

処理により、ライナーの酸化を防止し、重量減少を顕著に抑制することができた。

MPC ポリマー処理ビタミン E 添加 CLPE は、きわめて高い酸化防止能力と耐摩耗性を併せ持つことがわかった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Hashimoto M: Evaluation method of artificial joint. *J Soc Inorg Mater Japan* 19: 480-485, 2012.
- 2) 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.
- 3) Kawashita M, Kamitani A, Miyazaki T, Matsui N, Li Z, Kanetaka H, Hashimoto M: Zeta potential of alumina powders with different crystalline phases in simulated body fluids. *Materials Science Engineering C* 32: 2617-2622, 2012.
- 4) Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T, Kanetaka H, Hashimoto M: MC3T3-E1 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. *Key Engineering Materials* 529-530: 365-369, 2012.
- 5) Hashimoto M, Hayashi K, Kitaoka S: A comparative hip joint simulator study of the wear, debris and metal ion release of CoCrMo / CoCrMo and CoCrMo / CL-UHMWPE couplings. *Nano Biomedicine* 5(1): 25-30, 2013.
- 6) Hashimoto, M, Hayashi, K, Kitaoka, S: Enhanced apatite formation on Ti metal heated in PO<sub>2</sub>-controlled nitrogen atmosphere. *Materials Science Engineering C* 33: 4155-4159, 2013.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Multidirectional wear and impact-to-wear tests of phospholipid-polymer-grafted and vitamin E-blended crosslinked polyethylene: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 473(3): 942-951, 2015.
  - 14) 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.
  - 15) 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).
  - 16) Ito H, Takatori Y, Moro T, Oshima H, Oka H, Tanaka S: Total hip arthroplasty after rotational acetabular osteotomy. *J Arthroplasty* (in press).
  - 17) 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).
- 18) Watanabe K, Kyomoto M, Saiga K, Taketomi S, Kadono Y, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K, Moro T: Effects of surface modification and bulk geometry on the biotribological behavior of cross-linked polyethylene: Wear testing and finite element analysis. *Biomed Res Int* (in contribution).
- 19) 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).
- 20) Yarimitsu S, Moro T, Kyomoto M, Watanabe K, Tanaka S, Ishihara K, Murakami T: Influences of dehydration and rehydration on the lubrication properties of phospholipid polymer grafted cross-linked polyethylene. *Proc Inst Mech Eng H* (in contribution).
- 21) 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.
- 2.学会発表
- ① 国内学会
- 1) 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, 7.19-21, 2012.
- 2) 林純平, 川下将一, 宮崎敏樹, 橋本雅美, 金高弘恭:  $\delta$ 型アルミナのアルブミン吸着挙動. 日本バイオマテリアル学会. 仙台, 11.26, 2012.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) 川下将一, 林純平, 工藤忠明, 金高弘恭, 李志霞, 宮崎敏樹, 橋本雅美: アルブミンを吸着させた水酸アパタイトおよび $\delta$ 型  $Al_2O_3$  に対する MC3T3-E1 および RAW264.7 細胞の応答. 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム. 長野, 9.4-6, 2013.
- 7) 橋本雅美, 林一美, 北岡諭, 金高弘恭: 酸化処理チタンに対する Rat-1 線維芽細胞の応答. 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム. 長野, 9.4-6, 2013.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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: 「パネルディスカッション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.
- 11) 山根史帆里, 京本政之, 渡辺健一, 茂呂徹, 田中栄, 石原一彦: ガスプラズマ滅菌による PMPC 処理架橋ポリエチレンの特性への効果. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会. 東京, 11.17-18, 2014.
- 12) 渡辺健一, 京本政之, 山根史帆里, 田中栄, 石原一彦, 茂呂徹: PMPC 処理を施したビタミン E 添加架橋ポリエチレンの摩耗特性. 第 41 回日本臨床バイオメカニクス学会. 奈良, 11.21-22, 2014.
- 13) 茂呂徹: ランチョンセミナー 「MPC ポリマー処理技術を応用した人工股関節の実用化研究と臨床成績」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会シンポジウム. 東京, 11.17-18, 2014.
- 14) 京本政之, 山根史帆里, 渡辺健一, 茂呂徹, 田中栄, 石原一彦: リン脂質ポリマー処理と抗酸化剤添加による次世代人工股関節ライナーの創出. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会. 東京, 11.17-18, 2014.
- 15) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 渡辺健一, 山根史帆里, 大嶋浩文, 毛利 貫人, 田中健之, 田中栄: MPC 処理を施した人工股関節の開発と臨床成績. 東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム 2015. 東京, 1.22, 2015.

