

かにした。

そこで本研究では、生体内と同等の酸化劣化処理がビタミン E 添加 MPC 処理 CLPE ライナーの摩耗特性に与える影響を調べるため、大径骨頭と組み合わせて股関節シミュレーター試験機を用いて評価し、評価後のライナーの表面解析および血清中の摩耗粉の解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 股関節シミュレーター試験

耐摩耗性評価試験は、MTS 社製の股関節シミュレーターを用いて行った (図 1)。骨頭には市販品のコバルトクロム合金大径骨頭 (径 32 mm) を、臼蓋コンポーネント (ライナー) には酸化劣化処理を行ったビタミン E 添加 CLPE (CLPE+E) および MPC ポリマー処理ビタミン E 添加 CLPE (MPC 処理 CLPE+E) を用いた。酸化劣化処理は、ASTM F2003-00 Standard Guide for Accelerated Aging of Ultra-High Molecular Weight Polyethylene を参照し、CLPE+E および MPC 処理 CLPE+E ライナーを 80°C の大気中で 3 週間保管することにより行った。耐摩耗性の試験条件は国際標準化機構 (ISO) 14242-3 に準じ、潤滑液には 25% 牛血清を用い、液量約 750 mL で、毎秒 1 回の歩行周期 (1 Hz) に 1.8 と 2.7 kN の 2 つのピークをもつ Double Peak Paul の歩行条件で、最大 1000 万サイクル (10~15 年分の歩行不可に相当) ま

での摩耗試験を行った。試験後のライナーについて、走査型レーザー顕微鏡 (OLS-1200, Olympus) を用いた表面観察および三次元形状測定機 (Crysta-Apex C574, Mitutoyo) を用いた変形量測定を行った。



図 1. 股関節シミュレーター全体像

### 2. 摩耗粉の分離および解析

試験液からの摩耗粉の抽出方法は、以下に示すように行った。100 万サイクル試験後の潤滑液全量から 1 mL 採取し、その中に 1 mL の 5N-NaOH を加えて、65°C で 3 時間振動処理を行った。室温で 1 日冷却後、密度 1.2 g/cm<sup>3</sup> に調製したシヨ糖/蒸留水混合液と 0.919 g/cm<sup>3</sup> に調製したイソプロパノール (IPA) /蒸留水混合液を加えて遠心分離 (25,500 rpm, 5°C, 3 時間) を行った。遠心分離後の溶液の境界層をピペットで取り出し、メタノールを加えて超音波により 1 分攪拌した。遠心分離を行い (25,500 rpm, 5°C, 3 時間)、摩耗粉部を沈降させ、上澄みを捨てた。この操

作を2回繰り返した。その後、5°Cに冷却後、1.05 g/cm<sup>3</sup>に調製したシヨ糖/蒸留水混合液 10 mL を注ぎ、超音波で1分間攪拌させた。その上に、まず0.973 g/cm<sup>3</sup>に調製したIPA/蒸留水混合液 10 mL を注ぎ、次に0.919 g/cm<sup>3</sup>に調製したIPA/蒸留水混合液 10 mL を注ぎ、遠心分離を行った(25,500 rpm、5°C、3時間)。遠心分離後、0.973 g/cm<sup>3</sup>と0.919 g/cm<sup>3</sup>のIPA/蒸留水混合液の境界層をピペットで採取し、最終的に0.1 μmのフィルターを用いて、ライナーから発生する摩耗粉をろ過抽出した。

走査型電子顕微鏡(SEM)により抽出した摩耗粉を観察した。観察箇所は、フィルター上の任意9カ所とし、倍率は5,000倍とした。

また、摩耗粉の形状や粒径分布の評価には解析プログラム:ImageJ (National Institute of Health 製)を使用した。具体的には、摩耗粉の個数、面積、体積、粒径、アスペクト比および円環性の評価を行った。個数に関しては、9視野分の摩耗粉個数をカウントし、総数を採取量で除することにより、1 mLあたりの個数とした。面積および体積は、ImageJを用いて求めた。粒径は、摩耗粉の最大長さとした。円環性は、摩耗粉がどの程度円に近いかを表す尺度であり、値が1の場合には完全な円であり、0に近いほど形態が繊維状であることを示す。

## C. 研究結果

### 1. 試験後ライナーの表面解析結果

図2に、Load-soak control群における(a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび(b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーのレーザー顕微鏡観察像を示す。MPC 処理の有無に関わらずライナー摺動面にツールマーク痕が観察された。また、図3に、32 mmφのCoCr 骨頭と組み合わせて摺動試験を行った(a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび(b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーのレーザー顕微鏡観察像を示す。未処理 CLPE+E (3w Aging) ライナー表面に、摺動で生じた深い摩耗痕が観察されたのに対し、MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナー表面にそれは観察されなかった。

図4に、32 mmφのCoCr 骨頭と組み合わせた(a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび(b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーの三次元形状測定結果を示す。MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーの変形量は、未処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーのそれと比較して抑制されていることがわかった。

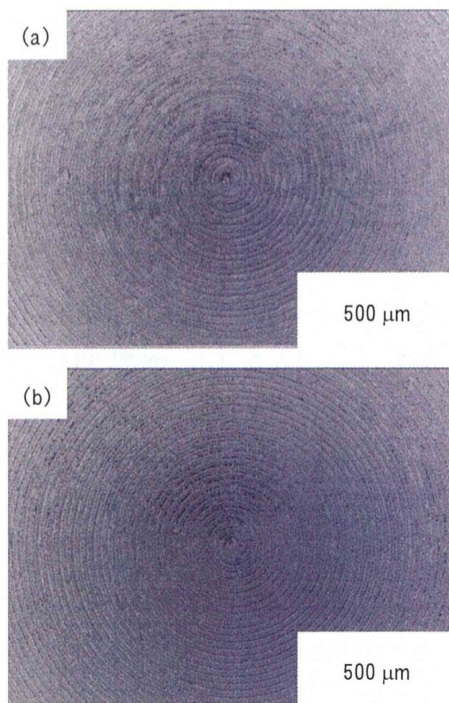


図2. Load-soak control 試験後の(a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび(b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーのレーザー顕微鏡観察像

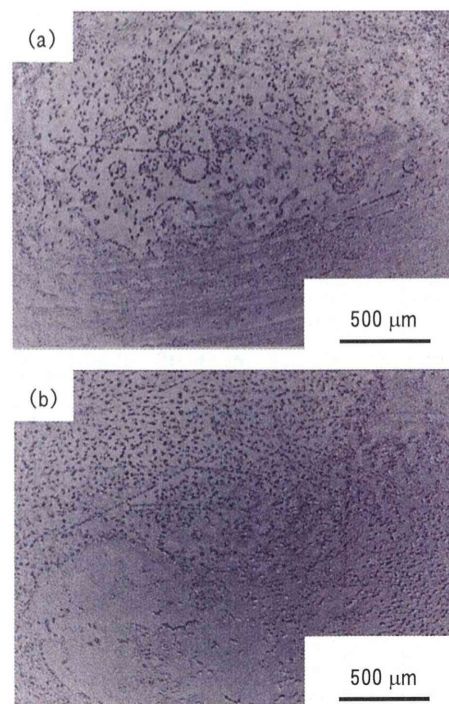


図3. 32 mmφのCoCr 骨頭と組み合わせた(a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび(b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーのレーザー顕微鏡観察像



