HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酸化グラフェン超薄膜の導入による抗菌剤の基材定着性の向上
Author(s)	宮治, 裕史; 西田, 絵利香; 郷田, 隼 他
Citation	バイオマテリアル : 生体材料, 43(2), 152-157
Issue Date	2025-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96045
Type	journal article
File Information	2025_miyaji_biomaterial.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

酸化グラフェン超薄膜の導入による抗菌剤の基材定着性の向上

Enhancement of Substrate Adhesion of Antimicrobial Agents through the Introduction of Graphene Oxide Ultrathin Films.

著者らは，酸化グラフェン（GO）超薄膜を活用した抗菌剤の基材定着性向上と，湿潤環境下でも長期間安定した抗菌効果を発揮する簡便なコーティング法を新たに開発した．この方法では，GO の酸素官能基とカチオン性界面活性剤（CSAA）との相互作用により，CSAA が基材に強固に定着し，洗浄後も流出せずに抗菌効果が持続する．またこのコーティングは透明であり，基材の色合いを損なうことなく効果を保つことができる．さらに歯基材への応用も容易で，口腔内細菌に対して優れた抗菌性を示し，口腔感染症の治療および予防において臨床応用できる可能性がある．
キーワード：酸化グラフェン，界面活性剤，口腔感染症，細胞親和性，口腔ケア

宮治　裕史* Hirofumi Miyaji
北海道大学大学院歯学研究院口腔総合治療学教室
General Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University

西田絵利香 Erika Nishida
北海道大学大学院歯学研究院口腔総合治療学教室
General Dentistry, Faculty of Dental Medicine,　Hokkaido University

郷田　　隼 Syun Gohda
株式会社日本触媒，コーポレート研究本部・研究センター
Nippon Shokubai Co., Ltd

川崎　英也 Hideya Kawasaki
関西大学化学生命工学部界面化学研究室
Colloid and Surface Chemistry laboratory, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

1.　はじめに

口腔感染症，特に歯周病やう蝕は重症化すると歯を失う原因となり，生活の質（Quality of Life）を大きく低下させる．それは，私たちの健康寿命を縮め日常生活に深刻な影響を与えることになる．特に高齢者においては，唾液の分泌量が減少し，口腔内の自浄作用が低下するばかりでなく，身体機能や認知機能の低下が進み口腔ケアが困難になることが多い．この

ため，口腔ケアの補助として抗菌効果を持つ口腔洗口剤の使用が求められる．しかし，従来の洗口剤に含まれるカチオン性界面活性剤（CSAA）や抗菌性有機化合物は，歯面に強固に付着することができず，飲水や唾液によって容易に洗い流されるため，洗口後に長時間の抗菌効果が期待できない．こうした背景から，筆者らはナノカーボン材料である酸化グラフェン（graphene oxide；GO）の超薄膜を用い，抗菌剤の基材定着性を向上させ，湿潤環境でも長時間安定して抗菌効果を発揮する新たなコーティング技術を開発した[1)]．

2. GO の特性

GO は，黒鉛（グラファイト）を強力な酸化剤と超音波処理によって層間剥離し得られるナノ炭素材料である[2)]．厚さ約 1nm，シート長が数ミクロンから数十ミクロンであり，極めて高いアスペクト比を持ち驚異的な特性を引き出す．酸化処理によって，GO の表面にはエポキシ基，ヒドロキシル基，カルボキシル基など，多様な酸素含有官能基が導入され（図 1A），これにより水に優れた分散性を示し，さまざまな分子との強力な相互作用が可能となる．GO の分散液に CSAA の一種である塩化ベンザルコニウム（BAC）を加えると，一瞬で凝集が起こる（図 1B 矢印）．また，ファンデルワールス力やイオン相互作用といった表面間相互作用が強力に働き，さまざまな基材面に対して優れた接着性を発揮する．

3. GO/CSAA コーティングの施工方法

GO の超薄膜表面に CSAA を定着させる抗菌コーティング施工方法は簡便であり，特別な機器を必要としない．施工手順を模式図（図 2A）に示す．まず基材に GO 分散液を滴下塗布し，その後乾燥させることで GO と基材の間の水分を除去する．次に水洗を行い，基材上に残る余剰な GO を除去する．GO 処理後のガラス基材の肉眼所見（図 2B）を示すと，コーティングの有無による外観の変化は見られず，GO コーティング後の光透過率は 99%以上（検出限界以上）であり，基材の色調を損なうことなくコーティングが施されたことが確認された．カーボン系材料は一般的に黒変する印象があるが，GO コーティングは高い透明性を維持する点が特筆すべき利点である．

電子顕微鏡像（図 2C 上段）では，水洗後も基材上に残留した単層 GO（黒色）が観察され，基材の GO 被覆率は約 80%であった．次に GO コーティング面に CSAA 水溶液を滴下塗布し CSAA を定着させた後，再度水洗し施工を完了する．CSAA の一種である塩化セチルピリジニウム（CPC）を滴下・水洗後の基材表面の SEM 像（図 2C 下段）を観察すると，GO 超薄膜は基材上に維持され，被覆率は約 77%であった．これにより，CSAA 処理を施しても GO と基材の接着性が高く剥離が生じないことが示された．さらに，ラマン分光分析の結果，GO および GO/CPC の両者において GO 特有の G バンド（1600 cm^{-1}，赤線）および D バンド（1350 cm^{-1}，青線）が確認され，基材への GO の付着が示唆された（図 2D）．

4. GO/CSAA コーティングの元素分析および接触角評価

図 3A は，GO 処理を施していない基材（UNT）および GO 超薄膜コーティングを施した石英基材に，BAC，CPC，塩化ベンゼトニウム（BZC）を滴下塗布した後，水洗した各基材表面の X 線光電子分光法による元素分析結果を示している．C1s スペクトルの評価では，GO 処理基材において酸素官能基によるピークシフトが観察され，GO の化学的特徴が明確に反映されていることがわかる．また，N1s スペクトルでは，CSAA 単独で処理した基材表面では基材と同様にピークは検出されなかった．これは，CSAA を単独で塗布・水洗した場合，基材表面にほとんど残留せず，水洗によって除去されたことを示唆している．一方，GO 超薄膜コーティング後に CSAA 処理を行うと，いずれの CSAA でも四級アンモニウム構造が検出され，GO の存在が CSAA の基材定着性を向上させることが明らかとなった．この定着性の向上は，基材表面の接触角測定（図 3B）でも観察された．石英基材およびポリエチレンテレフタレート（PET）基材における接触角を測定した結果，GO 超薄膜コーティングした基材は，もともとの疎水性から超親水性へと変化した．さらに BAC を塗布し水洗すると，接触角が再び増加し疎水性に戻ることが示された．これは，GO 超薄膜上に BAC が定着したことを示唆している．

GO との相互作用が強い石英基材では，GO 分散液を滴下し乾燥させるだけで GO が容易に付着する．一方，PET のような疎水性の強い基材では，水性の GO 分散液が弾かれるため，高濃度に調整したペースト状の GO 分散液を塗布し，十分に乾燥させて水分を飛ばすことで GO を密着させることが可能となった．この方法により，強い疎水性基材にも透明な GO コーティングを形成できる．

5. GO/CSAA による抗菌コーティングのメカニズム

図 4 に GO と CSAA による抗菌コーティングのメカニズムを示す．本施工で使用する GO は，脱プロトン化により表面に豊富なアニオン性官能基を持つ「GO アニオン」として存在する．これを基材に塗布し，乾燥させることで，基材と GO の間の水分が蒸発し，強い表面間相互作用によって GO が基材に接着する．その後，水洗によって余剰な GO を除去するが，基材と直接接触している GO は強固な相互作用によって保持され，脱落しない．

次に，GO コーティング面に CSAA を付着させる．プロセスは極めて簡便であり，CSAA 溶液を塗布するだけで GO と CSAA の複合体が形成される．GO には酸素官能基が豊富に残留しており，アニオン-カチオン相互作用により，CSAA と強固に結びつく．このため，水洗後も GO/CSAA 複合体は基材上に保持され，GO は基材と CSAA の接着材として機能することとなる．さらに，GO の六員環構造は，π-π スタッキングや CH/π 相互作用などの結合効果を発揮することが知られており，CSAA の付着性向上にはこれらの相互作用が寄与する．

6. GO/CSAA コーティングの抗菌性の実証

GO/CSAA コーティングの抗菌性を実証するために，培養用ウェルの底面に GO 超薄膜を

形成し，その上に BAC を滴下塗布した後十分に水洗した．次に，う蝕原因菌（*Streptococcus mutans*）および歯周病原菌（*Actinomyces naeslundii*）を播種し，24 時間後に濁度を測定して抗菌性を評価した．対照として未処理（UNT）のウェル，BAC のみ（BAC 滴下塗布後に水洗），GO コーティングのみのウェルを用意した．その結果を図 5A，B に示す．*S. mutans* および *A. naeslundii* の濁度は，未処理および GO コーティング単独のウェルで同様の値を示し，GO 単独では抗菌性がないことが確認された．一方，BAC のみのウェルでは若干の濁度低下が認められたが，GO/BAC コーティングでは濁度が有意に低下し，BAC の基材への定着性が向上することで高い抗菌性を発揮することが示唆された．

次に，GO 超薄膜に定着した BAC がどの程度の期間抗菌性を維持するかを検討するため，GO/BAC コーティングウェルの耐水性を評価した．同様に作製した GO/BAC コーティングウェルを 5L の水に 1，3，7 日間浸漬後，乾燥させ，*A. naeslundii* を播種し，24 時間後の濁度を測定した．その結果，いずれの浸漬期間においても濁度の有意な低下が確認され，1 週間程度は GO 超薄膜上に BAC が安定的に保持され，抗菌性を維持できることが明らかとなった（図 5C）．しかし，28 日間の水中浸漬後には GO/BAC コーティングの抗菌性が失われ，BAC が GO 超薄膜から脱離したと考えられた（図 5D）．先行研究でも示されているように，GO/CSAA が過剰量の水中に曝露された場合，H^+，OH^-，HCO_3^-イオンなどとのイオン交換により，CSAA の脱離が徐々に進行することが示唆されている [3]．

ただし，抗菌性を失った GO/BAC コーティングウェルに再び BAC を滴下塗布し，*A. naeslundii* を用いて抗菌試験を行ったところ，抗菌性が完全に回復することが示された（図 5D）．これは，水浸漬中に GO 超薄膜上の CSAA が徐放されるものの，GO 表面の酸素官能基は残存しており，過剰量の CSAA を再度塗布することで，GO と再結合したことを示唆している．GO の酸素官能基を除去するためには高温処理や強力な還元剤，紫外線照射などが必要であり，口腔内のような温和な環境では GO の酸素官能基が容易には除去されないと考えられる．したがって，一度歯に GO 超薄膜をコーティングした後，CSAA を含む洗口剤を定期的に使用することで，GO コーティング膜に CSAA が繰り返し定着し，長期間にわたる持続的な抗菌効果を発揮する可能性がある．

7. 布基材への GO/CSAA コーティング

病室のカーテンや寝具は，院内感染の一因として指摘されている．もし布基材に GO/CSAA コーティングを施すことができれば，院内感染対策に革新をもたらす可能性がある．そこで筆者らは医療用ガーゼを用いて GO/CSAA コーティングの効果を実証した [4]．

まず医療用ガーゼを各種濃度の GO 分散液に浸漬し，水洗後に乾燥させた．その結果，0.1% GO 分散液ではガーゼが強く褐色に変色し，0.01%でも肉眼的に若干の変色が確認された（図 6A）．石英のような滑沢な基材と比較して，布基材では GO の残留性が高いため，適切な濃度調整が必要と考えられる．そこで，肉眼的に変色を認めず未処理（UNT）と同色だった 0.001% GO 分散液を用いて実験を実施した．ラマン分光分析の結果，GO 処理ガー

ゼには G バンドピークが確認され，GO がガーゼ表面に確実に残存していることが示された（図 6B）.
次に 0.001% GO 分散液で処理したガーゼを CPC 溶液に浸漬し，直後に十分に水洗・乾燥した後，その抗菌効果を検証した．大腸菌（*Escherichia coli*）または *A. naeslundii* を接種し，24 時間培養後に濁度を測定した．対照として，未処理，CPC 処理のみ，GO 処理のみのガーゼを用意したところ，GO/CPC 処理ガーゼが最も濁度を低下させた（図 6C）．これらの結果から，GO 超薄膜コーティングは布基材にも適用可能であり，CPC の定着性を向上させ，優れた抗菌活性を示すことが示唆された．布製品への GO/CSAA コーティング技術は，病院環境の清潔維持に革新をもたらし，院内感染対策の新たな選択肢となる可能性を秘めている．

8. 歯基材への GO/CSAA コーティング

歯の主要成分であるハイドロキシアパタイトは，カチオン性のカルシウムイオンを豊富に含んでいる．このためアニオン性の GO は歯の表面と強く結びつく可能性がある．筆者らは北海道大学病院に通院する患者からインフォームドコンセントを得た上で，通常の治療で抜歯された歯を提供してもらい（自主臨床研究承認 17-222），GO/CSAA コーティングの効果を検証した．
まず，抜去歯から象牙質の歯基材を作製し，0.01% GO 分散液に 10 秒間浸漬後，強圧エアーで迅速に乾燥させた．その結果，歯の変色は認められず（図 7A），電子顕微鏡観察では GO の凝集によると思われる微細な構造が確認された（図 7B 矢印）．GO 分散液が酸性を示すため，歯の表層ミネラルがわずかに脱灰され，放出されたカルシウムイオンと GO が結合し凝集したと推察される．
次に，GO 処理した歯基材を CPC 溶液に 10 秒間浸漬し，水洗後に *S. mutans* を播種し増殖を評価した．対照群として，未処理（UNT），CPC 処理のみ，GO 処理のみの歯基材を用意した．その結果，CPC 処理のみの歯基材では，未処理のものと同様に *S. mutans* の増殖が確認され，CPC は歯の表面に定着せず，水洗によって容易に流されることが示唆された．これは，CPC 含有洗口剤を用いても，CPC が歯に長く留まらないことを示している．一方，GO 処理後に CPC に浸漬した歯基材では，*S. mutans* の増殖が顕著に抑制された（図 7C, D）．この結果は，たった 10 秒間の GO 浸漬処理でも歯の表面に GO が定着し，さらに CPC が GO と強く結合して定着することを示している．
本技術は，簡便で効果的な新しい口腔ケア法としての可能性を秘めており，日常の歯科診療やセルフケアに革新をもたらす可能性がある．今後，安全性をさらに検証し，臨床応用の可能性を探っていきたい．

9. GO 超薄膜の細胞親和性

強い抗菌性を持つ薬剤は，しばしば高い細胞毒性を示すことがある．そこで，本研究では

GO/CSAA の細胞親和性を評価し，その安全性を検証した．まず，GO/BAC コーティングを施した蛍光染色用のガラス製ディッシュおよび細胞生存率アッセイ用の 96 ウェル培養プレートを作製し，マウス線維芽細胞株（NIH3T3）を播種した．24 時間培養後，生細胞を蛍光染色し観察すると，すべてのウェルで多数の生細胞（緑色）が確認された．特に GO 処理のみのウェルでは，生細胞数が多い傾向が見られた（図 8A）．また，WST-8 アッセイによる細胞生存率評価においても，GO 処理ウェルは未処理（UNT）ウェルよりも有意に高い生存率を示した（図 8B）．この興味深い結果は，GO の優れた物質吸着能力に起因している可能性がある．つまり培地中の接着分子が GO 膜に吸着され，細胞活性を高める環境を提供した可能性がある [5]．

一方で，GO の細胞毒性についてはこれまで多くの研究が報告されているが，その毒性の程度は GO の濃度に依存するとされている．一般に，20 μg/mL 以下の GO は細胞に対してほとんど毒性を示さない [6]．本研究で各ウェルに塗布された GO の量はわずか 0.1 μg であり，さらに水洗プロセスにより多くの GO が除去されているため，残存量は極めて少ないと考えられる．

なお，GO/BAC 処理ウェルにおいて WST-8 値が未処理よりも低かったのは，GO 自体の毒性ではなく，BAC との複合効果によるものであると推測される．このように GO/BAC は口腔内細菌に対して強い抗菌性を示す一方で，哺乳類細胞への影響は限定的であり，その臨床応用における安全性の懸念を払拭する結果となった．

10．骨補填材の GO/Zn 抗菌処理

亜鉛は生体必須元素であり，細胞毒性が低く，カチオン性金属イオンとして添加できるため，骨補填材などの再生医療用材料に抗菌性を付与するのに効果的であると考えられる．そこで GO 超薄膜技術を活用し、抗菌性を有するバイオマテリアル開発を試みた．

市販のコラーゲンスポンジに GO と酢酸亜鉛溶液を用いて GO/Zn コーティングを施し，抗菌性試験および細胞親和性試験を実施した．その結果，GO/Zn コーティングを施したコラーゲンスポンジは *S. mutans* に対して優れた抗菌性を示し（図 9A），同時に細胞の増殖に大きな影響を与えることなく，良好な細胞親和性を示すことが明らかとなった．さらに，GO/Zn コーティングを施したコラーゲンスポンジをラット背部皮下に埋植する実験（動物実験承認 21-42）を行い，HE 染色で観察した（図 9B）．コラーゲンスポンジ構造内に細胞の侵入が認められ，細胞が黒色に変化する様子が確認された．これらの細胞は CD68 陽性のマクロファージであり，コラーゲンスポンジという異物を貪食する過程で GO を細胞内で濃縮し，その結果黒色化したと考えられる．過去の著者らの研究では，GO 処理した骨補填材が動物実験において良好な組織再生効果を示し，同様に黒変した細胞が観察された 7)．超薄切片で観察したところ，細胞内の器官に GO と思われるシート状の物体が確認され，これはライソゾームなどで分解中の GO であると推察される．ただし，GO の炭素シート結合は強固であり，分解には時間を要すると思われる．このように，生体組織内に入った GO

がどのように分解されるのか，またその過程でどれくらいの時間がかかるのかについてはまだ十分に解明されていない．今後の研究により，GO の分解メカニズムの解明が進むことが期待される．

11．おわりに

微生物は水の存在する湿潤環境を好むため，耐水性を有する抗菌コーティング法の開発が求められている．今回我々が開発した GO/CSAA は，湿潤環境下でも持続的な抗菌効果を発揮し，口腔感染症の治療および予防に有用である可能性を示した．この技術は，医療現場や水周り環境をはじめ，長期的な耐水性と抗菌性が求められる環境や材料においても，色味を損なうことなく効果を維持できる可能性を有している．

さらに，GO 超薄膜は表面への定着物質を変えることで，再生医療やエレクトロニクス分野など，多岐にわたる応用が期待される[8)]．ナノカーボンの新規利用法として，これからのイノベーションがますます注目され，さらなる研究の発展が望まれる．

参考文献

1. Miyaji H, Kanemoto Y, Hamamoto A, Shitomi K, Nishida E, et al.: Sustained antibacterial coating with graphene oxide ultrathin film combined with cationic surface-active agents in a wet environment. Sci Rep, 2022,12:16721.

2. Hummers WS, Offeman, RE: Preparation of graphitic oxide. J Am Chem Soc, 1958,80:1339.

3. Fujii R, Okubo K, Takashiba S, Bianco A, Nishina Y: Tailoring the interaction between graphene oxide and antibacterial pyridinium salts by terminal functional groups. Carbon, 2020, 160:204-210.

4. Kanemoto Y, Miyaji H, Nishida E, Hamamoto A, Sugaya T, et al.: Water-resistant antibacterial properties of a graphene oxide/cetylpyridinium chloride complex formed on medical gauze fibers. J Oral Biosci, 2023,35:202-205.

5. Lee WC, Lim CH, Shi H, Tang LA, Wang Y, et al.: Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. ACS Nano, 2011,5:7334-7341.

6. Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, et al.: Biocompatibility of graphene oxide. Nanoscale Res Lett, 2011,6:8.

7. Kawamoto K, Miyaji H, Nishida E, Miyata S, Kato A, et al.: Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of class II furcation defects in dog. Int J Nanomed, 2018,13:2365-2376.

8. Nakasuji A, Gohda S, Kawasaki H: Graphene-Oxide-Assisted Electroless Cu Plating on a Glass Substrate. Langmuir, 2025,41:729-738.

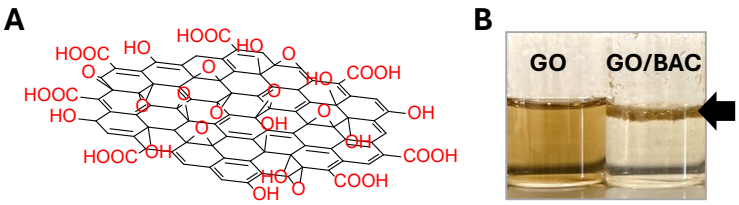

図 1　（A）酸化グラフェン（GO）の模式図,（B）GO 分散液（左）と塩化ベンザルコニウム溶液（BAC）を添加した GO 分散液（右）[1].

