

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01773

研究課題名（和文）ナノ構造に起因する殺菌原理解明にむけた単一細胞とナノ構造界面の相互作用解析

研究課題名（英文）Analysis of interaction between single cell and nanostructured surface to clarify the sterilization mechanism due to nanostructure

研究代表者

伊藤 健（Takeshi, Ito）

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ナノ構造に付着した細菌は、ナノ構造と細菌の物理的相互作用により細胞外皮が損傷し、やがて死に至ると考えられている。その過程は複雑でありいまだ解明されていなかった。本研究では、物質界面に敏感な電気化学計測と蛍光顕微鏡画像を同時に取得することで、その過程の解析を行った。また、細菌が発現する膜溶解酵素を欠損した菌とナノ構造の相互作用を解析した。それらの結果から、膜損傷は、ナノ構造に付着したことにより物理的ストレスが発生し、それにとまなうストレス関連物質が生成され、膜溶解酵素の活性化が起こることに起因すると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、ナノ構造の殺菌メカニズムは、ナノ構造が膜を貫通し物理的な損傷を与えると考えられてきたが、本研究から物理的に膜が引き延ばされたことによる膜溶解酵素の活性化、つまり生化学応答に起因することが認められた。最近では分裂する際に膜溶解を自ら生じさせているため、ナノ構造との物理的作用がきっかけとなり生物独自の機構で発生すると考えられる。このことから、どのような微生物であっても同じ現象が生じる可能性があり、適用できる菌種が多い、つまり広い抗菌スペクトルを持つであろうと期待できる。そのため、医療材料など強い薬剤を用いずとも抗菌の必要がある用途への展開が可能である。

研究成果の概要（英文）：Bacteria adhering to nanostructures are killed as a result of cell membrane damage caused by the physical interaction between the nanostructure and the bacteria. The process is complex and has not yet been elucidated. In this study, we analyzed this process by simultaneously acquiring electrochemical measurements which is very sensitive to the material interface and fluorescence microscopy imaging. We also analyzed the interaction of nanostructures with bacteria lacking lytic enzymes of bacteria. From these results, it was concluded that membrane damage is caused by physical stress due to adhesion to the nanostructures, with the associated production of stress-related substances and activation of the lytic enzymes.

研究分野：ナノ・マイクロ工学

キーワード：ナノ構造 抗菌 殺菌 膜溶解酵素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セミの翅にあるナノ構造が細菌を物理的に殺菌することが2012年に初めて報告された。その後、トンボの翅やヤモリの指先など、様々な生物がもつナノ構造表面に同じ作用があることが見いだされた。細菌を覆う膜の厚みは非常に薄いので、ナノレベルの突起部が直接突き刺さり、膜を突き破ることにより殺菌を発現するという単純な系が想定されていた。しかしながら、メカニズムの解明に向けた研究が進むにつれ、単純ではなく様々な要因が関与し、複雑であることがわかってきたが、医療応用を目指すうえでメカニズムの解明は重要である。

2. 研究の目的

ナノ構造と細菌の相互作用とその作用による殺菌性発現を評価するには、これまでに透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡(SEM)、原子間力顕微鏡(AFM)、蛍光顕微鏡などが活用されてきた。TEM、SEMはナノレベルの観察が可能であるが、生きたままの観察が難しいため、実際に何が起きているのかをリアルタイムで評価することはできない。AFMは、形状情報の他に硬さや位相のずれなどをほぼリアルタイムで評価できるが、肝心のナノ構造と細胞膜の接触部を観察することはできない。蛍光顕微鏡は、生体の情報を可視化することが可能であるが、ナノレベルでの評価が難しい。以上のことから、単細胞レベルでナノ構造と細胞の相互作用を評価できる方法を構築することが重要である。また、これまでの研究では、ナノ構造の物理的特性、つまり構造の密度、アスペクト比などのパラメーターと殺菌性の関係について研究がなされてきたが、生物側の要因、微生物種による影響などについて着目した事例がほとんどなかった。

