

# 骨・関節領域感染制御のための バイオマテリアル開発

島袋 将 弥\*

## 1. はじめに

骨組織は自重支持や臓器保護といった力学機能に加え、代謝機能、造血機能を有する重要組織である。骨・関節疾患治療では、骨組織の搔爬あるいは切除によって骨欠損が生じ、骨組織が本来有していた機能を結果的に損失してしまうことがある。このような場合、骨欠損の規模や治療目的に応じて、人工関節あるいは人工骨を用いた骨組織再建が必要となる。人工関節や人工骨の素材には、主に金属材料や無機材料が利用されており、代表例としてチタンやリン酸カルシウムが挙げられる。チタンやリン酸カルシウムは、細胞の生育や組織形成の足場として機能し、材料埋入部位近傍の骨組織を再建することができる。一方、これらの材料は、細胞のみならず細菌の生育や後述のバイオフィーム形成の足場としても機能してしまう。このため、材料表面に細菌が接着すると、骨・関節領域における感染症が惹起される。

人工関節周囲感染、骨折関連感染、骨髄炎は代表的な骨・関節領域感染症である。これらの感染症の発症要因の1つとして、材料や壊死骨上におけるバイオフィーム形成(図1)が挙げられる。バイオフィームは細菌とその分泌物である細胞外高分子物質(EPS)が一体化した3次元構造体であり、構造内の細菌を薬剤や免疫応答から保護する特性を有する<sup>(1)</sup>。この特性により、診断・治療技術が発展した今日においても、骨・関節領域感染症は難治性である場合が多く、骨組織の喪失を伴う重篤な機能障害を惹起してしまう。さらに骨・関節領域感染症治療では、抗生物質の投与や入院期間の長期化によって医療費が激増してしまう。このため、人工関節・人工骨開発においては、細胞生育や骨組織形成に有益な

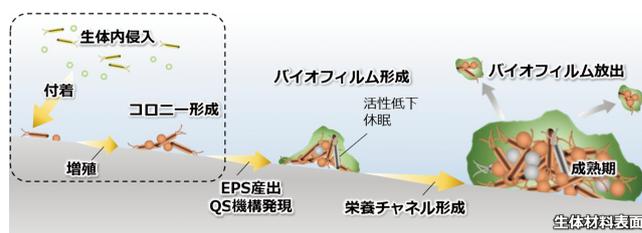


図1 材料表面におけるバイオフィーム形成の概略図<sup>(2)</sup>。材料表面への浮遊細菌の接着を開始点とし、増殖とともにEPSを産出することで最終的にバイオフィームが形成される。バイオフィームが成熟すると、凝集体の一部を外部へ放出するため、広範囲で感染が起こる。図中破線部は形成初期に分類される。(QS:クオラムセンシング(細菌間のコミュニケーション))(オンラインカラー)

性質だけでなく、細菌の生育を抑制し、その後のバイオフィーム形成を防止する性質が要求される。

## 2. 骨・関節領域感染制御のための材料設計

バイオフィーム形成を効果的に防止する性質として、抗付着性(Anti-biofouling property)あるいは抗菌性(Antibacterial property)が挙げられる。本稿では、抗付着性と抗菌性を、細菌の死滅の有無によって分類した。

抗付着性は細菌接着を抑制する性質であり、細菌の死滅を伴うことはない。これまでのところ、機能性分子を固定化することにより、材料表面への抗付着性付与がなされている。一方、抗付着性を人工関節や人工骨に付与する場合は、骨組織を形成する骨芽細胞の接着をも抑制してしまうことが課題として挙げられる<sup>(3)</sup>。抗菌性は細菌増殖を抑制する性質であ

\* 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所；助教(〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10)  
Development of Biomaterials for Infection Control in Bone and Joint Area; Masaya Shimabukuro\*(<sup>\*</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo)  
Keywords: antibacterial biomaterial, antibacterial scaffold, titanium, apatite, surface modification  
2024年1月19日受理[doi:10.2320/materia.63.243]



