

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19008

研究課題名（和文）制御可能なナノ構造を用いた微生物抗菌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of bactericidal effect using controllable nanostructures

研究代表者

伊藤 健（ITO, Takeshi）

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：50426350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノ構造が発現する抗菌メカニズムを解明するために、ナノ構造の寸法を制御すること、そしてその物理化学的性質を制御することでそれらのパラメーターが抗菌性に及ぼす影響について評価を行った。
研究の結果、シリコン基板にナノピラーを任意の寸法で形成できる技術を開発し、それを用いて抗菌性を発現する構造的特徴を見出した。また、物理化学的条件も重要である事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの抗菌剤は、金属系や化学物質が使われてきたが、それらに耐性をもつ薬剤耐性菌が生まれ、それらの菌に感染して亡くなる人の数が増加の一途をたどっている。
本研究から生まれる技術は、物理的な作用により抗菌性を発現するものであるため、薬剤耐性菌を生み出しにくいと考えられている。抗菌性を発現する原因を突き止めることで、効果的な人工材を提供できるものと考えられ、人類の保健衛生に大いに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to reveal the antimicrobial mechanism expressed by nanostructures, we controlled the dimensions of the nanostructures and their physicochemical properties to evaluate the effects of these parameters on the antimicrobial properties in this study.
As a result of the research, we developed a technology that could form nanopillars on silicon substrates with setup dimensions, and found the structural features that make them exhibit antibacterial properties. We also found that physicochemical conditions are also important.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：ナノ構造 抗菌 殺菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セミやトンボなどの昆虫の翅には無数のナノレベルのピラー(柱状)構造が存在していることが知られている。ナノピラーの構造は、幅、ピッチ(構造の中心間距離)、高さともに 100~300 nm である。このナノピラー構造は、光に対する反射防止機能を示す。そのため、外部環境に溶け込み外敵から見つけられないように進化を遂げたと考えられている。さらに、この構造は雨でも自由に飛べるように超撥水性を実現している。近年、ナノピラー構造にはこれらの機能に加えて、抗菌作用が有ることが報告された。そのメカニズムは、ナノ構造により細菌の膜が引き延ばされ、やがて破壊するためと推測されている。しかしながら、セミの翅では水への接触角が 140° 以上(超撥水という)であることから、細胞がピラー間のギャップに引きずり込まれる要因が解決したとは言えない。

一方で、近年は薬剤耐性菌(AMR)の出現が問題視されている。これまでに数多くの化学的な抗菌剤が開発されてきたが、それらの抗菌作用に耐性を持った AMR が現れるようになった。現在、AMR に感染し命を落とす人の数は全世界で年間 70 万人と推計されている。上述したナノ構造による抗菌作用は物理的な作用と考えられるため、AMR は生じにくいと考えられている。抗菌作用が現れるナノ構造の物理的な条件を見出せば、公衆衛生問題を解決できる新しい抗菌材として期待できる。

2. 研究の目的

ナノ構造が発現する抗菌作用を人類が有効活用するため、つまり産業化するためには、ナノ構造による抗菌メカニズムの解明が急務である。本研究では、セミの翅に存在するナノ構造を人工的に模倣することで構造条件や濡れ性など様々な条件を制御し、大腸菌をモデルとした抗菌発現の条件を見出すと共に、抗菌メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

3.1 抗菌を発現するナノ構造の寸法制御

セミの翅にあるナノ構造を模倣するために、コロイダルリソグラフィとメタルアシストケミカルエッチングを組み合わせて、シリコン基板を使って任意の寸法を持つナノ構造を作製した。具体的な作製法を以下に記す。作製工程は から に分かれる。

樹脂ビーズの配列。スピンコート法を用いて、樹脂ビーズをシリコン基板に単層で堆積させる。この時、樹脂ビーズの直径でナノピラーのピッチを制御している。

ビーズ径の制御。樹脂ビーズを酸素プラズマを用いてエッチングすることでビーズ直径を小さくする。

金属薄膜の形成。メタルアシストケミカルエッチングの際に触媒となる金属薄膜を で作製した表面に製膜する。

メタルアシストケミカルエッチング。特殊なエッチング液に で作製した基板を浸漬する。金属薄膜とシリコン基板が密着している箇所が選択的にエッチングされナノピラーが形成される。なお、ピラーの高さは浸漬時間により制御できる。

