

紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性

東京理科大学 基礎工学部

鈴木 高 広

Antimicrobial activity and the biocompatibility of titania were investigated using glass plates and beads coated with the photocatalyst. The activity of photocatalyst was stepwise regulated by the thickness of titania layer on the surface of soda-lime glass plates. Time-dependent growth profiles of *E. coli* cultured on the glass plates showed that the viability decreased due to the photocatalytic reaction induced by UV radiation. On the other hand, the UV absorption by titania powder was found to be effective on decreasing the damages for microbial cells. Similarly, the medium components including serum proteins for tissue culture of epithelial cell line were effective on protecting cells from the damages by UV radiation. These results suggested that the UV absorbent reaction is effective on protection of cells rather than damaging by the photocatalytic reaction.

1 緒 言

二酸化チタンの光触媒作用による環境浄化と抗菌技術が注目されているが、抗菌および滅菌効果を定量的に評価する技術が十分に確立されていないことが、光触媒技術の実用化において障害の一つとなっている。従来の無機系抗菌剤の多くは無機担体に銀を主剤、および銅、亜鉛を副剤として混入し、これらの金属イオンが徐々に溶出することにより、微生物の細胞膜を損傷したり電子伝達系を阻害することが知られている。一方、銀担持リン酸ジルコニウムは、結晶構造に組み込まれた銀イオンが光照射下で活性酸素の生成を促進し、殺菌作用が得られる¹⁾。同様に、二酸化チタンの光触媒作用による殺菌効果も活性酸素の生成に依存した反応であることが知られている^{2,3)}。二酸化チタン (n 型半導体) にそのバンドギャップ以上のエネルギーをもつ光を照射すると、伝導体に電子が、価電子帯に電子の抜け殻である正孔が生じる。この電子、正孔を半導体表面に取り出し、表面接触物質と反応させることで、二酸化チタン表面で酸化と還元との両反応が進行する。水や酸素が吸着した場合の酸化、還元反応は次のように考えられている⁴⁻⁶⁾。



このとき生じるヒドロキシラジカルやスーパーオキシドイオンなどの活性酸素や正孔が接触分子と反応する。二酸化チタンの正孔の酸化力はオゾンよりも強く、たいいていの有機化合物を水と二酸化炭素にまで分解することができる。

このような無機系抗菌剤の抗菌効果試験方法としては、

Effect of Photocatalytic Reaction on the Biocompatibility of UV Absorbent Titania

Takahiro Suzuki

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo



銀系無機抗菌剤研究会がフィルム密着法を用いた試験方法を規格化し、抗菌剤や抗菌製品の評価指標としている。そこで、このフィルム密着法に基づき酸化チタン材料の抗菌効果を評価する試験方法を検討した。酸化チタンの光触媒の抗菌作用を医療・衛生機器や環境浄化に利用するための研究は、近年活発に行われており、通常は、数時間の光照射による微生物の生菌率の変化を計測することによって比較検討されている⁷⁾。しかし、多くの細菌の比増殖速度は15分～1時間以内であることから再現性が乏しく、迅速な定量的評価技術の確立が望まれている。

二酸化チタンは、歯磨き粉の添加剤や食品添加物としても利用されるほど安全性の高い物質であるとされており、その紫外線吸収効果により化粧品の添加剤としても利用されている。大気汚染によるオゾン層の減少により紫外線が強まり皮膚癌の増加が危惧されており、紫外線吸収効果をもつ二酸化チタンは、紫外線から皮膚を保護する目的で化粧品の添加剤として用いられている。しかし、屋外における化粧品としての使用においては、二酸化チタンによる紫外線の吸収に伴い上述のように活性酸素の生成が避けられず、このような光触媒剤に接している皮膚組織に影響を与えることも危惧される。従来このような皮膚組織に対する光触媒作用の影響は十分な検討が行われてこなかったのが現状である。そこで、上記の抗菌性評価試験方法に基づき、二酸化チタンによる光触媒作用が皮膚組織に対する影響を解析するための評価試験方法も検討した。二酸化チタン材料が光照射下で皮膚組織に与える影響を明らかにするために、組織培養において細胞の生育と損傷に与える影響を定量的に測定する試験方法を検討し、さらに細胞炎症のメカニズムを解明することを試みた。皮膚に接する化粧品成分が、光照射下で直接的あるいは間接的に影響を与えていることは現実的であり、組織培養によりその影響を再現することが可能となれば、より生体に安全で生体保護作用を持つ化粧品や生体移植材料の開発と評価に役立つ。また、個体差や再現性に問題がある動物実験の代替試験法としても

