

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670640

研究課題名(和文)ヨード担持インプラントの生体内減衰と生体親和性の評価

研究課題名(英文)The effectiveness and biocompatibility of iodine coated implant

研究代表者

西田 英司(Hideji, Nishida)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：50569374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌力試験において、ヨードコーティング担持インプラントは黄色ブドウ球菌のコロニー形成を有意に抑制した。骨芽細胞の生体親和性を調べたところ、ステンレス製と比べ、チタン製、酸化被膜、ヨード担持インプラントでより多くの骨芽細胞接着を認めたが、チタン製、酸化被膜、ヨード担持インプラントの間に有意な差は認めなかった。次に、ヨード担持インプラントをウサギの大腿骨に挿入し、一定期間後に抜去してヨード担持量を調べたところ、4週後にヨード担持量は50%以上を維持していた。以上のことから、チタン製インプラントより作成したヨード担持インプラントは正常骨の生着を抑制することなく長期に抗菌力を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Iodine-coated implants significantly inhibited colonization of the staphylococcus aureus. Biocompatibility of osteoblasts on instruments made by stainless steel, titanium, iodine coated titanium were evaluated. Stainless steel inhibited adhesion of osteoblast on the instruments. On the other hand, there is no significant difference among titanium, titanium with oxidation film, iodine-coated implants. More than 50% of iodine was detected in the implants four weeks after implantation in rabbits. Our results suggest that iodine-coated implants has antibacterial effects without toxicity to normal bone tissues.

研究分野：整形外科

キーワード：抗菌インプラント

1. 研究開始当初の背景

整形外科関連手術において、骨や関節の感染は非常に重篤な合併症であり、万が一発症した場合には治療に長期間を要し、患者の日常生活に大きな制限が残ることも少なくない。整形外科関連の手術では、骨接合術や人工関節置換術などの際に生体内に金属が挿入される場合が多く、使用されるインプラントは必要不可欠な存在である。しかし、インプラント表面に細菌が接着するとバイオフィームが形成され、宿主免疫や抗菌薬に対する強い耐性を獲得することが報告されている。そのため、金属表面のバイオフィーム形成を防ぐためこれまでも抗生剤や銀をコーティングしたインプラントが術後感染予防のために開発されてきたが、抗生剤は耐性化の問題があり、銀によるコーティングはその生体毒性が大きな問題となってきた。そこで申請者らは、広く消毒剤にも使用されているヨードに注目し、ヨード担持チタンインプラントの開発を行ってきた (Shirai T et al. Acta Biomater. 2011)。

ヨードは生体毒性が極めて低く、日常生活用品でも抗菌加工として幅広く用いられている。また抗菌スペクトルが非常に広く、菌の耐性化を生じる心配もない。我々は、既に消毒剤にも使用されるヨードを表面に担持させたインプラントを臨床使用し、感染予防を試みている (H.Tsuchiya et al. J Orthop Sci. 2012)。しかし実際に生体内でヨードがどのように減衰していくか、またヨード担持インプラントの周囲骨への親和性がどれほどかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗菌作用を有するヨード担持インプラントと既存のチタン製インプラントの比較で、ヨード担持インプラント表面のヨードの生体内での減衰過程、ヨード担持インプラントの骨への生体親和性、を明らかにして、周術期感染の予防と術後感染症例の新たな治療戦略の確立を構築することである。

3. 研究の方法

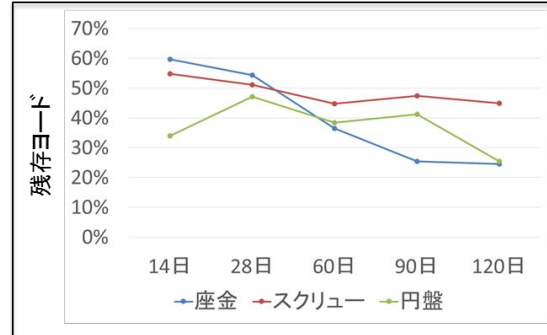
日本白色家兎の大腿骨にヨード担持インプラントを挿入する。挿入後、2週、1ヶ月後、2ヶ月後、4ヶ月後、8ヶ月後、12ヶ月後、それぞれ期間が経過後にインプラントを抜去してヨード担持状態を調べる (生体内減衰試験)。また、日本白色家兎の骨欠損モデルを作成し、ヨード担持インプラント (プレート+ケージ) を用いて骨接合術を行う。このモデルにおいても2週、1ヶ月後、2ヶ月後、4ヶ月後、8ヶ月後、12ヶ月後経過した場合の骨治癒や骨形成を調べる (生体親和性試験)。

4. 研究成果

担持ヨード量の減衰評価

ヨード担持インプラントをウサギの大腿骨に挿入し、一定期間後に抜去。そのヨード担持量を評価した。挿入後4週間後にヨード担持量は50~60%への減衰が認められた。しかし、その後120日経過したのちも、ヨード量は30%ほどの残存が認められていた (図1)。

