

可視光応答型光触媒による大腸菌の光殺菌効果の可視化の検討

水野 康平・小畑 賢次・藤野 高彰*・松嶋 茂憲

Visualization of photosterilization of *Escherichia coli* by a visible-light responsive photocatalyst

Kouhei MIZUNO, Kenji OBATA, Takaaki FUJINO, and Shigenori MATSUSHIMA

Abstract

Photosterilization of pathogens is potentially useful for infection control in healthcare facilities or public environments. Currently, the most widely used photocatalyst is TiO_2 that requires ultraviolet (UV) light to generate reactive oxygen species known as bactericidal agents. However, its application is limited because of cytotoxicity of UV light, whereas visible-light responsive photocatalyst is expected as an alternative technology. Here, we prepared WO_3 , a visible-light responsive photocatalyst, and constructed a model to visualize the process of bactericidal effect of WO_3 against *Escherichia coli*. In the model, fluorescence microscopic analysis was performed. It was found that propidium iodide as dead cell indicator specifically stained cells attaching on WO_3 micro-scale granules, suggesting that the photosterilization effect of WO_3 could be influenced by the contact between *Escherichia coli* cells and the catalyst granules.

Keywords: Visible-light irradiation, photocatalyst, anti-colibacillus, WO_3 , *Escherichia coli*

1. 緒言

病原体の殺菌は、免疫力の低下した患者の多い病院において、院内感染防止の観点から重要な課題である。このような問題に対し、アナターゼ構造を持つ酸化チタンの大腸菌群の光殺菌効果が注目されている [1, 2]。酸化チタンは波長410nm以下の光照射により励起し、その触媒作用により溶存酸素や水から $\cdot\text{OH}$ （ヒドロキシラジカル）などの酸化剤ラジカルが生成する。この酸化剤ラジカルが細胞内の補酵素を酸化し、代謝経路を破壊することにより、微生物細胞が死滅するものと考えている [3, 4]。しかしながら、 TiO_2 における光殺菌効果は、紫外線照射下でしか機能しない。これに対して、最近、可視光応答性の光触媒として、 WO_3 が注目されている [5]。 WO_3 は、可視範囲（2.5~2.8 eV）の間に吸収端をもつn型半導体であり、可視光照射下で光触媒活性を示す [6]。この可視光の照射によって励起した WO_3 のホールは、その高い価電子帯準位のために強い酸化力を持ち、酸化剤ラジカルを生成するが、その殺菌メカニズムの詳細は分かっていない。そこで、本研究では、これらの可視光応答型光触媒における大腸菌の光殺菌効果について、モデル実験系を構築して、蛍光顕微鏡観察により殺菌プロセスを可視化する条件を検討した。

2. 実験方法

2.1 光触媒の調製

WO_3 粉末は、アンモニウム塩熱分解法により調製した [7]。 WO_3 は、パラタングステン酸アンモニウムを空气中400, 500 °Cで2時間焼成することで調製し、昇温速度は10 °C/minとした。合成した酸化物に関するキャラクリゼーションは、粉末X線回折 (XRD) 測定により実施した。

2.2 光殺菌能の評価

殺菌の試験菌として、大腸菌*Escherichia coli* BW25113を用いた。試験菌は、LB培地で37 °C、120 rpmで一晩培養し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で2回洗菌後、PBSで置換懸濁

液を 10^4 または 10^5 希釈して使用した。触媒液は、ガラスサンブル瓶に入れたPBS菌体懸濁液10 mlに酸化タングステン触媒を100 mg添加して調製した。光照射装置（分光計器製 OTENTOUSUN-III）にて、室温で3.5時間照射した。照射中、ガラス瓶中の触媒/菌体懸濁液をスターラーにより100 rpmで攪拌した。大腸菌の生菌数は、LB寒天プレート上のコロニー数の測定（colony forming unit: CFU）により評価した。

2.3 光殺菌の顕微鏡観察による評価

殺菌の状態を臭化プロビジウム (PI) による死菌体染色により評価した。PIは、死菌体の損傷した膜から細胞内に侵入して核を染色する蛍光試薬である。3.5時間照射後の菌体/触媒懸濁液をよく懸濁した後、その15 μL に対してスライドガラス上でPI溶液を終濃度3.5 μM になるように添加して5分以上染色した [8]。その後、蛍光顕微鏡Eclipse 80i (Nikon) にて、励起、蛍光波長をそれぞれ525–550 nm、565 nmにて観察した。撮影した画像を画像解析ソフトImage Jを用いて明視野画像と蛍光画像を合成した。

3. 結果及び考察

3.1 XRD測定

調製した WO_3 光触媒の結晶構造を確認するために、XRD

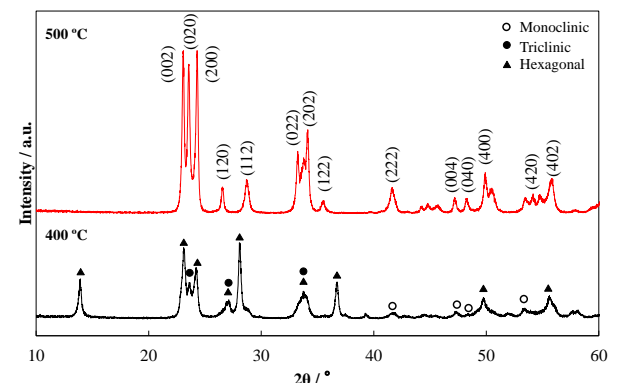


Fig. 1 WO_3 に関するXRDパターン

*北九州工業高等専門学校専攻科 生産デザイン工学専攻

測定を実施した。Fig. 1には、種々の温度で処理したWO₃に関するXRDパターンを示している。空气中400℃の熱処理によってWO₃相が確認されるが、単斜晶系、三斜晶系、六方晶系の各WO₃相が混在していた。空气中500℃以上で焼成すると、単斜晶系のWO₃単相へと変化した。この図から、パラタングステン酸アンモニウムを空气中500℃で2時間処理すると、単一相のWO₃が得られることを確認した。

