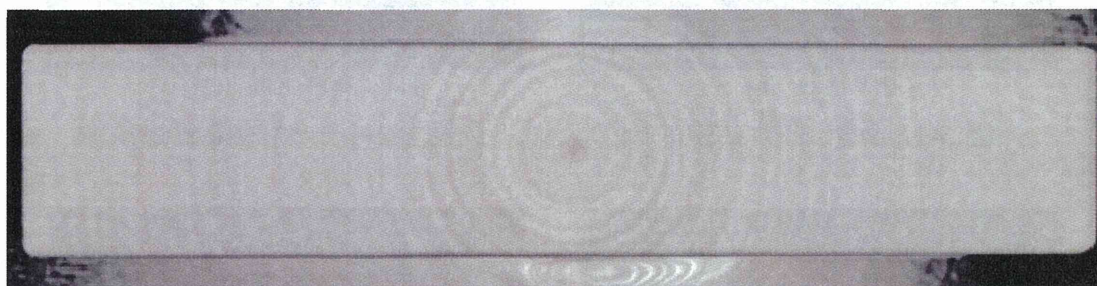


未処理 CLPE (3 mm)



PMPC 処理 CLPE (3 mm)



未処理 CLPE (6 mm)



PMPC 処理 CLPE (6 mm)

図 6. 衝撃-摺動試験前後のディスクの断面像

D. 考察

200 万サイクル終了後、厚さ 3 mm および 6 mm の試験片ともに、PMPC 処理 CLPE は未処理 CLPE に比べて低い摩耗量を示した。PMPC 処理層による水和潤滑の機構により、衝撃-摺動による摩耗も抑制されたと考えられた。

PMPC 処理 CLPE では、厚さ 3 mm、6 mm の試験片ともに試験開始時よりも重量が増大した。静的環境である浸漬試験では、衝撃-摺動により動的な荷重を受ける摩耗試験下の CLPE 試験片の吸水重量を完全に再現することは難しいためと考えられた。本試験は、全ての試験片を同一試験条件下で行っているため、試験片群間の摩耗特性の比較を行うことは妥当であると考えられた。

200 万サイクル終了後のディスク表面では、全ての試験片において、衝撃部におけるツールマークの消失が認められた。よって、PMPC 処理層による衝撃の緩衝効果は、200 万サイクル終了後のレーザ顕微鏡による表面観察だけでは確認できなかった。

ディスク背面では、全ての試験片において、ホールによる円形の痕が形成された。つまりチタン合金製治具と接する領域ではツールマークが薄くなる傾向が見られた。PMPC 処理は基材の機械特性に影響を与えないため、PMPC 処理の有無はディスク背面の変化に影響を与えなかったと考えられた。

円形痕の形成およびホール部外側のツールマークの薄化は厚さ 3 mm の試験片において顕著であった。ディスクが薄いことで試験片にかかる応力が高くなったため、背面の変形が顕著になったと考えられた。背面にスクリーホールのある CLPE 製品の設計においては、厚さについて考慮する必要があると考えられた。

いずれの試験片においても、デラミネーションなどの異常摩耗や、内部クラックの発生は認められなかった。実際の体内の人工膝関節で発生するデラミネーションやコンポーネント破損は、手術後長期間経過した製品での報告が多く、体内での材料の酸化が進行した状態になっていると推測される。本試験で用いた試験片は不活性ガスを充填したバックに保管されており、開封直後に試験を実施したため、材料の酸化劣化が進んでいなかったと考えられた。

E. 結論

通常歩行時に膝関節に生じる摺動モードを想定した衝撃-摺動試験において、PMPC 処理の効果および試験片の厚さが CLPE に与える影響を評価した。

衝撃-摺動条件下において、PMPC 処理は CLPE の摩耗を抑制することが示された。厚さ 3 mm の CLPE では、6 mm の CLPE に比べて、ホールに背面の変形が増大することが

明らかとなった。いずれの試験片においても、デラミネーションなどの異常摩耗や、内部クラックの発生は認められなかった。

以上より、適切な厚さを有する PMPC 処理 CLPE は、十分な強度と低摩耗を両立する優れた人工膝関節インサート材料となり得ることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 23: 722-728, 2013.
- 2) Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Kim J, Koyama Y, Ito H, Kawaguchi H, Nakamura K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted highly cross-linked polyethylene liner in primary total hip replacement: One-year results of a prospective cohort study. *J Artif Organs* 16: 170-175, 2013.
- 3) Murakami T, Yarimitsu S, Nakashima K, Sawae Y, Sakai N: Influence of synovia constituents on tribological behaviors of articular cartilage. *Friction* 1: 150-162, 2014.
- 4) Yarimitsu S, Nakashima K, Sawae Y, Sakai N, Murakami T: Influence of Phospholipid and Protein Constituents on Tribological

Properties of Artificial Hydrogel Cartilage Material. *J.*

Biomechanical Science and Engineering 8: 257-267, 2013.

- 5) 趙昌熙, 村上輝夫, 澤江義則: 超高分子量ポリエチレン脛骨インサートの微細加工痕の接触解析. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 34: 171-178, 2013.
- 6) Murakami T, Yarimitsu S, Nakashima K, Yamaguchi T, Sawae Y, Sakai N, Suzuki A: Superior Lubricity in Articular Cartilage and Artificial Hydrogel Cartilage. *J. Engineering Tribology* 228: (in press)
- 7) Muraki S, Oka H, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Sasaki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Association of dietary intake with joint space narrowing and osteophytosis at the knee in Japanese men and women: The ROAD Study. *Mod Rheumatol* (in press)
- 8) Yoshimura N, Akune T, Fujiwara S, Nishiwaki Y, Shimizu Y, Yoshida H, Sudo A, Omori G, Yoshida M, Shimokata H, Suzuki T, Muraki S, Oka H, Nakamura K: Prevalence of knee pain, lumbar pain and its co-existence in Japanese men and women: The Longitudinal Cohorts of Motor System Organ (LOCOMO) study. *J Bone Miner Meta* (in press)
- 9) Muraki S, Akune T, Nagata K, Ishimoto Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: Association of knee osteoarthritis with onset and resolution of pain and physical functional disability: The ROAD Study. *Mod Rheumatol* (in press)