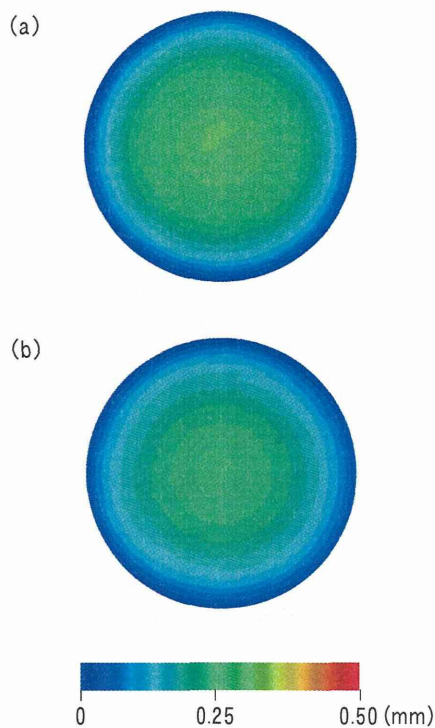


図4. 32 mmφのCoCr 骨頭と組み合わせた (a) CLPE+E (3w Aging) ライナーおよび (b) MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーの三次元形状測定結果

## 2. 摩耗粉解析結果

32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E (3w Aging) および MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーから発生した摩耗粉の SEM 写真を図5 および 6 に示す (試験回数 100 万サイクル)。CLPE+E (3w Aging) ライナーから発生した摩耗粉の形状は、顆粒状および繊維状の摩耗粉が観察された。しかし、MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーから発生した摩耗粉の形状は、ほとんど粒状であり、摩耗粉の数も CLPE+E (3w Aging) に比べて少なかった。

表 1 に、32mmφCoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E (3w Aging) および MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーに対して、試験後の潤滑液中に存在する摩耗粉の個数、面積および体積を示す。CLPE+E (3w Aging) ライナーに比べて、MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーの摩耗粉の個数、面積および体積どれも少なく、面積に関しては 1/4、体積に関しては 1/10 の産生量を示した。

以上の結果から、ビタミン E を添加した CLPE ライナーを MPC 処理したものは、酸化劣化処理後も、未処理と比較して摩耗粉産生量は著しく減少することがわかった。

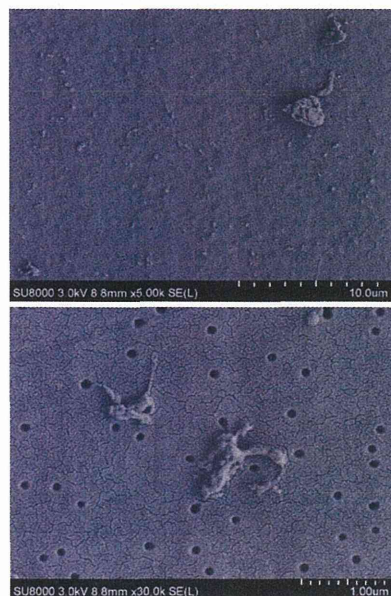


図5. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた CLPE+E (3w Aging) ライナーから発生した摩耗粉

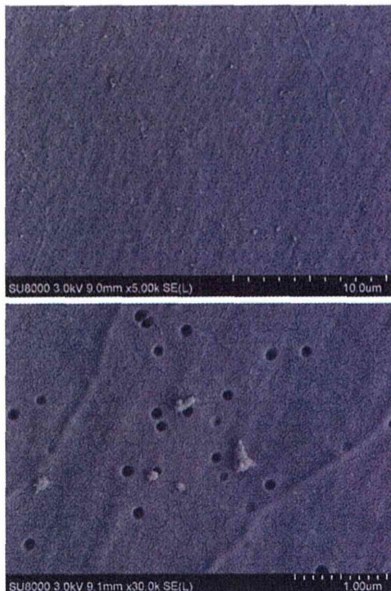


図 6. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた MPC 処理 CLPE+E (3 Aging) ライナーから発生した摩耗粉

表 1 CLPE+E (3w Aging) および MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) ライナーから発生した摩耗粉の個数、面積および体積

	3w Aging, 100 万回	
	CLPE+E	MPC 処理 CLPE+E
摩耗粉個数 (個/ml)	1336	785
面積 ( $\mu\text{m}^2/\text{ml}$ )	39.2	10.0
体積 ( $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ )	12.4	1.4

次に、32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた各ライナーから発生した摩耗粉の粒径分布を図 7 に示す。

CLPE+E (3w Aging) の粒径分布は、MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) と比べて広く、粒径 3  $\mu\text{m}$  までの摩耗粉が存在した。しかし、MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) の場合には、粒径は小さく、1.6  $\mu\text{m}$  までの摩耗粉が存在していることがわかった。

次にアスペクト比に関して、CLPE+E (3w Aging) および MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) の場合も、ほぼ同等の分布を示し、アスペクト比が 3 で極大をとり、その後アスペクト比が増加するに従い、割合が減少する傾向を示した (図 8)。

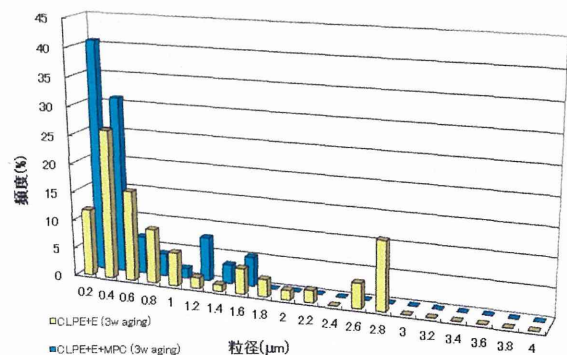


図 7. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の粒径分布

(■CLPE+E (3w Aging) , ■MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) )

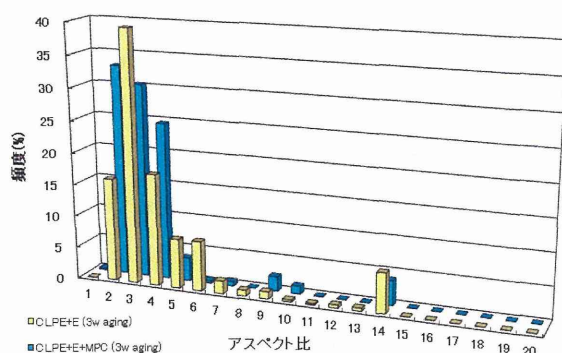


図 8. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉のアスペクト比分布

(■CLPE+E (3w Aging) , ■MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) )

