

氏 名	澤井 恭久
(ふりがな)	(さわい やすひさ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 74 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項
学 位 論 文 題 名	Enhancement of in vitro antibacterial activity and bioactivity of iodine-loaded titanium by micro- scale regulation using mixed-acid treatment (混酸処理によりマイクロスケール制御されたヨウ 素担持チタンの in vitro 抗菌活性および生体活性に 及ぼす影響)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 中野 隆史 教授 根尾 昌志 教授 矢野 貴人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

チタン金属 (Ti)は、優れた生体親和性のため、口腔顔面領域の手術で用いられているが、Ti デバイスは骨との結合が不十分で緩みを生じることがある。また、口腔内細菌を原因とする術後感染は、しばしば直面する問題であり、その結果デバイス除去に至る可能性もある。そのため Ti デバイスには、骨結合性と口腔内細菌に対する抗菌性を持つことが望まれる。

これまでに Ti に NaOH-CaCl₂-加熱-ICl₃ 処理(ヨウ素処理)を施すと、特有のナノポーラス構造を持ち、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対し抗菌性を示し、擬似体液(SBF)中でアパタイトを形成することが明らかになっている。一方、Ti を混酸溶液(66.3% H₂SO₄ : 10.6% HCl = 1 : 1)に浸漬する(混酸処理)ことで、表面にマイクロスケールの凹凸が生じ、*SPPI*、

RUNX2、*ALP* 等の骨形成や骨分化を促す遺伝子発現を向上させると報告されている。本研究は、ヨウ素処理後の Ti の口腔内細菌に対する抗菌性を評価するとともに、混酸処理により形成したマイクロ構造がその後のヨウ素処理を施した Ti 表面の、抗菌性、アパタイト形成能及び骨芽細胞様細胞の細胞増殖や分化に及ぼす影響を調べることを目的とする。

《方法》

- ・試料作製：純 Ti 板を用い、未処理 Ti (UT)、ヨウ素処理を施した Ti (NaCaThIo)、混酸処理後にヨウ素処理を施した Ti (MA-NaCaThIo)を作製した。

- ・表面構造解析：表面形態を走査型電子顕微鏡(FE-SEM)及び共焦点レーザー顕微鏡により観察し、算術平均粗さ *Ra* 及び最大粗さ *Rz* を算出した。また、薄膜 X 線回折装置及び X 線光電子分光装置により結晶構造と化学組成を解析した。

- ・ぬれ性評価：処理直後から、真空中で 4 週間まで保管した試料につき、超純水を 4 μ L 滴下したときの接触角を測定した。

- ・イオン溶出評価：ヨウ素処理後の試料をリン酸緩衝液に 36.5℃で 2 週間まで浸漬した際の、ヨウ素およびカルシウムイオンの溶出量を誘導結合プラズマ発光分光装置により測定した

- ・アパタイト形成能評価：試料を SBF に 36.5℃で 3 日間浸漬し、浸漬後の表面を FE-SEM にて観察した。

- ・抗菌性評価：*Streptococcus mitis* と *Prevotella intermedia* を用い、ISO 22196 に準拠し、各試料上に 1×10^6 CFU/mL に調整した *S. mitis* および *P. intermedia* 菌懸濁液 100 μ L を播種した。相対湿度 95%、35℃、24 時間嫌気下で培養後、コロニー計数法にて生菌数を計測した。

- ・細胞接着・増殖試験：MG-63 および Vero 細胞を用い細胞増殖能を評価した。各試料上で 3 日、7 日間培養後、生細胞測定試薬を用いて、細胞数を計測した。また、1、3、24 時間培養後、試料上の細胞をグルタルアルデヒドにて固定し、細胞接着を FE-SEM にて観察した。

- ・細胞分化評価：MG-63 を試料上に播種し、コンフルエントになるまで培養後、7 日、

14 日間培養後のアルカリホスファターゼ(ALP) 活性を ALP 測定キットを使用して測定した。また、培養 7 日、14 日後にアリザリンレッド S による染色を行い、細胞の石灰化能を評価した。

・統計処理：一元配置分散分析により群間比較を行った後、Tukey 法で多重比較検定を行った。また、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

《結果》

NaCaThIo は厚み約 $1\ \mu\text{m}$ のナノポーラス層を有し、 Ra 及び Rz はそれぞれ $0.26\ \mu\text{m}$ 及び $1.56\ \mu\text{m}$ であった。一方、MA-NaCaThIo ではマイクロ／ナノスケールの階層構造を認め、マイクロ構造谷部においてナノポーラス層の厚みは約 $1.5\ \mu\text{m}$ と厚くなり、 Ra 及び Rz はそれぞれ $0.35\ \mu\text{m}$ 及び $2.21\ \mu\text{m}$ となり、NaCaThIo よりも有意に大きな値となった。これらの表面層はいずれもヨウ素含有カルシウム欠損チタン酸水素カルシウムとルチルから成り、いずれもヨウ素 10.8%及びカルシウム 2.7%程度を含んでいた。接触角を測定したところ、処理直後はいずれも超親水性を示し、真空下で 4 週間後に NaCaThIo で 27.0° 、MA-NaCaThIo で 7.5° とやや増加したものの高い親水性を維持していた。イオン溶出試験において、MA-NaCaThIo から溶出したヨウ素イオン濃度は 2 週間までに 12.6 ppm となり、NaCaThIo の 7.9 ppm よりも大きな値となった。カルシウムイオンにおいても、MA-NaCaThIo 及び NaCaThIo の溶出量はそれぞれ 0.25 ppm 及び 0.22 ppm となり同様の傾向を示した。これらの試料を SBF に 3 日間浸漬したところ、MA-NaCaThIo は NaCaThIo より多くのアパタイトが観察された。

抗菌試験結果によると、NaCaThIo 及び MA-NaCaThIo はいずれも *S. mitis* 及び *P. intermedia* に対して菌減少率 $>99.99\%$ の高い抗菌活性を示した。両群間の抗菌性を比較したところ、*P. intermedia* に対し、MA-NaCaThIo が有意に高い値を示した。

細胞試験結果から、MG-63、Vero 細胞に対し、NaCaThIo および MA-NaCaThIo はいずれも UT と比較して細胞接着を促進し、特に MA-NaCaThIo において多くの細胞伸長が見られた。培養 3 日後には NaCaThIo および MA-NaCaThIo に、培養 7 日後には MA-

NaCaThIo において UT よりも有意に高い細胞増殖が見られた。一方、同培養期間において Vero 細胞の増殖に差は認められなかった。培養 7 日後の MG-63 の ALP 活性を評価したところ、UT と比較して NaCaThIo は 7 日後に有意に上昇し、MA-NaCaThIo は 7、14 日後に有意に上昇した。さらに、MA-NaCaThIo は 14 日後に UT および NaCaThIo よりも有意に石灰化が促進していた。

《考察》

本研究により、ヨウ素処理を施した Ti が、口腔外科領域における主要な術後感染原因菌である *S. mitis* 及び *P. intermedia* に対して強い抗菌性を示すことが明らかになった。さらに、表面結晶構造、化学組成が同等であるものの、表面粗さの異なる NaCaThIo 及び MA-NaCaThIo を作製し、マイクロ構造がアパタイト形成、イオン徐放性、抗菌性及び細胞活性に及ぼす影響を調べたところ、MA-NaCaThIo はこれらの因子をいずれも向上させることが明らかになった。これは、MA-NaCaThIo のマイクロ/ナノ構造に起因する表面積の増大及びイオン徐放性能向上によるものと考えられる。また NaCaThIo、MA-NaCaThIo は、細胞毒性を認めず、UT に比較して初期の細胞接着に優れ、MA-NaCaThIo は早期の石灰化を促していることがわかった。このことから、MA-NaCaThIo は高い抗菌性と早期に骨結合を誘導する、新たな医療用デバイスとしての応用が期待される。

論文審査結果の要旨

口腔顔面領域における手術において、チタン(Ti)デバイスが骨結合不全で緩むことや口腔内細菌による術後感染は、しばしば直面する問題である。これまでにヨウ素処理を施した Ti はナノポーラス構造を持ち、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対して抗菌性を示し、擬似体液中でアパタイトを形成することが明らかになっている。また、Ti を混酸処理をすることで種々の細胞活性を向上させるマイクロスケールの凹凸が生じることもわかっている。

そこで申請者はヨウ素処理後の Ti の口腔内細菌に対する抗菌性を評価するとともに、混酸処理により形成したマイクロ構造が、その後ヨウ素処理を施した Ti 表面の、抗菌性、アパタイト形成能及び骨芽細胞様細胞の細胞増殖や分化に及ぼす影響を検討した。

本研究より、混酸処理後にヨウ素処理を施した Ti は、マイクロ／ナノスケールの階層構造を持ち、ヨウ素処理のみを施した Ti よりも表面粗さは高いが、同等の結晶構造および化学組成を持つことがわかった。またアパタイト形成、イオン徐放性、抗菌性、細胞接着、細胞増殖および骨分化誘導能についても向上していることが明らかになった。

これまでにナノスケール表面とマイクロ／ナノスケール表面での抗菌性について詳細に検証した報告はなく、今回の結果は、今後、高い抗菌性と早期に骨結合を誘導する新たな医療用デバイスの臨床的応用の基盤となることが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Biomedical Materials Research Part A

2024 in press

doi: 10.1002/jbm.a.37647