図2 純銅をラット頭蓋冠上に4週間設置した検体のHematoxylin-eosin(HE)染色標本. 図中破線で囲んだ領域は骨吸収部を示す. (文献(4)より改変)(オンラインカラー)

り, 材料表面に接着した細菌や表面近傍の細菌を死滅させることができる. 材料表面への抗菌性付与においては, 有機系あるいは無機系抗菌剤を用いる手法が主流である. とりわけ, 無機系抗菌剤である銀, 銅およびそれらの化合物は, 骨・関節領域感染症の原因菌である表皮ブドウ球菌, 黄色ブドウ球菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を含む様々な細菌の増殖を抑制することができる. 一方, 無機系抗菌剤は細胞や生体組織に対して毒性や悪影響を及ぼすことが知られている. 例えば, 純銅は主として表面からの銅イオン溶出によってMRSAの増殖を抑制するが, 同様の理由で骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞の増殖も抑制してしまう. このため, 細菌と細胞は, いずれも純銅表面で増殖することはできない. さらに純銅をラットの頭蓋冠上に設置すると, 4週間経過時点で骨組織は形成されず, 図2の破線部で示したような骨吸収が起きてしまう<sup>(4)</sup>. すなわち, 無機系抗菌剤を人工関節・人工骨として単独使用すると, 抗菌性と骨形成能を両立することはできない. 一方, Liらによれば, MC3T3-E1細胞に対する銅イオンの半数阻害濃度は $135 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ であるのに対し, 黄色ブドウ球菌や大腸菌の増殖を抑制する銅イオン濃度は $37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ と報告されている<sup>(5)</sup>. すなわち, 無機系抗菌剤に対する細菌と細胞の感受性には相違があり, 至適量の無機系抗菌剤は, 細菌増殖のみを抑制することができる. 筆者はこれまでに, 細菌と細胞の感受性の相違に基づいて, チタンやリン酸カルシウムへの抗菌性付与に取り組んできた. 本稿では, 抗菌性付与手法や, 感染予防における抗菌性材料の有効性を検討した結果について紹介する. また, 抗菌性付与手法については優れた文献があるので, ご興味のある読者はこちらも参照されたい<sup>(6)-(8)</sup>.

### 3. チタン表面への抗菌性ポーラス酸化物層形成

ここでは, 電気化学的処理によるチタン表面への抗菌性ポーラス酸化物層形成について紹介したい. 人工関節の素材には, 優れた機械的強度と破壊韌性に加え, 生体内で良好な耐食性を示す金属材料が使用されている. とくに人工股関節のステム部など, 骨組織と接触する部位においては, チタンや

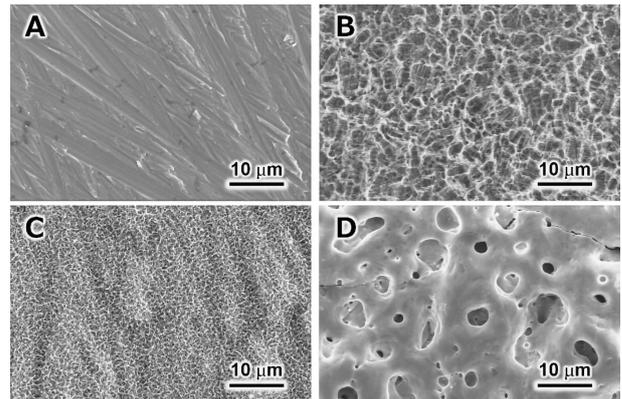


図3 代表的な表面処理技術(ウェットプロセス)を施したチタン表面のSEM像. 処理前(未処理)(A), 酸エッチング後(B), アルカリ加熱後(C), マイクロアーク酸化後(D).

