

200921006B

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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

総合研究報告書

研究代表者 川口浩

平成22(2010)年 4月

## 目次

I.	総合研究報告 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 川口浩	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	213
III.	研究成果の刊行物・別刷	219

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

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

研究代表者 川口浩（東京大学医学部附属病院 准教授）

研究要旨：生体適合性高分子材料 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを用いた生体内解離性ハイドロゲル (MPC ポリマーゲル) による新規運動器疾患治療法を開発するため、① MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定、② 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、③ 屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討、④ マウス骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討、⑤ ラット脊椎椎弓切除モデルを用いた神経・硬膜外癒着防止効果の検討、を行った。

MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定では、MPC ポリマーユニットの比率や体外排泄を考慮した分子量、至適混合濃度等を検討した。また、MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果発生メカニズムを検討し、MPC ポリマーゲルはゲル内への細胞の移動性を抑制し、これによって線維芽細胞が癒着形成に働かず、組織癒着が防止されること、MPC ポリマーゲルは細胞の生存性に影響せず、生体内適合性が高いことを明らかにした。

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では、まず摩擦試験機を用いて静摩擦係数・動摩擦係数を経時的に検討し、至適条件の絞り込みを行った。また、これらをマウス変形性膝関節症 (OA) モデルに用いて検討し、関節面の潤滑機構の改善と保護を達成することを明らかにした。

屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討では、まずラットアキレス腱損傷モデルを確立し、MPC ポリマーゲルが効果を発揮するための至適混合条件の絞り込みを行った。また、ウサギ趾腱損傷モデルを確立し、このモデルを用いて腱癒着・治癒の評価を経時的・定量的に行い、MPC ポリマーゲルが腱の治癒を妨げることなく、効率的に腱癒着を防止することを明らかにした。

マウス骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討では、まず大腿骨骨折モデルの評価系を確立した。さらに、この系に MPC ポリマーゲルを用い、ゲルの被覆により骨折部周囲の癒着抑制による関節拘縮防止と骨折部の骨癒合が両立すること、術後 3 週での関節固定解除時にはゲルが消失しており、関節可動域訓練に影響しないことが期待できること、を明らかにした。

椎弓切除モデルを用いた硬膜周囲癒着防止効果の検討では、まずラット脊椎硬膜外癒着モデルの評価系を確立した。さらにこの系に MPC ポリマーゲルを用い、このゲルが脊椎硬膜周囲の癒着形成を抑制し、癒着を防止すること、ラットの神経を傷害しないこと、を明らかにした。

以上の研究成果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法を開発を推進しうるものであり、その臨床応用が期待できる内容であった。

## 研究分担者

石原一彦	(東京大学大学院工学系研究科 教授)
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)
三浦俊樹	(東京大学医学部附属病院 助教)
金野智浩	(東京大学大学院工学系研究科 特任准教授)

### A. 研究目的

わが国における医療の進歩と生活環境基盤の整備により長寿社会が達成されつつある一方で、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いる。この傾向は全世界でみられ、2000年にWHOが「運動器の10年」の世界運動を発足させるなど、支援や介護の原因となる運動器疾患を克服し、終生健やかに身体を動かすことができる生活の質(QOL)が保証される社会の実現を目指す気運が高まっている。実際にわが国においては、高齢者の要支援・軽度の要介護の原因には運動器疾患が多くを占めており、運動器疾患対策を充実させれば自立を保てるはずの高齢者が、現実には自立喪失に陥っている。そこで我々は、この原因となる変形性関節症、外傷・骨折後の関節拘縮と組織癒着の新規治療法として、

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマー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、ビニルフェニルボ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型できること、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。

本研究の目的は、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を完成させることである。この目的で① MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定、② 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、③ 屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討、④ マウス骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討、⑤ ラット脊椎椎弓切除モデルを用いた神経・硬膜外癒着防止効果の検討、を行った。

### B. 研究方法

#### ① MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定

(分担研究者 石原一彦・高取吉雄  
・三浦俊樹・金野智浩)

#### 1. ポリマー分子構造の規格化

##### 1) 分子量分画を規定した低分子量 MPC ポリマーの合成

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)、*n*-ブチルメタクリレート(BMA)、*p*-ビニルフェニルボロン酸(VPBA)からなる水溶性 MPC ポリマーを合成した。合成時のモノマー組成、ポリマーの分子量、分子量分布を制御した。重合開始剤として $\alpha,\alpha'$ -アゾビスイソブチロニトリル

(AIBN)、*t*-ブチルパーオキシネオデカノエート(PBND)を用いた。合成後の精製過程において透析法、限外ろ過法を採用し、種々の分子組成、分子量分布を有するポリマーを合成した。

## 2) ポリビニルアルコールの分子量制御

重合度 200 および 300 のポリビニルアルコール(PVA)を用いた MPC ポリマーゲルを創製するために、PVA の分子量分布を制御した。限外ろ過法の適用により、重合度 200 の PVA 中から低分子量画分を除去し、これを用いて MPC ポリマーゲルの形成至適条件を検討した。

## 3) MPC ポリマーゲルの形成および解離

フェニルボロン酸基を 10mol% 有する MPC ポリマーと重合度 200 の PVA からなる MPC ポリマーゲルを調製した。この際に、MPC ポリマーの分子量、分子組成、PVA の重合度（分子量）および分布に留意した。形成した MPC ポリマーゲルの解離特性について溶液中での重量変化測定、および生体内に埋植後の残存性から評価した。

## 2. 性状変化と解離速度の検討

### 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・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。

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、体液の交通が許されるメチルセルロース膜を貼付したチャンバーの中に MPC ポ