3. 研究の方法

(1) ナノ構造と細胞の相互作用を評価する方法として、電気化学インピーダンス法(EIS)と蛍光顕微鏡を組み合わせた方法を発案した。いずれも経時変化を追うことができるため、ほぼリアルタイムの評価が可能となる。蛍光顕微鏡では、高さ方向の分解能が低いため、ナノレベルの突起物に細胞が付着したのか否かを判断することはできない。一方EISは、電極表面の電子の授受を高感度にとらえることができる手法であり、電極表面に細菌が付着すれば、電子の授受が妨げられるため、インピーダンスが増加する。そこで、この二つを組みあわせることで、付着の情報をインピーダンスから、生体内の反応を蛍光像から確認することができる。

(2) ナノ構造がどのような形状、物であっても、その表面に付着した細菌は膜が溶解しているように見える。そこで、細胞側の要因について膜溶解酵素に着目した。この酵素は細胞分裂時に活性化される。大腸菌をモデル微生物ととらえ、大腸菌の主な膜溶解酵素である MltA, MltB, Slt70 の3つに着目し、それぞれの酵素が欠損した菌株を準備し、菌株の違いによる膜損傷の経時変化を観察した。

(3) ナノ構造へ細菌が付着すると、やがてバイオフィームと呼ばれる微生物の集合体を形成する。バイオフィームは様々な産業や一般生活を送るうえで障害となっており、バイオフィーム抑制に有効ではないかと考えた。そこで、ナノ構造に対する抗バイオフィーム性をクリスタルバイオレット染色法で評価した。

4. 研究成果

(1) 単一細胞評価に向けたナノ構造の作製

EISを用いて細菌の付着を評価するためには、導電性があるナノレベルの電極を作製する必要がある。そのため、Si基板上に金薄膜を形成した後に電子ビーム(EB)リソグラフィを用いてホールパターンを作製した。パルスメッキを用いることで構造間距離500nm、直径280nm、高さ390nmの二次元最密充填配列を取るAu電極を作製した(図1)。レジストを除去した後、再度EBリソグラフィを行い、直径20および100 μm のホールを作製した。このホール部のみが電極と細菌を含む溶液が接する部分となるため、単細胞レベルでの評価が可能となる。さらに、作製した基板に対して菌液を導入するマイクロセルが必要となる。マイクロセルには、対向電極としてAu薄膜、参照電極としてAg/AgClペーストを塗布したガラス基板を利用した。ガラス基板には計測溶液の出し入れ用に穴が2つ設けられている。これらを厚み500 μm のPDMSシートで挟み込んだ(図2)。

(2) ナノ構造電極によるインピーダンス計測と蛍光顕微鏡との同時評価

EIS測定は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS: Phosphate Buffered Saline, pH=7.4)に電解質として塩化ナトリウム(NaCl)を0.15M溶解させ、RedOxプローブとしてフェリシヤニド($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)とフェロシヤニド($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)を各10mMで混合させた溶液を使用した。また、周波数は0.1Hz~100KHzとし、電圧は自然電位に対して10mVの振幅で加えた。測定対象には、蛍光たんぱく質(mCherry)を発現した大腸菌と直径約1 μm のリボソームに蛍光物質であるローダミン6G(R6G)を含有させたものとした。リボソームは脂質二重膜から構成されるため疑似細胞として利用した。大腸菌を投入した際のEISの結果を図3に示す。同じ測定系(電極、測定溶液)を利用しても R_{ct} にばらつきが生じるため、測定開始時の R_{ct} を基準とし、それに対する抵抗の変化率($R_{ct}(T)/R_{ct}(0)$)で評価する。ここで、Tは時刻であり、T=0とは測定の基準になる時刻を0と

