

助成番号 0716

自然光照射下で有効な二酸化チタン光殺菌反応場の設計 —NaCl の共同効果による殺菌活性の向上—

田谷 正仁, 西岡 求

大阪大学大学院基礎工学研究科

概要 【背景】近年、清潔な環境を維持するという観点から、高い酸化力を有する二酸化チタンを用いた光触媒反応システムが、広範囲の微生物に有効に作用する新規殺菌技術として注目されている。室内環境中に存在する微生物の多くは、固体表面に付着して増殖・拡散することから、光触媒を塗布した表面において付着微生物を殺菌することで、室内環境中の微生物を低減できる。実用的な観点から、本研究では、二酸化チタン光殺菌システムにおける課題を解決するため、自然光照射下において有効に機能する光殺菌面の設計と評価を行った。

【結果および考察】二酸化チタン光触媒の室内光照射下での低い殺菌効率を向上させるためには、銅成分添加によるフェントン様反応を組み合わせることが効果的である。自然光(室内照明光)照射下の実使用環境を念頭に、光殺菌効率におよぼす環境因子について調べたところ、反応液中に含まれる無機塩が殺菌活性に大きな影響をおよぼすことが示されたため、ファージ不活性化における銅および無機塩の共同効果について検討した。

白色蛍光灯照射下 TiO_2 薄膜上に CuCl_2 のみを添加した場合、添加しない場合と比べて活性が若干向上した。さらに、 CuCl_2 と NaCl を同時に添加した場合、 TiO_2 薄膜の活性が著しく増加することが分かった。また、 TiO_2 薄膜の代わりにガラス面を用いた場合にはファージ不活性化効果は認められず、活性の向上は CuCl_2 、 NaCl 、 TiO_2 および光の4要素が必要であることが示された。

NaCl のうち Na^+ と Cl^- のどちらかが活性向上に寄与しているかを検討するため、 KCl または NaNO_3 と $10 \mu\text{M}$ の CuCl_2 を添加してファージ不活性化実験を行った。 KCl を添加した場合、 NaCl を添加したときと同様の不活性化速度定数の向上が見られたが、 NaNO_3 を加えた場合、 NaCl や KCl を添加したときにみられたような不活性化速度の増加は認められなかった。以上のことから、反応液中に塩化物イオンが存在することで Cu^{2+} が Cu^+ に還元され、それによってフェントン様反応が促進された結果、高い不活性化効果が得られるものと考えられた。

1. 研究目的

近年、清潔な環境を維持するという観点から、高い酸化力を有する二酸化チタンを用いた光触媒反応システムが、広範囲の微生物に有効に作用する新規殺菌技術として注目されている。室内環境中に存在する微生物の多くは、固体表面に付着して増殖・拡散することから、光触媒を固定化した表面において付着した微生物を殺菌することで、室内環境中の微生物を低減できる。二酸化チタンの電子励起には 410 nm 以下の近紫外光が必要とされるため、可視

光を多く含む太陽光や白色蛍光灯の下では十分な活性を示さない。したがって、実使用環境を想定した場合、二酸化チタン光触媒の利用には、自然光(室内照明光)照射下でいかに高い殺菌活性を発揮させるかが重要な課題となる。本研究では、実用的な観点から、これらの課題を解決するため、自然光照射下において有効に機能する光殺菌面の設計と評価を目的とし、二酸化チタンの活性を向上させる手法として銅イオンの効果に着目し、塩化銅を酸化チタン薄膜上に添加し、殺菌対象としてファージウイルス

スを用いて殺菌実験を行った。また、無機イオンを添加することでさらなる活性の向上を目指し、反応操作条件とファージ不活性化速度の関係を検討し、そのメカニズムの解明を試みた。

2. 研究方法

2.1 二酸化チタン薄膜の作成

二酸化チタンコーティング剤(タイノック CZP223[®], 多木化学社製)1 mLをスライドガラス(Micro Slide Glass, 岩城硝子社製)上へのせ、スピコーター(ミカサ社製)を用いてスピコーティングにより塗布した。塗布後、100°Cで10 min 乾燥した。二酸化チタン薄膜(TiO₂ 薄膜)は作製後、室温・暗条件にて保存した。

