

抗菌性と生体適合性を併せ示す生糸織物の開発

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

川下 将一

Raw silk can be doped with metal element such as Ca and Zn due to high affinity of sericin, outer layer of the raw silk. Thus, raw silk doped with metal element is expected to show various functions favorable as biomaterials. In this study, we investigated to apatite-forming ability in simulated body fluid (SBF) and antibacterial activity against *Escherichia coli* of metal-doped raw silk fabric. The samples were prepared by soaking in the aqueous solution containing Ca, Cu or Zn ion. Cu-doped and Zn-doped raw silk fabric showed antibacterial activity, suggesting antibacterial agents of Cu and Zn released from the samples killed the bacteria. On the other hand, Ca-doped raw silk fabric showed both apatite-forming ability and antibacterial activity. The apatite formation on fabric is might be because Ca ion released from the sample increased a degree of supersaturation of SBF to respect with apatite and accelerate the apatite formation. Also, it is considered that release of Ca ion causes pH increase locally and the bacteria hardly survive at the sample surface. Therefore, Ca-doped, Cu-doped and Zn-doped raw silk fabric are useful as antibacterial biomaterials. Further, Ca-doped raw silk fabric has potential to bond to living bone.

1. 緒言

生糸は蚕の繭を構成する天然繊維であり、フィブロインをセリシンが覆ったタンパク質の2層構造を取っている¹⁾。これまで生糸表面のセリシンはアルカリ溶液やセッケン水などにより除去および廃棄されてきたが、セリシンには創傷治癒効果²⁾や抗酸化作用³⁾に加え、ヒト皮膚線維芽細胞の接着促進効果⁴⁾などが最近報告されているようになり、近年では様々な医用材料への応用が期待されている。また、セリシンに含まれるセリンやアスパラギン酸は側鎖にヒドロキシ(OH)基あるいはカルボキシル(COOH)基を含むため、カルシウム(Ca)や亜鉛(Zn)などの金属元素と高い親和性を示す⁵⁾。従って、生糸表面に金属元素を導入すれば、生糸がバイオマテリアルとして有用な様々な機能を発現する可能性がある。

骨結合性材料は、生体内においてその表面に骨類似アパタイトを形成し、それを介して生体骨と結合する^{6,7)}。人工材料のアパタイト形成能を評価する方法として、ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液(SBF: simulated body fluid)に試料を浸漬する方法がある⁸⁾。これまでにSBFのイオン濃度を1.5倍にした1.5SBF中において、生糸織物表面にアパタイトが形成することが見出されている⁹⁾。しかし、1.5SBF中で生糸織物表面に形成されたアパタイトは、そのCa/P比や格子定数がヒトの

アパタイトのそれらと大きく異なる¹⁰⁾ため、生体内で優れた骨結合性を示さない可能性がある。一方、CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラスやケイ酸カルシウムで処理したエチレン-ビニルアルコール重合体は、材料中からCaイオンが溶出することによって、SBF中でもアパタイトを形成する^{11,12)}。従って、生糸にCaイオンを導入できれば、SBF中においても生糸がアパタイトを形成する可能性がある。さらに、生糸を織物にすれば、生糸中心部のフィブロインが機械的強度に優れる¹⁾ことから、高荷重のかかる腱や靭帯などの代替材としての応用を期待できる。

一方、近年、人工材料埋入時の手術創部の感染症(SSI: surgical site infection)が問題となっている。整形外科領域においては、脊椎手術では0.6~11.9%、初回人工関節置換術では0.2~2.9%、人工関節再置換術では0.5~17.3%のSSI発症が報告されている¹³⁾。一度SSIを発症してしまうと、埋入した人工材料の再置換が必要となり、患者に大きな負担を強いることから、人工材料自体が抗菌効果を発揮することが望ましい。近年では、抗菌元素として知られる銀(Ag)や銅(Cu)、Znなどを材料に担持させる方法¹⁴⁻¹⁶⁾や、酸化チタン(TiO₂)の光触媒による酸化作用を利用する方法¹⁷⁾が試みられている。後者の方法では光の届かない生体内における抗菌効果は期待できないが、前者の方法であれば生体内でも抗菌効果を期待できる。そこで本研究では、Ca、CuあるいはZnを導入した生糸織物のSBF中におけるアパタイト形成能および大腸菌に対する抗菌性を評価することにより、骨結合性や抗菌性を示す生糸織物を得る基礎的条件を調べた。

2. 方法

2.1. 試料の作製

いずれも特級試薬の塩化カルシウム(CaCl₂)、塩化銅(II)



