

表2-1: チタンプレート上の培養で10倍以上発現量が高いタンパク質

fold	protein name	function
1	Collagen alpha-1(XVIII) chain (COL18A1)	様々な細胞の基底膜に発現がある。 C末端断片であるエンドスタチンは内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害する。
1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1 (GBP1)	GTPを加水分解しGDPだけでなくGMPにする。
0.9998	Transcription initiation factor TFIID subunit 3 (TAF3)	転写因子TFIID複合体の基本因子の一つ。
81.034	Probable aminopeptidase NPEPL1 (NPEPL1)	種々のペプチドのN末端側の非置換型アミノ酸を取り除く。
65.489	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4)	JNK, p38およびCSBP2のMAPK系を活性化する。
49.761	Arginase-1 (ARG1)	L-アルギニンを加水分解し、L-オルニチンと尿素に分解する。
22.702	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1 (ADHL16A1)	アルデヒド脱水素酵素の一種。アルデヒドを酸化してカルボン酸に変える。
20.119	A-kinase anchor protein 2 (AKAP1)	プロテインキナーゼAの調節サブユニットに結合し、 極性の確立やシグナル伝達系などに関与している。
11.661	Tudor domain-containing protein 5 (TDRD5)	RNAと結合するドメインを有し、精子形成時のRNAプロセッシングに関与している。
11.579	COP9 signalosome complex subunit 1 (GPS1)	ユビキチンリガーゼの働きを調節し、細胞増殖やDNA修復などに関与している。

fold:チタンプレート上で培養/細胞培養用シャーレで培養  
赤字:チタンプレート上で培養した細胞でのみ発現があった

表2-2: チタンプレート上の培養で発現量が1/10以下だったタンパク質

fold	protein name	function
0	Neuroblastoma-amplified sequence (NBAS)	神経芽細胞腫で増幅される遺伝子で低身長症との関連が示されている。
0.0134	Regulator of microtubule dynamics protein 1 (FAM82B)	種々の器官で有糸分裂期の染色体分配において、微小管に結合して機能している。
0.0194	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A (USP4A)	細胞質分裂に関与している。
0.0246	Keratin, type I cytoskeletal 9 (KRT9)	ケラチンの一種で特に手掌と足底で発現がある。
0.0272	Titin (TTN)	有糸分裂期の染色体濃縮および染色体分配で重要な役割を果たしている。
0.0606	Midasin (MDN1)	60Sリボソームの成熟と核移行に必要なシャペロンタンパク質である。
0.0866	Dynein heavy chain 17, axonemal (DNAH)	ATPアーゼ活性を有し、微小管のマイナス端方向に移動する。

fold:チタンプレート上で培養/細胞培養用シャーレで培養  
赤字:チタンプレート上で培養した細胞で発現がなかった

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究課題名

整形インプラント材料の界面特性に着目した新規評価方法の開発

研究分担者 迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官

研究要旨

人工関節は毎年 15 万例が使用され、今後も使用数の増加が予想されている。同時に不具合による再置換も増加しており、人工関節の長寿命化が望まれている。人工関節の不具合要因の一つとして、摺動面材料である超高分子量ポリエチレンの摩耗が挙げられる。そこで、摺動面材料自体の耐摩耗性の向上を目指した研究開発が行われてきた。一方、近年、界面の親水性処理技術による摺動面の低摩擦化、低摩耗化の研究開発が進んでいる。

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine ポリマーは、細胞膜成分類似の構造を持つことから、高い生体適合性を有しているため、循環器系のインプラントなどに応用されている。また、その高い親水性のために人工関節の低摩擦化、低摩耗化にも寄与することが報告されている。しかし、その詳細な作用機序や耐久性については不明な点も多い。今後も類似の親水性界面処理技術が応用される可能性もあることから、親水性界面を持つ摺動面の低摩擦、低摩耗の機構の解明と、耐久性評価法の確立を目的とした。

本年度は、既存の摩擦試験機に改造を加え、摩擦係数の測定が可能となるシステムを構築した。キャリブレーションを行い、摩擦係数の測定が可能であることを確認した。既存の摺動面材料である超高分子量ポリエチレンを用いて、摩擦係数の測定を行った。求められた摩擦係数は過去の文献のデータと一致し、構築した摩擦係数測定システムの妥当性が示唆された。

A. 研究目的

人工関節は、整形外科領域で使用される代表的なインプラントであり、主に変形性関節症や関節リウマチの患者で、疼痛などの理由により歩行や起立といった日常生活に支障が生じた場合に使用される。2007 年度現在、年間約 15 万例が使用されていると推計されており、今後も高齢人口の増加などを背景に、毎年、症例数が増加すると予想されている。

人工関節は一度埋植されると、恒久的に使

用できることが望ましいが、一般的に耐用年数は 20 年程度と言われ、症例数の増加に伴って不具合により再置換される事例も増加している。再置換術は、不具合を起こした人工関節を抜去する必要があること、初回手術に比べて人工関節を支える骨の量の減少および質の低下があることなどの理由により、初回の手術に比べ困難な手術となる。そこで、再置換に至らない人工関節の開発、つまり、人工関節の長寿命化に関する研究が盛んに行わ

れている。人工関節の長寿命化が実現すれば、再手術による患者や家族の身体的および精神的、経済的な負担が解消されるだけでなく、困難な手術を行う医師の負担も軽減される。また、社会経済学的にも医療費の削減など、非常に有益である。

人工関節の不具合の原因は、患者に起因するものや、手術手技に起因するものなども含め、極めて多岐にわたる<sup>2)</sup>が、製品に起因する主な原因としては、摺動面における摩耗が挙げられる<sup>2,3)</sup>。この問題の解決のため、1990年代より、摺動面材料である超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) の改良などが積極的に行われてきた。近年、これに加え、摺動面の表面を改質することにより、低摩擦化と低摩耗化を目指した研究開発が行われるようになった。

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) は細胞膜に含まれる代表的なリン脂質である、phosphatidylcholine (PC) と同じ phosphorylcholine を含む物質であり、これを重合した MPC ポリマー (PMPC) は親水性が極めて高く<sup>4)</sup>、蛋白を吸着しない<sup>5)</sup>など優れた生体適合性を示すことが知られている。Moro et al.はこの PMPC を人工関節の摺動面に適用し、低摩擦と低摩耗を実現できることを報告した<sup>6,7)</sup>。また、in vivo および in vitro において摩耗粉を模した微細な粉体を使用して実験を行い、PMPC コーティングを施した粉体は通常の粉体に比べ、マクロファージの活性化や骨溶解が抑制される<sup>8)</sup>ことから、万一摩耗により生体内に摩耗粉として放出されても、PMPC コーティングの作用により人工関節のゆるみなどの不具合につながりにくい可能性を示した。

このような親水性ポリマーを用いた界面処

理による低摩擦化、低摩耗化は、PMPC 以外のポリマーでも報告されており<sup>8)</sup>、その親水性や電荷、ポリマーブラシ構造と呼ばれる立体構造に起因していると考えられている。しかし、その詳細については不明であり、耐久性などの評価法も確立していない。そこで、本研究では親水性ポリマーブラシ構造をもつ摺動面の低摩擦、低摩耗の機構の解明と、耐久性評価法の確立を目的とした。

また、摺動面材料の基材としては、従来からある UHMWPE や金属、セラミックスに加え、polyetheretherketone (PEEK) の研究<sup>9,10)</sup>も進んでおり、PMPC コーティングも可能である<sup>11)</sup>ことから、基材についてもあらゆる可能性をふまえて、幅広く検討することとした。

本年度は測定システムの構築と、対照試料となる UHMWPE の基礎データ収集を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 摩擦力測定システムの構築

