

## 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：抗感染性の検討の前提として、金属表面のポリ MPC (PMPC)処理について、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を用いて検討した。グラフトコーティング法では、MPC 水溶液濃度・紫外線照射時間 (重合時間)の至適条件 (0.5 mol/L、90 分)を確立した。また、これらの表面処理表面について、タンパク質吸着、細菌付着が抑制されることを明らかにした。以上の成果により、MPC ポリマー処理金属は、親水性の高い、タンパク質吸着を抑制する表面を有しており、細菌付着の抑制が期待できる。

#### A. 研究目的

疾患や外傷による膝関節の機能障害は、中高年者の健康寿命を短縮し、生活の質 (QOL)を低下させる重大な病態である。高齢化が急速に進むわが国において膝関節障害の患者数は今後も増え続けることは確実であり、その治療法を確立することは、重要な課題といえる。

人工膝関節手術は、高度の膝関節障害に対する治療法である。実用化から約半世紀が経過し、優れた治療法として健康寿命の延伸と QOL の獲得に貢献をしている。一方、人工関節表面へのバイオフィーム形成に続発する感染、は一度生じると入れ換えを余儀なくされる深刻な合併症である。手術成績の向上のため、これらの合併症を克服する画期的

な人工膝関節のニーズは高い。

申請者らは平成 15 年度長寿科学総合研究事業を通じて、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)を用いて、ポリエチレン表面を修飾する技術を開発した。MPC ポリマーは、細胞やタンパク質の吸着を抑制することから、感染の誘因となるバイオフィームの形成を抑制する効果も期待できる。

本研究の目的は、金属コンポーネント表面に MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、タンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイオフィーム形成の抑制効果について検討することである。このため、まず、金属表面における至適な MPC

ポリマー処理方法を確立した。次に、これらの MPC ポリマー処理金属表面について、タンパク質吸着抑制効果・細菌付着抑制効果を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

本研究では、人工関節に用いられているコバルトクロムモリブデン (Co-Cr-Mo)合金および純チタン (以下純 Ti)を用いた。Co-Cr-Mo 合金および純 Ti の表面を、表面粗さ 0.01 ~ 0.02  $\mu\text{m}$  になるよう研磨した後、米国材料試験協会 (ASTM)の基準に従って、不純物の除去と酸化被膜の形成のために 35 vol%の硝酸に 35 分浸漬した。硝酸処理した金属片を洗浄した後、速やかに 500 W の酸素プラズマ処理を 5 分間行った。

### 2. MPC 処理方法の検討

得られた Co-Cr-Mo 合金、純 Ti

試験体表面を、MPC ポリマーを用いたディップコーティング法、ポリ (MPC) (PMPC)を用いたグラフトコーティング法により処理した (図1)。

PMB30 ポリマーを用いたディップコーティング法 (PMB30 処理)

MPC と *n*-ブチルメタクリレート (以下、BMA)を予め共重合した PMB30 ポリマー (30 mol%の MPC を含有)を用いて、0.5 mass%となるように調整した PMB30 エタノール溶液を準備した。B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、PMB30 エタノール溶液に浸漬することで、ディップコーティングを行った (PMB30 処理)。

PMPC グラフトコーティング法

B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、5 mass%トリメタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (MPSi)、1 mass%コハク酸、0.1 mass%イルガキュア

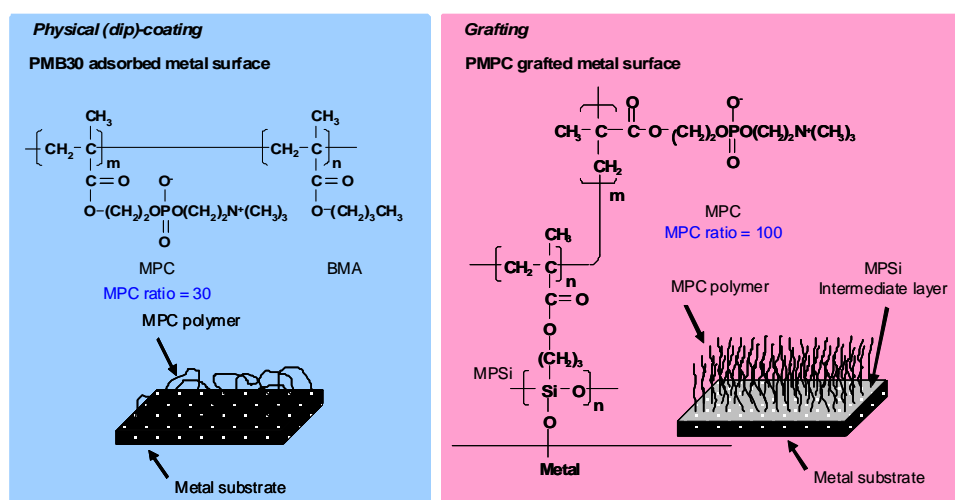


図 1. PMB30 を用いたディップコーティング、PMPC を用いたグラフトコーティングによる金属表面処理

(D2959)を含むエタノール溶液に 12 時間浸漬した。Co-Cr-Mo 試験体を取り出し、エタノールで洗浄した後、70 °C で 3 時間アニール処理した。

続いて 0.5 mol/L に調製した MPC の水溶液にシラン処理した Co-Cr-Mo 試験体を浸し、5 mW/cm<sup>2</sup> の強度をもつ紫外線を 90 分間照射して、光開始グラフト重合を行った。照射後、試験体を水およびエタノールで洗浄し、未重合の MPC および遊離のポリマーを除去した。

### 3. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

得られた PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 試験体について、X 線光電子分光 (XPS) 分析、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 分析、水による静的接触角の測定、蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察および透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着試験を行った。

#### XPS 分析

PMB30 処理/PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体の表面元素状態について、XPS 分析を行った。XPS 分析には、KRATOS ANALYTICAL 社製 XPS 分析装置 AXIS-HSi165 型を用い、X 線源は Mg-K $\alpha$  線、印加電圧を 15kV、光電子の放出角度を 90° とした。

#### FT-IR 分析

PMB30 処理/PMPC 処理前後の

Co-Cr-Mo 試験体の官能基振動について、FT-IR 分析を行った。FT-IR 分析は、全反射 (ATR) 法により行った。波数 800 ~ 2000 cm<sup>-1</sup>、分解能 4 cm<sup>-1</sup>、積算回数 100 回とした。

#### 水の静的接触角測定

試験体表面の静的なぬれ性 (静的表面接触角) について、液滴法により評価した。静的表面接触角は ISO 15989 規格に準拠し、液滴量 1  $\mu$ L の純水を液滴後、60 秒間経過時点において測定した。

蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

200 ppm に調製したローダミン 6G 水溶液を染色に用いた。蛍光発光イメージングには、蛍光顕微鏡を使用した。レンズ倍率は 5 倍で、サンプル毎に、適切な感光時間で撮影した。

#### TEM 観察

PMB30 処理/PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体を所定の大きさに切削し、表面を Al 保護した後、Ga イオンビームを照射して断面を薄膜化 (FIB 加工) した。透過型電子顕微鏡を用い、試料縦断面を観察した。

### 4. PMPC 処理の至適条件の検討

一般に浸漬する溶液の濃度を変化させるだけのディップコーティングの制御に比べ、グラフトコーティングの制御は複雑である。したがって、ここでは、溶液濃度・処理時間を変化させて、その至適条件を検討した。

2- に記載の方法のうち、MPC 水溶液の濃度を 0.25 ~ 1.00 mol/L の範

囲で、紫外線照射時間 (重合時間)を 23 ~ 180 分の範囲で変化させて、グラフト重合を行った。種々の条件で作製された PMPC 処理 Co-Cr-Mo の表面について、3 項で示される方法にて解析した。

### 5. タンパク質吸着試験

金属表面へのタンパク質吸着について、低濃度のタンパク質濃度測定に適した micro-BCA Protein Assay 試薬を用いて評価した。

PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したタンパク質量について、micro-BCA 法により評価した。測定前、いずれの試験片も、リン酸緩衝液 (PBS) に 1 時間浸漬させた。PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体を、ウシ血清アルブミン (BSA、 $M_w = 6.7 \times 10^4$ ; シグマ-アルドリッチ社製)、ウシ血清  $\gamma$ -グロブリン ( $M_w = 1.5 \times 10^5$ ; シグマ-アルドリッチ社製) およびウシ血漿フ

ヒトの血漿の 10% の濃度になるように、それぞれ 4.5、1.6 および 0.3 g/L に調製した。浸漬後、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金試験体は、PBS で 5 回洗浄した後、室温で 1 時間、界面活性剤溶液に浸漬した。PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面より引き剥がされた BSA、 $\gamma$ -グロブリンおよびフィブリノーゲンの量は、micro-BCA Protein Assay 試薬 (#23235) を用いて、評価した。

### 6. 細菌付着抑制効果の検討

#### 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  $\times$  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

表 1. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度と静的接触角

Sample	Surface elemental composition (atom%)								Contact angle (deg)
	C <sub>1s</sub>	O <sub>1s</sub>	N <sub>1s</sub>	P <sub>2p</sub>	Si <sub>2p</sub>	Co <sub>2p</sub>	Cr <sub>2p</sub>	Mo <sub>3d</sub>	
Co-Cr-Mo (untreated)	14.6 (1.3)*	52.9 (2.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	26.7 (1.5)	5.4 (0.4)	0.4 (0.0)	81.6 (4.8)
PMB30-adsorbed Co-Cr-Mo	70.6 (1.4)	24.1 (1.3)	2.3 (0.4)	3.0 (0.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	95.8** (3.5)
PMPC-grafted Co-Cr-Mo	61.7 (0.7)	28.0 (0.6)	5.0 (0.3)	5.3 (0.1)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	23.5** (8.4)

\* The standard deviations are shown in parentheses.

\*\* Significant difference ( $p < 0.001$ ) as compared to the untreated Co-Cr-Mo.

ィブリノーゲン ( $M_w = 3.4 \times 10^5$ ; シグマ-アルドリッチ社製) 溶液に、37 で 1 時間浸漬させた。BSA、 $\gamma$ -グロブリンおよびフィブリノーゲン溶液は、

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

オフィル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、 $8 \times 10^8$  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 °C 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 °C 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). バイオフィルム形成抑制効果の検討

バイオフィル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  $6 \times 10^5$  /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 °C 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 でバイオフィル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 °C 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. PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

##### XPS 分析

表 1 に、XPS スペクトルより求めた PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度を示す。PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面には、MPC 由来の窒素、リンが検出された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の窒素、リンの原子濃度は、PMPC の理論値 (各々、5.3 atom%) に近い値にまで達していた。これに対し、MPC 含有量が 30 mol% である PMB30 を用いて処理した表面でのそれらは、2.3 ~ 3.0 atom% に留まった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の結果であった (表省略)。

##### FT-IR 分析

図 2 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトルを示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、赤外吸収ピークの存在が認められなかったのに対し、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、 $1460\text{cm}^{-1}$  付近にメチレンに帰属されるピーク、 $1240$ 、 $1080$  および  $970\text{cm}^{-1}$

にリン酸基に帰属されるピークが、 $1720\text{cm}^{-1}$  にケトン基に帰属されるピークが観察された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、Si-O 基に帰属されるピークが観察された。また、PMB30 処理/PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様のピークが認められた (図省略)。

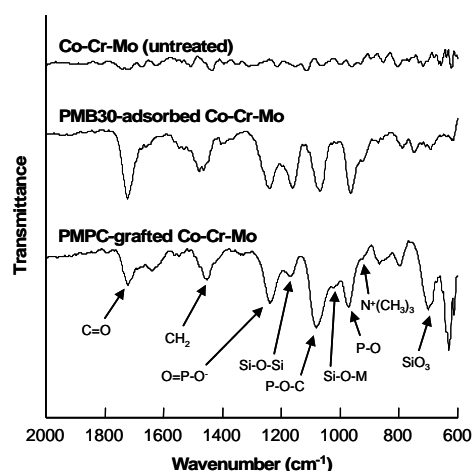


図 2. PMB30 処理 /PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトル

##### 水による静的接触角の測定

表 1 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角を示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金/純 Ti 表面の静的接触角は、それぞれ  $81.6^\circ$ 、 $77.2^\circ$  だった。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金/純 Ti 表面の静的接触角は  $95.8^\circ$ 、 $95.6^\circ$  であった。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金/純 Ti 表面のそれらは、それぞれ  $23.5^\circ$ 、 $20.1^\circ$  と高い親水性を示した (PMB30 処理

/PMPC 処理純 Ti の表省略)。

蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

図 3 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の蛍光顕微鏡写真を示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金では、ほとんど蛍光発光が見られないのに対し、PMB30 処理 /PMPC 処理した Co-Cr-Mo 合金はいずれも、表面全域において発光が認められ、その状態は均一であった。また、PMB30 処理 /PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の蛍光発光状態が認められた(図省略)。

