

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23032

研究課題名（和文）抗菌性炭酸アパタイト骨補填材の創製

研究課題名（英文）Fabrication of antibacterial carbonate apatite bone substitute

研究代表者

島袋 将弥（Shimabukuro, Masaya）

九州大学・歯学研究院・特任助教

研究者番号：40883434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：炭酸アパタイトと広域の抗菌スペクトルを示す銀系化合物の併用は、骨再生と感染予防に有用である。本研究では、骨再生に影響を及ぼさないリン酸銀の最大無影響量の導出と、その結果に基づいて、炭酸アパタイトハニカム表面をリン酸銀修飾した。結果として、0.1 wt%リン酸銀を含有する炭酸アパタイトは、骨芽細胞の接着、増殖、酵素活性、石灰化に無影響であり、in vivoで炎症反応を伴うことなく骨再生することが明らかとなった。すなわち、リン酸銀の最大無影響量は0.1 wt.%であった。さらに炭酸アパタイトハニカム表面を0.1wt.%以下のリン酸銀で修飾すると、in vivoで骨再生と感染予防とを同時に達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会への突入を契機として、骨補填材を用いた硬組織再建術が急増しており、これに伴い、骨補填材の埋植を原因とした細菌感染症が益々深刻化している。本研究は、銀系化合物を利用した抗菌性炭酸アパタイト骨補填材の創製を通じて、骨領域における感染症の治療・予防に貢献しうる医療機器を提案することができた。また本研究より得られた知見は、銀系化合物の生体内利用、とくに硬組織での使用に関して基盤的知見となる。さらに本研究は、毒性学に基づいた新たな材料設計指針を提案し、抗菌性医療機器開発の一助となることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：The use of combined broad-spectrum antibacterial silver compounds and carbonate apatite artificial bone is an effective strategy for achieving both bone regeneration and infection prevention. In this study, the no-observed-effect level (NOEL) of silver phosphate on bone regeneration was determined based on in vitro and in vivo experiments. Furthermore, the surface of carbonate apatite honeycomb scaffolds was modified with silver phosphate based on its NOEL. As a result, the sample containing 0.1 wt.% silver phosphate did not adversely affect cellular adhesion, proliferation, alkaline phosphatase activity and calcification of MC3T3-E1 cells, and achieved the in vivo bone formation without any inflammatory reaction. In other words, NOEL of silver phosphate on bone regeneration was 0.1 wt.%. Furthermore, the silver phosphate-modified carbonate apatite honeycomb scaffold, which was modified based on NOEL, achieved both bone regeneration and infection prevention in vivo.

研究分野：生体材料

キーワード：抗菌性 炭酸アパタイト 骨補填材 リン酸銀 最大無影響量 感染症予防 感染症治療 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会への突入を契機として、硬組織再建術が急増しており、骨補填材を用いた外科的治療が積極的に行われている。これに伴い、骨補填材の埋植を原因とした細菌感染症が益々深刻化している。リン酸カルシウム系化合物を主成分とする既存の骨補填材は、細菌感染に対して抵抗性を示さないため、細菌が材料に付着し感染が遷延化すると、骨の喪失を伴う重篤な機能障害を惹起する。このため、感染症防止を可能とする骨補填材開発には、細菌制御能として抗菌性が必要不可欠である。

骨の無機成分と同組成である炭酸アパタイトは骨リモデリングと調和して材料が骨に置き換わる性質を有しており、現在骨補填材として臨床使用されている。銀およびその化合物は、広域の抗菌スペクトルを有することから、炭酸アパタイトと銀系化合物とを組み合わせることで抗菌性炭酸アパタイト骨補填材の創製が可能であると考えた。申請者はこれまでに、溶解析出法を応用することで、巨視的な構造変化を伴わずに、一軸貫通孔を有する炭酸アパタイト構造体表面をリン酸銀修飾することに成功した。一方、銀系化合物は濃度依存的に生体組織に対して毒性を示すため、リン酸銀の毒性学的知見に基づいて、炭酸アパタイト構造体表面をリン酸銀修飾する必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、リン酸銀含有量の異なる炭酸アパタイトを作製し、*in vitro* および *in vivo* 試験によって、リン酸銀含有量の相違が細胞・組織レベルに及ぼす影響を明らかにすることで、骨再生に影響を及ぼさないリン酸銀の“最大無影響量”の導出を目指した。また最大無影響量に基づいて、炭酸アパタイト構造体表面をリン酸銀修飾することで、毒性を伴わずに感染症を防止する抗菌性炭酸アパタイト骨補填材の創製に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) リン酸銀含有炭酸アパタイトの作製と最大無影響量の導出

