

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462340

研究課題名(和文) バイオフィーム形成に影響する人工生体材料因子と環境因子

研究課題名(英文) Biomaterial mechanical characters and environmental factors influencing biofilm formation

研究代表者

依田 周 (YODA, Itaru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：40646775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体人工材料表面に細菌がバイオフィームを形成すると、抗菌剤での治療は困難となり、感染に対する頻回の手術が必要となる。我々は、現在使用されている人工材料を用いてバイオフィーム形成を阻害し、発育を抑制する因子を明らかとした。人工材料因子では表面の凹凸不整が少なく、疎水性であるほど細菌が付着しにくく、環境因子では標準タンパク(アルブミン)が多く、温度が低いほどバイオフィーム形成は抑制された。こうした知見は、術後インプラント関連感染症を予防し、罹患した人々を速やかに治療する一助となる。

研究成果の概要(英文)：When bacteria form biofilm on biomaterial surface, chemo-therapy with antibiotics is difficult, and surgeries for implant-related infection are required. We evaluated the efficacy of mechanical characters of biomaterial and environmental factors inhibiting biofilm formation. The smooth and hydrophobic surface of biomaterial obstructed bacterial adherence. In addition to that, biofilm formation was inhibited in albumin rich environment at lower temperature. These finding will help us to prevent a postoperative implant-related infection and to treat the suffered patients.

研究分野：感染症

キーワード：感染 バイオフィーム 生体人工材料

1. 研究開始当初の背景

整形外科分野において、人工金属生体材料は生体親和性が高く、低腐食性で機械的特性に優れていることから、医療分野で使用される**生体材料全体の70%以上**を占め、広く活用されてきた。特に**チタン**、**ステンレス**、及びその合金はプレートや髄内釘などの**骨接合器具**、**コバルトクロム合金**などは**人工関節**に應用されている。その他にも、歯科インプラント、血管内ステント、脳動脈クリップ、心臓人工弁など金属生体材料の実用例は枚挙にいとまがない。しかし、こうした金属材料の中に血管が新生することはなく、細菌やウイルスなどが付着すると、**インプラント関連感染症**を発症する。その発生率は**整形外科手術例の0.2~17.3%**に及ぶ。特に**糖尿病**や**膠原病**など基礎疾患を有する患者は**免疫能が低下**しているため、健常人よりも発症率が高く、治療効果も**低い**。人工材料を除去して**感染制圧**、**鎮静化**を図ることも少なくなく、**複数回手術**、**膨大な医療費**、**長期にわたる治療期間**、**患者への甚大な苦痛**を強いることとなる。細菌が生体材料表面に付着、増殖すると、glycoproteinなどのムコ多糖類を分泌して、細菌集団の周囲に**バイオフィーム**を形成する。バイオフィームに包まれた細菌群は**生体の免疫能**や**抗菌薬**の作用から免れることが可能となるため、極めて**難治性**となる。**バイオフィーム**が形成される過程は、一般に**4-stageモデル**で表現されるが、実際には**細菌側因子**、**生体内の環境因子**、**人工材料側因子**が複雑に絡み合って起こる現象であり、未だ解明に至っていない。従って、人工材料表面における**バイオフィーム形成機序**を詳細に**分析**し、これに影響する**因子**をひとつひとつ明確にすることを**研究の目的**とした。これによって、**バイオフィーム形成を抑制**するための**手段**や**工夫**、**人工材料の開発**に発展させることができれば、**インプラント関連感染症**で**苦しむ患者**を少しでも減らすことができると考えられる。我々は、米国のSmith & Nephew社の協力を得て、2008年に本邦で販売開始された**表面酸化処理ジルコニウム-ニオブ合金(OXINIUM)**を入手した。過去にOXINIUMを含む生体材料を用いたバイオフィーム研究は**皆無**である。

2. 研究の目的

本研究の**目的**は、各種人工生体材料に対する**バイオフィーム形成量**や**速度**、**形態**や**質**などを分析し、この現象に**影響する因子**を明らかにすることである。**バイオフィーム形成を抑制**する**人工材料の特徴**が判明すれば、手術時に使用される**デバイス**の選択の一つの基準となる。また、**インプラント関連感染症発生率**を低下させることで、手術を受ける**患者**や**その家族に福音**をもたらすことができる。

3. 研究の方法

- 1) 現在、臨床で使用される**生体材料間の細菌付着能**を比較する。
- 2) **細菌付着性**に影響する物理的**因子**を特定

する。

- 3) **バイオフィーム形成**に影響する因子も、上記と同様に検討する。
- 4) 他の菌株(黄色ブドウ球菌、緑膿菌、及び耐性菌)での評価を加える。
- 5) 蛋白や糖、金属摩耗粉や抗生剤、温度など**環境因子の関与**について検証する。

