HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Bactericidal effect of cationic hydrogels prepared from hydrophilic polymers [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 柴田, 優輝 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 甲第14215号 |
| Issue Date | 2020-09-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/79554 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Yuki_Shibata_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏 名　柴 田 優 輝

## 学 位 論 文 題 名

Bactericidal effect of cationic hydrogels prepared from hydrophilic polymers
（親水性高分子から調製したカチオン性ハイドロゲルの殺菌効果に関する研究）

ハイドロゲルは親水性ポリマーが高分子網目を形成した高分子材料である。ハイドロゲルは構成するポリマーの特性に依存して様々な物性や電荷などを示す。柔軟かつ高含水という特性のハイドロゲルは生体組織ととても類似した性質のため、一般的にコンタクトレンズや吸水剤、保冷剤として利用されるほか、現在では人工関節などの人工代替材料としての応用が考えられ研究されている。しかしハイドロゲルはその特性上多湿環境で利用されることが多く、ハイドロゲル上で菌が増殖し汚染される可能性が高い。菌に汚染された材料を医療機器や食品関係に感染症や食中毒などのリスクを伴うため、材料を殺菌処理するもしくは材料そのものに殺菌効果を付与することは極めて重要である。

現在までに殺菌効果を持つ材料が多く発見されており、そのメカニズムも多種多様である。殺菌メカニズムは大きく２つに分けられる。一つは殺菌剤が菌内に入り、菌の代謝を阻害して殺菌するメカニズム。一般的に知られている殺菌剤としてペニシリンが挙げられる。ペニシリンは菌が細胞壁を構成するペプチドグリカンを作る酵素(PBP)と結合しその機能を阻害する。結果菌は細胞壁を作れなくなり次第に細胞壁が薄くなる。菌内の細胞質と外液との浸透圧により菌は膨張し最終的に溶菌する。もう一つは物理的な作用で菌の細胞膜に穴を開けて殺菌するメカニズムである。代表的な例として近年セミの羽の表面に存在する nano サイズのピラーが挙げられる。このピラーに菌が接触すると次第にピラーが菌に食い込み、最終的に細胞膜が破れて菌が死滅する。

菌内で代謝を阻害する殺菌剤を多用すると菌が薬剤に対して耐性を獲得してしまうリスクがある。実際にペニシリンに対して耐性を獲得した菌としてペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)が挙げられる。PRSP はペニシリンの標的であるペニシリン結合タンパクが変異しているためペニシリンが機能しない。このように薬剤耐性菌は薬剤の標的タンパクを変異するもしくは薬剤そのものを排出するポンプ作り排出することで薬剤を無効化してしまう。薬剤耐性菌に感染した場合、治療が困難となり重症化し死亡するリスクが高まる。一方で nano ピラーのような物理的な殺菌メカニズムは菌がこのような耐性を持つことがないというメリットがあり注目されている。

本研究ではビグアニド系殺菌剤という菌内に入らず細胞膜に直接作用する殺菌機構に着目した。ビグアニド系殺菌剤はカチオン性電荷を持っており、それが菌の細胞膜のアニオン性電荷部位に多点でイオン結合する。ビグアニド系殺菌剤に結合された細胞膜を構成する分子は流動性が失われる。その部位は次第にドメインを形成したのち、細胞膜から離れる。この部位から細胞質が漏れ出し,最終的には細菌が死滅するといわれている。

現在ハイドロゲルが実用化されるにつれて、ハイドロゲルに殺菌性を付与する実験が多く行われてきた。銀イオンやキチンなど殺菌効果を持つことが知られている物質を新たにハイドロゲルに組み込むことで、ハイドロゲルに殺菌性を付与する方法が研究されている。

