

プロテオグリカンを含む培養および配合軟骨組織モデルの摩擦挙動

Friction behavior of cultured and compound tissue model with proteoglycan

九州大（学）*佐藤 巧 九州大（非学）加藤 歩夢 九州大（非学）開作 隆

九州大（正）森田 健敬 九州大（正）鎗光 清道 九州大（正）澤江 義則

Takumi Sato*, Ayumu Kato*, Ryu Kaisaku*, Takehiro Morita*, Seido Yarimitsu*, Yoshinori Sawae*

*Kyushu University

1. 緒言

関節軟骨の細胞外基質（ECM）に含まれるプロテオグリカン（PG）は周囲の水との相互作用により組織に保水性と粘弾性を付与しており、また軟骨表層に存在する PG 由来の水和層は低摩擦にも寄与すると考えられている。しかし、境界および混合潤滑条件下で ECM または PG 由来の水和層が摩擦低減にどの程度寄与しているかまでは明らかになっていない。先行研究では、軟骨組織を模擬した培養モデルを用いて ECM 含有量と摩擦挙動の関係を調査し、高含有量ほど混合潤滑領域の最大摩擦力が減少することを報告した¹⁾が、PG 単体の寄与かどうかまでは切り分けられていない。

本報では、前述の培養モデルおよび PG 単体をアガロースゲルに含有させた配合モデルの 2 つの軟骨組織モデルを作製し、PG 含有率が境界および混合潤滑領域の摩擦挙動に及ぼす影響をゲルの凝着摩擦理論²⁾を適用することで考察した。

2. 実験方法

2.1 培養モデル

ウシ（20 ヶ月齢）の球節から採取した軟骨細胞を 2 w/v% アガロースゲル（Agarose type VII, 直径 8 mm, 厚さ 2.5 mm）に初期細胞濃度 10^7 /mL で播種し、37 °C, 5 % CO₂ 環境下で 1 週間の静置培養および動的圧縮負荷培養を行うことにより試料を作製した。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。培地には 20 v/v% FBS, 1 v/v% 抗生物質, 2mM アスコルビン酸添加 DMEM を使用した。また、アガロースゲルのみの培養環境による物性変化の影響を考慮するため、細胞未播種（No cell）の試料も同様に作製した。

2.2 配合モデル

培養モデルと同様に 2 w/v% アガロース溶液を調製し、そこに 0.05-0.4 wt% の PG 粉末（SNCP10, コスモ・バイオ株式会社）を加え 4 °C で 15 分間冷却することで試料を作製した。作製後、両モデルともリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に 24 時間以上浸漬させた。

2.3 PG 含有率測定

PG の糖鎖であるコンドロイチン硫酸含有量を測定した。試料をアガラーゼ（10 units/sample）およびパパイン（3 units/sample）混合緩衝液中で溶解し、DMMB assay を利用した比色定量法により溶解液の 520 nm のおける吸光度を測定することで試料内の PG 含有量を測定した。その後、試料の重量で除することで含有率を算出した。

2.4 平衡圧縮弾性率測定

万能試験機（AGS-X, SHIMADZU）を用いて、試験片に 15 % 圧縮ひずみを与え 1200 秒間の応力緩和試験を行った。得られた応力緩和曲線に対しカーブフィッティング³⁾を行うことで時間が無限大における圧縮緩和弾性率（平衡圧縮弾性率： E_∞ ）を算出した。なお、測定は室温環境下にて PBS 中で行った。

2.5 動的せん断弾性率測定

レオメータ（MCR301, Anton Paar）を用いて周波数分散測定を行い動的せん断弾性率（ $G^* = (G'^2 + G''^2)^{1/2}$ ）を測定した。測定治具には PP08 を用い、せん断ひずみ 0.1 % とし、周波数を 0.01-100 Hz まで変化させた。なお、測定は室温環境下にて PBS 中で行った。

2.6 摩擦試験

同レオメータを用いて速度依存を示す摩擦力を測定した。PP08 の先端にホウケイ酸ガラス（ $R_z = 0.4$ nm）を接着させ相手面として用いた。試験手順としては予め 5 分間の応力緩和を行った後、ディスクオンディスク型の一方向回転摩擦試験を行った。試験は、荷重 0.1 N, 平均すべり速度を 0.005-500 mm/s まで変化させ、室温環境下にて PBS 中で行った。

3. 実験結果および考察

Fig.1 に各 PG 含有率における平衡圧縮弾性率 E_∞ および動的せん断弾性率 G^* ($f = 1$ Hz) を示す。培養モデルは E_∞ , G^* ともに高含有率ほどわずかに増加する傾向を示したが、これは ECM 産生による組織化が行われたことが原因と考えられる。一方で配合モデルは、 E_∞ は含有率に依存せず G^* は含有率の増加とともに減少し、 $C_{PG} > 0.2$ wt% で一定となった。配合モデルでは、培養モデルと異なりゲル化前に PG を含有させたため PG がアガロース分子鎖同士の架橋を阻害しアガロースの架橋密度が低下したことが G^* が減少した原因と考えられる。

