

3. T. Akaïke, *Biofunctional Materials — Fundamental for Artificial Organs, Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Corona, Tokyo (2005).
4. G. Krausch, E. J. Kramer, M. H. Rafailovich and J. Sokolov, *Appl. Phys. Lett.* **64**, 2655 (1994).
5. O. Ikkala and G. T. Brinke, *Science* **295**, 2407 (2002).
6. S. Amada, Y. Ichikawa, T. Munneka, T. Munekata, Y. Nagase and H. Shimizu, *Composites* **28B**, 13 (1997).
7. S. Suresh, *Science* **292**, 2447 (2001).
8. K. Suganuma, T. Okamoto, M. Shimada and M. J. Koizumi, *J. Am. Ceram. Soc.* **66**, c117 (1983).
9. T. Ishikawa, H. Yamaoka, Y. Harada, T. Fujii and T. Nagasawa, *Nature* **416**, 64 (2002).
10. P. Czubarow and D. Seyferth, *J. Mater. Sci.* **32**, 2121 (1997).
11. B. Hexig, H. Alata, N. Asakawa and Y. Inoue, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **43**, 368 (2005).
12. B. Hexig, H. Alata and Y. Inoue, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **43**, 3069 (2005).
13. Y. Agari, A. Shimada, A. Ueda and S. Nagai, *Macromol. Chem. Phys.* **197**, 2017 (1996).
14. X. M. Xie, T. J. Xiao, Z. M. Zhang and A. J. Tanioka, *J. Colloid Interface Sci.* **206**, 189 (1998).
15. B. Hexig, H. Alata, N. Asakawa and Y. Inoue, *Adv. Funct. Mater.* **15**, 1630 (2005).
16. Y. Kano, S. Akiyama, H. Sano and H. Yui, *Polym. J.* **29**, 158 (1997).
17. V. Zacchi, C. Soranzo, R. Cortivo, M. Radice, P. Brun and G. Abatangelo, *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 187 (1998).
18. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer and A. Naumann, *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 172 (1998).
19. L. A. Solchaga, J. E. Dennis, V. M. Goldberg and A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.* **17**, 205 (1999).
20. J. U. Park and T. Tsuchiya, *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 541 (2002).
21. R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai and T. Okano, *Nature* **374**, 240 (1995).
22. N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki and Y. Sakurai, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **11**, 571 (1990).
23. T. Okano, N. Yamada, H. Sakai and Y. Sakurai, *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 1243 (1993).
24. S. Ohya, H. Sonoda, Y. Nakayama and T. Matsuda, *Biomaterials* **26**, 655 (2005).
25. H. Tan, C. M. Ramirez, N. Miljkovic, H. Li, J. P. Rubin and K. G. Marra, *Biomaterials* **30**, 6844 (2009).
26. J.-P. Chen and T.-H. Cheng, *Polymer* **50**, 107 (2009).
27. J. E. Scott, *Ciba Foundation Symp.* **143**, 6 (1989).
28. J. E. Scott, C. Cummings, A. Brass and Y. Chen, *Biochem. J.* **274**, 699 (1991).

ヒト間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析  
—無血清培地を用いた *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について—

澤田留美, <sup>\*,a</sup> 山田貴史, <sup>a</sup> 土屋利江, <sup>b</sup> 松岡厚子<sup>a</sup>

**A Microarray Analysis of the Effects of Serum-free Medium on Gene Expression Changes in Human Mesenchymal Stem Cells during the *in Vitro* Culture**

Rumi SAWADA, <sup>\*,a</sup> Takashi YAMADA, <sup>a</sup> Toshie TSUCHIYA, <sup>b</sup> and Atsuko MATSUOKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and <sup>b</sup>Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received June 18, 2010; Accepted July 5, 2010; Published online July 6, 2010)

We examined the effects of serum-free medium on the gene expression changes in human mesenchymal stem cells (hMSCs) during the *in vitro* culture using a DNA microarray analysis. In this study, we cultured hMSCs with two kinds of medium; 1) MSCGM (contain 10% fetal bovine serum) or 2) STK2 (serum-free medium developed for mesenchymal stem cells multiplication), and compared hMSCs proliferation, cell morphology, and gene expression changes until 50 days culture. Expression analysis was performed with Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. hMSC proliferation was significantly higher in STK2 medium than in MSCGM medium. The cell morphology of hMSC cultured with STK2 was not significantly changed in 50 days culture. The gene expression changes in hMSCs during the *in vitro* culture were significantly higher in STK2 than in MSCGM. After 50 days culture, 1991 genes were significantly changed the expression levels compared with 3 days in STK2 but not MSCGM. The expressions of genes related to cell cycle, cancer, proliferation, and cell growth were significantly changed by STK2 for 50 days culture. It was also changed by STK2 that the expressions of genes related to the signaling pathways contain various growth factors, such as IGF-1, FGF, TGF- $\beta$ , EGF, proliferation, and cell cycle. These results suggest that STK2 may be useful to obtain an enough number of hMSC cells for tissue engineered medical devices in short-term, however, it should be recognized that STK2 would alter the expressions of genes related to a variety of signaling pathways in hMSC if the culture period would be extended to obtain a large number of cells.

**Key words**—human mesenchymal stem cell; gene expression; serum-free medium; proliferation; *in vitro* culture

緒 言

近年, iPS細胞樹立の発表が世界的に脚光を浴び, iPS細胞の再生医療への応用に大きな期待が寄せられている。しかしながら, iPS細胞は「万能」と呼ばれる多分化能を持つ一方で, 組織再生の目的に沿ったiPS細胞の適切な作製法や制御法の確立の必要性, さらにがん化の可能性といった安全性の問題もあり, 再生医療への臨床応用や実用化にはまだ少し時間を要するであろう。一方, 成体幹細胞の一種である間葉系幹細胞は, 骨, 軟骨, 筋, 腱, 脂肪, さらに神経細胞や肝細胞, 心筋, 皮膚など胚葉を

越えた分化も報告されており幅広い再生医療分野での利用が期待され, 実用化に向けた研究開発が進められている。現在, 骨髄, 脂肪組織, 臍帯血由来の間葉系幹細胞が, その採取技術及び*in vitro*での培養技術も確立されており, 細胞組織医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの1つであると考えられる。実際に細胞組織医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して*in vitro*で培養して増殖させるという工程を経なければならないため, *in vitro*での培養期間中に幹細胞が目的以外の形質を持った細胞に変化しないことを確認し, 患者に戻される細胞の安全性を担保する方法を確立することは大変重要であろう。

*in vitro*での様々な細胞培養条件は間葉系幹細胞の性質に影響を及ぼすため, 本研究では細胞の培養

<sup>a</sup>国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, <sup>b</sup>大阪大学医学部附属病院未来医療センター

\*e-mail: rsawada@nihs.go.jp

液に着目し *in vitro* 培養による細胞の変化について検討した。間葉系幹細胞の培養には一般的に牛血清又は自家ヒト血清が培地に添加されるが、牛血清使用による病原性ウイルスやプリオンなどの混入の危険性やヒト血清使用のための患者への身体的負担等の回避のために無血清培地を用いる方法も検討されており、間葉系幹細胞の増殖培養に適した無血清培地も研究開発されている。<sup>1,2)</sup> そこで本研究では、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地を用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を細胞組織医療機器の材料として臨床現場で利用されることを想定した *in vitro* 培養期間 (50 日以内) を設定して培養し、このような短期間でも培養期間中に細胞に変化が生じるのかどうか調べるために、増殖能、細胞の形態を検討するとともに、網羅的遺伝子発現解析を行い遺伝子発現の変化について検討した。

## 実験方法

**1. 細胞及び培養** ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) (Lonza Walkersville, Inc.) を、1) Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) (Lonza Walkersville, Inc.) : Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (10% 牛胎児血清を含む) 又は 2) STK2 (DS ファーマバイオメディカル) : 間葉系幹細胞用無血清培地でそれぞれ培養した。無血清培地である STK2 は、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された培地であり、FGF, PDGF などの成長因子が添加されている。培養期間は、実際に細胞組織医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し妥当な培養期間 (多少長めに設定し 50 日以内) とした。

**2. Total mRNA の調製** 培養期間が 3 日間、20 日間、50 日間の細胞からそれぞれ RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

**3. 網羅的遺伝子発現解析** 2 種類の培地 (MSCGM 又は STK2) にてそれぞれの期間培養した hMSC から調製した totalRNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。それぞれ Technical replicate (Duplicate) にて行った。遺伝子発現解析は、GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technologies) を用いて行った。パスウェイ解析は、

Ingenuity Pathway Analysis Software (Ingenuity Systems) を用いて行った。

## 結果

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を、10% 牛胎児血清を含む培地 (MSCGM) と無血清培地 (STK2) それぞれの培地で培養した際の増殖曲線を Fig. 1 に示す。hMSC の増殖能は STK2 の方が MSCGM に比べて著しく高かった。MSCGM では 50 日間の培養で約 14000 倍の細胞を得られたが、STK2 では 20 日間で得られており、STK2 を用いることにより MSCGM と比較して 30 日間の培養期間短縮が可能であった。

