Antibacterial activity of visible light-responsible nanosilver photocatalyst against pathogenic bacteria

(1近大院産理工専攻生環化、2伊都研究所) 〇宮﨑 愛1、田尻 晋太郎1、深野木 伸太1、伊東 謙吾2、田中 賢二1

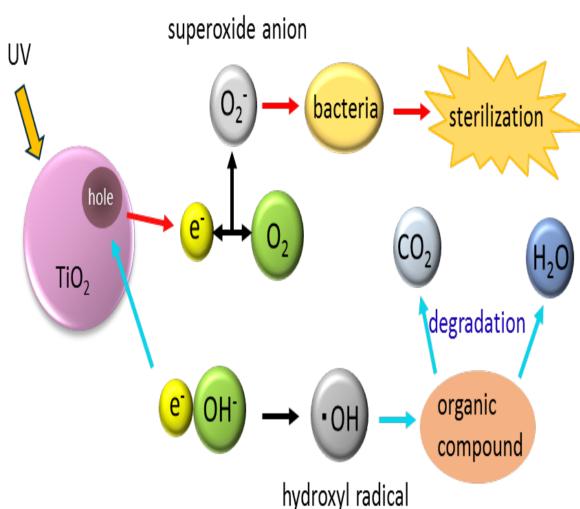
目的

光触媒とは

我々は銀ナノ粒子(A)、ボロン樹脂(B)、クレイナノ粒子(C)から成る新規な光触媒物質(ABC光触媒)を開発した。このABC光触媒の光吸収領域は可視光から近赤外 域にも及び、屋内でも有効な光触媒・光電変換素子として期待され、また銀ナノ粒子を含有することから暗所での抗菌活性も期待している。本研究では、組成の異 なる3タイプのABC光触媒を用い、組成および培養条件の違いがどのように抗菌活性に影響を及ぼすのか、病原細菌を検定菌として検証を行った。

光を照射することにより触媒作用を示す物質であり、 代表として酸化チタン(TiO2)などがあげられる。 **UV** TiO,は様々な工業製品に 用いられている。 Impurity-proof **Antifogging** Clean water TiO₂ Air Sterilization purification Fig.1 Function of the photocatalyst

光触媒の原理(従来型)



ABC光触媒の構造

ABC光触媒の組成

[Characteristic of ABC visible light responsible photo catalyst]

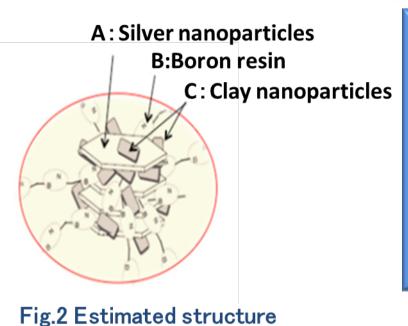


Fig.3 Color and light absorption

Ag:Boron resin:Clay=1:6:3 Type I Ag 3.4mg/ml

Ag:Boron resin:Clay=1:2:1 Type II Ag 8.5mg/ml

Ag:Boron resin:Clay=1:24:12 Ag 0.9mg/ml

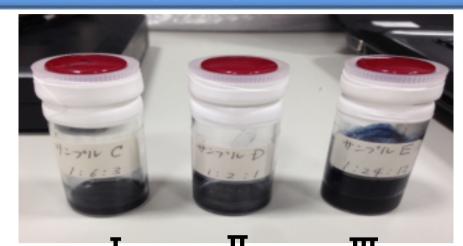


Fig.4 Appearance of ABC photocatalyst in butyl acetate

しかし従来型は…

紫外線は吸収するものの可視光に応答しない。 日中や屋外での使用に限られる。

屋内使用型(可視光応答型)への期待

実験方法

◆検定菌

抗生物質や抗菌素材の抗菌評価でよ く使用される菌を検定菌とした。

腸管出血性病原性大腸菌(分離株) Escherichia coli O157:H7

緑膿菌

(グラム陰性通性嫌気性桿菌) Pseudomonas aeruginosa NBRC3080 黄色ブドウ球菌

(グラム陽性通性嫌気性球菌) Staphylococcus aureus NBRC12732

E.coli O157:H7

 ${
m II}$.256 fold

dilution

100.0%

47.8%

10.9%

13.0%

10.9%

I .128 fold

dilution

100.0%

73.0%

65.1%

54.0%

44.4%

dark

white

 red

(660nm)

