



緑茶カテキンによる染色の抗菌性

長島, 真由

(Citation)

課題研究優秀論文集, 2022:121-140

(Issue Date)

2023-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/0100477741>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477741>



2022 年度 卒業研究最終論文

緑茶カテキンによる染色の抗菌性

神戸大学附属中等教育学校 9 回生

6 年 1 組 20 番

長島 真由

(指導教員 玉久保 敦也)

2022 年度 卒業研究最終論文

緑茶カテキンによる染色の抗菌性

神戸大学附属中等教育学校 9 回生 6 年 1 組 20 番 長島 真由

(指導教員 玉久保 敦也)

要旨

抗菌性が高いことで知られているカテキンを強力にかつ持続可能な抗菌方法として役立てるために、本研究ではカテキン染色による抗菌に着目した。理想的な抗菌を実現するためには、強い抗菌効果があり、持続性のある染色条件を見つける必要があった理想的な抗菌を実現するためには、カテキンを繊維に適度な強さで結合させる必要があると考え、最適な濃度条件を求めた。カテキンによる染色を行う上で、銅イオンを含む後媒染剤の濃度を変化させ、最適な染色条件を求める実験を行った。指標として、染色の抗菌力はハロー法で定量化し（1 つ目の実験）、染料分子と繊維の結合は、繊維からの浸出液の濃度を吸光度測定により定量化した（2 つ目の実験）。

1 つ目の実験では、銅イオンとカテキンを用いて染色した 5 種類の繊維の抗菌作用をハロー法で検証した。銅イオンが含まれているものであれば、ある程度高い抗菌性が見られた。

2 つ目の実験では、分光光度計による吸光度測定を用いて、染色した製品を水に浸したときの、水中のカテキン、銅イオン、銅カテキン錯体の濃度を測定し、結合力を定量化した。結果は、銅イオンが過剰に含まれていないものだと浸出液中の吸光度が低く、繊維と染料との結合力が強いというものだった。

この結果から結合力の強弱が適当であった為に、長期間安定した抗菌性を持つ染色条件が明らかになった。その濃度では、カテキンと銅イオンが過不足なく結合していると思われた。

その条件を明らかにするために、銅イオンとカテキン錯体が飽和で結合する濃度を定量化する実験を追加した。カテキンの濃度は一定のまま、銅イオン濃度を変化させ、全体の吸光度の変化をみることで、錯体がどのように形成されるかが明らかになった。銅イオン濃度に比例して吸光度が増えていくことがわかったものの、飽和となる点が現れる濃度よりも大分低かったことから、銅カテキン錯体の平衡定数を求めることはまだできていないが、結合力の高さを明らかにすることができた。

今後の展望として、染色の平衡定数を算出し、理想の染色濃度比を求めたい。この緑茶カテキンによる染色に着目することで、天然抗菌物質の抗菌性の性質を踏まえ、持続可能な抗菌製品など、それぞれにあう活用の仕方を探求することに繋がるだろう。

目次

要旨	1
第 1 章 序論	1
第 1 節 新たな抗菌方法の提案	1
第 2 節 緑茶カテキン・銅イオンに関する先行研究	1
第 3 節 染色に関する先行研究	3
第 4 節 本研究の目的	8
第 5 節 本論文の構成	8
第 2 章 染色の抗菌力	9
第 1 節 本調査の概要	9
第 2 節 調査目的	9
第 3 節 調査方法	9
第 4 節 調査結果	12
第 5 節 考察	13
第 3 章 染色の結合力	14
第 1 節 本調査の概要	14
第 2 節 調査目的	14
第 3 節 調査方法	14
第 4 節 調査結果	15
第 5 節 考察	19
第 4 章 染色条件	21
第 1 節 本調査の概要	21
第 2 節 調査目的	21
第 3 節 調査方法	21
第 4 節 調査結果	24
第 5 節 考察	29
第 5 章 結論	34
第 1 節 まとめ	34
第 2 節 今後の展望	34
謝辞	35
参考文献	36

第 1 章 序論

第 1 節 新たな抗菌方法の提案

今日の衛生観の高まりや持続可能な製品への代替の重要性、薬剤耐性菌対策の必要性から、天然抗菌物質を用いた持続可能な抗菌が求められる。本研究では、緑茶カテキンを用いた染色による抗菌を提案したい。

詳しくは第 1 章 第 3 節で述べるが、緑茶カテキンを用いた染色による抗菌に着目した理由は、緑茶カテキンと金属による錯体を有効に用いるということである。前年度の研究を踏まえると、金属カテキン錯体を安全かつ効果的に用いる必要があった。そこで、緑茶カテキンが染料として使われていることと、染色の製法で金属媒染液が使われていることから、本研究を発想した。

第 2 節 緑茶カテキンや銅イオンに関する先行研究

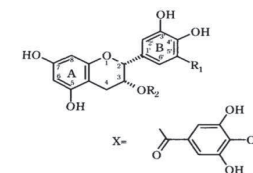
第 1 項 緑茶カテキン

カテキンは、茶の渋みを担う成分である。茶カテキンは、代表して 4 種（エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート）があり（図 1，2）、それぞれ異なる構造を持つ異性体である。名称の意味としては、エビは、酵素失活のための加熱以外の加熱が行われていないという意味、ガロは、カテキンから水酸基（親水性）が増えたという意味、ガレートは、3つの水酸基が増えたという意味である。現在分かっているだけで、次の表のようなカテキンの機能がわかっている。

緑茶抽出液中の主なカテキンの割合

カテキンの種類	割合 (%)
(-)Epicatechin (EC) エピカテキン	6.4
(-)Epigallocatechin (EGC) エピガロカテキン	19.2
(-)Epicatechin gallate (ECg) エピカテキンガレート	13.7
(-)Epigallocatechin gallate(EGCg) エピガロカテキンガレート	59.1

図 1 緑茶抽出液中の主なカテキンの割合



EC : R₁=H, R₂=H
EGC : R₁=OH, R₂=H
ECg : R₁=H, R₂=X
EGCg : R₁=OH, R₂=X

図 2 主な緑茶カテキンの構造

表 1 カテキンの機能性（原征彦 2000）

抗酸化作用	殺菌作用	抗腫瘍作用
抗突然変異作用	α -アミラーゼ阻害作用	歯垢合成酵素阻害作用
血糖上昇抑制作用	体脂肪抑制作用	血圧上昇抑制作用
抗がん作用	消臭効果	

第 2 項 カテキンの抗菌作用

緑茶は、カテキンに起因する抗菌活性を有している。しかし、高い抗菌活性ではないため、日常的に抗菌物質として利用するには、その他の天然抗菌物質と組み合わせた上でそれぞれの抗菌活性を十分に生かす方法もしくは、相乗効果を生み出す方法を検討する必要がある。食品類に抗菌性を付与することを考慮し行った実験より、はちみつやレモンなどの天然抗菌物質と緑茶カテキンを組み合わせると、抗菌活性は見られたものの、それぞれの抗菌活性の総和より低くなっていることが分かった。また、カテキンとの金属錯体を利用すると強い抗菌性を持つことが分かった。

緑茶カテキンには、まだまだ生理活性を高める余地があり、さまざまな探求が可能である。

抗菌効果として、カテキン自体は菌の増殖抑制をすると考える。なぜならば、図 3 のコロニーの大きさを比較すると、カテキンのみコロニーの大きさが小さく、コロニー数は比較的多いことがわかる。つまり、菌をすべて殺菌するのではなく、殺菌されなかった残りの菌が増殖してコロニーの増殖速度を下げているということがわかる。

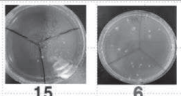
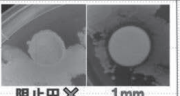
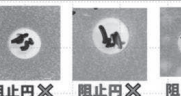
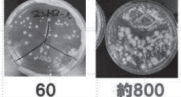
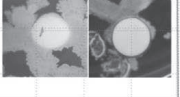
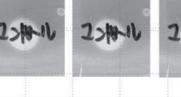
カテキン十濃 コントロール 読み取り 特徴	コロニーカウント法	ペーパーディスク法			ATP測定法
	 15 6	 阻止円× 1mm	 阻止円× 阻止円× 阻止円×		92 /20uL
	 60 約800		 2>10uL 2>10uL 2>10uL		1282 /20uL
	コロニー小 菌増殖抑制 定量的 コロニーの大きさ	弱い抗菌効果 ←菌増殖抑制 定量的△ 阻止円の外の密度	抗菌効果× ←菌増殖抑制 定量的△ 外的要因少ない		強い抗菌 正確

図 3 4 つの方法を用いた緑茶カテキンの抗菌性試験

もともと抗菌作用を持ち合わせている、銅イオンや銀イオンであるが、相乗効果が見込

まれるのはカテキン-銅錯体のみであった。金属とカテキンとの錯体であるが、カテキン-銅錯体においてはカテキンの還元作用による一価の銅イオンへの変化、つまりは相乗効果が起こり、より強い抗菌効果が見込まれる。しかし、銀イオンに対しては、還元作用によって銀イオンの価数の変化はないことと、カテキンによって強い抗菌効果を持つ酸化銀にはならないため、抗菌効果が弱くなっていくと考えられる。（4 KP より）

