

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05059

研究課題名(和文)チタン系生体材料に発現する長期抗菌性の機構解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of long-term antibacterial property arisen in titanium based biomaterial

研究代表者

森本 幸裕 (Morimoto, Yukihiro)

大阪大学・産業科学研究所・招へい教授

研究者番号：80607218

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)：(V)UV照射後にチタン表面に発現する長期抗菌性の再現と機構を解明することを目的とし、波長依存性の有無把握から研究をスタートした。UV処理法として以下の3種類を揃えた。(1)低圧Hgランプの185nmと254nm線スペクトルを同時照射、(2)185nm光をカットし254nm光のみを照射、(3)Xeエキシマランプが発する172nm帯スペクトルを照射する系である。その結果、未処理チタンと(2)では死菌は観察されず、(1)と(3)のでは24時間後には生菌は認められないまでに抗菌作用が確認された。現象としてpost-UV照射で抗菌作用を発現したのは、真空紫外光の影響であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VUV照射後では、“有意に抗菌”と認められる2Logレベル以上の抗菌性がチタン表面に発現する、この材料科学的なメカニズムの全貌は未だ憶測の域を出ていないが、抗菌を誘起する、現象をスタートさせる波長は、200nm以下の光であることがわかった。チタン(合金)製の医療用インプラント等は経時変化で生体親和性に劣化を来すが、これをUV-C光で元の活性表面に戻す光機能化技術(PF)が発明され、骨芽細胞など生体組織との初期親和性を確保する手段とされている。即ち、本研究で得たVUV照射による抗菌性の発現は、200nm以上の光で起こるPFとは異なる。医療現場での光の利用法が1つ、加わったかもしれない。

研究成果の概要(英文)： To clarify the mechanism of the long-term antibacterial properties realized at titanium surface after (V)UV irradiation, we started to understand the wavelength dependence on this phenomena. The following three types of UV treatment methods were prepared. (1) simultaneously irradiates the 185 nm and 254 nm line spectra of a low-pressure Hg lamp, (2) cuts 185 nm light and irradiates only 254 nm light, and (3) irradiates the 172 nm band spectrum emitted by the Xe excimer lamp.

As a result, almost no dead bacteria were observed in untreated titanium and (2) case, and in (1) and (3), strong antibacterial activity was confirmed after 24 hours of antibacterial action time. It is considered that the antibacterial effect was exhibited by post-UV irradiation as a phenomenon due to the influence of vacuum ultraviolet light.

研究分野：光科学(光発生と光利用)、材料科学

キーワード：抗菌 紫外光 チタン

1. 研究開始当初の背景

医療用インプラントによく使われるチタン(合金)材料は、人体(骨や軟組織)に対する機械的特性や生体親和性のマッチングが良い反面、組織と接するチタン表面は、製造後の保存期間にその特性が大きく変化する場合があり、生体親和性の劣化を招く問題を起す。その解決策である、UV-C光(200~280nm)を照射する光機能化法を、本研究提案者の森本と密に連携しながら整形外科用インプラントへの適用研究を遂行していた板橋らは、チタンがUV処理時点から7日後も有効な殺菌特性を示すことを発見した[1]。具体的には、低圧Hgランプを具備したUV装置を用いてTiとTi-6Al-4Vの板状試料に対して185, 254nm UV-C光を同時に照射する処理を施し、これにより試料は9 J/cm²のエネルギー照射を受けた。処理後は決めた放置時間毎に試料を暗所から取り出し、バクテリア調整液を播種して放置し殺菌時間とした。UV処理前のチタン試料は全く抗菌性を示さなかった一方、照射直後では、UV光が無いにも関わらずUV光で照らされている光触媒と同等の抗菌効果があり、2Logレベル以上の抗菌性が7日も続いている。このUV-C光処理後の“抗菌性”の発現と長期持続に関する材料科学的なメカニズムは、未だ憶測の域を出ず、不明なままであった。

2. 研究の目的

チタン(合金)材料の表面において1週間に渡って持続する長期抗菌性を再現しその抗菌機構を解明することを研究の目的とした。解明の後には、チタン材料に限らずに広く展開し解明した機構を利用し新規抗菌剤のデザインに進む(=創造性に対応)、研究を行うにあたり以下の仮説を持った。

物理モデル：非常に活性なチタン表面に吸着した酸素との反応でなるTiO₂は光触媒材料であり、長期抗菌性の機構はこの光触媒と同類で光照射後の光で照らされていない長時間に渡って酸化と還元的作用を起す可能性があり、TiO_{2-x}の組成では長期間にわたって電子と正孔が滞留するモデル。

化学モデル：ナノ構造で組成がTiO_{2-x}で成る表面層がUVC光で照らされると、ある種の反応性活性種(Reactive species: RS)を放出する構造ができ、このRSが枯渇するまで放出し続け、菌の膜に作用し続けるという仮説モデル。

成果として、閉鎖空間にあるチタンをUV-C光照射することで極表面に生じるナノ構造酸化物がもたらすマクロな殺菌作用であり、表面モルフォロジーと持続的な活性酸素放出が長期抗菌性の機構である、との結論となるかもしれない。これは小さな新しい学術的知見かもしれないが、安価で安全な新規抗菌材料をデザインする上での“ルール”と“ゴール”を与えてくれる可能性が高く、即ち、効果的・安全な新規抗菌機能の設計に繋がり、国内で問題の院内感染や院内衛生への問題に貢献できる。

3. 研究の方法

チタン(合金)の表面は化学的に活性であり周囲環境の分子と反応しやすい金属である。よって照射処理中に表面組成の変化を起す可能性の有り/無しと、有りの場合にはその程度を助長する条件で結果を比べることは、機構を予想するための一助となる。よって、試料表面に施すUV処理法として3種類の照射手段を揃えた。それぞれ、低圧Hgランプの185nmと254nm線スペクトルを同時照射、185nm光をカットし254nm光のみを照射、Xeエキシマランプが発する172nm帯スペクトルを照射する系である。

抗菌性の評価は2通りで行った。即ち、(a)試料表面で抗菌作用させた後にLive/Dead染色し視覚的に効果を見る方法と、(b)抗菌作用後に菌を回収し生菌を回収して抗菌率を求める方法とを執り行った。

(a) 純チタン円板に対して上記3種類のUV照射(7 J/cm²)を施し、直ぐに黄色ブドウ球菌(SA菌)を播種する場合と、滅菌純水に7日間浸漬し暗所放置した後にSA菌を播種する場合とを実施した。そして播種後の1, 3, 6, 24h後にチタンに付着しているSA菌をLive/Dead染色して共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

(b) 試料としてTi、Ti-6Al-4V、陽極酸化させたTi、そして異種金属でありその素性として抗菌性を有する銅(Cu)について評価をした。Ti-6Al-4Vは、不純物の影響を計るため、陽極酸化Tiは、表面を最大限に酸化させておいたケースを知るために採択した。UV照射としては185nmと254nm線スペクトルを同時照射(7 J/cm²)し、10⁶ CFUのSA菌を播種して暗所で24時間放置した。ここで、抗菌作用後に試料表面に菌が張り付いた場合は回収が不完全となり抗菌率が正確に求まらなかったため、これを回避するために試料表面の菌液が乾燥しないように水蒸気雰囲気を保った。この状態で24時間の抗菌作用後、菌を回収するとともに試料表面には菌が残留しないことを(a)の染色法を使って確認した。

回収した菌液を段階希釈して寒天培地に塗布し、37 24 時間培養後に細菌コロニー数をカウントして細菌数を計算した。

4 . 研究成果

UV 光の波長域の違いで抗菌性発現状況が異なることを見出した。抗菌性の評価(a)の結果を Fig.1 と 2 に示す。最上段に control として UV 照射無しの Ti 試料を示し、その下に 3 条件で UV 処理をした Ti について示す。生菌は green 蛍光、死菌は red 蛍光として観察した。何れの照射も直後に播種した SA 菌は死菌が優勢であるが、254 nm 照射のケースは徐々に生菌が優勢になり、185+254 nm と 172 nm 照射では抗菌性が持続した。この傾向は既報の記述と一致する[1,2]。この様相から、抗菌性の評価(b)では、抗菌作用時間を 24 時間に定めた。照射後に 7 日間放置した後に播種した SA 菌は、254 nm 照射した Ti では死菌とならないが、185+254 nm や 172 nm 照射した Ti では、照射直後に播種した場合と視覚的には変わらぬ程の抗菌性を示した。この様に、照射 7 日後の post-irradiation 現象を確認した。また、現象として 7 日間抗菌性を示したのは、185+254 nm 照射と 172 nm 照射を施した Ti であり、200 nm 以下の真空紫外光の影響であると考えられる。

抗菌性の評価(b)では、抗菌率を再現性良く求めることに注力したが、データのバラツキが収まらず困難をきたした。また、想定した 10^{-6} の滅菌レベルまでの死菌化が達成できなかった。

