生体関節における蛋白成分とリン脂質の境界潤滑作用*

日垣 秀彦^{*1}, 村上 輝夫^{*1}, 中西 義孝^{*2}Boundary Lubricating Ability of Protein and Phospholipid
in Natural Synovial Joints

Hidehiko HIGAKI, Teruo MURAKAMI and Yoshitaka NAKANISHI

The role of protein and phospholipid in the boundary lubrication mode of a natural synovial joint was examined by using a pendulum friction tester with a pig shoulder joint as the sliding pair. Detergent (polyoxyethylene p-t-octylphenyl ether) was successfully used to remove adsorbed film from the articular cartilage surface. The hydrophobic surface of natural articular cartilage was changed to hydrophilic by ultrasonic rinsing in the saline solution of detergent without large change of surface profile observed by confocal laser microscope. Although the coefficient of friction in the lubricating condition with the saline solution of 1.0 wt% and 0.5 wt% sodium hyaluronate was not changed by the treatment, it was significantly increased in the lubricating condition of 0.2 wt% sodium hyaluronate. This indicates that the adsorbed film on the articular cartilage surface contributes to boundary lubrication with lower viscosity lubricant. Moreover, it was confirmed that the surface treated with detergent was significantly well lubricated with addition of 3.0 wt% γ -globulin in lubricant or 10.0 mg dipalmitoyl phosphatidylcholine on the articular cartilage surface. It appears that protein and phospholipid can be effective boundary lubricants in natural a synovial joints.

Key Words: Tribology, Biomechanics, Lubrication, Natural Synovial Joint, Protein, Phospholipid, Boundary Lubrication, Detergent

1. はじめに

人間の下肢関節である股関節、膝関節および足関節は歩行時には体重の数倍程度の高荷重を受け、平均寿命約75年において10⁸程度の繰返し数に耐える非常に優れたトライボシステムである。膝関節における歩行時の典型的な荷重屈曲パターン⁽¹⁾を図1に示す。通常歩行はHeel strikeに始まりToe offに終わる立脚期と、低荷重と大きな屈曲からなる遊脚期に大別されるが、とくに高荷重下の低速往復運動となる立脚期では、薄膜潤滑状態となりやすい。さらに、生理的に荷重条件を大きく変化させ得る激しいスポーツや、大腿・脛骨摩擦面間での形状適合性が悪い状態での静止状態がつづく正座位からの運動など、生体関節の潤滑モードは多様に変化する。生体関節の潤滑機構は池内ら⁽²⁾のソフトEHLやDowsonら⁽³⁾のマикроEHL等の考察によれば、その大部分は流体膜による潤滑が可能と考えられるが、シビアなモードにおいては境界潤滑^{(4),(5)}や滲出潤滑⁽⁶⁾などの補足的な潤滑機構が作用すると考えられる。著者ら

図1 生体膝歩行時における荷重屈曲パターン

(7),(8)は、このように過酷度の変化に対応して各種の潤滑モードが機能する潤滑機構^{(9),(10),(11)}を多モード適応潤滑(Adaptive multimode lubrication)と称することを提案し、そのような視点から生体関節の潤滑機構の解明を試みている。

摩擦面である軟骨表層と潤滑液である関節液を構成する成分に関しても各潤滑モードでの役割^{(12),(13)}が認められ、過酷度に対応して各成分が分担あるいは協調す

* 原稿受付 1994年12月15日。

^{*1} 正員, 九州大学工学部 (〒812 福岡市東区箱崎6-10-1)。^{*2} 学生員, 九州大学大学院。

ることにより低摩擦・耐摩擦を実現していることが推察される。ヒアルロン酸は関節液の粘度を高く維持することにより、とくに潤滑膜厚に履歴を伴うような歩行運動等において流体膜形成を促し、蛋白成分は関節液および軟骨表面のプロテオグリカゲルの成分として存在し、吸着膜およびゲル膜を形成することにより表面保護の役割を有すると考えられる。

