

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20760098

研究課題名（和文） ハイブリッド型人工軟骨材料の開発及び評価

研究課題名（英文） Development and evaluation of hybrid artificial cartilage

研究代表者

中嶋和弘（NAKASHIMA KAZUHIRO）

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：70315109

研究成果の概要（和文）：軟骨細胞を有する人工軟骨材料の開発を行い，摩擦特性について調査した．人工軟骨材料にはポリビニルアルコール(PVA)ハイドロゲルを用い，その表面に軟骨細胞を播種した後に培養して PVA ハイドロゲルの表面に細胞外マトリックスを有するハイブリッド型人工軟骨を開発した．ハイブリッド型人工軟骨は培養日数に伴い摩擦係数が低下することを示し，細胞外マトリックスを有するハイブリッド型人工軟骨材料の開発が可能であることを示した．

研究成果の概要（英文）：Hybrid artificial cartilage was developed and was evaluated on friction property. PVA hydrogel was used as basic material, and condrocyte was introduced on PVA hydrogel surface, then hybrid artificial cartilage with extra-cellular matrix was developed. Hybrid artificial cartilage showed that coefficient of friction was decreased with incubating time. Therefore, development of hybrid artificial cartilage was successful.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：バイオトライボロジー

科研費の分科・細目：機械工学・設計工学・機械機能要素・トライボロジー

キーワード：人工関節，人工軟骨，細胞外マトリックス，蛋白質吸着膜，境界潤滑

## 1. 研究開始当初の背景

現在一般に臨床応用されている超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)と耐食性金属もしくはセラミックスの組み合わせは寿命が数年から 20 年程度と言われている．若年の患者が人工関節置換術を経験した場合には数回の人工関節再置換術が必要となるため

さらなる長寿命化が求められている．そこで，人工関節の潤滑モードを境界・混合潤滑主体から流体潤滑へ移行させるために摩擦面に生体関節軟骨と同様な機械的特性を有する人工軟骨を利用した人工関節の開発を行ってきた．人工軟骨材料としてポリビニルアルコール(PVA)ハイドロゲルを用いると，歩行条

件下では低摩擦を示し、良好な潤滑状態であることが示されている。臨床応用時には長期立位時からの歩行のように厳しい潤滑状態が考えられるため、直接接合が発生する薄膜潤滑状態での摩擦摩耗特性の改良が必要である。研究代表者は PVA ハイドロゲル表面に蛋白質吸着膜を形成することで摩擦摩耗を低減できることを示し、蛋白質吸着膜が摩擦摩耗を低減させるメカニズムについても明らかにした。

生体関節軟骨は 70～80 年もメンテナンスフリーで摺動し、長期にわたり低摩擦低摩耗を維持する非常に優れた機械要素とみなすことが出来る。生体関節軟骨は表面に水和層や蛋白質・脂質膜を有しており、この表面構造が長期の寿命と低摩擦低摩耗を支えていると考えられる。この表面構造を有する人工軟骨材料を開発することで、より長期の寿命をもつ人工関節の設計が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、人工軟骨候補材料の PVA ハイドロゲルの表面で軟骨細胞を培養し、軟骨細胞から産生される細胞外マトリックス(ECM)を PVA ハイドロゲル表面に形成させ、生体関節軟骨と同様に長期の寿命を有するハイブリッド型人工軟骨材料の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) PVA ハイドロゲルの作製

PVA ハイドロゲルは反復凍結法で作成した。PVA を純水に 20%濃度で溶解させ、-20 で 10 時間、4 で 20 時間の凍結・解凍を 1 サイクルとして 5 サイクル反復することで PVA ハイドロゲルを得た。この PVA ハイドロゲルは生体軟骨と同程度の 1.2MPa のヤング率を持つ。

