

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560656

研究課題名（和文）金属材料の抗菌性およびバイオフィルム生成挙動評価

研究課題名（英文）Evaluation of antibacterial properties and biofilm formation of metal materials

研究代表者

佐藤 嘉洋（ SATO YOSHIHIRO ）

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00170796

研究成果の概要（和文）： 抗菌性金属材料の創製に必要な不可欠な基礎的データを収集することを目的に、21種類の金属元素および23種類の金属イオンの抗菌特性を明らかにした。また、金属材料表面に形成されるバイオフィルム形成挙動を観察した。その結果、銀、銅、コバルト等の金属元素は抗菌性が高く、錫、タンタル、白金等の金属元素は抗菌性を示さないことが分かった。金属イオンによる抗菌試験においても金属元素と同様な傾向の結果が示された。また、抗菌性の高い金属表面ではバイオフィルムの形成が抑制されることが示された。

研究成果の概要（英文）： The antibacterial characteristics of 21 kinds of bulk metals and 23 kinds of metal ions were clarified to obtain the basic data for the creation of antibacterial metallic materials. Moreover, the biofilm formation behavior formed on the metal surfaces was observed. As a result, antibacterial properties of the bulk metals such as silver, copper and cobalt, etc. are high, and it has been understood that tin, tantalum, and platinum doesn't show antibacterial properties. The similar tendency was shown in the antibacterial examination with the metal ions. It was shown that the formation of the biofilm was restricted on the metal surfaces where antibacterial property was high.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：バイオマテリアル、抗菌機能性材料

## 1. 研究開始当初の背景

2007年に日本の「抗菌製品技術協議会」(SIIA)が定める抗菌性評価の試験方法が、ISO(国際標準化機構)の国際規格として承認され、「KOHKIN」(抗菌)のSIIAマークが国際商標になるなど材料の抗菌機能化が国際的にも関心を集めていた。日本では1999年からこのSIIAマーク制度が実施されていたが、マークが表示されているのは、プラスチック、セラミックス等が圧倒的に多く、金属製品にはまだまだ少ない状況であった。しかし、微生物が関与する微生物起腐食(Microbiologically Influenced Corrosion: MIC)と称する場合もある)や食品製造施設や病院における相次ぐ災害が報告されると、抗菌性金属材料の開発への期待も高まっていた。当時は世界的に観て抗菌性金属材料を開発しようとする動きは活発ではなく、比較的開発の進んでいる日本でさえ、民生品の一部に抗菌性金属材料が使われ始めたばかりであった。

また、2000年12月にJIS(日本工業規格)として制定された「抗菌加工製品—試験方法・抗菌効果」(JIS Z 2801)の標準法(フィルム密着法)による各種金属元素の統一的抗菌性評価はほとんどと行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、銀、金、白金等の貴金属を含む20種類以上のバルク金属元素について抗菌性を評価する。この場合、JISの評価基準である材料が菌液と接触後24時間での生菌数の調査だけでなく、24時間以内の各時間による生菌数変化を追跡し、各種金属材料の抗菌特性を総合的に評価する。JIS基準では抗菌性の有無だけが判断されるが、各種金属材料の抗菌特性を詳細に判断するためには、24時間以内の生菌数変化を検討することが特に重要と考えたからである。また、各種金属イオンについても抗菌性を評価する。金属材料が抗菌性を発現する場合にはその金属イオンが作用する、との考えも多いからである。次に、抗菌性はバイオフィルム生成挙動とも密接な関係があると考えられている。菌が付着・増殖する過程で形成されるバイオフィルムは、微生物誘起腐食部位に必ず確認される微生物増殖形態だからである。従って、各種金属元素への微生物付着・増殖挙動の調査を行い、各種金属元素のバイオフィルム生成特性と抗菌性の

