

プロテオグリカンとヒアルロン酸の協調効果が アガロースゲルの摩擦特性におよぼす影響

Effect of cooperative function of proteoglycan and hyaluronic acid
on the frictional properties of agarose gels

九州大・工（学）*北川 輝 九州大・工（正）佐藤 巧

九州大・工（正）新盛 弘法 九州大・工（正）鎗光 清道 九州大・工（正）澤江 義則

Teru Kitagawa*, Takumi Sato*, Hironori Shinmori*, Seido Yarimitsu*, Yoshinori Sawae*

*Kyushu University

1. はじめに

近年、世界の高齢化が急速に発展し、高齢者の運動器疾患の問題が深刻化している。特に、変形性関節症の患者数は年々増加している。そのため、人工関節置換術や再生軟骨移植などによる関節機能再建の重要性が高まるとともに、本来の関節軟骨の有する高度な潤滑機能のメカニズム解明も急務となっている。生体関節はヒアルロン酸（HA）を含む高粘性の関節液中で満たされており、関節軟骨の組成は重量比で水分 79 %、軟骨細胞 1 %、コラーゲン 14 %、プロテオグリカン（PG）6 % の割合で構成され、摩擦係数 0.01 以下の超低摩擦を実現している。PG は関節軟骨表面に数 μm の水和層を形成することで、低摩擦を実現している⁽¹⁾。先行研究では、アガロースゲルに PG を添加したゲルを軟骨モデル材料として用いその摩擦特性の速度依存性を評価した結果、ゲル中の PG 濃度増加に伴い境界潤滑から混合潤滑域への遷移が促進され、高速度域では顕著に摩擦が低減した⁽²⁾。本研究はその次の段階として、軟骨内部の PG と関節液中の HA との協調による潤滑効果に着目した。そして、PG-HA 混合液中でのアガロースゲルの摩擦試験、HA 溶液中での PG 混合アガロースゲルの摩擦試験および PG-HA 混合液の粘度測定を行うことで、PG と HA の協調効果が軟骨モデル材料としてのアガロースゲルの摩擦特性におよぼす影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 粘度測定

先行研究より、PG と HA には両者の凝集による増粘効果があると考えられている⁽³⁾。そのため、PG-HA の凝集効果が顕著にみられる PG と HA 濃度を粘度測定により検討した。粘度測定には回転式レオメータ（Physica MCR301, Anton Paar）を用い、測定子には直径 50 mm、コーン角度 0.5° のコーンプレートを使用した。測定する溶液 400 μl をステージにのせてコーンプレート先端をステージから 0.049 mm の高さまで降下させ、揮発を防ぐためにカバーを被せた。温度を 25 $^{\circ}\text{C}$ 、せん断速度を 0.001~1000 s^{-1} まで連続的に変化させ、速度変化により粘度を測定した。PG の濃度を 0.2 wt% とし、HA の濃度を 0, 0.05, 0.1, 0.2 0.4 wt% の 5 パターンの粘度測定を行った。

2.2 試験片作製

試験片は、本研究の軟骨モデル材料のベースとして、多糖類のアガロースのゲルを用いた。まず、アガロース（Type VII-A, A0701, Sigma Aldrich）の粉末を作製量の 2 w/v% を計量し、作製量の半量のハンス平衡塩溶液（HBSS）とともに耐熱ビンに入れ、オートクレーブ（LC2-045, SEKISUI）を使用し 120 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間の高圧蒸気滅菌をした。滅菌後、体温と同等の温度になるまで冷却し、ゲル中 PG 濃度が 0.2wt% となるようにサケ鼻由来プロテオグリカンをダルベッコ改変イーグル培地に溶解し、HBSS 溶液の量と 1:1 になるような割合で混合した。混合液を直径 8 mm、厚さ 2.5 mm のモールドに流し込み、スライドガラスで上下を挟んで冷蔵庫で 15 分間冷却することでゲル化させ試験片を作製した。

Product name	Salmon Nasal Cartilage Proteoglycan
Ingredient	Salmon nasal cartilage
pH	6.9
Loss on drying	2.7%
Intense heat component	13.2%
Non-denaturing proteoglycan	99.2%
Molecular weight (HPLC)	1092 kDa
Absolute molecular weight	3463 kDa

