

令和 4 年 4 月 5 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12811

研究課題名(和文) 体内必須元素を活用した抗感染性ナノ材料の開発

研究課題名(英文) Development of an antibacterial nanomaterial using of a biological essential element

研究代表者

古菌 勉 (Furuzono, Tsutomu)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：30332406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、体内必須元素の亜鉛(Zn)に着目し、当該金属元素をハイドロキシアパタイト(HAp)結晶構造中に置換したZnドープHAp(Zn-HAp)ナノ粒子を創出し、当該ナノ粒子の材料特性評価、高分子複合化、アナフィラキシー(様)反応評価、抗菌メカニズム評価等を行い、新規な概念を有する抗感染性ナノ材料の開発および抗菌メカニズムの解明を行った。具体的には、結晶性・分散性Zn-HApナノ粒子合成法・コーティング法の確立、抗菌活性評価・持続性、およびイオン交換・活性酸素種蓄積の現象解明について明らかにした。以上から、抗菌持続性とアレルギー反応を起こしにくいナノ材料の創出を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究課題の学術的意義は、生体必須元素である亜鉛イオンを置換した結晶性および分散性に優れるナノ粒子を創出し、このナノ材料が医療機器表面にナノコーティング可能であり、また抗菌活性の持続性を持ち、さらにアレルギー様反応を引き起こしにくいということを明らかにした点である。また、社会的意義として、これまで我が国で臨床上、喫緊の課題とされていた抗菌活性の持続性および埋植により患者へのアレルギー反応を低減できることが大いに期待できる。本研究成果は、我が国が直面している超高齢化対策および在宅医療の推進に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn) ions, a biological essential trace element, was doped hydroxyapatite (Zn-HAp) was developed in this study. Evaluation of material properties, fabrication of an inorganic-polymer composite, examination of anaphylactoid reactions, and elucidation of antibacterial mechanisms were conducted. In details, establishment of crystalline and dispersible Zn-HAp nanoparticles, establishment of a coating of nanoparticles on polymer substrate, manifesting of sustainable antibacterial activities, and elucidation of mechanisms of antibacterial effects (phenomena of ion-exchange and accumulation of ROS in bacteria) were done. Based on these results, a novel nanomaterial possessing sustainable antibacterial activities and poor at inducing an allergic-like reactions in vitro was developed.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：ハイドロキシアパタイト 生体必須元素 抗菌性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

人工臓器関連の皮膚を貫通する医療機器（経皮デバイス）として、例えば血管内留置カテーテルや腹膜透析(Peritoneal dialysis, PD)用カテーテル、またはドライブラインを構成要素とする補助人工心臓(Ventricular assist device, VAD)などがあり、いずれも医療機器のリスク分類で高度管理医療機器に該当する。これらのデバイス使用時における細菌感染は死に至るケースが少なくないため、高度な感染制御が必要となる。

感染に係るサーベイランスが十分に検討されている医療機器として、血管内留置カテーテルが挙げられる。我が国における疫学データによる感染率は約 10%との報告がなされている。そのほか、PD カテーテルでは出口部感染率が約 22%との報告もある。特に VAD の感染率(1 年後)は、植込み型が 44%、そして体外設置型が 68%となっており、ほかのデバイスに比べて感染の発生頻度が極めて高い。

我が国では 20 世紀末に、クロルヘキシジン/スルファジアジン銀を含浸したカテーテルを使用した患者においてアナフィラキシーショックにより 13 例中 1 例が死亡するという事例が発生した。この症例は西欧諸国では報告されていないことから、アレルギーに係る人種差によるものと推察されている。この事案を契機に、抗菌カテーテルの使用が忌避されるようになった。最近になって、抗菌薬（ミノサイクリン/リファンピン）含浸カテーテルが輸入・承認されたが、耐性菌発現のリスクを懸念し、日本感染症学会の関連ガイドラインにより使用症例を限定（熱傷患者や臓器移植患者等）するなどの厳しい使用基準が設けられている。すなわち、アナフィラキシーショックや薬剤耐性菌の出現への懸念から、抗菌カテーテル使用について他国には見られない特異な規制下にあり、打開策が見えないのが現状である。

また学術的には、例えば、親水性ポリマーを高分子基材にコーティングすることで細菌接着性を低減させる技術が報告されているが、留置部におけるデバイスと生体組織との界面に隙間が生じ細菌感染のルートになる恐れがあるなど、体内植込み型デバイスには不向きであることなどが挙げられる。以上のことから、体内植込みを念頭に置いた新しい概念による抗感染性材料の開発が急務となっている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、体内必須元素の亜鉛(Zn)に着目し、当該金属元素をハイドロキシアパタイト(HAp)結晶構造中に置換した Zn ドープ HAp(Zn-HAp)ナノ粒子を創出し、当該ナノ粒子の材料特性評価、高分子複合化、アナフィラキシー（様）反応評価、抗菌メカニズム評価等を行い、新規な概念を有する抗感染性ナノ材料の開発および抗菌メカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、生体必須元素である Zn を HAp 結晶構造中に置換した結晶性・分散性 Zn-HAp ナノ粒子を合成し、Zn 置換率を変えた Zn-HAp のキャラクタリゼーション、カテーテル起炎菌等に対する抗菌性評価、高分子基材へのコーティング、菌体内の金属イオン挙動の定量、顕微鏡を用いた可視的評価、および抗菌メカニズムについて検討する。

