

研究報告2021 目次

【研究開発部】

国際評価技術サービス提供事業

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

◆総括	222
◆新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み	224
◆光触媒を用いたバイオフィルム形成抑制効果	227
◆酸化チタンと酸化モリブデンを組み合わせた可視光応答型光触媒材料の抗ウイルス活性に関する研究	230
◆業績	233

「抗菌・抗ウイルス研究」グループ

グループリーダー 窪田 吉信、石黒 齊

【基本構想】

本プロジェクトでは、「KISTEC 機器の共用化」による光触媒加工品やその他抗菌・抗ウイルス加工品による性能評価試験を行い、様々な企業や研究機関による抗菌・抗ウイルス加工品の研究開発を推進することを目的とした取り組みを行っている。また、JIS/ISO に基づいた性能評価試験だけではなく、それぞれの加工品や製品の特徴に合わせたオーダーメイドの性能評価試験方法を提供している。性能評価の提供にあたっては、抗菌分野(JIS Z 2801)について ISO 17025 を取得しており、国際的に通用する評価機関として、日々その技術や品質の向上に努めながら、KISTEC で展開していく評価技術センター機能の構築に向けた取り組みを行っている。その他、新たな試験方法の提供に向けた取り組みや共同研究、自主研究を通じた新規 ISO/JIS の作成や抗菌・抗ウイルス効果を持つ新規物質の探索などの取組を続けている。

1. 2020 年度の研究目的

プロジェクト 16 年目となる 2020 年度についても、様々な活動を行ってきた。その中から、以下の各項目について、検討を行ってきた。

(1) 抗菌試験室の ISO 17025 管理体制の整備・維持と KISTEC 機器の共用化

ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)は、試験所及び校正機関がある試験や校正等を実施する能力があるとして認められる認定を受けるための規格である。我々は、抗菌分野の中で、JIS Z 2801 について、ISO/IEC 17025 の取得しており、その管理維持を行った。

KISTEC 機器の共用化としては、昨年度より引き続き、各企業や研究機関の研究開発に向けて、抗菌・抗ウイルス性能評価の提供を行った。研究開発を進めている各企業や研究機関からは SARS-CoV-2 を用いた性能評価の要望が非常に多いことから、SARS-CoV-2 を使用出来る BSL3 施設を整備し、SARS-CoV-2 を用いた性能評価の提供に向けた取り組みを行った。

(2) 光触媒による抗バイオフィルム効果の検証

現在、抗菌製品技術協議会では抗バイオフィルム試験法の ISO 化に向けた取り組みが、進められている。一方で、光触媒加工品を用いた抗バイオフィルム試験方法は現在確立されていない。そこで、本検討では、光触媒加工品を用いて、細菌が形成するバイオフィルムを抑制することが出来るかを確認し、標準試験方法開発に向けた検討を行った。

(3) 新しい光触媒材料の抗ウイルス活性に関する研究

これまでに、銅化合物や銀化合物以外に、高い抗菌・抗ウイルス活性を持つ金属化合物の探索を行い、酸化モリブデン(MoO_3 、 MoO_2)に高い抗ウイルス活性があることを見出している。一方で、酸化モリブデンには可視光応答

性がほとんどないことも明らかとしている。本検討では、酸化モリブデンの高い抗ウイルス活性を維持したまま、可視光応答性を示す材料の作成について、検討を行った。更に、実環境に近い状態のウイルス付着状況における抗ウイルス性能についても検討を行った。

2. 2020 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の具体的な研究成果であり、それぞれの項目について順調な成果を上げることが出来た。

(1) 抗菌試験室の ISO 17025 管理体制の整備・維持と KISTEC 機器の共用化

KISTEC 機器の共用化として、提供した評価件数を図 1 に示す。図 1 にあるように、年々と件数が増加しており、さらにコロナウイルスの感染拡大により、2019、2020 年と大きな伸びとなった。このような急激な伸びは、国内に

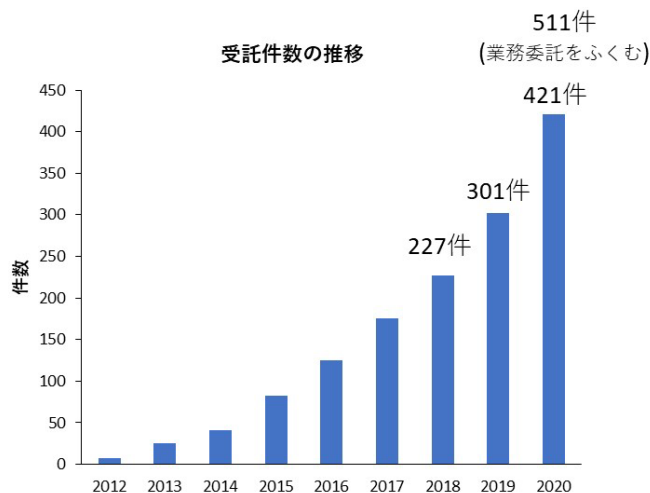


図 1 受託件数の推移

における感染リスク低減に向けて、各企業、研究機関が精力

的に抗菌・抗ウイルス加工製品の開発に取り組んだ結果と考えられる。また、KISTECを始め、国内の試験機関全体に性能評価の問い合わせや依頼が殺到したことにより、性能評価の結果報告まで、非常に時間を要することとなった。そのため、出来るだけ迅速に結果の報告を行うための対応がKISTECを始め、国内試験機関の新たな課題となると考えている。

また、これまでに提供している抗ウイルス性能評価ではインフルエンザウイルス、ネコカリシウイルス、バクテリオファージを対象に抗ウイルス評価となっている。一方で、これらの性能評価を行う中で、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を用いた性能評価の要望が非常に高まってきた。そこで、その要望に応え、SARS-CoV-2を用いた性能評価を可能とするために、SARS-CoV-2の取り扱いが可能な施設(BSL3 施設)の整備を進め、性能評価の提供に向けた取り組みを行った。具体的には既存のBSL2施設の条件に加えて、個人認証による開錠とした二重扉の設置、差圧管理によるBSL3施設内を陰圧とした空調の整備などである。また、SARS-CoV-2については、神奈川県衛生研究所より、臨床分離株の供与を受け、その増殖条件の検討や性能評価への応用について検討を行った。その結果、KISTECにてSARS-CoV-2の取り扱いを可能とし、12月25日より、SARS-CoV-2を用いた性能評価試験の問い合わせに対応することが可能となった。現時点では、性能評価の対象となる加工品は平板状及び繊維状の状態に限っているが、今後液体加工品などについても、対象を広げるよう取り組みを続けている。

