

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670901

研究課題名(和文) 光触媒デバイスを用いた口腔内バイオフィーム予防の機構解明と実用検証

研究課題名(英文) Elucidation of the oral biofilm prevention mechanism by photocatalytic devices and their practical application

研究代表者

楊 英男 (YANG, Yingnan)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50561007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室で開発したP/Ag₂₀/Ag/Ag₃PO₄/TiO₂新規光触媒材料を用いて、異なった分子量と添加量、温度、時間、塗膜層のPEG修飾条件を検討し、最適条件を確立し、新規光触媒デバイス開発のための材料の作製に成功した。本材料を用いて107CFU/mlの大腸菌は10分以内で完全死滅の結果が得られた。その結果は通常の光触媒材料に比べ、数十倍または数百倍の殺菌効果を有することが明らかになった。さらに、光触媒反応機構を解明した。光触媒デバイスの作成を試み、開発した材料によるバイオフィーム抑制効果を検討した結果、十分な殺菌効果があることが明らかになった。今後の実用化に向け貴重な情報を得られた。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent the oral biofilm, a developed photocatalytic device used for detect the practical effect and the prevention mechanism also be elucidated. P/Ag₂₀/Ag/Ag₃PO₄/TiO₂, a novel photocatalyst developed in our lab was used in this research. In this research, the optimal molecular weight and addition dosage of PEG and calcination temperature, time and number of coating layers was investigated to optimize the coating condition of PEGm-P/Ag/Ag₂₀/Ag₃PO₄/TiO₂ photocatalytic thin film. The result of E.coli (107CFU/ml) inactivation by using PEG modified photocatalyst showed that all of the E.coli was destroyed by P/Ag/Ag₂₀/Ag₃PO₄/TiO₂ only in 10 minutes, but pure TiO₂ have little effect on sterilization. Furthermore, the oral biofilm prevention effect have been demonstrated and the mechanism also be elucidated. The valuable information for future practical application have been obtained.

研究分野：生物工学

キーワード：光触媒デバイス バイオフィーム 口腔衛生 反応機構

1. 研究開始当初の背景

(1) TiO_2 光触媒は390 nm以下の紫外線を照射することで、 TiO_2 の価電子帯の電子が紫外線で伝導帯に励起されると、還元力の強い電子と非常に酸化力の強い正孔が生成する。これらの電子と正孔から生成する種々の活性酸素種は非常に強い酸化力を示し、バクテリアなどに対して分解作用を示した。最近、申請者らが開発した光触媒を用いて、水環境における有毒アオコ中猛毒を持つ*2-methylisoborneo*と*geosmin*が短時間で完全分解できることが確認された。光触媒は化学薬剤などで十分な効果が得られないバイオフィームなどの形成防止や除去に威力を発揮できる。通常、病院などの公衆衛生維持を目的として、壁床などを TiO_2 でコーティングして、ブラックライトを照射するだけで殺菌処理を行うことが可能となっている。このように、 TiO_2 特性を利用した材料は製品化され、すでに多方面で利用されている。しかしながら、紫外線照射では、遮蔽物が存在するような場合や、体内など深部への照射の場合では照射効率が低下するため、活性酸素種の発生効率が低下することは明らかである。そこで、申請者は体内への光照射をどのようにして行うのかという問題について、光ファイバーを用いることによって、遮蔽物が存在するような場合でも、活性酸素種の発生効率が低下せず、口腔内バイオフィームの形成予防、将来はがん治療やカテーテルに抗菌効果が発揮できると考えている。

(2) 本研究は光ファイバーへの光触媒のコーティング技術を確認し、安全で耐久性に優れた光触媒膜光ファイバー材料を用いて、人工的に培養した口腔内バイオフィームへの抑制機構を解明し、効果を確認する。さらに、本材料を利用して、人工歯型をモデルとしたデバイスを作製し、実証研究を行い、口腔内バイオフィーム抑制の実用化の可能性について明らかにしていきたい。

