

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06881

研究課題名(和文) 量産型酸化グラフェンをキャリアとした医療機器への抗菌性付与技術の探索

研究課題名(英文) Search for the antibacterial technology of medical devices using mass-produced graphene oxide as a carrier

研究代表者

大久保 圭祐 (OKUBO, Keisuke)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：00802349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、酸化グラフェン(GO)の物性に着目し、従来抗菌力を付与できなかった医療機器に抗菌成分を維持させることを可能にする新規材料を開発することである。

既に抗菌剤として使用されてきた塩化セチルピリジニウム(CPC)とGOを反応させ、CPC-GOを作製した。その結果、CPC-GOはCPC単体と比較して試験体(シリコン)上において高い滞留性を発揮し、尚且つ有意に抗菌効果を示した。また、GO中にCPCが十分に導入されていることを確認し、CPC-GO作製における適当な反応量を解明した(CPC:GO=1:1)。そして、CPC-GOの化学結合様式はイオン結合であることまでを推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、酸化グラフェン(GO)に期待される多彩な応用方法の1つに、抗菌剤のキャリアとしてGOを実用化しうることの現実性をより具体化することができた。

それは即ち、GOを応用することで、物質表面に抗菌成分を維持させる新しい発想の抗菌加工剤を開発することができ、既存の抗菌剤と比較して高い持続性や抗菌成分の低濃度化が期待できる。そして、今後医療を超えた様々な分野で応用可能な技術の礎となりうるからこそが、本研究の意義である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to focus on the features of Graphene Oxide (GO) and to develop new materials that enable medical devices which have not been able to impart antimicrobial activity to maintain antimicrobial components.

CPC-GO was prepared by reacting GO with cetylpyridinium chloride (CPC), which has already been used as an antibacterial agent. As a result, CPC-GO exhibited higher retention on the test sample (silicon) as compared to CPC alone, and showed sufficient antimicrobial effect. In addition, it was confirmed that CPC was sufficiently introduced into GO, and the appropriate reaction amount in preparation of CPC-GO was elucidated (CPC:GO=1:1). And it was presumed that the chemical bonding pattern of CPC-GO was ionic bonding.

研究分野：歯周病学，歯科保存学，理工系歯学，病院・医療管理学

キーワード：社会医学 医療機器 院内感染 酸化グラフェン ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

医療機関における院内感染への対応は、高齢者や易感染性患者数の増加や機関利用者の意識向上といった社会的背景の変化に伴い、さらに高度に要求されるものとなっている。しかし、実際の臨床現場や使用する医療機器においては、一般的な消毒滅菌や患者ごとに使い捨てができない箇所が数多く存在し、院内感染発生の盲点となっている。このような経緯から、院内感染への予防には、高い抗菌水準と幅広い適応が期待できる材料の開発が必要であり、界面レベルにおける微生物の付着抑制と抗菌作用の付与が必要であるという発想に至った。

現在、市販流通している抗菌加工製品は、クワルヘキシジンに代表される有機系、銀イオン等に代表される無機系、さらに自然成分を利用した天然系といった3種に大別される。これらは、その抗菌効果が実用化されている一方で、2016年の米国FDAの販売禁止措置に代表されるように、生体への為害性や効果の持続性について疑義が生じ、不安視されている現状がある。そこで、抗菌加工の技術革新や新規材料の探索を目的に、本研究ではカーボンナノシート「酸化グラフェン (Graphene Oxide: GO)」(Figure 1)の物性に着目した。

GOの原料であるグラフェンは、2010年にGeimらの関連研究でノーベル物理学賞を受賞した物質で安定したシート状の構造を持ち、上図の利点がある。また、GOは合成によって大量の極性官能基が付与されたことで、あらゆる物質に対して、 $2,000 \text{ m}^2/\text{g}$ を超える高い比表面積を有し、塗布による膜形成や液相における化学的な修飾が可能である。さらに、GO単体の安全性については過去に実験動物を用いた研究で示されている(Wang et al., *Nanoscale Res Lett*, 2011)。しかし、グラフェン(1億円/g)だけでなくGOもその合成に困難を要するため、これまで研究用途として利用されるのみであった(固形分換算で約1万円/g)。共同研究グループである岡山大学異分野融合先端研究コアの仁科勇太准教授(現教授)らは、GOの形成メカニズムを解明し(*Chem Mater*, 2017)、黒鉛からGOへの合成技術に革新をもたらした。具体的には、従来の5倍である500gスケールを8時間で合成することに成功し、コスト面での問題も解決(10円/g)した(特許登録:第5098064号)。さらに、単層のGOに金属を固定化する合成法(*Nanoscale*, 2014)も確立され、現実的な研究が可能となった。

