

MATERIAL TECHNOLOGY

材料技術



Material Technology

March-April

2021

Vol. 39, No. 2

ISSN 0289-7709

CODEN: MTECFQ

材料技術研究協会

Japan Research Institute of
Material Technology

<https://www.jrint.jp>

Contents

<Articles>

Effect of various conditions on the expression of structural color of calcium carbonate

炭酸カルシウムの構造色の発現に及ぼす諸条件の影響

Risako NATSUME, Tetsuo UMEGAKI, Yoshiyuki KOJIMA*

夏目 莉紗子, 梅垣 哲士, 小嶋 芳行*15

Three drugs combined effect of antibiotics and natural antimicrobial agents against E. coli and Candida

E. coliおよびCandidaに対する抗生物質と天然系抗菌剤の三剤併用効果

Koki TANAKA, Ikuhiro TANIDA, Satoshi OSAWA

田中 昂希, 谷田 育宏, 大澤 敏21

<Editorial Note>

Acceptance of Materials Technology at J-STAGE

J-STAGE 登録誌としての採択について

.....29

炭酸カルシウムの構造色の発現に及ぼす諸条件の影響

夏目莉紗子¹⁾, 梅垣哲士¹⁾, 小嶋芳行^{1)*}

Effect of various conditions on the expression of structural color of calcium carbonate

Risako Natsume¹⁾, Tetsuo Umegaki¹⁾, Yoshiyuki Kojima^{1)*}

^a Department of Materials and Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Nihon University, 1-8, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308,

Abstract

In this study, we investigate the development of structural color of elliptical spherical vaterite with an average particle size of $0.66 \mu\text{m}$ synthesized using MEA. Since the vaterite crystal is an elliptical sphere with a length: width = 1: 0.7, a structural color corresponding to the wavelength of light in the visible light region from $0.7 \times$ average particle size to the average particle size could be observed. The strength of color development was related to the amount of crystals adhering to the slide glass and the overlap. That is, when there were few crystals attached to the slide glass, the structural color became lighter without interference. On the contrary, when crystals adhered in multiple layers, the particle size deviated greatly from the wavelength of visible light, and the structural color became lighter due to the dispersion of light. The optimum dip coating conditions for developing the structural color were to repeat 30 times at a suspension concentration of 0.04 % and an average pulling speed of $25 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. In addition, the equation that the light interference strengthens can be shown by $2dncos\theta = (m + 1/2)\lambda$, and the complementary color of the calculated light wavelength matches the observed color.

Keywords : Vaterite, Structural color, Dip coating, Light interference

Received January 28, 2021; accepted February 17, 2021

1) Department of Materials and Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Nihon University, 1-8, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308, Japan

日本大学大学院理工学研究科物質応用化学専攻
〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14

* E-mail: kojima.yoshiyuki@nihon-u.ac.jp

1 はじめに

構造色とは、コンパクトディスクやシャボン玉のように微細な構造をもつことにより発色する現象である。構造色はその物質の持つ色素の色とは異なった発色をし、光エネルギーを失わない、かつ重金属を用いないという特徴が挙げられる¹⁾。自然界で構造色を示すものとしては真珠や貝の真珠層があり、これらの主成分は炭酸カルシウムである¹⁾。貝の真珠層では長さ0.5-20 μm 、厚さ0.3-1.5 μm 程度であり、この大きさは光の波長に近似するため光の干渉を受け、様々な色をみることができる^{1),2)}。また、二酸化ケイ素の球状粒子も構造色を示すことが知られている。たとえば、粒径280nmでは緑、360nmでは赤紫になるなどの報告がみられる³⁾。ポリスチレンなどでも同様の構造色を示す⁴⁾。また、構造色は、粒径、粒子間距離、屈折率、配置、角度、粒子の色および形状に依存することが知られている⁵⁾。

炭酸カルシウムは、医薬品やプラスチック、ゴムの添加剤などの分野で広く利用されており、カルサイト、アラゴナイトおよびバテライトの3つの結晶多形が存在する⁶⁾。これら3つの多形は、それぞれ異なる粒子形態をもち、カルサイトは紡錘状や菱面体、アラゴナイトは柱状、バテライトは球状および板状の粒子形状となる。そのため、要求される形状は用途ごとに異なる。真珠層の炭酸カルシウムの形態はアラゴナイトといわれているが、アラゴナイトの板状結晶を生成させた例はない。これに対して、バテライトではこれまで球状および板状結晶の合成が報告されている⁷⁾。筆者らはすでに、水酸化カルシウム-二酸化炭素系反応によりモノエタノールアミン(MEA)を用いることで、微細な球状バテライト単一相の合成について報告している^{8),9)}。さらに、炭酸水素カルシウム水溶液を加熱することにより六角板状バテライトが生成することも報告している¹⁰⁾。このように、バテライトは板状および球状の形態を生成するには適した形態である。しかし、合成されたバテライトが構造色を示した例はない。それは平均粒径が1 μm 以下のバテライト単一相の合成例が確立されていないこと、微細な結晶を均一に並べられないためである。前報において、MEA水溶液濃度、温度を制御することにより、平

均粒径0.66~1.65 μm のバテライト単一相の合成に成功しており、平均粒径1.65 μm 以下のバテライト単一相で構造色が発現した。しかし、発色の濃さや色にむらがあった¹¹⁾。そこで、本研究では、0.66 μm の粒径に制御した楕円球状バテライトを用いて構造色を発現することを目的とし、構造色の発色に及ぼすバテライト結晶の粒径、懸濁液濃度および引き上げ速度の影響について検討を行った。

2 試料および実験方法

2.1 試料

バテライトの合成には、水酸化カルシウム(純度96%)およびモノエタノールアミン(MEA)、(純度99%)を用い、これらの試薬は関東化学社製である。また、炭酸化のための二酸化炭素ガス(純度99.95%)には、巴商会社製を用いた。ディップコート用の溶媒に用いたアセトン(純度99%)は関東化学製である。

2.2 実験方法

2.2.1 楕円球状バテライトの合成

8 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ に調製したMEA水溶液100 cm^3 に対して水酸化カルシウムを0.05 mol 添加し、0.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 水酸化カルシウム懸濁液を調製した。この懸濁液の温度を55 $^{\circ}\text{C}$ に決定し、300 rpm でかくはんしながら、100% CO_2 ガスを500 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ でガラスボールフィルターを用いて20分間吹き込むことで炭酸カルシウム懸濁液を作製した。この懸濁液を10000 rpm で2分間遠心分離を行い、その後ろ過、洗浄することにより、楕円状バテライトを得た。得られた試料のキャラクタリゼーションは、X線回折、レーザ回折式粒度分布測定、マイクロスコブおよび走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて行った。