- 16) 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.
- 17) 渡辺健一, 京本政之, 山根史帆里, 田中栄, 石原一彦, 茂呂徹: PMPC 処理を施したビタミン E 添加架橋ポリエチレンの耐衝撃摩耗特性. 第45回日本人工関節学会. 福岡, 2.27-28, 2015.
- 18) 上原周一郎, 鎗光清道, 茂呂徹, 京本政之, 渡辺健一, 田中栄, 石原一彦, 村上輝夫: リン脂質ポリマー処理架橋ポリエチレンの耐摩耗特性. 第35回バイオトライボロジシンポジウム. 福岡, 3.14, 2015.
- ② 国際学会
- 1) Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T, Kanetaka H, Hashimoto M: MC3T3-E1 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. 24th International Symposium of Ceramics in Medicine. Fukuoka, Japan, 8.21-24, 2012.
- 2) Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T, Kanetaka H, Hashimoto M: RAW264.7 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. Archives of BioCeramics Research Volume 12. Tainan, Taiwan, 11.18-21, 2012.
- 3) 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, 1.26-29, 2013.
- 4) 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.
- 5) Kawashita M, Hayashi J, Li Z, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H: Adsorption characteristics of bovine serum albumin on alumina particles with specific crystalline structure. 8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Sendai, Japan, 4.29-30, 2013.
- 6) Kawashita M, Hayashi J, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H: Zeta Potentials and

- Bovine Serum Albumin Adsorption of d-Alumina-Based Ceramic Particles. The European Society for Biomaterials 2013. Madrid, Spain, 9.8-12, 2013.
- 7) Kyomoto M, Moro T, Yamane S, Watanabe K, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Bio-inspired technologies with PMPC-grafting and vitamin E-blending make life-long durability of orthopedic bearings. 2014 ICJR Pan Pacific Congress. Kona, USA, 7.16-19, 2014.
  - 8) Moro T, Kyomoto M, Yamane S, Ishihara K, Takatori Y, Tanaka S: Clinical results of PMPC-grafted highly cross-linked polyethylene liners. 2014 ICJR Pan Pacific Congress. Kona, USA, 7.16-19, 2014.
  - 9) Moro T, Kyomoto M, Yamane S, Ishihara K, Takatori Y, Tanaka S: Effect of larger femoral head on the wear-resistance of the biocompatible PMPC-grafted highly cross-Linked polyethylene liner. 2014 ICJR Pan Pacific Congress. Kona, USA, 7.16-19, 2014.
  - 10) Yarimitsu S, Moro T, Kyomoto M, Oshima H, Tanaka S, Ishihara K, Murakami T: Influence of rehydration on lubrication property of phospholipid polymer grafted cross-linked polyethylene. The 15th International Union of Materials Research Societies (IUMRS)-International Conference in Asia (IUMRS-ICA) 2014. Fukuoka, Japan, 8.24-30, 2014.
  - 11) Yamane S, Kyomoto M, Watanabe K, Moro T, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K: Effects of gas plasma sterilization on wear resistance performance of PMPC-grafted cross-linked PE. 27th Annual Congress ISTA 2014. Kyoto, Japan, 9.24-27, 2014.
  - 12) Watanabe K, Kyomoto M, Yamane S, Ishihara K, Takatori Y, Tanaka S, Moro T: Impact-to-wear resistance of PMPC-grafted hydrated bearing surfaces determined using a pin-on-disk tester. 27th Annual Congress ISTA 2014. Kyoto, Japan, 9.24-27, 2014.
  - 13) Watanabe K, Kyomoto M, Yamane S, Ishihara K, Takatori Y, Tanaka S, Moro T: Tribological evaluation of PMPC-grafted hydrated bearing surface using multidirectional pin-on-disk tester. 27th Annual Congress ISTA 2014. Kyoto, Japan, 9.24-27, 2014.
  - 14) 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.

- 15) Kyomoto M, Moro T, Yamane S,  
Watanabe K, Tanaka S,  
Ishihara K: Reduction of in vivo  
oxidation induced by lipid  
absorption by phospholipid  
polymer grafting on orthopedic  
bearings. ORS 2015 Annual  
Meeting. Las Vegas, USA, 3.28-  
31, 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 埜 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：人工関節感染は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り、インプラントの抜去および再置換が必要となるなど長期予後を決する深刻な合併症である。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーは生体親和性材料のひとつで、MPC ポリマー表面では細胞の接着や活性化が抑制されることが明らかにされている。我々はこの点に着目して、人工股関節のライナー表面を MPC で表面処理することで、細菌の付着を抑制し、感染を制御することができるかどうかについて検討することにした。まず、MPC 処理をグラフトコーティング法で施したビタミン E 添加架橋ポリエチレンの表面特性を評価したところ、親水性の高い、電気的中性の表面を有し、蛋白質吸着を抑制することが明らかとなった。次に、細菌付着抑制効果、細菌バイオフィルムの抑制効果、抗菌薬の作用増強効果について検討した。その結果、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。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。以上の結果から、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、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。

A. 研究目的  
人工関節感染は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り、インプラントの抜去および再置換が必要となるなど長期予後を決する深刻な合併症である。バイ

オフィルム形成はインプラントへの細菌の付着が端緒となるが、これはインプラント表面と菌体表面蛋白質との相互作用することでおこる。したがって、インプラント表面への蛋白質吸着を抑制することができれば細菌の付着が阻止され、感染が防止できると期待される。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーは生体親和性材料のひとつで、MPC ポリマー表面では細胞の接着や活性化が抑制されることが明らかにされている。我々はこの点に着目して、人工股関節のライナー表面を MPC で表面処理することで、細菌の付着を抑制し、感染を制御することができるかどうかについて検討することにした。そのためにまず、MPC 処理をグラフトコーティング法で施したビタミン E 添加架橋ポリエチレンの表面特性を評価した。次に、細菌付着抑制効果、細菌バイオフィルムの抑制効果、抗菌薬の作用増強効果についての検討をおこなった。