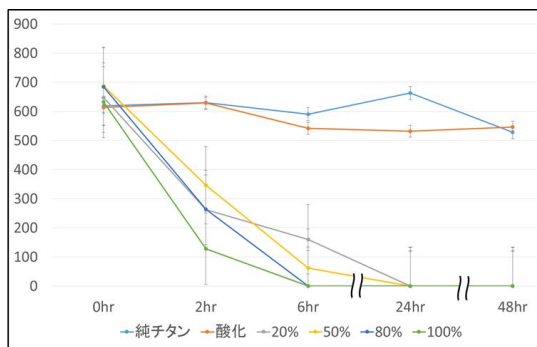
図1. 担持ヨード量の減衰評価



ヨード担持量と抗菌力の関係

ヨード量 $0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0%), $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (20%), $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (50%), $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (80%), $13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100%) と純チタンのインプラントを用い、約 1×10^3 colony Forming Unit の菌 (黄色ブドウ球菌, 大腸菌) を播種させた。0時間, 2時間, 6時間, 24時間, 48時間後に菌を培地へ播種させ、その colony 数を計測した。抗菌力試験では、黄色ブドウ球菌および大腸菌ともに、純チタン, $0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のインプラントで colony 数の減少が認められなかった。

S. aureus (ATCC25923)



E. coli (MG1455)

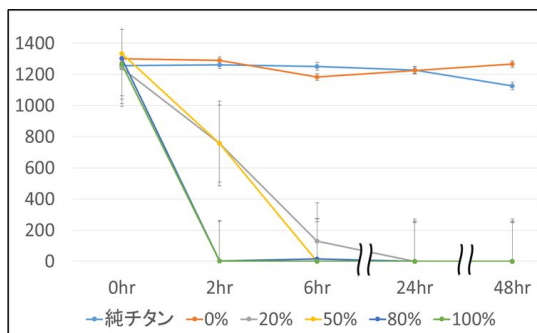
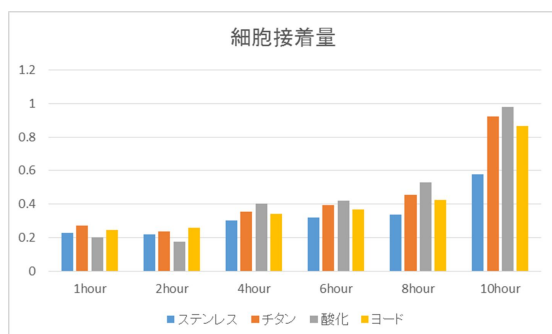


図2. ヨード担持量と抗菌力の関係

ヨード量 $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (20%)以上のインプラントでは、すべてのインプラントで 2 時間後に colony の減少が確認された。また、 $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (50%)以上では 6 時間後に colony 数が 0 となり、 $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (20%)では 24 時間後に colony 数が 0 となった。これらは純チタン、 $0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のインプラントと比較し、有意な減少であった。

細胞接着量



ステンレス製インプラント、チタン製インプラント、酸化被膜のみ ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) として、ヨード担持インプラントの上に 1×10^4 の骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を播種させ、37 インキュベーターで培養させた。1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、10 時間後にインプラント上に接着している細胞数を吸光度測定にて評価した。ステンレスと比較し、チタン・酸化被膜・酸化被膜 + ヨード担持の 3 種で細胞接着量が多い傾向が示された。この結果から、チタン表面に酸化被膜をコーティングし、ヨードを含有させたヨード担持インプラントはチタンインプラントと同程度の細胞親和性を有することが示唆された。

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 13 件)

