

関節潤滑における摩擦系構成成分の役割に関する実験的研究

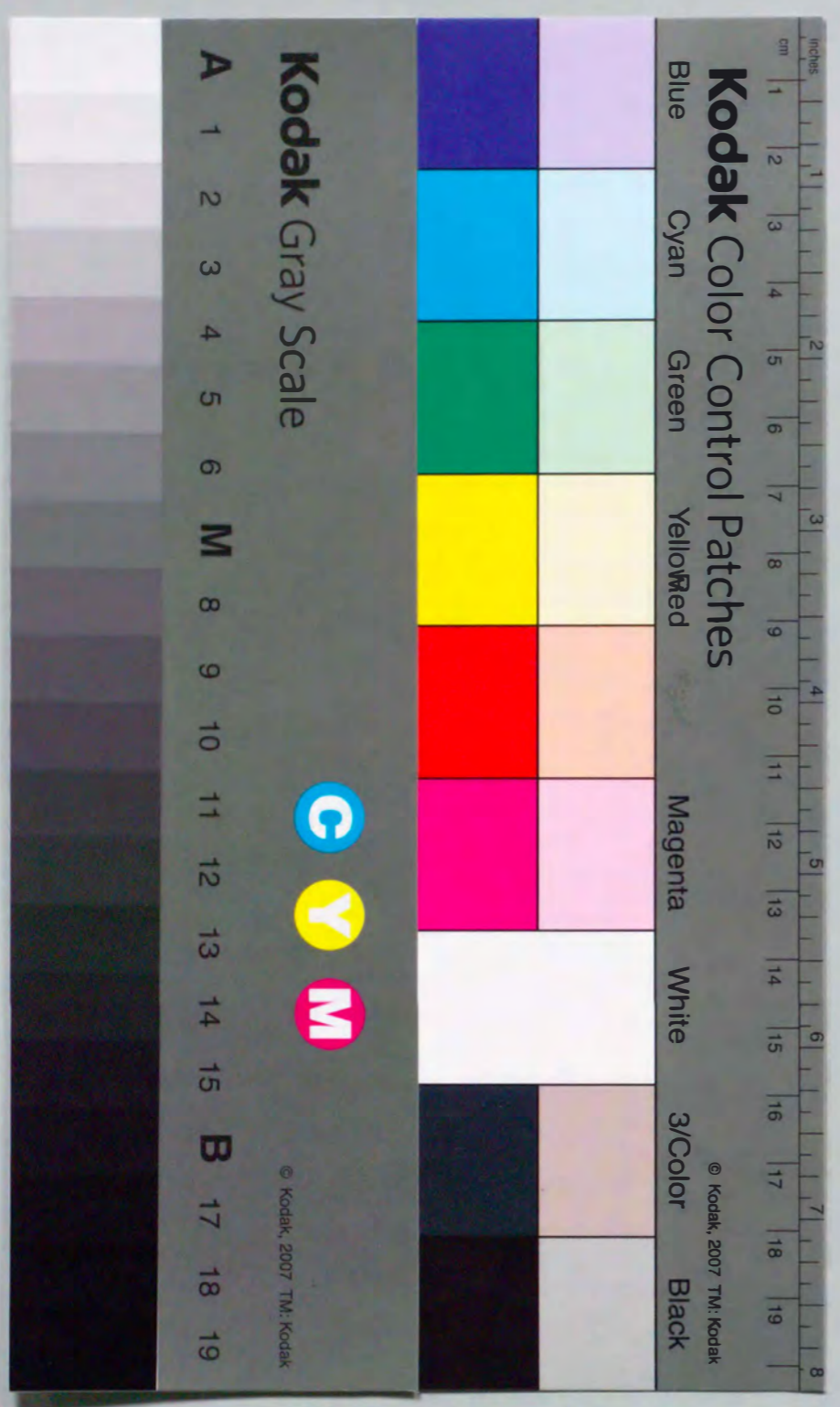
日垣, 秀彦

<https://doi.org/10.11501/3120513>

出版情報 : 九州大学, 1996, 博士 (工学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :

関節潤滑における摩擦系構成成分の
役割に関する実験的研究

日 恒 秀 彦



関節潤滑における摩擦系構成成分の役割に関する実験的研究

日垣 秀彦

目次

1章 緒言	1
1.1 研究目的	2
1.2 研究背景	4
1.3 本論文の構成	8
2章 生体関節の構造と構成成分	10
2.1 滑膜	11
2.2 軟骨	11
2.2.1 軟骨細胞	11
2.2.2 細胞外マトリックス	14
2.3 関節液	16
2.3.1 ヒアルロン酸	16
2.3.2 蛋白成分	18
2.3.3 リン脂質	21
3章 実験方法	23
3.1 実験材料	24
3.2 装置	26
3.2.1 往復動摩擦試験	26
3.2.2 振子摩擦試験	26
3.2.3 粘度測定	28
3.2.4 Langmuir-Blodgett膜作成	29
3.2.5 リポソームの調製	31
3.2.6 リポソームの観察	31

4章 実験結果	33
4.1 軟骨と人工骨頭候補材料による摩擦摩耗試験	35
4.1.1 人工骨頭候補材料と潤滑液	35
4.1.2 <i>in vitro</i> における軟骨と人工材料の摩擦試験	36
4.1.3 <i>in vivo</i> における摩耗試験との比較	40
4.1.4 まとめ	44
4.2 酵素を用いた生化学的消去法による往復動摩擦試験	44
4.2.1 酵素消化による潤滑液粘度への影響	44
4.2.2 酵素消化による関節液過飽和結晶への影響	45
4.2.3 潤滑液による摩擦への影響	46
4.2.4 酵素消化による摩擦挙動への影響	48
4.2.5 まとめ	51
4.3 関節液成分を添加剤として水溶液に用いた往復動摩擦試験	53
4.3.1 潤滑液条件と粘度	54
4.3.2 関節液成分添加による摩擦挙動への影響	55
4.3.3 関節液成分添加による軟骨摩擦面の摩耗挙動	57
4.3.4 アルブミンと γ グロブリン粒子の境界潤滑膜形成能	57
4.3.5 まとめ	61
4.4 混合潤滑領域における蛋白成分とリン脂質の表面膜に着目した振子摩擦試験	63
4.4.1 潤滑液条件と粘度	63
4.4.2 摩擦挙動に及ぼす潤滑液粘度の影響	64
4.4.3 摩擦挙動に及ぼす実験前の負荷時間の影響	64
4.4.4 軟骨摩擦面処理	66
4.4.5 軟骨摩擦面の表面処理による形状と親水・疎水性の変化	68
4.4.6 摩擦挙動に及ぼす軟骨表面処理の影響	69

4.4.7 境界潤滑モードにおける蛋白成分とリン脂質の潤滑性能	70
4.4.8 γ グロブリンとL α -DPPCの生理的濃度での潤滑性の検討	72
4.4.9 まとめ	73
4.5 蛋白成分とリン脂質のLangmuir-Blodgett膜による軟骨表面境界潤滑膜のモデル化と往復動摩擦試験	74
4.5.1 Langmuir-Blodgett膜作成	74
4.5.2 関節液とHA水溶液を用いた潤滑による軟骨とガラスの摩擦挙動の経時的変化	76
4.5.3 L α -DPPCのLangmuir-Blodgett膜の潤滑効果	76
4.5.4 両親媒性多成分の軟骨表面吸着膜による境界潤滑機構の仮説	78
4.5.5 γ グロブリンとL α -DPPCの混合による境界潤滑膜モデルの潤滑効果	79
4.5.6 まとめ	80
4.6 振子摩擦試験によるL α -DPPCリポソーム添加における境界潤滑膜形成効果の評価	81
4.6.1 軟骨摩擦面の界面活性剤処理による摩擦挙動への影響	82
4.6.2 界面活性剤処理された軟骨摩擦面における関節液の潤滑性	83
4.6.3 L α -DPPCリポソームの形態観察	83
4.6.4 L α -DPPCリポソームと γ グロブリン添加による摩擦挙動への影響	83
4.6.5 まとめ	87
5章 結論	88
文献	92
謝辞	109

1章 緒言

1. 1 研究目的

1. 2 研究背景

1. 3 本論文の構成

1章 緒言

1.1 研究目的

人間の下肢関節、特に股関節や膝関節は高荷重低速往復動の非常に厳しい条件下にあるトライボシステムである。このシステムは 10^3 のオーダの摩擦係数、人間の寿命以上の耐久性を有する耐摩耗性や自己修復性、スポーツ等の衝撃を伴う激しい運動に対応する衝撃吸収性や運動安定性等の優れた性能を有している。生体関節の構成は骨端海綿骨を多孔質低弾性の軟骨で被覆した部分が相対面となり、体液に比べ高粘度の関節液が潤滑液として存在する。さらに、関節液成分の産生、及び成分安定のための血漿の透過等を制御する滑膜を内面に形成する関節包によりシールドされており、トライボシステムとして機能的に構成されている。分子レベルにおいても、生体の器官の構成成分は合目的に存在していることが考えられ、関節液と軟骨表面に共通して存在するヒアルロン酸や蛋白成分、及びリン脂質の役割は、工学的には添加剤や表面膜等の潤滑要素と同様な関係にあると類推される。

関節に存在するヒアルロン酸⁽¹⁾は、関節液中においては粘度を高く維持しており、軟骨内部ではプロテオグリカンとして凝集体を形成し大量の水を保持することにより、衝撃吸収材の役割を果たす。これらの機構は後述するが、工学的にも粘度指数向上剤や潤滑性コロイド膜と同様な効果を有していることが推察される。

関節液や軟骨表層に存在する蛋白成分の大部分は血漿蛋白に由来するものである。すなわち、滑膜まで通じている血管の血漿から滑膜の調節機能により選択的に関節液中濃度が保たれるように透過された球状蛋白質⁽²⁾と考えられる。血漿に可溶な関節液中蛋白分子は両親媒性であるが、疎水性のアミノ酸側鎖が分子の内側に位置し、極性基が分子の外側に多く現れる構造になっており、一般に両性電解質である。臨床での電気泳動分析等において応用されているように分子量や等電点等に特異的な分布を示し、アルブミン、 α_1 グロブリン、 α_2 グロブリン、 β グロブリン、および γ グロブリン等に、分類される。これらの分子はそれぞれ相対的に緩衝的な役割を有することが

推察されるが、工学的にも様々な摩擦面の変化に対応する吸着性の添加剤と見なすことができる。したがって、これら蛋白成分が一定濃度を保ち関節液を構成していることは、高性能なトライボシステムを代表する生体関節の合目的な器官の成分構成であることから推察しても興味深い。

生体内のリン脂質^{(3),(4)}は、その二重層が細胞膜を形成していることがよく知られており、グリセロールと2本の脂肪酸鎖の結合からなる小分子である。グリセロールは負の電荷をもったリン酸基が結合し、親水性で極性をもった頭部となり、脂肪酸鎖は疎水性の尾部を形成する。したがって、これらの小分子は極微量の代謝循環においても、極性の高い界面に容易に膜を形成し、境界潤滑剤として関節腔内に残留していることが推察される。

膝関節のような主要な下肢関節の通常歩行は踵接地 (heel strike) に始まり爪先離地 (toe off) に終わる立脚期と、低荷重と大きな屈曲からなる遊脚期に大きく分かれ、潤滑上の作動条件は二峰性の極大荷重において相対運動方向が変わる位相で最も厳しくなると推察される。さらに、生理的に荷重条件を大きく変化させ得る激しいスポーツや、大腿脛骨間での形状適合性が悪い状態での静止状態がつづく正座位からの運動など、生体関節の潤滑モードは多様に変化する。これら変動荷重下の潤滑機構は池内ら⁽⁵⁾のソフトEHLやDowsonら⁽⁶⁾のマイクロEHL等の考察により、その大部分は流体膜による潤滑が可能と考えられるが、シビアなモードにおいては境界潤滑^{(5),(6),(7),(8)}やゲル膜潤滑^{(9),(10),(11)}、滲出潤滑^{(12),(13)}などの補足的な潤滑機構が作用すると考えられる。しかし、実験対象が生体であるため実験条件に制限があり、広範な作動条件下の潤滑機構における上述の成分の役割を個々に抽出する系統的な研究は報告されていない。村上^{(14),(15)}は、このように過酷度の変化に対応して各種の潤滑モードが協調的に機能する潤滑機構^{(16),(17),(18)}を「多モード適応潤滑」と称することを提案した。そのような視点から個々の成分の役割に着目し、生体関節の潤滑機構の解明を試みることは、臨床において多様な関節疾患に対する投与薬剤成分の選択、ならびに人工関節の潤滑における同構成成分の役割を考慮した潤滑上効果的な材料設計等に非常に有用であると考えられる。

1. 2 研究背景

運動器関節系の代表的疾患⁽¹⁹⁾として、慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis, RA) および変形性関節症 (Osteoarthritis Arthrosis, OA) が挙げられる。RAは多発性の非化膿性の関節炎を主症状とする原因不明の慢性全身性疾患である。手や足の小さい関節あるいは肘・膝関節などの疼痛と腫脹で初発し、次第に全身の関節を侵す。当初は関節炎であるが、軽快と憎悪を繰り返して、軟骨や骨が破壊されて、変形と機能障害を起こすことが多い。OAはRAと異なり、局所性の疾患である。関節軟骨や軟骨下骨層の変性に続く破壊が初期症状で、反応的に骨の増殖性変化が続発し、滑膜の二次的炎症が加わって臨床症状を呈する。全身的要因に明確なものは示されていないが、局所的要因として、関節に加わる機械的ストレスの異常が重要であることは否めない。病的には、軟骨基質の生化学的変化による粘弾性や摩擦特性の変化に伴い、軟骨内部の応力状態に変化が起こり、摩耗表面下の軟骨細胞から分解酵素等が分泌され、軟骨基質のプロテオグリカンなどが破壊されて進行するようである。最近では細胞の培養系での力学試験が盛んに行われており、著者らも九州大学医学部整形外科との共同研究⁽²⁰⁾において、軟骨細胞にせん断応力を与えることにより、OA関節内で認められる生体防御に関わる因子の遺伝子蛋白質を誘導し得た。生理的な周期的静水圧負荷等には軟骨基質の産生や成長に関わる新陳代謝^{(21),(22)}が報告されており、軟骨層の材料物性や低摩擦が正常に維持されていれば、生理的に許容な応力場を保ち、成長促進が認められるようである。ところが、軟骨の物性変化や軟骨表面の摩耗進行等が起こると、軟骨細胞に異常な応力が負荷され、軟骨細胞が力覚反応として退行性反応を起こすことが推察され、早期における潤滑性の維持・回復が治療法としても望まれるところである。

生体関節の優れた潤滑性能については1934年にJones⁽²³⁾の馬膝関節の摩擦係数の測定以来、多くの研究報告がなされてきた。*in vivo* (生体内)の実験系による報告としてBarnetら⁽²⁴⁾による人指、及び笹田ら⁽²⁵⁾による人膝を用いたものがあり、麻酔下において振子摩擦試験を行っている。摩擦係数は、低振幅域において振幅の減衰から求めてお

り、軟部組織の影響が否めないが、指において0.0075~0.018、膝において0.006~0.01と非常に低い値を報告している。*in vitro* (生体外環境)における試みは多く、Barnetら⁽²⁴⁾による犬足関節、Radinら⁽²⁶⁾による牛中足骨母指関節、Clarkeら⁽²⁷⁾、O'Kellyら⁽²⁸⁾、馬淵・塚本ら^{(29),(30)}による人股関節を用いた振子試験により、摩擦係数は0.003~0.03の範囲に含まれるようである。通常の機械要素と比較すると非常に低い摩擦係数であり、この機構については実験、解析及び解剖学的手法により多くの説が挙げられている。