### 4. 研究成果

- (1) 結晶性・分散性 Zn-HAp ナノ粒子の合成

Zn 置換率の異なる4種類の Zn-HAp ナノ粒子を調製した (Zn 置換率 : 0, 5, 10 および 15% [Zn/(Ca + Zn)×100]). 融着防止法を施した Zn-HAp はいずれもアパタイト構造を有する生成物であり、得られた XRD データから酸化亜鉛等の結晶性不純物は認められなかった (図 1).

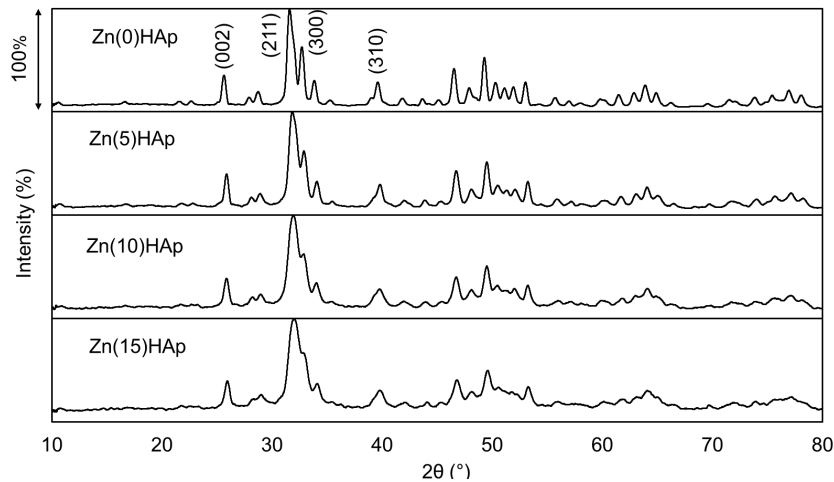


図 1. Zn-HAp の XRD プロファイル

また、それらの Zn 置換率を元素分析法 (ICP-AES) により測定したところ、それぞれ、0, 4.7%, 9.2 および 13.5%であり、仕込みの 9 割の Zn イオンが置換されていた。さらに、それらの格子定数を算出したところ、Zn 置換率の増加に伴う格子定数の直線的な減少が認められた (表 1)。Zn-HAp 結晶構造中において、Zn イオンは同様の価数である Ca イオンに置換される。Ca イオン半径は 1.00 Å、Zn のイオン半径は 0.74 Å であり、Zn イオンが置換したことで軸長が減少したと考えられる。したがって、置換する Zn イオン数が増加すると、格子間の長さもそれに伴って減少するため、Zn 置換率の増加に伴い格子定数が減少したと推察される。

表 1. Zn-HAp の格子定数

Sample	a, b 軸 (Å)	c 軸 (Å)	cell volume (Å <sup>3</sup> )
Zn(0)HAp	9.45	6.90	532.97
Zn(5)HAp	9.43	6.89	530.34
Zn(10)HAp	9.41	6.89	529.06
Zn(15)HAp	9.40	6.88	526.33

## (2) 高分子複合化

ポリアクリル酸をグラフトした高分子シートに Zn(0)HAp および Zn(15)HAp ナノ粒子をエタノール媒体中で懸濁させてコーティングし、SEM 観察を行った。図 2 よりコーティングされた Zn-HAp ナノ粒子の平均粒径は約 50 nm であり、融着防止処理を施したことで粒子同士が凝集することなく、分散性が向上したと考えられた。また、当該複合シートは 95%以上の表面被覆率を有し、ほぼ単層かつ均一にコーティングされていることが認められた。アクリル酸のグラフト重合によるアニオン性のカルボキシル基と Zn-HAp ナノ粒子のカチオン性 Ca サイトまたは Zn サイトが静電的相互作用にて結合することで、基材表面にコーティングされたと考えられる。