- (1) Hayashi K, Yamada S, Inatani H, Okamoto H, Takeuchi A, Nishida H, Yamamoto N, Tsuchiya H, Otsuka T. Salvage method for unplanned excision of soft tissue sarcoma: long-term results of second-look surgery following radio-hyperthermo-chemotherapy. *Anticancer Res* 35: 493-8, 2015. (査読あり)
- (2) Igarashi K, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Inatani H, Shimozaki S, Kato T, Tsuchiya H. Late recurrence of osteosarcoma: a report of two cases. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 22: 415-9, 2014. (査読あり)
- (3) Kimura H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Shimozaki S, Kato T, Aoki Y, Higuchi T, Tsuchiya H. Efficacy of triplet regimen antiemetic therapy for chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV) in bone and soft tissue sarcoma patients receiving highly emetogenic chemotherapy, and an efficacy comparison of single-shot palonosetron and consecutive-day granisetron for CINV in a randomized, single-blinded crossover study. *Cancer Med* 4: 333-41, 2015. (査読あり)
- (4) Miwa S, Takeuchi A, Shirai T, Yamamoto N, Hayashi K, Nishida H, Kimura H, Igarashi K, Tsuchiya H. Outcomes and complications of reconstruction using tumor-bearing frozen autografts in patients with metastatic bone tumors. *Anticancer Res* 34: 5569-77, 2014. (査読あり)
- (5) Kimura H, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Takeuchi A, Nojima T, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Tsuchiya H. Synovial sarcoma in knee joint, mimicking low-grade sarcoma confirmed by molecular detection of SYT gene split. *Anticancer Res* 34: 3105-11, 2014. (査読あり)
- (6) Shirai T, Tsuchiya H, Nishida H, Yamamoto N, Watanabe K, Nakase J, Terauchi R, Arai Y, Fujiwara H, Kubo T. Antimicrobial megaprotheses supported with iodine. *J Biomater Appl* 29: 617-23, 2014. (査読あり)
- (7) Shimozaki S, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Kato T, Tsuchiya H. Pedicle versus free frozen autograft for reconstruction in malignant bone and soft tissue tumors of the lower extremities. *J Orthop Sci* 19: 156-63, 2014. (査読あり)
- (8) Nomura I, Watanabe K, Matsubara H, Nishida H, Shirai T, Tsuchiya H. Correction of a severe poliomyelitic equinovarus foot using an adjustable external fixation frame. *J Foot Ankle Surg* 53: 235-8, 2014. (査読あり)
- (9) Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Inatani H, Okamoto H, Yamada S, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Nojima T, Ooi A, Otsuka T. Diagnosis and treatment of low-grade osteosarcoma: experience with nine cases. *Int J Clin Oncol* 19: 731-8, 2014. (査読あり)
- (10) Miwa S, Takeuchi A, Ikeda H, Shirai T, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H,

Igarashi K, Tsuchiya H. Prognostic value of histological response to chemotherapy in osteosarcoma patients receiving tumor-bearing frozen autograft. PLoS One 8: e71362, 2013. (査読あり)

- (11) Miwa S, Takeuchi A, Shirai T, Taki J, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Igarashi K, Ooi A, Tsuchiya H. Prognostic value of radiological response to chemotherapy in patients with osteosarcoma. PLoS One 8: e70015, 2013. (査読あり)
- (12) Murakami H, Demura S, Kato S, Nishida H, Yoshioka K, Hayashi H, Inoue K, Ota T, Shimura K, Yokogawa N, Fang X, Tsuchiya H. Increase of IL-12 following reconstruction for total en bloc spondylectomy using frozen autografts treated with liquid nitrogen. PLoS One 8: e64818, 2013. (査読あり)
- (13) Takeuchi A, Yamamoto N, Nishida H, Kimura H, Ikeda H, Tsuchiya H. Complete necrosis of a giant cell tumor with high expression of PPAR : a case report. Anticancer Res 33: 2169-74, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会(鹿児島) 2014 年 11 月 9-10 日
悪性骨軟部腫瘍に対する免疫療法(樹状細胞療法)の可能性
西田英司、山本憲男、林克洋、武内章彦、下崎真吾、加藤貴士、樋口貴史、青木裕、土屋 弘行
- (2) 第 86 回 日本整形外科学会総会(神戸) 2014 年 5 月 22-25 日
Dendritic cells immunotherapy for patients with malignant bone and soft tissue tumours
Hideji Nishida, Norio Yamamoto, Toshiharu Shirai, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Yoshikazu Tanzawa, Hiroaki Kimura, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Hiroyuki Tsuchiya
- (3) 第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会(東京) 2014 年 7 月 17-18

日

標準治療抵抗性の悪性骨・軟部腫瘍に対する樹状細胞療法の可能性

西田英司、山本憲男、白井寿治、林克洋、武内章彦、丹沢義一、木村浩明、三輪真嗣、五十嵐健太郎、下崎真吾、加藤貴士、青木裕、樋口貴史、土屋弘行

- (4) 第 52 回日本癌治療学術集会(横浜) 2014 年 8 月 28-30 日
悪性骨軟部腫瘍に対する腫瘍破砕物質を抗原とし TNF- α を併用した樹状細胞を用いた免疫療法
西田英司、山本憲男、武内章彦、木村浩明、野村一世、土屋弘行
- (5) 2014 American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) (ニューオーリンズ、USA) 2014 年 3 月 11-15 日
Immunotherapy based on dendritic cells for patients with malignant bone and soft tissue tumors
Hideji Nishida, Norio Yamamoto, Toshiharu Shirai, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Yoshikazu Tanzawa, Hiroaki Kimura, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Hiroyuki Tsuchiya
- (6) 2014 American Society of Clinical Oncology (シカゴ、USA) 2014 年 5 月 30 日—6 月 4 日
Immunotherapy based on dendritic cells is feasible for patients with malignant bone and soft tissue tumours
Hideji Nishida, Norio Yamamoto, Toshiharu Shirai, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Yoshikazu Tanzawa, Hiroaki Kimura, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Hiroyuki Tsuchiya

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 英司 (NISHIDA, Hideji)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：50569374

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：