

レーザー光による測定（レーザー像および形状測定）を行った。レーザー顕微鏡は共焦点光学系を持ち、焦点があった時のみ大きな信号（反射光）が得られることから、高さ（z軸）方向の走査により信号の最大点を検出し、その時のz軸位置から高さ情報が得られる。さらに水平（x軸、y軸）方向に走査することにより、3次元の立体形状が得られる。また、レーザー像は各点での最大の信号強度から得られる。

## 結 果

Virginに20kgの荷重を加え、コの字運動を与えた場合、10万サイクルの時点では摺動部の表面は平滑で光沢がありデラミネーションの発生は認められなかったが、16万サイクルでは、摺動部全域で大きな起伏が見られ、デラミネーションの発生が認められた（図1）。一方、往復動を与えた場合は100万サイクルを経過しても摺動部表面は滑らかであり、デラミネーションは発生しなかった。これに対してagedの場合、5kgの荷重で往復動を加えた場合を除き、いずれの条件でも100サイクルまでにデラミ

ネーションが発生した（図2）。ただし、コの字運動の方が往復動よりも、高荷重のほうが低荷重よりも、それぞれより広範囲でデラミネーションが発生していた。この中で、表層は滑らかでデラミネーションの発生が認められないものの、白色で輝度の高い部分が数カ所観察された（その一例を図2中に矢印で示す）。これは、表面下に発生した内部クラックではないかと考え、この部分の試料表面が範囲に入らないようにスキャン範囲を制限した上で再度レーザー観察を行った。通常の観察（図3-(a)上）では試料表面が全て観察できるよう、深さ方向の観察範囲を充分広く設定して全層を観察する。この場合、最もレーザー光の反射が大きい試料表面のデータのみが取得され、内部クラックは観察されない（図3-(a)下）。一方、内部クラック上部の試料表面が観察範囲に含まれないよう制限して観察する（図3-(b)上）と、その位置では内部クラックからの反射が相対的に最大となるため、内部クラックが観察できる（図3-(b)下）。ただしこの場合、試料表面が含まれず内部クラックもない場所ではレーザー光の

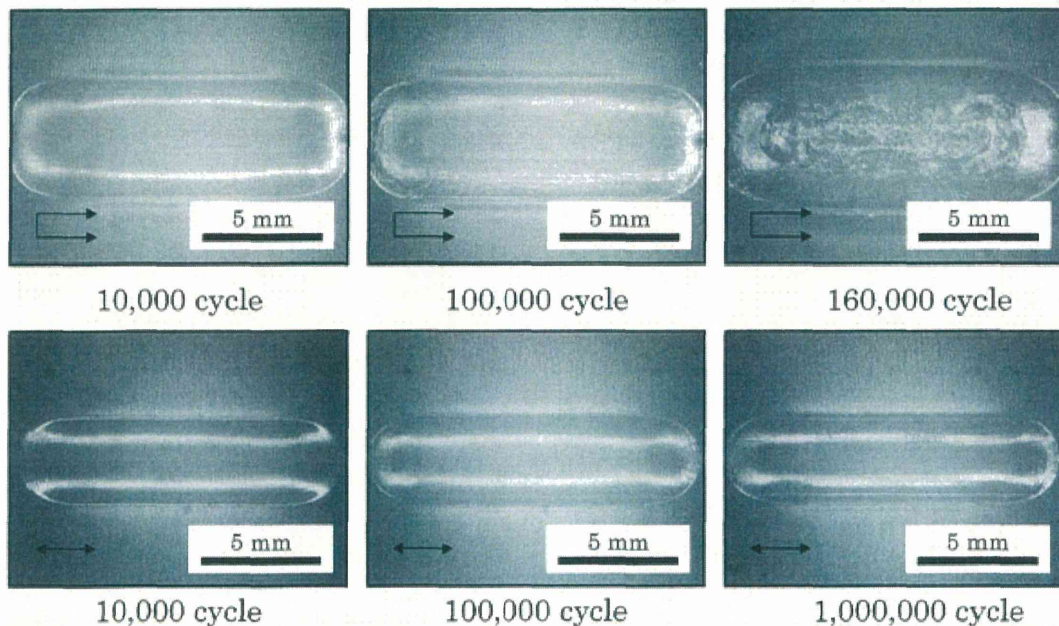


図1. Optical microscopic images of virgin specimens. Upper row shows those tested under U-shaped motion. Lower row shows those tested under simple reciprocating motion. Arrows indicate sliding direction.

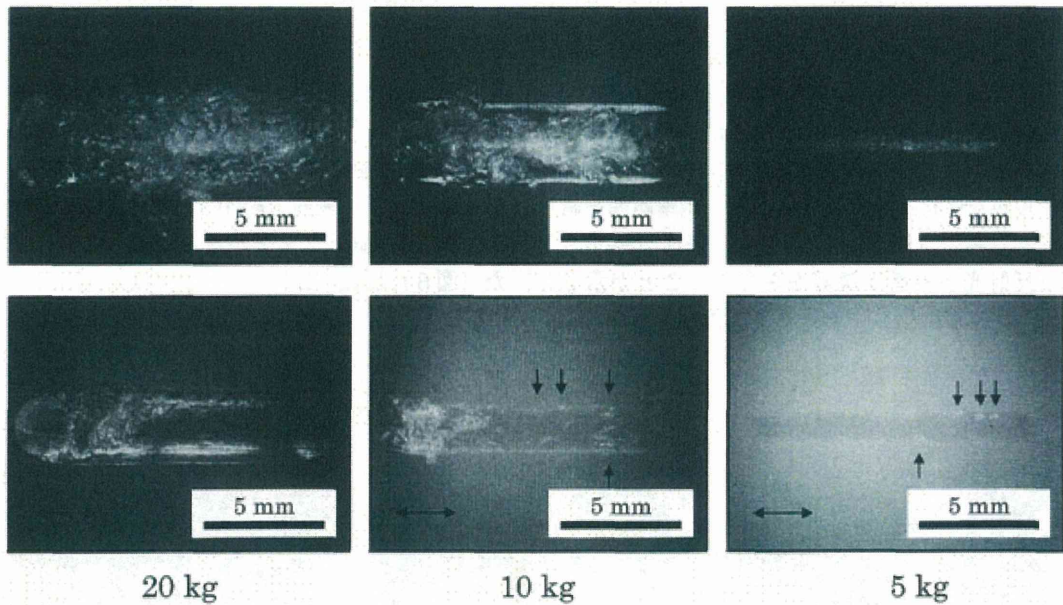


図2. Optical microscopic images of aged specimens. Upper row shows those tested under U-shaped motion. Lower row shows those tested under simple reciprocating motion. Two direction arrows indicate sliding direction. Short arrows indicate bright spots.

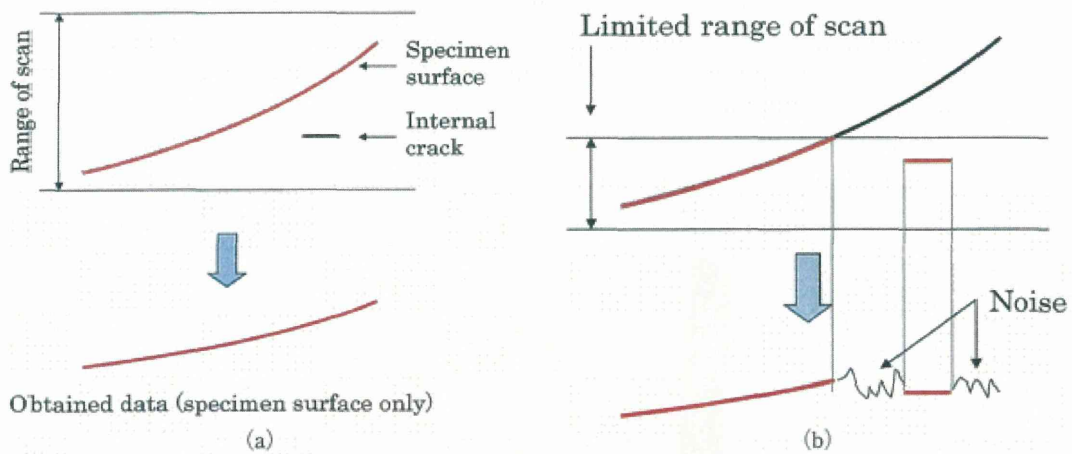


図3. Schema of the method to observe internal cracks. (a) Ordinary method scanning the full range can observe the specimen surface only. (b) Novel method limiting the range of the scan can observe part of the specimen surface, an internal crack and noise.

