



バイオフィルムの形成と金属材料表面-8

金属系生体材料表面におけるバイオフィルム形成の初期過程

Initial Stage of The Biofilm Formation on the Surface of Metallic Biomaterials

首藤文榮

Bun-ei Shuto

千葉晶彦

Akihiko Chiba

岩手大学 地域連携推進センター
客員教授

東北大学 金属材料研究所
加工プロセス工学研究部門 教授

1 はじめに

バイオフィルムは、自然界の至る所で形成される¹⁾。微生物は単独で生存することは少なく、他種の微生物と共生することで生存を有利にしている。この共生が、微生物生態系を支えている基本機構である。共生系は互いに他を護り合う機構であるから、外部からの攻撃に対して強い抵抗性を示す。

体内に装着されたインプラントの表面においても、それは例外ではない。インプラント表面にバイオフィルムが形成されると、その除去は困難であり、厄介な感染症の原因になる²⁾。

体内では、細菌の付着、増殖に対して多様な生体分子の関与がある。ある種の生体分子は細菌の付着を促進し、またある種の分子はこれを阻害する。さらに、金属系生体材料では、表面構造、遊離した金属イオンがこれに影響する。このような環境でのバイオフィルム形成は、自然界と少し趣を異にする点がある。バイオフィルム形成を防ぐには、その初期過程を制御することが重要である。このテーマでは、金属系生体材料表面におけるバイオフィルム形成の初期過程の特徴とその抑制への展望について述べる。

2 金属系生体材料の種類と特性

金属材料は優れた強度と靱性による高い力学的信頼性から多くの医療用デバイス（インプラント）に使用されている。インプラントの約80%は依然として金属系インプラント材料が占めており、その役割はますます重要性を帯びている³⁾。生体用に使用されている金属材料として、整形外科、循環器外科・内科用として、主にステンレス鋼、コバルトクロム合金、チタン（合金）がある。また、歯科用には金・白金合金、チタン（合金）などが使用されている。本章では、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、チタン（合金）について簡単に紹介する。

2.1 ステンレス鋼

最初にインプラントとして使用されたステンレス鋼は、クロム18%、ニッケル8%の18-8 (SUS302型) オーステナイト系ステンレス鋼である。それ以前は、バナジウム鋼が使用されていたが、耐食性に劣ることから、使用されなくなり、現在では、Moを添加し、さらに炭素の濃度を低下させたSUS316Lステンレス鋼が用いられている。人工股関節のステム、骨折固定材などとして使用されており、骨折固定用ワイヤー、心臓手術後に胸骨を固定するワイヤーとしても広く使用されている。

2.2 コバルトクロム合金⁴⁾

人工股関節および人工膝関節の材料として重要な金属材料としてCo-Cr-Mo合金がある。生体用のCo-Cr-Mo合金の原型は、1930年代後半に整形外科用として人工関節の開発に用いられたVitalium合金が最初であるとされ、今日でも人工関節用合金として多用されている。Table.1にASTMで

Table.1 Chemical compositions of ASTM standardized Co-based alloys

元素	組成 (mass%)		
	鋳造 Co-Cr-Mo	鍛造 Co-Cr-W-Ni	鍛造 Co-Ni-Cr-Mo
	(ASTM F75)	(ASTM F90)	(ASTM F562)
Cr	27.0-30.0	19.0-21.0	19.0-21.0
Mo	5.0-7.0	-	9.0-10.5
Ni	1.0 (max.)	9.0-11.0	33.0-37.0
Fe	0.75 (max.)	3.0 (max.)	1.0 (max.)
C	0.35 (max.)	0.05-0.15	0.025 (max.)
N	0.25 (max.)	-	-
Si	1.0 (max.)	0.40 (max.)	0.15 (max.)
Mn	1.0 (max.)	1.0-2.0	0.15 (max.)
P	0.02 (max.)	0.04 (max.)	0.015 (max.)
S	0.01 (max.)	0.03 (max.)	0.010 (max.)
W	0.2 (max.)	14.0-16.0	-
Ti	-	-	1.0 (max.)
Co	Bal.	Bal.	Bal.

