

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))

分担研究報告書

抗感染性の検討

分担研究者 茂呂 徹 (東京大学医学部附属病院 特任准教授)
宮本比呂志 (佐賀大学医学部 教授)

研究要旨：膝関節の高度障害に対する人工膝関節置換術は、優れた治療法として健康寿命の延長と生活の質(QOL)の向上に貢献している。しかし、手術後に細菌感染が生じると、現状では人工関節の抜去・再置換以外に解決する方法がなく、患者にとって大きな負担となる。そのため、術後感染をおこさない画期的な人工膝関節の開発が求められている。これまでに、2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを用いたディップコーティング法およびグラフトコーティング法による処理を施した金属表面で、蛋白質の吸着が阻害されることを示した。生体内においては、蛋白質が人工関節表面に吸着した後、細菌が付着してバイオフィームが形成されるため、インプラント表面のMPC処理が抗感染性を付与するものと期待された。そこで、MPC処理表面における細菌付着およびバイオフィーム形成の抑制効果について検討した。人工関節材料の純チタンの表面にMPC処理をディップコーティング法およびグラフトコーティング法にて施したところ、両法ともに細菌の付着を顕著に阻害した。MPC処理による細菌付着阻害効果は、コバルトクロムモリブデン合金表面においても確認された。さらに、純チタン表面のMPC処理は、バイオフィーム形成を劇的に抑制した。MPCポリマー処理金属は、その高親水性による蛋白質吸着阻害効果により、細菌付着およびバイオフィーム形成を抑制する表面を有しており、これを人工膝関節材料の表面に使用することで抗感染性が付与され、術後感染の予防が期待できる。

A. 研究目的

膝関節の機能障害は、疾患や外傷によって生じ、中高年者の健康寿命を短縮する重大な病態である。わが国においては、高齢化の急速な進行に伴って膝関節障害の患者数が増加し続ける

ことが確実で、その治療法を早期に確立することが重要である。膝関節の高度障害に対する人工膝関節置換術は、優れた治療法として健康寿命の延長と生活の質(QOL)の向上に貢献している。しかし、手術後に細菌感染が生

じると、現状では人工関節の抜去・再置換以外に解決する方法がなく、患者にとって大きな負担となる。そのため、術後感染をおこさない画期的な人工膝関節の開発が求められている。

昨年度までの本研究で、申請者らは2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを用いたディップコーティング法およびグラフトコーティング法による処理を施した金属表面で、蛋白質の吸着が阻害されることを示した。生体内においては、蛋白質が人工関節表面に吸着した後、細菌が付着してバイオフィームが形成されるため、インプラント表面のMPC処理が抗感染性を付与するものと期待される。

今年度の本研究では、MPC処理金属表面における細菌付着およびバイオフィーム形成の抑制効果について検討した。ディップコーティング法およびグラフトコーティング法によるMPC処理を施した金属表面への細菌付着について、蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察と、生菌数の測定をおこなった。また、細菌のバイオフィーム形成量を、蛍光顕微鏡観察と生菌数測定により検討した。これらの結果から、MPC処理による抗感染性を評価した。

B. 研究方法

1. 材料

人工膝関節に用いられている純チタン(Ti)、およびコバルトクロムモリブデン(Co-Cr-Mo)合金について、

直径14 mm × 1 mm厚の試験金属片を作製した。試験金属片表面を、前年度までに確立した方法で、MPCポリマーを用いたディップコーティング法(PMB30処理)、およびポリMPC(PMPC)を用いたグラフトコーティング法(PMPC処理)により、それぞれ処理した。

人工関節感染の多くは、患者自身に常在するブドウ球菌が起炎菌であるので、菌株には、バイオフィームを形成する黄色ブドウ球菌の臨床分離株 *Staphylococcus aureus* UEOH-6 を使用した。

