関節潤滑におけるジパルミトイルホスファチジルコリンリポソーム と γ グロブリン投与による境界潤滑膜形成の効果*

日垣秀彦^{*1}, 村上輝夫^{*1}, 中西義孝^{*2}
片桐崇門^{*3}, 三浦裕正^{*4}, 馬渡太郎^{*5}

Lubricating Effect of Boundary Films Formed by Addition of Liposomes of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine and γ -Globulin in Synovial Joints

Hidehiko HIGAKI, Teruo MURAKAMI, Yoshitaka NAKANISHI,
Takayuki KATAGIRI, Hiromasa MIURA and Taro MAWATARI

The effect of addition of liposomes of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and γ -globulin on the natural joint lubrication was evaluated through pendulum friction tests. The frictional characteristics of pig shoulder joints were confirmed to depend on the viscosity of lubricants only in the physiologically low-load condition and immediately after the loading. A detergent (polyoxyethylene p-t-octylphenyl ether) was successfully used to remove adsorbed films from the articular surfaces. The friction coefficient of natural joints was significantly increased in mixed lubrication mode with a saline solution of sodium hyaluronate (0.2 g/dl) by surface treatment with the detergent. The addition of liposomes of L α -DPPC or γ -globulin significantly improved the boundary lubricating ability of the articular surfaces treated with the detergent, depending on the quantity of the additives. It appears that the liposomes of L α -DPPC and γ -globulin can form protective films on the articular surfaces in severe frictional condition.

Key Words: Tribology, Lubrication, Biomechanics, Synovial Joint, Boundary Lubrication, Phospholipid, Liposome, γ -Globulin

1. 緒言

膝および肩の関節疾患の治療において、潤滑性の改善等を目的としたヒアルロン酸ナトリウム水溶液の投与が行われている。期待される潤滑効果は、その増粘作用による流体潤滑膜形成の促進が主要であると考えられる。著者ら⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾は生体関節の潤滑メカニズムにおいて軟骨表層と関節液の構成成分に着目し、とくに両親媒性成分の境界潤滑膜形成の可能性とその優れた潤滑性を報告している。本報では、いわゆる多モード適応潤滑の観点から、流体潤滑膜形成が困難であるシビアモードや荒廃退行した軟骨摩擦面において、境界潤滑膜形成を促進するためのジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) リポソームと γ グロブリンの投与効果を検討するため、*in vitro*における振子摩擦試験を行った。DPPCは関節液中の主要なリン脂質であるフォスファチジルコリン (PC) の大部分を占める極性の高い界面活性剤である⁽⁴⁾。 γ グロブリンは非極性アミノ酸側鎖を高い比率で有しており、両成分

分子における疎水基グループが水性の環境において境界潤滑膜形成に効果的に作用することが期待される⁽³⁾。

2. 実験方法

2・1 試験対象 対象となる潤滑液は関節液と、ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業製, 鶏冠由来, 分子量 $8.8\sim 9.6\times 10^5$, 以下HAと略す), γ グロブリン (和光純薬工業製, 人血清由来), およびL α -DPPC (和光純薬工業製) リポソームの生理食塩水溶液を用いた。関節液は複数の正常な豚膝関節より注射器にて採取した。関節液の分析結果を表1に示す。蛋白成分とリン脂質の分画は、それぞれ電気泳動法と薄層クロマトグラフィーにより行った。各潤滑液に対し、実験室温25℃において自作のパソコン制御コーン/プレート型回転粘度計を用い粘度測定を行った。

摩擦面に用いた関節軟骨は屠殺後の食用豚の正常な肩関節より、図1に示すような形状に切断した。軟骨表面膜除去を目的として、非イオン性の界面活性剤であるポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-100) を用いた。Triton X-100は生体膜可溶

* 原稿受付 1996年4月22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。

^{*3} 学生員, 九州大学大学院。

^{*4} 九州大学医学部。

^{*5} 九州大学大学院。

Table 1 Constituents of pig synovial fluid

Constituent	Concentration		
Hyaluronic acid	0.12 g / dl	Molecular weight = 4.8×10^6	
Protein	3.4 g / dl	Division of Albumin	Percentage $\pm$ SEM
		α 1-globulin	57.2 $\pm$ 0.92
		α 2-globulin	4.53 $\pm$ 0.59
		β -globulin	13.1 $\pm$ 0.68
		γ -globulin	6.91 $\pm$ 0.53
Phospholipid	0.019 g / dl	Phosphatidyl cholines (PC)	7.26 $\pm$ 0.62
		Sphingomyelins (Sp)	Percentage $\pm$ SEM
		Lysophosphatidyl cholines (LPC)	54.7 $\pm$ 2.23
		Phosphatidyl ethanolamines (PE)	28.2 $\pm$ 1.17
		Phosphatidyl inositols (PI)	3.23 $\pm$ 0.98
		Phosphatidyl serines (PS)	1.05 $\pm$ 0.62
			> 1.80 $\pm$ 0.62