2.2 ファージ不活性化実験

光不活性化実験において大腸菌ファージ MS2(ATCC 15597B1)の宿主として用いるために、*E. coli* 細胞(ATCC 15597)を培養した。培養培地には、蒸留水 1 L 当たり、10 g の Polypepton(和光純薬工業社製)、5 g の Bacto Yeast Extract(Difco Lab. 社製)、5 g の NaCl(和光純薬工業)を加え、1 N NaOH 水溶液を用いて pH 7.2 に調整した L-broth を用いた。L 字型試験管に入れた培養培地 10 mL に、*E. coli* 細胞を加え、37°C で 20 h 振盪培養した。実験で用いたファージ粒子は、二重寒天法に従って増殖させた。まず、濃度 1×10^{11} cells/L となるように *E. coli* を懸濁した 0.5% agar を含む軟寒天 L-broth 10 mL を調製し、これを L-broth 寒天プレート(1.5% agar) 上に流し込み、さらに MS2 懸濁液 0.02 mL を滴下し、37°C で 24 h 培養した。培養後の軟寒天をスパチュラで採り出し、20 mL のイオン交換水中に懸濁して $1,200 \times g$ 、4°C で 25 min 遠心分離した。遠心分離後の上清液をフィルター(Millex-GV, 孔径 0.22 μm, Millipore 社製)を用いて濾過し、濾液を 4°C で保存した。

本実験で用いた実験装置を Fig. 1 に示す。不活性化実験の光源には昼白色蛍光灯(FLR20SEX-N/M-HG, NEC 社製)2 本を用いた。TiO₂ 薄膜サンプルと光源との距離を変化させることにより、光強度を所定の値に設定した。装置全体は暗幕で覆い、暗条件とした。

作製した TiO₂ 薄膜にシリコンゴム製の枠(外径 40 mm × 40 mm、内径 30 mm × 30 mm、高さ 2 mm)を取り付け、枠内の TiO₂ 薄膜面積を 9 cm² とした。滅菌水を 0.1 N NaOH

水溶液または 0.1 N HCl 水溶液を用いて所定の pH に調整し保存しておいたファージ懸濁液を希釈して初期力価 $N_0 = 1 \times 10^9$ PFU/mL とし、反応液として 2 mL を枠内に滴下した。実験装置に設置し、所定の光強度で白色蛍光灯を照射してファージ不活性化反応を開始した。実験に用いた TiO₂ 薄膜は、表面の付着物を取り除くため、事前にブラックライト照射を行った。反応開始から所定時間毎に 0.1 mL をサンプリングした。サンプリングの際は、ピペッティングで反応液をよく攪拌してから行った。