摩擦係数は、摺動の状態を知る手がかりとなる、最も重要なパラメータであるため、初めに、摩擦係数を測定できるシステムの構築を行った。具体的には、既存の二次元摩耗試験機を利用し、これを改造することでシステムの構築を行った。この試験機では、上部に試料となるピンを保持するためのホルダーがあり、下部に相手面となるプレートを固定する金具が用意されている。摩耗試験機では、大きな荷重が長期にわたり加わるため、いずれも高剛性の設計となっており、摩擦係数の測定にはむかないものであった。そこで、このうち、上部のピンホルダー部分を、摺動中の摩擦力により変形するよう、二本の薄板で作製し、変形が最大となる部分に一般応力測

定用ゲージ（共和電業、KFG-02-120-C1-11L3M2R）を貼付した（図1）。ひずみゲージはセンサーインターフェース（共和電業、PCD-300B）を介して、パーソナルコンピュータに接続し、専用のダイナミックデータ収録ソフトウェア（共和電業、DCS-100A）により記録した。なお、ひずみゲージの接続法は4ゲージ法を用いた。この接続法では、引張圧縮ひずみは相殺され検出されず、曲げひずみのみが検出される。また、出力は4倍となり、より感度よく計測される。

この摩擦力測定システムのキャリブレーションを行った。試料ピンホルダー全体を万力で横向きに固定し、摩擦力の測定方向に重量が既知の錘を載せることで、摩擦力に対するひずみゲージの出力について調べた（図2）。キャリブレーションは、正負2方向について行い、合計3回繰り返した。

## 2. 摩擦係数測定試験

現在、人工関節の摺動面材料として最も多用されている、UHMWPEとコバルトクロム合金を試験試料として、構築したシステムを用いて、摩擦係数の測定を行った。

シート成形したUHMWPE GUR1020より、機械加工にて直径10 mm、高さ16 mm、摺動面が直径6 mmの円筒状のピンを作製し、試料ピンとした（図3）。

相手面には40 mm x 40 mm x 10 mmのコバルトクロム合金製プレートを使用した。摺動面は人工関節の骨頭と同様の鏡面仕上げとした。

荷重は生理的な荷重条件を考慮し、5 kg、10 kg、15 kg、20 kgとした。試料ピンの接触面積より、平均接触応力は、1.73 MPaから6.93 MPaとなり、数MPa程度といわれる、人工関節の生理的な接触応力に近い値と

なった。

摺動パターンは長さ10 mmの単純往復動とし、摺動速度は4 mm/sであった。

潤滑液には、牛血清水溶液を用いた。ISO規格<sup>12)</sup>を参考に、牛血清（三光純薬、Calf serum、CC3017-502、Lot No: 18110827）を蛋白量が20 g/Lとなるよう、蒸留水で希釈した。なお、今回使用した牛血清の総蛋白量は81 g/Lであった。カルシウムの沈着を抑制するためにエチレンジアミン四酢酸（EDTA、2Na、Bio-rad、161-0728）20 mmol/Lを加えた<sup>12)</sup>。また、微生物の繁殖を抑制するためにアジ化ナトリウム（NaN<sub>3</sub>、和光純薬、195-11092）1 g/Lを添加した<sup>13)</sup>。試験は室温で行った。

荷重を静かに加えた後、往復動を開始した。摩擦力は100 Hzで記録し、試験はおよそ5分間継続した。

## C. 研究結果

### 1. 摩擦力測定システムの構築

図4にキャリブレーションの結果の一例を示す。錘の重量とひずみゲージの出力の間には、極めて高い相関性が見られることがわかった。この結果から、原点を通る直線近似曲線を求め、その傾きを求めると、0.0146 N/ $\mu\epsilon$ であった。（ $\mu\epsilon$ ：マイクロひずみ）

表1に3回測定した際の傾きを示す。傾きは若干変化があるものの、相関係数はいずれも極めて高く、高い線形性が得られることがわかった。

### 2. 摩擦係数測定試験

図5に1サイクルの摩擦力の測定例を示す。サイクルのはじめに静止摩擦力に相当する高い摩擦力のピークが観察され、その後は動摩擦力を示すより低い値が観察された。摺動方

向が逆になると、逆方向の静止摩擦력에相当する負の方向へのピークが觀察され、その後同様に動摩擦力を示す値が觀察された。

この結果から、正方向への最大値と負方向への最小値の和の二分の一を静止摩擦力とした。また、正の方向への最小値と負の方向への最大値の和の二分の一を動摩擦力とした。サイクル数が進行するに従い、いずれの値も若干変化するため、安定する 51 サイクル目から 55 サイクル目の平均値を採用した。

図 6 に荷重を変化させた際の静摩擦係数と動摩擦係数の結果を示す。試験は各荷重値で 2 回測定した。静摩擦係数が高荷重条件で若干ばらついているものの、2 回の測定でほぼ同様の結果が得られた。静摩擦係数および動摩擦係数のいずれにおいても、高荷重になるにつれて摩擦係数が下がる傾向が見られた。

図 7 に動摩擦係数について、過去の計測結果との比較を示す。使用した試験機が異なるため、接触応力の値が異なり、摺動条件などその他の条件も多少異なるものの、計測結果はほぼ同一直線上に並んでおり、今回の計測の結果の妥当性が示唆された。

## D. 考察

### 1. 摩擦力測定システムの構築

キャリブレーションの結果、ホルダーに加わる力とひずみゲージの出力の間には高い相関性があることがわかった。このことから、今回構築したシステムで摩擦係数の測定が可能であると考えられた。

キャリブレーションにより得られた、力とひずみ間の係数は、第 1 回目の測定と第 2 回目の測定で 4 % の違いが生じた。これは、第 1 回目の測定と第 2 回目の測定の間で、ホルダーの分解と再組立をした結果であると考えられた。一方、第 2 回目と第 3 回目の測定

の間では 0.2 % の差しかなかった。この間には、摩擦測定試験を行っており、ホルダーの分解は行わなかった。このことから、ホルダーの組立時のアライメントの影響により係数が変化する可能性があること、摩擦試験前後では係数に大きな影響がないことが示唆された。従って、ホルダーを組み立てる際には、そのアライメントに十分注意すること、組み立てを行った場合はキャリブレーションをする必要があることがわかった。

キャリブレーションは、最大約 13 N の荷重を用いて行った。摩擦測定試験の結果、動摩擦力の最大値は約 12 N で、この範囲に入っていたが、静摩擦力の最大値は約 22 N で、キャリブレーションで使用した荷重の範囲外であった。従って、これらの測定結果はキャリブレーションからは線形性が保証されていないことになり、今後、キャリブレーションの範囲を拡大する必要性も考えられた。

摩擦力測定用のホルダーを単純な梁構造(図 8)と仮定して、材料力学を用いた理論計算によりホルダーに加わる摩擦力とひずみゲージ貼付部分に生じるひずみの関係について求めた。

梁の一端は完全固定で、他端に梁に垂直な力が摩擦力により加わりたわみが発生するが、この部分の梁のたわみ角は 0 であると仮定すると、

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} = \frac{1}{E} \cdot \frac{M}{I} \cdot \frac{h}{2} = \frac{3FL}{Ebh^2}$$

