

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560249

研究課題名(和文)新規合成法による銀ナノ粒子と担体との複合化による抗微生物化衛生・医療材料の創製

研究課題名(英文)Production of silver nanoparticles/carrier complexes and its medical application as antimicrobial materials

研究代表者

石原 雅之(Ishihara, Masayuki)

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・その他部局等・教授)

研究者番号：10508500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：銀ナノ粒子合成時の銀イオン含有ガラス粉末とグルコース水溶液をオートクレーブすることで銀ナノ粒子(粒径：約 $5 \pm 2$  nm)が形成する。この新たな銀ナノ粒子合成及び粒径制御技術と適切な担体の使用により、抗微生物活性を有した衛生材料、或いは医療用材料の開発が可能となった。特に、ナノ線維様或いはナノ多孔性表面構造を有するキチン・キトサン微粉末やシートは、銀ナノ粒子をその表面に効率的に吸着し、安定な複合体を形成する。この複合体は、銀ナノ粒子の吸着量に応じた強い抗微生物活性を発現した。さらに、複合体の細胞毒性についての検討で、活性酸素ラジカルの発生による強い酸化ストレスに起因することが示唆されている。

研究成果の概要(英文)：Size-controlled spherical silver nanoparticles (Ag NPs; diameter: about  $5 \pm 2$  nm) can be simply prepared by autoclaving mixtures of silver-containing glass powder with glucose. The Ag NPs were homogeneously dispersed and stably adsorbed onto the surface of chitin powders and CNFS with nanoscale fiber-like surface structure and chitosan powders with nanoscale porous surface structures. The antimicrobial activity of chitin/Ag NPs and CNFS/Ag NPs composites increased when the amounts of Ag NPs adsorbed to the chitin powder and CNSF increased. Furthermore, the proposed mechanism by which Ag NPs lead to cytotoxicity has been considered to partially be through the induction of reactive oxygen species (ROS) as an oxidative stress.

研究分野：生体材料

キーワード：ナノバイオ材料 抗微生物材料 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

単純でマクロな金属単体の塊状での物性とは全く異なった金属ナノ粒子は、そのサイズや形状に依存した抗微生物学的、光学的、電磁氣的、化学的特性を生じることが知られている。その中でも、銀ナノ粒子は安定な貴金属としては比較的安価であり、その物理的及び化学的性質から抗微生物剤、触媒、光学素子、蛍光増感剤、消臭剤、バイオセンサー、ドラッグデリバリー・システム等に应用することが用可能であるため、大きな注目を集めている。一例を挙げると、粒径が10 nm以下の銀ナノ粒子は、HIV-1 やインフルエンザウイルスのエンベロープに選択的に吸着し、ウイルスを不活化させることが知られている。従って、用途に応じて銀ナノ粒子を効率的に機能させるためには、粒径及び形状を制御する技術が必要である。

一方で、特に医療応用や環境適応性材料の分野から、銀ナノ粒子のクリーンな(有害物質の使用および排出のない)合成法が求められている。液相中での銀ナノ粒子には銀の供給源である銀イオン、銀イオンを金属銀に還元する還元剤と、生成したナノ粒子を過度の成長や凝集から保護する保護剤が必要である。我々は銀供給源に1 wt%の銀イオン含有ガラス粉末(粒径:約10 µm)及び還元剤にグルコース(0.8%)を用いて、 $5 \pm 2$  nmの均一な粒径を有する銀ナノ粒子コロイド溶液を調製した。この銀ナノ粒子溶液にナノ線維様表面構造を有するキチン微粉末と混合すると、高率的に銀ナノ粒子がキチン表面に吸着した強い抗微生物活性を有するキチン/銀ナノ粒子複合体が生成し、安定な乾燥微粉末として製造が可能である。