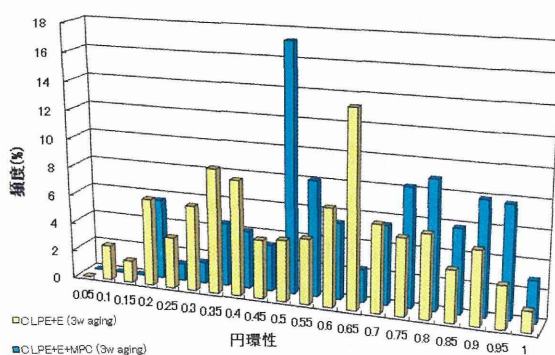


図 9. 32 mmφCoCr 骨頭と組み合わせた種々のライナーから発生した摩耗粉の円環性分布

(■CLPE+E (3w Aging) , ■MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) )

次に円環性に関して、CLPE+E (3w Aging) の場合、0.1~1 までの範囲に分布しており、繊維状から円状までの摩耗粉が存在していることが定量的に明らかになった(図 9)。MPC 処理 CLPE+E (3w Aging) の場

合には、0.2~1 付近の広い範囲に分布していたが、CLPE+E (3w Aging) よりも繊維状のものが少なく、円状のものが多い傾向を示した。

#### D. 考察

ビタミン E を添加した CLPE ライナーに MPC ポリマー処理を行うと、劇的な摩耗粉産生の抑制効果が持続することが明らかとなった。これは撥水性のビタミン E を添加した CLPE 表面を親水性の MPC ポリマーでナノ表面処理 (100~200 nm) することにより、関節摺動面に水和潤滑機構が働くようになったためと考えられる。

MPC 処理およびビタミン E 添加は、安定性と耐摩耗性に優れ、弛み、脱臼・破損という合併症を抑制する「革新的な人工股関節」を創出する基盤技術として期待される。

#### E. 結論

ビタミン E 添加 CLPE ライナーに MPC 処理を施すと、酸化劣化処理後も摺動面性状に大きな改善が見られた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) 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* 31: 100-106, 2014.
- 2) 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.
- 3) 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*  
35(25): 6677-6686, 2014.
- 4) 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* 102(9): 3012-3023, 2014.
- 5) Takatori Y, Moro T, Ishihara K,  
Kamogawa M, Oda H, Umeyama  
T, Kim YT, Ito H, Kyomoto M,  
Tanaka T, Kawaguchi H, Tanaka  
S: Clinical and radiographic  
outcomes of total hip replacement  
with poly(2-methacryloyloxyethyl  
phosphorylcholine)-grafted highly  
cross-linked polyethylene liners:  
Three-year results of a prospective  
consecutive series. *Mod  
Rheumatol* 25(2); 286-291, 2015.
- 6) Moro T, Takatori Y, Kyomoto M,  
Ishihara K, Kawaguchi H,  
Hashimoto M, Tanaka T, Oshima  
H, Tanaka S: Wear resistance of  
the biocompatible phospholipid  
polymer-grafted highly  
cross-linked polyethylene liner  
against larger femoral head. *J  
Orthop Res* (in press).
- 7) Yamane S, Kyomoto M, Moro T,  
Watanabe K, Hashimoto M,  
Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K:  
Effects of extra-irradiation on  
surface and bulk properties of  
PMPC-grafted cross-linked  
polyethylene. *J Biomed Mater Res  
A* (in contribution).
- 2.学会発表
- ① 国内学会
- 1) 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄, 鴨川  
盛秀, 織田弘美, 金潤沢, 梅山剛  
成, 伊藤英也, 田中健之, 川口浩,  
中村耕三: 「パネルディスプレイ  
⑨ 基礎研究から見た理想的  
な THA インプラント、術式」

MPC ポリマーのナノ表面処理を施したポリエチレンライナーを用いた人工股関節の成績. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 鹿児島, 10.10-11, 2014.

- 2) 茂呂徹, 高取吉雄, 織田弘美, 金潤澤, 梅山剛成, 川口浩, 伊藤英也, 田中健之, 大嶋浩文, 中村耕三, 田中栄: 生体親和性 MPC ポリマー処理架橋ポリエチレンライナーを用いた人工股関節: 手術後 5 年の臨床成績. 第 45 回日本人工関節学会. 福岡, 2.27-28, 2015.

## ② 国際学会

- 1) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Oda H, Kim YT, Umeyama T, Ito H, Kawaguchi H, Kyomoto M, Tanaka T, Oshima H, Tanaka S: Clinical outcomes of total hip replacement with PMPC-grafted highly cross-linked polyethylene. International Congress for Joint Reconstruction (ICJR) Japan. Osaka, Japan, 1.16, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (免疫アレルギー疾患等実用化研究事業  
免疫アレルギー疾患実用化研究分野))

分担研究報告書

抗感染性の検討

研究分担者 埴 隆夫 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)  
研究分担者 宮本比呂志 (佐賀大学医学部 教授)

研究要旨：インプラント表面での細菌バイオフィルムの形成が原因でおこる人工関節感染は、インプラントの抜去および再置換が必要となるなど治療に難渋する。バイオフィルム形成の端緒は細菌の付着で、これは人工関節表面と菌体表面蛋白質との相互作用による。そのため、インプラント表面への蛋白質吸着を抑制すれば細菌の付着が阻止され、感染が防止できると考えられる。昨年度までに、生体成分の吸着抑制効果を有することが知られている 2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーが、ビタミンE 添加架橋ポリエチレン表面に高親水性と中性電荷を賦与することを明らかにした。さらに、MPC ポリマーが蛋白質の吸着を抑制するのみならず、細菌の付着をも抑制することを示した。そこで本年度は、細菌付着抑制効果についてさらに詳細に検討するとともに、細菌バイオフィルムの抑制効果、さらに抗菌薬の作用増強効果について検討した。その結果、ビタミンE 添加架橋ポリエチレン表面への MPC 処理は、術後感染の起炎菌である黄色ブドウ球菌の付着のみならず、バイオフィルム形成をも、劇的に抑制することがわかった。走査型電子顕微鏡で観察したところ、MPC 処理表面には菌体はおろか菌の残骸等もほとんど見当たらないことから、MPC 処理が菌由来物の付着を効果的に抑制し、バイオフィルムへの成熟を阻害していると考えられた。また、MPC 未処理表面に形成されたバイオフィルム内の菌に対して無効な濃度のバンコマイシンが、MPC 処理表面の菌には有効に作用することがわかった。MPC ポリマー処理したビタミンE 添加架橋ポリエチレンは、その高親水性による蛋白質吸着阻害効果により、細菌付着とバイオフィルム形成を抑制する表面を有しており、術後感染の予防効果が期待できると考えられた。

A. 研究目的 イオフィルムの形成が原因の人工関節感染は、インプラントの抜去/再置換  
インプラント表面における細菌バ

が必要となるなど治療に難渋する。細菌バイオフィーム形成は、人工関節表面に菌体が「付着」することが端緒となる。「付着」は、人工関節表面と菌体表面の蛋白質との相互作用で起こるので、細菌の付着を抑制して感染を防止するためには、まず蛋白質の吸着を阻止することが重要である。

我々は、生体成分の吸着抑制効果を有することが知られている、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーに着目し、MPCで表面処理したビタミン E 添加架橋ポリエチレンを創出した。昨年度までに、MPC ポリマー処理が、ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面に高親水性と双極性電荷を賦与することを示し、MPC ポリマー処理による蛋白質吸着の抑制効果を明らかにするとともに、細菌の付着抑制効果を明らかにした。

