

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656111

研究課題名(和文) ナノ粒子を用いたスラリージェットエロージョン法によるバイオフィilm除去技術の開発

研究課題名(英文) Development of the biofilm removal technique by the slurry jet erosion method using nanoparticles

研究代表者

岩井 善郎 (Iwai, Yoshiro)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40115291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生体材料の洗浄技術や材料自体に滅菌性・生体親和性を付与する技術が求められている。バイオフィilmを対象としたとき物理的洗浄が望ましいこと、さらに光励起効果を利用することが有効であるとの着想から、ウェットブラスト技術を用いた萌芽的研究を行った。

その結果、TiO<sub>2</sub>粒子を超純水に混在させたスラリーはUVを照射することで滅菌性が発現すること、スラリー投射条件の制御によりステンレス鋼表面に投射粒子のアナターゼ型TiO<sub>2</sub>の皮膜が形成され親和性付与の可能性が見い出された。次いで、納豆菌バイオフィilmに対して本手法を適応した結果、その除去と洗浄面への光触媒効果付与の可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the technique to impart biocompatibility and also clean biomaterials is required. In this study, we investigated physical cleaning metallic materials and imparted photocatalytic function. We used wet blast technique as physical cleaning for the specimen of stainless steel (SUS316L). The projection particles were nanoparticles of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>). It was possible to impart photocatalytic function to the processed surface by controlling the air pressure (Pair), slurry pressure (Pslu) and processing time. It was possible to remove biofilms of Bacillus natto and also impart photocatalytic function on the surface after cleaning. We found that the cleaning method using the wet blast technique for metallic materials has a possibility of physical cleaning and the photocatalytic function imparting.

研究分野：工学

キーワード：バイオフィilm 酸化チタン ウェットブラスト スラリージェットエロージョン MSE 機能表面 紫外線照射

1. 研究開始当初の背景

近年、生体材料を用いた手術が増加している。このような手術では、細菌由来の感染症や骨結合不全によるトラブルが問題視され、生体材料の洗浄技術や、生体材料自体に滅菌性や生体親和性を付与する技術が求められている。生体材料の洗浄は、バイオフィルムの出現によって薬剤を用いた化学的洗浄では十分な効果が発揮されない。そこで、本研究グループは、対象をバイオフィルムとしたとき物理的洗浄が望ましいこと、さらに生体材料への滅菌性や生体親和性を付与することの実現のためには光触媒特有の光励起効果を利用することが有効であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロスラリージェットによるウェットブラスト法を用いて金属材料の物理的洗浄と光触媒効果の付与を行うことを試み、マイクロスラリージェットエロージョン法(MSE法)のバイオフィルムの除去法としての有用性について考察した。

3. 研究の方法

(1) 試験方法及び供試材料

ダブルポット式ウェットブラスト試験機

試験機には、ウェットブラストの原理を用いたダブルポット式ウェットブラスト試験機を使用した。概略を図1に示す。本試験機は、スラリーを入れる攪拌機付きポット(図中 Pot 1)から導かれたスラリーを、ガンユニットで圧縮空気との混合により加速し噴射する。投射後のスラリーはポット(図中 Pot 2)で回収される。投射ガンのノズル断面形状は正方形(1×1 mm)、投射距離 3 mm、投射角度  $\alpha=90^\circ$  とした。投射圧力は、スラリー流量が一定になるエア圧力( $P_{air}$ )とスラリー圧力( $P_{slu}$ )を表1の( )から( )の4条件に設定した。

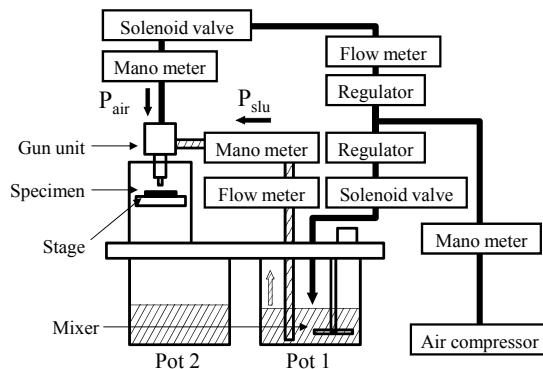


図1 試験機の概要

表1 試験条件

	( )	( )	( )	( )
$P_{air}$ , MPa	0.15	0.20	0.25	0.30
$P_{slu}$ , MPa	0.11	0.14	0.17	0.20

