

ポリ乳酸を用いた新規機能性材料創製に関する研究

平成 22 年度

2011 年 3 月

群馬大学大学院 工学研究科

工学専攻 物質創製工学領域

恩田 紘樹

目次

第1章 緒論	1
1. 1 研究背景	1
1. 2 生分解性プラスチック	2
1. 3 PLAの合成	5
1. 4 PLAの熱安定性	8
1. 5 PLAの物性	8
1. 6 PLAの加水分解	10
1. 6. 1 分子量	10
1. 6. 2 結晶化度	10
1. 6. 3 表面積	11
1. 6. 4 pH	12
1. 6. 5 温度	12
1. 6. 6 微生物	12
1. 7 PLAの物性改質	14
1. 8 PLAの用途	15
1. 9 研究目的	17
文献	18
第2章 ポリ乳酸-焼成貝殻粉末ブレンドの性質	24
2. 1 緒言	24
2. 2 実験	24
2. 2. 1 試料	24
2. 2. 2 試料の作成	25
2. 2. 3 抗菌性評価	25
2. 2. 4 分解試験	26
2. 2. 5 機器分析	27
2. 3 結果と考察	28
2. 3. 1 強伸度測定	28
2. 3. 2 融解・結晶化挙動	30
2. 3. 3 動的粘弾性測定	31
2. 3. 4 焼成貝殻およびPLAフィルムの抗菌性	35
2. 3. 5 熱分解挙動	41
2. 3. 6 アルカリ加水分解挙動	42
2. 3. 7 PLA分解酵素による分解挙動	43

2. 3. 8	土壌中での分解挙動	45
2. 3. 9	コンポスト中での分解挙動	46
2. 4	結論	48
	文献	49
第3章 PLAの緑膿菌バイオフィーム形成阻害効果		51
3. 1	緒言	51
3. 2	実験方法	52
3. 2. 1	試薬	52
3. 2. 2	試料作製	52
3. 2. 3	菌株および培地	53
3. 2. 4	緑膿菌バイオフィームの定量	53
3. 2. 5	高分子物性測定	54
3. 2. 6	抗菌性評価	55
3. 2. 7	走査型電子顕微鏡観察	55
3. 2. 8	高分子表面に吸着したタンパク質量	56
3. 2. 9	接触角測定	56
3. 2. 10	pH測定および乳酸濃度の定量	56
3. 2. 11	乳酸水溶液中におけるアルギン酸カルシウムゲルの重量減少および遊離カルシウム濃度測定	56
3. 2. 12	家庭厨芥を入れたネット上のバイオフィーム形成	57
3. 2. 13	微生物群集構造(PCR-DGGE)解析	57
3. 3	結果	61
3. 3. 1	フィルム表面の緑膿菌バイオフィーム定量	61
3. 3. 2	タンパク質吸着量評価	63
3. 3. 3	アルギン酸カルシウムゲルに対する乳酸の効果	64
3. 3. 4	蒸留水中での加水分解	65
3. 3. 5	ネットの表面形状	66
3. 3. 6	ネットの機械的強度	68
3. 3. 7	PLA-PE ネット中のPLAの分子量および熱的性質	69
3. 3. 8	ネットの緑膿菌バイオフィーム定量	70
3. 3. 9	PLA-PE ネットの緑膿菌に対する抗菌性	71
3. 3. 10	ネットの表面へのタンパク質付着量	72
3. 3. 11	ネットの加水分解	73
3. 3. 12	家庭厨芥を入れたネット表面におけるバイオフィーム形成	75
3. 4	考察	79

3. 4. 1	PLA の緑膿菌バイオフィルム形成阻害メカニズム	79
3. 4. 2	PLA-PE ネットのバイオフィルム形成阻害効果	82
3. 5	結 論	85
	文献	86
	第4章 総 括	89
	関連論文および参考論文	92
	謝辞	93

第 1 章 緒 論

1. 1 研究背景

石油系プラスチックは安価で強度や耐久性が高く、加工性にも優れるため、現代社会では必要不可欠な材料となっている。日本では、年間約 1,300 万トンのプラスチックが生産されているが、自然環境中でほとんど分解されないため、使用後の処理処分問題は、社会的な関心を集めている [1-3]。また、Fig. 1-1 に示す様に、プラスチックを焼却処理する場合、不完全燃焼によるダイオキシン、硫酸化物 (SO_x)、窒素酸化物 (NO_x) 等の有害物質の発生する可能性がある [4]。

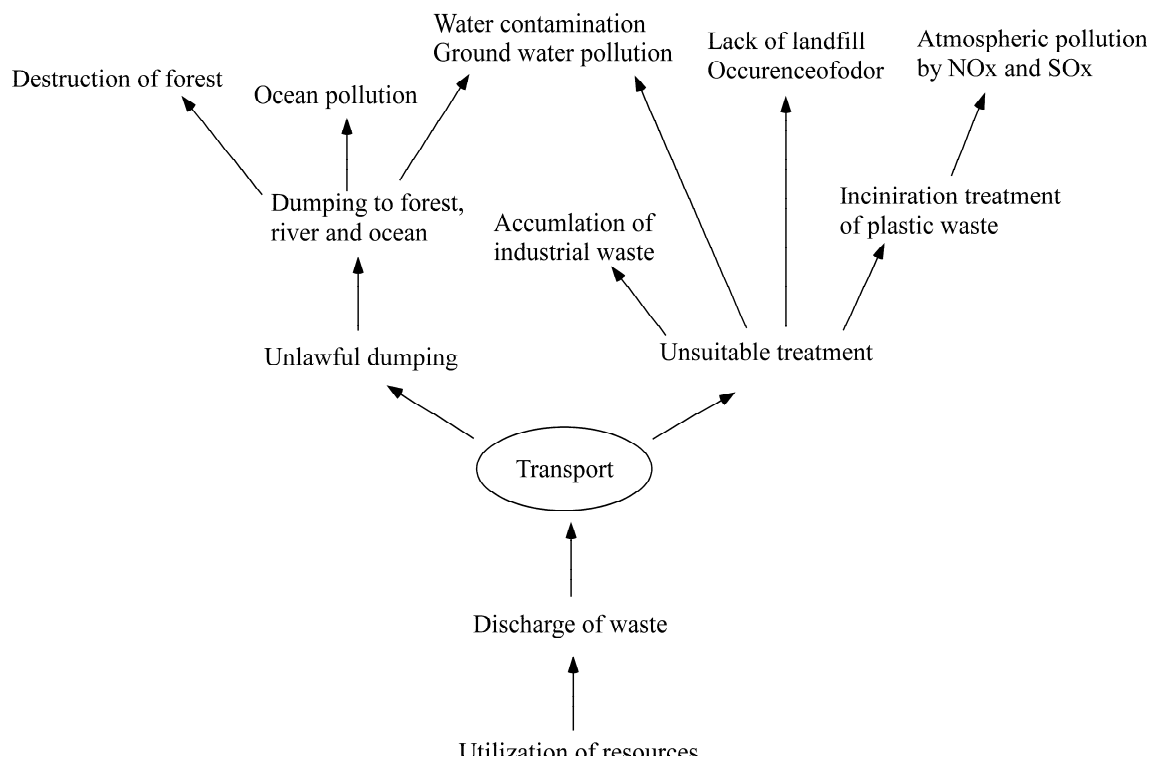


Fig. 1-1 Schematic diagram of the environmental pollution [3].

このような問題に対して、我が国では容器包装リサイクル法が1995年に制定され、プラスチックのリサイクル化が進められている[5]。しかし、生産量の約1%程度のプラスチックは、環境流出しており、プラスチックの「分解しない」という性質から、海洋や湖沼の生態系への悪影響が懸念されている[6-8]。

環境流出プラスチック問題に関しては、その場で生物により無機化されうる「生分解性プラスチック」の利用が、有力な解決方法の一つである。

1. 2 生分解性プラスチック

生分解性プラスチックとは、使用中は従来のプラスチックと同等の機能を有し、使用後は、土壤中、水中あるいは堆肥環境中などの微生物により分解され、最終的に水と二酸化炭素にまで変換される材料をさす。多くの生分解性プラスチックは、分子内に酸素原子を含むために、モノマー単位の炭素含率は、石油由来プラスチックと比較して、低くなる。このことにより、その燃焼温度、および燃焼エネルギーが低くなり、結果として焼却処理時に焼却炉を傷めることが少ない。また、分子内に塩素を含んでいないことからダイオキシンなどの有害物質発生の可能性が低い。さらに生分解性プラスチックは、生ゴミと一体的に処理し、コンポスト化を図ることも可能である。このように、既存のプラスチックに比べ有利な点も多い。

生分解性プラスチックには、Table 1-1に示すように、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHAs)[9-11] のように微生物によって生産されるもの、デンプン [13]、酢酸セルロース [12]、キトサン [13-14] などの天然高分子由来のもの、ポリ乳酸(PLA) [5]やポリカプロラクトン (PCL) [15]、ポリブチレンサクシネート (PBS) [16] などの化学合成によって製造されるものがある [17]。

Table 1-1 Commercially important biobased and biodegradable polymers for bulk applications and some of their sources[17].

Category	Polymer	Producer	Trade name
Bio- Chemosynthetic polymers	Poly(lactic acid)	NatureWorks, U.S.	NatureWorks
		Hycail, Netherlands	Hycail HM; Hycail LM
		Mitsui Chemicals, Japan	Lacea
		Toyota, Japan	U'z
	Poly(butylene succinate)	Mitsubishi Chemicals, Japan	GS Pla
	Poly(butylene succinate-co-adipate)	Showa High Polymer, Japan	Bionolla
	Poly(caprolactone)	Daicel Chemical Industries, Japan	Cell green PH, PHB
Biosynthetic polymers	Polyhydroxyalkanoates	Union Carbide, U. S.	Tone polymer
		Solvay, Belgium	Capa
		Biomer, Germany	Biomer
		Telles, USA	Mirel
		Mitsubishi Gas, Japan	Biogreen
		PHB Industrial S/A, Brazil	Biocycle
Natural polymers	Starch polymers	Metabolix, U.S.	Biopol
		Kaneka, Japan	
		Novamont, Italy	Mater-Bi
		Rodenburg, Netherlands	Solanyl
	Cellulose derivatives	BIOP, Germany	BIOPar
	Japan Corn Starch, Japan	Cornpol	
	Daicel Chemical Industries, Japan	Cellgreen	

微生物による生分解性プラスチックの生産プロセスは、化学合成プロセスと比較して、高コストであるため、PHAsは現在のところ汎用材の置換用途材としては見なされていない [18]。また、天然高分子由来生分解性高分子は、その成形性に問題があるものが多く、いわゆる熱可塑性材料としての用途は限られている [8][19]。

これらに対して化学合成生分解性高分子は、分子量のコントロールや、コポリマー化が容易なため、その物性制御が比較的容易であるという利点がある [20]。また、化学合成プロセスは、より簡略化しやすく、低コスト化しやすいため、化学合成生分解性プラスチックは、汎用高分子材料に対する置換え材料として期待されている [8]。

Fig. 1-2 に PLA の化学構造を示す。化学合成プラスチックである PLA は、比較的優れた物性を示すため、注目されている。また、植物由来バイオマス原料から製造できるために、「バイオマスプラスチック」としても認識されるようになってきた。

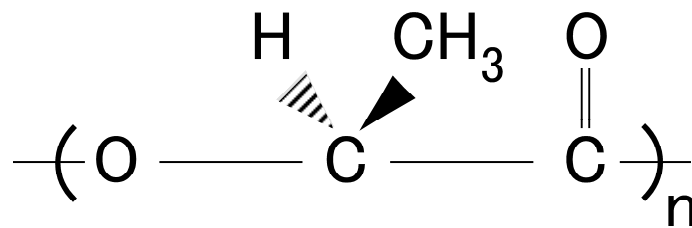


Fig. 1-2 Chemical structure of PLA.

1.3 PLA の合成

PLA の原料となる乳酸の合成方法として、Fig. 1-3 に示すような石油を原料とする化学合成法 [21] や、Fig. 1-4 に示すようなデンプンの酵素加水分解により得られるグルコースを原料とする乳酸発酵法が知られている [22]。

しかし、化学合成の場合は高コスト、収率が低い、光学純度の高い乳酸を得ることが難しいなどの問題があり、現在のところこの方法での乳酸の商業生産は行われていない [23]。一方で、乳酸発酵法は高収率で純度の高い乳酸を得ることができるため、1990 年以降、発酵法が乳酸生産手法として採用されている。乳酸発酵では、*Lactobacillus delbrueckii*、*L. amylophilus*、*L. bulgaricus*、*L. leichmanii* といった乳酸菌を用いて、pH 範囲 5.4~6.4、生育温度 38~42 °C の低酸素濃度条件下で、乳酸を生産する [24]。

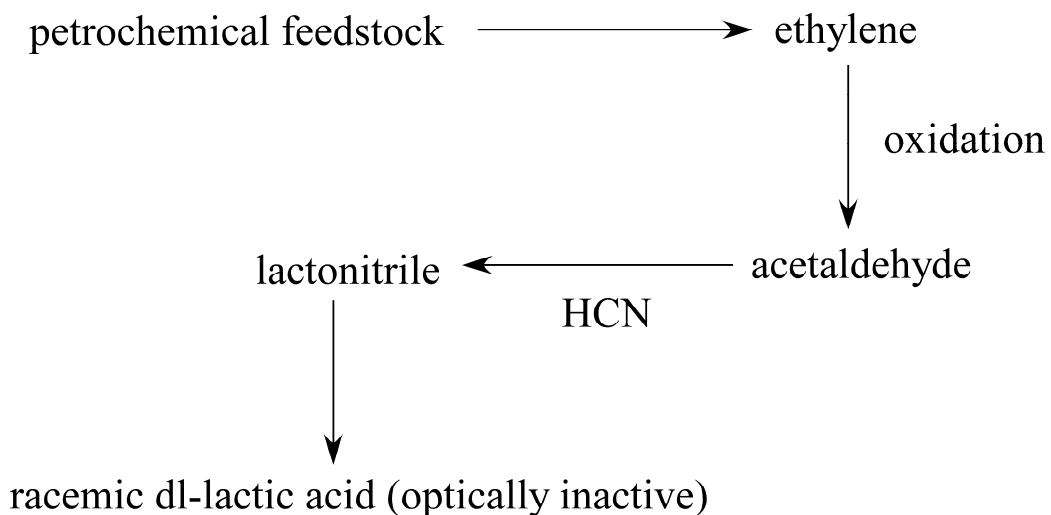


Fig. 1-3 Petrochemical route to lactic acid[21].

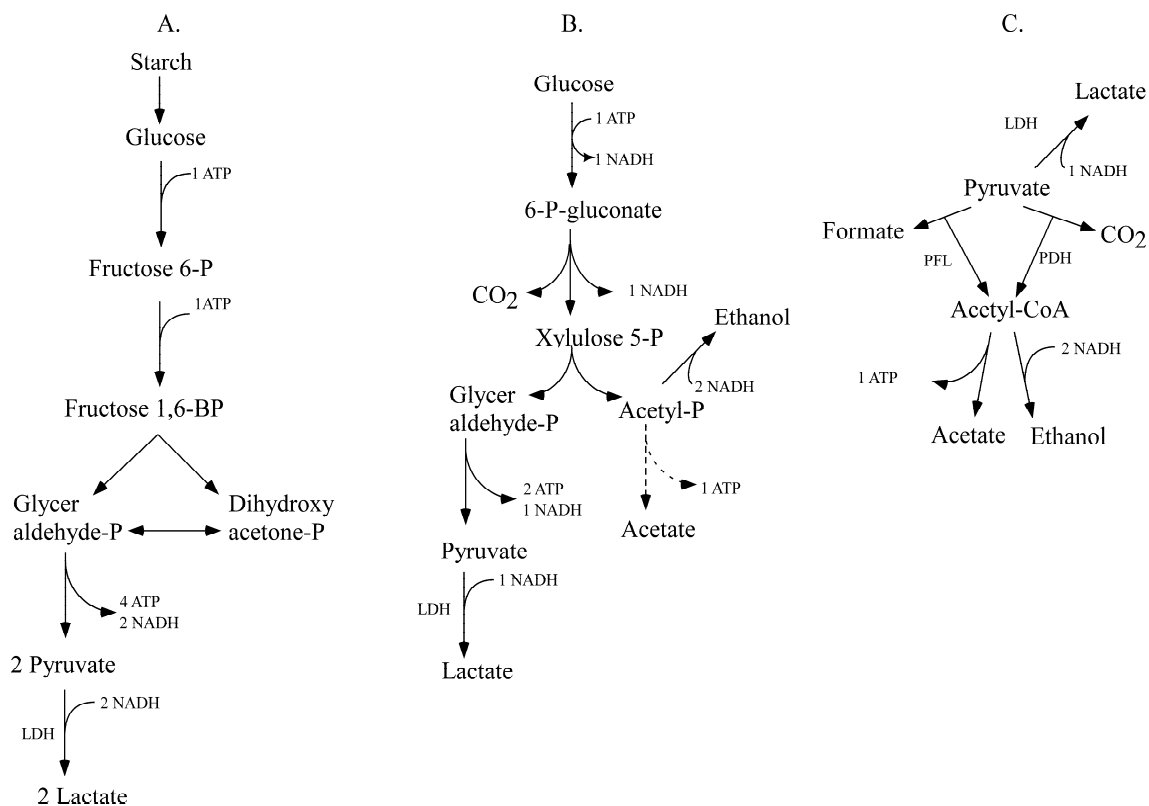


Fig. 1-4 Catabolic pathways in lactic acid bacteria. Homofermentation(A), heterofermentation(B) and mixed acid fermentation(C). P=phosphate, BP=bisphosphate, LDH=lactate dehydrogenase, PFL=pyruvate formate lyase and PDH=pyruvate dehydrogenase [22].

一般的に、PLAの原料にはL-乳酸が利用され、合成法としては、乳酸モノマーの脱水縮合重合による方法 [25-28] と、環状二量体ラクチドの開環重合による方法 [29-33] がある。ごく最近になるまで、脱水縮合法では高分子量のPLAを得ることは困難であったが、1994年に三井化学が、PLAの新しい直接重縮合法開発に成功している [34]。Fig. 1-5 に示すような、乳酸の環状二量体であるラクチドの開環重合によるPLA合成法は、手順は複雑であるが、比較的容易に高分子量のPLAが得られるため、Nature Works社(カーギルと帝人の合弁)は、この方法でPLAを生産している。また、開環重合では、重合開始剤の種類や濃度を変えることで分子量を十万から数

十万程度に制御できるという利点がある。重合開始剤としては、オクチル酸スズ（Ⅱ）が知られており、アルコールなど水酸基をもつ共開始剤を併用して重合が行われる [35-36]。さらに、モノマーとして用いられるラクチドは乳酸の脱水縮合や低分子量 PLA の解重合によって得られる [27]。また、環境負荷の低減のため、低温での反応が可能な酵素を用いた合成系も検討されている [37]。

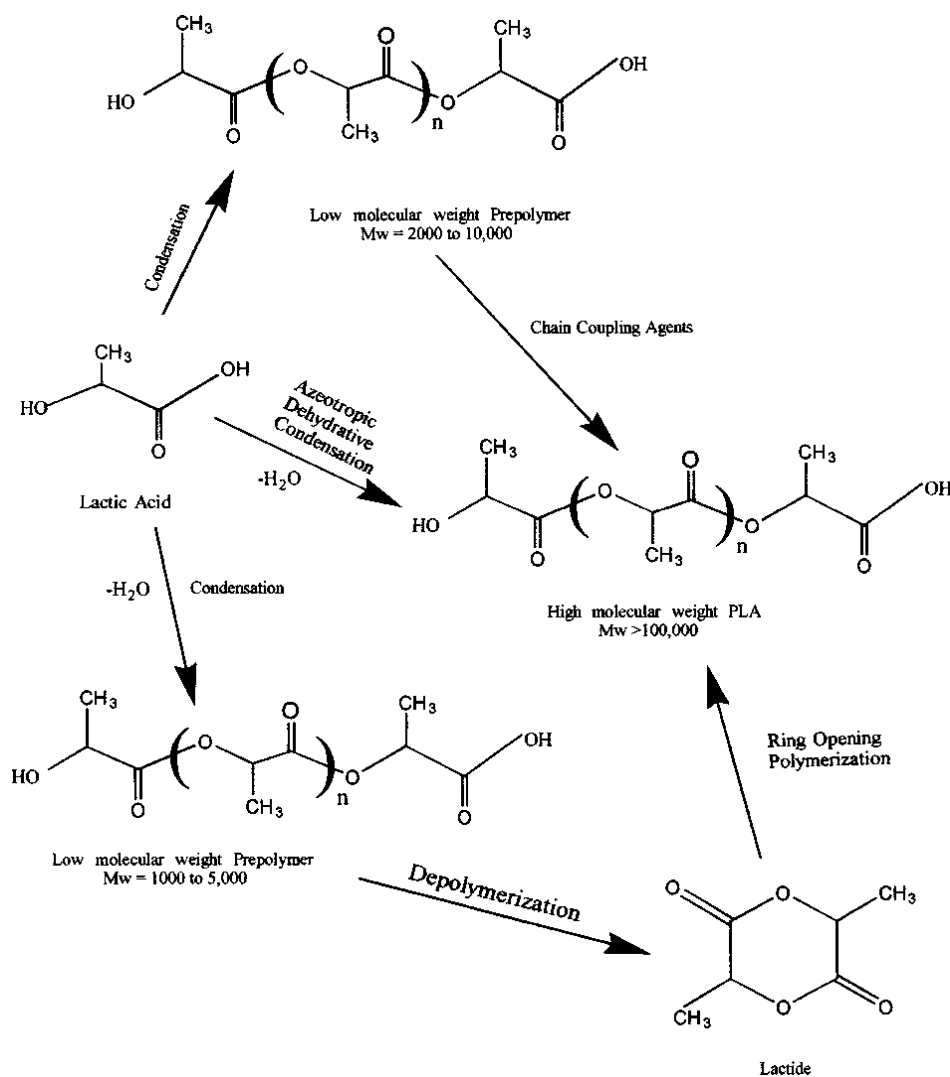


Fig. 1-5 Synthesis methods for high-molecular-weight PLA [32].

1. 4 PLA の熱安定性

PLA は熱に対して不安定であり、成形時の熱処理によって急激に分子量が低下する [38]。PLA の熱分解は処理温度が高いほど、処理時間が長いほど、あるいは成形時の素材の含水率が高いほど顕著になる。この際、加水分解やエステル交換反応により分子鎖が切断されて、揮発性の成分が発生し、材料外部に放出される [39-40] と考えられている。PLA において、加熱温度が約 250°C を超えると次第に PLA の重量減少がはじまり、400°C に至るまでにその重量はほぼゼロとなる [41-42]。この他の熱分解速度に影響を与える要因として、残存乳酸濃度、光学純度、分子量、素材の形状、および金属等の不純物などが挙げられる [43]。

1. 5 PLA の物性

PLA のガラス転移温度 (T_g) は分子量 [44] や光学純度 [44-45]、あるいは結晶化度 [46-47] などに影響される。ソルベントキャスト法で PLA を成形した場合は、 T_g は、PLA 中に残存した溶媒による影響も受ける [48]。また、PLA の融点はモノマーである乳酸の光学純度の影響を受ける。モノマーの光学純度が 100% では、PLA の融点は 180 °C 付近となる (平衡融点 215°C) [49]。L 体 PLA と D 体 PLA を 50 : 50 でブレンドしたステレオコンプレックスでは結晶構造が変化し、Table 1-2 に示すように、融点は約 230 °C に上昇する [50-51]。

Table 1-2 Crystal structure of PLLA and stereocomplex of PLA[50].

	PLLA	Stereocomplex of PLA
Crystal structure	orthorhombic	triclinic
Axis length	10.7 Å (a), 6.54 Å (b), 27.8 Å (c)	9.23 Å (a), 8.75 Å (b), 8.7 Å (c)
Degree	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	$\alpha=98.9^\circ, \beta=69.5^\circ, \gamma=121.2^\circ$
Helix	10/3 helix	3/1 helix
Melting temperature	$T_m=180^\circ\text{C}$	$T_m=230^\circ\text{C}$

PLA の機械的性質は分子量、結晶化度、あるいは分子配向度に影響され、これらの変化に伴い変化する [52-59]。脂肪族ポリエステル系の生分解性ポリマーの多くがポリエチレンやポリプロピレンに似た特徴を持つ。一方、PLA は、Table 1-3 に示すように、無延伸であればポリスチレン (PS) やポリエチレンテレフタレート (PET) に類似している [20][60-61]。また、他の生分解性ポリマーと比較して、PLA は、透明性 [62] やヤング率 [63] が高く、フィルムや繊維などの材料として好ましい物性を有している [64]。一方で、PLA の破断伸度や耐衝撃性が低いという課題もある [65-66]。

Table 1- 3 Physical property of plastics [67].

