



図 1. 股関節シミュレーター全体像

2. 摩耗粉の分離および解析

試験液からの摩耗粉の抽出方法は、以下に示すように行った。100 万サイクル試験後の潤滑液全量から 10 ml 採取し、その中に 10 ml の 5N-NaOH を加えて、65°C で 3 時間振動処理を行った。室温で 1 日冷却後、密度 1.2 g/cm^3 のシヨ糖/蒸留水混合液 10 ml と 0.919 g/cm^3 イソプロパノール (IPA) /蒸留水混合液 10 ml を加えて遠心分離 (25,500 rpm, 5°C, 3 時間) を行った。遠心分離後の溶液の境界層を 10 ml のピペットで取り出し、20 ml のメタノールを加えて超音波により 1 分攪拌した。遠心分離を行い (25,500 rpm, 5°C, 3 時間)、摩耗粉部を沈降させ、上澄みを捨てた。この操作を 2 回繰り返した。その後、5°C に冷却後、 1.05 g/cm^3 シヨ糖/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、超音波で 1 分間攪拌させた。その上に、まず 0.973 g/cm^3 IPA/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、次に 0.919 g/cm^3 IPA/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、遠心分離を行った (25,500 rpm, 5°C, 3 時間)。遠心分離後、 0.973 g/cm^3 と 0.919 g/cm^3 IPA/蒸留水混合液の境界層をピペットで採取し、最終的に $0.1 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて、ライナーか

ら発生する摩耗粉をろ過抽出した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) により抽出した摩耗粉を観察した。観察箇所は、フィルター上の任意 9 カ所とし、倍率は 5,000 倍とした。また、摩耗粉の形状や粒径分布の評価には解析プログラム: ImageJ (National Institute of Health 製) を使用した。具体的には、摩耗粉の個数、面積、体積、粒径、アスペクト比および円環性の評価を行った。個数に関しては、9 視野分の摩耗粉個数をカウントし、総数を採取量で除することにより、1 ml あたりの個数とした。面積および体積は、ImageJ を使用した。粒径は、摩耗粉の最大長さとした。円環性は、摩耗粉がどの程度円に近いかを表す尺度であり、値が 1 の場合には完全な円であり、0 に近いほど形態が繊維状であることを示す。

C. 研究結果

1. 股関節シミュレーター試験

4 種類のライナーに関して、Load-soak control を用いた 1000 万サイクル終了時の含水量を図 2(ビタミン無)および図 3(ビタミン有)に示す。試験サイクルの増加に伴い、ライナーの重量は増加したが MPC 処理の有無による含水量の差は、ほとんど見られなかった。しかし、ビタミン E の有無による含水量の差は大きく、ビタミン E の添加により含水量は半分になることが明らかとなった。

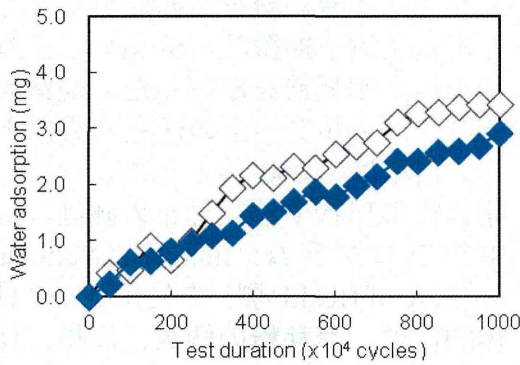


図 2. 32 mm Φ CoCr 骨頭に対する表面処理条件の異なるライナーの含水量
(◇CLPE ◆MPC 処理 CLPE)

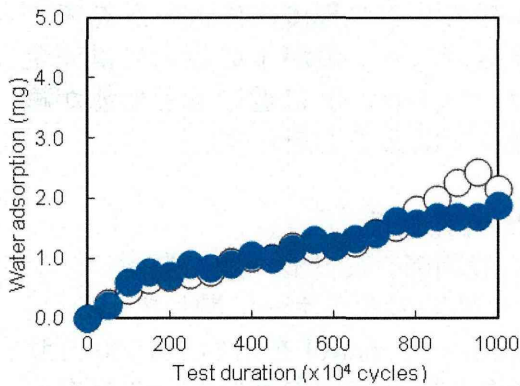


図 3. 32 mm Φ CoCr 骨頭に対する表面処理条件の異なるライナーの含水量(○CLPE+E
●MPC 処理 CLPE+E)

この結果を用いて含水量を補正し、ライナーの重量変化を計測すると、未処理の CLPE ではサイクル数が増加するにしたがって重量が減少し、400 万サイクル試験終了時に 44.1 mg、1000 万サイクルの試験終了時に 89.8 mg の摩耗量を示した。一方、MPC 処理 CLPE では 100 万回まではこのような重量減少が見られず、その後重量は減少したが、400 万サイクル

試験終了時に 7.7 mg、1000 万サイクル試験終了時で 33.7 mg の摩耗量に収まった(図 4)。次に未処理の CLPE にビタミン E を添加した場合、CLPE に比べて摩耗量は減少したが、MPC 処理をした場合よりは摩耗量は多く、400 万サイクル試験終了時で 19.5 mg、1000 万サイクル試験終了時で 49.7 mg の摩耗量であった。さらに MPC 処理 CLPE+E の場合には、今回実験を行った 4 種類のライナーの中で最も摩耗率が低く、400 万サイクル試験終了時に 2.6 mg、1000 万サイクル試験終了時に 24.8 mg の摩耗量であることがわかった(図 5)。

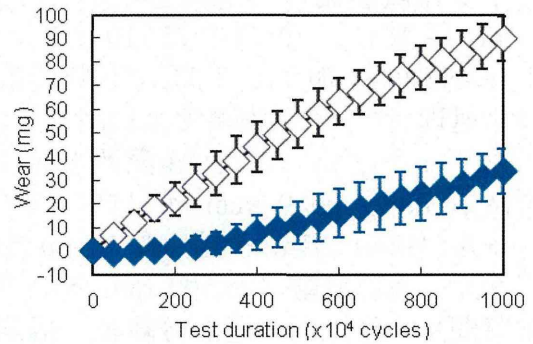


図 4. 各種ライナーの摩耗量
(CLPE◇および MPC 処理 CLPE◆)

