

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：85306

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18585

研究課題名（和文）Diamond-like carbonの尿路留置カテーテルへの適用

研究課題名（英文）Study for application of Diamond-like carbon to indwelling urinary catheters

研究代表者

和田里 章悟（Watari, Shogo）

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター（臨床研究部）・独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター（臨床研究部）・医師

研究者番号：80833277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細径カテーテルの内腔にDiamond-like carbon (DLC) コーティングを成膜する事により、カテーテル表面への細菌バイオフィルムの形成および尿路結石の付着を抑制する効果が示された。バイオフィルムの抑制効果は14日間にわたって持続すること、DLCコーティングは尿や細菌の曝露下においても、数ヶ月にわたって安定することも示された。ミニブタを用いたDLCコーティングカテーテルの尿路留置実験では、閉塞無く21日間の留置ができ、尿道粘膜に炎症所見は認めず高い安全性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路の閉塞や排尿障害に対して尿路に留置されるカテーテルは細菌バイオフィルムや尿路結石により予定外に閉塞してしまうことがある。本研究では、新世代のコーティング基材であるDiamond-like carbon(DLC)を尿路カテーテルへ応用し、尿中におけるバイオフィルムと尿路結石の抑制効果を証明した。DLCカテーテルは尿中でも長期間剥離や変性を起こさず、尿路カテーテルの医学的課題を解決する有望な技術であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study we demonstrated that a diamond-like carbon (DLC) coating on the lumen of a thin catheter inhibited bacterial biofilm formation and encrustation to the catheter surface. The biofilm inhibition was maintain at least 14 days. Furthermore, the DLC coating remained stable for several months under exposure to urine and bacteria. In vivo experiments with DLC-coated catheters indwelling in the urinary tract of swine showed that the catheters could remain in place for 21 days without obstruction and that there was no inflammatory finding in the urethral mucosa.

研究分野：尿路感染症

キーワード：Diamond-like carbon スツルバイト バイオフィルム キャピラリーフローセル 尿路留置カテーテル 尿路感染症 尿路結石

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路留置カテーテル(尿道カテーテル、尿管ステント)は、現代の医療において必要不可欠な尿路管理デバイスである。悪性腫瘍や排尿障害を中心に、尿路留置カテーテルを必要とする患者は非常に多く、本邦において尿道カテーテルは年間約1,000万本、尿管ステントは約20万本が使用されている(矢野経済研究所, 2017年)。尿路カテーテルの留置により違和感、痛み、性欲減退、血尿、膿尿といった副作用が起こる。尿道カテーテルは約1ヶ月、尿管ステントは約3ヶ月で定期交換が行われる。しかし、予定外のカテーテルの閉塞がしばしば問題となる。カテーテルの閉塞と尿路の感染を併発すると敗血症や腎不全など致命的な状態に陥り、緊急手術や血液透析を要することもある。閉塞の原因として細菌バイオフィーム(図1、所蔵・帰属:岡山大学泌尿器科)やカテーテル表面への結石付着の頻度が高いことが知られるが、確立された予防策は無いのが現状である。



(2) 本研究で使用する Diamond-like carbon (DLC) は半永久的に劣化しない超薄膜(数十ナノメートル単位)のコーティング素材であり、高い耐久性、耐摩耗性から自動車エンジン等の工業分野で使用されてきた。一方で、生体への親和性が高くアレルギーを起こしにくい上、抗菌性を有しており整形外科や歯科領域では実用段階に入っている。付加的な加工を施すことで親水・疎水性、表面電位等のコントロールが可能であるという特性も持つ。低コストな次世代の医療機器用コーティング材料として期待されるが、対象構造物表面への平面的なコーティングに限定され、カテーテルのような管状の対象物の内腔へのコーティングは不可能であった。その状況下で、2016年に岡山理科大学の研究チームによって独自の管状構造物内腔面へのDLCコーティング技術が世界で初めて開発された<sup>1)</sup>(図2)。



## 2. 研究の目的

DLCは高い生体適合性を有するため、カテーテル留置による違和感などの改善が期待できる<sup>2)</sup>。DLCの有する抗菌性等の特性により、尿路留置カテーテルの表面における細菌バイオフィームや結石の付着を抑制することが可能となれば、現存のデバイスよりも長期間の開存、予定外の閉塞の防止が期待できる。本研究ではDLC尿路留置カテーテル開発と実臨床への応用を目標に、必要な基礎的データを収集した。まず、尿路留置カテーテルを想定した細径チューブの内腔にDLCコーティングを適用した。次に、*in vitro*の実験で尿路留置カテーテルに最適なDLCコーティングの種類とコーティング条件を明らかにした。さらに、最適な条件で作成したDLCカテーテルで*in vivo*動物モデル実験を行い、その有効性と安全性を調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) コーティングの物性評価

DLCコーティングは炭化水素ガスに交流高電圧を負荷しプラズマ化させることで、炭素イオン、水素イオンを高エネルギーで対象物に衝突させることで堆積する膜構造である。炭化水素ガス

により堆積した DLC をプロトタイプとし、プロトタイプの成膜後に酸素やアンモニアガスを充填し再び交流高電圧によりプラズマ化させることで、親水性や表面電荷を変化させた付加 DLC も作成できる。炭化水素ガス、酸素、アンモニアガスそれぞれの電圧を負荷する時間を複数設定し、コーティングした材料を準備する。それぞれのコーティングの表面構造を、電子顕微鏡、X線元素分析装置、表面粗さ測定器、ゼータ電位の測定により評価する。

#### (2) キャピラリーフローセル実験

細菌のバイオフィーム形成を阻害する作用を、持続フローセルシステムを用いて、経時的に、かつ定量的に検証する。コーティングの対象物としては、現在尿道カテーテルとして広く使用されているシリコン素材の内径 2mm のチューブとした。DLC コーティングを施したシリコンチューブと対照となる非コーティングのシリコンチューブに GFP (Green fluorescent protein) 産生緑膿菌株を定着させた後に人工尿を灌流する。緑膿菌はバイオフィーム形成能力が高い細菌の一つである。チューブ内腔に不可逆に付着した GFP 産生緑膿菌が、人工尿灌流下で形成するバイオフィームを共焦点レーザー走査型顕微鏡によって定量化する。観察期間は細菌バイオフィームが十分に成熟する期間を考慮し 14 日間とした。<sup>3)</sup> (1) の物性評価の結果とあわせ、細菌バイオフィーム抑制に重要な物性を推測し、最適な DLC コーティングの種類と条件を決定する。

#### (3) 結石付着について

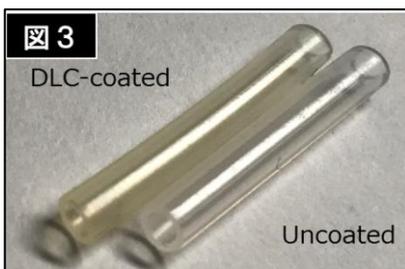
尿路留置カテーテルの閉塞のもう一つの主たる原因である結石の付着に対する DLC の有効性を検証する。尿路由来の細菌である *Proteus mirabilis* を人工尿中に混和し、pH をアルカリ性に変化させることで結石生成を促進できる。直径 12mm のシリコン製円盤状プレートに DLC をコーティングし、24 ウェル細胞培養プレート内に入れ、同プレート内で人工尿と *P. mirabilis* を振盪培養する。人工尿からプレート表面に析出し、付着した結石成分を原子吸光分析装置で定量分析した。対照は同形状の非コーティングシリコンとした。

#### (4) 動物実験

(1) から (3) で決定した最適な DLC コーティングを施した尿路留置カテーテルをブタの尿路に留置し、閉塞の有無、尿道の炎症について評価する。対照は非コーティングステントとした。コーティングを施した尿路留置カテーテルはガス滅菌し、条件統一のため、対照群も一度開封して同様の滅菌をかけて使用した。月齢 1 ヶ月のブタ (メス、30kg 前後) を使用し、カテーテルの留置は全身麻酔下、碎石位で行う。ストレスの少ない専用飼育場での長期管理を行い、DLC コーティングステントの有用性と生体での安全性を検証する。

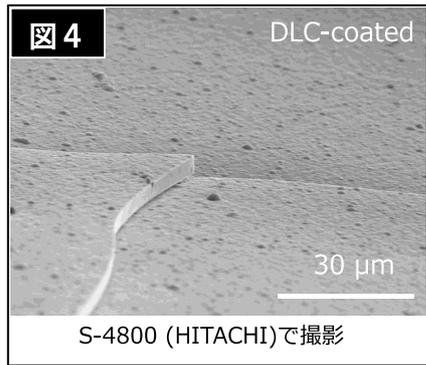
### 4. 研究成果

#### (1) コーティングの物性評価

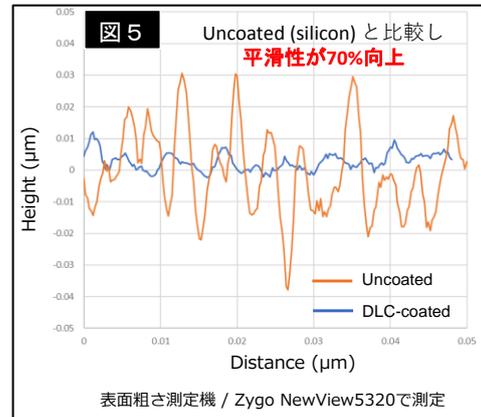


既存のカテーテル内腔へのコーティング方法をさらに応用し、内腔と外面の両方に同時にコーティングを行う方法を開発、特許出願した。プロトタイプの DLC コーティングは淡い黄色調の着色を起し、成膜時間が長いほど濃く変化した (図 3)。

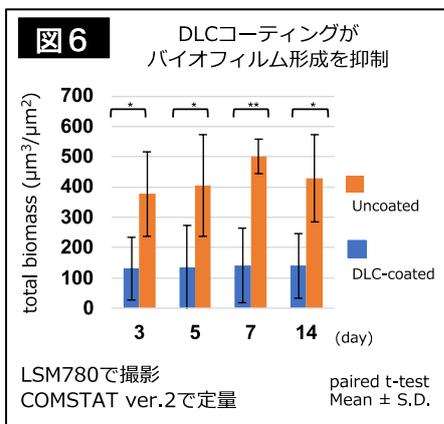
X線元素分析装置によりコーティングを行うことで、カテーテル内腔のシリコン表面の炭素の割合は約3割から7割に増加し、電子顕微鏡により薄膜が形成されていることが観察された。DLCの薄膜はシリコンが柔軟であるためにひび割れ(クラック)が生じていたが剥離や脱落を起こしている箇所は無かった(図4)。この薄膜は大気中や人工尿中に数ヶ月曝露させても変性や剥離を起こすことは無かった。



表面の粗さの測定により、コーティングをしていないシリコンよりもプロトタイプのDLCコーティングシリコンは平滑性が70%向上することが示された(図5)。酸素やアンモニアガスの負荷を行うと、DLC膜の表面に edging が生じ、平滑性が損なわれることが判明した。ゼータ電位を測定すると、プロトタイプのDLCと比較し、酸素負荷したDLCは表面の電荷が負(マイナス)となることがわかった。

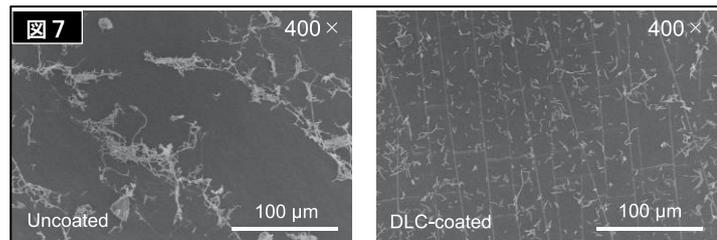


(2)キャピラリーフローセル実験



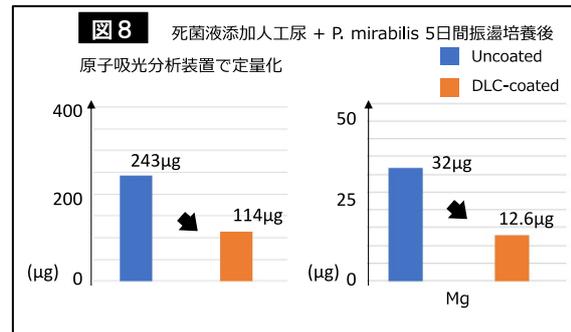
14日間の持続的な人工尿灌流下でGFP産生緑膿菌が形成したバイオフィームを3、5、7、14日時点で定量化した。プロトタイプのDLCは非コーティングと比較し統計学的に有意な差をもってバイオフィームの形成を抑制した。(図6)。酸素負荷DLCは、電荷的にマイナスであるという特徴を持っており、細菌との電氣的斥力が働くためより高い抑制能が期待された。しかし、実際にはプロトタイプのDLC(成膜時間20分)が最も高い効果を発揮した。細菌のバイオフィーム形成を抑制するには、電荷による静電的な斥力よりも、表面の平滑性の方が重要なのではないかと推測された。