(2) 光触媒を用いた抗バイオフィーム形成抑制効果

光触媒は紫外光や可視光の照射下において、抗菌・抗ウイルス性能を発揮する。これまでに、その性能を応用して、様々な加工品の開発が進められてきた。また、バイオフィームに関しても、その抑制効果について、研究が進められてきているが、これまでの抗バイオフィーム研究は、それぞれの研究機関の独自の方法によっている為、その効果の比較が困難な状況であった。そこで、本検討で試験法の標準化を進めるための検討を行った。用いた光触媒は紫外光応答形光触媒加工品及び無加工ガラス板であり、そこに、表皮ブドウ球菌を用いて、バイオフィームの形成を確認した。その際に、紫外光を照射し、バイオフィームの形成抑制を確認した。その結果、紫外光を照射した紫外光応答形光触媒加工品において、バイオフィーム形成抑制効果が得られた。一方で、紫外線強度を高くした場合、無加工ガラス板及び紫外光応答形光触媒加工品の間で、大きなバイオフィーム形成抑制効果の違いは得られなかった。このことから、光照射の条件や接種する細菌数など、今後より詳細を検討することで、光触媒加工品による抗バイオフィーム抑制効果を評価する試験方法の開発へ結び付けていくことが重要と考えられた。

(3) 新規機能性物質の探索と抗ウイルス性能

MoO₃の可視光応答性を付与するために、酸化モリブデ

ンと酸化チタンを組み合わせた材料(MoO₃/TiO₂)を作成し、その抗ウイルス効果の確認を行った。その結果、ネコカリシウイルス及びインフルエンザウイルスに対して、可視光照射下での高い抗ウイルス効果を認めた。このことから、新しい可視光応答形光触媒を作製することが出来ている。更に、試験室内の評価方法であるJISでの評価方法に加えて、グローブボックス内に、各種試験サンプルを設置後、ウイルスを噴霧し、各種試験サンプルにウイルスを吸着させた上での抗ウイルス効果の確認を行った。この方法により、実環境中におけるウイルスを含む飛沫がサンプルに付着する状況を模擬した試験を行うことが出来た。その結果から、実環境中に近い条件下においても、MoO₃/TiO₂は抗ウイルス活性を発揮することを見出した。更に、酸化モリブデンを始め、幾つかの酸化物について、共同研究を通じてSARS-CoV-2に対する性能評価を行い、これまでに開発してきた各種酸化物の抗ウイルス活性を確認することが出来た。今後は、この材料の抗ウイルス活性を更に高める方法について検討を進めていく予定である。

新型コロナウイルスを用いた性能評価の取り組み

永井 武

1. はじめに

2019 年末に中国の武漢で、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染事例が報告され、その後、瞬く間に世界中に拡散された。そして、2020 年 3 月 11 日、WHO が世界的な流行であるパンデミック宣言を出すに至った。日本でも、感染が拡大し、2020 年 4 月 7 日に一回目の緊急事態宣言が出された。この時、未知なる感染症の混乱の中、マスクや消毒剤などの感染症対策製品が全国的に品薄状態になった。ここで改めて、抗菌・抗ウイルス製品の重要性が認識されるとともに、これらの製品に対する信頼性が問われることとなった。特に市販の抗菌・抗ウイルス製品の多くは、「雑品」の扱いとなり、医薬品医療機器等法の適用範囲外であることから、中には効果の低い製品も販売されている。そこで、抗ウイルスを謳う製品について、性能評価を行える試験機関の重要性が高まりつつある。

当研究所（旧公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー）は、2016 年より、インフルエンザウイルス及びネコカリシウイルス（ノロウイルスの代替）を用いた抗ウイルス試験を開始しており、平板、繊維、光触媒及び液体などの様々な形状の試験品について抗菌・抗ウイルス性能評価を行ってきた。また、2020 年初旬より、抗菌・抗ウイルス製品を扱う企業からの評価依頼が急増し、さらに、これらの企業の多くが SARS-CoV-2 での評価を要望していた。そのため、これまでの経験を活かし、2020 年度に、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価を立ち上げるため、以下のように、BSL3 実験室の整備及び、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス評価系の構築を行った。

1. 1 SARS-CoV-2 の分類

SARS-CoV-2 は、感染症法の分類では四種病原体等であり、また、バイオセーフティレベル（BSL）の分類では、BSL3 に該当するため、これらの基準を満たした実験室が必要となる。そのため、当初使用していた BSL2 実験室に加えて、新たに BSL3 実験室を新設することとなった。

1. 2 BSL3 実験室について

BSL3 の実験室は、厚生労働省が推奨している「感染症法に基づく特定病原体等の管理規制」に基づいて設計を行った。特に、既存の BSL2 の施設基準に加え、主に、以下の仕様を追加し、BSL3 実験室を新設した。

- ① 個人認証及び二重扉を有する BSL3 専用前室の設置
- ② BSL2 実験室と BSL3 実験室の間にパスボックスを設置

- ③ HEPA フィルターを搭載し、差圧管理（BSL3 専用前室と BSL3 実験室が陰圧）できる空調設備の設置
- 各実験室の概略図を図 1 に示す。



図 1 BSL3 及び BSL2 実験室の概略図と BSL3 の様子

2. 実験と結果

2. 1 SARS-CoV-2 の培養及び感染価の測定

SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価を行うためには、まず、ウイルスを培養し増やす必要がある。本検討で用いた SARS-CoV-2 は、神奈川県衛生研究所より協力を受け、分与された臨床分離株を使用した（SARS-CoV-2/Hu/KngFJ/23RD5 株）。宿主細胞は、Vero 細胞（ATCC CCL-81）及び Vero E6 細胞（ATCC CRL-1586）を用いて検討した¹。方法として、培養フラスコ（75 cm²）に宿主細胞を 100%コンフルエントになるように培養し、培地を除去した後、SARS-CoV-2 のウイルス液 1 ml を加えた（multiplicity of infection (moi) = 0.01）。33℃の CO₂ イン

キューバーで、1時間培養した。(15分おきに振盪する)その後、MEM 培地 (血清不含) 10 ml を加え、33℃の CO₂ インキュベーターで、5日間培養した。この間の細胞の様子を図2に示す。

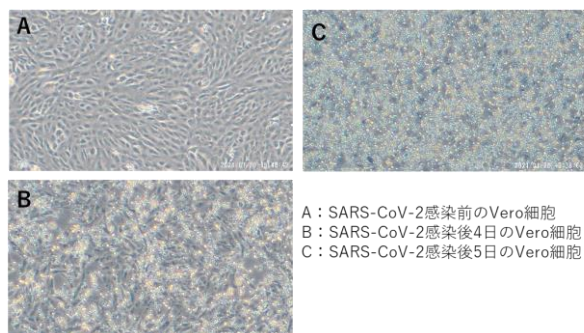
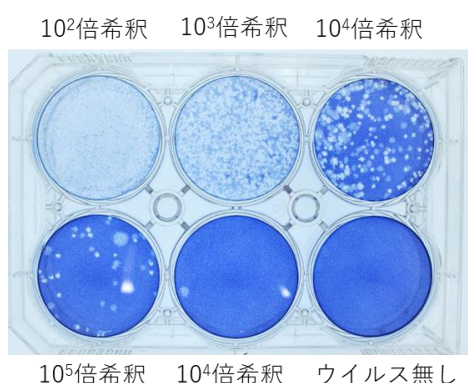