2.2.2 構造色の発現方法

試料にアセトンを添加して懸濁液濃度を0.01-0.12%に調整し、45kHzの超音波洗浄器を用いてこの懸濁液に超音波を5分間照射してコーティング液(懸濁液)を作製した。ディップコートは、速やかにスライドガラス板(スライドガラス 松浪硝子背製)を懸濁液に浸漬させて引き上げ速度3-25 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ で引き上げた。これを最大40回繰り返す、ディップコートを行った。

構造色の写真は iPhone XR にて撮影した。なお、用いた光源の発光スペクトルを図 1 に示す。このスペクトルをみると青色と黄色の組み合わせで疑似白色となっていることがわかった。

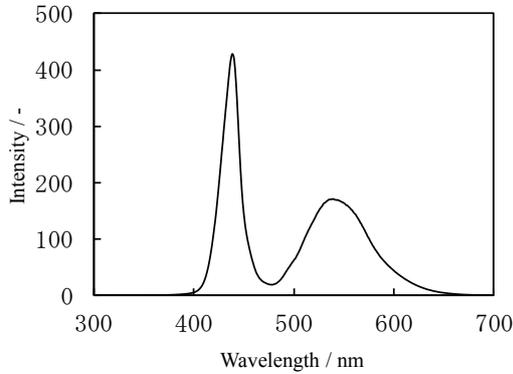


Fig.1 Emission spectrum of light source.

3 結果および考察

3.1 懸濁液濃度の影響

まず、合成した平均粒径 $0.66 \mu\text{m}$ のバテライトの SEM 写真を図 2 に示す。平均粒径は $0.66 \mu\text{m}$ であり、上下が平らとなった楕円球状であった。なお、長径に対する短径の割合は 0.7 であった。なお、X 線回折ではバテライトの単一相であることを確認し、粒度分布ではかなり分布幅の狭いものであった。

楕円球状バテライトを用いて懸濁液濃度を 0.01~0.12% に調整しディップコートを行った。図 3 に各懸濁液濃度でディップコートしたガラス板の下から光を照射した際の透過光の写真を示す。なお、ディップコート回数は 30 回とした。懸濁液濃度 0.01% では光の中心から外

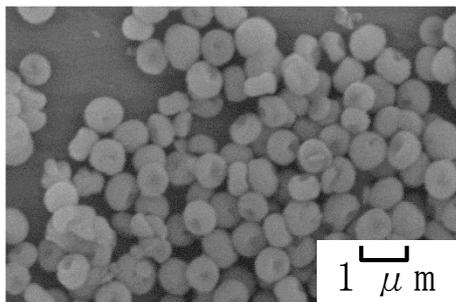


Fig.2 SEM photograph of spindle spherical vaterite with average particle size of $0.66 \mu\text{m}$.

になるに伴い構造色は、黄、赤、青、緑に変化していた。しかしながら、構造色の発現は明確ではなかった(a)。懸濁液濃度 0.04, 0.06% では構造色が(a)と比較して濃く発色していたが、0.04%のほうは各色の境目がはっきりしており、より強い発現であった((b), (c))。懸濁液濃度 0.12% では構造色の発現は不明瞭となった(d)。

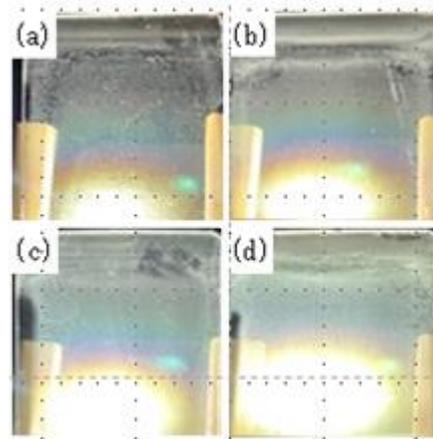


Fig.3 Photographs of samples changing concentration of suspension.
Average particle size: $0.66 \mu\text{m}$,
Suspension concentration / %
(a):0.01,(b):0.04,(c):0.06,(d):0.12

図 4 に試料のスライドガラス板表面をマイクロSCOPE および SEM 観察した写真を示す。まず、マイクロSCOPE 写真では、懸濁液濃度の増大に伴い、ガラス板上の粒子が多くなっているのが明確に観察された(a)-(d)。しかしながら、0.12% では白い部分が多く観察され、これは結晶同士が重なっていたためである(d)。さらに、詳細に観察するため、SEM 観察を行った。SEM 写真をみると、懸濁液濃度 0.01% では、バテライト結晶のガラス板への付着が非常に少なかった。このため、粒子による光の干渉が減少し、これにより構造色が薄いと考えられる(e)。懸濁液濃度 0.04% では、結晶の付着が増え、光の散乱が増加し、それにより構造色が濃く発現したと考えられる(f)。しかし、懸濁液濃度 0.06% では付着した粒子が落下してしまったのか、粒子数は 0.04% より少なくなっていた

(g). 懸濁液濃度 0.12%では結晶が積み重なって凝集体としてガラス板に付着していた(h). すなわち, 凝集体が光の透過を妨げることにより, 構造色が薄くなったと考えられる.

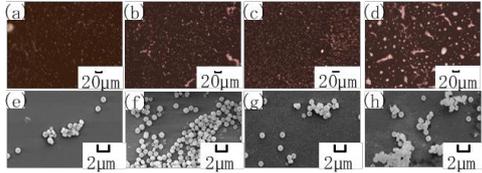


Fig.4 SEM and optical microscope images of samples synthesized changing concentration of suspension. Average particle size: $0.66\mu\text{m}$, Suspension concentration / %
(a), (e):0.01, (b), (f): 0.04, (c), (g):0.06, (d), (h):0.12

3.2 ディップコート回数の影響

平均粒径 $0.66\mu\text{m}$ の楕円状バテライトを用いて, 構造色の発現に及ぼすディップコート回数の影響について検討した. 図5に各ディップコート回数において観察された構造色の写真を示す. 1回ディップコートした試料では全体的に黄色い構造色が観察された(a). 10回行った試料では1回の試料よりも黄色味が強く発現していた(b). さらに, 回数を重ねて30回行った試料では, 内側から黄, 赤, 紫そして緑の順に構造色が強く観察された(c). しかし, 40回ディップコートした試料は構造色がわずかに薄

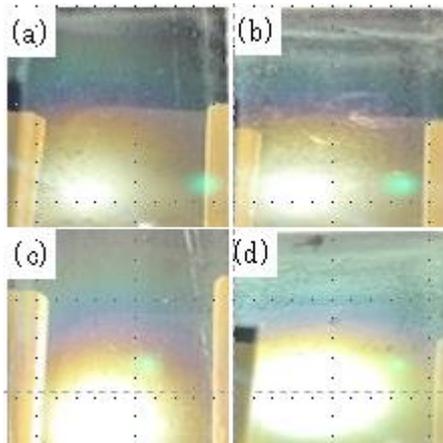


Fig.5 Photographs of structural color developed at each Number of dip coats.
Average particle size: $0.66\mu\text{m}$,
Number of dip coats / times
(a):1,(b):10,(c):30,(d):40

くなった(d).