有望である。

以上の背景に基づき本研究ではこれまでに、二酸化チタンの抗菌性を迅速に評価するための試験方法を検討し、その結果に基づき組織培養で二酸化チタンの光触媒反応の影響を解析する方法を検討した。

2 実験

2.1 抗菌性評価試験

2.1.1 検定用菌液の調製

検定用菌株には E.coli W3110 株を用いた。前培養には基本培地として、ラクトトリプトン;10g/L, 酵母エキス;5g/L, NaCl;5g/L, pH;7.0 に調製した培地を用いた。この基本培地 10mL を試験管に取り、120℃で15分間オートクレーブ滅菌したのち、冷蔵保存した寒天培地スラントから1白金耳を接種し、37℃で12時間振盪培養した。前培養時の菌体増殖は濁度計を用いて610nmの濁度が約1.0に達した時点で培養を終了し、回収した菌液を基本菌液とした。この時点で菌数は約 10^9 cells/mLに達した。光照射試験には、この菌液をさらに希釈し $10^5 \sim 10^7$ cells/mLに調製し、初期菌数の影響を比較した。この基本菌液の希釈には、基本培地を100倍に希釈した培地(希釈培地)を用いた場合と、蒸留水を用いて希釈した場合を比較した。

2.1.2 スライドガラス試験法

チタンのイソプロポキシドからチタニアゾルを調製し、ディップコーティングによりスライドガラス(76×26×1mm)面上に二酸化チタンの薄膜を形成した。乾燥の後、焼成する工程の回数により3, 5, 10層のTiO₂薄膜を用意し試験片とした。

図1に試験装置の概略図を示す。各スライドガラス面へ試験用菌液を100μL塗付し、この菌液をカバーガラスで覆い、図に示すように2本の紫外線ランプ(UV;10W)または蛍光灯(10W)の中間の位置に置き、UVまたは蛍光灯で一定時間照射したのち菌液を回収し、寒天培地上で1日後のコロニー数(CFU)を調べた。光照射時のスライドガラス面の乾燥を防ぐために、シャーレをポリエチレンフィルムで蓋をするとともに、シャーレ内には無菌水を満たした。また、短時間での光触媒作用を解析するために、光照射時間を1, 3, 5, 10分間と設定した。

スライドガラス試験法では初期菌体濃度を約 6×10^5 cells/mLに設定した。光照射後は、無菌蒸留水1.9mLで洗浄しすべての菌液を回収し、光触媒作用による生菌数の変化を比較した。

2.1.3 ガラスビーズ試験法

光触媒作用による空間的な連続接触滅菌効果を解析するために、図2に示す振盪攪拌フラスコ(容積500mL)にUVランプ(6W)を挿入した光触媒反応試験装置を用

いて実験を行った。スライドガラスへのTiO₂コーティングと同様に、ガラスビーズ(φ3mm)に10層のTiO₂をコーティングした試験材料、および、シリカゲルビーズ(φ3mm)にTiO₂をコーティングした試験材料を使用した。振盪フラスコへ各試料100ccを添加し、試験用菌液を200mL加え、室温(約20℃)で光照射しつつ160rpmで往復振盪を行った。光照射時間が5, 10, 20, 30分間に達した時点で、サンプル液を少量抜き取り、適宜希釈し寒天培地でCFUを計測した。この攪拌式滅菌試験では、菌株にE.coliと一般細菌の混合菌液を使用し、それぞれ初期菌体濃度は約200cells/mLおよび2000cells/mLに設定した。また、菌体分散液には発酵廃液(廃糖蜜, コーンステイプリカー培地)を蒸留水で100倍希釈した水溶液を使用した。

