

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350557

研究課題名(和文)細胞毒性抑制型抗菌マテリアルの創出

研究課題名(英文)Development of antibacterial material with reducing cytotoxicity

研究代表者

古 蘭 勉 (FURUZONO, Tsutomu)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：30332406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究課題では、細胞毒性を抑制し微弱な抗菌性を有する新規材料を創出することを目的とする。分散性および結晶性に優れたハイドロキシアパタイト(HAp)に銀イオンをドーブしたAg-HApナノ粒子の合成、コーティング特性の検討、材料特性および生物学的評価を行った。融着防止法により分散性に優れた結晶性Ag-HApナノ粒子を得ることができた。また、高分子基材へのコーティング特性にも優れていた。大腸菌および緑膿菌に対する抗菌性が認められた。ヒト咽頭がん由来線維芽細胞を用いた接着性評価にて、培養床と同様の細胞接着性が認められた。以上より、細胞毒性を低減させたコーティング用抗菌ナノ粒子の創出を達成した。

研究成果の概要(英文)：Our objective of the project is the development of antibacterial novel nanomaterial with weak cytotoxicity. Synthesis of Ag-doped hydroxyapatite (HAp) nanoparticles with highly dispersibility and crystallinity, examination of coating property, evaluations of material and biological properties were conducted. The highly dispersible Ag-HAp nanoparticles by using the anti-sintering method were prepared. The functionality for nano-coating on polymer substrates was well-satisfied. Antibacterial activities for E. coli, and P. aeruginosa were observed. In cell-adhesion test, human epithelial type 2 cells were well-adhered on the Ag-HAp coating sheet as same as cell culture dish. Thus, the antibacterial Ag-HAp nanoparticles as a coating nanomaterial on medical devices with reducing cytotoxicity have been successively developed.

研究分野：医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノ材料 ハイドロキシアパタイト 銀 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の中心静脈カテーテルの年間使用量は約 180 万本と算出されており、カテーテル感染率 10%から換算すると年間約 18 万のカテーテル感染が起こっていることになる。ここでカテーテル感染とはカテーテルを留置した際、カテーテルを介して細菌が侵入し、最終的に敗血症となり死に至ることである。カテーテル感染が直接の死亡原因となるのは年間 2 万 3 千人と推計され、つまり当該感染に起因する死亡者数は肺炎と不慮の事故による死亡原因の中間 (死因統計の第 5 位) に位置する¹⁾。平成 21 年の交通事故死亡者数が 4,914 人と比較すると 4 倍以上であることからその重篤性が容易に理解できる。

(2) 市販の抗菌カテーテルの例では、抗菌剤であるクロルヘキシジンとスルファジアジン銀を表面に練り込むことによって抗菌性を持たせたものがある。このカテーテル使用症例でのメタアナリシスの結果では、短期間の使用でカテーテル感染由来敗血症の発症を低減させていた。しかしながら我が国における当該抗菌カテーテル使用例でアナフィラキシーショックが 13 例に発症し、うち 1 例が死亡したことから、我が国では販売禁止となった。この原因がコーティング剤として使用された銀ではなくクロルヘキシジンに対するアレルギーであることが明らかになっている。本件以降、我が国では使用制限がなされてきたが、10 年余が経過した現在でも、長期間感染防止が可能な抗菌カテーテルの開発が切望され続けている。

2. 研究の目的

(1) 周辺組織への細胞毒性を最低限に抑え、長期に渡り微弱な抗菌効果を長期間に渡って発現する新規材料を創出することを目的とする。具体的には、感染防止の技術ポイントである①皮膚刺入部および②血管内留置部における細菌付着・増殖を抑制するナノ材料の創出を目指す。

(2) まず HAp 結晶構造に抗菌活性を有する銀イオンをドーピングしたナノ粒子(Ag-HAp)を合成する。ここで、単純に HAp へ銀イオンをドーピングし仮焼した場合、銀イオン半径がカルシウムイオン半径より大きいため、銀イオンが結晶格子に収まらず結晶性増加により銀ナノ粒子が析出することが分かっている。この現象を回避する方法として、銀ナノ粒子を析出させずに銀イオンを HAp 結晶内に保持するために、仮焼温度および時間を制御する。当該ナノ粒子より徐々に銀イオンを放出することで、急性細胞毒性の大きい銀化合物 (例えば、硝酸銀など) に比較して、微弱な抗菌性を長期間に渡り維持させることにより、細胞毒性を制御した抗菌マテリアルが創出可能となる。