図6に各ディップコート回数を行ったスライドガラス板表面のマイクロスコブおよびSEM観察した写真を示す. 1回ディップコートした試料ではバテライト結晶がスライドガラスにまばらに付着しているのが観察された(e). そのため, 光の干渉が減少して, 構造色の発現が弱かったと推察した. 10回行った試料では1回行った試料よりも多くの結晶が付着していたが, 結晶が付着していない箇所もみられ, 結晶の付着の仕方が不均一であった(f). 30回行った試料では何も付着していない部分もあったがかなり緻密に結晶が付着していた(g). そのため, 構造色の発現が強まったと考えられる. 40回行った試料では結晶同士が重なった部分が多く, それにより乱反射して構造色が薄くなったと考えられる(h).

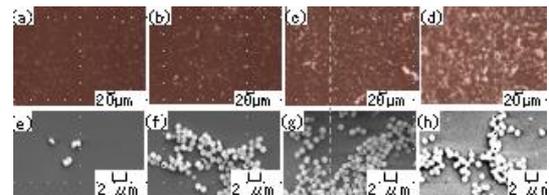


Fig.6 SEM and optical microscope images of samples synthesized changing concentration of Number of dip coats.
Average particle size: $0.66\mu\text{m}$,
Number of dip coats / times
(a), (e):1, (b),(f):10, (c), (g):30, (d),(h):40

3.3 構造色の発現に及ぼすディップコート速度の影響

つぎに, 構造色の発現に及ぼすディップコート速度の影響について検討を行った. 図7に各平均速度でディップコートした試料の写真を示す. いずれの試料もディップコート回数は30回である. 最も速度が速い平均速度 $25\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ では結晶どうしの重なりはみられず, 結晶が均一に付着しているのが観察され, また内側から, 黄, 赤, 青, 緑の構造色が濃く発色した(a). 平均速度 $5.0\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ になると, 結晶が重なった白い筋がみられるようになった. また, 内側から, 赤, 黄, 青の構造色が確認できた(b). しかしながら, 各色の境目が曖昧になった. 最も遅い平均速度 $3.3\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ では, 白い筋が多く観察

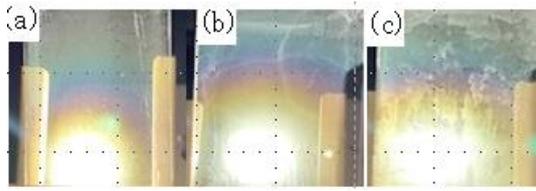


Fig.7 Photographs of samples changing average speed.
Average particle size:0.66 μm ,
Average speed / $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
(a):25,(b):5.0,(c):3.3

され、肉眼でも結晶が重なっていることが認識され、構造色も薄くなった(c)。

つぎに、これらの試料のスライドガラス板の表面のマイクروسコープおよびSEM写真を図8に示す。平均速度が遅くなるほど結晶が重なる部分が増加した。平均速度:25, 5.0 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ では結晶が1層または2層に並んでいた(d)。一方、平均速度:3.3 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ では結晶が3つ以上重なっている部分が多く、このため可視光の波長から粒径が大きく外れ、光が散乱して構造色がみえにくくなったと考えられる(f)。

3.4 構造色の発現機構

今回の研究において楕円球状バテライト結晶を並べて、そこに光を照射すると透過光で構造色が観察された。その色は観察側から黄、赤、青、緑となった。図9に構造色の入射角と発色を示す。

各色の入射角は黄が 65° 、赤が 61° 、青が 55° 、緑が 53° であった。今回は、ミー散乱のような光散乱現象が関係している可能性もあるが、楕円球状の粒子が層を形成していること

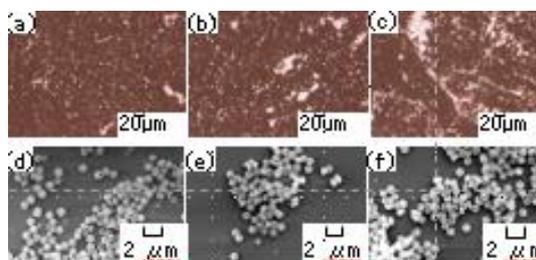


Fig.8 SEM and optical microscope images of samples changing average speed.
Average particle size:0.66 μm ,
Average speed / $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
(a), (d):25, (b),(e):5.0, (c),(f):3.3

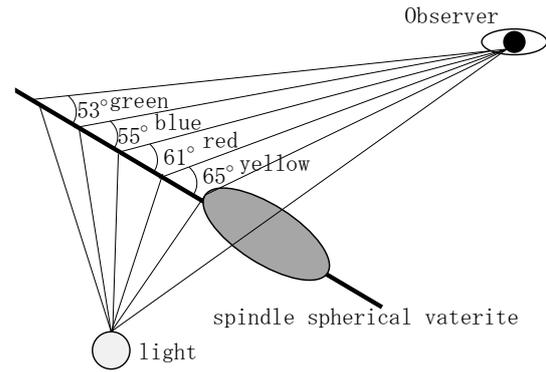


Fig.9 Incident angle of each structural color.

に着目し、近似的に薄膜干渉理論を用いて解析を試みた。光の干渉が強め合う式を

$$2dncos\theta=(m+1/2)\lambda$$

で表現することができる。ここで n : 屈折率, d : 厚み, λ : 波長であり, m : 整数, θ : 入射角である。バテライトの屈折率は 1.56–1.66 であり, 1.58 として計算を行った。厚みは結晶が長径:短径=1:0.7の楕円球状であることから $660 \times 0.7 = 462 \text{ nm}$ とした。また, $m = 1$ とした。黄色の入射角 $\cos\theta = 65^\circ$ として計算すると波長は 433nm となった。これは青色の波長であり, その補色の黄色が透過光として発色する。赤, 青, 緑の入射角で計算すると, 赤色の入射角 $\theta = 61^\circ$ のとき 497nm, 青色の入射角 $\theta = 55^\circ$ のとき 588nm, 緑色の入射角 $\theta = 53^\circ$ のとき 617nm を示した。それぞれの波長の補色は赤, 青, 緑色であり, 肉眼で観察した色とほぼ一致した。

