

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09028

研究課題名(和文) 抗菌性と骨形成促進作用を併せ持つ生体活性インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of bioactive implants with both antibacterial and osteogenic properties

研究代表者

藤林 俊介 (Fujibayashi, Shunsuke)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：30362502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌性イオンである銀(Ag)イオンと骨形成イオンであるストロンチウム(Sr)イオンを同時に徐放するSr+Ag処理チタン(Sr+Ag-Ti)と、抗菌性と骨吸収抑制作用を併せ持つガリウム(Ga)イオンを徐放するGa処理チタン(Ga-Ti)の検証を行った。Sr+Ag-Tiのin vitro実験では、高い骨分化促進作用を確認し、黄色ブドウ球菌と大腸菌の増殖の抑制を認めた。in vivo実験では、骨結合性の向上と黄色ブドウ球菌に対する抗菌性を認めた。Ga-Tiのin vitro実験では、黄色ブドウ球菌の増殖の抑制を認めた。in vivo実験では、骨結合性の向上と黄色ブドウ球菌に対する抗菌性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

整形外科手術で用いるインプラントの重大な合併症として、「インプラント周囲の感染」と「インプラントの弛みやインプラント周囲の骨脆弱化」が挙げられる。患者は長期間の治療を強いられ、莫大な医療コストがかかる。抗菌性を有するイオンと骨形成促進作用あるいは骨吸収抑制作用を有するイオンを同時に徐放するバイオ機能を付加したインプラントが実用化されれば、患者の負担軽減と医療コスト削減につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined Sr and Ag ions treated titanium metal (SrAg-Ti), which simultaneously releases antibacterial Ag ions and osteogenic Sr ions, and Ga ions treated titanium (Ga-Ti), which releases both antibacterial and bone resorption inhibitory Ga ions. In vitro experiments, SrAg-Ti showed high osteogenic effect and inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* growth, while in vivo experiments showed higher bone bonding ability and antibacterial effect against *S. aureus*. In vitro experiments, Ga-Ti showed inhibition of *S. aureus* growth, and in vivo experiments showed higher bone ability and antibacterial effect against *S. aureus*.

研究分野：生体材料

キーワード：抗菌性 骨形成促進 骨吸収抑制 銀 ストロンチウム ガリウム 黄色ブドウ球菌 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

(1)われわれはチタン金属表面の様々な処理方法を開発してきた。アルカリ加熱処理は水酸化ナトリウムを用いた化学処理および熱処理により純チタンおよびチタン合金に生体活性能(骨伝導能)を付与する技術である(Kokubo T. J Am Ceram Soc 1996)(Fujibayashi S. J Biomed Mater Res 2001)。すでにセメントレス人工股関節として臨床応用され、良好な臨床成績が得られている(Kawanabe K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009)。また、多孔体チタンへの応用では骨伝導能のみならず骨誘導能を見出し(Fujibayashi S. Biomaterials 2004)。その成果を脊椎固定術において臨床応用した(Fujibayashi S. Euro Spine J 2011)。

(2)金属インプラントを用いた手術では、「インプラントの弛みやインプラント周囲の骨脆弱化」が重大な合併症の一つであり、課題とされていた。まず、アルカリ加熱処理にカルシウム(Ca)イオン処理を追加することで、骨結合能の向上を認めた(Kizuki T. Acta Biomater 2010)。そこで、われわれは骨形成イオンであるマグネシウム(Mg)イオンとストロンチウム(Sr)イオンに着目し、連携研究者の山口らと共に骨形成を促進するこれらのイオンをインプラント表面の処理層へ導入することに成功した(Yamaguchi S. Acta Biomater 2014)。また、これらの骨形成イオンを導入した生体活性チタンを *in vitro*、*in vivo* で評価し、その有効性、安全性、分子細胞学的メカニズムを明らかにしてきた(Okuzu Y and Fujibayashi S. Acta Biomater 2017) (平成27-29年科研費・基盤(C)骨形成促進作用を有する次世代型生体活性チタン金属の開発)。

(3)金属インプラント手術の重大な合併症には、「インプラント周囲の感染」も挙げられ、その予防は喫緊の課題であった。そこでアルカリ加熱カルシウム処理を応用し、抗菌性のある銀(Ag)イオンを処理層に導入することに成功した。

