

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：

4. 1. 4 まとめ

摩擦試験は*in vitro*の条件ではあるが、各人工関節候補材料の表面特性の条件変化による摩擦への影響を微小な接線力の差から比較観察することが可能であった。関節液潤滑において、各材料の関節液潤滑下の摩擦係数の高低傾向と水の接触角に相関が認められた。とくに、ZrO₂とガラスの中心線平均粗さはほぼ等しい値を示しているが、親水性の高いガラスが極めて低く安定した摩擦を示していた。しかし、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液潤滑の摩擦係数の高低傾向に水の接触角の相関は認められなかった。ヒアルロン酸以外の関節液成分が境界潤滑性に寄与していることが示唆された。

最大摩耗部表面の走査電顕写真のgradingによる評価によりセラミックス群の摩耗がメタル群より軽度であったが、断面の最大摩耗深さの計測から定量的にも差が確認され、負荷運動時間の経過に依存して、その差が大きくなることが認められた。この一因としては表面プロフィールにも認められた材料の延性等に起因する加工精度が考えられた。摩擦試験におけるセラミックス群の低摩擦と、摩耗試験における低摩耗が対応しており、人工骨頭置換術において、軟骨の相対面となる人工骨頭表面材料には加工精度を高く要求できる材料であること共に、親水性に優れた材料が適していることが示された。

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

関節液潤滑において低摩擦を示すガラス平面を、軟骨の相対面に用いた往復動摩擦試験を行った。関節液と軟骨に共に含まれるヒアルロン酸と蛋白成分に関し、それらの分解酵素を摩擦試験中に潤滑液へ滴下することにより、摩擦摩耗挙動への影響を観察し、それぞれの潤滑上の役割について考察を行った。

4. 2. 1 酵素消化による潤滑液粘度への影響

実験に用いた潤滑液である豚関節液、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液(0.375wt%と1.0wt%、分子量約100万)の、実験温度27℃における粘度を図4. 9に示す。豚関節液

と0.375wt% HA水溶液は共にせん断速度5 s⁻¹で0.19Pa_s程度を示しているが、豚関節液の粘性はせん断速度依存性が高いことがわかる。各潤滑液に酵素を滴下することにより、消化時間に対する粘度の変化を測定した。測定条件はせん断速度5 s⁻¹、温度27℃とし、酵素の滴下量は摩擦実験同様に潤滑液に対して1 wt%の割合とした。結果を図4. 10に示す。各潤滑液ともヒアルロニダーゼ滴下により明瞭な粘度低下を示す。0.375wt% HA水溶液と比較して豚関節液の粘度低下が大きいことが分かる。ヒアルロニダーゼにより高粘性の維持の役割を有するヒアルロン酸に対し10分程度消化が進行し、その後減速することがわかる。トリプシン滴下では各潤滑液において粘度への影響は認められなかった。

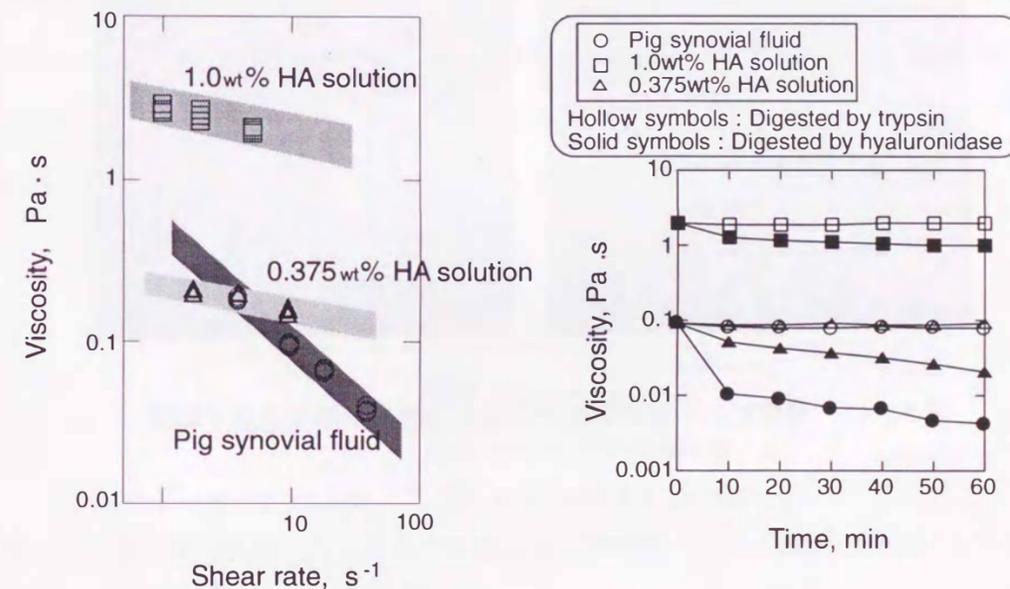


図4. 9 潤滑液粘度のせん断速度依存性 図4. 10 酵素による潤滑液粘度への影響

4. 2. 2 酵素消化による関節液過飽和結晶への影響

関節液を大気中で適当な速度で乾燥させると樹枝状の過飽和結晶を晶出する(図4. 11)。Walkerら⁽¹¹⁾も結晶形成が条件に依存する十字状の構造を観察しており、関節液成分の複合分子の絡み合った塊として報告している。関節液に1 wt%の割合で各酵素を滴下することにより結晶形成を観察した。図4. 11に示すようにトリプシン及

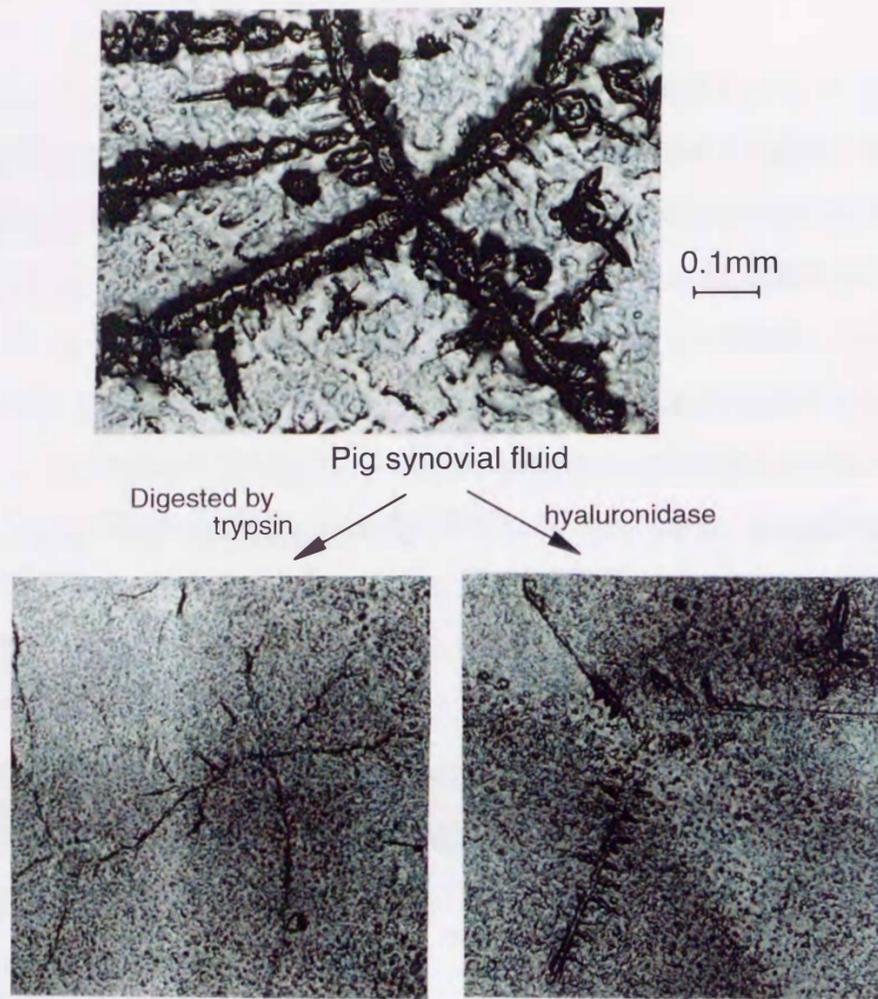


図4.11 酵素による関節液成分の過飽和結晶形成に及ぼす影響

びヒアルロニダーゼ滴下により樹枝状結晶は形成されず、この結晶が蛋白成分とヒアルロン酸を必要とする複合体であることがわかる。ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸分解は粘度低下からも認められるが、樹枝状結晶が形成不能であることよりトリプシンにおいても1wt%の滴下量で関節液中の蛋白成分分解が可能であることが示された。

4. 2. 3 潤滑液による摩擦への影響

各潤滑液の摩擦係数の分布を酵素滴下前の実験開始25分後の値により評価した。荷

重の影響を観察するために、荷重の逆数 Δ (N^{-1}) に対して図4.12に示す。各荷重、及び潤滑液条件における実験の繰り返し数は3回である。豚関節液においては全荷重条件を通して摩擦は低く安定しており、摩擦係数は0.01以下を示している。豚関節液と同程度の粘度を示す0.375wt% HA水溶液における摩擦係数は軟骨試験片の個体差により高い分散が認められるが、豚関節液に比べ、全荷重条件において極めて高い値を示す。HA水溶液について濃度1.0wt%を用いた場合には、0.375wt%より摩擦が低下したが、これは粘度上昇による流体潤滑効果に起因すると考えられる。しかし、1.0wt% HA水溶液は豚関節液における摩擦係数より高い値を示しており、特に、高荷重条件になると摩擦係数の差が大きくなるのが分かる。これらの結果より、HA水溶液潤滑では濃度を高めることにより粘度を上昇させ、ある程度、摩擦挙動を改善させることが可能と考えられる。しかし、今回行った実験条件の範囲では豚関節液の摩擦係数には及ばず、特に、高荷重条件になるほど摩擦係数に差を認めることから、ヒアルロン酸以外の成分が有効に作用し、境界潤滑性に関与していることがわかる。

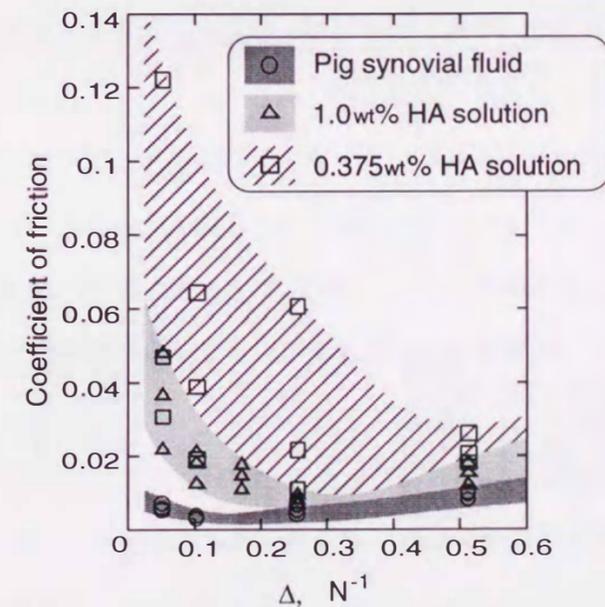


図4.12 ヒアルロン酸濃度と荷重条件が摩擦挙動におよぼす影響 (Δ は荷重の逆数)

4. 2. 4 酵素消化による摩擦挙動への影響

図4. 13に酵素滴下による摩擦係数の変化を実験開始25分後の値から60分後の値への矢印により示す。矢印のない条件では変化が観察されなかった。ヒアルロニダーゼ滴下により、2.0Nの低荷重条件の関節液潤滑と1.0wt%HA水溶液潤滑において摩擦係数が低下し、HA水溶液潤滑の高荷重条件においては上昇する傾向が観察された。一方、トリプシン滴下により、最も高荷重の条件である19.6N荷重において、関節液と0.375wt%HA水溶液潤滑の条件で摩擦係数の上昇が観察された。HA水溶液潤滑の条件において、最も高荷重の条件を除き、トリプシン滴下により摩擦係数が低下する傾向が観察された。

図4. 14と図4. 15に、それぞれヒアルロニダーゼとトリプシンの滴下による摩擦力波形の変化を酵素滴下前と実験終了前における摩擦力の増加量 ΔF により示す。図中の正弦波は上下試験片の相対変位であり、原点はストローク中央を示す。

図4. 14(1)は1.0wt%HA水溶液潤滑、2.0Nの低荷重条件におけるヒアルロニダーゼ滴下により最大摩擦係数が低下した実験の摩擦力変化である。各ストロークの全位相にわたり、摩擦力が低下している。図4. 14(2)は1.0wt%HA水溶液潤滑、9.8Nの高荷重条件におけるヒアルロニダーゼ滴下により最大摩擦係数が上昇した実験の摩擦力変化である。ストロークエンド近傍で摩擦力が上昇しており、ストローク中央では減少している。これは高荷重条件のストローク中央や低荷重条件では摩擦力に占める粘性抵抗成分が大きいため、ヒアルロニダーゼ滴下により粘度低下が起こり、摩擦力が減少したと考えられる。高荷重条件のストロークエンド近傍のように相対面が接近する厳しい条件では粘性膜による荷重分担が減少するため二面の接触が増加し、摩擦力が上昇したと考えられる。

図4. 15(1)は関節液潤滑、19.6Nの高荷重条件におけるトリプシン滴下により摩擦係数が上昇した実験の摩擦力変化である。ストロークエンド直前およびストロークエンドの通過直後の摩擦力がトリプシン滴下により増加している。これにより相対面が最も接近するストローク端近傍において、蛋白成分が表面保護膜成分として有効に作

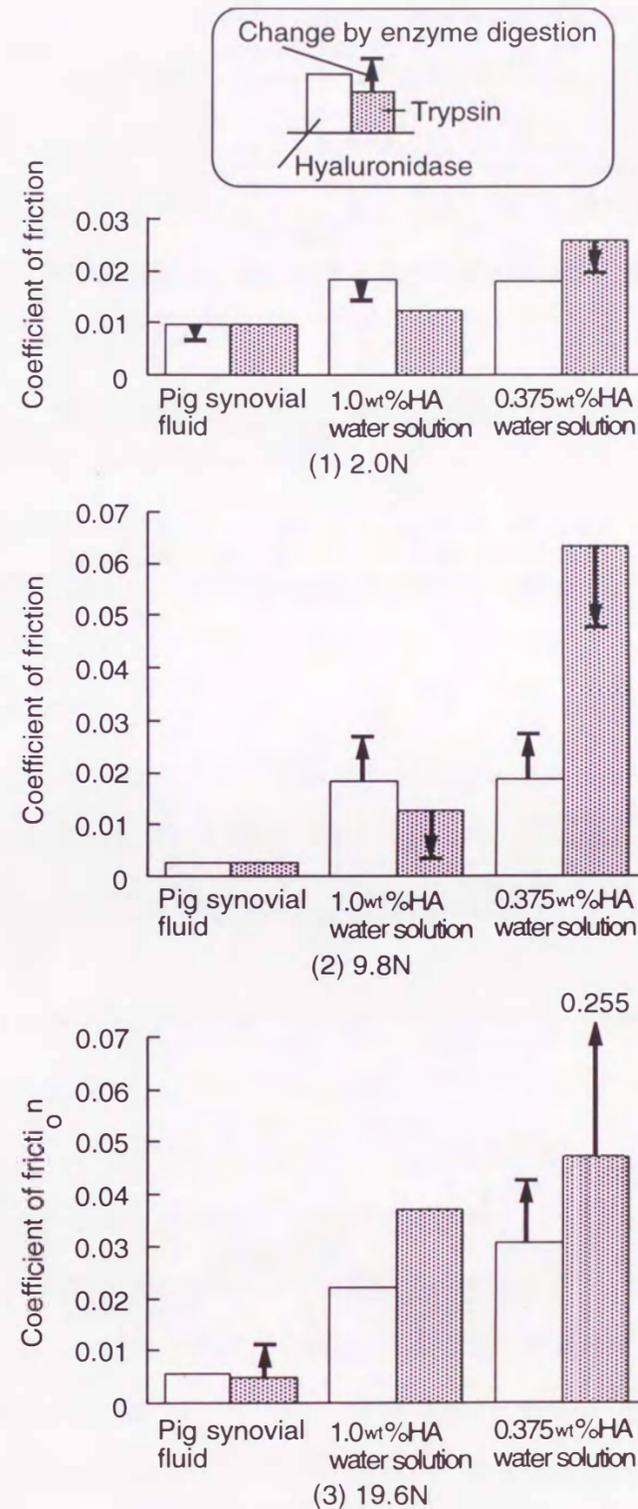


図4. 13 酵素消化による摩擦挙動の変化

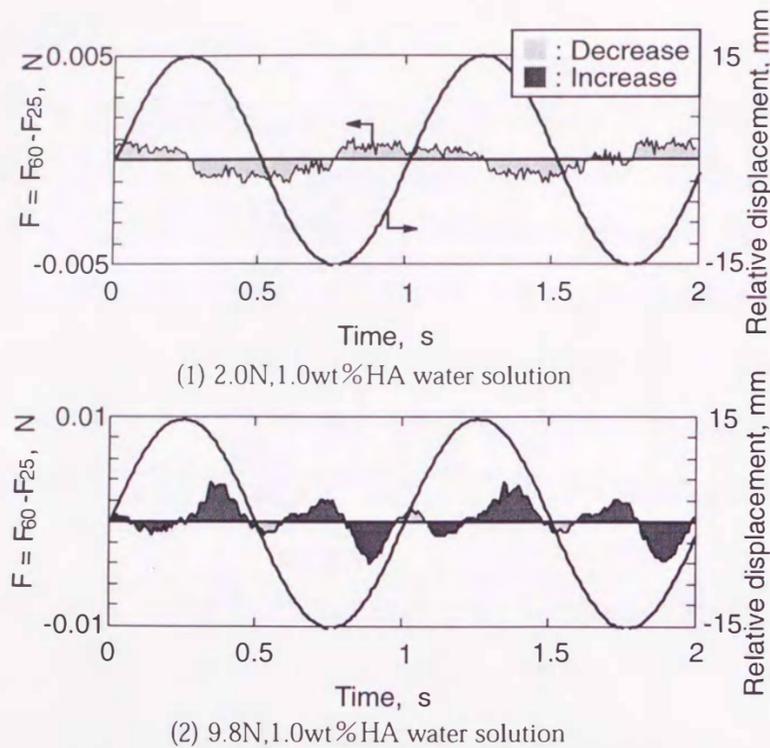


図4.14 ヒアルロニダーゼによる摩擦力波形の変化

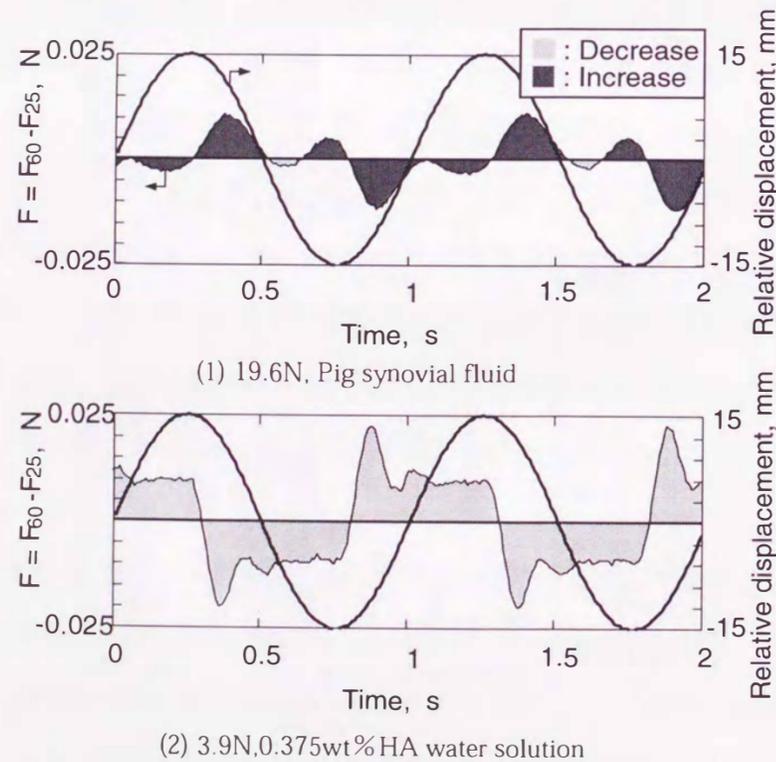


図4.15 トリプシンによる摩擦力波形の変化

用していることが推察される. 図4.15(2)は0.375wt% HA水溶液潤滑, 9.8Nの荷重条件におけるトリプシン滴下により摩擦係数が低下した実験の摩擦力変化である. ストロークエンドの通過直後の摩擦力が著しく低下している. HA水溶液には蛋白成分は含まれておらず, 軟骨表面の蛋白成分の分解に起因した現象であることが推察される. つまり, 人工材料であるガラスに対し, 蛋白成分を含む軟骨表面の一部が凝着を生じ高摩擦を示していた状態において, トリプシン滴下によりその凝着部分が分解され, 摩擦係数が低下したと考えられる.