Table.1 Proteoglycan composition

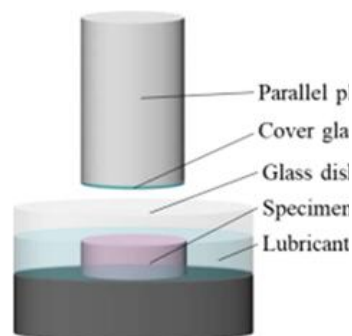


Fig.1 Schematic of Friction test

2.3 摩擦試験

摩擦試験は回転式レオメータ (Physica MCR301, Anton Paar) を使用した。レオメータは幅広いすべり速度で測定でき、速度変化による潤滑モードの遷移を評価可能である。本実験では、平面接触による摩擦試験を行った。面接触状態における摩擦試験は荷重を 1 N、温度 25 °C、5 分間の応力緩和を行い、すべり速度を $2 \times 10^{-5} \sim 1000$ mm/s まで連続的に変化させ、速度変化による摩擦挙動を評価した。

3. 結果及び考察

3.1 粘度測定

Fig. 2 に 0.2 wt%PG, 0.05 wt%HA, 0.4 wt%HA の単体溶液および混合液の粘度測定を示す。PG の有無によらず HA 濃度が増加すると粘度は増加し、PG と HA の共存下では HA 濃度が高いほど HA 単体溶液と比較して増粘効果が顕著であった。よって、HA を 0.4wt%添加する条件がより PG と HA の凝集効果が顕著であると考えられる。本研究の摩擦試験に用いる潤滑液には、PG 0.2 wt%溶液、HA 0.05 wt%もしくは 0.4 wt%溶液、そして PG 0.2 wt% +HA 0.05 wt%もしくは 0.4 wt%混合溶液を用いることとした。

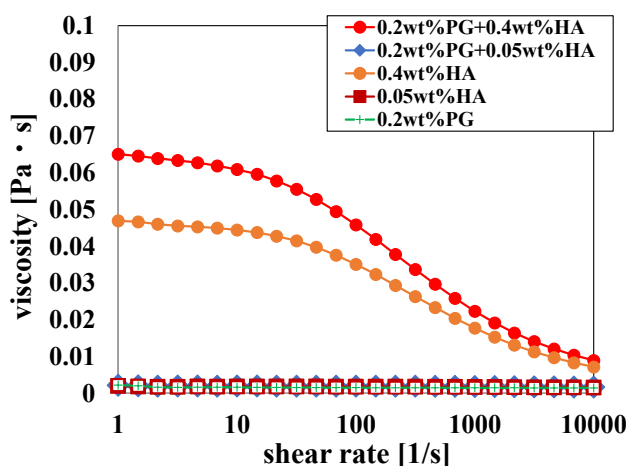


Fig.2 Viscosity of solutions

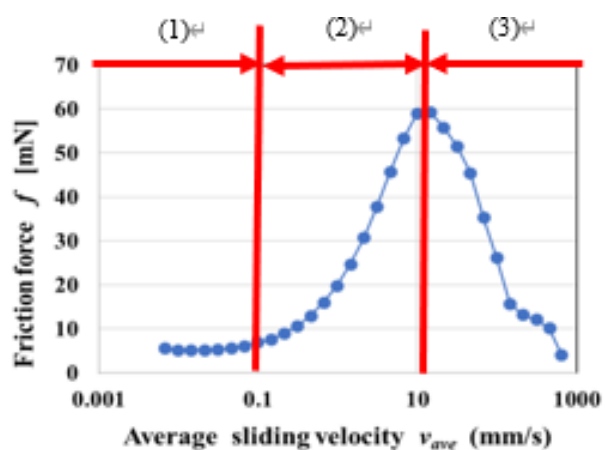


Fig.3 Friction test of hydrogel

3.2 摩擦試験

結果を述べる前に、まずハイドロゲル表面の摩擦挙動について説明する。Gong らのゲルの凝着摩擦モデル⁽⁴⁾に基づくと Fig. 3 に示すように(1) 静摩擦に近い領域、(2) 摩擦相手面に吸着した高分子鎖が伸長した際の弾性力で摩擦が増大する、(3) 摩擦相手面に吸着した高分子鎖の脱着が増加して摩擦が減少する領域に分割することができる。このとき、(2)から(3)に遷移するときの速度を遷移速度と呼ぶ。

