

活性酸素による滅菌・殺菌 システムの農業分野への応用

東海大学 工学部 機械工学科
教授 岩森 暁

2021年10月19日

OUTLINE

(1) 新技術の特長

- ・ 背景
- ・ 活性酸素とは？
- ・ 殺菌・滅菌
- ・ 従来技術とその問題点
- ・ 細胞接着のための表面改質
- ・ 活性酸素種のモニタリング技術：インジケータ

(2) 新技術の特徴

- ・ 従来技術との比較
- ・ 新技術の組合せ

(3) 想定される用途

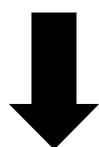
(4) 実用化に向けた課題

(5) 企業への期待

(1)新技術の特長 背景

当研究室では、以下のような分子や原子レベルで材料の表面を改質することで、材料の機能を向上する研究を行っている。

- ①材料の表面や界面での吸着現象
- ②材料の力学特性の発現メカニズムを分子・原子レベルで解析
- ③材料内部や表界面上でおこる物理化学現象の解析
- ④材料機能の創成・デバイス化に向けた研究



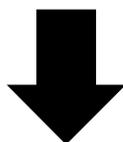
これらの研究の過程で、以下の技術を開発

- ✓ 活性酸素による低温滅菌・殺菌技術
- ✓ 活性酸素による材料表面改質
- ✓ 活性酸素の検出を目視で確認できる技術(センシング)

(1)新技術の特長 活性酸素とは？

活性酸素とは、化学反応性の高い酸素種の総称で、基底状態の酸素に比べ、桁違いに高い酸化力がある。

- 工業的に容易に生成可能(紫外線・プラズマ)
- 化学反応性が極めて高い
- 寿命が短い(残留性が無い、低環境負荷)
- 低温(常温近傍)で使用可能



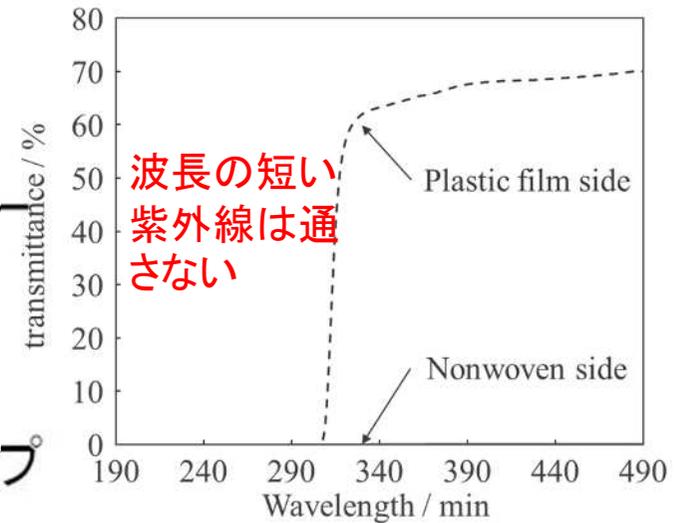
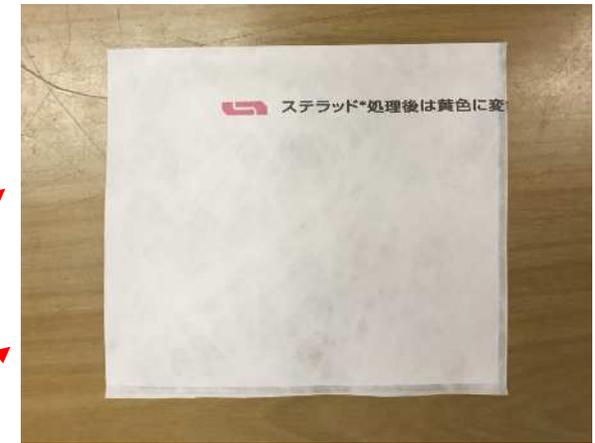
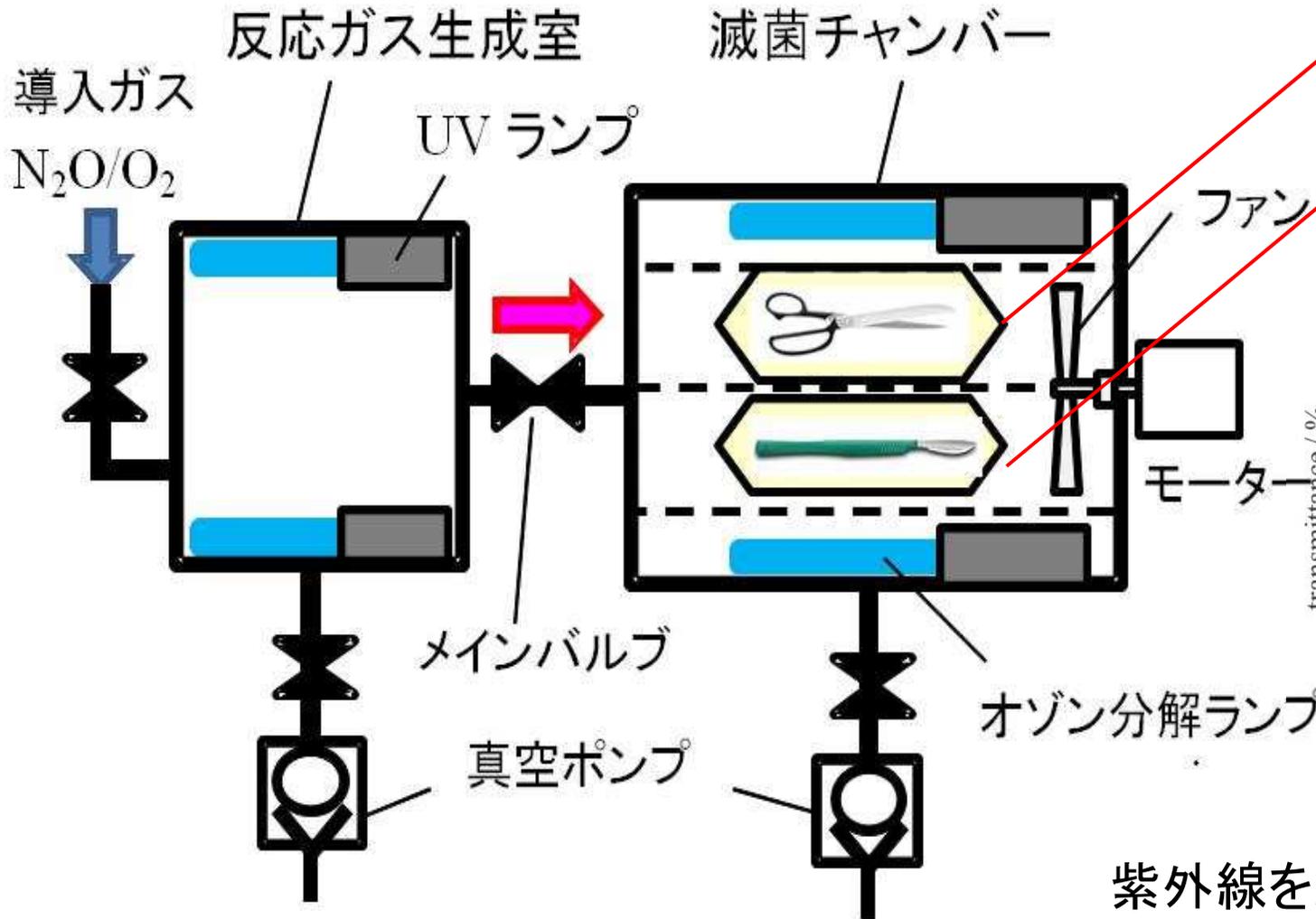
これらの特徴を利用して各種表面処理に応用
(例:洗浄、改質、殺菌、滅菌など)

