

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760572

研究課題名(和文) ナノポーラス金属表面における細菌および細胞の生命活動

研究課題名(英文) Microbes and cells on surface of nanoporous metals

研究代表者

袴田 昌高 (HAKAMADA, Masataka)

京都大学・エネルギー科学研究科・准教授

研究者番号：30462849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ナノポーラス金および(ナノポーラス構造を有しない)平滑金の表面に大腸菌および表皮ブドウ球菌を培養した。ナノポーラス金表面ではどちらの細菌の生菌数も平滑金表面より著しく減少しており、ナノポーラス金が抗菌性を示した。走査電子顕微鏡および走査プローブ顕微鏡による観察の結果、ナノポーラス金表面の大腸菌は中央部が大きくへこんでおり、また表皮ブドウ球菌は細胞膜が破損していた。これらはナノポーラス金の有機物に対する活性が通常の金と異なることが原因であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microbes (*Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*) were cultured on nanoporous gold fabricated by dealloying. For comparison, they were also cultured on flat gold plate with no nanoporous structure. Numbers of both microbes decreased on nanoporous gold more significantly than those on flat gold plate. Observations with scanning electron microscope and scanning probe microscope revealed that *Escherichia coli* on nanoporous Au had dimple on its center and that *Staphylococcus epidermidis* on nanoporous gold had fractured cell membrane. These antibacterial properties of nanoporous gold are presumably attributed to the abnormal effect of nanoporous gold on surrounding organic matters.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学

キーワード：ナノポーラス 金 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

ナノポーラス金属は nm オーダの微細孔径を持つスポンジのような金属材料であり、金属のナノ骨格とナノ気孔が 3 次元的に張りめぐらされた網目状構造を有している。電解液中で合金の特定の元素を溶出させる「脱合金化」という簡便なプロセスで作製可能なナノポーラス金属は 2001 年の報告 (*Nature* 410 (2001) 450) 以降国内外で盛んに研究されている。その内容はナノポーラス構造の形成原理追求から力学・化学・電磁気学的特性などの特異性解明にまで及ぶ。

一方、細胞の増殖・分化・死滅等の活動はその周囲の環境に敏感である。なかでも nm スケールの微細な材料表面形状がそこに培養された細胞の生命活動に大きく影響することが、近年のナノ構造形成技術の発達によりわかってきた (*Science* 310 (2005) 1135)。例えばナノ溝パターンを有する高分子材料の表面で平滑筋細胞を培養した場合、材料種そのものよりも表面ナノ構造(形状)の影響の方がはるかに大きいという報告がある (*Biomaterials* 26 (2005) 5405)。つまり、細胞は外界(細胞外基質)に含まれるフィブロネクチン(細胞接着性糖タンパク質の一種)等のタンパク質を認識し、それにもとづいて細胞分裂の際の遺伝情報を書き替えているが、そのタンパク質の認識過程にナノ構造が少なからず影響を与えている事実がわかりつつある。しかし異なる研究者の実験結果が相反するなど不明点も多く、細胞活性がナノ構造にどのように影響されるのか、活発に討議されている。

2. 研究の目的

以上のような研究背景を受け、本研究ではナノポーラス金属の表面上における細菌の増殖特性(抗菌性)を明らかにする。まずは化学的に安定であると考えられるナノポーラス金(Au)を培養基材として用い、ナノポーラス構造を持たない平滑 Au 表面の場合と比較し、ナノポーラス構造の影響を明らかにする。

ナノポーラス金属ならではの特殊性がタンパク質の立体配座や細胞膜の脂質二重層構造等に作用して、細菌あるいは細胞の増殖・死滅等の生命活動に影響する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. Au 試料作製

市販の洗浄済みスライドガラスを基板としてスパッタリングと脱合金化を組み合わせることにより、ナノポーラス Au を作製した。まずスライドガラスに金を所与の厚さスパッタリングし、ついで金銀合金をスパッタリングした。このように積層した試料を 70 質量%硝酸に 253 K で浸漬し(脱合金化)孔径の異なるナノポーラス Au を作製した。なお比較対象として、金のスパッタリングのみ