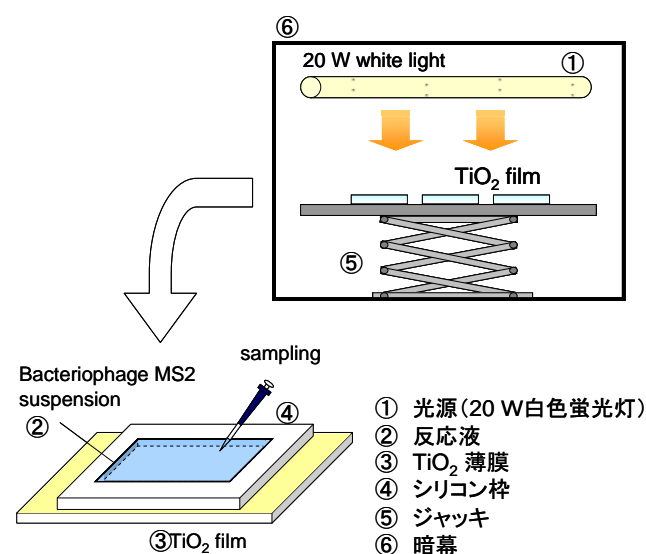


Fig. 1. TiO₂ 薄膜によるファージ不活性化実験装置

反応器から採取した反応液 0.1 mL を、滅菌された蒸留水を用いて適宜希釈した後、希釈液中の大腸菌ファージ MS2 を二重寒天法に従って増殖させ、反応液中のファージ力価をプラークカウント法により算出した。培養した *E. coli* を濃度 1×10^{11} cells/mL となるように懸濁した軟寒天 L-broth(0.5% agar) 10 mL に、ファージを含む希釈液 0.1 mL を滴下し、これを L-broth(1.5% agar) 寒天プレート上に流し込み、さらに 37°C で 24 h 培養した。培養後に、ファージに感染した大腸菌が溶菌することで、軟寒天中で増殖した大腸菌中に現れるプラークの数をカウントし、反応液中のファージ力価 N を算出した。

2.3 銅イオンおよび一価の銅イオンの定量

反応液中に添加した CuCl₂ 由来の銅イオンの TiO₂ 薄膜上での挙動を調べるため、一価の銅イオンと溶解銅イオン濃度の測定を行った。なお、本報告書においては錯体形

成の有無に関わらず、一価である銅イオンを Cu(I)、二価である銅イオンを Cu(II) と表記する。

反応液中の一価の銅イオンの濃度を Cu(I) キレーターである bathocuproine disulfonic acid (BC) を用いて測定を行った^[1]。0.01 mmol/L の CuCl₂ を含むイオン交換水 2 mL を塗布したガラスプレートまたは TiO₂ 薄膜に対して所定の光強度 ($I_0 = 0, 28 \text{ W/m}^2$) の白色蛍光灯照射を行い、所定時間ごとに 0.6 mL の反応液を採取し、最終濃度 0.05 mmol/mL となるよう 0.03 mL の BC を加え、反応液の吸光スペクトルを測定した。吸光度計を用いて波長 480 nm で測定し、吸光係数、 $\epsilon = 1.2 \times 10^4 \text{ m}^2/\text{mol}$ を用いて Cu(I) 濃度を算出した。

反応液中に添加した CuCl₂ 由来の銅イオンがファージ不活性化中にそのままイオン (Cu(I), Cu(II)) として液中に溶解しているか、あるいは固体として析出しているかを確認するために、以下の測定を行った。TiO₂ 薄膜にシリコンゴム製の枠を取り付け、枠内にイオン交換水または 100 mmol/L の NaCl 溶液 3 mL を入れ不活性化実験と同様に 20 W 白色蛍光灯を 28 W/m² で 40 min および 80 min 照射した。その後、2 mL をサンプリングし、0.22 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過して ICP-AES (ICAP-575 MarkII, 日本ジャーレルアッシュ社製) により測定を行った。

3. 研究結果

3. 1 TiO₂ 薄膜上への CuCl₂ および無機塩の添加によるファージ不活性化に対する効果

3. 1. 1 銅と NaCl 添加による活性の向上

所定の濃度の CuCl₂ および NaCl を添加した溶液にファージを懸濁し、pH を 6 に調整して反応液として白色蛍光灯照射下 (光強度 $I_0 = 28 \text{ W/m}^2$)、TiO₂ 薄膜上で、ファージ不活性化を行った。Fig. 2 にファージ不活性化の経時変化を示す。これより、NaCl のみの添加では不活性化効果に変化はみられず、実験で用いた濃度では NaCl のみの阻害効果も殺菌効果もないことが示唆された。一方、CuCl₂ のみを添加した場合わずかな活性の向上がみられた。CuCl₂ と NaCl を添加した場合、著しい活性の向上がみられた。また、暗条件下では不活性化の進行はみられなかった。以上から、TiO₂、光、CuCl₂、NaCl という四つの条件がそろった場合において非常に高いファージ不活性化効果が得られることが示された。