さらに、hMSC の培養 50 日以内の細胞形態の変化についてそれぞれの培地による影響を比較した。Figure 2 に各培養期間の hMSC の位相差顕微鏡像を示す。培養期間 28 日頃までは培養期間及び培地による細胞形態の変化はあまりみられなかった。培養 50 日後の hMSC は、STK2 では培養初期の形態を比較的保っていたが、MSCGM では細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された。

次に、hMSC における *in vitro* 培養 50 日以内の遺伝子発現の変化について、MSCGM と STK2 とを比較した。まずは、培養開始時としてそれぞれ培養 3 日における mRNA 発現レベルを 1 とし、20 日、50 日における変化を Fig. 3 に示した。50 日間の培養期間中のそれぞれの遺伝子発現の変化は、STK2 の方が MSCGM よりも非常に大きかった。実際に

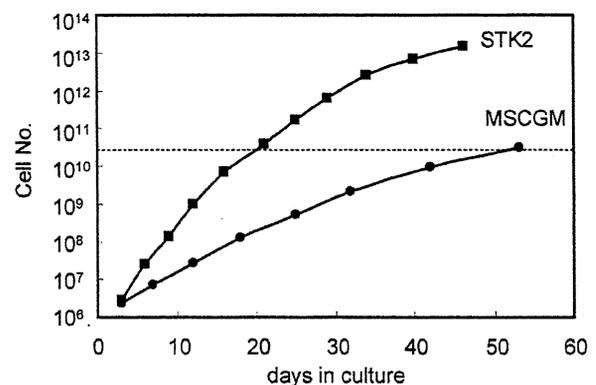


Fig. 1. Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)

hMSCs were cultured in MSCGM or STK2. They were seeded at a density of 6000 cells/cm<sup>2</sup> and when they were just subconfluent, they were subcultured and the number of cells was counted.

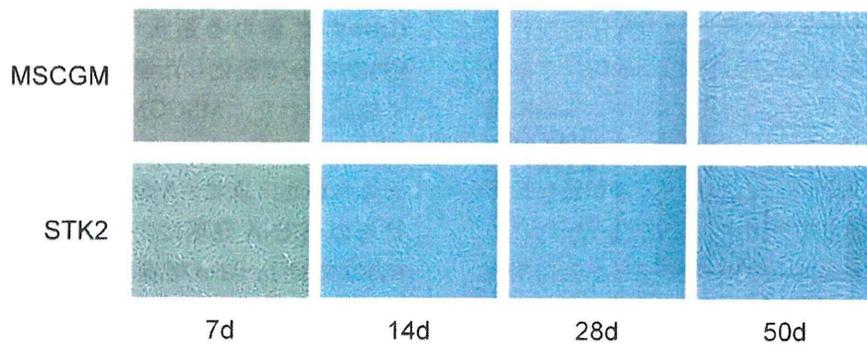


Fig. 2. Cell Morphology of hMSCs Cultured in MSCGM or STK2  
They were observed in 7, 14, 28, and 50 days.

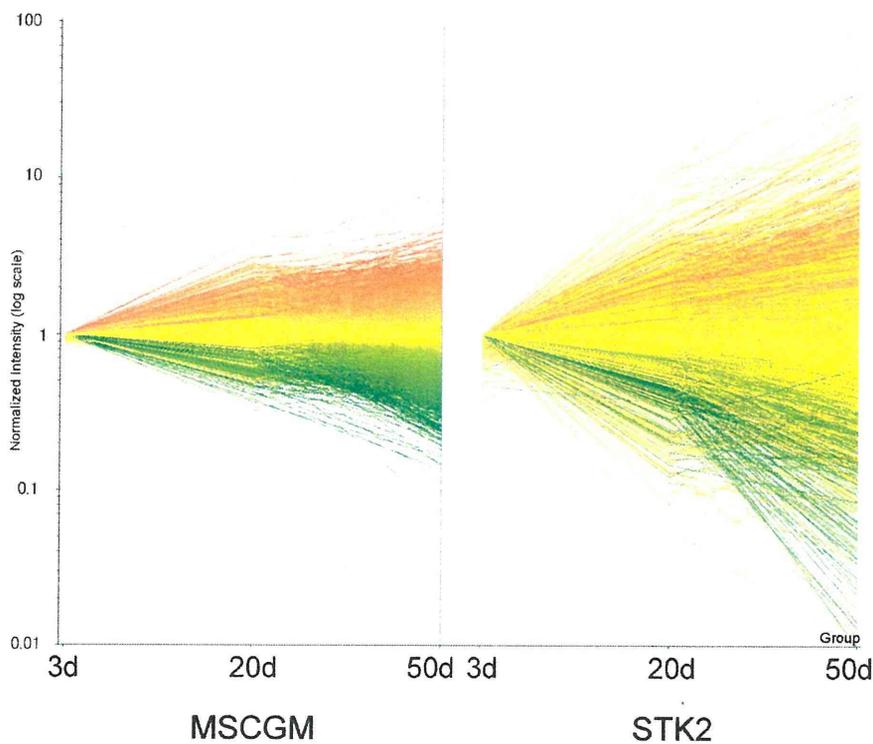


Fig. 3. Changes in Gene Expressions of hMSCs Cultured in MSCGM or STK2 during the *in Vitro* Culture  
Each mRNA expression in hMSCs for 3 days culture is expressed as 1, and those for 20 and 50 days are expressed relative to that for 3 days.

培養開始時と比較して有意 (2 倍以上又は 1/2 以下) に mRNA 発現が変化した遺伝子数を Fig. 4 に示した。どちらの培地を用いた場合でも、培養開始時と比較して有意に mRNA 発現が変化した遺伝子数は培養日数に依存して増加した。hMSC 培養 20 日、50 日それぞれにおいて、有意に mRNA 発現レベルが変化した遺伝子数は STK2 の方が多く、培養 50 日では 2000 以上の遺伝子の発現レベルが培養開始時と比較して有意に変化していた。有意に変化した遺伝子数は、MSCGM での培養 50 日と STK2 での

培養 20 日とがほぼ同程度であった。

では、このように *in vitro* 培養過程でその発現レベルが変化した遺伝子は、どのような性質 (機能) を持つ遺伝子なのだろうか? 変化した遺伝子をそれぞれ抽出してリスト化し、GeneSpring GX 7.3.1 にて変化した遺伝子群と同様の機能を持つ遺伝子群を検索することによって hMSC の *in vitro* 培養過程でどのような機能を持つ遺伝子群が変化したのか検討した。それぞれの培地で 20 日及び 50 日間培養した際に培養開始時と比較して有意に変化した遺伝

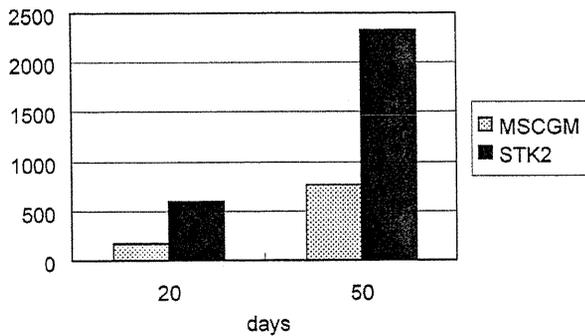


Fig. 4. Number of Genes Whose mRNA Expressions in hMSCs Were Significantly Different from Those for 3 Days Culture

Table 1. The Similar Gene Lists to the Genes Whose mRNA Expressions Significantly Changed during the *in Vitro* Culture of hMSCs

culture period (days)	Media	Number of Genes	Similar List <sup>a</sup>	overlap	p-value
20	MSCGM	174	—	—	—
	STK2	(395)	Cell Cycle	73	5.35E-23
			Cancer	121	5.26E-21
			Proliferation	54	1.08E-08
			(Cancer)	(69)	(1.38E-08)
			(Proliferation)	(32)	(9.56E-04)
50	MSCGM	762	Cell Cycle	101	8.15E-34
	STK2	2329	Proliferation	75	1.01E-14
			Cancer	117	3.57E-11
			Cancer	318	1.37E-23
			Cell Cycle	152	3.92E-17
			Proliferation	151	2.60E-13
STK2	(1991)	Cell Growth	40	1.33E-02	
		(Cancer)	(259)	(4.40E-16)	
		(Proliferation)	(116)	(4.52E-07)	
		(Cell Cycle)	(94)	(2.90E-03)	

<sup>a</sup> The name of lists that resemble the selected list or contain a statistically significant number of overlapping genes. The overlap is calculated using a standard Fisher's exact test and the p-value is adjusted with a Bonferroni multiple testing correction.

子数と、それぞれの遺伝子群に有意に重複する遺伝子群を Similar List として Table 1 に示した。( ) 内は、STK2 培養により変化した遺伝子のうち、MSCGM では有意な変化がみられず STK2 でのみ有意な変化がみられた遺伝子について表した。STK2 培養では、20 日の培養から Cell Cycle, Cancer, Proliferation に係わる遺伝子の発現に変化がみられ、50 日では遺伝子数の増加に伴いさらに Cell

Growth に係わる遺伝子に変化が認められた。STK2 のみで変化した遺伝子は、50 日では 2000 近く確認された。MSCGM 培養では、50 日間で Cell Cycle, Proliferation, Cancer に係わる遺伝子の変化がみられた。次に、MSCGM では 50 日間の培養中にその mRNA 発現に変化がなかった遺伝子のうち STK2 では *in vitro* 培養により有意に変化した遺伝子群について、どのようなパスウェイに係わる遺伝子に変化しているのか調べた。Ingenuity Pathway Analysis により検討し、Table 2 に上位 20 のパスウェイとそこに含まれる遺伝子を示した。IGF-1, FGF, TGF- $\beta$ , EGF, HGF, PDGF, MYC, JUN, SMAD3, TP53 等、様々な成長因子や細胞増殖又は細胞周期等に係わる遺伝子の発現が変化しており、多くのシグナル伝達系が STK2 培養によって変化することがわかった。

## 考 察

様々な疾病などによる組織や器官の機能不全に対して組織再生又は機能回復を目指した「再生医療」の早期実現が待望されており、現在その材料の 1 つとして間葉系幹細胞の有用性が期待されている。幹細胞の大きな特徴としては、多分化能をもちつつ増殖能を持つ点であり、実際に再生医療を目的として幹細胞を利用するためには幹細胞を体内から取り出した後、必要細胞数まで *in vitro* で培養して増殖させなければならない。安全性の観点から最も懸念されるのは、*in vitro* 培養中の細胞のがん化である。これまで、脂肪由来<sup>3)</sup>又は骨髄由来<sup>4)</sup>の間葉系幹細胞を 4.5 ヶ月-2 年といった長期間培養することによって細胞のがん化が起こるという報告がある一方で、骨髄由来<sup>5)</sup>でも脂肪由来<sup>6)</sup>でも hMSC の長期培養による形質転換はみられないとの報告もなされている。これらの報告の違いは、細胞のドナーの個体差も大きく係わるとも考えられる。実際、hMSC の多くが早いものでは 5 週間程度の培養期間で細胞老化の現象を示す。いずれにしても、*in vitro* 培養期間が短い方ががん化のような好ましくない変化の可能性をより低減できると考えてよいであろう。そのためには短期でより多くの細胞を得る必要があり、その目的に合った培養条件は重要なポイントである。本研究で用いた無血清培地 (STK2) は、牛血清使用による危険性の回避と同時に間葉系幹細胞の

Table 2. The Related Pathways to the Pathways that Contain Any of the Genes Whose mRNA Expressions Significantly Changed during the *in Vitro* Culture of hMSCs

Ingenuity Canonical Pathways	<i>p</i> -value	Molecules
IGF-1 Signaling	1.38E-05	IGFBP6, NRAS, CTGF, YWHAH, PIK3R1, IGFBP7, NEDD4, PIK3R3, JUN, FOXO3, MRAS, IGFBP3, IRS2, SFN
Hepatic Fibrosis/Hepatic Stellate Cell Activation	2.00E-05	CTGF, TGFBR1, FGF2, SMAD3, ACTA2, SMAD7, VEGFC, FAS, TGFBR2, MYL9 (includes EG:10398), VEGFA, CSF1, HGF, IGFBP3, PDGFRA, EDNRA, EGFR
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	2.63E-05	DNAJB12, NRAS, PIK3R1, ACTA2, MAP3K1, DNAJC13, GCLC, MAP3K5 (includes EG:4217), TXNRD1, PIK3R3, SOD2, JUN, ABCC1, MRAS, CCT7, MAP2K3, AOX1, SQSTM1, GCLM, PRKD1
Acute Phase Response Signaling	7.76E-05	IL6ST, TCF4, NRAS, C1S, PIK3R1, MAP3K1, SERPINF1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), NR3C1, C1R, PIK3R3, JUN, SOD2, NFKBIA, MRAS, MAP2K3, SERPINE1, SOCS5
Antigen Presentation Pathway	1.26E-04	PSMB9, HLA-A, HLA-B, PSMB8, HLA-G, HLA-C, HLA-F
Virus Entry <i>via</i> Endocytic Pathways	2.04E-04	PIK3R3, FLNB, NRAS, HLA-A, PIK3R1, ACTA2, MRAS, HLA-B, AP1B1, PRKD1, HLA-C, FOLR1
p53 Signaling	2.82E-04	PIK3R3, JUN, GADD45B, THBS1, FASN, PIK3R1, PERP, C12ORF5, SFN, HIPK2, SERPINE2, TP53I3
PI3K/AKT Signaling	2.88E-04	NRAS, YWHAH, PIK3R1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), EIF4EBP1, PIK3R3, NFKBIA, GAB1, PPP2R3A, FOXO3, MRAS, HLA-B, SFN
Neurotrophin/TRK Signaling	3.72E-04	PIK3R3, JUN, NRAS, GAB1, BDNF, SPRY2, PIK3R1, MRAS, MAP2K3, MAP3K5 (includes EG:4217)
TGF- $\beta$ Signaling	4.17E-04	TGFBR2, JUN, NRAS, TGFBR1, SMAD3, SMAD7, MRAS, SMURF2, VDR, SERPINE1, INHBA
Glutamate Metabolism	7.94E-04	EARS2, GLS, CCDC92 (includes EG:80212), GLUL, GCLC, GCLM, GOT2
LPS-stimulated MAPK Signaling	8.51E-04	PIK3R3, JUN, NRAS, NFKBIA, PIK3R1, MRAS, BCL3, MAP2K3, MAP3K5 (includes EG:4217), PRKD1
Biosynthesis of Steroids	9.33E-04	FDPS, SQLE, FDFT1, IDI1, LSS, SC5DL
Thrombopoietin Signaling	1.82E-03	PIK3R3, MYC, JUN, NRAS, PIK3R1, MRAS, IRS2, PRKD1
Insulin Receptor Signaling	1.95E-03	NRAS, PIK3R1, ACLY, EIF4EBP1, PIK3R3, GAB1, PPP1R7, FOXO3, PTPN1, MRAS, HLA-B, IRS2, STX4
CD27 Signaling in Lymphocytes	2.00E-03	JUN, NFKBIA, MAP3K1, BCL3, MAP2K3, TRAF5, MAP3K5 (includes EG:4217)
B Cell Receptor Signaling	2.24E-03	CALM3, NRAS, PIK3R1, MAP3K1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), PIK3R3, JUN, NFKBIA, GAB1, BCL10, MRAS, LYN, MAP2K3
Nucleotide Sugars Metabolism	2.29E-03	UGDH, UGP2, GLCE
NF- $\kappa$ B Activation by Viruses	3.16E-03	PIK3R3, NRAS, NFKBIA, PIK3R1, MAP3K1, ITGAV, MRAS, BCL3, PRKD1
Neuregulin Signaling	3.31E-03	PIK3R3, MYC, NRAS, PIK3R1, DCN, MRAS, HBEGF, ERRFI1, PRKD1, EGFR

増殖培養に適した培地として開発されたものである。そこで本研究では、この STK2 を用いて、hMSC を実際に細胞組織医療機器の材料として用いる場合を想定した妥当な培養期間内 (50 日以内) で培養し、このような短期間でも hMSC に変化が生じるのかどうか調べるために、増殖能、細胞の形態、遺伝子発現について検討した。

hMSC の増殖能については STK2 の方が MSCGM に比べて著しく高かった (Fig. 1)。MSCGM では

50 日間で約 14000 倍の細胞を得られたが、STK2 では 20 日間で得られており、STK2 は MSCGM が 50 日間の培養で得られる細胞数を 1 ヶ月程度短い培養期間で得られることがわかった。また、われわれはこれまでに MSCGM 以外の牛血清使用培地 (DMEM) と比較しても STK2 の方が hMSC の増殖能が高かったことを確認している。<sup>7)</sup> 細胞形態の変化については、培養 50 日後の hMSC は、STK2 では MSCGM と比較して培養初期の形態を比較的保っていたが、

MSCGM では細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された (Fig. 2). 一方, 50 日間の hMSC 培養期間中のそれぞれの遺伝子発現の変化は, STK2の方が MSCGM よりも非常に大きかった (Figs. 3 and 4). これまでにわれわれは本研究で用いた hMSC とは別の複数のロットを用いて MSCGM での培養における遺伝子発現の変化について検討している<sup>8)</sup>が, どのロットの hMSC も本研究における MSCGM 培養と同様な変化の程度であった. またどちらの培地を用いた場合でも, 培養開始時と比較して有意に mRNA 発現が変化した遺伝子数は培養日数に依存して増加した (Figs. 3 and 4). このように STK2 による 50 日間の *in vitro* 培養では, 細胞の形態に MSCGM と比較して一見変化がみられなかったものの, 遺伝子発現は培養開始時に比べて大きく変化しており, 20 日間培養と比較しても変化した遺伝子数は約 4 倍にも増加していた. さらに, STK2 による培養により変化した遺伝子は Cell cycle, Proliferation, Cancer に係わる遺伝子が多く (Table 1), また, FGF, TGF- $\beta$ , EGF など様々な成長因子に係わるシグナル伝達系が変化していた (Table 2). これらの変化は, STK2 では MSCGM と比較して hMSC 増殖能が上昇したことに関連する変化であろう. STK2 での 20 日間培養時と MSCGM の 50 日間培養時ではどちらも同レベル (約 14000 倍) の細胞が得られており (Fig. 1) かつ遺伝子発現の変化の程度も同レベルであった (Fig. 4) ことから窺える. そして, MSCGM と比較して STK2 では細胞の形態変化はあまりみられない培養期間においても細胞の性質が変化している可能性も示唆された. 細胞組織医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いるためにはその必要細胞数を得るために体内から細胞を取り出したのち *in vitro* での増殖培養過程を経なければならない. *in vitro* での培養は, 細胞にとってある種のストレスとなることは明らかで, その期間が短い方がよいであろうことは容易に想像できる. その点, STK2 培養により MSCGM と比較して短期間で多くの細胞を得ることができるのは大きな利点であると思われる. 短期間培養で同じ細胞数を得られることは, 患者の治療に緊急を要する場合には特に望まれることである. しかしながら, より多くの細胞を得るために STK2 での培養期間を伸ばしていくとそれに伴い遺

伝子発現等の変化がより大きくなることも認識すべきであろう.

本研究の結果から, 間葉系幹細胞培養用無血清培地 STK2 は, *in vitro* の培養期間を短縮するのに有効であるが, 使用の際に培養期間を延長することにより細胞の性質が変化する可能性も否定できないことがわかった. 体内から取り出してきた細胞と細胞組織医療機器の材料として用いられる際の細胞の性質が全く変化していないことが理想ではあるが, 現実的には, *in vitro* 培養過程において細胞にどのような変化が起こっているのかを認識することが重要であり, その上で, その変化をなるべく抑えるにはどのような培養条件で行うのがよいのか等を検討すべきであろう. 間葉系幹細胞だけでなく iPS 細胞も含む再生医療分野において, 血清を含まない合成培地開発が重要研究課題の 1 つとなっている. 今後は, 様々な研究機関により開発された無血清培地を用いることによって得られた細胞の安全性や再生能力等の有効性などの品質レベルが問われることになるだろう.

謝辞 本研究は, NEDO 「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/間葉系幹細胞を用いた再生医療早期実用化のための橋渡しプロジェクト」にて実施された研究の一部である.

## REFERENCES

- 1) Mannello F., Tonti G. A., *Stem Cells*, **25**, 1603-1609 (2007).
- 2) Liu C.-H., Wu M.-L., Hwang S.-M., *Biochem. Eng. J.*, **33**, 1-9 (2007).
- 3) Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A., *Cancer Res.*, **65**, 3035-3039 (2005).
- 4) Røsland G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCrmack E., Immervoll H., Mysliewitz J., Tonn J.-C., Goldbrunner R., Lønning P. E., Bjerkvig R., Schichr C., *Cancer Res.*, **69**, 5331-5339 (2009).
- 5) Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cmeta A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F., *Cancer Res.*, **67**, 9142-9149 (2007).
- 6) Merza-Zepeda L. A., Noer A., Dahl J. A.,

- 
- Micci F., Myklebost O., Collas P., *J. Cell Mol. Med.*, **12**, 553–563 (2008).
- 7) Ishikawa I., Sawada R., Kato Y., Tsuji K., Shao J., Yamada T. Kato R., Tsuchiya T., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 381–384 (2009).
- 8) Sawada R., Matsuoka A., Matsuda Y., Tsuchiya T., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1851–1856 (2008).

# 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

迫田 秀行<sup>\*1</sup> 石川 格<sup>\*1</sup> 脇谷 滋之<sup>\*2</sup> 天正 恵治<sup>\*3</sup>  
佐藤 道夫<sup>\*1</sup> 松岡 厚子<sup>\*1</sup>

Fundamental study of fractography of ultra-high molecular weight polyethylene for artificial joints.

Hideyuki SAKODA, PhD., Itaru ISHIKAWA, PhD., Shigeyuki WAKITANI, MD.,  
Keiji TENSHO, MD., Michio SATO, PhD., Atsuko MATSUOKA, PhD.

## Abstract

Application of fractography to ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) for joint prostheses would facilitate a better understanding of the mechanics of failure and long-term evolution of the microstructure of the material in vivo. Fundamental information on fractography is, however, still limited. In this study, two materials, virgin and retrieved UHMWPE, were fractured under three controlled conditions, fracture in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>), under tensile loading and under tensile fatigue. The fracture surfaces were observed by scanning electron microscope (SEM).

The fracture surface of virgin UHMWPE fractured in LN<sub>2</sub> was always normal to the applied load with a relatively flat appearance, indicating a homogeneous microstructure, while that of retrieved UHMWPE tilted and showed a river pattern, indicating heterogeneity of the microstructure.

Differences in fracture surfaces between virgin and retrieved UHMWPE were obvious under both tensile loading and tensile fatigue. Change in material property such as elongation to break due to oxidative degradation in vivo was considered the major reason.

Differences in fracture surfaces between tensile loading and tensile fatigue were not clear in either virgin or retrieved UHMWPE. It was considered that the cracks grew by mode I loading under these two conditions, resulting in similar fracture surfaces.

Key words : fractography, joint prosthesis, UHMWPE, fracture, microstructure.

- ※ 1 国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
- ※ 2 大阪市立大学 整形外科  
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3
- ※ 3 信州大学 整形外科  
〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1

Corresponding Author : Hideyuki SAKODA, PhD.

National institute of health sciences, Division of Medical Devices  
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN  
Tel : 03-3700-9264 Fax : 03-3700-9196  
E-mail address : sakoda@nihs.go.jp

## 緒 言

フラクトグラフィは、破断時の荷重や環境、材料特性、材料の微小構造などに応じて破断面に残される特徴を観察することにより、破壊のメカニズムなどを推定する手法であり、特に航空機事故や鉄道事故における事故原因の究明などに応用されている<sup>5), 7)</sup>。この手法は主に金属材料において発展しているが、人工膝関節用超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) への応用ができれば、生体内において発生したUHMWPEの破損事例の原因究明に役立つと考えられる。また、一定の条件下で人工的に破断させることにより、UHMWPEの生体内における材料物性やマイクロ構造の変化を推察できる可能性がある。しかしいずれの目的においても、現在までに得られている人工関節用UHMWPEのフラクトグラフィに関する情報は極めて限られている。そこで、本研究では実験室で条件を変えて破断面を作製し、その基礎となる代表的な破断面の特徴について調べた。

## 材料および方法

2種類の材料および3種類の条件により破断面を作製し観察を行った。

材料は、未劣化試料と劣化試料を使用した。未劣化試料は、UHMWPE GUR1020のvirgin材

を使用した。劣化試料は、不具合により抜去された人工関節のUHMWPEコンポーネントを使用した<sup>11)</sup>。これらの試料の最大酸化度は5.4~13.8であった。

それぞれの材料に対し、極低温破断面、引張破断面、疲労破断面を作製した。極低温破断面は、カッターを用いて5×5×20mm程度に切り出した試験片に1mm程度のノッチを作製し、液体窒素で10分以上冷却、ペンチで両端を把持し、曲げにより作製した。引張破断面は、同様の試験片の中央部が3×3mm程度になるようカッターでダンベル状に加工し、両端を万能試験機に固定、10mm/minの速度で引張により作製した。疲労破断面は、カッターを用いて3~4×4~8×20~30mm程度の試験片の中央部に約1mmのノッチを作製し、その両端を疲労試験機に固定、最大荷重100~440N、荷重比0.1の引張繰返し荷重を1Hzで加え、き裂成長により作製した<sup>12), 13)</sup>。

破断面の観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM) により行った。

## 結 果

極低温破断面は、未劣化試料、劣化試料のいずれの場合も脆性的な特徴を示した。未劣化試料では、ノッチに対して平行にき裂が成長し(図示していない)、他の報告<sup>3)</sup>とも類似の複数の

起点からのへき開に伴う比較的平滑な破断面 (図1) を示していた. 劣化試料ではノッチに対して斜めにき裂が成長し (図示していない), リバーパターンが観察された (図2).

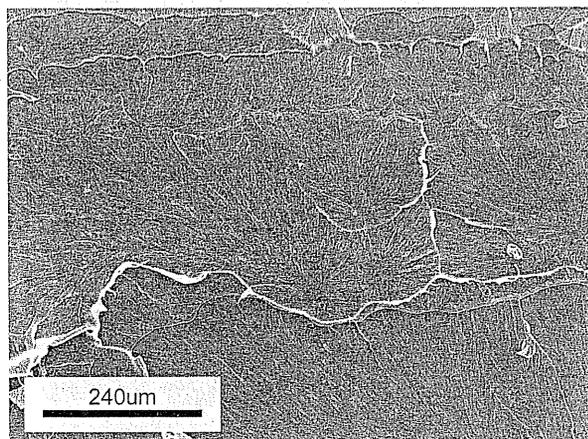


図1. Fracture surface of virgin UHMWPE fractured in LN<sub>2</sub>. Original magnification ×150.

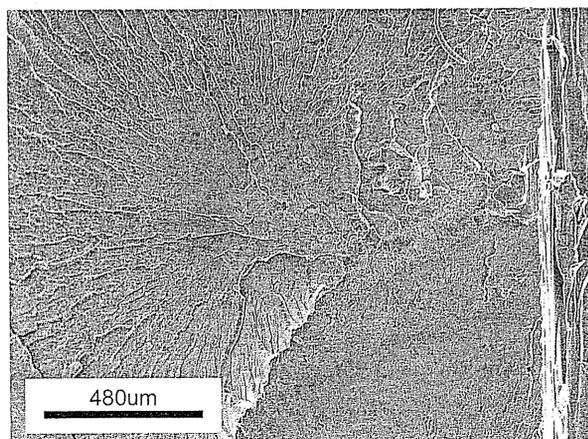


図2. Fracture surface of retrieved UHMWPE fractured in LN<sub>2</sub>. Original magnification ×75.

