

生体用 AM インプラント材料の抗菌特性評価のための
in vitro 共培養モデルの構築

Development of *in vitro* Co-Culture Model for Antibacterial Evaluation of
Additively Manufactured Metal Biomedical Implant Materials

松坂 匡晃・小坂 朋生・山野 大陸・船奥 和真
劉 甜・松垣 あいら・中野 貴由

Tadaaki MATSUZAKA, Tomoki KOSAKA, Riku YAMANO, Kazuma FUNAOKU,
Tian LIU, Aira MATSUGAKI and Takayoshi NAKANO

生体用 AM インプラント材料の抗菌特性評価のための
in vitro 共培養モデルの構築Development of *in vitro* Co-Culture Model for Antibacterial Evaluation of
Additively Manufactured Metal Biomedical Implant Materials

松坂 匡晃*・小坂 朋生*・山野 大陸*・船奥 和真*

劉 甜*・松垣 あいら*・中野 貴由*

Tadaaki MATSUZAKA, Tomoki KOSAKA, Riku YAMANO, Kazuma FUNAOKU,
Tian LIU, Aira MATSUGAKI and Takayoshi NAKANO

(Received 16 July 2025, Accepted 25 July 2025)

Implant-associated infections remain among the most critical complications in orthopedic and dental implantology, frequently leading to implant failure and necessitating revision surgery. These infections are particularly problematic during the early post-implantation phase, when the host immune response and bone regeneration processes are not yet fully established. Bacterial adhesion and biofilm formation during this vulnerable period highlight the importance of evaluating the intrinsic antibacterial properties of implant surfaces. Additive Manufacturing (AM) has emerged as a transformative technology in implant fabrication, enabling the production of highly complex, patient-specific three-dimensional structures with precisely controlled micro- and nano-topographies. However, the unique surface architectures fabricated with AM, which are potentially important in modulating host responses and infection dynamics, are not yet matched by *in vitro* evaluation systems capable of capturing such biologically relevant interactions. In particular, conventional assays lack the capacity to simultaneously assess bacterial behavior and host cellular responses. In this study, we developed a novel *in vitro* antibacterial evaluation platform incorporating a co-culture model of bacteria and primary osteoblasts, designed to better simulate the early biological environment encountered by implants. We first established a quantitative bacterial colony counting method based on image-based area correction and optimized both the bacterial seeding density and co-culture conditions to ensure reliable measurement of bacterial proliferation and osteoblasts viability. The system was then applied to AM-fabricated titanium substrates with or without unidirectional microgrooves. Under mono-culture conditions, bacterial viability did not differ significantly between groove and flat substrates. In contrast, in the co-culture setting, only the groove substrates exhibited a marked antibacterial effect, characterized by reduced bacterial survival alongside sustained osteoblasts morphology. This response was not detectable using conventional mono-culture-based assays. These findings indicate that the antibacterial performance of 3D-structured AM implants is highly context-dependent, becoming apparent only under biologically relevant, cell-interactive conditions. The proposed co-culture model provides a robust and physiologically meaningful platform for evaluating implant surface antibacterial properties, with significant implications for the preclinical assessment of next-generation AM biomaterials.

Key Words: Metal Additive Manufacturing, Anti-Bacteria, Biomedical Device, Bone Quality, *in vitro* Co-Culture

1. 緒言

医療用インプラント材料は、骨折治療など歯科・整形外科領域の広範な分野で使用されており、その生体適合性や機械的強度の向上が継続的に図られてきた^{1), 2)}。一方で、インプラント関連感染症は依然として大きな臨床的課題であり、手術後の感染が再手術や合併症の主要因となっている^{3), 4)}。とりわけ、インプラント埋入直後に発症する早期感染では、骨芽細胞の接着や骨形成の誘導、ならびに免疫応答が十分に発揮される前に細菌がインプラント表面に定着し、バイオフィーム形成を始めるため、インプラント材料自体が持つ初期抗菌性が、感染制御の鍵を握る。

