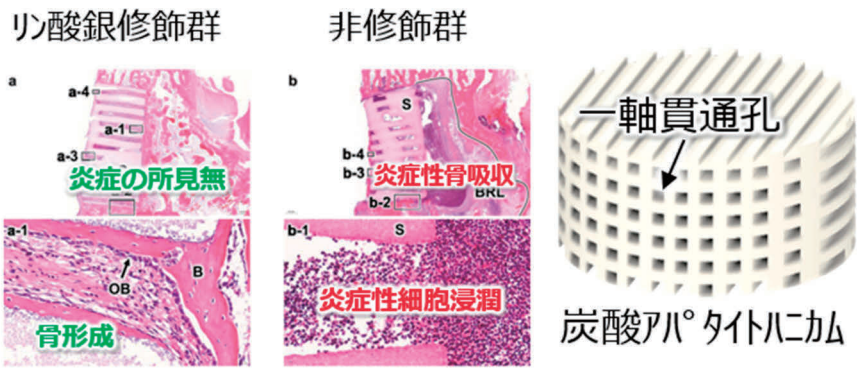
185　骨髄炎治療のための抗感染性ハニカム骨補填材の創製	島袋　将弥

【目的】化膿性骨髄炎は骨組織内部に細菌が侵入することで惹起される感染症であり、造血機能の損失と周辺骨組織の破壊を伴う深刻な炎症反応を示す。現在の骨髄炎治療では、抗生物質投与による保存治療が積極的に行われているが、重篤化すると外科手術が必要となる。この場合、感染部位の掻爬、洗浄、死腔管理が必要となり、死腔管理では骨の除去量に応じてリン酸カルシウムを主成分とする骨補填材が使用されている。しかしながら、骨補填材を構成するリン酸カルシウムは、感染に対して抵抗性を示さないため、骨形成の足場となると同時に細菌のバイオフィルム形成の足場としても機能してしまう。このため、骨髄炎治療で用いられる骨補填材においては、感染に対して抵抗性を示す材料が、骨組織再生と骨髄特有の微小環境形成とを同時達成することが理想的である。本研究では、優れた骨再生能を示す炭酸アパタイトハニカムに着目し、その表面をリン酸銀修飾することで骨髄炎治療への応用可能性を検討した。

【方法】押出成形によって炭酸カルシウムおよび有機バインダーからなるハニカムグリーンボディを作製し、加熱・リン酸化によって炭酸アパタイトハニカムを作製した。炭酸アパタイトハニカムを硝酸銀溶液に浸漬し、表面をリン酸銀修飾した。作製した材料は、材料学的手法によって構造・組成を詳細に分析した。さらに、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を用いた *in vitro* 抗菌性評価、MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨形成評価を行った。またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌液に浸漬した試料をウサギ大腿骨内側上顆に 2 週間埋殖し、病理学的解析によってリン酸銀修飾炭酸アパタイトハニカムの骨組織再生能と感染予防能を検討した。

【結果】炭酸アパタイトハニカムを硝酸銀溶液に浸漬すると、その表面にリン酸銀を修飾することができた。さらに至適量のリン酸銀修飾は、材料の機械的性質に悪影響を及ぼさなかった。非修飾群ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が検出された一方で、リン酸銀修飾群ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が検出されず、優れた抗菌効果を示した。さらにリン酸銀修飾群は MC3T3-E1 細胞に細胞毒性を示すことなく、非修飾群と同等の増殖・酵素活性・石灰化挙動を示すことが明らかとなった。*in vivo* 試験の結果より、非修飾群では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による感染によって、試料埋殖部位近傍に炎症性細胞浸潤、炎症性骨吸収および腐骨が確認された。一方、リン酸銀修飾群では炎症の所見は見受けられず、ハニカム構造の一軸貫通孔内部で骨形成が確認された。以上の結果より、リン酸銀修飾炭酸アパタイトハニカムは骨組織再生と感染予防とを同時に達成した。