本研究の予備検討として、GOに銀(Ag)を添加した化合物(Ag-GO)を作製し、単一の浮遊細菌に対する抗菌効果を検討した。その結果、Ag-GOは0.2%の濃度において、単体のGOやコントロール群と比較して、細菌の増殖を約1/10,000まで抑制できることを確認した。さらに、シリコンゴム表面にAg-GOを被膜させた後、頻回の洗浄処理を加えた状態でも試験体表面に抗菌力が維持される傾向を確認した。すなわち、試験体(シリコンゴム)表面にGOが結合することによってAgが保持され、持続的な抗菌効果が得られたものと推察した。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来抗菌力を付与できなかった医療機器に対して新規材料を応用することで抗菌性を付与し、さらなる院内感染予防を可能にする方法を探索する。これを達成するために本研究期間では、種々の物質表面に対するAg-GOの結合性について検討する。一方で、Ag-GOの使用にあたっての至適濃度を模索する。また、その結果を基にして、Ag-GOが抗菌効果を維持するメカニズムの解明を行い、銀以外の物質(フッ素、亜鉛、その他抗菌性を有するもの等)を応用しうる可能性についても明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 酸化グラフェン(GO)複合体の作製

GOは、岡山大学異分野融合先端研究コアから供与を受けた。そして、GOと硝酸銀(シグマアルドリッチ)を反応させAg-GOを作製した。一方、既に抗菌物質として汎用されている塩化セチルピリジニウム(CPC:シグマアルドリッチ)とGOを反応させることでCPC-GOを作製した(作製経緯は後述)。これらは、実験に応じて超純水を用いて濃度調整を行った。

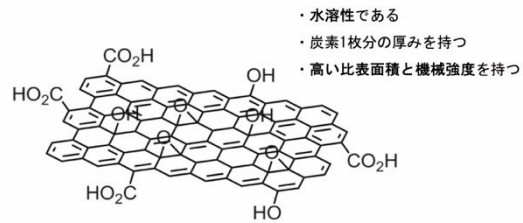
### (2) 試験体とその表面処理

GO複合体を被着させる対象として、シリコンシート(10×10×1 mm:三商)を用いた。シリコンシートは、0.5 mLの3-(Trimethoxysilyl) propyl Methacrylate (10% (w/v):東京化成工業)へ2時間浸漬後に余剰液を風乾し、表面にシラン処理をした後、0.5 mLのGO複合体へ30分間浸漬することで、試験体表面にGO複合体を被着させた。さらに、4 mLの超純水を用いて2回、試験体の洗浄を行った。

### (3) 細菌とその培養方法

Brain Heart Infusion(日本BD)培地を用いて *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) を培養(37

### 酸化グラフェン (Graphene oxide : Go)



- ・水溶性である
- ・炭素1枚分の厚みを持つ
- ・高い比表面積と機械強度を持つ

合成によって大量の極性官能基を付与

Figure 1: 酸化グラフェン (GO) の特徴

°C, 6 時間) し, 使用した。菌液は,  $1 \times 10^5$  cfu/mL に調整した上で試験体 1 枚あたり 4 mL を使用し, さらに 12 時間の培養を行った。

#### (4) アデノシン三リン酸 (ATP) 量の測定

細菌の ATP 量は, ルシフェール HS キット (キッコーマンバイオケミファ) を用いて測定した (検出範囲:  $1 \times 10^{-16} \sim 3 \times 10^{-11}$  mol ATP)。細菌以外の ATP はキット付属の試薬で消去した。

#### (5) 光分析法

GO 複合体における抗菌物質の導入率を紫外可視近赤外分光光度計 (UV-Vis; V-570: JASCO) を用いて推定した。また, GO 複合体を凍結乾燥させて作製した粉末に対し, フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR; IR Tracer: 島津製作所) を用いて, GO 複合体に形成されている化学結合様式を推定した。

#### (6) 電磁気分析法

卓上型粉末 X 線回折装置 (XRD; Aeris: スペクトリス) を用いて, GO 複合体における格子構造を測定した (特性 X 線: CuK  $\alpha$  線, 測定範囲:  $2\theta = 5 \sim 50^\circ$ )。GO 複合体の形態は, 走査型電子顕微鏡 (SEM; s-5200: 日立ハイテクノロジー) を用いて観察した (加速電圧: 20 kV)。また, GO 複合体の表面の厚みを原子間力顕微鏡 (AFM; SPM-9700: 島津製作所) を用いて測定した。さらに, X 線光電分光法 (XPS; JPS-9030: JASCO) を用いて GO 複合体の試料表面における元素比率 (C, O, N, Cl) を測定した (パスエネルギー: 20 eV)。

