

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09094

研究課題名(和文) 感染・偽関節の阻止を目指した革新的な骨折治療法に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Novel fracture treatment by prevention of bacterial adherence and biofilm formation

研究代表者

日高 亮 (Hidaka, Ryo)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：70761451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体細胞膜を模倣した生体親和性合成リン脂質材料・MPCポリマーによる細胞・タンパク質の付着抑制効果を基盤技術として骨折治療用機器表面のMPC処理方法を確立し、細菌付着・バイオフィルム形成の抑制による感染・偽関節の阻止を目指した革新的な骨折治療法を創出するための基礎を行った。具体的には、MPCポリマーの組成、溶液濃度、処理時間等を変化させ、至適条件を確立した。また、この条件で表面処理した金属をin vitro/vivo感染症モデルに用い、MPCポリマー処理により表面への細菌付着、バイオフィルム形成が抑制されることを明らかにした。以上の研究成果は、本技術の実用化の確信を得るに十分な結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨折手術は、大別して、金属製のプレート・スクリューによる内固定と、金属製のワイヤーやピンと創外固定器を組み合わせた外固定によって行われている。エビデンスに基づいた治療指針の確立、手術方法、医療機器等の進歩により、多くの症例で良好な臨床成績が得られるようになってきている一方で、感染と、続発する癒合不全(遷延治癒・偽関節)は深刻な合併症である。本研究成果により、これらの合併症を阻止し骨折の治療成績を向上させることが可能となり、患者の日常ADL・QOLの改善はもちろん、特に高齢者においては寝たきり防止・自立の保持による認知症や内臓疾患の予防、超高齢社会における労働力の確保や医療費の削減も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Initial bacterial adhesion to medical devices for the fracture treatment and subsequent biofilm formation are known as the leading causes of surgical site infection (SSI). In this study, we have proposed novel method for a highly hydrophilic, antibiofouling metal surface of the medical devices for the fracture treatment by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC). In addition we have successfully demonstrated that MPC coated metal surface suppress adhesion and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, using in vitro/vivo infection model. From the result of present study, we concluded that the MPC-coating will bring novel medical device in the field of fracture treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：医療・福祉 骨折 感染

1. 研究開始当初の背景

わが国における医療の進歩と生活環境基盤の整備により長寿社会が達成されつつある一方で、運動器疾患の手術は増加の一途をたどっている。中でも骨折は、厚生労働省の診療行為統計によると、1ヶ月で1万8千件の手術が行われており、整形外科分野において、最も手術適応となる運動器疾患の一つである。骨折手術は、大別して、金属製のプレート・スクリューによる内固定と、金属製のワイヤーやピンと創外固定器を組み合わせた外固定によって行われている。臨床エビデンスに基づいた治療指針の確立、手術方法、医療機器、リハビリテーション等の進歩により、多くの症例で良好な臨床成績が得られるようになってきている一方で、感染と、続発する癒合不全(遷延治癒・偽関節)は深刻な合併症である。

体内に異物が存在する場合、異物の非存在下と比較して10万分の1の細菌量で感染が生じる(J Infect Dis, 1982)。細菌は骨折の内固定材料表面にタンパク質を介して接着し、コロニー形成を経てバイオフィームが形成される。このバイオフィームが抗菌薬や宿主の免疫反応から細菌を保護するため、感染を生じると保存的には治療しえず、内固定材抜去、洗浄、植骨などによる骨折部の癒合促進と再固定等、複数回の手術を要することも少なくない。一方、創外固定については皮膚とピン・ワイヤーとの接触面における感染が問題となる。簡便な創外固定でも4カ所、イリザロフ法では10カ所以上のピン・ワイヤー刺入部が存在するため、70%前後の症例で感染を生じている。この感染が進行するとピン・ワイヤーの弛みを生じ再手術が必要となる。また、感染リスクの高い開放骨折において創外固定・内固定という二次的な治療が行われることがあるが、ピン周囲感染があるときの内固定への変更では感染率が50-60%と高いため、内固定に移行できないケースも散在する。このため、骨折治療における感染を阻止することは重要な課題であるが、これまでに有効な解決策を得られていないのが現状である。これらの合併症を阻止し骨折の治療成績を向上させることができれば、患者の日常生活動作(activities of daily living: ADL)・生活の質(quality of life: QOL)の改善はもちろん、特に高齢者においては寝たきり防止・自立の保持による認知症や内臓疾患の予防、超高齢社会における労働力の確保や医療費の削減も期待できることから、社会的に重要な課題といえることができる。申請者らは、この課題の解決のため、独自技術、「MPCポリマー(PMPC)によるナノ表面処理」を応用することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「生体細胞膜を模倣した生体親和性合成リン脂質材料・MPCポリマーによる細胞・タンパク質の付着抑制効果」を基盤技術として「骨折治療用機器(プレート、ピン等)表面のMPCポリマー処理方法」を確立し、「細菌付着・バイオフィーム形成の抑制による感染・偽関節の阻止を目指した革新的な骨折治療法」を創出するための基礎研究を完成させることである。