化能に優れ、図2に示すように、膜成分である蛋白分子やリン脂質分子等の疎水部を会合する形態で遊離させると考えられる。界面活性剤による軟骨表面処理は、軟骨試料をTriton X-100の10wt%濃度の生理食塩水

Fig. 1 Articular cartilage excised from pig shoulder joint as a sliding pair of pendulum friction tester

Fig. 2 Solubilization of biomembrane with nonionic detergent

溶液に浸し 40kHzの超音波振動を30分間与え、さらに生理食塩水中で30分間、同様の超音波振動を与えた。

2・2 リポソームの調製 リン脂質分子は水性の環境では集合し、非極性（疎水性）部分を会合する構造をとる。つまり、疎水鎖を中心に向け極性部を外側に向ける球状のミセルや疎水鎖を内側に向け会合させ並ぶ平面状の二重膜の形態をとる。本実験で用いるL α -DPPC分子は2本の脂肪酸の断面積が極性部の断面積よりは小さいが、脂肪酸鎖をシス型結合等により傾斜させることにより円筒型の分子形態を示す。したがって、極性基の断面積が大きい円錐型の両親媒性分子が作るミセル構造ではなく、曲率の小さい2重膜構造のリポソームにて安定する。

リポソームの調製はBanghamら⁽⁵⁾の手法により、クロロホルムに溶解したL α -DPPCをロータリーエバポレータの減圧操作により層状に乾燥させ、試験管ミキサーでアルゴンガス充填下において潤滑液に溶解することにより行った。溶解濃度は調整終了後にホスホリパーゼDとコリンオキシダーゼを用いた酵素法により確認した。リポソームの形態は、コロジオン膜上でモリブデン酸アンモニウムによりネガティブ染色⁽⁶⁾⁽⁷⁾を行い、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

2・3 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。豚肩関節の骨頭と球蓋は同じ豚から採取したものではなく、生後6カ月の同程度の体重約100 kgを有する豚より得た。実験における荷重は100Nと1 kN、初期振幅は0.1radである。図4に示すようにサンプリング周期10msの測定による振幅の減少量がほぼ一定であるため、振幅0.08rad $\sim$ 0.03radの平均減少振幅 $\Delta\theta$ から、次式⁽⁸⁾⁽⁹⁾により摩擦係数を算出した。

Fig. 3 Schematic representation of pendulum friction tester

Fig. 4 Typical tracing of decline in amplitude with a pig shoulder joint

重心支点間距離 L と揺動方向摩擦面半径 r は各試験片

$$f = \frac{L\Delta\theta}{4r}$$

に対し実測した。

3. 生体関節の振子摩擦試験における潤滑モード

3・1 HA生理食塩水溶液の粘度と濃度依存性 各HA濃度条件における、せん断速度に対する生理食塩水溶液粘度を図5に示す。測定温度は摩擦試験と同じく室温20℃である。高濃度条件では非ニュートン性が顕著になっているが、濃度増加に依存した粘度上昇が認められる。この増粘効果は、HA分子がペプチド鎖等と比較し柔軟性がなく、密な構造をとり難いことや、二糖単位の方であるグルクロン酸がカルボキシル基を有し、強く負に帯電していることに起因している。HA分子は水系溶媒中において高密度の負電荷が Na^+ 等の陽イオンを引きつけ、その浸透圧により大量の水分を保持しており、質量の割に容積の大きいゲルやゾルの形態をとる。Yanakiら⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾は関節液のような高濃度で