## B. 研究方法

### 1. 蛋白質吸着抑制効果の検討

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、MPC ポリマーをグラフトコーティングした (MPC 処理)。

本研究では、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレンの水による静的なぬれ性 (静的表面接触角)、表面ゼータ電位およびビシニコニン酸 (BCA) Protein Assay 試薬による測定一にて評価を行った。

#### ① 接触角測定

未処理および MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の水による静的なぬれ性 (表面接触角) について、協和界面科学社製表面接触角測定装置 (DM300) を用い、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 の純水を滴下後、60 秒時点において測定した。



図 1. ゼータ電位・粒径測定システム

#### ② ゼータ電位測定

未処理および MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面の表面ゼータ電位について、大塚電子社製ゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-2、図 1) を用い、レーザードップラー法により評価した。大塚電子社製ポリスチレン製モニター粒子溶液を、10 mM

NaCl 水溶液で約 100 倍に希釈し、モニター用の電気泳動液とした。測定は、平均電場 17 V/cm、移動度測定は平板用セルユニット内 10 箇所（図 2）、室温にて行った。

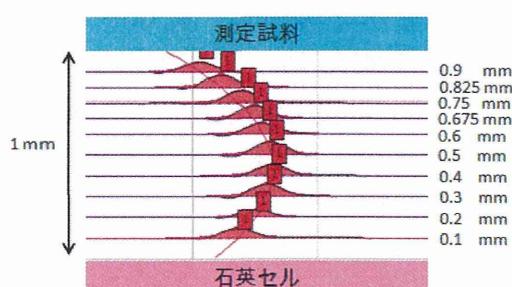


図 2. 平板用セルユニット内の移動度測定箇所

### ③ BCA 法による評価

CLPE 試験片表面への蛋白質吸着量を、ピシンコニン酸 (BCA) Protein Assay 試薬を用いて測定し、吸着抑制効果を評価した。

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。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) 溶液に、37°C で 1 時間浸漬させた。BSA 溶液は、ヒトの血漿の 10% の濃度になるように、それぞれ 4.5 g/L に調製した。浸漬後、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。試験片表面より引き剥がされた BSA の量は、micro-BCA Protein Assay 試薬 (#23235) を用いて、評価した。

## 2. 細菌付着抑制効果の検討

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。

細菌付着抑制効果は、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。

## 3. 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。

#### 4. 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。

#### 5. 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。

#### 6. 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 ( $n = 3$ )。

#### 7. 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. 蛋白質吸着試験

##### ① 接触角測定

未処理ビタミンE添加架橋ポリエチレン表面の水による静的表面接触角は約90°であったのに対し、MPC処理したその表面接触角は約35°であった(図3)。

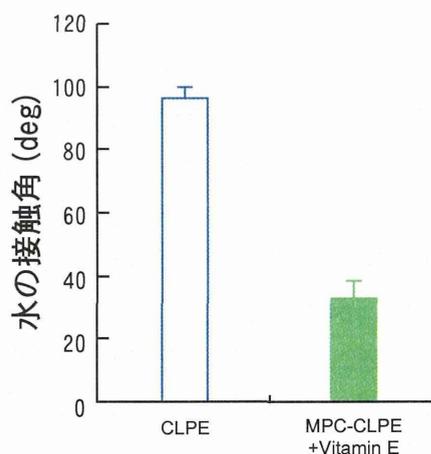


図3. MPC処理ビタミンE添加架橋ポリエチレン表面の水による静的表面接触角

##### ② ゼータ電位測定

未処理ビタミンE添加架橋ポリエ

チレン表面の表面ゼータ電位は-28.8~-24.2 と負に帯電していたのに対し、MPC 処理したそれは-0.8~0.1 と電氣的に中性であった (図 4)。

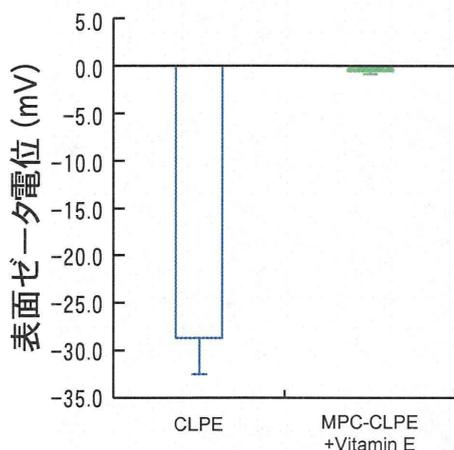


図 4. MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレン表面のゼータ電位

### ③ BCA 法による評価

図 5 に、BCA 法により評価した試験片表面の BSA 吸着量を示す。MPC 処理した CLPE 試験片表面に吸着した BSA 量は、未処理 CLPE 表面のそのの 1/6 程度であった (図 5)。