炭酸アパタイトハニカムへのリン酸銀修飾により感染予防・骨組織再生を同時達成



185. 骨髄炎治療のための抗感染性ハニカム骨補填材の創製

島袋　将弥

*九州大学 大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 生体材料学分野

Key words：骨髄炎，骨補填材，炭酸アパタイト，リン酸銀，抗菌性

緒　言

骨組織は自重支持や臓器保護といった構造部材としての力学的機能に加え、内部の骨髄は造血機能を有した重要組織である。骨髄内部に存在する造血幹細胞が血液細胞へと分化・増殖することで造血機能を発現しており、骨髄中で形成される特異な微小環境が造血機能の発現において重要な役割を担っている。化膿性骨髄炎は骨組織内部に細菌が侵入することで惹起される感染症であり、造血機能の損失と周辺骨組織の破壊を伴う深刻な炎症反応を示す。現在の骨髄炎治療では、抗生物質投与による保存治療が積極的に行われているが、重篤化すると外科手術が必要となる。この場合、感染部位の除去、洗浄、死腔管理が必要となり、死腔管理では骨の除去量に応じてリン酸カルシウムを主成分とする骨補填材が使用されている。しかしながら、骨補填材を構成するリン酸カルシウムは、感染に対して抵抗性を示さないため、骨形成の足場となると同時に細菌のバイオフィルム形成の足場としても機能してしまう。このため、骨髄炎治療で用いられる骨補填材においては、感染に対して抵抗性を示す材料が、骨組織再生と骨髄特有の微小環境形成とを同時達成することが理想的である。

骨の無機成分と類似組成である炭酸アパタイト（$Ca_{10-a}(PO_4)_{6-b}(CO_3)_c$）は、骨リモデリングに調和して材料が骨に置き換わる性質を有しており、他のリン酸カルシウムよりも優れた骨形成能を示す。我々はこれまでに、抗菌スペクトルに優れる銀系化合物に着目し、至適濃度のリン酸銀を含有した炭酸アパタイトが骨形成能と抗菌性とを両立することを報告した［1］。さらに炭酸アパタイトに一軸貫通を有するハニカム構造を付与すると、その構造的利点によって骨形成を促進することが近年報告された［2］。また炭酸アパタイトハニカムをウサギ大腿骨に 12 週間埋植すると、一軸貫通孔内部に骨髄様微小環境が形成される［3］。すなわち、至適量のリン酸銀を表面修飾した炭酸アパタイトハニカムは、細菌に対して抗菌効果を発現しつつも、骨組織再生と骨髄様微小環境形成が可能であり、骨髄炎によって損失した力学・造血機能の再建が期待できる。そこで著者は炭酸アパタイトハニカム表面へのリン酸銀修飾と骨髄炎治療への応用可能性を検討した。

方　法

1. 材料作製および材料特性評価

炭酸アパタイトの前駆体である炭酸カルシウム粉末と有機バインダー成分を混錬し、図１のような作製フローで炭酸アパタイトハニカムを調整した。ハニカム構造を付与するために、押出成形物の支柱及び孔サイズが約 300 μm となるような金型を使用し、混錬物を押出成形した。押出成形後、得られたハニカムグリーンボディを加熱し、バインダー成分を完全に除去することで炭酸カルシウムハニカムを作製した。加熱後、CAD/CAM によって直径６mm、厚さ３mm の円柱状試料を作製し、１M のリン酸水素ナトリウム溶液中に 353 K で１週間浸漬することで炭酸アパタイトハニカムを作製した。さらに作製した炭酸アパタイトハニカムを 0.1 mM の硝酸銀溶液に室温で１時間浸漬することでリン酸銀修飾炭酸アパタイトハニカムを作製した。作製した試料は炭酸アパタイトハニカムを浸漬した硝酸銀濃度に応じて HC-0（非修飾）、HC-0.1 と命名した。作製した試料は、材料工学的手法によって構造・組成を詳細に分析した。

*現在の所属：東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 無機生体材料学分野

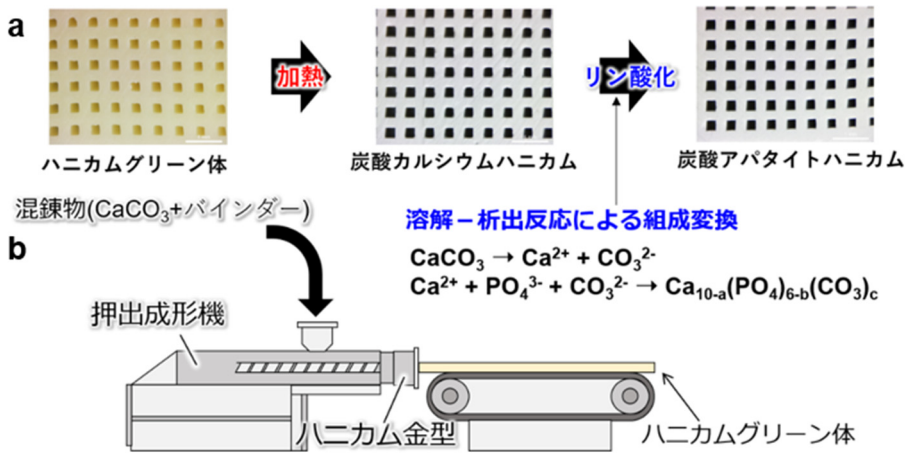


図 1. 炭酸アパタイトハニカムの作製フロー

a) ハニカムグリーン体を加熱・リン酸化することにより炭酸アパタイトハニカムを作製。

b) 炭酸アパタイトハニカムの作製に使用した押出成形機の概略図。

2. *in vitro* 評価

骨領域感染症の原因菌の 1 種であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA：Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）を用いて抗菌性評価（フィルム密着法）を行った。またマウス C57BL/6 頭頂骨由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を各試料に播種し、細胞毒性、細胞増殖、酵素活性、石灰化挙動の評価を行った。

