

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23760660
 研究課題名（和文）新規バイオアッセイを適用した金属の抗菌作用の発現及び微生物付着挙動に関する研究
 研究課題名（英文）Research for the generation of antibacterial effect of metal and bacterial ability of its surface based on a newly developed bioassay
 研究代表者
 宮野 泰征（MIYANO YASUYUKI）
 秋田大学・大学院工学資源学研究科・准教授
 研究者番号：60466589

研究成果の概要（和文）：抗菌性金属の質量を膜厚で制御した試験片を作製し、JIS Z 2801 (ISO22196)に基づく抗菌性評価を実施した。このような抗菌性評価により、抗菌性の発現と金属物質の関係を導くための新規バイオアッセイとして提案した。

研究成果の概要（英文）：The antibacterial assay using thin antibacterial metal coated material was carried out by the film contact method based on JIS Z 2801 (ISO22196). The results showed the possibility to detect the correlation between the quantity of metal as antibacterial agent and the antibacterial effectiveness to resist bacterial growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：構造・機能材料

キーワード：抗菌、抗菌性金属、銅、フィルム密着、JIS Z 2801, ISO 22196, バイオフィルム、薄膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 金属の抗菌性は古くから経験的に知られ有効活用されているものもあるが、その機構については未解明の部分も多い。また、金属表面への微生物の付着、バイオフィルム形成に関する金属物性の作用についても十分な詳細な検討も行われていない。

(2) 金属の抗菌作用の有効活用は、薬剤を利用した微生物除去の方法とは異なり、自然環境への負荷が小さいことが予想され、環境保全、高度福祉社会に有効な微生物制御技術と考えられる。また、微生物腐食などの構造材料への微生物影響に対し、将来的に有効な対処手法としても考えられる。

2. 研究の目的

(1) 金属の抗菌作用の機構としては、金属から放出されるイオン、金属表面に発生す

る活性物質の影響が疑われている。両者を定量的に評価するためのバイオアッセイを新規に構築し、機構解明のための研究を展開する。

(2) 金属の抗菌反応が微生物に作用している状況を“その場観察”する実験系を構築し、作用物質の特定、およびに金属表面の微生物挙動を検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗菌性金属薄膜の作製
IBAD (Ion beam assist deposition)法および、アークプラズマ成膜法などの薄膜作製法により、抗菌性金属原子質量を膜厚で制御した試料を作製し、抗菌性評価試験に供した。

(2) 製膜方法

図1にIBAD (Ion beam assist deposition)

装置の模式図を示す。真空チャンバー内の蒸発器内部に設置した蒸着源（抗菌性金属）を電子ビームで加熱し、金属原子をクラスター状に発生させ、発生した金属原子クラスターを Ar イオンビームで加速し、基盤に蒸着させるプロセスの概略を表している。膜厚（製膜量）の調整は蒸発器上部のシャッターの開閉によって実施した。本実験では、見かけ上の膜厚（製膜量）をチャンバー右上部に設置した膜厚計で監視しながら、基盤表面の膜厚に不均一な分布生じないように、基盤ホルダーに搭載した回転機構を作動させながら照射・製膜を実施した。表 1 に銅を製膜した際の条件を示す。

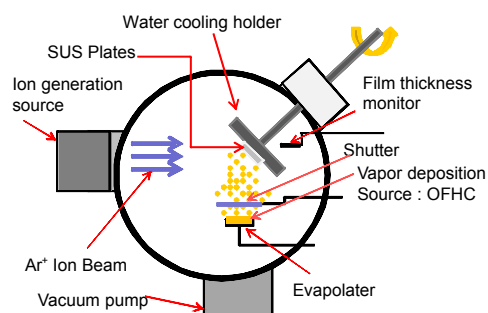


図 1. IBAD 装置の模式図

表 1. 銅を 304 鋼に製膜した際の主な条件

Condition	A	B	C
Monitored film thickness (KÅ)	0.5	0.1	0.05
Chamber pressure (Pa)	2.3×10^{-4}		
Ion source	Ar ⁺		
Current density (A/cm ²)	500~600		
Accelerating voltage (kV)	1		