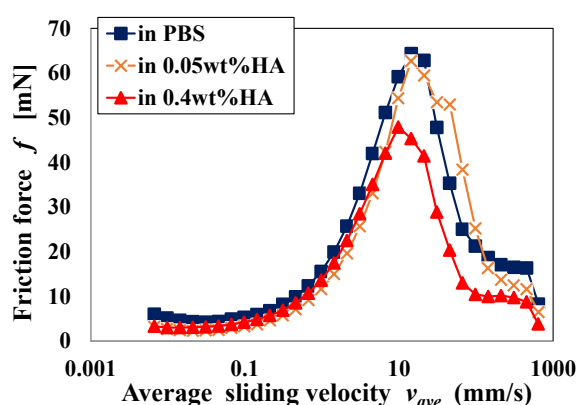


Fig.4 Friction test of agarose hydrogel in PBS or HA solutions

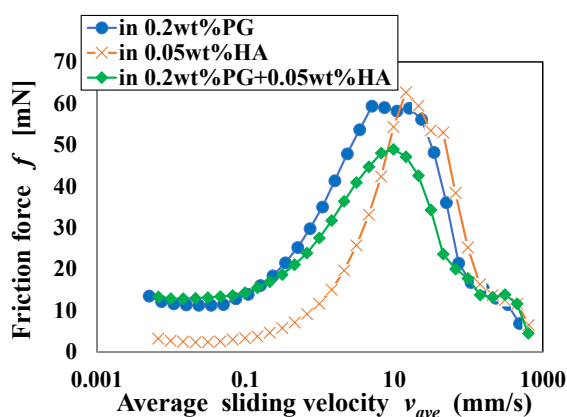


Fig.5 Friction test of agarose hydrogel in 0.2wt% PG, 0.05wt% HA, and mixture PG-HA solutions

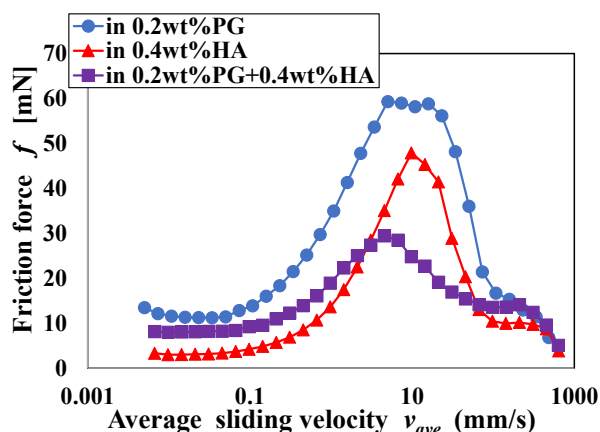


Fig.6 Friction test of agarose hydrogel in 0.2wt% PG, 0.4wt% HA, and mixture PG-HA solutions

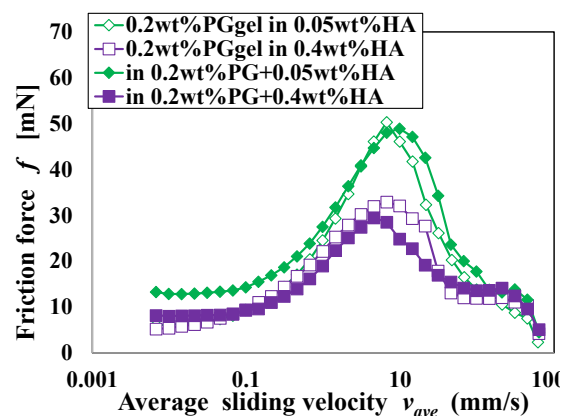


Fig.7 Friction test of agarose hydrogel containing PG in HA solutions and agarose hydrogel in PG-HA mixed solutions