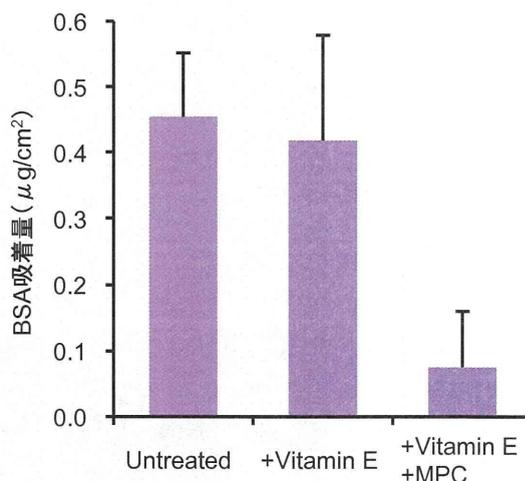


図 5. BCA 法により評価した CLPE 表面に吸着した BSA 量

## 2. 細菌付着抑制効果の検討

### (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 6 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。

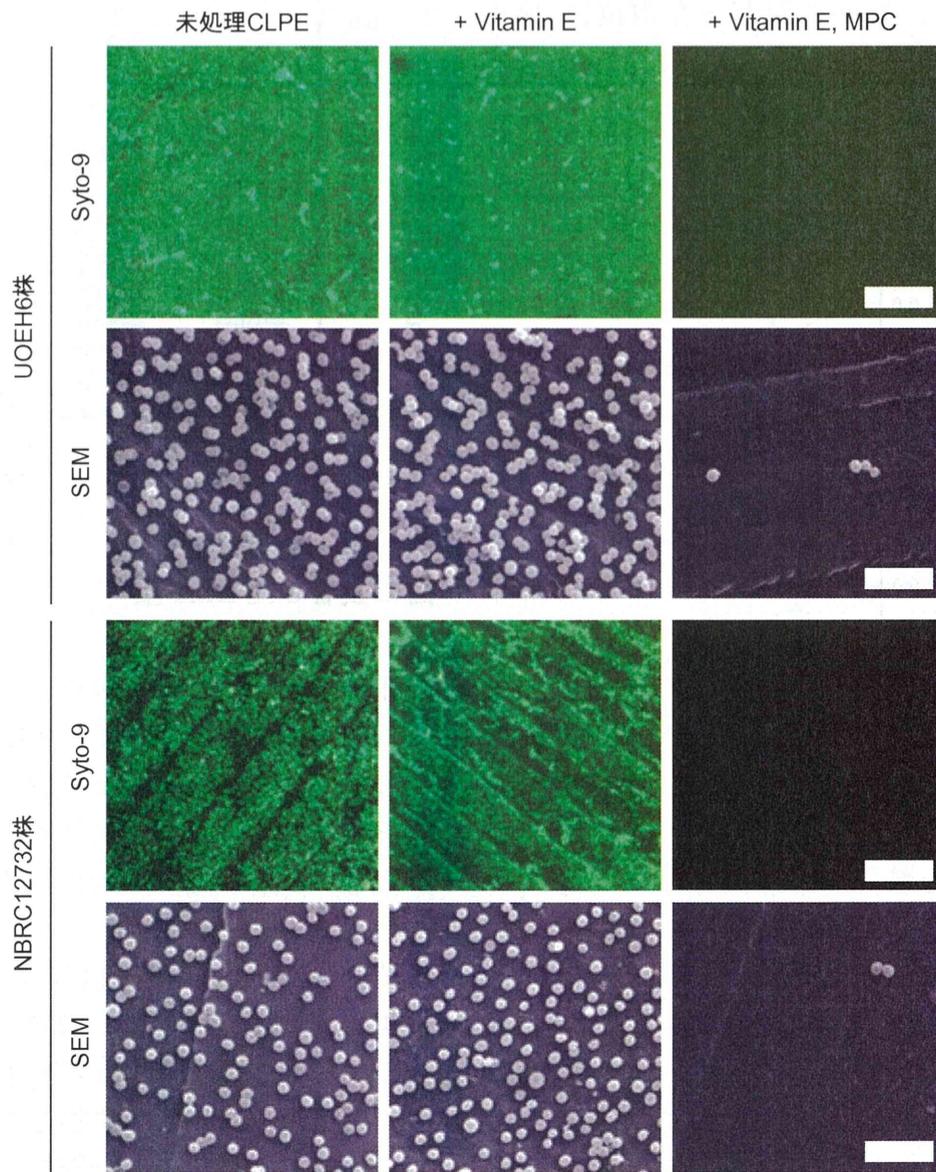


図 6. 静置条件下での CLPE 表面における黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株（上）および NBRC12732 株（下）の付着。蛍光顕微鏡（Syto-9）は対物 10 倍（bar=90  $\mu\text{m}$ ）、走査型電子顕微鏡（SEM）は 3,000 倍（bar=5  $\mu\text{m}$ ）でそれぞれ観察した。

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7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7下)。