関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) バルク金属元素の抗菌特性評価

21種類のバルク金属(Al, Si, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Zr, Nb, Mo, Pd, Ag, Sn, Ta, W, Pb, AuおよびPt)について抗菌特性評価試験を行った。各バルク金属は純度99%以上の純金属である。各供試材料を25×25mmに切断し70%エタノールで滅菌した後、UV(紫外線)照射の下で十分に乾燥させたものを試験片とした。ただし、Mnは板状の供試材を得ることが難しかったためにフレーク上の供試材を約25×25mm敷き詰め樹脂に埋込みを行い、試験片とした。また、20×20mmに切断したポリエチレン製フィルムを、同様の手順で滅菌・乾燥させたものを被覆フィルムとして用いた。試験菌には*Staphylococcus aureus subsp. aureus* NBRC 12732(黄色ブドウ球菌:以下*S. aureus*)と*Escherichia coli* NBRC 3972(大腸菌:以下*E. coli*)を用いた。

試験菌をNB培地に一白金耳移植し、35±1℃で18時間培養後、リン酸緩衝液を用いて、生菌数が1.0~10×10<sup>5</sup>cfu/mlとなるよう調製し、これを試験菌液とした。抗菌特性評価試験にはフィルム密着法を用いた。その概略は以下の通りである。滅菌シャーレ中の試験片表面上に試験菌液0.050mlを滴下し、その上から被覆フィルムを被せる。その後、温度35±1℃、相対湿度90%以上の条件下で一定時間インキュベーター中に保存した。また滅菌シャーレ上に試験菌液を直接接種し、被覆フィルムを被せたものをControlとした。一定時間経過後に試験片上の菌液を5mlのSCDLP培地を用いてフィルムおよび試験片に付着した菌を洗い出した。その後、標準寒天平板培養法により48時間培養後に生菌数の測定を行った。この場合、菌と材料が接して24時間後の菌数の減少により評価する抗菌性の有無の他に、24時間以内での菌数の減少曲線から金属元素の抗菌性の強弱についても評価した。24時間後の試験菌の生菌数がControlの生菌数の1%以下である場合、即ち、99%以上の菌を死滅させる材料は抗菌性を有すると判定した。

### (2) 金属イオンの抗菌特性評価

23種類の金属イオン(Ag, Mg, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb, Fe, Cr, Al, Zr, Mo, Pd, Au, Pt, Sn, V, Ti, Si, Nb,

Ta および W) について抗菌性を評価した。金属イオンには原子吸光分析用金属標準液を用いた。試験菌は、バルク金属の場合と同様に *S. aureus* NBRC 12732 (黄色ブドウ球菌: ) と *E. coli* NBRC 3972 (大腸菌) である。各種金属イオン濃度の試験液に菌数を  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  [cfu/ml] に調整した試験菌液を入れて 24 時間培養後、標準寒天平板培養法により 48 時間培養後にコロニー数が 5 [cfu/ml] 以下になる菌の発育を認めない試験液の最小濃度を最小殺菌濃度とした。この結果、多くの金属イオンでは試験液の pH が試験菌の至適 pH を逸脱し、この pH 変化の影響により菌が死滅すると思われる問題が起こり、各種金属イオンの最小殺菌濃度を測定することができなかった。そこで、金属イオン濃度 4ppm 一定とした試験液における抗菌性定量評価を行った。この試験では、金属イオン濃度 4ppm として 24 時間後の菌数を比較することにより 23 種類の金属イオンの抗菌活性値を相対的に比較することが可能になる。

### (3) バイオフィーム生成挙動観察

試験片はオーステナイト系ステンレス鋼 (SUS304)、オーステナイト系銅含有抗菌加工ステンレス鋼および無酸素銅の 3 種類の金属材料である。試験菌には *Pseudomonas. sp* (シュードモナス菌) を用いた。試験菌を接種した試験溶液中に試験片を 1~7 日間浸漬し、試験片に生成するバイオフィームを観察した。バイオフィームは生菌と死菌を区別して観察した。

## 4. 研究成果

### (1) バルク金属元素の抗菌特性評価

24 時間以内での菌数の減少曲線の時間変化が 1 次の速度論に従うものとして速度定数  $k$  値により各種バルク金属の抗菌特能を評価した。抗菌性があると判断される材料でも 24 時間以内での菌数が急激に減少する材料は抗菌性が高く、緩やかに減少する材料の抗菌性は低いと判断した。

このようにして抗菌特能を評価した結果を Fig.1 (試験菌: *E. coli*) および Fig.2 (試験菌: *S. aureus*) に示す。これによると、大腸菌および黄色ブドウ球菌の両菌に対して抗菌特性がある金属は Al, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Pd, Ag および W の 9 つの金属であり、黄色ブドウ球菌には抗菌性を示さず大腸菌に対してだけ抗菌性を示した金属は Pt お

