

培養軟骨組織モデルの境界・混合潤滑における摩擦低減機能評価

Study on friction-reduction ability of cultured cartilage tissue model under boundary and mixed lubrication conditions

九州大（学）*佐藤 巧 九州大（非学）松井 泰洋 九州大（正）森田 健敬 九州大（正）澤江 義則

Takumi Sato*, Taiyo Matsui*, Takehiro Morita*, Yoshinori Sawae*

*Kyushu University

1. 緒言

高含水の軟組織である関節軟骨は、軟骨細胞とその軟骨細胞から産生される細胞外基質（ECM）により構成されている。この ECM は主にⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンが占めており、関節軟骨に高い機械的強度を与えている。一方で、関節軟骨は潤滑性にも優れており、高負荷・低速という表面が直接接触し得る条件下で摩擦係数が 0.01 以下の超潤滑を実現している。しかし、その潤滑メカニズムについては未だ議論の最中である。これらの研究の中で、笹田らは ECM のプロテオグリカンとヒアルロン酸がボトルブラシ状に結合したプロテオグリカン凝集体が軟骨表面の低摩擦に寄与する」と提案している。しかし、現状ではその潤滑モデルに対する実験的根拠が少ない。

そこで、本研究では、軟骨細胞をアガロースゲルに播種しそれを培養することで培養軟骨組織モデルを作製し、接触ジオメトリの異なる 2 種類の摩擦試験を行うことにより境界潤滑域および混合潤滑域における ECM の摩擦低減効果を評価した。

2. 実験方法

2.1 培養軟骨組織モデル

本実験では、初期細胞濃度 $10^7/\text{mL}$ の牛の軟骨細胞を 2w/v%アガロースゲルに播種し、直径 8mm、高さ 2.5mm の円柱型に成型し、インキュベータ内で最大 15 日間培養することで試験片を作製した。本モデルは培養することで初めて ECM が産生されるため、培養前後を比較することで ECM による影響を評価可能としている。

2.2 ECM 蛍光染色

試験片表面に産生された ECM 成分のプロテオグリカンおよびⅡ型コラーゲンの分布の観察には免疫蛍光染色法および共焦点レーザ走査型顕微鏡（FV300-BX51BMS, OLYMPUS）を用いた。

2.3 圧縮試験、応力緩和試験

試験片の弾性率および透水係数を評価するため、卓上型精密万能試験機（AGS-X, SHIMADZU）を用いて圧縮試験および応力緩和試験を行った。押込み速度はそれぞれ 1mm/min と 1mm/s、押込み量は 0.5mm と 0.375mm とし、押込み後は変位一定で 1800 秒間保持した。

2.4 摩擦試験

摩擦試験はレオメータ（MCR301, Anton paar）およびナノトライボメータ（NTR³, Anton paar）を用いて行った。それぞれの摩擦試験機の概略図を Fig. 1(a), (b)に示す。また、試験条件を Table 1 に示す。レオメータでは面接触のディスク・オン・ディスク方式、ナノトライボメータでは点接触のボール・オン・ディスク方式を採用することで、前者は境界潤滑域、後者は混合潤滑域での摩擦挙動の評価を試みた。また、前者では接触面内ですべり速度が変化するため、半径 2mm における接線方向の速度を平均すべり速度とした。また後者では、しゅう動経路は試験片表面における半径 3mm、中心角 80°の円弧軌道とし、直径 3mm のガラス球を往復しゅう動させた。

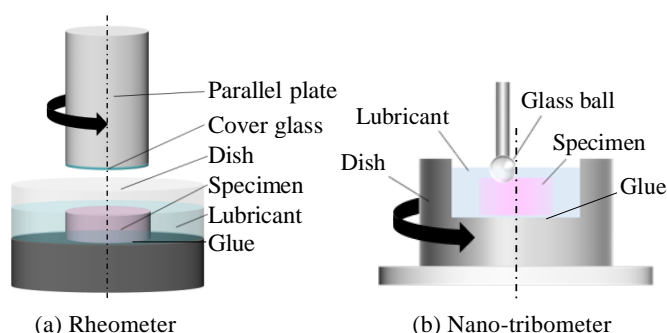


Fig. 1 Schematics of friction test apparatus

Table 1 Measurement condition

Test apparatus	Rheometer (MCR301)	Nano-tribometer (NTR ³)
Contact configuration	disk-on-disk	ball-on-disk
Sliding motion	undirection	reciprocating
Load [mN]	40 ~ 60	1, 3, 10
Average contact pressure [kPa]	0.8 ~ 1.2	4.4, 6.4, 9.6
Sliding velocity [mm/s]	0.01 ~ 50	0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2
Lubricant	PBS	PBS, HA solution (0.5wt%)

3. 実験結果および考察

3.1 ECM 蛍光観察, 圧縮試験および応力緩和試験

15 日間培養を行った試験片表面近傍においてプロテオグリカンの産生とⅡ型コラーゲンの網目構造が確認された。また, 培養初日と比較し 15 日間培養では接戦弾性率および緩和弾性率は増加し, 透水係数は減少した。これはコラーゲンの網目構造内に閉じ込められた親水性のプロテオグリカンが周囲の水を引き込み, その構造に膨張圧力を生じさせたためであると考えられる²⁾。

