

異分野融合・材料横断による生体医療材料研究

医療器具用金属材料における 抗菌表面処理技術の研究開発 -ナノピラー形成による抗菌機能化—

平野満大*大津直史**

1. はじめに

世界的に高齢化が進行しており,2050年での60歳以上人 口は世界人口の20%に到達すると予想されている⁽¹⁾.加齢 による生体機能の衰退に伴い,循環器や関節に関わる様々な 疾患の発症リスクが高まっていく.このため,健康寿命のさ らなる延伸が重要となるが,近年では体内埋植型医療器具を 用いた治療法が発展し,その有効性から治療件数も増加して いる.医療器具には力学的安全性が求められるため,機械的 強度および破壊靭性が高い金属材料が主に採用されてい る⁽²⁾.特にTiおよびその合金は化学的安定性が高いことも 相まって,ステント,ペースメーカー,人工関節などで臨床 応用されている⁽³⁾.また,埋め込み時の外科手術で必須とな るメスや鉗子,ピンセットなどの手術器具にはステンレス鋼 が用いられており⁽²⁾,様々な金属材料が近代医療を支えてい る.

一方で,外科手術中での細菌混入,それに伴う手術部位感 染症が長年の課題となっている⁽⁴⁾⁽⁵⁾.空気中には細菌が浮遊 し,また術者や患者の皮膚表面にも常在菌が細菌叢を形成し ている.このため,体内埋植型医療器具ならびに手術器具は 常に細菌付着のリスクに曝されており,完全に防止すること は極めて困難である⁽⁶⁾⁽⁷⁾.器具を介して体内に細菌が侵入す ると徐々に増殖し,ある一定数に達するとクオラムセンシン グにより多糖性物質を一斉に排出することでバイオフィルを 形成する⁽⁸⁾(図1).最終的にバイオフィルムから細菌が分散 することで感染部位が拡大し,感染症の発症に至る.ここで 注意すべきは,バイオフィルムは外部刺激から細菌を保護す る防壁となるため,治療で用いる抗菌薬の作用を著しく阻害



| 技術 // 増加 // ワオ フムセンシンワ // ハイオ フィルム形成

図1 病原性細菌によるバイオフィルムの形成過程(文献(8) を改変).(オンラインカラー)

する⁽⁸⁾. さらに,抗生物質に耐性を獲得した薬剤耐性菌が年 々増加しており⁽⁹⁾,今後より一層の感染症の難治化,慢性化 が危惧される.このため,感染症予防では発症の起点となる 細菌付着および増殖を器具表面で早期に抑制することが最も 重要となる.

本稿では,医療器具用金属材料の抗菌表面処理技術につい て概説する.細菌付着および増殖を抑制する材料表面の設計 方針を述べ,近年新たに注目されている表面処理技術を著者 の研究も交えて紹介する.

2. 表面処理による抗菌機能化の方針

表面処理は材料表面の組成や構造などを変化させることで 新たな機能性を付与することが可能である.表面処理が材料 自体の機械的特性に与える影響は極めて小さいため,力学的 安全性が要求される医療器具用金属材料の抗菌機能化では有 効な手法となる.図2に抗菌表面処理による表面設計の方針 についてまとめた.本分野では,抗菌メカニズムによって化 学的手法と物理的手法に大別される⁽¹⁰⁾.

*** 北見工業大学;教授 Antibacterial Surface Treatment for Metallic Material Applied to Medical Devices~Antibacterial Functionalization via Fabrication of Nanopillar~; Mitsuhiro Hirano* and Naofumi Ohtsu**(*Faculty of Engineering and Design, Kagawa University, Takamatsu. **Faculty of Engineering, Kitami Institute of Technology, Kitami Institute of Technology, Kitami) Keywords: antibacterial surface treatment, nanopillar, surgical site infection, titanium, stainless steel, plasma etching 2022年6月30日受理[doi:10.2320/materia.61.755]