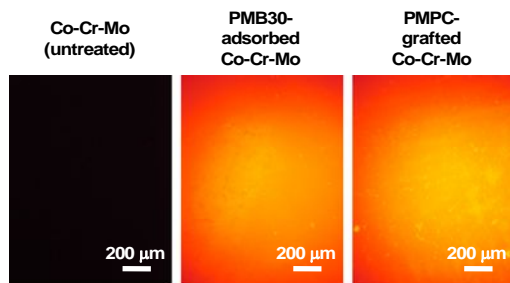


図 3. PMB30 処理 /PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の蛍光顕微鏡写真

TEM 観察

図 4 に、PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真を示す。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 50 nm の PMB30 処理層の形成が認められた。また、その層中には幾らかの気孔の形成も認められた。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 200 nm の均一な処理層の形成が認められた。また、PMB30 処理/PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の処理層形成が認められた(図省略)。

## 2. PMPC 処理の至適条件の検討

### XPS 分析

図 5 に、XPS スペクトルより求めた種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度を示す。いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面のケイ素濃度は減少する一方で、窒素、リンの濃度は増加した。0.50 mol/L の MPC 水溶液濃度 のとき、90 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、MPC 原子濃度の理論

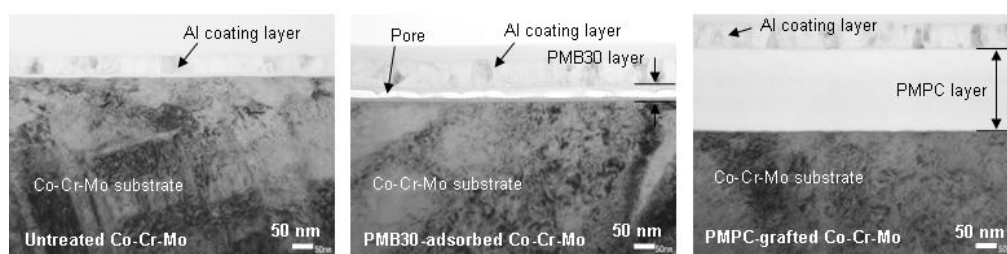


図 4. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真

値に到達した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度するとき、45 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、理論値に到達した。

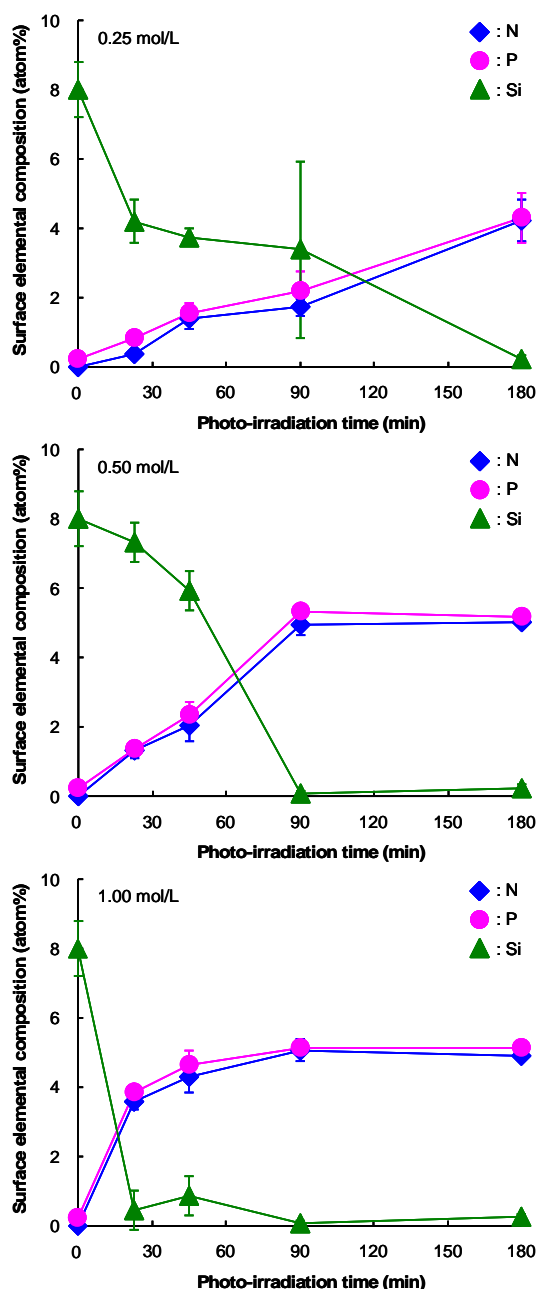


図 5. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度

### 水による静的接触角の測定

図 6 に、種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角を示す。いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は低下した。0.50 mol/L 以上の MPC 水溶液濃度するとき、90 分以上の紫外線照射時間で、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は約 20°で安定した。

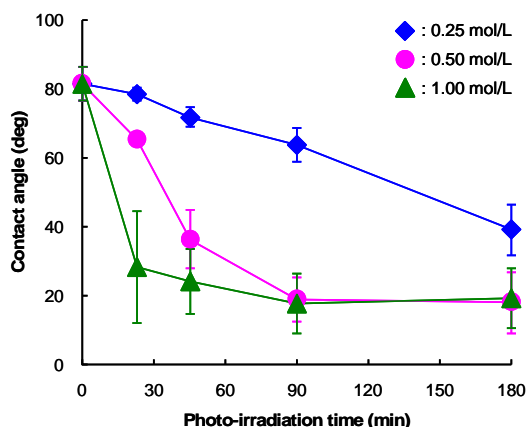


図 6. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角

### TEM 観察

図 7 に、種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金 (90 分の紫外線照射時間)の断面 TEM 写真を示す。

MPC 水溶液濃度を増やすことにより、Co-Cr-Mo 合金表面に形成する PMPC 層の厚さは増加した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度するとき、その層厚は約 360 nm に達した。



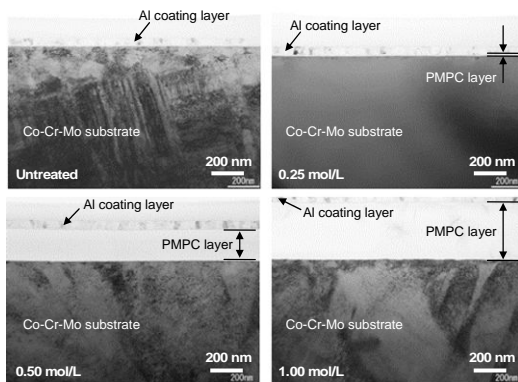


図 7. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真

### 3. タンパク質吸着試験

図 8～10 に、BCA 法により評価した PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面のアルブミン、 $\gamma$ -グロブリンおよびフィブリノーゲン吸着量を示す。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したアルブミン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/5～2/5 程度であった(図 8)。また、これらの群間における差は、統計学的に有意( $p < 0.001$ )であった。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着した $\gamma$ -グロブリン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面の 1/3～1/2 程度であった(図 9)。また、これらの群間における差は、統計学的に有意( $p < 0.001$ )であった。

PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したフィブリノーゲン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面の 1/16～1/8 程度であった(図 10)。また、群間における差は、統計学的に有意( $p < 0.001$ )であった。

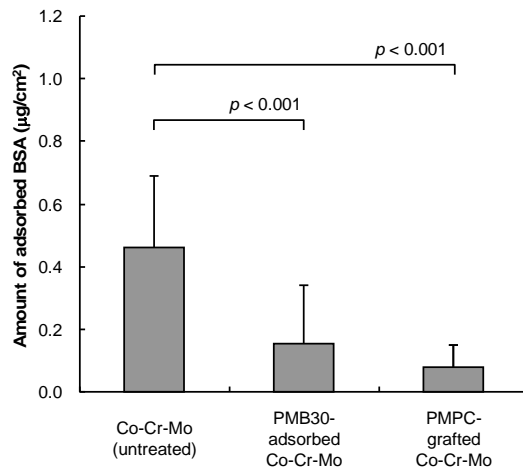


図 8. BCA 法により評価した PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金のアルブミン吸着量

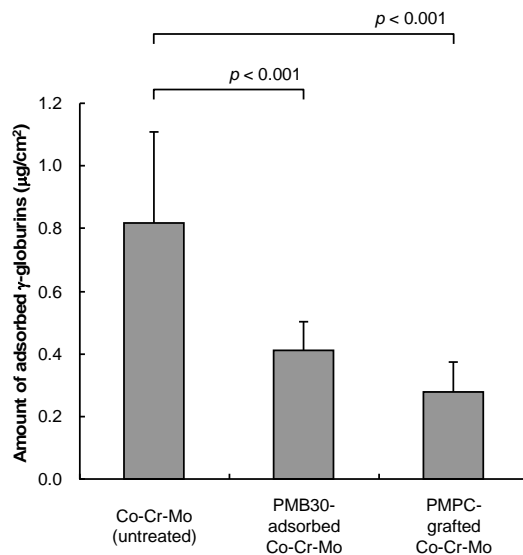


図 9. BCA 法により評価した PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の $\gamma$ -グロブリン吸着量

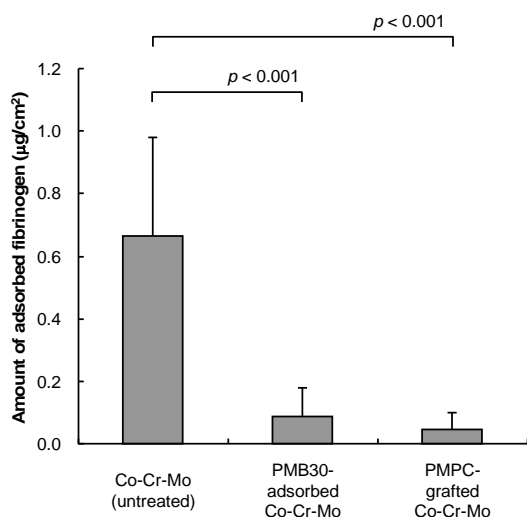


図 10. BCA 法により評価した PMB30 処理/PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金のフィブリノーゲン吸着量

#### 4. 細菌付着抑制効果の検討

##### 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。

##### a) 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 11)。その結果、未処理の場合にとりどころ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。

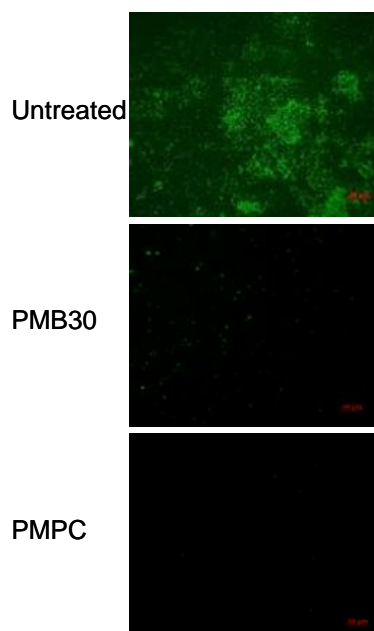


図 11. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

##### 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 12)。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 処理どちら場合でも、ほとんど菌が観察されなかった。

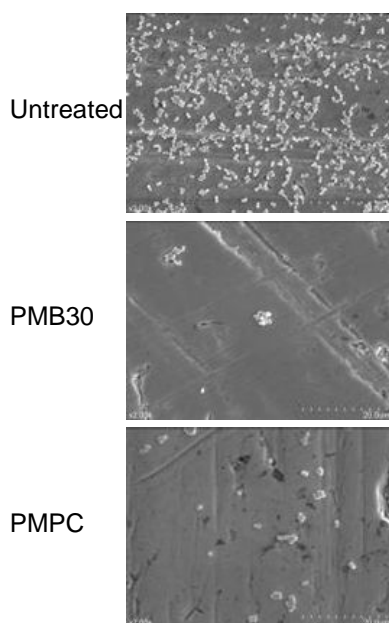


図 12. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の走査型電子顕微鏡観察像 (2000 倍)

