

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）術後感染を防ぐハニカム骨補填材の開発
（プログラム名）（英語）Development of honeycomb bone graft materials for preventing postoperative infection

実施期間：令和2年9月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）林 幸彦朗
（英語）Koichiro Hayashi

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）九州大学大学院歯学研究院 准教授
（英語）Faculty of Dental Science, Kyushu University, Associate Professor

II 補助事業の概要

超高齢社会を迎えた我が国では、整形外科領域における骨疾患治療や歯科インプラント治療の件数が急増しており、これに伴い、人工骨補填材の需要が増加している。骨補填材の市場は国内で約85億円（2019年度）、全世界で約2,000億円（2008年度）であり、2%/年で市場が拡大している（矢野経済調べ）。一方、骨疾患治療件数の増加につれて、術後感染が深刻な問題になっている。国内の骨・関節の手術部位術後感染率は17.3%である（日本整形外科学会、骨・関節感染症学会）。術後感染は治療に難渋することが多く、患肢切断に至ることもある。抗菌薬の投与では感染症を完全には防ぐことができない。このような状況を踏まえると、骨補填材に抗菌性を付与し、術後感染を抑制することが、社会的要請を満たす有効な手段であるといえる。

研究開発代表者は、ヒト骨の組成である炭酸アパタイトから成る骨補填材を開発してきた。炭酸アパタイトは骨伝導性を有し、破骨細胞により吸収されるという特徴を有する。一方、材料の組成は骨形成能を決める一つの因子にすぎず、構造により新生骨形成と材料吸収は大きく変化する。そこで、研究開発代表者は、マクロからナノスケールでの構造の影響を解明し、構造の最適化を図ってきた。その研究の中で、炭酸アパタイトをハニカム構造にすることで、材料内への細胞の侵入を容易にし、新生骨形成を促進することに成功した。加えて、ハニカム構造の支柱（ストラット）部分に存在するマイクロ・ナノ気孔が破骨細胞活性と新生骨形成に影響を与えることを発見し、これらの気孔制御により、新生骨形成と材料吸収を調和させることに成功した。

以上の研究成果を基盤とし、研究開発代表者は、炭酸アパタイトハニカム骨補填材に抗菌性を有するリン酸銀を修飾することで、抗菌性ハニカム骨補填材を開発することができると考えた。しかし、リン酸銀は抗菌性を有する一方で、細胞毒性を有し、骨形成を阻害することから、リン酸銀修飾量の制御法の確立とその効果の解明が必要である。そこで、本研究では、炭酸アパタイトハニカム骨補填材にリン酸銀を修飾する方法の確立とその効果を *in vitro* 及び *in vivo* 評価により解明することを目的とした。

炭酸アパタイトハニカム骨補填材を作製するために、まず初めに炭酸カルシウムと有機バインダーの混合物の真空押出成形により、ハニカムグリーン体を作製した。ハニカムグリーン体のチャンネル及びストラットは金型の設計により 100~700 μm の範囲で制御することができ、ハニカム面一辺を 0.6~35 mm の範囲で制御することができた。ハニカムグリーン体の焼成により有機バインダーを除去し、炭酸カルシウムから成るハニカム材料を作製した。その後、炭酸カルシウムハニカム材料をリン酸イオン含有溶液に浸漬し、組成を炭酸カルシウムから炭酸アパタイトに変換した。最後に、CAD/CAM (computer-aided design/computer-aided manufacturing) により、所望の形状・サイズに成形し、炭酸アパタイトハニカム骨補填材を得た。

有機バインダーを除去する際に焼結度を制御することで、気孔率、チャンネル平行・垂直方向強度を制御することができ、チャンネル平行方向強度は最大で約 100 MPa、垂直方向は最大で約 60 MPa まで向上させることができた。この結果から、炭酸アパタイトハニカムは高荷重部位での使用に十分耐えられると判断できる。また、動物実験に用いることを考慮して、CAD/CAM により $\phi 6$ mm、高さ 4 mm の円柱状に加工したが、割れや欠けはなく、切削・加工性に優れることが明らかになった。

さらに、炭酸アパタイトハニカムを 0.01~10 mM の硝酸銀溶液に浸漬し、リン酸銀被覆の可否を検討した。以後、0.01~10 mM の硝酸銀溶液に浸漬後の材料を HC-0.01, HC-0.1, HC-1, HC-10 とし、未浸漬の材料 (炭酸アパタイトハニカム) を HC-0 と表記する。硝酸銀に浸漬後も浸漬前と同様の構造を維持していることが明らかになった。

炭酸アパタイトハニカムの硝酸銀溶液浸漬によりリン酸銀被覆できていることを確認するために走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた表面微構造観察とエネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) による元素分析を行った。炭酸アパタイトハニカムのストラットは球状の炭酸アパタイトで構成されていた。1 mM の硝酸銀に浸漬した材料 (HC-1) ではリン酸銀が析出しており、10 mM の硝酸銀に浸漬した材料 (HC-10) ではリン酸銀の析出が顕著になり、結晶サイズが増大していた。炭素、酸素、リン、カルシウム、銀の元素マッピング結果から、いずれの材料においても炭酸アパタイトに由来する炭素、酸素、リン、カルシウムが検出され、硝酸銀濃度が高くなるにつれて、銀の析出量が増加していることが分かった。