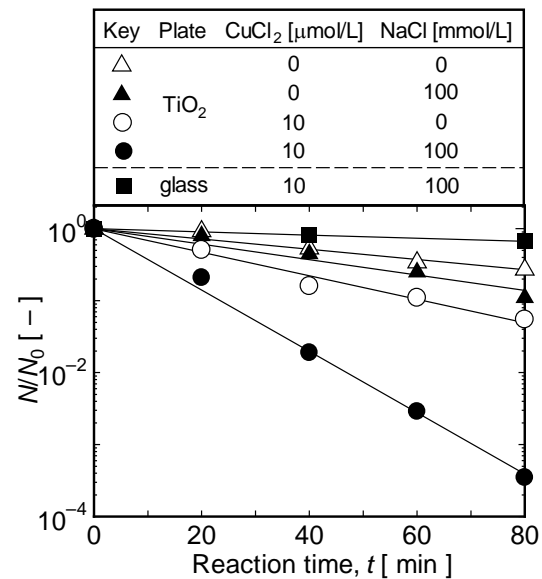


Fig. 2. TiO₂ 薄膜およびガラス面上におけるファージ不活性化におよぼす CuCl₂ と NaCl の影響

3. 1. 2 種々の条件下での光触媒特性

TiO₂ 薄膜上での銅イオンと NaCl の不活性化効果に対する NaCl 濃度の影響を調べた。Fig. 3 に示すように、CuCl₂ を含む条件下では NaCl 濃度 1 - 150 mmol/L の範囲において活性の向上がみられた。一方、NaCl のみの添加は、不活性化速度定数にほとんど影響を与えなかった。

また、TiO₂ 薄膜上での CuCl₂ と NaCl の不活性化効果に対する光強度の影響を調べた。Fig. 4 に示すように、どの条件においても光強度の増大に伴い、不活性化速度定数の増加が見られた。