今年度は、細菌付着抑制効果をさらに詳細に検討するとともに、細菌バイオフィームの抑制効果、さらに抗菌薬の作用増強効果について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

人工股関節のライナー部に用いられている架橋ポリエチレン (cross-linked polyethylene, CLPE) およびビタミン E 添加 CLPE について、直径 14 mm × 1 mm 厚の試験片を作製した。さらに、ビタミン E 添加 CLPE 試験片表面を、前年度までに確立した方法で、MPC ポリマーをグラフトコー

ティングした (MPC 処理)。

### 2. 菌株

人工関節感染の多くは、患者自身に常在しているブドウ球菌が起炎菌であるので、菌株には黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* を使用し、臨床より分離された 2 株 (UEOH-6 株、NBRC12732 株) について検討した。培養にはトリプトソイブロス (TSB) を使用した。

### 3. 細菌付着抑制効果の検討

二つの付着条件で検討した。まず、リン酸緩衝生理食塩水で調製した菌液 ( $1 \times 10^8$  cells/mL) の 0.5 mL を CLPE 試験片上に接種して、37°C で 1 時間静置培養し、穏やかに付着させた。その後、試験片表面を 1 mL の PBS で 3 回リンスして、未付着の細菌を除去した。試験片表面に残存した菌について、蛍光顕微鏡で全体を俯瞰的に観察するとともに、走査型電子顕微鏡で詳細な観察をおこなった。さらに、生菌数を測定した。次に、強固に付着した菌を観察するために、0.25% グルコース添加トリプトソイブロスで調製した菌液 ( $3 \times 10^6$  cells/mL) の 0.5 mL を CLPE 試験片上に接種して、37°C で 24 時間、激しく (毎秒 1.7 往復) 振盪培養した後、同様の観察と測定をおこなった。

### 4. バイオフィーム形成抑制効果の検討

0.25% グルコース添加トリプトソイブロスで調製した菌液 ( $3 \times 10^6$

cells/mL) の 0.5 mL を試験片上に接種して、37°C で 24 時間、穏やかに (毎秒 1 往復) 培地を流動させつつ培養した。その後、試験片表面を 1 mL の PBS で 3 回リンスして、未付着の細菌を除去した。試験片表面に残存した菌について、蛍光顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡観察、生菌数測定をおこなうのに加え、クリスタルバイオレット染色によりバイオフィルムを定量した。さらに、24 時間付着させた菌に対してバンコマイシンを一晩作用させ、Syto-9 染色した試験片表面を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 5. 蛍光顕微鏡観察

試験片表面を SYTO-9 により染色し (菌の核酸が染色される)、付着菌の緑色蛍光を観察した。

#### 6. 走査型電子顕微鏡観察

試験片を 2% グルタルアルデヒド中に室温で 2 時間浸漬した。洗浄後、50%、75%、90%、99.5% の各濃度のエタノール中に順次浸漬することで脱水を行った。t-ブタノールに置換して凍結乾燥後、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。

#### 7. 付着生菌数測定

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 (colony-forming unit,

CFU)、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。試験片 3 枚から得られた測定値の平均と標準偏差を求めた (n = 3)。

#### 8. クリスタルバイオレット染色

染色液 (1% クリスタルバイオレット) に試験片を 5 分間浸漬した。過剰な染色液を水で洗浄し、乾燥させた。表面に残存するクリスタルバイオレットを 30% 酢酸で抽出し、590 nm における吸光度を測定してバイオフィルム量を評価した。

### C. 研究結果

#### 1. MPC 処理による細菌付着抑制効果

##### (1) 穏やかな条件で付着させた場合

まず、PBS に懸濁した黄色ブドウ球菌を試験片上に接種して 1 時間静置することにより、穏やかな条件で付着させた。

試験片表面への黄色ブドウ球菌 UOEH6 株および NBRC12732 株の付着を、蛍光顕微鏡 (Syto-9) と走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した結果を図 1 に示す。黄色ブドウ球菌の UOEH6 株および NBRC12732 株のどちらの場合でも、未処理 CLPE 試験片では、表面全体に付着している菌が観察された。これはビタミン E 添加 CLPE 表面でも同様であった。一方、MPC 処理した試験片の表面では付着菌のみならず菌の残骸等もほとんど認められなかった。

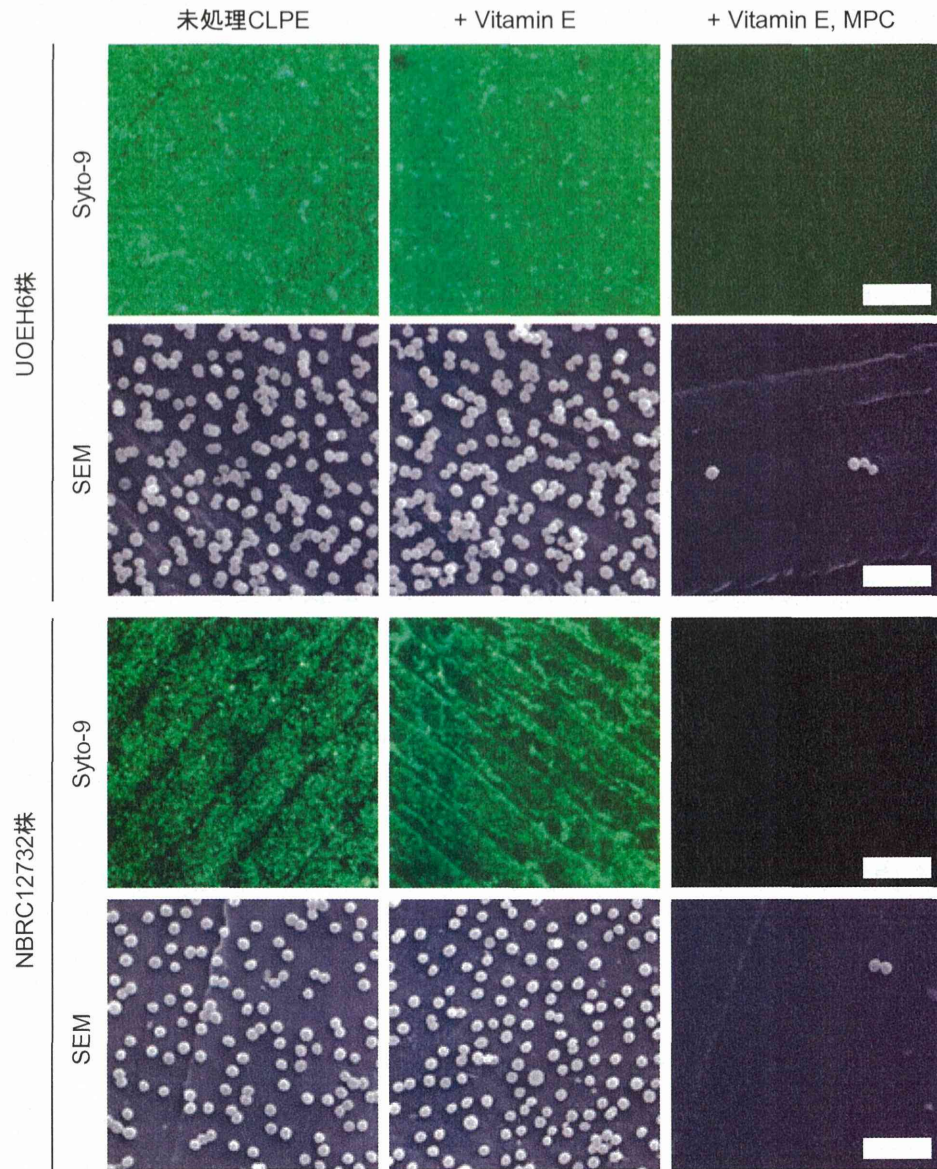


図1. 静置条件下での CLPE 表面における黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株（上）および NBRC12732 株（下）の付着。蛍光顕微鏡（Syto-9）は対物 10 倍（bar=90  $\mu\text{m}$ ）、走査型電子顕微鏡（SEM）は 3,000 倍（bar=5  $\mu\text{m}$ ）でそれぞれ観察した。



