

抗菌作用を有するヨード担持チタン製人工股関節の臨床応用と骨固着性に関する基礎的研究

金沢大学大学院医学系研究科機能再建学
加畑多文

はじめに

人工関節の手術件数は年々増加傾向にあるが、今後もこの傾向が持続するとみられており、人工関節の術後感染も増加することが予想される。人工関節置換術後の感染はもっとも深刻な合併症の一つであり、人工股関節置換術（THA）と人工膝関節置換術（TKA）の術後感染率は0.5～1%と報告されている¹⁻³⁾。人工関節周辺に一旦感染が生じると、時には人工関節自体の抜去が必要となるため、感染を予防することは、極めて重要である⁴⁻⁵⁾。

近年、術後感染対策の一環としてマテリアルに対する抗菌加工の研究が盛んに行われているが、実際に臨床応用されているものは僅かである⁶⁻¹⁰⁾。われわれは、チタン表面に電気的手法で多数の孔を有した酸化皮膜を形成させ、その孔内にヨードを含有する技術を開発し、その処理を施したチタン製インプラントが極めて抗菌作用に優れていることを明らかにしてきた¹¹⁾。しかし、ヨード担持インプラントと骨との親和性および固着性に関してはまだ不明である。また、その臨床的な効果についても明らかになっていない。本研究の目的は、ヨード担持インプラントと骨との親和性を動物実験から明らかにし、また実際の臨床例に応用した症例を後ろ向きに評価してヨード担持人工股関節の臨床効果を検証することである。

①ヨード担持インプラントと骨との固着性に関する基礎的研究

材料と方法

インプラント

家兎大腿骨に挿入可能な直径5mm、長さ25mmの円柱形の純チタン製インプラントをデザインし、一方は研磨したチタンインプラント（コントロールインプラント）、もう一方はコントロールチタンにヨード担持処理を施したチタンインプラント（ヨードインプラント）とし、それぞれを実験に使用した（Fig. 1）。Hashimotoらによる技術を用いてチタン表面に電気的手法で多数の孔を有した酸化皮膜を形成させ、その孔内にヨードを封入させた¹²⁾。

動物実験

実験は金沢大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

総数24羽の体重4～4.5kgの成熟家兎の大腿骨遠位部に清潔操作下に大腿骨の骨軸に平行に直径5mmのドリルで骨孔を作成したのち、チタンインプラントを挿入した（Fig. 2）。左大腿骨にはコントロールインプラント、右大腿骨にはヨードインプラントをそれぞれ埋入した。それぞれ6羽ずつ術後4, 8, 12週に犠牲死させ、インプラントを含む大腿骨遠位部を摘出し引き抜き試験を行った。また、組織学

的検索を挿入後 4 週後の大腿骨標本 6 羽を用いて施行した。

引き抜き試験

摘出した大腿骨顆部を削り、インプラントの遠位部を露出した。引き抜き試験では、自動測定器に接続したワイヤーをインプラントに掛け、インプラントの長軸方向に牽引した。インプラントが骨から剥がれたときの failure load を測定し、コントロールインプラントを挿入した群（コントロール群）とヨードインプラントを挿入した群（ヨード担持処理群）との 2 群間で比較した。

組織学的検索

インプラントと骨の界面における骨固着性を観察するために、組織学的検索を行った。標本を 10%ホルマリンにて固定した後、エタノールで脱水してポリエステル樹脂に包埋し、標本を近位、中間位、遠位の 3 部分をバンドソー (Maruto Co, Tokyo, Japan) にてインプラントの長軸に垂直に切断した (Fig. 3)。走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM 6301F, Tokyo, Japan) を用いてインプラントと骨の界面を観察し、インプラント周囲における骨が固着している部分の割合 (Bone affinity index) を計測し、コントロール群とヨード担持処理群とで比較した。また、引き抜き試験後のインプラント表面の観察も同時に行った。