本報では、軟骨摩擦面の界面活性剤処理により極性を有する吸着性物質を遊離させ、それらの摩擦面を用いた振子摩擦試験を行うことにより、蛋白成分とリン脂質の境界潤滑作用について新たな知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2・1 試験対象 対象となる潤滑剤は関節液、ヒアルロン酸ナトリウム（鶏冠製、分子量 1.02×10^6 、以下HAと略す）と人血清由来の分画された蛋白成分（アルブミン、 γ グロブリン）の生理食塩水溶液およびリン脂質（Dipalmitoyl phosphatidylcholine、以下DPPCと略す）の乾燥粉末を用いた。実験に用いた関節液は正常な豚肩関節より注射器にて採取した。関節液の蛋白成分分析としてセルロースアセート膜電気泳動分画、さらにリン脂質分析としてイアトロスキャン薄層クロマトグラフィー分画を行った。

摩擦面に用いた関節軟骨は正常な豚肩関節より屠殺後、図2に示すような形状で採取した。

図2 豚肩関節試験片

界面活性剤としては非イオン性のポリオキシエチレン p-t-オクチルフェニルエーテルを用いた。この界面活性剤は生体膜可溶化能に優れ、本実験における用途に適していると考えられる。界面活性剤による軟骨表面処理では、軟骨試料をポリオキシエチレン p-t-オクチルフェニルエーテルの10wt%濃度の生理食塩水溶液に浸し、30分間超音波振動を与え、さらに生理食塩水中で

30分間、同様の超音波振動洗浄を行った。

2・2 実験装置 豚肩関節を摩擦面として用いた振子摩擦試験機の概略を図3に示す。豚肩関節の骨頭と臼蓋は、生後6カ月の同程度の体重を有する異なる豚より採取したが、各形状寸法は類似であった。潤滑液は実験直前に0.5mlを臼蓋側に滴下した。荷重条件は100Nに設定し、負荷直後に揺動試験を行った。

図3 振子摩擦試験機概略図

初期振幅 θ_0 を0.1radに設定し、振幅が0.08radから0.03radの各振幅での減衰量を測定し、平均を求めた。摩擦係数 f は次式⁽¹⁴⁾により算出した。

$$f = (l/4r) (\theta_n - \theta_{n-1})$$

l : 重心支点間距離
 r : 摩擦面半径
 θ : 振幅

重心支点間距離 l と摩擦面半径 r は各試験片に対し実測した。

3. 結果および考察

3.1 界面活性剤処理による軟骨摩擦面の変化 豚肩より摘出後無処理および界面活性剤処理した軟骨表面の湿潤状態での共焦点レーザ顕微鏡写真と写真中白線で示した部分の断面形状を図4に示す。共に最大高さで2 μ m程度の粗さを示し、形状的に顕著な変化は認められない。

無処理および界面活性剤処理した軟骨表面を大気中で10時間乾燥させ、蒸留水10 μ lを滴下し、10秒後に接触角を測定した。結果を図5に示す。無処理の表面はHills⁽¹⁵⁾やChappuis⁽¹⁶⁾らの指摘と同様に疎水性を示した。界面活性剤処理後はHills⁽¹⁵⁾のクロロフォルム処理

図4 界面活性剤処理による軟骨表面の形状的变化

と同様に親水化しており、無処理と比較して急速に水分を吸収することが確認された。無処理の軟骨表面においては、乾燥後、自由表面に対し疎水基を向けた吸着膜が存在しているのに対し、界面活性剤処理した表面は、レーザ顕微鏡の分解能レベルにおいて確認不能

