

培養軟骨組織モデルにおけるプロテオグリカン含有量が潤滑特性に及ぼす影響

Influence of proteoglycan contents on lubrication properties of cultured cartilage tissue model

九州大（学）*佐藤 巧 九州大（非学）里 俊介 九州大（非学）開作 隆

九州大（正）鎌光 清道 九州大（正）森田 健敬 九州大（正）澤江 義則

Takumi Sato*, Shunsuke Sato*, Ryu Kaisaku*

Seido Yarimitsu*, Takehiro Morita*, Yoshinori Sawae*

*Kyushu University

1. 緒言

関節軟骨は、水分、軟骨細胞およびその軟骨細胞から産生されるプロテオグリカンやⅡ型コラーゲン等の細胞外基質（ECM）により構成されており、ECMは軟骨の優れた力学特性や潤滑特性（ $\mu < 0.01$ ）に寄与している。ECMの潤滑特性について、表層に存在するプロテオグリカン凝集体が負に帯電し水和層を形成することで低摩擦に寄与する、表面ゲル水和潤滑モデル¹⁾が提案されている。先行研究では、培養軟骨組織モデルを用いて、プロテオグリカンの含有量と一定速度下の摩擦係数の時間依存性の関係を報告している²⁾。一方で、軟骨表面は静止から歩行にかけてしゅう動速度が変化するため、境界潤滑から流体潤滑まで幅広い潤滑領域でECMの潤滑効果が期待されているが、各潤滑領域におけるECMの潤滑効果に関する知見が少ない。さらに、培養軟骨組織モデルの足場材としてはハイドロゲルがよく用いられ、そのハイドロゲルは潤滑領域ごとに特有の摩擦の速度依存性を示す³⁾。

そこで本研究では、培養軟骨組織モデルを用いて、各潤滑領域、特に境界および混合潤滑領域においてプロテオグリカン含有量が潤滑特性に及ぼす影響を調査した。

2. 実験方法

2.1 培養軟骨組織モデル

初期細胞濃度 10^7 /mLのウシ軟骨細胞を 2 w/v%アガロースゲル（直径 8 mm、高さ 2.5 mm）に播種し、37 °C、5 % CO₂ 環境下で 1 週間の静置および動的圧縮負荷培養を行うことにより試験片を作製した。Fig. 1 に(a)静置および(b)動的圧縮負荷培養装置の概略図を示す。動的圧縮負荷の培養条件は、周波数 1 Hz、予圧縮ひずみ 5 %、最大圧縮ひずみ 15 %、負荷時間 6 h/day とした。本手法では、培養方法および培養日数ごとにプロテオグリカン含有量の異なる試験片を作製可能としている。

2.2 プロテオグリカン含有量測定

プロテオグリカンの糖鎖であるグリコサミノグリカン（GAG）量を測定した。試験片をアガラーゼおよびパパイン混合溶液で溶解し、DMMB assay⁴⁾を利用した比色定量法によりその溶液の 520 nm のにおける吸光度を測定することで試験片内の GAG 含有量を算出した。

2.3 摩擦試験

Fig. 2 にレオメータ（MCR-301, Anton paar）を用いたディスクオンディスク型一方向回転摩擦試験の概略図を示す。相手面はガラスとし、試験条件は、垂直荷重 0.1 N、平均すべり速度 0.005 mm/s ~ 500 mm/s、潤滑液はリン酸緩衝生理食塩水とした。

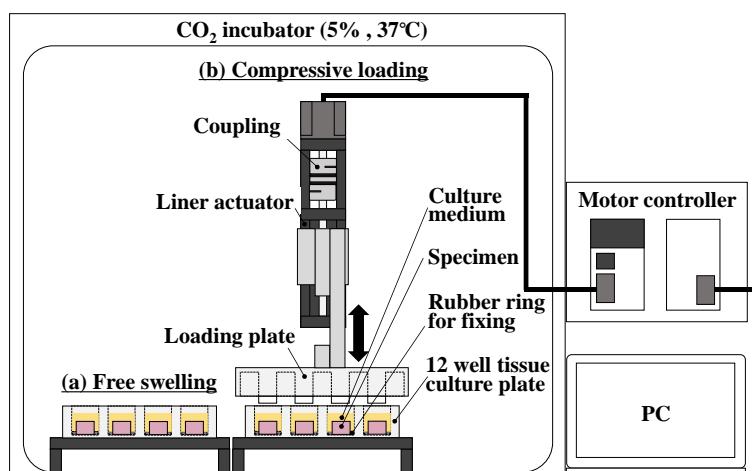


Fig. 1 Schematic diagrams of (a) free swelling and (b) compressive loading culture system