2. 学会発表

- ① 国内学会
- 1) 中嶋和弘, 村上輝夫: 摩擦挙動に寄与する蛋白質吸着膜の構造. トライボロジー会議 2013 春. 東京, 5.22, 2013.
 - 2) 大熊雄祐, 飛松好子, 赤居正美, 藤野圭司, 川島真人, 畑野栄治, 稲波弘彦, 本田雅人, 土肥徳秀, 中村耕三, 岩谷力: ロコモティブシンドロームにおける活動性に対する痛みの影響. 第 86 回日本整形外科学会学術集会. 広島, 5.23-26, 2013.
 - 3) 岩谷力, 土肥徳秀, 中村耕三, 赤居正美, 星野雄一, 飛松好子, 星地亜都司: ロコモティブシンドロームの操作的定義 ロコモティブシンドロームにおける活動性に対する痛みの影響. 第 86 回日本整形外科学会学術集会. 広島, 5.23-26, 2013.
 - 4) 緒方徹, 土肥徳秀, 赤居正美, 岩谷力, 中村耕三: ロコモティブシンドロームに対するポピュレーションアプローチ ロコモティブシンドロームにおける活動性に対する痛みの影響. 第 86 回日本整形外科学会学術集会. 広島, 5.23-26, 2013.
 - 5) 村木重之, 岡敬之, 阿久根徹, 延與良夫, 吉田宗人, 鈴木隆雄, 吉田英世, 石橋英明, 時村文秋, 山本精三, 中村耕三, 川口浩, 吉村典子: 膝における関節裂隙狭小化および骨棘形成が QOL に与える影響. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 広島, 5.23-26, 2013.
 - 6) 村上輝夫: 生体関節におけるバイオレオロジー. 第 36 回日本バイオレオロジー学会年会. 福岡, 6.7, 2013.
 - 7) 山口哲生, 村上輝夫: 低摩擦ハイドロゲルにおける応力-拡散結合. 第 36 回日本バイオレオロジー学会年会. 福岡, 6.7, 2013.
 - 8) 中嶋和弘, 工藤奨, 村上輝, Stefano Mischler: 蛋白質吸着膜の摩擦負荷による変化のその場観察. 生体医工学シンポジウム. 福岡, 9.20, 2013.
 - 9) 阿久根徹, 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 変形性膝関節症および筋力・運動機能低下は要介護のリスクである: The ROAD study -. 第 15 回日本骨粗鬆症学会. 大阪, 10.11-13, 2013.
 - 10) 村木重之, 阿久根徹, 田中栄, 岡敬之, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 縦断的コホート調査による変形性膝関節症の疼痛および ADL 障害への影響: The ROAD study -. 第 15 回日本骨粗鬆症学会. 大阪, 10.11-13, 2013.
 - 11) 村上輝夫: Superior Lubrication Mechanism in Natural Synovial Joints and Its Application to Artificial Joints. 日本機械学会バイオエンジニアリング部門生体システム技術研究会 第 26 回研究会. 九州大学バイオメカニクス研究センター第 6 回バイオメカニクスセミナー. 福岡, 11.7, 2013.
 - 12) 趙昌熙, 村上輝夫, 澤江義則: 人工関節用金属部品の表面突起形状の許容基準に関する研究. 日本臨床バイオメカニクス学会. 神戸, 11.22, 2013.
 - 13) 村上輝夫: Elucidation of adaptive lubrication mechanism with low friction and minimum wear in natural synovial joints and development of artificial hydrogel cartilage with superlubricity based on bionic design (Part 2). 第 2 回バイオメカニクス研究センター&エレクトロニクス実装学会九州支部合同研究会. 福岡, 2.3, 2014.

- 14) Lei Zhang, Yoshinori Sawae, Teruo Murakami, Hong Yang: Correlation between the oxidztion and radiation dose and wear properties of shelf-aged gamma-irradiated ultra-high molecular weight polyetylene (UHMWPE). 第34回バイオトライボロジシンポジウム. 京都, 3.8, 2014.
- 15) 村上輝夫, 鎗光清道, 中嶋和弘, 澤江義則, 坂井伸朗: 変性関節軟骨の潤滑機構における潤滑液成分の影響. 第34回バイオトライボロジシンポジウム. 京都, 3.8, 2014.
- 6) Murakami T, Yarimitsu S, Nakashima K, Yamaguchi T, Sawae Y, Sakai N, Suzuki A: Effective biphasic lubrication in artificial hydrogel cartilage for joint prostheses. 26th Annual Congress of International Society for Technology in Arthroplasty. Palm Beach, USA, 10.18, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

② 国際学会

- 1) Murakami T: Superior lubrication mechanism in natural and artificial joints. Fourth Advanced Forum on Tribology. Beijing, China, 4.14, 2013.
- 2) Akai M, Doi T, Uehara K, Okuma Y, Ogata T, Seichi A, Nakamura K, Iwaya T: “Locomotive Organ Dysfunction” in Elderly People; An Important Aspect of Geriatric Frailty in a “Super-aged” Society. 7th ISPRM Congress. Beijing, China, 6.19, 2013.
- 3) Nakashima K, Sawae Y, Murakami T, Mischler S: Behavior of Adsorbed Albumin film on CoCrMo Alloy under In-situ observation. World Tribology Congress 2013. Torino, Italy, 9.10, 2013
- 4) Yarimitsu S, Nakashima K, Sawae Y, Murakami T: Effect of Synovial Fluid Constituents on Tribological Performance of Artificial Hydrogel Cartilage Material. World Tribology Congress 2013. Torino, Italy, 9.12, 2013.
- 5) Murakami T, Yarimitsu S, Nakashima K, Yamaguchi T, Sawae Y, Sakai N, Araki T, Suzuki A: Superior Lubricity in Articular

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (政策創薬探索研究事業))

分担研究報告書

摩耗抑制効果の検討

分担研究者 川口 浩 (東京厚生年金病院 脊髄脊椎センター センター長)
武冨 修治 (東京大学医学部附属病院 助教)

研究要旨：人工膝関節摺動部材であるインサートの摩耗は、時間の経過とともに確実に進行するため、人工関節の長寿命化にとって最も重要な課題である。我々はこれまでに、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質ポリマーである poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) の層を、光開始グラフト重合法を用いて約100 nm の厚さで架橋ポリエチレン (CLPE) の表面に形成させる技術 (PMPC 処理) を開発した。γ線滅菌またはガスプラズマ滅菌を行ったPMPC処理CLPEインサートを、ISO 14243に準拠した膝シミュレータ試験にて評価したところ、どちらのCLPEインサートでもPMPC処理による摩耗抑制効果が確認された。人工膝関節に用いるCLPEインサートへのPMPC処理は、滅菌の方法に関わらずその耐摩耗性を向上させる技術であり、早期の実用化が期待される。

A. 研究目的

社会の超高齢化により、健康で充実した人生を送れる老年人口に対するニーズがますます高まっている。高齢化に伴い、運動器障害への対策が求められており、人工膝関節置換術もその有効な手立ての一つである。近年、人工関節置換術適用対象の若年化が進み、これまで 60 歳以上と言われてきた適用年齢が、最近では 50 歳代で手術を受ける患者も少なくない。社会の高齢化と適用症例の若年化が相まって、人工関節置換術後の期間が大幅に長期化

