

# 人工関節材料表面上のアルブミン吸着膜の摩擦挙動に与える荷重履歴の影響 Influence of Load History on the Frictional Characteristics of Adsorbed Albumin Film on Artificial Joint Material Surface

東洋大・理工（正）\*中嶋 和弘

Kazuhiro Nakashima

Toyo University

## 1. 緒言

人工関節の摩擦挙動は生体関節液に含まれる蛋白質により影響を受けることが報告されている<sup>1-3)</sup>。生体関節液中の蛋白質が人工関節しゅう動面に吸着し、蛋白質吸着膜を介してしゅう動することがその原因と考えられている。蛋白質吸着膜は静的吸着した後に相手面とのしゅう動によりせん断応力と垂直応力を受ける。そのため、摩擦環境下で形成される蛋白質吸着膜は静的吸着とは異なる構造を呈すると考えられる。さらに、蛋白質吸着膜の構造が異なると吸着膜内部での滑りやエネルギー散逸が変化することが考えられ、人工関節の摩擦挙動へ大きく影響すると考えられる。これまでに低摩擦を示す蛋白質吸着膜はラメラ構造を、高摩擦を示す蛋白質吸着膜はヘテロ構造を呈することが示されており<sup>1)</sup>、蛋白質吸着膜の構造を最適化することによって人工関節の摩擦特性を改善できる可能性がある。これまでの報告により、低摩擦と高摩擦を示す蛋白質吸着膜は溶液中のアルブミンとγグロブリンの2種の蛋白質の添加比によってラメラ構造とヘテロ構造のそれぞれの構造が形成されることが明らかになっている<sup>1)</sup>。摩擦環境下における蛋白質の変化については、蛋白質分子の二次構造と変性<sup>2,3)</sup>、蛋白質分子自体の破壊<sup>4)</sup>、それらに伴う蛋白質分子間の相互作用の変化による蛋白質吸着膜のせん断抵抗特性の変化により摩擦特性が変化すること<sup>1,3)</sup>は指摘されている。しかし、それらの変化が蛋白質吸着膜の構造に与える影響及び摩擦挙動の変化のメカニズムについては明らかになっていない。さらに、蛋白質の変性や破壊は摩擦する際の垂直応力やせん断応力によってもたらされるが、これら垂直応力やせん断応力が蛋白質吸着膜の形成及び構造に与える影響についてはこれまでほとんど検討されていない。従って、摩擦環境下における蛋白質吸着膜の形成過程が明らかでなく、それによって影響を受ける人工関節の摩擦挙動も不明瞭になっている。そのため、蛋白質吸着膜を最適構造化するためには、蛋白質吸着膜の形成過程を明らかにする必要がある。

歩行中の生体関節では変動荷重が発生しているため、人工関節しゅう動面は常に荷重の変化を受けており、上述したように蛋白質が影響を受けることで蛋白質吸着膜の摩擦挙動が変化していることが考えられる。そこで本研究では垂直荷重に着目し、垂直荷重の変化が蛋白質吸着膜の摩擦特性と蛋白質の脱吸着挙動に与える影響について検討した。歩行時の人工関節は連続歩行中だけでなく、1サイクル中においても複雑な荷重の変化を受けるが、本研究ではこれらの変化を荷重が増加する場合と減少する場合の2種に簡略化し、垂直荷重の変化による摩擦特性を明瞭化した。それらの結果から荷重の変化が蛋白質吸着膜の摩擦挙動と形成及び構造に与える影響について検討した。

## 2. 実験方法

摩擦試験は Fig. 1 に示す電気化学セルを有する往復動トライボメータを用い、蛋白質潤滑溶液中における超高分子量ポリエチレンピン試験片 (UHMWPE, GUR1050, 八十島プロシード (株), 端面 SR250 処理) と CoCrMo 合金平板試験片 (ASTM F 75, (株)旭精機, Ra < 200 nm) の組み合わせで行った。摩擦試験条件は滑り速度 10 mm/s, ストローク 15 mm, 600 サイクルを各定荷重の摩擦試験 1 回とし、垂直荷重は 0.59, 1.57, 2.55 3.53, 4.51 [N]とした。これらの垂直荷重を低荷重から高荷重へ、または高荷重から低荷重へ摩擦試験 1 回毎に変化させ、1組の試験片に対して 5 回の摩擦試験を連続して行った。上記のそれぞれの一定垂直荷重条件における摩擦力を測定し、摩擦係数の平均を各摩擦試験での摩擦係数 (COF) とした。蛋白質溶液として牛血清アルブミン (BSA, 富士フィルム和光純薬 (株)) を 0.7 mass%濃度でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4, Thermo Fisher Scientific K.K.) へ添加した BSA 溶液を用いた。