### (2) 軟骨細胞接着のための蛋白質吸着膜作製

軟骨細胞は PVA ハイドロゲル表面への接着性に乏しいため、PVA ハイドロゲル表面を蛋白質吸着膜で修飾することで軟骨細胞の接着を試みた。蛋白質には牛血清アルブミン(BSA)、ヒト血清 グロブリン(HGG)およびフィブリノーゲン(FIB)を用いた。PVA ハイドロゲル表面への蛋白質吸着膜の形成には単純浸漬法と本研究で開発した凍結コーティング法を行った。単純浸漬法は反復凍結法で作製した PVA ハイドロゲルを蛋白質溶液に浸漬させることで表面に蛋白質吸着膜を形成する方法であり、凍結コーティング法は PVA ハイドロゲル作製途中の反復凍結サイクル 1 回が終了した時点で蛋白質溶液を PVA ハイドロゲル滴下し、その状態で反復凍結を行うことで表面に蛋白質吸着膜を形成する方法である。それぞれの方法で作製した PVA ハイドロゲル表面に形成された蛋白質

吸着膜を蛍光染色して、吸着膜厚さの測定と PVA ハイドロゲルへの軟骨細胞の接着性を細胞接着数を測定して評価した。

### (3) 軟骨細胞培養

PVA ハイドロゲル上へ  $10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で軟骨細胞を播種し 7,14 日間インキュベータ内で培養した。培養後に接着細胞数の測定と産生組織を蛍光染色法による観察を行った。

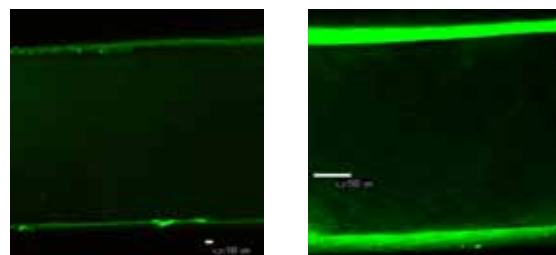
### (4) 摩擦試験

軟骨細胞を培養して表面に細胞外マトリックスを有する人工軟骨材料の摩擦特性評価を行った。下部試験片にハイブリッド型人工軟骨材料を、上部試験片に厚さ 2mm の PVA ハイドロゲルを楕円体のアクリルベースへ貼付したものをを用いた。摩擦試験は荷重 2.94N、滑り速度 4mm/s、ストローク 7mm、総滑り距離 8.4m で行った。潤滑液として PBS を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) PVA ハイドロゲルの蛋白質吸着膜による表面修飾

軟骨細胞の接着を促すために蛋白質吸着膜作製を行った結果を図 1 に示す。単純浸漬法ではどの蛋白質においても PVA ハイドロゲルへの蛋白質吸着膜は数十  $\mu$ m と薄いことが示された(図 1(a))。凍結コーティング法で形成した蛋白質吸着膜は 300～500  $\mu$ m と厚いことが観察された(図 1(b))。



(a) 単純浸漬 (b) 凍結コーティング

図 1 蛋白質吸着膜の蛍光観察像

### (2) PVA ハイドロゲル表面への軟骨細胞接着性

7 日培養後の軟骨細胞の接着数の測定結果を図 2 に示す。凡例の st は単純浸漬法を、ct は凍結コーティング法の結果を示す。単純浸

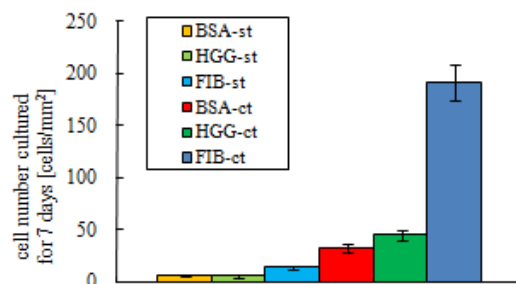


図 2 細胞接着数

漬では蛋白質吸着膜が薄いため細胞接着数が少ないが、凍結コーティング法では細胞接着数が増加し、特に FIB を用いたばあいには生体関節軟骨と同レベルの細胞接着数を得ることが可能となった。以下の産生組織観察と摩擦試験には最も細胞接着数が大きかった FIB-ct の試験片を用いて評価を行った。

### (3) 産生組織観察

図3に培養後に取得した蛍光観察画像から画像の面積に占めるコラーゲンタイプIIの面積割合を示す。図中の凡例は凍結コーティング法における滴下 FIB 溶液の濃度を表わす。接着細胞数は FIB 濃度 0.5%で最大となり、そのときにコラーゲンタイプIIの産生量が最大となることが明らかとなった。このことから、PVA ハイドロゲル上において蛋白質吸着膜を介し軟骨細胞を接着させることで表面に細胞外マトリックスを有するハイブリッド型人工軟骨材料が開発可能であるこ