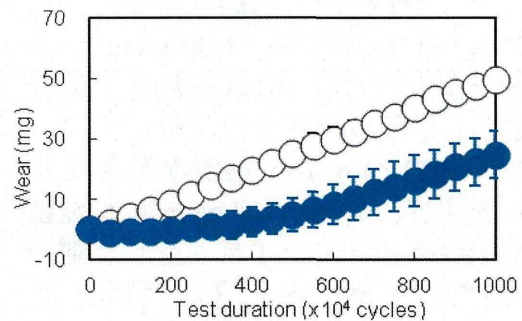


図 5. 各種ライナーの摩耗量
(CLPE+E○および MPC 処理 CLPE+E●)

2. 摩耗粉解析結果

32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた CLPE、MPC 処理 CLPE、CLPE+E および MPC 処理 CLPE+E ライナーから発生した摩耗粉の SEM 写真を図 6～9 にそれぞれ示す(試験回数 100 万サイクル)。CLPE ライナーから発生した摩耗粉の形状は、繊維状のものがほとんどであり、1 視野に非常に多数の摩耗粉が観察された。しかし、MPC 処理 CLPE ライナーから発生した摩耗粉の形状は、繊維状以外にも顆粒状のものが存在しており、粒径が小さくなり、摩耗粉の量も減少していた。一方、CLPE+E ライナーの場合、粒径の小さい粒子が 3 次元的に寄り集まって大きな塊になっていた。しかし、MPC 処理 CLPE+E ライナーに関しては、摩耗粉の粒径が小さくなり、摩耗粉の占有面積も著しく減少していることがわかった。

表 1 に、32mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた CLPE、MPC 処理 CLPE、CLPE+E および MPC 処理 CLPE+E ライナーに対して、試験後の潤滑液中の摩耗粉の個数、面積および体積を示す。CLPE および CLPE+E ライナーを MPC 処理すると、摩耗粉の個数は増加するが面積および体積は減少することから、摩耗粉産生量が減少していることがわかる。

以上の結果から、ビタミン E を添加した CLPE ライナーを MPC 処理したものは、未処理と比較して摩耗粉産生量は著しく減少することがわかった。

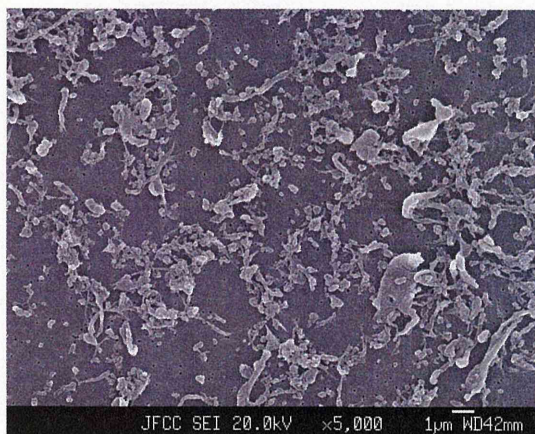


図6. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた未処理 CLPE ライナーから発生した摩耗粉

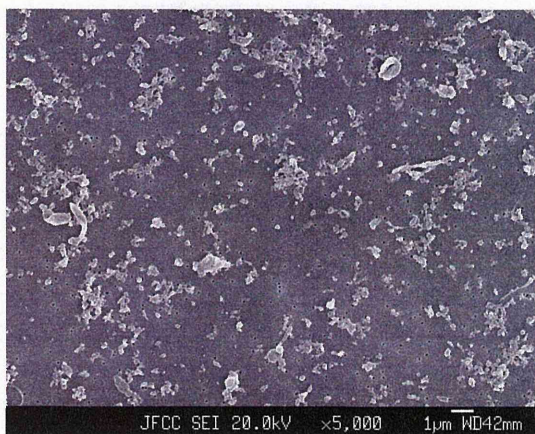


図7. 32 mm φ CoCr 骨頭と組み合わせた MPC 処理 CLPE ライナーから発生した摩耗粉

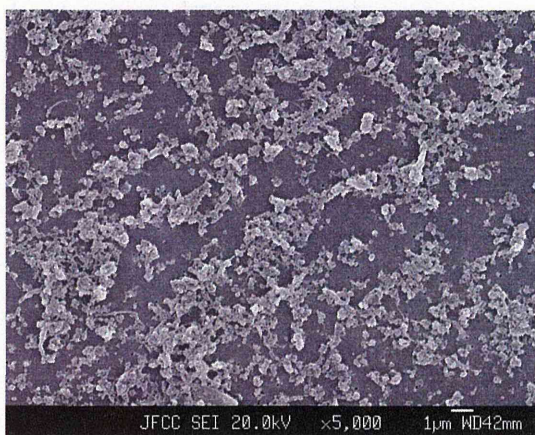


図8. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E ライナーから発生した摩耗粉

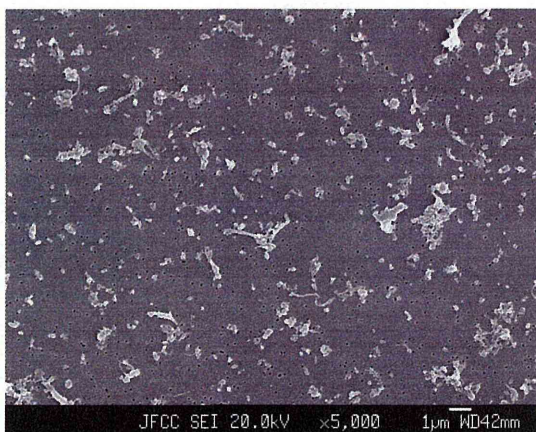


図9. 32 mm のφCoCr 骨頭と組み合わせた MPC 処理 CLPE+E ライナーから発生した摩耗粉

	ライナー	
	CLPE	MPC 処理 CLPE
摩耗粉個数 (個/ml)	314	463
面積 ($\mu\text{m}^2/\text{ml}$)	105.7	55
体積 ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$)	246	41.4

	ライナー	
	CLPE+E	MPC 処理 CLPE+E
摩耗粉個数 (個/ml)	207	413
面積 ($\mu\text{m}^2/\text{ml}$)	161.6	37.3
体積 ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$)	1108.2	20.4

表1 種々のライナーから発生した摩耗粉の個数、面積および体積

次に、32 mmφの CoCr 骨頭と組み合わせた各ライナーから発生した摩耗粉の粒径分布を図10および11に示す。MPC 処理 CLPE および MPC 処理

CLPE+E の場合も、粒径 $6\mu\text{m}$ 以下の摩耗粉が大部分を占め、粒径が大きくなるに従い、その割合が少なくなる傾向を示した。しかし、MPC 処理をしていない場合には $2\sim 30\mu\text{m}$ の広い範囲に摩耗粉が存在していた。