投射粒子と供試材料

投射粒子は光触媒の代表物質であるアナターゼ型の  $TiO_2$  粒子(平均粒径 36 nm)を用いた。 $TiO_2$  粒子と超純水を十分に攪拌し、濃度 3 mass%のスラリーとして使用した。供試材料には、SUS316L 板を 12×12×3 mm に切断し、エメリー紙#4000 で研磨し最終仕上げしたものを用いた。原子間力顕微鏡(以下、AFM)で計測した仕上げ面の算術平均粗さ  $S_a$  は約 30 nm であった。

(2) 試験方法

$TiO_2$  スラリーの滅菌性検証

スラリー自体がもつ滅菌性検証には、ATP + AMP ふき取り検査を行った。ATP + AMP ふき取り検査は、汚れが持っているアデノシン三リン酸(ATP)とアデノシン一リン酸(AMP)を指標とした清浄度検査である。検査箇所を専用の綿棒でふき取り、綿棒で捕らえたATPやAMPを試薬と反応して発光させ、得られる発光量を数値化(RLU値)した。RLU値が低いほどATPやAMP量が少なく、清浄度が高いと判定できる。

菌の選定には、取り扱い上の安全性を考慮し、バイオフィルムと粘り成分の類似性をもつ納豆菌を用いた。市販の納豆2粒(約1.0g)を試験管内で超純水9mlとふり混ぜ、納豆菌液を作製した。溶媒に納豆菌液を濃度 3 mass%添加し試液を 30 ml 作製する。比較のため納豆菌液を添加する溶媒は、超純水と  $TiO_2$  スラリーの2種類を用意した。本研究では、それぞれを超純水試液、 $TiO_2$  試液と呼ぶ。この試液をビーカー内でマグネチックスターラーを用い攪拌させた状態で、UV照射環境下でふき取り検査を実施した。UVの照度はビーカーの攪拌中心で 5.0 mW/cm<sup>2</sup> となるようにし、1時間毎にふき取り検査を行った。ふき取りは一度に3回行い、得られたRLU値の平均値を用いた。

ウェットブラスト投射と  $TiO_2$  皮膜

供試材料に対してウェットブラスト投射を行い、ウェットブラスト投射が材料表面に与える影響を解明し、その結果から洗浄および光触媒効果の付与に適した投射条件を選定した。供試材料に  $TiO_2$  スラリーを 10 秒間投射して観察した。これを繰り返して投射時間 60 秒までの材料の表面状態を時系列観察した。さらに、洗浄箇所の  $TiO_2$  粒子による親和性を検証するため、 $P_{air}=0.30$  MPa、投射時間 30 秒で洗浄した箇所に照射強度 5.0 mW/cm<sup>2</sup> で UV を照射し、UV 照射時間毎に水接触角を測定した。水接触角は超純水を 0.3  $\mu$ l 滴下して 3 回計測し、その平均値を用いた。

#### 納豆菌バイオフィーム除去試験

バイオフィームを模擬するために、菌には、TiO<sub>2</sub>スラリーの滅菌性検証と同様に、納豆菌を用いた。SUS316Lに納豆の粘り部分を塗布し、納豆菌が活動的になる38℃で24時間培養することで、SUS316L上に納豆菌バイオフィームを形成させた。P<sub>air</sub>=0.30 MPaで30秒間洗浄を行った後、試料表面に照射強度5.0 mW/cm<sup>2</sup>でUV照射を行い、本手法の洗浄に加えて洗浄箇所への光触媒効果付与の実行性を検証した。

滅菌性検証は、基材、バイオフィーム、洗浄後、UV照射後の表面に対して、ATP+AMPふき取り検査を行い評価した。バイオフィームを対象に滅菌性の検証を行うため、バイオフィーム全体をバイオマスとして捉えて定量する必要がある。そのため、ATPのみではなくAMPも測定することができる本検査方法を滅菌性の検証手段として採用した。洗浄後の試料表面のふき取り検査は、その後のUV照射後のふき取り検査の結果に影響を与える恐れがあるため、専用の試料を用意し、ふき取り検査を行った。ふき取りは洗浄箇所が微小なため、洗浄箇所のみをふき取れるように、マスキングし1回のみ行った。

親和性検証は、基材、洗浄後、UV照射後の表面に対して水接触角を測定しその結果から評価した。ふき取り検査を行った後に、同箇所の水接触角を節と同様にして水接触角を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TiO<sub>2</sub>スラリーの滅菌性の検証