未劣化試料の引張破断面 (図3-(A)) には, 開始点 (a), 低速度領域 (b), 高速度領域 (c) が認められ, 低速度領域ではき裂の成長方向に垂直なストライエーション (図3-(B)) が, 高速度領域ではき裂の成長方向に平行なラジアルパターン (図3-(C)) が観察された. これらの特徴は文献とも一致した<sup>6), 8), 10)</sup>. 疲労破断面 (図4) では, 他の報告<sup>1), 2), 4), 8), 9)</sup> と同様, 菱形模様とストライエーションが観察された.

劣化試料の引張破断面 (図5-(A)) には, 破壊の開始点 (a), 低速度領域 (b), 高速度

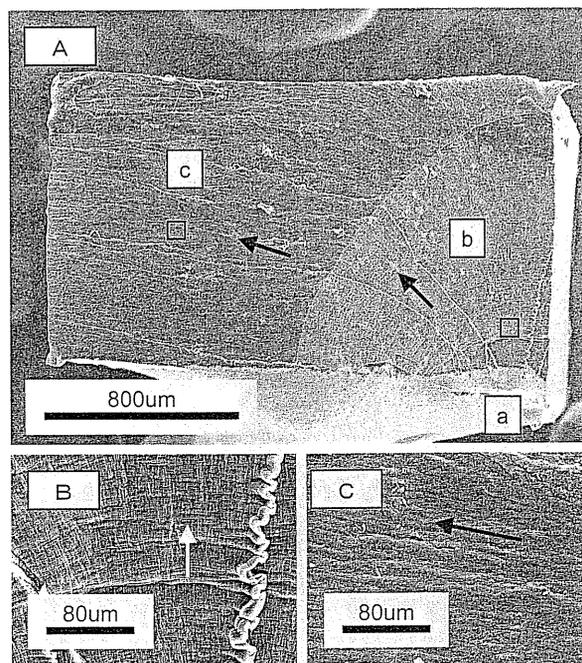


図3. Fracture surface of virgin UHMWPE fractured by tensile loading. Arrows indicate direction of crack growth. (A) Whole area. Original magnification ×55. a : initial point, b : slow growth region, c : fast growth region. Squares indicate approximate positions of figures 3B and 3C. (B) Close-up of slow growth region. Original magnification ×500. (C) Close-up of fast growth region. Original magnification ×500.

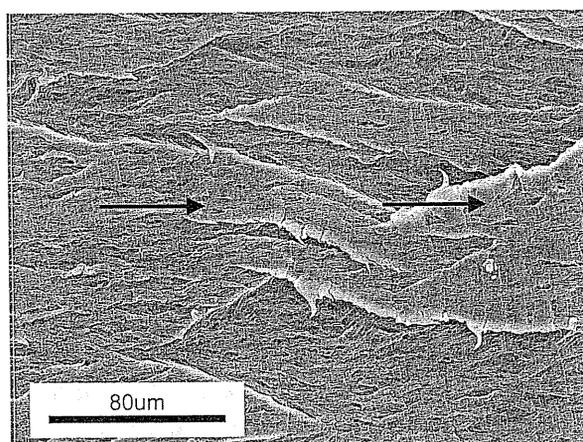


図4. Fracture surface of virgin UHMWPE fractured by tensile fatigue. Original magnification ×500. Arrows indicate direction of crack growth.

領域 (c) と繊維化領域 (d) が観察され, 加速酸化試料6や棚保管により自然酸化した試料10の破断面と類似していた. 繊維化領域では,

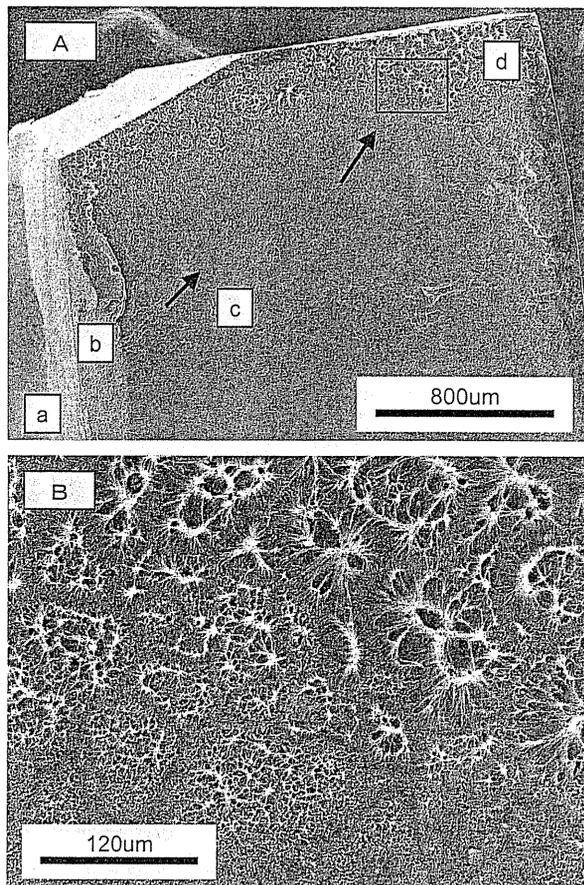


図5. Fracture surface of retrieved UHMWPE fractured by tensile loading. (A) Whole area Original magnification  $\times 50$ . Arrows indicate direction of crack growth. a : initial point, b : slow growth region, c : fast growth region, d : fibrillated region. Square indicates approximate position of figure 5B. (B) Close-up of fibrillated region. Original magnification  $\times 150$ .

原料粉の粒界と思われる約 $100\mu\text{m}$ の模様(図5-(B))が観察された. 劣化試料の疲労破断面(図6-(A))では, 高速度領域(b), 繊維化領域(c), ストライエーション(d)が観察された. 別の試料(図6-(B))では, 繊維化領域(b)のみが観察され, ストライエーションが観察されないものもあった. これらの特徴の一部は, 加速酸化試料<sup>1)</sup>の特徴とも一致していた.

### 考 察

未劣化試料の極低温における破断では, 主応力方向に垂直に比較的平滑な破断面が形成され

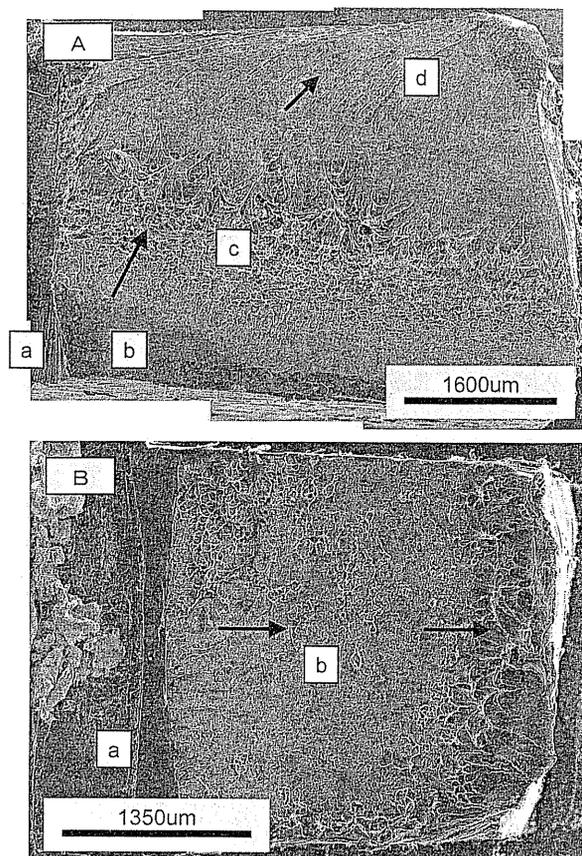


図6. Fracture surface of retrieved UHMWPE fractured by tensile fatigue. Arrows indicate direction of crack growth. (A) Whole area. a : initial point, b : fast growth region, c : fibrillated region, d : striation. Original magnification  $\times 50$ . (B) Another sample. a : initial point, b : fibrillated region. Original magnification  $\times 55$ .

た. 粒内の複数の破壊起点と粒界が観察されたが, Farrarら<sup>3)</sup>の報告にあるような溶融欠陥の形跡は見られなかった. 劣化試料は膝関節UHMWPEコンポーネントの非荷重部(前縁部または後縁部)から採取したが, き裂が主応力に対して斜めに成長しており, 他の方法では考察が難しい配向などの構造変化が観察された可能性が考えられた. 今後, 人工的に配向させた標準試料との比較などにより, 更なる考察が可能になると思われる.