3. 研究の方法

(1) Ag-HAp ナノ粒子の合成

Ag-HAp ナノ粒子は硝酸カルシウム四水合物、硝酸銀、およびリン酸水素二アンモニウムを原料として調製され、融着防止法を用いて焼成・精製した。融着防止処理²⁾は、硝酸カルシウムおよびポリアクリル酸をリン酸カルシウム反応溶液中に添加し、乾燥後焼成および Ag-HAp ナノ粒子周囲のカルシウム塩を除去することにより行った。

(2) Ag-HAp のキャラクタリゼーション

Ag-HAp ナノ粒子のキャラクタリゼーションは X 線回折法 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、ICP 発光分光分析法 (ICP-AES)、および動的光散乱法 (DLS) を用いて行った。

(3) Ag-HAp 複合化シートの作製

コロナ放電処理した高分子シートを 10% アクリル酸モノマー水溶液含有ガラス管に浸漬し、脱気・封緘後 60°C にて反応させ、ポリアクリル酸をグラフトした高分子シートを作製した。当該シートを Ag-HAp ナノ粒子/エタノール分散溶液に浸漬・乾燥させ、Ag-HAp をイオンの相互作用作用でコーティングした複合シートを作製した。

(4) Ag イオン徐放挙動の評価

Ag-HAp ナノ粒子を PBS に浸漬し、37°C で 32 週間インキュベートした。所定期間後、Ag-HAp ナノ粒子を取り出し乾燥後、ICP を用いて元素分析を行い、Ag-HAp に含まれる Ag イオンの濃度から徐放挙動を評価した。

(5) 抗菌性試験

Ag-HAp の抗菌性試験は、大腸菌 (*E. coli*) および緑膿菌 (*P. aeruginosa*) を用いて、粉末添加法およびシート接触法にて行われた。粉末添加法は、濃度を調整した菌液に Ag-HAp ナノ粒子粉体を添加し、転倒攪拌させ、一定時間の培養の後に希釈することにより抗菌性を評価する方法である。一方、シート接触法は、Ag-HAp ナノ粒子をコーティングしたシート上に濃度を調整した菌液を添加・静置し、一定時間培養した後に、菌液を回収・希釈を行うことで抗菌性を評価する方法である。

(6) 細胞接着性試験

Ag-HAp シート上へ濃度を調整したヒト咽頭がん由来線維芽細胞 (Hep-2) 懸濁液を添加して細胞接着性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) Ag-HAp ナノ粒子の合成

Ag 仕込比 20mol% にて Ag-HAp の合成を行った。仮焼後の粒子間における融着防止効果を確かめるため、(a) 湿式法合成直後のサンプル (as-prepared)、(b) 融着防止処理無しの仮焼サンプル、(c) 融着防止剤としてカルシウム塩

(Ca salt)のみを用いた仮焼サンプル、および(d)融着防止剤としてポリアクリル酸と Ca salt(PAA-Ca)を用いた仮焼サンプルの4サンプルを調製した。

(2) Ag-HAp のキャラクタリゼーション

XRD 分析の結果、(d)サンプルにおいて金属銀が析出したため、Ca salt のみによる融着防止処理を施すこととした (サンプル(c))。また FT-IR 分析により、得られた Ag-HAp は炭酸含有 HAp であることが確認された。

表 1 に各 Ag-HAp サンプルの unit cell parameter を示す。Ag イオンがドーピングされることにより、a 軸長が増加することが認められた。これは Ag のイオン半径が Ca のイオン半径より大きいことによると推察された。

Table1 Unit cell parameters of Ag-HAp

Sample	Parameters	
	a-axis (Å)	c-axis (Å)
Standard HAp	9.418	6.884
(a) as prepared	9.442	6.891
(b) without anti-sintering agent at 700°C for 2h	9.424	6.880
(c) With Ca salt anti-sintering agent at 700°C for 2h	9.426	6.888
(d) with PAA-Ca anti-sintering agent at 700°C for 2h	9.412	6.881

Ag 含有率 20mol%を目標に Ag-HAp を調製したにも係わらず、as-prepared サンプルにおいて Ag 含有率は 1.5mol%に著しく低減した。これは Ag イオン半径が Ca よりも大きいことから Ag イオンが置換されにくいことが推察された。また融着防止処理を施すことにより、処理前に比較して 1/3 に Ag 含有率が減少した。これは仮焼後における融着防止剤の洗浄により Ag イオンが流出したことによると考えられた。

