

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業  
(政策創薬探索研究事業)

生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた  
画期的な人工膝関節の開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 茂呂徹

平成24(2012)年 4月

## 目次

I.	総括研究報告	
	生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた 画期的な人工膝関節の開発に関する研究 茂呂徹	1
II.	分担研究報告	
1.	摺動面材料の検討	15
	石原一彦・埴隆夫・京本政之	
2.	衝撃耐久性の検討	27
	中村耕三・村上輝夫・岡敬之	
3.	摩耗抑制効果の検討	33
	川口浩・中川匠	
4.	抗感染性の検討	41
	茂呂徹・宮本比呂志	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV.	研究成果の刊行物・別刷	55

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（政策創薬探索研究事業））

## 総括研究報告書

### 生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた 画期的な人工膝関節の開発に関する研究

主任研究者 茂呂徹（東京大学医学部附属病院 特任准教授）

研究要旨：本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマー（PMPC）のナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。今年度は、①摺動面材料の検討、②荷重支持性の検討、③摩耗抑制効果の検討、④抗感染性の検討、を行った。

摺動面材料の検討では、機械特性と物理特性から評価し至適超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）レジンが GUR1020 であることを明らかにするとともに、次年度の研究に備え、各種の架橋 UHMWPE に対する PMPC 処理効果の検討を開始した。また、表面損傷による異常摩耗を防ぐため、超硬質表面化コバルトクロム(CoCr)合金を創出した。

荷重支持性の検討では、ローラーオンフラット型摩擦試験機を用いて、接触面圧、摺動速度、表面粗さおよび潤滑液成分を変化させたときの摩擦係数を計測し、PMPC 処理による水和潤滑ゲル層の潤滑モードを評価した。

摩耗抑制効果の検討では、上述の至適 UHMWPE レジンを用い、種々の照射線量により架橋された PE の摩耗抑制効果を、手術後の歩行を再現する膝関節シミュレーターを用い検討した。重量変化による摩耗量の測定、摺動面の解析(三次元解析装置、SEM、走査型レーザー顕微鏡)、潤滑液中の摩耗粉の回収及び解析による摩耗動態の分析、などにより、架橋処理による摩耗抑制効果を確認した。

抗感染性の検討では、まず金属表面の PMPC 処理について、溶液濃度・処理時間等の至適条件を確立した。また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系を確立した。

以上の研究成果は、生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた画期的な人工膝関節の開発を推進しうるものであり、革新的な人工膝関節の臨床応用が期待できる内容であった。

## 分担研究者

中村耕三	(東京大学医学部附属病院 教授)
川口浩	(東京大学医学部附属病院 准教授)
石原一彦	(東京大学大学院工学系研究科 教授)
村上輝夫	(九州大学工学研究院 教授)
宮本比呂志	(佐賀大学医学部附属病院 教授)
埴隆夫	(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)
中川匠	(東京大学医学部附属病院 講師)
岡敬之	(東京大学医学部附属病院 助教)
京本政之	(日本メディカルマテリアル株式会社 研究部係責任者)

### A. 研究目的

膝関節の機能障害は変形性関節症などの疾患や外傷によって起こる。申請者らの調査では、変形性膝関節症の患者は国内に約2300万人存在し、その1/4～1/3は有症性と推定できる(J Bone Miner Metab, 2009)。機能障害は加齢とともに悪化し、高齢化が急速に進む我が国では、歩行困難に陥る患者が増加している。実際、人工膝関節全置換術の件数は年率10%で増加し、年間に6万件以上行われている。しかし人工膝関節には、1) UHMWPE製コンポーネントの摩耗・破損、2) 非感染性弛み、3) 感染、などの合併症が伴う。このため、こうした合併症を激減させる画期的な人工膝関節のニーズは高い。

焦点となるUHMWPEの変化を人工股関節と比較すると、人工股関節では主として凝着摩耗が起こるのに対し、人工膝関節では凝着摩耗に加え、剥層・孔形成・疲労によるひび割れなどの特有な変化を示す。また、

感染は人工膝関節の1～2%に発生するが、これは人工股関節の約2倍である。これらは、画期的な人工膝関節を設計する条件が、人工股関節の場合とは異なることを示す。

画期的な人工膝関節の開発には、画期的な基盤技術が不可欠である。申請者らは平成15年度長寿科学総合研究事業の医工・産官学連携研究を通じて、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質、MPCポリマーを約100～200 nmの厚さで材料表面に結合させる技術(PMPC処理)を開発した(Nature Materials, 2004他)(平成17年度長寿科学振興財団会長賞)。PMPC処理は、生体の軟骨表面と同様のリン脂質構造を材料の表層に構築し、水和潤滑表面を創出する画期的な独創技術である(関連特許17件)。この技術を搭載した人工股関節は、既に治験段階に達している(AQUALA®: 製造承認申請中)。しかし人工股関節と比べ、人工膝関節は関節面の適合性が低く、屈伸運動に

roll-back と呼ばれる滑り運動が加わるなど、摺動条件が全く異なる。このため、PMPC 処理が効果を発揮するには、前述の剥層・孔形成・疲労によるひび割れなど膝特有の現象も考慮に入れた新たな研究が必要である。また、PMPC 処理した表面は、細胞やタンパク質の吸着を抑制することから、感染の誘因となるバイオフィルムの形成を抑制する効果も期待できる。

本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。この目的で、1) 衝撃吸収能を有する水和潤滑ゲル層の創出、2) 耐摩耗性に優れた関節摺動面の創出、3) 抗感染性表面の創出、を達成するための基礎検討を完成させる。

## B. 研究方法

### ① 摺動面材料の検討

(分担研究者：石原一彦・埴隆夫・京本政之)

#### 1. 至適架橋条件の検討

PMPC 処理効果を効率的に発揮する至適架橋条件を検討するため、種々のガンマ線照射量により架橋された PE (CLPE) を作製し、その機械的特性を評価した。

分子量の異なる 2 種類の圧縮成型ポリエチレン材 (GUR1020 および GUR1050) に、25~100 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120℃の熱処

理を行ない、CLPE を得た。徐冷後、機械加工により各種機械的特性評価用の CLPE 試験体を作製した。

得られた種々のガンマ線照射量による CLPE 試験体の機械的特性について、ASTM F648-10 規格および ISO5834-part2 規格を参照し、① 密度測定 (ASTM F648-07 規格および JIS K7112 A 法)、② 架橋密度測定、③ 引張り試験 (ASTM D638 規格および F648-07 規格)、④ アイゾット衝撃試験 (ASTM F648-07 規格)、⑤ 硬さ測定 (ASTM F648-07 規格)、により評価した。

## 2. 超硬質表面化コバルトクロム

### (Co-Cr) 合金の検討

超硬質表面化 Co-Cr 合金の検討材料には、Co-28Cr-6Mo 合金の熱間圧延丸棒材 (ASTM F1537 合金) を用いた。本丸棒材を機械加工により所望の試験片形状に機械加工した後、試験片評価面を #2400 までの炭化ケイ素の研磨紙による湿式研磨およびコロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理前の試験片を得た。この試験片を用いて、HF+N<sub>2</sub> 混合ガス雰囲気下で 350℃にて 2 時間保持の活性化熱処理を施した後、CO+H<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> 混合ガス雰囲気下で 500℃にて 32 時間保持の浸炭熱処理を施した。浸炭熱処理後、スレーティング除去を目的として、35% HNO<sub>3</sub> 水溶液中にて酸洗浄を施し、評価面を再度コロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理試験片を得た。

得られた表面について、X 線回折 (XRD) 分析・マイクロビッカースによる硬さ測定・グロー放電発光分光 (GDOES) 分析・走査型電子顕微鏡 (SEM) による低温浸炭層厚の測定を行った。

## ② 衝撃耐久性の検討

(分担研究者：中村耕三・村上輝夫・岡敬之)

### 1. PMPC 処理 PE (CLPE) の作製

#### 1) 試薬

ベンゾフェノンおよびアセトン、和光純薬製を用いた。MPC モノマーは、日油製を用いた。PE 基材には、人工股関節に使用されている架橋 PE (CLPE) を用いた。

#### 2) PMPC 処理

CLPE 試験体を 10 g/L に調製したベンゾフェノン含有アセトン溶液に 30 秒間浸漬した後、速やかに引き上げた。室温にて試験体表面のアセトン溶媒を除去した。完全に脱気した純水を用いて、MPC 水溶液 (0.5 mol/L) を調製した。ベンゾフェノンを表面にコーティングした CLPE 試験体を、MPC 水溶液に浸漬し、5 mW/cm<sup>2</sup> の紫外線 (中心波長 350 nm) を 90 分間照射することでグラフト重合を行った。照射中、MPC 水溶液を 60℃になるよう調整した。重合後、CLPE 試験体を超純水およびエタノールにて十分に洗浄し、PMPC 処理 CLPE を得た。

### 2. Roller-on-flat 摩耗試験装置を用いた、PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

今年度は、Roller-on-flat 摩耗試験装置を用い、PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験を行った。

Flat 型試験片には、接触面圧を変化させるため、表面形状をフラット、曲率半径 35 mm および 30.5 mm の曲面とした未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE を用いた。Roller 型試験片には、アルミナセラミックスを用いた。潤滑液には精製水および 30%ウシ胎児血清溶液 (FBS)を用いた。垂直荷重は 100 N とし、摺動速度は 9.42 mm/s から 1500 mm/s まで変化させ、摺動距離 377 m まで摩擦試験を行った。

動摩擦係数は、Roller-on-flat 試験機に設置されたロードセルより摺動動作中に検出される摩擦力および Roller より加えている垂直荷重より算出した。あわせて、摩擦試験後の Flat 試験片表面 PMPC 層の残存を Rhodamine 6G を用いた蛍光顕微鏡観察により確認した。

## ③ 摩耗抑制効果の検討

(分担研究者：川口浩・中川匠)

### 1. CLPE インサートの作製

PE 基材には、人工関節摺動部材として広く使用されている、GUR1020 UHMWPE を用いた。ガンマ線架橋線量による摩耗低減効果を比較するため、25、40、50 および 75 kGy のガンマ線照射を行った。CLPE はガ

