光触媒抗菌試験条件がチタン基板上的の大腸菌生存率に与える影響

坂本 広太^{1,*} 小宮谷真司^{1,*} 高原 豊文^{1,*}
住佐 太² 大津直史¹

¹北見工業大学機器分析センター

²北見工業大学バイオ環境化学科

J. Japan Inst. Met. Mater. Vol. 78, No. 4 (2014), pp. 159–162

© 2014 The Japan Institute of Metals and Materials

Effect of Testing Conditions for Photocatalytic Antibacterial Performance on *Escherichia Coli* Survival Rate of Ti Substrate

Kouta Sakamoto^{1,*}, Shinji Komiya^{1,*}, Toyofumi Takahara^{1,*},
Futoshi Sumisa² and Naofumi Ohtsu¹

¹Instrumental Analysis Center, Kitami Institute of Technology, Kitami 090–8507

²Department of Biotechnology and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology, Kitami 090–8507

To evaluate the antibacterial performance of photocatalytic coating, Japan Industrial Standard (JIS) committee has suggested the standard testing conditions for quantitative evaluation. However, these conditions had been constructed based on the experimental consideration from the coating formed on a glass substrate. In this study, to check the applicability of the JIS conditions to the coating on a titanium (Ti) substrate, the change of the survival rate of *Escherichia coli* (*E. coli*) on the Ti surface was evaluated. We confirmed that the decrease of microorganisms caused by dryness and UV-light were effectively suppressed by the use of these conditions. Furthermore, when testing the antibacterial performance of an anodic TiO₂ layer on a Ti substrate, its performance could be evaluated clearly. In conclusion, we confirmed that the survival rate of *E. coli* on the Ti substrate could be evaluated by using the experimental conditions described in the JIS. [doi:10.2320/jinstmet.J2013056]

(Received August 12, 2013; Accepted January 10, 2014; Published April 1, 2014)

Keywords: titanium, photocatalyst, ultraviolet light, antibacterial activity, *Escherichia coli*, dryness

1. 緒 言

チタン(Ti)は、医療用ピンセット、手術用メスなどの医療器具用素材として広く利用されている。これら医療器具を医療行為に供するとき、細菌による感染症を防ぐために、事前に滅菌処理を行う必要があり、医療現場では、一般に高圧蒸気滅菌が用いられている。しかしこの処理は、滅菌処理に時間を要し、さらに処理終了後は器具の冷却が必要である。ゆえに、迅速対応が求められる医療現場では不便である。短波長紫外光を器具に照射すると、簡便かつ迅速に滅菌処理することができるが、この方法は、殺菌効果が不十分である上、大気中の酸素からオゾンが発生する恐れもある¹⁾。近年、オゾンを発生しない微弱な長波長紫外光下において優れた抗菌性能を示す二酸化チタン(TiO₂)光触媒が注目されている。この材料は、波長 360 nm 以上の長波長紫外光を照射することで、大気中の酸素から活性酸素を発生させ、その強

い酸化力によって細菌の細胞膜を破壊し、抗菌性能を示す^{2–9)}。この被膜を Ti 基板表面に形成させると、滅菌工程の簡略化および、コストの低減が期待できるため、種々の方法で Ti 基板表面に TiO₂ 被膜を形成する研究が行われている^{6,8–12)}。

ところで、このような光触媒機能被膜を有する Ti 基板の研究を効率的に進めていくためには、その抗菌性能を精確に定量評価できる手法が必要となる。日本工業規格(JIS 規格)は、試料表面に大腸菌などの細菌懸濁液を滴下し、紫外光照射下に 8 時間留置した後、その表面における細菌数を算出することで、抗菌性能を定量的に評価する試験方法(JIS R 1702)を提案している¹³⁾。しかし、この試験における細菌数の減少には、光触媒作用によるものだけではなく、細菌の乾燥による死滅や紫外光自体の殺菌効果によるものも含まれる可能性があり、光触媒活性による抗菌性能を精確に評価するためには、これらの効果による細菌数の減少を把握するとともに、その影響を抑制できる試験条件の設定が肝要となる。そこで、JIS 規格では細菌の乾燥による死滅を防ぐ方法、および紫外光自体による殺菌効果を抑制できる照射条件を指示している¹³⁾。ところで、これらの指示は、ガラス基板上に