2. 細菌付着抑制効果の検討

トリプトソイブロス(TSB)中にて前培養を16時間行った黄色ブドウ球菌を遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)または非働化したウシ胎児血清(FCS)に懸濁した。金属材料表面に菌を付着させるために、 8×10^8 の菌を含む0.5 mLの懸濁液を、24ウェルプレートに配置した試験金属片上に接種して、37℃で1時間インキュベートした。その後、試験金属片表面を1 mLのPBSで3回リンスして、未付着の細菌を除去した。試験金属片表面に残存した菌について、2種の材質(純Ti、Co-Cr-Mo合金)の、2種の表面処理(PMB30処理、PMPC処理)で次の3つの項目について比較した。

蛍光顕微鏡観察

試験金属片表面の菌体をSYTO-9により染色し蛍光顕微鏡で観察した。
走査型電子顕微鏡観察

試験金属片を 2.5% グルタルアルデヒド中に室温で 1 時間浸漬した。洗浄後、5%きざみで 50%から 100%に調製したエタノール中に順次浸漬することで脱水を行った。乾燥後、試験片表面に金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡で観察した。

付着生菌数測定

試験金属片を 10 mL の PBS 中で超音波処理を 10 分間おこない、試験片表面に付着した菌を回収した。これをリン酸緩衝生理食塩水で段階希釈して 110 番寒天培地に塗布し、37 で 2 日間インキュベートした。出現したコロニーを計数し、付着生菌数を求めた。

3. バイオフィーム形成抑制効果の検討

バイオフィームを効率よく形成させるため、グルコース濃度を 0.5%に調整した TSB で 6×10^5 /mL に希釈した対数増殖期の黄色ブドウ球菌を 0.5 mL ずつ、24 ウェルプレートに配置した純 Ti 試験片上に接種して、37 で 24 時間インキュベートした。その後、純 Ti 試験片表面を 1 mL の PBS で 3 回リンスし、2 種の表面処理 (PMB30 処理、PMPC 処理) で次の 2 つの項目について比較した。

蛍光顕微鏡観察

純 Ti 試験片を SYTO-9 により菌体を、Sypro Ruby でバイオフィームの成分である菌体外マトリクスを、それぞれ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

付着生菌数測定

純 Ti 試験片表面をセルスクレーパーで掻き取ることにより、付着した菌を回収した。これを PBS で段階希釈して 110 番寒天培地に塗布し、37 で 2 日間インキュベートした。出現したコロニーを計数し、付着生菌数を求めた。試験片に付着しなかった菌も別途回収し、付着菌と同様に生菌数を測定した。

4. 細菌遺伝子発現の定量的評価

前項に記載した方法で、純 Ti 試験片上で黄色ブドウ球菌を培養し、バイオフィームと非付着菌をそれぞれ回収した。両者から全 RNA を抽出し、GeneChip *S. aureus* Genome Array (Affymetrix) にて網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。

C. 研究結果

1. 純チタン表面における細菌付着抑制効果の検討

人工関節のステム部分の材料として使用される、純 Ti について表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果を、PBS 中と FCS 中でそれぞれ検討した。

1) PBS 中での試験

まず、黄色ブドウ球菌の増殖に必要な栄養源を含まない PBS をもちいて、貧栄養下での検討をおこなった。

蛍光顕微鏡観察

黄色ブドウ球菌の純 Ti 表面への付着状態を観察するため、純 Ti 表面に付着した黄色ブドウ球菌を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察した (図 1)。その結果、未処理の場合にところ

どこかに観察された細菌塊が、PMB30 処理表面ではわずかに点在する細菌が観察されるのみで、付着細菌が著しく減少していた。驚いたことに、PMPC 処理表面では付着細菌がまったく観察されなかった。