を行い、金銀合金のスパッタリングおよび脱合金化を行わないことで、ナノポーラス構造を有しない平滑 Au も作製した。

3-2. 抗菌性試験

抗菌性試験には JIS Z 2801 に準じた手法を用いた。すなわち、3-1. で作製した試料に菌液約 0.4 mL を滴下しその上にフィルムをかぶせ、308 K で 24 時間培養した。培養後の菌液を洗い出して回収し、その洗い出し液から 10 倍希釈系列希釈液を作製し、寒天平板培養法により菌数を計測した。

なお上記 JIS では病原性の高い BSL (バイオセーフティレベル) 2 の細菌(大腸菌・黄色ブドウ球菌など)の使用が指示されているが、研究設備の制限により BSL2 の細菌は扱えないため、代替として大腸菌 K-12 株(NBRC 3301) および表皮ブドウ球菌(NBRC 100911)を用いた。どちらも BSL1 であり病原性は低い。

3-3. 観察・分析

3-2. の手法で所与の時間培養したあとの Au 試料表面の大腸菌および表皮ブドウ球菌形状を生体試料の SEM 観察のための前処理(固定・脱水・乾燥・金属コーティング)に供し、走査電子顕微鏡(SEM) および走査プローブ顕微鏡(SPM) で観察した。また、大腸菌についてはリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR) 分析により繊毛をつかさどる遺伝子の発現量解析も行った。

3-4. その他

細菌に対する影響を調べる前段階としてナノポーラス Au の有機物に対する影響を評価するために、メチルオレンジ(有機色素)水溶液の脱色反応に対するナノポーラス Au の触媒効果も調査した。

4. 主な研究成果

図 1 にナノポーラス Au の SEM 写真を示す。孔径約 20 nm のナノポーラス構造が形成されていることがわかる。また、平滑 Au にはナノポーラス構造が形成されていないことも SEM 観察により確認した。

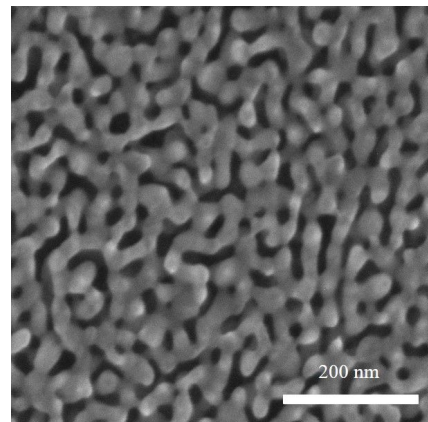


図 1 ナノポーラス Au の SEM 写真

図2には大腸菌の抗菌試験結果の一例を記す。ナノポーラス構造を有しない平滑 Au 表面に比べて、ナノポーラス Au 表面の大腸菌の生菌数は著しく減少していた。また、表皮ブドウ球菌についてもナノポーラス Au の表面での生菌数は平滑 Au 表面の生菌数より低かった。このことから、ナノポーラス Au に抗菌性があることが示された。

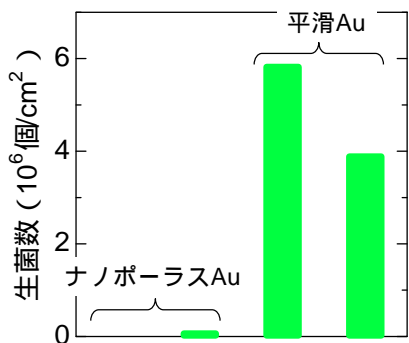


図2 ナノポーラス Au および平滑 Au 表面上の大腸菌の生菌数

図3にはナノポーラス Au および平滑 Au 表面上の大腸菌および表皮ブドウ球菌の SEM 像を示す。大腸菌の細胞形状は平滑 Au 表面に比べて大きくゆがみ、中央部に凹みが生じていた。細菌形状は実験条件に敏感であるが、SPM 観察により凹みを定量的に評価し、ナノポーラス Au 表面の大腸菌形状と平滑 Au 表面の大腸菌形状に有意の差があることが示唆された。