さらに、X 線回折 (XRD)、フーリエ変換赤外線分光法 (FTIR)、X 線光電子分光法 (XPS)、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-OES)、圧縮強度測定により、物理化学的・機械的特性評価を行った。XRD パターンにおいて、いずれの材料においてもアパタイトに起因する回折線がみられ、HC-10 ではリン酸銀に起因する回折線が明確に検出された。EDX では HC-0.01~HC-1 において銀が検出されたことから、HC-0.01~HC-1 に存在するリン酸銀は XRD の検出限界以下であると考えられる。FTIR において、いずれの材料においてもリン酸基及び炭酸基に由来する吸収がみられ、ハイドロキシアパタイト (HAp) ではみられるヒドロキシ基に由来する吸収はみられなかった。XRD 及び FTIR の結果から、HC-0~HC-10 の主組成は炭酸アパタイトであることが明らかになった。XPS 結果から、いずれの材料においても、表面にカルシウム、リン、銀が存在していることが明らかになった。XPS から求めた材料表面の銀濃度を図 4d に示す。HC-0、HC-0.01、HC-0.1、HC-1、HC-10 表面の銀濃度はそれぞれ 0、 $1.2 \pm 4.9 \times 10^{-2}$ 、 $1.4 \pm 4.6 \times 10^{-2}$ 、 5.4 ± 1.6 、 48 ± 7.3 wt%であった。また、ICP-OES から、HC-0、HC-0.01、HC-0.1、HC-1、HC-10 中に含まれるリン酸銀濃度を求めたところ、それぞれ 0、 $9.9 \times 10^{-4} \pm 5.8 \times 10^{-5}$ 、 $6.1 \times 10^{-3} \pm 6.3 \times 10^{-4}$ 、 $3.0 \times 10^{-2} \pm 4.5 \times 10^{-3}$ 、 $3.6 \times 10^{-1} \pm 3.7 \times 10^{-2}$ wt%であった。これらの結果から、リン酸銀は材料表面に局在しており、その濃度は硝酸銀溶液濃度により容易に制御することが明らかになった。さらに、HC-0、HC-0.01、HC-0.1、HC-1、HC-10 の圧縮強度を測定したところ、それぞれ 32.5 ± 4.3 、 30.4 ± 5.6 、 34.3 ± 4.5 、 32.1 ± 1.8 、 31.7 ± 9.4 MPa であった。サンプル間の圧縮強度に有意差はなく、リン酸銀修飾により圧縮強度は変化せず、元の材料強度が維持されることが明らかになった。

術後感染の原因となる多剤耐性菌であり、感染すると治療に難渋するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を用いて *in vitro* 抗菌試験を行った。材料上で MRSA を 24 時間培養したところ、HC-0.01 上では MRSA の生存率は $7.5 \pm 2.3\%$ であり、HC-0.1~HC-10 上では生存率がゼロであった。この培養期間中に HC-0、HC-0.01、HC-0.1、

HC-1、HC-10 から放出された銀イオンを測定したところ、それぞれ 0 ± 0 、 3.5 ± 0.7 、 10.9 ± 1.7 、 12.8 ± 2.0 、 $15.3 \pm 6.3 \mu\text{g/g}$ であった。つまり、 $3.5 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ の銀イオンで劇的に MRSA 生存率を下げ、 $10.9 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ 以上で完全に殺傷できることが明らかになった。

HC-0~HC-10 の *in vitro* 細胞毒性試験を骨芽細胞前駆細胞を用いて実施した。HC-0~HC-0.1 では細胞生存率に有意差はなく、毒性は認められなかった。一方、HC-1 と HC-10 では細胞生存率が有意に低く、毒性が認められた。よって、HC-0.1、すなわちリン酸銀濃度が $6.1 \times 10^{-3} \pm 6.3 \times 10^{-4}$ wt% のとき、細胞毒性を示さず、抗菌性を示すことが明らかになった。

HC-0.1 は細胞毒性と抗菌性の両者を満たしたことから、骨形成に関するさらなる検討を行った。骨芽細胞前駆細胞を用いた細胞増殖試験の結果、HC-0.1 上では HC-0 上と同様に細胞が増殖した。さらに HC-0.1 は HC-0 と同程度の ALP 活性を示し、石灰化を導いた。また、HC-0.1 は生理活性食塩水中で 35 日間銀イオンを放出し続けることが明らかになった。放出される銀イオン濃度は、最初の 7 日間で $14.4 \mu\text{g/g}$ であり、続く 28 日間で $13.2 \mu\text{g/g}$ であった。7 日目以降の銀放出速度はほぼ一定であり、一週間で $3 \sim 4 \mu\text{g/g}$ 銀イオンが放出された。生理活性食塩水浸漬前の HC-0.1 中の銀イオン濃度は $61.0 \mu\text{g/g}$ であるため、35 日後 HC-0.1 中の銀イオン濃度は $33.4 \mu\text{g/g}$ であると見積もられる。

