

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592236

研究課題名(和文) 生体材料関連感染症に対する光触媒酸化チタンの臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) The bactericidal efficacy of photocatalytic titanium dioxide in implant related infection

研究代表者

日浦 健 (HIURA, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：60554342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化チタンを体内人工物表面処理(薄膜)と溶液(微粒子)の両方で有効な殺菌性と低い生体毒性を確認し、今後の臨床応用の可能性を見出した。本研究を皮切りに複数の学会でも「無機抗菌材料」というセッションが設けられるようになり、抗菌剤など既存の対策とは別の感染症予防戦略として認知されてきた。本事業により、2012年以降の関連する掲載論文13件(英字論文4件)、学会発表54件(国際学会4件)の成果を得た。現在、酸化チタンの触媒反応を別の刺激によって惹起することで、感染症の「予防」から「治療」に重点を置き、更なる研究を推進している。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the effective bactericidal activity and the low toxicity of titanium dioxide in surface modification (thin film) and solution (fine particles). The future clinical application is expected. This study established the session called "inorganic antibacterial materials" in the several medical societies and has been recognized as the strategy for prevention of implant related infection. By this research fund, we obtained 13 associated publication articles (four English articles) and 54 presentations at the meeting (four international societies) after 2012. We shift the point from "the prevention" to "the treatment" of infection and the further study is continued by inducing the photocatalytic reaction by a different method.

研究分野：感染症

キーワード：薄膜・表面界面物性 金属物性、材料 感染症内科学 整形外科学

1. 研究開始当初の背景

人工金属生体材料は生体親和性が高く、低腐食性で機械的特性に優れていることから、医療分野で使用される**生体材料全体の70%以上**を占め、広く活用されてきた。特に**チタン**、**ステンレス**、及びその合金はプレートや髄内釘などの**骨接合器具**、**コバルトクロム合金**などは**人工関節**に應用されている。その他にも、**歯科インプラント**、**血管内ステント**、**脳動脈クリップ**、**心臓人工弁**など金属生体材料の実用例は枚挙にいとまがない。しかし、こうした金属材料の中に血管が新生することはなく、細菌やウイルスなどが付着すると、**Surgical Site Infection (SSI)**を発症する。**整形外科手術例の0.2~17.3%**にSSIが発生するが、特に**糖尿病**や**膠原病**など基礎疾患を有する患者は**免疫能が低下**しているため、健常人よりも発症率が高く、治療効果も低い。**人工材料を除去して感染制圧、鎮静化**を図ることも少なくなく、**複数回手術**、**膨大な医療費**、**長期にわたる治療期間**、**患者への甚大な苦痛**を強いることとなる。従って、**感染抵抗性**を有する人工材料を開発することで、**SSIに苦しむ患者**を少しでも減らせないかと考えた。我々は、平成20年度の科学研究費の採択を受け、**酸化チタン(TiO₂)の光触媒殺菌活性**の基礎的実験を重ねた結果、**富栄養環境条件**でも、**ブドウ球菌群**に対して殺菌率の高いTiO₂を開発し、用途の拡大のためにTiO₂形態を**超微粒子**と**薄膜(表面改質)**の2種類とすることができた。それぞれ**細胞毒性**、**生体毒性**、**光源の違い**による殺菌性についても検討を加え、TiO₂に関する**掲載論文13件(英字論文5件)**、**学会発表28件(国際学会5件)**の成果を得た。TiO₂は**紫外線**が当たると強力な**酸化力**によって**殺菌活性**を呈する。生体毒性が極めて**低く**、**ウイルス**や**細菌**の種類を問わず分解死滅させることができる。しかも、抗生物質のように**耐性菌**を誘導することもなく、微生物の**養分**や**毒素も分解**する特徴があるため、今後**有望な技術**と考えられるが、国内外でもTiO₂の臨床応用事例は未だない。

2. 研究の目的

酸化チタンの光触媒抗菌活性を利用して、**術後深部感染症**に対する有効な**予防**、**治療法**を考案すること、そしてさらに**作成法**や**成分調整**を進めることで、より細胞、生体毒性が少なく、殺菌性の高いTiO₂を実用化できるレベルのエビデンスを蓄積することが目的である。骨・関節にかかわる**生体インプラント自体に抗菌性**、**殺菌性**を発揮させることができれば、**術後感染症**という最大の合併症が**制圧**されることになり、これまでの感染症治療は一新する。

