”. **第56回高分子討論会**. 名古屋, 2007.9.19-21
- 4) 金野智浩、石原一彦: リン脂質ポリマーハイドロゲル”セルコンテナ”による細胞保持技術. **第29回日本バイオマテリアル学会大会**. 大阪, 2007.11.26-27
- 5) 京本政之、岩崎泰彦、茂呂徹、宮路史明、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 長寿命人工関節のためのリン脂質グラフとポリマーによる高潤滑性 Co-Cr-Mo 合金の創製. **第29回日本バイオマテリアル学会大会**. 大阪, 2007.11.26-27
- 6) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、伊藤祥三、金野智浩、吉河美都奈、大山但、中村耕三、川口浩、石原一彦: 生体内解離性リ

ン脂質ポリマーハイドロゲルによる組織癒着防止材の開発. **第29回日本バイオマテリアル学会大会**. 大阪, 2007.11.26-27

- 7) 北野和彦、松野亮介、金野智浩、高井まどか、石原一彦: ナノ構造制御したリン脂質ポリマーブラシのバイオ特性. **第18回日本MRS学術シンポジウム**. 東京, 2007.12.8
- 8) 京本政之、茂呂徹、宮路史明、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 超耐久性高潤滑インターフェイスの構築による長寿命型人工関節. **第56回高分子討論会**. 名古屋, 2008.3.2-5
- 9) 金野智浩、石原一彦: 常温・常圧で細胞機能を保持管理する自発形成—解離性高分子ハイドロゲル「セルコンテナ」. **第7回日本再生医療学会総会**. 名古屋, 2008.3.13-14

② 国際学会

- 1) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Ishihara K: High density grafting of nano-polymer makes ultra-longevity for artificial joints. **The 2007 Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition**. Chicago, USA, 2007.4.18-21
- 2) Ishihara K, Konno T: Cell recoverable polymer hydrogel matrix composed of phospholipid polymers. **7th International symposium on frontiers in biomedical polymers 2007 (FBPS2007)**. Ghent, Belgium, 2007.6.24-27

- 3) Konno T, Ishihara K: Cell encapsulation hydrogel matrix "cell-container" prepared by spontaneous reversible gelation between water-soluble phospholipid polymer bearing phenylboronic acid moiety and polyols. **234th ACS National Meeting**. Boston, USA, 2007.8.19-23
- 4) Konno T, Ishihara K: Cytocompatible phospholipid polymer hydrogel "cell-container" for reversible entrapment of stem cells. **45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs**. Osaka, 2007.10.28-31
- 5) Choi J, Konno T, Matsuno R, Takai M, and Ishihara K: Regulation of cell response by multilayered phospholipids polymer hydrogels capable of controlling bioactive agents release. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials)**. Tsukuba, 2007.12.6-8
- 6) Konno T, Ishihara K: Cytocompatible phospholipid polymer hydrogel "Cell-Container" for preservation of cells. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials)**. Tsukuba, 2007.12.6-8
- 7) Ishihara K and Konno T: Cell Function Controllable Polymer Hydrogel System by Highly Cytocompatible Phospholipid Polymers. **1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials)**. Tsukuba, 2007.12.6-8
- 8) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Ito S, Konno T, Yoshikawa M, Ohyama T, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible Anti-adhesion Effect of Biodissociated Phospholipid Polymer Hydrogel. **54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**. San Francisco, USA, 2008.3.2-5
- 9) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Yamawaki N, Ishihara K: Advanced wear resistance of MPC grafted surface with various phosphate density on cross-linked polyethylene. **54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**. San Francisco, USA, 2008.3.2-5
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称: 「組織癒着および関節拘縮防止材」
 発明者: 石原一彦、金野智浩、茂呂徹、石山典幸、川口浩、中村耕三、大山但、吉河美都奈
 出願番号: 特願 2007-303389
 出願日: 平成 19 年 11 月 22 日

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

マウス変形性関節症（OA）モデルを用いた関節潤滑機構改善効果の検討

分担研究者 高取吉雄（東京大学大学院医学系研究科 特任教授）
茂呂 徹（東京大学大学院医学系研究科 特任准教授）

研究要旨：我々は、高齢者の自立喪失の原因となる運動器疾患の克服を目指し、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮するリン脂質材料・

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine を用いた生体内解離性ハイドロゲル（MPC ポリマーゲル）を創出した。本研究では、関節軟骨表面にナノメートル単位のリン脂質層があり、軟骨表面の保護と関節の潤滑機構の改善に寄与することに着目し、生体内で安全かつ安定に長期間効果を発揮するリン脂質を投与すれば関節機能を改善できると考え、この新しいマテリアルを関節内投与剤として臨床応用するための基礎検討を行った。

今年度の研究では、まず Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用いた検討を行い、MPC ポリマーゲルの投与により関節面の静摩擦係数、動摩擦係数がともに改善すること、これらの効果は添加剤の投与により影響を受けないこと、を明らかにした。また、関節機能改善剤の効果判定方法としては、本研究で使用する C57Black/6J マウスを用い、関節の半月板切除と靭帯切離を組み合わせることにより重傷度が異なる 4 種類の OA を再現するマウス変形性関節症（OA）モデルを確立し、MPC ポリマーゲルを用いた検討を開始した。

以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうるものであり、MPC ポリマーゲルの関節機能改善剤としての臨床応用が期待できる。

A. 研究目的

医療の進歩と生活環境基盤の整備により日本は世界に例を見ない高齢社会となったが、支援や介護を要する高齢者が急激に増加傾向を示してきており、長寿と生活の質（QOL）の維持・改善の両立が求められている。高齢者が自立喪失に陥っていく過程は二分される。一つは、変形性関節症等の慢性疼痛による廃用症候群として徐々に自立喪失に陥る例、もう一つは骨折等の外傷や手術、その後の関節拘縮・組織癒着により急激に自立喪失に

陥る例である。我々はこの問題の解決のための新規治療法として、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮する高分子材料・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine を用いた生体内解離性ハイドロゲル（MPC ポリマーゲル）を創出した。これは、MPC とブチルメタクリレート、ビニルフェニルポロン酸の共重合体を組み合わせたもので、1) 患部・術野にあわせて瞬時に成形できること、2) ナノ単位の小孔を有する三次元構造からなり液性因子の透過を妨げないこと、3) 表面に

細胞の接着が起きないため癒着する可能性が少ないこと、4) 生体の異物反応を惹起しないこと、5) 潤滑性に優れること、6) 生体内の解離速度を制御可能であること、が判明している (Biomaterials 26:6853,2005)。本研究の目的は、この MPC ポリマーゲルを変形性関節症治療のための関節内注射剤として臨床応用するために必要な基礎的検討を完成させることである (図 1)。今年度は、まず、Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用い、MPC ポリマーが関節面の摩擦に与える影響を検討した。また、MPC ポリマーゲルの関節機能改善効果を判定するための、マウス変形性関節症 (OA) モデルを確立し、分担研究者の石原らが至適合成条件で作製した MPC ポリマーゲルを用いた検討を開始した。

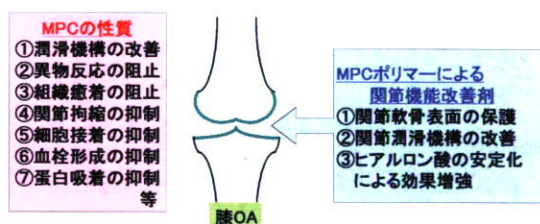


図 1. MPC ポリマーの性質と期待される効果

B. 研究方法

1) 摩擦試験

MPC ポリマーもしくはヒアルロン酸 (HA) を添加した潤滑液を用いたときの摩擦係数について、Ball-on-Flat 型摩擦試験機 (Tribostation 32, 新東科学 (株)) により評価した (図 2)。すべり速度 50 mm/min、すべり距離 25 mm、荷重 0.98 N、運動周波数は 1 Hz とし、潤滑液には蒸留水 (室温) を用いた。また、Ball にはコバルトクロム (Co-Cr) 合金、Flat にはシリコーン系ウレタン (Silicone polyether urethane)

を用いた。使用した潤滑液を下記の表 1 に示す。摩擦係数は、摺動回数 100 回時点の値を求めた。

No.	潤滑液
1	蒸留水
2	5% PMPC 水溶液 (日本油脂)
3	5% MPC ポリマー水溶液 : 1% ヒアルロン酸ナトリウム水溶液 = 80 : 20 (v/v)

表 1 試験に用いた潤滑液



図 2. Ball-on-Flat 摩擦試験機

2) マウス変形性関節症モデルにおける検討

マウスは C57Black/6J マウス (8 週齢・オス・18-22 g) を使用した。マウスの全身麻酔には、pentobarbiturate (0.5 mg/ 10 g body weight, Sigma, St. Louis, Missouri) の腹腔内注射を用いた。手術には微小外科技術・微小外科 (マイクロサージャリー) 用顕微鏡を使用した。

膝関節の半月板切除と靭帯切離の組み合わせを図 2 に示す。今年度はまず Medial model の検討を行った。右膝関節を正中縦切開によって前方より展開し、膝蓋靭帯を切離した。関節内に進入し、前十字靭帯 (ACL)、後十字靭帯 (PCL)、外側側副靭帯 (LCL) を温存し、内側側副靭帯 (MCL) の切離を行った。また、外側半月板 (LM) を温存し、内側半月板 (MM) の切除

を行った。関節内を洗浄した後、皮膚縫合した。手術中は関節軟骨を損傷せぬよう、十分に注意した。左膝関節については皮膚切開のみを行い、Sham手術とした。手術後マウスはゲージ内を自由に運動できるようにした。下記 a)、b) の検討を行った。

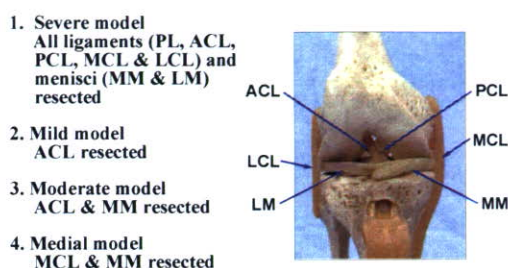


図 3. マウス変形性関節症モデル

a) X線撮影

マウスの膝関節の X 線撮影は、術後 0, 2, 4, 8 週において全身麻酔下に行った。膝関節の正面像、側面像を撮影した (CMB-2 ソフテックス株式会社)。撮影条件は、電圧 35 kV、電流 3.0 mA、時間 90 秒、撮影距離 65 cm として、工業用フィルム IX FR (富士フィルム) を使用した。

b) 組織学的解析

組織学的解析のためにマウスは 2, 4, 8 週で安楽死させた。固定液 (リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド、pH 7.4) を用いて灌流固定し、膝関節を一塊として摘出した後、固定液で 4°C にて 4 時間浸漬固定した。検体は脱灰液 (10% ethylene-diamine tetraacetic acid; EDTA; pH 7.4) に浸漬し、4°C にて 2 週間脱灰を行った。その後エタノールにて脱灰し、キシレンにて透徹した後、パラフィン・ブロックはマイクロトームを用いて、4 μm の厚さで薄切し、シリコンコーティング・スライド

に載せ乾燥させた。その後、冠状断で脛骨内側の関節軟骨をすべて薄切し、連続切片とした。組織切片はキシレンにて脱パラフィン後エタノール置換して親水化し、Hematoxilin・Eosin (HE) 染色、Safranin O 染色を行った。

(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」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

1) 摩擦試験

図 4 及び図 5 に、静摩擦係数および動摩擦係数を示す。

MPC ポリマー水溶液単剤の静摩擦係数は 0.381 ± 0.019 、MPC ポリマー水溶液 + ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の静摩擦係数は 0.385 ± 0.079 であり、潤滑液に蒸留水を用いた際の静摩擦係数 0.465 ± 0.036 と比し、改善傾向がみられた。

また、MPC ポリマー水溶液単剤の動摩擦係数は 0.164 ± 0.012 、MPC ポリマー水溶液 + ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の動摩擦係数は 0.165 ± 0.017 であり、潤滑液に蒸留水を用いた際の動摩擦係数 0.253 ± 0.004 と比し、約 40% 改善していた。