3. *in vivo* 評価

本動物実験は、日本 SLC 動物実験委員会の承認のもとに実施した（承認番号 NG03-0528）。実験動物には、23 週齢の日本白色家兎を選定した。動物実験は Yang らの方法を改変して行った［4］。大腿骨内側上顆に円筒状の骨欠損（直径：6 mm、深さ：3 mm）を作製し、MRSA の菌液に 10 分間浸漬した試料を骨欠損に埋殖した。2 週間の治癒期間を設けた後、実験動物を安楽死させたのちに材料と組織とを一塊に摘出し 10%ホルマリン中性緩衝液で固定した。脱灰した当該検体より薄切切片を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色によって、病理学的解析を行った。

結果および考察

1. 材料特性評価

材料特性評価の結果より、HC-0 および HC-0.1 はいずれもハニカム構造を有しており（図 2A、B）、30 MPa 以上の圧縮強度を示すことが明らかとなった（図 2C）。HC-0 および HC-0.1 の組成は、主としてアパタイトであり（図 2D）、アパタイト中の水酸基またはリン酸基の一部が炭酸基に置換した AB 型炭酸アパタイトであることが明らかとなった（図 2E）。XPS 分析の結果から、0.1 mM の硝酸銀溶液に浸漬した HC-0.1 では、その表面より微量のリン酸銀を検出した（図 2F）。これは、硝酸銀溶液中における炭酸アパタイトの溶解反応とリン酸銀の析出反応によって、炭酸アパタイトハニカムの支柱表面に微量のリン酸銀が修飾されたと考えられる。また本実験で実施したリン酸銀修飾条件は、炭酸アパタイトハニカムの機械的性質を損なうことなく、表面組成を制御できることが明らかとなった。

