

201307019B(1/2)

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)

生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた
画期的な人工膝関節の開発に関する研究

平成23～25年度 総合研究報告書

第1分冊 (1 / 2)

主任研究者 茂呂徹

平成26 (2014) 年 4月

目次

I.	総括研究報告	
	生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた 画期的な人工膝関節の開発に関する研究 茂呂徹	1
II.	分担研究報告	
1.	摺動面材料の検討	37
	石原一彦・埴隆夫・京本政之	
2.	衝撃耐久性の検討	67
	中村耕三・村上輝夫・岡敬之	
3.	摩耗抑制効果の検討	93
	川口浩・中川匠・武富修治	
4.	抗感染性の検討	113
	茂呂徹・宮本比呂志	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	135
IV.	研究成果の刊行物・別刷	139

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））

総括研究報告書

生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた 画期的な人工膝関節の開発に関する研究

主任研究者 茂呂 徹（東京大学医学部附属病院 特任准教授）

研究要旨：本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマー（PMPC）のナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。今年度は、① 摺動面材料の検討、② 荷重支持性の検討、③ 摩耗抑制効果の検討、④ 抗感染性の検討、を行った。

摺動面材料の検討では、機械特性と物理特性から評価し至適超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）レジンが GUR1020 であることを明らかにするとともに、PMPC 処理 PE の滅菌には、一般的な医療機器の滅菌法であるガンマ線照射法、ガスプラズマ法、エチレンオキサイドガス法のいずれも適応が可能であることを明らかにした。また、表面損傷による異常摩耗を防ぐため、超硬質表面化コバルトクロム（CoCr）合金を創出した。

荷重支持性の検討では、Roller-on-flat 型摩擦試験機を用いて、接触面圧、摺動速度、表面粗さおよび潤滑液成分を変化させたときの摩擦係数を計測し、PMPC 処理による水和潤滑ゲル層の潤滑モードを評価した。また、Pin-on-disk 型摩耗試験機を用いた衝撃-摺動条件下において、CLPE 表面に PMPC 処理を施すと高い耐摩耗性を得られること、基材の厚さが薄くなると摺動面及び背面において摩耗が進行する危険性が高くなることが明らかとなった。

摩耗抑制効果の検討では、膝関節シミュレーターを用い検討した。この結果、ガンマ線照射線量の増加にともない、インサートの摩耗が抑制されることが示された。また、PMPC 処理を CLPE 表面に施すことによって、インサートの摩耗が著しく抑制されることが示された。さらに、ガンマ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示された。

抗感染性の検討では、まず金属表面の PMPC 処理について、溶液濃度・処理時間等の至適条件を確立した。また、これらの表面処理表面について、タンパク質吸着、細菌付着、バイオフィーム形成が抑制されることを明らかにした。

以上の研究成果は、生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた画期的な人工膝関節の開発を推進しうるものであり、革新的な人工膝関節の臨床応用が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)
川口 浩	(東京厚生年金病院 脊椎脊髄センター センター長)
石原一彦	(東京大学大学院工学系研究科 教授)
村上輝夫	(九州大学工学研究院 教授)
宮本比呂志	(佐賀大学医学部附属病院 教授)
埴 隆夫	(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)
中川 匠	(帝京大学医学部附属病院 教授)
武富修治	(東京大学医学部附属病院 助教)
岡 敬之	(東京大学医学部附属病院 助教)
京本政之	(京セラメディカル株式会社 課長)

A. 研究目的

膝関節の機能障害は変形性関節症などの疾患や外傷によって起こる。申請者らの調査では、変形性膝関節症の患者は国内に約2300万人存在し、その1/4~1/3は有症性と推定できる(J Bone Miner Metab, 2009)。機能障害は加齢とともに悪化し、高齢化が急速に進む我が国では、歩行困難に陥る患者が増加している。実際、人工膝関節全置換術の件数は年率10%で増加し、年間に6万件以上行われている。しかし人工膝関節には、1) UHMWPE製コンポーネントの摩耗・破損、2) 非感染性弛み、3) 感染、などの合併症が伴う。このため、こうした合併症を激減させる画期的な人工膝関節のニーズは高い。

焦点となるUHMWPEの変化を人工股関節と比較すると、人工股関節では主として凝着摩耗が起こるのに対し、人工膝関節では凝着摩耗に加え、剥層・孔形成・疲労によるひび

割れなどの特異な変化を示す。また、感染は人工膝関節の1~2%に発生するが、これは人工股関節の約2倍である。これらは、画期的な人工膝関節を設計する条件が、人工股関節の場合とは異なることを示す。

画期的な人工膝関節の開発には、画期的な基盤技術が不可欠である。申請者らは平成15年度長寿科学総合研究事業の医工・産官学連携研究を通じて、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質、MPCポリマーを約100~200 nmの厚さで材料表面に結合させる技術(PMPC処理)を開発した(Nature Materials, 2004 他)(平成17年度長寿科学振興財団会長賞)。PMPC処理は、生体の軟骨表面と同様のリン脂質構造を材料の表層に構築し、水和潤滑表面を創出する画期的な独創技術である(関連特許17件)。この技術を搭載した人工股関節は、既に実用化されている(AQUALA®)。しかし人工股関節と比