(4)また、ガリウム(Ga)イオンは抗菌性と骨吸収抑制作用を併せ持つ特異なイオンであることが報告されていた(Verron E. British J Pharma 2010, Kelson AB. Curr Opin Pharmacol 2013)。連携研究者の山口らは Ga イオンのインプラント表面の処理層への導入に成功し、*in vitro* における同インプラントの有意な抗菌性も報告した(Yamaguchi S. Nanomaterials (Basel) 2017)。

2. 研究の目的

金属インプラント合併症である「インプラントの弛みやインプラント周囲の骨脆弱化」と「インプラント周囲の感染」を解決すべく、抗菌性を有するイオンと骨形成促進作用あるいは骨吸収抑制作用を有するイオンを同時に徐放するバイオ機能を付加したインプラントの開発を目的とする。抗菌性イオンである Ag イオンと骨形成イオンである Sr イオンを同時に徐放する Sr+Ag 処理チタンと、抗菌性と骨吸収抑制作用を併せ持つ Ga イオンを徐放する Ga 処理チタンの骨結合能と抗菌性の検証を行う。

3. 研究の方法

(1)アルカリ加熱カルシウム処理を応用して、カルシウム・ストロンチウム処理チタン(CaSr-Ti)、カルシウム・ストロンチウム・銀処理チタン(CaSrAg-Ti)を作製する。純チタン(cp-Ti)、CaSr-Ti、CaSrAg-Ti を *in vitro*、*in vivo* で比較する。

in vitro: ラット骨髄幹細胞を各円板材料上に播種して培養後、細胞接着評価(走査電子顕微鏡)、細胞増殖評価(XTT 試験)、細胞活性評価(ALP 活性試験)、遺伝子発現評価(RT-PCR)で評価する。黄色ブドウ球菌を各材料上に播種して培養後、CFU count を行って抗菌性を評価する。

in vivo: ラット大腿骨に各ロッド材料を挿入の上飼育して屠殺回収後、骨結合力評価(push out 試験)、組織標本評価(bone implant contact ratio)で評価する。ラット背部皮下ポケットを作成して、ポケット内に各円板材料を挿入した上で黄色ブドウ球菌菌液を注入する。飼育して屠殺回収後、CFU count を行って抗菌性を評価する。

(2)アルカリ加熱カルシウム処理を応用して、カルシウム処理チタン(Ca-Ti)、ガリウム処理チタン(Ga-Ti)、カルシウム・ガリウム処理チタン(CaGa-Ti)を作製する。cp-Ti、Ca-Ti、CaGa-Ti を *in vitro*、*in vivo* で比較する。

in vitro: マウス骨芽細胞様細胞を各円板材料上に播種して培養後、細胞接着評価(actin 染色)、細胞増殖評価(XTT 試験)で評価する。黄色ブドウ球菌を各材料上に播種して培養後、CFU count を行って抗菌性を評価する。

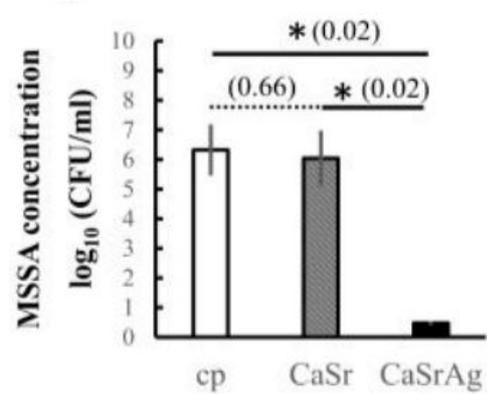
in vivo: 日本白色家兔脛骨に各平板材料を挿入の上飼育して屠殺回収後、骨結合力評価(引き剥がし試験)、画像評価(μ CT)で評価する。ラット脛骨髄腔に黄色ブドウ球菌菌液を注入後に各ロッド材料を挿入の上飼育して屠殺回収後、CFU count を行って抗菌性を評価する。

4. 研究成果

(1)CaSrAg-Ti は骨結合能の向上と高い抗菌性を示した。

走査電子顕微鏡において、cp-Tiと比較してCaSr-Ti、CaSrAg-Tiの上では良好な細胞接着を認めた。XTT試験では、CaSrAg-Tiはcp-Tiと比較して有意差はなく、明らかな細胞毒性を認めなかった。ALP活性試験では、CaSrAg-Tiはcp-Ti、CaSr-Tiと比較して、有意に高い活性値を認めた。RT-PCRでは、CaSrAg-Tiはcp-Ti、CaSr-Tiと比較して、*Runx2*、*Alp*の有意に高い発現を認めた。CaSrAg-Tiでは、cp-Ti、CaSr-Tiと比較して有意に低いCFU値を認めた(右図)。

push out試験、bone implant contact ratioいずれにおいても、CaSrAg-Tiは、cp-Tiと比較して有意に高い値を認めた。CaSrAg-Tiでは、cp-Tiと比較して、皮下ポケット内CFUの有意を認めた。