規格化されているCo-Cr-Mo合金の組成を示す。F75は、精密鑄造用合金としての規格でありCを0.35 wt%まで含有することが許容されている。耐摩耗特性に優れるため、人工関節などの用途に使用される。線材、板材、シートなどの薄板に加工する場合は、熱間鍛造・圧延や冷間での圧延加工が必要であるため、加工に耐えるだけの塑性加工性がなければならない。この場合は塑性加工性を高めるためにCrの添加量を少なめにして、Niを10-37%と多量に添加した合金組成とする。Table.1にある、F90およびF562がその代表的な鍛造加工用の合金として規格化されたものである。塑性加工性を持たせるためにNiの大量添加が必要になるが、Niの生体へのアレルギーなどの毒性を考えると鍛造加工用のCo-Cr-Mo合金規格では安全性の点に問題があり、Niフリーでも鍛造加工が可能なCo-Cr-Mo合金の開発の必要性が増している⁵⁾。

2.3 チタンおよびTi合金

チタンおよびチタン合金は活性なため表面に緻密な不動態被膜を生成し、生体内では優れた耐食性を示す。細胞毒性も低く生体適合性に優れる。さらに、比重がステンレス鋼やコバルトクロム合金の約半分と小さく軽量であり、弾性率が低く、金属系生体材料の中で最も骨に近いことから人工関節ステムなどへの応用が注目されている。ISO規格、ASTM規格、およびJIS規格で分類している工業用純チタン(CP-チタン)(1種から4種)の中で、通常は2種が使用されるが、強度が必要な場合は3種や4種が用いられる。1種は、人工歯根、心臓弁、骨折固定用プレートとして用いられている³⁾。Ti-6Al-4V合金は代表的な生体用チタン合金として使用されており、低弾性で高強度であるため人工関節ステム、骨折固定用ネイルなどに用いられている。最近、Ti-6Al-4V合金に含有されるVの毒性が指摘され、Vを使用しないで高強度かつ低弾性なTi-15Mo-5Zr-3Al合金が開発され実用化されている⁶⁾。

3 金属系生体材料表面のバイオフィルム

装着された金属系生体材料表面で、どのようにしてバイオフィルムが形成されるのだろうか。その特徴は、初期過程にある。

インプラントが装着されたとき、最初に触れるのは、血液、リンパ液、組織液などの体液、あるいは唾液のような分泌液である。人工関節は周囲の組織液に、血管ステントは血液に、歯冠は唾液に触れる。このとき、インプラントの表面には体液や分泌液中のタンパク質が結合し、コーティングされ

た状態になっている。微生物は、このタンパク質に付着する。その分子過程は、金属表面へのタンパク質の結合と結合タンパク質への細菌タンパク質の結合である。

3.1 金属系生体材料表面へのタンパク質の結合

インプラント表面にどのようなタンパク質が結合するのだろうか。Co-29Cr-6Mo合金をウシ血清に浸漬すると、表面に血清タンパク質が結合する。結合したタンパク質を2% SDSで溶出し、SDS-PAGEで分析すると約40種類のタンパク質分子が検出される(Fig.1)。図には示していないが、他の金属系生体材料でもほぼ同じ種類のタンパク質分子が検出される。その中に、細菌が結合するフィブロネクチン(Fn)と同じ分子質量(220kDa)のバンドが含まれている。

また、Fig.2右側の写真に示したように、合金表面では複合体の形成も見られる⁷⁾。複合体は1-20 μ mのものが多く、大きさや形から見て、細菌の付着する面積が大幅に広がり、菌体の中に入り込めるポケットができていているように見える。さらに、血清中には多くの細菌に対する免疫抗体が含まれている。実際に血清に浸漬した合金の表面にIgGに対する抗体を反応させてSEMで観察すると、IgG-IgG複合体が全面的に分布している(Fig.2写真左側)。合金表面に結合している

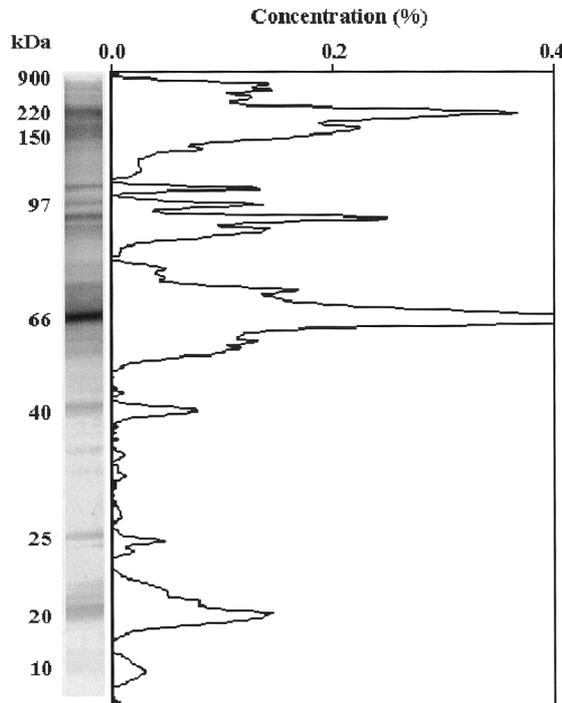


Fig.1 SDS-PAGE analysis of the Co-Cr-Mo alloy-bond serum proteins. One ml of the alloy particles was incubated with 0.5 ml of bovine serum at 37°C for 20 min. The particles were washed with PBS to remove unbound proteins, followed by dissociation of the bond proteins in 0.5 ml of 2% SDS solution. The sample was applied on 12.5% of polyacrylamide gel and electrophoresed at a constant voltage of 65 V. The proteins were stained by a silver stain method, followed by densitometry.

免疫抗体は、細菌の付着を促進する可能性がある。

3.2 金属表面結合タンパク質への細菌タンパク質の結合

金属表面に血清タンパク質が結合するが、これが細菌の付着基盤になり得るかという疑問が残る。合金表面では、結合したFnに*S.aureus*が結合することが報告されている⁸⁾。それ以外にも結合に関与しているタンパク質が存在するかも知れない。その点を明らかにする目的で、*S.aureus*を2%コール酸ナトリウムで処理し、菌体表面タンパク質と思われる画分を採取し、これを血清タンパク質処理合金に負荷する実験を試みた。Fig.3のように、40-250 kDaの数種類の分子が結合する。この中に、フィブロネクチン結合タンパク質 (FBP) の分子質量 (200 kDa付近) に相当する分子が含まれている。また、ウシ血清には常在細菌としてのブドウ球菌に対する抗体も含まれているから、表在抗原分子も結合していると考えられる。さらに、45 kDa 付近の分子の結合が見られるが、分子質量から見て、IgGに結合するプロテインAであろう。これらの結果から、血液に接触するインプラントの表面にはFnや抗体が結合しており、何らかの原因で*S.aureus*が侵入してくると、FBPや表在抗原分子を介して菌体が付着すると考えられる。抗体分子の一部が金属表面に固定されていると、細菌の付着を促進してしまう。浮遊状態で存在する場合は、抗体や補体系タンパク質は細菌をオプソニン化し、食細胞の貪食を助けるが、これらの分子が金属表面に固定されていると細菌の付着を助け、貪食を阻害する。本来、抗体や補体系タンパク質は生体防御に働くはずであるが、分子の一部が金属表面に固定されると、生体に対して不利に働くことになる。

口腔内のインプラントの場合はどうであろうか。インプラントは、最初に唾液中に曝される。唾液中のタンパク質分子が細菌の付着に関与していることが報告されている。Eddger-ton⁹⁾は、Ti表面に形成される唾液被膜を介してStrepto-

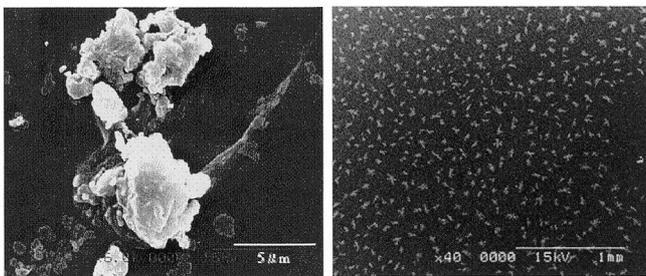


Fig.2 Scanning electron microscopic observation of serum protein complexes and IgG-IgG complexes
Left picture ; Co-Cr-Mo alloy was incubated with bovine serum, and washed with PBS and pure water. Right picture ; Co-Cr-Mo alloy was incubated with rabbit serum and washed with PBS and pure water, then incubated in bovine anti-rabbit IgG solution, followed by washed with PBS and pure water. The samples were treated by gold evaporation.