励起源(UV)を材料や基材に直接照射することがなく、酸化力の強い活性種のみが照射されることにより、材料に与えるダメージが少ない表面処理である。

活性酸素種	有機物との反応速度定数 ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)
OH^*	$10^{8\sim9}$
1O_2	$10^{6\sim7}$
$O(^3P)$	$10^{5\sim6}$
HO_2	$10^{2\sim3}$
O_3	$10^{2\sim3}$
O_2^-	$1\sim10$
O_2	10^{-30}

出典:「オゾンの基礎と応用」 杉光英俊 著 / 光琳

(1)新技術の特長 殺菌・滅菌



紫外線を遮断し、活性酸素を透過する

殺菌・滅菌装置の概略図

(1)新技術の特長 従来技術とその問題点

細胞を接着する細胞培養基板として
→ 一般的に**ポリスチレン (PS)** が利用されている。



例:PS製マルチウェルディッシュ

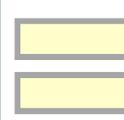
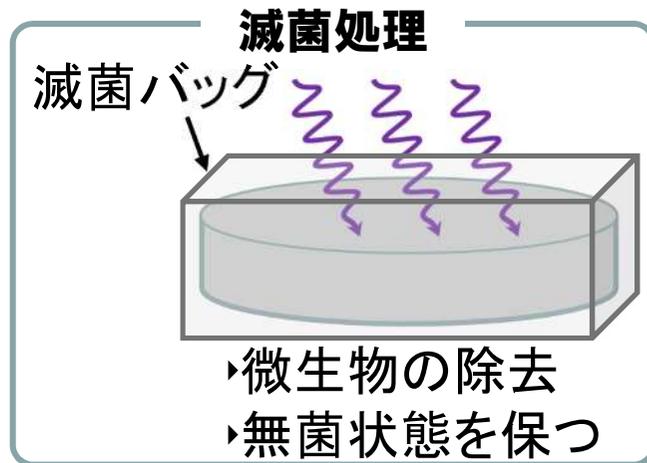
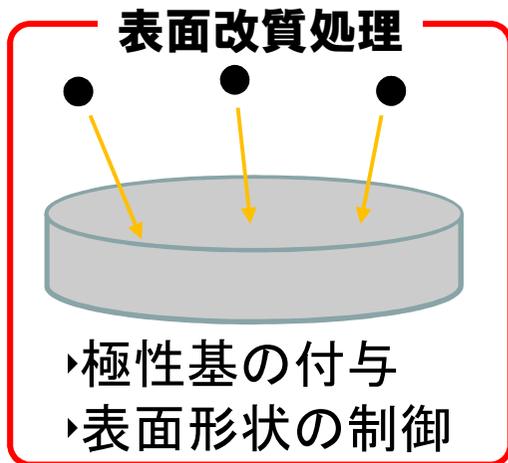
- ▶高透明性
- ▶良形状安定性
- ▶化学安定性