Table 2 Ag content and (Ca+Ag)/P of Ag-HAp

Sample	Ag content (mol%)*	(Ca+Ag)/P
(a) as prepared	1.5	1.69
(b) without anti-sintering agent at 700°C for 2h	1.5	1.69
(c) with Ca salt anti-sintering agent at 700°C for 2h	0.5	1.65

*Ag/(Ca + Ag) x 100

Ag-HAp ナノ粒子の粒径を DLS を用いて測定した結果、融着防止処理した場合、平均粒径 357±70nm であった。これは融着防止処理を施さず仮焼した場合の平均粒径 1540±994nm より減少しており、凝集を抑制していることが明らかであった。またこの値は SEM 観察とほぼ同程度であった。

(3) Ag イオン徐放挙動の評価

37°C、PBS 中における Ag-HAp ナノ粒子からの Ag イオンの徐放挙動を 32 週間に渡って追跡した。As-prepared (未仮焼) サンプルでは、16 週目で約 40%の Ag イオンが徐放され、その後飽和し一定値を示した。一方、融着防止処理を施した結晶性 Ag-HAp ナノ粒子では、

PBS 浸漬期間に従って Ag イオンは 32 週まで徐々に放出する挙動を示した。このことから、当該分散性・結晶性 Ag-HAp は優れた Ag イオンの徐放性を有することが明らかとなった。

(4) 抗菌性試験

E. coli を用いて Ag-HAp の抗菌性を粉末添加法で評価した。その結果、ノーマル HAp に比較して 90%以上の抗菌活性を示すことが認められた。

さらに Ag-HAp 複合シートを用いて、シート接触法による抗菌性試験を実施した。その結果、*E. coli* および *P. aeruginosa* においても抗菌性が認められた。このことから、Ag 含有率が 0.5mol%と低いにも係わらず、今回得られた Ag-HAp は良好な抗菌性を有することが明らかであった。

(5) 細胞接着性試験

Ag-HAp コーティングシートを用いて、ヒト線維芽細胞(Hep-2)の細胞接着性試験を行った (図 1)。その結果、コントロールとしたセルディスクおよびノーマル HAp コーティングシートに比較して、統計学的な有意差は認められなかった。シート接触法による抗菌性試験では抗菌性が認められたが、線維芽細胞の接着性に大きな影響を与えない理由は、細菌と線維芽細胞の細胞スケールの違いによるものと推察された。すなわち接触した細胞に対する Ag イオンの感受性の違いによるものと考えられた。

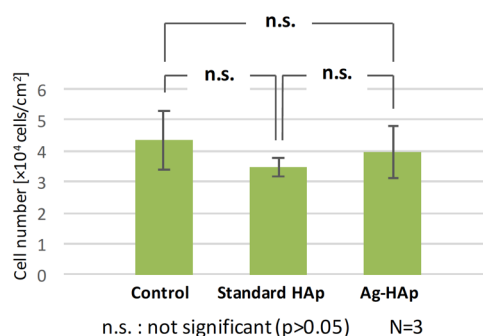


Fig1. Cell adhesion test on various sheets

以上のことから、今回開発した Ag-HAp ナノ粒子をコーティングした複合材料は、正常細胞に著しい悪影響を与えることなく抗菌性を発現する材料であることが認められた。当該ナノ材料を医療デバイスにコーティングすることにより、微弱な抗菌性を維持させ、細胞毒性を制御した新規な抗菌システムの構築が可能となると考えられる。

<引用文献>

- 1) 小林寛伊他、エビデンスに基づいた感染制御、メディカルフレンド社(2005)
- 2) M. Okada, T. Furuzono, J Mater Sci, 41, 6134-37(2007)