TiO<sub>2</sub>スラリー単体の拭き取り検査結果は、48 RLUとなった。この数値を基準に滅菌評価を行う。各試液のUV照射時間ともなうRLU値の推移を図2に示す。超純水試液とTiO<sub>2</sub>試液でUVを照射していない初期の検査結果に大きな差が生じた。TiO<sub>2</sub>スラリー作製時に蛍光灯に暴露していたことでスラリーが滅菌効果を発揮したためと考えられる。また、超純水試液にUVを照射した結果、RLU値が増加した。UV照射に伴い発生した熱の影響で試液温度が上昇し、超純水中で納豆菌が増殖したためであると考えられる。一方、TiO<sub>2</sub>試液は同様の温度の影響下でありながら、照射開始1時間でRLU値が顕著に減少しその後も低く推移した。TiO<sub>2</sub>試液にUVを12時間照射した結果、RLU値が50 RLUとなりTiO<sub>2</sub>スラリー単体の拭き取り検査結果と近い値となったことから、滅菌が完了したと判断した。以上より、TiO<sub>2</sub>スラリーは光触媒効果による滅菌性を十分に有しているとい

える。

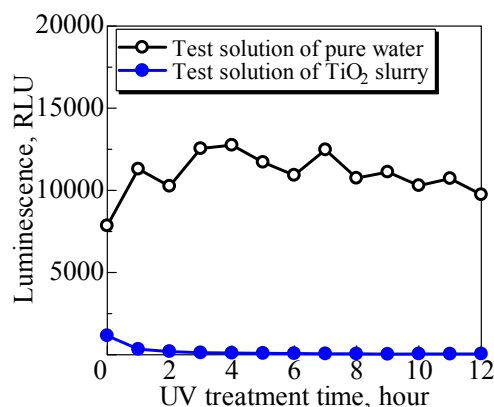


図2 UV照射時間ともなうRLU値の推移

##### (2) ウェットブラスト投射とTiO<sub>2</sub>皮膜

図3に洗浄痕のレーザー顕微鏡写真を示す。投射時間が長く、P<sub>air</sub>が大きくなると、洗浄痕が紫色に変化する。この変色は、ウェットブラスト投射によって洗浄箇所に皮膜が形成され、試料表面で光の干渉が生じたことによると考えられる。

未洗浄面と、P<sub>air</sub>=0.15 MPaで30秒投射を行った変色度合いが小さい洗浄痕、P<sub>air</sub>=0.30 MPaで30秒投射を行った青紫色に変色した洗浄痕の3種類の試料に対してエネルギー分散型X線分析装置(以下、EDX)による元素分析を行った。それら元素分析のスペクトルを図4に示す。未洗浄面ではTiのピーク位置(図中赤線)にスペクトルピークがないが、洗浄痕ではTiのピーク位置にスペクトルピークが現れた。そのピークは、洗浄痕の変色度合いが大きいほど、顕著であった。洗浄箇所にTiが検出されたことから、投射粒子であるTiO<sub>2</sub>が表面に存在すると考えられる。そこで、分子構造を推定するために、同箇所に対して顕微ラマン分光分析を行った。その結果を図5に示す。EDXの結果と同様に未洗浄面では、ラマンシフトに特異なピークは現れなかった。一方、洗浄痕では変色度合いが大きいほど、強い強度でピークが現れた。また、洗浄箇所のラマンシフトピーク位置とアナターゼ型TiO<sub>2</sub>のラマンシフトピーク位置は類似した。

以上のように、EDXによる元素分析とラマン分光による構造分析より、洗浄痕の変色箇所にはアナターゼ型TiO<sub>2</sub>の皮膜が形成されていることがわかった。また、青紫色のTiO<sub>2</sub>皮膜は光の干渉の観点から膜厚100 nm~150 nmであると推測される。