しかし…、PSのままでは**細胞の接着性・進展性が悪い**



細胞の接着性・進展性が向上するように**細胞培養基板の表面改質が必要**

■ 表面改質した細胞培養基板を研究等に利用できるようになるまでに…

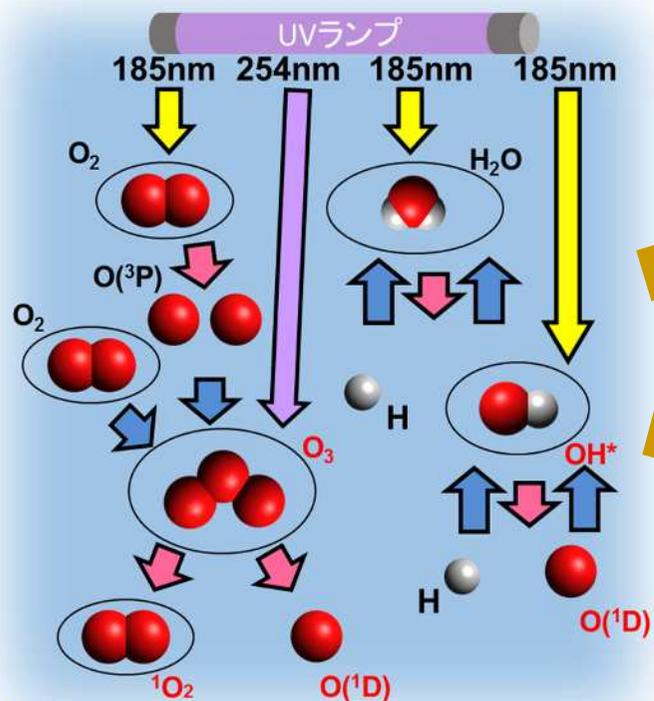


従来の処理方法のデメリット

- ▶**表面改質処理と滅菌処理の2工程に分けた処理が必要**
- ▶高真空が必要
- ▶装置が高額かつ巨大

➡ **1つの装置・1回の処理で表面改質と滅菌処理が可能**

(1)新技術の特長 細胞接着のための表面改質



紫外光励起活性酸素の生成メカニズム

同時に得られる
2つの効果

表面改質効果

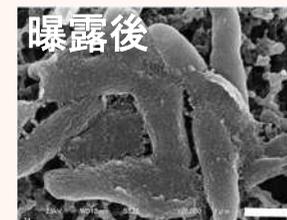


表面粗さの変化



極性基の付与

殺菌効果



Scale bar: 1 μm

活性酸素の曝露前後の大腸菌の様子

メリット1

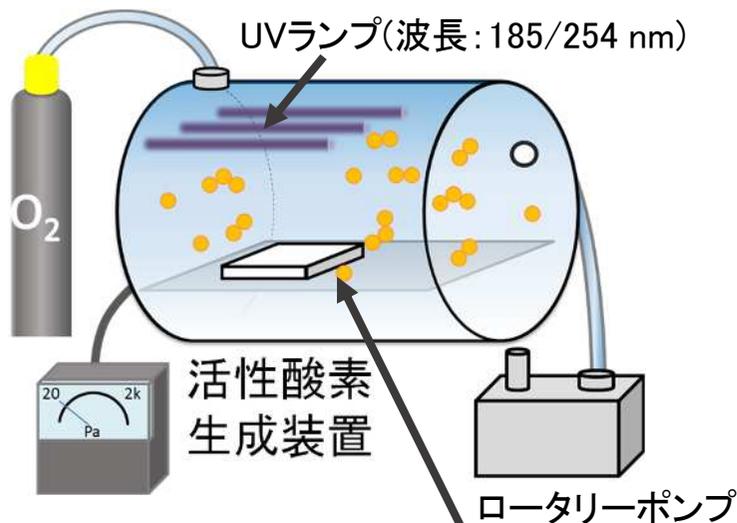
特定波長の紫外線を用いることで、活性酸素を安価 & 簡便に生成可能

メリット2

活性酸素を使うことで、表面改質と殺菌(滅菌)の同時処理が可能

(1)新技術の特長 細胞接着のための表面改質

実験条件



活性酸素曝露条件

- ・曝露基板:未処理PS基板
- ・雰囲気:O₂(2 kPa)
- ・曝露時間:30 min
- ・UVランプ出力:110 W
- ・UVランプ-基板間距離:14 cm

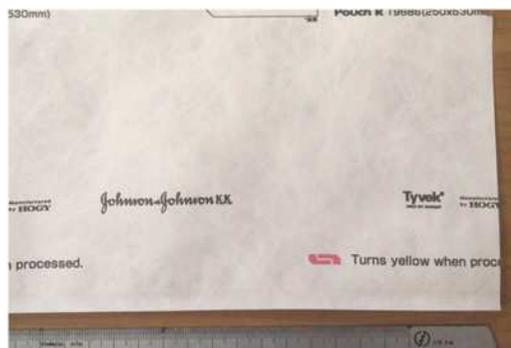
細胞培養条件

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1)3000cells/cm², CO₂37°Cで24時間培養

供試材料



マルチウェルセルカルチャープレート(CORNING®)



滅菌バッグ
(Jonson&Jonson, Tyvek®)

滅菌バッグに梱包
→活性酸素は透過
→紫外線遮断

→活性酸素のみで表面改質を行いながら無菌状態を保存

(1)新技術の特長 細胞接着のための表面改質

評価方法

表面特性評価

- ▶ X線光電子分光 (XPS)
= **表面化学状態の評価**
- ▶ 表面粗さ測定
= **表面形状の評価**
- ▶ 接触角測定
= **ぬれ性の評価**

細胞接着性評価

- ▶ 走査型電子顕微鏡 (SEM)
= **形態観察**
- ▶ 接着細胞数測定
= **接着しやすさ**
- ▶ 伸展面積測定
= **伸展しやすさ**

以下の3サンプルに対して上記の評価を行い、それぞれを比較

- ① **未処理 (untreated)**
- ② **プラズマ処理済み市販品 (Plasma)**
- ③ **活性酸素処理(本発明)**

表面特性評価 表面化学状態の評価(X線光電子分光 (XPS))

