

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12597

研究課題名（和文）優れた抗菌性を有するチタンインプラントの開発

研究課題名（英文）Development of titanium implants with excellent antimicrobial properties

研究代表者

大槻 文悟（Otsuki, Bungo）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30646766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：純チタン(cp-Ti)にアルカリ加熱カルシウム処理を施した生体活性チタン(Ca-Ti)にヨウ素をイオン交換で導入したヨウ素チタン(Ca-I-Ti)の3群でその抗菌性と生体活性を検討した。In vitroでCa-I-Tiは表面に付着するMSSAの数を1/100に減少させた。また骨芽細胞の増殖、分化能には悪影響を及ぼさないことが示された。

家兎を使用したin vivo試験では、Ca-I-Tiはヨウ素を導入する前のCa-Tiと同様の優れた骨結合能を有していること、またラットを用いた皮下感染モデルでも、材料表面の付着菌の数を著しく減少させるとともに、周囲組織の炎症や破壊を有意に抑制できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床で実際に使用されている抗菌インプラントは銀イオンを使用するものだけである。銀イオンは毒性があるが、抗菌性は高くない。一方ヨウ素は甲状腺ホルモンの原料で、術野の消毒に用いられるなど、抗菌性や安全性に優れている。われわれが開発したヨウ素の導入方法はイオン交換を用い、安価で複雑な形状にも対応できる。本研究ではこの技術を用いて作成したイオン含有チタン金属が、純チタンと比較して優れた生体活性を有することはもちろん、金属表面の細菌付着を強く抑制できることを示すことができた。安全性にも問題なく、本研究が臨床応用されれば、術後感染症を大幅に減らせ、医療経済学的にも大きなメリットである。

研究成果の概要（英文）：The antimicrobial properties and bioactivity of three groups of pure titanium (cp-Ti), bioactive titanium (Ca-Ti) treated with alkali-heat-calcium, and iodine titanium (Ca-I-Ti) in which iodine was introduced by ion exchange, were investigated. In vitro, Ca-I-Ti reduced the number of MSSA adhering to the surface to 1/100. It was also shown that Ca-I-Ti had no adverse effect on the proliferative and differentiation potential of osteoblasts. In vivo studies using rabbits showed that Ca-I-Ti has excellent bone-bonding ability similar to that of Ca-Ti, and a subcutaneous infection model using rats showed that Ca-I-Ti can significantly reduce the number of adherent MSSA on the material surface as well as significantly suppress inflammation and destruction of surrounding tissue.

研究分野：脊椎外科、医療材料

キーワード：整形外科 歯科 チタン金属 インプラント 感染 生体活性 骨伝導 黄色ぶどう球菌

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域における機能再建手術では、チタン金属およびその合金を用いた骨接合剤が広く使用されているが、初回手術のおよそ2%程度に感染を生じるとされている。またそのリスクは同一場所の複数回手術やステロイドの使用、放射線治療の既往などでも増大することが報告されているが、このような場合に感染を引き起こすと多数回の手術や長期間の抗生剤投与が必要となるなど、患者 QOL の面でも医療経済学的にも大きな問題点である。研究開始時において、金属インプラント自体に抗菌性を持たせて臨床使用できるものは銀イオンを付加した人工関節インプラントのみであるが、現時点において実際にそのインプラントの使用が感染を抑制できているかは明確な結果は発表されていない。また銀イオンは高濃度にすることで健康被害が予測されるため、強い抗菌性のために濃度を上げることが難しいという背景がある。

銀イオン以外で強い抗菌性を有する物質としてヨウ素がある。手術野の消毒や、うがい薬のように広く使われているとともに、安全性も比較的高いことが特徴である。チタン金属にヨウ素を付加する方法はすでに報告があり、チタン金属の陽極酸化処理と電着処理でヨウ素をチタンに付加する方法である。この方法はヨウ素の担持量が非常に少量であり、電気化学処理であることから複雑な形状の試料に均一に処理をすることが困難、さらに製造コストが高いという欠点がある。我々は、アルカリ加熱カルシウム処理を施した酸化チタン金属表面に含まれる Na イオンとヨウ素をイオン交換することで陽極酸化処理の最大で 100 倍のヨウ素を導入する技術を開発した。本処理法は安価で、複雑な形状の資料にも均一に処理できる特徴を有するが、陽極酸化処理で導入される要素が I<sub>2</sub> または I<sub>3</sub> であるのに対し、本方法では主に I<sup>-</sup> であり、その殺菌作用に関しては検証されていない。またこれまでの我々の研究から、ヨウ素を導入前のアルカリ加熱カルシウム処理チタンは優れた骨伝導能を有していることを報告してきたが、ヨウ素の導入後にも、この性質が保たれているかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、チタン金属に Na イオンとのイオン交換でヨウ素を導入された新規チタン材料が優れた抗菌性を有すると同時に、生体親和性(骨伝導能)も同時に有することを検証し、臨床応用を目指すことである。