チタン基合金が応用されている<sup>(9)</sup>. これはチタンが比較的骨組織との密着性に優れることに起因する. また図3のように, 種々の表面処理技術によってチタン表面を多孔質化あるいは粗造化すると, 骨との密着性を劇的に向上することができる. 一方, 多孔質化あるいは粗造化したチタン表面は, 平滑面よりも黄色ブドウ球菌の増殖を促進することが報告されている<sup>(10)</sup>. このため, 早期の骨組織再建と感染予防においては, 多孔質化あるいは粗造化したチタン表面に抗菌性を付与することが理想的である.

電気化学的処理であるマイクロアーク酸化は, 絶縁破壊現象を伴う陽極酸化処理であり, チタンをはじめとするバルブメタル(弁金属)表面に, 電解浴と基板成分からなるポーラス金属酸化物層を形成することができる. カルシウムイオンとリン酸イオンを含んだ電解浴中におけるマイクロアーク酸化をチタンに施すと, チタン表面にはリン酸カルシウムを含有したポーラスチタン酸化物層( $\text{pTiO}_2$ )が形成される(図3(D)). また $\text{pTiO}_2$ の構造(孔サイズ・表面粗さ・膜厚)は, 上限電圧, 電流密度といった処理条件によって制御できるため, マイクロアーク酸化はチタン表面の組成および微細構造制御に有用な手法である. また図4に示すように, リン酸カルシウムを含有した $\text{pTiO}_2$ は良好な骨-インプラント接触率を示し, 骨組織との密着性に優れている. このため, マイクロアーク酸化は, 歯科インプラントの歯根部に適応されており, 表面にポーラス酸化物層を有した歯科インプラントが上市されている.

筆者はマイクロアーク酸化の特性を利用し, チタン表面への抗菌性付与を試みた. まず,  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ の酢酸カルシウムと $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ のグリセロリン酸カルシウムからなる電解浴中に $0 \sim 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ の硝酸銀を添加した溶液を用いて, チタン表面にマイクロアーク酸化を施した. 種々の表面分析の結果から, チタン表面にはリン酸カルシウムと酸化銀を含有した $\text{pTiO}_2$ が形成されていた. また各条件で形成した $\text{pTiO}_2$ の抗菌性と骨形成能は, 電解浴中の硝酸銀濃度に応じて変化した.  $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ の条件と比較すると, 2.5

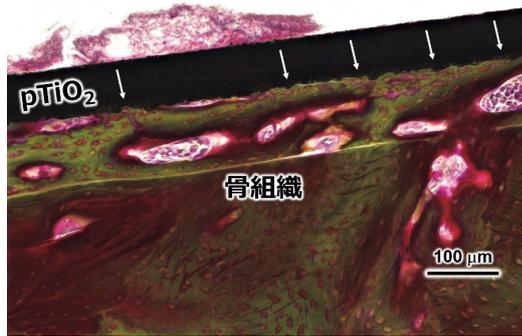


図4 カルシウムイオンとリン酸イオンを含んだ電解浴中におけるマイクロアーク酸化によってpTiO<sub>2</sub>を形成したチタン箔をラット頭蓋冠上に4週間設置した検体のVillanueva-Goldner染色標本. 図中の黒色部は試料を示し, 白色の矢印部分でpTiO<sub>2</sub>と骨組織とが直接密着している. (オンラインカラー)

mmol · L<sup>-1</sup>の条件では, 大腸菌の増殖を99%以上抑制したが, MC3T3-E1細胞の増殖も50%以上抑制した. 一方, 0.5 mmol · L<sup>-1</sup>以下の条件になるとMC3T3-E1細胞の増殖, 骨分化に対する悪影響は観察されず, 表面の多孔質化によって平滑なチタン(未処理試料)よりも石灰化を促進した. また0.05 mmol · L<sup>-1</sup>以上の条件であれば, 大腸菌の増殖を99%以上抑制することがわかった. これらの性質の変化は, 電解浴中の硝酸銀濃度に応じてpTiO<sub>2</sub>中のAg<sub>2</sub>O含有量が変化したことに起因していた. したがって, 適切な硝酸銀濃度条件(0.05-0.5 mmol · L<sup>-1</sup>)でマイクロアーク酸化を行うと, 抗菌性と骨形成能を両立したpTiO<sub>2</sub>をチタン表面に形成することができる<sup>(11)</sup>.