している。図3から明らかなように、測定開始後5分ほどで抵抗変化率が上昇し、多少の増減があるものの、35分まで初期値に対して大きな値を維持した。また、この時の蛍光顕微鏡観察の結果を図4に示す。図中の白点線の円は電極の位置を示す。青い実線で示された注目している細菌は測定開始後5分程度で動かなくなり電極に付着した様子が見て取れる。その後時間経過とともに蛍光強度の減少が見られた。以上の結果から、細菌の付着と死滅の様子をEISと蛍光顕微鏡観察の同時観察によってとらえることに成功したと言える。蛍光強度の減少を解析し時定数を算出すると 0.13 min^{-1} となった。この結果は、我々の以前の報告ともよく一致したことから、細菌の死滅する過程による蛍光強度の減少と結論付けた。同じ測定系を用いて蛍光物質としてローダミン6G (R6G) を含有させたリポソーム (平均粒子径約 $1 \mu\text{m}$) に対しても実験を行った。リポソームが電極に付着することをEISで確認したが、蛍光強度の減少は観察されなかった。つまり、細胞と同じ脂質二重膜で構成されるリポソームはナノ構造に付着した後、膜の崩壊が生じなかったと言える。このことから、ナノ構造が生み出す殺菌性は、微生物独自の機構によるものである可能性を見出した。

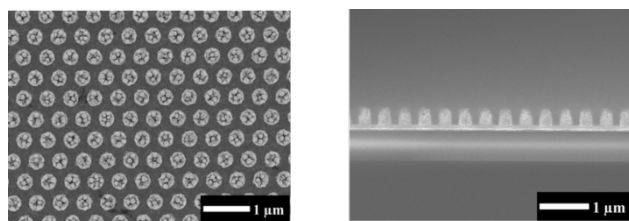


図1 作製したナノ構造電極(左：上面図、右：断面図)

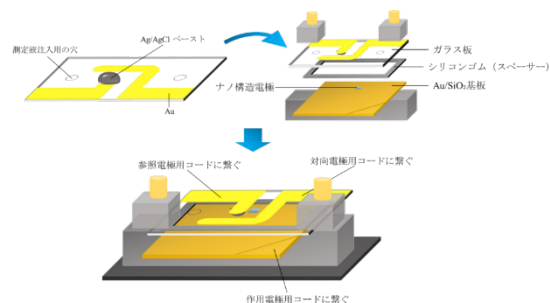


図2 EIS計測のためのマイクロセル模式図

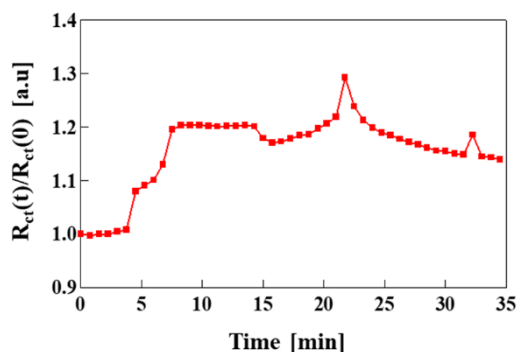


図3 大腸菌導入に伴うインピーダンスの経時変化 (0分を基準にした変化量)

