

# 選択的殺菌作用をもつマイクロ構造体の開発

## Development of microarchitecture with selective antibacterial activity

研究代表者 京都大学大学院エネルギー科学研究科 准教授 袴田昌高

Masataka Hakamada

Microarchitecture with a micrometer-scale geometric feature fairly affects activity of microorganisms including cells and bacteria. Here we propose the microarchitecture with nanoporous gold (NPG) grooves and flat gold (FG) islands for selective killing of microorganisms. NPG grooves with inactivation capacity against microorganism can capture and kill small microorganisms such as *E. coli*, while inert FG keeps large microorganisms alive and sound. The results indicate that microarchitecture is effective for utilization of short-range inactivation by NPG.

### 要旨

マイクロメートルオーダーの幾何学的特徴を持つマイクロ構造は、細胞や細菌を含む微生物の生命活動に大きく影響を与える。本研究では、微生物を選択的に不活性化することを目的として、ナノポーラス金の溝と、抗菌能を持たない平滑金の島構造を備えたマイクロ構造体を作製した。ナノポーラス金の溝と平滑金の島構造の幅あるいは一片の長さはマイクロメートルオーダーである。微生物に対する不活性化能力を持つナノポーラス金の溝は、大腸菌などの小さな細菌や細胞を捕獲して殺すことができ、不活性化平滑金の島構造はそれらより大きな細胞を生かすことができた。本研究の結果は、マイクロ構造体がナノポーラス金の短距離不活性化作用の応用に効果的であることを示している。

### 1. まえがき

金銀合金の脱合金化により簡便に作製できるナノポーラス金は、カーボンナノチューブあるいは量子ドットなどの既存のナノ材料に比べ、新しいナノ材料である<sup>(1)</sup>。ナノポーラス金は独特の3次元開気孔構造を持ち、脱合金化条件に応じて、リガメント（セル柱）および孔の大きさ（径）を数ナノメートルから数百ナノメートルの範囲で制御できる（図1）<sup>(2)(3)</sup>。ナノポーラス金の非常に小さいリガメントは、バルクの金にはない独特の物理的・化学的特性を提供する<sup>(4)(5)</sup>。

中でも、ナノポーラス金は大腸菌および表皮ブドウ球菌に対して、バルク金（ナノポーラス構造を持たない平滑金）にはない抗菌作用を発揮する<sup>(6)</sup>。ナノポーラス金の抗菌メカニズムは、細菌に対して有

害な拡散種（金属イオンや活性酸素など）を放出する従来の抗菌金属（銀・銅など）とは異なる。ナノポーラス金の抗菌活性はごく短距離で効果を発揮する。言い換えると、抗菌活性の発現には細菌とナノポーラス金の直接接触が必要である。

また、ナノポーラス金はそこに接着したヒト細胞に対しても、ある程度不活化することが明らかになりつつある<sup>(7)</sup>。ヒト細胞に対するナノポーラス金の不活化メカニズムは現在なお議論されているところであるが、細菌に対する抗菌性同様、有害な拡散種によるものではないことはわかっている。細胞外マトリクスに含まれ、培養基板への細胞の付着を仲介するタンパク質であるフィブロネクチンがナノポーラス金の特殊な表面の電子状態の影響を受けて構造変化して細胞が不活化するのではないかという仮説を立てている段階である<sup>(7)</sup>。フィブロネクチンの構造変化もナノポーラス金のリガメント表面ごく近傍で起こる現象であるから、結局、細胞や細菌に対するナノポーラス金の不活化効果は、リガメントにごく近い限られた領域（1ナノメートル未満程度と考えられる）の現象にその起源があると言える。

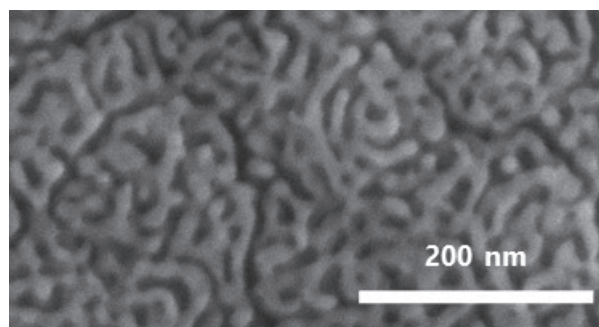


図1 ナノポーラス金の走査電子顕微鏡写真

一方、細胞や細菌の生命活動は、マイクロメートルオーダーの寸法の規則的凹凸構造を持つ「マイクロ構造」にも敏感である。過去の研究で、代表寸法が数マイクロメートルから数十マイクロメートルの溝や穴が、細胞や細菌を捕捉できることが示されている<sup>(8)(9)</sup>。またマイクロ構造は、幹細胞への物理的刺激を通じて、幹細胞の分化にも影響することが知られている<sup>(10)</sup>。