#### (7) 熱分析法

GO 複合体を凍結乾燥させて作製した粉末に対し, 熱重量測定装置 (TGA; Thermo plus EVO2: リガク) を用いて GO 複合体における抗菌物質の導入率を重量変化から推定した。

#### (8) 統計解析

統計処理は, Student's *t*-test (Microsoft Excel) を用いて行った。統計学的有意差の判定基準は,  $p < 0.05$  とした。

### 4. 研究成果

#### (1) GO 複合体の抗菌効果 (予備実験の続き)

当初は予備検討の結果を基に, Ag-GO (Ag: 約 0.2% (w/v)) の抗菌効果の確認を中心に実験を行う予定であった。その一方で, 実験の対照群として使用していた CPC と GO の化合物が容易であったことから, 試験的に CPC-GO (CPC: 0.05% (w/v), FDA 推奨濃度の 1/2 量) を作製し, 検討に加えた。その結果, Ag-GO は 2 回の試験体洗浄後に抗菌効果が消失していたが, 一方で CPC-GO は試験体表面に抗菌効果が維持されていることを確認した (Figure 2)。

予備検討の結果も踏まえると, Ag-GO は単一の浮遊細菌に対して効果は得られたものの, 試験体表面に十分な抗菌効果を維持させるほどの効果が安定して得られないことが分かった。この点については今後検討の余地があると考え。しかしながら, CPC-GO が示した高い抗菌効果は注目に値するものであり, その試験体表面への被着メカニズムの解明が必要と考え, CPC-GO が持つ分子構造の解析を進めた。

#### (2) CPC-GO における CPC 含有量の評価

CPC-GO の作製にあたり, CPC, および GO の最適な反応量を推定した。まず,  $3 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-2}$  mg/mL の範囲で濃度調製した CPC 水溶液を, UV-vis を用いて各々の吸光度を測定した (Figure 3A)。そして, 258 nm (CPC が持つピリジン環の吸光度に相当) における各濃度の吸光度を基に検量線を作成した (Figure 3B)。

CPC 濃度が便宜的に 0.05 mg/mL となるように調整した CPC-GO に遠心分離を行い, その上清中の残余 CPC 量 (Figure 3B, 赤点) を測定することで, CPC-GO における CPC の導入量を推定した。その結果, 重量比において CPC:GO が 1:1 の時に, 95% 以上の CPC の導入が確認された。この重量比を基に作製した CPC-GO を以下の実験に用いた。

次に, CPC-GO における CPC の導入を加熱による重量変化から確認した (Figure 4)。

CPC は 300 °C 付近で分解した。

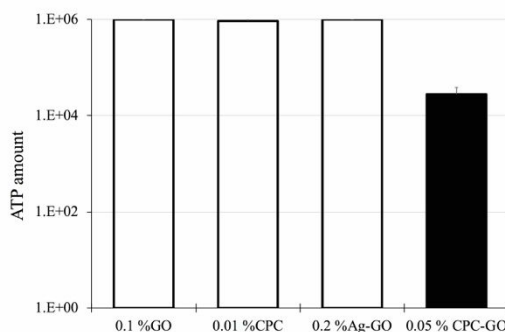


Figure 2: GO複合体の抗菌効果の検討

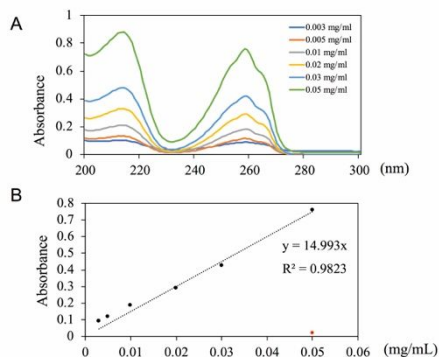


Figure 3: UV-Visを用いたCPC含有量の推定

GOは200℃付近までで約35%の重量減少が生じた。これはGOに含まれる酸素官能基が還元されたことによるものと考察している。

CPC-GOでは、200℃付近におけるGOの還元による重量減少(約25%)が確認されたことに加え、300℃~500℃においても約19%の重量減少が起こった。これはGOでは確認されなかった動態であることから、CPCの存在に起因する現象と推察する。

CPC-GOの加熱後における重量減少は、GOにおける重量減少と比較して少なかった。これは、CPCをGOに導入したことで完全に分解できず、特にGOの層間でCPCが炭素化されたことが原因ではないかと現在は考察している。

さらに、CPC-GOの格子構造をXRDを用いて解析した(Figure 5)。ブラッグの条件  $2d\sin\theta = \lambda$  ( $d$ : 格子面間隔,  $\theta$ : 格子面と入射波のなす角,  $\lambda$ : 入射波の波長)に、得られた各種  $\theta$  の値と  $\lambda = 1.5418$  (Å) を代入 (CuK  $\alpha$  線を特性 X 線として用いたため) することで、各複合体の格子面間隔である  $d$  の値を求めた。GO、そしてCPC-GOにおいて  $8.0 < 2\theta < 12.0^\circ$  の範囲にあるXRDパターンは、各々のグラフェン層間の距離を反映したものであり、低角度側になるほど層間距離が広がることを示している。

CPC-GOのXRDパターンは、CPC単体のXRDパターンとは異なるものであった。また、CPC-GOでは、GOとは異なる単一のXRDパターンを  $2\theta = 8.02^\circ$  の位置で観測した。このことから、CPC-GOではCPC単体の結晶が生成していないことが推察された。すなわち、CPC-GOは物理的な混合ではなく、化学結合によって構成されていることが示唆された。

また、CPC-GOとGOのXRDパターンを比較すると、CPC-GOのXRDパターンは低角度側にシフトしていた。すなわち、CPC-GOはGOと比較して層間距離が広がっていることを確認した。さらに、ブラッグの条件を用いて各層間距離を求めると、GOの層間距離は7.89 Åで、CPC-GOの層間距離は11.02 Åであることから、CPCを導入することで、層間距離は3.13 Å拡大した。このことから、CPCがGO中に導入されていることが示唆された。

### (3) CPC-GOの形態観察

CPC-GOの平面的な構造をSEMを用いて観察した(Figure 6)。その結果、GO、そしてCPC-GOともに単層のものと積層した状態となっているものが混在していることを確認した。また、いずれも平面的なサイズは同等であった。

CPC-GOの単層部分において、AFMを用いて厚みを測定した(Figure 7)。その結果、CPC-GOはGOと比較して平均で約0.16 nmの厚みの増加が観察された。

### (4) CPC-GOにおける化学結合様式の推定

FT-IRの結果(Figure 8)において、CPC-GOのスペクトルは2900~3700  $\text{cm}^{-1}$  の位置にGO

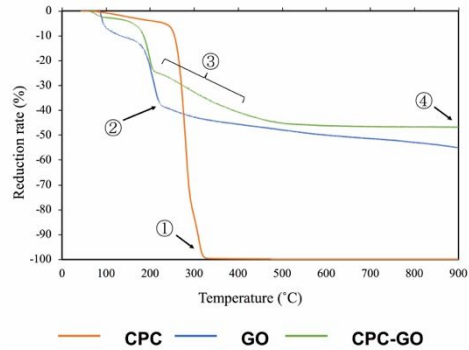
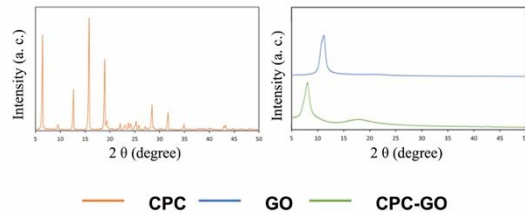


Figure 4: 加熱によるCPC-GOの重量動態



|                         | GO   | CPC-GO |
|-------------------------|------|--------|
| Interlayer distance (Å) | 7.89 | 11.02  |

Figure 5: CPC-GOの格子構造の解析

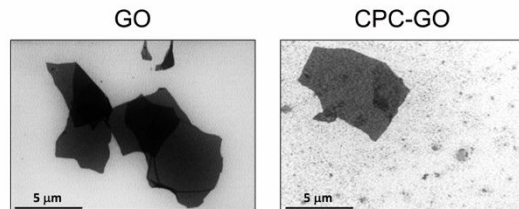


Figure 6: CPC-GOのSEM画像

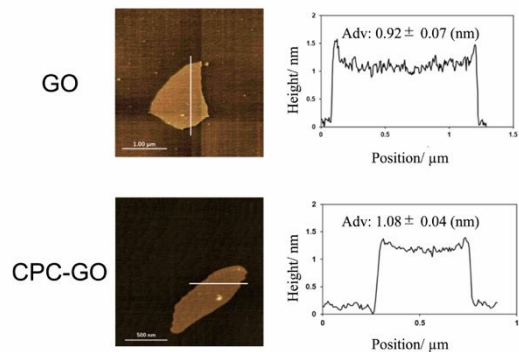


Figure 7: AFMを用いたCPC-GOの厚み測定

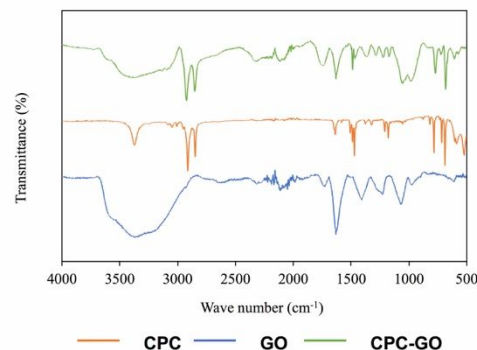


Figure 8: FT-IRを用いたCPC-GOの結合様式の推定

のヒドロキシ基由来のピーク,そして 2850  $\text{cm}^{-1}$  の位置に CPC が持つアルキル鎖由来のピークが観測されたことから, CPC が GO へ導入されていることが示唆された。

また, CPC-GO のスペクトルにおいて, GO の酸素官能基のピーク(OH:2900~3700  $\text{cm}^{-1}$ , C=O:1750  $\text{cm}^{-1}$ ) にシフトがないことから, GO の酸素官能基と CPC との間の化学的な相互作用は微弱であることが示唆され,これは抗菌成分の徐放に繋がる所見と推察している。

一方で, 試料表面の元素比を XPS を用いて測定した (Table 1)。その結果, CPC は元素比が N:Cl=1:1 であったが, GO へ導入した後では Cl の割合が減少した。これは, CPC が持つピリジン環の窒素原子(正電荷)と GO (負電荷) がイオン結合を形成したことで塩化物イオンが放出された結果, Cl の元素比が減少したものと推察する。また, N1s のピークが CPC-GO において確認されたが,これは CPC に由来するピークであることから,GO との結合様式には影響がないものと考えられる (Figure 9)。

#### (5) CPC-GO の有効濃度の探索

CPC-GO が抗菌効果を発揮する CPC 濃度を検討した (Figure 10)。その結果, CPC が 0.05% (w/v) 以上の濃度において, 陰性対照群と比較して有意に細菌の増殖を抑制した (統計処理は 0.2% CPC の結果と比較)。すなわち, 0.05% (w/v) 以上の CPC 濃度を有する CPC-GO は, 現在 FDA が推奨する CPC 濃度の上限 2 倍量よりも高い抗菌効果を示すことが分かった。また, 培養後における菌液の色を観察しても明らかに澄明であった。

今後は, 将来的な実用化を見据えながら, 本研究成果を基にシリコン以外の試験体を用いた抗菌効果の検証と, CPC-GO と試験体との界面における被着機構の解析,そして CPC-GO が抗菌成分を徐放するメカニズムの解明を中心に研究を継続する予定である。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

大久保圭祐, 歯科用ユニット給水管路汚染対策用の自動注水制御シミュレータの評価, 第147回日本歯科保存学会学術大会, 2017年10月, 盛岡

### 6. 研究組織

該当なし

|        | C (at %) | O (at %) | N (at %) | Cl (at %) |
|--------|----------|----------|----------|-----------|
| GO     | 69.2     | 30.9     | -        | -         |
| CPC    | 84.2     | 10.1     | 2.8      | 2.8       |
| GO-CPC | 72.5     | 25.8     | 1.4      | 0.2       |

Table 1: CPC-GO表面における元素比率

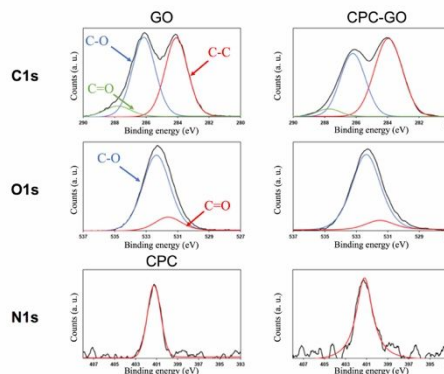


Figure 9: XPSを用いた分子構成の推定

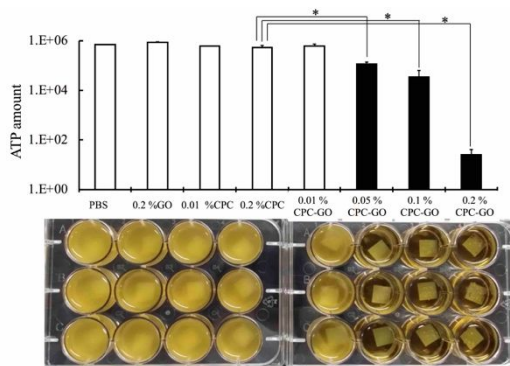


Figure 10: CPC-GOの有効濃度の検討