前年度の研究から、緑茶カテキンと天然抗菌物質の組み合わせによる抗菌には限界があること、金属と緑茶カテキンの錯体を形成することで相乗的な抗菌作用が現れることが分かったため、今年度の研究ではおもに銅カテキン錯体に着目することとした。

また、前年度の研究では、カテキンの抗菌活性を実際にどのように活用するかについて配慮していなかったことを踏まえ、今年度では、緑茶カテキンを用いた抗菌方法を実際に使用する形として、カテキンを布染色に使用した際の抗菌効果を研究対象にしようと考えた。

第 3 項 カテキン銅錯体の抗菌作用

カテキンと銅イオンにおいて、図 4 のようなカテキン銅錯体が形成されると言われている。

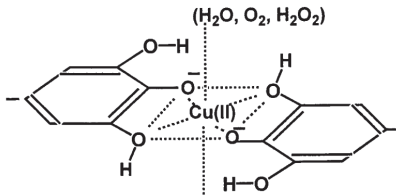


図 4 カテキン-銅（Ⅱ）錯体の構造（Yoshioka, H. 2001）

カテキンと銅イオンそれぞれ抗菌力を有しているが、カテキンが二価の銅イオン Cu^{2+} を一価の銅イオン Cu^{+} に還元することで銅イオンの抗菌力を増強させていることが知られてい。また、カテキンは銅（Ⅱ）イオンが共存すると酸化促進作用を示し、DNA 鎖の切断や脂質の過酸化を引き起こす。大腸菌と黄色ブドウ球菌に対するカテキン-銅（Ⅲ）錯体の殺菌作用を比較し、その殺菌機構を検討した研究を以下に示す。大腸菌にカテキン-銅（Ⅱ）錯体を作用させると、大腸菌の ATP 量とカリウム量は著しく減少し強い殺菌作用が現れた。各種阻害実験により、カテキン-銅（Ⅱ）錯体は大腸菌表面のリボ多糖体と結合し、ここで過酸化水素を発生することが示された。（星野伸夫 2000）

第 3 節 染色に関する先行研究

第1項 染色・染料について

染色とは、染料・顔料で繊維などを堅牢に着色することをいう。(高岸徹 2003)

物体に可視光線が当たると特定の色が現われる。これは物体が選択的に可視光線を吸収し、吸収されなかった残りの反射光が固有の色を示すためである。このように固有の色を持つ物質を色素という。一般に、色素のうちで水に溶解または分散した状態で繊維に親和性があり、かつ洗濯で容易には脱落せず、光や熱などの外的条件に対して耐性があるものを染料という。(今田邦彦 2001)

第2項 染色の仕組み

染浴中には、繊維、染料、染色助剤、媒体、酸、塩基、塩が共存している。本研究の染色媒体は水である。共存物質は系内で平衡状態を保っていて、模式的には図5のように示される。主な過程は染料の繊維表面への吸着(図5の1)と繊維内部への拡散(図5の2)である。

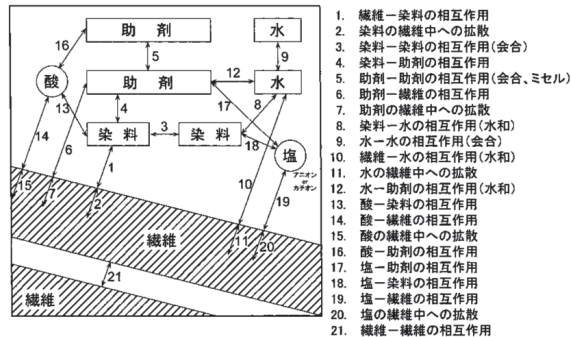


図5 染浴中の平衡(高岸徹 2003)

まず、染浴において、水溶性染料の分子は分子内に有する親水性基と水分子との相互作用によって水和(染料分子と水分子とのゆるい結合のこと)(図5の8)している。一方、セルロースも分子内の親水性基と水分子との相互作用によって水和(セルロースと水分子とのゆるい結合のこと)(図5の10)している。次に、水和した染料はセルロースの表面に向かって染浴を拡散し、セルロース表面に達し、そこで染料分子とセルロースは両者とも水和した水分子を分離し、染料分子はセルロース表面に吸着される。さらに、染料分子はセルロース内の間隙を通して繊維内部へ拡散していく(図5の2)。この過程において、セルロースと染料分子との間にある種の結合が生じ、染着が完結する。一般に、染料分子が繊維に染着する過程は可逆的であるから、一旦染着した染料分子が繊維の他の部分へ拡散し、その部分に染着することもあるし、また繊維に染着した染料分子が染浴内に移行し拡散することもある。染色の最後には、染浴中の染料濃度と繊維内部の染料濃度の割合が一定になり見かけ上染着が停止したかのような状態になる。これを染着平衡という。染着

平衡に至るまでの過程において、染料分子が染浴から繊維に移動する速さを染色速度と呼んでいる。(今田邦彦 2001)

第3項 染料分子と繊維との結合

染料が繊維に染着する際には、染料と繊維の間に種々の結合力が生じる。染料分子と繊維との間のこの結合力の強弱が染めやすさや染色堅牢度を支配する。繊維と染料の間の結合の様式は、結合エネルギーの大きさにより非共有結合と共有結合とに分類される。

(a) 非共有結合力

2つの原子あるいは原子団の間に働く力が弱い場合の結合を物理結合力といい、結合エネルギーは10kcal/mol以下である。物理結合力としては次の結合力が挙げられる。

表2 染料—繊維間の結合様式

染料／繊維	主な結合様式
直接染料／綿	水素結合、分散力
建染染料／綿	水素結合、分散力
ナフトール染料／綿	水素結合、分散力
反応染料／綿	共有結合
酸性染料／羊毛(ナイロン)	イオン結合、水素結合、分散力
酸性媒染染料／羊毛	イオン結合、配位結合、水素結合、分散力
分散染料／ポリエステル繊維	分散力、水素結合
カチオン染料／アクリル繊維	イオン結合、分散力、水素結合

(b) 繊維—染料間の相互作用

繊維の化学構造、物理構造によって結合力は異なり、その結合力としては、共有結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力、配位結合、疎水結合などがある。セルロース系繊維(木綿、紙)における染色形式について述べる。(高岸徹 2003)

(c) 緑茶カテキン染色の結合力と堅牢度

染色における堅牢度繊維と染料の間での結合力に起因するとされる。先行文献(文献)より、繊維と染料の間で起こる結合、特にセルロースと直接染料においては、水素結合と分子間力が発生する。カテキンとセルロースの結合力は高いと考えられる。なぜなら、カテキン4種のうち2種は水酸基を持ち、親水性であるためだ。(根拠)直接染料として扱えるため、セルロースの水酸基の周期と近い状態の染料がセルロースに親水性を持つことから、水素結合が染着に寄与している。また、ジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide(DMSO))中のスルホン酸基は染料を水溶性にするために導入されているが、疎水性の芳香基とセルロースの疎水性部分との間に疎水結合や分散力も働いて染着していると考えられる。(高岸徹 2003)

これらの文献（高岸徹 2003, 今田邦彦 2001）を踏まえると、カテキンのみでも布との疎水性相互作用ははたらくと考えるが、媒染剤として銅イオンを用いたときに、どのような結合状態になるのか、という疑問が生まれる。まず、カテキンと銅イオンは錯体形成をし、強い結合力を持つとされる。以下の通りに錯体形成時の結合を予想した。

仮説として、カテキンと銅イオンの錯体形成が優先される結果、セルロースとの結合力が弱くなり、結果として、媒染剤として銅イオンを多く用いたときのカテキン染色量は減ってしまうと考える。セルロースとの結合は、銅イオンを用いないときと同様に起こるか疑問である。つまりは、色落ちするのが速いことにつながるが、最も色落ちしにくいとされるカテキンと銅（Ⅱ）イオンの割合を示した文献は見当たらなかったため、探求する価値があり、新規性のある研究だと考えている。

第4項 染色に関する実験知識

物理的分析法の多くは、電磁波や粒子線と物質との相互作用に基づく応答を検出することにより、情報を得ている。物理的分析法は基本的に、電磁波の量子力学的共鳴吸収・放射に基づいているものが多く、これを総称して分光法といい、分光法による定性・定量分析をとくに分光分析という。

分光分析は電磁波と物質との相互作用に基づく分析法で、分析対象物質によって吸収あるいは放射される光子の量が、その物質の濃度や量に依存することを原理とする。この光子の吸収・放出は、物質（イオン、分子）のもついろいろなエネルギー準位での量子力学的遷移に対応するもので、ある特定のエネルギーのときに起こる、これは量子力学的な共鳴現象であり、この電磁波のエネルギーとその吸収量や放射量との関係をスペクトルという、スペクトル線には共鳴点、線幅、強度の三つの要素がある。

共鳴点は定性分析に用いられ、いろいろな分光分析により異なる呼称（共鳴周波数、共鳴振動数、共鳴波数、吸収極大、吸収帯など）がある。イオン、原子、分子は、それぞれある特定の周波数の電磁波を吸収したり放射したりする受信機兼発信機ともいえる。異なる化学種や官能基は異なる周波数の電磁波を吸収・放射する、そこで物質のスペクトルは個々の物質の種類を識別することができる。また、スペクトル強度はスペクトル線で囲まれた部分の面積に相当する量であるが、近似的にスペクトル線の極大高さが用いられることもあり、定量分析に用いられる。

