

生体膜類似構造を有するMPCの表面処理による人工関節弛緩防止に関する基礎的研究

東京大学医学部整形外科助教授
高 取 吉 雄

1. 研究の背景および目的

人工股関節手術は、変形性股関節症・特発性大腿骨頭壊死・関節リウマチ・外傷等で役割を果たせなくなった股関節機能を回復させる手術として既に確立された治療法であるが、術後に生じる弛みは、その長期予後を決定する最大の合併症である。弛みは、関節摺動面を構成するポリエチレン(PE)の摩耗粉を貪食したマクロファージ(MΦ)が破骨細胞の活性化を介して人工関節周囲の骨吸収を惹起する結果として発生する。

我々は、摺動面の潤滑性を改善し、かつ摩耗粉による細胞系の活性化を抑制すればこの弛みを阻止できると考え、生体適合性高分子材料・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーをナノスケール(100-150nm)で光学的にグラフト(MPC処理)したPE表面を創製した(現在特許申請中)。MPCポリマーは、生体細胞膜外膜と同様、ホスホリルコリン基を有するため生体内での異物反応を回避できると考えられており、この特性を生かした血管ステント、カテーテル、人工肺は、すでに厚生労働省、U.S. Food and Drug Administration (FDA) 等の認可を受け国内外で臨床応用されている。申請時までのパイロットスタディでは、1) ポリエチレン表面をMPCポリマー処理すると関節摺動面の摩擦が1/6に減少すること、2) 回転揺動摩耗試験装置を用いた実験ではMPCポリマー

処理したライナーの摩耗が有意に低減し、その効果は試験終了時(100万サイクル)まで持続すること、3) MPCの微小粉はマクロファージによる貪食をうけがたいこと、が明らかになっており、既に学会等で報告している。本研究においては、臨床応用に必要な基礎検討として、以下の2に示す項目に関する検討を行った。

2. 研究の内容および結果

① MPCポリマー処理がライナーの摩耗に与える影響

生体内の環境を再現し摩擦特性と長期のポリマー処理効果を判定するため、フィンセラミックセンター(愛知県名古屋市)の12連式股関節シミュレーターを用い500万サイクルの連続運転を行った。MPCポリマー処理したライナーと骨頭間での 1) ライナーの摩耗量、2) ライナーの表面性状の変化、を観察した。

1) ライナーの摩耗量

50万サイクルごとにライナーを回収し、その重量変化を計測して摩耗量を解析した。未処理PEライナーは試験開始直後より重量の減少を続け、500万サイクルで90.14±23.56mgの重量減少を示した。未処理クロスリンクポリエチレン(CLPE)は、試験開始直後こそライナーの含水量が摩耗量を上回り重量増を示したものの、150万サイクル

以降は摩耗量が含水量を上回って重量減に転じ、最終的に 16.31 ± 5.68 mgの重量減少を示した。これに対し、表面をMPC処理したCLPEライナー(MPC+CLPE)では、試験終了時まで一貫して含水量が摩耗量を上回り重量増加を続け、最終的に 6.04 ± 1.45 mgの重量増加を示した。

2) ライナーの表面性状の解析

試験終了後のライナー表面を、三次元解析装置で計測すると、未処理PE、未処理CLPEでは顕著な摩耗が見られたのに対し、MPC+CLPEではほとんど摩耗が見られなかった。さらに、ライナー表面をSEMで観察すると、未処理PE、未処理CLPEでは製品加工の際に生じるマシンマークが消失していたが、MPC+CLPEでは残存していた。また、試験終了後のMPC+CLPE表面をX-ray photoelectron spectroscopy(XPS)で解析すると、MPCユニットのP、Nが検出され、MPC処理効果が残存していることが確認できた。

② MPC微小粉が骨吸収に与える影響

弛みの主因とされる、直径約500nmのナノ微粒子表面をMPCポリマーで被覆したMPC微粒子を作製し、以下の *in vitro* osteolysis model の実験系に用いた。*in vitro* osteolysis model の実験系では、これらの粒子および未処理微粒子をJ774.1細胞(マウス・マクロファージ細胞株)に暴露して24時間後に培養上清を回収し、これらの溶液を conditioned medium として検討を行った。

1) 骨吸収を誘導するサイトカインおよびプロスタグランジンの誘導能

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法及び enzyme immunoas-

say (EIA) 法を用い、conditioned medium 中のTNF- α 、IL-1 α 、IL-6、PGE₂濃度を測定した。この結果、未処理の微粒子を暴露した群では、溶液のみを暴露した対照群と比し、4~20倍の濃度上昇を示したが、MPC微粒子を暴露した群ではこの濃度上昇が見られず、対照群と有意な差が見られなかった。

2) 骨芽細胞でのRANKLの発現の検討

conditioned medium 存在下で培養したマウス骨芽細胞からRNAを抽出した。これを用いてRT-PCR, real time PCRを行いreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の発現を調べた。この結果、未処理微粒子を暴露した群ではRANKLの発現が強力に誘導されたのに対し、MPC微粒子を暴露した群ではこれらは全く誘導されなかった。