炭酸カルシウム粉末に対して、0, 0.1, 1, 10, 20 wt.%となるようにリン酸銀粉末を添加・混合し、一軸加圧成形によってリン酸銀含有量の異なる炭酸カルシウムのディスク状試料を作製した。ディスク状試料を 1 mol L^{-1} のリン酸水素ナトリウム溶液に浸漬することで、リン酸銀含有量の異なる炭酸アパタイトディスクを作製し、X線回折法、フーリエ変換赤外分光法、走査型電子顕微鏡、X線光電子分光法、誘導結合プラズマ発光分光法を用いて材料学的評価を行った。*in vitro* 試験では、骨芽細胞様細胞“MC3T3-E1”を用いた細胞毒性試験を行い、リン酸銀含有量と細胞毒性との相関を評価した。また細胞毒性が認められなかった試料を用いて、細胞接着、細胞増殖、酵素活性、石灰化挙動の評価を行った。*in vivo* 試験では、日本白色家兔の大腿骨内側上顆に直径6 mm厚さ3 mmの骨欠損を作製し、細胞への影響を認められなかった試料を当該欠損へと埋植した。4週間の治癒期間後、マイクロコンピュータ断層撮影および病理学的解析によって、リン酸銀含有量の相違が組織レベルに及ぼす影響を明らかにした。以上の試験により、細胞・組織レベルでの応用を明らかにすることで、リン酸銀の骨再生対する最大無影響量を導出した。

(2) 炭酸アパタイト構造体表面へのリン酸銀修復

炭酸カルシウム粉末と有機系バインダーとを混合し、押出成形によって一軸貫通孔を有する構造体を作製し、脱脂を行うことで炭酸カルシウム構造体を作製した。その後、炭酸カルシウム構造体を 1 mol L^{-1} のリン酸水素ナトリウム溶液に浸漬することで、一軸貫通孔を有する炭酸アパタイト構造体を作製した。さらに $0, 0.01, 0.1, 1, 10 \text{ mmol L}^{-1}$ の硝酸銀溶液浸漬によって、表面にリン酸銀を修飾した炭酸アパタイト構造体を作製した。作製した試料は、(1)と同様にX線回折法、フーリエ変換赤外分光法、走査型電子顕微鏡、X線光電子分光法、誘導結合プラズマ発光分光法を用いて材料学的評価を行い、(1)で導出した最大無影響量以下となるようなリン酸銀修飾条件を調査した。*in vitro* 試験では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を用いた抗菌性評価を行い、最大無影響量以下であり、かつ抗菌効果の高いサンプルを導出した。さらに *in vivo* 試験では、日本白色家兔の大腿骨内側上顆に直径6 mm厚さ3 mmの骨欠損を作製し、菌液に浸したリン酸銀修飾/非修飾試料を当該欠損に埋植した。2週間の治癒期間後、マイクロコンピュータ断層撮影および病理学的解析によって、最大無影響量以下のリン酸銀修飾が、骨再生と感染予防を同時に達成するかを確認した。

4. 研究成果

(1) リン酸銀含有炭酸アパタイトの作製と最大無影響量の導出

前駆体である炭酸カルシウムに任意量のリン酸銀を添加することで、リン酸銀含有量の異なる炭酸アパタイトディスクの作製に成功した (図1)。

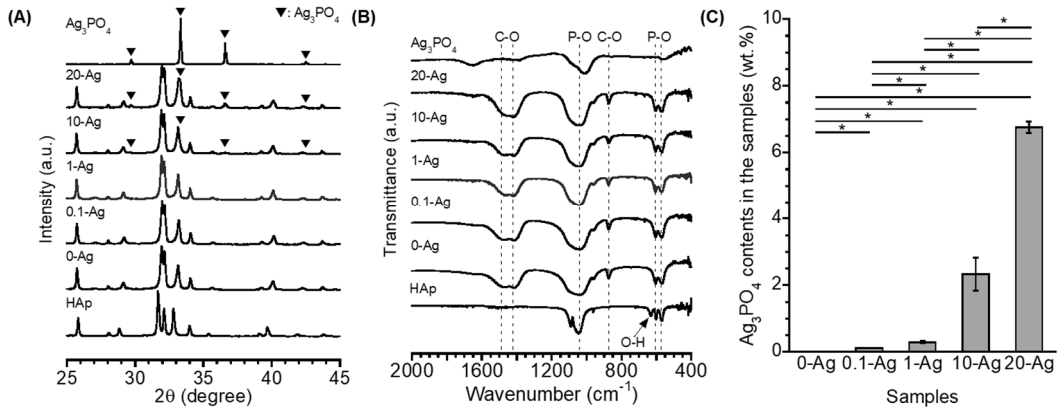


図1 リン酸銀含有量の異なる炭酸アパタイトディスクのX線回折パターン (A)、赤外線吸収スペクトル (B) および誘導結合プラズマ発光分光法による炭酸アパタイト中のリン酸銀含有量の定量結果 (C)。

