

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01734

研究課題名（和文）ナノポーラス金の近接抗菌作用を利用した細胞に無害な選択抗菌性マイクロ構造の開発

研究課題名（英文）Microarchitecture for selective antibacterial activity utilizing nanoporous gold with short-range antibacterial activity

研究代表者

馬淵 守 (Mabuchi, Mamoru)

京都大学・エネルギー科学研究科・教授

研究者番号：00358061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,420,000円

研究成果の概要（和文）：抗菌性ナノポーラス金を細胞に無害な平滑金のマイクロ構造と組み合わせ、細菌のみを選択的に殺菌し、細胞のみを選択的に増殖させることを目的とした。市販のニッケルメッシュをテンプレートとして用い、スパッタリングと脱合金化によって溝部（凹部）にナノポーラス金を、島状部（凸部）に平滑金を持つマイクロ構造基板を作製した。細胞どうし（HeLa細胞/前駆脂肪細胞）、また細菌と細胞（大腸菌/前駆脂肪細胞）の共培養において、サイズの小さい種（前者ではHeLa細胞、後者では大腸菌）のみを選択的に不活化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌がナノポーラス金に直接触れることによって不活化する現象は、他の抗菌性金属（銀イオン、活性酸素等の拡散性物質の放出）の機構とは根本的に異なり学術的に興味深い、応用例はまだない状態であった。マイクロ構造との創造的な組み合わせにより、遠心分離や抗生物質などの方法とは異なる「細胞にやさしい」すなわち細胞の活性を極力保ったまま分離する物理的分離として本提案手法は成功した。このことはナノポーラス金とマイクロ構造の双方の応用に寄与する。

研究成果の概要（英文）：We combined antimicrobial nanoporous gold with a microstructure of smooth gold, which is harmless to cells, to selectively sterilize only bacteria and selectively grow only cells. Using a commercially available nickel mesh as a template, microstructured substrates with nanoporous gold in the grooves and flat gold in the islands were fabricated by sputtering and dealloying. In the co-cultivation of cells-and-cells (HeLa cells/preadipocytes) and bacteria-and-cells (E. coli/preadipocytes), we succeeded in selectively inactivating only small-sized species (HeLa cells in the former and E. coli in the latter).

研究分野：金属学

キーワード：ナノポーラス 抗菌 細胞培養

### 1. 研究開始当初の背景

ナノポーラス金属(図1)は、ナノメートルオーダの孔径・リガメント径の多孔質構造を持つ金属である。超微細なポーラス構造はバルク金属にない興味深い特性をもたらすことが報告されており、申請者らも、ナノポーラス金が(不活性なバルク金にない)抗菌性を持つことを、独自につきとめた(図2)。この抗菌性は、ナノポーラス金と細菌の接触により発現する。ここではこれを「近接抗菌作用」と呼ぶ。

一方で、ナノポーラス金は有害な細菌だけでなく、人を構成する細胞にも悪影響を及ぼす可能性がある。これを解決するためには、細胞はナノポーラス金に触れずに、細菌だけがナノポーラス金に触れるようにすればよい。

ここで、細胞・細菌の大きさに注目する。大腸菌やブドウ球菌などの細菌は1~3 μmの大きさを有し、μmオーダの大きさの凹構造に集まりやすい。一方、ヒト細胞の大きさは10~50 μmであり、細菌よりひとまわり大きい。そこで本研究ではこのサイズの違いを利用して、細菌のみをナノポーラス金と接触させて殺菌し、細胞を生かすことを考えた。