2. 研究の目的

本研究は光ファイバーへの光触媒のコーティング技術を確認し、安全で耐久性に優れた光触媒膜光ファイバー材料を用いて、口腔内バイオフィームと光触媒の相互作用による活性種の生成とその同定を行うことによって、光触媒を用いたバイオフィーム処理の

メカニズムを明らかにする。さらに、本材料を利用して、口腔内バイオフィーム抑制デバイスを作製し、実用化に向けての実証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 安全性がすでに確認されたチタン、ステンレス、金、銀、プラチナを用いて、無毒・高活性光触媒材料を開発する。本研究室で開発した $\text{P/Ag}_2\text{O/Ag/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$ 新規光触媒材料を用いて、XRD, SEM, TEM, EDS, XPS, PLなど新規材料解析に欠かせない手法を駆使し、材料の特性解析を行った。また、口腔内バイオフィームと光触媒の相互作用による活性種の生成とその同定を行うことによって、光触媒を用いたバイオフィーム処理のメカニズムを明らかにする。さらに、LED光源を用いて、開発した光触媒材料のコーティング効果を確認し、最適条件を確立する。光触媒膜表面の親水化反応にバイオフィームがどの程度関与しているか調べる。

(2) 材料への最適コーティング条件と反応機構を解明したことによって、デバイスの作製を試みた。口腔内から採集したバイオフィームの培養を行い、人工歯型を用いて、開発した材料によるバイオフィーム抑制効果を検討する。また、抑制効果を検討すると同時に、光の強度の影響、実際のバイオフィーム抑制に必要な時間及び口腔内装着適正効果を確認し、実用化に向けた関連要素を抽出し、世界初光触媒を用いた口腔内バイオフィーム抑制デバイスの開発を試みる。

4. 研究成果

(1) 本研究室が開発した $\text{P/Ag}_2\text{O/Ag/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$ 新規光触媒材料を用いて、XRD, SEM, TEM, EDS, XPS, PLなど新規材料解析に欠かせない手法を駆使し、材料の特性解析を行った(図1)。その結果、開発した $\text{P/Ag}_2\text{O/Ag/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$ 新規光触媒材料は、従来の材料に比べ格段に高い光触媒活性を持つ原因は明らかになった(図2)。このような組み合わせにより、 TiO_2 が本来持つ長所を伸ばしたうえで短所を克服し、安定的かつ耐久性のある高い光触媒活性を持つことが可能になった。

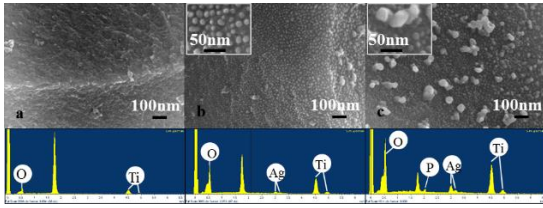


図1 各種材料の SEM 写真 (a) TiO₂, (b) Ag/Ag₂O/TiO₂, (c) P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ と EDS 解析図

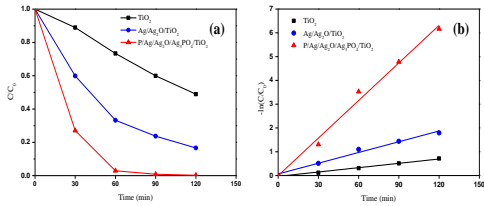


図2 (a)各種材料のローダミン B の分解効果、(b)とその分解速度

(2) また、材料への最適コーティング条件を検討することによって、400 °C、2 時間焼結と三層塗膜が最も良い条件であることが明らかになった (図3)。さらに、その材料の反応機構の検討結果、正孔 (h⁺) の他、スーパーオキシドアニオン (・O²⁻)、ヒドロキシラジカル (・OH) が発生した酸化還元反応が処理のメカニズムであることが明らかになった。