3.2 摩擦試験

まず, 培養初日と 15 日間培養を行った試験片の PBS 中でのレオメータによる摩擦試験結果を Fig.2(a)に示す。縦軸は摩擦力, 横軸は平均すべり速度を示す。Figure2(a)では, 典型的なハイドロゲルの摩擦力の速度依存性³⁾が確認された。この摩擦挙動で特徴的な最大摩擦力における速度 (遷移速度 v_t) は, 培養前後ともに 13.5mm/s であり変化は確認されなかった。しかし, 培養前と比較して培養後の摩擦力は全速度域で平均して約 4 割減少し, またその減少量は高速域側ほど小さくなった。 $v_{ave} < v_t$ では, 試験片表面において相手面に吸着している高分子鎖が引き伸ばされることにより摩擦力が増加する。このことから, 培養によって親水性のプロテオグリカンが試験片表面に産生されることで, せん断抵抗の大きいアガロース分子鎖の吸着点数が減少したことにより摩擦力が減少したと考えられる。また, $v_t < v_{ave}$ では, 高分子鎖が相手面から脱離し流体が界面に介入し始めることで摩擦力が減少することから, 表面特性の影響が小さくなり摩擦力の減少量が小さくなったと考えられる。

次に, 培養初日と 15 日間培養を行った試験片の PBS 中および HA 溶液中でのナノトライボメータによる摩擦試験結果を修正ストライバック曲線 (τ - S 曲線) で表したグラフを Fig.2(b)に示す。縦軸はせん断応力, 横軸はゾンマーフェルト数 (S) を示す。軟骨の潤滑性評価にも用いられている従来のストライバック曲線⁴⁾では, 縦軸が摩擦係数であるのに対し, 本報ではせん断応力を用いることで Hertz の点接触における摩擦係数の圧力依存性を排除した。本実験では混合潤滑から流体潤滑へ遷移する様子が確認された。培養することでせん断応力が最小値を示す遷移点が境界潤滑側にシフトし, かつそのせん断応力も減少したが, 流体潤滑域ではその影響は小さかった。これらは, レオメータでの結果と同様に ECM 由来の水和層の形成により, 混合潤滑域におけるせん断抵抗が低下し, 流体潤滑域への遷移が促進されたと考えられる。

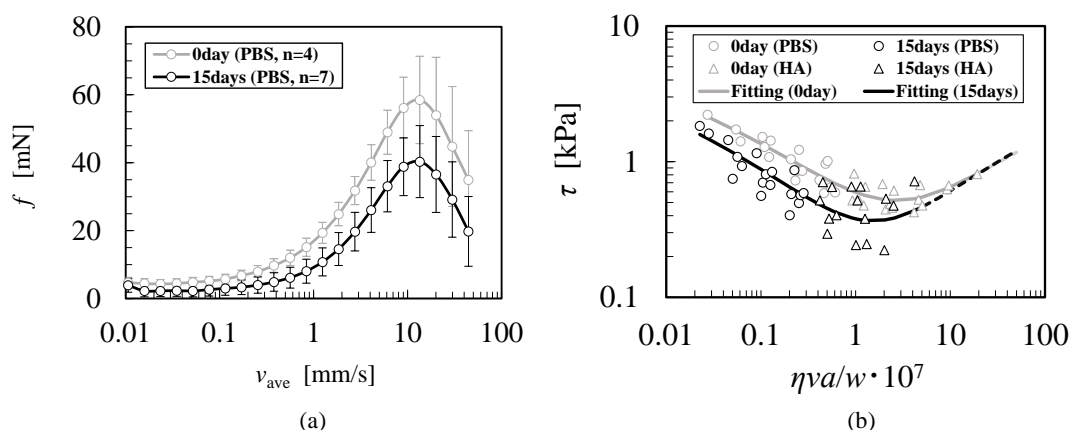


Fig. 2 Friction behaviors for 0day and 15days specimens in PBS or HA solution using (a) rheometer and (b) nano-tribometer

4. 結言

本研究では, 培養軟骨組織モデルを用いて境界潤滑域および混合潤滑域における ECM の摩擦低減効果をレオメータおよびナノトライボメータを用いて評価した。ECM の摩擦低減効果はどちらの領域においても確認されたが, 流体潤滑域ではその効果は小さかった。

文献

- 1) 笹田直, 動物関節における表面ゲル水和潤滑, トライボロジスト, 52 (8), 2007, 573-578.
- 2) J. P. Gong, Y. Osada, Gel friction: A model based on surface repulsion and adsorption, *J. Chem. Phys.*, 109(18), 1998, 8062-8068.
- 3) T. E. Hardingham, Cartilage; Aggrecan-Link Protein-Hyaluronan Aggregates, *Hyaluronan Today*, 2(5), 1998.
- 4) E.D.Bonnevie et al., Elastoviscous Transitions of Articular Cartilage Reveal a Mechanism of Synergy between Lubricin and Hyaluronic Acid, *PLoS ONE*, 10 (11): e0143415, 2015.