陽極酸化によって形成された酸化皮膜が整流作用を示す場合, その金属は弁金属に分類される. マイクロアーク酸化はチタンをはじめとする弁金属に適応可能である. 2.5 mmol · L<sup>-1</sup>の硝酸銀を含む電解浴中でジルコニウム表面にマイクロアーク酸化を施すと, ジルコニウム表面においても, ポーラスジルコニウム酸化物層(pZrO<sub>2</sub>)を形成することができる. ただし, pZrO<sub>2</sub>中の銀の存在状態は, Ag<sub>2</sub>Oと金属銀(Ag<sup>0</sup>)の中間的な状態である可能性が高い(図5). pTiO<sub>2</sub>とpZrO<sub>2</sub>中の銀の存在状態の相違によって, 試料表面から溶出する銀イオン量が異なるため, 金属基板によって細胞や細菌の応答が変化することを最近報告した<sup>(12)</sup>. また弁金属としての特性を反映し, pTiO<sub>2</sub>は整流作用を示すため, カソード反応を利用することで, pTiO<sub>2</sub>上に無機系抗菌剤を担持することができる. カソード反応により至適量の銅を担持したpTiO<sub>2</sub>は, 抗菌性と骨形成能を両立することができる<sup>(13)</sup>.

#### 4. 抗菌性炭酸アパタイトハニカム

さて, ここからはリン酸カルシウムへの抗菌性付与について紹介したい. 炭酸アパタイト(Ca<sub>10-a</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6-b</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>c</sub>)は, 骨の無機成分と類似組成を示し, 優れた骨形成能を示す

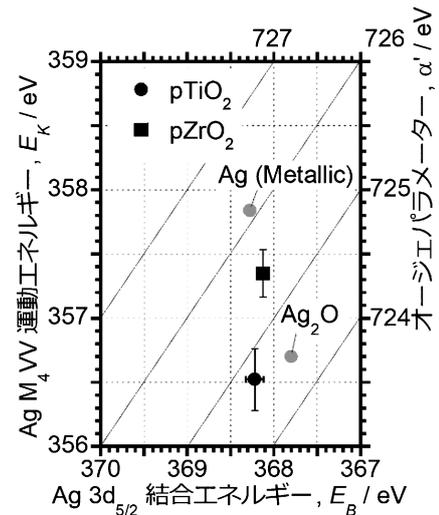


図5 Ag<sup>0</sup>, Ag<sub>2</sub>O, およびpTiO<sub>2</sub>あるいはpZrO<sub>2</sub>中に存在するAgのワグナープロット. 図中に示された斜線はオージェパラメーター(α')軸を示す. pTiO<sub>2</sub>とpZrO<sub>2</sub>間の化学シフトは0.1 eVであったが, α'は0.8 eVの差があった. pZrO<sub>2</sub>のα'は, Ag<sup>0</sup>とAg<sub>2</sub>Oのα'の中間的な位置にあった. (文献(12)より改変)

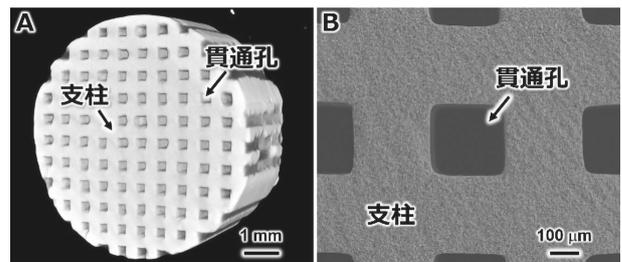


図6 炭酸アパタイトハニカムのマイクロコンピューター断層撮影(μCT)(A)像とSEM像(B).

