

令和元年6月6日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01401

研究課題名(和文) アナフィラキシー回避型抗菌性ナノマテリアルの開発

研究課題名(英文) Development of antibacterial nano-materials leaving from anaphylaxis

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究課題では、Fイオンをドーブした分散性と結晶性が高く、微弱な抗菌性を有しアナフィラキシー(様)反応を回避するF-HApナノ粒子を開発し、新規な抗感染性カテーテル創出のための基盤技術を確立した。当該ナノ粒子の性能評価として、Fイオンの放出挙動、病原性微生物を用いた抗菌性評価、線維芽細胞(L929細胞)を用いた接着性評価、およびプロトタイプ作製のためのカテーテル素材へのコーティング(複合化)の検討を実施した。以上の結果から、多種の細菌に微弱な抗菌性を有しつつも正常細胞に対して毒性が低く、またカテーテル素材へのコーティング好適な抗菌性ナノ粒子の創出を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、医用材料に係るアナフィラキシー(様)反応をin vitroで評価する方法を確立したこと、創出したナノ材料が微弱な抗菌性を有すること、また正常細胞に対して毒性を示さないことを明らかにした点にある。また社会的意義として、アナフィラキシー(様)反応や耐性菌の発現を低減できる抗菌ナノ材料の開発により、これまで我が国で臨床上、喫緊の課題とされていた新規な抗感染性カテーテルの創出のみならず、各種インプラント型医療機器への応用にも目処が立ったことが挙げられる。本研究成果は、我が国が推進している在宅医療を代表とする地域包括ケアシステムの確立に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this research, a basic technology of antibacterial coating with nano-materials was established to aim at fabricating a novel anti-infection catheter by development of fluorine(F)-ion doped hydroxyapatite (F-HAp) nanoparticles possessing highly crystalline, dispersible, and weak antibacterial activity. The material especially leaved from expression of anaphylactoid reaction. Several kinds of chemical and biological evaluations, such as F-ion releasing test, anti-bacterial test using several types of bacteria, cell adhesion test with fibroblast cells (L929 cells), and examination of nano-coating on the substrate of catheter to fabricate prototype model were conducted. In conclusion, novel anti-bacterial nanoparticles were finally developed showing weak anti-bacterial activity against several bacteria, non-toxicity for normal cells, and suitable for coating on catheter substrate.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：抗菌性 アナフィラキシー ナノマテリアル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

カテーテルとは体内と体外とを繋ぐチューブであり、体外から薬注や輸液を行い、また体内から体液等を排出させる重要な医療機器である。また、カテーテル感染（カテーテル関連血流感染）とは、カテーテルを留置した際、カテーテルを介して細菌が侵入し、最終的に敗血症となって死に至らしめる感染症である。我が国においてカテーテル感染が直接の死亡原因となるのは年間2万3千人と推定されており、当該感染に起因する死亡者数は肺炎と不慮の事故による死亡原因の中間に位置する。平成26年における交通事故死亡者数は4,113人に比較すると5倍以上であることから、その重篤性が容易に理解できる。このことからカテーテル感染が臨床、克服すべき重要な課題とされている。

一方で、米国ではカテーテル感染を防止するため最も有効な手段として、抗菌剤を含浸したカテーテルが臨床使用されている。例えば、抗菌剤であるクロルヘキシジンとスルファジアジン銀を表面に練り込むことによって抗菌性を持たせたものがある。しかしながら、我が国における当該抗菌カテーテル使用例でアナフィラキシーショックが13例に発症し、うち1例が死亡するに至った。集中治療室など人的労力によりカテーテル感染防止に係る感染制御が行われているが、医療においても経済性を優先させている事実から、これ以上の人的行為による感染制御は著しく困難であり、材料のみで感染防止できる医療機器の開発が急務となっている。

これまでの経緯から、我が国ではアナフィラキシーショックの原因となるような物質はカテーテルの抗菌材料として使うことは困難である。新規材料は、アナフィラキシーショックの原因とならないことを証明する必要がある。このような観点から、抗感染性デバイスの研究開発がなされた例は存在しない。

2. 研究の目的

そこで我々は、オーラル（口腔）ケアとして日常的に用いられているフッ素(F)に着目した。幼児のオーラルケアにも用いられる、微弱な抗菌性を有するFイオンをHAp結晶構造にドープすることによりFイオン含有ハイドロキシアパタイト(F-HAp)ナノ粒子を合成し、細菌の増殖を抑制する「静菌性ナノ材料」を創出し、最終的に抗感染性カテーテルを開発することを目的とする。同時に、材料がアナフィラキシーを誘引するか否かの評価法を確立し、カテーテル抗菌剤として用いられ、アナフィラキシーを誘引するクロルヘキシジンと比較検討することにより、より安全な抗感染性カテーテルの概念を確立することを目指す。