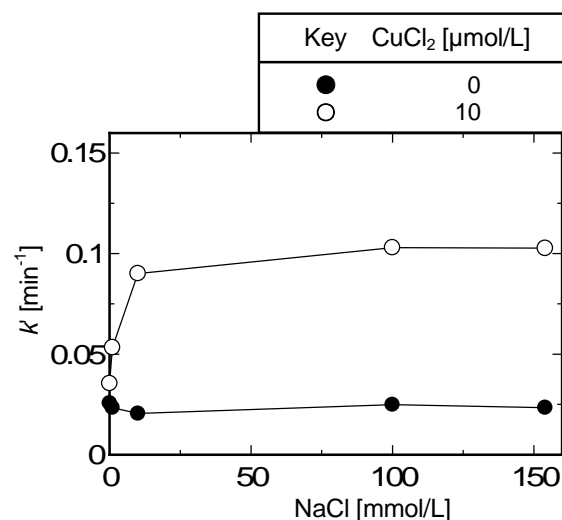


Fig. 3. NaCl 濃度とファージ不活性化速度定数の関係

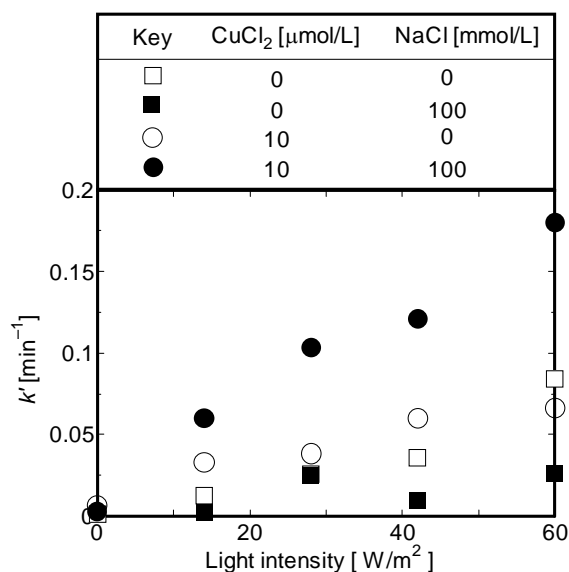


Fig. 4. 照射光強度とファージ不活性化速度定数の関係

3. 1. 3 活性向上に寄与する無機イオンの検証

TiO₂ 薄膜と CuCl₂ の活性向上の原因となるイオン種を調べるために、他の無機塩を用いて TiO₂ 薄膜上で同様のファージ不活性化実験を行った。実験には NaCl の構成イオンである Na⁺ の効果を調べるために NaNO₃ を、Cl⁻ の効果を調べるために KCl をそれぞれ添加してファージ不活性化に対する影響を調べた (Table 1)。

Table 1. ファージ不活性化速度定数に及ぼす無機塩と CuCl₂ の効果

CuCl ₂ [μmol/L]	k' [10 ⁻² min ⁻¹]			
	Inorganic salts (100 mmol/L)			
	None	NaCl	KCl	NaNO ₃
0	2.6	2.5	1.8	5.3
10	3.6	10	11	7.8

KCl を添加した場合、NaCl を添加した場合と同様に KCl のみを添加した場合には活性の向上がみられず、CuCl₂ と同時に添加した場合、著しい活性の向上がみられた。それに対し、NaNO₃ を添加した場合、ガラス面および TiO₂ 薄膜上における NaNO₃ のみの添加でもファージの不活性化効果がみられた。また、暗条件下では NaNO₃ による不活性化はほとんどみられなかったことより、光と NaNO₃ によってファージ不活性化が進行していることが示唆された。さらに、CuCl₂ を同時に添加した場合について

も活性の向上がみられた。しかし、NaCl や KCl と CuCl₂ を同時に添加した時にみられたような大きな相乗効果はみられなかった。以上より、TiO₂ 薄膜上で CuCl₂ との相乗効果を示すイオン種は、Cl⁻ であることが示唆された。

3. 2 反応場における各種銅成分の測定

反応液中に存在する Cu の状態が活性に影響を与えていると考え、Cu(I) キレーター (Cu(I) イオン濃度) および ICP 分光分析 (Cu(I)+Cu(II) 濃度) を用いて銅成分を測定し、反応場における Cu(I)、Cu(II)、固体銅成分 (Cu (solid)) 濃度を算出した。Fig. 5 より、NaCl を含まない場合には Cu (solid) が生成されるのに対し、NaCl を含む場合には Cu(I) イオンの生成がみられた。よって、Cu(I) イオンが活性の向上に携わっている可能性が考えられた。

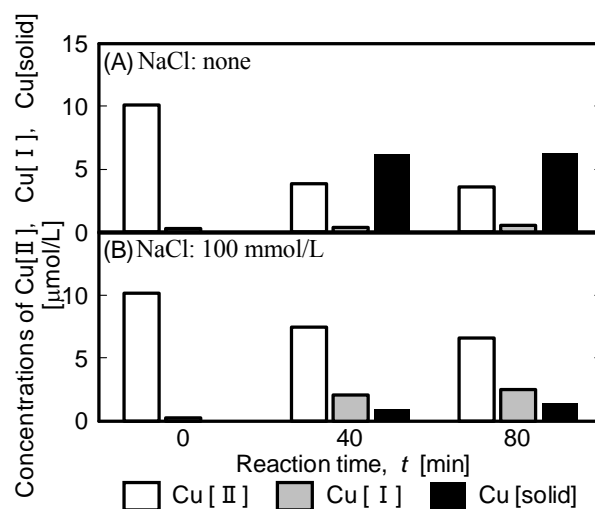


Fig. 5. 種々の時間における Cu(I)、Cu(II)、Cu(solid) の濃度

3. 3 銅含有 TiO₂ 薄膜 (Cu/TiO₂ 薄膜) によるファージ不活性化

以上の結果を踏まえ、TiO₂ 薄膜に銅を含有させた薄膜 (Cu/TiO₂ 薄膜) を作成し、ファージ不活性化実験を行い、NaCl を添加してその効果を確認した。Fig. 6 に示すように反応液に NaCl を含む場合活性の向上がみられたため、銅イオンを含有させた場合も銅と NaCl の相乗効果が得られることが分かった。