本研究の基盤技術であるMPCポリマーは、血液凝固を抑制するポリマーを創製することを目的に、研究分担者の石原らが細胞膜表面に存在するリン脂質極性基(ホスホリルコリン基)に着目して分子設計をした日本オリジナルの高分子材料である(Ishihara K, et.al. Polym J 1990; 22: 355-60)。側鎖にホスホリルコリン基を有しているため、生体内で優れた親和性を発揮する。石原らは1987年に研究室スケールでの効率の良いMPCの合成法を確立した後、これを国内の化学メーカーに技術移転した。さらに製造条件の改良を進め、MPCおよびこれを原料とするMPCポリマーの製造は1999年から工業的プラントで開始されており、現在のMPCの純度は98.5%以上となっている。

MPCポリマーは、極めて高い親水性(水溶性)を示し、表面の電位はほぼ0 mVと、電氣的に中性である。さらに、ディップコーティングという一般的な手法で、MPCポリマーのアルコール溶液に浸漬することにより、医療デバイスに利用される材料表面に簡単に導入することができる。また、生体環境においても構造が変化することもなく、酵素分解や加水分解も受けない。線滅菌はもちろんのこと、エチレンオキシドガス(EOG)滅菌、オートクレーブ滅菌環境での安定性に関して全く問題ない。これらのことは、MPCポリマーの主鎖構造が化学的に安定なポリメタクリル酸エステルであることに起因する特徴である。MPCポリマーで処理をした医療デバイス表面の特徴としては、タンパク質の吸着、細胞の接着、細胞の活性化が抑制される。また、血

栓の形成が抑制されること、水なじみの改善により表面の潤滑性が向上することも明らかになっている。さらに、MPC ポリマーの生体内における安全性についても、急性毒性試験、皮膚一次刺激性試験、連続皮膚刺激性試験、感作性試験、光毒性試験、光感作性試験、眼刺激性試験、変異原性試験およびヒトパッチ試験により担保されている。

申請者らは、骨折治療用機器表面を MPC ポリマーで覆うことができれば、表面の生体親和性を向上させるとともにタンパク質の吸着を抑制することが可能となり、この結果、細菌付着・バイオフィーム形成が阻止できると着想した。

具体的には、骨折内固定用の金属プレート・スクリューおよび創外固定用のワイヤー・ピンの表面に MPC ポリマーのコーティング層を形成させる。この「MPC ポリマー混合エタノール溶液による MPC ポリマーコーティング方法」は、カテーテル(Londis[®])、血管ステント(Endeavor[®])、体内埋め込み型人工心臓(EVAHEART[®])など、すでに実用化された医療機器の表面処理方法にも数多く使われており、長いもので 20 年間以上の臨床実績がある。上述の生体内安全性に加え、こうした臨床エビデンスによっても、安全性が担保された材料ということができる。

3. 研究の方法

本研究では MPC ポリマーの表面処理による革新的な骨折治療方法に関する基礎研究を完成させるため、「MPC ポリマー処理条件の最適化」、「In vitro/vivo 感染症モデルを用いた細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果の検討」の 2 つのサブテーマを設定して研究を行った。

MPC ポリマー処理条件の最適化

表面処理するためには、1) 低侵襲で処理できること、2) 生体親和性が高く安全な材料であること、3) 短時間で高効率に高密度の処理ができること、等の特性が求められる。この課題の克服のため、本研究課題では、骨折治療材料であるステンレス、チタン合金の表面に細菌付着・バイオフィーム形成を阻止する表面処理を施すこととした。このため、本サブテーマでは MPC ポリマーの分子設計・配合比率を規定するとともに細菌感染・バイオフィーム形成を効果的に抑制するための MPC ポリマー処理方法(濃度、時間等)について最適化した。

In vitro/vivo 感染症モデルを用いた細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果の検討

1) タンパク質吸着抑制効果の検討

骨折治療用医療機器表面ではまずタンパク質が吸着し、この吸着層に細菌が付着する。そこで、タンパク質の吸着量および表面の電荷を計測した。

2) In vitro 感染モデルにおける評価

「MPC ポリマー処理条件の最適化」の条件で MPC ポリマー処理を行ったステンレス、チタン合金を、in vitro 感染モデル(静置環境下・流動環境下)に用い、細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果を検討した。

3) In vivo 感染モデルにおける評価

「MPC ポリマー処理条件の最適化」の条件で MPC ポリマー処理を行ったステンレス、チタン合金を、マウス皮下感染モデルに用い、細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果を検討した。

4. 研究成果

MPC ポリマー処理条件の最適化

ステンレス、チタン合金表面の MPC ポリマーによるナノ表面処理について、MPC ポリマーの組成、溶液濃度、処理時間等を変化させ、至適条件を確立した。試料表面を a) X 線光電子分光分析、b) 赤外分光光度分析で観察し、MPC ポリマーに含まれるトリメチルアミン基およびリン酸塩基、カルボニル基およびリン酸基等に帰属されるピークをそれぞれ同定し、その処理率等から最適化を行った。