Polymer	Density (g/cm ³)	Tensile strength (kgf / cm ²)	Elongation at break (%)	Impact strength (kgf•cm/cm)	
Poly (L-lactic acid)	1.27	680	4	2.7	
Polyethylene terephthalate	1.34	570	300	4.2	
Polystyrene	1.04	439	2	1.3	
Polyethylene	Low density	0.92	160	800	-
	High density	0.94	294	20-100	66.0
Polypropylene	0.95	380	700	5.0	

1. 6 PLA の加水分解

Table 1-4 に示すように、PLA の加水分解速度は、分子量、結晶化度、あるいは、形状などにより変化する。また、外的要因として、環境温度やpHによっても変化する [68-70]。以下、加水分解の要因について述べる。

Table 1- 4 Promotion factors of PLA hydrolysis [69].

endogenous factors			exogenous factors
Structure	Composit	Processing	
carboxy end group (autocatalysis)	catalyst	water content	temperature
crystallinity	alkaline compound	processing temperature	humidity
surface area		processing time	pH

1. 6. 1 分子量

PLA の分子量が低下すると、単位重量当たりの末端基数の増加による自己触媒効果と、材料内部への水分子の拡散速度の増大により、加水分解が促進される [71-72]。その結果、PLA から水溶性低分子量オリゴマーやモノマーの生成量が増加する。一連の加水分解過程により、PLA は、まず分子量低下を起こし、最終的に重量損失を招く [73]。

1. 6. 2 結晶化度

PLA において、結晶部と比較して非晶領域は、より運動性が高く水分が拡散しやすい。そのため、非晶部の加水分解速度は、結晶部より大きくなる [74-76]。しかし、PLA の加水分解に与える結晶化度の影響は分解種により異なっている。アルカリ性物質や酵素等の求核種では、結晶領域の分子鎖は加水分解されにくいため、結晶化度の上昇に伴い、加水分解速度は低下する。しかし、中性付近のpHで、PLA の融点以下の温度条件下では、Fig. 1-6 に示すように、結晶

化度の上昇に伴い非晶領域に含まれる末端基密度が増加する。その結果、結晶化度が高いほど加水分解速度は上昇する [77]。

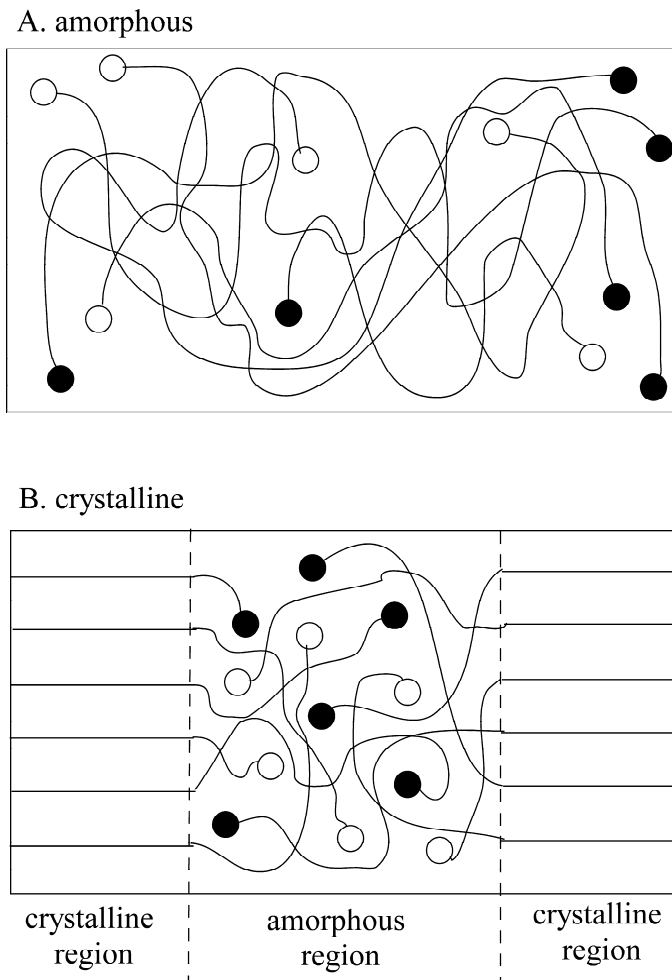


Fig. 1-6 Schematic diagram of (A) amorphous and (B) crystalline PLA [77].

1. 6. 3 表面積

中性付近の pH 条件下において、厚みのある PLA 材料は表面では水分子による加水分解が起こる。この時、内部ではさらに、加水分解により生成したオリゴマーやモノマーがトラップされ、エステル結合の加水分解反応の触媒として働くため、表面よりも加水分解速度が速くなる [78]。板状試料の場合は厚みが 2mm 以上で、表面と内部

とでは異なる機構による加水分解が起こることが知られている [79]。

また、後述のアルカリや酵素による加水分解では、加水分解は表面で起こるため、表面積を増加させると加水分解速度は大きくなる。

1. 6. 4 pH

PLA はアルカリ環境下では、材料表面の方が内部よりも加水分解速度が高く、分子量低下とほぼ同時に重量減少が起こる [80]。一方、中性および酸性環境下では、加水分解は材料全体においてほぼ均一に進行し、エステル鎖の切断もランダムに起こるが、PLA 分子鎖の末端部分ではカルボキシル基による自己触媒反応によって加水分解が促進されるという報告もある [81-83]。しかし、加水分解速度はアルカリ環境下よりも遅く、分子量が一定の水準まで低下した後に、重量減少が起こる [84-85]。

1. 6. 5 温度

温度も PLA の加水分解速度に大きく影響する。ガラス転移温度以上になると加水分解速度は著しく大きくなる [86]。ガラス転移温度を超えると非結晶領域のミクロブラウン運動、すなわちセグメント単位の運動が可能となる。そのため、加水分解に必要な水分子が材料内部に拡散しやすくなり、その結果、加水分解速度が急激に上昇する。また、融点以上ではさらに加水分解は起こりやすくなり、PLA から乳酸を再生する手法としても利用されている。辻らは、250 °C の高温高圧水で10~20分処理することにより PLA から約 90% の収率でL-乳酸が得られることを報告している [87]。

1. 6. 6 微生物

PE、PP、PS、PVC などの汎用性プラスチックは微生物による分解を受けないが、PLA は環境中の微生物により分解される。

PLA は、コンポストなどの高温環境中では、Fig. 1-7 に示すように、非生物学的な加水分解や、菌体外酵素により、水に溶解するほど分子量が低下する。PLA の低分子量体のうち、モノマーやダイマ

一は、微生物体内に取り込まれて代謝され、TCA サイクルや電子伝達系を経て二酸化炭素と水にまで分解される [69][88]。しかし、中温域での PLA の環境分解速度は、他の生分解性プラスチックと比較して極端に低い [89-91]。

これまでに同定された PLA の分解菌として、Table 1-5 に示すように、*Amycolatopsis* 属 [92-95] などが知られている。PLA の分解酵素は、多くがセリンプロテアーゼである [96]。特に *Tritirachium album* 由来のセリンプロテアーゼ、proteinase K は、PLA や PLA コポリマーの酵素分解挙動の研究に利用されている [97-98]。

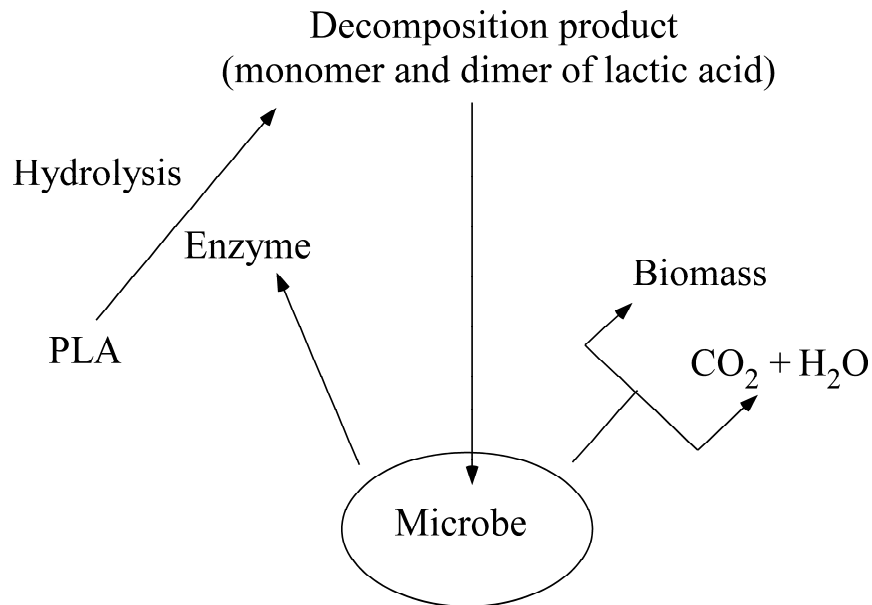


Fig. 1-7 Biodegradation of PLA [88].

Table 1-5 PLA-degrading microorganisms, their enzymes and substrate specificities and detection methods used for degradation test [43].

Strain	Type of enzyme	Substrate specificity	Detection method for PLA degradation	Reference
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain HT 32	Protease	L-PLA	Film-weight loss; monomer production	[99]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain 3118	Protease	L-PLA	Film-weight loss; monomer production	[100]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain KT-s-9	Protease	Silk fibroin, L-PLA	Clear-zone method	[101]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain 41	Protease	L-PLA, silk powder, casein, Suc-(Ala) ³ -pNA	Film-weight loss; monomer production	[102]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain K104-1	Protease	L-PLA, casein, fibrin	Turbidity method	[103]
<i>Lentzea waywayandensis</i>	Protease	L-PLA	Film-weight loss; monomer production	[104]
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	Protease	L-PLA	Film-weight loss; monomer production	[105]
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	Protease	L-PLA, silk fibroin, elastin	Film-weight loss; monomer production	[106]
<i>Bacillus brevis</i>	Protease	L-PLA	Change in molecular weight and viscosity	[107]
<i>Bacillus stearothermophilus</i> *	Protease	D-PLA	Change in molecular weight and viscosity	[108]
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> *	Protease	L-PLA	Change in molecular weight and viscosity	[109]
<i>Bacillus sinithii</i> strain PL 21*	Lipase (Esterase)	L-PLA, pNP-fatty acid esters	Change in molecular weight	[110]
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> strain TB13	Lipase	TB-13 DL-PLA, PBS, PES, PCL, triolein, PBSA,	Turbidity method	[111]
<i>Cryptococcus</i> sp. strain S-2	Lipase (Curtinase)	L-PLA, PBS, PCL, PHB	Turbidity method	[112]

*Thermophilic PLA-degrading microorganisms

1. 7 PLA の物性改質

PLA の物性（熱安定性、耐衝撃性、延性 [113]、および分解速度）の改善、および製造コスト削減等を目的として、PLA に種々の機能性粒子や他の高分子材料を混合する例が多く報告されている。例えば、PLA への無機物フィラーの例として、モンモリロナイト [114]、ハイドロキシアパタイト [115]、炭酸カルシウム [116]、硫酸カルシウム [117]、カーボン [118]、およびガラスファイバー [119-120] などがある。これらを添加することで、剛性、形態安定性、変形温度、成形性の向上、あるいは導電性の付与などが期待できる。一方、ケナフ [121] やジュート [122]、パルプ [123] などのセルロース系天然物フィラーを混合すると、補強効果の他に、生分解性の維持、製造コストの削減、軽量化などが期待できる [124-125]。近年ではフィラーの粒径をナノサイズにしたナノコンポジットを使用し、より効果的に物性改善に関する研究も行われている [126-127]。

一方、PLAよりも生分解速度の速いPGA [128]、PHB [129]、PCL [130]、およびPBS [131]等の生分解性プラスチックや、PE [132]、およびPS [133]等の非生分解性プラスチックと混練した例もある。PLAとブレンド材料の相溶性が高い場合、酵素やアルカリによるPLA部分の加水分解速度は低下する。これは、PLAへの酵素やアルカリのアプローチがブレンド材料により阻害されるためである。一方、非相溶性である場合は各成分が別々にドメインを形成し、ドメインの隙間を酵素やアルカリが入り込むため加水分解速度は高くなる [134]。

PCLなどの軟質なプラスチック、乳酸オリゴマー、グリセロール、トリアセチン、あるいはクエン酸塩等を、PLAに混練することで、その耐衝撃性を改善した報告例もある [135-136]。

1. 8 PLAの用途

石油系プラスチックと比較して価格が高いという課題は残されているものの、PLAの加水分解物である乳酸は、人体における代謝産物の一つであり、生体適合性も高い。このため、最初は、Table1-6に示すような縫合糸、骨接合材、およびドラックデリバリーシステム(DDS)用担体などといった医用材料として利用されてきた

[34][137-143]。現在では量産化による原料コストの低減や、様々な手法による物性改善も可能になり、Table1-7に示すような食品包装容器、マルチフィルムや育苗ポットなどの農業資材、土嚢植生資材などの土木建築資材、日用生活用品、および繊維製品などの分野でも利用されている [34][144]。

この他にも、乳酸モノマーやオリゴマーによるpH低下と金属イオンに対するキレート効果により、PLAは抗菌性を示すことが知られている [145-148]。また、乳酸モノマーやオリゴマーが植物生長因子に類似しているため、植物生長促進剤としても利用されている [149-150]。このことから、PLAの加水分解によって生じた乳酸モノマーやオリゴマーを利用した用途展開も期待できる。

Table 1-6 Medical applications of bioabsorbable polymers [70].

Function	Purpose	Examples
Bonding	Suturing	Vascular and intestinal anastomosis
	Fixation	Fractured bone fixation
	Adhesion	Surgical adhesion
Closure	Covering	Wound cover, Local hemostasis
	Occlusion	Vascular embolization
Separation	Isolation	Organ protection
	Contact inhibition	Adhesion prevention
Scaffold	Cellular proliferation	Skin reconstruction, Blood vessel reconstruction
	Tissue guide	Nerve reunion
Capsulation	Controlled drug delivery	Sustained drug release

Table 1- 7 Ecological applications of biodegradable polymers [70].

Application	Fields	Examples
Industrial applications	Agriculture, Forestry	Mulch films, Temporary replanting pots, Delivery system for fertilizers and pesticides
	Fisheries	Fishing lines and nets, Fishhooks, Fishing gears
	Civil engineering and construction industry	Forms, Vegetation nets and sheets, Water retention sheets
	Outdoor sports	Golf tees, Disposable plates, cups, bags, and cutlery
Composting	Food package	Package, Containers, Wrappings, Bottles, Bags, and Films, Retail bags, Six-pack rings
	Toiletry	Diapers, Feminine hygiene products
	Daily necessities	Refuge bags, Cups

1.9 研究目的

バイオベースマテリアルとして今後さらに利用用途、需要拡大が期待される PLA を対象として、以下の研究を行う。

第二章では PLA の加水分解速度向上によるコンポスト化を容易にすることを目的として、貝殻を粉碎処理後、1000℃以上で高温処理し、主成分が酸化カルシウムとなった焼成貝殻粉末を PLA に混練した。焼成貝殻粉末の結晶核剤としての効果、および PLA の抗菌性、生分解性に与える影響について検討する。

第三章では、食中毒や院内感染などでしばしば問題となっているバイオフィルムの形成抑制素材の創製を目的とし、PLA の加水分解によって生じる乳酸の緑膿菌バイオフィルム形成阻害効果を検討する。実用的な用途開発を目的とし、汎用性プラスチックであるポリエチレンに PLA を重量比 10% の割合で熔融混合したネット (PLA-PE ネット) を作製し、ネットの基本物性と緑膿菌バイオフィルム形成阻害抑制効果を評価する。さらに、PLA-PE ネットに食品残渣を 30 日間入れた後のネット表面上のバイオフィルム微生物叢を PCR-DGGE 法により群集解析する。

最終的に本博士論文で得られた成果に基づき、PLA の新たな用途を提案する。

文献

1. 鎌田悟, 工藤素, 柴山敦, 邱建輝, *資源と素材*, **119**, 747-754(2003)
2. 佐々木大輔, 鈴木義弘, 萩原俊紀, 矢野彰一郎, 澤口孝志, *日本エネルギー学会誌*, **87**, 208-214 (2008)
3. Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu and S. Aiba, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 3722-3742(2009)
4. S. Hellweg, T. B. Hofstetter and K. Hungerbühler, *Environ. Model. Assess.*, **6**, 219-235(2001)
5. 大島一史, *日本緑化工学会誌*, **28**, 490-496 (2003)
6. A. T. Pruter, *Mar. Pollut. Bull.*, **18**, 305-310(1987)
7. A. Stefatos, M. Charalampakis, G. Papatheodrou and G. Ferentinos, *Mar. Pollut. Bull.*, **36**, 389-393(1999)
8. 小原仁実, *化学と生物*, **34**, 174-180 (1996)
9. A. J. Anderson and E. A. Dawes, *Microbiol Rev*, **54**, 450-472 (1990)
10. Y. B. Kim and R. W. Lenz, *Adv Biochem Eng. Biotechnol*, **71**, 51-79 (2001)
11. K. Sudesh, H. Abe and Y. Doi, *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555(2000)
12. L. Yu, K. Dean and L. Li, *Prog. Polym. Sci.* **31**, 576-602 (2006)
13. 田村裕, *繊維学会誌*, **65**, 404- 406 (2009)
14. N. V. Majeti and R. Kumar, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27(2000)
15. D. Goldberg, *J. Polym. Environ.*, **3**, 61-67(1995)
16. Z. Gan, H. Abe, H. Kurokawa and Y. Doi, *Biomacromolecules*, **2**, 605-613(2001)
17. K. Sudesh and T. Iwata, *Clean-Soil, Air, Water*, **36**, 433-442(2008)
18. T. Hiraishi and S. Taguchi, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **6**, 44-54(2009)
19. L. Junistia, A. K. Sugih, R. Manurung, F. Picchioni, L. P. B. M. Janssen and H. J. Heeres, *Starch*, **60**, 667-675 (2008)
20. A.P. Gupta, V. Kumar, *Eur. Polym. J.*, **43**, 4053-4074(2007)
21. J. Lunt, *Polym. Degrad. Stabili.*, **59**, 145-152(1998)
22. K. Hofvendahl, B. Hahn-Ha'gerdal, *Enz. Microbial Technol.*, **26**, 87-107(2000)
23. R. Datta and M. Henry, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1119-129(2006)
24. R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia and S. N. Upadhyay, *J. Macromol. Sci. Polym. Rev.*, **45**, 325-349(2005)
25. M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suzuki and A. Yamaguchi, *J. Polym. Environ.*, **3**, 225-234(1995)
26. M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suruki and A. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2125-2131(1995)
27. G.-X. Chen, H. -S. Kim, E. -S. Kim, J. -S. Yoon, *Eur. Polym. J.*, **42**, 468-472(2006)
28. S. -I. Moon, H. Urayama and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, **3**, 301-309(2003)
29. S. Wang, W. Cui and J. Bei, *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 547-556(2005)
30. Y. Tokiwa and B. P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 244-251(2006)

31. R. Auras, B. Harte and S. Selke., *Macromol. Biosci.*, **4**, 835-864(2004)
32. D. Garlotta, *J. Polym. Environ.*, **9**, 63-84(2001)
33. Y. Ikada and H. Tsuji, *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 117-132(2000)
34. M. H. Hartmann, High-molecular-weight polylactic acid polymers., in D. L. Kaplan, editor. *Biopolymers from renewable resources.*, Springer, Berlin, p. 367-411(1998)
35. W. Yuan, J. Yuan, F. Zhang and X. Xie, *Biomacromolecules*, **8**, 1101-1108(2007)
36. R. Tong and J. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 4744-4754(2009)
37. S. Matsumura, K. Mabuchi and K. Toshima, *Macromol. Rapid Commun.*, **18**, 477-482(1997)
38. L. T. Lim, R. Auras and M. Rubino, *Prog. Polym. Sci.*, **33**, 820-852(2008)
39. V. Taubner and R. Shishoo, *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 2128-2135(2001)
40. 辻秀人, ポリ乳酸, p105, 米田出版
41. K. Jamshidi, S.-H. Hyon and Y. Ikada, *Polymer*, **29**, 2229-2234(1988)
42. T. Ohkita and S. -H. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, **100**, 3009-3017(2006)
43. M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot and S. Desobry, *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, **9**, 552-571(2010)
44. J. R. Dorgan, J. Janzen and M. P. Clayton, *J. Rheol.*, **49**, 607-619(2005)
45. H. Tsuji and Y. Ikada, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 3483-3499(1996)
46. A. Celli and M. Scandola, *Polymer*, **33**, 2699-2703(1992)
47. H. Cai, V. Dave, R. A. Gross and P. McCarthy, *J. Polym. Sci.*, **B34**, 2701-2708(1996)
48. P. Van De Witte, P. J. Dijkstra, J. W. A. Van DeBerg and J. Feijen, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **34**, 2553-2568(1996)
49. B. Kalb and A. J. Pennings, *Polymer*, **21**, 607-612(1980)
50. 山根秀樹, 材料, **56**, 993-997 (2007)
51. H. Tsuji, *Macromol. Biosci.*, **5**, 569-597(2005)
52. B. Eling, S. G. Gogolewski and A. J. Pennings, *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 1587-1593(1982)
53. S. G. Gogolewski and A. J. Pennings, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 1045-1061(1983)
54. G. Perego, G. D. Cella and C. Bastioli, *J. Appl. Polym. Sci.*, **59**, 37-43(1996)
55. H. Tsuji and Y. Ikada, *Macromolecules*, **26**, 6918-6926(1993)
56. J. R. Sarasua, A. L. Arraiza, P. Balerdi and I. Maiza., *Polym. Eng. Sci.*, **45**, 745-753(2005)
57. G. Kister, G. Cassanas and M. Vert., *Polymer*, **39**, 267-273(1998)
58. K. Kishore and R. Vasanthakumari., *Colloid Polym. Sci.*, **266**, 999-1002(1988)
59. K. Kishore, R. Vasanthakumari and A. J. Pennings, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **22**, 537-542(1984)
60. R. Auras, B. Harte, S. Selke and R. Hernandez, *J. Plast. Film Sheet.*, **19**, 123-135(2003)
61. 梶山宏史, 繊維学会誌, **59**, 329-332 (2003)
62. V. Krikorian and D. J. Pochan, *Chem. Mater.*, **15**, 4317-4324(2003)

63. 神澤岳史, 徳満勝久, *成形加工*, **21**, 469-473(2009)
64. B. Gupta, N. Revagade and J. Hilborn, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 455-482(2007)
65. J. R. Dorgan, H. Lehermeier and M. Mang, *J. Polym. Environ.*, **8**, 1-9(2000)
66. 原田征, 飯田浩史, *成形加工*, **20**, 432-437(2008)
67. 辻秀人, 筏義人, ポリ乳酸, p166-169, 高分子刊行会
68. Y. Tokiwa and A. Jarerat, *Biotechnol. Lett.*, **26**, 771-777(2004)
69. 辻秀人, ポリ乳酸, p85-86, 米田出版
70. H. Tsuji and K. Ikarashi, *Polym. Degrad. Stabili.*, **85**, 647-656(2004)
71. H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano and M. Kumakura, *Eur. Polym. J.*, **25**, 1019-1026(1989)
72. C. Shih, *J. Control. Release*, **34**, 9-15(1995)
73. 辻秀人, 筏義人, ポリ乳酸, p19-24, 高分子刊行会
74. M.-A. Paul, C. Delcourt, M. Alexandre, Ph. Dege'e, F. Monteverde and Ph. Dubois, *Polym. Degrad. Stabili.*, **87**, 535-542 (2005)
75. H. Tsuji, A. Mizuno, Y. Ikada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, 2259-2268(1998)
76. M. Hakkarainen, *Adv Polym Sci*, **157**, 113-138(2002)
77. 辻秀人, 生分解高分子材料の科学, p169-172, コロナ社
78. F. V. Burkersroda, L. Schedl and A. Göpferich, *Biomaterials*, **23**, 4221-4231(2002)
79. I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert., *Biomaterials*, **16**, 305-311(1995)
80. S. J. de Jong, E. R. Ariasa, D. T. S. Rijkersb, C. F. van Nostruma, J. J. Kettenes-van den Bosch and W. E. Hennink, *Polymer*, **42**, 2795-2802(2001)
81. H. Tsuji, *Polymer*, **43**, 1789-1796(2002)
82. V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani and M. D. Rosa, *Trends Food Sci. Tech.*, **19**, 634-643(2008)
83. S. M. Li, H. Garreau and M. Vert, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **1**, 123-130(1990)
84. R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney and L. M. Sanders, *Macromolecules*, **20**, 2398-2403(1987)
85. L. S. Naira and C. T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762-798(2007)
86. D. K. Gilding and A. M. Reed, *Polymer*, **20**, 1459-1464(1979)
87. H. Tsuji, K. Nakahara and K. Ikarashi, *Macromol. Mater. Eng.*, **286**, 398-406(2001)
88. 望月政嗣, 生分解性ポリマーの話, p45, 日刊工業新聞社
89. H. Tsuji and K. Suzuyoshi, *Polym. Degrad. Stabili.*, **75**, 347-355(2002)
90. H. Nishida and Y. Tokiwa, *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1**, 227-233(1993)
91. H. Tsuji, K. Suzuyoshi, Y. Tezuka and T. Ishida, *J. Polym. Environ.*, **11**, 57-65(2003)
92. H. Pranamuda and Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.*, **21**, 901-905(1999)
93. Y. Ikura and T. Kudo, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**, 247-251(1999)
94. F. Li, S. Wang, W. Liu and G. Chen, *FEMS Microbiol. Lett.*, **282**, 52-58(2008)
95. K. Nakamura, T. Tomita, N. Abe and Y. Kamio, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 345-353(2001)