ンマ線照射後、フリーラジカルを除去するため、熱処理を実施した。PE および CLPE から、機械加工により人工膝関節インサートをそれぞれ作製した。作製したインサートは 25 kGy のガンマ線滅菌を施した。

## 2. 膝関節シミュレーター試験機を用いた摩耗試験

膝関節シミュレーター試験機 (Knee simulator, AMTI) を用い、CLPE インサートの摩耗特性試験を行った。

CLPE インサートと対向させる大腿骨コンポーネントは Co-Cr-Mo 合金により作製した。潤滑液には 27% ウシ胎児血清を用いた。シミュレーター試験は ISO 14243 に基づき、ヒトの歩行動作を再現した動作条件で 500 万サイクルの試験を行った。

膝関節シミュレーター試験では、50 万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、CLPE インサートの回収、洗浄、乾燥、重量測定を行い、CLPE インサートの摩耗量として算出した。あわせて、三次元形状測定機 (Crysta-Apex C574, Mitutoyo) を用いた摺動部の変形量測定および走査型レーザー顕微鏡 (OLS-1200, Olympus) を用いた摺動部の観察を行った。

また、シミュレーターの潤滑液は凍結乾燥させたのち、水酸化ナトリウム水溶液によるタンパク質除去、メタノールによる油脂の分解および遠心分離による不純物の除去を行うことで CLPE 摩耗粉を回収した。得られた摩耗粉は走査型電子顕微鏡

(S-3400N, Hitachi) により形態観察を行うとともに、円相当径による粒度分布解析を行った。

## ④ 抗感染性の検討

(分担研究者：茂呂徹・宮本比呂志)

### 1. MPC 処理方法の検討

人工関節に用いられているコバルトクロムモリブデン (Co-Cr-Mo) 合金および純チタン (以下 Ti) 試験体表面を、MPC ポリマーを用いたディップコーティング法 (PMB30 処理)、ポリ (MPC) (PMPC) を用いたグラフトコーティング法 (PMPC 処理) により処理した。

### 2. MPC ポリマー処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

得られた PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 試験体について、X 線光電子分光 (XPS) 分析、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 分析、水による静的接触角の測定、蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察および透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系を確立するため、低濃度のタンパク質濃度測定に適したビスニコニン酸 (BCA) Protein Assay 試薬について、検討した。MPC ポリマー処理前後の Co-Cr-Mo 試験体を、アルブミン溶液に浸漬させた後、BCA Protein Assay 試薬を用いて評価した。

## C. 研究結果

### ① 摺動面材料の検討

(分担研究者：石原一彦・埴隆夫・

京本政之)

#### 1. 至適架橋条件の検討

##### 1) 密度測定

ガンマ線照射線量が増加するにもなって、密度は増加した。また、GUR1050 レジンによる CLPE の密度は、GUR1020 レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

##### 2) 架橋密度

ガンマ線照射線量が増加するにもなって架橋密度は増加し、75 kGy でほぼ一定となった。また、GUR1050 レジンによる CLPE の架橋密度は、GUR1020 レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

##### 3) 引張り試験

ガンマ線照射線量が増加するにもなって引張り降伏強度は増加したのに対し、引張り破断強度および引張り破断伸びは減少した。

特に 75 kGy 以上のガンマ線を照射した GUR1050 レジンによる CLPE の引張り破断伸びは、ASTM 規格による要求値を満たしていなかった。また、GUR1020 レジンによる CLPE の引張り伸びは、GUR1050 レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

##### 4) 衝撃試験

ガンマ線照射線量が増加するにと

もなって、アイゾット衝撃強度は減少した。また、GUR1020 レジンによる CLPE のアイゾット衝撃強度は、GUR1050 レジンのそれに比べ、25 kGy を除くいずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

##### 5) 硬さ測定

ガンマ線照射線量が増加するにもなって、硬さは増加した。また、GUR1050 レジンによる CLPE の硬さは、GUR1020 レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

#### 2. 超硬質表面化 Co-Cr 合金の検討

##### 1) SEM 観察

浸炭熱処理後の Co-Cr 合金表面には、約 20  $\mu\text{m}$  の均一な処理層の形成が認められた。これに対し、浸炭熱処理前後において、基材である Co-Cr 合金のマイクロ組織に変化は認められなかった。

##### 2) XRD 分析

Co-Cr 合金の XRD パターンには、Co の $\gamma$ 相 (111 面、200 面) に帰属されるピークが観察された。浸炭熱処理後の Co-Cr 合金の XRD パターンでは、この Co の $\gamma$ 相 (111 面、200 面) に帰属されるピークが低角にシフトし、また、ブロード化した。すなわち、(111) 面と (200) 面の面間隔が広くなり、格子の規則性も低下した。

##### 3) 硬さ測定

浸炭熱処理後、Co-Cr 合金表面のマイクロビッカース硬さは、未処理のそ



れの約3倍にまで増加した。この硬質な処理層は、表面から約20 $\mu\text{m}$ の深さまで存在しており、断面SEM写真で認められた処理層の厚さと一致した。また、その硬さは表面から徐々に減少しており、処理層が傾斜的であることを示した。

#### 4) GDOES 分析

浸炭熱処理後、Co-Cr合金表面の炭素濃度は約4 mass%であり、その濃度は表面から徐々に減少した。

炭素が含まれる層は、表面から約20 $\mu\text{m}$ の深さまで存在しており、断面SEM写真で認められた処理層の厚さと一致した。

#### ② 衝撃耐久性の検討

(分担研究者：中村耕三・村上輝夫・岡敬之)

##### 1. Roller-on-flat 摩耗試験装置を用いた、PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

精製水環境では未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE とともに、速度の上昇により摩擦係数は低下する傾向を示した。人工膝関節に近い低速度域に着目すると、未処理 CLPE に比べ PMPC 処理 CLPE は低い摩擦係数を示した。高速度域においては未処理 CLPE と PMPC 処理 CLPE の摩擦係数は同程度となった。

血清環境では、精製水環境に比べ低い摩擦係数を示し、未処理 CLPE と PMPC 処理 CLPE の摩擦係数に差は見られなかった。

#### ③ 摩耗抑制効果の検討

(分担研究者：川口浩・中川匠)

##### 1) 摩耗量の評価

まず重量変化から架橋条件と摩耗量の関係を検討した。非架橋 PE と比較し、CLPE の摩耗は低減し、架橋線量に比例して摩耗低減効果は高くなった。特に、架橋線量 50 kGy の CLPE では顕著に摩耗が抑制された。次に、摩耗率と架橋線量の関係を検討すると、架橋線量の上昇とともに摩耗率は低下する傾向を示した。

##### 2) インサート表面の評価

試験終了後の CLPE インサート表面を三次元形状測定機で計測すると、摺動部の変形は、50 kGy および 75 kGy の架橋線量が大きい群の CLPE において顕著に抑制された。また、CLPE インサート摺動部のレーザー顕微鏡観察像を示す。非架橋 PE、25 kGy および 40 kGy CLPE では、摺動方向に沿った深い摩耗痕が認められた。一方、50 kGy および 75 kGy CLPE では、大きな摩耗痕は認められなかった。また、試験終了後の CLPE インサート摺動部をレーザー顕微鏡で観察すると、非架橋 PE、25 kGy および 40 kGy CLPE では、摺動方向に沿った深い摩耗痕が認められた。一方、50 kGy および 75 kGy CLPE では、大きな摩耗痕は認められなかった。また、摺動部の観察において、剥層やひび割れなどの破損は認められなかった。

##### 3) 摩耗粉の評価

PE では、視野全体に多くの摩耗粉が分散している様子が見られた。摩耗粉は細長い fibril 様の形態を示すもの

が多くみられた。架橋線量 50 kGy の CLPE の群では視野に見られる摩耗粉の数は、PE に比べ少なく、その形態は granular が主であった。

円相当径の平均は、PE では 0.89  $\mu\text{m}$ 、架橋線量 50 kGy の CLPE の群では 0.87  $\mu\text{m}$  となり、有意な差は認められなかった。一方、その粒子数は PE に比べ架橋線量 50 kGy の CLPE の群では顕著に少なく抑制されていた。

#### ④ 抗感染性の検討

(分担研究者：茂呂徹・宮本比呂志)

##### 1. MPC ポリマー処理 Co-Cr-Mo 合金 および純 Ti 表面の解析

###### 1) XPS 分析

PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面には、MPC 由来の窒素、リンが検出された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の窒素、リンの原子濃度は、PMPC の理論値(各々、5.3 atom%) に近い値にまで達していた。これに対し、MPC 含有量が 30 mol% である PMB30 を用いて処理した表面でのそれらは、2.3~3.0 atom% に留まった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の結果であった。

###### 2) FT-IR 分析

未処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、赤外吸収ピークの存在が認められなかったのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、 $1460\text{cm}^{-1}$  付近にメチレンに帰属されるピーク、 $1240$ 、 $1080$  および  $970\text{cm}^{-1}$

にリン酸基に帰属されるピークが、 $1720\text{cm}^{-1}$  にケトン基に帰属されるピークが観察された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、Si-O 基に帰属されるピークが観察された。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様のピークが認められた。

###### 3) 水による静的接触角の測定

未処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は、それぞれ  $81.6^\circ$ 、 $77.2^\circ$  だった。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は  $95.8^\circ$ 、 $95.6^\circ$  であった。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面のそれらは、それぞれ  $23.5^\circ$ 、 $20.1^\circ$  と高い親水性を示した。

###### 4) 蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

未処理 Co-Cr-Mo 合金では、ほとんど蛍光発光が見られないのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理した Co-Cr-Mo 合金はいずれも、表面全域において発光が認められ、その状態は均一であった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の蛍光発光状態が認められた。

###### 5) TEM 観察

PMB30 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 50 nm の PMB30 処理層の形成が認められた。また、その層中には幾らかの気孔の形成も認められた。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 200

nm の均一な処理層の形成が認められた。また、PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の処理層形成が認められた。

## 2. グラフトコーティングの至適条件の検討

### 1) XPS 分析

いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面のケイ素濃度は減少する一方で、窒素、リンの濃度は増加した。0.50 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、90 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、MPC 原子濃度の理論値に到達した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、45 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、理論値に到達した。

### 2) 水による静的接触角の測定

いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は低下した。0.50 mol/L 以上の MPC 水溶液濃度のとき、90 分以上の紫外線照射時間にて、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は約 20° で安定した。

### 3) TEM 観察

MPC 水溶液濃度を増やすことにより、Co-Cr-Mo 合金表面に形成する PMPC 層の厚さは増加した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、その層厚は約 360 nm に達した。

## 3. タンパク質吸着試験

PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したアルブミン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/5~2/5 程度であった。また、これらの群間における差は、統計学的に有意であった。

### D. 考察

本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマー (PMPC) のナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。今年度は、①摺動面材料の検討、②荷重支持性の検討、③摩耗抑制効果の検討、④抗感染性の検討、を行った。

摺動面材料の検討では、機械特性と物理特性から評価し至適超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) レジンが GUR1020 であることを明らかにするとともに、次年度の研究に備え、各種の架橋 UHMWPE に対する PMPC 処理効果の検討を開始した。また、表面損傷による異常摩耗を防ぐため、超硬質表面化コバルトクロム (CoCr) 合金を創出した。

荷重支持性の検討では、ローラーオンフラット型摩擦試験機を用いて、接触面圧、摺動速度、表面粗さおよび潤滑液成分を変化させたときの摩擦係数を計測し、PMPC 処理による水和潤滑ゲル層の潤滑モードを評価した。

摩耗抑制効果の検討では、上述の至適 UHMWPE レジンを用い、種々の照射線量により架橋された PE の摩耗抑

制効果を、手術後の歩行を再現する膝関節シミュレーターを用い検討した。重量変化による摩耗量の測定、摺動面の解析(三次元解析装置、SEM、走査型レーザー顕微鏡)、潤滑液中の摩耗粉の回収及び解析による摩耗動態の分析、などにより、架橋処理による摩耗抑制効果を確認した。

抗感染性の検討では、まず金属表面のPMPC処理について、溶液濃度・処理時間等の至適条件を確立した。また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系を確立した。

#### E. 結論

以上の研究成果は、生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた画期的な人工膝関節の開発を推進しうるものであり、革新的な人工膝関節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) Ishihara K, Goto Y, Matsuno R, Inoue Y, Konno T: Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions. *Biochim Biophys Acta-General* 1810(3): 268-75, 2011.
- 2) Inoue Y, Nakanishi T, Ishihara K: Adsorption force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces.

*React Funct Polym* 71(3): 350-5, 2011.

- 3) Matsuno R, Ishihara K: Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications. *Nano Today* 6(1): 61-74, 2011.
- 4) Ye Y, Fukazawa K, Huang N, Ishihara K: Effects of 3,4-dihydrophenyl groups in water-soluble phospholipid polymer on stable surface modification of titanium alloy. *Colloid and Surfaces B: Biointerface* 88(1): 215-20, 2011.
- 5) Sakai N, Hagihara Y, Furusawa T, Hosoda N, Sawae Y, Murakami T: Analysis of biphasic lubrication of articular cartilage loaded by cylindrical indenter. *Tribology International* 46: 225-236, 2012.
- 6) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33: 4451-4459, 2012.
- 7) Byambaa B, Konno T, Ishihara K: Cell adhesion control on photoreactive phospholipid polymer surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (in press)

##### 2.学会発表

- ① 国内学会

- 1) 茂呂徹: MPC ポリマーによるナノ表面処理を応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第31回バイオトライボロジシンポジウム. 東京, 5.14, 2011.
- 2) 井上祐貴, 中西智亮, 石原一彦: タンパク質吸着過程のナノ解析による生体親和型ポリマー表面の設計. 第60回高分子学会年次大会. 大阪, 5.25-27, 2011.
- 3) 井上和臣, 井上祐貴, 石原一彦: タンパク質吸着に与えるポリマーブラシ表面の水和状態の効果. 第60回高分子学会年次大会. 大阪, 5.25-27, 2011.
- 4) 石原一彦: ナノバイオマテリアル・インテグレーションと未来医学. ナノ学会第9回大会. 札幌, 6.2-4, 2011.
- 5) 柴山崇, Seo Ji-Hun, 石原一彦, 高井まどか: ブロックコポリマーの自己組織化相分離構造による細胞接着性の制御. 第23回化学とマイクロ・ナノシステム研究会. 千葉, 6.10-11, 2011.
- 6) 茂呂徹: ナノテクノロジーを応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第16回ひむか運動器セミナー. 宮崎, 7.4, 2011.
- 7) 茂呂徹: MPC ポリマーによるナノ表面処理の基礎. 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科先端の医学獣医学特論(大学院特別セミナー). 宮崎, 7.4, 2011.
- 8) 茂呂徹, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーの表面処理による人工関節金属表面の細菌付着抑制効果. 第34回日本骨・感染症学会. 淡路島, 7.8-9, 2011.
- 9) 京本政之: 関節軟骨に学んだ長寿命型人工関節の開発と実用. 第48回三次元臓器造形研究会. 東京, 9.11, 2011.
- 10) 石原一彦, 山岡哲二: 未来を拓くナノ医療とは?—新しい医療原則の確立と価値の創出. 第60回高分子討論会. 岡山, 9.28-30, 2011.
- 11) 井上祐貴, 井上和臣, 石原一彦: タンパク質吸着を支配するポリマーブラシ表面近傍の水和状態. 第60回高分子討論会. 岡山, 9.28-30, 2011.
- 12) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦: 生体親和性ポリマーブラシ表面でのタンパク質との相互作用力のナノ解析. 第60回高分子討論会. 岡山, 9.28-30, 2011.
- 13) 石原一彦: 日本発の高性能ポリマーバイオマテリアル MPC ポリマーの創発と応用. 医療機器フォーラム. 東京, 10.3, 2011.
- 14) 茂呂徹, 高取吉雄, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 伊藤英也: シンポジウム「人工股関節摺動面の特性と問題点」 MPC ポリマーをグラフトした人工股関節摺動面の特性. 第38回日本股関節学会学術集会. 鹿児島, 10.7-8, 2011.
- 15) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本

- 政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 中村耕三, 川口浩: 人工関節金属インプラント表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果の検討. 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 16) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: MPC 処理による摩耗低減効果に対するポリエチレン厚さの影響 — 繰り返し衝撃-摺動試験での検討—. 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 17) 石原一彦: 低侵襲医療に役立つ生体親和型ポリマーバイオマテリアル. 東海ライブ研究会. 豊橋, 10.20-22, 2011.
- 18) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 石原一彦: 繰り返し衝撃-摩耗環境におけるポリエチレン厚さが背面摩耗に及ぼす影響. 第 38 回日本臨床バイオメカニクス学会. 神戸, 11.18-19, 2011.
- 19) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーナノグラフトを基盤にした新しい人工膝関節の開発. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 20) 京本政之, 茂呂徹, 雑賀健一, 立石崇晴, 高取吉雄, 石原一彦: 対向する摺動面を保護する生体軟骨模倣 CFR-PEEK 表面の創製. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 21) 石原一彦: MPC ポリマーの基礎と応用. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 22) 井上和臣, 井上祐貴, 石原一彦: タンパク質吸着に与えるポリマーブラシ表面の水和状態の影響. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 23) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 石原一彦, 高取吉雄: ポリエチレン厚さが MPC 処理ポリエチレンの耐久性に及ぼす影響 — 多方向摺動試験による検討. 第 42 回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.
- 24) 茂呂徹: 生体親和性材料 MPC ポリマーの表面処理による新しい人工股関節 — 長寿命化を目指して. 第 42 回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.
- ② 国際学会
- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: High oxidation- and wear-resistance of PMPC-grafted polyethylene arisen by extra plasma irradiation. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
- 2) Ishihara K, Goto Y, Matsuno R, Inoue Y, Konno T, Takai M: Inhibition of inflammatory responses on

- phospholipid polymer-coated nanoparticles. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
- 3) Byambaa B, Konno T, Ishihara K: Cytocompatible polymer surface with photocleavable groups for regulating the single cell attachment/detachment. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
  - 4) Inoue Y, Nakanishi T, Ishihara K: Elucidation of protein adsorption behavior based on molecular dynamics around polymer brush surface. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
  - 5) Oda H, Konno T, Ishihara K: Mechanical property-tunable and cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for cell encapsulation. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
  - 6) Tateishi T, Kyomoto M, Yamaoka T, Ishihara K: Biocompatible surface generation on poly(ether ether ketone) by self-initiated photoinduced graft polymerization. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
  - 7) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Inoue Y: Surface modification with phospholipid polymers for long-term implantable medical devices. THERMEC'2011. Quebec, Canada, 8.1-5, 2011.
  - 8) Inoue K, Inoue Y, Ishihara K: Importance of dynamics of water molecules on protein adsorption at polymer brush surfaces. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
  - 9) Ishihara K: Highly biocompatible surface for implantable artificial organ. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
  - 10) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: High Oxidation- and Wear-resistances of Polyethylene Arisen by Vitamin E-blending and Poly(MPC) Grafting. 5th UHMWPE meeting. Philadelphia, USA, 9.22-23, 2011.
  - 11) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Takatori Y: Biomimetic surface modification on artificial hip joint for elongation of implantation life. European Society for Artificial Organs (ESAO). Porto, Portugal, 10.9-12, 2011.
  - 12) Saiga KI, Moro T, Kyomoto M, Ito H, Kadota T, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K, Takatori Y: Effect of MPC-grafting and PE thickness on wear and fracture in multi-mode pin-on-disk wear test. 6th

International Biotribology Forum  
Biotribology Fukuoka 2001. Fukuoka,  
Japan, 11.5, 2011.

- 13) Inoue Y, Inoue K, Ishihara K: Direct evaluation of interaction force between proteins and polymer brush surfaces with well-characterized hydration state. 5th International Symposium of Nanomedicine. Nagoya, 3.15-17, 2012.
- 14) Inoue Y, Ishihara K: Evaluation of protein adsorption at polymer brush surfaces based on the water structure surrounding the surface. American Chemical Society, Spring 2013 National Meeting & Exposition. San Diego, USA, 3.25-29, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（政策創薬探索研究事業））

## 分担研究報告書

### 摺動面材料の検討

分担研究者 石原一彦 (東京大学大学院工学系研究科 教授)  
塙 隆夫 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授)  
京本政之 (京セラメディカル株式会社 研究部課責任者)

研究要旨：至適な架橋照射線量の検討では、最大 100 kGy のガンマ線照射を行うことで各種の架橋ポリエチレン (CLPE)試験体を作製し、機械的特性、物理特性について評価した。また、種々の分子構造特性 (分子量)をもつ、ポリエチレンレジンを用意し、ガンマ線照射による架橋効果について前述と同様に評価した。得られた機械特性と物理特性の結果から、至適な架橋照射線量は 75 kGy、至適ポリエチレンレジン は GUR1020 であることを明らかにした。また、表面損傷による異常摩耗を防ぐため、コバルトクロム (Co-Cr)合金に表面から傾斜的に炭素を固溶させ、合金表面を硬質化した、超硬質表面化 Co-Cr 合金を創出した。

#### A. 研究目的

変形性関節症などの疾患や外傷による膝関節の機能障害は、中高年者の健康寿命を短縮し、生活の質 (QOL)を低下させる重大な病態である。高齢化が急速に進むわが国において膝関節障害の患者数は今後も増え続けることは確実であり、その治療法を確立することは、重要な課題といえる。

外傷や疾患により、保存的治療が効果ない状態まで機能障害をきたした膝関節を人工の関節に置き換える人工膝関節置換手術は、実用化から

約半世紀が経過し、優れた治療法として健康寿命の延伸と QOL の獲得に貢献をしている。一方、ポリエチレン (PE)製コンポーネントの摩耗・破損、および続発する非感染性弛みは一度生じると入れ換えを余儀なくされる深刻な合併症である。手術成績の向上のため、これらの合併症を克服する画期的な人工膝関節のニーズは高い。

近年、我々は優れた生体親和性と高い潤滑性を兼ね備えた摺動面を創出することを目的として、合成リン脂質、2-methacryloyloxyethyl

phosphorylcholine (MPC)ポリマーを約 100~200 nm の厚さで PE 表面に結合させる技術 (PMPC 処理)を開発した。この技術を搭載した人工股関節は、既に治験段階に達している。しかし人工股関節と比べ、人工膝関節は関節面の適合性が低く、摺動条件が全く異なる。このため、PMPC 処理が効果を発揮するには、新たな研究が必要であった。

本研究では、PMPC 処理効果を効率的に発揮するための至適架橋条件の確立、および、大腿骨側コンポーネントの表面損傷による異常摩耗を防ぐため、コバルトクロム (Co-Cr)合金表面の硬質化を行った。

## B. 研究方法

### 1. 至適架橋条件の検討

PMPC 処理効果を効率的に発揮するための至適架橋条件を検討するため、種々のガンマ線照射量により架橋された PE (CLPE)を作製し、その機械的特性を評価した。

分子量の異なる 2 種類の圧縮成型ポリエチレン材 (GUR1020 および GUR1050)に、25~100 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120°C の熱処理を行ない、CLPE を得た。徐冷後、機械加工により各種機械的特性評価用の CLPE 試験体を作製した。

得られた種々のガンマ線照射量による CLPE 試験体の機械的特性について、ASTM F648-10 規格および ISO5834-part2 規格を参照し、以下に示す試験を行った。

### ① 密度測定

得られた種々のガンマ線照射量による CLPE 試験体の密度を、ASTM F648-07 規格および JIS K7112 A 法 (水中置換法)に準拠して測定した。

### ② 架橋密度測定

準備した厚さ 1 mm のシート状試験片を、酸化防止剤として 0.5 mass% 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノールを添加した *p*-キシレン中にて、72 時間煮沸し、ゾル画分を抽出した。抽出後、ゲル画分を新しい *p*-キシレンに移し、120°C で 2 時間平衡化した後、秤量した。秤量後、アセトン中にて解膨潤させた後、減圧下、60°C にて重量が一定になるまで乾燥させ、再度、秤量した。得られた数値を用い、架橋密度を計算した。

### ③ 引張り試験

引張り試験を ASTM D638 規格および F648-07 規格に従って行った。機械加工により、IV 号試験片を作製した。被験物質については、ダンベル型試験の片面に対し、PMPC 処理を施した。準備した試験片の引張り特性について、島津製作所製オートグラフ (ASG-5kNG)を用い、試験速度 50 mm/min にて評価した。

### ④ 衝撃試験

アイゾット衝撃試験を、ASTM F648-07 規格に準拠して行った。機械加工により、 $63.5 \times 6.4 \times 12.7 \text{ mm}^3$  の試験体を作製した。得られた試験

体に対して、ノッチ深さ  $4.57 \pm 0.08$  mm のダブルノッチを入れた。これらのアイゾット衝撃強度を、オリエンテック製アイゾット衝撃試験機を用い、ハンマー容量 3.92 J (40 kg\*m) にて測定した。

#### ⑤ 硬さ測定

デュロメータ硬さ (ショア D) を、ASTM F648-07 規格に準拠して測定した。

### 2. 超硬質表面化コバルトクロム (Co-Cr) 合金の検討

超硬質表面化 Co-Cr 合金の検討材料には、Co-28Cr-6Mo 合金の熱間圧延丸棒材 (ASTM F1537 合金) を用いた。本丸棒材を機械加工により所望の試験片形状に機械加工した後、試験片評価面を #2400 までの炭化ケイ素の研磨紙による湿式研磨およびコロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理前の試験片を得た。