摩擦試験中における蛋白質吸着膜の脱吸着挙動を測定するために電気化学的手法を用いた。CoCrMo 合金と BSA 溶液間のポテンシャルを電気化学アナライザー (ビー・エー・エス(株)) とカロメルプローブ (ビー・エー・エス(株))

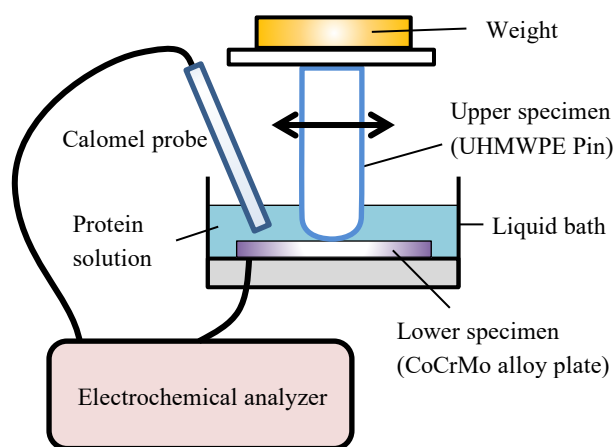


Fig. 1 A reciprocating tribometer with electrochemical cell

を用いて Open Circuit Potential 条件で測定した。定荷重の摩擦試験 1 回のポテンシャルの測定例を Fig. 2 に示す。図の青線が生データ、橙線が補正後のデータを示す。ポテンシャルは各垂直荷重条件の摩擦試験開始前 10 分から摩擦試験終了後 10 分まで測定した。ポテンシャルの増加は CoCrMo 合金表面の酸化及び蛋白質分子の吸着を、ポテンシャルの減少は CoCrMo 合金表面の還元及び蛋白質分子の脱落を表す。ポテンシャルの変化量は酸化還元反応した原子の守る数と相関する。摩擦試験開始前 10 分間と摩擦試験終了後の 10 分間は摩擦していない状態でポテンシャルを測定した。Fig. 2 に示すように摩擦していない場合でもポテンシャルが変化することがわかる。この挙動はポテンシャルが減少していることから、CoCrMo 合金表面の還元を示している。さらに、この反応は CoCrMo 合金と BSA 溶液が接触している限り発生していることが、摩擦試験後のポテンシャルが摩擦前と同じ傾きに回復していることからわかる。そのため、摩擦試験中のポテンシャルの変化は CoCrMo 合金表面自体の酸化還元反応と電荷を持つ蛋白質の脱吸着挙動の両方が重なった結果であることがわかる。

CoCrMo 合金表面の酸化還元反応をポテンシャル測定結果から除外するために、摩擦試験開始前 10 分間のポテンシャルの傾きを用いてポテンシャルデータの補正を行った。Fig. 2 に示すようにデータを補正することで、蛋白質の脱吸着挙動のみを検討することが可能となる。Fig. 2 の例では生データではポテンシャルが摩擦試験中に減少していることから蛋白質分子が表面から多く脱落しているように見えるが、データを補正することで、Fig. 2 のポテンシャル変化は CoCrMo 合金表面の還元反応が支配的であり、蛋白質分子の脱落によるポテンシャルの変化は少ないことがわかる。また、摩擦試験終了後と摩擦試験開始時のポテンシャルの差を  $\Delta$ ポテンシャルとした。 $\Delta$ ポテンシャルの値が正の場合はポテンシャルの増加を表すため蛋白質分子の吸着を、負の場合はポテンシャルの減少を表すため蛋白質分子の脱落を示す。また、 $\Delta$ ポテンシャルの絶対値の大きさは吸着/脱落した蛋白質分子の数と相関を示す。本実験において  $\Delta$ ポテンシャルは一定の垂直荷重の摩擦試験 1 回毎に算出し、それを  $\Delta$ ポテンシャルを各垂直荷重における  $\Delta$ ポテンシャルの値とした。