blue

(470nm)

green

▶試験方法 1. Refresh

3. Spreading ABC photocatalyst

on agar plate

photocatalyst

(type $I \cdot I \cdot II$)

butyl acetate

dilution

100µl

Butyl acetate

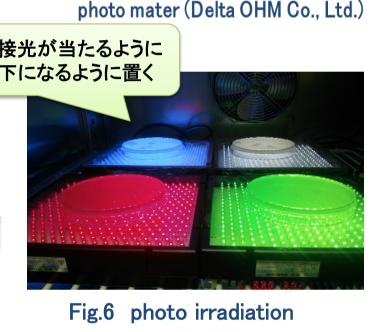
2. Preculture 30℃ 30°C 、120rpm 24h 24h cell suspension culture medium (nutrient broth)

菌液塗布部に直接光が当たるように シャーレの蓋が下になるように置く 4. Estimation of number of viable cells saline solution

dilution

100µl

cell suspension



illuminance:1000lx

Fig.5 LED panels (CCS Inc.)

9.00

(1) E. coli O157: H7 (dark)

結果

〈ABC photocatalyst was suspended in butyl acetate〉 %inoculation: 7.8 \times 10⁷ cfu/plate 10.00 cells(log(cfu)) viable 4.00 of 3.00 Number 2.00 0.00 Type I .8 fold Type II .8 fold Type III .8 fold dilution dilution Fig.7 Antibacterial activity of each photocatalyst to *E.coli* O157:H7

※O157(分離株)の抗菌試験は福岡県保健環境研究所にて 実施した。

※可視光照射試験では暗所で抗菌活性を示さない濃度まで光触媒を希釈した

P.aeruginosa

II.128 fold

dilution

100.0%

14.4%

0.6%

4.2%

② E.coli 0157:H7, P.aeruginosa, S.aureus (photo irradiation) ③ E.coli O157:H7、 P.aeruginosa、 S.aureus (photo irradiation)

I .128 fold

dilution

100.0%

25.0%

24.1%

19.8%

12.5%

(ABC photocatalyst was suspended in butyl acetate) Xinoculation (E.coli O157:H7):100 cfu/plate

 \coprod .32 fold

dilution

100.0%

17.1%

43.9%

53.7%

26.8%

(P.aeruginosa, S.aureus):500 cfu/plate Table 1 Comparison of colony formation rate with highly diluted ABC photocatalyst (suspended in butyl acetate) between different light conditions

(ABC photocatalyst was suspended in ethanol) Xinoculation (E.coli O157:H7):100 cfu/plate (P.aeruginosa, S.aureus):500 cfu/plate Table 2 Comparison of colony formation rate with highly diluted ABC photocatalyst

incubation

(30°C, 48h)

counting bacterial colony

(suspended in ethanol) between different light conditions II 128 fold dilution

| ureus | _ | 11.120 1014 411441011 | | |
|--------------|------------------|-----------------------|--------------|----------|
| II .128 fold | | O157:H7 | P.aeruginosa | S.aureus |
| dilution | dark | 100.00/ | 100.00/ | 100.00/ |
| 100.0% | (butyl acetate) | 100.0% | 100.0% | 100.0% |
| 9.6% | dark | 0.0% | 0.0% | 14.89% |
| | white | 0.0% | 0.0% | 12.23% |
| 4.8% | red (660nm) | 0.0% | 0.0% | 4.79% |
| 14.4% | blue (470nm) | 0.0% | 0.0% | 6.91% |
| 23.4% | green (525nm) | 0.0% | 0.0% | 5.85% |

(525nm)P.aeruginosaおよび S.aureusに関してはO157:H7の試験において最も抗菌効果の表れた光触媒 I とⅡのみで試験を行った。

S.aureus

I .128 fold

dilution

100.0%

29.2%

17.4%

18.4%

17.7%

抗菌試験法の問題点と改善

◆光触媒分散性の悪さ

・ABC光触媒は疎水性のナノ粒子であり、有機溶媒中でも凝集を起こす→抗菌力低下 ・平板培地上で凝集しやすい→本来の抗菌効果が得られていない



溶媒を酢酸ブチルからエタノールへ変更 ◆培地上で検定菌と光触媒が培養終了時まで常時接触

→抗菌効果が静菌作用か殺菌作用によるもの判断できない

◆適切なバインダー成分を開発し、光触媒をプラスチックやガラス表面にコート

'フィルム密着法"による抗菌試験へ

フィルム密着法による殺菌試験

実験方法

◆検定菌

結果

◆試験方法

非病原性大腸菌O157:H7 Escherichia coli O157:H7JCM18426

1. Refresh • Preculture 2. Preparation of cell suspension Dillution



Fig.8 A PET FILM coated with ABC photocatalyst using the binder

PET FILM (with binder), 8h/photoirradiation

Photocatalyst - coated PET FILM, 8h/photoirradiation

Photocatalyst - coated PET FILM, 8h/dark

LED(white light)

3. Inhibition test on PET film Cover film cell suspension (150_uI) PET film illuminance:1000lx

cell suspension $6.7 \times 10^5 \sim 2.6 \times 10^6 \text{cells/ml}$ Inoculation to agar plate washout recovery of incubation survived cells (30°C, 48h) ABC photocatalyst and binder

 2.48×10^6

 2.7×10^{1}

E.coli O157:H7 (Type II,500 fold dilution)

 Table3
 The number of the survived bacteria cells after exposed on each PET FILM samples
 Number of Condition survived bacteria(cfu) PET FILM, 0h 2.13×10^{6} PET FILM, 8h/dark 1.75×10^{6} PET FILM, 8h/photoirradiation 1.58×10^6 PET FILM (with binder), 8h/dark 3.62×10^6

抗菌活性の計算

 $R = \{log(U_{F-I}/U_s) - log(T_{F-I}/U_s)\} = log(U_{F-I}/T_{F-I})$ R:抗菌活性値 U_s:直後の生残菌数 U_{F-T}: 抗菌加工なし試験片で8時間光照射した後の生残菌数

counting bacterial colony

T_{F-I}: 抗菌加工あり試験片で8時間光照射した後の生残菌数 ※R≥2 の場合に光触媒機能ありと判断される

試験結果から、抗菌活性値Rは5.44となった

(JIS R 1752 規定)

要約•考察

- ◆ABC光触媒については暗所では銀による抗菌作用、可視光照射下 ではさらに光触媒反応による抗菌作用が働いていると考えられる。
- ◆組成の異なるABC光触媒Type I、II、IIはそれぞれ腸管出血性病 原性大腸菌E.coli O157:H7に対して暗所において強い抗菌活性を示し、 Type I、Ⅱにおいては8倍希釈を行っても菌数を7桁減少させた。
- ◆E.coli O157:H7、緑膿菌P.aeruginosa、黄色ブドウ球菌S.aureusに対 して可視光照射を行うことでさらに抗菌力が増すことが確認された。
- ◆ABC光触媒の抗菌力はTypeⅡ>Ⅰ>Ⅲの順に高かった。 Type II のAgの比率が高いためと考えられるが、ボロン樹脂を抜くと 可視光照射しても抗菌活性を示さないことから、ABC光触媒が抗菌活 性を発揮するにはボロン樹脂が必要不可欠である(データ未公表)
- ◆光触媒はその濃度が高いと凝集を起こしやすく、凝集が抗菌力を 低下させている可能性がある。しかし、光触媒の凝集を抑える溶媒と してエタノールを選択したことで大幅に抗菌活性が向上した。
- ◆フィルム密着法によって試験を行ったところ、非病原性O157:H7に 対して暗所および光照射下において菌数を大幅に減少させることが 確認された。
- ◆JIS R 1752で規定される抗菌活性計算式に基づく抗菌活性値は5.44 となり、基準値を大幅に超えていることからABC光触媒の抗菌効果が 強力であると判断できる。

今後の展望

病原細菌に対してもフィルム密着法で試験を行うとともに、 使用フィルムにおいてはバインダー上での使用濃度、吸着剤の改良など、 バインダー上での分散状態を改善し、さらなる抗菌活性の向上を目指す。