

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18024

研究課題名（和文）ヨード担持インプラントにおける血行性術後インプラント周囲感染の予防効果

研究課題名（英文）Prevention of hematogenous postoperative periprosthetic joint infection for iodine supported implant

研究代表者

井上 大輔（Inoue, Daisuke）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00707094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヨード担持インプラントは、インプラント挿入後中期においても、約65%程度の担持ポビドンヨードが残存していることが判明し、そのポビドンヨード担持量においてMSSA・MRSA・Pseudomonas Aeruginosaに対して良好な抗菌効果・抗バイオフィルム効果を認めることが判明した。また、血行性感染モデルを用いた難治性細菌に対する抗菌効果に関しては、血行性感染ラットモデルの構築を継続的に行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、ヨード担持インプラントがインプラント挿入後中期においても有意な抗菌効果・抗バイオフィルム効果を示しており、今後本抗菌インプラントが臨床応用された場合の人工関節周囲感染をインプラント挿入後短期から中期にかけて予防しうることを意味する。これは今後人工関節手術を受ける患者だけでなく手術を施行する医師に対しても、大きな福音をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The iodine supported implants were found to retain approximately 65% of the loaded povidone iodine in the mid-term after implant insertion. Regarding with the amount of 65% loaded povidone iodine, good antibacterial and antibiofilm effects against MSSA, MRSA, and Pseudomonas Aeruginosa were confirmed. In addition, we continued to construct a rat model of hematogenous periprosthetic joint infection for antimicrobial efficacy against incurable organism profile.

研究分野：整形外科

キーワード：抗菌インプラント ポビドンヨード 術後インプラント周囲感染

1. 研究開始当初の背景

わが国は、世界一の長寿国であり、人口構成の急速な高齢化が進行している。それに伴い、四肢の人工関節手術数は顕著な増加を示している。この傾向は、国内だけでなく、人工関節手術のメッカである欧米諸国においても同様である。昨今、人工関節手術の適応となる患者の多くは、高齢者や生活習慣病をもつ免疫力の低下したケースが決して稀ではなく、術後合併症として人工関節周囲感染 (Periprosthetic joint infection: PJI) が懸念される。PJI は、手術部位に病原微生物の感染が生じ、インプラント表面にバイオフィームが形成されることで発症する。しかし、バイオフィームは抗菌薬に耐性であり、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る。したがって、インプラントの抜去を含めた多数回におよぶ手術を余儀なくされることが多いため、患者の健康生活維持に重大な被害を与えるだけでなく医療費の増大にも直結し、世界レベルでの問題となっている。

免疫力が低下した患者は、肺炎や腎盂腎炎といった全身性の感染症を発症することで菌血症を引き起こすことを、しばしば臨床現場で経験する。これらの全身性感染症を契機に、挿入された人工関節に血行性の PJI を併発することは稀ではない。さらに、これらの起因菌は Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ・ Methicillin-sensitive *Staphylococcus Epidermidis* (MSE) ・ *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) ・ *Candida Albicans* といった難治性菌であることが多い。

PJI の発症を予防すべく、世界中でインプラントに抗菌効果を付与する試みがなされてきた。抗菌インプラントは、強い抗菌効果を持つ 人体への細胞毒性が少ないこと 骨伝導能を阻害しないことの三条件が必要である。申請者の研究グループは、医療現場で頻用される抗菌スペクトルの広いポピドンヨードを、整形外科インプラントで最も使用されるチタン素材にコーティングしたヨード担持インプラントを開発し、本インプラントの有用性について基礎研究を継続的に行ってきた。我々の研究グループの過去の基礎研究の結果から、本インプラントは前述したすべての条件を持ち合わせることが証明されており、術後早期の PJI を予防しうる有用なツールであることが明らかになっている (Inoue D et al. *J Orthop Sci* 2019, Taga T et al. *J Orthop Sci* 2018, Inoue D et al *Int Orthop* 2017, Shirai T et al. *Acta Biomater* 2011)。

しかし、抗菌インプラントは時間経過に伴い抗菌効果が減弱するという短所がある。すなわち、臨床現場において、ヨード担持インプラントが挿入されてから、抗菌効果が実際にどれくらい持続しているのか？を検討した研究が求められていた。したがって、本抗菌インプラントがインプラント挿入後も難治性菌に対して抗菌効果が持続し、その結果として免疫力の低下した全身状態でも血行性 PJI を予防することができるか？という学術的な疑問が生じた。これらを証明できれば、本抗菌インプラントの中長期での感染予防効果を証明することになり、PJI 予防に大きな福音をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ヨード担持インプラントがインプラント挿入後も難治性菌に対して抗菌効果が持続し、その結果として免疫力の低下した全身状態でも血行性の PJI が予防できるかを証明するための足掛かりを作ることである。

3. 研究の方法

使用する金属試験片は、ヨード担持インプラントの作成工程を踏まえ、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-0) ・ ヨード担持インプラント (Ti-I) の3種類を用いた比較研究とした。

インプラント挿入後における難治性菌に対する抗菌効果

インプラント挿入後中期モデルとして、*in vivo* で8週間 (術後2か月) ヨード担持インプラントを動物内に挿入し、担持ヨード量を減衰させた。その後、挿入されたインプラントを抜去し、ヨード担持量を測定した後に、抗菌効果 (バイオフィーム形成阻害能を含む) を検討した。使用した細菌は、PJI の原因菌として知られる Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA:ATCC25923) ・ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA:ATCC43300) ・ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) の3種類を用いた。

インプラント挿入後長期モデルとして、インプラント挿入後1年経過時を想定した。ただし、術後1年経過時を再現する際には、*in vivo* で作成することが困難であり、*in vitro* でヨード担持量を意図的に減衰させたインプラントを使用して抗菌効果を検討する方針とした。通常のヨード担持量は $10\text{-}15\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度であるため、減衰したヨード担持量を $2\text{-}4\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ・ $3\text{-}7\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とした2パターンのヨード担持量が減衰したインプラントを用意する予定とした。使用する菌株は MRSA (JCM8702) ・ *P.aeruginosa* (NBRC13275) ・ *Candida Albicans* (NBRC1594) の3菌種を使用する予定とした。

血行性感染モデルを用いた難治性細菌に対する抗菌効果

実臨床に即した研究を行う目的で、in vivo で本検討を予定とした。実験動物は、免疫力の低下した実際の患者を模倣するため、10 週齢の糖尿病ラットを用いる予定とした。インプラント挿入は、膝関節を内側傍膝蓋骨アプローチで展開した後、直径 1.2mm の 3 種類 (チタン (Ti)・酸化被膜 Ti・ヨード担持 Ti) の K-wire を各大腿骨骨孔内へ挿入する方法で行った。ヨード担持チタンの減衰量に関しては、減衰したヨード担持量を $2-4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot 3-7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とした 2 パターンのヨード担持量が減衰したインプラントを用意する予定とした。

血行性感染モデルを構築するためには、ラット尾静脈からどれほどの細菌数を投与すれば、過去に我々が作成した PJI ラットモデルと類似するかを検討した。血行性 PJI は先行感染の数週後に発症することが多いため、ラット尾静脈に決定した細菌投与量を静注した 6 週後に、ラットに安楽死処置を施した後インプラントを抜去する。抜去したインプラントを用いて、インプラント周囲の細菌接着阻害効果・バイオフィーム形成阻害効果・大腿骨の組織学的評価を行う予定とした。

4. 研究成果

インプラント挿入後における難治性菌に対する抗菌効果

インプラント挿入後中期モデル (術後 8 週) でのポピドンヨード担持量は、平均 65% であった。術後 4 週では平均 72% であったことから、担持ポピドンヨードの減衰パターンは中期的には緩やかであることが示された。

中期モデルでの抗菌効果 (希釈平板法)・バイオフィーム形成阻害効果 (蛍光顕微鏡) に関しては、有意にヨード担持インプラントは術後 8 週でも有意な効果を示すことが示された (図 1.2)。

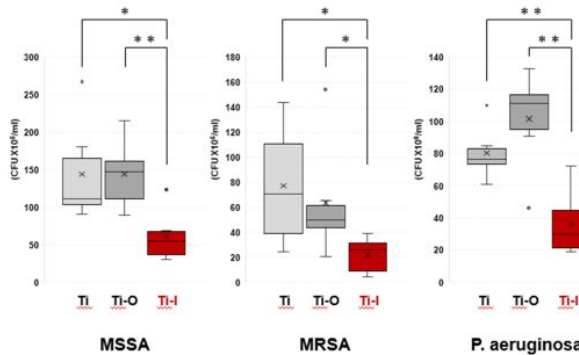


図 1: 希釈平板法における CFU 数

	BCR with live bacteria (%)			BCR with dead bacteria (%)		
	Ti	Ti-O	Ti-I	Ti	Ti-O	Ti-I
MSSA	12.2 (9.4 - 34.5)	14.9 (14.4 - 16.2)	1.2 (1.1 - 2.3)	2.5 (2.0 - 6.8)	7.4 (4.4 - 7.6)	7.6 (5.9 - 8.7)
p value						
(Ti-I vs Ti)	0.016			0.31		
(Ti-I vs Ti-O)	0.008			0.69		
(Ti-O vs Ti)	0.841			0.31		
MRSA	27.4 (22.3 - 41.9)	59.2 (57.2 - 61.6)	5.9 (3.5 - 7.3)	5.6 (3.7 - 5.8)	7.3 (6.5 - 11.3)	7.5 (3.9 - 10.0)
p value						
(Ti-I vs Ti)	0.008			0.421		
(Ti-I vs Ti-O)	0.008			0.841		
(Ti-O vs Ti)	0.032			0.052		
P. aeruginosa	11.2 (10.4 - 12.6)	16.7 (13.3 - 17.2)	1.3 (1.2 - 5.3)	4.5 (4.3 - 5.2)	12.4 (3.2 - 13.1)	6.7 (5.0 - 8.1)
p value						
(Ti-I vs Ti)	0.008			0.548		
(Ti-I vs Ti-O)	0.008			0.548		
(Ti-O vs Ti)	0.548			0.548		

図 2: Biofilm coverage rate

インプラント挿入後長期モデル (術後 1 年) に関しては、減衰したヨード担持量を $2-4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot 3-7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とした 2 パターンのヨード担持量が減衰したインプラントを作成した。JIS 基準 (JIS Z 2801) にしたがって抗菌効果の検討を行った。しかし、一部の細菌で試験不成立となってしまったものが存在したため、前培養または使用菌量の再検討を継続的に行っている状態であり、今後の検討課題であると考えている。

血行性感染モデルを用いた難治性細菌に対する抗菌効果

10 週齢の糖尿病ラットを用いたインプラント挿入は、過去の我々の基礎研究ですでに安定化した実験手技となっている (図 3)。



図 3(左): インプラント挿入手術

図 4(右): 尾静脈からの細菌投与

血行性感染モデルの構築のため、ラット尾静脈から細菌を投与する方法でおこなった (図 4)。投与コロニー数を 100.150.200.500CFU と変化させ、術翌日・術後 1 週・術後 6 週での関節内コロニー数を検討した。今後は、これらのコロニー数を考慮しながら、どの投与コロニー数が血行性 PJI モデルに最も類似しているのかを検討する必要性があると考えられ、現在も継続中である。

そして、血行性 PJI モデルに最適な尾静脈からのコロニー投与数を探索した後に、術後 6 週でのインプラント周囲の細菌接着阻害効果・バイオフィーム形成阻害効果・大腿骨の組織学的評価を行い、本抗菌インプラントでの血行性感染モデルを用いた難治性細菌に対する抗菌効果を証明していきたいと考えている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上大輔
2. 発表標題 インプラントクオリティから考える 人工関節周囲感染 (PJI) の予防
3. 学会等名 日本整形外科学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inoue D
2. 発表標題 Antibacterial effect for iodine-supported titanium implants in terms of basic research
3. 学会等名 WA10T 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------