96. Y. Oda, A. Yonetsu, T. Urakami and K. Tonomura, *J. Polym. Environ.*, **8**, 29-32(2000)
97. D. F. Williams, *Eng. Med.*, **10**, 5-7(1981)
98. T. Iwata and Y. Doi, *Macromolecules.*, **31**, 2461-2467(1998)
99. H. Pranamuda, Y. Tokiwa and H. Tanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1637-1640 (1997)
100. A. Jarerat, Y. Tokiwa and H. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **72**, 726-731(2006)
101. Y. Tokiwa, M. Konno and H. Nishida, *Chem. Lett.*, **28**, 355-356(1999)
102. H. Pranamuda, A. Tsuchii and Y. Tokiwa, *Macromol. Biosci.*, **1**, 25-29(2001)
103. K. Nakamura, T. Tomita, N. Abe and Y. Kamio, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 345-353(2001)
104. A. Jarerat and Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.*, **25**, 401-404(2003)
105. A. Jarerat and Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.*, **25**, 2035-2038(2003)
106. A. Jarerat and Y. Tokiwa, *Macromol. Biosci.*, **1**, 136-140(2001)
107. K. Tomita, Y. Kuroki and K. Nagai, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 752-755(1999)
108. K. Tomita, H. Tsuji, T. Nakajima, Y. Kikuchi, K. Ikarashi and N. Ikeda, *Polym. Degrad. Stabili.*, **81**, 167-171(2003)
109. K. Tomita, T. Nakajima, Y. Kikuchi and N. Miwa, *Polym. Degrad. Stabili.*, **84**, 433-438(2004)
110. K. Sakai, H. Kawano, A. Iwami, M. Nakamura and M. Moriguchi, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 298-300(2001)
111. Y. A. Shigeno, T. Teeraphatpornchai, K. Teamtisong, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakahara and T. N. Kambe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2498-2504(2003)
112. K. Masaki, N. R. Kamini, H. Ikeda and H. Iefuji, *Appl. Environ. Microbiol.*, **7**, 7548-7550(2005)
113. M. Harada, T. Ohya, K. Iida, H. Hayashi, K. Hirano and H. Fukuda, *J. Appl. Polym. Sci.*, **106**, 1813-1820(2007)
114. D. Wu, L. Wu, L. Wu and M. Zhang, *Polym. Degrad. Stabili.*, **91**, 3149-3155(2006)
115. T. Kasuga, Y. Ota, M. Nogami and Y. Abe, *Biomaterials*, **22**, 19-23(2001)
116. T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata and M. Ueda, *Biomaterials*, **24**, 3247-3253(2003)
117. M. Murariu, A. D. S. Ferreira, M. Pluta, L. Bonnaud, M. Alexandre and P. Dubois, *Eur. Polym. J.*, **44**, 3842-3852(2008)
118. N. Wang, X. Zhang, X. Ma and J. Fang, *Polym. Degrad. Stabili.*, **93**, 1044-1052(2008)
119. I. Ahmed, P. S. Cronin, E. A. A. Neel, A. J. Parsons¹, J. C. Knowles and C. D. Rudd, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **89B**, 18-27(2009)
120. P. Haque, I. A. Barker, A. Parsons, K. J. Thurecht, I. Ahmed, G. S. Walker, C. D. Rudd and D. J. Irvine, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **48**, 3082-3094(2010)
121. M. Avella, G. B. -Gaceva, A. Bužarovska, M. E. Errico, G. Gentile and A. Grozdanov, *J. Appl. Polym. Sci.*, **108**, 3542-3551(2008)

122. D. Plackett, T. L. Andersen, W. B. Pedersen, L. Nielsen, *Compos. Sci. Technol.*, **63**, 1287-1296(2003)
123. L. Liu, M. L. Fishman, K. B. Hicks and C. -K. Liu, *J. Agr. Food Chem.*, **53**, 9017-9022(2005)
124. K. Oksman, A.P. Mathewa, D. Bondesona and I. Kvien, *Compos. Sci. Technol.*, **66**, 2776-2784(2006)
125. A. Iwatake, M. Nogi and H. Yano, *Compos. Sci. Technol.*, **68**, 2103-2106(2008)
126. M. Alexandre and P. Dubois, *Mater. Sci. Eng. R.*, **28**, 1-63(2000)
127. J. W. Rhim, *Food Sci. Biotechnol.*, **16**, 691-709(2007)
128. J. O. Hollinger, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 71-82(1983)
129. I. Ohkoshi, H. Abe, Y. Doi, *Polymer*, **41**, 5985-5992(2000)
130. L. Wang, W. Ma, R.A. Gross and S.P. McCarthy, *Polym. Degrad. Stabili.*, **59**, 161-168(1998)
131. T. Yokoharaa and M. Yamaguchi, *Eur. Polym. J.*, **44**, 677-685(2008)
132. H. T. Oyama, *Polymer*, **50**, 747-751(2009)
133. J. Y. Lim, J. C. Hansen, C. A. Siedlecki, R. W. Hengstebeck, J. Cheng, N. Winograd and H. J. Donahue, *Biomacromolecules*, **6**, 3319-3327(2005)
134. H. Tsuji, Degradation of poly (lactide)-based biodegradable materials, in L. B. Albertov editor, *Polymer degradation and stability research development*, Nova sciebce publishers, New York, p. 11-59(2007)
135. 田中利幸, 西村美郎, 西田雅一, 早川由夫, 成型加工, **19**, 711-714(2007)
136. N. Ljungberg, D. Colombini and B. Wessle´en, *J. Appl. Polym. Sci.*, **96**, 992-1002(2005)
137. 辻秀人, 筏義人, ポリ乳酸, p152-153, 高分子刊行会
138. E. J. Bergsma, F. R. Rozema, R. R. Bos and W. C. de Bruijin, *J. Oral Maxil. Surg.*, **52**, 666-670(1993)
139. Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa and E. Fukuda, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 553-558(1996)
140. T. Asahi, H. Fukase, M. Ichiki, J. Kobayashi and E. Fukuda, *Ferroelectrics*, **109**, 339-342(1990)
142. Y. Ogawa, H. Okada, T. Heya and T. Shimamoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 439-444(1989)
142. Y. Ogawa, H. Okada, M. Yamamoto and T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576-2581(1988)
143. H. Okada, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **28**, 43-70(1997)
144. R. E. Drumright, P. R. Gruber and D. E. Henton, *Adv. Mater.*, **12**, 1841-1846(2000)
145. J.-W. Rhima, S. -I. Hongb and C. -S. Ha, *LWT - Food Sci. Technol.*, **42**, 612-617(2009)
146. 望月政嗣, 村瀬繁満, 松永伸洋, 繊維学会誌, **62**, 323-329(2006)
147. 檜山圭一郎, 小林修, 畠中芳郎, 岡田正夫, 小原仁実, 防菌防黴, **29**, 153 -159(2001)
148. P. R. Velugoti, L. K. Bohra, V. K. Juneja, A. Thippareddi, *J. Food Protect.*, **70**, 923-929(2007)
149. A. M. Kinnersley, T. C. Scott III, J. H. Yopp and G. H. Whitten, *Plant Growth Regul.*, **9**,

137-146(1990)

150. M.-N. Kim, J. -H. Shin, S. -S. Im, *J. Polym. Environ.*, **11**, 101-105(2003)

第2章 ポリ乳酸-焼成貝殻粉末ブレンドの性質

2.1 緒言

ポリ乳酸 (PLA) は、乳酸の重合[1-2]や、ラクチドの開環重合[3]によって得られる高分子材料で、特に塩基性条件下で容易に加水分解・低分子化する[4-5]。また、生分解性プラスチックの中では透明性が高く、フィルムや繊維へ成形しやすいなどの特徴がある[6]。現在、PLA はインプラントや薬物徐放システムだけでなく、包装容器、フィルム、繊維、不織布などの用途で使用されている[7-8]。また、PLA は抗菌性を示すが、これは加水分解によって生じた乳酸に由来するものと考えられ[9]、抗菌機能付与のため PLA をブレンドした材料開発が進められている[10]。

しかし、ポリカプロラクトン(PCL)や、ポリヒドロキシブチレート(PHB)等、他の生分解性プラスチックと比較すると、PLA の生分解速度は遅く、これまでに単離された PLA 分解菌も非常に数少ない[11]。

一方、焼成貝殻は、ホタテやカキの貝殻を 1000 °C 以上で焼成したもので、その主成分は酸化カルシウムであり、吸湿性が高い。焼成貝殻を水中に懸濁すると、その上清はアルカリ性を示し、さらに、活性酸素種($O_2^{\cdot-}$)が発生することが報告されている[12-16]。このため焼成貝殻には抗菌効果があり、現状では食品添加物や野菜の殺菌洗浄に使用されている。また、元来廃棄物である貝殻を資源として利用できるため、環境負荷低減も期待できる。

そこで、本章では、焼成貝殻の複合による PLA の抗菌性、強度、粘弾性特性や生分解挙動の変化を測定し、焼成貝殻の複合効果について検討した。

2.2 実験

2.2.1 試料

PLA 試料は三井化学製 LACEA H-100 ($M_w:1.4 \times 10^5$ 、PDI:1.41)を用い、焼成貝殻はカルサイン製の平均粒径 20 μm 以下のものを、タルクは和光純薬製平均粒径 7~12 μm のものを用いた。試料はすべて 25 °C、48 時間以上、減圧乾燥して用いた。

2. 2. 2 試料の作成

東洋精機製ラボプラストミル[®]を用い、185 °C、20 cycle/min の条件で PLA に所定量の焼成貝殻粉末を 1%、3%、5%、10%、20%、および 40%の重量割合で添加して混練サンプルを作製した。混練サンプルを、IKEDA 製 Hot press 機を用いて 180 °C、3 min、150 atm で熱プレス処理した後、25 °C、3 min、150 atm で冷プレス処理し、厚さ 0.2 mm のフィルム状に成形した（以下、混練フィルム）。

動的粘弾性試験用のサンプルは、Mining & Chemical Products 製プランジャー型小型射出成形機を用いて作製した。成形温度は、PLA: 180 °C、PLA/焼成貝殻: 175 °C、PLA/タルク: 185 °C とした。

2. 2. 3 抗菌性評価

焼成貝殻粉末の抗菌性評価は、40mm×50mm の大きさに裁断した無処理の綿布上に 0.5g の焼成貝殻粉末を均一に付着したものに対して、JIS L1902 「繊維製品の抗菌性試験方法」[17]を参考にして行った。菌体濃度 1.0×10^5 個/ml 程度の菌培養液 200 μ m と DIFCO 製 Bacto Beef Extract 3g と、DIFCO 製 Bacto Peptone 5g とを加え、1000 ml の蒸留水に溶解した培地（以下、Nutrient 培地）25 μ l を上記試料上に滴下した。そして、37 °C のインキュベーター内で 18 時間静置した後、20 ml の生理食塩水中に試料を浸漬し、10 倍希釈系列を作製して、それぞれ Nutrient 固体培地上に塗布した。さらに、37 °C のインキュベーター内で 48 時間静置した後、固体培地上のコロニー数を計数した。この時、比較試料として、無処理の綿布を使用した。

PLA フィルムおよび混練フィルムの抗菌性評価を行う場合は、フィルムを 40 mm×50 mm の大きさに裁断し、上記と同様の方法で行った。また、この時、比較試料としてポリエステル布を使用した。

静菌活性値および殺菌活性値は、以下の計算式により算出した。

$$\text{静菌活性値 (Bacteriostatic activity)} = \log (A / C) \quad (1)$$

$$\text{殺菌活性値 (Bacteriocidal activity)} = \log (B / C) \quad (2)$$

ここで、A、B、C はそれぞれ

A: 比較試料に植菌し、37 °C で 18 時間静置後の生菌数

B:比較試料へ植菌した直後の生菌数

C:焼成貝殻粉末を付着した綿布、PLA フィルムおよび混練フィルムに植菌し、37 °C で 18 時間静置後の生菌数を表している。

オートクレーブにより滅菌する場合は、平山製作所製オートクレーブ HA-300-M II を用い、121 °C、2 atm の条件下で 15 分間処理した。また、エタノールにより滅菌する場合は、試料を 99.5 %エタノール中に 10 分間浸漬し、その後室温で 24 時間自然乾燥した。

2. 2. 4 分解試験

アルカリ加水分解試験には、pH 13.0 に調整した NaOH 溶液を用いた。37 °C の人工気象機中に 10 mm×10 mm×0.2 mm の大きさに裁断したフィルムを上記 NaOH 溶液に 6 日間浸漬した。フィルムは 24 時間毎に回収し、希薄 HCL 溶液で中和後、蒸留水により洗浄し、24 時間以上凍結乾燥させた。また、重量減少割合は以下の計算式によって算出した。

$$\text{重量減少割合(\%)} = \{(W_o - W_d) / W_o\} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 W_o は分解試験前のフィルム重量を、 W_d は分解試験後のフィルム重量を表している。

酵素分解試験には、*Tritirachium album* 由来の proteinase K を使用した。proteinase K を 100 mM Tris-HCl (pH8.5) 中に 10 mg/ml となるように溶解し、この中に 10 mm×10 mm×0.2 mm の大きさに裁断したフィルムを 37 °C で 6 日間浸漬した。また、酵素溶液は 24 時間ごとに交換した。この時の重量減少割合は式 (1) により算出した。

土壌埋設試験および模擬コンポスト試験では、10 mm×10 mm×0.2 mm の大きさに裁断したフィルムを齋田鉄工所製腐葉土と群馬大学桐生キャンパス内の土壌を 1 対 1 で混合した試験用土壌に埋設し、温度条件は、それぞれ 25 °C、58 °C とした。また、いずれの試験においても、試験用土壌の水分含有率が 40~45% となるように蒸留水を噴霧して調整した。回収した試験片は、水洗した後にメタノール中に浸漬し、24 時間減圧乾燥した。この時の重量減少割合は式 (1) により算出した。

2. 2. 5 機器分析

フィルムの示差走査熱量測定(Differential scanning calorimetry : DSC)は島津製作所製 DSC-60 を用いて行った。First-run、second-run 共に窒素雰囲気下、重量 $3.5 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg}$ 、加熱速度 $10 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ 、測定温度範囲 $25 \text{ }^\circ\text{C} \sim 185 \text{ }^\circ\text{C}$ 、ホールド時間 3 分 ($185 \text{ }^\circ\text{C}$)、冷却速度 $5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ で測定を行った。また、熱履歴を等しくするため、測定結果は second-run の加熱曲線の値を用いた。

強伸度測定は東洋ボールドウィン製テンシロン UTM-III-500 を用いた。フィルムを $30 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$ の大きさに裁断し、クロスヘッドスピードは $2 \text{ mm} / \text{min}$ 、ゲージ長は 25 mm とし、測定は室温で行った。

動的粘弾性測定は UBM 製 Rheogel-E 4000 を用いた。 $5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ の大きさに試料を成形した直後に、周波数 10 Hz 、測定温度範囲 $25 \sim 175 \text{ }^\circ\text{C}$ 、昇温速度 $5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ 、初期荷重 25 g の条件下において、3 点曲げ法により貯蔵弾性率(E')、損失正接($\tan \delta$)を測定した。

熱重量測定(Thermogravimetric Analysis: TGA)は、島津製作所製 TGA-50 を用い、試料重量 $3.5 \pm 0.1 \text{ mg}$ 、昇温速度 $10 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ 、測定温度範囲 $25 \sim 500 \text{ }^\circ\text{C}$ 、窒素雰囲気下において行った。

PLA の分子量測定には、ゲル浸透クロマトグラフィー(Gel permeation chromatography : GPC)を使用した。GPC 測定装置はジーエルサイエンス社製デガッシングユニット(DG660B)、ポンプ(GL-7410)、カラムオープン(CO631A)、RI 検出器(GL-7454)よりなり、溶離液はクロロホルム、ポリマー濃度は $1.0 \text{ mg} / \text{ml}$ とし、カラムオープン温度 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 、流速 $1.0 \text{ ml} / \text{min}$ の条件で測定した。また、土壌埋設試験および模擬コンポスト分解試験における試料の分子量測定は、日本分光製デガッサ(DG-2080-53)、ポンプ(PU-2080)、カラムオープン(CO-2065)、RI 検出器(RI-2031)よりなる GPC 測定装置を使用し、カラムオープン温度は $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 、流速 $1.0 \text{ ml} / \text{min}$ とした。この時、標準試料にはポリスチレンを使用し、その検量線から分子量を換算した。

電子顕微鏡観察は、フィルムを JEOL 製金蒸着装置 FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100 を用いて表面に金蒸着し、日立製作所製走査型電子顕微鏡 S-2250N を用いて印加電圧 5 kV の条件で行った。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 強伸度測定

Fig. 2-1 に焼成貝殻粉末の混練割合が 1%、3%、5%および 10%の混練フィルム of 応力ひずみ曲線を、また Table 2-1 には各フィルムの破断強度、破断伸度およびヤング率を示す。PLA のみのフィルムの破断強度、破断伸度およびヤング率はそれぞれ 42.2MPa、2.07%および 2.03GPa であった。混練フィルムでは破断強度、破断伸度およびヤング率はそれぞれ(混練割合 1%) : 49.0MPa、2.26%および 2.19GPa; (3%) : 46.1MPa、2.10%および 2.20GPa; (5%) : 41.8MPa、1.91%および 2.20GPa ; (10%) : 38.0MPa、1.53%および 2.45GPa であった。

ヤング率は混練割合が増加するに従い上昇した。また、混練割合が 1%および 3%の混練フィルムでは、PLA のみのフィルムと比較して破断強度も若干上昇した。これは、焼成貝殻粉末を混練したことによる補強効果によるものであると考えられる。さらに、フィルム作製時の熱処理によって、PLA の結晶化が進むと考えられる。この時、混練フィルムの方が PLA のみのフィルムよりも結晶化しやすかったために、PLA のみのフィルムよりもヤング率と破断強度が高くなった可能性がある。一方、混練割合が 1%および 3%の混練フィルムの破断伸度が PLA のみのフィルムよりも大きかったのは、焼成貝殻粉末のフィルム中への分散が不十分であったためと考えられる。

焼成貝殻の混練割合が 5%および 10%の混練フィルムでは、PLA のみのフィルムと比較して破断強度および破断伸度は低下した。これは、混練割合の増加と共に、PLA フィilm 中にできる空隙等のウィークポイントが増加したためであると考えられる。

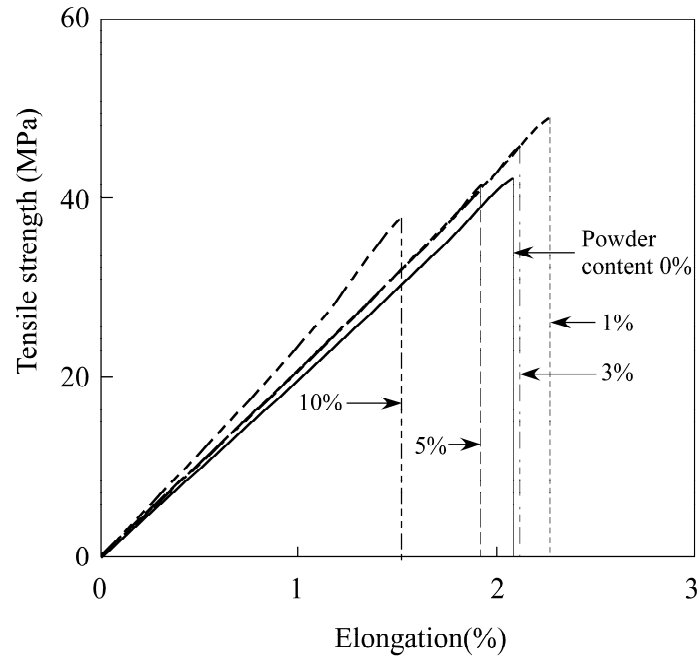


Fig. 2-1 Stress-strain curve of PLA blended with baked shell powder.

Table 2-1 Mechanical properties of PLA blended with baked shell powder.

	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Young's modulus (GPa)
PLA	42.2	2.07	2.03
PLA with 1 % powder	49.0	2.26	2.19
PLA with 3 % powder	46.1	2.10	2.20
PLA with 5 % powder	41.8	1.91	2.20
PLA with 10 % powder	38.0	1.53	2.45

2. 3. 2 融解・結晶化挙動

Fig. 2-2 に混練フィルムの DSC 測定結果を示す。その結果、PLA のみのフィルムでは、ガラス転移点、結晶化温度および融点はそれぞれ 62.2 °C、120.7 °C および 160.7 °C であったのに対し、焼成貝殻粉末の混練割合が 1%、5%、10%、20%、および 40% の混練フィルムのガラス転移点、結晶化温度および融点はそれぞれ(混練割合 1%) : 62.8 °C、122.8 °C および 160.7 °C; (5%) : 62.6 °C、122.7 °C および 161.2 °C; (10%) : 62.0 °C、120.8 °C および 161.2 °C; (20%) : 62.2 °C、122.6 °C および 160.9 °C; (40%) : 62.8 °C、122.1 °C、および 160.2 °C であった。

本実験は加熱曲線であるものの、結晶化ピーク温度が約 2 °C 上昇したことから、焼成貝殻粉末が結晶核剤として機能した可能性が考えられる。また、ガラス転移温度、融点には、大きな変化は見られなかった。さらに、融点のピークは、粉末の混練割合の上昇とともに低下したが、これは混練フィルム中に占める PLA の割合が相対的に減少したためであると考えられる。

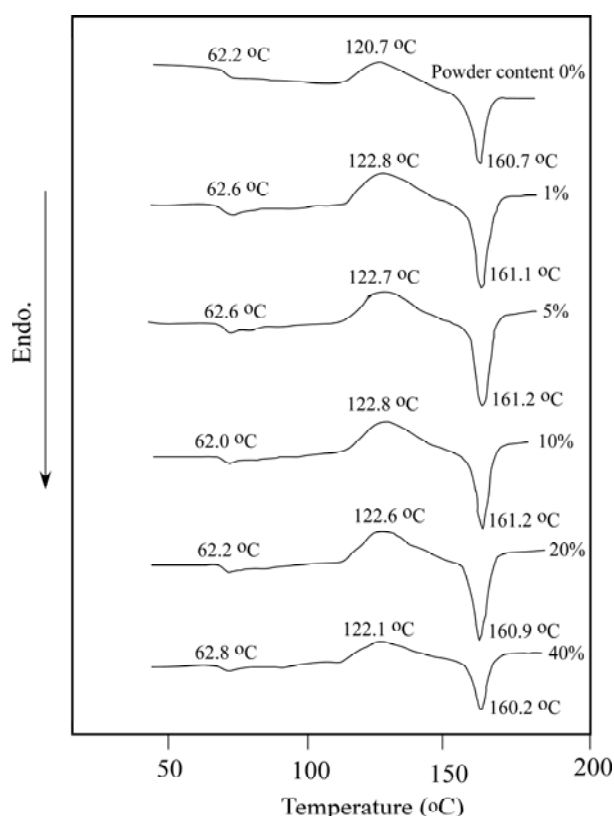


Fig. 2-2 DSC thermograms (second-run heating) of PLA films blended with various contents of baked shell powder.

2. 3. 3 動的粘弾性測定

動的粘弾性試験では、試料の作製条件が DSC 測定の試料とは異なり、熱分解の影響が考えられるため、測定前に分子量を測定した。Table 2-2 に、動的粘弾性試験で使用した各試験片の重量平均分子量を、Fig. 2-3 には、分子量の分散を示す。焼成貝殻粉末を混練した試験片は PLA のみの試験片より分子量の低下と分散が大きく、特に焼成貝殻粉末を充填すると分子量ピークの非対称性が増し、低分子量 PLA の割合が増加した。

焼成貝殻粉末の混練により、成形時における PLA の熱分解や、試験片中への水分の拡散が促進されたと考えられる。また、タルクを混練した試験片よりも、焼成貝殻を混練した試験片の分子量低下が著しいことから、アルカリ加水分解も起こると考えられる。

Table 2-2 Number - average molecular weight M_n , weight- average molecular weight M_w and polydispersity index (PDI, M_w/M_n) for PLA, PLA blended with 5% of talc powder or 5% of baked shell powder.

Sample	M_n	M_w	PDI
PLA	5.9×10^4	9.1×10^4	1.53
PLA with talc	4.0×10^4	8.6×10^4	2.16
PLA with baked shell	3.3×10^4	7.7×10^4	2.36

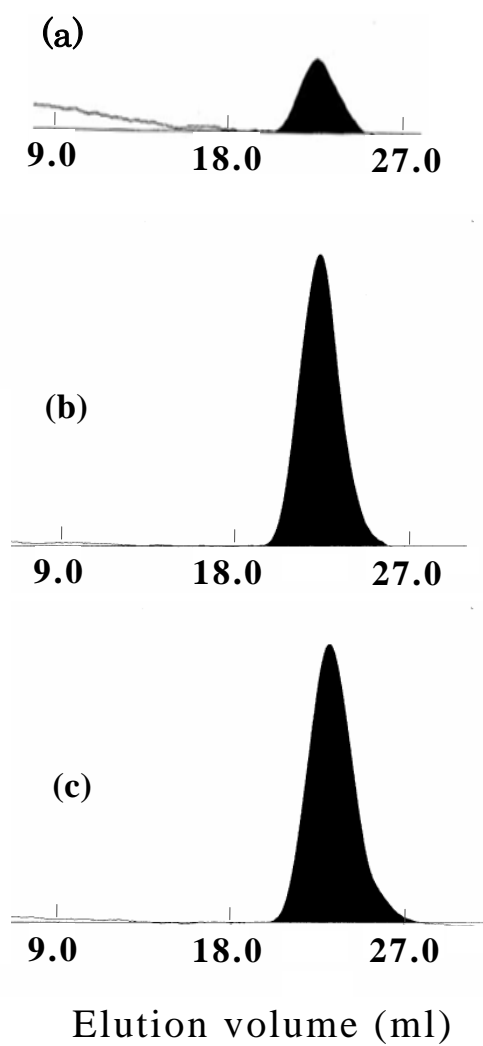


Fig. 2-3 Gel permeation chromatograms of PLA (a), PLA blended with 5% of talc powder (b) and PLA blended with 5% of baked shell powder (c).

