

医工連携に基づいた「抗バイオフィルム材料」の開発 Development of anti-biofilm material based on medicine-engineering collaboration

大澤 敏、吉村 治、小田 忍、真田龍大、
西澤康平、伊崎奈津美、宮崎 優

*Satoshi OSAWA, Osamu YOSHIMURA, Shinobu ODA, Tatsuhiko SANADA,
Kohei NISHIZAWA, Natsumi ISAKI, Yu MIYAZAKI*

学生と教員のチームが、石川県保健環境センターおよび金沢医科大学の関係者と医療および衛生に関する意見交換した。本事例報告は、その中で明らかになった課題である「抗バイオフィルム材の開発」に関する取り組みの経緯と研究成果をまとめたものである。材料表面に形成されるバイオフィルムは、医療や衛生関連の現場で感染症などの問題を引き起こしている。ここでは、地域の専門機関との連携によるテーマ設定の経緯、材料開発およびバイオフィルム定量法に関する研究成果について述べ、医工連携に基づく研究における地域および学科間連携による教育研究の有効性について紹介する。

キーワード：地域連携、医工連携、バイオフィルム、抗菌物質、インプラント材料

Student-Teacher team has collaborated with Ishikawa Research Laboratory for Public health and Environment and Kanazawa Medical University to search problems to be solved in these fields. Based on the research, we have developed anti-biofilm material and the evaluation method of the material, through medicine-engineering and chemistry-bioscience collaborations. In this report, we described the setting up process of the research target and the results of study, as well as the effects of the collaboration on student's education and research.

Keywords: Society collaboration, medicine-engineering collaboration, biofilm, antibacterial agent, implant material

1. はじめに

金沢工業大学COC事業の医工連携プロジェクトの中でバイオ・化学分野において地域連携を図るために石川県保健環境センターおよび金沢医科大学と連携して衛生・医療分野で貢献できる領域を教員3名と学生4名のチームで調査した。その結果、石川県保健環境センターからは入浴施設等においてバイオフィルムの形成が衛生上の大きな課題であることが提示された。一方、金沢医科大学においては、人工関節や人工脊椎等のインプラント材表面での細菌によるバイオフィルム形成が問題となっていることが明確になった。いずれの課題においてもその根本的な解決策は、バイオフィルムを形成しない材料開発であることが分かった。そこで、衛生と医療の観点からバイオ・化学分野のチームでは、上述の問題に対応するために「抗バイオフィルム材料」を開発しその性能評価方法を確立することで地域貢献を図ることを目的とした。

バイオフィルムとは多種の細菌、あるいは微生物と様々な相互作用を持ちながら、複雑な構造中にお

いて基質を種間で協調し代謝している一種の「微生物共同体」のことである¹⁾。衛生分野では、レジオネラ肺炎を起こすレジオネラ属菌の増殖が、バイオフィーム形成と関連していることが知られている。また、医療分野における人工臓器でのバイオフィーム形成に起因した感染症の発症等、他分野においても問題が挙げられている。これらの問題を解決するために汎用高分子であるポリエチレン(PE)やポリプロピレン(PP)、生体適合性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)等の材料にバイオフィーム形成抑制能を付与し、その抗バイオフィーム性能を評価した。

2. 連携研究の推進方法

連携研究を以下の手順で推進した。

- ① 教員と学生が、現場の問題点を実感するために石川県保健環境センターと金沢医科大を訪問し、担当者と意見交換した。
- ② 連携研究は、高分子材料に抗菌剤を添加して抗バイオフィーム材を作製する班と、その材料の性能を評価するための新規方法を開発する班の2班に分かれそれぞれ当該機関と連絡をとりながら研究を進めた。
- ③ 一定の成果が出た時点で、その結果に対する当該機関の評価を基に改善を行った。また、関連する研究会や講演会にも参加して、本研究の社会における位置づけを確認した。これらの過程で、学生は基礎研究であってもその目的が地域社会と強く関わることを意識することができた。図1に当該機関での学生と担当者の意見交換の写真を示した。
- ④ 抗バイオフィーム作製チーム(応用化学科)とその評価方法の開発チーム(応用バイオ学科)で定期的に進捗を報告しながら学科融合型研究を進めた。



図1 石川県保健環境センターにおける担当者と学生・教員との意見交換

3. 研究成果

3. 1 抗バイオフィーム材の開発

本研究では有機系天然抗菌剤として菌体内でのpH低下作用による生育抑制を有している酢酸、pHに関わりなく菌の生育を阻止するL-乳酸、納豆に含まれており病原性大腸菌の生育を抑制して短期間で完全に消失させることができるジピコリン酸を選定対象とした^{4), 5), 6)}。また、比較対象として銀イオンの効果によって微生物の代謝系の酵素を阻害し、微生物の増殖を抑制するゼオミックAJ10D((株)シナネンゼオミック)等の無機系抗菌剤を幾つか用いた。高分子材料には汎用高分子であるPEを使用した。また抗菌試験には汚染や衛生の指標に用いられる大腸菌(E. coli JM109)を用いた。