べ、人工膝関節は関節面の適合性が低く、屈伸運動に roll-back と呼ばれる滑り運動が加わるなど、摺動条件が全く異なる。このため、PMPC 処理が効果を発揮するには、前述の剥層・孔形成・疲労によるひび割れなど膝特有の現象も考慮に入れた新たな研究が必要である。また、PMPC 処理した表面は、細胞やタンパク質の吸着を抑制することから、感染の誘因となるバイオフィルムの形成を抑制する効果も期待できる。

本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。この目的で、1) 衝撃吸収能を有する水和潤滑ゲル層の創出、2) 耐摩耗性に優れた関節摺動面の創出、3) 抗感染性表面の創出を達成するための基礎検討を完成させた。

B. 研究方法

① 摺動面材料の検討

(分担研究者：石原一彦・埴隆夫・京本政之)

1. 至適架橋条件の検討

PMPC 処理効果を効率的に発揮する至適架橋条件を検討するため、種々のガンマ線照射量で架橋した PE (CLPE) を作製し、機械的特性を評価した。

分子量の異なる 2 種類の圧縮成型ポリエチレン材 (GUR1020 および GUR1050) に、25~100 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120℃の熱処理を行ない、CLPE を得た。徐冷後、

機械加工により各種機械的特性評価用の CLPE 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 CLPE 試験体の機械的特性について、ASTM F648-10 規格および ISO5834-part2 規格を参照し、1) 密度測定、2) 架橋密度測定、3) 引張り試験、4) アイゾット衝撃試験、5) 硬さ測定、6) 結晶化度測定、7) クリープ変形測定、8) 微小多軸引張り試験 (スモールパンチ試験) により評価した。

2. 滅菌方法の検討

総ガンマ線照射量が 75 kGy となるよう各試験体を作製した後、PMPC 処理を施した。PMPC 処理 CLPE 試験体の機械的特性を評価するため、引張り試験、衝撃試験およびスモールパンチ試験を、物理的特性を評価するため、密度測定および架橋密度測定を、化学的安定性を評価するため、酸化誘導時間測定を実施した。

1) 種々の滅菌条件における PMPC 処理 CLPE の作製

a) PMPC 処理 CLPE (ガンマ線) の作製

UHMWPE 材 (GUR1020) 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℃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。得られた試験体に対し、PMPC 処理を行った。得られた PMPC 処理 CLPE に不活性雰囲気下でガンマ線を照射し、PMPC 処理 CLPE (ガンマ線) を得た。

b) PMPC 処理 CLPE (GP) および PMPC

処理 CLPE (EOG) の作製

UHMWPE 材 (GUR1020) に、不活性雰囲気にて 75 kGy のガンマ線を照射した。照射後、120℃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。得られた試験体に対し、PMPC 処理を行った。ガスプラズマ滅菌およびエチレンオキサイドガス滅菌を施し、PMPC 処理 CLPE (GP) および PMPC 処理 CLPE (EOG) を得た。対照として滅菌前の PMPC 処理 CLPE (未滅菌) を用いた。

2) PMPC 処理 CLPE の評価

a) 機械的特性

引張試験、アイゾット衝撃試験、スモールパンチ試験にて評価した。

b) 物理的特性

架橋密度にて評価した。

c) 化学的安定性

酸化誘導時間測定にて評価した。

2. 超硬質表面化コバルトクロム (Co-Cr) 合金の検討

超硬質表面化 Co-Cr 合金の検討材料には、Co-28Cr-6Mo 合金の熱間圧延丸棒材 (ASTM F1537 合金) を用いた。本丸棒材を機械加工により所望の試験片形状に機械加工した後、試験片評価面を #2400 までの炭化ケイ素の研磨紙による湿式研磨およびコロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理前の試験片を得た。この試験片を用いて、HF+N₂ 混合ガス雰囲気下で 350℃にて 2 時間保持の活性化熱処理を施した後、CO+H₂+N₂ 混合ガス雰囲気下で 500℃にて 32 時間保持の浸炭

熱処理を施した。浸炭熱処理後、スレーティング除去を目的として、35% HNO₃ 水溶液中にて酸洗浄を施し、評価面にコロイダルシリカによるバフ研磨を施し、浸炭熱処理試験片を得た。

試験片表面の、X 線回折 (XRD) 分析・マイクロビッカースによる硬さ測定・グロー放電発光分光 (GDOES) 分析・走査型電子顕微鏡 (SEM) による低温浸炭層厚の測定を行った。

② 衝撃耐久性の検討

(分担研究者：中村耕三・村上輝夫・岡敬之)

1. PMPC 処理 PE (CLPE) の作製

1) 試薬

MPC モノマーは、日油製を用いた。PE 基材には、人工股関節に使用されている架橋 PE (CLPE) を用いた。

2) PMPC 処理

CLPE 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 試験体を、MPC 水溶液に浸漬し、5 mW/cm² の紫外線を 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℃になるよう調整した。重合後、CLPE 試験体を超純水およびエタノールにて十分に洗浄し、PMPC 処理 CLPE を得た。