図5 界面活性剤処理による軟骨表面での水の接触角の変化

な吸着膜が遊離され、親水性を示す軟骨マトリックスが露出していることが推察される。

3. 2 摩擦挙動に及ぼす界面活性剤処理の影響 界面活性剤処理が摩擦挙動に及ぼす影響を観察するために摘出後無処理の軟骨の組合せで振子摩擦実験を行った後に、同じ軟骨の組合せに界面活性剤処理を施し、再度実験を行った。潤滑液としてのHA水溶液の粘性効果⁽¹⁷⁾を利用し、HA濃度を変化させることにより潤滑モードを変化させた。コーンプレート粘度計により測定した実験室室温20℃における潤滑液粘度を、せん断速度に対して図6に示す。各HA濃度において非ニュートン性を示すが、濃度上昇に依存して粘度が上昇することがわかる。0.5wt% HA水溶液は、せん断速度 5 s^{-1} 程度において豚関節液と同程度の粘度を有する。

図6 関節液とHA水溶液の粘度と非ニュートン性

振子摩擦実験による摩擦係数を図7に示す。関節液成分による吸着膜の残存が認められる無処理の軟骨摩擦面において、各HA濃度における摩擦係数を比較するとHA高濃度1.0wt% (a) および0.5wt% (b) の条件は0.2wt% (c) より低い値を示す。HA高濃度1.0wt% (a) および0.5wt% (b) の条件では、界面活性剤処理による摩擦係数の増減は、統計的には認められない。HA濃度を0.2wt% (c) に低下させることにより、全実験に共通して摩擦係数は上昇しており、統計的にも有意水準 (t 検定) 0.005において摩擦係数の上昇が認められた。

本荷重条件が生理的条件よりかなり低いため、比較的高濃度のHA水溶液では流体潤滑状態を維持できていることが推察される。したがって、極めて低い摩擦係数を示し、界面活性剤処理後の軟骨摩擦面の吸着層の変化が摩擦挙動に影響を与えていないと考えられる。一方、0.2wt%の条件では粘度低下により流体膜形成能が低下し、境界潤滑モードが含まれる摩擦条件になっ

図7 軟骨摩擦面の界面活性剤処理による摩擦挙動への影響

ていると推察され、界面活性剤処理による吸着膜遊離が摩擦係数上昇の原因と考えられる。

3.3 豚関節液に含まれる蛋白成分とリン脂質の分画

豚関節液の蛋白成分をセルロースアセテート膜電気泳動法により分画した結果を、笹田ら⁽¹⁸⁾の人関節液の結果と対比して、表1に示す。動物から採取した関節液は一般にグロブリン画分に特異なバンドを有し、本実験および分析に用いた豚の場合は α 2グロブリンが高い分布を示している。豚関節液に含まれる総蛋白成分量は3.4g/dlであった。

表1 セルロースアセテート膜電気泳動法による関節液の蛋白分画

Protein	Percentage $\pm$ SEM	Percentage
	Pig, N=30	Human ⁽¹⁸⁾
Albumin	57.2 $\pm$ 0.92	55~70
α 1-globulin	4.53 $\pm$ 0.59	6~8
α 2-globulin	13.1 $\pm$ 0.68	5~7
β -globulin	6.91 $\pm$ 0.53	8~10
γ -globulin	7.26 $\pm$ 0.62	10~14

これらの蛋白は電気泳動により分画されることから分かるように、水系の環境において粒子表面が帯電する。表1において上から示す順序で陽極側から陰極

側へ分布する。したがって、摩擦実験では生理的水系環境のpHで最も負に帯電するアルブミンと正に帯電する γ グロブリンを選択した⁽¹³⁾。

豚関節液のリン脂質成分の薄層クロマトグラフィーにより分画した結果を、Hillsら⁽¹⁹⁾の犬関節液の結果と対比して、表2に示す。豚関節液に含まれる総リン脂質量は19mg/dlであった。

両動物においてフォスファチジルコリンが主成分であることが分かる。さらに、Hills⁽¹⁵⁾は、そのフォスファチジルコリンの大部分がリン脂質の中でも極めて表面活性が高いDPPCからなることを指摘しており、本摩擦実験ではリン脂質としてDPPC粉末を用いた。