3. 研究の方法

- 1) 多剤耐性黄色ブドウ球菌に対する光触媒抗菌効果を in vitro で評価する
- 2) 殺菌能力を向上させる各種ドーピングを検討する
- 3) 細菌付着性を検討する

4) 市販されている**消毒剤**、**抗菌製品**との比較

- 3) **髄内釘**の感染に対する有効性を検証する
- 4) **生体毒性**の有無について in vivo で評価する
- 5) **バイオフィーム形成阻害能力**を評価する
- 6) **光源の違い**による抗菌活性の違いを検討する

4. 研究成果

1) 黄色ブドウ球菌に対する光触媒抗菌効果を照射時間との関連で証明することができた (in vitro)

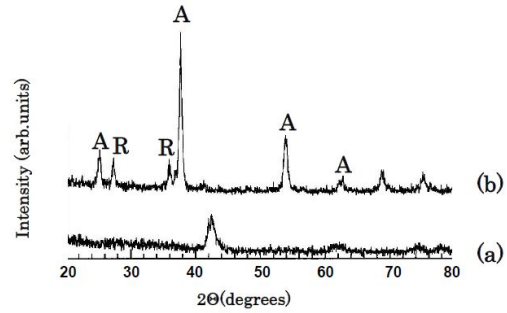


図1

図1, XRD 分析
TiO₂ 処理直後(a)と加熱後(b)
加熱によってアナターゼ型結晶構造を示すピークが認められる。A: anatase, R: rutile

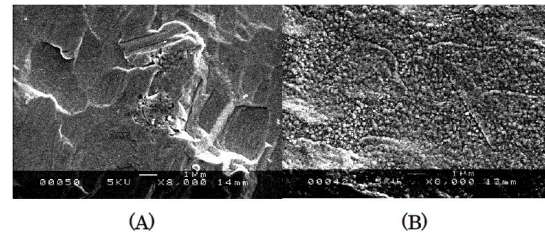


図3

図2 チタン基材のSEM像
コントロール(a), TiO₂ 処理後(b)
TiO₂ 処理した基材表面には、TiO₂ のナノ粒子が表面全体に確認できる。Scale bar = 1 μm: Magnification = 8000x

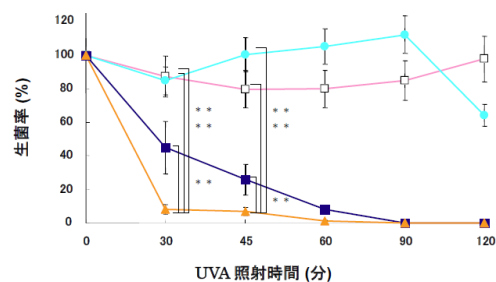


図4A

図4, *S. aureus* の生菌率
A: チタン基材
B: ステンレス鋼基材
紫外線照射 30 分, 45 分において、グループ1は他のグループよりも有意に生菌率を抑制した (p<0.05)
グループ1 (○), グループ2 (□), グループ3 (△), グループ4 (◇)

2) 殺菌能力を向上させるドーピング方法として酸化剤添加を見出した

成分	含有量(%)
過炭酸ナトリウム	37%
メタケイ酸ナトリウム	6%
クエン酸	31%
トリポリリン酸ナトリウム	25%
珪酸マグネシウム	0.5%
二酸化チタン	0.38%

表1

表1, 酸化チタン微粒子の成分
過炭酸とクエン酸で pH8.0 に調整している。

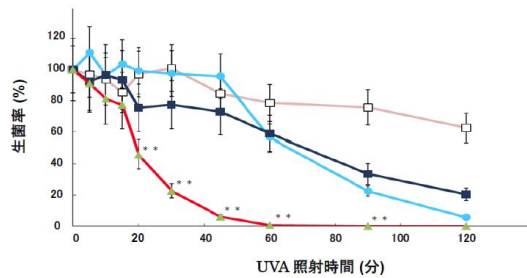


図2

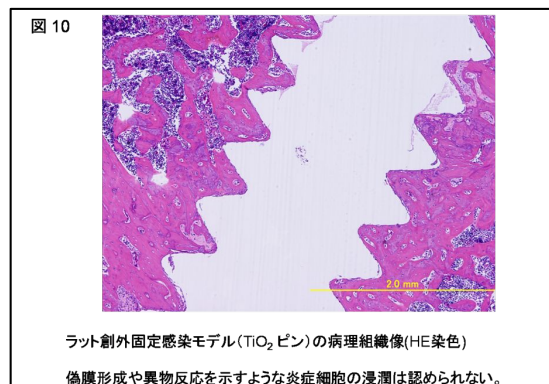
図2, *S. aureus* の生菌率
紫外線照射 20~90 分において, グループ 1 は他のグループよりも有意に生菌率を抑制した ($p < 0.05$)
グループ 1 (○), グループ 2 (□), グループ 3 (△), グループ 4 (◇)