cocciが付着することを報告しており、Ahnら¹⁰⁾は、ブラケットの表面に、低分子量ムチン、 α -アミラーゼ、分泌型IgA、酸性プロリンリッチタンパク質およびシスタチンが結合すること、これらの中には、*S.gordonii*の付着を促進するものがあることを報告している。また、Amanoら¹¹⁾は、唾液中のプロリンリッチ糖タンパク質に*P.gingivalis*の繊毛が結合することを報告している。分泌型IgAは、浮遊型であれば細菌の排除に有効であるが、金属表面に結合していると細菌の付着を助けることになる。このように、口腔内のインプラントの表面には、唾液タンパク質を介して菌体が付着する。

3.3 バイオフィルムの形成

*S.aureus*はFBPを介してFnに、*S.epidermidis*はSdrG (Fibrinogen-binding bacterial adhesin) を介してフィブリノーゲンに結合する。人体には生体防御機構が備わっており、体内に侵入した細菌は食細胞に貪食され、殺菌される。しかし、細菌が他の異物に結合し、食細胞に貪食されにくい状態

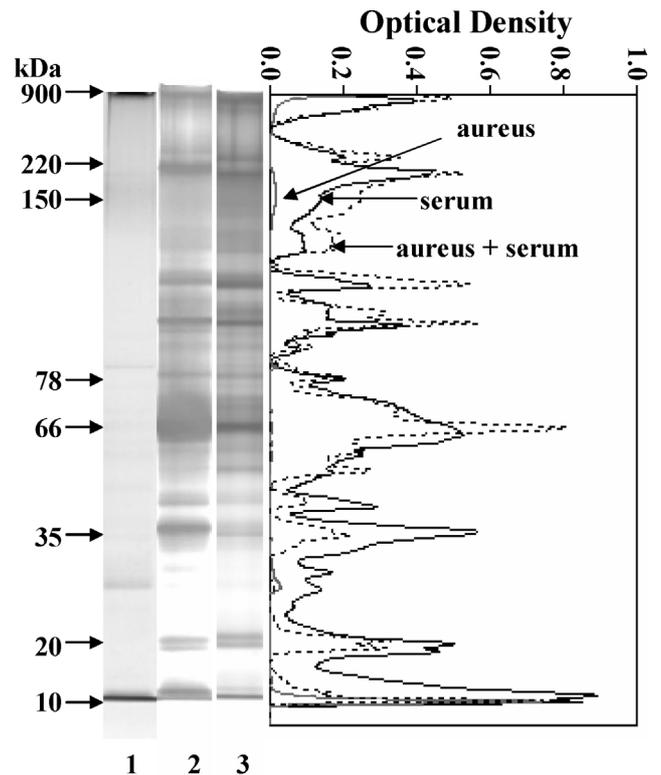


Fig.3 SDS-PAGE analysis of the Co-Cr-Mo alloy-bond serum proteins and *S. aureus* proteins
Lane 1 ; Co-Cr-Mo alloy-bond *S. aureus* proteins that extracted with 2% of sodium cholate solution. Lane 2 ; Co-Cr-Mo alloy-bond serum proteins. Lane 3 ; Co-Cr-Mo alloy-bond serum proteins and *S. aureus* proteins. The serum protein bond alloy particles were incubated with *S. aureus* extract, and bond proteins were dissociated with 2% SDS solution. The samples were electrophoresed on 10.0% of polyacrylamide gel. The proteins were stained by a silver stain method, followed by densitometry.

になっていると、少ない数の菌でも増殖する¹²⁾。インプラント表面でも類似の現象が起きる可能性がある。

インプラントの表面に付着した細菌は、栄養、水分、pH、温度、二酸化炭素など良好な増殖環境に恵まれて増殖する。バイオフィルムの形成においては、クォーラムセンシング(微生物が細胞密度を感知して、一定の密度に達すると特定の遺伝子を発現させる機構をクォーラムセンシングとよび、情報を伝達する分子をクォーラムセンシングシグナル分子とよぶ)が大きな役割を果たす。増殖した菌が一定数に達するとクォーラムセンシングシグナル分子が産生され、バイオフィルムが構築される。

バイオフィルムは、細菌の単なる集塊ではなく、集団における菌体間情報伝達と遺伝子発現の制御システムであり、病原性の発現にも関わっている¹³⁾。構造的に内部に物質が浸透し難いため、抗生物質に対して強い抵抗性を示し、簡単に除去することができない。そのために感染症を引き起こし¹⁴⁾、場合によっては再置換手術が必要になる¹⁵⁾。

人工関節感染症例では、Coagulase-negative staphylococci (30-43%)、*S.aureus* (12-23%)、Streptococci (9-10%) などの菌が検出されている¹⁶⁾。体内には、球菌が中心になってバイオフィルムを作りやすい理由があるのかも知れない。

口腔内インプラントは常に大量の細菌に曝されているが、細菌の付着には唾液中のタンパク質成分が関与している^{17,18)}。プロリンリッチ糖タンパク質¹⁹⁾は*Pgingivalis*の付着に促進的に働くと考えられるが、分泌型IgAは促進的にも抑制的にも働く可能性がある。インプラント表面におけるバイオフィルムの形成は、これらの分子の他にリゾチームの影響も受けるであろう。

3.4 もう一つの過程：タンパク質分子によるイオン溶出の促進

これまで、バイオフィルムの形成過程について微生物側から見てきたが、その間、金属側にはどのような変化が起こるのであろうか。

はじめに金属表面にタンパク質分子が結合したとき、金属表面からのイオン溶出が促進されるかどうかを調べた。新しい粒状のCo-29Cr-6 Mo合金をメタノールと純水で超音波洗浄した後、PBSまたは血清中で37℃、20分間インキュベートすると金属イオンが溶出される。血清とインキュベートすると、PBSの約2倍量のCoイオンと約6倍量のMoイオンが溶出される。次に、一度血清で処理した金属粒子を2% SDS存在下で超音波洗浄し、さらにメタノールと純水で洗浄したCo-Cr-Mo合金粒子を用いて、再度イオンの溶出を試みると、PBSではCoイオンもMoイオンも検出されない。

しかし、血清ではCoイオンは溶出されないが、Moイオンが僅かに溶出される。このように、血清には特定のイオンの溶出を促進する作用があると考えられる。これを金属側から見ると、表面から特定の金属イオンが選択的に持ち去られることになる。

金属イオンの解離は、どのような形で進行するのであろうか。Sousaら²⁰⁾は、Ti表面で結合したAlbuminが血清Albuminに置換されることを報告している。このとき、金属表面から離れるAlbuminがTiイオンを結合したまま解離する可能性がある。もしそうであれば、Co-29Cr-6 Mo合金の場合は、組成金属原子が血清タンパク質により表面から奪われる可能性がある。これを、金属イオンによる血清タンパク質の吸収スペクトル変化を利用して調べた。希釈血清に金属イオンを加えると、吸収スペクトルが変化する。その変化を差スペクトルで示した。Fig.4に示すように、差スペクトルの形は金属イオンにより異なり、変化量は金属イオンの濃度に依存する。このことを踏まえて、Co-29Cr-6 Mo合金粒子(粒径600μm)1粒または10粒を3.0 mLの希釈血清に加え、紫外吸収スペクトルを測定した。Fig.5のように、わずか1粒の粒子であっても、血清タンパク質の吸収スペクトルが変化する。このことは、タンパク質分子が金属イオンを受け取ったことを示唆している。

金属表面からのイオンの解離は、タンパク質分子だけではなく接着している細胞の影響も受けると考えられる。インプラントの表面にはこのタンパク質層の外に組織細胞または微生物が付着している。これらの細胞が放出する水素イオンや塩素イオンは、電気化学的に金属イオンの解離を促進する。また、生体にとっては、医療用金属材料は異物であり、体内に導入されると生体防御反応を引き起こす²¹⁾。インプラント

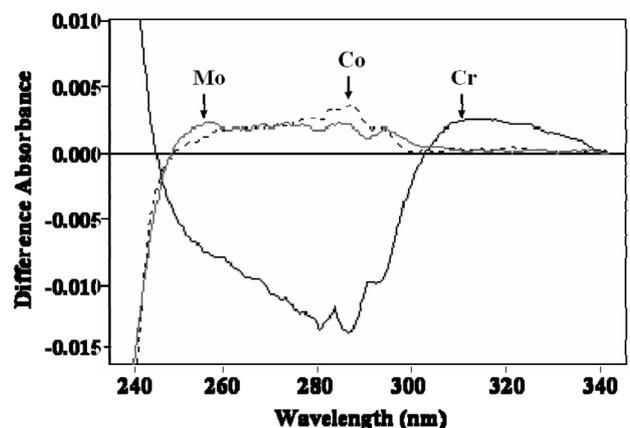


Fig.4 Absorption spectral changes of serum proteins
The diluted bovine serum (approximately 1.5mg protein/ml) was incubated with metallic ions at a final concentration of 1μM. After 20 min incubation at 37℃, absorption spectrum was determined. Difference spectrum was obtained by subtraction of the absorption spectrum of serum without metallic ions from that of with metallic ions.

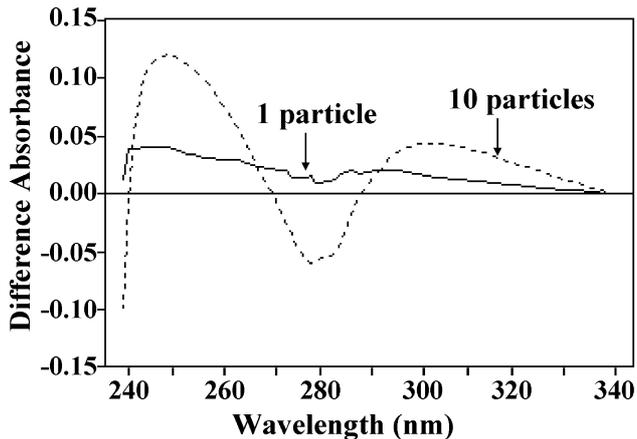


Fig.5 Absorption spectral changes of serum proteins
The diluted bovine serum (approximately 1.5mg protein/ml) was incubated with 1 or 10 particles (with a 600 μ m of diameter) of Co-Cr-Mo alloy at 37 $^{\circ}$ C for 20 min. Difference spectrum was obtained by subtraction of the absorption spectrum of serum without alloy particle from that of with alloy particles.

表面では、食細胞の貪食性と活性酸素産生系が活性化され、表面の侵食と金属イオンの解離が促進されると考えられる。どのような様式であれ、解離した金属イオンは体液流に乗って流通しているタンパク質に持ち去られるから、インプラント表面からの金属イオンの解離は持続することになる。長い年月の間に腐蝕が進行するのは、このような機構によるのであろう。

4 今後の展望

従来、金属材料の生体適合性は、細胞適合性として評価されてきたが、前述のように金属表面からのタンパク質分子より金属イオンの溶出があり、血清タンパク質の結合がバイオフィーム形成の基盤になることを考えると、より安全なインプラントを開発するためには、細胞適合性に加えてタンパク質分子適合性とバイオフィーム形成性についても検討が必要である。

4.1 タンパク質分子の侵蝕作用

現在、金属表面のタンパク質による修飾機構について、以下のような作業仮説を設定している。

金属表面の原子は組織内部の原子と原子間の結合様式が異なっている。最外側原子の電子は内側に引き寄せられている。そこにタンパク質分子が近づくと、界面エネルギーで吸着される。また、一部のタンパク質は対象分子の構造を識別して結合する。その場合も界面エネルギーによる吸着が起こる。タンパク質分子は金属原子またイオンと結合するとコンフォメーション変化(タンパク質分子が、pHや周囲に存在するイオン、あるいは結合するリガンドなどの影響を受けたとき

にみられる立体構造の変化)を引き起こす。このとき、吸光度が上がるから、軌道エネルギーが大きくなっている。これはタンパク質分子の π 電子エネルギーが下がっていることから、タンパク質分子の電子は金属側に移っている。金属は電子をつぎ込まれると金属原子間の結合が緩み、表面から遊離しやすくなる。このように、タンパク質分子は金属側の電子要求に対して、立体構造を変えることにより対応する。金属イオンと結合したまま構造変化することにより最外側原子は組織から引き離され、タンパク質分子側に取り込まれる。これによりタンパク質分子の金属表面との結合力が弱くなる。そこに新しいタンパク質分子が近づいてくると、それに追い出される形で置換される。金属表面を離れると金属イオンを結合したタンパク質分子のあるものは直近の細胞に取り込まれ、他のものは体液循環により全身に運ばれる。この現象の継続により、硬い金属表面が修飾される。

これはあくまでも仮説である。柔らかいタンパク質分子が、硬い金属表面から原子を一つずつ剥がしてゆくメカニズムを解き明かす領域が、バイオフィーム形成を抑制する一助になるであろう。