#### 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 13)。

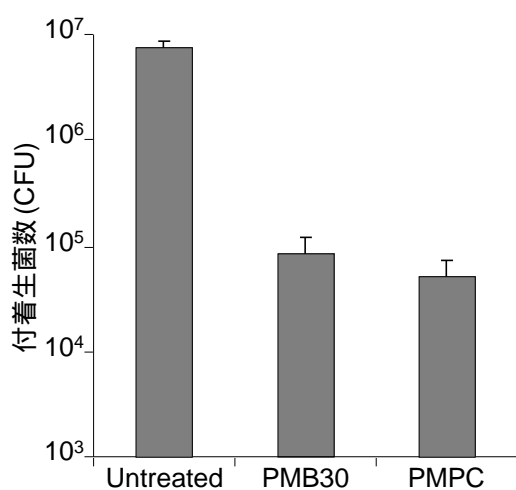


図 13. PBS 中における純 Ti 表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

#### b) 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 14)。

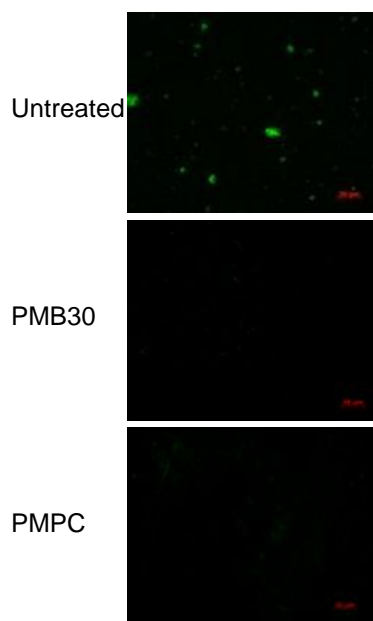


図 14. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

#### 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 15)。

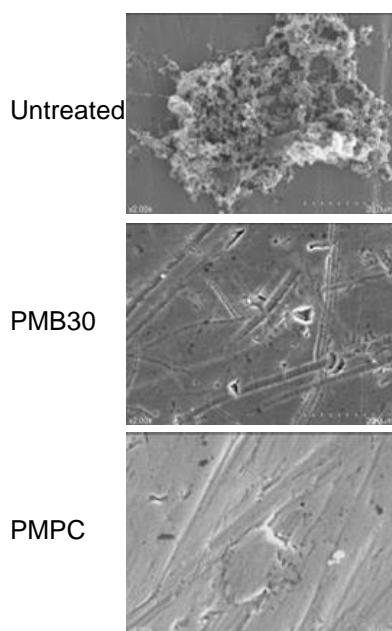


図 15. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた純 Ti 表面の走査型電子顕微鏡観察像 (2000 倍)

#### 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 16)。

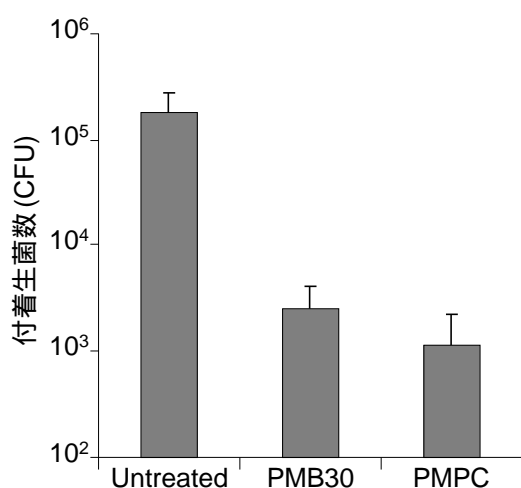


図 16. FCS 中における純 Ti 表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

## 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。

### a) 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 17)。

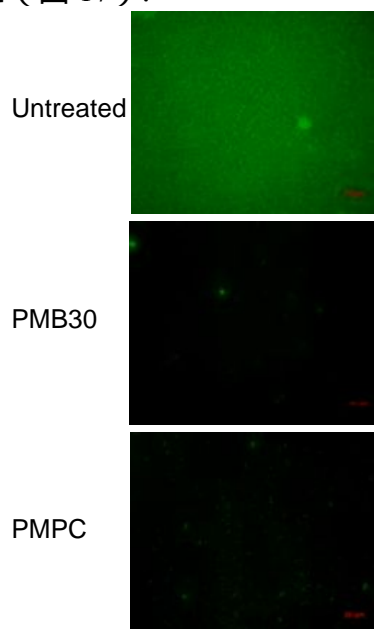


図 17. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の蛍光顕微鏡観察像 (200 倍)

#### 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 18)。

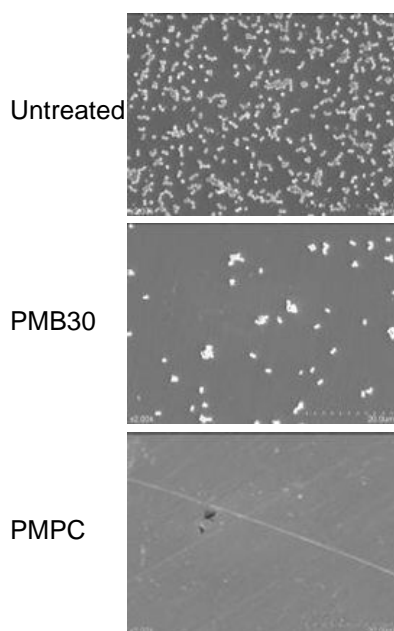


図 18. PBS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の走査型電子顕微鏡観察像（2000 倍）

#### 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 19）。

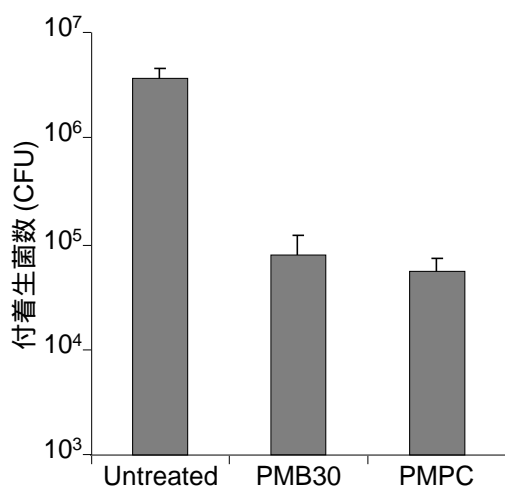


図 19. PBS 中における Co-Cr-Mo 合金表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