反射がほとんどないため、ノイズの大きなデータとなる。輝度が高かった部分の拡大図を図4に示す。なお、この例における全層スキャンのz軸方向の走査範囲は約40 $\mu$ m、制限スキャンでは深部の内部クラックを含める必要があるため約80 $\mu$ mであった。なお、全層スキャンで深部まで測定範囲に含めても、表面での反射が大

きいため結果は同じである。カラー像(図4-(a))では輝度の高い部分(図中、破線付近)がかろうじて確認されるが、全層のレーザー像(図4-(b))では試料表面のみが観察され、内部クラックは全く観察されない。これに対し、観察範囲を制限した場合のレーザー像(図4-(c))ではカラー像で輝度が高かった場所(図



中破線付近)で表面以外からの反射光が明確に確認された。材料内部の異物でも反射は起こるが、異物が混入する可能性は考えにくいため、内部クラックと判断した。同じ部分の形状測定結果でも、全層(図5-(a))では試料表面の滑らかな性状が確認できる一方、観察範囲を制限した場合(図5-(b))では、表面以外からの反射光が表面下深部からであることが示され、これが内部クラックであることを再確認

されるとともに、その深さ方向の位置が示された。同じ場所の断面プロファイル(ここでは図4あるいは図5中央の摺動方向と垂直な面を使用)について、全層の形状測定結果と観察範囲を制限した場合の形状測定結果を重ね合わせることで、表面下約70 $\mu\text{m}$ のところ幅約200 $\mu\text{m}$ の内部クラックがあることが確認された(図6)。

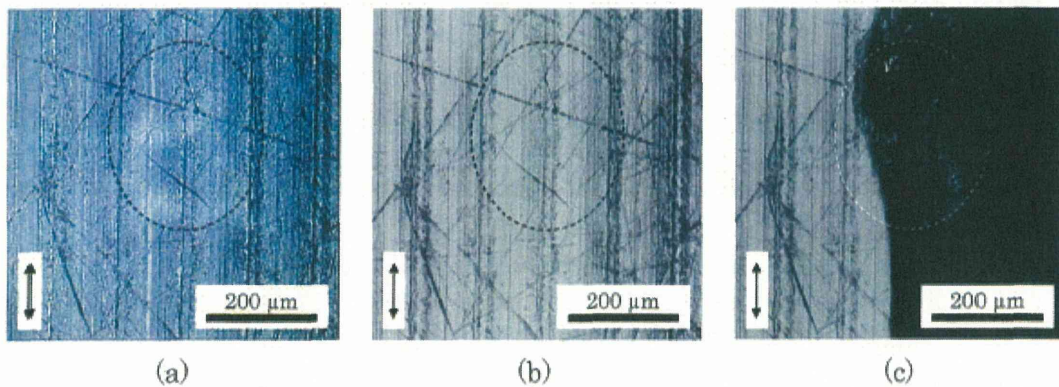


図4. Magnified images of the internal crack. (a) Color image, (b) laser image (full range of scan) and (c) laser image (limited range of scan). Arrows indicate sliding direction. Broken lines indicate estimated position of the internal crack.

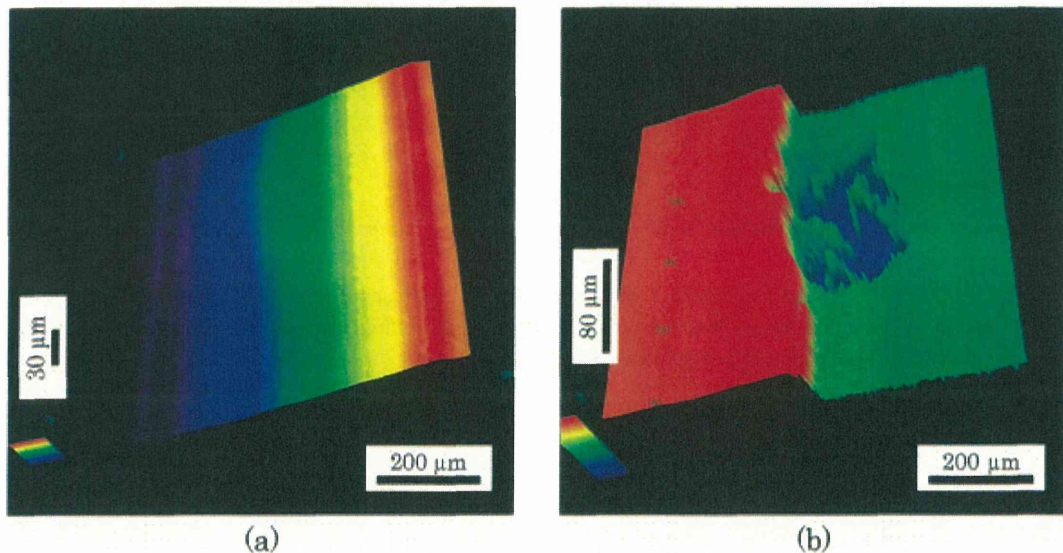


図5. Three-dimensional profile of the internal crack. (a) Result of full range of scan showing smooth specimen surface only. (b) Result of limited range of scan showing the internal crack (shown in blue) surrounded by noise area (shown in green).

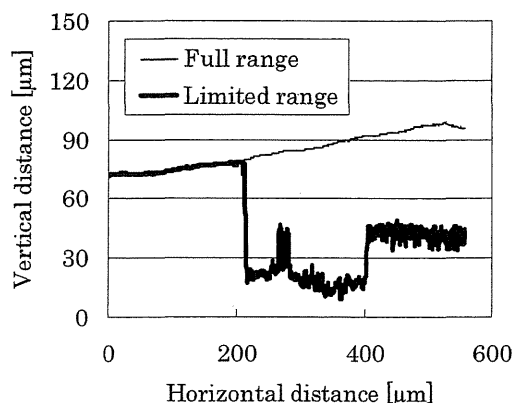


図6. Cross-section of the internal crack.

### 考 察

3次元測定レーザー顕微鏡は、可視光による観察（カラー像）と、レーザーを用いた観察（レーザー像）および形状測定が可能である。本研究では、内部クラックがあった場合、カラー像において輝度の高い部分として観察されることがわかった。レーザー像では、通常的全層の観察ではレーザーの反射率が最も高い試料表面のみが観察されるが、観察範囲を試料表面を含まないように制限することで内部クラックの観察および形状測定が可能であることがわかった。これにより、内部クラックの位置、深さ、大きさが定量的に評価可能であった。

一方、デラミネーションが既に発生している部分では、内部クラックがほとんど観察されなかった（図示していない）。この理由として、デラミネーション発生の結果として内部クラックが表面に露出したことのほかに、デラミネーションが発生した表面の起伏が大きく、内部クラックが観察しにくいことが考えられた。また、*virgin*の試料では内部クラックが観察されなかった。その理由として、内部クラックの発生とデラミネーションの発生の間でタイミングよく観察できなかった可能性と、*virgin*ではデラミネーション発生機構が異なり、デラミネーションに先立って内部クラックが発生していない可能性や、より深層にクラックが発生していた可能性も考えられた。今後の検討が必要

と思われる。

今回観察された内部クラックは、表面下約70  $\mu\text{m}$ の深さにあった。これは成型前の原料粉の大きさ（約80  $\mu\text{m}$ ～130  $\mu\text{m}$ ）にほぼ相当する。内部クラックの発生部位として原料粉の粒界が指摘されて<sup>10)</sup>おり、関連性が考えられる。

内部クラックの評価法としては、超音波を使用する方法<sup>10)</sup>が報告されている。しかし、この方法では個々のクラックの大きさや深さについては報告されていない。また、表面から0.2 mm以下の浅い部分については、表面からの反射が大きいため測定ができない。これに対して、本研究の方法では、個々のクラックの場所と大きさが評価可能であった。ただし、より深いところに発生したクラックは光の反射が弱いため観察できていない可能性がある。

本研究において使用したデラミネーションの再現試験法や、今回確立した内部クラックの観察法は、デラミネーション発生機構の解明や、新材料のデラミネーション特性の評価、デラミネーションを発生しない新材料の開発などにつながることを期待される。

### 結 論

デラミネーションを再現する耐久性試験を行った試料を3次元測定レーザー顕微鏡で観察した結果、内部クラックを観察し、その大きさと深さを測定できた。これにより、デラミネーションの発生機構の解明などにつながることを期待される。

### <謝 辞>

本研究は安心安全次世代医療機器事業費による成果である。

### 文 献

- 1) ASTM F2003-00: Standard guide for accelerated aging of ultra-high molecular weight polyethylene. Method B.
- 2) ISO 14242-1: 2002 Implants for surgery — Wear of total hip-joint prostheses — Part 1: Loading and displacement parameters for wear-testing

- machines and corresponding environmental conditions for test.
- 3) ISO 14243-1 : 2009 Implants for surgery — Wear of total knee-joint prostheses — Part 1 : Loading and displacement parameters for wear-testing machines with load control and corresponding environmental conditions for test.
  - 4) 平成21年3月6日付け 薬食機発第0306001号 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「人工股関節の審査ガイドラインについて」
  - 5) 平成21年3月6日付け 薬食機発第0306004号 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「人工膝関節の審査ガイドラインについて」
  - 6) 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.
  - 7) 迫田秀行, 鄭徳泳 他 : 人工関節の不具合要因分析 第二報 人工股関節. 臨床バイオメカニクス 30 : 319-323, 2009.
  - 8) 迫田秀行, 松岡厚子 : 超高分子量ポリエチレンのデラミネーション破壊発生特性評価法の開発. 第23回 バイオエンジニアリング講演会 23 : 8B-16, 2011.
  - 9) Shibata N, Tomita N et al. : Defect initiation at subsurface grain boundary as a precursor of delamination in ultrahigh molecular weight polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research* 67A : 276-284, 2003.
  - 10) Tomita N, Kitakura T et al. : Prevention of fatigue cracks in ultrahigh molecular weight polyethylene joint components by the addition of vitamin E. *Journal of Biomedical Materials Research* 48 : 474-478, 1999.