図2 SARS-CoV-2 感染後の Vero 細胞

ウイルス感染後、はがれた細胞を含む培養液を -80℃のフリーザーを用いて、凍結融解を2回行った。そして、遠心分離後、細胞沈査を除去し、上清を SARS-CoV-2 原液として -80℃に保存した。

次に、ウイルスの感染価を測定するため、ISO21702² を参考に、プラーク法を用いて感染価の測定を行った。上記のウイルス原液を MEM 培地で 10 倍の段階希釈系列を作製した。細胞用 6 穴プレートに、宿主細胞を 100%コンフルエントになるように培養し、培地を除いた後、ウイルス原液、及び各希釈液を 100 µl 加えた。33℃の CO₂ インキュベーターで、1時間培養した。(15分おきに振盪する)その後、寒天培地を重層し、33℃の CO₂ インキュベーターで、5日間培養した。そして、ホルマリン固定後、寒天培地を除去し、メチレンブルーで染色した。ウイルスによって形成されたプラークの数を測定し、感染価を求めた。(図3)

図3 Vero 細胞で培養した SARS-CoV-2 によるプラーク



その結果、Vero 細胞で培養した方が、Vero E6 細胞で培養したものより、高い感染価の SARS-CoV-2 ウイルス原液が得られた。(5.0×10⁷ pfu/ml、pfu : plaque-forming units)。これをウイルス液として性能評価に用いることとした。

2. 2 光触媒サンプルによる抗ウイルス性能評価

光触媒サンプルによる抗ウイルス性能評価は、バクテリ

オフアージを用いる JIS R 1706³ (紫外光) 及び JIS R 1756⁴ (可視光) があり、これらと ISO21702 を参考に試験を行った。紫外光応答型光触媒加工ガラス、可視光応答型光触媒加工ガラス及び無加工品に、滅菌水で 10 倍に希釈した SARS-CoV-2 ウイルス液 150 µl を接種し、密着フィルムで密着させる。これらを安全キャビネット内の暗幕 (図4) にセットし、所定の照度または暗所で2時間静置した。そして、SCDLP 培地 1 ml によりウイルスを回収し、10 倍の段階希釈系列を作製した。これらを 6 穴プレートに培養した Vero 細胞に接種し、プラーク法によりウイルスの感染価を測定した。(図5)



図4 安全キャビネット内の光照射装置

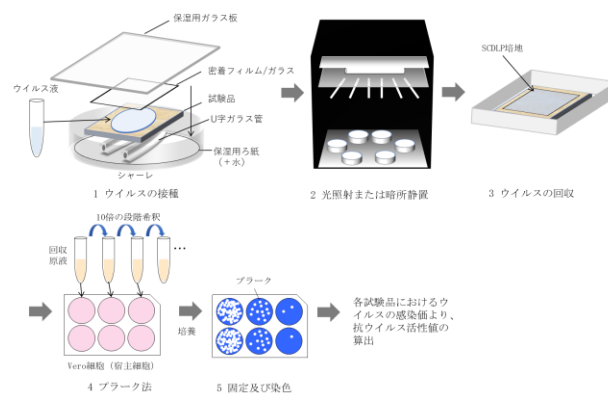


図5 光触媒サンプルによる抗ウイルス性能評価の流れ

得られたプラークから、それぞれの感染価を計算した結果を図6に示す。

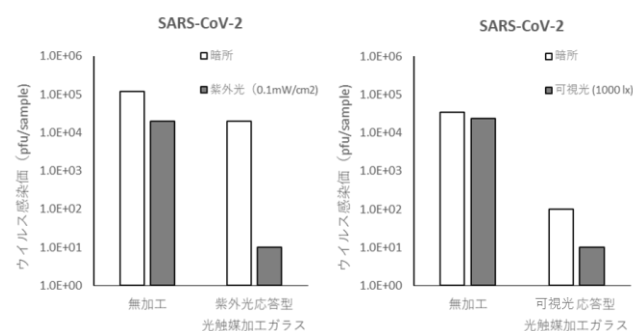


図6 SARS-CoV-2 を用いた光触媒抗ウイルス性能評価の結果

無加工品では、接種したウイルスがあまり減少することなく回収されていた。また、紫外光及び可視光応答型光触媒

によって、ウイルス感染価が大きく減少する結果となった。特に、可視光応答型光触媒は、ハイブリッド加工であるため、暗所においてもウイルスの減少が見られた。

次に、同じサンプルを用いて、インフルエンザウイルスを用いた抗ウイルス性能評価を行った。SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスはともにエンベロープを有する RNA ウィルスであり、構造上の類似性が見られる。そのため、これらを用いた抗ウイルス試験では、相関性のある結果が得られると考えられる。図 7 に、インフルエンザウイルス（A 型、H3N2 株）を用いた抗ウイルス性能評価の結果を示す。

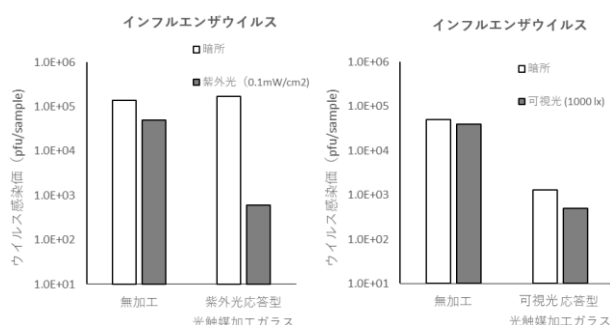


図 7 インフルエンザウイルスを用いた光触媒抗ウイルス性能評価の結果

その結果、抗ウイルス活性自体は、SARS-CoV-2 よりも低いものの、暗所及び明所の感染価の関係性を見ると、高い相関があることが明らかとなった。

3. 考察及び今後の展望

上記の通り、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価を行える体制が整ったと考えられる。SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価系で重要と考えられる点は、既存の ISO 及び JIS 規格と同等の条件であることである。特に、抗ウイルス製品を開発・販売する企業は、ISO21702 (平板)、ISO18184 (繊維)、JIS R 1706 及び 1756 (光触媒) をもとに開発している。そのため、これらの試験規格と試験条件が大きく異なると、これまでの知見を活かすことができず、一からの開発となってしまう可能性が高い。そこで、当研究所では、これらの試験規格に準用する形で行える体制を整えた。特に、上記試験規格と同じ条件とすべき、重要な点は以下が挙げられる。