(3) 製膜試料表面の分析

製膜試料表面をよび製膜層中の元素を、X線光電子分光装置 (X-ray photoelectron spectroscopy : XPS) により分析した。この際、Ar スパッタリングを 2nm/min のレートで実施しながら、最表面から深さ方向に向かう元素プロファイルを取得した。一方、製膜試料の膜厚については、蛍光 X 線元素分析装置 (XRF; X-ray Fluorescence Analysis) を使用し、以下に示す方法で数値を取得した。X 線強度より各試料の銅原子の質量を求め、その値と銅の原子密度から膜厚を算定した。

(4) 抗菌性評価

JIS Z 2801 に示されるフィルム密着法に準拠して行った。二代培養後の微生物の純粋培養液 (個体数 $2.5 \sim 9.0 \times 10^8$ cfu/ml に調整) を、マイクロピペットで正確に 0.075ml 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。フィルム密着操作完了後、試料を滅菌シャーレに封

入し、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 ± 1 K とした。24 時間保持後、試料表面、およびフィルム表面を SCDLP 培地で洗浄し、洗浄液中の生菌数を測定した。

抗菌性評価は、前述した JIS Z 2801 の規定を準用し 24 時間経過後の対象系の生菌数と、供試材のある環境に接種した生菌数の差を対象に検討した。これは、次式で示される抗菌活性値が 2.0 以上の場合を“抗菌性が確認される”と判断する方法である。

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

R: 抗菌活性値

A: 対照系に接種直後の生菌数 (cfu/ml)

B: 対照系 24 時間経過後の生菌数 (cfu/ml)

C: 供試材系で 24 時間経過後の生菌 (cfu/ml)

ここで、抗菌活性値が 2.0 以上の場合とは、縦軸に生菌数を対数で示した場合、対照系と比較して生菌数が二桁以上減少している場合である。

(5) 金属表面における微生物挙動観察

共焦点レーザー顕微鏡を使用し、作製した金属薄膜試料表面、各種金属 (抗菌性金属を含む) 表面の微生物付着挙動、バイオフィーム形成挙動の評価を行った。

4. 研究成果

(1) XPS による成膜試料の膜厚、元素分析
図 2. に基盤表面の薄膜解析結果を示す。縦軸は薄膜構成元素の組成を原子百分率で示したもので、横軸は基盤最表面からの深さを示している。製膜後の試料の保管には万全を期したが、いずれの最表面近傍にも外部環境から汚損に由来すると思われる C の付着と思われる領域の存在が確認された。しかし、膜厚計の読み値が最大の条件 Condition A では $10 \text{ \AA} \sim 170 \text{ \AA}$ にかけては Cu が支配的となっている領域が確認できる (図 2(a))。一方、膜厚計の読み値が最小の条件 Condition C では、基盤上に銅の存在が支配的となる領域が全く確認されなかった (図 2(b))。

(2) XRF による製膜試料の膜厚測定

蛍光 X 線元素分析法において X 線強度の解析から得られた、単位面積当たりの銅原子の質量は、Condition A で、 $15.203 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、Condition B で $7.292 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、Condition C で $4.406 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と求められた。ここで求められた単位面積当たりの銅原子の質量に対し、銅の原子密度 $8.94 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ を考慮することで、それぞれの膜厚は Condition A で約 210 \AA 、Condition B で 80 \AA 、Condition C で 50 \AA と算定され、XPS で求められた数値と異なる結果となった。