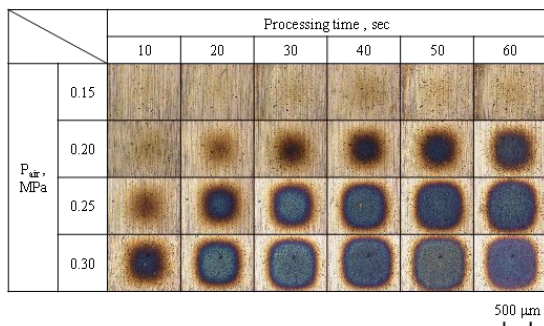


図3 洗浄痕のレーザー顕微鏡写真

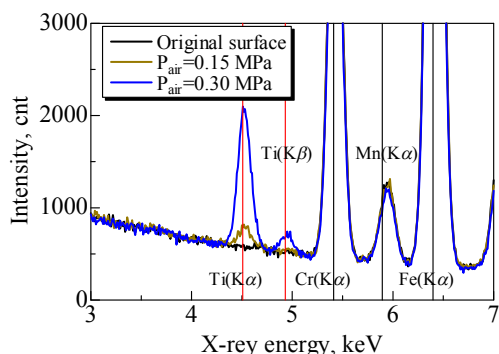


図4 EDXによる元素分析結果

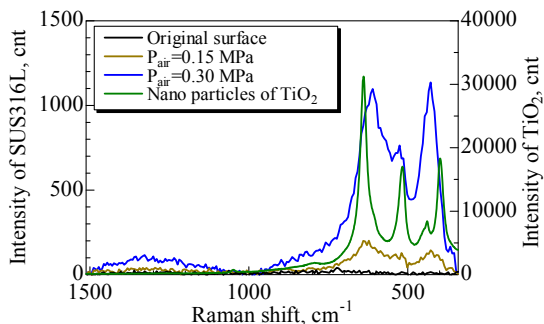


図5 顕微ラマン分光分析結果

### (3) 納豆菌バイオフィームの除去と洗浄面の評価

ふき取り検査の結果を図6に示す。処女面のRLU値は15 RLUであった。培養後のバイオフィームでは、バイオフィームに含まれている細菌の影響で、RLU値が22432 RLUと非常に大きい。洗浄後はバイオフィームが除去されたことで、RLU値が406 RLUとなった。この時点では、バイオフィームが物理的に除去されたのみで、洗浄箇所の滅菌は行われていない。洗浄後にUVを24時間照射した試料ではRLU値が13 RLUとなった。この結果は、バイオフィーム除去後に残存していた細菌が洗浄箇所の滅菌効果によって、死滅したためであることを示唆している。

洗浄度合いと水との親和性を水接触角測定から考察した。水接触角測定結果を図7に示す。洗浄後の試料の水接触角と、洗浄後にUVを24時間照射した試料の水接触角を比較すると、水接触角が約22%減少したことが

ら洗浄性ならびに水との親和性は向上することがわかった。

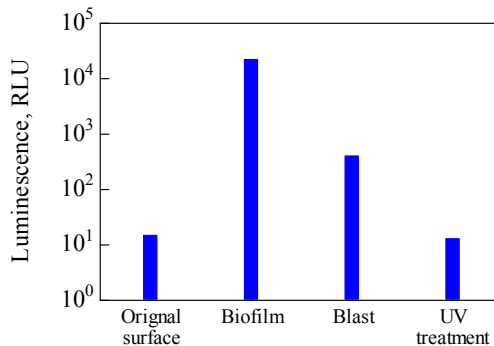


図6 ふき取り検査の結果

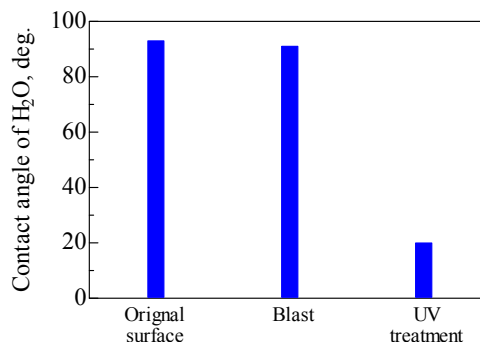


図7 水接触角測定の結果

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

Kentaro Mori、Toshiro Miyajima、Mamoru Kohata、Tomomi Honda、Yoshiro Iwai、Cleaning method using a wet blast technique for metallic materials、Cleaning method using a wet blast technique for metallic materials、ISAMPE 2013、2013.11.15、福井大学(福井県・福井市)

森健太郎、宮島敏郎、木幡護、岩井善郎、松原亨、ウェットブラスト法を用いた金属材料の洗浄方法、日本トライボロジー学会 トライボロジー会議2013秋 福岡、2013.10.24、アクロス福岡(福岡県・福岡市)

森健太郎、宮島敏郎、岩井善郎、ウェットブラストを用いた金属材料の洗浄法、日本機械学会北陸信越支部第50期総会・講演会、2013.3.9、福井大学(福井県・福井市)

森健太郎、宮島敏郎、岩井善郎、ウェットブラストを用いた金属材料の洗浄方法に関する基礎研究、日本トライボロジー学会 第3回トライボロジー秋の学校 in 愛知、2012.11.30、愛知健康プラザ(愛知県・知多郡)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 善郎 (Iwai, Yoshiro)

福井大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40115291

(2)研究分担者

宮島 敏郎 (MIYAJIMA, Toshiro)  
富山県立大学・工学部・講師  
研究者番号：60397239