

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20041

研究課題名(和文)ヨード担持インプラントのバイオフィーム形成阻害能の解析

研究課題名(英文)Biofilm inhibition of iodine-supported implants

研究代表者

井上 大輔(Inoue, Daisuke)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00707094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工関節置換術後のインプラント周囲感染症は現在でも治療に難渋する病態であることが知られている。我々の研究グループは、その治療を進展させるために抗菌インプラントの研究を継続して行ってきた。今回我々は、抗菌インプラントであるヨード担持インプラントの感染抵抗性の有意性の評価のため、金属表面への細菌接着阻害効果とバイオフィーム形成阻害効果について検討を行った。検討の結果、ヨード担持インプラントは人工関節置換術後のインプラント周囲感染の様々な原因菌に対して、有意に細菌接着阻害効果を示すことが判明し、その作用によって、金属表面へのバイオフィーム形成を阻害している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Periprosthetic joint infection (PJI) is well known to the disease that still remains difficult to treat. Therefore, we have continued the research of anti-bacterial implant in order to advance the treatment of PJI. In this study, we investigated the anti-bacterial attachment effect and inhibition of the biofilm formation in the iodine-supported implant as anti-bacterial implant. As a result of our examinations, it was found that iodine-supported implants have good antibacterial attachment effect for the various bacteria causing PJI, and so have good anti-biofilm formation.

研究分野：人工関節術後インプラント周囲感染症

キーワード：術後インプラント周囲感染 人工関節置換術 インプラント バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

我が国は世界一の長寿国であり、人口構成の急速な高齢化を示している。それに伴い、四肢の人工関節や骨折の手術数は顕著な増加を示している。四肢の人工関節手術や骨折手術で最も懸念される合併症の一つは、術後インプラント周囲感染症である。手術部位に病原微生物の感染が生じ、金属表面にバイオフィームが形成されると、人工関節などのインプラントを温存しての感染の沈静化は困難を極め、インプラントの抜去を含めた多数回におよぶ手術が必要となることが多い。このように、術後インプラント周囲感染症は、患者の健康生活維持に重大な障害を与える大きな問題を孕んでいるにも関わらず、その予防および対策に関して、未だ画期的な方策がないのが現状である。

国内外では、この問題に対して、術後インプラント周囲感染症を低減させるために、抗生剤や銀をコーティングしたインプラントが基礎研究で報告されている。しかしながら、抗菌期間が短い・細胞毒性が強い・抗菌スペクトルが限られているなどの課題が依然残っている。私が所属する金沢大学整形外科では、インプラントの主要成分であるチタン金属表面に、抗菌スペクトルが極めて広いとされるヨードをチタン表面にコーティングするヨード担持インプラントを開発し研究を継続してきた (Tsuchiya H et al. J Orthop Sci 2012)。すでに我々のグループの過去の基礎研究により、ヨード担持表面処理を施した創外固定用ピンが従来のチタン製ピンよりも有意に感染や炎症が少なく、かつ本インプラントの生体内安全性について明らかにした (Tsuchiya H et al. J Orthop Sci 2012, Shirai T et al. Acta Biomaterialia 2011)。また、人工関節だけでなく、骨折内固定材料であるプレート・髄内釘・脊椎インストゥルメンテーションなどにも応用可能であることも明らかになっている。しかしながら、これらの整形外科インプラントは創外固定用ピンと違い、体内に恒久的に留置する必要があることが最大の相違点となる。したがって、ヨード担持インプラントが、金属表面への細菌接着を阻害し、ひいては感染の沈静化を困難にするバイオフィームの形成を阻害していることが証明されれば、整形外科インプラント使用手術後の感染予防・感染鎮静化の手段として、術後インプラント周囲感染症の治療に大きな福音をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

整形外科領域において術後インプラント周囲感染症は、医療が進歩した現在においても治療に難渋する病態である。この感染症が生じると多数回の手術を必要とすることが

多く、感染症の鎮静化のためにインプラントの抜去を余儀なくされることも多いのが現状である。したがって、ヨード担持インプラントが、金属表面への細菌接着を阻害し、ひいては感染の沈静化を困難にするバイオフィームの形成を阻害していることが証明されれば、整形外科インプラント使用手術後の感染予防・感染鎮静化の手段として、術後インプラント周囲感染症の治療に大きな福音をもたらすと考えられる。

本研究の目的は、ヨード担持インプラントが従来のインプラントよりも優位に金属表面への細菌接着阻害効果を持ち、感染鎮静化を極めて困難にするバイオフィームを形成阻害しているかにつき、科学的根拠をもって明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ヨード担持インプラントの感染抵抗性を検討するために、臨床現場で術後インプラント周囲感染症の原因菌となりうる Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA: ATCC25923)・Methicillin-sensitive *Staphylococcus Epidermidis* (MSSE: ATCC35984)・Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA: ATCC43300)・*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)・*Candida Albicans* (ATCC10231) を用いて検討を行った。ヨード担持インプラントは、チタン表面を陽極酸化処理して酸化被膜を形成させ、そのポーラス構造部にヨードを封入する3層構造でコーティングが形成されている。したがって、本研究で使用する金属試験片は、チタン製インプラント (Ti)・酸化被膜のみをコーティングしたインプラント (Ti-O)・ヨード担持インプラント (Ti-I) の3種類を用いて比較検討を行うこととした。

ヨード担持インプラントの細菌接着阻害効果の検討: MSSA については過去の我々の基礎研究により有意な細菌接着阻害能を示すことが判明しているため、MRSA・MSSE・*P. aeruginosa*・*Candida albicans* における細菌接着阻害効果の検討を行ったので、その実験方法の概略について述べる。本検討は JIS-Z:2801 のプロトコールに準じて検討を行った。前述した各菌種の菌液を調整した後、各々0.4mlの菌液を、5cm×5cm・厚さ1mmの金属試験片に滴下した。その後直ちに4cm×4cm・厚さ0.9mmのポリエチレン製カバーガラスで滴下表面を密封させ、細菌を金属表面に接着させた。その後、35±24時間インキュベーターで培養した。最後に、希釈平板法を用いて、金属試験片に付着しているコロニー数を計測した。培地は、MRSA・MSSE・*P. aeruginosa* については1/200NB培地、*Candida Albicans* についてはポテトデキストロス寒天培地を使用した。

次に in vivo における細菌接着阻害効果の

検討方法について述べる。過去に Lucke らにより報告されている術後インプラント周囲感染モデル(Lucke et al. Injury 2006)に準じて施行した。ラット大腿骨遠位髄腔に細菌を投与した後にインプラントを想定した 1.6 mmのワイヤーを大腿骨髄腔内に挿入することで、術後インプラント周囲感染症を想定した状態を構築した。ワイヤーは前述のとおり3種類の金属種を用いて検討を行った。感染状態構築後 24・48・72 時間にラット大腿骨内のワイヤーを抜去し、インプラント周囲に付着したコロニー数を希釈平板法で測定し、比較検討した。

ヨード担持インプラントにおけるバイオフィーム形成阻害効果の検討：過去に Breamらが報告しているモデルに準じて実験を行った(Bream A et al. J Bimed Mater Res PartA. 2014)。各菌液を金属ワッシャーに 24well 内で 24 時間細菌を接着させ、バイオフィームを金属表面に形成させるモデルを採用した。バイオフィームは、直径 6mm・厚さ 0.5mm の金属ワッシャー表面に in vitro で形成させた。定性的評価として、金属表面への細菌付着終了 24 時間後に、走査電子顕微鏡により金属表面のバイオフィームの形態・分布を観察した。定量的評価として、細菌付着終了後 24・72 時間後に形成されたバイオフィームを超音波洗浄機や攪拌機を用いて金属表面から剥離した後、TSB 培地などを用いて希釈平板法により、バイオフィーム内の生菌数を計測することで検討した。

4. 研究成果

ヨード担持インプラントの細菌接着阻害効果能の検討：MRSA・MSSE・P.aeruginosa・Candida Albicans における in vitro の細菌接着阻害効果能の結果について述べる。どの菌種においても、ヨード担持インプラントは、チタンインプラント・酸化被膜コーティングチタンインプラントよりも、有意に少ないコロニー数であるという結果を得た(下図1)。

図1 各金属片の付着菌数

Pseudomonas	試験片	測定		
		測定1	測定2	測定3
接種直後	Titanium	8.3 × 10 ⁶	9.1 × 10 ⁶	9.0 × 10 ⁶
35°C 24時間後	Titanium	1.3 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁶	2.1 × 10 ⁶
	Ti-O	2.9 × 10 ⁶	4.3 × 10 ⁶	4.6 × 10 ⁶
	Ti-I	<0.63	<0.63	<0.63
MRSA	試験片		測定	
	測定1	測定2	測定3	
接種直後	Titanium	1.9 × 10 ⁶	1.6 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁶
35°C 24時間後	Titanium	6.1 × 10 ⁶	4.3 × 10 ⁶	5.6 × 10 ⁶
	Ti-O	4.0 × 10 ⁶	3.3 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁶
	Ti-I	<0.63	<0.63	<0.63
Epidermidis	試験片		測定	
	測定1	測定2	測定3	
接種直後	Titanium	2.3 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶	2.2 × 10 ⁶
35°C 24時間後	Titanium	1.3 × 10 ⁶	1.9 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁶
	Ti-O	3.2 × 10 ⁶	4.6 × 10 ⁶	3.1 × 10 ⁶
	Ti-I	<0.63	<0.63	<0.63
C.albicans	試験片		測定	
	測定1	測定2	測定3	
接種直後	Titanium	1.2 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶
25°C 24時間後	Titanium	3.0 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁶
	Ti-O	1.6 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶
	Ti-I	<0.63	<0.63	<0.63

※ 生菌数は試験片1cm²当たりの生菌数

また抗菌活性値においても、ヨード担持インプラントは、すべての菌種において、その他の金属種と比較して、有意に抗菌効果を持つことが証明された(下図2 抗菌活性値が 2.0 以上であれば、有意な抗菌効果ありと判断される)。

図2 抗菌活性値

菌種	酸化チタン	ヨード担持チタン
Pseudomonas	0.0	>2.8
MRSA	3.6	>5.9
Epidermidis	0.6	>4.3
Candida	0.3	>4.7

$$R = (Ut - U0) - (At - A0) = Ut - At$$

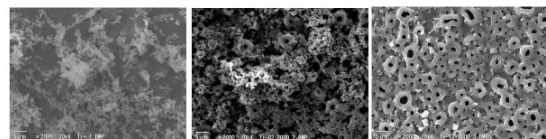
R 抗菌活性値 (2.0以上の場合は抗菌活性ありと判断可)
 U0 チタンの接種直後の生菌数(/cm²)の対数値の平均値
 Ut チタンの接種24時間後の生菌数(/cm²)の対数値の平均値
 A0 酸化チタン・ヨード担持チタンの接種24時間後の生菌数(/cm²)の対数値の平均値

MSSA における、in vivo のヨード担持インプラントにおける細菌接着阻害効果の検討は、細菌付着終了後 24・48・72 時間後のどの時間帯においても、有意にヨード担持インプラントで付着コロニー数が少ないという結果を得るに至った。

本結果より、ヨード担持インプラントは術後インプラント周囲感染症に対して、有意な細菌接着阻害効果能を持つことが示された。

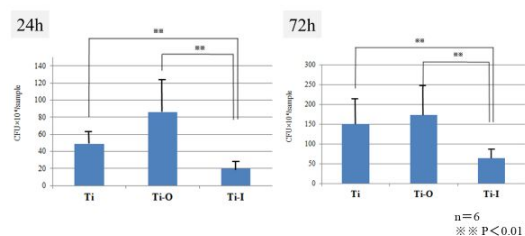
ヨード担持インプラントにおけるバイオフィーム形成阻害効果の検討：MSSA において、定性的評価では、チタンや酸化被膜コーティングインプラントでは成熟したバイオフィームが形成される傾向が認められたが、ヨード担持インプラントでは有意にバイオフィーム形成が阻害されている傾向が認められた(下図3)。

図3 金属表面上のバイオフィーム形成
 左：Ti 中央：Ti-O 右：Ti-I



また、定量的評価においても、バイオフィーム内細菌数は有意にヨード担持インプラントで少ない傾向が認められた(下図4)。

図4：バイオフィーム内細菌数
 左：細菌付着終了 24 時間後 右：細菌付着終了 72 時間後



n=6
 ※※ P<0.01

これらの結果により、MSSAにおいて、ヨード担持インプラントは有意なバイオフィルム形成阻害効果を示しているという結果を得た。

この結果をもとに、MRSA・MSSE・P.aeruginosa・Candida Albicansのどの菌種においても、ヨード担持インプラントが有意にバイオフィルム形成阻害効果を示しているのかを検討した。現在も研究進行中であるが、MRSA・P.aeruginosa・MSSEにおいて、ヨード担持インプラントがバイオフィルム形成を有意に阻害していることに矛盾しない結果が得られつつある。

以上本研究を遂行した結果をまとめると、ヨード担持インプラントは、術後インプラント周囲感染症の原因となりうる様々な菌種に対して有意に抗菌活性を持ち合わせており、その効果によってバイオフィルム形成を阻害しているのではないかと考えられた。本研究結果は、ヨード担持インプラントの有意な感染抵抗性を支持する内容であると考えられ、今後の整形外科関連のインプラント使用手術後の感染予防に対して、大きな福音をもたらす可能性を示していると考えられる。

今後の展望としては、バイオフィルム形成阻害効果の検討をより体内の環境に即した状況と類似させて検討する必要があると考えているため、in vivoでの検討を加えること、そしてヨード担持インプラントのヨードが減衰した状態であってもバイオフィルム形成阻害効果を示すのかどうかについても今後の検討を加えていく必要があるのではないかと考えている。

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)

[学会発表](計 3 件)

Inoue D et al. Iodine-supported titanium implants inhibit biofilm formation and growth. 17th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology 2016
井上大輔(代表). ヨード担持インプラントのバイオフィルム形成阻害能. 日本整形外科学会学術総会 2016

井上大輔(代表). ヨード担持インプラントの感染抵抗性評価. バイオフィルム形成阻害効果に注目して. 日本人工関節学会 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 大輔 (INOUE, Daisuke)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号: 00707094

(2)研究協力者

加畑 多文 (KABATA, Tamon)
大谷 郁 (OHTANI, Kaori)
土屋 弘行 (TSUCHIYA, Hiroyuki)