## 人工関節摺動面用材料の形状変化による 摩耗量評価の可能性の検討

迫田 秀行<sup>\*1</sup> 京本 政之<sup>\*2</sup> 井上 祐貴<sup>\*2</sup> 石原 一彦<sup>\*2</sup> 松岡 厚子<sup>\*1</sup>

Possibility of wear property evaluation of articulating materials for artificial joints by the geometric method.

Hideyuki SAKODA, PhD., Masayuki KYOMOTO, PhD., Yuuki INOUE, PhD.,  
Kazuhiko, ISHIHARA, PhD., Atsuko MATSUOKA, PhD.

### Abstract

Since wear debris generation on the bearing surfaces of artificial joints has been found as a cause of joint loosening, research on more wear-resistant material has been actively carried out. Many reports of negative wear on such novel wear-resistant materials, however, strongly indicate that the existing wear evaluation method is inappropriate to evaluate the low wear of these materials.

The latest laser microscope has a resolution of 1 nm, which provides the possibility of geometrical evaluation of very low wear. In this study, we investigated the effects of soaking and loading on the weight and dimensions of some bearing materials in order to discuss the possibility of a geometric method, instead of the existing gravimetric method for evaluation of wear.

Ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) and two polyetheretherketone (PEEK) materials (PEEKs, PEEK and carbon fiber-reinforced PEEK) were machined into wear pin specimens and soaked in bovine serum-based lubricant under or without a load. Weight and height of the specimens were periodically measured after washing.

Amount of water absorption of PEEKs was 30 times higher than that of UHMWPE and the weight of PEEKs was not stable during weighing. UHMWPE showed height change of 0.7% under a load of 20 kg while PEEKs showed no change irrespective of loading.

The marked water absorption and dimensional stability of PEEKs indicate that the geometric method is more suitable for these materials than the gravimetric method.

Key words : artificial joint, wear test, UHMWPE, PEEK.

- ※ 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 東京大学大学院 工学系研究科  
〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

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

人工関節の摺動面における摩耗と摩耗粉の発生は人工関節のゆるみの原因となるため、摺動面用材料の低摩耗化の研究が行われてきた<sup>4)</sup>。従来の超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) に比べ摩耗量が大幅に低下した高度架橋 UHMWPE が実用化されているほか、更なる摩耗量の低減を目指した新材料やコーティングの検討、開発、応用がなされている。

それら新材料の摩耗量評価は重量測定により行われているが、報告される摩耗量が負という場合もある。すなわち、UHMWPE の摩耗量評価のために確立された従来の摩耗量測定法<sup>1)</sup>では、これら新材料の少ない摩耗量を正しく評価できていない可能性が高い。従って、これら新材料の摩耗量を正しく評価できる新規の方法が必要である。

摩耗量の評価方法として、現在行われている重量測定による方法の他に、形状測定による方法が考えられる。例えば、摺動面が直径 6 mm (面積約 28mm<sup>2</sup>) のピンオンプレート型摩耗試験を想定し、試験材料の密度を 1 g/cm<sup>3</sup> と仮定すると、筆者らが使用している天秤の分解能である 1 μg の重量変化は 36nm の高さ変化に相当し、これはレーザー顕微鏡の分解能である 1 nm より大きいいため、測定機器の能力としては不可能ではない。一方、重量による場合は水分量、埃やタンパク質などの汚れの吸着、脂質な

どの浸入、形状による場合はクリープなどの変形や熱膨張がそれぞれ誤差の要因として考えられるが、これらの大小は試験材料により大きく異なる。

そこで本研究では、UHMWPE と人工関節摺動面への応用が検討されているポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 系の材料<sup>2),3)</sup>を対象として、潤滑液中への浸漬と荷重が種々の材料の水分吸収量と寸法に与える影響について評価し、形状変化による摩耗量評価の可能性について検討を行った。

## 材料および方法

UHMWPE (GUR 1020), PEEK (450G), 炭素繊維強化 PEEK (CFR-PEEK, スミプロイ CK4600) を用いて、高さ 16mm, 直径 10mm, 摺動面直径 6 mm のピンを作製した (UHMWPE は n = 11, 他は n = 6)。これらを、ウシ血清を含む潤滑液 (タンパク質濃度 20g/l, 20mmol EDTA, 0.1% アジ化ナトリウム) に浸漬した。ASTM 規格<sup>1)</sup> に準拠したプロトコルに従い洗浄後、重量測定およびマイクロメータ (ミットヨ, MDC-25MJ, 最小表示量 1 μm) による高さ寸法測定を行った。重量測定および寸法測定は室温で行い、それぞれ 3 回繰り返した。荷重による吸水量への影響を調べるため、一部 (各 n = 3) は摩耗試験を想定した 20kg の荷重下で浸漬した。具体的には、二次元摩耗試験機 (エムエステック) に装着し、荷重を加え、潤滑液

中で静置した。洗浄、重量測定、寸法測定は同様にを行った。

### 結 果

図1に非荷重における重量変化を示す。PEEKおよびCFR-PEEK（以下、PEEK系材料）では重量増加が100日以上継続し、UHMWPEの約30倍吸水した。図2に各材料の荷重下と非荷重における重量変化を示す。UHMWPEでは荷重下において重量の増加が大きくなる傾向が見られたのに対し、PEEK系材料では、荷重による重量変化への影響は見られなかった。図3に重量測定中の重量変化を示す。UHMWPEでは測定中（測定間隔6～8分）の重量変化はなかったが、PEEK系材料（測定間隔3～4分）では、重量の減少が認められた。図4に各ピンの寸法変化を材料毎に示す。いずれにおいても荷重および非荷重のピンをまとめて図示している。UHMWPEでは、荷重による寸法減少が明確で、およそ0.1mm（約0.7%）寸法が減少することがわかった。浸漬44日目に荷重するピンを交代しているが、荷重したピンは同様に寸法が減少している。これに対しPEEK系材料では、荷重の有無による影響は見られず、寸法変化は概ね5 $\mu$ m（約0.03%）以下であった。

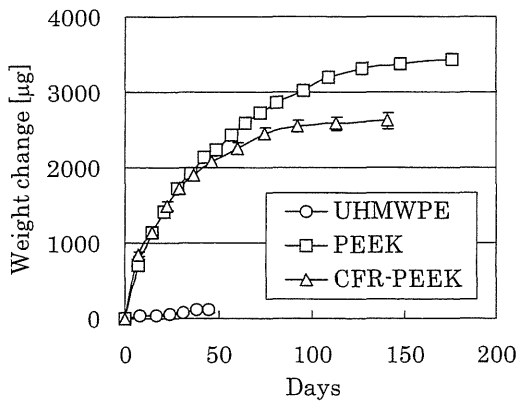
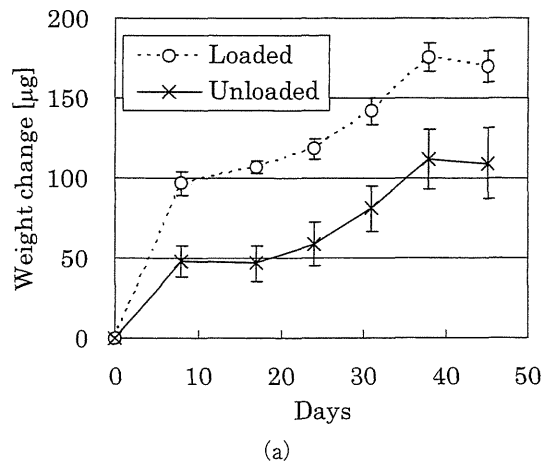


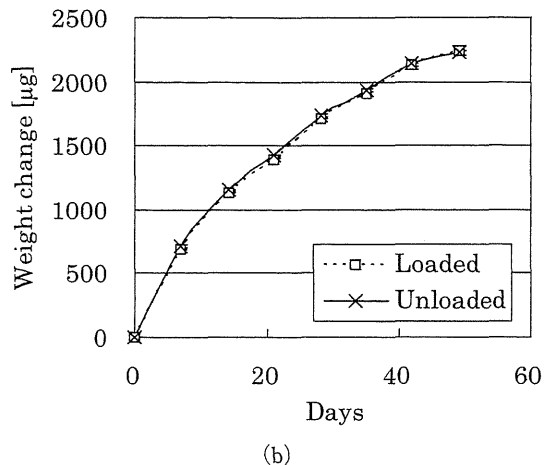
図1. Weight change of specimens without loading.

### 考 察

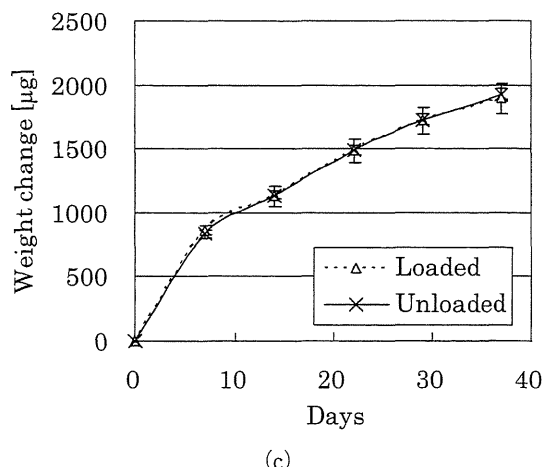
McKellopら<sup>5)</sup>は、UHMWPEの摩耗量の評価方法について検討し、形状変化による方法で



(a)



(b)



(c)

図2. Effect of loading on the weight of specimens. (a) UHMWPE, (b) PEEK and (c) CFR-PEEK.