Development of raw silk fabric with antibacterial activity and biocompatibility

Masakazu Kawashita

Institute of Biomaterials and Bioengineering
Tokyo Medical and Dental University

二水和物 (CuCl₂·2H₂O) あるいは塩化亜鉛 (ZnCl₂) を蒸留水に溶解させることにより、1 M の CaCl₂、CuCl₂ あるいは ZnCl₂ 水溶液を調製した。1 cm 四方に裁断した市販の生糸織物 (R-Silk) を各水溶液 30 mL に 36.5℃ で 24 時間浸漬した後、取り出し、蒸留水で洗浄してから室温で自然乾燥させた。CaCl₂、CuCl₂ あるいは ZnCl₂ 水溶液に浸漬した試料の名称は、それぞれ R-Ca、R-Cu あるいは R-Zn とした。なお、後述の抗菌試験には、1.5 cm 四方の試料に上記処理を行ったものを用い、1 cm 四方の試料の場合と単位面積あたりの液量を合わせるため、1.5 cm 四方の試料を浸漬する CaCl₂、CuCl₂ あるいは ZnCl₂ 水溶液の量は 67.5 mL とした。

2.2. 試料表面の形状および元素分析

R-Silk および 2.1. で得られた試料の表面を電子走査型顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。また、5 日間真空凍結乾燥した R-Silk、R-Ca、R-Cu および R-Zn の表面に存在する元素を X 線光電子分光分析装置 (XPS) を用いて調べた。

2.3. 試料の溶出試験

1000 mL の蒸留水に 6.118 g のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンを溶解させ、そこに水溶液の pH が 7.4 になるように 1 M 塩酸を加え、これをトリス塩酸緩衝液 (TBS) とした。R-Ca、R-Cu または R-Zn を 30 mL の TBS に 36.5℃ で 1、3 あるいは 7 日間浸漬した。その後、TBS から試料を取り出し、それぞれの TBS 中における Ca、Cu あるいは Zn イオンの濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) によって測定した。また、TBS に 7 日間浸漬した試料の表面に存在する元素を、XPS を用いて調べ、TBS に 7 日間浸漬した試料から溶出した Ca、Cu あるいは Zn の割合を式 (1) によって見積もった。

$$\text{溶出割合 (\%)} = \frac{(C_0 - C_7)}{C_0} \times 100 \dots\dots (1)$$

C₀: TBS 浸漬前の試料表面の Ca、Cu あるいは Zn の存在率を炭素 (C) の存在率で規格化した値。

C₇: TBS 浸漬 7 日後における試料表面の Ca、Cu あるいは Zn の存在率を C の存在率で規格化した値。

2.4. 擬似体液 (SBF) 浸漬試験

ISO 23317: 2014 に準拠し、pH 7.4 に調製した SBF を作製した。R-Ca、R-Cu あるいは R-Zn を 30 mL の SBF に 36.5℃ で 3、5 あるいは 7 日間浸漬し、その後、試料を取り出し、蒸留水で洗浄した後、室温で自然乾燥させた。SBF 浸漬後の試料の表面構造を SEM および X 線回折装置 (XRD) を用いて調べた。SBF に 7 日間浸漬した試料については、エネルギー分散型 X 線分光器 (EDX) を用いて表面の元素分析を行った。また、試料浸漬による SBF の Ca およびリン (P)

のイオン濃度の変化を ICP-AES を用いて測定した。

2.5. ハロー法による抗菌試験

JIS L 1902: 2015 を参考にして、ハロー法によって試料の抗菌性を定性的に評価した。蒸留水に肉エキス、ペプトンおよび塩化ナトリウムを加えてブイオン培地を作製した。大腸菌 (*Escherichia coli*) 1 コロニー分をブイオン培地 20 mL に移植後、18 時間一次培養し、さらに菌液 0.4 mL を新しいブイオン培地 20 mL に移し替え、4 時間二次培養した。蒸留水で 20 倍に希釈したブイオン培地を用いて二次培養後の菌液を 100 倍に希釈し、これを抗菌試験に用いた。調製した菌液 1 mL をペトリディッシュに加え、その上から普通寒天培地 15 mL を加えてよくかき混ぜた。普通寒天培地上に試料を静置し、36.5℃ で 24 時間培養した。培養後、試料の周りのハロー (菌の発育阻止帯) の有無を確認し、大腸菌に対する試料の抗菌性を評価した。

2.6. 菌液吸収法による抗菌試験

JIS L 1902: 2015 を参考にして、菌液吸収法によって試料の抗菌性を定量的に評価した。蒸留水に肉エキスおよびペプトンを加えて、ニュートリエント培地 (NB) を作製した。大腸菌 1 コロニー分を 2.5. と同様の方法で NB にて一次培養および二次培養を行った。蒸留水で 20 倍に希釈した NB を用いて、二次培養後の菌液を 1000 倍に希釈し、これを抗菌試験に用いた。

バイアル瓶に入れた 6 検体に、上記で調整した菌液 50 μL をそれぞれ数か所に分けて接種した。3 検体は 36.5℃ で 18 時間培養、残りの 3 検体はポリソルベート 80 を添加した生理食塩水を加え 30 回手振りして菌を洗い出した。続いて、洗い出した菌液から 10 倍希釈系列を作製した。それぞれの倍率で希釈した菌液 1 mL をペトリディッシュに加え、その上から混釈平板培養法用寒天培地 (EA) を 15 mL 加えてよくかき混ぜた。EA は、蒸留水に脱水酵母エキス、カゼイン製トリプトン、D (+)-グルコースおよび寒天を加えることで作製した。36.5℃ で 24 時間培養後、コロニー数を数えた。

菌液を接種して 18 時間の培養を行った 3 検体についても上記と同様の方法で大腸菌のコロニー数を数えた。その後、JIS L 1902: 2015 に従って、菌増殖値 (F) および抗菌活性値 (A) を算出した。なお、コントロールには 1.5 cm 四方の R-Silk を用いた。有意差の評価については、Tukey の方法を使用し、有意水準は 5% とした。

3. 結果

3.1. 試料表面の構造および元素分析

Fig. 1 に各試料の SEM 写真を示す。R-Ca および R-Cu の表面形状と R-Silk のそれに差異は見られなかったが、R-Zn の表面には析出物 (矢印) が確認された。Table 1 に

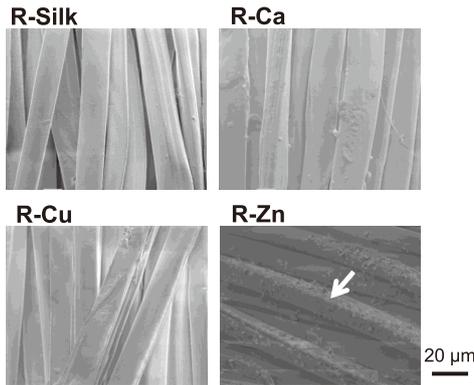


Fig. 1 SEM photographs of R-Silk, R-Ca, R-Cu and R-Zn.

Table 1 Surface abundance of elements on samples which was measured by XPS.

Sample	Surface abundant (atomic%)							
	C	N	O	Cl	Si	Ca	Cu	Zn
R-Silk	67.3	4.82	20.8	—	7.07	—	—	—
R-Ca	65.7	4.56	18.4	0.37	8.47	0.62	—	—
R-Cu	65.2	5.27	20.6	0.17	8.64	—	0.13	—
R-Zn	66.1	4.47	19.2	0.83	8.67	—	—	0.76

(—: Not detected)

XPSによる各試料表面の元素分析の結果を示す。R-Ca、R-CuあるいはR-Znについて、それぞれ微量のCa、CuあるいはZnが検出された。また、全ての試料において、ケイ素(Si)が検出された。

Fig. 2にR-Ca、R-CuあるいはR-Znの Ca_{2p} 、 Cu_{2p} あるいは Zn_{2p} XPSスペクトルを示す。R-Caは、347.6および351.1 eV付近に Ca^{2+} に帰属される Ca_{2p} ピークを与えた^{18, 19}。また、R-Cuは、932.9、934.8および944.6 eV付近に Cu^+ および Cu^{2+} に帰属される Cu_{2p} ピークを与えた¹⁹。さらに、R-Znは、1022.0 eV付近に酸化亜鉛(ZnO)および/あるいは水酸化亜鉛($Zn(OH)_2$)に帰属される Zn_{2p} ピークを与えた^{19, 20}。

3.2. 試料の金属イオン溶出特性

Fig. 3に種々の期間TBSに浸漬した各試料から溶出したCa、CuあるいはZnイオンの濃度を示す。R-Ca、R-CuあるいはR-Znを浸漬したTBSにおいて、それぞれCa、CuあるいはZnイオンの濃度が上昇した。また、いずれの金属イオンの場合も、TBS浸漬1日後と浸漬7日後でその濃度はほぼ同じであった。Table 2にTBSに7日間浸漬した各試料の表面のXPSによる元素分析の結果を示す。Table 1、2および式(1)から、R-Ca中のCaは73.3%、R-Cu中のCuは33.2%、R-Zn中のZnは35.7%程度、TBS中に溶出したと見積もられた。