4.2.5 酵素による軟骨摩擦面の変化

図4.16に実験終了後の摩擦面の共焦点レーザー顕微鏡写真と図中に白線で示した部分の表面形状を示す. 図4.16(1)は関節液潤滑, 19.6Nの高荷重条件におけるトリプシン滴下により摩擦係数が上昇した実験の摩擦面である. 深さ5 μ mから10 μ mのピットを有する摩耗状態が観察される. なお, 関節液潤滑, 19.6N荷重の同条件において無滴下及びヒアルロニダーゼ滴下により表面損傷は観察されなかった. 図4.16(2)は0.375wt% HA水溶液潤滑, 3.9Nの荷重条件におけるトリプシン滴下により摩擦係数が低下した実験の摩擦面である. 最大高さで1 μ m程度で実験前と同様に平滑であることがわかる.

先述のトリプシン滴下における荷重条件と潤滑液の違いにより摩擦係数の変化として, 逆の現象が生じたが, これらの実験後の摩擦表面の違いから説明される. つまり, 高荷重条件においてはトリプシン滴下により表面保護作用を行う関節液中の蛋白成分の分解が起こり, 二面の直接接触が進行するとともに, 酵素消化が軟骨表面下まで進行し, ピット状の摩耗を引き起こし, 摩擦を上昇させている. 一方, HA水溶液潤滑における9.8N以下の低荷重条件での摩擦係数の低下は凝着部の蛋白成分のミクロな分解により摩擦状態が改善されたためで, 酵素消化にともないマクロな摩耗は進行せず, 摩擦面にはレーザー顕微鏡の分解能レベルにおいては変化が起こっていない.

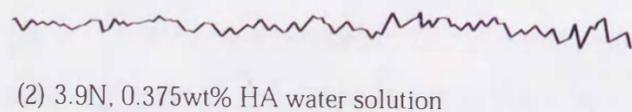
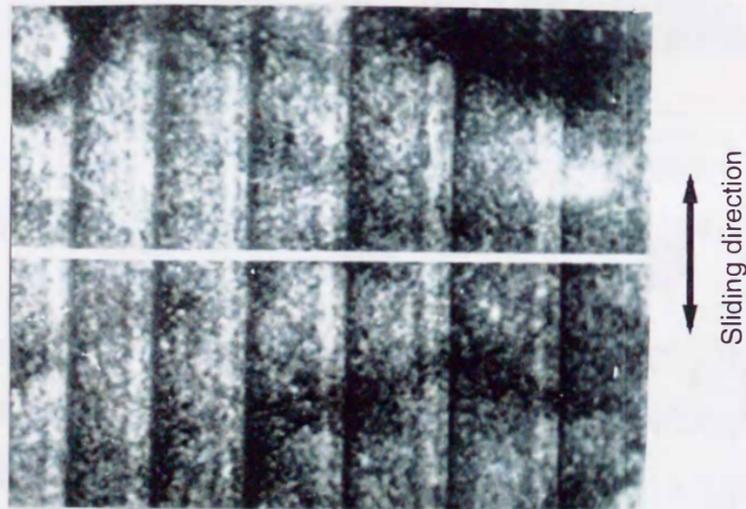
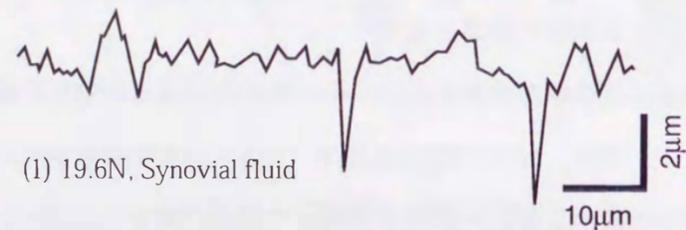


図 4. 16 トリプシン滴下条件における軟骨摩擦面評価

4. 2. 6 まとめ

軟骨に対するガラスの摩擦において、軟骨表面と関節液に含まれるヒアルロン酸と蛋白成分に対し酵素消化を行うことにより、以下のことが明らかになった。

ヒアルロン酸は濃度の異なるヒアルロン酸ナトリウム水溶液の粘度測定と摩擦実験、およびヒアルロニダーゼ滴下の影響から、関節液の粘度を高く維持しており、歩行のような多モード潤滑において潤滑膜形成の履歴等を考慮すると、流体膜形成を通じて寄与することがわかった。

蛋白成分はトリプシン滴下の摩擦実験と摩擦面変化の結果によれば、表面保護に機能するゲル膜・吸着膜の主要な成分として存在し、比較的過酷なモードにおいて耐摩耗性を向上させている。

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液潤滑の高荷重を除く荷重条件下の摩擦実験において、トリプシン滴下により摩擦係数が低下する傾向を示したことから、軟骨表面の蛋白成分のガラスへの凝着に起因した摩擦力が生じていることが考えられる。一方、関節液潤滑で観察された低摩擦は関節液に含まれるヒアルロン酸以外の成分が境界潤滑性を示すことを示唆している。前項において、軟骨の相对摩擦面が人工関節候補材料の場合、関節液潤滑下において人工材料表面の親水性が摩擦に関与しており、親水性に優れたガラスは比較的低摩擦を示すが、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液潤滑においては人工関節候補材料による摩擦への影響は小さいことを報告している。したがって、関節液に含まれるヒアルロン酸以外の成分が摩擦面の親水性に関係して境界潤滑に寄与していると考えられる。

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

本節では、蛋白成分の境界潤滑性について主要な因子の特定を行うことを目的に、関節液潤滑で低摩擦を示すガラスを軟骨相対面に用いた往復動摩擦試験において、硫酸塩析と電気泳動により分画された蛋白成分の潤滑への影響を観察した。

4. 3. 1 潤滑液条件と粘度

実験に用いた潤滑液は豚関節液と関節液含有成分の水溶液で表4. 2に構成成分を示す。表中の豚関節液成分は実験に使用した関節液のもので、複数の膝関節から採取した関節液を混合した後の分析結果である。水溶液に用いた蛋白成分のアルブミン、 α グロブリンおよび γ グロブリンは人血清より硫酸塩析と電気泳動により分画された

表4. 2 豚関節液分析と潤滑液性状

Lubricant	Hyaluronic acid	Protein		
		Albumin	α -globulin	γ -globulin
Pig synovial fluid	0.119wt% (Mw=4.77 $\times 10^6$)	Total 3.4wt%		
Water solution A	0.375wt% (Mw=1.02 $\times 10^6$)	—		
B	0.375wt% (Mw=1.02 $\times 10^6$)	2.1wt%	0.45wt%	0.45wt%
C	0.375wt% (Mw=1.02 $\times 10^6$)	3.0wt%	—	—
D	0.375wt% (Mw=1.02 $\times 10^6$)	—	3.0wt%	—
E	0.375wt% (Mw=1.02 $\times 10^6$)	—	—	3.0wt%
F	—	—	—	3.0wt%

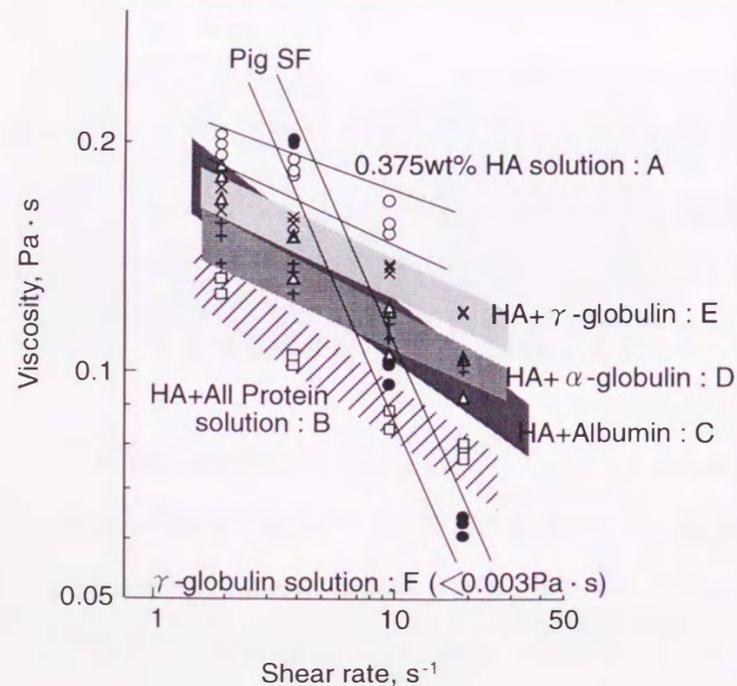


図4. 17 関節液と関節液成分の水溶液の粘度と非ニュートン性

試薬である。各水溶液のせん断速度に対する粘度を図4. 17に示す。ヒアルロン酸濃度の0.375wt%は豚関節液と同程度の粘度を示すように設定したが、蛋白成分濃度は豚関節液の成分分析結果(表2. 1)と人関節液の測定結果⁽⁹⁾を考慮し、生体の関節液に近い濃度に設定した。HAを含まない3.0wt% γ グロブリン水溶液を除き、各水溶液とも非ニュートン性を示す。豚関節液と0.375wt%HA水溶液は、共にせん断速度 5 s^{-1} で $0.19\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 程度を示している。しかし、0.375wt%HA水溶液に蛋白成分を加えた水溶液B, C, D, Eにおいて粘度が低下しており、特に、アルブミン濃度の高い水溶液B, Cでは粘度の速度依存性が増し、関節液の傾きに近づいていることが分かる。ヒアルロン酸のランダムコイル状に折りたたまり大量に水分を吸収している分子が、環境に極性をもった蛋白分子が添加されたことによりHAのカルボキシル基の解離とHA分子の内外での浸透圧差が変化し、水分を放出し分子排除体積が縮小した結果、粘度が影響を受けていることが考えられる。

4. 3. 2 関節液成分添加による摩擦挙動への影響

図4. 18に荷重条件3.9N、9.8N、19.6Nにおける各潤滑液条件下での実験開始25分から26分後までの最大摩擦係数の平均、および標準偏差を示す。実験の繰り返し数は6回である。前項においても指摘したように、各荷重条件を通じて関節液潤滑では摩擦係数が0.01以下の低く安定した摩擦挙動を示すが、HAのみの水溶液Aの条件では摩擦係数が著しく上昇している。摩擦試験の形態が往復動であるため、ストローク端近傍での速度の減少に伴い、相対面間の距離が接近する厳しい位相が条件として含まれており、HAの粘性効果のほかに境界潤滑性を示す潤滑性成分の寄与が必要と考えられる。まず、HA水溶液に生体関節液の組成に近い濃度の蛋白成分を添加した水溶液Bの結果を関節液潤滑の結果と比較すると、関節液潤滑のような低摩擦は実現できないことがわかる。さらに、水溶液Bの結果をHA水溶液Aと比較すると、比較的低荷重条件(3.9N, 9.8N)においてHA水溶液潤滑Aより平均摩擦係数は低下しており、高荷重条件(19.6N)において上昇しているが、軟骨による個体差が大きいため、 t 検定によれ

ば有意水準0.1においても摩擦係数の高低関係に差は認められない。つぎに、各蛋白成分を生理的濃度より高い3.0wt%の濃度で別々に添加した水溶液C, D, Eにおいては、 γ グロブリン添加HA水溶液Eの場合に関節液潤滑と同様の低摩擦が示され、HA水溶液Aと比較して、特に低荷重条件3.9Nと9.8Nでは、それぞれ有意水準0.05と0.01において摩擦係数の改善が認められた。関節液や γ グロブリン添加HA水溶液Eと比較して高摩擦を示す水溶液A, B, C, Dの各荷重条件における摩擦係数については、それぞれの相

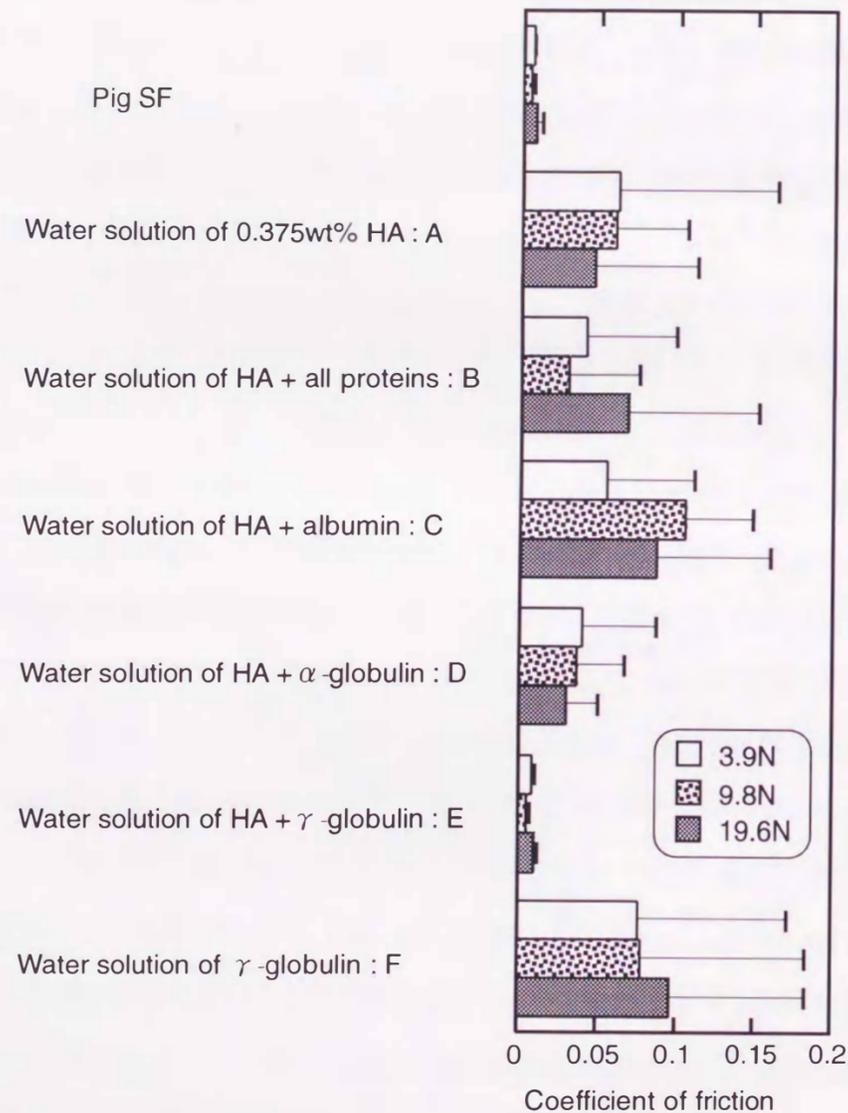


図4.18 軟骨とガラスの摩擦における関節液と関節液成分の水溶液による潤滑効果 (Error bars indicate S.D., N=6)

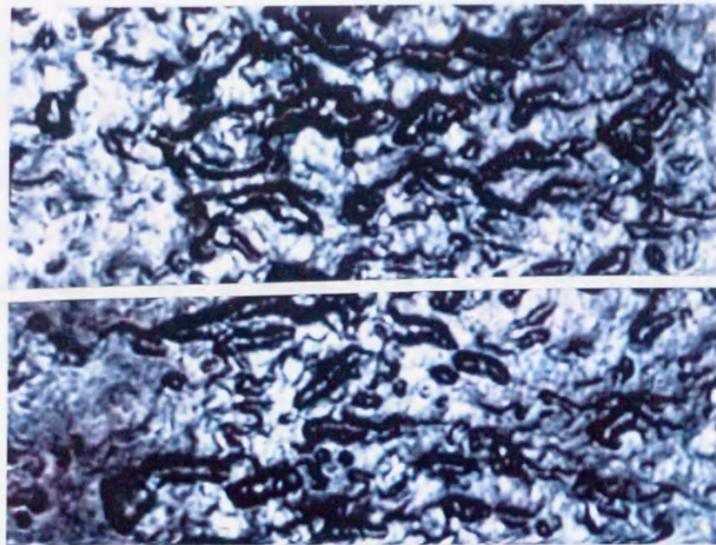
対関係で有意差は認められず、HA水溶液にアルブミンや α グロブリンまたは生理的濃度の γ グロブリンの添加では摩擦挙動の明白な改善は認められない。さらに、HAを含まない γ グロブリン水溶液Fでは摩擦係数は非常に高い値を示しており、高濃度 γ グロブリン添加HA水溶液潤滑における低摩擦は、生理的濃度より高いある程度の濃度の γ グロブリンとHAとの協調作用であることが分かる。