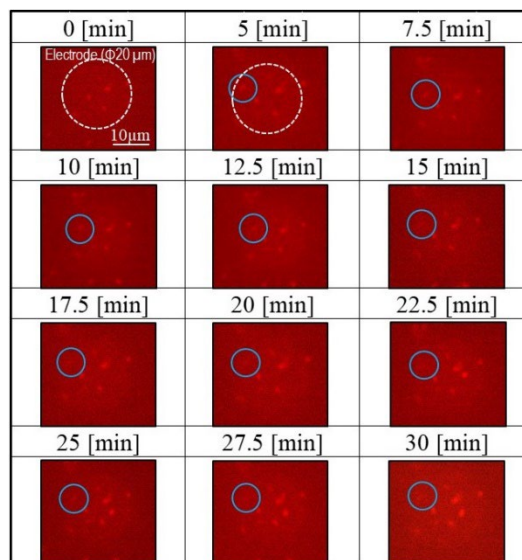


図4 ナノ構造に付着した大腸菌の蛍光像

(3) 大腸菌における膜溶解酵素の種類が殺菌効果に与える影響

ナノ構造に付着した細菌の膜にはナノ構造により膜を変形させる応力が発生する。この応力により、細胞には物理的なストレスが生じる。このストレスにより膜溶解酵素が活性化し、細胞膜の溶解が生じるのではないかと考えた。細菌には、ペプチドグリカンと呼ばれる強固な分子層が存在しており、膜が破られるにはこのペプチドグリカン層が破壊されなければならない。一方、細菌は、細胞増殖や分裂にこの層を自ら破壊する必要がある。自己溶解酵素(オートリシン)はこのような時に活性化される酵素である。大腸菌には MltA、MltB、Slt70 の主に3つのオートリシンが存在している。MltA、MltB は外膜に存在しており、基質はグリカン鎖とペプチドグリカンである。また、Slt70 はペプチドグリカン層に存在しており、基質はペプチドグリカンである。これらのオートリシンを欠損した大腸菌株 (それぞれ $\Delta mltA$ 、 $\Delta mltB$ 、 $\Delta slt70$ とする) と野生株 (WT) の Si ナノスパイク上での生菌率を2つの DNA 染色色素 (PI, SYTO9) を利用して評価した。SYTO9 は膜透過性があり、細胞内に侵入した後に DNA と結合して緑色の蛍光を示す。一方、PI は膜透過性が無く、膜の損傷部から細胞内に侵入し、DNA と結合して赤色の蛍光を示す。PI の発光強度が SYTO9 よりも高いことから膜損傷がある場合には細菌が赤く光る。つまり、これらの蛍光試薬で染色された大腸菌を蛍光顕微鏡で観察することで細菌の膜損傷率の経時変化を評価できる。生菌率は、赤の菌数を全体の菌数 (緑+赤) の菌数で除した値に100を掛けることで計算した。

まず初めに、ナノスパイクによる殺菌効果を確認するためにナノスパイクが形成された Si と形成されていないフラットな Si (コントロール) の上に WT を滴下して生菌率の経時変化を評価した。ナノスパイクが無い状態では2時間経過後も生菌率は96%を保っていた。一方、ナノスパイク上に塗布された WT では、2時間経過後に生菌率は4.4%まで減少していた。この結果から、膜損傷はナノスパイクがあるときのみ発現することが証明された。

次に、オートリシン欠損株と WT をナノスパイクが形成された Si に塗布した際の結果について記述する。実験結果を図5に示す。実験は全く独立した実験を3回実施した平均値をプロットしている。グラフから明らかなように、*Δslt70* では2時間後の生菌率は84%であり、実験に供した大腸菌の中では最も大きかった。*ΔmltA* では、はじめ生菌率はWTよりも速く低下するが40分ほどから変化率が低下し、2時間後には15%を保っていた。*ΔmltB* は *ΔmltA* と *Δslt70* の中間をとり、2時間後の生菌率は40%であった。この結果から、ナノスパイク上に付着した大腸菌は主に *slt70* が活性化することで自己融解が生じ、それによる膜損傷が発生している可能性が高いことを示している。これまでは物理的作用のみによって殺菌が発現するとの考えであったが、今回の結果から物理的作用は一次トリガーであり、細胞膜の変形がオートリシンを活性化(二次トリガー)させ、自己溶解が発生していると考えられる。上記の考えを補強するためには別の視点からの評価が必要である。培養液に Mg イオンを添加するとオートリシンが活性化しないという報告がある。この条件を適用すれば、オートリシン機能が働かない条件で膜損傷の経時変化を評価することができる。すなわち、ストレッチング効果などの物理的な膜損傷のみが生じるかを評価することができる。そこで、培養液に Mg²⁺ を 10 mM 添加した菌液 (WT) をナノスパイクが形成されたサンプルに滴下し、大腸菌の蛍光像を観察した。結果を図6に示す。Mg イオンを添加した場合には、2時間経過後の生菌率はほとんど低下しなかった。この結果は、オートリシンが活性化されない溶液条件では膜損傷が生じないことを意味しており、ナノ構造体が発現する膜損傷は細菌自身の酵素反応が寄与していることが明らかとなった。

(2)で記載の結果から、付着から早いもので5分程度、遅いものでも15分ほどで蛍光強度がほぼ死に至ったと推測できる。酵素反応はおおむね10分程度と考えられるので、本研究で得られた実験結果はオートリシンにより膜損傷が生じる結果とおおむね一致したと言える。