4. 研究成果

1) 現在臨床で使用されている金属材料表面への細菌の付着性を評価し、コバルトクロム合金への細菌付着が最も低い(付着しにくい)ことを発見した。(図1)

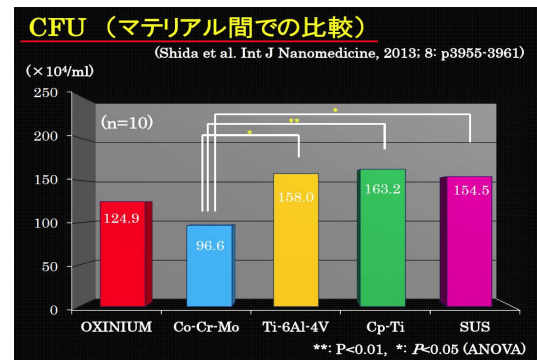


図1, 材料間での付着菌数の比較

OXINIUM: オキシニウム、Co-Cr-Mo: コバルトクロム合金、Ti-6Al-4V: チタン合金、Cp-Ti: 純チタン、SUS: ステンレス鋼

2) 物理的特性(表面の粗さ、ぬれ性、表面自由エネルギー、Z電位、吸水率など)の中で表面の粗さ、ぬれ性、及び表面自由エネルギーが影響することを明らかとした(図2~3, 表1~2)。

	Ra (nm)		P-value
	Fine group	Coarse group	
Oxinium	7.5 (0.5) b,c,e	20.1 (15.2)	<0.01
Co-Cr-Mo	2.3 (0.5) a,c,d	14.1 (16.0)	<0.01
Ti-6Al-4V	4.8 (1.9) a,b,e	16.2 (10.3)	<0.01
cp-Ti	5.4 (1.2) b,e	22.0 (6.0)	<0.01
stainless steel	1.4 (0.5) a,c,d	7.2 (1.9)	<0.01

図2, 材料表面の粗さ(OLS4000, c=80 μm: 50x) 平滑群(Fine group)と不整群(Coarse group)

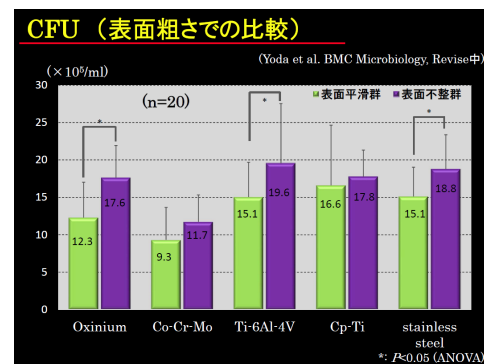


図3, 付着菌数比較

平滑群が不整群よりも付着しにくい。

	OX	Co-Cr-Mo	Ti-6Al-4V	Cp-Ti	SUS
Contact angle (degree)	78.7±2.0	100.4±2.0	80.6±2.0	83.4±2.0	89.1±2.0

表1, 接触角

コバルトクロム合金が疎水性を示した。

	Contact angle (degree)				
	Water	Diiodo-methane	$\gamma_s^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )
OX	69.0	37.8	34.3	9.6	43.9
Co-Cr-Mo	107.3	49.7	34.1	0.0	34.1
Ti-6Al-4V	71.7	36.5	35.6	7.8	43.4
cp-Ti	96.9	41.1	39.9	0.1	40.0
SUS	90.4	38.7	39.5	0.9	40.4

表2, 表面自由エネルギー

コバルトクロム合金が最も低い。

3)、4) メチシリン耐性表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成量は、初期に付着した菌量に影響される(図4~5)。