4. 3. 3 関節液成分添加による軟骨摩擦面の摩耗挙動

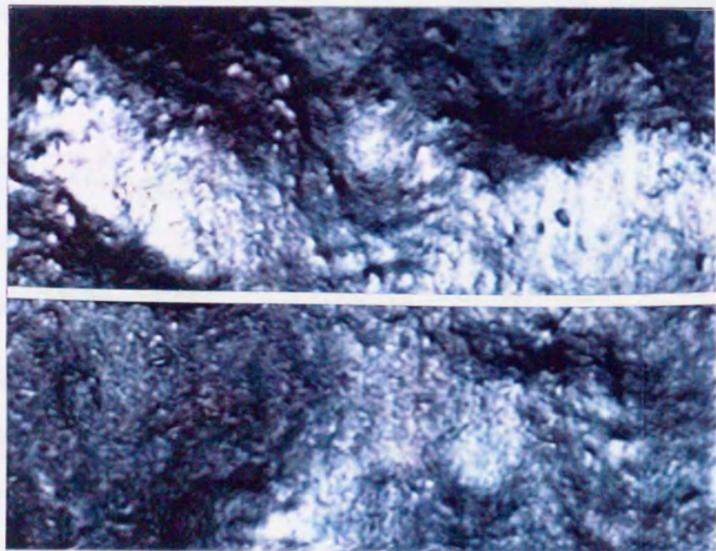
図4.19に荷重19.6Nの条件におけるアルブミン添加HA水溶液Cと γ グロブリン添加HA水溶液Eの実験後の摩擦面のレーザー顕微鏡写真と図中白線で示した部分の表面形状を示す。 γ グロブリン添加HA水溶液潤滑の実験後の摩擦表面は実験前と同様な最大高さ2 μ m程度の滑らかな形状を保っているが、アルブミン添加HA水溶液潤滑の実験後では、他の高摩擦を示した潤滑液A, B, C, D, Fの条件と同様に深さ8 μ m程度のピット状の表面損傷が観察された。

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

アルブミンと γ グロブリンを0.3wt%の濃度で 9×10^{-4} M KCl溶液に溶かし、HCl-KOH系においてpHを調整し、 ζ 電位を測定した。結果を図4.20に示す。 ζ 電位が0 mVを示すpHの値が蛋白粒子表面の電荷の代数和が0となる等電点に相当すると考えられる。アルブミンと比較して γ グロブリンの等電点は高く、pH7程度以下の環境において正の電荷を帯びていることがわかる。蛋白成分の吸着担体への飽和吸着量は等電点において極大を示す傾向があることが指摘されており^{(112),(113)}、 γ グロブリンは生理的pHが摩擦面への吸着に有利であることがわかる。さらに、 γ グロブリンは電気泳動において最も陰極に分画される蛋白成分であることから、正に荷電したアミノ酸残基が集めたドメインを持つヒアラドヘリンファミリーのように、軟骨表面のプロテオグリカン凝集体や関節液中のヒアルロン酸との結合に優位性を示すことにより低摩擦を維持していることが推察される。



Water solution of 0.375wt%HA and 3.0wt% albumin: C



Water solution of 0.375wt%HA and 3.0wt% γ globulin: E

図4. 19 摩耗挙動におよぼす分画された蛋白成分の影響

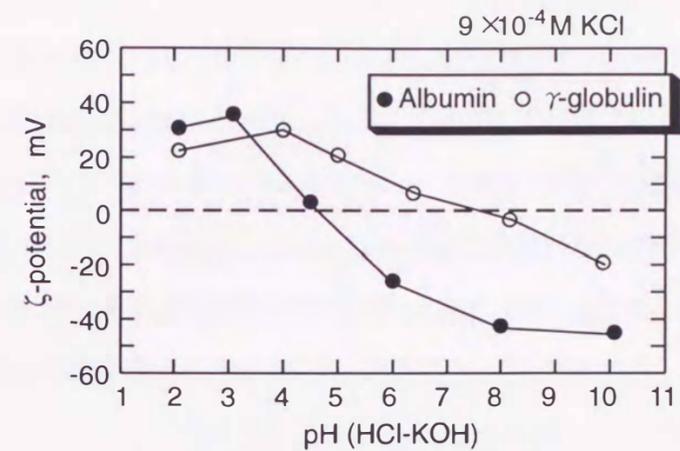


図4. 20 pH環境を変化させた場合の蛋白粒子表面のゼータ電位

蛋白成分分子は非極性部分を有し、水性の環境ではその難溶性に依存した固体面への吸着が予想される。これは、油系の潤滑において難溶性の極性添加剤が容易に境界潤滑膜を形成する現象と反対に、水系の潤滑においては非極性部分が周囲の水に対して極性部分の強い水和により会合することにより、その分子の形態に依存した膜構造や、ミセル等を形成するからである。近年、その術後成績における低摩耗により見直されてきているメタル対メタルの人工股関節^{(114),(115),(116)}は、笹田ら⁽¹¹⁷⁾による*in vitro*におけるシミュレーションでは非常に高い比摩耗量を示した。これは、シミュレーション試験において蛋白成分を含まないデキストラン水溶液が潤滑液として使用されたのに対し、*in vivo*では二次関節液に含まれる蛋白成分が存在し、保護膜を形成していることが考えられる。

そこで、アルブミンと γ グロブリンに対し、ニンヒドリン反応を用いたクロマトグラフィーにより、アミノ酸側鎖分析を行った。結果をSwannらの報告したLGP-1⁽⁹⁾の結果と共に表4. 3に示す。生化学的解析による蛋白のコンフォメーションから、軟骨表面のプロテオグリカンモノマーにおけるグリコサミノグリカンコア蛋白のセリン残基に特異に結合していることが報告されており^{(118),(119),(120),(121)}、本摩擦実験に用いた γ グロブリンのセリン残基が、グリシンに次いで115/1000と高比率を占めることから

潤滑における優位性が推察される。

LGP-1^{(5),(56),(57)}は関節液をバイオゲルA型を用いたゲルクロマトグラフィーと塩化セシウム溶液を用いた密度勾配超遠心法を行うことにより分画された糖蛋白成分である。分子の形態は電子顕微鏡観察からマンノース、グルコサミンとペプチドからなる領域とオリゴ糖の鎖からなり、その分子長は100~300 nm、分子量は20万程度、濃度は10~30 mg/lである。Swannらは兔軟骨とガラスの滑り摩擦試験機により、ペロナール緩衝液潤滑では高摩擦を示す低速度域において、LGP-1溶液 (65 µg/ml) が関節液同様の低摩擦を示すことを確認した。

同様な糖蛋白を対象とした実験的研究を、Jayら⁽⁶⁾が報告している。陰イオン交換法とゲルクロマトグラフィー、及び密度勾配遠心分離法により牛関節液中の糖蛋白を分

表4. 3 蛋白分子とLGP-1⁽⁵⁾のアミノ酸残基と化学組成

	Albumin	γ-globulin	LGP-1	
Amino acids residues / 1000				
Aspartic acid	76	58	38	pK=4.7
Threonine	48	71	234	
Serine	43	115	60	pK=4.7
Glutamic acid	152	94	106	
Proline	46	70	244	
Glycine	25	176	32	
Alanine	116	53	93	
Cystine	26	10	-	
Valine	64	75	15	
Methionine	9	7	5	
Isoleucine	13	19	11	
Leucine	112	75	22	
Tyrosine	29	38	3	
Phenylalanine	55	32	4	
Lysine	110	63	117	pK=10.2
Histidine	27	16	7	pK=6.5
Arginine	42	28	9	pK=12.0
Percentage of polar residues	40.7	25.9	27.7	
Percentage of non-polar residues	59.3	74.1	72.3	
Total amino acids (% , w/w)			40.0	
Carbohydrate				
Mannose			0.1	
Galactose			15.9	
Glucosamine			2.0	
Galactosamine			16.9	
N-Acetylneuraminic acid			16.5	

画し、PSLF (Purified Synovial Lubricating Factor) の存在を指摘し、ガラス (親水性) とラテックス (疎水性) の摩擦系において、濃度に関し定量的に境界潤滑性を報告している。この場合の潤滑機構はChappuisら⁽¹⁰⁵⁾の指摘と同様に、乾燥下で軟骨表面が疎水性を示す挙動から、その水系潤滑剤の反発力により揚力が駆動され、低摩擦を維持すると考察されている。蛋白成分の両親媒性が、境界潤滑に影響を及ぼしていることは、境界潤滑機構に潤滑剤の吸着が関与していることから容易に推察されるが、そのモデルは様々であり^{(5),(7),(122),(123),(124)}、さらに検討されるべき問題と考える。

アミノ酸側鎖は極性基を有するものがあり、pHに依存して可逆的に電離する。生理的pHでは図4. 21に示す側鎖が極性を示し、他の側鎖は非極性である。表4. 3に示すように、側鎖の構成においてアルブミンは非極性残基の比率が59.3%であるのに対し、γグロブリンは74.1%を占めており、水に対して難溶性であることがわかる。LGP-1におけるアミノ酸残基もγグロブリンと同様に非極性の比率が高く72.3%をしめし、PSLF⁽⁷⁾においても89.5%という高い値になっている。水系潤滑剤において疎水基グループが支配する摩擦面近傍への会合が境界潤滑性に寄与していることが推察される。これは水の水素結合による強い凝集力のため疎水性基が水中から排除され、その結果疎水部分が会合することに起因しており、相対運動が起こる固液界面に集合する可能性が高いことが予想されるためである。これら非極性部分を有する蛋白成分の生体膜形成等において重要な役割をもつ成分として、同じ両親媒性成分であるリン脂質が協調的に境界潤滑膜形成に影響をおよぼすことが考えられる。非極性残基の比率が高く、関節液中でLGP-1やPSLFに比べ重量濃度が非常に高いγグロブリン画分は、リン脂質等の疎水基に会合する形態をとり、生体膜のように膜構造に組み込まれ吸着膜を形成することが推察される。

4. 3. 5 まとめ

軟骨に対するガラスの往復動摩擦において、潤滑液であるヒアルロン酸ナトリウム水溶液に血漿由来の蛋白成分を条件により混合することにより、以下のことが明らか

となった。

軟骨とガラスの摩擦において、等電点の高い γ グロブリンを生理的濃度より高い濃度でヒアルロン酸ナトリウム水溶液に添加することにより、関節液潤滑同様の低摩擦を実現できた。

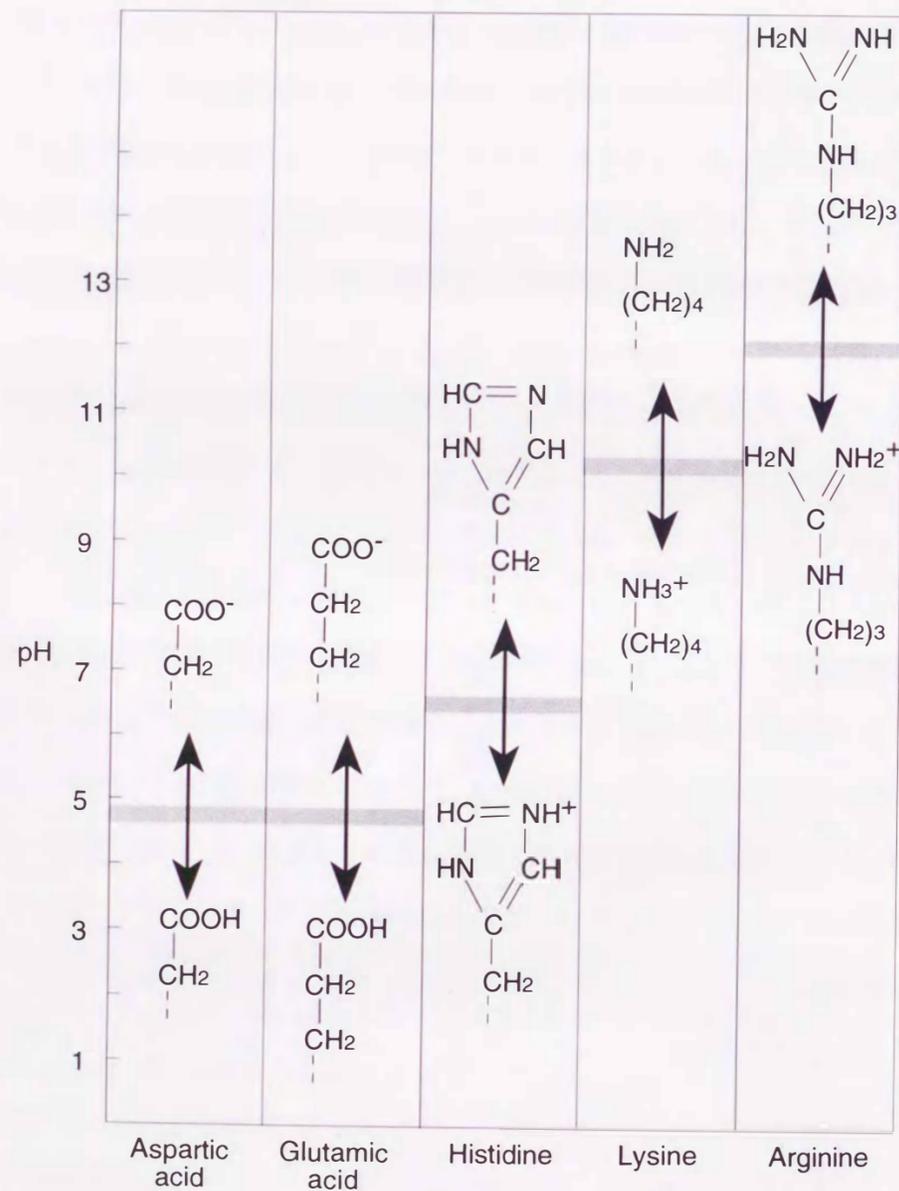


図4.21 極性アミノ酸側鎖のpHによる電離

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
界面活性剤処理することにより極性基を有する吸着性物質を遊離させた軟骨摩擦面を用い、振子摩擦試験を行った。関節液中の両親媒性成分である蛋白成分とリン脂質成分を潤滑液に添加することによる摩擦挙動への影響を観察し、それら成分の境界潤滑機構における役割について考察する。

4.4.1 潤滑液条件と粘度

潤滑液としてHAの生理食塩水溶液のHA濃度を変化させることにより潤滑モードを変化させた。コーンプレート粘度計により測定した実験室室温20℃における潤滑液粘度をせん断速度に対して図4.22に示す。各HA濃度において非ニュートン性を示すが、濃度上昇に依存して粘度が上昇することがわかる。0.5wt%HA生理食塩水溶液はせん断速度5s⁻¹程度において豚関節液と同程度の粘度を有する。0.2wt%HA生理食塩水溶液は γ グロブリンを添加することにより0.2wt%生理食塩HA水溶液の粘度と比較してわずかな上昇を認めるが、アルブミンを添加することにより速度依存性を増し、せん断速度10s⁻¹以上において低下することがわかる。

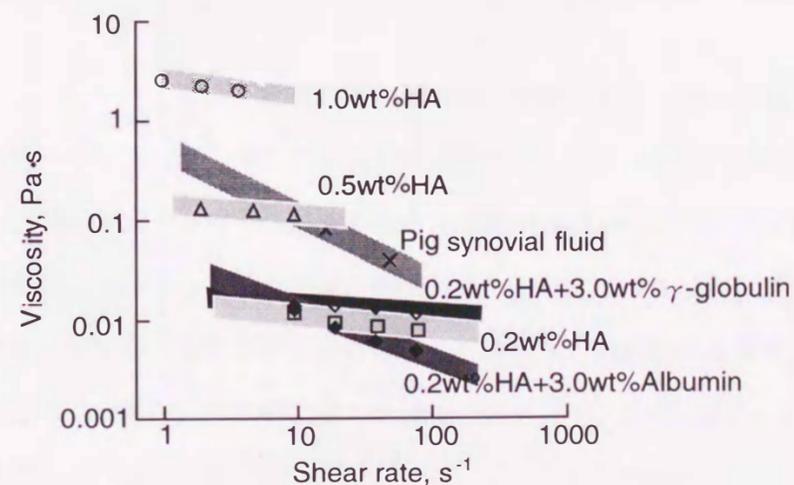


図4.22 潤滑液粘度と非ニュートン性

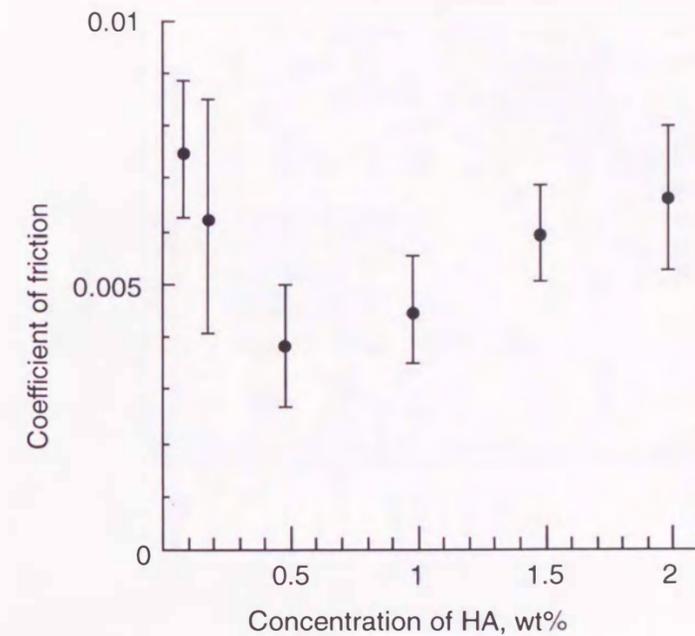
4. 4. 2 摩擦挙動に及ぼす潤滑液粘度の影響

潤滑液のHA濃度を变化させることによる摩擦係数の変化を図4. 23に示す。荷重条件100NではHA濃度0.5wt%で最小0.0037を示し、それより高濃度においても低濃度においても摩擦係数は増加した。しかしながら、荷重条件1kNにおいては摩擦挙動がHA濃度に依存する傾向は認められない。今回実験に用いた豚肩関節は、ボールジョイント状の形態で骨頭と球蓋は共に曲率半径に長径と短径を有し、運動に方向性があるようである。図4. 24に示すように骨頭の両曲率と比較し球蓋のそれぞれの曲率が大きく、十分な形状適合を得るには、ある程度以上の荷重が必要であることが推察される。1kNの荷重条件はおおよそ豚の体重に相当し、揺動中において常に負荷されていることもあり、生理的には厳しい条件になっていることが考えられる。摩擦試験の揺動減衰が持続する1分弱の間、高荷重により両試験片間の形状適合性が高く保たれ、荷重直後の十分なEHL膜を維持していることが推察される。