* 北見工業大学大学院生(Graduate Student, Kitami Institute of Technology)

形成した光触媒被膜を試料として決定したものである。金属材料は一般に熱伝導性が高いため、紫外光照射により表面温度が上昇しやすく、ゆえに、試料表面付近の湿度低下が顕著である。そのため、Ti 基板の場合、乾燥や紫外光照射による細菌数減少効果は、JIS 規格における予測と異なる可能性がある。

本研究では、光触媒活性を持たない Ti 基板を試料として、JIS 規格に準拠した方法で抗菌試験を実施し、その表面における細菌数の推移を調べることで、光触媒作用以外の効果による細菌数の減少を把握することを試みた。さらに、Ti 基板上に形成した TiO_2 被膜を、既存の JIS 規格で実際に評価することが可能かどうかを検証した。

2. 実験方法

20 mm × 10 mm × 1 mm の純 Ti 板 (99.9%) を、表面形状による影響を排除するために、平均粒形 40 nm のコロイド状のシリカ懸濁液で化学研磨し、その後、エタノールおよび蒸留水で、それぞれ 10 分間超音波洗浄した。さらに、試験菌以外の細菌を除去するために、波長 253.7 nm の殺菌灯 ($20 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) を 24 時間照射したものを試料とした。

試験菌種は JIS 規格で指示されている大腸菌 (ATCC6922 株) を用いた。牛肉エキスを混入したペプトン培地を用いて、大腸菌を 37°C ・24 時間の条件で液体培養した後、その大腸菌懸濁液を、生理食塩水を用いて $2.0 \times 10^7 \text{ CFU}/\text{mL}$ (Colony-Forming Unit) に調製した。大腸菌懸濁液 50 μL を試料表面に滴下し、暗所およびブラックライト ($\lambda = 365 \text{ nm}$; $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) 照射下における 2 時間毎の大腸菌生存率の変化を測定した。大腸菌生存率は一定時間後における試料上生菌数を、滴下直後の生菌数で割った値と定義した。また、生菌数は、試料上に付着した大腸菌を、SCDLP ブイヨン培地中で洗い出し、その培地を牛肉エキス混入ペプトン寒天培地に塗布後、コロニーカウントすることで計測した。ここで、SCDLP ブイヨン培地とは、Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate80 の略であり、大豆ペプトン (和光純薬工業製)、カゼインペプトン (和光純薬工業製)、塩化ナトリウム (和光純薬工業製)、リン酸二水素カリウム (ナカライテスク製)、グルコース (ナカライテスク製)、界面活性剤の Lecithin (和光純薬工業製)、および Polysorbate80 (関東化学製) を用いて調合した¹⁴⁾。測定サンプル数は各試料条件につき $N=2$ とし、これらの実験を 3 回繰り返すことで、大腸菌生存率の増減傾向に再現性があることを確認した。また、試料表面の乾燥を防ぐため、JIS 規格に準拠して、オートクレープ滅菌水を十分に含むろ紙を試料付近に留置した (Fig. 1)。この乾燥防止処置有りの場合、周囲の湿度は 35% 程度に保持されるが、無しの場合には、10% 程度まで低下することを確認した (Fig. 2)。また、本研究の結果における大腸菌生存率の有意差は、Student の t 検定、および Tukey 法を用いた統計解析で検証した。

Fig. 1 Schematic illustration of the sample setting to keep humidity.

Fig. 2 Time transition of the humidity in a petri dish.