Fig. 2-4 に PLA に焼成貝殻粉末、タルク粉末を各 5% 混練した試験片について、 E' と $\tan \delta$ の温度依存性を測定した結果を示す。未充填のサンプルも含めて全ての $\log E'$ プロファイルは 60°C 以下および 120°C 以上の温度範囲で平坦となり一致した。 $60\sim 100^\circ\text{C}$ では E' が急激に低下し、粉末を混練した場合の方が若干、低下開始温度が低くなった。 $100\sim 120^\circ\text{C}$ においては PLA の結晶化によって E' が急激に増加するが、粉末を充填すると、 E' の増加割合は大きくなった。また、タルクを混練した系の方が焼成貝殻の場合に比べて若干、 E' の増加割合は大きかった。一方、 $\tan \delta$ のピーク強度は焼成貝殻粉末を充填した試験片において PLA のみやタルク粉末を充填した試験片よりも低くなり、ピーク温度は PLA のみの試料が 79°C で、タルク粉末混練試料、焼成貝殻混練試料はともに 75°C であり、粉末の種類によらず 4°C 低下した。

フィラーの粒径が小さく、添加量が多いほど、マトリックスとの接触面積が増大し、相互作用が強くなる。その結果、マトリックスが拘束され、 E' の値は高くなることが報告されている[18-19]。しかし、本実験で用いた粉末の粒径の大きさ、および充填量では PLA 分子鎖の運動性への影響はほとんど無かったと考えられる。また、結晶化による E' の増加割合が大きくなることから焼成貝殻粉末およびタルク粉末は共に核生成剤として機能していると考えられる。

$\tan \delta$ のピーク強度は、マトリックスの運動単位を反映し、フィラー充填によるマトリックス分率の減少と、さらにフィラーとマトリックスとの相互作用によるマトリックスの運動性低下によって低下する[20]。例えば、永田らは、疎水鎖がポリプロピレン、極性鎖が官能基としてカルボン酸を有したポリアクリレートのブロックポリマーにアルカリ性表面を持つフィラーを充填すると酸塩基反応によってポリマーの分子鎖が強く拘束され、 $\tan \delta$ のピーク強度が低下することを報告している[21]。本実験においても焼成貝殻粉末を混練した PLA サンプルの $\tan \delta$ ピーク強度低下は、焼成貝殻と PLA の酸塩基反応によって PLA の分子鎖が拘束されたためと考えられる。

一方、粉末を充填した試料における $\tan \delta$ のピーク温度の低下は、mechanical coupling effect によるものと考えられる。また、吸湿等によるマ

トリックスの可塑化により低下することが知られている [22]。このことから、焼成貝殻粉末やタルク粉末による水分の吸湿によっても、 $\tan \delta$ のピーク温度が低下したと考えられる。

前述の DSC 測定では、焼成貝殻粉末の混練によるガラス転移温度の変化は小さかった。これは、フィルムを成形してから測定を行うまでの間に PLA の結晶化が進んだためである可能性が考えられる。さらに、 $\tan \delta$ のピーク温度は材料のガラス転移温度に対応するが、DSC 測定の結果よりも高くなった。これは、動的粘弾性測定時に設定した昇温速度 ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) に対して、試料の昇温速度は緩やかだった可能性が考えられる。

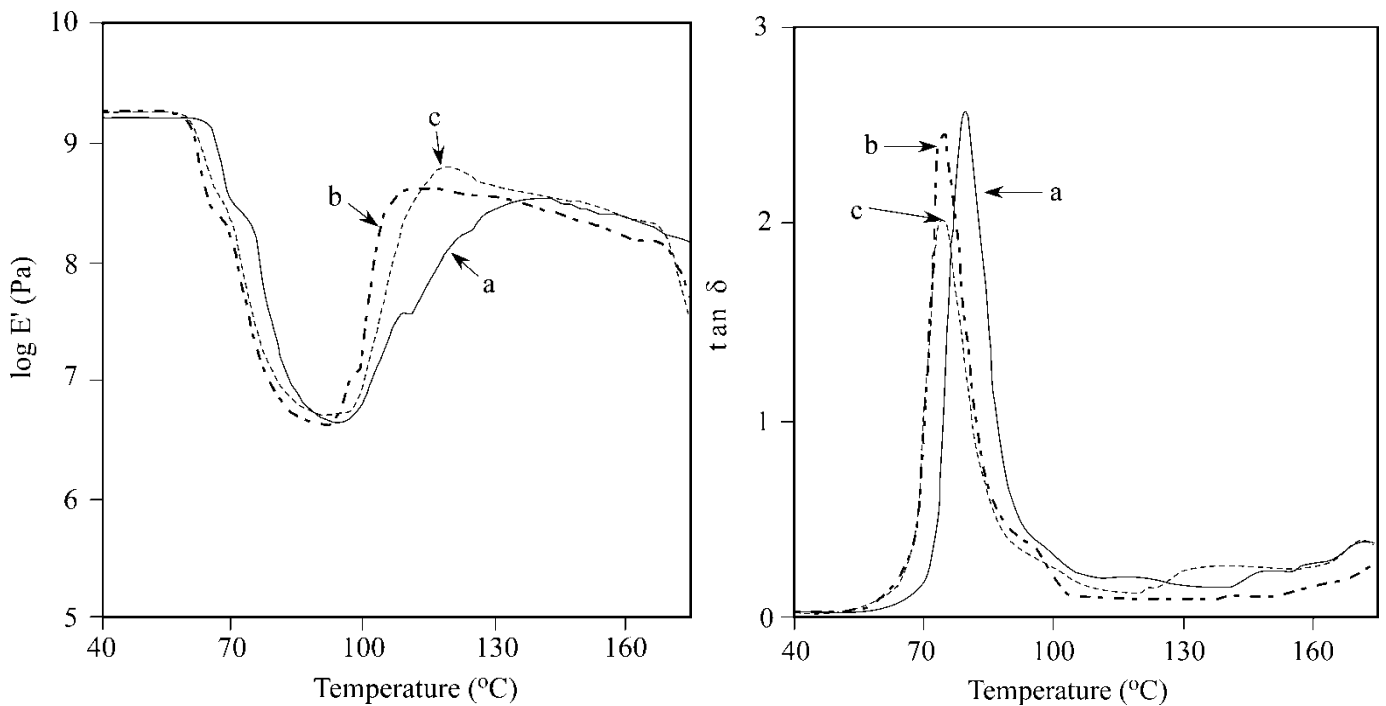


Fig. 2-4 Temperature dependency for the logarithm of storage modulus E' and $\tan \delta$. a: PLA; b: PLA blended with 5% of talc powder; c: PLA blended with 5% of baked shell powder.

2. 3. 4 焼成貝殻および PLA フィルムの抗菌性

Table 2-3 に、焼成貝殻粉末を付着した綿布および PLA フィルムの、黄色ブドウ球菌および肺炎かん菌に対する抗菌性評価の結果を示す。比較試料として使用した綿布およびポリエステル布上の生菌数はそれぞれ 1.89×10^6 個および 1.89×10^6 個(黄色ブドウ球菌)、 4.98×10^7 個および 4.98×10^7 個(肺炎かん菌)であったが、焼成貝殻粉末を付着した綿布および PLA フィルム上では、どちらの菌種も生育が認められなかった。

また、焼成貝殻粉末及び PLA フィルムの静菌活性値はそれぞれ 4.97 および 5.28 (黄色ブドウ球菌)、5.37 および 6.70 (肺炎かん菌)であり、殺菌活性値はそれぞれ 2.85 および 2.83 (黄色ブドウ球菌)、2.98 および 3.10 (肺炎かん菌)であった。

社団法人繊維評価技術協議会による抗菌防臭加工繊維製品の認証基準は、静菌活性値が 2.2 以上である [23]。また、制菌加工繊維製品の認証基準は殺菌活性値が 0 以上である [24]。このことから、焼成貝殻粉末および PLA フィルムは、繊維製品とは異なるものの、ともに黄色ブドウ球菌、肺炎かん菌に対して抗菌性を有することが示された。

Table 2-3 Viable cell count of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* on cotton fabric with baked shell powder (A) and PLA film (B) after incubation for 18 hours at 37 °C.

(A)

Sample Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Viable cell count (cfu)	Bacteriostati c activity	Bacteriocidal activity	Viable cell count	Bacteriostati c activity	Bacteriocidal activity
Cotton fabric	9.52×10^5	-	-	2.37×10^6	-	-
Cotton fabric with baked shell powder	<10	4.97	2.85	<10	5.37	2.98

Viable cell count of inoculated bacteria (cfu) : 7.16×10^3 (*Staphylococcus aureus*), 9.49×10^3 (*Klebsiella pneumoniae*).

(B)

Sample Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Viable cell count (cfu)	Bacteriostati c activity	Bacteriocidal activity	Viable cell count	Bacteriostati c activity	Bacteriocidal activity
Polyester fabric	1.89×10^6	-	-	4.98×10^7	-	-
PLA film	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10

Viable cell count of inoculated bacteria (cfu) : 6.80×10^3 (*Staphylococcus aureus*), 1.27×10^4 (*Klebsiella pneumoniae*).

Table 2-4 (A)には、混練フィルムをエタノール滅菌処理した後の黄色ブドウ球菌および肺炎かん菌に対する抗菌性評価の結果を、Table 2-4 (B) には、混練フィルムをオートクレーブ処理した後に同様の菌種に対する抗菌性評価の結果を示す。エタノール滅菌処理を行った場合には焼成貝殻粉末の混練量にかかわらず、全てのフィルムで黄色ブドウ球菌および肺炎かん菌の生育は見られなかった。この時、静菌活性値および殺菌活性値も全てのフィルムでそれぞれ 5.28 および 2.83 (黄色ブドウ球菌)、6.70 および 3.10 (肺炎かん菌) であった。

しかし、オートクレーブ処理を行った場合は、焼成貝殻粉末の混練割合が 1%、5%、10%、および 40%の混練フィルムでは生菌数はそれぞれ 2.03×10^5 個、 1.65×10^6 個、 1.14×10^6 個および 1.31×10^6 個(黄色ブドウ球菌)、 3.00×10^6 個、 4.34×10^7 個、 4.65×10^7 個および 4.76×10^7 個(肺炎かん菌) であった。また、静菌活性値はそれぞれ 0.97、0.06、0.22 および 0.16 (黄色ブドウ球菌)、1.22、0.06、0.03 および 0.02 (肺炎かん菌) であった。さらに、殺菌活性値はそれぞれ -1.47、-2.38、-2.24 および -2.29 (黄色ブドウ球菌)、-2.37、-3.53、-3.56 および -3.57 (肺炎かん菌) であった。

比較試料であるポリエステル布上の生菌数が 1.89×10^6 個(黄色ブドウ球菌) および 4.98×10^7 個(肺炎かん菌) であることを考慮すると、オートクレーブ処理により、混練フィルムでは抗菌性が著しく低下することがわかる。

Table 2-4 Viable cell count of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* on PLA film blended with baked shell powder after incubation for 18 hours at 37 °C. PLA film was sterilized by ethanol (A) or autoclave treatment (B).

(A)

Sample Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Viable cell count (cfu)	Bacteriostatic activity	Bacteriocidal activity	Viable cell count	Bacteriostatic activity	Bacteriocidal activity	
Polyester fabric	1.70×10^6	-	-	4.26×10^7	-	-	
PLA film							
	0	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10
Baked shell content (%)	1	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10
	5	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10
	10	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10
	40	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10

(B)

Sample Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Viable cell count (cfu)	Bacteriostatic activity	Bacteriocidal activity	Viable cell count	Bacteriostatic activity	Bacteriocidal activity	
Polyester fabric	1.89×10^6	-	-	4.98×10^7	-	-	
PLA film							
	0	<10	5.28	2.83	<10	6.70	3.10
Baked shell content (%)	1	2.03×10^5	0.97	-1.47	3.00×10^6	1.22	-2.37
	5	1.65×10^6	0.06	-2.38	4.34×10^7	0.06	-3.53
	10	1.14×10^6	0.22	-2.24	4.65×10^7	0.03	-3.56
	40	1.31×10^6	0.16	-2.29	4.76×10^7	0.02	-3.57

Viable cell count of inoculated bacteria (cfu) : 6.80×10^3 (*Staphylococcus aureus*), 1.27×10^4 (*Klebsiella pneumoniae*).

Table 2-5 は、オートクレーブ処理前後の PLA フィルムの分子量を表している。PLA フィルム成形時の数平均分子量および重量平均分子量はそれぞれ 5.7×10^4 および 8.5×10^4 であったが、オートクレーブ処理によりそれぞれ 3.2×10^4 および 5.8×10^4 に低下した。混練フィルム成形時の数平均分子量および重量平均分子量はそれぞれ(混練割合 1 %): 4.7×10^4 および 8.7×10^4 ; (5 %): 3.9×10^4 および 7.8×10^4 ; (10 %): 4.3×10^4 および 8.1×10^4 であったのに対し、オートクレーブ処理後の数平均分子量および重量平均分子量はそれぞれ(1 %): 3.0×10^4 および 5.7×10^4 ; (5 %): 3.0×10^4 および 5.2×10^4 ; (10 %): 2.5×10^4 および 4.6×10^4 に低下した。

さらに、Fig.2-5 に、焼成貝殻の混練割合が 5 % の混練フィルムについて、オートクレーブ処理前後の表面の様子を示す。オートクレーブ処理により、フィルム表面は処理前よりも表面が粗くなり、亀裂も観察された。

PLA は分子量が低いほど末端基数が相対的に増加し、吸水率が増加する [25-27]。また、Mohd-Adhan らは、PLA フィルムのオートクレーブ処理を行うと、処理温度が高いほど、また処理時間が長いほどフィルム内部に水分が入りやすくなり、加水分解による分子量低下が著しくなることを報告している [28]。本実験でも、オートクレーブ処理によってフィルム中に水分が拡散しやすくなる。その際、焼成貝殻と PLA の加水分解により生じた乳酸との中和効果によって両方の抗菌性が弱められたと考えられる。一方、エタノールで滅菌した場合、フィルム中に水分が拡散しにくいために、このような中和効果は起こらず、抗菌性が維持されたと考えられる。

Table 2-5 Number - average molecular weight M_n , weight- average molecular weight M_w and polydispersity index (PDI, M_w/M_n) for PLA film blended with before or after autoclave treatment.

	Baked shell content (%)	M_n	M_w	PDI
Before autoclave	0	4.1×10^4	8.2×10^4	2.00
	1	4.7×10^4	8.7×10^4	1.85
	5	3.9×10^4	7.8×10^4	2.00
	10	4.3×10^4	8.1×10^4	1.88
After autoclave	0	3.1×10^4	5.7×10^4	1.84
	1	3.0×10^4	5.7×10^4	1.90
	5	3.0×10^4	5.2×10^4	1.73
	10	2.5×10^4	4.6×10^4	1.84

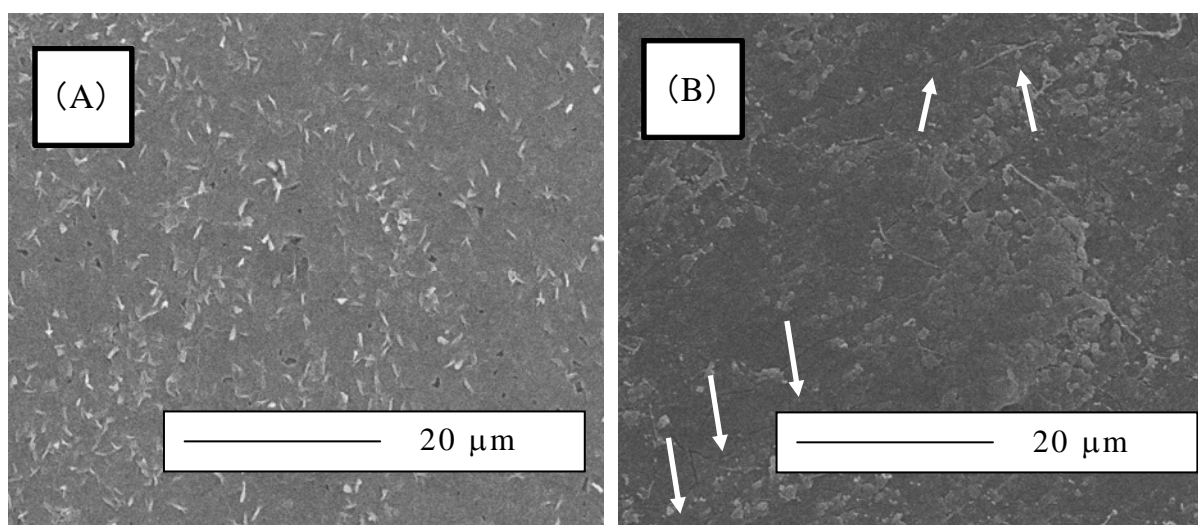


Fig. 2-5 Surface of PLA film blended with 5% of baked shell powder before (A) and after (B) autoclave treatment. Cracks were pointed by white arrows.

2. 3. 5 熱分解挙動

Fig. 2-6 に焼成貝殻を混練した PLA フィルムの熱分解挙動を示す。PLA のみのフィルムの場合、334 °C で 5% の重量減少を生じたのに対し、焼成貝殻を 5 % 混練すると、309 °C で、さらに 10% 混練すると 288 °C で 5% の重量減少を生じ、焼成貝殻の混練割合増加に伴い PLA の熱分解温度が低下した。

PLA 合成触媒である亜鉛やスズ化合物が存在する場合、熱分解の触媒として作用することが知られている [29-30]。焼成貝殻には主成分の酸化カルシウムの他にも様々な微量ミネラルが含まれており [31]、これらの触媒効果によって熱分解温度が低下した可能性がある。また、PLA は、分子量が小さいほど熱分解温度が低下する [32]。本実験でも、吸湿性の高い焼成貝殻の存在により、フィルム中に水分が入り込み、アルカリ加水分解によって分子量が低下したために、分解温度が低下した可能性が考えられる。

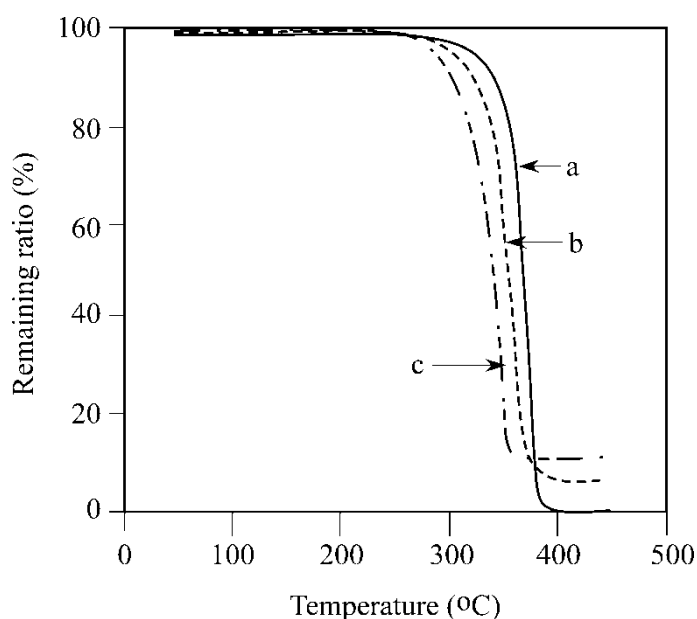


Fig. 2-6 TGA curves of PLA (a), PLA blended with 5% of baked shell powder (b) and PLA blended with 10% of baked shell powder (c).

2. 3. 6 アルカリ加水分解挙動

Fig. 2-7に混練フィルムのアルカリ加水分解性を示す。PLAのみのフィルムは6日で重量が70%減少したが、時間経過とともに、その重量減少速度は低下した。一方、混練フィルムでは、焼成貝殻粉末の混練割合増加に伴い、その重量減少速度は高くなった。

一方、煮沸により溶存二酸化炭素を除去した後37℃まで冷却した蒸留水にPLAフィルムを14日間浸漬すると、蒸留水のpHは約4.0に低下した。しかし、焼成貝殻を混練した場合、pHは7.0で、ほとんど変化しなかった。

PLAのみのフィルムにおいて見られた重量減少速度の低下は、PLAの加水分解で生じた乳酸により溶液のpHが低下し、アルカリ加水分解が阻害されたためであると考えられる。一方、混練フィルムでは、乳酸によるpH低下が抑制され、また、焼成貝殻によるアルカリ加水分解も受けると考えられる。また、PLAのアルカリ加水分解は材料表面から進行し、表面積が大きいほど分解速度も高くなる[33]。このため、焼成貝殻粉末の混練によるフィルム表面積の増加も加水分解が促進された要因の一つであると考えられる。

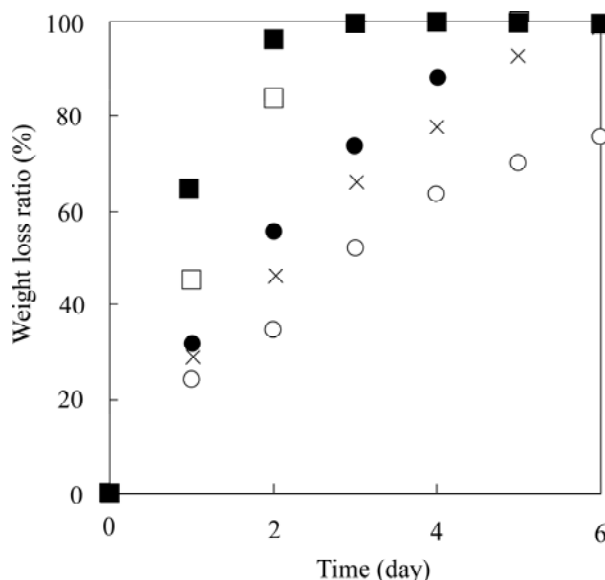


Fig. 2-7 Weight loss curves of PLA films blended with baked shell powder by alkaline degradation experiment.

○:PLA, ×:PLA with 1% of baked shell powder, ●:PLA with 3% of baked shell powder, □:PLA with 5% of baked shell powder, ■:PLA with 10% of baked shell powder.

2. 3. 7 PLA 分解酵素による分解挙動

混練フィルムを PLA 分解酵素 proteinase K の溶液に浸漬した場合の重量変化を Fig. 2-8(A)に、分子量変化を Fig. 2-8(B)に示す。焼成貝殻粉末の混練割合が増加するにつれ、混練フィルムの重量減少速度および分子量低下速度は大きくなり、酵素溶液中に 6 日間浸漬した後の PLA のみのフィルムの重量平均分子量は 8.0×10^4 から 6.7×10^4 に低下し、焼成貝殻粉末の混練割合が 1%、3%、5% および 10% の混練フィルムはそれぞれ 4.6×10^4 、 4.1×10^4 、 3.2×10^4 、および 2.2×10^4 に低下した。

一方、PLA 分解酵素を除いて同様の操作を行った場合は、混練フィルムも含めて重量減少はほとんど認められなかった。

さらに、Fig. 2-9 に酵素分解試験前および酵素溶液に浸漬して 5 日経過した後の PLA のみのフィルム、および焼成貝殻粉末の混練割合が 5% の混練フィルムの電子顕微鏡像を示す。混練フィルムでは、5 日間の酵素溶液中への浸漬によってフィルム表面だけでなく、断面にも無数の空隙が観察され、PLA 内部でも加水分解が引き起こされることが分かる。

PLA の酵素分解は表面から進行することが知られている [33]。また、PLA に親水性の無機フィラーを混練すると、フィラーと PLA マトリックスの境界面からも加水分解が起こる [34]。本実験でも、混練フィルムでは proteinase K によって、最初に表面が分解し、内部の焼成貝殻粉末が露出する。その結果、焼成貝殻粉末と PLA マトリックスとの境界から水分や酵素が侵入するため、酵素による分解だけでなく、焼成貝殻によるアルカリ加水分解が起こると考えられる。さらに、分解が進行すると、焼成貝殻粉末の崩落により表面積の増大が起き、さらに PLA の加水分解が促進されると考えられる。

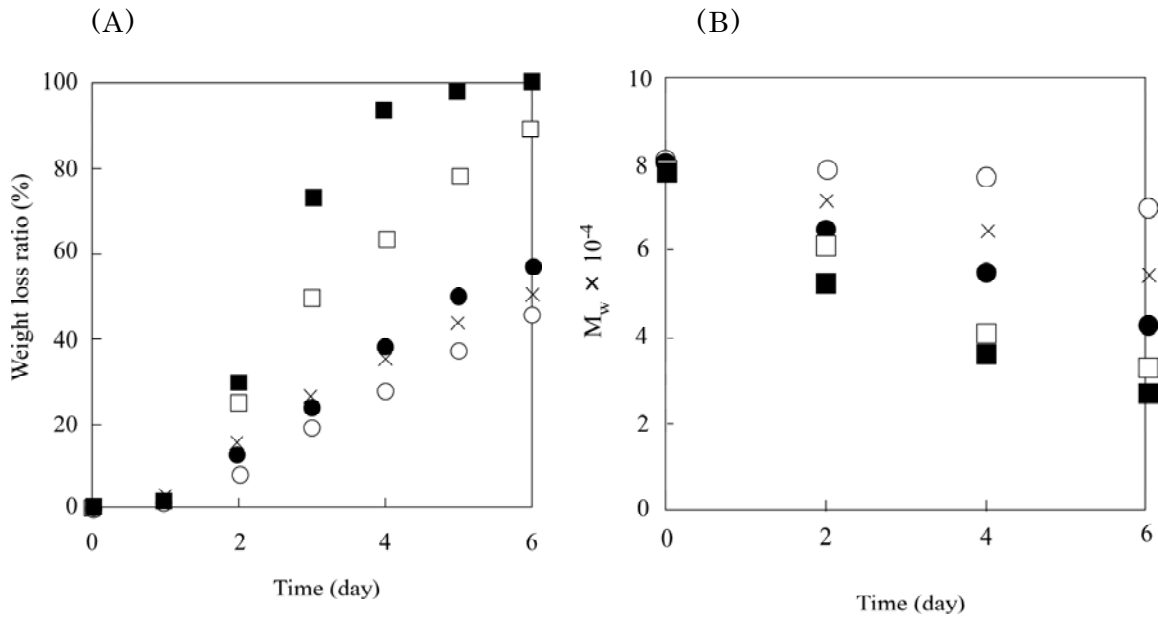


Fig. 2-8 Weight loss curves (A) and the molecular weight change (B) of PLA films blended with baked shell powder during enzymatic degradation.

○:PLA, ×:PLA with 1% of baked shell powder, ●:PLA with 3% of baked shell powder, □:PLA with 5% of baked shell powder, ■:PLA with 10% of baked shell powder.