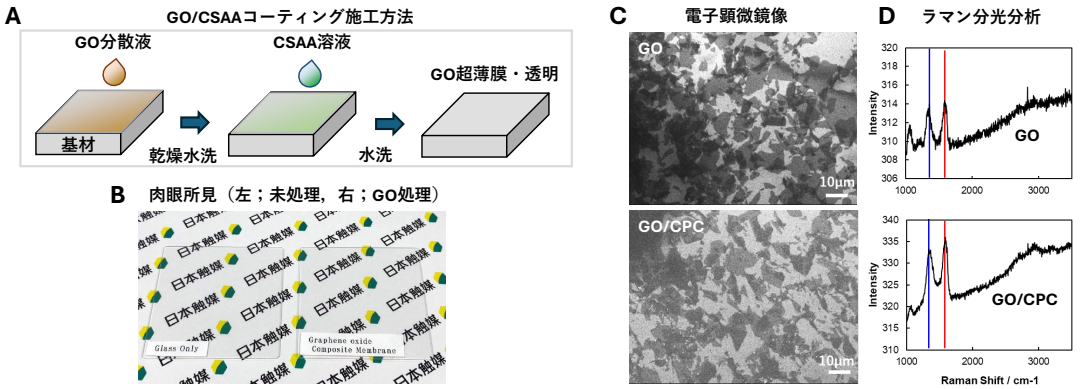

図 2　（A）GO/CSAA コーティング施工方法の模式図，（B）GO 処理後のガラス基材の肉眼所見．未処理基材（左）と GO 処理基材（右），（C）電子顕微鏡像，黒色；GO，（D）ラマン分光分析結果 [1]．

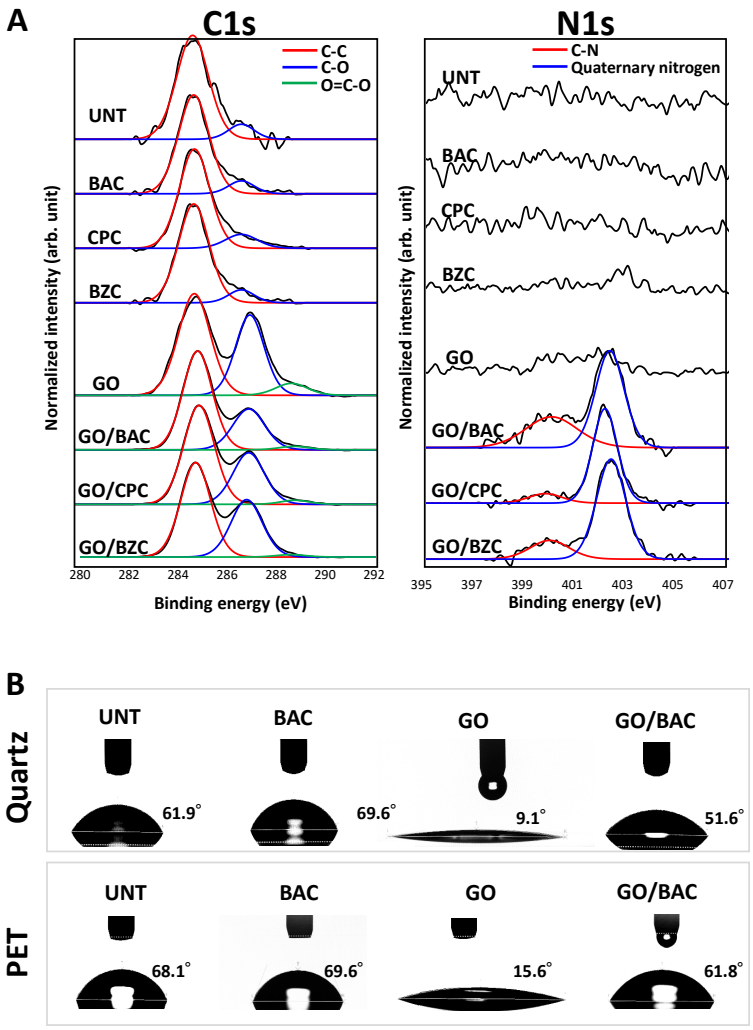

図３　（A）X 線光電子分光法による元素分析結果，（B）接触角測定結果 [1].

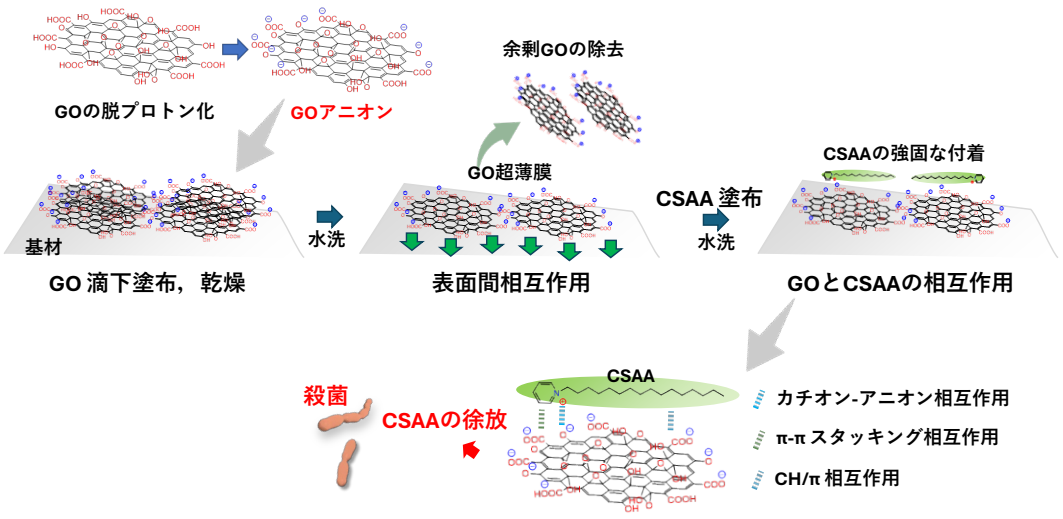

図４　GO/CSAA による抗菌コーティングのメカニズム（模式図）[1)].

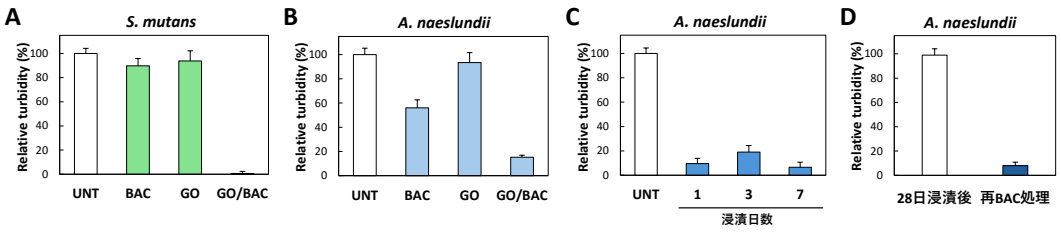

図 5　（A）24 時間培養後の *S. mutans* の濁度，（B）24 時間培養後の *A. naeslundii* の濁度，（C）長時間の水浸漬後の *A. naeslundii* の濁度，（D）水浸漬 28 日後と再処理後の *A. naeslundii* の濁度 [1)].

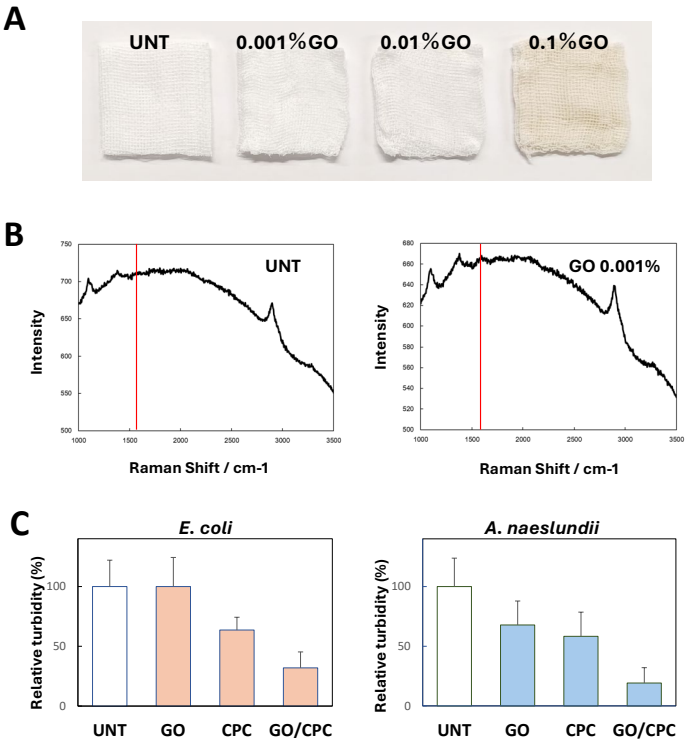

図 6　（A）ガーゼの肉眼所見，（B）ラマン分光分析結果，（C）24 時間培養後の *E. coli* と *A. naeslundii* の濁度.