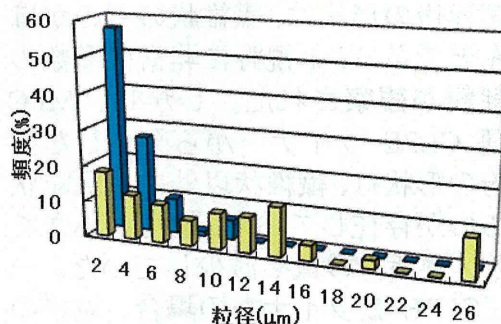


図10. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の粒径分布 (■CLPE, ■MPC 処理 CLPE)

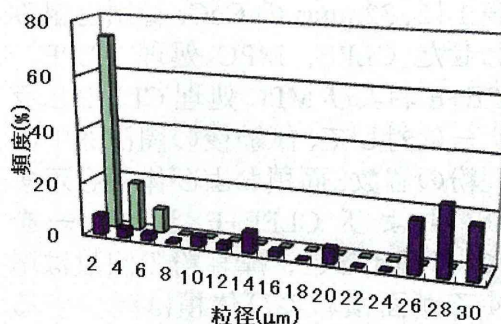


図11. 32 mm のφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の粒径分布 (■CLPE+E, ■MPC 処理 CLPE+E)

次にアスペクト比に関して、何れのライナーの場合も分布に大差は無く、アスペクト比が4までは増加し、その後アスペクト比が増加するに従い、割合が減少する傾向を示した(図12および13)。

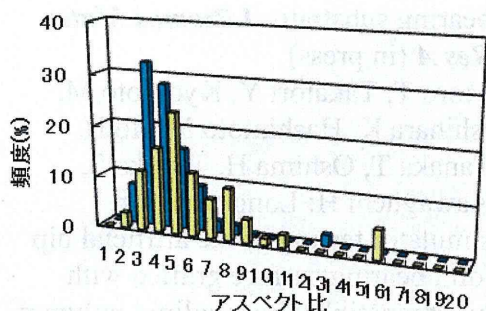


図 12. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉のアスペクト比分布 (■CLPE, ■MPC 処理 CLPE)

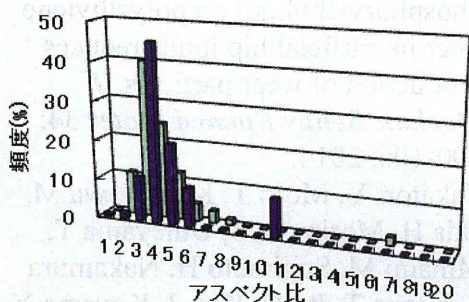


図 13. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉のアスペクト比分布 (■CLPE+E, ■MPC 処理 CLPE+E)

次に円環性に関して、CLPE の場合、0.05~0.25 までの範囲に約 90% の摩耗粉が分布していた。よって、摩耗粉の形状は、繊維状のものが主流であることが定量的に明らかとなった。MPC 処理 CLPE の場合には、0.1~1 付近の広い範囲に分布しており、繊維状のものから円状のものまで存在することがわかった(図 14)。しかし、CLPE+E ライナーの場合には、円環性が 0.05 以下の繊維状の摩耗粉がほとんどであるのに対し、MPC 処理 CLPE+E ライナーの場合には、MPC 処理 CLPE ライナーと同様に 0.1~1 までの広い範囲に分布していることから、繊維状から顆粒状まで種々の形状の摩耗粉

が存在することがわかった(図 15)。

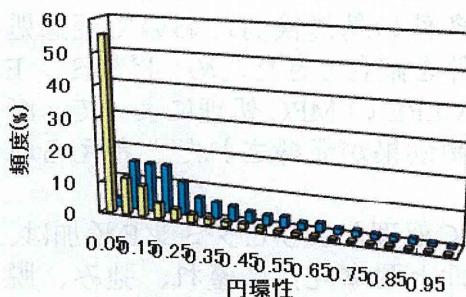


図 14. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の円環性分布 (■CLPE, ■MPC 処理 CLPE)

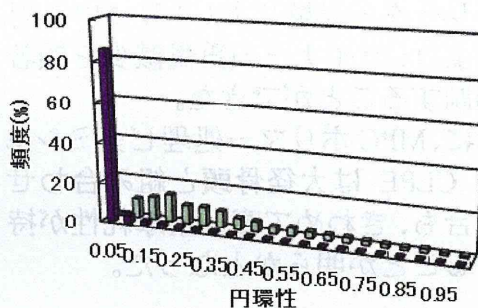


図 15. 32 mmφ の CoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の円環性分布 (■CLPE+E, ■MPC 処理 CLPE+E)

D. 考察

股関節シミュレーター試験の結果をライナーの重量変化から検討すると、CLPE およびビタミン E 添加 CLPE を MPC 処理した場合、劇的な摩耗抑制効果が見られた。特にビタミン E 添加 CLPE を MPC 処理した場合、大径骨頭と組み合わせても最も摩耗量が小さいことがわかった。これは撥水性の CLPE 表面を親水性の MPC ポリマーでナノ表面処理 (100~200 nm) することにより、関節摺動面に水和潤

滑機構が働くようになったためと考えられる。また、今年度取り組んだビタミンE添加量、架橋照射線量、MPC処理条件の基礎検討において至適処理条件を確立できたため、ビタミンE添加CLPEのMPC処理によって、摩擦抑制効果が発揮されたと考えられる。

MPC処理およびビタミンE添加は、安定性と耐摩耗性に優れ、弛み、脱臼・破損という合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出する基盤技術として期待される。

E. 結論

10～15年分の歩行負荷をかけたシミュレーター試験において、MPC処理により、ライナーの重量減少を顕著に抑制することができた。

特に、MPCポリマー処理ビタミンE添加CLPEは大径骨頭と組み合わせた場合も、きわめて高い耐摩耗性が持続することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Watanabe K, Hashimoto M, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafting and vitamin E blending for high wear resistance and oxidative stability of orthopedic bearings. *Biomaterials* (in press)
- 2) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara K: Effect of UV-irradiation intensity on graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on orthopedic

bearing substrate. *J Biomed Mater Res A* (in press)

- 3) 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* 32(3): 369-376, 2014.
- 4) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Saiga K, Hashimoto M, Tanaka S, Ito H, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Takatori Y: Grafting of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on polyethylene liner in artificial hip joints reduces production of wear particles. *J Mechan Behav Biomed Mater* 34: 100-106, 2014.
- 5) Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Ito H, Kim J, Koyama Y, Kawaguchi H, Nakamura K: The 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.
- 6) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara K: Poly(ether-ether-ketone) orthopedic bearing surface modified by self-initiated surface grafting of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 34: 7829-7839, 2013.
- 7) 茂呂徹, 京本政之, 高取吉雄: 人工股関節ポリエチレンライナーのMPC処理. *Bone Joint Nerve* 10(3): 417-424, 2013.

