

## 新規技術により作成した二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)不織布の光触媒反応による ウイルス不活性化効果についての検討

国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

高木 弘 隆 杉山 和 良

(平成 22 年 3 月 30 日受付)

(平成 23 年 2 月 28 日受理)

Key words: photocatalysis, titanium dioxide, antimicrobial activity, nonwoven fabric

### 要 旨

我々は新規技術による二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)不織布を用い、この光触媒効果によるネコカリシウイルス F9 株(FCV-F9 株)、ヒトアデノウイルス GB 株(HAdv3-GB 株)、インフルエンザ(Influenza A 及び B, 以下 Inf-A 及び Inf-B)ウイルスの不活性化効果および吸着効果を検討した。

各ウイルス液 10μL を 1cm<sup>2</sup> の TiO<sub>2</sub> 不織布に滴下・乾燥後に最大波長 356nm の紫外線を照射したところ、FCV-F9 株及び HAdv3-GB 株は 30 分間で 3.5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> 以上の感染価減少が認められた。Inf-A ウイルス及び Inf-B ウイルスでは紫外線照射以前より感染価が著しく減少し、TiO<sub>2</sub> 不織布へ直接吸着することが示唆された。

そこで TiO<sub>2</sub> 不織布への各ウイルスの吸着効果を各ウイルス液の滴下のみで検討した。FCV-F9 株及び HAdv3-GB 株では吸着性は認められなかったが、Inf-A 及び Inf-B ウイルスではコントロールと比較して、5 分後に 2 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>、30 分後で 3 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> の感染価減少が認められ、その吸着性が示唆された。Inf A 及び B ウイルス数株による TiO<sub>2</sub> 不織布への経時的吸着効果は、早いもので 5 分、概ね 30 分で 3 log<sub>10</sub> から 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> 以上の吸着性が示唆された。

新技術により TiO<sub>2</sub> を高密度・平滑、安定な状態で不織布にコーティングした。これにより 3 種のウイルスに対する不活性化効果とインフルエンザウイルスに対する強力な吸着効果が示唆され、今後この素材によるウイルス感染制御の可能性が期待される。

[感染症誌 85: 244~249, 2011]

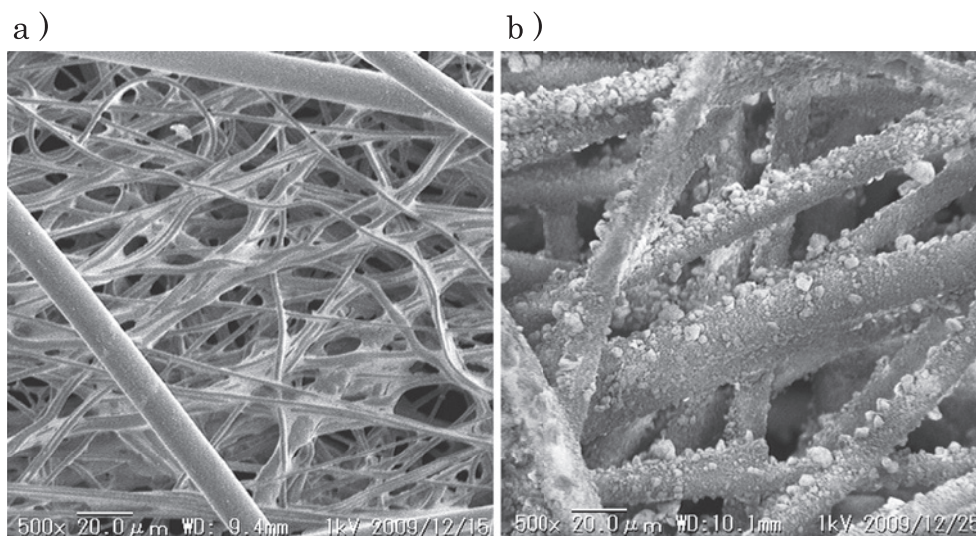
### 序 文

二酸化チタン(以下 TiO<sub>2</sub>)による光触媒作用は汚れ分解、脱臭、殺菌など現在様々な分野に応用されている。これは光触媒の特徴として、そのバンドギャップよりも大きなエネルギーをもつ波長 400nm 以下の紫外線(UV)を照射すると価電子体中の電子が励起し、この酸化電位により接触した有機物を酸化分解することによる<sup>1)2)</sup>。この酸化分解を殺菌・不活性化に用いるための実験的報告は多数あるが、多くは対象となる微生物がバクテリア或いはバクテリオファージであり、使用する TiO<sub>2</sub> も粒子状態での混合処理<sup>1)3)</sup>、実験的な簡易コーティング<sup>4)</sup>、あるいは専用装置<sup>5)~7)</sup>によるもの

である。ナノサイズ TiO<sub>2</sub> 粒子の特殊コーティングによる報告<sup>7)</sup>もあるが、より高い酸化分解力を発揮するための基材への固定方法が検討されてきた。その結果ナノサイズ TiO<sub>2</sub> 粒子表面をシリコン修飾することにより<sup>8)</sup>、ナノサイズ TiO<sub>2</sub> の凝集を抑制し、加工剤としての分散安定性、繊維基材に対する基材密着性、基材保護性を高めるに至った(Fig. 1a, b)。さらにこの表面修飾 TiO<sub>2</sub> 粒子をサブミクロンメルトブローン繊維含有不織布に均一塗工することで TiO<sub>2</sub> 結合安定性の要となる耐水性を付与させ、光触媒機能を有する粒子捕捉性の高いフィルターへの応用などを可能とした<sup>9)</sup>。今回我々は本表面修飾 TiO<sub>2</sub> 粒子コーティング不織布を用いて、ウイルスに対する光触媒—不活性化効果を検討した。また本不織布によるウイルス吸着様作用も示唆されたので合わせて報告する。

別刷請求先：(〒524-0002) 滋賀県守山市小島町 515 番地  
旭化成せいい株式会社不織布事業部不織布技術  
開発部 小川 達也

Fig. 1 Surface electron microscopy photographs of TiO<sub>2</sub>-coated nonwoven fabric (magnification: 500×)  
 a) New siliconized TiO<sub>2</sub>-coated nonwoven fabric  
 b) Major TiO<sub>2</sub>-coated nonwoven fabric



## 材料及び方法

### 1. 供試材料及び調製

試験用 TiO<sub>2</sub>担持不織布は旭化成ケミカルズ・旭化成せんいにより共同作成された「ナノサイズ変性二酸化チタン光触媒担持一極細繊維積層不織布」(以下 TiO<sub>2</sub>-F) でサイズは 1cm×1cm, 電子線滅菌済みのものを試験に用いた。この不織布は, ①最大 TiO<sub>2</sub>担持不織布 (4.0mg/m<sup>2</sup>担持, 以下 1×TiO<sub>2</sub>-F), ②基材不織布 (以下 control-F) の 2 種類とした。なお control-F は使用前に親水化処理として, 0.01% Tween20 溶液に 10 分以上浸漬後に滅菌精製水で洗浄し試験に供した。

供試ウイルスはネコカリシウイルス F9 株 (以下 FCV-F9), ヒトアデノウイルス 3 型 GB 株 (以下 HAdV3-GB), インフルエンザ A ウイルス亜型 H1N1 New Caledonia 株およびインフルエンザ B ウイルス Shandong 株 (以下 Inf-A/NC および Inf-B/Sd) の細胞培養上清を用いた。ウイルス培養には CRFK 細胞 (JCBR9035, FCV 用), A549 細胞 (JCBR0076, HAdV 用) 及び MDCK 細胞 (JCBR9029, Influenza virus 用) を使用した。

UV 照射装置は CSL-206G (コスモバイオ) に UV-A 灯 (最大波長 356nm) 8W ランプ 1 本を装着したものを使用し, UV 測定装置 CUSTOM UV-340 (測定波長特性 290~390nm) にて 1,100~1,300μW/cm<sup>2</sup> を示す条件で照射を行った。ウイルスを用いた一連の試験は安全キャビネット内で操作した。

### 2. TiO<sub>2</sub>-F による各ウイルスの不活性化試験

供試フィルターを細胞培養用 12well-plate に 1 枚/

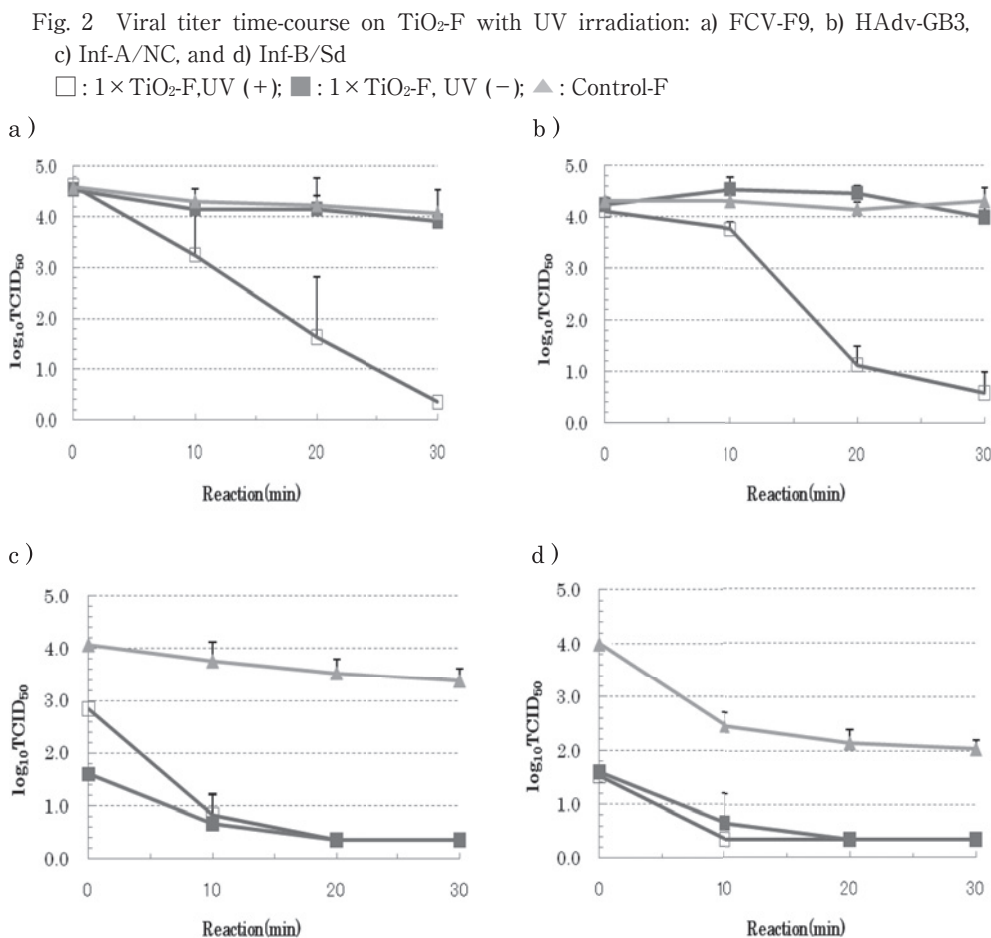
well 置き, これらフィルターに FCV-F9, HAdV3-GB, Inf-A/NC 及び Inf-B/Sd の各培養上清を 10μL 滴下し安全キャビネット内で 5 分以上静置・乾燥後, ここに UV-A を照射し, 一定時間ごとにフィルターを回収した。FCV-F9 及び HAdV3-GB は 5% 牛胎児血清含有イーグル MEM 培地 0.5mL でウイルス溶出を行い, これを 5 倍段階希釈後, 各培養細胞単層 96well-plate に接種し 3~7 日間培養した。Inf-A/NC 及び Inf-B/Sd は 0.25% BSA 含有 L-15 培地でウイルス溶出を行い, これを 5 倍段階希釈後, MDCK 細胞単層 96well-plate に接種し, Acetyl-trypsin 存在下で 5~7 日間培養した。各々培養後 10% ホルマリン-PBS (-) 溶液にて固定後メチレンブルー染色し, 50% 感染価 (TCID<sub>50</sub>) を Behrens-Kärber の方法<sup>10)</sup>にしたがって算出した。

### 3. TiO<sub>2</sub>-F に対する各ウイルスの吸着様反応試験

供試フィルターを細胞培養用 12well-plate に 1 枚/well 置き, これらフィルターに FCV-F9, HAdV3-GB, Inf-A/NC 及び Inf-B/Sd の各培養上清を 10μL 滴下し, 5 分後及び 30 分後に 2. と同様の方法で溶出・培養を行い, 10% ホルマリン-PBS (-) 溶液にて固定後メチレンブルー染色して TCID<sub>50</sub> を算出した。

### 4. TiO<sub>2</sub>-F に対するインフルエンザウイルスの吸着様反応速度試験

供試フィルターのうち, 1×TiO<sub>2</sub>-F を細胞培養用 12 well-plate に 1 枚/well 置き, Inf-A/NC, Inf-B/Sd, その他各亜型の臨床分離株 3 株及び 2 株の培養上清を 10μL 滴下し, 一定時間ごとにフィルターを回収した。0.25% BSA 含有 L-15 培地でウイルス溶出を行い, これを 5 倍段階希釈後, MDCK 細胞単層 96well-plate



に接種し、Acetyl-trypsin 存在下で5~7日間培養した。培養後10%ホルマリン-PBS(-)溶液にて固定後、メチレンブルー染色してTCID<sub>50</sub>を算出した。

なお2から4までの試験はすべて3回繰り返し、これらの平均値及び+1SDをデータとして示した。

## 結果

### 1. TiO<sub>2</sub>-Fによる各ウイルスの不活性化効果

FCV-F9株ではUV-A照射後10分から30分まではほぼ直線的に減少し、30分後では約4 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>の感染価減少が認められた。HAdv3-GB株では照射10分後より感染価減少が始まり30分間照射で3 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>以上の感染価減少が認められた。またこれら2種類のウイルスではUVによる不活性化およびTiO<sub>2</sub>-F自身による不活性化はともに認められなかった(Fig. 2-a, b)。

一方Inf-A/NC及びInf-B/Sdでは両者ともにUV照射前の時点より感染価が著しく減少しており、照射10分後にはコントロールと比較して2 log<sub>10</sub>から3 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>の感染価減少となり、これはUV未照射の1×TiO<sub>2</sub>-Fでも同様であった(Fig. 2-c, d)。またFCV-F9やHAdv3-GBとは異なり、UV照射のみでも感染価が減少し、特にInf-B/Sdでより顕著に認めら

れた。

### 2. TiO<sub>2</sub>-Fの各ウイルスに対する吸着様効果

FCV-F9株及びHAdv3-GB株においてはウイルス液滴下5分及び30分後では、両者とも1×TiO<sub>2</sub>-FとControl-Fにおいて感染価に差が認められなかった(データは示さず)。一方Inf-A/NC及びInf-B/SdではControl-F及び1×TiO<sub>2</sub>-Fと比較すると、5分後で2 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>、30分後では約3 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>の感染価減少が認められ、UV非照射下でTiO<sub>2</sub>-Fと特異及び時間依存的にウイルスが吸着することが示唆された(Fig. 3及び4)。またInf-A/NCについて0.1%Tween20や0.5MまでのNaCl負荷による溶出を試みたが、いずれも溶出することはできなかった(データは示さず)。

### 3. インフルエンザウイルスのTiO<sub>2</sub>-Fに対する経時的吸着様効果

Inf-A/NC及び臨床株3種類では反応10分後までは株間で感染価減少に差が認められたが、反応30分後ではInf-A/NCを除き、3.5 log<sub>10</sub>~5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>の感染価減少が認められ、1×TiO<sub>2</sub>-Fへの時間依存的吸着様反応が示唆された(Fig. 5)。Inf-B/Sd及び臨床株2株についてはInf-Aに比べより早い吸着様反応を示

Fig. 3 Comparison of Inf-A/NC infectivity titers on TiO<sub>2</sub>-F and Control-F for 5 and 30 min without UV irradiation.  
■ : 1×TiO<sub>2</sub>-F; □ : control-F

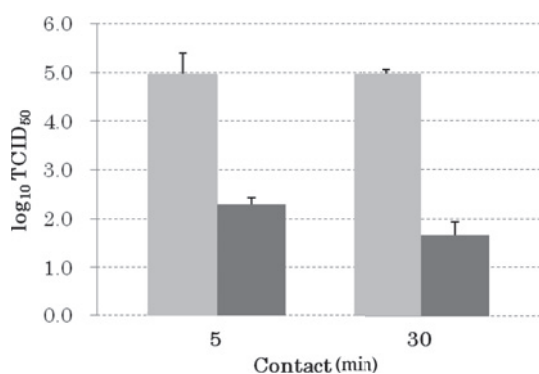
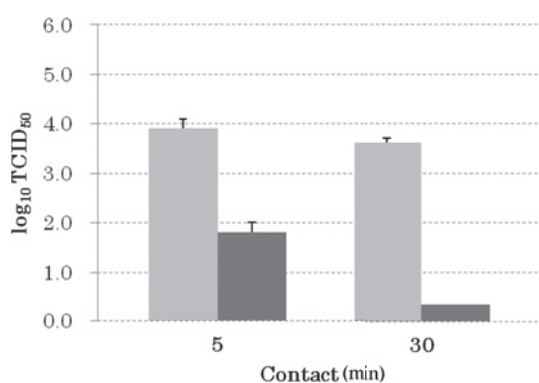


Fig. 4 Comparison of Inf-B/Sd infectivity titers on TiO<sub>2</sub>-F and Control-F for 5 and 30 min without UV irradiation  
■ : 1×TiO<sub>2</sub>-F □ : control-F



し、5分後で約3 log<sub>10</sub>、10分後3.5 log<sub>10</sub>から4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>の感染価減少が認められた (Fig. 6).

### 考 察

TiO<sub>2</sub>-UV 照射による微生物制御又は不活性化について、これまでの多くはバクテリア及びウイルスの代替としてのバクテリオファージを用いた検討<sup>13)~7)</sup>がほとんどである。今回 ss (+) RNA ウィルス, dsDNA ウィルス, ss (-) RNA ウィルスの3種類の中から envelope-virus と capcid-virus を各1株ずつ選択して、性状・構造の異なるウィルスに対する不活性化効果を検討した。供試ウィルスは接触・飛沫感染を起こすタイプのウィルスであり、これらが付着表面で不活性化されることは感染制御の上からも非常に重要である。

この検討で FCV 及び HA<sub>2</sub>V については TiO<sub>2</sub>-UV 照射によりその不活性化が示唆され、これは筆者の経験上、殺菌目的で使用される UV-C 領域(max.254nm) による不活性化と同等以上であった。Lee ら<sup>3)</sup>はλ254

Fig. 5 Time-course of influenza A/H1N1 infectivity titers on 1×TiO<sub>2</sub>-F without UV irradiation.  
□ : A/New Caledonia; ■, ▲, and × : clinical isolates

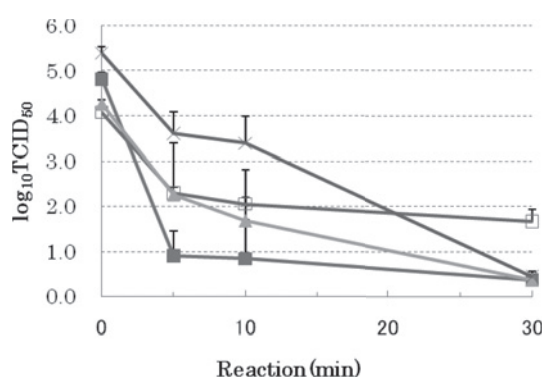
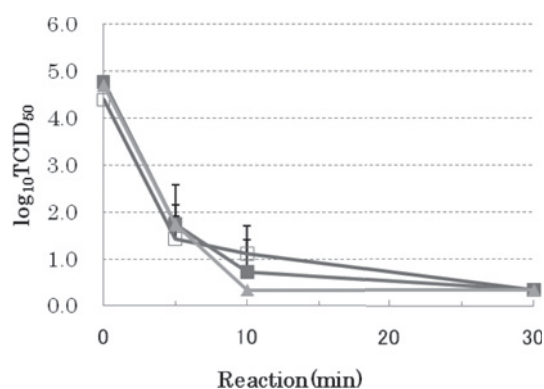


Fig. 6 Time-course influenza B infectivity titers on 1×TiO<sub>2</sub>-F without UV irradiation.  
□ : B/Shandong; ■ and ▲ : clinical isolates



nm 照射下で TiO<sub>2</sub> 有無により murine norovirus の不活性化効果を検討しているが、紫外線での不活性化効果との判別が難しかった。今回の検討では最大波長 356nm での直接的なウィルス不活性化は生じていないため、環境や材質、人体に影響の少ないλ350~400 nm での不活性化が可能なることは大きな利点となる。Li ら<sup>11)</sup>は TiO 変性窒素-パナジウム繊維を用いてλ400nm による MS2 フェージの処理効果を示しており、今回の TiO<sub>2</sub> でこうした波長で同等以上の効果を得る可能性は高いと考える。また Torimoto ら<sup>12)</sup>はメタノールと酢酸の分解性が前者は波長に、後者は光強度に依存して高くなることを報告しており、ウィルスによって分解効率が異なることも考えられる。近年 LED による紫外線発生なども実用化・市販されているため、より低エネルギーでの不活性化処理検討に加え、波長 400nm 以下の太陽光での検討もしてゆきたい。Influenza virus については吸着様反応のために不活性化の証明には至らなかったが、他の 2 ウィルスの

結果から不活性化効果は大いに期待できると考える。

TiO<sub>2</sub>の特性の1つとされる有機物吸着能について、供試したウイルスのうち Influenza virus にのみ強力な吸着様効果が見られ、NaCl 負荷や Tween20 による溶出もできていないため、現時点では吸着ウイルスの不活性化確認には至っていない。しかし捕捉性能という点では重要な性質であり、UV 励起での酸化分解には非常に有利に働く。今後 FCV や HAdV についても様々な株を用いて経時的不活性化及び吸着性について検討する必要がある。同時にコーティング基材種や TiO<sub>2</sub>コーティング量、静電効果ある素材と組み合わせた吸着性能向上化なども合わせて検討してゆく。

今回用いた新規 TiO<sub>2</sub>粒子とコーティング技術により、実用的なウイルス不活性化・吸着の効果が確認され、今後こうした素材による新たな感染制御の形が大いに期待できる。

謝辞：本研究は平成19年度 国立感染症研究所一旭化成せんい株式会社・旭化成ケミカルズ株式会社の共同研究により実施した。

また本研究にあたり、TiO<sub>2</sub>フィルターの作成・供与いただきました旭化成せんい株式会社 不織布事業部 上野郁雄様、橋本真規子様、旭化成ケミカルズ株式会社 機能性コーティング事業部 小熊淳一様および関係者各位に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J : Different Inactivation Behaviors of MS-2 phage and *Esherichia coli* in TiO<sub>2</sub> Photocatalytic Disinfection. *Appl. Environ Microbiol* 2005 ; 71 : 270—5.
- 2) 橋本和仁, 坂井伸行, 入江 寛, 高見和之, 砂田香矢乃 : 光触媒応用技術. 東京図書. 2007 ; p. 104—51.
- 3) Lee J, Zoh K, Ko G : Inactivation and UV Disinfection of Murine Norovirus with TiO<sub>2</sub> under Various Environmental Conditions. *Appl. Environ Microbiol* 2008 ; 74 : 2111—7.
- 4) Kashige N, Kakita Y, Nakashima Y, Miake F, Watanabe K : Mechanism of Photocatalytic Inactivation of *Lactobacillus casei* phage PL-1 by Titania thin Film. *Current Microbiol* 2001 ; 42 : 184—9.
- 5) Pal A, Pehkonen SO, Yu LE, Ray MB : Photocatalytic Inactivation of Airborne Bacteria in a Continuous-Flow Reactor. *Ind Eng Chem Res* 2008 ; 47 : 7580—5.
- 6) Vohra A, Goswami DY, Deshpande DA, Block SS : Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air. *Applied Catalysis B Environmental* 2006 ; 65 : 57—65.
- 7) Gerrity D, Ryu H, Abbaszadegan JCM : Photocatalytic inactivation of virus using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light. *J Environ Sci Health Pt A* 2008 ; 43 : 1261—70.
- 8) 特許番号 日本国特許第 4212242.
- 9) 小熊純一, 大橋亜沙美, 中村 亮 : 光触媒担持形態の有機物分解活性に及ぼす影響. *会報光触媒* 2005 ; 18 : 124—5.
- 10) Kärber G : Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Path Pharm* 1931 ; 162 : 480—3.
- 11) Qi Li Q, Page MA, Mariñas BJ, Shang JK : Treatment of Coliphage MS2 with Palladium - modified Nitrogen-Doped Titanium Oxide Photocatalyst Illuminated by Visible Light. *Environ Sci Technol* 2008 ; 42 : 6148—53.
- 12) Torimoto T, Aburakawa Y, Kawahara Y, Ikebe S, Ohtani B : Light intensity dependence of action spectra of photocatalytic reactions with anatase titanium (IV) oxide. *Chemical Physics Letters* 2004 ; 392 : 220—4.

## Efficacy of Inactivating Viruses by Photocatalytically Reacting Nonwoven Titanium Dioxide Fabric

HirotaKa TAKAGI & Kazuyoshi SUGIYAMA

Division of Biological Safety Control and Research, National Institute of Infectious Diseases

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) photocatalysis causes oxidative destruction dependent on electrons excited by  $\leq 400\text{nm}$  ultraviolet (UV) rays. Many studies have covered the destruction of organics and bacteria and bacteriophage inactivation by photocatalysis.

We studied the inactivation by new nonwoven siliconized titanium dioxide fabric of the feline calicivirus F9 (FCV-F9), human adenovirus GB (HAdV3-GB), and influenza A and B virus (A/New Caledonia, B/Shandong, and 5 clinical strains).

We spotted 10 $\mu\text{L}$  of viral suspensions containing infectious 5 log<sub>10</sub> 50% tissue culture doses (TCID<sub>50</sub>) onto 1cm<sup>2</sup> pieces of TiO<sub>2</sub>-coated nonwoven control fabric treated or not treated with UV light ( $\lambda_{\text{max}}$ , 365nm, 1,100-1,300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). We then measured the virus titers of 50 $\mu\text{L}$  of viral suspension recovered from these fabrics.

FCV-F9 and HAdV3-GB infectivity titers were reduced by over 3.5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> after 30 min of irradiation, but influenza viral titer was reduced to where it was undetectable even without UV irradiation. Comparing individual viral titer reduction due to nonwoven fabric contact without UV irradiation exposure, showed that FCV-F9 and HAdV3-GB titer infectivity was not reduced. In contrast, influenza A and B titer infectivity was reduced to 2 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> after 5 min of contact with the nonwoven fabric and to 3 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> after 30 min of contact. Titers of 6 of 7 influenza A and B strains were reduced by over 4 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> within 30 min.

Siliconized TiO<sub>2</sub>-coated nonwoven fabric thus efficiently inactivated FCV-F9 and HAdV-GB and absorbed influenza viruses.