Langmuir-Blodgett 法により作成した軟骨表面 境界潤滑膜モデルの潤滑性能*

日垣 秀彦^{*1}, 村上 輝夫^{*1}, 中西 義孝^{*2}

Lubricating Ability of Langmuir-Blodgett Films as Boundary Lubricating Films on Articular Surfaces

Hidehiko HIGAKI, Teruo MURAKAMI and Yoshitaka NAKANISHI

Frictional behavior in sliding pairs of pig articular cartilage and glass plate has been studied to elucidate the tribological role of constituents in a synovial fluid and a surface layer of the articular cartilage. Pig synovial fluid and water solution of hyaluronic acid were used as lubricants. The synovial fluid had a significantly superior lubricating ability to a sodium hyaluronate solution of equivalent viscosity under physiologically high load condition. The superiority of the synovial fluid seems to be responsible for the boundary lubricating ability of constituents other than hyaluronic acid. Langmuir-Blodgett films of phospholipid ($L\alpha$ -dipalmitoyl phosphatidylcholine, $L\alpha$ -DPPC) on the glass plate maintained low and stable friction, depending on the number of film layers. In conditions of mixed films containing γ -globulin and $L\alpha$ -DPPC, the frictional behavior was improved by increasing the quantity of γ -globulin. A model of the boundary lubricating mechanism is proposed in which the effective adsorbed film is composed of proteins, phospholipids and other conjugated constituents on the articular surfaces, and controlled by hydrophobic groups in those amphiphiles.

Key Words: Synovial Joint, Biotribology, Boundary Lubrication, Phospholipid, Protein, Langmuir-Blodgett Method

1. はじめに

生体関節はスムーズな生理的運動を許容するため、骨端は低弾性の軟骨や海綿骨からなる傾斜構造をとり、関節液には高粘度を維持する高分子多糖類や吸着膜形成能を有する両親媒性分子を備える優れたトライボシステムである。この潤滑機構に対し、多数の実験的、解析的あるいは解剖学的考察がなされ、生体特有の材料物性・構造の寄与や、潤滑性を有する細胞外マトリックスの合目的的な存在が報告されてきた。そこで、生体関節の潤滑は特定の潤滑メカニズムだけが機能するシステムではなく、複数のメカニズムが複合的に寄与していることが示唆されてきている⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾。

著者ら⁽⁵⁾は過酷な潤滑モードにおける軟骨表層の吸着膜の役割に着目し、関節液含有成分である蛋白成分やリン脂質の境界潤滑作用を報告した。しかし、軟骨表面吸着膜は界面活性剤により一旦除去されると、単に生理的濃度の蛋白成分やリン脂質を投与しただけで

は再形成されず、その境界潤滑性の回復は認められなかった⁽⁶⁾。そこで、生理的な濃度条件において、それら両親媒性成分の有効性の発現を確認するために、Langmuir-Blodgett (LB) 法により生体膜類似の境界潤滑膜モデルを作成し、その摩擦挙動を評価した。

2. 実験方法

2.1 試験片と往復動摩擦試験機 摩擦面として使用する軟骨は、Fig. 1に示すように豚前肢上腕骨より肩関節骨頭球面部分を利用した。各実験条件に対し、6個の炎症症状のない関節を選び、半球状に切断し荷重アームに固定した。軟骨の相対面にはガラス平板を用い、条件により表面にLB膜を作成した。

実験に使用した往復動摩擦試験機の概略をFig. 2に示す。荷重条件は19.6Nに設定し、ガラス平板の裏面から観察した接触面積より見積もった平均面圧は軟骨による個体差を示し、 1.34 ± 0.47 MPaの範囲であった。静的な荷重条件であるため生理的には過酷になっており、荷重値を変化させた摩擦測定⁽⁷⁾から混合潤滑状態を含む荷重条件になっていると推察された。一定荷重負荷直後に下部人工材料試験片に周期1秒、ストロー

* 原稿受付 1996年3月21日。

^{*1} 正員、九州大学工学部 (〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1)。

^{*2} 正員、九州大学大学院。

ク30mmで正弦波状の往復運動を与え、上部固定試験片側のひずみゲージにより摩擦力を測定した。

2. 2 潤滑液 実験に用いた潤滑液は豚関節液とヒアルロン酸ナトリウム（以下、HAと略す）の水溶液でTable 1に構成成分を示す。豚関節液は、屠殺後、炎症症状のない後肢膝関節より注射器にて採取した。表中の豚関節液成分は、複数の膝関節から採取した関節液を混合した後の分析結果である。蛋白成分とリン脂