同様に、MPC ポリマー処理表面の水接触角を測定し親水性を評価し、この数値の変位を用いて最適化を行った。

In vitro/vivo 感染症モデルを用いた細菌付着・バイオフィーム形成抑制効果の検討

1) タンパク質吸着抑制効果の検討

タンパク質の吸着量は、ピシニコニン酸法により定量する系を用いて評価した。この結果、「MPC ポリマー処理条件の最適化」の条件で行った MPC ポリマー処理によって、骨折治療機器であるステンレス、チタン合金表面へのタンパク質吸着が抑制されることを確認した。

また、「MPC ポリマー処理条件の最適化」の条件で MPC ポリマー処理を行ったステンレス、チタン合金表面の電荷を、ゼータ電位測定により評価し、両者とも表面の電荷が中性に近づいていることを確認した。

2) In vitro 感染モデルにおける評価

a) 静置環境下における評価

「MPC ポリマー処理条件の最適化」で絞り込んだ処理方法を用い、ステンレス、チタン合金製のディスク表面を MPC ポリマー処理した。24 穴プレート中にディスクを配置し、手術部位感染 (SSI) の主な病原菌である、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌細菌を播種し、37 °C にて静置培養後、ディスクを回収して a) 付着生菌数測定、b) 蛍光顕微鏡観察、c) 走査型電子顕微鏡観察を行い、評価した。この結果、MPC ポリマー処理ステンレス、チタン合金製のディスクとともに、未処理のディスクと比較して、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌の付着が 99% 以上抑制されていることを確認できた。

b) 流動環境下における評価

より生体内の環境に近い、流動環境下のモデルを用いて評価を行った。「MPC ポリマー処理条件の最適化」で絞り込んだ処理方法を用い、ステンレス、チタン合金製のディスク表面を MPC ポリマー処理した。24 穴プレート中にディスクを配置し、手術部位感染 (SSI) の主な病原菌である、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌細菌を播種し、37 °C にて 24 時間、流動環境下で培養後、ディスクを回収して a) 付着生菌数測定、b) 蛍光顕微鏡観察、c) 走査型電子顕微鏡観察を行い、評価した。この結果、24 時間後であっても、上記 a) と同様、MPC ポリマー処理ステンレス、チタン合金製のディスクとともに、未処理のディスクと比較して、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌の付着が 99% 以上抑制されていることを確認できた。

次に、同様の条件で 24 時間の培養を行った後、更に 24 時間、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌に抗菌作用を有するバンコマイシンを混合した培養液で培養を行った後、a) 付着生菌数測定、b) 蛍光顕微鏡観察、c) 走査型電子顕微鏡観察を行い、評価した。この結果、未処理のディスクではバイオフィームが形成されるためバンコマイシンが効果を発現しないのに対し、MPC ポリマー処理ステンレス、チタン合金製のディスクとともに、バイオフィーム形成が抑制されるため、抗菌薬の効果が発現することを確認した。

3) In vivo 感染モデルにおける評価

「MPC ポリマー処理条件の最適化」で絞り込んだ処理方法を用い、ステンレス、チタン合金製のディスク表面を MPC ポリマー処理した。バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌をディスク表面に接種後、マウスの背部皮下に試験片を挿入して縫合した。3 日後に試験片を摘出して a) 付着生菌数測定、b) 蛍光顕微鏡観察、c) 走査型電子顕微鏡観察を行い、評価した。この結果、MPC ポリマー処理ステンレス、チタン合金製のディスクとともに、未処理のディスクと比較して、バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌の付着が 90% 以上抑制されていることを確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 茂呂徹, 石原一彦, 高取吉雄	4. 巻 92(10)
2. 論文標題 MPCポリマーと運動器疾患に対する応用.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本整形外科学会誌	6. 最初と最後の頁 765-776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kaneko T, Saito T, Shobuie T, Miyamoto H, Matsuda J, Fukazawa K, Ishihara K, Tanaka S, Moro T:	4. 巻 Article ID 5639651
2. 論文標題 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer coating inhibits bacterial adhesion and biofilm formation on a suture: an in vitro and in vivo study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 5639651-5639651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/5639651	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 茂呂徹
2. 発表標題 整形外科と工学の融合 生体親和性高分子バイオマテリアルの整形外科疾患に対する応用.
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨接合用医療機器	発明者 茂呂徹、田中栄、石原一彦、岡崎裕司、佐藤和強、程原誠、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-171818	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	田中 栄 (Tanaka Sakae) (50282661)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	石原 一彦 (Ishihara Kazuhiko) (90193341)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	
研究分担者	茂呂 徹 (Moro Toru) (20302698)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	
研究分担者	高取 吉雄 (Takatori Yoshio) (40179461)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	
研究分担者	田中 健之 (Tanaka Takeyuki) (00583121)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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