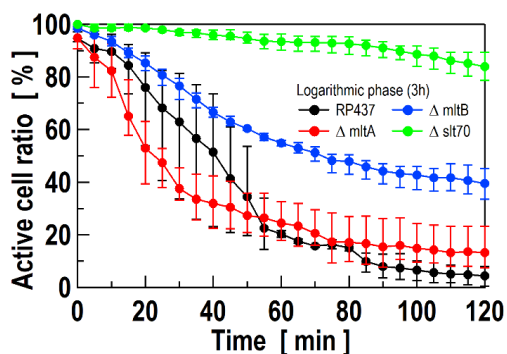


図5 WT およびオートリシン欠損株のナノスパイク上での生菌率経時変化

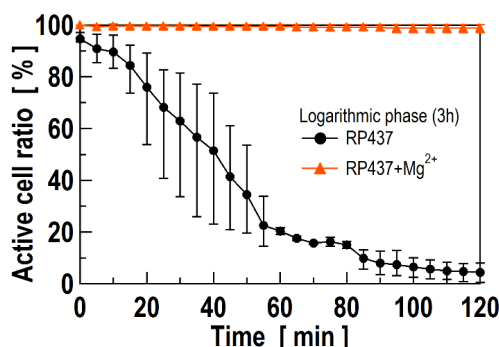


図6 Mg イオンの添加の有無によるナノスパイク上に滴下した WT の生菌率経時変化

(4) ナノスパイクの抗バイオフィーム性評価

Si 基板にナノレベルの突起物 (ピッチ、直径、高さ : 200, 100, 600 nm) を作製し、このサンプルに対して3種の細菌 (緑膿菌(NBRC 12689),大腸菌(NBRC 13898),黄色ブドウ球菌(NBRC 100910)) をそれぞれ滴下し、35°Cで24時間培養しバイオフィームを形成させた。対照実験として無加工なフラットな Si 基板についても同時に実験を行った。培養後、滅菌液で洗浄した後、クリスタルバイオレット (CV) 染色法により、形成されたバイオフィーム量を評価した。この方法は、バイオフィーム量と染色量が1次相関することを利用し、重量ではなく、波長 590 nm における吸光度で定量する方法である。結果を図7に示す。緑膿菌と黄色ブドウ球菌については大きな抗バイオフィーム性を示したが、大腸菌については有意な差が認められなかったため、抗バイオフィーム性が認められなかった。この結果については、試験に用いた大腸菌の種類がバイオフィームを形成しやすい菌種であったこと、また、大腸菌は気液界面にバイオフィームを形成しやすいため、ナノ構造に微生物が接触しづらいことによる影響ではないかと推測している。