3. 研究の方法

当該研究課題では、微弱な抗菌性を有するF-HApナノ粒子を合成し、高分子基材にコーティングした抗感染性カテーテル用複合材料を創出する。特に、アナフィラキシーショックが生じたことにより、我が国から抗菌カテーテルが撤退したことを重視し、材料におけるアナフィラキシー様反応の評価法の確立、および当該反応を惹起させないナノ複合材料の概念を導き出す。具体的な実験方法として、材料工学的手法、生化学的手法、細胞および微生物を用いた生物学的評価法等を用いる。

4. 研究成果

(1) 分散性と結晶性に優れるF-HApナノ粒子の合成

ナノ粒子の分散性を向上させるため、独自技術である融着防止法を用いて、F含有率の異なるF-HApナノ粒子を合成した。表1より、各F-HApは仕込み比に対してFイオンが80~100%置換されていることが認められた。FT-IR測定では、HAp結晶構造中のOHイオンの一部がF

イオンに置換されていることが確認された。XRD 測定において、F-HAp は HAp と同様の結晶構造を有することが認められた (図 1)。また a 軸長の減少から、F イオンの置換が推察された。SEM 像にて粒子凝集の抑止が観察され、F-HAp の結晶形態はロッド状を呈しており、仮焼による結晶成長が認められた。

表 1. 各サンプルの F 置換率および Ca / P

sample	Fluoride ion content (%)*		Ca / P
	Nominal	Measured	
nHAp**	0	0	1.67
F(30)-HAp	30	24	1.61
F(50)-HAp	50	52	1.63
F(100)-HAp	100	85	1.68

*F / (F+OH) × 100 (%), **nHAp: normal HAp

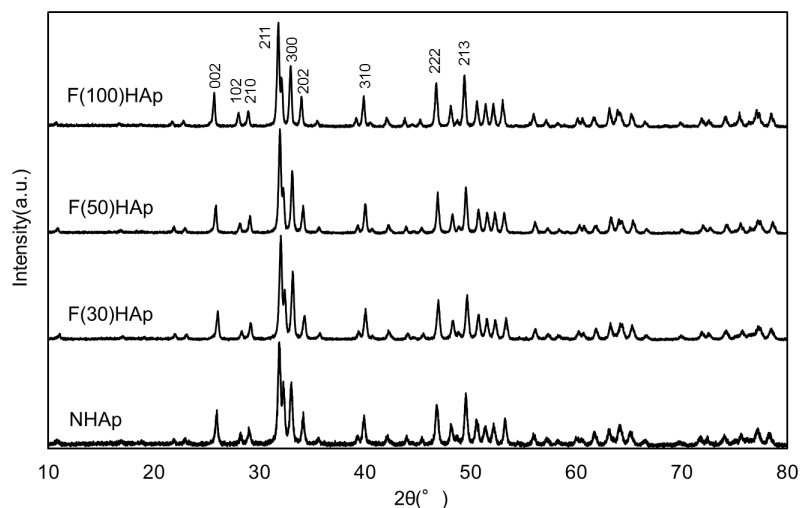


図 1. XRD プロファイル

(2) 高分子基材表面への F-HAp ナノ粒子の複合化

アニオン性ポリマーをグラフト重合した高分子シートに、nHAp ナノ粒子を単層コーティングし、さらに F-HAp ナノ粒子を積層することによって複合材料の作製を行った。高分子基材としてカテーテル素材に用いられるポリエチレンを用いた。当該シートは HAp ナノ粒子上に F-HAp ナノ粒子が積層した構造を有しており、F-HAp が剥離した場合でもシート上には nHAp ナノ粒子が存在し続けるため、生体親和性の維持が可能であると推察された。

(3) F イオン放出挙動の評価

調製した F-HAp の体内安定性を推定する目安として、長期における F-HAp ナノ粒子からの F イオン放出挙動を評価した。実験には、最も F イオンを置換した F(100)-HAp を用いた。F イオンは 2 週間で約 10%、そして 1 年で約 20% が徐放された。F-HAp の化学的安定性を考慮すると、この徐放された F イオンはナノ粒子表面に局在すると推察された。

(4) アナフィラキシー様反応の評価

酵素法と酵素結合免疫吸着法の 2 つの方法を用いてアナフィラキシー様反応評価法の検討を行った。酵素法では、測定感度の問題があり当該実験系には相応しくないと判断した。一方、