3) 共存培養系における破骨細胞形成能および骨吸収能の測定

conditioned medium 存在下でマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養を行い、破骨細胞を特異的に染色するtartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色陽性の多核細胞数を計測し、破骨細胞形成能を測定した。この結果、未処理の微粒子を暴露した群では、溶液のみを暴露した対照群の約7倍の破骨細胞を形成したのに対し、MPC微粒子を暴露した群では対照群と有意な差が見られなかった。

4) 抗体・阻害剤による抑制実験

さらに3)と同様の実験系を用い、抗サイトカイン抗体(TNF- α 、IL-1 α 、IL-6抗体)、RANKLの阻害剤osteoprotegerin(OPG)、cyclooxygenase-2(COX-2)の抑制剤celecoxibを用いた抑制実験を行い、破骨細

胞形成能を観察したところ、全ての因子で破骨細胞形成抑制効果が見られた。

5) マウス in vivo osteolysis model

による検討

MPC処理または未処理微粒子をマウスの頭蓋骨外側の皮質骨上に移植し、7日後に頭蓋骨を採取した。これを固定・脱灰した後、TRAP染色を行い、骨吸収の有無を観察した。この結果、未処理微粒子を移植した群では強力に骨吸収が誘導されたが、MPC微粒子を移植した群では誘導されなかった。

3. 研究の成果

今回の研究は、人工股関節摺動面 PE 表面のMPCナノ表面処理が弛みの阻止に与える影響について、生体工学的、分子骨代謝学的に検討したものである。股関節シミュレーターを用いた生体工学的評価では、MPCナノ表面処理により関節摺動面の摩擦と摩耗が著明に抑制されること、その効果は500万サイクル終了時にも残存することが明らかになった。また、マウス in vitro/osteolysis model を用いた分子骨代謝学的検討では、MPCのナノ微小粉が骨吸収を誘導しないことが明らかとなった。以上の結果は、人工股関節摺動面のMPC処理は弛みの主因となるPE摩耗粉の産生を著減させること、かりにMPCが摩耗粉となってもそれ自体は骨吸収を誘導しないことを意味しており、人工股関節の弛みを阻止し、寿命を飛躍的に延長させる画期的な新技術として実用化が期待できる。

4. 本研究成果に関連した研究発表

- 1) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、丸山典夫、黒田大介、塙隆夫、松下富春。
MPCポリマー処理の摩擦特性に対す

る影響—人工関節への応用に関する検討—。第24回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2002.11.29-30

- 2) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、丸山典夫、黒田大介、塙隆夫、松下富春。生体適合性MPCポリマーの人工関節への適用—弛みの抑制効果—第33回人工関節学会、大分、2003.2.21-22
- 3) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦。
人工関節摺動面のMPCポリマー処理による弛緩抑制。第47回日本リウマチ学会、東京、2003.4.24-26
- 4) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、川口浩、金野智浩、松下富春、中村耕三。生体膜類似構造を持つMPCポリマーの人工関節への応用に関する検討—第2報：股関節シミュレーターによる摩擦特性の評価—。第76回日本整形外科学会学術集会、金沢、2003.5.22-25
- 5) 茂呂徹、高取吉雄、金野智浩、石原一彦、近津大地、片桐美佳、中村耕三、川口浩。
生体膜類似構造を有するMPCポリマー被覆による人工関節の弛緩防止。第21回日本骨代謝学会、大阪、2003.6.5
- 6) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩。
生体適合性に優れた人工材料・MPCによるナノ表面処理を用いた人工関

節の弛緩防止

—耐摩耗特性と摩耗粉に対する生体反応の評価—

第18回日本整形外科学会基礎学術集会、北九州、2003.10.16

- 7) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩。

ライナー表面のMPCポリマー処理は人工股関節の loosening を抑制する。
第30回日本股関節学会、東京、2003.10.31

- 8) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇。

ポリエチレンライナー表面のMPCポリマー処理による人工関節の長寿命化。
第25回日本バイオマテリアル学会大会、大阪、2003.12.16

- 9) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇。

MPCポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する—長寿命型人工股関節の開発—。
第34回人工関節学会、千葉、2004.1.30-31

- 10) Moro,T; Takatori,Y; Ishihara,K; Konno,T; Takigawa,Y, Nakamura, K; Kawaguchi,H

Inhibition of aseptic loosening of artificial joints by graft polymerization of a novel biocompatible polymer MPC.

50th Annual Meeting of the Or-

thopaedic Research Society,

San Francisco, USA,2004.3.7-10

- 11) Moro,T; Takatori,Y; Ishihara,K; Konno,T; Takigawa,Y, Nakamura, K; Kawaguchi,H

Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner.
7thWorld Biomaterial Congress, Sydney, Australia,2004.5.17-21

- 12) Moro, T; Takatori, Y; Ishihara, K; Konno, T; Takigawa, Y; Takadama, H; Nakamura, K; Kawaguchi, H

Biocompatible phospholipid polymer nano-grafting onto articular surface of the artificial hip joint prevents aseptic loosening. Nano-technology to prolong the longevity of the artificial joint.
17th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty Biomaterial.

Roma, Italy, 2004.9.23-25