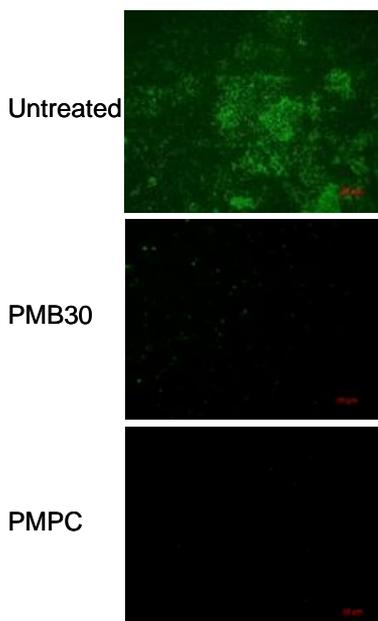


図 1. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

走査型電子顕微鏡観察

黄色ブドウ球菌の純 Ti 表面への付着状態をさらに詳しく観察するため、純 Ti 表面に付着した黄色ブドウ球菌を走査型電子顕微鏡で観察した(図 2)。その結果、未処理の表面には多数の黄色ブドウ球菌が観察された。一方、MPC 処理を施した純 Ti 表面には、PMB30 処理、PMPC 処理どちらの場合でも、ほとんど菌が観察されなかった。

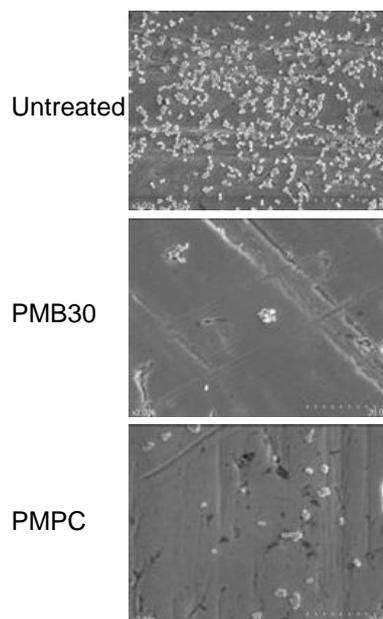


図 2. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の走査型電子顕微鏡観察像 (2000 倍)

付着生菌数

純 Ti 表面に付着した黄色ブドウ球菌の数を測定したところ、純 Ti 表面への PMB30 処理および PMPC 処理は、付着生菌数を約 99%減少させることがわかった(図 3)。

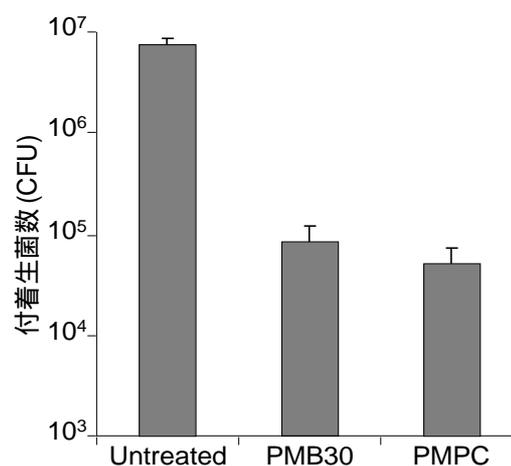


図 3. PBS 中における純 Ti 表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

2) FCS 中での試験

次に、人工膝関節が装着された生体内の環境を再現するために、FCS をもちいた検討をおこなった。

蛍光顕微鏡観察

未処理の純 Ti 表面には点在する細菌が観察されたが、MPC で処理された表面では、PMB30 処理、PMPC 処理ともに、菌がほとんど観察されなかった (図 4)。

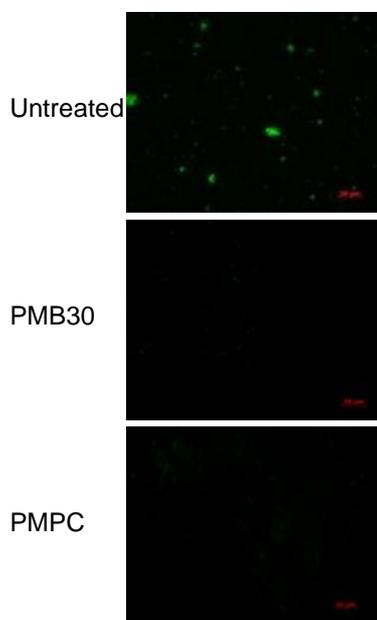


図 4. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

走査型電子顕微鏡観察

未処理の純 Ti 表面には、凝集した細菌塊が観察された。一方、MPC 処理を施した純 Ti 表面には、PMB30 処理、PMPC 処理どちら場合でも、ほとんど菌が観察されなかった (図 5)。

