

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15060

研究課題名（和文）感染症防止のためのフッ素コートDLC膜の基礎的検討

研究課題名（英文）Fundamental study of fluorine-coated DLC film for preventing infection

研究代表者

西村 直之（Nishimura, Naoyuki）

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・教授（特定雇用）

研究者番号：10644940

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）：近年人工関節、脊椎ゲージなどの進展により適用数が増加している。一方で手術初期から晩期にわたって感染症も増加している。感染防止という観点から抗菌性処理の1つとしてDLC（ダイヤモンドライクカーボン）に着目し、DLCコーティングの平滑性に基づく菌付着の防止、F（フッ素）添加による糖代謝抑制による増殖の阻害を目的として研究を行った。

これまでにPBI法によりDLC膜を製膜し、日本兎の大腿骨遠位に所定の試験片を埋入し、骨組織と試験片周辺の組織観察した。従来の材料と比較して骨誘導能の向上がみられた。さらにFを導入することにより抗菌性に関してさらに向上することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在適用が増加している体内埋入機器の感染に対する対処方法の1つとして、1) DLCコート（表面の平滑化）や2) Fの添加による抗菌性の向上が確認できた。併せて骨誘導能においても問題がないことを確認した。

このことは将来的にDLCコートだけではなく、同様の表面処理コンセプト、仕様を持つ体内埋入機器を開発することにより、患者に適用される機器に起因する感染症の防止に役立つことになると考えている。

研究成果の概要（英文）： In recent years, the number of applications has increased due to the development of artificial joints, spinal gauges, etc. On the other hand, the number of infections is also increasing from the early to late stages of surgery. From the perspective of infection prevention, we focused on DLC (diamond-like carbon) as one of the antibacterial treatments, and conducted research with the aim of preventing bacterial adhesion due to the smoothness of DLC coating and inhibiting proliferation by suppressing sugar metabolism with the addition of F (fluorine).

DLC films have been produced using the PBI method, and specified test specimens have been embedded in the distal femur of Japanese rabbits, and the bone tissue and tissue around the test specimens have been observed. Compared to conventional materials, improved bone induction ability was observed. Furthermore, it was found that the introduction of F further improved antibacterial properties.

研究分野：生体材料学関連

キーワード：DLC 抗菌性 フッ素 骨誘導能 固定性 体内埋入型医療機器 日本兎 平滑性

1. 研究開始当初の背景

【緒言】

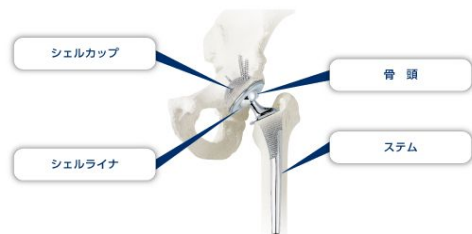


図 1. 人工関節 (人工股関節)

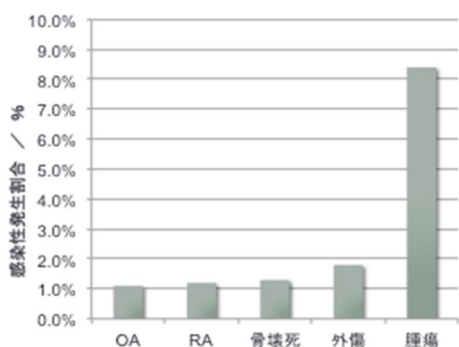


図 2. 原症例における感染発生割合

関節の再置換を行う可能性もある。

2. 研究の目的

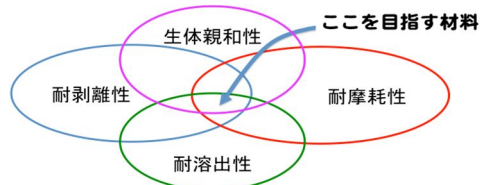


図 3. 人工関節の具体的な要求事項

様々である。

一方で人工関節材料に要求される有効性、安全性に関してはその使用環境から通常の機械使用環境に比べてかなり過酷な環境で使用される。

DLC コーティングを適用した場合に具体的には以下の5つ程度の課題を解決する必要がある。

- 1) 金属イオンの溶出を現在の溶出量より大きく抑制できる DLC コーティングであること
- 2) 生体内において骨誘導能、抗菌性を有するコーティングで有ること
- 3) 母材表面より DLC 膜の剥離が発生しないこと
- 4) 金属材料の孔などの平面だけでなく、立体的な構造体内部にまで DLC 膜をコーティング出来ること
- 5) 実用化できるコストで有ること

