

を(和光純薬工業株式会社)に加え、温度 60°C で 24 時間静置した。

NaOH/CaCl₂ 処理: NaOH 処理した Ti に 0.1 M 塩化カルシウム溶液を加え、温度 60°C で 24 時間静置した。

NaOH/Ca(OH)₂ 処理: NaOH 処理した Ti に 0.01 M 水酸化カルシウム溶液を加え、温度 60°C で 24 時間静置した。

いずれも滅菌した超純水で中性になるまで洗った後、使用した。

2. 表面解析

表面構造は JEOL Quick Auto Coater JFC-1500 により Au 被覆した後、JEOL JST-5800LV 走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて 3,000 倍で観察した。

表面の水に対する接触角は Sessile drop 法にて測定した。

3. 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC, LONZA 社)を φ35 mm 細胞培養用シャーレに各 Ti を静置した上に播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で一週間培養した。その間に培地 (MSCGM, LONZA 社) 交換を一回行った。

4. タンパク質調製

各 Ti 上で培養した細胞は Ti ごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、常法に従ってトリプシン処理により剥離した。その後、トリプシンの 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄後、細胞数を計測した。同細胞を Nucleases Mix (GE Healthcare)および Protease inhibitor Mix (GE Healthcare)を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA)に溶解した。遠心分離により不溶物を除去し、2D clean-Up Kit (GE Healthcare)を用いてタンパク質を精製した後、Protein Extraction Reagent type 4 に再溶解し、2D-Quant (GE

Healthcare)によりタンパク質量を測定した。得られたタンパク質試料は試験に供するまで -80°C にて凍結保存した。

5. MS 解析用ペプチド試料の調製

上記のようにして調製したタンパク質各 40 μg を常法に従って、還元 (リン酸トリブチル), アルキル化 (ヨードアセトアミド) した。この溶液 10.6 μl に 50 mM NH₄HCO₃ (94.1 μl)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3.3 μl)及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 2 μl)を添加し、37°C で一晩インキュベーションした後、10% TFA 5.78 μl を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドは OMIX Tip (C18, 100 μl: VARIAN 社)を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant)に供して乾燥させた後、0.1 μg/μl の濃度になるように 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)含有 2%アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで 4°C で保存した。

6. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、Thermo Scientific 社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ/Orbitrap XL を使用し、測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、DiNa-A オートサンプラー (KYA Tech)を装備した DiNa システム (KYA Tech)を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、KYA 社製 HiQ sil C18W-3 (0.1 x 100 mm)を使用した。スプレーチップとしては、KYA 社製 TI-30-150 チップを使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode

(スプレー電圧 1.8 kV)により行った。スキャンデータ (MS スペクトル)は FT analyzer (分解能 30,000; 測定質量範囲 m/z 350-1, 400; Lock mass = シロキササン; Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間はサンプル注入 10 分後から 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸含有 2%アセトニトリル)と B 溶媒 (0.1%ギ酸含有 90%アセトニトリル)を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (0.5 μ g)はオートサンプラーを使用して行った。一分析当たりの溶出時間は 160 分とし、サンプル注入後、脱塩ステップとして 10 分間は A 溶媒のみを送液した後、120 分かけて B 溶媒濃度を 50%まで上昇させた。その後、5 分間かけて B 溶媒濃度を 100%まで増加させ、10 分間保持後、15 分間 A 溶媒のみを送液して流路を平衡化した。また、次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は $n=3$ とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (7 参照)を Method File に登録し、同様の分析を更に 2 回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

7. タンパク質の同定と定量

7-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データを Thermo Scientific 社製タンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェアにアップロードし、Mascot 検索 Work Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用してタンパク質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは ± 3 -5 分に設定した。

7-2. 比較定量解析

タンパク質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群 (各試料 $n=3 \times 3$)を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/ UniPort/Swiss-Prot データベースによるタンパク質同定、アルブミン由来ペプチドを利用したリテンションタイム補正、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

8. 倫理面への配慮

研究に用いた hMSC は LONZA 社より購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) 表面構造

未処理および各化学処理を施した Ti の SEM 解析した結果を図 1 に示す。未処理が比較的滑らかなのに対して、化学処理を施した Ti はいずれも網目構造が観察された。さらに NaOH/Ca(OH)₂ 処理では立方体様の結晶の付着がみられた。

接触角は未処理が 83.8 ± 7.0 度であった

のに対して、化学処理を施したチタンプレートはいずれも水を表面に滴下するとすぐに広がってしまい、測定不可能であった。

(2) タンパク質発現比較解析

得られた MS データを i-RUBY ソフトウェアを用いたデータベース検索した結果、未処理の Ti に対して発現量が 2 倍以上になったタンパク質が NaOH 処理で 3,849 個、NaOH/CaCl₂ 処理で 3,660 個、NaOH/ Ca(OH)₂ 処理で 1,872 個同定された。一方、発現量が 1/2 未満に減少したタンパク質は NaOH 処理で 523 個、NaOH/CaCl₂ 処理で 455 個、NaOH/ Ca(OH)₂ 処理で 778 個であった。(表 1: すべて $p < 0.05$)

骨芽細胞分化マーカーの発現について表 2 に示した。骨芽細胞分化のマスター遺伝子であり、転写因子である RUNX2 の発現は、未処理でも各化学処理 Ti 上でも発現がみられなかった。さらに他の代表的な転写因子の発現もみられなかった。一方、骨基質タンパク質である type I collagen (CO1A1) や fibronectin (FN) は未処理 Ti に対して化学処理を施した Ti 上で培養した hMSC で発現量が上昇していた。しかしながら、RGD 配列 (細胞結合配列) を含む糖タンパク質である osteopontin (OPN) や骨シアラタンパク質 (bone sialo-protein: BSP)、および osteocalcin (OCN) はいずれも発現が認められなかった。骨の成長や分化に関与がみられる bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor-beta (TGF-beta), fibroblast growth factors (FGFs), parathyroid hormone (PHT) などの成長因子やホルモンの発現もみられなかった。Wnt5a および代表的骨芽細胞分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) はいずれの Ti 上でも発現

があったが、未処理と同程度か減少していた。

表 3 に骨形成に関与があるタンパク質および間葉系幹細胞を骨分化させた時に発現上昇が報告されているタンパク質 (一部抜粋) を示した。(参考文献 1-7) 黄色が未処理 Ti に比して発現量が 2 倍以上 5 倍未満、ピンクが 5 倍以上になったものを示している。細胞外マトリクス (collagen, FN, integrin, versican core protein 等)、成長因子類 (PDGFR, EGF, GDF5 等)、シグナル伝達系 (Ras, Rab, MAP4K 等)、カルシウムチャネルタンパク質 (Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1, Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1 等)、グルタミン酸関連タンパク質 (Glutamate dehydrogenase 1, glutamate receptor 等) およびカルシウム結合タンパク質である SPARC (osteonectin) が有意に化学処理 Ti で発現上昇していた。