上述の試験片を用いて、HF+N<sub>2</sub> 混合ガス雰囲気下で 350°C にて 2 時間保持の活性化熱処理を施した後、CO+H<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> 混合ガス雰囲気下で 500°C にて 32 時間保持の浸炭熱処理を施した。浸炭熱処理後、スレーティング除去を目的として、35% HNO<sub>3</sub> 水溶液中にて酸洗浄を施し、評価面を再度コロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理試験片を得た。

得られた表面について、X 線回折

(XRD) 分析・マイクロビッカースによる硬さ測定・グロー放電発光分光 (GDOES) 分析・走査型電子顕微鏡 (SEM) による低温浸炭層厚の測定を行った。

#### ① SEM 観察

未処理および浸炭処理 Co-Cr 合金の断面マイクロ組織の評価には、鏡面仕上げした試験体の切断面を塩酸と過酸化水素水の混合溶液中に 5~10 秒間浸漬することでエッチングし、マイクロ組織を露出させた試験体を用いた。マイクロ組織観察は、SEM (日立製 S-3400 型) を用い、加速電圧 15 kV、電流 60 mA の条件で行った。

#### ② XRD 分析

未処理および浸炭処理 Co-Cr 合金表面の各結晶相を同定するため、XRD 分析を行った。リガク製 RINT-2000 型を用い、X 線源には Cu-K $\alpha$  線、電圧を 40 kV、電流を 300 mA とし、回折角 ( $2\theta$ ) を 30~80° の範囲について XRD 分析を行った。

#### ③ マイクロビッカースによる硬さ測定

未処理および浸炭処理 Co-Cr 合金表面の硬さおよび断面硬さを評価するため、マイクロビッカースによる硬さ試験を行った。マイクロビッカース硬さ測定は、ミットヨ製 MicroWiZhard を用い、押し込み荷重を 20 gf、保持時間を 15 秒の条件で行った。

#### ④ GDOES 分析

未処理および浸炭処理 Co-Cr 合金断面 (表面からの深さ方向)の炭素濃度を評価するため、GDOES 分析を行った。GDOES 分析には、堀場製作所製 JY-5000 型を用い、放電電力を 40 W、アルゴン圧力を 775 Pa、測定時間を 750 秒、放電範囲を直径 4 mm とし、アルゴンスパッタ時間に対する炭素元素の発光強度を測定した。得られた発光強度を用い、標準試料で作成した検量線により濃度を求めた。スパッタ深さは、試験片を 750 秒間測定したときの放電痕深さを表面粗度計測で測定することでスパッタ速度を求め、測定時間から深さ位置を算出した。

### C. 研究結果

#### 1. 至適架橋条件の検討

##### ① 密度測定

図 1 に、種々のガンマ線照射量にて架橋処理した CLPE の密度を示す。ガンマ線照射線量が増加するに伴って、密度は増加した。また、GUR1050 レジンによる CLPE の密度は、GUR1020 レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

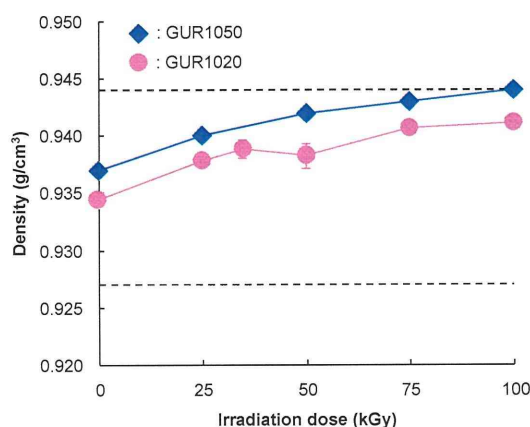


図 1. 種々のガンマ線照射量にて架橋処理した CLPE の密度  
破線は、ASTM 規格および ISO 規格の要求値 (上下限)を示す

##### ② 架橋密度

図 2 に、種々のガンマ線照射量にて架橋処理した CLPE の架橋密度を示す。

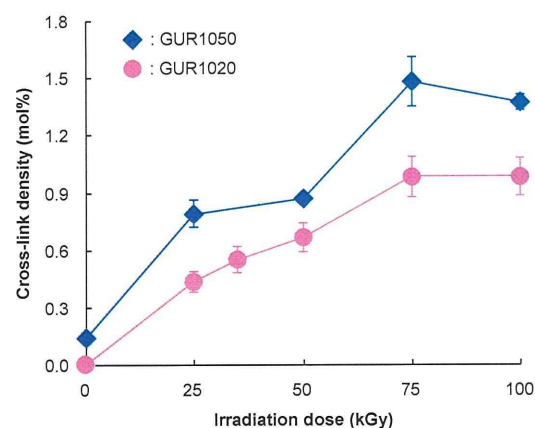


図 2. 種々のガンマ線照射量にて架橋処理した CLPE の架橋密度  
破線は、ASTM 規格および ISO 規格の要求値 (下限)を示す

ガンマ線照射線量が増加すると