3) 創外固定ピンでのピン刺入部感染の抑制効果を証明できた

	感染なし	炎症・浸出液	排膿あり	Total
非 TiO ₂	1 (5%)	15 (75%)	4 (20%)	20
TiO ₂	16 (80%)	4 (20%)	0 (0%)	20

表1, 臨床所見
非 TiO₂ ピン群に感染所見が強い傾向が見られた。

4) 病理組織で生体内での異物反応が低いことを証明した (in vivo)



5) 濃度勾配で細胞毒性が低いことを確認

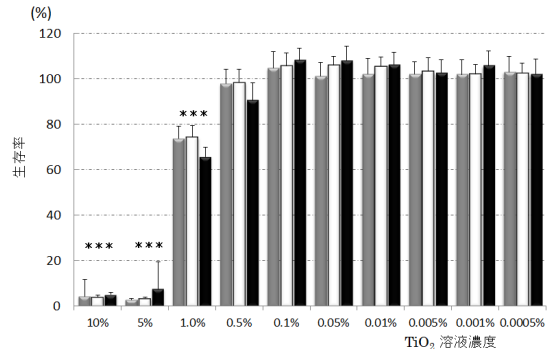


図11, 角膜由来細胞の生存率
TiO₂ 微粒子溶液 1.0% 濃度以上では, 3 種類とも有意な毒性を示した ($P < 0.01$).

■ Chang conjunctiva □ SIRC, ■ RC-1

6) バイオフィームの形成に関わる実験系の確立と物理的因子を同定した

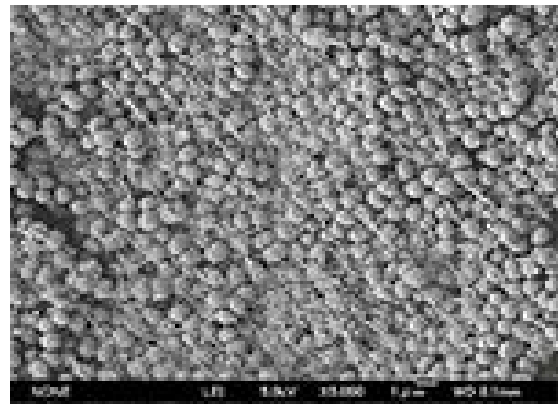


図13, バイオフィーム SEM 像
Original magnification × 5000, scale bar=1μm

7) 細菌の付着現象に関する実験系の確立と影響因子を同定できた

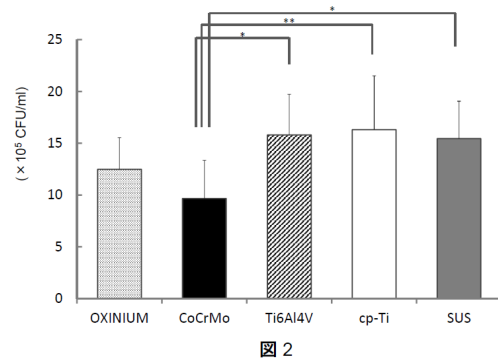


図2, 表皮ブドウ球菌の付着菌数

*: $P < 0.05$

** : $P < 0.01$

■ OXINIUM ■ CoCrMo ■ Ti6Al4V □ cp-Ti ■ SUS

5. 主な発表論文等
(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1) PLoS One (査読有り)
2014 9;9(10): e107588. doi:
10.1371/journal.pone.0107588.
eCollection 2014

Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: in vitro study

Hironobu Koseki, Masato Tomita, Takayuki Shida, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Yoshitomo Morinaga, Katsunori Yanagihara, Hideyuki Sakoda, Makoto Osaki

2) BMC Microbiology (査読有り)

Volume 2014, 14: 234, DOI:
10.1186/s12866-014-0234-2, 2014 「査読あり」(IF 2.976)

Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion

Itaru Yoda M.D., Hironobu Koseki M.D., Masato Tomita M.D., Takayuki Shida M.D., Hidehiko Horiuchi M.D., Hideyuki Sakoda Ph.D., Makoto Osaki M.D

3) 日本関節病学会誌, Vol.33 (No.1) : p79-83, 2014 (査読有り)

生体人工材料表面への表皮ブドウ球菌付着性の比較

小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

4) 日本骨・関節感染症学会誌, Vol.27 : p91-94, 2013 (査読有り)

チタン系人工材料の表面粗さと表皮ブドウ球菌付着量の関係

志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

5) International Journal of Nanomedicine (査読有り)

Volume 2013:8 Pages 3955-3961, DOI:
10.2147/IJN.S51994.

