

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22787

研究課題名（和文）独自の金属ナノ粒子合成技術を利用した医療従事者用の機能性材料の創製

研究課題名（英文）Creation of functional materials for healthcare workers using unique metal nanoparticle synthesis method

研究代表者

中村 伸吾（Nakamura, Shingo）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 医療工学研究部門・教授

研究者番号：00505323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：銀ナノ粒子（AgNP）には微生物殺菌効果、そしてウイルス不活化効果が備わっている。本研究では、AgNPに紫外線を照射することで、その効果が高まることを実証した。この増強効果は、紫外線照射でAgNPから反応性の高いヒドロキシルラジカルが生成することに起因している。強力な酸化剤として知られるヒドロキシルラジカルは、細菌やウイルス、化学物質に対して抑制的な効果を発揮する。しばしば議論の対象となるAgNPのバイオセーフティ問題や環境安全性へ慎重に対処していく必要はあるものの、本システムは細菌やウイルス感染から医療従事者を守ることに役立つと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の成果は、銀ナノ粒子（AgNP）への紫外線照射がラジカルを発生させ、殺菌活性が高まることを実証した点に集約される。本研究ではハンディタイプの簡易型紫外線ランプを使用しており、その汎用性も高い。紫外線の波長もUVA帯域であり、一般的な殺菌目的で使用されるUVC帯域と比べて安全性が高い。本研究成果の活用は、例えば、医療従事者が防護服の脱衣時において病原因子へ誤接触してしまっても、その因子は既に不活化されているために感染をしなくてもすむといったような、新たな感染防護システムの構築につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Silver nanoparticle (AgNP) have been shown to have bactericidal action and virus inactivation effect. In this study, we demonstrated that UV irradiation of AgNP is effective at enhancing bactericidal activity. This bactericidal effect is attributable to the UV irradiation-mediated enhanced production of highly reactive hydroxyl radicals generated from AgNP. Hydroxyl radicals, renowned as powerful oxidizing agents, are likely to be effective against viruses, bacteria, and in the degradation of chemicals. Although biosafety issues and environmental safety concerns related to AgNP, which are often been a subject for discussion, need to be carefully addressed, this system is expected to be useful in protecting healthcare workers from infection with pathogens.

研究分野：医療工学

キーワード：銀ナノ粒子 殺菌活性 紫外線照射 ラジカル

1. 研究開始当初の背景

銀の殺菌作用は古くから知られており、そのメカニズムの一端がこれまでの研究で解明されてきた。代表的なものとしては銀から放出される銀イオンの作用によるものがあり、例えば、銀イオンが細胞内に侵入して細胞の機能維持に必要な機能性タンパク質を変性させ、細胞に害を及ぼす系が示されている。一方で、ウイルスを対象とした研究の歴史は浅く、例えば、非常に小さな粒径の銀ナノ粒子 (AgNP) がウイルスの宿主への吸着を物理的に阻害してウイルスの増殖を抑制するといった報告が出されている。銀の安全性は比較的高く、耐性菌等を出現させることも少ない。特定の微生物等に限定されることなく殺菌等の効果を発揮する。このような経緯から、環境中への流出を防ぐなどしてその使用方法を誤らなければ、医療従事者の感染防止等を目的とした機能性材料の創製に役立つ素材として、AgNP は魅力的な材料であった。

AgNP の殺菌効果等を増強させる方策として、例えば、AgNP に紫外線を照射して銀イオンの放出を高めるとする報告が出されていた。我々もまた、殺菌効果等の増強に関する検討を進め、紫外線照射によって AgNP からラジカルが発生することを示唆したデータを得ていた。そこで本研究では、この知見を深化させて優れた殺菌効果等を示す複合材料の創製につなげることを目指し、紫外線照射による AgNP からのラジカル発生システムの検討を進めることとした。このシステムが構築できれば、任意のタイミングで殺菌、ウイルス不活化、化学物質無毒化等を増強させることが可能な新しい医療素材の開発へと道筋が付く。これにより、医療従事者のための新たな感染防護ツールが作成でき、感染事故防止等への貢献に期待が持てた。