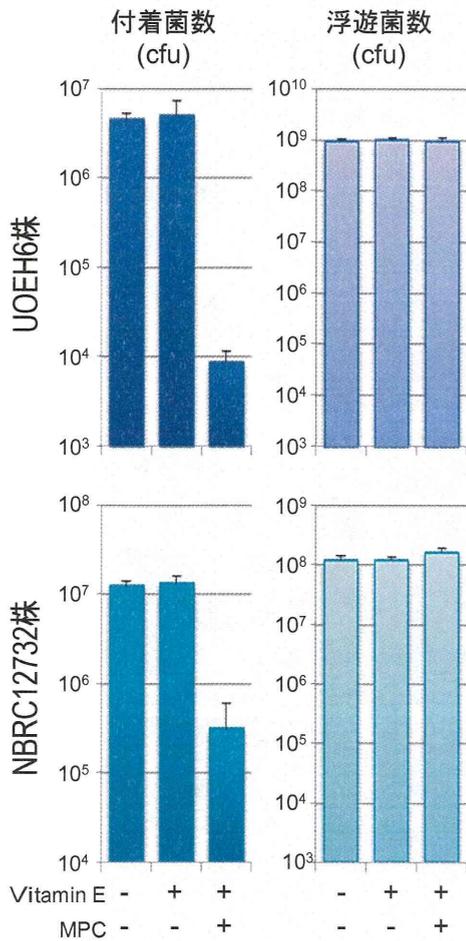


図7. 静置条件下で CLPE 表面に付着した黄色ブドウ球菌数 (左) と、付着しなかった浮遊菌数 (右)

(2) 激しい振盪下で付着させた場合  
 図8、図9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。

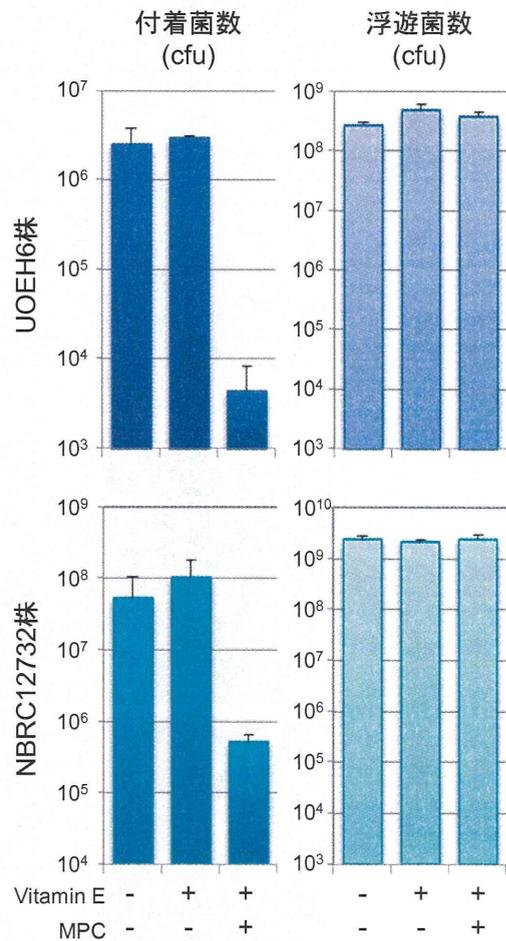


図8. 激しい振盪下で CLPE 表面に付着した黄色ブドウ球菌数 (左) と、付着しなかった浮遊菌数 (右)