また、黄色ブドウ球菌 UOEH6 株の付着生菌数を計測すると、MPC 未処理の場合は  $5 \times 10^6$  CFU 前後であったのに対し、MPC 処理を施すことによって  $8.8 \times 10^3$  CFU と、99%以上低下しており、蛍光顕微鏡観察の結果とよく一致していた (図 2 上)。

黄色ブドウ球菌 NBRC12732 株の場合でも、97%以上の付着抑制効果が認められた (図 2 下)。

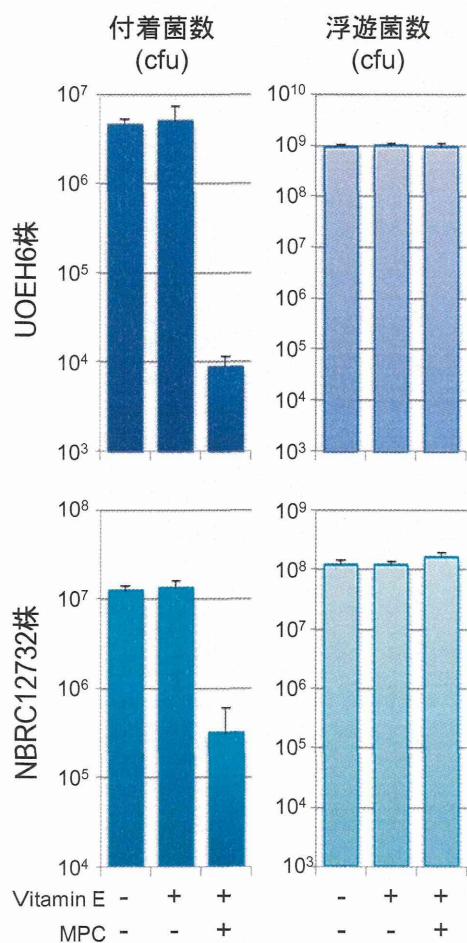


図 2. 静置条件下で CLPE 表面に付着した黄色ブドウ球菌数 (左) と、付着しなかった浮遊菌数 (右)

(2) 激しい振盪下で付着させた場合

図 3、図 4 に示すとおり、24 時間の激しい振盪下で強固に付着した菌についても、穏やかに付着させた場合とほぼ同様に、MPC 処理表面に付着する細菌数が顕著に減少していた。また、どちらの付着条件でも未付着菌の数は、3 種の試験片で差はなかった。

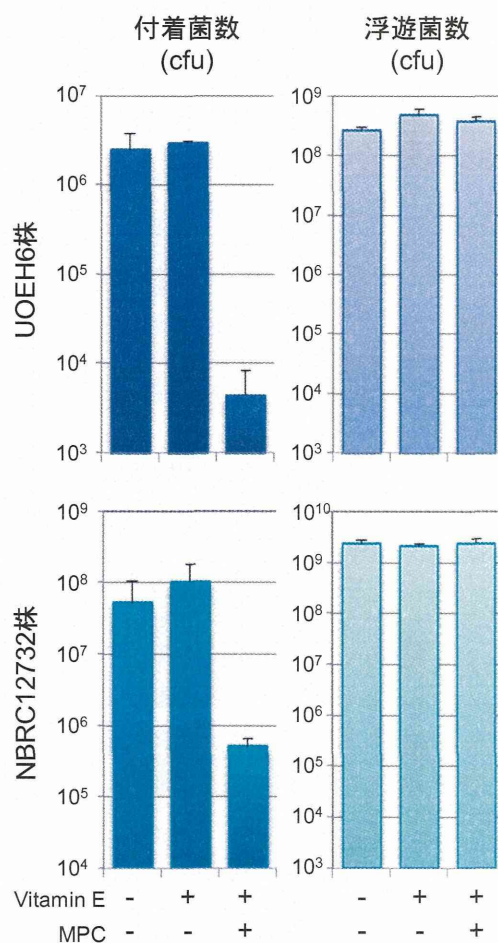


図 3. 激しい振盪下で CLPE 表面に付着した黄色ブドウ球菌数 (左) と、付着しなかった浮遊菌数 (右)

図 4 に示すとおり、MPC 未処理の試験片では、表面全体に付着している菌が蛍光顕微鏡下で観察されたが、MPC 処理された表面ではほとんど認められなかった。また、走査型電子顕微鏡下、MPC 未処理表面で平面的に付着