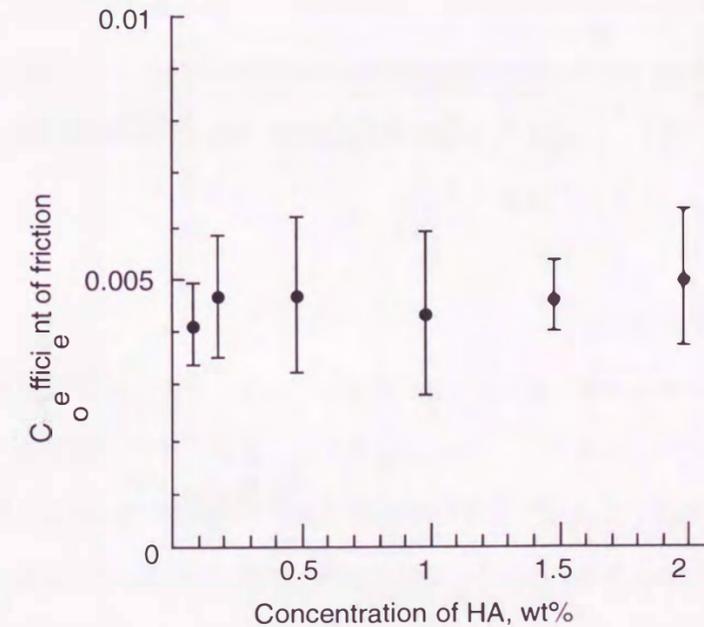
したがって、低荷重条件では両試験片間の形状適合性が低いことから、相対運動は不安定で、比較的スクイズアウトの速度が高いことが推察される。低荷重、HA低濃度の条件においては摩擦面の局所的接触に起因する混合潤滑領域での摩擦力の増加、高濃度においては粘性抵抗の増加が推察される。

4. 4. 3 摩擦挙動に及ぼす実験前の負荷時間の影響

図4. 25に摩擦実験前の荷重負荷時間に対する摩擦係数の変化を示す。両荷重条件において、荷重負荷時間経過に伴い摩擦係数の増加が認められる。Forsterら⁽¹²⁵⁾は軟骨とメタル平板の摩擦系において実験前の負荷時間の影響を報告しており、負荷時間に伴い摩擦力は急上昇する結果になっている。軟骨相対面が平板である場合は、軟骨の変形によるエネルギー損失は小さく、流体膜の破綻による境界摩擦力の発生が原因とされた。本実験においても、潤滑液のスクイズアウトに伴う接触面積の増加による境界摩擦力の増加が考えられる。しかし、両相対面が完全な球形ではないため、潤滑の低下と相乗的に起こる軟骨摩擦面の変形に伴うヒステリシスロスも主要な原因に考えられる。荷重

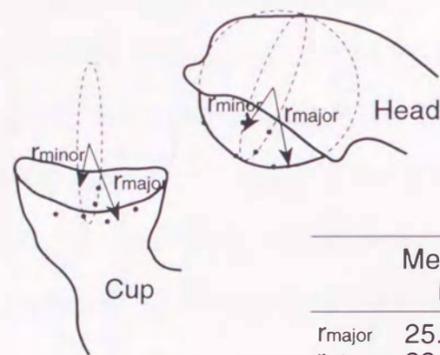


(1) 100N



(2) 1kN

図4. 23 負荷直後の摩擦挙動におよぼすヒアルロン酸濃度の影響



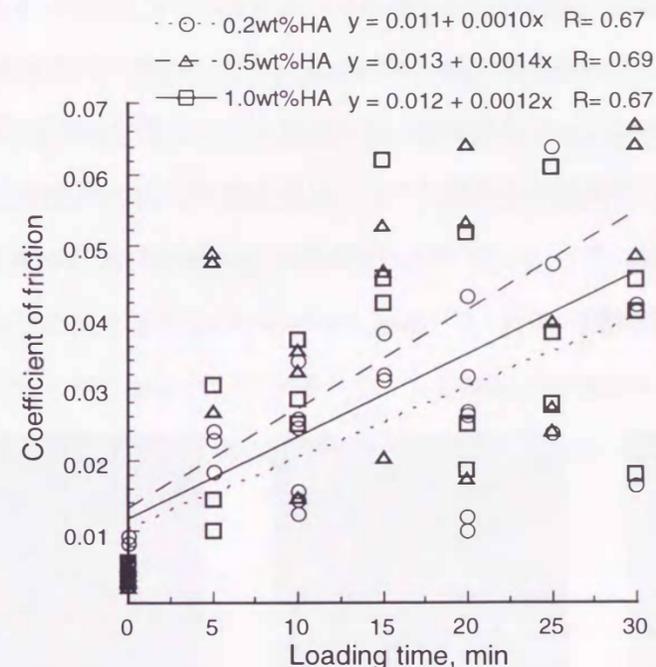
	Mean radius ± S.D., mm	
	Head	Cup
r _{major}	25.24 ± 1.25	19.14 ± 3.04
r _{minor}	22.65 ± 1.86	18.18 ± 3.02

図4.24 豚肩関節骨頭と球蓋の曲率半径

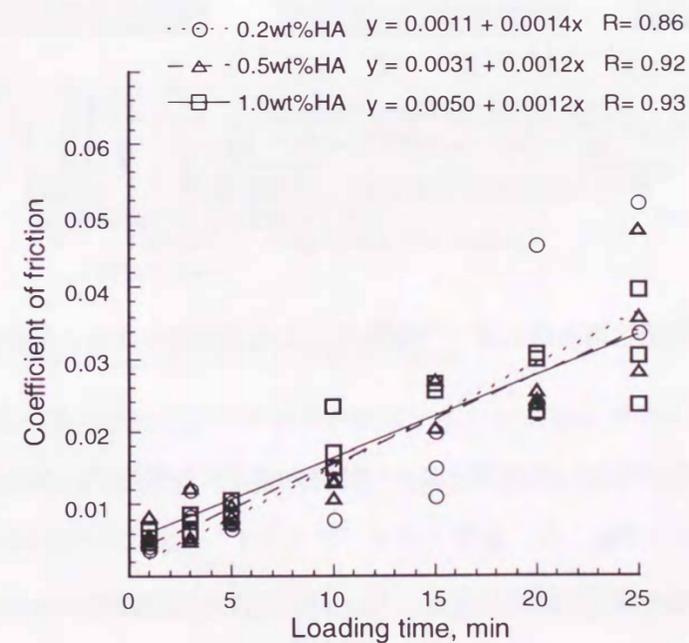
100Nの条件では、摩擦係数の分散が大きく、相関係数が比較的低い値を示し、負荷直後に比べ5分経過後では、著しい摩擦係数の上昇が認められ、潤滑モードの急激な変化が推察される。荷重1kNの条件では、摩擦係数の分散が小さく、線形での相関係数が高い値を示し、全体的に100Nの条件より低い値を示す。100Nの条件では1kNの条件と比較し、形状適合性の低い不安定な摩擦状態にあることが推察されるが、低荷重であることにより、図4.23(1)に示すように荷重負荷直後においては流体の粘性効果により支配された潤滑モードの変化が観察される。

4.4.4 軟骨摩擦面処理

軟骨表面の吸着膜の除去を目的に、界面活性剤処理とトリプシンによる酵素処理を行った。界面活性剤としては非イオン性のポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを用いた。この界面活性剤は生体膜可溶化能に優れ、本実験における吸着膜剥離という目的に適していると考えられる。界面活性剤と酵素による軟骨表面処理では、軟骨試料をポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルの10wt%濃度の生理食塩水溶液、または、トリプシン200unit/mlのリン酸緩衝液に浸し、30分間超音波振動を与え、さらに生理食塩水中で30分間、同様の超音波振動を与えた。



(1) 100N



(2) 1kN

図4.25 摩擦挙動におよぼす実験前の静的荷重時間の影響

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

豚肩より摘出後無処理、界面活性剤処理およびトリプシン酵素処理を行った軟骨表面の湿潤状態での共焦点レーザー顕微鏡像と図中白線で示した部分の断面形状を図4. 26に示す。無処理及び界面活性剤処理においては最大高さで2 μm 程度の粗さを示し、形状的な変化は認められない。トリプシン酵素処理では5 μm から10 μm 程度の欠陥が生じ、軟骨表層のゲル膜に消化が及んでいることがわかる。

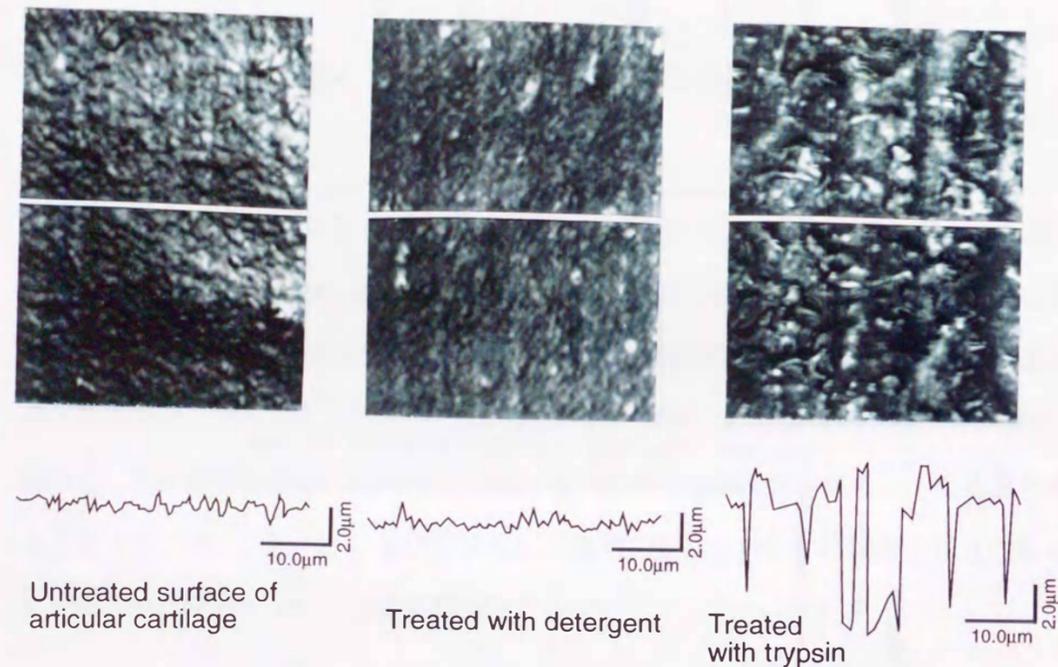


図4. 26 界面活性剤と蛋白成分分解酵素による湿潤軟骨表面の形態変化

無処理および各処理を施した軟骨表面を10時間大気中で乾燥させ、水の接触角を蒸留水10 μl 滴下10秒後に測定した。結果を図4. 27に示す。無処理の表面はHillsら^{(6),(61)}やChappuis⁽¹⁰⁵⁾らの指摘と同様に疎水性を示した。界面活性剤処理後はHillsらのクロロフォルム処理と同様に親水化しており、無処理と比較して急速に水分を吸収することが確認された。トリプシン酵素処理では有意な変化は認められない。無処理の軟骨表面においては乾燥下において自由表面に対し疎水基を向けた吸着膜が存在しているの

に対し、界面活性剤処理した表面は、レーザー顕微鏡の分解能レベルにおいて確認不能な吸着膜が遊離され、親水性を示す軟骨マトリックスが露出していることが推察される。Hillsら⁽⁶⁾は軟骨表面を擦過した組織において、リン脂質の多重層膜を、Kirkら⁽¹²⁶⁾は透過型電子顕微鏡とエネルギー分散分光器により軟骨表層でのリン脂質の存在を確認している。乾燥下において疎水性を現し得る成分として、リン脂質等の脂質成分のほかに、蛋白成分の疎水基グループが考えられる。トリプシン酵素処理においては、軟骨表面の蛋白分子が分解されたペプチドやリン脂質等の両親媒性分子が残留したため、水の接触角に有意な変化が認められなかったと考えられる。

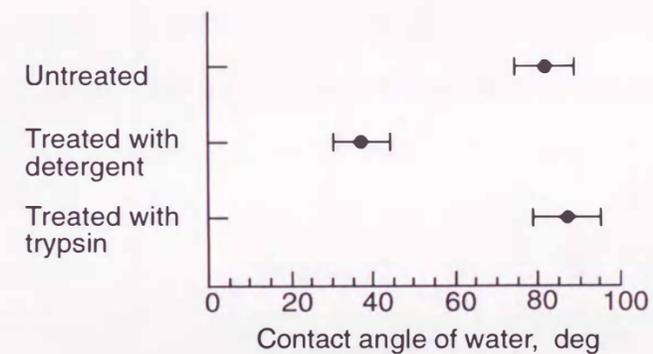


図4. 27 界面活性剤と蛋白成分分解酵素による軟骨表面の水の接触角の変化

4. 4. 6 摩擦挙動に及ぼす軟骨表面処理の影響

軟骨表面処理が摩擦挙動に及ぼす影響を観察するために無処理の軟骨の組み合わせで振子摩擦実験を行った後に、同じ軟骨の組合せに軟骨表面処理を施し、再度実験を行った。

振子摩擦試験による摩擦挙動の変化を図4. 28に示す。界面活性剤処理によりHA高濃度1.0wt%および0.5wt%の条件では、それぞれの変化に共通した摩擦係数の増減は認められない。HA濃度を0.2wt%に低下させることにより、全実験に共通して摩擦係数は上昇しており、統計的にも有意水準0.005において摩擦係数の上昇が認められた。荷重

条件が生理的条件よりかなり低いことが予想され、比較的高濃度HA生理食塩水溶液では流体潤滑状態を維持できていることが推察される。したがって、摩擦面の吸着層の変化が摩擦挙動に影響を与えていないと考えられる。0.2wt%の条件では粘度低下により流体膜形成能が低下し、境界潤滑モードが含まれる摩擦条件になっていると考えられ、界面活性剤処理による軟骨表面の変化が摩擦に影響をおよぼしたことが推察される。トリプシン酵素処理においては全HA濃度条件に有意な摩擦への影響は認められない。乾燥時の水の接触角からもわかるように、リン脂質等の吸着性成分の残留が低摩擦維持に寄与していることが推察される。

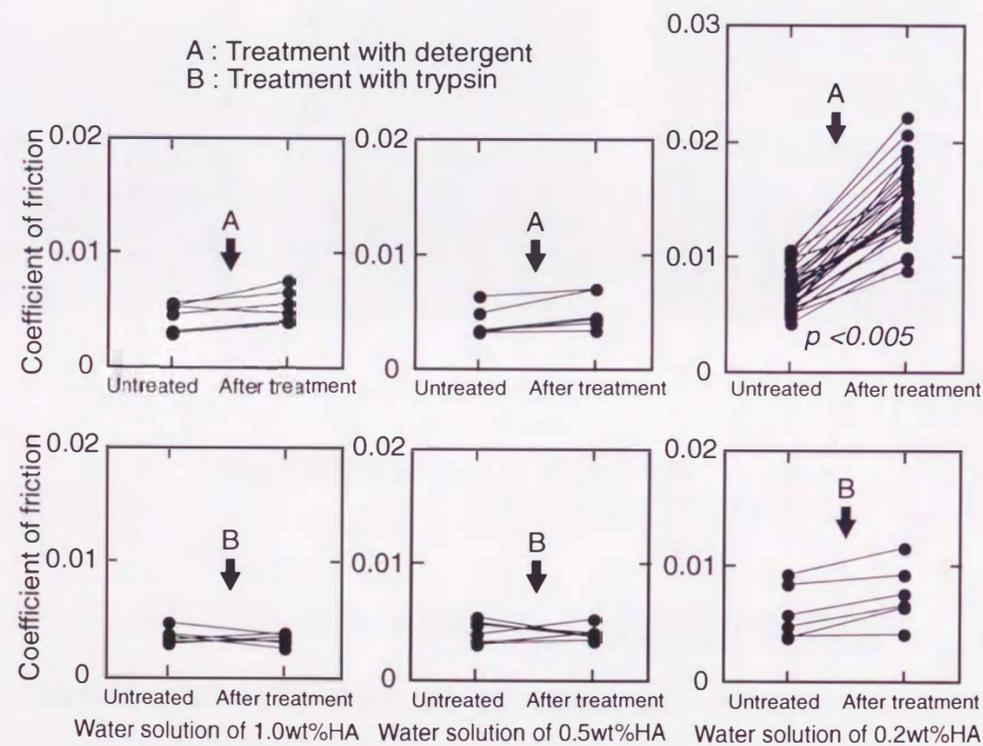


図4.28 界面活性剤と蛋白成分分解酵素処理による摩擦挙動への影響

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

蛋白成分とリン脂質の境界潤滑性を観察するために、0.2wt%HA生理食塩水溶液の条件において無処理と界面活性剤処理の摩擦実験の後、30分間生理食塩水中で超音波を

与え、軟骨表面に残留した0.2wt%HA生理食塩水溶液を洗浄し、再度、アルブミン、 γ グロブリンあるいはL α -DPPCを添加した0.2wt%HA生理食塩水溶液の条件で実験を行った。アルブミンおよび γ グロブリンは3.0wt%の濃度で0.2wt%HA生理食塩水溶液に溶かすことにより、L α -DPPCは軟骨摩擦面に乾燥粉末10mgを塗布することにより使用した。

振子摩擦実験による摩擦係数変化を図4.29に示す。先述したように、全実験において界面活性剤処理により摩擦係数は上昇する。関節液潤滑では全実験に共通して界面活性剤処理後の実験より摩擦係数の低下が認められ、統計的にもt検定における有意水準0.01において低下を認め、境界潤滑膜が修復されていることが示唆される。比較として再度0.2wt%HA生理食塩水溶液を用いた実験を行ったが、有意な変化は認められなかった。アルブミン添加においては摩擦係数に有意な変化は認められず、 γ グロブリン添加においては有意水準0.005において摩擦係数の低下が認められた。先に示した軟骨とガラスにおける往復動摩擦の結果においても、他の面分と比較して特異的に γ グ