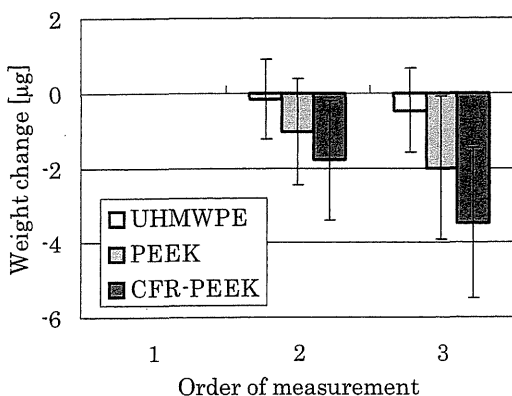
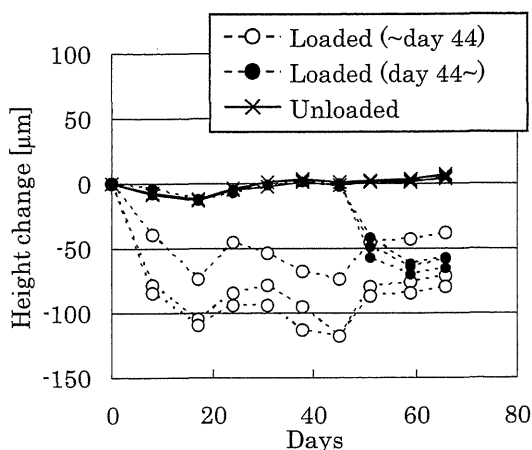


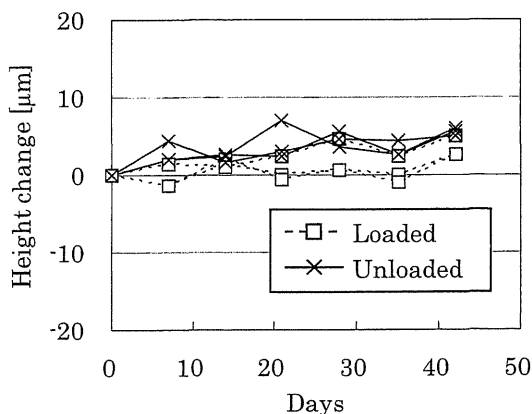
図3. Weight change of specimens during weighing.

はクリープ変形の影響を除去し難いこと、重量変化による方法では吸水による影響があるものの、その影響は試験前の浸漬と吸水量を相殺するためのコントロール試料の採用により充分低減できることを示した。現在の摩擦量測定法<sup>1)</sup>も、これを踏襲している。本研究でも、UHMWPEは吸水量が少ない一方、荷重により容易に変形するため、重量測定による摩擦量評価が有利であることが確認された。これに対し、PEEK系材料では吸水量がUHMWPEの約30倍であることに加え、洗浄プロトコルで脱水を行っていても測定中に重量減少が生じることから、重量による方法では誤差を生じやすく、UHMWPEの重量測定を目的に作成された従来法をそのまま応用することは好ましくないと言える。一方、荷重による寸法変化はほとんどなく、形状が極めて安定していることから、形状による方法を用いることで重量による方法よりも誤差を低減し精度高い評価ができる可能性がある。

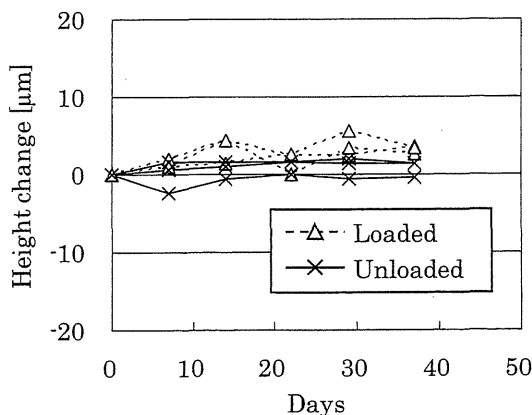
UHMWPE, PEEK, CFR-PEEKの蒸留水中での吸水率はそれぞれ、 $<0.01\%$ ,  $0.14\%$ ,  $0.06\%$ であり、潤滑液中で試験を行った今回の結果もほぼ一致した。UHMWPEは極性がないメチレン基のみで構成されているのに対し、PEEKでは極性が強いケトンが含まれているため、PEEKの吸水量の方が多くなったと考えられる。CFR-PEEKは、PEEKに30%の短い炭素繊維を加えたものであり、炭素繊維が加えられた分だけ吸水量が低下したと思われる。



(a)



(b)



(c)

図4. Effect of loading on the dimension of specimens. (a) UHMWPE, (b) PEEK, and (c) CFR-PEEK.

UHMWPEでは荷重下の方が多く吸水していたが、その原因として、荷重に伴う圧力により水分あるいは潤滑液中の脂質の浸入が促進された可能性が考えられる。しかし、その詳細についてはまだ不明であり、今後の検討が必要と思われる。

試料には潤滑液に含まれる血清由来のタンパク質が付着しているため、既存の方法では洗剤を用いた擦り洗いが求められている<sup>1)</sup>。近年、親水性コーティングを施した材料が実用化されたが、洗浄によりコーティングが傷つけられる可能性がある。これに対し、形状による摩耗量測定では水分量の制御や付着物の除去のための洗浄を簡略化でき、また、レーザー顕微鏡などによる非接触での測定はコーティングを傷つける可能性も避けられる。すなわち、このような材料の場合に特に形状による方法の優位性が顕著になると結論できる。

しかしながら、形状による方法では、基準となる面を適切に設定しないと測定が難しいため、形状測定による方法に適した試験片形状および摩耗試験方法についてはさらなる検討が必要である。

## 結 論

水分量や寸法の安定性は材料によって大きく異なるため、材料によっては重量による従来の摩耗量の評価法よりも、形状による摩耗量の評価の方が精度高い評価ができる。

## <謝 辞>

本研究は厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究H22-医薬-一般-009による成果である。

## 文 献

- 1) ASTM F732-00 : Standard test method for wear testing of polymeric materials used in total joint prostheses.
- 2) Brockett CL, John G et al. : Wear of ceramic-on-carbon fiber-reinforced poly-ether ether ketone hip replacements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* : Mar 27, 2012. [Epub ahead of print]
- 3) Howling G, Sakoda H et al. : Biologicdal response to wear debris generated in carbon based composites as potential bearing surfaces for artificial hip joints. *Journal of Biomedical Materials Research* 67B : 758-764, 2003.
- 4) Kurtz SM, Muratoglu OK et al. : Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20 : 1659-1688, 1999.
- 5) McKellop H, Clarke IC et al. : Wear characteristics of UHMW polyethylene : A method for accurately measuring extremely low wear rates. *Journal of Biomedical Materials Research* 12 : 895-927, 1978.

# 生体人工材料表面におけるバイオフィーム形成

小関弘展 志田崇之 依田 周 堀内英彦 迫田秀行 尾崎 誠

## はじめに

体内に埋入する硬性人工材料は、その目的によって多種多様にわたって存在し、今日までの医学の進歩に大きく貢献してきた。整形外科分野においては、生体親和性や耐腐食性などの機械的特性を有する人工生体材料が使用され、プレートや髄内釘、人工関節や脊椎インストゥルメントなど繁用性が高い。しかし一方で、こうした人工生体材料は細菌感染に対して不利であり、インプラント関連感染症の温床となる危険性も併存する。細菌が生体材料表面に付着、増殖すると、glycoproteinなどのムコ多糖類を分泌して、細菌集団の周囲にバイオフィームを形成する。バイオフィームに包まれた細菌群は生体の免疫機構や抗菌薬から免れることが可能となるため、きわめて難治性となる<sup>1),2)</sup>。

## Key words

バイオフィーム(biofilm)  
生体材料(biomaterial)  
インプラント関連感染症(implant-related infection)

インプラント関連感染症の病原菌としては、ブドウ球菌属が過半数を占め<sup>3)</sup>、特に表皮ブドウ球菌の生体材料表面への付着能や集簇能は高く、多くの生体材料表面にバイオフィームを形成することができる<sup>4)-7)</sup>。整形外科分野で使用される生体人工材料は、チタンやステンレス、コバルトクロムや超高分子量ポリエチレンなど数種類の材料が、その用途に応じて使用されている。

Steinbergら<sup>8)</sup>は、チタンとチタン合金表面への細菌付着性に違いがあることを報告した。近年、歯科分野では母床となる硬性材料自体が有する表面の物理的特性が、バイオフィーム形成に影響を与えるという報告が散見される<sup>9),10)</sup>。しかし、インプラント関連感染症を前提に、生体材料間の時間軸におけるバイオフィーム形成過程を比較した文献は、著者らが渉猟しえた限り認められない。

本研究では、臨床で実際に応用されているコバルトクロム、チタン合金、純チタン表面における表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成能を *in vitro* で比較、検討した。