これらの中で DLC 膜などの検討が進められているが、実際応用が進んでいるステント、歯科材料などに比べて実用化は進んでいないのが現状である。特に剥離に関しては素材表面の影響も大きく受けるために、多々単純に DLC コーティングを施工しただけではこれらの問題に対して大きなリスクを発生させることになる。

近年、イオン注入を応用した DLC 成膜方法が開発され、実用化に向けた取り組みがなされている。この技術の特徴は DLC コーティングを施す表面に事前にイオン注入を行うことにより、DLC

変形性関節症やリュウマチ患者向けの最終的な治療手段として人工関節置換術が挙げられる。これらは疾患によって機能不全に陥った関節を人工物で構成された人工関節に置き換えて本来の活動性を取り戻す手段である。人工関節は近年大幅な進歩を遂げ、その寿命は20年以上とされている。高齢者人口の急激な増加と QOL (Quality Of Life) の向上を求める社会的情勢からもこれらの症例数は現在 15 万人を超え、今後増加することが予想される。

【課題】

一方で人工関節手術後に感染症に罹患する患者も少なくなく、高齢者の再手術は命に関わる事例も報告されている。感染症は早期と遅発性に分かかれ、発症もしくは兆候出現が 3 週間以内は早期、それ以降は遅発性と言われている。遅発性感染症は数年もしくは数十年スパンで発症する場合もあり、血行性感染によるとされているが詳細は分かっていない。また腫瘍を原疾患とした場合感染症の発生率はその他の原症例と比較して大幅に大きいものである (図 2)。

人工関節自体は金属などを用いた人工物であり金属材料を体内で長期間利用する為、微量ながら金属イオンが溶出することは避けられない。金属イオンが生体内で溶出することにより様々なリスク、例えばアレルギーや免疫不全等が発生する可能性が数多く報告されている。長期にわたっては血流性感染症などを引き起こし、最終的には人工

と素材表面との間に化学結合を持つことが可能となり、高い剥離耐性を持つ膜の生成が可能である。またその膜自体にはフッ素などを含有させると高い抗菌性を持つことも報告されている。

3. 研究の方法

これら技術を適用し、人工関節に最適な条件の DLC 膜を探索・選定する。

1. チタン合金、PEEK 素材表面への DLC 膜の作製

これまでに基材との間に中間層を持ち耐剥離性が比較的に高いと考えられる PBI (Plasma-Based Ion Implantation) 法により基材表面へ DLC 膜を導入した。基材は Ti-6Al-4V 及び PEEK (カーボンファイバー30%添加：主に脊椎ケージで使用以降 PEEK /CF と称す) 材料を用いた。また得られた DLC 膜へ水酸化ナトリウム水溶液による親水化処理を行った。

成膜の完全性に関してはチタン合金上に DLC を成膜し、JIS T 0302 「金属系生体材料のアノード分極による耐食性の評価方法」に従い、アノード分極曲線の浸漬電位、電流値よりその完全性を評価した。

2. 耐摩耗性に関する評価

耐剥離特性を確認するためにピンオンディスク摩耗試験を実施した。摺動特性試験は Optimal Instruments 社製摺動特性試験機 SRV を用いて行った。試験はアルミナボールをピンとして用い、純水中荷重を徐々に上昇させることによる摩擦係数の変化を調べた。用いた試験片は 30 mm、t=5mm の形状である。試験条件は荷重 0~1000N、ストローク 1mm、速度 5Hz の条件下で行った。

3. 細胞による評価 (骨誘導能、抗菌性)

骨伝導能を調べる指標の 1 つである MC3T3-E1 骨芽細胞による細胞 (あるいは骨) 親和性試験を 24 時間後の細胞接着率を調べた。用いた試験片は 14mm、t=2mm の形状である。細胞試験に供する前に線による滅菌 (>25kGy) を行った。