線幅はスペクトルを与えるエネルギー準位の振れに原因があり、イオン分子間の衝突や回転、あるいは反応などによりもたらされる。したがって、線幅の成因に関する解析が正確になされれば、分子間相互作用などに関する情報が得られる。同じ分子でも、固体、液体、気体状態で、その電子状態、振動状態回転状態、あるいは電子・核スピンの磁気共鳴吸収スペクトルなどの線幅は一般に著しく変わる。したがって、このことを利用すれば、物質の種々の状態分析が可能になることがある。線幅の原因は、共鳴点の近い複数の化合物、官能基などのスペクトルの単純な重なりによることもある。この場合は、それぞれのスペクトルを分離しない限り有用な情報は得られない。

強度については Beer-Lambert の法則「 $A = \epsilon_M c l$ 」が重要である。この法則は、溶液中の

試料物質の光吸収の度合から、その濃度を求めるために使われる関係式である。溶液中の可視吸光分析に関して生まれた法則であるが、原子の吸光、赤外吸収などについても成立し、役立っている。

図6の左から入射した光 P_0 は、厚さ b のセルの中の濃度 c の試料物質溶液により吸収されて強度が減衰し、 P となって出てくる、その比 P_0/P の対数には

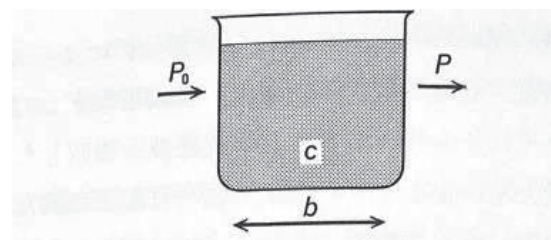


図6 溶液による光の吸収、 P_0 :入射光強度、 P :透過光強度、 c :濃度、 b :光路長

$$\log \frac{P_0}{P} = K \cdot b \cdot c \quad (1)$$

の関係が成立する。ここで $\log P_0/P$ を吸光度といい、 A で表わす。比例定数 K は濃度 c の単位によって変わる。 c の単位が mol l^{-1} のとき、定数をモル吸光係数と呼び、 ϵ で表わす。また c の単位が g l^{-1} のときは吸光係数と呼び a で表わす。すなわち Beer-Lambert 則には次のいずれかの表わし方がある。

$$A = abc; (g \text{ l}^{-1}) \text{ または } A = \epsilon bc; c (\text{mol l}^{-1}) \quad (\text{梅澤喜夫, 1998})$$

（日本化学会, 1992）

このことから、本研究では、第3章におけるまだ精密さを必要としない実験ではガラスセルを用い、第4章での精密さを必要とする実験のときは石英セルを用いた。

・検量線

調べる溶液の吸光度を縦軸に、調べる溶液の濃度を横軸にとり、直線状のグラフが検量線である。検量線は、未知濃度の試料の濃度の吸光度を計測することで求めるための指標となるものである。手順としては、調べる溶液の濃度の低いものから順番に4点ほど測定し、検量線をひき、立式したあとに、サンプルの吸光度を測定する。

・染色堅牢度

「堅ろう」は、「堅牢」とも書き、丈夫さ（抵抗性）を意味する。染色堅ろう度試験とは、染料などで染色された生地染色の丈夫さ（抵抗性）、いわゆる「色の変わりにくさ」や「色落ちのしにくさ」を見るものだ。染色堅ろう度には、「変退色」と「汚染」がある。（センカ株式会社）

第 4 節 本研究の目的

緑茶カテキンの抗菌性を効果的かつ持続的な方法で生かすことを目的としている。そのため、本研究でのリサーチクエスションは、「緑茶カテキンを用いた染色における、抗菌性が効果的かつ持続的となる染色条件とは。」と設定した。

第 5 節 本論文の構成

持続的に抗菌する染色条件には、染色した際に抗菌力が発揮されること、それが持続することの二つの観点があり、どちらもを満たす染色条件を求める。第 2 章では染色の抗菌力を取り扱い、第 3 章では染色の結合力を取り扱う。そして、第 3 章で明らかになった結論をより定量化するために、第 4 章では染色条件を具体的に求めていく。

第 2 章 染色の抗菌力

第 1 節 本調査の概要

抗菌力が持続するための、銅とカテキンを用いた理想的な染色条件を求めるために、様々な条件で染色を行った染色布の抗菌力を、ハロー法を用いて調査した。

第 2 節 調査目的

まず抗菌力を調査し、理想的な染色条件を絞り込む。ここでは、染色したカテキンと銅イオンそのものの抗菌力のみならず、染色した場合のそれらの抗菌効果がどのように発揮されるのかも結果に影響するとみて、染色条件を比較する。

第 2 章では抗菌力の持続性は考慮せず、1 回の試験における抗菌力を定量化し、第 3 章では繊維と染料との結合力を定量化することで、その抗菌力がどれだけ持続するかを調査する。

第 3 節 調査方法

第 1 項 染色布作成

次の通り、5 つの染色条件 (④) で染色布を作成した。変化させたのは濃度のみで、染料と媒染剤の混合比率は常に 1:1 とした。

本研究において、染色布の作製手順は、次の通りである。
①染液抽出 ②染色 ③媒染 ④染色条件

① 染液抽出

染液として、カテキン溶液 (※) を用いた。25 mg/mL のカテキン溶液を DMSO で希釈して 2.5mg/mL にしたものを用いた。

② 染色

染色対象を、市販の無地ハンカチ (綿) とし、1 枚につき 8mL のカテキン溶液をマイクロピペッターを用いて染み込ませ、2 日間十分乾燥させた。

③ 媒染

染色布 1 枚につき市販の銅媒染液 8mL を染み込ませ、2 日間十分乾燥させた。ただし、この市販の銅媒染液の内容物は銅塩とのみ記載されていて、濃度も分からないため、原液を 100% ととして質量パーセントで濃度を表すこととした。

④ 染色条件

これらの操作を以下の条件にあわせて行った。乾燥させる場所や温度、時間等は同一条件で行った。

- A : カテキン溶液 2.5 mg/mL 銅媒染液 100%
B : カテキン溶液 2.5 mg/mL 銅媒染液 8%
C : カテキン溶液 2.5 mg/mL
D : 銅媒染液溶液 100%
E : DMSO

※カテキン溶液:Catechin Mixture (EC, EGC, ECg, EGCg) 長良サイエンス株式会社

第2項 抗菌力

実験手順としては、第2項すべての実験において次のように行った。

- ①固体培地作製 ②菌の培養（マスタープレートからの培養）③染色 ④菌の散布 ⑤滅菌操作 ⑥抗菌性測定
それぞれの基本操作を簡潔に以下に示す。

①固体培地作製

1. ニススイ標準寒天培地粉末を電子天秤、薬さじ、薬包紙を使って 4.7g はかり、200ml の蒸留水を入れた三角フラスコに入れた。
2. その三角フラスコの口をアルミホイルで2重に包み、軽く中の蒸留水と粉末を混ぜた。
3. その三角フラスコを 121°C、15 分、2 気圧に設定したオートクレーブにかけた。
4. ガスバーナーをつけて上昇気流を起こし、菌がシャーレに落ちてこないようにしながら、ガスバーナーの近くで三角フラスコに入った培地を滅菌シャーレに分注した。または、殺菌されたクリーンベンチ内で作業を行った。
5. 培地が固まってから、滅菌シャーレをひっくり返し、冷蔵庫で保存した。

②菌の培養（マスタープレートからの培養）

1. 大腸菌（W3110）を滅菌済みの白金耳を用いてプレート上に散布した。
2. 37°Cに保たれているインキュベーター内で24時間培養した。
3. マスタープレート内の一つのコロニーを蒸留水の入った 1.5ml チューブ内で懸濁した。
4. チューブを24時間 37°Cで浸透培養した。

③布の染色

カテキンは 2.5mg/mL の濃度、銅媒染液は原液を 100%として、100%のものと 8%のもの（蒸留水で希釈）2種類を用意した。染色条件 A はカテキン 2.5mg/mL と銅媒染液 100%、染色条件 B はカテキン 2.5mg/mL と銅媒染液 8%、染色条件 C はカテキン 2.5mg/mL、染色条件 D は銅媒染液 100%、染色条件 E はネガティブコントロールとして布に対し何も加工

しない。

④菌の散布

1.コロニーカウント法の場合

クリーンベンチ内で、チューブ内の培養した菌液を培地に適当な量（それぞれの実験手順に明記する。）置き、コンラージ棒を用いて広げた。

2.ハロー法の場合

クリーンベンチ内で、チューブ内で培養した菌液に白金耳を入れ、表面張力によって得られた少量の液を培地に格子状に広げた。その際、一方向の菌液の偏りのないように、一度広げた菌液の軌跡を終点からなぞるようにした（図7）。



図7 ハロー法の場合の菌の散布方法

⑤抗菌剤の散布

1. 染色した布を 2cm×2cm の大きさに切り、固体培地上に適度な距離をあけて、1 枚につき 3 条件の染色布をおいた。
2. ふたに水滴が着いた時に培地に落ちないようにするため、その寒天培地が入っている滅菌シャーレを上下逆さまにして、インキュベーターに入れた。
3. 実験の過程で菌が入っていないかを確認するために、残りの 1 つの殺菌したガラスシャーレに蒸留水につけた布を置き、2.と同じように作業してインキュベーターに入れた。
4. 菌が存在しているか確認するために、菌を散布した培地を作製した。
5. インキュベーターで 37°C、24 時間培養を行った。
6. 阻止円（ハロー）の有無を観察し、細菌の増殖が抑えられて透明な阻止円が出現している場合は大きさを測定した。この際、その様子を撮影した写真をパワーポイント内に読み込み、直径の比を用いて大きさを計測した。