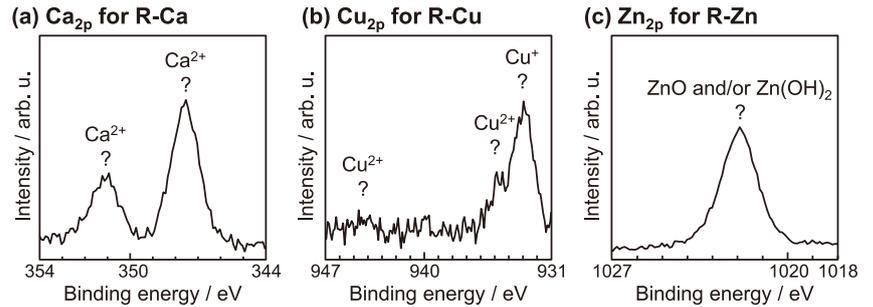


Fig. 2 Ca_{2p} XPS spectrum of R-Ca (a), Cu_{2p} XPS spectrum of R-Cu (b) and Zn_{2p} XPS spectrum of R-Zn (c).

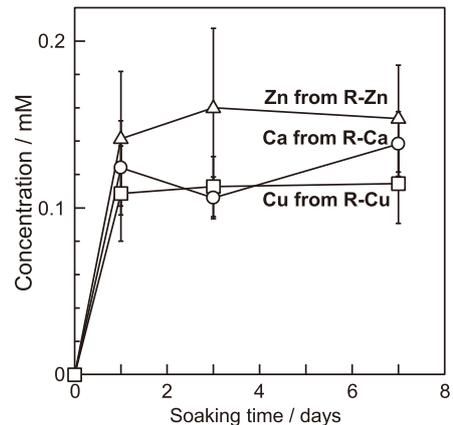


Fig. 3 Concentrations of Ca, Cu and Zn released from R-Ca, R-Cu and R-Zn into TBS, respectively.

Table 2 Surface abundance of elements on samples after soaking in TBS for 7 days which was measured by XPS.

Sample	Surface abundant (atomic%)							
	C	N	O	Cl	Si	Ca	Cu	Zn
R-Ca	67.4	4.12	19.6	—	8.72	0.17	—	—
R-Cu	67.5	4.74	18.8	—	8.88	—	0.09	—
R-Zn	67.6	4.56	18.7	0.19	8.49	—	—	0.50

(—: Not detected)

3.3. 試料のアパタイト形成能

Fig. 4に、SBF浸漬後のR-Ca、R-CuあるいはR-ZnのSEM写真を示す。R-Caでは、SBF浸漬後3日後にその表面に析出物(矢印)が観察され、浸漬後5日後から7日後にかけてR-Caの表面全体が析出物によって覆われた。R-Cuでは、SBF浸漬前後においてその表面構造に変化は見られなかった。R-Znでは、SBF浸漬前から表面に見られた析出物(Fig. 1)が浸漬後7日後にも残存していた。

Fig. 5に、SBF浸漬後のR-Ca、R-CuあるいはR-ZnのXRDパターンを示す。SBFに5あるいは7日間浸漬したR-Caでは、水酸アパタイト(HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)に帰属される回折ピークが観察された^{9, 21}。一方、R-CuおよびR-Znでは、SBF浸漬後7日までの間にXRDパター

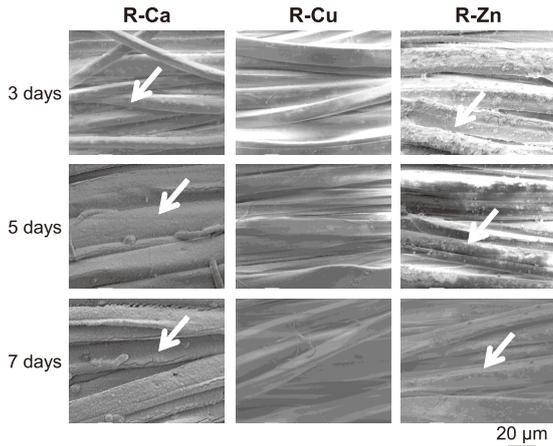


Fig. 4 SEM images of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for various periods. Arrows indicate precipitates.

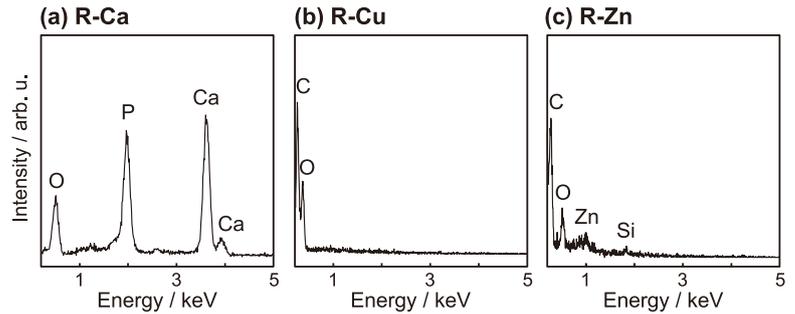


Fig. 7 EDX spectra of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for 7 days.

