

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670672

研究課題名(和文)光触媒と電磁波を併用した異物関連感染症の制圧

研究課題名(英文)Prevention of implant related infection using titanium dioxide photocatalyst and electromagnetic wave

研究代表者

金 郁ちよる(Kim, Wook-Choel)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：50244603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは骨折治療に用いる鋼線を光触媒処理し、紫外線照射による感染予防効果を確認し、すでに臨床応用している。しかし、生体内人工物には紫外線が到達しないため、侵入できる超音波を用いて光触媒を励起させ、殺菌やバイオフィルムの分解を行う手法を考案し、これを早期の感染症対策に応用することを目的とした。光触媒の励起状態の確認としてメチレンブルー退色試験による評価を行った。市販の超音波洗浄機を用い出力200w、発振周波数36kHzでの超音波照射を行い、光触媒群ではコントロール群に比して経時的に吸光度の減少を認め、超音波による励起により光触媒から活性酸素を生じ、メチレンブルーの退色が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：We have photocatalyst treated steel wire used for bone fracture treatment, confirmed the effect of preventing infection by ultraviolet irradiation, and already applied clinically. However, since ultraviolet rays do not reach the artificial body in vivo, devising a method to excite the photocatalyst using invadable ultrasonic waves, disinfect bacteria and decompose the biofilm, and apply it for countermeasures against early infectious diseases aimed at. As a confirmation of excited state of the photocatalyst, it was evaluated by a methylene blue fade test. Ultrasonic irradiation was performed with a commercial ultrasonic washer at an output of 200 w and an oscillation frequency of 36 kHz. In the photocatalyst group, as compared with the control group over time reduction of absorbance was observed, and active oxygen was generated from the photocatalyst by excitation by ultrasonic waves, and it is considered that fading of methylene blue was obtained.

研究分野：小児整形外科領域

キーワード：光触媒 インプラント感染 超音波 感染予防

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩によりインプラントなど人工物・内固定材料を用いた治療は今日不可欠であり、特に整形外科領域では、骨折治療用の内固定材料、関節を置換する人工関節、脊椎体幹を矯正する脊椎固定・後方インストレーションなど発展が著しい。

一方で、人工物の挿入後には感染症の発症頻度が増加し、この異物に起因した感染症(implant related infection)は、発症すれば治療に難渋する。

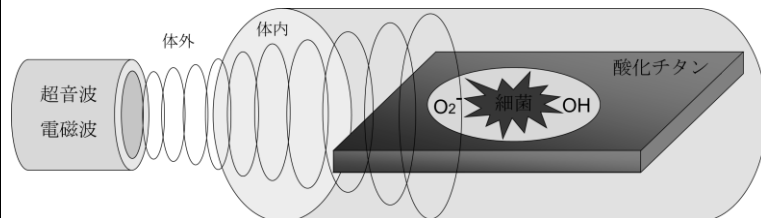
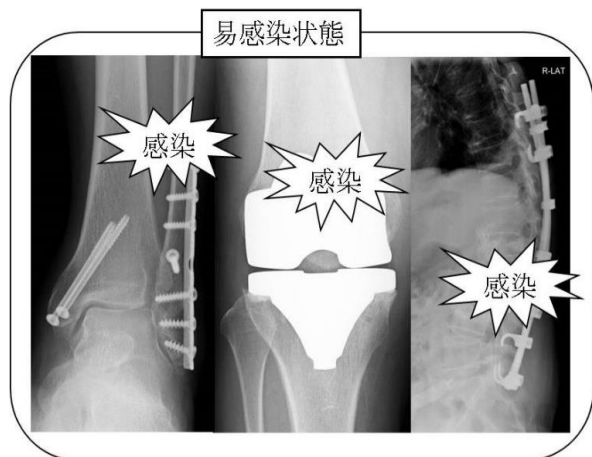
感染症の治療は現在のところ初期治療として抗生物質などの薬剤を用いるのが一般的である。骨・関節感染症の治療は薬剤による化学療法で効果が得られなければ、異物や壊死組織を切除するデブリドマン処置など、外科的ドレナージが行われる。しかし、異物に起因した感染症の根治には多数回の処置や手術を必要とすることが多い。その理由として、異物表面にバイオフィームが形成されるため薬剤の効果が得られにくく、多数回の手術で改善できなければ、根治のためにインプラントの抜去を余儀なくされる。しかし、これまでの感染症治療研究の方向性としては、薬剤を効率的に局所に届けるか、さらに強力な薬剤の開発に重点が置かれてきた。MRSAをはじめとする多剤耐性菌が問題となっているものの未だ革新的な治療法や予防法はない。薬剤による治療アプローチはより強い耐性菌の発生を誘導するため限界が来ると考えられ、新規の抗菌薬の開発など医療経済に与える影響も多大なものがある。