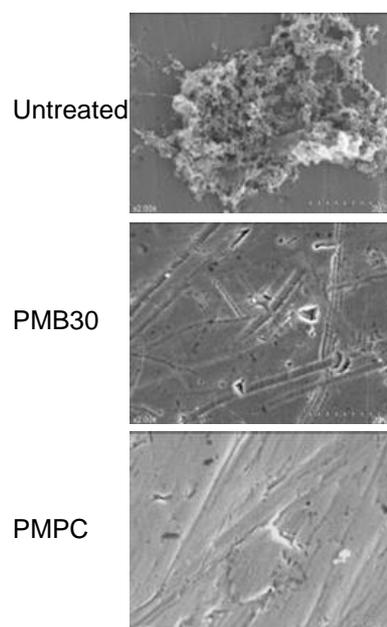


図 5. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の走査型電子顕微鏡観察像 (2000 倍)

付着生菌数

PBS 中の場合と同様に、純 Ti 表面に PMB30 処理および PMPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99% 減少した (図 6)。

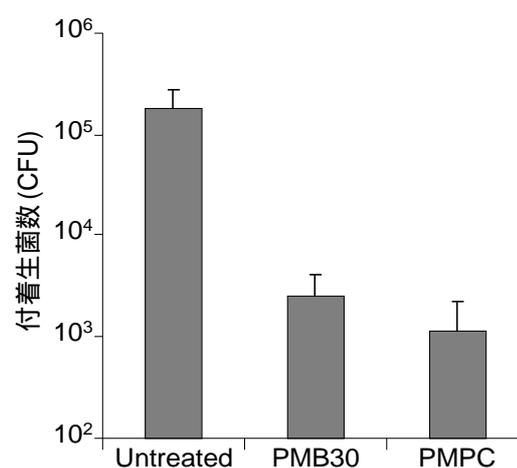


図 6. FCS 中における純 Ti 表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

2. Co-Cr-Mo 合金表面への細菌付着抑制効果の検討

人工関節のステム部分の材料として純Tiとともに使用される、Co-Cr-Mo合金について、表面のMPC処理による細菌付着抑制効果を、PBS中とFCS中でそれぞれ検討した。

1) PBS 中での試験

蛍光顕微鏡観察

未処理表面では菌が全表面に均一に付着していたのに対し、PMB30処理およびPMPC処理を施すことによって、菌の付着が顕著に抑制されていた(図7)。

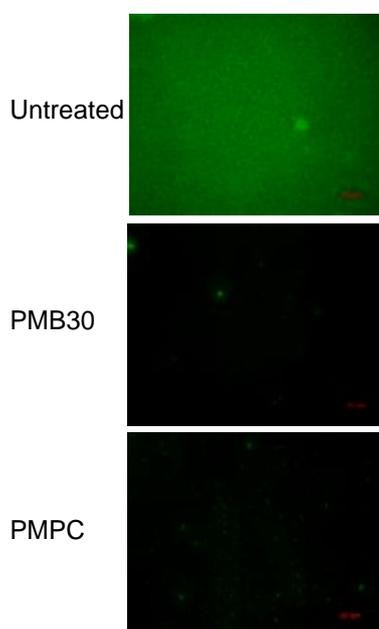


図7. PBS中で黄色ブドウ球菌と接触させたCo-Cr-Mo合金表面の蛍光顕微鏡観察像(200倍)

走査型電子顕微鏡観察

純Tiの場合と同様に、MPC処理によって菌の付着が顕著に抑制された(図8)。

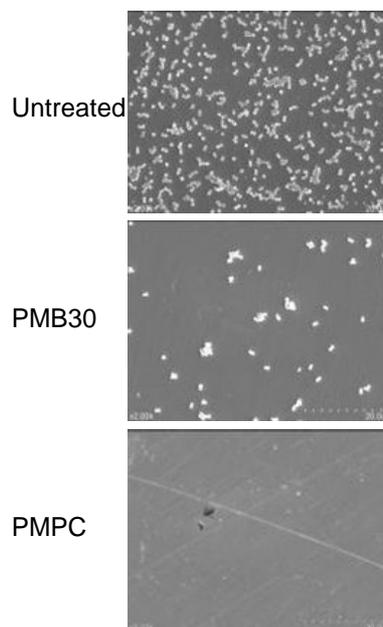


図8. PBS中で黄色ブドウ球菌と接触させたCo-Cr-Mo合金表面の走査型電子顕微鏡観察像(2000倍)