4. おわりに

本研究では、MEA を用いて合成した平均粒径 0.66 μm の楕円球状バテライトを用いて、構造色の発現について検討を行った。結晶が長径:短径=1:0.7の楕円球状であることから、平均粒径 $\sim 0.7 \times$ 平均粒径に準ずる色が観察できた。スライドガラスに付着した結晶が少ないと、透過する光が減少し構造色が薄くなり、何層にも重なって付着すると可視光の波長から粒径が大きく外れ、光が分散し構造色が薄くなった。

そこで、構造色の現時点での最適なディップコート条件は、懸濁液濃度0.04%,平均速度25cm・s⁻¹で30回ディップコートした試料であった。また、光の干渉が強め合う式を $2d\text{ncos } \theta = (m+1/2)\lambda$ で表現することができ、求めた光の波長の補色と、観察できた色がほぼ一致した。

参考文献

- 1) K. Hashimoto, *J.Soc.Inorg.Mater.,Japan*, **2010**, *17*, 306-313.
- 2) N.Fukazawa, *Journal of the Surface Finishing Society of Japan*, **2010**, *11*, 574-576.
- 3) 特開 2016-534186
- 4) T.Ishizaki, *Journal of the Surface Finishing Society of Japan*, **2010**, *11*, 747-750.
- 5) Michinari Kohri et al. *LANGMUIR* **2019**, *35*, 5574-5580.
- 6) 守吉佑介 “無機材料必須 300-原理・物性・応用- “, 三共出版, **2008**, p.477-500.
- 7) 特開 2010-222161
- 8) Y.Kojima, Y.Kawamoto, R.Koshikawa, T.Umegaki, *J.Soc.Inorg.Mater.,Japan*, **2015**, *22*, 206-212.
- 9) Alexander Finnemore et al. *Biomimetic Layer-by-Layer Assembly of Artificial Nacre*, **2012**, *966*, 1-7.
- 10) Y.Kojima, A.Sadotomo, T.Umegaki, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, **1992**, *100*, 1145-1153.
- 11) R.Natsume, T.Umegaki, Y.kojima, *J. Soc. Inorg. Mater., Japan*, **2020**, *27*, 163-168.

E. coli および *Candida* に対する 抗生物質と天然系抗菌剤の三剤併用効果

田中 昂希, 谷田 育宏, 大澤 敏

金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所, 〒924-0838 石川県白山市八束穂 3-1

Three drugs combined effect of antibiotics and natural antimicrobial agents against *E. coli* and *Candida*

Koki Tanaka, Ikuhiro Tanida, Satoshi Osawa

Genomu Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology,
Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa, 924-0838

E-mail : b6900980@planet.kanazawa-it.ac.jp

Abstract

The three drugs combined effects of various antibiotics and natural antimicrobial substances, Benzyl isothiocyanate (BITC), Cinnamaldehyde (CAL) have been investigated against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*). Antimicrobial activities were determined by minimum inhibitory concentration (MIC) using micro-dilution method. The combination effect was judged by the fractional inhibitory concentration (FIC) index using the checkerboard method. Microencapsulation was performed by a submerged curing coating method in which a mixture of sodium alginate and an antibiotic or antibacterial agent was reacted with calcium chloride to form capsules by ionic cross-linking. The results showed that the combination of Polymyxin B and BITC, CAL had combined effect against *E. coli*. The combination of Amphotericin B, BITC and CAL showed combined effects on *C. parapsilosis*. MIC value of three drugs combination is much lower than that of two drugs combination, leading to reduction of antibiotic usage. Furthermore, sustained release of antimicrobial agents from microcapsules was conformed *in vitro* experiment.

Keywords : Antibiotics, Natural antimicrobial agent, Combined effect, Microcapsule

Received February 6, 2021; accepted March 1, 2021

1 緒言

2019年における全世界の主な死因は、虚血性心疾患や脳卒中、肺疾患などの非感染症であるが、低所得国の死因TOP10のうち、6つは感染症である¹⁾。また、近年では、薬剤耐性菌の患者数も増加傾向にあり、対策が求められている。薬剤耐性菌に対して、世界的な対応が行われなければ、2050年には世界で、年間約1000万人が死亡するとの試算が発表されている²⁾。これらの感染症には、抗生物質を用いた治療が行われるが、抗生物質は様々な副作用を引き起こすことが知られている^{3,4)}。特に、真菌感染症において、高頻度で発生するカンジダ症⁵⁾の治療に中心的な役割を果たしているAmphotericin Bは、抗真菌スペクトルは広いものの、腎毒性が強く、低カリウム血症等を引き起こすことが知られている^{6,7)}。また、新規抗生物質の開発は、新規ターゲット分子の探索が困難であり、開発コスト、収益性といった観点から、停滞傾向にある⁸⁾。そのため、既存の抗生物質を使用して、副作用を軽減させる治療法が必要である。

本研究では、抗生物質と、抗生物質とは異なる作用機構を有する天然系抗菌剤であるBenzyl isothiocyanate (BITC)、およびCinnamaldehyde (CAL)との三剤併用による抗生物質の使用量削減を試みた。WHOが新規抗菌薬として緊急に必要な細菌に選定したものの中から⁹⁾、腸内細菌である*E. coli*、また、*Candida* spp.の中でも、*Candida albicans*に次ぐ死亡率を示す*Candida parapsilosis*¹⁰⁾に対する効果を調べた。これまでに、二剤併用効果を示す報告は多くなされている^{6, 11, 12)}が、二剤の併用では抗生物質の使用量削減には限度がある。そのため、三剤併用により、さらなる抗生物質の使用量削減を検討した。

さらに、薬剤の副作用を軽減させるアプローチとして、薬剤のマイクロカプセル (MC)化を検討した。MC化により、薬剤が徐放能を示すことが知られており、また、材料、濃度、製法

等の様々な条件設定により、薬剤の徐放が異なる挙動を示すことも知られている。そこで、三剤併用効果を示した抗真菌薬、BITC、CALをMC化させ、その薬剤の溶出挙動を検討した。

2 実験方法

抗生物質として、Ampicillin (ABPC；富士フィルム和光純薬(株)製)、Fradiomycin sulfate (FRM；東京化成工業(株)製)、Polymyxin B sulfate (PL-B；富士フィルム和光純薬(株)製)、Amphotericin B (AMPH-B；富士フィルム和光純薬(株)製)、Itraconazole (ITCZ；東京化成工業(株)製)、5-Fluorocytosine (5-FC；東京化成工業(株)製)を使用した。併用物質として選定した天然系抗菌剤には、Fig. 1に示したBenzyl isothiocyanate (BITC；東京化成工業(株)製)、Cinnamaldehyde (CAL；富士フィルム和光純薬(株)製)を用いた。

供試菌株には、*Escherichia coli* JM109 (*E. coli* JM109；タカラバイオ(株))、カンジダ属の中から、*Candida parapsilosis* NBRC1396 (*C. parapsilosis* NBRC1396；独立行政法人製品評価技術基盤機構)を選定し、本研究での試験対象とした。吸光度の測定に使用した分光光度計は、(株)日立製作所製 Spectrophotometer UV-Vis U-3310にて測定した。

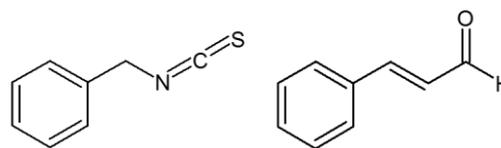


Fig. 1 Chemical structures of BITC (left) and CAL (right)

2.2 最小発育阻止濃度測定試験

本研究の抗菌性評価は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)および日本化学療法学会の試験法を参考に、併用試験のプロトコルを考案し、微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration : MIC)を

測定した^{13,14)}.

