

抗菌効果を有する酸化チタン溶射皮膜の研究

柿本雅史, 富永一哉, 田村吉史, 赤沼正信*, 田中大之*, 片山直樹*

Studies on the Thermal Sprayed TiO₂ Coatings with Antibacterial Effects

Masashi KAKIMOTO, Kazuya TOMINAGA, Yoshifumi TAMURA,
Masanobu AKANUMA, Hiroyuki TANAKA and Naoki KATAYAMA

We produced different surface area samples by carrying out surface finishing treatment after spraying TiO₂ and examined its antibacterial effects. As a result, the "as sprayed" surface area without the after-treatment increased most, and the antibacterial effects were most effective. The after-treatment which decreased the surface area of the sprayed coating was unnecessary for giving sufficient antibacterial effects in the sprayed coating of TiO₂.

In addition, after examining the antibacterial effects of the TiO₂ sprayed coating for a various range of microorganisms such as food contaminating microorganisms and food poisoning bacteria, the resulting antibacterial effects of the TiO₂ sprayed coating was sufficient enough for non-spore bacteria such as *Escherichia coli* O-157, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus*.

近年、食品製造業においては腸管出血性大腸菌O157の集団感染、サルモネラ菌や黄色ブドウ球菌などによる大型食中毒事故などにより、HACCPの導入など食品加工工程の管理手法や使用される加工設備に対する衛生面の関心が高まっている。しかしながら、食品加工場で使用されている加工設備の素材は、ステンレス鋼等の金属材料や樹脂系材料が中心であり、これらの材料は一般に抗菌効果がないことから、数々の技術を用い抗菌効果を付与する研究が進められている。我々の研究グループは、金属素材自体に抗菌性を付与するために、酸化チタンの光触媒作用により発生する活性酸素の抗菌作用に着目し、溶射技術による酸化チタン皮膜の形成に関する研究を行ってきた。

既報¹⁾では、粒度が5~25 μ mの酸化チタン粉末をガス粉末溶射装置を用いて溶融させ、ステンレス基材表面に吹き付けると、アナターゼ型結晶の含有量が多い酸化チタン

皮膜となることを、さらに、その酸化チタン溶射皮膜は大腸菌に対して抗菌効果があることを明らかにした。

溶射したままの酸化チタン皮膜には、その形成原理上、必然的に多くの気孔と亀裂が存在する。この多孔性は用途によっては、有効に利用されることもあるが不都合をきたすこともある²⁾。そこで本報は、ステンレスの基材に酸化チタンを溶射し形成した皮膜に対して、後処理として2種類の表面加工処理を行うことで、表面積が異なる試料を作製し、その抗菌効果について検討した。また、食品汚染菌や食中毒菌などの各種微生物に対する抗菌効果についても検討を加え、若干の知見を得たので報告する。なお、「抗菌」という用語は、細菌に対する殺菌を含めた増殖抑止作用を総称するが、本報においては抗菌と殺菌を厳密には区別せず、酸化チタン光触媒作用による細菌類、真菌類に対する殺菌を含めた増殖抑止作用として用いた³⁾。

*北海道立工業試験場

事業名：一般試験研究

課題名：殺菌作用を有する光半導体皮膜の形成に関する研究

実験方法

1 抗菌性試験の評価方法

実験中に試料表面の菌液の乾燥を防ぐため、滅菌プラスチックシャーレに滅菌済みの濾紙を敷き、滅菌水1mlを添加し湿度を保持した。加熱殺菌した試料表面に、1日間前培養後、滅菌生理食塩水にて菌数を $10^5 \sim 10^6$ cfu/mlに調整した供試菌液を0.5ml滴下し、菌液と試料面の密着度を高めるため滅菌ポリエチレンフィルムを被せた。ランプを所定時間照射後、滅菌済みポリエチレン袋に試料を入れ、滅菌生理食塩水10mlを添加し試料を十分洗浄後、菌を回収し回収菌液とした。菌数測定は、常法に従い、標準寒天培地（日水製薬社製）などの寒天培地を用いて行った。対照は、基材として用いたステンレス（SUS316L）と酸化チタン皮膜にランプを照射しない遮光区とした（図1）。照射するランプには紫外線ランプ（FL15BLB型 東芝製）と3波長形昼白色灯（FL15EX-N-X型 東芝製以後蛍光灯と称す）を使用した。紫外線強度は310~400nmの波長について紫外線強度計（UM-10型 ミノルタ製）で、蛍光灯や太陽光の照度は照度計（T-1型 ミノルタ製）にて測定した。使用した紫外線ランプは酸化チタンの光触媒励起波長である350nm付近

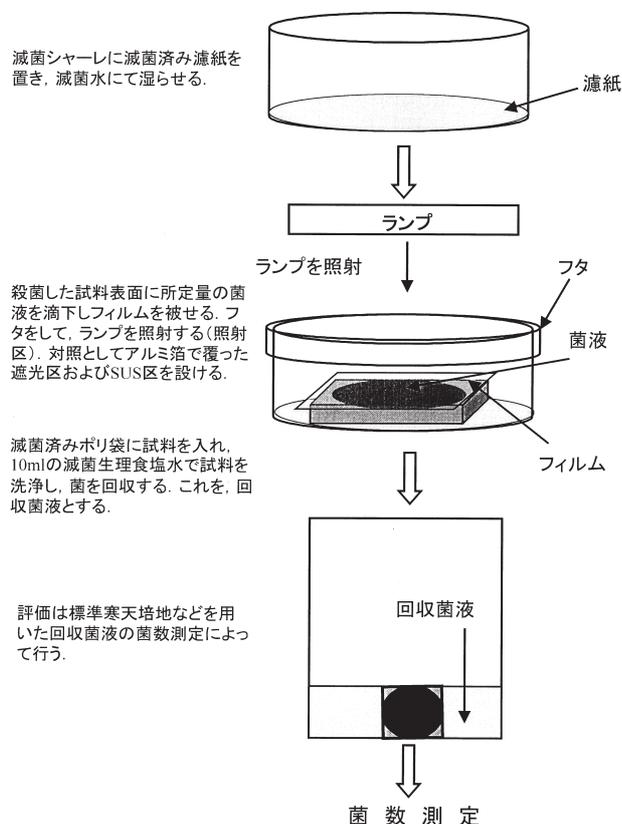


図1 評価方法

の紫外線を多く含有するが、250nm付近の殺菌線は含まず抗菌効果は無い。なお紫外線ランプを用いた試験については、試料面の紫外線強度を約 0.7 mW/cm^2 とした。

2 表面加工処理の異なる溶射試料の抗菌効果

1) 酸化チタン溶射試料の作成

基材はSUS316L（ $50 \times 50 \times 4$ mm）を用い、その表面にアルミナグリットによりブラスト処理を行い、平均粒径 $10 \mu\text{m}$ の市販の酸化チタン溶射材料をガス粉末式溶射法にてコーティングし、酸化チタン試料（厚さ約 0.1 mm ）を作製した（無処理：as sprayed）。さらに、この無処理区試料に、エメリー研磨処理（研磨：finished）したものおよびシリコン系樹脂の含浸により封孔後、エメリー研磨処理（シール：sealed+finished）したもの、以上2種類の表面処理試料を作製した。

2) 供試菌と紫外線照射条件

供試菌には大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649を用い、普通ブイヨンにて1日間前培養後、滅菌生理食塩水にて希釈後供試菌液とし、紫外線ランプを1、2時間照射して抗菌性試験を行った。

3 蛍光灯及び太陽光による抗菌効果

供試料には無処理の酸化チタン試料を用いた。

試料に蛍光灯を6、12時間照射し抗菌性試験を行った。試料面の照度は約 4500 Lux 、紫外線強度は約 0.01 mW/cm^2 とした。また、当センターの実験室窓際に試料を置き、太陽光の照射による抗菌性試験を行った。照射時間は3時間とし、紫外線強度、照度を経時的に測定した。供試菌は大腸菌 *Escherichia coli* JCM 1649を用いた。

4 各種微生物に対する抗菌効果

供試試料には無処理区の酸化チタン試料を用いた。

供試菌株には、次の菌株を使用した。細菌は、*Escherichia coli* CR-3（O-157:H7、毒素陰性、独立行政法人動物衛生研究所中沢室長分与株）、*Enterobacter aerogenes* JCM1235、*Salmonella* Enteritidis IFO3313、*Bacillus subtilis* JCM1465、*Staphylococcus aureus* IFO12732、*Lactobacillus helveticus* B1（財団法人日本乳業技術協会株）、*Lactococcus lactis* JCM5805、真菌には *Saccharomyces cerevisiae* JCM7255、*Aspergillus niger* JCM1864を使用した。

Lactobacillus helveticus、*Lactococcus lactis*は、LACTOBACILLI MRS BROTH（DIFCO社製）にて 37°C 、2日間前培養し、その他の細菌株は、普通ブイヨンにて 35°C 、1日間前培養後、供試菌液を調製した。*Saccharomyces cerevisiae*は、YPD培地にて 25°C 、1日間前培養し、 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mlに調整し供試菌液とした。

Aspergillus niger は、PDA (MERCK社製) 斜面培地にて25°C、約10日間前培養後、滅菌脱脂綿を充填した滅菌ロートにてカビの菌体をろ過し、カビの孢子懸濁液を調製⁶⁾し供試菌液とした。なお、この時の菌数は、 4.0×10^6 cfu/mlであった。

紫外線ランプ照射後、回収した菌液の生菌数の測定に用いた培地は以下の通りである。*Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* にはBCP加プレートカウント寒天培地(日水製薬社製)を用いた。他の細菌については、標準寒天培地を使用した。*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* についてはPDA培地を使用した。

結果と考察

1 表面加工処理の異なる溶射試料の抗菌効果

紫外線を照射した試料の大腸菌に対する抗菌効果は、無処理、研磨、シールの順に大きかった(図2)。無処理では1時間の照射で生菌数は、初発菌数に比べ1/100以下に減少し、2時間の照射では1/1,000以下の菌数となり抗菌効果は大きかった。一方、研磨区、シールの抗菌効果は小さく、2時間の照射では1/10程度の減少であり、特に、シールでは2時間の照射でも1/100以下に菌数を低減する事はできず、十分な抗菌効果が発揮されなかった。

3種類の試料表面の電子顕微鏡写真を図-3に示した。試料表面の形状の粗さを示すRz値(十点平均粗さ)は、

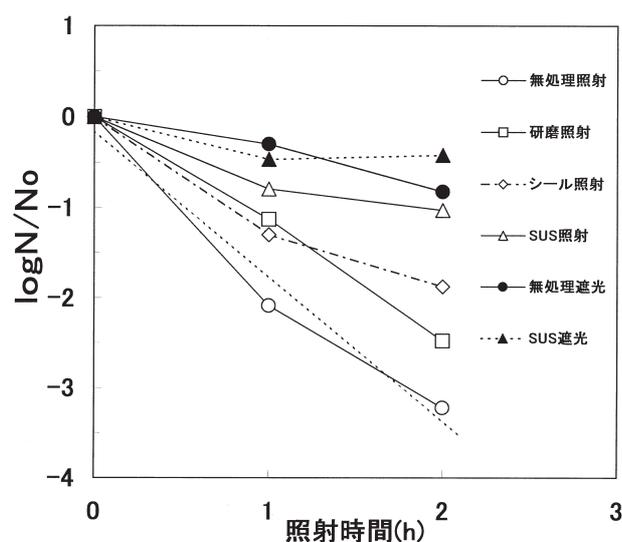
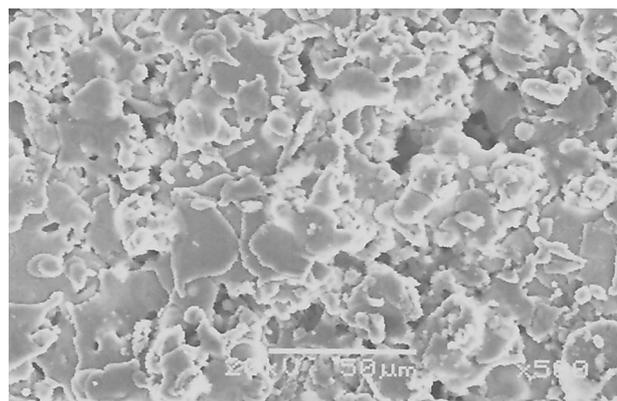
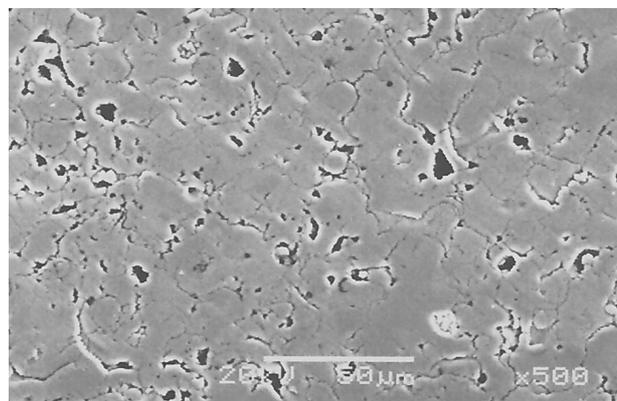


図2 表面処理の違いによる抗菌効果の比較
N, 照射後の生菌数, No, 照射前の生菌数
試料面紫外線強度は約0.7mW/cm².
....., 無処理照射の生残曲線 ($y = -1.611x - 0.158$)

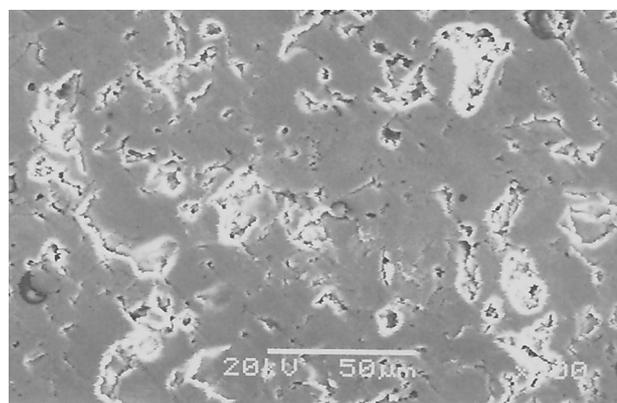
無処理 (Rz=27.4 μm), 研磨 (Rz=5.2 μm), シール (Rz=3.5 μm) の順に大きかった。すなわち、試料表面の酸化チタンの表面積は、無処理>研磨>シールの順に大きいといえる。以上のことから、酸化チタン原料や皮膜形成方法が同一の場合、抗菌効果の大小は、表面積に大きく依存することが明らかになった。すなわち、酸化チタンの表面積が大きいことは、紫外線を受光する面積



(a) 無処理 (as sprayed)



(b) 研磨 (finished)



(c) シール (sealed + finished)

図3 酸化チタン溶射皮膜表面の電子顕微鏡写真 (500倍)

が大きくなり、試料面積あたりの光触媒反応量が増加することで、発生する活性酸素量が多くなり抗菌効果が大きくなったと考えられる。従って、酸化チタン溶射皮膜の表面積が最も大きい無処理の抗菌効果が、表面積が小さい他の2試料と比較し大きくなったといえる。酸化チタンの溶射皮膜に十分な抗菌効果を付与するためには、溶射皮膜の表面積を小さくする表面加工処理は極力避けた方が良いことがわかった。これらの結果から、以後の実験には無処理試料を用いた。

一般に加熱による微生物の死滅は一次反応に従うとされており、D値（decimal reduction time：ある一定の温度において微生物を90%死滅させるのに要する時間）が抗菌効果の指標となっている。光触媒による死滅も加熱抗菌と同様に評価する⁴⁾と図2のプロットから生残菌曲線が得られ、その傾きからD値を求められる⁵⁾。無処理区のD値は37分であった（表1）。

表1 供試細菌類のD値一覧

菌種名	D値(min)
<i>Escherichia coli</i>	JCM1649 37
<i>Escherichia coli</i> (O157)	CR3 44
<i>Enterobacter aerogenes</i>	JCM1235 37
<i>Salmonella</i> Enteritidis	IFO3313 43
<i>Lactobacillus helveticus</i>	B1 15
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805 37
<i>Staphylococcus aureus</i>	IFO12732 37
<i>Bacillus subtilis</i>	JCM1465 114

2 蛍光灯及び太陽光による抗菌効果

酸化チタンを溶射した試料は、6時間の蛍光灯照射では照射、遮光区に抗菌効果の差は認められなかった（図4）。しかし、12時間の照射で遮光区はほとんど菌が死滅しないのに対し、照射区は1/1,000以下の菌数となった。また、酸化チタンを溶射した照射区は、12時間の照射で対照のSUSに比べても約1/1000の生菌数となった。

本実験においてもD値を求めると213分であった。紫外線ランプの照射に比べD値は大きくなったが、蛍光灯でも長時間の照射を行うと抗菌効果が得られることがわかった。

太陽光の紫外線強度は実験開始時に一時的には高かったが、実験中はおおむね0.3~0.4mW/cm²の強度で推移した（図5A）。酸化チタンを溶射した試料は、3時間の照射で遮光区に比べ1/100以下の菌数まで減少した（図5B）。一方、対照のSUSでは、照射・遮光区に菌数の差はなく照射前後で菌数の減少は認められなかった。このことから、酸化チタンの照射区の菌数低下は太陽光に含まれる紫外線（殺菌線）による現象ではなく、太陽光の照射で光触媒反応が進行し、抗菌効果が得られるこ

