

201229035A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

関節リウマチ患者の関節機能を再建する
革新的な人工股関節の創出

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高取吉雄

平成25（2013）年 4月

目次

I.	総括研究報告 関節リウマチ患者の関節機能を再建する革新的な人工股関節の 創出 高取吉雄	1
II.	分担研究報告	
1.	至適ビタミンE添加量・至適架橋照射線量の検討 中村耕三・京本政之	29
2.	抗酸化剤添加 CLPE への至適 MPC 処理条件の検討 石原一彦・田中栄・茂呂徹	41
3.	多方向摺動試験による耐摩耗特性の評価 村上輝夫・雑賀健一	59
4.	摩耗抑制効果(耐久性)の応用検討 馬淵昭彦・伊藤英也・橋本雅美	69
5.	抗感染性の検討 埴隆夫・宮本比呂志	83
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	93
IV.	研究成果の刊行物・別刷	95

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

総括研究報告書

関節リウマチ患者の関節機能を再建する革新的な人工股関節の創出

主任研究者 高取吉雄（東京大学医学部附属病院 特任教授）

研究要旨：本研究の目的は、独創的な基盤技術に医療材料分野における最新の知見を取り入れ、三大合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出するための基礎検討を完成させることである。このため、今年度は、MPC 処理の至適条件の検索、多方向摩耗の基礎検討、摩耗抑制効果の応用検討、抗感染性の検討を行った。

MPC 処理の至適条件の検索では、機械特性と物理特性から評価し至適ビタミン E 添加量・至適架橋照射線量を確立した。また、MPC 処理における溶液濃度、処理時間、紫外線強度の至適条件を確立した。

多方向摩耗の基礎検討では、ASTM 規格 F732-00 に準じた多方向摩耗試験を行い、重量変化、形状変化などから、MPC 処理によってビタミン E 添加 CLPE の摺動面の潤滑機構が改善し、摩耗抑制効果が得られることを明らかにした。

摩耗抑制効果の応用検討では、ISO 規格 14242-3 に準じて手術後の歩行を再現する股関節シミュレーター試験を行い、重量変化による摩耗量の測定、摺動面の解析（三次元解析装置、SEM、走査型レーザー顕微鏡）、潤滑液中の摩耗粉の回収及び解析による摩耗動態の分析などにより、ビタミン E 添加 CLPE を MPC 処理した場合、顕著な摩耗抑制効果がみられることを明らかにした。

抗感染性の検討では、感染発症の原因の 1 つであるタンパク質の吸着に影響を与える表面の親水性と電荷が、MPC の処理により改善することを明らかにした。また、細菌付着抑制効果を検討するための実験系を確立できた。

以上の研究成果は、革新的な人工股関節の創出が十分に期待できる内容であった。

分担研究者

中村耕三	(国立障害者リハビリテーションセンター 総長)
石原一彦	(東京大学大学院工学系研究科 教授)
田中 栄	(東京大学医学部附属病院 教授)
村上輝夫	(九州大学バイオメカニクス研究センター 特命教授)
塙隆夫	(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)
宮本比呂志	(佐賀大学医学部附属病院 教授)
茂呂 徹	(東京大学医学部附属病院 特任准教授)
馬淵昭彦	(東京大学大学院医学系研究科 准教授)
伊藤英也	(東京大学医学部附属病院 講師)
橋本雅美	(ファインセラミックスセンター 上級研究員)
京本政之	(京セラメディカルマテリアル株式会社 課長)
雑賀健一	(京セラメディカルマテリアル株式会社 研究員)

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の治療は近年、疾患を制御し寛解を目指す治療に変革しているが、関節破壊により機能障害が進行している患者は数多く存在する。こうした関節機能障害の治療には人工関節が用いられており、中でも人工股関節は歩行能力の再建、患者の自立性喪失の防止に重要な役割を果たしている。一方、人工関節の弛み、脱臼・破損、感染—は再置換を余儀なくされる深刻な合併症である。RA患者は変形性関節症患者と比べ若い時期に手術を受けることが多い。また、筋力低下に伴う脱臼のリスク、および免疫抑制剤などの内服による感染リスクの増大も危惧される。したがってこれらの三大合併症を制御し、人工股関節の耐久性(耐用年数)を向上させることは、重要な課題といえる。

弛みの主因は、関節摺動面を構成するポリエチレン (PE) から生じる微小摩耗粉が惹起する骨溶解である。摩耗抑制に有効な技術として、 γ 線照射により架橋を増加させた架橋 PE (CLPE) が実用化されて 10 年が経過したが、体内で酸化劣化した CLPE の破損や層状剥離に起因する異常摩耗という新たな合併症の存在が明らかとなった。このため、次世代の摺動面材料としてビタミン E などの抗酸化剤を添加した CLPE の研究が国内外で始まっているが、従来の γ 線照射では現行品と同等の架橋効果を得られないなどの技術的な課題のため、一部を除いて実用化には至っていない。

弛みの阻止を目指し、申請者らは 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) 処理技術を開発した。この日本発の技術は、生体

親和性と潤滑特性に優れた MPC ポリマーを PE 表面にナノメートル単位で結合させるものである。厚生労働科学研究費補助金を通じて研究を進め、MPC 処理により CLPE の摩耗が顕著に抑制されること、MPC の微小粉が骨吸収を誘導しないこと、すなわち、前述の弛みに対する独創的な新技術であることを明らかにした。平成 18 年には PMDA との事前面談と対面助言を受けて治験を実施し、23 年に「従来品の表面に MPC 処理した人工股関節」は薬事承認を得た。

申請者らは、MPC 処理技術を「抗酸化剤添加 CLPE」と融合させ、弛みと破損を制御することを考えた。また、脱臼の制御には骨頭の大径化が考えられるが、この場合でも摩耗が著減するという知見を得ている。さらに、細胞の接着を抑制するという知見から MPC 処理表面の細菌の付着を抑制する効果（感染抑制効果）が期待できる。本研究は、日本独自の材料・MPC を用いて摺動面表層の特性を向上させ、人工股関節の三大合併症を制御するという他に類を見ないものであり、次世代の摺動面を目指した「抗酸化剤添加 CLPE」をはるかに凌駕する、革新的な研究といえる。