図8 阻止円

⑥ 滅菌操作

滅菌操作は、クリーンベンチ中で行った。用いる道具は、使用する前にオートクレーブを用いて乾熱滅菌しておいた。

第 4 節 調査結果

第 1 項 実験①～銅媒染液～

ハロー法を用いて阻止円が A,B,D の 3 つの条件下で形成されたのち、撮影した写真に対してパワーポイントの距離を計測するツールを用い、定量した結果、図 9 の通りの結果となった。

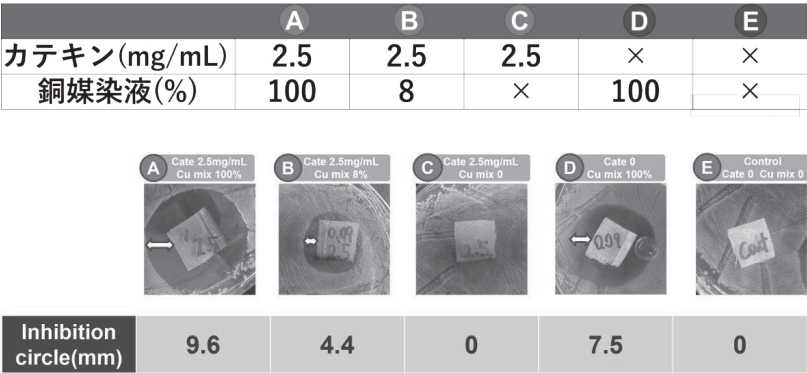


図 9 ハロー法を用いた抗菌性試験

カテキンと銅媒染液が最大濃度である染色条件 A で最も大きい阻止円が見られた。その次に銅媒染液のみの染色条件 D、そしてカテキンと銅媒染液の濃度が低いものの染色条件 B が続いた。

第 5 節 考察

第 1 項 実験①

抗菌性は、銅イオンを多く含むものほど高くなると考える。前年度の研究からもわかるように、カテキンは菌増殖を抑制する、いわば緩やかな抗菌力を持っていて、銅との錯体においては抗菌増強作用を持っている。それは、図 7 の A,C,D を比較するとその傾向が読み取れる。カテキン単体 (C) では阻止円が全く現れないのに対し、A では銅と錯体を形成することで D と同じ濃度の銅イオンが A ではより大きい阻止円を形成する結果となった。持続性のある抗菌が可能な染色条件には、数回洗っただけで抗菌性が失われないような結合力を持つことが必要であると仮説を立てているため、第 3 章では繊維と染料の結合力に着目する。

第 3 章 染色 の 結 合 力

第 1 節 本調査の概要

理想の染色条件、つまり、高い抗菌性が長い間持続する染色条件を求めるには、繊維と染料間の結合力が適切に保たれる徐放性が必要であると考え、染色した繊維を水に浸した時のカテキン、銅、それらの錯体の水中濃度を測定し、理想的な染色条件を見出した。

第 2 節 調査目的

繊維と染料間の結合力が適切に保たれる理想の染色条件、つまり、高い抗菌性が長い間持続する染色条件を求める。なぜならば、第 2 章で示されたように強い抗菌性を持たせることができたとしても、染料が 1 回に大量に溶出してしまうと、数回のうちに抗菌性がなくなる可能性があるからである。染色を用いた抗菌の良さの一つである持続可能性を達成するためには、一度に染料が大量に溶出することを防ぐ必要がある。

この調査は、染色の堅牢度を求めることも兼ねている。堅牢度は、目視で染色の色落ち具合を見るのに対し、この調査では染料が繊維から離れる過程を定量的に測定できることから、現在行われている堅牢度調査より詳細な情報を得られると考えた。

第 3 節 調査方法

第 1 項 検量線作成

カテキンに対して銅が過不足な銅イオン濃度を求めるために、銅媒染液の濃度を変化させたときの吸収スペクトルの変動を調べた。手順は以下の通りに行った。ただし、すべてのスペクトル測定において、DMSO などの溶媒のスペクトルは補正した。

①カテキンは一定で、銅媒染液濃度を变化させた混合溶液のスペクトルの変化を調べた。カテキンは 2.5mg/mL の濃度、銅媒染液は原液を 100%として、20%、10%、8%、5%、3%、1%のもの（蒸留水で希釈）を用意した。それぞれの混合溶液を 3mL ガラスセルに入れ、分光光度計のスペクトル測定機能を用いてスペクトルを計測した。

②波長 600nm 付近のスペクトルの谷の吸光度に着目し、その値が銅媒染液濃度に比例することを確認した後、その吸光度が一定になる銅媒染液濃度を、カテキン 2.5mg/mL に対する飽和濃度とした。

③②で求めた飽和濃度の銅媒染液とカテキン溶液 2.5mg/mL の混合液、カテキン溶液 2.5mg/mL、飽和濃度の銅媒染液それぞれ 3mL をガラスセルに入れ、分光光度計のスペク

トル測定機能を用いてスペクトルを計測し、そのピーク波長や吸光度を求めた。

④③でスペクトルを計測した銅媒染液、カテキン溶液、それらの混合液の濃度をそれぞれ 10 倍、100 倍希釈したものを用意した。

⑤③で求めたスペクトルピーク波長でそれぞれの吸光度を計測した。

⑥3 点をグラフに起こし、近似直線の式を算出した。

第 2 項 濃度測定

第 4 節第 1 項で作成した検量線をもとに、水に浸しておいた試料のカテキン・銅イオン・カテキン銅錯体の濃度を以下のように定量化した。濃度未知の試料溶液において、各 3 種類の吸収スペクトルピークの波長の吸光度と実際の溶出濃度とが比例していたことから、以下のような関係式が得られた。（ABS:吸光度 C:濃度（%）

銅イオン：ABS=0.161C

カテキン：ABS=0.142C

銅カテキン錯体においては、濃度が未知の状態である現段階では検量線を作ることはできないので、銅カテキン錯体のスペクトルの極大波長の吸光度との比を計算した。

銅カテキン錯体：ABS:3.47（ $\lambda=360$ ）

この関係式を使って、最初に布に染み込ませた濃度（初期濃度とする）と比較して何%が溶出したかを算出した。

第 4 節 調査結果

第 1 項 検量線作成

図 1 0 のように、波長 780nm 付近で銅媒染液濃度にほぼ比例して吸光度が増加した。カテキン溶液 2.5mg/mL、銅媒染液 8%で混合したときに波長 780nm 近傍点では変動が見受けられなかった。よって、カテキン溶液が 2.5mg/mL に対し、銅媒染液 8%において飽和に結合していると推測した。これをもとに、カテキン溶液 2.5mg/mL 銅媒染液 8%を混合させた際にできるカテキン銅錯体における吸光度を基準として、検量線を作成した。

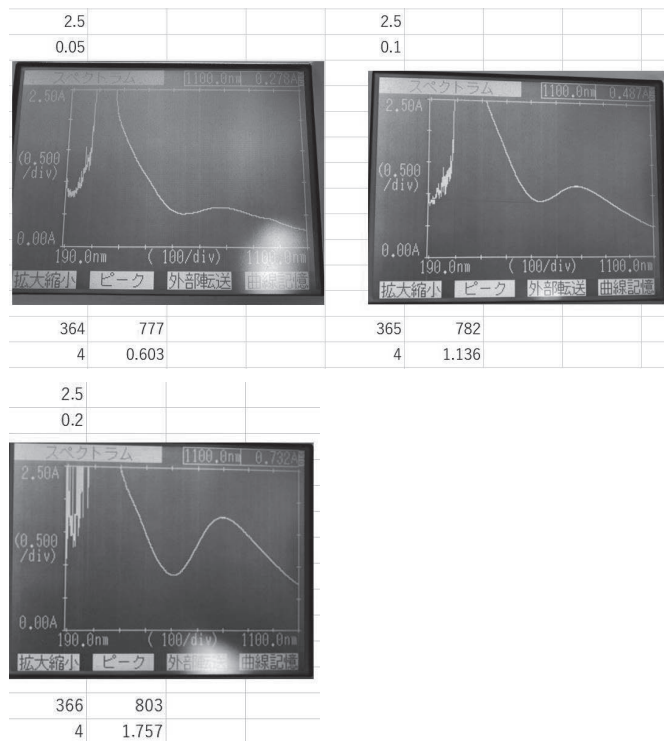
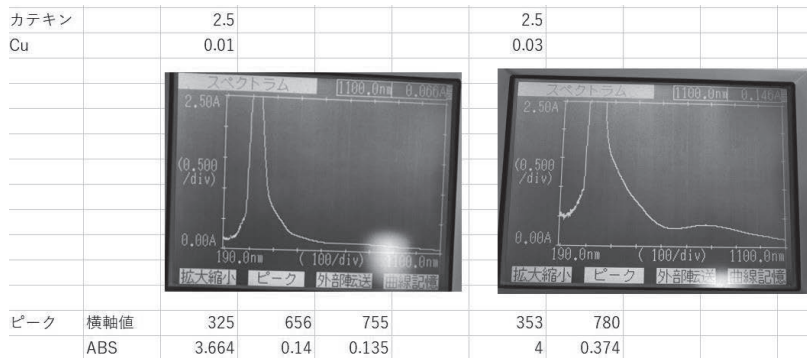


