

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12666

研究課題名(和文) 抗菌性と血管内膜誘導性を備えた多孔質性チタンスキャフォールドの開発

研究課題名(英文) Development of micro-porous titanium scaffold for equipping antibacterial functions and promoting neointimal growths

研究代表者

関根 一光 (SEKINE, Kazumitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：50447182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内埋植に幅広く使用されるチタンについて、細胞足場となりながら抗菌性を目的としたキトサン・ウレタン様表面修飾による表面作成手法の検討と表面分析、細胞足場修飾に関する基礎的検討をおこなった。

純チタン試料を水酸化処理後に、3種類の異なる濃度のコラーゲン・キトサン溶液を塗布後にイソシアネート処理することでキトサン・ウレタン表面を作成した。

各試料片の化学的、生化学的、光学的評価をおこなったところ、対照チタン群と比べて良好なぬれ性と確かな表面修飾、さらには対照チタン群の4倍程度、従来法とは同程度の細胞接着性を確認できた。今後はキトサン濃度とウレタン様生成膜の特性についての詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の目的は、近年で広く普及した補助人工心臓の術後における血液接触表面における血栓形成や感染症に対する要素技術である。侵襲度の高い循環器系手術において、術後の血液塞栓症や感染症に対する対策は主に薬剤投与や術後ケアになるが、根元にあるのは人工材料上への血栓形成や細菌付着能にある。本課題はそのような術後リスクに対し、循環器系デバイスで広く使用されるチタンの表面修飾法を提案することで、血栓形成を低減するための自己血管内皮の誘導、またデバイス上への細菌付着の低減を主眼にしており、今後さらに普及が想定される人工心臓等の循環器系チタンデバイスへ広く使用される事に意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：To developing chitosan-urethane-like surface modification for Titanium(Ti) with the cell adhesion and the anti-bacterial effect, we studied fundamental coating process with chitosan and collagen onto the Ti, and then evaluated.

Ti specimens were treated firstly hydroxylation treatment and isocyanate treatment with various concentration of collagen, citrate and chitosan mixture. Treated specimens were evaluated with hydrophilic study, optical study, X-ray study, and cell cytotoxicity and cell compatibility. Our results indicated that chitosan-urethane like surface modification showed fine hydrophilicity, good cell adhesion and compatibility compared to bulk Ti material, and exact chitosan modification onto the surface of Ti with thin layered composite that were guaranteed with optical analysis and X-ray analysis and observation.

研究分野：生体材料工学

キーワード：スキャフォールド チタン 血液接触表面

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チタンはその不動態化による生体親和性の高さから、生体内埋植に幅広く使用されている。近年では、補助人工心臓の技術発展により、終末医療としての症例が増えており、高度高齢化や成人病の増加などの社会的動向からも循環器領域での需要が増えると予想される。また歯科や整形外科においても、歯科用インプラントや人工関節など、チタンを基材とした人工臓器が広く普及しており、骨格系代替においても需要が増える一方である。そのような生体内埋植に幅広く使用されるチタンについて、我々は歯科インプラントに限らない様々な応用を期待し、細胞足場効果の向上を目的としたチタンの表面修飾について検討をおこなってきた。それにより、チタンの水酸化処理とI型コラーゲン後のイソシアネート処理によるウレタン様表面修飾が、細胞足場としての効果を認めた。その一方、チタン表面が有機質コーティング性状となることは菌類に対しても足場となってしまうことを、黄色ブドウ球菌による予備的な細菌性試験によって確認した。そのため、細胞に対する足場効果の向上をさせるが、抗菌性もしくは菌類に対して有利とならないような表面修飾の実現が必要と考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題としては、足場とするチタン表面の構造について、平均粒径 $150\ \mu\text{m}$ のマイクロチタン粒子の焼結体によるマイクロ多孔体チタン構造とすることで、接触表面積を向上させることによるチタン足場としての機能向上についても検討してきた。そのため、細胞足場効果の高いチタン表面修飾法の確立は、チタン構造体の接触表面積の向上と相乗的に高い細胞接着性が期待できるため、その実現が期待される。そこで、細胞に対する足場効果はそのままに、菌類に対しては抗菌性を示すような都合の良いチタン表面修飾法として、その抗菌性が広く知られるキトサンを1次塗布製剤として、抗菌性と細胞足場効果を期待した修飾法に関する基礎的検討することとした。キトサンは、我々がこれまでのチタン表面修飾に用いてきた Type-I コラーゲンと同様にアミノ基を有するため、従来法に準じたウレタン様表面作成の可能性がある。

3. 研究の方法

チタン試料はいずれも JIS2 種を使用した。表面修飾法についての試料としては、 $10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ の純チタン切板の修飾対象表面を #400 湿式研磨し、洗浄後に乾燥させた。試料は遠沈管中で $10\ \text{mL}/\text{片}$ の $15\% \text{H}_2\text{O}_2$ に浸漬し、 60°C で 48 時間恒温下においた。

本課題で抗菌性媒体として期待しているキトサンは水に難溶性であり、酸に可溶である。そのため本課題においては、細胞接着性に関与する因子としてコラーゲンを初めとする有機質を考察している点から、同じく有機の酸への溶解であればその修飾溶液を従来法と同等に扱えると考え、数種の酸への溶解性を検討する中で予備試験を経て、クエン酸を溶解溶媒として選定した。時間終了後に超純水で超音波洗浄して風乾した後、3種類の異なる濃度のキトサン溶液 $100\ \mu\text{L}$ を滴下し、クリーンベンチ内で風乾した。キトサン溶液は最終的に、 $0.5\ \text{M}$ クエン酸への溶解が適切となり、この溶液にそれぞれ $1\ \text{mg}/\text{mL}$ 、 $10\ \text{mg}/\text{mL}$ 、 $100\ \text{mg}/\text{mL}$ となるように溶解調整して作成した。風乾後の試料片は $5\% \text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{NCO})_2\text{-Benzene}$ 溶液に $3\ \text{mL}/\text{片}$ で浸漬し、 60°C に 2 時間恒温保持した。時間終了後、試料片は Benzene 溶液洗浄、その後超純水で洗浄し、風乾させた。これらをそれぞれ CTS-1、CTS-10、CTS-100 とした。対照群として研磨処理のみのチタン片 (C)、また実験対照群として従来の $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$ の Type-I 塗布後は上記と同様に処理した試料 (Co1) を準備した。

各試料片はまず、イソシアネート処理前のコラーゲン溶液およびクエン酸キトサン溶液塗布後、また塗布後のイソシアネート処理およびその後の蒸留水洗浄後にデシケーター内での十分な乾燥の後でのデジタルマイクロスコープによる光学的観察、またイソシアネート処理後試料を金蒸着し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察による表面性状確認をおこなった。その後別試料においてぬれ性状評価として液滴接触角による親水性評価、修飾表面分析として反射法フーリエ変換赤外分光光度 (FT-IR) 分析および X 線光電子分光 (XPS) 分析、また細胞接着性評価としてマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 細胞の試料表面への播種後 2~6 日経過後の細胞接着性評価および LDH 細胞障害性評価、蛍光像による生死細胞接着様相評価をそれぞれおこなった。

4. 研究成果

図 1 に光学顕微鏡による表面の検鏡像を示す。イソシアネート処理前では CTS-1 は基材の研磨面、および Co1 群と同様な #400 研磨面が確認できた。Co1 群とも同様な虹色文様からも表面処理厚みも同等と考えられる。一方イソシアネート処理後では、Co1 群では鱗状虹色文様であったが、CTS-1 では同等の大きさの鱗状の明るい虹色文様が、CTS-10 群ではより細かい鱗状虹色文様を確認した。またいずれも研磨傷は確認できないため、文様からも比較的均質な層が生成できていると考えられる。また干渉色として考えると、処理層の厚みは $\text{Co1 群} > \text{CTS-1 (CTS-10)}$ であると考えられる。なお、CTS-100 群については、溶液塗布後およびイソシアネート処理後でいずれも有機的な肥厚層が、特にイソシアネート処理後には処理過程での気泡と考えられる表面を

確認した。また洗浄後ではあるものの粘着質な肥厚層であった。以後のSEMについて、CTS-100はその表面性状から観察対照外とした。SEM像を図2に示す。Col群およびCTS-10群では、乾燥によるひび割れた様相が確認できた。またCTS-1群では不定形な有機質構造体中に繊維状の形態を認めた。形態的には溶解前のキトサンに近い印象を持ったが、キトサンがより高濃度であるCTS-10では示さない形態であったため、十分な考察には至らなかった。

