

**Figure 2.** The adhesion of cells in human bone marrow aspirates onto the culture plates coated with MPC polymers with various compositions of MPC unit. The number of cells that were attached on the MPC polymer-coated plates at day 7 of the cell culture decreased according to the density of the MPC unit. All values are presented as mean plus standard deviation of five samples per group. Statistics were assessed using Dunnett's test (\* $p < 0.01$  vs. 0% MPC unit composition).

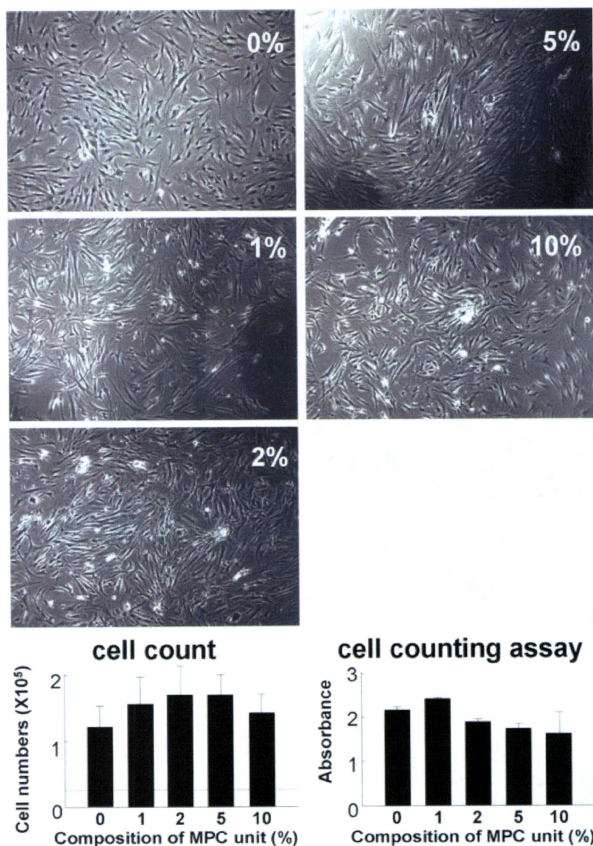
MPC unit compositions. For 3 days, the number of adherent cells on the plate surface had plateaued on all plates. At 3 days, the medium was changed together with the floating cells and were replaced by another medium. The adherent cells continued to be cultured for four more days on the same MPC polymer-coated plates, and then were harvested for cell counting. The cells attached on the plate surface were observed to have a higher density on the dishes treated with a 0% MPC unit composition, compared with those of increasing the MPC unit composition, at 7 days (Fig. 2). The number of cells harvested from the plates had significantly decreased according to the increase in the density of the MPC polymer coating [Fig. 2 (graph)]. The cell numbers on the MPC polymer-coated dishes with 2% or 10% MPC units were approximately half or quarter of 0%, respectively.

To examine the proliferation ability of MPC polymer-selected MSCs, the cells harvested from each

MPC polymer-coated plate were reseeded onto the conventional PS plates ( $\phi$  2.2 cm) with the same cell number of  $1.9 \times 10^4$  in the second passage (passage 2), and then cultured for 7 days. The cells were equally proliferated during this period, while the total cell number after a 7 day-culture had not significantly changed among the cells derived from the different MPC polymer-coated plates [Fig. 3 (cell count)]. The result was represented by the experiment using the cell counting assay [Fig. 3 (cell counting assay)].

#### Surface epitopes of cells selected by MPC polymer-coated plates

We next examined the surface epitopes of the cells selected by the MPC polymer-coated plates (passage 1). It is known that CD29 (integrin  $\beta$ 1), CD44 (hya-



**Figure 3.** Proliferation of the cells that had been selected by the plate-coated MPC polymer with various MPC unit compositions. The cells cultured on the MPC polymer-coated plates were harvested and then reseeded onto the conventional PS plates. The numbers of human cells were counted at 7 days of culture (cell count). All values are presented as mean plus standard deviation of five samples per group. Statistics were assessed using Dunnett's test. No significant difference was seen among the proliferation of the cells harvested from each MPC polymer-coated plate (0–10% MPC unit composition). The dashed line indicates the number of cells originally seeded on the plate ( $1.9 \times 10^3$  cells). The result was represented by the experiment using the cell counting assay in the rat MSCs (cell counting assay). All values are presented as mean plus standard deviation of three measurements per group. No significant difference (Dunnett's test) was seen among each groups.

luronan receptor), CD105 (Endoglin) and CD166 (ALCAM) were expressed in MSC, but that CD34 and CD45 (LCA) were markers specific for hematopoietic stem cells. Although the hematopoietic stem cell markers were negative in all cells selected by the plates coated with the 0, 1, 2, 5, or 10% of MPC unit

poietic stem cells. Although the hematopoietic stem cell markers were negative in all cells selected by the plates coated with the 0, 1, 2, 5, or 10% of MPC unit

TABLE I  
Expression of Surface Epitopes in MPC-Selected Cells

Surface Epitopes	MPC 0%	MPC 1%	MPC 2%	MPC 5%	MPC 10%
CD29 (integrin $\beta$ 1)	++	++	+++	++	++
CD44 (Hyaluronan receptor)	++	++	++	++	++
CD105 (Endoglin)	+	+	+	+	+
CD166 (ALCAM)	+	+	+	+	+
CD34	-	-	-	-	-
CD45 (LCA)	-	-	-	-	-

composition, CD29, CD44, CD105, and CD166 were detectable in the cells of all MPC unit compositions. The levels of the MSC markers in the cells selected by the 1–10% MPC unit composition were almost similar to those in cells of 0% that corresponds to the control MSC, implying that the MPC polymer-selected cells belong to the category of MSC on the surface epitopes (Table I).

#### Osteogenic and chondrogenic potential of MPC polymer-selected cells

After the culture on the MPC polymer-coated plates (passage 1), the cells were cultured on the conventional PS culture plates for a long term with repeated passages. By passage 5, the cell numbers had expanded by approximately 1000-fold in the cells of each MPC unit composition (0–10%). Under the osteogenic condition, the cells selected by the MPC polymer coated-plates and cultured in the conventional PS plate ones for a single time (passage 2) more highly expressed the COL1A1 mRNA in the 2–5% MPC than in the 0%, but those by the 1 or 10% MPC polymer-coated plates did not show any significant increase in the COL1A1 expression. The promotion effects of the COL1A1 expression in 2% MPC unit composition continued even at passage 5, although the cells at passage 2 were more sensitive for the osteogenic differentiation than those at passage 5. ALP also peaks at 2–5% MPC unit composition for both passages, although no statistical difference of the ALP expression was detected in passage 2 [Fig. 4(a)]. The ALP enzyme activity was also significantly higher in 5% MPC unit composition than others at passage 2 [Fig. 4(b)].

The expression of the chondrocyte markers in the MPC polymer-selected cells under the chondrogenic conditions was also enhanced in the 2–5% MPC unit composition, as observed during osteogenesis. Responding to the chondrogenic induction, the cells began to express COL2A1, COL10A1, and Sox 9, and especially cells selected by the 2% MPC unit composition showed a prominent expression of all chondrocyte markers not only at passage 2, but even at passage 5 (Fig. 5).