実験開始より2時間の段階でチューブ表面に付着した細菌を観察すると、非コーティングシリコン表面の緑膿菌は集簇しmicro colonyの形成をしているのに対し、DLCコーティングチューブでは表面に付着した僅かな細菌が、孤立し散在していた(図7)。細菌が物質表面に付着すること、そして付着した後のtwitching motility(物質表面を移動する動き)を、DLCが持つ平滑性が抑制している可能性が推測された。



### (3) 結石付着

人工尿と *P. mirabilis* を混和したウェルプレート内に、*P. mirabilis* の死菌をさらに混和することで結石の析出を大きく促進できることが判明した。5日間の振盪培養で、シリコン製プレートに付着した結石に含有されるカルシウムとマグネシウム量を原子吸光分析で定量化した結果、プロトタイプ of DLC でコーティングしたシリコン製プレートでカルシウム、マグネシウムの付着量は大幅に減少した(図8)。



### (4) 動物実験

これまでの実験結果から、細菌バイオフィーム形成の抑制と結石付着の抑制に対して、プロトタイプ of DLC (成膜時間 20 分) が最適なコーティングであると判断した。2頭のブタ (メス、30kg 程度) の尿道に DLC コーティングをしたシリコン製尿道カテーテルと非コーティングシリコンカテーテルをそれぞれ留置した。いずれのカテーテルにおいても、3週間の飼育期間で閉塞は起こらなかった。2週間程度留置した時点で、非コーティングカテーテルを留置したブタの尿道から少量の白色の膿様の液体の流出を認めたが、DLC コーティングシリコンを留置したブタの尿道からは認めなかった。非コーティングシリコンと比較した DLC カテーテルの閉塞に対する有効性を示すことは困難であった。しかし、生体における安全性には問題が無いことが示され、寧ろ、コーティングをしていないシリコンよりも生体の炎症反応は抑えられる可能性が期待される。

### (5) 今後の展望

今回の研究を通して、DLC コーティングは尿路カテーテルの内腔に適応可能であり、尿中でも長期間脱落しないことや、細菌バイオフィームの形成と結石の付着を抑制する効果を持つというデータを収集した。ブタを使用した生体実験でも安全性に問題はない事が示唆された。本研究で得られた基礎データから、DLC 尿路カテーテルは実臨床での使用を検討する価値が高いと考える。医療品として実用化するため、医療機器メーカーや医薬品製造会社へのコンタクトを取りプレゼンテーションに取り組んでいく。

### <引用文献>

- 1) Nakatani T, Imai Y, Fujii Y, Goyama T, Ozawa S. Novel DLC Coating Technique on an Inner-wall of Extended Polytetrafluoroethylene Vascular Grafts Using Methane Plasma Produced by AC HV Discharge. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 2018; 31: 373-7.
- 2) Laube N, Kleinen L, Bradenahl J, Meissner A. Diamond-like carbon coatings on ureteral stents--a new strategy for decreasing the formation of crystalline bacterial biofilms? *J Urol*. 2007; 177: 1923-7.
- 3) Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002; 184: 1140-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shogo Watari, Koichiro Wada, Motoo Araki, Takuya Sadahira, Daiki Ousaka, Susumu Oozawa, Tatsuyuki Nakatani, Yuichi Imai, Junichi Kato, Reiko Kariyama, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu	4. 巻 28(12)
2. 論文標題 Intraluminal diamond-like carbon coating with anti-adhesion and anti-biofilm effects for uropathogens: A novel technology applicable to urinary catheters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1282-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14675.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田里章悟
2. 発表標題 DLCの泌尿器領域への応用
3. 学会等名 第2回DLC研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田里章悟
2. 発表標題 Diamond-like carbon 尿路留置カテーテル開発の現状と展望
3. 学会等名 日本医用DLC研究会第3回総会・研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 尿路カテーテル	発明者 和田里章悟, 逢坂大樹, 荒木元朗, 和田耕一郎, 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-122972	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

令和2年度日本医用DLC研究会研究奨励賞受賞  
<https://www.dlc-med.org/reports>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------