

## 抗菌性と骨適合性を有するハイブリッドインプラントの創製

### [1] 組織

代表者：上田 恭介

(東北大学大学院工学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：成島 尚之 (東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費40万円

### [2] 研究経過

世界的な高齢者人口の増加に伴いインプラントの需要は増大しており、特に加齢に伴う歯の喪失、関節リウマチや関節の変形による人工関節等、硬組織代替デバイスの利用が増加している。硬組織代替デバイスには骨との迅速で強固な結合が求められる。

一方、インプラントに関連した手術部位感染(Surgical site infection, SSI)は少なくとも数%から30%発生している。骨組織では食細胞が少なく生体防御機構が弱いことに加え、加齢に伴う免疫機能の低下により SSI のリスクは増加する。加齢に伴う骨形成能の低下から、インプラントの固定に時間を要し、長期間の入院を強いられることもある。これらの問題解決には、SSI 対策としての抗菌性と骨形成能の両方を有するハイブリッドインプラントが有効な手段である。

当グループではこれまで、生体吸収性を有する非晶質リン酸カルシウム(ACP)に着目し、RF マグネトロンスパッタリング法による ACP コーティングにより、チタン製硬組織代替デバイスの骨形成能向上を動物実験により明らかにした。加えて、ACP への元素添加により溶解性の制御が可能であることを見出した。インプラントへの抗菌性付与には様々な方法があるが、耐性菌を生じにくい、広い抗菌スペクトルを有する、といった特徴を有する Ag に着目し、Ag 添加 ACP (Ag-ACP)コーティング膜は大腸菌に対して抗菌性を有することを見出した。しかし、過剰な Ag は細胞毒性を発現することが予想される。

そこで本研究では、元素添加により ACP の溶解性を制御することで、Ag の徐放速度を制御した元素添加 Ag-ACP コーティング膜の作製およびその溶解性、細胞毒性を評価することを目的とした。

対応者である小笠原教授とはこれまでも共同研究を行ってきっていたが、平成 29 年 4 月 26 日に新たに第 1 回の打ち合わせを行った。その際に、工学研究科の学生 4 名が加齢研小笠原研究室にて抗菌性評価試験を行うことを決めた。学生 4 名がほぼ毎日小笠原研究室にて実験を行った。具体的には、小笠原研が所有する大腸菌(DH 5 $\alpha$ )を用い、NB 培地中での培養、濃度調整(希釈 NB 培地)、試料と菌液の共培養、菌液回収、生菌数測定(寒天平板培養法)である(Fig. 1)。試験後の菌液は遠心分離後 ICP 法による溶出金属イオン濃度測定に、コーティング試料は SEM/EDX による残存膜の分析に、それぞれ供した。

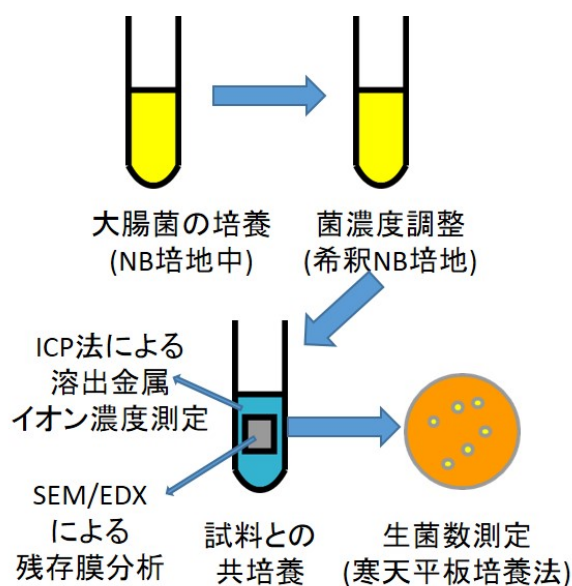


図1 本研究のプロトコル模式図

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

実際の歯科用インプラントに用いられているものと同じ表面粗さを有するプラスト処理チタンを基板として用いた。RF マグネトロンスパッタリング法により以下の3種類のコーティング膜を作製した。なお、膜厚はいずれも 0.5  $\mu\text{m}$  とした。

- ・0Ag-ACP: 無添加の ACP 膜
- ・Ag-ACP: Ag を添加した ACP 膜
- ・Ag/Nb-ACP: Ag と Nb を共添加した ACP 膜