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. T. Furuzono, et al. (Y. Azuma: 5 名中 4 番目), Synthesis and antibacterial evaluation of calcinated Ag-doped nano- hydroxyapatite with dispersibility, Int J Artif Organs, 38, 251-258(2015), 査読有り, DOI:10.5301/ijao.5000408
2. 岡本 成平他 (東 慶直 : 9 名中 9 番目), 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 を用いた細胞融合法と育種法による耐熱性食酢醸造菌の創出と田村造酢(株) 監修による食酢醸造試験, 近畿大学生物理工学部紀要, 35, 17-32(2015), 査読有り, <http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/modules/xoonips/detail.php?id=AN1153712-20150331-0017>
3. M. Kawai, et al. (Y. Azuma:8 名中 8 番目), Complete genome and gene expression analyses of *Asaia bogorensis* reveal unique response to culture with mammalian cells as a potential opportunistic human, DNA Res, 22, 357-366(2015), 査読有り, DOI: 10.1093/dnares/dsv018
4. 東 慶直, クラミジアの持続感染と宿主アポトーシス制御、そして多様な慢性感染症, 近畿大学生物理工学部紀要, 34, 1-14(2014), 査読有り, <http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/modules/xoonips/detail.php?id=AN11153712-20140930-0001>
5. N. Higashiura, et al. (Y. Azuma: 7 名中 7 番目), Draft Genomic DNA Sequence of the Facultatively Methylophilic Bacterium *Acidomonas methanolica* type strain MB58, FEMS Microbiol Lett, 351, 9-13(2014), 査読有り, DOI : 10.1111/1574-6968.12357
6. M. Matsutani, et al. (Y. Azuma:15 名中 14 番目), Complete Genomic DNA Sequence of the East Asian Spotted Fever Disease Agent *Rickettsia japonica*, PLoS One, e71861(2013), 査読有り, DOI : 10.1371/journal.pone.0071861

[学会発表] (計 29 件)

1. 古菌 勉、ボトムアップ型ナノアセンブリによる医療機器の開発、第 53 回日本人工臓器学会、2015.11.19-21、東京ドームホテル (東京都文京区)
2. 古菌 勉他 (東 慶直 : 7 名中 3 番目)、分散性/結晶性 Ag イオン置換アパタイトナノ粒子の合成と生物学的評価、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015.11.9-10、京都テルサ(京都府京都市)
3. 樋口みのり他(東 慶直:4 名中 4 番目)、一般的な抗生剤とは全く異なる物質を用いての肺炎クラミジア感染抑制方法の試

み、第 26 回大学間交流会、2015.9.26-27、ツネイシしまなみビレッジ (広島県福山市)

4. 古菌 勉、抗感染性カテーテルの開発と在宅血液透析のバスキュラーアクセスを考える、和歌山県臨床工学技士会第 22 回学術集会、2015.6.21、近畿大学生物理工学部 (和歌山県紀の川市)
5. 東 慶直、酢酸菌の耐熱性育種株および Omics 解析日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.29、岡山大学(岡山県岡山市)
6. 河合 幹彦、東 慶直、Genome and RNA-seq analyses reveal adaptive responses of opportunistic pathogen *Asaia bogorensis*、2015 年日本細菌学会、2015.3.26-29、長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)
7. Y. Azuma, Thermo-tolerant modification of acetic acid bacteria by adaptation, genetic recombination and cell fusion, 中高温微生物センター国際シンポジウム、2015.3.8-10、山口大学 (山口県宇部市)
8. 河合幹彦他 (東 慶直 : 7 名中 7 番目)、日和見病原菌 *Asaia bogorensis* の環境適応遺伝子群、第 9 回日本ゲノム微生物学会年会、2015.3.6、神戸大学(兵庫県神戸市)
9. 古菌 勉、新しい抗感染性デバイスをつくる抗菌・静菌ナノ材料の開発、メディカルジャパン 2015、2015.2.4-6 インテックス大阪 (大阪府大阪市)
10. 古菌 勉、抗感染性カテーテルの設計と HHD におけるバスキュラーアクセスを考える、広島透析アクセス懇話会、ANA クラウンプラザホテル広島、2015.1.22、(広島県広島市)
11. 東 慶直、新規ストレス耐性化(耐熱化)微生物の作出方法、新技術説明会、2015.1.13、科学技術振興機構東京本部別館 (東京都千代田区)
12. 河合幹彦他 (東 慶直 : 7 名中 7 番目)、Genome and RNA-seq analyses of *Asaia bogorensis* reveal adaptive responses as an opportunistic pathogen、酢酸菌研究会・乳酸菌学会合同研究集会、2014.12.5、日本大学藤澤校 (神奈川県藤沢市)
13. 岡本成平他 (東 慶直 : 9 名中 9 番目)、細胞融合および育種による耐熱性酢酸菌を用いた食酢醸造試験、酢酸菌研究会・乳酸菌学会合同研究集会、2014.12.5、日本大学藤澤校 (神奈川県藤沢市)
14. 新川悠一他 (東 慶直 : 3 名中 3 番目)、酢酸菌のセルロース合成能に関するゲノムワイド遺伝子発現解析、酢酸菌研究会・乳酸菌学会合同研究集会、2014.12.5、日本大学藤澤校 (神奈川県藤沢市)
15. 河合幹彦他 (東 慶直 : 8 名中 8 番目)、全ゲノム解析と RNA-seq 解析によって明らかになった酢酸菌 *Asaia bogorensis* の新規ストレス応答遺伝子群、分子生物学会、2014.11.25、横浜国際会議場 (神奈川県横浜市)