ジピコリン酸、L-乳酸、ゼオミックAJ10Dを添加したNB培地(Nutrient Broth 培地:食品や医薬品の

分野で一般的な細菌の培養に用いる培地)における生菌数の測定結果を図2に示した。なお、標準偏差を図2中の誤差線で示した。NB 培地のみでは72 時間以降に急激な増殖がみられた。各抗菌剤を添加した NB 培地における生菌数は開始直後にわずかに増加が確認されたものの大きな変化は見られず、72 時間後から穏やかに減少することが確認された。この結果からジピコリン酸、L-乳酸、ゼオミック AJ10D は大腸菌に対して静菌作用を有すると示唆された。また L-乳酸ならびにゼオミック AJ10D に比べジピコリン酸を添加した NB 培地における生菌数が低いことからジピコリン酸の抗菌効果が L-乳酸、ゼオミック AJ10D に比べて優れることが分かった。

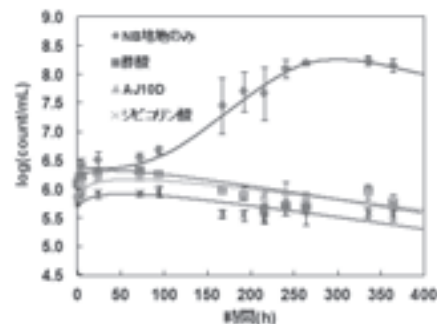


図2 無機および有機系抗菌剤の大腸菌に対する抗菌評価

そこで、本研究では高分子材料に添加する抗菌剤としてジピコリン酸を選定した。ジピコリン酸が優れた抗菌効果を示した要因として細菌内部での H^+ の過剰な解離と酸解離定数の高さによるものだと考えられる。有機系天然抗菌剤の抗菌効果は非解離状態にて細菌内部へ取り込まれた後、菌体内にて H^+ が遊離して pH を低下させることにより発現する⁷⁾。ジピコリン酸は構造内にカルボキシ基を2つ有しているため他の抗菌剤に比べ細菌内部での H^+ の遊離が多く、ATP による排除が十分に行われず優れた抗菌効果を示したと考えられる。また有機系天然系抗菌剤の細菌内部への取り込まれやすさは酸解離定数に依存している。ジピコリン酸は酢酸、L-乳酸に比べて同じ pH 環境下における非解離状態の比率が多いため、内部に取り込まれやすいと考えられる。

100 $\mu g/mL$ のジピコリン酸を基準として 1/2 倍量または 2 倍量の濃度系列を添加した MHB 培地 (Mueller-Hinton Broth 培地: 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験で規定されている培地) における菌の発育の有無をまとめたものを表1に示した^{8), 9)}。マイナスの記号は菌の発育阻止、プラスの記号は菌の発育を示した。ジピコリン酸の添加濃度が 1600 $\mu g/mL$ 以下の MHB 培地にて靱状の物質もしくは沈殿物が視覚的に確認された。これに対してジピコリン酸を 3200 $\mu g/mL$ 以上添加した MHB 培地ではいずれも沈殿物等が見られず、肉眼観察における菌の発育阻害の判定基準を満たすことが確認された。この結果からジピコリン酸における MIC 値は 3200 $\mu g/mL$ 付近であると推定した。さらに 3200 $\mu g/mL$ から 1600 $\mu g/mL$ の間で、再度定量試験を行った結果、ジピコリン酸の MIC 値は 2800 $\mu g/mL$ であることが分かった。

表1 肉眼観察によるジピコリン酸の MIC 値

	①	②	③
MHB培地のみ	+	+	+
50 $\mu g/mL$	+	+	+
100 $\mu g/mL$	+	+	+
200 $\mu g/mL$	+	+	+
400 $\mu g/mL$	+	+	+
800 $\mu g/mL$	+	+	+
1600 $\mu g/mL$	+	+	-
3200 $\mu g/mL$	-	-	-

MIC 値 2800 $\mu\text{g/mL}$ における抗菌効果の有用性を検討するために各抗菌剤との抗菌効果比較試験を行った結果、ジピコリン酸は MIC にて菌の増殖に対して強い静菌作用を示し、比較対象として用いた他の代表的な有機、無機系抗菌剤に比べ抗菌効果が優れていることが見出された。そこで、ジピコリン酸の割合が 2.8 % となるように PE ペレットに添加した。200 °C、10 rpm、10 分間混練した後 110 °C、5 MPa で 3 分加圧成形してシート状の試料を得た。なお抗菌剤は選定したジピコリン酸と比較用に無機系抗菌剤のゼオミック AJ10D を用いた。