樹脂ビーズと金属薄膜を除去する。

3.2 抗菌を発現するための濡れ性の制御

3.1で作製したナノピラーを持つシリコン基板(今後、シリコンナノピラーと呼ぶ)は、酸化膜で覆われているため親水的である。しかしながら、セミの翅は上述した通り超撥水性を示す。セミの翅の状態に近づけるためには、表面の濡れ性を制御する必要がある。そこで、自己組織化膜(SAM)を利用した。3.1で作製したシリコンナノピラーに金をごく薄く堆積し、その上に官能基の異なるアルカンチオール(メチル基を有するもの(疎水的): 1-Dodecanthiol、ヒドロキシ基を有するもの(親水的): 11-Mercapto-1-undecanol)を結合させた。また、接触角を制御するために、これらの試薬の混合率を変化させて結合させた。

3.3 抗菌作用の時間特性の評価

抗菌作用の時間特性、つまりどれくらいの時間で菌が死んでいくかを評価するために、遺伝子組み換え技術を利用して蛍光たんぱく質を生成させた大腸菌を作り出した。また、表面への物質吸着と粘弾性評価が可能である水晶振動子マイクロバランス法(QCM-D)を利用し、ナノ構造が作製された電極への付着から死滅までの周波数変化及び抵抗変化を計測した。水晶振動子にはセミの翅を模倣したナノピラーを持つ電極を作製した。電子線描画装置を利用してナノホールを形成し、パルスめっきを用いてホール部に金からなるナノレベルの柱状電極を形成させた。

4. 研究成果

4.1 ナノ構造の寸法と抗菌性の関係

3.1で記載した3次元ナノピラーを制御する方法を用いて図1に示すようなシリコンナノピラーを作製した。図を見てわかるように、規則正しくナノピラーが配列されていることが分かる。ナノピラーの構造中心間距離(ピッチ)を100~2000nmで変化させ、大腸菌に対してJIS Z2801(フィルム密着法)に準拠して抗菌試験を行った。結果を図2に示す。横軸はピッチ、縦軸は抗菌性を発現したアスペクト比(構造の高さ/幅)を示す。抗菌性を示すという意味は、試験前後の生菌数の比に100を掛けた数値が1%を切ることを意味する。この結果から、抗菌性を発現する構造条件を見出すことができた。

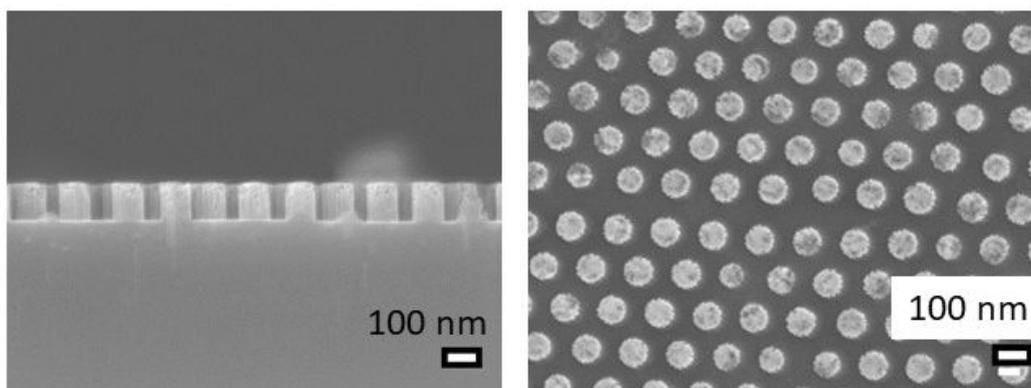


図1 コロイダルリソグラフィとメタルアシストエッチングを用いて形成したシリコンナノピラーの走査型電子顕微鏡像(左:断面、右:上面)