3. 結果と考察

3.1 乾燥が Ti 基板上の大腸菌生存率に与える影響

JIS 規格では、試料表面の乾燥による細菌の死滅を減らすための処置が指示されている。この処置が、Ti 基板においても有効であるかどうかを検討した。Fig. 3 は、JIS 規格に準拠した乾燥防止処置 (Fig. 1) 有り、および無しの条件下で、暗所に 8 時間留置したときの大腸菌生存率の経時変化である。乾燥防止処置を行わなかった場合、4 時間までは大腸菌生存率はほぼ 100% であるが、それ以降は、生存率は時間経過に伴い減少し、8 時間ではほぼ 30% になった。この死滅は、乾燥の進行によるものであると考えられる。一方、滅菌水を含むろ紙を留置した場合、8 時間留置後でも大腸菌生存率は減少していなかった。また、乾燥防止処置有り、お

Fig. 3 Survival rate of *E. coli* on a Ti substrate placed in a dark with and without the wet filter paper.

Fig. 4 Survival rate of *E. coli* on a substrate in a dark place and under an UV light.

よび無しの条件下における8時間の生存率には、統計的有意差があることを確認できた。これらの結果より、Ti基板上における抗菌性能試験において、照射時間4時間以内であれば乾燥防止処置は必要ないが、より長い時間の経時変化を調べる場合は、湿度を保つための何らかの処置が必要であり、その処置としてJISで指示されているろ紙を用いる方法は、Ti基板の場合でも有効であることがわかった。

3.2 紫外光照射がTi基板上の大腸菌生存率に与える影響

波長365 nm程度の長波長紫外光であっても、それ自体が殺菌効果を示す。光量が微弱である場合は殺菌効果も微弱であるため無視できるが、光量の低下に伴い光触媒機能が十分に発現しなくなる。そこで、JIS規格には、これらの影響を加味し、試験に用いる紫外光照射強度は $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ が適切であると記載されている。そこで本研究では、この強度の紫外光照射が、Ti基板上に存在する大腸菌の生存率に与える影響を調査した。Fig. 4は、細菌懸濁液を滴下したTi基板を、紫外光 $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の照射下および暗所に8時間留置したときの大腸菌生存率の経時変化である。なお、どちらの場合も滅菌水含有紙による乾燥防止処置を行った。暗所に留置した場合、8時間まで大腸菌生存率の減少は観察されなかった。一方、紫外光照射下に留置した場合、4時間まで大腸菌生存率の変化は観察されないが、6時間で減少しはじめ、8時間では70%まで減少していた。紫外光照射下および暗所に留置8時間の生存率には、統計的有意差があることを確認できた。8時間照射後におけるTi材料表面の温度を測定すると 40°C 未満であったため、この死滅は、温度上昇に起因するものではないことがわかる。すなわち、Ti基板の場合、 $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の紫外光を用いることで、光触媒性能による抗菌効果を評価可能であるが、照射時間が6時間

を超過すると、紫外光自体による殺菌効果が顕著になるため、その減少分を事前に見積もっておく必要があることがわかった。

3.3 陽極酸化Ti基板への光触媒抗菌試験の適用例

JISに規定されている乾燥防止処置(Fig. 1)および、紫外光照射条件を用いることで、Ti基板上における大腸菌の乾燥による死滅および紫外光自体による殺菌効果を抑制できると考えられる。そこでこれらの条件を利用して、光触媒 TiO_2 被膜Ti基板の抗菌性能を実際に調べた。 TiO_2 被膜は硫酸アンモニウム化成液を用いた陽極酸化処理で作製し、メチレンブルー(MB)脱色試験(JIS R 1703-2)で光触媒活性を調べた^{11,15)}。結果はFig. 5のとおりである。なお、本被膜の表面形状、結晶構造などに関する詳細なデータは過去の文献を参照されたい¹¹⁾。