### 3. 実験結果

Figs. 3, 4 に垂直荷重を増加させた場合と減少させた場合のそれぞれの摩擦係数について示す。Fig. 3 に示すように垂直荷重を増加させた場合は摩擦係数が単調に増加することが明らかとなった。一方、垂直荷重を減少させた場合は Fig. 4 に示すように荷重の減少とともに摩擦係数が減少する傾向が見られた。このことから垂直荷重の増加の場合と減少の場合では摩擦特性が異なる BSA 吸着膜が形成されたことが示され、垂直荷重の履歴により人工関節の摩擦特性が変化することが考えられる。

Figs. 5, 6 に垂直荷重を増加させた場合と減少させた場合の  $\Delta$ ポテンシャルについて示す。どちらの場合も 1 回目の摩擦試験において BSA 分子が脱落することが示された。CoCrMo 合金表面に静的吸着した BSA 分子が UHMWPE のしゅう動により除去されたことを示している。しかし、Fig. 5 に示すように、垂直荷重を増加させてさらに摩擦試験を続行した場合には BSA 分子が吸着する傾向が見られた。一方、Fig. 6 に示すように垂直荷重を減少させた場合には BSA 分子の脱吸着挙動が垂直荷重の減少と共に 0 に近づく傾向が見られた。 $\Delta$ ポテンシャルの絶対値は脱吸着した BSA 分子の数と相関があることから、荷重が減少すると BSA 分子の吸着と脱落のどちらも発生しにくくなり、BSA 吸着膜が安定することが示された。