3.4 境界潤滑モードにおける蛋白成分とリン脂質の潤滑性能 蛋白成分とリン脂質の境界潤滑性を観察するために、0.2wt%HA水溶液の条件において無処理と界面活性剤処理の摩擦実験の後、30分間生理食塩水中で超音波を与え、0.2wt%HA水溶液を洗浄し、再度、アルブミン、 γ グロブリンあるいはDPPCを添加した0.2wt%HA水溶液の条件で実験を行った。アルブミンおよび γ グロブリンは、3.0wt%の濃度で0.2wt%HA水溶液に溶かすことにより、DPPCは軟骨摩擦面に乾燥粉末10mgを塗布することにより使用した。アルブミンおよび γ グロブリンを添加することによる0.2wt%HA水溶液

表2 薄層クロマトグラフィーによる関節液のリン脂質分画

Phospholipid	Percentage $\pm$ SEM	
	Pig, N=6	Canine, N=8 ⁽¹⁹⁾
Phosphatidyl cholines (PC)	54.7 $\pm$ 2.23	44.7 $\pm$ 3.90
Sphingomyelins (Sp)	28.2 $\pm$ 1.17	12.2 $\pm$ 2.23
Lysophosphatidyl cholines (LPC)	3.23 $\pm$ 0.98	10.9 $\pm$ 2.83
Phosphatidyl ethanolamines (PE)	1.05 $\pm$ 0.62	15.1 $\pm$ 3.25
Phosphatidyl inositols (PI)		7.3 $\pm$ 2.08
Phosphatidyl serines (PS)	> 1.80 $\pm$ 0.62	7.4 $\pm$ 2.14

の20℃における粘度の変化を図8に示す。 γ グロブリンを添加することにより、0.2wt%HA水溶液の粘度と比較してわずかな上昇を認めるが、アルブミンを添加することにより、せん断速度 10 s^{-1} 以上において低下するとともに速度依存性が増加することがわかる。

図8 潤滑液粘度と非ニュートン性

振子摩擦実験による摩擦係数変化を図9に示す。上述したように、全実験において界面活性剤処理により摩擦係数は上昇する。関節液潤滑 (a) では全実験に共通して界面活性剤処理後の実験より摩擦係数の低下が認められ、統計的にもt検定における有意水準0.01において低下し、境界潤滑膜が修復されていることが示唆される。比較として再度0.2wt%HA水溶液を用いた実験

(b)を行ったが、有意な変化は認められなかった。アルブミン添加 (c) においては摩擦係数に有意な変化は認められず、 γ グロブリン添加 (d) においては有意水準0.005において摩擦係数の低下が認められた。先に報告した軟骨とガラスにおける往復動摩擦の結果⁽¹³⁾においても、他の画分と比較して特異的に γ グロブリンの境界潤滑性が確認されており、生理的環境下での γ グロブリン粒子表面の正のゼータ電位が関与していることが推察される。DPPCを軟骨摩擦面に塗布する条件 (e) においても有意水準0.005において摩擦係数の低下が認められた。

γ グロブリンとリン脂質において認められる界面活性剤処理後の摩擦挙動からの改善は、それらの成分が軟骨表面に潤滑性を有する膜を形成することに起因していると考えられる。

3.5 γ グロブリンとDPPCの生理的濃度での潤滑性の検討 豚関節液の蛋白成分とリン脂質の総量測定と分画結果より、境界潤滑性を示した γ グロブリンの関節液中濃度は約0.25wt%，DPPCは約0.01wt%と見積もることができる。上述の振子試験では、両成分とも生理的濃度よりもかなり高濃度の条件下で潤滑効果が認められた。しかるに、両成分とも極性基を含むため、吸着挙動により軟骨表面では、液中よりも高い濃度を示すと考えられる。とくにDPPCの関節液分析ではミセルもしくは蛋白との複合体として存在している液中成分のみを測定しているとみなされる。そこで、振

図9 蛋白成分とリン脂質の境界潤滑性 (横軸は潤滑剤, HA濃度は0.2wt%)