本研究の目的は、独創的な基盤技術に医療材料分野における最新の知見を取り入れ、弛み、脱臼・破損、感染という三大合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出するための基礎検討を完成させることである。このた

め、今年度は、MPC 処理の至適条件の検索、多方向摩耗の基礎検討、摩耗抑制効果の応用検討、抗感染性の検討を行った。

B. 研究方法

① 至適ビタミン E 添加量・至適架橋照射線量の検討

(分担研究者：中村耕三・京本政之)

1. 物理的特性の評価

ビタミン E を添加したポリエチレンに対して、種々のガンマ線照射を行い、得られたビタミン E 添加架橋ポリエチレンの物理的特性を評価した。

ビタミン E を添加した分子量の異なるポリエチレン (GUR1020E および GUR1050E) に対して、25～150 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120℃ の熱処理を行ない、ビタミン E 添加架橋ポリエチレンを得た。徐冷後、機械加工により各種物理的特性評価用のビタミン E 添加架橋ポリエチレン試験体を作製した。

1) 密度測定

試験体の密度を、ASTM F648-07 規格および JIS K7112 A 法 (水中置換法) に準拠して測定した。

2) 架橋密度測定

準備した厚さ 1 mm のシート状試験片を、酸化防止剤として 0.5 mass% 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノールを添加した *p*-キシレン中にて、72 時間煮沸し、ゾル画分を抽出した。抽出後、ゲル画分を新しい *p*-キシレンに移し、120℃ で 2 時間平衡化した後、秤量した。秤量後、アセトン中にて解膨潤さ

せた後、減圧下、60℃にて重量が一定になるまで乾燥させ、再度、秤量した。得られた数値を用い、膨潤度、網目鎖密度、架橋間数平均分子量及び架橋密度を求めた。なお、既報を参考に *p*-キシレンのモル容積には 136 mL/mol、Flory-Hussins 相互作用パラメーターには 0.37 を用いた。

2. 機械的特性の評価

ビタミン E を添加した分子量の異なるポリエチレン (GUR1020E および GUR1050E) に対して、25~150 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120℃ の熱処理を行ない、ビタミン E 添加架橋ポリエチレンを得た。徐冷後、機械加工により各種物理的特性評価用のビタミン E 添加架橋ポリエチレン試験体を作製した。得られた種々のガンマ線照射量によるビタミン E 添加架橋ポリエチレン試験体の機械的特性について、以下に示す試験を行った。

1) 引張り試験

ASTM D638 規格および F648-07 規格に従って行った。機械加工により、IV 号試験片を作製した。準備した試験片の引張り特性について、万能試験機を用い、試験速度 50 mm/min にて評価した。

2) 衝撃試験

ASTM F648-10 規格に準拠して行った。機械加工により作製した試験体に対して、ノッチ深さ 4.57 ± 0.08 mm のダブルノッチを入れた。これらのアイゾット衝撃強度を、アイゾット衝撃試験機を用い、ハンマー容量 3.92 J (40

kg·m) にて測定した。

3) クリープ変形測定

ASTM F648-98 規格および D621-64 規格に準拠して測定した。オリエンテック社製クリープ試験機 (CP6-L-1000 型) を用い、室温にて 1000 psi (6.90 MPa) の荷重をかけた試験片の 24 時間経過後の試験片高さ、および荷重を取り除いた後、1.5 時間後の試験片高さを測定した。試験には、12.7 x 12.7 x 12.7 mm³ のブロック状試験片を用いた。

4) 硬さ測定

ビタミン E 添加架橋ポリエチレン試験片のデュロメータ硬さ (タイプ D 圧子) を、ASTM F648-07 規格に準拠して測定した。

② 抗酸化剤添加 CLPE への至適 MPC 処理条件の検討

(分担研究者：石原一彦・田中栄・茂呂徹)

1. 種々の条件における MPC 処理 CLPE (VE) の作製

CLPE (VE) への MPC 処理の至適条件を検討するため、1) UV 照射強度、2) UV 照射時間、および 3) MPC モノマー濃度を変化させたサンプルを作製した。

1) UV 照射強度

CLPE (VE) 試験体を、MPC 水溶液に浸漬し、1.5~20.0 mW/cm² の紫外線 (中心波長 350 nm) を 90 分間照射することでグラフト重合を行った。

2) UV 照射時間

CLPE (VE) 試験体を、MPC 水溶液

に浸漬し、 5 mW/cm^2 の紫外線（中心波長 350 nm）を 15～180 分間照射することでグラフト重合を行った。

3) MPC モノマー濃度

0～1.0 mol/L の MPC 水溶液を調製した。CLPE (VE) 試験体を、MPC 水溶液に浸漬し、 5 mW/cm^2 の紫外線（中心波長 350 nm）を 90 分間照射することでグラフト重合を行った。

2. MPC 処理 CLPE (VE) の評価

1) XPS 分析

XPS 分析には、KRATOS ANALYTICAL 社製 XPS 分析装置 AXIS-HSi165 型を用い、X線源は Mg-K α 線、印加電圧を 15 kV、光電子の放出角度を 90°とした。

2) FT-IR 分析

FT-IR 分析には、日本分光株式会社製 FT-IR 装置 FT/IR-6300 type A を用い、ATR 法により行った。分解能 4 cm^{-1} 、積算回数 64 回とした。得られたスペクトルから MPC に含まれるリン酸基を定量することで、CLPE (VE) 試験体表面に結合している MPC ユニット量を相対的に評価した。その相対量をリン酸指数として定義し、以下の式により算出した。

$$\text{リン酸指数} = \frac{1080 \text{ cm}^{-1} \text{ ピーク強度}}{1460 \text{ cm}^{-1} \text{ ピーク強度}}$$