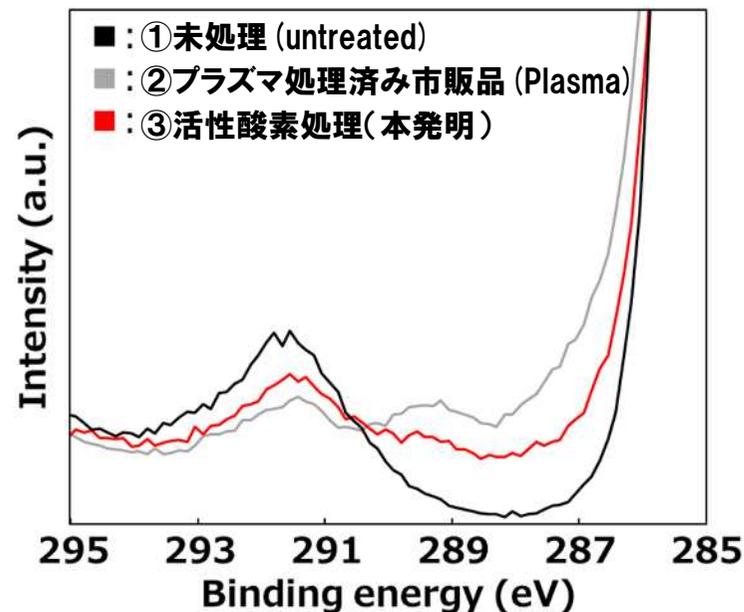
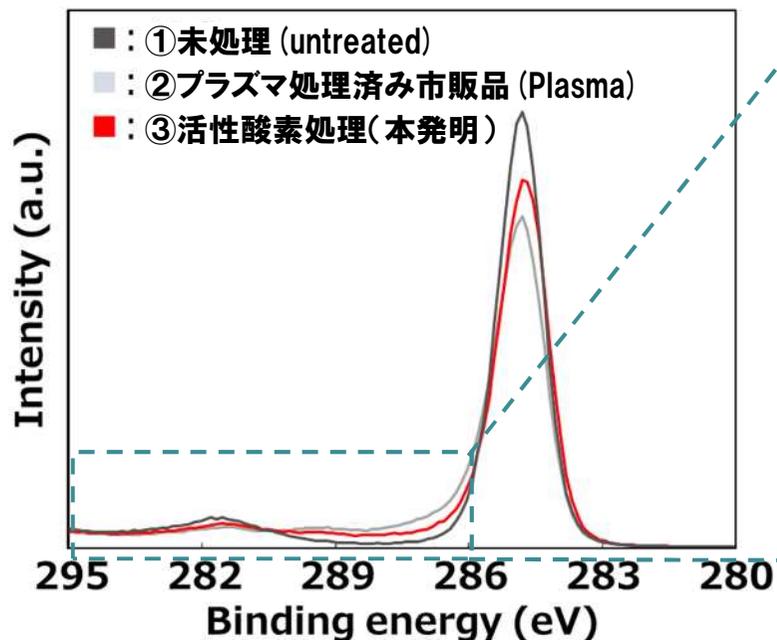


Fig. C1s XPS スペクトル

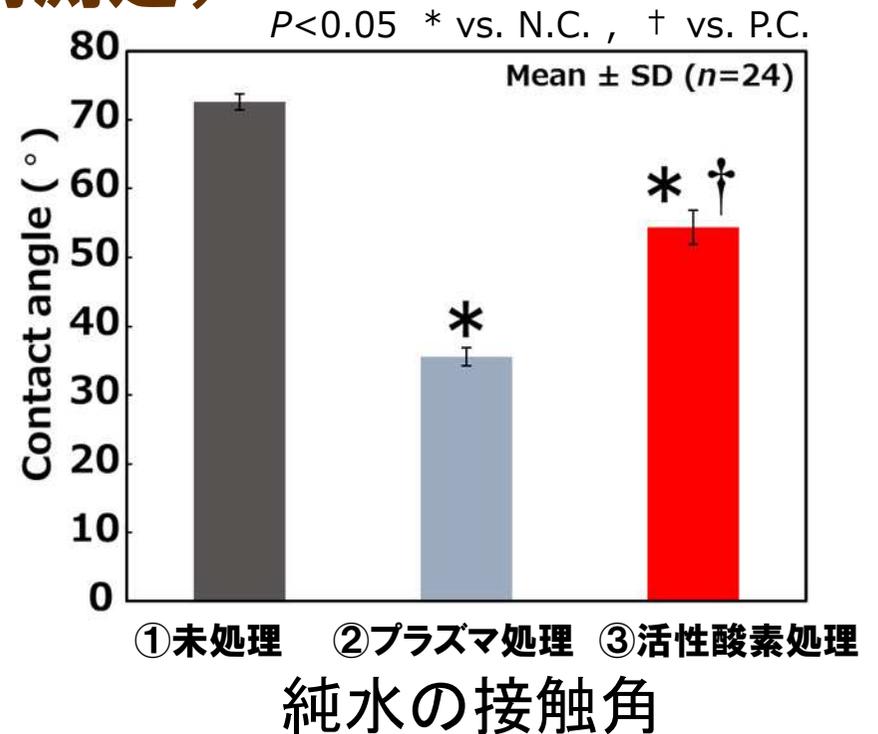
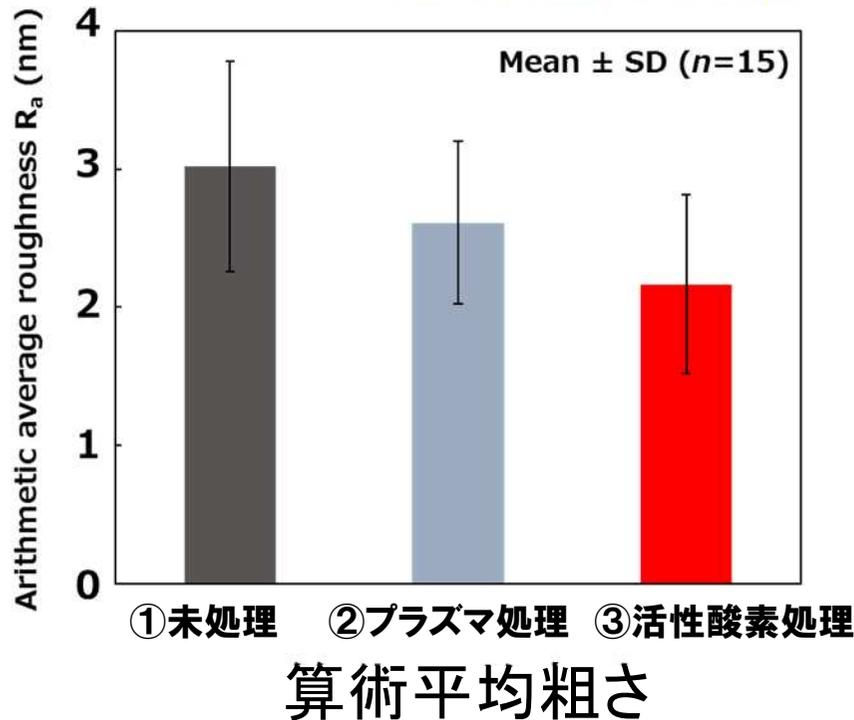
K. Hosoya, et al., Vacuum, 148, pp. 69-77, (2018)

