

平成25年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研 究 課 題 名	ボトムアッププロセスによる刺激応答性抗菌マテリアルの創製	
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部医用工学科 教授 古菌 勉 共同研究者：理工学部応用化学科 准教授 岩崎 光伸 生物理工学部食品安全工学科 准教授 東 慶直	

1. 研究目的・内容

当該研究課題では、光触媒複合材料の母材への悪影響を最低限に抑え、外部からの光刺激による抗菌制御を目的としたボトムアップ型ナノ無機・有機複合材量からなる新規な医療用抗菌性材料の創出を目指す。ナノ積層構造体の構築、光触媒反応の定量化、さらに微生物を用いた抗菌活性評価を行う。当該ナノ構造体の界面特性と光触媒活性および抗菌性との相関性を導き出し、抗菌カテーテル用素材としての最適化を行う。

2. 研究経過及び成果

1. ナノ複合シートの物性試験（水中, 37℃）

*in vitro*においてバイオマテリアルの骨親和性を評価する場合、一般的に用いられる静的条件下での評価では、動的負荷を常時うける生体内環境を正確に再現しているとは言い難い。動的条件下においても機能しうる優れた骨親和性評価システムの開発が急務とされている。本研究では、骨関連細胞の動的細胞機能評価に適した細胞足場材料を作製するため、基材の伸縮に耐えられるハイドロキシアパタイト(HAp)複合シートの調製を試みた。前年度では、当該シートを用いて大気中にて繰り返し引っ張り試験を行い、シート表面へコーティングした HAp ナノ単結晶の脱落の有無を評価し、HAp が強固に結合していることを明らかにした。今回の報告では、水中にて同試験を実施することにより、動的細胞機能評価に用いる足場材料として応用可能か否かについて検討した。

シリコンシート（膜厚 0.3mm, 信越ポリマー（株）製）をソックスレー抽出により清浄化した後、コロナ放電処理を行い、基材表面にラジカルを導入した。このシートを 10w/w% アクリル酸モノマー水溶液を注入したガラス管に留置し、脱気封緘した。さらに 60℃ 温浴に封緘したガラス管を 30 分間浸漬し、グラフト反応を行った。反応後、ポリアクリル酸をグラフト重合したシリコン(PolyAAc-g-silicone)シートを温水で十分に洗浄し乾燥させた（グラフト密度：10-20mg/cm²）。次に、球状 HAp ナノ単結晶の分散水溶液(0.1wt%)に PolyAAc-g-silicone シートを 1 時間浸漬し、HAp ナノ単結晶をシート表面に吸着・結合させた。浸漬後、超音波洗浄を行い、過剰に吸着したナノ粒子を取り除いた。テンシロン試験機（島津製作所製、電磁力式微小試験機 MMT-101NV-10）を用いて、PolyAAc-g-silicone シートの繰り返し引っ張り試験を大気中および PBS 中(37℃)にて実施した（歪み：10%、周期：1Hz、時間：1 日および 3 日）。電界放射型走査型電子顕微鏡(FE-SEM, 日立製作所、S-4800)を用いて、引っ張り試験前後の PolyAAc-g-silicone シートの表面観察を行った。さらに、HAp ナノ単結晶の表面被覆率を統計学的に比較検討した。

試験 1 日後および 3 日後においても、HAp ナノ単結晶の剥離について、統計学的な有意差は認められなかった。これはグラフト鎖のカルボキシル基が HAp ナノ単結晶表面の Ca イオンと静電的相互作用で結合し、さらにナノ単結晶がグラフトポリマー鎖と多点で結合していることによるものであり、シリコン基材の伸縮に十分に耐えられるほどの結合強度を有していることが明らかとなった。このことから、カテーテル基材にナノ粒子複合処理を施した場合、生体内においても安定した界面を提供できることを証明できた。

2. ボトムアップ型ナノ界面の構築

上記の方法で調製したナノ複合シートを用いて、酸化チタン(TiO_2)ナノ粒子を階層的に複合化させた。複合化させる際、 pH を制御し、 TiO_2 の表面電荷とシリコン基材の表面電荷を制御することにより、シリコン基材と反発させ、HAp 表面に TiO_2 が効果的に吸着する条件を見出した。ロッド状 HAp をコーティングしたシリコンシート (HAp/SI)、および HAp/SI 上に TiO_2 を階層的に複合化したシリコンシート ($\text{TiO}_2/\text{HAp/SI}$) の表面を、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。その結果、画像処理によって算出された無機ナノ粒子の表面被覆率は、それぞれ HAp/SI が $32 \pm 3\%$ で、 $\text{TiO}_2/\text{HAp/SI}$ が $34 \pm 2\%$ と算出された($n=8$)。優位差検定(t 検定)により両者に優位差が認められなかったことから、 TiO_2 ナノ粒子は選択的に HAp ナノ粒子状に階層化されていることが予想された。