## 2. 研究の目的

銀イオン供給剤として銀イオン含有ガラス粉末、還元剤としてグルコースを用いて、121 °C 5気圧下20分間のオートクレーブで、銀イオン含有ガラス界面からの銀イオンの拡散及び還元により均一な粒子径(約 $5 \pm 2$  nm)を有する銀ナノ粒子の簡便な合成法を確立する。銀ナノ粒子はナノ線維様表面構造を有するキチン微粉末の表面に効率的に吸着し、安定したキチン/銀ナノ粒子複合体を形成する。そのキチン/銀ナノ粒子複合体微粉末やシートのキログラムスケールでの製造法を確立し、それらの抗微生物(抗真菌、抗菌、抗ウイルス)活性及び安定性を検証するとともに、汎用衛生材料及び抗感染性創傷被覆材料への適用により実用化に結び付ける。

## 3. 研究の方法

$5 \pm 2$  nmの均一な粒径を有する銀ナノ粒子は、ナノ線維様或いは多孔様の表面構造をもつキチン/キトサン担体との相互作用により吸着する。本研究で使用したキチンそしてキトサン微粉末は、それぞれナノ線維様そし

てナノ多孔様表面構造を有する微粉末(粒5 - 10 µm)で、それぞれ銀ナノ粒子を最大30そして60 µg/mg吸着できることが明らかにしている。キチン、キトサン微粉末単独では、弱い抗真菌(*Aspergillus niger* に対して)、抗菌(*E. coli*(DH5<sup>-</sup>) に対して)、抗ウイルス(A型インフルエンザ(A(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) に対して)活性しか観察されないため、銀ナノ粒子のそれぞれの微粉末表面への添加は、濃度に依存して抗真菌、抗菌、抗ウイルス活性を増強するかを検証する。さらに、安全性を評価するため細胞毒性について、酸化ストレスの発現について各種ストレスマーカーを用いて検討する。

## 4. 研究成果

キチン・キトサン/銀ナノ粒子複合体微粉末は強力な抗微生物活性を示し、抗真菌(*Aspergillus niger* と *Penicillium funiculosum*)、抗菌[大腸菌(*E. coli*)と緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)]、抗ウイルス[A型インフルエンザ(A(H1N1))]活性についての評価を完了した。さらに、これらの抗微生物活性を、感染性微生物に対する除染剤、各種汎用衛生材料、抗感染性創傷被覆材として適用するために、有効な抗微生物活性に要求されるナノ繊維様表面構造を有するキチン担体とナノ多孔性表面構造を有するキトサン担体(粉末及びシート)への銀ナノ粒子吸着量、及び添加するキチン・キトサン/銀ナノ粒子複合体微粉末の濃度を最適化し、有効な微生物防護材料を創製した。

キチン・キトサン/銀ナノ粒子複合体は、生体内や生態系への銀ナノ粒子の流出を防ぐことが可能で環境に優しい材料である。そこで、各種繊維、紙、コットン、ゴム類、プラスチック類、木材、樹脂、塗料等の汎用材料への混合・塗布・被覆により、強い抗微生物活性を有する汎用衛生材料・除染材料・防護材料としての用途に供することも検討した。さらに、本キチン・キトサン/銀ナノ粒子複合体の細胞毒性が活性酸素ラジカルによる酸化ストレスによることを明らかにしている(発表論文準備中)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Kishimoto S, Inoue KI, Nakamura S, Hattori H, Ishihara M, Sakuma M, Toyoda S, Iwaguro H, Taguchi I, Inoue T, Yoshida KI: Kow-molecular weight heparin protamine complex augmented the potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia. *Atherosclerosis* 2016, 249 (132-139): 132-139.
2. Ishihara M, Kishimoto S, Murakami K, Hattori H, Nakamura S:

- Heparinoid-based biomaterials and their application. *Int J Pharma Bio Sci* 2016, 7 (2): 218-234.
3. Ishihara M, Nguyen VQ, Mori Y, Nakamura S, Hattori H: Adsorption of silver nanoparticles onto different surface structures of chitin/chitosan and correlations with antimicrobial activities. *Int J Mol Sci* 2015, 16 (6): 13973-13988.
  4. Ishihara M, Hattori H, Nakamura S: A review on biomedical applications of chitosan-based biomaterials. *Int J Pharma Bio Sci* 2015, 6 (3): 162-178.
  5. Ishihara M, Kumano I, Hattori H, Nakamura S: Application of hydrogels as submucosal fluid cushions for endoscopic mucosal resection and submucosal dissection. *J Artif Org* 2015, 18 (3): 191-198
  6. Hattori H, Ishihara M: Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical Materials* 2015, 10 (1): 15014.
  7. Takikawa M, Nakamura S, Ishihara M, Takabayashi Y, Fujita M, Hattori H, Kushibiki T, Ishihara M: Improved angiogenesis and healing in crush syndrome by fibroblast growth factor-2-containing low-molecular-weight heparin (Fragmin)/protamine nanoparticles. *J Surg Res* 2015, 196 (2): 247-257.
  8. 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 (1): Article No. 49.
  9. Nguyen VQ, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui T: Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinical in Iwaki, Fukushima, Japan. *Am J Infection Control* 2014, 42 (5): 551-553.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 木之田 淳, 服部 秀美, 中村 伸吾, 横江 秀隆, 石原 雅之. 創傷治癒における銀ナノ粒子の影響と安全性. 第 61 回防衛衛生学会(2016) 東京、2月4 - 5日.
2. 木之田 淳, 服部 秀美, 中村 伸吾, 横江 秀隆, 石原 雅之. 創傷治癒にお

ける銀ナノ粒子/キチン複合体の影響と安全性. 第 37 回日本バイオマテリアル学会(2015) 京都、11月9 - 10日.

3. 服部 秀美, 辻本 広紀, 木之田 淳, 長谷 和生, 石原 雅之. 腹腔鏡内視鏡合同手術用の新規粘膜下注入材の開発. 第 37 回日本バイオマテリアル学会(2015) 京都、11月9 - 10日.
4. 服部 秀美, 木之田 淳, 石原 雅之. ラクトース導入キトサン誘導体の諸性質の検討. 第 37 回日本バイオマテリアル学会(2015) 京都、11月9 - 10日.
5. 服部 秀美, 辻本 広紀, 木之田 淳, 長谷 和生, 石原 雅之. キトサンを用いた腹腔鏡内視鏡合同手術のための粘膜下注入材の開発. 第 29 回日本キチン・キトサン学会(2015) 熊本、8月19 - 21日.
6. 石原 雅之, 服部 秀美, 中村 伸吾. 抗微生物材料としての銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体の細胞毒性と自然免疫. 第 20 回エンドトキシン・自然免疫研究会(2014) 東京、12月5 - 6日.
7. 服部 秀美, 石原 雅之. 脱アセチル化度及び分子量が異なるキトサンの創傷治癒促進効果の違いについて. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(2014) 千葉、11月17 - 18日.
8. Vinh Quang Nguyen, 石原 雅之, 服部 秀美, 松井 岳巳. The antiviral effect of silver nanoparticles/chitin composites against H1N1 influenza A virus. 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム(2014) 東京、8月7 - 8日.
9. 石原 雅之, Vinh Quang Nguyen, 服部 秀美, 中村 伸吾, 松井 岳巳. 抗微生物材料としての銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体(シンポジウム). 第 28 回キチン・キトサンシンポジウム(2014) 東京、8月7 - 8日.
10. Vinh Quang Nguyen, 石原 雅之, 服部 秀美, 松井 岳巳. キチンナノファイバー/銀ナノ粒子複合体を用いた抗感染性創傷被覆材の開発. 第 53 回日本生体医工学大会(2014) 仙台、6月24 - 26日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石原 雅之 (ISHIHARA, Masayuki)  
防衛医科大学校・その他の部局等・教授  
研究者番号：10508500

##### (2) 研究分担者

宮平 靖 (MIYAHIRA, Yasushi)  
防衛医科大学校・その他の部局等・教授  
研究者番号：40265781

服部 秀美 (HATTORI, Hidemi)  
防衛医科大学校・その他の部局等・助教  
研究者番号：80508549

中村 伸吾 (NAKAMURA, Shingo)  
防衛医科大学校・その他の部局等・講師  
研究者番号：00505323