

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20511

研究課題名（和文）抗菌性生体材料の開発を目指した組織細胞およびバクテリアの付着予測モデル構築

研究課題名（英文）Predictive modeling of tissue cell and bacterial cell adhesion for the development of antimicrobial biomaterials

研究代表者

梅津 将喜 (Umetsu, Masaki)

東北大学・環境科学研究科・助教

研究者番号：30891387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はコロイド粒子の凝集/分散を表すモデルであるXDLVO理論を利用し、生体環境における材料表面への微生物付着の体系化を目指した。生体環境では材料表面に血液成分が吸着するため、組織細胞や微生物細胞は有機物吸着層を介して付着する。複数の生体材料に対しXDLVO理論を用いて大腸菌の付着親和性を予測したところ、予測結果と実際の付着実験の結果が似た傾向を示した。また、これらの生体材料をウシ胎児血清に浸漬した結果、全体的に大腸菌の付着量が減少したものの付着傾向は維持されていた。したがって生体環境においても、材料の表面性状から微生物の付着特性を間接的に予測できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では材料表面に形成する有機物吸着層に注目し、これらの吸着層が材料表面性状や微生物付着性に与える影響を評価した。これまで行われてきたXDLVO理論による微生物付着予測の多くは、きれいに洗浄し乾燥した材料の表面性状データを元に計算されていることから、生体環境のような雑多な環境における付着結果と差異が生じる原因となっている可能性が考えられる。また本研究において、微生物培養培地に浸漬した材料でも微生物付着性に変化が見られたことから、微生物の付着性を評価する上で微生物懸濁液に存在する有機物の種類や量についても考慮する必要があることが示された。

研究成果の概要（英文）：This study utilizes XDLVO theory, a model for the aggregation/dispersion of colloidal particles, to systematize microbial attachment to material surfaces in biological environments. In a biological environment, blood components are adsorbed on the surface of materials, and tissue cells and microbial cells adhere to the organic adsorption layer. We predicted the adhesion affinity of Escherichia coli to several biomaterials using XDLVO theory, and found that the predicted results were similar to the results of actual adhesion experiments. In addition, when these biomaterials were immersed in fetal bovine serum, the overall amount of E. coli adherence decreased, but the adherence trend was maintained. Therefore, it is suggested that it may be possible to indirectly predict the adhesion characteristics of microorganisms from the surface properties of materials in the biological environment.

研究分野：微生物付着

キーワード：微生物付着 生体材料 タンパク質吸着 細胞接着 DLVO理論

1. 研究開始当初の背景

生体材料は、デバイスの安定化や病原因子の侵入を防止する観点から、周辺組織細胞との高い付着親和性が求められる。一方で、大腸菌やブドウ球菌のような病原性微生物の付着は、重大な感染症やデバイスの劣化の原因となってしまう。したがって生体材料には「生体組織細胞への親和性」と「病原性微生物細胞への非親和性」といった異なる性質が必要とされている。抗生物質のコートリングなど、材料表面に抗菌機能を付与する研究も進んでいるが、組織細胞への毒性や抗菌活性の持続性などの問題から、生体材料への利用には課題も多く残っている。そこで本研究では、抗菌剤コートリングを必要としない物理化学的抗菌表面性状を持った生体材料の開発指針を得るために、生体材料に対する組織細胞および微生物細胞の付着メカニズムの体系化を目指した。

生体材料が体内に入ると、血液などに含まれるタンパク質などが吸着し薄い層を形成するため、組織細胞や微生物はこれらのタンパク質層を介して材料に接着する(Fig.1)。例えば組織細胞は、タンパク質吸着層にフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質がある時、細胞膜タンパク質であるインテグリンと相互作用し細胞接着を行うことが知られている。したがって、生体材料表面における各種細胞の付着を制御するためには、生体材料表面への「細胞付着性タンパク質の吸着」および「タンパク質層へのバクテリアの付着」をそれぞれ理解する必要がある。

近年、微生物細胞が溶液中で疎水性コロイドと似た挙動を示すことを利用し、コロイド粒子の分散/凝集モデルである拡張 Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek 理論 (XDLVO 理論) を用いた微生物付着の予測が行われている。XDLVO 理論とは、コロイド粒子の分散性を van der Waals 相互作用エネルギー、電気的相互作用エネルギー、疎水性相互作用エネルギーの和として表した理論であり、それぞれの材料のゼータ電位や表面張力から導出することができる。一方でこれらの予測の多くが、きれいに洗浄し乾燥した材料表面の性状を測定することで計算されているが、前述のとおり溶液に接触した材料表面には溶液中の有機物などが吸着層を形成する。そこで、有機物の吸着層が材料表面性状や微生物付着性に与える影響を評価し、材料表面性状から吸着層の性状を予測することができるようになれば、間接的に微生物の付着予測を行うことができるのではないかと考えた。

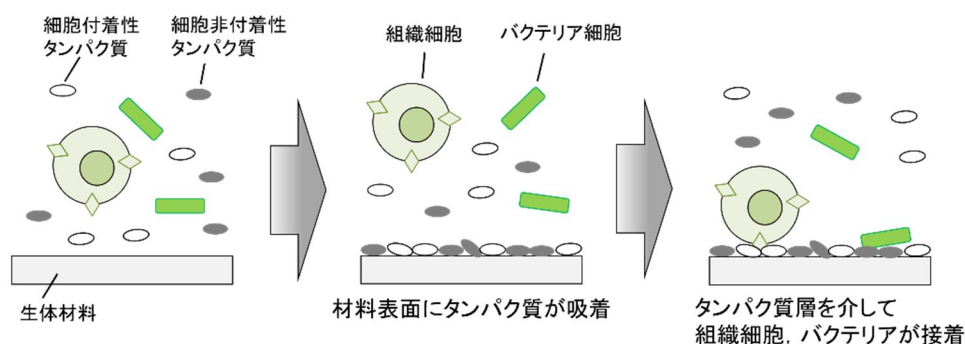


Fig.1 生体内における組織細胞接着およびバクテリア細胞接着のフロー

2. 研究の目的

抗菌材コートリングを必要としない物理化学的抗菌表面性状を持った生体材料の開発を行うために、生体材料に対する組織細胞および微生物細胞の付着メカニズムを体系化することを目的とした。

本研究ではコロイド粒子の凝集/分散を表す代表的なモデルである XDLVO 理論を利用し、生体環境における材料表面上への微生物付着の予測に挑戦した。代表的な生体材料であるアルミナ、チタン、高分子などの表面性状を測定し、実際の微生物付着培養実験から得られた結果との関係性を探索した。また、培養培地や血液成分にこれらの材料を浸漬し、材料表面性状や微生物付着性の変化を評価することで、材料表面性状から有機物吸着層の性状予測、延いては有機物吸着層に対する微生物の付着予測を行うための方針を探索した。

3. 研究の方法

(1) 酸化チタンの光触媒活性を利用した表面性状の変化と微生物付着性への影響

材料の表面性状と微生物付着性の関係性を明らかにするために、酸化チタンを用いて出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の付着性評価を行った。チタンは代表的な生体材料であり、様々な酸化処理によって表面性状を変化させることで組織細胞との親和性が向上することが報告されている。さらに、酸化チタンは光触媒活性を持つため紫外線(UV)を照射したとき超親水化が起きる。そこで UV 照射により表面性状を変化させることで、酸化チタンの物理的な構造を変えず、表面親水性の変化による微生物付着性への影響を評価できると考えた。

研磨したチタン板に対し大気酸化処理と陽極酸化処理をそれぞれ行った。大気酸化処理では、電気炉を用いて研磨チタンを 10 °C/min で昇温し 600°Cで 60 min 保持した後、室温まで炉冷した。また研磨チタンを陽極として 0.1 M 硫酸中で 200 V, 5 min の電圧を印加することで陽極酸化処理を行った。これら 3 種類のチタン試料に対し、実験使用直前に UV を 60 min 照射(170 mW/cm²)し光触媒活性を行い、表面自由エネルギーの変化を測定した。

新鮮な YPD 培地に *S.cerevisiae* を懸濁し、酸化処理および UV 照射を行ったチタンサンプルを 2 時間静置で浸すことで付着実験を行った。このとき、YPD 培地は、脱イオン水に Bacto™ Yeast Extract (Gibco™) 1 g/L, Bacto™ Peptone (Gibco™) 2 g/L, D(+)-Glucose 2 g/L を溶解し、オートクレーブ滅菌(121°C, 10 min)することで作製した。