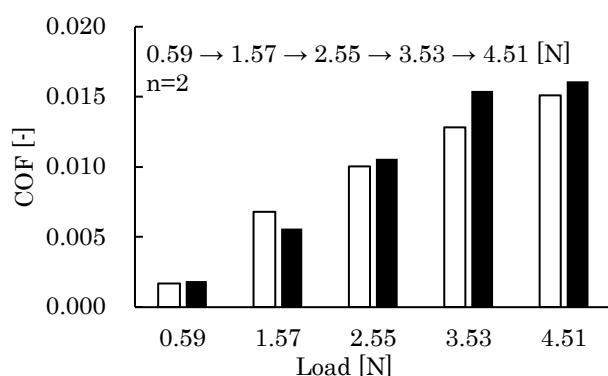


Fig. 3 Variation in COF under increasing normal load

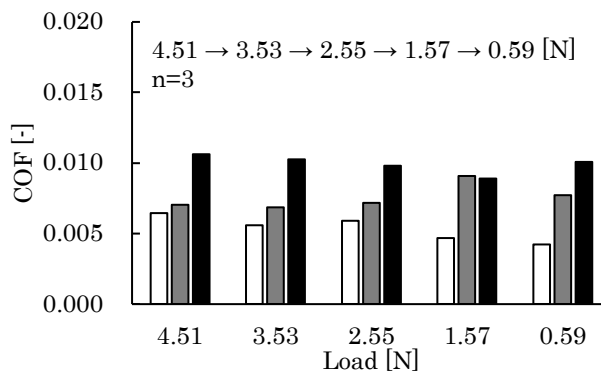


Fig. 4 Variation in COF under decreasing normal load

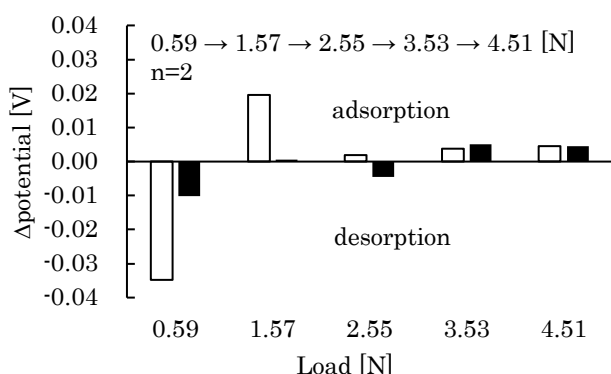


Fig. 5 Variation in  $\Delta$ potential under increasing normal load

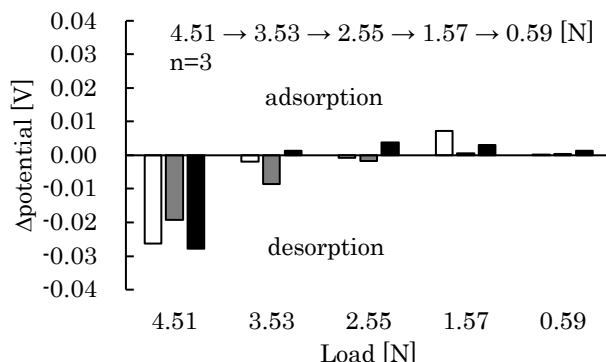


Fig. 6 Variation in  $\Delta$ potential under decreasing normal load

#### 4. 考察

BSA 分子の脱吸着挙動と摩擦係数の関係について検討するため、Fig. 7 に各垂直荷重における  $\Delta$ ポテンシャルと摩擦係数のそれぞれの平均の関係について示す。 $\Delta$ ポテンシャルが各試験で最も小さい1回目の試験では高荷重の場合が低荷重の場合よりも摩擦係数が高いことがわかる。垂直荷重を増加させた場合では蛋白質の脱落傾向から吸着傾向に次第に変化し、その変化と共に摩擦係数が指数関数的に増加することが示された。一方、垂直荷重を減少させた場合には蛋白質の脱吸着挙動が脱落から吸着へ変化することは荷重を増加させた場合と同様であるが、摩擦係数は  $\Delta$ ポテンシャルの増加とともに減少することが示され、垂直荷重が増加する場合とは異なる挙動を示すことが明らかとなった。また、 $\Delta$ ポテンシャルと摩擦係数は線形の関係になっており、垂直荷重を増加させた場合では摩擦挙動が異なることから、蛋白質吸着膜の構造が異なることがこの実験結果から明らかである。

高荷重から摩擦を開始すると低荷重の場合よりも大きな垂直荷重が作用するため、BSA 吸着膜に大きな圧縮応力が加えられる。その圧縮応力によって BSA 分子内の水素結合の破壊や再結合による BSA 分子の変性に伴い、BSA 分子内及び BSA 吸着膜内でのエネルギー散逸が大きくなり、未変性の BSA 分子が多く存在する低荷重の場合よりも高荷重における摩擦が大きくなったと考えられる。高荷重下で変性した BSA 分子は二次構造がランダムコイルへ変化し<sup>3)</sup>、BSA 分子の内側に折り畳まれていた疎水基が分子表面に露出すると考えられる。BSA 分子は疎水基よりも親水基を多く含むこと、周囲は PBS をベースとした水系の溶液中であるため、露出した疎水基は CoCrMo 合金表面側に集まり、親水基が溶液側に集まると考えられる。その結果、BSA 分子の疎水基と CoCrMo 合金表面が疎水結合することで未変性の BSA 分子よりも強く吸着すると考えられる。しゅう動による UHMWPE ピンの移動と共に CoCrMo 合金表面に静的吸着している BSA 分子が連鎖的に変性し、CoCrMo 合金表面へ吸着することで接触面内に強固で均一な(単分子の)吸着膜を形成すると考えられる。そのようにして形成された BSA 吸着膜表面は溶液側に親水基が露出しているため、溶液中の BSA 分子と親水基同士の接触となることで相互作用が小さい。そのため、以降の摩擦では BSA 吸着膜上に静的吸着した BSA 分子の滑りが発生する<sup>5)</sup>と考えられる。さらに摩擦すると一部の BSA 分子は吸着するが、垂直荷重が減少することで圧縮応力が減少するため、変性が少ない状態で吸着すると考えられる。そのため吸着挙動を示すが、低摩擦を維持したと考えられる。その結果として、BSA 吸着膜の脱落と吸着が少なく、安定した BSA 吸着膜が形成され、 $\Delta$ ポテンシャルの増加と共に摩擦が減少する傾向が見られたと考えられる。

一方、低荷重から摩擦を開始すると、圧縮応力が小さいために BSA 分子の変性に十分なエネルギーが供給されず、BSA 分子の変性が少ないことで BSA 分子表面に親水基が露出しており、CoCrMo 合金表面との相互作用が小さくなり、CoCrMo 合金表面に強固に吸着する BSA 分子が少ないと考えられる。そのため、BSA 分子の低せん断抵抗による滑りが発生する<sup>5)</sup>ために高荷重の場合よりも摩擦が低くなると考えられる。さらに摩擦するとしゅう動面間に存在する BSA 分子が滑り(転がり)ながら次第に変性や凝集体を形成する<sup>6,7)</sup>と考えられる。そのため、BSA 分子よりも大きな凝集体が CoCrMo 合金表面に吸着するため、疎な吸着膜が形成されることで不均一な吸着膜が形成される<sup>7)</sup>と考えられる。このような吸着膜の構造では変性 BSA 分子と未変性 BSA からなるヘテロ構造となることで BSA 分子の滑りが抑制<sup>1)</sup>され、繰り返し垂直荷重やせん断応力を受けるために BSA 分子の変性や凝集体の形成が促進されると考えられる。その結果、BSA 吸着膜内でのエネルギー散逸が大きくなるために滑り距離と共に摩擦が増加したと考えられる。