Fig. 1 Articular cartilage excised from pig shoulder joint as upper stationary specimen

Fig. 2 Schematic representation of reciprocating friction tester

質成分はさらに電気泳動法と薄層クロマトグラフィーにより分画した。それぞれ、アルブミンとフォスファチジルコリン（PC）が主成分であることがわかる。関節液中PCの大部分がリン脂質の中でも表面活性の高いジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）から成ることが指摘されている⁽⁸⁾。水溶液に用いたHAは鶏冠由来で、蛋白残量0.2%以下の高純度のものであり、平均分子量は96万である。両液の粘度をコーン/プレート型回転粘度計を用い、実験室温度20℃で測定した。HA水溶液濃度の0.375 wt%はせん断速度2 s⁻¹における粘度が豚関節液と等しくなるように選択した。

2. 3 Langmuir-Blodgett法による多層膜形成 関節液含有成分に認められる微量両親媒性分子による生体膜類似の表面膜を形成するために、LB法に従いガラス表面に多層膜を形成した。LB法は、まず水面に有機溶媒を用い展開した膜成分を、バリエーを使い圧縮し、表面圧を制御する。固体凝縮膜状態を維持しながら、基板を昇降させ、単分子膜を累積することにより多層膜を形成する。

実験には膜成分として、前報⁽⁵⁾⁽⁶⁾において生理的に高濃度での境界潤滑性が認められたL α -DPPCと人血清由来の γ グロブリンを用いた。有機溶媒にはクロロフォルム、エタノール、ベンゼンおよびヘキサン等の等重量比混合液を用いた。生体膜の一例として赤血球細胞膜の成分構成に占めるリン脂質重量が25.8%であることから⁽⁹⁾、膜成分構成比はL α -DPPC： γ グロブリンが（25：75）とし、対照として（100：0）および（10：90）を調製した。LB膜の累積は、ガラスを水中に浸した状態から上昇させることにより、極性基がガ

Table 1 Constitutions of lubricants

Lubricant	Constituent	Concentration		
Pig synovial fluid	Hyaluronic acid	0.12 g / dl	Molecular weight = 4.8×10^6	
	Protein	3.4 g / dl	Division of Albumin α_1 -globulin α_2 -globulin β -globulin γ -globulin	Percentage $\pm$ SEM 57.2 $\pm$ 0.92 4.53 $\pm$ 0.59 13.1 $\pm$ 0.68 6.91 $\pm$ 0.53 7.26 $\pm$ 0.62
	Phospholipid	0.019 g / dl	Phosphatidyl cholines (PC) Sphingomyelins (Sp) Lysophosphatidyl cholines (LPC) Phosphatidyl ethanolamines (PE) Phosphatidyl inositols (PI) Phosphatidyl serines (PS)	Percentage $\pm$ SEM 54.7 $\pm$ 2.23 28.2 $\pm$ 1.17 3.23 $\pm$ 0.98 1.05 $\pm$ 0.62 > 1.80 $\pm$ 0.62
Water solution of hyaluronic acid	Sodium hyaluronate	0.375 g / dl	Molecular weight = 9.6×10^5	

ラスに面した単分子膜を形成し、下降することにより疎水基が向かい合い、対をなすことで得られる2重膜を1層とした。LB膜の摩擦評価は積層後24時間乾燥させた後、LB膜上にHA水溶液を供給することにより行った。L α -DPPCの単分子膜を圧縮した場合の表面圧・分子占有面積曲線は、Harkinsら⁽¹⁰⁾のPC (Phosphatidyl choline) についての報告と同様に、圧縮極限面積が30~40 Å²/molecule程度の範囲で表面圧が上限を保つため、35 Å²/moleculeを固体凝縮膜状態の制御目標に設定した。

ガラス基板への単分子膜の形成の確認のため、原子間力顕微鏡 (AFM) によりLB膜表面の形態を観察した。さらに、累積比を、基板上に移し取られた膜の面積に対する水面上の単分子膜の面積減少分として定義し、L α -DPPC単分子膜に対し100 %になることを確認した。L α -DPPCと γ グロブリンが混在する条件では、累積比は100 %以上の値を示し、圧縮時に立体的な凝縮会合を行っていることが示唆された。

3. 結果および考察

3. 1 Langmuir-Blodgett 膜表面の原子間力顕微鏡による観察 L α -DPPCと γ グロブリンの各構成比における単分子膜のAFM像をFig. 3に示す。L α -DPPCの単分子膜は非常に平滑であるのに対し、 γ グロブリンが混在するLB膜では、 γ グロブリンの構成比に依存して数十nmの塊が局在していた。