^{*} 香川大学; 助教(〒761-0396 高松市林町2217番地20)



(1) 化学的手法

化学的手法は本分野における従来法であり,表面処理層は 手法により[1]細菌付着抑制性, [2]接触殺菌性, [3]抗菌剤 徐放性を発揮する(10).細菌付着抑制および接触殺菌では, ポリマーや抗菌ペプチドなどをコーティングすることで細 菌-材料間における付着力の減衰や細胞膜の機能阻害により 抗菌性が発揮される(11)(12).しかし、コーティング膜の密着 性や生体環境下での化学的安定性が乏しいことから、定常的 に抗菌性を発揮することが難しい. 一方で, 抗菌剤徐放では 表面処理層に担持または内包された抗菌剤が放出され、細菌 と化学的に作用することで抗菌性が発揮される. 近年では薬 剤耐性菌の拡大防止の観点から抗生物質の使用が制限されて いるため,抗菌金属が活用されている. Ag, Cu, Zn などが 抗菌金属として知られているが、特に Ag は抗菌スペクトル が広く、感染症の原因となる表皮ブドウ球菌や緑膿菌などの 増殖を抑制することができる⁽¹³⁾. Agは表面処理層から Ag+として放出され、細菌内部の代謝酵素や DNA と化学 反応することで生命活動を阻害し、抗菌性を発揮する(14). しかし, 高濃度の Ag+ は生体組織に対しても毒性を示すた め、徐放量および速度の最適化が課題である(15). さらに、 民生分野でのAgの使用頻度急増に伴いAg耐性菌の拡大が 懸念され、実際に耐性菌の分離報告件数は増えつつある(16).

(2) 物理的手法

対して、物理的手法では材料表面に特異的なナノスケール の表面構造(ナノ表面構造)を設けることで細菌の付着および 増殖を抑制する.ナノ表面構造による抗菌性は、10年前に Ivanova らの研究チームがセミの翅から初めて発見し、細菌 の細胞膜とナノ表面構造の間に作用する物理現象に基づくこ とを見出した⁽¹⁷⁾.セミの翅表面には高さ数百ナノメートル の突起物(ナノピラー)が密集して垂直に林立している.細菌 が翅表面に付着すると自重によりナノピラーが深く差し込ま れ、細胞膜は徐々に引き伸ばされていく.弾性限界に到達す ると細胞膜が破裂し、細菌内部から細胞質が流出することで 細菌が死滅する(図3).また、ナノピラーとの接触で物理的 刺激を感受すると細菌内部で活性酸素種(Reactive Oxygen



Species: ROS)が生成されるため, DNA や細胞膜が酸化損 傷を受け,代謝機能が阻害される⁽¹⁸⁾.抗菌メカニズムは現 在も議論されているが,これらの現象が競合していると考え られており,いずれもナノピラーとの物理的な接触に起因し ていることから新たな抗菌性として学術的に定義された.ま た,セミ以外にもトンボの翅やヤモリの皮膚でも同様の現象 が確認されている⁽¹⁹⁾.注目すべきは,抗菌剤を全く必要と せず,接触から最短5分後に細菌が死滅し始めるため即効 性に優れる点である⁽¹⁷⁾.

3. 医療器具用金属材料表面へのナノピラー形成技術

上述した物理現象に起因する抗菌性は手術部位感染症およ び薬剤耐性菌の拡大防止策として有望視されている.近年で は生物表面のナノピラーを人工的に再現する表面処理技術が 研究されており、ウェットプロセスおよびドライプロセスの 両方面で検討されている.本章では、医療器具用金属材料で ある Ti およびステンレス鋼を対象とした抗菌性ナノピラー 形成技術について概説する.