ただし、 $\varepsilon$ 、 $\sigma$ 、 $M$  はそれぞれひずみが最大となる梁の端点におけるひずみ、応力、モーメント、 $L$ 、 $h$ 、 $b$ 、 $I$  はそれぞれ梁の長さ、板厚、幅、断面二次モーメント、 $F$  は梁の端部に加わる荷重、 $E$  は弾性率である。これを  $F$  について解くと、

$$F = \frac{Ebh^2}{3L} \varepsilon$$

である。ここで、実際の梁は 2 本あること、4 ゲージ法を使っているため出力は 4 倍になることを考慮すると、摩擦力  $F$  は、

$$F = 2F$$

ひずみの出力  $\varepsilon$  は、

$$\varepsilon = 4\varepsilon$$

となる。ここから、摩擦力とひずみゲージの出力の間の係数  $k$  を求めると、

$$F = k\varepsilon$$

であるから、 $E = 167 \text{ GPa}^{14)}$ 、 $L = 20 \text{ mm}$ 、 $h = 1 \text{ mm}$ 、 $b = 10 \text{ mm}$  とすると、

$$k = 0.0139 \text{ [N}/\mu\varepsilon]$$

と計算される。この値は実測値である  $0.0152 \text{ N}/\mu\varepsilon$  と比べ 10 % 低い値である。

そこで、実際のひずみゲージの幅についても考慮することにした。ひずみゲージはなるべく小さなものを準備したが、今回使用したひずみゲージには 2 mm の幅があるため、梁の端部に貼付しても端部から 2 mm までの範囲の平均値を計測していると考えられる。そこで、ひずみが最大となる端点から 1 mm の点のひずみについて考察すると、梁の長さが 20 mm であるから、端部に生じる最大のひずみより 10 % 小さなひずみが生じると計算される。すると、

$$k = 0.0155 \text{ [N}/\mu\varepsilon]$$

となり、今回の計測値は理論値とほぼ一致していることがわかった。

## 2. 摩擦係数測定試験

静摩擦係数および動摩擦係数のいずれも、高荷重になるにつれ摩擦係数が低下することがわかった。過去の測定結果とあわせると、0.05 MPa から 7 MPa の範囲で同様の結果が得られることがわかった。二つの試験の試験

条件を比較すると、荷重条件が大きく異なるほか、摺動条件なども若干異なる (表 2)。しかし、両者の結果はよく一致しており、これらの試験条件の違いは摩擦係数に大きな影響を与えないことがわかった。

## E. 結論

二次元摩耗試験機を改造し、摩擦測定が可能なシステムを構築した。キャリブレーションを行った結果、このシステムは高い線形性を有していることがわかった。人工関節の摺動面材料として最も多く使用されている UHMWPE とコバルトクロム合金を用いて摩擦測定を行ったところ、高荷重になるにつれ摩擦係数が低下する傾向が見られた。この結果を過去の文献のデータと比較するとよく一致し、今回の試験の妥当性が示唆された。また、これらのデータを総合すると、0.05 MPa から 7 MPa という広い荷重範囲で同様の傾向が見られることがわかった。このシステムにより、親水性界面処理を施された新材料の摩擦特性を評価することが可能であると思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 迫田秀行, 石川格, 脇谷滋之, 天正恵治, 佐藤道夫, 松岡厚子: 人工関節用超高分子量ポリエチレンのフラクトグラフィに関する基礎的研究 臨床バイオメカニクス, 31, 187-191 (2010)
- 2) 石川格, 迫田秀行, 菅野伸彦, 松岡厚子, 土屋利江: 光学式 3D デジタイザによる抜去人工股関節 UHMWPE ライナーの摩耗測定 臨床バイオメカニクス, 31, 299-304 (2010)
- 3) Sakoda, H., Ishikawa, I., Jung, D. Y.,

Wakitani, S., Tensho, K., Sato, M. and Tsuchiya, T. : Direct evaluation of fatigue property of ultra-high molecular weight polyethylene components of retrieved knee implants using small specimens. *Strength, Fracture and Complexity*, 6, 103-114 (2010)

4) 迫田秀行, 石川格, 松岡厚子, 西井孝, 菅野伸彦: 破損したバイポーラ型人工骨頭の不具合要因分析 日本人工関節学会誌, 40, 550-551 (2010)

## 2. 学会発表

1) 迫田秀行, 松岡厚子: 高度架橋超高分子量ポリエチレンの疲労特性評価 日本機械学会 2010 年度年次大会, (2010 年 9 月)

2) 迫田秀行, 松岡厚子: 打ち抜き試験による超高分子量ポリエチレンの機械特性評価

第 37 回 日本臨床バイオメカニクス学会, (2010 年 11 月)

3) 迫田秀行, 靄島由二, 松岡厚子: 生体脂質による超高分子量ポリエチレンの酸化劣化

第 32 回 日本バイオマテリアル学会 (2010 年 11 月)

4) 迫田秀行, 松岡厚子: 超高分子量ポリエチレンのデラミネーション破壊発生特性評価法の開発

第 23 回 バイオエンジニアリング講演会, (2011 年 1 月)

5) Sakoda, H., Kawakami, T., Haishima, Y., Tensho, K., Wakitani, S. and Matsuoka, A. : Quantitative analysis of lipids extracted from retrieved UHMWPE knee component by organic

solvents.

*Orthopaedic Research Society*, 57th Annual Meeting, (2011 年 1 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

## H. 参考文献

1. 株式会社矢野経済研究所: 2008 年版 メディカルバイオニクス (人工臓器) 市場の中期予測と参入企業の徹底分析 19 (2008)
2. Ulrich, S. D., Seyler, T. M., Bennett, D., Delanois, R. E., Saleh, K. J., Thongtrangan, I., Kuskowski, M., Cheng, E. Y., Sharkey, P. F. and Parvizi, J. : Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? *International Orthopaedics*, 32, 597-604 (2008)
3. Kurtz, S. M., Muratoglu, O. K., Evans, M. and Edidin, A. A. : Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials*, 20, 1659-1688 (1999)
4. Ishihara, K., Ueda, T. and Nakabayashi, N. : Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes. *Polymer Journal*, 22, 355-360 (1990)
5. Ishihara, K., Nomura, H., Mihara, T., Kurita, K., Iwasaki, Y. and Nakabayashi, N. : Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?

- Journal of Biomedical Materials Research, 39, 323-330 (1998)
6. Moro, T., Takatori, Y., Ishihara, K., Konno, T., Takigawa, Y., Matsushita, T., Chung, U., Nakamura, K. and Kawaguchi, H. : Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nature materials*, 3, 829-836 (2004)
  7. Moro, T., Kawaguchi, H., Ishihara, K., Kyomoto, M., Karita, T., Ito, H., Nakamura, K. and Takatori, Y. : 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)
  8. Raviv, U., Glasson, S., Kampf, N., Gohy, J., Jerome, R. and Klein, J. : Lubrication by charged polymers. *Nature*, 425, 163-165 (2003)
  9. Nakahara, I., Takao, M., Bando, S., Bertollo, N., Walsh, W. and Sugano, N. : Histologic analysis of retrieved carbon fiber reinforced polyetheretherketone bearing in an ovine model. *Transactions of orthopaedic research society*, 36, 1001 (2011)
  10. Brockett, C., John, G., Williams, S., Isaac, G. and Fisher, J. : Wear of ceramic-on-carbon fibre reinforced PEEK hip replacements. *Transactions of orthopaedic research society*, 36, 1117 (2011)
  11. Kyomoto, M., Moro, T., Takatori, Y., Kawaguchi, H., Nakamura, K. and Ishihara, K. : Self-initiated surface grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on poly(ether-ether-ketone). *Biomaterials*, 31, 1017-1024 (2010)
  12. ISO FDIS 18192-1 : Implants for surgery - Wear of total intervertebral spinal disc prostheses - Part 1: Loading and displacement parameters for wear testing and corresponding environmental conditions for test. (2010)
  13. Sakoda, H. : PhD thesis, University of Leeds (2002)
  14. JIS G4313 : ばね用ステンレス鋼帯 (1996)



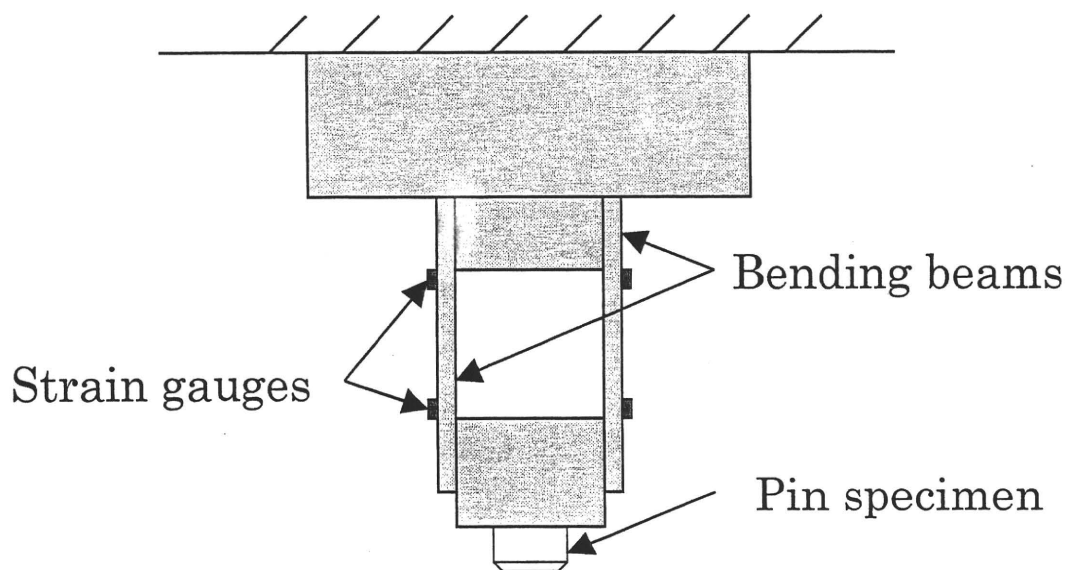


図1 本研究で製作した摩擦力測定用試料ピンホルダー

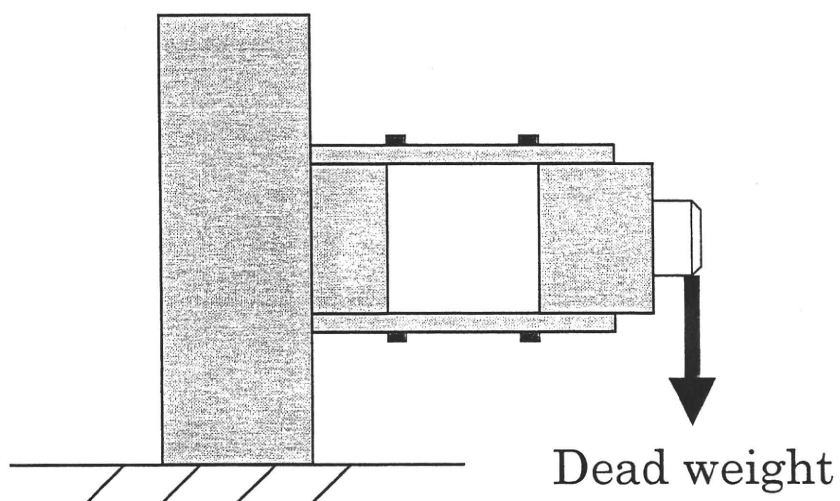


図2 摩擦力測定用試料ピンホルダーのキャリブレーション試験方法

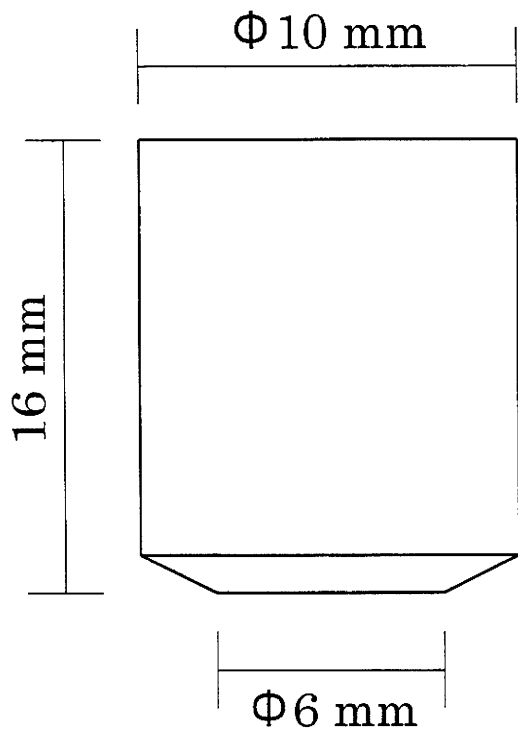


図3 試料ピンの寸法

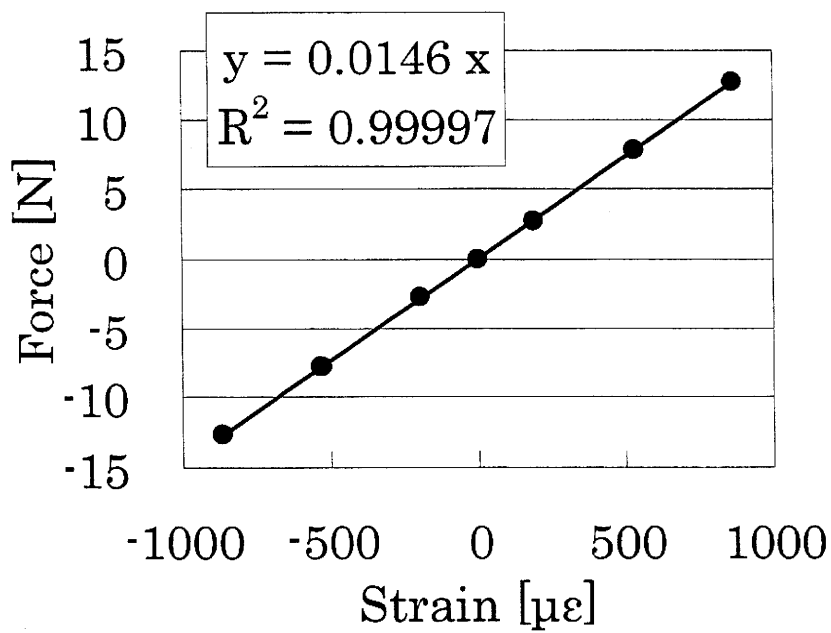


図4 摩擦力測定用試料ピンホルダーのキャリブレーション試験結果の一例

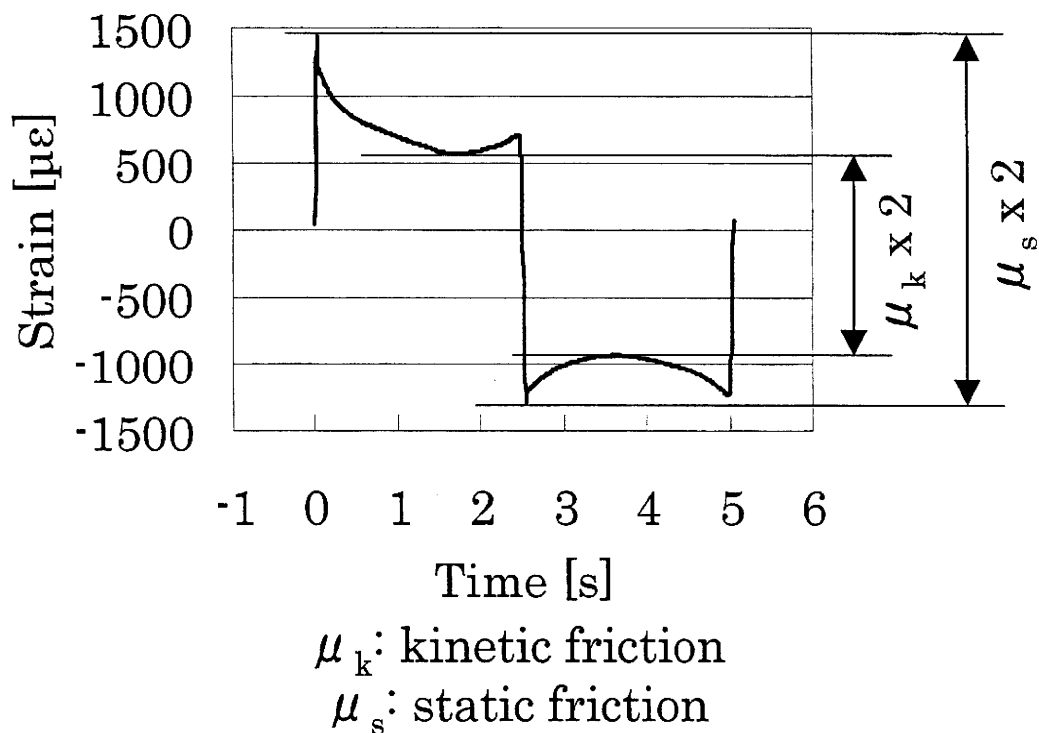


図5 UHMWPE ピンの摩擦力測定データの一部と静摩擦係数、動摩擦係数の算出方法

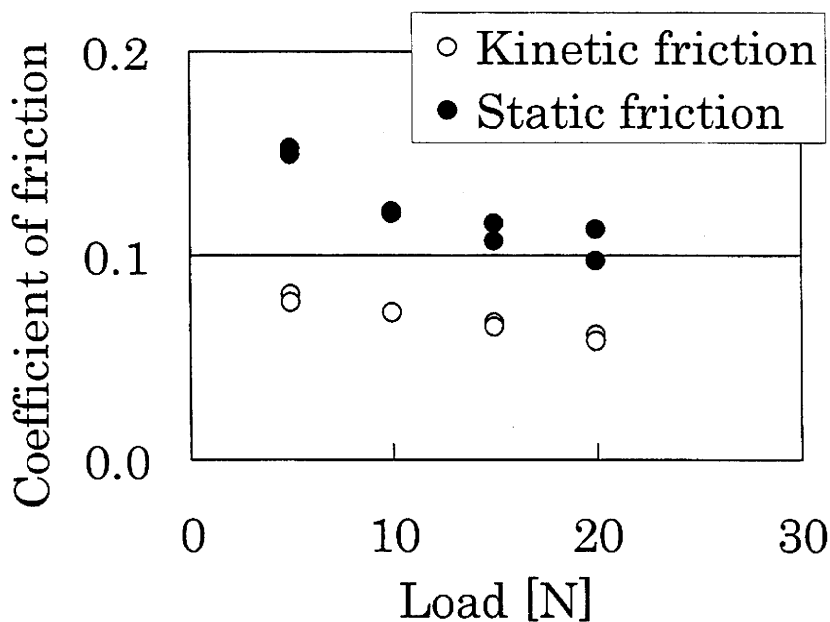


図6 UHMWPE ピンの静摩擦係数と動摩擦係数

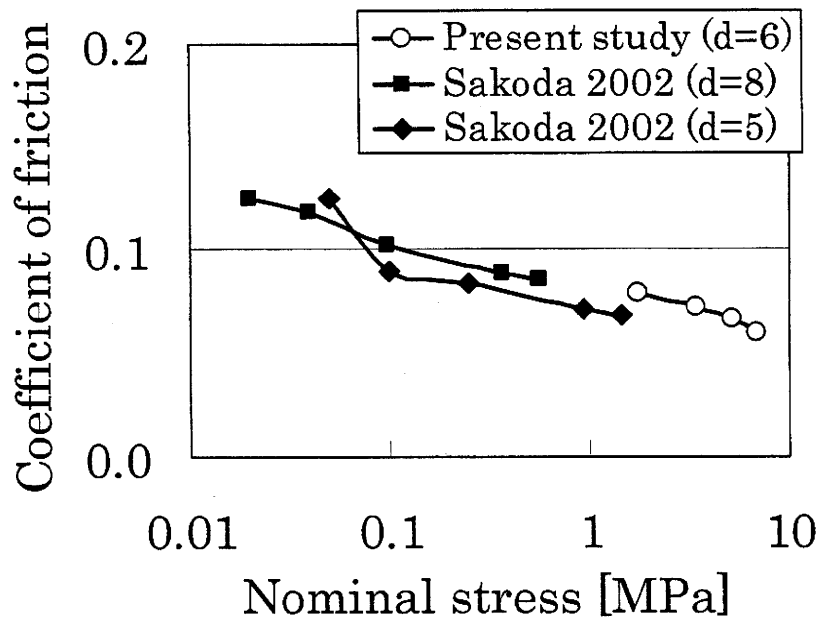


図7 UHMWPE ピンの動摩擦係数の過去の文献との比較

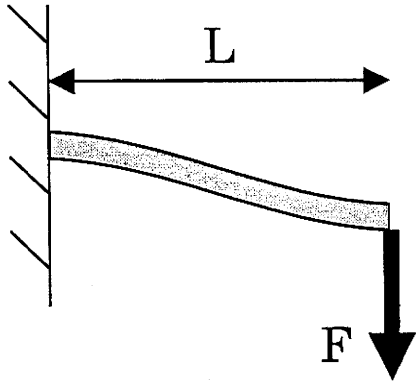


図8 摩擦力測定用試料ピンホルダーの材料力学を用いた理論計算モデル

表 1 キャリブレーション試験結果と試験間の係数差（差は直前の試験との係数の差を示す）

No.	Coefficient [N/ $\mu\text{e}$ ]	R <sup>2</sup>	Difference [%]
1	0.014648	0.999972	
2	0.015226	0.999863	3.95
3	0.015196	0.999784	-0.20

表 2 本研究と過去の文献における摩擦係数測定の試験条件の比較

	Present study	Sakoda 2002		
Contact surface diameter [mm]	6	8	5	
Load	min [N]	49	1	
	max [N]	196	28	
Nominal stress	min [MPa]	1.73	0.02	0.05
	max [MPa]	6.93	0.56	1.44
Sliding distance [mm]	10		20	
Sliding velocity [mm/s]	4	7.85 (max)		
Lubricant	Calf serum (20 g/L protein)	Calf serum (25 %)		
Counterface	CoCrMo	Alumina		
Counterface roughness [ $\mu\text{m}$ ]		Ra = 0.011		

分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究課題名  
分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討

研究分担者 植松美幸 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
研究協力者 中野達也 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部

研究要旨

医療機器などの血液適合性の評価において、材料表面と生体成分との相互作用を明らかにすることは重要である。しかしながら、高分子材料中における水分子構造の違いが高分子表面の安定性に与える影響は十分に知られていない。そこで、本研究では分子動力的シミュレーションをベースにその理論的な裏付けを行う。今回、血液適合性がよいとされる高分子材料を選定し、その材料と水分子との相互作用を可視化し、拡散係数を導入することで材料近傍の水の結合状態をシミュレーションした。

A. 研究目的

生体内に留置する医療機器は生体内の過酷な環境にさらされることになる。新規に開発された医療機器を審査する立場から評価する場合、現在行われている臨床試験は医療機器の留置年月に比べれば短期間であり、また、個人差の問題等も含まれる。よって、*in-vivo* での長期的な安全性をこのような臨床試験から評価するのは難しい。

そこで、われわれはシミュレーションを用いることにより、実際の状況を模倣しながら、実時間ではすぐに得られない情報を比較的短時間で得ることを目指す。一方、シミュレーションの結果に対して、実験などにより実際に起こりうる現象との対応をとることで、相補的な情報を獲得する。