図 9 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。

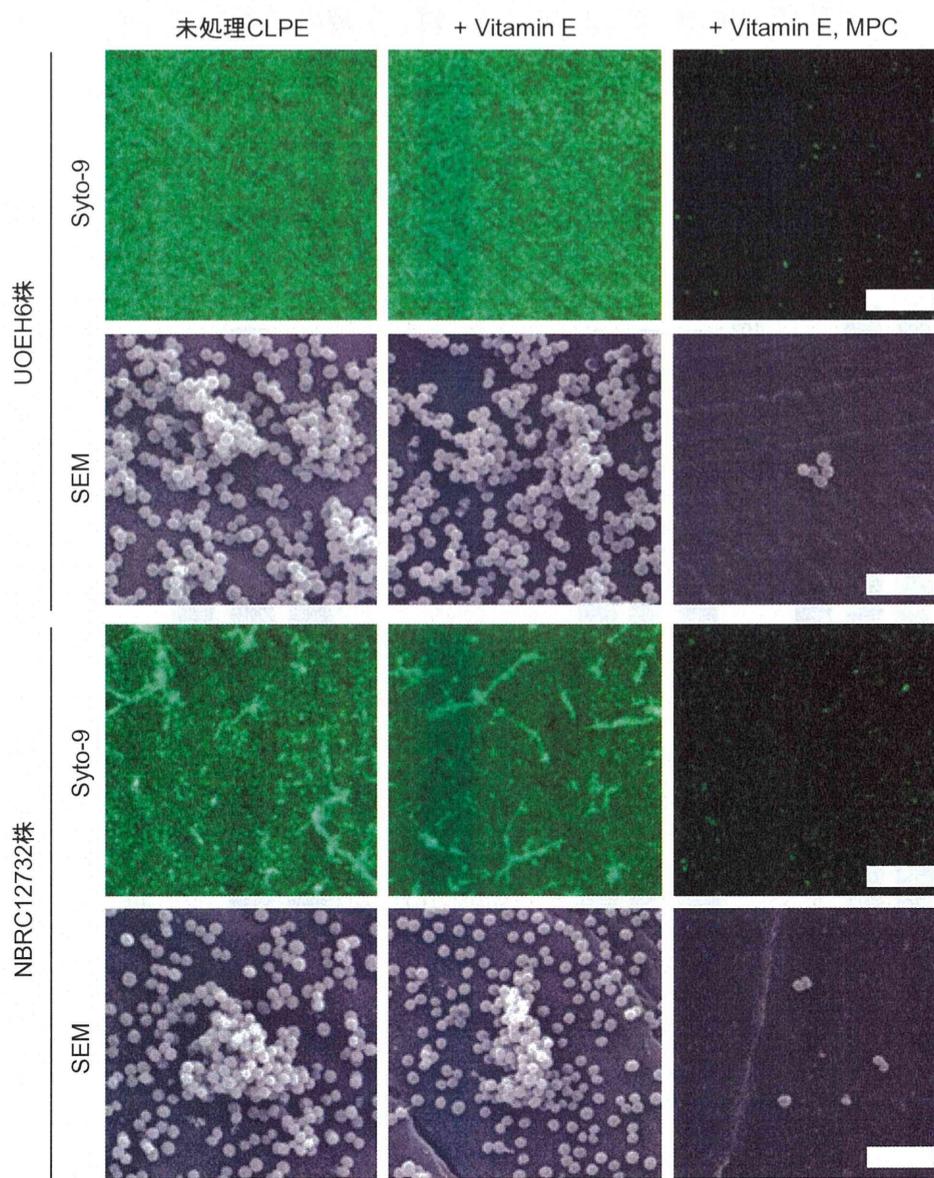


図 9. 激しい振盪下での CLPE 表面における黄色ブドウ球菌 UEOH-6 株（上）および NBRC12732 株（下）の付着。蛍光顕微鏡 (Syto-9) は対物 10 倍 (bar=90  $\mu\text{m}$ )、走査型電子顕微鏡 (SEM) は 3,000 倍 (bar=5  $\mu\text{m}$ ) でそれぞれ観察した。

### 3. MPC 処理による細菌バイオフィルム形成抑制効果

次に、バイオフィルム形成条件下、各試験片表面で菌を培養した。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 10)。

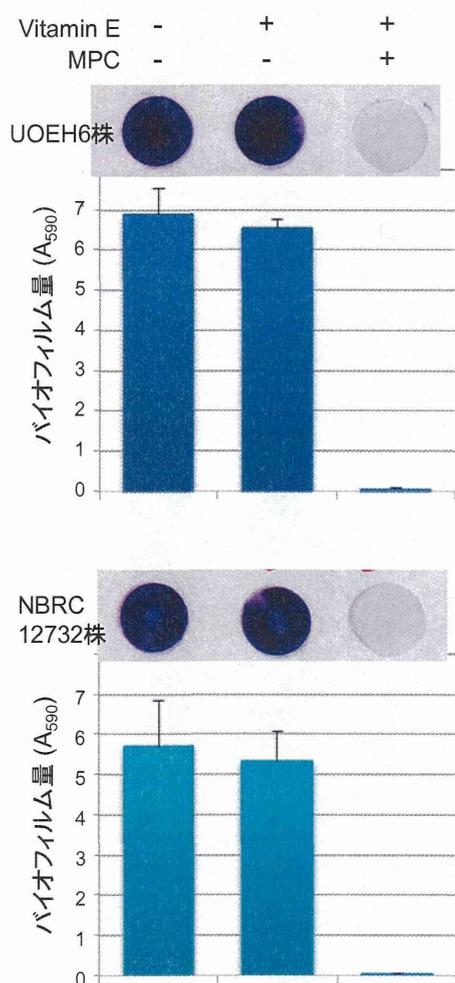


図 10. CLPE 表面に形成された黄色ブドウ球菌 UOEH6 株 (上) および NBRC12732 株 (下) のバイオフィルムのクリスタルバイオレット染色と定量

試験片表面の生菌数を図 11 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。

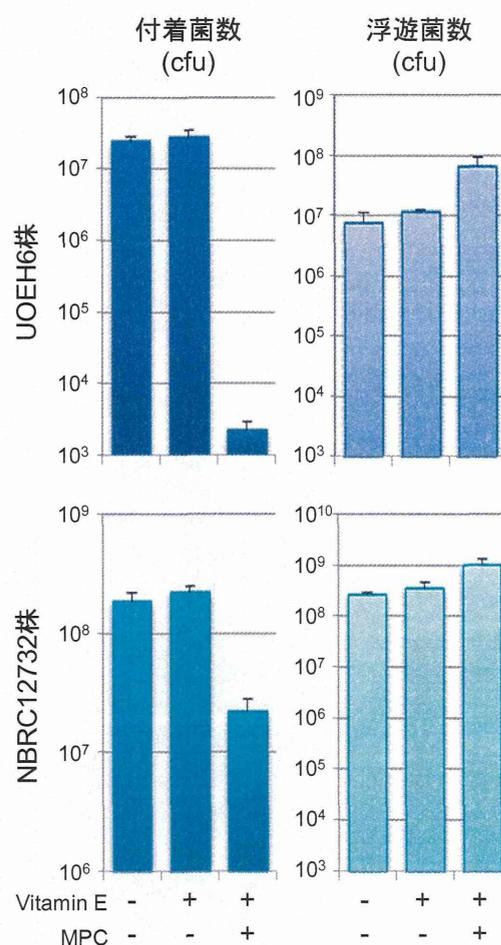


図 11. CLPE 表面のバイオフィルム中の黄色ブドウ球菌数 (左) と、バイオフィルム外の浮遊菌数 (右)