本研究において考察した荷重履歴による蛋白質吸着膜の形成過程についての模式図を Fig. 8 に示す。BSA 分子は外側に親水基、内側に疎水基を折り畳んだ状態で PBS 中に分散している。静的に吸着した BSA 分子は溶液中と同様に外

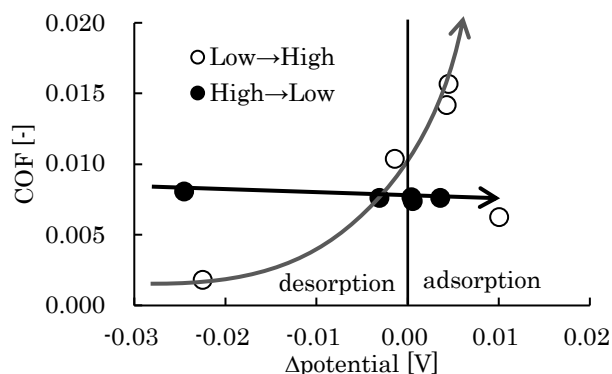


Fig. 7 COF as a function of  $\Delta$ potential

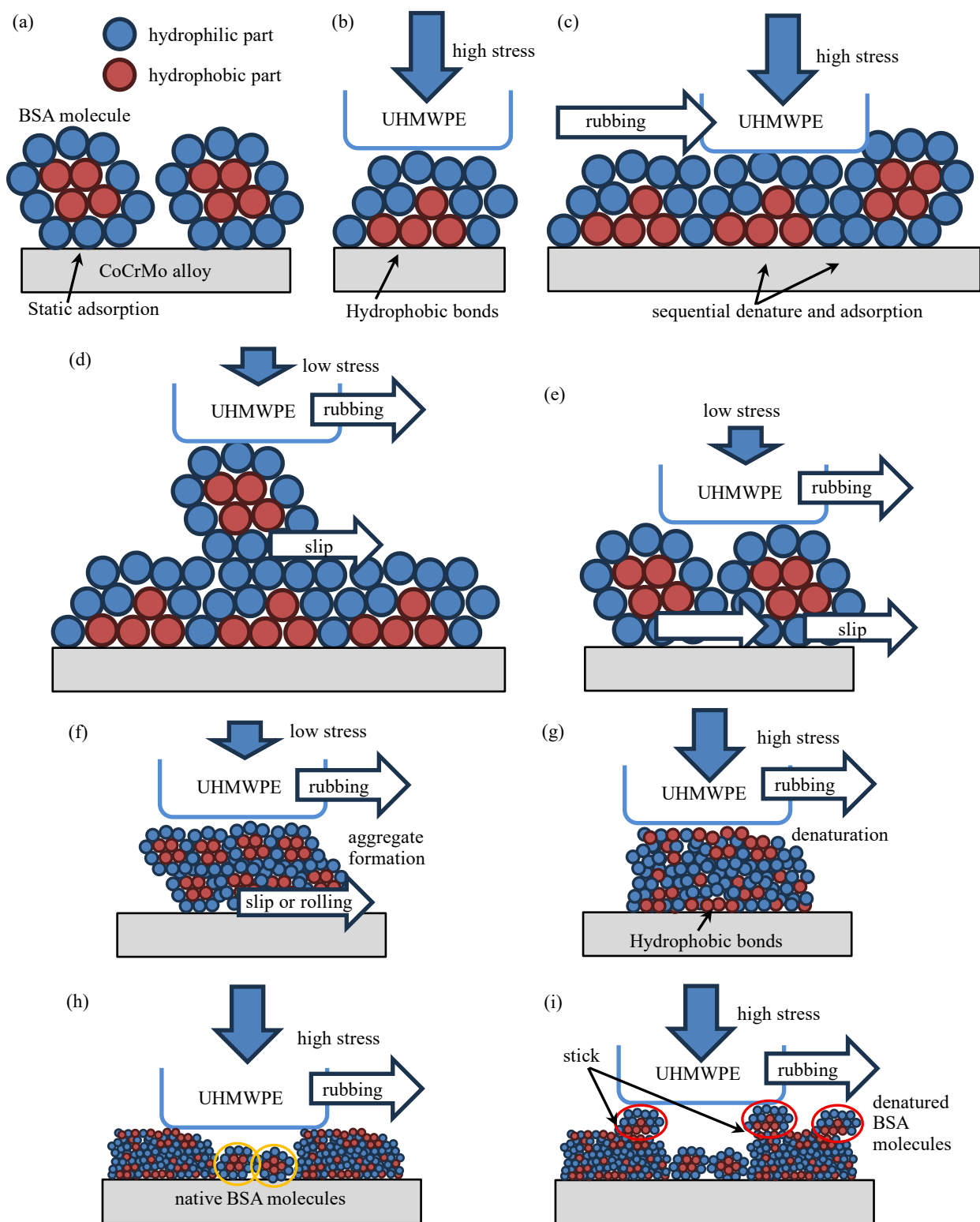


Fig. 8 Schematic images illustrating the estimated formation process of BSA adsorbed film. (a) static adsorption of BSA molecules on CoCrMo alloy surface, (b) denaturation of BSA molecule due to high compressive stress from the counter surface, (c) sequential formation of denatured BSA adsorbed film under high compressive and shear stress, (d) slippage of BSA molecule on BSA adsorbed film due to weak interaction, (e) slippage of BSA molecules on CoCrMo alloy surface under low compressive stress, (f) aggregate formation under low compressive stress caused by cyclic shear and compressive stress, (g) denaturation of aggregate under high shear and compressive stress, (h) sparse adsorption of aggregates on CoCrMo alloy surface and formation of heterogeneous BSA film, (i) adsorption of denatured BSA molecules onto heterogeneous adsorbed BSA film.