3. 2 関節液と関節液成分の水溶液を用いた潤滑による軟骨とガラスの摩擦挙動

3. 2. 1 潤滑液粘度 摩擦実験に用いた潤滑液である豚関節液と0.375wt %HA水溶液のせん断速度に対する粘度をFig. 4に示す。両液とも非ニュートン性を示し、ヒアルロン酸分子量の差違がせん断速度依存性に表れており、高分子量ヒアルロン酸を含む豚関節液の粘度が顕著なせん断速度依存性を示した。せん断速度2 s⁻¹の条件で共に0.4 Pa $\cdot$ s程度の粘度を示し、それ以上のせん断速度では0.375wt %HA水溶液が高粘度を示した。

3. 2. 2 関節液成分の潤滑への寄与 LB膜を形

Fig. 3 Atomic force micrographs of a layer of LB film with L α -DPPC and γ -globulin on glass plate (Fluid tapping mode in water)

Fig. 4 Viscosity and non-Newtonian flow of lubricants

成していないガラスを用い、豚関節液と0.375 wt% HA水溶液の潤滑性を比較した。経時的なストローク中最大摩擦係数の変化をFig. 5に示す。実験開始直後は共に摩擦係数0.01程度を示したが、HA水溶液潤滑条件では直ちに著しく上昇し、3分後からはt検定 ($p < 0.01$) による統計的有意差を認めた。

著者らは、ヒアルロン酸の濃度を上昇させることにより、摩擦は低下させうるが、特に本実験と同じ高荷重条件において関節液潤滑の摩擦係数には達し得ないことを報告しており⁽⁷⁾、関節液中のヒアルロン酸以外の成分の境界潤滑への寄与が推察される。さらに、非イオン性界面活性剤ポリオキシエチレン p-t-オクチルフェニルエーテル (Triton X-100) を用い軟骨表面を洗浄することにより、乾燥下に疎水性を示す軟骨表面が親水化することを報告した^{(5) (6)}。この時、湿潤軟骨表面の形状はレーザ顕微鏡の分解能レベル (約0.4 μm) において変化は認められなかった。軟骨表層のプロテオグリカンマトリックスは負の電荷を有し極めて親水性であることから、軟骨表面における分子レベルの吸着膜が除去されたことを示唆していた。Hillsら

Fig. 5 Lubricating ability of pig synovial fluid and water solution of 0.375 wt% HA in sliding pairs of articular cartilage and glass plate ($N=6$, Error bars indicate S. D.)

(11) は、軟骨表面から軽く削り取った組織において、透過型電子顕微鏡により高密度のリン脂質を確認した。Kirkら⁽¹²⁾も透過型電子顕微鏡とエネルギー分散分光器により軟骨表層のリン脂質を確認しており、軟骨表面でのリン脂質を含む吸着膜の存在の可能性を示唆している。

3. 3 $\text{L}\alpha$ -DPPCによるLangmuir-Blodgett膜の潤滑効果 HA水溶液潤滑の条件において、 $\text{L}\alpha$ -DPPCのみのLB膜形成の潤滑への影響を観察した。経時的最大摩擦係数の変化をFig. 6に示す。2重膜1層ではLB膜を形成していない場合と比較して有意な改善は認められないが、累積を増すことにより摩擦は低下安定し、2重膜5層および10層において有意な摩擦挙動の改善を認めた。

牛関節軟骨において、表面のリン脂質を有機溶媒により遊離させ、薄層クロマトグラフィーにより定量することにより、対象軟骨表面積に 6.8 ± 2.1 層の単分子膜に相当するリン脂質が存在することが報告されている⁽¹¹⁾。

本実験において、30分後の2分子膜1層、5層、および10層における摩擦係数の平均値と標準偏差は、それぞれ 0.110 ± 0.054 , 0.015 ± 0.003 , 0.014 ± 0.003 で、関節液の値 (0.009 ± 0.002) と比較し、すべて危険率1%で有意に高い結果となった。他の生体膜と同様に、蛋白成分等のリン脂質以外の成分の境界潤滑膜形成への寄与が推察される。

Fig. 6 Effect of LB films of $\text{L}\alpha$ -DPPC on frictional behavior ($N=6$, Error bars indicate S. D.)