3) 水による静的接触角の測定

CLPE (VE) 表面の静的な濡れ性（水による静的接触角）について、協和界面科学社製表面接触角測定装置 DM300 を用い、液滴法により評価した。水による静的接触角は ISO 15989

規格に準拠し、液滴量 $1 \mu\text{L}$ の純水を液滴後、60 秒時点において測定した。

4) TEM 観察

観察前、試験体をエポキシ樹脂に包埋し、四塩化ルテニウム染色後超薄切片を切り出した。TEM 観察には、日本電子製 JEM-1010 型を用い、加速電圧 100 kV とした。

③ 多方向摺動試験による耐摩耗特性の評価

(分担研究者：村上輝夫・雑賀健一)

1. MPC 処理 CLPE および CLPE (VE) の作製

1) 試薬

PE 材 (GUR1020 resin) に、不活性雰囲気にて 50 kGy のガンマ線を照射した。照射後、 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ の熱処理を行い、CLPE を得た。徐冷後、機械加工により CLPE 試験体を作製した。

0.1 % のビタミン E 添加 PE 材 (GUR1020E resin) に、不活性雰囲気にて 100 kGy のガンマ線を照射した。照射後、 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ の熱処理を行い、CLPE (VE) を得た。徐冷後、機械加工により CLPE (VE) 試験体を作製した。

2) MPC 処理

CLPE および CLPE (VE) 試験体を 10 g/L に調製したベンゾフェノン含有アセトン溶液に 30 秒間浸漬した後、速やかに引き上げた。室温にて試験体表面のアセトン溶媒を除去した。完全に脱気した純水を用いて、MPC 水溶液 (0.5 mol/L) を調製した。ベンゾフェノンを表面にコーティングした CLPE および CLPE (VE) 試験体を、

MPC 水溶液に浸漬し、 5 mW/cm^2 の紫外線（中心波長 350 nm）を 90 分間照射することでグラフト重合を行った。照射中、MPC 水溶液を 60°C になるよう調整した。重合後、CLPE および CLPE (VE) 試験体を、超純水およびエタノールにて十分に洗浄し、MPC 処理 CLPE および CLPE (VE) 試験体を得た。

2. Pin-on-disk 型摩耗試験装置を用いた、MPC 処理 CLPE および CLPE (VE) の摩耗特性試験

ASTM F732-00 規格、F2025-06 規格を参考に、pin-on-disk 型摩耗試験装置 (AMTI 製 Ortho-POD) を用い、多方向摺動試験（股関節における通常歩行時に生じる摩擦動作を想定した試験）を行った。

Disk 型試験片には、厚さ 3 mm の未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE、未処理 CLPE (VE) および MPC 処理 CLPE (VE) を用いた。対向する Pin 型試験片には、コバルトクロム合金 (Co-Cr) を用いた。Disk 型試験片は、スクリーホールを模擬した直径 8 mm の貫通孔を有するチタン合金製ジグと組み合わせて試験機に設置した。多方向摺動試験は、 37°C のウシ血清中にて行った。最大荷重は 213 N とし、摺動距離 30 mm、摺動速度 1 Hz の条件で 100 万サイクルまで試験を行った。25 万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、disk 型試験片の回収、洗浄、乾燥、重量測定を行った。併せて、厚さ 3 mm の未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE、未処理 CLPE (VE) および MPC 処

理 CLPE (VE) の試験片をコントロール群として潤滑液中に浸漬し、その重量変化から吸水量を補正することで摩耗量を算出した。

未処理 CLPE (VE) および MPC 処理 CLPE (VE) の disk 型試験片の変形量は、非接触式超精密表面性状測定機 (AMETEK Taylor Hobson 製 TALYSURF CCI Lite) を用い、摺動面および背面の表面性状を測定した。表面性状測定結果における摩耗試験の動作範囲外を基準面として、disk 型試験片の最大変位および変形体積をそれぞれ計測した。

④ 摩耗抑制効果（耐久性）の応用検討

(分担研究者：馬淵昭彦・伊藤英也・橋本雅美)

1. 股関節シミュレーション試験

耐摩耗性評価試験は、MTS 社製の股関節シミュレーターを用いて行った。骨頭には市販品のコバルトクロム合金骨頭（径 26 mm）を、臼蓋コンポーネント（ライナー）は未処理 (CLPE)、MPC ポリマー処理架橋 PE (MPC 処理 CLPE) およびビタミン E 添加 CLPE 表面を MPC ポリマー処理したもの (MPC 処理 CLPE+E) を用いた。試験条件は国際標準化機構 (ISO) 14242-1 に準じ、潤滑液には 25% 牛血清を用い、液量約 750 ml で、毎秒 1 回の歩行周期 (1 Hz) に 1.8 と 2.7 kN の 2 つのピークをもつ Double Peak Paul の歩行条件で、1000 万サイクル (10~15 年分の

歩行不可に相当) の摩耗試験を行った。50 万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、ライナーの回収、洗浄、乾燥、重量測定を行った。Load-soak control で計測した含水量で補正して、ライナーの重量の変化を計測した。

2. 人工股関節シミュレーション試験後の試験体分析

1) 表面 LSM 観察

人工股関節シミュレーション試験後における未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE および MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーの摺動表面観察を、オリンパス株式会社製作所製走査型共焦点レーザー顕微鏡にて、観察倍率 5 倍で行った。観察部位はライナー天頂部とした。

2) 三次元形状測定

人工股関節シミュレーション試験後における未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE および MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーの摩耗を調査するため、ライナー摺動部の 3 次元形状測定を行った。測定には、ミットヨ製 CNC 三次元測定器を使用した。また、ライナー摺動面について、4 方向 (0-180° 線、45-225° 線、90-270° 線、および 135-315° 線) に対し、0.2 mm 間隔にて中心位置から半径を測定した。得られた値と未使用ライナーの半径との差分を算出し、コンター図化した。