付着生菌数

純Tiの場合と同様に、PMB30処理およびPMPC処理を施すことにより、菌の付着が約99%減少した(図9)。

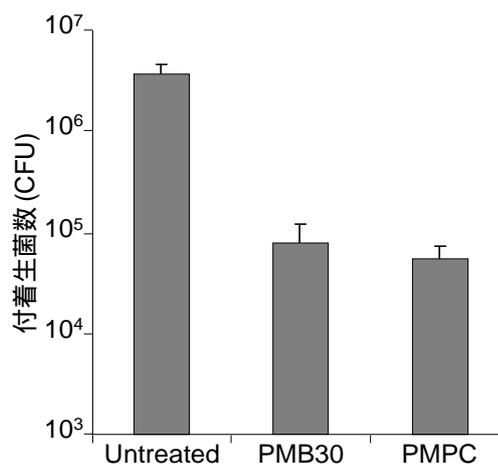


図9. PBS中におけるCo-Cr-Mo合金表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

2) FCS 中での試験

蛍光顕微鏡観察

純 Ti の場合と同様に、未処理表面で観察された細菌が、MPC 処理表面ではほとんど観察されなかった（図 10）。

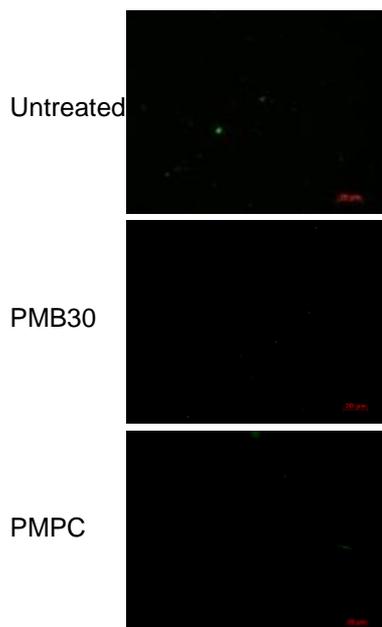


図 10. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の蛍光顕微鏡観察像（200 倍）

走査型電子顕微鏡観察

純 Ti の場合と同様に、PMPC 処理によって菌の付着が顕著に抑制された（図 11）。

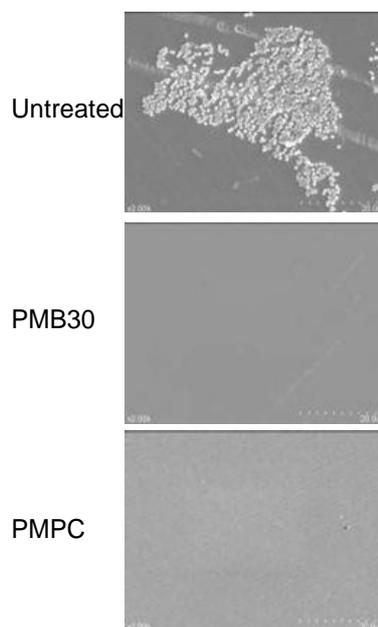


図 11. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の走査型電子顕微鏡観察像（2000 倍）

付着生菌数

純 Ti の場合と同様に、Co-Cr-Mo 合金表面に PMB30 処理および PMPC 処理を施すことにより、菌の付着が約 99% 減少した（図 12）。

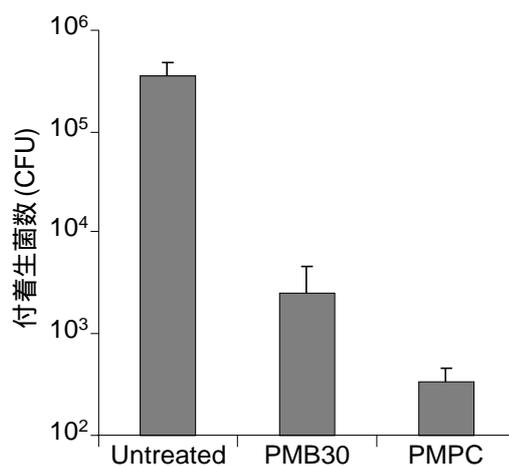