2.2.1 培地

E. coli JM109 では、滅菌済み Mueller-Hinton Broth に、ろ過滅菌した 25 mg/L の Mg^{2+} および 50 mg/L の Ca^{2+} を添加し、2 mol/L の NaOH 水溶液で pH 7.3 に調整した Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) 培地を使用した。

C. parapsilosis NBRC1396 に対しては、L-glutamine 添加 RPMI 1640 培地 (ナカライテスク (株) 製) に、3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS ; ナカライテスク (株) 製) を 0.165 mol/L となるように加えたものを、2 mol/L の NaOH 水溶液で pH 7.0 に調整し、ろ過滅菌したものをを用いた。

2.2.2 接種薬剤の調製

薬剤の力価も考慮したうえで秤量し、水溶性の抗生物質は蒸留水、非水溶性の抗生物質および BITC, CAL は DMSO (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を、それぞれ目的濃度となるように加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌、溶解させた後、ろ過滅菌したものをを使用した。その後、調製した培地を用いて、薬剤の 2 倍希釈系列を作製し、VIORAMO 製丸底 96 well plate の各ウェルに、全量が 100 μ L となるように接種した。なお、本実験の濃度では、薬剤を混合した際の薬剤の析出は確認されなかった。

2.2.3 接種菌液の調製および培養時間

E. coli JM109 はニュートリエント寒天培地, *C. parapsilosis* NBRC1396 は、ポテトデキストロース寒天培地上において、35°C, 24 h の条件で前培養した。前培養した菌体を 0.85 % 生理食塩水中に懸濁させ、ボルテックスミキサーを用いて菌体を生理食塩水中に分散させた。その後、懸濁液を McFarland 0.5 に調整後、最終接種菌数が *E. coli* JM109 : 約 5.0×10^4 cells/well, *C. parapsilosis* NBRC1396 : 約 $5 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^2$ cells/well となるように調整した。その後、96 well plate に菌液を

5 μ L 接種し、恒温槽にて 35°C, 24 h の条件で培養後、各ウェル中のなかで、菌の発育が認められない最小濃度を MIC とした。

2.4 併用効果の判定

併用効果を測定した MIC 値を用いて、併用効果の有無を判定する FIC index を算出した¹⁵⁾。下記に示す計算式により、算出値が ≤ 0.5 を相乗作用, $0.5 < \sim \leq 1.0$ を相加作用, $1.0 < \sim \leq 2.0$ を不関, > 2.0 を拮抗作用とした。なお、相乗作用および相加作用となる FIC index 1.0 以下を示したものを併用効果有りとした。

2.5 マイクロカプセルの作製

Table 1 の組成に従い、薬剤添加 1.0 wt % アルギン酸ナトリウム水溶液 (Na-Alg ; ナカライテスク (株) 製) をシリンジにいれ、注射針 (内径 0.70 mm; テルモ (株)) を通じて、液面からの高さ 5 cm より、スターラー攪拌下にある 1.0 wt % または 5.0 wt % 塩化カルシウム (富士フィルム和光純薬 (株) 製) 水溶液中へ滴下させ、アルギン酸カルシウム (Ca-Alg) ゲルとする粒径約 2 mm の各薬剤を添加した MC をそれぞれ作製した。MC 形成後、ガラスフィルターを用いて、塩化カルシウムと MC を分離し、MC を回収した。

Table 1 Composition of antimicrobial agents encapsulated Na-Alg aq

	Amount (g)
AMPH-B, 5-FC	0.1
ITCZ	0.02
BITC, CAL	1.0
5 wt% Na-Alg aq	3.0
DMSO	2.5
Distilled water	9.5

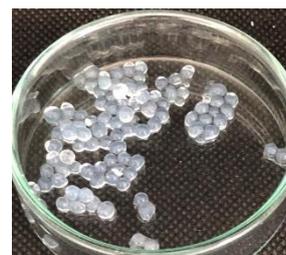


Fig. 2 Photograph of the prepared microcapsules

2.6 マイクロカプセルの薬剤溶出試験

内包する薬剤の特徴的な吸収波長、すなわち AMPH-B, ITCZ, 5-FC (385, 262, 234 nm), BITC, CAL (243, 292 nm)における吸光度を、アセトニトリル(MeCN; 富士フィルム和光純薬(株)製)-0.9%生理食塩水 (Saline) [6:4, v/v]に溶解させて測定し、検量線を作成した。作製した薬剤内包 MC 1.0 g を、50 mM のクエン酸三ナトリウム(富士フィルム和光純薬(株)製)を溶解させた 0.9 % 生理食塩水 50 mL 中に浮遊・懸濁させ、37°C, 140 rpm, 30 min の条件で振とうし、MC を完全に溶解させた。この溶液をシリンジフィルターでろ過した後、吸光度を測定し、検量線の値から MC の薬剤内包量を算出した。

溶出試験は、生理食塩水 50 mL を加えた 100 mL エルレンマイヤーフラスコに、MC 1.0 g を浮遊させ、37°C, 100 rpm の条件で振とうした。1 h 毎に溶出液のみを 500 μ L 分取し、その都度、新しい生理食塩水を 500 μ L 加える操作を、振とう開始から 6 h 経過まで、経時的に繰り返した。分取した溶出液を MeCN-Saline [6:4, v/v] に溶解させて吸光度を測定し、内包量をもとに、MC の薬剤溶出率を算出した。

3 実験結果および考察

3.1 併用物質の抗菌性および抗真菌性評価

Table 2 に、BITC, CAL 単剤の *E. coli* JM109 および *C. parapsilosis* NBRC1396 に対する MIC 測定試験結果を示す。供試菌株に対して、Table 2 の濃度で抗菌性を示すことが確認された。また、Table 2 より、CAL の *C. parapsilosis* に対する抗真菌性は特に強いことが確認された。