感染予防効果を持つ医療材料の作成は急務である。現在までに異物に起因した感染症に関する研究では金属に抗生物質を担持させる試み(Parvizi, Clin Orthop Relat Res, 2004)がなされているが、耐性菌の発生や全身性の副作用の問題が払拭できない。

光触媒は、日本の藤嶋による発見により本邦が研究と応用においても世界で最も進んでいるが、医療への応用は実用化レベルではなく医学・工学・化学が連携して研究を進める必要がある。近年触媒機能の強化など産業界での応用は実用化レベルに達している。しかし光触媒の医療応用は未開拓の分野であり、臨床に広く応用されているものは現在まで限られている。

骨折治療としての経皮鋼線固定や創外固定術では、体表面に露出した金属刺入部の感染率が高いが、これに対しわれわれは刺入する材料を光触媒に置き換え感染予防効果を確認し(Oka, J Biomed Mater Res B, 2008)、臨床応用に成功した。さらに研究を進展させ、光が当たらない深部への適用として、生体深部まで達する超音波の応用に着眼した。近年光触媒の励起に超音波を用い分解反応を確認した報告が注目されている(Pandit, Ultrasonics Sonochemistry, 2001).

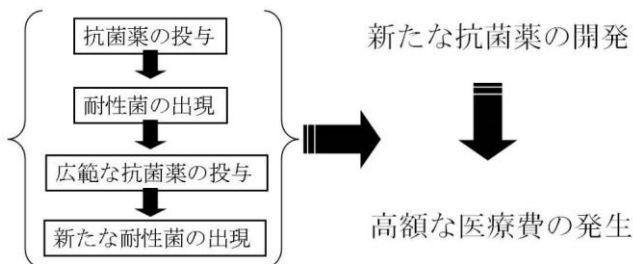
Mahmoud, Biochem Engine J, 2005). このように、異物に起因した感染症治療に、光触媒効果を付加した内固定材料に超音波・電磁波による励起を応用した技術を導入することを考え本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

(1) 生体内人工物には紫外線が到達しないため、侵入できる電磁波を用いて光触媒を励起させ、殺菌やバイオフィームの分解を行う手法を考案し、これを早期の感染症対策に応用することを目的とした。

(2) われわれは基礎研究において、酸化チタン光触媒ピンを用いることで、ピン刺入部の細菌のコロニー数が有意に減少することを報告した。しかし、臨床での有用性はまだ明らかではないため、酸化チタン光触媒ピンの使用による創外固定症例の感染抑制効果についての検討を行った。



3. 研究の方法

(1)光触媒インプラントの超音波を用いた励起条件の決定

①in vivo, in vitro におけるインプラントへのバイオフィーム形成の検討

菌数測定フィルム密着法 (JISZ2801, IS02196) を改変した試験法を用いる。

材料：酸化チタン光触媒プレート

菌種…グラム陽性球菌の代表として MRSA (ACTT43300) を用いる。普通ブイヨン入りの試験管に入れ、指数関数的増殖期まで 37°C, 24 時間増殖させる。菌液を希釈して調整し、 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 CFU/ml の菌液を作成する。

上記の菌液を LDPE (Low density polyethylene) フィルム上にのせた 1cm 角の酸化チタン光触媒プレートに滴下し、試験中の乾燥を防ぐため再度フィルムを被せ、60 分、120 分後に金属片を清潔操作で取り出し、滅菌生理食塩水で洗い出しを行う。洗い出し後の金属片を Live/Dead® bacterial viability assay により蛍光顕微鏡で観察し残存細菌の検討を行う。

また創外固定による加療を行った患者の創外固定ピンに対して抜釘後に洗い出しを行い、同様に蛍光顕微鏡による残存細菌の検討を行う。

②光触媒の超音波による最適励起条件の確認

メチレンブルー (以下 MB) 水和物 5mg をメスフラスコ内で 100ml の蒸留水に融解し、この MB 溶液を 10ml ずつ採取 6 本のメスフラスコにわけ、それぞれを 10 倍希釈し 5ppm, 100ml の MB 溶液を 6 本作製した。

それぞれをバイアル瓶に移し、No. 1-5 にはメッシュ状にした光触媒チタンを加えた。No6 にはチタンを加えずコントロールとした。これらのバイアル瓶を、冷却装置を用いて水温を 20°C に維持した水槽内に留置し、超音波照射による温度上昇の抑制を行った。

以上の条件下で、機器洗浄などのために市販されている超音波洗浄装置 (シャープ UT-204®) を使い、出力 200W, 発振周波数 36kHz での照射を行った。

No1-5 にそれぞれ 1-5 時間の超音波照射を行い、照射終了と同時に MB 溶液に対して、SIMADZU UV-2550 分光光度計を用いて、吸光度の経時変化を検討した。