図 12. FCS 中における Co-Cr-Mo 合金表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

3. バイオフィーム形成抑制効果の検討

MPC 処理による純 Ti 表面および Co-Cr-Mo 合金表面への菌の付着抑制効果はきわめて大きなものであるが、わずかに付着した菌が、バイオフィームを形成する可能性がある。そこで、MPC 処理のバイオフィーム形成抑制効果について検討した。MPC 処理による黄色ブドウ球菌の付着抑制効果は、金属材料で差がなかったため、純 Ti でのみ検討をおこなった。

蛍光顕微鏡観察

未処理の場合には純 Ti 試験片表面が多数の菌体とバイオフィームに覆われていたが、MPC で処理された表面では、PMB30 処理、PMPC 処理ともに、菌体とバイオフィームがほとんど観察されなかった(図 13)。

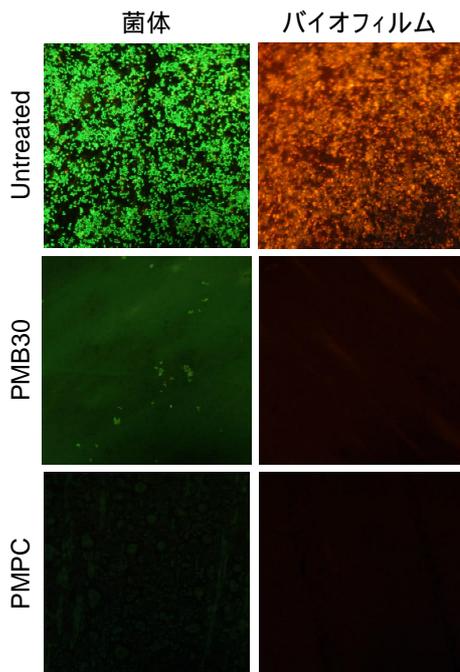


図 13. 純 Ti 表面におけるバイオフィーム形成 (200 倍)

付着生菌数

純 Ti 表面に PM30 処理および PMPC 処理を施すことで、付着菌数が 99%減少した(図 14)。一方、浮遊菌数は、MPC 処理の有無で差がなかった。

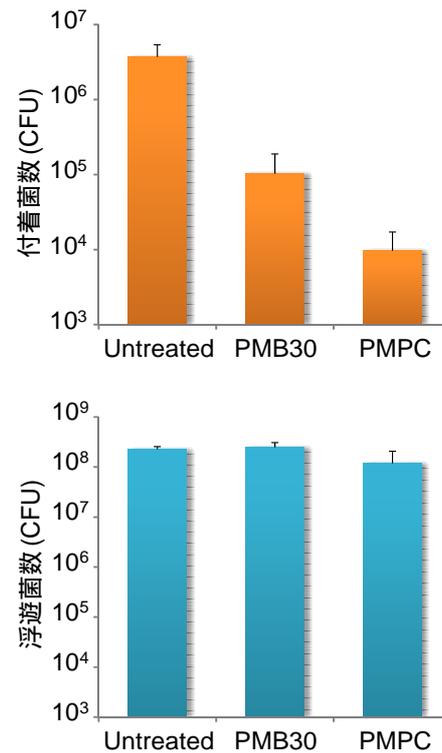


図 14. 純チタン表面のバイオフィーム中の生菌数(上)および未付着浮遊菌の生菌数(下)