Table 2 MIC for BITC and CAL of microbial strains

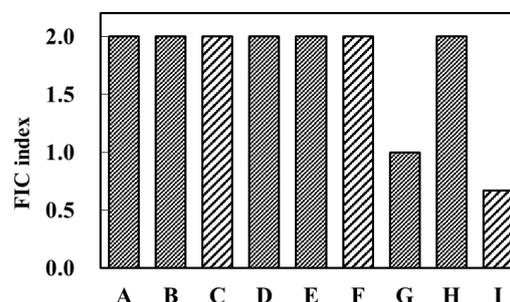
Microbial strain	MIC (μ g/mL)	
	BITC	CAL
<i>E. coli</i> JM109	200	400
<i>C. parapsilosis</i> NBRC1396	200	50

3.2 *E. coli* JM109 に対する併用試験

Table 3 に、*E. coli* JM109 に対する薬剤併用試験の結果を、Fig. 3 に併用試験での MIC 値をもとに算出した FIC index の結果を示す。Table 3 より、PL-B では三剤併用効果を示し、PL-B の MIC

値は、単剤 : 0.125 μ g/mL から、BITC との二剤併用 : 0.0625 μ g/mL, BITC と CAL との三剤併用 : 0.0313 μ g/mL へと低下し、PL-B の使用量は単剤と比較すると、三剤併用では 1/4 に抑えられた。また、Fig. 3 に示した FIC index の算出結果より、BITC との二剤併用, BITC と CAL との三剤併用では、相加効果 (FIC index \leq 1.0) を示すことが分かった。PL-B は、グラム陰性菌の細菌細胞膜に作用する薬剤である¹⁶⁾。また、BITC および CAL の詳細な抗菌メカニズムは明らかとされていないが、イソチオシアネート(ITC)類は、細菌の非特異的な酵素の不活化、呼吸系の作用障害に加え、タンパク質の改変による細菌細胞膜損傷等が報告されている^{17, 18)}。また、ITC 類の抗菌メカニズムは、 β -ラクタム系抗生物質よりペプチド系抗生物質である PL-B などに類似しているとの報告もある¹⁹⁾。CAL の抗菌メカニズムは、主に細菌細胞壁に損傷を与える²⁰⁾ため、BITC, CAL が *E. coli* の外膜構造等に損傷を与えたことにより、細菌細胞膜に作用点をもつ PL-B が作用しやすくなったことが要因となり、相加効果を示したと考えられる。

ABPC, FRM は二剤併用, 三剤併用ともに併用効果は確認されなかった。ABPC は細胞壁ペプチドグリカンに作用するが、BITC と作用メカニズムが異なる¹⁹⁾ため、併用効果を示さなかったと考えられる。また、FRM などのアミノグリコシド系抗生物質は、カチオン性のアミノ基を多数有する構造である。そのため、細菌外膜のリポ多糖の Mg^{2+} を排除することで、自らリポ多糖と結合し、外膜構造を破壊することで、リボソームに到達して作用することで抗菌性を示す²¹⁾。しかし、FRM 単剤での MIC 値以下



A: ABPC+BITC B: ABPC+CAL C: ABPC+BITC+CAL
D: FRM+BITC E: FRM+CAL F: FRM+BITC+CAL
G: PL-B+BITC H: PL-B+CAL I: PL-B+BITC+CAL

Fig. 3 FIC indices of combinations consisting of antibiotics, natural antimicrobial agents in *E. coli* JM109

Table 3 MICs for single, double and triple combinations of antibiotics, BITC and CAL against *E. coli* JM109

Combinations of antibacterial agents		MIC (μg/mL)			Ratio [※]		
		Antibiotics	BITC	CAL	double	triple	
ABPC	Single	ABPC	0.5	-	-	-	
	Double	ABPC + BITC	0.5	200	-	1	-
		ABPC + CAL	0.5	-	400	1	-
		Triple	ABPC + BITC + CAL	0.5	200	400	-
FRM	Single	FRM	0.25	-	-	-	
	Double	FRM + BITC	0.25	200	-	1	-
		FRM + CAL	0.25	-	400	1	-
		Triple	FRM + BITC + CAL	0.25	200	400	-
PL-B	Single	PL-B	0.125	-	-	-	
	Double	PL-B + BITC	0.0625	100	-	1/2	-
		PL-B + CAL	0.125	-	400	1	-
		Triple	PL-B + BITC + CAL	0.0313	100	100	-

※ Ratio : Ratio of [MIC of antibiotics when Combined use of double or triple] to [MIC of antibiotics alone], that is, ratio of decrease in antibiotics usage.

$$\text{FIC index (2 drugs)} = \frac{\text{MIC of Antibiotics in combined}}{\text{MIC of Antibiotics alone}} + \frac{\text{MIC of (BITC / CAL) in combined}}{\text{MIC of (BITC / CAL) alone}}$$

$$\text{FIC index (3 drugs)} = \left(\frac{\text{MIC of Antibiotics in combined}}{\text{MIC of Antibiotics alone}} + \frac{\text{MIC of BITC in combined}}{\text{MIC of BITC alone}} + \frac{\text{MIC of CAL in combined}}{\text{MIC of CAL alone}} \right) / 1.5$$

では、リポ多糖の遊離作用が低かったことで、併用効果を示さなかったと考えられる。

3.3 *C. parapsilosis* NBRC1396 に対する併用試験

Table 4 に、*C. parapsilosis* NBRC1396 に対する三剤併用試験結果を、Fig. 4 に FIC index の算出結果を示す。選定した全ての抗生物質、すなわち AMPH-B, ITCZ, 5-FC と CAL の二剤併用では抗生物質の MIC 値が 1/4 ~ 1/2 に、さらに BITC を加えた三剤併用では、1/8 ~ 1/4 に減少し、抗生物質の使用量が二剤併用時よりも減少することが分かった。また、Fig. 4 に示す FIC index の値より、ITCZ, 5-FC と CAL との二剤併用においては、相加効果 (FIC index ≤ 1.0) を示し、さらに、三剤併用試験においては、全ての組み合わせで相加効果を示し、抗生物質だけではなく併

用物質である BITC, CAL の MIC 値も、三剤併用により低くなった。

C. parapsilosis に対する BITC および CAL の抗菌メカニズムに関しても、詳しくは解明されていないものの、BITC は真菌細胞壁に損傷を与え、代謝酵素を阻害することが知られている²²⁾。また、CAL は真菌細胞壁への損傷に加え、細胞壁合成酵素への阻害、真菌中のミトコンドリアおよび真菌細胞膜に損傷を与えるといった抗菌メカニズムが報告されている²³⁻²⁵⁾。また、本研究により、CAL の *C. parapsilosis* に対する MIC は、細菌である *E. coli* よりも低い傾向 (Table 2) にある。