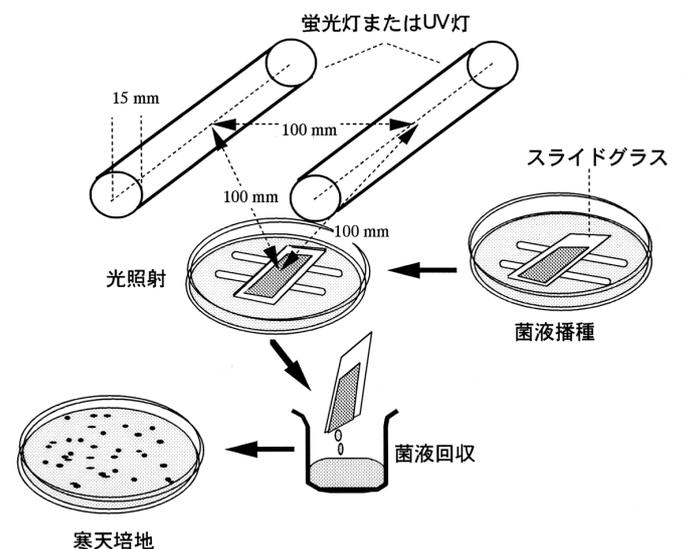


図1 スライドガラスを用いた光触媒反応実験の操作手順

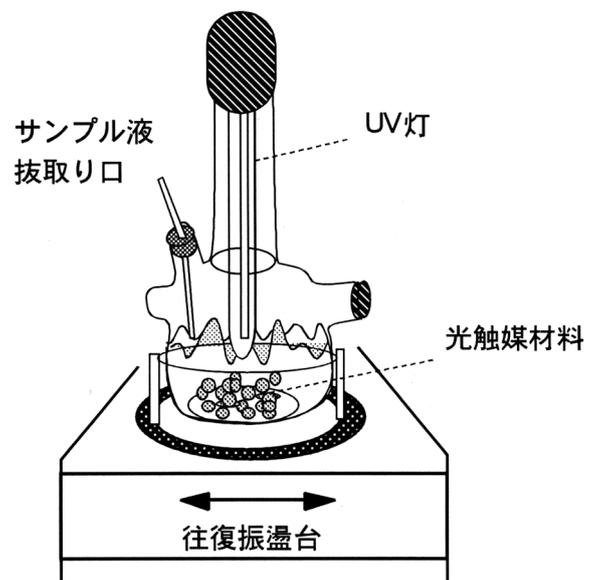


図2 振盪フラスコを用いた光触媒反応実験装置

2.1.4 ガラスビーズ試験法

各種酸化チタン材料による細胞損傷レベルを定量的、且つ迅速に評価する条件を検討するために、ヒト口腔類表皮癌由来の上皮系KB細胞を用いた。抗菌性試験に用いたTiO₂スライドガラス上にKB細胞を播種した後、シャーレ内の培地に浸漬し5% CO₂ インキュベーター内で静置培養した。培地には牛胎児血清を10%添加したMEM培地(10% FBS/MEM)を使用し、24時間静置培養した後、培地を除去し、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、図1に示した実験装置を用いて、蛍光灯またはUVランプで一定時間光照射し、細胞の生育へ与える影響を比較した。

3 結果

3.1 スライドガラス抗菌性評価試験

試験菌液の条件、培地条件、および播種菌数の影響を検討したところ、通常の前培養操作では菌の生育活性が不均一なため、光触媒反応の抗菌効果を定量的に評価することが困難であった。そこで、対数増殖期の前培養液を回収し分注液を-80℃に保存し、冷凍菌液を各試験毎に融解し、そのまま希釈して使用することで再現性の良い結果が得られることがわかった。また、LB培地で希釈した菌液を使用すると光照射中に増殖が進み、抗菌効果を得るまでに数時間の照射を要するとともに、試験液の乾燥や温度変化が大きく影響することがわかった。そこで、蒸留水を希釈に用いるとともに、乾燥を防ぐ方法を検討したところ、コーティング層に依存した生菌率の変化が10分間の光照射時間により定量的に再現性よく得られることがわかった。