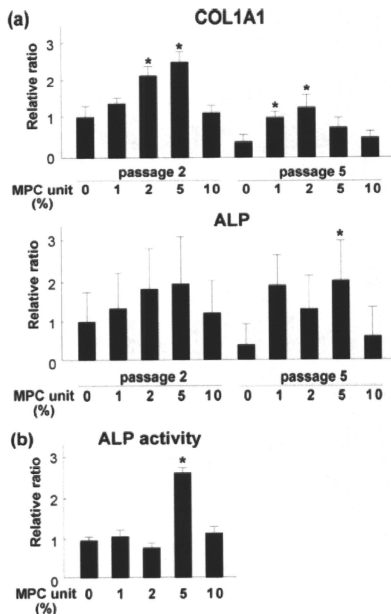
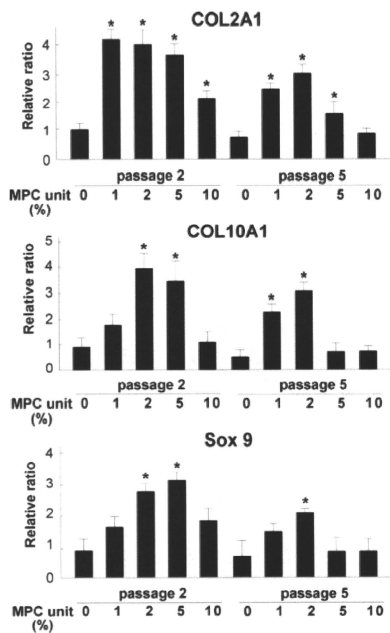


Figure 4. (a) Gene expression of COL1A1 and ALP in the osteogenic induction. Significant expression of COL1A1 gene was found in human MSCs selected by the MPC polymer-coated plates (2–5% unit composition) at passage 2, while the high expression level in the 5% MPC unit composition continued by passage 5. Also, in the ALP expression, the promotion effect was observed in 2–5% MPC unit composition, especially at passage 5. All values are presented as mean plus standard deviation of five samples per group. Statistics were assessed using Dunnett's test ( $p < 0.01$  vs. 0% MPC unit composition). (b) The enzyme activity for ALP in the osteogenic induction. The ALP enzyme activity was also significantly higher in 5% MPC unit composition than others in the rat MSCs at passage 2. All values are presented as mean plus standard deviation of three measurements per group. Statistics were assessed using Dunnett's test ( $p < 0.01$  vs. 0% MPC unit composition).



**Figure 5.** Gene expression of COL2A, COL10A1, and Sox9 during the chondrogenic induction. The expressions of COL2A1, COL10A1, and Sox9 genes peaked at 2–5% MPC unit composition not only at passage 2 but also at passage 5. All values are presented as mean plus standard deviation of five samples per group. Statistics were assessed using Dunnett's test ( $p < 0.01$  vs. 0% MPC unit composition).

## DISCUSSION

The adhesion capacity seems to have some association with the cellular activities and functions. Specific adhesion to the laminin and type IV collagen coated on the surface of the culture dishes could select the myogenic cells of the embryonic mouse thigh from fibroblastic cells. Over a brief time period (10–20 min), myoblasts from the embryonic mouse thigh muscle had adhered faster to the laminin than did the fibroblasts from the same tissue, while the latter adhered faster to the fibronectin than the former.<sup>19</sup> Laminin-1 also enriched the osteoblast progenitor cells from rat calvarial cells when they were seeded on the culture wells coated with it. The lami-

nin-1 inhibited cell attachment of the rat calvarial cells, but could select the highly osteogenic lineage according to the difference in the cell adhesiveness to that of the molecule.<sup>20</sup> Thus, through the selection of the cell adhesion to some molecules, a specific cell subpopulation that possesses a high differentiation potency would be concentrated from heterogeneity of the cell sources.

MSC expresses many adhesion-related molecules, like the integrin subunits  $\alpha 4, 5, 6, 8, 9, \nu/\beta 1, 3, 5, \text{ICAM-1, ALCAM, VCAM-1, SCF, fibronectin, E-cadherin, and hyaluronan receptor}^{21-23}$  and can be bound to various ligands including laminin and E-cadherin to play biological roles through the cell-to-cell or cell-to-matrix contacts. As examples of the cell-to-cell contact with MSCs *in vivo*, homing functions for the hematopoietic cells of MSCs should be discussed. Through the cell-to-cell contacts with hematopoietic stem cells mediated by VCAM-1, fibronectin, SCF, E-cadherin, or ICAM-1, MSCs secrete extracellular matrix proteins, produce secreted/membrane-bound cytokines and regulate hematopoiesis.<sup>22</sup> MSCs are also recruited and adhered to the damaged tissues in order to participate in tissue repair. These cells can provide cell sources for tissue repair in bone, cartilage, and even skeletal muscle or myocardium that do not directly make contact with bone marrow. Once muscles are injured, the MSCs are delivered to the degenerative muscles from the circulation, are adhered to the lesion, take part in the regenerative process, and provide fully differentiated muscle fibers.<sup>24</sup> In the murine model of cardiac repair following ischemic injury, MSCs were mobilized from bone marrow, homed and generated cardiac myocytes. Among the adhesion molecules of the MSC such as integrin  $\alpha 4, 6, 8, 9,$  and  $\beta 1,$  blockade of the integrin  $\beta 1$  by the neutralizing antibody reduced the total number of MSCs in the infarcted myocardium, suggesting that MSCs utilized integrin  $\beta 1$  for cell adhesion to the myocardium and its regeneration.<sup>23</sup>

Thus, MSCs can be bound to various partners via many kinds of adhesion molecules to exert physiological and pathological functions. Although the adhesiveness to some ligands likely selects a cell subpopulation with a high differentiation potency of a certain lineage,<sup>19,20</sup> such a specific selection may have the risk to reduce the multipotency in MSCs. Therefore, we applied the selection system based not on the adhesiveness to specific molecules, but on the general adhesion ability to the MPC polymer-coated plates. As a result, we could enrich the cells to have a high potency of both osteogenesis and chondrogenesis from the crude MSCs.

It has yet remained unknown why the strength of the adhesion ability in MSCs could enhance not the proliferation rate of the cells, but the differential



potential for both osteogenesis and chondrogenesis. Speculating that such multipotent cells may show a stronger adhesion than fibroblastic cells in bone marrow, the MPC polymer-selection due to cell attachment could exclude the fibroblastic ones that possess a lower differentiation potential. This selection probably enriched the cells with high differentiation potential. It implied not that the MPC polymer-coated plates did not induce the phenotype changes in each cell, but that they purified the cell populations by the elimination of fibroblastic cells from the total populations of bone marrow adhesive cells. Therefore, the difference in osteogenic and chondrogenic ability was maintained during the repeated passaging, and the MPC polymer selection could improve cellular potential even after recultivation on PS plates. However, as we do not currently possess the methods to exactly distinguish MSCs from fibroblastic cells using cell surface epitopes, it may be hard to prove that the MPC selection could concentrate the multipotent MSCs from a mixture of the MSCs with fibroblast, by flow cytometry that can exactly exclude the hematopoietic lineage from the MSCs.

MSC can be differentiated into a variety of tissues including bone, cartilage, tendon, fat, heart, muscle or brain, *in vitro* and *in vivo*.<sup>1,8</sup> Autologous MSCs have advantages over embryonic stem cells, regarding the teratocarcinoma formation, immune rejection, or ethical problems. The cell sources have already been used for the treatment of osteogenesis imperfecta, bone/cartilage defects, myocardial infarction, or skin ulcer.<sup>25–28</sup> Conversely, the MPC polymers have also been already applied in the clinical field for the surfaces of intravascular stents, intravascular guide wires, soft contact lenses, and the artificial lung, all of which were authorized by the United States Food and Drug Administration.<sup>13,14</sup> Thus, the biocompatible polymer is regarded to be approved for safe clinical use.

The MPC selection is as simple as to culture MSCs with MPC polymer-coated plates in the first passage, which would reduce the risks of contamination or mismanagement during the culture procedure. The improvement of the MSCs in purity and multipotency by the MPC polymer selection would provide promising technologies for the next generation-cell therapy that can be applied for more severe and other various diseases. The clinical application of the MPC polymer-selected MSCs is now underway.