3) 金属骨頭解析

人工股関節シミュレーション試験前後の Co-Cr 骨頭について、表面粗さ

測定、表面観察を行った。

表面粗さ測定は、粗さ測定計を用い、骨頭天頂部、赤道部を測定した。観察部位は、天頂部 A 点と 45° 部 B 点の 2 箇所とした。骨頭の表面観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて行った。測定倍率は 2000 倍、10 kV の加速電圧とした。

3. 摩耗粉の分離および解析

試験液からの摩耗粉の抽出方法は、以下に示すように行った。試験後の潤滑液全量から 10 ml 採取し、その中に 10 ml の 5N-NaOH を加えて、65°C で 3 時間振動処理を行った。室温で 1 日冷却後、密度 1.2 g/cm³ のシヨ糖/蒸留水混合液 10 ml と 0.919 g/cm³ イソプロパノール (IPA) /蒸留水混合液 10 ml を加えて遠心分離 (25,500 rpm, 5°C, 3 時間) を行った。遠心分離後の溶液の境界層を 10 ml のピペットで取り出し、20 ml のメタノールを加えて超音波により 1 分攪拌した。遠心分離を行い (25,500 rpm, 5°C, 3 時間)、摩耗粉部を沈降させ、上澄みを捨てた。この操作を 2 回繰り返した。その後、5°C に冷却後、1.05 g/cm³ シヨ糖/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、超音波で 1 分間攪拌させた。その上に、まず 0.973 g/cm³ IPA/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、次に 0.919 g/cm³ IPA/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、遠心分離を行った (25,500 rpm, 5°C, 3 時間)。遠心分離後、0.973 g/cm³ と 0.919 g/cm³ IPA/蒸留水混合液の境界層をピペットで採取し、最終的に 0.1 μm のフィルターを用いて、ライナー

から発生する摩耗粉をろ過抽出した。走査型電子顕微鏡 (SEM) により抽出した摩耗粉を観察した。観察箇所は、フィルター上の任意 9 カ所とし、倍率は 5,000 倍とした。

また、摩耗粉の形状や粒径分布の評価には解析プログラム:ImageJ

(National Institute of Health 製) を使用した。具体的には、摩耗粉の個数、面積、体積、粒径および円環性の評価を行った。個数に関しては、9 視野分の摩耗粉個数をカウントし、総数を採取量で除することにより、1 ml あたりの個数とした。面積および体積は、ImageJ を用いて求めた。粒径は、摩耗粉の最大長さとした。円環性は、摩耗粉がどの程度円に近いかを表す尺度であり、値が 1 の場合には完全な円であり、0 に近いほど形態が繊維状であることを示す。

⑤ 抗感染性の検討

(分担研究者：埴隆夫・宮本比呂志)

1. タンパク質吸着抑制効果の検討

1) 接触角測定

未処理および MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の水による静的なぬれ性 (表面接触角) について、協和界面科学社製表面接触角測定装置 (DM300) を用い、液滴法により評価した。静的表面接触角は ISO 15989 規格に準拠し、液滴量 1 μ L の純水を滴下後、60 秒時点において測定した。

2) ゼータ電位測定

未処理および MPC 処理ビタミン E

添加架橋ポリエチレン表面の表面ゼータ電位について、大塚電子社製ゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-2) を用い、レーザードップラー法により評価した。大塚電子社製ポリスチレン製モニター粒子溶液を、10 mM NaCl 水溶液で約 100 倍に希釈し、モニター用の電気泳動液とした。測定は、平均電場 17 V/cm、移動度測定は平板用セルユニット内 10 箇所、室温にて行った。

2. 細菌付着抑制効果の検討

本研究では、先行研究で既に表面処理方法を確立している純チタンを用い、実験系を確立することとした。

純チタンの表面を、表面粗さ 0.01 ~ 0.02 μ m になるよう研磨した後、米国材料試験協会 (ASTM) の基準に従って、不純物の除去と酸化被膜の形成のために 35 vol% の硝酸に 35 分浸漬した。硝酸処理した金属片を洗浄した後、速やかに 500 W の酸素プラズマ処理を 5 分間行った。

得られた純チタン試験体表面を、MPC ポリマーを用いたディップコーティング法により処理した。MPC と n-ブチルメタクリレート (以下、BMA) を予め共重合した PMB30 ポリマー (30 mol% の MPC を含有) を用いて、0.5 mass% となるように調整した PMB30 エタノール溶液を準備した。洗浄した純 Ti 試料を、PMB30 エタノール溶液に浸漬することで、ディップコーティングを行った。

人工関節感染の多くは、患者自身に常在しているブドウ球菌が起炎菌で

あるので、菌株には、バイオフィルムを形成する黄色ブドウ球菌の臨床分離株 *Staphylococcus aureus* UEOH-6 を使用した。

トリプトソイブロス (TSB) 中にて前培養を 16 時間行った *Staphylococcus aureus* UEOH-6 を遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) またはウシ胎児血清 (FBS) に懸濁した。純チタン表面に菌を付着させるために、 8×10^8 の菌を含む 500 μl の懸濁液を、24 ウェルプレートに配置した直径 14 mm x 1 mm 厚の純チタン試験片上に接種して、37°C で 1 時間インキュベートした、その後、純チタン試験片表面を 1 ml の PBS で 3 回リンスして、未付着の細菌を除去した。純チタン試験片表面に残存した菌について、次の 3 つの項目について比較した。

1) 付着生菌数測定

純チタン試験片を 10 mL の PBS 中で超音波処理を 10 分間行い、試験片表面に付着した菌を回収した。これを PBS で段階希釈して 110 番寒天培地に塗布し、37°C で 2 日間インキュベートした。出現したコロニーを計数し、付着生菌数 (colony-forming units) を求めた。

2) 蛍光顕微鏡観察

純チタン試験片を FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit (Invitrogen) により染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

3) 走査型電子顕微鏡観察

純チタン試験片を 2.5% グルタルアルデヒド中に室温で 1 時間浸漬した。

洗浄後、5% きざみで 50% から 100% に調製したエタノール中に順次浸漬することで脱水を行った。乾燥後、試験片表面に金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

① 至適ビタミン E 添加量・至適架橋照射線量の検討

(分担研究者：中村耕三・京本政之)

1. 物理的特性の評価

1) 密度測定

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、密度は増加した。また、GUR1020E レジンによる架橋ポリエチレンの密度は、GUR1050E レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれのレジンによる架橋ポリエチレンも、ISO や ASTM などの国際規格が要求する値を満たした。

2) 架橋密度測定

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、いずれの分子量のポリエチレンの膨潤度も徐々に低下し、75 kGy でほぼ一定となった。また、GUR1020E レジンによる架橋ポリエチレンの膨潤度は、GUR1050E レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、わずかに高い値を示した。

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、いずれの分子量のポリエチレンの架橋密度は増加した。また、

GUR1050E レジンによる架橋ポリエチレンの架橋密度は、GUR1020E レジンのそれに比べ、いずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

2. 機械的特性

1) 引張り試験

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、いずれの分子量のポリエチレンの引張り降伏強度も徐々に増加したのに対し、引張り破断強度および引張り破断伸びは徐々に減少した。また、GUR1020E レジンによる架橋ポリエチレンの引張り特性は、GUR1050E レジンのそれに比べ、優位であった。

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれの特性も、ISO や ASTM などの国際規格が要求する値を満たした。

2) 衝撃試験

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、いずれの分子量のポリエチレンのアイゾット衝撃強度も徐々に減少した。また、未照射および 100 kGy のガンマ線照射の場合のみ、GUR1020E レジンによる架橋ポリエチレンのアイゾット衝撃強度は、GUR1050E レジンのそれに比べ、高い値を示した。

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれの特性も、ISO や ASTM などの国際規格が要求する値を満たした。

3) クリープ変形測定

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれの分子量のポリ

エチレンのクリープ変形量も、ほとんど変化しなかった。

4) 硬さ測定

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれの分子量のポリエチレンのデュロメータ硬さも、ほとんど変化しなかった。また、レジンによる差も認められなかった。

150 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲においては、いずれのレジンも、ISO や ASTM などの国際規格が要求する値を満たした。

② 抗酸化剤添加 CLPE への至適 MPC 処理条件の検討

(分担研究者：石原一彦・田中栄・茂呂徹)

1. MPC 処理の至適条件の検討

A. UV 照射強度

1) XPS 分析

0~5.0 mW/cm² の範囲では、UV 照射強度の増加とともに N、P 原子濃度は増加した。UV 照射強度が 5.0 mW/cm² において表面原子濃度は理論的な MPC のそれと同様の値となった。UV 照射強度が 5.0 mW/cm² 以上では、N、P 原子濃度は 4.0~4.5 atom% であった。

2) FT-IR 分析

照射強度が 1.5 mW/cm² 以上になると、リン酸指数はほぼ一定であった。

3) 水による静的接触角の測定

UV 照射強度の増加とともに、水による静的接触角は低下した。1.5 mW/cm² 以上では水による静的接触角は 40° 以下を示した。

4) TEM 観察

UV 照射強度が 1.5 mW/cm^2 以上で、 $100\sim 200 \text{ nm}$ の MPC 層の形成が認められた。

B. UV 照射時間

1) XPS 分析

UV 照射時間の増加とともに N、P 原子濃度は増加した。UV 照射時間が 90 分以上において N、P ともに表面原子濃度は、理論的な MPC のそれと同様の値となった。

2) FT-IR 分析

UV 照射時間の増加とともに、リン酸指数は増加する傾向を示した。

3) 水による静的接触角の測定

UV 照射時間の増加とともに、水による静的接触角は低下した。UV 照射時間が 180 分にまで至ると、その静的接触角はわずかに増加した。

4) TEM 観察

UV 照射時間が 45 分以上の MPC 処理 CLPE (VE) 表面には、厚さ $100\sim 200 \text{ nm}$ の MPC 層が観察された。UV 照射時間が 23 分以下の CLPE (VE) 表面は、MPC 層の被覆は部分的であった。覆っている MPC 層の厚さは $100\sim 200 \text{ nm}$ であった。

C. MPC モノマー濃度

1) XPS 分析

グラフト重合に用いる MPC 水溶液の濃度が増加する ($0\sim 0.50 \text{ mol/L}$) につれて、徐々に N、P 濃度が増加した。 $0.50\sim 1.00 \text{ mol/L}$ では N、P 濃度が減少し、約 4.0 atom\% の値を示した。 0.50

mol/L の MPC 濃度により重合した MPC 処理 CLPE (VE) 表面の原子組成は、理論的な MPC のそれとほぼ同じであった。

2) FT-IR 分析

MPC 水溶液の濃度が増加するとともにリン酸指数は増加する傾向を示した。

3) 水による静的接触角の測定

MPC 処理することにより、水による静的接触角は小さくなり、濡れ性が高まった。MPC 水溶液の濃度が増加するにつれて、接触角は徐々に低下した。特に、 $0.25\sim 0.50 \text{ mol/L}$ の MPC 水溶液により重合した MPC 処理 CLPE (VE) 表面の接触角は約 30° にまで低減した。その後、 0.67 mol/L 以上の MPC 水溶液により重合した MPC 処理 CLPE (VE) 表面では、接触角が増加した。