MacConail⁽³¹⁾とDintenfass⁽³²⁾は、それぞれくさび膜とスクイズ膜による流体潤滑の理論的可能性を考察した。その後、池内ら⁽³⁾やMedleyら⁽³³⁾による軟骨層の低弾性率を考慮したソフトEHL (弾性流体潤滑) やDowsonら⁽⁴⁾による軟骨表面の微小粗さを考慮したマイクロEHLなどの理論的展開を見せた。これら流体潤滑の考え方は生体関節の耐久性や低摩擦を説明する上で十分であるように思われたが、馬淵ら^{(29),(34)}は流体潤滑のみの説明では実験的に得られた摩擦力は3桁以上高いという試算を示し、他に摩擦を構成する因子が存在することを論じている。関節液が他の体液などと比べ高粘度で存在し、日常、軟骨摩擦面において接触起因の摩耗の進行が認められないことから推察しても、EHLが生理的な運動の大部分で機能していることは確かなようである。補足的な機構としては境界潤滑やゲル膜潤滑、滲出潤滑などの説が有望であると考えられる。

Charnley⁽³⁵⁾は関節摩擦に速度依存性がないことを示し、境界潤滑説を唱えた。天児⁽³⁶⁾福岡⁽³⁷⁾も犬足関節を用いた振子摩擦試験により、その直線減衰性や潤滑液への依存性のないことから境界潤滑を支持しているが、軟骨より滲み出す水分の摩擦への影響も否定できないことを報告している。その後、蛋白成分をはじめとして数種の境界潤滑性を有する成分が指摘されてきている。酵素を用いた生化学的消去法により蛋白成分の境界潤滑性に否定的な報告⁽²⁸⁾が散見されるが、実験においては作動条件を広く設定し、他の潤滑機構との分担・協調を考慮した系統的研究はなされていないようである。

武井・小林ら^{(9),(11),(38),(39)}は凍結走査電子顕微鏡による軟骨断面の観察より、コラーゲ

ン繊維と細胞が存在しない無定形最表層の存在を確認した。笹田ら⁽¹⁰⁾はこの最表層がプロテオグリカングルにより構成されており、擦過後、著しく潤滑性が低下することを示している。これらゲル膜の存在は摩擦面保護の機能や摩擦面の低弾性化等の潤滑への寄与が考えられるが、固液界面の実効粘度の上昇による潤滑膜維持といった解釈⁽⁴⁰⁾もなされている。しかし、ゲル膜擦過といった手法はゲル膜表面の吸着膜をも取り除いてしまうことになり、ゲル膜のみの潤滑への寄与を証明していることにはなっていない。

McCutchenらは^{(12),(41),(42),(43),(44)}は軟骨の変形に伴い液体が摩擦面に滲出し、弾性流体潤滑に寄与するWeeping lubricationを唱えた。この潤滑機構は、解析的には軟骨内の自由水の流動抵抗に依存しており、流動抵抗を低く見積もると軟骨内部を通過する流れが生じ、スクイズ膜の持続時間は短くなり、効果は否定される^{(45),(46)}。しかし、池内ら^{(13),(47)}は軟骨内部流動抵抗が極めて高いことを指摘し、固液二層からなる軟骨表面モデルの、固体マトリックスの接触を考慮することにより、摩擦面への十分な水分の滲出を確認し、Weeping lubricationの可能性を示した。

これらの諸説をふまえ、生体関節の潤滑機構について、さらに詳細にその構成成分の役割に着目した研究が行われてきている。O'Kellyら⁽²⁸⁾やRobertsら⁽⁴⁸⁾は関節摩擦測定に歩行シミュレーターを用いることにより変動荷重・屈曲条件により潤滑モードを考慮しており、ヒアルロン酸が関節液粘度を向上させ、生理学的な変動荷重下の流体膜形成に影響することを指摘している。近藤⁽⁴⁹⁾は多数の正常、及び病的関節液を採取し、各症例に対する粘度を実験的に求め、極限粘度とヒアルロン酸分子量の関係から病的関節液の粘度低下が濃度と分子量の低下の両因子によることを明らかにした。馬淵・小原ら^{(50),(51),(52)}は生体関節を用いた振子試験により混合潤滑と推定される条件においてヒアルロン酸が流体膜形成を促すことにより潤滑に寄与することを報告しており、潤滑性改善のための投与効果の評価を行っている。

Linnらは、犬足関節を用いた揺動摩擦試験機を開発し⁽⁵³⁾、潤滑液粘度、揺動周期、および荷重条件を変化させることにより、動物関節の潤滑メカニズムが自己圧縮流体

潤滑 (Weeping lubricationと同意) と境界潤滑、および弾性流体潤滑のコンビネーションによるものであることを指摘している⁽⁵⁴⁾。しかしながら、同実験系において、ヒアルロン酸分解酵素の影響は低く、蛋白成分分解酵素の影響が高いことから、糖蛋白成分ムチンによる境界潤滑性に着目した⁽⁵⁵⁾。その後、Swannら^{(5),(56),(57)}は、関節液中において蛋白成分を含む巨大分子であるLGP-1 (Lubricating glycoprotein-1)の形態や分子量を明らかにし、その境界潤滑性を指摘している。この機構における蛋白成分の役割は、潤滑モードに対応して巨大分子中における親水・疎水基の制御に関与し、吸着膜形成を促していることが考察されている。近間⁽⁵⁸⁾は5種の染色および固定法により関節液の電子顕微鏡観察を行った。関節液中の蛋白成分が20~30nm大の球形であることを指摘し、長鎖状のヒアルロン酸の網目に保持されたボールベアリング機構の転動体類似作用により関節の低摩擦を説明しているが、さらに検討が必要と考えられる。

Bole⁽⁵⁹⁾は関節リュウマチの関節液の分析において、蛋白成分とリン脂質が正の相関をもって上昇することを報告している。組織の退行崩壊と共に生体の何らかの適応を示唆しているのかもしれないが、Hillsら^{(6),(60),(61)}やWilliamsら⁽⁸⁾は、関節液中に存在するリン脂質の組成等を同定し、特に濃度及び極性がともに高いDPPC (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine)の潤滑性を確認している。

1. 3 本論文の構成

本研究では実験室環境 (*in vitro*) の摩擦試験を主体として、摩擦形態や荷重条件、潤滑液粘度条件を変化させることにより、広範な潤滑モードにおける生体関節のトライボロジー特性の評価を試みた。

次章ではヒト生体関節の構成要素である滑膜、軟骨、および関節液の解剖学的構造と本研究の背景となる軟骨細胞の力覚反応に関する基礎的実験結果を概説する。さらに、摩擦実験に用いた豚関節液の構成成分分析結果を示し、その化学的構造と形態により期待される潤滑上の役割を推察する。

第3章では本研究に用いた摩擦試験機、潤滑液粘度測定装置、及び軟骨表面膜モデル化のためのLangmuir-Blodgett膜積層の原理と形成装置を解説した。リン脂質等の両親媒性分子の水系潤滑剤への溶解、および関節腔内への投与を目的としたリポソームの調製、ならびに形成確認の手法を示す。

第4章では実験結果と考察を列挙する。4. 1節は軟骨と人工材料の往復動摩擦試験を主体に人工材料表面の親水性および潤滑液の影響^{(62),(63)}を考察する。4. 2節では軟骨と極性の高い表面を有するガラス平板の往復動摩擦試験において、対象関節構成成分の分解酵素を用いた生化学的消去法により、各構成成分の役割とその潤滑モード依存性⁽⁶⁴⁾を考察する。4. 3節では軟骨とガラスの往復動摩擦試験において潤滑剤に関節液構成成分を用いた人工関節液を用い、特に電気泳動により分画された蛋白成分の潤滑効果^{(63),(65)}を確認した。4. 4節では豚肩関節を摩擦面に用いた振子摩擦試験を行い、4. 3節と同様に人工関節液によりリン脂質等を含めた関節液構成成分の潤滑上の役割^{(66),(67)}を推察した。4. 5節では4. 3節と4. 4節で確認された境界潤滑性を有する両親媒性成分に対し定量的潤滑効果を確認するために、Langmuir-Blodgett法によりガラス表面に多層膜を作成し、その潤滑効果を確認し、軟骨表面の境界潤滑膜モデル^{(68),(69)}を類推した。4. 6節ではリン脂質等の水系潤滑剤への溶解、関節腔内への投与を考慮し、リポソームの調製を行うことにより、他の成分との協調的境界潤滑性の確認ならびに定量的投与効果⁽⁷⁰⁾の推察等を行った。

第5章では第4章での実験事実に基づき、生体関節の潤滑モードに依存した各潤滑機構における関節構成成分の役割、ならびに各構成成分の関節症への投与に対し期待される効果を論じる。

第2章 生体関節の構造と構成成分

2.1 滑膜

2.2 軟骨

2.2.1 軟骨細胞

2.2.2 細胞外マトリックス

2.3 関節液

2.3.1 ヒアルロン酸

2.3.2 蛋白成分

2.3.3 リン脂質

2章 生体関節の構造と構成成分

2.1 滑膜

可動関節の概略を図2.1に示す。滑膜 (Synovial membrane) は関節包 (Joint capsule) の内側や関節内を走る膝関節十字靭帯等の表面にあつて、軟骨周縁と連続することにより、関節腔を形成する。その構造は表層の滑膜細胞と深層の疎性結合組織からなり、滑膜細胞が疎性結合組織まで通じている毛細血管と関節液 (Synovial fluid) の代謝を行っている。滑膜細胞は透過成分を制御し、ヒアルロン酸の産生を行っている。

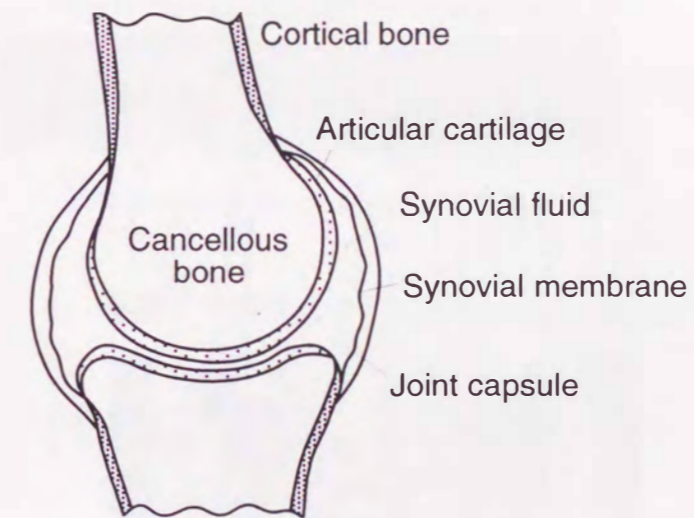


図2.1 生体関節概略

2.2 軟骨

摩擦面となる軟骨 (Articular cartilage) は軟骨下骨、海面骨 (Cancellous bone) や皮質骨 (Cortical bone) といった傾斜構造により過大な応力を避け、各要素において衝撃吸収を行う合理的な構造を成している。

2.2.1 軟骨細胞

軟骨細胞 (Chondrocyte) は結合組織細胞族に属し、同族の繊維芽細胞や骨細胞と相

互転換能を有する。その分化形質の自由度は組織や器官における支持や修復に重要な役割を有している。関節において摩擦面に相当する骨端軟骨被覆部の断面の概略を図2. 2に示す。軟骨細胞は自身が産生する細胞外マトリックスに覆われている。石灰下層から深層に位置する細胞は、球形で比較的大型であり、毛細血管が近傍まで届いているため、活発に機能している。中層から表層に位置する細胞は扁平あるいは紡錘状の形態を示し小型になる。表層周囲には酸素や栄養分が少なく、不活性であると考えられる。

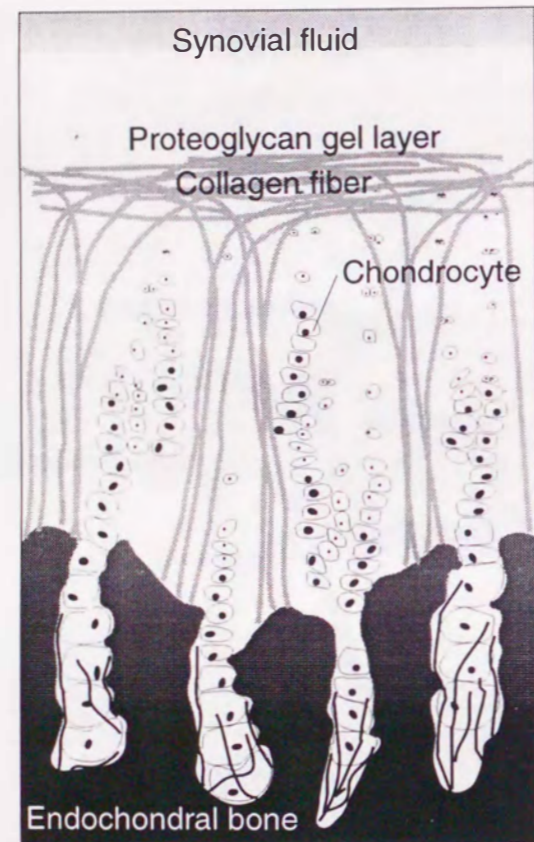


図2. 2 軟骨断面概略

軟骨細胞の力覚反応はOA等の病理において重要視されており、九州大学医学部との共同研究⁽²⁰⁾により、せん断応力場における軟骨細胞の反応を経時的に観察した。試験装置概略を図2. 3に示す。せん断応力はコーンプレート型回転粘度計を利用することにより、流体を介して一様せん断応力場を形成することにより与える。人正常軟骨細胞を高密度単層培養したディッシュを下部平面に用いることにより、1.7Paのせん断

応力を与えた。1~24時間後に経時的に培養液中のサイトカインIL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6を酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により解析した。最も顕著な変化が認められたのはインターロイキン-6 (IL-6) で、図2. 4に示すように24時間後には非負荷対照の10倍に増加した。負荷条件における線維芽細胞 (Fibroblast) においては、IL-6の産生が認められないことから、軟骨細胞特有の反応であることがわかる。IL-6は非特異的生体防御の早期に重要な働きをしていることが考

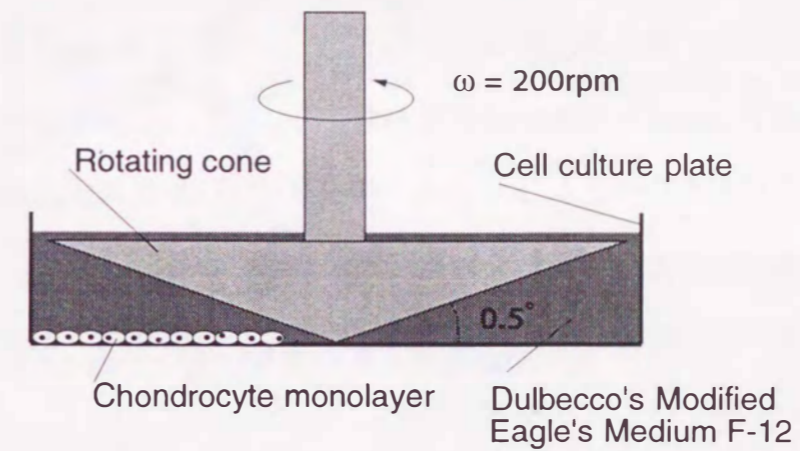


図2. 3 単層培養細胞へのせん断応力負荷装置概略

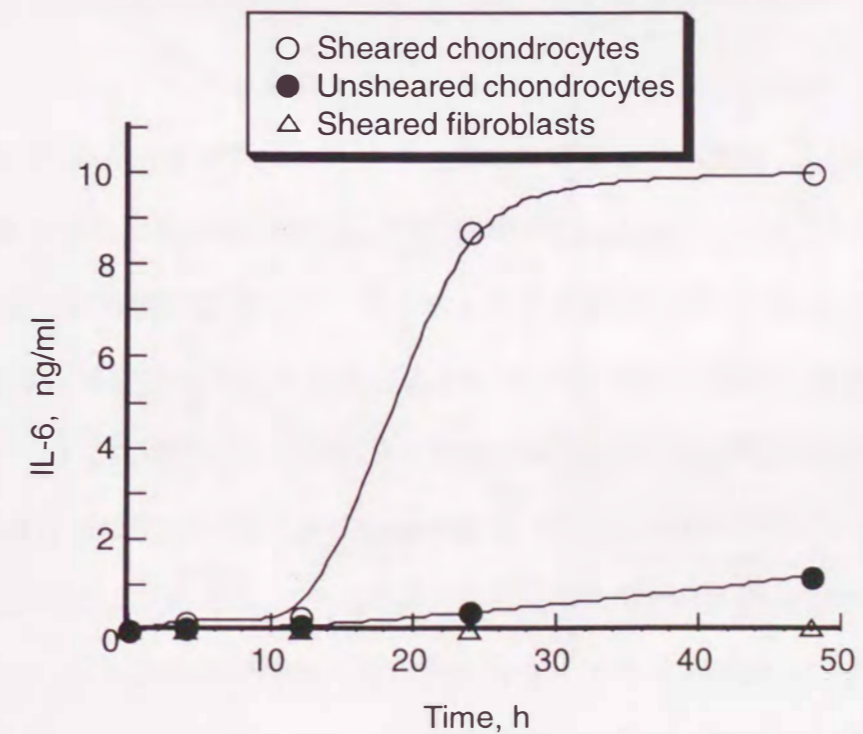


図2. 4 せん断応力刺激による軟骨細胞のサイトカイン産生

えられている。さらに、人正常関節軟骨を死後24時間以内の剖検例の膝関節より、OA関節軟骨を人工膝関節置換術を受けた患者より採取し、*in situ*（生体内の原位置）における遺伝子発現の解析のため、それぞれの軟骨細胞よりRNAを抽出した。*in situ*ではIL-6はOA軟骨細胞にのみ発現されており、正常軟骨細胞には検出されなかった。静水圧的圧縮応力が持続されると軟骨マトリックスの代謝は減少し⁽⁷¹⁾、周期的に負荷すると活性化させることが報告⁽⁷²⁾されている。生理的な応力条件で軟骨細胞は活性化され、非生理的条件では退行することが示唆されている^{(73),(74)}。生理的に軟骨表面における接触圧力は数MPaに昇るのに対し、1.7Paといった僅かなせん断応力において特異的に生体防御に関わる因子の発現が誘導されたことにより、正常関節軟骨ではコラーゲンや水分を吸収したプロテオグリカンマトリックスが、軟骨細胞周囲においては持続時間の短い静水圧的応力に変換していることが推察される。さらに、関節の潤滑性の低下や軟骨表層の物性の変化が、荷重時の応力場に影響を与え、IL-6を介してOA等関節症の病因になっていることが推察された。

2. 2. 2 細胞外マトリックス

細胞外マトリックス⁽⁷⁵⁾としてはコラーゲン、プロテオグリカン及び水分がその主成分であり、水分は軟骨湿潤重量の70~80%を占める。コラーゲンファイバーは深部では軟骨表面に垂直に、表層部では並行に走行しており、軟骨細胞を立体的に保護するような構造をなしている。Rosenbergら⁽⁷⁶⁾の撮像による軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグレカン凝集体の電子顕微鏡写真より作製した3次元的模式図を図2. 5に示す。さらに、多数の報告^{(77),(78),(79),(80),(81),(82),(83)}に基づきアグレカン凝集体の形態の計測結果を概略したHunzikerら⁽⁸⁴⁾による模式図を図2. 6に示す。アグレカンモノマーは細胞外でヒアルロン酸に2個の蛋白リンカーにより結合して、巨大な重合複合体を形成する。蛋白リンカーはヒアラドヘリンファミリーに属し⁽⁸⁵⁾、正に帯電したアミノ酸残基が集合したヒアルロン酸結合ドメインを含んでいる。アグレカンモノマーに認められるグリコサミノグリカンはコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸であり、コア蛋白に共

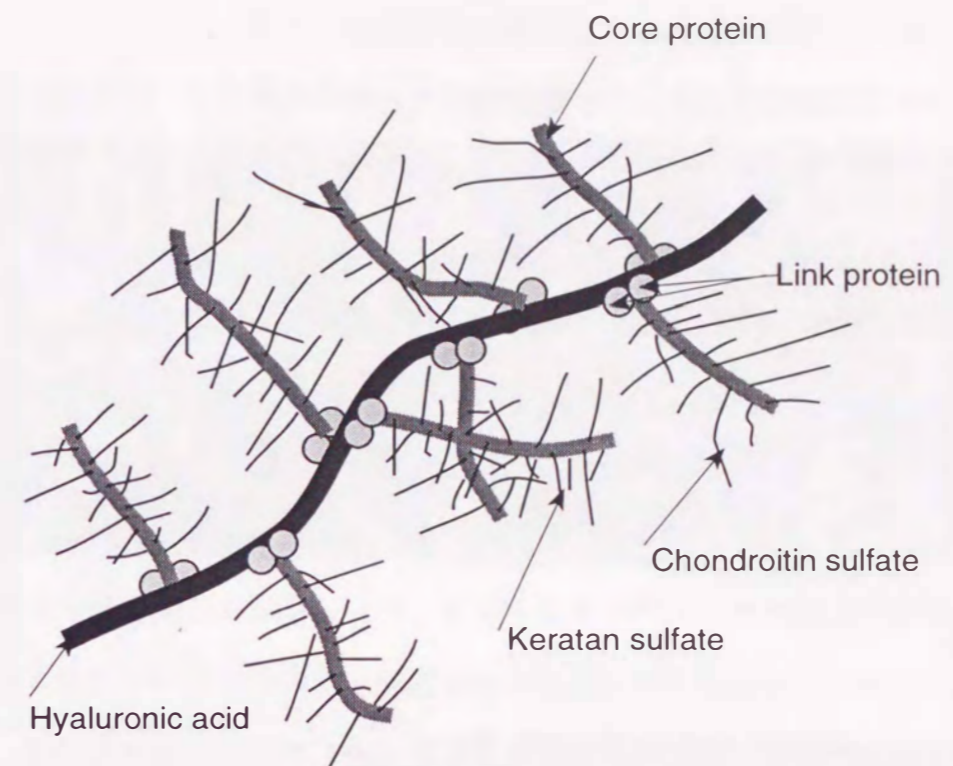


図2. 5 アグレカン凝集体模式図

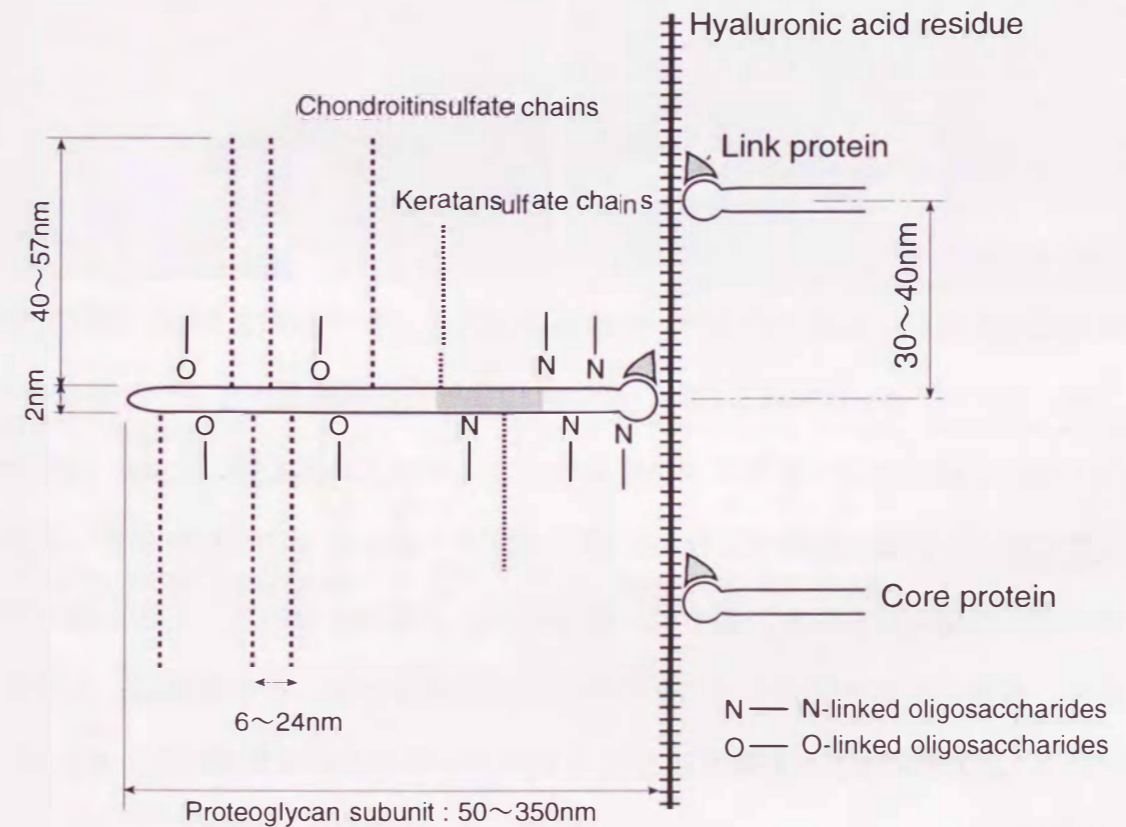


図2. 6 Hunzikerら⁽⁸⁴⁾によるアグレカン凝集体の形態概略図

有結合しており、その硫酸基により大量な負電荷を有する。

図2. 7に湿潤軟骨表面のレーザ顕微鏡写真と図中白線で示した断面の表面形状を示す。図2. 7(1)は十分に水分を含む生体内と同様な状態と考えられるが、図2. 7(2)から図2. 7(3)のように大気中で乾燥が進むと深さ3~6 μm の楕円形のくぼみが、所々かたまって点在しており、その多くは2個対になっている。再度、水分を補給すると図2. 7(1)と同様、図2. 7(4)のように最大高さで1 μm 程度の平滑な表面形状に戻る。Kirkら⁽⁸⁶⁾も、Wet-SEMを用いることにより、湿潤軟骨平面が極めて平滑であることを指摘している。この平滑な面は水分を十分に含ませることにより形成されることから軟骨ゲル膜の表面に対応すると考えられ、乾燥による表面形状の変化は水分の移動性に差を有する細胞が抜け落ちた軟骨細胞小窩⁽⁸⁷⁾の存在やプロテオグリカンとコラーゲン繊維の軟骨表面近傍における分布を反映していると考えられる。図2. 7(3)の点在するくぼみは、軟骨細胞が抜け表層近傍まで移動してきた水分濃度が高い細胞小窩が存在していることを示している。

2. 3 関節液

2. 3. 1 ヒアルロン酸

ヒアルロン酸は滑膜細胞や軟骨細胞の細胞膜に埋め込まれている複合酵素系により、直接細胞表面から生成される⁽⁸⁸⁾。その構造は図2. 8に示すように、硫酸をもたない二糖が最大25,000個程度まで繰り返し連結した最も単純なグリコサミノグリカンである。その二糖の一方であるグルクロン酸はカルボキシル基を持つため、強く負に帯電しており、その鎖は柔軟性がなく、ポリペプチド鎖のように折りたたまれて密な球状構造をもたない。しかも、親水性に富むため、生体内において、のびた構造をとりやすく、質量の割に容積の大きいゲルやゾルの形態をとる。この機構は、高密度の負電荷によりNa⁺等の陽イオンを大量に引きつけ、その浸透圧で大量の水分を吸収しているためである。

摩擦実験に用いたヒアルロン酸水溶液（鶏冠より抽出）及び豚関節液の粘度をコー

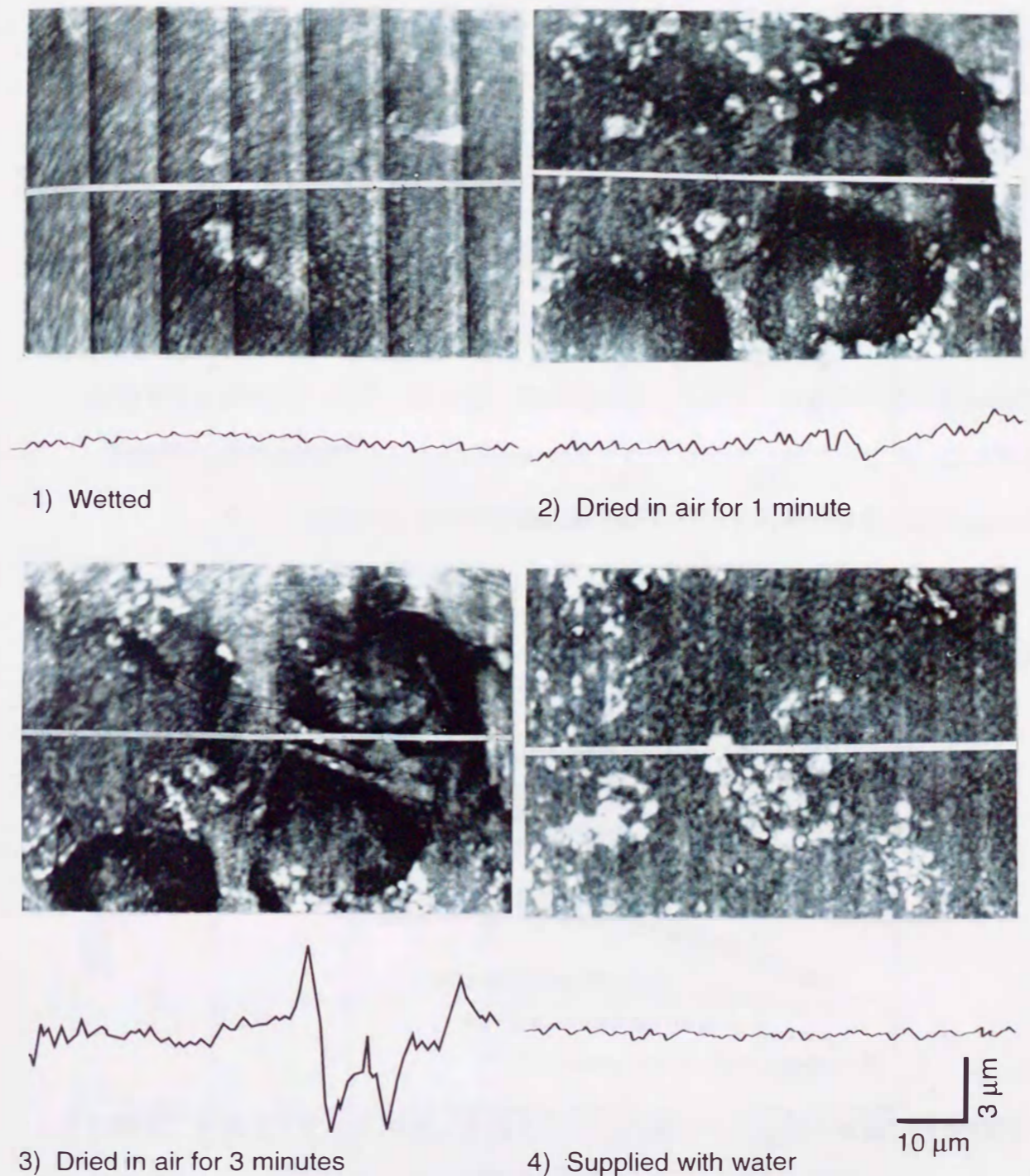


図2. 7 軟骨試験片表面の共焦点レーザー顕微鏡写真と断面形状

ン/プレート型回転粘度計により測定した。ヒアルロン酸分子量と濃度への依存性を図2. 9に示す。一般に高分子の分子量Mはその稀薄溶液の粘度から次式⁽⁸⁹⁾に (Mark-Houwinkの式) より経験的に与えられる。

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha$$

このとき $[\eta]$ は稀薄溶液を用いた極限粘度である。

ヒアルロン酸についてはLaurent⁽⁹⁰⁾により生理食塩水を希薄溶媒として、実験的に $K = 3.7 \times 10^{-4}$, $\alpha = 0.78$ が求められている。

関節液のように、生理的な高濃度でのヒアルロン酸分子の粘性に及ぼす詳細な挙動はYanakiら^{(91),(92)}が報告しており、せん断速度と分子量への高い依存性を示す挙動を、ヒアルロン酸分子に対しランダムコイルをモデルとした排除体積効果から説明し、Fixman⁽⁹³⁾によるビーズスプリングモデルに対応することを示している。

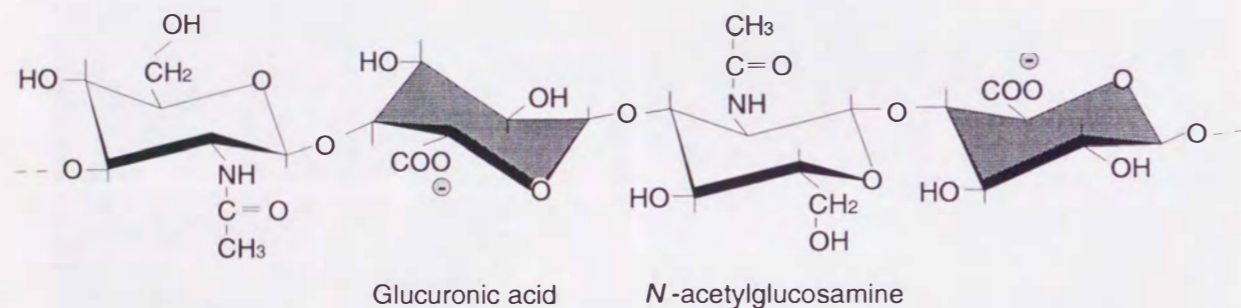


図2. 8 ヒアルロン酸の二糖単位

2. 3. 2 蛋白成分

蛋白成分の基本構造はアミノ酸がペプチド結合したポリペプチド鎖を二次構造としている。この主鎖は多くの形態をとりうる可能性があるが、そのアミノ酸配列に依存して、側鎖どうし、あるいは水分子との非共有結合により特定のコンフォメーションをとる。蛋白分子の三次構造を比べてみると、全体的には独特であるが、部分的にはある特定のパターンにより構成されている。これはアミノ酸側鎖の相互作用ではなく、ペプチド結合の間のできる規則的な水素結合によるもので、螺旋状に鎖が巻かれ

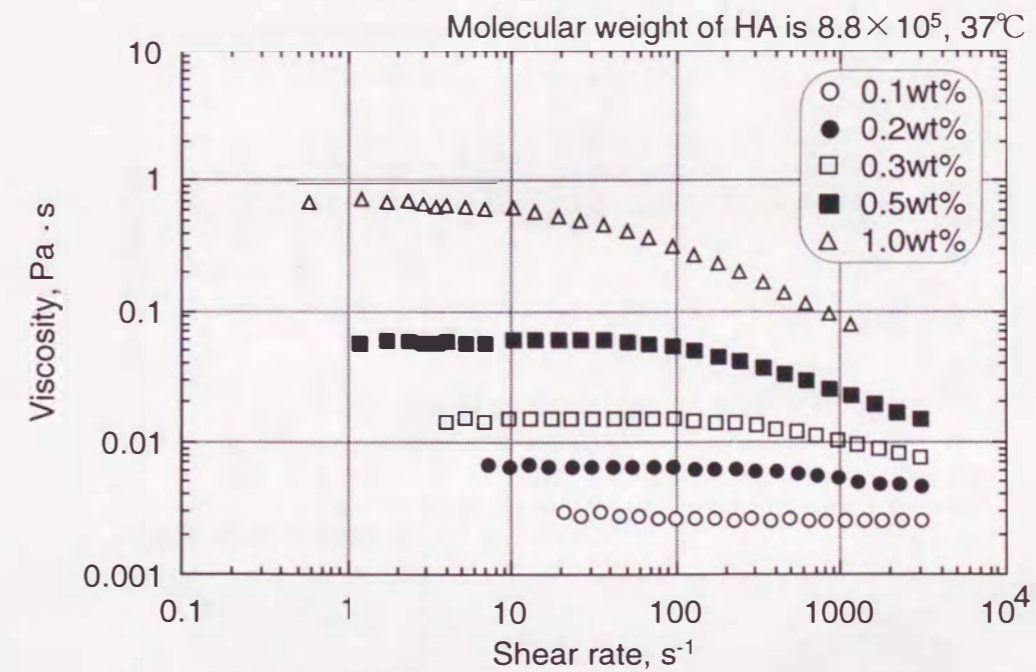
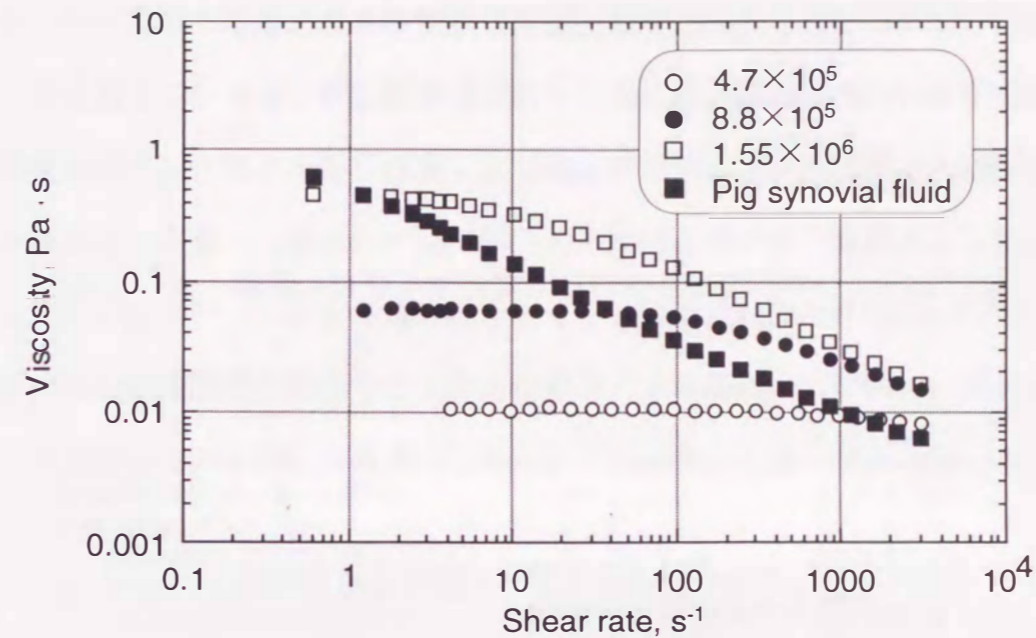


図2. 9 関節液とヒアルロン酸ナトリウム0.5wt%水溶液の粘度とそのヒアルロン酸分子の分子量と濃度への依存性

た α ヘリックスとシート状に鎖が並んだ β シートがある。この様に蛋白分子の大部分は自然に折りたたまれて、固有のコンフォメーションをとる。球状蛋白分子では、中心部に疎水性側鎖が集まり、外側に極性側鎖が複雑で不規則な表面を形成する。この複雑な表面が蛋白分子に固有な性質を与え、吸着現象に関与してくることになる。

臨床的に体液中の蛋白成分を大別するためによく使われるセルロース・アセテート膜電気泳動法による豚関節液の分析結果を人の関節液⁽⁹⁴⁾と比較し、表2. 1に示す。豚関節液に含まれる総蛋白分量はビュレット法による定量により3.4 g/dlであった。電気泳動法は、図2. 10に示すように蛋白分子が分子表面の解離基の代数和と分子の形態による流体抵抗に依存して電場中で移動する性質を利用したものである。

表2. 1 セルロースアセテート膜電気泳動法による関節液中蛋白成分の分画

Protein	Percentage \pm SEM Pig, N=30	Percentage Human ⁽⁹⁴⁾
Albumin	57.2 \pm 0.92	55~70
α 1-globulin	4.53 \pm 0.59	6~8
α 2-globulin	13.1 \pm 0.68	5~7
β -globulin	6.91 \pm 0.53	8~10
γ -globulin	7.26 \pm 0.62	10~14

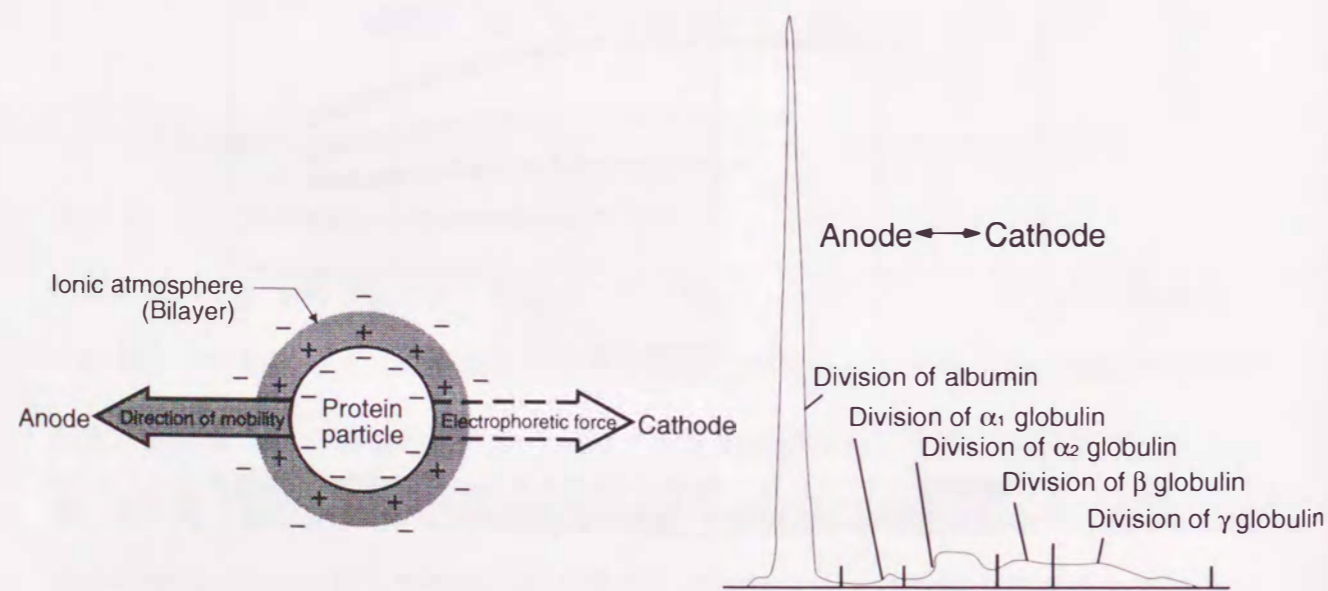


図2. 10 電気泳動法による蛋白分画

2. 3. 3 リン脂質

薄層クロマトグラフィーによる豚関節液中のリン脂質に対する分析結果をHillsら⁽⁶⁰⁾の犬の結果と比較して表2. 2に示す。豚関節液に含まれる総リン脂質濃度はコリンオキシダーゼとペルオキシダーゼを用いた酵素法による定量により19 mg/dlであった。両動物においてフォスファチジルコリン (PC) が主成分であることがわかる。さら

表2. 2 薄層クロマトグラフィーによる関節液のリン脂質分画

Phospholipid	Percentage \pm SEM	
	Pig, N=6	Canine, N=8 ⁽⁶⁰⁾
Phosphatidyl cholines (PC)	54.7 \pm 2.23	44.7 \pm 3.90
Sphingomyelins (Sp)	28.2 \pm 1.17	12.2 \pm 2.23
Lysophosphatidyl cholines (LPC)	3.23 \pm 0.98	10.9 \pm 2.83
Phosphatidyl ethanolamines (PE)	1.05 \pm 0.62	15.1 \pm 3.25
Phosphatidyl inositols (PI)	> 1.80 \pm 0.62	7.3 \pm 2.08
Phosphatidyl serines (PS)		7.4 \pm 2.14

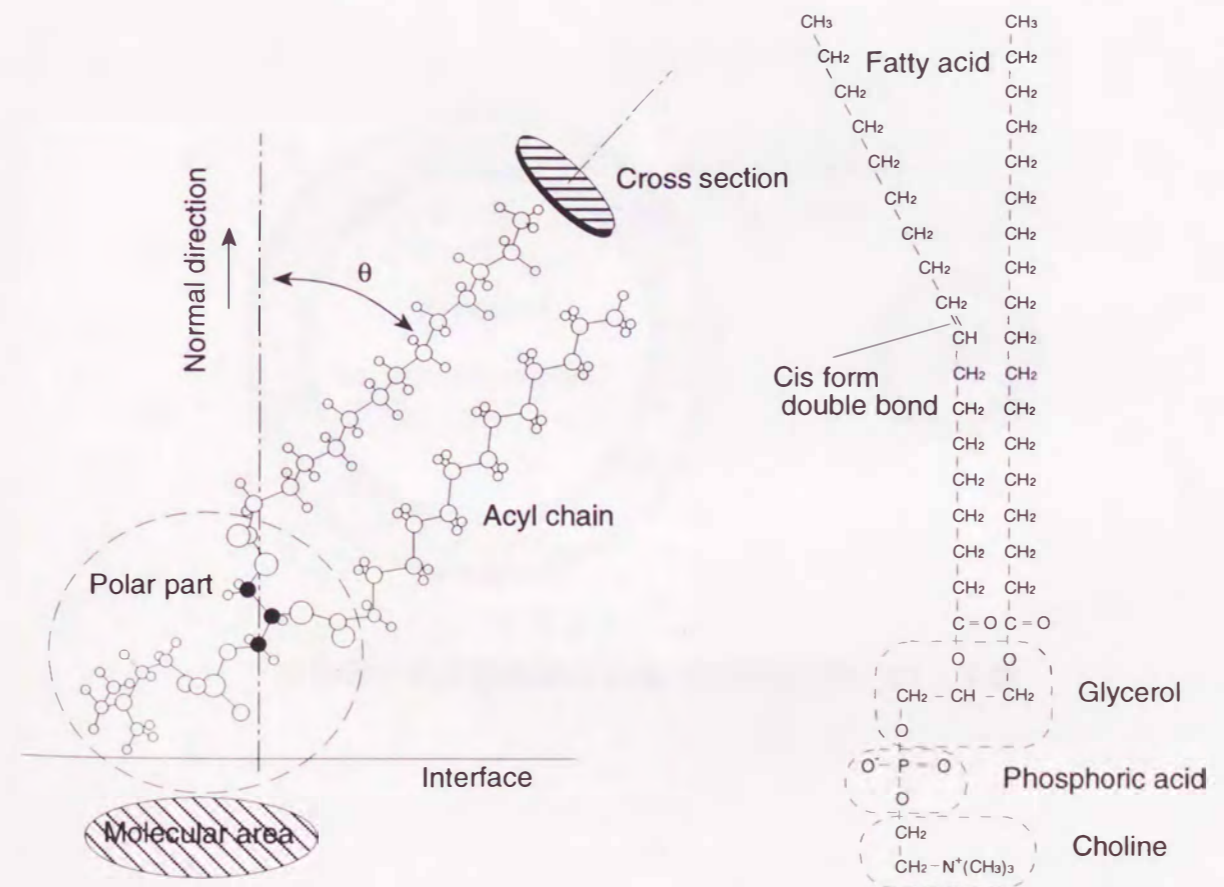


図2. 11 フォスファチジルコリンの形態と構造

に、Rabinowitzら⁹⁹⁾はそのPCの大部分がリン脂質の中でも極めて表面活性が高いジパ
 ルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) からなることを指摘している。PCの構造
 を図2. 11に示す。リン脂質分子は極性の高いコリン・リン酸・グリセロールからな
 る頭部と非極性の2本の脂肪酸からなる尾部より構成され、その断面積が異なること
 により、尾部は軟骨表面に対し垂直方向より傾き、あるいは折れ曲がり、水平方向の
 断面積を増加させることにより、空間的に安定な膜を形成する。化学構造式に示すよ
 うに、通常2本の脂肪酸のうち1本はシス型の2重結合を含む不飽和脂肪酸である。
 リン脂質分子は水性の環境では集合し、非極性（疎水性）の尾部を会合させる構造を
 とる。つまり、図2. 12に示すように球状に尾部を中心に向け頭部を外側に向けるミ
 セルと、平面上に尾部を内側に向け背中合わせに並ぶ二重膜の形態をとる。PCは2本
 の脂肪酸の断面積が頭部の断面積よりは小さいが、比較的大きく円筒型にあたるた
 め、ミセル構造（円錐型分子）よりもリポソームのような膜構造にて安定する。

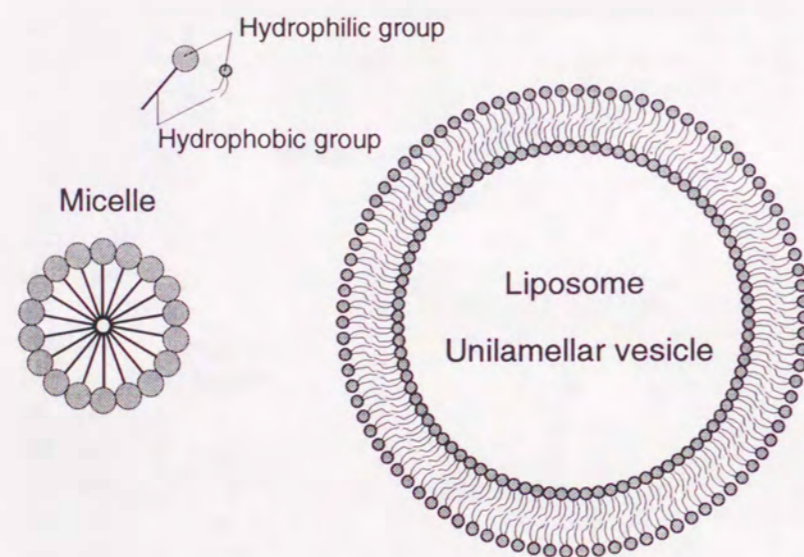


図2. 12 極性溶媒中における界面活性分子の会合

3章 実験方法

3. 1 実験材料

3. 2 装置

3. 2. 1 往復動摩擦試験

3. 2. 2 振子摩擦試験

3. 2. 3 粘度測定

3. 2. 4 Langmuir-Blodgett膜作成

3. 2. 5 リポソームの調製

3. 2. 6 リポソームの観察

3章 実験方法

3.1 実験材料

生体軟骨試料として、図3.1に示すような屠殺後の約100kgの豚より切断した肩関節を用いた。往復動摩擦試験では肩関節骨頭のみを用い、相対面として表3.1に示す人工関節候補材料であるSUS316ステンレス鋼、バイタリウム (CoCrMo), アルミナセラミックス (Al₂O₃), ジルコニアセラミックス (ZrO₂), ガラス, 超高分子量ポリエチレン (Ultra High Molecular Weight Polyethylene, UHMWPE), およびポリテトラフルオロエチレン (Poly (tetrafluoroethylene), PTFE) を用いた。犬股関節における *in vivo* 摩耗試験においては, SUS316L, CoCrMo, Al₂O₃, およびZrO₂製の球状人工骨頭を用いた。



図3.1 豚肩関節から切断した軟骨試料

表3.1 人工関節候補材料

SUS316	Cr=18, Ni=12, Mo=2.5, C=0.06 (%)
SUS316L	Cr=16-18, Ni=12-15, Mo=2-3, C<0.03, Si<0.045, Mn<2.00, P<0.03, S<1.0, Fe=Bal.
CoCrMo	Cr=27-30, Mo=5-7, Ni=2.5, Mn=1.0, Si=1.0, Fe=0.75, C=0.35, Co=Bal.
Al ₂ O ₃	Polycrystalline alumina containing Y ₂ O ₃ (3.0mol%)
ZrO ₂	Tetragonal zirconia polycrystals containing Y ₂ O ₃ (3.0mol%)
Glass	SiO ₂ =70, CaO=9, K ₂ O=9, Na ₂ O=8, ZnO=2, BaO=1, TiO ₂ =0.5, Sb ₂ O ₃ =0.5 (%)
UHMWPE	-(CH ₂ -CH ₂) _n , The molecular weight is 4 × 10 ⁶
PTFE	-(CF ₂ -CF ₂) _n

潤滑液として、屠殺直後の豚膝関節より注射器にて採取した関節液、鶏冠より抽出したヒアルロン酸ナトリウムと人血清由来の蛋白成分 (アルブミン, αグロブリン, γグロブリン) 及び合成リン脂質 (Lα-Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline, Lα-DPPC) の水溶液, または生理食塩水溶液を用いた。

関節液, および軟骨表層成分の分解酵素として, リン酸緩衝液に溶かしたトリプシン (蛋白成分分解酵素) と酢酸緩衝液に溶かしたヒアルロニダーゼ (ヒアルロン酸分解酵素) をそれぞれ200unit/ml-pH6.8と20unit/ml-pH5.0に調製することにより用いた。トリプシンはポリペプチド鎖中のアルギニンやリシン等のカルボキシル基側において, ペプチド結合の加水分解を触媒する酵素である。ヒアルロニダーゼはグルクロニド結合とN-アセチルグルコサミニド結合を分解し, ヒアルロン酸を低分子化する酵素である。

軟骨表面の吸着膜の除去を目的に, 界面活性剤 (Polyoxyethylene Octylphenyl Ether, Triton X-100)の10wt%水溶液を超音波洗浄の洗浄剤として用いた。Triton X-100の洗浄作用は図3.2に示すように, 生体膜を構成する球状蛋白やリン脂質のような両親媒性

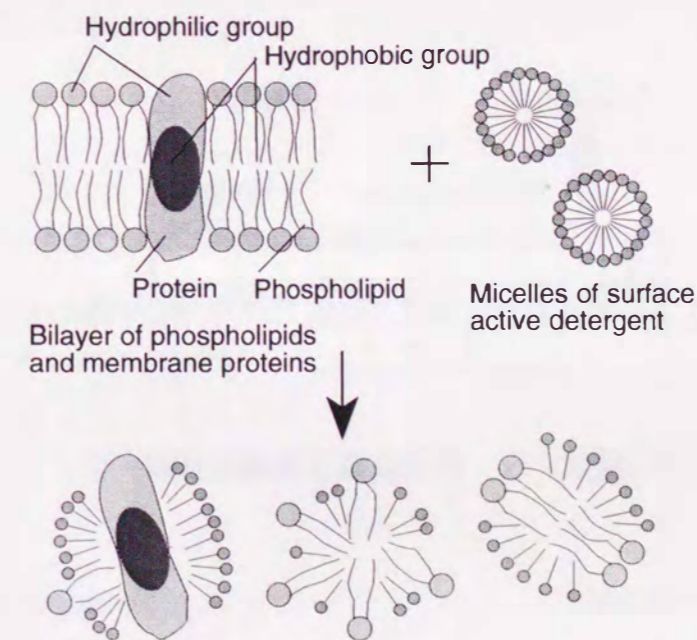


図3.2 非イオン性界面活性剤による生体膜の可溶化

分子の疎水性部分を水性の環境に対して自らの疎水鎖により覆い包むことにより、分解遊離するものである。

3. 2 装置

3. 2. 1 往復動摩擦試験

摩擦面として使用する軟骨には図3. 1に示すように豚前肢上腕骨より肩関節骨頭球面部分を利用した。炎症症状のない関節を選び、半球状に切断して用いた。軟骨の相対面には人工関節候補材料平板を用いた。荷重条件は2.0Nから19.6Nの間で設定した。ガラス平板を用い裏面から観察した接触面積より見積もった平均面圧は、同荷重条件においても軟骨に個体差を認め、0.17MPaから1.65MPaの範囲であった。

往復動摩擦試験機の概略を図3. 3に示す。一定荷重負荷後に、駆動装置により下部人工材料平面試験片を周期1秒、ストローク30mmで正弦波状の往復動をさせ、ひずみゲージにより摩擦力を測定した。さらに、実験前後に共焦点レーザ顕微鏡により軟骨表面の観察と表面形状の測定を行い、摩耗の進行を評価した。摩擦評価のために、設定間隔毎に1分間の60ストロークにおける各ストロークの最大摩擦係数の平均を測定した。

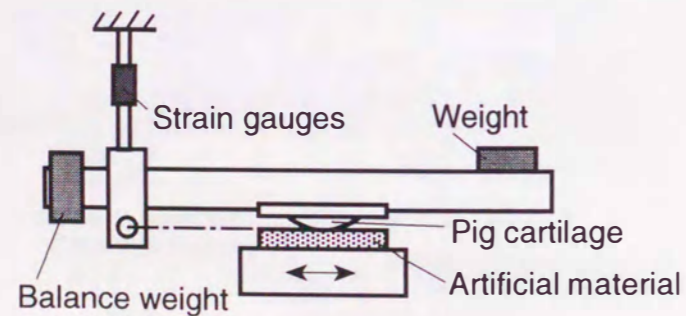


図3. 3 往復動摩擦試験機概略

3. 2. 2 振子摩擦試験

豚肩関節を摩擦面として用いた振子摩擦試験機の概略を図3. 4に示す。関節軟骨は正常な豚肩関節より屠殺後、図3. 1に示すような形状で採取した。豚肩関節の骨

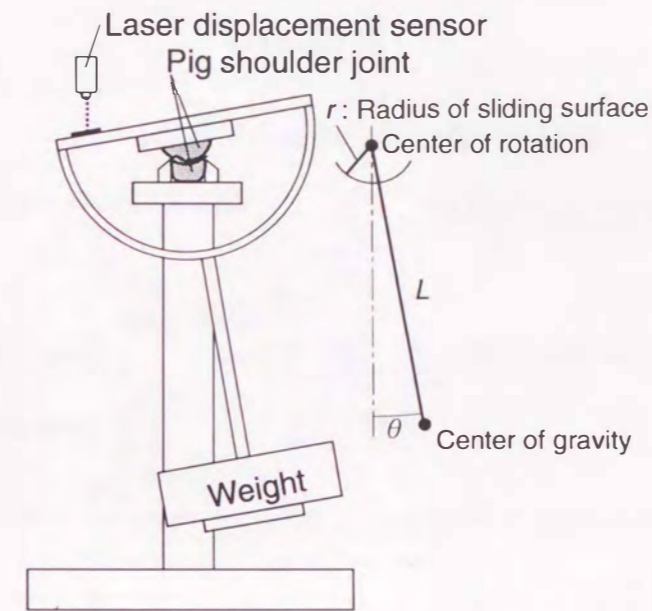


図3. 4 振子摩擦試験機概略

頭と球蓋は同じ豚から採取したものではなく、生後6カ月の同程度の体重(約100kg)を有する豚より得た。実験における荷重は100Nと1kN、初期振幅は0.1radとし、振幅の減衰はレーザ変位計により測定した。関節液潤滑における測定例を図3. 5に示す。振幅 θ の減少量 $\Delta\theta$ がほぼ一定であるため、摩擦係数 f は次式^{(96),(97)}より0.08~0.03radの範囲に対して算出した。

$$f = \frac{L\Delta\theta}{4r} \quad (1)$$

このとき、 L は振子の重心支点間距離、 r は摩擦面の平均半径である。

(1)式は次のように導くことができる。振り子が軟骨摩擦面において、1振幅に失うエネルギーは、

$$\Delta E = mgr(4\theta - 2\Delta\theta) \quad (2)$$

このとき、 m は振子の質量である。

位置エネルギーの減少量は

$$\Delta E = mgL\{\cos(\theta - \Delta\theta) - \cos\theta\} \quad (3)$$

このとき、 $\theta \ll 1$ においては

$$\cos \theta \approx 1 - \frac{\theta^2}{2}$$

したがって、式(3)の括弧の中は、以下ようになる。

$$\cos(\theta - \Delta\theta) - \cos \theta = \Delta\theta \left(\theta - \frac{\Delta\theta}{2} \right) \quad (4)$$

式(2), (3), (4)より式(1)は導かれる。

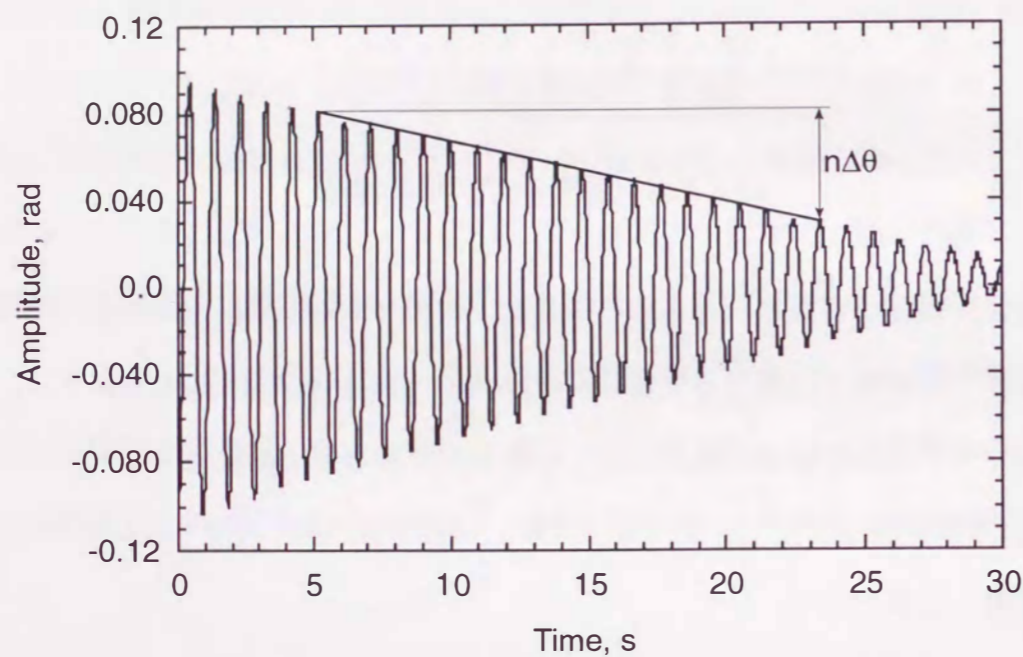


図3.5 豚肩関節を対象とした振子摩擦試験における振幅の減衰

3. 2. 3 粘度測定

測定対象となる潤滑液は、関節液と関節液成分の水溶液であり、そのほとんどがヒアルロン酸を含むため、非ニュートン性を示す。したがって、温調可能なコーン/プレート型回転粘度計を製作し、せん断速度はサーボモーターを用いてパソコンにより制御し、自動計測を行った。粘度計の概略を図3.6に示す。

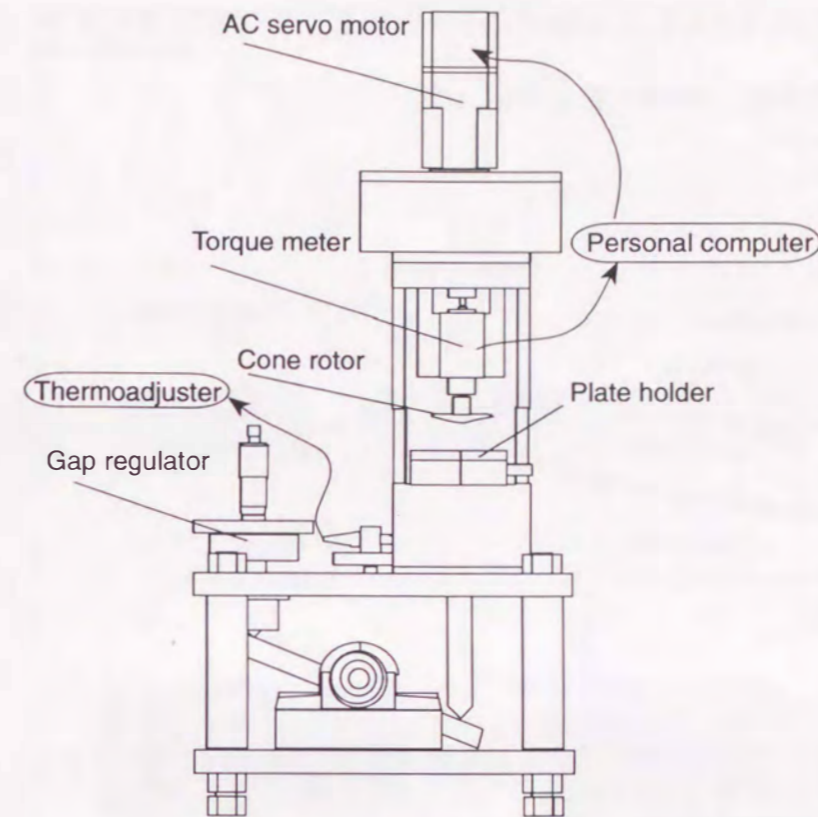


図3.6 Cone/plate type 回転粘度計

3. 2. 4 Langmuir-Blodgett膜作成

軟骨表面の境界潤滑膜のモデル化においてLangmuir-Blodgett法によりガラス表面に関節液成分の多層膜を作成した。Langmuir-Blodgett法の概略を図3.7に示す。膜分子としては $L\alpha$ -DPPCと γ グロブリンを用いたので、展開溶媒はクロロフォルム、エタノール、ベンゼンおよびヘキサンの等重量比混合液を用い、上昇・下降の両工程で膜が累積されるY累積により多層膜を積層した。装置概略を図3.8に示す。 $L\alpha$ -DPPCの単分子膜を圧縮した場合の、表面圧-分子占有面積曲線を図3.9に示す。Harkinsら⁽⁹⁸⁾のPC (Phosphatidylcholine) についての報告と同様に、圧縮極限面積が $30 \sim 40 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ 程度の範囲で表面圧が上限を保つため、圧力変動が認められない圧縮面積(約 $35 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ 程度)を固体凝縮膜状態の制御目標に設定した。ガラス基板への単分子膜の形成の確認のため、累積比を、基板上に移し取られた膜の面積に対する水面上の単分子膜の面積減少分として定義し、各条件において確認した。単分子膜

を固体膜の状態に維持制御した状態でガラス試料に二分子膜を累積した。形成状態の確認は原子間力顕微鏡 (AFM) により行った。

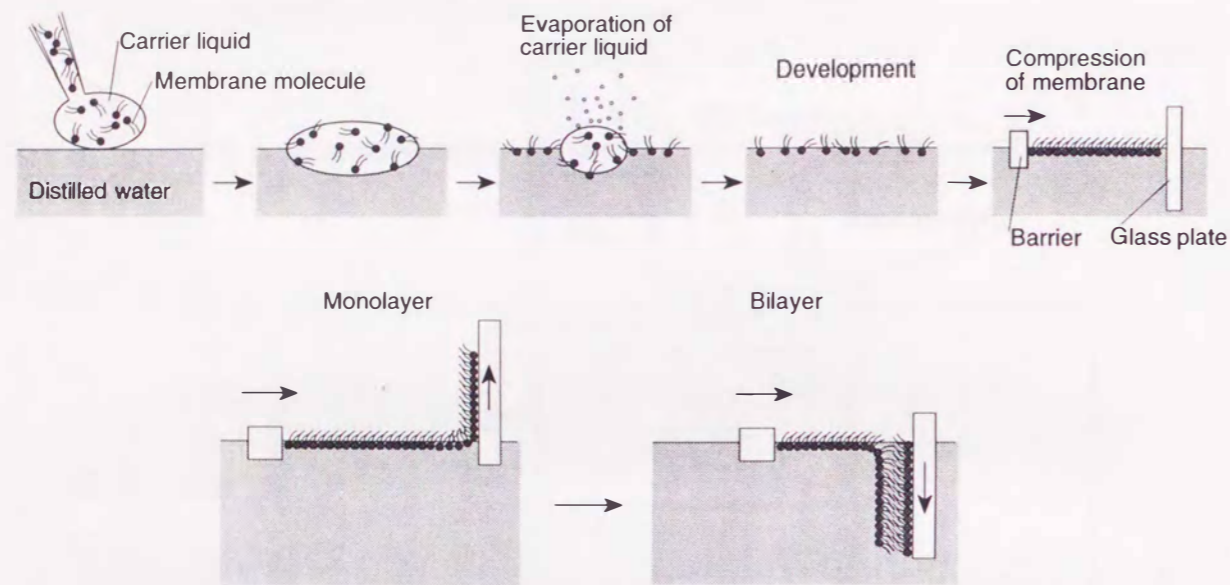


図 3. 7 Langmuir-Blodgett 法による 2 分子膜累積の概略

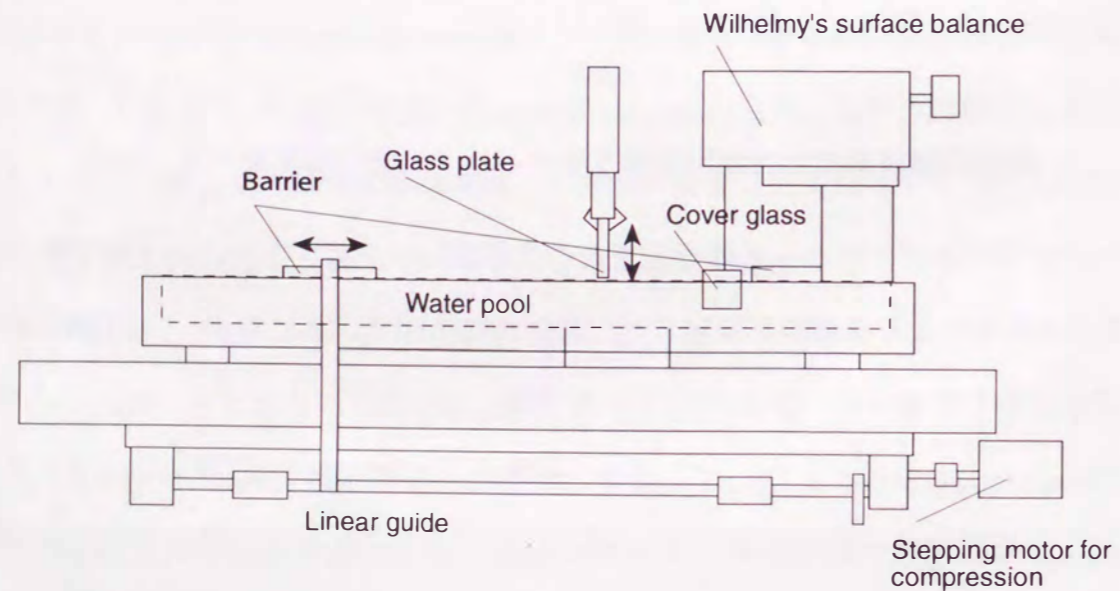


図 3. 8 Langmuir-Blodgett 膜形成装置概略

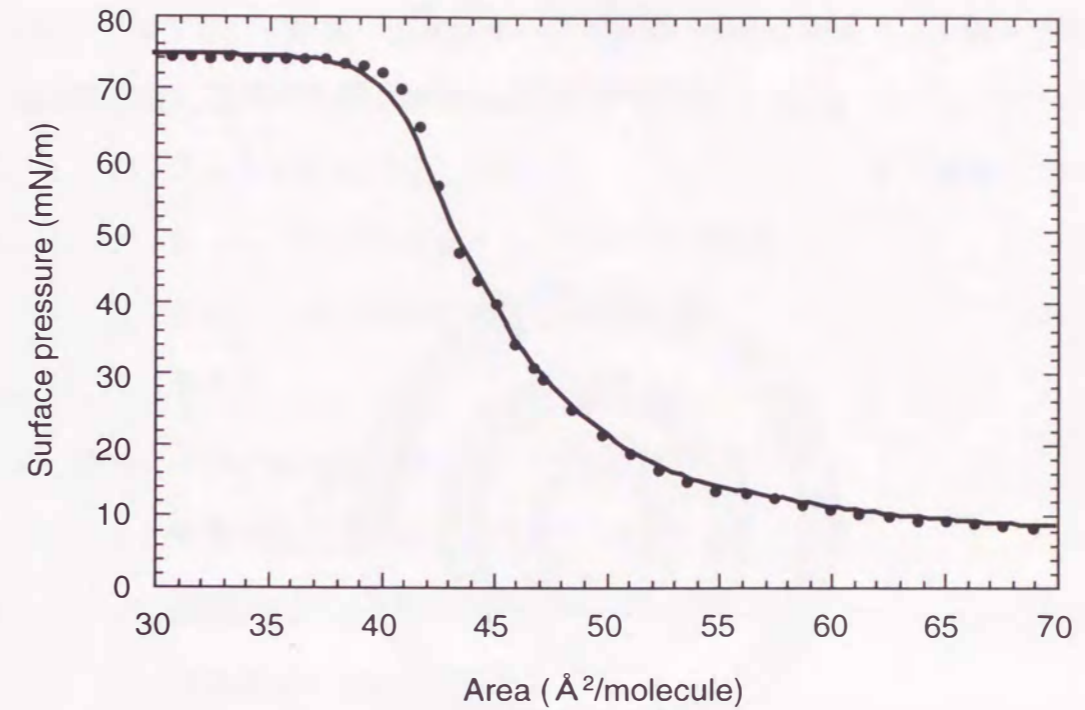


図 3. 9 α -DPPC 単分子膜の表面圧-分子占有面積曲線

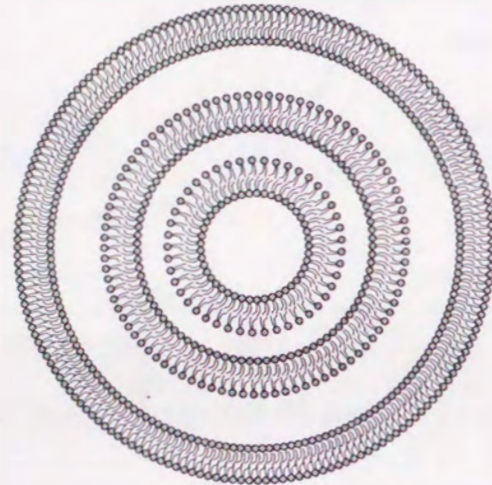
3. 2. 5 リポソームの調製

リン脂質を添加剤として関節液をはじめとする水系潤滑剤に溶解・分散させる際、前述したように、リン脂質分子の形態は円筒型に近く、疎水鎖が 1 本 (円錐型) の時みられるようなミセルは形成しない。したがって、曲率の小さいリポソームを形成する必要がある。リポソームの調製^{(99),(100)}は溶媒に溶かしたリン脂質をロータリーエバポレータにより膜形成と同時に乾燥させ、水系の潤滑液溶媒とアルゴンで封入し、Voltex ミキサーにより振動を加えることにより行った。この調製方法はサイズや層数の均一化のための操作⁽¹⁰¹⁾を行っておらず、そのほとんどが図 3. 10 に示すような多層膜になると考えられる。

3. 2. 6 リポソームの観察

リポソームの形成確認のため透過型顕微鏡により観察を行った。染色はネガティブ染色法^{(102),(103),(104)}により行った。具体的には、400メッシュの銅製グリッド上にコロジオン薄膜をコートした支持ネットを作製した。ネット上に約 10 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したリポ

ソーム溶液を滴下し、余剰の液体を濾紙で吸い取った後、室温で乾燥する。1%アンモニウムモリブデート (pH7.2) によりリン酸基を修飾し染色した後、濾紙で余剰の液体を吸い取り検鏡する。



Multilamellar vesicle

図3.10 2分子膜の多重層リポソーム

4章 実験結果

4. 1 軟骨と人工骨頭候補材料による摩擦摩耗試験
 4. 1. 1 人工骨頭候補材料と潤滑液
 4. 1. 2 *in vitro* における軟骨と人工材料の摩擦試験
 4. 1. 3 *in vivo* における摩耗試験との比較
 4. 1. 4 まとめ
4. 2 酵素を用いた生化学的消去法による往復動摩擦試験
 4. 2. 1 酵素消化による潤滑液粘度への影響
 4. 2. 2 酵素消化による関節液過飽和結晶への影響
 4. 2. 3 潤滑液による摩擦への影響
 4. 2. 4 酵素消化による摩擦挙動への影響
 4. 2. 5 まとめ
4. 3 関節液成分を添加剤として水溶液に用いた往復動摩擦試験
 4. 3. 1 潤滑液条件と粘度
 4. 3. 2 関節液成分添加による摩擦挙動への影響
 4. 3. 3 関節液成分添加による軟骨摩擦面の摩耗挙動
 4. 3. 4 アルブミンと γ グロブリン粒子の境界潤滑膜形成能
 4. 3. 5 まとめ
4. 4 混合潤滑領域における蛋白成分とリン脂質の表面膜に着目した振子摩擦試験
 4. 4. 1 潤滑液条件と粘度
 4. 4. 2 摩擦挙動に及ぼす潤滑液粘度の影響
 4. 4. 3 摩擦挙動に及ぼす実験前の負荷時間の影響
 4. 4. 4 軟骨摩擦面処理
 4. 4. 5 軟骨摩擦面の表面処理による形状と親水・疎水性の変化
 4. 4. 6 摩擦挙動に及ぼす軟骨表面処理の影響
 4. 4. 7 境界潤滑モードにおける蛋白成分とリン脂質の潤滑性能

- 4. 4. 8 γ グロブリンとL α -DPPCの生理的濃度での潤滑性の検討
- 4. 4. 9 まとめ
- 4. 5 蛋白成分とリン脂質のLangmuir-Blodgett膜による軟骨表面境界潤滑膜のモデル化と往復動摩擦試験
 - 4. 5. 1 Langmuir-Blodgett膜作成
 - 4. 5. 2 関節液とHA水溶液を用いた潤滑による軟骨とガラスの摩擦挙動の経時的変化
 - 4. 5. 3 L α -DPPCのLangmuir-Blodgett膜の潤滑効果
 - 4. 5. 4 両親媒性多成分の軟骨表面吸着膜による境界潤滑機構の仮説
 - 4. 5. 5 γ グロブリンとL α -DPPCの混合による境界潤滑膜モデルの潤滑効果
 - 4. 5. 6 まとめ
- 4. 6 振子摩擦試験によるL α -DPPCリポソーム添加における境界潤滑膜形成効果の評価
 - 4. 6. 1 軟骨摩擦面の界面活性剤処理による摩擦挙動への影響
 - 4. 6. 2 界面活性剤処理された軟骨摩擦面における関節液の潤滑性
 - 4. 6. 3 L α -DPPCリポソームの形態観察
 - 4. 6. 4 L α -DPPCリポソームと γ グロブリン添加による摩擦挙動への影響
 - 4. 6. 5 まとめ

4章 実験結果

4. 1 軟骨と人工骨頭候補材料による摩擦摩耗試験

生体関節の相対運動における摩擦作動条件は、荷重や速度が大きく変化し、多様な潤滑機構が作用していると考えられる。本節では往復動摩擦試験機において、軟骨の相対摩擦面に人工材料平面を用いることにより、生体関節摩擦において占められる軟骨の粘弾性変形の成分が小さい摩擦形態に単純化し、荷重条件と人工材料表面の極性が摩擦挙動に及ぼす影響を観察した。

さらに、人工材料として人工骨頭候補材料を用いることにより、*in vivo*の摩耗実験と比較し、臨床において重要視されている臼蓋軟骨摩耗の低い材料選択や設計について考察する。

4. 1. 1 人工骨頭候補材料と潤滑液

摩擦試験における人工骨頭材料表面の親水性の評価のために、実験条件と同様のアルコール洗浄後における水の接触角を静的接触角測定装置により測定した。表4. 1に各人工材料表面の水の接触角と測定長さ0.1mmにおける仕上げ粗さを示す。ガラス<セラミックス群<メタル群<ポリマー群の順で水の接触角が増大することが確認される。ポリマー群は材料の加工性が不良なため、仕上げ粗さが他の材料と比較して大きくなっている。

表4. 1 人工関節候補材料の試験片平面の水の接触角と仕上げ粗さ(測定長さ0.1mm)

	Contact angle	Roughness(Ra)
Glass	18.8°±3.2°	0.006 μ m
Zirconia	29.5°±3.5°	0.006 μ m
Alumina	40.2°±2.4°	0.009 μ m
CoCrMo	52.2°±3.2°	0.008 μ m
SUS316	66.2°±8.8°	0.008 μ m
UHMWPE	77.7°±7.3°	0.11 μ m
PTFE	96.9°±5.9°	0.03 μ m

摩耗試験においては臨床応用されている材料であるZrO₂, Al₂O₃, CoCrMo, および SUS316Lを対象とした。図4. 1に犬用人工骨頭の代表的2カ所のprofile, および形状補正を行った表面仕上げ粗さ(測定長さ0.1mm)を示す。ステンレス群は測定箇所により差異が認められ, 特にCoCrMo鋼では高さ0.15μm程度のうねりが認められる。走査型電子顕微鏡により人工骨頭材料表面の形状を観察した。(図4. 2)メタル群においては仕上げの際の研磨痕の凹凸が認められるが, セラミックス群では極めて平滑な面を示しており, 凹のみの粗さになっていることがわかる。メタル群とセラミックス群では加工性に顕著な差を認める。

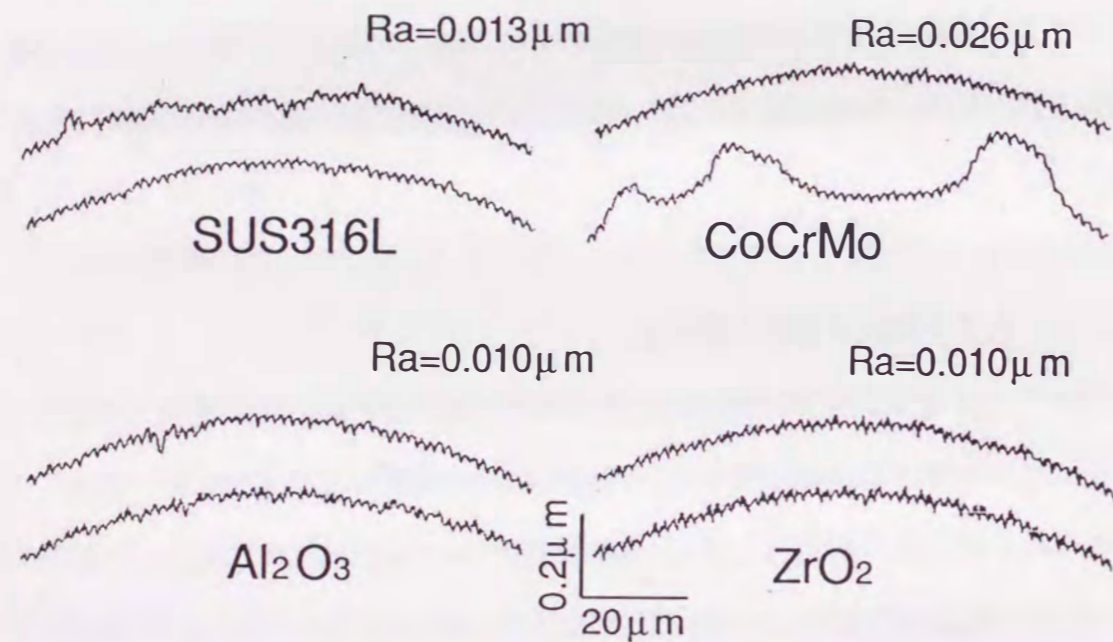


図4. 1 犬用人工骨頭試験片の仕上げ粗さ

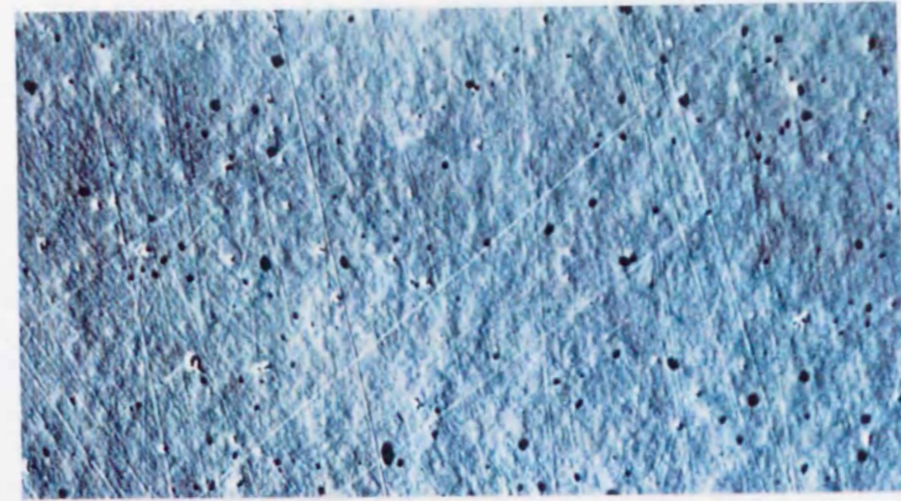
摩擦試験には潤滑液として豚関節液と1.0wt%HA水溶液を用いた。実験室温27℃における, せん断速度に対する粘度を図4. 3に示す。共に非ニュートン性を示し, 測定条件範囲では一桁以上HA水溶液の粘度が高く, 豚関節液はせん断速度依存性が高いことがわかる。

4. 1. 2 *in vitro*における軟骨と人工材料の摩擦試験

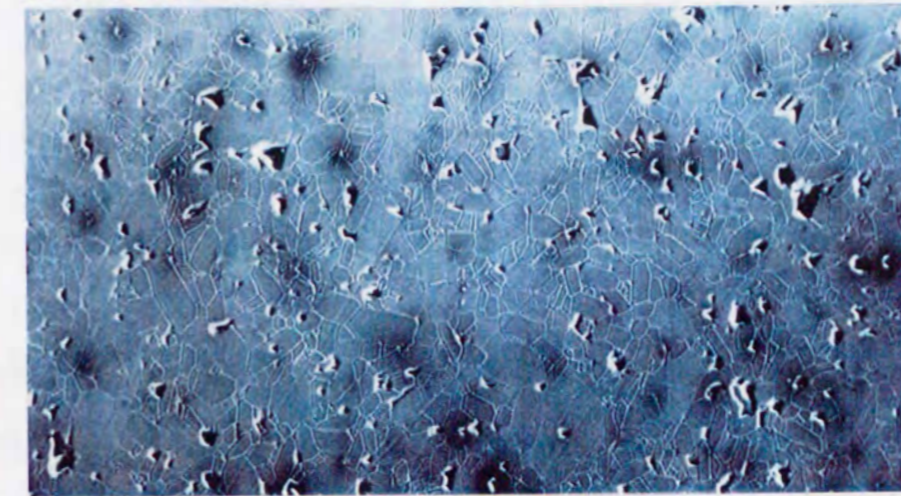
荷重条件を変化させ, 各条件に対し3回実験を繰り返した。実験開始25分から26分

ZrO₂

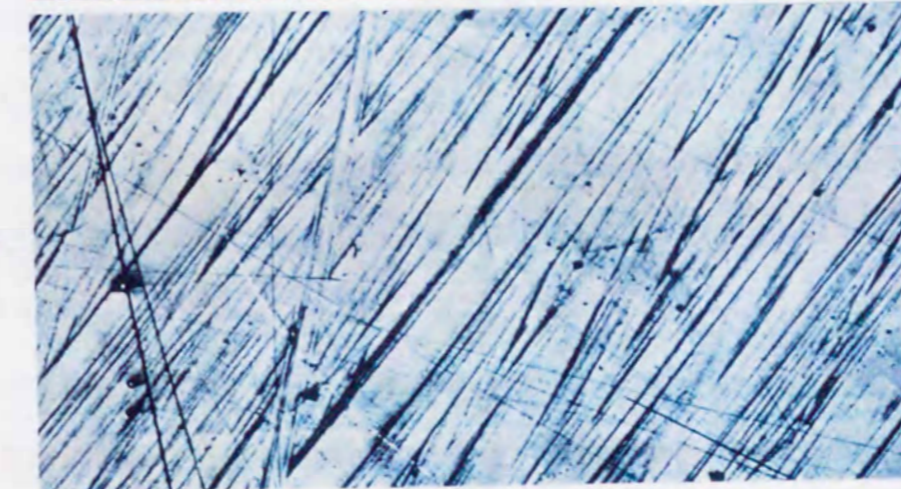
20 μm



Al₂O₃



CoCrMo



SUS316L

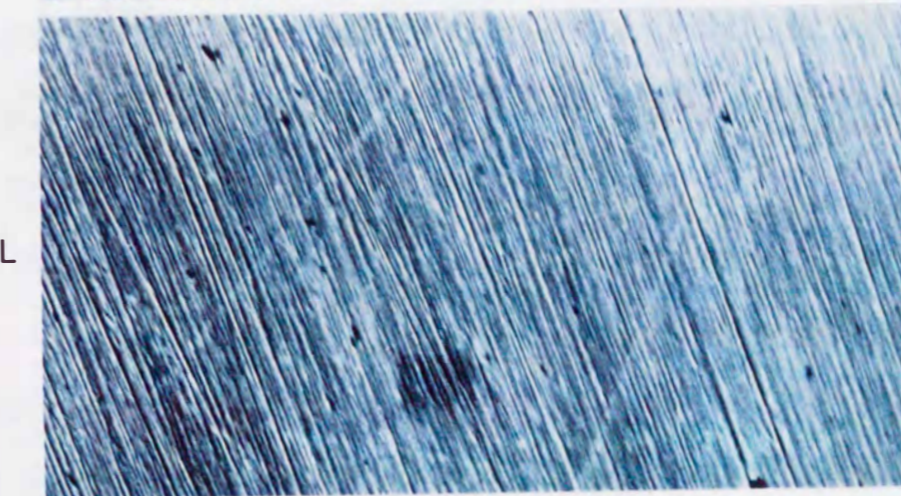


図4. 2 人工骨頭用材料表面の電子顕微鏡写真

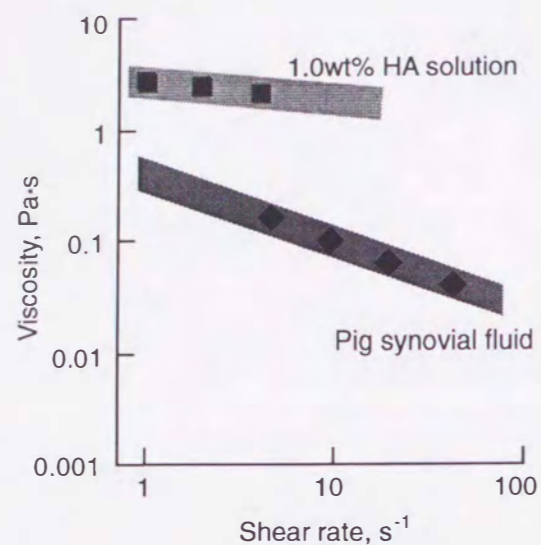


図4.3 関節液と1.0wt%HA水溶液の粘度と非ニュートン性

後までの60ストロークにおける各ストロークの最大摩擦係数の平均を荷重の逆数 Δ (N^{-1}) に対して図4.4に示す。豚関節液潤滑においてはガラスとPTFEにおいて全荷重条件をとおして低く安定した摩擦係数を示すが、臨床における人工骨頭置換術において、軟骨の相対面として既に利用されているセラミックス群とメタル群については、セラミックス群の方が摩擦係数が低下する傾向が分かる。しかし、1.0wt%HA水溶液潤滑においてはPTFEを除き、人工材料による摩擦係数の明瞭な高低傾向は観察されない。水の接触角の大きいPTFEは仕上げ粗さが大きくなるが、両潤滑条件においても低く安定した摩擦を示す。Chappuisら⁽¹⁰⁵⁾は生体軟骨に対するPTFEの低速度1mm/min, 高荷重15Nの摩擦条件における無潤滑, 生理食塩水潤滑および少量の関節液潤滑下において、実験開始3分後にガラスよりも低い摩擦係数を示すことを報告している。PTFEにおける低摩擦現象は、生体軟骨表面が極性の低い相対面へ凝着を起こしにくいことが一因と考えられるが、Chappuisらは生体軟骨表面が乾燥後、疎水性を示すことから、疎水性二面間における水系潤滑剤の揚力により低摩擦が生じるものと考察しており、今後の検討が必要とされる。

ガラス、セラミックス群およびメタル群について、荷重条件3.9N, 9.8N, および19.6Nに対する実験開始25分から26分後までの60ストロークにおける各ストロークの最

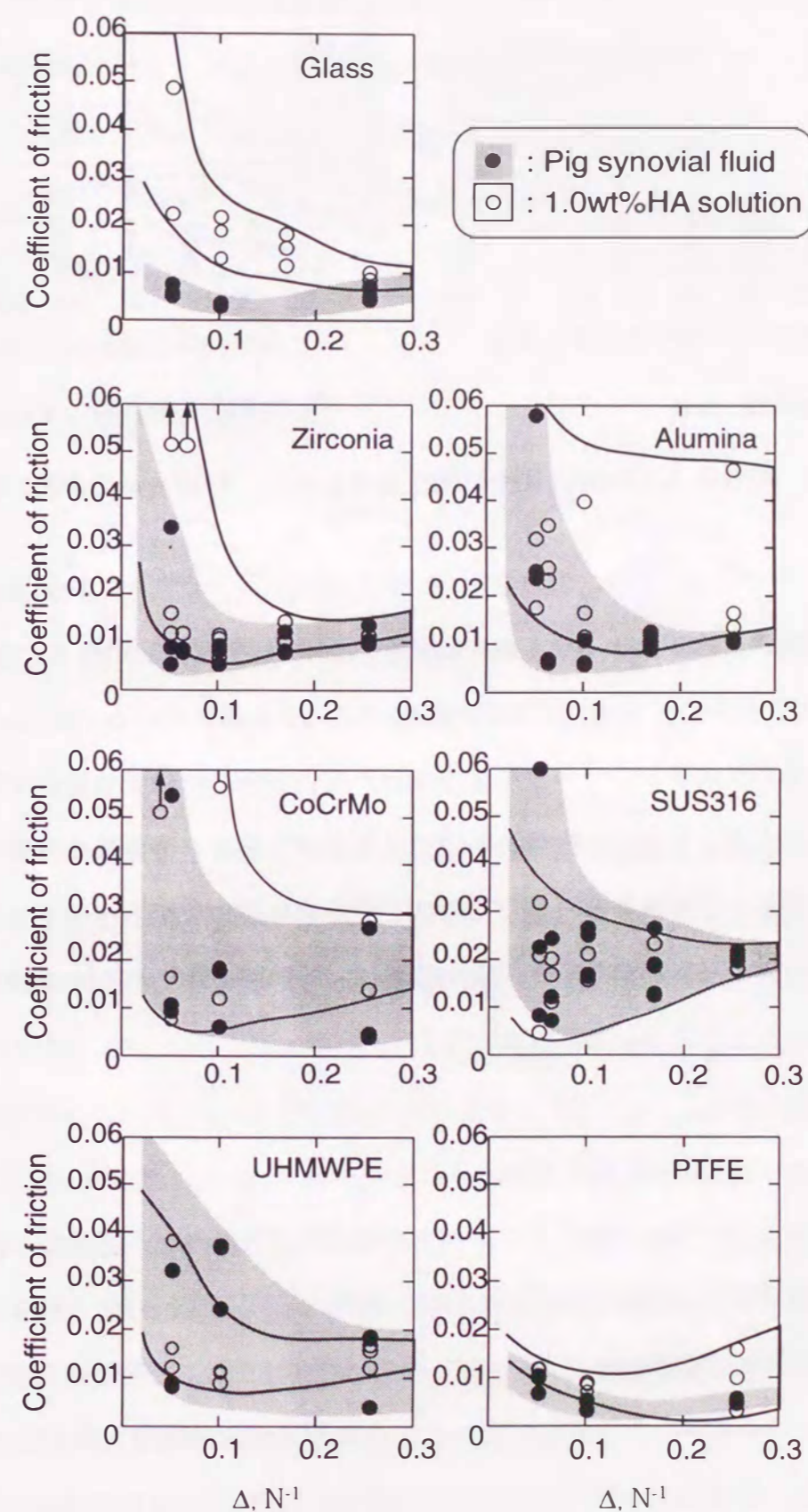
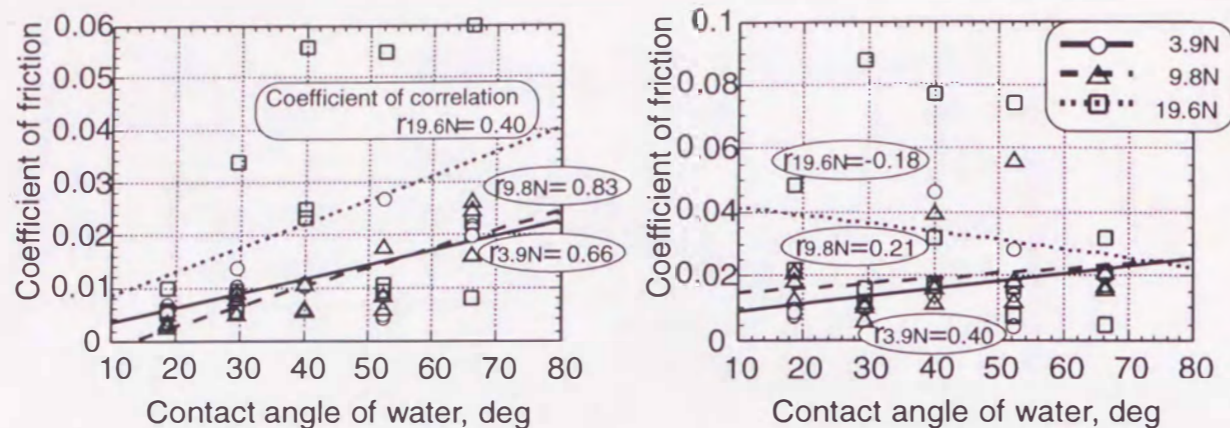


図4.4 軟骨相対面の摩擦挙動におよぼす影響



(1) Synovial fluid

(2) Water solution of 1.0wt% HA

図4.5 軟骨と人工材料の摩擦挙動におよぼす人工材料表面の極性の影響

大摩擦係数の平均を人工材料の水の接触角に対して図4.5に示す。関節液潤滑において、摩擦係数の分散が大きくなる高荷重条件19.6Nでは相関係数が低下するが、1.0wt%HA水溶液潤滑にくらべ、全荷重条件に正の相関が認められる。Nordeら⁽¹⁰⁶⁾は電荷密度の異なるポリスチレンラテックスを用い、蛋白成分の飽和吸着量が電荷密度に依存することを指摘しており、吸着担体表面の電荷が関節液中の蛋白成分等の吸着現象に影響を及ぼすことが考えられる。このことから水の接触角が小さいガラスにおいて関節液潤滑により特異的に低摩擦を示す現象は、関節液に含まれるHA以外の成分の極性に起因した効果であることが推察される。

4. 1. 3 *in vivo* における摩擦試験との比較

in vitro における摩擦実験の結果と、九州大学整形外科で行った人工骨頭と軟骨摩擦面の*in vivo* 摩擦評価実験結果^{(107),(108)}との比較を共同研究として行った。摩擦評価に用いた犬股関節荷重運動装置を図4.6に示す。実験動物は12kg前後の雑種成犬を5群に分けて用いた。ネンブタール麻酔下において、それぞれの両股関節大腿部にSUS316Lステムを挿入し、第1群：一側にSUS316L人工骨頭、他側にAl₂O₃人工骨頭、第2群：一側にSUS316L人工骨頭、他側にZrO₂人工骨頭、第3群：一側にCoCrMo人工骨頭、他側にAl₂O₃人工骨頭を置換した。術後直ちに実験装置に仰臥位にて固定し、6kg負荷条

件にて全振幅30°、周期1秒の強制屈伸運動を行った。3時間及び6時間負荷運動後に犬臼蓋軟骨を取り出し、表面を走査型電子顕微鏡にて比較観察した。さらに、定量的な摩擦量の比較のため、CoCrMo人工骨頭とAl₂O₃人工骨頭の組合せについて、第4群：6頭を6時間、第5群：6頭を12時間負荷運動を行い、最大摩擦部の剖面より最大摩擦深さを計測した。

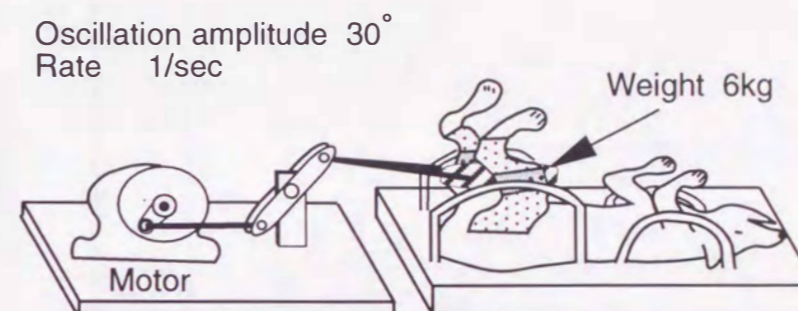
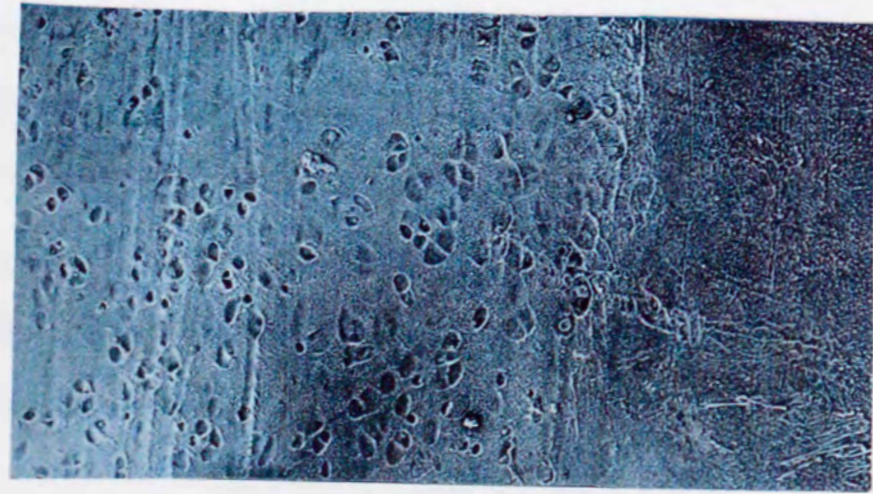


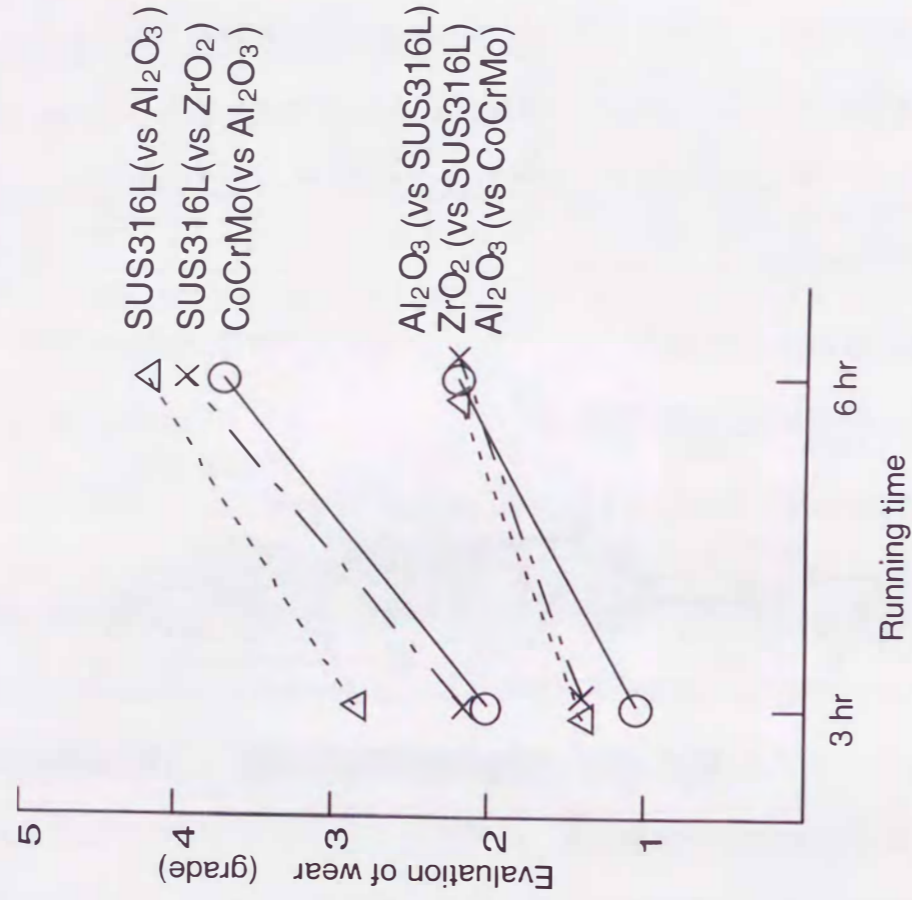
図4.6 犬股関節摩擦試験装置

脱臼操作後骨頭置換を行わず6時間負荷運動を行った非置換群では表面摩擦は観察されず、正常軟骨と同様の所見であった。図4.7(a)は下方から上方に摩擦が進行している臼蓋軟骨の走査電顕写真である。組織学的な軟骨表面からの深さに対応しており、grade 1は細く密なフィブリル層における繊維の乱れがあり、grade 2はやや太い繊維の露出が認められる。grade 3は約30μmの対をなす浅いlacunaが認められ、grade 4はさらに約20μm程度の深いlacunaが混在し、grade 5は約20μmの深いlacunaが多数認められるものである。このgradingにより第1・2・3群の各人工骨頭材料による軟骨面の摩擦を評価した。図4.7(b)に結果を示す。3時間負荷群においても6時間負荷群においても全例につきメタル群(SUS316L, CoCrMo)に高摩擦が認められ、セラミックス群(Al₂O₃, ZrO₂)では比較的低摩擦を示した。

第4・5群の実験において、臼蓋軟骨の摘出後、表面と最大摩擦部を通る剖面の走査電顕写真より、最大摩擦部と摩擦していない外縁部の軟骨の厚みの差を計測した。図4.8に結果を示す。6時間及び12時間負荷運動後のAl₂O₃側の最大摩擦深さは



Grade 5
Grade 4
Grade 3
Grade 2
Grade 1



(a) Grading of worn surface

(b) Wear behavior in canine hip joint

図4.7 人工骨頭による犬臼蓋軟骨の摩擦挙動への影響

CoCrMo側より軽度で、負荷運動時間の延長により、その差は大きくなることが認められた。この摩耗試験においては、材料の加工性の違いによる仕上げ粗さの差に起因したアブレシブ摩耗の関与が推察される。しかしながら、摩擦実験のセラミックス群・関節液潤滑における低摩擦は、セラミックス骨頭と臼蓋軟骨の組合せにおける低摩擦に対応していることがわかる。

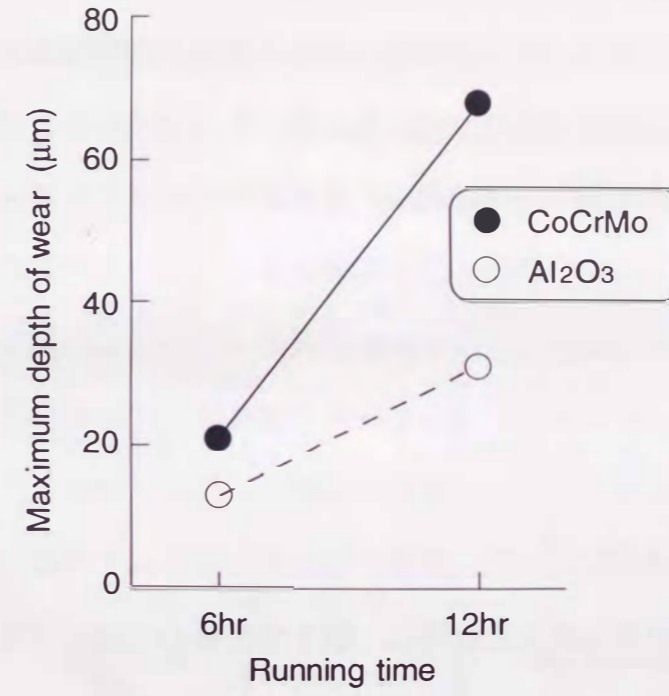


図4.8 人工材料に対する犬臼蓋軟骨摩耗の定量的評価

関節液成分の境界潤滑性を考慮し関節潤滑のモデル化を試みる場合、軟骨摩擦面表層の母材はプロテオグリカン凝集体であるため、非常に極性が高く負に帯電していることが摩擦挙動を支配すると考えられる。本摩擦摩耗実験において高い極性を有する人工材料の優位性が示唆され、特に、ガラス表面はプロテオグリカン同様に負に帯電していることから、軟骨表面における関節液成分の吸着現象と摩擦挙動をモデル化する材料として適していると考えられる。軟骨とガラスにおける摩擦挙動が軟骨同士の摩擦に近いという報告は散見され^{(109),(110)}、以降の往復動摩擦試験では軟骨相対面としてガラスを用い、生体内の優れた摩擦挙動を人工的なモデル化により再現することにより関節潤滑機構を例証する。