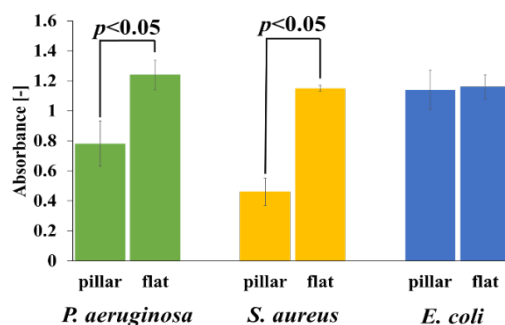


図7 抗バイオフィーム試験の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Mimura Soma, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Iwaki Hiroaki, Ito Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Bactericidal effect of nanostructures via lytic transglycosylases of Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 1645 ~ 1652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra07623j	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 Zhao Zihao, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi	4. 巻 98
2. 論文標題 Cicada wing-inspired artificial nanopatterns with antifouling properties for clay adhesion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physica Scripta	6. 最初と最後の頁 085929 ~ 085929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1402-4896/ace562	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 Daimon Masato, Yanagisawa Yushi, Ishibashi Kenta, Tominari Yukihiro, Tanaka Shukichi, Kojima Hiroaki, Shimizu Tomohiro, Shingubara Shoso, Ito Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Fluorescence Intensity of Liposomes and E. coli Attached to Nanopillar Arrays: Implications for Bacterial Death on Nanostructures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1610 ~ 1619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.2c04489	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 伊藤 健	4. 巻 49
2. 論文標題 セミの翅から殺菌、抗菌作用を導く	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会	6. 最初と最後の頁 437-442
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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 三村爽馬、清水智弘、新宮原正三、岩木宏明、伊藤健
2. 発表標題 ナノ構造が発現する殺菌メカニズムの解明～オートリシスの影響について～
3. 学会等名 2022年第59回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikki Shingeya, Natsuki Ogawa, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, Takeshi Ito
2. 発表標題 Fabrication of Polymeric Nanopillars and Their Application to Antibacterial Materials
3. 学会等名 MIPE2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsuki OGAWA, Tomohiro SHIMIZU, Shoso SHINGUBARA, Takeshi ITO
2. 発表標題 Fabrication of bactericidal and antibacterial resin nanopillars using nanoimprint technologies
3. 学会等名 MIPE2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soma Mimura, Hiroaki Iwaki, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, Takeshi Ito
2. 発表標題 Evaluation of bactericidal mechanism expressed on nanostructures ~ the influence of autolysis ~
3. 学会等名 the 4th International workshop on the symbiosis of biology and nanodevices (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Daimon, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, Takeshi Ito
2. 発表標題 Evaluation of behavior of lipid bilayer membranes on nanostructure surface by simultaneous observation both of electrochemical impedance spectroscopy and fluorescence microscope
3. 学会等名 The 4th International Workshop on Symbiosis of Biology and Nanodevices (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zihao Zhao, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, Takeshi Ito
2. 発表標題 Antifouling property for clay adhesion of cicada wings and artificial nanopatterns
3. 学会等名 第70回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本叡佳、田中重光、永尾寿浩、新宮原正三、清水智弘、伊藤健
2. 発表標題 樹脂製ナノピラーの抗バイオフィルム評価
3. 学会等名 第84回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松下唯人、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 樹脂ナノピラーの表面特性が及ぼす殺菌性能の評価
3. 学会等名 第84回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本叡佳、田中重光、永尾寿浩、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 ナノピラーの抗微生物評価
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第49回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新家谷一生、小川夏輝、清水智弘、伊藤健、新宮原正三
2. 発表標題 ポリマー製ナノピラーの作製と抗菌材料への応
3. 学会等名 応用物理学会第83回大会 秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川夏輝、小田皓介、小嶋寛明、石黒齊、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 樹脂フィルムに形成したナノピラーの形状が殺菌性に及ぼす影響
3. 学会等名 第69回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大門証登、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 電気化学インピーダンス法と蛍光顕微鏡同時観察によるナノ構造上の脂質二重膜の挙動評価
3. 学会等名 第38回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙子豪、梁楠、清水智弘、新宮原正三、伊藤健
2. 発表標題 樹脂ナノピラーの粘土付着に対する防汚性評価
3. 学会等名 第71回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takeshi Ito
2. 発表標題 Natural bactericidal nano-pattern of cicada wings on four cicada species in Japan
3. 学会等名 IEEE Nano 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Ito
2. 発表標題 Fabrication of polymeric film with nano-pillar array to mimic 3D nanostructures on cicada wing
3. 学会等名 39th ICPST (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Ito
2. 発表標題 Antimicrobial properties of artificial nano and micro textures
3. 学会等名 IEEE AMSE 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ナノ機能物理工学研究室
<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/nano/>

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	岩木 宏明 (Iwaki Hiroaki) (00368200)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	
研究分担者	田中 重光 (Tanaka Shigemitsu) (20509822)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員 (84431)	
研究分担者	永尾 寿浩 (Nagao Toshihiro) (30416309)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・総括研究員 (84431)	
研究分担者	田中 秀吉 (Tanaka Shukichi) (40284608)	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・室長 (82636)	

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	富成 征弘 (Tominari Yukihiro) (90560003)	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・研究員 (82636)	削除：2023年2月16日

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