

# ポルフィリン型有機光触媒による可視光殺菌

保田昌秀\*

## Visible-light Assisted Sterilization by Porphyrin-type Organic Photocatalysts

Masahide YASUDA

### Abstract

A silica gel-supported dihydroxo(tetraphenylporphyrinato)antimony(V) (Sbtp/SiO<sub>2</sub>) could induce remarkable photocatalytic activity for bactericidal reaction of *E. coli* cells under fluorescent light irradiation. Also the Sbtp/SiO<sub>2</sub> photocatalyst showed much superior bactericidal activity to the commercially available TiO<sub>2</sub> under irradiation by sunlight. Moreover, visible-light irradiation of the Sbtp/SiO<sub>2</sub> catalyst was effective for sterilization of *Legionella* species in the living environment. Under the operation of a cylindrical photocatalytic bactericidal apparatus in a cooling tower for 10 days, the concentrations of *Legionella* species were reduced to less than the detection limit. Also, a photocatalytic sterilization was conducted with a fountain. The concentrations of *Legionella* species were reduced to less than the detection limit 12 days after the Sbtp/SiO<sub>2</sub> catalyst was installed in the fountain receiving sunlight irradiation. The concentrations of *Legionella* species were kept at less than an environmental quality standard for three months. Dimethoxo(tetraphenylporphyrinato)phosphorus immobilized on silica gel (Ptp/SiO<sub>2</sub>) was examined for the sterilization of *E. coli*. It was found that the bactericidal reaction obeyed zero-order kinetics by analysis according to Michaelis-Menten's equation. Adsorption of bacteria on the catalyst is thought to be a key pathway. The Ptp/SiO<sub>2</sub> which was treated with tetraethoxysilane was applied to the sterilization of *Legionella* species occurring in fountain.

Thus the sterilization was able to be performed under the visible light irradiation. Silica gel is most suitable for visible light-driven catalyst support because silica gel is transmitted visible light effectively and immobilize porphyrin chromophores. Sbtp and Ptp had high affinity with microorganisms owing to their cationic complexes. The bactericidal effect was mainly attributed to singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) which was generated by energy transfer from the excited triplet state of the porphyrins to O<sub>2</sub>.

Key words:

Bactericidal effect, Antimonyporphyrin, Phosphorusporphyrin, Silica gel, Singlet oxygen

### 1. はじめに

近年、レジオネラ属菌、O-157, MRSA, ノロウィル

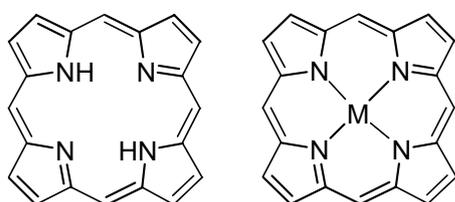
\*物質環境化学科 教授

ス等の有害微生物による感染で多くの被害が報告され、尊い命が奪われてしまう例も少なくない。現在の殺菌方法の主流は、界面活性剤、酸、塩素、オゾン、アルコール等を主体とする化学殺菌であり、薬剤を使用す

る事により環境，人体に対する二次汚染を考慮に入れる必要がある。そこで，次世代殺菌技術として，薬剤を用いない，省エネルギー，メンテナンスフリーの殺菌技術の開発が，社会から要望されている。

現在，有害微生物の殺菌方法として，酸化チタン光触媒による殺菌が多く検討されている。酸化チタン光触媒は，駆動エネルギー源が光である事から，環境に優しく，経済性に優れている。現在までに *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* (大腸菌), *Chlorella vulgaris* について紫外光を駆動源にした酸化チタン光触媒の効果が報告されている<sup>1-8)</sup>。しかし，酸化チタンの励起波長領域が紫外光領域のため，光源に紫外光を必要とし，この紫外線が人体に悪影響を及ぼす可能性があるのが最大の欠点である。そのために，酸化チタンを中心とする化合物半導体光触媒系でも，可視光領域で駆動する光触媒の開発が望まれている<sup>9-10)</sup>。

一方，ポルフィリン化合物は，4つのピロール環が環状に縮合した芳香族化合物であり，環の中心の4つの窒素原子によってほとんどの金属イオンと配位結合して金属錯体を形成することができる (Scheme 1)。自然界に存在する葉緑素中のクロロフィルもマグネシウムポルフィリン錯体であり，赤血球のヘモグロビンのヘム鉄は鉄ポルフィリン錯体である。一般に，金属ポルフィリン錯体は420 nm付近にSoret帯と呼ばれる強い吸収帯と500 nm～600 nm付近にQ帯と呼ばれる比較的弱い吸収帯をそれぞれ持つ<sup>11-14)</sup>。金属ポルフィリン錯体は「可視光触媒」の有力候補であるが，いままでに金属ポルフィリン錯体自身が光触媒活性を示す例は少なく，電子メディエーターとしての役割を担う研究例がほとんどである<sup>8)</sup>。



Scheme 1. Porphyrin and metalloporphyrin

我々は，中心金属がアンチモンおよびリンのポルフィリン錯体 (Mtp, M= Sb, P) に着目した (Figure 1)。これらの錯体は+5価の高原子価状態を取り，錯体自体がカチオン性である。このことは，電子受容性が増大

すると同時に，酸化力が増大することを意味する。このため，他の金属ポルフィリン錯体よりも酸化反応に適している。

また，シリカゲル (SiO<sub>2</sub>) は，安全性が高く，光透過に優れ，表面積が高く，豊富なシラノール基により固定化力が強く，多孔質のために優れた担体である<sup>15)</sup>。そこで，ポルフィリン錯体をシリカゲル担体に固定化させる事により，効率的に光触媒作用を発現させ，取り扱いも容易になることが期待される。当研究グループでは今までに，シリカゲル担持金属ポルフィリン (有機光触媒) を調製して，クロロフェノール類の脱塩素化反応およびシクロアルケンのエポキシ化反応などについて検討している<sup>16-18)</sup>。

ここでは，当研究グループが2000年から研究を進めているシリカゲル担持 Mtp 触媒による可視光殺菌について報告する。

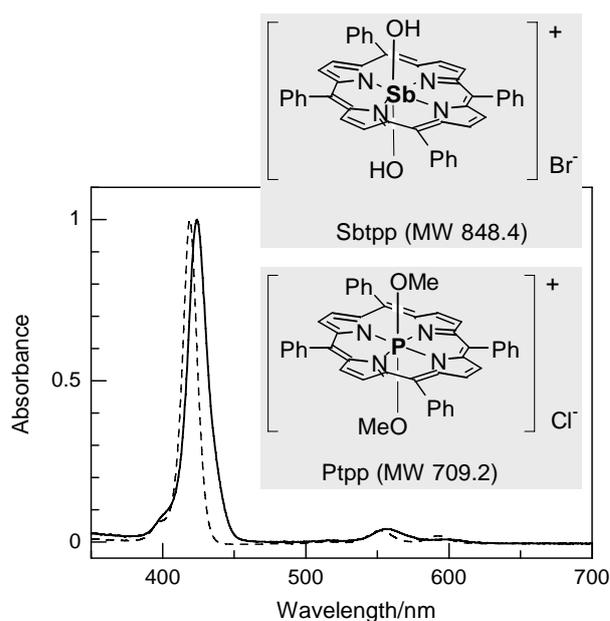


Figure 1. Absorption spectra of dihydroxo(tetraphenylporphyrinato)antimony bromide (Sbtp; dotted line) and dimethoxo(tetraphenylporphyrinato)phosphorus chloride complexes (Ptp; solid line) at Soret and Q bands.

## 2. 実験

### 2.1 シリカゲル担持金属ポルフィリン光触媒 (Mtp/SiO<sub>2</sub>) の調製

ジヒドロキシ(テトラフェニルポルフィリナト)アンチモン(V)臭化物(以下 Sbtp と略)<sup>19-20)</sup>，ジメトキシ(テ

トラフェニルポルフィリナト)リン(V)塩化物錯体 (以下 Ptp<sub>p</sub> と略)<sup>21-22)</sup>, およびジヒドロキソ(テトラフェニルポルフィリナト)リン(V)塩化物錯体 (以下 Ptp<sub>p'</sub> と略)<sup>21-22)</sup>は既報にしたがって合成した。

SiO<sub>2</sub>への固定化は, Sbtpp 170 mgをトルエン 400 cm<sup>3</sup>に溶解させ, そこへパウダー状シリカゲル (p-SiO<sub>2</sub>, 30 g, 0.04 mmφ, 429 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, BW300, 富士シリシア化学製)を加え一昼夜加熱し, 濾別後, アセトンおよび水洗浄および乾燥することでSbtpp/p-SiO<sub>2</sub>触媒を調製した<sup>23)</sup>. Sbtpp/b-SiO<sub>2</sub>触媒の調製は, Sbtpp 60 mgをトルエン-MeOH混合溶媒 (4:1 v/v, 500 cm<sup>3</sup>)に溶解させ, ビーズ状シリカゲル (b-SiO<sub>2</sub>, 70 g, 1.7-4.0 mmφ, 306 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, CARIACT Q-10 富士シリシア化学製)を加え 18 h 放置し, MeOHを減圧留去後, 濾別してアセトンおよび水洗浄後, 70°Cで乾燥することで調製した。

Ptp<sub>p</sub>/b-SiO<sub>2</sub>の調製は, Ptp<sub>p</sub> 132 mg の入ったトルエン溶液 400 cm<sup>3</sup>に p-SiO<sub>2</sub> 30 gを加え 18 h 還流することで行った<sup>24)</sup>. 反応後, 濾別乾燥して Ptp<sub>p</sub>/p-SiO<sub>2</sub>を得た. 同様に, Ptp<sub>p</sub> 13.2 mg のトルエン-MeOH 溶液 (4:1 v/v, 200 cm<sup>3</sup>)に b-SiO<sub>2</sub> 30 gを加えて還流を行った. 反応後, 濾別し, アセトン 100 cm<sup>3</sup>および水 100 cm<sup>3</sup>で洗浄をして, Ptp<sub>p</sub>/b-SiO<sub>2</sub>を得た。

また, Ptp<sub>p</sub>/b-SiO<sub>2</sub>触媒の安定性向上のために, (EtO)<sub>4</sub>Si (TEOS)によるポアフィリング (pore filling)処理を行った. Ptp<sub>p</sub> 8.5 mgをMeOH 1 cm<sup>3</sup>に溶解し, さらにTEOS 10 cm<sup>3</sup>を加えた. 得られた溶液にb-SiO<sub>2</sub> 10 gを攪拌しながら少しずつ加え担持を行った. 70°Cで減圧乾燥してTEOS処理触媒 (Ptp<sub>p</sub>/m-SiO<sub>2</sub>)を得た. 調製した光触媒の担持量等はTable 1に示す。

Table 1. Characterization of photocatalysts

catalyst <sup>a</sup>	Average particle size (mm)	Contents of Mtp <sub>p</sub> (wt%)
Sbtpp/p-SiO <sub>2</sub>	0.04	0.87
Sbtpp/b-SiO <sub>2</sub>	3.0	0.05
Ptp <sub>p</sub> /p-SiO <sub>2</sub>	0.04	0.42
Ptp <sub>p</sub> /b-SiO <sub>2</sub>	3.0	0.042
Ptp <sub>p</sub> /m-SiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	3.0	0.085

<sup>a</sup> Silica gel powder (p-SiO<sub>2</sub>): 0.04 mmφ, 429 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, BW300, Fuji Silysia. Silica gel beads (b-SiO<sub>2</sub>): 1.7-4.0 mmφ, 306 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, CARIACT Q-10, Fuji Silysia. <sup>b</sup> Modified silica gel (m-SiO<sub>2</sub>) was prepared by the pore-filling treatment of b-SiO<sub>2</sub> by (EtO)<sub>4</sub>Si.

## 2.2 共焦点走査レーザー顕微鏡による触媒の解析

共焦点走査レーザー顕微鏡 (CLSM)は, 一般的にレーザー光をガルバノミラーおよび対物レンズによって試料上を走査し, 試料の表面および内部の焦点面から発した蛍光を対物レンズおよび共焦点に位置するピンホールを経て検出し, 空間分布をコンピュータ処理によって画像に変換する顕微鏡である. 特に, 深さ方向の分解能がきわめて高く, 高画質な画像解析を行うことができる. 本研究に用いたCLSMは, 本体 (Olympus FV-300)に分光器 (STFL 250, Seki Technotron)をガラスファイバーでつなぐことで画像解析だけでなく, 表面および断面での蛍光スペクトルの測定できる. Mtp<sub>p</sub>に由来の600および650 nm付近の蛍光をCLSMによって測定することでMtp<sub>p</sub>の固定化を確認した。

また, CLSMの透過照明装置のハロゲンランプを光源として用いて吸収スペクトルを測定した. 試料を透過した透過光は, 対物レンズで集光され, ピンホールおよびファイバーを通り, 分光器および検出器 (PMT)で検出されて吸収スペクトルが測定することができる (Figure 2). また, 吸光スペクトルの測定領域は, 対物レンズの倍率 (X) およびピンホールの直径 (h) またはファイバーコアの直径 (f) によって決められる円

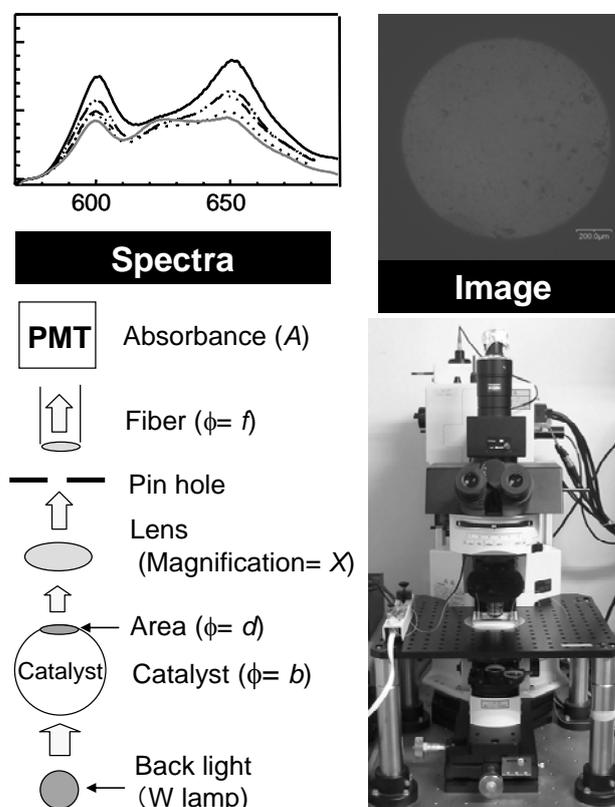


Figure 2. Microscopic absorption spectrophotometry using confocal laser scanning microscope (CLSM).

$$d = 3f / (3.5 X) \quad (\text{eq. 1})$$

$$A = b \varepsilon C \quad (\text{eq. 2})$$

形内となる。円形の直径 ( $d$ ) は、 $f$ の三倍の値または $h$ の値の小さい方で規制され、 $h \geq 3f$ の時は(1)式で表される<sup>25)</sup>。 $d$ の値が触媒の触媒の粒径 ( $b$  cm) に比べて十分に狭くなる $X$ の対物レンズを用いて微小領域の吸光度分析を行った。

触媒の吸光度 ( $A$ ) は、溶液の吸光度分析の場合と同様にLambert-Beer則によって、光路長、 $\varepsilon$ 、および $Mtpp$ のモル濃度 ( $C/\text{mol dm}^{-3}$ ) の積で表すことができる。 $A$ を触媒の中心線で測定した場合、光路長は $b$ と同じになることから、 $A$ は(2)式で表される。そこで、CLSMのステージに置いたスライドガラス上に数十個の触媒を置き、その上にカバーガラスを乗せて固定した。同時に、スライドガラス上に $Mtpp$ を固定化していない同じ粒径の $\text{SiO}_2$ 数個を置き、吸光度分析のブランクとして用いた。無作為に5個の触媒を選んで、ステージを移動させて顕微鏡の視野の中心に触媒の中心線が来るようにした。吸収スペクトルを500~650 nmの範囲で測定し、極大吸収波長の547 nmにおける $A$ を求め、さらに画像解析から $b$ を求め、(2)式から $Mtpp$ の担持量を決定した。この様にして触媒の吸光度分析から求めた担持量は、吸着されずに溶液に残った $Mtpp$ 量の分析から算出した担持量の値とよい一致を示した<sup>25)</sup>。また、本分析法は使用後の触媒分析にも利用された。

## 2.3 菌体量の測定方法

*E. coli* の生菌数の測定のために、バクトトリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、および塩化ナトリウム 1%からなる基本培地 (pH 6.5) に寒天 2%を添加した培地をシャーレに入れ、寒天プレートを作成した<sup>26)</sup>。*E. coli* の菌体量の測定は、検体 100  $\mu\text{l}$  を三枚の寒天プレートそれぞれ塗布し、30°Cで24時間培養して出現したコロニーを計数することで行った。

生活環境場に存在する *Legionella* 属菌の生菌数は、100 CFU/100  $\text{cm}^3$  (CFU= colony formation unit) 程度と低濃度であることから、菌体測定は **Figure 3** のように行った<sup>27)</sup>。検水 (500 または 1000  $\text{cm}^3$ ) を採取し、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の滅菌済メンブランフィルター (HA, ミリポア) で吸引ろ過した。このフィルターを滅菌済 0.9%生理食塩水 5  $\text{cm}^3$  の入った遠沈管 (100  $\text{cm}^3$ ) に入れ、フィルターが碎けるまで激しく攪拌した。遠沈管に

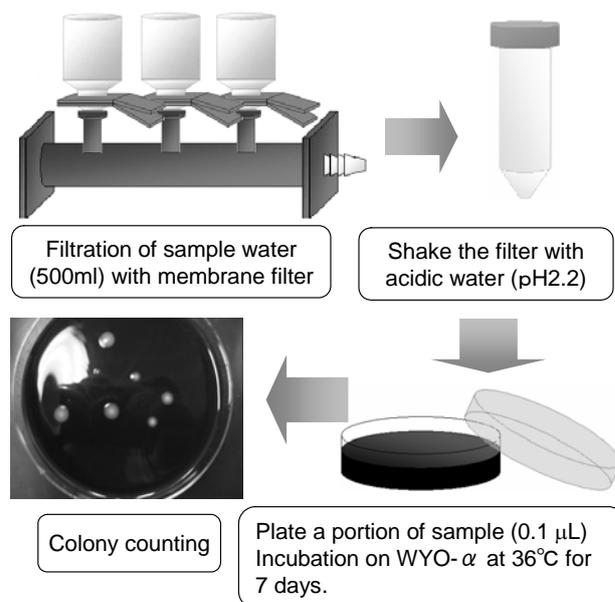


Figure 3. Determination of the amounts of *Legionella* species occurring in the living environmental fields.

HCl-KCl 緩衝溶液 (0.2 M, pH 2.2, 5  $\text{cm}^3$ ) を添加し、時々攪拌しながら室温で正確に 20 分間放置した。そこから、ピペッターを使って 0.1  $\text{cm}^3$  ずつ採取し、三枚の選択寒天培地 (WYO- $\alpha$ , 栄研化学) の全面に塗抹し、36 °C で 7 日間培養した。7 日目に現れた青みを帯びた灰白色のコロニー数を計数し、三つの平均値から検水 100  $\text{cm}^3$  当たりの生菌数を求めた。

*Legionella* 属菌の同定は、BCYE- $\alpha$ 寒天培地と羊血液寒天培地を用いた培養試験および *Legionella* 免疫血清によるスライド凝集試験によって行った。さらに、宮崎県衛生環境研究所において、LEG 遺伝子と *Lmip* 遺伝子を PCR 法を用いて調べ、既知の *L. pneumophila* との比較から、後述のクーリングタワーおよび噴水から採取した *Legionella* 属菌は I 型と判定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>光触媒による *E. coli* の可視光殺菌

可視光殺菌実験は、初濃度  $6.4 \times 10^3$  cells  $\text{cm}^{-3}$  の *E. coli* (K-12, IFO3335) および Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> 10 mg を含むリン酸緩衝溶液 10  $\text{cm}^3$  を L 字型反応管 (**Figure 4A**) に入れ、振とう機で振とうしながら上部から蛍光灯 (FL-15ECW,  $\lambda = 400\text{-}723$  nm, 最大強度波長: 545 nm) 2 本で光照射を行った (**Figure 4B**)<sup>23)</sup>。10 分間隔でサンプル 100  $\mu\text{l}$  を採取して、寒天プレートに塗布し、30°Cで24

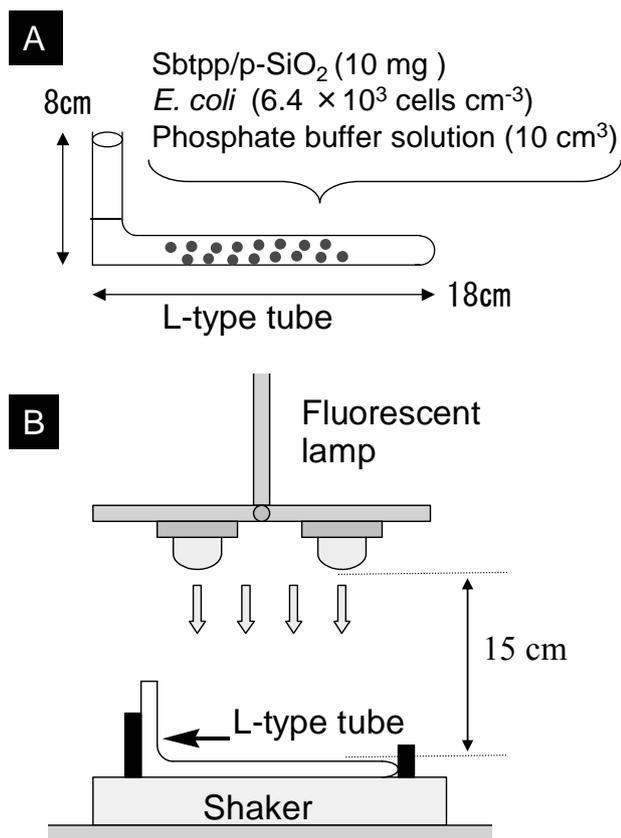


Figure 4. A phosphate buffer solution (10 cm<sup>3</sup>) containing Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> (10 mg) and *E. coli* (6.4×10<sup>3</sup> cells cm<sup>-3</sup>) was introduced in L-type tube (A) which was set on a shaker and irradiated by fluorescent lamp (B).

Table 2. Bactericidal effect of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> under irradiation of sunlight<sup>a)</sup>

Time (min)	Survival ratio (%) <sup>b)</sup>		
	Sbtp/p-SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> <sup>c)</sup>	Blank <sup>d)</sup>
0	100	100	100
10	0	103	99
30	0	83	90
60	0	63	79

a) An L-type tube containing 6.4×10<sup>3</sup> cells cm<sup>-3</sup> of *E. coli* and 5 mg of catalyst in phosphate buffer was set on a shaker and exposed to sunlight. Light intensity of sunlight varied from 200 to 1100 W·m<sup>-2</sup> during 60 min and average intensity was about 530 W·m<sup>-2</sup>. Average temperature of reaction mixtures was about 30 °C.

b) Survival ratio = 100B/B<sub>0</sub> where B and B<sub>0</sub> denote the amounts of bacteria at given time and initial amounts of bacteria.

c) HQA51, Shinto V-cerax Ltd., Japan

d) In the absence of photocatalyst.

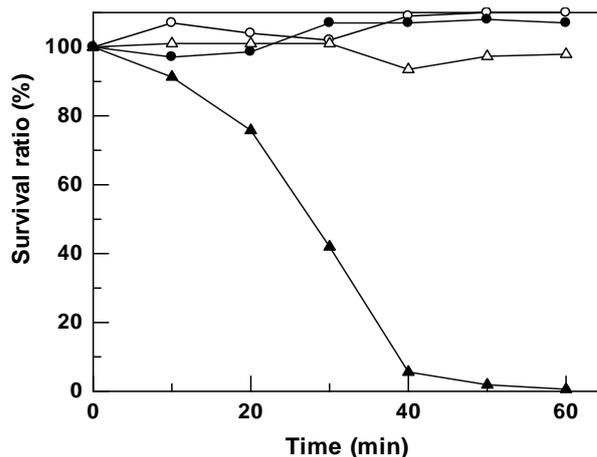


Figure 5. Bactericidal effect of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> on *E. coli*.  
 ○: Dark reaction in the absence of the photocatalyst  
 ●: Under irradiation in the absence of the photocatalyst  
 △: Dark reaction in the presence of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>  
 ▲: Under irradiation in the presence of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>

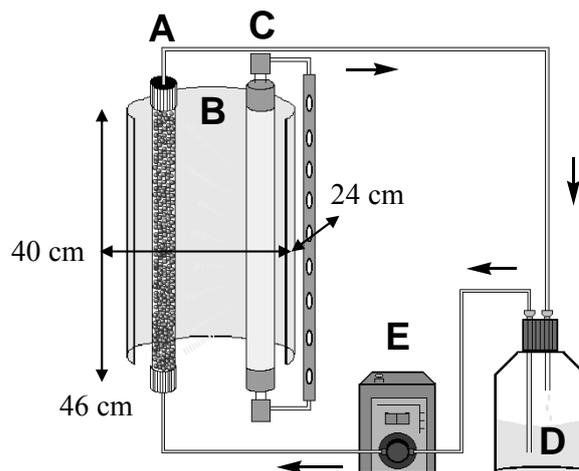


Figure 6. An oval-type of photo-bactericidal apparatus consisted of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> photocatalyst (A), oval mirror (B), and a fluorescent lamp (C). Cell suspension was fed from sample holder (D) to A by pump (E) and the reacted cell suspension was returned to the holder.

時間培養して出現したコロニーを計数した。

可視光照射実験の結果 (Figure 5), 光照射下で触媒が存在する時に菌体数が減少し, 40 分後に *E. coli* はほぼ消滅した。非照射下および触媒が存在しない場合には菌体量がほとんど減少しなかったことから Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> の *E. coli* に対する可視光殺菌効果が確認された。また, 光量・触媒量・初期菌体量を変化させた実験を行い, 殺菌効果は光量および触媒量に依存していることを明らかにした。

さらに、比較のために3種類のTiO<sub>2</sub>光触媒（アナターゼ型、ルチル型；和光純薬製）およびSiO<sub>2</sub>粉末に担持されたTiO<sub>2</sub>（新東Vセラミック製HQA51）を用いて、同様の殺菌実験を行ったところ、いずれのTiO<sub>2</sub>においても120分の蛍光灯照射では90%程度は生存しており、Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>はTiO<sub>2</sub>に比べて可視光殺菌能力が高いことが示された<sup>26)</sup>。

次に、太陽光照射下において殺菌実験を行った。Table 2に示すように、この実験においてもSbtp/p-SiO<sub>2</sub>はTiO<sub>2</sub>よりも高い光殺菌作用を示した。また、実用化を目指して楕円形殺菌装置（Figure 6）を用いた連続殺菌反応を行った。楕円形殺菌装置は、楕円の二つの焦点の位置に蛍光灯と反応管を配置することで、蛍光灯から発した光は楕円ミラーで反射して反応管に集約する構造になっている<sup>28)</sup>。菌体懸濁液をホルダーから反応管に送液して行った連続殺菌実験においてもSbtp/b-SiO<sub>2</sub>の高い殺菌効果が確認された<sup>26)</sup>。そこで、生活環境場での殺菌実証実験へ展開することとした。

### 3.2 生活環境場に存在する *Legionella* 属菌に対する Sbtp/b-SiO<sub>2</sub>による可視光殺菌

レジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*) は、比較的水温の高い場所で、藻あるいはバイオフィームのある場所に生息し、肺炎症を発症させる病原性細菌である。1976年にアメリカのフィラデルフィア市のホテルにて開催された在郷軍人会 (American Legion) への参加者が原因不明の重症肺炎を発症し、米国疾病管理センターが新たな細菌による感染症 (在郷軍人病) であるとしたことから、その発見に至っている<sup>29)</sup>。

*L. pneumophila* は浴槽や空調用クーリングタワー冷却水、噴水等の修景用水、滞留型加湿器等の滞留水中で繁殖する。我々の噴水中の *L. pneumophila* 菌体数の調査結果 (Figure 7) に示すように気温の上昇とともに菌体数が増加し、気温15°Cで急激に繁殖する特徴がある。そこで、生活環境場において水温が比較的高く、閉鎖水系の空調用クーリングタワーおよび循環式噴水を実験場として選定し、Sbtp/b-SiO<sub>2</sub>による *Legionella* 属菌に対する光殺菌実証実験について検討した。

実証実験に先駆けて、L字型試験管を用いたSbtp/p-SiO<sub>2</sub>触媒による *Legionella* 属菌の可視光殺菌実験<sup>27)</sup>を行った。菌体には、後述の噴水での実証実験で採取・増殖させて *Legionella* 属菌I型と判定されたものを用いた。*Legionella* 属菌 10<sup>4</sup> cells cm<sup>-3</sup> および

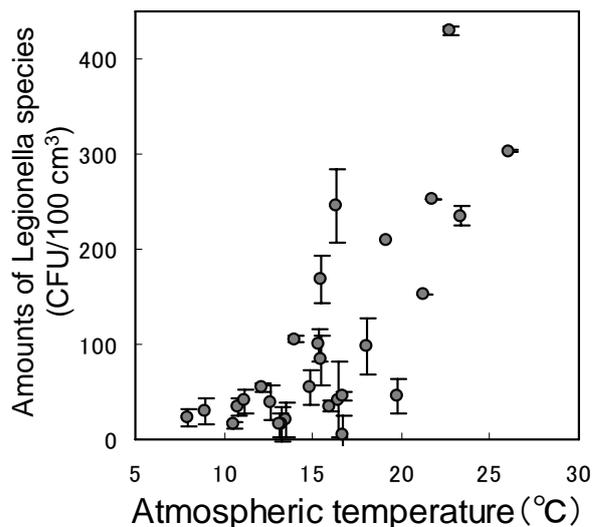


Figure 7. Dependence of amounts of *Legionella* species naturally occurring in the fountain on the highest atmospheric temperature.

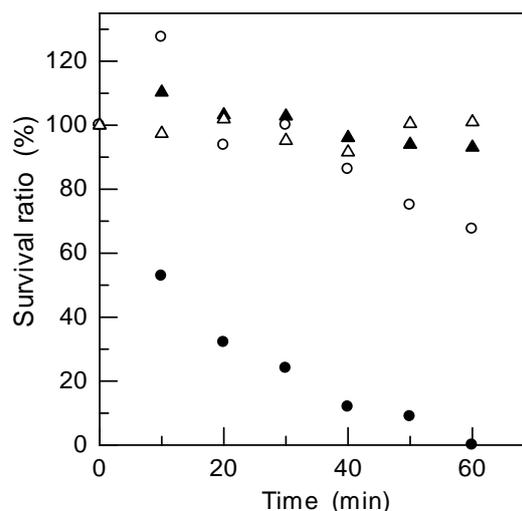


Figure 8. Bactericidal effect of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> on *L. pneumophila*.

●: Under irradiation by fluorescent lamp in the presence of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>.  
○: Under the irradiation in the absence of the catalyst.  
▲: Under dark reaction in the presence of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub>.  
△: Under dark reaction in the absence of the catalyst.

Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> 10 mg を含むリン酸緩衝液 (10 cm<sup>3</sup>) をL字型反応管に入れ、3.1と同様の方法で蛍光灯照射による可視光殺菌実験を行った。10分間隔でサンプル0.1cm<sup>3</sup>を採取し、三枚のWYO-α寒天培地で培養し、7日目に現れたコロニー数を計数し、三つの値の平均値

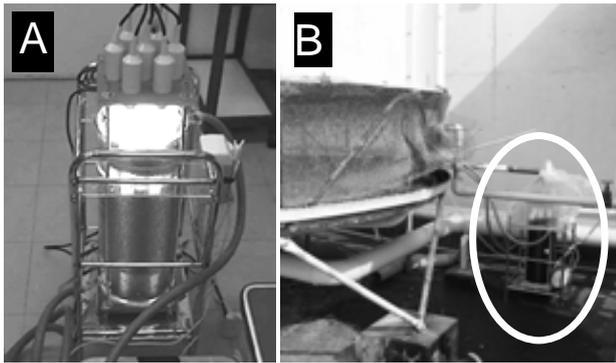


Figure 9. A cylindrical type photo-bactericidal apparatus (A) was set in the cooling-tower (B).

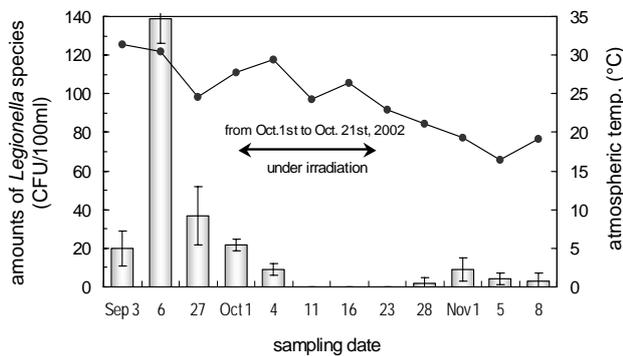


Figure 10. Time-course plots of the amounts of *Legionella* species in the cooling-tower along with the atmospheric temperature (●). The cylindrical photo-bactericidal apparatus was operated during October 1 to October 21, 2002 under the following reaction conditions: Sbtp/b-SiO<sub>2</sub> catalyst; 4 kg, contents of water; ca. 800 dm<sup>3</sup>, flow rate; 28 dm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>, and the average retention time; 26 sec.

から菌体数を求めた。その結果、コントロール殺菌実験 (Figure 8) に示すように、光照射下で触媒が存在する時のみに菌体の減少が観測された。非照射下および触媒が存在しない場合には菌体量がほとんど減少しなかったことから、Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> の *Legionella* 属菌に対する可視光殺菌効果が確認された。これは、世界で初めて見出された *Legionella* 属菌に対する光触媒殺菌効果である。

次に、クーリングタワーでの実証実験のために、蛍光灯 (18W, 7本) と可視光触媒 (Sbtp/b-SiO<sub>2</sub>, 4 kg, 12 dm<sup>3</sup>) を組み込んだ光殺菌装置 (Figure 9A) を製作した。クーリングタワーの冷却水溜 (水量 800 kg) から流速 28 dm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup> で水を光殺菌装置に循環させて、光照射を行い、定期的に 100 cm<sup>3</sup> 中の検水中の菌体量 (単位: CFU/100 cm<sup>3</sup>) を測定した (Figure 9B)。その結果、投入後すぐに *Legionella* 属菌の減少が確認され、11日

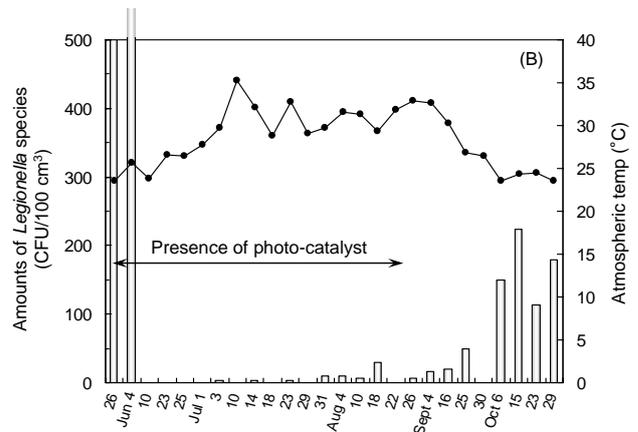
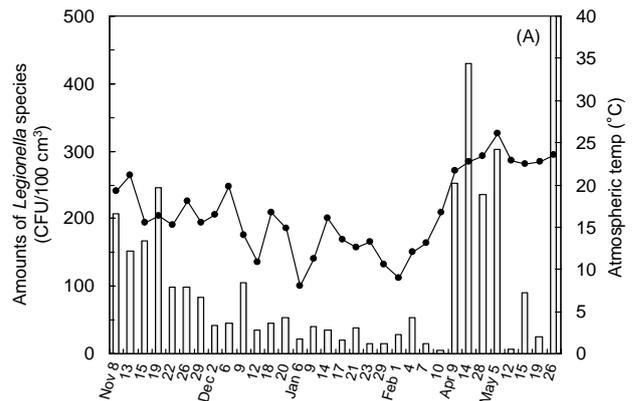


Figure 11. (A) Survey of *Legionella* species found in the fountain from November 26, 2002 to May 26, 2003. (B) The bactericidal experiment of *Legionella* species was performed using a leaf-type photo-bactericidal apparatus containing Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> (80 g) under sunlight irradiation from May 26 to August 22, 2003. The highest atmospheric temperature was denoted by ●.

目から実験終了まで *Legionella* 属菌の繁殖は確認されなかった (Figure 10)。検出された *Legionella* 属菌を同定した結果、*Legionella pneumophila* I型であることが分かった。

次に噴水での実証実験を行うために、宮崎市内の噴水 (水量 13 トン) の *Legionella* 属菌の菌体数調査を 2002 年 11 月から 2003 年 5 月にかけて行った。その結果、Figure 11A に示すように気温変化および定期的な清掃によって菌体量は増減するが、季節を通じて菌体の存在を確認した。そこで、ハスの葉型光殺菌装置 (Figure 12) の中に Sbtp/b-SiO<sub>2</sub> (80g) を充填し、同噴水に浮かべて太陽光による殺菌実証実験を 2003 年 5 月に開始した。その結果、投入後 12 日目に菌体数の減少が確認され、それ以降 3 ヶ月間以上、80 g (Sbtp 含有量: 40 mg)

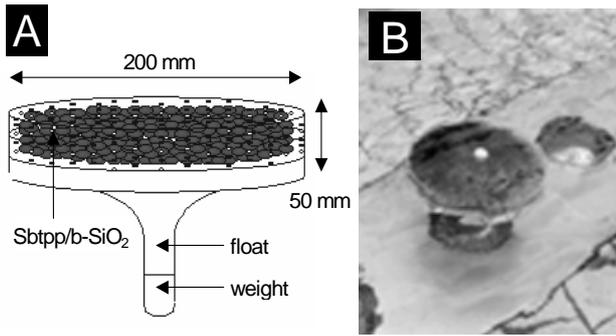


Figure 12. A leaf-type photo-bactericidal apparatus (A) was installed in the fountain (B).

Table 3. Elemental analysis of Sbtp/p-SiO<sub>2</sub><sup>a)</sup>

Elements	Before use (ppm)	After use in fountain for 3 months (ppm)
Al	29	89
Na	67	208
Ca	12	316
Fe	0.2	0.5
Mg	6	79
Sb	80	13

a) Measured by atomic absorption.

の光触媒によって水量 13 トンの噴水中の *Legionella* 属菌量を環境基準値の 100 CFU/100 cm<sup>3</sup> 以下に抑制することに成功した (Figure 11B)。これによって、Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> を使った生活環境場での殺菌技術の有用性が実証された。

Table 3 に使用前および使用後の触媒の元素分析結果を示す。市水由来の Na, Ca, Mg などの金属が増加し、替わって触媒由来の Sb が実験前の 80 ppm から実験終了後には 13 ppm まで減少した。Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> は蒸留水中では全く脱色を示さないことから、市水中では噴水中に含まれるアルカリ金属およびアルカリ土類金属とカチオン性の Sbtp がイオン交換を起こして脱離していることが分かった。

### 3.3 Ptp/p-SiO<sub>2</sub> 光触媒による *E. coli* の可視光殺菌

Sbtp/p-SiO<sub>2</sub> 触媒は生活環境場で効果的な光殺菌性を示したが、Sbtp が溶出する問題あることが分かった。溶出した Sbtp は自然界で発ガン性の三酸化アンチモン<sup>30)</sup> に変換する可能性があることから、実用化に向けて、中心金属をアンチモンからより安全性の高い同

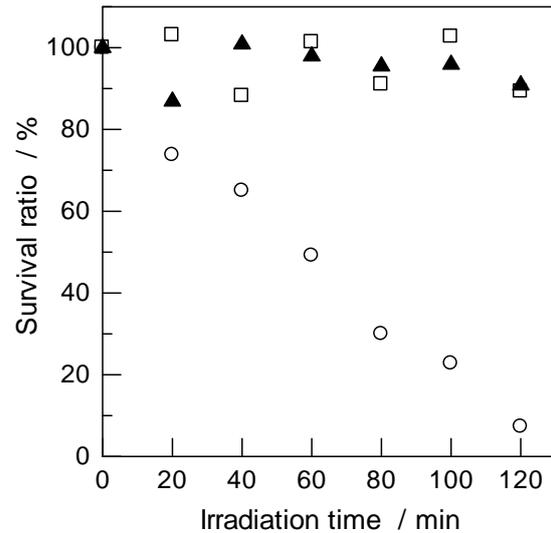
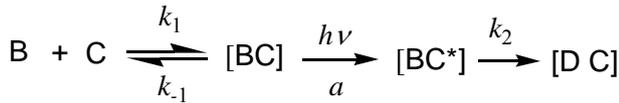


Figure 13. Bactericidal experiment for *E. coli* in the presence of Ptp'/p-SiO<sub>2</sub> under irradiation by a fluorescent lamp (○), in the absence of a catalyst under irradiation (□), and in the presence of Ptp'/p-SiO<sub>2</sub> under dark conditions (▲). Reaction conditions were shown as follows: Initial concentration of *E. coli* = ca. 1.0 × 10<sup>4</sup> cells·cm<sup>-3</sup>, [Ptp'/p-SiO<sub>2</sub>] = 1.0 g·dm<sup>-3</sup>, light intensity = 21 W·cm<sup>-2</sup>.

族のリンに変えた軸水酸基型リンポルフィリン (Ptp') および軸メトキシ型リンポルフィリン (Ptp) を用いて *E. coli* に対する光殺菌効果について検討を行った<sup>24)</sup>。

最初に、Ptp'担持触媒 (Ptp'/p-SiO<sub>2</sub>) を調製して、可視光殺菌実験を行った。Ptp'/p-SiO<sub>2</sub> (10 mg) および *E. coli* に (1.0 × 10<sup>4</sup> cells·cm<sup>-3</sup>) を含むリン酸緩衝液 (10 cm<sup>3</sup>, pH=7.0) をL字型試験管に入れ、3.1 に示した方法と同様の方法で蛍光灯照射下で殺菌実験を行った。Figure 13 に示すコントロール殺菌実験の結果、触媒存在下での光照射条件のみで殺菌効果が認められた。

次に、可視光触媒による殺菌機構を解明するため、光強度 (*a*), 触媒量 ([C]) を変化させて、照射時間 (*t*) 毎の菌体量 ([B]) を測定した結果、[B]は *t* に対して直線的に減少し、その直線の傾きが *a* および [C] に比例していることが分かった<sup>24)</sup>。そこで、基底状態で光触媒 (C) と *E. coli* (B) が複合体を形成する Michaelis-Menten 型の反応機構 (Scheme 2) を仮定して速度論的解析を行った。Scheme 2 に従えば、反応速度 (*v*) は(3)式で表される。ここで、*k*<sub>-1</sub> が *k*<sub>-1</sub> および *k*<sub>2</sub> に比べて十分に大きいと仮定すると、*K*<sub>m</sub> (= (*k*<sub>-1</sub> + *k*<sub>2</sub>)/*k*<sub>1</sub>) = 0 と仮定することができ、(4)式および(5)式が得られる。(5)式では、菌体減少量 ([B]<sub>0</sub> - [B]) が *t*, *a*, [C] に比例し、[B] に対して 0 次であり、実験結果と良い一致を示している。これは、Scheme 2 の平衡が複合体形成側に大きく



Scheme 2. Possible mechanism. B: living cells, C: catalyst, D: deactivated cells.

$$v = k_2[B][aC]/(K_m + [B]) \quad (\text{eq. 3})$$

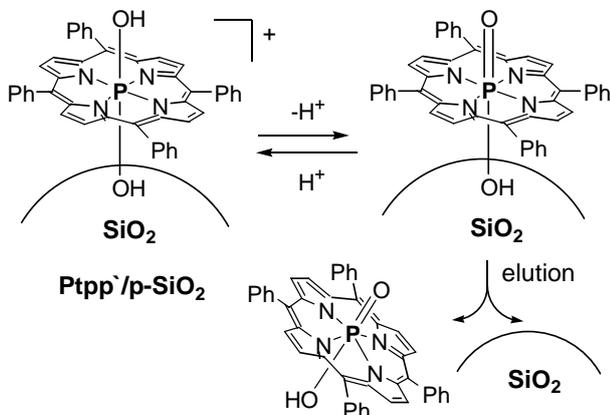
$$v = -d[B]/dt = a k_2[C] \quad (\text{eq. 4})$$

$$[B_0] - [B] = a k_2[C] t \quad (\text{eq. 5})$$

傾いており、菌体が触媒に強く吸着していることを示している。

当初はアンチモンの場合と同様に、軸水酸基型リンポルフィリン (Ptp<sup>+</sup>) を用いて触媒を調製したが、水中での安定性に問題があった。これは Ptp<sup>+</sup> の軸水酸基のプロトンが解離性であるために、錯体が中性化して吸着力が弱まるためである (Scheme 3)。そこで、軸配位子を非解離性の軸メトキシ型 Ptp<sup>+</sup>/p-SiO<sub>2</sub> の可視光殺菌効果を検討した。L 字形試験管を用いて、照射下、暗下および酸素存在下、非存在下の条件で、*E. coli* に対する Ptp<sup>+</sup>/p-SiO<sub>2</sub> の光殺菌効果の検討を行った結果、照射・酸素雰囲気下において可視光殺菌効果が発現した (Figure 14)。このことにより、殺菌には酸素が必要ながことが明らかになった。

これらの結果から、光殺菌のメカニズムは Ptp<sup>+</sup> 三重項状態から三重項酸素へのエネルギー移動により、一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) が発生し、これが菌細胞を攻撃する事により、菌が死滅するというメカニズムが推察された<sup>31)</sup>。OH ラジカルが光殺菌作用を発現するというこ



Scheme 3. Plausible mechanism for elution of Ptp<sup>+</sup> from the SiO<sub>2</sub> support

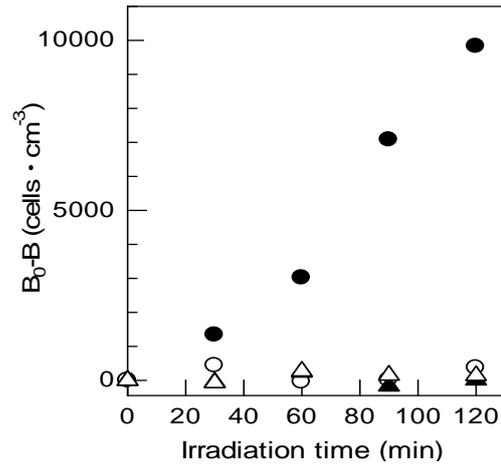


Figure 14. Effects of oxygen to the photochemical sterilization of *E. coli* by Ptp<sup>+</sup>/p-SiO<sub>2</sub>. Visible light irradiated reaction under an aerobic conditions (●) and under a nitrogen atmosphere (○). Dark reaction under an aerobic atmosphere (▲) and a under nitrogen atmosphere (△).

が知られている酸化チタンとは異なる反応機構が推測された<sup>32)</sup>。また、Ptp<sup>+</sup> はカチオン性であることが、生体親和性を増加させ、効率の高い殺菌が実現されたと思われる。

### 3.4 噴水のレジオネラ属菌に対する Ptp<sup>+</sup>/m-SiO<sub>2</sub> による太陽光殺菌

カチオン性の Ptp<sup>+</sup> の SiO<sub>2</sub> への固定化はイオン吸着によっているために、3.3 で示したようにイオンを多く含む市水中で触媒を用いた場合、市水中の Na, Ca, イオンとのイオン交換によって Ptp<sup>+</sup> が脱離する問題があった。そこで、TEOS によるポアフィリング処理 (2.1 を参照) によって SiO<sub>2</sub> 細孔を狭くすることで溶出を防いだ TEOS 処理触媒 (Ptp<sup>+</sup>/m-SiO<sub>2</sub>) を用いて噴水中での実証実験を行った。3.2 に示した実証実験に使用した噴水に比べて水量の多い噴水の太陽光殺菌に対応するために、大型の噴水用殺菌装置を製作した。

上部に小穴 (直径 2 mmφ), 下部に金網 (24 メッシュ) を有する円筒型モジュール (アクリル製, 直径 24 cmφ, 厚さ 2 cm, Figure 15A および 15B) を (株) ヒュウガ化工 (宮崎県延岡市) において製作した。円筒型モジュール内に Ptp<sup>+</sup>/m-SiO<sub>2</sub> 光触媒 120 g を充填した (Figure 15C)。円筒型モジュールはフロート (SUS 製, 直径 14 cmφ, 厚さ 11 cm) に固定化し、さらに水面に安定して浮かべるためにフロートを金具で連結し、5 個のモジュ

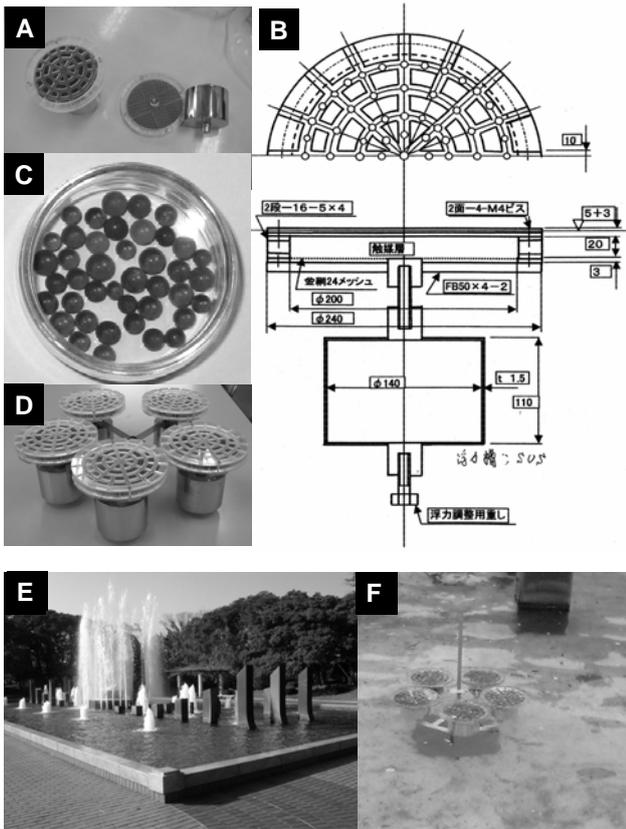


Figure 15. A leaf-type module and a float (A) were manufactured according to a draft (B) and was packed with Ptp/m-SiO<sub>2</sub> (C; 120 g/module). The modules were connected with floats and five modules were jointed each other with the attachment to form photo-bactericidal apparatuses (D) which was set in fountain (E; water amounts: 255 m<sup>3</sup>). A picture (F) shows D during the experiment.

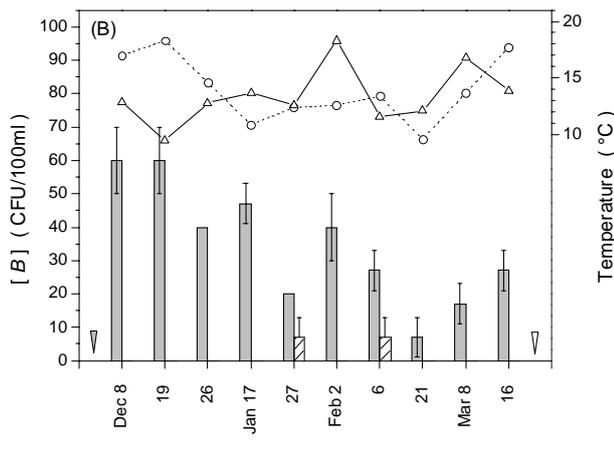


Figure 16. Amounts of bacteria ([B]) in the bactericidal experiment using Ptp/m-SiO<sub>2</sub> under sunshine in 2005–2006 (▨) in comparison with [B] for experiment without the photocatalyst in 2004–2005 (■). The atmospheric temperatures were donated by Δ for 2005–2006 and ○ for 2004–2005. The bactericidal apparatus was installed at mark (∇) and removed at mark (∨).

ールを円状に配列した光殺菌装置 (Figure 15D) を製作した<sup>33)</sup>。

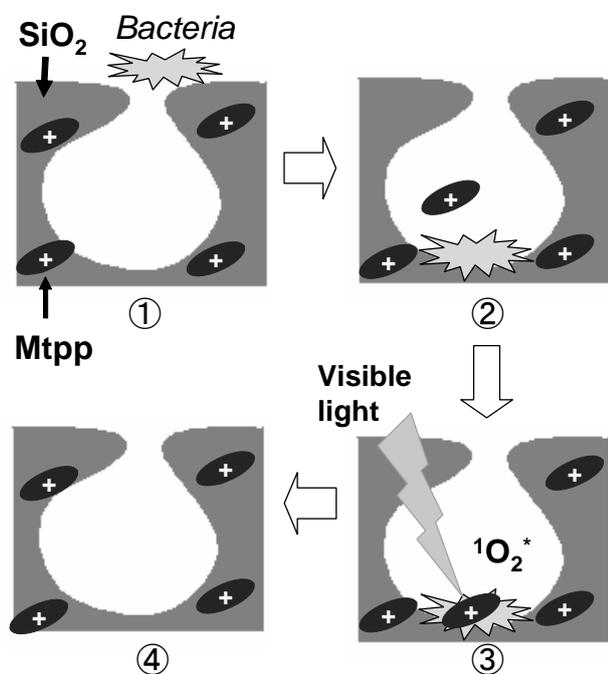
宮崎県都市公園総合事務所が管理している運動公園の噴水 (長さ: 28 m, 幅: 13.5 m, 深さ: 0.675 m, 水量: 255 m<sup>3</sup>, Figure 15E) を実験場とした。まず, 光殺菌装置を投入しないで, 2004 年 4 月から 2005 年 3 月までの 1 年間にわたって検水 500 cm<sup>3</sup> を 7–10 日間隔で採水を行い, *Legionella* 属菌の生菌数 ([B]; 単位 CFU/100 cm<sup>3</sup>) の調査を行った。同時に採水日当日とその前 2 日間の 3 日間の宮崎市の最高気温の平均値を記録した。実験中に管理者によって清掃, 水の入れ替え等が行われ, 生菌数がほぼ 100CFU/100 cm<sup>3</sup> 以下に抑制されていたが, 気温の低い冬季も含めて 1 年間を通じて噴水中に *Legionella* 属菌を確認した。この測定値を, 光殺菌実証実験のブランクとした。

光殺菌実験は, 2005 年 12 月から 2006 年 3 月にかけて行った。Ptp/m-SiO<sub>2</sub> 600 g (Ptp 含有量 510 mg) を充填した殺菌装置 (Figure 15D) を噴水に投入し, 定期的に[B]を測定した。菌体量を 2004 年度のブランクと比較して Figure 16 に示す。ブランクと比較して, 大きく生菌数が抑制され, 光殺菌装置を撤収した 2006 年 3 月 16 日にまで 100 日間殺菌効果が持続した。つまり, 510 mg の Ptp が 5×10<sup>8</sup> 倍の水量にあたる 255 トンの水を 100 日間太陽光によって殺菌を行うことができた<sup>33)</sup>。しかし, TEOS で細孔を閉塞させるポアフィリング処理をしたのにも関わらず, 撤収後の触媒の顕微蛍光分析では, ほとんどの Ptp が溶出しており, Ptp/m-SiO<sub>2</sub> の安定性に問題を残している。

#### 4. 結論

これまでの結果から Scheme 4 に可視光殺菌機構についてまとめた。水中に存在する微生物の多くはシリカゲル表面および細孔内に吸着されると思われる。一方, 金属ポルフィリン (Mtp) は, 水中に多く存在するアルカリ金属イオンとイオン交換されて, SiO<sub>2</sub> から遊離すると思われる。遊離した Mtp は微生物の中に進入し, そこで, 光照射を受けて一重項酸素が発生し, 微生物の DNA 等を損傷し, 殺菌が起こると考えられる。その後, Mtp は再びシリカゲルに吸着し, 再吸着されなかったものは水中に溶出すると思われる。そのために, シリカゲルは触媒担体としての役割と Mtp を徐放する効果を有している。

シリカゲルは表面積が広く吸着性があり、可視光透過性に優れている環境負荷の少ない安全な材料である。また、Sbtp および Ptp は生体親和性が高く、その急性毒性 LD<sub>50</sub> は 2000 mg/Kg 以上<sup>34)</sup>であり、毒性がほとんどないことが確認されている。さらに、酸化チタンと比較して、可視光および太陽光照射下で効率的な光殺菌を起こすことも明らかにされた。また、太陽光および蛍光灯などの可視光線は人体に無害であり、水中での透過性が高く、紫外線による殺菌方法に比べて効率的である。これらの特徴を組み合わせた可視光殺菌技術は、安全安心な生活環境の構築に役立つ技術であると思われる。



Scheme 4. Visible light-assisted sterilization was proceeded according to the following steps.

- ① Bacteria is adsorbed on SiO<sub>2</sub>.
- ② Mtp liberates from SiO<sub>2</sub> and adsorbs inside bacteria.
- ③ <sup>1</sup>O<sub>2</sub> is generated under irradiation of to Mtp damage the bacteria.
- ④ Mtp is adsorbed on SiO<sub>2</sub> again.

## 謝辞

可視光殺菌の研究は、2000年に首藤里香氏（共同研究員、1995年卒業）に地域共同研究センターで大腸菌を使った光殺菌実験をしてもらったのが切っ掛けで始まった。その後、山根賢也（2002年卒、敬称略）、増田

絵里子（2003年卒業）、中島功司（2004年卒業）、江藤寿哲（2005年大学院修了）、河内岳史（2006年修了、横井研究室）、朝倉有香（2005年卒業）、小宮康宏（2006年大学院修了）、新井博之（2006年卒業）、佐藤哲平（2006年卒業）、鈴木秀茂（2007年大学院修了、横井研究室）、江馬智（2007年大学院修了）、中原卓郎（2009年大学院修了）ら、多くの学生が可視光触媒の研究に従事した。なかでも、笛田佳之氏（富士シリシア化学㈱）は工学研究科博士後期課程に社会人入学され、2007年9月に「シリカゲル担持金属ポルフィリンの可視光殺菌効果」で博士（工学）の学位を取得した。これらの方々に感謝致します。

また、財政的支援を、2002年度九州地域環境リサイクル産業交流プラザ（K-RIP）プロジェクト「太陽光/光触媒を利用した屋外クーリングタワーの防かび・抗菌システムの開発」、2003年度宮崎県新産業創出共同研究委託事業「生活環境場におけるレジオネラ属菌の可視光駆動触媒による除菌技術の開発」、2004～2005年度地域新生コンソーシアム「生活環境場に調和した可視光殺菌技術の開発」から受けました。これらの研究を共同で行って頂いた東洋検査センター、第一ビル管理㈱、富士シリシア化学㈱、旭化成エンジニアリング㈱、東西化学産業㈱、㈱ヒュウガ化工の皆様にご感謝申し上げます。

また、2002-2006年度科学研究費補助金特定領域研究「光機能界面の学理と技術」に採択され、「シリカゲル担持金属ポルフィリン錯体の界面光触媒機能と物質変換」の研究テーマで研究を行うことができました。領域代表の藤島昭先生（神奈川技術アカデミー理事長、東京大学名誉教授）および班長の真嶋哲朗先生（大阪大学産業科学研究所教授）にご感謝申し上げます。

実験場を提供して頂きました宮崎県都市公園総合事務所、宮崎市、財団法人弘潤会野崎病院、および第一ビル管理㈱にご感謝致します。また、殺菌メカニズムの解明では平川和貴准教授（静岡大学）に、菌体実験では横井春比古教授に、レジオネラ属の同定では宮崎県衛生環境研究所の河野喜美子科長、鈴木泉所長（当時）にお世話になりました。これらの方および共同研究者の白上努准教授および松本仁助教にご感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) A. L. Pruden, and D. F. Ollis, J. Catalysis., 82, 404

- (1983).
- 2) J. C. D' Oliveria, G. Al-Sayyed, and P. Pichat, *Environ. Sci. and Technol.*, 24, 990 (1990).
  - 3) T. Hisanaga, K. Harada, and T. Tanaka, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 54, 113 (1990).
  - 4) C. Kormann, D. W. Bahnemann, and M. Hoffman, *Environ. Sci. and Technol.*, 25, 494 (1991).
  - 5) O. Legrini, E. Iliveros, and A. M. B. Braun, *Chem. Rev.*, 93, 671 (1993).
  - 6) K. Vinodgopal, U. Stafford, K. A. Gray, and P. V. Kamat, *J. Phys. Chem.*, 98, 6797 (1994).
  - 7) J. Theurich, M. Lindner and D. W. Bahnemann, *Langmuir*, 12, 6368 (1996).
  - 8) C. Wei, W. Y. Lin, Z. Zainai, N. E. Williams, K. Zhu, A. P. Kruzic, S R. L. Smith, and K. Rajeshwar, *Environ. Sci. Technol.*, 28, 934 (1994).
  - 9) R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, and Y. Taga, *Science*, 293, 269 (2001).
  - 10) 橋本和人, 大谷文章, 工藤昭彦, 光触媒 基礎・材料開発・応用, エヌ・ティー・エス出版 (2007).
  - 11) D. Gust, T. A. Moore, K. M. Kadish, K. M. Smith, and R. Guilard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, Vol. 8, p.153, and reference cited therein, Academic Press, New York, 2000.
  - 12) K. Kalyanasundaram, and M. Graetzel, "Photosensitization and Photocatalysis using Inorganic and Organometallic Compound, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 1993.
  - 13) M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.*, 92, 435 (1992).
  - 14) S. Anderson, H. L. Anderson, and J. K. M. Sander, *Acc. Chem. Res.*, 26, 469 (1993).
  - 15) R. H. Iler, *The chemistry of silica*, Wiley- Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 1979.
  - 16) T. Shiragami, J. Matsumoto, H. Inoue, and M. Yasuda, *J. Photochem. Photobiol. C: Review*, 6, 227 (2005).
  - 17) 保田昌秀, 白上努, 松本仁, 光化学, 38 9-14 (2007).
  - 18) 金属ポルフィリン錯体の光触媒作用と応用展開, 白上 努, 保田昌秀, 光機能性高分子材料の新たな潮流—最新技術とその展望—, 25, シーエムシー (2008).
  - 19) T. Shiragami, K. Kubomura, D. Ishibashi, and H. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6311 (1996).
  - 20) S. Takagi, M. Suzuki, T. Shiragami, and H. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 8712 (1997).
  - 21) R. P. Pandian, T. K. Chandrashekar, and V. Chandrasekhar, *Indian J. Chem.*, 30A, 579 (1991).
  - 22) H. Segawa, K. Kunimoto, A. Nakamoto, and T. Shimidzu, *J. Chem. Soc, Perkin Trans.*, 1, 939 (1991).
  - 23) T. Shiragami, Y. Shimizu, K. Hinoue, Y. Fueda, K. Nobuhara, I. Akazaki, and M. Yasuda, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 156, 115 (2003).
  - 24) Y. Fueda, H. Suzuki, Y. Komiya, Y. Asakura, T. Shiragami, J. Matsumoto, H. Yokoi, and M. Yasuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 79, 1420 (2006).
  - 25) 松本朋子, 白木隆一, 松本仁, 白上努, 保田昌秀, 分析化学, 57, 819-824 (2008).
  - 26) H. Yokoi, T. Shiragami, J. Hirose, T. Kawauchi, K. Hinoue, Y. Fueda, K. Nobuhara, I. Akazaki, and M. Yasuda, *World J. Microbiol. Biotech.*, 19, 559 (2003).
  - 27) Y. Fueda, M. Hsashimoto, K. Nobuhara, H. Yokoi, Y. Komiya, T. Shiragami, J. Matsumoto, K. Kawano, S. Suzuki, and M. Yasuda, *Biocontrol Science*, 10, 55 (2005).
  - 28) 保田昌秀, 白上努, 信原一敬, 笹田佳之, 公開特許公報, "光触媒装置" 特開 2002-136879.
  - 29) F.-Y. Chang and V. L. Yu, Legionella infection. In *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*, ed. by A. P. Fishman, J. A. Elias, J. A. Fishman, M. A. Grippi, L.R. Kaiser, and R. Senior, McGraw Hill, New York vol 2, 3rd edn.1996, p. 945.
  - 30) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 47, 291 (1989).
  - 31) K. Hirakawa, S. Kawanishi, J. Matsumoto, T. Shiragami, and M. Yasuda, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 82, 37 (2006).
  - 32) T. Saito, T. Iwase, J. Horie, and T. Morioka, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 14, 369 (1992).
  - 33) 江馬智, 柴田博文, 弥富勝美, 信原一敬, 笹田佳之, 松本仁, 白上努, 保田昌秀, 防菌防黴学会誌, 35, 547 (2007).
  - 34) Fifty percent of lethal dose (LD<sub>50</sub>) of Ptp was examined by Japan food research laboratories for use in male and female mice on 2005 (404110082-001).