細胞毒性試験では、炭酸アパタイト中のリン酸銀含有量 2 wt.%以上の試料では毒性効果が確認された (図 2)。また回帰結果から、リン酸銀含有量 0.95 wt.%未満であれば MC3T3-E1 に対して無毒性であることが示唆された。リン酸銀含有量 0.1 および 0.3 wt.%の試料は MC3T3-E1 に対して無毒性であったが、当該試料は MC3T3-E1 の接着、増殖、酵素活性、石灰化挙動に無影響であった。このため、リン酸銀含有量 0.1 および 0.3 wt.%の試料を *in vivo* 試験に用いた。

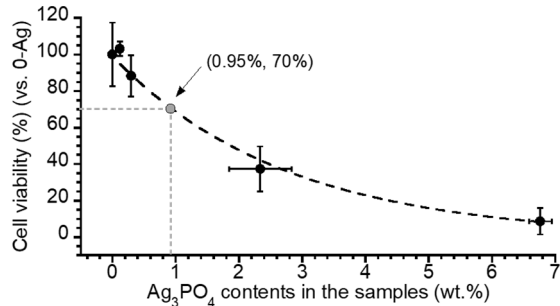


図2 炭酸アパタイトディスク中のリン酸銀含有量と試料表面における MC3T3-E1 の 24 時間培養後の生存率。

リン酸銀含有量 0.1 および 0.3 wt.%の試料を粉砕して 600-1000 μm 程度の顆粒状試料へと加工した。作製した顆粒状試料をウサギ大腿骨内側上顆に 4 週間埋植した。マイクロコンピュータ断層撮影および病理学的解析によって、リン酸銀含有量 0.3 wt.%の試料を埋植した検体では炎症の所見が確認された一方で、リン酸銀含有量 0.1 wt.%では炎症の所見は認められなかった (図 3)。またリン酸銀含有量 0 および 0.1 wt.%の検体の新生骨量は同程度であったことから、リン酸銀の骨再生対する最大無影響量は 0.1 wt.%と決定した。

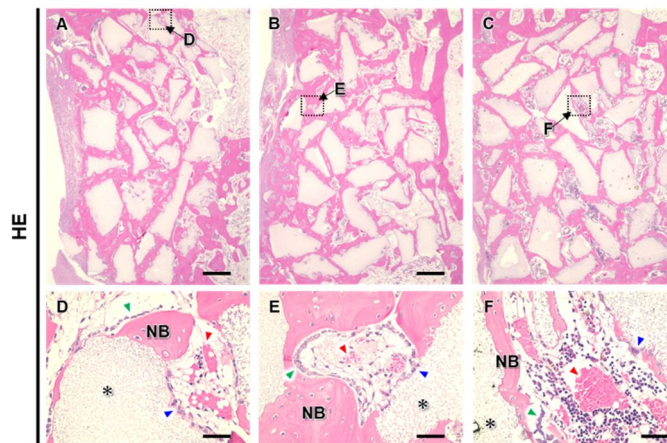


図3 ウサギ大腿骨内側上顆にリン酸銀含有量 0, 0.1 および 0.3 wt.%の試料を 4 週間埋植した検体より作製した病理組織標本。リン酸銀含有量 0 wt.% (A, D), リン酸銀含有量 0.1 wt.% (B, E), リン酸銀含有量 0.3 wt.% (C, F)。

(2) 炭酸アパタイト構造体表面へのリン酸銀修飾

一軸貫通孔を有する炭酸アパタイト構造体を硝酸銀溶液に浸漬することで、その表面にリン酸銀を修飾することに成功した (図4)。リン酸銀を修飾した試料は、すべての条件でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果を示した。また 0.1 mmol L^{-1} の硝酸銀溶液浸漬によって作製した試料のリン酸銀含有量は、(1)の最大無影響量以下であった。このため、当該試料を *in vivo* 試験に用いた。

