

課題番号 40

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)

Wu Jun (東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

世界的な高齢者人口の増加に伴い生体埋入デバイスの需要は増大しており、特に高齢に伴う歯の喪失による人工歯根、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、骨との迅速かつ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%程度の確率で発生している。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。そのため、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 Ta 添加により溶解性を抑制できることを見出した。加えて、インプラントへの抗菌性付与として、耐性菌を生じにくい、広い抗菌スペクトルを有する Ag に着目した。平成 30 年度までに、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。Ag-ACP に Ta を供添加することで、Ag-ACP の溶解性を抑制できることを

明らかにした。

そこで本年度は、Ag, Ta 供添加 ACP の抗菌性を評価することを目的とした。加えて、過剰の Ag は毒性を示す可能性があるため、細胞毒性評価も行い、最適 Ta 添加量を検討した。

本研究課題は前年度からの継続課題であるため、代表者および分担者の博士課程学生の Wu 氏が、対応者である小笠原教授の研究室の設備を利用し、抗菌性の評価を行った。細菌を用いた評価であるため、1セットの評価につき 2 週間程度の連続した実験が必要である。そのため、Wu 氏を中心に一月に 2 週間程度の頻度で小笠原研究室を訪問し、実験を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

抗菌性評価方法には、シェーク法を用いた。Ag イオンの徐放による継続した抗菌性の発現を調査するために、繰り返しシェーク法を確立し、本コーティング膜の抗菌性を評価した。コーティング膜の細胞毒性は、ISO 10993-5 に準拠した、V79 細胞を用いた直接法および間接法により評価した。

試料には、Ta 添加量を 3 レベルで変化させた Ag-ACP (Ta 添加無し)、(Ag+L-Ta)-ACP (低濃度 Ta 添加)および(Ag+H-Ta)-ACP (高濃度 Ta 添加)コーティング膜を用いた。基板にはチタン板を用い、いずれも膜厚は 0.5 μm とした。

抗菌性評価には、1/500 に希釈した普通ブイヨン培地(1/500NB)を用いた。小笠原研究室で所有する大腸菌(DH5 α)を用い、初期菌濃度 10^7 CFU/mL の菌液 5 mL 中にコーティング膜を浸漬し、6 時間の攪拌培養を行った。その後試料を取り出し、エタノールにて洗浄・滅菌後に、新しい菌液にてさらに 6 時間の培養を行った。この操作を 7 回繰り返した。

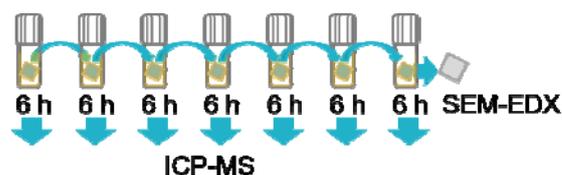


図1 本共同研究により確立した繰り返しシェーク法による抗菌性評価方法の模式図

各培養後の菌液は、寒天平板培養法により生菌数を測定した。菌液中に溶出した Ag イオン濃度は、菌液に硝酸を加えて酸性溶液とした後、遠心分離により細菌を沈殿させ、上清を ICP-MS により測定した。図 1 に、本プロトコルの模式図を示す。

Ag-ACP および(Ag+L-Ta)-ACP コーティング膜においては、1 回目の培養後において生菌数は 0 となり、抗菌性を示したものの、2 回目以降は生菌数の減少は見られなかった。Ag イオン溶出量をみても、1 回目培養では 0.2 ppm 程度の溶出が確認されたが、2 回目培養以降は 0.02 ppm 以下となっていた。一方、Ta 添加量の多い(Ag+H-Ta)-ACP コーティング膜においては、4 回目の培養まで生菌数は 0 となり、5 回目では 10^3 程度まで減少した。4 回目までの Ag イオン溶出量は 0.2~0.1 ppm であり、5 回目は 0.1 ppm 未満、6 回目以降は 0.02 ppm 以下となっていた。

すなわち、本実験系においては、0.1 ppm 以上の Ag イオン溶出がある場合に抗菌性を示すことが明らかとなった。加えて、(Ag+H-Ta)-ACP コーティング膜は繰り返し培養においても抗菌性を発現したことから、生体内においても長期間の抗菌性発現が予想される。

間接法による細胞毒性評価は、20 mL の培地中にコーティング膜 5 枚を浸漬させ、抽出を行った。この抽出液 1 mL に 50 cells/mL の濃度の V79 細胞を播種し、培養を行い付着細胞数を測定した。直接法においては、試料上に直接 50 cells/mL の濃度の V79 細胞を播種し、7 日間培養後の付着細胞数を測定した。なお、コーティングを施していないチタン基板を試料として用いた系をブランクとした。

間接法においては、いずれの試料においてもブランクと同程度の付着細胞数であり、有意差は確認されなかった。直接法においては、Ag-ACP および(Ag+L-Ta)-ACP コーティング膜において、ブランクよりも有意に低い付着細胞数となった。一方、(Ag+H-Ta)-ACP コーティング膜においてはブランクと同程度の値であり、有意差も確認されなかった。

以上の結果から、(Ag+H-Ta)-ACP コーティング膜は繰り返し抗菌能を示しつつ、細胞毒性を示さないことが分かった。今後は、骨芽細胞を用いた ALP 活性評価により、骨形成能についても調査していく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本年度は、本共同研究の成果を 2 報の投稿論文として発表することができた。加えて、基材であるチタンについての国際会議にて口頭発表を行った。

加えて、代表者の上田は、2019 年 8 月より、英

国の Imperial College London に留学し、本共同研究の成果を踏まえて、ウェットプロセスによるチタンの抗菌性コーティングの研究を開始した。受け入れ先からは、我々が確立した抗菌性評価方法に強い関心を持っており、今後も受け入れ先との共同研究をすすめることになっている。

[4] 成果資料

投稿論文

- (1) J. Wu, K. Ueda, T. Narushima: "Fabrication of Ag- and Ta-containing amorphous calcium phosphate films formed on titanium substrates by RF magnetron sputtering," Proceedings of The 14th World Conference on Titanium, (査読付き, accepted.)
- (2) J. Wu, K. Ueda, T. Narushima: "Fabrication of Ag and Ta co-doped amorphous calcium phosphate coating films by radiofrequency magnetron sputtering and their antibacterial activity," Mater. Sci. Eng. C, 109 (2020) 110599.

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110599>

著書

- (3) 上田恭介, 佐藤直生, 成島尚之: 「リン酸カルシウムコーティングやガス法によるチタン表面改質」無機/有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与、シーエムシー出版刊, (2019), pp. 90-100. 2019 年 5 月 ISBN コード: 978-4-7813-1415-0

国際会議発表

- (4) J. Wu, K. Ueda, T. Narushima: "Fabrication and bioresorbability of Ag- and Ta-containing amorphous calcium phosphate films formed on titanium substrates by RF magnetron sputtering," The 14th World Conference on Titanium, La Cite Nantes Events Center, Nantes, France, 2019 June 10-14 (12) Biomedical and Healthcare Applications, T3-S5-3

国内学会発表

- (5) Jun Wu, 上田恭介, 伊藤甲雄, 小笠原康悦, 成島尚之: "Evaluation of antibacterial activity of Ag- and Ta-containing amorphous calcium phosphate films," 日本金属学会第 165 回大会 (2019 年秋期)岡山大学津島キャンパス 2019 年 9 月 11~13 日 (発表 12 日) 講演番号 454.