Table 元素組成比 (atomic %)

比較対象	C	O
①未処理(untreated)	99	1
②プラズマ処理済み市販品(Plasma)	88	12
③活性酸素処理(本発明)	93	7

- ▶ 表面酸素量の増加
- ▶ C-C/C-Hの減少
- ▶ C=O, O=C-Oの増加
- 極性基の付与が行える

表面特性評価 表面形状の評価(表面粗さ測定) ぬれ性の評価(接触角測定)



K. Hosoya, et al., Vacuum, 148, pp. 69-77, (2018)

- ▶ 3サンプルともに表面粗さに有意な変化は無い。
- ▶ ①未処理と比べると②プラズマ処理、③活性酸素処理は表面の親水性が向上。
- ▶ ②プラズマ処理の方が③活性酸素処理よりも親水性は高い。

活性酸素処理によって表面の化学状態が変化し、親水性が向上 11

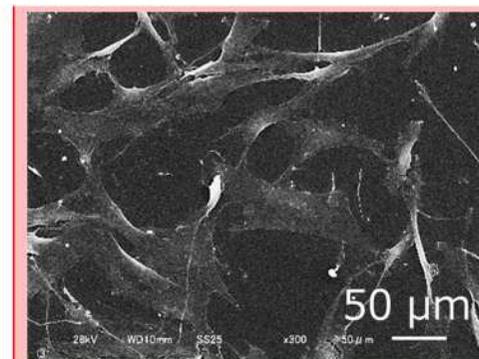
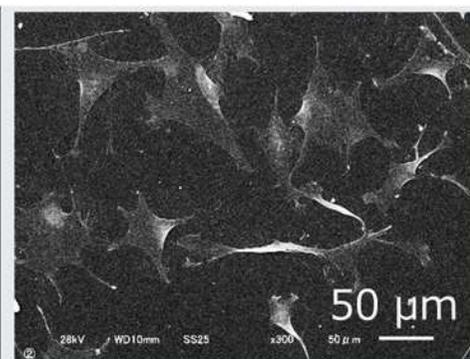
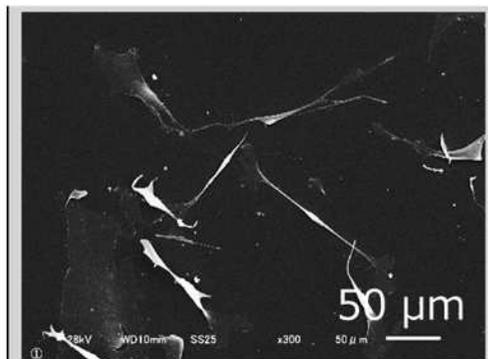
細胞接着性評価 形態観察(走査型電子顕微鏡 (SEM))