抗菌性試験の指標の 1 つである JIS Z2801 抗菌加工製品 - 抗菌性試験方法・抗菌効果を用い黄色ブドウ球菌により抗菌活性値を算出した。用いた試験片は角 50mm、t=5mm の形状である。抗菌性試験に供する前に線による滅菌 (>25kGy) を行った。

4. 家兎大腿骨への埋入による骨誘導能評価

家兎大腿骨 (4 週間、12 週間埋入) を用いた組織解析によって評価した。家兎大腿骨埋入試験に供する前に線による滅菌 (>25kGy) を行った。

5. その他

フッ素の存在下では金属の腐食の問題が発生する可能性がある。この問題を検証するためにフッ化ナトリウムの存在下において、JIS T 0302 「金属系生体材料のアノード分極による耐食性の評価方法」に従い、アノード分極曲線の浸漬電位、電流値よりそのフッ素の影響を評価した。

4. 研究成果

1. チタン合金、PEEK 素材表面への DLC 膜の作製

チタン合金としては Ti-6Al-4V (ASTM- F136 適合品) を用い、PEEK 材料はインプラントグレード PEEK 材 (ASTM F2086 適合品) を用いた。

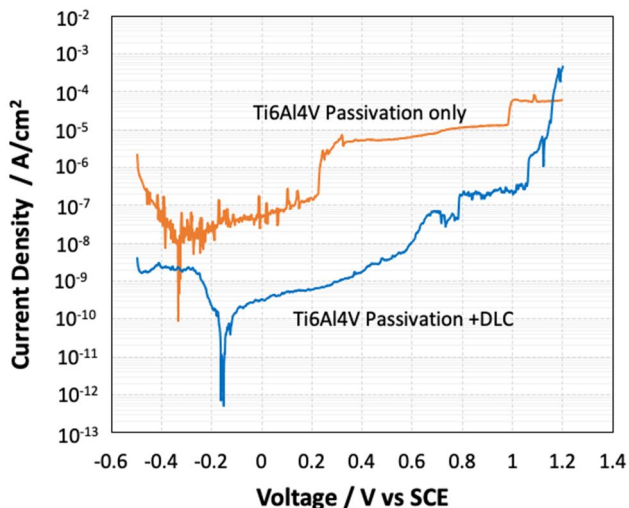


図 4. チタン合金及び DLC 処理品のアノード分極曲線

PBI 法による DLC 膜作製は厚み 0.7 μm の DLC 膜 (a-C:H) を (株) プラズマイオンアシストに依頼して行った。

また DLC 処理後に 1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 80 に加熱した溶液に浸漬することで親水化処理を行った。表面の水との接触角としては約 30° 程度である。

膜の完全性を調べる目的で Ti-6Al-4V 基板上に DLC 膜を作製しアノード分極を行った。結果を図 4 に示す。図より DLC 膜を持たない試験片に対して DLC 膜を持つ場合、2桁程度低い電流値を持ち、浸漬電位も高くなっていることより、本製造方法で作製した DLC 膜は水溶液中において高い耐食性を持つことがわかる。

2. 耐摩耗性に関する評価

PEEK /CF 系に関して説明する。荷重に対する摩擦係数の変化を示した結果を図 5. に示す。50N 以下の低荷重の場合では PEEK/CF_DLC は摩擦係数 0.1 程度を示し、他方 PEEK/CF は 0.2~0.3 程度を変動していることがわかる。200N 以上の荷重では PEEK/CF_DLC は徐々に摩擦係数は増加し、500N を超えると PEEK/CF とほぼ同じ摩擦係数を示した。この事より 50N 以下では DLC コーティングにより低摩擦係数を示し、これを超えると徐々に DLC 膜の効果が失われる事が解る。