以上に基づき、著者らは共培養における細菌・細胞の選択的不活化技術を提唱することとした。すなわち、図2に示すように、ナノポーラス金を底部に持つ溝と平滑金（バルク金）の島構造を備えたマイクロ構造をうまく利用して、細菌・細胞をサイズ分離する。溝部に分離・捕捉されたサイズの小さい細菌あるいは細胞は、上述した短距離の不活化効果によりナノポーラス金の溝の底部で不活化される。一方で、より大きな細胞は、無害な平滑金の島の上にあるため、ナノポーラス金と接触していないため、活性が下がらないことを期するというわけである。

最初に、予備段階の実験として、接着を伴わない浮遊性細胞であるJurkat細胞に対するナノポーラス金の不活化能を調べ、細胞に対するナノポーラス金の不活化範囲が短距離であることを再確認した。次に、ナノポーラス金の溝と平滑金の島構造を併せ持つマイクロ構造金基板を作製し、2種類の共培養、すなわち「細胞と細胞」および「細胞と細菌」の共培養を行った。培養基板がマイクロ構造を持たない場合と比較し、マイクロ構造の効果を検討した。

なお、研究タイトルは細菌の不活化を意味する「抗菌」としたが、研究を進めていくうちの試行錯誤から、細胞同士の共培養条件下でも選択的不活化が可能かどうかを調べたことを付記する。

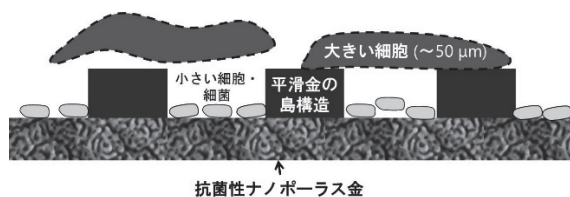


図2 小さい細胞・細菌だけを不活化する選択的抗菌マイクロ構造

## 2. 実験方法

### 2.1 Jurkat細胞の培養

Jurkat細胞として理化学研究所提供のRCB3052を、RPMI1640培地（Gibco製）を用いて継代培養したものを用いた。

Jurkat細胞の培養用ナノポーラス金基板の作製には、高周波スパッタリング装置（サンヨー電子製SVC-700RF）を用いた。最初に、金薄膜（>99.9質量%）を直径35mmのガラスディッシュ底部に厚さ100nmでスパッタリング製膜し、次に、その上に金銀合金（金：銀=3：7（モル比））を150nmの厚さで同様にスパッタリング製膜した。この金銀/金/ディッシュを69質量%硝酸で脱合金化（自然腐食、253K、24時間）に供し、銀の溶解とともに金のナノポーラス構造を得た。また、ナノポーラス構造のない平滑金基板上でJurkat細胞を培養するために、金薄膜（>99.9質量%）を直径35mmのガラスディッシュ底部に厚さ100nmでスパッタリング製膜した。基板の微細構造の観察には走査型電子顕微鏡（SEM、日立ハイテクノロジーズ製SU-6600）を使用した。

解凍サンプルから2継代後のJurkat細胞を、5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下、ナノポーラス金および平滑金基板（ディッシュ）上でRPMI1640培地を用いて、310Kで24時間培養した。その後、浮遊したJurkat細胞を含む培養液を回収し、回収した溶液の一部を0.4質量%のトリパンブルー水溶液（サーモフィッシャーサイエンティフィック製）を用いたトリパンブルー試験に供し、血球計算盤により生存しているJurkat細胞数を計測した。再現性を確認するために実験は2回行った。

### 2.2 HeLa培養と前駆脂肪細胞の共培養

ヒトHeLa細胞（理化学研究所提供）の培養は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、サーモフィッシャーサイエンティフィック製）に10%熱不活化ウシ胎児血清（FBS、サーモフィッシャーサイエンティフィック）と抗生物質・抗真菌物質（サーモフィッシャーサイエンティフィック製）を添加したものを用いて行った（以降の説明ではこの