4.2 バイオフィームの形成とクォーラムセンシングシグナル伝達機構

バイオフィームの形成には、クォーラムセンシングシグナル伝達機構(一定の密度に達した菌がシグナル分子を放出し、その分子を受容した菌が菌体内で新たに遺伝情報を発現するための一連の反応系)が必要である。金属表面にタンパク質分子が結合するとそれを基点にして菌体が結合し、増殖が始まる。増殖した菌は、一定の密度に達するとクォーラムセンシングシグナル分子を出して、新たな遺伝子を発現させ、菌体間の新たな関係を構築する。この過程に関しては、既に多くの報告がある²²⁻²⁴⁾。しかし、それぞれの過程にCo、Cr、Moなどの金属イオンはどのような影響を及ぼすのか。クォーラムセンシングシグナル分子の発現や作用に対する金属イオンの影響は、ほとんど明らかにされていない。金属イオンの影響を調べるには、これまでのクォーラムセンシングシグナル伝達機構に関する研究よりも遙かに多くの研究が必要になるであろう。金属イオンは、クォーラムセンシングシグナル伝達機構の制御因子になるかも知れない。

これからの金属系生体材料の生体適合性として、バイオフィーム形成も評価項目に加える必要がある²⁵⁾。また、抗菌性についても、微生物の付着や増殖を抑制するという面に加えて、クォーラムセンシングシグナル伝達機構を抑制するという面も評価する必要がある。

参考文献

- 1) 松山東平：バイオフィーム入門，日本微生物生態学会
バイオフィーム研究部会編著，(2005)，145.
- 2) A. Trampuz and W. Zimmerli : Swiss Med. Wkly.,
135 (2005), 243.
- 3) 堀隆夫：バイオマテリアル，(2007)，214.
- 4) 千葉晶彦：まてりあ，46 (2006)，9.
- 5) 千葉晶彦：金属，77 (2007)，37.
- 6) 佐々木佳男，土井憲司，松下富春：金属，66 (1996)，
812.
- 7) 阿部将也：未発表研究，(2005)，付図
- 8) Delmi M., Vaudaux P., Lew D.P. and Vasey H. : J.
Orthop. Res., 12 (1994), 432.
- 9) Edgerton M., Lo S.E. and Scannapieco F.A. : Int. J.
Oral. Maxillofac. Implants, 11 (1996), 443.
- 10) Ahn S.J, Kho H.S, Lee S.W and Nahm D.S. : J.
Dent. Res., 81 (2002), 411.
- 11) Amano A., Shizukuishi S., Horie H., Kimura S.,
Morisaki I. and Hamada S. : Infect. Immun., 66
(1998), 2072.
- 12) S.D. Elek and P.E. Conen : Br. J. Exp. Pathol., 38
(1957), 573.
- 13) Morfeldt E., Tegmark K. and Arvidson S. : Mol.
Microbiol., 21 (1996), 1227.
- 14) Mack D., Rohde H., Harris L.G., Davies A.P.,
Horstkotte M.A. and Knobloch J.K. : Int. J. Artif.
Organs, 29 (2006), 343.
- 15) Donlan R.M. : Emerg. Infect. Dis., 8 (2002), 881.
- 16) A. Trampuz and W. Zimmerli : Swiss Med. Wkly.,
135 (2005), 243.
- 17) Amano A., Sojar H.T., Lee J.Y., Sharma A., Levine
M.J. and Genco R.J. : Infect. Immun., 62 (1994) ,
3372.
- 18) Amano A., Sharma A., Lee J.Y., Sojar H.T., Raj
P.A. and Genco R.J. : Infect. Immun., 64 (1996) ,
1631.
- 19) Amano A., Shizukuishi S., Horie H., Kimura S.,
Morisaki I. and Hamada S. : Infect. Immun., 66
(1998), 2072.
- 20) Sousa S.R., Moradas-Ferreira P., Saramago B.,
Melo L.V. and Barbosa M.A. : Langmuir., 20 (2004),
9745.
- 21) 筏義人：生体材料学，(1994)，25.
- 22) Reading N.C. and Sperandio V. : FEMS Microbil.
Lett., 254 (2006), 1.
- 23) Giacometti A., Cirioni O., Gov Y., Ghiselli R., Del
Prete M.S., Mocchegiani F., Saba V., Orlando F.,
Scalise G., Balaban N. and Giorgio Dell'Acqua G. :
Antimicrob. Agents Chemother., 47 (2003), 1797.
- 24) Cvitkovitch D.G., Li Y.H. and Ellen R.P. : J. Clin.
Invest., 112 (2003), 1626.
- 25) Adachi K., Tsurumoto T., Yonekura A., Nishimura
S., Kajiyama S., Hirakata Y. and Shindo H. : J.
Orthop. Sci., 12 (2007), 178.

(2007年8月17日受付)