3.2 光触媒活性試験

酸化タングステンWO₃の大腸菌生菌数への殺菌効果を調べた。殺菌プロセスを可視化するモデル実験系を構築するために、初期生菌数よりCFUで1桁程度の殺菌力を示す条件を様々に検討した結果、Table 1に示す通り、室温、3.5時間の光照射により、初期値の10⁸からコントロールの光照射なしと比べて、10⁷の桁へと1桁低下する条件を確認した。

Table 1 光照射による大腸菌の生菌数変化

条件	時間(h)	生菌数 (CFU/mL)
初期	0	1.62 (±0.78) ×10 ⁸
光照射なし	3.5	2.06 (±0.54) ×10 ⁸
光照射あり	3.5	1.46 (±0.48) ×10 ⁷

次に、光触媒粒子の殺菌力は、一般に光触媒粒子との接触または近傍で生じると考えられることから、粒子と菌体との接触の状態を顕微鏡により観察した (Fig. 2)。その結果、菌の死滅状態を示すPI染色陽性の菌体は、酸化タングステン粒子上に付着した状態であったのに対して、粒子周辺に確認された大腸菌菌体の多くはPI陰性であったことが示された。このことは、本条件における光触媒の殺菌力が、菌体との接触に大きく依存する可能性を示唆している。

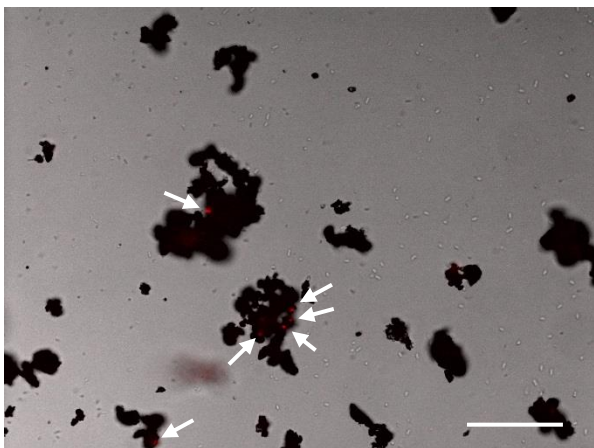


Fig. 2 WO₃光触媒粒子と大腸菌のPI染色像

殺菌された大腸菌細胞はPIに染まり赤く光る。PI染色陽性細胞はWO₃粒子上に分布しており (矢印)、背景には染色されていない細胞が見られる。

Scale bar:50 μm

本殺菌モデル系は、今後、菌体とのコンタクトに関与する様々な因子 (粒子径、細孔、塗布方法など) の検討に役立つと期待できる。また、非接触による殺菌プロセスの有無と可視化方法を検討する必要がある。

4. 結論

本研究では、可視光応答型光触媒 (WO₃) を調製し、可視光照射下におけるWO₃の大腸菌に対する光殺菌効果を調べた。以下に、本研究の成果を列挙する。

1. XRD測定から、パラタングステン酸アンモニウムを空气中500℃で2時間処理すると、単一相のWO₃が得られることを確認した。
2. WO₃は10 mg/mlで、3.5時間の光照射により生菌数 (CFU/mL) で1桁の殺菌力を示した。
3. 殺菌菌体をPI染色した結果、WO₃触媒粒子に接触した菌体に死滅菌体を確認した。

謝辞

本研究は、JSPS科研費JP16K06782の助成を受けて実施した。

<参考文献>

- [1] 藤嶋昭, 橋本和仁, 窪田吉信, 表面科学, **16**, (3), 188-193, (1995).
- [2] T. Asahara, H. Koseki, T. Tsurumoto, K. Shiraishi, H. Shindo, K. Baba, H. Taoda, N. Terasaki, *Japanese J. Infect. Dis.*, **62**, 378-380 (2009).
- [3] R. Cai, K. Hashimoto, K. Itoh, Y. Kubota and A. Fujishima, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **64**, 1268-1273 (1991).
- [4] L.-S. Zhang, K.-H. Wong, H.-Y. Yip, C. Hu, J. C. Yu, C. Y. Chan, P.-K. Wong, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 1392-1398 (2010).
- [5] T. Arai, M. Horiguchi, M. Yanagida, T. Gunji, H. Sugihara, and K. Sayama, *Chem. Commun.*, 2008, **0**, 5565-5567 (2008).
- [6] J. Kim, C. W. Lee, and W. Choi, *Environ. Sci. Technol.*, **44** (17), 6849-6854 (2010).
- [7] 山本良治, 松本明英, 本川惺, 志垣憲良, 「粉体および粉末冶金」, 40 (8), 784-788 (1993).
- [8] L. Shi, S. Günther, T. Hübshmann, L. Y. Wick, H. Harms, and S. Müller, *Cytometry part A*, **71**, 592-598 (2007).

(2017年11月 6日 受理)