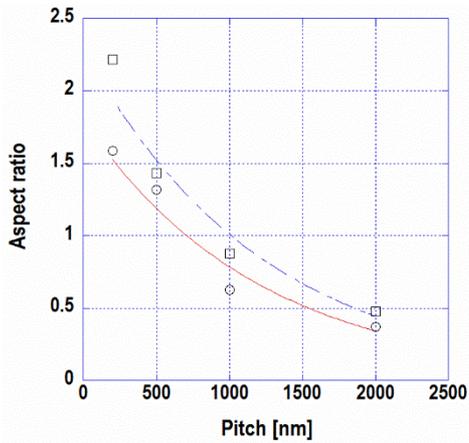


図2 抗菌性を発現するナノピラーのピッチとアスペクト比の関係

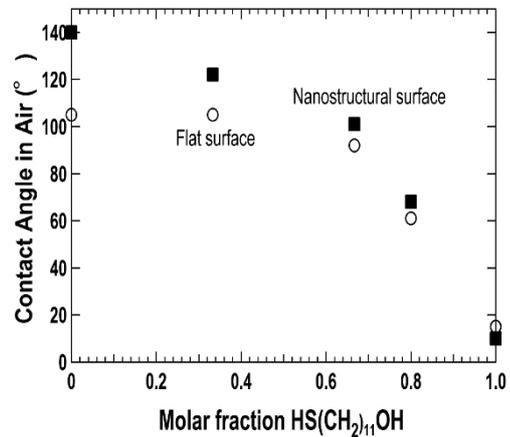


図3 SAMの分子比率とWCA(接触角)の関係

4.2 濡れ性の制御と大腸菌の付着数の関係

3.2に記載した方法により水に対する接触角(WCA)を制御できるかを検討した。図3に示すように、1-Dodecanthiolと11-Mercapto-1-undecanolの配合比を変化させるとWCAが変化することが分かった。また、ナノ構造の無いフラットな基板ではWCAの最大値が105°であるが、ナノ構造がある場合には140°まで向上した。この結果は、微細構造では濡れ性が大きく変化するロータス効果と言われるものである。

続いて、WCAと大腸菌の付着数の関係を評価した。ナノ構造が発現する抗菌性は、その表面に細菌が付着することで初めて効果を発揮するため、付着数を多くできるという事はそれだけ抗菌性が高くなると推測される。評価の結果、WCAの増加につれて単位面積当たり的大腸菌付着数が増加することが分かった。また、同じWCAでもナノ構造がある場合の方が、より多くの大腸菌が付着するという事を見出した。この結果から、大腸菌の何らかの特異性によりナノ構造への付着数増加が生じていると考えられる。

4.3 大腸菌抗菌作用の時間特性

mCherryを発現した大腸菌を3.1に記したシリコンナノピラーに滴下し、蛍光顕微鏡下で蛍光像を5分おきに撮影した。付着後の蛍光強度を1に規格化し、20個の大腸菌の蛍光強度の経時変化を評価した。結果を図4に示す。図から、蛍光強度変化には3つの傾きがあることが分かる。初めに、ほぼ蛍光強度が変化しない領域があり(20個のうち3個で観察)、その後緩やかな傾きを持つ領域と、急な傾きを持つ領域に分かれることが分かった。変化の無い領域は大腸菌がナノ構造に付着し、膜損傷が生じていないことを示している。緩やかな傾きの領域では、細胞膜に小さな損傷が生じ、そこから蛍光たんぱく質が漏れ出ていることを示している。最後の領域では、膜損傷が大きくなりいっせいに内容物が放出したと考えられる。この結果は、セミの翅をサンプルに用いて評価したときの結果と良く一致していた。つまり、材料ではなく、物理的な作用によって生じていることを証明している。また、細菌の付着から蛍光消失までの時間は長くとも20分以内であり、即効性が高い事を示した。

次に、水晶振動子上にナノ構造電極を形成し、その表面の濡れ性を变化させた時の共振周波数変化(付着量)と抵抗変化(粘弾性変化)に関する結果を図5に示す。濡れ性の变化は4.2の結果に記載したように、自己組織化膜を利用して調整した。表面処理の無い水晶振動子(WCA