培地を単にDMEMと称する)。また、ヒト皮下脂肪前駆細胞（ロンザ製）の培養には、1%L-グルタミン、10%FBS、0.1%GA-1000を添加した前駆脂肪細胞用基本培地2（ロンザ）を使用した。

平滑金のマイクロ島構造を備えたナノポーラス金基板の製造には、2.1で述べた高周波スパッタリング装置と、市販のニッケルメッシュを使用した。最初に、金薄膜（>99.9質量%）を直径35mmのガラスディッシュ底部に厚さ100nmでスパッタリング製膜し、次に、その上に金銀合金（金：銀=3：7（モル比））を150nmの厚さで同様にスパッタリング製膜した。この金銀/金/ディッシュを69質量%硝酸で脱合金化（自然腐食、253K、24時間）に供し、銀の溶解とともに金のナノポーラス構造を得た。さらにこの底部を、一辺が114 $\mu$ mの正方形の開口部を持つニッケルメッシュ（くればあ製）で覆い、その上から厚さ1000または1500nmの金をスパッタリング製膜した。メッシュの正方形の開口部は平滑金によるマイクロ島構造の形成を可能にする一方、メッシュの骨格は金の製膜を防ぎ、骨格の下の表面をナノポーラスのままに保つことができる（図3）。ニッケルメッシュを手で取り除き、平滑金のマイクロ島構造を持つナノポーラス金基板を得た。

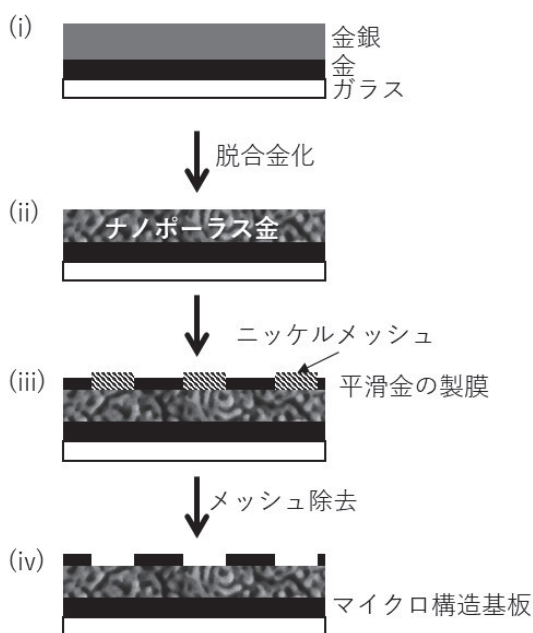


図3 マイクロ構造金基板の作製法

また、比較のため、2.1同様に、マイクロ構造を有しないナノポーラス金基板および平滑金基板も作製した（ただしディッシュ径は46mm）。基板の微細構造観察には2.1と同じSEMを使用した。

継代培養中にサブコンフルエンスに達した細胞を、TrypLE™Express（サーモフィッシュャーサイエンティフィック製）で回収し、10mLのDMEMに再懸濁した。TrypLE™Expressを除去するために、懸濁液を遠心分離して細胞のペレットを底に残し、その後、上清9mLを除去した。次に、9mLのDMEM培地を加え、ピペティングで細胞を分散させた。10 $\mu$ Lの細胞懸濁液と0.4質量%のトリパンブルー水溶液（サーモフィッシュャーサイエンティフィック製）を混合し、生存HeLa細胞と前駆脂肪細胞の数を血球計算盤でカウントした。次に、約3.5 $\times 10^5$ 個のHeLa細胞と脂肪前駆細胞を1.6mLのDMEM培地の各基板（マイクロ構造基板、ナノポーラス金基板、平滑金基板、細胞培養皿）に播種し、皿を水平に振って2種類の細胞を均一にした。5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で310Kで24時間培養した後、基板上の細胞を蛍光光学顕微鏡（BX53、オリンパス）で観察した。

### 2.3 大腸菌と前駆脂肪細胞の共培養

大腸菌（製品評価技術基盤機構提供K-12株、NBRC3301）は、以降の実験の前に、ルリア・ベルターニ（LB）培地で308Kで48時間培養して用いた。寒天培養には、カゼインペプトングルコース酵母エキス寒天（和光純薬工業株式会社）を使用した。

マイクロ構造培養基板の作製は2.2で述べたものとはほぼ同じであるが、メッシュの開口部一片の長さは8または20 $\mu$ mとした。また、比較のため、溝部にナノポーラス金を持たずにした。

大腸菌のコロニーから、1白金耳量を5mLの1/500ブイヨン培地（NB培地）に入れ、ボルテックスで懸濁させ、さらに1/500NB培地で1/10000に希釈した。この希釈懸濁液500 $\mu$ Lを、前駆脂肪細胞（細胞密度は約1.0 $\times 10^5$ 細胞/mL）を含む4mLの培地（ダルベッコ改変

イーグル培地+10%ウシ胎児血清)に加え、攪拌した。その後、この前駆脂肪細胞+大腸菌混合懸濁液1000 $\mu$ Lを基板に滴下し、次に培地2000 $\mu$ Lを加え、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下308Kの標準的な細胞培養条件下で24時間保持した。

脂肪前駆細胞を2mLのトリプシン溶液で完全に回収し、2mLの培地に再懸濁した。トリプシンを除去するために、懸濁液を遠心分離して底部にペレットを残し、その後、上清3mLを除去した。残りの懸濁液10 $\mu$ Lと0.4w/v%トリパンプルー水溶液を混合したのち前駆脂肪細胞の生細胞数および死細胞数を血球計算盤で計数し、前脂肪細胞の不活化率(=死細胞数/(生存細胞数+死細胞数))を計算した。また、培養された大腸菌は、7mLのSCDLP培地で回収し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で10倍に希釈した。希釈したPBSをLB培地と順次混合して10倍希釈系列を作成し、これらを308Kで48時間インキュベートしたのち、プレートのコロニー数を数えることで大腸菌数を評価した。

マイクロ構造基板上で24時間インキュベートした前駆脂肪細胞+大腸菌を、SEM(2.1および2.2で用いたものと同一)で観察した。生物系飼料のSEM観察の前処理として、基板上の細菌と細胞を2%グルタルアルデヒド+4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、PBSで洗浄して取り除いた後、標本を一連のエタノール溶液(50、60、70、80、90、99、および100体積%)およびtert-ブチルアルコール中で脱水した。その後凍結乾燥し、厚さ10nmの白金-パラジウムでコーティングした。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 Jurkat細胞の培養

図4に、平滑金およびナノポーラス金基板上的Jurkat細胞の生細胞率を示す。ナノポーラス金基板上で培養されたJurkat細胞の生細胞率は、平滑金基板上で培養されたJurkat細胞のそれと同程度であり、有意な差は見られなかった。すなわち、浮遊細胞はナノポーラス金基質の影響を受けなかった。

この結果は、接着性の細胞であるHeLa細胞<sup>(7)</sup>

と細菌<sup>(6)(11)(12)</sup>に関する以前の結果と相まって、ナノポーラス金が短距離で抗菌効果と細胞不活化効果を持っていることを示唆する。つまり、ナノポーラス金表面での抗菌効果・細胞不活化効果は、表面に非常に近い領域で制限されると考えられ、銀イオン、活性酸素種、あるいは触媒能を有するナノポーラス金によって生成される可能性のある毒性分子などの拡散種は、ナノポーラス金の抗菌効果・細胞不活化効果には関与しない。ナノポーラス金の細胞不活化効果(細胞毒性)が短距離にしか及ばないことは、後で示すように、細胞と細菌の受動的かつ選択的不活化において重要な性質である。