## References

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999;103:697–705.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711–10716.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakova SF, Luria EA, Rudakow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83–92.
- Sekiya I, Larson BL, Vuorio JT, Cui JG, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 2004;19:256–264.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7841–7845.
- Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 2004;22:823–831.
- Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H, Sugiyama M, Kamata N, Iwata T, Matsubara T, Nakamura K, Kurihara H, Tsuji K, Kato Y. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:297–303.
- Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004;103:1647–1652.
- Ueda H, Watanabe J, Konno T, Takai M, Saito A, Ishihara K. Asymmetrically functional surface properties on biocompatible phospholipid polymer membrane for bioartificial kidney. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:19–27.
- Sawada S, Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K. Stress response of adherent cells on a polymer blend surface composed of a segmented polyurethane and MPC copolymers. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:476–484.
- Sibarani J, Takai M, Ishihara K. Surface modification on microfluidic devices with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers for reducing unfavorable protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;54:88–93.
- 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.
- Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, Litwak P, Kameneva MV, Ushiyama H, Tokuno T, Borzelleca DC, Umezumi M, Tomioka J, Tagusari O, Akimoto T, Koyanagi H, Kurosawa H, Kormos RL, Griffith BP. *In vivo* evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs* 2003;27:188–192.
- Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 2004;3:829–836.
- Goda T, Ishihara K. Soft contact lens biomaterials from bio-inspired phospholipid polymers. *Expert Rev Med Devices* 2006;3:167–174.
- Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F, Takano Y. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9552–9556.

18. Ebisawa K, Hata K, Okada K, Kimata K, Ueda M, Torii S, Watanabe H. Ultrasound enhances transforming growth factor  $\beta$ -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004;10:921-929.
19. Kuhl U, Ocalan M, Timpl R, von der Mark K. Role of laminin and fibronectin in selecting myogenic versus fibrogenic cells from skeletal muscle cells in vitro. *Dev Biol* 1986;117:628-635.
20. Roche P, Rousselle P, Lissitzky JC, Delmas PD, Malaval L. Isoform-specific attachment of osteoprogenitors to laminins: Mapping to the short arms of laminin-1. *Exp Cell Res* 1999;250:465-474.
21. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67-73.
22. Hall BM, Gibson LF. Regulation of lymphoid and myeloid leukemic cell survival: Role of stromal cell adhesion molecules. *Leuk Lymphoma* 2004;45:35-48.
23. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells utilize integrin beta 1 not CXCR4 chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* 2007;18:2873-2882.
24. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
25. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-313.
26. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-386.
27. Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarabek L, Ulicna M, Blasko M. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27(Suppl 2):134-137.
28. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137:491-502.

## 生体適合性と耐摩耗性に優れた人工股関節の開発

\*1東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学講座, \*2東京大学大学院医学系研究科  
感覚・運動機能医学講座, \*3東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

茂呂 徹\*1,2, 高取 吉雄\*1,2, 石原 一彦\*3, 京本 政之\*1,3,  
中村 耕三\*2, 川口 浩\*2

Toru MORO, Yoshio TAKATORI, Kazuhiko ISHIHARA, Masayuki KYOMOTO,  
Kozo NAKAMURA, Hiroshi KAWAGUCHI



### 1. はじめに

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いる。一方、骨に固定された人工股関節の周囲に骨吸収 (osteolysis) が起き、固定性が失われる「弛み」は、その長期予後を決する深刻な合併症である<sup>1)</sup>。ひとたび固定性を失った人工股関節は加速度的に周囲の骨を吸収し、疼痛、歩行障害、関節可動域制限の原因となり再置換手術が必要となる。したがって、人工股関節の弛みを防止し寿命を延長することは重要な課題である。

人工股関節の弛みの原因には、手術手法、術後管理、合併症など様々なものがあるが、材料側の原因としては、関節摺動面から生じるナノメートル単位の摩耗粉が引き起こす骨吸収であることが諸家により報告されている。これらの摩耗粉には、関節摺動面から生じる超高分子量ポリエチレン (ultra high molecular weight polyethylene: UHMWPE, 以下PE)、金属、セラミックス、骨セメントなどがあり、それぞれ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、微粒子の中ではPE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<sup>2)</sup>。これらの摩耗粉は異物として認識されることでマクロファージに貪食され、マクロファージは生体活性物質を分泌する。これらの生体活性物質が破骨細胞の形成・活性化を促進し、人工股関節周囲に骨吸収を生じ、弛みに至る。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つの方向性で行われており、その代表的なものについては2005年の本誌にて紹介した<sup>3)</sup>。本稿では、関節摺動面の表面構造に着目し、筆者らの研究開発について紹介する。

### 2. 生体の関節軟骨の表面構造

生体の関節軟骨は、生涯にわたり荷重や運動の負荷を受け続けるにもかかわらず、少なくとも数十年にわたり関節面を保護し、その潤滑機構を改善するなど、優れた表面構造を構築する。人工股関節の構造は、生体本来のものに近づくように設計されているにもかかわらず、関節面に関しては、PE・金属・セラミックスの組み合わせが用いられており、その表面構造を生体の関節軟骨表面に近づける試みはほとんど行われていない。

関節軟骨表面にはナノメートルスケールのリン脂質の組織化層が存在し、この層が関節面の保護と潤滑機構の改善に寄与していることが報告されている<sup>4)</sup>。したがって、人工股関節の関節表面にナノメートルスケールのリン脂質層を構築できれば、生体の関節軟骨表面に近づけることができる。一方、荷重という特殊な環境下で表面処理が早期に剥離したり、剥離した材料自体が骨吸収を誘導したり、あるいは表面処理により基材の性質が変化したりすると、人工股関節の弛みの阻止を達成できない。

以上の事実から、生体適合性とリン脂質構造をあわせ持つポリマーにより関節摺動面にインターフェイスを創製すると、人工股関節の弛みの阻止に有効であると考えた。そこで筆者らは、すでにポリマーバイオマテリアルとして利用されているリン脂質ポリマー、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーに着目した。

#### ■ 著者連絡先

東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学講座  
(〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1)  
E-mail: moro-ort@h.u-tokyo.ac.jp

### 3. 生体適合性に優れたMPCポリマーによる 高潤滑人工股関節摺動面の構築

MPCは、生体細胞膜表面にリン脂質極性基が配列することに着目して分子設計されたメタクリル酸エステルである<sup>5)</sup>。このMPCポリマーを用いて基材表面を処理すると、その表面は優れた生体適合性を発揮し、生体との相互作用も抑制される。例えば、表面への蛋白質吸着や血栓形成が抑制されるほか<sup>6)</sup>、MPCポリマーで表面処理された微粒子は異物としての認識を受けにくく、マクロファージによる貪食やこれに続く破骨細胞の形成・活性化が抑制されることが明らかになっている<sup>7)</sup>。また、MPCポリマーは親水性であることから、湿潤環境下では表面に水の薄層を形成する。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様々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。

筆者らは、人工関節の弛みの抑制のため、関節摺動面を構成するPEライナーをMPCポリマーで表面処理することを考えた。この際、他の医療機器のMPCポリマー表面処理に用いたdip coatingでは荷重条件下での剥離がみられたため<sup>8)</sup>、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(MPCポリマー処理)を創案した<sup>7)</sup>。この処理法は、紫外線を用いてPEから直接MPCをグラフトするもので、MPCポリマー鎖の末端とPEの炭素原子同士が安定した状態で共有結合される。また、ナノメータースケール(100~200 nm)の表面処理であるため、基材となるPEの特性に影響を与えない<sup>9)</sup>。MPCポリマー処理前後のPE表面の水ぬれ性を接触角、スプレー法で評価すると、撥水性であったPE表面がMPCポリマー処理により親水性へと変化し、その水ぬれ性が劇的に向上していることが明らかとなった。さらに、摩擦試験で摩擦特性を評価すると、動摩擦係数はMPCポリマー処理により1/7~1/10にまで低減していた。MPCは非常に親水性の高い化合物であり、そのポリマーは水溶性である。したがってこのポリマーがグラフトされた表面には高い親水性が付与されることとなり、高い潤滑性を有することになると考えられる。

さらに筆者らは、MPCポリマー処理技術の実用化のため、MPC水溶液濃度<sup>10)</sup>、紫外線処理時間など<sup>11)</sup>、MPCポリマー処理条件の最適化を行った。例えば、紫外線照射時間をえてMPCポリマー処理を行い、表面を透過電子顕微鏡で観察したところ、照射時間23分の群でPEライナー表面が部分的にMPCポリマー層で覆われ始め、照射時間