図10 銅イオン濃度を変化させたときの全スペクトル変化

以下は、分光光度計のスペクトル測定の結果をエクセルデータに起こし、グラフ化した

ものである。

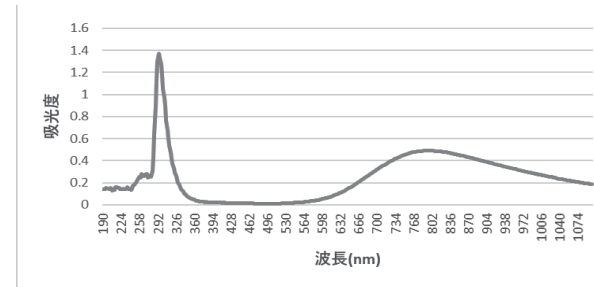


図11 銅イオンの吸収スペクトル

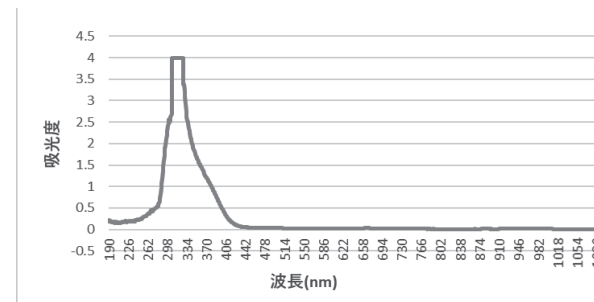


図12 カテキンの吸収スペクトル

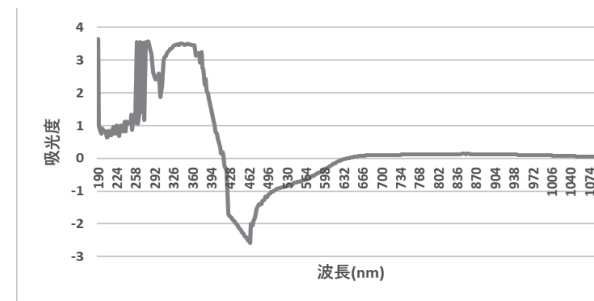


図13 カテキン銅錯体（過剰のカテキン・銅イオンを含む）の吸収スペクトル

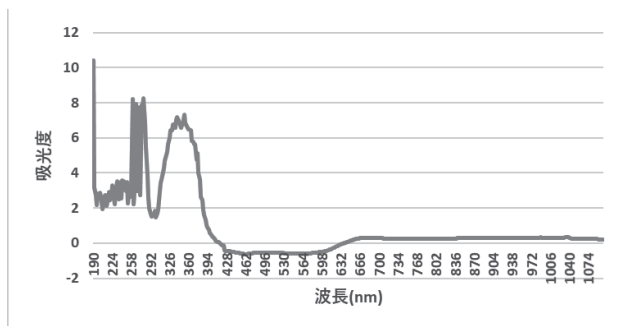


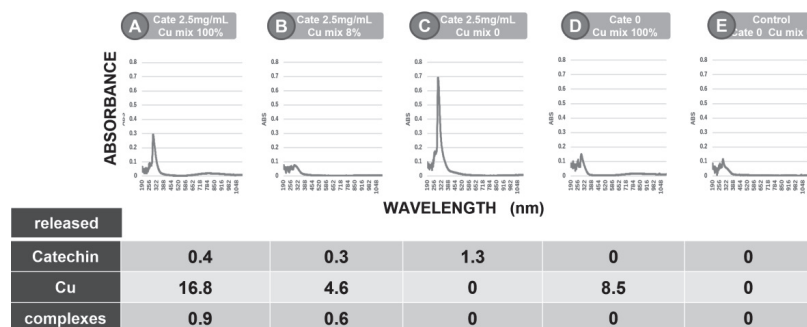
図 1 4 カテキン銅錯体のみの吸収スペクトル

カテキン銅錯体のみの吸収スペクトルのピーク波長は 360nm であった。濃度未知の試料溶液において、この波長を見るとカテキン銅錯体の溶出濃度がわかるということである。

第 2 項 濃度測定

その結果は以下の表 3 の通りである。表 3 の値を見るとカテキン、銅、カテキン銅錯体がそれぞれ何パーセント浸出液中に流れ出たかが分かる。しかし、浸出液に流れ出た物質の総量を見るための指標として正しい計算ができていないか確かでないため、グラフのピーク値の吸光度と％を総合的に評価した結果、A と C の条件で染色したものからの浸出液中のスペクトルピークが高い、B と D の条件で染色したものからの浸出液中にスペクトルピークが見られないと分かる。

表 3 全染色条件で染色した布からの浸出液のスペクトル



第 5 節 考察

第 1 項 検量線作成

第 3 章では、カテキン、銅媒染液中の銅イオン、カテキン銅錯体を対象に検量線を作成し、スペクトルや吸光度の測定を行った。第 4 章からは、より正確な定量が必要となるため、銅イオン濃度を定量化できる塩化銅を用いて実験を行った。

第 2 項 濃度測定

表 3 の結果により、A と C の条件で染色したものは、浸出液中の吸光度が高くなっている、言い換えれば、A と C のカテキンと銅イオンが繊維から離れて水中に流れ出すということであることが分かる。つまり、A と C の染色の結合力は弱いということがわかる。同様に、B の条件で染色したものは、浸出液中の吸光度が低くなっている、言い換えると、B と D 中のカテキンと銅イオンが繊維から離れにくいということである。つまり、B と D の染色の結合力は強いということがわかる。

第 2 章の染色の抗菌力の結果を踏まえると、B の条件は抗菌力、結合力ともに高いことから、最も理想的な染色条件は B のカテキンになるべく多く錯体を形成するように銅イオン濃度を設定して染色することだという結論を出せる。

第 3 項 平衡定数

以上の結果より、カテキンと銅イオンが効率的に錯体を形成する濃度条件を定量的に調べる目的で、カテキンと銅イオンを用いた染色における平衡関係（図 1 3）に注目することとした。

実際は、1 つの銅イオンに対し 2 つのカテキンが配位することから、カテキン銅錯体反応は 2 段階となるが、本研究では、簡略化のために 1 段階とすることにする

第 2 項の考察から、カテキンと銅イオンが飽和に結合する染色における濃度条件を定量化するために、カテキンと銅イオン間の平衡定数とカテキン銅錯体と繊維間の平衡定数を算出する必要があると考えた。なぜならば、第 2 章、第 3 章で理想的な濃度条件と考えられるものは、カテキンと銅イオンが強く結合する、すなわち、結合定数が非常に大きいために実験条件下で効率よく錯体が形成されることを期待した。そのために、定量的な実験を行う必要があると考えた。

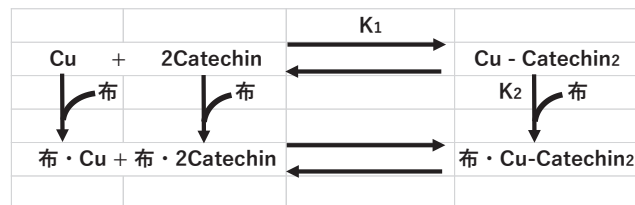


図 1 5 カテキンと銅イオンを用いた染色における平衡関係

第 4 章 染色条件

第 1 節 本調査の概要

第 2 章、第 3 章で明らかになったように、銅媒染液によるカテキンの染色条件をより正確に定量するために、まずはカテキンと銅イオンの平衡定数を求める。そのために、カテキンの濃度は一定に、銅イオン濃度を少しずつ変化させたときの銅カテキン錯体の吸光度の変化を調べた。

第 2 節 調査目的

平衡定数を定量化することで、もしカテキンと銅イオンとの結合定数が非常に大きいことがわかれば、理想的な抗菌が可能な染色を過不足なく行える。また、形成されたカテキンと銅イオンの錯体についてより深く調べることが可能になる。

第 3 節 調査方法

第 1 項 カテキンと銅イオン間の平衡定数

第 3 項 (p.19) で述べたように、銅イオン 1 分子とカテキン 2 分子とが錯体を形成するので、錯体形成の平衡反応は図 1 4 のように表される。



図 1 4 カテキンと銅イオン間の平衡

$$K_1 = \frac{[\text{Cu} - \text{Catechin}_2]}{[\text{Catechin}]^2 [\text{Cu}]} \quad \text{---①}$$

カテキン銅錯体の平衡定数 K_1 を算出するためには、カテキン銅錯体の濃度を定量化する必要があった。そのために、以下の式からカテキン銅錯体吸光係数を算出した。

ϵ_{Cu} ; 銅イオンのモル吸光係数 $\epsilon_{\text{Catechin}}$: カテキンのモル吸光係数 $\epsilon_{\text{Cu} - \text{Catechin}_2}$: 銅カテキン錯体のモル吸光係数 A : ある波長において観測される吸光度 $[X]_t$: X の総濃度

$$A = \epsilon_{\text{Cu}} [\text{Cu}] + \epsilon_{\text{Catechin}} [\text{Catechin}] + \epsilon_{\text{Cu} - \text{Catechin}_2} [\text{Cu} - \text{Catechin}_2] \quad \text{---②}$$

$$[\text{Cu}]_t = [\text{Cu}] + [\text{Cu} - \text{Catechin}_2] \quad \text{---③}$$

$$[\text{Catechin}]_t = [\text{Catechin}] + 2[\text{Cu} - \text{Catechin}_2] \quad \text{---④}$$

$$\text{Beer-Lambert の式より } A = \epsilon_{\text{Cu}} [\text{Cu}] l \quad \text{---⑤}$$

$$A = \epsilon_{\text{Catechin}} [\text{Catechin}] l \quad \text{---⑥ } l: \text{光路長}$$

$$A = \epsilon_{\text{Cu}} [\text{Cu}]_t + \epsilon_{\text{Catechin}} [\text{Cu}]_t + (\epsilon_{\text{Cu} - \text{Catechin}_2} - \epsilon_{\text{Cu}} - \epsilon_{\text{Catechin}}) [\text{Cu} - \text{Catechin}_2] \quad \text{---⑦}$$

$$2K_1 [\text{Cu} - \text{Catechin}_2]^2 + (1 - K_1 (2[\text{Cu}]_t + [\text{Catechin}]_t)) [\text{Cu} - \text{Catechin}_2] + K_1 [\text{Cu}]_t [\text{Catechin}]_t$$

= 0

$$2[\text{Cu-Catechin}_2] + (1/K_1 - (2[\text{Cu}]_t + [\text{Catechin}]_t)) [\text{Cu-Catechin}_2] + [\text{Cu}]_t [\text{Catechin}]_t = 0$$

$0 < [\text{Cu-Catechin}_2] < [\text{Cu}]_t, [\text{Catechin}]_t$ なので、 $[\text{Cu-Catechin}_2]$ の二次方程式の解は

$$[\text{Cu-Catechin}_2] = -1/4 \left((1/K_1 - (2[\text{Cu}]_t + [\text{Catechin}]_t)) \right) \pm \sqrt{\left((1/K_1 - (2[\text{Cu}]_t + [\text{Catechin}]_t)) \right)^2 - 8[\text{Cu}]_t [\text{Catechin}]_t} \quad \text{---⑧}$$

文献値は $\epsilon_{\text{Catechin}} : 10^{4.01} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ となっていたが、それも実験で求めた。

以上の、平衡定数とモル吸光係数を求める手順を具体的に述べると以下の通りである。

⑩スペクトルのベースライン補正

カテキンは DMSO 溶液に溶解したが、その DMSO には吸収スペクトルがあったので、使用する各カテキン濃度に含まれる DMSO 濃度のスペクトルを差し引いた。その方法を以下に述べる。

平衡定数を求めるこの実験においては、できるだけ実験誤差を減らすために、分光光度計による自動ベースライン補正を行うのではなく、あらかじめ自分でベースラインとなる溶液のスペクトルを計測し、濃エクセルでの計算で補正をおこなった。そのため、最初に機械でのベースライン補正は、ガラスセルもしくは石英セルになにもいれないまま行った。そして、ガラスセルもしくは石英セルに蒸留水を入れたもの、ガラスセルもしくは石英セルに DMSO を入れたもののスペクトルを計測した。

また、計測する溶液を取り換える際は、溶液を廃液入れに入れ、蒸留水で数回ゆすいだ後に、その直後に計る予定の液を少しセルに入れ、出しを数回繰り返して、共洗いをを行った。

①計測波長の決定

カテキン 0.25mg/mL、塩化銅水溶液 mol/L、カテキンと CuCl_2 水溶液 (aq) の混合液の吸収スペクトルを測定した。カテキンと塩化銅それぞれの合計スペクトルとカテキンと塩化銅を混合させたスペクトルの差分のスペクトルピークから、錯体スペクトルを正確に測れる波長を求めた。つまり、等吸収点を求める操作をした。

② ϵ_{Cu} と $\epsilon_{\text{Catechin}}$ (カテキン、銅イオンのモル吸光係数) の決定

①と同じ手順でカテキン、銅イオンそれぞれのスペクトルピークより、計測波長を決定した。その波長下である濃度における吸光度を測定し、⑤⑥より ϵ_{Cu} と $\epsilon_{\text{Catechin}}$ を求めた。

③ $\epsilon_{\text{Cu-Catechin}_2}$ (カテキン銅錯体のモル吸光係数) の決定

①で求めた波長下で、カテキン濃度は 0.25mg/mL 一定で、塩化銅水溶液のみを濃度変化させた混合液を 5 つ用意し、それぞれのスペクトルを計測した。横軸が塩化銅水溶液の濃度、縦軸が吸光度として 5 つ点をプロットしたグラフを作成し、 K_1 と $\epsilon_{\text{Cu-Catechin}_2}$ を求めることを試みた。その傾きが穏やかとなる吸光度を飽和点における吸光度とし、②③④から $\epsilon_{\text{Cu-Catechin}_2}$ を求めた。

④カテキン銅錯体の濃度の算出

③で求めた $\epsilon_{\text{Cu-Catechin}_2}$ をもとに②から算出する。

⑤平衡定数の算出

①から算出する。

第 2 項 カテキン銅錯体と繊維間の平衡定数

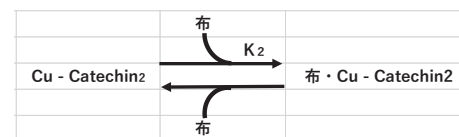


図 1 5 カテキン銅錯体と繊維間の平衡関係

$$K_2 = \frac{[\text{布} \cdot \text{Cu-Catechin}_2]}{[\text{Cu-Catechin}_2][\text{布}]} \quad \text{---③} \quad [\text{布}] : \text{布 } 1\text{cm}^3 \text{ or } 1\text{g} \text{ あたり } 1 \text{ とする}$$

$[\text{布} \cdot \text{Cu-Catechin}_2]$: 布に染色したカテキン度錯体の濃度

度

①染色

染色対象を、市販の無地ハンカチ (綿) とした。トレイにカテキン溶液 (0.25mg/mL) と銅イオン溶液 (飽和濃度) の混合物を 20mL 入れ、無地ハンカチ 1 枚を置いて染み込ませ、一晩放置した。ハンカチを引き上げ、そのままの状態で固定しておくことで余分なカテキン溶液をもとのトレイに戻した。その後、トレイに残っているカテキン溶液の体積を測定した。その濃度を $[\text{Cu-Catechin}_2]$ とした。

② $[\text{布} \cdot \text{Cu-Catechin}_2]$ 測定

布の濃度を定量的に決めた上で、染色した 1 枚の布の濃度を算出し、 $[\text{布} \cdot \text{Cu-Catechin}_2]$ を求めた。

③平衡定数の算出

①で求めた $[\text{Cu-Catechin}_2]$ と②で定めた $[\text{布}]$ 、求めた $[\text{布} \cdot \text{Cu-Catechin}_2]$ を③の式に数値を代入し、平衡定数 K_2 を求めた。

第 4 節 調査結果

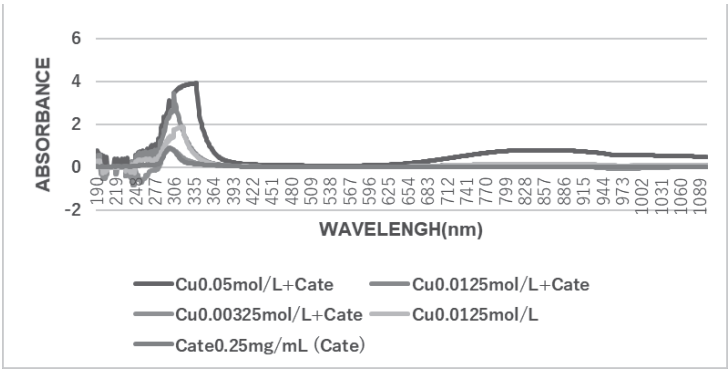


図 1 6 190nm-1100nm におけるカテキン銅混合物とカテキンと銅のスペクトル（1 回目）

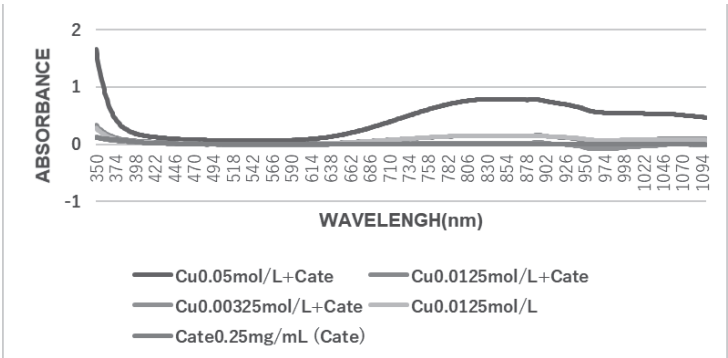


図 1 7 350nm-1100nm におけるカテキン銅混合物とカテキンと銅のスペクトル（1 回目）

この図 1 6、1 7 より、錯体のスペクトルピークがあり、かつ、銅イオンのスペクトルの影響が比較的少ない 360nm と 860nm 付近で銅カテキン錯体の吸光度を求めることとした。

360nm における各吸光度を、表にしたものが表 4 である。生データに対して、DMSO や蒸留水のスペクトルを差し引いた。その値は補正後の列に書き、グラフにした。

表 4 360nm における各吸光度（1 回目）

$\lambda = 360$			
原液濃度	測定中濃度	生データ	補正後
DMSO		0.048	
Water		0.032	
Catechin (mg/mL)			
2.50	2.50	1.85	1.81
0.25	0.250	0.214	0.171
Cu (mol/L)			
0.500	0.500	0.872	0.840
0.250	0.250	0.188	0.156
0.050	0.050	0.040	0.008
0.025	0.025	0.035	0.003
0.005	0.005	0.034	0.002
Cu (mol/L) (Catechin (0.250mg/mL) との混合液)	Cate0.125mg/mL		
0.050	0.025	1.100	0.953
0.025	0.013	0.432	0.285
0.013	0.006	0.286	0.139
0.005	0.003	0.033	-0.114
0.003	0.002	0.154	0.007
0	0	0.107	0

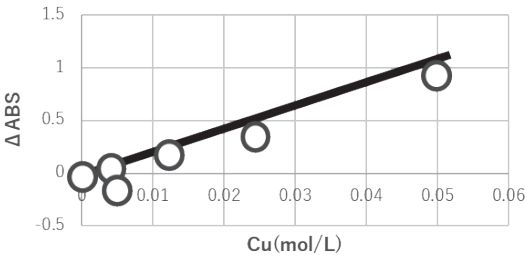


図 1 7 360nm の吸光度の Cu におけるカテキン銅錯体の吸光度（1 回目）

カテキン銅錯体の吸光度のグラフは直線的に増加した。

表 5 860nm における各吸光度 (1 回目)

原液濃度	測定中濃度	生データ	補正後
DMSO		0.048	
Water		0.032	
Cu (mol/L) (Catechin (0.25mg/mL) との混合液)			
0.025	0.013	0.787	0.747
0.013	0.006	0.144	0.104
0.003	0.002	0.015	-0.025
0	0	0.107	0.107

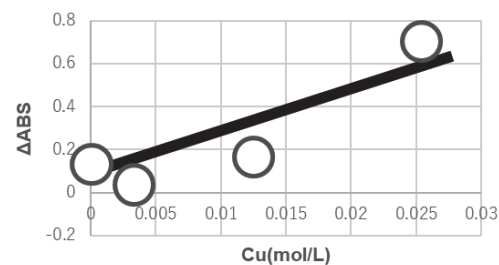


図 1 8 860nm の吸光度の Cu におけるカテキン銅錯体の吸光度 (1 回目)

表 6 360nm における各吸光度 (2 回目)

$\lambda = 360$			
原液濃度	測定中濃度	生データ	補正後
DMSO		0.048	
Water		0.032	

Catechin (mg/mL)			
2.50	2.50	1.853	1.81
0.250	0.250	0.214	0.171
Cu (mol/L)			
0.239	0.119		
0.119	0.060	4.00	3.85
0.090	0.045	4.00	3.85
0.060	0.030	2.17	2.02
0.030	0.015	1.25	1.10
0.0150	0.007	1.05	0.903
0	0	0.107	-0.040
Cu (mol/L) (Catechin (0.25mg/mL) との混合液)	Cate0.125mg/mL		
0.239	0.119	0.119	0.087
0.119	0.060	0.024	-0.008
0.090	0.045	0.001	-0.031
0.060	0.030	-0.015	-0.047
0.030	0.0149	-0.024	-0.056
0.0150	0.007	-0.032	-0.064
0	0	0.107	0

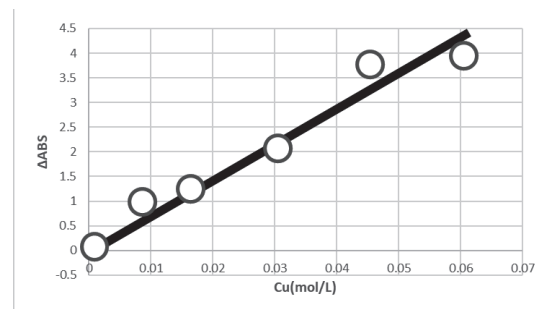


図 1 9 360nm の吸光度の Cu におけるカテキン銅錯体の吸光度 (2 回目)

表 7 860nm における各吸光度 (2 回目)

$\lambda = 860$			
原液濃度	測定中濃度	生データ	補正後
DMSO		0.048	
Water		0.032	
Catechin (mg/mL)			
2.50	2.50	1.85	1.80
0.250	0.250	0.214	0.171
Cu (mol/L)			
0.119	0.060	1.85	1.70
0.090	0.045	1.52	1.38
0.060	0.030	0.874	0.727
0.030	0.015	0.342	0.285
0.0150	0.007	0.165	0.139
0	0	0.107	-0.040
Cu (mol/L) (Catechin (0.25mg/mL) との混合液)	Cate0.125mg/mL		
0.238806	0.119	3.32	3.23
0.119403	0.060	1.57	1.54
0.089552	0.045	1.18	1.15
0.059701	0.030	0.792	0.760
0.029851	0.015	0.375	0.343
0.014925	0.007	0.177	0.145
0	0	0.107	0

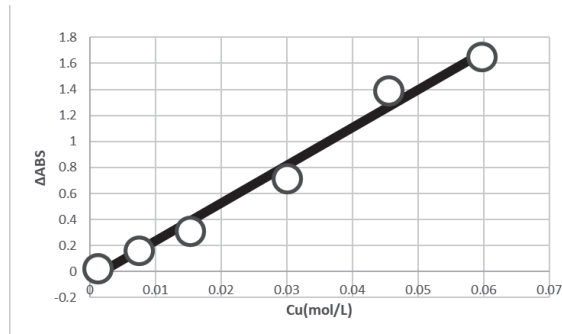


図 2 0 860nm の吸光度の Cu におけるカテキン銅錯体の吸光度 (2 回目)

第 5 節 考察

カテキン銅錯体の吸光度をプロットしたところ、360nm と 860nm のいずれにおいても線形近似をとることができたため、カテキン銅錯体の濃度は、銅イオン濃度に比例していることがわかる。しかし、結合定数は小さいため、結合定数やモル吸光係数を求めることはできなかった。

第 5 章 仮説検証

第 1 節 本調査の概要

結論に説得力を持たせるため、本研究の最も大きな仮説を検証する実験を行う。抗菌力と結合力ともに満たした染色条件が持続的に抗菌するのか、緑茶カテキンに対し銅イオンがともに過不足ない濃度が 8%なのかを検証する実験である。

第 2 節 調査目的

布の洗浄回数を増やすことでどのように抗菌性が変化するかを調べる。また、緑茶カテキンに対し銅イオンがともに過不足ない濃度を求める。

第 3 節 仮説

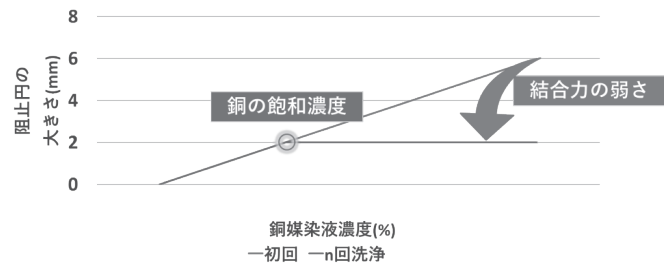


図 2 1 検証実験の仮説

第 4 節 調査方法

主に手順は第 3 章の抗菌性試験と同じく、ハロー法を用いた。次の濃度表の通りに布を染色した。

表 8 検証試験における布の染色条件

	2	4	8	16	32
カテキン (mg/mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
銅媒染液 (%)	2	4	8	16	32