している。したがって、人工関節にはより一層の長寿命化が必要とされている。

人工膝関節の寿命を規定する因子として、摺動部材であるポリエチレン (PE) インサートの摩耗、コンポーネントの破損、感染といった不具合事例が報告されている。これらは、人工関節全般に抱える問題であるが、特にインサートの摩耗は、時間の経過とともに確実に進行するため、人工膝関節の長寿命化にとって最も深刻な問題である。

我々はこれまでに親水性と生体親

和性に優れた合成リン脂質ポリマーである poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) の層を、光開始グラフト重合法を用いて約 100 nm の厚さで架橋ポリエチレン (CLPE) の表面に形成させる技術 (PMPC 処理) を開発した。PMPC 処理を施した人工股関節ライナーは、長期間の股関節シミュレータ試験と、短期の臨床成績において良好な結果を残している。この技術を人工膝関節に展開することで、最も重要な課題であるインサートの摩耗を抑制できると期待した。

人工関節製品は、感染防止のため、その製造方法において製品の滅菌の工程が不可欠である。滅菌の方法は様々であるが、主にエチレンオキサイドガス滅菌、 γ 線滅菌、電子線滅菌、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌 (ガスプラズマ滅菌) などが採用されている。 γ 線照射は、インサート材料の一つである CLPE の作製にも用いられる最も一般的な滅菌方法であった。しかし、PE 材料の劣化が γ 線滅菌にあるとされ、近年、急速にガスプラズマ滅菌に置き換わりつつある。

滅菌は、滅菌対象となる材料の機械特性および摩耗特性に影響を与える重要な製造工程であり、滅菌方法が変われば、材料の特性も大きく変わってくる。よって、新たな人工関節材料を創出、実用化するためには、その滅菌方法も含めた評価が必須である。

今回我々は、人工膝関節の長寿命化を目的として、PMPC 処理を施した CLPE インサートを作製した。その実用化に向けて、 γ 線滅菌とガスプラズマ滅菌それぞれの方法で滅菌した PMPC 処理 CLPE インサートを準備し、それらの摩耗特性を評価した。

B. 研究方法

1. γ 線滅菌 CLPE インサートの評価

① インサートの切り出し

GUR1020 の棒材を不活性雰囲気にて 50 kGy のガンマ線を照射し、120°C の熱処理を行った。徐冷後、機械加工により京セラメディカル社製 Bi-Surface 5 (BS5) PS 型の形状をした CLPE インサートを切り出した。

② インサートの PMPC 処理

CLPE インサートを 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 モノマー (日油製) の水溶液 (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 インサートを、MPC 水溶液に浸漬し、5 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。照射中、MPC 水溶液を 60°C になるよう調整した。重合後、インサートを超純水およびエタノールにて十分に洗浄した。

③ インサートの γ 線滅菌

インサートを不活性雰囲気にて 25 kGy のガンマ線を照射し、試験検体を得た (図 1)。

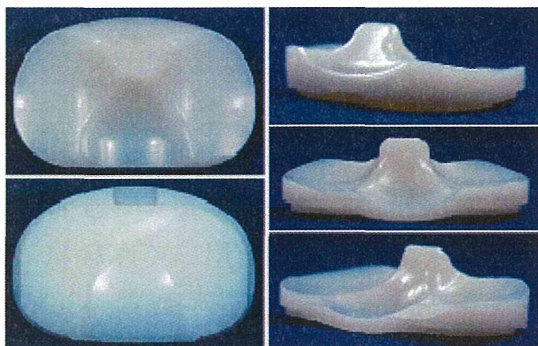


図 1 CLPE インサート外観

④ 膝シミュレーター試験

ISO 14243 に準拠し、2 台の膝シミュレーター (インストロン製) を用いて摩耗試験を実施した (図 2)。

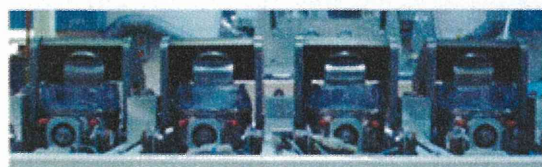


図 2 膝シミュレーター (インストロン製 Instron-Stanmore knee simulator)

入力荷重は ISO 14243-1 に準拠し、ヒトの歩行動作パターンを再現した荷重波形を入力した。

対向する大腿骨コンポーネントは Co-Cr-Mo 合金製 BS5 大腿骨コンポーネントを用いた (図 3)。インサートは BS5 脛骨トレイ (図 4) に設置後、試験機に固定した。