45分以上の群では厚さ100~200 nmの均一な層で覆われていた。また、フーリエ変換赤外分光分析により表面のリン酸基を定量化したところ、照射時間の増加に伴いMPCポリマー層が高密度化することが明らかとなった。さらに、これらの表面の動摩擦係数も、MPCポリマー層の高密度化により低減することが明らかとなった。

### 4. 股関節シミュレーターによる耐摩耗性の評価

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、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、手術後の患者の連続1,000万歩分の歩行負荷をかけ検討した。骨頭はコバルトクロム合金骨頭(径26 mm)を用いた。ライナーに架橋PE(CLPE)表面をMPCポリマー処理したもの(MPC群)を用い、未処理のCLPE(CLPE群)と比較した。ライナーの摩耗量を重量変化で計測すると、CLPE群ではこれらの重量変化がみられなかった。さらに、試験終了後のライナー表面を三次元解析装置で解析すると、CLPE群では顕著な摩耗がみられたのに対し、MPC群ではほとんど摩耗していなかった。また、レーザー顕微鏡を用い、ライナー加工時に表面に形成される同心円状のマシンマークの有無を観察すると、CLPE群ではこのマークが消失し顕著な摩耗がみられたのに対し、MPC群では残存しており、ほとんど摩耗していなかった。

以上の結果により、MPCポリマーでナノ表面処理を施した高潤滑人工関節インターフェイスが人工股関節の弛みの主因となるPEライナーの摩耗を抑制すること、長期の歩行負荷をかけてもその処理効果は持続することが明らかになった<sup>12)</sup>。最近では、2,000万歩分以上という長期の歩行負荷をかけても安定して高い耐摩耗性を維持するという結果が得られている。さらに、骨頭にアルミニウムセラミックスを用いた場合、あるいはライナーに非架橋PEを用いた場合も同様の高い耐摩耗性を示すことが明らかとなっており<sup>13)</sup>、人工股関節の耐用年数の延伸(長寿命化)が期待できる。

### 5. おわりに

2008年、社団法人日本整形外科学会は、超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命の延伸を目指し、ロコモティブシンドローム(locomotive syndrome:運動器症候群)を提唱した<sup>14)</sup>。これは、骨、関節など運動器の障害によって、介護が必要な状態や介護が必要となるリスクが高い状態を

示す新しい概念である。運動器の障害はそれ自体が要介護の原因となるだけでなく、認知症や内臓疾患など他の要介護原因にも関係している。社会の超高齢化とともに、人工股関節手術を受けた患者のその後の人生が長期化していることと考え合わせても、人工股関節の長寿命化は、医工連携で解決すべき重要な課題であり、今回紹介した革新的な新技術はその解決策の一つとなり得ると考える。

## 文 献

- 1) Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, et al: Osteolysis: basic science. *Clin Orthop* **393**: 71-7, 2001
- 2) Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, et al: A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop* **244**: 182-7, 1989
- 3) 茂呂 徹, 高取吉雄: 人工関節. *人工臓器* **34**:166-70, 2005
- 4) Hills BA, Butler BD: Surfactants identified in synovial fluid and their ability to act as boundary lubricants. *Ann Rheum Dis* **43**: 641-8, 1984
- 5) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N: Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym J* **22**: 355-60, 1990
- 6) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, et al: Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res* **39**: 323-30, 1998
- 7) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* **3**: 829-36, 2004
- 8) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, et al: 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* **90**: 362-71, 2008
- 9) Kyomoto M, Moro T, Konno T, et al: 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**: 1809-15, 2007
- 10) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, et al: 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
- 11) Kyomoto M, Moro T, Konno T, et al: Enhanced wear resistance of modified cross-linked polyethylene by grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *J Biomed Mater Res A* **82**: 10-7, 2007
- 12) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al: 2006 Frank Stinchfield Award: grafting of biocompatible polymer for longevity of artificial hip joints. *Clin Orthop Relat Res* **453**: 58-63, 2006
- 13) Moro T, Kawaguchi H, Ishihara K, et al: Wear resistance of artificial hip joints with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafted polyethylene: comparisons with the effect of polyethylene cross-linking and ceramic femoral heads. *Biomaterials* **30**: 2995-3001, 2009
- 14) 中村耕三: 超高齢社会とロコモティブシンドローム. *日整会誌* **82**: 12, 2008



## 長寿命型人工関節の開発

茂呂 徹<sup>\*1)</sup> 高取 吉雄<sup>\*2)</sup> 石原 一彦<sup>\*\*</sup>  
 京本 政之<sup>\*\*\*</sup> 中村 耕三<sup>\*\*\*\*1)</sup> 川口 浩<sup>\*\*\*\*\*2)</sup>

高齢者の増加に伴い体内に人工関節をもつ人口は増加し、その耐用年限の延長は喫緊の課題と言える。人工関節の寿命は、摺動面のポリエチレンが摩耗してできる微小粉が骨溶解を誘導し、骨との固定が弛むことで決まる。我々は、骨溶解の抑制には摩耗の低減と摩耗粉が骨溶解を誘導しにくいことの2点を同時に達成することが必要と考え、合成リン脂質である2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) の重合体(MPC ポリマー)をポリエチレン表面に共有結合させる技術を開発した。最初の臨床応用として人工股関節を選び、前臨床試験によって安全性と有効性が確認できたため、2007年から治験を実施している。

### Progress of Research for Osteoarthritis.

#### *Invention of longer lasting artificial joints.*

*Division of Science for Joint Reconstruction/Orthopaedic Surgery.*

*Sensory & Motor System Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.*

*Toru Moro, Yoshio Takatori*

*Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo.*

*Kazuhiko Ishihara*

*Division of Science for Joint Reconstruction, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.*

*Masayuki Kyomoto*

*Orthopaedic Surgery, Sensory & Motor System Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.*

*Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi*

\* 東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学寄付講座 / 感覚運動機能医学講座整形外科学 <sup>1)</sup> 特任准教授 (もろ・とおる)  
<sup>2)</sup> 特任教授 (たかとり・よしお)

\*\* 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学 (いしはら・かずひこ)

\*\*\* 東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学寄付講座 (きょうもと・まさゆき)

\*\*\*\* 東京大学大学院医学系研究科感覚運動機能医学講座整形外科学 <sup>1)</sup> 教授 (なかむら・こうぞう)  
<sup>2)</sup> 准教授 (かわぐち・ひろし)

In the advent of the aging society, the lifetime of artificial joints is a matter of concern. The major cause of revision surgery is periprosthetic osteolysis caused by polyethylene wear particles. To prevent osteolysis, both the reduction of wear and the suppression of osteoclast induction are necessary. For these purposes, we developed a new technology for grafting 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer on the surface of polyethylene liners. On the basis of encouraging results of the preclinical studies, we have started a large-scale clinical trial of new artificial hip joints since 2007.