以上の *in vitro* 試験結果から、HC-0.1 は細胞毒性を示さず、骨前駆細胞の増殖、分化、石灰化を導き、35 日間に渡り抗菌性を示すことが明らかになり、生体内において感染予防と骨再生を両立することが期待できると判断した。よって、HC-0.1 を以降の動物実験に用いることにした。

MRSA を付着した HC-0 及び HC-0.1 をウサギ大腿骨内側顆に形成した自然には治癒しないサイズの骨欠損に埋植した。2 週間及び 4 週間後、材料を周囲組織と共に摘出し、生菌数測定、肉眼解剖的解析、X 線 CT 解析、病理組織学的解析を行った。

埋植から 2 週間後、HC-0.1 埋植群には膿瘍が形成されていなかったが、HC-0 埋植群には膿瘍が形成されていた。4 週間後も HC-0.1 埋植群には膿瘍が形成されておらず、肉眼的感染所見は認められなかった。HC-0 埋植群では細菌の排出に伴う瘻孔が観察された。材料埋植部の生菌数測定の結果、術後 2 週では HC-0 埋植群では MRSA が検出されたが、HC-0.1 埋植群では検出されなかった。4 週間後、HC-0.1 埋植群では MRSA は検出されず、HC-0.1 は 4 週間に渡り抗菌効果を示すことが確認された。

埋植後の μ -CT 画像から、2 週間後、HC-0.1 埋植群では材料周囲に骨が存在していたが、HC-0 埋植群では材料周囲の骨が細菌により大きく溶解していた。4 週間後、HC-0.1 と周囲骨との間には新しい骨が形成していた。HC-0.1 埋植群の溶解骨体積は 2 週及び 4 週時点で共にゼロであり、HC-0.1 は細菌による骨溶解を完全に防ぐことができることが明らかになった。

埋植後 2 週時点の病理組織学的所見において、HC-0.1 埋植群は感染の所見は見られず、新たな骨が材料内及び材料周囲に形成していることが明らかになった。骨膜側では、骨に分化する前の間葉系組織が形成していた。細菌を染色する Giemsa 染色所見でも、細菌は検出されなかった。HC-0 埋植群では、大規模に骨が溶解し、炎症性細胞が浸潤していた。炎症細胞と腐骨は材料内及び周囲に見られた。また、骨膜側にも腐骨が見られた。

埋植後 4 週時点の病理組織学的所見では、HC-0.1 埋植群では、2 週時点に比べ、材料内及び周囲に形成した骨の量が増加していることが明らかになった。また、2 週時点では間葉系組織が形成していた骨膜側でも、骨が形成していた。新生骨表面には骨芽細胞が存在し、材料上には破骨細胞が見られたことから、材料が破骨細胞により吸収され、新生骨と置換することが確認された。Giemsa 染色所見で、細菌は検出されなかった。HC-0 埋植群では、骨溶解の名残がみられた。

以上より、HC-0.1 は本研究で目的としていた抗菌性と骨形成を両立する感染予防機能を有する骨補填材と有用であることが明らかになった。良好な結果が得られたことから、PMDA 対面助言を実施した。現在、実用化に向けて進んでいる。この材料が上市されれば世界初の抗菌性骨補填材となり、術後感染の懸念がない安全な骨再建が導かれる。

Surgical site infection (SSI) is a severe complication associated with orthopedic bone reconstruction. For both infection prevention and bone regeneration, the framework surface of osteoconductive and bioresorbable scaffolds must be locally modified by minimum antibacterial substances, without sacrificing the osteoconductivity of the scaffold framework. In this study, we fabricated antibacterial honeycomb scaffolds by replacing carbonate apatite, which is the main component of the scaffold, with silver phosphate locally on the scaffold surface via dissolution–precipitation reactions. When the silver content was 9.9×10^{-4} wt%, the honeycomb scaffolds showed antibacterial activity without cytotoxicity and allowed cell proliferation, differentiation, and mineralization. Furthermore, the antibacterial honeycomb scaffolds perfectly prevented bacterial infection *in vivo* in the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, formed new bone at 2 weeks after surgery, and were gradually replaced with a new bone. Thus, the antibacterial honeycomb scaffolds achieved both infection prevention and bone regeneration. In contrast, severe infection symptoms, including abscess formation, osteolytic lesions, and inflammation, occurred 2 weeks after surgery when honeycomb scaffolds without silver phosphate modification were implanted. Nevertheless, the unmodified honeycomb scaffolds eliminated bacteria and necrotic bone through their scaffold channels, resulting in symptom improvement and bone formation. These results suggest that the honeycomb structure is inherently effective in hindering bacterial growth. This novel insight may contribute to the development of antibacterial scaffolds. Moreover, our modification method is useful for providing antibacterial activity to various biomaterials.