Fig.2 に培養モデルの細胞播種 (Cell) 試料における培養初期 (0 day), 1 週間の静置 (1 week F.S.) および動的圧縮負荷 (1 week D.C.) 培養後の速度依存の摩擦挙動を示す。また, Fig.3 に配合モデルにおける同摩擦挙動を示す。培養および PG 含有率の増加に伴い, 両モデルとも境界潤滑領域の摩擦力が増大し, 境界潤滑から混合潤滑へ遷移する速度 (遷移速度) が配合モデルの 0.05 wt%を除いて低速側にシフトした。前者においては極低速度域 ($v_{ave} < 0.001$ mm/s) でバルクのねじり挙動が確認されたことから, セン断弾性率と最大ねじり変形量が関与していると推察される。後者に関して, 得られた遷移速度, G^* および環境温度からゲルの凝着摩擦理論²⁾を用いて理論粘度を算出した。Fig.4 に培養モデルおよび配合モデルにおける各 PG 含有率での理論粘度をそれぞれ 0.02 wt%および 0.05 wt%の値で正規化した値 (培養モデルでは細胞未播種試料の結果で補正) と, 参考に $\dot{\gamma} = 100$ s⁻¹における PG 溶液の粘度を 0.05 wt%の値で正規化した値を示す。配合モデルでは, 全ての含有率において正規化した理論粘度が PBS (0 wt%PG 溶液) および PG 溶液の粘度より高いことから, 理論粘度は表層のアガロースと PG の分子鎖の流動性または局所的な界面粘度を示すことが推察される。さらに, $C_{PG} > 0.2$ wt%で G^* が一定かつ 0.4 wt%では理論粘度に PG 溶液の粘度が近づくことを踏まえると, 0.4 wt%ではアガロースとの結合が飽和した PG が界面に染み出し, 溶液として振る舞ったことが推察される。以上をまとめると, 配合モデルにおいて $C_{PG} \leq 0.2$ wt%では PG がゲル表層に留まることによる表層の流動性の低下が支配的で, $C_{PG} > 0.2$ wt%では溶液としての増粘効果が支配的となることが示唆される。これに対して培養モデルでは, わずかな粘度上昇効果はあったものの配合モデルほどではなかった。

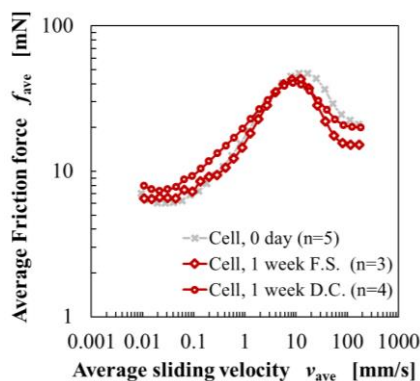


Fig. 2 Velocity dependence of the friction force for 0day, 1week F.S. and 1week D.C. cultured specimens

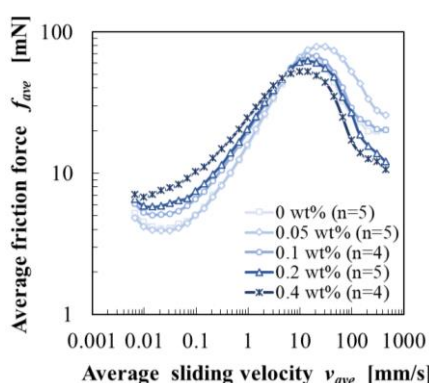


Fig. 3 Velocity dependence of the friction force for 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 wt% PG specimens

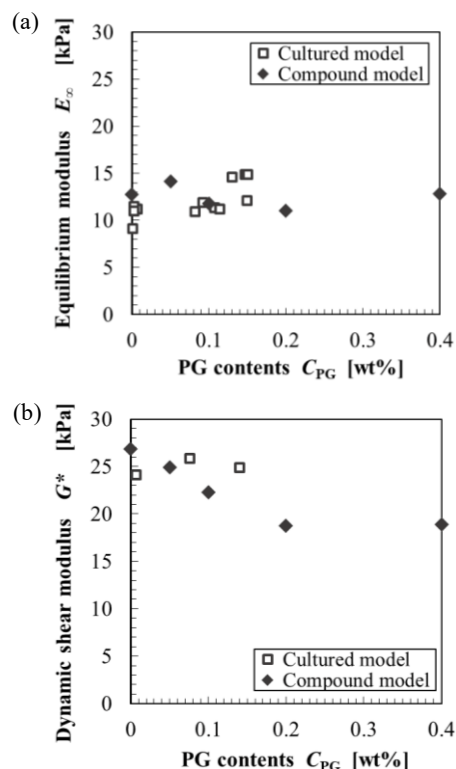


Fig. 1 Relation between (a) equilibrium modulus and (b) dynamic shear modulus and PG contents

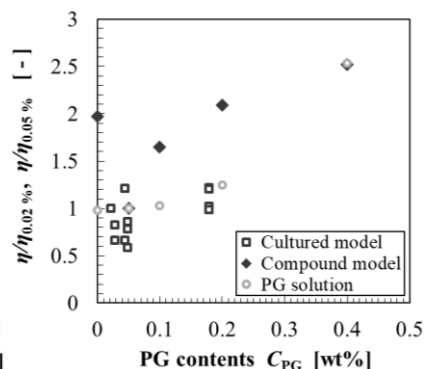


Fig. 4 Relation between Normalized viscosity and PG contents

4. 結言

本研究では, 培養および PG 配合軟骨組織モデルを用いて PG 含有率が境界および混合潤滑領域の摩擦挙動に及ぼす影響をゲルの凝着摩擦理論を適用することで調査した。その結果として, PG 含有率の増加に伴い境界潤滑領域の摩擦が増加する一方で, 遷移速度は減少し混合潤滑領域への早期移行が示唆される。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP21H04535, JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2136 の支援を受けたものである。

文献

- 1) 佐藤ら, 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, トライボロジー会議 2023 春 東京 予稿集, 198-199, 2023.
- 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. Yamaguchi et al., Propagation of Fatigue Cracks in Friction of Brittle Hydrogels, *Gels*, 4(2):53, 2018.