(2) チタン板への血清成分吸着が微生物の付着性に与える影響

血清成分の吸着が微生物付着性に与える影響を評価するために、鏡面研磨を行ったチタン板をそれぞれ蒸留水、ウシ胎児血清(FBS), 1 g/L ウシ血清アルブミン溶液に 30 分浸漬したのち、蒸留水で軽くすすぎ酵母(*S.cerevisiae*)または大腸菌(*Escherichia coli*)を懸濁したリン酸緩衝生理食塩水(PBS 溶液)に浸して微生物付着量を比較した。

(3) XDLVO 理論を用いた大腸菌付着性の予測と、血清成分の吸着による付着性の変化

一般的な生体材料であるアルミナおよび高分子(PVC, PTFE)の材料表面性状を測定し、XDLVO 理論を用いた大腸菌(*Escherichia coli*)付着親和性の予測と、実際の付着実験の結果との比較を行った。さらに、これらの材料をウシ胎児血清(FBS), 1 g/L ウシ血清アルブミン溶液に浸し、表面性状の変化と大腸菌の付着性への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 酸化チタンの光触媒活性を利用した表面性状の変化と微生物付着性への影響

酸化処理および UV 照射による酵母の付着量の変化を Fig.2 に示す。「研磨のみ」、「大気酸化」、「大気酸化+UV」のチタンと比較して、「陽極酸化」のチタンサンプルで酵母の付着量が有意に増加していた。一般的に表面自由エネルギーの大きい固体材料ほどエネルギーを安定させるために、表面での物質吸着や微生物の付着が起きやすいとされている。しかし、UV 照射により表面の親水性や表面自由エネルギーが向上したにもかかわらず、本研究では UV 照射の有無による酵母付着量の差は見られなかった。この理由の一つとして、YPD 培地成分の吸着による影響が考えられる。YPD 培地は Yeast Extract やペプトンに由来するアミノ酸やペプチドを大量に含んでいるため、酵母がチタン表面に付着する前に有機物の吸着層が形成すると考えられる。実際に「研磨+UV」や「大気酸化+UV」のサンプルでは UV 照射により表面自由エネルギーが大きく向上していたが、YPD に浸漬した後は UV を当てていないサンプルと同程度にまで表面自由エネルギーが減少していた(Fig.3)。一方で「陽極酸化」および「陽極酸化+UV」のサンプルは YPD 浸漬後も高い表面自由エネルギーを維持していたことが、酵母の付着性に影響を与えた一因である可能性が考えられる。