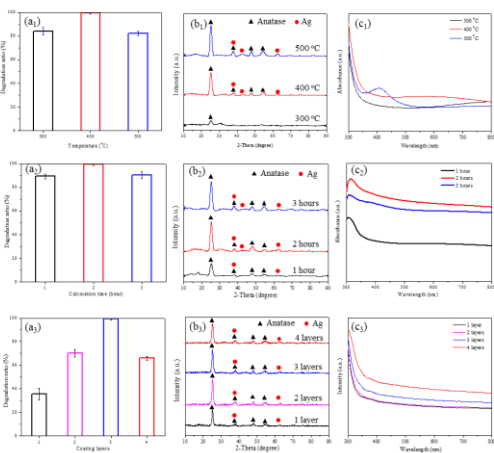


図3 材料への最適コーティング条件 (温度、時間、層) の検討

(3) P/Ag₂O/Ag/Ag₃PO₄/TiO₂ 新規光触媒材料を用いて、異なった分子量の PEG を修飾し、その最適 PEG 分子量と添加量を確認した。そ

の結果、PEG 修飾した P/Ag₂O/Ag/Ag₃PO₄/TiO₂ 新規光触媒材料は、最適割合条件において従来の材料に比べ、高い光触媒活性と耐久性を持つ特徴を確認し、更なる新規光触媒材料の開発に成功した。PEG 修飾により、P/Ag₂O/Ag/Ag₃PO₄/TiO₂ が本来持つ長所をさらに伸ばし、安定的かつ耐久性のある高い光触媒活性を持つ新たな光触媒材料の合成に成功した。

(4) 本材料を用いて殺菌効果を検討し、10⁷CFU/ml の大腸菌を 10 分以内で完全死滅との大変優れた結果が得られた (図4)。図5は 10 分間反応前後大腸菌 SEM 観察結果 (図5)。

その殺菌効果は通常の光触媒材料に比べ、数十倍または数百倍の殺菌効果を有することが明らかになった。

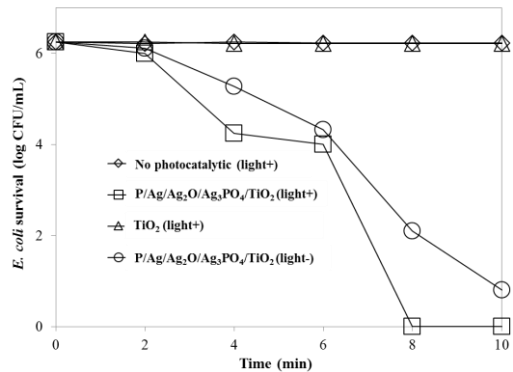


図4 10⁷CFU/ml の大腸菌 10 分以内で完全死滅

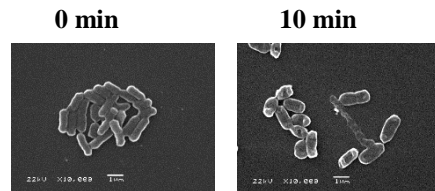


図5 10 分間反応前後大腸菌 SEM 観察結果

さらに、材料への最適コーティング条件と反応機構を解明したことによって、デバイスの作製を試みた。口腔内から採集したバイオフィルムの培養を行い、人工歯型を用いて、開発した材料によるバイオフィルム抑制効果を検討した結果、十分な殺菌効果があることが明らかになった。今後の実用化に向け貴

重なる情報を得られた。

研究期間中において、研究成果は国際誌7報掲載、国際学会10回、国内学会14回で発表し、特許1件の実績を得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件) 全て査読有

1. Ma J., Sun, H., Yang, Y. N., Zhang, Z. Y.: Ultrasonic-Assisted Extraction and Antioxidant Activities of the Polysaccharides Extracted from Soybean Curd Residue Fermented by *Flammulina velutipes*. *International Journal of Biology*. 8 (1), 1-8 (2016) doi:10.5539/ijb.v8n1p61
 2. Wang, X., Yang, Y. N., J., Hu, X., Kawazoe, N., Yang, Y. N. Chen, G.: Morphological and mechanical properties of osteosarcoma microenvironment cells explored by atomic force microscopy, *Analytical Sciences*. 32, 1177-1182 (2016) doi.org/10.2116/analsci.32.1177
 3. Wang, X., Hu, X., Kawazoe, N., Yang, Y. N. Chen, G.: Manipulating cell nanomechanics using micropatterned surfaces. *Advanced Functional Materials*. 26, 7634-7643 (2016). DOI:10.1002/adfm.201601585
 4. Wang, X., Hu, X., Li, J., Adriana C. Mulero Russe, Kawazoe, N., Yang, Y. N. Chen, G.: Influence of cell size on cellular uptake of gold nanoparticles, *Biomater. Sci.*, 4, 970-978 (2016). DOI: 10.1039/c6bm00171h
 5. Wang, X., Hu, X., Dulińska-Molak, I., Kawazoe, N., Yang, Y. N. Chen, G.: Discriminating the independent influence of cell adhesion and spreading area on stem cell fate determination using micropatterned surfaces. *Scientific Reports*. 6, 28708 (2016) doi: 10.1038/srep28708
 6. Li, Y., Meng, S., Wang, L., Shi, M., Hu, X. S, Yang, Y. N., Zhang, Z. Y.: Bioactivity evaluation of crude polysaccharide from rice bran fermented by *Preussia aemulans* and the changes in its nutritional contents, *Journal of Food Biochemistry*, 40, 67-75 (2015) DOI: 10.1111/jfbc.12258
 7. Hu, X. S, Cheng, D., Wang, L., Li, S., Wang, Y., Li, K., Yang, Y. N., Zhang, Z. Y.: Evaluation of anti-hyperglycemic effect of *Actinidia koomikta* (Maxim. et Rur.) Maxim. root extract. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28 (3), 1135-1140 (2015)
- [学会発表] (計24件)
1. Yang, Y. N.: Development of Highly Efficient Visibal-light-driven P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ Photocatalyst. Shanghai University International Cooperation Symposium, Shanghai, China. 16th March, 2017.
 2. Liu, N., Zhu, Q., Negishi, N., Yang, Y. N.: Enhanced bactericidal activity of *Escherichia coli* with a novel TiO₂ based composite synthesized by a hydrothermal method. つくば医工連携フォーラム2017, January 20, Tsukuba, Japan (2017).
 3. Ma, Q. S., Hu, X. H., Yang, Y. N.: Preparation of Ag-Based Bi₂WO₆ Thin Film with Enhanced Photocatalytic Activity for Degradation of Wastewater. つくば医工連携フォーラム2017, January 20, Tsukuba, Japan (2017).
 4. Nagai, D., Zhu, Q., Yang, Y. N.: Comparing the Water Splitting Efficiency of Photocatalytic Composite Prepared Under Different Calcination Temperature by Hydrothermal Method. つくば医工連携フォーラム2017, January 20, Tsukuba, Japan (2017).
 5. Zhu, Q., Hu, X. H., Stanislaus, M.S., Yang, Y. N.: Physico-chemical Properties of Visible Light-responsive TiO₂-Based Nanophotocatalyst with Silver Dopant and Improved Photocatalytic Ability by Hydrothermal Method. つくば医工連携フォーラム2017, January 20, Tsukuba, Japan (2017).
 6. Hu, X. H., Wang X. L., Zhu, Q., Zhang, N., Kawazoe N., Yang, Y. N.: Photodynamic therapy for cancer cells by TiO₂ based nano photosensitizer. つくば医工連携フォーラム2017, January 20, Tsukuba, Japan (2017).
 7. 楊 英男: 可視光利用型新規光触媒材料の研究開発。第14回環境研究シンポジウム、11月22日、東京 (2016)
 8. Yang, Y. N., Hu, X. H., Zhang, N., Stanislaus, M.S.: Development of Highly Efficient Visibal-light-driven TiO₂ Photocatalyst. The 12th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis (NMS-XII), Changsha, China. 14th -19th October, 2016.
 9. Zhu, Q., Hu, X. H., Mishma, S. S., Yang, Y. N.: Improvement of silver modified TiO₂ solar-light-driven photocatalyst by hydrothermal method. 68th SBJ Annual Meeting, September 28-30, Toyama, Japan (2016)
 10. Liu, N., Zhu, Q., Xiao, R. D., Yang, Y. N.: Inactivation of *Escherichia coli* using P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ photocatalyst under LED irradiation. 68th SBJ Annual Meeting, September 28-30, Toyama, Japan (2016)
 11. Ma, Q. S., Dong, Z. T., Zhu, Q., Hu, X. H., Yang, Y. N.: Development of P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ thin film modified

- by polyethylene glycol for water treatment. 68th SBJ Annual Meeting, September 28-30, Toyama, Japan (2016)
12. Zhu, Q., Hu, X. H., Stanislaus, M.S., Yang, Y. N.: Effect of Hydrothermal Treatment on Physico-chemical Properties of Visible Light-responsive P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ Photocatalyst. The 9th Korea-China-Japan Graduate Student Forum, Daejeon, Japan, September 20-23, (2016).
 13. Liu, N., Zhu, Q., Negishi, N., Yang, Y. N.: Effects of experiment conditions on the inactivation of *Escherichia coli* using P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ photocatalyst under LED irradiation. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 14. Zhu, Q., Hu, X. H., Mishma, S. S., Yang, Y. N.: Enhancement of P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ Solar-light-driven Photocatalyst by Hydrothermal Method. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 15. Dong, Z. T., Zhu, Q., Hu, X. H., Yang, Y. N.: Synthesization of PEG Modified P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ Photocatalyst. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 16. Hu, X. H., Shen, H. X., Zhu, Q., Yang, Y. N.: Optimization of H₂ and O₂ Generation in Water-splitting Process by P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ photocatalyst under Solar Light. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 17. Ma, Q. S., Hu, X. H., Zhu, Q., Yang, Y. N.: Preparation of Ag-based Bi₂WO₆ Thin Film on Glass Substrate with Enhanced Photocatalytic Activity for Decomposition of Organic Dye. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 18. Nagai, D., Zhu, Q., Shen, H. X., Yang, Y. N.: Comparing the Water Splitting Efficiency by Using Different Temperature of Hydrothermal Synthesis of Photocatalytic Composite under Solar Light. Ag-ESD Symposium 2016, September 18-19, Tsukuba, Japan (2016)
 19. Hu, X. H., Zhu, Q., Xiao, R. D., Yang, Y. N.: Preparation, Characterization and Application of a Novel TiO₂ Based Photosensitizer for Photodynamic Therapy. Ag-ESD Symposium 2015, November 16-20, Tsukuba, Japan (2015)
 20. Xiao, R. D., Hu, X. H., Zhu, Q., Yang, Y. N.: Evaluation of Microorganism Inactivation in Water Environments by using P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ Thin Film Reactor Circle System under LED Irradiation. Ag-ESD Symposium 2015g, November 16-20, Tsukuba, Japan (2015)
 21. Xiao, R. D., Zhu, Q., Hu, X. H., Yang, Y. N.: Enhanced photocatalytic disinfection of *E. coli* using P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ photocatalytic reactor under LED irradiation. 67th SBJ Annual Meeting, October 26-28, Kagoshima, Japan (2015)
 22. Hu, X. H., Zhu, Q., Wang, X. L., Kawazoe, N., Yang, Y. N.: Preparation of a novel TiO₂ based photosensitizer and its application for photodynamic therapy. 67th SBJ Annual Meeting, October 26-28, Kagoshima, Japan (2015)
 23. Zhu, Q., Hu, X. H., Li, D. W., Yang, Y. N.: Efficient photocatalytic ability of novel P/Ag/Ag₂O/Ag₃PO₄/TiO₂ thin film on glass substrate for decomposition of recalcitrant organic waste under simulated solar light. The 8th Japan-China-Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan. 16-19, September, 2015.
 24. Hu, X. H., Zhu, Q., Xiao, R., Yang, Y. N.: Development of a novel TiO₂ based photosensitizer for photodynamic therapy. The 8th Japan-China-Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan. 16-19, September, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：可視光で利用できる光触媒

発明者：楊英男、呼小紅

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-218918

出願年月日：平成 28 年 1 月 9 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 英男 (YANG, Yingnan)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50561007

(2) 連携研究者

川添 直輝 (KAWAZOE, Naoki)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員

研究者番号：90314848