ことに加え, 骨リモデリングに調和して新生骨へと置き換わる性質(生体吸収性)を有する<sup>(14)</sup>. 2018年には, 歯科インプラント治療で使用できる人工骨として上市されている. また炭酸アパタイトは, 前駆体を用いた溶解-析出法によって調製することができる. 溶解-析出法では, 前駆体である炭酸カルシウムのマクロ構造を維持したまま, 炭酸アパタイトへと組成を変換することができるため, 炭酸アパタイトからなる様々な形状の三次元構造体を作製することができる<sup>(15)-(17)</sup>. とりわけ, 一軸貫通孔を有するハニカム構造体(図6)は, 高気孔率でありながら比較的優れた強度を示す. さらにハニカム構造の孔サイズは, 骨形成に多大な影響を及ぼすことがHayashiらによって報告されている<sup>(18)-(20)</sup>. ここでは, 炭酸アパタイトハニカム(HCS)表面への金属リン酸塩修飾について紹介したい<sup>(21)(22)</sup>. 炭酸アパタイトを適切な条件の銀イオン含有溶液に浸漬すると, マクロ構造を維持しつつも, 炭酸アパタイト表面にリン酸銀(Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)を修飾することができる. さらにAg<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>含有量の制御によって抗菌性と骨形成能の両立が達成されている<sup>(23)</sup>. このため, HCS表面に至適量のAg<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を修飾することで, HCSが抗

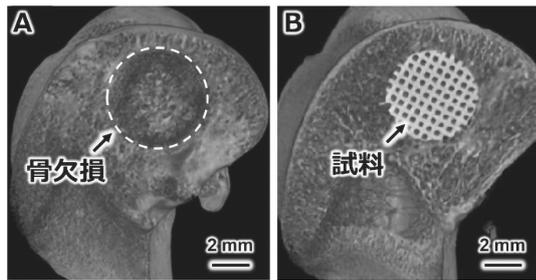


図7 骨欠損を作製した大腿骨内側上顆(A)と骨欠損中に試料を埋入した大腿骨内側上顆(B)の $\mu$ CT像。

菌性と骨形成能を両立する可能性がある。

HCSを $0.01\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の硝酸銀溶液に浸漬し、 $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 修飾量の異なるAg-HCSを作製した。*in vitro*試験によって各条件で作製した試料の抗菌性と骨形成能を評価し、最適な処理条件を探索した。その結果、 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下の条件で作製したAg-HCSが、抗菌性と骨形成能を両立することがわかった。感染予防と骨組織再建におけるAg-HCSの有効性を明らかにするために、Yangらの実験モデル<sup>(24)</sup>を一部改変し、MRSAを用いた感染動物実験を実施した。同実験モデルでは、ウサギ大腿骨内側上顆に直径6mm・深さ3mmの円柱状骨欠損(図7(A))を作製し、埋入直前に、MRSAの菌液中に10分間浸漬したAg-HCSあるいはHCSを用いて骨組織再建を試みた(図7(B))。

埋入2週間後の術部を観察すると、Ag-HCS群では感染の所見は観察されなかったが、HCS群では膿瘍の形成が観察された。また、試料とその近傍を摘出・粉砕し、試料埋入部位近傍の生菌数を測定した。Ag-HCS群では、MRSAは検出されなかったが、HCS群ではMRSAが検出された。図8にAg-HCSあるいはHCSを2週間埋入した検体のHE染色標本とGiemsa染色標本を示す。図8(a)よりAg-HCS近傍では炎症の所見は観察されず、貫通孔内部では支柱を沿うように骨が形成され、試料側面と骨組織が密着していることがわかった(図8(a-1), (a-2))。また骨膜側では間葉組織の浸潤が観察された(図8(a-3))。Giemsa染色標本では、貫通孔内部におけるMRSAの存在は認められなかった(図8(a-4))。一方、図8(b)よりHCS近傍では大規模な骨吸収が観察され、試料周囲における炎症性細胞の浸潤(図8(b-1))や、貫通孔内における腐骨形成が認められた(図8(b-2), (b-3))。またGiemsa染色標本では、貫通孔内部にMRSAの存在が認められた(図8(b-4))。これらの結果から、HCS群では細菌感染が惹起され、骨組織再建を達成することはできなかった。また興味深い現象として、図8(b-3)では腐骨や細菌が凝集しており、貫通孔を介して、骨組織内部から骨膜側へと腐骨や細菌が排出されていた。すなわち、HCSはその構造機能によって細菌や腐骨を組織外へと排出することができ、その結果、膿瘍を形成したと考えられる。一方、Ag-HCS群からは、感染や炎症の所見は観察されず、試料側面や内部で骨組織が形成されていた。このため、至適量の