3. 2Plate-hanging 法によるバイオフィーム形成抑制能評価

細菌としてグラム陰性菌である *Pseudomonas putida* NBRC 14164、真菌として *Candida utilis* NBRC 0619 を用い、前者はポリメチルメタクリレート板、後者はポリプロピレン板におけるバイオフィーム形成量を定量化する手法を開発した。本研究で開発した評価方法 (Plate-hanging 法) の概略を図 3 に示すが、試験片を培養器内壁に接触させることなく振盪培養を行なうことが可能であるため、試験片と培養器内壁との接触が避けられない従来のバイオフィーム定量法と比較して、精度が高い手法と言える。

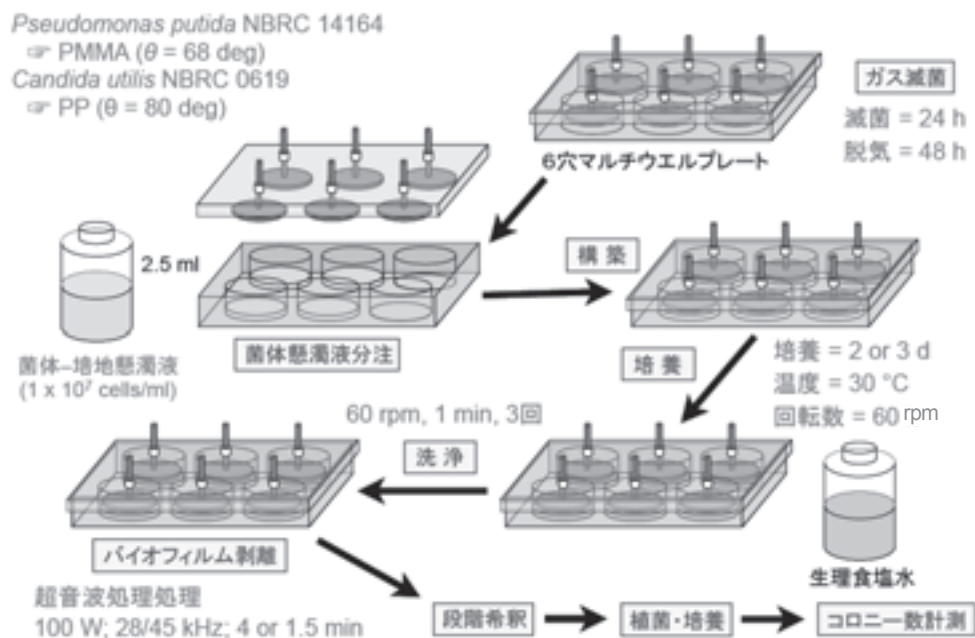


図3 Plate-hanging 法

この Plate-hanging 法を用いて、調整したフィルム of *Pseudomonas putida* NBRC 14164 バイオフィーム形成抑制能を図 4 に示した。なお、標準偏差を図 4 中の誤差線で示した。PE に比べ抗菌剤を添加した各フィルムで、バイオフィームの形成抑制が確認された。またジピコリン酸を添加したフィルムは PE の 45 %、ゼオミック AJ10D を添加したフィルムは PE の 59 % となり、ジピコリン酸を添加した方によりバイオフィーム形成を抑制することができた。*Candida utilis* NBRC 0619 によるバイオフィーム形成に対する効果を図 5 に示した。なお、標準偏差を図 5 中の誤差線で示した。PE に比べゼオミック AJ10D を添加したフィルムはバイオフィーム形成量が増加したにも関わらず、ジピコリン酸を添加したフィルムは PE の 35 % までバイオフィーム形成を抑制した。以上より PE にジピコリン酸を添加することによりバイオフィーム形成抑制能が付与できると示唆された。