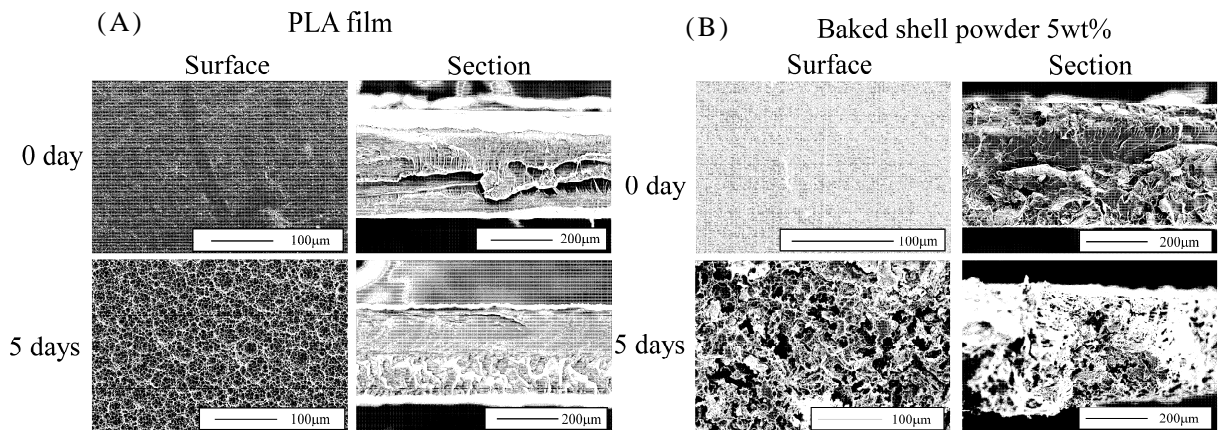


Fig.2-9 Surface and section of PLA film (A) and PLA film blended with 5% of baked shell powder (B) during enzymatic degradation.

2. 3. 8 土壌中での分解挙動

Fig. 2-10 に土壌埋設試験による PLA の重量平均分子量の変化を示す。埋設後 24 ヶ月後には、PLA のみのフィルムの重量平均分子量が 6.1×10^4 であったものが、焼成貝殻粉末の混練割合が 3%、5% および 10% の混練フィルムでは、重量平均分子量は、それぞれ 6.1×10^4 、 5.6×10^4 および 5.2×10^4 であり、焼成貝殻混練による加水分解効果は極わずかであった。

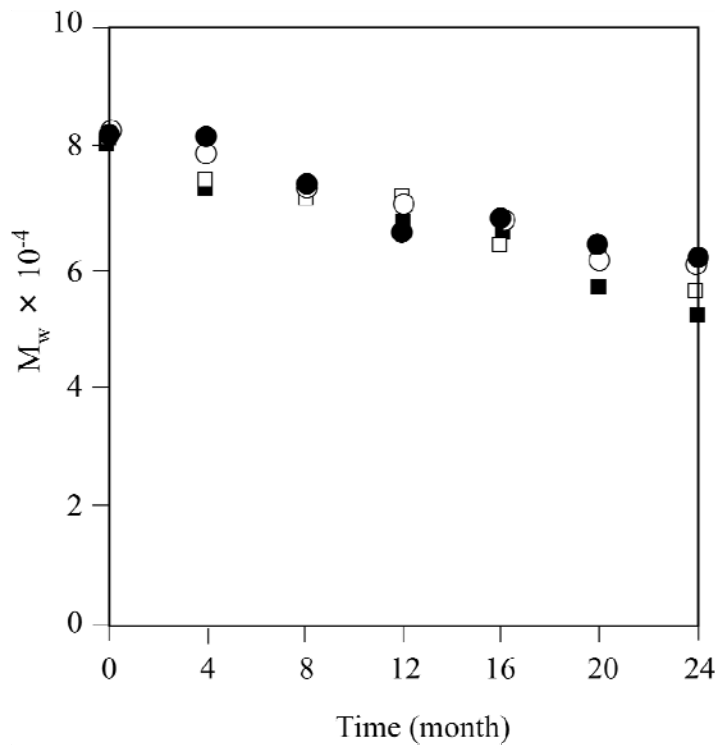


Fig. 2-10 Changes in the molecular weight of PLA films blended with baked shell powder during the degradation in the soil conditioned at 25°C, water content of 40~45%.

○:PLA, ●:PLA with 3% of baked shell powder, □:PLA with 5% of baked shell powder, ■:PLA with 10% of baked shell powder.

2. 3. 9 模擬コンポスト中での分解挙動

模擬コンポスト試験による PLA フィルムの重量変化を Fig. 2-11(A)に、重量平均分子量の変化を Fig.2-11(B)に、数平均分子量の変化を Fig.2-11(C)示す。PLA のみのフィルムでは、埋設後 20 日目で 12.6%の重量減少を生じ、重量平均分子量および数平均分子量はそれぞれ 3.9×10^4 および 1.8×10^4 に低下した。一方、焼成貝殻粉末の混練割合が 3%、5%および 10%の混練フィルムでは、重量減少割合はそれぞれ 27.4%、79.1%および 95.6%、重量平均分子量はそれぞれ 3.0×10^4 、 1.2×10^4 および 8.7×10^3 、数平均分子量はそれぞれ 1.6×10^4 、 5.6×10^3 および 3.4×10^3 であった。また、混練割合が 5%および 10%の混練フィルムでは、埋設後 10 日目までは、PLA のみのフィルムと同程度に分子量は低下したが、それ以降は急激な重量減少と分子量低下を生じた。

高い温度条件、特にガラス転移温度以上では、水分が PLA 内部に拡散しやすくなり、加水分解速度が高まる [35-36]。このため、模擬コンポスト試験では、土壌埋設試験よりも PLA の加水分解速度が高くなると考えられる。

埋設後 10 日目以降では、焼成貝殻粉末の混練割合が 5%および 10%の混練フィルムの重量減少割合が急激に増加したが、これはフィルムの崩壊と焼成貝殻粉末の剥落によるものと考えられる。

また、コンポスト中では、自己触媒的な加水分解により、PLA の数平均分子量は対数的に低下することが知られている [37]。このことから、埋設後 10 日目までは、焼成貝殻粉末を混練した PLA フィルムも、自己触媒的な加水分解により、分子量が低下すると考えられる。

さらに、PLA のみのフィルムの数平均分子量変化をもとに、分子量近似曲線を作成した (Fig. 2-11(C)中の実線)。その結果、埋設後 20 日目の数平均分子量の推定値は、 1.7×10^4 であった。しかし、焼成貝殻粉末の混練割合が 5%および 10%の混練フィルムの数平均分子量は、この推定値よりも著しく低かった。このことから、焼成貝殻粉末の混練割合が 5%および 10%の混練フィルムで起きた急激な分子量低下は、フィルムの崩壊による表面積の増加や、焼成貝殻によるアルカリ加水分解が原因であると考えられる。

この他、PLA の加水分解で生成した乳酸が焼成貝殻により中和され、模擬コンポスト中の PLA 分解菌の生育が阻害されにくくなった可能性もある。

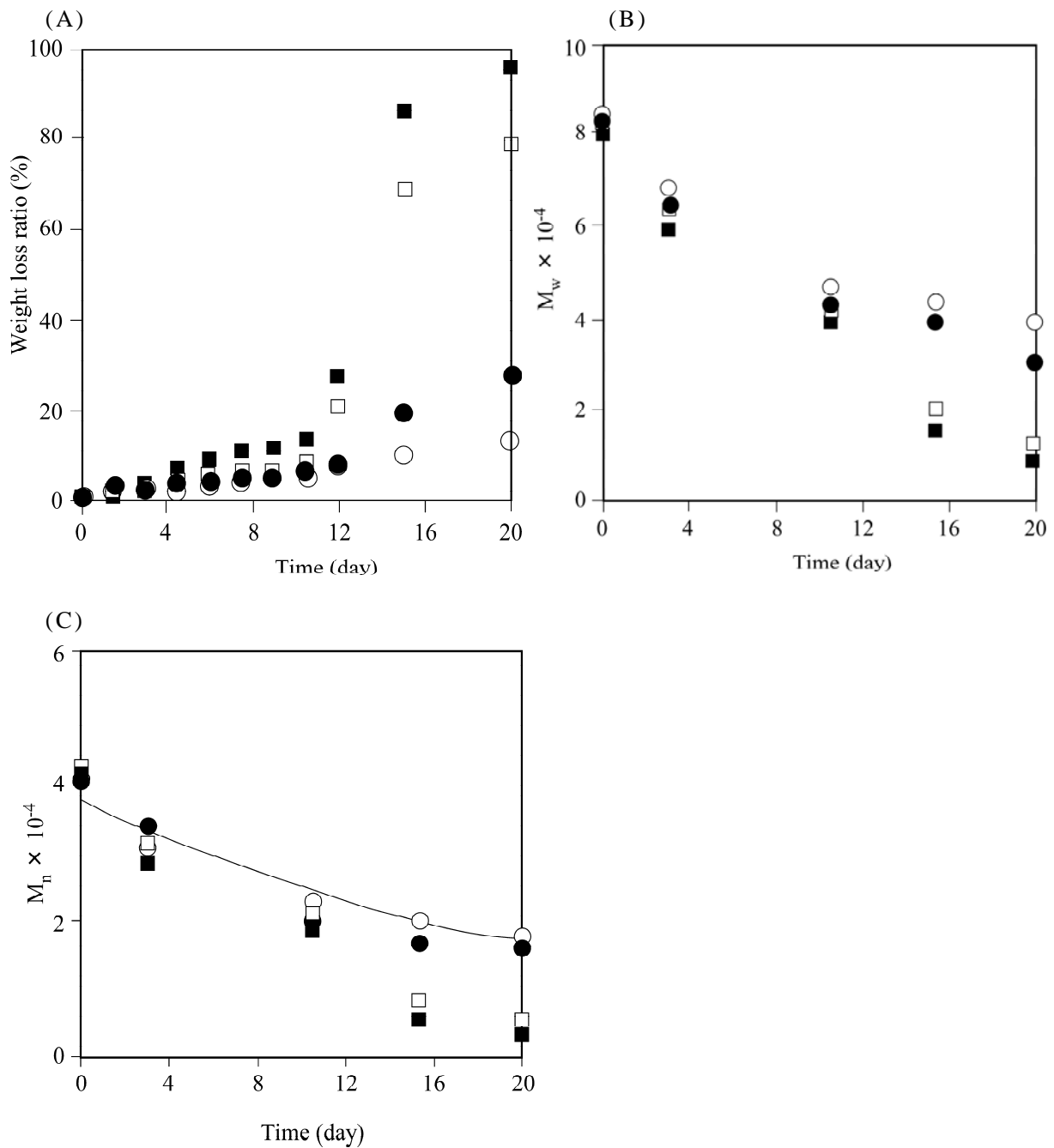


Fig. 2-11 Weight loss (A), weight-average molecular weight change (B) and number-average molecular weight change (C) of PLA films blended with baked shell powder during the degradation in the soil conditioned at 58°C, water content of 40~45%. Solid line: exponential fit to number-average molecular weight change.

○:PLA, ●:PLA with 3% of baked shell powder, □:PLA with 5% of baked shell powder, ■:PLA with 10% of baked shell powder.

2. 4 結論

焼成貝殻粉末の混練による PLA の熱的性質、強伸度、熱分解挙動、抗菌性、アルカリ加水分解挙動および生分解挙動への影響について検討した。

その結果、焼成貝殻粉末を PLA フィルムに混練することにより、PLA の抗菌性が著しく低下した。また、アルカリ加水分解速度、酵素分解およびコンポスト分解速度が向上した。さらに、若干ではあるが、焼成貝殻粉末の混練による熱分解の促進、補強効果と結晶化促進も見られた。

以上のことから、焼成貝殻粉末を PLA に混練することによって、コンポスト化が容易になることが示唆された。

文献

1. K. G. Ho, A. L. Pommet III and P. N. Hinz, *J. Environ. Polym. Degr.*, **7**, 83-92(1999)
2. S. Schmidt and N. Padukone, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 10-14(1997)
3. O. D. Cabaret, B. M. Vaca and D. Bourissou, *Chem. Rev.*, **104**, 6147-6176(2004)
4. Y. Tokiwa and B. P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 244-251(2006)
5. S. Vainionpaa, P. Rokkanen and P. Tormall, *Prog. Polym. Sci.*, **14**, 679-716(1989)
6. B. Gupta, N. Revagade and J. Hilborn, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 455-482(2007)
7. H. Tsuji and Y. Ikada, *J. Polym. Sci.: Part A, Polym. Chem.*, **36**, 59-66(1998)
8. 辻秀人, 生分解性高分子材料の科学(2002), p6, コロナ社
9. 望月政嗣, 村瀬繁満, 松永伸洋, *繊維学会誌*, **62**, 323-329(2006)
10. 檜山圭一郎, 小林修, 畠中芳郎, 岡田正夫, 小原仁実, *防菌防黴*, **29**, 153 -159(2001)
11. Y. Tokiwa and A. Jarerat, *Biotechnol. Lett.*, **26**, 771-777(2004)
12. J. Sawai, H. Shiga and H. Kojima, *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 211-218(2001)
13. M. L. Bari, H. Kusunoki, H. Furukawa, H. Ikeda, K. Isshiki and T. Uemura, *J. Food. Protect.*, **62**, 128-132(2002)
14. M. L. Bari, Y. Inatsu, S. Kawasaki, E. Nazuka and K. Isshiki, *J. Food Protect.*, **65**, 1706-1711(2002)
15. 澤井淳, 大橋沙由, 三好啓之, 四日洋和, *防菌防黴*, **35**, 3-11(2007)
16. J. Sawai, E. Kawada, F. Konou, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan and M. Shimizu, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **29**, 627-633(1996)
17. JIS L1902:2008 繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果
18. 正原和幸, 魚谷耕輔, 山根秀樹, *日本レオロジー学会誌*, **31**, 329-335 (2003)
19. 正原和幸, 魚谷耕輔, 山根秀樹, *日本レオロジー学会誌*, **32**, 79-84 (2004)
20. A. Dufresne, *Compos. Interfaces*, **7**, 53 -67(2000)
21. 永田員也, 日笠茂樹, 児子英之, 前川一彦, 吉原資二, 古宮行淳, 岡山県工業技術センター報告, **28**, 35-40 (2001)
22. M. Roohani, Y. Habibi, N. M. Belgacem, G. Ebrahim, A. N. Karimi and A. Dufresne, *Eur Polym J.* **44**, 2489 -2498(2008)
23. 社団法人繊維評価技術協議会, 抗菌防臭加工繊維製品認証基準, p4
24. 社団法人繊維評価技術協議会, 制菌加工繊維製品認証基準, p5
25. H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano and M. Kumakura, *Eur. Polym. J.*, **25**, 1019-1026(1989)
26. C. Shih, *J. Controll. Release*, **34**, 9-15(1995)
27. Y. Takagi, R. Yasuda, M. Yamaoka and T. Yamane, *J. Appl. Polym. Sci.*, **93**, 2363-2369(2004)
28. A. -F. Mohd-Adnan, H. Nishida and Y. Shirai, *Polym. Degrad. Stabili.*, **93**, 1053-1058(2008)
29. F. -D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, M. Möder and O. Wachsen, *Polym. Degrad. Stabili.*, **53**, 329-342(1996)

30. H. Abe, N. Takahashi, K. J. Kim, M. Mochizuki and Y. Doi. *Biomacromol.*, **5**, 1606 -1614(2004)
31. 下野功、菅原智明、大森幸子、山元明, 日本セラミックス協会年会講演予稿集, p165(2007)
32. 辻秀人, ポリ乳酸, p105, 米田出版
33. Y. Tokiwa and B. P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 244-251 (2006)
34. N. Fukuda, H. Tsuji and Y. Ohnishi, *Polym. Degrad. Stabili.*, **78**, 119-127(2002)
35. H. Tsuji and K. Ikarashi, , *Biomaterials*, **25**, 5449-5455 (2004)
36. 小原仁実, *防菌防黴*, **26**, 207-215 (1998)
37. X. Zhang, U. P. Wyss, D. Pichora and M. F. A. Goosen, *Bioact. Compat. Polym.*, **9**, 80-100(1994)

第3章 PLAの緑膿菌バイオフィルム形成阻害効果

3.1 緒言

土壌や水といった自然環境中では、多くの微生物は固体表面にバイオフィルムとして付着している[1-3]。バイオフィルムは微生物細胞、菌体外多糖(Exocellular polysaccharide : EPS)、タンパク質、核酸およびリン脂質などから構成されている[4-5]。バイオフィルムの構成成分のうち、EPSは最も多くを占める化合物であり、固体表面への微生物付着には不可欠である[1]。多くの生物種のEPSは、ポリアニオン性多糖類である[6]。微生物バイオフィルムは、そこに包接される微生物に対して、乾燥ストレス耐性を獲得する[7]。さらに、栄養分の保持能力[8]、細胞間情報伝達効率[9]、プラスミド安定性や遺伝子交換効率[10]などの向上をもたらす。

特に医療とバイオフィルムとの関係は、我々の健康に直接影響するという点から、非常に重要である。例えば代表的なバイオフィルム形成菌である緑膿菌は、いわゆる日和見感染菌であり、大きな病原性を有さないが、医療器具等にバイオフィルムとして付着した場合、微生物自身の薬剤抵抗性[11-14]を増大させ、結果的にその病原性を増すこととなる。

予防医学の観点からも、バイオフィルムの除去や形成防止に関する多くの研究例がある。例えば、ブラッシングなどの物理的除去[15]やアルギン酸分解酵素などのEPS分解酵素[16]、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤の添加[17]などが報告されている。しかしながら、これらの研究例の多くは、対症療法的な意味合いが強く、必ずしも有効な解決策となっていない。

緑膿菌のEPSは β -D-mannuroic acidのC2位およびC3位の一部がアセチル化したアルギン酸である。このアルギン酸は2価カチオン(自然環境中では主に Ca^{2+})存在下でゲル化し[18-22]、緑膿菌バイオフィルムの形成に重要な役割を果たす[23]。

ポリ乳酸(PLA)は人体に安全な乳酸から構成されており、生体適

合性も高いため、医用材料や環境材料として利用されている[24-25]。また、最近では、ポリ乳酸がカーボンニュートラルなバイオベースポリマーとしての側面からも注目を集めている。

一方で、我々の知る限り PLA 表面における緑膿菌バイオフィルム形成に関する研究報告例はない。そこで、本章では、まず、緑膿菌をモデルとし、PLA フィルム表面のバイオフィルム形成阻害効果について調べる。さらに、応用研究として、代表的な汎用性プラスチック材料の一つであるポリエチレン(以下、PE)とを加熱熔融混合したネット(以下、PLA-PE ネット)を製造し、その基本物性とバイオフィルム形成阻害効果についても検討する。

3. 2 実験方法

3. 2. 1 試薬

ポリ乳酸 (PLA) は三井化学製 LACEA H-400($M_n:6.4 \times 10^4$, $M_w:1.5 \times 10^5$)を使用した。また、ポリエチレンは、東ソー製低密度 PE ペトロセン 291R($M_n:1.9 \times 10^4$, $M_w:1.7 \times 10^5$) (LDPE)および高密度 PE ニボロンハード 5110($M_n:1.5 \times 10^4$, $M_w:1.4 \times 10^5$) (HDPE)を使用した。

3. 2. 2 試料作製

フィルムは、東洋精機社製 Hot press 機 mini TEST PRESS-10 を用い、180°C、3 min 間、150 atm の条件で高分子をフィルム状に熔融させた。その直後に、熔融フィルムを氷水中に入れて急冷して、成形した(100 mm×100 mm×0.2 mm)。

ネット作製には、LDPE、HDPE および PLA を重量比 87 : 3:10 の割合となるように混合し、関東エンジニアリング製押出成形機 MODEL E50-25BB を用いて、これをネット状に成形した。Fig. 3-1 に押出成形機の模式図を示す。押出成形機の押出機部分(C1~C4)およびダイ部分(D1~D2)の温度設定は C1:185 °C、C2:235 °C、C3:245 °C、C4:250 °C、D1:270 °C および D2:265 °C とした。回転ノズルから成形品が出てきた直後に、水槽に入れて冷却し、巻き取ったものを PLA-PE ネットとした。この時、紡糸口金には直径 0.5mm のホール

が 280 個あり、その回転速度を 42rpm とした。また、紡糸口金からの紡糸速度は 19.8g/s とした。成形直後に、ネットを 25°C の水槽中で急冷し、巻き取り速度 9m/s で巻き取った (Fig.3-1)。また、比較のため、同様の温度条件で LDPE を用いたネット (以下、PE ネット) を作製した。また、PLA-PE ネットから PLA を除去する場合は、PLA-PE ネット作製後に浴比 1:100 でクロロホルム溶液中に 24 時間浸漬した。

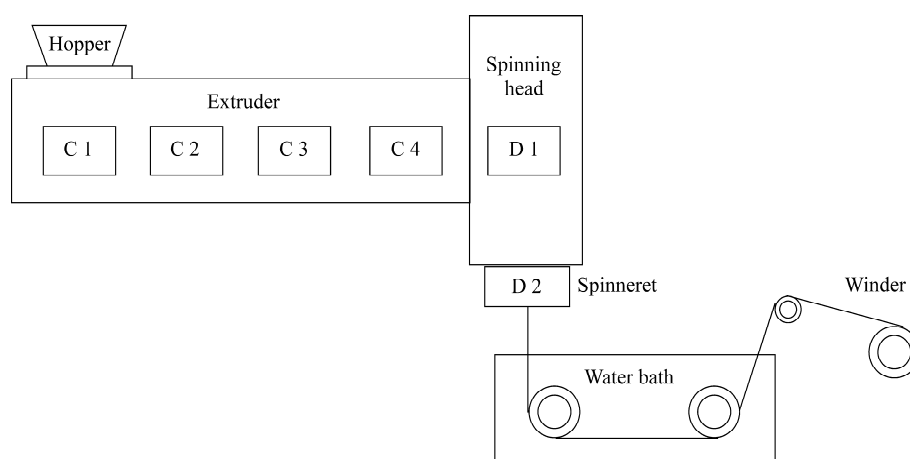


Fig. 3-1 Schematic diagram of extrusion molding system.

3. 2. 3 菌株および培地

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* IAM1275) は、IAM culture collection より入手した。

緑膿菌は、Mueller Hinton 液体培地 (MH 培地) (Difco; 0.2% beef extract, 1.75% acid hydrolysis of casein, 0.15% starch, final pH 7.3 ± 0.2 at 25°C) [26] で、好氣的に培養した。また、抗菌性試験では、DIFCO 製 Bacto Beef Extract 3g と、DIFCO 製 Bacto Peptone 5g とを加え、1000ml の蒸留水に溶解した培地 (以下、Nutrient 培地) [27] を使用した。また、固体培地は、寒天粉末を 1.5% (wt/vol) となるように上記培地に添加し作製した。

3. 2. 4 緑膿菌バイオフィルムの定量

MH 液体培地中に緑膿菌を接種し、37°C で、一晩好氣的に培養した。この緑膿菌培養液 50μl を、25cm² の大きさに裁断した各種高分

子フィルムおよびネットを含む液体 MH 培地 20ml 中に植菌した。37 °C で所定の時間静置培養した後、緑膿菌が付着した試料を新しいシャーレに移した。

高分子フィルムおよびネット表面の緑膿菌付着量の定量は Favre-Bonté らの方法 [28] に従った。バイオフィルムが付着した高分子フィルムおよびネットを 0.1% クリスタルバイオレット溶液 10ml 中に 10 分間保持した後、蒸留水 10ml 中で 2 回洗浄した。着色したフィルムおよびネットを 99.5% エタノール 10ml 中に 10 分間保持し、色素を遊離させた。遊離色素量は、日立製作所製分光光度計 UM-3300 を用いて、595nm における吸光度を測定した。この遊離色素量は、高分子フィルムおよびネット表面に付着した菌数に比例するため、これをバイオフィルム量とした。

3. 2. 5 高分子物性測定

ネットの破断点荷重、および破断伸度の測定はオリエンテック製 テンシロン RTF-1250 を用いて測定した。その際、クロスヘッドスピード 100mm/min、ゲージ長 100mm および試料幅を 50mm として、20 °C、相対湿度 65% の条件で行った。また、応力ひずみ曲線を作成し、ヤング率を算出した。

ネットの融解温度測定は島津製作所製 DSC-60 を用いて窒素雰囲気下、重量 3.5mg ± 0.1mg、加熱速度 5 °C /min、測定温度範囲 25 °C ~ 185 °C の条件で行った。また、PLA の平衡融解エンタルピーが 93J/g であることから [29]、PLA の結晶化度は以下の計算式により算出した。

$$X = 100 \times \Delta H_m / 93 / 0.1 \dots (1)$$

ここで、

X: PLA-PE ネット中の PLA の結晶化度 (%)

ΔH_m : PLA-PE ネット中の PLA の融解エンタルピー (J/g)

をそれぞれ表している。

PLA の分子量測定は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 測定装

置を使用した。GPC 装置は、日本分光製デガッサ (DG-2080-53)、ポンプ (PU-2080)、カラムオープン (CO-2065)、RI 検出器 (RI-2031) より構成されていた。カラムオープン温度 38 °C、流速 1.0 ml/min の条件で測定された。また、溶離液はクロロホルムを使用し、標準試料はポリスチレンを用いた。

3. 2. 6 抗菌性評価

抗菌性の評価は、JIS L1902「繊維製品の抗菌性試験方法」[27]を参考にして行われた。0.4g のネットを 99.5% エタノール中に 5 分間浸漬し、一晚室温にて乾燥させた。その後、 1.0×10^5 個/ml 程度の緑膿菌培養液 200 μ l と Nutrient 液体培地 25 μ l との混合溶液をネット上に滴下した。これを、37 °C で 18 時間静置保持した後、20ml の生理食塩水中にネットを浸漬した。さらに、微生物懸濁液の希釈系列を調製し、これを Nutrient 固体培地上に塗布した。37 °C で 48 時間平板培養した後、固体培地上のコロニー数を計数した。静菌活性値および殺菌活性値は、以下の計算式により算出された。

$$\text{静菌活性値} = \log (A / C) \quad (2)$$

$$\text{殺菌活性値} = \log (B / C) \quad (3)$$

ここで、A、B、C はそれぞれ

A: PE ネットに植菌し、37 °C で 18 時間培養した後の生菌数

B: PE ネットに植菌した直後の生菌数

C: PLA-PE ネットに植菌し、37 °C で 18 時間培養した後の生菌数をそれぞれ表している。

3. 2. 7 走査型電子顕微鏡観察

フィルムおよびネットの表面観察は Araujo らの方法 [30] を参考にして行われた。試料を 2.5% (wt/vol) グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.3) に 4 °C で一晚浸漬した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.3) で 3 回洗浄した。次に、これを 50%、70% および 90% (vol/vol) のエタノール溶液中で、順次 10 分間ずつ保持した後、99.5% (vol/vol) エタノール中で 10 分間ずつ 3 回保持した。次に、試料を関東化学製