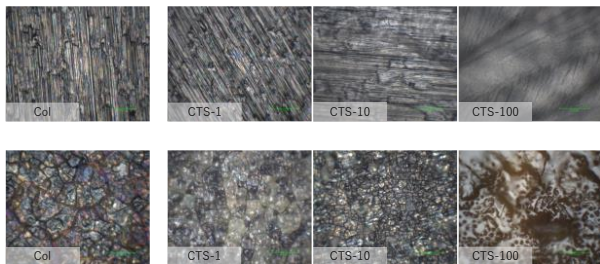


図1 チタン試料の光学顕微鏡 検鏡像

上段：各溶液塗布後に乾燥した試料

下段：イソシアネート処理後に洗浄した試料

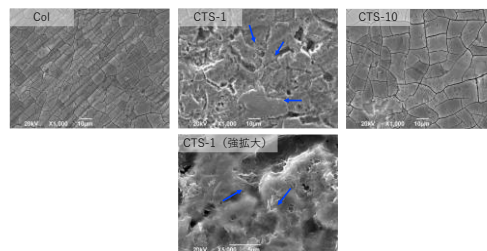


図2 チタン試料表面のSEM観察像

青矢印は繊維状，針状析出物を示す

液滴接触角による親水性評価については、それぞれ平均でC: 76.3° , Col: 52.2° , CTS-1: 50.8° , CTS-10: 54.1° , CTS-100: 62.3° (n=6)であった。CおよびColについては過去の測定と同等であり、またCTS群ではキトサン濃度が高いものほど接触角が大きくなる傾向であった。細胞接着性については、Col, CTS各群いずれもCと比較して4倍程度の細胞接着性が確認できたが、Col, CTSいずれの各群間での有意差を認めなかった。

表面分析のうちFT-IRの結果では、Amide Iを示すピーク強度がCTS-1 > CTS-10 > CTS-100となった(図3)。Col群およびCTS各群について、いずれもAmide I, C=O, O-Hを検出できていることから、ウレタン様表面が作成できていると推察された。またAmide Iの検出から、二次構造の詳細な解析が必要であることは今後の研究課題である。

図4にXPSの結果からの定量分析においても、N1sのatomic%はCTS-1で最も高くなる結果であった。Colと比較すると各CTS群でのN1sのatomic%は低値を示したが、C1sは同程度であった。またCTS-100では明らかな肥厚膜が確認できている。この結果より表面のウレタン様膜は高濃度ではウレタン結合が阻害される要因があると考えられる。またC1sの詳細分析として、キトサン溶液塗布後のウレタン化処理前後についても、キトサン濃度に依存してO=C-Oピークの減少が確認された。

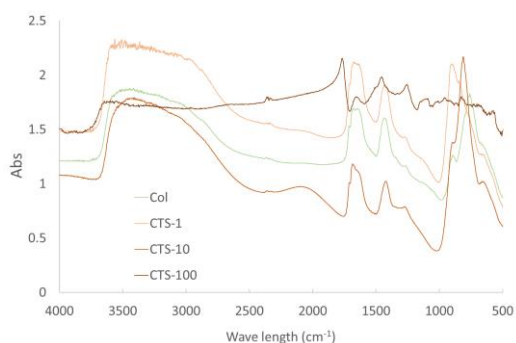


図3 FTIRによる修飾表面分析結果

Amide I (C=O stretch): $1,635\text{ cm}^{-1}$

Amide III (C-N stretch): $1,265\text{ cm}^{-1}$

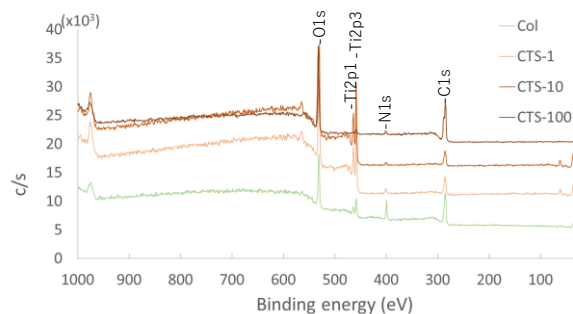


図4 XPSによる修飾表面分析結果

N1s: N-H, N-O, C1s: C-O, C-N, O=C-O (N=C=O)

本報告においては、従来法で1次塗布製剤としたコラーゲン溶液と同程度のウレタン様修飾を目指し、代替としたキトサン溶液でも同程度のウレタン様修飾が可能かどうかの基礎的検討をおこなった。ぬれ性や細胞接着性による評価では同等程度の結果を得たものの、化学的分析からはキトサン溶液濃度に依存したウレタン結合の減少が推察される結果を得た。今後はキトサン濃度とウレタン様生成膜の特性についての詳細な検討が必要である。また1次塗布製剤としたキトサンの抗菌性としての優位性についても今後、検討を進める必要がある。

以上の結果より、本課題実施期間においては抗菌性を期待して作成したキトサン溶液の調整と作成を検討し、従来までに検討してきたコラーゲン塗布からのウレタン様表面修飾とほぼ同等と推察される、キトサン溶液によるチタンへのウレタン様表面修飾に至った。実施期間中においては菌類による抗菌性試験の実施には至らなかったが、今後の変更点や改良改質を踏まえての抗菌性評価を後継研究で実施したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関根 一光, 武川 恵美, キム イエウン, 花輪 茂己, 浜田 賢一
2. 発表標題 抗菌性と細胞足場効果の向上を期待したチタン表面修飾の研究
3. 学会等名 令和5年度日本歯科理工学会近畿中四国地方会セミナー
4. 発表年 2023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	浜田 賢一 (HAMADA Kenichi) (00301317)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

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