(1) ウェットプロセス

ウェットプロセスは液相で材料表面に生じる化学反応を利用した表面処理法である.ナノピラーの形成ではアルカリ溶液を用いた水熱処理が挙げられ,Tiおよびその合金に応用されている.Ti材料を NaOH または KOH 溶液に浸漬し,密閉容器内で高温高圧処理するとチタン酸化合物で構成されたナノ表面構造を形成する.後処理として HCl 溶液に浸漬することで層内のアルカリ金属イオンを H⁺ と置換し,大気中で熱処理することで TiO₂ ナノピラーが等方的に形成される⁽²⁰⁾⁽²¹⁾.実際に Cao らは水熱処理で形成した TiO₂ ナノピラーが表皮ブドウ球菌の細胞膜を物理的に変形し,抗菌性を発揮することを実証している⁽²²⁾.

(2) ドライプロセス

ドライプロセスは真空下において気相での化学反応または 物理的な相互作用を利用した表面処理法であり、斜入射スパ ッタリング法およびプラズマエッチング法が研究されている.

(a) 斜入射スパッタリング法

斜入射スパッタリング法は基板を大きく斜めに傾けた状態 でスパッタ原子を堆積することで、三次構造を形成する手法 である.通常のスパッタリング法ではターゲットと基板を並 行に設置し、均一な膜を得ることができる.対して、斜入射 スパッタリング法では島状の安定核が一定の大きさになるま で成長すると、島自身によってスパッタ原子の堆積が遮蔽さ れる自己遮蔽効果が生じる.このため、スパッタ原子の堆積 箇所および成長方向が限定され、最終的に構造物が形成され る⁽²³⁾.この手法により、Ziegler らは Ti-6Al-4V 合金表面 に Ti ナノピラーを, Bobaru らはステンレス鋼表面に SUS301鋼で構成されたナノピラーを形成し、大腸菌に対し て抗菌性を示すことを報告している⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾.

(b) プラズマエッチング法

プラズマエッチング法では材料をプラズマに曝し、活性種 のエッチング作用によりナノピラーを形成する.処理工程が 単純であり、垂直に林立したナノピラーを再現できることか ら、本分野では最も報告件数が多い⁽¹⁹⁾. Tiへのナノピラー 形成では、Cl₂ガスを用いた反応性イオンエッチング(Reactive Ion Etching: RIE)が検討されている. Cl₂ガスを高周波 放電することで発生したプラズマには Cl2 または Cl 原子が 含まれている. Ti表面との化学反応に伴い揮発性の高い TiCl₄またはTiCl₂が生成することでエッチングが進行 し⁽²⁶⁾, 最終的に TiO₂ ナノピラーの形成に至る. また, RIE の処理時間, Cl₂のガス流量, 放電時の印加電力など処理条 件を調整することで、ナノピラーの形状制御が可能であ 症の原因菌である緑膿菌および黄色ブドウ球菌に対して抗菌 性を示すことを実証している(28).しかし、金属塩化物は一 般的に蒸気圧が高いため⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾,医療器具用金属材料におい て RIE の適用対象は Ti に限定される.

Ar プラズマエッチング法を活用したナノピラー 形成によるステンレス鋼の抗菌機能化

一方で、Ar ガスを用いたプラズマエッチング法でもナノ ピラーの形成が可能である.プラズマ中では、Ar+が材料 表面に衝突することで原子が物理的に弾き出されるスパッタ リング現象が生じ、金属材料表面でナノスケールまたはマイ クロスケールの突起物が点在して形成されることは古くから 知られていた⁽³¹⁾⁻⁽³³⁾.著者らはこの現象に着目し、高いバ イアス電圧(イオンの入射エネルギー)が得られる直流放電を 利用した Ar プラズマエッチング法により、ナノピラーを密 集して形成させることで、ステンレス鋼の抗菌機能化に成功 した.以降はこれまでの研究成果について紹介する.