## はじめに

人工関節置換術は、変形性関節症 (osteoarthritis: OA) 等により機能を喪失した関節を人工関節に置換し、関節機能の再建を図る手術である。関節痛を緩和し、生活の質 (quality of life: QOL) を改善する治療法として確立され、わが国では2006年度に約14万件の手術が行われている。また、わが国は2007年に65歳以上の高齢者が22%となり、超高齢社会を迎えたが、こうした社会の高齢化とともに人工関節置換術の件数は増加し、人工関節を入れた患者のその後の人生も長期化している。

一方、手術後に人工関節の周囲に生じる骨溶解 (osteolysis) と、これに続発する弛み (loosening) は、今なお解決策が得られていない合併症である。弛みによって不安定になった人工関節は、周囲の骨を急速に吸収し、疼痛や可動域制限を生じるため、入れ替え (再置換術) が必要となる<sup>1)</sup>。すなわち弛みは、人工関節の耐用年限 (寿命) を決める重要な要因であり、人工関節を入れた患者は、再置換術の潜在的な対象である。前述の社会状況を考えれば、わが国では再置換術の件数が飛躍的に増加し続けるものと予想できる。従って骨溶解を抑制し、人工関節の長寿命化を図ることは喫緊の課題と言える。

## 骨溶解の原因と対策

骨溶解の原因は、関節摺動面を構成するポリエチレン (polyethylene, 以下PE) 製ライナーや、金属製あるいはセラミック製の骨頭から生じる、ナノメートル単位 (サブミクロンサイズ) の摩耗粉であることが明らかとなっている<sup>2)</sup>。これらの摩耗粉はマクロファージに貪食され、マクロファージはサイトカインやプロスタグランジンを分泌する。これらの生体活性物質は周囲の間葉系細胞に作用し、破骨細胞分化因子である receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現を誘導する。その結果、破骨細胞の形成・活性が促進されて骨が吸収され、骨溶解に至るといのが定説である。

関節摺動面から生じる摩耗粉の素材はPEが圧倒的に多く、骨溶解の主因と考えられている<sup>3)</sup>。人工股関節全置換術を受けた患者の retrospective な検討によれば、PEの年間線摩耗量が0.1~0.3 mm程度<sup>4)</sup>、再置換手術時のインプラント周囲の解析では組織1gあたり $1 \times 10^{10}$ 個の摩耗粉の産生が骨吸収を生じる境界値とされている<sup>5)</sup>。すなわち、これ以下の摩耗の患者では骨溶解は観察されにくく、骨溶解はPEの摩耗粉の数量に依存した現象であることがわかつている。

従って、骨溶解の抑制に関する先行研究は、①摩耗粉を減少させること、②骨吸収過程を抑制すること、の2つの目標のいずれかで行われてき

OA: osteoarthritis (変形性関節症), PE: polyethylene (ポリエチレン), RANKL: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

た。しかし、これらの研究では決定的な解決策を得るには至っておらず、我々はこの2つの目標を同時に達成する解決策が必要と考えた。

#### ■ 我々の研究の概念

生体の関節軟骨表面にはナノスケールのリン脂質層が存在し、少なくとも数十年にわたり表面潤滑の改善の役割を果たしている<sup>6)</sup>。従って、人工関節の摺動面にナノスケールのリン脂質層を構築(表面処理)できれば、生体の軟骨表面に近づけることができる。この視点から、我々は「リン脂質構造を有し生体適合性に優れた生体材料」を摺動面に結合させることができれば、①摩耗粉を減少させること、②骨吸収過程を抑制すること、の2つを同時に達成し、骨溶解の抑制に有効であると考えた。具体的には、合成バイオマテリアルである2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) に着目した。

#### ■ 生体適合性に優れた MPC ポリマーによる高潤滑人工股関節摺動面の構築

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<sup>7)</sup>。MPC ポリマーで処理した表面は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発揮するほか、生体との相互作用も抑制される。すなわち、MPC ポリマーの存在によって、表面へのタンパク質吸着の抑制や血栓形成の抑制が実現する<sup>8) 9)</sup>。これらの特性をいかし、医療分野への応用を目指したさまざまな研究が行われ、一部は認可を受けた医療機器として国内外の臨床で使用されるなど、MPC ポリマーは生体内安全性が確立されている<sup>10)</sup>。

前述のように、骨溶解は PE の摩耗粉の数量に

依存した現象である。そこで我々は、関節摺動面を構成する PE ライナーへ MPC ポリマーを表面処理することにした。この際、ほかの医療機器の MPC 表面処理に用いた dip coating 法では、荷重という特殊な環境下で表面処理が早期に剥離する可能性が考えられたため<sup>11)</sup>、光開始ラジカル重合法を用いて表面処理する方法を創案した(MPC ポリマー処理)(図1)<sup>12)</sup>。これは紫外線を用いて PE の炭素原子と MPC ポリマーの炭素原子を結合させる方法であり、安定した共有結合を有するだけでなく、ナノスケールの表面処理(100 ~ 200 nm)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<sup>13)</sup>。

MPC ポリマー処理後の PE 表面の水ぬれ性を、接触角およびスプレー法で評価すると、撥水性であった表面が親水性へと変化し、そのぬれ性が劇的に向上していることが明らかとなった。さらに、表面の摩擦特性を評価すると、動摩擦係数は MPC ポリマー処理により 1/7 ~ 1/10 にまで低減していた。MPC は親水性の非常に高い化合物であり、ポリマーがグラフトされた表面は高い親水性が付与され、水の薄膜層が形成されることとなり、高い潤滑性を有することになると考えられる<sup>14)</sup>。

MPC ポリマー処理の最適化のため、我々は、MPC 水溶液濃度<sup>15)</sup>や紫外線照射時間<sup>16)</sup>等の条件を変化させ、条件を変化させて検討した。例えば紫外線照射時間を変えて MPC ポリマー処理を行い、表面を透過電子顕微鏡で観察すると、照射時間 23 分間の群では表面の一部が MPC ポリマー層で覆われ、照射時間 45 分以上の群では厚さ 100 ~ 200 nm の均一な層で覆われることが判明した(図2)。また、赤外分光分析により表面のリン酸基を定量化すると、照射時間の増加に伴い MPC ポリマー層が高密度化しており、表面の動摩擦係数も低減していた。

MPC : 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine

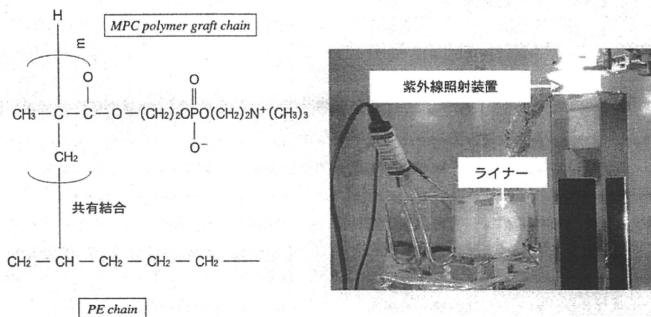


図1 MPCポリマー処理

紫外線を用いて MPC ポリマー鎖とポリエチレン (PE) の炭素原子同士に安定な共有結合をさせるもので、ナノスケール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。

(筆者ら作成)

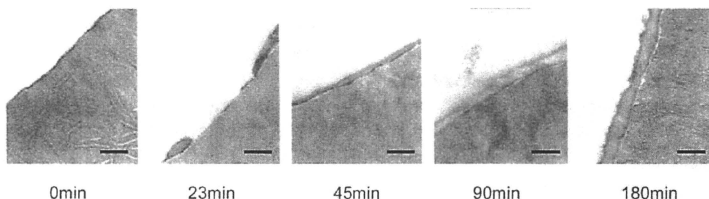


図2 紫外線照射による MPC ポリマー層の変化 (透過電子顕微鏡写真)

照射時間 23 分の群で PE 表面が部分的に MPC ポリマー層で覆われはじめ、照射時間 45 分以上の群で、厚さ 100 ~ 200 nm の均一な層で覆われていた。

スケールバー：200 nm

(文献 16 より一部改変)

### 人工股関節掲動面の耐摩耗性の評価

最初の臨床応用として人工股関節を選択したため、この項では人工股関節(図3)の実用化に向けた前臨床試験について紹介する。

ヒトの歩行周期では、股関節にはさまざまな方向から体重の数倍の負荷を加わる。そこで、生体内により近い環境下での耐摩耗効果を検証するた

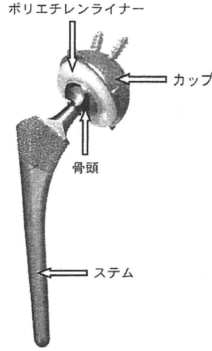
め、生体の歩行周期を再現する「股関節シミュレータ」を用いた。骨頭には市販品のコバルトクロム合金骨頭(径 26 mm)、ライナーは同じく市販品の架橋 PE (CLPE) 表面を MPC ポリマー処理したもの (MPC 群) を用い、未処理の CLPE (未処理群) と比較した。試験条件は ISO 1424-3 に準じて、潤滑液は 25% 牛血清を用い、毎秒 1 回