また、表皮ブドウ球菌についても、平滑 Au 表面では本来の球形を保っていたが、ナノポーラス Au 表面では細胞膜が破れており、細胞内組織が流出するなど、形状の大きな変化が確認された。

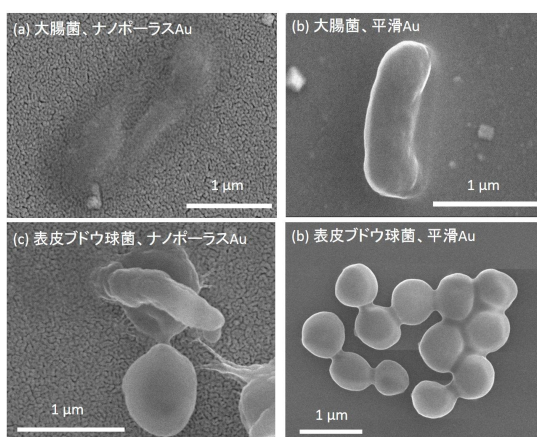


図3 ナノポーラス Au および平滑 Au 上での大腸菌および表皮ブドウ球菌の SEM 写真

さらにナノポーラス Au 上の大腸菌について、繊毛をつかさどる遺伝子の発現解析をリアルタイム PCR で行った結果、ナノ凹凸構造を有する Au 上の大腸菌の該当遺伝子を解析した Rizello らの ACS Nano への報告 (ACS

Nano. 5 (2011) 1865) とは真逆の結果となった(図4)。今回の実験条件では SEM 観察(図3)で大腸菌に繊毛が観察されていないことも考えあわせると、ナノポーラス Au の抗菌機構は Rizello らの材料と根本的に異なっていることが示唆される。

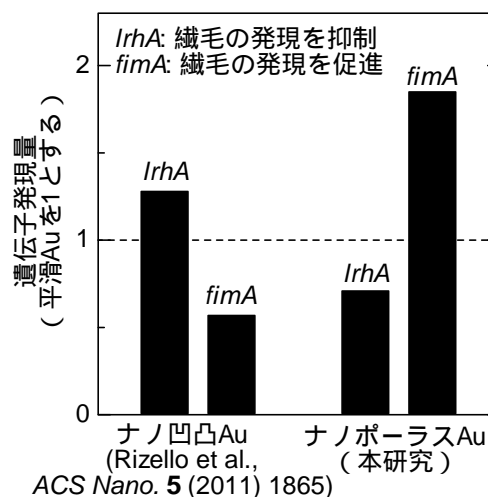


図4 繊毛発現遺伝子の解析結果 (リアルタイム PCR 測定)

いっぽう、前段階として行ったナノポーラス Au によるメチルオレンジ色素分解実験においては、ナノポーラス Au が平滑 Au にはない有機物分解特性を示すことが明らかになっている。ナノポーラス Au の抗菌性についてもこれと同様に、ナノポーラス Au 特有の有機物への分解特性が起因するものと推測される。

以上のように、ナノポーラス Au の抗菌性が示され、ナノポーラス Au の有機物に対する特異性が影響していることが示唆されたが、詳細な抗菌メカニズムの解明には至らなかった。今後、大腸菌や表皮ブドウ球菌の生命活動のどの部分にナノポーラス Au が影響して抗菌性能の発揮に至ったかを、追加分析等で考察する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- [1] M. Hakamada, F. Hirashima and M. Mabuchi, Catalytic decoloration of methyl orange solution by nanoporous metals, Catalysis Science and Technology 2 (2012) 1814–1817.
DOI: 10.1039/c2cy20218b
- [2] M. Hakamada, M. Yuasa, T. Yoshida, F. Hirashima and M. Mabuchi, “Photocatalysis of ZnO deposited on strained nanoporous Au”, Applied Physics A 114 (2014) 1061–1066.
DOI: 10.1007/s00339-014-8299-1

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

袴田昌高 (HAKAMADA, Masataka)

京都大学・大学院工ネルギー科学研究科・
准教授

研究者番号：30462849