リマーゲルを封入し、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、2 週でチャンバーを摘出してゲルを回収し、その肉眼性状の観察、走査型電子顕微鏡 (SEM) による微細構造の観察を行なった。

### 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、MPC ポリマーゲルを上記 1) と同様のチャンバーに封入し、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 内に浸漬した (n=6)。PBS は 37 °C で持続震盪した。経時的 (1 日、3 日、7 日、14 日後) に各チャンバーの重量を測定し、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。

### 3) 細胞実験における対象細胞種の選択・培養条件

組織癒着に働く主な細胞・線維芽細胞のマウス細胞株である NIH3T3 細胞を使用して検討を行った。培養条件は、37 °C および 5% CO<sub>2</sub> とし、培養液は、DMEM に 10% FBS および 1% ペニシリン $\square$ ストレプトマイシンを混合したものを使用した。

### 4) MPC ポリマーゲルの細胞移動性への影響の検討

MPC ポリマーゲルがゲル内への細胞の移動を抑制することによって癒着の形成を防止している可能性を確認するため、細胞移動モデルを確立した。これは、2 層性の細胞培養ディッシュを使用し、上層に細胞培養液における FBS を 10% から 2% に変更した培養液の細胞懸濁液 (5000 cells/well) を、下層には前述の細胞培養液をそのまま入れることで低栄養状態となった細胞を上層から下層へ誘導する細胞

培養系である。

上層と下層を分離する細胞接着膜に多数開存している小孔は、細胞が通行できる  $8.0\ \mu\text{m}$  径のものを使用した。24 h 培養後、細胞培養膜を採取し、上層側に接着している細胞を 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、ギムザ液にて染色した。小孔を通過して下層側に移動し、染色された細胞数を画像解析ソフトを用いてカウントする細胞移動性試験を行った。MPC 群では下層を細胞接着膜上面まで MPC ポリマーゲルで被覆し、対照群では MPC ポリマーゲルを使用せず、それぞれ細胞を培養した。移動・染色された細胞数を統計学的に検定し、細胞の移動性を検討した。

### 3. 蛍光分子標識型 MPC ポリマーの合成

体外排泄試験に供する MPC ポリマーを合成した。蛍光性モノマーを一成分として加えた水溶性 MPC ポリマーを合成した。蛍光性 MPC ポリマーをラットモデルを用いて、その体外排泄性について評価した。

### ② 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

(分担研究者 川口浩・高取吉雄・茂呂徹)

#### 1. 摩擦試験

##### 1) 摩擦係数の測定

MPC ポリマーもしくはヒアルロン酸ナトリウム (HA) を添加した潤滑液を用いたときの、静摩擦係数、動摩擦係数について、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  $50\ \text{mm/min}$ 、すべり距離  $25\ \text{mm}$ 、荷重  $0.98\ \text{N}$ 、運動周波数は  $1\ \text{Hz}$  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 にはシリコン系ウレタン (Silicone polyether urethane) を用いた。蒸留水、MPC 単剤、ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 単剤、MPC とヒアルロン酸ナトリウム (HA) の混合液、MPC とヒアルロン酸ナトリウム (HA) の共重合体について、濃度の条件を変えて使用した。摩擦係数は、摺動回数 100 回時点の値を求めた。

#### 2) 摩擦係数の経時的な変化の検討

上記 1) の研究結果に基づき、蒸留水、1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 水溶液、2% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の 4 群で、Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用い、静摩擦係数、動摩擦係数を計測した。MPC-ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 共重合体については静摩擦係数、動摩擦係数とも改善の程度が軽度であったため、今回の試験群からは除外した。試験条件は 1) と同様とした。

### 2. マウス変形性関節症モデルにおける検討

#### 1) マウス OA モデルの確立

マウスは C57Black/6J マウス (8 週齢・オス・ $18\text{--}22\ \text{g}$ ) を使用した。右膝関節を前方より展開し、内側側副靭帯 (MCL) の切離、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。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。

##### a) X 線撮影

マウスの膝関節の X 線撮影は、術後 0, 2, 4, 8 週において行った。膝関節の正面像、側面像を撮影した。

## 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。灌流固定し、膝関節を一塊として摘出した後、固定液で固定した。検体は脱灰液に浸漬し、脱灰を行った。パラフィン・ブロックはマイクロトームを用いて、4 $\mu$ mの厚さで薄切し、連続切片とした。組織切片はHematoxylin-Eosin (HE) 染色、Safranin O 染色を行った。

## 2) マウス OA モデルを用いた検討

初期の変形性膝関節症の病像を呈する、Medial model を用いて検討を行った。

上記1) の手法で関節内を洗浄した後、1)の実験で至適条件を確立した2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA)混合液を加え、コントロール群では生理食塩水を加えた後、皮膚縫合した。術後6週で関節軟骨を回収し、組織学的に検討した。

## ③ 屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討

(分担研究者 川口浩・茂呂徹  
・三浦俊樹・金野智浩)

### 1. ラットアキレス腱損傷モデルの確立

- 1) 麻酔・体位：腹腔内麻酔後、ラットを腹臥位とした。
- 2) 坐骨神経の切断：手術用顕微鏡下に坐骨神経を切断した。
- 3) 足底筋腱の切断：アキレス腱直上を皮膚切開後、足底筋腱を切断した。
- 4) アキレス腱の切断・縫合：アキレス腱を剪刀にて切断し、modified Kessler 法にて腱をコア縫合した後、周囲縫合を追加した。
- 5) 閉創：創内を生理食塩水にて洗浄

後、皮膚を縫合し、閉創した。

- 6) ギプス固定・覚醒：右下肢をギプス固定した上で麻酔からの覚醒を待ち、以後はケージ内で自由に運動させた。
- 7) 腱癒着と修復の評価：術後3週で、術後の腱組織の癒着および修復の状態を以下の2、3で評価することとした。

### 2. ラットアキレス腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

MPC ポリマーゲルを構成する PMBV ポリマーの溶液濃度の条件をかえ、組織癒着防止効果を検討した。上記1)の術後3週の時点で、手術創を再切開し、まず創内を肉眼的に評価した。次に、癒着線維の切離回数を癒着の程度を表す指標として測定した。

### 3. ラットアキレス腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

2)でアキレス腱を周囲組織から切離後に、全長にわたって採取した。レオメーターシステムを用い、腱が破断するまで牽引した。この際の最大破断張力を組織修復の指標として測定し、統計学的に検討した。

### 4. 鶏趾屈筋腱損傷モデルの確立

- 1) 麻酔・体位：鶏を筋肉内麻酔後に腹臥位とした。
- 2) 屈筋腱鞘の切除：手術用顕微鏡下に左足第3趾を皮膚切開後、腱鞘を切除した。
- 3) 趾屈筋腱の損傷・縫合：趾屈筋腱を剪刀にて切断した。癒着評価用には深趾屈筋腱の半切断のみ行ない、修復評価用には全切断した。modified Kessler 法にて深趾屈筋腱

をコア縫合し、周囲縫合を追加した。

- 4) 閉創：創内を生理食塩水にて洗浄後、皮膚縫合し、閉創した。
- 5) ギプス固定・覚醒：閉創後、左脚をギプス固定した上で麻酔からの覚醒を待ち、以後はケージ内で自由に運動させた。
- 6) 腱癒着と修復の観察：術後3週で、術後の腱組織の癒着および修復の状態を肉眼的に評価した。
- 7) 腱癒着と修復の評価：術後3週で、術後の腱組織の癒着および修復の状態を以下の8)、9)、10)で評価した。
- 8) 屈曲仕事量測定による検討：レオメーターを用いて、趾屈曲仕事量を測定した。
- 9) 腱破断張力測定の検討：趾屈筋腱を全長にわたって採取し、レオメーターシステムにより腱が破断するまで牽引した。この際の最大破断張力を組織修復の指標として測定した。
- 10) 組織標本の検討：縫合部を含めて採取した腱を Hematoxylin および Eosin (H-E) にて染色し、縫合部の組織連続性を評価した。

## 5. ウサギ趾腱損傷モデルの確立

- 1) 麻酔・前処置・体位：筋注麻酔を行い、抗生剤を皮下注射し、ウサギを腹臥位とした。
- 2) 屈筋腱鞘の切除：手術用顕微鏡下に右足第2趾および第4趾を皮膚切開後、腱鞘を切除した。
- 3) 趾屈筋腱の損傷・縫合：趾屈筋腱を剪刀にて切断した。癒着評価用（第4趾）は深趾屈筋腱の半切断のみ行ない、修復評価用（第2趾）は全切断した。Kessler 法にて深趾屈筋腱をコア縫合し、周囲縫合を

追加した。

- 4) 閉創：創内を生理食塩水にて洗浄後、皮膚縫合し、閉創した。
- 5) ギプス固定・覚醒：閉創後、右脚をギプス固定した上で麻酔からの覚醒を待ち、以後はケージ内で自由に運動させた。
- 6) 腱癒着と修復の評価：術後3週で、術後の腱組織の癒着および修復の状態を以下の6、7で評価することとした。

## 6. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

MPC ポリマーゲルを構成する PMBV ポリマーと PVA ポリマーの溶液濃度を PMBV:PVA[%]=5.0:2.5 とした。

腱縫合後に、MPC 群では MPC ポリマーゲルを、対照群では生理食塩水を創内に滴下した。

第4趾の創内を肉眼的に評価した。次に、線維性癒着組織の切離回数を癒着の程度を表す指標として測定した。また、縫合部を含めて採取した深趾屈筋腱を Hematoxylin および Eosin (H-E) にて染色し、癒着グレードを評価した。さらに、レオメーターシステムを用いて、趾屈曲仕事量を測定し、組織癒着の指標として統計学的に検討した。

## 7. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

第2趾の深趾屈筋腱を周囲組織から切離後に採取し、レオメーターシステムを用いて腱が破断するまで牽引した。この際の最大破断張力を組織修復の指標として測定し、統計学的に検討した。



## 8. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果の経時的検討

上記 5 と同様の実験操作を行い、ウサギを無作為に 2 群に分類し、5.0% PMBV、2.5% PVA の水溶液から生成される MPC ポリマーゲルまたは対照となる蒸留水の術野への局所投与 (100  $\mu$ L) を行った。術後 1、3、6 週で、腱組織の癒着状態を以下の i)-iii) の方法で評価した。

- i) 肉眼的評価：癒着形成の程度を、腱周囲の線維性癒着組織のみ残存させて定性的に評価し、さらに、腱の遊離に鋭的切離が必要になる区画が全 40 区画に占める割合 (%) を癒着率として定量的に評価した。
- ii) 組織学的評価：ウサギの第 2 趾にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。癒着グレードを使用し、腱周囲の癒着の所見を重症度に従って分類した。
- iii) 生体力学的評価：第 4 趾の趾屈曲仕事量をレオメーターシステムにて測定し、組織癒着の指標として統計学的に検討した。

## 9. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての経時的検討

上記 8 と同様の実験操作を行い、術後 1、3、6 週で、術後の腱組織の修復の状態を以下の i)-ii) の方法で評価することとした。

- i) 組織学的評価：ウサギの第 2 趾にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。炎症グレードを使用し、腱周囲の炎症の所見を重症度に従って分類した。
- ii) 生体力学的評価：腱最大破断張力をレオメーターシステムにて

組織修復の指標として測定し、統計学的に検討した。

## ④ 骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討

(分担研究者 石原一彦・高取吉雄)

### 1. マウス大腿骨骨折モデルの確立

- 1) 麻酔・前処置・体位・皮切：腹腔内麻酔を行い、右大腿部を消毒後、マウスを左側臥位とし、大腿骨直上を皮膚切開した。
- 2) 大腿骨の全周性剥離：右大腿骨骨幹部を全長に渡り全周性に剥離し、骨と筋肉を分離した。
- 3) 大腿骨の骨折操作：電動ボーンソーを使用して、骨幹部中央にて大腿骨を骨折した。
- 4) 骨折部の内固定：22G スパイナル針の内針を髓内釘として骨折部を内固定した。
- 5) MPC ポリマーゲルの滴下・閉創：創内を生理食塩水にて洗浄後、MPC ポリマーゲル (PMBV:PVA[%]=5.0:2.5) を 200  $\mu$ l 滴下し、骨折部を含む大腿骨周囲を被覆し、対照群では生理食塩水 200  $\mu$ l を創内に滴下した。6-0 ナイロン糸にて皮膚縫合し、閉創した。
- 6) 覚醒・運動：麻酔からの覚醒後はケージ内で自由に運動させた。
- 7) 骨折部の癒着による関節拘縮と骨骨折部の骨癒合の評価：術後の骨折部の癒着および癒合の状態を以下の 2~5 で評価し、関節拘縮を効果的に防止できるかを検討した。

### 2. MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果についての検討 (肉眼所見)

術後 1・3 週で、手術創を再切開し、創内を肉眼的に評価した。

### 3. MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討(単純レントゲン所見)

術後1・3週で、骨折部の骨癒合の状態を単純レントゲン所見にて評価した。

### 4. MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果の検討(組織所見)

術後3週で、周囲の筋肉を含めて大腿骨を組織標本とし、Hematoxylin および Eosin (H-E) にて染色した。顕微鏡にて観察し、骨折部と周囲の筋肉との癒着状態を評価した。合わせて骨癒合の状態も観察した。

### 5. MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討(骨塩量所見)

術後1・3・6週で、骨折部の骨塩量変化を術前の骨塩量に対する割合(%)として計算し、骨癒合状態を評価した。

## ⑤ 椎弓切除モデルを用いた硬膜周囲癒着防止効果の検討

(分担研究者 川口浩・三浦俊樹)

### 1) ラット脊椎硬膜外癒着モデルの確立

a) 麻酔・体位：腹腔内麻酔および局所麻酔を実施し、ラットを腹臥位とした。

b) 腰椎椎弓切除：背側正中切開をおき、第1腰椎(L1)から第4腰椎(L4)までの棘突起および椎弓を展開しL1~L4の椎弓切除を行い、硬膜背側を展開した。

c) 硬膜周囲の処置：剥離子を用いて硬膜側面の剥離操作を実施した。

d) 閉創：止血を確認した後、洗浄、皮膚を縫合し、閉創した。

e) 術後処置：手術後はケージ内で自由に運動させた。

f) 硬膜周囲癒着の評価：術後の硬膜周囲組織の癒着の状態を以下の2)~5)で評価した。

### 2) 硬膜周囲癒着の肉眼的評価

硬膜周囲の癒着の程度を肉眼所見で分類した。Grade0(癒着なし)、1(弱い引っ張り力ではがれる)、2(中等度から強度の引っ張り力で剥離できる)、3(鋭的な切除でのみ剥離できる)の4段階評価を行った。

### 3) 硬膜周囲の組織学的評価

硬膜表面から癒着組織までの距離・硬膜の厚み・癒着中の炎症細胞数・クモ膜下腔の面積について測定した。同時に癒着防止材料の残存の有無についても評価した。

### 4) 神経学的評価

癒着防止材が脊髄・硬膜の治癒を妨げず、神経機能に障害を与えないことを確認するため、神経学的評価を行った。評価基準には、ラット後肢の運動機能評価を行うBBB scoreを使用した。

### 5) 硬膜周囲癒着の力学的評価

上硬膜および脊椎を採取しレオメーターシステムを用い、椎体および硬膜管を把持し、遠位方向へ破断するまで牽引する(この際の最大破断張力を癒着程度の指標として測定し、統計学的解析を実施した)。

## 6) MPC ポリマーゲルの被覆による硬膜周囲の癒着防止効果についての検討

1) で確立したラット脊椎硬膜外癒着モデルを使用して、実験動物を2群に分け、1群はMPCゲル1mlを硬膜周

囲に注入し、他群は生理食塩水を硬膜周囲に注入した。

硬膜周囲癒着の評価：2群に分けた実験動物の術後の硬膜周囲組織の癒着の状態を上記の2)~5)で評価した。

(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」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

## C. 研究結果

### ① MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定

#### 1. ポリマー分子構造の規格化

##### 1) MPC ポリマーの合成

MPC ポリマーの分子組成はMPCを60 mol%含み、n-ブチルメタクリレート(BMA)を30 mol%、p-ビニルフェニルボロン酸 (VPBA)を10 mol%を含むMPC ポリマー (PMBV60)を合成した。ポリマー合成時に使用する重合開始剤として $\alpha, \alpha'$ -アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) または t-butyl peroxyneodecanoate (PBND)を用いて合成した。AIBN または PBND を重合開始剤として用いて合成することにより得られた2種類のMPC ポリマーは、ともに水溶性ポリマーであることを確認した。また、 $^1\text{H-NMR}$ 測定に基づく構造解析の結果、ともに重合時の仕込みモノマー組成通りであることを確認した。ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による分子量測定の結果、2種類のMPC ポリマーは分子量が異なることがわかった。このMPC ポリマーとポリビニルアルコール(PVA)とを室温条件下で混合するとMPC ポリマーゲルを形成した。用いたPVA

は完全ケン化型で平均重合度が200を用いた。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いた。また、ポリマー溶解時の溶媒として純水、PBS または細胞培養液を用いたが、いずれでもゲル化が確認された。

#### 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、重量変化を測定した結果、全てのゲルで解離による重量減少を認めた。また、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、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ることが見出された。

#### 2. 性状変化と解離速度の検討

##### 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

肉眼の観察では、各群のMPC ポリマーゲルとも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。SEMによる観察では、術後1週および2週においても微細構造に大きな変化はみられなかった。

## 2) PBS 内での重量変化の測定による解離速度の検討

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。溶液濃度が高いゲルほど解離速度は低値であり、濃度依存性がみられた。

## 3) MPC ポリマーゲルの細胞移動性への影響の検討

培養 24 h 後の細胞接着膜上の細胞をギムザ染色後に観察すると、対照群と比較し、移動した細胞数は MPC 群で有意に少なかった。

また、画像解析ソフトによる細胞数の定量評価でも、移動した細胞数は MPC 群で有意に少なかった。

以上の結果により、MPC ポリマーゲルがゲル内への細胞の移動性を抑制することが確認された。

## 4) MPC ポリマーゲルの細胞生存性への影響の検討

培養 24 h 後の細胞接着膜の顕微鏡にて観察すると、両群間に NIH3T3 細胞の形態・密度に明確な差異はみられなかった。

また、MTT アッセイ法による細胞培養液の吸光度の定量評価では、対照群と MPC 群で有意な差異はなかった。

以上の結果により、MPC ポリマーゲルが細胞の生存性に影響しないことが確認された。

## 3. 蛍光分子標識型 MPC ポリマーの合成

分子量の異なる蛍光性 MPC ポリマーを合成した。分子量として 5000～10000、10000～50000 および 50000 以上の各画分における投与後 3 日の累積尿中排泄率は投与量の 33.6%、7.1% 及び 4.5% であった。この結果、MPC ポリマーゲルに使用するポリマーの

体外排泄性を確認することができた。

## ② 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

### 1. 摩擦試験

#### 1) 摩擦係数の測定

蒸留水の静摩擦係数は 1.635 だったが、1%、2% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 水溶液ではそれぞれ 1.244、0.794 と、期待したほど摩擦係数は改善しなかった。これに対し、1%、2% MPC 水溶液の摩擦係数はそれぞれ 0.615、0.376 と改善がみられた。さらにこれらを混合した際の摩擦係数を観察すると、1% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の摩擦係数がそれぞれ 0.220、0.310 と、著明な改善を示した。

これらの傾向は、動摩擦係数でも同様であった。つまり、蒸留水の静摩擦係数は 1.675 だったが、1%、2% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 水溶液ではそれぞれ 1.142、0.665 と、摩擦係数の改善は軽度であった。これに対し、1%、2% MPC 水溶液の摩擦係数はそれぞれ 0.515、0.285 と改善がみられた。さらにこれらを混合した際の摩擦係数を観察すると、1% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の摩擦係数がそれぞれ 0.081、0.168 と、著明な改善を示した。

以上の研究結果を鑑み、蒸留水、1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 水溶液、1% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の 4 群で、下記 2) において経時的な摩擦係数を計測することとした。

#### 2) 摩擦係数の経時的な変化の検討

2% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の 2 群では 1000 万サイクル時の摩擦係数

が 0.311、0.296、5000 万サイクルで 0.254、0.270、10000 万サイクルで 0.251、0.257 と、経時的に各タイミングで安定して効果を発揮した。

動摩擦係数においても、静摩擦係数と同じ傾向の結果が見られた。つまり、2% MPC 水溶液、2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液の 2 群では 1000 万サイクル時の摩擦係数が 0.177、0.139、5000 万サイクルで 0.108、0.118、10000 万サイクルで 0.093、0.113 と、経時的に各タイミングで安定して効果を発揮した。

MPC ポリマー水溶液単剤、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、蒸留水と比し、改善傾向がみられた。また、MPC ポリマー水溶液単剤、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、蒸留水と比し、約 40% 改善していた。

## 2. マウス変形性関節症モデルにおける検討

### 1) マウス OA モデルの確立

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。組織学的解析においても、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 OA モデルを用いた検討

2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液を加えた MPC 群では、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 層

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、生理食塩水を加えたコントロール群では軟骨破壊が進んでおり、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。

## ③ 屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討

### 1. ラットアキレス腱損傷モデルの確立

肉眼での観察では、術後 3 週において、アキレス腱切断部の連続性は良好であった。また、アキレス腱周囲の癒着は著明にみられ、周囲組織との分離には剪刀による鋭的切離を必要とした。以上より、このラットの腱損傷モデルは本研究において適当であると考えられたため、以後の実験でも使用することとした。

### 2. ラットアキレス腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

1 のラットの腱損傷モデルにおいてアキレス腱を縫合後、縫合部を含めた腱全体を 3 種類の MPC ポリマーゲルでそれぞれ被覆した群 (各群 n=8) では、コントロール群 (n=8) と比較し、線維性癒着の切離回数が低値であった。

### 3. ラットアキレス腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

上記 2 の操作に引続いて行った力学試験において、最大破断張力はコントロール群と各 MPC ポリマーゲル群

の間で、有意な差を認めなかった。

#### 4. 鶏趾屈筋腱損傷モデルの確立

肉眼での観察では、術後3週において、趾屈筋腱切断部の連続性は良好であった。また、趾屈筋腱周囲の癒着は著明にみられ、周囲組織との分離には剪刀による鋭的切離を必要とした。さらに、レオメーターによる趾屈曲仕事量の測定が可能であった。また、腱破断張力もラットアキレス腱と同様に測定でき、組織標本においても腱断裂部の連続性が回復してきていることが確認できた。

以上より、この鶏腱損傷モデルは、今回の研究において趾屈曲仕事量を測定して力学的評価する上でも適していると考えられ、以降の実験で使用しようと考えたが、折からの鳥インフルエンザの影響により鶏の入手・飼育が困難となり、使用を断念した。

#### 5. ウサギ趾屈筋腱損傷モデルの確立

肉眼での観察では、術後3週において、腱切断部の連続性は良好であった。また、腱周囲の癒着は著明にみられ、周囲組織との分離には剪刀による鋭的切離を必要とした。

以上より、このウサギの腱損傷モデルは本研究において適当であると考えられたため、以後の実験でも使用することとした。

#### 6. MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

5のウサギの腱損傷モデルにおいて、MPC群 (n=5) では、ゲルを使用しなかったコントロール群 (n=5) と比較し、線維性癒着の切離回数、癒着グレードが有意 ( $p<0.05$ ) に低値であった。

さらに、MPC群 (n=7) では、コントロール群 (n=7) と比較し、趾屈曲

仕事量が有意 ( $p<0.05$ ) に低値であった。

#### 7. MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

最大破断張力はコントロール群 (n=5) と MPC 群 (n=5) の間で、有意な差を認めなかった。

#### 8. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果の経時的検討

肉眼所見では、対照群において、術後1週では線維性癒着の形成が乏しかったが、術後3週以降は線維性の癒着が高度であった。一方、MPC群では術後1週以降、線維性の癒着が少なかった。癒着率は、対照群 (n=5) と比較し、MPC群 (n=5) では低値をとり、特に術後3週では有意に低値であった。

組織所見では、対照群では、術後1週から癒着形成が出現し、以後も癒着が増強していくことが観察された。一方、MPC群では、MPCポリマーゲルが術後1、3週の時点で残存し、術後6週では解離して消失することが観察され、いずれの時点においても、明らかな癒着形成は観察されなかった。癒着グレード (各群 n=5) は、観察期間を通して MPC 群で低値をとり、特に術後3、6週において有意に低値であった。

生体力学所見では、趾屈曲仕事量 (各群 n=10) は、術後3週において、MPC群で有意に低値であり、6週でも低下がみられた。

#### 9. ウサギ趾腱損傷モデルにおける MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての経時的検討

組織所見では、白血球の浸潤に関し

ては観察期間を通して両群間で明らかな差異はなく、MPC群で炎症反応の増強はみられなかった。炎症グレード（各群 n=5）は、観察期間を通して両群間で有意な差はみられなかった。

生体力学所見では、腱最大腱破断張力（各群 n=7）は、術後3週までは両群間で有意な差はみられず、6週においてはMPC群でむしろ有意に増強していた。

#### ④ 骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討

（分担研究者 石原一彦、高取吉雄）

##### 1. マウス大腿骨骨折モデルの確立

麻酔による術中・術後死例はなく、麻酔からの覚醒も安定していた。出血のコントロールも良好であった。

対照群の骨折部周囲の癒着は術後3週では著明にみられた。また、単純レントゲン所見による骨癒合の評価では、術後3週において骨折部の仮骨形成は良好であった。

##### 2. MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果についての検討（肉眼所見）

マウス骨折モデルにおけるMPC群の骨折部の肉眼所見（術後1週および3週）は、いずれも対照群と比較し、明確な差はみられなかった。

##### 3. MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討（単純レントゲン所見）

マウス骨折モデルにおけるMPC群の骨折部の単純レントゲン所見（術後1週および3週）は、いずれも対照群と比較し、明確な差はみられなかった。

##### 4. MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果の検討（組織所見）

大腿骨を周囲の筋肉とともにHE染

色した組織所見では、術後3週での対照群において、骨折部と周囲筋肉との間隙が見られず癒着が高度であった。一方、MPC群では骨折部と周囲筋肉との境界に間隙が見られ、癒着が抑制されていた。また、ゲルの残存は確認できなかった。また、両群ともに骨折部の離開はなく、骨癒合は同程度に進行していた。

#### 5. MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討（骨塩量所見）

骨塩量の変化（各群 n=3）は、術後1・3・6週のすべてにおいて両群間で有意な差はみられず、骨癒合の過程が同程度であった。

#### ⑤ 椎弓切除モデルを用いた硬膜周囲癒着防止効果の検討

（分担研究者 石原一彦、高取吉雄）

##### 1) ラット脊椎硬膜外癒着モデルの確立

麻酔死例はなく、覚醒も安定していた。また手術中の中途覚醒はなく十分な麻酔深度が得られていた。手術用顕微鏡を用いた慎重な操作により、出血のコントロールも良好であった。また椎弓切除や硬膜の剥離操作において硬膜および脊髄神経の肉眼的損傷はなかった。

##### 2) 硬膜周囲癒着の肉眼的評価

コントロール群において、術後6週および8週の時点で、硬膜周囲の癒着がみられ、剪刀による鋭的切離を必要とした。癒着の程度が比較的軽度のものもあったが全例で何らかの癒着が確認できた。（Grade 0 : 0例、Grade 1 : 1例、Grade 2 : 3例、Grade 3 : 2例）