図3 人工股関節の構造

ポリエチレンライナーと骨頭との間で関節摺動面が構成される。

(筆者ら提供)



の歩行周期として、183kgfと280kgfの2つのピークを持つDouble Peak Paulの歩行条件とした。

連続1,000万歩分(1,000万サイクル)の摩耗試験を行った<sup>17)</sup>。①50万サイクルごとにライナーの重量を計測し、ライナーの摩耗量を計測した。その結果、未処理群では経時的に重量が減少したのに対し、MPC群では重量減少がみられず摩耗が抑制されていた。②試験終了後のライナー表面を三次元形状測定機で解析した。未処理群では顕著な摩耗がみられたのに対し、MPC群ではほとんど摩耗がみられなかった。③試験終了後のライナー表面をレーザー顕微鏡で観察し、ライナー加工時に摺動面に形成される「同心円状のマシンマーク」の形状を調べた。未処理群では、顕著な摩耗によってマークが消失していたのに対し、MPC群では残存しており、ほとんど摩耗していなかった(図4)。④潤滑液から摩耗粉を回収して解析した。両群間で、摩耗粉の形状や粒径分布に

差は認められなかったが、摩耗粉の数はMPC群で顕著に抑制されていた。

以上の結果より、PEライナーをMPCポリマーでナノ表面処理することで、人工股関節の弛みの主因となるPEの摩耗を顕著に抑制できること、また長期の歩行負荷後もその効果が持続することが明らかになった。換言すれば、MPCポリマー処理によってPE表面には高潤滑人工関節インターフェイスが構築された。

最近では、2,000万歩分以上という長期の歩行負荷を加えた実験が終了しているが、高い耐摩耗性を安定して維持するという知見が得られている。さらに、臨床の場での使用を想定し、径22mmの骨頭を用いた場合<sup>12)</sup>、骨頭にアルミナセラミックスを用いた場合<sup>18)</sup>、ライナーに非架橋PEを用いた場合<sup>18)</sup>、滅菌操作が与える影響等についても検討を行っているが<sup>17)19)</sup>、いずれの条件でも高い耐摩耗性を示すという結果を得ている(図5)。



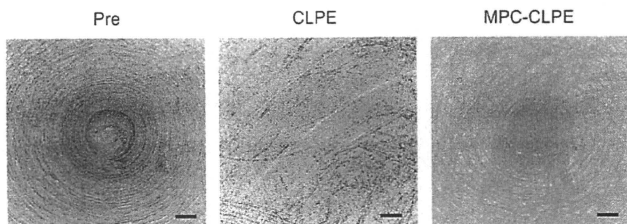


図4 1,000万サイクル後のPEライナー表面の評価(レーザー顕微鏡写真)

ライナー加工時に表面に形成される同心円状のマシニングマークの有無を観察すると、未処理の架橋PE (CLPE) ではこのマークが消失しており顕著な摩耗がみられたのに対し、MPC処理CLPE (MPC-CLPE) では残存しており、ほとんど摩耗していなかった。

スケールバー：200  $\mu\text{m}$

(文献 17 より一部改変)

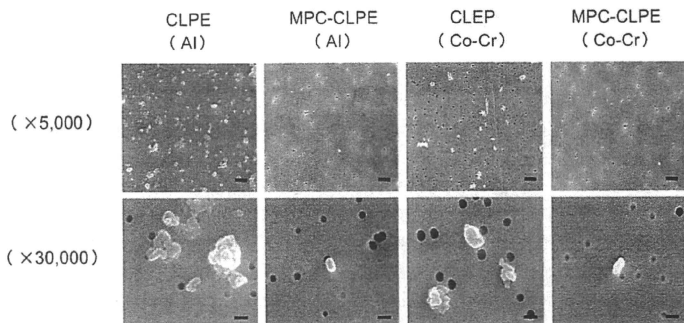


図5 骨頭の材質がMPC処理の摩耗抑制効果に与える影響の評価(走査型電子顕微鏡写真)

CLPEライナーと組み合わせてシミュレーター試験を行い、潤滑液から摩耗粉を抽出して評価すると、骨頭にアルミナを用いた場合 (Al)、コバルトクロム合金を用いた場合 (Co-Cr) とも、ライナーにMPC処理をした群 (MPC-CLPE) で摩耗粉の産生量が顕著に抑制された。

スケールバー：上段 1.0  $\mu\text{m}$ 、下段 0.1  $\mu\text{m}$

(文献 18 より一部改変)

#### MPC 摩耗粉が骨吸収に及ぼす影響の評価

前述のように、人工関節の弛みの主因となる摩耗粉は、サブミクロンサイズである。そこで平均粒径約 500 nm の MPC ナノ微粒子を作製し<sup>20)</sup>、

MPC の微小摩耗粉が生じた場合に骨吸収に与える影響を *in vitro/in vivo* のマウス骨吸収モデルを用いて検討した<sup>12)</sup>。

① 微粒子を蛍光物質で標識し、マウスマクロ

ファージ培養系に曝露して貪食実験を行った。未処理の微粒子はマクロファージに大量に貪食されたが、MPC 処理微粒子はマクロファージにほとんど貪食されなかった。

② MPC 処理 / 未処理の微粒子溶液または微粒子を含まない溶液 (対照群) をマウスマクロファージ様細胞株・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 として以下の検討を行った。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 (tumor necrosis factor)- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、PGE<sub>2</sub> の濃度を計測した。未処理微粒子曝露群の濃度は、対照群と比べ、約 4~46 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、対照群と有意な差がみられなかった (図 6)。次にマウス骨芽細胞培養系に condi-

tioned 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った。さらにマウス骨髄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対照群に比し 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対照群と有意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- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 それぞれの抗体、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。

③ *in vivo* マウス骨吸収モデルにおいて、マウス

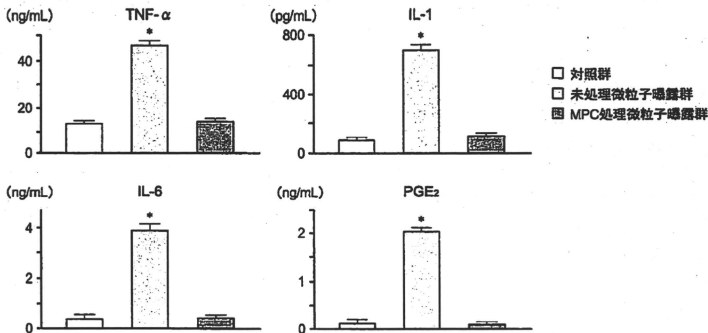


図 6 *In vitro* マウス骨吸収モデルの結果

骨吸収を誘導する液性因子濃度：未処理微粒子曝露群の濃度は、溶液のみを加えた対照群と比べ約 4~46 倍高値を示したが、MPC 処理微粒子を曝露した群ではこれらの濃度上昇がみられず、対照群と有意な差がみられなかった。

\*:  $p < 0.01$

(文献 12 より一部改変)

COX-2: cyclooxygenase-2, TNF: tumor necrosis factor, TRAP: 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ

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、単位面積あたりの破骨細胞数 (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・骨吸収面が対照群のそれぞれ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対照群と有意な差がみられなかった。

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 ポリマーはマクロファージに異物としての認識を受けないため、MPC の微小粉は貪食されず、その結果、破骨細胞の形成・活性化および骨吸収を誘導しないことが明らかになった。

## ■ おわりに

今回紹介した研究から、人工関節の PE 摺動面の MPC 処理は、骨溶解の主因となる 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、が明らかになった。すなわち、① 摩耗粉を減少させること、② 骨吸収過程を抑制すること、の2つの目標が同時に達成できることが示された。この結果、我々は本技術が、長寿命型の人工関節の創出につながるものと考え、2007 年から MPC 処理を加えた PE 摺動面を搭載した人工関節の治験を行っている。