約 82°) のデータは実線、疎水表面 (WCA 約 126°) のデータは点線、親水性表面 (WCA 約 14°) は一点鎖線で示している。また、赤線は周波数変化 (左軸)、青線は抵抗変化 (右軸) である。この結果から、疎水的なほど抵抗の変化が大きくなることが分かった。また、いずれの場合にも 2400 秒程度 (40 分) で抵抗変化が飽和することが分かった。一方、周波数変化の方を見ると、表面処理の無い電極で最も大きな変化を示し、疎水的な電極が最も変化量が小さかった。4.2 で記載したように、細菌は疎水性のナノ構造に付着しやすい性質があるが、周波数変化つまり重量変化は最も少なかった。しかし、抵抗の変化量は一番大きかった。抵抗変化については、膜損傷を受けた細菌がナノ構造の隙間に徐々に入り込むことで粘弾性が増加したことに起因すると考えられる。一方、周波数変化が少なかったのは、計測原理が一因であると考えられる。本来、水と水晶振動子が接している部分では、水にも弾性波が吸収され、それが周波数変化に寄与するが、疎水的な場合には水に触れる面積が小さくなるため水に吸収される弾性波が小さくなると考えられる。そのため、周波数変化としては小さく表れたのではないかと推測している。抵抗変化のみに着目すれば、4.2 の結果とよく一致した。