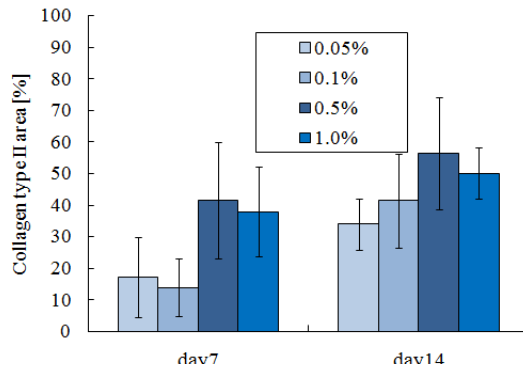


図3 細胞外マトリックス(コラーゲンタイプII)の産生量

とが示された。

### (4) 摩擦試験結果

図4に FIB-ct 試験片の摩擦試験結果を示す。FIB-ct(no cells)は表面に FIB 吸着膜のみを形成した試料である。この試料では摩擦係数の低減は観察されなかったことから、他の試験片で摩擦係数が低下しているのは細胞を播種し培養を行ったためであることがわかる。FIB 濃度 1.0%では培養日数に関わらず 6.3m で摩擦係数が上昇していることから表面に産生された細胞外マトリックスが脱

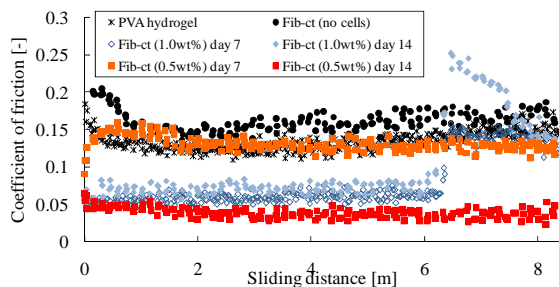


図4 FIB-ct 試料の摩擦特性

落したことがわかる。一方 FIB 濃度 0.5%で 14 日培養したものは摩擦距離 8.4m でも低摩擦を維持したことから人工軟骨材料の表面に軟骨細胞から産生される細胞外マトリックスを有するハイブリッド型人工軟骨の開発に成功したことが示された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計8件)

鎗光清道, 中嶋和弘, 澤江義則, 村上輝夫, 人工軟骨候補材料の低摩擦化に寄与する最適境界潤滑膜形成に及ぼすリン脂質添加の影響, 日本機械学会年次大会, 2008年8月6日, 横浜国立大学

Seido Yarimitsu, Kazuhiro Nakashima, Yoshinori Sawae and Teruo Murakami, Influences of lubricant composition on forming boundary film composed of synovia constituents, 35th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, 2008年9月11日, United Kingdom

Teruo Murakami, Kazuhiro Nakashima, Yoshinori Sawae, Nobuo Sakai and Natsuko Hosoda, Roles of adsorbed film of surface gel layer in hydration lubrication for articular cartilage, 35th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, 2008年9月12日, United Kingdom

鎗光清道, 中嶋和弘, 澤江義則, 村上輝夫, 蛋白質とリン脂質の共存下における境界潤滑膜形成のその場観察, トライボロジー会議 2008名古屋, 2008年9月16日, 名城大学  
中嶋和弘, 澤江義則, 村上輝夫, 超高分子量ポリエチレンの摩擦低下に寄与する蛋白質境界潤滑膜の観察, ME学会九州支部講演会, 2009年3月7日, 九州大学

馬場章央, 中嶋和弘, 澤江義則, 村上輝夫, ポリビニルアルコールハイドロゲルへの細胞接着方法の検討, 日本機械学会九州支部講演会, 2009年10月10日, 長崎大学

中嶋和弘, 新開光, 澤江義則, 村上輝夫, 人工軟骨候補材料の摩擦に与える蛋白質二次構造の影響, 第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山理科大学

中嶋和弘, 馬場章央, 澤江義則, 村上輝夫, 細胞外基質を有するハイブリッド型人工軟骨の開発, 平成21年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2010年3月6日, 九州大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中嶋 和弘 (NAKASIMA KAZUHIRO)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：70315109

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：