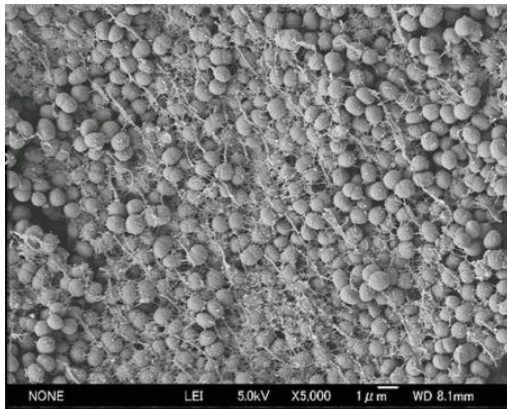


図4, バイオフィーム SEM 像

Original magnification × 5000, scale bar=1μm

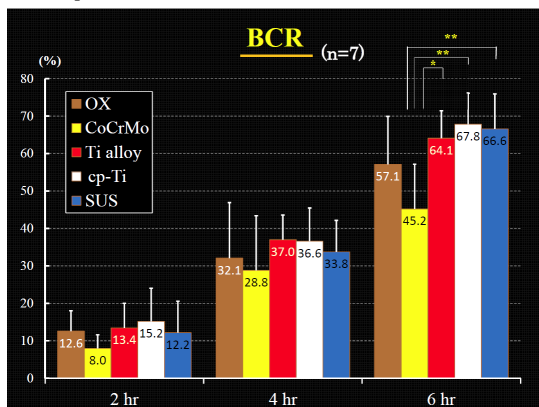


図5, バイオフィームの経時的発育量

2~6 時間にかけてコバルトクロム表面でのバイオフィーム発育は抑制されていた。

5) 標準タンパクは細菌の初期付着に抑制的に働き、温度は 25 よりも 37 の方が付着菌数は多かった。また、至適濃度の抗生剤は浮遊菌とバイオフィームの両方を抑制するが、不十分量な場合には浮遊菌が減少してバイオフィームが増加する。コバルトクロム合金の摩耗粉は金属イオンが殺菌性に働く(図6~9)。

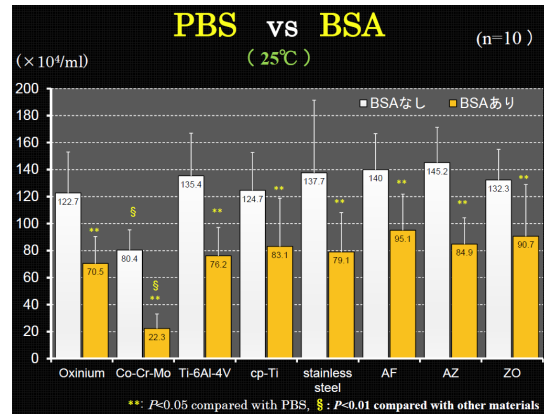


図6, 標準タンパク(BSA)の影響

全ての材料表面で付着菌数は低下していた。

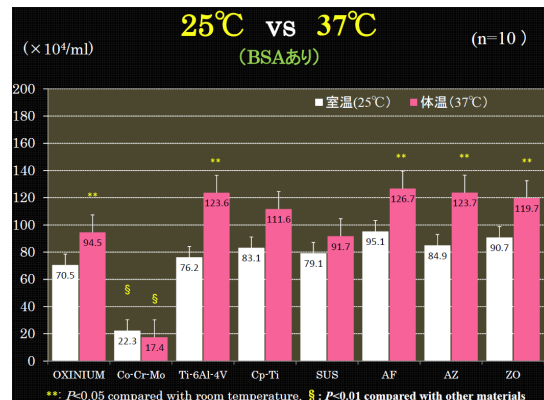


図7, 温度の影響

全ての材料表面で 25 よりも 37 の方が付着菌数は多かった。

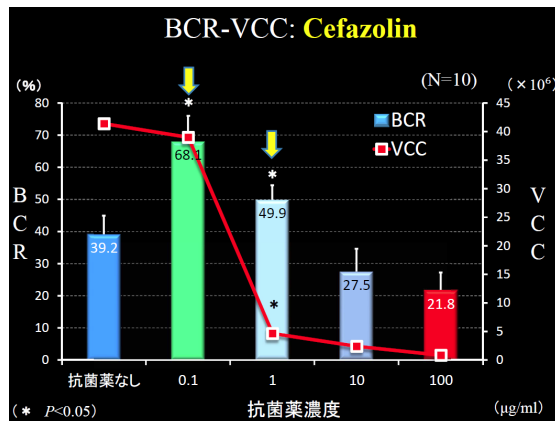


図8, 濃度勾配による浮遊菌数とバイオフィーム量

抗菌薬(セファゾリン)を投与した場合、至適濃度(10μg/ml)では浮遊菌(折れ線グラフ)とバイオフィーム量(棒グラフ)の両方も低下したが、不十分量(0.1、1μg/ml)では浮遊菌が減少してバイオフィームが増加した。菌自らが防衛すべく、クオラムセンシングによってバイオフィーム形成の方へ移動したと推察される。他の抗 MRSA 抗菌剤でも同様の傾向が認められた。

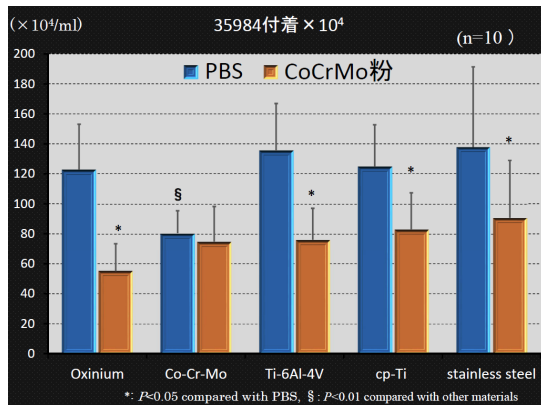


図9, 金属摩耗粉の影響

金属摩耗粉は周囲の骨吸収や局所反応性病変の原因となるが、細菌に対しては殺菌性に作用していた。コバルトやクロムはイオン化すると生体毒性を持つため、細菌に対しても毒性を發揮したものと推察される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

#### 1) PLoS One (査読有り)

2014 9;9(10): e107588. doi: 10.1371/journal.pone.0107588. eCollection 2014

#### Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: in vitro study

Hironobu Koseki, Masato Tomita, Takayuki Shida, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Yoshitomo Morinaga, Katsunori Yanagihara, Hideyuki Sakoda, Makoto Osaki

#### 2) BMC Microbiology (査読有り)

Volume 2014, 14: 234, DOI: 10.1186/s12866-014-0234-2, 2014 「査読あり」(IF 2.976)

#### Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion

Itaru Yoda M.D., Hironobu Koseki M.D., Masato Tomita M.D., Takayuki Shida M.D., Hidehiko Horiuchi M.D., Hideyuki Sakoda Ph.D., Makoto Osaki M.D

#### 3) 日本関節病学会誌, Vol.33 (No.1) : p79-83, 2014 (査読有り)

#### 生体人工材料表面への表皮ブドウ球菌付着性の比較

小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

#### 4) 日本骨・関節感染症学会誌, Vol.27 : p91-94, 2013 (査読有り)

#### チタン系人工材料の表面粗さと表皮ブドウ球菌付着量の関係

志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

#### 5) International Journal of Nanomedicine (査読有り)

Volume 2013:8 Pages 3955-3961, DOI: 10.2147/IJN.S51994.

#### Adherence ability of *Staphylococcus epidermidis* on Prosthetic Biomaterials: an in vitro study

Takayuki Shida, Hironobu Koseki, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Hideyuki Sakoda, Makoto Osaki

#### 6) International Journal of Nanomedicine (査読有り)

Volume 2013:8 Page 593-599, DOI: http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S39201

#### Clinical and histomorphometrical study on titanium dioxide-coated external fixation pins

Hironobu Koseki, Tomohiko Asahara, Takayuki Shida, Itaru Yoda, Hidehiko Horiuchi, Koumei Baba, Makoto Osaki

#### 7) 関節外科(基礎と臨床), Vol.32 (No.1) : p101-105, 2013 (査読有り)

#### 生体人工材料表面におけるバイオフィルム形成

小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

[学会発表](計22件)