図 12 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。

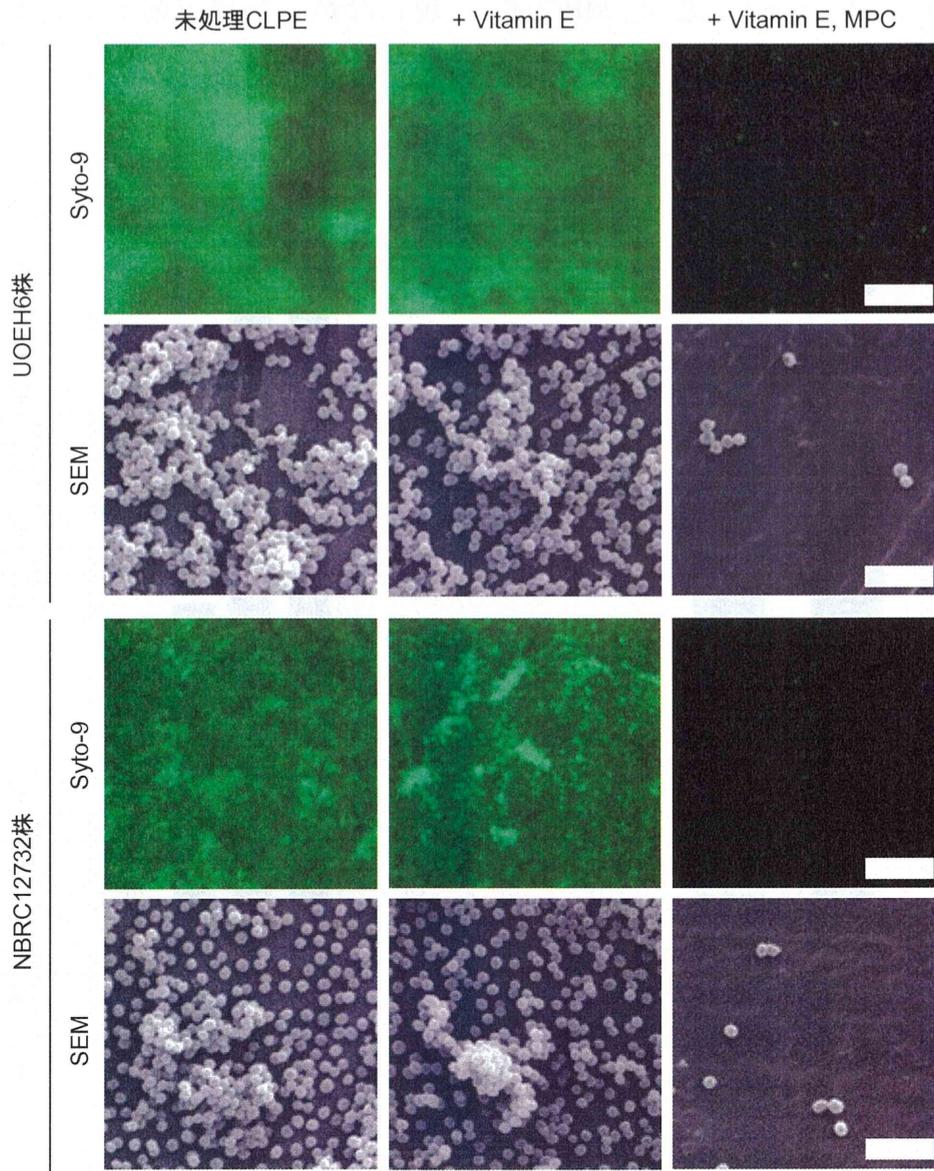


図 12. CLPE 表面に形成された黄色ブドウ球菌 UOEH6 株(上)および NBRC12732 株(下)のバイオフィルム。蛍光顕微鏡 (Syto-9) は対物 10 倍 (bar=90  $\mu\text{m}$ )、走査型電子顕微鏡 (SEM) は 3,000 倍 (bar=5  $\mu\text{m}$ ) でそれぞれ観察した。

#### 4. MPC 処理による抗菌薬の作用増強効果

バイオフィルム内部の菌に対しては抗菌薬が作用しづらいことが知られているが、MPC 処理はバイオフィルムの成熟を阻止することで抗菌薬が作用しやすいように働くと考えられる。そこで、MPC 処理表面における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13に示す。未処理CLPE表面のバイオフィルムに対して、4-8  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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。