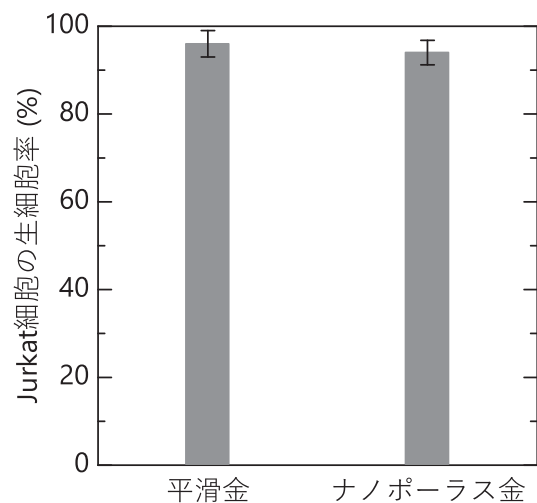


図4 Jurkat細胞の生細胞率に及ぼす基板の影響

#### 3.2 HeLa細胞と前駆脂肪細胞の共培養

平滑金のマイクロ島構造を設けたナノポーラス金基板上で別々に3時間培養されたHeLa細胞と前脂肪細胞の画像を図5に示す。図5(a)に示すように、HeLa細胞はナノポーラス金を底部に持つ溝にトラップされており、平滑金の島構造の上にはほとんど見られなかった。一方、図5(b)に示すように、前駆脂肪細胞はナノポーラス金の溝にトラップされていなかった。前駆脂肪細胞はナノポーラス金の溝の幅よりも大きいいため、ナノポーラス金に触れない状態を保ち、細胞毒性の低い平滑金の島構造の上に接着した。なお、以前の研究<sup>(7)</sup>で示したように、HeLa細胞は3時間の培養ではナノポーラス金基板から脱離しない。したがって、HeLa細胞はナノポーラス金の溝にトラップされて接触する

が、不活化の前の状態であるため、基板に付着していたと考えられる。

図6に、共培養における全接着細胞に対するHeLa細胞の比率(=HeLa細胞数/(HeLa細胞数+前駆脂肪細胞数))を基板種類ごとに示す。HeLa細胞の初期比率は50%であったが、HeLa細胞の増殖速度は前駆脂肪細胞のそれよりも大きいため、割合は平滑金基板および市販の細胞培養皿で50%を超えた。しかし、マイクロ構造基板およびナノポーラス金基板では、HeLa細胞の比率は50%未満にまで低くなり、特に、マイクロ構造基板におけるHeLa細胞の比率はかなり低くなった。つまり、ナノポーラス金に平滑金マイクロ島構造を付与することで、前駆脂肪細胞が多く、HeLa細胞が少なくなることを意味する。図5に示したように、HeLa細胞がナノポーラス金の溝にトラップされた一方で、前駆脂肪細胞はマイクロ島構造に載ることで溝にはトラップされにくくなるので、選択的にHeLa細胞のみが不活化したものと考えられる。

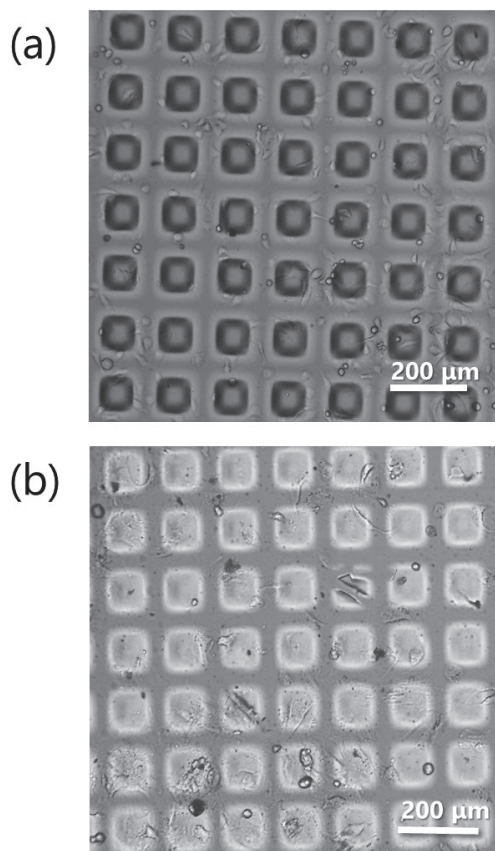


図5 マイクロ構造基板上で培養した (a) HeLa細胞 (b) 前駆脂肪細胞

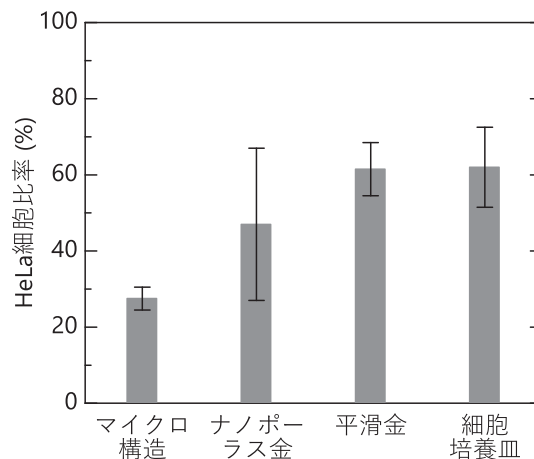


図6 HeLa細胞と前駆脂肪細胞を各基板上で共培養したときのHeLa細胞の比率(=HeLa細胞数/(HeLa細胞数+前駆脂肪細胞数))

