

The PDMS elastomer was coated by the immersing method using the polymer solution. In order to disregard the effect of low concentration, all the polymer solutions were prepared with a sufficiently high concentration (30 mg mL^{-1}). The changes in the surface properties on immersing in the polymer solution were estimated by confirming the changes in a hysteresis loop during three successive immersing processes (Fig. 2). In the case of pure ethanol, the hysteresis loop shows no changes during the repeated immersion process, which indicates no significant conformation changes on the PDMS surface. In contrast, for copolymer solutions, the hysteresis loop showed a significant change at the first cycle of the immersion process, indicating that the surface property changed with the immersion into the polymer solution; this change is possibly induced by the adsorption of polymer molecules on the PDMS surface. Further, the hysteresis area was significantly decreased for each copolymer solutions. This indicates that the ethanol solvent feel equilibrated state between the treated PDMS surface and the polymer solution because of the enhanced wettability on the PDMS surface.

In order to estimate the coating efficiency and the stability in water, the surface element of treated PDMS was analyzed by XPS before and after washing with water. The resulting atomic ratio is shown in Fig. 3. For the PDMS surfaces coated with a block-type copolymer, only a little amount of MPC polymer was detected in the case of B1 immediately after coating, whereas a large amount of coated polymer was detected in the case of B2 and B3. Although B1 solution increased the wettability of the PDMS elastomer, it did not provide a stable coating from the ethanol solution. This indicates that in addition to the wettability

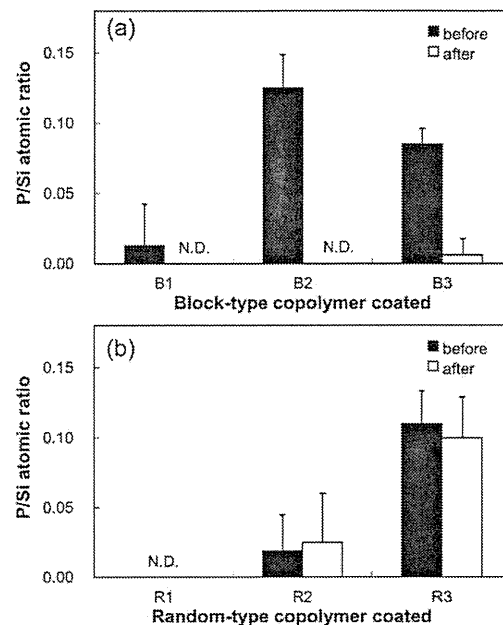


Fig. 3 P/Si atomic ratio of PDMS surface coated with (a) 30 mg mL^{-1} of block copolymer and (b) 30 mg mL^{-1} of random copolymer for 3 min. This ratio is determined before and after washing the surface with water.

of the substrate, its affinity with solvent must be considered when designing a coating agent. On the other hand, a large amount of polymers were coated from ethanol on PDMS elastomer in the case of B2 and B3 solutions. This indicates that the polarity of B2

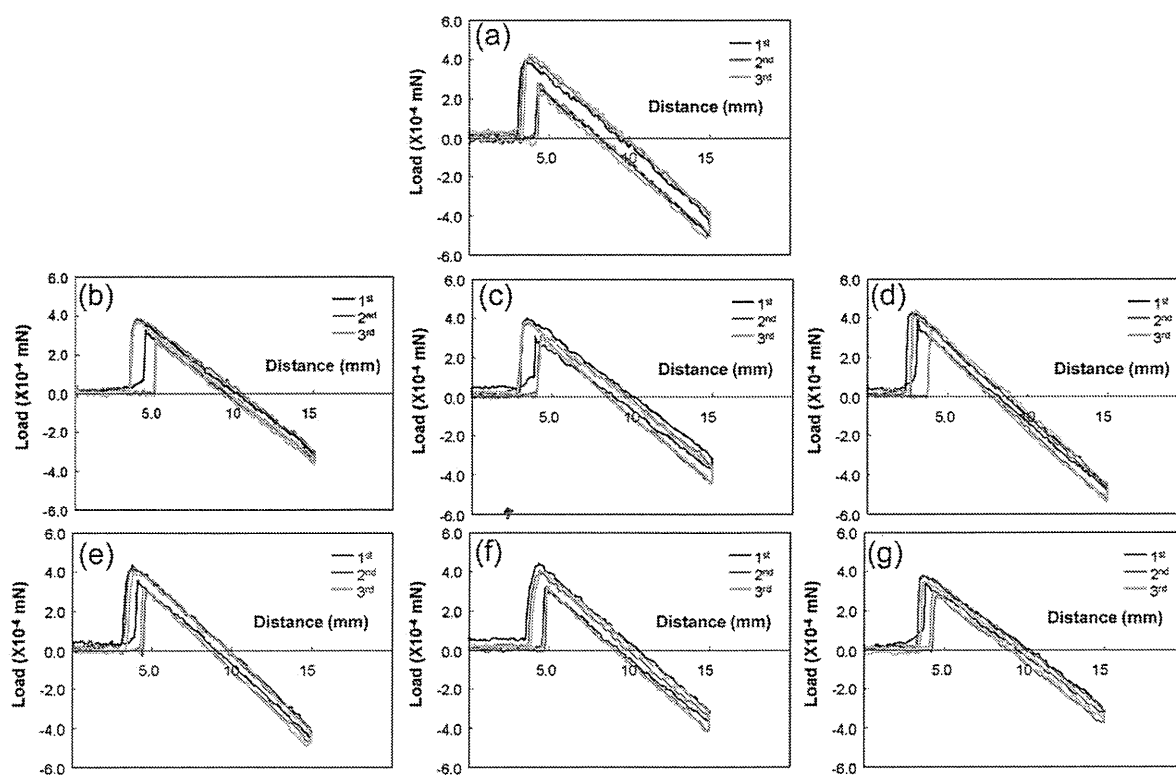
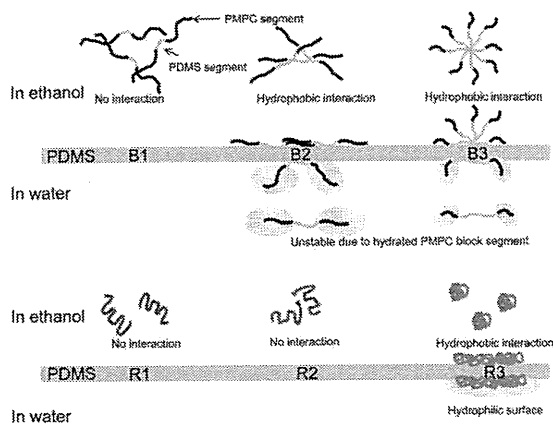


Fig. 2 Changes in hysteresis loop during three successive immersions in (a) pure ethanol and in 30 mg mL^{-1} of (b) B1, (c) B2, (d) B3, (e) R1, (f) R2, and (g) R3 solutions.

and B3 was hydrophobic enough to overcome the affinity with solvent for coating on the PDMS surface. Even though both B2 and B3 show a good coating efficiency from a polar solvent, the stability in the aqueous media was not satisfied. After the PDMS surfaces were thoroughly washed with water, most of the block-type copolymer was removed from them. Because both B2 and B3 did not show good solubility with water (turned opaque), the result has to be considered with respect to molecular structure. It is thought that the PMPC block segment on the PDMS surface is heavily hydrated when the substrate is immersed in water.¹⁵ Therefore, a strongly hydrophobic PDMS surface might easily repel the PMPC block segment in water; this repulsion is probably the reason for the instability of block-type copolymers on the PDMS surface (Scheme 2). In all cases, a block-type copolymer synthesized in this research did not seem to be a suitable molecular design for developing a stabilized surface modifier of the PDMS elastomer. Fig. 3b shows the atomic ratio of the PDMS surface coated with random-type copolymers. Obviously, R1 and R2 were not effectively coated on the PDMS surface in ethanol, possibly for a similar reason as that in the case of B1. On the contrary, a large amount of R3 was coated on the surface right after the coating process and most of the R3 molecules were retained even after the surface is thoroughly washed with water. This indicates that a higher content of hydrophobic DMS in a random-type molecular structure is a key factor in maximizing the coating efficiency of the polar solvent.

