

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18586

研究課題名（和文）銀コーティングによる抗菌性評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for evaluating the antimicrobial properties of silver coatings.

研究代表者

堀 美喜 (Hori, Miki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40804422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：銀の接触による菌体の影響として、酸化ストレスと膜変性が報告されている。まずは菌体への酸化ストレスがどのような化学物質の生成によるものかを検討するため、スーパーオキシドイオンの有無にNBT法、過酸化水素の有無にセリウム塩法を適用し、透過電子顕微鏡による形態観察で評価を行った。結果、スーパーオキシドイオン、過酸化水素の発生が一部に観察された。また、発光タンパク質を定常的に生成する大腸菌の確立を目指し、picALucの遺伝子を利用してBL21株に遺伝子導入した。一時的に35000RLUの高い発光を示したが、継代と共に指数関数的に発光量が減少し、安定株の確立は今後の検討課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

銀の抗菌効果についてはこれまで多くの報告があったものの、そのメカニズムについては近年ようやく解明されてきている。銀の抗菌効果を利用した歯科用機器も多く、特にインプラント材料については感染予防が成功の鍵となるためこの抗菌効果が期待されている。しかし、これまでに銀の抗菌効果を菌体のストレスレベルで評価できる方法がない。現時点での研究成果では実用には到達できておらず、菌体で安定的に発光タンパク質を生成する株の樹立が課題として残っている段階である。

研究成果の概要（英文）：The influence of silver contact on bacterial cells has been reported to induce oxidative stress and membrane damage. To investigate the chemical species responsible for oxidative stress on bacterial cells, we employed the NBT (nitroblue tetrazolium) method to detect the presence of superoxide ions and the precipitation method to determine the presence of hydrogen peroxide. Morphological observations were conducted using transmission electron microscopy to assess the effects. The results revealed the partial generation of superoxide ions and hydrogen peroxide. Furthermore, in pursuit of establishing Escherichia coli, which continuously produces luminescent proteins, we introduced the picALuc gene into the BL21 strain. Initially, a high luminescence of 35,000 relative luminescence units (RLU) was transiently observed. However, with successive passages, the luminescence intensity exponentially decreased, and the establishment of a stable strain remained a topic for further investigation.

研究分野：歯科理工学

キーワード：抗菌 銀 大腸菌 発光タンパク質 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 銀による抗菌評価法について

銀の抗菌効果は古くから知られ、医療機器のみならず日用品にも多く用いられている。歯科用機器では特にインプラント材料に対し感染対策の一つとして銀コーティングが施されている製品が存在する。抗菌性の評価方法は菌の増殖能に着目したものが主流であり、銀の抗菌メカニズムから菌のストレスレベルを定量評価する方法はない。

銀の抗菌メカニズムは細菌膜の変性、細菌膜の穿孔、活性酸素による膜破壊、活性酸素によるDNAの複製傷害、リボソームの変性による抗菌効果などが近年報告され、銀の抗菌メカニズムについて解明されつつある。

(2) 発光システムの利用について

これまでに使用者は細胞を用いた細胞毒性試験の確立を行ない、生体に対し毒性物質として働く親電子性物質あるいは酸化ストレス物質によるストレス量を定量的に計測できるシステムを構築した。測定には発光遺伝子のホタルルシフェラーゼあるいはガウシアルルシフェラーゼを使用したレポーターアッセイ法を適用した。このシステムを用い、歯科用レジン材料、歯科用金属に用いられる純金属(金、銀、銅)に対し、ある濃度で高いストレス量を検出した。この結果から、特に銀に対する活性化に着目し、銀による抗菌効果の定量評価法に応用することを着想した。

(3) 細菌の発光システムの利用

ISO 11348-3:2007 Water quality に細菌の発光システムを利用した水質調査の試験法が記載されている。海洋細菌(*Vibrio fischeri*)のクオラムセンシングを応用し、土壌あるいは水質に含まれる汚染物質により菌体に毒性がある材料の検知を、発光量を測定することで評価する。本システムは菌体が発光タンパク質を分泌するため、本研究には則さないものの菌体の発光システムの指標となり得る。

2. 研究の目的

銀の抗菌メカニズムのうち、細菌膜の変性、細菌膜の穿孔の評価は、大腸菌の菌体内に発光タンパク質を生成し、菌体外に漏出した発光タンパク質量を定量することにより穿孔の有無の評価を行う。また、解毒代謝系が発現する経路にはレポーターアッセイ法による評価により、銀に特異的な抗菌評価法の確立を目的とした。本研究は全く新しい手法であり、臨床、基礎分野において社会的な波及効果は大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 銀接触下における活性酸素種の確認

銀は直径 10 μm の銀粒子を用いた。使用前にオートクレーブ滅菌した。菌体は大腸菌、表皮ブドウ球菌を用いた。

菌体の穿孔、加えて酸化ストレスの影響を形態的に観察するため、透過電子顕微鏡による評価を行った。形態保存性を重視し、包埋材(LR white, NER814, ケトール 653)、固定(オスミウム固定の有無)の条件検討を行った。菌体の穿孔の評価には、ポジティブコントロールとして大腸菌のコンピテントセル(BL21 株)の穿孔と比較した。酸化ストレスの観察にはスーパーオキシドイオンの有無にNBT法、過酸化水素の有無にセリウム塩法を適用し、それぞれの発生の有無および発生場所の観察を行なった。

(2) 非分泌型発光タンパク質の生成安定株の樹立

細菌内で安定的に発光タンパク質を生成する安定株の樹立を行うため、以下の検討を行った。

発光タンパク質遺伝子は、大腸菌内で発光活性の高い発光タンパク質を生成すると報告されている picALuc (島津製作所、京都)を使用した。

pQE30 ベクターに picALuc 遺伝子を組み込み、pQE30-picALuc 遺伝子を作製した。制限酵素はマルチクローニングサイトの両末端 BamHI、HindIII を使用した(図1)。BL21 株(大腸菌のタンパク質発現用株、ニッポンジーン社製、TAKARA 社製でそれぞれ比較)に導入し、LB 寒天培地に播種後、コロニーを各プレートから 20 個回収した。各コロニーを 30mL の LB 培養液中で 6~8 時間振盪培養(150rpm, 37 度)した。濁度(OD₆₀₀)0.8 に調整し、ペレットを回収した。細菌膜



図 1. 発光タンパク質遺伝子を組み込んだベクターマップ

の破壊を目的とし、ペレットを-80度に凍結させた。2 mLのPassive Lysis Buffer (PLB)(Promega社、東京)でペレットを完全に溶解後、遠心分離して菌体溶解液を作製した。細菌膜溶解法はそれ以外に超音波による破碎、EzBactoYeast Crusher (ATTO社、東京)を使用し、発光活性の比較検討を行った。5 µg/mLのセレンテラジン溶液(Promega社)に2 µLの菌体溶解液を添加直後にルミネッセンサー(AB2200, ATTO社製)で発光活性を測定した。測定条件は5秒間のピーク値とした。

4. 研究成果および考察

(1) 形態観察および活性酸素種の発生

形態の評価において、包埋材はLR whiteが適していることが判明した。

ブドウ球菌においてスーパーオキシドイオンの発生が菌体内に発生しているのが観察された(図2)。しかし、スーパーオキシドイオンの発生は接触後24時間後から急激に認められ、接触直後から12時間後の観察では認められなかった。また、過酸化水素の発生は菌体の膜表面に発生している様子が確認された。銀に接触している菌体のみならず、非接触の菌体にもスーパーオキシドイオンおよび過酸化水素の発生を認めていることから、これらの活性酸素種の発生は、銀から溶出する銀イオンが影響を及ぼしている可能性が示唆された。