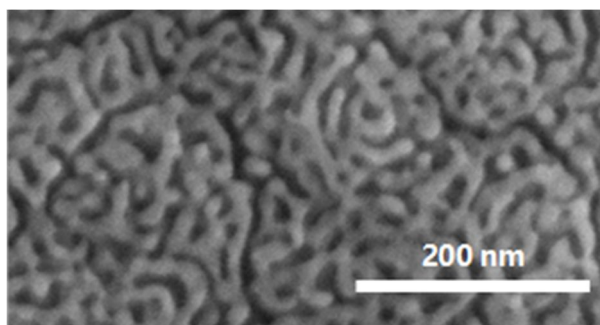


図1 ナノポーラス金属の電子顕微鏡写真

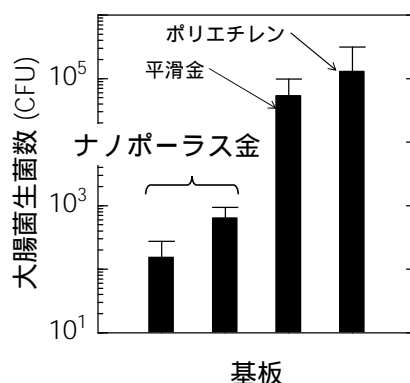


図2 ナノポーラス金の抗菌特性。比較対象の平滑金・ポリエチレンに比べ生菌数が激減する

### 2. 研究の目的

本研究では、抗菌性ナノポーラス金を細胞に無害な平滑金のマイクロ構造と組み合わせ、細菌のみを選択的に殺菌し、細胞のみを選択的に増殖させることを目的とした。すなわち、人体(ヒト細胞)にサイズの的にはなんら影響を及ぼさず、有害な細菌だけをナノポーラス金により死滅させるマイクロ構造体の開発を目指した。

具体的には、数 μm の幅の溝の底部に抗菌性ナノポーラス金 (NPG) を配置し、凸部には細胞に無害なバルク(平滑)金 (FG) を配置する。溝に集まった細菌はナノポーラス金の抗菌性で死滅する一方、溝に入れないヒト細胞はナノポーラス金の悪影響を受けることなく増殖可能であり、サイズ分離の可能性が期待される(図3)。なお、細胞と細菌の組み合わせのほか、細胞同士でもサイズ分離が可能かどうかを調べた。

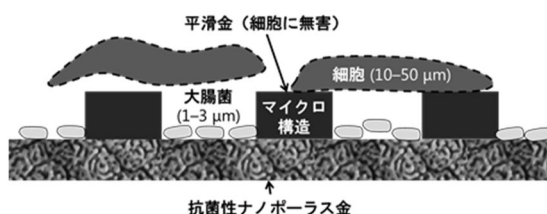


図3 サイズの違いを利用した選択的殺菌

### 3. 研究の方法

(1) 培養基板の作製 NPG をスパッタリングと脱合金化法で作製し、その上に FG のマイクロ構造を、市販のニッケルマイクロメッシュをテンプレートとしたスパッタリングで作製した(図4)。

(2) NPG および FG 基板上での浮遊細胞培養 NPG の近接抗菌効果を確認するため、浮遊細胞である Jurkat 細胞を NPG および FG 基板上の培地中にて 24 時間、310 K、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養し、生細胞率をトリパンブルー法で測定した。

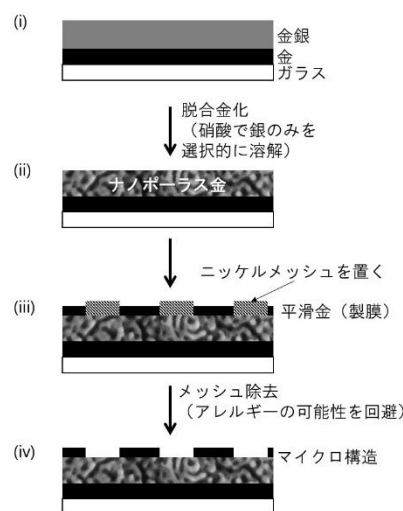


図4 選択的抗菌マイクロ構造基板の作製手法

(3) HeLa 細胞と前駆脂肪細胞の共培養 約  $3.5 \times 10^5$  個の HeLa 細胞と前駆脂肪細胞を 1.6 mL の培地に懸濁させ、マイクロ構造を有する基板とそうでない各種基板を有するディッシュ上に播種し、皿を水平に振って 2 種類の細胞を均一に混合した。5% CO<sub>2</sub> の雰囲気下で 310 K で 24 時間培養した後、基板上的細胞を、光学顕微鏡観察により計数した。

(4) 大腸菌と前駆脂肪細胞の共培養 密度が約  $1.0 \times 10^5$  個/mL の前駆脂肪細胞を含む培地に、白金耳一採取量から希釈を経て作製した大腸菌懸濁液を少量加え攪拌した。その後、前駆脂肪細胞と大腸菌の懸濁液を、マイクロ構造を有する基板とそうでない各種基板を有するディッシュ上に滴下し、308 K、5% CO<sub>2</sub> の条件で 24 時間培養した。回収後、トリパンブルー法での計数結果から前駆脂肪細胞の不活化率 (= 死細胞数 / (生細胞数 + 死細胞数)) を算出した。また大腸菌は、希釈平板法により計数した。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロ構造培養基板の作製 図 5 に示したように、図 4 で提案した方法によって凹部 (溝) に NPG を、凸部 (島状構造) に FG を持つ培養基板を作製できた。以下、特に (3)(4) に示すように、このマイクロ構造が細胞同士、また細胞 / 細菌のサイズ分離に有効であることがわかった。

(2) NPG および FG 基板上での浮遊細胞培養 両基板上で培養した Jurkat 細胞の生細胞率には有意差が見られなかった。この結果は NPG が悪影響を及ぼす HeLa 細胞等の接着細胞あるいは細菌 (大腸菌・表皮ブドウ球菌) とは対照的であり、銀イオンや活性酸素等の拡散性のものではない NPG 特有の近接抗菌作用を裏付ける。

(3) HeLa 細胞と前駆脂肪細胞の共培養 マイクロ構造を有する基板で共培養した試料中の HeLa 細胞は、他のマイクロ構造を有しない基板で共培養した試料に比べて少なくなった (図 6)。共培養中の試料を光学顕微鏡で観察した結果、HeLa 細胞は NPG を有する凹部に捕捉されている一方で、FG の島状構造上にはほとんど見られず、さらに、前駆脂肪細胞は NPG の溝に捕捉されておらず、NPG 溝に触れず、細胞毒性のない FG の島状構造上に接着していた。HeLa 細胞は NPG の溝に拘束されるが、NPG の溝幅よりも大きい前駆脂肪細胞は FG の島状構造上に付着したまま活性を保っていた。

前駆脂肪細胞の典型的なサイズ (= 100–150 μm) は NPG の溝幅 (= FG の島状構造の間隔) よりも大きい。従って前駆脂肪細胞は、NPG の溝ではなく、FG の島状構造に接触する。一方、HeLa 細胞の一般的なサイズは 30–40 μm と前駆脂肪細胞より小さいので、NPG を敷いた溝は HeLa 細胞をトラップできる。NPG の細胞に対する不活化効果は近接的、つまり NPG と細胞が直接接触する必要があるため、NPG の溝にトラップされた HeLa 細胞のみが NPG によって不活化され、その後脱着されたと考えられる。

つまりこの基板では、前駆脂肪細胞の活性を保ちつつ NPG 溝が HeLa 細胞を選択的に不活性化したが、これは細胞サイズの違いによるものである。すなわち、本研究で作製した NPG/FG マイクロ構造基板は、細胞を物理的にサイズ分離できたと言える。

(4) 大腸菌と前駆脂肪細胞の共培養 各基板上で大腸菌と共培養した前駆脂肪細胞の不活性化率を図 7 に示す。大腸菌と共培養した前駆脂肪細胞は、NPG を凹部に、FG を凸部島状構造に有するマイクロ構造基板 (NPG+8μFG) 上ではマイクロ構造を有しない NPG 基板上よりも不活化されず、FG を凹部と凸部に有するマイクロ構造基板 (FG+8μFG) 上と同程度の不活性化率を示した。これは、

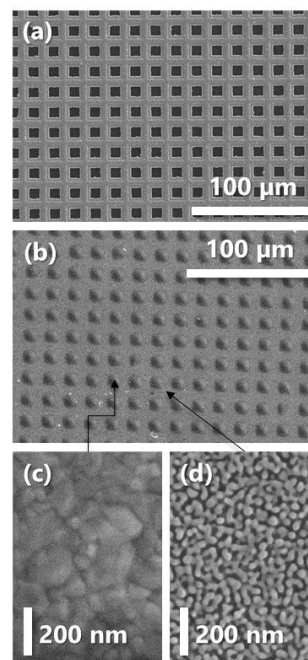


図 5 (a) ニッケルメッシュ (b) マイクロ構造基板 (c) マイクロ構造基板凸部 (d) マイクロ構造基板凹部の走査電子顕微鏡写真

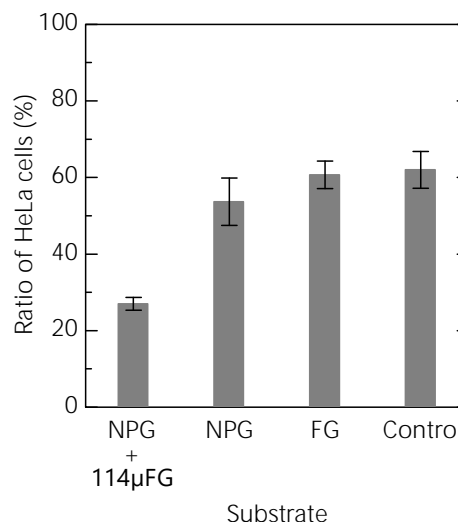


図 6 マイクロ構造基板 (NPG+114μFG) および非マイクロ構造基板上で共培養した HeLa 細胞と前駆細胞試料中の HeLa 細胞の割合

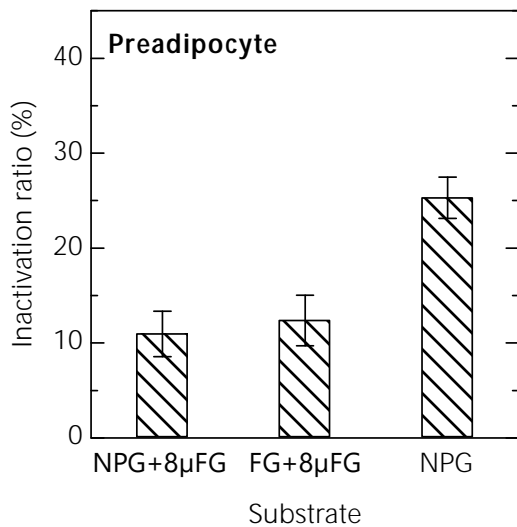


図 7 3種の基板上で共培養した大腸菌と前駆細胞試料中の前駆脂肪細胞の不活化率

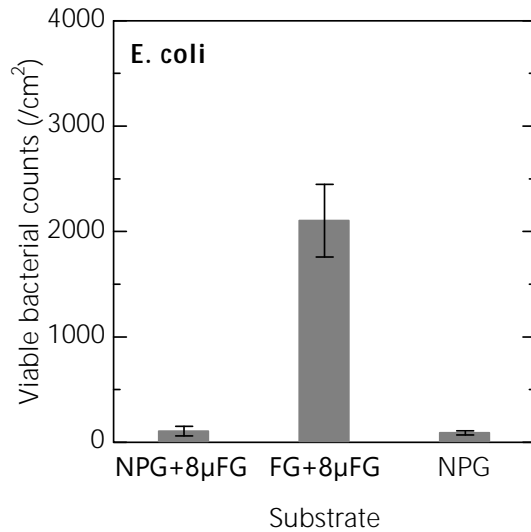


図 8 3種の基板上で共培養した大腸菌と前駆細胞試料中の大腸菌数

NPG+8μFG が FG+8μFG と同様に前駆脂肪細胞に対して無害であることを意味する。一方、FG 島状構造のない NPG 基材は、大腸菌と共培養した前駆脂肪細胞の 25% を不活化した。

各基板上で前駆脂肪細胞と共培養した大腸菌の生菌数 (VBC) を図 8 に示している。NPG+8μFG 基板上で前駆脂肪細胞と共培養した大腸菌の VBC は、FG+8μFG 基板上で共培養した大腸菌の VBC よりもはるかに低く、NPG+8μFG の NPG 溝が大腸菌を効果的に不活化していることがわかる。また、NPG+8μFG 基材上で共培養した大腸菌の VBC が FG 島状構造のない NPG 基材上と同程度に減少していたことから、FG の島状構造は NPG の抗菌性に悪影響を及ぼさないことが示唆された。別途行った培養中の基板観察からも、NPG+8μFG のマイクロ構造が溝に大腸菌を捕捉している一方で、前駆脂肪細胞は島状構造の上にまたがっており、図 3 に示した状況になっていることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Miyazawa Naoki, Sakakibara Susumu, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Electronic origin of antimicrobial activity owing to surface effect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37645-w	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 Deguchi Soichiro, Kato Atsushi, Wu Peizheng, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 121
2. 論文標題 Heterogeneous role of integrins in fibroblast response to small cyclic mechanical stimulus generated by a nanoporous gold actuator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 418 ~ 430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.12.014	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 Deguchi Soichiro, Yokoyama Ryo, Maki Takuya, Tomita Kazuki, Osugi Ryosuke, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 119
2. 論文標題 A new mechanism for reduced cell adhesion: Adsorption dynamics of collagen on a nanoporous gold surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 111461 ~ 111461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2020.111461	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 Hakamada Masataka, Sakakibara Susumu, Miyazawa Naoki, Deguchi Soichiro, Mabuchi Mamoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibacterial activity of ultrathin platinum islands on flat gold against Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66504-w	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 Deguchi Soichiro, Hakamada Masataka, Shingu Jumpei, Sakakibara Susumu, Sugiyama Hironobu, Mabuchi Mamoru	4. 巻 7
2. 論文標題 Inactivation of HeLa cells on nanoporous gold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materialia	6. 最初と最後の頁 100370 ~ 100370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtla.2019.100370	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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	中野 裕美  (Nakano Hiromi)  (00319500)	豊橋技術科学大学・教育研究基盤センター・教授    (13904)	

#### 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
---------	---------