Fig. 5 Viscosity and non-Newtonian flow of HA solution

のHA分子に対しランダムコイルをモデルとした排除体積効果から、その粘性挙動を説明している。

3・2 摩擦挙動におよぼす潤滑液粘度の影響 潤滑液のHA濃度を变化させることによる摩擦係数の変化を、負荷直後の条件において図6に示す。実験は室温20℃において行い、実験前の軟骨試料の乾燥は生理食塩水溶液を含んだガーゼで被覆することにより留意した。図6に示した摩擦係数は、各軟骨試料の初回使用の値である。生理的に低荷重条件と考えられる100NではHA濃度0.5 g/dlで最小 0.0037 ± 0.0012 を示し、それより高濃度と低濃度双方において摩擦係数は増加した。しかしながら、高荷重条件の1 kNにおいては摩擦挙動がHA濃度に依存する傾向は認められない。今回実験に用いた豚肩関節は、ボールジョイント状の形態であるが、骨頭と球蓋の形状は共にほぼ直交する長径と短径の主曲率半径を有し、生理的運動の方向性に適応した曲率分布を示しているようである。この摩擦実験に用いた関節から無作為に選んだ30対の骨頭と臼蓋の主曲率半径を測定した。図7に示すように骨頭の両平均曲率と比較し、球蓋のそれぞれの曲率が大きく、十分な形状適合を得るには、ある程度以上の荷重が必要であることが推察される。1 kNの荷重条件はおおよそ豚の体重に相当し、揺動中において常に負荷されていることもあり、生理的には厳しい条件になっていることが考えられる。摩擦試験では長径方向を揺動方向に設定したが、揺動減衰が持続する1分弱の間、高荷重により両摩擦面間の形状適合性が高く保たれ、荷重直後の十分なスクイズ膜を維持していることが推察される。

一方、低荷重条件では両摩擦面間の形状適合性が低いことから、相対運動は不安定であり、スクイズアウトの速度も比較的高くなることが推察される。したがって、図6(1)における低荷重、HA低濃度の条件においては摩擦面の局所的接触に起因する混合潤滑領

Fig. 6 Influence of concentration of sodium hyaluronate on frictional behavior immediately after loading (N=7, *N=30, Error bars indicate standard deviation.)

Fig. 7 Radius of curvature of a pig shoulder joint (N=30)

域での摩擦力の増加, HA高濃度においては粘性抵抗の増加が推察される。

3・3 摩擦挙動に及ぼす実験前の負荷時間の影響

実験開始前の荷重負荷時間に対する摩擦係数の変化を図8に示す。軟骨試料は1回の摩擦測定に付き新たに切断した一対を使用した。両荷重条件において、荷

重負荷時間経過に伴い摩擦係数の増加が認められる。Forsterら⁽¹²⁾は軟骨と金属平板の摩擦系において実験前の負荷時間の影響を報告しており、負荷時間に伴い摩擦力は急上昇する結果になっている。軟骨の相対面が平板である場合は、軟骨の変形によるエネルギー損失は小さく、流体膜の破綻による境界摩擦力の発生が原因とされた。本実験においても、潤滑液のスクイズアウトに伴う接触面積の増加による境界摩擦力の増加がその一因に考えられる。しかし、両相対面が完全な球形ではないため、潤滑性の低下と相乗的に起こる軟骨摩擦面の変形に伴うヒステリシスロスも主要な原因に考えられる。荷重100Nの条件では、摩擦係数の分散が大きく、負荷直後に比べ5分経過後では、著しい摩擦係数の上昇が認められ、潤滑モードの急激な変化が推察される。荷重1kNの条件では摩擦係数の分散が小さく、比較的高濃度ヒアルロン酸水溶液における線形での相関係数が高い値を示し、摩擦係数自体は全体的

Fig. 8 Influence of loading time prior to the friction test on frictional behavior

に100Nの条件より低い値を示す。

荷重負荷時間の経過に伴い、100Nの条件では1kNの条件と比較し、形状適合性の低い不安定な摩擦状態にあることが推察される。しかしながら、低荷重であることにより図6(1)に示すように荷重負荷直後においては流体の粘性効果により支配された潤滑モードの変化が観察される。

4. 界面活性剤による軟骨表面処理

4・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秒後に軟骨表面と水滴の接触角をCCDカメラにより撮影し、画像計測を行った。無処理の表面は82.2 $\pm$ 7.1 $^{\circ}$ の疎水性を示した。界面活性剤処理後は37.8 $\pm$ 6.7 $^{\circ}$ の値を示し、Hills⁽¹³⁾のクロロフォルム処理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現象が確認された。

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観察では、前報⁽²⁾において示したように、形状的には顕著な変化は認められない。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リン脂質⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾等の両親媒性成分が存在している。一方、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、接触角の変化より推察される。