本研究の最終目的は人工材料表面の血液適合性評価に関する指標を提案することである。血液適合性は血液／材料界面における水の構造が関連するのではないかと研究が進められており、Differential scanning calorimetry (DSC) によって計測される Cold

crystallization の有無が材料と水分子の結合状態と関連があることが示されている<sup>1)</sup>。この考えをもとに、本研究では血液適合性がよいとされる高分子材料を選定し、その材料と水分子の相互作用を分子動力的シミュレーションにより可視化することを目標とする。

B. 研究方法

1. 材料表面の水の水和状態による血液適合性

人工材料の血液適合性のよさは表面に吸着する血漿タンパク質の吸着挙動によるといわれている。そして、材料表面が血液に接触した場合、タンパク質が吸着する前に水が吸着することが知られている。血液が材料表面に付着することを考えたときに、材料の界面における水の構造がどのようになっているのかを知ることができれば、血液適合性との関係を解明する一歩となるのではないかと考えられる。

そこで、本シミュレーションでは、材料

表面近傍に存在する水分子について、または、存在する水分子を想定し、その水分子が材料に対してどの程度の動きやすさを持つのかについて、分子動力学的計算に基づいて表現する。

## 2. 分子動力学的シミュレーション

### 2.1 分子の初期構造

対象とする高分子材料については、モノマーそのものではなく、高分子 1 ユニット相当分の分子構造を簡易モデルとして設定した。しかしながら、十分な初期構造情報が得られなかったことから、ChemSketch (ACD/Labs、フリーウェア) で分子構造を描画した後、付属の 3D Viewer で簡易な MD 計算を行ったものを初期構造に設定した。

### 2.2 溶媒

高分子材料の表面に存在する水分子構造を知るため、材料の周りを取り巻く溶媒として水を設定する。水分子のモデルは種々提案されているが、分子動力学に用いられ、CHARMM 力場用に調整されている TIP3P を用いた。

### 2.3 境界条件

境界条件は、非周期境界条件と周期境界条件に分けられる。

- i) 非周期境界条件:対象分子系が真空中に孤立している。
- ii) 周期境界条件:対象分子系が無限につながっている。

対象材料の表面からの距離に応じた水の動きやすさを知るために、境界での拘束条件を受けないバルク水で満たされた状態を周期境界条件により設定した。

### 2.4 シミュレーション手順

シミュレーションを行うにあたっては、Discovery Studio (Accelrys) を用いた。シミュレーションの手順<sup>2)</sup>は次の通りである。

1) 材料の初期構造を構築し、Molecular Dynamics 計算で構造エネルギーを最小化する。

2) Discovery Studio で読み込み、力場 (CHARMM: Chemistry at HARvard Molecular Mechanics<sup>3)</sup>) を与えた上で、Smart Minimizer アルゴリズム (最急降下法・準ニュートン法・Truncated ニュートン法を用いた方法) により最小化する。

3) 材料の周りに TIP3P water を配置し、初期構造を Smart Minimizer アルゴリズムで決定する。

4) Standard Cascade Dynamics を行う。尚、Standard Cascade Dynamics の内容は次の通りである。

- i) 最急降下法による最小化
- ii) 共役勾配法による最小化
- iii) 加熱
- iv) 平衡化
- v) 構築

5) 周りの水の挙動を調べるため、エネルギーが安定となるステップの Trajectory を抽出し、保存する。

## 3. 評価方法: 拡散係数<sup>4),5)</sup>

水やイオンの拡散速度の度合いを示す物理量に拡散係数がある。ある分子の拡散係数が大きいほど拡散しやすく、小さければ拡散しにくいことを示す値である。

まず、単純化するために 1 方向の分子の動きについて考える。N 個の分子の集合を考えたとき、i 番目の分子の n ステップ目の位置  $x_i(n)$  が (n-1) ステップ目の位置  $x_i(n-1)$  から  $\pm \delta$  移動したとする。これは式 1 で表される。

$$\begin{aligned}\langle x(n) \rangle &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i(n) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [x_i(n-1) \pm \delta] \\ &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i(n-1) = \langle x(n-1) \rangle \dots \dots \dots \text{(式 1)}\end{aligned}$$

N が十分に大きい場合、 $\pm \delta$  は平均すると 0 となることから、分子の平均位置は 1 ステップ変化しても同じであるといえる。

つまり、全分子に対しての変位の 2 乗を平均したもの (平均 2 乗変位) は式 2 で表される。

$$\begin{aligned} \langle x^2(n) \rangle &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2(n) \\ &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [x_i^2(n-1) \pm 2\delta x_i(n-1) + \delta^2] \\ &= \langle x^2(n-1) \rangle + \delta^2 \dots \dots \dots \text{(式 2)} \end{aligned}$$

分子がすべて原点からの移動であるので、 $x_i(0) = 0$ 。したがって、式 2 は式 3 で表すことができる。

$$\langle x^2(n) \rangle = n\delta^2 \dots \dots \dots \text{(式 3)}$$

ここで、 $n=t/\tau$ であることから、 $x(n)$  を  $x(t)$  で表すと、式 4 となる。

$$\langle x^2(t) \rangle = \frac{t}{\tau} \delta^2 = \frac{\delta^2}{\tau} t \dots \dots \dots \text{(式 4)}$$

拡散係数を  $D = \delta^2/2\tau$  とおくと、式 5 となる。

$$\langle x^2(t) \rangle = 2Dt \dots \dots \dots \text{(式 5)}$$

ここで、分子の 3 方向に拡張する。それぞれの方向には独立であるとする、式 6 となる。

$$\langle r^2(t) \rangle = \langle x^2(t) \rangle + \langle y^2(t) \rangle + \langle z^2(t) \rangle = 6Dt \dots \dots \text{(式 6)}$$

これをアインシュタインとスモールコフスキーの式という。

以上より、拡散係数  $D$  は平均 2 乗変位の傾きを 6 で割ったもので計算できる。

### C. 実験

#### 1. 対象の選定

DSC の分析により Cold Crystallization が見られる材料を中心に、下記の材料を選定した。

- 1) PMEA: Poly(2-methoxyethyl acrylate)
- 2) PMEMA: Poly(2-methoxyethyl methacrylate)
- 3) PHEMA: Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
- 4) PHEA: Poly(2-hydroxyethyl acrylate)
- 5) PPEA: Poly(2-phenylethyl acrylate)
- 6) PEA: Poly(ethyl acrylate)
- 7) PBA: Poly(butyl acrylate)
- 8) PEHA: Poly(2-ethyl hexyl acrylate)

- 9) PTHFA: Poly(tetrahydrofurfuryl acrylate)
- 10) PEEA: Poly[2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate]
- 11) PMPC: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)

まず、ポリマーを構成する基本単位である 1 ユニットの構造に水素基を配置したものを対象としてシミュレーションを行った。比較対象には水を設定した。さらに、代表的な 4 種類の材料に対して、10 ユニットの分子構造を作成し、同様にシミュレーションを行った。

### D. 実験結果と考察

#### 1. 全材料の 1 ユニット分に関する比較

平衡状態にある 11 種類の材料に対し、平均 2 乗変位を算出した結果を図 1 に示す。また、拡散係数を算出した結果を図 2 に示す。ここで、1) PMEA、9) PTHFA、10) PEEA、11) PMPC は Cold crystallization が観測される材料であるが、これらの材料は 1 ユニット分に関して算出した拡散係数がバルク水の拡散係数と近い値を示していた。以上の結果より、この材料表面の水分子の動きやすさを示す指標がバルク水に近いことと Cold crystallization がみられることに関係性があることが示唆された。

#### 2. 選択した各材料の 10 ユニット分に関する比較

本研究課題で血液適合性がよいとされる高分子材料として取り組む 1) PMEA、11) PMPC、また、従来血液適合性がよいとされてきた 3) PHEMA、さらに上記 1 で最も拡散係数が小さかった 6) PEA の 4 種類の材料を選択し、材料表面からの距離に応じた水分子についてシミュレーションした。結果を次に示す。図 3、図 4、図 5 及び図 6 は、それぞれ、PMEA、PHEMA、PEA 及び PMPC の 10 ユニット分の平均 2 乗変位を材料表面からの 1 Å ごとの距離に応じて示した結果である。