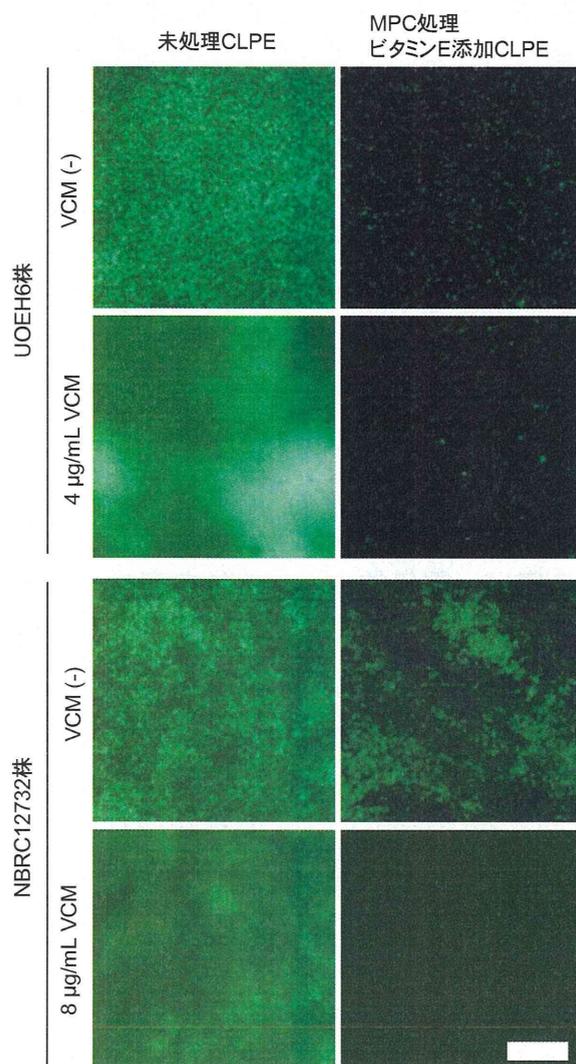


図13. CLPE 表面の菌に対するバンコマイシンの作用 (対物10倍、bar=90  $\mu\text{m}$ )

#### D. 考察

MPC ポリマーは、生体の細胞膜表面と同様のホスホリルコリン基を有するため、異物としての認識を受けにくく、優れた生体親和性を発揮する。これまでに、MPC ポリマー表面では細胞の接着・活性化、タンパクの吸着、血栓の形成が抑制されることが明らかになっている。これらの特性を利用した様々な医療デバイスが開発されており、国内外で実用化されるなど、MPC ポリマーの生体内での安全性と機能性は確認されている。

インプラントへの細菌の付着は、インプラント表面への細菌表層蛋白質の吸着が端緒となる。そこで、蛋白質吸着に影響を与える材料表面の親水性と表面電荷を評価することは極めて重要である。本研究では、MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレンの水による静的なぬれ性（静的表面接触角）、表面ゼータ電位、BCA 法について評価を行った。この結果、MPC 処理ビタミン E 添加架橋ポリエチレンの表面は、親水性の高い、電気的中性の表面を有していること、蛋白質の吸着が抑制されることが明らかとなり、表面への細菌の付着および続発する感染を制御できる可能性が強く示唆された。

実際、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。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。バイオフィルム内部の菌に対しては、バイオフィルムがバリアとして働くために抗菌薬が作用しづらいことが知られているが、MPC 処理は、それ自体に殺菌作用はないものの、バイオフィルムの成熟を阻止することで抗菌薬が作用しやすいように働くと考えられる。これを裏付けるように、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できることが確認できた。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) Nam K, Tsutsumi Y, Yoshikawa C, Tanaka Y, Fukaya R, Kimura T, Hanawa T, Kishida A: Preparation of novel polymer- metal oxide nanocomposites with nanophase separated hierarchical structure. *Bull Mater Sci* 34(7): 1289-1296, 2011.
- 2) Ma C, Nagai A, Yamazaki Y, Toyama T, Tsutsumi Y, Hanawa T, Wang W, Yamashita K: Electrically polarized micro-arc oxidized TiO<sub>2</sub> coatings with enhanced surface hydrophilicity. *Act Biomater* 8: 860-5, 2012.
- 3) Hieda J, Niinomi M, Nakai M, Kamura H, Tsutsumi H, Hanawa T: Effect of terminal functional groups of silane layers on adhesive strength between biomedical Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy and segment polyurethanes. *Surf Coat Technol* 206: 3137-41, 2012.
- 4) Nagai A, Tsutsumi Y, Suzuki Y, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K: Characterization of air-formed surface oxide film on a Co-Ni-Cr-Mo alloy (MP35N) and its change in Hanks' solution. *Appl Surf Sci* 258: 5490-8, 2012.
- 5) Tsutsumi Y, Bartakova S, Prachar P, Suyalatu, Migita S, Doi H, Nomura N, Hanawa T: Long-term corrosion behavior biocompatible b -type Ti alloy in simulated body fluid. *J Electrochem Soc* 159: C435-40, 2012.
- 6) Akazawa T, Murata M, Tazaki J, Hino J, Nakamura K, Yoshinari S, Tabata Y, Hanawa T, Takahata M, Iwasakai N, Ito M, Ohmori T, Yamachika H, Kikuchi M: Characterization of bio-absorbable and biomimetic granules produced from animal bone by the high velocity rotation-crushing and demineralizing technique. *Phosphate Res Bull* 26: 65-70, 2012.
- 7) Katagiri N, Shobuie 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.
- 8) Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H: Nocardia elegans infection involving purulent arthritis in humans. *J Infection and*