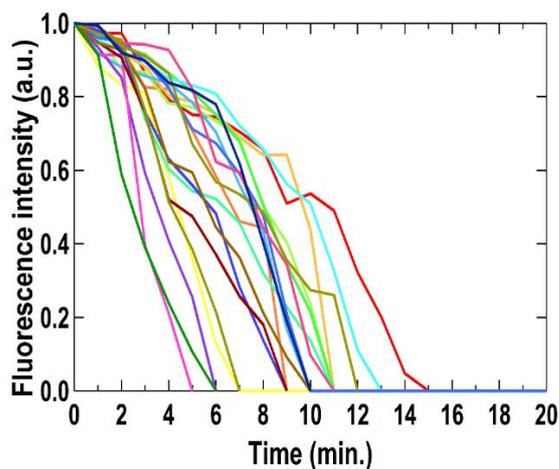


図4 ナノ構造上に付着した mCherry を発現した大腸菌の経時的蛍光強度変化

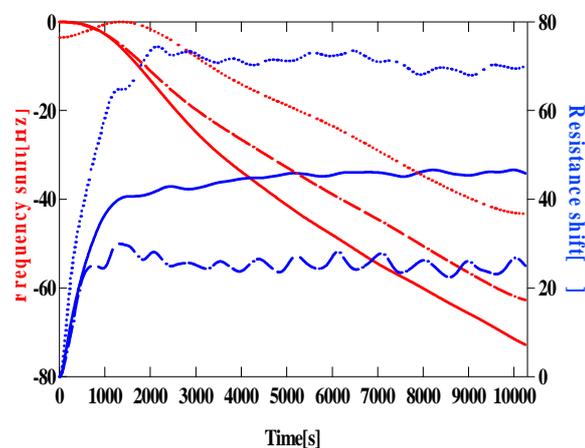


図5 ナノ構造電極を持つ水晶振動子を用いて大腸菌を含む液を滴下した際の応答

5. 今後の課題

本研究からナノ構造が発現する抗菌性は、付着後の物理的な作用により小さな膜損傷、その後に大きな膜損傷が生じていることが分かった。しかし、それらの損傷がなぜ生じるかは解明できなかった。これらの解明には単一細胞レベルでナノ構造と微生物の相互作用を経時的に評価する技術が必要である。また、微生物側にも要因がある可能性があるため、遺伝子欠損株や多種の細菌を用いた相互作用評価を実施する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keisuke Jindai, Kazuki Nakade, Kyosuke Masuda, Takashi Sagawa, Hiroaki Kojima, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, Takeshi Ito	4. 巻 10
2. 論文標題 Adhesion and Bactericidal Properties of Nanostructured Surfaces Dependent on Bacterial Motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 5673-5680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9RA08282D	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 伊藤健	4. 巻 39
2. 論文標題 クマゼミの翅を模倣した抗菌材料の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 機能性材料	6. 最初と最後の頁 44-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nakade Kazuki, Jindai Keisuke, Sagawa Takashi, Kojima Hiroaki, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Adhesion and Bactericidal Properties of a Wettability-Controlled Artificial Nanostructure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 5736 ~ 5741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.8b01340	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 Nakade Kazuki, Jindai Keisuke, Sagawa Takashi, Kojima Hiroaki, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Single cell / real-time imaging of bactericidal effect on the nano-structural surface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Today: Proceedings	6. 最初と最後の頁 497 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matpr.2018.11.115	査読の有無 無
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 Jindai Keisuke, Nakade Kazuki, Sagawa Takashi, Kojima Hiroaki, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Investigation of nanostructure-based bactericidal effect derived from a cicada wing by using QCM-D	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Today: Proceedings	6. 最初と最後の頁 492 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matpr.2018.11.114	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 T. Ito, K. Nakade, K. Jindai, T. Sagawa, H. Kojima, T. Shimizu, S. Shingubara
2. 発表標題 Bactericidal effect on the nanostructural surface: mimicking the cicada wing
3. 学会等名 Biomimetics in bioengineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ito, K. Masuda, K. Jindai, H. Kojima, I. Yamashita, T. Shimizu, S. Shingubara
2. 発表標題 Estimation of bacteria death on the nanostructured surface using electrochemical impedance spectroscopy
3. 学会等名 IEEE Nano (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ito, K. Masuda, K. Jindai, H. Kojima, I. Yamashita, T. Shimizu, S. Shingubara
2. 発表標題 Detection of adhesion and deformation of E. coli on the 3D nanostructural electrode using electrochemical impedance spectroscopy
3. 学会等名 M&Be 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田恭介、神代啓輔、藤野優佑、小嶋寛明、山下一郎、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造における抗菌メカニズム解明を目指した微小空間での電気化学インピーダンス測定
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神代啓輔、増田恭介、富成征弘、田中秀吉、小嶋寛明、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造が発現する抗菌作用のリアルタイム観察の試み
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Ito, Kazuki Nakade, Keisuke Jindai, Takashi Sagawa, Hiroaki Kojima, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara
2. 発表標題 Time-lapse imaging of bactericidal effect on nanostructural surface
3. 学会等名 SPIE Smart Structures (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造が発現する抗菌作用の解明に向けた取り組み
3. 学会等名 長崎大学化学・物質工学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中出一輝、神代啓輔、佐川貴志、小嶋寛明、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造が発現する抗菌作用に付着力が及ぼす影響
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神代啓輔、増田恭介、小嶋寛明、佐川貴志、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造表面の濡れ性が抗菌作用に及ぼす影響
3. 学会等名 第46回日本防菌防黴学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jindai Keisuke, Masuda Kyosuke, Kojima Hiroaki, Sagawa Takashi, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi
2. 発表標題 Detection of adhesion and deformation of E.coli on the nanostructured surface using QCM-D
3. 学会等名 The 13th Asian Conference on Chemical Sensors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神代啓輔、中出一輝、佐川貴志、小嶋寛明、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 水晶振動子上に作製した周期的ナノ構造による抗菌特性の定量化
3. 学会等名 第35回センサシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤健 (坂上吉一監修)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 232
3. 書名 天然系抗菌・防カビ剤の開発と応用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌材料及びこれを備えた抗菌部材	発明者 伊藤、清水、新宮 原、中出、神代、佐 川、小嶋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-072475	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

関西大学ナノ機能物理工学研究室 http://www2.kansai-u.ac.jp/nano/index.html

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	小嶋 寛明 (KOJIMA Hiroaki) (00359077)	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・上席研究員 (82636)	
研究分担者	新宮原 正三 (SHINGUBARA Shoso) (10231367)	関西大学・システム理工学部・教授 (34416)	

6. 研究組織（つづき）

	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	清水 智弘 (SHIMIZU Tomohiro) (80581165)	関西大学・システム理工学部・教授 (34416)	

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