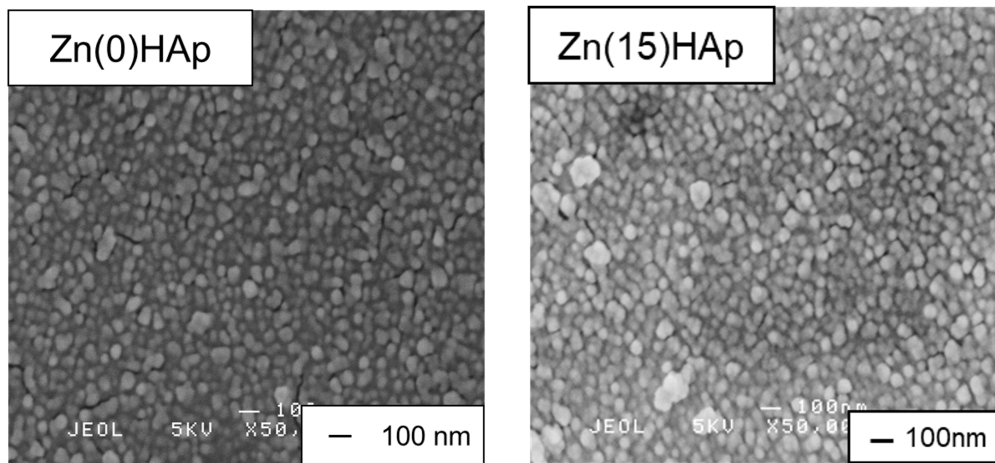


図 2. Zn-HAp ナノ粒子コーティングシート表面の SEM 像

### (3) 抗菌性試験

Zn-HAp ナノ粒子を大腸菌(*E. coli*)に添加することにより、抗菌性試験を実施した。Zn(10)HAp および Zn(15)HAp において、Zn(0)HAp と比較して有意な抗菌性が認められた (図 3)。Zn(0)HAp と比較し、Zn(5)HAp において有意な差が認められなかったことから、Zn 置換率 5%では抗菌性を発現しないことが明らかとなった。また、Zn(15)HAp コーティングシートにおいても、有意な抗菌性が認められた。

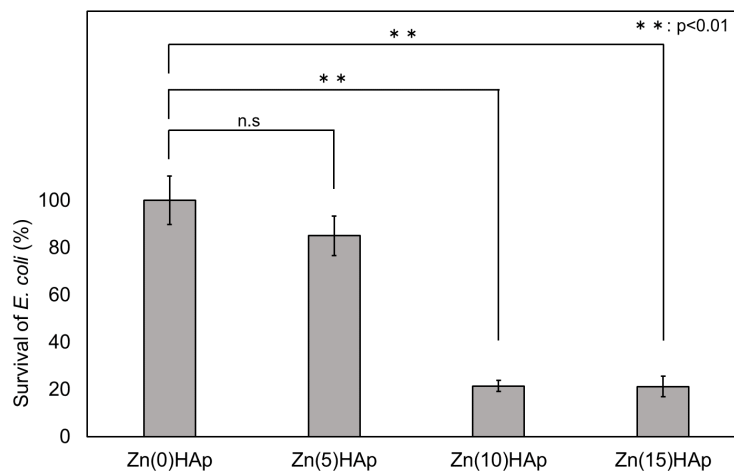


図 3. 粉末添加法による抗菌性試験

### (4) アナフィラキシー様反応の評価

ヒト肥満細胞(HMC-1)に Zn-HAp ナノ粒子およびポジティブコントロールとしてグルコン酸クロルヘキシジンを添加することにより、ヒスタミン放出量を酵素結合免疫吸着法を用いて評価した。その結果、Zn-HAp ナノ粒子添加ではクロルヘキシジンに比較して細胞膜受容体への刺激は極めて微弱であり、アナフィラキシー様反応を惹起しにくい材料であることが明らかとなった。

### (5) 抗菌メカニズムの検討

#### A. 金属イオンの交換

ZnCl<sub>2</sub> 溶液と *E. coli* を接触させると Zn イオンが増加し、Mg イオンが減少した。Ning らの

報告によると、Zn イオンは活性酸素種を発生させ、その結果生じた膜損傷が主な抗菌メカニズムであると示している。取り込まれた Zn イオンは Zn トランスポーターにより細菌外へと排出されるが、高濃度であったため、細菌が死滅したと考えられる。

また、Mg イオンは約 300 種類の酵素の働きを保つために必要な元素であり、タンパク質や細胞膜の構造を安定化させる、および酵素や触媒活性を促進するなど、極めて多様な生理的役割を担っている。細胞壁や細胞膜には Mg イオンが多く含まれており、細胞の形状を保持するためには Mg イオンが必要である。さらに、DNA ポリメラーゼは DNA を複製する酵素であり、Mg が必須である。