次に、Cu/TiO₂ 薄膜上で光強度を変化させて同様の実験を行ったところ、光強度の増加とともに活性も増加した (Fig. 7)。

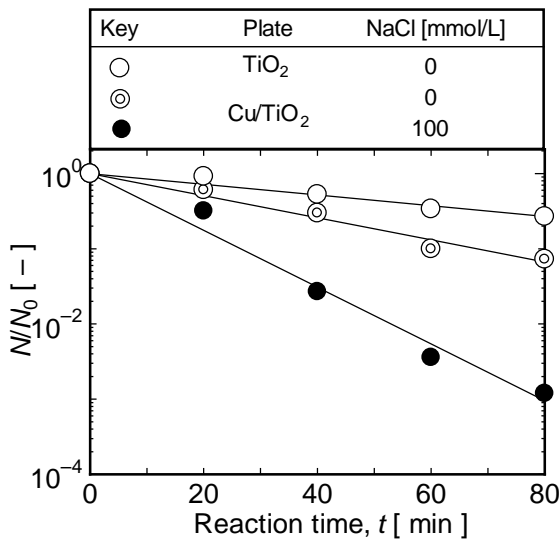


Fig. 6. TiO₂および Cu/TiO₂ 薄膜上におけるファージ不活性化

4. 考察

二酸化チタン薄膜上で銅および塩化物イオンが共存することでファージ不活性化が向上するメカニズムを、以下のように考察した。

まず、二酸化チタンによる活性酸素種生成機構については様々な研究が行われており、研究者によって異なる説も存在するが、基本的には酸素が電子受容体として光励起によって生成した電子を受け取り、また水や水酸化物イオンが電子供与体として正孔と反応するという機構が多く文献などで共通して報告されている^[2]。

二酸化チタンを含む反応液中に銅が存在する場合、

1. 酸素のように電子受容体としての作用

2. Fenton 様反応による活性酸素種量の生成が促進
 の二つの可能性が考えられる。反応が平衡状態であると仮定すると銅イオンのみを添加した場合、二酸化チタン表面では酸化還元電位の大小により、添加された CuCl₂ 由来の Cu²⁺ は二酸化チタン表面の還元サイトによって Cu⁺、Cu⁰ へと還元されると考えられる。さらに Cu⁺ は非常に不安定なイオンであり、すみやかな Cu²⁺ や Cu⁰ への変化や溶存酸素による CuO や Cu₂O への酸化によって、二酸化チタン薄膜表面に析出することが想定される。そのため、