ヘキサメチルジシラザンに 30 秒間ずつ 2 回浸漬し、10 分間室温で乾燥した。最後に、試料を、JEOL 製金蒸着装置 FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100 を用いて金蒸着した。処理済み試料を、日立製作所製走査型電子顕微鏡 S-2250N を用いて印加電圧 20kV でフィルム表面を観察した。

3. 2. 8 高分子表面に吸着したタンパク質定量

フィルム(1cm×1cm)5 枚を、5ml の 500 μ g/ml 牛血清アルブミン(BSA)/0.1M リン酸緩衝液(pH7.4)溶液(BSA 溶液)中に 25 °C で 1 時間、保持した。フィルムを取り除いた後、上清中の BSA 濃度を Bradford 法[31]により定量した。フィルム 1cm² 当たりの BSA 吸着量は以下の計算式によって算出した。

$$\text{吸着量}(\mu\text{g}/\text{cm}^2)=(500-A)\times 5/10 \quad (1)$$

ここで、A はフィルム浸漬後の上清中の BSA 濃度(μ g/ml)を表している。

3. 2. 9 接触角測定

協和界面科学製接触角計 CA-X 型を用い、液滴法によって高分子フィルム表面の水接触角を測定した。

3. 2. 10 pH 測定および乳酸濃度の定量

100ml の三角フラスコに 10ml の蒸留水を入れて沸騰させ、溶存 CO₂ を除去した。これを室温まで自然冷却した後、1g のフィルムあるいは 5g のネットを入れて密閉し、37°C で振とう(50 strokes/min)した。溶液の pH は、東亜 DKK 製 pH メーター HM-25R 型を用いて測定された。また、乳酸濃度を、Bio vision 製乳酸定量キットを用いて定量した。

3. 2. 11 乳酸水溶液中におけるアルギン酸カルシウムゲルの重量減少および遊離カルシウム濃度測定

2% (wt/vol)アルギン酸ナトリウム水溶液 (関東化学、M_w; 2.18×10⁵, M_n;1.31×10⁵) 5ml と 2% (wt/vol)塩化カルシウム水溶液 5ml を混合し、アルギン酸カルシウムゲルを作製した。この時、浸漬前の

ゲルに含まれる総カルシウム重量は 33.8mg であった。その後、このゲルを、0、0.01、0.1、0.5、および 1.0%(wt/vol)乳酸水溶液 10ml 中に加え、1 時間室温で保持し、既知乾燥重量の濾紙 No.1 で濾過した。80 °C で一晩乾燥し、再度濾紙の重量を測定した。ゲルの残存率は以下の式から求めた。

$$\text{残存率 (\%)} = W/W_0 \times 100 \quad (2)$$

ここで W_0 は浸漬前のアルギン酸カルシウムゲル乾燥重量を、 W は、アルギン酸カルシウムゲルを乳酸水溶液中に 1 時間浸漬した後、乾燥させたゲルの重量を表している。また、溶液中の遊離カルシウムイオン濃度を、Biochain 製 Calcium assay kit を用いて、遊離カルシウムと Phenolsulphonephthalein dye とのキレートによる 612nm の発色量として、定量した。

3. 2. 1 2 家庭厨芥を入れたネット上のバイオフィーム形成

5g のネットに群馬県の家庭で得られた食品廃棄物を 100g 入れ、37 °C、相対湿度 65% の条件下で 30 日間静置した。食品廃棄物を取り除いた後、ネットを 5cm 四方に裁断し、3. 2. 4 に記載された方法でネット表面に吸着したバイオフィームの量を定量した。

3. 2. 1 3 微生物群集構造(PCR-DGGE)解析

3. 2. 1 2 で使用したネットから家庭厨芥を取り除いた後、50ml の滅菌蒸留水とともにネットを 500ml 遠沈管へ入れ、4 °C、8000rpm で 30 分間遠心した。50ml 遠沈管に沈殿物を回収し、4 °C、8000rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を捨てて、沈殿物に 500 μ l の milliQ 水を加え懸濁した。得られた懸濁液からのメタゲノム DNA 抽出には、ニッポンジーン製 ISOIL for Beads Beating キットを用いた。実験手順は、プロトコールに従って行った。そして、得られたメタゲノム DNA とプライマー(341F-GC および 907R)(Table 3-1)を用いて、Table 3-2 に示す様に混合した。そして、PCR 法により Fig. 3-2 に示す条件で約 600bp の DGGE 試料を作製した。また、16S rDNA マップと、本研究で使用したプライマーによる増幅位置を Fig. 3-3 に示す。

Table 3-1 Primer sequence used in this study.

Primer (341F-GC)
5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCC GCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
Primer (907R)
5' -CCGTCAATTCCTTT[A/G]AGTTT-3'
Primer (341F)
5' -CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
Primer (518R)
5' -ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Table 3-2 Content of PCR reaction solution.

Ex taq	0.25 μ l
10 \times Ex taq buffer	5 μ l
dNTP	4 μ l
primer(341F-GC)	2.5 μ l
primer(907R)	2.5 μ l
template DNA	2 μ l
H ₂ O	33.75 μ l
	50 μ l

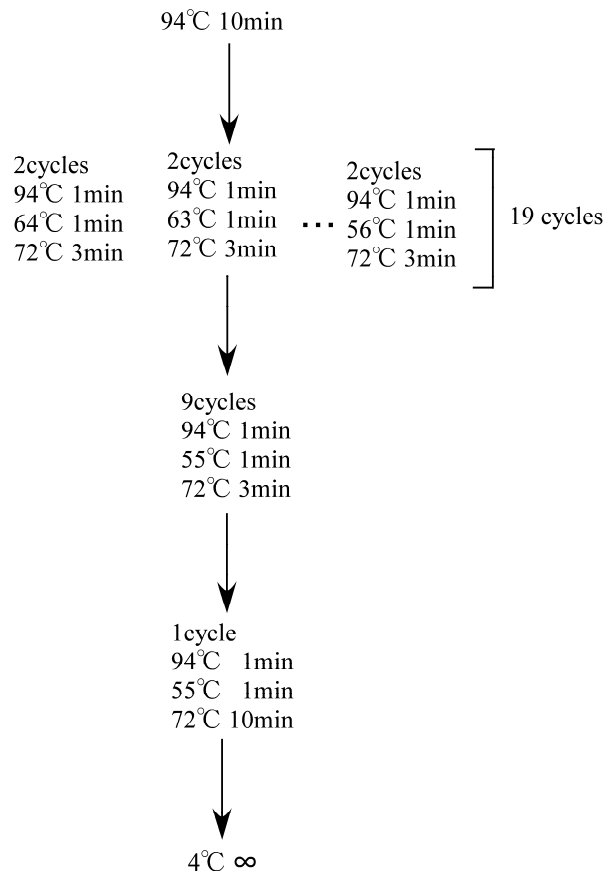


Fig. 3-2 Thermal cycles for preparation of PCR DGGE loading samples.

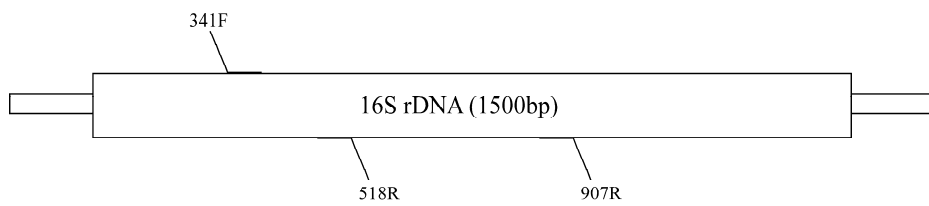


Fig. 3-3 Position of primers used for PCR amplification in this study.

試料の DGGE 解析は、DCode ユニバーサルミュートーション検出システム (Bio Rad)[32]を用いて行われた。DGGE はアクリルアミドゲル濃度 6%T、変性剤(Urea)濃度勾配 20-60%、泳動温度 58℃、加電圧 200V の条件で行い、泳動時間は 4 時間とした。

泳動後、ゲル中の DNA バンドを検出するために、SYBR Green でゲルを染色した。各バンドを切り出し、DNA 断片を得た。DNA 断片とプライマー(341F および 518R)(Table 3-1)を用いて、Table 3-3 に示す様に混合した。そして、PCR 法により、Fig. 3-4 に示す条件で約 200bp の DNA 断片を増幅した。

Table 3-3 Content of PCR reaction solution.

Ex taq	0.25 μ l
10 \times Ex taq buffer	5 μ l
dNTP	4 μ l
primer(341F)	2.5 μ l
primer(518R)	2.5 μ l
template DNA	5 μ l
H ₂ O	30.75 μ l
	50 μ l

95°C 10min



30cycles
95°C 30sec
55°C 30sec
72°C 90sec



72°C 10min



4°C ∞

Fig. 3-4 Thermal cycles for amplifying the 200 bp DNA fragment.

増幅した DNA 断片を pGEM-T easy ベクターに DNA リガーゼを用いて連結し、DNA 断片の配列を解析した。これらの各配列をもとに、相同性検索プログラム BLAST([http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), データベース:Gene Bank)[33]を用いて相同性の高い配列を取得した。これらの配列を clustlW 法で整列させ、これに基づき Neighboring-Joining(NJ)法[34]で系統樹を作成した。

3. 3 結果

3. 3. 1 フィルム表面の緑膿菌バイオフィルム定量

Fig.3-5 に、MH 培地中での PLA フィルムおよび PE フィルム上に形成された、緑膿菌バイオフィルム量の経時変化を示す。各フィルム上に付着した緑膿菌バイオフィルム量は、培養開始から 24 時間後では PE:PLA \approx 7.5:1 であった。また、PE フィルムを含む MH 液体培地の溶液中の単位体積あたり細胞数は、 9.6×10^9 個/ml であった。PLA を含む培地中では、細胞数は 9.2×10^9 個/ml であり、PE フィルム中のそれとほぼ同数であった。

さらに、Fig. 3-6 にフィルム表面の走査型顕微鏡写真を示す。培養から 8 時間後には PE フィルム表面では緑膿菌の凝集が多く見られたが、PLA フィルム表面では、凝集はほとんど見られなかった。

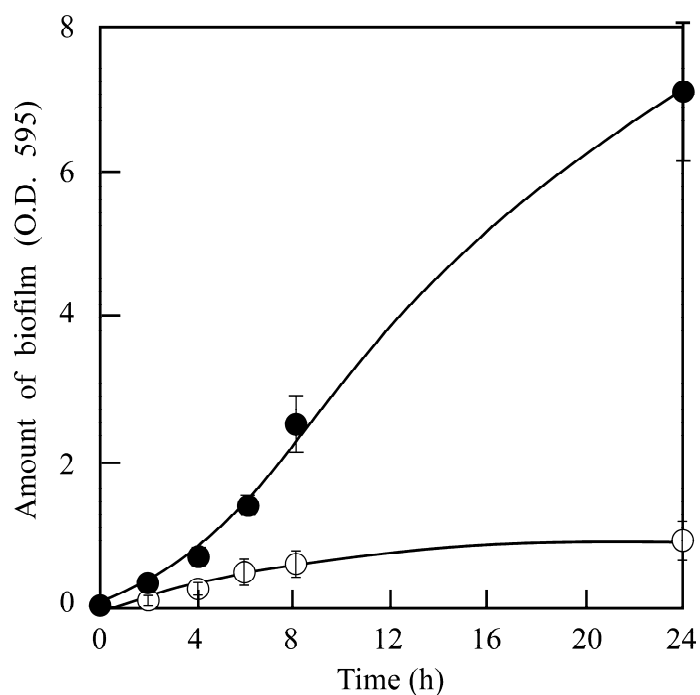


Fig. 3-5 Time course of *P. aeruginosa* biofilm formation on PE film (closed circle) and PLA film (open circle) surface. Error bars indicate the width of experimental values.

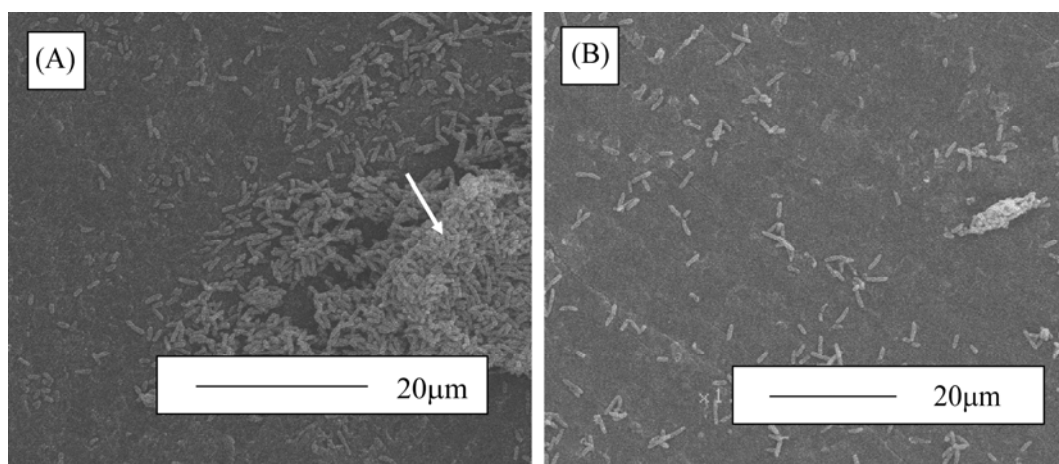


Fig. 3-6 Surface of PE film (A) and PLA film (B) after incubation for 8 hours in MH liquid medium inoculated with *P. aeruginosa*. The aggregation of *P. aeruginosa* was pointed by an arrow.

3. 3. 2 タンパク質吸着量評価

Table 3-4 は、PE フィルムおよび PLA フィルムの水接触角および BSA タンパク質の吸着量を示している。PE フィルムの水接触角は 92.7° であり、PLA フィルムのそれは、 82.6° だった。また、BSA 溶液中に 1 時間浸漬した PE フィルムに、BSA は $20.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 吸着した。一方、PLA フィルムには $18.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 吸着した。

Table 3-4 Contact angle of and the amount of BSA bound to PE and PLA film surface.

Sample	Contact angle (degree)	Amount of bound BSA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PE film	92.66	20.6
PLA film	81.82	18.3

3. 3. 3 アルギン酸カルシウムゲルに対する乳酸の効果

Fig. 3-7 は、各濃度の乳酸水溶液に 1 時間浸漬したアルギン酸カルシウムゲルの乾燥重量割合と、水溶液中の遊離カルシウムイオン濃度を示している。乳酸濃度が高いほどゲルの乾燥重量は減少した。この時、111mM 乳酸水溶液に浸漬した後のゲル乾燥重量は浸漬前の 67.3% になった。この時の各乳酸水溶液の pH は、乳酸濃度が高いほど低下し、111mM 乳酸水溶液では 2.46 だった。また、各乳酸濃度で処理されたアルギン酸カルシウムゲルから遊離したカルシウムの濃度は、乳酸濃度が高いほど高くなった。この時、111mM 乳酸水溶液に浸漬した後の遊離カルシウム濃度は、約 15mM だった。

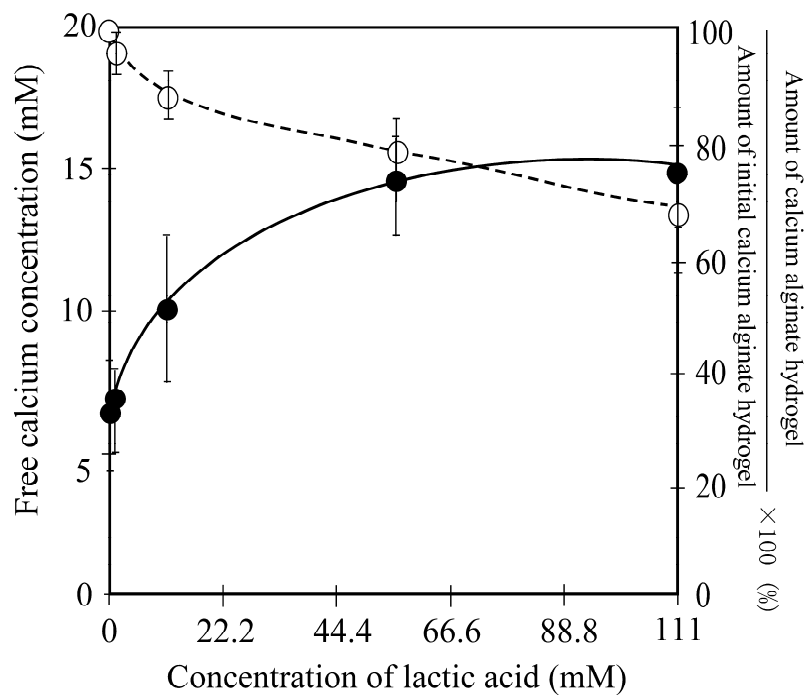


Fig. 3-7 Free calcium concentration (closed circle) and the calcium alginate gel fraction (open circle) after incubation for an hour in various concentration of lactic acid solution. The pH values in each concentration of lactic acid solution were 6.91 (0mM), 3.19 (1.11mM), 2.84 (1.11mM), 2.60 (55.5mM) and 2.46 (111mM). The error bars indicate the width of experimental values.

3. 3. 4 蒸留水中での PLA の加水分解

Fig. 3-8 は、蒸留水中で PLA フィルムから遊離する乳酸量と溶液の pH の経時変化を示している。PLA フィルム 1g を蒸留水 10ml 中に浸漬すると、乳酸濃度は 2 時間後に約 20nmol/ml になった。それ以降は 1 時間当たり約 1.3nmol/ml 乳酸濃度が上昇し、8 時間後には約 28.2nmol/ml になった。また、蒸留水の pH は 6.8 から、8 時間後には 5.2 に低下した。

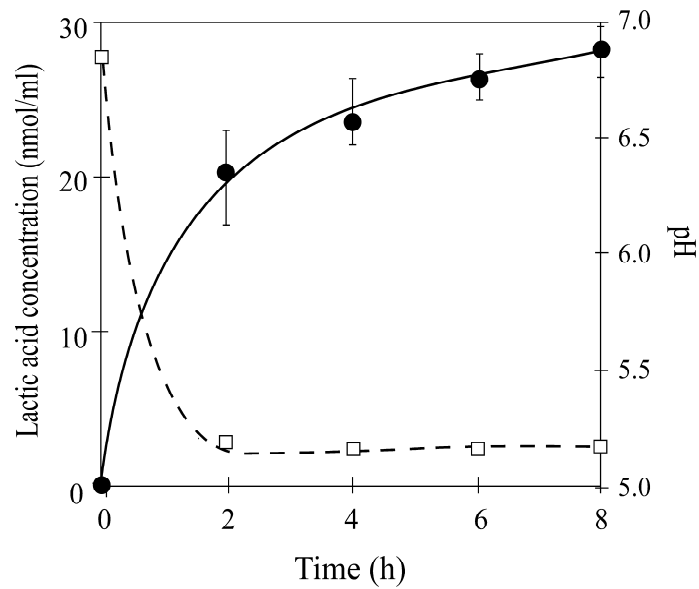


Fig. 3-8 Time course of the lactic acid concentration (closed circle) and pH value (open square) in the distilled water containing PLA film at 37 °C.

3. 3. 5 ネットの表面形状

Fig. 3-9 に、PE ネットおよび PLA-PE ネットの表面形状の走査電子顕微鏡像を示す。PE ネットは表面が平滑で、糸の直径が約 $350\mu\text{m}$ であったが、PLA-PE ネットの糸の直径は約 $250\sim 300\mu\text{m}$ と不均一であり、表面は粗かった。

Fig. 3-10 は、クロロホルム処理された PLA-PE ネットを示している。処理済み PLA-PE ネット表面には、細かい凹凸が確認された。また、処理前と比較して、その重量は、約 3.2% (160mg) 減少した。PE はクロロホルムに溶解しないため、PLA-PE ネットの重量減少量は PLA に由来すると考えられる。ここで用いた 5g の PLA-PE ネット中には、PLA が 500mg 含まれている。溶解した PLA が 160mg であったことから、PLA-PE ネットに含まれる全 PLA 中 32% が表面に存在し、残りは PE 内部に存在していることが示唆された。

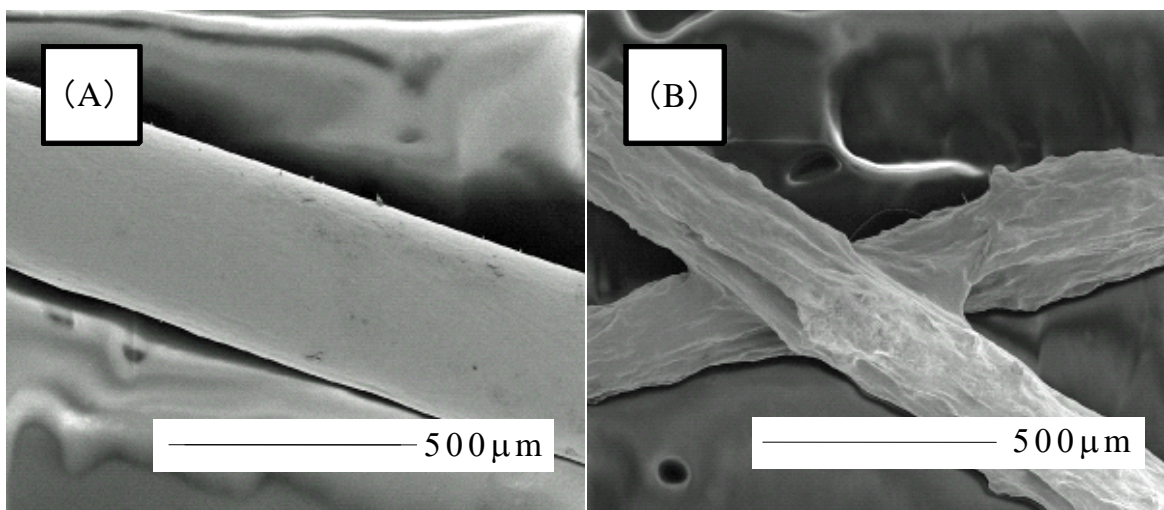


Fig. 3-9 Surface of (A) PE net and (B) PLA-PE net.

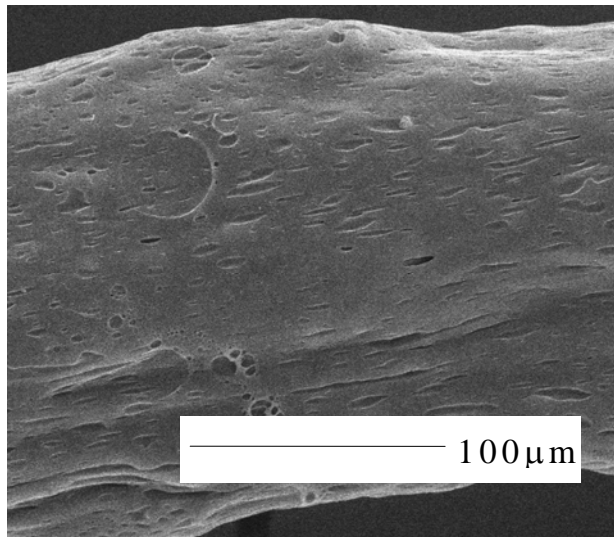


Fig. 3-10 Surface of treated PLA-PE net.

3. 3. 6 ネットの機械的強度

Fig. 3-11 に PLA-PE ネットの押出方向および垂直方向を示す。また、Table 3-5 には、PE ネットおよび PLA-PE ネットの押出方向および垂直方向に対する破断強度、破断伸度およびヤング率を示す。PLA-PE ネットの破断強度、伸度、ヤング率は押出方向が 12.9N、284.0%、1471.5N/cm²、垂直方向は 8.1N、251.0%、750.9N/cm² だった。PE ネットについては、押出方向が 17.7N、174.6%、2903.3N/cm²、垂直方向は 7.2N、139.5%、626.1N/cm² だった。

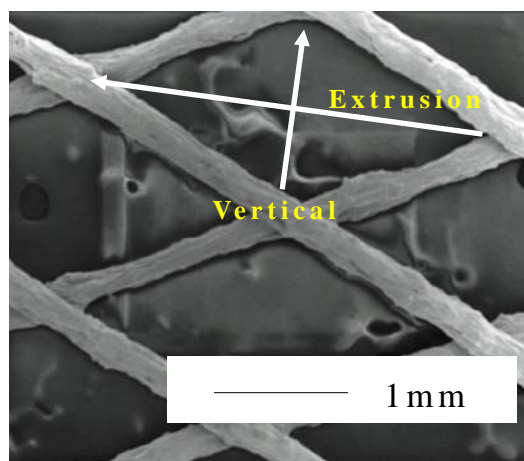


Fig. 3-11 Direction of PLA-PE net.

Table 3-5 Mechanical properties of net.

	Direction	Tensile strength (N)	Elongation at break (%)	Young's modulus (N/cm ²)
PE net	Extrusion	17.7	174.6	2903.3
	Vertical	7.2	139.5	626.1
PLA-PE net	Extrusion	12.9	284.0	1471.5
	Vertical	8.1	251.0	750.9

3. 3. 7 PLA-PE ネット中の PLA の分子量および熱的性質

PLA-PE ネット中に含まれる PLA の数平均分子量および重量平均分子量はそれぞれ約 2.3×10^4 、約 4.3×10^4 であった (Table 3-6)。Fig.3-12 は、PLA-PE ネットの DSC 曲線を示している。3つの吸熱ピーク (103.4°C、124°C、および 167.2°C) が存在した。PLA の融点は 163.3°C、融点到達時の PLA-PE ネットに含まれる PLA の融解エンタルピーは 17J/g だった。

Table 3-6 Molecular weight of PLA blended in PLA-PE net.