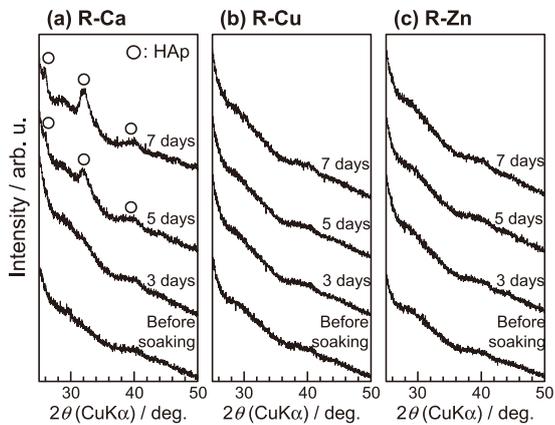


Fig. 5 XRD patterns of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for various periods.

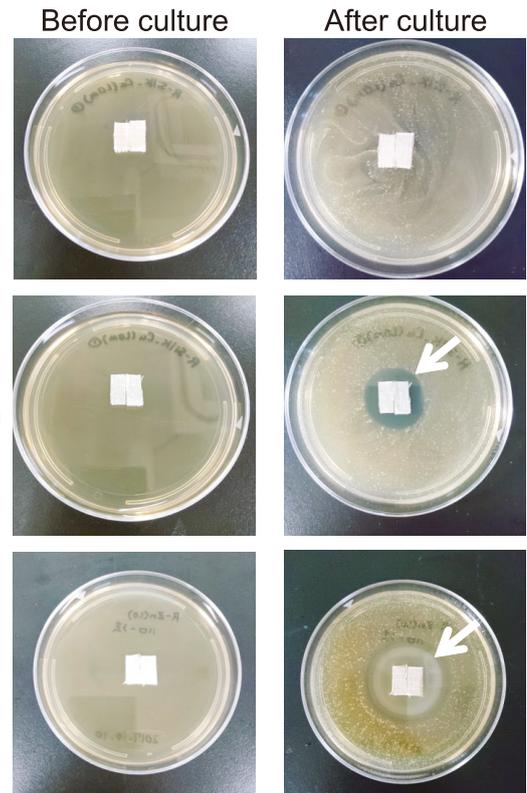


Fig. 8 Results of qualitative antibacterial tests for R-Ca, R-Cu and R-Zn before and after culture.

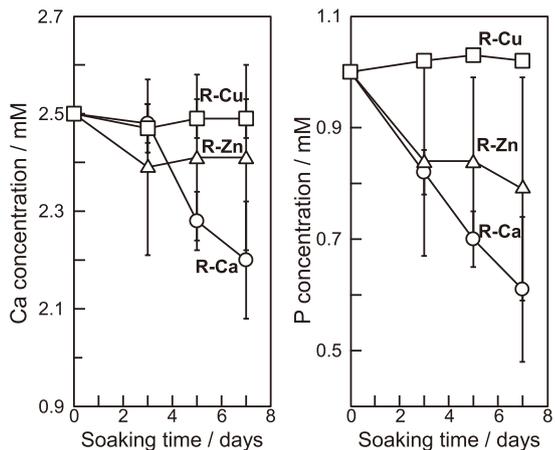


Fig. 6 Change in calcium and phosphorus concentration of SBF after soaking R-Ca, R-Cu and R-Zn for various periods.

ンに変化は見られなかった。

Fig. 6 に、試料浸漬による SBF の Ca および P 濃度の変化を示す。R-Ca の浸漬によって SBF 中の Ca および P イオンの濃度が顕著に低下したが、R-Cu では、Ca および P

イオンの濃度低下は見られなかった。また、R-Zn を浸漬した SBF においても Ca および P イオン濃度の顕著な低下は確認されなかった。

Fig. 7 に、SBF 浸漬 7 日後の各試料の EDX スペクトルを示す。R-Ca では、Ca と P の EDX ピークが見られたが、R-Zn では、それらのピークは確認されず、Zn の EDX ピークがわずかに見られた。また、R-Cu においては、Cu の EDX ピークがほとんど見られなかった。

3.4. 試料のアパタイト形成能

Fig. 8 に、ハロー法による抗菌試験の結果を示す。培養 24 時間後において、R-Cu および R-Zn ではハロー (矢印) が見られた。従って、これらの試料は大腸菌に対して抗菌