Adherence ability of Staphylococcus epidermidis on Prosthetic Biomaterials: an in vitro study

Takayuki Shida, Hironobu Koseki, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Hideyuki Sakoda, Makoto Osaki

6) International Journal of Nanomedicine (査読有り)

Volume 2013:8 Page 593-599, DOI:
http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S39201

Clinical and histomorphometrical study on titanium dioxide-coated external fixation pins

Hironobu Koseki, Tomohiko Asahara, Takayuki Shida, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Koumei Baba, Makoto Osaki

7) 関節外科(基礎と臨床), Vol.32 (No.1) : p101-105, 2013 (査読有り)

生体人工材料表面におけるバイオフィルム形成

小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

[学会発表](計26件)

1)2014.11.7 虎の門ヒルズフォーラム(東京都港区)

第42回, 日本関節病学会

初期バイオフィルム形成に影響する生体材料の表面粗さ以外の物理的特性

野口智恵子, 小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 尾崎 誠, 森永芳智, 柳原克紀

2)2014.10.10 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

第29回, 日本整形外科学会基礎学術集会

生体金属材料の表面特性がバイオフィルム形成に与える影響

志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 堀内英彦, 尾崎 誠, 森永芳智, 柳原克紀, 迫田秀行

3)2014.10.9 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

第29回, 日本整形外科学会基礎学術集会

表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの最小限界域

依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦, 尾崎 誠

4)2014.6.21 京王プラザホテル(東京都新宿区)

第37回, 日本骨・関節感染症学会

表皮ブドウ球菌バイオフィルム形成に対する固体表面自由エネルギーの影響

小関弘展¹⁾, 志田崇之¹⁾, 依田 周¹⁾, 堀内英彦¹⁾, 尾崎 誠¹⁾

5)2014.6.21 京王プラザホテル(東京都新宿区)

第37回, 日本骨・関節感染症学会

表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの最小限界域

依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦

6)2014.6.6 The Prince Hakone (Hakone, Kanagawa)

24nd The Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium 2014

The Effect of Carbon Ion Implantation on the Tribology of Metal-on-Metal Bearings

Hironobu Koseki, Makoto Osaki

7)2014.6.6 The Prince Hakone (Hakone, Kanagawa)

24nd The Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium 2014

Staphylococcal Biofilm Formation on Orthopaedic solid Implant materials

Hironobu Koseki¹⁾, Takayuki Shida¹⁾, Itaru Yoda¹⁾, Hidehiko Horiuchi¹⁾, Makoto Osaki¹⁾

8)2014.3.1 良順会館(長崎県長崎市)