染色したのち、その布を用いてハロー法を用いて抗菌性試験を行った。次に、複数回洗浄した布で同じように抗菌性試験を行った。複数回洗浄とは、水ですすぎながら布を 10

回ずつこすりあわせて洗う作業を指す。

第 5 節 調査結果

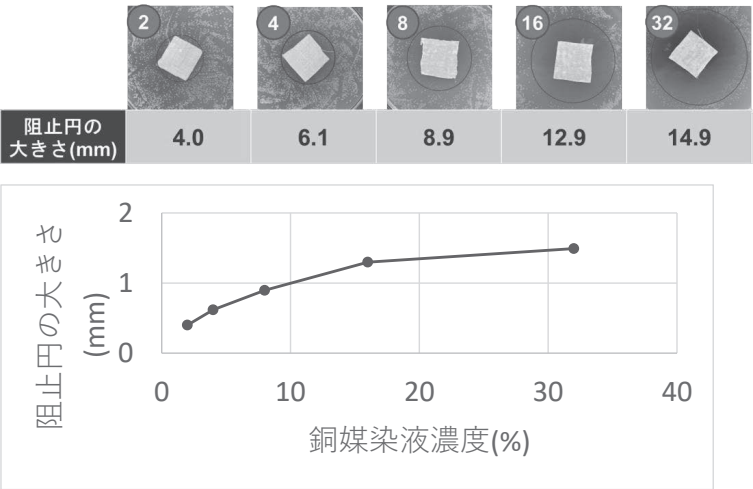


図 2 2 洗浄前の布の抗菌性試験結果

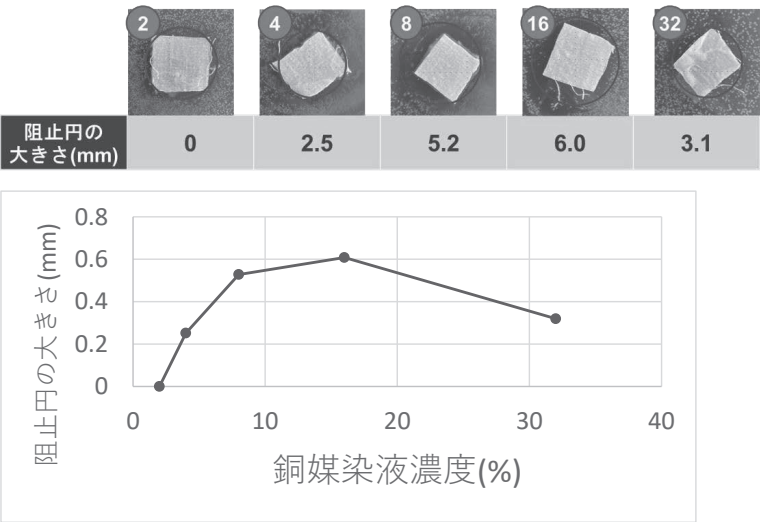


図 2 2 洗浄後の布の抗菌性試験結果

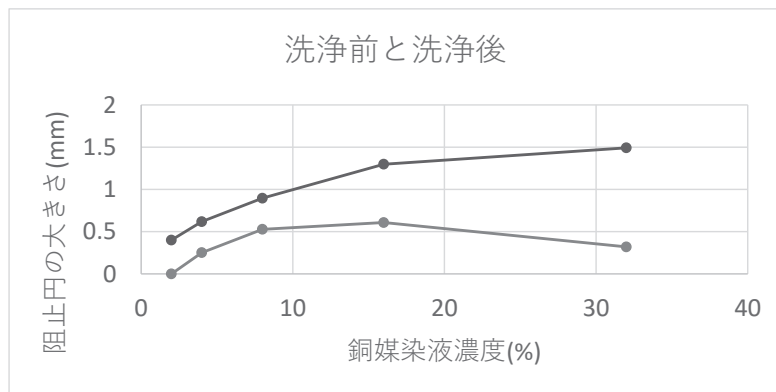


図 2 3 洗浄前と洗浄後の抗菌性試験結果比較

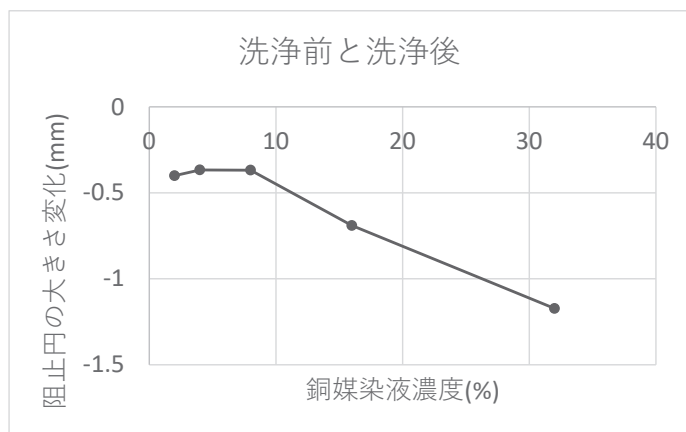


図 2 4 洗浄前と洗浄後の阻止円の大きさの差

第 6 節 考察

図 2 3 より、結合力の低い銅媒染液濃度の高い布の抗菌性は、洗浄により簡単に低くなってしまうことがわかる。よって、第一の仮説に関し、抗菌力と結合力ともに満たした染色条件が持続的に抗菌すると立証することができた。

またそのことを踏まえ、阻止円の大きさの変化値が結合力の大きさを示していると考えることができる。よって、図 2 4 より、結合力が最も高いのは 8% あたりと推測すること

ができ、求めたい濃度は 8% で正しいことがわかる。

図 2 1 と図 2 2、図 2 3 を比較すると、銅媒染液濃度に対して直線的に比例して抗菌性が高くなっていないことがわかるが、それは、以下のような結合モデルを推測して説明することができる。

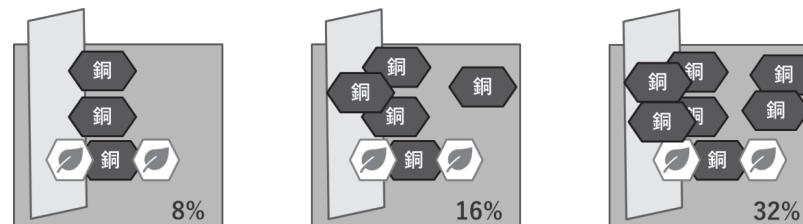


図 2 5 銅媒染時のモデル

銅媒染液濃度が高くなるにつれ、繊維と結合できないあまりの銅イオンが増えていくことから、抗菌性を発揮する、繊維に結合している銅イオン量は銅媒染液濃度に対して比例的に増えていかない。つまり、繊維に結合する銅イオン（カテキンにも当てはまる）の限界量があるわけではなく、平衡状態になっている。これは図 5 の染色平衡モデルから、正しいことがわかる。よって、この現象を説明することができる。

また、図 2 2 において、32% の阻止円の大きさが小さいのは、実験誤差だと考えられる。

第 6 章 結論

第 1 節 まとめ

抗菌力が高い染色条件は、銅イオンが含まれているもの、結合力が高い染色条件は、銅イオンが過剰に含まれていないもの、という調査結果・考察より、抗菌性が現れ、結合力が適当であるために長期間安定した抗菌性を持つ染色条件は、カテキンと銅イオンが飽和で結合していると思われる濃度であることが分かった。その条件を定量化するために、カテキン銅錯体の平衡定数を求めることはできなかったが、カテキン銅錯体は銅イオン濃度に比例して形成されることがわかった。

第 2 節 今後の展望

第 1 項 実験に関する今後の展望

染色の平衡定数を、カテキン銅錯体の平衡定数を経由して導出するのではなく、直接求める方法を考える。例えば、圧平衡定数を模倣して、吸光度を用いた平衡定数を新たに作成し、実験値を求める。その方法としては、濃度を変化させたときの吸光度の変化率から、平衡時の布の吸光度と濃度の関係を定量化する。

第 2 項 研究としての展望

実際に染色を施すことで、どこまで抗菌性が強く持続するかを検証したい。例えば、現実的に可能だと考えられるのは、エコバッグやハンカチへの染色である。本研究で導いた理想的な染色条件であれば、繰り返し使用・洗濯をしても抗菌性が持続する製品開発が可能になるのではないかと考えている。

むやみに強力な抗菌性をもつ製品を使い捨てで使用するのではなく、場合に応じて、持続する抗菌製品を使用することの必要性があるだろう。それに対して、天然抗菌物質の抗菌性の性質を踏まえ、それぞれにあう活用の仕方を探求する研究として、本研究は意味をなすのではないだろうか。

謝辞

実験にあたり、山本拓弥先生、竹村実成先生、櫛間聖矢先生にご指導ご協力を頂きました。また、大阪大学 SEEDS 実感プログラムの所属先の大阪大学理学部名誉教授倉光成紀先生、特任教授中川紀子先生には、研究についてのご指導や資材の提供をして頂きました。ここに感謝いたします。

参考文献

- Nakayama, M. (2013) “A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate”, *Elsevier Science* **33**, 433-439
(doi 10.1016/j.foodcont.2013.03.016)
- Yoshioka, H. (2001) “Spin-trapping study on the hydroxyl radical formed from a tea catechin-Cu (II) system”, *Food & Nutrition Science* **65**, 1697-1706
(doi 10.1271/bbb.65.1697)
- 西川武志 (2006) 「茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討」『腸内細菌学雑誌』, **20**, 321-327
- 原征彦 (2000) 「茶カテキンの機能性とそれらの応用例」『日本食品保蔵科学会誌』, **47**-54
- 星野伸夫 (2000) 「カテキン-銅 (II) 錯体による酸化ストレスと選択的殺菌作用」, 滋賀医科大学
- 今田邦彦 (2001) 「染色技術者のための染料化学」『繊維機械学会誌』, **54**, 413-419
- 高岸徹 (2003) 「染色の化学」『繊維学会誌』, **59**, 358-362
- 大下浩司, 松岡有里, 高木秀明, 下山進 (2011) 「植物繊維と動物繊維に対する紅花色素の染色機構に関する理論的考察」『文化財情報学研究』, 59-62
- 染色の違いによる繊維の識別法 センカ株式会社
https://center.esnet.ed.jp/uploads/07shiryo/05rika/03_dyestuffs.pdf
- 一般財団法人カケンテストセンター 「染色堅ろう度の概要と判定 (JIS L 0801)」
<https://www.kaken.or.jp/test/search/detail/12> (2022 年 1 月 29 日閲覧)
- 梅澤喜夫 (1998) 『分析化学 化学入門コース 7』 pp.46-50. 岩波書店
ISBN:4-00-007987-5
- 社団法人 日本化学会 (1992) 『実験化学講座 7 分光Ⅱ』 pp.180-184 第 4 版, 丸善株式会社. ISBN:4-621-03664-5
- その他閲覧した文献
- 朝賀昌志 (2000) 「加熱による緑茶浸出液の抗菌性の増加」『日本食品化学工学会誌』, **47**, 708-715