(3) XPS、XRF の解析結果からの膜厚導出
各条件で作製された試料について、XPS と XRF

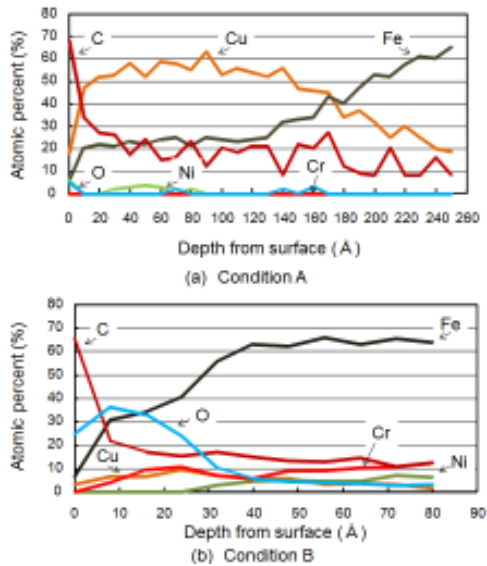


図 2. 銅成膜試料の XPS 結果

のそれぞれの解析で求められた膜厚が異なる結果となった理由について以下のような検討を行った。図 3(a) は蛍光 X 線元素分析法で得られた X 線強度と膜厚の関係を示したグラフである。表 1 で示した各製膜条件で作製された膜厚を示すプロットは、X 線の強度と吸収の関係を示す関数 (式 1) 上に配置されている。

$$I_F = -\frac{If}{\alpha}(1 - e^{-\alpha x}) \dots (式 1)$$

IF: X 線強度、 α : 吸収係数、I: 入射 X 線の強度、f: 蛍光収率、x: 膜厚

しかし、ここでの X 線強度は、基盤に使用した SUS304 鋼が合金元素として含んでいた銅の影響を受けているものと考えられる。実際、基盤に使用した SUS304 鋼の化学組成は表 1 に示すように 0.294mass% 程度の銅を含んでいた。そこで、理論式 (式 2) より、基盤中の銅の X 線強度を考慮した場合の X 線強度と吸収の関係を示す図 3(b) に示した

$$I_F^B = I_F + 0.034e^{-\alpha x} \dots (式 2)$$

基盤を考慮した X 線強度、X 線強度、 α : 吸収係数

この理論式より導かれる、製膜中の銅の X 線強度と銅製膜試料の膜厚の関係より、Condition A では 165 Å、Condition C では 0 Å と求められ、XPS の結果と極めて良い相関が確認された。また、Condition B における膜厚は 25 Å と求められた。以上の結果は、本検討で採用した製膜方法により、SUS304 基盤上に、Å オーダーの銅の薄膜が形成されていたことを示しており、本手法を最適化することにより、抗菌作用物質である銅原子の質量を、基盤表面上に精度良く制御できる可能性が確認された。

(4) フィルム密着法による抗菌性評価

図 4 は、フィルム密着法により実施した抗菌性評価試験の結果である。本検討では、SUS304 鋼と最も製膜量の少ないことが予想される Condition C 以外のすべての試料において、著しい抗菌性が確認された。すなわち、二種類の製膜試料と無酸素銅においては、8.0 以上の抗菌活性値が確認された。

JIS Z 2801 が規定するフィルム密着法は、固体表面に微生物培養液を接触させ、それをフィルムで覆うことでできる抗菌性評価空間を形成し、その空間内における微生物の生死を評価する方法である。

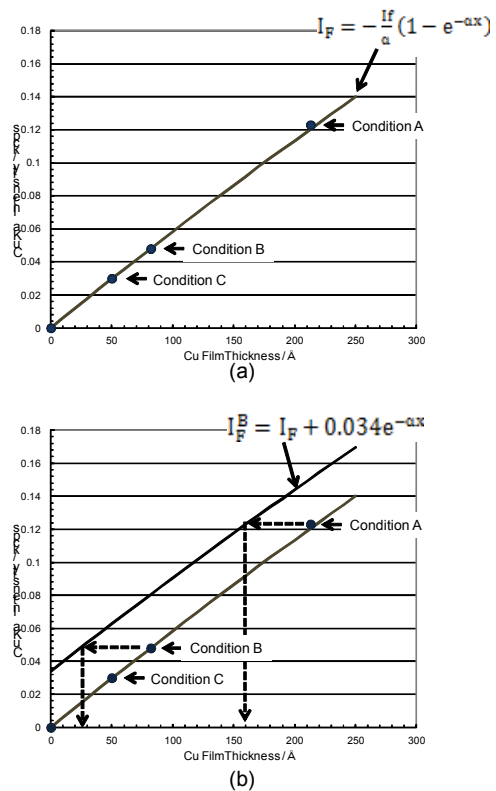
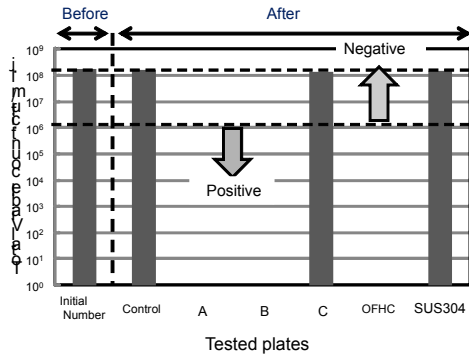