2. Roller-on-flat 摩耗試験装置を用いた PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

Flat 型試験片には、接触面圧を変化させるため、表面形状をフラット、曲率半径 35 mm および 30.5 mm の曲面とした未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE を用いた。Roller 型試験片には、アルミナセラミックスを用いた。潤滑液には精製水および 30%ウシ胎児血清溶液 (FBS)を用いた。垂直荷重は 100 N とし、摺動速度は 9.42 mm/s から 1500 mm/s まで変化させ、摺動距離 377 m まで摩擦試験を行った。動摩擦係数は、Roller-on-flat 試験機に設置されたロードセルより摺動動作中に検出される摩擦力および Roller より加えている垂直荷重より算出した。あわせて、摩擦試験後の Flat 試験片表面 PMPC 層の残存を Rhodamine 6G を用いた蛍光顕微鏡観察により確認した。

3. Pin-on-disk 摩耗試験装置を用いた PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

ASTM F732-00 規格、F2025-06 規格を参考に、pin-on-disk 型摩耗試験装置を用い、衝撃-摺動試験を行った。Disk 型試験片には、厚さ 3 mm/6 mm の未処理 CLPE/PMPC 処理 CLPE を用い、pin 型試験片には、コバルトクロム合金 (Co-Cr) を用いた。衝撃-摺動試験は、37°C のウシ血清中にて行った。最大荷重は 150 N とし、摺動距離 10 mm、摺動速度 1 Hz の条件で 200 万サイクルまで試験を行った。衝撃-摺動試験は、5 万、20 万、50

万、100 万および 200 万サイクル終了時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 または 6 mm の未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE の試験片の soak 試験を行い、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。また、外観観察を行うとともに、デジタルマイクロスコープ (キーエンス製 VHX-200) を用いて摺動部の観察、走査型共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス製 OLS1200) を用いたディスク試験片表面の衝撃部・背面の孔部の観察、マイクロ CT 装置 (島津製作所製 InspeXio) を用いたディスク試験片内部の観察を行った。

③ 摩耗抑制効果の検討

(分担研究者：川口浩・中川匠・
武富修治)

1. CLPE インサートの作製

PE 基材には、人工関節摺動部材として広く使用されている、GUR1020 UHMWPE を用いた。ガンマ線架橋線量による摩耗低減効果を比較するため、25、40、50 および 75 kGy のガンマ線照射を行った。CLPE はガンマ線照射後、フリーラジカルを除去するため、熱処理を実施した。人工膝関節インサートを作製し、25 kGy のガンマ線滅菌を施した。

2. PMPC 処理

②-2.の方法に準じて行った。

3. 滅菌

滅菌操作が PMPC 処理効果に与える影響を検討するため、 γ 線滅菌またはガスプラズマ滅菌を行った PMPC 処理 CLPE インサートを準備した。

4. 膝関節シミュレーター試験機を用いた摩耗試験

膝関節シミュレーター試験機を用い、インサートの摩耗特性試験を行った。インサートと対向させる大腿骨コンポーネントは Co-Cr-Mo 合金により作製した。潤滑液には 27%ウシ胎児血清を用いた。シミュレーター試験は ISO 14243 に基づき、ヒトの歩行動作を再現した動作条件で 500 万サイクルの試験を行った。50 万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、インサートの回収、洗浄、乾燥、重量測定を行い、摩耗量として算出した。三次元形状測定機を用いた摺動部の変形量測定および走査型レーザー顕微鏡を用いた摺動部の観察を行った。また、シミュレーターの潤滑液から摩耗粉を回収し、走査型電子顕微鏡により形態観察を行うとともに、円相当径による粒度分布解析を行った。

④ 抗感染性の検討

(分担研究者：茂呂徹・宮本比呂志)

1. 金属表面の PMPC 処理方法の検討

人工関節に用いられているコバルトクロムモリブデン(Co-Cr-Mo)合金、純チタン(以下 Ti)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(PMB30 処理)、ポリ(MPC)

(PMPC)を用いたグラフトコーティング法(PMPC 処理)により処理した。

2. PMPC 処理金属表面の解析

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金/純 Ti 試験体について、X 線光電子分光(XPS)分析、フーリエ変換赤外分光(FT-IR)分析、水による静的接触角の測定、蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察、透過電子顕微鏡(TEM)観察を行った。

3. タンパク質吸着試験

金属表面へのタンパク質吸着について、低濃度のタンパク質濃度測定に適した micro-BCA Protein Assay 試薬を用いて評価した。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したタンパク質量について、micro-BCA 法により評価した。PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体を、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ血清 γ -グロブリン、ウシ血漿フィブリノーゲン溶液に、37°C で 1 時間浸漬させた。BSA、 γ -グロブリン、フィブリノーゲン溶液は、ヒトの血漿の 10%の濃度になるように、それぞれ 4.5、1.6 および 0.3 g/L に調製した。浸漬後、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体は、室温で 1 時間、界面活性剤溶液に浸漬した。PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面より引き剥がされた BSA、 γ -グロブリンおよびフィブリノーゲンの量は、micro-BCA Protein Assay 試薬(#23235)を用いて、評価した。

4. 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 (*Staphylococcus aureus* UEOH-6) 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、純 Ti/Co-Cr-Mo 合金の表面処理 (PMB30 処理/PMPC 処理) で、蛍光顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡観察、付着生菌数測定 の 3 項目について比較した。

5. バイオフィルム形成抑制効果

バイオフィル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、蛍光顕微鏡観察、付着生菌数測定 の 2 の項目を比較した。