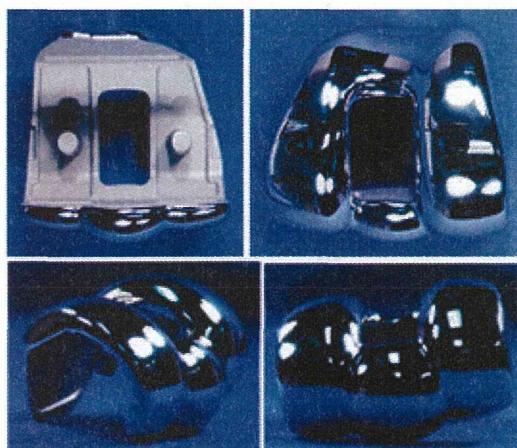


図 3 BS5 大腿骨コンポーネント

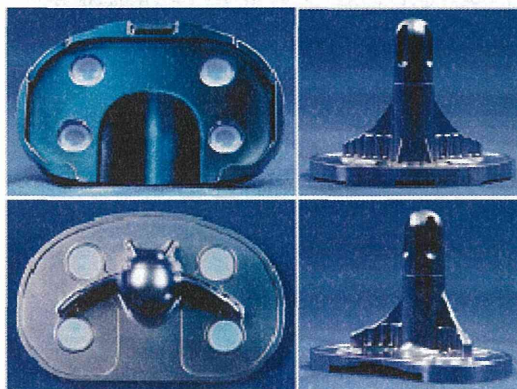


図 4 BS5 脛骨トレイ

軸荷重線は、生理学的下肢アライメントを再現するため、コンポーネント中心から 5 mm 内側にオフセットさせた (図 5)。

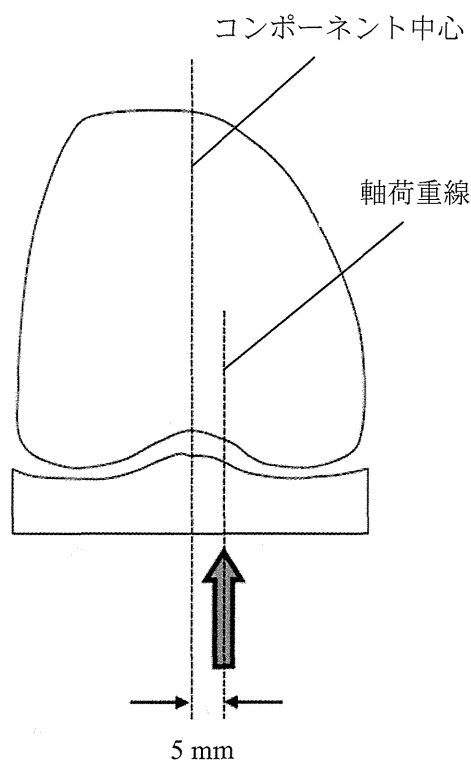


図5 軸荷重線位置

潤滑液は約 30%ウシ血清溶液を用いた。50 万サイクル毎に潤滑液の交換を行い、同時インサートの洗浄、乾燥、重量測定を行った。試験は 500 万サイクルまで実施した。加えて、摩耗試験と同様の軸荷重のみを加えた浸漬試験を同時に実施し、吸水重量補正を行った。

2. ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの評価

① インサートの切り出し

GUR1020 の棒材を不活性雰囲気にて 75kGy のガンマ線を照射し、123℃の熱処理を行った。徐冷後、機械加工により Bi-Surface 5 PS 型インサートを切り出した。

② インサートの PMPC 処理

前述の γ 線滅菌 CLPE インサートと同様の方法で PMPC 処理を実施した。

③ インサートの滅菌

ガスプラズマ滅菌装置を用いて、インサートの滅菌を実施した。

④ 摩耗試験

ISO 14243 に準拠し、膝シミュレーター (AMTI 社) を用いて摩耗試験を実施した。入力荷重は ISO 14243-3 に準拠し、ヒトの歩行動作パターンを再現した荷重波形を入力した。対向する大腿骨コンポーネントは Co-Cr-Mo 合金製 BS5 大腿骨コンポーネントとした (図 3)。インサートは BS5 脛骨トレイ (図 4) に設置され、試験機に固定された。

潤滑液は 27%ウシ血清溶液を用いた。50 万サイクル毎に潤滑液の交換を行い、同時インサートの洗浄、乾燥、重量測定を行った。試験は 500 万サイクルまで実施した。加えて、摩耗試験と同様の軸荷重のみを加えた浸漬試験を同時に実施し、吸水重量補正を行った。

⑤ 基材の靱性評価

試験後の基材の靱性を評価するため、ASTM F2183-02 に準拠し、以下のとおりスモールパンチ試験を実施した。

1 つのインサートにつき内側摺動部、外側摺動部、非摺動部 (顆間部) よりそれぞれ表面近傍と深さ 1.5 mm、深さ 3.0 mm の位置から、 $\phi 6.35 \times 0.5$ mm の試験片を切り出した。試

験片をスモールパンチ試験治具に固定した後、その試験治具を引張・圧縮試験機（インストロン社）に設置し、ヘッドスピード 0.5 mm/min にて半球形のパンチを試験片に押し当て、試験片が破断するまでの荷重と変位を記録した。得られた荷重-変位曲線から、Bluehill 3 Ver.3.13（インストロン社）を用いて最大荷重、最大変位および破断エネルギーを算出した。

C. 研究結果

1. γ 線滅菌 CLPE インサートの評価

γ 線滅菌 CLPE インサートの重量摩耗を図 6 に示す。

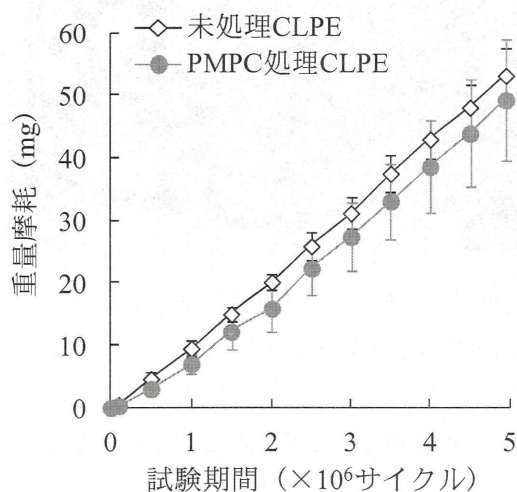
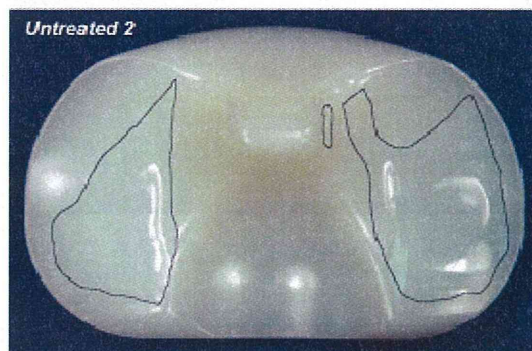


図6 γ 線滅菌 CLPE の膝シミュレータ試験における重量摩耗

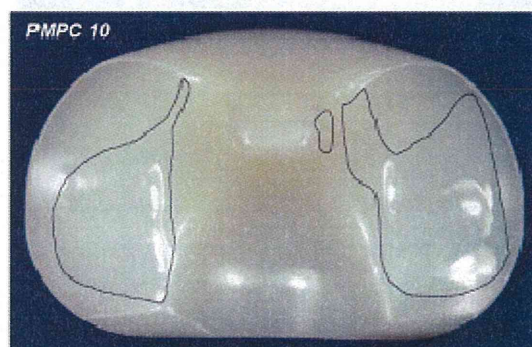
未処理 CLPE、PMPC 処理 CLPE ともに試験サイクルの増加に伴い重量摩耗は増加した。PMPC 処理 CLPE は未処理 CLPE に比べて重量摩耗が少ない傾向が見られたが、500 万サイクル終了時の摩耗量に有