4) TEM 観察

0.17 mol/L 以上の MPC 水溶液により重合した MPC 処理 CLPE (VE) 表面には、厚さ $10\sim 250 \text{ nm}$ の MPC 層が観察された。重合に用いた MPC 水溶液の濃度が増加するにつれて、CLPE (VE) 表面に形成する MPC 層の厚さも増大した。しかしながら、 1.00 mol/L の MPC 水溶液を用いて重合した MPC 処理 CLPE (VE) 表面では MPC 層と CLPE (VE) 基材の間に空隙が認められた。また、 0.10 mol/L 未満の MPC 水溶液により重合した MPC 処理 CLPE (VE) において、表面に MPC 層は認められなかった。

③多方向摺動試験による耐摩耗特性の評価

(分担研究者：村上輝夫・雑賀健一)

1. Pin-on-disk 型摩耗試験装置を用いた、MPC 処理 CLPE および CLPE (VE) の多方向摺動試験

未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE、未処理 CLPE (VE) および MPC 処理 CLPE (VE) の摩耗量を重量変化から検討した。いずれの試験片においても、試験サイクル数の増加とともにその摩耗量は線形に増加した。100 万サイクルの試験後、未処理 CLPE (VE) の摩耗量は未処理 CLPE と比較して約 2 分の 1 であった。また、MPC 処理 CLPE (VE) では、未処理 CLPE (VE) と比較してその摩耗量は 4 分の 1 以下であった。

次に、100 万サイクルの多方向摺動試験後の未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE、未処理 CLPE (VE) および PMPC 処理 CLPE (VE) の摺動部および背面の性状測定を行った。100 万サイクルの摩耗試験によって、disk 型試験片の摺動面には摺動動作に沿った長方形の摩耗痕が見られた。摩耗痕は長方形の角部にあたる領域で特に大きく変形していた。背面には、設置ジグの貫通穴に沿った変形が認められた。また、表面性状測定により摺動面の変形量を計測したところ、PMPC 処理 CLPE (VE) は未処理 CLPE (VE) と比較して、最大変位は約 75% に、変形体積は約 60% に抑制されていた。一方、背面の変形量は未処理 CLPE (VE) および PMPC 処理 CLPE (VE) の間で最

大変位および変形体積ともに有意な差は認められなかった。

④ 摩耗抑制効果 (耐久性) の応用検討

(分担研究者：馬淵昭彦・伊藤英也・橋本雅美)

1. 股関節シミュレーション試験

試験後、Load-soak control を用いて求めた 1000 万サイクル終了時の含水量は、3 種類のライナー間で差が見られず、MPC 処理の有無、ビタミン E 添加の有無は含水量に影響を与えないことが明らかとなった。

次に、含水量の値で補正したシミュレーション試験後の未処理 CLPE、MPC 処理 CLPE および MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーの摩耗量を検討した。未処理の CLPE ではサイクル数が増加するにしたがって摩耗量が増加し、1000 万サイクルの試験終了時に 49.3 mg の摩耗量を示した。一方、MPC 処理 CLPE ではこのような摩耗量増加が見られず、終了時に 7.0 mg の重量増加を示した。この傾向は MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーでも同様に見られ、試験終了時に 1.4 mg の重量増加を示した。

2. 人工股関節シミュレーション試験後の試験体分析

1) 表面 LSM 観察

MPC 処理の有無、ビタミン E 添加の有無に関わらずシミュレーション試験前のライナー摺動表面には、全域に機械加工によるマシンマークが見

られた。

試験後、未処理 CLPE ライナーの摺動部では、試験前に観察されたマシンマークは消失していた。これに対し、MPC 処理 CLPE およびビタミン E 添加 CLPE ライナーの摺動面では、多くのマシンマークの残存が確認された。

2) 三次元形状測定

MPC 処理 CLPE および MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーでは僅かな形状変化が認められた。しかし、未処理 CLPE ライナーに比べ、その形状変化量は大幅に減少していた。

3) 金属骨頭解析

Co-Cr 骨頭表面の解析では、試験前後における骨頭の表面粗さに有意な変化はみられなかった。

対合するライナーの PMPC 処理の有無およびビタミン E 添加の有無による影響を調査したが、有意な差異は確認されなかった。

3. 摩耗粉の分離および解析

何れの試験回数の場合も、CLPE ライナーから発生した摩耗粉の形状は、顆粒状および繊維状のものがほとんどであり、1 視野に非常に多数の摩耗粉が観察された。しかし、MPC 処理 CLPE ライナーから発生した摩耗粉の形状は、ほとんど粒状であり、摩耗粉の数もほとんど確認できなかった。また、MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーの場合にも、摩耗粉の形状は粒状であり、数もほとんど確認できなかった。

次に、潤滑液中の摩耗粉の個数、面積および体積を検討した。未処理

CLPE ライナーの場合には、試験回数の増加にともない摩耗粉の産生量が増加しているのがわかった。その産生量は、MPC 処理により何れの試験回数の場合も著しく減少し、未処理のものより約 99%減少していた。MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE ライナーの場合には、試験回数が 100 万回の時に、MPC 処理 CLPE ライナーの場合と同様に、著しく摩耗粉産生量は減少し、未処理の場合と比べて約 90%減少していた。

以上の結果から、ビタミン E 添加 CLPE ライナーを MPC 処理すると、無添加の場合と同様に、未処理と比較して摩耗粉産生量は著しく減少していた。

次に、各ライナーから発生した摩耗粉の粒径分布および、円環性分布を検討した。まず粒径の場合、未処理、MPC 処理および MPC 処理ビタミン E 添加の場合も、CLPE および MPC-CLPE ライナーの場合も、1 μm までの割合が最も大きく、試験回数が大きくなると、粒径が増加する傾向を示した。次に円環性に関して、未処理の場合何れの試験回数でも、0.2~1 までの広い範囲に分布していた。よって、摩耗粉の形状は、繊維状から円状までが存在することが定量的に明らかとなった。MPC 処理の場合には、試験回数が増加すると 0.2~0.3 付近の繊維状の摩耗粉も確認できるが、基本的に 0.8~1 付近の円状の摩耗粉が大多数を占めることがわかった。最後に MPC 処理ビタミン E 添加の場合、MPC 処理の場合よりは円環性の分布は広く、