2. 研究の目的

本研究では、AgNP の微生物殺菌効果等をさらに高めるため、AgNP からのラジカル発生システムの検討を中心に実験を進めた。具体的には、AgNP からラジカルを発生させるための紫外線照射の条件の検討、発生したラジカル種の同定、実際の殺菌効果について検討を進めた。

3. 研究の方法

(1) AgNP の準備

AgNP の懸濁液 (約 5 nm、10 ng/μL、pH7.2) は既報の方法 [1] で調製した。即ち、500 mL のガラス製バイアルに 100 mL のグルコース水溶液 (0.8 wt%) を用意し、銀含有ガラス粉末 1 g を分散させた。この混合液を高圧蒸気滅菌処理 (121 °C、200 kPa、20 分) し、室温まで徐冷した。その後、遠心処理 (1500 rpm、25 °C、10 分) して上清から AgNP を回収した。AgNP の存在は UV-Vis スペクトロメーターによる分析で確認し、使用するまでは 4 °C の暗所にて保存した。

(2) AgNP から発生したラジカルの測定

AgNP 50 μL に対して紫外線 (365 nm) の照射をそれぞれ 0.5、1、3、30 分間実施した。紫外線照射には汎用型のハンディタイプの紫外線照射装置 (UVGL-58; Analytik Jena、カリフォルニア州、米国) を使用した。紫外線照射後に 10 μL のラジカルトラップ試薬 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMP0) (#LM-2110; 同仁化学研究所、熊本、日本) を加え、穏やかに攪拌した。その後、この混合物 50 μL を対象として卓上型電子スピン共鳴装置 (EMX-nano; Bruker Corporation、マサチューセッツ州、米国) によるラジカルの測定と分析を行った。本実験は全て、外光の無い環境にて実施した。

(3) 殺菌効果の評価

AgNP による殺菌効果は既報の方法 [2] に若干の修正を加えて実施した。即ち、大腸菌 (DH5; タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を 2 mL の LB 培地で前培養し、その後 600 nm の光学密度が 0.260 に達するまで培養した。大腸菌培養液を LB 培養液で 10 倍に希釈し、各試験ではこの大腸菌懸濁液 100 μL を使用した。実験は 2 つのアプローチで行った。1 つは水中での効果を確認するものであり、もう一つは乾燥環境下 (AgNP をコーティングした環境を想定) での殺菌効果を確認するものである。前者については、30 μL の AgNP に対して紫外線照射を 1 分または 3 分間実施した後に大腸菌懸濁液へ加え、寒天培地プレートにプレーティングして 37 °C にてオーバーナイトさせた。後者については、100 μL の AgNP を寒天プレート上にコーティングして室温で風乾させ、続いて大腸菌懸濁液をプレーティングした後に紫外線照射を実施して 37 °C にてオーバーナイトさせた。両実験においてオーバーナイトさせたプレートは、写真撮影を行って 1 平方センチメートルあたりのコロニー数をカウントし、そのコロニー数の増減によって殺菌効果の評価した。対照群としては、AgNP の代わりに PBS を用いて同手順の操作を実施した。

4. 研究成果

(1) AgNP の調製

調製した AgNP 液は 390 nm から 400 nm 付近に最大吸収を示した。これは球状 AgNP の代表的なパターンであり、以前からの報告[2]とも一致した特徴であった。実験で使用する AgNP は問題なく得ることができたと判断した。

(2) 紫外線照射によるラジカルの生成

紫外線照射実験では、汎用型のハンディタイプの紫外線照射装置を使用した。この装置は、アガロースゲル電気泳動におけるエチジウムブロマイド染色 DNA の検出で使用されているもので、波長 365 nm の紫外線を発する。この波長は安全性が比較的高いとされる UVA 帯域 (320 ~ 400 nm) に属している。殺菌を目的としたいわゆる「紫外線」の波長は、一般的には UVC 帯域 (200 ~ 280 nm) に属しており、この帯域の波長は生物にとって有害とされる。