図 3. XPS, XRF 各定量値と膜厚の関係

通常、フィルム密着法を利用した抗菌性評価試験においては、バルク材料、合金材料、およびメッキ材料などの様々な材料が抗菌性評価のための対象として使用される。この場合、抗菌性の有無の決定が第一義的な課題となるのであるが、同様の実験系で抗菌評価を実施した際の、評価時間と微生物の個体数の減少から抗菌性の強度について検討した結果も報告されている。一方、一般にフィルム密着法において、抗菌性評価空間内の抗菌作用物質の質量を詳細に検討した報告例は極めて少ないと考えられる。抗菌作用物質として金属イオンを対象に、フィルム密着法に準拠した実験系で微生物細胞の増殖挙動を検討した報告がされている。したがって、

溶出していない金属原子の質量を対象とした抗菌評価の実験系を構築し、抗菌作用物質となる金属原子の質量と微生物細胞の増殖挙動を検討した例は本報が最初と考えられる。微小な抗菌性評価空間の微生物培養液中への金属（抗菌作用物質）の溶出量を定量することは極めて難しいと考えられるが、水溶液に接する金属固体表面から溶出する金属



原子の質量を定量することは、金属の抗菌機

図4. 抗菌性評価試験結果

構を解明する上で極めて重要な課題と考えられる。

本報で提案した薄膜試料を対象とした抗菌性評価の実験系は、抗菌性評価空間内に投入される固体金属原子の質量をÅオーダーの膜厚で制御することで、抗菌性評価空間内での抗菌作用物質の質量と抗菌性の発現の相関を厳密に議論することを目的に考案したものである。バルク材などを対象とした評価実験系では、フィルム密着法で規定される微小空間内への金属の極めて微量な溶出量を定量することは実験原理的にも極めて難しい。しかし、本研究が提案する手法は、物質質量を膜厚制御した試料を実験対象として使用することで、フィルム密着法で規定される微小空間内の抗菌作用物質の総量を規定してしまうことを特徴とする。すなわち、製膜層中に存在する金属原子の質量を、溶出限界量と仮定することが可能となり、これより金属の抗菌作用の発現に必要な固体金属原子の質量の閾値を導出できると考えられる。この閾値は、金属イオンの濃度と微生物活性との相関を示した MBC、MIC とは異なる、固体金属原子の質量と微生物活性の相関を示す数値として、金属原子の抗菌強度の指標と位置付けられるのではないかと考えている。

本検討における抗菌性評価空間は、サイズ 23×23mm のフィルムの被覆下にある体積 0.075ml の供試液と、その供試液が直接接触する供試材表面（サイズ 23mm×23mm = 529mm²）によって構成される。この空間内の供試材表面には、Condition A では 165Å、Condition B では 25Å の銅原子が薄膜とし

て存在している。この時の X 線強度と単位面積当たりの銅原子の質量の比の相関から、各製膜中の銅原子の質量は、Condition A で 77.8582μg、Condition B で 11.7967μg と算定される。本研究が提案する評価方法の実験原理とは、これらの数値をフィルム密着法で規定される微小空間内の抗菌作用物質の総量として規定するものである。本検討においては、フィルム直下の領域（529mm²）に存在する銅の物質質量は、それぞれ Condition A で 0.1465μg、Condition B で 0.0225μg と求めることができる。以下では、ここで求められた銅原子の質量を、抗菌性評価空間へ溶出可能な最大値として推定し、本研究が提案する評価方法に基づき考察を進める。