近年、Additive Manufacturing (AM、積層造形) 技術を用

いたインプラントの開発が進展し、患者個別の解剖学的形状や機能に応じた高精度かつ複雑な三次元構造の創製が可能となりつつある^{5), 6)}。AM技術により、これまで困難とされていた微細構造の三次元的制御が実現しつつあり、生体模倣設計への応用が期待されている。とりわけ、健全骨はコラーゲン線維およびアパタイト結晶が規則的に配向化した秩序構造を示し、骨配向性は骨の力学的強度を規定する重要な骨質因子である^{7), 8)}。骨形成プロセスにおいては骨芽細胞の規則的な伸展・配列化は骨配向化を導くことから、インプラント材料表面と細胞との界面相互作用が骨形成能を制御する重要な起点となる。加えて、筆者らはこうした骨の配向構造が骨組織の抗菌特性にも寄与することを報告しており、これは生体組織が本来備える秩序構造が細

*大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1)

Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, The University of Osaka (2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

菌感染抵抗への恒常性維持に資することを示唆している⁹⁾。すなわち、三次元的に精緻な表面構造を自在に設計可能な AM 造形材料は、生体骨模倣化による骨配向化制御を通じて抗菌機能に影響を与える可能性を示唆しており、その機構解明は材料設計の基盤要素を示すのみならず、臨床における感染抑制の観点からも極めて意義深い。しかしながら、このような AM 造形材料に対する抗菌性評価は未だ標準化されておらず、表面の微細構造や三次元形状が細菌の付着や増殖に与える影響を定量的かつ再現性高く評価するための手法が確立されていない。さらに、生体内環境は、免疫機能関連細胞、骨形成細胞、線維芽細胞など多様な細胞群が精緻に協調しつつ恒常性の維持および病原体の排除に寄与する多層的に調節された生理環境である¹⁰⁻¹³⁾。このような複雑な生理的条件下における宿主細胞と細菌との相互作用を直接的に *in vivo* (生体内) で解析することは極めて困難である。一方で、従来の *in vitro* (生体外) 評価系では、主に細菌の単独培養が用いられてきたが、生体における細胞-細菌間の動的相互作用や局所微小環境の変化を反映するには不十分である。そのため、*in vitro* において、細菌と骨芽細胞を同時に制御し、相互作用を観察できる共培養モデルの構築が求められる。本研究では、AM インプラント材料の抗菌特性を生体模倣的に解析可能な新規 *in vitro* 評価システムの構築を目的とし、細菌と骨芽細胞の共培養モデルを導入することで、従来の単独培養では捉えきれなかった抗菌性能の評価を可能にした。特に、細菌のコロニー形成解析、共培養条件の最適化、さらには三次元構造を有する基板材料上での抗菌特性検証を通じて、生体内環境を模倣した抗菌特性評価モデルの確立を目指した。

2. 実験方法

3D-CAD データに基づいて、Ti-6Al-4V 合金粉末を用い、レーザ積層造形装置 (M290, EOS, Germany) により、一方配向溝構造を有する Groove 基板および平滑構造を有する Flat 基板を作製した。溝の寸法は、溝幅 200 μm 、溝深さ 150 μm とした。造形後はエタノール、アセトンで洗浄後、フッ硝酸処理により不完全溶融粉末を除去した。播種前にオートクレーブ (121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分) により滅菌処理を行った。抗菌性評価には、ブドウ球菌 (ATCC 700576) を使用し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm で 12-18 時間振盪しながら Tryptic Soy Broth (TB) 培地にて培養した。ブドウ球菌濃度は波長 540 nm の吸光度により解析した。骨芽細胞は新生児マウス (3 日齢) 頭蓋冠より逐次的酵素処理により抽出した。 α -MEM 培地に 10% FBS および 1% Penicillin/Streptomycin を添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 環境下で培養した。造形基板上での抗菌性能の評価は付着した生菌数により評価した。PBS (Phosphate Buffered Saline) 中で 15 分間超音波処理を行い、培養基板に付着した細菌を剥離させた。得られた懸濁液を 100 倍に希釈し、TB 寒天培地上に均一に播種した後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間インキュベートした。寒天培地上のコロニー形成数はコロニー