とがわかった。

3 各種微生物に対する抗菌効果

Escherichia coli O-157CR-3では2時間の照射で初

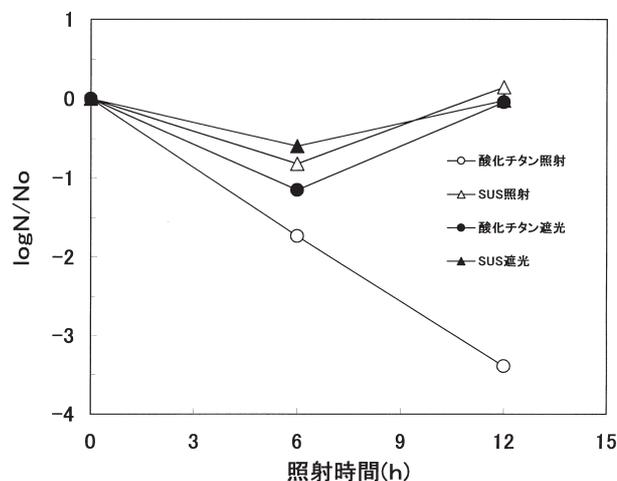


図4 蛍光灯照射下での抗菌効果
N, 照射後の生菌数, No, 照射前の生菌数
試料面紫外線強度は約0.01mW/cm²。

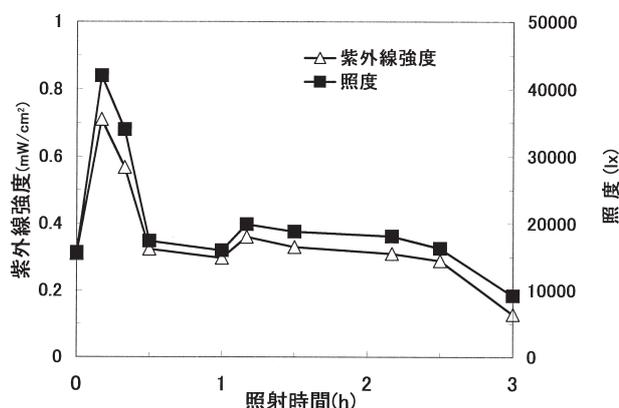


図5 太陽光照射試験中の紫外線強度と照度の推移

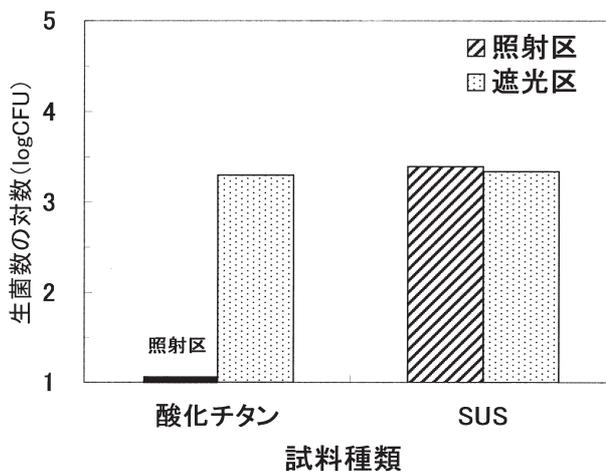


図6 太陽光照射下での抗菌効果

発菌数に比べ約 1/700の菌数まで減少した(図7A)。同様に芽胞非形成菌の酸化チタン照射区における菌数は、遮光区や対照であるSUS照射区と比較して1~2時間の照射で1/100以下となり十分な抗菌効果が認められた。

しかしながら、芽胞形成菌である *Bacillus subtilis* に対する抗菌効果は小さく、3時間の照射でも、約 1/30の菌数の低減しか出来なかった(図7B)。また、他の細菌のように菌数が1時間毎に急激に減少する傾向が認められず、2時間と3時間の生残菌数には差がなかった。

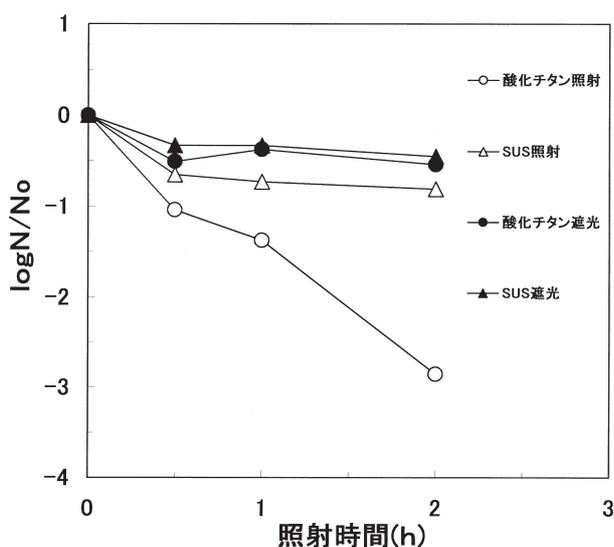


図7A *Escherichia coli* O157に対する抗菌効果

抗菌効果が認められた細菌類に対しD値を求めた(表1)。抗菌効果が大きかった細菌類のD値は、*Lactobacillus helveticus*が最も小さく15分、その他の菌種には大きな差がなく37~44分であった。しかし、抗菌効果が小さかった *Bacillus subtilis* のD値は、最も大きく114分となり、D値は菌種により差が認められる結果となった。

芽胞非形成菌のD値は、小さくまた菌種間にも大きな差がないことから、酸化チタンの溶射皮膜は、今回供試

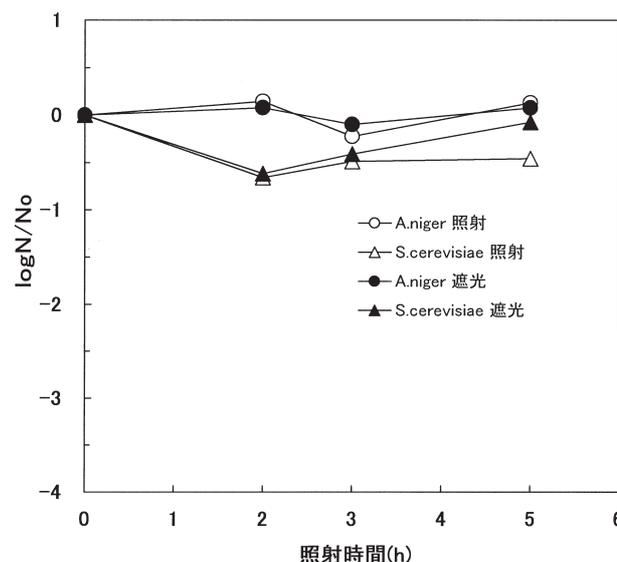


図7C *Aspergillus niger*と *Saccharomyces cerevisiae* に対する抗菌効果

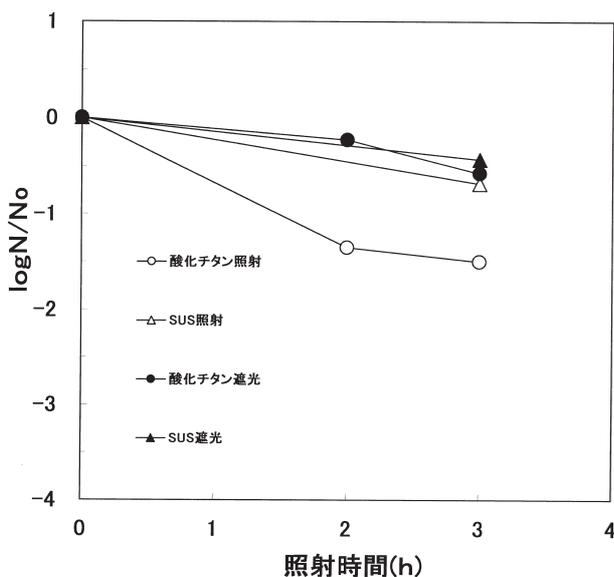


図7B *Bacillus subtilis*に対する抗菌効果

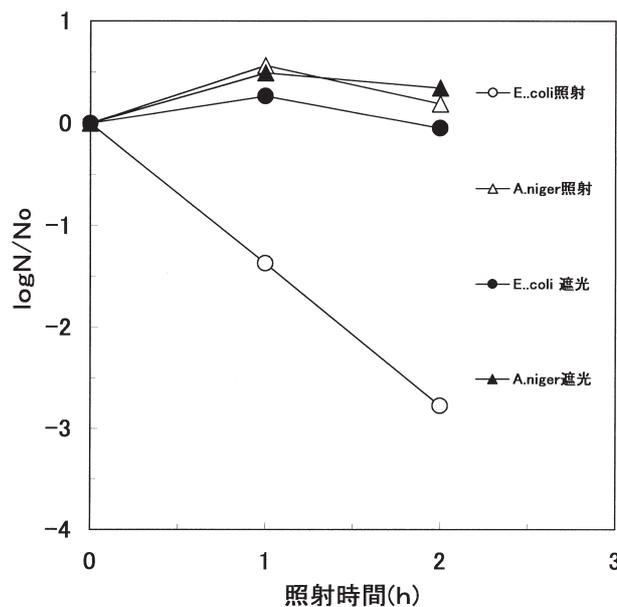


図7D *Escherichia coli*と *Aspergillus niger* の混合液に対する抗菌効果

N, 照射後の生菌数, No, 照射前の生菌数 試料面紫外線強度は約0.7mW/cm²。

しなかった他の芽胞非形成菌に対しても抗菌効果を有する可能性が示唆された。しかし、芽胞形成菌である *Bacillus subtilis* のD値は大きく、また死滅曲線においても2時間の照射以降大きな菌数の減少がなく横這い傾向にあった。*Bacillus subtilis*の供試菌液は、栄養細胞と芽胞が混在していることが想定されることから、酸化チタンの溶射皮膜の本菌に対する抗菌効果は、非芽胞形成状態である栄養細胞のみに対するものであり、加熱や薬剤などの耐性が強い⁸⁾ことが知られている芽胞には、抗菌効果がないことが推察された。

一方、真菌である *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* に対しては、5時間の照射を行ったが酸化チタンの照射区の菌数に照射前と差がなく、抗菌効果は認められなかった(図7C)。また、菌数の経時変化も、遮光区やSUSの照射区と同様であった。

そこで、真菌類は菌体が大きく供試菌液中の菌体同士が重なり合い、紫外線が酸化チタン皮膜表面に到達するのをさえぎる遮蔽効果が発生し、活性酸素の生成を妨げていることで真菌に対する抗菌効果が認められないことが想定されたため、*Aspergillus niger* と *Escherichia coli* の混合菌液を用いた抗菌性試験を行った。その結果、混合菌液による試験においても、*Aspergillus niger* は生残り *Escherichia coli* の菌数は減少した(図7D)。また、同様な結果は *Saccharomyces cerevisiae* との混合菌液においても得られた。このことから、本実験で作製した酸化チタン溶射皮膜が実験中に発生する活性酸素量は、大腸菌などの芽胞非形成菌を殺菌するには十分な量であるが真菌の殺菌に十分な量を発生していないと推察した。酸化チタンと同じ活性酸素を抗菌力の主体としている強酸性次亜塩素酸水(強酸性電解水)は、細菌との接触時間が数秒間でも、極めて大きな殺菌効果⁷⁾を示す。しかし、酸化チタンの溶射皮膜も同じ活性酸素を抗菌主体としているが、その抗菌効果は1時間から数時間を要して初めて発揮され、強酸性電解水に比べ緩やかな抗菌力であるといえる。真菌は、細菌と比較して細胞が大きいため、菌体との接触により消費される活性酸素が多くなること、接触しても細胞の外側を形成する細胞壁が細菌より数倍から10数倍厚い⁹⁾ため、細胞壁の損傷破壊がされにくいことが、抗菌効果が認められない一因であると推察した。

この様に、本研究において作製した酸化チタンの溶射皮膜の抗菌効果は、芽胞形成菌に対しては小さく、真菌に対しては効果がないことがわかった。しかしながら、食中毒菌である大腸菌O-157, サルモネラ, 黄色ブド

ウ球菌などの芽胞非形成菌に対する抗菌効果は、十分大きかった。酸化チタンの溶射皮膜は、食中毒防止や感染症対策を目的として、食品加工機器や太陽光を十分受光できる屋外施設・器具への応用が期待できた。

要 約

酸化チタンを溶射した後に、表面加工処理を行い、酸化チタンの表面積が異なる溶射試料の抗菌効果について検討した。また、食品汚染菌や食中毒菌など各種微生物に対する抗菌効果についても検討した。

- (1) 溶射処理後の表面加工処理を行わない、無処理区の抗菌効果が最も大きく、酸化チタン原料や皮膜形成方法が同一の場合、抗菌効果は、表面積に依存することが明らかになった。
- (2) 蛍光灯でも長時間の照射を行うと酸化チタン皮膜の抗菌効果が得られ、太陽光の照射でも同様に抗菌効果が得られることがわかった。
- (3) 芽胞形成菌である *Bacillus subtilis* に対する抗菌効果は小さく、真菌には抗菌効果は認められなかった。しかし、食中毒菌である大腸菌O-157, サルモネラ, 黄色ブドウ球菌などの芽胞非形成菌に対する抗菌効果は、十分大きかった。酸化チタンの溶射皮膜は、食中毒防止や感染症対策を目的として、食品加工機器や太陽光を十分受光できる屋外施設・器具への応用が期待できた。

文 献

- 1) 赤沼正信・田中大之・片山直樹・柿本雅史・田村吉史・富永一哉：北海道立工業試験場報告, No299, 31 (2000).
- 2) 蓮井淳：新版溶射工学(産報出版, 東京) p. 77 (1996).
- 3) 渡部俊也・砂田香矢乃・橋本和仁：無機マテリアル, 6, 532 (1999).
- 4) 砂田香矢乃・橋本和仁・藤島昭：防菌防黴, 26, 611 (1998).
- 5) 芝崎勲：改訂新版・新・食品殺菌工学, (光琳, 東京) p. 81 (1998).
- 6) 中島照夫：抗菌のすべて, 弓削治編, (繊維社, 大阪) p. 184 (1997).
- 7) 堀田国元：強酸性電解水の基礎知識, ウォーター研究会編(オーム社, 東京) p. 26 (1997).
- 8) 入江良三郎：畜産の研究, 40, 1243 (1986).
- 9) 析倉辰六郎：新版応用微生物学 I (朝倉書店, 東京) p. 91 (1981).