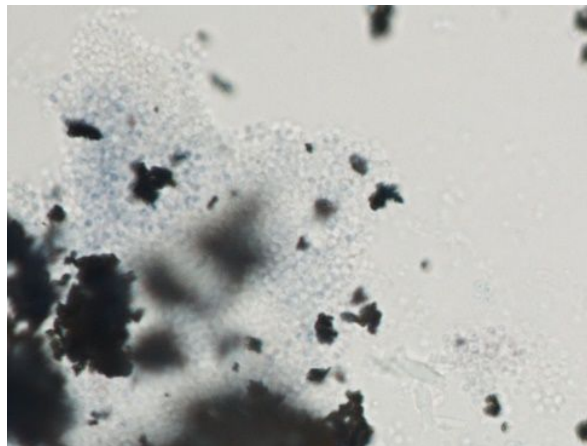


図2. スーパーオキシドイオンの確認

表皮ブドウ球菌と銀粒子を接触させ、24時間後の顕微鏡観察像。ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)法による観察を行なった。細菌が青く染まっている部分はスーパーオキシドイオンが発生していることを示す。

菌体膜の穿孔はコンピテントセルと比較するとほとんど認められなかった。上記結果より、銀イオンを添加することで菌体膜の変化を追加観察する必要がある。

(2) 大腸菌の非分泌型発光タンパク質の安定株樹立

大腸菌の安定した発光遺伝子の報告はこれまでになく、本研究でも最も重要な課題となった。

細菌溶解液の検討はPLBが最も発光活性が高かった。超音波による破碎は同程度の発光活性を示したものの、破碎操作時に溶液量が5 mL以上は必要であることから、発光強度の計測にはPLBのほうが有利であることが判明した。EzBactYeast CrusherはPLBより発光活性が1/10程度低い結果となった。

図3に、コロニー別の発光活性強度およびそれらの継代後の発光活性強度の変化を示す。最も高い発光強度は38000 RLUを超える結果を示したが、1度の継代で急激に発光強度は490 RLUまで減少した。選択したコロニーで、フリーズストックした株はいずれも2桁以上活性が減少し、安定した活性安定株の樹立が困難であった。本研究の目的には必須であり、今後の検討課題として残った。

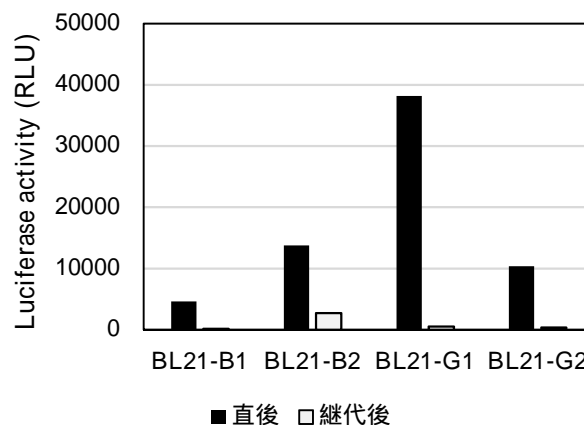


図3. 発光活性強度の比較および継代後の変化

黒色で示すバーは、遺伝子導入後に寒天培地から採取したコロニーを液体培地で培養した菌体(ペレット)の発光活性を示す。いずれもBL21株を使用し、B1, B2はニッポンジーン社製、G1, G2はTAKARA社製のコンピテントセルを用いた。灰色で示すバーは、それぞれの菌体培養液を1度継代したものを使用した発光活性を示す。全ての株で急激な減少を認めた。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chisato Takahashi, Keiichi Moriguchi, Miki Hori, Tatsushi Kawai, Mari Sato and Chikara Sato	4. 巻 28(19)
2. 論文標題 Microscopy Society of America 2022 Biofilm Formation of Staphylococcus epidermidis With and Without Collagen Imaged Using Atmospheric Scanning Electron Microscopy and Antibacterial Effect of Ag-decorated Polymeric Particles Imaged by Transmission Electron Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microsc. Microanal.	6. 最初と最後の頁 1432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S1431927622005827	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
---------------------------	-----------------------	----

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