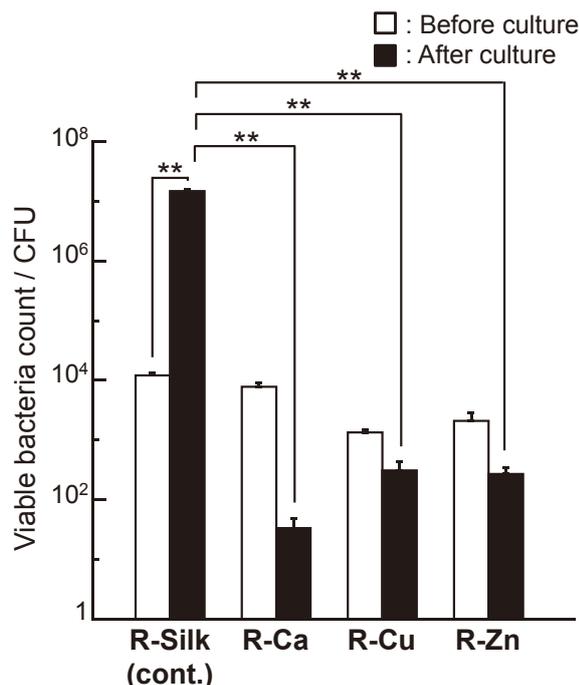


Fig. 9 Results of quantitative antibacterial tests for R-Ca, R-Cu and R-Zn. (** $P < 0.01$)

性を示すことが分かる。Fig. 9に、菌液吸収法による抗菌試験の結果を示す。コントロールとして用いたR-Silkでは、培養前後で大腸菌が有意に増殖したが、R-Ca、R-CuおよびR-Znにおいては、培養前後で大腸菌の生菌数が減少した。さらに、各試料間の培養後の生菌数を比較すると、R-Ca、R-CuおよびR-Znの生菌数はR-Silkのそれよりも有意に小さかった。Fig. 9の結果から菌増殖値(F)と抗菌活性値(A)を算出した結果をTable 3に示す。JIS 1902:2015では、 $2.0 \leq A < 3.0$ となる試料に抗菌効果が認められ、 $A \geq 3.0$ となる試料には強い抗菌効果が認められると定義されていることから、R-Ca、R-CuおよびR-Znは、大腸菌に対して強い抗菌性を示すことが分かった。

4. 考察

4.1. 試料表面の構造および元素分析

R-Ca、R-CuあるいはR-Znの表面にそれぞれ微量のCa、CuあるいはZnが検出された(Table 1)ことから、 CaCl_2 、 CuCl_2 あるいは ZnCl_2 水溶液浸漬によってR-SilkにCa、CuあるいはZnを導入できたことが分かる。また、全ての試料において検出されたSiは、生糸織物にわずかに含まれる無機物に由来すると考えられる²²⁾。

Fig. 2より、R-Ca中のCaは Ca^{2+} として存在していると考えられる。セリシンのOH基あるいはCOOH基はCaとキレート結合を作ると考えられている⁵⁾が、セリシンの等電点が4.3程度である²³⁾ことから、COOHは CaCl_2 水溶液中において電離して COO^- となっており、そこに Ca^{2+} が

Table 3 Growth value (F) and antibacterial activity value (A) for R-Ca, R-Cu and R-Zn. R-Silk was used as control.

	F	A
R-Silk	+3.09	Control
R-Ca	-2.37	5.46
R-Cu	-0.64	3.78
R-Zn	-0.89	3.98

配位すると考えられる。従って、R-Ca中のCaは主にアスパラギン酸の側鎖に担持されている可能性が高い。また、R-Cu中のCuはとして存在していると考えられる。 Cu^{2+} の一部が Cu^+ に還元された理由については不明だが、これらイオンはCaと同様に、主にアスパラギン酸の側鎖に担持されていると推察される。さらに、R-Zn表面の析出物(Fig. 1)は、 ZnO および/あるいは $\text{Zn}(\text{OH})_2$ と考えられる。

4.2. 試料の金属イオン溶出特性

Fig. 3に示すように、R-Ca、R-CuあるいはR-ZnのTBSへの浸漬によって、TBSのCa、CuあるいはZnイオンの濃度が上昇したことから、それぞれの試料に導入した金属イオンがTBS中へ溶出したことが分かる。また、いずれの金属イオンの場合も、TBS浸漬1日後の濃度と浸漬7日後のそれがほぼ同じであったことから、各試料からの金属イオンの溶出はTBS浸漬1日以内に終わると考えられる。