酵素結合免疫吸着法では、細胞数と試薬添加量の最適化を行うことで評価法を確立した。当該ナノ粒子およびヒスタミンの遊離を促進する薬剤（グルコン酸クロルヘキシジン）をヒト肥満細胞(HMC-1)に添加し、ELISA 競合法を用いることで、HMC-1 から分泌されるヒスタミン濃度を定量した。その結果、F-HAp 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(図2)。

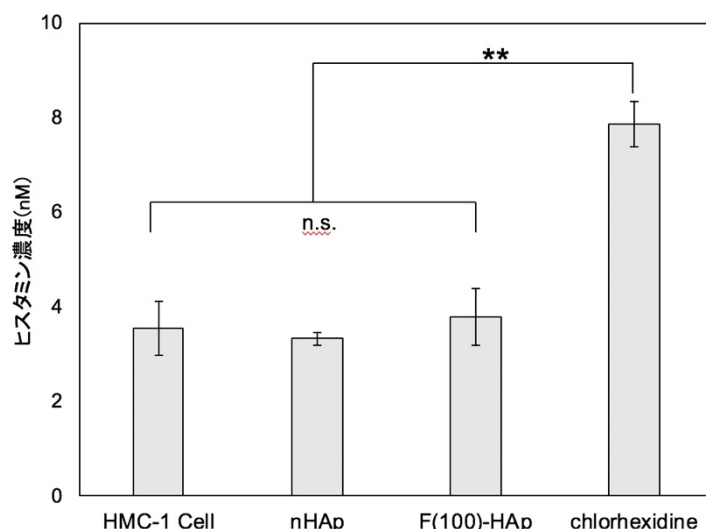


図2. アナフィラキシー様反応試験(n=3)

(5) 病原性微生物を用いた抗菌性評価

抗菌性が発現する F(100)-HAp の添加濃度を調べるために、添加濃度別抗菌性評価を実施した。F(100)-HAp を 0~100mg の範囲で採取し、OD₆₀₀=0.01 に調整した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)と接触させた。F-HAp は少量の粉末添加量では緑膿菌に対して抗菌性を示さなかったが、25mg/0.2mL 以降の添加濃度では抗菌性が認められた。すなわち、抗菌性を示す添加濃度に臨界点があることが明らかとなった。

次に、多種類の菌種を用いて、抗菌性試験を実施した(表2)。F(100)-HAp は、評価に用いられた全ての細菌に対して抗菌性を示した。確認された抗菌性はいずれも nHAp と比較して有意に高い値を示した。この結果から、F-HAp はカテーテル感染起因菌のみならず、呼吸器感染菌および食中毒関連菌に対しても有効に機能することが期待される。

表2. 各細菌に対する殺菌率

Bacteria	Sterilization rate (%), Experimental repetition				Mean (%)	SD (%)
	1	2	3	4		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34.4	58.6	60.0		
<i>Staphylococcus aureus</i>	43.1	68.9	65.1	23.4	50.1	18.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55.5	63.1	42.1	52.6	53.3	7.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	42.8	77.3	47.0	67.2	58.6	14.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	66.6	90.9	84.6	80.7	80.7	8.8

(6) 動物細胞の接着性評価

線維芽細胞(L929 細胞)を用いた細胞接着性試験にて、培養シャーレと同様に F-HAp シート上にも当該細胞が良好に接着・伸展していることが認められた。このことから、F-HAp シート

では正常細胞に対して毒性が低いことが明らかとなった。

当該研究課題において、カテーテル感染の完全制圧を目指して、アナフィラキシーを惹起させることなく、また耐性菌発現の恐れのある抗菌剤を使わない、微弱な抗菌性を有する新規なナノ材料および高分子複合材料の創出を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. T. Furuzono, Y. Azuma, Y. Niigawa, Y. Kogai, Y. Sawa, Preparation and characterization of dispersible fluorinated hydroxyapatite nanoparticles with weak antibacterial activity, *ASAIO J.*, 62, 197-202(2016)