0.6~1 付近の摩耗粉がほとんどであることがわかった。

以上のように、MPC 処理および MPC 処理ビタミン E 添加の場合も、摩耗粉の形状に有意差は見られず、ほぼ円状のものが大多数を占めることがわかった。

⑤ 抗感染性の検討

(分担研究者：埴隆夫・宮本比呂志)

1. タンパク質吸着抑制効果の検討

1) 接触角測定

未処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の水による静的表面接触角は約 90° であったのに対し、MPC 処理したその表面接触角は約 35° であった。

2) ゼータ電位測定

未処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の表面ゼータ電位は $-28.8 \sim -24.2$ と負に帯電していたのに対し、MPC 処理したそれは $-0.8 \sim 0.1$ と電氣的に中性であった。

2. 細菌付着抑制効果の検討

A) リン酸緩衝生理食塩水中での試験

1) 付着生菌数測定

未処理群で 7.4×10^6 個、MPC 処理群で 8.6×10^4 個であった。MPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99% 減少することがわかった。

2) 蛍光顕微鏡観察

リン酸緩衝生理食塩水中で金試験片表面に付着した黄色ブドウ球菌を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。未処理の純チタン表面では、ところどころに細菌塊が観察されたが、

MPC 処理表面で点在する細菌がわずかに観察されたが、未処理の場合に比べて付着細菌が著しく減少していた。

3) 走査型電子顕微鏡観察

リン酸緩衝生理食塩水中で試験片表面に付着した黄色ブドウ球菌を走査型電子顕微鏡で観察した。未処理の純チタン表面には多数の黄色ブドウ球菌が観察された。一方、MPC 処理を施した純チタン表面には、ほとんど菌が観察されなかった。

B) リウシ胎児血清中での試験

1) 付着生菌数測定

表面に付着した黄色ブドウ球菌の数を測定すると、未処理群で 2.1×10^5 個、MPC 処理群で 1.6×10^3 個であった。生理食塩水中の場合と同様に、MPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99% 減少した。

2) 蛍光顕微鏡観察

未処理の場合には点在する細菌が観察されたが、MPC で処理された表面では菌がほとんど観察されなかった。

3) 走査型電子顕微鏡観察

未処理の純チタン表面には凝集した細菌塊が観察された。一方、MPC 処理を施した純チタン表面には、ほとんど菌が観察されなかった。

D. 考察

本研究の目的は、独創的な基盤技術に医療材料分野における最新の知見を取り入れ、三大合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出するた

めの基礎検討を完成させることである。このため、今年度は、MPC 処理の至適条件の検索、多方向摩耗の基礎検討、摩耗抑制効果の応用検討、抗感染性の検討を行った。

MPC 処理の至適条件の検索では、MPC 処理するための至適なビタミン E 添加 CLPE を得るために、分子量が異なるビタミン E 添加 PE を準備し、最大 150 kGy のガンマ線照射を行うことで、各種のビタミン E 添加 CLPE 試験体を準備した。機械的特性(引張り特性、衝撃特性、クリープ変形性、硬さ特性)、物理特性(密度、膨潤度、架橋密度)について評価し、ガンマ線照射による架橋効果について評価した。機械特性と物理特性から評価し、至適な架橋照射線量は 100~150 kGy、至適 UHMWPE レジンが GUR1020 であることを明らかにした。ビタミン E 添加 CLPE への MPC の至適処理条件として、紫外線照射強度、紫外線照射時間、MPC モノマー濃度について検討した。紫外線照射強度を制御することで PMPC 層の密度が制御でき、5.0 mW/cm² 以上に至適条件があることがわかった。紫外線照射時間を制御することで、PMPC 層の被覆率を制御することができ、45 分以上の重合によって、基材全体が均一な PMPC 層で被覆されることが確認された。MPC モノマー濃度を制御することで、PMPC 層の厚みを制御することができ、0.33~0.50 mol/L が至適条件であることがわかった。以上の結果より、ビタミン E 添加 CLPE への PMPC 処理至適条件を

確立できた。抗酸化性と耐摩耗性を併せ持つ人工関節の実現が期待される。

多方向摩耗の基礎検討では、ビタミン E 添加 CLPE における PMPC 処理の摩耗低減効果を、pin-on-disk 型摩耗試験装置を用いて、股関節における摩擦摩耗動作を想定した摩耗特性(多方向摺動)試験によって評価した。この結果、PMPC 処理により、その摩耗量は 4 分の 1 以下となり、耐摩耗性が向上することが確認された。また、摺動面の変形量を計測したところ、PMPC 処理により最大変位は約 75%に、変形体積は約 60%に抑制されていた。ビタミン E 添加 CLPE は耐摩耗性と抗酸化性を併せ持つ新しい人工関節材料として期待されることが示唆された。

摩耗抑制効果の応用検討では、MPC 処理を施したビタミン E 添加 CLPE の耐摩耗特性を評価するため、手術後の歩行を再現する股関節シミュレーターを用い Co-Cr-Mo 合金骨頭と組み合わせて ISO 規格 14242-3 に準じた試験を行った。まず、重量変化から摩耗量を計測すると、未処理の CLPE が重量減少を示し、摩耗しているのに対し、MPC 処理を施したビタミン E 添加 CLPE ではこのような傾向が見られず、摩耗は抑制されていた。また、試験終了後のライナー表面を三次元解析装置、レーザー顕微鏡で解析すると、MPC 処理を施したビタミン E 添加 CLPE ではほとんど摩耗がみられなかった。さらに、摩耗粉を抽出して解析しても、個数・面積・体積とも、MPC 処理を施したビタミン E 添加 CLPE で