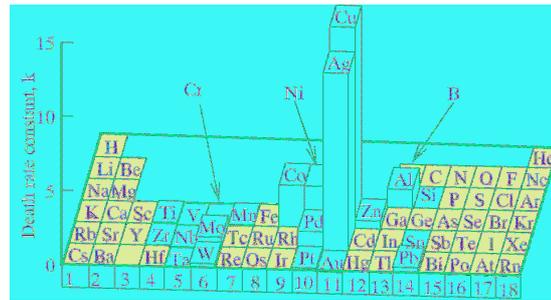


Fig.1 Death rate constants for *E. Cole.*

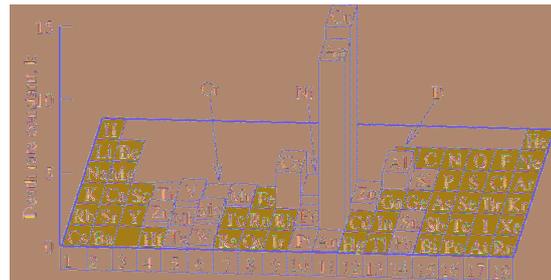


Fig.2 Death rate constants for *S. aureus*.

よび Pb の 2 種類であり、黄色ブドウ球菌に対してだけ抗菌性を示した金属は V および Zr の 2 種類であった。また、抗菌性を示さない金属は Si, Ti, Cr, Mn, Nb, Sn, Ta および Au であった。更に、抗菌性の強い金属は Cu, Ag, Co などであった。以上の結果を周期律表上にまとめて Fig.3 に示す。

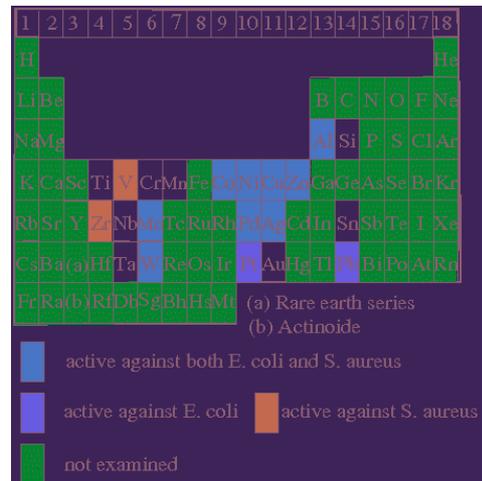


Fig.3 Antibacterial activity of metals evaluated by application of JIS Z 2801.

以上のように新しい JIS 基準に従って統一的に 21 種類のバルク金属元素について抗菌性の有無を明らかにするとともに、各種金属元素の抗菌特性を明らかにした。

(2) 金属イオンの抗菌特性評価

最小殺菌濃度および抗菌活性値に基づいて金属イオンの抗菌性の強弱を比較した。その結果順によれば、試験菌 *E.coli* をとした場合、 $Ag > Cu = Cr > Zn > Pb > Al > Au > Co = Ni > V > Pt > Pd > Mo = Mn = Zr > Fe > W > Sn > Ti = Si = Mg > Nb > Ta$  の順に抗菌性が強く、試験菌を *S.aureus* とした場合  $Ag > Cr > Cu = Pb > Zn > Mn > Ni > Au > Co > Nb > Pd > Zr > Ta > Ti > Fe > Al > Sn > V > Mo > Pt > W > Si > Mg$  の順に抗菌性が強くなった。また、グラム陰性菌 *E.coli* はグラム陽性菌 *S.aureus* に比べて金属イオンの抗菌性に対する高い抵抗性を持つ可能性があることが示された。金属イオンの抗菌性の順位とバルク状純金属の抗菌性の強弱にはある程度の相関が見られ、金属イオンの抗菌性を周期律表に配置したところ、抗菌性の強い金属は第9族から第13族に多く、抗菌性の弱い金属は第4族から第8族に多い傾向があることが示された。