さらに、ナノ階層化を確認するために、X 線光電子分光法 (XPS) を用いて両シート (HAp/SI および $\text{TiO}_2/\text{HAp/SI}$) のナノ界面における元素分析 (Ca, Ti) を行った。その結果、Ca および Ti の割合は、HAp/SI において $\text{Ca}=1.00\%$ および $\text{Ti}=0.00\%$ であり、また $\text{TiO}_2/\text{HAp/SI}$ において $\text{Ca}=0.83$ および $\text{Ti}=1.10\%$ であった。XPS によるナノ界面の元素分析にて、Ca の割合が減少していることから、 TiO_2 ナノ粒子が HAp ナノ粒子の表面を覆っていることを裏付けていることが示された。これらのことから、ナノ階層化複合構造が形成されていることが認められた。

3. 光触媒活性評価

光触媒活性はアセトアルデヒドの気相光酸化分解反応によって行った。試料シートをサンプル台にのせ、それを可視・紫外光($\lambda_{\text{ex}} > 300 \text{ nm}$)を十分透過させる特注のパイレックス製反応容器(容量 640 mL)の中に入れて密閉し、容器内部を約 5.0 mmHg まで減圧した後、約 500 mmHg までアセトアルデヒド標準ガス(594 mmHg, BALANCE N_2)を導入したのち、空気を導入して常圧に戻し、系内のアセトアルデヒド濃度を約 300ppm に制御した。暗所において吸着平衡に到達したことを確認後、室温で、光照射(Wacom 製キセノンランプ HX-500、 $\lambda_{\text{ex}} > 300 \text{ nm}$, $I_{320-400} = 2.0 \text{ mW cm}^{-2}$)を開始した。反応容器内の気体を 15 分ごとに 0.5 mL サンプルングし、その中に含まれる未分解のアセトアルデヒドをガスクロマトグラフ(GC-2014, FID 検出器)を用いて定量した。ガスクロマトグラフ測定条件としては、カラムに SHINCARBON A(半径 1.6 mm × 長さ 3.1 m)を用い、カラム温度 70 °C, 注入口温度 90 °C, 検出器温度 90 °C とした。 TiO_2 ナノ粒子をコーティングしたナノ複合シートの光触媒活性を評価した。アセトアルデヒド濃度の減少量の経時変化を一次の反応速度式で回帰することにより反応速度定数(k/h^{-1})を求めて、その値を比較することにより光触媒活性を評価した結果、 TiO_2 ナノ粒子コート複合シートの光触媒活性(k)は、 $0.012\text{--}0.08 \text{ h}^{-1}$ と酸化チタンの担持量ならびに担持状態により大きく異なった。また、一部のシートにおいては、十分な光触媒機能を有していることが明らかになった。

4. 抗菌性評価

これまでに、近紫外光である 405nm の光を用いて、マウスの耳および眼への有害性試験を実施した。免疫細胞の組織浸潤や組織の繊維化、肥厚などの組織の病変に基づき検証した結果、蛍光灯の光と同様、病変は全く観察されず、人体に限りなく安全であると考えられた。一方で、350nm の紫外線を照射した場合では明らかな病変が観察された。また、衛生管理試験における標準微生物である大腸菌を、酸化チタンでコートした高分子シート上に置き、近紫外光を照射することにより殺菌効果を検証しところ、1 時間の照射で、98%以上の殺菌効果を確認した。このとき近紫外光単独、もしくは酸化チタン単独では、抗菌活性は観察されなかった。

さらに大腸菌だけではなく、実際に院内感染の原因となる黄色ブドウ球菌や緑膿菌などの微生物をもちいて殺菌効果を検証した。用いた 8 種類の細菌のうち、6 種類(大腸菌、緑膿菌、肺炎桿菌、サルモネラ菌、セラチア菌、黄色ブドウ球菌)に対しては、97%以上の殺菌効果を確認した。セレウス菌についても生存菌数は半減していたが、化膿連鎖球菌には 2 時間の照射では殺菌効果は観察されなかった。このことは微生物の細胞膜の膜タンパク質や構造の違いによるものと推察された。今後の検討が必要である。

結論として、カテーテル感染起炎菌を含む大腸菌、緑膿菌、肺炎桿菌、サルモネラ菌、セラチア菌および黄色ブドウ球菌には光刺激で高い殺菌効果を示したことから、抗感染性カテーテル用素材として有用であることが明らかとなった。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本年度は最終年度である。今後は、技術移転先（企業）の探索を行いながら、医療デバイスへ向けての開発を進める予定である。

4. 成果の発表等

発 表 機 関 名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日(予定を含む)
FEMS Microbiol Lett.	国際研究論文	2013. 12. 14
PLoS One	国際研究論文	2013. 09. 09
日本細菌学会	口頭発表（招待）	2014. 03. 28
5 th Congress of the International Federation for Artificial Organs	ポスター	2013. 09. 27
第 2 回生体材料接着研究会	口頭発表（招待）	2014. 01. 22
日本セラミックス協会 2014 年年会	ポスター	2014. 03. 17
International Symposium on Smart Biomaterials	口頭発表（招待）	2014. 03. 24
表面技術協会	口頭発表	2013. 09. 24
表面技術協会関西支部	口頭発表	2013. 11. 28
材料技術研究協会	口頭発表	2013. 12. 07
材料技術研究協会	口頭発表	2013. 12. 07