①未処理

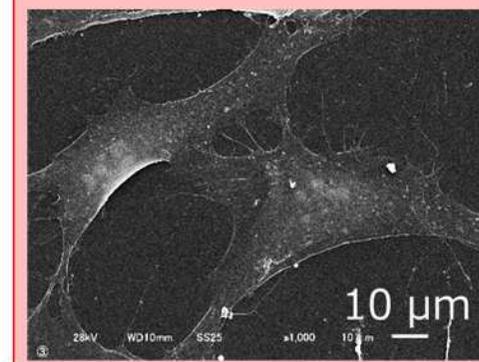
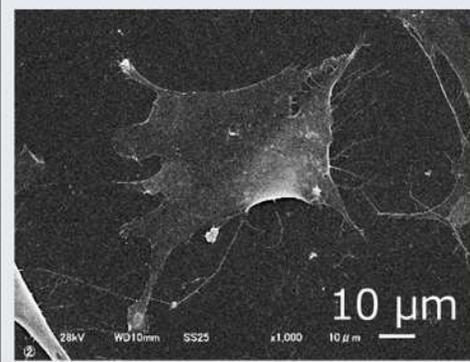
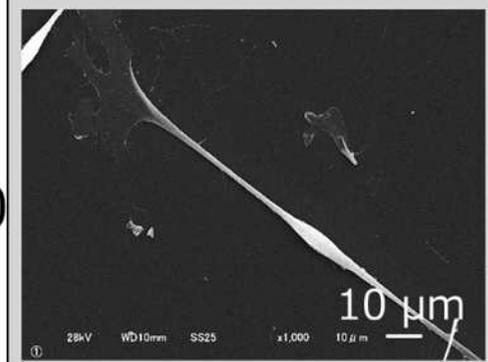
②プラズマ処理

③活性酸素処理

×300



×1000

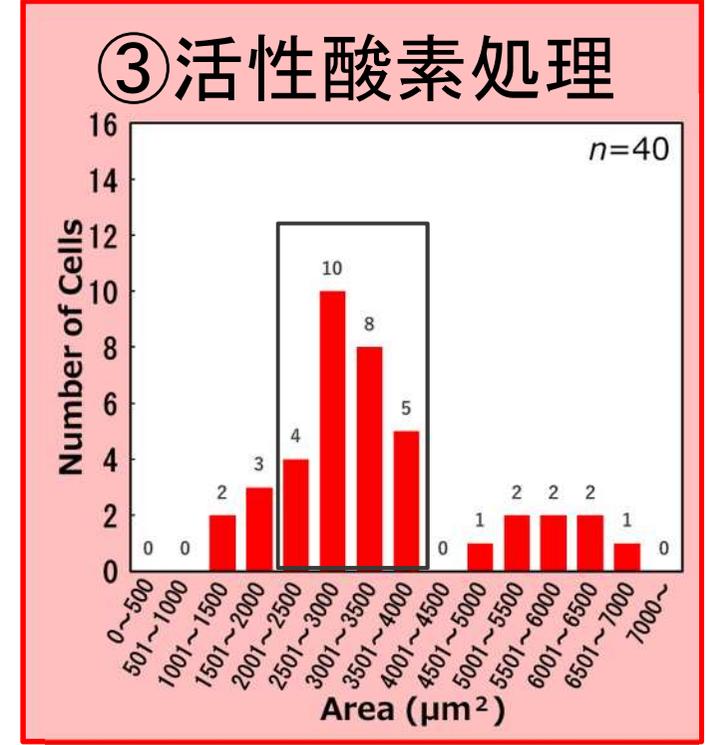
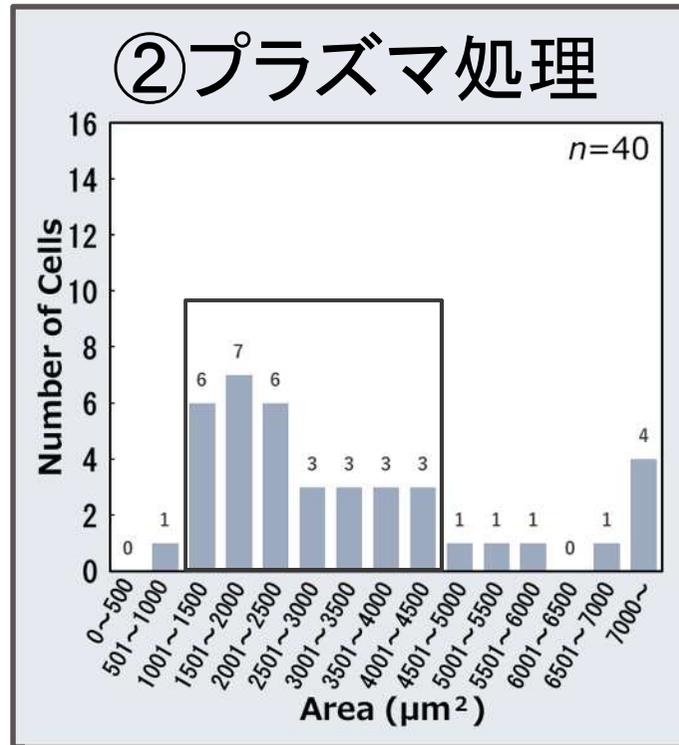
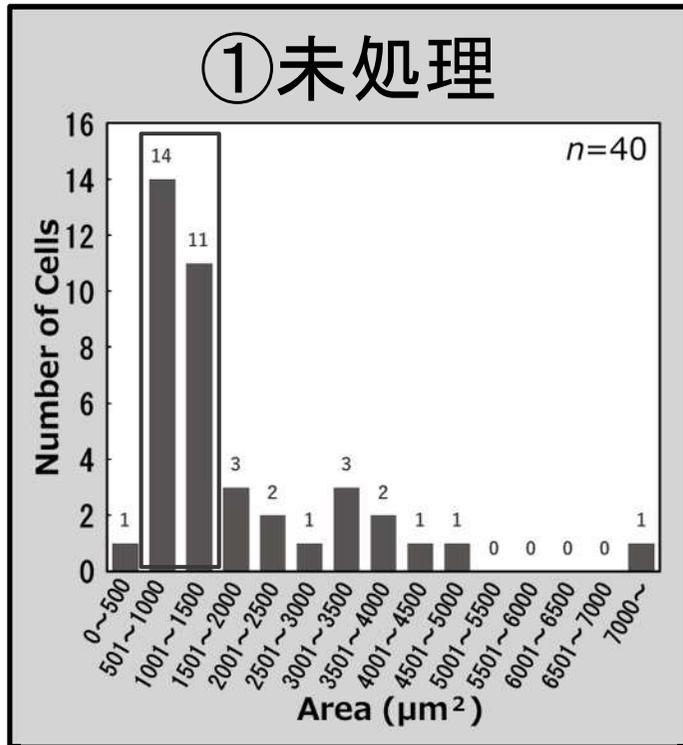