	M_n	M_w	PDI
PLA (original pellet)	6.4×10^4	1.5×10^5	2.3
PLA (PLA-PE net)	2.3×10^4	4.3×10^4	1.7

M_n : number - average molecular mass

M_w : weight - average molecular mass

PDI: polydispersity index

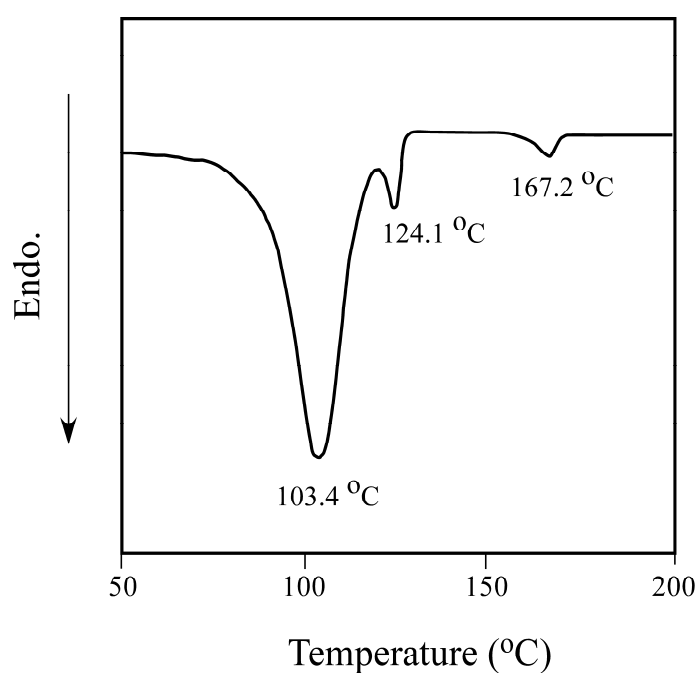


Fig. 3-12 DSC curve of PLA-PE net.

3. 3. 8 ネットの緑膿菌バイオフィルム定量

Fig.3-13 は、緑膿菌接種後 24 時間後に、PE ネット、PLA-PE ネットおよび処理済 PLA-PE ネット上に形成されるバイオフィルム付着量を示している。植菌後 2、4、6、8、24 時間経過した後の緑膿菌バイオフィルム付着量を測定したところ、植菌後 4 時間以降で PLA-PE ネットでは PE ネットよりも付着量が少なくなり、植菌後 24 時間が経過すると、PE ネットと PLA-PE ネットに付着したバイオフィルム量の比はおおよそ 2:1 だった。一方、処理済み PLA-PE ネットは PE ネットと同程度の付着量だった。

さらに、Fig. 3-14 に植菌後 6 時間経過した後の PLA-PE ネット表面の電子顕微鏡写真を示す。PLA-PE ネット上で、緑膿菌は PE 表面に遍在し、PLA 部分に付着した菌はわずかだった。

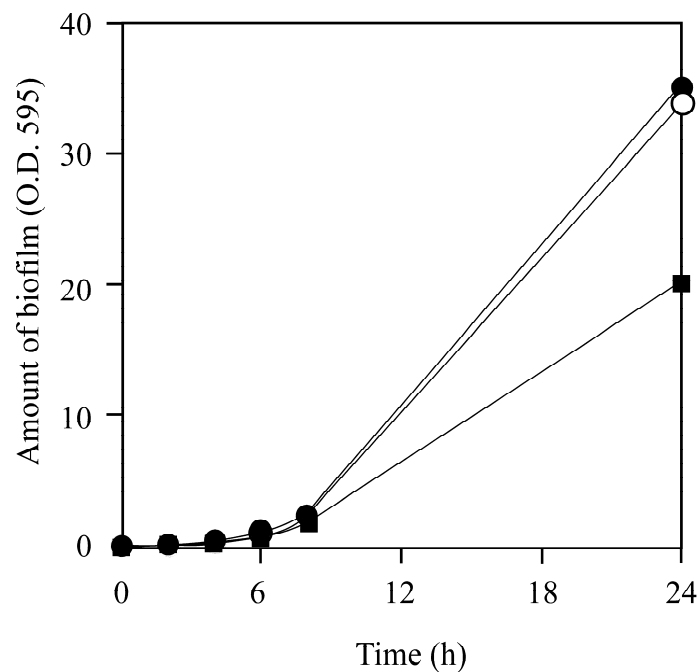


Fig. 3-13 Time course of amount of the biofilm formed on the surface of PE net (●), PLA-PE net (■) and treated PLA-PE net (○) after incubation in MH medium at 37 °C.

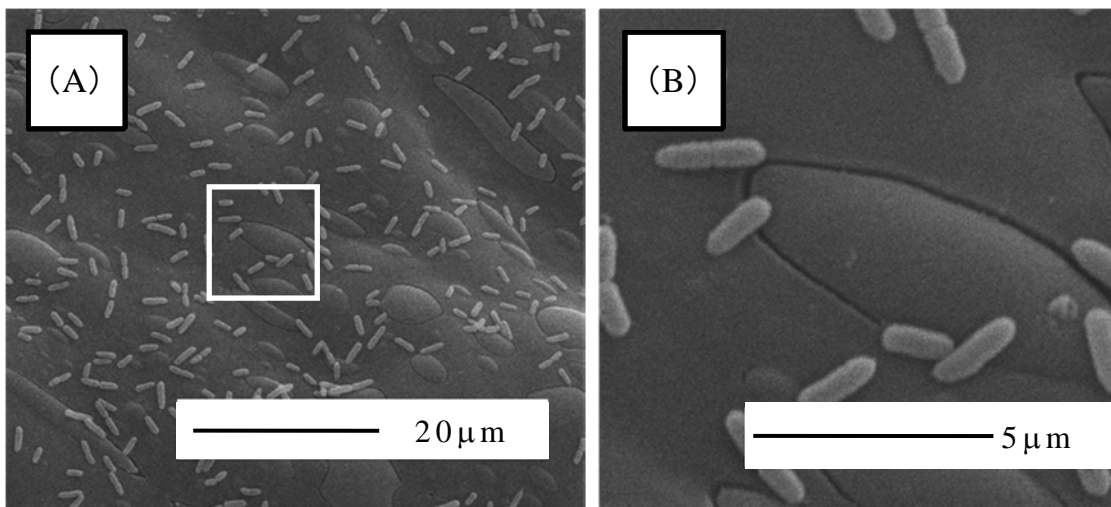


Fig. 3-14 Surface of PLA-PE net after incubation for 8 hours in MH liquid medium with *P. aeruginosa*. (B) is the enlarged image of the square in (A).

3. 3. 9 PLA-PE ネットの緑膿菌に対する抗菌性

Table 3-7 に PLA-PE ネットの緑膿菌に対する抗菌性評価の結果を示す。緑膿菌を植菌し、37℃で 18 時間静置した後の PE ネットおよび PLA-PE ネット上の生菌数はそれぞれ 6.6×10^7 個および 4.9×10^7 個だった。また、静菌活性値および殺菌活性値はそれぞれ 0.14、-3.31 だった。

Table 3-7 Antibacterial activity of PLA-PE and PE nets to *P. aeruginosa*.

Sample	Viable cell count(cfu/ml)	Bacteriostatic activity	Bacteriocidal activity
PE net	6.6×10^7	-	-
PLA-PE net	4.9×10^7	0.14	-3.31

Viable cell count of inoculated *P. aeruginosa*: 2.6×10^4 cfu/ml

3. 3. 10 ネットの表面へのタンパク質付着量

Table 3-8 には、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の BSA 溶液中に PLA-PE ネット、処理済み PLA-PE ネットおよび PE ネットを 25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間保持した後のネット上に付着した BSA 量を示す。PE ネット、PLA-PE ネットおよび処理済み PLA-PE ネット表面へのタンパク質付着量はそれぞれ 24.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、25.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、および 26.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ だった。

Table 3-8 Amount of BSA bound to the surface of PE net, PLA-PE net and treated PLA-PE net.

Sample	Bound BSA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PE net	24.9
PLA-PE net	25.3
Treated PLA-PE net	26.2

3. 3. 1 1 ネットの加水分解

Fig. 3-15 は、PLA-PE ネットを蒸留水中で 37℃ の温度条件下で保持した際の、pH 変化を示している。蒸留水初期 pH は、7.0 であったが、8 時間後には 4.0 まで低下した。また、処理済 PLA-PE ネットを用いて、同様の実験を行ったところ、8 時間後に蒸留水の pH は 5.7 となった。

Fig. 3-16 は、PLA-PE ネットを蒸留水中で 37℃ の温度条件下で保持した際の、蒸留水中の乳酸濃度の経時変化を示している。蒸留水中の乳酸濃度は、時間に伴い上昇し、8 時間後の乳酸濃度は、15.3nmol/ml であった。

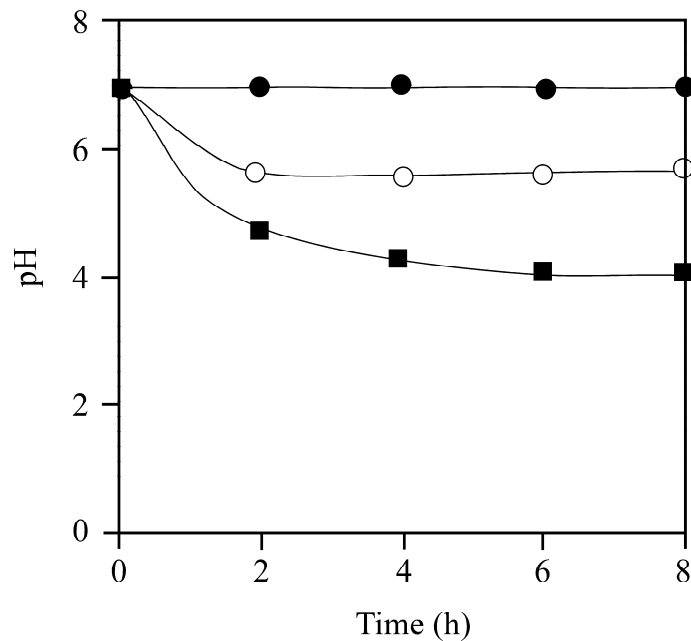


Fig. 3-15 Time course of the pH in the distilled water containing PE net (●), PLA-PE net (■) and treated PLA-PE net (○). Five grams of nets were incubated in 50ml of distilled water (pH 7.0) at 37 °C.

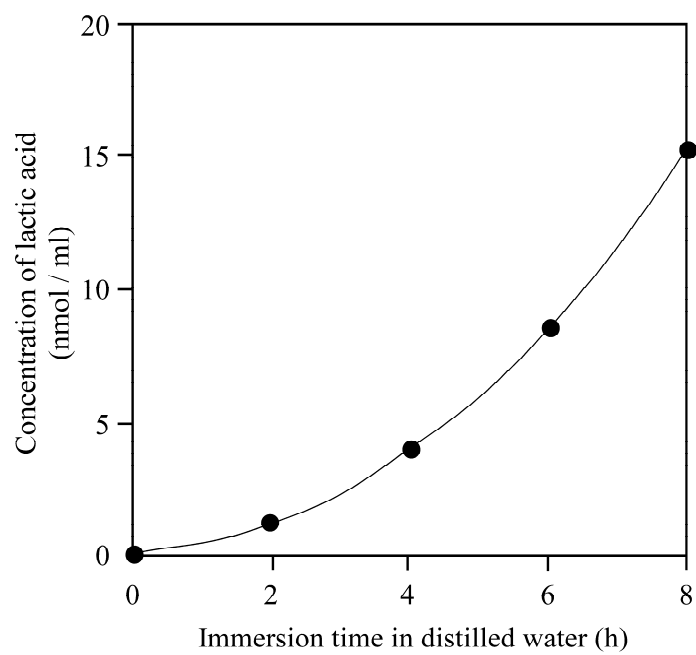


Fig. 3-16 Time course of concentration of lactic acid in the distilled water containing PLA-PE net. Five grams of PLA-PE net were incubated in 50ml distilled water at 37 °C.

3. 3. 1 2 家庭厨芥を入れたネット表面におけるバイオフィルム形成

Fig. 3-17 は、30 日間家庭厨芥にさらされた PE ネットおよび PE-PLA ネット上に形成されたバイオフィルムの量を示している。PE ネットおよび PLA-PE ネット上に形成されたバイオフィルム量の比は、おおよそ 2:1 であった。一方、Fig. 3-18 に示すように、両者のネット表面上での、バイオフィルムの形状には、大きな差異は見られなかった。

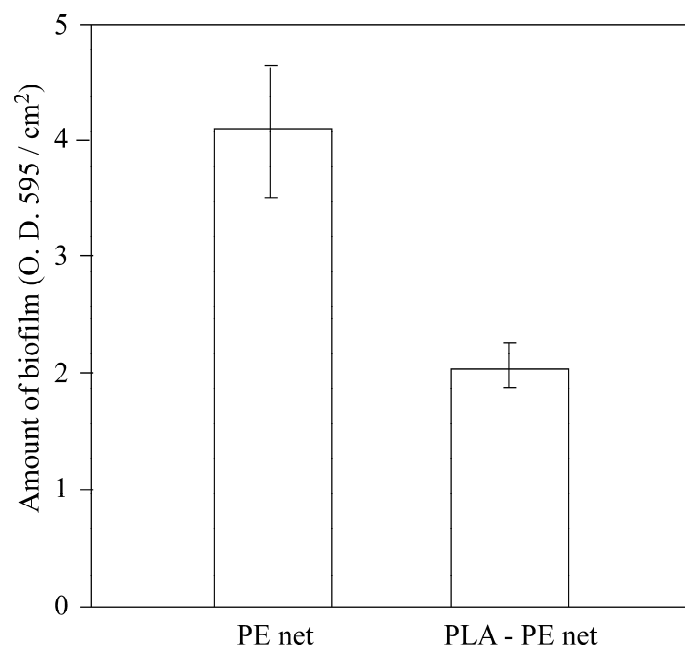


Fig. 3-17 Amount of biofilm formed on PE and PLA-PE net surfaces.

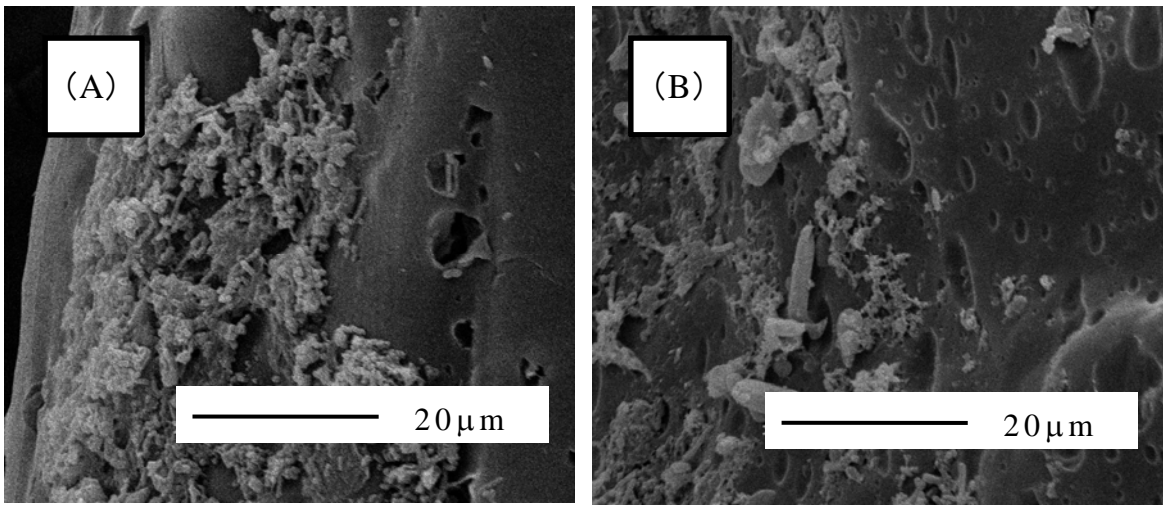


Fig. 3-18 Surface of (A) PE net and (B) PLA-PE net with food waste after incubation for 30 days at 37 °C under 65% relative humidity.

次に、ネット上に形成されたバイオフィルムの細菌叢群集構造を明らかにするために、バイオフィルムから回収されたメタゲノムを鋳型とし、16S rDNA をターゲットとした PCR-DGGE 解析を行った。Fig. 3-19 は、PE および PLA-PE ネット上に形成されたバイオフィルムを対象とした DGGE 像である。PE ネットに対しては 10 本、および PLA-PE ネットでは 14 本のバンドが確認された。これらの各バンドをゲルより切り出し、得られた DNA 断片の配列解析をした。

Fig.3-20 に、得られた DNA 断片の塩基配列に基づいて発生させた系統樹を示す。*Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属、*Enterobacter* 属は PLA-PE ネット、PE ネット双方のバイオフィルム中に存在することがわかった。また、*Clostridium* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Bifidobacterium* 属、*Sporanaerobacter* 属(偏性嫌気性菌)や *Paracoccus* 属(通性嫌気性菌)は PLA-PE ネットのみで確認された。*Acetobacter* 属(好気性菌)、*Olsenella* 属、*Raoultella* 属、あるいは *Enterococcus* 属(通性嫌気性菌)は、PE ネットのみで確認された。

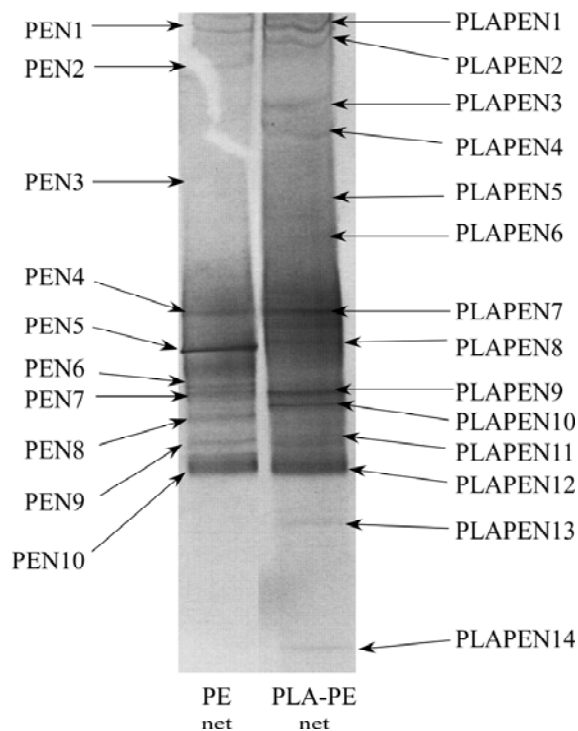


Fig. 3-19 PCR-DGGE analysis using meta genome DNA extracted from the biofilm formed on PE and PLA-PE net.

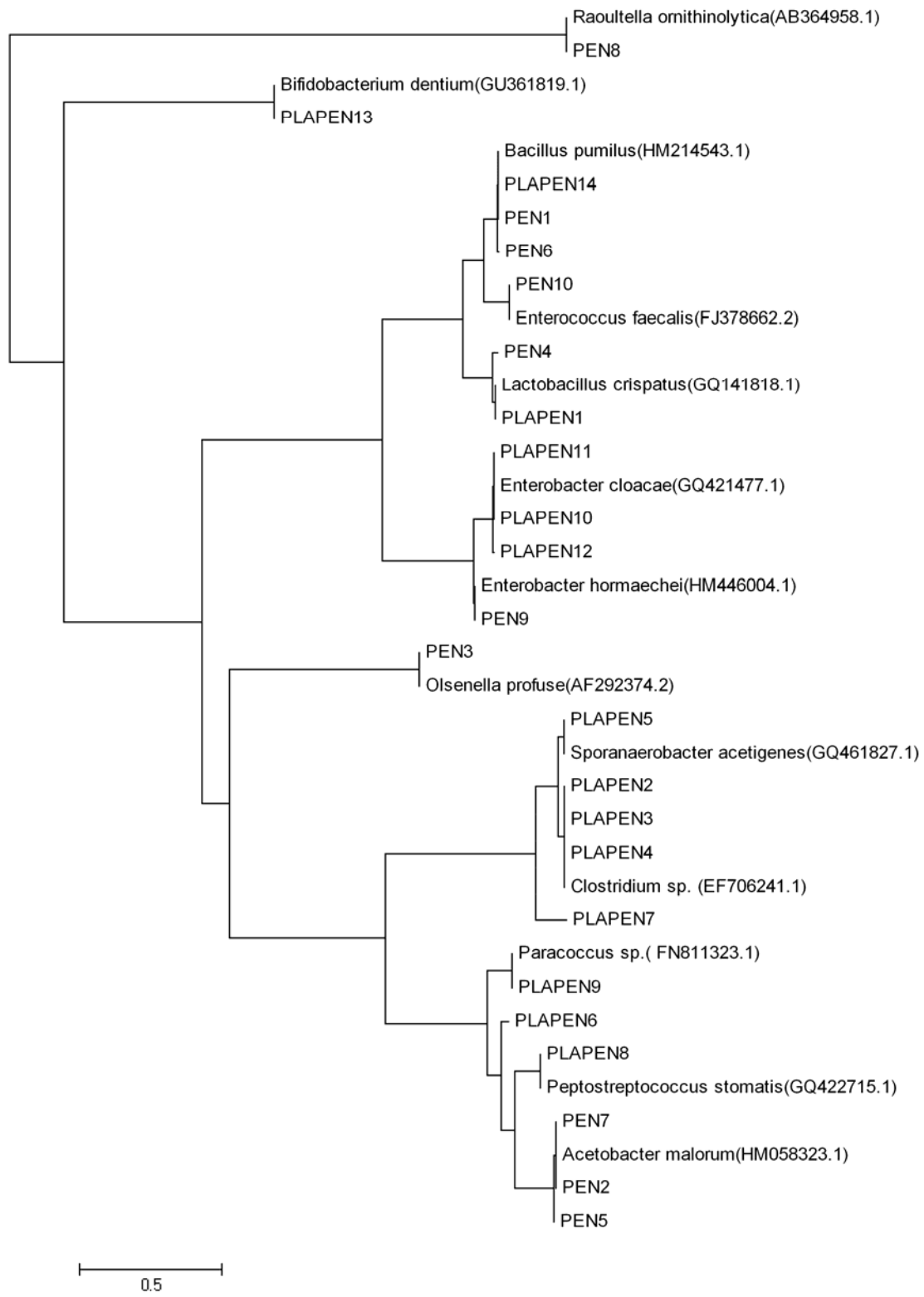


Fig. 3-20 Phylogenetic tree of biofilm formed on PE and PLA-PE net based on 16s rDNA sequences.

3. 4 考察

3. 4. 1 PLA の緑膿菌バイオフィルム形成阻害メカニズム

Fig. 3-5 に示すように、PLA フィルム表面では緑膿菌バイオフィルムの形成は、PE フィルム表面と比較して阻害された。また、Fig. 3-6 に示すように、菌の凝集もほとんど見られなかった。このことから、PLA に緑膿菌バイオフィルム形成阻害効果があることが示唆された。一方で、この時、MH 培地中での PLA フィルムと PE フィルムの緑膿菌の生育度合は、ほぼ同程度であり、培地中での生育阻害効果は認められなかった。

PLA は加水分解により乳酸が生成するため抗菌性を有することが報告されている [35-36]。緑膿菌の場合、pH2.5 の乳酸水溶液中で生育が著しく阻害され、3.0 以上では生育は阻害されない [37]。本実験において、Fig. 3-8 でも示されるように、分解した乳酸モノマーは、蒸留水を pH5.2 にまでしか低下させることができなかった。つまり、このことは、培地中において、PLA 由来の乳酸モノマーは抗菌作用を示さないことを示唆している。

一方、Table 3-4 に示すように、表面疎水性は PE フィルムの方が PLA フィルムよりも若干高かった。また、BSA タンパク質の吸着量は PE フィルムの方が PLA フィルムより若干多くなった。

一般的に、疎水性表面の方が、親水性表面よりもタンパク質が吸着しやすいことが知られている [38]。このため、PE フィルムの方が BSA タンパク質の吸着量が多くなったと考えられる。

緑膿菌がバイオフィルムを形成する前段階として、固体表面に、静電相互作用や疎水性相互作用によって迅速にタンパク質を含む有機物の層(コンディショニングフィルム)が形成され、そこに細胞が吸着する [39-41]。本実験の結果から、PLA フィルムおよび PE フィルム表面上でも、コンディショニングフィルムが形成されると考えられる。従って、Fig. 3-5 で示された、PLA フィルムおよび PE フィルム表面上における緑膿菌バイオフィルム形成量の差は、コンディショニングフィルム形成とは相関性が低いと考えられる。

次に、緑膿菌 EPS のモデルとしてアルギン酸カルシウムゲルを作製し、乳酸水溶液中に浸漬した。その結果、Fig. 3-7 に示すように、乳酸濃度が高いほど、ゲルの重量は低下し、遊離カルシウム濃度は上昇した。

塩酸による低 pH 環境中ではアルギン酸の酸加水分解により分子量が低下する [42]。また、アルギン酸カルシウムゲルに含まれるカルシウムイオンとプロトンの交換反応 [43-44] によってカルシウムが脱離する。しかし、本実験において、5ml の 2% アルギン酸ナトリウム溶液に等量の 1% (wt/vol) 乳酸水溶液を混合してもアルギン酸の分子量は低下しなかった (date not shown)。また、乳酸の pKa 値 (3.86 [45]) は、アルギン酸の pKa 値 (約 3 [46]) よりも高い。このため、乳酸によるアルギン酸の酸加水分解や、カルシウムイオンとのプロトン交換反応は起こっていないと考えられる。

乳酸産生菌 *L. helveticus* をアルギン酸カルシウムゲルに固定すると、乳酸のキレート効果によりカルシウムイオンが脱離し、ゲルの構造が不安定になる [47-49] ことが知られている。このことから、本実験でも、乳酸のキレート効果によってアルギン酸カルシウムゲルからカルシウムが脱離したと考えられる。

一方、ゲルからのカルシウム溶出割合 (溶出したカルシウム重量 / ゲル作製時に含まれるカルシウム重量) は、乳酸濃度が 0.5% (wt/vol) 以上では、ほぼ一定値 (17.6%) となった。このことから、PLA 表面での緑膿菌バイオフィルムの形成阻害は、アルギン酸密度が低いバイオフィルム形成初期の段階で生じていることが示唆された。

PLA フィルムを 37 °C の温度条件下で 10ml の蒸留水に浸漬すると、最初の 2 時間で約 200nmol の乳酸が溶出したが、それ以降は約 1.33nmol/ml/h の割合で乳酸が溶出し、8 時間後には 28.2nmol/ml となった (Fig. 3-8)。

PLA の熱分解は 250 °C 以上で引き起こされ [50]、水分の存在により加水分解も起こる [51]。このため本実験で、初期の乳酸溶出量が多くなったのは、PLA フィルムに含まれる乳酸モノマーが蒸留水中

に溶出したためであると示唆される。また、Fig. 3-8 に示された溶出曲線に従って乳酸が溶出した場合、本研究で使用した PLA フィルム 1g が全て加水分解によって溶出するには約 95 年要すると予想される。このことから、本研究で用いた PLA フィルムの緑膿菌バイオフィーム形成阻害効果は長期間にわたり持続することが示唆された。

以上の結果から総合的に判断すると、Fig. 3-21 に示されるようなメカニズムによって、バイオフィーム形成阻害が引き起こされていると示唆される。すなわち、加水分解によって PLA 表面から溶出した乳酸のキレート効果により、緑膿菌バイオフィームに含まれるアルギン酸カルシウムゲルからカルシウムが脱離する。その結果、バイオフィームが不安定化すると考えられる。

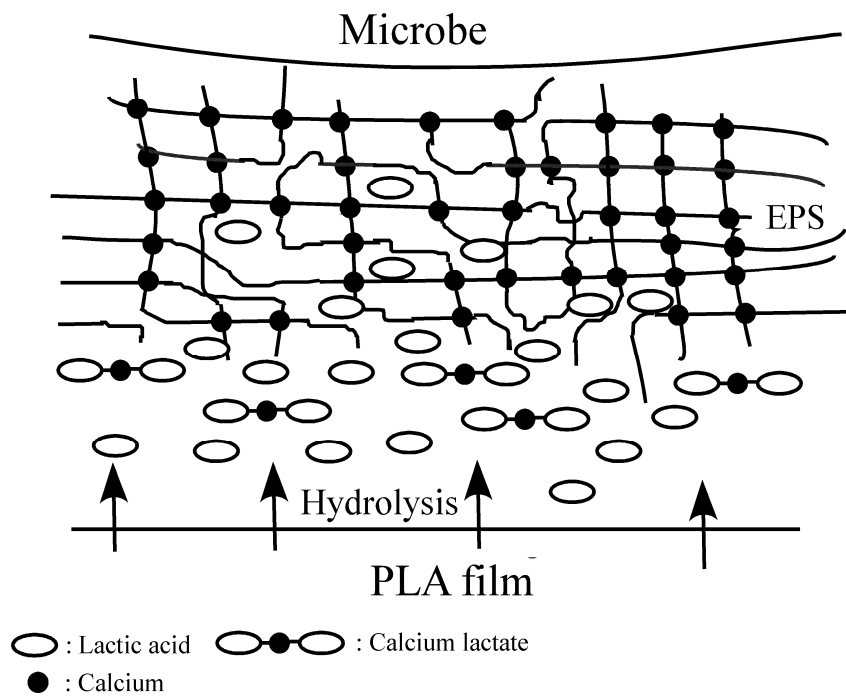


Fig. 3-21 Model of inhibition effect of biofilm formation by PLA.

3. 4. 2 PLA-PE ネットのバイオフィルム形成阻害効果

Fig. 3-10 に示されたように、電子顕微鏡による PLA-PE ネットの表面観察では表面に海島構造が認められた。また、PLA-PE ネットをクロロホルム処理すると 3.2%の重量減少が見られた。

PLA-PE ネットのクロロホルム処理による重量減少率は PLA-PE ネットにおける PLA の混合割合(10%)より少ないことから、PLA-PE ネットにおいて、マイナー成分である PLA は島となり、連続相としては存在していないことが示唆された。また、PE と PLA の溶解度パラメーターはそれぞれ 7.9[52]および 20.2[53]と異なることから、PLA-PE ネット中の PE と PLA との相分離が強く示唆される。

Fig. 3-12 に示すように、PLA-PE ネットの DSC 測定では 3 種類の吸熱ピークが得られた。これらの吸熱ピーク温度は、各材料の融点に表すため、103.4°C のピークは LDPE、124.1°C のピークは HDPE、そして 167.2°C のピークは PLA に由来することが示唆される。また、PLA-PE ネット中の PLA の融解エンタルピー値から、PLA の結晶化度は約 18%と見積もられた。この結晶化度は、ソルベントキャスト法により得られる PLA の結晶化度(40-50%)と比較して著しく低い。これは、ネットの作製時の急冷プロセスが原因であると考えられる。

Table 3-5 に示すように、PLA-PE ネットは押出方向の方が、垂直方向と比較して破断強度がより高かった。これは、Fig.3-9 に示すように糸の方向が押出方向に近いためであると考えられる。

PLA-PE ネット中の分子量は、PLA ペレットと比較して著しく低下した(Table 3-3)。PLA-PE ネット製造時の成形温度は 270 °C と高いため、熱分解や加水分解による分子量低下もより顕著になると考えられる。

Fig. 3-13 に示すように、緑膿菌を植種した MH 培地中に PLA-PE ネット表面と、PE ネット表面を浸漬したところ、24 時間後に付着した緑膿菌バイオフィルム量の比は PLA-PE ネット: PE ネット ≒ 2 : 1 であった。また、クロロホルムで PLA を除去すると PE ネット表面と同程度になった。さらに、緑膿菌が植菌された MH 培地中に 6

時間 PLA-PE ネットを浸漬すると、Fig. 3-14 に示すように PLA 部分に対して菌付着が少なかった。このことから、PLA の混合割合が 10wt% の PLA-PE ネットにも、PLA による緑膿菌バイオフィルムの形成阻害効果があることがわかった。今後は、コスト低減のため、PLA の混合割合を低下させた PLA-PE ネットを作製し、同様の評価を行う必要がある。

PLA-PE ネットの緑膿菌に対する静菌活性値および殺菌活性値はそれぞれ 0.14 および -3.31 だった (Table 3-7)。社団法人繊維評価技術協議会による抗菌防臭加工繊維製品の認証基準は、静菌活性値が 2.2 以上である [54]。また、制菌加工繊維製品の認証基準は殺菌活性値が 0 以上である [55]。従って、PLA-PE ネットの緑膿菌バイオフィルム形成阻害効果は PLA の抗菌性によるものではないと結論付けられる。

さらに、Table 3-8 に示すように PLA-PE ネットの方が、PE ネット表面よりも、BSA タンパク質吸着量が若干多い程度であった。これは、PLA-PE ネット表面には凹凸があり、PE ネットと比較して表面積が大きいと考えられる。このことから、フィルムの場合と同様に、PLA-PE ネットと PE ネットの緑膿菌バイオフィルム形成量の差は、コンディショニングフィルム形成とは相関性が低いと考えられる。

PLA-PE ネットを含む蒸留水は、時間とともに pH 低下が見られ (Fig. 3-15)、また、同様に時間とともに乳酸濃度上昇が観測された (Fig. 3-16)。このことから、PLA-PE ネットに混合されている PLA の加水分解によって乳酸オリゴマーやモノマーが溶出していることが示唆された。また、Fig. 3-14 に示された溶出曲線に従って乳酸が溶出すると仮定すると、5g の PLA-PE ネット表面に存在する PLA が加水分解によってすべて溶出するには約 389 日要すると予測される。このことは、長期に渡って PLA-PE ネットがバイオフィルム阻害効果を発揮し続ける可能性を示唆している。

家庭厨房を入れた PLA-PE ネット表面のバイオフィルム量は PE ネット

ットの半分程度であった (Fig. 3-17) が、電子顕微鏡による表面観察では、バイオフィルム形態に明確な差異は認められなかった (Fig. 3-18)。

本実験では、ネット表面に様々な種類の微生物が付着したと考えられるが、Ahimou らや Chen らは、バイオリアクターから収集したバイオフィルムの基材表面への粘着力は、カルシウムの添加によって上昇することを報告している [56-57]。さらに、Turakhia らはカルシウムの特異的キレート剤である EGTA の添加によって下水管に付着したバイオフィルムの脱離が顕著に増加することを報告している [58]。乳酸にもカルシウムに対するキレート効果があることが知られており、PLA-PE ネットでは、PLA の加水分解で生じた乳酸のキレート効果によってカルシウムが除去され、ネット表面へのバイオフィルムの粘着力が低下したと考えられる。

PCR-DGGE 解析では、好氣的な生育環境にもかかわらず、PLA-PE ネット表面には、*Clostridium* 属等の偏性嫌気性菌が存在していた (Fig. 3-20)。一般に、成熟したバイオフィルム内部では酸素濃度が低下することが知られている [59]。このため、偏性嫌気性細菌がバイオフィルム構成細菌として見いだされたと考えられる。また、Fig. 3-19 で得られたバンドの濃さを定量した。PLA-PE ネット表面では、*Enterobacter* 属および *Clostridium* 属といった耐酸性の高いもの [60-62] が、全体の 44.5% および 26.6% を占めた。一方、PE ネット上では、*Enterococcus* 属および *Acetobacter* 属が優先種として存在し、それぞれ全体の 34.3% および 26.7% を占めた。これらの群集構造の差は、PLA-PE ネットに含まれる PLA の加水分解により発生する乳酸により、ネット表面近傍で pH 低下が起こり、表面環境が著しく異なっていることに起因していると考えられる。これらのことを、総合すると、PLA-PE ネット上での形成バイオフィルム量の制限および特殊な優先菌種の存在は、PLA の存在による効果であることが強く示唆される。

5. 結論

PEにPLAを溶融紡糸により混合したPLA-PEネットにバイオフィルム形成阻害効果があることがわかった。また、PLA-PEネットは実用に耐えうる強度を有していた。さらに、PLAの緑膿菌バイオフィルム形成阻害の主な原因は、加水分解で生じる乳酸のキレート効果によるものであり、前述の蒸留水中でのPLA加水分解による乳酸溶出速度を考慮すると、その効果は半永久的であると考えられる。本研究により、PLAには様々な形態でバイオフィルム形成阻害材料として利用できる可能性が示された。さらに、第2章で明らかにしたようにPLAに焼成貝殻粉末を混練し、加水分解を促進することで、バイオフィルム形成阻害効果をさらに向上できる可能性がある。

文献

1. R. M. Donlan, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 881-890(2002)
2. A. Boyd and A. M. Chakrabarty, *J. Ind. Microbiol.*, **15**, 162-168(1995)
3. M. L. Davey and G. A. O'toole, *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, **64**, 847-867(2000)
4. J. R. Lawrence, G. D. W. Swerhone, G. G. Leppard, T. Araki, X. Zhang, M. M. West and A. P. Hitchcock, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5543-5554(2003)
5. S. S. Branda, A. Vik, L. Friedman and R. Kolter, *Trends Microbiol.*, **13**, 20-26(2005))
6. I. W. Sutherland, *Microbiology*, **147**, 3-9(2001)
7. R. B. Simmons, L. J. Rose, S. A. Crow, D. G. Ahearn, *Curr. Microbiol.*, **39**, 141-145 (1999)
8. G. M. Wolfaardt, J. R. Lawrence, R. D. Roberts and D. E. Caldwell, *Microb. Ecol.*, **35**, 213-223(1998)
9. C. Dahlberg, C. Linberg, V. L. Torsvik and M. Hermansson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4692-4697(1997)
10. A. P. Roberts, J. Pratten, M. Wilson and P. Mullany, *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**, 63-66(1999)
11. W.W. Nichols, S. M. Dorrington, M. P. E. Slack and H. L. Walmsley, *Antimicrob. Agents Ch.*, **32**, 518-523(1988)
12. W.W. Nichols, M. J. Evans, M. P. E. Slack and H. L. Walmsley, *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1291-1303(1989)
13. P. Gilbert, J. Das and I. Foley, *Adv. Dent. Res.*, **11**, 160-167(1997)
14. L. Coquet, G. A. Junter and T. Jouenne, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **42**, 755-760(1998)
15. O. Basso, J. -F. Lascourrèges, M. Jarry and M. Magot, *Environ. Microbiol.*, **7**, 13-21(2005)
16. T. Chaki, T. Baba, N. Hiura and M. Kobayashi, *J. Appl. Glycosci*, **55**, 81-88(2008)
17. E. Banin, K. M. Brady and E. P. Greenberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2064-2069(2006)
18. P. Gacesa, *Microbiology*, **144**, 1133-1143(1998)
19. G. M. Patriquin, E. Banin,² Christie Gilmour, R. Tuchman, E. P. Greenberg and K. Poole, *J. Bacteriol.*, **190**, 662-671(2008)
20. M. J. Franklin, C. E. Chitnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White and D. E. Ohmani, *J. Bacteriol.*, **176**, 1821-1830(1994)
21. W. R. Gombotz and S.F. Wee, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **31**, 267-285(1998)
22. S. Birnbaum, R. Pendleton, P. Larsson and K. Mosbach, *Biotechnol. Lett.*, **3**, 393-400(1981)
23. T. B. May, D. Shinabarger, , R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. Devault, S. Roychoudhury, N. A. Zielomski, A. Berry, R. K. Rothmel, T. K. Misra and A. M. Chakrabarty, *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 191-206(1991)
24. H. Tsuji, H. Daimon, K. Fujie, *Biomacromolecules*, **4**, 835-840(2003).
25. M. Noda, H. Okuyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 467-471(1999)
26. C. E. Catrenich and W. Johnson, *Infect. Immun.*, **57**, 1862-1864(1989)

27. JIS L1902:2008 繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果
28. S. Favre-Bonté, T. Köhler and C. Van Delden, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **52**, 598-604(2003)
29. E.W. Fischer, H. J. Sterzel and G. Wegner, *Kolloid Z. Z. Polym.*, **251**, 980-990(1973)
30. J. C. Araujo, F. C. Téran, R. A. Oliveira, E. A. A. Nour, M. A. P. Montenegro, J. R. Campos and R. F. Vazoller, *J. Electr. Microsc.*, **52**, 429-433(2003)
31. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254(1976)
32. Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schafer, H., Wawer, C., Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., De Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academics, Dordrecht, pp. 1-27(1997)
33. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410(1990)
34. N. Saitou and M. Nei, *Mol Biol Evol.*, **4**, 406-425(1987)
35. N. J. Kruger. The Bradford method for protein quantitation. In: J. M. Walker, editor. *Protein protocols handbook second edition*. Totowa, New Jersey: Humana Press, p. 15-21(1996)
36. H. Gollwitzer, K. Ibrahim, H. Meyer, W. Mittelmeier, R. Busch and A. Stemberger, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **51**, 585-591 (2003)
37. R. S. Tanner and S. A. Janes, *J. Ind. Microbiol.* **10**, 229-232(1992)
38. 岩田博夫, バイオマテリアル, p24-27(2005), 共立出版
39. J. J. Ludwick, S. N. Rossmann, M. M. Johnson and J. L. Edmonds, *Int. J. Pediatr. Otorhi...*, **70**, 407-410(2006)
40. T. R. Neu, *Microbiol. Rev.*, **60**, 151-166(1996)
41. G. M. Bruinsma, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *Biomaterials*, **22**, 3217-3224 (2001)
42. S. Lyu, J. Schley, B. Loy, D. Lind, C. Hobot, R. Sparer and D. Untereker, *Biomacromolecules*, **8**, 2301-2310(2007)
43. A. Haug and B. Larsen, *Acta. Chem. Scand.*, **17**, 1653-1662(1963)
44. S.K. Bajpai, S. Sharma, *React. Funct. Polym.*, **59**, 129-140(2004)
45. Merck Index 14th ed., 5335-5337
46. I. T. Norton, W. J. Frith and S. Albert, *Food Hydrocolloid.*, **20**, 229-239(2006)
47. K. A. Presser, T. Ross and D. A. Ratkowsky, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1773-1779(1998)
48. C. -H. Zheng, J.-Q. Gao, Y.-P. Zhang and W. -Q. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 1321-1327(2004)
49. D. Roy and J. Goulet, *J. Dairy. Sci.*, **70**, 506-513(1987)
50. 辻秀人, ポリ乳酸, p105-108(2008), 米田出版
51. M. H. -Vainio, P. Varpomaa, J. Seppala and P. Tormala, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 1503-1523 (1996)

52. F. Allan and M. Barton, *Chem. Rev.*, **75**, 731-753(1975)
53. D. Karst and D. Yang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **96**, 416-422(2005)
54. 社団法人繊維評価技術協議会, 抗菌防臭加工繊維製品認証基準, p4
55. 社団法人繊維評価技術協議会, 制菌加工繊維製品認証基準, p5
56. F. Ahimou, M. J. Semmens, P. J. Novak and G. Haugstad, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2897-2907(2007)
57. X. Chen and P. S. Stewart, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 718-720(2002)
58. M. H. Turakhia, K. E. Cooksey and W. G. Characklis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1236-1238(1983)
59. S. B. Borenstein, *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*, p4-5, Industrial Press Inc., New York (1994)
60. L.Z. Jin, Y.W. Ho, N. Abdullah and S. Jalaludin, *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 183-185(1998)
61. C. Matthies, C. H. Kuhner, G. Acker and H. L. Drake, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1119-1125(2001)
62. S. Edelson-Mammel, M.K. Porteous, R.L. Buchanan, *J. Food Sci.*, **71**, M201-M207(2006)

第4章 総括

これまで広く利用されてきた石油系プラスチックは安価で強度や耐久性が高く、加工性にも優れるため、現代社会では必要不可欠なものとなっている。しかし、自然環境中でほとんど分解されないため、埋め立て処理場の不足や、生態系への悪影響などの問題がある。また、これらを焼却する際、不完全燃焼によるダイオキシンやSO_x、NO_x等の有害物質の発生なども社会問題となっている。このことから、植物や微生物等の再生可能資源を原料とした生分解性プラスチックが注目されている。ポリ乳酸(PLA)は優れた物性を示し、かつ量産化されており、もっとも研究が進んでいる生分解性プラスチックの一つである。しかしながら、PLAの生分解速度は他の生分解性プラスチックよりも著しく遅く、製造コストもポリエチレン(PE)やポリスチレン(PS)などの汎用性プラスチックと比較すると高価である。

そこで、本論文では、第2章でPLAの環境分解性(加水分解性)向上を目的としてアルカリ性物質である焼成貝殻粉末をPLAに混練し、その抗菌性、物理特性、および加水分解挙動を詳しく調べた。

その結果、焼成貝殻粉末の混練したPLAフィルムは、その抗菌性が著しく低下し、また、より高い分解性を有することが分かった。これにより、PLAのコンポスト化が容易になるとともに、これまで以上にPLAの様々な用途展開が可能であることを明らかにした。

第3章では、PLAのバイオフィルム抑制効果を調べた。本章では、従来の抗菌剤を使用したバイオフィルム形成阻害剤とは異なる、環境に優しい新しいバイオフィルム形成抑制材料を提案した。

PLAの加水分解により生成する乳酸が、バイオフィルム形成阻害機能を発現することを見出した。より実用的な用途展開の可能性を模索するため、PLAとPEを加熱溶解混合したネット(PLA-PEネット)を作製した。PLA-PEネットには緑膿菌に対する抗菌性は確認されなかったが、PEネットと比較してバイオフィルム付着量が半分程度に減少した。また、PLA-PEネット表面のPLA部分への緑膿菌付着がほとんど認められなかった。さらに、家庭

厨芥を利用した微生物群集構造解析を行ったところ、PLA-PE ネット上では乳酸に対して耐性の高い菌種が優先種となっていることがわかった。

これにより、従来のような抗菌剤や分解酵素を添加せずに細胞外多糖の形成や付着を阻害することが可能な材料が製造可能であることを明らかにした。また、乳酸は、人体や環境に対して無毒であると考えられ、これまでにない抗バイオフィームシステムを構築できる可能性を示した。

以上の結果をふまえて、Fig. 4-1 に本研究成果により新たに期待できる PLA の用途を示す。第二章の成果により、生分解性資材としての建築工事用シート、マルチフィルムや育苗ポット等の農業資材、および包装容器やトレイ等の日用品といった、最終的には消失することが望ましい用途への展開が期待できる。また、第三章の成果により、バイオフィームの発生しにくい医療用カテーテル、食品製造装置、排水フィルターおよび水切りネットなどの用途が期待できる。

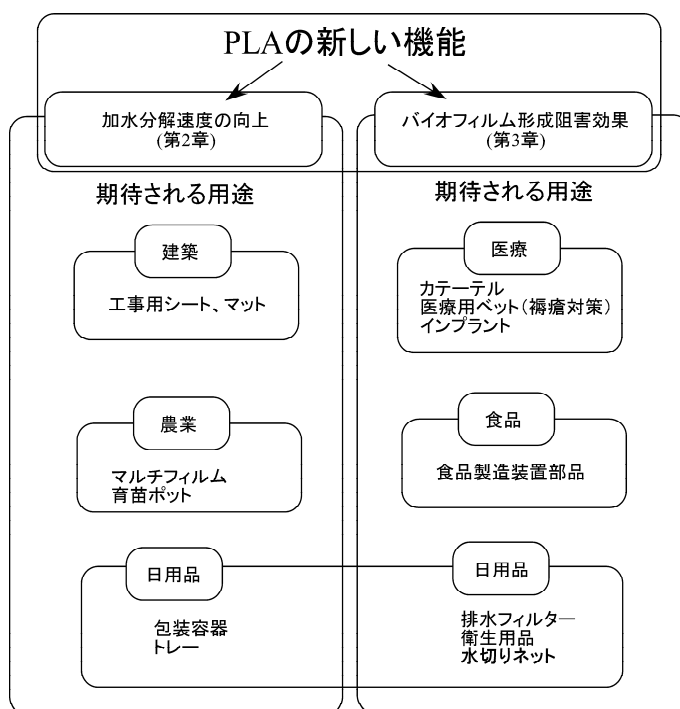


Fig. 4-1 新たに期待される PLA の用途。

このように、汎用高分子に対する置き換え材料として、PLA の用途開発に力を注ぐことが、環境調和型社会の構築および産業の発展につながると考えられる。今後も環境問題や資源枯渇問題の解決のため、生分解性高分子材料の需要が高まると予想される。さらに、生分解性以外の新しい機能の発見あるいは付与も求められると予想される。従って、こうした地道な検証の積み重ねが PLA の新たな用途展開を可能にすると確信し、社会への貢献のため、研究に真摯に取り組んでいく必要がある。

関連論文および参考論文

関連論文

第2章 ポリ乳酸-焼成貝殻粉末ブレンドの性質

恩田紘樹、浜田敦、三友宏志、河原豊、石本聖明、小原仁美、山根秀樹

ポリ乳酸/焼成貝殻コンパウンドの物性

繊維学会誌, **66**, 120-123(2010)

Koki Onda, Atsushi Hamada and Hiroshi Mitomo

Antibacterial ability and physical properties of poly (L-lactic acid) film blended with baked shell powder

繊維学会誌, **63**, 295-300(2007)

参考論文

恩田 紘樹, 久保川 博夫, 篠沢 隆雄

Pseudomonas aeruginosa 産生物質の繊維への吸着と抗菌性効果

繊維学会誌, **61**, 19-24(2005)

恩田 紘樹, 久保川 博夫, 篠沢 隆雄

Pseudomonas aeruginosa 培養上清液で処理した繊維の染色堅ろう性及び抗菌耐久性

繊維学会誌, **61**, 132-137(2005)

恩田 紘樹, 久保川 博夫, 篠沢 隆雄

キダチアロエ抽出物で処理した繊維の染色堅ろう性及び抗菌性効果

繊維学会誌, **61**, 303-308(2005)

Tamao Odake, Toshihiko Saheki, Kazutoshi Kamezawa, Kozue Miyata, Hiromi Takiguchi,

Hiroki Hotta, Koki Onda, Yasuaki Kojima, Jinxiang Li and Kin-ichi Tsunoda

Miniaturized two-dimensional gel electrophoresis of high-molecular-weight proteins using low-concentration multifilament-supporting gel for isoelectric focusing

Journal of Electrophoresis, **53**, 57-61(2009)

Lei Zhang, Kouki Onda, Ryozo Imai, Ryouichi Fukuda, Hiroyuki Horiuchi, Akinori Ohta

Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochemical and Biophysical Research Communications, **307**, 308-314(2003)

謝 辞

本研究を行うに当たり、日頃ご指導いただいた群馬大学大学院工学研究科、粕谷健一教授、同、河原豊教授、同、三友宏志名誉教授に心より御礼申し上げます。本論文の審査の労を賜るとともに、ご指導頂きました、群馬大学大学院工学研究科、土橋敏明教授、同、浅川直紀准教授に心より御礼申し上げます。

また、ポリ乳酸と焼成貝殻粉末の混練、フィルム成形ならびに動的粘弾性測定に関してご助言頂きました齊藤陽氏に感謝いたします。ポリ乳酸とポリエチレンを加熱溶解混合にご協力いただきました(有)高橋製作所代表取締役社長の高橋幸雄氏に心より感謝いたします。アルギン酸の分子量測定に関して、直接指導していただくとともに、的確なご助言やご協力を頂いた群馬大学大学院工学研究科、高橋亮助教に心より感謝いたします。微生物群集構造(PCR-DGGE)解析に関してご協力頂きました室井文篤氏に心より感謝いたします。

さらに、職責を果たしながら、ここまでの研究をなしえたのも上司の温かいご支援があつてのことであり、群馬県繊維工業試験場長の眞下寛治氏や素材試験係長の新井正直氏をはじめ、職員の皆様に心より感謝いたします。

最後に、本研究を精神的な面で支えていただいた家族に感謝いたします。