紫外線照射を受けた AgNP 液を電子スピン共鳴分析すると、ラジカルの存在が確認された (図 1)。そのピークの特徴から、このラジカルはヒドロキシルラジカルであることも判明した。ヒドロキシルラジカルは活性酸素とも呼ばれ、反応性が高く、酸化力が非常に強い。紫外線照射時間が 1 分まではヒドロキシルラジカルの生成量は増加していく。その量は、紫外線未照射 (0 分) と比べて、照射時間 0.5 分で 1.7 倍、1 分では 4.5 倍となった (図 2)。照射時間 1 分以上では、ラジカル発生量のそれ以上の増加はみられなかった。このことは、本系の限界を示しているのか、あるいは、使用したラジカルトラップ剤や AgNP の量的なものに関係した結果なのか、今回の実験では結論付けることはできず、今後の検討課題である。

AgNP を水中へ投じると少量のラジカルが発生する現象は、活性酸素が殺菌活性を発揮するメカニズムについて探索を行っていた Zhang ら [3] の研究で指摘されていた (即ち、本研究における紫外線照射時間 0 分のラジカル発生と同義)。これに対し、今回の我々の実験では、紫外線照射という人為的操作で AgNP からヒドロキシルラジカルが発生すること、即ち、ラジカル発生を制御できることが初めて示された。この点が他の類似研究とは異なる本研究の学術的成果といえる。紫外線照射による AgNP からのヒドロキシルラジカルの生成メカニズムは、いくつかの仮説を考えている。例えば、紫外線照射によって AgNP 表面上の電子が集団振動することをきっかけとした現象等であるが、その機序の解明には今後の詳しい研究が必要である。

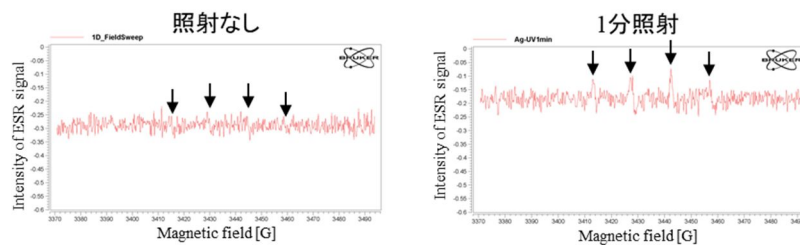


図 1. 卓上型電子スピン共鳴装置で検出された波形

AgNP から発生した特徴的な波形 (両グラフ中における 4 つの矢印) は、ヒドロキシルラジカルを示している。紫外線を照射していない群 (左グラフ: 照射なし) と比べて、紫外線照射を 1 分行った群 (右グラフ: 1 分照射) では強いピークが確認された。

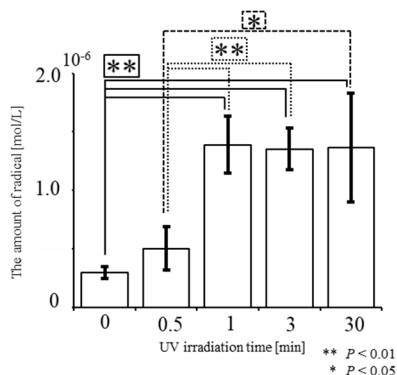


図 2. 発生したヒドロキシルラジカルの量

卓上型電子スピン共鳴装置に備わっている解析ソフトによってヒドロキシルラジカル量を計算したところ、紫外線照射時間 1 分まではヒドロキシルラジカル量は増加したが、照射時間を延ばしてもそれ以上の量的変化は確認されなかった。

(3) 紫外線照射による AgNP の殺菌効果の増強

紫外線照射によるヒドロキシルラジカルの発生は、AgNP の殺菌効果増強系の構築に期待を持たせた。そこで、水中 (図 3A) ならびに乾燥環境下 (図 3B) での大腸菌の殺菌効果を調べた。

まず、水中における殺菌効果については、AgNP に紫外線照射を行うことで殺菌活性は有意に高まった。紫外線照射の時間については、未照射 (0 分) と比べて 1 分ならびに 3 分では殺菌効果が増大した。しかし、照射時間 1 分と 3 分の間では違いは生じなかった。これはラジカル発生量について検討をした実験結果 (図 2) と同じ傾向を示している。この時、AgNP の代わりに PBS を使用した対照群では殺菌効果そのものがほとんど確認できなかった。また、乾燥環境下における殺菌効果についてもその傾向は同じであった。AgNP に紫外線照射を行った場合が最も殺菌効果が得られた。なお、両実験における紫外線照射は通常の殺菌灯等で使用されている UVC 帯域の波長ではなく、UVA 帯域に属する 365 nm の波長によって行われたことに留意されたい。本結果から、AgNP と紫外線照射を組み合わせることで、AgNP の効果的な殺菌系が構築できることが示された。

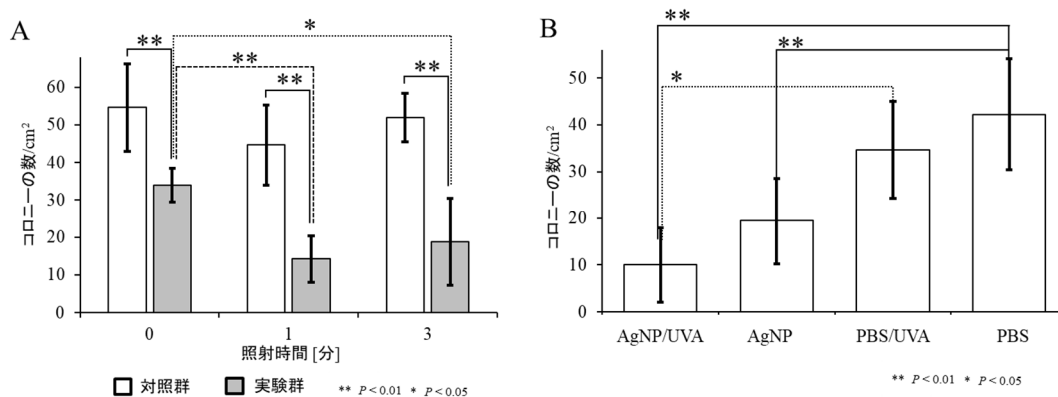


図 3. AgNP の紫外線照射による大腸菌の殺菌効果に関する実験結果

(A) 水中における検討では、対照群 (PBS を使用) と比べて実験群 (AgNP を使用) では大腸菌の数は有意に減少した。この時、紫外線照射を行うことで、その効果はさらに増大した。紫外線の照射時間については、1 分あるいは 3 分で違いは確認されなかった。(B) 乾燥環境下における検討では、対照群 (PBS を使用) と比べて AgNP を使用することで大腸菌の数は減少した。そして紫外線照射を行うことでその効果はさらに増大した。

以上の結果が示すように、本研究では、AgNP が 1 分程度の紫外線 (UVA: 365 nm) 照射を受けることでヒドロキシルラジカルを効率良く発生させることを電子スピン共鳴分析によって明らかにし、それを活用することで AgNP の水中および乾燥環境下での殺菌効果を増強できることを実証した[4]。本システムはラジカルを主体としているものであり、エンベロープ型ウイルスのエンベロープを破壊することでウイルス不活化にも効果があると期待できる。ただし、強力なラジカルであるヒドロキシルラジカルは生体への傷害性などの悪影響もあるため、皮膚に直接接しない様に配慮したり、洗浄液などを併用する等の対応が必要になってくるかもしれない。現在、この観点から大量使用しても環境負荷の懸念等が少ないと考えられるバイオマス資源由来の洗浄液の開発を進めている。

(参考文献)