ここで、Nb は ACP の溶解性を抑制する元素である。

作製したコーティング膜はいずれも均一かつ基板の凹凸を覆うようにコーティングされており、高い密着力を有していた。加えて、組成も膜厚方向に対して一定であった。

抗菌性試験の結果を図 2 に示す。なお、Control としてコーティング無しの基板まま(Substrate)を用いた。Substrate、0Ag-ACP コーティング膜においては、培養期間の増加に伴い僅かに生菌数は増加した。一方、Ag を含有する Ag-ACP および AgNb-ACP コーティング膜においては、10.8 ks 培養後に生菌数は  $10^{-1}$  (=0) CFU となった。Substrate の 10.8 ks 培養後の生菌数は約  $7 \times 10^7$  CFU であり、抗菌活性値は 7.2 と計算された。JIS L1902 では抗菌活性値 2 以上が抗菌性発現の目安とされており、Ag 添加 ACP 膜が優れた抗菌性を発現することが確認できた。抗菌性を有することが確認された。試験後、いずれの試料からも Ag イオンの溶出が ICP 分析で確認されており、溶出した Ag イオンにより大腸菌が死滅したと考えられる。

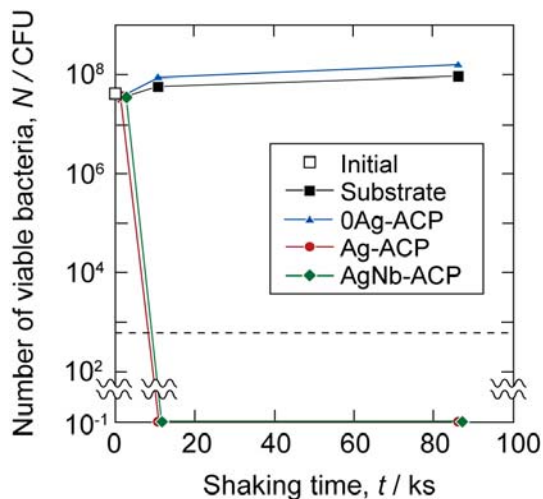


図 2 各試料の培養試験における生菌数と培養時間の関係

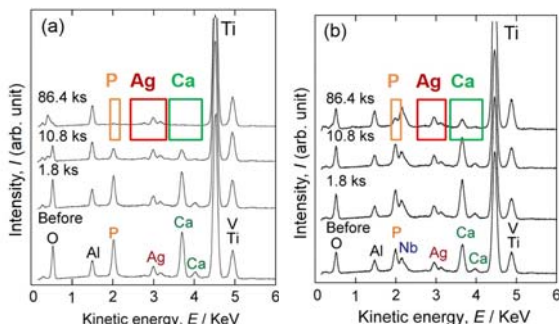


図 3 培養試験前後の(a) Ag-ACP および(b) AgNb-ACP コーティング膜の EDX スペクトル

各時間培養後試料表面の EDX スペクトルを、培養前の結果とあわせて図 3 に示す。Ag-ACP コーティング膜においては、24 時間(86.4 ks)培養後では Ag のピークのみが確認され、Ca, P のピークは確認されなかった。すなわち、母相である ACP はほとんど溶出してしまったと考えられる。一方、AgNb-ACP コーティング膜においては、24 時間の培養後においてもコーティング膜の構成元素である Ca, P, Ag, Nb のいずれのピークも見られたことから、コーティング膜は残存していることが確認された。以上の結果から、Nb 添加により、抗菌性は発現しつつ Ag-ACP の溶解性は抑制することができた。これは、長期間の抗菌性と骨形成能向上を可能とする。

ただし、過剰の Ag イオン溶出は細胞毒性を招く。次年度以降は、本コーティング膜の細胞毒性評価を行い、最適な Ag 含有量と ACP の溶解性について検討を行う。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により得られた抗菌性評価手法は、現在当グループで検討しているチタニアの光触媒を利用した抗菌性表面処理の抗菌性評価に適用でき、評価をすすめている。Ag イオン溶出とチタニアの光触媒という多面的なアプローチは、学術的にも、実用化という観点からも波及効果は大きい。これらの成果は、国際会議や国内学会での共著発表に発展している。担当学生の国内シンポジウムでのポスター受賞等、若手の育成にも貢献した(成果資料 2)。

### [4] 成果資料

- 1) T. Ueda, K. Ueda, K. Ogasawara, T. Narushima et al.: "Antibacterial property of visible-light active TiO<sub>2</sub> layers formed on Ti-Au alloys by thermal oxidation," 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB2017), Megaron Athens International Conference Centre, Athens, Greece, 2017 September 4-8 (5), PP005 (ポスター発表)
- 2) 井上紅花、上田恭介、小笠原康悦、成島尚之ら: 「RF マグネトロンスパッタリング法による Ag 含有非晶質リン酸カルシウム膜の作製と評価」東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ・日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会「バイオマテリアル研究 東北地区交流会」、東北大学金属材料研究所 2017 年 9 月 25 日, P13 (ポスター発表) **優秀ポスター受賞**  
他 国内口頭発表 8 件