図4にArプラズマエッチングにて10から60min処理したSUS316鋼表面のSEM像を示す⁽³⁴⁾.なお,プラズマエ ッチングはArガス圧力300Pa,定電流0.10Aの条件で実施した.10min処理した表面では直径数百nmの球状突起物が点在していたが,時間経過に伴い円錐状に変化していき,最終的に60minでは表面全体が柱状物で覆われた.これらの表面観察から,直流放電を採用したArプラズマエッ チングによりSUS316鋼表面にナノピラーを密集して形成できることを明らかにした.一連の表面形態の変化から,ナノ ピラーの形成過程を下記の様に予想される.Ar+の衝突に伴い基板表面の温度が上昇することで球状炭化クロムが析出する.炭化物はエッチングの遮蔽物となるため,周りの素地部分が優先的にエッチングされ,ナノピラーの形成に至ったと考えられる.



図 4 Ar プラズマエッチングした SUS316表面の FE-SEM 像: (a), (b) 10 min, (c), (d) 30 min, (e), (f) 60 min (文献(34)を改変).



図5 Ar プラズマエッチングした (a), (c) SUS316L および (b), (d) SUS410S 表面の FE-SEM 像: (a), (b) 10 min, (c), (d) 60 min(文献(35)を改変).





また、様々な鋼種のステンレス鋼をArプラズマエッチン グすると、興味深いことに鋼種ごとに特徴のあるナノピラー が形成した⁽³⁵⁾. 一例として、図5にSUS316L鋼および SUS410S鋼のSEM像を示す.SUS316鋼と比較すると、 SUS316L鋼ではナノピラーの寸法および本数が全体的に減 少したが、SUS410S鋼では細長い形状のナノピラーが形成 し、本数も増加傾向を示した(図5(c)(d)).エッチングの初 期段階を観察すると、球状突起物の形成状態が鋼種によって 異なることも併せて確認できた(図5(a)(b)).これは、合金 組成および結晶構造が炭化物の析出挙動に影響を及ぼしたた め、ナノピラーの寸法および形状が変化したと考えられる.

SUS316鋼表面に形成されたナノピラー(図4(c),(f))に対 し,JIS Z 2801に規格されたフィルム密着法にて抗菌性を 評価した.試験菌にはグラム陰性菌である大腸菌およびグラ ム陽性菌である表皮ブドウ球菌を用いている.細菌を含む懸 濁液を評価試料に滴下し,35℃で4h培養後,試料表面の生 菌数を計測した.図6に各試料表面で4h培養後の細菌生存 率を示す⁽³⁴⁾.ここで,生存率は4h培養後における試料上



図7 (a), (c) 未処理および (b), (d) Ar プラズマエッチング した SUS316鋼表面に接着した大腸菌 (a), (b) および 表皮ブドウ球菌 (c), (d) の FE-SEM 像(文献(34)を改 変).

の生菌数を懸濁液滴下直後の生菌数で除し、100を乗するこ とで算出した.即ち、生存率が100%より大きければ細菌が 4h後に増加し, 逆に小さければ減少したことを意味する. エッチング表面での大腸菌生存率は10%未満であったが、 表皮ブドウ球菌生存率は約80%であった.故に、形成され たナノピラーは大腸菌, 表皮ブドウ球菌に抗菌性を示すが, その程度は細菌種に依存する.次に,抗菌性発現の要因を明 らかにするために細菌の形態観察を行った. 図7にナノピラ ーに付着した大腸菌および表皮ブドウ球菌の SEM 像を示 す⁽³⁴⁾. 大腸菌はナノピラーによって引き伸ばされていた が、表皮ブドウ球菌では顕著な形態変化は観察できなかった (図7(c)(d)). この観察結果から, SUS316鋼に形成された ナノピラーの抗菌性は、生物の表面構造と同様に細菌の形態 変化に伴う細胞膜の物理的損傷が要因であることを示唆す る. それ故に、大腸菌と比較して形態変化が乏しい表皮ブド ウ球菌では抗菌性が減衰したと考えられる.