### 3.3 大腸菌と前駆脂肪細胞の共培養

各基板上で大腸菌と共培養された前駆脂肪細胞の不活化率を図7に示す。なお、ここではわかりやすさのため、ナノポーラス金をNPGと、平滑金をFGと略記し、マイクロ構造を有する基板については、マイクロ構造作製時に用いたニッケルメッシュの開口幅(=マイクロ島構造の正方形の一辺の長さ)によってNPG+8 $\mu$ FGおよびNPG+20 $\mu$ FGと略記する。大腸菌と共培養された前駆脂肪細胞は、NPG+20 $\mu$ FGおよびNPG基板上よりもNPG+8 $\mu$ FG基板上で不活化が少なかった。NPG+8 $\mu$ FG基板上の前駆脂肪細胞の不活化率は、FG+8 $\mu$ FG基質上の前駆脂肪細胞のそれと同じくらい低い。これは、NPG+8 $\mu$ FGがFG+8 $\mu$ FGと同様に前駆脂肪細胞の活性に影響を及ぼさなかったことを意味する。

一方、NPG+20 $\mu$ FG基板上では、大腸菌と共培養した前駆脂肪細胞が不活化された。すなわち、NPG+20 $\mu$ FG基板上の前駆脂肪細胞の不活化率は、NPG+8 $\mu$ FG基質上の前駆脂肪細胞のそれよりも高く、抗菌ナノポーラス金が前駆脂肪細胞と直接接触するナノポーラス金基板と同程度だった。このことは、NPG+8 $\mu$ FGよりも広いナノポーラス金の溝の幅を持つNPG+20 $\mu$ FG基板は、マイクロ島構造のないナノポーラス金と同じくらい前駆脂肪細胞に有害であることを意味する。

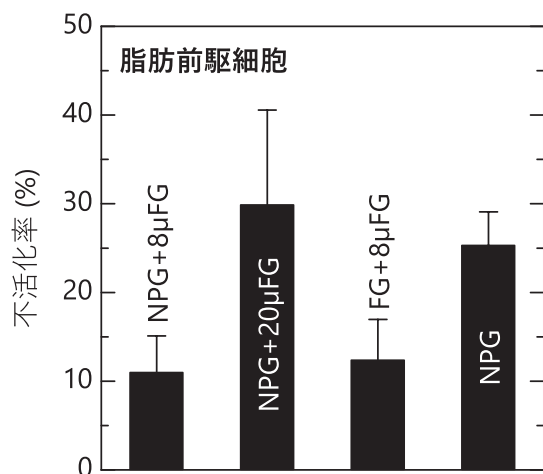


図7 前駆脂肪細胞と大腸菌を各基板上で共培養したときの前駆脂肪細胞の不活化率

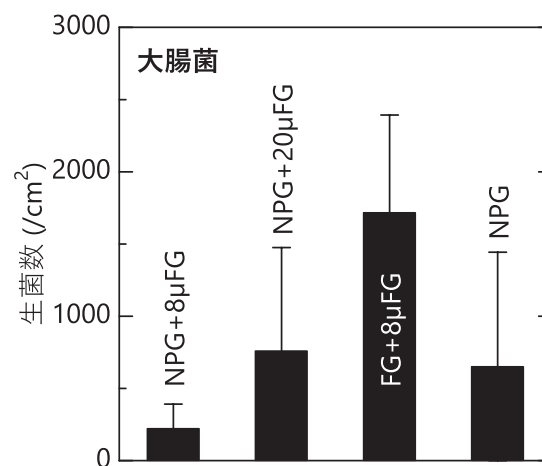


図8 前駆脂肪細胞と大腸菌を各基板上で共培養したときの大腸菌の生菌数

図8に、各基板上で前脂肪細胞と共培養された大腸菌の生菌数を示す。NPG+8 $\mu$ FG基板上で前脂肪細胞と共培養された大腸菌の生菌数は、FG+8 $\mu$ FG基板上で共培養された大腸菌のそれよりもはるかに低く、NPG+8 $\mu$ FGの溝部分にあるナノポーラス金が、大腸菌を効果的に不活化したことを示す。NPG+20 $\mu$ FG基板およびNPG基板基質上で共培養された大腸菌の生菌数も、FG+8 $\mu$ FG上で共培養された大腸菌のそれよりも低かった。ただし、NPG+8 $\mu$ FG上の大腸菌の生菌数は、調べた基板の中で最も少なかった。