2. 学会発表

① 国内学会

- 1) 茂呂徹, 高取吉雄: シンポジウム「セメントレス THA の摺動面とインプラントデザイン」MPC ポリマー処理を施した人工股関節摺動面の特性. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 広島, 5.23-26, 2013.
- 2) 大嶋浩文, 伊藤英也, 田中滋之, 田中健之, 岡敬之, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 寛骨臼回転骨切り術後の変形性股関節症に対する人工股関節全置換術 —RAO がその後の THA に及ぼす影響—. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 広島, 5.23-26, 2013.
- 3) 山根史帆里, 京本政之, 茂呂徹, 雑賀健一, 石原一彦, 高取吉雄: 人工関節環境下における PMPC 処理 CLPE の耐摩耗性検討. 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム. 東京, 6.8, 2013.
- 4) 伊藤英也, 田中健之, 大嶋浩文, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 患者固有人工股関節設置ガイドの臨床試験. 第 40 回日本股関節学会学術集会. 広島, 11.9-10, 2013.
- 5) 茂呂徹, 高取吉雄, 鴨川盛秀, 織田弘美, 森本修平, 梅山剛成, 田中栄, 荻田達郎, 伊藤英也, 田中健之, 川口浩, 中村耕三: MPC 処理ポリエチレンライナーを用いた人工股関節の臨床成績. 第 44 回日本人工関節学会. 沖縄, 2.21-22, 2014.

② 国際学会

- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Yamane S, Takatori Y, Ishihara K: Smart modification of PEEK by self-initiated surface graft polymerization for orthopedic bearings. 1ST PEEK International Meeting. Philadelphia, USA, 4.26, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (免疫アレルギー疾患等実用化研究事業
免疫アレルギー疾患実用化研究分野))

分担研究報告書

臨床での長期使用による酸化劣化を模擬した MPC 処理ライナーの
耐摩耗性の検討

分担研究者 伊藤英也 (東京大学医学部附属病院 講師)
橋本雅美 (ファインセラミックスセンター 上級研究員)

研究要旨：架橋 PE(CLPE)ライナーを患者の体内で長期間使用すると酸化が生じ、劣化することが問題となっている。本研究では、臨床での長期使用に伴う酸化劣化を加速試験で模擬した MPC ポリマー処理ビタミン E 添加 CLPE と大径骨頭を組み合わせた場合の耐摩耗特性を調べることを目的とする。股関節は、その歩行周期の中で様々な方向から体重の数倍の負荷を受ける。そこで、より生体内に近い環境下での耐摩耗効果を観察するため、手術後の歩行周期を再現する股関節シミュレーターを用い重量の変化から耐摩耗特性を検討した。この結果、MPC 処理を施したビタミン E 添加 CLPE ライナー表面に酸化劣化処理を施しても、PE の摩耗低減効果が発揮されることが明らかとなった。MPC 処理ビタミン E 添加 CLPE は、新たな人工股関節用材料として真に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

社会の高齢化とともに人工股関節置換術の件数は増加し、また、手術を受けた患者のその後の人生も長期化している。こうした社会状況を背景に、健康寿命の延伸と生活の質 (QOL) の改善を達成するため、人工関節の耐久性の向上 (長寿命化) が求められている。このためには、入れ換え (再置換) 手術の要因となる人工関節の弛みや破損、感染を阻止することが重要な課題である。

まず、非感染性の弛み (aseptic loosening) は、人工関節周囲の骨溶解 (osteolysis) に続発する。関節面を構成するポリエチレン、金属、セラミックが摩擦により摩耗し、摩耗粉を生じる。この摩耗粉を貪食したマクロファージが骨溶解作用を有する破骨細胞の形成・活性を促進し、弛みに至る。弛みによって固定性を失った人工関節は疼痛や歩行障害の原因となるため、再置換の手術が必要となるが、溶解した骨を補填する

必要があるなど、難しい手術となることが多い。こうした弛みを抑制するため、摩耗粉の産生を抑制する技術、あるいは摩耗粉への生体反応を抑制する技術が必要とされる。

次に、破損は、PEの機械的特性と各関節特有の諸条件が合わさって生じるとされる。人工股関節では、前述の摩耗抑制に有効な技術として、 γ 線照射により架橋を増加させた架橋PE (CLPE) が実用化されて10年が経過したが、架橋処理や生体内での酸化劣化に伴い機械的特性の低下したCLPEの破損や層状剥離に起因する異常摩耗という新たな合併症の存在が明らかとなっている。

我々は、PE摩耗粉の発生を抑制する目的として、生体親和性に優れた2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを用いて、人工股関節用架橋ポリエチレン (CLPE) ライナーの表面処理を行ってきた (MPC処理)。また、CLPEライナーの酸化を防止する目的として、ビタミンEをCLPEライナーに添加することが有効であると考えられている。そこで本研究では、生体内と同等の酸化劣化処理がビタミンE添加MPC処理CLPEライナーの摩耗特性に与える影響を調べるため、大径骨頭と組み合わせて股関節シミュレーター試験機を用いて評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 股関節シミュレーター試験

耐摩耗性評価試験は、MTS社製の股関節シミュレーターを用いて行った(図1)。骨頭には市販品のコバルトクロム合金大径骨頭(径32 mm)を、臼蓋コンポーネント (ライナー) には酸化劣化処理を行った未処理ビタミンE添加CLPE(CLPE+E(Aging)) およびMPCポリマー処理ビタミンE添加CLPE(MPC処理CLPE+E(Aging)) を用いた。酸化劣化処理は、ASTM F2003-00 Standard Guide for Accelerated Aging of Ultra-High Molecular Weight Polyethylene を参照し、CLPE+E およびMPC処理CLPE+Eライナーを80℃の大気中で3週間保管することにより行った。耐摩耗性の試験条件は国際標準化機構 (ISO) 14242-3 に準じ、潤滑液には25%牛血清を用い、液量約750 mlで、毎秒1回の歩行周期 (1 Hz) に1.8と2.7 kNの2つのピークをもつDouble Peak Paulの歩行条件で、最大1000万サイクル (10~15年分の歩行不可に相当) までの摩耗試験を行った。50万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、ライナーの回収、洗浄、乾燥、重量測定を行った。Load-soak controlで計測した含水量で補正してライナーの重量の変化を計測した。



図 1. 股関節シミュレーター全体像

2. 摩耗粉の分離および解析

試験液からの摩耗粉の抽出方法は、以下に示すように行った。100万サイクル試験後の潤滑液全量から 10 ml 採取し、その中に 10 ml の 5N-NaOH を加えて、65℃で 3 時間振動処理を行った。室温で 1 日冷却後、密度 1.2 g/cm³ のショ糖/蒸留水混合液 10 ml と 0.919 g/cm³ イソプロパノール (IPA) /蒸留水混合液 10 ml を加えて遠心分離 (25,500 rpm, 5℃, 3 時間) を行った。遠心分離後の溶液の境界層を 10 ml のピペットで取り出し、20 ml のメタノールを加えて超音波により 1 分攪拌した。遠心分離を行い (25,500 rpm, 5℃, 3 時間)、摩耗粉部を沈降させ、上澄みを捨てた。この操作を 2 回繰り返した。その後、5℃に冷却後、1.05 g/cm³ ショ糖/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、超音波で 1 分間攪拌させた。その上に、まず 0.973 g/cm³ IPA/蒸留水混

合液 10 ml を注ぎ、次に 0.919 g/cm³ IPA/蒸留水混合液 10 ml を注ぎ、遠心分離を行った (25,500 rpm, 5℃, 3 時間)。遠心分離後、0.973 g/cm³ と 0.919 g/cm³ IPA/蒸留水混合液の境界層をピペットで採取し、最終的に 0.1 μm のフィルターを用いて、ライナーから発生する摩耗粉をろ過抽出した。

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

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

C. 研究結果

1. 股関節シミュレーター試験

Load-soak control を用いて 1000 万サイクル終了時の含水量を計測すると、2 種類のライナー間で差が見

られず、酸化劣化処理を行った場合、MPC 処理の有無は含水量に影響を与えず、1000 万サイクル後に約 1.0 mg の重量増加を示した(図 2)。

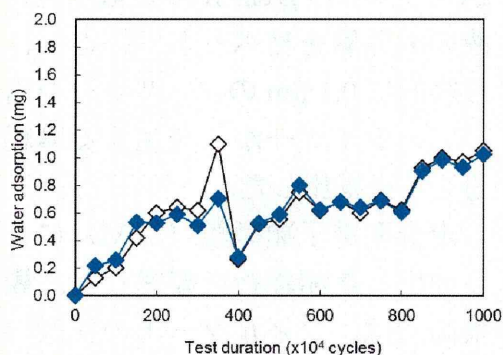


図 2. 酸化劣化処理を行った各種ライナーの含水量
(CLPE+E(Aging)◇および MPC 処理 CLPE+E(Aging)◆)

この結果を用いて含水量を補正して計算したライナーの摩耗量を図 3 に示す。未処理の CLPE+E(Aging)ではサイクル数が増加するにしたがって摩耗量が増加し、200 万サイクルの試験終了時に 7.3 mg の摩耗量を示し、1000 万サイクル試験終了時には 45.5 mg の摩耗量を示した。一方、MPC 処理 CLPE+E(Aging)では 50 万サイクルまではこのような摩耗量増加が見られず、その後、摩耗量は増加し、1000 万サイクル試験終了時に 26.5 mg であり、CLPE+E(Aging)の場合の 2分の1の摩耗量を示した。

以上の結果を酸化劣化処理前のデータと比較すると、何れのライナ

一の場合も、酸化劣化処理前後で摩耗量の変化がほとんど見られないことがわかった。

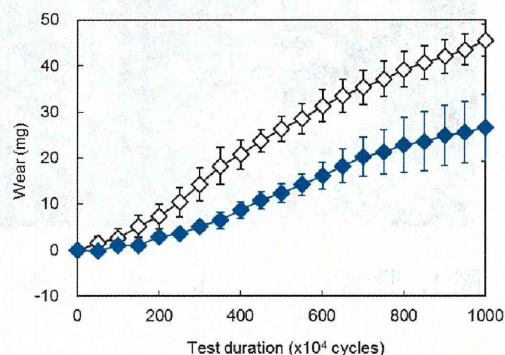


図 3. 各種ライナーの摩耗量
(CLPE+E(Aging)◇および MPC 処理 CLPE+E(Aging)◆)

2. 摩耗粉解析結果

32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E(Aging)および MPC 処理 CLPE+E(Aging)ライナーから発生した摩耗粉の SEM 写真を図 4 および 5 に示す(試験回数 100 万サイクル)。CLPE+E(Aging)ライナーから発生した摩耗粉の形状は、顆粒状および繊維状のものがほとんどであり、1 視野に非常に多数の摩耗粉が観察された。しかし、MPC 処理 CLPE+E(Aging)ライナーから発生した摩耗粉の形状は、ほとんど粒状であり、摩耗粉の数も CLPE+E(Aging)に比べて少なかった。

表 1 に、32mmφCoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E(Aging)および MPC 処理 CLPE+E(Aging)ライナー

に対して、試験後の潤滑液中に存在する摩耗粉の個数、面積および体積を示す。CLPE+E(Aging)ライナーに比べて、MPC 処理 CLPE+E(Aging)ライナーの摩耗粉の個数、面積および体積どれも少なく、面積に関しては 1/10、体積に関しては 1/60 の産生量を示した。

以上の結果から、ビタミン E を添加した CLPE ライナーを MPC 処理したものは、酸化劣化処理後も、未処理と比較して摩耗粉産生量は著しく減少することがわかった。

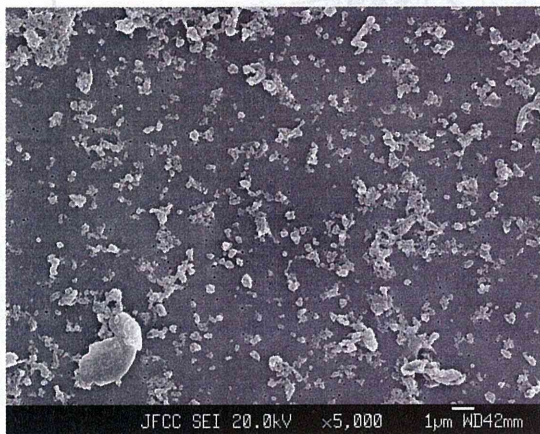


図 4. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた未処理 CLPE+E(Aging)ライナーから発生した摩耗粉

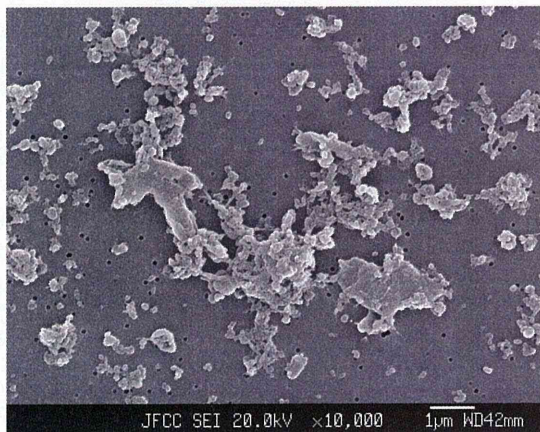


図 4. 続き



図 5. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた MPC 処理 CLPE+E(Aging)ライナーから発生した摩耗粉

	ライナー	
	CLPE+E (Aging)	MPC 処理 CLPE+E (Aging)
摩耗粉 個数 (個/ml)	365	214
面積 (μ m ² /ml)	83.9	7.7
体積 (μ m ³ /ml)	98.5	1.7

表 1 種々のライナーから発生した摩耗粉の個数、面積および体積

次に、32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた各ライナーから発生した摩耗粉の粒径分布を図6に示す。

CLPE+E(Aging)および MPC 処理 CLPE+E(Aging)の場合も、粒径 1 μm 以下の摩耗粉が最も多く、粒径が大きくなるに従い、その割合が少なくなる傾向を示した。しかし、MPC 処理 CLPE+E(Aging)の場合には、粒径 1 μm 以下の摩耗粉が約 90% 近くの大部分を占めているのに対し、CLPE+E(Aging)の場合は約 20% であった。

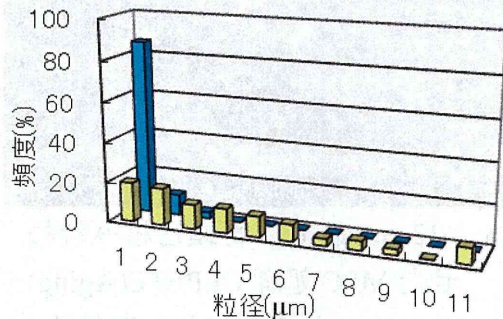


図6. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の粒径分布

(■CLPE+E(Aging), ■MPC 処理 CLPE+E(Aging))

次にアスペクト比に関して、CLPE+E(Aging)および MPC 処理 CLPE+E(Aging)の場合もアスペクト比が 3 までは増加し、その後アスペクト比が増加するに従い、割合が減少する傾向を示した (図7)。

次に円環性に関して、

CLPE+E(Aging)の場合、0.05~0.25 までの範囲に約 60%の摩耗粉が分布していた。よって、摩耗粉の形状は、繊維状のものが主流であることが定量的に明らかとなった(図8)。MPC 処理 CLPE+E(Aging)の場合には、0.2~1 付近の広い範囲に分布しており、繊維状のものから円状のものまで存在することがわかった。

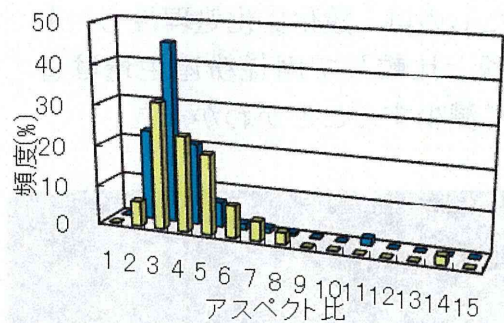


図7. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉のアスペクト比分布

(■CLPE+E(Aging), ■MPC 処理 CLPE+E(Aging))

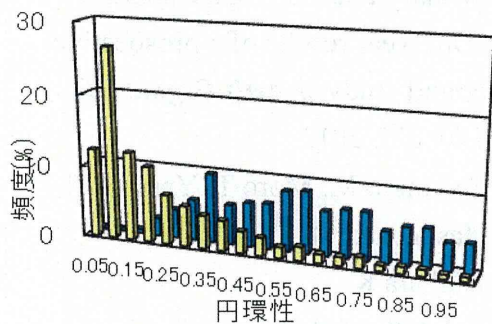


図 8. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の円環性分布

(■CLPE+E(Aging), ■MPC 処理 CLPE+E(Aging))

D. 考察

股関節シミュレーター試験の結果をライナーの重量変化および摩耗粉産生量から判断すると、酸化劣化処理した後でも、CLPE+E ライナーの MPC 処理を行うと劇的な摩耗抑制効果が持続することが明らかとなった。これは撥水性のビタミン E を添加した CLPE 表面を親水性の MPC ポリマーでナノ表面処理 (100 ~ 200 nm) することにより、関節摺動面に水和潤滑機構が働くようになったためと考えられる。

ビタミン E 添加 CLPE ライナーに MPC 処理を施すことで、酸化劣化処理後も摩耗試験後の摺動面性状に大きな改善が見られた。

また、今年度、酸化劣化処理後もビタミン E 添加 CLPE の MPC 処理によって、摩耗抑制効果が発揮されており、ビタミン E 添加量、架橋照

射線量、MPC 処理条件は、至適処理条件を確立できていると考えられる。

MPC 処理およびビタミン E 添加は、安定性と耐摩耗性に優れ、弛み、脱臼・破損という合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出する基盤技術として期待される。

E. 結論

10~15 年分の歩行負荷をかけたシミュレーター試験において、MPC 処理により、ライナーの重量減少を顕著に抑制することができた。

特に、MPC ポリマー処理ビタミン E 添加 CLPE は、大径骨頭と組み合わせても酸化劣化処理後もきわめて高い耐摩耗性が持続することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Watanabe K, Hashimoto M, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafting and vitamin E blending for high wear resistance and oxidative stability of orthopedic bearings.

Biomaterials (in press)

- 2) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y,

- Ishihara K: Effect of UV-irradiation intensity on graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on orthopedic bearing substrate. *J Biomed Mater Res A* (in press)
- 3) 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* 32(3): 369-376, 2014.
 - 4) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Saiga K, Hashimoto M, Tanaka S, Ito H, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Takatori Y: Grafting of poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on polyethylene liner in artificial hip joints reduces production of wear particles. *J Mechan Behav Biomed Mater* 34: 100-106, 2014.
 - 5) Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Ito H, Kim J, Koyama Y, Kawaguchi H, Nakamura K: The 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.
 - 6) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara K: Poly(ether-ether-ketone) orthopedic bearing surface modified by self-initiated surface grafting of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 34: 7829-7839, 2013.
 - 7) Hashimoto M, Hayashi K, Kitaoka S: A comparative hip joint simulator study of the wear, debris and metal ion release of CoCrMo / CoCrMo and CoCrMo / CL-UHMWPE couplings. *Nano Biomedicine* 5(1): 25-30, 2013.
 - 8) Hayashi, J, Kawashita, M, Miyazaki, T, Kudo, T, Kanetaka, H, Hashimoto, M: MC3T3-E1 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. *Key Engineering Materials* 529-530, 365-369, 2013.
 - 9) Hashimoto, M, Hayashi, K, Kitaoka, S: Enhanced apatite formation on Ti metal heated in PO₂-controlled nitrogen atmosphere. *Materials Science Engineering C*, 33, 4155-4159, 2013.

2.学会発表

① 国内学会

- 1) 大嶋浩文, 伊藤英也, 田中滋之, 田中健之, 岡敬之, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 寛骨臼回転骨切り術後の変形性股関節症に対する人工股関節全置換術 —RAOがその後のTHAに及ぼす影響—。第86回日本整形外科学会学術総会。広島, 5.23-26, 2013.
- 2) 川下将一, 林純平, 工藤忠明, 金高弘恭, 李志霞, 宮崎敏樹, 橋本雅美: アルブミンを吸着させた水酸アパタイトおよび δ 型 Al_2O_3 に対するMC3T3-E1およびRAW264.7細胞の応答。日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム。長野, 9.4-6, 2013.
- 3) 橋本雅美, 林一美, 北岡諭, 金高弘恭: 酸窒化処理チタンに対するRat-1線維芽細胞の応答。日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム。長野, 9.4-6, 2013.
- 4) 伊藤英也, 田中健之, 大嶋浩文, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 患者固有人工股関節設置ガイドの臨床試験。第40回日本股関節学会学術集会。広島, 11.9-10, 2013.
- 5) 茂呂徹, 高取吉雄, 鴨川盛秀, 織田弘美, 森本修平, 梅山剛成, 田中栄, 苅田達郎, 伊藤英也, 田中健之, 川口浩, 中村耕三: MPC処理ポリエチレンライナーを用いた人工股関節の臨床成績。第44回日本人工関節学会。沖縄, 2.21-22, 2014.

② 国際学会

- 1) Kawashita M, Hayashi J, Li Z, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H: Adsorption characteristics of bovine serum albumin on alumina particles with specific crystalline structure. 8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Sendai, Japan, 4.29-30, 2013.
 - 2) Kawashita M, Hayashi J, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H: Zeta Potentials and Bovine Serum Albumin Adsorption of δ -Alumina-Based Ceramic Particles. The European Society for Biomaterials 2013. Madrid, Spain, 9.8-12, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (免疫アレルギー疾患等実用化研究事業
免疫アレルギー疾患実用化研究分野))

分担研究報告書

抗感染性の検討

分担研究者 埜 隆夫 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)
宮本比呂志 (佐賀大学医学部 教授)

研究要旨：人工股関節の術後感染は、インプラント表面に付着した細菌がバイオフィルムを形成することが原因で起こる。バイオフィルム内部の細菌は抗菌薬や宿主の免疫反応から保護されるため、人工股関節に形成されたバイオフィルムを除去することは事実上不可能で、インプラントの入れ替えを余儀なくされる。バイオフィルム形成は、人工関節表面に吸着した生体内蛋白質に菌体が付着することが端緒となるため、蛋白質吸着と細菌付着を抑制することが感染防止のために重要である。昨年度までに、生体成分の吸着抑制効果を有することが知られている 2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーが、ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面に高親水性と中性電荷を賦与することを明らかにし、蛋白質の吸着および細菌の付着に影響を与えることを示唆する結果を得た。そこで本年度は、蛋白質吸着および細菌付着の抑制効果について検討した。ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面に MPC 処理をグラフトコーティング法にて施したところ、術後感染の起炎菌である黄色ブドウ球菌の付着が顕著に抑制されることがわかった。MPC ポリマー処理したビタミン E 添加架橋ポリエチレンは、その高親水性による蛋白質吸着阻害効果により、細菌付着を抑制する表面を有しており、バイオフィルム形成を防止することで、術後感染の予防効果が期待できると考えられた。

A. 研究目的

人工股関節置換術の合併症として重要なもののひとつに、術後感染が挙げられる。人工関節感染では、人工関節の表面で起炎菌のバイオフィルムが形成されている。術後感染の原因は、バイオフィルムから菌体が持続的に

離脱することにあるため、根治にはバイオフィルムを含めた付着菌体の除去が必須である。しかし、バイオフィルム内の菌体は抗菌薬や宿主の防御機構から保護されるため、いったん形成されたバイオフィルムを除去することは非常に困難で、術後感染が生じ

た際には、人工股関節の抜去・再置換を余儀なくされるのが現状である。再手術は患者にとって大きな負担であるので、バイオフィルムの形成そのものを阻害することによる感染防止策が求められている。

バイオフィルム形成は、人工関節表面に吸着した生体内蛋白質に菌体が付着することが端緒となるため、蛋白質吸着と細菌付着を抑制することが感染防止に重要である。我々は、生体成分の吸着抑制効果を有することが知られている、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーに着目し、MPC で表面処理したビタミン E 添加架橋ポリエチレンを創出した。昨年度の本研究で、MPC ポリマー処理が、ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面に高親水性と双極性電荷を賦与することを示し、MPC ポリマー処理による蛋白質吸着の抑制効果、ひいては細菌付着の抑制効果が期待できることを明らかにした。そこで今年度は、昨年度の本研究において構築した実験系を用い、MPC ポリマー処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の蛋白質吸着抑制効果および細菌付着抑制効果の検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

人工股関節のライナー部に用いられている架橋ポリエチレン (cross-linked polyethylene, CLPE) およびビタミン E 添加 CLPE について、直

径 14 mm × 1 mm 厚の試験片を作製した。さらに、ビタミン E 添加 CLPE 試験片表面を、前年度までに確立した方法で、MPC ポリマーをグラフトコーティングした (MPC 処理)。

2. 蛋白質吸着抑制効果の検討

CLPE 試験片表面への蛋白質吸着量を、ビシンコニン酸 (BCA) Protein Assay 試薬を用いて測定し、吸着抑制効果を評価した。

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。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) 溶液に、37°C で 1 時間浸漬させた。BSA 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 g/L に調製した。浸漬後、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。試験片表面より引き剥がされた BSA の量は、micro-BCA Protein Assay 試薬 (#23235) を用いて、評価した。

3. 細菌付着抑制効果の検討

人工関節感染の多くは、患者自身に常在しているブドウ球菌が起炎菌であるので、菌株には黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* を使用し、臨床より分離された 2 株 (UEOH-6 株、NBRC12732 株) について検討した。

トリプトソイブロス (TSB) 中にて前培養を 18 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) に懸濁した。試験片表面に

菌を付着させるために、 1×10^8 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。試験片表面に残存した菌について、以下の 2 つの項目について検討した。

① 蛍光顕微鏡観察

試験片表面の菌体を SYTO-9 により染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

② 付着生菌数測定

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 (colony-forming unit, CFU)、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。

C. 研究結果

1. 蛋白質吸着試験

図 1 に、BCA 法により評価した試験片表面の BSA 吸着量を示す。試験片表面に吸着した BSA 量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/6 程度であった (図 1)。

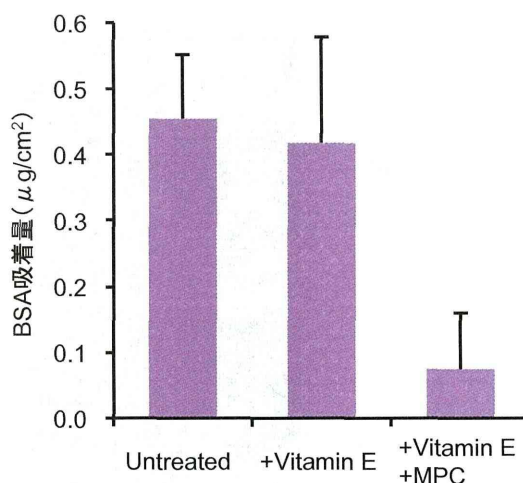


図 1. BCA 法により評価した CLPE 表面に吸着した BSA 量

2. 黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株を用いた試験

① 蛍光顕微鏡観察

MPC 未処理の場合には CLPE 試験片表面がおびただしい数の菌体に覆われていたが (図 2 上、中)、MPC で処理された表面では、菌体がほとんど観察されなかった (図 2 下)。

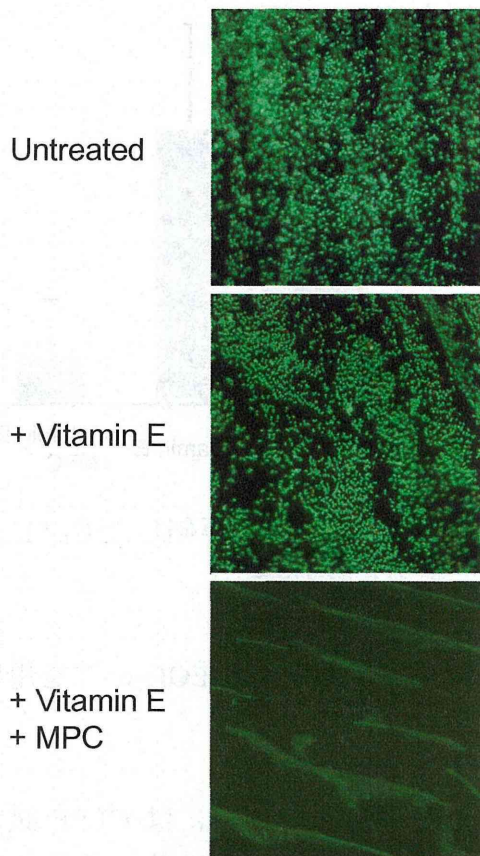


図2. CLPE 表面における黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株の付着 (対物 40 倍)

② 付着生菌数

付着生菌数を計測すると、MPC 未処理の場合は 5×10^6 CFU 前後であったのに対し、MPC 処理を施すことによって 8.8×10^3 CFU と、ほぼ 1/1,000 にまで低下しており、蛍光顕微鏡観察の結果とよく一致していた(図3上)。一方、浮遊菌数は、MPC 処理の有無にかかわらず 1.0×10^9 CFU で、差は認められなかった(図3下)。ビタミン E 未添加 (MPC 未処理) の CLPE 表面に付着した菌数は、ビタミン E 添加 (MPC 未処理) CLPE 表面と同程度で、ビタミン E 添加は黄色ブドウ球菌

UEOH-6 株の付着を抑制も促進もしなかった。

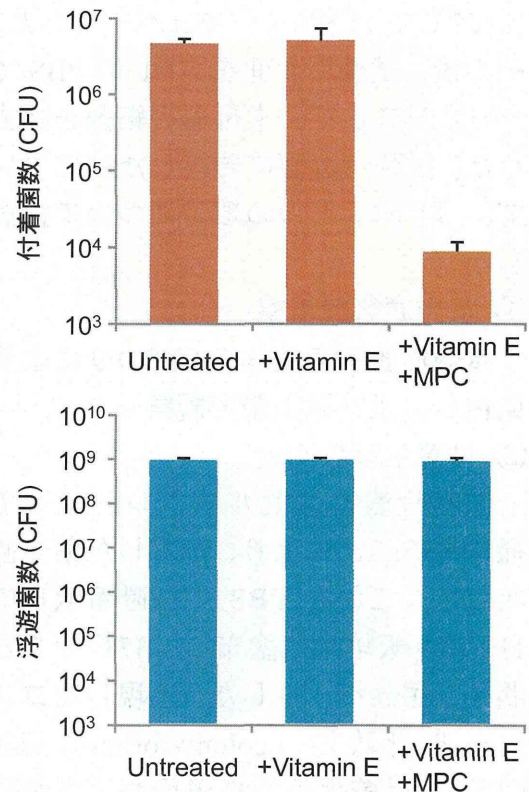


図3. CLPE 表面に付着した黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株の生菌数 (上) および未付着浮遊菌の生菌数 (下)

3. 黄色ブドウ球菌 NBRC12732 株を用いた試験

① 蛍光顕微鏡観察

UEOH-6 株の場合と同様に、MPC 未処理の CLPE 試験片表面にはおびただしい数の菌体が観察されたが(図4上中)、MPC で処理された表面では、菌体がほとんど認められなかった(図4下)。