本研究では真菌細胞膜に作用する AMPH-B, ITCZ, 真菌の核酸合成を阻害する 5-FC を選定した¹⁶⁾。これらの薬剤は、全て真菌細胞壁内部

Table 4 MICs for single, double and triple combinations of antibiotics, BITC and CAL against *C. parapsilosis* NBRC1396

Combinations of antifungal agents		MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Ratio [※]		
		Antibiotics	BITC	CAL	double	triple	
AMPH-B	Single	AMPH-B	0.5	-	-	-	
	Double	AMPH-B+BITC	0.5	200	-	1	-
		AMPH-B+CAL	0.125	-	50	1/4	-
	Triple	AMPH-B+BITC+CAL	0.0625	100	25	-	1/8
ITCZ	Single	ITCZ	0.5	-	-	-	-
	Double	ITCZ+BITC	0.5	200	-	1	-
		ITCZ+CAL	0.25	-	25	1/2	-
	Triple	ITCZ+BITC+CAL	0.0625	100	25	-	1/8
5-FC	Single	5-FC	0.125	-	-	-	-
	Double	5-FC+BITC	0.125	200	-	1	-
		5-FC+CAL	0.0625	-	25	1/2	-
	Triple	5-FC+BITC+CAL	0.0313	50	25	-	1/4

※ Ratio : See footnote to Table 3.

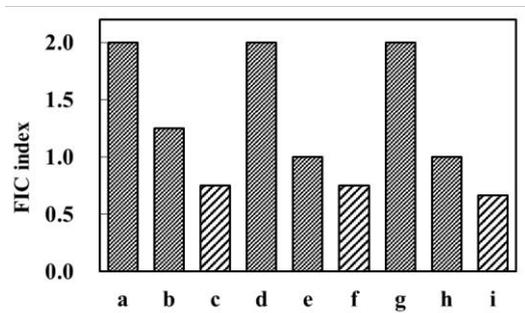


Fig. 4 FIC indices of combinations consisting of antibiotics, natural antimicrobial agents in *C. parapsilosis* NBRC1396

に作用点をもつため、二剤併用では、*C. parapsilosis* に対して、抗生物質と CAL の強力な抗真菌作用により、抗生物質の使用量が削減されたと考えられる。また、CAL との二剤に加え、さらに BITC を加えた三剤併用では、BITC および CAL が真菌細胞壁などの真菌外膜構造への損傷に加え、酵素阻害、ミトコンドリアに

対する機能阻害等の多様な抗菌メカニズムにより、*C. parapsilosis* に損傷を与えたことで、抗生物質が真菌細胞壁内部への取り込みが促進され、二剤併用時よりもさらに MIC 値が低くなったと考えられる。

3.4 マイクロカプセルの薬剤溶出試験

Fig. 5 に薬剤添加 MC の薬剤溶出挙動を示す。薬剤を MC 化することで、薬剤が徐放能を有することが明らかとなり、塩化カルシウム濃度が高いものほど、また、分子量が大きいものほど溶出速度が遅い傾向にあった。本研究では、Alg-Na と塩化カルシウム中の Ca^{2+} のイオン架橋により Ca-Alg ゲルとなる液中硬化被膜法により MC を作製した。Ca-Alg は、1 価金属塩水溶液中において、Ca-Alg ゲル中の Ca^{2+} と、1 価金属イオン間でのイオン交換反応により、Ca-Alg の一部が Na-Alg となることで、Ca-Alg の架橋密度が低下し、MC の弾性率を弱めることが知られている。そのため、1 価金属塩水溶液中では、MC の高分子網目内に多くの水を含んだ構造体となる²⁶⁾。以上の点から、Ca-Alg と溶出液間に

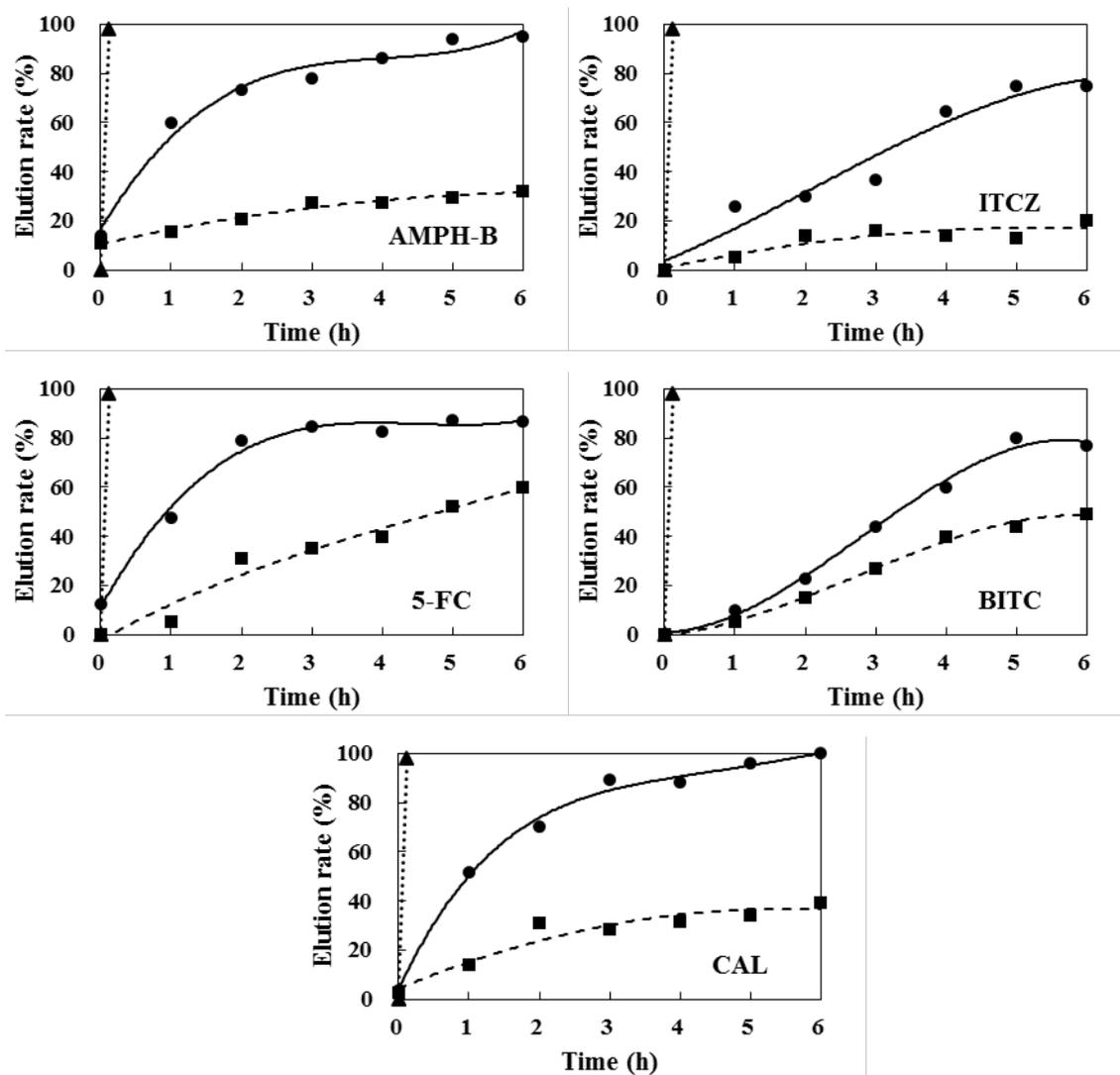


Fig. 5 Comparison of elution rates of MC containing various antimicrobial agents at 37°C in saline stirring at 100 rpm; microencapsulated with 1 wt % (●), 5 wt % (■) CaCl₂ aqueous solution, non-microencapsulation (▲)

において、薬剤の溶出が可能となり MC は徐放能を示し、また、5 wt %塩化カルシウム水溶液で作製した MC は、1 wt %で作製したものと比較すると、Ca-Alg の架橋密度がある程度維持されたことにより、徐放速度が 1 wt %のものより遅くなったと考えられる。

Ca-Alg の膜透過性には、溶質分子である薬剤の分子サイズが関係しており、分子量の大小だけではなく、分子構造が関係することも明らかとなっている²⁶⁾。そのため、分子量の大小、分子構造の違い、および Ca-Alg と各薬剤間との親和性の違い、分配係数などにより、薬剤の溶出挙動が異なることが示唆された。

4 結言

本研究では、臨床現場において使用される抗生物質と、植物由来の抗菌成分である BITC, CAL を併用させた三剤併用試験を行った。その結果、PL-B および AMPH-B, ITCZ, 5-FC と BITC, CAL との三剤併用により、単剤、二剤併用時と比較して抗生物質の MIC 値が小さくなる傾向にあり、抗生物質の使用量がさらに削減できることが示された。また、薬剤内包 MC は、その架橋強度により薬剤徐放能を制御でき、三剤併用と合わせて抗生物質の使用量削減に有効であると結論した。

参考文献

- 1) WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 2020.12.27 参照
- 2) J.O. Neill, *HM Government Wellcome Trust*, 1-20 (2014).
- 3) 堀誠治, *Yakugaku Zasshi*, **127**, 931-937 (2007).
- 4) 堀誠治, *Yakugaku Zasshi*, **131**, 1423-1428 (2011).
- 5) Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J., *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**, 288-305 (2012).
- 6) 野崎阿季子, 高橋栄造, 岡本敬の介, 伊藤秀之, 波多野力, *Yakugaku Zasshi*, **130**, 895-902 (2010).
- 7) T.J. Walsh, R.W. Finberg, C. Arndt, J. Hiemenz, C. Schwartz, D. Bodensteiner, P. Pappas, N. Seibel, R.N. Greenberg, S. Dummer, M. Schuster, J.S. Holcenberg, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 764-771 (1999).
- 8) 舘田一博, *日本内科学会雑誌*, **102**, 2908-2914 (2013).
- 9) WHO, <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, 2020.11.20 参照
- 10) Puig-Asensio M., Pemán J., Zaragoza R., Garnacho-Montero J., Martín-Mazuelos E., Cuenca-Estrella M., Almirante B., *Crit. Care Med.*, **42**, 1423-1432 (2014).
- 11) Samonis G., Maraki S., Karageorgopoulos D.E., Vouloumanou E.K., Falagas M.E., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 695-701 (2012).
- 12) Rathod T., Padalia T., Chanda S., *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **6**, 579-589 (2017).
- 13) 日本化学療法学会, *Chemotherapy*, **38**, 102-105 (1990).
- 14) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, Third ed.*, CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, (2008).
- 15) 木場由美子, 猪川和朗, 小野寺一, 長岡里枝, 原稔典, 城市由美子, 横崎典哉, 大毛宏喜, 森川則文, *日本化学療法学会雑誌*, **60**, 469-477 (2012).
- 16) 西島正弘, 後藤直正, 増澤俊幸, 河村好章編, "薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 [第2版]", 廣川書店, (2012).
- 17) 岸本憲明, 田野達男, 原田靖裕, 増田秀樹, *日本食品保蔵科学会誌*, **25**, 7-13 (1999).
- 18) Sofrata A., Santangelo E.M., Azeem M., Borg-Karlson A.K., Gustafsson A., Pütsep K., *PLoS One*, **6**, 1-10 (2011).
- 19) Lin C.M., Preston J.F. 3rd, Wei C.I., *J. Food Prot.*, **63**, 727-734 (2000).
- 20) Shen S., Zhang T., Yuan Y., Lin S., Xu J., Ye H., *Food Control*, **47**, 196-202 (2015).
- 21) 山口明人, 澤井哲夫, *ファルマシア*, **28**, 867-871 (1992).
- 22) Pereira C., Calado A.M., Sampaio A.C., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, (2020).
- 23) Y. Taguchi, Y. Hasumi, S. Abe, Y. Nishiyama, *Med. Mol. Morphol.*, **46**, 8-13 (2013).
- 24) Ka H., Park H.J., Jung H.J., Choi J.W., Cho K.S., Ha J., Lee K.T., *Cancer lett.*, **196**, 143-152 (2003).
- 25) Bang K.H., Lee D.W., Park H.M., Rhee Y.H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1061-1063 (2000).
- 26) 齋藤設雄, 根津尚史, 平雅之, 佐々木かおり, 荒木吉馬, *歯科材料・器械*, **26**, 311-316 (2007).

編集後記

本誌は、本年9月7日付で国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) が運営する電子ジャーナルプラットフォーム J-STAGE への採択の通知を受けました。来年度のできるだけ早い時期に本協会のウェブから J-STAGE に移行する予定です。

お陰様で、協会ウェブへの電子版の公開に移行後も、会員の皆様から多くの興味深い論文原稿を御投稿いただいております。J-STAGE への移行後には、各記事に DOI(Digital Object Identifier)が付与されることもあり、可視性が格段に高まることが期待されます。今後も奮って御投稿いただけますようお願い申し上げます。

(浜松医科大学 三浦康弘)



MATERIAL TECHNOLOGY 材料技術

昭和62年8月5日第三種郵便物許可 令和3年4月25日発行（隔月25日発行） 第39巻 第2号
定価2,100円