In order to confirm the effect of the polymer concentration on the coating efficiency, R3 in various concentrations was tested as a coating solution. Fig. 4a shows the result of the P/Si atomic ratio measured after water washing. Clearly, it was confirmed that the amount of coated polymer was almost saturated when the polymer concentration was more than 5 mg mL⁻¹, and a slightly increased amount of P/Si was detected along with the concentration increase. This result indicates that the concentration of the polymer solution plays an important role in completely coating the PDMS surface with the R3 polymer solution. The effect of the immersing time in the 30 mg mL⁻¹ R3 polymer solution was also investigated to obtain the optimized coating condition; the resultant P/Si atomic ratio is shown in Fig. 4b. From the result, there was almost no coating effect when the immersion time was 10 s. However, the P/Si atomic ratio was



Scheme 2 Schematic explanation of interactions between solvent-copolymers and PDMS substrate.

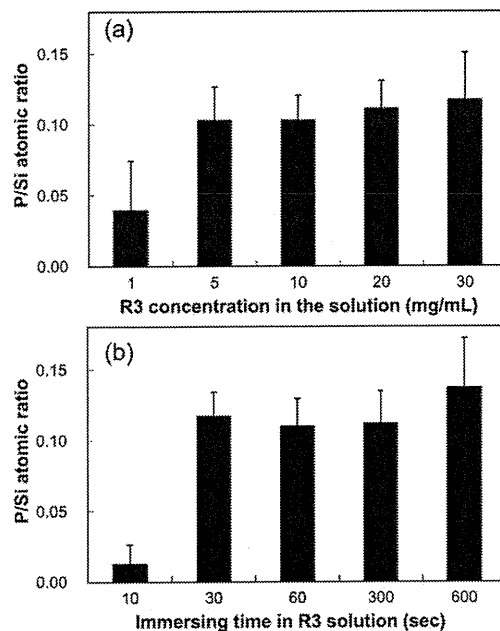


Fig. 4 P/Si atomic ratio of PDMS surface coated with different coating conditions. (a) Coated for different concentrations of R3 solution and (b) coated for different immersion time in a 30 mg mL⁻¹ R3 solution after washing with water.

almost saturated when the coating time was over 30 s; this indicates that a large amount of polymer adsorption onto PDMS surface requires an immersion time of more than 10 s. In general, hydrophobic surfaces are completely covered with a large amount of protein because of hydrophobic interactions within a few seconds in PBS. The kinetics of this sort of interaction is generally controlled by physicochemical factors such as temperature, pH, surface charge, or ionic strength, *etc.*²³ Since random-type copolymer adsorption onto PDMS surface is considered due to hydrophobic interactions, quite similar to that of the protein adsorption process, this time-dependent coating efficiency could possibly be varied by controlling the above-mentioned physicochemical factors in ethanol.

A topological analysis of the coated PDMS surface was carried out by conducting AFM observations in water; the results are shown in Fig. 5. All the PDMS elastomers were immersed into the polymer solution for more than 10 min in order to prevent insufficient coating induced by the abovementioned time-dependent properties. The non-coated PDMS surface is flat, as expected. In the case of the PDMS surface coated with 1 mg mL⁻¹ R3 solution, only a limited amount of polymer adsorption was observed on the surface. This clearly indicates that the immersion time is not a sufficient factor for completely coating the PDMS surface; this result is in good agreement with the XPS data. When the PDMS elastomer was coated with the 5 mg mL⁻¹ R3 solution, the overall PDMS surface was covered with the polymer, as shown in Fig. 5 c. However, a hole-like surface indentation was commonly observed on the coated surface; this indentation is possibly due to the polymer concentration being insufficient to completely coat the surface. On the other hand, The PDMS surface coated with the 30 mg mL⁻¹ polymer solution was observed to be almost completely covered; this result once again confirms the XPS result, *i.e.* 30 mg mL⁻¹ polymer solution

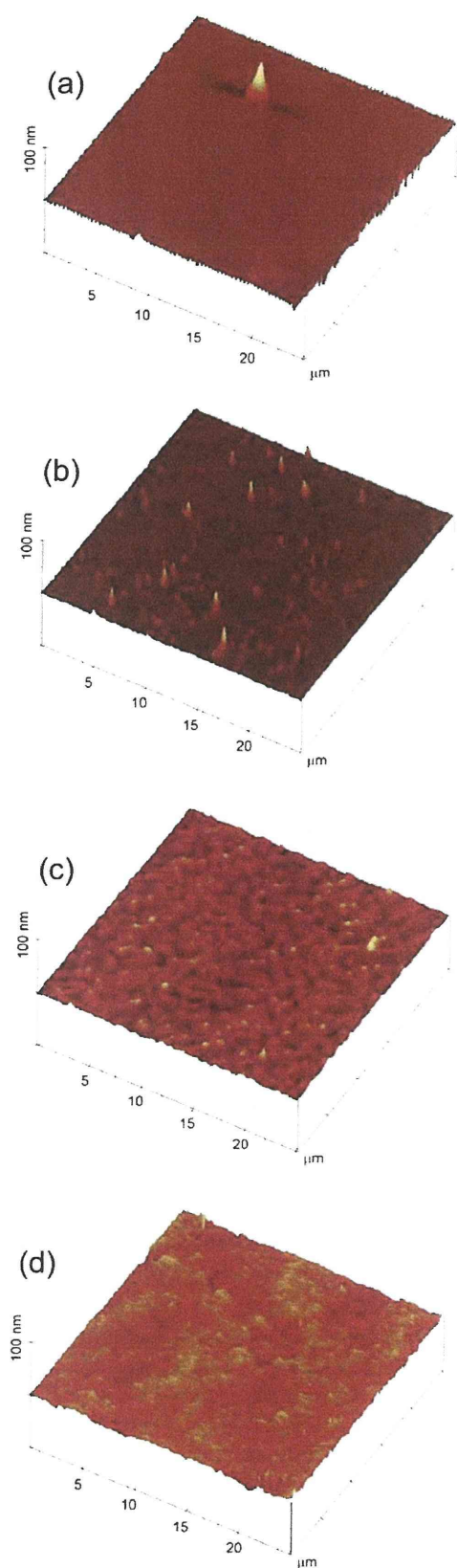


Fig. 5 AFM topological image of (a) bare PDMS surface and of a PDMS surface coated with (b) 1 mg mL^{-1} , (c) 5 mg mL^{-1} , (d) 30 mg mL^{-1} R3 solution.

was the optimized concentration. It is considered that the large amount of protein adsorption is mainly due to hydrophobic interactions between the amino acid residue and hydrophobic surfaces. Other physicochemical factors such as surface charge or ionic strength also have a considerable effect on the protein adsorption behavior.²⁴ However, the zwitterionic phosphorylcholine group and the DMS units are electrically neutral and the ionic strength of PBS is not changed in any of the experimental steps in this research. Thus, in this study, the degree of hydrophilicity was primarily considered as an important factor in suppressing the protein adsorption. The hydrophilicity of the coated surface was investigated by measuring the air bubble contact angle in water; the result is shown in Fig. 6. The bare PDMS surface shows an air bubble contact angle of approximately 80° , which indicates strong hydrophobicity in water. When the PDMS surface was coated with the 1 mg mL^{-1} R3 solution, the hydrophobicity of the PDMS surface did not improve significantly, even though the air bubble contact angle was increased slightly. As confirmed from the AFM topological images, a large area of the bare PDMS surface still remained when the surface was coated with the 1 mg mL^{-1} R3 solution. The coated surface remains a hydrophobic surface possibly because of the presence of this residual bare surface. In contrast, PDMS surfaces coated with R3 solution with a concentration of over 5 mg mL^{-1} show significantly improved hydrophilicity, and the degree of hydrophilicity was almost saturated when the polymer concentration was over 5 mg mL^{-1} . The results of the surface elemental analysis and AFM also indicated that the minimal concentration of R3 solution required for the complete coating of the PDMS surface was 5 mg mL^{-1} . This indicates that once the surface is covered with the polymer, its hydrophilicity is not significantly improved even when the polymer concentration is increased.

Fig. 6 also shows the relative amount of protein adsorbed on each coated surface, as calculated by the micro-BCATM experimental method. When the surface was coated by the 1 mg mL^{-1} R3 solution, the amount of protein adsorption was decreased to 60% of the bare PDMS surface. The amount of adsorbed protein continuously decreased with the increasing polymer concentration. The surface coated with the 30 mg mL^{-1} polymer solution could suppress approximately 70% of the adsorption on the bare PDMS surface; this value was slightly above the detection limit of micro-BCATM. Because the surface elemental analysis data and the subsequent hydrophilicity of the coated surface was almost saturated for polymer concentrations of over 5 mg mL^{-1} ,

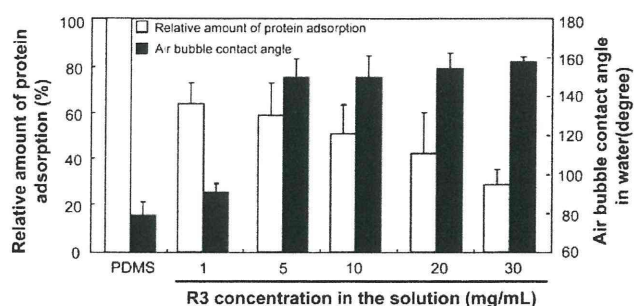


Fig. 6 Air contact angle in water and relative amount of protein adsorption on each PDMS surface. Coating time: 10 min.

it was expected that the amount of protein adsorption could also be minimized from the surface coated with the 5 mg mL⁻¹ R3 solution. However, the amount of protein adsorption on the surface with 5 mg mL⁻¹ solution is almost twice that on the surface coated with the 30 mg mL⁻¹ solution. This indicates that in addition to the surface hydrophilicity, other factors such as surface morphology observed by AFM, must be considered for optimizing the physical coating process as previously discussed in other literature.⁹ Even though the surface elemental analysis and the hydrophilicity of coated surface is almost saturated for polymer concentrations over 5 mg mL⁻¹, a hole-like surface indentation was commonly observed on the coated surface with the 5 mg mL⁻¹ as described above in the AFM images. It is very well known that significant protein adsorption is detected even on hydrophilic polymer surfaces.²⁵ This type of adsorption is thought to be due to geometrical factors of polymer surfaces, such as chain mobility, intermolecular distance, or interstitial vacancies.⁹ Primary protein adsorption is mainly dominated by the intermolecular distance between coated polymers. Based on the AFM observation, considerable primary adsorption might easily occur on the PDMS surface coated with the 5 mg mL⁻¹ R3 solution rather than that coated with a 30 mg mL⁻¹ R3 solution.

One of the major applications of PDMS in advanced bioengineering field is to fabricate the microfluidic chip. To enhance the performance of the microfluidics, non-specific adsorption of biological components should be avoided. In order to confirm the coating efficiency of the designed polymer, the PDMS microchannel was modified using the R3 solution based on the condition discussed in the above result. Fig. 7 shows the fluorescence microscopy images obtained after the protein adsorption test using the FITC-labeled BSA solution. Obviously, the bare PDMS channel shows a significant amount of protein adsorption on its surface. On the other hand, the amount of protein adsorption was significantly decreased almost to the background level when the channel was coated with 30 mg mL⁻¹ R3 solution. This indicates that coating with R3 solution at a suitable concentration effectively suppresses the protein adsorption in PDMS-based materials such as a PDMS microchannel.

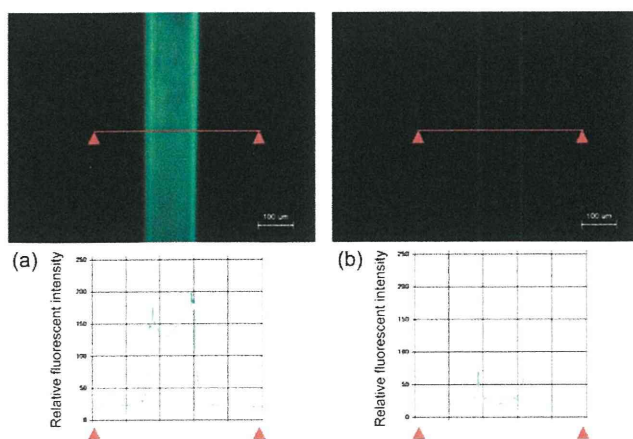


Fig. 7 Fluorescence microscopy image and relative fluorescence intensity of (a) bare PDMS micro-channel and of the PDMS microchannel coated with (b) 30 mg mL⁻¹ R3 solution, obtained after the FITC-labeled BSA adsorption test.

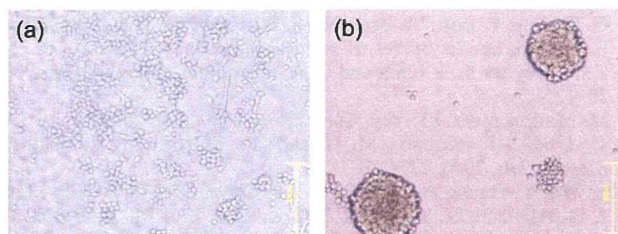


Fig. 8 Optical microscopy image of adhered cells on (a) bare PDMS surface and (b) PDMS coated with R3 (30 mg mL⁻¹, 3min) solution.

The cellular responses on the PDMS surface also play an important role in designing various types of biomedical devices such as cell-based drug screening systems or oxygen-permeable cell analysis systems.²⁶ Therefore, uncontrollable cellular attachment on the material surface must be prevented by proper surface modification. Fig. 8 shows the optical microscopy images of the PDMS substrates after performing the L929 cell adhesion test. Contrary to the significantly adhered cells on a bare PDMS surface, no adhered cells were observed on the PDMS surface treated with R3. Instead, we could observe cell aggregates flowing on the surface which is normally observed cell morphology on MPC polymer treated surface. The primary phenomenon required for cell adhesion on the material surface is a large amount of protein adsorption.²⁷ Since the R3-treated PDMS surface shows a significantly decreased amount of adsorbed proteins (Fig. 6), non-specific cellular adhesion could be effectively suppressed by MPC polymer coating.^{28,29}

3. Conclusion

Modification of the surface of a PDMS elastomer in a simple and efficient manner was investigated by designing various compositions of block- and random-type MPC copolymers. The level of the hydrophobic DMS unit as a random-type component should be high (>70%) in order to stably immobilize the polymer on the surface in aqueous media. The immersion time and polymer concentration were also found to be important factors for realizing the optimal coating condition for suppression of large amount of protein adsorption and for inducing non-cell adhesive properties on the PDMS surface. Namely, molecular structure, unit composition, immersing time, and concentration of polymer solution must be comprehensively considered in optimizing the coating process on the PDMS surface.

4. Acknowledgments

This research was supported by the Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, and Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas “Molecular Soft-Interface Science” from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT).

References

- 1 S. Chen, J. A. Jones, T. Xu, H.-Y. Low, J. M. Anderson and K. W. Leong, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3479.
- 2 M. T. Lam, W. C. Clem and S. Takayama, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1705.

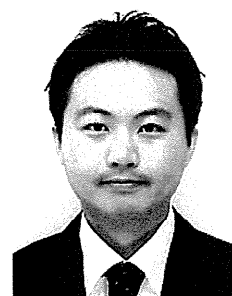
- 3 G. Soldani, P. Losi, M. Bernabei, S. Burchielli, D. Hiappino, S. Kull, E. Briganti and D. Spiller, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2592.
- 4 K. A. Heyries, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 1251.
- 5 M. Madou and J. Florkey, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2679.
- 6 T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro and K. Ishihara, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5151.
- 7 Y. Wu, Y. Huang and H. Ma, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 7226.
- 8 J. G. Alauzun, S. Young, R. D'Souza, L. Liu, M. A. Brook and H. D. Sheardown, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3471.
- 9 H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu and D. Li, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, **33**, 1059.
- 10 D. J. Wilson, R. C. Pond and R. L. Williams, *Interface Sci.*, 2000, **8**, 389.
- 11 B. Wang, L. Chen, Z. Abdulali-Kanji, J. H. Horton and R. D. Oleschuk, *Langmuir*, 2003, **19**, 9792.
- 12 D. P. Brennan, A. Doble, P. J. Sideris and S. R. J. Oliver, *Langmuir*, 2005, **21**, 11994.
- 13 R. Wang, Y.-L. Yang, M. Qin, L.-K. Wang, L. Yu, B. Shao, M.-Q. Qiao, C. Wang and X.-Z. Feng, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 3227.
- 14 D. Lazos, S. Franzka and M. Ulbricht, *Langmuir*, 2005, **21**, 8774.
- 15 K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **39**, 323.
- 16 H. I. Kim, M. Takai and K. Ishihara, *Tissue Eng., Part C*, 2009, **15**, 125.
- 17 K. Ishihara, N. P. Ziats, B. P. Tierney, N. Nakabayashi and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, **25**, 1397.
- 18 T. Shimizu, T. Goda, N. Minoura, M. Takai and K. Ishihara, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3274.
- 19 K. Ishihara, T. Ueda and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, 1990, **22**, 355.
- 20 J.-H. Seo, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1367.
- 21 J.-H. Seo, R. Matsuno, M. Takai and K. Ishihara, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5330.
- 22 A. Takahara, A. Z. Okkema, H. Wabers and S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, **25**, 1095.
- 23 A. V. Elgersma, R. L. J. Zsom, J. Lyklema and W. Norde, *Colloids Surf.*, 1992, **65**, 17.
- 24 Y. Xu, M. Takai, T. Konno and K. Ishihara, *Lab Chip*, 2007, **7**, 199.
- 25 E. P. K. Currie, W. Norde and C. M. A. Stuart, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2003, **100**, 205.
- 26 R. D. Lovchik, F. Bianco, N. Tonna, A. Ruiz, M. Matteoli and E. Delamarche, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3936.
- 27 S. V. Nolte, W. Xu, H. O. Rennekampff and H. P. Rodemann, *Cells Tissues Organs*, 2008, **187**, 165.
- 28 K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992, **26**, 1543.
- 29 K. Ishihara, E. Ishikawa, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 1999, **10**, 1047.

MPC ポリマー処理架橋ポリエチレン人工関節の実用化

*1東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, *2東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学講座, *3日本メディカルマテリアル株式会社研究部

京本 政之*1~3, 茂呂 徹*2, 石原 一彦*1

Masayuki KYOMOTO, Toru MORO, Kazuhiko ISHIHARA



1. はじめに

関節は運動機能を支える重要な器官であり、外傷や疾患による関節機能障害は日常の生活動作に大きな支障をきたす。人工関節置換術は、機能障害をきたした関節を人工関節に置き換える手術である。高齢化が進む現在、患者の痛みを取り除き運動機能を回復させる治療法として、手術件数は飛躍的に増加している¹⁾。しかし、医療技術の進歩と社会基盤の整備などで平均寿命の延伸が進んでいる一方で、人工関節の耐用年数(寿命)は一般に約15~20年といわれており、手術を受けた患者は、生涯のうちに人工関節の入れ換えの手術(人工関節再置換術)が必要となる可能性がある。特に中年期以前の患者の場合、複数回の再置換術が予測されることから、他の治療を受けながら、ある程度高齢になるまで疼痛や日常生活動作障害を我慢して過ごす場合も見られる。しかし、最近では患者の価値観や生活の質が尊重されるようになり、40歳代後半から50歳代でも、快適な生活を送るための一手段として人工関節置換術が選択されることも少なくない。したがって、活動性が高く充実した生活を実現するための人工関節の果たす役割は大きく、その長寿命化が期待されている。

人工関節の耐用年数は、患者の活動度や体重など、様々な要因で規定されるが、材料の側からは、関節摺動面から生じるサブミクロンサイズの摩耗粉が引き起こすインプラント周囲の骨溶解(osteolysis)と、これに続発する弛み(loosening)が主因の一つとされている²⁾。骨溶解は摩耗粉発生数に依存する現象であることが明らかとなってお

り、人工関節の長寿命化を図るには、関節摺動面からの摩耗粉の産生を減らして弛みを阻止することが重要である。したがって、関節摺動面を構成する超高分子量ポリエチレン(PE)や金属・セラミックスの改良、摺動面材料の組み合わせの変更など、様々な研究が行われてきたが、根本的な解決策は得られておらず、可及的速やかに解決すべき課題である。

そこで、筆者らは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを架橋PE(CLPE)白蓋ライナー表面にナノメートルスケールでグラフトするバイオミメティクスの研究から生まれた革新的な技術“Aquala® technology”による人工股関節用白蓋ライナー(MPC処理CLPE)を開発した^{3)~5)}。MPCは、細胞膜を構成するリン脂質分子に着目し分子設計されたメタクリル酸エステルで、石原らが大量合成法を確立した。このMPCを重合して得られるMPCポリマーを用いて基材表面を処理すると、容易に人工細胞膜構造を構築できる⁶⁾。この表面は優れた抗血栓性および組織適合性を発揮するとともに、親水性であることから、水の薄膜層を形成する。これらの特性を利用した様々な医療デバイス(血管拡張ステント、ソフトコンタクトレンズ、人工肺、埋め込み型人工心臓)が開発されており、既に国内外で承認を受け臨床使用されるなど、MPCポリマーの生体内での機能性の確認、安全性の担保はなされている。

2. 生体関節軟骨の模倣

生体の関節軟骨の表面では、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなど凝集体がブラシ構造を持つゲル層を形成し、この表面ゲル層が水和潤滑という機能により良好な摩擦・摩耗特性を示すと考えられている(図1)⁷⁾。また、関節軟骨の最表面にはナノメートルスケールのリン脂質分子層が存

■ 著者連絡先

東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻
(〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)
E-mail kyomoto@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