平滑金のマイクロ島構造のないナノポーラス金基板の大腸菌に対して十分に抗菌性が発現していないのは、培養懸濁液が十分な量だけ存在し、大腸菌と基質の直接接触の頻度が低下したためと考えられる。それと比較すれば、NPG+8 $\mu$ FGのマイクロ構造が溝内に大腸菌を捕捉できるため、マイクロ構造のない場合よりも大腸菌の生菌数が減ったと考えるのが妥当である<sup>(8)(9)</sup>。

ただし、NPG+20 $\mu$ FG基板上の大腸菌の生菌数は、マイクロ島構造のないナノポーラス金基板上のそれと同程度であることから、ナノポーラス金の溝の幅を適切に設定する（この場合は8 $\mu$ m）ことが、大腸菌の選択的殺菌に重要であることが示唆される。つまり、溝の幅が広すぎる（この場合は20 $\mu$ m）と、大腸菌を捕捉できず逃がしてしまうと考えられる。

図9に、NPG+8 $\mu$ FG（a、b）およびNPG+20 $\mu$ FG基質（c）で共培養した前脂肪細胞と大腸菌のSEM画像を示す。NPG+8 $\mu$ FG基板では、前脂肪細胞は、平滑金マイクロ島構造をまたがって広がっているのが確認できる（図9（a））。8 $\mu$ mという狭い幅を持つ溝は、前脂肪細胞とナノポーラス金との接触を最小限に抑え、前脂肪細胞への有害な作用を抑えるのに有効である。

また、同じNPG+8 $\mu$ FG基板で、溝部への大腸菌の捕捉が確認された（図9（b））。これは、以前の研究と一致しており<sup>(8)(9)</sup>、前段落で述べた推測を裏付けてもいる。したがって、NPG+8 $\mu$ FGは、前脂肪細胞の活性を損なわないうえで大腸菌の選択的捕捉に成功していると言える。

一方、図9（c）に示すように、NPG+20 $\mu$ FG基板は、ナノポーラス金の溝内に前脂肪細胞を捕捉してしまっている。NPG+20 $\mu$ FG基板の溝は、NPG+8 $\mu$ FGのそれよりも幅が広く、典型的なサイズが35 $\mu$ mである前脂肪細胞をより捕捉しやすくなっていると考えられ、大腸菌を選択的に捕捉するのに適していない。なお、前脂肪細胞の活動に対するナノポーラス金の有害な影響は知られていませんが、以前の研究<sup>(7)(13)</sup>は、ナノポーラス金が接着した哺乳類・ヒト細胞の活動を悪化させることを示唆しており、したがって、NPG+20 $\mu$ FGでの前脂肪細胞の不活化は、少なくとも

部分的には、ナノポーラス金の溝へ細胞が捕捉されてしまうことに起因する。もう一つ考えられる原因としては、大腸菌がうまく殺菌できておらず（図8）、前駆脂肪細胞に害を及ぼしたことも挙げられる。

これらの結果を考慮すると、NPG+8 $\mu$ FG基板は、大腸菌の選択的殺傷および脂肪前駆細胞の生存と健全性の維持に適した基板であると言え、マイクロ構造とナノポーラス金を組み合わせることの有効性が示された。

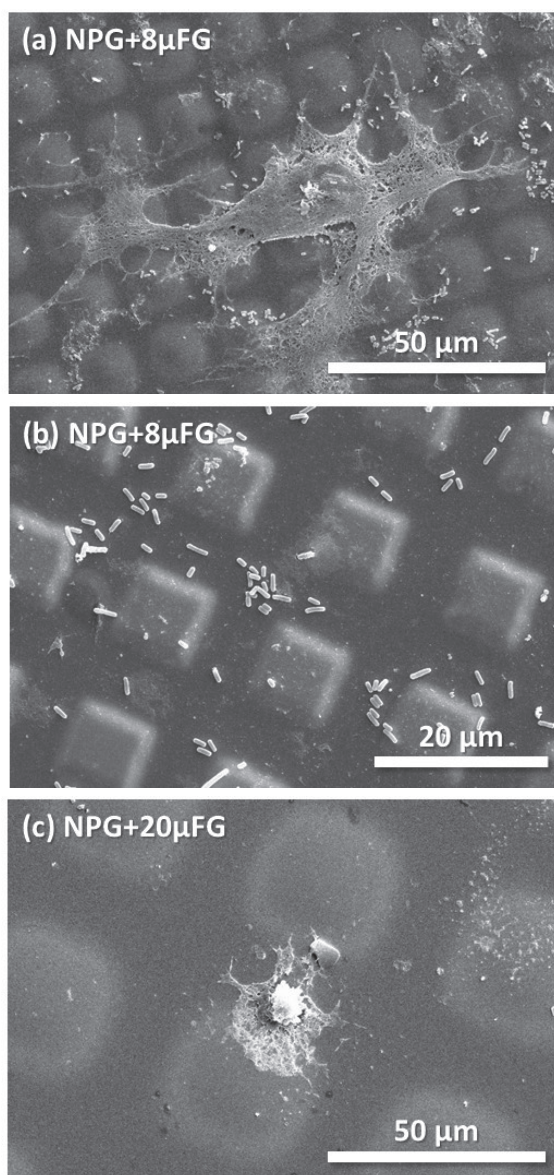


図9 前駆脂肪細胞と大腸菌を（a、b）NPG+8 $\mu$ FG基板（c）NPG+20 $\mu$ FG基板上で共培養した試料のSEM写真

#### 4. まとめ

ナノポーラス金の細胞毒性と抗菌性が短距離であることを予備的に確認したのち、平滑金マイクロ島構造を備えたナノポーラス金基板を作製し、前駆脂肪細胞との共培養においてHeLa細胞および大腸菌を選択的に不活化する性能を発揮させることができた。すなわち、HeLa細胞と前駆脂肪細胞とを同時に平滑金マイクロ島構造を備えたナノポーラス金基板上で培養すると、前者がより多く死滅した。また、NPG+8 $\mu$ FG基板上での大腸菌と脂肪前駆細胞の同時培養も、前駆脂肪細胞の生存と大腸菌の死をもたらした。これらの選択的不活化作用は、短距離範囲の不活化作用を持つナノポーラス金のマイクロ溝が大腸菌やHeLa細胞をトラップできる一方で、典型的なサイズが35 $\mu$ mと大きい前駆脂肪細胞は主に不活化能を持たない平滑金マイクロ島構造と接触することに由来する。

#### 5. 謝辞

本研究を支援くださった公益財団法人マツダ財団の関係各位に感謝を申し上げる。

#### 発表論文

なし（投稿準備中）

#### 参考文献

- (1) Erlebacher, J., Aziz, M. J., Karma, A., Dimitrov, N. & Sieradzki, K. Evolution of nanoporosity in dealloying. *Nature* 410, 450-453 (2001).
- (2) Hakamada, M. & Mabuchi, M. Thermal coarsening of nanoporous gold: Melting or recrystallization. *J. Mater. Res.* 24, 301-304 (2009).
- (3) Li, R. & Sieradzki, K. Ductile-brittle transition in random porous Au. *Phys. Rev. Lett.* 68, 1168-1171 (1992).
- (4) Hakamada, M. & Mabuchi, M. Fabrication, microstructure, and properties of nanoporous Pd, Ni, and their alloys by dealloying. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 38, 262-285 (2013).
- (5) McCue, I., Benn, E., Gaskey, B. & Erlebacher, J. Dealloying and Dealloyed Materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 46, 263-286 (2016).
- (6) Hakamada, M., Taniguchi, S. & Mabuchi, M. Antibacterial activity of nanoporous gold against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Mater. Res.* 32, 1787-1795 (2017).
- (7) Deguchi, S. et al. Inactivation of HeLa cells on nanoporous gold. *Materialia* 7, (2019).

- (8) Whitehead, K. a., Colligon, J. & Verran, J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 41, 129-138 (2005).
- (9) Perera-Costa, D., Bruque, J. M., González-Martín, M. L., Gómez-García, A. C. & Vadillo-Rodríguez, V. Studying the influence of surface topography on bacterial adhesion using spatially organized microtopographic surface patterns. *Langmuir* 30, 4633-4641 (2014).
- (10) Abagnale, G. et al. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials* 61, 316-326 (2015).
- (11) Miyazawa, N., Hakamada, M. & Mabuchi, M. Antimicrobial mechanisms due to hyperpolarisation induced by nanoporous Au. *Sci. Rep.* 8, (2018).
- (12) Miyazawa, N., Sakakibara, S., Hakamada, M. & Mabuchi, M. Electronic origin of antimicrobial activity owing to surface effect. *Sci. Rep.* 9, (2019).
- (13) Chapman, C. A. R. et al. Nanoporous gold as a neural interface coating: Effects of topography, surface chemistry, and feature size. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 7093-7100 (2015).