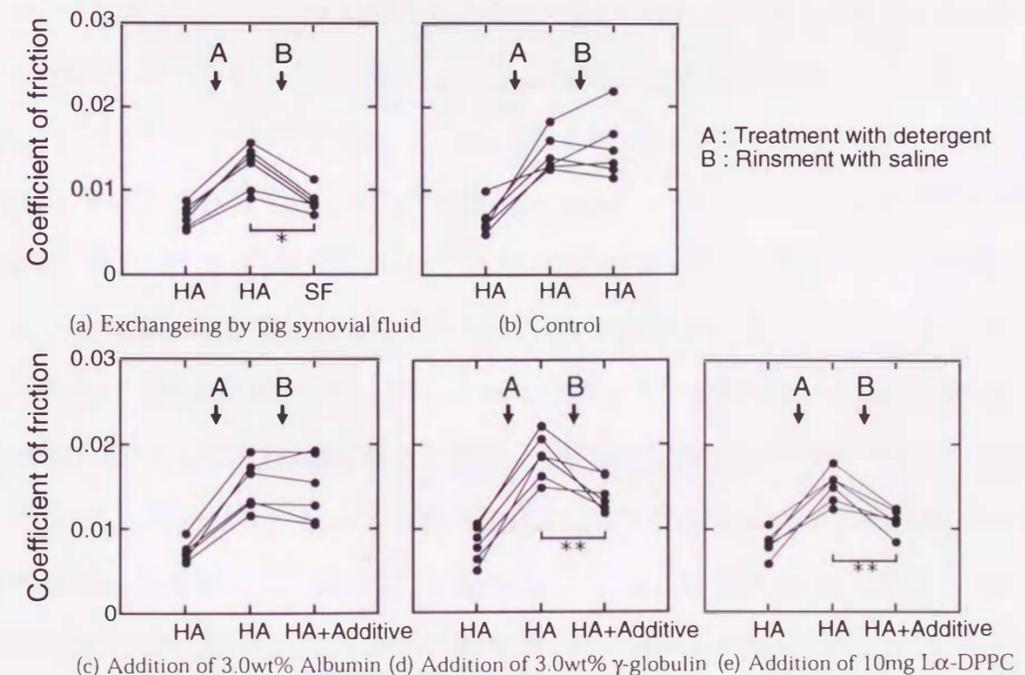


図4.29 界面活性剤処理された軟骨の摩擦挙動におよぼす γ グロブリンとL α -DPPCの影響 (HA濃度は0.2wt%, * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$)

ロブリンの境界潤滑性が確認されており、生理的環境下での γ グロブリン分子の高い比率における非極性部分と分子表面の正のゼータ電位が関与していることが推察される。L α -DPPCを軟骨摩擦面に塗布する条件においても有意水準0.005において摩擦係数の低下が認められた。

γ グロブリンとリン脂質において認められる界面活性剤処理からの摩擦挙動の改善は、それらの成分が軟骨表面に潤滑性を有する膜を形成することに起因していると考えられる。具体的な軟骨表面の境界潤滑膜モデルは次節において提案し、その潤滑性を検討する。

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

豚関節液の蛋白成分とリン脂質の総量測定と分画結果より、境界潤滑性を示した γ グロブリンの関節液中濃度は約0.25wt%、DPPCは約0.01wt%と見積もることができる。上述の振子試験では、両成分とも生理的濃度よりもかなり高濃度の条件下で潤滑効果が認められた。しかるに、両成分とも極性基を含むため、吸着挙動により軟骨表面では、液中よりも高い濃度を示すと考えられる。とくにDPPCの関節液分析はミセルもしくは蛋白との複合体として存在している液中成分のみを測定しているとみなされる。そこで、振子摩擦実験において滴下する潤滑液が約0.5mlであることより、L α -DPPCを約0.2wt%にあたる1.0mgを軟骨表面に塗布し、 γ グロブリンを0.3wt%の濃度で0.2wt%HA生理食塩水溶液に添加することにより、より生理的条件に近い濃度条件として摩擦評価を行った。前実験と同様に0.2wt%HA生理食塩水溶液の潤滑条件において無処理と界面活性剤処理の摩擦実験の後、30分間生理食塩水中で超音波を与え、再度、 γ グロブリン添加と同時に軟骨表面へのL α -DPPC塗布の条件で行った。摩擦係数の変化を図4. 30に示す。生理的濃度に近い γ グロブリン添加およびL α -DPPC塗布では有意な摩擦の改善は認められない。

一般に細胞膜のような生体膜の構造⁽¹²⁷⁾は極性脂質と蛋白成分から構成され、生体内は水系の環境であるため両親媒性である脂質と蛋白成分は疎水基を膜内部に配し、親水基が膜表面あるいは吸着部を形成する。軟骨表層におけるリン脂質の存在が指摘されており

^{(6),(122)}、軟骨表層のプロテオグリカンゲルの表面にも類似の膜が形成されていることが推察される。生理的濃度よりかなり高い濃度における γ グロブリンとL α -DPPCの単独での境界潤滑性は確認されたが、本実験において見積もった生理的濃度において摩擦の改善が認められなかった。 γ グロブリンの潤滑液への添加およびL α -DPPCの軟骨面への塗布といった膜形成につながる手法に検討が必要であることを示唆しており、生体関節の境界潤滑性については、さらに、LGP-1^{(5),(56),(57)}やPSLF⁽⁷⁾のような生合成等により存在する他の成分との複合体微量成分の寄与などを考慮する必要がある。

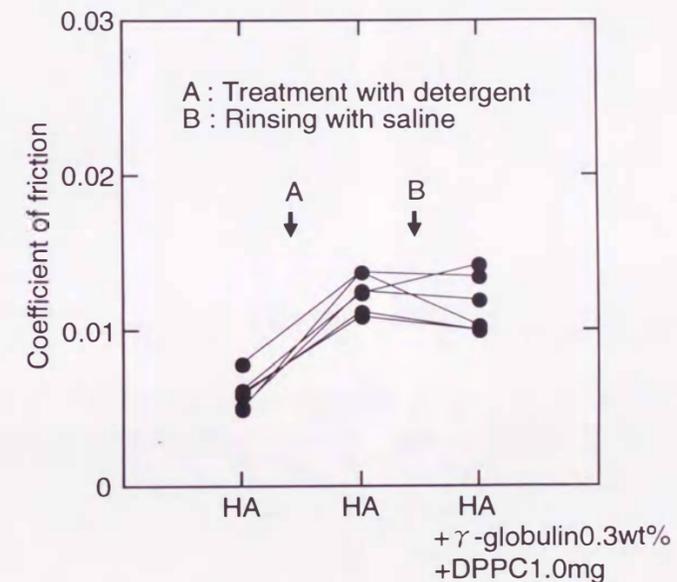


図4. 30 生理的濃度における γ グロブリンとDPPCの境界潤滑性評価

4. 4. 9 まとめ

豚肩関節を用いた振子摩擦試験により、以下のことが明らかになった。

軟骨表面を界面活性剤処理することにより、乾燥下で疎水性を示す表面吸着膜を遊離させ、境界潤滑性を低下させることを確認した。

表面吸着膜を失った軟骨表面は、生理的濃度より高い濃度ではあるが、 γ グロブリンの潤滑液添加、あるいは軟骨摩擦面へのリン脂質塗布により境界潤滑性を向上する。

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

生理的な濃度条件において、蛋白成分やリン脂質等の両親媒性成分の境界潤滑性の発現を確認するために、軟骨とガラスの往復動摩擦試験において、ガラス平面状にLangmuir-Blodgett (LB) 法により生体膜類似の境界潤滑膜モデルを形成し、その摩擦挙動を評価した。

4. 5. 1 Langmuir-Blodgett膜作成

摩擦評価は軟骨とガラス平板の往復動摩擦試験により行い、ガラス表面に数種の条件のLB膜を作成した。荷重条件は19.6Nに設定し、ガラス平板の裏面から観察した接触面積より見積もった平均面圧は軟骨による個体差を示し、 1.34 ± 0.47 MPaの範囲であった。静的な荷重条件になるため生理的には過酷になっており、図4. 12に示す荷重条件を変化させた摩擦測定から混合潤滑状態を含む荷重条件になっていると推察された。一定荷重負荷後に下部人工材料試験片に周期1秒、ストローク30mmで正弦波状の往復動を与え、ひずみゲージにより摩擦力を測定した。実験に用いた潤滑液は豚関節液と0.375 wt% HA水溶液である。

LB膜成分として、前項において生理的に高濃度での境界潤滑性が認められたL α -DPPCと人血清由来の γ グロブリンを用いた。有機溶媒にはクロロフォルム、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た。生体膜の一例として赤血球細胞膜の成分構成にしめるリン脂質重量が25.8%であることから⁽¹²⁸⁾、膜成分構成比はL α -DPPC： γ グロブリンが(25：75)とし、対照として(100：0)および(10：90)を調製した。LB膜の累積は、ガラスを水中に浸した状態から上昇させることにより、極性基がガラスに面した単分子膜を形成し、下降することにより疎水基が向かい合い、対をなすことで得られる2重膜を1層とした。LB膜の摩擦評価は積層後24時間乾燥させた後、LB膜上にHA水溶液を供給することにより行った。累積比はL α -DPPC単分子膜に対し100%になることを確認した。L α -DPPCと γ グロブリンが混在する条件では、累積比の値が100~300%を示

し、圧縮時に立体的な凝縮会合が起こっていることが示唆された。

L α -DPPCと γ グロブリンの各構成比における単分子膜のAFM像を図4. 31に示す。L α -DPPCの単分子膜は非常に平滑であるのに対し、 γ グロブリンが混在するLB膜では、 γ グロブリンの構成比に依存して数十nmの塊が局在していることがわかる。

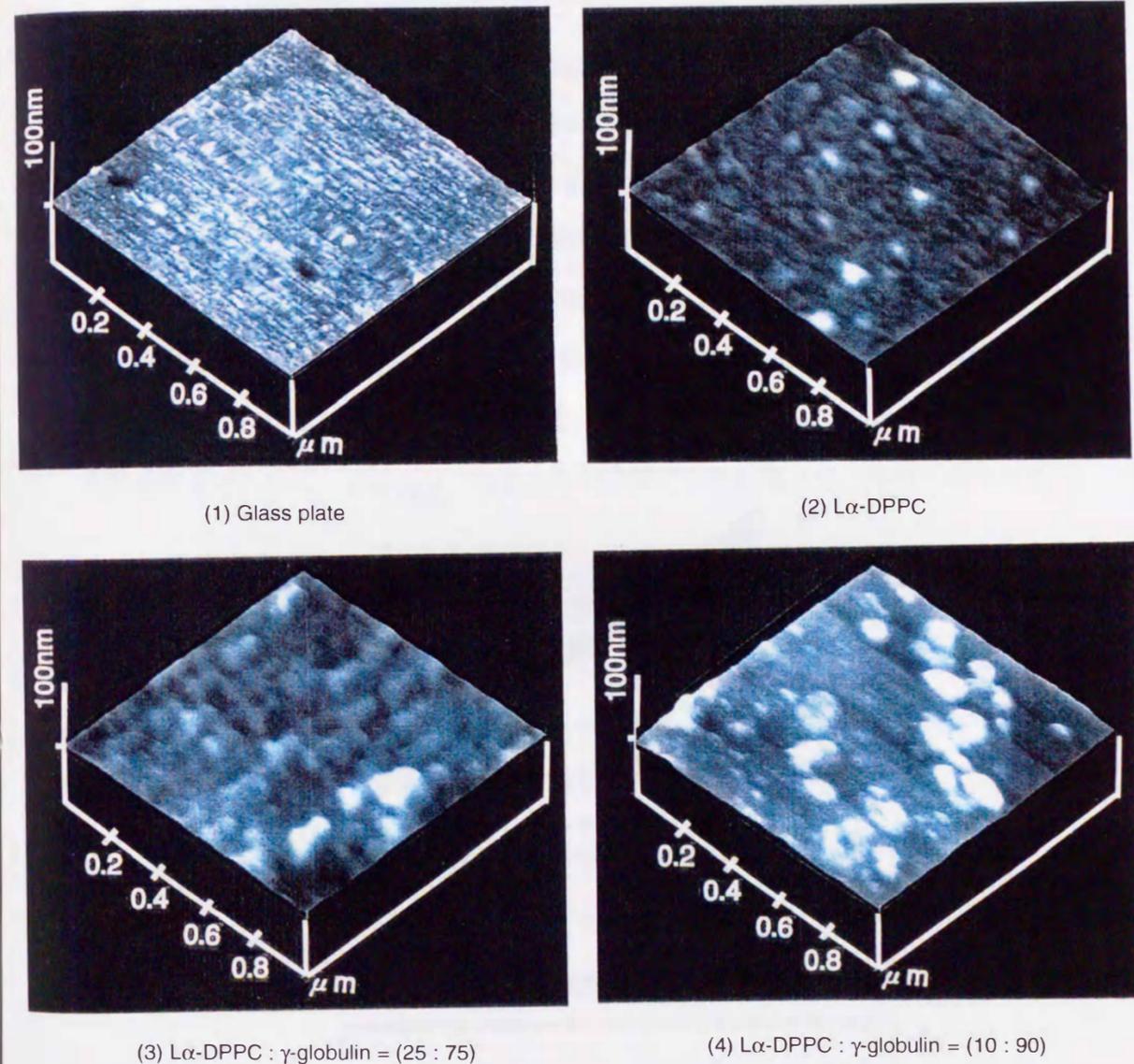


図4. 31 L α -DPPCと γ グロブリンを用いた単分子膜のAFM像 (Tapping mode in water)

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

実験室温20°Cにおける豚関節液と0.375wt% HA水溶液のせん断速度に対する粘度を図4. 32に示す。両液とも非ニュートン性を示し、含有ヒアルロン酸の分子量が高い豚関節液の粘度が高いせん断速度依存性を示している。せん断速度 2 s^{-1} の条件で共に $0.4\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 程度の粘度を示し、それ以上のせん断速度では0.375wt% HA水溶液が高粘度を示す。

LB膜を形成していないガラスを用い、豚関節液と0.375 wt% HA水溶液の潤滑性を比較した。経時的なストローク中最大摩擦係数の変化を図4. 33に示す。実験開始直後は共に摩擦係数0.01程度を示すが、HA水溶液潤滑条件では直ちに著しく上昇し、3分後からはt検定 ($p<0.01$) による統計的有意差を認める。

図4. 12に示すように、ヒアルロン酸の濃度を1.0wt%に上昇させることにより、摩擦は低下させうるが、特に本実験と同じ高荷重条件において関節液潤滑の摩擦係数には達し得ないことがわかる。

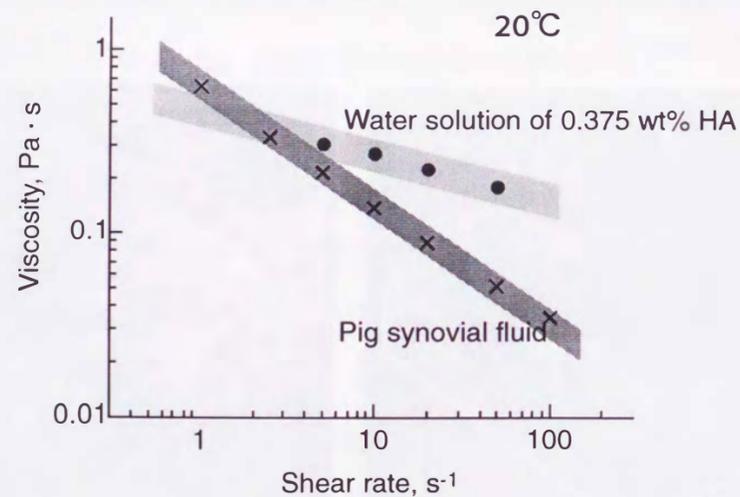


図4. 32 豚関節液とHA水溶液の粘度と非ニュートン性

4. 5. 3 $L\alpha$ -DPPCのLangmuir-Blodgett膜の潤滑効果

HA水溶液潤滑の条件において、 $L\alpha$ -DPPCのみのLB膜形成の潤滑への影響を観察した。経時的最大摩擦係数の変化を図4. 34に示す。2重膜1層ではLB膜を形成していない場

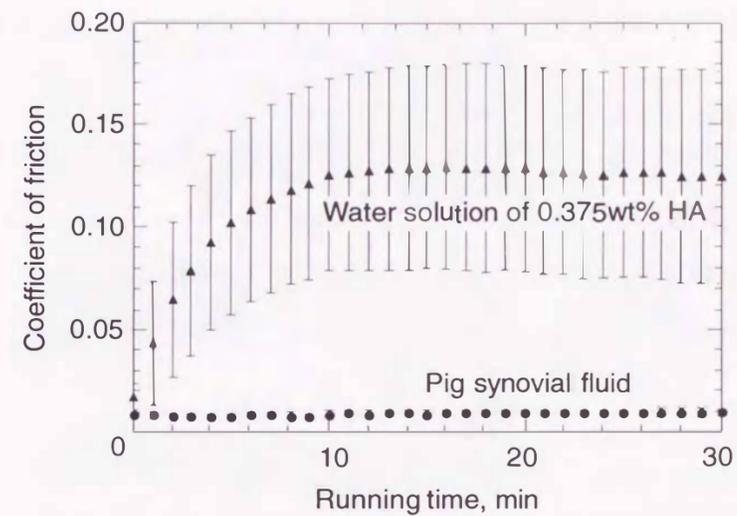


図4. 33 関節液とヒアルロン酸水溶液潤滑における軟骨とガラスの経時的摩擦挙動の変化 (N=6, Error bars indicate S. D.)

合と比較して有意な改善は認められないが、累積を増すことにより摩擦は低下安定し、2重膜5層および10層において有意な摩擦挙動の改善が認められる。

牛関節軟骨において、表面のリン脂質を有機溶媒により遊離させ、薄層クロマトグラ

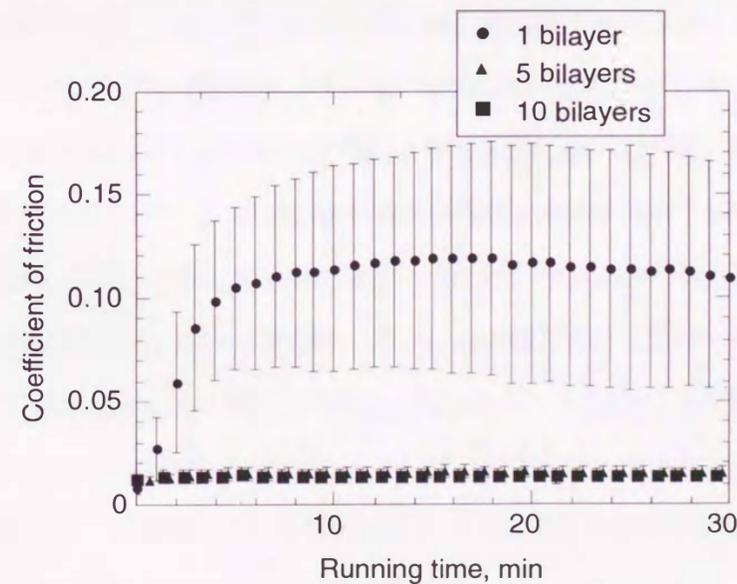


図4. 34 $L\alpha$ -DPPCのLB膜の境界潤滑効果 (N=6, Error bars indicate S. D.)

フィーにより定量することにより、対象軟骨表面に 6.8 ± 2.1 層の単分子膜に相当するリン脂質が存在することが報告されている⁽⁶⁾。

本実験において、30分後の2分子膜1層、5層、および10層における摩擦係数の平均値と標準偏差は、それぞれ 0.110 ± 0.054 、 0.015 ± 0.003 、 0.014 ± 0.003 で、関節液の値(0.009 ± 0.002)と比較し、すべての条件において有意水準0.01で高い結果となっている。他の生体膜と同様に、蛋白成分等のリン脂質以外の成分の境界潤滑膜形成への寄与が推察される。

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. 3項、図4. 18に示すようにHA水溶液潤滑の同摩擦実験系において、等重量濃度のアルブミンの添加に比して γ グロブリンの添加に有意な境界潤滑性を確認した。さらに、Swannら^{(5),(56),(57)}の報告した糖蛋白LGP-1画分やJay⁽⁷⁾によるPSLF画分と人血清由来のアルブミンと γ グロブリンのアミノ酸残基の分析の比較から、非極性残基グループの境界潤滑機能への関与が推察された。

関節液中において比較的濃度が高く非極性残基の比率が高い γ グロブリン画分も、軟骨表面に高密度で認められるリン脂質等の疎水基に非極性部分を会合する形態をとることが考えられる。この時、球状蛋白や糖蛋白の非極性アミノ酸グループは生体膜のように疎水基が内側に会合する膜構造に組み込まれ、図4. 35に示すように2分子膜を基本単位とする吸着膜を形成し、低摩擦に寄与する機構が推察される。軟骨表面におけるこのような生体膜は軟骨細胞や滑膜細胞の細胞膜等からの由来であることが推察され、Singerら⁽¹²⁷⁾の流動モザイクモデルが積層された形態を図示した。低摩擦を示した人血清由来の γ グロブリンの平均分子径は数十nmで、6~8nmのリン脂質2分子膜厚に対し、数層にもわたり非極性グループが会合し低摩擦性を維持していることが考えられる。この仮説に対し、 γ グロブリンとL α -DPPCの両成分が混在した境界潤滑膜モデルを作製し、その潤滑性を検討した。

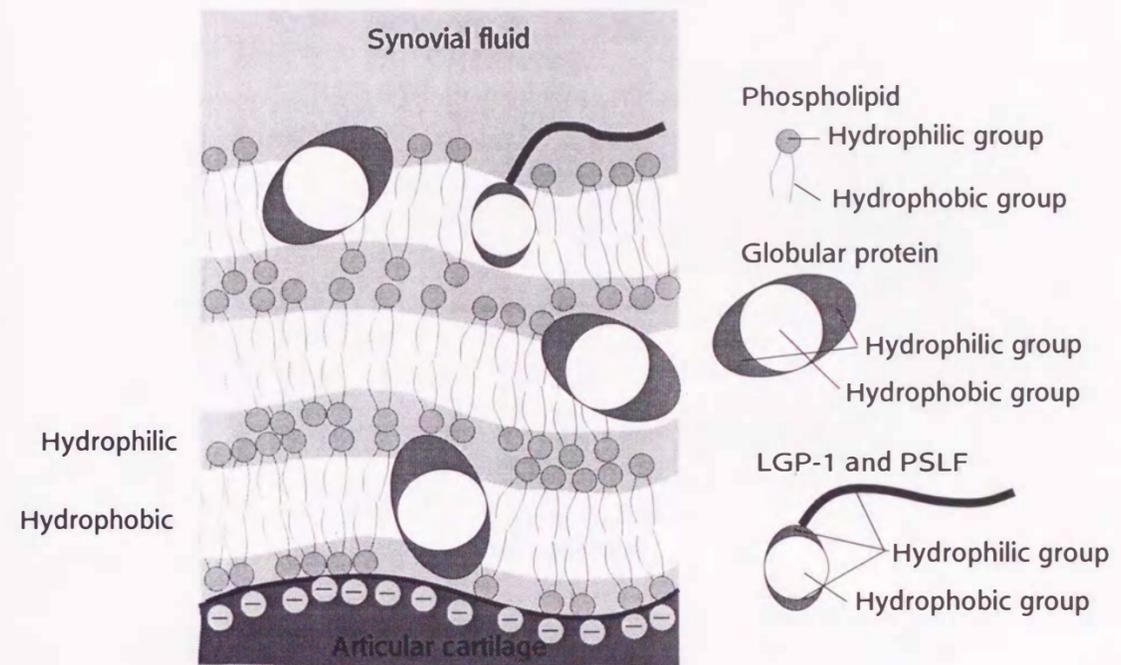


図4. 35 軟骨表面の境界潤滑モデル

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

L α -DPPCと γ グロブリン混合のLB 2重膜1層と10層における摩擦挙動の経時的変化を図4. 36に示す。 γ グロブリンを混在させることにより、表面膜のないガラスやL α -DPPCの2分子膜1層の条件と比較し、摩擦挙動に有意な改善が認められた。さらに、累積層数と膜中における γ グロブリンの含有量に依存して摩擦が低下安定する傾向を認める。

4. 3項において潤滑液中への生理的に高濃度での γ グロブリン添加により、同摩擦実験系において低摩擦を示したことから、ある程度の γ グロブリンが摩擦面に供給されることにより、低摩擦を維持できることがわかる。しかしながら、2重膜10層の条件では、L α -DPPCのみと γ グロブリンが混在するLB膜の条件では、摩擦係数に有意差は認められない。

次に、 γ グロブリンをガラスに面する第1膜形成の際にのみL α -DPPCとの各混合条件において用い、第2膜はL α -DPPCのみから成る2重膜1層を作製した。各混合条件にお

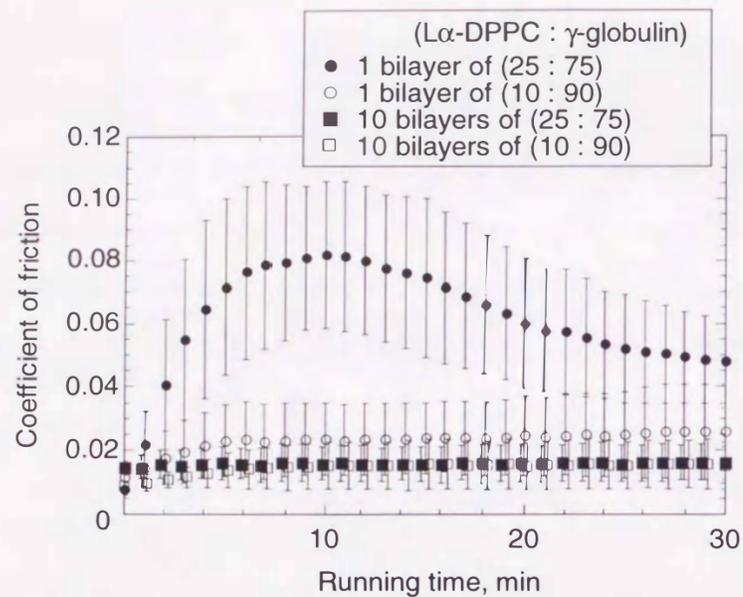


図4. 36 L α -DPPCと γ グロブリンのLB膜の境界潤滑性 (N=6, Error bars indicate S. D.)

ける経時的な摩擦挙動の変化を図4. 37に示す。各混合比において、混合膜を2重に積層した摩擦係数の結果（図4. 36）と比較し、有意な低下が認められる。さらに、 γ グロブリンを第1膜に90%含む条件では、関節液の摩擦係数との間に有意水準0.05においても統計的な差は認められない。このとき、LB膜に含まれるL α -DPPCと γ グロブリンの重量は、それぞれ $6.6 \times 10^{-8} \text{ g/mm}^2$ と $7.2 \times 10^{-8} \text{ g/mm}^2$ で、関節腔内の生理的濃度により十分形成可能な吸着膜であると考えられる。L α -DPPCの単分子膜を第2膜に形成することにより低摩擦を示す現象は、潤滑液であるHA水溶液に対してL α -DPPCの親水基が均一に並ぶことや混合2重膜において第2膜の γ グロブリンの安定性が低いことなどが予想されるが、さらに検討が必要と考えられる。

4. 5. 6 まとめ

軟骨とガラスの摩擦において、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液と比較し関節液は優れた潤滑性を示す。ヒアルロン酸ナトリウム水溶液潤滑条件において、ガラス表面のリン脂質（L α -DPPC）LB膜はその累積層数に依存して潤滑性を向上させ、2分子膜5層にお

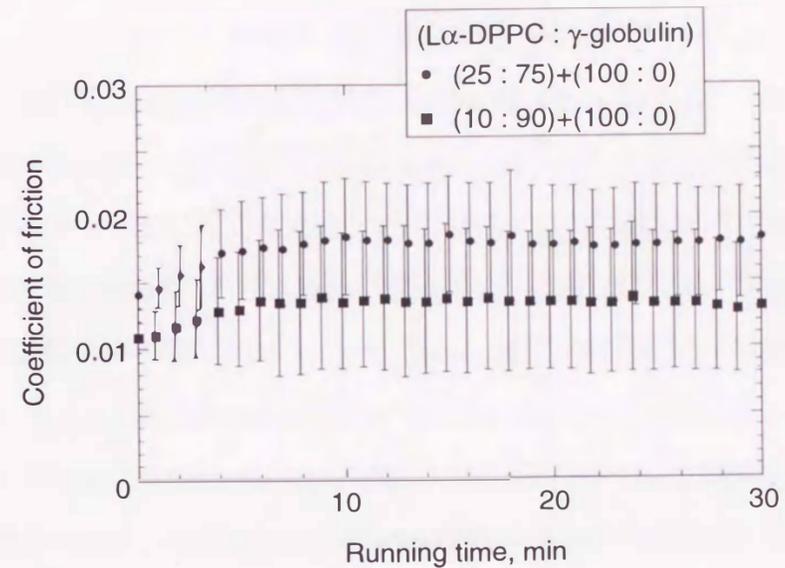


図4. 37 第1膜にL α -DPPCと γ グロブリンの混合膜と第2膜にL α -DPPCのみの単分子膜を形成したLB膜の境界潤滑性 (N=6, Error bars indicate S. D.)

いて安定した低摩擦を示す。L α -DPPCと γ グロブリンが混在するLB膜は、定量的に関節腔内の生理的濃度においても形成可能と考えられる微量な吸着により、関節液同様の安定した低摩擦を実現する。

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

臨床における膝および肩の関節疾患に対し、潤滑性の改善等を主な目的としてヒアルロン酸ナトリウム水溶液の投与が行われている。期待される潤滑効果は、先述したように、その増粘作用による流体潤滑膜形成の促進が主要であると考えられる。本節では、多モード適応潤滑の観点から、流体潤滑膜形成が困難であるシビアモードや荒廃退行した軟骨摩擦面において、境界潤滑膜形成を促進するための両親媒性成分ジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）リポソームと γ グロブリンの定量的投与効果を検討するため、振子摩擦試験を行った。

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. 4節の図4. 23(1)に示したように、豚肩関節における低荷重条件100Nでは両摩擦面間の形状適合性が低いことから、相対運動は不安定であり、スクイズアウトの速度も比較的高くなることが推察された。したがって、高荷重条件と比較し、その摩擦挙動は顕著に潤滑液粘度に依存しており、HA低濃度の条件においては摩擦面の局所的接触に起因する混合潤滑領域での摩擦力の増加、HA高濃度においては粘性抵抗の増加が推察された。

潤滑液粘度に依存した潤滑モードの変化が認められた100N負荷直後の条件において、界面活性剤処理が摩擦挙動におよぼす影響を確認した。HA濃度が0.2 g/dlの潤滑条件において、無処理の軟骨の組合せで振子摩擦試験を行った後に、同じ軟骨の組合せに界面活性剤処理を施し、再度摩擦試験を行った。摩擦挙動の変化を図4. 38に示す。界面活性剤処理により有意な摩擦係数の上昇が認められる。図4. 28に示したように、HA高濃度1.0 wt%および0.5 wt%の条件では、それぞれの同界面活性剤処理による摩擦係数の変化に共通した増減および有意差は認められない。しかしながら、HA濃度を0.2 g/dlに低下させることにより、全実験に共通して摩擦係数は上昇しており、統計的にも有意水準0.005 (t検定)において摩擦係数の上昇が認められた。先述したように、100Nの荷重条件は豚の体

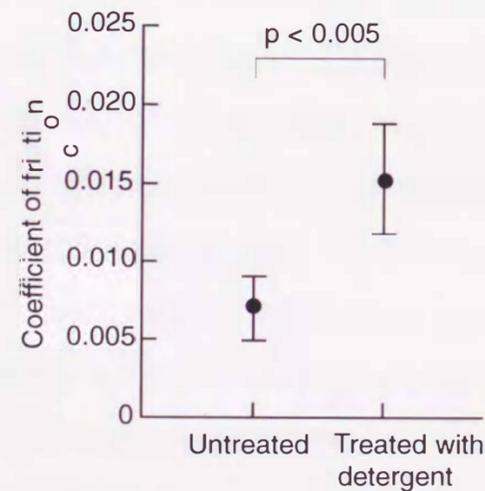


図4. 38 豚肩関節の摩擦挙動に及ぼす界面活性剤処理の影響
(The concentration of HA is 0.2 g/dl, N=60, Error bars indicate S.D.)

重から予想される生理的条件より、かなり低いとみなされ、比較的高濃度HA生理食塩水溶液では流体潤滑状態を維持できていることが推察される。したがって、摩擦面の吸着層の変化が摩擦挙動に影響を与えていないと考えられる。一方、0.2 g/dlの条件では粘度低下により流体膜形成能が低下し、境界潤滑モードが含まれる摩擦条件になっていると考えられ、界面活性剤処理による軟骨表面の変化が摩擦に影響を及ぼしたことが推察される。

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

図4. 38に示したHA生理食塩水溶液(0.2 g/dl)の条件の無処理と界面活性剤処理の実験を行った後、同軟骨試験片に生理食塩水中で30分間超音波振動を与え、再度、関節液潤滑により摩擦実験を行った。対照としての0.2 g/dl HA生理食塩水溶液潤滑による結果と共に図4. 39に示す。界面活性剤処理後の摩擦係数と比較し、同じHA生理食塩水溶液潤滑において有意な変化は認められないのに対し、関節液潤滑では有意水準0.005において低下が認められ、その値は 0.0087 ± 0.0016 であった。図4. 38の未処理の軟骨摩擦面における、HA生理食塩水溶液潤滑の60関節の摩擦係数と比較すると、有意水準0.05において差は認められず、HA以外の関節液成分の境界潤滑膜の修復と潤滑への寄与が推察される。

4. 6. 3 $L\alpha$ -DPPCリポソームの形態観察

$L\alpha$ -DPPCリポソーム(1.0 mg/dl)水溶液のネガティブ染色による透過電子顕微鏡像を図4. 40に示す。0.1~0.5 μ m径のリポソームの形成が確認される。

4. 6. 4 $L\alpha$ -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

HA生理食塩水溶液(0.2 g/dl)の条件の無処理と界面活性剤処理の実験を行った後、同軟骨試験片に生理食塩水中で30分間超音波振動を与え、再度、各成分を添加したHA生理食塩水溶液を摩擦面に供給し摩擦挙動への影響を観察した。 $L\alpha$ -DPPCリポソームと γ グロブリンの添加濃度に対する摩擦係数をそれぞれ図4. 41(1)と(2)に示す。無添加HA生

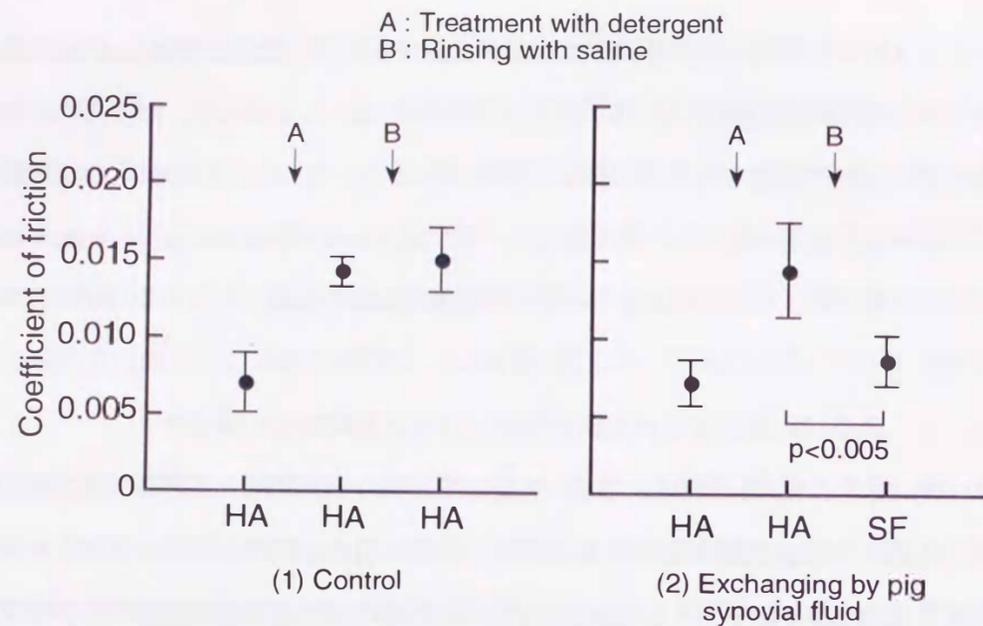


図4.39 界面活性剤処理した軟骨摩擦面における関節液の潤滑性 (N=6, Error bars indicate S. D.)