6. 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

オフィル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 摺動面材料の検討

(分担研究者：石原一彦・埴隆夫・京本政之)

1. 至適架橋条件の検討

1) 密度測定

ガンマ線照射線量の増加にともなう、密度は増加した。また、GUR1050 レジンによる CLPE の密度は、GUR1020 レジンに比べ、何れのガンマ線照射量でも、高い値を示した。

2) 架橋密度

ガンマ線照射線量の増加にともない架橋密度は増加し、75 kGy でほぼ一定となった。また、GUR1050 レジンによる CLPE の架橋密度は、GUR1020 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。

3) 引張り試験

ガンマ線照射線量の増加にともない引張り降伏強度は増加したのに対し、引張り破断強度および引張り破断伸びは減少した。特に 75 kGy 以上のガンマ線を照射した GUR1050 レジンによる CLPE の引張り破断伸びは、ASTM 規格による要求値を満たしていなかった。また、GUR1020 レジンによる CLPE の引張り伸びは、GUR1050 レジンに比べ、何れのガンマ線照射量でも、高い値を示した。

4) 衝撃試験

ガンマ線照射線量が増加するにともなって、アイゾット衝撃強度は減少した。また、GUR1020 レジンによる CLPE のアイゾット衝撃強度は、GUR1050 レジンのそれに比べ、25 kGy を除くいずれのガンマ線照射量においても、高い値を示した。

5) 硬さ測定

ガンマ線照射線量の増加にともない硬さは増加した。また、GUR1050 レジンの CLPE の硬さは、GUR1020 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。

6) 結晶化度測定

100 kGy 以下のガンマ線照射量の範囲では、何れの分子量のレジンによる CLPE の結晶化度も、変化しなかった。

7) クリープ変形測定

ガンマ線照射線量の増加にともない、何れの分子量のレジンの CLPE もクリープ変形量は徐々に低下した。100 kGy 以下のガンマ線照射の範囲において、レジンによるクリープ変形量の差は認められなかった。また、何れの CLPE の値も、ASTM が要求する値を満たした。

8) 微小多軸引張り試験（スモールパンチ試験）

ガンマ線照射線量の増加にともない、何れの分子量の CLPE の微小多軸引張り破断荷重も徐々に増加したが、微小多軸引張り破断変位・微小多軸引張り破断エネルギーは徐々に減少した。50 kGy 以下のガンマ線照射の範囲において、レジンによる微小多軸引張

り特性の差は認められなかった。

2. 滅菌方法の検討

1) 機械的特性の評価

a) 引張試験

PMPC 処理 CLPE (GP) が滅菌前と比較して有意に低い最大強度を示した。破断点歪みは滅菌前後で有意な差がみられなかった。いずれの滅菌条件においても最大強度および破断点歪みともに ASTM F648 の規格を満たす結果であった。

b) アイゾット衝撃試験

PMPC 処理 CLPE (GP) および PMPC 処理 CLPE (EOG) は有意に高い衝撃強度を示した。いずれの滅菌条件においても ASTM F648 の規格を満たす結果であった。

c) スモールパンチ試験

最大荷重はいずれの滅菌前後においても有意差がなかった。破断点距離は、PMPC 処理 CLPE (GP)、PMPC 処理 CLPE (EOG) が滅菌前と比較して有意に高い値を示した。破断エネルギーは、PMPC 処理 CLPE (GP) が滅菌前と比較して有意に高い値を示した。その他の滅菌前後には有意差はみられなかった。

2) 物理的特性

各滅菌条件での PMPC 処理 CLPE の架橋密度を比較すると、いずれの滅菌前後においても有意差がなかった。

3) 化学的安定性

滅菌条件での PMPC 処理 CLPE の酸化誘導時間を比較すると、いずれの滅菌前後においても有意差がなかった。

3. 超硬質表面化 Co-Cr 合金の検討

1) SEM 観察

浸炭熱処理後の Co-Cr 合金表面には、約 20 μm の均一な処理層の形成が認められた。一方、浸炭熱処理前後において、基材である Co-Cr 合金のミクロ組織に変化は認められなかった。

2) XRD 分析

Co-Cr 合金の XRD パターンには、Co の γ 相 (111 面、200 面) に帰属されるピークが観察された。浸炭熱処理後の Co-Cr 合金の XRD パターンでは、この Co の γ 相 (111 面、200 面) に帰属されるピークが低角にシフトし、また、ブロード化した。すなわち、(111) 面と (200) 面の面間隔が広くなり、格子の規則性も低下した。

3) 硬さ測定

浸炭熱処理後、Co-Cr 合金表面のマイクロビッカース硬さは、未処理の約 3 倍にまで増加した。この硬質な処理層は、表面から約 20 μm の深さまであり、断面 SEM 写真で認められた処理層の厚さと一致した。また、その硬さは表面から徐々に減少しており、処理層が傾斜的であることを示した。

4) GDOES 分析

浸炭熱処理後、Co-Cr 合金表面の炭素濃度は約 4 mass% であり、その濃度は表面から徐々に減少した。炭素が含まれる層は、表面から約 20 μm の深さまで存在しており、断面 SEM 写真で認められた処理層の厚さと一致した。

② 衝撃耐久性の検討

(分担研究者：中村耕三・村上輝夫・

岡敬之)