16. 早崎君江他 (東 慶直: 4名中4番目)、根こぶ病の主因である *Plasmodiophora brassicae* の試験管内実験系の確立、第25回微生物研究交流会、2014.10.25、大阪府羽衣青少年センター (大阪府高石市)
17. 岡本成平他 (東 慶直: 9名中9番目)、実験室改良耐熱性酢酸菌の社会実装に向けた食酢醸造の試み、第25回微生物研究交流会、2014.10.25、大阪府羽衣青少年センター (大阪府高石市)
18. 河合幹彦他 (東 慶直: 7名中7番目)、酢酸菌 *Asaia bogorensis* の日和見病原性を規定する候補遺伝子群のゲノム解析とRNA-seq解析による同定、第25回微生物研究交流会、2014.10.25、大阪府羽衣青少年センター (大阪府高石市)
19. 古菌 勉他 3名、人工臓器の感染制御戦略: 材料工学的ナノテクノロジーの応用、第52回日本人工臓器学会、2014.10.17-19、京王プラザホテル札幌 (北海道札幌市)
20. 古菌 勉、来たるべき在宅医療の時代: 抗感染性バスキュラーアクセスの材料工学的挑戦、第23回日本次世代人工腎臓研究会、2014.9.13、全社協・灘尾ホール (東京都千代田区)
21. 古菌 勉他 3名、銀ドーパアパタイトナノ粒子の合成と融着防止剤の影響、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、2014.9.9-11、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
22. N. Noda, *et al.* (Y. Azuma: 5名中4番目)、Gene organization of large plasmids of novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* TK-E6, 2014 International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 47th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2014.8.3-7, Johannes Gutenberg University in Mainz, Germany
23. Y. Azuma, Experimental and bioinformatic analyses of stress tolerant acetic acid bacteria, ALCA/JST presents Workshop on Advanced Low-Carbon Biotechnology, 2014.7.3, Kasetsart University (Thailand)
24. 古菌 勉、抗感染性デバイスを目指した静菌性マテリアルの開発、第59回日本透視医学会学術集会・総会、2014.6.12-15、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
25. 古菌 勉、ナノセラミックス複合化技術による抗感染性デバイスの開発と事業化、第8回医歯工融合セミナー、2014.6.5、物質・材料研究機構 (茨城県つくば市)
26. 東 慶直、遺伝子導入による耐熱化、ALCA サイトビジット講演会、2014.6.1、山口大学工学部 (山口県宇部市)
27. 古菌 勉、感染制御に基づく医療用カテーテルの基礎と新素材の開発、&TECH 主催セミナー、2014.5.30、東京中央区産業会館 (東京都中央区)
28. 東 慶直、肺炎クラミジアの封入体膜タンパク質 IncA2 による Apaf-1 非依存

性 caspase-9 の活性化、2014年日本細菌学会、2014.3.28、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

29. H. Hadano, *et al.* (Y. Azuma: 6名中6番目)、113rd General Meeting: American society for Microbiology, 2013.5.19-21, Denver, Colorado, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. ハイドロキシアパタイト誘導体粒子群、古菌 勉、東 慶直 (他2名)、近畿大学、(株)ソフセラ、特願 2014-108961、出願 2014年5月27日、国内
2. 酸化ストレス抑制因子の増強による耐熱化微生物の造成、赤田 倫治他 (東 慶直: 9名中9名)、近畿大学、特願 2014-159048、出願 2014年8月4日、国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古菌 勉 (FURUZONO, Tsutomu)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 30332406

(2) 研究分担者

東 慶直 (AZUMA, Yoshinao)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号: 90333509

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし