The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	自己組織化ナノ細孔を形成したSUS316Lステンレス鋼の薬剤徐放性
Author(s)	宮部, さやか; 藤永, 悠志; 土谷, 博昭 他
Citation	スマートプロセス学会誌. 2021, 10(4), p. 256-260
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/88670
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

研究論文

自己組織化ナノ細孔を形成したSUS316Lステンレス鋼の薬剤徐放性

Drug Release Characteristic of Type 316L Stainless Steel with Self-Organized Nanopores

宮部さやか*・藤永悠志*・土谷博昭*・藤本慎司*
Sayaka MIYABE, Yushi FUJINAGA, Hiroaki TSUCHIYA and Shinji FUJIMOTO

（Received 1 March 2021, Accepted 8 March 2021）

Drug-releasing implants are attracting attention as a local drug delivery system（LDDS）with high drug efficiency and few side effects because they can administer drugs locally and continuously. Since the surface structure of implants is important for drug-releasing implants, many research reports have been made using metallic surfaces with nanostructures such as TiO_2 nanotubes as the platform for LDDS. In present study, we investigated drug release characteristic of collagen coated Type 316L stainless steel with self-organized nanopores formed by anodic polarization. Regardless of whether or not nanopore structure, the collagen coating treatment increased the amount of drug loaded on samples. The samples with nanopore structure suppressed burst release and increased the rate of slow release.

Key Words: Local Drug Delivery System, Anodic Polarization, Nanopore, Nanostructure, Biomaterials

1. 緒言

現在、我が国は超高齢社会を迎えており、加齢による生体機能の低下や損失に加え、事故や疾病による身体の機能障害や機能不全に苦しむ患者数は増加している。失われた人体機能を再建し患者のQOL（Quality of Life）を向上させるため、人工関節などのインプラントを埋入する外科的手術が多く行われる。インプラントを埋入する際、インプラント周囲は血流が乏しく、細菌が繁殖しやすい環境になるため細菌感染が起こりやすく、合併症のリスクが伴う。さらに局所的な炎症、糖尿病や腎不全などの患者側の因子も加わり体系的な処置が困難になる恐れがある[1),2)]。患部の早期回復、インプラントと生体組織との接着およびインプラント本来の機能を適切に発揮するためには、感染症・炎症の予防および治療が必須であり、外科的処置を除けば、抗生物質、抗炎症薬、抗血液凝固剤あるいは抗再狭窄剤などの薬剤の静脈内投与、経口投与あるいは筋肉内投与が行われる[3),4)]。しかし、吸収効率の低さや全身の血管を介した輸送のため、ほとんどの薬剤は代謝あるいは体外へ排泄されてしまい、投与された薬剤のほんの一部しか標的作用部位へ到達できないため血中の薬剤濃度を長期間有効領域に保つことは難しい。薬剤の治療効果を得るために行われる大量頻回投与では、疾患部位以外での薬剤濃度が上昇し、標的組織以外での副作用の原因となる問題があり、このような薬剤管理には限界があると考えられている[5),6)]。そこで、この課題を克服するために、埋入部位でのインプラントからの局所的な薬剤投与が注目されている。こうした投薬の効果を体内で時間的、空間的にコントロールする技術はドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System: DDS）と呼ばれ、特に埋入部位からのDDSは局所ドラッグデリバリーシステム（Local Drug Delivery System: LDDS）と呼ばれる[7)]。局所的な投薬を可能とするLDDSには多くの利点が存在する。例えば、目的組織外への薬剤の影響を最低限に留め深刻な副作用が生じにくいこと、作用組織付近の薬剤濃度を適正に保ちやすいこと、肝臓などの作用による薬剤除去が生じず薬剤効率が向上することなどが挙げられる。

LDDSでは、インプラントをリザーバーとする場合、薬剤担持のためにインプラントの表面積は大きいことが望ましい。金属材料の表面積を増大させる手法としてエッチング法、ゾルゲル法、水熱法など様々な手法が検討されてきた[8),9)]。ナノサイエンスやナノエンジニアリングの発展により、金属材料でもナノオーダーでの構造制御が可能になった。金属表面を電気化学的に酸化する陽極酸化法は、大型な装置や複雑な工程を必要としないため、安価であり、電解液、印加電圧、時間、温度を制御することで、容易にナノオーダーで構造を制御できる利点を有する。陽極酸化によるナノ構造付与としては、ポーラスアルミナ[10-12)]やチタニアナノチューブ[13),14)]が広く知られている。ステンレス鋼においても陽極酸化処理により鋼表面にナノサイズの細孔（ナノホール）が付与できる[15)]。ステンレス鋼ナノホールは下地鋼に直接発現することからチタニアナノチューブで危惧される脆弱性は問題とならない。また、陽極酸化処理によってSUS316Lステンレス鋼表面にナノホールを付与した試料上で細胞増殖および細胞活性が向上する[16)]ことから、

＊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, Osaka University（2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan）

インプラント表面へのナノホール付与によるインプラント埋入後の生体適合性向上が期待される。

本研究では、SUS316L ステンレス鋼に陽極酸化処理によってナノホールを生成し、さらにⅠ型コラーゲンを塗布した試料の薬剤放出試験を行い、ナノホール構造やコラーゲン塗布が薬剤放出挙動に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

供試材は SUS316L ステンレス鋼（Cr: 17.35, Ni:12.18, Mo: 2.07, Mn: 1.20, Si: 0.63, P: 0.030, C: 0.011, S:0.001, Fe: bal.（mass%））とした。放電加工機を用いて直径 ϕ15.5 mm、厚さ 1 mm の円板状試料を作製し、表面を SiC 耐水研磨紙で #2000 まで湿式研磨した。その後、アセトン、エタノール、脱イオン水の順に超音波洗浄し、室温にて大気乾燥した。陽極酸化には白金を対極とする二電極電気化学セルを用い、電解溶液には 2.01 M $NaClO_4$ を含むエチレングリコールを用いた。試料への印加電圧を 0 V から所定の電圧（20、40 V）まで挿引速度 0.1 V/s で挿引し、電解電圧に到達後は 300 秒間定電位分極を行った。その後、アセトン、エタノール、脱イオン水中にて超音波洗浄し、乾燥した。試料の表面構造は電界放射型走査型電子顕微鏡（FE-SEM; JSM-6500; JEOL）および原子間力顕微鏡（AFM; SPM9500; Shimadzu）を用いて観察した。

2.2 コラーゲン塗布

試料表面に 3 mg/ml のⅠ型コラーゲン溶液（コラーゲンタイプⅠウシ真皮由来（ペプシン可溶化），PSC-1-100-20, nippi）を 0.2 ml 滴下し、37℃のオーブン内で乾燥させた。乾燥後、コラーゲン再構成のために pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩水（PBS 溶液）を試料表面に 1.2 ml 滴下し、37℃のオーブン内で乾燥させた。再構成後、試料表面上に残った余分な PBS を除去するために脱イオン水で洗浄した。コラーゲン塗布後、FE-SEM を用いて形態観察を行った。

2.3 薬剤導入

モデル薬剤としてウシ血清由来アルブミン（Bovine Serum Albumin：BSA）を用いた。2 mg/ml の BSA 溶液を容器に注ぎ、試料を容器底面に設置し BSA 溶液に浸漬させた。その後、試料ごと容器をデシケーター内に移して真空引きし、1 分間保持した後、ゆっくりと大気圧に戻した。試料を BSA 溶液から取り出し 37℃のオーブン内で乾燥させた後、試料裏面に付着した過剰な BSA を拭き取った。上記の薬剤導入操作を 3 回行った。

2.4 薬剤放出試験

薬剤導入後の各試料を用い薬剤放出実験を行った。試料を 24 ウェルプレートの底面に設置し、1.5 ml/well の PBS 溶液中での薬剤放出量を測定した。薬剤放出試験は 37℃、湿度 52% に保たれたクールインキュベーター（CN-25C, Mitsubishi Electric Engineering）内において行い、32 日間、所定の時間間隔で薬剤放出を測定した。なお、測定毎に採取した溶液と同量の PBS 溶液を新たに加えた。

PBS 溶液中に放出された薬剤量は BCA Protein Assay Kit（Thermo Scientific）を用いて、562 nm における吸光度を Microplate Reader（SH-9000, Corona Electric）にて測定し求めた。また、薬剤放出試験終了後に Sirius Red（Polysciences）を用いて、PBS 溶液へのコラーゲン溶出量の測定を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 試料形態

陽極酸化処理によって試料表面に付与された微細構造を確認するため、FE-SEM 観察を行った。**Fig. 1** に示すように、陽極酸化電圧 20 V および 40 V のいずれの電圧条件の陽極酸化試料においても試料表面に規則的に配列したナノホール構造が確認された。ナノホールのポア径は陽極酸化 20 V 試料にて 25.6 ± 1.8 nm、陽極酸化 40 V 試料にて 188.8 ±26.2 nm であった。陽極酸化処理に用いたセルは、試料上面全面が電解液と接する構造であり、試料表面全面に規則的に配列したナノホールが確認された。著者らの過去の研究より、作製したナノホールの深さは陽極酸化 20 V 試料では 1.7 nm 程度、陽極酸化 40 V 試料では 18.4 nm 程度と考えられる[16]。

コラーゲン再構成処理前後の陽極酸化 40 V 試料の表面 SEM 像を **Fig. 2** に示す。コラーゲン形状は再構成前後で大きく変化しており、コラーゲンは再構成処理前では平坦な

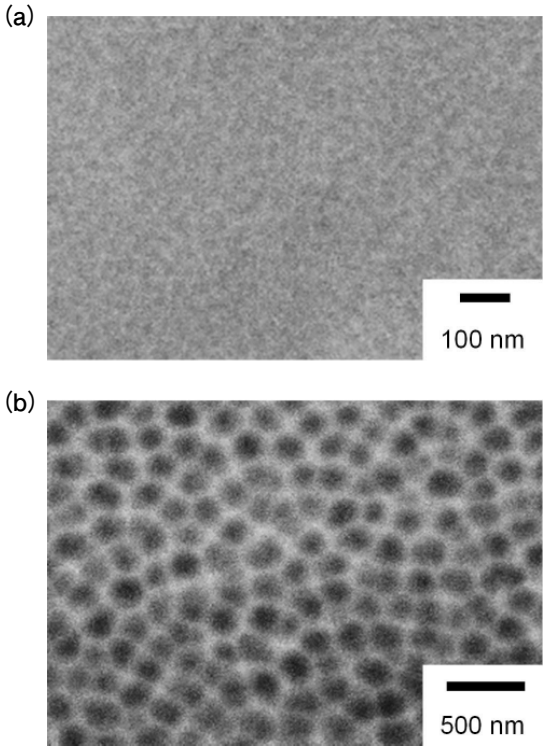

Fig. 1 SEM images of the self-organized nanopores formed on Type 316L stainless steel anodized at (a) 20 V and (b) 40 V.

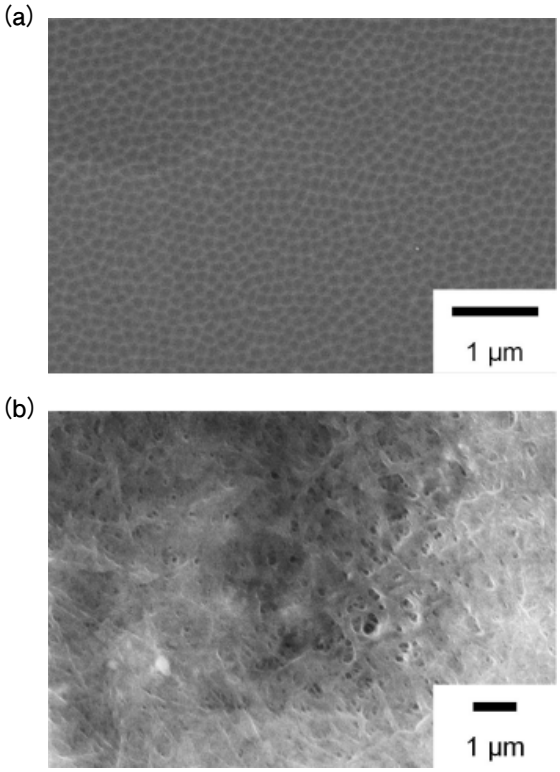

Fig. 2 SEM images of the self-organized nanopores formed on Type 316L stainless steel anodized at 40 V (a) without reconstruction of collagen and (b) with reconstruction of collagen.

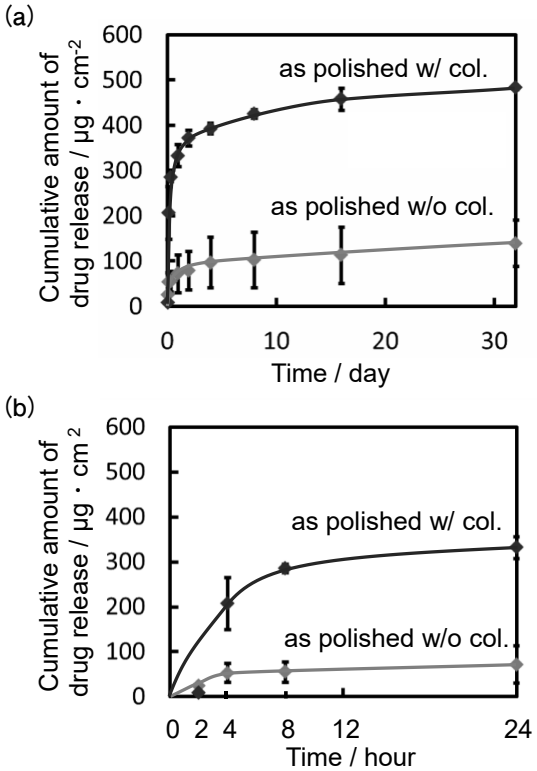

Fig. 3 Release behavior of BSA from as polished with or without collagen for (a) 32 days and (b) 24 hours.

膜状構造であったが、再構成処理によって密に絡み合った繊維状の構造となっている。Müller らは様々な金属上にコラーゲンを塗布して細胞培養を行ない、コラーゲン塗布試料上では金属上よりも優れた細胞接着性および細胞増殖性を示すことを報告している[17]。よって、本研究でのコラーゲン塗布も細胞に良好な環境となると考えられるため、人工関節等の骨との接触部への適応では生体適合性の向上が期待される。

3.2 薬剤放出試験

本研究での薬剤放出量測定に用いたタンパク質測定法の BCA 法では、モデル薬剤として使用したアルブミンの放出量とコーティング剤として使用したコラーゲンからの溶出量を分離して評価することが困難である。しかしながら、Sirius Red 染色によりコラーゲン溶出量を検討した結果、薬剤放出試験終了時に溶液中に溶出していたコラーゲン量は薬剤放出量の 2% 程度と極微量であったことから、本研究でのコラーゲン溶出量は無視できるものとし、BCA 法によるタンパク質測定は薬剤放出由来とした。

コラーゲン塗布の有無による薬剤放出挙動への影響について検討するため、**Fig. 3** にコラーゲン塗布有り、および無しの研磨まま試料の薬剤放出試験の結果を示す。コラーゲン塗布の有無に関わらず、いずれの試料の薬剤放出挙動にも試験開始から 8 時間の初期に急速に薬剤が放出されるバーストリリースと、その後薬剤が穏やかに放出されるスローリリースが確認された。薬剤放出試験開始直後は周辺の PBS 溶液中に薬剤が存在せず、溶液と試料間の大きな濃度差を駆動力として試料に導入された薬剤は急速に溶液中に拡散する。その後、時間の経過とともに試料表面と周辺 PBS 溶液中との薬剤濃度差が小さくなり、拡散の駆動力も小さくなる。そのため､バーストリリースからスローリリースへと移行したと考えられる。コラーゲン塗布試料では塗布無し試料よりも放出された薬剤の総量が多く、この傾向はナノホールを付与した陽極酸化 20 V 試料および 40 V 試料でも同様であった。再構成処理後のコラーゲン形状が繊維状構造であったことから、繊維状のコラーゲン上および間に BSA が担持され、薬剤担持量が増加したと考えられる。本研究では細胞接着性に優れるコラーゲンを用いたが、コーティングするタンパク質を用途に応じて変化させた場合にも、薬剤担持量を制御できる可能性がある。

Fig. 4 にコラーゲン塗布した研磨まま試料、陽極酸化 20 V 試料および陽極酸化 40 V 試料の 32 日間の薬剤放出試験結果を示す。試験終了時点での陽極酸化 40 V 試料の放出薬剤総量は他試料と比較して小さい。しかしながら、試験終了後に試験溶液を新たな PBS 溶液と交換し、放出された薬剤量を残存薬剤量として 32 日間の放出薬剤総量に加えた量を比較すると、コラーゲン塗布した研磨まま試料、陽極酸化 20 V 試料および陽極酸化 40 V 試料間に有意差は認められなかった。今回作製したナノホール構造は非常に径が小さく浅い構造であったため、表面の凹凸による孔の体積増

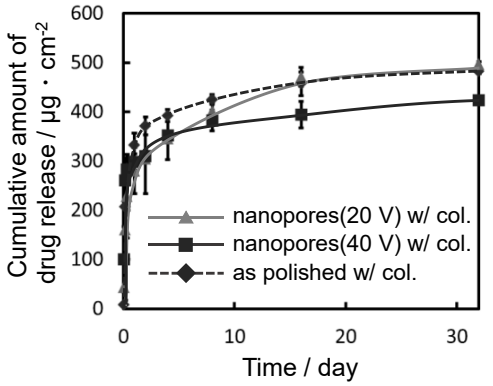

Fig. 4　Release behavior of BSA from each sample for 32 days.

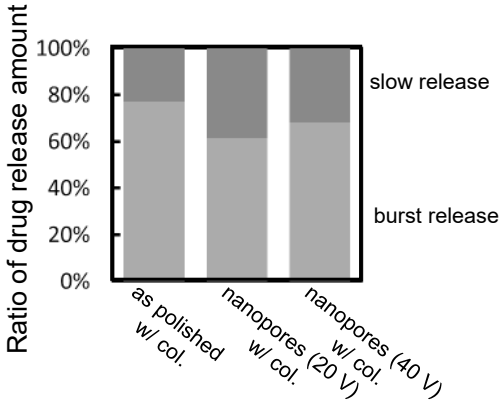

Fig. 5　Ratio of burst release and slow release in 32-day drug release.

加および表面積増加は僅かであり、薬剤担持量への影響は小さかったと考えられる。いずれの試料もバーストリリース、スローリリースが確認されたが、陽極酸化20 V試料および陽極酸化40 V試料では研磨まま試料と比較して初期の薬剤放出速度が小さかった。32日間でのバーストリリース量とスローリリース量の比較を行うため、薬剤放出試験開始から8時間までの薬剤放出をバーストリリース、8時間以降の薬剤放出をスローリリースとし、その割合を Fig. 5 に示す。陽極酸化20 V試料および陽極酸化40 V試料のいずれのナノホール試料でも研磨まま試料と比較してスローリリースの割合が高かった。この傾向はコラーゲン塗布無しの試料でも同様であった。金属酸化物表面への薬剤担持では、薬剤と金属表面に生成している酸化物表面のOH基とが結合し、その後薬剤同士が分子間力などで結合しており、金属酸化物表面のOH基との結合は、薬剤同士の結合よりも強いと報告されている[18]。陽極酸化試料では研磨まま試料と比較して金属酸化物表面にOH基が多く存在しており、薬剤とOH基との結合割合が多いため、バーストリリースが抑制され、スローリリースが増加したと考えられる。

以上より、SUS316Lステンレス鋼表面へのナノホール付与およびコラーゲン塗布は、薬剤導入量の増加および、薬剤放出速度の制御を実現し、より長期的な薬剤徐放が可能であったことから、ナノホール構造を付与したSUS316Lステンレス鋼はLDDSのプラットホームとして期待できることが分かった。

4.　結 論

本研究では、SUS316Lステンレス鋼に陽極酸化処理によってナノホールを生成し、さらにⅠ型コラーゲンを塗布した試料の薬剤放出試験を行い、ナノホール構造やコラーゲン塗布が薬剤放出挙動に及ぼす影響について検討し、以下の知見を得た。

1）SUS316Lステンレス鋼表面に形成したナノホールの径は、陽極酸化20 V試料では25.6±1.8 nm、陽極酸化40 V試料では188.8±26.2 nmであった。
2）コラーゲン塗布した試料のコラーゲン形状は、コラーゲン再構成前では平坦な膜状構造であったが、再構成によって密に絡み合った繊維状の構造となることが確認された。
3）SUS316Lステンレス鋼表面にコラーゲン塗布を行うことで、ナノホール構造の有無に関わらずいずれの試料においても、薬剤担持量は増加した。
4）SUS316Lステンレス鋼表面に陽極酸化によりナノホール形状を付与した試料では、バーストリリースを抑制し、スローリリースの割合を増加させた。

謝 辞

本研究は、JSPS科研費 基盤研究（C）（project No. 18K12031）および若手研究（B）（project No. 25870410）による援助を受けて実施された。

参 考 文 献

1）J. Esteban and J. Cordero-Ampuero: “Treatment of prosthetic osteoarticular infections”, Expert Opin. Pharmacother., **12**（2011）, 899-912.
2）T. Miclau, A.H. Schmidt, J.C. Wenke, L.X. Webb, J.M. Harro, R. Prabhakara and M.E. Shirtliff: “Infection”, J. Orthop. Trauma, **24**（2010）, 583-586.
3）H. Liu and T.J. Webster: “Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools”, Biomaterials, **28**（2007）, 354-369.
4）K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. LaTempa, C.A. Grimes and T.A. Desai: “Titania nanotubes: A novel platform for drug-eluting coatings for medical implants?”, Small, **3**（2007）, 1878-1881.
5）P.A. Tran, L. Sarin, R.H. Hurt and T.J. Webster: “Opportunities for nanotechnology enabled bioactive bone implants”, J. Mater. Chem., **19**（2009）, 2653-2659.
6）H. Cheng, A. Chawla, Y. Yang, Y. Li, J. Zhang, H.L. Jang and A. Khademhosseini: “Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery”, Drug Discov. Today, **22**（2017）, 1336-1350.
7）D. Losic, M.S. Aw, A. Santos, K. Gulati and M. Bariana: “Titania nanotube arrays for local drug delivery: Recent advances and perspectives”, Expert Opin. Drug Deliv., **12**（2015）, 103-127.

8）J.A. Lyndon, B.J. Boyd and N. Birbilis: “Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic applications”, J. Control. Release, **179**（2014）, 63-75.
9）S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini and S. Spriano: “Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration”, Appl. Surf. Sci., **311**（2014）, 279-291.
10）F. Keller, M.S. Hunter and D.L. Robinson: “Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum”, J. Electrochem. Soc., **100**（1953）, 411-419.
11）H. Masuda and K. Fukuda: “Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina”, Science, **268**（1995）, 1466-1468.
12）H. Masuda and M. Satoh: “Fabrication of Gold Nanodot Array Using Anodic Porous Alumina as an Evaporation Mask”, Jpn. J. Appl. Phys., **35**（1996）, L126.
13）D. Gong, C.A. Grimes, O.K. Varghese, W. Hu, R.S. Singh, Z. Chen and E.C. Dickey: “Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation”, J. Mater. Res., **16**（2001）, 3331-3334.
14）H. Tsuchiya, J.M. Macak, L. Taveira, E. Balaur, A. Ghicov, K. Sirotna and P. Schmuki: “Self-organized TiO_2 nanotubes prepared in ammonium fluoride containing acetic acid electrolytes”, Electrochem. Commun., **7**（2005）, 576-580.
15）H. Tsuchiya, T. Suzumura, Y. Terada and S. Fujimoto: “Formation of self-organized pores on type 316 stainless steel in organic solvents”, Electrochim. Acta, **82**（2012）, 333-338.
16）S. Miyabe, T. Suehiro, Y. Fujinaga, H. Tsuchiya, S. Hiromoto and S. Fujimoto: “Cell activity on Type 316L stainless steel with self-organized nanopores formed by anodic polarization”, Mater. Trans., **57**（2016）, 2065-2071.
17）R. Müller, J. Abke, E. Schnell, D. Scharnweber, R. Kujat, C. Englert, D. Taheri and P. Angele: “Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen”, Biomaterials, **27**（2006）, 4059-4068.
18）G. Mani, C. E. Macias, M.D. Feldman, D. Marton, S. Oh and C.M. Agrawal: “Delivery of paclitaxel from cobaltechromium alloy surfaces without polymeric carriers”, Biomaterials, **31**（2010）, 5372-5384.

代表者メールアドレス

宮部さやか　miyabe@mat.eng.osaka-u.ac.jp