常温において作製された破断面は, 未劣化試料と劣化試料とで, 全く異なる特徴を示した. 未劣化試料が延性的に破断するのに対し, 劣化

試料では酸化劣化が進行し、脆性的に破壊したことが原因であると考えられた。また、劣化試料では粒界が観察され、酸化劣化による不均一な物性変化が示唆された。一方、引張破断面と疲労破断面との差は、引張破断面で破壊の開始点や低速度領域と高速度領域の明確な境界が見られることだけで、それ以外には明確に両者を識別する特徴は見出せなかった。これは、き裂の成長速度が多少異なるものの、いずれの破断面もモードI破壊によるものであるためと考えられた。今後は、より複雑な力学条件下での破断面についても検討する必要がある。

## 結 論

UHMWPEの破断面は、破断の原因となった荷重の形態、材料の物性などに応じた特徴的な外見を有することがわかった。従って、UHMWPE製コンポーネントの破損事例にフラクトグラフィ解析を応用し、人工関節の不具合原因の究明に貢献することが期待できる。また、UHMWPEの生体内における材料物性やミクロ構造の変化を推察する手段としても期待できる。

## <謝 辞>

本研究の一部は安心安全次世代医療機器事業費および厚生労働科学研究費 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「医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」による成果である。

## 文 献

- 1) Baker DA, Hastings RS et al. : Study of fatigue resistance of chemical and radiation crosslinked medical grade ultrahigh molecular weight polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research* 46 : 573-581, 1999.
- 2) Baker DA, Bellare A et al. : The effects of degree of crosslinking on the fatigue crack initiation and propagation resistance of orthopedic grade polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research* 66A : 146-154, 2003.
- 3) Farrar D and Brain A : The microstructure of ultra-high molecular weight polyethylene used in total joint replacements. *Biomaterials* 18 : 1677-1685, 1997.
- 4) Gencur SJ, Rimnac CM et al. : Fatigue crack propagation resistance of virgin and highly crosslinked thermally treated ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials* 27 : 1550-1557, 2006.
- 5) 北川英夫, 小寺沢良一 : 破壊力学と材料強度講座 15 フラクトグラフィ. 培風館 1977.
- 6) Medel F, Gomez-Barrena E et al. : Fractography evolution in accelerated aging of UHMWPE after gamma irradiation in air. *Biomaterials* 25 : 9-21, 2004.
- 7) 日本材料学会フラクトグラフィ部門委員会 : フラクトグラフィ : 破面と破壊情報解析. 丸善 2000.
- 8) Niinomi M, Wang L et al. : Fatigue characteristics of ultra high molecular weight polyethylene with different molecular weight for implant material. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 : 267-272, 2001.
- 9) Oral E, Malhi AS et al. : Mechanisms of decrease in fatigue crack propagation resistance in irradiated and melted UHMWPE. *Biomaterials* 27 : 917-925, 2006.
- 10) Puertolas JA, Larrea A et al. : Fracture behavior of UHMWPE in non-implanted, shelf-aged knee prostheses after gamma irradiation in air. *Biomaterials* 22 : 2107-2114, 2001.
- 11) 迫田秀行, 鄭徳泳 他 : 人工関節の不具合要因分析. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 29 : 361-365, 2008.
- 12) 迫田秀行, 鄭徳泳 他 : 微小試験片を用いた人工関節用UHMWPEの疲労特性評価. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 29 : 367-372, 2008.
- 13) 迫田秀行, 石川格 他 : 微小試験片を用いた高密度架橋ポリエチレンの疲労特性評価. *臨床バイオメカニクス* 30 : 263-268, 2009.

# 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

石川 格<sup>\*1</sup> 迫田 秀行<sup>\*1</sup> 菅野 伸彦<sup>\*2</sup> 松岡 厚子<sup>\*1</sup> 土屋 利江<sup>\*3</sup>

Wear Measurement of Retrieved UHMWPE Acetabular Liner Using Optical  
Three-Dimensional Digitizer.

Itaru ISHIKAWA, PhD., Hideyuki SAKODA, PhD., Nobuhiko SUGANO, MD.,  
Atsuko MATSUOKA, PhD., Toshie TSUCHIYA, PhD.

## Abstract

Wear measurement of retrieved acetabular liners is necessary to elucidate the mechanisms of arthroplasty failure. This study evaluated the wear volume of retrieved acetabular liners using an optical 3D digitizer. In order to calculate the wear volume from measured geometry, information on the unworn geometry of the liner is needed, but the lack of this information becomes a problem. In this study, we introduced a novel calculation method to identify the unworn geometry of retrieved liners. This method assumes that the geometry of the unworn sliding surface was a sphere and the center of the sphere was on the central axis of the liner. As a result of the verification test using test data, this method could identify the unworn geometry correctly. We applied this method to the geometry data of the retrieved liner measured by optical 3D digitizer, so that the unworn geometry of the sliding surface was estimated. It seemed that the unworn part of the sliding surface which is estimated by this method was consistent with visual examination of the liner. Using this estimated unworn geometry, the wear volume of the retrieved acetabular liner could be calculated. It is thought that the unworn surface estimation method proposed in this study can be applied to similar geometric data measured by other devices, such as a contact-type coordinate measurement machine or micro-CT.

Key words : Retrieved acetabular liner, Wear measurement, Optical 3D digitizer, Unworn surface estimation.

---

※ 1 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

※ 2 大阪大学大学院 医学系研究科 運動器医工学治療学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

※ 3 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15

Corresponding Author : Itaru ISHIKAWA, PhD.

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan

Tel : 03-3700-1487 Fax : 03-3700-9196

E-mail address : itaru@nihs.go.jp

## 緒 言

人工股関節の超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)ライナーから生じる摩耗粉は、人工股関節の再置換につながる大きな要因である。そのため、抜去インプラントの摩耗量測定は、不具合要因を分析する上で重要である。UHMWPEライナーの摩耗量を測定する方法としては、特に抜去インプラントに対しては、抜去ライナーの形状を測定して摩耗前と比較することによって摩耗体積を測定する方法が採られることが多い。形状計測に使用される装置としては、超音波厚さ計<sup>1)</sup>や接触式座標測定装置<sup>2), 5)</sup>、マイクロCT<sup>3)</sup>等が用いられている。本研究では、近年リバースエンジニアリング等に用いられている光学式3Dデジタル計測を用いてUHMWPEライナーの形状を測定し、摩耗量の算出を試みた。この装置は比較的簡便に多くの測定点が得られる特徴があり、数度に分けて形状を測定することによりライナー全体の形状測定データを得ることも比較的容易である。

抜去ライナーの摩耗体積を算出するためには、そのライナーの摩耗前の形状に関する情報が必要である。形状測定の結果から摩耗体積を算出する従来の研究では、使用前の同型モデルについても形状測定を行う方法<sup>1)</sup>や、摺動面から摩耗が少ない部分を主観的に定めてその部分にフィットする球面を算出する方法<sup>2), 5)</sup>などで摩耗前の形状を定めている。しかし、抜去インプラントの場合には同型の未使用インプラントを入手することが難しいため、未使用インプラントの形状測定を行う方法は採れないことが少なくない。また、摩耗が少ない部分を主観的に定める方法では、測定者の経験や主観に

よって測定結果が変わる可能性がある。そこで、計測形状データからできる限り主観を排除して非摩耗形状を推定する方法について考案した。

## 方 法

### 1. 形状測定

UHMWPEライナーの形状を、光学式3次元デジタル計測機VIVID 9i(コニカミノルタセンシング(株))を用いて測定した。測定の際、UHMWPEの光透過性が測定への妨げとなるため、ライナー表面に微小粉末をスプレー塗布することで、表面において光が散乱する状態とした。粉末塗布は、デジタル計測機メーカーからの推奨方法として、染色浸透探傷剤R-1S(NT)(栄進化学(株))(粉末粒子径: 5~6 μm)を用いて行った。VIVID 9iと連動する回転テーブルを用いて、ライナーの摺動面や外形の形状を複数回に分けて測定した。測定した表面形状は、連結した多数の三角形からなるポリゴンデータとして得ることができる。得られた複数の表面形状ポリゴンデータに対し、Rapidform XOR2(INUS Technology, Inc.)を用いて位置合わせと合成を行い、ライナー全体形状のポリゴンデータを作成した。

### 2. 非摩耗形状の推定方法

次のような仮定(以下、前提条件と呼ぶ)の下に、測定したポリゴンデータから非摩耗形状を推定する方法を考案した。

- UHMWPEライナーの摺動面は、摩耗していない状態では単一の球面(以下、非摩耗球と呼ぶ)からなる。
- 非摩耗球の中心位置は、ライナーの中心軸上にある。
- ライナー摺動面に摩耗していない部分が残さ

れている。

ライナーの中心軸については、多くのライナーにおいて、摺動面以外の部分の形状的特徴から導き出すことができる。本研究の測定例では、図1に示すように、外形の円筒部分から中心軸を算出した。この中心軸を $t$ 軸とし、 $t$ 軸上に中心を置く球 $S$ を考えてその中心位置を $C(t)$ 、半径を $r$ とする。もし上記の仮定が成り立つならば、球 $S$ が非摩耗球と一致していれば、摺動面の摩耗していない部分の測定データは球 $S$ とよく重なるはずである。逆に、中心位置 $C(t)$ と半径 $r$ を変化させて測定データの一部とよく一致する球を探索すれば、そのときの球 $S$ が非摩耗球である可能性がある。

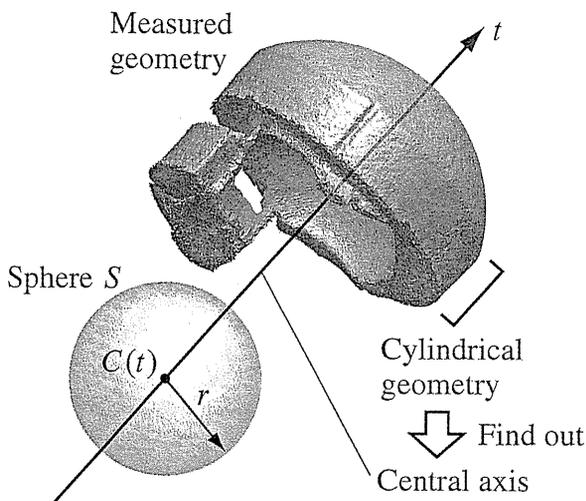


図1. Schematic diagram of the unworn surface estimation method.

計算機上でこのような球 $S$ の探索を行うためには、球 $S$ が測定データとどの程度一致しているかを数値的に判断できる評価関数が必要になる。本研究で使用した評価関数を定義するに当たり、まず、測定した摺動面のポリゴンデータが連結した $n$ 個の三角形からなっているとし、その $i$ 番目の三角形 $T_i$ の面積が $A_i$ であるとする。また、球 $S$ の中心位置 $C(t)$ と三角形 $T_i$ の重心位置との距離が $x_i$ で表されるとする。このとき、本研究では、次のような関数 $P(t, r)$ を評価関数として用いた。

$$P(t, r) = \sum_{i=1}^n A_i \times G(x_i - r, \sigma)$$

ここで、 $G(x, \sigma)$ は、標準偏差 $\sigma$ のガウス分布関数であり、次式で表される。

$$G(x, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$$

標準偏差 $\sigma$ の値は、VIVID 9iの測定精度の値( $\pm 0.05$  mm (TELEレンズ使用, 測定距離0.6 m時))に基づき、 $\sigma = 0.05/3$  mmとした。つまり、関数 $P(t, r)$ は、あるポリゴン三角形の重心が球 $S$ の表面に近い位置にあればあるほどその三角形の面積により大きな値を掛け、その積を総和した値を返す。 $P$ の値に大きく寄与するのは、球 $S$ の表面から内外に向かってVIVID 9iの測定精度程度の範囲内に重心がある三角形の面積であり、その範囲を外れた位置にある三角形の面積はほとんど加味されない。

本研究では、球 $S$ が非摩耗球と一致する際に評価関数 $P(t, r)$ が極大になると考えた。そこで、関数 $P(t, r)$ の極大位置を見つけるために、中心位置 $t$ と半径 $r$ を変化させて関数 $P(t, r)$ の値の分布を求めた。その分布図からピーク位置を推測した上で、正確なピーク位置をNelder-Mead法<sup>4)</sup>を用いて算出した。

### 3. テストデータを用いた検証

上記の非摩耗球推定法が機能するかどうかを確認するために、摩耗したライナー形状を想定したテストデータを作成し、非摩耗球を推定できるかを検証した。まず、図2の模式図に太線で示すような、半球状のカップが球でえぐられた形状を3DモデリングソフトウェアRhinoceros 3D 4.0 (Robert McNeel & Associates) とFEMプリプロセッサFemap 10 (Siemens PLM Software Inc.) を用いて作成した。作成した形状モデルのカップ内面をFemap上で三角形一次要素にメッシュ分割することで、連結した三角形からなるメッシュデータを生成した。さらに、ガウス分布に従う乱数を用いて各節点座標に変位を加算することで測定誤差のような凹凸を与えた。以上の手順で作成したテストデータに対

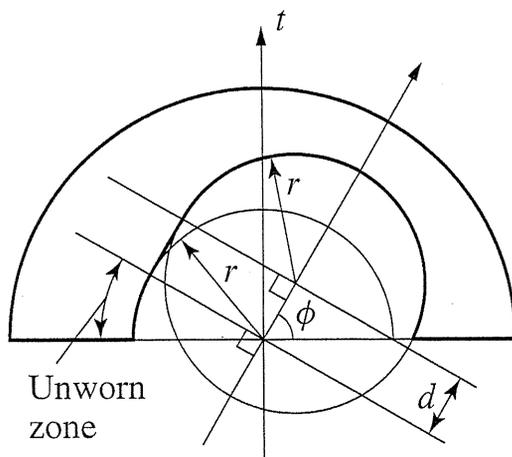


図2. Cross-section of worn acetabular liner model.

し,  $t$  軸を中心軸として使用して評価関数値の分布を求め, ピーク位置を算出した.

#### 4. 摩耗量の算出

大阪大学医学部附属病院にて再置換のために抜去されたライナーを対象として形状測定を行った. 非摩耗球推定によって算出された非摩耗球の中心位置  $C(t)$  と半径  $r$  をもとに, 摩耗したライナーのカップ内側の容積から非摩耗球部分に相当する体積を差し引くことで摩耗体積を算出した.

### 結 果

非摩耗球推定法の検証のために作成したテストデータと, そのデータに対する評価関数値の分布図を図3に示す. 図3-(a)のテストデータは, 非摩耗球を  $t=1$  mm,  $r=14$  mmにおき,

図2の形状を  $\phi=60^\circ$ ,  $d=3$  mmとして作成したものである. メッシュ分割後の各節点には, VIVID 9iの仕様に倣って, 標準偏差  $\sigma=0.05/3$  mmのガウス分布に従う変位をノイズとして与えた. このテストデータにおいて, 評価関数  $P(t, r)$  の値は図3-(b)のような分布を示した. この分布には, A部とB部に2つの極大が見られた. A部のピークは  $t=1.0157$ ,  $r=13.997$  の位置にあって極大値は  $P=4012$ , B部のピークは  $t=3.119$ ,  $r=15.510$  の位置にあって極大値は  $P=953$  であり, A部のピーク位置は本来の非摩耗球の値とほぼ一致していた.

図4は, 抜去インプラントのUHMWPEライナーに対して非摩耗球推定を行った例を示している. 図内左上の測定データに対し, 評価関数値の分布を求めたものが右上のコンター図である. このサンプルでは, 分布図内にa, b, cで示した3つの位置にピークが見られた. 図4内のa~c図は, それぞれのピーク位置において, 重心位置  $x_i$  が  $r \pm 0.05$  mmの範囲内にあるポリゴン三角形をグレーに色付けした図である. すなわち, これらは, それぞれのピークにおいて非摩耗部分と判断された位置を示している. それぞれの非摩耗部分を比較すると, 最大の極大であるa部のピークによる非摩耗位置が, 実際のサンプルの目視と照らし合わせて最も適切であると考えられた. したがって, ピークaにおける  $t$  と  $r$  の値を用いて摩耗量を算出し,  $484 \text{ mm}^3$  の値を得た.

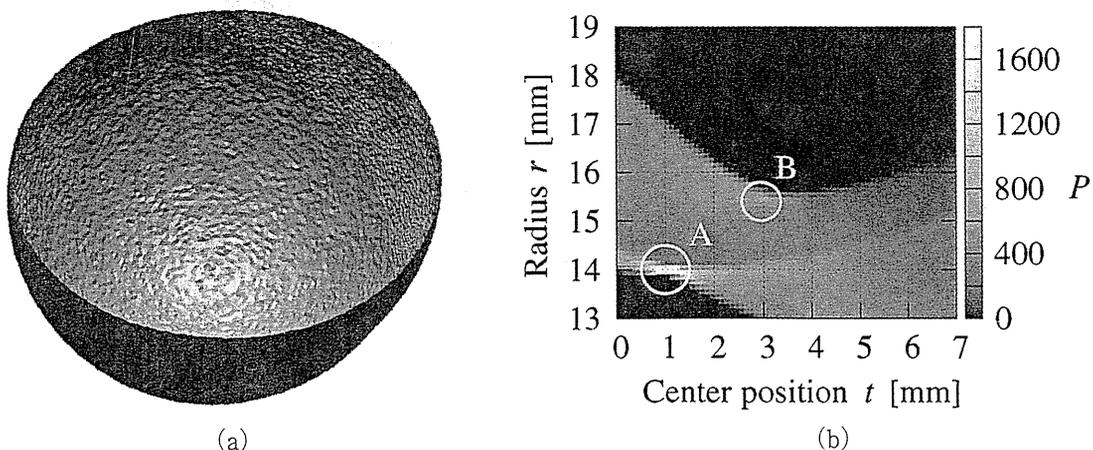


図3. Result of verification test using a test model ( $t=1$  mm,  $r=14$  mm,  $\phi=60^\circ$ ,  $d=3$  mm).

(a) : Shape of test model. (b) : Contour plot of  $P(t, r)$  values.