また 50N の一定負荷をかけた場合の摩擦係数の変化を図 6. に示す。図より PEEK /DF のみの場合に

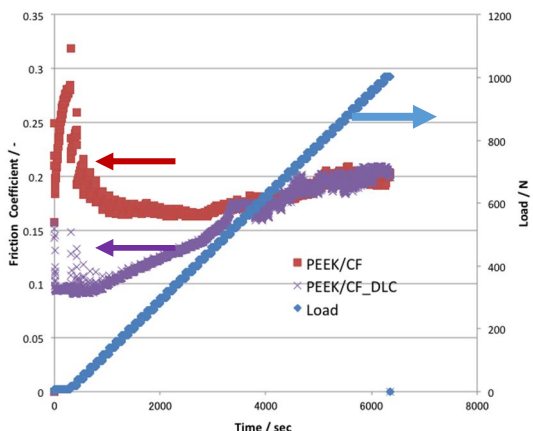


図 5. PEEK/CF/DLC の荷重に対する摩擦係数の変化

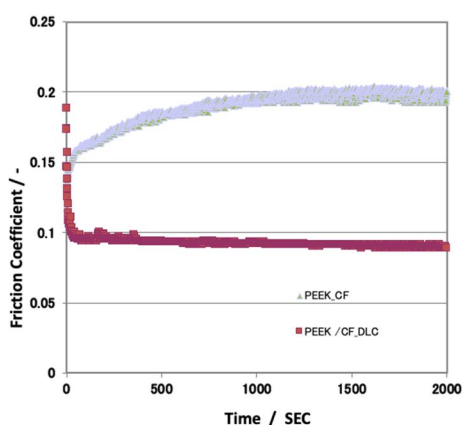


図 6. PEEK/CF/DLC の一定荷重に対する摩擦係数の変化

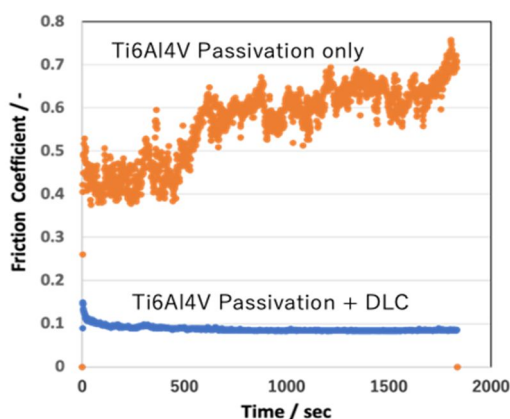


図 7. Ti-6Al-4V/DLC の一定荷重に対する摩擦係数の変化

は摩擦係数は 0.2 付近であるが、DLC 膜を付与したものは摩擦係数 0.1 以下で安定していることがわかる。Ti-6Al-4V の系でも同様に DLC 膜を付与したものは摩擦係数 0.1 以下で安定していることがわかる。これによりある程度の荷重下において DLC は大規模に剥離することはなく、その表面に膜を保持しているものと推測している。

3. 細胞による評価 (骨誘導能、抗菌性)

細胞数(amarBlue 蛍光強度) * : $p < 0.05$

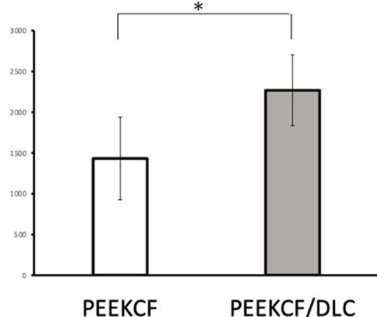


図 8. 細胞数の比較 (3day)

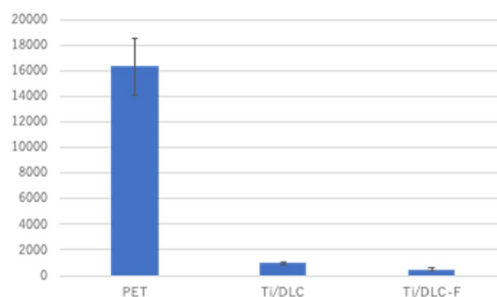


図 9 抗菌試験後の残留生菌数の比較 (S. aureus にて試験)

【骨誘導能】図 8. に各試験片の細胞接着性の変化を示す。PEEK/CF_DLC は PEEK/CF と比較

して、細胞の増殖率が増加している事が解る。また水酸化ナトリウムによる処理を行った PEEK/CF_DLC_Na はさらに細胞増殖率が増加している事が解る。

【抗菌性】抗菌試験後の残留生菌数の比較を示す。コントロールに対して残存生菌数は大幅に減少しており、DLC 膜の効果及び F 添加により抗菌性が付与されていることがわかる。