Biofilm formation on solid biomaterials

0286-5394/13/¥400/論文/JCOPY

H. Koseki : 医療法人和仁会 和仁会病院整形外科

T. Shida, I. Yoda, H. Horiuchi, M. Osaki : 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科学

H. Sakoda : 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

## 対象と方法

医療用品質のコバルトクロム (ASTM F75 high carbon), チタン合金 (ASTM F136), 純チタン (ASTM F-67) 製の円盤状基板 (直径12mm, 厚さ6mm) を作製した。試験片表面を洗浄滅菌後, 試料台に電導テープで固定し, 走査型電子顕微鏡 (SEM: JSM-6610LV, JEOL, Tokyo, Japan) で表面を観察した。粗さ測定は, 各材料の基板3個ずつの中央と辺縁の2カ所 (合計6カ所) を三次元形状測定レーザー顕微鏡 (OLS4000, Shimadzu) で計測した (粗さ測定モードは対物レンズ50×で, カットオフ $\lambda_c=80\mu\text{m}$ とした)。

ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis* strain RP62A < ATCC35984 >) を 37℃ の trypticase soy broth (TSB) 培地内で24時間培養し,  $7.5 \times 10^7$  CFU/mL (対数増殖:  $\text{OD}_{600}=0.2$ ) の菌液を作製した (pH 7.0)。菌液3mLで満たしたポリスチレン製容器 (12 well plate) 内に, 超音波洗浄と高圧蒸気滅菌した各基板を3分間浸漬した。取り出した基板表面を phosphate-buffered saline (PBS) で2回リンス後, 新鮮な TSB 培地内に移して培養した (培養時間: 2時間, 4時間, 6時間)。基板表面をエタノール固定し, クリスタルバイオレットで染色したバイオフィルムをデジタル実体顕微鏡で撮影した。得られた任意9カ所の画像を分析して, Kajiyamaら<sup>7)</sup>の方法に準じてバイオフィルム占拠率 (biofilm coverage rate; BCR) を算出した。

上記操作を7回ずつ施行し, 各材料間での BCR 値を統計学的に比較した (一元配置分散分析法: ANOVA, 多重比較検定)。

## 結果

基板の表面SEM像を図1に示す。いずれも線状の研磨痕を認めるが, コバルトクロムは比較的線状痕が浅く, チタン合金や純チタンに見られる深い溝や粒状構造は認められなかった。表

面の粗さ測定では, コバルトクロム表面が平均2.3nmと比較的平滑であったのに対し, チタン合金と純チタンのRa値は, それぞれ平均17.2nm, 22.0nmと高かった(表1)。

すべての試験基板上でバイオフィルムは形成され, 培養時間が長くなるにつれてBCR値は上昇した。各培養時間におけるBCR値を図2に示す。2時間培養後のBCR値は, コバルトクロムが平均 $8.0 \pm 3.6\%$ , チタン合金が平均 $24.7 \pm 11.3\%$ , 純チタン平均 $22.7 \pm 5.8\%$ であり, コバルトクロムはチタン合金と純チタンよりもバイオフィルムの発育度が低かった ( $p < 0.01$ )。4時間培養すると, 全試験基板のBCR値は2時間値よりも上昇した。統計学的有意差はないものの, コバルトクロムのBCR値は, チタン合金と純チタンよりも低い傾向が認められた。6時間培養後のBCR値はコバルトクロムが最も低く, チタン合金との間に統計学的有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。培養2~6時間の経時の変化をみると, チタン合金と純チタンはほぼ同じ値で推移しており, コバルトクロムは一貫して比較的低い値を示した。

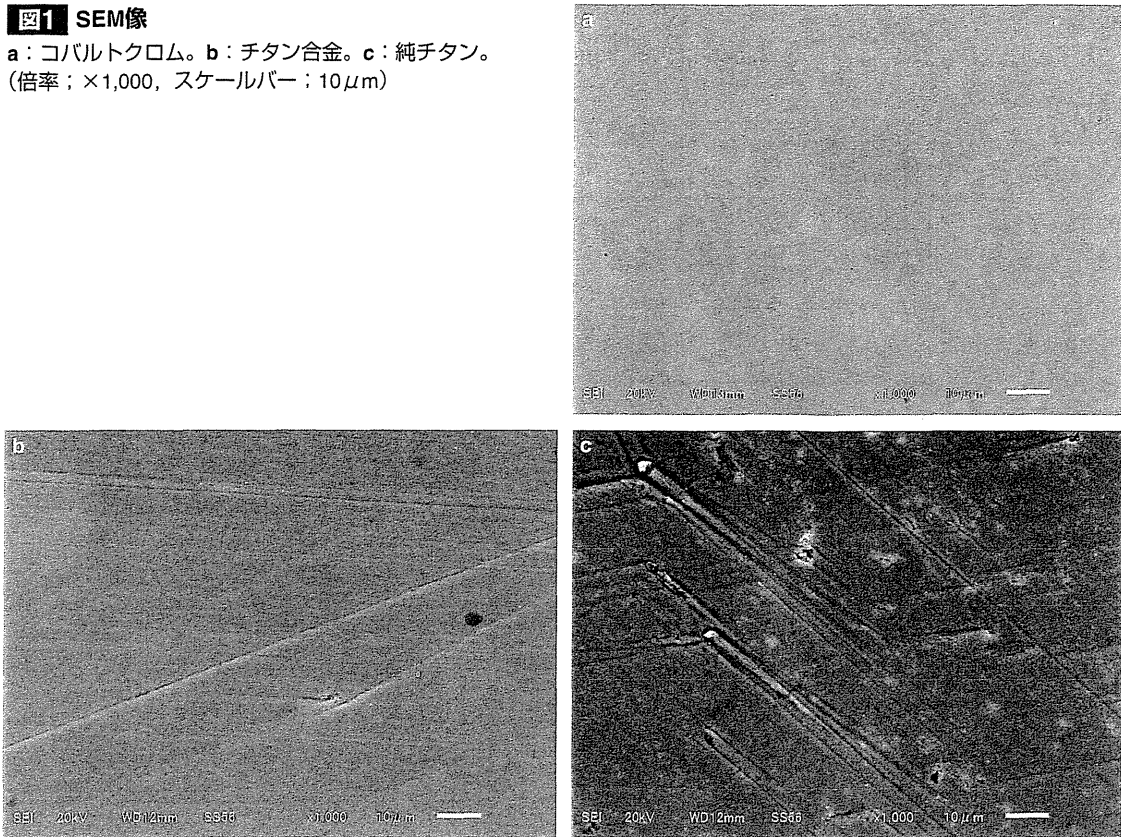
## 考察

表皮ブドウ球菌はヒトの皮膚などに常在する菌であるが, ひとたび生体人工材料表面に付着・増殖すると, バイオフィルムを形成してインプラント関連感染症を引き起こしやすい<sup>4)~7)</sup>。細胞外マトリックスによって庇護された細菌群は, 抗菌薬や宿主の免疫機能など外部からの侵襲に抵抗することができる。細菌にとっては潜在的に備わった自己防衛機能といえるが, 医療側にとっては治療の大きな障害となる<sup>1), 2)</sup>。従って, 表皮ブドウ球菌のバイオフィルムが形成しにくい材料を検討することは, 臨床的に重要な意味をもつ。

バイオフィルムの形成される過程は, van der Waals 引力によって引き寄せられた細菌が静電

**図1 SEM像**

a: コバルトクロム。b: チタン合金。c: 純チタン。  
(倍率: ×1,000, スケールバー: 10μm)



**表1 表面の粗さ**

	Ra (nm)	Rz (nm)
コバルトクロム	2.3±0.5	17.2±7.5
チタン合金	17.2±5.5	125.3±37.2
純チタン	22.0±6.0	177.5±54.9

Ra: 算術平均粗さ(粗さ曲線の標高の絶対値の平均値)。  
Rz: 最大高さ(中心線に平行な2線で粗さ曲線をはさんだときの2線間の距離)。

気反発力によるエネルギー障壁を超えて人工材料表面に到達し、可逆的-非可逆的付着(2段階付着機構)を経てコロニー形成に至る4-stageモデルが一般的であるが<sup>11)</sup>、実際は細菌側因子、生体内の環境因子、人工材料側因子が複雑に絡み合って起こる現象である。表皮ブドウ球菌の場合、AtIE, Embp, Fbeなどを含む自己溶解酵素やPIAなどの関与が示唆されている<sup>5),6)</sup>。本研

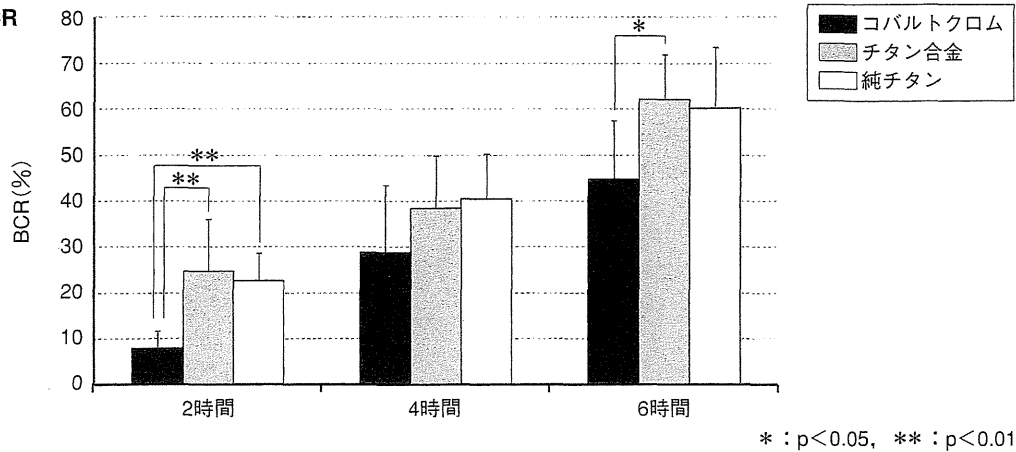
究では、RT-PCRにて*ica-A*遺伝子陽性のPIA産生株<sup>7)</sup>のみを使用し、細菌側の条件を統一するとともに、イオン強度などの環境因子の影響を排除して、一律の操作を繰り返し行った。