4・2 界面活性剤処理による摩擦挙動への影響

振子摩擦試験において潤滑液粘度に依存した潤滑モードの変化が認められた100N負荷直後の条件において、界面活性剤処理が摩擦挙動におよぼす影響を観察した。HA濃度が0.2 g/dlの潤滑条件において、無処理の軟骨の組合せで振子摩擦試験を行った後に、同じ軟骨の組合せに界面活性剤処理を施し、再度摩擦試験を行った。摩擦挙動の変化を図9に示す。界面活性剤処理により有意な摩擦係数の上昇が認められる。軟骨試料の再度の使用による影響は否めないが、前報⁽²⁾に示したように、HA高濃度1.0 g/dlおよび0.5 g/dlの条件では、それぞれの同界面活性剤処理による摩擦係数の変化に共通した増減および有意差は認められない。しかしながら、HA濃度を0.2 g/dl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0.005(t検定)において摩擦係数の上昇が認められた。先述したように、100Nの荷重条件は豚の体重から予想される生理的条件より、かなり低いとみなされ、比較的高濃度HA生理食塩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、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、0.2 g/dl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ていると考えられ、界面活性剤処理による軟骨表面の変化が摩擦に影響を及ぼしたことが推察される。

Fig. 9 Influence of the treatment of detergent on frictional behavior (N=60, Error bars indicate S.D.)

4・3 界面活性剤処理された軟骨摩擦面における関節液の潤滑性

図9に示したHA生理食塩水溶液(0.2 g/dl)の条件の無処理と界面活性剤処理の実験を行った後、無作為に抽出した6対の軟骨試験片に生理食塩水中で30分間超音波振動を与え、再度、関節液潤滑により摩擦実験を行った。対照としての0.2 g/dl HA生理食塩水溶液潤滑による結果と共に図10に示す。界面活性剤処理後の摩擦係数と比較し、同じHA生理食塩水溶液潤滑において有意な変化は認められないのに対

Fig. 10 Lubricating ability of pig synovial fluid in the articular surfaces treated with detergent (N=6)

し、関節液潤滑では有意水準0.005において低下が認められ、その値は 0.0087 ± 0.0016 であった。図9の未処理の軟骨摩擦面における、HA生理食塩水溶液潤滑の60関節の摩擦係数と比較すると、有意水準0.05において差は認められず、HA以外の関節液成分の境界潤滑膜の修復と潤滑への寄与が推察される。

5. リン脂質リポソームと蛋白成分の添加による潤滑効果

5・1 L α -DPPCリポソームの形態観察 L α -DPPCリポソーム (1.0 mg/dl) 水溶液のネガティブ染色による透過電子顕微鏡像を図11に示す。0.1~0.5 μ m径のリポソームの形成が確認される。

Fig. 11 Negatively stained sonicated liposomes diluted to a concentration of 1.0 mg of L α -DPPC per dl of 0.5% ammonium molybdate, gently sprayed onto a carbon-colloidon grid, and allowed to dry in air

5・2 L α -DPPCリポソームとγグロブリン添加による摩擦挙動への影響 HA生理食塩水溶液 (0.2 g/dl) の条件の無処理と界面活性剤処理の実験を行った後、同軟骨試験片に生理食塩水中で30分間超音波振動を与え、再度、3回目の実験として各成分を添加したHA生理食塩水溶液を摩擦面に供給し摩擦挙動への影響を観察した。本実験におけるL α -DPPCリポソームとγグロブリンの添加条件において、HA生理食塩水溶液の粘度変化は5%以内 (せん断速度 $10 \sim 3000 \text{ s}^{-1}$) であった。L α -DPPCリポソームとγグロブリンの添加濃度に対する摩擦係数をそれぞれ図12 (1) と (2) に示す。無添加HA生理食塩水溶液潤滑と比較し、L α -DPPCリポソーム添加においては、0.01 g/dl以上の濃度条件において有意な摩擦係数の低下が認められ、その平均値は0.01程度を示す。γグロブリン添加においても、1.0 g/dl以上の濃度条件において有意な摩擦係数の低下が認められ、その平均値はL α -DPPC添加により低下した値

と同様に0.01程度を示す。前報⁽²⁾において、生理的条件と同程度と見積もったL α -DPPC 1.0 mgの軟骨表面への塗布とγグロブリン0.3 g/dlのHA水溶液への添加では、同界面活性剤処理した軟骨摩擦面の摩擦係数の低下は認められなかったことを報告している。本実験において、γグロブリン0.3 g/dlにおいて摩擦係数の低下が認められず、前報と同様の結果になっているが、L α -DPPCリポソーム 0.01 g/dlの添加条件において、リン脂質の生理的濃度 (0.019 g/dl) より低濃度であるにも関わらず、摩擦係数の低下が認められ、リポソーム調製による潤滑液への添加が効果的に境界潤滑膜形成に寄与していることが推察される。さらに、L α -DPPCはγグロブリンと比較して、生理的にも低濃度において潤滑性の向上が認められるため、生体関節の境界潤滑機構において主要な役割を有していることが推察される。