以上のことから、細菌内の様々な酵素や構造中の Mg イオンが Zn イオンに置換されることにより、細菌の増殖が阻害され、抗菌性が発現したと推察される。

## B. 活性酸素種(ROS)の菌体内蓄積

ROS は、様々な非生物学的ストレスにより過剰生産され、タンパク質や DNA に損傷を与えることが知られている。一方、酸素を使用してエネルギーを作り出すからには、活性酸素の発生は避けられない。そのため、酸化ストレスを最小限に抑えるために、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やグルタチオンペルオキシダーゼ・カタラーゼなどの酵素を含む抗酸化物質が備わっている。生物学的に関連性のある ROS には、スーパーオキシドアニオンラジカル( $\cdot O_2^-$ )、ヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )、一重項酸素( $^1O_2$ )、および過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が挙げられる。その中でも、 $\cdot OH$  は不対電子を持つフリーラジカルであり、半減期が非常に短く化学的には不安定である。すなわち、反応性が高く、タンパク質や DNA などを攻撃するため、最も有害とされている。

本実験では、E. coli に  $ZnCl_2$  溶液を添加し hydroxyphenyl fluorescein(HPF)染色により ROS 発現を評価した。その結果、Zn(15)HAp を添加したサンプルでは、Zn(0)HAp と比較して、活性酸素の蓄積が認められた。

一般に、呼吸鎖の複合体 I である NADH 脱水素酵素が ROS の発生源であると考えられている。発生した  $\cdot O_2^-$  は、 $H_2O$  と反応し、SOD により  $\cdot O_2^-$  を不均化する。その際に  $H_2O_2$  が生成され、グルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼにより、 $H_2O_2$  を不均化し、 $H_2O$  と  $O_2$  に分解することで ROS を処理している。一方で、 $H_2O_2$  は鉄や銅などの還元型金属元素によって式(7-1)に示すようなフェントン反応を誘導し、 $\cdot OH$  を作り出すことが知られている。また、Zn イオンを添加することでこの反応を促進するという報告もある。

以上のことから、活性酸素の蓄積は Zn イオンおよび Zn-HAp による抗菌メカニズムの 1 つであることが明らかとなった。

本研究課題では、Zn イオンを置換した結晶性・分散性に優れた Zn-HAp ナノ粒子を調製し、高分子複合化、抗菌性、および抗菌メカニズムについて検討し、カテーテルコーティング材料として好適であることを明らかにした。以上により、当該ナノ粒子を留置型カテーテルにコーティングすることにより新規な抗感染性デバイスの創出が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 H. Gyotoku, Y. Azuma, T. Furuzono	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Evaluation of fluorinated hydroxyapatite nanoparticles as an antibacterial material for catheter coating	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Renal Replacement Therapy	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41100-019-0251-6	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古園 勉
2. 発表標題 我が国の腎代替療法の動向と在宅医療に向けたデバイス開発
3. 学会等名 第71回医用高分子研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古園 勉
2. 発表標題 バスキュラーアクセスカテーテル被覆材を目指したナノ抗菌微粒子の開発と長期使用の可能性
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Furuzono
2. 発表標題 Soft-Nanoceramics Technology for Medical Devices
3. 学会等名 ABC2019&ISMBA(The 19th Asian BioCeramics Symposium and 2019 International Symposium of Materials for Biomedical Application) （招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Umeda, Y. Azuma, T. Furuzono
2. 発表標題 Investigation of the anaphylactoid reaction using various antibacterial nanoparticles for coating materials
3. 学会等名 ABC2019&ISMBA(The 19th Asian BioCeramics Symposium and 2019 International Symposium of Materials for Biomedical Application)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Oshita, Y. Azuma, T. Furuzono
2. 発表標題 Preparation of Apatite Nanoparticles Suitable for Catheter Coating Material and Analysis of Antibacterial Mechanism
3. 学会等名 ABC2019&ISMBA(The 19th Asian BioCeramics Symposium and 2019 International Symposium of Materials for Biomedical Application)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下真璃、東 慶直、古園 勉
2. 発表標題 コーティング材として好適なアパタイトナノ材料の調製と抗菌メカニズムの検討
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田晃治、東 慶直、古園 勉
2. 発表標題 カテーテルコーティング材を目的とした各種抗菌ナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の検討
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下真璃、東 慶直、古園 勉
2. 発表標題 抗感染性カテーテルの創出を目指したアパタイトナノ材料の調製および抗菌メカニズムの検討
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Furuzono
2. 発表標題 Superiority of Home Hemodialysis and Development of Antibacterial Nanoparticles for VA Catheters
3. 学会等名 IFA02019(The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Furuzono
2. 発表標題 Medical Devices Developed during My Kidney Disease Life of over 32 Years
3. 学会等名 TERMIS-AP2019(Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society, AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古園 勉
2. 発表標題 抗感染性カテーテル創出を実現するナノセラミックス表面修飾技術
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年



〔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	東 慶直  (Azuma Yoshinao)  (90333509)	近畿大学・生物理工学部・教授   (34419)	

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