抗菌性評価空間中水溶液の体積は 0.075ml である。この時、仮に試料表面の銅薄膜が全て溶液中に全て溶出したと仮定した場合、水溶液中に溶解した銅イオンの濃度は Condition A で 1035ppm、Condition B で 159ppm と推定される。これらの数値は、MIC: 最小発育阻止濃度 (E. coli の視認できる発育を阻止する銅イオンの最小濃度) 39ppm よりはやや大きい、MBC: 最小殺菌濃度 (E. coli を完全に死滅させることのできる銅イオンの最小濃度) 2000ppm 強よりは小さな数値である。殺菌、抗菌の概念には諸説ありここでは言及しないが、24 時間の抗菌試験で試料表面に製膜された銅原子が全て溶解したとは考えにくく、銅の溶出以外の機構が抗菌性の発現に作用した可能性が強く示唆される。このような製膜試料を使用した抗菌評価の実験手法は、抗菌性の発現に必要な最小の固体原子の質量を検討するための新規のバイオアッセイとして、固体金属の抗菌機構を解明に活かされるものと考えられる。

(5) 微生物付着挙動観察

上記実験系を対象に、上記実験系を対象としたその場観察に関する予備的検討を実施した。図5に観察結果を示す。

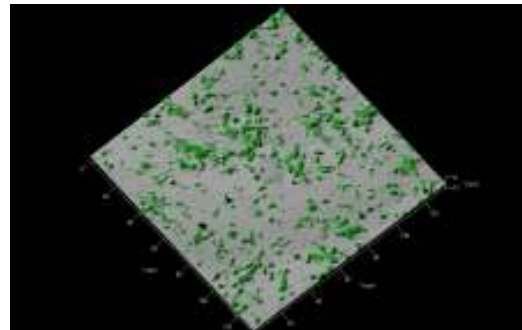


図5. 微生物付着挙動観察結果

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2件)

(1) 宮野泰征、抗菌性金属を利用したバイオフィルム抑制技術、査読無、バイオマテリアル—生体材料、Vol. 29, No. 4, 2012、pp. 259—265

(2) 宮野泰征、本城国明、神谷修、木内正人、膜厚制御型試料を利用した銅の抗菌性発現最小量評価法の開発、査読有、日本銅学会誌「銅と銅合金」、Vol. 51, No. 1, 2013、pp. 168—174

〔学会発表〕(計4件)

○宮野泰征, 本城国明, 古川壮一, 森永康, 荻原博和, 神谷修, 千葉隆, 木内正人
「膜厚制御型金属表面を適用した新規バイオアッセイによる銅の抗菌機構の解明」
日本防菌防黴学会 第38回年次大会
千里ライフサイエンスセンター(2011. 08. 24)

○宮野泰征, 本城国明, 神谷修, 木内正人
「銅薄膜材を使用した銅の抗菌機能に関する基礎的研究」
日本銅学会(銅及び銅合金技術研究会) 第51回全国大会
京都テルサ(2011. 11. 16)

○Yasuyuki Miyano, Kuniaki Honjo, Takashi Chiba, Osamu Kamiya, Masato Kiuchi
“Development of new bioassay for the antibacterial mechanism of metallic copper using Cu thin coating plates”
The 8th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing/JSPP2012
東大寺カルチャーセンター(2012. 01. 15)

○Yasuyuki Miyano, Kuniaki Honjo, Osamu Kamiya, Masato Kiuchi
“New Bioassay to Evaluate the Minimum Antibacterial Mass of Metallic Copper Using Cu Thin Coating”
The 7th International Conference on Materials Engineering for Resources (ICMR2013AKITA)
秋田ビューホテル(2013. 11. 20)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
現在準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 泰征 (MIYANO YASUYUKI)
秋田大学・大学院工学資源学研究科・准教授
研究者番号：60466589

(2) 研究分担者

該当者無し

(3) 連携研究者

木内 正人 (KIUCHI MASATO)
独立行政法人産業技術総合研究所・ナノテクノロジー研究部門・主任研究員
研究者番号：50356862

本城 国明 (HONJO KUNIAKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・ナノテクノロジー研究部門・招聘研究員
研究者番号：50356862

野村 暢彦 (NOMURA NOBUHIKO)
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：60292520

古川 壮一 (FURUKAWA SOUICHI)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：40339289

神谷 修 (KAMIYA OSAMU)
秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授
研究者番号：60113891