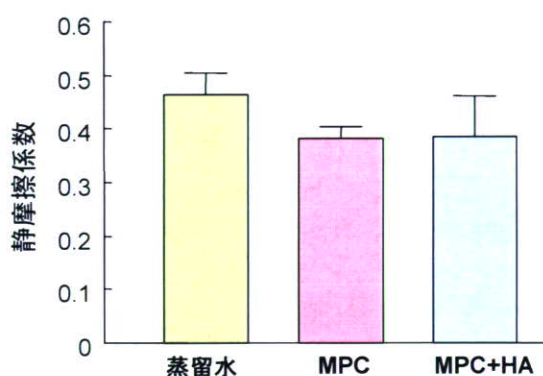


図 4. 静摩擦係数

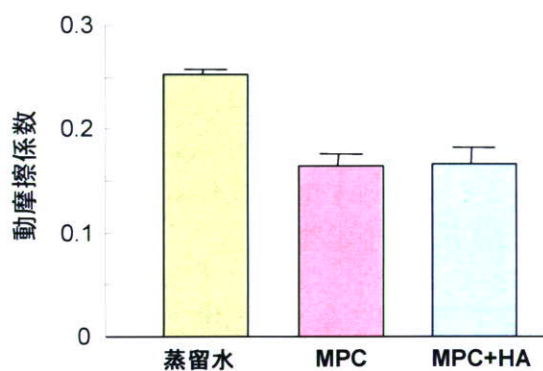


図 5. 動摩擦係数



図 6. 術後 8 週の X 線像

b) 組織学的解析

図 7 に術後 8 週の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色像を、図 8 に術後 8 週 Safranin O 染色像を示す。

Sham 手術を行った膝関節軟骨は滑らかな表面を保ち、染色性は均一で、基質の破壊像や欠損像はみられなかった。関節軟骨の superficial zone では、扁平な軟骨細胞が関節表面と平行して配列して 2 ないし 3 層を形成していた。Tidemark よりも表層の middle zone では円形の軟骨細胞が柱状配列を形成していた。これらの組織学的所見は、手術侵襲を加えていない正常膝関節軟骨のものと同様であった。一方、Medial model では術後 2~4 週で軟骨細胞の分裂像と大型化が観察され、術後 8 週では軟骨破壊が middle zone に及んでおり、ヒトの初期変形性関節症 (OA) にきわめて近い病像を呈していた。

2) マウス変形性関節症モデルにおける検討

a) X 線撮影

図 6 に術後 8 週の X 線像を示す。Medial model では術後 4 週までに変形性関節症様の変化はみられなかったが、術後 8 週において関節適合性の低下と軟骨下骨硬化像が観察された。

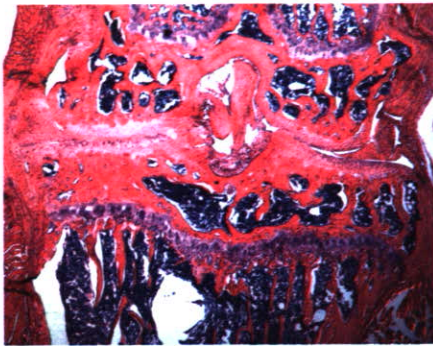


図 7-1 術後 8 週の HE 染色像
(弱拡大)

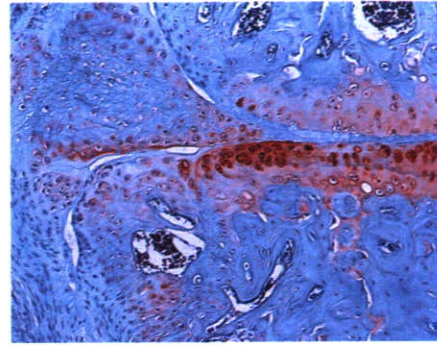


図 8-2 術後 8 週の Safranin O
染色像 (強拡大)

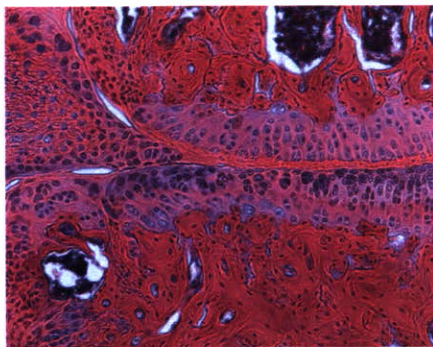


図 7-2 術後 8 週の HE 染色像
(強拡大)