1. Roller-on-flat 摩耗試験装置を用いた PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

精製水環境では未処理 CLPE/PMPC 処理 CLPE とともに、速度の上昇により摩擦係数は低下する傾向を示した。人工膝関節に近い低速度域に着目すると、未処理 CLPE に比べ PMPC 処理 CLPE は低い摩擦係数を示した。高速度域においては未処理 CLPE/PMPC 処理 CLPE の摩擦係数は同程度となった。

血清環境では、精製水環境に比べ低い摩擦係数を示し、未処理/PMPC 処理 CLPE の摩擦係数に差はなかった。

2. Pin-on-disk 摩耗試験装置を用いた PMPC 処理 CLPE の摩耗特性試験

厚さ 3 mm または 6 mm の未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE の衝撃-摺動試験を行った。いずれの試験片についても摩耗量がマイナスの値を示した。同様の研究を行っている諸家からも報告されているが、静的環境である soak 試験では、動的環境である摩耗試験下の CLPE 試験片の吸水重量を完全に再現することは難しいことが原因として考えられた。しかし、本試験は、同一試験条件下における試験片群間の摩耗特性の比較という性質を持ち合わせており、吸水重量による補正を含む試験は、試験片の摩耗特性の傾向を評価する方法として妥当であると考えられた。

200 万サイクルの試験後、いずれの厚さにおいても、PMPC 処理 CLPE の摩耗量は未処理 CLPE と比べて低く、

PMPC 処理によって高い耐摩耗性を得ることがわかった。また、各材料において、厚さ 3 mm の試験片は、6 mm と比べて高い摩耗量を示した。

マイクロスコープ観察および表面性状評価結果から未処理 CLPE および PMPC 処理 CLPE において、背面摩耗が生じることが明らかとなった。背面摩耗の進行は未処理 CLPE 群および PMPC 処理 CLPE 群ともに、厚さ 3 mm の disk 試験片で顕著であった。

200 万サイクル終了後のディスク試験片をレーザー顕微鏡で観察すると、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。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は認められなかった。ディスク背面では、全ての試験片において、チタン合金製治具の中央に設けたホールによる円形の痕が形成された。ホールの外側、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。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。

200 万サイクル終了後のディスク試験片をマイクロ CT で評価すると、いずれの試験片においても、内部クラックの発生は認められなかった。

③ 摩耗抑制効果の検討

(分担研究者：川口浩・中川匠・武富修治)

1. 架橋線量が耐摩耗特性に与える影響の検討

1) 摩耗量の評価

重量変化から架橋条件と摩耗量の関係を検討した。非架橋 PE と比較し、CLPE の摩耗は低減し、架橋線量に比例して摩耗低減効果は高くなった。特に、50 kGy の CLPE では顕著に摩耗が抑制された。摩耗率と架橋線量の間を検討すると、架橋線量の上昇とともに摩耗率は低下する傾向を示した。

2) インサート表面の評価

インサート表面を三次元形状測定機で計測すると、摺動部の変形は、50、75 kGy の架橋線量の CLPE で顕著に抑制された。また、インサート摺動部のレーザー顕微鏡観察を行うと、非架橋 PE、25、40 kGy CLPE では、摺動方向に沿った深い摩耗痕が認められた。一方、50、75 kGy CLPE では、大きな摩耗痕は認められなかった。また、試験終了後の CLPE インサート摺動部をレーザー顕微鏡で観察すると、非架橋 PE、25、40 kGy CLPE では、摺動方向に沿った深い摩耗痕が認められた。一方、50、75 kGy CLPE では、大きな摩耗痕は認められなかった。摺動部の観察において、剥層やひび割れなどの破損は認められなかった。

3) 摩耗粉の評価

PE では、視野全体に多くの摩耗粉が分散している様子が見られた。摩耗粉は細長い fibril 様の形態を示すものが多くみられた。架橋線量 50 kGy の CLPE の群では視野に見られる摩耗粉の数は、PE に比べ少なく、その形態は granular が主であった。円相当径の平均は、PE では 0.89 μm 、架橋線量

50 kGy の CLPE の群では $0.87 \mu\text{m}$ となり、有意な差は認められなかった。一方、その粒子数は PE に比べ架橋線量 50 kGy の CLPE の群では顕著に少なく抑制されていた。

2. PMPC 処理 CLPE インサートの摩耗特性評価

1) 摩耗量の評価

重量変化から摩耗量を検討すると、PMPC 処理 CLPE インサートは、未処理群と比較して全く摩耗しなかった。

2) インサート表面の評価

三次元形状測定機で計測すると、未処理 CLPE と比較して PMPC 処理 CLPE は、摺動部の形状変化が抑制されていることがわかった。また、インサート摺動部のレーザー顕微鏡観察像を行うと、試験後、未処理 CLPE の摺動面は摩耗し、滑らかな表面状態であることが観察された。これに対し、PMPC 処理インサート摺動面にはツールマークの残存が認められた。

3) 摩耗粉の評価

未処理 CLPE では、視野全体に摩耗粉が分散している様子が観察された。これに対し PMPC 処理群では摩耗粉は殆ど観察されなかった。また、未処理/PMPC 処理 CLPE 群で観察した摩耗粉の形態は granular 様が主であった。さらに、摩耗粉における円相当径分布の解析を行うと、CLPE では $0.1\sim 2.5 \mu\text{m}$ の範囲の摩耗粉が観察され、中でも $0.5\sim 1.0 \mu\text{m}$ の摩耗粉が多かった。一方、PMPC 処理 CLPE では、 $0.5\sim 1.5 \mu\text{m}$ の摩耗粉が観察された。PMPC 処

理 CLPE の摩耗粉粒子数は、CLPE と比べ、著しく少なかった。

3. 滅菌操作が耐摩耗特性に与える影響の検討

1) γ 線滅菌 CLPE インサートの評価

重量摩耗を検討すると、未処理 CLPE、PMPC 処理 CLPE と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差はみられなかった。

試験後のインサートの摺動表面を観察すると、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。インサートの背面では、小さな傷の発生と、脛骨トレー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摺動面を観察すると、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。

2) 滅菌 CLPE インサートの評価

重量摩耗を検討すると、PMPC 処理 CLPE インサートは未処理 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差はみられなかった。

膝シミュレーター試験後の未処理 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。

④ 抗感染性の検討

(分担研究者：茂呂徹・宮本比呂志)

1. MPC ポリマー処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

1) XPS 分析

PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面には、MPC 由来の窒素、リンが検出された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の窒素、リンの原子濃度は、PMPC の理論値(各々、5.3 atom%)に近い値にまで達していた。これに対し、MPC 含有量が 30 mol%である PMB30 を用いて処理した表面でのそれらは、2.3~3.0 atom%に留まった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の結果であった。

2) FT-IR 分析

未処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、赤外吸収ピークの存在が認められなかったのに対し、PMB30 処理および

PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、 1460cm^{-1} 付近にメチレンに帰属されるピーク、 1240 、 1080 および 970cm^{-1} にリン酸基に帰属されるピークが、 1720cm^{-1} にケトン基に帰属されるピークが観察された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、Si-O 基に帰属されるピークが観察された。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様のピークが認められた。

3) 水による静的接触角の測定

未処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は、それぞれ 81.6° 、 77.2° だった。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は 95.8° 、 95.6° であった。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面のそれらは、それぞれ 23.5° 、 20.1° と高い親水性を示した。

4) 蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

未処理 Co-Cr-Mo 合金では、ほとんど蛍光発光が見られないのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理した Co-Cr-Mo 合金はいずれも、表面全域において発光が認められ、その状態は均一であった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の蛍光発光状態が認められた。

5) TEM 観察

PMB30 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 50 nm の PMB30 処理層の形成が認められた。また、その層中には幾らかの気孔の形成も認められた。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 200

nm の均一な処理層の形成が認められた。また、PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の処理層形成が認められた。

2. グラフトコーティングの至適条件の検討

1) XPS 分析

いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面のケイ素濃度は減少する一方で、窒素、リンの濃度は増加した。0.50 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、90 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、MPC 原子濃度の理論値に到達した。

1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、45 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、理論値に到達した。

2) 水による静的接触角の測定

いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は低下した。0.50 mol/L 以上の MPC 濃度のとき、90 分以上の紫外線照射時間で、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は約 20° で安定した。

3) TEM 観察

MPC 水溶液濃度を増やすことにより、Co-Cr-Mo 合金表面に形成する PMPC 層の厚さは増加した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、その層厚は約 360 nm に達した。

3. タンパク質吸着試験

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo

合金表面に吸着したアルブミン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/5~2/5 程度であった。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着した α -グロブリン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/3~1/2 程度であった。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したフィブリノーゲン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/16~1/8 程度であった。

4. 純チタン表面における細菌付着抑制効果の検討

1) PBS 中での試験

a) 蛍光顕微鏡観察

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この結果、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。

b) 走査型電子顕微鏡観察

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 処理どちら場合でも、ほとんど菌が観察されなかった。

c) 付着生菌数

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。

2) FCS 中での試験

a) 蛍光顕微鏡観察

未処理の純 Ti 表面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、PMB30 処理、PMPC 処理ともに、ほとんど観察されなかった。

b) 走査型電子顕微鏡観察

未処理の純 Ti 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 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。

c) 付着生菌数

純 Ti 表面に PMB30 処理および PMPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99%減少した。

5. Co-Cr-Mo 合金表面への細菌付着抑制効果の検討

1) PBS 中での試験

a) 蛍光顕微鏡観察

未処理表面では菌が全表面に均一に付着していたのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理を施すことで、菌の付着が顕著に抑制されていた。

b) 走査型電子顕微鏡観察

純 Ti の場合と同様に、MPC 処理によって菌の付着が顕著に抑制された。

c) 付着生菌数

純 Ti の場合と同様に、PMB30 処理および PMPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99%減少した。

2) FCS 中での試験

a) 蛍光顕微鏡観察

純 Ti の場合と同様に、未処理表面で観察された細菌が、MPC 処理表面ではほとんど観察されなかった。

b) 走査型電子顕微鏡観察

純 Ti の場合と同様に、PMPC 処理によって菌の付着が顕著に抑制された。

c) 付着生菌数

純 Ti の場合と同様に、PMB30 処理および PMPC 処理を施すことで、菌の付着が約 99%減少した。

6. バイオフィーム形成抑制効果

MPC 処理による黄色ブドウ球菌の付着抑制効果は金属材料で差がなかったため、純 Ti で検討を行った。

a) 蛍光顕微鏡観察

未処理の場合には純 Ti 試験片表面が多数の菌体とバイオフィームに覆われていたが、MPC で処理された表面では、PMB30 処理、PMPC 処理ともに、菌体とバイオフィームがほとんど観察されなかった。

b) 付着生菌数

純 Ti 表面に PM30 処理および PMPC 処理を施すことで、付着菌数が 99%減少した。一方、浮遊菌数は、MPC 処理の有無で差がなかった。

7. 遺伝子発現の定量的評価

純 Ti 表面で形成されたバイオフィーム中の菌と、未付着の浮遊菌とで遺伝子発現を定量的に比較し、バイオフィームで発現が上昇している遺伝子を探索した。その結果、純 Ti 表面のバイオフィームでは、物質輸送、細胞壁、鉄イオン結合、代謝、などに関与する遺伝子の発現が、浮遊菌に比べて亢進していることがわかった。

D. 考察

本研究の目的は、生体親和性に優れた MPC ポリマー (PMPC) のナノ表面処理技術を応用し、耐久性と抗感染能に優れた画期的な人工膝関節を開発することである。今年度は、① 摺動面材料の検討、② 荷重支持性の検討、③ 摩耗抑制効果の検討、④ 抗感染性の検討、を行った。

摺動面材料の検討では、耐久性に優れた画期的なナノ表面構築型人工膝関節を開発するための至適な架橋照射線量は 75 kGy、至適 PE レジンは GUR1020 であることを明らかにした。また、PMPC 処理 PE の滅菌には、一般的な医療機器の滅菌法であるガンマ線照射法、ガスプラズマ法、エチレンオキサイドガス法のいずれも適応が可能であることを明らかにした。さらに、表面損傷による異常摩耗を防ぐため、コバルトクロム (Co-Cr)合金に表面から傾斜的に炭素を固溶させ、合金表面を硬質化した、超硬質表面化 Co-Cr 合金を創出した。

荷重支持性の検討では Roller-on-flat 型摩擦試験機を用いて、接触面圧、摺動速度、表面粗さおよび潤滑液成分を変化させたときの摩擦係数を計測し、PMPC 処理による水和潤滑ゲル層の潤滑モードを評価した。また、Pin-on-disk 型摩耗試験機を用いた衝撃-摺動条件下において、CLPE 表面に PMPC 処理を施すと高い耐摩耗性を得られること、基材の厚さが薄くなると摺動面及び背面において摩耗が進行する危険性が高くなることが明らかとなった。

摩耗抑制効果の検討では、至適レジンをを用い、種々の照射線量により架橋された PE の摩耗抑制効果を、膝関節シミュレーターを用い検討した。この結果、ガンマ線照射線量の増加にともない、インサートの摩耗が抑制されることが示された。また、PMPC 処理を CLPE 表面に施すことによって、インサートの摩耗が著しく抑制されることが示された。さらに、 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。

抗感染性の検討では、まず金属表面の PMPC 処理について、溶液濃度・処理時間等の至適条件を確立した。また、これらの表面処理表面について、タンパク質吸着、細菌付着、バイオフィーム形成が抑制されることを明らかにした。

E. 結論

以上の研究成果は、生体親和性材料によるナノ表面処理を用いた画期的な人工膝関節の開発を推進しうるものであり、革新的な人工膝関節の臨床応用が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) Ishihara K, Goto Y, Matsuno R, Inoue Y, Konno T: Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions.

- Biochim Biophys Acta-General* 1810(3): 268-75, 2011.
- 2) Inoue Y, Nakanishi T, Ishihara K: Adsorption force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces. *React Funct Polym* 71(3): 350-5, 2011.
 - 3) Matsuno R, Ishihara K: Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications. *Nano Today* 6(1): 61-74, 2011.
 - 4) Ye Y, Fukazawa K, Huang N, Ishihara K: Effects of 3,4-dihydrophenyl groups in water-soluble phospholipid polymer on stable surface modification of titanium alloy. *Colloid and Surfaces B: Biointerface* 88(1): 215-20, 2011.
 - 5) 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: 225-236, 2012.
 - 6) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33: 4451-4459, 2012.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsuda S, Nakamura K: Mortality and morbidity in dialysis-dependent patients undergoing spinal surgery: analysis of a national administrative database in Japan. *J Bone Joint Surg Am* 94(5):433-8, 2012.