#### b) 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 20）。

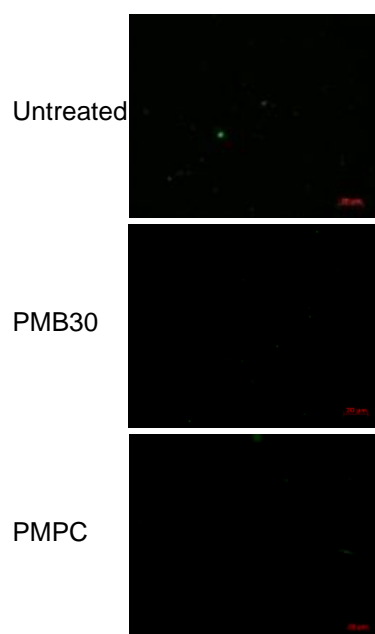


図 20. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の蛍光顕微鏡観察像（200 倍）

##### 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 21）。

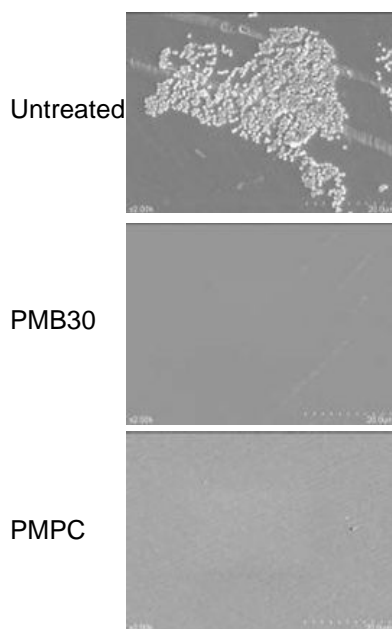


図 21. FCS 中で黄色ブドウ球菌と接触させた Co-Cr-Mo 合金表面の走査型電子顕微鏡観察像（2000 倍）

#### 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 22）。

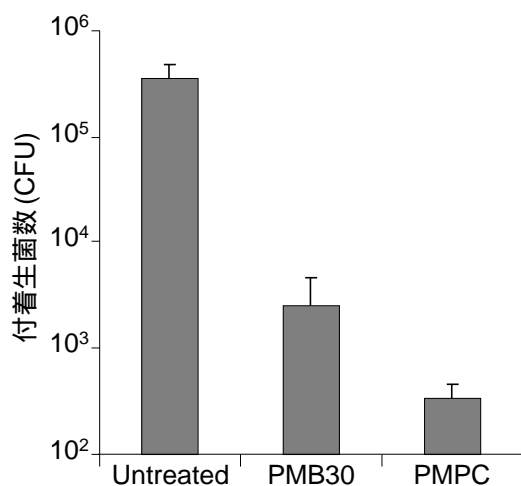


図 22. FCS 中における Co-Cr-Mo 合金表面への黄色ブドウ球菌の付着生菌数

## 2). 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 23）。

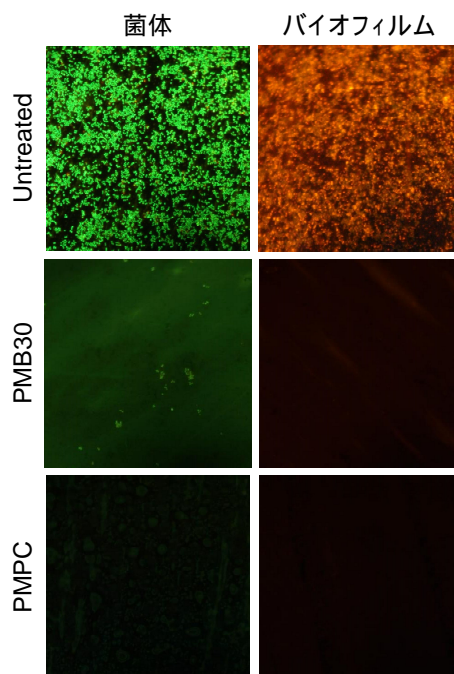


図 23. 純 Ti 表面におけるバイオフィーム形成（200 倍）

### 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 24)。一方、浮遊菌数は、MPC 処理の有無で差がなかった。

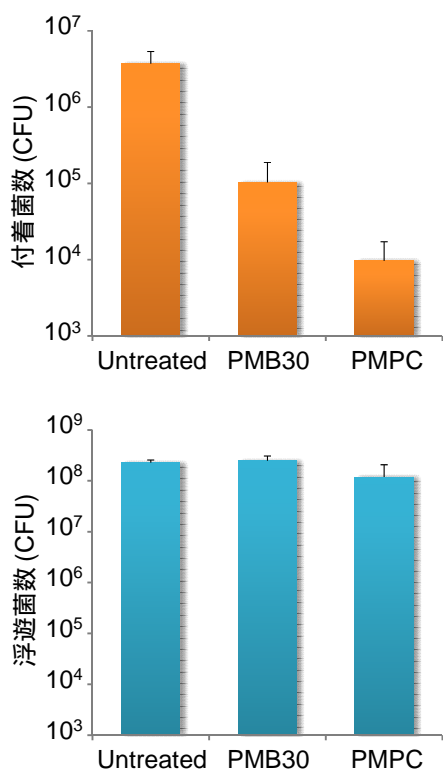


図 24. 純チタン表面のバイオフィルム中の生菌数(上)および未付着浮遊菌の生菌数(下)

### 3). 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ルム中の菌と、未付着の浮遊菌とで遺伝子発現を定量的に比較し、バイオフィル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 表面のバイオフィルムでは、物質輸送、細胞壁、鉄イオン結合、代謝、などに関与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 25)。

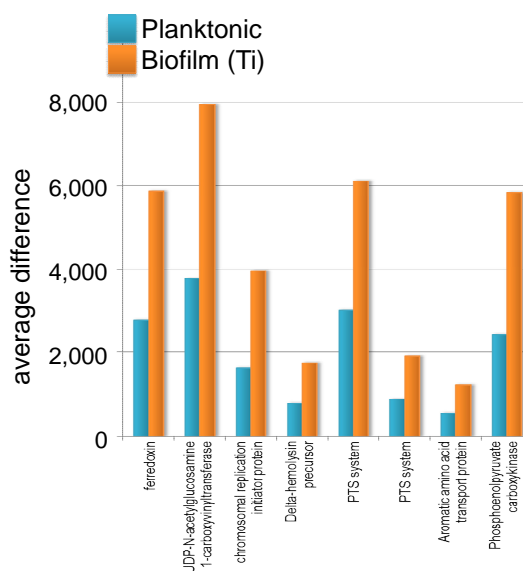


図 25. 未処理 Ti 表面のバイオフィルムで発現が誘導される遺伝子

### D. 考察

本研究の目的は、金属コンポーネント表面に MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、タンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイオフィルム形成の抑制効果について検討することである。

#### 1. 金属表面の MPC ポリマー処理

ディップコーティング法、グラフトコーティング法を用いて検討した。いずれの方法でも、Co-Cr-Mo 合金表面に均一な MPC ポリマー層が形成することが確認された。

ディップコーティング法に用いた PMB30 は、30 mol%の MPC しか含まれておらず、水に不溶性ポリマーである。従って、PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の静的接触角は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のそれよりも高い値を示した。しかしながら、