4. 遺伝子発現の定量的評価

純 Ti 表面で形成されたバイオフィーム中の菌と、未付着の浮遊菌とで遺伝子発現を定量的に比較し、バイオフィームで発現が上昇している遺伝子を探索した。その結果、純 Ti 表面のバイオフィームでは、物質輸送、細胞壁、鉄イオン結合、代謝、などに関する遺伝子の発現が、浮遊菌に比べて亢進していることがわかった(図 15)。

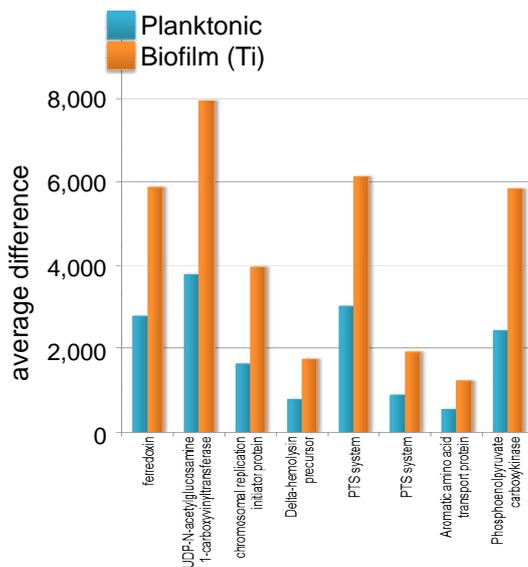


図 15. 未処理 Ti 表面のバイオフィルムで発現が誘導される遺伝子

D. 考察

純 Ti と Co-Cr-Mo 合金どちらの場合でも、MPC 処理によって菌の付着が著しく抑制されることがわかった。また、未処理純 Ti 表面でバイオフィルムがしっかりと形成される条件でも、MPC 処理によりバイオフィルム形成が劇的に抑制された。ただ、PMB30 処理表面では PMPC 処理表面の 10 倍程度の菌が付着していた。これは、長時間の培養による、コーティングの剥がれによるものであると考えられる。人工膝関節が生体内に長期間留置されることを考えると、抗感染性の観点からは、耐久性に優れた PMPC 処理が適していると考えられる。

MPC 処理の有無で浮遊菌数に差が認められないことから、MPC 処理による試験片表面の付着菌の減少は、菌

の殺滅によるものではなく、表面への菌の付着そのものが阻害されたことによるものであるといえる。

さらに、純 Ti 表面のバイオフィルム形成に関連すると予想される遺伝子を同定することができた。MPC 処理により付着が阻害されると、これらバイオフィルム関連遺伝子の発現が誘導されないため、バイオフィルム形成がおこらないことが示唆された。

E. 結論

MPC 処理は、細菌付着の“下地”となる蛋白質吸着を抑制することにより、細菌の付着とそれに続くバイオフィルム形成を劇的に抑制する。人口膝関節材料の表面に MPC 処理を施すことで、効果的に抗感染性を付与することが期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Watanabe K, Hashimoto M, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafting and vitamin E blending for high wear resistance and oxidative stability of orthopedic bearings. *Biomaterials* (in press)
- 2) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara

- K: Effect of UV-irradiation intensity on graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on orthopedic bearing substrate. *J Biomed Mater Res A* (in press)
- 3) Moro T, Takatori Y, Kyomoto M, Ishihara K, Hashimoto M, Ito H, Tanaka T, Oshima H, Tanaka S, Kawaguchi H: Long-term hip simulator testing of the artificial hip joint bearing surface grafted with biocompatible phospholipid polymer. *J Orthop Res* 32(3): 369-376, 2014.
 - 4) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Saiga K, Hashimoto M, Tanaka S, Ito H, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Takatori Y: Grafting of poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on polyethylene liner in artificial hip joints reduces production of wear particles. *J Mechan Behav Biomed Mater* 34: 100-106, 2014.
 - 5) Takatori Y, Moro T, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Minami M, Sugimoto H, Nakamura S, Karita T, Ito H, Kim J, Koyama Y, Kawaguchi H, Nakamura K: The poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted highly cross-linked polyethylene liner in primary total hip replacement -One-year results of a prospective cohort study. *J Artif Organs* 16: 170-175, 2013.
 - 6) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Hashimoto M, Takatori Y, Ishihara K: Poly(ether-ether-ketone) orthopedic bearing surface modified by self-initiated surface grafting of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* 34: 7829-7839, 2013.
 - 7) 茂呂徹, 京本政之, 高取吉雄:人工股関節ポリエチレンライナーのMPC処理. *Bone Joint Nerve* 10(3): 417-424, 2013.
 - 8) Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H: *Nocardia elegans* infection involving purulent arthritis in humans. *J Infect Chemother* (in press)
 - 9) Akiyama T, Miyamoto H, Yonekura Y, Tsukamoto M, Ando Y, Noda I, Sonohata M, Mawatari M: Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia. *J Orthop Res* 31(8): 1195-1200, 2013.
 - 10) 枝川亜希子, 木村明生, 三輪由佳, 田中英次, 足立伸一, 宮本比呂志: レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較. *防菌防黴学会雑誌* 41(2): 63-66, 2013
 - 11) Furuhashi K, Edagawa A, Miyamoto H, Kawakami Y, Fukuyama M: *Porphyrobacter colymbi* sp. nov. isolated from swimming pool water in Tokyo, Japan. *J Gen Appl Microbiol* 59: 245-250, 2013

- 12) 宇木望, 於保恵, 永沢善三, 東谷孝徳, 太田昭一郎, 末岡榮三朗, 宮本比呂志: 質量分析装置 MALDIバイオタイパーによる血液培養陽性ボトルからの直接迅速同定法に関する検証. **臨床病理** 61(3): 224-230, 2013.

2.学会発表

国内学会

- 1) 茂呂徹, 高取吉雄: シンポジウム「セメントレス THA の摺動面とインプラントデザイン」MPC ポリマー処理を施した人工股関節摺動面の特性. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 広島, 5.23-26, 2013.
- 2) 大嶋浩文, 伊藤英也, 田中滋之, 田中健之, 岡敬之, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 寛骨臼回転骨切り術後の変形性股関節症に対する人工股関節全置換術 —RAO がその後の THA に及ぼす影響—. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 広島, 5.23-26, 2013.
- 3) 山根史帆里, 京本政之, 茂呂徹, 雑賀健一, 石原一彦, 高取吉雄: 人工関節環境下における PMPC 処理 CLPE の耐摩耗性検討. 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム. 東京, 6.8, 2013.
- 4) 上田修, 永沢善三, 宮本比呂志: 質量分析装置 MALDI バイオタイパーを用いた MRSA の多変量解析による疫学解析. 第 25 回臨床微生物迅速診断研究会. 東京, 7.6, 2013
- 5) 塚本正紹, 宮本比呂志, 安藤嘉基,

野田岩男, 江頭秀一, 秋山隆行, 米倉豊, 園畑素樹, 馬渡正明: 銀含有ハイドロキシアパタイトコーティングインプラントの in vivo における生体安全性評価. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 千葉, 10.17-18, 2013.

- 6) 伊藤英也, 田中健之, 大嶋浩文, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄: 患者固有人工股関節設置ガイドの臨床試験. 第 40 回日本股関節学会学術集会. 広島, 11.9-10, 2013.
- 7) 茂呂徹, 高取吉雄, 鴨川盛秀, 織田弘美, 森本修平, 梅山剛成, 田中栄, 苅田達郎, 伊藤英也, 田中健之, 川口浩, 中村耕三: MPC 処理ポリエチレンライナーを用いた人工股関節の臨床成績. 第 44 回日本人工関節学会. 沖縄, 2.21-22, 2014.

国際学会

- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Yamane S, Takatori Y, Ishihara K: Smart modification of PEEK by self-initiated surface graft polymerization for orthopedic bearings. 1ST PEEK International Meeting. Philadelphia, USA, 4.26, 2013.
- 2) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: Effects of antioxidative substrate and cartilage-inspired surface on the durability of acetabular liner. 6th International UHMWPE Meeting. Torino, Italy, 10.10-11, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。