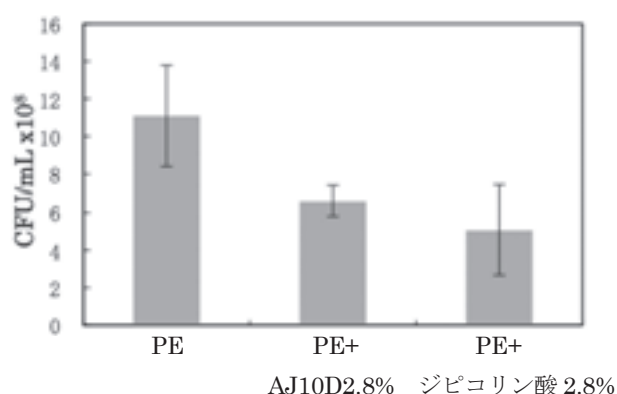


図4 フィルムに付着した *P. putida* NERC 14164 の菌数

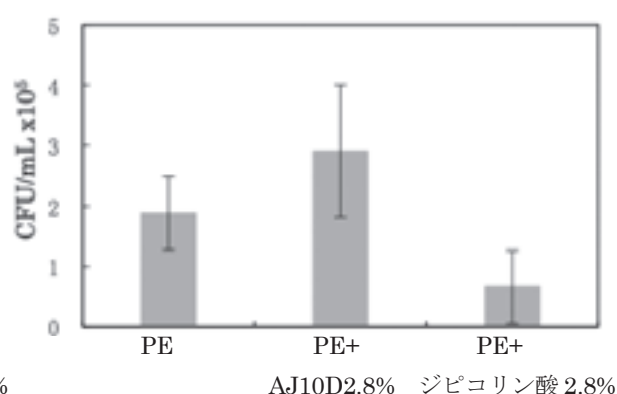


図5 フィルムに付着した *C. utilis* NBRC 0619 の菌数

4. おわりに

納豆に含まれる有機系天然抗菌剤のジピコリン酸を PE に添加することで抗菌性およびバイオフィルム形成抑制能を有する汎用高分子素材の開発を地域研究機関と2学科の融合チームで行った。連携機関の担当者からはこれらのフィルムを加工することで、衛生関連施設での応用にとどまらず高齢者の健康を考えた入浴施設等のフィルターへの応用が期待できるとの評価が得られた。一方医療分野では、天然抗菌剤であるジピコリン酸の特徴を活かして生体適合性に優れた高分子材料へ配合することにより、例えば、バイオフィルム感染症を併発しない損傷部被覆材等の開発に繋がる可能性もある。この様に基礎研究であっても、外部機関との連携、さらには学科融合型の研究手法によってその現実的な用途と異分野融合の重要性を強く意識することができ、学生のモチベーションを上げるとともに、プロジェクトデザインⅢに地域連携教育を導入することの有効性が認められた。

5. 謝辞

本プロジェクトの推進に当たり、多大なご助言と評価を戴きました、石川県保健環境センターの川上慶子氏、ならびに金沢医科大学の川原範夫教授と川口真史助教に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 古畑勝則・松下貢・森川正章 他:『バイオフィルムの基礎と制御 特性・解析事例から形成防止・有効利用まで』(エヌティーエス, 2008), pp3-13
- 2) 株式会社東レリサーチセンター調査研究部門:『抗菌・防カビ技術-抗菌・防カビ剤とその応用展開の全容-』(株式会社東レリサーチセンター, 2004), p89
- 3) 石川県:『資料編 石川の特性(詳細) 1. 地域関連』, (<https://www.pref.ishikawa.lg.jp/kikaku/keikaku/documents/tokusei.pdf>), p171
- 4) 指原信廣:酸性条件下で受けるストレス・損傷に対する細菌の挙動とその制御, 日本食品微生物学会雑誌, 26, pp81-85, (2009)
- 5) 松田敏生 他:有機酸類の抗菌作用-各種 pH における最小発育阻止濃度の検討, 日本食品科学工学会誌, 41, pp687-701, (1994)
- 6) 伏見洋行:伝統食品の科学-ルーツ、おいしさ、機能-5 納豆の歴史と機能成分, 日本味と匂学会誌, 14, pp132-134, (2007)
- 7) 林宣明 他:野菜飲料の有機酸の静菌効果および官能評価, 日本食品科学工学会誌, 58, p493, (2011)

- 8) 阪上末治:『抗菌のすべて-ヘルスケアとメディカル・食品衛生・繊維・プラスチック・金属への展開-』,
(株式会社繊維社, 1997), p123
- 9) 株式会社東レリサーチセンター調査研究部門:『抗菌・防カビ技術-抗菌・防カビ剤とその応用展開の
全容-』, (株式会社東レリサーチセンター, 2004), p42-43

[受理 平成 27 年 3 月 24 日]



大澤 敏
教授
バイオ・化学部
バイオ・化学系 応用化学科



西澤康平
バイオ・化学部
応用化学科



吉村 治
教授
バイオ・化学部
バイオ・化学系 応用化学科



伊崎奈津美
バイオ・化学部
応用バイオ学科



小田 忍
教授
バイオ・化学部
バイオ・化学系 応用バイオ学科



宮崎 優
バイオ・化学部
応用バイオ学科



真田龍大
工学研究科
バイオ・化学専攻