表 4 に hMSC の骨形成分化に伴い発現に変化のある膜タンパク質 (参考文献 5) の発現を示した。各 Ti 上で培養した hMSC で発現がみとめられなかったタンパク質が 4 個あった。骨分化マーカーである ALP は未処理 Ti に比して NaOH 処理は同等であったが、NaOH/CaCl₂ 処理および NaOH/ Ca(OH)₂ 処理では下がっていた。Retinol dehydrogenase 14 はすべての化学処理を施した Ti 上で発現低下がみられた。それ以外のタンパク質は化学処理を施した Ti 上で発現上昇傾向がみられた。

表 5 に hMSC の骨形成分化に伴い発現に変化のある分泌タンパク質 (参考文献 6) の発現を示した。報告があった細胞外分泌タンパク質 17 個のうち、6 個の発現がみら

れ、Chitinase-3-like protein 1, Peroxidase homolog, Vitronectin precursor, Thrombospondin-2 は特に NaOH 処理で発現が高くなっていた。一方、報告のあった細胞内分泌タンパク質 44 個のうち、36 個の発現がみられ、いずれも化学処理 Ti 上で未処理 Ti に対して同等か高い発現が認められた。

D. 考察

化学処理を施した Ti はいずれも水ぬれ性が上がり、網目構造が観察されているが、NaOH 処理ではチタン酸水素ナトリウムからなる網目構造、NaOH/CaCl₂ 処理および NaOH/Ca(OH)₂ 処理では、Na がイオン交換により Ca に置換され、チタン酸水素カルシウムからなる網目構造になっていると考えられる。また、NaOH/Ca(OH)₂ 処理でのみ結晶構造が観察されているが、これは Ca(OH)₂ が CaCl₂ より溶解性が悪いため、各処理後の滅菌水での洗浄後も残存し結晶化したものが付着しているのではないかと考えられる。このように化学処理を施した Ti 上でそれぞれ培養した hMSC のタンパク質発現挙動を、LC-MS/MS を用いて特に骨分化に着目して解析したが、骨分化マーカーとして用いられる転写因子、骨基質タンパク質および骨成長・分化因子のほとんどの発現を認めることができなかった。一方、同様の培養条件での遺伝子発現解析では、発現の上昇がみられている遺伝子もあった（研究分担者澤田の報告書参照）。これらの違いは、遺伝子発現とタンパク質発現にタイムラグがあることや今回のタンパク質の精製方法では細胞中のすべてのタンパク質を回収できなかった可能性があること等に起因する

と考えられる。表 4 の左側に hMSC-TERT(hMSC に Telomere Reverse Transcriptase を導入し不死化した細胞)を増殖培地と分化培地で 4 日間培養後、膜タンパク質を精製し、両者間でタンパク質発現と遺伝子発現を比較した結果を示しているが（参考文献 5）、発現量が上昇したタンパク質で遺伝子発現も同様に上昇していたのは ALP のみで、残りの遺伝子は検出できなかったか、両者間で大きな差がなかった。このことから遺伝子発現とタンパク質発現が一致しないことが分かる。Versican core protein は骨形成過程の後半で分泌されることが知られているが、骨芽細胞分化の初期での発現はこの論文で初めて示されていた。NaOH 処理および NaOH/CaCl₂ 処理を施した Ti で Versican core protein の発現上昇がみられている。さらに、Versican core protein は CD44 や tenascin と相互作用することが分かっており、これら 2 つのタンパク質も NaOH 処理および NaOH/CaCl₂ 処理を施した Ti で発現が上昇していることからこれらが協調して骨分化を促進している可能性も考えられる。

また、表 5 では骨分化能の高い bone marrow derived MSC (BMSC) と骨分化能が低い BMSC を血清抜き骨分化培地で 16 h 培養後、細胞上清を回収して精製したタンパク質間で発現を比較し、骨分化能の高い BMSC で高発現しているタンパク質をリストアップしている（参考文献 6）。リストアップされている細胞外分泌タンパク質の約 2/3 が各 Ti 上で培養した hMSC から検出されていないが、今回は細胞からタンパク質を精製してきているので、細胞外分泌タンパク質が回収されていない可能性が高い。

それ以外の分泌タンパク質は NaOH 処理および NaOH/CaCl₂ 処理を施した Ti で発現上昇が認められている。一方、NaOH/Ca(OH)₂ 処理でもそのほとんどが未処理と同程度以上の発現がみられていることから、化学処理により、Ti に骨分化能が付加されていることが示唆された。

以上のように、未処理 Ti 上に比べて化学処理を施した Ti 上で培養した hMSC では、骨形成に関与がある既知のタンパク質だけでなく hMSC を骨分化させた時に発現上昇がみられるタンパク質の発現も上昇する傾向がみられた。その傾向は NaOH 処理 ≧ NaOH/CaCl₂ 処理 > NaOH/Ca(OH)₂ 処理の順で強かった。一方、昨年度の研究分担者伊佐間の報告では、今回と同じ条件の化学処理を施した Ti を疑似体液に浸漬したところ、アパタイト形成能は NaOH/Ca(OH)₂ 処理 > NaOH 処理 = NaOH/CaCl₂ 処理であった。この結果は今回の骨形成過程に関与するタンパク質の発現結果とは一致していない。しかしながら、今回は増殖培地で培養した 7 日目のタンパク質発現しかみていないことや、そのタンパク質発現パターンも遺伝子発現と違いがあることなどから、両者の結果を単純に比較することはできない。さらに今回の結果が、Ti に化学処理を施すことにより、疑似体液中でアパタイト形成能が高くなることと、hMSC の骨分化を促進することが比例関係ではないことを示唆している可能性もある。これらを検証していくためには、タイムコースを追った培養を行い、処理の違いによって骨分化に差が生じるか検討する必要がある。

E. 結論

処理の違いにより程度の差はあるが、化学処理を施すことで Ti に骨形成促進能を付加できることが示唆された。Ti を材料とした医療製品等において、適切な化学処理を施すことで、骨再生を促せることができる可能性がある。

参考文献

1. Chiellini C, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G, Alessi MC, Dani C, Amri EZ. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol.* 26: 9-26, 2008
2. Copland IB, Lord-Dufour S, Cuerquis J, Legault-Coutu D, Annabi B, Wang E, Galipeau J. Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. *Stem Cells*, 27: 467-477, 2009
3. Sun HJ, Bahk YY, Choi YR, Shim JH, Han SH, Lee JW. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res.* 24: 2059-2071, 2006
4. Salasnyk RM, Westcott AM, Klees RF, Ward DF, Xiang Z, Vandenberg S, Bennett K, Plopper GE. Comparing the protein expression profiles of human mesenchymal stem cells and human osteoblasts using gene ontologies. *Stem Cells Dev.* 14: 354-366, 2005
5. Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M. Differential expression

profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells*. 23: 1367-1377, 2005

6. Choi YA, Lim J, Kim KM, Acharya B, Cho JY, Bae YC, Shin HI, Kim SY, Park EK. Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation. *J Proteome Res*. 9:2946-2956, 2010

7. Pataquiva-Mateus AY, Wu HC, Lucchesi C, Ferraz MP, Monteiro FJ, Spector M. Supplementation of collagen scaffolds with SPARC to facilitate mineralization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. doi: 10.1002/jbm.b.32650, 2012

8. 伊佐間和郎「アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析」平成 22 年度総括・分担研究報告書 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 p47-57

9. 澤田留美「遺伝子発現の網羅的解析を利用した医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験」平成 23 年度総括・分担研究報告書 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 p57-74

F. 研究発表

学会発表

1. 加藤玲子, 薮島由二, 長谷川千恵, 松岡厚子「異なる表面処理を施したチタンプレート

上で培養したヒト間葉系幹細胞のタンパク質発現解析」

第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11)

2. Reiko Kato, Yuji Haishima, Chie Hasegawa, Atsuko Matsuoka 「Comparison of protein expression profiles in human mesenchymal stem cells cultured on surface-modified titanium with chemical treatments」

The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3)

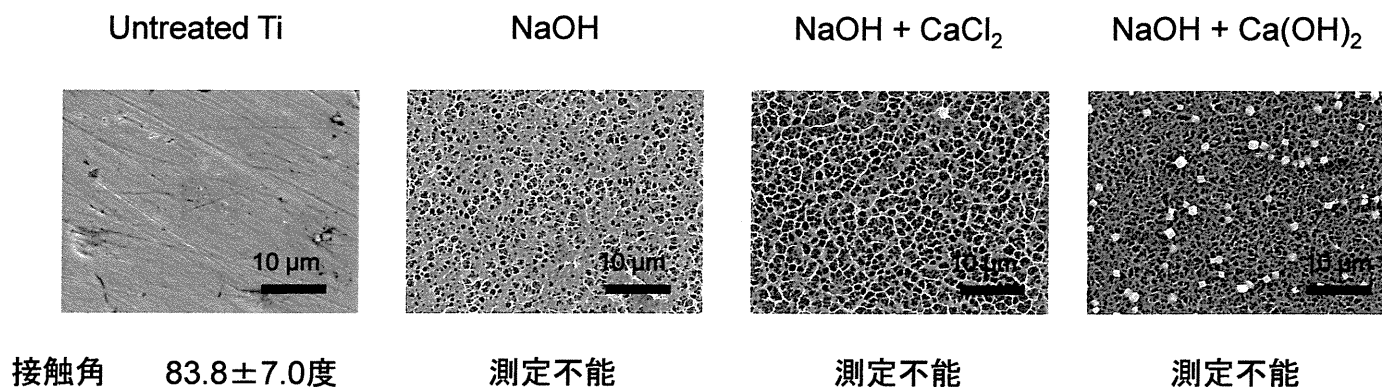


図1. 未処理および化学処理を施したTiのSEM画像(x 3,000)と接触角

表1. 化学処理を施したTi上で培養したhMSCにおいてその発現量が2倍以上か1/2未満に減少したタンパク質数

fold	NaOH	NaOH+CaCl ₂	NaOH+Ca(OH) ₂
≥ 2	3849	3660	1872
< 0.5	523	455	778

p<0.05

表2. 骨芽細胞分化マーカーの発現

転写因子	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti	骨芽細胞分化
RUNX2	ND	ND	ND	ND	初期促進・後期抑制
Msx2	ND	ND	ND	ND	初期促進/抑制
OSX	ND	ND	ND	ND	促進
ATF4	ND	ND	ND	ND	促進
Fra1	ND	ND	ND	ND	促進
FosB	ND	ND	ND	ND	促進
Dlx5	ND	ND	ND	ND	後期促進
Twist	ND	ND	ND	ND	初期抑制

骨基質タンパク質	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti	骨芽細胞分化に伴う発現時期
COL1A1	1	4.9	2.68	1.37	初期～
FN	1	5.83	3.95	2.01	初期/中期～
OPN	ND	ND	ND	ND	初期/中期～
BSP	ND	ND	ND	ND	後期
OC	ND	ND	ND	ND	後期

ALP	1	1.22	0.33	0.41	初期/中期～
-----	---	------	------	------	--------

骨成長・分化因子	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti
BMP2	ND	ND	ND	ND
BMP4	ND	ND	ND	ND
TGF-beta	ND	ND	ND	ND
FGF1	ND	ND	ND	ND
FGF2	ND	ND	ND	ND
PTH	ND	ND	ND	ND
Wnt5a	1	0.87	0.73	0.38

表3. 骨形成に関与があるタンパク質および間葉系幹細胞を骨分化させた時に発現上昇が報告されているタンパク質(一部抜粋)

■ 2倍以上5倍未満, ■ 5倍以上/対照群

Protein name	Protein Score	Peptide count	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti
Collagen alpha-1(I) chain	489.62	33	1.00	4.90	2.68	1.37
Collagen alpha-2(I) chain	355.44	28	1.00	5.23	2.94	1.71
Collagen alpha-3(VI) chain	1647.29	87	1.00	1.522	2.237	1.332
Fibronectin	1439.67	67	1.00	5.83	3.95	2.01
CD44 antigen	187.76	7	1.00	6.12	3.66	2.52
Integrin beta-1	139.96	12	1.00	2.61	1.35	1.28
Integrin beta-5	171.28	9	1.00	4.65	3.65	2.32
Integrin alpha-11	69.84	3	1.00	6.57	3.28	2.45
Integrin alpha-E	21.83	1	1.00	1.75	80.10	0.00
Vinculin	797.94	42	1.00	2.27	1.97	1.29
Protocadherin alpha-6	14.72	1	1.00	0.73	3.04	0.02
Versican core protein	34.66	2	1.00	8.24	2.19	0.26
Talin-2	105.02	10	1.00	2.61	2.72	1.30
Laminin subunit beta-1	56.93	4	1.00	8.99	2.38	1.64
Laminin subunit beta-2	28.9	1	1.00	2.84	1.88	1.76
Laminin subunit gamma-1	95.96	5	1.00	8.15	3.63	2.01
Vimentin	5234.3	104	1.00	6.52	3.74	1.81
Tenascin	47.3	1	1.00	3.11	2.18	1.65
Tenascin-R	28.35	1	1.00	121.68	10.39	38.16
Bone morphogenetic protein 8A	24.34	2	1.00	0.24	0.48	0.20
Bone morphogenetic protein receptor type-2	20.58	1	1.00	9.38	0.40	1.13
Basic fibroblast growth factor receptor 1	32.35	1	1.00	0.03	2.48	1.63
TGF-beta-induced protein ig-h3	21.59	2	1.00	2.92	3.09	1.83
Beta-type platelet-derived growth factor receptor	28.61	2	1.00	3.86	7.21	4.72
Pro-epidermal growth factor	25.46	1	1.00	9.30	2.36	8.68
Growth/differentiation factor 5	21.43	1	1.00	11.07	7.25	2.62
Vascular endothelial growth factor receptor	28.61	2	1.00	6.04	1.78	1.20
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	617.06	42	1.00	3.52	2.28	1.61
Ras-related protein Rab-1A	335.5	10	1.00	3.89	2.94	1.56
Ras-related protein Rab-2A	108.69	10	1.00	4.87	3.32	2.04
Ras-related protein Rab-7a	214.98	8	1.00	5.33	3.06	2.61
Ras-related protein Rab-1B	277.68	6	1.00	5.37	3.27	2.21
Mitogen-activated protein kinase 1	99.75	8	1.00	3.93	4.59	2.46
Mitogen-activated protein kinase 15	28.61	1	1.00	3.49	2.67	1.92
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	23.76	1	1.00	907.33	10.42	397.03
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	49.1	4	1.00	2.82	4.47	2.51
Homeobox protein MSX-1	23.32	1	1.00	7.09	80.56	19.93
Plasminogen activator inhibitor 1	29.76	2	1.00	6.69	9.49	4.32
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	44.91	2	1.00	5.10	3.10	2.04
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	144.36	11	1.00	4.86	3.38	1.67
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	27.9	1	1.00	34.20	27.90	20.16
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	84.91	13	1.00	4.24	2.65	1.36
Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	64.51	8	1.00	4.77	3.52	1.70
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	142.73	5	1.00	5.65	2.63	2.18
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	24.35	1	1.00	6.70	8.82	9.35
Annexin A1	1116.9	32	1.00	3.62	3.14	2.52
Annexin A2	1251.16	44	1.00	4.03	2.96	1.57
Annexin A5	640.71	31	1.00	1.68	2.53	1.51
Cathepsin B	292.96	12	1.00	4.54	4.58	1.72
Cathepsin D	521.67	21	1.00	3.51	2.81	1.85
Alpha-enolase	1392.44	43	1.00	1.71	2.46	1.59
Beta-enolase	332.68	6	1.00	2.12	2.53	1.65
Gamma-enolase	310.98	8	1.00	1.67	2.16	1.45
pyruvate kinase, muscle isoform M1	101.51	2	1.00	5.56	5.94	3.38
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2080.41	60	1.00	2.19	2.94	1.77
Protein disulfide-isomerase	942.4	42	1.00	4.86	2.99	1.71
Calreticulin	544.24	30	1.00	6.83	3.82	2.38
Peroxiredoxin-4	289.62	15	1.00	5.04	3.21	2.08
Calumenin	146.14	15	1.00	5.51	3.63	2.22
plectin 1 isoform 1	22.29	4	1.00	3.17	3.28	1.70
SPARC (osteonectin)	145.73	8	1.00	7.88	3.89	2.28
Thrombospondin-1	194.39	18	1.00	3.15	1.11	0.62
Thrombospondin-2	41.86	2	1.00	2.66	1.96	1.18
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	37.51	1	1.00	1.22	0.03	0.41
Wnt-5a	22.63	1	1.00	0.87	0.73	0.38
Frizzled-6	26.69	1	1.00	5.66	34.12	4.11
Catenin beta-1	79.02	4	1.00	2.01	1.20	0.44

表4.骨分化にともなう発現変化が報告されている膜タンパク質

■ 2倍以上5倍未満, ■ 5倍以上/対照群

発現比*		Protein name	Protein Score	Peptide count	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti
protein	mRNA							
27	13 ± 5	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	37.51	1	1.00	1.22	0.03	0.41
15	1.0 ± 0.1	Enhancer of rudimentary homolog	101.24	2	1.00	7.42	3.19	2.52
13	1.1 ± 0.2	Versican core protein	34.66	2	1.00	8.24	2.19	0.26
12	ND	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	58.5	3	1.00	3.89	3.54	2.08
11	1.0 ± 0.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	212.44	10	1.00	3.30	1.91	1.81
8.7 ± 4.4	0.8 ± 0.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	99.61	4	1.00	6.92	3.36	2.11
8.7 ± 1.5	1.2 ± 0.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	317.75	20	1.00	4.57	2.81	1.79
3.2 ± 0.6	ND	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	194.49	16	1.00	5.18	2.81	2.15
10	1.0 ± 0.1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	382.71	19	1.00	4.43	3.26	1.93
6.4 ± 0.6	0.9 ± 0.1	Catalase	51.5	2	1.00	3.50	3.36	2.14
5.1 ± 1.9	1.0 ± 0.3	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	151.79	14	1.00	2.06	1.66	1.35
5.1 ± 1.7	1.06 ± 0.04	Ribosome-binding protein 1	399.8	35	1.00	3.77	2.24	1.94
4.9 ± 1.9	0.9 ± 0.1	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	288.76	17	1.00	5.16	2.48	1.83
4.2 ± 1.1	ND	ATP-dependent RNA helicase A	157.46	16	1.00	4.13	2.27	1.55
4.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	Tenascin	47.3	1	1.00	3.11	2.18	1.65
4.0 ± 1.2	ND	THO complex subunit 4	32.19	1	1.00	1.58	1.98	1.17
3.7 ± 2.3	1.4 ± 0.2	Ras-related protein R-Ras2	120.83	2	1.00	36.99	9.74	22.35
3.4 ± 2.5	2.3 ± 0.5	C-type mannose receptor 2	86.11	7	1.00	2.93	3.76	1.27
3.4 ± 2.6	ND	Prohibitin	85.99	10	1.00	5.03	2.35	1.65
3.3 ± 1.7	1.1 ± 0.2	Coiled-coil domain-containing protein 47	95.56	1	1.00	0.88	1.26	1.13
3.2 ± 1.6	0.9 ± 0.3	DnaJ homolog subfamily C member 13	47.94	3	1.00	1.88	2.06	1.46
3.2 ± 0.9	0.8 ± 0.2	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	166.6	6	1.00	4.35	3.46	3.14
3.2 ± 0.8	ND	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	35.2	2	1.00	20.47	9.23	3.78
3.2 ± 2.5	ND	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	526.98	31	1.00	3.73	2.59	2.01
3.1 ± 0.7	1.3 ± 0.4	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	856.18	31	1.00	6.56	3.75	2.23
3.1 ± 0.7	0.9 ± 0.1	26S protease regulatory subunit 7	105.05	6	1.00	5.79	2.29	1.88
3.0 ± 2.3	1.1 ± 0.1	Integrin alpha-11	69.84	3	1.00	6.57	3.28	2.45
3.0 ± 2.5	1.2 ± 0.1	Collagen alpha-1(VI) chain	663.64	24	1.00	3.10	2.73	1.93
3.0 ± 2.9	1.2 ± 0.1	40S ribosomal protein S11	165.6	8	1.00	2.76	1.86	2.07
3.0 ± 0.9	1.0 ± 0.3	Retinol dehydrogenase 14	31.94	2	1.00	0.14	0.00	0.02
5.3 ± 2.6	1.1 ± 0.2	Myb-binding protein 1A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4.1 ± 0.9	1.1 ± 0.2	GTP-binding protein NG	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3.8	1.0 ± 0.3	E3 UFM1-protein ligase 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3.7 ± 2.7	ND	Nucleolar RNA helicase 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*増殖培地に対して分化培地で培養したhMSC-TERTのタンパク質およびmRNAの発現比

表5. 骨分化にともなう発現変化が報告されている分泌タンパク質

細胞外

■ 2倍以上5倍未満, ■ 5倍以上/対照群

Protein name	Protein Score	Peptide count	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti
Chitinase-3-like protein 1	48.28	2	1.00	18.64	16.33	6.26
Peroxidasin homolog	45.41	2	1.00	3.61	1.77	1.16
Vitronectin precursor	47.57	1	1.00	15.58	22.66	9.09
Thrombospondin-2	41.86	2	1.00	2.66	1.96	1.18
Periostin	39.38	1	1.00	0.21	0.62	1.51
Dermcidin	34.36	2	1.00	0.57	0.94	0.52
Interstitial collagenase	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Connective tissue growth factor	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalloproteinase inhibitor 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SPARC-related modular calcium-binding protein 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Microfibrillar-associated protein 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Stanniocalcin-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Transforming growth factor beta-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Angiogenin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Insulin-like growth factor-binding protein 5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

細胞内

Protein name	Protein Score	Peptide count	untreated Ti (cont.)	NaOH Ti	NaOH/CaCl ₂ Ti	NaOH/Ca(OH) ₂ Ti
Peripherin	316.29	7	1.00	5.61	3.13	1.67
40S ribosomal protein S20	44.63	3	1.00	3.84	1.54	1.06
40S ribosomal protein S11	165.6	8	1.00	2.76	1.86	2.07
40S ribosomal protein S13	188.18	10	1.00	3.34	2.94	2.08
40S ribosomal protein S14	69.95	7	1.00	4.07	2.91	1.51
40S ribosomal protein S17	156.11	5	1.00	3.99	2.98	1.27
40S ribosomal protein S19	139.76	12	1.00	3.24	2.43	1.84
40S ribosomal protein S2	229.11	19	1.00	1.98	2.05	1.52
40S ribosomal protein S24	99.88	4	1.00	2.85	3.51	2.31
40S ribosomal protein S25	67.98	5	1.00	4.14	1.66	1.75
40S ribosomal protein S3	276.85	16	1.00	2.72	1.70	1.38
40S ribosomal protein S8	264.98	13	1.00	3.96	3.16	1.73
60S ribosomal protein L10a	122.73	9	1.00	3.69	1.97	1.43
60S ribosomal protein L18	199.75	10	1.00	3.39	2.66	1.72
60S ribosomal protein L5	173.67	15	1.00	5.48	4.76	2.41
60S ribosomal protein L7	313.3	19	1.00	2.55	2.36	1.84
60S ribosomal protein L8	158.98	11	1.00	2.97	2.31	1.96
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	218.84	7	1.00	2.59	2.43	1.80
Histone H2B type 2-E	375.22	8	1.00	1.87	1.26	0.82
Triosephosphate isomerase	544.05	23	1.00	2.39	2.92	2.43
Protein disulfide-isomerase A6	508.88	19	1.00	5.89	3.32	2.30
L-lactate dehydrogenase A-like 6A	72.91	2	1.00	4.27	2.52	1.30
Fascin	258.97	15	1.00	1.30	2.20	1.48
Proteasome subunit beta type-3	242.85	5	1.00	2.61	2.45	2.11
Proteasome subunit alpha type-1	94.08	8	1.00	3.02	1.93	1.64
Fructose-bisphosphate aldolase C	141.52	4	1.00	8.69	9.65	4.53
High mobility group protein 1-like 10	53.98	2	1.00	2.03	2.27	1.69
F-actin-capping protein subunit beta	101.93	9	1.00	2.15	2.01	1.22
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	329.4	18	1.00	4.97	3.43	2.07
Probable phosphoglycerate mutase 4	138.96	5	1.00	2.08	1.08	1.48
Ras-related protein Ral-B	61.29	2	1.00	3.99	2.47	1.72
Elongation factor 2	1305.78	51	1.00	1.98	2.61	1.54
Keratin, type I cytoskeletal 24	39.53	2	1.00	2.46	1.64	1.34
Lactoylglycyl-L-homoserine lyase	42.92	4	1.00	1.03	1.41	1.11
Peroxioredoxin-2	186.02	10	1.00	1.56	2.25	1.37
Tubulin-specific chaperone A	24.69	1	1.00	82.90	50.37	61.81
cDNA FLJ14048 fis, clone HEMBA1006650	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ribonuclease 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PNAS-139	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Probable helicase with zinc finger domain	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Semaphorin-7A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Torsin-1B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zinc finger protein 677	ND	ND	ND	ND	ND	ND

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

研究協力者 石原一彦 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 教授

研究協力者 井上祐貴 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 助教

研究協力者 京本政之 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 産学連携研究員

研究要旨

人工関節は毎年 17 万例以上が使用され、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における摩耗が挙げられるため、界面の親水性コーティング技術や新材料の開発、応用などが試みられてきた。

2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーは、細胞膜成分類似の構造を持ち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へのコーティングとして応用されている。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。また、今後も類似の親水性コーティング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指し、摩擦係数測定を行った。

Polyetheretherketone (PEEK) や炭素繊維で強化した炭素繊維強化 PEEK (CFR-PEEK) は生体適合性が高く機械的特性も良好であるため、人工関節用材料としての応用が検討されている。しかし、現在使用されている超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) を対象として構築された摩耗量評価法では、正しく摩耗量が評価できていない可能性がある。

摩擦係数測定の結果、poly (MPC) (PMPC) コーティングを施していない試料については文献等とほぼ同様の結果が得られたが、当初低い摩擦係数が予想された PMPC コーティングを施した試料では、片当たりにより 1 サイクルの摺動でコーティングが剥離し、高い摩擦係数が観察された。この結果、PMPC コーティングの剥離の可能性があり、応用の際は剥離に対する対策が重要であることが明らかになった。

各種材料の潤滑液中での重量変化と荷重による寸法変化を調べたところ、PEEK や CFR-PEEK は UHMWPE に比べ吸水量が多く、重量変化による摩耗量測定は困難である可能性が高いこと、寸法が安定しているため形状変化による摩耗量評価の可能性が高いことがわかった。

A. 研究目的

人工関節置換術は、整形外科領域で最も成功した治療法とも言われ、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。2010年度現在、年間約17万例[1]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、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、再置換に至る不具合の生じない人工関節の開発や、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[2]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[2, 3]。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 ポリマーは親水性が極めて高く[4]、蛋白を吸着しない[5]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 poly (MPC) (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[6, 7]。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[6]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[8]、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。

もう一つの低摩耗化の取り組みとして、新規の摺動面材料導入の検討も行われている。例えば、従来からある UHMWPE や金属、セラミックスに加え、polyetheretherketone (PEEK) の研究[9, 10]も進んでおり、PMPC コーティングも可能である[11]。

新材料の摩耗特性の評価は、従来の UHMWPE の評価方法に則って行われていることが多い。しかし、摩耗量が負であると

の報告が多くなっている。その一因として摩擦耗量が少ないことも考えられるが、水分の吸収量が従来の UHMWPE に比べ多いなど、材料特性が UHMWPE とは異なるために生じる誤差が原因で、摩擦耗量が正しく評価できていない可能性が考えられる。人工関節の摺動面材料の摩擦特性は、人工関節の寿命に大きく影響を与えることが考えられるため、これを正しく評価することは極めて重要である。そこで、本研究では、このような摩擦耗量が少ない新材料の摩擦特性を適切に評価できる新しい評価方法についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 摩擦係数の評価

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。摩擦係数の測定のため、二次元摩擦試験機に、摩擦係数を測定できるシステムを取り付けた(図1)。具体的には、二次元摩擦試験機の上部にあるピンホルダー部分に、摺動中の摩擦力により変形する二本の薄板を取り付け、ここ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。これらのひずみゲージを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。ひずみゲージの接続法には4ゲージ法を用い、引張圧縮ひずみが相殺され、曲げひずみのみが検出されるようにした。この方法では出力は4倍となり、より感度よく計測される。昨年度はこのシステムについてキャリブレーションを行い、極めて高い線形性が得られることを報告した。

試験材料としては、UHMWPE(GUR1020)、PEEK(450G)、炭素繊維強化PEEK

(CFR-PEEK、スミプロイCK4600)を用いた。機械加工により端面が直径6mm、12mm、24mmとなるよう、円筒状のピン試料を作製した(表1)。なお、PEEKとCFR-PEEKについては端面を研磨加工した。

また、PEEKとCFR-PEEKの表面にPMPCコーティングを施した[11]試料(PMPC-PEEKおよびPMPC-CFR-PEEK)も用意した。

炭素繊維を含む材料を相手面に金属を使用すると、材料に含まれる炭素繊維により金属製相手面に傷がつくため、相手面には40mm x 40mm x 10mmのアルミナセラミック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。

荷重条件は、2kg、5kg、10kg、20kgとした。端面の大きさが異なる3種類の試料ピンに対して実験を行ったため、公称接触応力(負荷した荷重を試料端面の面積で割った値)は、0.02MPaから6.58MPaという広範囲となった(表1)。なお、公称接触応力の計算においては、試験機についているカウンターウエイトによる荷重の増減を加味している。

摺動パターンは長さ10mmの単純往復動とし、摺動速度は4mm/sであった。

潤滑液には、牛血清水溶液を用いた。ISO規格[12]を参考に、牛血清(三光純薬、Calf serum、CC3017-502、Lot No: 18110827)を蛋白量が20g/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81g/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、161-07284)および4Na、Sigma-Aldrich、09-1510-5)20mmol/Lを加えた[12]。また、微生物の繁殖を抑制するためにアジ化ナトリウム(NaN₃、和光純薬、

195-11092) 1 g/L を添加した[13]。試験は生体内を模して 37°C 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。

PMPC コーティングを施した試料について、コーティングの剥離が疑われる現象が生じたため、摺動面の光学顕微鏡観察を行った。実際の観察には 3 次元測定レーザー顕微鏡（島津製作所、OLS4000）を使用したが、レーザー測定ではなく、可視光を用いたカラー像による観察を行った。

2. 摩耗量の評価

近年、人工関節用摺動材料の摩耗特性に関する報告では、摩耗量が負であったとの報告が多くあるが、その原因として試験中の水分の吸収や、潤滑液中の脂質などの浸入が原因と考えられる。そこで、潤滑液中における各種材料の重量変化を調べた。

UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK より作製した、端面の直径が 6 mm のピン試料を使用した（表 1）。これを前述の潤滑液（牛血清水溶液、総蛋白量 20 g/L、20 mmol/L EDTA、1 g/L NaN_3 ）に室温で浸漬した。

これらの試料の重量変化を定期的に測定した。重量測定は電子天秤（Mettler-Toledo、XP26、最小表示単位 1 μg ）を用いた。また、測定の前には洗浄を行った[14]。この洗浄方法は UHMWPE の摩耗量を重量変化により評価するために作られたもので、試料に付着した脂質や蛋白などを除去するための洗剤での洗浄、蒸留水によるすすぎ、付着した水分を除去するためのメチルアルコールによる脱水の行程が含まれる。

試験中の荷重による影響を調べるため、一部の試料（材料毎に $n = 3$ ）については二次

元摩耗試験機に装着し、浸漬期間中は 20 kg の荷重を加えた。ただし、摺動は加えなかった。また、重量測定による摩耗量評価に代わる方法として形状測定による方法が考えられるが、その可能性について検討するため、重量測定と同時にピンの長さをマイクロメータ（Mitsutoyo、MDC-25MJ）で測定し、試料の寸法変化について調べた。