考 察

本研究では、光学式3Dデジタイザを用いてUHMWPEライナーの形状を測定し、その結果から摩耗体積の算出を試みた。この装置は、多数の測定点が容易に得られることから、摩耗体積の算出に当たって多くの測定点を利用することができる。それにより、測定点の少なさに起因する誤差は生じにくいことが期待できる。その一方、使用した装置では測定精度が $\pm 0.05$  mmとなっており、微小な摩耗体積を測定するには十分でない。また、本研究では、測定に際してライナー表面に粉末の塗布を行う必要があった。今回、この塗布膜厚さの計測は行っていないが、デジタイザメーカーから得た情報では一般的に10~30  $\mu$ m程度の厚さである。これは、測定精度よりも小さいものの、無視できな

い大きさである。この様なことから、本研究の形状計測方法では、ある程度大きな摩耗が存在するライナーのみが測定可能対象となる。

また、本研究では、形状測定データに対して演算を行うことにより、可能な限り主観に頼らずに非摩耗形状を推定する方法について提案を行った。この推定法では、評価関数 $P(t, r)$ が極大となる位置を探索することで、非摩耗球を推定する。図3に示すテストデータでの結果から、前提条件が理想的に成り立つ状況であれば、球Sと非摩耗球とが重なる位置で評価関数 $P(t, r)$ が極大となっており、この関数が評価関数として機能しうることが分かる。逆に、評価関数 $P$ が極大となる位置から非摩耗球を推定するには、複数あるピークからの選択を要するため、完全に主観を排することはできていない。また、実際のサンプルにおいては、前提条

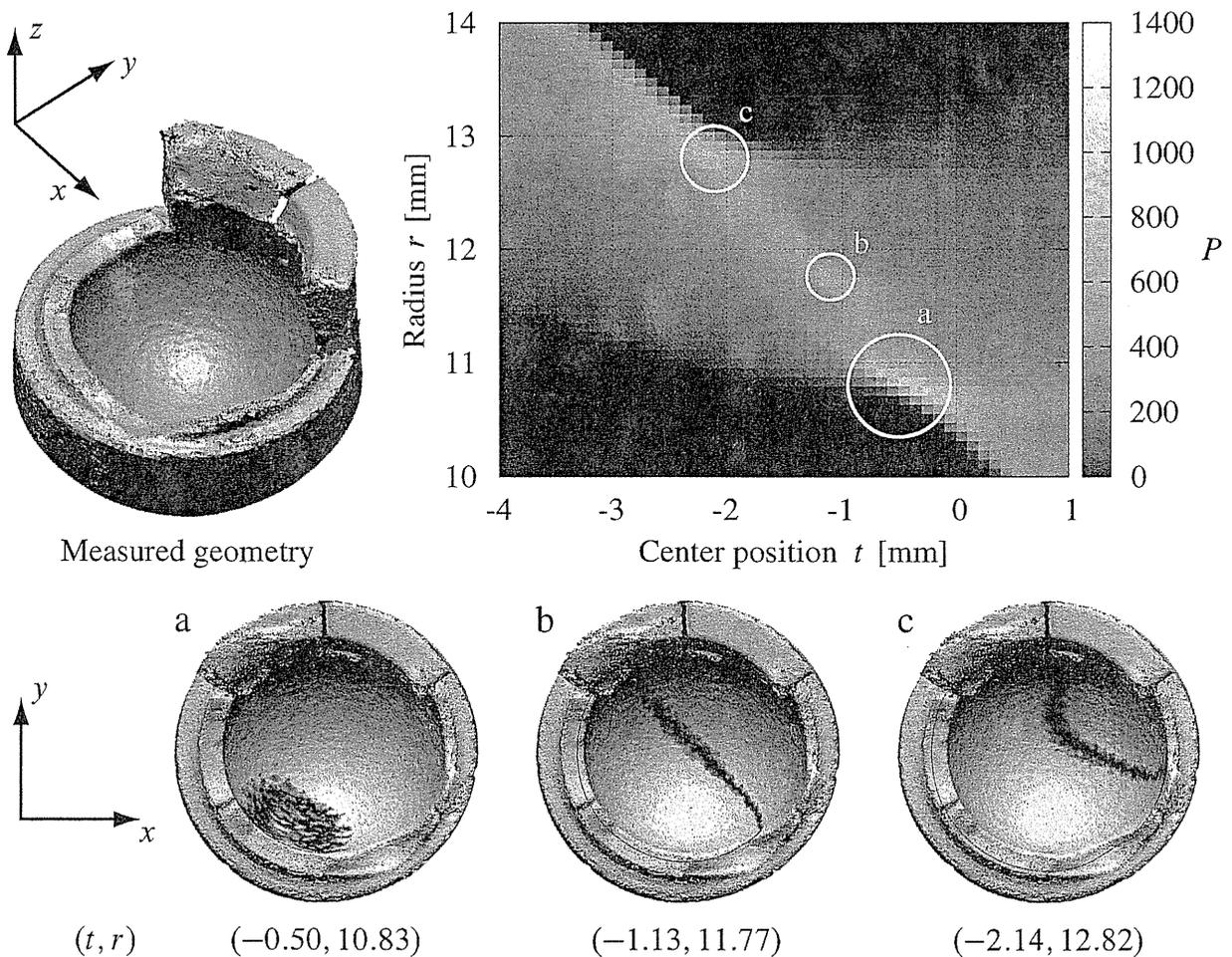


図4. Result of unworn surface estimation for retrieved acetabular liner.

件が満たされうるかの判断がまず必要になる。前提条件を満たしうるサンプルであっても理想的に満たすことはないため、前提条件からのずれがピークの出現位置にどの程度影響するかについてさらなる検討が必要である。

本研究で使用した評価関数は、一般的に計測誤差がガウス分布状に分布することを考慮し、ポリゴン三角形の面積にガウス分布関数をかけて総和した値を返す関数として定義した。その際、ガウス分布の標準偏差 $\sigma$ には、測定装置であるVIVID 9iの測定精度に基づいて値を設定した。しかし、この $\sigma$ の値には、より適切な値が存在するかもしれない。

図4に示した測定例のライナーは骨頭径22 mmのステムと組み合わせて使用されるものであると考えられるが、ピークaの位置として予測された非摩耗球半径は11 mm未満(10.83 mm(図4))になっている。ライナー内径にはステムの骨頭径に加えてクリアランスも必要であることを考慮すると、この推定値は妥当性に疑問が残る値である。この要因としては、計測の際にライナーに粉末を塗布したことによる計測誤差、前提条件から外れてしまっていることによる影響、 $\sigma$ の値が不適当なため、あるいは実際にクリープ変形によってライナーがわずかに歪んでいるため等が考えられる。

今回提案した非摩耗球の推定方法は、接触式座標測定装置やマイクロCTなど比較的広範囲

の3次元形状を測定できる測定装置であれば、それらの測定データにも応用可能であると考えられる。特に、精度面では接触式座標測定装置、測定範囲面ではマイクロCTの方が光学式3Dデジタイザよりも優れている場合が多い。これらの測定装置の測定データに対しても本研究の非摩耗球推定法を適用してみることでこの推定法の妥当性を検証したい。

## 文 献

- 1) Berzins A, Sumner DR et al. : Dimensional characteristics of uncomplicated autopsy-retrieved acetabular polyethylene liners by ultrasound. J Biomed Mater Res 39 : 120-129, 1998.
- 2) Bills P, Blunt L et al. : Development of a technique for accurately determining clinical wear in explanted total hip replacements. Wear 263 : 1133-1137, 2007.
- 3) Bouden AE, Kurtz SM et al. : Validation of a micro-CT technique for measuring volumetric wear in retrieved acetabular liners. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 75 : 205-209, 2005.
- 4) Nelder JA, Mead R : A simplex method for function minimization. Comput J 7 : 308-313, 1965.
- 5) Raimondi MT, Sassi R et al. : A method for the evaluation of the change in volume of retrieved acetabular cups. Proc Inst Mech Eng H 214 : 577-587, 2000.

# Direct evaluation of fatigue property of ultra-high molecular weight polyethylene components of retrieved knee implants using small specimens

Hideyuki Sakoda <sup>a,\*</sup>, Itaru Ishikawa <sup>a</sup>, Dukyoung Jung <sup>a,\*\*</sup>, Shigeyuki Wakitani <sup>b</sup>, Keiji Tensho <sup>c</sup>, Michio Sato <sup>a</sup> and Toshie Tsuchiya <sup>a,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup> *Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan*

<sup>b</sup> *Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan*

<sup>c</sup> *Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Shinshu University, Matsumoto, Nagano, Japan*

Received 8 January 2010

Accepted 25 August 2010

**Abstract.** Ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) has been widely used as a bearing surface of joint implants. Since wear of UHMWPE component has been the primal cause of implant failure, crosslinking of UHMWPE is now widely used to improve its wear property. On the other hand, crosslinking degrades its fatigue property and increase of fatigue related failure, such as delamination, is possible. However, the relationship between degraded fatigue property and implant failure is not clear, primarily because the fatigue properties of failed and retrieved UHMWPE components are not known. In this study, we propose a new test method to evaluate the fatigue property of retrieved UHMWPE components or final products using small specimens.

First, the effects of test conditions were investigated using virgin UHMWPE. Then, tests were repeated using specimens from UHMWPE components of retrieved knee implants. The fatigue properties of virgin and retrieved UHMWPE were successfully evaluated by the new test method and a relationship was found among the extent of oxidation, the fatigue property, and occurrence of delamination. This result suggested that evaluation of fatigue property of UHMWPE component can predict the occurrence of fatigue related implant failure during operation *in vivo*.

Keywords: Joint implant, polyethylene, oxidation, degradation, fatigue, mechanical test

---

\* Address for correspondence: Hideyuki Sakoda, Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 9264; Fax: +81 3 3700 9196; E-mail: sakoda@nihs.go.jp.

\*\* Present address: Center for Supporting Industries of Senior Necessities, Pusan, Korea.

\*\*\* Present address: Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Osaka, Japan.