しかしこの論文では殺菌効果がすでに知られている材料をハイドロゲルに加えるのではなく、

カチオン性ハイドロゲルそのものがビクアニド殺菌剤のような殺菌機構を示すと考え、それらの殺菌効果を調べた。さらにこの殺菌効果が主鎖となるポリマーに多くのカチオン基が固定されている親水性カチオン性ハイドロゲルにもあてはまると考え殺菌試験を行った。さらにカチオン性ハイドロゲルの殺菌効果がハイドロゲルのどの物性に起因しているものか調べ、その殺菌機構をハイドロゲルの物性という従来にない観点から考察した。

この研究により親水性カチオンハイドロゲルはすでに殺菌部位がポリマーに固定されている材料から作られているため、調製が簡便でさらに徐放性殺菌剤を含まない環境に優しい材料であり、医療や従来の殺菌剤が使用できないセンシティブな環境での応用が期待される。

第1章では本研究の背景と目的、そして章ごとの実験内容及び結果を概説し、本論分への導入とする。

第2章では、本研究で用いたハイドロゲルの合成方法やそれらの組成、殺菌試験に用いた菌の種類と培養方法、そして殺菌試験の方法について記した。

第3章で、はじめにカチオン性ハイドロゲルの殺菌時間を調べるため、ハイドロゲル上に菌を播種し、菌の生死を time laps 観察した。観察前にハイドロゲルに生きている菌を染色できる蛍光色素 (SYTO-9) と死んでいる菌を染色する蛍光色素(Propidium iodide)を含ませることで、顕微鏡観察した際、菌の生死を判別できるようにした。インキュベーター付属の蛍光顕微鏡でハイドロゲル表面の一箇所を time-laps 観察し、経過時間毎の菌の生存率を算出して生存曲線を作成した。実験のネガティブコントロールとして寒天を用意した。その結果カチオン性ハイドロゲルには長時間菌と接触することで殺菌効果を示すことが明らかになった。

第4章では次にカチオン性ハイドロゲルと中性ハイドロゲル、寒天の３種類の基盤を用意し、その上に菌を播種した。一定時間インキュベーター内で静置してから顕微鏡観察し菌の生存率を算出した。またサンプル間で生存率に差があるか比較することでカチオン性ハイドロゲルの殺菌効果について評価した。次に、経時観察で観察された殺菌効果が PDMAPAA－Q ゲルに特有であるかどうかを明らかにするために、異なるモノマー種を有するいくつかのカチオン性ハイドロゲル(架橋剤濃度:6mol%)を調製し、それらのハイドロゲルで同じ殺菌試験を行った。その結果カチオン性ハイドロゲルがそれらの化学構造が異なるにもかかわらず、高い殺菌活性を示すことを示すことが明らかになった。

第5章ではカチオン性ハイドロゲルのどの要因が殺菌効果と関係があるのか論じている。
中性モノマーとカチオン性モノマーからコンポジットハイドロゲルを作製し殺菌試験に用いた。ハイドロゲルを構成するカチオン性モノマーの割合と架橋剤の濃度を調整して、異なる物理化学的性質を有するハイドロゲルを調製した。本論文では初期弾性率、単位面積当たりのモノマー面密度、含水率に着目し菌の死亡率との相関関係を調べた。結果、単位面積当たりのモノマー面密度と強い相関があることが明らかになった。

第6章で、カチオン性ハイドロゲルの殺菌機構をハイドロゲルの弾性エネルギーが細胞膜を破壊するという従来にない観点から考察した。筆者はイオン性相互作用により吸着した菌の細胞膜に、ハイドロゲルの変形領域で蓄えられた弾性エネルギーがかかり、それが細胞膜の脂質二分子膜構造を維持する界面張力を超えた時カチオン性ハイドロゲルは細胞膜を破壊して殺菌すると考えた。実際にこれらの値を計算し比較したところ、菌とカチオン性ハイドロゲルの接着面積が広くなるほど合理的な小さな歪で弾性エネルギーは増大し、細胞膜の界面張力を上回ることが明らかになった。これらのことからカチオン性ハイドロゲルはイオン性相互作用により菌と広い領域で接触し、そこに生じる弾性エネルギーで細胞膜を破壊しているのではないかと考えられる。
第7章では、これら成果の総括を述べる。