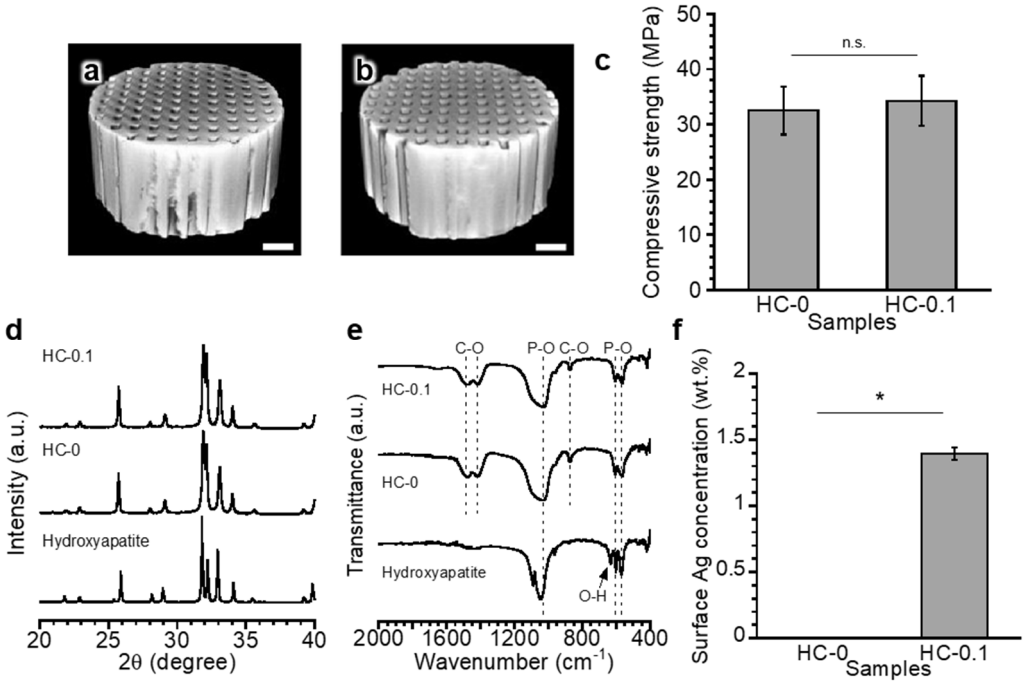


図 2. HC-0 および HC-0.1 の材料特性評価結果

a) HC-0 のマイクロコンピューターX 線断層撮影像（スケールバー：1 mm）。

b) HC-0.1 のマイクロコンピューターX 線断層撮影像像（スケールバー：1 mm）。

c) HC-0 および HC-0.1 の圧縮強度（one-way ANOVA、SNK、$P<0.05$）。

d) HC-0 および HC-0.1 の X 線回折パターン。

e) HC-0 および HC-0.1 のフーリエ変換赤外分光スペクトル。

f) HC-0 および HC-0.1 の X 線光電子分光スペクトルより算出した表面銀濃度（one-way ANOVA、SNK、$P<0.05$）。

2. *in vitro* 評価

抗菌性評価の結果より、HC-0 群では MRSA が検出された一方で、HC-0.1 群からは MRSA が検出されなかった（図 3A）。このため、HC-0.1 群はリン酸銀修飾によって優れた抗菌効果を示すことが明らかとなった。さらに HC-0.1 群は MC3T3-E1 細胞に細胞毒性を示すことなく、HC-0 群と同等の増殖（図 3B）・酵素活性（図 3C）・石灰化挙動（図 3D）を示すことが明らかとなった。このため、今回実施したリン酸銀修飾条件は、骨形成に悪影響を及ぼすことなく、炭酸アパタイトハニカムに抗菌性を付与できることが明らかとなった。

3. *in vivo* 評価

HC-0 群と HC-0.1 群をそれぞれ MRSA の菌液中に 10 分間保持し、ウサギ大腿骨内側上顆に作製した骨欠損中に 2 週間埋殖した検体より作製した HE 染色標本を図 4 に示す。HC-0.1 群では、MRSA の菌液中に 10 分間浸漬したにも関わらず、炎症の所見は見受けられなかった。さらに一軸貫通孔内部では骨形成が確認でき、新生骨表面からは骨芽細胞が確認された（a-1）。さらに HC-0.1 の壁面には骨組織が伝導しており（a-2）、一軸貫通孔の骨膜側からは繊維性組織の浸潤（a-3）が確認された。一方、HC-0 では、感染による炎症性骨吸収（b）、炎症性細胞浸潤（b-1、b-2、b-3）、腐骨（b-2、b-3）が確認された。このため、HC-0.1 は、その優れた抗菌性により、骨組織再生と感染予防とを同時に達成することが明らかとなった