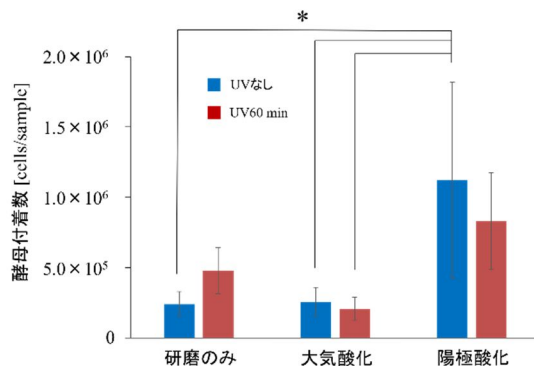


Fig.2 酸化チタン表面の酵母付着量

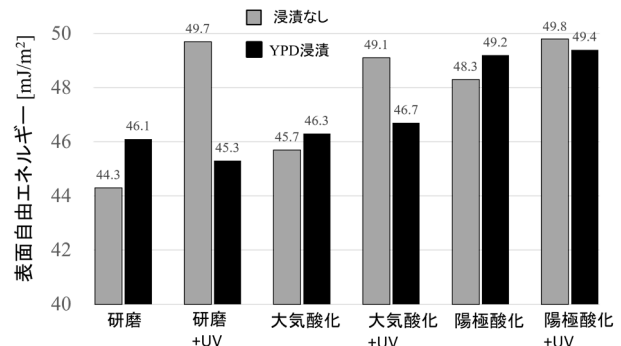


Fig.3 YPD 浸漬前後における酸化チタンの表面自由エネルギー

(2) チタン板への血清成分吸着が微生物の付着性に与える影響

鏡面チタン上に付着する出芽酵母および大腸菌をデジタルマイクログラフで観察した (Fig.4)。これらの微生物はメチレンブルーで染色しているため、青い点がそれぞれの微生物細胞である。蒸留水に浸していたチタンと比較して、FBS およびアルブミン溶液に浸漬したチタンでは酵母と大腸菌の付着量が明らかに減少した。また、酵母は FBS およびアルブミン浸漬チタンの両方でほとんど付着を示さなかったのに対し、大腸菌は FBS 浸漬チタンに対しても一定の付着を示した。したがって、血液成分の吸着層に対する親和性は微生物種によって異なり、生体材料の微生物付着性を評価するためには、「材料表面-血液成分」、「血液成分吸着層-微生物」の付着親和性をそれぞれ評価する必要があることが改めて示された。

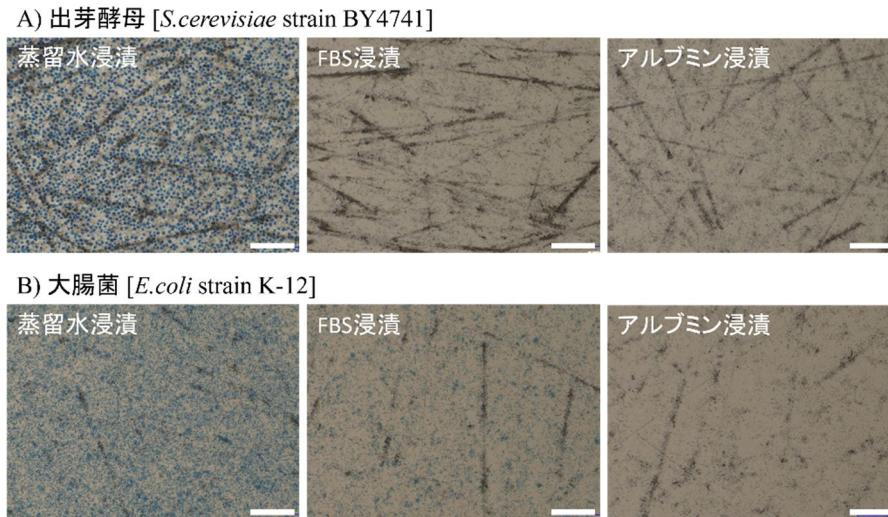


Fig.4 血液成分の吸着による微生物付着性の変化(スケールバーは 50 μ m)

(3) XDLVO 理論を用いた大腸菌付着性の予測と、血清成分の吸着による付着性の変化

アルミナ、PVC、PTFE のゼータ電位および表面接触角の測定値から、XDLVO 理論を用いて大腸菌の付着親和性を予測したところ、材料の表面性状から計算した予測結果と実際の付着実験の結果が似た傾向を示した。また、これらの生体材料を FBS に浸漬したところ全体的に大腸菌の付着量が減少したものの付着傾向は維持されていた。一方でアルブミン溶液に浸漬した材料では、材料の表面自由エネルギーおよび大腸菌の付着量が一定量に収束する傾向が見られた。アルブミンは血漿タンパク質の 60% を占め、吸着タンパク質層の大部分がアルブミンであると言われているが、吸着したアルブミンは他のタンパク質や有機物と部分的に置き換わる。この時、置換するタンパク質の種類や量が、生体材料の元々の表面性状に依存する可能性が考えられた。

これらの結果より生体環境のような雑多な環境においても、材料の表面性状から微生物の付着特性を間接的に予測することができる可能性が示唆された。したがって材料表面に吸着した有機物の種類や量の測定、および有機物が吸着した状態での材料表面性状の測定することができれば、XDLVO 理論を用いた微生物の付着予測の精度がさらに向上することが期待される。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 梅津 将喜	4. 巻 100
2. 論文標題 微生物と非生物の狭間から見る付着性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 380 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.7_380	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堰合亮太, 梅津将喜, 上高原理暢
2. 発表標題 純チタンの表面酸化と紫外線照射が酵母付着性に与える影響の評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会2022年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅津将喜, 堰合亮太, 星京吾, 上高原理暢
2. 発表標題 チタン表面への血清成分吸着が微生物付着挙動に与える影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堰合亮太, 梅津将喜, 簡梅芳, 上高原理暢
2. 発表標題 純チタンの表面酸化による酵母の付着と脱着の制御
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第35回秋季シンポジウム
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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