このようにして最適化した実験条件下で行ったスライドガラス試験法における、光触媒反応による抗菌性試験の結果を図3に示した。初期菌体濃度を約 6×10^5 cells/mLに設定した場合に光照射後の回収液中の菌体濃度は約 3×10^3 cells/mLとなり、図に示すようにTiO₂のコーティング層数に依存して殺菌効果に変化した。図4には各死滅曲線から計算した死滅速度定数をまとめた。その結果、UV照射の場合にはTiO₂ 5層の場合に死滅速度がほぼ最大に達したが、蛍光灯の場合には、コーテ

ィング層数に依存して死滅効果が高まることがわかった。比較のためにTiO₂スライドガラスを用いて乳酸の分解を試みたところ、図5に示すように反応初期にはTiO₂層による分解反応が顕著であるが、徐々に反応性が低下し、TiO₂層数の差の影響も見られなくなった。これらの結果は、TiO₂層の表面へ乳酸の分解生成物が蓄積したことを示唆しており、抗菌性試験においても、死滅菌体や溶菌による菌体

分解産物が付着したことが考えられる。

以上の結果、TiO₂層の光触媒反応による抗菌性試験を、再現性良く、ある程度定量的に行うための実験条件を設定することが可能となった。

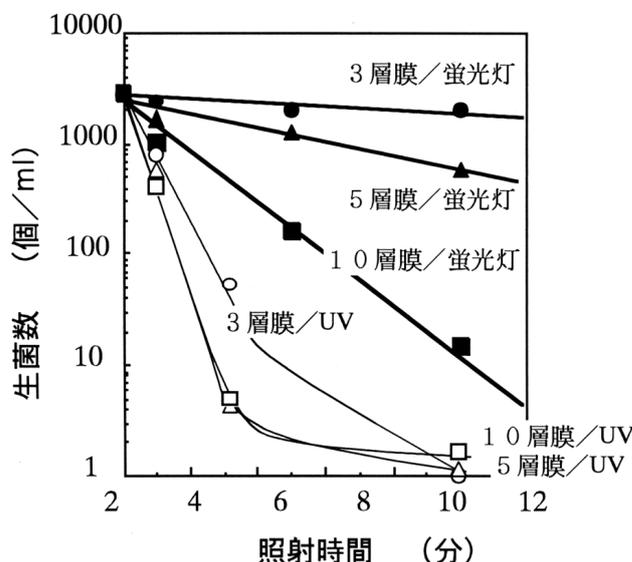


図3 蛍光灯およびUVランプの照射時間と残存生菌数

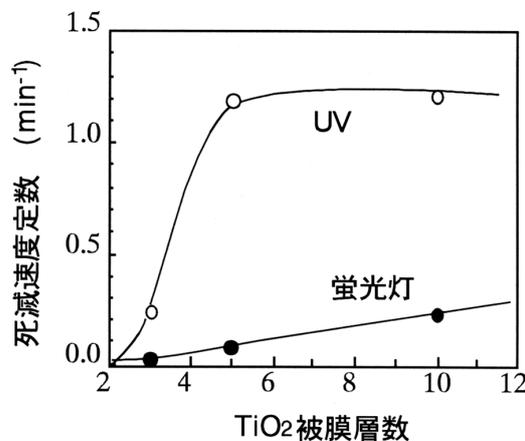


図4 酸化チタン被膜層数による死滅速度 r 変化

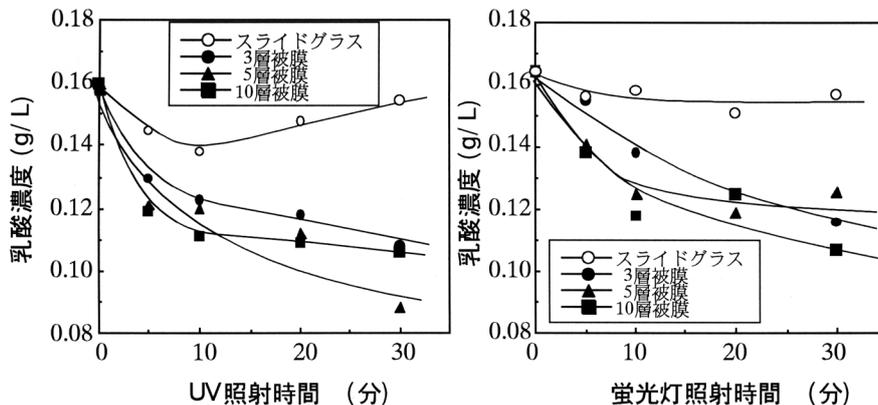


図5 TiO₂被膜スライドガラスによる乳酸の分解

3.2 ビーズ抗菌性評価試験