顕著に抑制されることが明らかとなり、優れた耐摩耗特性を有することが明らかとなった。

抗感染性の検討では、検討の前提として、タンパク質吸着に影響を与える材料表面の親水性と表面電荷を評価した。この結果、MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレンの表面は、親水性の高い、電気的中性の表面を有していることが明らかとなった。生体内においては、インプラント表面にまずタンパク質が吸着し、この吸着層に細菌が接着することから、細菌付着の抑制が期待できる。さらに、次年度以降の検討に備え、既に MPC 処理方法を確立している金属試験片を用いて、「細菌付着抑制効果を検討するための実験系」の構築を行った。この結果、金属片を用いた検討ではあったが、MPC 処理により、バイオフィーム形成の端緒となる「菌の付着」が顕著に阻害されたことから、MPC 処理を施したビタミン E 添加架橋ポリエチレンの表面においてもバイオフィーム形成を防止する効果が期待される。

E. 結論

以上の研究成果は、革新的な人工股関節の創出が十分に期待できる内容であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1.論文発表

- 1) Nam K, Tsutsumi Y, Yoshikawa C, Tanaka Y, Fukaya R, Kimura T, Hanawa T, Kishida A: Preparation of novel polymer- metal oxide nanocomposites with nanophase separated hierarchical structure. ***Bull Mater Sci*** (in press).
- 2) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Saiga K, Hashimoto M, Tanaka S, Ito H, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Takatori Y: Grafting of poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on polyethylene liner in artificial hip joints reduces production of wear particles. ***J Mechan Behav Biomed Mater*** (in press).
- 3) Lee S, Matsuno R, Ishihara K, Takai M: Electron transfer with enzymes on nanofiliform titanium oxide films with electron-transport ability. ***Biosens Bioelectron*** (in press).
- 4) Byambaa B, Konno T, Ishihara K: Photoresponsive and cytocompatible polymer substrate for maintaining higher functionality of photoinduced detached cells. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*** (in press).
- 5) Fukazawa K, Li Q, Seeger S, Ishihara K: Direct observation of selective protein capturing on molecular imprinting substrates. ***Biosens Bioelectron*** (in press).
- 6) Oka H, Akune T, Muraki S, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K,

- Yoshimura N: The mid-term efficacy of intra-articular hyaluronic acid injections on joint structure: a nested case control study. *Mod Rheumatol* (in press).
- 7) Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Physical performance, bone and joint diseases, and incidence of falls in Japanese men and women: a longitudinal cohort study. *Osteoporos Int* (in press).
- 8) Taketomi S, Inui H, Nakamura K, Hirota J, Takei S, Takeda H, Tanaka S, Nakagawa T: Three-Dimensional Fluoroscopic Navigation Guidance for Femoral Tunnel Creation in Revision Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthroscopy Techniques* (in press).
- 9) Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H. *Nocardia elegans* infection involving purulent arthritis in humans. *J Infect Chemother* (in press).
- 10) Silberberg Y, Mieda S, Amemiya Y, Sato T, Kihara T, Nakamura N, Fukazawa K, Ishihara K, Miyake J, Nakamura C: Evaluation of the actin cytoskeleton state using an antibody-functionalized nanoneedle and an AFM Original Research Article. *Biosens Bioelectron* (in press).
- 11) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Akune T: Does mild cognitive impairment affect the occurrence of radiographic knee osteoarthritis? A 3-year follow-up in the ROAD study. *BMJ Open* (in press).
- 12) Muraki S, Akune T, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: Risk factors for falls in a longitudinal population-based cohort study of Japanese men and women: The ROAD Study. *Bone* 52(1): 516-23, 2013.
- 13) Lin X, Konno T, Takai M, Ishihara K: Redox phospholipid polymer microparticles as doubly functional polymer support for immobilization of enzyme oxidase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 857-63, 2013.
- 14) Oshima Y, Seichi A, Takeshita K, Chikuda H, Ono T, Baba S, Morii J, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S: Natural course and prognostic factors in patients with mild cervical spondylotic myelopathy with increased signal intensity on t2-weighted magnetic resonance imaging. *Spine* 37(22):1909-13, 2012.
- 15) Kawashita M, Kamitani A, Miyazaki T, Matsui N, Li Z, Kanetaka H, Hashimoto M: Zeta potential of alumina powders with different crystalline phases in simulated body

- fluids. *Materials Science Engineering C* 32: 2617-2622, 2012.
- 16) Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T, Kanetaka H, Hashimoto M: MC3T3-E1 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. *Key Engineering Materials* 529-530: 365-369, 2012.
- 17) Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis and knee pain in Japanese men and women: a longitudinal population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 64(5): 1447-56, 2012.
- 18) Masuda K, Chikuda H, Yasunaga H, Hara N, Horiguchi H, Matsuda S, Takeshita K, Kawaguchi H, Nakamura K: Factors affecting the occurrence of pulmonary embolism after spinal surgery: data from the national administrative database in Japan. *Spine J* 12(11): 1029-34, 2012.
- 19) Nagata K, Yoshimura N, Muraki S, Hashizume H, Ishimoto Y, Yamada H, Takiguchi N, Nakagawa Y, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshida M: Prevalence of cervical cord compression and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: the wakayama spine study. *Spine* 37(22):1892-8, 2012.
- 20) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage* 20(11): 1217-26, 2012.
- 21) Hashimoto M: Evaluation method of artificial joint. *J Soc Inorg Mater Japan* 19: 480-485, 2012.
- 22) Sakai N, Hagihara Y, Furusawa T, Hosoda N, Sawae Y, Murakami T: Analysis of biphasic lubrication of articular cartilage loaded by cylindrical indenter. *Tribology International* 46: 225-36, 2012.
- 23) Muraki S, Akune T, Oka H, Ishimoto Y, Nagata K, Yoshida M, Tokimura F, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Incidence and risk factors for radiographic lumbar spondylosis and lower back pain in Japanese men and women: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage* 20(7): 712-8, 2012.
- 24) Hieda J, Niinomi M, Nakai M, Kamura H, Tsutsumi H, Hanawa T: