

〈一般研究課題〉 抗菌ガラスファイバーの作製とその機能制御

助成研究者 名古屋工業大学 小幡 亜希子



## 抗菌ガラスファイバーの作製とその機能制御

小幡 亜希子  
(名古屋工業大学)

### Development of glass fibers with antibacterial property and control of their functions

Akiko Obata  
(Nagoya Institute of Technology)

#### Abstract :

A 3D bioactive glass scaffold was developed as an ideal implant material with the ability of prevention of the bacterial infection and regeneration of tissues. The sol-gel process and electrospinning were combined to fabricate the 3D cotton-wool-like sol-gel glass fibers that can mimic the skin extracellular matrix and deliver ionic therapeutic cues. Silver was incorporated into the glass structure to give antibacterial ability to the glass fibers. It was studied how synthesis and process variables affects the morphology of the fibers, size and distribution of silver in the fibers, and the antibacterial property of the fibers. The calcination temperatures for the samples after electrospinning was found to influence the state of silver in the glass fibers, with nanoparticles forming and coarsening as the calcination temperature increased, which reduced the antibacterial property. These phenomena suggest that not only the amount of silver but also the calcination temperature plays a significant role on influencing properties of silver-doped sol-gel glasses. The silver doped 3D non-woven sol-gel glass fibers were expected to be a good candidate for tissue regeneration scaffolds.

#### 1. はじめに

生体組織の治療用材料としてセラミックスやガラスなどの無機酸化物が臨床応用されており、特に骨や歯などの硬組織用材料として、その有用性は広く実証されている。特に「生体活性」と呼ば

れる機能を持つ材料は、体内にインプラントされると自家骨と化学的な反応を経て直接接合する。国内で臨床応用されている生体活性材料は、主にハイドロキシアパタイトや $\beta$ 型リン酸三カルシウムなどのリン酸カルシウム化合物である。一方で、生体活性材料として初めて開発された人工材料は45S5型バイオガラス(45S5BG)と呼ばれるガラス材料であり、化学組成は46.1 mol.%  $\text{SiO}_2$  - 24.4 mol.%  $\text{Na}_2\text{O}$  - 26.9 mol.%  $\text{CaO}$  - 2.6 mol.%  $\text{P}_2\text{O}_5$ である。この45S5BGはケイ酸イオンとカルシウムイオンを溶出し、これらイオンは骨を作る細胞(骨芽細胞など)を活性化させる働きを持つことが報告されている<sup>1)</sup>。このような活性化効果は他の複数の無機イオンについても確認されおり、これら無機イオンを積極的に活用した新規生体材料設計が進められている<sup>2)</sup>。一方で、抗菌機能を発現する無機イオンも存在し、代表的なイオンに銀(Ag)イオン<sup>3)</sup>、亜鉛イオン、銅イオンなどがあげられる。つまり、材料から溶出する無機イオンを上手に制御することで、生体組織の再生を促進させたり、抗菌機能を発現させたりすることが可能である。

骨充填剤として臨床応用される材料の多くは、多孔質なブロック体や顆粒などの形状をもつ。これら材料は非常に有用である一方、複雑形状をもつ部位ではその形状にうまく適合させるのが難しかったり、充填する際に想定外の部位に飛散してしまったりといった課題があった。そこで我々の研究グループでは、新たに綿(わた)のような繊維構造体の設計に取り組んできた。これまでに、生分解性ポリマーと生体用セラミックス粒子の複合材料を母材とした綿状繊維構造体の作製に成功しており、細胞培養実験および動物実験の結果からその有用性を示してきた<sup>4)</sup>。柔軟性や操作性に優れるのはもちろんのこと、連通孔を含む繊維構造体であることから細胞が材料内部にまで容易に侵入可能であり、組織の再生を促進する。さらに近年、ゾルゲル法とエレクトロスピンニング法を組み合わせることで、ゾルゲルガラスのみから成る綿状繊維構造体の作製にも成功している<sup>5)</sup>。本研究においては、生体活性と報告されている70 mol.%  $\text{SiO}_2$  - 30%  $\text{CaO}$ 組成のゾルゲルガラス(70S30)をベースに、新たにAg担持ゾルゲルガラス綿状構造体の開発を試みた。まずは、綿状構造の作製に対するエレクトロスピンニング時の湿度の影響について検討した。さらに、最終生成物の構造や物性に対する焼成温度の影響について、特にAgの挙動に着目して検討した。

## 2. 試料および実験方法

### 2.1 ガラスファイバーの合成と構造解析

テトラエトキシシラン、エタノール、水、硝酸を、モル比で 1 : 2 : 3 : 0.05 の量で混合した。1

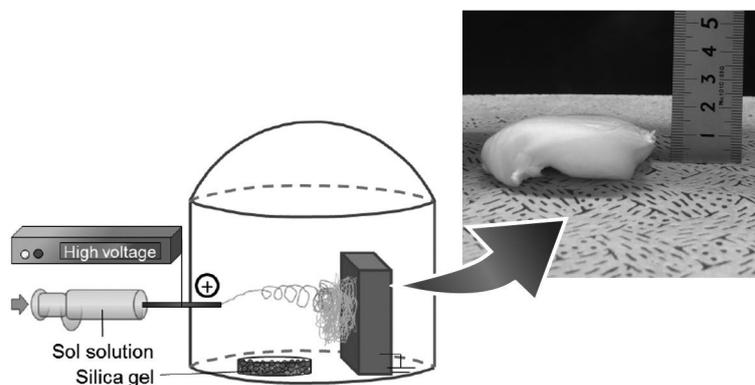


図1. エレクトロスピンニングシステムの概要図と得られる綿状繊維構造体の外観写真。

時間混合した後、硝酸カルシウム四水和物を $\text{SiO}_2 : \text{CaO}$ のモル比が7 : 3となるよう添加し、さらに24時間混合した。得られた溶液は40℃で17時間熟成させることで、70S30C組成のゾル溶液を得た。Ag添加組成のサンプルにおいても同様な手法で合成し、 $\text{SiO}_2 : \text{CaO} : \text{Ag}_2\text{O}$ のモル比が70 : (30-x) : x (x = 1, 2, 以降は70S29C1Aまたは70S28C2Aと表記)となるよう硝酸銀をさらに添加することでゾル溶液を得た。各ゾル溶液を10% poly(vinylbutyral)溶液と重量比で1 : 1にて混合し、これをエレクトロスピンニング用の溶液として使用した。エレクトロスピンニングは図1に示すようなシステムにて実施し、コレクター側に集積した繊維構造体は、電気炉を用いて600~800℃にて5時間処理することで焼成した。

## 2.2 ガラスファイバーの構造解析および抗菌能評価

得られた各種繊維構造体のサンプルについて、走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察、X線回折法(XRD)による結晶の有無およびその定性を行なった。また、体内環境に近い状況におけるサンプルからのAg溶出挙動を調査すべく、37℃の細胞培養用培地(DMEM培地)に所定期間浸漬し、サンプルから溶出したAg量について高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)にて測定した。最後に、大腸菌(*E.coli*)を用いたシェーク法による抗菌能評価試験を実施した。

## 3. 実験結果

### 3.1 繊維構造に対するES時の湿度の影響

一般的にエレクトロスピンニング法にて得られる繊維構造体は、いわゆる不織布と呼ばれるようなシート状のものである。これに対し、我々はエレクトロスピンニング時の空間の湿度を変化させることで、紡糸された繊維同士の絡まり具合が変化し、立体的な綿状の繊維構造体を得ることが可能であることを見出した。図2に湿度を5段階で変化させた時に得られた70S30CサンプルのSEM画像を示す。湿度50%を除く全条件にて、サブミクロンサイズの繊維のみが存在することがわかった。しかし、繊維の密度に変化があり、湿度が低いと密度が高い傾向が見られた。これらのサンプルを目視で観察すると、比較的低い湿度である20~30%程度では、シート状のものがメインまたは混在することが確認できた。一方、湿度50%では、繊維の中に粒状物質が混在していることがSEM画像から観察された。これは、紡糸した際に、繊維状に延伸されず粒子として飛散した結果だと推測される。目

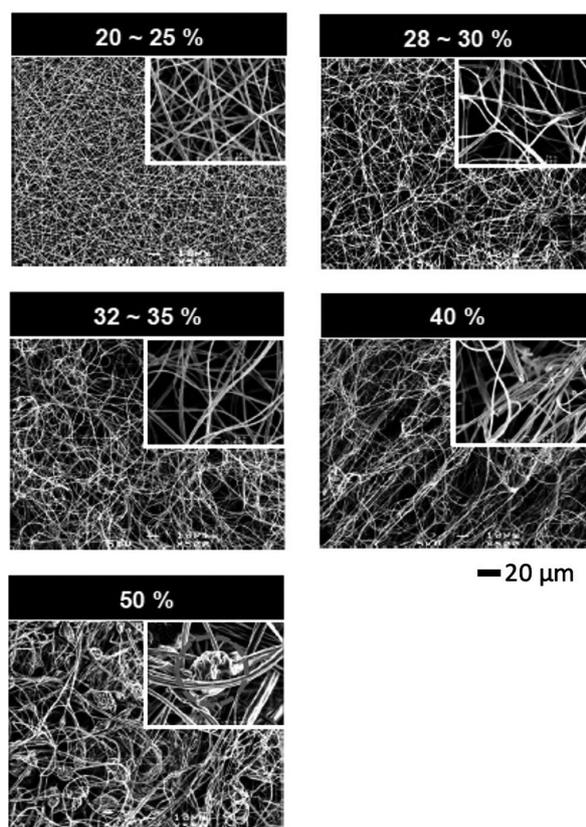


図2. 異なる湿度環境下にて作製した繊維サンプルのSEM画像.

視で観察すると、比較的高い湿度である40%と50%では、繊維同士が絡み合って形成された太い繊維が混在する様子が観察された。湿度が32~35%においては、SEM観察および目視での観察結果から、最も理想とする立体的な繊維構造体を得られることがわかった。以上の結果から、これ以降のエレクトロスピンニングは湿度が32~35%付近にて実施することとした。

### 3.2 Ag担持繊維構造体の構造・イオン溶出機能評価

図3に70S30Cおよび70S28C2Aの焼成前後のSEM画像を示す。どちらの組成のサンプルにおいても、ほぼ同程度の繊維径からなる繊維構造体を得ることに成功した。また、焼成処理を経ることで繊維径が減少していることが確認された。同サンプルに対する示差熱・熱重量同時測定装置による測定結果を合わせて考察すると、この繊維径の減少はエレクトロスピンニング用の溶液に添加したPVB等の有機物質の消失や、ゲルの焼きしまりによるものであることがわかった。なお、SEM観察のレベルでは繊維表面に気孔の存在は観察されず、密な組織を持った繊維であることがわかった。

図4に焼成温度の異なる70S28C2AサンプルのXRDパターンを示す。焼成温度に関わらず金属Agに由来するピークが観察され、温度が上昇するにつれてシャープになることが確認された(図中の網掛け部分)。Scherrerの式を用いて結晶子サイズを算出したところ、600、650、700、800℃の順で9.37、13.4、26.9、30.7 nmであった。一方で、透過型電子顕微鏡にて同サンプルを観察したところ、結晶粒子サイズの増大が確認された。このことから、本サンプルにおいては焼成温度の上昇に伴いAg粒子が成長することがわかった。また、800℃で焼成したサンプルについては、wollastonite相に由来するピークが確認された。一方で、70S30Cサンプルを800℃で焼成したサンプルにてwollastonite相のピークがほとんど観測されなかったことから、おそらくガラス相内に生成したAg粒子が結晶核となって、wollastoniteの成長を促したことが考えられた。

図5に焼成温度の異なる70S28C2Aサンプルを細胞培養培地中へ浸漬した時の、Agの溶出挙動を調査した結果を示す。焼成温度が比較的低温である600と

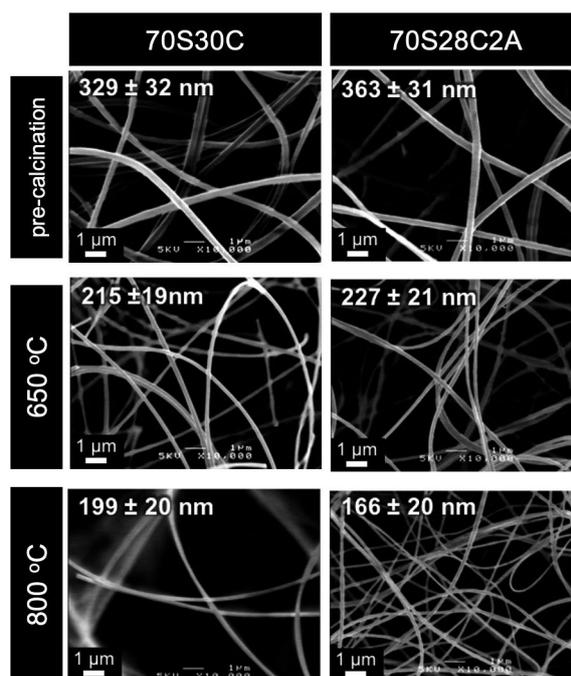


図3. 焼成前後の70S30Cおよび70S28C2AサンプルのSEM画像。

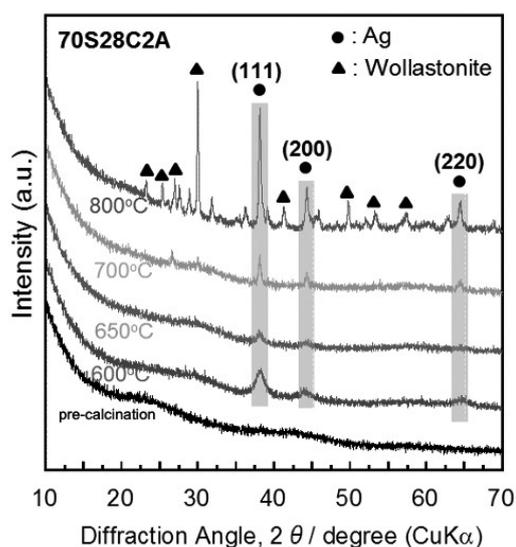


図4. 異なる焼成温度で処理した70S28C2AサンプルのXRDパターン。

650℃のサンプルにおいては、約24時間以内にて大幅な溶出が認められ、その後緩やかな溶出へ変化した。700℃で処理したサンプルにおいては、全体を通して浸漬時間に則した溶出挙動を示した。800℃で処理したサンプルについては、全体的に溶出量が大幅に減少し、72時間後の時点において他のサンプルの約1/8の量であった。

他の溶出イオン(ケイ酸イオンとカルシウムイオン)について計測したところ、焼成温度が高くなるにつれ溶出量が減少するといったAgと同様な傾向が観察された。その一方で、800℃サンプルにて観察された大幅な減少については、他のイオンでは確認されなかった。

また、これらのサンプルについて窒素ガス吸着法による比表面積を計測した結果、600、650、700、800℃サンプルはそれぞれ25.6、18.6、17.7、10.3 m<sup>2</sup>/gであり、焼成温度の上昇とともに比表面積が減少する傾向にあった。

以上のことから、70S28C2Aサンプルからの各種イオンの溶出挙動は焼成温度によって制御可能であった。しかし、Agの溶出挙動についてはその減少傾向が特異的であることがわかった。これはゾルゲルガラス組織内でのAg粒子の形成と、焼成処理に伴う成長に起因すると考える。焼成温度を上昇させると、形成されるAg粒子は成長し同時に比表面積は減少する。また、おそらくガラス中のAgイオン量も減少することが予想される。成長した粒子からイオンが溶出することも考えられるが、その量は比表面積に依存するため、全体として材料から溶出するAgイオン量は減少したと考える。また興味深いことに、透過型電子顕微鏡観察の結果より、特に大きく成長したAg粒子は繊維の中心部に比較的多く存在することがわかった。この局在化も、溶出するイオン量の減少に寄与したと考える。

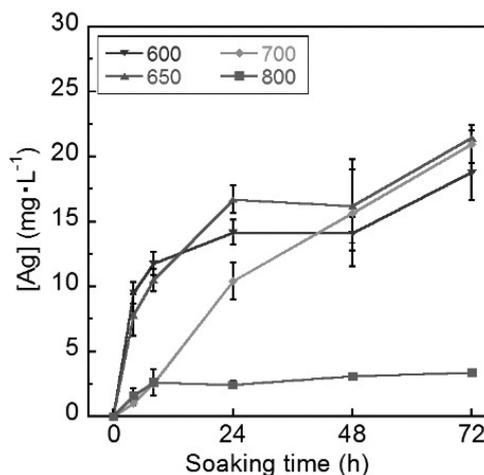


図5. 細胞培養培地中における70S28C2AサンプルからのAg溶出挙動。

### 3.3 Ag担持繊維構造体の抗菌機能評価

作製した各種繊維構造体に対する抗菌機能試験の結果を図6に示す。使用するサンプル量を4段階で変化させて比較試験を実施したところ、Ag担持サンプルである70S29C1Aおよび70S28C2A(図中では各々1Agおよび2Agと表記)にて、サンプル濃度がそれぞれ0.2および0.1 mg/mL以上にて抗菌機能が確認された。また、Agを担持していないサンプルではどの濃度条件においても抗菌機能は発現しなかった。

以上の結果より、担持したAgが抗菌に

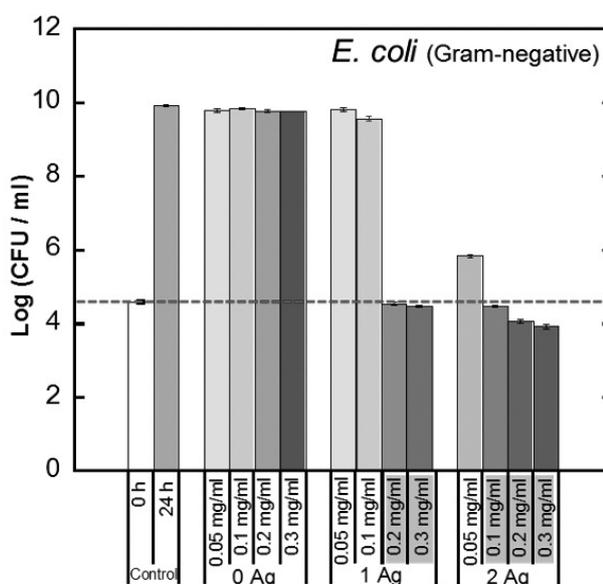


図6. サンプル濃度を変化させた際の生菌数変化。(全サンプルの焼成温度は650℃で固定)

寄与したことがわかる。また、その効果は担持量によって制御可能であることもわかる。一方で、焼成温度の違いによる抗菌機能を調査したところ、焼成温度が上昇するにしたがって機能が低減することがわかった。これは前述したように、焼成温度の上昇に伴い溶出するAg量が減少したことに起因すると考える。つまり、単に担持量を調整するだけでなく、焼成温度によっても最終生成物の抗菌機能は制御可能であることを見出した。

#### 4. おわりに

本研究では、Ag担持生体活性ゾルゲルガラスからなる綿状の繊維構造体を開発した。従来方式では難しかった立体的な繊維構造体について、湿度の調整により簡便に作製することができることを見出した。また、Agによる抗菌機能の発現も確認され、その効果は単にAg導入量の違いだけでなく、合成過程で行う焼成処理条件によっても変化することを見出した。これは、焼成過程におけるAg粒子の成長と局在化が寄与することが示唆された。

#### 参考文献

1. J. R. Jones, *Acta Biomater.*, **9**, 4457-86, (2013).
2. A. Hoppe, N. S. Gldal and A. R. Boccaccini, *Biomaterials*, **32**, 2757-74, (2011).
3. A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi and S. Minaian, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **3**, 168-71, (2007).
4. T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, Y. Ota, X. Yao and K. Oribe, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.*, **23**, 2349-57, (2012).
5. E. Norris, C. Ramos-Rivera, G. Poologasundarampillai, J. P. Clark, Q. Ju, A. Obata, J. V. Hanna, T. Kasuga, C. A. Mitchell, G. Jell and J. R. Jones, *Biomed. Mater.*, **15**, 015014, (2020).