Fig. 4 の摩擦試験はアガロースゲルに対し、潤滑液を 0-0.4wt%HA 溶液とし、HA 濃度変化による摩擦挙動を示す。Fig. 5 の摩擦試験はアガロースゲルに対し、潤滑液を 0.2 wt%PG, 0.05 wt%HA, 0.2 wt%PG+0.05 wt%HA とし、低濃度の HA 溶液に PG 溶液を添加し、PG と HA の協調効果を示す。Fig. 6 の摩擦試験はアガロースゲルに対し、潤滑液を 0.2 wt%PG, 0.4 wt%HA, 0.2 wt%PG+0.4 wt%HA とし、高濃度の HA 溶液に PG 溶液を添加し、PG と HA の協調効果を示す。Fig. 7 の摩擦試験は PG ゲルに対し、潤滑液を 0.05 wt%HA, 0.4 wt%HA としたものとアガロースゲルに対し、潤滑液を 0.2 wt%PG+0.05 wt%HA, 0.2 wt%PG+0.4 wt%HA とし、PG をゲル側か溶液側に添加する場合の HA との協調効果にある差異を示す。

Fig. 4 では、潤滑液の HA 濃度を増加するとともに、最大摩擦力は減少し、遷移速度は低速側へシフトした。低速域での摩擦力は、0 %HA > 0.4 %HA > 0.05 %HA の大小関係であった。最大摩擦力の減少は HA 濃度の上昇による流体潤滑膜形成能の向上や HA 吸着膜による摩擦面間接触の減少によると考えられる。Gong らの凝着摩擦モデル⁴⁾によると遷移速度は溶媒粘度に反比例するため、遷移速度の低下は HA 溶液の粘度上昇によると考えられる。低速域で HA 添加により摩擦が減少し HA 濃度が高いほど摩擦が高くなったのは、吸着 HA 分子が境界潤滑膜として機能するものの高濃度 HA ほどせん断抵抗が増加したためと考えられる。

Fig. 5 と Fig. 6 はともに、PG と HA の協調効果によって最大摩擦力が減少した。遷移速度は Fig. 6 では低速域へシフトしたが、Fig. 5 では遷移速度はあまり変化していない。これは、0.2wt%PG 溶液の粘度に対し 0.2wtPG + 0.4wt%HA 溶液の粘度が大きく、0.2wt%PG + 0.05wt%HA 溶液の粘度があまり変わらないことが原因と考えられる。

Fig. 7 では、PG がゲル側に添加した場合と溶液側に添加した場合、最大摩擦力の大きさにあまり差は見られなかったが、遷移速度の大きさには差が見られた。HA 濃度が 0.05wt%の場合、PG をゲル側に添加した方が、遷移速度がより低速側にシフトした。これは、溶液粘度に明確な差がないにもかかわらず、遷移速度に差が生じていることから、PG と HA の協調効果がゲル最表層で局所的な粘度上昇を引き起こした可能性が示唆される。協調効果の一因としては、先行研究³⁾にもあるように PG と HA の凝集体形成の可能性が考えられる。HA 濃度が 0.4wt%の場合、0.05wt%の場合とは逆に PG をゲル側に添加した方が、遷移速度が大きくなった。高濃度 HA の潤滑液中では、潤滑液側での粘度増加により遷移速度の低下すなわち混合潤滑領域への移行が早まる効果が支配的となり、先述のゲル表面での局所的な増粘効果の影響が相対的に小さくなったと考えられる。一方で、HA 濃度が 0.4wt%の場合、低速域での摩擦力はゲル側に PG を添加した場合の方がより低くなった。低速域ではゲル内部の PG と潤滑液中の HA の協調効果が境界潤滑性を向上させており、特に HA が高濃度の場合は摩擦低減効果があることが示唆された。

以上の結果より、PG と HA の協調効果は、両分子の存在箇所やその濃度に応じて摩擦特性に影響を与えることが明らかになった。とくに PG と HA の協調効果による摩擦低減や遷移速度の変化については両者による凝集体形成の寄与が考えられ、今後は PG-HA 複合体形成の有無や両分子の表面吸着状態、吸着膜構造等の検討が必要である。

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.
- 2) 佐藤・加藤・開作・森田・鎗光・澤江: 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, トライボロジー会議 2024 春東京 予稿集 (2024)
- 3) 西村正宏, ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の相互作用に関する研究, 広大歯誌, 29(1997), 32.
- 4) J.P. Gong, "Friction and lubrication of hydrogels—its richness and complexity", Soft Matter, 2 (2006), 544.