しかしながら、摩擦係数の低下が認められたL α -DPPCとγグロブリンの添加濃度条件において、その摩擦係数値の各相対関係に有意差は認められない。それらの添加条件は、未処理の軟骨摩擦面におけるHA生理

Fig. 12 Effect of the addition of liposomes of L α -DPPC or γ-globulin on frictional behavior (N=6, Error bars indicate S. D., *p < 0.005, **p < 0.01)

食塩水溶液潤滑の条件や界面活性剤処理後の関節液潤滑の条件より高い値を示しており、HAとL α -DPPCおよびHAと γ グロブリンの組み合わせにおける境界潤滑性の限界を示唆しているようである。

次に、HA生理食塩水溶液 (0.2 g/dl) の条件の無処理と界面活性剤処理の実験を行った後、同軟骨試験片に生理食塩水中で30分間超音波振動を与え、再度、3回目の実験として、それぞれ有意な摩擦係数の低下が認められたL α -DPPCの0.01 g/dlと γ グロブリンの1.0 g/dlの両方をHA (0.2 g/dl) 生理食塩水溶液に添加し、摩擦係数を測定した。3回目の実験にHA生理食塩水溶液と豚関節液を用いた条件と比較して図13に示す。HA生理食塩水溶液の条件に対し有意な摩擦係数の低下が認められるが、図12に示す高濃度でのL α -DPPCと γ グロブリン添加の条件と同様に摩擦係数は0.01程度を示した。この値は界面活性剤処理した軟骨摩擦面における関節液潤滑の条件と有意水準0.05において高摩擦を示している。

Fig. 13 Effect of the addition of 0.01 g of L α -DPPC and 1.0g of γ -globulin per dl on the frictional behavior in the articular surfaces treated with detergent (N=6, Error bars indicate S. D., * $p < 0.005$)

前報⁽³⁾において、軟骨に対するガラス面上のL α -DPPCと γ グロブリンの混在する2分子膜1層のLangmuir-Blodgett (LB) 膜がL α -DPPC単体による同LB膜より低摩擦を示したが、本実験系における潤滑液への添加ということでは、両成分が混在することによる潤滑への相乗効果は認められない。この現象は多重層 (2分子膜10層) のLB膜においてL α -DPPC単体とL α -DPPCと γ グロブリンが混在する場合で摩擦係数が0.01から0.02の範囲で有意差が認められない現象と同様に、L α -DPPC単体においても軟骨表面のプロテオグリカンの直接接触を避けるに十分な吸着膜が形成されていれば、混合膜と同様な低摩擦を維持することを示唆している。しかしながら、関節液潤滑の摩擦係数はさらに低い摩擦係数を示し、他の境界潤滑性の微量成分

(15) (16) の関与を示唆していると考えられる。

6 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、混合潤滑条件において摩擦係数が上昇する。

界面活性剤処理により表面吸着膜が除去された軟骨表面は、ある程度の濃度のL α -DPPCリポソーム、あるいは γ グロブリンの添加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)、なら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の交付を受けて実施したことを付記する。

文献

- (1) 日垣・他3名, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 16, (1995), 369-374.
- (2) 日垣・他2名, 機論, 61, 588-C, (1995), 3396-3401.
- (3) 日垣・他2名, 機論, 62, 604-C, (1996), 4684-4689.
- (4) Rabinowitz, J. L., 他2名, Clin. Orthop., 190, (1983), 292-298.
- (5) Bangham, A. D., 他2名, J. Mol. Biol., 13, (1965), 238-252.
- (6) Johnson, S. M., 他3名, Biochim. Biophys. Acta., 233, (1971), 820-826.
- (7) Papahadjopoulos, D., 他3名, Biochim. Biophys. Acta., 352, (1974), 10-28.
- (8) Stanton, T. E., The Engineer, 29, (1923), 678-680.
- (9) Tsukamoto, Y., 他3名, Acta. Orthop. Scand., 63, (1992), 648-652.
- (10) Yanaki, T. and Yamaguchi, T., Biopolymers, 30, (1990), 415-425.
- (11) Yanaki, T. and Yamaguchi, T., Chem. Pharm. Bull., 42, 8, (1994), 1651-1654.
- (12) Forster, H., 他3名, Proc. 22nd Leeds-Lyon Symp. Tribology, to be published in 1996.
- (13) Hills, B. A., J. Rheumatology, 16, 1, (1989), 82-91.
- (14) Kirk, T. B., 他2名, J. Orthop. Rheum., 6, (1993), 21-28.
- (15) Swann, D. A., 他4名, Biochem. J., 225, (1985), 195-201.
- (16) Jay, G. D., Connective Tissue Res., 28, (1992), 71-88.