#### 1) 2015.11.6 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

第43回, 日本関節病学会

#### 低濃度 cefazolin による MRSE バイオフィルム形成誘導

小関弘展, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 尾崎 誠

#### 2) 2015.10.23 富山国際会議場(富山県富山市)

第30回, 日本整形外科学会基礎学術集会

#### 不十分な cefazolin 投与はバイオフィルム形成を誘導する

依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 馬場恒明, 尾崎 誠

#### 3) 2015.10.23 富山国際会議場(富山県富山市)

第30回, 日本整形外科学会基礎学術集会

#### 低出力超音波パルス刺激による酸化チタンの殺菌活性

小関弘展, 野口智恵子, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 迫田秀行, 尾崎 誠

#### 4) 2015.10.23 富山国際会議場(富山県富山市)

第30回, 日本整形外科学会基礎学術集会

#### 表皮ブドウ球菌の初期バイオフィルム形成に及ぼすタンパクの影響

志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 尾崎 誠

#### 5) 2015.7.4 かがわ国際会議場(香川県高松市)

第38回, 日本骨・関節感染症学会

#### 低出力超音波パルスによる酸化チタンの殺菌活性

野口智恵子, 小関弘展, 志田崇之, 依田

周, 堀内英彦, 尾崎 誠  
6) 2015.7.4 かがわ国際会議場(香川県高松市)  
第38回, 日本骨・関節感染症学会  
**表皮ブドウ球菌の生体材料表面付着に対するタンパクと温度の影響**  
小関弘展, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 森永芳智, 柳原克紀, 尾崎 誠  
7) 2015.7.4 かがわ国際会議場(香川県高松市)  
第38回, 日本骨・関節感染症学会  
**不十分な抗菌薬投与はバイオフィーム形成を助長する**  
小関弘展, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 森永芳智, 柳原克紀, 尾崎 誠  
8) 2015.2.28 良順会館(長崎県長崎市)  
第39回, 長崎感染症研究会  
**表皮ブドウ球菌の生体材料表面付着に対するタンパクと温度の影響**  
小関弘展, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 森永芳智, 柳原克紀, 尾崎 誠  
9) 2015.2.28 良順会館(長崎県長崎市)  
第39回, 長崎感染症研究会  
**不十分な抗菌薬投与はバイオフィーム形成を助長する**  
小関弘展, 依田 周, 志田崇之, 堀内英彦, 野口智恵子, 迫田秀行, 森永芳智, 柳原克紀, 尾崎 誠  
10) 2015.2.28 良順会館(長崎県長崎市)  
第39回, 長崎感染症研究会  
**当科における感染症手術の実態調査**  
小関弘展, 依田 周, 尾崎 誠  
11) 2014.11.7 虎の門ヒルズフォーラム(東京都港区)  
第42回, 日本関節病学会  
**初期バイオフィーム形成に影響する生体材料の表面粗さ以外の物理的特性**  
野口智恵子, 小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 堀内英彦, 尾崎 誠, 森永芳智, 柳原克紀  
12) 2014.10.10 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)  
第29回, 日本整形外科学会基礎学術集会  
**生体金属材料の表面特性がバイオフィーム形成に与える影響**  
志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 堀内英彦, 尾崎 誠, 森永芳智, 柳原克紀, 迫田秀行  
13) 2014.10.9 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)  
第29回, 日本整形外科学会基礎学術集会  
**表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの最小限界域**  
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦, 尾崎 誠  
14) 2014.6.21 京王プラザホテル(東京都新宿区)  
第37回, 日本骨・関節感染症学会  
**表皮ブドウ球菌バイオフィーム形成に対する**

**る固体表面自由エネルギーの影響**  
小関弘展<sup>1)</sup>, 志田崇之<sup>1)</sup>, 依田 周<sup>1)</sup>, 堀内英彦<sup>1)</sup>, 尾崎 誠<sup>1)</sup>  
15) 2014.6.21 京王プラザホテル(東京都新宿区)  
第37回, 日本骨・関節感染症学会  
**表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの最小限界域**  
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 堀内英彦  
16) 2014.6.6 The Prince Hakone (Hakone, Kanagawa)  
24<sup>nd</sup> The Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium 2014  
**The Effect of Carbon Ion Implantation on the Tribology of Metal-on-Metal Bearings**  
Hironobu Koseki, Makoto Osaki  
17) 2014.6.6 The Prince Hakone (Hakone, Kanagawa)  
24<sup>nd</sup> The Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium 2014  
**Staphylococcal Biofilm Formation on Orthopaedic solid Implant materials**  
Hironobu Koseki<sup>1</sup>, Takayuki Shida<sup>1</sup>, Itaru Yoda<sup>1</sup>, Hidehiko Horiuchi<sup>1</sup>, Makoto Osaki<sup>1</sup>  
18) 2014.3.1 良順会館(長崎県長崎市)  
第38回, 長崎感染症研究会  
**表皮ブドウ球菌バイオフィーム形成に対する固体表面自由エネルギーの影響**  
小関弘展, 志田崇之, 依田 周, 尾崎 誠  
19) 2014.3.1 良順会館(長崎県長崎市)  
第38回, 長崎感染症研究会  
**表皮ブドウ球菌付着に影響する表面粗さの最小限界域**  
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 尾崎 誠  
20) 2013.10.17 幕張メッセ国際会議場(千葉県美浜区中瀬)  
第28回, 日本整形外科学会基礎学術集会  
**表面酸化ジルコニウム合金への表皮ブドウ球菌付着性**  
志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 尾崎 誠  
21) 2013.7.6 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
第36回, 日本骨・関節感染症学会  
**酸素イオン注入した純チタン表面の殺菌効果**  
依田 周, 小関弘展, 志田崇之, 尾崎 誠  
22) 2013.7.6 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
第36回, 日本骨・関節感染症学会  
**チタン系金属生体人工材料の表面粗さと表皮ブドウ球菌付着量の関係**  
志田崇之, 小関弘展, 依田 周, 尾崎 誠

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagasaki-seikei.com/>

<http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/physical/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

依田 周 (YODA, Itaru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

客員研究員

研究者番号：40646775

### (2) 研究分担者

小関 弘展 (KOSEKI, Hironobu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：70457571

尾崎 誠 (OSAKI, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：20380959