Fig. 6は光触媒 TiO_2 被膜Ti基板を暗所もしくは紫外光照射下に8時間留置したときの大腸菌生存率の経時変化である。光触媒 TiO_2 被膜材料を暗所に留置した場合、大腸菌懸濁液滴下後2時間で、生存率の僅かな減少が観察されるが、統計的有意差は確認できず、4時間以降は減少しなかった。一方、紫外光 $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 照射下の場合、光触媒 TiO_2 被膜上では大腸菌懸濁液滴下後2時間で生存率50%以下まで減少し、さらに、4時間以降は、ほぼ0%となった。また、2時間以降で、紫外光照射下および暗所における生存率に、統計的有意差があることが確認できた。すなわち、強度 $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の紫外光は、紫外光自体による殺菌効果が発現せず、さらに、 TiO_2 の光触媒活性を十分に引き出せることが確認できた。

Fig. 5 Degradation of MB under an UV light, due to the photocatalytic reaction of the TiO_2 coating.

Fig. 6 Survival rate of *E. coli* on TiO_2 -coated Ti substrates in a dark and under an UV light.

4. 結 言

本研究では、JIS が提案している光触媒抗菌試験の試験条件を Ti 基板の場合でも、そのまま評価することが可能であるかどうかを検討するために、光触媒機能を持たない Ti 基板上において、大腸菌が受ける乾燥や紫外光照射の影響を詳細に調査した。Ti 基板上において大腸菌は乾燥によって死滅するが、その影響は滅菌水を含むろ紙を用いた乾燥防止処置によって抑制できることがわかった。また、長波長紫外光 (365 nm) による殺菌効果は、光量 $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 以下および照射時間 6 時間未満であればその効果はほぼ無視でき、さらに、この紫外光強度は、陽極酸化法を用いて作製した光触媒 TiO_2 被膜の光触媒性能を引き出すための十分な強度であることがわかった。これらのことから、Ti 基板を用いた場合でも、既存の JIS 規格の試験条件に則って、評価することが可能であることが確認できた。

本研究は、JSPS 科研費基盤研究 (C) (No. 24560841) の助成を受けて行った。

文 献

- 1) Z. Kuluncsics, D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel and E. Sage: Photochem. Photobiol. **49** (1999) 71–80.
- 2) S. Lewandowski, V. Rejsek-Riba, A. Bernes and S. Perraud: Int. J. Appl. Polym. Sci. **129** (2013) 3773–3781.
- 3) H. Koseki, T. Asahara, T. Shida, I. Yoda, H. Horiuchi, K. Baba and M. Osaki: Int. J. Nanomedicine **8** (2013) 593–599.
- 4) P. Evans, T. English, D. Hammond, M. E. Pemble and D. W. Sheel: Appl. Catal. A **321** (2007) 140–146.
- 5) D. Alrousan, P. Dunlop, T. McMurray and J. Byrne: Water Res. **43** (2009) 47–54.
- 6) Y. Oka, W. Kim, T. Yoshida, T. Hirashima, H. Mouri, H. Urade, Y. Itoh and T. Kubo: J. Biomed. Mater. Res. B **86** (2008) 530–540.
- 7) A. K. Benabbou, Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune and C. Guillard: Appl. Catal. B **76** (2007) 257–263.
- 8) F. Sayilkan, M. Asilturk, N. Kiraz, E. Burunkaya, E. Arpac and H. Sayilkan: J. Hazard. Mater. **162** (2009) 1309–1316.
- 9) J. Choi, C. J. Chung, K. Oh, Y. Choi and K. Kim: Angle Orthodontist **79** (2009) No. 3.
- 10) N. Ohtsu, H. Kanno, S. Komiya, Y. Mizukoshi and N. Masahashi: Appl. Surf. Sci. **270** (2013) 513–518.
- 11) N. Ohtsu, S. Komiya and K. Kodama: Thin Solid Films **534** (2013) 70–75.
- 12) C. Zhao, B. Feng, Y. Li, J. Tan, X. Lu and J. Weng: Appl. Surf. Sci. **280** (2013) 8–14.
- 13) JIS R 1702: 2006 (J)
- 14) H. Shintani, E. Taniai, A. Miki, S. Kurosu and F. Hayashi: J. Hosp. Infect. **56** (2004) 42–48.
- 15) JIS R 1703-2: 2007 (J)