本稿では、主として人工関節に関する研究を紹介したが、人工関節においても高い耐摩耗効果を期待できるという知見を得ており、基礎検討を進めている。また、金属表面やセラミックス表面の MPC ポリマー処理技術の確立も進めており、今後、さまざまな臨床応用の道が開けるものと期待している<sup>21)</sup>。

## 文 献

- 1) Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, et al : Osteolysis : basic science. Clin Orthop **393** : 71-7, 2001.
- 2) Harris WH : Wear and periprosthetic osteolysis : the problem. Clin Orthop **393** : 66-70, 2001.
- 3) Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, et al : A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and non-loosened total hip arthroplasties. Clin Orthop **244** : 182-187, 1989.
- 4) Manley MT, D'Antonio JA, Capello WN, et al : Osteolysis : a disease of access to fixation interfaces. Clin Orthop **405** : 129-137, 2002.
- 5) Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H : Wear and osteolysis in total joint replacements. Acta Orthop Scand Suppl **278** : 1-16, 1998.
- 6) Hills BA, Butler BD : Surfactants identified in synovial fluid and their ability to act as boundary lubricants. Ann Rheum Dis **43** : 641-648, 1984.
- 7) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N : Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. Polym J **22** : 355-360, 1990.
- 8) 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 **29** : 181-188, 1995.
- 9) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, et al : Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption ? J Biomed Mater Res **39** : 323-330, 1998.
- 10) Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW : Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. Biomaterials **23** : 1697-1706, 2002.
- 11) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, et al : 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* **90** : 362-371, 2008.
- 12) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al : Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* **3** : 829-836, 2004.
  - 13) Kyomoto M, Moro T, Konno T, et al : 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.
  - 14) Dowson D, Fisher J, Jin ZM, et al : Design considerations for cushion form bearings in artificial hip joints. *Proc Inst Mech Eng H* **205**:59-68, 1991.
  - 15) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, et al : 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** : 439-447, 2008.
  - 16) Kyomoto M, Moro T, Konno T, et al : Enhanced wear resistance of modified cross-linked polyethylene by grafting with poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *J Biomed Mater Res A* **82** : 10-17, 2007.
  - 17) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, et al : 2006 Frank Stinchfield Award : grafting of biocompatible polymer for longevity of artificial hip joints. *Clin Orthop Relat Res* **453** : 58-63, 2006.
  - 18) Moro T, Kawaguchi H, Ishihara K, et al : Wear resistance of artificial hip joints with poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafted polyethylene : comparisons with the effect of polyethylene cross-linking and ceramic femoral heads. *Biomaterials* **30** : 2995-3001, 2009.
  - 19) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, et al : 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 Appl Biomater* **84** : 320-327, 2008.
  - 20) Konno T, Kurita K, Iwasaki Y, et al : Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *Biomaterials* **22** : 1883-1889, 2001.
  - 21) Kyomoto M, Iwasaki Y, Moro T, et al : High lubricious surface of cobalt-chromium-molybdenum alloy prepared by grafting poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* **28** : 3121-3130, 2007.



## Lubricity and stability of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) polymer layer on Co–Cr–Mo surface for hemi-arthroplasty to prevent degeneration of articular cartilage

Masayuki Kyomoto<sup>a,c,f</sup>, Toru Moro<sup>c,d</sup>, Ken-ichi Saiga<sup>a,c,f</sup>, Fumiaki Miyaji<sup>f</sup>, Hiroshi Kawaguchi<sup>d</sup>, Yoshio Takatori<sup>c,d</sup>, Kozo Nakamura<sup>d</sup>, Kazuhiko Ishihara<sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup> Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>b</sup> Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>c</sup> Division of Science for Joint Reconstruction, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>d</sup> Sensory & Motor System Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>e</sup> Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>f</sup> Research Department, Japan Medical Materials Corporation, 3-3-31 Miyahara, Yodogawa-ku, Osaka 532-0003, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 July 2009

Accepted 22 September 2009

Available online 9 October 2009

#### Keywords:

Phosphorylcholine

Cobalt alloy

Hip replacement prosthesis

Surface modification

Cartilage

Friction

### ABSTRACT

Migration of the artificial femoral head to the inside of the pelvis due to the degeneration of acetabular cartilage has emerged as a serious issue in resurfacing or bipolar hemi-arthroplasty. Surface modification of cobalt–chromium–molybdenum alloy (Co–Cr–Mo) is one of the promising means of improving lubrication for preventing the migration of the artificial femoral head. In this study, we systematically investigated the surface properties, such as lubricity, biocompatibility, and stability of the various modification layers formed on the Co–Cr–Mo with the biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer by dip coating or grafting. The cartilage/poly(MPC) (PMPC)-grafted Co–Cr–Mo interface, which mimicked a natural joint, showed an extremely low friction coefficient of <0.01, as low as that of a natural cartilage interface. Moreover, the long-term stability in water was confirmed for the PMPC-grafted layer; no hydrolysis of the siloxane bond was observed throughout soaking in phosphate-buffered saline for 12 weeks. The PMPC-grafted Co–Cr–Mo femoral head for hemi-arthroplasty is a promising option for preserving acetabular cartilage and extending the duration before total hip arthroplasty.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Resurfacing or bipolar hemi-arthroplasty for the treatments of osteoarthritis or osteonecrosis of hip of the young, active patient profile, and fractures of the femur neck of the typically aged patient profile, has long been advocated [1]. Consequently, resurfacing and bipolar hemi-arthroplasties can be possibly used as delaying tactics prior to revision surgeries of total hip arthroplasty. Most patients receive dramatic pain relief and rapid improvement in both their daily activities and quality of life due to advantages such as reduced blood loss, lower dislocation, ease of implantation, etc. However, migration of the artificial femoral head to the inside of the pelvis

due to the degeneration of acetabular cartilage has emerged as a serious issue in the hemi-arthroplasties [2]. The longevity of the artificial femoral head after hemi-arthroplasty depends upon the quality of the acetabular cartilage or the lubrication conditions between the artificial femoral head and acetabular cartilage. Surface modifications of cobalt–chromium–molybdenum alloy (Co–Cr–Mo) for the artificial femoral head is one of the promising means of improving lubrication and preventing the degradation of acetabular cartilage, thereby preventing the migration of the artificial femoral head. Such surface modifications may improve hemi-arthroplasty survival, and liberate the restrictions for its application to younger, active patients.

Most frequently, surface modification with polymer is performed using either of the following methods: (1) surface-initiated graft polymerization, termed as the “grafting from” method, in which monomers are polymerized from initiators, and the polymeric molecules are grafted onto the substrate through covalent bonding; and (2) adsorption or immobilization of the polymer onto

\* Corresponding author. Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan. Tel.: +81 3 5841 7124; fax: +81 3 5841 8647.

E-mail address: [ishihara@mpec.u-tokyo.ac.jp](mailto:ishihara@mpec.u-tokyo.ac.jp) (K. Ishihara).



the substrate (i.e., dipping, cross-linking, and ready-made polymers with reactive end groups reacting with the functional groups of the substrate) [3–5].

2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymers have attracted considerable attention as surface modifiable polymers for several medical devices [6–16]. MPC is a monomer for preparing novel polymer biomaterials and can undergo conventional radical copolymerization with other methacrylates, such as *n*-butyl methacrylate (BMA), *n*-dodecyl methacrylate (DMA), and 3-methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPSI), to form poly (MPC-co-BMA), poly(MPC-co-DMA), and poly(MPC-co-MPSI), respectively [10–16]. They have potential applications in a variety of fields such as biomedical science, surface science, and bioengineering because they possess unique properties such as excellent anti-biofouling ability and low friction ability. Thus, surface modification with the MPC polymer on medical devices is effective for obtaining biocompatibility. In fact, several medical devices have already been developed by utilizing MPC polymers and used clinically; therefore, the efficacy and safety of MPC polymers as biomaterials are well established [14–16].