(3) バイオフィーム生成挙動観察

3種類の試験片の抗菌性試験においてオーステナイト系ステンレス鋼 (SUS304) には抗菌性は認められず、銅含有オーステナイト系抗菌加工ステンレス鋼および無酸素銅は抗菌性材料であり、無酸素銅は非常に強い抗菌性があることが分かった。これらの試験片へのバイオフィームの付着面積率を Fig.4 に示す。

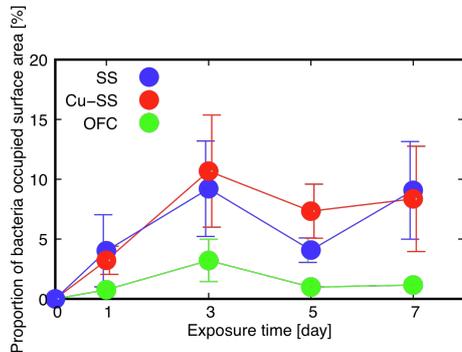


Fig.4 Change in surface area occupied by Bacterial cells.

抗菌性が非常に強い無酸素銅への付着面積率は小さいが、通常のオーステナイト系ステンレス鋼および銅含有オーステナイト系抗菌加工ステンレス鋼へのバイオフィーム付着面積率は同等であることが分かる。そこで、材料表面に付着したバイオフィーム中の菌の生死判別を行った。その結果を Fig.5 に示す。

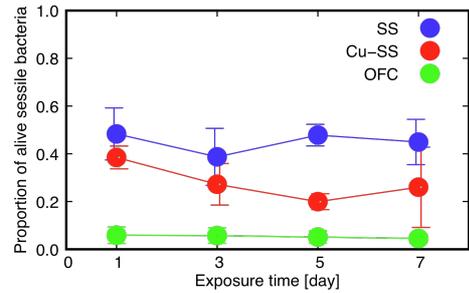


Fig.5 Proportion of alive sessile bacterial cells to total sessile bacterial cells.

この結果より、抗菌性の強い材料ほどバイオフィームは付着しにくく、バイオフィームが付着しても、その活性が低いことが予想される。これらの結果から、材料表面へのバイオフィームの付着挙動と材料の抗菌性との関係をまとめて Fig.6 に示す。

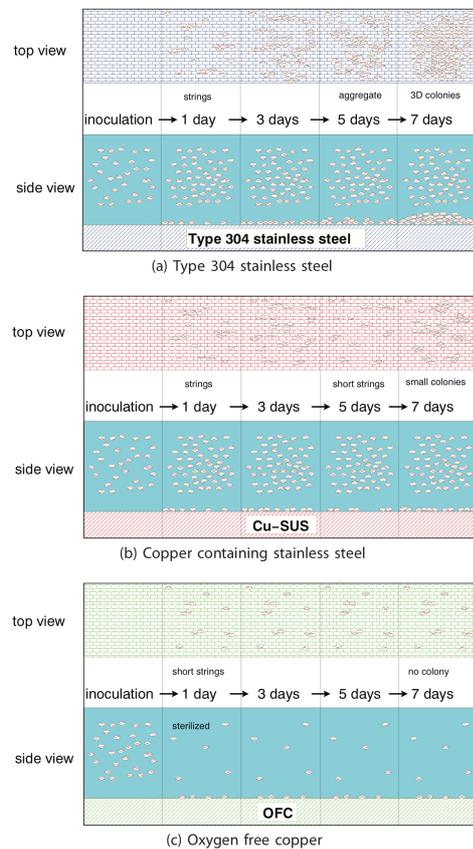


Fig.6 Schematic illustration of experimental results obtained from exposure experiment.

材料表面近くでは、抗菌性の強い材料ほど活性な菌が少なく、材料への付着量も少なくなる。また、抗菌性がある材料では、一度付着しても殺菌される可能性があることを示している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Y. Miyano, K. Kunihiro, S. Kurissery, N. Kanavillil, Y. Sato and Y. Kikuchi: Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 査読有, Vol.26,2010,851-858.
- ② H. Kawakami, K. Kittaka, Y. Sato, Y. Kikuchi: Bacterial adhesion and initiation of biofilms on the surface of copper containing stainless steel, ISIJ International, 査読有, Vol.50,2010,133-138.
- ③ 佐藤嘉洋, 菊地靖志: 微生物による溶接部の腐食とその対策, 溶接技術, 査読無, Vol. 57,2009,112-119.
- ④ 佐藤嘉洋: 金属材料の抗菌性, 高温学会誌, 査読有, Vol.35,2009,121-125.
- ⑤ 宮野泰征, 小山訓裕, 佐藤嘉洋, 菊地靖志: 銅および銅合金の抗菌性評価, 銅と銅合金, 査読有, Vol.48,2009,290-299.
- ⑥ H. Kawakami, K. Yoshida, Y. Nishida, Y. Kikuchi, and Y. Sato: Antibacterial Properties of Metallic Elements for Alloying Evaluated with Application of JIS Z2801:2000, ISIJ International, 査読有, Vol.48,2008,1299-1304.