- ① 試験ウイルス液は、無血清で、かつ同じ培地で調整し、滅菌水で 10 倍に希釈したものを用いる
- ② 試験サンプルからウイルスを回収する際は、SCDLP 培地を用いる
- ③ ウイルスの感染価は、プラーク法（もしくは TCID₅₀ 法）で測定する。特に、試験ウイルス液の調整については、抗ウイルス活性に大きく影響を与えると考えられるので、最も重要な点である

一方、SARS-CoV-2 を用いた性能評価の場合、既存の規格と条件を合わせることが出来ない点もあり、当研究所では以下が挙げられる。

- ① ウィルス及び宿主細胞が異なっている
- ② ウィルス液の濃度が、既存の規格に比べ約 1/10 程度である
- ③ 回収液の量を 1 ml とした（繊維サンプルでは 10 ml）

しかし、これらの点は、抗ウイルス活性にはほとんど影響しないと考えられるため、当研究所では、今後 SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルスは、上記の試験規格に準用する形で運用していく予定である。

なお、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価サービスは、当研究所の広報誌である KISTEC NEWS (図 8) でも取り上げられている。また、現在は、SARS-CoV-2 を用いた抗ウイルス性能評価は、平板及び繊維状のサンプルに限定しているが、今後、液体サンプルでも評価できるように整備していく予定であり、サービスを拡大していく予定である。



図 8 KISTEC NEWS Vol15 の表紙

【参考文献】

1. Jennifer Harcourt, Azaibi Tamin, Xiaoyan Lu, Shifang Kamili, et al., *Emerg. Infect. Dis.*, **26**(6):1266 (2020)
2. ISO 21702 (2019) "Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces."
3. JIS R 1706 (2020) "ファインセラミックス—光触媒材料の抗ウイルス性試験方法—バクテリオファージ Qβ を用いる方法"
4. JIS R 1756 (2020) "ファインセラミックス—可視光応答型光触媒材料の抗ウイルス性試験方法—バクテリオファージ Qβ を用いる方法"
5. ISO18184 (2014) "Textiles—Determination of antiviral activity of textile products"

光触媒を用いたバイオフィーム形成抑制効果

石黒 齊

1. はじめに

多くの細菌は、一般的な生活環境において、様々な表面に付着し、増殖していく。その結果として、水回りのぬめりなどのバイオフィームが形成される。このようなバイオフィーム内で増殖した細菌が基材表面から剥離し、エアロゾル等として環境中に放出されることにより、院内感染の原因や循環式浴槽、公衆浴場等におけるレジオネラ症の原因となっている。そのことから、バイオフィーム形成の抑制や除去方法の確立は医療分野や公衆衛生分野における重要な課題となっている。

光触媒は光があたる事で、抗菌効果や超親水性を発揮する機能性物質であり、様々な分野で応用されており、その機能を評価する各種標準試験法も開発されており、実際の研究開発の現場で使用されている。一方で、バイオフィームの形成に関する標準試験方法は確立されていない。そこで、本検討では、標準試験方法の作成に向けた取り組みとして、光触媒によるバイオフィーム形成抑制効果を検討した。

2. 実験と結果

2. 1 実験方法

基本的な実験方法としては、抗菌技術製品協議会より報告されている試験方法⁽¹⁾を参考にして行った。具体的に使用した材料等は以下の通りである。

2. 1. 1 材料

対象とした細菌は表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*, ATCC 35984)を用いた。細菌液の作製方法は、以下の通りである。始めに、細菌を寒天培地で一晚培養し、増殖したコロニーを1/5TSB培地に移植して、一晚培養した。得られた培養液の細菌数を $10^6/\text{ml}$ 程度になるように1/5TSB培地で希釈し、細菌液とした。

本検討で用いた試験片は、光触媒加工品は酸化チタンをコートしたガラスを用い、対照として、酸化チタンをコートしていないガラス(無加工品)を用いた。それぞれのサイズは2.5 cm角として、他の細菌等の汚染を防ぐため、これら表面をエタノールで拭いてから、検討に用いた。

2. 1. 2 光照射条件

各試験片は5 cm角のプラスチックケースに入れた後、細菌液を20 ml入れてから、光触媒加工品の抗菌効果を評価する規格であるJIS R 1702⁽²⁾に規定されている保湿ガラスをかぶせ、光照射を行った。光照射は恒温培養器の中で

行い、10WのBLBランプを恒温培養器内に設置し、その下部に細菌液を入れたプラスチックケースを置いてから、48時間35℃の条件で光照射を行った。照射強度は、 $0.4 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 及び $0.8 \text{ mW}/\text{cm}^2$ の条件とした。

2. 1. 3 バイオフィームの確認

48時間光照射を行った後、バイオフィームの形成について、確認を行った。始めに水で試験片を洗浄し、その試験片を0.1%のクリスタルバイオレットで染色した。染色後、クリスタルバイオレットを溶出し、その吸光度を測定した。

2. 2 結果

図1に、48時間反応後の試験片の一例を示す。図にあるように、試験片の表面が白っぽくなっており、バイオフィームが形成されていることが確認できる。

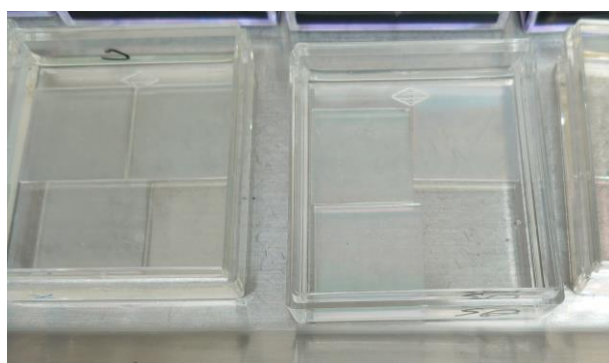


図1. 48時間反応後の試験片の様子

これらの試験片をクリスタルバイオレットで染色、風乾させたものが図2となる。それぞれ、図2(a)は無加工品の暗所静置群、図2(b)は無加工品の光照射群、図2(c)は光触媒加工品の暗所静置群及び図2(d)は光触媒加工品の光照射群である。無加工品については、図にあるようにクリスタルバイオレットにより、はっきりと染色されており、バイオフィームの形成が認められる。また、光触媒加工品についても、暗所静置群ではしっかりとクリスタルバイオレットによる染色が認められており、バイオフィームが形成されていることは明らかである。一方で、光触媒加工品に光照射を行った群では、多少の染色がみられるものの、明らかにバイオフィームの形成が抑制されていることが見て取れる。

次に、これらの染色した試験品からクリスタルバイオレットを溶出し、その吸光度を測定することで、バイオフィ

ルムの形成量を確認した。その結果を図3に示す。無加工品及び光触媒加工品の暗所群については、2群の間に大きな差は認められなかった。0.4 mW/cm²、0.8 mW/cm²の光照射を行った群については、暗所群と比較して、すべての群で吸光度の値が減少していた。また、0.4 mW/cm²の光照射群では、同じ光照射を行った無加工品の群と比較して、光触媒加工品における吸光度の値がより減少していることが確認できた。一方で、0.8 mW/cm²の光照射を行った群においては、無加工品及び光触媒加工品との間に明確な差は認めず、またその吸光度の値は0.4 mW/cm²の光照射を行った光触媒加工品と同程度の値であった。

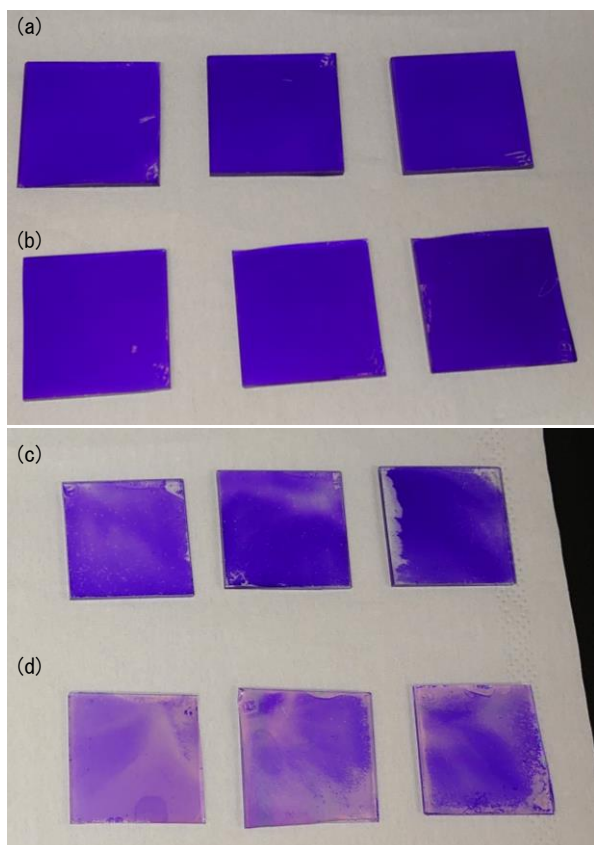


図2. クリスタルバイオレット染色結果

3. 考察及び今後の展望

以上の結果から、光触媒反応により、バイオフィーム抑制効果を得ることが出来ることが明らかとなった。一方で、強い光を照射した群においては、無加工品及び光触媒加工品のどちらについても、明確な差を認めなかった。このことから、光照射の強さが、バイオフィームの形成に影響を与える可能性が示唆された。また、光触媒加工品に光照射を行った群について、薄いながらもバイオフィームの形成が認められている。このことから、光触媒反応によって、バイオフィームの形成を抑制する機構としては、表面上の抗菌作用によって、バイオフィームの形成時間を遅らせていることによるものと推測された。そのため、一度バイオフィームの形成が開始された場合、その形成を遅らせることは出来るが、形成されたバイオフィーム自身を分解する

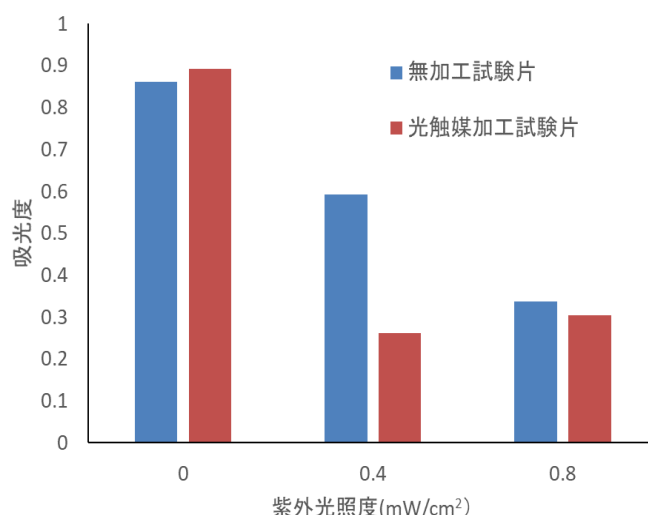


図3. 吸光度測定の結果

ためには、更に強い光照射や反応時間が必要と考えられる。

今後、本検討を基に、様々な条件下での検証をさらに進めていく。具体的には、以下の通りである。

① 接種する細菌数の違いによる影響

本検討では、確実にバイオフィームが形成されるよう、非常に多くの細菌数を接種した。そのため、細菌数を減らした条件で検討を行い、より効果を確認しやすい細菌数を探索する。

② 光照射の時間の違いによる影響

本検討では、48時間の照射時間におけるバイオフィームの形成について確認した。今回の結果から、暗所群について、48時間で十分なバイオフィームの形成が認められた。そこで、より短い時間での評価を行う。

③ 光照射の照度の違いによる影響

本検討では2条件での光照射条件での検討を行った。一方で、0.8 mW/cm²では、光照射による影響と思われるバイオフィーム形成抑制が認められている。そこで、照度を更に細かくした条件で検討を行い、無加工品におけるバイオフィーム形成能を抑制しない照度の探索を行う。

④ 光触媒の種類の違いによる影響

今回用いた光触媒は紫外光応答形光触媒である。一方で、現在は可視光応答形光触媒の開発が進んでおり、更にはハイブリッド型と呼ばれる、暗所においても抗菌効果を発揮する光触媒加工製品も開発されている。これら様々な光触媒加工品を用いて、バイオフィーム形成抑制効果の検討を進める。

以上のような、項目について、更に検討を進めていき、光触媒加工品による抗バイオフィーム性能評価方法の開発へとつなげていくことを計画している。また、抗菌製品技術協議会が進めている抗バイオフィーム試験法のISO

化について、ISO 規格として成立した際には、それらの試験方法も取り入れながら、新しい光触媒性能評価方法として、確立を目指していく予定としている。

【参考文献】

1. 抗バイオフィルム試験法について．2017 年度 SIAA 委員会活動報告会．平成 30 年 01 月 29 日．
2. JIS R 1702:2020 ファインセラミックスー光触媒抗菌加工材料の抗菌性試験方法及び抗菌効果．一般財団法人 日本規格協会．