人工材料側因子に関しては、化学構造、表面の粗さ、親水性、Zポテンシャル、表面の自由エネルギーなどが挙げられている<sup>9),10),12),13)</sup>。しかし、ほとんどが口腔内環境を前提とした歯科インプラントに関する研究であり、生体内医療材料を対象としたものは少ない。Olsonら<sup>6)</sup>は、人工生体材料表面でのPIA産生型表皮ブドウ球菌の付着性を調査し、材料の種類によって差があることを報告したが、その原因や菌付着後のバイオフィーム形成に関しては言及していない。

本研究では、実際に使用されている3種類の生体人工材料を対象として、インプラント関連



図2 BCR



感染症の主因たるPIA陽性表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成能を比較した。

2時間培養後、コバルトクロムのBCR値はチタン合金と純チタンよりも低かった(p<0.01)。これは、表面の粗さがバイオフィーム形成初期に大きく関与したと考えられる。表面の粗さは、単に細菌が付着できる表面積が増加するだけでなく、細菌が付着・増殖しやすい足場の役目を果たす<sup>13)</sup>。in vivoでは、閾値(200nm)以下の表面粗さは細菌の付着性に影響しないという報告もあるが<sup>14)</sup>、今回のin vitro研究の結果からは、たとえ200nm以下の表面の粗さであっても、培養2時間時点のバイオフィーム形成度に影響を与えることが示唆された。一方、培養時間が4~6時間経過すると、すべての材料上のバイオフィームは発育、増殖したが、コバルトクロムのBCR値は2~6時間を通して最も低く、バイオフィームの発育が抑制されていた。最近の研究では、バイオフィームの成熟によって異なる材料間の特性は補正されるとしている<sup>15)</sup>。しかし、今回の結果では、表面が平滑なコバルトクロム

基板上では、培養6時間までバイオフィーム形成を阻害する、あるいは発育を遅らせる効果が認められた。これには、表面の粗さ以外の因子が関与している可能性もあるため、今後も検討を重ねていく必要がある。

本研究は、実際の生体内での複雑な現象を正確に再現したものとはいえないが、あらゆる環境因子を統一した初期実験として、純粋に各材料表面でのバイオフィーム形成能を比較することができた。

### まとめ

コバルトクロム、チタン合金、純チタン表面におけるバイオフィーム形成能を比較した。培養時間が長くなるに従ってすべての材料上のBCR値は上昇したが、コバルトクロムはほかの材料よりもバイオフィームが形成しにくい傾向が認められた。人工生体材料に発生するバイオフィームとインプラント関連感染症の病態解明に向けてさらなる研究が必要である。

文献

- 1) Stewart PS, et al : Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358 : 135-138, 2001.
- 2) Hoyle BD, et al : Bacterial resistance to antibiotics : the role of biofilms. *Prog Drug Res*, 37 : 91-105, 1991.
- 3) Chu VH, et al : *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with prosthetic devices : costs and outcomes. *Am J Med*, 118 : 1416, 2005.
- 4) Mack D, et al : Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem*, 387 : 399-408, 2007.
- 5) Fluckiger U, et al : Biofilm formation, ica ADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesion synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun*, 73 : 1811-1819, 2005.
- 6) Olson ME, et al : Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is augmented by PIA. *Clin Orthop Relat Res*, 451 : 21-24, 2006.
- 7) Kajiyama S, et al : Quantitative analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on the surface of biomaterial. *J Orthop Sci*, 14 : 769-775, 2009.
- 8) Steinberg D, et al : Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Implants Res*, 9 : 67-72, 1998.
- 9) Teughels W, et al : Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 17 : 68-81, 2006.
- 10) Subramani K, et al : Biofilm on dental implants : a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24 : 616-626, 2009.
- 11) Hori K, et al : Bacterial adhesion : From mechanism to control. *Biochem Eng J*, 48 : 424-434, 2010.
- 12) Katsikogianni M, et al : Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 7(8) : 37-57, 2004.
- 13) Scheuerman TR, et al : Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *J Col Interf Sci*, 208 : 23-33, 1998.
- 14) Bollen CM, et al : Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention : a review of the literature. *Dent Mater*, 13 : 258-269, 1997.
- 15) Al-Ahmad A, et al : Biofilm formation and composition on different implant materials *in vivo*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 95 : 101-109, 2010.

## TOPICAL REVIEW

# Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces

Yasuhiko Iwasaki<sup>1</sup> and Kazuhiko Ishihara<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-8680, Japan

<sup>2</sup> Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp and ishihara@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

Received 29 June 2012

Accepted for publication 6 September 2012

Published 18 October 2012

Online at stacks.iop.org/STAM/13/064101

## Abstract

This review article describes fundamental aspects of cell membrane-inspired phospholipid polymers and their usefulness in the development of medical devices. Since the early 1990s, polymers composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) units have been considered in the preparation of biomaterials. MPC polymers can provide an artificial cell membrane structure at the surface and serve as excellent biointerfaces between artificial and biological systems. They have also been applied in the surface modification of some medical devices including long-term implantable artificial organs. An MPC polymer biointerface can suppress unfavorable biological reactions such as protein adsorption and cell adhesion – in other words, specific biomolecules immobilized on an MPC polymer surface retain their original functions. MPC polymers are also being increasingly used for creating biointerfaces with artificial cell membrane structures.

Keywords: phospholipid polymers, biocompatibility, biointerface, surface modification, medical devices

## 1. Development of MPC polymer science

The cell membrane is considered the best surface for smooth interaction with biological components such as proteins and cells. A model of the structure of a cell membrane, which is well known as the fluid-mosaic model, was proposed by Singer and Nicolson [1]. According to this model, amphiphilic phospholipids are arranged in a bilayer structure and proteins are located in or on it. The distribution of these components is asymmetric, that is, negatively charged phospholipids such as phosphatidylserine are predominantly found on the inner, cytoplasmic side of the membrane, whereas neutral, zwitterionic phosphorylcholine lipids such as phosphatidylcholines are more commonly located in the outer leaflet [2]. Phosphatidylcholine provides an inert surface for

the biological reactions of proteins and glycoproteins to occur easily on the membrane. This fact is extremely important for the design of a biointerface that can function between artificial and biological systems.

A new concept was proposed for designing blood-compatible polymeric materials with cell membrane-like surfaces; this concept uses 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC, figure 1), which is a methacrylate monomer with a phosphorylcholine (PC) group. Although MPC polymers were studied back in 1978, their properties were not understood [3]. The synthesis of MPCs was rather difficult and complex, and therefore sufficient amounts of pure MPC could not be obtained. Later, Ishihara *et al* established a refined and complete process for the synthesis and purification of MPC [4]. This achievement brought about



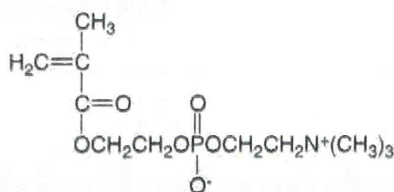


Figure 1. Chemical structure of MPC.

(a) Macromolecular design of MPC polymers



(b) Surface modification with MPC polymers



Figure 2. Schematic of molecular designs (a) and surface modification (b) performed with MPC polymer science.

considerable progress in the development of MPC polymers as biomaterials.

In 1999, with the cooperation of Ishihara and Nakabayashi and the support of the Japan Science and Technology Agency, the Japanese chemical company NOF Corporation built the world's first commercial plant to produce MPC and its polymers on an industrial scale.

Because MPC is easily polymerized, numerous MPC polymers having a wide variety of molecular architectures, that is, random copolymers [5], block-type copolymers [6–9], graft-type copolymers [10–13], and terminal-functionalized polymers [10, 14], have been prepared, as shown in figure 2(a). Polymerization of MPC and its derivatives are summarized in this review article [15]. MPC polymers are soluble in water, and the solubility can be easily adjusted by changing the structure and fraction of the comonomers. Free-radical polymerization is one of the most preferable processes to make MPC polymers and typical initiators including redox types [16].

In recent years, much effort has been focused on the development of a 'living' free-radical polymerization process, which would be useful in the syntheses of homopolymers and block copolymers with controlled molecular weight and narrow molecular weight distribution. Armes *et al* developed the atom transfer radical polymerization (ATRP) of MPC, and many studies on this topic have been reported [17–21]. This method of polymerization can be used to introduce a specific functional group in the terminal of the polymer chain and produce a variety of multi-branched polymers [17, 22–24].

Reverse addition fragmentation transfer (RAFT) polymerization is another process with a living polymerization approach. It is useful for making block and end-functional polymers and various types of amphiphilic MPC copolymers. RAFT polymerization of MPC was first performed by Yusa *et al* [25] and elaborated in further reports [26–28]. This method of polymerization was also performed in protic media; in contrast with the ATRP process,

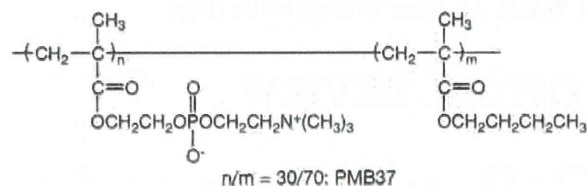


Figure 3. Chemical structure of BMB37.

it does not require the removal of metal catalysts from the polymers [29–31].

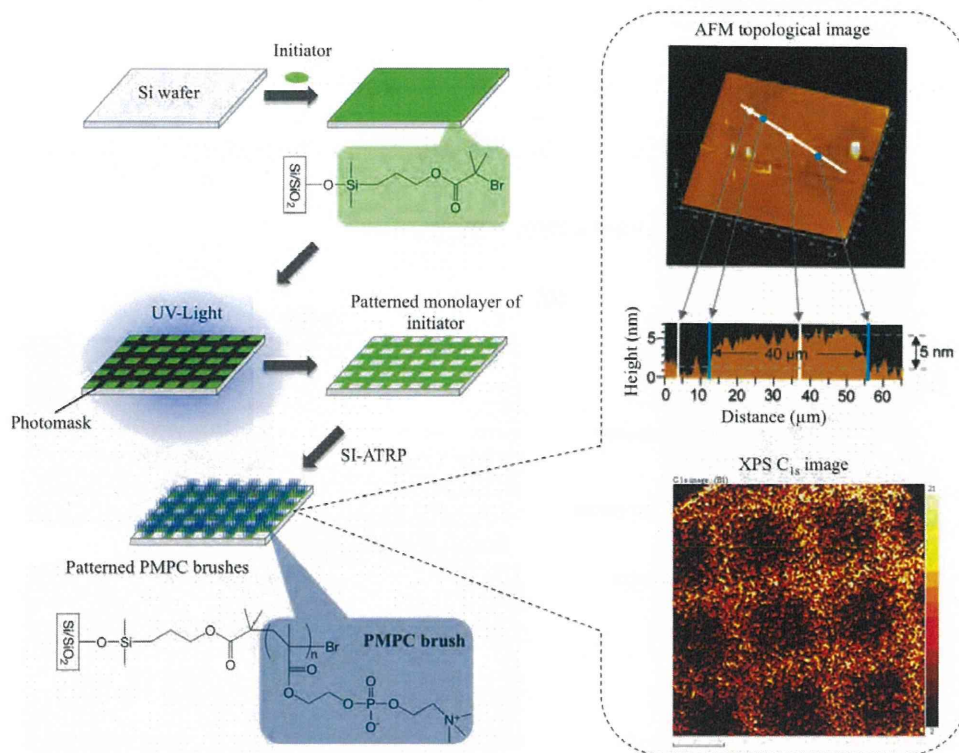
## 2. Surface design with MPC polymers

### 2.1. Coating of artificial materials with MPC polymers

Figure 2(b) shows the available surface modification processes with MPC polymers on substrates [32]. Among them, the coating process is most appropriate and suitable for immobilization of MPC polymers. Considering the molecular interactions expected between the polymers and the surface, a hydrophobic group should be introduced in the MPC polymers. For this purpose, random copolymerization of MPC with an alkyl methacrylate is commonly used for preparation of the MPC polymers [5]. Not only the solubility of the wetting solvent for the substrate but also the molecular weight of the MPC polymer is important for achieving an adequate and stable coating [33, 34]. The most common MPC polymer for a coating on the substrate is poly(MPC-co-*n*-butyl methacrylate) (that is, poly(MPC-co-*n*-BMA) or PMB, figure 3) with 30 mol% of the MPC unit in the polymer (PMB37) [4, 5, 32]. The MPC polymer coating surface shows a higher contact angle for water because the hydrophobic alkyl methacrylates enriched at the air–material interface reduce surface free energy. The surface is dynamic; thus, surface equilibrium with aqueous media is necessary to orient the polar PC groups in the MPC units at the surface [35]. To shorten the equilibrium period, the mobility of the PC groups has been studied as a function of the chemical structure of monomer [35, 36], solvent composition [37], and types of comonomers [38]. For example, polydimethylsiloxane (PDMS) is one of the most commonly used materials. However, coating of PDMS with another polymer is difficult because of its extreme hydrophobicity and high mobility of the polymer chains. Fukazawa *et al* developed a system of MPC polymer and solvent for coating [39], that is, poly(MPC-co-2-ethylhexyl methacrylate-co-*N,N*-diethylaminoethyl methacrylate) (abbreviated as poly(MPC-co-2-EHMA-co-*N,N*-DEAEMA) or PMED) in a 20 vol% solution of ethanol in water. PMED stably covers the PDMS surface owing to complex molecular interactions such as hydrophobic interaction induced by the EHMA units and electrostatic force generated by the DEAEMA units. The solvent composition regulates the PMED conformation in the solution by spreading the polymer chains.

By comparison with random polymers, a block-type polymer with a poly(MPC) segment has much higher mobility and enrichment of PC groups at the surface. Other segments





**Figure 4.** Preparation of a micropatterned poly(MPC) brush surface.

in such a block-type polymer play an important role in attaching the poly(MPC) segment to the substrate [31, 40]. Layer-by-layer molecular integration is also applicable for modifying the substrate with MPC polymers [41–43].

*2.2. Hybridization of MPC polymers with conventional materials*

For the surface modification of materials, the formation of blending [44–49] and interpenetrating networks (IPNs) [50–54] is effective in reducing the elution of MPC polymers from the substrate. Segmented polyurethane (SPU) and polysulfone (PSf) are engineered polymers that are suitable for this task because of their good mechanical properties [44–46]. Blends of SPU and PSf with MPC polymers can be prepared by solvent evaporation. The MPC content can be optimized to improve the surface properties of the blend while preserving the mechanical properties of SPU and PSf.

*2.3. Grafting of MPC polymers on materials*

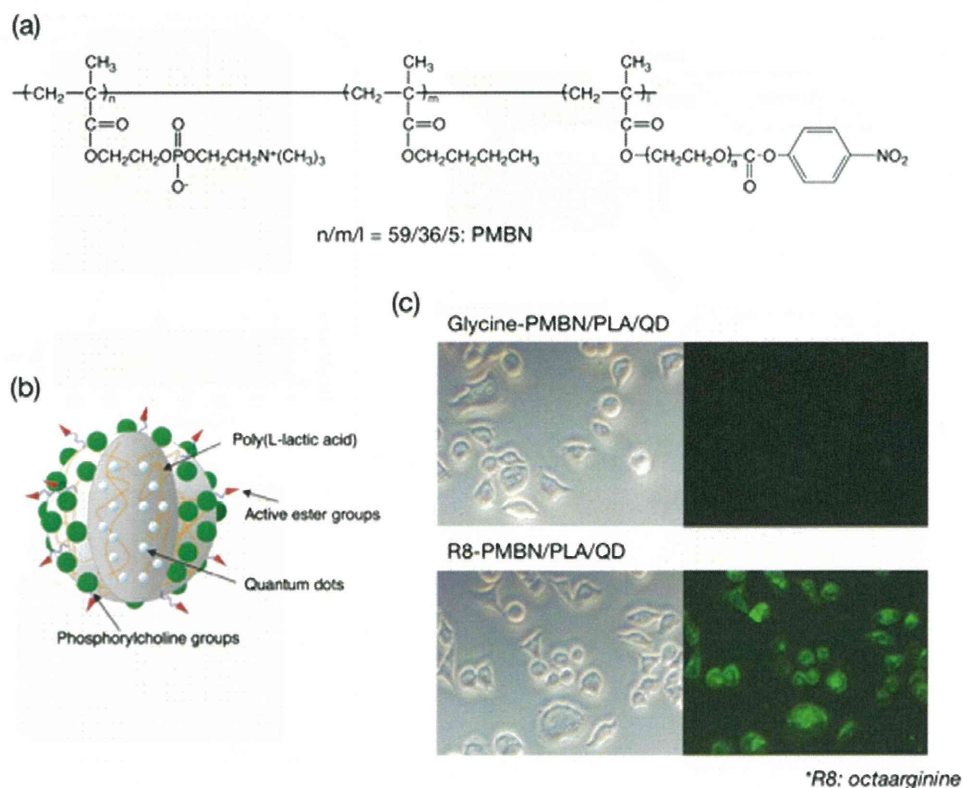
Graft polymerization of MPC is a familiar method used to modify surface properties; the modified surface is relatively stable because the graft polymers are connected to the substrate by covalent bonding. Graft polymerization can be achieved by chemical reactions [55, 56] as well as by physical treatments such as plasma treatment [57], corona discharge [58], and photoirradiation [59, 60]. Comb-shaped MPC graft polymers at the interface do not need reorientation with aqueous media to exhibit nonfouling properties. As an alternative method, surface-initiated ATRP (SI-ATRP) of

MPC was also applied for surface modification of a solid surface [61–63]. This procedure is called ‘grafting from’ and can be used to prepare dense polymer brushes—cf with the adsorption of functionalized polymers to solid/liquid interfaces, which is called ‘grafting to’ because of steric hindrance of the polymers [64]. Surface patterning of polymer brushes is not only of interest for many applications ranging from microelectronics to biomaterials, but is also useful for scientific studies of surface-tethered polymer films. The poly(MPC) brush region and its dimensions can be well controlled via selective decomposition of surface-bound ATRP initiators by UV irradiation, resulting in micropatterns of poly(MPC) brushes as shown in figure 4.

*2.4. Functionalization of MPC polymers with other biomolecules*

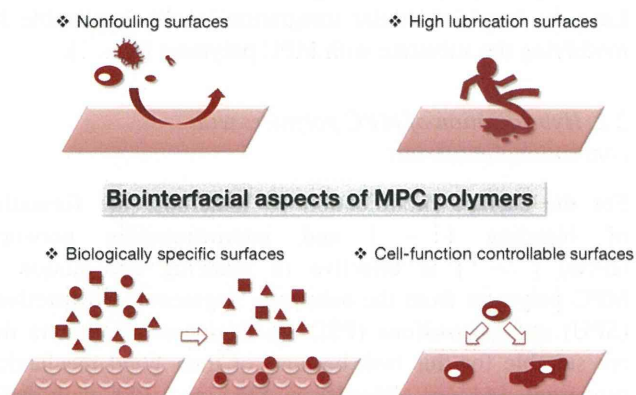
Immobilization of biomolecules, including proteins, polysaccharides, and DNA, is important in the preparation of sensors, monitors and diagnostic devices based on bioaffinity. To that end, a simple method is necessary for immobilization under gentle conditions. Additionally, the activity of biomolecules after immobilization should be maintained as that in the native state. MPC units in the polymer surface effectively reduced the denaturation of proteins immobilized with the polymers [65]. Then, a novel MPC polymer based on the chemical structure of PMB: poly(MPC-co-BMA-co-*p*-nitrophenyloxycarbonyl poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP)) (PMBN) was synthesized [66]. One of the monomer units, the MEONP unit, has an active ester group in the side chain, and can react with a specific biomolecule *via* condensation with its





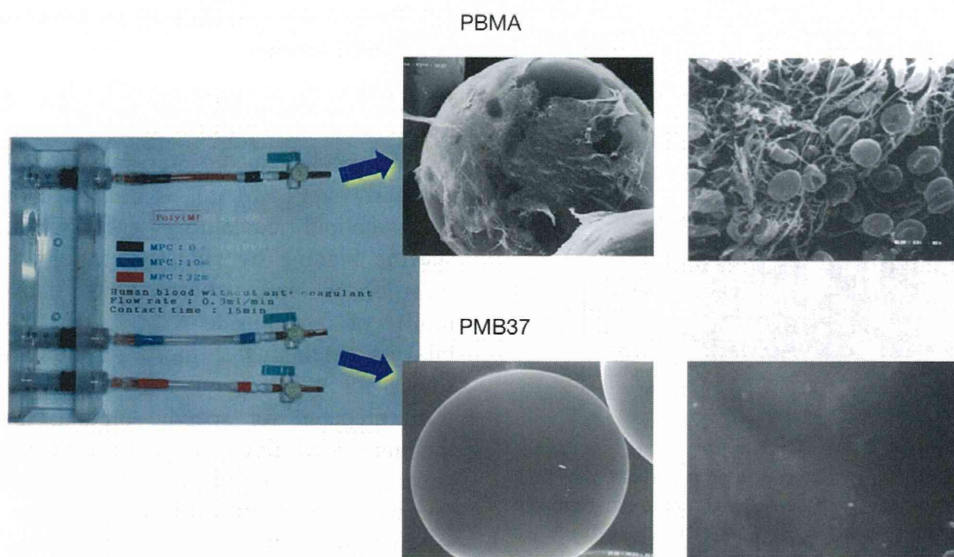
**Figure 5.** (a) Chemical structure of PMBN. (b) Schematic of one polymer nanoparticle embedding quantum dots within an artificial cell membrane surface. (c) Uptake of polymer nanoparticles covered with artificial cell membrane without and with R8 immobilization.

amino group. After that, the substrate is coated with the water-insoluble PMBN *via* solvent evaporation, and the biomolecules are immobilized. The PMBN is coated on glass, cyclic polyolefin, and gold substrates. For example, a PMBN surface is useful for DNA immobilization, and is applied to produce DNA chips such as Prime Surface<sup>®</sup> by Sumitomo Bakelite Co. Ltd. Kinoshita *et al* focused on the hybridization properties with regard to a suitable surface chemistry for a cyclic olefin copolymer (COC) surface with PMBN. They also discussed new approaches for the application of an on-chip DNA detection method through multiple primer extension (MPEx) by DNA polymerase [67]. Besides the nitrophenyloxycarbonyl group, other functional groups were also proposed for the conjugation of proteins with MPC polymers [20, 21, 68]. Iwata and coworkers utilized well-defined block copolymer brushes consisting of poly(MPC) and poly(glycidyl methacrylate) (poly(GMA)) on silicon wafers to immobilize antibody Fab' fragments in a defined orientation [68]. The orientation of the antibody fragments was defined by derivatizing the GMA units with pyridyl disulfide and immobilizing the antibodies *via* thiol–disulfide interchange reactions. Very recently, instead of MEONP units, other active ester units, *N*-succinimidylloxycarbonyl di(ethylene glycol) methacrylate units, were introduced into an MPC polymer (PMBS) [69]. Both PMBN and PMBS were fabricated as nanofibers deposited by electrospinning, and antibodies were immobilized to capture a specific antigen. Alternatively, a water-soluble amphiphilic PMBN was synthesized with

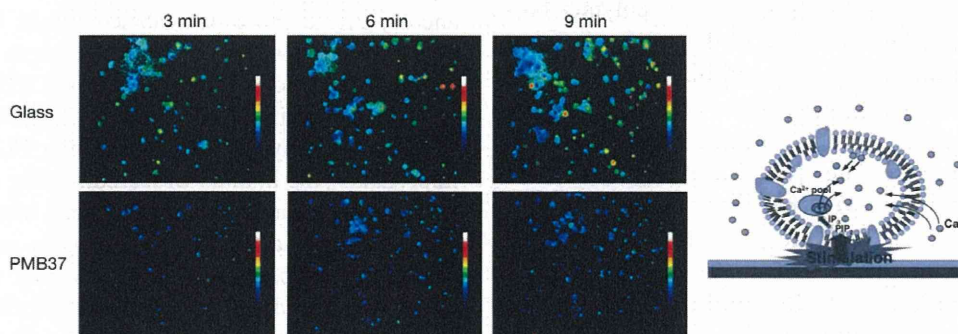


**Figure 6.** Biointerfacial aspects of MPC polymers.

controlled monomer fractions in PMBN, and monodispersed nanoparticles covered with the PMBN were prepared (figure 5(a)) [70]. On the surface of the nanoparticles, several kinds of enzymes were immobilized, and sequential enzymatic reactions on the nanoparticles were conducted. The enzyme-immobilized nanoparticles were applied as biosensing devices coupled with a microdialysis system [66, 71]. Using these devices, acetylcholine and choline can be detected continuously. Ishihara *et al* immobilized arginine octapeptide (R8) on PMBN-covered nanoparticles (figure 5(b)) [72–74]. The nanoparticles were well penetrated into HeLa cells, whereas PMBN-covered nanoparticles without immobilization of R8 were not delivered to the cells



**Figure 7.** Microsphere columns after passage of whole blood for 15 min (left) and scanning electron microscopy images of polymer-coated beads packed in the columns (right).



**Figure 8.** Change in cytoplasmic calcium ion concentration of platelets after contact with glass and PMB37 surfaces.

(figure 5(c)). This result indicates that the interaction between cells and PMBN nanoparticles can be controlled by a ligand immobilized on the nanoparticles.

### 3. Biointerfaces of MPC polymers

#### 3.1. Nonfouling surfaces

MPC polymers have great potential in the design of biointerfaces as shown in figure 6. Particularly, the nonfouling nature of MPC polymers is essential for biomedical materials. Protein adsorption is the first phenomenon that occurs when synthetic materials come in contact with a living organism. The uncontrolled protein adsorption works as a trigger for foreign body reactions with materials from a host. Therefore, protein adsorption is important in the preparation of synthetic materials for biomedical applications.

PMB37 is one of the MPC polymers used for the surface modification of implantable medical devices. The blood compatibility of PMB is differentiated for each blood component, e.g., cells, plasma protein, phospholipids, and water [32, 75–80].

Figure 7 shows experimental columns containing polymer-coated poly(methyl methacrylate) beads, and micrographs of the bead surface after a contact with human blood without any anticoagulant. On poly(BMA), which does not have any MPC units, many adherent blood cells are observed and a clot is generated. In contrast, PMB37 effectively suppresses cell adhesion. While adherent platelets may sometimes easily detach from the surface, they are strongly activated by contact with the polymer surface and induce embolization. Therefore, to understand the blood compatibility it is necessary to evaluate the activation of platelets that barely contact the polymer surface and those that adhere to it. The activation of platelets after contact with PMB37 was evaluated by measuring the concentration of cytoplasmic calcium ions in the platelets (figure 8) [81]. The results clearly indicated a lower degree of activation for the platelets that contacted the PMB37 surface than those on other polymer substrates or glass. That is, PMB37 is an excellent antithrombogenic polymer for the suppression of cell activation and adhesion.

As mentioned above, SI-ATRP results in a well-controlled molecular architecture [82]. Previous papers described the effectiveness of ATRP in preparing a