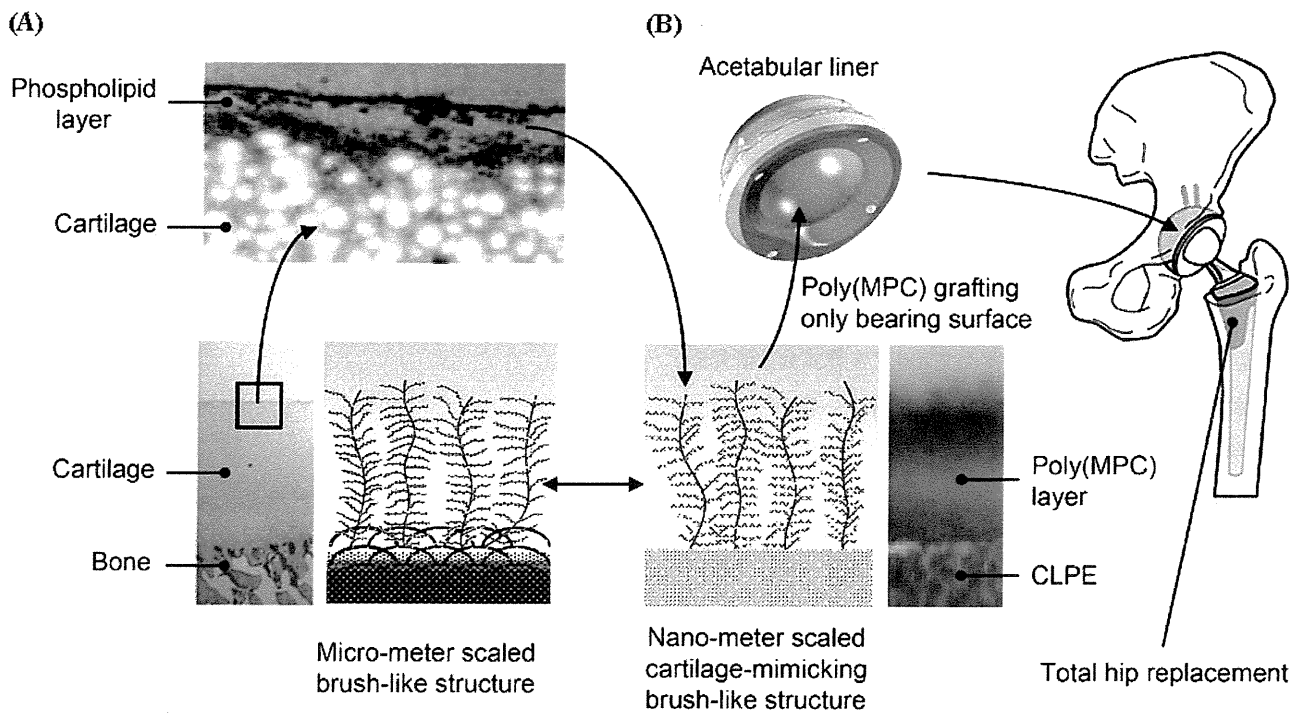


図1 生体軟骨 (cartilage) と MPC 処理 CLPE の表面ゲル層 (A) および MPC 処理 CLPE 臼蓋ライナーを擁する人工股関節 (B)

在し、この層が関節面の保護と潤滑作用に寄与していることも既に知られている。そこで、筆者らは、生体関節軟骨を模倣したブラシ構造を持つリン脂質ポリマーによる表面ゲル層を人工関節摺動表面に創製することで、生体関節軟骨と同様の安定した潤滑性、耐摩耗特性を発揮する表面を備えたインプラントを創出できると考えた。

3. 高潤滑性 MPC ポリマーによる人工関節の創製

MPC ポリマーの利点を活かし、生体関節軟骨を模倣したブラシ構造を持つ人工股関節摺動面を創製するため、その処理方法として、紫外線による光開始ラジカル重合法を適用した⁸⁾。これは、CLPE から直接 MPC をグラフト重合する方法で、MPC ポリマー鎖と CLPE は、安定した状態で共有結合されている。また、CLPE 表面のみを改質させる方法であるため、基材である CLPE の特性には影響を及ぼさない⁹⁾。

光増感剤であるベンゾフェノン を CLPE 表面に吸着させ、MPC 水溶液¹⁰⁾ に浸漬し、紫外線を照射することでグラフト重合を行い¹¹⁾、MPC 処理 CLPE が得られる。MPC 処理 CLPE 臼蓋ライナーの製造工程は、従来の CLPE 臼蓋ライナー製造工程の「機械加工」の後、「滅菌」の前に MPC 処理工程が追加されるのみである¹²⁾。

4. 高潤滑性人工関節インターフェイスの特性

MPC 処理前後の CLPE の表面ぬれ性をスプレー法で、摩擦特性を Ball-on-plate 型摩擦試験で評価した。CLPE および MPC 処理 CLPE 表面イメージを観察すると、撥水性であった CLPE 表面が MPC 処理により親水性へと変化し、そのぬれ性が劇的に向上していることがわかった (図 2)⁹⁾。次いで、摩擦特性を評価すると、ぬれ性の向上に伴って、MPC 処理 CLPE の動摩擦係数は、CLPE のその 10 分の 1 にまで低減していた。ナノメートルスケールのリン脂質ポリマー層を構築した MPC 処理 CLPE 表面の動摩擦係数は、生体関節軟骨表面と同等 (日常生活動作における動摩擦係数として、 ~ 0.02 程度) にまで低減しており、MPC 処理 CLPE を摺動面とする人工股関節は高い潤滑性を持つといえる。

5. 人工股関節シミュレーション試験による摩耗特性の評価

歩行周期において股関節は、様々な方向から体重の数倍に及ぶ負荷を受ける。生体内での人工関節の摩耗特性を評価するため、歩行周期を再現する人工股関節シミュレーション試験機を用いた。試験には、MPC 処理 CLPE 臼蓋ラ

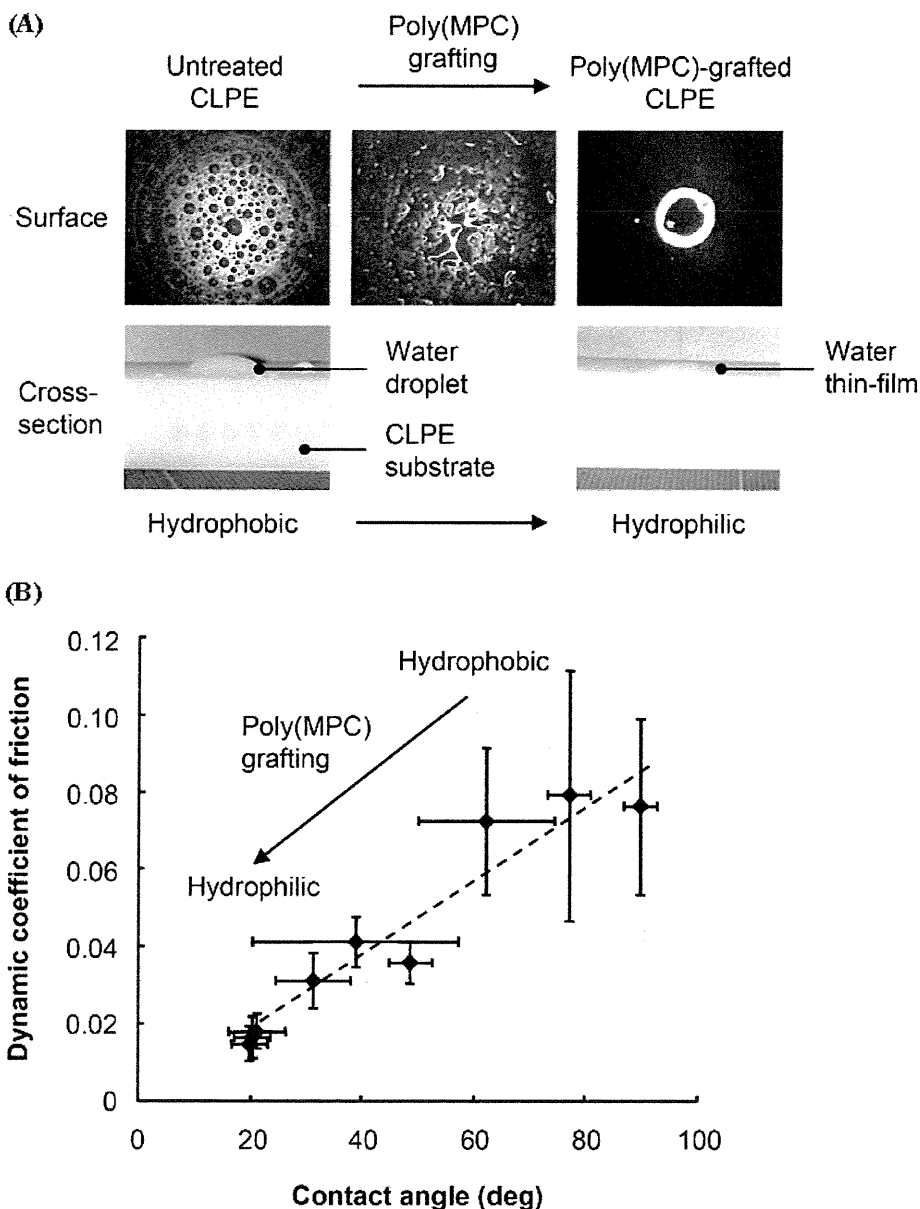


図2 MPC処理CLPEのぬれ性と摩擦特性
 (A) MPC処理によるCLPE表面のぬれ性の変化, (B) CLPE表面におけるぬれ性と動摩擦係数の関係。

イナーとコバルトクロム合金製骨頭(直径26 mm)を用いた。試験はISO14242-3に準じて行い、潤滑液には25%ウシ血清を用いて毎秒1回の歩行周期にて1,000万歩(1,000万サイクル)の歩行を模擬した。MPC処理CLPEライナーの経時的な摩耗量をその重量変化で検討すると、MPC処理CLPEライナーの摩耗量は未処理CLPEライナーに比べ、著しく少なかった(図3)⁴⁾。また、試験に使用した潤滑液から摩耗粉を分離・回収して解析をしたところ、MPC処理CLPEと未処理CLPEとの間で、摩耗粉の形状や粒径分布に差は認められなかったが、MPC処理CLPEライナーからの摩耗粉発生数は、未処理CLPEライナーからのそれ

に比べ、顕著に抑制されていた。

6. 生物学的安全性の評価

MPC処理CLPEは、人工股関節摺動材料として生体内に長期間埋入して使用される医療機器である。したがって、生体に対する為害作用の有無を広範な角度から検討するため、基礎的な生物学的安全性について表1に示す試験を行った。その結果、いずれの試験項目についても毒性は認められず、細胞、局所組織および全身の各レベルにわたってMPC処理CLPEは高い生物学的安全性を有することが示された。

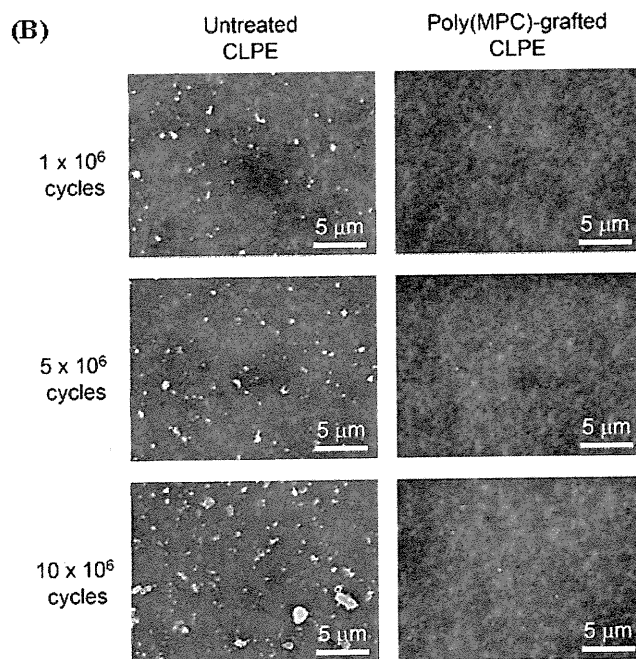
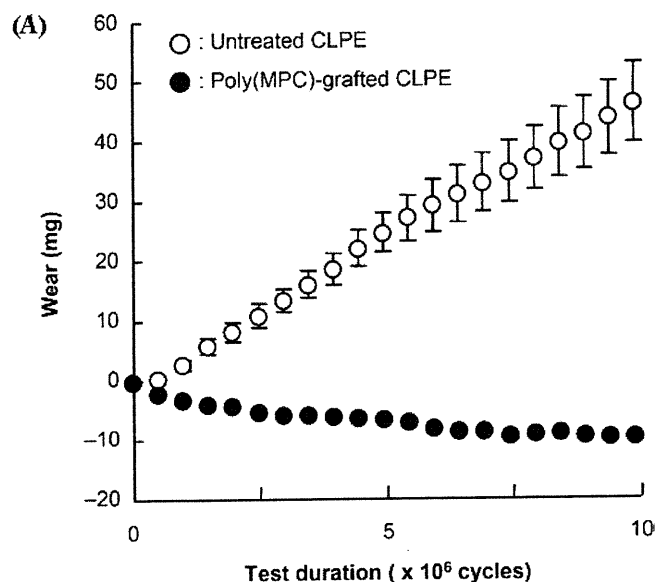


図3 人工股関節シミュレーション試験によるMPC処理CLPE白蓋ライナーの摩耗特性
(A)重量変化による摩耗量, (B)白蓋ライナーより産生された摩耗粉。

表1 MPC処理CLPEの生物学的安全性試験結果

Biological effects	Test methods	Results
Cytotoxicity	Cytotoxicity test (extract)	Negative
Sensitization	Sensitization test	Negative
Genotoxicity	Chromosomal aberration / Gene mutation	Negative
Local pathological effects	Implantation in tissue	No abnormal observation
Local pathological effects	Implantation in bone	No abnormal observation
Local pathological effects / Subchronic toxicity	Implantation in articular joint	No abnormal observation

7. おわりに

MPC処理CLPE白蓋ライナーは、PE摩耗粉の発生を抑制することで、人工股関節の弛みを阻止する次世代の医療機器として注目されている。最近では、7,000万サイクル以上という長期の人工股関節シミュレーション試験後も安定して高い耐摩耗特性を維持しているという結果も得られており、従来の製品より格段に耐用年数の延長した長寿命型の人工股関節の達成が期待される。MPC処理CLPE白蓋ライナーは、再置換術フリー人工股関節の創製へ道を開く革新的な技術として、医工・産学連携のもと、臨床への応用が進められている。2007年4月より東京大学医学部附属病院を中心とした治験を行い、2011年4月に医療機器製造販売の承認を得た。

この革新的なバイオミメティクス技術“Aquala® technology”は、高齢化が進むに伴って増え続ける人工関節の再置換術を減らすとともに、これまで手術の適応が困難であった若年患者への治療法の選択肢が広がるなど、多くの可能性を有する。MPCポリマーは石原らが創製した日本独自の材料であり、組織適合性も含め、優れたポリマー特性を活かしたMPC処理CLPE白蓋ライナーを擁する人工股関節は、日本発の長寿命型人工股関節として第一歩を踏み出そうとしている。国内はもとより海外においても広く用いられる技術となることを確信している。

文 献

- 1) Kurtz S, Mowat F, Ong K, et al: Prevalence of primary and revision total hip and knee arthroplasty in the United States from 1990 through 2002. *J Bone Joint Surg Am* **87**: 1487-97, 2005
- 2) Harris WH: The problem is osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* **311**: 46-53, 1995
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 石原一彦: 先端医療を支える新素材 MPCポリマー. *MMJ* **6**: 68-70, 2010
- 7) Ishikawa Y, Hiratsuka K, Sasada T: Role of water in the lubrication of hydrogel. *Wear* **261**: 500-4, 2006
- 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, 2009
- 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) 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**: 320-7, 2008

は PMPC ブラシ基板で 0.26、PSBMA ブラシ基板で 0.48、PCBMA ブラシ基板で 0.67、PHEMA ブラシ基板で 0.79、PmOEGMA ブラシ基板で 0.36、PTMAEMA ブラシ基板で 0.38 chains/nm²であった。算出されたグラフト密度とポリマー鎖の断面積から表面被覆率を概算した結果、PMPC、PCBMA、PSBMA、PHEMA、PmOEGMA および PTMAEMA ブラシ基板においてそれぞれ、39、74、69、59、65 および 37%であった。これらの結果は、作製されたポリマーブラシ基板が高密度領域に達していることを示した。

表 1. 各ポリマーブラシ層の表面物性

Polymer	Graft density (chains/nm ²)	Surface coverage	Dynamic contact angle* (°)			ζ-potential* (mV)
			Advancing	Retreating	Hysteresis	
Poly(MPC)	0.26	39%	21	17	4	-3.6
Poly(CBMA)	0.67	74%	22	16	6	-1.8
Poly(SBMA)	0.48	69%	23	17	6	-9.2
Poly(HEMA)	0.79	59%	65	24	41	-9.1
Poly(mOEGMA)	0.36	65%	50	37	13	-8.7
Poly(TMAEMA)	0.31	37%	62	19	43	4.2

* Polymer brush with 5-nm-thick (ζ-potential: 10 mM NaCl)

表 1 には、各ポリマーブラシ表面の濡れ性および表面電位に関する結果を併記した。これらの結果は、5 nm 程度の乾燥膜厚を有するポリマーブラシ表面の特性結果である。生体応答は水環境下で誘起されるため、水中における表面特性が特に重要である。ここでは、水環境下での濡れ性の指標となる動的接触角の後退接触角に着目した。双性イオン性もしくはカチオン性のポリマーブラシ基板では 20° 以下の非常に小さい接触角を示し、高い濡れ性を示した。一方、非イオン性の PHEMA および PmOEGMA ブラシ表面では比較的高い後退接触角となり、多少疎水性の表面であることが示唆された。ゼータ電位測定結果に関して、カチオン性の PTMAEMA ブラシ層が 40 mV を超える表面電位を示し、非イオン性およびスルホベタイン構造のポリマーブラシ表面が -10 mV 程度と多少アニオン性であった。弱酸-弱塩基の組み合

わせからなるホスホベタインやカルボキシベタイン構造を有するポリマーブラシ表面はほぼ中性であった。このように高密度ポリマーブラシ構造により、精密な構造および様々な特性を有するモデル表面を構築することができた。

2. タンパク質吸着挙動の解析

図 3 に、ポリマーブラシ表面への FBS の吸着量とポリマーブラシ表面の膜厚の関係を示す。

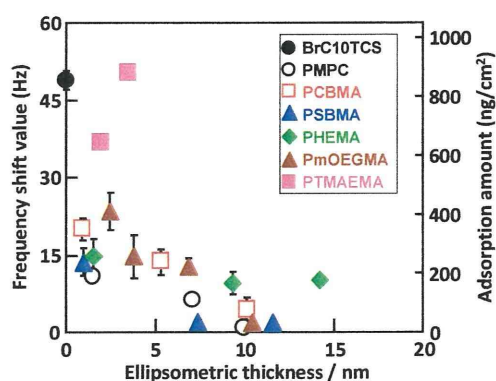


図 3. ポリマーブラシ表面へタンパク質吸着量と膜厚の関係

ATRP 開始基が固定化された表面では、800 ng/cm² 程度のタンパク質が吸着した。双性イオン性のポリマーブラシ表面ではブラシ層の厚さの増加に伴いタンパク質吸着量が低下した。今回評価した最大膜厚を有するポリマーブラシ層において、そのタンパク質吸着量は、PMPC ブラシ表面で 20 ng/cm² 以下、PSBMA ブラシ表面で 30 ng/cm²、PCBMA ブラシ表面で 80 ng/cm² 程度まで抑制された。非イオン性のポリマーブラシ表面でも、同様に膜厚の増加に従い吸着量が減少する結果となり、PHEMA ブラシ表面で 180 ng/cm²、PmOEGMA ブラシ表面で 30 ng/cm² となった。一方、カチオン性の PTMAEMA ブラシ表面では、膜厚の増加に伴いタン

パク質吸着量が増加した。これは表面に存在するカチオンの電荷量によるものであると考えられる。このようにタンパク質の吸着抑制効果はポリマーブラシ構造を形成するモノマーユニットの化学構造や膜厚に依存した。特に5から10 nm程度の膜厚からタンパク質吸着量が平衡に達したことから、タンパク質吸着挙動に対する水和状態の影響を調べるためには、5 nm程度の膜厚が必要であることがわかった。

3. ポリマーブラシ基板に対するタンパク質吸着力

図4にポリマーブラシ表面に対するアルブミン吸着力とポリマーブラシ層の膜厚の関係を示す。

疎水性の ATRP 開始基固定化基板では、3.0 nN 程度のタンパク質吸着力が検出された。一方、5 nm 程度の膜厚を有する各ポリマーブラシ基板に対するタンパク質吸着力は ATRP 開始基固定化基板と比較して有意に抑制された。膜厚の変化とタンパク質吸着力との関係はタンパク質吸着量の結果と同様であった。つまり、双性イオン性ポリマーブラシでは、膜厚の増加に対してタンパク質吸着力が低下し、最大膜厚の PMPC、PCBMA および PSBMA ブラ

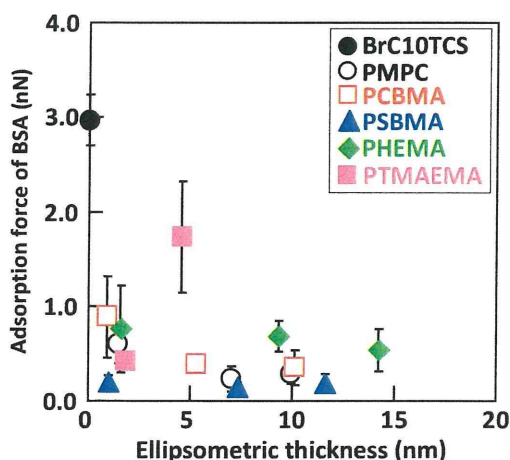


図4. ポリマーブラシ表面に対するタンパク質吸着力と膜厚の関係

シ基板に対するタンパク質吸着力はそれぞれ0.2、0.4および0.1 nNとなった。非イオン性の PHEMA ブラシ基板に対するタンパク質吸着力は膜厚の変化に対してほぼ一定の 0.7 nN であった。カチオン性の PTMAEMA ブラシ基板においては、膜厚の増加に対してタンパク質吸着力が増加した。タンパク質吸着力はタンパク質と基板表面との直接的な相互作用であるため、この結果は、カチオン電荷の増加が表面とタンパク質との相互作用に直接関与していることを示唆した。

図5にタンパク質吸着力とタンパク質吸着量との関係を示す。

図5からわかるように、ポリマーブラシ表面において、タンパク質吸着力とタンパク質吸着量の間には正の相関があった。つまり、双性イオン性のポリマーブラシ表面においてタンパク質吸着量が非常に小さく抑えられたのは、タンパク質とポリマーブラシ層との相互作用が非常に小さいためであることがわかった。

4. 水和状態の解析

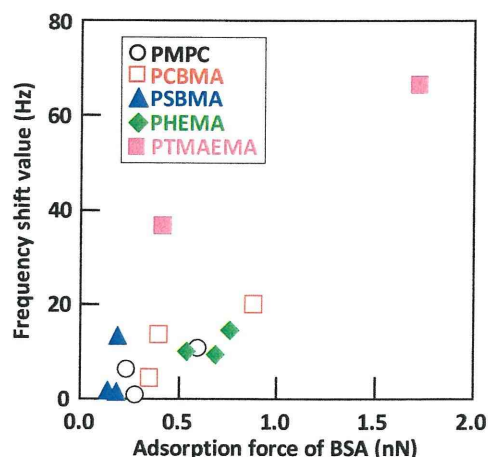


図5. ポリマーブラシ表面におけるタンパク質吸着力とタンパク質吸着量の関係

図6に膜厚が5 nm程度のポリマーブラシ層近傍の水分子の自己拡散定数(D)および水和層厚(α)の値を示す。

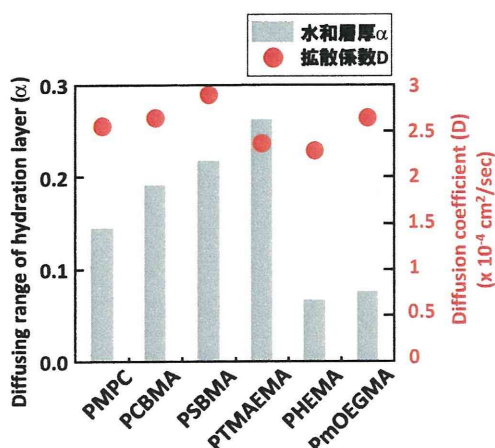


図6. ポリマーブラシ表面における水和状態

水分子の運動性に対応する自己拡散係数は、カチオン性のPTMAEMAブラシ表面や非イオン性のPHEMAブラシ表面で小さい値を示した。これは強いイオン性水和や水素結合性水和により、水分子が表面に捕捉され、その運動性が低下していることを示唆する。一方で、オリゴエチレングリコール鎖を有するPmOEGMAブラシ表面や双性イオン性のポリマーブラシ表面近傍の水分子は、比較的大きな自己拡散定数を有しており、水分子が高い運動性を有することがわかった。これは適度な水素結合性水和やイオン性水和が影響を与えていると考えられる。水和層厚に関しては、非イオン性のポリマーブラシ表面で α 値が小さく、薄い水和層を形成していることがわかった。これは非イオン性のポリマーブラシ表面が水中で比較的低い濡れ性であることと関連していると考えられる。一方、カチオン性もしくは双性イオン性のポリマーブラシ表面は大きな α 値を有し、比較的厚い水和層が形成されていることがわかった。

図7にタンパク質吸着力と水分子の自己拡散係数との関係を示す。

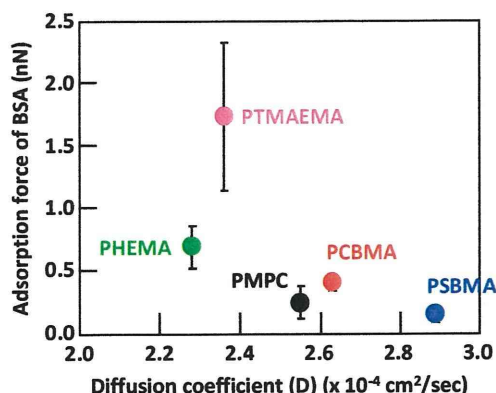


図7. ポリマーブラシ表面におけるタンパク質吸着力と水分子の自己拡散係数の関係

図7から分かるように、自己拡散係数が増加するに従い、タンパク質吸着力が低下した。つまり、双性イオン性のポリマーブラシ表面で、タンパク質との相互作用が非常に小さい要因のひとつとして、同表面の水分子の運動性が非常に高く、さらにある程度厚い水和層厚を有しているためであるとわかった。

D. 結論

構造明確なポリマーブラシ表面を、様々な化学構造を有するモノマーユニットを用いて作製し、バイオマテリアルのモデル表面を調製した。タンパク質吸着量が非常に少ない双性イオン性のポリマーブラシ表面では、タンパク質との相互作用が非常に小さかった。さらに、双性イオン性ポリマーブラシ表面近傍に存在する水分子は高い運動性を有し、水和層厚が大きかった。

本研究により、マテリアル表面におけるタンパク質吸着挙動を新たな観点から理解することが可能となった。

E. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Ye Yao, Kyoko Fukazawa, Nan Huang, and Kazuhiko Ishihara, "Effects of 3,4-dihydrophenyl groups in water-soluble phospholipid polymer on stable surface modification of titanium alloy", Colloid and Surfaces B: Biointerface, (2011) 88 (215-220).
2. Ji-Hun Seo, Takashi Shibayama, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Quick and simple modification of poly(dimethylsiloxane) surface by optimized molecular design of the anti-biofouling phospholipid copolymer", Soft Matter, (2011) 7 (2968-2976).
3. 京本政之、茂呂 徹、石原一彦、「MPC ポリマー処理架橋ポリエチレン人工関節の実用化」人工臓器 (2011) 40 (57-61).

分担研究課題名
生体適合性高分子の合成と水の構造解析

研究協力者 田中 賢 山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

研究要旨

生体適合性高分子の設計および生体適合性発現機構の解明を行うために、メトキシ基やエトキシ基などのアルコキシル基を有する（メタ）アクリレートおよびポリスルホベタインの合成を行い、熱分析により水和構造を調べた。両者ともに中間水の構造に特徴が見られることが分かった。

A. 研究目的

医療製品が血液・組織と接触すると、直ちに水やタンパク質が材料表面に吸着する。また、生命現象の反応場の観点から水分子に着目すると、この水分子はタンパク質や細胞の接着形態や機能発現の場を形成しており、この水分子の構造や運動性が医療用材料に要求される生体適合性に大きな影響を与えると考えられる^{1,2)}。本研究では、優れた生体適合性を示す poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)³⁾ 類似体および近年、新しい生体適合性高分子として注目されている両性イオンポリマーとしてポリスルホベタインを合成し、水の構造を調べた。

B. 研究方法

PMEA の類似体として、poly [2-(2-ethoxyethoxy)ethyl methacrylate] (PEEMA) などのアルコキシアシル基を有する（メタ）アクリレート(A)～(F) (図 1) およびポリスルホベタインメタク

リレート (図 2) を合成した。また、示差走査熱量計 (DSC) を用いて、飽和含水した高分子の水の構造を調べた。飽和含水量と各転移における熱量から高分子中に存在する 3 種の水の量を以下の式に従い求めた。なお、本研究では、高分子に飽和含水した水のうち、*Non-freezing water* (不凍水) は、-100 °C においても凍結しない水、*Freezing bound water (Intermediate water)* (中間水) は、低温結晶化 (CC) する水、*Free water* (自由水) は、0°C 付近で融解する水としてそれぞれ扱った^{4,5)}

飽和含水量(EWC) = $W_{nf} + W_{fb} + W_f$,
 $W_{fb} = \Delta H_{cc} / C_p$, $W_f = (\Delta H_m / C_p) - W_{fb}$, ここで、 W_{nf} : 不凍水量、 W_{fb} : 中間水量、 W_f : 自由水量、 C_p : 融解潜熱、 ΔH_{cc} : 低温結晶化 (CC) した水におけるエンタルピー変化量、 ΔH_m : -15~0°C で融解した水におけるエンタルピー変化量とした。

C. 研究結果

DSCを用いて、含水したPEEMA中の水の構造を調べた。その結果、 $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ からの昇温過程で水の低温結晶形成に由来する発熱ピークが観測された。PEEMAは非水溶性の高分子であるが、その類似体は下限臨界溶液温度(LCST)を有することがわかり、生体適合性と温度応答性を併せ持つ高分子であることが分かった。また、ポリスルホベタインメタクリレートにも低温結晶形成に由来する発熱ピークが観測された。この低温結晶形成を示す中間水は、生体適合高分子の代表例であるリン脂質(MPC)ポリマー(ポリホスホベタイン)、PMEAなどのメトキシ基やエトキシ基などのアルコキシ基を有する(メタ)アクリレート、ポリテトラヒドロフルフルリアクリレート(PTHFA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリビニルメチルエーテル(PVME)、生体高分子であるゼラチンやアルブミン、チトクロームCなどのタンパク質、ヒアルロン酸、アルギン酸、ヘパリンなどの多糖、DNAなどの核酸高分子にも共通して観測されることを見出した。なお、時間分解赤外分光⁶⁾や固体NMR⁷⁾測定の結果からもCCの存在が確認できる。一方、生体適合性の劣る高分子にはCCとして観測される中間水は観測されなかった。

D. 考察

タンパク質や多糖などの生体成分は血液中で水和殻を形成し安定化されているが、材料表面の不凍水などが直接この水和殻に接触し、これを攪乱あるいは破壊すると、生体成分の材料表面への吸着・活性化の引き金となると考えられている。生体適合性表面では上述の中間水が、生

体成分の水和殻と材料表面の不凍水層の間に存在し両者が直接接触することを阻害するため、異物認識が起きないと推察される。中間水は生体成分の水和層を破壊するほどの特異な水素結合構造は有していないものの、高い分子運動性を有する高分子鎖と弱く相互作用した水であるため、自由水と不凍水との界面に安定に存在できると考えられる。高分子鎖の高い運動性(高分子のダイナミクス)と高分子と水の分子間相互作用とのバランスが機能発現に重要と考えられる。今後、本研究で定義した中間水の生体適合性の指標化作業を行う予定である。

E. 結論

優れた生体適合性を示すPMEAの類似体として、アルコキシアルキル基を有する(メタ)アクリレートおよびポリスルホベタインを合成した。低温結晶形成として観測される中間水の構造に共通の特徴が見られた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) 田中 賢. 生体親和性高分子に形成される中間水と細胞接着との相関. 第60回第60回高分子討論会依頼講演 高分子科学とナノ医療(2011年9月・岡山)
- 2) 田中 賢. 高分子学会旭化成賞受賞講演 バイオ界面における水分子の役割の解明と医療高分子への応用. 第60回高分子討論会 依頼講演 高分子科学とナノ医療(2011年9月・岡山)
- 3) 田中 賢ら. 血管内皮細胞接着性を有する抗血栓高分子表面の創製. バイオ

