

平成24年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学

課題番号：KD14

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名		
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部医用工学科 教授 古菌 勉 共同研究者：理工学部応用化学科 准教授 岩崎 光伸 生物理工学部食品安全工学科 准教授 東 慶直	

1. 研究目的・内容

当該研究課題では、光触媒複合材料の母材への悪影響を最低限に抑え、外部からの光刺激による抗菌制御を目的としたボトムアップ型ナノ無機・有機複合材量からなる新規な医療用抗菌性材料の創出を目指す。ナノ積層構造体の構築、光触媒反応の定量化、さらに微生物を用いた抗菌活性評価を行う。当該ナノ構造体の界面特性と光触媒活性および抗菌性との相関性を導き出し、抗菌カテーテル用素材としての最適化を行う。

2. 研究経過及び成果

1) ボトムアップ型ナノ複合体の物性試験

シリコンシート（膜厚 0.3mm, 信越ポリマー（株）製）をソックスレー抽出により清浄化した後、コロナ放電処理を行い、基材表面にラジカルを導入した。このシートを 10w/w% アクリル酸モノマー水溶液を注入したガラス管に留置し、脱気封緘した。さらに 60℃ 温浴に封緘したガラス管を 30 分間浸漬し、グラフト反応を行った。反応後、ポリアクリル酸をグラフト重合したシリコン(PolyAAc-g-silicone)シートを温水で十分に洗浄し乾燥させた（グラフト密度：10-20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）。次に、球状 HAp ナノ単結晶の分散水溶液(0.1wt%)に PolyAAc-g-silicone シートを 1 時間浸漬し、HAp ナノ単結晶をシート表面に吸着・結合させた。浸漬後、超音波洗浄を行い、過剰に吸着したナノ粒子を取り除いた。テンシロン試験機（島津製作所製、電磁力式微小試験機 MMT-101NV-10）を用いて、PolyAAc-g-silicone シートの繰り返し引っ張り試験を実施した（歪み：10%、周期：1Hz、時間：1 日および 3 日）。電界放射型走査型電子顕微鏡(FE-SEM, 日立製作所、S-4800)を用いて、引っ張り試験前後の PolyAAc-g-silicone シートの表面観察を行った。HAp ナノ単結晶の表面被覆率は、フリーソフト Image J(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)によるデジタル画像処理にて算出した。

繰り返し引っ張り試験の結果、試験 1 日後および 3 日後においても、HAp ナノ単結晶の剥離について、統計学的な有意差は認められなかった。これはグラフト鎖のカルボキシル基が HAp ナノ単結晶表面の Ca イオンと静電的相互作用で結合し、さらにナノ単結晶がグラフトポリマー鎖と多点で結合していることによるものであり、シリコン基材の伸縮に十分に耐えられるほどの結合強度を有していることが明らかとなった。既に我々は、原子間力顕微鏡を用いたスクラッチ試験により、HAp 単結晶と高分子基材にグラフトしたポリマー鎖とは強い相互作用を示すことを見出している。今回の結果は、それを裏付けるものとなった。

光触媒試験用サンプルとして、ポリアクリル酸グラフトシートにポリアリルアミンをカルボジイミド試薬(WSC)を用いて共有結合で結合させることにより、表面にカチオン性基を導入した。この表面へ、酸化チタンナノ粒子を静電的相互作用で結合させて、複合ナノシートを作製した。当該シートを光触媒活性および抗菌性試験に提供した。

2) 光触媒活性の評価

酸化チタンナノ粒子をコーティングしたナノ複合シートの光触媒活性を評価した。光触媒活性はアセトアルデヒドの気相光酸化分解反応によって行った。試料シートをサンプル台にのせ、それを可視・紫外光($\lambda_{\text{ex}} > 300 \text{ nm}$)を十分透過させる特注のピレックス製反応容器(容量 640 mL)中に入れて密閉し、容器内部を約 5.0 mmHg まで減圧した後、約 500 mmHg までアセトアルデヒド標準

ガス(594 mmHg, BALANCE N₂)を導入したのち、空気を導入して常圧に戻し、系内のアセトアルデヒド濃度を約 300 ppm に制御した。暗所において、この状態で約 18 時間放置して、吸着平衡に到達したことを確認後、室温で、光照射(Wacom 製キセノンランプ HX-500、 $\lambda_{ex} > 300 \text{ nm}$, $I_{320-400} = 2.0 \text{ mW cm}^{-2}$)を開始した。反応容器内の気体を 15 分ごとに 0.5 mL サンプルングし、その中に含まれる未分解のアセトアルデヒドをガスクロマトグラフ(GC-2014, FID 検出器)を用いて定量した。ガスクロマトグラフ測定条件としては、カラムに SHINCARBON A(半径 1.6 mm × 長さ 3.1 m)を用い、カラム温度 70 °C, 注入口温度 90 °C, 検出器温度 90 °C とした。アセトアルデヒド濃度の減少量の経時変化を一次の反応速度式で回帰することにより反応速度定数(k/h^{-1})を求めて、その値を比較することにより光触媒活性を評価した結果、酸化チタンナノ粒子コート複合シートの光触媒活性(k)は、0.59~0.72 h^{-1} であった。

3) 病原性微生物の付着および増殖性の評価

酸化チタンナノ粒子をコーティングしたナノ複合シートが、その光触媒活性に依存した殺菌効果を評価した。一般的に細菌は、長時間(6時間-)の近紫外線の照射で、もしくは短時間(1分間-)の紫外線の照射で死滅する。その紫外線単独の殺菌効果ではなく、ナノ複合シートにコーティングした酸化チタンナノ粒子の光触媒活性に依存した殺菌効果を評価する必要がある。

評価には、紫外線や活性酸素に対する感受性の異なる3菌、大腸菌(SOS反応系を欠失した紫外線・活性酸素感受性)、大腸菌 O-157(Vero toxin 非生産臨床分離株)、黄色ブドウ球菌(メチシリン感受性臨床分離株)の3菌を用いた。酸化チタンの光活性化には、405 nm 近紫外線(12.8 mW/cm^2 (カタログ値、以下同様)、距離 2 cm)、312 nm 紫外線(2.0 mW/cm^2 、距離 12 cm)、254 nm 紫外線(1.0 mW/cm^2 、距離 40 cm)、蛍光灯の光を用い、光を遮断した条件をコントロールとした。

使用する細菌は 5 mL の LB 液体培地で一晚培養し、吸光度が 0.1 になるように調製する。この菌液 50 μL を酸化チタンナノ粒子でコーティングしたナノ複合シートもしくはコーティングしていないシートの上に置き、紫外線を一定時間照射する。その後、菌液を回収し、10倍希釈系列を作り、LB寒天培地上にスポットする。そのLB寒天培地を37度で保温し増殖する菌量を測定した。

結果として、黄色ブドウ球菌を用いた場合、酸化チタンナノ粒子をコーティングしたナノ複合シート上で 312 nm 紫外線を 20 間照射すると、完全なコントロール比較すると 128 倍ブドウ球菌の生存率は低下していた。同様に、完全なコントロール比較するとナノ複合シート上で紫外線を照射しない場合 8 倍程度低下し、コントロールシート上で同様に紫外線を照射した場合は 2 倍程度低下していた。この黄色ブドウ球菌は、以前の研究で大腸菌や緑膿菌よりも近紫外線に感受性であることが観察されていたが、今回の紫外線照射では非照射と比較すると金の生存率は 2 倍程度低下していた。

つまり、酸化チタンナノ粒子をコーティングしたナノ複合シート上での 312 nm 紫外線の照射により期待される生存率低下の相乗効果は $(1/2 \times 1/8)$ であるが、実際の生存率低下はそれよりもはるかに低い 1/100 以上であることから、酸化チタンによる光触媒活性に依存した殺菌効果が観察されたと考えられる。その場合、光触媒活性に依存した殺菌効果は計算上 8 倍程度となる。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

- 1) これまでの研究で、HAp ナノ単結晶はポリマー基材上にグラフト重合したポリアクリル酸に強固に結合することが確かめられた。今後は当該ナノ単結晶上へ均一に酸化チタンナノ粒子をコーティングする調製条件を検討する。
- 2) コントロール基材の光触媒活性、および新しく製造されたボトムアップ型ナノ複合材料の光触媒活性を比較検討するとともに、さらに光触媒活性の高い材料を作製するための指針を導出する。具体的には、ボトムアップ型ナノ複合材料の TiO₂ コーティング量や付着状態と光触媒活性との関連付けを検討する。
- 3) 十分な光触媒活性を維持しつつ、生体や機材への負荷の小さい波長を選択し、効果を評価する。また、最も効果の高い TiO₂ コーティング量や付着状態を検討するために、殺菌効果の評価方法を簡素化する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
<i>Mater. Trans.</i>	学術論文	2011年5月
<i>J. Cera. Soc. Jpn</i>	学術論文	2011年10月
<i>J. Orthop. Biomater.</i>	学術論文	2011年12月
<i>Mater. Tech.</i>	学術論文	2012年2月
<i>Mater. Tech.</i>	学術論文	2012年12月
<i>Mater. Tech.</i>	学術論文	2013年1月
<i>J. Artif. Organs</i>	学術論文	2013年8月
日本セラミックス協会 2013 年年会	学会発表	2013年3月

1. K. Shimada, K. Kudoh, Y. Tamagawa, H. Horikawa, M. Iwasaki, Surface characteristics of titanium oxide film prepared by micro-arc oxidation: comparison of direct current electrolysis and pulse electrolysis, *Mater. Trans.*, **52**, 1410-1417 (2011).
2. W.K. Park, J.Y. Kim, S.R. Kim, M. Iwasaki, Fabrication of a PVP (Polyvinylpyrrolidone)-assisted TiO₂ film using a high-concentrated TiO₂ nano sol and its optical properties, *J. Cera. Soc. Jpn*, **119**, 745-751 (2011).
3. 墳本一郎、浜西千秋、柴田明、寺村岳士、堀江拓尔、岩崎光伸、赤木将男、チタンワイヤーボール(TWB)の骨・軟骨置換基材としての可能性、*J. Orthop. Biomater.*, **30**, 21-28 (2011).
4. 藤見篤史、岩崎光伸、有機溶媒系でのチタニアナノチューブの作製、*Mater. Tech.*, **30**, 23-28 (2012).
5. 櫻井理貴、南恭平、藤見篤史、岩崎光伸、火花放電アノード酸化による SrTiO₃ 皮膜の作製、*Mater. Tech.*, **30**, 175-177 (2012).
6. 櫻井理貴、柴田明、岩崎光伸、アルカリ加熱処理したチタンワイヤボール、*Mater. Tech.*, **31**, 12-16 (2013).
7. T. Furuzono, T. Iwamoto, Y. Azuma, M. Okada, Y. Sawa, Preparation of carboxylate Ag nanoparticles as a coating for medical devices and control of antibacterial activity, *J. Artif. Organs.*, in press.
8. 古菌 勉、児玉 尽、大藪利文、宮崎祐次、山本 衛、本田義知、岡田正弘、武田昭二、動的細胞機能評価用ナノアパタイト複合足場シートの引っ張り試験評価、日本セラミックス協会 2013 年年会、東京都(東工大)、2013.3.17-19