ガラスビーズおよびシリカゲルビーズにTiO₂をコーティングし、振盪フラスコを用いて空間的な抗菌性効果試験を行った結果を図6に示す。いずれの場合にも30分以内のUV照射により、E. coliおよび一般細菌の生菌数は急速に減少した。しかし、光触媒ビーズを添加せずにUV照射を行った場合よりも、滅菌速度が低下していることがわかった。表1には、処理前の菌液と各30分間の振盪後の、610nmにおける濁度の変化を示した。UV照射下での振盪では、濁度にはほとんど変化は認められなかったが、ビーズを添加した場合には著しく濁度が上昇したことがわかる。すなわち、振盪によりビーズ表面の崩壊とTiO₂の剥離が起きたために試験菌液が白濁し、その結果溶液の透光性が低下し、UVによる殺菌効果が抑えられたことがわかった。

このように、光触媒反応を空間的に利用する場合には、溶液中の透過光量を高く維持することが不可欠であった。すなわち、粉末状のTiO₂を分散させた場合には、TiO₂表面積が増大し光触媒反応量や菌体との接触効率を増加させる効果よりも、濁度が上昇することにより透過光量が減少し、UVの殺菌力が低下するために、死滅速度が減少することがわかった。

3.3 ビーズ抗菌性評価試験

光触媒スライドガラス上でKB細胞に一定時間照射した後、生細胞数を測定した。図7は通常の10% FBS/MEM 培養液に浸漬したまま照射した場合の生細胞数の変化を示す。UVおよび蛍光灯を照射したが、比較に用いたスライドガラス素面上の生細胞数といずれも大差なく、光触媒作用による細胞毒性は認められなかった。この結から、培地中の各種成分が光エネルギーを吸収していると考えられたため、PBS中に浸漬し照射を行ったところ、図8に示すように30分間の照射により細胞の死滅率に顕著な差が認められた。死滅速度は蛍光灯よりもUVの方が大きく、また、いずれの場合もTiO₂のコーティング層数に依存して死滅率が大きくなることがわかった。これらの結果は、TiO₂面における光エネルギーの利用効率が大きく影響していることを示しており、細胞密度にも影響されることが示唆された。そこで、細胞