- 13) 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.
- 14) Murakami T: Importance of adaptive multimode lubrication mechanism in natural and artificial joints. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J. J Engineering Tribology* 226(10): 827-37, 2012.
- 15) Omata S, Sonokawa S, Sawae Y, Murakami T: Effects of both vitamin C and mechanical stimulation on improving the mechanical characteristics of regenerated cartilage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424(4):724-9, 2012.
- 16) Cho C, Murakami T, Sawae Y: Wear phenomena of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) joints. *Chapt.8 in Wear of Orthopaedic Implants and Artificial Joints, ED by S. Affatato. Woodhead Publishing* 221-45, 2012.
- 17) Ikeda J, Iwamoto M, Yarimitsu S, Murakami T: Differences in Kinetics of Phase Transformation of 3Y-TZP Ceramics between Aging Test under Hydrothermal Environment and Hip Simulator Wear Test, J. *Biomechanical Science and Engineering* 7(2): 199-210, 2012.
- 18) 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.
- 19) Ma C, Nagai A, Yamazaki Y, Toyama T, Tsutsumi Y, Hanawa T, Wang W, Yamashita K: Electrically polarized micro-arc oxidized TiO₂ coatings with enhanced surface hydrophilicity. *Act Biomater* 8: 860-5, 2012.
- 20) Hieda J, Niinomi M, Nakai M, Kamura H, Tsutsumi H, Hanawa T: Effect of terminal functional groups of silane layers on adhesive strength between biomedical Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy and segment polyurethanes. *Surf Coat Technol* 206: 3137-41, 2012.
- 21) Nagai A, Tsutsumi Y, Suzuki Y, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K: Characterization of air-formed surface oxide film on a Co-Ni-Cr-Mo alloy (MP35N) and its change in Hanks' solution. *Appl Surf Sci* 258: 5490-8, 2012.
- 22) Tsutsumi Y, Bartakova S, Prachar P, Suyalatu, Migita S, Doi H, Nomura N, Hanawa T: Long-term corrosion behavior biocompatible b-type Ti alloy in simulated body fluid. *J Electrochem Soc* 159: C435-40, 2012.
- 23) Akazawa T, Murata M, Tazaki J, Hino J, Nakamura K, Yoshinari S, Tabata Y, Hanawa T, Takahata M, Iwasakai N, Ito M, Ohmori T, Yamachika H, Kikuchi M: Characterization of bio-absorbable and biomimetic granules produced from animal bone by the high velocity rotation-crushing and demineralizing technique. *Phosphate Res Bull* 26: 65-70, 2012.
- 24) Inoue Y, Ye L, Ishihara K, Yui N: Preparation and Surface Properties of Polyrotaxane-containing Tri-block Copolymers as a Design for Dynamic Biomaterials Surfaces. *Colloids and*

- Surfaces B: Biointerfaces* 89(1): 223-227, 2012.
- 25) Choi J, Konno T, Takai M, Ishihara K: Regulation of cell proliferation by multilayered phospholipid polymer hydrogel through controlled release of bioactive agent. *Biomaterials* 33(3): 954-61, 2012.
- 26) Mieda S, Amemiya Y, Kihara T, Okada T, Sato T, Fukazawa K, Ishihara K, Nakamura N, Miyake J, Nakamura C: Mechanical Force-Based Probing of Intracellular Proteins from Living Cells Using Antibody-Immobilized Nanoneedles. *Biosens Bioelectron* 31(1): 323-9, 2012.
- 27) Takahara A, Kikuchi M, Terayama Y, Ishikawa T, Hoshino T, Kobayashi M, Ogawa H, Masunaga H, Koike J, Horigome M, Ishihara K: Chain Dimension of Polyampholytes in Solution and Immobilized Brush States. *Polym J* 44(1): 121-30, 2012.
- 28) Bhuchar N, Thundat T, Sunasee R, Ishihara K, Narain R: Degradable Thermo-Responsive Nanogels for Proteins Encapsulation and Controlled Release. *Bioconjugate Chem* 23(1): 75-83, 2012.
- 29) Aikawa T, Konno T, Takai M, Ishihara K: Continuous preparation of a spherical phospholipid polymer hydrogel for cell encapsulation using a flow-focusing microfluidic channel device. *Langmuir* 28(4): 2145-50, 2012.
- 30) Li Z, Konno T, Takai M, Ishihara K: Fabrication of polymeric electron-transfer mediator/enzyme hydrogel multilayer on an Au electrode in a layer-by-layer process. *Biosensor Bioelectron* 34(1): 191-6, 2012.
- 31) Yao Y, Fukazawa K, Ma W, Ishihara K, Huang N: Platelet adhesion-resistance of titanium substrate with mussel-inspired adhesive polymer bearing phosphorylcholine group. *Appl Surf Sci* 258(14): 5418-23, 2012.
- 32) Kotanen C, Nolan A, Ann W, Wilson M, Ishihara K: Anthony Guiseppi-Elie: Biomimetic hydrogels gate transport of calcium ions across cell culture inserts. *Biomed Microdevice* 14(3): 549-58, 2012.
- 33) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33(18): 4451-9, 2012.
- 34) Seo J, Kakinoki S, Inoue Y, Yamaoka T, Ishihara K, Yui N: Designing dynamic surfaces for regulation of biological responses. *Soft Matter* 8: 5477-85, 2012.
- 35) Kobayashi M, Terayama Y, Yamaguchi H, Terada M, Murakami D, Ishihara K, Takahara A: Wettability and antifouling behavior on the super hydrophilic polymer brush immobilized surfaces. *Langmuir* 28(18): 7212-22, 2012.
- 36) Fukazawa K, Ishihara K: Simple surface treatment using amphiphilic phospholipid polymers to obtain wetting and lubricity on polydimethylsiloxane-based substrates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 97(1): 70-5, 2012.
- 37) Byambaa B, Konno T, Ishihara K: Cell adhesion control on photoreactive phospholipid polymer surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 99(1):1-6, 2012.
- 38) Sibarani J, Konno T, Takai M, Ishihara K: Nonbiofouling surfaces covered by bio-inspired 2-methacryloyloxyethyl