子摩擦実験において滴下する潤滑液が0.5mlであることより、DPPCを約0.2wt%にあたる1.0mgを軟骨表面に塗布し、 γ グロブリンを0.3wt%の濃度で0.2wt%HA水溶液に添加することにより、より生理的条件に近い濃度条件として摩擦評価を行った。前実験と同様に0.2wt%HA水溶液の潤滑条件において無処理と界面活性剤処理の摩擦実験の後、30分間生理食塩水中で超音波を与え、再度、 γ グロブリン添加と同時にDPPC塗布の条件で行った。摩擦係数の変化を図10に示す。生理的濃度に近い γ グロブリン添加およびDPPC塗布では有意な摩擦の改善は認められない。

図10 生理的濃度における γ グロブリンとDPPCの境界潤滑性評価

一般に細胞膜のような生体膜の構造は極性脂質と蛋白成分から構成され、生体内は水系の環境であるため両親媒性である脂質と蛋白成分は疎水基を膜内部に配し、親水基が膜表面あるいは吸着部を形成する。軟骨表層のプロテオグリカンゲルの表面にも類似の膜が形成されていることが推察される^{(5),(15)}。生理的濃度よりかなり高い濃度における γ グロブリンとDPPCの単独での境界潤滑性は確認されたが、本実験において見積もった生理的濃度において摩擦の改善が認められないのは、 γ グロブリンの潤滑液への添加およびDPPCの軟骨面への塗布といった膜形成につながる手法に検討が必要であることを示唆しており、生体関節の境界潤滑性については、さらに、生合成等により存在する他の成分との複合体⁽⁴⁾の寄与などを考慮する必要がある。

4. 結論

以上の実験により次のことが明らかとなった。

軟骨表面を界面活性剤処理することにより、乾燥下で疎水性を示す表面吸着膜を遊離させ、境界潤滑性を低下させることを確認した。

表面吸着膜を失った軟骨表面は、生理的濃度より高い濃度ではあるが、 γ グロブリンの潤滑液添加あるいは軟骨摩擦面へのリン脂質塗布により境界潤滑性を向上する。

試料を提供いただいた生化学工業(株)、並びに福岡市食肉衛生検査所の関係各位に謝意を表す。なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金重点領域研究「バイオメカニクス」(04237106)の交付を受けて実施したことを付記する。

文 献

- (1) Morrison, J. B., Bio-med. Eng., 3, 4, (1968), 164.
- (2) 池内・ほか3名, 機論, 47-420, C (1981), 1046.
- (3) Dowson, D. and Jin, Z. M., Engng Med., 15, 2, (1986), 63.
- (4) Swann, D. A., ほか2名, J. Biol. Chem., 256, (1981), 5921.
- (5) Williams III, P. F., ほか2名, Proc. Instn. Mech. Engrs., 207, (1993), 59.
- (6) McCutchen, C. W., Proc. Instn. Mech. Engrs., 181, Pt. 3J, (1966-67), 55.
- (7) Murakami, T., JSME Intern. Journal, Series III, 33, 4, (1990), 465.
- (8) Murakami, T., ほか2名, Thin Films in Tribology, (1993), 673, Elsevier.
- (9) Dowson, D., Proc. Instn. Mech. Engrs., 181, Pt. 3J, (1966-67), 45.
- (10) 笹田, 潤滑, 23, 2, (1978), 79.
- (11) 池内, トライボロジスト, 39, 4, (1994), 333.
- (12) 日垣・村上, トライボロジスト, 39, 7, (1994), 625.
- (13) 日垣・村上, トライボロジスト, 掲載予定.
- (14) Murakami, T., ほか5名, Proc. Int. Cong. Biomech., (1982), 97.
- (15) Hills, B. A., J. Rheum., 16, 1, (1989), 82.
- (16) Chappuis, J., ほか2名, Ann. Biomed. Eng., 11, (1983), 435.
- (17) 馬淵・ほか5名, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 14, (1992), 233.
- (18) 笹田・ほか2名, バイオトライボロジー, (1988), 40, 産業図書.
- (19) Hills, B. A. and Butler, B. D., Ann. Rheum. Dis., 43, (1984), 641.