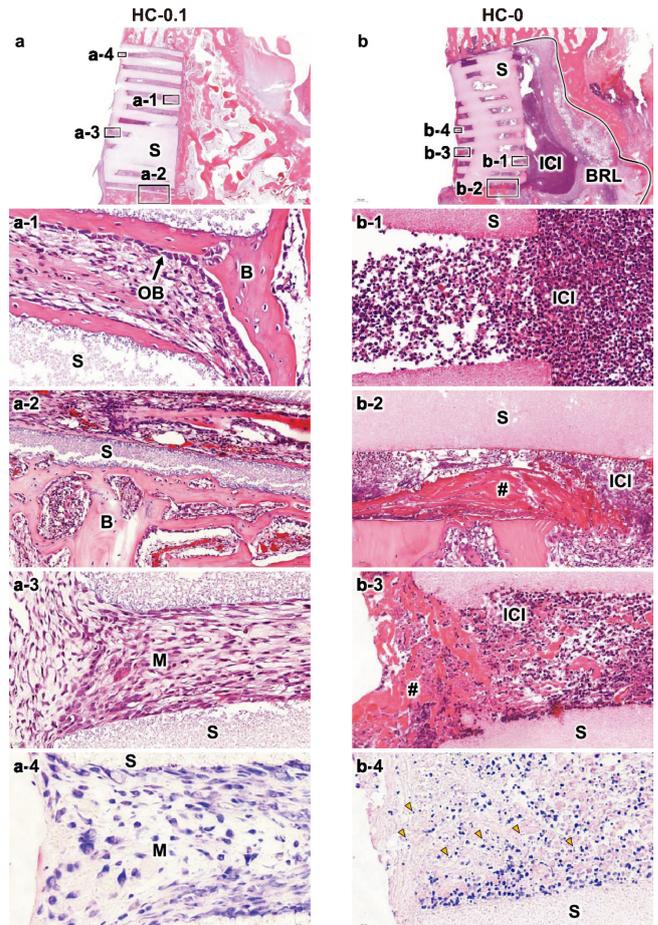


図8 MRSAの菌液中に10分間浸漬したAg-HCS(a)およびHCS(b)を2週間埋入した検体のHE染色(1-3)とGiemsa染色(1-3)標本。(BRL:骨吸収, ICI:炎症性細胞浸潤, B:新生骨, OB:骨芽細胞, #:壊死骨, S:試料, M:間葉組織, 矢印:細菌)(文献(21)より改変)。(オンラインカラー)

$\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 修飾によって抗菌性と骨形成能を両立したAg-HCSは、感染予防と骨組織再建を同時に達成することが明らかとなった。すなわち、骨・関節領域感染制御において、細菌と細胞の感受性の相違に基づいた抗菌性バイオマテリアル開発は効果的な戦略といえる。

## 5. おわりに

本稿では骨・関節領域感染制御を目指したバイオマテリアル開発について紹介した。現在も「抗菌」をキーワードとして研究活動を展開している。本研究の遂行に際して、東京医科歯科大学 塙隆夫名誉教授、川下将一教授、九州大学 石川邦夫教授、林幸彦朗准教授、土谷享助教、岸田良助教、物質材料研究機構 堤祐介主席研究員にご指導・ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究は、JSPS 科研費 JP21K18057, JP23H04614, 公益財団法人 MSD 生命科学財団の助成を受けて行われたものである。