既報において、動的な接触角は低い値を示しており、十分な湿潤環境にある生体内においては、親水性表面を形成すると考えられた。

グラフトコーティング法では、シラン処理と MPC の表面グラフト重合の二段階処理を行った。シラン処理により、重合性基を Co-Cr-Mo 合金表面に導入した表面では、その表面接触角が約 80°と比較的高い値を示したが、PMPC 処理することにより、その接触角は顕著に低下した。

MPC 水溶液濃度や紫外線照射時間（重合時間）が増すにつれ接触角の低下は早まり、また、水溶液濃度によって Co-Cr-Mo 合金表面の PMPC 層の厚みも制御できた。MPSi 中間層には、光重合開始剤 (D2959) が含有されているため、ラジカル重合は Co-Cr-Mo 合金表面から開始されると考えられた。その結果、比較的高密度の PMPC 層が形成されていると思われた。XPS 分析および TEM 観察の結果からも、比較的厚い PMPC 層で、Co-Cr-Mo 合金表面が完全に覆われていることも確認できた。以上の結果により、PMPC 処理における MPC 水溶液濃度と紫外線照射時間の至適条件は、0.5 mol/L、90 分であると判断した。

## 2. タンパク質吸着抑制効果

低濃度のタンパク質濃度測定に適した BCA 法により、Co-Cr-Mo 合金のアルブミン吸着量を評価したところ、PMB30 処理 /PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したタン

パク質量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面の 1/16 ~ 1/2 程度であった。また、これら群間の差は、いずれも統計学的に有意 ( $p < 0.001$ ) であった。MPC ポリマー処理金属は、親水性の高い、タンパク質吸着を抑制する表面を有することが明らかとなった。

## 3. 細菌付着抑制効果

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生じないことが示唆された。



## E. 結論

抗感染性の検討の前提として、金属表面の MPC ポリマー処理について、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を用いて検討した。PMPC 処理では、溶液濃度・処理時間の至適条件を確立した。また、これらの表面処理表面について、タンパク質吸着、細菌付着が抑制されることを明らかにした。以上の成果により、MPC ポリマー処理金属は、親水性の高い、タンパク質吸着を抑制する表面を有しており、細菌付着の抑制が期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33: 4451-4459, 2012.
- 2) Katagiri N, Shobuike T, Chang B, Kukita A, Miyamoto H: The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* 14(13): 1123-1132, 2012.
- 3) Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H: *Nocardia elegans* infection involving purulent arthritis in humans. *J Infection and Chemotherapy* 18 (3): 386-389, 2012 .
- 4) Matsubara R, Kukita T, Ichigi Y, Takigawa I, Qu P-F, Funakubo N, Miyamoto H, Nonaka K, Kukita A: Characterization and identification of subpopulations of mononuclear preosteoclasts induced by TNF-alpha in combination with TGF-beta in rats. *PLoS ONE* 7(10): e47930, 2012 .
- 5) Furuhashi K, Edagawa A, Miyamoto H, Morimoto Y, Fukuyama M: Identification of *Legionella rubrilucens* isolated from a hot spring for foot-soaking in Niigata, Japan. *Biocontrol Science* 17(2): 101-105, 2012.
- 6) Kukita A, Ichigi Y, Takigawa I, Watanabe T, Kukita T, Miyamoto H: Infection of RANKL-primed macrophages, RAW-D cells with *Porphyromonas gingivalis* promotes osteoclastogenesis in TNF-independent manner. *PLoS ONE* 7(6): e38500, 2012.
- 7) Sato R, Miyamoto H, Aoki Y, Hayashi S, Mizuta T, Tsuruoka N, Iwakiri R, Fujimoto K: Characteristics of Bacterial Species in Positive Blood Cultures among Hospitalized Patients in Three Wards in the Department of Internal Medicine, Gastroenterology, *Hepatology and Respiriology*: Retrospective Chart Review during January 1999 to December 2008. *Internal Medicine* 51: 1159-1166, 2012 .
- 8) Sano N, Yamashita Y, Fukuda K, Taniguchi H, Goto M, Miyamoto H: Comprehensive analysis of bacterial flora in postoperative maxillary cyst fluid by 16S rRNA gene and culture methods. *ISRN Dentistry* 1-11, 2012.
- 9) Nagata M, Ueda O, Shobuike T, Muratani T, Aoki Y, Miyamoto H: Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Open Journal of Medical Microbiology* 2: 8-15, 2012.

- 10) Park C, Kim B, Kim H, Yun Y, Ko K, Miyamoto H, Kim B: Yoon-Hoh Kook Analysis of Population Structure among Korean and Japanese *Legionella pneumophila* Isolates Using hsp60 Sequences. ***Microbiol Immunol*** 56: 572-578, 2012.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H: *Nocardia elegans* infection involving purulent arthritis in humans. ***J Infect Chemother*** (in press)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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.
- 20) 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
- 21) 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: MPC ポリマーによるナノ表面処理を応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第31回バイオトライボロジシンポジウム. 東京, 5.14, 2011.
- 2) 茂呂徹: ナノテクノロジーを応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第16回ひむか運動器セミナー. 宮崎, 7.4, 2011.
- 3) 茂呂徹: MPC ポリマーによるナノ表面処理の基礎. 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科先端的医学獣医学特論(大学院特別セミナー). 宮崎, 7.4, 2011.
- 4) 茂呂徹, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーの表面処理による人工関節金属表面の細菌付着抑制効果. 第34回日本骨・感染症学会. 淡路島, 7.8-9, 2011.
- 5) 茂呂徹, 高取吉雄, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 伊藤英也: シンポジウム「人工股関節摺動面の特性と問題点」 MPC ポリマーをグラフトした人工股関節摺動面の特性. 第38回日本股関節学会学術集会. 鹿児島, 10.7-8, 2011.
- 6) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 中村耕三, 川口浩: 人工関節金属インプラント表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果の検討. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 7) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: MPC 処理による摩耗低減効果に対するポリエチレン厚さの影響 —繰り返し衝撃 - 摺動試験での検討—. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 8) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 石原一彦: 繰り返し衝撃-摩耗環境におけるポリエチレン厚さが背面摩耗に及ぼす影響. 第38回日本臨床バイオメカニクス学会. 神戸, 11.18-19, 2011.
- 9) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーナノグラフトを基盤にした新しい人工膝関節の開発. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 10) 京本政之, 茂呂徹, 雑賀健一, 立石崇晴, 高取吉雄, 石原一彦: 対向する摺動面を保護する生体軟骨模倣 CFR-PEEK 表面の創製. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 11) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 石原一彦, 高取吉雄: ポリエチレン厚さが MPC 処理ポリエチレンの耐久性に及ぼす影響 —多方向摺動試験による検討—. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.
- 12) 茂呂徹: 生体親和性材料 MPC ポリマーの表面処理による新しい人工股関節 —長寿命化を目指して—. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012. 野田岩男, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 塚本正紹, 秋山隆行, 米倉豊, 河野俊介, 園畑素樹, 馬渡正明: 銀系抗菌生体材料の開発(第6報). 第35回日本骨・関節感染症学会. 鹿児島, 2012.4.27-28.