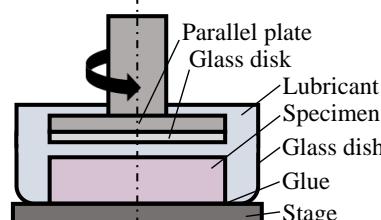


Fig. 2 Schematic diagram of friction test

3. 実験結果および考察

Fig. 3 に培養初日, 1週間の静置 (F.S.) および動的圧縮負荷 (D.C.) 培養における試験片の GAG 含有量を示す。培養初日と比較して, 1 週間培養では GAG 含有量が増加し, 特に動的圧縮負荷培養では約 5 倍増加した。これは培養時に細胞に力学的刺激が付加されたことで基質産生が促進されたと考えられる。

Fig. 4 に培養初日, 1週間の静置 (F.S.) および動的圧縮負荷 (D.C.) 培養における試験片の摩擦力の速度依存性を示す。すべての培養条件において, 表面の高分子鎖の吸着・脱離による摩擦力の速度依存性が確認された。また, 本試験の速度条件では, 速度の増加とともに摩擦力が増加する境界潤滑領域と, 摩擦力が減少する混合潤滑領域が確認された。

Fig. 5 に GAG 含有量と f - v_{ave} 曲線における最大摩擦力の相関を示す。両者の間には負の相関がみられ, 相関係数は 0.491 と中程度の相関を示した。ハイドロゲルの摩擦の速度依存性において, 摩擦力の大きさは高分子鎖の相手面への吸着点数に依存することが知られている³⁾。また, ソフトマテリアルであるエラストマーの動摩擦においては, 高分子鎖が相手面へ吸着しやすい場合と比較すると, 吸着しにくい場合は最大摩擦力が減少し, ピーク形状がプロードすることが報告されている⁵⁾。このことから, GAG 含有量が増加すると表層にプロテオグリカン由来の水和層が形成され, 表面のアガロース分子鎖の吸着点数または凝着力が減少することで最大摩擦力が減少したと考える。

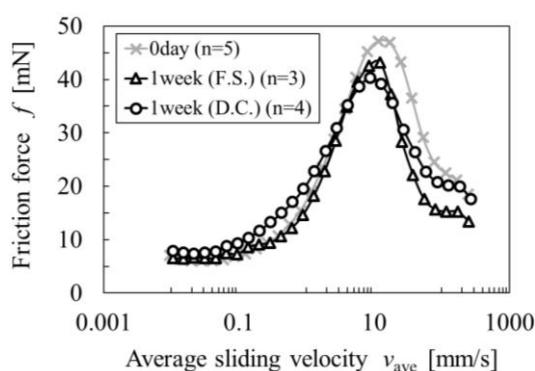


Fig. 4 Velocity dependence of the friction force for 0day, 1week (F.S.) and 1week (D.C.) cultured specimens

4. 結言

本研究では, 培養軟骨組織モデルを用いて境界および混合潤滑領域におけるプロテオグリカン含有量が潤滑特性に及ぼす影響を調査した。その結果として, GAG 含有量は f - v_{ave} 曲線における最大摩擦力と負の相関をもつことが確認された。これは GAG 含有量の増加により表面のアガロース分子の吸着点数または凝着力が減少したためと推察される。

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) Y. Morita et al., Frictional properties of regenerated cartilage in vitro, *Journal of Biomechanics*, 39, 2006, 103-109.
- 3) J. P. Gong, Y. Osada, Gel friction: A model based on surface repulsion and adsorption, *J. Chem. Phys.*, 109(18), 1998, 8062-8068.
- 4) Farndale et al., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyle blue, *BBA*, 1986, 173-177.
- 5) K. Vorvolakos, M. K. Chaudhury, The Effects of Molecular Weight and Temperature on the Kinetic Friction of Silicone Rubbers, *Langmuir*, 19, 2003, 6778-6787.

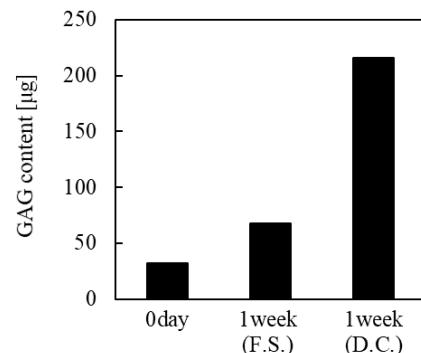


Fig. 3 GAG content for 0day, 1week free swelling (F.S.) and 1week dynamic compression (D.C.) cultured specimens

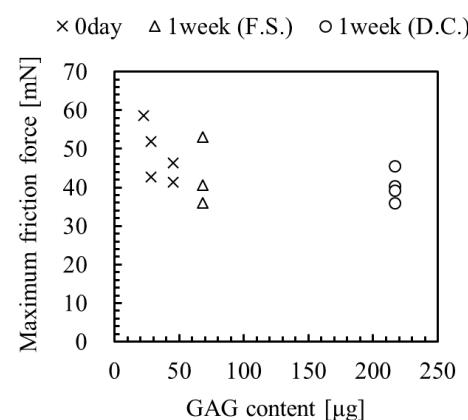


Fig. 5 Correlation between GAG content and Maximum friction force on f - v_{ave} curve