表1 振盪処理による濁度

	菌体液	UV 処理液	ガラスビーズ TiO ₂ /UV 処理液	シリカゲル TiO ₂ /UV 処理液
濁度	0.018	0.020	0.50	1.08

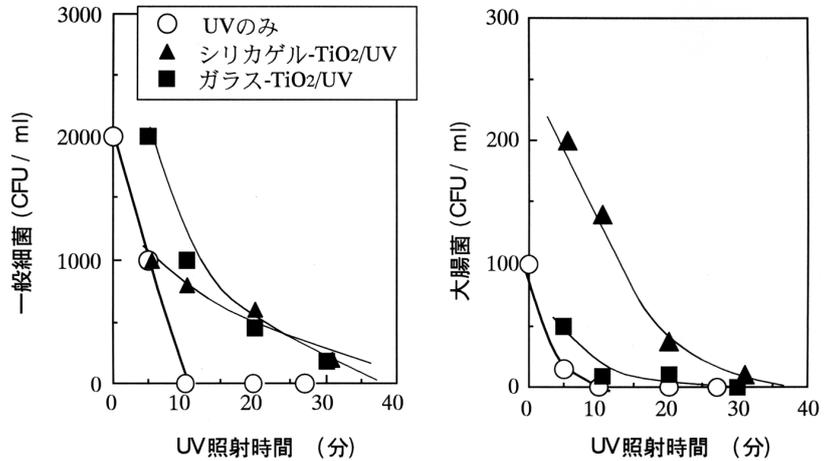


図6 振盪フラスコを用いたビーズ材の抗菌性評価試験

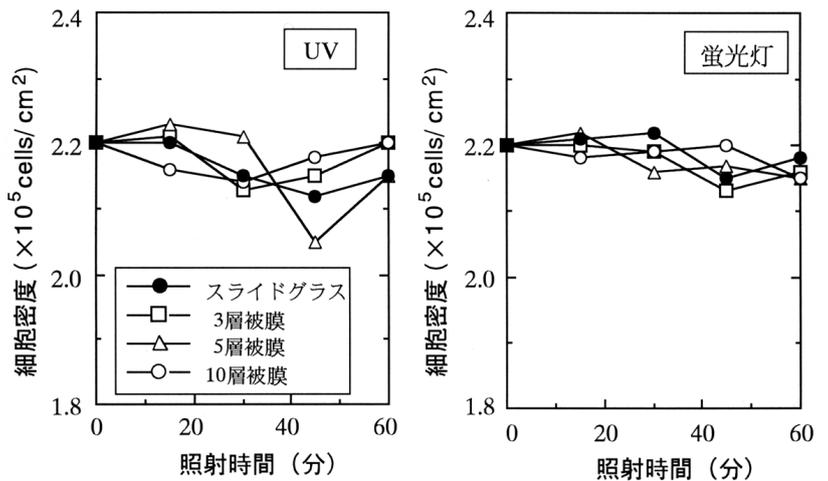


図7 10% FBS/MEM 培養液中のKB細胞に対する光触媒作用

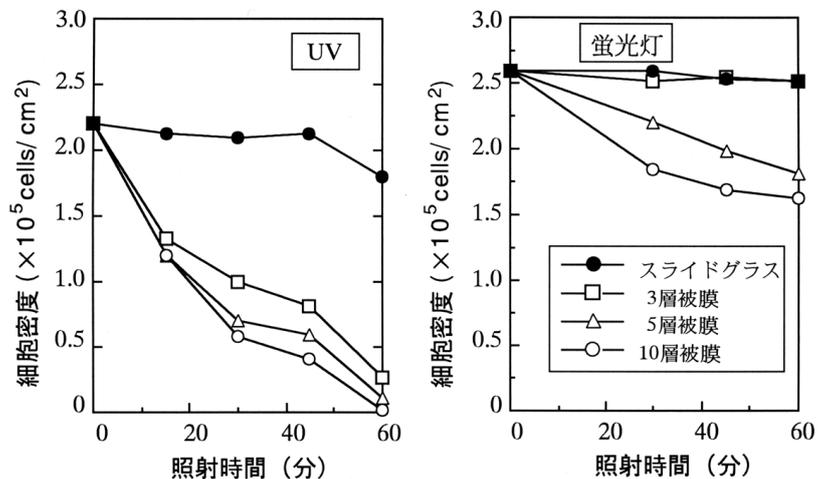


図8 PBS中のKB細胞に対する光触媒作用

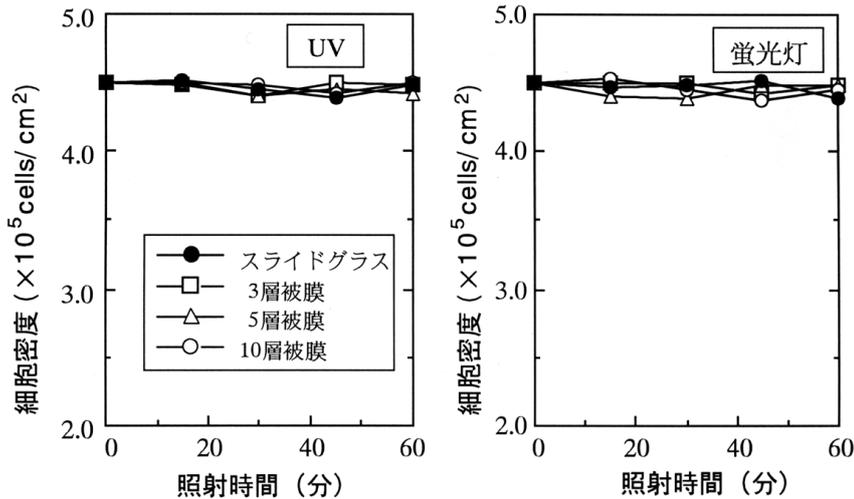


図9 PBS中の高密度KB細胞に対する光触媒作用

密度を2倍に高め、光触媒層の全面が細胞で覆われる条件下での影響を調べたところ、図9に示すように、光触媒の影響が消滅することがわかった。以上の結果、培地成分や細胞構成成分により光エネルギーが吸収され、TiO₂面での光触媒作用は細胞の生育にほとんど影響を与えないという結論に達した。

4 考察

酸化チタンの紫外線吸収効果と活性酸素生成が、培養組織に与える影響を解明するために、抗菌性試験および細胞毒性試験を行った。光触媒面で反応が著しい場合には、培養組織に対しても毒性をもつことがわかった。しかし、抗菌性および細胞毒性のいずれの場合でも、通常用いられる各種蛋白質やアミノ酸含有培地中では、光触媒作用が無視できる程低下することがわかった。これは、生体分子が光のエネルギーを吸収したり透過光量を減少させるために、光触媒面に達する光エネルギー量が減少するためであると考えられた。これらの結果から、紫外線吸収剤として化粧品に混合される酸化チタンの光触媒作用は、太陽光等にさらされる分散剤表面層でのみ反応しており、皮膚との接触面側では皮膚組織に影響を与える程の作用を及ぼすこ