- 13) 塚本正紹, 宮本比呂志, 安藤嘉基, 野田岩男, 秋山隆行, 米倉豊, 園畑素樹, 馬渡正明: 銀系抗菌生体材料の開発 - 牛血清流動環境下における銀 HA 溶射被膜のバイオフィルム形成阻害作用の持続性の評価 -. 第 35 回日本骨・関節感染症学会. 鹿児島, 2012.4.27-28.
- 14) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 中川匠, 岡敬之, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: 人工膝関節環境における MPC 処理架橋ポリエチレンの耐摩耗特性の検討. 第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 沖縄, 2012. 7. 19-21.
- 15) 茂呂徹: ナノテクノロジーを用いた新しい人工関節の開発 -基礎研究から応用まで-. 第 22 回弘前大学整形外科夏の研修会. 弘前, 2012. 8. 4.
- 16) 枝川亜希子, 木村明生, 田中榮次, 足立伸一, 宮本比呂志: レジオネラ属菌を検出するためのアメーバ共培養法に関する検討. 日本防菌防黴学会. 東京, 2012. 9. 11-12.
- 17) 高取吉雄, 茂呂徹, 京本政之, 石原一彦, 川口浩, 中村耕三: シンポジウム「人工関節成績改善に繋がる近未来の医療用素材」 ポリエチレン摺動面の MPC ポリマー処理. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋, 2012.10. 26.
- 18) 野田岩男, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 江頭秀一, 塚本正紹, 秋山隆行, 米倉豊, 河野俊介, 園畑素樹, 馬渡正明: 次世代型抗菌性 HA コーティング (第 5 報). 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋, 2012. 10. 26-27.
- 19) 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: 流動環境における銀含有ハイドロキシアパタイト溶射被膜のバイオフィルム形成阻害効果の検討. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋, 2012. 10. 26-27.
- 20) 茂呂徹, 高取吉雄, 京本政之, 岩崎泰彦, 宮路史明, 田中栄, 伊藤英也, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦: シンポジウム「メタルベースハイブリッドバイオマテリアル」 生体機能分子固定化による摩擦低減. 第 34 回日本バイオマテリアル学会シンポジウム. 仙台, 2012. 11. 27.
- 21) 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 バイオタイパーでの同定精度に関する性能評価. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都, 2012. 11. 29- 12.2.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 上田修, 永沢善三, 宮本比呂志: 質量分析装置 MALDI バイオタイプ

- 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
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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, Takatori Y, Ishihara K: High oxidation- and wear-resistance of PMPC-grafted polyethylene arisen by extra plasma irradiation. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
- 2) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Inoue Y: Surface modification with phospholipid polymers for long-term implantable medical devices. THERMEC'2011. Quebec, Canada, 8.1-5, 2011.
- 3) Inoue K, Inoue Y, Ishihara K: Importance of dynamics of water molecules on protein adsorption at polymer brush surfaces. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
- 4) Ishihara K: Highly biocompatible surface for implantable artificial organ. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
- 5) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: High Oxidation- and Wear-resistances of Polyethylene Arisen by Vitamin E-blending and Poly(MPC) Grafting. 5th UHMWPE meeting. Philadelphia, USA, 9.22-23, 2011.
- 6) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Takatori Y: Biomimetic surface modification on artificial hip joint for elongation of implantation life. European Society for Artificial Organs (ESAO). Porto, Portugal, 10.9-12, 2011.
- 7) Saiga KI, Moro T, Kyomoto M, Ito H, Kadota T, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K, Takatori Y: Effect of MPC-grafting and PE thickness on wear and fracture in multi-mode pin-on-disk wear test. 6th International Biotribology Forum Biotribology Fukuoka 2001. Fukuoka, Japan, 11.5, 2011.
- 8) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: Cartilage-inspired surface and antioxidative substrate give high durability to orthopaedic polyethylene bearings. 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress. Chengdu, China, 2012. 6. 1-5.
- 9) Noda I, Miyamoto H, Eto S, Tsukamoto M, Akiyama T, Yonekura Y, Kawano S, Sonohata M, Mawatari M: Next Generation Antibacterial HA coating. 31st European Bone and Joint Infection Society. Montreux, Switzerland, 2012. 9. 20-22.
- 10) Tsukamoto M, Miyamoto H, Ando Y, Noda I, Eto S, Akiyama T, Yonekura Y, Sonohata M, Mawatari

- M: The hydroxyapatite coating containing silver continuously inhibits the biofilm formation in a flow condition of fetal bovine serum. 25th Annual congress of International Society for Technology in Arthroplasty. Sydney, Australia, 2012. 10. 3-6.
- 11) Oho M, Nagasawa Z, Kusaba K, Higashitani T, Ohta S, Sueoka E, Miyamoto H: Application of MALDI-TOF MS-based strain typing for characterization of epidemiological relationships among bacterial strains. 12th Meeting of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine. Kyoto, Japan, 2012. 11. 29-12. 1.
  - 12) Moro T, Takatori Y; Kyomoto M, Kamogawa M, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Kawaguchi H, Nakamura K: Clinical results of PMPC-grafted polyethylene acetabular liners. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
  - 13) Moro T, Kyomoto M, Ishihara K, Tanaka S, Oshima H, Tanaka T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H, Takatori Y: Effect of larger femoral head on the wear resistance of the biocompatible polymer-grafted cross-linked polyethylene liner. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
  - 14) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Yamane S, Takatori Y, Ishihara K: Antioxidation and high wear resistance of life-long liners by vitamin E blending and poly(MPC) grafting. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
  - 15) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Yamane S, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on orthopedic polymeric bearing materials. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Antonio, USA, January 26-29, 2013.
  - 16) Moro T, Takatori Y, Oda H, Morimoto S, Umeyama T, Kamogawa M, Kyomoto M, Kawaguchi H, Nakamura K: Clinical results of PMPC-grafted cross-linked polyethylene liner in primary total hip arthroplasty. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) 2013 Annual Meeting. Chicago, USA, March 19-23, 2013.
  - 17) 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.
  - 18) 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。