意な差は認められなかった。

試験後のインサートの代表的な摺動表面写真を図 7 に示す。



(a) 未処理 CLPE の摺動表面

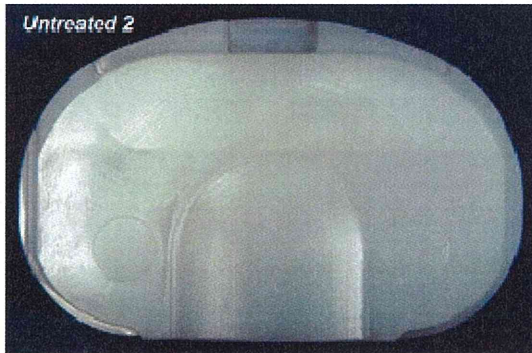


(b) PMPC 処理 CLPE の摺動表面

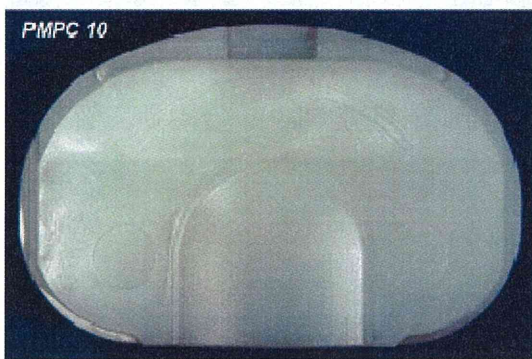
図7 試験後の CLPE インサートの摺動表面写真

摺動表面では、内外側に研磨面様の摩耗が確認された。ピッチングやデラミネーション等の異常摩耗は発生しなかった。摩耗領域は外側よりも内側の方が広い傾向が見られた。全てのインサートにおいて、内側のポスト部に僅かな摩耗が確認された。

試験後のインサートの代表的な背面写真を図 8 に示す。



(a) 未処理 CLPE の背面

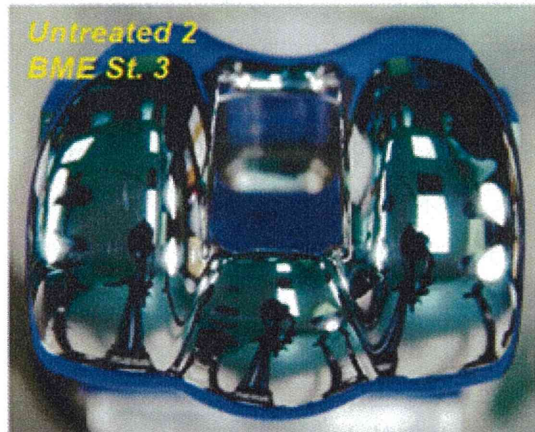


(b) PMPC 処理 CLPE の背面

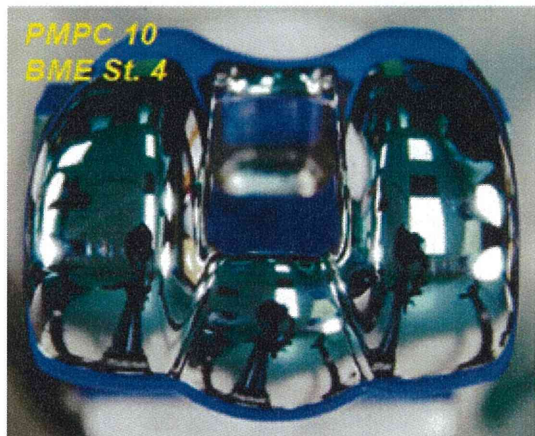
図8 試験後のCLPEインサートの背面写真

インサートの背面では、小さな傷の発生と、脛骨トレイのスクリーホールによる円形痕の発生が認められた。背面の大部分でツールマークの残存が確認された。

試験後の大腿骨コンポーネントの代表的な摺動面写真を図9に示す。大腿骨コンポーネントの摺動面では、ごく一般的な小さな傷の発生が認められた。いずれのコンポーネントにおいても摩耗を増大させるような大きな傷の発生は認められなかった。



(a) 未処理 CLPE と対向した大腿骨コンポーネント



(b) PMPC 処理 CLPE と対向した大腿骨コンポーネント

図9 試験後の大腿骨コンポーネント

2. ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの評価

ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの重量摩耗を図10に示す。

PMPC 処理 CLPE インサートは未処理 CLPE インサートに比べて重量摩耗が少ない傾向が見られたが、500 万サイクル終了時の摩耗量に有

意な差は認められなかった。

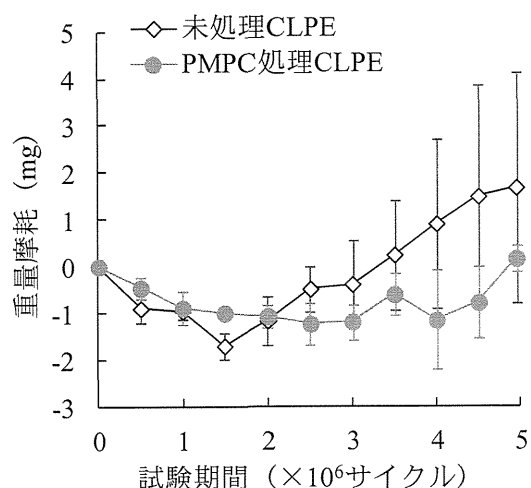


図 10 ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの重量摩耗

膝シミュレータ試験後の未処理 CLPE インサートおよび PMPC 処理 CLPE インサートのスモールパンチ試験結果を図 11、12 にそれぞれ示す。

未処理 CLPE インサートのスモールパンチ試験では、表面から切り出した試験片の最大変位と破断エネルギーにおいて、内側および外側摺動部と非摺動部との間に有意な差を認めた。

PMPC 処理 CLPE インサートのスモールパンチ試験では、表面から切り出した試験片の最大変位において、内側および外側摺動部と非摺動部との間に有意な差を認めた。深さ 1.5 mm から切り出した試験片の最大荷重、最大変位および破断エネルギーにおいて、外側摺動部と非摺動部との間に有意差を認めた。

