

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12803

研究課題名(和文) 抗菌性分子を徐放する生分解性シルク縫合糸の創出

研究課題名(英文) Development of absorbable silk fibroin-based sutures with anti-bacterial properties

研究代表者

橋本 朋子 (Hashimoto, Tomoko)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：10589930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、合成由来の既存吸収性縫合糸に比べ、緩やかに生分解・吸収され、さらに生分解・吸収に伴い抗菌性分子を徐放する新しいシルクフィブロイン縫合糸の創出を目指して各評価・検討を進めた。またさらに、新規ペプチド型抗菌分子を設計・合成し、シルク糸への固定化を試みた。オートクレーブ(AC)処理とメタノール水溶液への浸漬処理を組み合わせることで、緩やかに分解・吸収される特性を有するシルク縫合糸を作製した。また、AC処理によりシルク糸に固定化でき、生理的条件下で緩やかに放出され、生体への安全性が高い新しい抗菌性分子の創出に寄与する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において2000年代に腸線製のカットグットの使用が禁止されて以降、使用されている吸収性縫合糸は全て合成由来である。また近年は、吸収性の有無によらず、新しい素材を使った縫合糸は世界的にも上市されていない。さらに、手術予後のSSI回避のためには、一定期間の抗張力維持と共に抗菌活性の維持が求められるものの、既存の抗菌剤コーティング生分解性縫合糸では、効果的なSSI回避が示されていない状況にある。このような動向の中、本研究で得られた糸の生分解・吸収のメカニズム、抗菌分子の徐放制御に関する知見は、学術的にも意義があり、また新しい製品の可能性として社会的意義をも有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, novel absorbable silk fibroin-based sutures w that slowly releases antibacterial molecules during biodegradation and absorption in the tissues. Furthermore, novel peptide-type antibacterial molecules were designed and synthesized. By combination of autoclave (AC) treatments and immersion treatments in aqueous methanol solutions, silk suture showed slow biodegradation properties. Additionally, novel antibacterial molecules were immobilized on silk sutures by AC treatment without degradations and were slowly released from sutures under physiological conditions.

研究分野：高分子バイオマテリアル

キーワード：シルク縫合糸 吸収性 抗菌性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

既存の吸収性(生分解性)縫合糸の抗張力維持期間は比較的短い。例えば脂肪族ポリエステル由来であるポリグリラクチン製縫合糸の場合、3週間後の抗張力は0-50%程度に下がる。しかしながら、超高齢社会を迎えている我が国では、3週間以後も抗張力を維持できる縫合糸が必要である。なぜなら、対象組織や創傷サイズによっては、特に生理活性や治癒能力が低下した高齢患者における組織の十分な接合には時間を要するためである。また、術後の大きな問題として、手術部位感染(SSI, Surgical site infection)があり、大腸や膀胱等の手術での臓器/腔感染や、切開部での感染等、体内外の外科手術において発症する。SSIは致命的となることはなくとも、術後の回復に大きく影響する。この発症が患者のQOL低下をもたらす、さらに入院期間延長による医療費の高騰にもつながるため、早急に予防策を講じることが求められる。SSI要因は、患者の年齢や健康状態、手術中の手技や所要時間等が挙げられており、それぞれ対策が講じられている。これら因子のうち、米国疾病管理予防センターは「SSI予防のため、抗菌剤コーティング縫合糸の使用を考慮に入れる」と提言しており、適切な抗菌性縫合糸の選択・使用もSSI予防に有用な一手であると考えられる。現在、抗菌剤として2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル(トリクロサン)がコートされた縫合糸が使用されている。しかしながら、米国食品医薬品局(FDA)はトリクロサン等の長期的曝露が、薬剤耐性又はホルモンへの影響等のリスクをもたらす可能性があるとし、2013年に規制案を公表している。このFDAの措置を受けて、2016年には厚生労働省が石鹸等に含まれる該当薬剤の切り替えを要請している通り、トリクロサンは日本国内でも使用が避けられてきている抗菌性薬剤である。よって縫合糸に適用する抗菌剤の選択や開発も重要であると言える。

2. 研究の目的

「非吸収性縫合糸」として長く使用されているシルクフィブロイン(シルク)糸を、緩やかな生分解に伴い「抗菌性分子を徐放する生分解性シルク縫合糸」として新しく変貌させる。本課題で目指す緩やかな生分解とは、各組織・部位の接合期間に適した抗張力を維持しながら、抗菌性分子を徐放する、制御された分解である。これまでにシルク布帛に高温高圧水蒸気処理を施すとタンパク質二次構造変化を惹起できることを見出しており、この技術を縫合糸へ適応する。二次構造変化により縫合糸内シルク分子の分解特性を変え、シルク縫合糸を生分解性へと変える。さらに、外科手術後に高率で発症し問題となっている手術部位感染(SSI)の低減に寄与するべく、菌にのみ作用し安全性が高い生体由来の抗菌性分子(カチオン性ペプチド)を、AC処理中にシルク非晶領域へ抗菌性分子を固定化する。これら各処理により、各組織で求められる抗張力の維持をカバーできる様々な分解特性を有する「生分解性」と「抗菌性」を兼ね備えた縫合糸の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1)メタノール水溶液(MeOH)への浸漬、オートクレーブ(AC)処理の有無、またその温度を変えて組み合わせ、シルク縫合糸の処理を行った。各処理による糸の表面近傍のタンパク質二次構造、抗張力変化をそれぞれ全反射測定法によるフーリエ変換赤外吸収スペクトル測定、引張試験(JIS T 4101:2005)により調べた。また各処理糸を酵素共存/非共存下のリン酸緩衝液(pH:7.4)に所定期間浸漬し、回収後に重量、二次構造、抗張力の変化を調べた。糸の特性に与える影響を調べた。さらに、各処理を施したシルク縫合糸のラット皮下への埋入を行った。

(2)AC処理(121℃)中に共存させシルク糸へ固定化が可能な熱耐性を有する抗菌ペプチドを設計し、Fmoc固相合成法により合成した。精製後、熱耐性やシルク糸への固定化をAC処理により行った。また固定化後のシルク糸を所定日数、リン酸緩衝液の浸漬し、糸からの放出挙動を調べた。さらにペプチド固定化布帛を用いた抗菌性評価を行った。

4. 研究成果

(1)AC処理およびMeOH浸漬処理を組み合わせ作製した各処理シルク糸の二次構造解析より、処理温度またMeOH処理の有無が二次構造の微増減に影響することが認められた。各処理糸の引張試験により、処理温度が高いほど糸の強度にわずかな低下傾向が示され、また生分解試験の重量変化の評価において、未処理糸に比べ、AC処理糸では分解の促進が示され、その処理温度が高いほど、糸の生分解性が高くなる可能性が示唆された。生分解に伴う、糸表面近傍の二次構造含有率にも微増減が示された。また、生分解に伴う抗張力変化は、生分解性との関連性が示唆された。

続いて、AC処理による抗菌性モデル分子の固定化効率を評価した結果、室温浸漬(RT 30 min)に比べ、AC処理が糸への分子の固定化効率を向上させる結果が得られた(図1)。表面の二次構造などの特性が分子の固定化に影響していると考えられる。また抗菌性モデル分子を固定化し

た処理系からのモデル分子放出試験の結果、固定化量および生分解性に伴って放出量も変化した。ただし、AC 処理温度が高い場合、モデル分子が糸の表面だけでなくより繊維深部に固定化され、放出量が減少した可能性が示唆された。

ラット皮下へ埋入し、所定日数後回収した処理系の抗張力は、*in vitro* 生分解試験での生分解後の抗張力変化と同様の傾向が認められた。

以上の結果より、AC と MeOH 処理を組み合わせることで緩やかに分解するシルク縫合糸を作製できた。

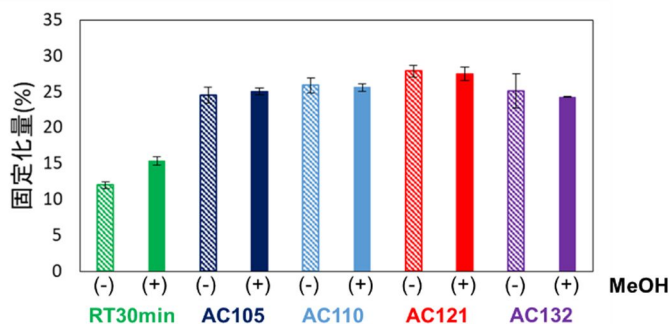


Fig. 1 The amounts of immobilized Rhodamine B on silk fibroin sutures.

(2) 熱耐性評価より、設計・合成した全てのペプチドが AC 処理への耐性を有することが示された。この結果は、(1) で得られたモデル分子を用いた評価とも一致しており、シルク糸への固定化評価では、室温浸漬に比べ AC 処理による固定化量が多くなり、系中の水分子、ペプチド、シルク分子の運動性が向上したことにより、ペプチドのシルク非晶領域内への浸潤と固定化が促進したためと考えられる。また、カチオン性配列を付記していない最も短いペプチドの固定化効率が高かった。シルクフィブロイン、ペプチド分子の安定構造解析によりカチオン性配列の有無やその鎖長が異なるペプチドのシルク分子への固定化メカニズムを詳細に評価した結果、シルクへの固定には、ペプチド-シルク間の静電的な相互作用だけでなく、両分子に含まれる芳香環同士の相互作用も寄与している可能性が示唆された。また、リン酸緩衝液中での放出試験では、固定化繊維からの緩やかなペプチド分子の放出が認められた。この放出濃度範囲においてマウス繊維芽細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から AC 処理によりシルク糸に固定化でき、生理的条件下で緩やかに放出される新しい抗菌性分子の創出に寄与する知見が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 橋本朋子、玉田靖、山岡哲二	4. 巻 38
2. 論文標題 臨床における吸収性高分子バイオマテリアル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオマテリアル –生体材料–	6. 最初と最後の頁 236-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本朋子
2. 発表標題 新しい応用展開を目指した高機能化シルクの創出
3. 学会等名 日本家政学会 第49回被服材料部会夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本萌子、玉田靖、山岡哲二、大背戸豊、橋本朋子
2. 発表標題 抗菌性ペプチドの設計とシルクフィブロインへの固定化評価
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本萌子、玉田靖、山岡哲二、大背戸豊、橋本朋子
2. 発表標題 シルクフィブロインへの新規抗菌性ペプチド固定化評価
3. 学会等名 第69回日本シルク学会研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本萌子、玉田靖、山岡哲二、大背戸豊、橋本朋子
2. 発表標題 抗菌性ペプチド固定化シルクフィブロイン系の創出
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第17回若手研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本朋子、森島知子、山岡哲二、玉田靖
2. 発表標題 吸収性を示すシルクフィブロイン系の機能性評価
3. 学会等名 2022年 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本朋子、亀田恒徳、黒子弘道、山岡哲二、玉田靖
2. 発表標題 新しい機能を有するシルク縫合糸の創出
3. 学会等名 2021年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本朋子
2. 発表標題 シルクの魅力を活かしたバイオマテリアル研究
3. 学会等名 日本蚕糸学会 中部支部第77回・東海支部第73回 研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 朋子
2. 発表標題 シルク縫合糸への生分解性・抗菌性付与
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	山岡 哲二 (Yamaoka Tetsuji) (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

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
---------	---------