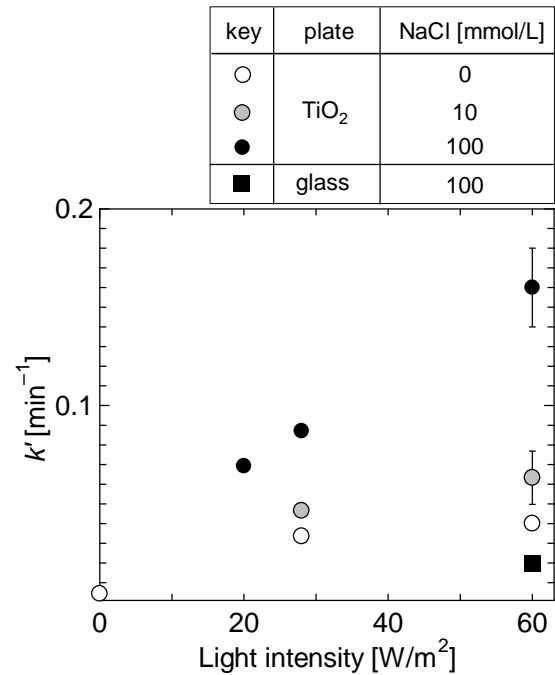


Fig. 7. 照射光強度とファージ不活性化速度定数の関係

Cu⁺は平衡状態においてほとんど存在しておらず、過酸化水素との反応である Fenton 様反応による活性酸素種量の生成が起こりにくい条件である。

一方、反応液中に銅と塩化物イオンが存在する場合、不安定な Cu⁺イオンは塩化物イオンと錯体を形成し、[CuCl₂] あるいは [CuCl₃]²⁻ となり銅イオンが一価の状態 (Cu(I)) で反応液中に安定して存在することができるとされている^[3]。それにより、Cu(I) を介した Fenton 様反応が起こりやすい条件であると考えられる。生成される Cu⁺イオンと [CuCl₂] では、[CuCl₂] の方が安定であり、反応液中に存在しやすい条件である。また、銅が固体として析出しておらず、陽イオンとして存在しているために電子受容体としても働きやすい条件であると考えられる。さらに、二酸化チタンを用いた殺菌において最も強力な活性酸素種であると考えられている・OH は、その寿命が非常に短いため^[4]、ファージの不活性化は主に二酸化チタン表面で起こるとされている^[5]。一方、Cu(I) が反応場全体に存在することで、Cu(I) を介した Fenton 様反応により液相全体で・OH が生成され、それによって高い活性が得られている可能性も考えられる。塩化物イオンの働きに関して考慮に入れなければならない事として、塩化物イオンが反応液中に存

在する場合、ラジカルに対するスカベンジャー作用や、二酸化チタン表面の活性部位への吸着による活性サイトの不活性化が報告されており、非常に高濃度の NaCl は、殺菌に対して阻害効果を及ぼす可能性がある。塩化物イオンについて、推定される活性向上メカニズムは Fig. 8 のようにまとめられる。

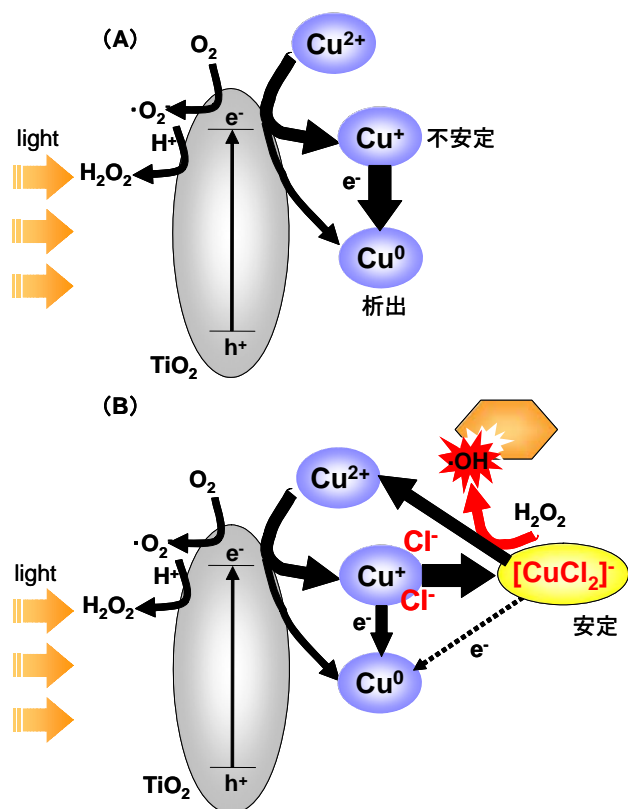


Fig. 8. 二酸化チタン、銅、Cl⁻ による活性向上のメカニズム (A) Cl⁻ 非存在下, (B) Cl⁻ 存在下

5. 結 言

(1) 二酸化チタン薄膜を用いて白色蛍光灯照射下でファージ不活性化を行ったところ、0.01 mmol/L の塩化銅と種々の濃度の NaCl を同時に添加することで高い不活性化効果が得られた。また、NaCl 濃度 1 - 150 mmol/L の範囲において、活性の向上効果がみられた。

(2) NaCl の代わりに 100 mmol/L KCl と 0.01 mmol/L の CuCl₂ を添加した場合、NaCl を添加した場合と同様に活性が著しく向上したのに対し、100 mmol/L NaNO₃ と 0.01 mmol/L の CuCl₂ を添加した場合、このような相乗効果による活性の向上はみられなかったため、銅と無機塩による活性の向上は銅イオンと塩化物イオンとが関与しているものと考えられた。

(3) 白色蛍光灯照射下、二酸化チタン薄膜上で NaCl を含む条件で、二価の銅イオンから一価の銅イオンの生成が促進されたことから、塩化物イオンの添加により一価の銅が錯体として安定して存在することができると考えられる。塩化物イオンの共存は一価の銅を介した Fenton 様反応が起こりやすい条件を提供するものと考えられた。

参考文献

- [1] K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa and S. Kawanishi, "Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide," *Free Radical Research*, **38** (2004) 439-447
- [2] R. Cai, Y. Kubota, and A. Fujishima, "Effect of copper ions on the formation of hydrogen peroxide from photocatalytic titanium dioxide particles," *Journal of Catalysis*, **219** (2003) 214-218
- [3] J. W. Moffett and R. G. Zilka, "Reaction kinetics of hydrogen peroxide with copper and iron in seawater," *Environmental Science and Technology*, **21** (1987) 804-810
- [4] H. Sibata, "酸化チタン光触媒における活性酸素の生成機構と殺菌作用," *Bokin Bobai*, **30** (2002) 589-596
- [5] M. Cho, H. Chung, W. Choi and J. Yoon, "Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection," *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (2005) 270-275

No. 0716

Design of Effective Photosterilization Field with Titanium Dioxide under Common Light Sources: Enhancement of Deactivation Activity Based on Synergy Effect of NaCl

Masahito Taya, Motomu Nishioka

Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science,
Osaka University

Summary

For maintaining our surroundings biologically clean, in recent years, TiO₂ photosterilization has attracted increasing attention because of its stable and strong oxidative power yielding biocidal activity. In a practical aspect of TiO₂ photosterilization system, it should be a problem to be solved that UV rays effective for photo-exciting TiO₂ are very weak in living-based light sources such as a white light fluorescent lamp, which is an obstacle to realize sufficient biocidal activity of TiO₂ for inactivating biohazardous microorganisms and viruses. It has been reported that the enhancement of photocatalytic activity of TiO₂ took place through converting photo-generated H₂O₂ into more reactive •OH via copper-mediated Fenton-type reactions. In the present study, the deactivation of phage was examined using photocatalytic TiO₂ thin films with copper under an ambient lighting condition with a white light fluorescent lamp and the synergy effect of inorganic salts on the deactivation activity.

The copper-aided photo-deactivation of *Escherichia coli* phage was tested on TiO₂ thin films under a illuminating condition of poor UV rays with a white light fluorescent lamp. It was found that the deactivation activity of TiO₂ thin film with CuCl₂ was remarkably enhanced with the coexistence of NaCl. However, the coexistence of CuCl₂ and NaCl did not affect the deactivation activity on a glass plate without TiO₂, indicating that four factors, i.e., CuCl₂, NaCl, TiO₂ and light, were requisite for the enhancement of photo-deactivation activity under an ambient lighting condition. Next, the effect of coexistence of KCl or NaNO₃ on the deactivation activity was examined to clarify contribution of Na⁺ and Cl⁻. An equivalent increase in activity was observed in the case of KCl addition, whereas NaNO₃ addition was not effective for the increase in activity, indicating that existence of Cl⁻ is essential to encourage the activity. Assuming that Cu²⁺ is reduced to Cu⁺ by receiving electron from photo-excited TiO₂ and then Cu⁺ reacts with photocatalysis-derived H₂O₂ to produce •OH via a Fenton-like reaction, we proposed a possible mechanism that Cl⁻ stabilizes Cu⁺ through complex ion formation and thereby enhances the Fenton-like reaction.