(2)光触媒ピンの臨床的感染抑制効果の検討

2007 年 7 月以降にリング型創外固定器を用いて下腿の変形矯正・延長治療を行った 67 例 73 肢を対象とした。

光触媒酸化チタンピン使用群 (光触媒群) が 27 例 (男性 17 例, 女性 10 例), 光触媒酸化チタンピン非使用群 (コントロール群) が 40 例 (男性 28 例, 女性 12 例) であった。

ピン刺入部は光触媒群で 334 ヲ所, コントロール群で 307 ヲ所であった。手術時年齢は光触媒群で平均 12.7 歳 (4 歳 3 ヲ月 ~ 62 歳), コントロール群で平均 16.9 歳 (3 歳 4 ヲ月 ~ 77 歳 8 ヲ月) であった。疾患は光触媒群で先天性疾患 15 例, 成長障害 6 例, 外傷 2 例, 腫瘍 4 例であった。コントロール群では先天性疾患 15 例, 成長障害 8 例, 外傷 7 例, 腫瘍 10 例であった。創外固定器は光触媒群でイリザロフ創外固定器が 18 例, Taylor Spatial Frame® (TSF) が 9 例, コントロール群でイリザロフ創外固定器が 6 例, TSF が 5 例, EBI が 15 例, Orthofix が 13 例, Hoffmann II が 1 例であった。ピン刺入部に紫外線が到達するように、創外固定器を覆わずに露出するように指示をした。

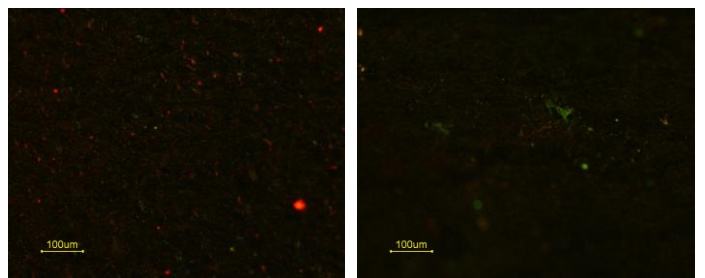
刺入部の評価方法は、Dahl の分類を当科で改変した方法に則り、Grade を 0 から 4 に分類した。Grade0: 汚染なしあるいは漿液性滲出液, Grade1: 疼痛のみ, Grade2: 発赤, 腫脹を伴う, Grade3: 膿性滲出液を伴う, Grade4: 蜂窩織炎あるいは X 線学的骨融解像とした。Grade2 以上を明らかな感染とし、抗生剤による薬物療法開始の指標とした。抗生剤による薬物療法では、まず経口投与を行い、効果が不良であれば経静脈的投与へ変更した。さらに効果が不良の場合はピン抜去を行うこととした。結果はカルテ記載を元に後ろ向きに評価した。

創外固定器装着期間、ピン刺入部感染数、抗生剤経静脈的投与症例数、および光触媒ピンの生体への有害事象の有無につき調査し、非光触媒群と光触媒群の 2 群間で比較検討した。