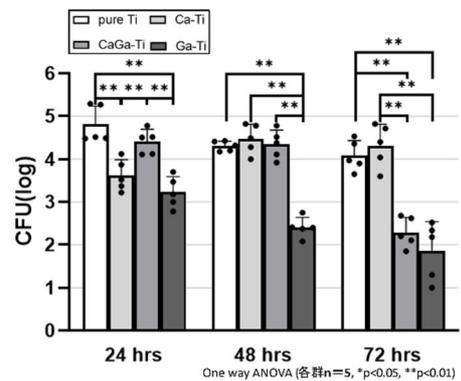


(2)CaGa-Ti は骨結合能の向上と高い抗菌性を示した。

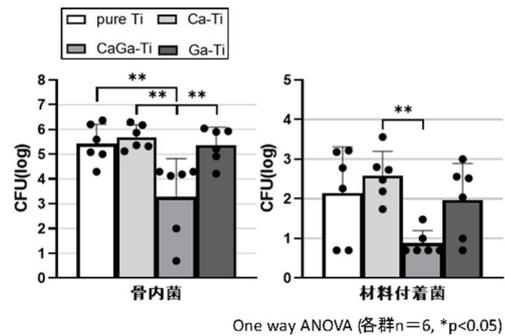
actin染色において、cp-Tiと比較してCa-Ti、CaGa-Ti、Ga-Tiの上では良好な細胞接着を認めた。XTT試験では、各材料で有意差はなく、CaGa-Ti、Ga-Tiともに明らかな細胞毒性を認めなかった。CaGa-Ti、Ga-Tiでは、cp-Ti、Ca-Tiと比較して有意に低いCFU値を認めた(右図)。

引き剥がし試験では、CaGa-Ti、Ga-Tiは、cp-Tiと比較して有意に高い値を認めた。μCTでは、CaGa-Tiはcp-Tiと比較して、材料表面に新生骨が有意に多い結果を認めた。

CaGa-Tiにおいて、骨内菌の有意に低いCFU値を認めた(右図)。



(3)CaSrAg-Ti、CaGa-Ti いずれにおいても骨結合能の向上と高い抗菌性を認めた。今後は、最適なイオン担持量等を模索して追加検証を行い、臨床応用を目指す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masamoto Kazutaka, Fujibayashi Shunsuke, Yamaguchi Seiji, Otsuki Bungo, Okuzu Yaichiro, Kawata Tomotoshi, Goto Koji, Shimizu Takayoshi, Shimizu Yu, Kawai Toshiyuki, Hayashi Makoto, Morizane Kazuaki, Imamura Masashi, Ikeda Norimasa, Takaoka Yusuke, Matsuda Shuichi	4. 巻 109
2. 論文標題 Bioactivity and antibacterial activity of strontium and silver ion releasing titanium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 238 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuzu Yaichiro, Fujibayashi Shunsuke, Yamaguchi Seiji, Masamoto Kazutaka, Otsuki Bungo, Goto Koji, Kawai Toshiyuki, Shimizu Takayoshi, Morizane Kazuaki, Kawata Tomotoshi, Shimizu Yu, Hayashi Makoto, Matsuda Shuichi	4. 巻 35
2. 論文標題 In vitro study of antibacterial and osteogenic activity of titanium metal releasing strontium and silver ions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Applications	6. 最初と最後の頁 670 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0885328220959584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林信実、藤林俊介、山口誠二、高岡佑輔、池田周正、清水孝彬、河井利之、大槻文悟、後藤公志、松田秀一
2. 発表標題 ガリウムイオン担持チタン金属の評価
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正本和誉、藤林俊介、山口誠二、大槻文悟、奥津弥一郎、川田交俊、後藤公志、清水孝彬、清水優、河井利之、松田秀一
2. 発表標題 SrおよびAgイオン徐放性チタンインプラントの骨結合性および抗菌性評価
3. 学会等名 第39回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------