MPC群においても全例で何らかの癒着がみられたが、その程度はコントロール群と比較してやや軽度の傾向

であった。(Grade 0 :0 例、Grade 1 :2 例、Grade 2 :3 例、Grade 3 :0 例)

### 3) 硬膜周囲の組織学的評価

コントロール群において硬膜周囲の癒着および脊柱管の圧迫所見が見られた。椎弓切除を行った硬膜背側に肉芽組織が増生し脊柱管は圧排され扁平化していた。硬膜と肉芽組織との境界は不明瞭で高度に癒着している所見であった。強拡大では硬膜周囲に炎症細胞の浸潤および線維性組織の増生が見られた。

MPC 群では、硬膜周囲の癒着および癒痕形成は存在するものの、その層は薄く、組織内に多数の空胞形成がみられた。また、空胞の上層には多数の炎症細胞および血管新生がみられたが、脊柱管との間には空胞が介在しているため、脊柱管の圧排は見られなかった。硬膜の損傷・硬膜周囲組織の異常所見・創部感染等はなく、MPC ポリマーゲルの残存はなかった。

### 4) 神経学的評価

MPC ポリマー群およびコントロール群のいずれも、BBB score は 21 点であり神経障害は見られなかった。

### 5) 硬膜周囲癒着の力学的評価

コントロール群および MPC 群の両群において、椎体と硬膜管との間の癒着はほとんどなく、最大破断強度は、両側の神経根の引き抜き強度とほぼ同等の強度であった。次に背側の軟部組織と硬膜とを把持して同様の牽引試験を行ったが、背側の軟部組織の強度が牽引検査に耐えうるほどではなく、容易に破損を生じたため、正確な最大破断強度を得られることはできなかった。

## D. 考察

本研究の目的は、MPC ポリマーゲルを運動器疾患の革新的な治療法と

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。この目的で、① MPC ポリマーゲル合成の至適条件の決定、② 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、③ 屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討、④ マウス骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討、⑤ ラット脊椎椎弓切除モデルを用いた神経・硬膜外癒着防止効果の検討、を行った。

MPC ポリマーゲルの至適合成条件の検討では、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 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、これにより、MPC ポリマー組成・MPC ポリマー分子量の制御を満足した。また、1) 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、2) 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期待できること、3) MPC ポリマーゲルは、ラットへの埋植後、異物巨細胞の出現も認められず、極めて高い生体親和特性を発揮すること、が明らかとなった。さらに、MPC ポリマーゲルの組織癒着防止材としての効果発生メカニズムの一端を解明することができ、MPC ポリマーゲルはゲル内への細胞の移動性を抑制し、これによって線維芽細胞が癒着形成に働けず、組織癒着が防止されることが推察された。また、MPC ポリマーゲルは細胞の生存性に影響せず、この点に



において臨床応用する上での安全性に問題は生じないことが明らかとなった。今後は、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、MPC ポリマー構造の最適化と同時に工学的パラメーターの制御基盤技術を確立するとともに、PMBV ポリマー濃度、PVA との混合比等に変更を加えて、より至適な合成条件の検討を継続していく予定である。

関節機能改善効果に関する検討では、Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用い、MPC 水溶液、ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 水溶液、生理食塩水 (コントロール群) の静摩擦係数および動摩擦係数を計測した。また、MPC+ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液、MPC-ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 共重合体水溶液についても静摩擦係数、動摩擦係数を計測し、至適混合比、至適濃度を検討した。さらに、これらの検討で条件を絞り込んだ 4 群で、10000 万サイクルの長期摩擦試験を行い、静摩擦係数、動摩擦係数を経時的に測定して至適混合比、至適濃度を検討した。また、膝関節の半月板切除と靭帯切離の組み合わせによりヒトの変形性膝関節症に近い病像を再現するマウス変形性膝関節症 (OA) モデルを確立し、上記の基礎検討で最適と考えられた 2% MPC+1% ヒアルロン酸ナトリウム (HA) 混合液を用い。これらが関節面の潤滑機構の改善と保護を達成することを確認した。

屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討では、ラットアキレス腱損傷モデルを確立し、このモデルにおいて、MPC ポリマーゲルが腱組織の修復を阻害することなく、周囲組織と腱との癒着を有意に抑制するための至適作成条件の絞り込みを行っ

た。また、ウサギ趾腱損傷モデルを使用し、MPC ポリマーゲル

(PMBV:PVA[%]=5.0:2.5) を用い、癒着率・癒着グレード・趾屈曲仕事量による組織癒着の評価と炎症グレード・腱最大破断張力による組織修復への影響の評価を経時的・定量的に行い、MPC ポリマーゲルが腱の治癒を妨げることなく、効率的に腱癒着を防止することを明らかにした。

マウス骨折モデルを用いた関節拘縮防止効果の検討では、マウス大腿骨骨折モデルを確立し、このモデルにおいて、骨折部の肉眼および組織所見での骨折部の癒着による関節拘縮の評価と、単純レントゲン所見および骨塩量による骨癒合の評価を行った。この結果、MPC ポリマーゲルは骨癒合を妨げることなく骨折部周囲の癒着を抑制することが示唆された。また、術後 3 週までにゲルが消失し、元のポリマー水溶液に解離したと考察された。以上より、MPC ポリマーゲルには極めて独創的かつ画期的な関節拘縮防止策になり得ることが期待できた。