3. 4 両親媒性多成分の軟骨表面吸着膜による境界潤滑機構の仮説 著者ら⁽⁷⁾はHA水溶液潤滑の同実験系において、等重量濃度のアルブミンの添加に比して γ グロブリンの添加に有意な境界潤滑性を確認した。Swannら^{(13) (14)}は関節液をバイオゲルA型を用い

たゲルクロマトグラフィーと塩化セシウム溶液を用いた密度勾配超遠心分離法を行うことにより分画し、境界潤滑性を有するLGP-1 (Lubricating glycoprotein-1) 画分の存在を報告している。同様にJay⁽¹⁵⁾も陰イオン交換法、ゲルクロマトグラフィーと密度勾配遠心分離法によりPSLF (Purified synovial lubricating factor) の存在を指摘し、ガラス(親水性)とラテックス(疎水性)の摩擦系においてその境界潤滑性を報告している。

蛋白成分分子は非極性部分を有し、水性の環境ではその難溶性に依存した担体への吸着が予想される。これは、油系の潤滑で難溶性の極性添加剤が容易に境界潤滑膜を形成する現象と反対に、水系の潤滑において周囲の水に対する極性部分の水和に依存して、水中から排除された非極性部分が会合することによるものである。そこで、摩擦実験に用いた人血清由来のアルブミンと γ グロブリンに対し、ニンヒドリン反応を利用したクロマトグラフィーを行い、アミノ酸残基の分析を行った。人膝関節液中のLGP-1⁽¹³⁾と牛関節液中のPSLF⁽¹⁵⁾のアミノ酸部分の結果と比較してTable 2に示す。側鎖の構成においてアルブミンは非極性残基の比率が59.3%であるのに対し、 γ グロブリンは74.1%を占めており、水に対して難溶性であることがわかる。LGP-1やPSLFにおけるアミノ酸残基も γ グロブリンと同様に非極性の比率が高く、他の両親媒性分子の非極性部分と会合し、容易に水中から排除されることが予想され、そのことが高い境界潤滑性能に関与していることが推察される。

関節液中において比較的濃度が高く非極性残基の比率が高い γ グロブリン画分も、軟骨表面に高密度で認

められるリン脂質等の疎水基に非極性部分を会合する形態をとることが考えられる。この時、球状蛋白や糖蛋白の非極性アミノ酸グループは生体膜のように疎水基が内側に会合する膜構造に組み込まれ、2分子膜を基本単位とする吸着膜を形成し、低摩擦に寄与するモデルが推察される。この仮説に対し、 γ グロブリンとL α -DPPCの両成分が混在した境界潤滑膜モデルを形成し、その潤滑性を検討した。

3. 5 γ グロブリンとL α -DPPCの混合による境界潤滑膜モデルの潤滑効果 L α -DPPCと γ グロブリン混合のLB2重膜1層と10層における摩擦挙動の経時的変化をFig. 7に示す。 γ グロブリンを75%含む2重膜1層の条件では、実験開始直後から摩擦係数の上昇が認められるが、10分後をピークに低下した。膜中に γ グロブリンを混在させることにより、表面膜のないガラスやL α -DPPCの2分子膜1層の条件と比較し、摩擦挙動に有意な改善が認められた。さらに、累積層数と膜中における γ グロブリンの含有量に依存して摩擦が低下安定する傾向を認めた。前報⁽⁷⁾において潤滑液中への生理的に高濃度での γ グロブリン添加により同実験系において低摩擦を示したことからも、ある程度の γ グロブリンが摩擦面に供給されることにより、低摩擦を維持できることが示唆された。しかしながら、2重膜10層の条件では、L α -DPPCのみと γ グロブリンが混在するLB膜の条件では、摩擦係数に有意差は認められなかった。

次に、 γ グロブリンをガラスに面する第1膜形成の際にのみL α -DPPCとの各混合条件において用い、第2膜はL α -DPPCのみから成る2重膜1層を形成した。各混合条件における経時的な摩擦挙動の変化をFig. 8に

Table 2 Amino acid residues of globular proteins, LGP-1⁽¹³⁾ and PSLF⁽¹⁵⁾
(* Acidic amino acid, ** Basic amino acid)

	Albumin	γ -globulin	LGP-1	PSLF	
Amino acids residues / 1000					
Aspartic acid*	76	58	38	18	pK=4.7
Threonine	48	71	234	82	
Serine	43	115	60	40	
Glutamic acid*	152	94	106	14	pK=4.7
Proline	46	70	244	117	
Glycine	25	176	32	34	
Alanine	116	53	93	105	
Cystine	26	10	-	-	
Valine	64	75	15	137	
Methionine	9	7	5	41	
Isoleucine	13	19	11	87	
Leucine	112	75	22	133	
Tyrosine	29	38	3	36	
Phenylalanine	55	32	4	83	
Lysine**	110	63	117	21	pK=10.2
Histidine**	27	16	7	8	pK=6.5
Arginine**	42	28	9	44	pK=12.0
Polar residues / 1000	407	259	277	105	
Non-polar residues	593	741	723	895	