[学会発表] (計10件)

- ① 堀川直樹, 川上洋司, 菊地靖志, 佐藤嘉洋: 黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する Ag, Cu, Zn, Co, Ni, Mn, Au, Pd, Cr, Ti, Sn, Pb, Al, およびV金属イオンの最小殺菌濃度測定, 日本鉄鋼協会第160回秋季講演大会, 2010年9月26日, 北海道大学.
- ② H. Kawakami, K. Kittaka, Y. Sato and Y. Kikuchi: Bacterial adhesion to copper alloyed antibacterial stainless steel surfaces, The 15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, 2010年7月28日, Newcastle, England.
- ③ 川上洋司, 高岡誠人, 松田孝順, 佐藤嘉洋, 菊地靖志: Ag<sup>+</sup>および Cu<sup>2+</sup>の作用により黄色ブドウ球菌に生じた損傷の透過型電子顕微鏡観察, 日本金属学会 2010年春期大会, 2010年3月29日, 筑波大学.
- ④ H. Kawakami, M. Takaoka, Y. Sato and Y. Kikuchi: Transmission electron microscopic study of silver ions induced damage of *Staphylococcus aureus*, 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009, September 18, 2009, Kobe University.
- ⑤ 川上洋司, 高岡誠人, 佐藤嘉洋, 菊地靖志: 銀イオンの作用により *Staphylococcus*

*aureus*に生じた損傷の透過型電子顕微鏡による観察, 日本防菌防黴学会 第36回年次大会, 009年9月15日, 千里ライフセンター(大阪).

- ⑥ 堀川直樹, 川上洋司, 菊地靖志, 佐藤嘉洋: 黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>および Mn<sup>2+</sup> 金属イオンの最小殺菌濃度測定, 日本鉄鋼協会第158回秋季講演大会, 2009年9月16日, 京都大学.
- ⑦ 川上洋司, 高岡誠人, 佐藤嘉洋, 菊地靖志: 銀イオンの作用により *Staphylococcus aureus*に生じた損傷の透過型電子顕微鏡による観察, 日本鉄鋼協会第158回秋季講演大会, 2009年9月16日, 京都大学.
- ⑧ 宮野泰征, 佐藤嘉洋, 菊地靖志: 銅および銅合金の抗菌性評価, 第48回銅および銅合金技術研究会講演大会, 2008年11月23日, 芝浦工業大学豊洲キャンパス.
- ⑨ 橋高顕治, 川上洋司, 菊地靖志, 佐藤嘉洋: 各種金属表面への微生物付着挙動, 日本鉄鋼協会第156回秋季講演大会, 2008年9月23日, 熊本大学工学部.
- ⑩ Y. Miyano, Y. Sato and Y. Kikuchi: Application of Antibacterial Ability of Metals for Bacterial Control-A Viable Strategy to Control Bacterial Attachment and Microbiologically Influenced Corrosion-, The 14<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, 2008年7月30日, 神戸国際会議場.

[図書] (計2件)

- ① 兼松秀行, 佐藤嘉洋他 21名, 米田出版, 安心・安全・信頼のための抗菌材料, 2010, 154.
- ② 米虫節夫, 佐藤嘉洋他 41名, 工業調査会, 食品安全の正しい常識, 2009, 187.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 嘉洋 (SATO YOSHIHIRO)  
大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 00170796

### (2) 研究分担者

川上 洋司 (KAWAKAMI HIROSHI)  
大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 90305615  
菊地 靖志 (KIKUCHI YASUSHI)  
大阪市立大学・大学院工学研究科・  
客員教授  
研究者番号: 90005405

### (3) 連携研究者

なし