

験におけるCLPEおよびPMPC処理CLPEインサートの摩耗重量を示す。PMPC処理CLPEインサートは、CLPEインサートと比較して全く摩耗せず、その重量は試験サイクルが進むにつれ増加した。

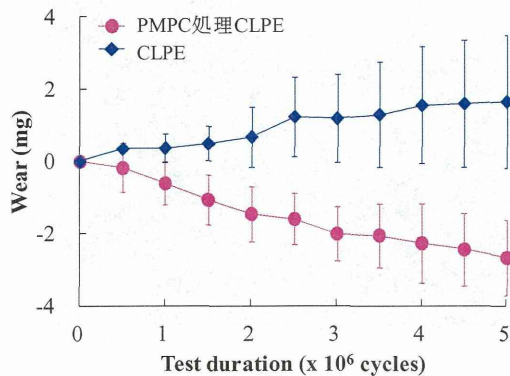


図 9. 膝関節シミュレーター試験によるCLPEおよびMPC処理CLPEインサートの摩耗重量

図 10 に、500 万サイクル後のCLPEおよびMPC処理CLPEインサート摺動部の変形量測定結果を示す。CLPEと比較するとPMPC処理CLPEは、インサート摺動部の形状変化が抑制されていることがわかった。

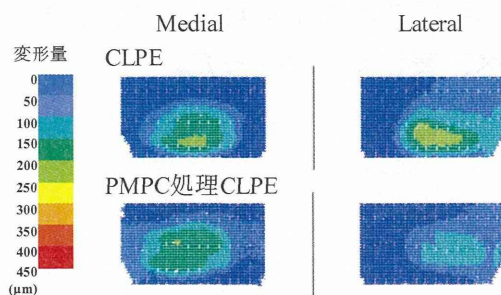


図 10. 500 万サイクル後のCLPEインサート摺動部の変形量

図 11-1 に、膝関節シミュレーター試験前後におけるCLPEインサート摺動部、図 11-2 に、PMPC処理CLPEインサート摺動部のレーザー顕微鏡観察像を示す。500 万サイクルのシミュレーター試験後、CLPEインサートの摺動面は摩耗し、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CLPE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。

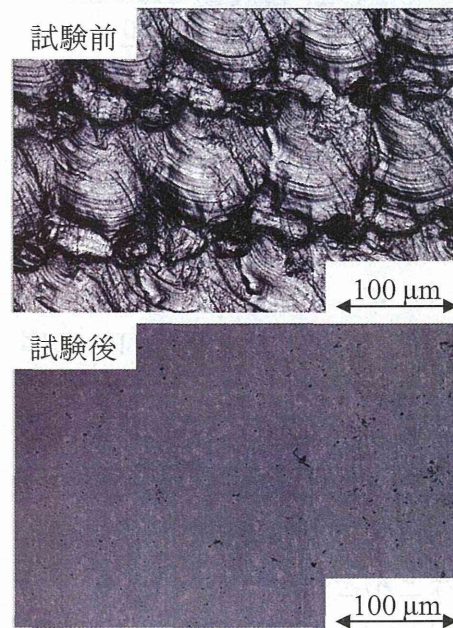


図 11-1. 試験前後におけるCLPEインサート摺動部のレーザー顕微鏡観察像

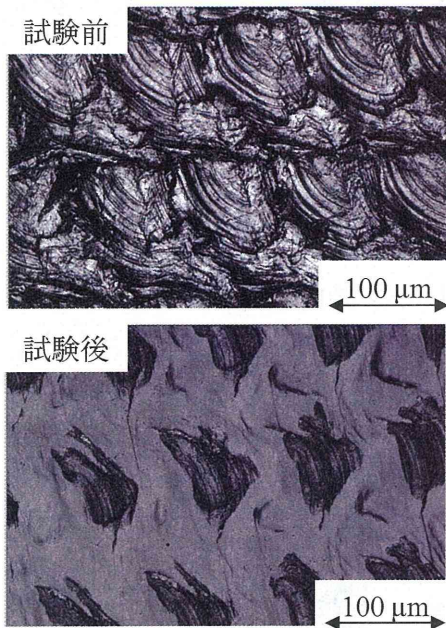


図 11-2. 試験前後における PMPC 処理 CLPE インサート摺動部のレーザー顕微鏡観察像

図 12 に、500 万サイクル後の CLPE および PMPC 処理 CLPE の摩耗粉観察像を示す。CLPE において、数は少ないが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 CLPE では摩耗粉はほとんど観察されなかった。また、CLPE および PMPC 処理 CLPE から観察された摩耗粉の形態は granular 様が主であった。

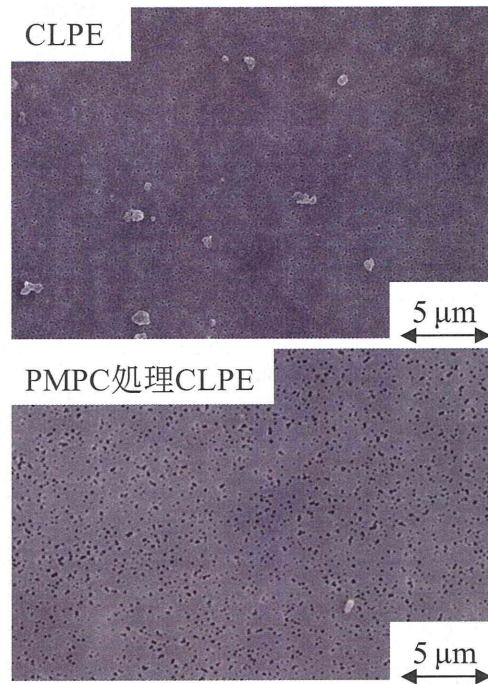


図 12. 500 万サイクル後の CLPE および PMPC 処理 CLPE の摩耗粉観察像

図 13 に、500 万サイクル後の CLPE および MPC 処理 CLPE の摩耗粉における円相当径分布の解析結果を示す。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。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。

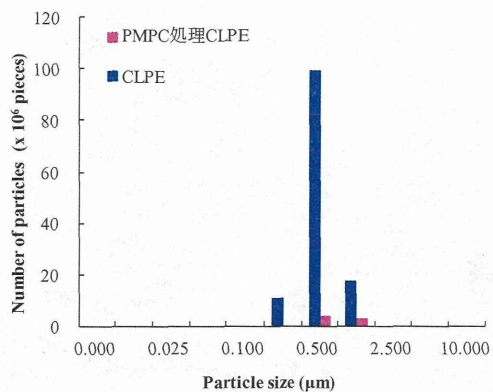


図 13. 500 万サイクル後の CLPE および MPC 処理 CLPE の摩耗粉円相当径分布

3. 滅菌操作が耐摩耗特性に与える影響の検討

γ線滅菌 CLPE インサートの重量摩耗を図 14 に示す。

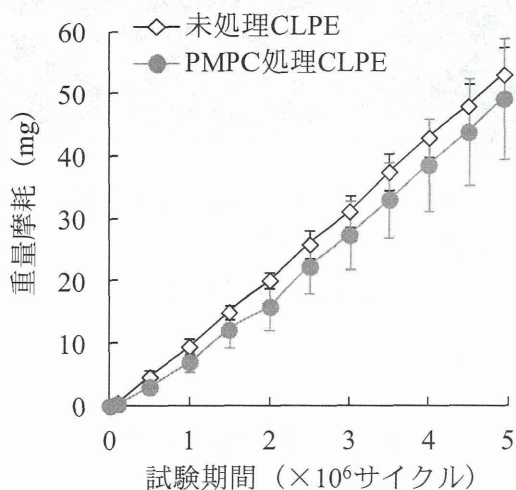
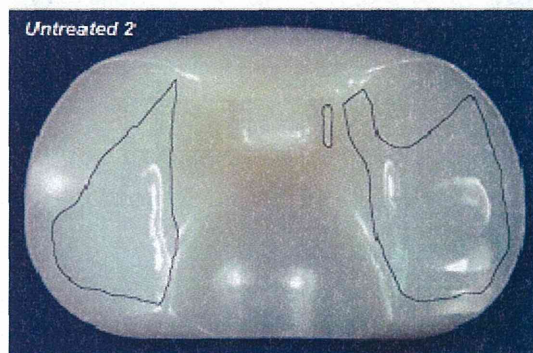


図 14 γ線滅菌 CLPE の膝シミュレーター試験における重量摩耗

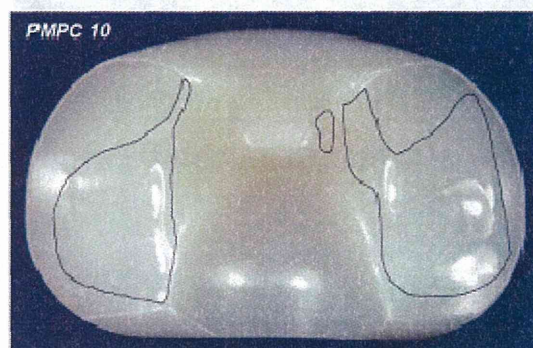
未処理 CLPE、PMPC 処理 CLPE とともに試験サイクルの増加に伴い重量摩耗は増加した。PMPC 処理 CLPE は未処理 CLPE に比べて重量

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 15 に示す。



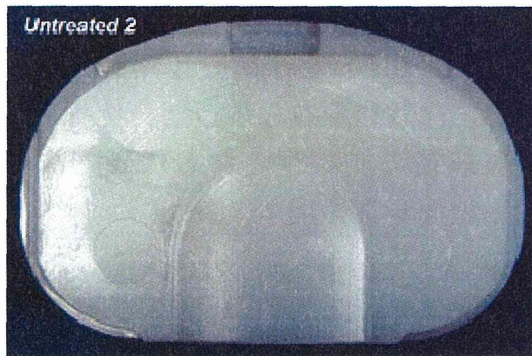
(a) 未処理 CLPE の摺動表面



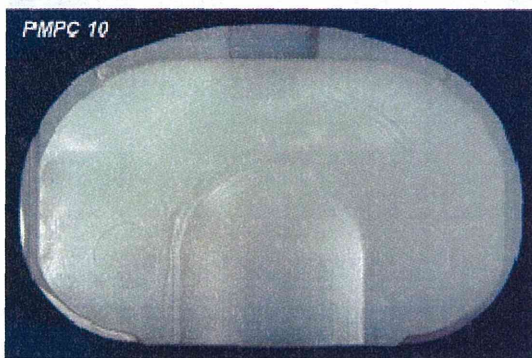
(b) PMPC 処理 CLPE の摺動表面
図 15 試験後の CLPE インサートの摺動表面写真

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。全てのインサートで、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 16 に示す。



(a) 未処理 CLPE の背面

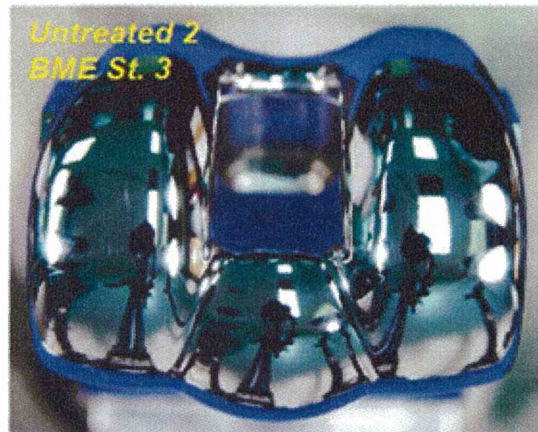


(b) PMPC 処理 CLPE の背面

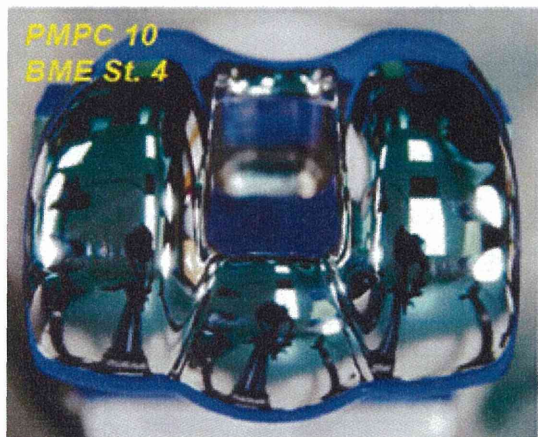
図 16 試験後の CLPE インサートの背面写真

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ュ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 17 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 17 試験後の大腿骨コンポーネント

ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの重量摩耗を図 18 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。

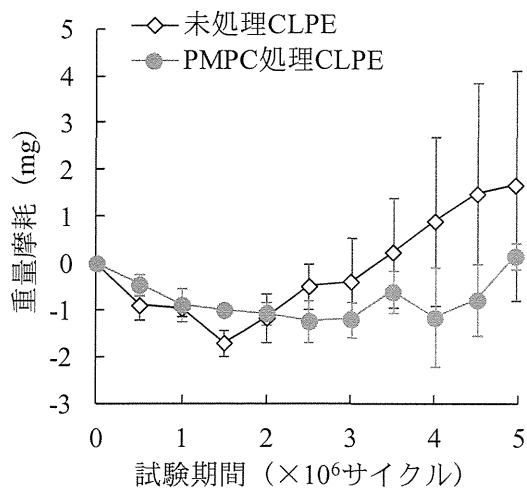
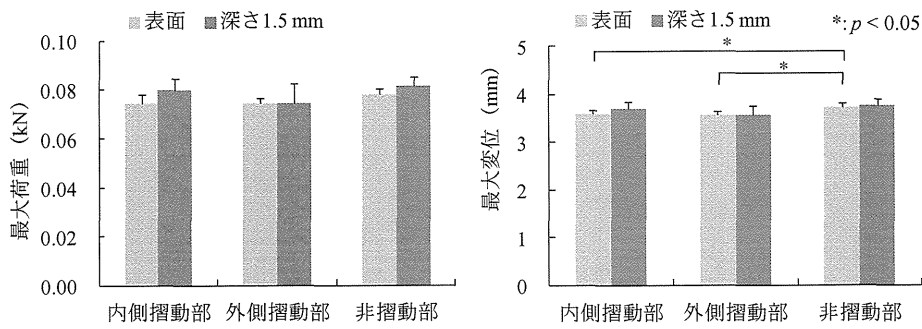


図 18 ガスプラズマ滅菌 CLPE インサートの重量摩耗

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結果を図 19、20 にそれぞれ示す。

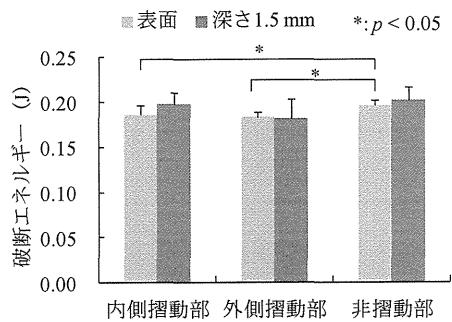
未処理 CLPE インサートのスモールパンチ試験では、表面から切り出した試験片の最大変位と破断エネルギーにおいて、内側および外側摺動部と非摺動部との間に有意な差を認めた。

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。



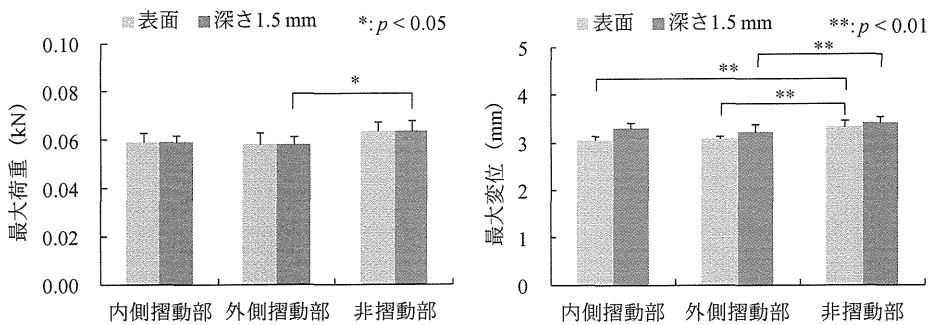
(a) 最大荷重

(b) 最大変位



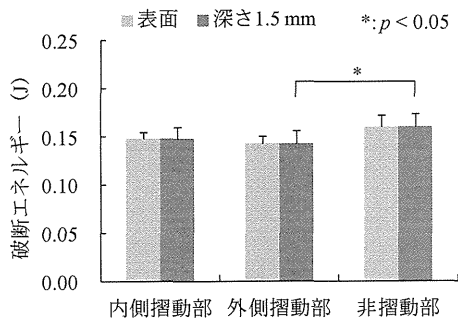
(c) 破断エネルギー

図 19 未処理 CLPE のスモールパンチ試験



(a) 最大荷重

(b) 最大変位



(c) 破断エネルギー

図 20 PMPC 処理 CLPE のスモールパンチ試験

D. 考察

1. 架橋線量が耐摩耗特性に与える影響の検討

人工膝関節シミュレーターによる500万サイクルの摩耗試験の結果、ガンマ線照射線量の増加とともに、インサートの摩耗は低減する傾向が認められ、特に照射線量 50 kGy の CLPE ではその低減効果が顕著であった。また、照射線量 50 kGy および 75 kGy の CLPE の摺動部の形状変化は、非架橋 PE に比べ、顕著に抑制されており、架橋によってクリープ変形と摩耗が顕著に抑制されることが示された。試験終了後のインサートの観察では非架橋 PE、照射線量 25 kGy および 40 kGy の CLPE の摺動面には、摺動方向に沿った凹凸が認められ、摩耗が進行したものと考えられた。一方、照射線量 50 kGy および 75 kGy の CLPE では深い摩耗痕は見られず、照射線量 50 kGy 以上のガンマ線を照射することで、滑らかな摺動表面、摩耗抑制効果を獲得できることが明らかとなった。また、一般に、架橋により PE は延性を失い、層状剥層やひび割れなどの破損が発生するリスクが上昇するといわれている。しかし、本研究ではいずれの CLPE においてもこれらの破損は認められなかった。

潤滑液より回収された摩耗粉の解析において、非架橋 PE では fibril 様、照射線量 50 kGy の CLPE では granular 様と異なる摩耗粉形態が観

察された。このことより、非架橋群と架橋群では摩耗の機序になんらかの差違が生じていることが推察された。また、照射線量 50 kGy の CLPE の摩耗粉の産生量は、非架橋 PE に比べ、顕著に少なかった。これらは、いずれも PE の架橋によると考えられた。

人工関節置換術後の骨溶解は、サブミクロンサイズの摩耗粉に対する免疫反応として引き起こされ、摩耗粉の量依存性の現象である。人工膝関節環境においても、照射線量 50 kGy の CLPE では摩耗粉産生が顕著に抑制されており、骨溶解とこれに続発する非感染性弛みの抑制に対して、架橋は有用であることが示唆された。

以上の結果より、照射線量 50 kGy 以上のガンマ線を照射した CLPE において高い耐摩耗性と荷重支持特性が示されること、これらの照射線量をかけても、層状剥層やひび割れなどの破損が生じないことが明らかとなった。これらの結果より、次年度以降に検討する、「PMPC 処理 CLPE インサート」の基材として、照射線量 50 kGy 以上のガンマ線を照射した CLPE が好適であることが明らかとなった。

2. PMPC 処理 CLPE インサートの摩耗特性評価

人工膝関節シミュレーターによる500万サイクルの摩耗試験の結果、PMPC 処理 CLPE インサートの摩耗量は未処理のものと比較して著し

く低い値を示した。PMPC 処理 CLPE において摩耗量がマイナスの値を示したのは、実際の摺動試験においては Load-soak 試験と比較して荷重のかかる面積が広く、吸水量が多かったことが原因として考えられる。摺動部の形状変化は、PMPC 処理を施すことによって、抑制されており、摩耗が抑制されていることが示された。試験終了後のインサートの観察では未処理 CLPE の摺動面には、明らかな摩耗痕は観察されなかったものの、試験前とは異なる滑らかな表面状態となっており、摩耗の進行が示唆された。

一般に、人工関節によって引き起こされる骨融解は、サブミクロンサイズの摩耗粉に対するマクロファージの反応によるものであり、その反応は、摩耗粉の量に依存すること知られている。PMPC 処理 CLPE の摩耗粉の量は、未処理のものと比較して著しく少量であった。骨溶解とそれに誘発される弛みの抑制に対して、PMPC 処理は非常に有用であることが示唆された。

3. 滅菌操作が耐摩耗特性に与える影響の検討

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などの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差はなかった。 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、ガスプラズマ滅菌群の試験では、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、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

本研究では、膝関節特有の動作が CLPE インサートに与える影響を検討するため、人工膝関節シミュレー

ター試験機を用いて、その耐摩耗特性を評価した。

シミュレーター試験の結果より、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、いずれの CLPE においても、層状剥層やひび割れなどの破損は認められなかった。50 kGy 以上のガンマ線を照射した CLPE は、PMPC 処理人工膝関節インサートの基材に適した材料であることが示された。

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。PMPC 処理 CLPE は、人工膝関節インサートの基材として非常に適した材料であることが示唆された。

さらに、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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) Taketomi S, Hiraoka H, Nakagawa T, Miyamoto Y, Kuribayashi S, Fukuda A, Takeda H, Fukai A, Hirota J, Nakajima K, Haga N, Nakamura K: Osteochondral autograft for medial femoral condyle chondral lesions in a patient with multiple epiphyseal dysplasia: long-term result. *J Orthop Sci* 17(4): 507-11, 2012.
 - 10) 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.
 - 11) 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.

- 12) 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.
- 13) 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)
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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.
- 20) 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.
2. 学会発表
- 国内学会
- 1) 茂呂徹, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーの表面処理による人工関節金属表面の細菌付着抑制効果. 第34回日本骨・感染症学会. 淡路島, 7.8-9, 2011.
- 2) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩

- 文, 中村耕三, 川口浩: 人工関節金属インプラント表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果の検討. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 3) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: MPC 処理による摩耗低減効果に対するポリエチレン厚さの影響 —繰り返し衝撃—摺動試験での検討—. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
 - 4) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーナノグラフトを基盤にした新しい人工膝関節の開発. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
 - 5) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 石原一彦, 高取吉雄: ポリエチレン厚さがMPC処理ポリエチレンの耐久性に及ぼす影響—多方向摺動試験による検討. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012. 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹: シンポジウム6 OA治療学の疫学から治療まで: 住民疫学研究ROADからみえてきた日本のOA 第56回日本リウマチ学会総会 グランドプリンホテル新高輪, 東京 2012.4.26-28
 - 6) 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹: 要介護移行の予測におけるロコチェックの有用性の検討:The ROAD Study: 第85回日本整形外科学会 京都, 2012.5.17-20
 - 7) 岡敬之, 村木重之, 阿久根徹, 中村耕三, 川口浩, 吉村典子: コンピュータ自動計測を用いた定量評価に基づく3年間の膝X線画像縦断変化に関する検討:The ROAD Study: 第85回日本整形外科学会 京都, 2012.5.17-20
 - 8) 村木重之, 阿久根徹, 岡敬之, 中村耕三, 川口浩, 吉村典子: 変形性膝関節症の発生率及びその危険因子 —The ROAD Study—: 第85回日本整形外科学会 京都, 2012.5.17-20
 - 9) 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹, 吉村典子: 膝関節裂隙狭小化および骨棘形成における痛みおよび身体機能への影響の違い —The ROAD Study—: 第32回日本骨形態計測学会 大阪, 2012.6.7-9
 - 10) 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹, 吉村典子: 経口摂取栄養素が膝関節裂隙狭小化および骨棘形成に与える影響 —The ROAD Study—: 第32回日本骨形態計測学会 大阪 2012.6.7-9
 - 11) 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹, 吉村典子: 膝関節裂隙狭小化および骨棘形成がADL/QOLに与える影響 —The ROAD Study—: 第24回日本運動器科学会 東京, 2012.7.7
 - 12) 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹: 高骨密度者の特徴とその経過: ROAD 追跡調査より Characteristics of individuals being high bone density: A follow-up of the ROAD cohorts: 第30回日本骨代謝学会 東京, 2012.7.19-21
 - 13) 村木重之, 阿久根徹, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 吉村典

- 子：複数回転倒の危険因子：ROAD 追跡調査より Risk Factors for Multiple Falls: A follow-up of the ROAD cohorts：第30回日本骨代謝学会 東京、2012.7.19-21
- 14) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 中川匠, 岡敬之, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: 人工膝関節環境における MPC 処理架橋ポリエチレンの耐摩耗特性の検討. 第4回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 沖縄, 2012. 7. 19-21.
- 15) 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 阿久根徹: 高骨密度を有する者の特徴とその予後: 第14回日本骨粗鬆症学会/骨ドック・健診分科会 新潟市, 2012.9.27-29
- 16) 村木重之, 阿久根徹, 岡敬之, 田中栄, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 大規模住民追跡調査による複数回転倒の危険因子: ROAD スタディ: 第14回日本骨粗鬆症学会/骨ドック・健診分科会 新潟市, 2012.9.27-29
- 17) 高取吉雄, 茂呂徹, 京本政之, 石原一彦, 川口浩, 中村耕三: シンポジウム「人工関節成績改善に繋がる近未来の医療用素材」 ポリエチレン摺動面の MPC ポリマー処理. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋, 2012.10. 26.
- 18) 森田充浩, 山田治基, 吉村典子, 伊達秀樹, 岡敬之, 村木重之, 阿久根徹, 川口浩: 関節症マーカー・画像診断と関節症の疫学 大規模住民コホートにおける変形性膝関節症と関節マーカー 第40回日本関節病学会 鹿児島市, 2012.11.8.
- 19) 岡敬之, 川口浩, 村木重之, 阿久根徹, 吉村典子: 関節症マーカー・画像診断と関節症の疫学: 単純X線画像における変形性膝関節症のコンピュータ支援診断システム KOACADの臨床利用 第40回日本関節病学会 鹿児島市, 2012.11.8
- 20) 茂呂徹, 高取吉雄, 京本政之, 岩崎泰彦, 宮路史明, 田中栄, 伊藤英也, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦: シンポジウム「メタルベースハイブリッドバイオマテリアル」 生体機能分子固定化による摩擦低減. 第34回日本バイオマテリアル学会シンポジウム. 仙台, 2012. 11. 27.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- ② 国際学会

- 1) Saiga KI, Moro T, Kyomoto M, Ito H, Kadota T, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K, Takatori Y: Effect of MPC-grafting and PE thickness on wear and fracture in multi-mode pin-on-disk wear test. 6th International Biotribology Forum Biotribology Fukuoka 2001. Fukuoka, Japan, 11.5, 2011.
 - 2) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: Accumulation of Metabolic Risk Factors Raises The Risk of Occurrence and Progression of Knee Osteoarthritis: The ROAD Study. Annual European Congress of Rheumatology 2012, Berlin, Germany, 2012.6.6-9
 - 3) Ishimoto Y, Yamada H, Hashizume H, Nagata K, Takiguchi N, Yoshida M, Kawaguchi H, Nakamura K, Muraki S, Oka H, Akune T, Yoshimura N: The relation between radiographic lumbar spinal stenosis and symptomatic persons in the general population -The Wakayama. Golden Jubilee Congress of The Asia Pacific Orthopaedic Association(APOA) and 7th Congress of the Asia Pacific Knee Society(APKS), New Delhi, India, 2012.10.3-6.
 - 4) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T; Mild Cognitive Impairment Increases The Risk of Knee Osteoarthritis: A 3-Year Follow-Up in The ROAD Study. IOF Regionals - 3rd Asia-Pacific Osteoporosis Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, 2012.12.13-16
 - 5) Muraki S, Akune T, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Oka H, Yoshimura N: Physical Performance, Bone and Joint Diseases, and Incidence of Falls in Japanese Men and women: The ROAD Study. IOF Regionals - 3rd Asia-Pacific Osteoporosis Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, 2012.12.13-16
 - 6) Moro T, Takatori Y; Kyomoto M, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Kawaguchi H, Nakamura K: Clinical results of PMPC-grafted polyethylene acetabular liners. *Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
 - 7) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Tanaka S, Oshima H, Tanaka T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H, Takatori Y: Effect of larger femoral head on the wear resistance of the biocompatible polymer-grafted cross-linked polyethylene liner. *Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
 - 8) Moro T, Takatori Y, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Kamogawa M, Kyomoto M, Kawaguchi H, Nakamura K: Clinical results of PMPC-grafted cross-linked polyethylene liner in primary total hip arthroplasty. *American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) 2013 Annual Meeting*. Chicago, USA, March 19-23, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

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：抗感染性の検討の前提として、金属表面のポリ MPC (PMPC)処理について、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を用いて検討した。グラフトコーティング法では、MPC 水溶液濃度・紫外線照射時間（重合時間）の至適条件（0.5 mol/L、90 分）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、細菌付着が抑制されることを明らかにした。以上の成果により、MPC ポリマー処理金属は、親水性の高い、タンパク質吸着を抑制する表面を有しており、細菌付着の抑制が期待できる。

A. 研究目的

疾患や外傷による膝関節の機能障害は、中高年者の健康寿命を短縮し、生活の質（QOL）を低下させる重大な病態である。高齢化が急速に進むわが国において膝関節障害の患者数は今後も増え続けることは確実であり、その治療法を確立することは、重要な課題といえる。

人工膝関節手術は、高度の膝関節障害に対する治療法である。実用化から約半世紀が経過し、優れた治療法として健康寿命の延伸と QOL の獲得に貢献をしている。一方、人工関節表面へのバイオフィーム形成に続発する感染、は一度生じると入れ換えを余儀なくされる深刻な合併症である。手術成績の向上のため、これらの合併症を克服する画期的

な人工膝関節のニーズは高い。

申請者らは平成 15 年度長寿科学総合研究事業を通じて、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)を用いて、ポリエチレン表面を修飾する技術を開発した。MPC ポリマーは、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ームの形成を抑制する効果も期待できる。

本研究の目的は、金属コンポーネント表面に MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、タンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイオフィーム形成の抑制効果について検討することである。このため、まず、金属表面における至適な MPC

ポリマー処理方法を確立した。次に、これらの MPC ポリマー処理金属表面について、タンパク質吸着抑制効果・細菌付着抑制効果を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

本研究では、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)合金および純チタン (以下純 Ti)を用いた。Co-Cr-Mo 合金および純 Ti の表面を、表面粗さ 0.01 ~ 0.02 μm 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。

2. MPC 処理方法の検討

得られた Co-Cr-Mo 合金、純 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、ポリ (MPC) (PMPC)を用いたグラフトコーティング法により処理した (図1)。

① PMB30 ポリマーを用いたディップコーティング法 (PMB30 処理)

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。B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、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 (PMB30 処理)。

② PMPC グラフトコーティング法

B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、5 mass%トリメタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (MPSi)、1 mass%コハク酸、0.1 mass%イルガキュア

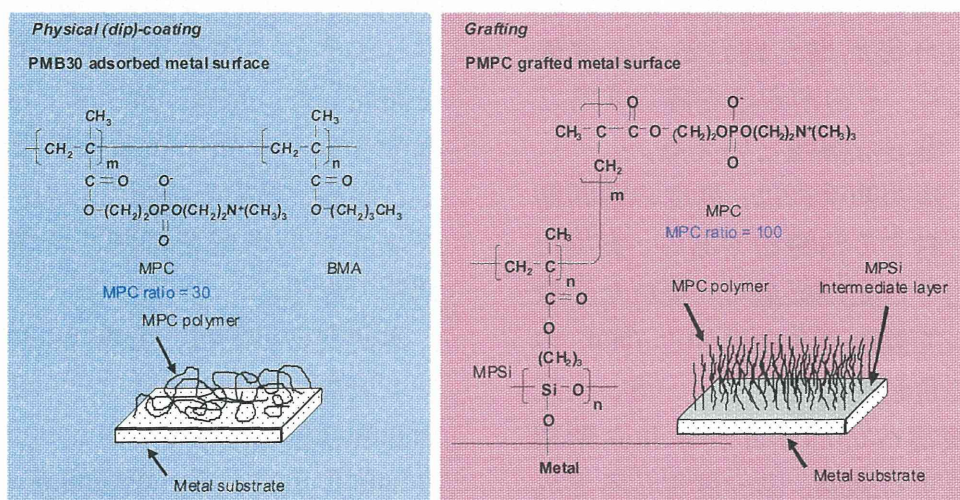


図1. PMB30 を用いたディップコーティング、PMPC を用いたグラフトコーティングによる金属表面処理

(D2959)を含むエタノール溶液に 12 時間浸漬した。Co-Cr-Mo 試験体を取り出し、エタノールで洗浄した後、70°Cで3時間アニール処理した。

続いて 0.5 mol/L に調製した MPC の水溶液にシラン処理した Co-Cr-Mo 試験体を浸し、5 mW/cm² の強度をもつ紫外線を 90 分間照射して、光開始グラフト重合を行った。照射後、試験体を水およびエタノールで洗浄し、未重合の MPC および遊離のポリマーを除去した。

3. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

得られた PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 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および透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着試験を行った。

① XPS 分析

PMB30 処理/PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体の表面元素状態について、XPS 分析を行った。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 15kV、光電子の放出角度を 90° とした。

② FT-IR 分析

PMB30 処理/PMPC 処理前後の

Co-Cr-Mo 試験体の官能基振動について、FT-IR 分析を行った。FT-IR 分析は、全反射 (ATR) 法により行った。波数 800~2000 cm⁻¹、分解能 4 cm⁻¹、積算回数 100 回とした。

③ 水の静的接触角測定

試験体表面の静的なぬれ性 (静的表面接触角) について、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 の純水を液滴後、60 秒間経過時点において測定した。

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

200 ppm に調製したローダミン 6G 水溶液を染色に用いた。蛍光発光イメージングには、蛍光顕微鏡を使用した。レンズ倍率は 5 倍で、サンプル毎に、適切な感光時間で撮影した。

⑤ TEM 観察

PMB30 処理/PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体を所定の大きさに切削し、表面を Al 保護した後、Ga イオンビームを照射して断面を薄膜化 (FIB 加工) した。透過型電子顕微鏡を用い、試料縦断面を観察した。

4. PMPC 処理の至適条件の検討

一般に浸漬する溶液の濃度を変化させるだけのディップコーティングの制御に比べ、グラフトコーティングの制御は複雑である。したがって、ここでは、溶液濃度・処理時間を変化させて、その至適条件を検討した。

2-②に記載の方法のうち、MPC 水溶液の濃度を 0.25~1.00 mol/L の範

囲で、紫外線照射時間 (重合時間)を 23~180 分の範囲で変化させて、グラフト重合を行った。種々の条件で作製された PMPC 処理 Co-Cr-Mo の表面について、3 項で示される方法にて解析した。

5. 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 処理および 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。測定前、いずれの試験片も、リン酸緩衝液 (PBS) に 1 時間浸漬させた。PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体を、ウシ血清アルブミン (BSA, $M_w = 6.7 \times 10^4$; シグマ-アルドリッチ社製)、ウシ血清 γ -グロブリン ($M_w = 1.5 \times 10^5$; シグマ-アルドリッチ社製) およびウシ血漿フ

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 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体は、PBS で 5 回洗浄した後、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。

6. 細菌付着抑制効果の検討

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 \times 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

表 1. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度と静的接触角

Sample	Surface elemental composition (atom%)								Contact angle (deg)
	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}	P _{2p}	Si _{2p}	Co _{2p}	Cr _{2p}	Mo _{3d}	
Co-Cr-Mo (untreated)	14.6 (1.3)*	52.9 (2.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	26.7 (1.5)	5.4 (0.4)	0.4 (0.0)	81.6 (4.8)
PMB30-adsorbed Co-Cr-Mo	70.6 (1.4)	24.1 (1.3)	2.3 (0.4)	3.0 (0.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	95.8** (3.5)
PMPC-grafted Co-Cr-Mo	61.7 (0.7)	28.0 (0.6)	5.0 (0.3)	5.3 (0.1)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	23.5** (8.4)

* The standard deviations are shown in parentheses.

** Significant difference ($p < 0.001$) as compared to the untreated Co-Cr-Mo.

ィブリノーゲン ($M_w = 3.4 \times 10^5$; シグマ-アルドリッチ社製) 溶液に、37°C で 1 時間浸漬させた。BSA、 γ -グロブリンおよびフィブリノーゲン溶液は、

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。

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. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

① XPS 分析

表 1 に、XPS スペクトルより求めた PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度を示す。PMB30 処理/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 (表省略)。

② FT-IR 分析

図 2 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトルを示す。

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/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/PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様のピークが認められた (図省略)。

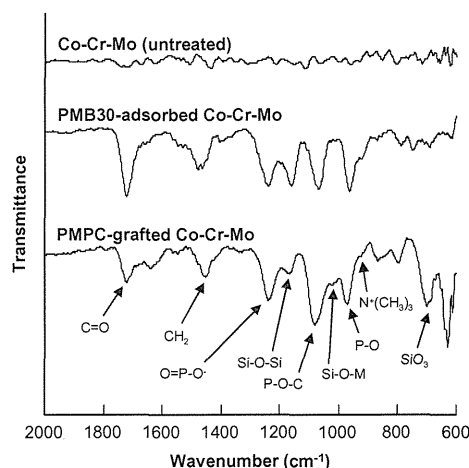


図 2. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトル

③ 水による静的接触角の測定

表 1 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角を示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金/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/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/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 (PMB30 処理