5. おわりに

本稿では、医療器具用金属材料の抗菌表面処理,特にナノ ピラーの形成による抗菌機能化ついて概説した.抗菌性ナノ ピラー形成技術は感染症や薬剤耐性菌の拡大防止に有望であ るが、医療現場での応用には解決すべき課題は多々ある.第 ーに感染症の原因菌上位であるグラム陽性菌に対する抗菌性 の増強が必須であり、ナノピラーの抗菌性はその形状や配列 に依存するため⁽¹⁹⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾、表面構造の最適化,それを実現 する表面処理技術のさらなる開発が不可欠となる.また、ナ ノピラーは軽く触れただけで破壊されるため、実用化にはナ ノピラーの強度向上も重要となる.一方で、ナノピラーは細 菌のみならずカビやウイルスにも抑制効果を発揮するた め⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾、表面構造の最適化により病原性微生物全般を抑制 できる可能性を秘めている.近年の SARS-CoV-2 など新型 感染症に対する特効薬の開発には長期間を要しているなか, ナノピラー形成に基づく抗菌機能化は今後の新興感染症の発 生防止への寄与が期待され,今後より一層の発展が望まれる.

文 献

- (1) V. Fuster: J. Am. Coll. Cardiol., 69(2017), 3002-3005.
- (2) Q. Chen and G. A. Thouas: Mater. Sci. Eng. R Rep., 87 (2015), 1–57.
- (3) G. Manivasagam, D. Dhinasekaran and A. Rajamanickam: Recent Patent. Corros. Sci., 2(2010), 40–54.
- (4) J. S. VanEpps and J. G. Younger: Shock, 46(2016), 597-608.
- (5) L. H. Hitchman, G. E. Smith and I. C. Chetter: Surgery, 37 (2019), 38–44.
- (6) Y. Cai, K. Xu, W. Hou, Z. Yang ang P. Xu: Int. J. Surg., 39 (2017), 221–228.
- (7) S. Sadrizadeh, A. Aganovic, A. Bogdan, C. Wang, A. Afshari, A. Hartmann, C. Croitoru, A. Khan, M. Kriegel, M. Lind, Z. Liu, A. Melikov, J. Mo, H. Rotheudt, R. Yao, Y. Zhang, O. Abouali, H. Langvatn, O. Skoldenberg and G. Cao: J. Build. Eng., 40(2021), 102693.
- (8) B. F. Ricciardi, G. Muthukrishnan, E. Masters, M. Ninomiya, C. C. Lee and E. M. Schwarz: Curr. Rev. Musculoskelet. Med., 11 (2018), 389–400.
- (9) C.-C. Lai, S.-Y. Chen, W.-C. Ko and P.-R. Hsueh: Int. J. Antimicrob., 57 (2021), 106324.
- (10) A. Uneputty, A. Davila-Lezama, D. Garibo, A. Oknianska, N. Bogdanchikova, J. F. Hernández–Sánchez and A. Susarrey– Arce: Colloids Interface Sci. Commun., 46 (2022), 100560.
- (11) S. Gon, K.-N. Kumar, K. Nüsslein and M. M. Santore: Macromolecules, 45 (2012), 8373–8381.
- (12) A. A. Bahar and D. Ren: Pharmaceuticals, 6(2013), 1543– 1575.
- (13) D. Sun, M. B. Shahzad, M. Li, G. Wang and D. Xu: Mater. Technol., **30**(2015), B90–B95.
- (14) M. Godoy–Gallardo, U. Eckhard, L. M. Delgado, Y. J. D. deRooPuente, M. Hoyos–Nogués, F. J. Gil and R. A. Perez: Bioact. Mater., 6(2021), 4470–4490.
- (15) M. Shimabukuro: Antibiotics, 9(2020), 716.
- (16) O. McNeilly, R. Mann, M. Hamidian and C. Gunawan: Front. Microbiol., 12(2021), 652863.
- (17) E. P. Ivanova, J. Hasan, H. K. Webb, V. K. Truong, G. S. Watson, J. A. Watson, V. A. Baulin, S. Pogodin, J. Y. Wang, M. J. Tobin, C. Löbbe and R. J. Crawford: small, 8(2012), 2489–2494.
- (18) J. Jenkins, J. Mantell, C. Neal, A. Gholinia, P. Verkade, A. H. Nobbs and B. Su: Nat. Commun., 11 (2020), 1626.
- (19) D. Chopra, K. Gulati and S. Ivanovski: Mater. Today Adv., 12 (2021), 100176.
- (20) R. Yoshida, Y. Suzuki and S. Yoshikawa: J Solid State. Chem., 178(2005), 2179–2185.
- (21) A. R. Armstrong, G. Armstrong, J. Canales and P. G. Bruce: Nanomaterials, 43(2004), 2286–2288.