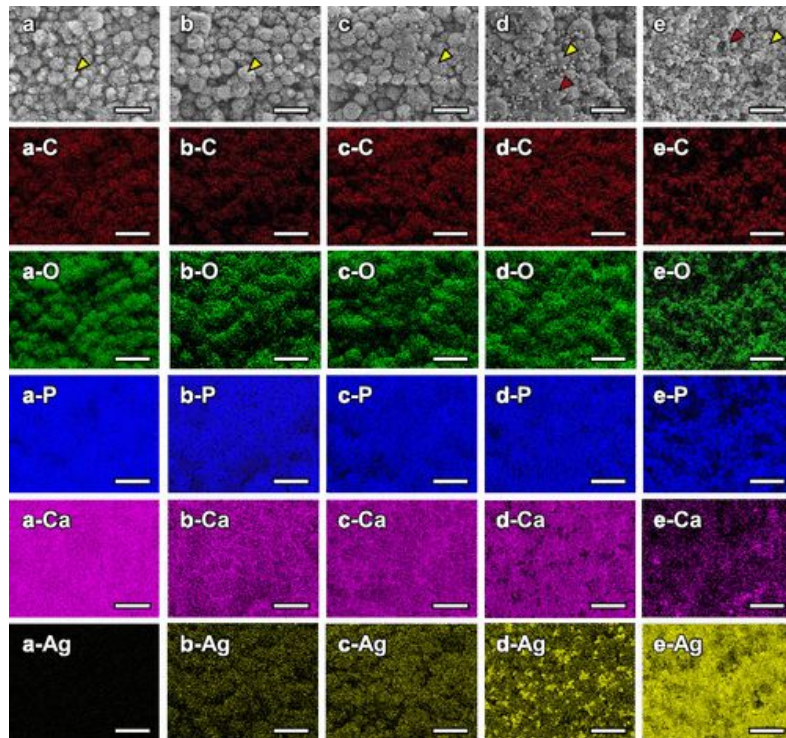


図4 リン酸銀を修飾した炭酸アパタイト構造体の表面走査型電子顕微鏡像と元素マッピング像. 各画像は 0 mmol L^{-1} 硝酸銀(a列), 0.01 mmol L^{-1} 硝酸銀(b列), 0.1 mmol L^{-1} 硝酸銀(c列), 1 mmol L^{-1} 硝酸銀(d列), 10 mmol L^{-1} 硝酸銀(e列) 浸漬によって得られた。

0 および 0.1 mmol L^{-1} 硝酸銀溶液浸漬によって、作製した試料をそれぞれリン酸銀非修飾群とリン酸銀修飾群として *in vivo* 試験を行った。各試料をメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌液に浸漬した後、ウサギ大腿骨内側上顆に2週間埋植した。マイクロコンピューター断層撮影および病理学的解析によって、リン酸銀非修飾群では炎症性骨吸収、炎症性細胞浸潤などの所見が確認された一方、リン酸銀修飾群では炎症の所見は認められず、一軸貫通孔内部に骨形成が確認された (図5)。このため、最大無影響量以下のリン酸銀修飾は、毒性といった悪影響を伴わずに炭酸アパタイト構造体への抗菌性の付与が可能であり、骨再生と感染予防の同時達成が可能であった。

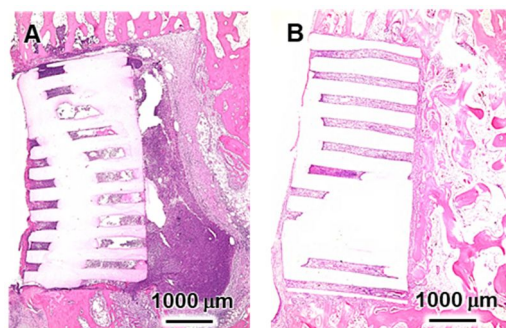


図5 リン酸銀非修飾群(A)およびリン酸銀修飾群(B)を埋植した検体より作製した病理組織標本。

以上より、本研究成果は骨再生におけるリン酸銀の毒性学的知見の集積に貢献し、その知見に基づいた抗菌性材料開発によって、骨再生・感染予防を同時達成する抗菌性炭酸アパタイト骨補填材の創製を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimabukuro Masaya, Hayashi Koichiro, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 in press
2. 論文標題 Surface functionalization with copper endows carbonate apatite honeycomb scaffold with antibacterial, proangiogenic, and pro-osteogenic activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Advances	6. 最初と最後の頁 212751 ~ 212751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioadv.2022.212751	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 -
1. 著者名 Shimabukuro Masaya, Hayashi Koichiro, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 8
2. 論文標題 No-Observed-Effect Level of Silver Phosphate in Carbonate Apatite Artificial Bone on Initial Bone Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 159 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.1c00480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimabukuro Masaya, Hayashi Koichiro, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 48
2. 論文標題 Effects of carbonate ions in phosphate solution on the fabrication of carbonate apatite through a dissolution/precipitation reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceramint.2021.09.188	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 -
1. 著者名 Masaya Shimabukuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Antibacterial Property and Biocompatibility of Silver, Copper, and Zinc in Titanium Dioxide Layers Incorporated by One-Step Micro-Arc Oxidation: A Review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics9100716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 島袋将弥、埴隆夫、石川邦夫
2. 発表標題 骨再生における炭酸アパタイト骨補填材中のリン酸銀の無毒性量
3. 学会等名 日本金属学会 2022年春期 第170回講演大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masaya Shimabukuro (分担執筆)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Series in Biomaterials Science and Engineering	5. 総ページ数 18
3. 書名 Innovative Bioceramics in Translational Medicine I (Chapter 6 Surface Functionalization of Titanium for the Control and Treatment of Infections)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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