

氏名	加納 玄
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7435号
学位授与の日付	令和8年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	塩化セチルピリジニウム-酸化グラフェン複合体の医療機器への応用を指向した 滞留性および抗菌効果持続性の検討
論文審査委員	宮脇 卓也 教授 松本 卓也 教授 仲 周平 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

医療機器の内部構造は狭隘かつ複雑であり、洗浄・殺菌の困難な部位にバイオフィームが形成され、慢性的な細菌汚染の原因となることが知られている。特に高齢者や全身疾患をもつ患者では感染リスクが高く、また、院内感染の原因にもなり得るため、医療機器の長期的な抗菌化が重要な課題である。しかしながら、従来の銀イオンやクロルヘキシジン等による抗菌処理には、生体安全性や効果持続性に課題が残されている。

本研究では、カーボンナノシートである酸化グラフェン (graphene oxide : GO) の高い吸着能と化学安定性に着目し、殺菌消毒剤として汎用される塩化セチルピリジニウム (cetylpyridinium chloride : CPC) との複合体 (CPC-GO) を医療機器材料へ応用することを目的とした。代表的な医療機器材料にCPC-GOを塗布し、CPC放出挙動、表面滞留性、および抗菌効果を評価した。

【材料と方法】

1. 試験溶液・試験体とその表面処理

GOはMorimotoらの方法 (Chem Mater, 2017) に準じて作製し、CPC-GOはFujiiらの報告 (Carbon, 2020) に基づいてCPC (Sigma-Aldrich) を用いて合成した。濃度調製には99.5%エタノール (EtOH : Sigma-Aldrich) を用い、対照溶液としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; pH 7.4 ; Thermo fisher) , CPC, GO, EtOHを使用した。

10×10×1 mmのシリコーン (三商) , ステンレス (SUS304 : Engineering Test Service) , ポリメチルメタクリレート (PMMA : 三商) , 及びポリ塩化ビニル (PVC : 三商) を0.5 mLの試験溶液に30分浸漬後、十分に風乾させ、超純水で2回洗浄した。また、20×20×1 mmのシリコーンに対しても同様の処理を行い、100 mLの超純水中に最長で7日間の浸漬を行った。

2. 光学・分光分析

CPCの放出量は紫外可視分光光度計 (UV-Vis ; V670 ; 日本分光) で測定し、258 nmにおける吸光度から検量線を作成して濃度を算出した。試験体表面の観察は光学顕微鏡 (RX-100, HR2500 ; ハイロックス) で行い、化学構造解析にはラマン分光光度計 (NRS-3100 ; 日本分光) を用いた (測定範囲 : 1,100–3,300 cm^{-1} , 露光時間 : 10 秒) 。

3. 細菌培養と抗菌評価

Streptococcus mutans (ATCC 25175) をBrain Heart Infusion (BHI) 培地 (日本BD) で37℃, 6時間好気培養した。菌液を 1×10^5 CFU/mLに調整し, 各試験体を浸漬して12時間培養した。抗菌効果は, アデノシン三リン酸 (ATP) 量をルシフェールHSキットおよびルミテスターC-110 (キッコーマンバイオケミファ) で定量した。また, LIVE/DEAD®染色下において, 蛍光顕微鏡 (BZ-X810 ; Keyence) を用いて定性的に観察し, 同機搭載のハイブリッドセルカウント機能を用いて生菌数・死菌数を測定した。それらの比率から, 細菌生存率を算出した。抗菌効果の持続性は, 試料を浸漬した菌液を12時間ごとに新しい菌液に交換し, 濁りの変化が陰性対照と同等になるまで繰り返し評価した。

4. 統計解析

3群以上の差の検定にはone-way ANOVAを用い, 多重比較はTukey's multiple comparisons testを用いた。一方で, 抗菌効果の持続性評価における群間比較にはtwo-way ANOVAを用い, 多重比較はSidak's multiple comparisons testを用いた。統計処理には, GraphPad Prismを用い, 統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

1. CPC溶出量の経時変化

CPC-GO処理試験体からのCPC溶出濃度は経時的に増加した。7日目の溶出濃度は約0.0039 mg/mLで, GOに複合したCPC量の約8.0%に相当した。

2. 試験体表面におけるGO滞留性

GOおよびCPC-GO処理後の試験体は表面色調が変化し, 洗浄後もGO層の残存が認められた。ラマン分光分析では, GOに由来するDバンド ($1,360 \text{ cm}^{-1}$) およびGバンド ($1,580 \text{ cm}^{-1}$) がいずれの試験体でも確認された。

3. 抗菌効果および持続性

CPC-GO処理試験体はいずれの材料においてもATP量を有意に低下させ, LIVE/DEAD®染色でも生菌率の低下を示した。抗菌効果の持続性試験では, CPC-GO群のATP量は菌液交換を重ねるごとに段階的に増加し, 3回目までは陰性対照と比較して有意に低値であったが, その後有意差はなくなった。同時に試験体表面ではCPC-GO層の剥離が観察された。

【考察】

CPC-GOは試験体表面へ滞留し, 洗浄後もCPCを放出しながら持続的な抗菌効果を示した。ATP量測定による評価に加え, LIVE/DEAD®染色に基づいた細菌生存率評価においてもCPC-GO処理群は陰性対照と比較して有意に抗菌効果を示したことから, GO担持によるCPCの滞留性と持続性が向上したと考える。また, CPCは初期付着およびバイオフィーム形成を阻害する作用を有することから, 本複合体は殺菌効果に加え, 医療機器表面でのバイオフィーム形成抑制にも寄与し得る。一方で, 繰り返しの液交換や物理的刺激によりCPC-GO層が剥離する傾向があり, 今後は基材に適したCPC-GOの製法の検討, 基材表面への滞留性, そして基材表面からの耐脱離性を向上させる方法の開発が必要である。また, 多菌種バイオフィームや水流など, 実際の環境を模した条件での評価を行い, 医療機器を対象とする実用化に向けた有効性を検証する必要がある。

【結論】

CPC-GO 複合体は, 医療機器構成材料表面において高い滞留性を示し, 洗浄後も CPC の放出により抗菌効果が持続することが示唆された。

論文審査結果の要旨

【諸言】医療機器の内部構造は狭隘かつ複雑であり、洗浄や殺菌が困難な部位にバイオフィルムが形成され、慢性的な細菌汚染の原因となることが知られている。特に高齢者や全身疾患を有する患者では感染リスクが高く、院内感染防止の観点からも、医療機器表面における長期的な抗菌化は重要な課題である。しかし、従来の銀系材料やクロルヘキシジンなどによる抗菌処理では、生体安全性や抗菌効果の持続性に課題が残されている。本研究では、高い吸着能と化学的安定性を有する酸化グラフェン（graphene oxide : GO）に着目し、汎用殺菌消毒剤である塩化セチルピリジニウム（cetylpyridinium chloride : CPC）との複合体（CPC-GO）を作製し、医療機器材料への応用可能性を検討した。

【方法】GOは既報の方法に準じて作製し、CPC溶液と混合・攪拌後、遠心洗浄を繰り返すことでCPC-GO複合体を調製した。試験体として、シリコン、ステンレス、ポリメチルメタクリレート、そしてポリ塩化ビニルを用い、CPC-GO溶液に浸漬後、乾燥および洗浄処理を行った。CPCの溶出動態は紫外可視分光法によって評価し、表面滞留性は光学顕微鏡観察およびラマン分光分析によって検討した。抗菌効果の評価には*Streptococcus mutans*を指標菌として用い、細菌増殖能および生存率を解析した。さらに、菌液交換を繰り返す試験系を用いて、抗菌効果の持続性を評価した。

【結果】CPC-GO処理試験体からは、経時的なCPCの溶出が認められ、複合化されたCPCが徐放されることが確認された。光学顕微鏡観察およびラマン分光分析によって、洗浄後もGO由来のシグナルが各種材料表面に残存していることが示された。抗菌評価では、CPC-GO処理群において、いずれの材料においてもATP量と生菌率が陰性対照と比較して有意に低下した。抗菌効果の持続性試験では、培地交換の回数増加に伴い効果は徐々に減弱したものの、複数回の交換後まで有意な抗菌効果が維持された。

【考察】本研究の結果から、CPC-GO複合体は各種医療機器材料表面に滞留し、洗浄後もCPCを放出しながら抗菌効果を示すことが示唆された。GOを担体とすることで、CPC単体では困難であった表面滞留性と抗菌効果の持続性が向上したと考えられる。一方で、菌液交換を繰り返すことで複合体層の部分的剥離が認められ、固定化技術の改良や実機環境を模した条件下での評価が今後の課題として挙げられる。

本研究は、CPC担持材料としてのCPC-GOの有用性を示した点で新規性を有し、医療機器表面の感染対策技術の発展に寄与する成果であると評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。