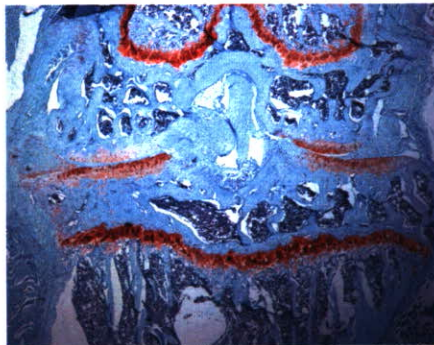


図 8-1 術後 8 週の Safranin O
染色像 (弱拡大)

D. 考察

現在、変形性関節症の治療では、ヒアルロン酸 (HA) 製剤の関節内注射が汎用されているが、申請者らは関節液の主成分であるヒアルロン酸 (HA) 製剤の研究開発・臨床試験を行い実用化している (薬理と治療 22:267,1994)。この治療法は汎用される一方で、長期の効果を得ることが難しい、OA が進行した症例や高齢者ではその効果は少ないという問題点が指摘されている。これらの問題は、1) 正常関節液中の HA の平均分子量は 500~1000 万であるにもかかわらず、実用化されている HA 製剤の平均分子量が 90 万と 190 万の 2 種類のみであること、2) HA の生体内での半減期が 20 時間であること、3) HA を摩擦環境下に置くと早期に低分子化し効果を失うこと、に起因する。したがって、国内外で HA の高分子化が試みられているが、急性炎症など投与時反応が大きいことが指摘されている。我々は、関節軟骨表面にナノメートル単位のリン脂質層があり、軟骨表面の保護と関節の潤滑機構の改善に寄与することに着目し、生体内で安全かつ安定に長期間効果を発揮するリン脂質を投与すれば効果を発揮できると考え今回の研究を創案した。本研究では、MPC ポリマー自

体による軟骨表面の保護、関節潤滑機構の改善とともに、MPC ポリマーの多糖、タンパク質の保護作用によるHAの安定化・効果発現時間の延長も期待できる。

今年度の検討により、MPC ポリマーゲルの投与により関節面の静摩擦係数、動摩擦係数がともに改善すること、その効果は添加剤を加えても影響を受けないこと、が明らかとなった。来年度以降は、分担研究者の石原らが確立した至適合成条件の結果を応用するとともに、ポリマーゲル濃度、ヒアルロン酸ナトリウムとの混合比等についても検討を加える予定である。また、Ball-on-Flat 型摩擦試験機の試験条件もかえ、ヒアルロン酸の安定化についても検討を加える予定である。

関節機能改善剤の効果判定方法としては、本研究で使用するC57Black/6Jマウスを用いマウス変形性関節症

(OA) モデルを確立し、MPC ポリマーゲルを用いた検討を開始した。来年度以降も、Medial model、Severe model、Moderate model、Mild model の4種のモデルを用い、MPC ポリマーゲルの有効性を検討する予定である。

E. 結論

今年度の研究により、MPC ポリマーゲルの投与により関節面の静摩擦係数、動摩擦係数がともに改善することが明らかとなった。また、本研究で使用するマウスを用いて変形性関節症(OA)モデルを確立し、関節機能改善剤としての効果の検討を開始した。以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうるものであり、MPC ポリマーゲルの関節機能改善剤としての臨床応用が期待できる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① 和文

1) 茂呂徹: 人工臓器. *医療ナノテクノロジー—最先端医学とナノテクノロジーの融合*—片岡一則監修, 杏林図書, p139-146, 2007.

② 英文

1) Kyomoto M, Iwasaki Y, Moro T, Konno T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: High lubricious surface of cobalt-chromium-molybdenum alloy prepared by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 28: 3121-3130, 2007.

2) Kimura M, Konno T, Takai M, Ishiyama N, Moro T, Ishihara K: Prevention of tissue adhesion by a spontaneously formed phospholipid polymer hydrogel. *Key Engineering Materials* 342-343: 777-780, 2007.

3) Ikeda T, Saito T, Ushita M, Yano F, Kan A, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI: Identification and characterization of the human SOX6 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 383-390, 2007.

4) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Yamawaki N, Ishihara K: Effects of photo-induced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on physical properties of cross-linked polyethylene in artificial hip joints. *J*