MC3T3-E1のSEM像

K. Hosoya, et al., Vacuum, 148, pp. 69-77, (2018)

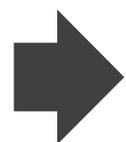
- ▶ ①未処理では、細胞接着性が悪く、線形化した。
- ▶ ②プラズマ処理および③活性酸素処理では、表面改質の効果により細胞が大きく伸展した。

細胞接着性評価 伸展しやすさ(伸展面積測定)



K. Hosoya, et al., Vacuum, 148, pp. 69-77, (2018)

- ① 未処理では、501~1500 μm^2 の細胞が集中して多い
- ② プラズマ処理では、1001~4500 μm^2 の細胞が幅広く分布
- ③ 活性酸素処理では、2001~4000 μm^2 の細胞が集中して多い



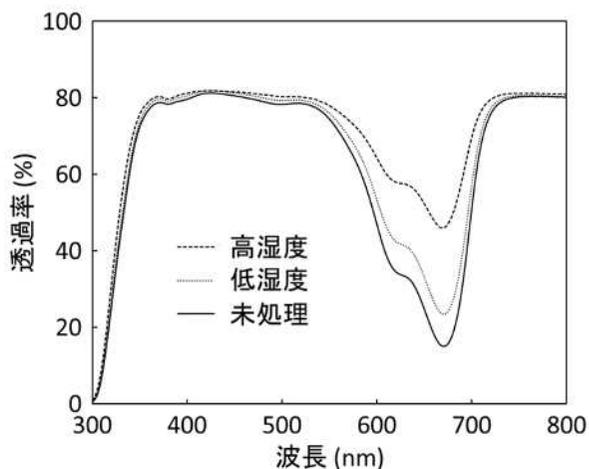
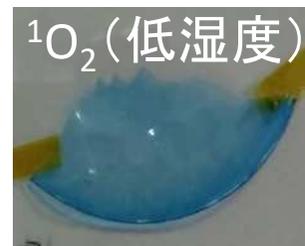
**プラズマ処理よりも活性酸素処理の方が
伸展面積の大きい細胞が多く分布している。**

(1)新技術の特長 活性酸素種のモニタリング技術:インジケータ

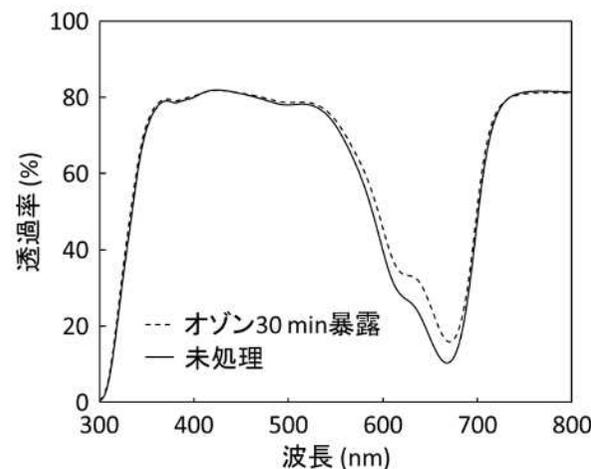
活性酸素を工業的に応用する場合、活性酸素の発生状況を把握する必要がある。そこで、センシングする技術の1つとして、ケミカルインジケータを開発。



最も酸化力の高い「OH*」に特異的に反応し、脱色する均一な薄膜型インジケータ



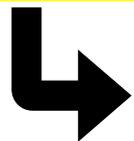
インジケータ(開発品)の色消失特性



オゾン曝露時のデータ

(1)新技術の特長 活性酸素種のモニタリング技術:インジケータ

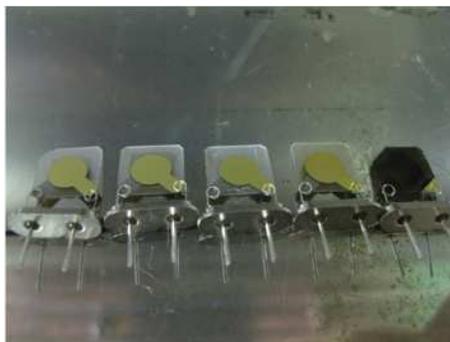
活性酸素をセンシングする別の技術として、水晶振動子を活用。



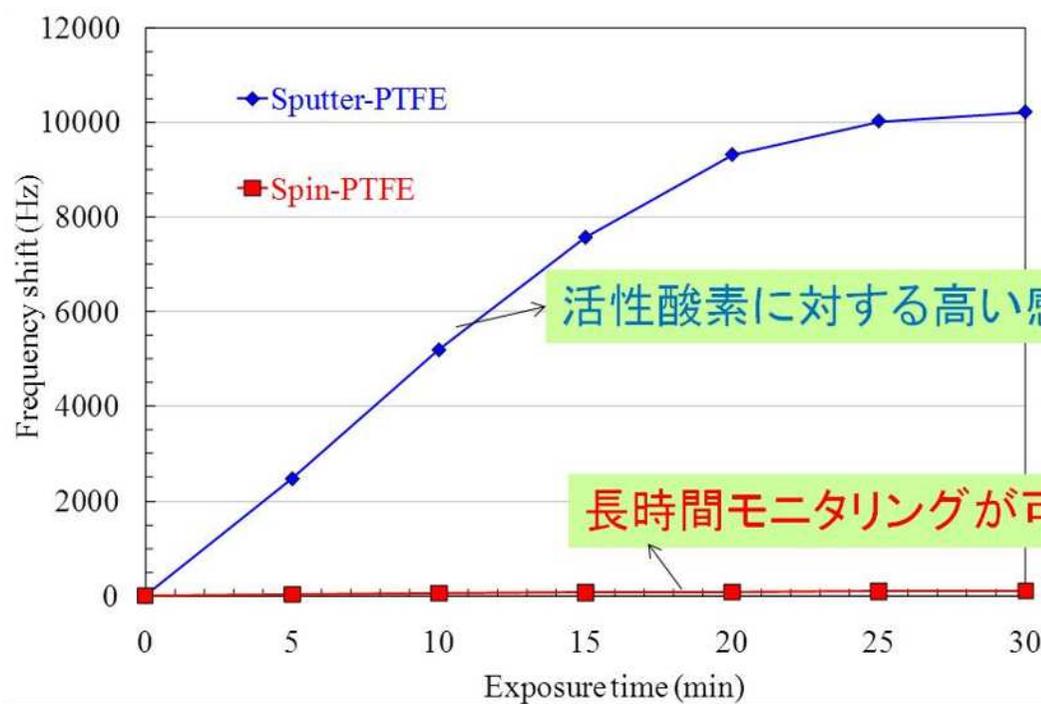
スパッタPTFE薄膜を検知膜にした水晶振動子型インジケータ



開発した活性酸素検出
モニター用の水晶素子



水晶微小天秤センサー



S. Iwamori, et al, Sens. & Act. B: Chem., 171–172, pp.769-776, (2012).

(2)新技術の特徴 従来技術との比較

- 従来技術(プラズマ処理法)の問題点を解決するために、紫外線励起活性酸素を用いることで、細胞培養基材の表面改質と殺菌(滅菌)処理を1工程実施する方法を提案した。
- 本技術の適用により、簡便にポリスチレン製の細胞培養基板に適度な粗さと親水性を付与し、殺菌(滅菌)できる。
- 滅菌バッグ内で処理することで、紫外線が直接照射されず、材料表面のダメージを極力抑えた表面改質技術である。

(2)新技術の特徴 新技術の組合せ

- 「活性酸素種の表面作用量を測定する技術」や「特定の活性酸素種にのみに反応する色素インジケータ」を併用することで、活性酸素種の表面作用量を簡便に定量化でき、最適な表面処理と殺菌(滅菌)処理が可能になる。

(3) 想定される用途

- 反応性の高い活性酸素種を用いて、研究開発で使用するシャーレなどのプラスチック製品の殺菌・滅菌と表面改質が可能である。
- 農業器具等の様々な器具等の殺菌・滅菌技術として展開することも可能と思われる。

(4)実用化に向けた課題

- これまで、医療用の滅菌技術として本技術と、周辺技術として殺菌や滅菌等の指標（インジケータ）に関する開発を行ってきた。今後、農業分野等の医療分野以外への応用の可能性を検証したく考えている。
- 細胞培養基材の表面改質特性について、PS以外の生体材料に対する活性酸素処理による表面改変の効果の検証を考えている。

(5) 企業への期待

- 紫外線励起活性酸素を用いたプラスチック等の表面改質と滅菌処理を1工程で実施する装置の実用化に興味のある企業との連携を希望。
- 上記の組合せに限らず、紫外線励起活性酸素を用いた滅菌装置・殺菌装置等の実用化を検討している企業への技術移転を希望。
- また、活性酸素種の表面作用量を測定する技術や、特定の活性酸素種にのみに反応する色素インジケータ等の実用化を検討している企業との共同研究(技術移転)を希望。

本技術に関する知的財産権

特許①

発明の名称: 活性酸素による細胞培養基板の表面改質および滅菌処理

特許番号: 特許第6712072号

出願人: 学校法人東海大学、岩崎電気株式会社

発明者: 岩森 暁、大家 溪、細谷 和輝、松本 裕之、吉野 潔、
岩崎 達行、小佐々 亮

特許②

発明の名称: 活性酸素検知用インジケータ

特許番号: 特許第6573304号

出願人: 学校法人東海大学

発明者: 岩森 暁、岡村 陽介、大家 溪、西山 信人、水越 晴彦、
松本 裕之、吉野 潔、岩崎 達行、小佐々 亮、野田和俊

産学連携の経歴

<企業等との連携>

2010年～2015年 光学系の企業と共同研究を実施

2019年～2021年 産官学連携拠点形成を目指し、複数の企業、自治体、大学等との連携体制を構築中

<実用化に向けた公的研究>

2010年 JST研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)シーズ顕在化タイプ「活性酸素種の殺菌プロセスへの応用と評価モニタリング技術の開発」に採択

2012年 JST A-STEP本格研究開発ハイリスク挑戦タイプ「活性酸素表面処理装置の開発と医療用滅菌器への応用」に採択

2015年 JST A-STEP機能検証フェーズ「活性酸素による細胞接着性に優れる培養基板の創成」に採択

お問い合わせ先

東海大学

ビーワンオフィス(研究担当)

T E L : 0463-59-4364

e-mail: sangi01 @tsc.u-tokai.ac.jp