側に親水基，内側に疎水基を折り畳んだ状態で CoCrMo 合金表面に吸着する (Fig. 8 (a)). 高荷重から摩擦を開始すると，圧縮応力とせん断応力により物理的に変形され内部に折りたたまれていた疎水基が分子表面へ露出し変性する。

BSA 分子周囲は PBS 溶液であるため、露出した疎水基は CoCrMo 合金表面と疎水結合する (Fig. 8 (b)). この BSA 分子の変性と変形が UHMWPE ピンの移動と共に接触面内で連鎖的に発生することで、均一で強固に吸着した BSA 吸着膜が形成される (Fig. 8 (c)). このように形成された BSA 吸着膜の表面は親水基が露出しているため、BSA 溶液中に分散している BSA 分子との相互作用が小さく、BSA 分子が BSA 吸着膜と結合せずに滑ることで摩擦が低く保たれる (Fig. 8 (d)).

一方、低荷重から摩擦を開始した場合は圧縮応力とせん断応力が小さいため、BSA 分子の折り畳み構造を破壊せず、疎水基が BSA 分子表面に露出しないため強固な吸着が発生せず、単に BSA 分子がせん断応力によって CoCrMo 合金表面上を滑ることで摩擦が低くなる (Fig. 8 (e)). このとき、BSA 分子は UHMWPE ピンと CoCrMo 合金に挟まれた 2 面間の領域を転がることで他の BSA 分子と接触を繰り返し、凝集体を形成する (Fig. 8 (f)). そのようにして形成された凝集体が高い圧縮応力を受けながら 2 面間で転がると圧縮応力とせん断応力の作用により BSA 分子の疎水基が露出し、CoCrMo 合金へ疎水基を介して吸着する (Fig. 8 (g)). 凝集体は BSA 分子よりも大きく、BSA 分子よりも個数が少ないため疎に吸着する。疎に吸着した凝集体の間に溶液中の BSA 分子が静的吸着し、ヘテロ構造の吸着膜を形成する (Fig. 8 (h)). これら吸着した凝集体が繰り返しせん断応力と圧縮応力を受ける度に BSA 分子の変性や分子間の結合が発生し、次第に凝集体表面に疎水基が露出する。摩擦面間に存在する BSA 分子は徐々に増加する圧縮応力とせん断応力により変性して表面に疎水基を露出させ、吸着膜に疎水結合することで高せん断抵抗を発生させる。それらのエネルギー散逸によってさらに摩擦が大きくなると考えられる (Fig. 8 (i)).