第38回, 長崎感染症研究会

表皮ブドウ球菌バイオフィルム形成に対する

る固体表面自由エネルギーの影響

小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 尾崎 誠
9) 2014.3.1 良順会館(長崎県長崎市)
第 38 回, 長崎感染症研究会
**表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの
最小限界域**
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 尾崎 誠
10) 2013.10.17 幕張メッセ国際会議場(千
葉県美浜区中瀬)
第 28 回, 日本整形外科学会基礎学術集会
**表面酸化ジルコニウム合金への表皮ブドウ
球菌付着性**
志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 尾崎 誠
11) 2013.7.6 パシフィコ横浜(神奈川県横
浜市)
第 36 回, 日本骨・関節感染症学会
**酸素イオン注入した純チタン表面の殺菌効
果**
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 尾崎 誠
12) 2013.7.6 パシフィコ横浜(神奈川県横
浜市)
第 36 回, 日本骨・関節感染症学会
**チタン系金属生体人工材料の表面粗さと表
皮ブドウ球菌付着量の関係**
志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 尾崎 誠
13) 2012.10.27 名古屋国際会議場(愛知
県名古屋市)
第 27 回, 日本整形外科学会基礎学術集会
**酸化チタン創外固定ピンの深部感染と骨破
壊抑制効果**
依田 周, 小関弘展, 浅原智彦, 志田崇之,
堀内英彦¹, 尾崎 誠¹
14) 2012.10.26 名古屋国際会議場(愛知県
名古屋市)
第 27 回, 日本整形外科学会基礎学術集会(名
古屋市)
**光刺激で活性化した酸化チタン微粒子溶液
の細胞毒性評価**
堀内英彦¹, 小関弘展², 浅原智彦¹, 志田
崇之¹, 依田 周¹, 尾崎 誠¹
15) 2012.10.26 名古屋国際会議場(愛知県
名古屋市)
第 27 回, 日本整形外科学会基礎学術集会
**酸化ジルコニウムとチタン合金のバイオフ
ィルム形成能比較**
志田崇之¹, 小関弘展², 浅原智彦¹, 堀内
英彦¹, 依田 周¹, 尾崎 誠¹
16) 2012.6.30 京王プラザホテル(東京都
新宿区)
第 38 回, 日本骨折治療学会
**光触媒殺菌活性を有する酸化チタンピンの
骨組織親和性**
浅原智彦¹, 小関弘展², 志田崇之¹, 堀内
英彦¹, 依田 周¹, 尾崎 誠¹
17) 2012.6.8 Senhime Monogatari Inn(Nikko,
Tochigi)
22nd The Japanese-Korean Combined
Orthopaedic Symposium 2012(Nikko)
Biofilm formation on zirconium oxide,
Co-Cr-Mo, and titanium alloy discs: an *in*

vitro study

Takayuki Shida, Hironobu Koseki, Tomohiko
Asahara, Hidehiko Horiuchi, Itaru Yoda,
Makoto Osaki
18) 2012.6.8 Senhime Monogatari Inn
(Nikko, Tochigi)
22nd The Japanese-Korean Combined
Orthopaedic Symposium 2012
Titanium Dioxide-deposited External
Fixation Pin Prevents Bacterial
Inflammation and Bone Absorption: an *in*
vivo study
Hironobu Koseki, Tomohiko Asahara,
Takayuki Shida, Itaru Yoda, Makoto Osaki
19) 2012.6.2 北九州市国際会議場(福岡県
北九州市)
第 123 回, 西日本整形・災害外科学会
**蛍光灯により活性化した酸化チタン微粒子
溶液の細胞毒性**
小関弘展, 浅原智彦, 志田崇之, 堀内英彦
20) 2012.6.2 北九州市国際会議場(福岡県
北九州市)
第 123 回, 西日本整形・災害外科学会
**光触媒酸化チタンピン周囲組織の病理学的
検討**
浅原智彦, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦
21) 2012.4.28 城山観光ホテル(鹿児島県
鹿児島市)
第 35 回, 日本骨・関節感染症学会
**紫外線照射下での光触媒酸化チタンの細胞
毒性評価**
小関弘展, 浅原智彦, 日浦 健, 志田崇之,
22) 2012.4.27 城山観光ホテル(鹿児島県
鹿児島市)
第 35 回, 日本骨・関節感染症学会
**紫外線照射時間による酸化チタンピンの光
触媒殺菌活性**
浅原智彦, 小関弘展, 日浦 健, 志田崇之
23) 2012.3.24 ポンペ会館(長崎県長崎市)
第 36 回, 長崎感染症研究会
**蛍光灯による酸化チタン超微粒子の殺菌
効果**
志田崇之, 小関弘展, 日浦 健, 浅原智彦
24) 2012.3.24 ポンペ会館(長崎県長崎市)
第 36 回, 長崎感染症研究会
**光触媒酸化チタンピン周囲組織の病理学的
検討**
小関弘展, 浅原智彦, 日浦 健, 志田崇之
25) 2011.7.8 兵庫県立淡路夢舞台国際会議
場(兵庫県淡路市)
第 34 回, 日本骨・関節感染症学会
**酸化チタン超微粒子の蛍光灯による殺菌
効果**
日浦 健, 浅原智彦, 小関弘展, 埴田博史
26) 2011.7.8 兵庫県立淡路夢舞台国際議
議場(兵庫県淡路市)
第 34 回, 日本骨・関節感染症学会
**酸化チタン創外固定ピン周囲の骨病理組織
学的検討**
小関弘展, 浅原智彦, 日浦 健, 馬場恒明

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagasaki-seikei.com/>

<http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/physical/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日浦 健 (HIURA, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

客員研究員

研究者番号：60554342

(2) 研究分担者

小関 弘展 (KOSEKI, Hironobu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：70457571

尾崎 誠 (OSAKI, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：20380959