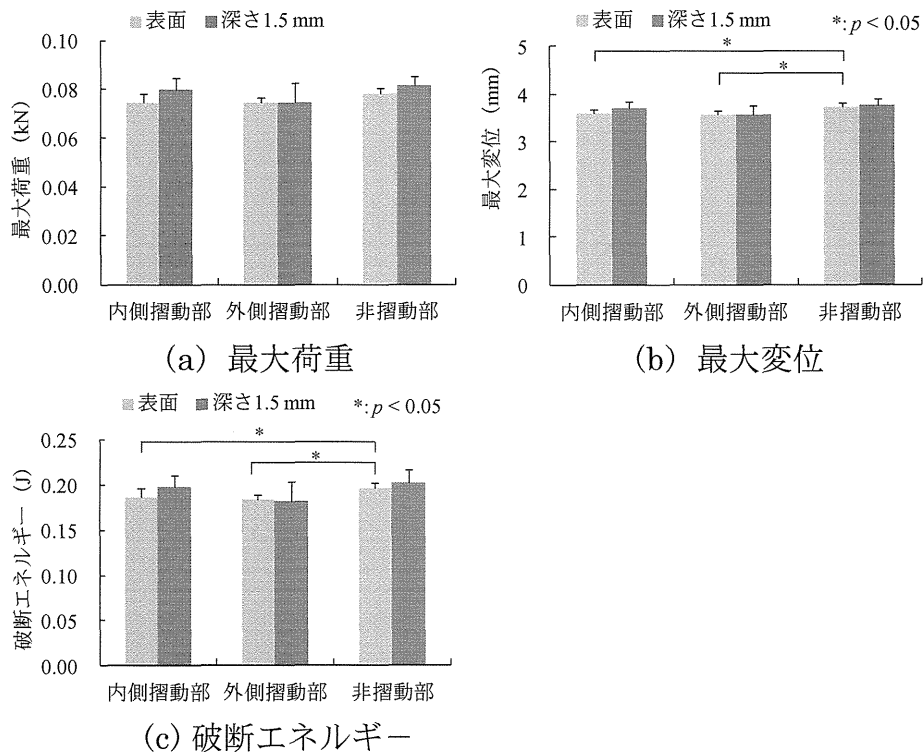


図 11 未処理 CLPE のスモールパンチ試験

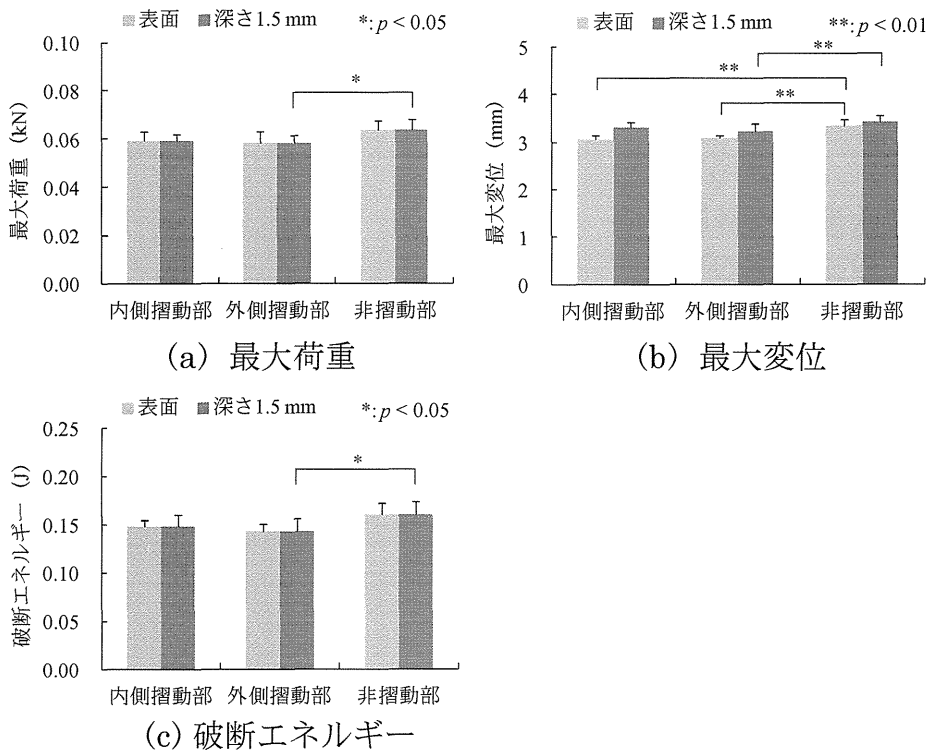


図 12 PMPC 処理 CLPE のスモールパンチ試験

D. 考察

本研究では、 γ 線滅菌またはガスプラズマ滅菌を行った PMPC 処理 CLPE インサートを用いて膝シミュレーター試験を実施し、その摩耗抑制効果について検証した。

γ 線滅菌したインサートを用いた膝シミュレーター試験において、PMPC 処理 CLPE は未処理 CLPE に比べて重量摩耗が少ない傾向が見られたが、500 万サイクル終了時の摩耗量に有意な差は認められなかった。また対向する大腿骨コンポーネントの表面に大きな傷などの異常は認められなかった。

最近の研究で、PMPC 処理人工股関節ライナーは、7000 万サイクルという長期間のシミュレーター試験において、劇的に CLPE の摩耗を抑制することが明らかとなった。人工膝関節は、人工股関節に比べて関節の接触面積が小さいため、局所的に高い応力が発生すると考えられる。また、人工膝関節の抜去品調査研究によれば、人工膝関節のインサートにはピッチングやデラミネーションといった人工膝関節特有の摩耗が発生することが知られており、このような摺動条件の違いが人工股関節のシミュレーター試験結果と同程度の摩耗抑制効果を発揮するには至らなかった原因と考えられた。

ガスプラズマ滅菌したインサートを用いた膝シミュレーター試験において、PMPC 処理 CLPE は未処

理 CLPE に比べて重量摩耗が少ない傾向が見られたが、500 万サイクル終了時の摩耗量に有意な差は認められなかった。 γ 線滅菌 CLPE の結果と同様に、人工股関節と人工膝関節の摺動条件の違いによると考えられた。

γ 線滅菌したインサートを用いた膝シミュレーター試験とガスプラズマ滅菌したインサートを用いた試験では、500 万サイクル終了時の摩耗量に 10 倍以上の差を認めた。 γ 線滅菌したインサートの試験では、前後荷重と回旋トルクを荷重制御で行ったため、BS5 のような関節面の拘束性が低いインサートでは可動範囲が大きくなり、摩耗する面積が増大したと考えられた。一方、ガスプラズマ滅菌したインサートの試験では、前後移動と回旋運動を変位制御で行ったため、荷重制御に比べて摩耗する面積が小さかったと推測された。加えて、 γ 線滅菌したインサートでは軸荷重線を内側に 5 mm オフセットさせたことで、インサートの内側の摺動表面に応力が集中し、摩耗を増大させたと推測された。

膝シミュレーター試験後の未処理 CLPE インサートおよび PMPC 処理 CLPE インサートのスモールパンチ試験では、未処理 CLPE インサート、PMPC 処理インサートともに、表面から切り出した試験片の最大変位において、内側および外側摺動部と非摺動部との間に有意な差を

認めた。膝シミュレーター試験によって受けた摺動が、材料の表面を疲労させ、材料の伸び特性を劣化させたと推測された。

PMPC 処理 CLPE インサートの最大荷重、最大変位および破断エネルギーは、未処理 CLPE インサートのそれらに比べて低い値を示した。PMPC 処理は基材の機械特性に影響を与えないことが知られているため、差の原因は材料のばらつきや材料ロットの違いにあると考えられた。

E. 結論

本研究の結果、 γ 線滅菌およびガスプラズマ滅菌したインサートの両方で、PMPC 処理の摩耗抑制効果が確認された。CLPE インサートへの PMPC 処理は、滅菌の方法に関わらずその耐摩耗性を向上させる技術であり、早期の実用化が期待される。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Osteoporosis Int* 24: 459-66, 2013.
- 2) Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Hikata

T, Kobayashi H, Fukai F, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, and Kawaguchi H: Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 1875-1880, 2013.

- 3) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, and 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)
- 4) Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Kim J, Koyama Y, Ito H, Kawaguchi H, and Nakamura K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted highly cross-linked polyethylene liner in primary total hip replacement: One-year results of a prospective cohort study. *J Artif Organs* 16: 170-175, 2013.
- 5) 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* 23: 722-728, 2013.
- 6) Muraki S, Akune T, En-Yo Y, Yoshida M, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Oka H, Yoshimura N: Association of dietary intake with joint space narrowing and osteophytosis at the knee in Japanese men and women: the ROAD study. *Mod Rheumatol* (in press)
- 7) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Saiga K, Hashimoto M, Tanaka S, Ito H, Tanaka T, Oshima H,

- Kawaguchi H, and Takatori Y:
Grafting of poly
(2-methacryloyloxyethyl
phosphorylcholine) on polyethylene
liner in artificial hip joints reduces
production of wear particles. *J Mech
Behav Biomed* (in press)
- 8) Moro T, Takatori Y, Kyomoto M,
Ishihara K, Hashimoto M, Ito H,
Tanaka T, Oshima H, Tanaka S,
Kawaguchi H: Long-term hip
simulator testing of the artificial hip
joint bearing surface grafted with
biocompatible phospholipid polymer.
J Orthop Res (in press)
- 9) Inui H, Taketomi S, Nakamura K,
Sanada T, Tanaka S, Nakagawa T:
An additional reference axis
improves femoral rotation alignment
in image-free computer navigation
assisted total knee arthroplasty. *J
Arthroplasty* 28(5): 766-771, 2013.
- 10) Inui H, Taketomi S, Nakamura K,
Takei S, Takeda H, Tanaka S,
Nakagawa T: Influence of
navigation system updates on total
knee arthroplasty. *BMC Sports Sci
Med Rehabil* 5(1): 10, 2013.
- 変形性膝関節症および筋力・運動
機能低下は要介護のリスクであ
る：The ROAD study -. 第 15 回日
本骨粗鬆症学会. 大阪, 10.11-13,
2013.
- 4) 村木重之, 阿久根徹, 田中栄, 岡敬
之, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子：
縦断的コホート調査による変形性
膝関節症の疼痛およびADL障害へ
の影響：The ROAD study -. 第 15
回日本骨粗鬆症学会. 大阪,
10.11-13, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

2.学会発表

- 1) 川口浩：変形性関節症治療の現状
と未来：国内外の治療ガイドライ
ンと標的分子の探索. 第 57 回日本
リウマチ学会総会・学術集会. 京都,
4.18-20, 2013.
- 2) 村木重之, 岡敬之, 阿久根徹, 延與
良夫, 吉田宗人, 鈴木隆雄, 吉田英
世, 石橋英明, 時村文秋, 山本精三,
中村耕三, 川口浩, 吉村典子：膝に
おける関節裂隙狭小化および骨棘
形成が QOL に与える影響. 第 86
回日本整形外科学会学術総会. 広
島, 5.23-26, 2013.
- 3) 阿久根徹, 村木重之, 岡敬之, 田中
栄, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子：

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (政策創薬探索研究事業))

分担研究報告書

抗感染性の検討

分担研究者 茂呂 徹 (東京大学医学部附属病院 特任准教授)
宮本比呂志 (佐賀大学医学部 教授)

研究要旨：膝関節の高度障害に対する人工膝関節置換術は、優れた治療法として健康寿命の延長と生活の質（QOL）の向上に貢献している。しかし、手術後に細菌感染が生じると、現状では人工関節の抜去・再置換以外に解決する方法がなく、患者にとって大きな負担となる。そのため、術後感染をおこさない画期的な人工膝関節の開発が求められている。これまでに、2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーを用いたディップコーティング法およびグラフトコーティング法による処理を施した金属表面で、蛋白質の吸着が阻害されることを示した。生体内においては、蛋白質が人工関節表面に吸着した後、細菌が付着してバイオフィームが形成されるため、インプラント表面のMPC処理が抗感染性を付与するものと期待された。そこで、MPC処理表面における細菌付着およびバイオフィーム形成の抑制効果について検討した。人工関節材料の純チタンの表面にMPC処理をディップコーティング法およびグラフトコーティング法にて施したところ、両法ともに細菌の付着を顕著に阻害した。MPC処理による細菌付着阻害効果は、コバルトクロムモリブデン合金表面においても確認された。さらに、純チタン表面のMPC処理は、バイオフィーム形成を劇的に抑制した。MPCポリマー処理金属は、その高親水性による蛋白質吸着阻害効果により、細菌付着およびバイオフィーム形成を抑制する表面を有しており、これを人工膝関節材料の表面に使用することで抗感染性が付与され、術後感染の予防が期待できる。

A. 研究目的

膝関節の機能障害は、疾患や外傷によって生じ、中高年者の健康寿命を短縮する重大な病態である。わが国においては、高齢化の急速な進行に伴って膝関節障害の患者数が増加し続ける

ことが確実で、その治療法を早期に確立することが重要である。膝関節の高度障害に対する人工膝関節置換術は、優れた治療法として健康寿命の延長と生活の質（QOL）の向上に貢献している。しかし、手術後に細菌感染が生

じると、現状では人工関節の抜去・再置換以外に解決する方法がなく、患者にとって大きな負担となる。そのため、術後感染をおこさない画期的な人工膝関節の開発が求められている。

昨年度までの本研究で、申請者らは2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーを用いたディップコーティング法およびグラフトコーティング法による処理を施した金属表面で、蛋白質の吸着が阻害されることを示した。生体内においては、蛋白質が人工関節表面に吸着した後、細菌が付着してバイオフィームが形成されるため、インプラント表面のMPC処理が抗感染性を付与するものと期待される。

今年度の本研究では、MPC処理金属表面における細菌付着およびバイオフィーム形成の抑制効果について検討した。ディップコーティング法およびグラフトコーティング法によるMPC処理を施した金属表面への細菌付着について、蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察と、生菌数の測定をおこなった。また、細菌のバイオフィーム形成量を、蛍光顕微鏡観察と生菌数測定により検討した。これらの結果から、MPC処理による抗感染性を評価した。

B. 研究方法

1. 材料

人工膝関節に用いられている純チタン (Ti)、およびコバルトクロムモリブデン (Co-Cr-Mo) 合金について、

直径 14 mm × 1 mm 厚の試験金属片を作製した。試験金属片表面を、前年度までに確立した方法で、MPC ポリマーを用いたディップコーティング法 (PMB30 処理)、およびポリ MPC (PMPC) を用いたグラフトコーティング法 (PMPC 処理) により、それぞれ処理した。

人工関節感染の多くは、患者自身に常在するブドウ球菌が起炎菌であるので、菌株には、バイオフィー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。

2. 細菌付着抑制効果の検討

トリプトソイブロス (TSB) 中にて前培養を 16 時間行った黄色ブドウ球菌を遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または非働化したウシ胎児血清 (FCS) に懸濁した。金属材料表面に菌を付着させるために、 8×10^8 の菌を含む 0.5 mL の懸濁液を、24 ウェルプレートに配置した試験金属片上に接種して、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、試験金属片表面を 1 mL の PBS で 3 回リンスして、未付着の細菌を除去した。試験金属片表面に残存した菌について、2 種の材質 (純 Ti、Co-Cr-Mo 合金) の、2 種の表面処理 (PMB30 処理、PMPC 処理) で次の 3 つの項目について比較した。

① 蛍光顕微鏡観察

試験金属片表面の菌体を SYTO-9 により染色し蛍光顕微鏡で観察した。

② 走査型電子顕微鏡観察

試験金属片を 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。

③ 付着生菌数測定

試験金属片を 10 mL の PBS 中で超音波処理を 10 分間おこない、試験片表面に付着した菌を回収した。これをリン酸緩衝生理食塩水で段階希釈して 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、付着生菌数を求めた。

3. バイオフィーム形成抑制効果の検討

バイオフィームを効率よく形成させるため、グルコース濃度を 0.5%に調整した TSB で 6×10^5 /mL に希釈した対数増殖期の黄色ブドウ球菌を 0.5 mL ずつ、24 ウェルプレートに配置した純 Ti 試験片上に接種して、37°C で 24 時間インキュベートした。その後、純 Ti 試験片表面を 1 mL の PBS で 3 回リンスし、2 種の表面処理 (PMB30 処理、PMPC 処理) で次の 2 つの項目について比較した。

① 蛍光顕微鏡観察

純 Ti 試験片を SYTO-9 により菌体を、Sypro Ruby でバイオフィームの成分である菌体外マトリクスを、それぞれ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

② 付着生菌数測定

純 Ti 試験片表面をセルスクレーパーで掻き取ることにより、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、付着生菌数を求めた。試験片に付着しなかった菌も別途回収し、付着菌と同様に生菌数を測定した。

4. 細菌遺伝子発現の定量的評価

前項に記載した方法で、純 Ti 試験片上で黄色ブドウ球菌を培養し、バイオフィームと非付着菌をそれぞれ回収した。両者から全 RNA を抽出し、GeneChip *S. aureus* Genome Array (Affymetrix) にて網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。

C. 研究結果

1. 純チタン表面における細菌付着抑制効果の検討

人工関節のステム部分の材料として使用される、純 Ti について表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果を、PBS 中と FCS 中でそれぞれ検討した。

1) PBS 中での試験

まず、黄色ブドウ球菌の増殖に必要な栄養源を含まない PBS をもちいて、貧栄養下での検討をおこなった。

① 蛍光顕微鏡観察

黄色ブドウ球菌の純 Ti 表面への付着状態を観察するため、純 Ti 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 (図 1)。その結果、未処理の場合にところ

どころに観察された細菌塊が、PMB30 処理表面ではわずかに点在する細菌が観察されるのみで、付着細菌が著しく減少していた。驚いたことに、PMPC 処理表面では付着細菌がまったく観察されなかった。

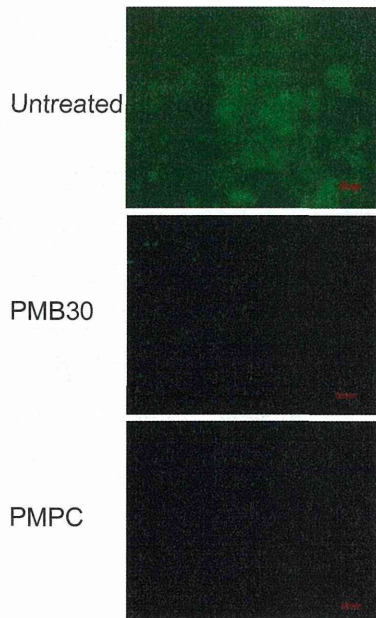


図 1. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

② 走査型電子顕微鏡観察

黄色ブドウ球菌の純 Ti 表面への付着状態をさらに詳しく観察するため、純 Ti 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(図 2)。その結果、未処理の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 Ti 表面には、PMB30 処理、PMPC 処理どちらの場合でも、ほとんど菌が観察されなかった。

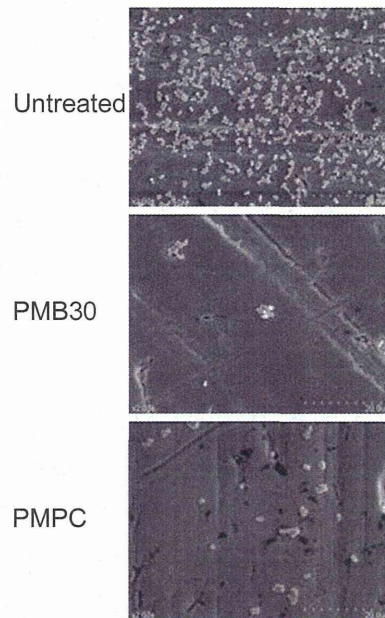


図 2. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の走査型電子顕微鏡観察像 (2000 倍)

③ 付着生菌数

純 Ti 表面に付着した黄色ブドウ球菌の数を測定したところ、純 Ti 表面への PMB30 処理および PMPC 処理は、付着生菌数を約 99%減少させることがわかった(図 3)。

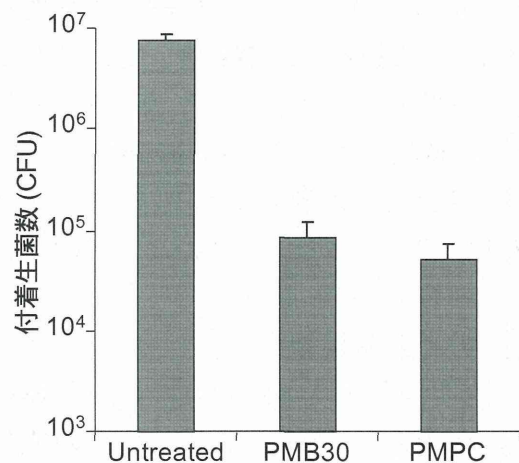


図 3. PBS 中における純 Ti 表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数