理食塩水溶液潤滑と比較し, $L\alpha$ -DPPCリポソーム添加においては, 0.01 g/dl以上の濃度条件において有意な摩擦係数の低下が認められ, その平均値は0.01程度を示す. γ グロブリン添加においても, 1.0 g/dl以上の濃度条件において有意な摩擦係数の低下が認められ, その平均値は $L\alpha$ -DPPC添加により低下した値と同様に0.01程度を示す. 4. 4. 8項にお

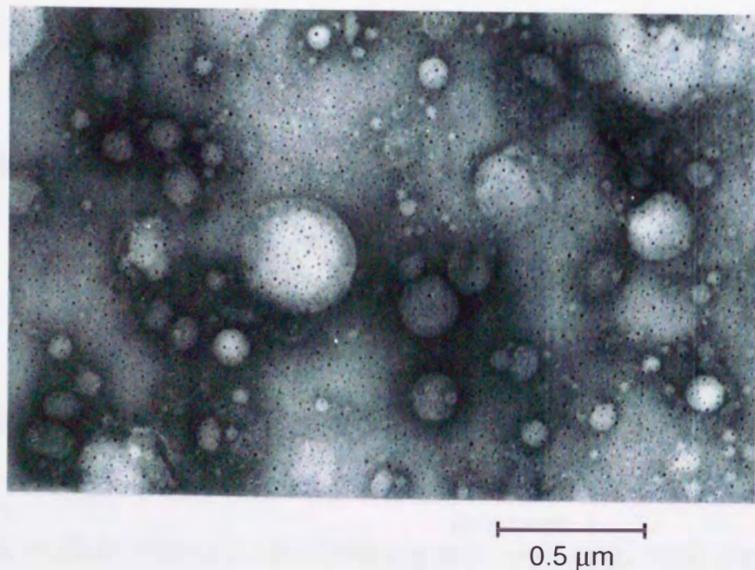


図4.40 ネガティブ染色による $L\alpha$ -DPPCリポソーム (1.0 mg/dl) の透過型電子顕微鏡像

いて, 生理的条件と同程度と見積もった $L\alpha$ -DPPC1.0mgの軟骨表面への塗布と γ グロブリン0.3 wt%のHA水溶液への添加では, 同界面活性剤処理した軟骨摩擦面において, 摩擦係数の低下は認められなかった. 本実験において, γ グロブリン0.3 g/dlにおいて摩擦係数の低下が認められず, 先の結果を支持するものになっている. しかしながら, $L\alpha$ -DPPCリポソーム0.01 g/dlの添加条件においては (潤滑液0.5mlに対して約0.05mg), リン脂質の生理的濃度 (0.019 g/dl) より低濃度であるにもかかわらず, 摩擦係数の低下が認められ, リポソーム調製による潤滑液への添加が効果的に境界潤滑膜形成に寄与していること

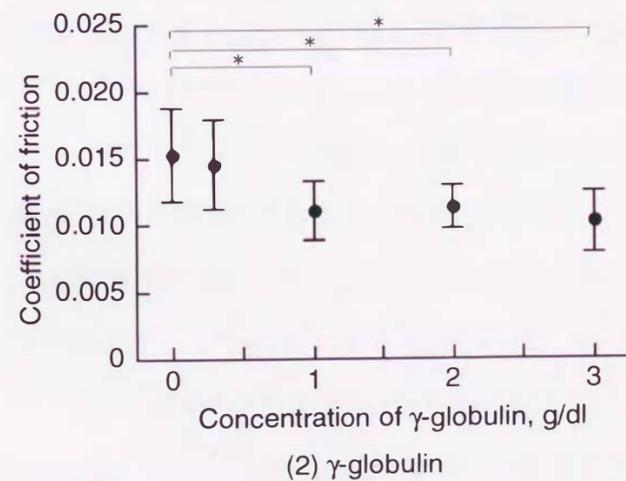
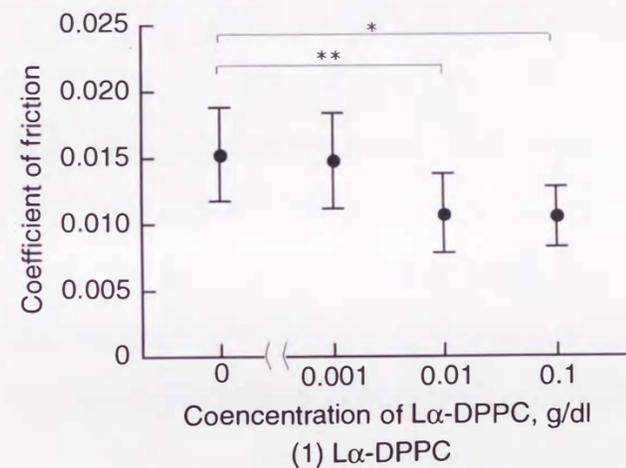


図4.41 界面活性剤処理された軟骨摩擦面における $L\alpha$ -DPPCリポソームと γ グロブリンの潤滑液への添加による潤滑効果 (N=6, Error bars indicate S. D., * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$)

が推察される。さらに、L α -DPPCは γ グロブリンと比較して、生理的にも低濃度において潤滑性の向上が認められるため、生体関節の境界潤滑機構において主要な役割を有していることが推察される。

しかしながら、摩擦係数の低下が認められたL α -DPPCと γ グロブリンの添加濃度条件において、その摩擦係数値の各相対関係に有意差は認められない。それらの添加条件は、未処理の軟骨摩擦面におけるHA生理食塩水溶液潤滑の条件や界面活性剤処理後の関節液潤滑の条件より高い値を示しており、HAとL α -DPPCおよびHAと γ グロブリンの組合せにおける境界潤滑性の限界を示唆しているようである。

次に、界面活性剤処理された軟骨摩擦面において、有意な摩擦挙動の改善が認められたL α -DPPCの0.01 g/dlと γ グロブリンの1.0 g/dlの両方をHA (0.2 g/dl) 生理食塩水溶液に添加し、界面活性剤処理した軟骨摩擦面における摩擦係数を測定した。図4. 42にHA生理食塩水溶液と豚関節液の条件と比較して示す。HA生理食塩水溶液の条件に対し有意な摩擦挙動の改善が認められるが、図4. 41に示す高濃度でのL α -DPPCと γ グロブリン添加の条件と同様に摩擦係数は0.01程度を示した。この値は界面活性剤処理した軟骨摩擦面における関節液潤滑の条件と有意水準0.05において高摩擦を示している。

前節において、軟骨に対するガラス面上のL α -DPPCと γ グロブリンの混在する2分子膜1層のLangmuir-Blodgett (LB) 膜がL α -DPPC単体による同LB膜より低摩擦を示したが、本実験系における潤滑液への添加ということでは、両成分が混在することによる潤滑への相乗効果は認められない。この現象は多重層(2分子膜10層)のLB膜においてL α -DPPC単体とL α -DPPCと γ グロブリンが混在する場合で摩擦係数が0.01から0.02の範囲で有意差が認められない現象と同様に、L α -DPPC単体においても軟骨表層のプロテオグリカンの直接接触を避けるに十分な吸着膜が形成されていれば、混合膜と同様な低摩擦を維持することを示唆している。しかしながら、関節液潤滑の摩擦係数はさらに低い摩擦係数を示し、他の境界潤滑性の微量成分^{(6),(7)}の関与を示唆していると考えられる。

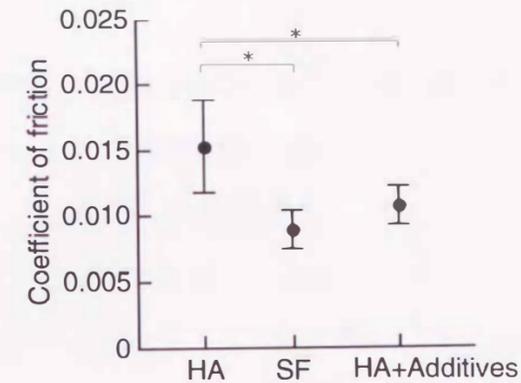


図4. 42 界面活性剤処理した軟骨摩擦面におけるL α -DPPC 0.01 g/dlと γ グロブリン 1.0 g/dlの潤滑液への添加による潤滑効果 (N=6, Error bars indicate S. D., *p < 0.005)

4. 6. 5 まとめ

界面活性剤処理した豚軟骨摩擦面の摩擦に対し、L α -DPPCリポソームと γ グロブリンを潤滑液へ添加することにより、以下のことが明らかとなった。

軟骨表面を界面活性剤処理することにより、混合潤滑条件において摩擦係数が上昇することを確認し、その表面吸着膜が除去された軟骨表面は、ある程度の濃度のL α -DPPCリポソーム、あるいは γ グロブリンの添加により境界潤滑性を回復することがわかった。しかしながら、その境界潤滑作用による摩擦係数は0.01に留まり、関節液より高い値を示した。

5章 結論

5章 結論

生体関節潤滑に関して実験的手法により、関節液と軟骨表層の構成成分であるヒアルロン酸と蛋白成分、及びリン脂質の役割を推察した。

ヒアルロン酸は、豚関節液の分析結果や鶏冠由来のヒアルロン酸ナトリウムの水溶液に対する粘度測定より、関節液中において工学的に粘度向上剤のような役割を有していることが示された。さらに、軟骨とガラスの摩擦試験での濃度増加に伴う低摩擦化傾向とヒアルロニダーゼによる消化の影響としての摩擦の増減や、軟骨同士の振子試験での低荷重負荷直後の条件における摩擦挙動のヒアルロン酸濃度への依存性等から、関節液の粘性が支配的な潤滑モードにおいて、ヒアルロン酸の存在が潤滑に影響を及ぼすことが示された。ヒアルロン酸の生化学的な構造形態を考慮すると、生体内環境で必然的に粘度を向上させるメカニズムを持つ合目的成分であり、歩行のような潤滑膜厚に履歴を伴うような潤滑モードにおいて、流体潤滑に寄与していることが考察される。

蛋白成分に関しては、両親媒性成分であるため、多くの糖や脂質との複合体が存在していると考えられるが、トリプシンを用いた摩擦実験において、軟骨表面の顕著な損傷が確認され、軟骨表層における保護膜的な役割が示された。これは組織学的に、細胞外マトリックスであるアグレカン凝集体が形成するゲル膜の構造蛋白や蛋白吸着膜に、酵素消化がおよんだためと推察される。さらに、硫酸塩析と電気泳動により分画された蛋白成分を、添加剤として関節液中の球状蛋白成分モデルとして用いた摩擦実験においては、他の画分と比較し有意に γ グロブリン画分に潤滑性が認められ、その高比率の非極性部分の存在が寄与していることが推察された。

リン脂質については、豚関節液の分析により主要成分と認められるジパルミトイルフォスファチジルコリン ($L\alpha$ -DPPC) に対し、境界潤滑膜形成能と潤滑液への添加効果を評価した。ガラス表面に作製したLB膜と軟骨の往復動摩擦試験において、その累積層数に依存した低摩擦性が示され、界面活性剤処理により表面吸着膜を失った軟骨同士の振子摩擦試験においても、その定量的な添加に依存して、境界潤滑性を示すことが確認された。

生体関節の摩擦係数についての多数の報告^{(24),(25),(26),(27),(28),(29),(30)}によると、その値はおおよ

そ0.003~0.03の範囲にあるようであるが、本研究における豚肩関節の振子摩擦試験において、揺動前の負荷時間の延長に対し、摩擦係数の上昇を認め、その値は0.07にも達する。この現象は軟骨の粘弾性変形によるヒステリシス損失が含まれていると考えられるが、人工材平面と軟骨の摩擦においても相対運動前の負荷時間による摩擦の上昇が報告されている⁽¹²⁵⁾。生体において全くの静止状態の継続というのは生理的に困難で、正座のような大腿脛骨面の形状適合性が低い状態の比較的静的接触が続いた後でも、運動に移行する際に、下肢の障害者の補償動作等のように、周囲の筋力によって一度は相対面が引き離され、関節液を呼び込む動作が入ることが考えられる。さらに、同振子摩擦実験における負荷直後の条件においても、ヒアルロン酸の濃度調整による粘度条件の変化に対し、生理的に低荷重と考えられる条件ではストライバック線図様の依存性を示し、高荷重条件では低荷重条件の最低値に近い0.005程度以下の値を安定して示し、粘度に依存する傾向は認められなかった。すなわち、低荷重における最適粘度以外の条件では、高荷重条件の方が低い摩擦係数を示した。したがって、神経病性関節症 (Charcot joint) ^{(129),(130)}において関節システム内のメカノセンサーにあたる神経系の機能停止により関節構造は著しく崩壊することからもわかるように、*in situ*における関節の潤滑機構は、関節周囲の軟部組織や筋肉と神経等により構築されているシステムが摩擦条件をも制御していることが推察された。つまり、*in situ*における生理的な摩擦条件は靭帯等の制御により限定された範囲を維持していることが考えられ、*in vitro*の実験系における一定荷重の摩擦形態では生体組織材料に対して過酷な物性評価になっていることが推察された。

弾性流体潤滑における解析的報告により、関節摩擦の大部分は流体を介した潤滑になっていることが指摘され、関節システムとしても流体膜形成が不能な作動条件を極力回避するように構成されていると予想されるが、本実験においては、分解酵素や界面活性剤を用いた生化学的消去法により、生体関節が持つ複数のフェイルセーフ的な機能の一つとして、蛋白成分とリン脂質による境界潤滑機能を考察した。

ガラス平面上に作製した γ グロブリンとL α -DPPCのLB膜と軟骨の往復動摩擦試験から、生理的にも微量の吸着膜により低摩擦状態が維持されることを指摘した。さらに、振

子摩擦試験においても、 γ グロブリン単体では生理的濃度において境界潤滑性は確認されなかったが、L α -DPPCをリポソームの形態で潤滑液に溶解することにより、生理的に低濃度での境界潤滑性を確認し、軟骨表面への吸着が示唆された。関節液中や軟骨表層では、蛋白成分やリン脂質の二分子膜から成る細胞膜のような生体膜が観察されており、本実験における界面活性剤を利用した実験手法は、軟骨表面の摩擦により引き剥がされた吸着膜が、関節液中の両親媒性成分により修復されうることを示唆している。

近年、臨床において膝や肩の変形性関節症に対し、ヒアルロン酸の投与が行われている。変形性関節症は、軟骨に異常な応力がかかるか、もしくは荷重を受ける軟骨自体の構造や潤滑性が異常をきたすことにより相乗的に進行する。ヒアルロン酸の投与目的は、その増粘効果による流体潤滑膜形成の促進が主要であると考えられる。しかしながら、多モード適応潤滑の観点からは、流体潤滑膜の維持が困難と考えられる荒廃退行した軟骨摩擦面に対しては、境界潤滑膜形成を促進する成分の投与がさらに効果的と考えられる。本研究で境界潤滑性の評価を行ったL α -DPPCや γ グロブリンをはじめ、他の微量吸着性成分のヒアルロン酸との付加的投与が、生体膜類似の軟骨表面吸着膜を形成し、ヒアルロン酸のみとは異なる機構において、協調的な潤滑効果を発現しうると考えられる。

文献

- (1) 例えば, Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D., *Molecular Biology of the Cell*, Third edition, Garland Publishing, (1994).
- (2) Gennis, R. B. (西島正弘 他訳), *生体膜*, シュプリンガー・フェアラーク東京, (1990), 31-78.
- (3) 池内・ほか3名, 円形弾性面の周期運動におけるスクイズ膜の研究, *機論*, 47-420, C(1981), 1046-1053.
- (4) Dowson, D. and Jin, Z. M., Micro-elastohydrodynamic lubrication of synovial joints, *Engng Med.*, 15, 2, (1986), 63-65.
- (5) Swann, D. A., Silver, F. H., Slayter, H. S., Stafford, W. and Shore, E., The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids, *Biochem. J.*, 225, (1985), 195-201.
- (6) B.A.Hills, Oligolamellar lubrication of joints by surface active phospholipid, *J. Rheumatology*, 16, 1, (1989), 82-91.
- (7) Jay, G. D., Characterization of a bovine synovial fluid lubricating factor, 1. Chemical, surface activity and lubricating properties, *Connective Tissue Res.*, 28, (1992), 71-88.
- (8) Williams, P. F., Powell, G. L. and LaBerge, M., Sliding friction analysis of phosphatidylcholine as a boundary lubricant for articular cartilage, *Proc. Instn. Mech. Engrs.*, 207, (1993), 59-66.

- (9) 武井経憲, 生体関節の変形の不思議, 潤滑, 31, 11, (1986), 769-774.
- (10) 笹田 直, 塚本行男, 馬淵清資, バイオトライボロジー, 産業図書, (1988), 60-61.
- (11) 小林千益, 米久保荘, 黒河内靖子, 関節軟骨の無定形最表層の関節表面擦過による変化, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 16, (1995), 337-340.
- (12) McCutchen, C. W., Physiological lubrication, Proc. Instn. Mech. Engrs., 181, Pt. 3J, (1966-67), 55-62.
- (13) 池内 健・岡 正典・森 美郎, 股関節におけるスクイーズ膜効果のシミュレーション, 機論, 55, 510 C編, (1989), 508-515.
- (14) Murakami, T., The lubrication in natural synovial joints and joint prostheses, JSME Intern. Journal, Series III, 33, 4, (1990), 465-474.
- (15) Murakami, T., Ohtsuki, N. and Higaki, H., The adaptive multimode lubrication in knee prostheses with compliant layer during walking motion, Thin Films in Tribology, Elsevier, (1993), 673-682.
- (16) Dowson, D., Modes of lubrication in human joints, Proc. Instn. Mech. Engrs., 181, Pt. 3J, (1966-67), 45-54.
- (17) 笹田 直, 関節における摩擦と潤滑, 潤滑, 23, 2, (1978), 79-84.
- (18) Ikeuchi, K., The role of synovial fluid in joint lubrication, Tribology series 30 lubricants and

- lubrication (Ed. D. Dowson), Elsevier, (1995), 65-71.
- (19) 例えば, 井上駿一, 広畑和志, 寺山和雄, 標準整形外科学, 医学書院, (1979), 139-244.
- (20) 馬渡正明, 杉岡洋一, 日垣秀彦, 村上輝夫, せん断ストレスによる人関節軟骨細胞でのIL-6の発現誘導, 機講論, 95-10, 4, (1995), 11-12.
- (21) Schneiderman, R., Keret, D. and Maroudas, A., Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study, J. Orthop. Res., 4, (1986), 393-408.
- (22) Hall, A. C., Urban, J. P. G. and Gehl, K. A., The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage, J. Orthop. Res., 9, (1991), 1-10.
- (23) Jones, E. S., Joint lubrication, Lancet, 1, (1936), 1043-1044.
- (24) Barnett, C. H. and Cobbold, A. F., Lubrication within living joints, J. Bone and Joint Surg., 44B, (1962), 662-674.
- (25) 笹田 直, 前沢伯彦, 生体膝関節の摩擦測定, 潤滑, 18, 12, (1973), 901-906.
- (26) Radin, E. L., Paul, I. L. and Pollock, D., Animal joint behaviour under excessive loading, Nature, 226, (1970), 554-555.
- (27) Clarke, I. C., Contini, R. and Kenedi, R. M., Friction and wear studies of articular cartilage - a scanning electron microscope study -, Trans. ASME J. Lub. Tech., 97, (1975), 358-368.

(28) O'Kelly, J., Unsworth, A., Dowson, D., Hall, D. and Wright, V., A study of the role of synovial fluid and its constituents in the friction and lubrication of human hip joints, *Eng. in Med.*, 7, (1978), 73-83.

(29) 馬淵清資, 森田真史, 塚本行男, 二見俊郎, 近藤 仁, 南沢育雄, 笹田 直, 振子法による成人股関節の摩擦測定, *整形外科基礎科学*, 8, (1981), 399-405.

(30) 塚本行男, ほか, 関節疾患と関節液—粘性・潤滑, *整形外科MOOK*, 32, (1984), 9-17.

(31) MacConail, M. A., The function of intra-articular fibrocartilages, with special reference to the knee and inferior radio-ulnar joints, *J. Anatomy*, 66, (1932), 210-227.

(32) Dintenfuss, L., Lubrication in synovial joints: A theoretical analysis, *J. Bone and Joint Surg.*, 45A, (1963), 1241-1256.