4. 研究成果

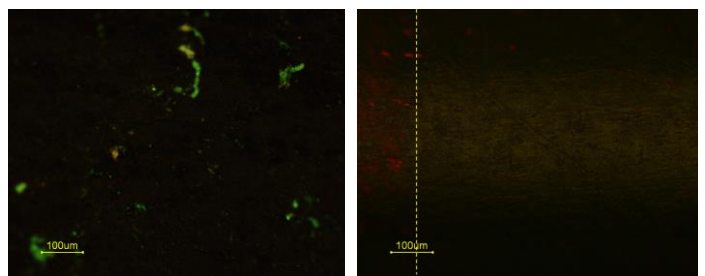
(1)光触媒インプラントの超音波を用いた励起条件の決定

①in vivo, in vitro におけるインプラントへのバイオフィーム形成の検討



1×10^4 CFU/ml MRSA

1×10^5 CFU/ml MRSA



1×10^4 CFU/ml MRSA

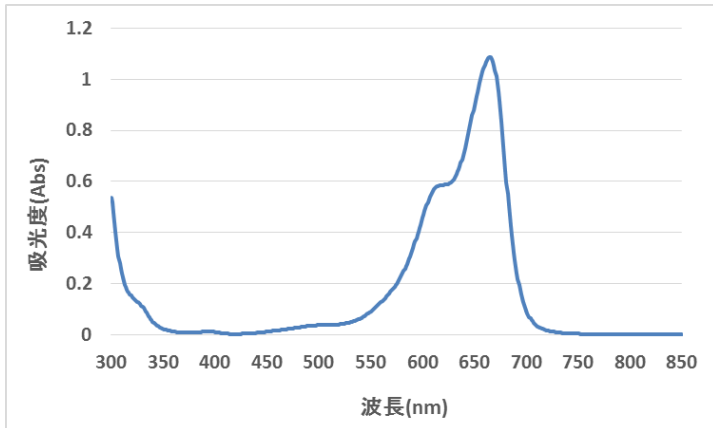
臨床例

緑：生菌 赤：死菌

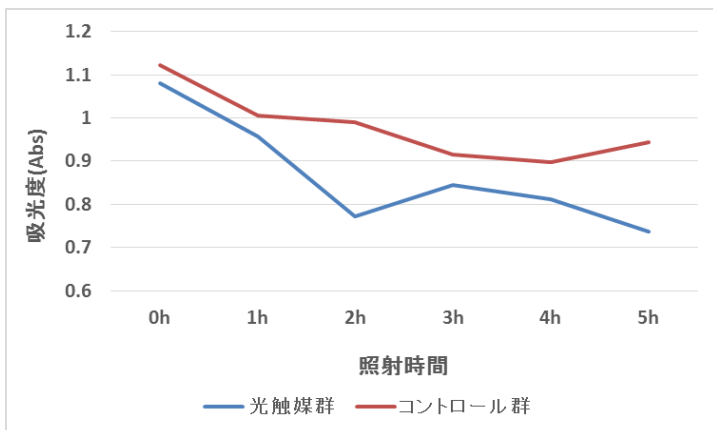
菌量の増加に伴い、生菌・死菌ともにプレート表面の残存菌量の増加を認めた。臨床例では創外固定ピンの皮膚刺入部に多くの残存細菌を認めた。

②光触媒の超音波による最適励起条件の確認

メチレンブルーは 293nm, 665nm に強い吸収スペクトルを示すことが知られており、No1-6 の超音波照射前(0h)での吸光度は、本研究でも下図の通り 665nm でピークを示した。



そこで 665nm の UV 可視スペクトルでの吸光度の変化を計測した。吸光度は照射時間に伴い減少する傾向を認め、光触媒が超音波刺激によって励起され活性酸素を産生することで、MB を退色させたと考えられる。



(2) 光触媒ピンの臨床的感染抑制効果の検討

創外固定器装着期間は、光触媒群で平均 177 日間、コントロール群で 170 日間であり、光触媒群が有意に装着期間は長かった ($p < 0.05$)。ピン刺入部感染数は、光触媒群の内、Grade2 が 48 カ所 (14.3%)、Grade3 が 3 カ所 (0.89%)、Grade4 が 2 カ所 (0.59%) であった。一方、コントロール群の内、Grade2 が 88 カ所 (28.6%)、Grade3 が 27 カ所 (8.79%)、Grade4 が 3 カ所 (0.98%) であ

った (表 1)。

表 1

刺入部感染数

Grade	光触媒群 (337カ所)	コントロール群 (307カ所)
2	48カ所 (14.3%)	88カ所 (28.6%)
3	3カ所 (0.89%)	27カ所 (8.79%)
4	2カ所 (0.59%)	3カ所 (0.98%)

Grade2 と Grade3 において両群間での統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。抗生剤投与症例数は、経静脈投与が光触媒群で 4 例 (14.8%)、コントロール群で 16 例 (40.0%) であり、経口投与が光触媒群で 18 例 (66.6%)、コントロール群で 22 例 (55.0%) であった。

感染症例における CRP および白血球数の最高値は CRP が光触媒群で 1.39、コントロール群で 3.01 であり、白血球数が光触媒群で $8696 / \mu\text{L}$ 、コントロール群で $9385 / \mu\text{L}$ であった。

抗生剤の経静脈投与数および最大 CRP は光触媒群で低値であった。

光触媒機能を付与したチタン合金の使用で感染症の発症・重症化の予防が可能であったと考える。

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 1 件)

①中瀬雅司, 酸化チタン光触媒を利用した創外固定ピン感染の予防効果, 日本創外固定・骨延長学会雑誌, 査読有, vol. 26, 2015, pp. 189-92

〔学会発表〕 (計 2 件)

①岡佳伸, 光触媒を用いたピン刺入部感染の予防効果, 第 30 回日本創外固定・骨延長学会学術集会, 2017 年 3 月 4 日, 久留米市, 久留米シティプラザ

②岡佳伸, 光触媒を用いたピン刺入部感染予防の臨床成績, 第 28 回日本創外固定・骨延長学会学術集会, 2015 年 3 月 20 日-3 月 21 日, 東京都, 六本木アカデミーヒルズ

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 郁ちよる (Kim Wook-Cheol)
京都府立医科大学大学院医学研究科
運動器機能再生外科学
(整形外科学教室) 特任教授
研究者番号 : 50244603

(2) 研究協力者

岡 佳伸 (Oka Yoshinobu)
京都府立医科大学大学院医学研究科
運動器機能再生外科学
(整形外科学教室) 講師
研究者番号 : 80719865