C. 研究結果

1. 摩擦係数の評価

図 2 に 1 サイクルの摩擦力の測定例（生データ）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、逆方向の静止摩擦力に相当する負の方向へのピークが観察され、その後同様に動摩擦力を示す値が観察された。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。静止摩擦力は常に動摩擦力より高値を示すが、動摩擦力とほぼ同様の傾向を示すことと、動摩擦力の値の方がより安定することから、本報告書では、動摩擦力のデータのみを示す。また、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 46 サイクル目から 50 サイクル目の平均値を採用した。

図 3 にコーティングを施していない、UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK について接触応力を変化させた際の動摩擦係数の結果を示す。接触応力が高くなるにつれて摩擦係数が下がる傾向が見られた。また、PEEK と CFR-PEEK の摩擦係数は UHMWPE に比べ高いこと、また、ばらつきが大きいことがわ

かった。

PMPC コーティングを施した PMPC-PEEK、PMPC-CFR-PEEK はコーティングを施していない PEEK、CFR-PEEK とほぼ同等の高い摩擦係数を示した（図示していない）。その原因について検討するため、摺動開始直後の摩擦力の測定結果（生データ）について調べた（図 4）。その結果、PMPC-PEEK の摩擦力は 1 サイクル目に徐々に上昇し、2 サイクル目からはコーティングなしと同等になることがわかった。このことから、コーティングの剥離が予想されたため、摺動面の観察を行った。その結果、図 5 に示すように、辺縁部におけるコーティングの剥離が確認された。

2. 摩耗量の評価

図 6 に UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK の重量変化を示す。PEEK と CFR-PEEK は UHMWPE の 20 倍以上吸水することがわかった。図 7 に UHMWPE の荷重下と非荷重での重量変化を示す。UHMWPE の場合、荷重下では非荷重に比べ吸水量が増加する傾向が見られた。これに対して、PEEK と CFR-PEEK では、荷重による吸水量への影響は見られなかった（図 8、図 9）。図 10 から図 12 に浸漬中の個々の試料ピンの寸法変化を示す。UHMWPE では、荷重下にあった 3 つのピンの寸法が減少していることが明らかであった。これに対して、PEEK と CFR-PEEK では、荷重による寸法への影響は認められなかった。図 13 に重量測定中の重量変化を示す。重量測定は誤差を低減する目的で試料を 3 回繰り返して測定するが、材料によってはこの間にも水分の減少などの理由により重量が変化する。そこで、1 回目の測定に対する 2 回目、3 回目の測定値につい

て調べたものである。UHMWPE の場合、試料の数が多かったため測定間隔は 6~8 分であったがその間の重量変化は小さく、ほぼ無視できることがわかった。これに対して PEEK と CFR-PEEK では、試料数が UHMWPE より少なかったため測定時間が 3~4 分と短かったにもかかわらず、測定中の明らかな重量変化が観察された。

D. 考察

1. 摩擦係数の評価

コーティングを施していない試料では、公称接触応力が高くなるにつれ摩擦係数が低下することがわかった。これは、過去の測定結果と同様の傾向であった[13]。これは、摺動する二面間にトラップされた潤滑液成分による荷重支持の割合が公称接触応力の増加に伴って大きくなることがその原因として考えられた（図 14）。

PMPC コーティングを施した試料の摩擦係数は、低い値が計測されることが期待されていたが、実際にはコーティングを施していない試料とほぼ同様の結果であった。その原因は、コーティングの剥離であり、その位置がピン試料の辺縁であったことから、ピン試料の端面と相手面が完全に平行に接触せず、片当たりが生じていたためであると考えられた。その原因として、二次元摩耗試験装置の平行度の不足、ピン試料およびプレート試料の平行度の不足、ピン治具の平行度の不足などの可能性も否定できなかったが、ひずみゲージを貼付した摩擦力測定システムの剛性の不足が原因であった可能性が最も高いと考えられた。このことは、PMPC コーティングを施していない試料についても同様の片当たりが生じていた可能性を示唆しており、PEEK や CFR-PEEK の摩擦係数に大きなバラツキ

が見られた原因であった可能性も考えられた。

本研究では、当初予定していた PMPC コーティングを施した試料の摩擦係数測定ができなかったが、結果的に以下の 2 点の結論を得ることができた。第一に、PMPC コーティングは片当たりなどにより高い接触応力が発生すると 1 サイクルという短時間で剥離してしまうこと、第二に、PMPC コーティングが剥離した面は PMPC コーティングを施していない PEEK あるいは CFR-PEEK と同様の高い摩擦係数を示すことである。従って、このような材料を埋植医療機器の摺動面に应用することを考える場合、片当たりなどで高い接触応力が発生することがないように設計が必要であること、万が一コーティングが失われても直ちに不具合につながるような設計とすることが必要であると思われる。

例えば、PMPC コーティングを埋植医療機器の摺動面として応用した事例として、人工股関節の UHMWPE 製摺動面に応用した事例があるが、この事例は以上のような条件が考慮された好例ではないかと考えられる。つまり、股関節はボールソケット型の摺動面であるため片当たりが生じる可能性が極めて低く、また、万が一コーティングが失われた場合でもすでに臨床使用されているコーティングが施されていない従来品と同等になるだけで、不具合のリスクを上昇させるものではないからである。

2. 摩耗量の評価

PEEK や CFR-PEEK の吸水量は UHMWPE の 20 倍以上であった。逆に、PEEK や CFR-PEEK の荷重による寸法変化は 20 分の 1 以下であった。UHMWPE は寸法が容易に変化する一方、吸水による重量変化が少ないことから、重量変化による摩耗量

の評価が適当であることがわかった。これに対して PEEK や CFR-PEEK では、吸水量が多いため重量測定による摩耗量の評価が困難である可能性が高い一方、寸法の変化がほとんどないため形状測定による摩耗量評価が可能であることが示唆された。

レーザー顕微鏡などの技術の発展により非接触による高い精度の形状測定が可能になってきている。PMPC コーティングに代表される親水性コーティングが施された試料では、乾燥や脱水による水分量の制御がより困難になる可能性があること、コーティング剥離の危険性があるため積極的な洗浄が困難であることから、これらが不要な形状測定による方法が特に最適である可能性が高いと考えられる。

E. 結論

二次元摩耗試験機を改造し構築した摩擦測定システムにより、UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK の摩擦係数を広範囲の接触応力で測定した。その結果、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。また、PEEK や CFR-PEEK の摩擦係数は UHMWPE より高かった。