- (22) Y. Cao, B. Su, S. Chinnaraj, S. Jana, L. Bowen, S. Charlton, P. Duan, N. S. Jakubovics and J. Chen: Sci. Rep., 8 (2018), 1071.
- (23) K. Robbie, J. C. Sit and M. J. Brett: J. Vac. Sci. Technol. B, 16 (1998), 1115–1122.
- (24) N. Ziegler, C. Sengstock, V. Mai, T. A. Schildhauer, M. Köller and A. Ludwig: nanomaterials, 9(2019), 60.
- (25) S. Bobaru, V. Rico-Gavira, A. García-Valenzuela, C. López-Santos and A. R. González-Elipe: Mater. Today Commun., 31 (2022), 103266.
- (26) E. R. Parker, B. J. Thibeault, M. F. Aimi, M. P. Rao and N. C. MacDonald: J. Electrochem. Soc., **152**(2005), C675–C683.
- (27) M. Ganjian, K. Modaresifar, H. Zhang, P.-L. Hagedoorn, L. E. Fratila-Apachitei and A. A. Zadpoor: Sci. Rep., 9(2019), 18815.
- (28) J. Hasan, S. Jain and K. Chatterjee: Sci. Rep., 7(2017), 41118.
- (29) H. P. Nielsena, F. J. Frandsena, K. Dam–Johansena and L. L. Baxter: Prog. Energy Combust. Sci., 26 (2000), 283–298.
- (30) J. Liu, J. Chen and L. Huang: Sci. Rep., 5(2015), 17270.
- (31) M. Tanemura and F. Okuyama: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B, 47 (1990), 126–132.
- (32) A. Rizk, S. K. Habib and N. S. Rizk: J. Mater. Sci., 24(1989), 2408–2414.
- (33) 張 清廉, 王 栄光, 加藤昌彦, 中佐啓治郎: 日本金属学会 誌, 69(2005), 312-319.
- (34) M. Hirano, M. Hashimoto, K. Miura and N. Ohtsu: Surf. Coat. Technol., 406 (2021), 126680.
- (35) M. Hirano, S. Takeda and N. Ohtsu: Mater. Chem. Phys., 272 (2021), 125054.
- (36) E. P. Ivanova, D. P. Linklater, A. Aburto-Medina, P. Le, V. A. Baulin, H. K. D. Nguyen, R. Curtain, E. Hanssen, G. Gervinskas, S. H. Ng, V. K. Truong, P. Luque, G. Ramm, H. A. B. Wösten, R. J. Crawford, S. Juodkazis and S. Maclaughlin: J. Colloid Interface Sci., **603**(2021), 886–897.
- (37) J. Hasan, Y. Xu, T. Yarlagadda, M. Schuetz, K. Spann and P. K. D. V. Yarlagadda: ACS Biomater. Sci. Eng., 6(2020), 3608– 3618.

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★ 平野満大

- 2021年3月 北見工業大学大学院工学研究科博士課程修了
- 2021年4月 大阪産業技術研究所研究員
- 2022年4月-現職
- 専門分野:金属材料表面工学



大津直史



平野満大