(33) Medley, J. B. and Dowson, D., Lubricating of elastic-isoviscous line contacts subject to cyclic time-varying loads and entrainment velocities, *ASLE Trans.*, 27, 3, (1984), 243-251.

(34) 文献(10) の70ページ.

(35) Charnley, J., The lubrication of animal joints in relation to surgical reconstruction by arthroplasty, *Ann. Rheum. Dis.*, 19, (1960), 10-19.

(36) 天児民和, 関節の潤滑性について, *久留米医学会雑誌*, 25, 5, (1962), 212-215.

(37) 福岡善平, 関節潤滑に関する実験的研究, *医学研究*, 34, 2, (1964), 24-34.

(38) 小林千益, 米久保荘, 関節軟骨表層 (superficial tangential zone) の形態のトポグラフィック的变化, 凍結走査電子顕微鏡による研究, *中部整災誌*, 36, (1993), 1217-1224.

(39) 小林千益, 米久保荘, 武井経憲, 凍結走査電子顕微鏡による関節軟骨の無定形最表層 (upper-most amorphous layer) の観察, *日整会誌*, 67, (1993), S1645.

(40) 笹田 直, 石川泰成, 池内 健, 固/液界面近傍における高粘度域, -関節潤滑機構に関連して-, *日本臨床バイオメカニクス学会予稿集*, 22, (1995), 56.

(41) McCutchen, C. W., Sponge-hydrostatic and Weeping Bearings, *Nature*, 184, (1959), 1284-1285

(42) McCutchen, C. W., The frictional properties of animal joints, *Wear*, 5, (1961), 1-17.

(43) McCutchen, C. W., Why did nature make synovial fluid slimy?, *Clin. Orthop.*, 64, (1969), 18.

(44) Lewis, P. R. and McCutchen, C. W., Experimental evidence for weeping lubrication in mammalian joints, *Nature*, 184, (1959), 1285.

(45) Hou, J. S., Mow, V. C., Lai, W. M. and Holmes, M. H., An analysis of the squeeze-film lubrication mechanism for articular cartilage, *J. Biomechanics*, 25, 3, (1992), 247-259.

(46) Jin, Z. M., Dowson, D. and Fisher, The effect of porosity of articular cartilage on the lubrication of a normal human hip joint, *J., Proc. Instn. Mech. Engrs., part H*, 206, (1992), 117-124.

- (47) 池内 健, 生体関節・人工関節とEHL, トライボロジスト, 39, 4, (1994), 333-336.
- (48) Roberts, B. J., Unsworth, A. and Mian, N., Modes of lubrication in human hip joints, *Ann Rheum Dis*, 41, (1982), 217-224.
- (49) 近藤 仁, 正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究, -とくに粘性変化に関する因子と潤滑への影響について-, 北里医学, 10, (1980), 485-498.
- (50) 馬淵清資, 藤江裕道, 森田真史, 塚本行男, 小原健男, 山口敏二郎, 関節潤滑におけるヒアルロン酸の役割, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 14, (1992), 233-236.
- (51) 馬淵清資, 塚本行男, 小原健男, 山口敏二郎, 関節の潤滑に及ぼすヒアルロン酸投与の効果, 生体材料, 11, 1, (1993), 20-26.
- (52) 小原健男, 磯 貴子, 山口敏二郎, 塚本行男, 馬淵清資, 実験的に作製した変性関節の摩擦係数とヒアルロン酸添加の潤滑効果, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 16, (1995), 357-361.
- (53) Linn, F. C., Lubrication of animal joints, 1. The arthrotripsometer, *J. Bone and Joint Surg.*, 49-A, 6, (1967), 1079-1098.
- (54) Linn, F. C., Lubrication of animal joints, 2. The mechanism, *J. Biomechanics*, 1, (1968), 193-205.
- (55) Linn, F. C. and Radin, E. L., Lubrication of animal joints, 3. The effect of certain chemical alterations of the cartilage and lubricant, *Arthritis and Rheumatism*, 11, 5, (1968), 674-682.

- (56) Swann, D. A., Hendren, R. B., Radin, E. L., Sotman, S. L. and Duda, E. A., The lubricating activity of synovial fluid glycoproteins, *Arth. Rheum.*, 24, 1, (1981), 22-30.
- (57) Swann, D. A., Slayter, H. S. and Silver, F. H., The molecular structure of lubricating glycoprotein-1, the boundary lubricant for articular cartilage, *J. Biol. Chem.*, 256, (1981), 5921-5925.
- (58) 近間英明, 関節潤滑に関する実験的研究—関節液蛋白およびヒアルロン酸の役割—, 日整会誌, 59, (1985), 559-572.
- (59) Bole, G. G., Synovial fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 5, 6, (1962), 589-601.
- (60) Hills, B. A. and Butler, B. D., Surfactants identified in synovial fluid and their ability to act as boundary lubricants, *Ann. Rheum. Dis.*, 43, (1984), 641-648.
- (61) Hills, B. A. and Butler, B. D., Phospholipids identified on the pericardium and their ability to impart boundary lubrication, *Ann. Biomed. Engng.*, 13, (1985), 573-586.
- (62) 日垣秀彦・村上輝夫・林 和生・中川 悟・杉岡洋一, 軟骨摩擦面に対する人工骨頭材料の摩擦摩耗特性の評価, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 15, (1993), 217-220.
- (63) 日垣秀彦, 村上輝夫, 関節潤滑における関節液と軟骨表層の構成成分の役割 (第2報) -蛋白成分の境界潤滑性-, トライボロジスト, 40, 7, (1995), 598-604.
- Higaki, H., Murakami, Role of constituents in synovial fluid and surface layer of the articular cartilage in joint lubrication (Part 2) -Boundary lubricating ability of proteins-, *Jap. J. Tribology*,

40, 7, (1996).

(64) 日垣秀彦, 村上輝夫, 関節潤滑における関節液と軟骨表層の構成成分の役割 (第1報) -酵素消化による実験的評価-, トライボロジスト, 39, 7, (1994), 625-632.

Higaki, H., Murakami, Role of constituents in synovial fluid and surface layer of the articular cartilage in joint lubrication (Part 1) -Experimental study in application of enzyme digestion-, Jap. J. Tribology, 39, 7, (1995), 859-869.

(65) 日垣秀彦, 村上輝夫, 安藤博文, 中西義孝, 関節潤滑における蛋白成分の役割 (第1報) -境界潤滑性の実験的評価-, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 16, (1995), 369-374.

(66) Higaki, H., Murakami, T. and Nakanishi, Y., Lubricating ability of constituents in synovial fluid and articular cartilage, Proc. 4th China-Japan-USA-Singapore Conf. Biomechanics, 154-157.

(67) 日垣秀彦, 村上輝夫, 中西義孝, 生体関節における蛋白成分とリン脂質の境界潤滑作用, 日本機械学会論文集, 61, 588 C編, (1995), 3396-3401.

(68) Higaki, H. and Murakami, T., The boundary lubricating ability of proteins in natural joints, Proc. Intern. Trib. Conf. Yokohama, to be published in 1996.

(69) 日垣秀彦, 村上輝夫, 中西義孝, Langmuir-Blodgettにより作成した軟骨表面境界潤滑膜モデルの潤滑性能, 日本機械学会論文集, 掲載予定.

(70) 日垣秀彦, 村上輝夫, 中西義孝, 関節潤滑におけるジバルミトイルフォスファチジルコリンリポソームとγグロブリン投与による境界潤滑膜形成の効果, 日本機械学会論文集,

掲載予定.

(71) Jones, I. L., Klamfeldt, A. and Sandstrom, T., The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro, Clin. Orthop., 165, (1982), 283-289.

(72) Sah, R. L. Y., Kim, Y. J., Doong, J. Y. H., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H. K. and Sandy, J. D., Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression, J. Orthop. Res., 7, (1989), 619.

(73) Gray, M. L., Pizzanelli, A. M., Grodzinsky, A. J. and Lee, R. C., Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response, J. Orthop. Res., 6, (1988), 777-792.

(74) Mow, V. C., Bachrach, N. M., Setton, L. A. and Guilak, F., Stress, strain, pressure and flow fields in articular cartilage and chondrocytes, Cell Mechanics and Cellular Engineering, Springer-Verlag, (1994), 345-379.

(75) Mow, V. C., Ratcliffe, A. and Poole, A. R., Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures, Biomaterials, 13, 2, (1992), 67-97.

(76) Rosenberg, L., Hellmann, W. and Kleischmidt, A. K., Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage, J. Biol. Chem., 250, (1975), 1877-1883.

(77) Thyberg, J., Lohmander, S. and Hinegard, d., Proteoglycans of hyaline cartilage, Electron microscopic studies on isolated molecules, Biochem. J., 151, (1975), 157-166.

(78) Heinegard, D., Lohmander, S. and Thyberg, J., Cartilage proteoglycan aggregates, Electron - microscopic studies of native and fragmented molecules, *Biochem. J.*, 175, (1978), 913-919.

(79) Kimura, J. H., Osdoby, P., Caplan, A. J. and Hascall, V. C., Electron microscopic and biochemical studies of proteoglycan polydispersity in chick limb bud chondrocyte cultures, *J. Biol. Chem.*, 253, (1978), 4721-4729.

(80) Hascall, G. K., Cartilage proteoglycans : composition of sectioned and spread whole molecules, *J. Ultrastruct. Res.*, 70, (1980), 369-375.

(81) Hardingham, T., Proteoglycans : their structure, interactions and molecular organization in cartilage, *Biochem. Soc. Trans.*, 9, 6, (1981), 489-497.

(82) Hascall, V. C. and Lowther, D. A., Components of the organic matrix : proteoglycans, *Biological Mineralization and Demineralization*, Springer-Verlag, (1982), 179-198.

(83) Buckwalter, J. A. and Rosenberg, L. C., Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans, Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate - rich region of proteoglycan subunit core protein, *J. Biol. Chem.*, 257, (1982), 9830-9839.

(84) Hunziker, E. B. and Schenk, R. K., Cartilage ultrastructure after high pressure freezing, freeze substitution, and low temperature embedding. 2. Intercellular matrix ultrastructure-preservation of proteoglycans in their native state, *J. Cell Biol.*, 98, (1984), 277-282.

(85) Toole, B. P., Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation, *Cell biology of extracellular matrix*, 2nd ed., Plenum Press, (1991), 305-341.

(86) Kirk, T. B., Wilson, A. S. and Stachowiak, G. W., The effects of dehydration on the surface morphology of articular cartilage, *J. Orthop. Rheum.*, 6, (1993), 75-80.

(87) Clarke, I. C., Articular cartilage : A review and scanning electron microscope study, 1. The interterritorial fibrillar architecture, *J. Bone and Joint Surg.*, 53B, 4, (1971), 732-750.

(88) Prehm, P., Hyaluronate is synthesized at plasma membranes, *Biochem. J.*, 220, (1984), 597-600.

(89) 例えば, K. E. Van Holde, *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall Tokyo, (1971), 141-157.

(90) Laurent, T. C., Ryan, M. and Pietruszkewics, A., Fraction of hyaluronic acid, The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body, *Biochim. Biophys. Acta.*, 42, (1960), 476-485.

(91) Yanaki, T. and Yamaguchi, T., Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition, 1. Molecular-weight dependence, *Biopolymers*, 30, (1990), 415-425.

(92) Yanaki, T. and Yamaguchi, T., Shear-rate dependence of the intrinsic viscosity of sodium hyaluronate in 0.2M sodium chloride solution, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 8, (1994), 1651-1654.

(93) Fixman, M., Polymer dynamics : Non-Newtonian intrinsic viscosity, *J. Chem. Phys.*, 45, (1966), 793-803.

(94) 文献 (10) の40-41ページ.

(95) Rabinowitz, J. L., Gregg, J. R. and Nixon, J. E., Lipid composition of the tissues of human knee joints, 2. Synovial fluid in trauma, *Clin. Orthop.*, 190, (1983), 292-298.

(96) Stanton, T. E., Boundary lubrication in engineering practice, *The Engineer*, 29, (1923), 678-680.

(97) Tsukamoto, Y., Mabuchi, K., Futami, T. and Kubotera, D., Motion of the bipolar hip prosthesis components, *Acta. Orthop. Scand.* 63, (1992), 648-652.

(98) Harkins, W. D. and Anderson, T. F., 1. A simple accurate film balance of the vertical type for biological and chemical work, and a theoretical and experimental comparison with the horizontal type. 2. Tight packing of a monolayer by ions, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, (1937), 2189-2197.

(99) Bangham, A. D. and Horne, R. W., Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.*, 8, (1964), 660-668.

(100) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13, (1965), 238-252.

(101) 寺田 弘, 吉村哲郎, リポソーム, シュプリンガー・フェアラーク東京, (1992), 60-96.

(102) Johnson, S. M., Bangham, A. D., Hill, M. W. and Korn, E. D., Single bilayer liposomes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 233, (1971), 820-826.

(103) Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B. E. and Vail, W. J., Membrane fusion and

molecular segregation in phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta.*, 352, (1974), 10-28.

(104) Wiessner, J. H., Mar, H., Baskin, D. G. and Hwang, K. J., Peptide-carrier interaction : Induction of liposome fusion and aggregation by insulin, *J. Pharmaceutical sciences*, 75, 3, (1986), 259-263.

(105) Chappuis, J., Sherman, I. A. and Neumann, A. W., Surface tension of animal cartilage as it relates to friction in joints, *Ann. Biomed. Eng.*, 11 (1983) 435-449.

(106) Norde, W. and Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.*, 66, (1978), 266-276.

(107) 中川 悟・林 和生・大賀正義・上野山和秀・松口信行・杉岡洋一・豊永敏宏・金丸孝昭, アルミナセラミックス及びCoCrMo合金製人工骨頭による犬臼蓋軟骨摩耗, *整形外科と災害外科*, 37, 4 (1989) 1816-1820.

(108) S. Nakagawa, K. Kohashi, K. Hayashi & Y. Sugioka : *Bioceramics*, 6 (1993) , 295-298.

(109) McCutchen, C. W., The frictional properties of animal joints, *Wear*, 5, (1962), 1-17.

(110) Walker, P. S., Dowson, D., Longfield, M. D. and Wright, V., Boosted lubrication in synovial joints by fluid entrapment and enrichment, *Ann. Rheum. Dis.*, 27, (1968), 512-520.

(111) Walker, P. S., Sikorski, J., Dowson, D., Longfield, M. D. and Wright, V. and Buckley, T., Behaviour of synovial fluid on surfaces of articular cartilage, A scanning electron microscope study, *Ann. Rheum. Dis.*, 28, (1969), 1-14.

(112) Armstrong, D. E. and Chesters, G., Properties of protein-bentonite complexes as influenced by equilibration conditions, *Soil Science*, 98, (1964), 39-52.

(113) Bull, H. B., Adsorption of bovine serum albumin on glass, *Biochem. Biophys. Acta*, 19, (1956), 464-471.

(114) Streicher, R. M., Schön, R. and Semlitsch, M., Untersuchung des tribologischen Verhaltens von Metall/Metall-Kombinationen für künstliche Hüftgelenke, *Biomed. Technik*, 35, 5, (1990), 107-111.

(115) Streicher, R. M., Semlitsch, M., Schön, R. and Weber, H., Metal on metal articulation for artificial hip joints : Laboratory study and clinical results, *J. Engng. Med.*, to be published in 1996.

(116) Semlitsch, M. and Willert, H. G., Clinical wear behaviour of UHMW polyethylene cups paired with metal and ceramic ball heads in comparison to metal on metal pairings of hip joint replacements, *J. Engng. Med.*, to be published in 1996.

(117) 文献(10)の123-125ページ.

(118) Ruoslahti, E., Structure and biology of proteoglycans, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 4, (1988), 229-255.

(119) Kjellen, L. and Lindahl, U., Proteoglycans : structures and interactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 60, (1991), 443-475.

(120) Hascall, V. C., Heinegard, D. K. and Wight, T. N., Proteoglycans : metabolism and

pathology, *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd ed., Plenum Press, (1991), 149-176.

(121) Hardingham, T. E. and Fosang, A. J., Proteoglycans : many forms and many functions, *FASEB J.*, 6, (1992), 861-870.

(122) Davis, W. H., Lee, S. L. and Sokoloff, L., A proposed model of boundary lubrication by synovial fluid : Structuring of boundary water, *Trans. ASME, J. Biomech. Engng.*, 101, (1979), 185-192.

(123) Davis, W. H., Lee, S. L. and Sokoloff, L., Boundary lubricating ability of synovial fluid in degenerative joint disease, *Arthritis and Rheumatism*, 21, 7, (1987), 754-760.

(124) 日本化学会編, コロイド科学, 東京化学同人, (1996), 209-212.

(125) Forster, H., Fisher, J., Dowson, D. and Wright, V., The effect of stationary loading on the friction and boundary lubrication of articular cartilage in the mixed lubrication regime, *Proc. 22nd Leeds-Lyon Symp. Tribology*, to be published in 1996.

(126) Kirk, T. B., Wilson, A. S. and Stachowiak, G. W., The morphology and composition of the superficial zone of mammalian articular cartilage, *J. Orthop. Rheum.*, 6, (1993), 21-28.

(127) Singer, S. J. and Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membrane, *Science*, 175, (1972), 720-731.

(128) 阿部康次, 土田英俊, 高分子と細胞膜の相互作用, 共立出版, (1992), 1-3.

(129) 例えば, 文献(19)の175-176ページ.

(130) Xu, D. Y., Cao, L. B., Liu, C., Zhan, A. L. and Feng, W. H., Neuroarthropathy. Clinico-radiologic analysis of 115 cases, Chin. Med. J. Engl., 105, 10, (1992), 860-865.

謝辞

本論文を終えるにあたり終始懇切丁寧なる御指導御鞭撻を賜り, 格別の御配慮にあづかった九州大学村上輝夫教授に厚く御礼を申し上げます. 本研究をまとめるにあたり九州大学工学部梶山千里教授, 市丸和徳教授, 山本雄二教授には貴重な御教示を数多く賜り, 深甚なる謝意を表します.

本研究の一部は九州大学医学部整形外科教室との共同研究によるもので, 懇切丁寧なる御指導をいただいた杉岡洋一総長, 林和生助教授, 三浦裕正講師, 馬渡正明氏, 中川悟氏に深甚なる謝意を表します. 実験の遂行にあたり貴重な御教示を賜りました九州大学工学部高原淳助教授, 杉村丈一助教授に厚く御礼申し上げます.

さらに, 試料を提供して下さった福岡市食肉衛生検査所, 生化学工業株式会社, 京セラ株式会社, ならびに瑞穂医科工業株式会社の関係各位, 本研究の遂行にあたり御支援をいただいた九州大学工学部機械系設計グループと九州大学医学部整形外科教室のみなさまに深く感謝いたします.