次に PMPC コーティングを施した試料の摩擦係数を測定したが、試料の片当たりによりコーティングが剥離し、コーティングを施していない試料と同等の高い摩擦係数が測定された。摩擦係数のデータから、コーティングは 1 サイクル目で剥離していることがわかった。

UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK の吸水特性について牛血清水溶液を用いて調べたところ、PEEK や CFR-PEEK は UHMWPE の 20 倍以上吸水することがわかった。このことから、これらの材料について重量測定により

微小な摩耗量を評価することは困難であると思われた。荷重による寸法の変化を調べたところ、PEEK や CFR-PEEK の寸法はほとんど変化せず、これらの材料については形状測定による摩耗量評価が適当である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 臨床バイオメカニクス, 32, 277-281 (2011)

2. 学会発表

1) 迫田秀行, 松岡厚子: デラミネーションの再現と内部クラック観察

第38回 日本臨床バイオメカニクス学会, (2011年11月)

2) 迫田秀行, 京本政之, 井上祐貴, 石原一彦, 松岡厚子: 人工関節摺動面用材料の形状変化による摩耗量評価の可能性の検討 第38回 日本臨床バイオメカニクス学会, (2011年11月)

3) 迫田秀行, 松岡厚子: ガンマ線架橋超高分子量ポリエチレンの酸化劣化に対する熱処理の影響

第33回 日本バイオマテリアル学会, 33, P158 (2011年11月)

4) 迫田秀行, 松岡厚子: 人工関節用超高分子量ポリエチレンのデラミネーション破壊特性評価

第42回 日本人工関節学会, 42, PS2-062 (2012年2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: 2011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 (2011)
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. ASTM F 732-00 : Standard Test Method for Wear Testing of Polymeric Materials Used in Total Joint Prostheses

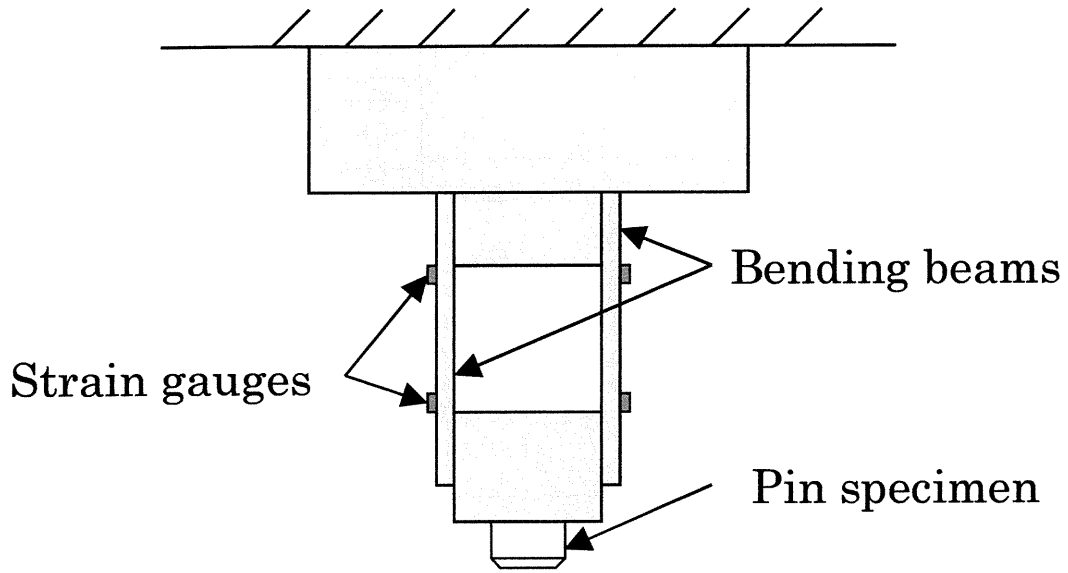


図1 本研究で製作した摩擦力測定用試料ピンホルダー。

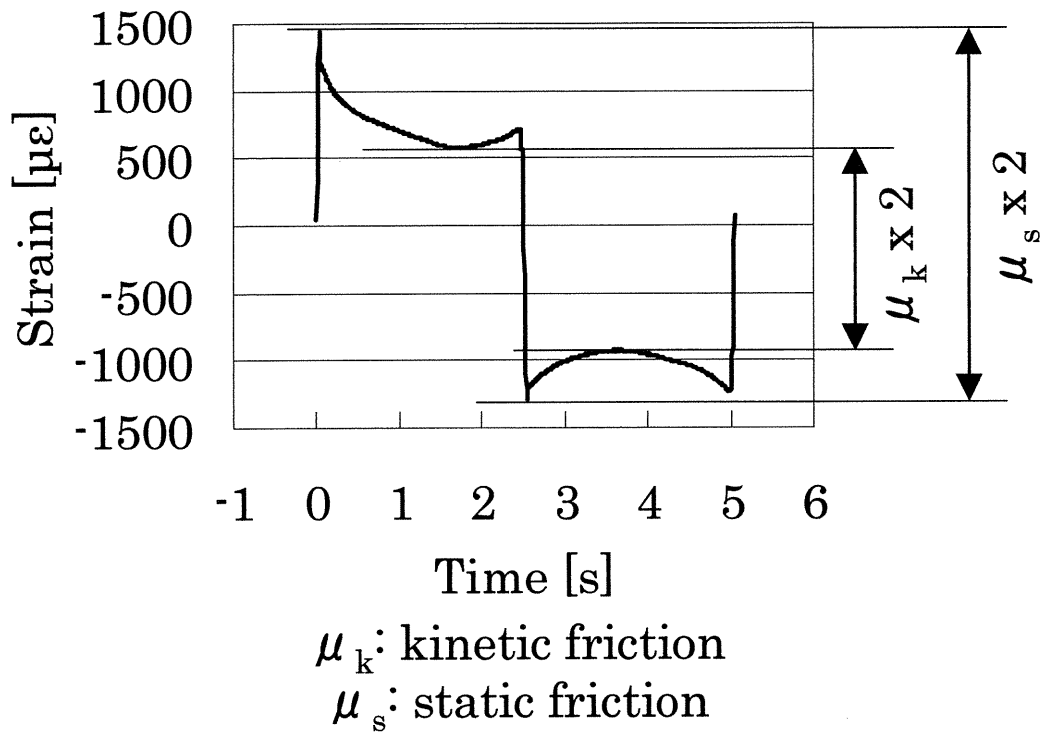


図2 UHMWPE ピンの摩擦力測定データの一例と静摩擦係数、動摩擦係数の算出方法。