カウンター (Colony Counter 1.0; Microte Niton) を用いて定量解析を行った。特に、複数のコロニーが融合した場合においても統一して定量解析するために、単一コロニーの平均面積を参照基準とし、連結コロニーの総面積から実質的な菌数を推定する解析法を導入した (Fig. 1)。計測した生菌数を滴下量で除した値を試料のコロニー形成濃度 (CFU: Colony Forming Unit) として算出した。

3. 実験結果と考察

細菌増殖の指標として寒天培地上でのコロニー形成を用いるにあたり、定量解析が可能となる最適な細菌接種濃度および培養期間を検討した。3 段階の播種濃度 (1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 CFUs/mL) において、培養 24 時間後および 72 時間後のコロニー形成数を定量した (Fig. 2)。その結果、 1×10^2 CFUs/mL では過度なコロニー間融合により個別コロニーの識別が困難であった一方、 1×10^0 CFUs/mL ではコロニー数が極端に少なく、定量解析が困難であった。さらに、72 時間培養では、 1×10^1 CFUs/mL においては良好な増殖応答が得られたが、 1×10^2 CFUs/mL では菌の過密増殖が進行し、 1×10^0 CFUs/mL では依然として増殖が不十分であった (Table 1)。以上より、本研究の評価系においては、播種濃度 1×10^1 CFUs/mL、培養期間 24 時間の実験条件を採用した。

生体環境中でのインプラント埋入による感染環境を模擬するために、細菌と骨芽細胞を同一基板上で共培養した。ブドウ球菌 (1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 CFUs/mL) と骨芽細胞 (5×10^4 cells/mL) を同時に培養し、24 時間共培養後の細胞・細菌の挙動を位相差顕微鏡により観察した (Fig. 3)。その結果、細菌濃度が 1×10^1 CFUs/mL の条件では、骨芽細胞の接着・伸展が維持され、細菌との共存状態が安定してい

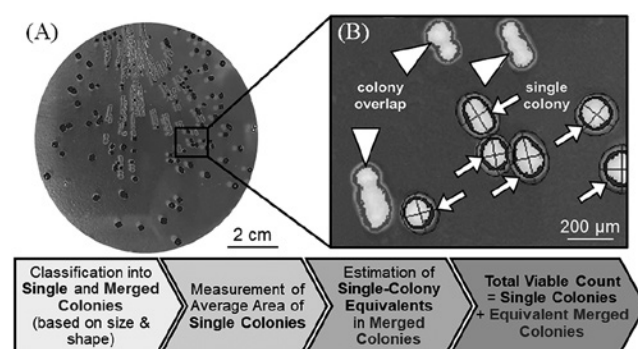


Fig. 1 Image-based quantification method for viable bacterial colonies. (A) Representative image of an agar plate showing visual classification of bacterial colonies into single (black) and merged (gray) categories based on their shape and size. (B) Enlarged view highlighting the identification of overlapping colonies (arrowheads) and individual single colonies (white arrows). Merged colonies were quantified by estimating the number of single-colony equivalents based on total area. A schematic workflow of the analysis procedure is presented at the bottom of the figure.

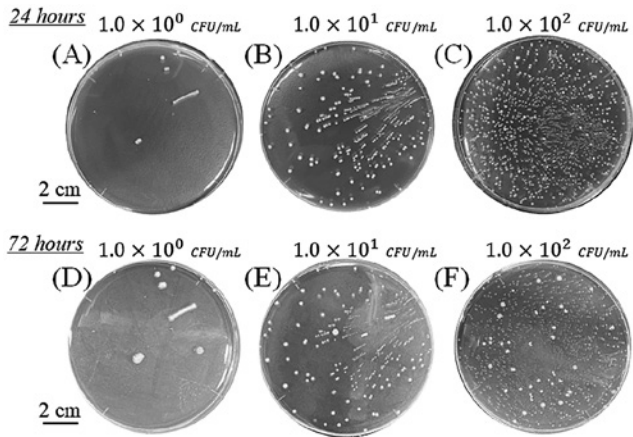


Fig. 2 Optimization of bacterial seeding density and incubation time. Representative colony images of bacteria seeded at three concentrations (A, B, C: 1 day incubation, D, E, F: 3 days incubation): A, D = 1×10^0 CFUs/mL, B, E = 1×10^1 CFUs/mL, C, F = 1×10^2 CFUs/mL.

Table 1 Quantitative analysis of bacteria colony formation as a function of seeding densities and culture durations. Values are expressed as number/cm².

1 day	1.0 × 10 ⁰ CFU/mL	1.0 × 10 ¹ CFU/mL	(Number/cm ²) 1.0 × 10 ² CFU/mL
Single colonies	5.3 ± 3.5	95.7 ± 21.5	273.3 ± 50.3
Merged colonies	13.7 ± 5.0	85.6 ± 26.8	395.4 ± 185.0
Total	19.0 ± 7.8	181.3 ± 15.0	668.7 ± 218.9
3 days	1.0 × 10 ⁰ CFU/mL	1.0 × 10 ¹ CFU/mL	1.0 × 10 ² CFU/mL
Single colonies	17.7 ± 3.1	46.0 ± 12.5	276.7 ± 81.4
Merged colonies	26.3 ± 4.6	535.3 ± 107.4	495.3 ± 108.7
Total	44.0 ± 6.0	581.3 ± 101.7	772.0 ± 176.8

た。一方、 1×10^2 CFUs/mL 以上の条件では、細菌の急速な増殖により細胞の生存性が著しく損なわれ、骨芽細胞の存在はほとんど確認できなかった。以上より、共培養評価系において、細菌濃度 1×10^1 CFUs/mL は、細胞と細菌の共存を可能にし、生体内における初期感染の模倣条件として適切であることが示された。

本研究により構築した共培養モデルを用いて、AM 造形チタン基板に施された一方向微細溝構造の有無による抗菌特性の変化を解析した (Fig. 4)。細菌単独での培養においては、Flat 基板および Groove 基板の比較により生菌数に有意差は認められず、基板構造自体には細菌の直接的な付着や増殖を阻害する効果がないことが示唆された。一方で、骨芽細胞とブドウ球菌の共培養では、Groove 基板においてのみ顕著な抗菌効果を発揮することが明らかとなった。共培養環境下では、細胞単独培養下と同様に Flat 基板では骨芽細胞の伸展方位はランダムであり、一方で Groove 基板では溝方向に沿った一方向性の細胞伸展を示した。このとき、Groove 基板でのみ細菌の生菌数が有意に低下したことから、骨芽細胞の配向化が抗菌特性発現の抑制に寄与することが示唆される。近年の研究により、骨芽細胞がグ

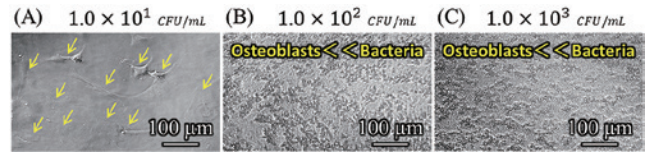


Fig. 3 Optimization of co-culture conditions for osteoblasts and bacteria. Phase-contrast microscopy images after 24 hours of co-culture under different bacterial seeding densities. (A) At 1×10^1 CFUs/mL, osteoblasts (indicated by yellow arrows) showed well-spread morphology. (B, C) At higher densities (1×10^2 and 1×10^3 CFUs/mL), excessive bacterial proliferation inhibited osteoblast viability and spreading.

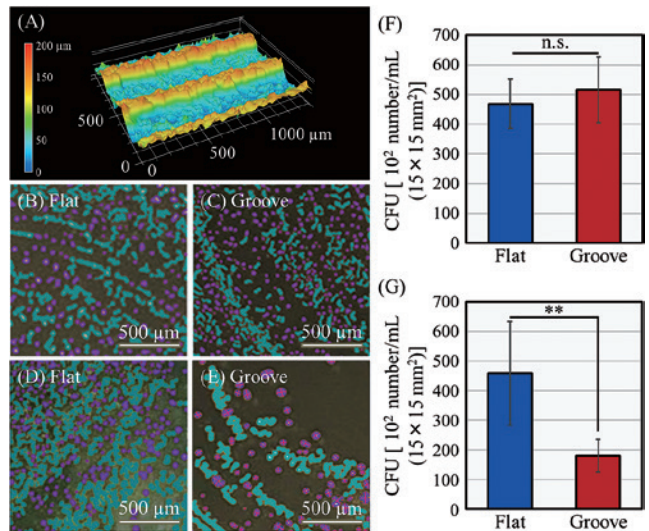


Fig. 4 Quantitative analysis of viable bacteria on AM-fabricated substrates. (A) Laser scanning microscopy images showing surface topography of AM-fabricated Groove substrate. Fluorescence images showing bacterial colony distribution after 24 h culture: (B, C) Mono-culture of bacteria on Flat and Groove substrates. (D, E) Co-culture with osteoblasts on Flat and Groove substrates. Single colonies are shown in magenta, and merged colonies in cyan. (F) CFU quantification in mono-culture conditions showing no significant difference between substrates (n.s.). (G) CFU quantification in co-culture conditions showing a significant reduction in bacterial viability on Groove substrates (**: $p < 0.01$).

ラム陽性菌や炎症性サイトカインなどの細菌刺激に応答して抗菌ペプチドを分泌することが報告されており、骨組織における固有の感染防御機構として注目されている^{14), 15)}。さらに、筆者らの研究により、AM 溝構造を有する基板上で配向した骨芽細胞は、非配向細胞と比較して抗菌ペプチド β -ディフェンシン-2, 3 の分泌量を増加し、その結果、大腸菌の付着抑制効果を発現することを明らかにしている⁹⁾。このように、AM を活用したインプラント表面構造の付与は、細胞機能制御を介して細菌感染に対する抵抗性を誘導し、新たな骨の機能発現を示唆している。すなわち、細胞の形態的制御を通じて生体由来の抗菌機構を活性化するという観点から、AM 構造の機能的意義が改めて明確になったといえる。

本研究により、AM 造形によって設計された三次元構造が骨芽細胞の一方方向への伸展を誘導し、それを介して抗菌特性を発揮する新規機能が明確化された。これは、初期感染を模倣した独自の共培養モデルを確立したことにより初めて明らかとなったものであり、従来の単独培養系による細菌評価では捉えられなかった現象である。共培養モデルを用いることで、物理的形状と生物学的応答の相関を捉え、より生体に近い抗菌評価を実現することが可能となった。さらに、この共培養モデルは、部位や感染時期に応じた模倣環境を構築するため、細胞・細菌種の組み合わせや播種タイミングを調整することで、術前・術後の感染成立過程を再現するプラットフォームとしても応用が期待される。以上より、本研究は、形状誘導による細胞応答を介した抗菌性発現という新たな設計概念を提示するとともに、今後の AM インプラント材料開発における「配向化組織誘導型抗菌設計」の基盤となる知見を提供するものである。