## 3. 研究の方法

**試験材料** コントロールとして純チタン(cp-Ti)を、そして生体活性処理(アルカリ処理 + 温熱処理 + 塩化カルシウム処理)のみ(Ca-Ti)、生体活性処理に三塩化ヨウ素処理を追加したヨウ素処理チタン(Ca-I-Ti)を用意した。In vitro の試験に関しては、直径 13mm、厚さ 1mm の円板を作成した。また in vivo の力学試験に用いるものは先程の円板以外に 15x10x2mm の直方体を用意した。材料表面特性は電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)や原子操作型電子顕微鏡(AFM)を用いて解析した。材料表面の元素分析は X 線光電子分光法(XPS)を用いて解析した。

### In vitro 試験

**骨芽細胞への影響**：骨芽細胞様細胞として MC3T3-E1 細胞を用い、材料表面での分化や増殖能を検討した。細胞の増殖能に関しては XTT アッセイを用い、細胞の接着性に関してはファロイジン染色を用いて評価した。分化能は ALP 活性や骨関連遺伝子(Osteocalcin (Ocn), Osteopontin(Opn), 1 型コラーゲン(Col1a1))などの発現を検討した。

**抗菌試験**：メチシリン非耐性黄色ぶどう球菌(MSSA)を用い、材料表面に  $1.5 \times 10^6$  の細菌懸濁液を播種し、一定時間培養後、付着菌を回収し、コロニーカウントを行った。また材料表面を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察を行った。

### In vivo 試験

**骨伝導能**：日本白色家兎の脛骨に材料を移植した後、一定期間後に回収し、骨と材料表面の引っ張り強度を計測した。また材料と骨との界面を透過型光学顕微鏡にて観察し、材料の面積の中で骨と結合している面積の割合(BIC)を計測した。

**ヨウ素の安全性**：材料の移植後 0, 1 週、1, 3, 6 ヶ月後に採血を行い、腎機能及び甲状腺ホルモン値の測定を行った。

**抗菌試験**：ラットの皮下に円板上インプラントと MSSA 懸濁液( $6.0 \times 10^5$ )を移植し 7 日後に取り出した。取り出した円板の付着菌を in vitro 試験と同様にコロニーカウントを行った。またインプラント周囲の組織評価も行った。

## 4. 研究成果

**表面正常** SEM での観察では、Ca-Ti 及び Ca-Ti-I に 1 $\mu$ m 程度の細かな溝がネットワーク構造をもって形成されていた。また XPS アッセイで、Ca-Ti-I のみに 615-640eV のピークがみられ、ヨウ素が導入されていることが示された

### In vitro 試験

**骨芽細胞への影響**：XTT アッセイでは、材料 3 群間に差はなく、ヨウ素処理が骨芽細胞に対し、明らかな毒性を有しないことが示された。また SEM による観察では cp-Ti 群に比較して Ca-Ti または Ca-Ti-I 群では細胞の仮足の伸長や細胞質自体の伸長が見られ、純チタンよりも生体親和性に優れている可能性が示された。また、cp-Ti 群に比較して Ca-Ti または Ca-Ti-I 群では優位に ALP 活性が高く、Ocn や Opn の発現が上昇していた。しかし、Col1a1 の発現は 3 群間での差は見られなかった。以上の結果から、イオン導入処理は in vitro で骨芽細胞の分化増殖に悪影響を及ぼさないことが示された。

**抗菌試験**：材料に接着する MSSA のコロニー数は Ca-Ti-I 群で有意に少なく、およそ 1/100 となった(図 1)。また浮遊菌に関しても 1/3 程度と有意に減少したが、付着菌に対する作用ほど大きいものではなかった。

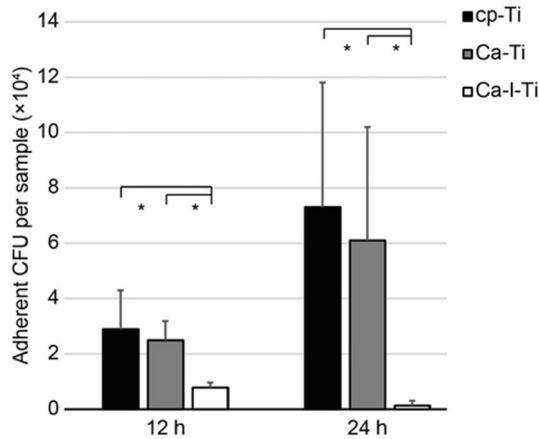


図 1 材料の付着菌のコロニーカウント

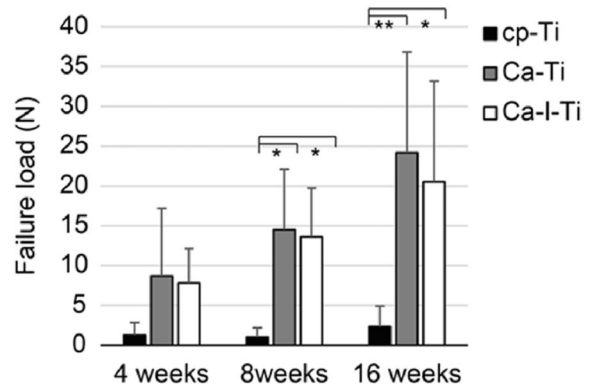


図 2 力学試験の結果

### In vivo 試験

**骨伝導能**：骨と材料間でのひっぱり試験の結果、Ca-Ti 及び Ca-I-Ti 群では cp-Ti と比較して有意に強い骨結合能を有していた(図 2)。また Ca-I-Ti 群では BIC が有意に高く、材料と骨との結合が確認された(図 3)