また、これより図 7、図 8、図 9、図 10



は、それぞれ、PMEA、PHEMA、PEA 及び PMPC の 10 ユニット分の拡散係数を材料表面からの 1 Å ごとの距離に応じて示した結果である。

これらの結果より、PMEA では材料表面から 8-10 Å で中間水が存在し、10 Å 以上ではバルク水となる。PMPC では 7-10 Å あたりで緩やかに中間水が存在し、10 Å 以上ではバルク水として水分子がふるまうと考えられる。一方で、PHEMA、PEA には 8-9 Å あたりで結合力が他の 2 つに比べて弱い中間水があり、9 Å 以上ではバルク水としてのふるまいがみられていると考えられる。

PMPC は PHEMA などと比べて中間水が多く、タンパク質が水を介することから変性せず、材料に吸着しない<sup>9)</sup>という機構を補足する結果といえる。

#### E. 本実験における限界

今回の結果から各材料に対する水分子の拡散係数の違いが材料表面の水分子の結合状態と関連している可能性が示されたが、考慮すべき課題がさらに残されている。

まず、今回は簡略化したモデルを設定するために 1 ユニット分の材料を比較し、ユニットとして開裂したモノマーを考えたときに、その部分を水素基で置換したが、メチル基で置換する場合についても考慮すべきであると考えられる。

また、実際の材料はポリマーであり、側鎖の情報が含まれていない。実際には側鎖同士的位置によって水分子の結合状態も変わることが考えられる。さらに、ポリマーでは左右に存在するユニットの割合の考慮も必要である。シンジオタクチック、イソタクチック、アタクチックの構造の違いによる差異についても今後十分に検討すべき課題である。

分子の初期構造の与え方によっては、エネルギーの安定化に大きな影響がある。次年度では NMR などによって実験的に得られる情報をもとに初期構造情報を決定する予定である。

また、拡散係数は、平均 2 乗変位の傾き

より算出する値であることから桁数の精度は満たすが、それにかかる係数の精度は十分でないと考えている。結合水、中間水、バルク水という水の形態を論じるにはどの程度の値が妥当であるのかについても今後の課題として残される。

#### F. 結論

血液適合性がよいとされる高分子材料を選定し、その材料と水分子の相互作用を分子動学的シミュレーションにより可視化することを目標とした。

11 種類の材料の 1 ユニット分の分子と水分子の相互作用を分子動力学シミュレーションにより計算した。血液適合性がよいとされる材料周りの水分子の動きはバルク水の動きに近いことが観察された。

また、10 ユニット分の分子についても同様にシミュレーションしたところ、材料表面からの距離に応じた水分子の動きやすさが異なることが観察され、材料表面における水和状態と Cold crystallization がみられることとの関連性が示唆された。

#### G. 参考文献

- (1) 田中賢：水分子の構造制御による血液適合性発現機構の解明，バイオマテリアル，28(1)，34-45，2010
- (2) 古明地勇人、上林正巳、長嶋雲兵：生体分子の分子動力学シミュレーション(1)方法，J. Chem. Software，6(1)，1-36，2000
- (3) BR. Brooks, RE. Bruccoleri, BD. Olafson, DJ. States, S. Swaminathan, M. Karplus: "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations", J. Comp. Chem. 4, 187-217, 1983
- (4) CL 3rd. Brooks, M. Karplus: "Solvent effects on protein motion and protein effects on solvent motion, Dynamics of the active site region of lysozyme", J. Mol. Biol., 208(1): 159-81, 1989
- (5) 上田 顯：分子シミュレーション-古典系から量子系手法まで-，裳華房，2003
- (6) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi: "Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?" J. Biomed. Mater. Res., 39(2), 323-30, 1998

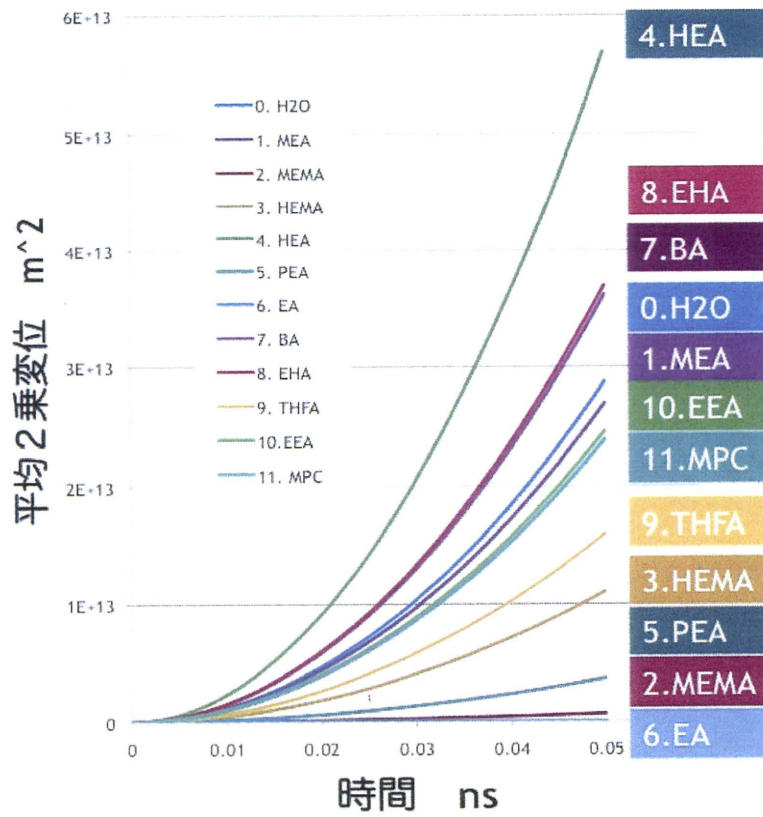


図1 平均2乗変位 (1ユニット)

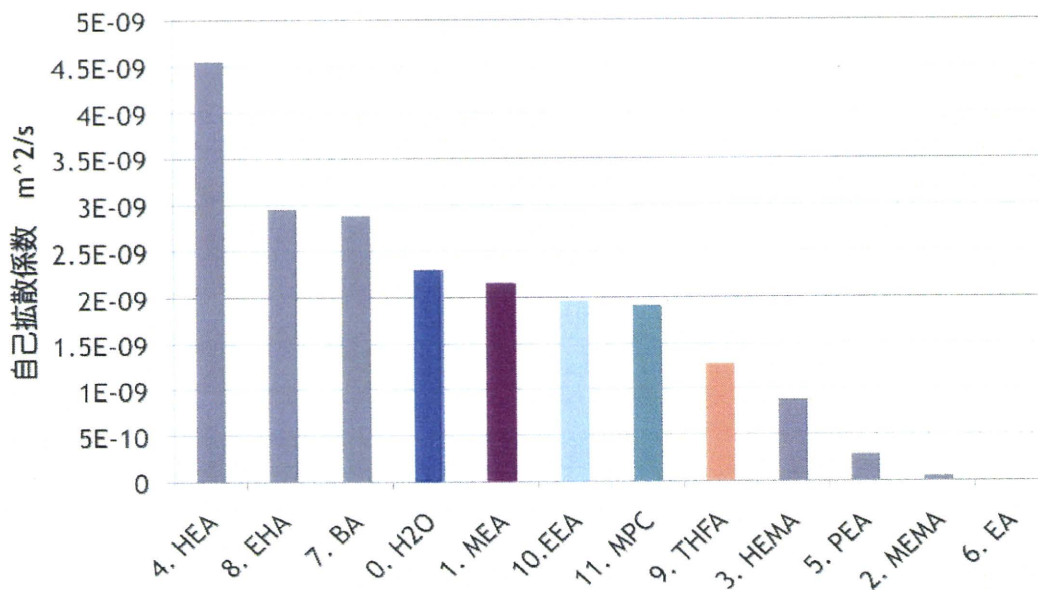


図2 拡散係数 (1ユニット)

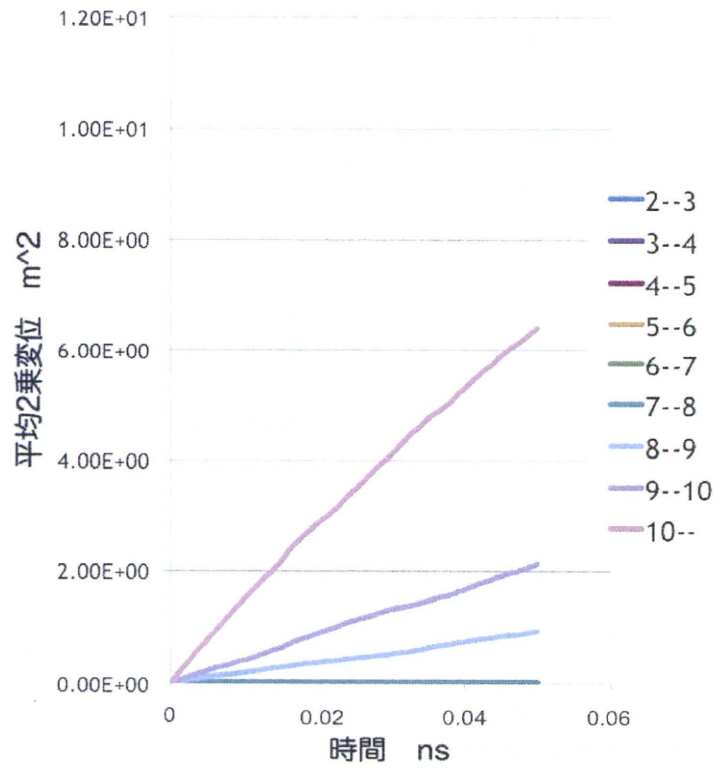


図3 平均2乗変位 (PMEAの10ユニット)

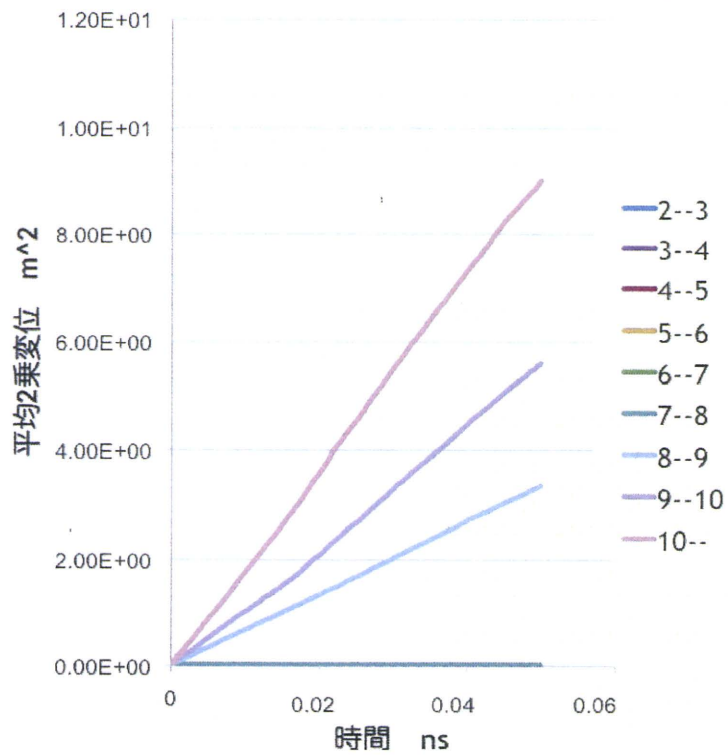


図4 平均2乗変位 (PHEMAの10ユニット)

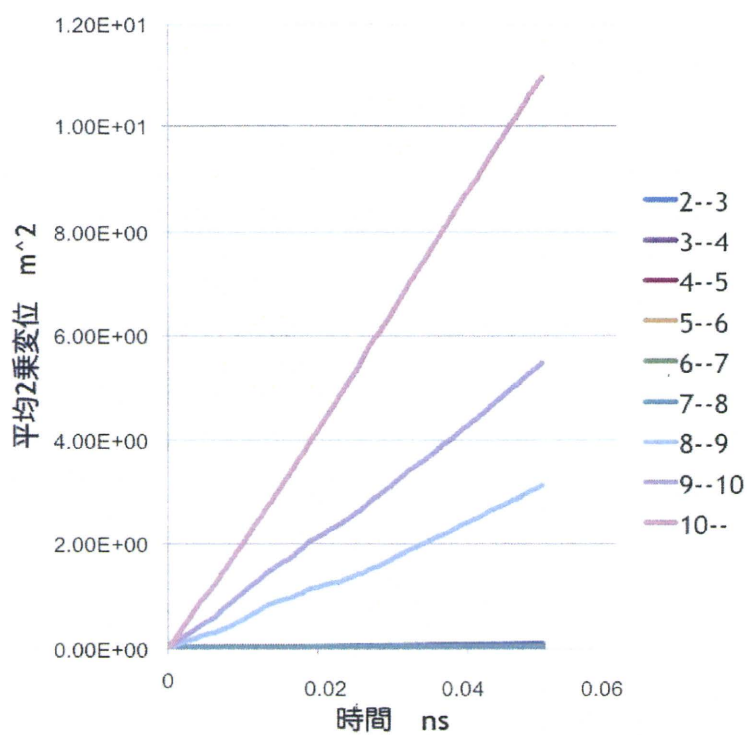


図 5 平均 2 乗変位 (PEA の 10 ユニット)

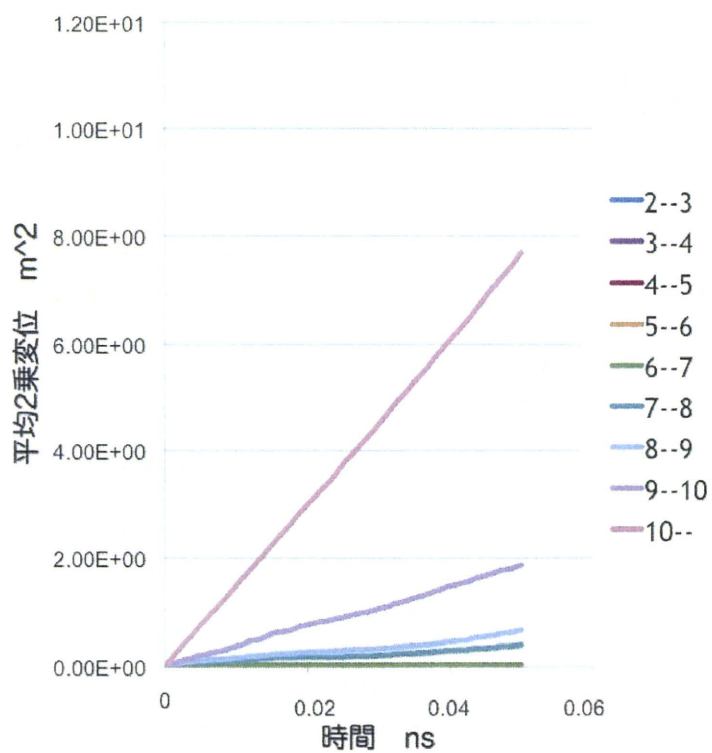


図 6 平均 2 乗変位 (PMPC の 10 ユニット)