4. 結論

本研究では、AM 技術により造形された三次元インプラント材料の抗菌特性を、生体模倣的に評価可能な新規 *in vitro* 共培養モデルの構築を行った。細菌と骨芽細胞の共培養モデルを導入することで、従来の細菌単独培養では捉えきれなかった細胞－細菌間の相互作用を反映した評価が可能となった。定量的な菌数算出法を導入し、コロニー形態に依存しない再現性の高い菌数評価法を導入した。さらに、共培養における細菌濃度・骨芽細胞密度および培養期間の最適化により、骨芽細胞の生存性と菌の存在を両立させた条件を確立した。構築した共培養モデルを用いて AM 基板の抗菌性を解析した結果、Groove 構造を有する基板においてのみ、骨芽細胞の存在下で顕著な抗菌効果が認められた。この抗菌効果は、Groove 構造によって誘導される骨芽細胞の配向化が、生理的免疫応答の活性化を促進した結果と考えられ、AM 構造が有する新たな機能的役割を提示するとともに、それに基づく抗菌型インプラント設計に資するものである。すなわち、本研究で提案した共培養モデルは、構造的・生物学的に統合された新たな抗菌性評価手法として、AM バイオマテリアルの設計と機能評価において有用な基盤技術となることが示された。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (23H00235)、ならびに JST-CREST 革新的力学機能材料の創出に向けたナノスケール動的挙動と力学特性機構の解明 (ナノ力学) (JPMJCR2194)、JST-CREST 分解・劣化・安定化の精密材料科学 (JPMJCR22L5) などの支援を受けて実施された。ここに謝意を示します。

参考文献

- 1) J. Lia, L. Qinb, D. Zhao, et al.: “Materials evolution of bone plates for internal fixation of bone fractures: A review”, *Journal of Materials Science & Technology*, **36** (2020), 190-208.
- 2) H. Zhang, S. Xu, P. Duan, et al.: “Design of internal fixation implants for fracture: A review”, *Journal of Orthopaedic Translation*, **50** (2025), 306-332.
- 3) H. Zhou, Y. Yang, W. Huang, et al.: “Current Status and Perspectives of Diagnosis and Treatment of Periprosthetic Joint Infection”, *Infection and Drug Resistance*, **17** (2024), 2417-2429.
- 4) E. A. Masters, B. F. Ricciardi, E. M. Schwarz, et al.: “Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management”, *Nature Reviews Microbiology*, **20** (2022), 385-400.
- 5) E. Davoodi, H. Montazerian, E. Toyserkani, et al.: “Additively manufactured metallic biomaterials”, **15** (2022), 214-249
- 6) A. Matsugaki, M. Ito, T. Nakano, et al.: “Innovative design of bone quality-targeted intervertebral spacer: Accelerated functional fusion guiding oriented collagen/apatite microstructure without autologous bone graft”, *The Spine Journal*, **23** (2023), 609-620.
- 7) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Umakoshi, et al.: “Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by micro-beam X-ray diffractometer system”, *Bone*, **31** (2002), 479-487.
- 8) J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano, et al.: “Adaptive Enhancement of Apatite Crystal Orientation and Young’s Modulus Under Elevated Load in Rat Ulnar Cortical Bone”, *Bone*, **181** (2024), 1-10.
- 9) R. Watanabe, A. Matsugaki and T. Nakano: “Host bone microstructure for enhanced resistance to bacterial infections”, *Biomaterials Advances*, **154** (2023), 1-9.
- 10) T. Jiang, M. T. Zheng, N. J. Ouyang, et al.: “The effects of matrix stiffness on immune cells in bone biology”, *Mechanobiology in Medicine*, **2** (2024), 100046.
- 11) T. Matsuzaka, A. Matsugaki and T. Nakano: “Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli”, *Biomaterials*, **279** (2021), 1-10.
- 12) Y. Ando, M. Tsukasaki, H. Takayanagi, et al.: “The neutrophil-osteogenic cell axis promotes bone destruction in periodontitis”, *International Journal of Oral Science* volume **16** (2024), 16-18.
- 13) A. Matsugaki, T. Matsuzaka, T. Nakano, et al.: “PBF-LB fabrication of microgrooves for induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells”, *International Journal of Bioprinting*, **10** (2024), 406-416.
- 14) V. Granata, V. Possetti, Cristina Sobacchi, et al.: “The osteoblast secretome in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis”, *Frontiers in Immunology*, **13** (2022), 1048505.
- 15) Yiyu Peng, L. Li, X. Bi, et al.: “Effect of Bifunctional β Defensin 2-Modified Scaffold on Bone Defect Reconstruction”, *ACS Omega*, **5** (2020), 4302-4312.

代表者メールアドレス

中野貴由 nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp