

各種純金属の抗菌性評価

宮野 泰征*・小山 訓裕*²・K. R. スリクマリー*³・佐藤 嘉洋*⁴・菊地 靖志*⁵

Evaluation of Antibacterial Ability of Some Pure Metals

Yasuyuki MIYANO, Kunihiro KOYAMA, K. R. SREEKUMARI, Yoshihiro SATO and Yasushi KIKUCHI

Synopsis : The biohazard in the medical treatment or the food industry sometimes is a matter of serious concern. Recently, the corrosion or degradation due to microbial activity is also coming to consider as one of significant problems in the industrial technology. In these biohazards, the proliferation and colonization of microbes on the material surfaces is recognized as the precursor. From a point of view of this point, the utilization of antibacterial material is considered as one of effective approach to control the activation of harmful microbes and to create a hygiene life space. Although there are so many commercial products with antibacterial ability, they are generally plastics, clothing fibers or ceramics. While, antibacterial metals (commercial products of metals with antibacterial ability) are not so popular as former. Moreover, there are some researches for antibacterial ability of silver or copper metal, the substance which is more paid attention as antibacterial agent is organic substances rather than inorganic ones. In this study, the interaction of some pure metals and microbes was examined by two experimental methods, the film contact method and the shaking flask method. Through these experiments, we evaluated the anti-bacterial ability of some pure metals and investigated the possibility of utilization for alloy element.

Key words : antibacterial metals; pure metal; corrosion; degradation; microbes.

1. 緒言

微生物による有害作用が、人体を初めとして工業材料・製品等で広く報告されている。その対策として、各分野で有害微生物を制御する研究が進められている。抗菌加工された各種商品の登場は、こうした技術開発の成果の一例である。抗菌¹⁾とは、細菌の発生・生育・増殖を抑制することであり、生きている細菌を積極的に死滅させることを目的とした殺菌とは異なる。抗菌には、我々の生活環境中の有害微生物を効果的に制御し、衣食住における微生物による被害を防ぎ、安全かつ快適な生活環境の実現を目指そうとする意識がある。自然環境への負荷が少ないため、微生物と人間との共生を考える上で有効な微生物制御方法の一つと考えられる。

有害作用の例としては、食中毒、院内感染、あるいは治療薬としての抗生物質への耐性菌の発生や、住宅の高気密化にともなう空間環境の微生物汚染の顕在化などがあげられる。このような問題への対策として、安心・安全・清潔空間を創出するための素材開発への需要が高まっている²⁾。

工業分野では、金属材料や機器・配管等における微生物

による腐食・劣化被害^{3,4)}が報告されている。対策の例として、高耐食性材料の開発以外に、構造用金属材料の性質の中に抗菌的な機能を付与することで、被害を抑制しようとの試みも展開されている^{5,6)}。

微生物の構成元素は主としてC, H, O, N, P, Sである。生命活動を維持するために、微量ではあるがFeなどの金属元素も必須である。しかし、生物が必要とする金属元素は、必要量に限度があり、それをこえると毒性を示すようになる。一方、Ag, Cu, Pbなどのように殺菌性を持った金属の存在は、古くから知られている。最近、これらの金属やその酸化物を、合金元素としてステンレス鋼へ添加したり^{5,6)}、または表面へ被覆する^{7,8)}などの方法により、微生物制御機能を持った抗菌性金属材料が開発されて注目されている。しかし、現在応用されている金属の種類は少数である。材料開発を進める上で、どのような金属に抗菌性があるのかを検討することは、極めて重要と考えられる。

以上のような背景から、著者らは、金属の持つ抗菌性を微生物制御機能として応用することを目的に、材料学的な観点から金属と微生物との相互作用を検討することとした。すなわち、各種純金属の抗菌性を、主としてフィルム

平成18年5月26日受付 平成18年8月25日受理 (Received on May 26, 2006; Accepted on Aug. 25, 2006)

* 大阪大学大学院 (現: 日本学術振興会特別研究員 (独) 産業技術総合研究所) (Research Fellow of Jpn Society for Science Promotion, now National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-8-31 Midorioka Ikeda 563-0026)

* 2 大阪大学大学院 (現: (株) 村田製作所) (Graduate School of Engineering, Osaka University, now Murata Manufacturing Co., Ltd.)

* 3 大阪大学接合科学研究所 (現: レークヘッド大学) (Joining and Welding Research Institute, Osaka University, now Lake Head University)

* 4 大阪市立大学 (Osaka City University)

* 5 大阪大学名誉教授 (大阪市立大学客員教授) (Professor Emeritus, Osaka University) (Guest Professor of Osaka City University)

Table 1. Chemical components of test metals.

Material	Purity (mass%)
Zn	99.5
Ni	99.7
Pb	99.9
Sn	99.5
Ti	99.5
Co	99.9
Zr	99.7
Mo	99.95
Cu	99.9

密着法^{9,10)} (JIS Z2801に準拠), およびシェークフラスコ法¹⁰⁾で評価し, 金属による抗菌性の検証を行った。金属表面における微生物の生死の状態については, 二重染色試薬を用いた蛍光顕微鏡観察を実施した。さらに, 抗菌性評価試験実施後の微生物を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察することにより, 抗菌性金属が持つ微生物細胞への影響についても若干の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 供試材と供試細菌

実験にはTi, Co, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Sn, Pbの9種類の純金属を用いた。その化学組成をTable 1に示す。各材料を所定の寸法に調整した後, 樹脂埋めし, 表面をSiC研磨紙で#1000まで湿式研磨したものを試料とした。研磨後, 試料はアセトンで超音波洗浄により脱脂し, その後, 70 v/v%のエタノールに浸漬して滅菌処理を施した。紫外線照射条件下で, 十分に乾燥した後, 実験に供した。抗菌性の有無を確認する目的から, 金属を埋め込まない, 樹脂のみの試料を対照試料(以下, Controlと表記。)として用意した。

抗菌性評価に使用する細菌については, JIS Z 2801⁹⁾に準拠し, グラム陽性菌の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)と, グラム陰性菌の大腸菌(*E. coli*)の二種類を用いた。本実験では, 財団法人 発酵研究所から入手した, 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: IFO No. 12732 以下, *S. aureus*) と, 大腸菌 (*E. coli*: IFO No. 3972 以下 *E. coli*) を試験に供した。これらの試験菌は, 評価試験の再現性を期す目的から, 以下に示すような方法で, 二代までの継体培養を実施した。Neutrient Broth (普通ブイヨン培地, Difco社製: 以下, NBと表記。)で作成した寒天培地上に各供試微生物を一白金耳接種し, 線引き平板法¹¹⁾により復元(一代培養)した。復元された微生物をNB液体培地に一白金耳接種し, 各供試微生物の純粋培養液を得た(二代培養)。培養の条件は, いずれも温度303±1K, 時間16~24hとした。NBの化学成分組成をTable 2に示す。

2.2 抗菌性評価試験

本研究における抗菌性評価のための試験方法について

Table 2. Chemical composition of Nutrient Broth.

Component	Amount
Nutrient Broth	8.0g
(Beef extract)	(3.0g)
(Peptone)	(5.0g)
Distilled Water	1ℓ

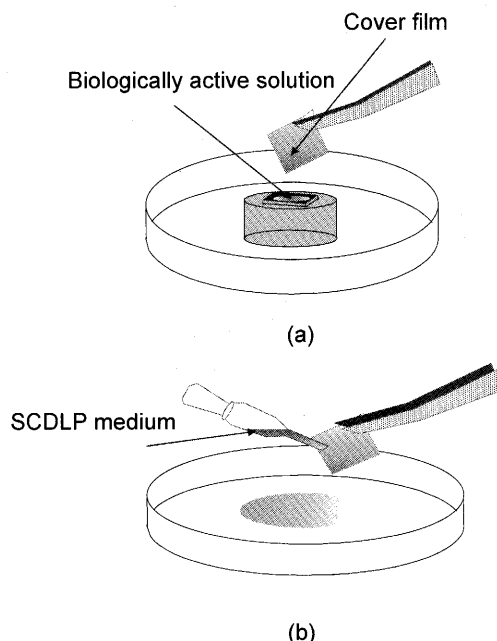


Fig. 1. Schematic illustration of the film contact method. (a) Covering the biologically active solution on metal surface. (b) Flushing the film by SCDLP medium.

は, 以下で示すフィルム密着法とシェークフラスコ法という二つの方法により行った。

2.2.1 フィルム密着法

この方法は, 供試材表面上に菌液を滴下し, その上を薄いフィルムで被うことで, 供試液を微小空間に静置保持したまま, 金属表面と接触させる方法である。フィルムは, 金属と菌液との接触面積を大きくする効果, 菌液の蒸発を抑える効果を担っている。この方法は, 抗菌性能を高感度で評価できる方法¹⁰⁾といわれているが, 操作が煩雑なため, 熟練を要するという欠点も指摘されている。実際の手順を以下に示す。三角フラスコに, 濃度0.5 v/v%に希釈調整した無菌のNB培地を200 mL用意した。この溶液に, 前培養後の各微生物の純粋培養液を, 1 mL接種したものを供試液とした。一連の操作により, 各供試液中の微生物の個体数は, 2.5~10×10⁶ cfu/mLに調整される。次に, 供試液を, マイクロピペット(Gilson: P-1000)で正確に0.075 mL採液し, 各試料表面(大きさ: 25×25 mm)に滴下した。滴下操作後, 試料表面の液を, 大きさ23×23 mmのフィルムで被覆した。模式図をFig. 1に示す。この操作は, 試験期間中, 試料と供試液を密着状態に維持することを目的としている。使用するフィルムは, 実験開始前にエタノールで浸漬滅菌し, UV照射下で滅菌処理を施しながら乾燥してあ

Table 3. Chemical composition of SCDLP medium.

Component	Amount
SCDLP	38g
Polypeptone(Casein)	(17g)
Polypeptone(Soy bean)	(3g)
NaCl	(5g)
KH ₂ PO ₄	(2.5g)
Glucose	(2.5g)
Lecithin(Soy bean)	(1g)
Polysorbate80	(7g)
Distilled Water	1ℓ

る。フィルム密着操作完了後、試料を滅菌シャーレに封入し、シャーレごと温度制御されたインキュベーター内に保持した。温度は $308\pm 1\text{K}$ とした。この時、試料表面の供試液の乾燥を防ぐ目的から、シャーレの雰囲気相対湿度90%に維持した。保持期間は原則24時間とした。試験後、試料表面、およびフィルム表面を、界面活性機能を有するSCDLP培地 (SOYBEAN-CASEIN DIGEST BROTH with LECITHIN & POLYSORBATE: 日本製薬製) で洗浄し、洗浄液中の生菌数を測定した。洗浄操作に要するSCDLP培地の量は、5 mLとした。SCDLP培地の化学成分組成をTable 3に示す。

2.2.2 シェークフラスコ法

シェークフラスコ法は、供試液中に金属試料を浸漬し、震盪装置の攪拌運動により、供試液と金属表面を強制的に接触させる方法である。振盪接触試験とも呼ばれる。実際の手順を以下に示す。三角フラスコに、濃度0.5 v/v%に希釈調整した無菌のNB培地を200 mL用意した。この溶液に、二代培養後の各微生物の純粋培養液を、1 mL接種したもの供試液とした。一連の操作により、各供試微生物の個体数は、 $2.5\sim 10\times 10^6$ cfu/mLに調整される。この中に各試料 (サイズ: 12.5×12.5 mm) を、フラスコ内に水平、上向きに浸漬した。浸漬中は、 $308\pm 1\text{K}$ の条件で温度制御されたインキュベーター内に保持し、フラスコ口部を培養シリコ栓で密封した。実験期間中は85 rpmの速度で振盪した。4, 8, 16および24時間後の供試液中の生菌数を測定した。実験の模式図をFig. 2に示す。

2.2.3 評価方法

抗菌性評価については、前述したJIS Z 2801の規定を準用した。すなわち、試験開始から24時間経過後の対照系の生菌数と、供試材のある環境に接種した生菌数の差から評価を行った。それは、次式で示される抗菌活性値が2.0以上の場合に“抗菌性が確認される”と判断する⁹⁾ものである。

$$R = [\log(B/A) - \log(C/A)] = [\log(B/C)]$$

ここで、R: 抗菌活性値

A: 対照系に接種直後の生菌数の平均値 (cfu/mL)

B: 対照系に接種してから24時間経過後の生菌数の平均値 (cfu/mL)

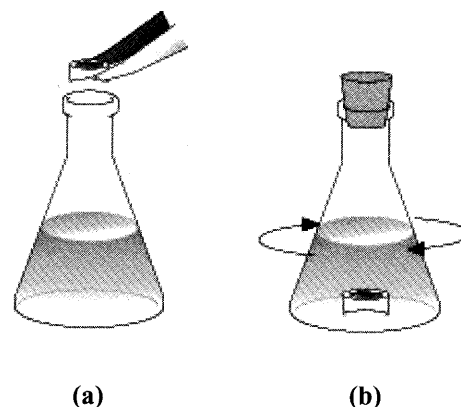


Fig. 2. Schematic illustration of shaking flask method. (a) Inserting test coupon into the flask. (b) Shaking flask at 85 rpm in an incubator.

Table 4. Chemical composition of phosphate buffer solution.

	Component	Amount
A	Na ₂ HPO ₄	9.5g
	Distilled Water	1ℓ
B	KH ₂ HPO ₄	9.1g
	Distilled Water	1ℓ

C: 供試材に接種してから24時間経過後の生菌数の平均値 (cfu/mL)である。

ここで、抗菌活性値が2.0以上の場合とは、縦軸に生菌数を、横軸に時間を示した図に結果をプロットした場合、上式の生菌数が二桁以上減少している場合である。

2.3 生菌数の測定

2.2で示した二つの抗菌性評価試験における生菌数の測定は、いずれも混釈法¹²⁾により実施した。以下に概略を述べる。

フィルム密着法においては洗浄液を、シェークフラスコ法においては浸漬液を、それぞれ測定用のサンプル原液 (以下、原液と記載。) とし、以下のような操作により測定用の試料を得た。まず、原液を1 mL採液し、9 mLのリン酸緩衝液に懸濁する。これにより、1/10の濃度の希釈液を得る。この操作を繰り返し行うことにより、1倍濃度 (原液) ~ 1/10⁶倍濃度までの希釈系列が得られる。これらを対照に、混釈法により生菌数測定用の平板寒天培地を作成した。測定用の試料は、各濃度の微生物懸濁液1 mLを滅菌シャーレに採液し、標準寒天培地 (Standard Agar: 以下SAと表記。) を注ぎ込み、適度に攪拌した後、固化させることにより準備した。固化後の試料は、相対湿度90%以上の条件で、 $308\pm 1\text{K}$ に温度制御されたインキュベーター内に保持した。24~48 h培養後、シャーレ内に形成されたコロニーの個数より、原液1 mL中の生菌数を算定した。リン酸緩衝液の化学成分組成をTable 4に示す。

2.4 二重染色試薬を用いた蛍光顕微鏡観察

金属表面が微生物に与える影響について調べることを目

的に、漬浸後の試料表面に付着した細菌の生死状態を視覚的に確認するための実験を行った。供試細菌 *E. coli* を含む供試液に、シェークフラスコ法で72h漬浸した試料を用いた。実験には、微生物細胞の生死の視覚的確認を可能とする二重染色試薬 (ViaGram Red+Bacterial Gram Stain and Viability Kit (V7023) (Molecular Probes社製)) を使用し、蛍光顕微鏡を使用し観察を行った。なお、観察条件については、生細胞は青色、死細胞は緑色の発色で確認できるように調整した。

2.5 抗菌試験実施後の透過型電子顕微鏡(TEM)観察

金属の抗菌性が、微生物に対しどのように作用し、どのように死滅させるかを抗菌試験実施後の微生物をTEM観察し検討した。供試微生物には *S. aureus* を使用し、フィルム密着法を12h実施後のものを観察した。観察試料の作成手順は、以下のようなものである。フィルムおよび金属試料表面から細菌を洗浄回収し、その溶液を1mL採取し、容量1.5mLのエッペンドルフチューブに入れ、回転速度12000rpmで300sの遠心分離操作を実施した。分離後、チューブから上澄み液のみを除去し、再度、新たに洗浄液1mLを入れ、遠心分離操作をすることにより、最終的に2mLに相当する溶液からの微生物の沈殿層を得た。この沈殿層を樹脂で固化し、その後、ミクロトームで50~60μmの切片を作製し、これを観察に供した。

3. 実験結果

3.1 フィルム密着法

Fig. 3(a)に *S. aureus* を用いた結果を示す。図は、縦軸に生菌数を、横軸に各種金属を示してある。24時間経過後の生菌数は、TiおよびSnの場合、Controlとほぼ同数である。一方、Co、Ni、Cu、Zn、Zr、MoおよびPbの場合、生菌数は4桁ほどの大きな減少を示し、測定限界とされる値にまで到達した。ここで測定限界とは、平板培養法で確認が可能な最小の個体数である。原液中の微生物の個体数が1cfu/mL (cfu: colony forming unit)に満たない場合が測定限界値以下となる。本検討では、0.075mLの供試液原液をもとに、個体数を測定している。このとき、理論的にもとまる1mL中の最小の個体数を測定限界値として設定してある。

Fig. 3(b)は、*E. coli*の結果を示す。24時間経過後の生菌数は、Snの場合、Controlとほぼ同数である。一方、それ以外の金属では、生菌数は著しく減少し、測定限界値にまで到達していた。

以上を総括すると、*S. aureus*の場合では、TiおよびSnを除く全ての金属で、*E. coli*の場合では、Sn以外の全ての金属で抗菌性が確認される結果となった。

CuおよびZnについては、従来より、微生物の増殖を抑制する作用があることが知られていたが、本検討でも、そ

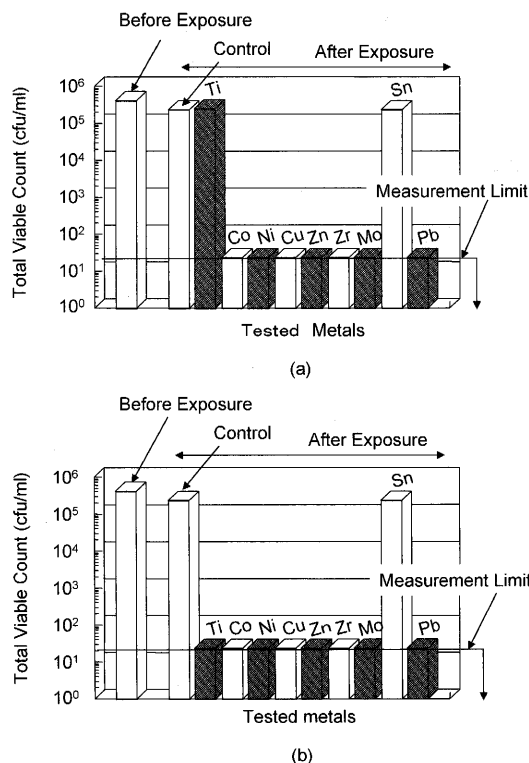


Fig. 3. Experimental result of film contact method. (a) In the case of *Staphylococcus aureus*. (b) In the case of *E. coli*.

の性質が定量的に示された。Tiは、*S. aureus*には抗菌性を示さないが、*E. coli*にはそれを示すという興味深い結果となった。

3.2 シェークフラスコ法

本実験でも試験開始時と一定時間経過した時点での生菌数を測定して、生菌数と時間との関係をもとに抗菌性を評価した。測定時間は、4、8、16および24時間の4つの測定区間を設定した。Fig. 4(a)に *S. aureus* を、Fig. 4(b)に *E. coli* を用いた場合の結果を示す。各測定区間終了時のControlと供試材の生菌数から、抗菌活性の指標となる2桁を超える生菌数の減少を検証したところ、*S. aureus*の場合では試験開始後16hでPbに、*E. coli*の場合では試験開始後8時間でZnに、24hでCoで減少が確認されたが、それ以外については、大きな変動は確認されなかった。これより、*S. aureus*の場合では、Pbに、*E. coli*の場合では、CoとZnで抗菌性が確認される結果となった。実験結果において、フィルム密着法との相関性は確保されておらず、用いた微生物によって抗菌効果を示す材料に違いがある点など興味深い結果となった。

3.3 蛍光顕微鏡観察

Fig. 5は、*E. coli*に対しシェークフラスコ法を72h実施時の観察結果である。Fig. 5(a)は、Znの場合である。表面に付着している細胞は、すべて緑色に発色しており、材料表面の細菌が、高い確率で死滅している様子が確認できる。試薬の染色作用を受けない金属表面は、黒色で示されてい

る。Fig. 5(b)は、Snの場合である。表面に付着した細胞には、緑色に対して青色の発色の存在比が多く、生細胞が高い確率で存在している様子が確認できる。金属表面に付着した微生物の生死の挙動については、金属の抗菌性の有無に対応した顕著な違いが認められる結果となった。すなわち、抗菌性を有する金属では、金属表面に付着した微生物は高い確率で死滅していた。

3.4 透過電子顕微鏡観察

Fig. 6は、*S. aureus* に対しフィルム密着法を24h実施時の観察結果である。Fig. 6(a)は、controlのものである。ほぼ球状の形態を呈しており、細胞膜は2重の明瞭な輪郭が

確認できる。細胞の中央部には核が鮮明に確認され、原形質が細胞膜内部に均一に分布している。正常な状態の細胞の外観と判断される。

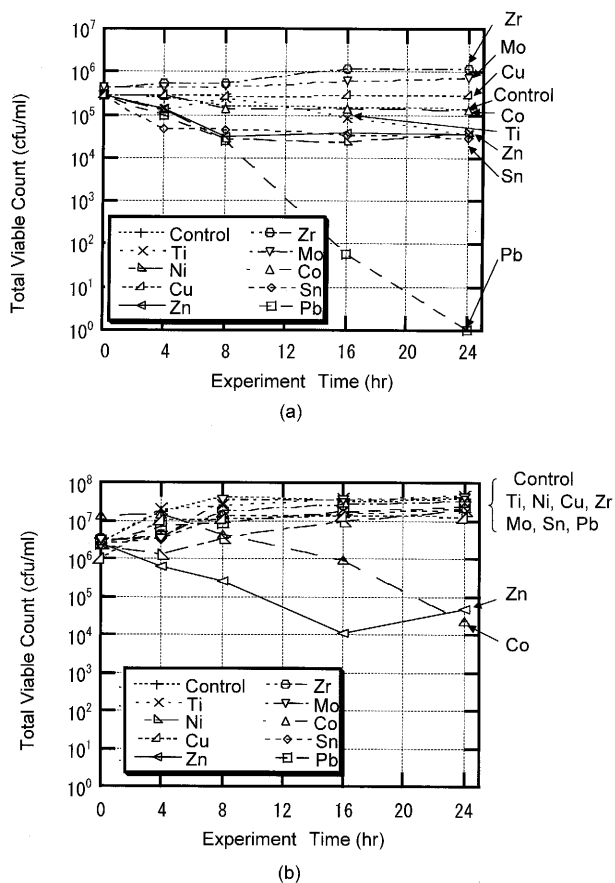


Fig. 4. Valiation of TVC during shake flask method. (a) In the case of *Staphylococcus aureus*. (b) In the case of *Escherichia coli*.

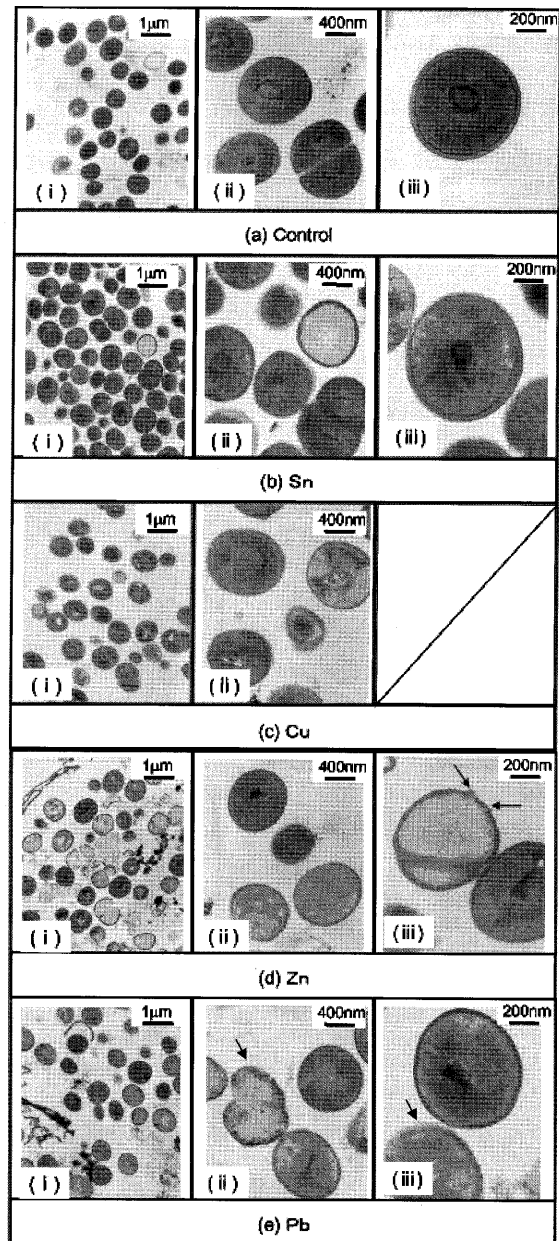


Fig. 6. TEM micro photograph of the shape of *Staphylococcus aureus* after film contact method.

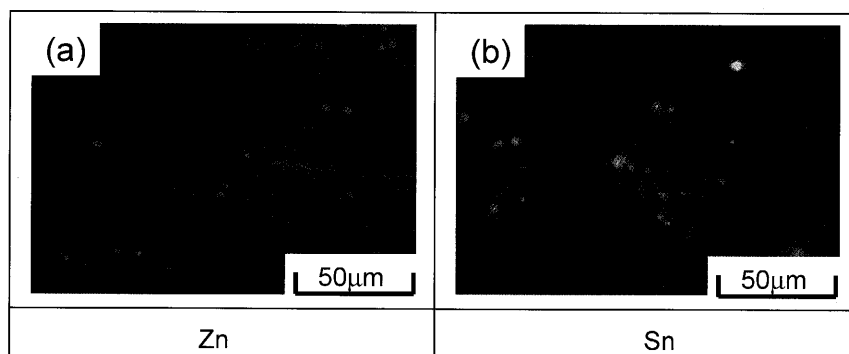


Fig. 5. Photomicrograph of the bacterial cell adhered on test coupon stained with dual staining kit after shaking flask method.

Fig. 6(b)は、抗菌性が確認されなかったSnの観察結果である。外観の特徴は、ほぼcontrolと同様であることが確かめられる。

Fig. 6(c)にCu, Fig. 6(d)にZn, Fig. 6(e)にPbの結果を示す。これらは、いずれも抗菌性が確認された材料である。Cuの場合、(c)(i)に示すように、外観はほぼ球状の形状が維持されているが、原形質には白い領域が形成されている様子が確認される。(c)(ii)は拡大図であるが、細胞膜を形成する輪郭線が不明瞭であり、原形質も不均一な分布を示している。Znの場合、(d)(i)に示すように、形状が崩壊している細胞が一部で確認された。(d)(iii)の矢印は、細胞膜の構造が破壊し、原形質が外部に漏れ出して入る様子である。Pbの場合、(e)(i)に示すように、Znと同様、形状が崩壊している細胞が一部で確認された。拡大図を(e)(ii), (iii)に示す。原形質が白変し、核の存在が不鮮明になっている様子が確認できる。矢印で示したように、原形質に、斑点状の黒い組織が析出している様子や、細胞膜の輪郭線が不鮮明になっている様子が確認された。以上示したように、抗菌性を有する金属が存在する環境に暴露した細胞と、そうでない細胞の外観には顕著な違いが確認される結果が得られた。

4. 考察

4.1 抗菌性発現の機構と抗菌性評価試験の結果検証

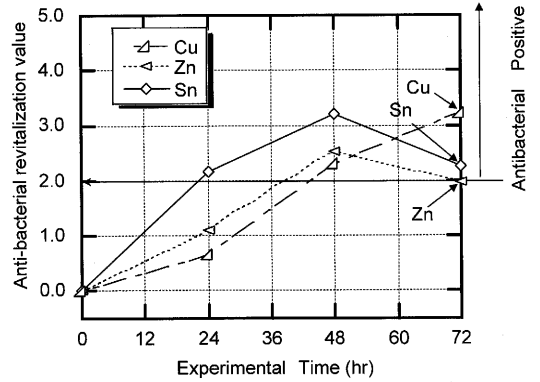
4.1.1 評価方法が結果に及ぼす影響

金属の抗菌性発現の機構は、一般に、次の二つの観点から説明されている¹³⁾。一つは、溶出する金属イオンが有する毒性である。これは、溶出した金属イオンが、微生物主体のたんぱく質と結合し、触媒活性を低下させ、呼吸活動や代謝機能を阻害し、あるいは浸透圧の調整を阻害して微生物を死滅させる効果を生導くというものである。金属イオンが直接的に微生物に作用する機構と言える。もう一つは、溶出した金属イオンの作用でラジカルが副産物として生成され、これらの強い酸化作用により有機物質の分解が促進されるというものである。金属イオンが間接的に微生物に作用する機構と言える。酸素ラジカルの作用が、微生物細胞を破壊、分解する効果については、熊田らによって主張されている¹⁴⁾。これらの抗菌性発現の機構については、現在も様々な研究領域から検証が行われているが、微量物質の分析などに技術的な問題もあり、定量的な解明にまではいたっていない。本研究では、Zn, Sn, Cuの3種類の純金属を対象に、再度シェークフラスコ法を実施し、供試材からのイオンの溶出量と、抗菌効果との関係を調べた。

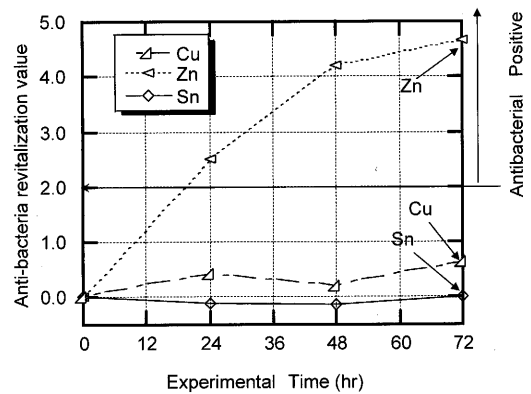
各金属イオンの溶出量をTable 5に示す。数値は、原子吸光分析により、試料の浸漬開始から48h, および72h経過後の溶出量を測定した結果である。ただし、分析に供した溶液は、微生物および栄養源を含まない蒸留水を用いた。

Table 5. Analysis of dissolved ion concentration by atomic absorption spectroscopy after 48 and 72 h exposure.

Sample	48hr			72hr		
	Zn ⁺	Sn ⁺	Cu ²⁺	Zn ⁺	Sn ⁺	Cu ²⁺
Control	<1.0	<1.0	<0.1	<1.0	<1.0	<0.1
Zn	2.41	—	—	4.69	—	—
Sn	—	<1.0	—	—	<1.0	—
Cu	—	—	0.46	—	—	1.06



(a)



(b)

Fig. 7. Anti-bacterial revitalization value of shaking flask method. (a) In the case of *Staphylococcus aureus*. (b) In the case of *Escherichia coli*.

Zn, Cuに関しては、時間経過に伴うイオンの溶出量が増加傾向が確認された。一方、Snに関しては検出にはいたらず、イオンの溶出量が微量だったものと思われる。

Fig. 7に各細菌に対する抗菌活性値と時間との関係を示す。Fig. 7(a)は *S. aureus* の場合で、48hの測定でSnに、48h以降の測定でZn, SnおよびCuの三種類の金属で、抗菌性が確認された。一方、Fig. 7(b)は *E. coli* の場合で、24h以降の測定でZnに確認された。各金属イオンの溶出量と、ここでの結果から、時間経過とともに供試液中に溶出した金属イオンの濃度が上昇し、抗菌性が発現した可能性は大きいと考えられる。しかし、3.3で示した様に、抗菌性のある材料に接触した細菌は高い確率で死滅する傾向が確認されている。我々はこれを、かならずしも水溶液中への抗菌物質の(例えば金属イオン)溶出がなくとも、金属と細菌の接触という物理的作用によって、抗菌効果が発現する

可能性があることを示唆する結果として考えている。今後、金属の抗菌性を評価する上で、溶出イオン以外に、金属表面近傍での細菌との相互作用をどのように考慮していくかが大きな課題になるものと思われる。

以上で示した二つの説とは別に、金属が溶解する際の酸化・還元作用に伴うpHの急激な変動により、微生物の生死が影響を受ける可能性についても指摘されている¹⁵⁾。本実験においても、フィルム密着法実施前後の供試液のpHを測定し、生菌数の変動との関係を検討したところ以下に示すような結果を得ている。なお、測定は、pH試験紙(Advantec社製)を使用し、フィルム装着部の供試液を直接測定することで行った。

Fig. 8(a)が*S. aureus*, Fig. 8(b)が*E. coli*を使用した場合の結果である。実験開始時の供試液は全てpH 6.8程度であるが、Pbの場合のみ、24h後の試験終了時の液性が大きくアルカリに変動している。他の供試材、および対照系の場合では、変化はほとんど確認されず、Pbについてのみ、酸化・還元作用により溶液のpHが変動した可能性が考えられた。すなわち、以下に示すような酸素還元型の反応がおり、生成されたOH⁻の作用で液性がアルカリに変化したものと考えられた。

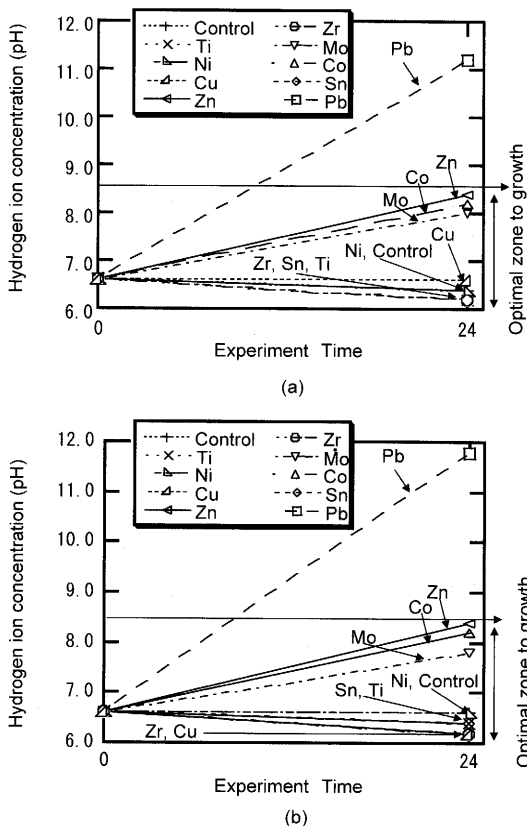
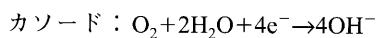
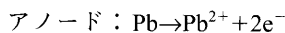


Fig. 8. Variation in hydrogen ion concentration as a function of time. (a) In the case of *Staphylococcus aureus*. (b) In the case of *Escherichia coli*.

ここで、供試微生物とした、*S. aureus*と*E. coli*の生育最適とされるpHに注目すると、その範囲はおよそ6.0~8.5の範囲である。pHは、温度、酸素濃度、栄養源などと同様に生育環境を決定する重要な条件である。今回のようにpHが11以上というレベルにまで極端に変動したケースでは、溶出物質による抗菌性の発現以外に、溶液のアルカリ化という環境の変化によって微生物の成育が阻害された可能性が考えられる。このような材料の溶解に伴う反応は、材料の安定性、環境負荷の軽減という側面から、抗菌の機構としては必ずしも望ましいものではないが、著しい抗菌の効果が示されている。

以上示した、溶出金属イオンの影響、副産物として生成されるラジカルの影響、あるいは金属の溶出にともなうpHの変化の影響は、いずれも微生物環境への金属の溶出にともなっておきる反応である。そのため、試料に対し十分に大きな体積の供試液を用いるシェークフラスコ法では、フィルム密着法と比較して、感度の高い評価ができない可能性は十分に考えられる。すなわちフィルム密着法とシェークフラスコ法で抗菌性を評価した際、双方の結果には必ずしも相関性が確保されなかった点については、二つの評価方法の実験原理の違いが、影響したものと考えられる。

4.1.2 供試微生物の違いが結果に及ぼす影響

実験には、*S. aureus*と*E. coli*という二種類の細菌を使用した。抗菌性能が二種類の細菌の一方にしか確認されない結果も得られている。これについては、二つの細菌の生態学的な違いが影響した可能性が考えられる。

*S. aureus*と*E. coli*は、細胞表面構造の違いに基づき、それぞれ、グラム陽性菌とグラム陰性菌に分類される。グラム陽性菌は、細胞壁のペプチドグリカン層が網目状に、10~50 μmの厚さに発達しており、これを基本とした一般的な構造形態を持つものの総称である。この構造は、浸透圧の変化に柔軟に対応し、細胞の破裂を抑止するのに有効とされる。実際、グラム陽性菌は、物理的ストレス(温度・圧力等の変化)に対する適応性が高いことが知られており、この特性と関連づけて理解されている¹⁶⁾。一方、グラム陰性菌は、ペプチドグリカン層は厚くはないが、化学的に機能分化した幾つかの膜によって、多層で複雑な構造形態を持っているものの総称である。グラム陰性菌は、化学的ストレス(環境の化学的性質の変化)に対する適応性が高いことが知られている¹⁶⁾。

前項で、Pbを供試材とした場合に、pHが大きくアルカリ側にシフトする動きを確認し、環境の急変により、微生物の生菌数が減少した可能性が推察された。このような環境下では、酸素の還元反応がおり、OH⁻が生成され、環境がアルカリ性になろうとする動きが展開されていたものと思われる。シェークフラスコ法実施下では、供試液の体積が供試材に対して十分に大きいため、供試液全体

のpHが大きくアルカリに変動することはなかったが、グラム陽性菌である *S. aureus* は、生成される OH⁻ に対するストレス、すなわち化学的ストレスへの感受性が高いため、生菌数を維持できなかつたものと考えられる。

4.2 各種金属の抗菌性

各種金属の抗菌性を評価し、材料開発を展開するためには、抗菌性の有無以外に、抗菌の効果の優劣の評価を行うことも重要と考えられる。以上の検討から、金属が環境中に存在する場合、その抗菌性は、金属イオンに代表される溶出物質だけではなく、金属表面における微生物との表面反応などの要素の影響もあるものと考えられた。しかし、様々な金属を対象に、それらの溶出イオンの量を制御すること、および溶出イオンによる微生物の死滅と、表面反応による微生物の死滅を別々に評価することは非常に困難と考えられる。ここでは、フィルム密着法実施時の微生物の生菌数減少の挙動と時間との相関をもとに、各種金属の抗菌性の優劣について検討することとした。評価には、供試微生物として *S. aureus* を、供試材には、Co, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Pb の7種類の純金属を使用した。

Fig. 9に試験時間に対する微生物の生菌数の変化を示す。8hの試験時間以内に、全ての条件で生菌数が測定限界とされる値にまで減少する様子が確認された。

また、測定限界に至るまでの生菌数 y と時間 x の関係の傾向は、おおよそではあるが、Fig.10に図示したような直線関係で近似することができた。これらの各傾斜直線の回帰式は、図中に示す $y = M_0 \exp(-M_1 x)$ の指数関数である。ここで、 M_0 は初発菌数、 M_1 は金属の種類に依存する定数である。

この式より、各条件で、微生物の個体数が1/10に減少する際の時間(min)を求めた。この値は、殺菌の性能の指標となる、D値(Decimal Reduction Value)¹⁷⁾ というものである。ここでは、フィルム密着法実施下での各種金属の、抗菌の性能を示す値として推定される。各種金属のD値を示すグラフをFig.11に示す。グラフが低いもの、すなわちD値が小さいものほど抗菌性に優れる材料で、金属間に大きな差があることがわかった。

4.3 抗菌試験実施後の透過型電子顕微鏡(TEM)による細菌の形態変化観察

TEMによる細菌の細胞観察の結果、抗菌性のある金属に曝露したのものには形態的な異変が生じている様子が明らかとなった。その異変とは、細胞の外形、あるいは細胞の膜構造に大きな変化が生ずる以外に、細胞内の構造に分離が発生したり、析出物らしきものの発生という興味深い現象が見られた。このような現象は、金属イオンが微生物の表面に吸着し、その近傍でなんらかの反応をおこしたり、あるいは細胞膜を通過し細胞内に入り込むことによって異変(この場合は、析出物質の形成)を生じさせている可能性を示唆するものである。今後、TEM観察に元素分析の

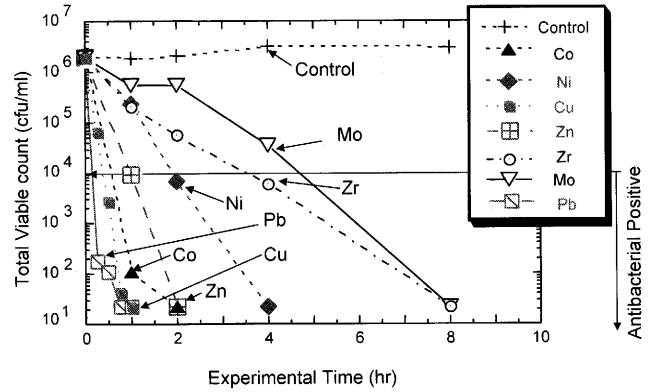


Fig. 9. Valiation of TVC as a function of experimental time.

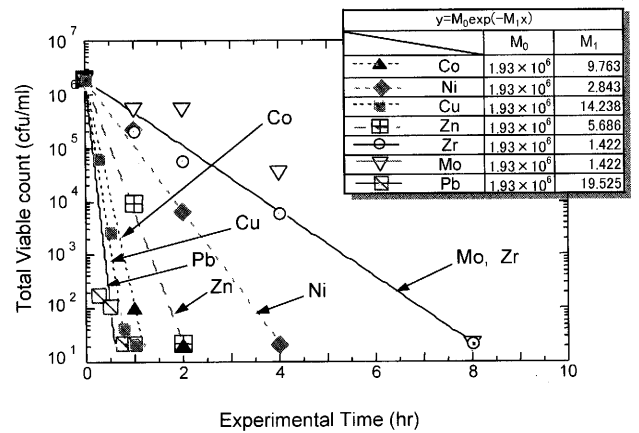


Fig. 10. Valiation of TVC during film contact method in the case of *Staphylococcus*.

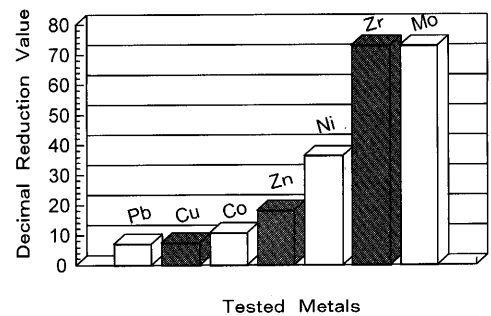


Fig. 11. Decimal reduction value of each tested metals estimated through film contact method.

技術を導入することにより、細胞の表面近傍、あるいは細胞内の金属元素の分布について検証することで、その可能性を検証していきたいと考えている。

5. 結言

(1) フィルム密着法により、Ti, Co, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Sn, Pbの9種の純金属の抗菌性能を評価した結果、*S. aureus* に対してはCo, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Pbの7種の純金属で、*E. coli* に対してはTi, Co, Ni, Cu, Zn, Zr,

Mo, Pbの8種の純金属で抗菌性が確認された。

(2) シェークフラスコ法により, Ti, Co, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Sn, Pbの9種の純金属の抗菌性能を評価した結果, *S. aureus*に対しては, Pbで, *E. coli*に対してはCo, Znで抗菌性能が確認された。

(3) シェークフラスコ法実施時の試料表面への *E. coli* の付着の様子を, 二重染色試薬を用いた蛍光顕微鏡観察により評価したところ, 抗菌性能を有する金属の表面では, 微生物が死滅している様子が顕著に確認された。

(4) フィルム密着法によるCo, Ni, Cu, Zn, Zr, Mo, Pbの7種類の純金属の *S. aureus* に対する抗菌性の優劣を, D値として推定した。これにより, 経験的に知られていた金属の抗菌性を定量的に評価できる可能性を示した。

(5) 抗菌性能を有する金属が存在する環境に暴露された細菌の細胞には損傷, または異変が発現している様子をTEM観察により確認した。

本研究は, 社団法人日本鉄鋼協会 鉄鋼研究振興助成(第14回)を受けたことを付記し感謝する。

微生物細胞の電顕観察結果をもとに, 種々の御討論をいただいた大阪大学大学院医学系研究科教授 杉本 央博士, 抗菌性の評価に関して御討論いただいた日本大学生物資源科学部助手 古川壮一博士に深甚なる謝意を表す。電顕による細胞観察にご協力いただいた大阪大学接合科学研究所技術支援職員 花市敬正氏に謝意を表す。本研究に協

力をいただいた, 大阪大学接合科学研究所 廣谷恭三技術支援職員に謝意を表す。

文 献

- 1) H.Kourai: *Boukin-Boubai (Jpn.)*, **26** (1998), 571.
- 2) Y.Kikuchi: *J. High Temp. Soc. Jpn.*, **2** (2003), 43.
- 3) M.Inoue: *J. Jpn Inst. Light Met.*, **16** (1966), 37.
- 4) Y.Miyano and Y.Kikuchi: *J. Adhes. Soc. (Jpn.)*, **40** (2004), 75.
- 5) S.Suzuki, K.Shiokawa and N.Hiramatsu: *Boukin-Boubai (Jpn.)*, **29** (2001), 433.
- 6) T.Yokota, M.Tochihara, K.Takao, S.Sato and H.Yamashita: *Materia Jpn.*, **40** (2001), 85.
- 7) F.Ishiguro, T.Nishikawa, R.Amano and T.Oyanagi: **38** (1999), 64.
- 8) H.Kanematsu, H.Ikigai, Y.Kikuchi and T.Oki: *Trans. Inst. Met. Finish.*, **83** (2005), 205.
- 9) JIS Z 2801 抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果, (2000), 2, 7, 8.
- 10) 芝崎 勲: 誰でもわかる抗菌の基礎知識, テクノシステム, (1999), 40.
- 11) R.Y.スタニエ, E.A.エーデルバーグ, J.L.イングラム, M.L.ウィーリス 共著 (高橋 甫, 齊藤日向, 手塚泰彦, 水島昭二, 山口英世 共訳): 微生物学入門編, 培風館, (2001), 16, 96, 291.
- 12) 須藤隆一: 環境微生物実験法, 講談社サイエンティフィク, (1194), 265.
- 13) 特許庁 技術分野別特許マップ 化学24, (2001).
- 14) M.Kumada, R.Akada, S.Kobuchi, T.Matsuo, Y.Todoroki and K.Naotori: *J. JCBRA (Jpn.)*, **40** (2001), 126.
- 15) 佐藤佑也: 大阪大学修士論文, (2001), 37.
- 16) K.Isobe: *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.*, **22** (2001), 653.
- 17) 柴崎 勲: 新食品殺菌工学, 光琳, (1983), 80.