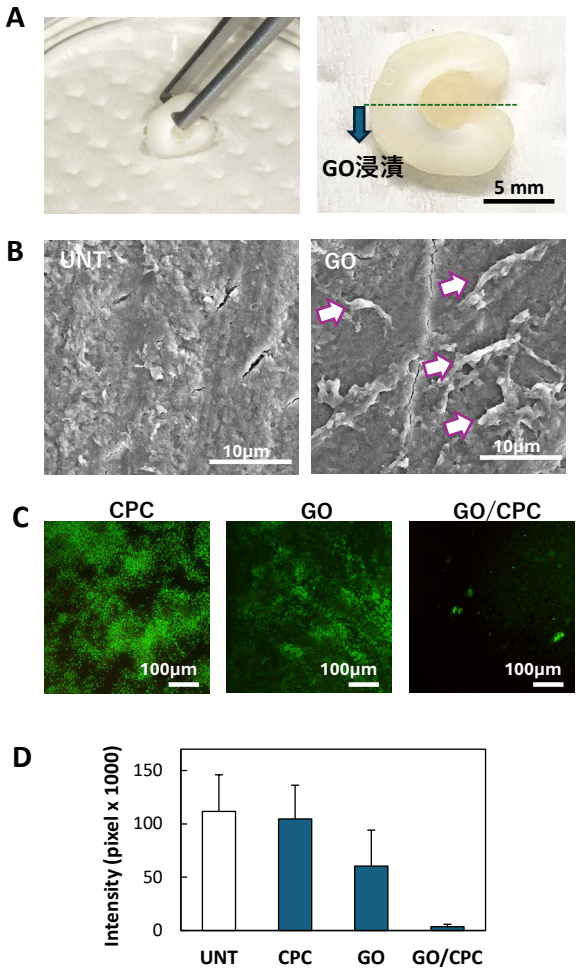

図 7　（A）歯基材の肉眼所見，（B）電子顕微鏡像，（C）蛍光顕微鏡像，　緑色；*S. mutans*，（D）蛍光強度 [1].

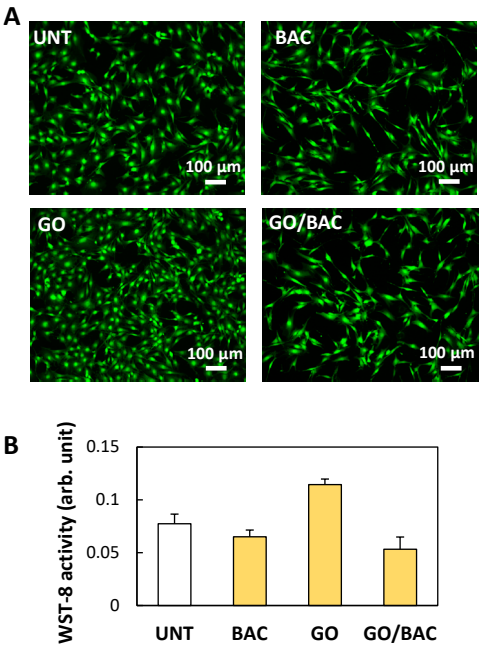

図 8　　（A）蛍光顕微鏡像，緑色；NIH3T3 細胞，（B）WST-8 活性 [1)].

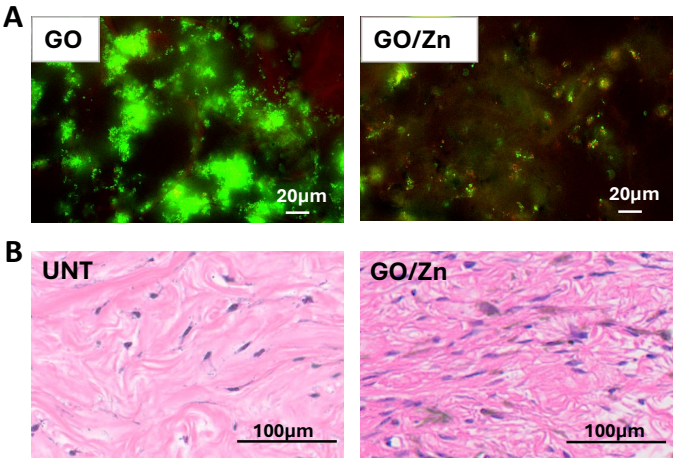

図 9　（A）GO 処理及び GO/Zn 処理コラーゲンスポンジへ *S. mutans* 播種培養後の蛍光顕微鏡像，緑色；*S. mutans* ，（B）未処理（UNT） と GO/Zn 処理コラーゲンスポンジの HE 染色像.