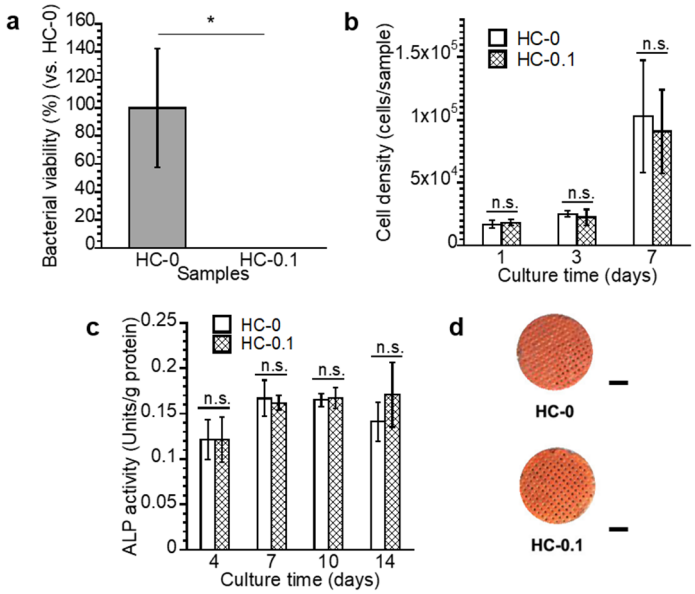


図 3. HC-0 および HC-0.1 の *in vitro* 評価結果

a) MRSA を用いた抗菌性評価の結果（one-way ANOVA、SNK、$P<0.05$）。

b) MC3T3-E1 の増殖挙動（one-way ANOVA、SNK、$P<0.05$）。

c) MC3T3-E1 の ALP 活性（one-way ANOVA、SNK、$P<0.05$）。

d) MC3T3-E1 の石灰化部染色結果（スケールバー：2 mm）。

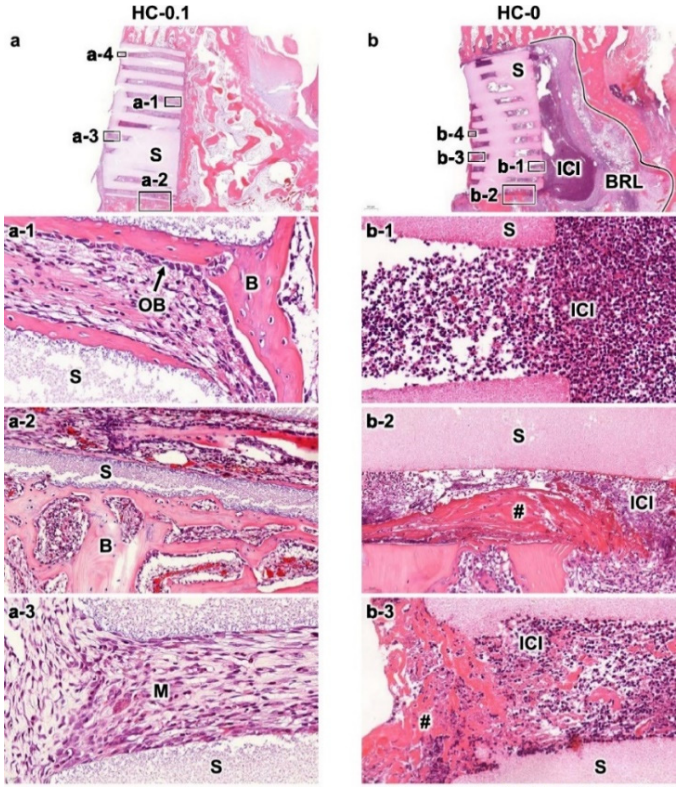


図 4. HC-0 および HC-0.1 の *in vivo* 評価結果

a) HC-0.1 を 2 週間埋殖した検体より作製した HE 染色標本とその拡大像。

b) HC-0 を 2 週間埋殖した検体より作製した HE 染色標本とその拡大像。

本研究成果は、炭酸アパタイトハニカム表面のリン酸銀修飾が *in vitro* および *in vivo* レベルで骨組織再生・感染予防に有用であることを明らかにした。さらに本研究成果に付随して、足場材料の組成および構造が骨組織再生または感染予防に及ぼす影響について［5～7］に報告している。今後は開発物の骨髄特有微小環境形成能の解明を目指して研究を展開していく。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたって、九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野の石川邦夫教授、林幸壱朗准教授、東京医科歯科大学の川下将一教授より適切なご助言とご協力を頂いた。また材料評価では、土谷享助教、岸田良助教にご協力頂いた。ここに感謝の意を表する。

文　献

1) Shimabukuro M, Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. No-Observed-Effect Level of Silver Phosphate in Carbonate Apatite Artificial Bone on Initial Bone Regeneration. ACS Infect Dis. 2022 Jan 14;8(1):159-169. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00480. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34875165.
2) Hayashi K, Shimabukuro M, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Structurally optimized honeycomb scaffolds with outstanding ability for vertical bone augmentation. J Adv Res. 2022 Nov;41:101-112. doi: 10.1016/j.jare.2021.12.010. Epub 2022 Jan 5. PMID: 36328740; PMCID: PMC9637481.
3) Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. Adv Biosyst. 2019 Dec;3(12):e1900140. doi: 10.1002/adbi.201900140. Epub 2019 Sep 30. PMID: 32648680.
4) Yang Y, Chu L, Yang S, Zhang H, Qin L, Guillaume O, Eglin D, Richards RG, Tang T. Dual-functional 3D-printed composite scaffold for inhibiting bacterial infection and promoting bone regeneration in infected bone defect models. Acta Biomater. 2018 Oct 1;79:265-275. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.015. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30125670.
5) Hayashi K, Shimabukuro M, Ishikawa K. Antibacterial Honeycomb Scaffolds for Achieving Infection Prevention and Bone Regeneration. ACS Appl Mater Interfaces. 2022 Jan 26;14(3):3762-3772. doi: 10.1021/acsami.1c20204. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020349.
6) Shimabukuro M, Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Surface functionalization with copper endows carbonate apatite honeycomb scaffold with antibacterial, proangiogenic, and pro-osteogenic activities. Biomater Adv. 2022 Apr;135:212751. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.212751. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35929223.
7) Tan JLT, Shimabukuro M, Kishida R, Ishikawa K. Fabrication and histological evaluation of ant-nest type porous carbonate apatite artificial bone using polyurethane foam as a porogen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2023 Mar;111(3):560-567. doi: 10.1002/jbm.b.35173. Epub 2022 Oct 7. PMID: 36205010.