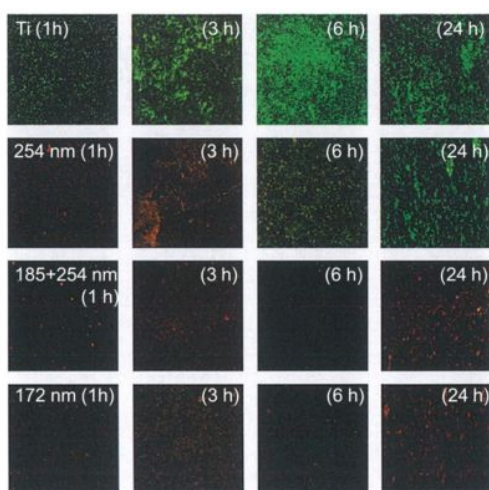


Fig. 1 照射直後に播種したSA菌を染色したチタン表面の写真

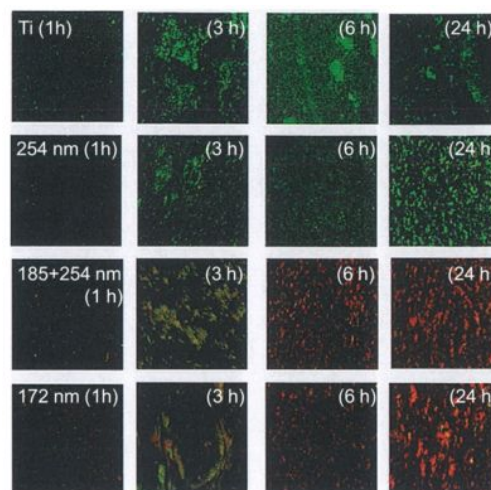


Fig. 2 照射後 7 日間放置後に播種したSA菌を染色したチタン表面の写真

この原因は、菌液が乾燥することによる細菌の試料表面への張り付きを避ける条件で評価をしたが、このことにより Ti に近接する細菌の割合がバラついてしまっており、またこの状況では滅菌レベルまで死菌化しない状況でなかったらどうかと想像する。

この仮説を確かめるため、UV 照射処理をした Cu に菌を播種し、乾燥を避けながら 24h 放置した後に、上層から順に寒天培地に付けて剥がした。剥がれた層と Cu 表面を Live/Dead 染色して共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察し、Cu 表面では死菌の層が、中間層には死菌と生菌が、上層には生菌だけが見られた。別観点であるが、銅に播種した菌液について数時間後には過酸化水素の発生が認められた。チタンの場合も同様の形跡があり現象確定には今後の検討を要する。

この様に、本研究の抗菌率評価法は播種した菌に部分的に作用する条件ではあるが、評価実施した試料について、純 Ti の 24 時間の抗菌率を 1 として相対値で示すと、Ti-6Al-4V は 0.9、陽極酸化 Ti は 0.5、そして Cu は、1 時間以内に 1 に達することが分かった。Fig.3 には、試料とした無酸素銅の抗菌性を示す。作用時間 40 分で 1/100 に達する素性であったが、185+254 nm UV の処理で滅菌レベルにまで機能が増幅した。

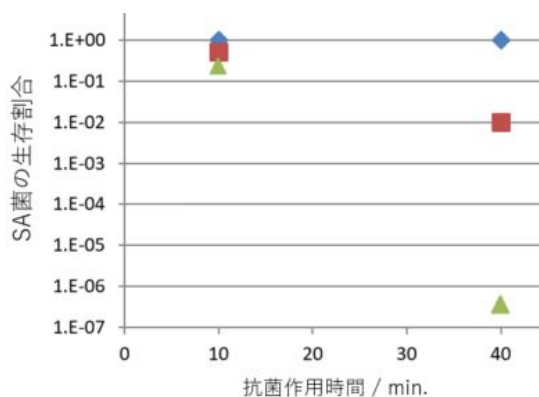


Fig. 3 銅(Cu)板に播種したSA菌の生存割合の変化
◆ control, ■ as received, ▲ as irradiated (185+254 nm)

< 引用文献 >

- [1] T. Itabashi, et al., Bone Joint Res 2017;6:108-112.
- [2] Gallardo AM, et al., Biomaterials 2010;31:5159-5168.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	関野 徹 (Sekino Toru) (20226658)	大阪大学・産業科学研究所・教授 (14401)	
研究分担者	後藤 知代 (Goto Tomoyo) (60643682)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	
研究分担者	小正 聡 (Komasa Akira) (70632066)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

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