椎弓切除モデルを用いた硬膜周囲癒着防止効果の検討では、ラット脊椎硬膜外癒着モデルを確立し、癒着の評価方法の検討を行った。本研究の結果から、確立した癒着モデルおよび硬膜周囲癒着の評価方法が適切であることを確認した。このモデルを使用し、MPC ポリマーゲルの被覆による硬膜周囲の癒着防止効果についての実験を行った。本研究の結果から、MPC ポリマーゲルは脊椎硬膜周囲の癒着形成を抑制し、癒着を防止することが示唆された。また、ラットの神経を傷害する可能性を示唆する所見は見られなかった。しかし硬膜-椎体破断張力の測定においては有意な差はみられず、これは測定方法に限界があるた

めと考えられた。

#### E. 結論

本研究成果は、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ポリマーゲルの臨床応用が期待できる内容であった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Konno T, Ishihara K: Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a Photo-immobilization of a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety. *Biomaterials* 28: 1770-1777, 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) Choi J, Konno T, Takai M, Ishihara K: Biocompatible phospholipid polymer hydrogel layer on metal surface for releasing bioactive agents. *Trans Mater Res Soc Jpn* 32 (4): 1243-1246, 2007.
- 4) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and 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* 84: 320-327, 2008.
- 5) Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Phosphorylation of GSK-3 $\beta$  by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest* 118: 2506-2515, 2008.
- 6) Sato S, Kimura A, Ozdemir J, Asou Y, Miyazaki M, Jinno T, Ae K, Liu X, Osaki M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kawaguchi H, Haro H, Shinomiya K, Karsenty G, and Takeda S: The Distinct role of the Runx proteins in chondrocyte differentiation and intervertebral disc degeneration: Findings in murine models and in human disease. *Arthritis Rheum* 58: 2764-2775, 2008.
- 7) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and 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* 86: 439-47, 2008.
- 8) Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Krüppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 283: 24682-24689, 2008.
  - 9) Oka H, Muraki S, Akune T, Mabuchi A, Suzuki T, Yoshida H, Yamamoto S, Nakamura K, Yoshimura N, and Kawaguchi H: Fully automatic quantification of knee osteoarthritis severity on plain radiographs. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1300-1306, 2008.
  - 10) Kawaguchi H: Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 25: 1-6, 2008.
  - 11) Koyama Y, Miyashita M, Irie S, Yamamoto M, Karita T, Moro T, Takatori Y, Kazuma K: A study of disease management activities of hip osteoarthritis patients under conservative treatment. *J Orthop Nurs* 12: 75-83, 2008.
  - 12) Seo JH, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Surface Tethering of Phosphorylcholine Groups onto Poly(dimethylsiloxane) through Swelling-deswelling Methods with Phospholipids Moiety Containing ABA-type Block Copolymers. *Biomaterials* 29(10): 1367-1376, 2008.
  - 13) Fujii K, Matsumoto H, Koyama Y, Iwasaki Y, Ishihara K, Takakuda K: Prevention of Biofilm Formation with a Coating of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Polymer. *J Vet Med Sci* 70(2): 167-173, 2008.
  - 14) Watanabe J, Ishihara K: Multiple Protein Immobilized Phospholipid Polymer Nanoparticles: Effect of Spacer Length on Residual Enzymatic Activity and Molecular Diagnosis. *Nanobiotechnology* 3(2): 76-82, 2008.
  - 15) Ishihara K, Ando B, Takai M: Phosphorylcholine Group-immobilized Surface Prepared on Poly(dimethylsiloxane) Membrane by in situ Reaction for Its Reduced Biofouling. *Nanobiotechnology* 3(2): 83-88, 2008.
  - 16) Kihara T, Yoshida N, Mieda S, Fukazawa K, Nakamura C, Ishihara K, Miyake J: Nanoneedle Surface Modification with 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Polymer to Reduce Nonspecific Protein Adsorption in a Living Cell. *Nanobiotechnology* 3(2): 127-134, 2008.
  - 17) Futamura K, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Rapid Development of Hydrophilicity and Protein Adsorption

- Resistance by Polymer Surfaces Bearing Phosphorylcholine and Naphthalene Groups. *Langmuir* 24(18): 10340-10344, 2008.
- 18) Morisaku T, Watanabe J, Konno T, Takai M, Ishihara K: Hydration of Phosphorylcholine Groups Attached to Highly Swollen Polymer Hydrogels Studied by Thermal Analysis. *Polymer* 49(21): 4652-4657, 2008.
- 19) Kitano K, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Nanoscale Structured Phospholipid Polymer Brush for Biointerface. *Tans Mater Res Soc Jpn* 33(3): 771-774, 2008.
- 20) Hoshi T, Matsuno R, Sawaguchi T, Konno T, Takai M, Ishihara K: Protein adsorption resistant surface on polymer composite based on 2D/3D controlled grafting of phospholipid polymers. *Appl Surf Sci* 255(2): 379-383, 2008.
- 21) Choi J, Konno T, Matsuno R, Takai M, Ishihara K: Surface Immobilization of Biocompatible Phospholipid Polymer Multilayered Hydrogel on Titanium Alloy. *Colloid and Surfaces B : Biointerfaces* 67(2): 216-223, 2008.
- 22) Kawaguchi H: Regulation of osteoarthritis development by Wnt- $\beta$ -catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res* 24: 8-11, 2009.
- 23) Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum* 60: 166-178, 2009.
- 24) Chikuda H, Seichi A, Takeshita K, Shoda N, Ono T, Matsudaira K, Kawaguchi H, and Nakamura K: Radiographic analysis of the cervical spine in patients with retro-odontoid pseudotumors. *Spine* 34: E110-114, 2009.
- 25) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP  $\beta$  promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57<sup>Kip2</sup>. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009.
- 26) Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: A large-scale population-based study. *Arthritis Rheum* 61: 779-786, 2009.
- 27) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kinoshita H, Yoshida M, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K, and Akune T: Epidemiology of lumbar