以上から、最適なトライボロジー特性を有する BSA 吸着膜の形成のためには、BSA 分子を変性させ CoCrMo 合金表面に強固な吸着層を形成した後に低荷重による BSA 分子の低せん断性を発揮させることが必要であることが明らかとなった。これまでに BSA と  $\gamma$  グロブリンの混合溶液中での低摩擦を示した蛋白質吸着膜の構造について蛍光標識観察<sup>1)</sup>とモデル実験<sup>2)</sup>から、吸着力の強い  $\gamma$  グロブリン分子の安定した吸着層上に BSA 分子による低せん断性の吸着層が形成されたラメラ構造において摩擦が低減することが示されている。本実験の結果においても、同一の蛋白質分子ではあるが強固に吸着し安定な吸着層を形成した後に低せん断性の層を形成することで摩擦が低減することが示された。従って、摩擦を低減する最適構造の蛋白質吸着膜は強固に吸着し安定な吸着層と低せん断性の層の協調的な効果により効果を発揮すると考えられる。

本試験での各垂直荷重における平均接触面圧は垂直荷重が小さい方から、0.62, 0.85, 1.00, 1.12, 1.21 MPa (ヘルツ圧) であった。膝関節や股関節の人工関節の接触面圧はそれぞれ 20MPa や 5MPa 程度であり、本摩擦試験条件は臨床条件よりも低接触面圧であるため、本研究結果をそのまま人工関節に応用することは難しい。しかし、下肢関節の人工関節は歩行開始時に荷重が増加傾向であるため、人工関節しゅう動面表面に低摩擦を呈する最適な蛋白質吸着膜を形成する可能性がある。また、臨床応用を想定した人工関節の摩耗試験で評価されるような歩行周期 100 万サイクルなどに比べると本試験では滑り距離が短いため、滑り距離をより長くした試験において蛋白質の脱吸着挙動と摩擦特性について評価する必要がある。今後は臨床応用に近い荷重条件や摩擦距離をより長距離とした摩擦条件における蛋白質吸着膜のトライボロジー特性について調査検討予定である。

## 5. 結言

生体関節液に含まれる蛋白質である BSA の吸着膜の摩擦挙動へ与える垂直荷重の履歴の影響について調査した。垂直荷重を増加させた場合と減少させた場合では摩擦挙動が異なることが明らかとなった。垂直荷重を増加させた場合には BSA 分子の吸着と共に摩擦係数が増加し、減少させた場合には BSA 吸着膜が安定し、摩擦が低く保たれていることが示された。これらの挙動の差異は BSA 分子の変性による吸着挙動の変化に起因する吸着膜構造の差異によるものと考えられた。従って、蛋白質吸着膜を介した摩擦が発生する人工関節では、歩行荷重条件のような変動荷重によって摩擦挙動が変化する要因として蛋白質吸着膜の構造が影響を与えることが明らかとなった。

## 文献

- 1) K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami: Study on Wear Reduction Mechanisms of Artificial Cartilage by Synergistic Protein Boundary Film Formation, JSME C, 48, 4 (2005) 555.
- 2) K. Nakashima, Y. Sawae and T. Murakami: Influence of Protein Conformation on Frictional Properties of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel for Artificial Cartilage, Tribology Letters, Vol. 26, No. 2 (2007) 145
- 3) D. Nečas, Y. Sawae, T. Fujisawa, K. Nakashima, T. Morita, T. Yamaguchi, M. Vrbka, I. Křupka, M. Hartl: The Influence of Proteins and Speed on Friction and Adsorption of Metal/ UHMWPE Contact Pair, Biotribology, 11 (2017) 51.
- 4) H. Mishina, M. Kojima: Changes in Human Serum Albumin on Arthroplasty, Wear, 265 (2008) 655.
- 5) 中嶋, 黒田: 流体せん断応力を用いた吸着アルブミン分子のせん断強さ評価, 臨床バイオメカニクス, 44 (2023) 291.
- 6) 近間: 関節潤滑に関する実験的研究-関節液蛋白及びヒアルロン酸の役割-, 日整会誌, 59 (1985) 559.
- 7) S. Yarimitsu, K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami: Influences of Lubricant Composition on Forming Boundary Film Composed of Synovia Constituents, Tribology International, 42 (2009) 1615.