**ヨウ素の安全性**：いずれのタイムポイントにおいても、Cr, BUN の値は正常範囲内であり、腎不全はみられなかった。また TSH, FT3, FT4 の値も 3 群間で差は見られなかった。

**抗菌試験**：皮下に埋植した材料表面に付着する最近は Ca-I-Ti 群で有意に抑制された(図 4)。また組織のグラム染色でも cp-Ti 群では組織破壊が強く、MSSA の菌体が多数観察されたが、Ca-I-Ti 群では MSSA がわずかに観察されたが、組織の構造は保たれており、炎症が抑制されていた。

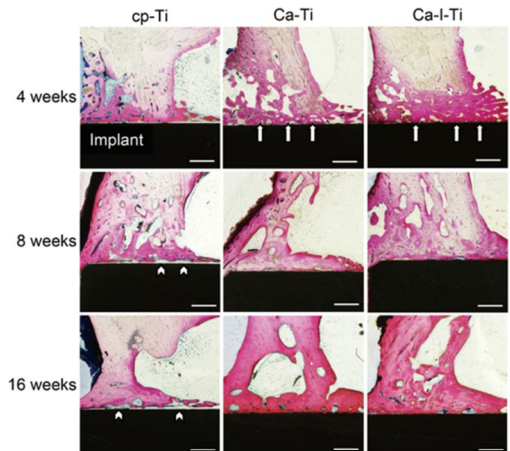


図 3 骨、材料界面の組織学的評価

以上の結果から、ヨウ素導入された Ca-I-Ti は、明らかな生体への毒性を有さず、さらに骨伝導能などの生体活性を失うことなく、材料表面への MSSA の付着を、in vitro でも in vivo でも強く抑制できることが明らかとなった。

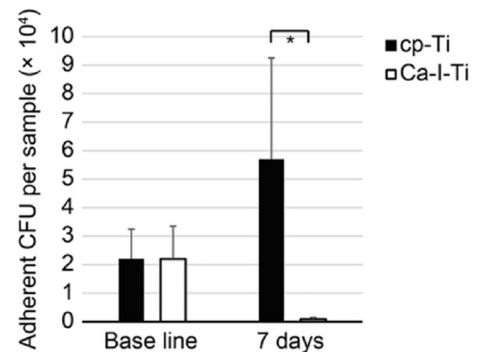


図 4 ラットを用いた in vivo 抗菌試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田周正、藤林俊介、山口誠二、池崎龍仁、本田新太郎、織田和樹、高岡祐輔、奥津 弥一郎、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<br>アルカリ加熱処理後ヨウ素担持チタンの生体活性及び抗菌性の生体内評価.                                  |
| 3. 学会等名<br>第41回整形外科バイオマテリアル研究会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田周正、藤林俊介、山口誠二、池崎龍仁、本田新太郎、織田和樹、高岡祐輔、奥津 弥一郎、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<br>アルカリ加熱処理後ヨウ素担持チタンの生体活性及び抗菌性の生体内評価.                                  |
| 3. 学会等名<br>第37回日本整形外科学会基礎学術集会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田周正、藤林俊介、山口誠二、高岡祐輔、奥津弥一郎、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<br>アルカリ加熱処理後ヨウ素担持チタンの生体活性及び抗菌性の評価.                     |
| 3. 学会等名<br>第36回日本整形外科学会基礎学術集会                                  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>池田周正、藤林俊介、山口誠二、織田和樹、高岡祐輔、奥津弥一郎、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<br>アルカリ加熱処理後ヨウ素担持チタンの生体活性及び抗菌性の評価（主に細胞評価に関して）.              |
| 3. 学会等名<br>日本バイオマテリアル学会関西ブロック第16回若手研究発表会                            |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田周正、藤林俊介、山口誠二、池崎龍仁、本田新太郎、織田和樹、高岡祐輔、奥津 弥一郎、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<br>アルカリ加熱処理後ヨウ素担持チタンの生体活性及び抗菌性の評価（主に生体内評価に関して）                         |
| 3. 学会等名<br>第40回整形外科バイオマテリアル研究会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                             | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 藤林 俊介<br><br>(Fujibayashi Shunsuke)<br><br>(30362502) | 京都大学・医学研究科・特定教授<br><br><br><br>(14301) |    |

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 |
|---------|---------|