In this study, we hypothesize that the structure of surface modification layers might affect the long-term stability, hydration kinetics, articular cartilage retention, etc., and particularly that the poly(MPC) (PMPC)-grafted surface might assure the long-term performance of the artificial femoral head for partial hemiarthroplasty. Therefore, we investigated the surface properties of various surface modification layers with the MPC polymer and the effects of the surface properties on the friction of the artificial femoral head against articular cartilage. The results reveal that the structure of the PMPC-grafted layer on the Co–Cr–Mo surface plays an important role in the articular cartilage retention in the long term.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

MPC was industrially synthesized by using the method reported by Ishihara et al. and supplied by NOF Corp. (Tokyo, Japan) [17]. MPSI was purchased from Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Succinic acid and ethanol were purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan). 2-Hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-propan-1-one (DAROCUR 2959; D2959), as a highly efficient radical photoinitiator for ultraviolet (UV) curing, was purchased from Ciba Specialty Chemicals Holding Inc. (Basel, Switzerland). Poly(MPC-co-BMA) (PMB30; MPC unit mole fraction = 0.3) [17], poly(MPC-co-MPSI) (PMS190; MPC unit mole fraction = 0.9) [13], and PMPC (for lubricant additive in friction test) were synthesized in ethanol using 2,2'-azobisisobutyronitrile as an initiator by a conventional radical copolymerization method.

### 2.2. Co–Cr–Mo alloy substrate and pretreatments

The Co–Cr–Mo alloy was supplied by Yoneda Advanced Casting Co., Ltd. (Takaoka, Japan). This alloy was manufactured according to the ASTM F75 standard specification for the Co–28Cr–6Mo alloy. The Co–Cr–Mo samples were machined and polished so that the average surface roughness was approximately 0.01  $\mu\text{m}$ ; this surface was comparable to those of femoral ball products.

The polished Co–Cr–Mo samples were washed with acetone, and then immersed in 35 vol% nitric acid at room temperature for 35 min. This treatment aimed at passivation by surface oxidation; this would lead to the dissolution of certain foreign substance residues and the concentration of the Cr constituent by "resurfacing" [18]. After the nitric acid treatment, the Co–Cr–Mo samples were irradiated with  $\text{O}_2$  plasma at a 500-W high-frequency output and 150-mL/min  $\text{O}_2$  gas flow for 5 min by using an  $\text{O}_2$  plasma etcher (PR500; Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan). The  $\text{O}_2$  plasma treatment increased the thickness of the surface oxide layer [18].

### 2.3. MPC polymer coating

The preparation of the MPC polymer-coated Co–Cr–Mo is schematically illustrated in Fig. 1. The physical adsorption of PMB30 was carried out by the solvent evaporation method, where the pretreated Co–Cr–Mo specimens were dipped into ethanol solution containing 0.2 mass% PMB30 ( $M_w = 6.0 \times 10^3$ ) for 10 s for coating

and then placed in an ethanol vapor atmosphere at room temperature for 1 h. The coated Co–Cr–Mo specimens were again dipped for 10 s and placed in the ethanol vapor atmosphere at room temperature for 1 h (PMB30-adsorbed Co–Cr–Mo).

The chemical immobilization of PMS190 was also carried out by the solvent evaporation method. The pretreated Co–Cr–Mo specimens were dipped into ethanol solution containing 0.5 mass% PMS190 ( $M_w = 9.8 \times 10^4$ ) and 0.063 mg/mL succinic acid for 12 h for the silanization of trimethoxysilane group of PMS190 and placed in the ethanol vapor atmosphere at room temperature for 1 h. The coated Co–Cr–Mo specimens were annealed in air at 70 °C for 3 h for dehydration (PMS190-immobilized Co–Cr–Mo).

### 2.4. MPSI silanization and MPC graft polymerization

The preparation of the PMPC-grafted Co–Cr–Mo is schematically shown in Fig. 1. The pretreated Co–Cr–Mo samples were immersed in an ethanol solution containing 5 mass% MPSI, 1 mass% succinic acid, and 0.1 mass% D2959 at room temperature for 12 h for silanization of the trimethoxysilane group. In this study, D2959 was used as the photoinitiator for surface-initiated polymerization so as to be included in the MPSI layer. They were then annealed at 70 °C for 3 h in air for dehydration. MPC was dissolved in degassed pure water to obtain a concentration of 0.5 mol/L. Subsequently, the MPSI (containing D2959)-coated Co–Cr–Mo samples were immersed in MPC aqueous solutions. Photoinduced graft polymerization on the Co–Cr–Mo surface was performed using ultraviolet irradiation (UVL-400HA ultra-high pressure mercury lamp; Riko-Kagaku Sangyo Co., Ltd., Funabashi, Japan) with an intensity of 5 mW/cm<sup>2</sup> at 60 °C for 90 min; a filter (Model D-35; Toshiba Co., Tokyo, Japan) was used to restrict the passage of ultraviolet light to wavelengths of 350  $\pm$  50 nm (PMPC-grafted Co–Cr–Mo) [19]. After the polymerization, the PMPC-grafted Co–Cr–Mo samples were removed from the solution, washed with pure water and ethanol, and dried at room temperature. The molecular weight of the PMPC graft chain on the PMPC-grafted Co–Cr–Mo samples could not be determined due to the difficulty in separating the PMPC graft chain from the Co–Cr–Mo substrate. Additional efforts are needed in this aspect.

### 2.5. Articular cartilage from porcine ankle joint

Articular cartilage specimens were harvested from the flat part of the ankle joint of the fresh frozen porcine tibia (age 6–9 months) by using a surgical saw for the friction test. The pin-type (cylinder-shaped with a height of 5 mm and diameter of 9 mm) articular cartilage specimens had approximately a 1-mm cartilage layer and the subchondral bone used for mounting. Throughout the procedure, the articular cartilage surface was hydrated regularly with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, ion strength = 0.15 M; Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan).

### 2.6. Surface analysis of surface-modified Co–Cr–Mo with various MPC polymers

The functional group vibrations of the surface-modified Co–Cr–Mo samples were examined by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy with attenuated total reflection (ATR) equipment. The FT-IR/ATR spectra were obtained using an FT-IR analyzer (FT/IR61S; JASCO Co., Ltd., Tokyo, Japan) for 32 scans over the range from 800 to 2000 cm<sup>-1</sup> at a resolution of 4.0 cm<sup>-1</sup>.

The surface elemental conditions of the surface-modified Co–Cr–Mo samples were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The XPS spectra were obtained using an XPS spectrophotometer (AXIS-HSi165, Kratos/Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipped with a 15-kV Mg-K $\alpha$  radiation source at the anode. The take-off angle of the photoelectrons was maintained at 90°. Five scans were taken for each sample.

The static-water contact angles on the surface-modified Co–Cr–Mo samples were measured by the sessile drop method using an optical bench-type contact angle goniometer (Model DM300, Kyowa Interface Science Co., Ltd., Saitama, Japan). Drops of purified water (1  $\mu\text{L}$ ) were deposited on the surface-modified Co–Cr–Mo surfaces, and the contact angles were directly measured with a microscope after 60 s of drooping. Measurements were repeated fifteen times for each sample, and the average values were regarded as the contact angles.

The surface-modified Co–Cr–Mo samples were stained with rhodamine GG (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) and observed by fluorescence microscopy (FM). According to previous literature, rhodamine GG effectively stains the MPC polymer, which possesses great structural similarity to lipids [20]. This simple staining technique enables the evaluation of the surface-modified layer with MPC polymer by FM. An aqueous solution of 200 mass ppm rhodamine GG was used for all the staining experiments. The samples were immersed in the rhodamine GG solution for 30 s and then removed. Then, they were washed two times consecutively in distilled water for 30 s and then dried. A fluorescence microscope (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) was used for FM imaging and examination of all samples. Pseudo-color images were obtained using a charge coupled device (CCD) camera (VB-7010, Keyence Co., Osaka, Japan) and imaging software (VH analyzer 2.51). Lenses with  $\times 10$  magnification and appropriate exposure time (approximately 0.1 s) were employed to obtain the best image quality of the various samples.