- [1] Mori Y, Tagawa T, Fujita M, Kuno T, Suzuki S, Matsui T, Ishihara M. Simple and environmentally friendly preparation and size control of silver nanoparticles using an inhomogeneous system with silver-containing glass powder. *J Nanopart Res.* **2011**; 13: 2799-2806.
- [2] Nguyen VQ, Ishihara M, Kinoda J, Hattori H, Nakamura S, Ono T, Miyahira Y, Matsui T. Development of antimicrobial biomaterials produced from chitin-nanofiber sheet/silver nanoparticle composites. *J Nanobiotechnology.* **2014**; 12: 49.
- [3] Zhang L, Wu L, Si Y, Shu K. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PLoS One.* **2018**; 13: e0209020.
- [4] Nakamura S, Ando N, Sato M, Ishihara M. Ultraviolet Irradiation Enhances the Microbicidal Activity of Silver Nanoparticles by Hydroxyl Radicals. *Int J Mol Sci.* **2020**; 21: 3204.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hiruma Sumiyo, Hata Yuuki, Ishihara Masayuki, Takayama Tomohiro, Nakamura Shingo, Ando Naoko, Fukuda Koichi, Sato Yoko, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Efficacy of Bioshell Calcium Oxide Water as Disinfectants to Enable Face Mask Reuse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 27 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4265/bio.26.27	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 -
1. 著者名 Nakamura Shingo, Ando Naoko, Sato Masahiro, Ishihara Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Ultraviolet Irradiation Enhances the Microbicidal Activity of Silver Nanoparticles by Hydroxyl Radicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3204 ~ 3204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093204	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 -
1. 著者名 Takayama Tomohiro, Ishihara Masayuki, Nakamura Shingo, Sato Yoko, Hiruma Sumiyo, Fukuda Koichi, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Ointment for the Disinfection and Healing of Pseudomonas aeruginosa-Infected Wounds in Hairless Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4176 ~ 4176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114176	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 -
1. 著者名 Takayama Tomohiro, Ishihara Masayuki, Sato Yoko, Nakamura Shingo, Fukuda Koichi, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka	4. 巻 31
2. 論文標題 Bioshell calcium oxide (BiSCaO) for cleansing and healing Pseudomonas aeruginosa?infected wounds in hairless rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 95 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-201082	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 -

1. 著者名 Nakamura Shingo, Ishihara Masayuki, Sato Yoko, Takayama Tomohiro, Hiruma Sumiyo, Ando Naoko, Fukuda Koichi, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Concentrated Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Water Kills Pathogenic Microbes: Characterization and Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3001 ~ 3001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25133001	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 -

1. 著者名 Ishihara Masayuki, Hata Yuuki, Hiruma Sumiyo, Takayama Tomohiro, Nakamura Shingo, Sato Yoko, Ando Naoko, Fukuda Koichi, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Safety of Concentrated Bioshell Calcium Oxide Water Application for Surface and Skin Disinfections against Pathogenic Microbes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4502 ~ 4502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25194502	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 -

1. 著者名 Kuwabara Masahiro, Sato Yoko, Ishihara Masayuki, Takayama Tomohiro, Nakamura Shingo, Fukuda Koichi, Murakami Kaoru, Yokoe Hidetaka, Kiyosawa Tomoharu	4. 巻 28
2. 論文標題 Healing of Pseudomonas aeruginosa-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid cleansing and silver nanoparticle/chitin-nanofiber sheet covering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Wound Medicine	6. 最初と最後の頁 100183 ~ 100183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wndm.2020.100183	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakamura Shingo, Sato Masahiro, Sato Yoko, Ando Naoko, Takayama Tomohiro, Fujita Masanori, Ishihara Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (Ag NPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3620 ~ 3620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153620	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 -

1. 著者名 Sato Yoko, Ishihara Masayuki, Nakamura Shingo, Fukuda Koichi, Takayama Tomohiro, Hiruma Sumiyo, Murakami Kaoru, Fujita Masanori, Yokoe Hidetaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Preparation and Application of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Nanoparticle-Dispersions with Bactericidal Activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3415 ~ 3415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24183415	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 -

1. 著者名 Sato Yoko, Ohata Heisuke, Inoue Akinori, Ishihara Masayuki, Nakamura Shingo, Fukuda Koichi, Takayama Tomohiro, Murakami Kaoru, Hiruma Sumiyo, Yokoe Hidetaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Application of Colloidal Dispersions of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) for Disinfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 1991 ~ 1991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym11121991	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 佐藤洋子, 中村伸吾, 高山智宏, 比留間寿美代, 安藤尚子, 福田孝一, 藤田真敬, 石原雅之
2. 発表標題 ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム懸濁液の分散化手法の検討および抗菌活性の検討
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山智宏, 佐藤洋子, 中村伸吾, 比留間寿美代, 安藤尚子, 福田孝一, 藤田真敬, 村上馨, 横江秀隆, 石原雅之
2. 発表標題 難治性創傷に対するホタテ貝殻焼成酸化カルシウムの効果
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会
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	佐藤 正宏 (Sato Masahiro) (30287099)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・共同研究員 (82612)	

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