【謝辞】

本検討にあたっては、公益財団法人東京応化科学技術振興財団からの第 34 回「研究費の助成」として、助成を受けて行った。

酸化チタンと酸化モリブデンを組み合わせた可視光応答型 光触媒材料の抗ウイルス活性に関する研究

砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武、石黒 斉

1. はじめに

2020 年から新型コロナウイルスによる感染症が世界中で蔓延し、パンデミックとなった。最後の切り札であるワクチン接種が進行しているが、感染症対策がまだまだ必要とされる社会状況である。感染症対策の一つとしてエタノールなどによる手指の消毒やドアノブに代表される人が触る物の清拭による消毒が行われている。エタノールによる消毒は、即効性があるものの持続性はないため、1 日に何度も清拭が必要となる。そこで、持続性のある抗ウイルス剤でドアノブなどの表面をコーティングしておけば、エタノール清拭と組み合わせることにより、持続性のある感染症リスク低減となる。本稿では、持続性のある新規の抗ウイルス剤を開発しようとこれまで取り組んできた金属酸化物の抗ウイルス活性について報告する^{1),2)}。

1. 1 金属酸化物の抗ウイルス活性

これまで、銅化合物や銀化合物以外の金属化合物の中に、抗菌・抗ウイルス活性が高い化合物を見出すために、抗菌効果を示す金属イオン、たとえば Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Sn^{4+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} をふくむ金属酸化物を中心に抗ウイルス活性を評価した。評価に供した金属酸化物は、 Fe_2O_3 、 MnO_2 、 CeO_2 、 MoO_3 、 MoO_2 、 WO_3 、 SnO_2 、 NiO 、 ZnO の 9 種であり、これらの粉体の抗ウイルス活性を、エンベロップをもたないバクテリオファージ Q β 、ネコカリシウイルスならびにエンベロップをもつバクテリオファージ $\phi 6$ 、インフルエンザウイルスを対象に、可視光応答性も調べるため白色蛍光灯照射下と暗所下で評価した。結果として、光照射下、暗所下ともに、酸化亜鉛(ZnO)で弱い抗ウイルス活性が認められ、さらに、酸化モリブデン(MoO_3 、 MoO_2)において、非

常に高い抗ウイルス活性が認められた。また、 MnO_2 は、バクテリオファージ Q β に対しては、ほとんど効果を示さなかったのに対し、バクテリオファージ $\phi 6$ に対しては、暗所下、光照射下とも低い抗ウイルス活性が認められた。これらの結果は、抗菌活性を示すイオンをもつ金属酸化物でも、抗ウイルス活性を示す金属酸化物は少なく、抗菌活性があっても、抗ウイルス活性をもつとは限らないことを示している。また、高い抗ウイルス活性を示した酸化モリブデンは、光照射効果すなわち可視光応答性はほとんどないことも判明した。なお、酸化モリブデンは、抗菌効果を示すことは、すでに報告されている^{3),4)}。

酸化モリブデンの高い抗ウイルス活性を生かしながら可視光応答性を示す材料を作製できないかと、酸化チタンと酸化モリブデンを組み合わせた材料を調製した。その材料の抗ウイルス活性について実環境に近い状態のウイルスを対象に評価したので、紹介する。

2. 実験と結果

2. 1 抗ウイルス活性評価方法

モリブデン酸化物と酸化チタンを組み合わせた材料は、酸化チタンを Na_2MoO_4 水溶液に浸漬、加温して 3 時間攪拌しながら作製した。その後、水で洗浄し、 100°C で乾燥し、それをサンプルとした。この粉体をガラスに担持して、抗ウイルス活性を評価した。

抗ウイルス活性評価は、基本的には JIS R 1756 に従って行った。対象ウイルスとしては、バクテリオファージ Q β (NBRC20012、宿主大腸菌(NBRC106373))、バクテリオファージ $\phi 6$ (NBRC105899、宿主菌(NBRC14084))、ネコカリシウイルス F-9 株(ATCC VR-782、宿主:CRFK 細胞(ATCC

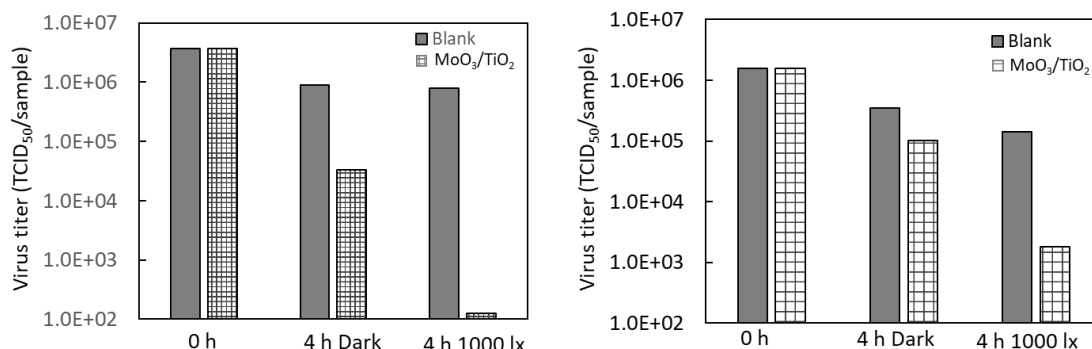


図 1. $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ の抗ウイルス活性 (左: ネコカリシウイルスに対して、右: インフルエンザウイルスに対して)

CCL-94)) 並びにインフルエンザウイルス (H1N1) A/PR/8/34 株(ATCC VR-1469、宿主:MDCK 細胞(ATCC CCL-34))を用いた。ネコカリシウイルスやインフルエンザウイルスの感染価は、TCID₅₀として求めた。光照射は、光源として白色蛍光灯(FL20SSW/18, MITSUBISHI)を TypeB filter(380nm 以下の波長をカット)のもとで照射し、1000 lx の照度で行った。

2. 2. MoO₃/TiO₂の抗ウイルス活性

酸化チタンとモリブデン酸化物を組み合わせた材料 (MoO₃/TiO₂)を調製し、ネコカリシウイルス、インフルエンザウイルスを対象として評価した結果を図 1 に示した。MoO₃ 単独での暗所下の活性が生かされ、暗所でも低い抗ウイルス活性が認められたが、1000 lx の可視光照射下では、ネコカリシウイルスについては、4 時間で検出限界まで感染価が低下し、高い抗ウイルス効果が観察された。また、インフルエンザウイルスに対しても光照射下で 2.0 以上の抗ウイルス活性を示した。これらの結果は、本材料が可視光応答性を示すことを明らかにした。

2. 3. 実環境に近い存在状態でのウイルスに対する抗ウイルス活性

図 1 で示した抗ウイルス活性は、JIS R 1756 を参考に評価を行っているが、サンプル粉末にウイルス液を滴下し、密着フィルムで覆うことで、液中のウイルスをサンプルに接触させ、反応させる。一方で、実際の生活空間でのウイルスは、液中に存在しているのではなく、材料表面に吸着した状態で存在し、JIS での評価方法より水分が少ない状態で存在していると考えられる。そのため、JIS で測定した活性が、実際の生活空間に存在するウイルスに有効であるかを示すことは、真の抗ウイルス活性を知るうえで重要なことと思われる。以前携わっていた NEDO プロジェクト(2007 年～2012 年 東京大学で行われた NEDO の「循環社会構築型光触媒産業創成プロジェクト」(PL: 橋本和仁教授(現 NIMS 理事長))で、病院や空港といった実空間

で可視光応答型光触媒をコーティングした材料の抗菌活性を測定したところ、JIS では、99.99%の抗菌活性をもっていた材料でも、実環境では 1 年を通して平均すると、50～95%の抗菌活性しか示さなかった。それは、上述したように、実環境での菌やウイルスは、たとえばテーブル表面にホコリや手の皮脂などの他の有機物と共存し、水分もありない状態で付着しており、菌やウイルスの存在状態が JIS の場合とは異なるためと考えられた。

そこで、実環境に近い存在状態でのウイルスを対象にして、作製した MoO₃/TiO₂の抗ウイルス活性を調べることを試みた。実環境に近い状態のウイルスは、図 2 の左図に示した装置で調製した。すなわち、10-20%程度の湿度を保った 370 L のグローブボックス内に、MoO₃ と MoO₃/TiO₂の粉末を担持したガラスサンプルを設置し、ネブライザーでバクテリオファージ Qβ(2×10⁹ pfu)をグローブボックス内に噴霧した。噴霧後、グローブボックス内のファンで攪拌し、ガラスサンプルにファージを吸着させた。吸着させたそのままの状態、MoO₃/TiO₂のサンプルは可視光 1000 lx 照射下と暗所下に置き、MoO₃のサンプルとコントロールのガラスサンプルも暗所下に置き、それぞれの感染価を測定した。

図 2 右図にその測定結果を示した。コントロールのガラスサンプルと MoO₃ サンプルは、24 時間放置しても、感染価はおおよそ 1 桁弱しか減少しなかった。また、MoO₃/TiO₂の暗所下に置いたサンプルも同様の減少率を示したのに対し、可視光照射下の MoO₃/TiO₂ サンプルは、24 時間で 2 桁以上の感染価減少が観察され、実環境に近いウイルスに対しても一定の抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。

MoO₃ 単独の抗菌活性は、水分があれば漏出する MoO₄²⁻のイオンと低い pH になる酸性(H₃O⁺)によるものと報告があり⁴⁾、MoO₃の抗ウイルス活性も同様の活性種が働いていると示唆されるデータを昨年報告している。そのため、MoO₃の抗ウイルス活性を発現させるためには、水分の存在が不可欠であり、乾燥した表面では効果が得にくいと考

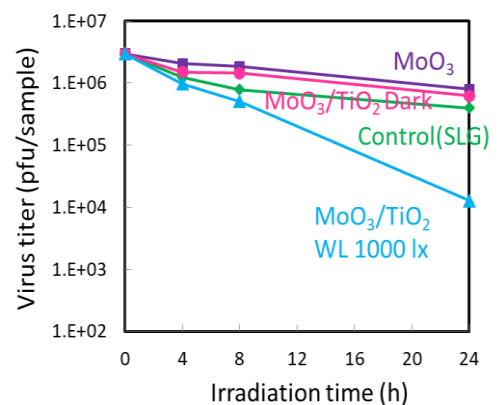
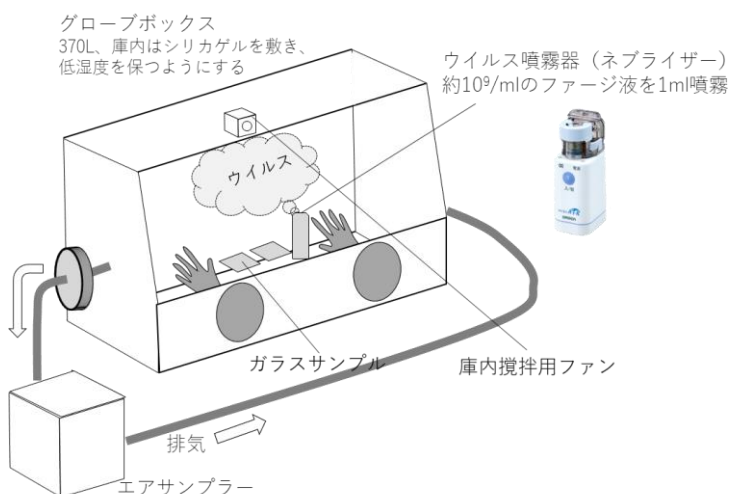


図 2. 実環境に近いウイルスでの抗ウイルス活性

左図: ウイルスを噴霧し、サンプルにウイルスを吸着させたグローブボックス装置、
右図: MoO₃, MoO₃/TiO₂の実環境に近いウイルスでの抗ウイルス活性

えられ、今回の測定結果もそのメカニズムを支持している。一方で、その MoO_3 と酸化チタンと組み合わせた $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ は、生活空間にある可視光が照射されれば、実環境に近いウイルスに対しても抗ウイルス活性を示し、 MoO_3 の弱点が克服できたデータで得られた。 $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ が真に抗ウイルス活性を持つことを示せたことは非常に重要な知見であると考えている。

3. 考察及び今後の展望

高い抗ウイルス活性があることを見出した酸化モリブデン(MoO_3)と酸化チタンを組み合わせた新規の可視光応答型光触媒材料 $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ を創製し、その抗ウイルス活性を JIS の評価方法でのウイルスと、実環境に近い存在状態でのウイルスとを対象に評価を行い、実環境でのウイルスに対しても抗ウイルス活性を示すことを報告した。現在のコロナ禍に役立つ真に高い抗ウイルス活性をもつ材料の創製を目指して、今後も本材料の抗ウイルス活性を高める改善を行っていきたいと考えている。

なお、本材料に関する特許が成立し、またある企業との共同研究により、フィルム材料として実用化を目指した研究も行った。

また、東京工業大学中島研究室、奈良県立医科大学との共同研究の中で、セリウムとモリブデンの複合酸化物($\gamma\text{-Ce}_2\text{Mo}_3\text{O}_{13}$: CMO)の新型コロナウイルス(SARS-Cov-2)に対する抗ウイルス活性²⁾を測定した際に、 MoO_3 単独の活性についても調べた。CMO には及ばなかったものの

MoO_3 も 6 時間の反応で SARS-Cov-2 の感染価が検出限界となる抗ウイルス活性を示した⁵⁾。

実環境に近い存在状態のウイルスを調製した図 2 左図に示したグローブボックス装置は、空間にウイルスを噴霧できるので、空気清浄機などの抗ウイルス活性の性能も測定できる。当試験室では、そのような試験も受託しているので、開発されている企業の方々に大いに利用して頂ければと思っている。

また、実環境に近い存在状態の細菌に対する抗菌活性の評価方法は、可視光応答型光触媒材料に対して、日本が提案した方法が ISO 化され、2020 年に ISO 22551 が成立している。

本研究は、科研費(JSPS JP20K12251)のサポートによって行った。ここに、感謝申し上げます。

【参考文献】

1. M. Miyauchi, K. Sunada, K. Hashimoto, *Catalysts* 10(9), 1093 (2020).
2. T. Ito, K. Sunada, T. Nagai, H. Ishiguro, A. Nakajima *et al.*, *Materials Letters*. 290, 129510 (2021).
3. K. Krishnamoorthy, M. Premanathan, M. Veerapandian, S. J. Kim, *Nanotechnology*, 25, 315101 1-10 (2014).
4. C. Zollfrank, K. Gutbrod, P. Wechsler, J. P. Guggenbichler, *Mater. Sci. Eng. C*, 32, 47-54 (2012).
5. <https://www.titech.ac.jp/news/2021/049124>

業 績

【原著論文】

1. Motomura H, Ozaki A, Tamori S, Onaga C, Nozaki Y, Waki Y, Takasawa R, Yoshizawa K, Mano Y, Sato T, Sasaki K, Ishiguro H, Miyagi Y, Nagashima Y, Yamamoto K, Sato K, Hanawa T, Tanuma S, Ohno S, Akimoto K. Correlation between Glyoxalase 1 and Protein kinase C λ is predictive of poor clinical outcomes in late-stage breast cancer. *Oncol lett.* accepted.
2. Miyauchi M, Sunada K, Hashimoto K. Antiviral Effect of Visible Light-Sensitive $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ Photocatalyst. *Catalysis*, **10**, 1093 (2020).
3. Nozaki Y, Motomura H, Tamori S, Kimura Y, Onaga C, Kanai S, Ishihara Y, Ozaki A, Hara Y, Harada Y, Mano Y, Sato K, Sasaki K, Ishiguro H, Ohno S, Akimoto K. High PKC λ expression is required for ALDH1A3-positive cancer stem cell function and indicates a poor clinical outcome in late-stage basal-like breast cancer patients. *PLoS One*, **15**, e0235747 (2020).
4. Matsumoto T, Sunada K, Nagai T, Isobe T, Matsushita S, Ishiguro H, Nakajima A. Effects of cerium and tungsten substitution on antiviral and antibacterial properties of lanthanum molybdate. *Materials Science and Engineering C*, **117**, 111323 (2020).
5. Kawahara T, Teramoto Y, Li Y, Ishiguro H, Gordetsky J, Yang Z, Miyamoto H. Impact of Vasectomy on the Development and Progression of Prostate Cancer: Preclinical Evidence. *Cancers*, **12**, 2295 (2020).
6. Ito T, Sunada K, Nagai T, Ishiguro H, Nakano R, Suzuki Y, Nakano A, Yano H, Isobe T, Matsushita S, Nakajima A. Preparation and evaluation of cerium molybdates with antiviral activity. *Materials Letters*. **290**, 129510 (2021).

【総説】

1. 中島 章、砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉. 抗菌・抗ウイルス活性を有する撥水性複合酸化物. *バイオインダストリー* 37(11):10-19, 2020.
2. 中島 章、砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉. 抗菌・抗ウイルス活性を有する撥水性複合酸化物. *塗装工学*. 55(11):1-12, 2020.
3. 石黒 斉、砂田 香矢乃、永井 武、濱田 健吾、青木 大

輔、落合 剛. 光触媒の DDS マテリアルとしての可能性と医療応用. *Drug Delivery System*. 36(1):10-17, 2021.

4. 岡本 隆太、石黒 斉、砂田 香矢乃. 飛沫粒子の拡散分布シミュレーション技術. *クリーンテクノロジー*. 31(1):1-5, 2021.
5. 砂田 香矢乃、宮内雅浩. 銅担持酸化チタン光触媒材料の抗ウイルス活性とその評価. *技術情報協会 雑誌「研究開発リーダー」* 18(1), 18-21, 2021.
6. 宮内 雅浩、砂田 香矢乃. 可視光応答形光触媒とその抗菌・抗ウイルス機能. *AndTech 書籍「抗菌・抗ウイルス技術の開発・評価と樹脂、繊維、塗料、フィルム等への製品応用」* 第 6 節 ISBN978-4-909118-23-3

【書籍】

1. 酒井 宗寿、石黒 斉、中島 章. 第 3 章 材料・表面の化学的効果を利用した撥水・撥油・親水化. 4 酸化チタン光触媒による光誘起超親水性コーティング. 撥水・撥油・親水性材料の開発動向. *CMC 出版*, 151-162, 2021.
2. 砂田 香矢乃、宮内 雅浩. 光触媒材料の抗菌・抗ウイルス活性とそのメカニズム. *技術情報協会書籍「抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与、加工技術と評価」* 269-278, 2021.
3. 石黒 斉. 第 10 章 抗菌・抗ウイルス系性能評価方法. 光触媒実験法. 北野出版. 161-175, 2021.

【口頭発表】

1. 砂田 香矢乃. 銅化合物光触媒の抗菌・抗ウイルス効果とその評価. *技術情報協会セミナー*. 9 月, オンライン .
2. 椎名(本村) 瞳、尾崎 綾葉、多森 翔馬、野崎 優香、高澤 涼子、佐々木 和教、石黒 斉、宮城 洋平、長嶋 洋治、田沼 靖一、大野 茂男、秋本 和憲. ステージ III-IV 乳癌における GLO 1 - PKC λ 共発現患者は予後不良である. 第 79 回日本癌学会学術総会. 10 月, 広島.
3. 砂田 香矢乃、畑山 靖佳、永井 武、中島 章、石黒 斉. 可視光下での酸化モリブデン担持酸化チタンの抗ウ

イルス活性について.

第 25 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」. 11 月, オンライン.

4. 伊東 拓朗、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉.
モリブデン酸セリウムの作製とその抗ウイルス活性.
日本セラミックス協会 2021 年会. 3 月, 大阪, オンライン.
5. 加藤 千尋、磯部 敏宏、松下 祥子、中島 章、砂田 香矢乃、石黒 斉、永井 武.
CoO_x 担持 Ce_{0.8}Bi_{0.2}O_{2-δ}, Ce_{0.8}La_{0.2}O_{2-δ} による水中 2-ナフトール分解および抗ウイルス活性.
日本セラミックス協会 2021 年会. 3 月, 大阪, オンライン.
6. 中島 章、砂田 香矢乃、永井 武、石黒 斉.
撥水性と抗ウイルス活性を併せ持つ新規セラミックス材料.
日本セラミックス協会 2021 年会. 3 月, 大阪, オンライン.

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件