した菌の中にバイオフィーム様の三次元的な構造体が散見されたのに対し、MPC 処理した試験片表面では、付着菌のみならず菌の残骸等もほとんど認められなかった。

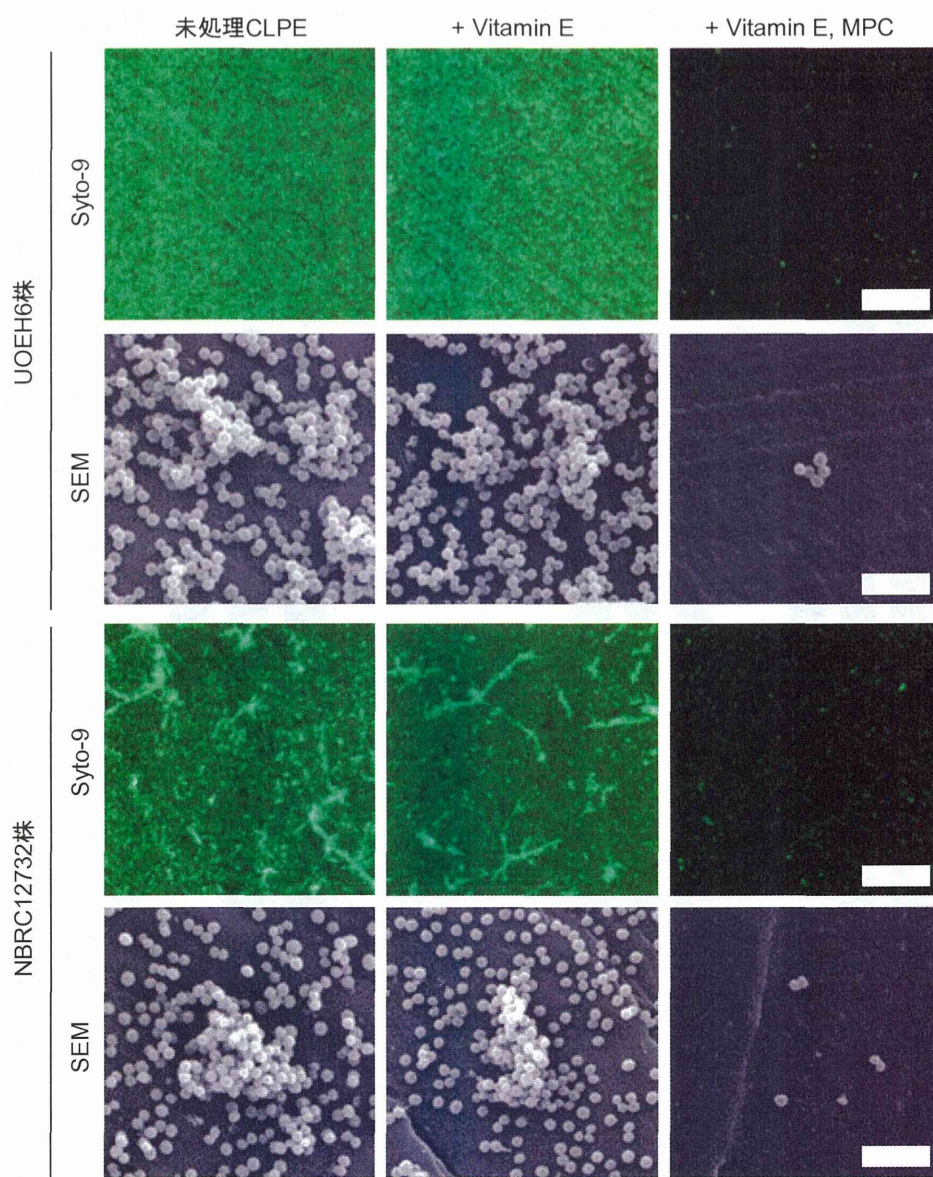


図 4. 激しい振盪下での CLPE 表面における黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株（上）および NBRC12732 株（下）の付着。蛍光顕微鏡 (Syto-9) は対物 10 倍 (bar=90  $\mu\text{m}$ )、走査型電子顕微鏡 (SEM) は 3,000 倍 (bar=5  $\mu\text{m}$ ) でそれぞれ観察した。



## 2. MPC 処理による細菌バイオフィルム形成抑制効果

バイオフィルム量と相関するクリスタルバイオレット染色量は、未処理およびビタミン E 添加 CLPE に比べ、MPC 処理 CLPE では 1/100 未満であった (図 5)。

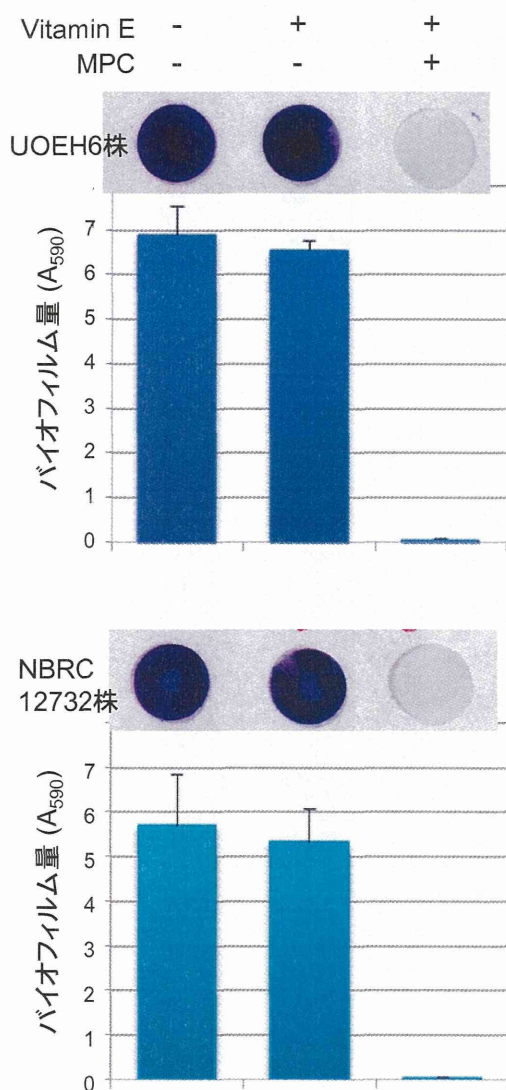


図 5. CLPE 表面に形成された黄色ブドウ球菌 UOEH6 株 (上) および NBRC12732 株 (下) のバイオフィルムのクリスタルバイオレット染色と定量

試験片表面の生菌数を図 6 に示す。未処理の試験片に比べ、MPC 処理した試験片では 10 分の 1 (NBRC12732 株) ~10,000 分の 1 (UOEH6 株) に減少していた。表面への菌の付着の程度と逆相関して、MPC 未処理表面に付着しなかった浮遊菌数が低下する傾向が見られた。

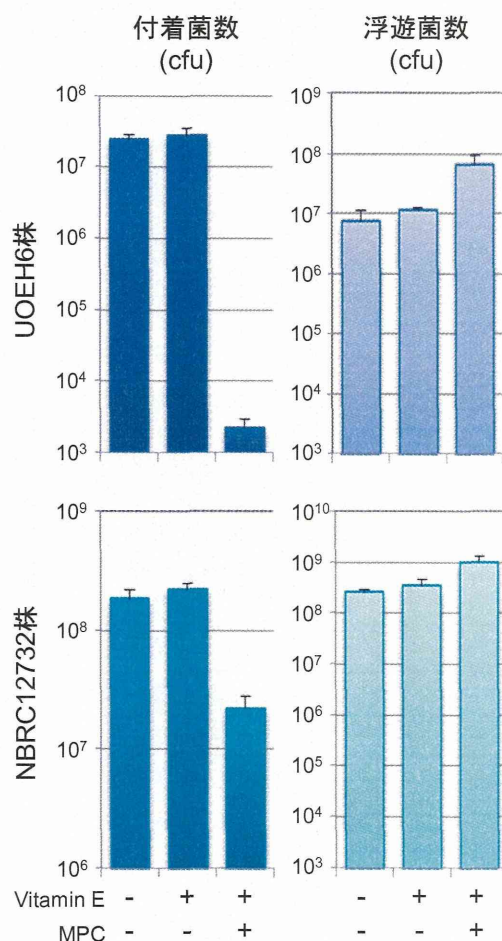


図 6. CLPE 表面のバイオフィルム中の黄色ブドウ球菌数 (左) と、バイオフィルム外の浮遊菌数 (右)

図 7 に示すとおり、MPC 未処理の試験片では、表面全体に付着している菌が蛍光顕微鏡下で観察されたが、MPC 処理された表面ではほとんど認められなかった。また、走査型電子顕

微鏡下、MPC 未処理表面でバイオフィルムの三次元的構造体が随所に観察されたのに対し、MPC 処理した試験片表面では、付着菌のみならず菌の残骸等もほとんど認められなかった。

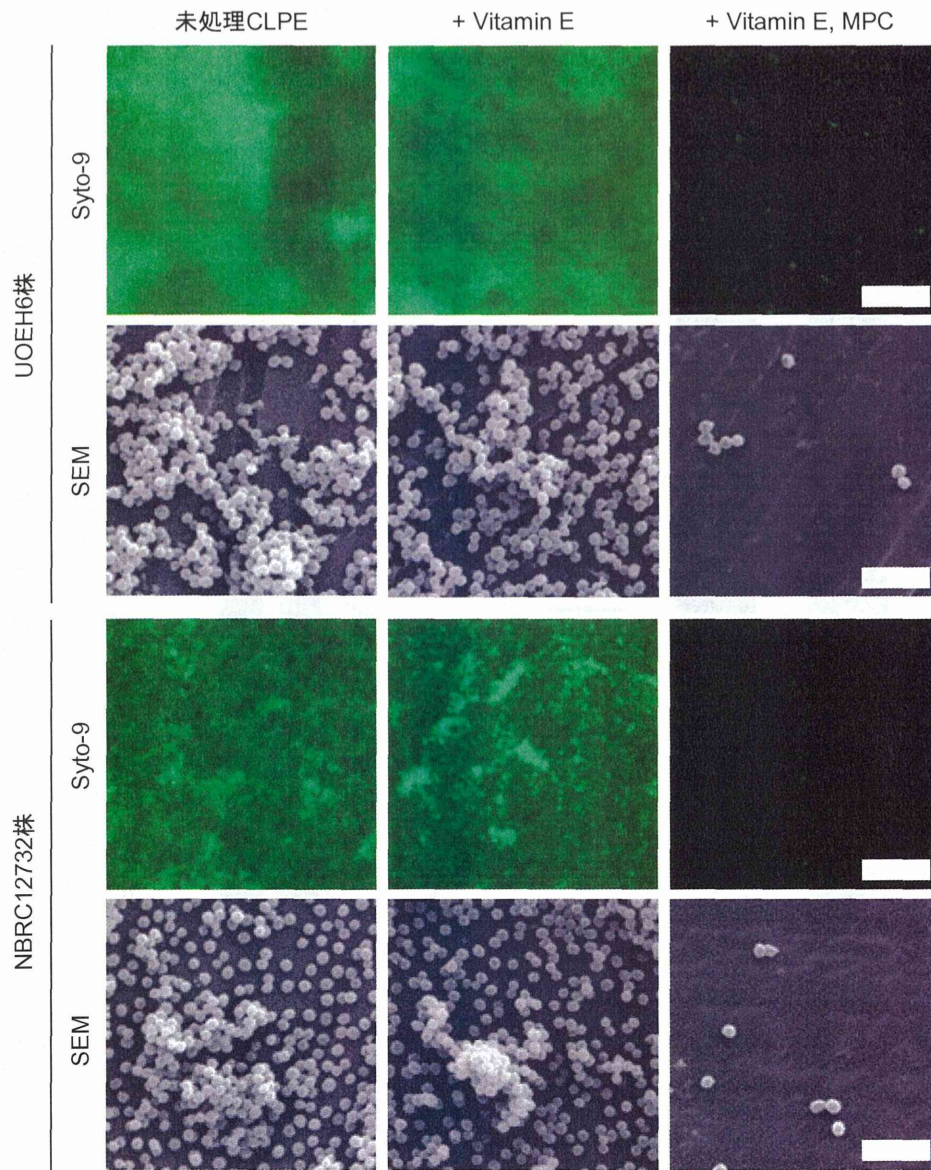


図 7. CLPE 表面に形成された黄色ブドウ球菌 UOEH6 株 (上) および NBRC12732 株 (下) のバイオフィルム。蛍光顕微鏡 (Syto-9) は対物 10 倍 (bar=90  $\mu\text{m}$ )、走査型電子顕微鏡 (SEM) は 3,000 倍 (bar=5  $\mu\text{m}$ ) でそれぞれ観察した。



### 3. MPC 処理による抗菌薬の作用増強効果

次に、抗菌薬の作用について検討した。24 時間の培養で CLPE 表面に形成されたバイオフィルムに対して、バンコマイシンを 24 時間作用させ、試験片表面を観察した結果を図 8 に示す。未処理 CLPE 表面のバイオフィルムに対して、4-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のバンコマイシン

(VCM) は、まったく無効であった。一方、2 日間の培養で、MPC 処理表面の NBRC12732 株の付着菌がやや増大したが、これが 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のバンコマイシンによってほぼ完全に除去されていた。UOEH6 株は 2 日間の培養でも MPC 処理表面に菌の付着はほとんど認められなかった。

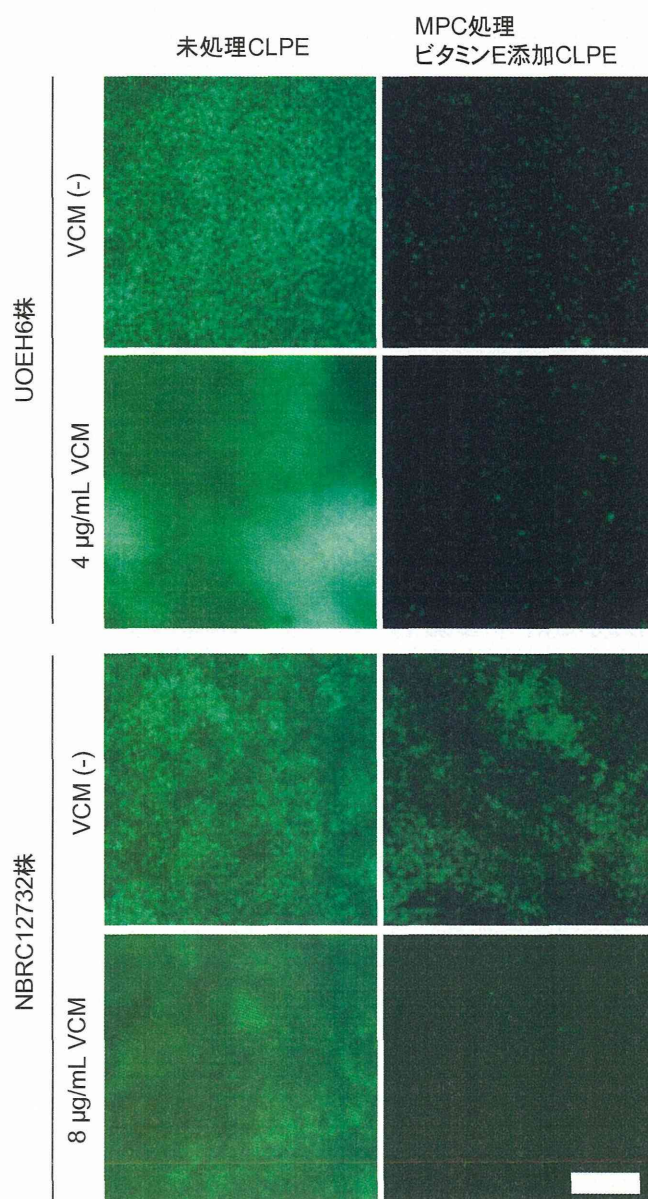


図 8. CLPE 表面の菌に対するバンコマイシンの作用 (対物 10 倍、bar=90  $\mu\text{m}$ )

#### D. 考察

MPC 処理は、黄色ブドウ球菌の CLPE 表面への付着を劇的に抑制した。さらに、MPC 処理表面にわずかに付着した黄色ブドウ球菌は、バイオフィルムを形成するには至らないことがわかった。MPC 処理が CLPE 表面に高親水性と双極性電荷を賦与することで黄色ブドウ球菌の菌体表面蛋白質の CLPE 表面への吸着を抑制し、黄色ブドウ球菌の定着そのものや、バイオフィルムの成熟が阻止されたものと推測される。

MPC 処理表面に生菌のみならず菌の残骸等も観察されないこと、および 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 処理による付着菌およびバイオフィルムの減少は、菌の殺滅によるものではなく、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。また、ビタミン E は、黄色ブドウ球菌の付着やバイオフィルム形成に対する影響はないと考えられる。

MPC 処理表面に付着した黄色ブドウ球菌を、バンコマイシンによって容易に除去することができた。このことは、万一感染が成立した場合でも抗菌薬により難渋なく治療できる可能性を示している。

#### E. 結論

MPC 処理は、黄色ブドウ球菌の菌体表層蛋白質の吸着を抑制することにより、ビタミン E 架橋ポリエチレン表面への細菌の付着を劇的に抑制し

バイオフィルム形成を阻害する。このことから、人工股関節のライナー表面に MPC 処理を施すことで、効果的に抗感染性を賦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) Shinonaga T, Tsukamoto M, Nagai A, Yamashiata K, Hanawa T, Matsushita N, Xie G, Abe N: Cell spreading on titanium dioxide film formed and modified with aerosol beam and femtosecond laser. *Appl. Surf. Sci.* 288, 649-653, 2014.
- 2) Hayashi R, Ueno T, Migita S, Tsutsumi Y, Doi H, Ogawa T, Hanawa T, Wakabayashi N: Hydrocarbon Deposition Attenuates Osteoblast Activity on Titanium. *J. Dent. Res.* 93, 698-703, 2014.
- 3) Nagai A, Suzuki Y, Tsutsumi Y, Nozaki K, Wada N, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K: Anodic oxidation of a Co-Ni-Cr-Mo alloy and its inhibitory effect on platelet activation. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102B: 659-666, 2014.
- 4) Niinomi M, Nakai M, Hieda J, Cho K, Goto T, Hanawa T: Biofunctional surface layer and its bonding strength in low modulus  $\beta$ -type titanium alloy

- for biomedical applications. *Mater. Sci. Forum* 783-786: 78-84, 2014.
- 5) Niiinomi M, Nakai M, Hieda J, Cho K, Kasuga T, Hattori T, Goto T, Hanawa T: A review of surface modification of a novel low modulus  $\beta$ -type titanium alloy for biomedical applications. *Int. J. Surf. Sci. Eng.* 8: 138-151, 2014.
- 6) Tsukamoto M, Miyamoto H, Ando Y, Noda I, Eto S, Akiyama T, Yonekura Y, Sonohata M, Mawatari M: Acute and subacute toxicity in vivo of thermal-sprayed silver containing hydroxyapatite coating in rat tibia. *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2014/902343, 2014.
- 7) Eto S, Miyamoto H, Shobuike T, Noda I, Akiyama T, Tsukamoto M, Ueno M, Someya S, Kawano S, Sonohata M, Mawatari M: Silver oxide-containing hydroxyapatite coating supports osteoblast function and enhances implant anchorage strength in rat femur. *J Orthop Res* (In press).
- 8) Kyomoto M, Shobuike T, Moro T, Yamane S, Takatori Y, Tanaka S, Miyamoto H, Ishihara K: Prevention of bacterial adherence and biofilm formation on a vitamin E-blended, cross-linked polyethylene surface with a poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) layer. *Acta Biomaterialia* (in contribution).
- 9) Niiinomi M, Nakai M, Hieda J, Cho K, Kasuga T, Hattori T, Goto T, Hanawa T: Enhancing biocompatibility of low modulus beta-type titanium alloy through bioactive ceramic and bio-polymer surface modification. *IJSURFSE* (in contribution).
- 10) 塙隆夫: 生体材料としてのチタン. *J. Bio-Integ.* 4: 135-142, 2014.
- 2.学会発表
- ① 国内学会
- 1) 福原佑介, 塙隆夫, 堤祐介, 陳鵬, 土居壽, 蘆田茉希, 井上祐貴, 石原一彦: MPC ポリマーの電着がチタン表面の血小板粘着に及ぼす効果. 日本金属学会 2014 年秋期 (第 155 回) 講演大会. 愛知, 9.24-26, 2014.
- 2) 西坂武, 堤祐介, 陳鵬, 蘆田茉希, 土居壽, 塙隆夫: チタン合金構成元素の生体成分反応性. 第 36 回日本バイオマテリアル学会. 東京, 11.17-18, 2014.
- 3) 福原佑介, 井上祐貴, 石原一彦, 堤祐介, 陳鵬, 永井亜希子, 塙隆夫: MPC ポリマー電着固定によるチタン表面の生体機能化. 第 36 回日本バイオマテリアル学会. 東京, 11.17-18, 2014.
- 4) 塙隆夫: 合金開発および表面改質による金属材料の生体機能化. 第 10 回医歯工融合セミナー. つくば, 12.17, 2014.
- 5) 塙隆夫: 医療用金属材料の表面改質. 第 89 回金属のアノード酸化

皮膜の機能化部会。東京, 1.30, 2015.

② 国際学会

- 1) Hanawa T: Electrochemical surface modification of titanium. Joint Symposium between Chulalongkorn University and IBB/TMDU on Biomedical Materials and Engineering. Bangkok, Thai, 10.27, 2014.
- 2) Hanawa T: Biofunctionalization of titanium with electrodeposition of biofunctional polymers. Project CNPq-JST – 3rd Project Meeting, Iguassu Falls, Brazil, 11.3, 2014.
- 3) Fukuhara Y, Inoue Y, Tsutsumi Y, Chen P, Ishihara K, Hanawa T: Electrodeposition of phospholipid polymer to titanium to improve the platelet adhesion. The 7th International Symposium on Surface Science(ISSS). Shimane, Japan, 11.2-6, 2014.
- 4) Niizeki N, Tsutsumi Y, Chen P, Ashida M, Doi H, Noda K, Hanawa T: Development of antibacterial titanium surface by simple electrochemical treatment. The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5). Tokyo, Japan, 11.19, 2014.
- 5) Tanaka Y, Tsutsumi Y, Chen P,

Ashida M, Doi H, Shimojo M, Hanawa T: Real-time analysis of protein adsorption behavior on metals by electrochemical impedance spectroscopy. The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5). Tokyo, Japan, 11.19, 2014.

- 6) Hanawa T: Development of new materials meeting clinical demand. BK21 Plus-Invited International Speaker's Seminar. Daegu, Korea, 12.18, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。