〔学会発表〕（計 17 件）

1. 梅田晃治、石丸佳樹、東 慶直、古菌 勉、各種抗菌ナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の評価、第 40 回日本バイオマテリアル学会、2018.11.12-13、神戸国際会議場、神戸市（ポスター）
2. 古菌 勉、皮膚貫通型デバイスの現状と感染制御を目指した複合ナノ材料の開発、第 37 回エレクトロセラミックスセミナー（セラミックス協会電子材料部会セミナー）、2018.10.12 富士通労働組合会館、神奈川県川崎市（招待講演）
3. 梅田晃治、東 慶直、古菌 勉、各種イオンをドーピングしたアパタイトナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の検討、日本セラミックス協会第 31 回秋季シンポジウム、2018.9.5-7 名古屋工業大学、名古屋市（ポスター）
4. K. Umeda, Y. Azuma, T. Furuzono, Evaluation of Anaphylactoid Reaction Using Novel Antibacterial Nanomaterials for Medical Device Coating, AUSBME2018 (3rd Asian University Symposium on Biomedical Engineering 2018), 2018.7.5-7, Auditorium at Dental Hospital, Kyung Hee University, Seoul, Korea (Poster)
5. T. Furuzono, Development of Novel Antibacterial Nanoparticles Suitable for Coating on an Percutaneous Device, AUSBME2018 (3rd Asian University Symposium on Biomedical Engineering 2018), 2018.7.5-7(Presentation July 6), Auditorium at Dental Hospital, Kyung Hee University, Seoul, Korea (Invited Lecture)
6. T. Furuzono, Development of novel antibacterial nanoparticles suitable for coating on intravascular catheters, CIMTEC2018(14th International Conference on Modern Materials and Technologies) – 8th Forum on New Materials, 2018.6. 10-14 (Presentation June 12), Centro Congressi Hotel Quattrotorri at Best Western Hotel Quattrotorri Perugia, Perugia, Italy(Invited Lecture)
7. T. Furuzono, Development of nano-particles with antibacterial control consisting of apatite structure suitable for catheter surface modification、第 63 回日本透析医学会学術集会・総会、2018.6.29-7.1、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場ほか、神戸市、兵庫県（委員会企画セッション、口演、7/1）
8. 梅田晃治、東 慶直、古菌 勉、各種ナノマテリアルを用いたアナフィラキシー様反応惹起性の評価、第 63 回日本透析医学会学術集会・総会、2018.6.29-7.1、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場ほか、神戸市、兵庫県（ポスター、6/29）
9. 古菌 勉、抗菌性を制御する新たなカテーテル表面修飾ナノマテリアルの開発、第 62 回日本透析医学会学術集会・総会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2017.6.16-18（学会・

委員会企画、依頼講演)

10. 古菌 勉、抗菌性制御を可能とする長期留置型カテーテル表面修飾ナノマテリアルの開発、第 55 回日本人工臓器学会大会、法政大学、東京都、2017. 9. 1-3 (ジョイントシンポジウム、依頼講演)
11. 行徳宏樹、東 慶直、古菌 勉、長期留置型カテーテルコーティングに好適な微弱抗菌ナノ材料の開発、第 55 回日本人工臓器学会大会、法政大学、東京都、2017.9.1-3 (ポスター)
12. 行徳宏樹、東 慶直、古菌 勉、高分子基材へのコーティングに好適な微弱抗菌フッ素置換 HAp ナノ粒子の開発、日本セラミックス協会第 30 回秋季シンポジウム、神戸大学、兵庫県、2017.9.19-21、(口演)
13. 行徳宏樹、東 慶直、古菌 勉、微弱な抗菌性を有するフッ素含有 HAp ナノ粒子の調製と材料特性評価、第 20 回生体関連セラミックス討論会、吹田市、大阪大学銀杏会館、2016. 12. 2
14. 古菌 勉、在宅人工腎臓治療におけるバスキュラーアクセスの課題とデバイス開発、第 54 回日本人工臓器学会大会、米子市、鳥取県、米子コンベンションセンター、2016. 11. 23-25
15. 行徳宏樹、東 慶直、古菌 勉、微弱な抗菌性を有する長期留置型カテーテルコーティング材の開発、第 54 回日本人工臓器学会大会、米子市、鳥取県、米子コンベンションセンター、2016. 11. 23-25
16. 古菌 勉、抗菌性を制御する新たなカテーテル表面修飾ナノマテリアルの開発、第 61 回日本透析医学会、大阪市、大阪国際会議場、2016. 6. 10-12
17. 行徳宏樹、東 慶直、古菌 勉、微弱な抗菌性を有する長期留置型カテーテル素材の開発、第 61 回日本透析医学会、大阪市、大阪国際会議場、2016. 6. 10-12

[図書] (計 1 件)

1. 古菌 勉、船渡川圭次、切替照雄、経皮デバイスと感染、人工臓器、47, 2018, 216-218.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東 慶直

ローマ字氏名：Yoshinao AZUMA

所属研究機関名：近畿大学

部局名：生物理工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90333509

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。