②ヨード担持チタン製人工股関節の臨床応用

臨床研究

本臨床研究は、金沢大学臨床試験審査委員会の承認を得て施行された。

対象と方法

チタン製でハイドロキシアパタイトコーティングなどが施されていない人工股関節インプラントにヨード担持表面処理を行い、感染後の人工股関節再置換 (14 例 14 関節) と、化膿性股関節炎後もしくは極めて術後感染のリスクが高い患者の初回人工股関節 (11 例 13 関節) または人工骨頭からの人工股関節への移行 (3 例 3 関節) に対し使用した。使用インプラントは、全例ヨード担持表面処理が可能なチタン製インプラント (Zimmer Trilogy、Stryker Tritanium、DePuy S-R0 M-A、Zimmer Alloclassic 等) を用いた。手術時平均年齢は 56 歳 (17-81)、術後経過観察期間は平均 2 年 3 か月 (7 か月～6 年 1 か月) であった。これらに対し、臨床評価として感染予防に使用した症例に対しては術後感染の有無を、感染後の症例に対しては感染の再燃の有無を調査し、画像評価としてインプラントの固着性の有無を検討した。

結果

引き抜き試験

引き抜き試験では、肉眼的にすべての標本が骨とインプラントの界面で剥がれた。コントロール群における引き抜きに要した力は、術後 4 週で 102.1 ± 25.5 N、8 週で 215.7 ± 67.1 N、12 週で 227.1 ± 109.1 N であった。ヨード担持処理群では術後 4 週で 201.6 ± 41.1 N、8 種で 355.7 ± 91.2 N、12 週で 343.8 ± 80.9 N であり、それぞれコントロール群に比して、有意に高かった (Fig. 4)。

組織学的試験

Bone affinity index は、コントロール

群で $87.5 \pm 7.1\%$ 、ヨード担持処理群では $97.0 \pm 3.9\%$ であり、コントロール群に比してヨード担持処理群で有意に高かった (Fig. 5)。

また引き抜き試験後のインプラント表面の観察では、コントロール群の表面には骨組織の付着がほとんど認めなかったが、ヨード担持処理群の表面には骨組織の付着を旺盛に認めた (Fig. 6a, b)。

臨床研究

感染後の治療目的でヨード担持人工股関節を用いた 14 関節では、1 関節で持続的な術後の浸出液を認めたため追加の洗浄を要したが、最終観察の時点で全例感染の沈静化に成功し、良好な機能回復が得られた。感染の予防目的で使用した 16 関節では、術後創治癒に全く問題を認めず、全例で感染の予防が達成できた。インプラントと骨との固着性では、カップで fibrous fixation と考えられた症例が 2 関節存在したが、明らかなゆるみを生じた例はなく、骨との良好な固着性が得られていた。問題となる有害事象が生じたものはなかった。

考察

人工関節置換術後の深部感染は、時にインプラントの抜去や複数回手術を要することになる重篤な合併症であり、その積極的な予防は重要である。インプラント由来の感染症発生を予防させる目的で、これまでに多くの表面加工処理が報告されている¹³⁻¹⁷⁾。特に銀は強い抗菌作用を有することから、種々の医療材料のコーティング材として研究が進められている。しかし、銀の持つ細胞毒性を危惧する報告もある¹⁸⁻²⁰⁾。一方、ヨードは整形外科

領域における臨床でごく一般的に使われてきた安全性の高い物質である。強い抗菌作用と非常に広域の抗菌スペクトラムを有しており、抗菌薬のような耐性菌をつくらないという特徴が挙げられる^{21, 22)}。われわれはチタン表面に酸化被膜を作成し、その被膜に物質を担持させる技術を開発したが、その担持させる物質としては上記の理由によりヨードが適切であると考えた。そこで基礎的実験により、ヨード担持チタンの抗菌性および安全性を証明し、その成果を報告してきた¹¹⁾。しかし、ヨードによる創傷治癒遅延やその細胞毒性の報告を危惧する報告も散見される^{23, 24)}。特に人工関節にこの技術を応用するためには、インプラントと骨との良好な固着 (bone ingrowth または on growth) が得られる必要がある。そこで本実験では、ヨード担持チタンの骨組織との親和性と固着性を調べた。

本研究の結果では、ヨード担持処理したチタンはコントロールのチタンと比較して機械的試験、組織学的試験ともに有意に骨との結合性が高く、ヨード担持処理したチタンの高い組織親和性を示唆した。また引き抜き試験後のインプラント表面の観察では、コントロール群の表面には骨組織の付着がほとんど認めなかったが、ヨード担持処理群の表面には骨組織の付着が旺盛に認めた (Fig. 6)。このような骨伝導能の特性を有することは、インプラント表面での良好な bone ingrowth または on growth が求められる人工関節の材質としては十分なものと判断できる。ヨードイオンと骨形成との関連については、生体内におけるヨードイオンが骨芽細胞の増殖を抑制しないという報告され

ているが²⁵⁾、ヨードイオンの骨伝導能に関する報告はこれまでない。このヨード担持チタンのもうひとつの特性としてインプラント表面の酸化被膜の存在がある。この酸化被膜は表面の陽極化処理を施して形成されるが¹²⁾、この陽極化処理に伴う電荷反応の結果、ヨード担持チタンの高い骨親和性が得られた可能性がある²⁶⁾。この高い骨親和性がヨードイオンの直接的な化学作用によるものであるか、もしくはヨード担持チタンの酸化被膜に存在する無数の孔によるものかは今回の研究では明らかではない。ヨードを封入していないチタンインプラントを用いた実験を追加し、今回の結果と比較する必要がある。

人工股関節の長期的合併症のひとつに骨溶解があげられる²⁷⁾。骨溶解はポリエチレンの磨耗粉が生体反応を引き起こし、局所にサイトカインが産生されるため発生するが、摺動面のポリエチレンの微細な磨耗粉が骨とインプラント表面の間に存在する線維組織を通過しインプラント周囲に到達し発生すると考えられている²⁸⁾。したがって、インプラント界面に強固に骨組織が形成されることで進行性の骨溶解を減少させることにつながる。ヨード担持チタンの強力な骨伝導能は、人工関節における骨溶解の予防に有利にはたらくと予想される。

また、今回臨床研究としてヨード担持チタン製人工股関節を30関節に使用し、後ろ向きにその効果を調査したが、感染後の症例に対しても感染予防の症例に対しても有効であった。インプラント周囲感染で問題となるのは、いったん細菌がインプラント表面でバイオフィルムを形成

してしまうと治療に難渋するということである。したがってインプラント表面での細菌の接着や増殖が抑制されれば、感染は生じにくく、また再燃しにくいということになる。そこで考案されたのが抗菌加工技術であり、抗菌加工を施した整形外科領域のインプラントとしては、すでに銀や抗生剤などものが臨床応用されてきた^{29, 30)}。しかしながら、銀に関しては前述のようにその細胞毒性が問題であり¹⁸⁻²⁰⁾、抗生剤では、抗菌スペクトラムや耐性菌などの問題がどうしても存在する。われわれのヨード担持加工は、細胞毒性が極めて少ないことが基礎実験でわかっており¹¹⁾、耐性菌を作らず広い抗菌スペクトラムを有している。これらの点で、他のコーティングよりも大きなアドバンテージを持っているといえる。臨床的にも短期ではあるが感染予防に対しても感染治療に対しても有効であった。また、人工股関節としての機能や骨固着性に関しても、なんら従来のものとかわりなく、明らかな有害事象も認めなかった。以上より、ヨード担持表面処理を施したチタン製人工股関節は、股関節の感染または感染後状態における全く新しい対策法として、また新しい感染予防法として有効な可能性がある。

本研究は、公益財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成を受けた。

参考文献

1. Gravin KL, Hanssen AD. Infection after total hip arthroplasty. Past, present, and fracture. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1576-1588.
2. Schmalzried TP, Amstutz HC, Au M

- K, Dorey FJ. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clin Orthop Relat Res* 1992;280:200-207.
3. Schutzer SF, Harris WH. Deep-wound infection after total hip replacement under contemporary aseptic conditions. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:724-727.
 4. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645-1654.
 5. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004;350:1422-1429.
 6. Li B, Jiang B, Boyce BM, Lindsey BA. Multilayer polypeptide nanoscale coatings incorporating IL-12 for the prevention of biomedical device-associated infections. *Biomaterials* 2009;30:2552-2558.
 7. Jiang B, Li B. Polypeptide nanocoatings for preventing dental and orthopaedic device-associated infection: pH-induced antibiotic capture, release, and antibiotic efficacy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88:332-338.
 8. Antoci V Jr, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parviza J. Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection; preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 2007;461:88-95.
 9. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003;32:521-531.
 10. Alt V, Bitschnau A, Osterling J. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006;27:4627-4634.
 11. Shirai T, Shimizu T, Ohtani K, Zen Y, Takaya M, Tsuchiya H. Antibacterial iodine-supported titanium implants. *Acta Biomater*. 2011;7:1928-1933.
 12. Hashimoto K, Takaya M, Maejima A, Saruwatani K, Hirata M, Toda Y, Udagawa S. Antimicrobial characteristics of anodic oxidation coating of aluminum impregnated with iodine compound. *Inorg Mater*. 1999;6:457-462.
 13. Agarwal A, Weis TL, Schurr MJ, Faith NG, Czuprynski CJ, McNulty JF. Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. *Biomaterials* 2010;31:680-690.
 14. Vasilev K, Sah V, Anselme K, Ndi C, Mattescu M, Dollmann B. Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth. *Nano Lett* 2010;10:202-207.
 15. Atiyer BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 2007;33:139-148.
 16. Li B, Liu X, Cao C, Dong Y, Ding C. Biological and antibacterial properties of plasma sprayed wollastonite/silver coatings. *J Bi*

- omed Mater Res B Appl Biomater 2009;91:596-603.
17. Necula BS, Fratila-Apachitei LE, Zaat SAJ, Apachitei I, Duszczyk J. In vitro antibacterial activity of porous TiO₂-Ag composite layers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Acta Biomater 2009;5:3573-3580.
 18. Chen X, Shcluesener HJ. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicol Lett 2008;176:1-12.
 19. Asharani PV, Wu YL, Gong ZY, Valiyaveetil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology 2008; 19(25):102-110.
 20. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. Toxicol In Vitro 2010;24:872-878.
 21. Kayode OO, Aaron AG, Diarmuid CM, David M, James PO. Anti-biofilm Activity of Sub-Inhibitory Povidon-Iodine Concentrations against Staphylococcus Epidermidis and Staphylococcus Aureus. J Orthopaedic Society 2010;
 22. Greenstein G. Povidon-iodine's effects and role in the management of periodontal disease: a review. J Periodontal 70;1397-1405.
 23. Fabreguette A, Zhi Hua S, Lasne F, et al. Evaluation of the cytotoxicity of antiseptics used in current practice on cultures of fibroblasts and keratinocytes. Pathologie-Biologie. 1994;42(9):88-892.
 24. Kaysinger KK, Nicholson NC, Ramp WK, et al. Toxic effects of wound irrigation solutions on cultured tibiae and osteoblasts. J Orthopaedic Trauma 1995;9(4):303-311.
 25. P.R Schmidlin, T Imfeld, P Sahrmann, A Tchouboukov, and F.E Weber. Effect of short-time povidone-iodine application on osteoblast proliferation and differentiation. J Open Dent.2009;3:208-212.
 26. Z. Abdolldhi, A. A. Ziaee M., and A. Afshar. Investigation of Titanium Oxide Layer in Thermal-Electrochemical Anodizing of Ti6Al4V Alloy. International Journal of Chemical and Biological Engineering
 27. Harris WH. The problem is osteolysis. Clin Orthop Relat Res 1995;311:46-53.
 28. Jasty M, Bragdon C, Jiranek W, Chandler H, Maloney W, Harris WH. Etiology of osteolysis around porous-coated cementless total hip arthroplasties. Clin Orthop Relat Res 1994;308:111-126.
 29. Hussmann B, Johann I, Kauther MD, Landgraeber S, Jäger M, Lendemanns S. Measurement of the silver ion concentration in wound fluids after implantation of silver-coated megaprotheses: correlation with the clinical outcome. Biomed Res Int. 2013, Epub 2013 May 29.
 30. Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Raschke MJ. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. Arch Orthop Trauma Surg. 2011;131(10):1419-25

図表

Figure 1



使用インプラントは直径 5mm、長径 25mm の純チタン製円柱形インプラントで、おのおのの先端には引き抜き試験用の穴が開いている。

右：ヨードインプラント
左：コントロールインプラント

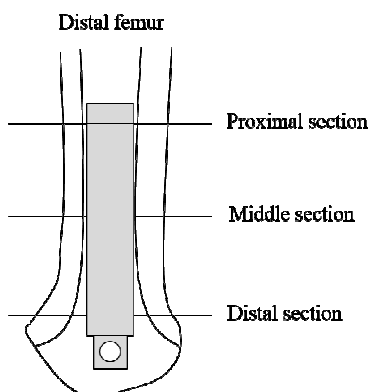
Figure 2

インプラント挿入後の家兎の
大腿骨 X 線写真

25mm×5mm のインプラントが
大腿骨遠位から大腿骨内に挿入されて
いる。

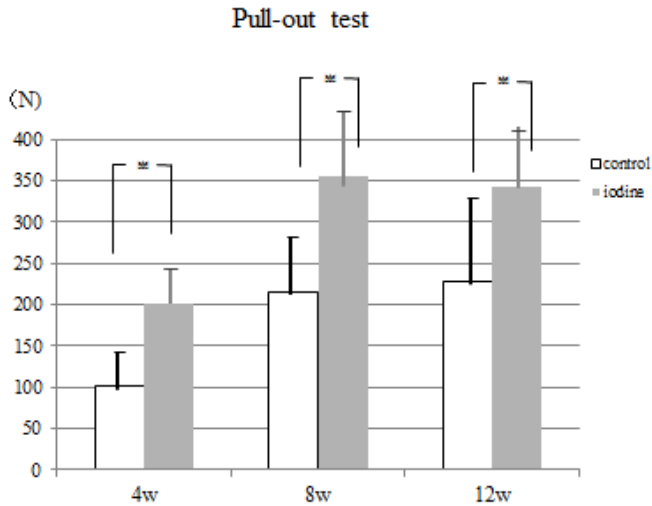


Figure 3



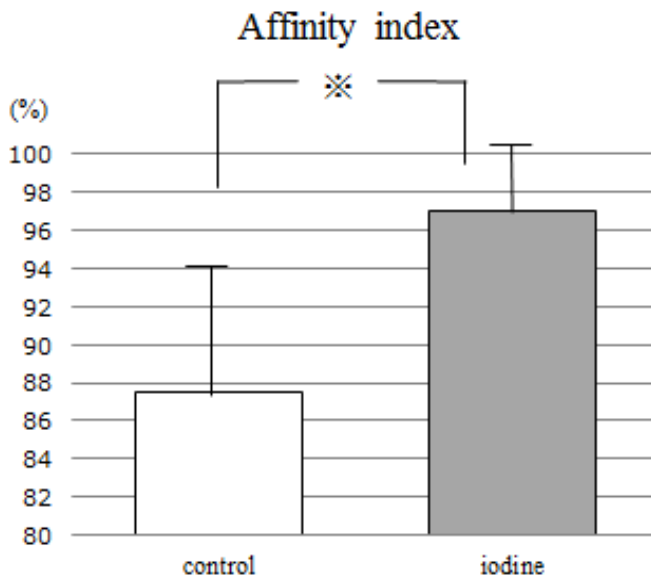
標本はホルマリンで固定後包埋し、近位、中間位、遠位の3部分をインプラントの長軸に垂直に切断した。

Figure 4



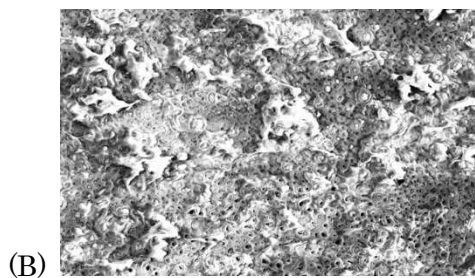
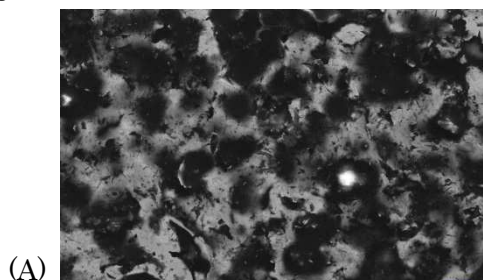
引き抜き試験は、インプラント挿入後、4週、8週、12週で行われた。
ヨード担持処理群ではどの時点でもそれぞれコントロール群に比して有意に強い引き抜き強度を示した。※:p<0.05

Figure 5



インプラント周囲における骨が固着している部分の割合 (Bone affinity index) の計測で、ヨード担持処理群がコントロール群より有意に Bone affinity index が高かった。※p<0.05

Figure 6



- (A) **コントロール群4週時のSEM標本**コントロール群の表面には骨組織の付着がほとんど認めなかった
- (B) **ヨード担持群4週時のSEM標本**
ヨード担持処理群の表面には骨組織の付着を旺盛に認めた