とはないことが示唆される。また、抗菌性試験において濁度の上昇により光触媒作用が失われたことから、光触媒反応による毒性作用よりも、紫外線による直接的な毒性作用の方が細胞に対する影響が顕著であり、TiO₂により紫外線を吸収することで細胞保護効果が高まると考えられる。

各種生体材料開発において組織炎症マーカーとしての酵素系が見い出されてきており、中でも活性酸素の生成に関与するNO合成酵素の誘導発現は、組織の炎症と再構築の過程で重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。したがって、NO合成酵素と光触媒作用により活性酸素の生成が相乗的に高められる可能性も残されて

おり、これらの反応性と影響を皮膚組織培養において解析することで、さらに詳細に光触媒の保護作用と副作用を評価することが可能となるのではないかと考えられる。

(引用文献)

- 1) 鈴木昌二：抗菌剤及び抗菌加工製品の抗菌効力評価法，セラミックス，**31**, 590-593, 1996.
- 2) 橋本和仁，藤島昭：ニューセラミックス，**2**, 55-61, 1996.
- 3) 埴田博史：抗菌性セラミックス製品-酸化チタン光触媒，セラミックス，**31**, 587-589, 1996.
- 4) Ishibashi K, Nosaka Y, Hashimoto, K, Fujishima A: J. Phys. Chem., **102**, 2117-2120, 1998.
- 5) Hoffmann MR, Martin ST, Choi W, Bahnemann SW: Chem. Rev., **95**, 69-96, 1995.
- 6) Salama SB, Natarajan C, Nogami G, Kennedy JH: J. Electrochem. Soc., **142**, 806-810, 1995.
- 7) 砂田香矢乃，橋本和仁，藤島昭：酸化チタン光触媒反応による抗菌効，J. Antibact. Antifung. Agents, **11**, 611-620, 1998.