示す。各混合比において、混合膜を2重に積層した摩擦係数の結果 (Fig. 7) と比較し、有意な低下を認めた。さらに、 γ グロブリンを第1膜に90%含む条件では、関節液の摩擦係数との間に危険率5%においても統計的な有意差は認められなかった。このとき、LB膜に含まれる $\text{L}\alpha$ -DPPCと γ グロブリンの重量は、それぞれ $6.6 \times 10^{-8} \text{ g/mm}^2$ と $7.2 \times 10^{-8} \text{ g/mm}^2$ で、関節腔内の生理的濃度により十分形成可能な吸着膜であると考えられる。 $\text{L}\alpha$ -DPPCの単分子膜を第2膜に形成することにより低摩擦を示す現象は、潤滑液であるHA水溶液に対して $\text{L}\alpha$ -DPPCの親水基が均一に並ぶことや混合2重膜において第2膜の γ グロブリンの安定性が低いことなどが予想されるが、さらに検討が必要と考えられる。

Fig. 7 Effect of LB films of $\text{L}\alpha$ -DPPC and γ -globulin on frictional behavior ($N=6$, Error bars indicate S. D.)

Fig. 8 Effect of LB films of $\text{L}\alpha$ -DPPC and γ -globulin on glass plate, in which the films are composed of two layers of first mixed film and second film with $\text{L}\alpha$ -DPPC alone ($N=6$, Error bars indicate S. D.)

4. 結論

以上の実験により次のことが明らかとなった。
軟骨とガラスの摩擦において、ヒアルロン酸ナトリ

ウム水溶液と比較し関節液は優れた潤滑性を示した。
ヒアルロン酸ナトリウム水溶液潤滑条件において、ガラス表面のリン脂質 ($\text{L}\alpha$ -DPPC) LB膜はその累積層数に依存して潤滑性を向上させ、2分子膜5層において安定した低摩擦を示した。 $\text{L}\alpha$ -DPPCと γ グロブリンが混在するLB膜では、定量的に関節腔内の生理的濃度においても形成可能と考えられる吸着膜により、関節液同様の安定した低摩擦を実現できた。

原子間力顕微鏡による試料の計測にご協力いただいた九州大学中央分析センター、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る。なお、本研究は文部省科学研究費の交付を受けて実施したことを付記する。

文献

- (1) Dowson, D., Proc. Instn. Mech. Engrs., 181, Pt. 3J, (1966-67) 45.
- (2) 笹田 直: 潤滑, 23, 2 (1978) 79.
- (3) Murakami, T., JSME Intern. Journal, Series 3, 33, 4, (1990) 465.
- (4) Ikeuchi, K., To be published in Proc. 21st Leeds-Lyon Symp. Tribology.
- (5) Higaki, H., Murakami, T. and Nakanishi, Y., Proc. 4th CJUS Conf. Biomechanics, (1995), 154.
- (6) 日垣秀彦, 村上輝夫, 中西義孝, 機論, 61, 588, C, (1995), 3396.
- (7) 日垣秀彦, 村上輝夫, トライボロジスト, 40, 7, (1995), 598.
- (8) Rabinowitz, J. L., Gregg, J. R. and Nixon, J. E., Clin. Orthop., 190, (1983), 292.
- (9) 阿部康次, 土田英俊, 高分子と細胞膜の相互作用, 共立出版, (1992), 2.
- (10) Harkins, W. D. and Anderson, T. F., J. Am. Chem. Soc., 59, (1937), 2189.
- (11) Hills, B. A., J. Rheumatol, 16, (1989), 82.
- (12) Kirk, T. B., Wilson, A. S. and Stachowiak, G. W., J. Orthop. Rheum., 6, (1993), 21.
- (13) Swann, D. A., Silver, F. H., Slayter, H. S., Stafford, W. and Shore, E., Biochem. J., 225, (1985), 195.
- (14) Swann, D. A., Hendren, R. B., Radin, E. L., Sotman, S. L. and Duda, E. A., Arthritis Rheum., 24, 1, (1981), 22.
- (15) Jay, G. D., Connective Tissue Res., 28, (1992), 71.