4.3. 試料のアパタイト形成能

Fig. 4および5より、R-CaはSBF中においてアパタイト形成能を示すが、R-CuおよびR-Znはアパタイト形成能を示さないことが明らかとなった。Fig. 6に示すように、R-Caの浸漬によってSBF中のCaおよびPイオンの濃度が顕著に低下したことから、CaやPイオンがR-Caの表面に取り込まれ、アパタイトが形成されたと考えられる。なお、CaおよびPイオンの濃度低下がR-Caの浸漬3日後にすでに生じていたことから、SBF浸漬3日後にR-Ca表面に見られた析出物(Fig. 4)は低結晶性のリン酸カルシウムであると考えられる。R-Cuを浸漬した場合は、CaおよびPイオンの濃度低下は見られなかった(Fig. 6)ことから、R-Cuにおいては、CaやPイオンが表面に取り込まれず、従ってアパタイトが形成されなかったと考えられる。なお、SBF浸漬後のR-CuのEDXスペクトル(Fig. 7(b))にCuのEDXピークがほとんど見られなかったことから、R-Cuに導入されたCuは7日間のSBF浸漬によってほとんど溶出したと考えられる。R-Znを浸漬した場合でもCaおよびPイオン濃度の顕著な低下は確認されなかったことから、

SBF浸漬後のR-Zn表面に見られた析出物(Fig. 4)は、SBF浸漬後にも残存したZnOおよび/あるいはZn(OH)₂と考えられる。このことは、SBF浸漬後のR-ZnのEDXスペクトルにおいて、ZnのEDXピークが僅かに見られた(Fig. 7(c))ことから示唆される。

以上より、R-Caにおいては、CaCl₂水溶液処理によって導入されたCaイオンがTBS中(Fig. 3)と同様にSBF中に溶出することでSBFに対するアパタイトの過飽和度を上昇させたため、Caイオンが試料表面に取り込まれ、アパタイトが形成したと考えられる^{11,12)}。一方、R-CuやR-Znにおいては、CuまたはZnイオンがTBS中(Fig. 3)と同様にSBF中に溶出したと推測されるが、それにも関わらず試料表面にCaイオンは取り込まれず、アパタイトは形成しなかったと考えられる。これは、CuまたはZnイオンの溶出に伴ってSBF中のCaイオンとのイオン交換が生じているとしても、SBF中にはCaイオン以外にもヒドロニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオンなどが存在しており⁸⁾、これらイオンがCaイオンの試料表面への選択的導入を阻害した可能性がある。

4.4. 試料の抗菌性

Fig. 8に示すように、ハローが形成されたR-CuおよびR-Znにおいては、試料から抗菌元素であるCuイオンまたはZnイオンが溶出したことにより、抗菌性が発現したと考えられる¹⁴⁾。これらの抗菌メカニズムを既往の研究から推察すると、R-Cuについては、溶出したCuイオンがタンパク質の変性や酵素機能の阻害を引き起こし、細菌の増殖を抑制した可能性がある^{24,25)}。また、R-Znについては、Znイオンの溶出によって、能動輸送の阻害やアミノ酸の代謝機構および酵素機能の阻害などが生じた可能性がある²⁶⁾。さらに、R-Znでは、溶出したZnイオンだけでなく、表面に形成された亜鉛の化合物も抗菌性に寄与していると考えられる。ZnOは暗所においても活性酸素を生成し²⁷⁾、細菌の細胞壁を破壊する。従って、R-Zn表面の形成物にZnOが含まれているとすれば、ZnOが抗菌性に寄与した可能性がある。一般に活性酸素は飛程距離が短く不安定であるが、ZnOが寒天培地中に拡散することによって、試料から離れた細菌に対しても抗菌効果を示したと考えられる。これは、ZnOが水に不溶であることや、R-Zn周囲に生じたハローが白く濁っていた(Fig. 8)ことから示唆される。また、R-Caについては、ハロー法では抗菌性を示さなかったが菌液吸収法(Fig. 9)では強い抗菌性を示した。これは、R-Caに担持されたCaイオンが培地中に溶出することで、R-Caのごく表面に存在するH⁺がイオン交換によって試料中に取り込まれ、試料表面付近のpHが上昇したためと考えられる。既往の研究によれば、大腸菌の成

長における最適なpHは6~8であることから²⁸⁾、培地をアルカリ化することによって菌を死滅し得る²⁹⁾。

5. 総括

本研究では、Ca、CuあるいはZnイオンを導入した生糸織物のSBF中におけるアパタイト形成能および大腸菌に対する抗菌性を調べた。Caイオンを導入した生糸織物をSBFに浸漬すると、同織物はその表面にアパタイトを形成した。これは、同織物からのCaイオンの溶出によって、アパタイトに対するSBFの過飽和度を上昇させたためと考えられる。また、Ca、CuあるいはZnイオンを導入した生糸織物は、大腸菌に対して強い抗菌性を示した。Ca導入試料においてはCaイオンの溶出に伴って試料表面付近のpHが上昇したことによって、Cu導入試料においては抗菌元素であるCuイオンが溶出したことによって、またZn導入試料においては、Znイオンの溶出と活性酸素の生成によって抗菌性が発現したと考えられる。

(引用文献)

- 1) G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, **24** (2003) 401-416.
- 2) P. Aramwit, A. Sangcakul, The effects of sericin cream on wound healing in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** (2007) 2473-2477.
- 3) N. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, M. Nomura, Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (1998) 145-147.
- 4) K. Tsubouchi, Y. Igarashi, Y. Takasu, H. Yamada, Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (2005) 403-405.
- 5) M. Sasaki, H. Yamada, N. Kato, Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats, *Nutr. Res.*, **20** (2000) 1505-1511.
- 6) M. Neo, S. Kotani, T. Nakamura, T. Yamamuro, C. Ohtsuki, T. Kokubo, Y. Bando, A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26** (1992) 1419-1432.
- 7) L. L. Hench, Bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81** (1998) 1705-1728.
- 8) T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, **27** (2006) 2907-2915.

- 9) A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, H. Tanaka, M. Yamazaki, M. Tanihara, Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **65** (2003) 283-289.
- 10) H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **46** (1999) 228-235.
- 11) C. Ohtsuki, T. Kokubo, T. Yamamuro, Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid, *J. Non-Cryst. Solids*, **143** (1992) 84-92.
- 12) A. Oyane, M. Kawashita, K. Nakanishi, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silane coupling agent and calcium silicate solutions, *Biomaterials*, **24** (2003) 1729-1735.
- 13) K. Matsushita, S. Abe, T. Ishi, S. Kajiyama, A. Kotani, M. Saito, T. Masaoka, T. Suguro, Prevention of perioperative infection in bone and joints, *Jpn. J. Chemother.*, **60** (2012) 319-326. (In Japanese)
- 14) D. H. Nies, Microbial heavy metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** (1999) 730-750.
- 15) T. N. Kim, Q. L. Feng, J. O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. C. Chen, F. Z. Cui, Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **9** (1998) 129-134.
- 16) C. Prinz, M. Elhensheri, J. Rychly, H. G. Neumann, Antimicrobial and bone-forming activity of a copper coated implant in a rabbit model, *J. Biomater. Appl.*, **32** (2017) 139-149.
- 17) K. Gupta, R. P. Singh, A. Pandey, A. Pandey, Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, *Beilstein J. Nanotech.*, **4** (2013) 345-351.
- 18) W. Gu, D. W. Bousfield, C. P. Tripp, Formation of calcium carbonate particles by direct contact of Ca(OH)₂ powders with supercritical CO₂, *J. Mater. Chem.*, **16** (2006) 3312-3317.
- 19) J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, ULVAC-PHI, Inc., (1995) 68-69, 86-89.
- 20) J. Duchoslav, R. Steinberger, M. Arndt, D. Stifter, XPS study of zinc hydroxide as a potential corrosion product of zinc: rapid X-ray induced conversion into zinc oxide, *Corros. Sci.*, **82** (2014) 356-361.
- 21) A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Kamitakahara, S. Ogata, M. Yamazaki, Y. Furutani, H. Kinoshita, M. Tanihara, Heterogeneous nucleation of hydroxyapatite on protein: structural effect of silk sericin, *J. R. Soc. Interface*, **2** (2005) 373-378.
- 22) M. Mondal, K. Trivedy, S. N. Kumar, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review, *Caspian J. Env. Sci.*, **5** (2007) 63-76.
- 23) A. M. Sookne, M. Harris, Electrophoretic studies of silk, *J. Res. Natl. Stand.*, **23** (1939) 299-308.
- 24) R. B. Thurman, C. P. Gerba, G. Bitton, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Crit. Rev. Environ. Control.*, **18** (1989) 295-315.
- 25) R. M. Sterritt, J. N. Lester, Interactions of heavy metals with bacteria, *Sci. Total Environ.*, **14** (1980) 5-17.
- 26) A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Lett.*, **7** (2015) 219-242.
- 27) K. Hirota, M. Sugimoto, M. Kato, K. Tsukagoshi, T. Tanigawa, H. Sugimoto, Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions, *Ceram. Int.*, **36** (2010) 497-506.
- 28) E. Padan, D. Zilberstein, S. Schuldiner, pH homeostasis in bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **650** (1981) 151-166.
- 29) J. F. Siqueira, H. P. Lopes, Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review, *Int. Endod. J.*, **32** (1999) 361-369.