4. 家兎大腿骨への埋入による骨誘導能評価

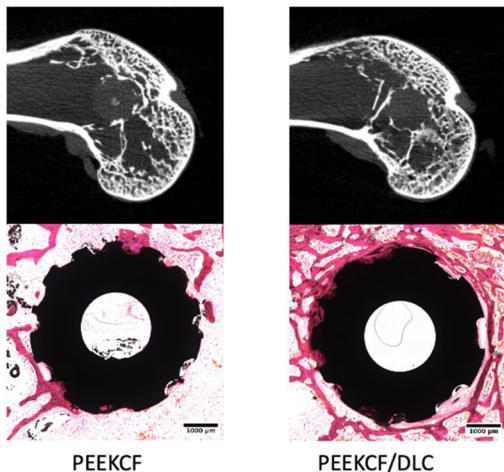


図 10. ウサギへの埋入による組織評価

5 L15mm の試験片(螺旋の溝あり) を作製し、この表面に均質になるように DLC を成膜した。コントロールとしては同じ形状の DLC を成膜していない試験片を用いた。図 10. に家兎の大腿骨遠位に 12 週間埋入した試験片の断面を示す。

周囲には、炎症などは発生しておらず、健全な組織が見られる。DLC を成膜した試験片と成膜していない試験片を比較すると、DLC を成膜した試験片の周囲には新生骨の成長が見られる。

なお、本試験において埋入した試験片を押し抜き試験により評価を行ったが、優位な差が見られなかった。

5. その他

フッ素を含む溶液中では金属の腐食が課題になる場合がある。チタン合金においても同様のことが想定されるために、一例として水溶液中に NaF を存在させた場合のアノード分極曲線からその影響に関して調査を行った。

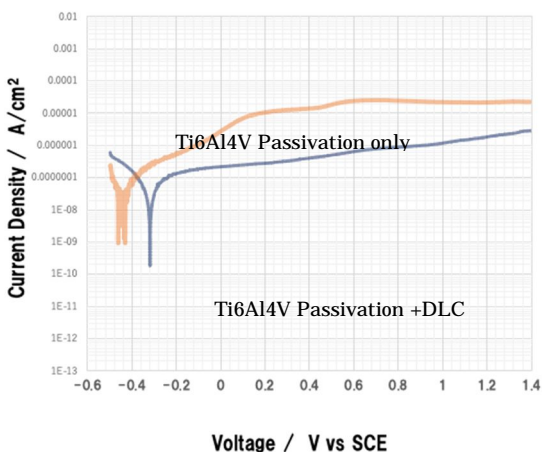


図 11 0.5%NaF 溶液中でのアノード分極曲線

試験片は DLC を成膜した試料と DLC を成膜していない(不動態処理のみ)の試料を比較した。

不動態処理を行った Ti6Al-4V 合金と比較して DLC の成膜を行ったサンプルは 0.5%NaF 溶液中低い電流値を示した。

フッ素溶液中においても、DLC による表面処理は高い耐食性を示す一助になる。浸漬電位も高くなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村 直之, 國次 真輔, 大八木 博文, 沖原 巧, 青木 薫, 植 村 健 , 齋藤 直人
2. 発表標題 PEEK表面へのDLC処理による生体材料への適用 【脊椎ケージを例にとり】
3. 学会等名 医用DLC研究会 第7回総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白田悠、國次真輔、齋藤直人、西村直之
2. 発表標題 PEEK表面へのDLC処理による 生体材料への適応検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村直之
2. 発表標題 チタン合金表面へのDLC処理による生体材料への適用
3. 学会等名 表面技術協会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村直之
2. 発表標題 PEEK表面へのDLC処理による生体材料への適用検討
3. 学会等名 表面技術協会
4. 発表年 2021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
研究協力者	岡本 正則 (Okamoto Masanori)		臨床情報の提供
研究協力者	國次 真輔 (Kunitsugu Shinsuke)		・基礎及び応用的なDLC成膜技術、DLC膜における各種評価技術を保有。 ・DLC膜製造設備、AFM(ナノインデンテーション)、FE—SEM等
研究協力者	沖原 巧 (Okihara Takumi)		・医療機器におけるQMS評価(微量分析等)技術を保有。 ・GC—MS、化学分析機器

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
---------	---------