

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13628

研究課題名(和文) 銀ナノ粒子による抗微生物機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of antimicrobial mechanism by silver nanoparticles

研究代表者

清野 智史 (Seino, Satoshi)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：90432517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：銀ナノ粒子の抗微生物機構の解明に向けて、材料学的解析法を利用してアプローチした。抗微生物試験環境における銀化学状態の変化を検討する為、含硫黄物質であるシステイン、メチオニン、グルタチオンを模擬物質として、XANES解析を利用した検討を行った。その結果、高濃度の含硫黄物質との混合により、銀ナノ粒子の化学状態が金属状態から変化し硫黄と結合した状態となることが明らかとなった。この化学状態の変化が、使用環境により抗微生物性が失活する要因であることが強く示唆された。モデル菌種として大腸菌を用い、抗菌処理された菌のSEM観察を行った。その結果、銀ナノ粒子の作用機構は膜破壊ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial mechanism of silver nanoparticles were discussed by using material analysis methods. The XAFS analysis technique was used to investigate the change in the chemical state of silver nanoparticles under antimicrobial test environments. Sulfur-containing substances such as cysteine, methionine and glutathione was used as model compounds. It was revealed that chemical state of the silver nanoparticles changed from the metal to form sulfur bonded state under high concentration of sulfur-containing substances. It was strongly suggested that this change in the chemical state is a factor to inactivate antimicrobial properties. SEM observation of antibacterial treated bacteria was carried out using E-coli as the model bacterial species. It was revealed that the action mechanism of silver nanoparticles was not membrane destruction.

研究分野：ナノ粒子工学

キーワード：銀ナノ粒子 抗微生物

1. 研究開始当初の背景

銀が抗菌・抗カビ効果を示すことは古くから知られており、近年は抗ウイルス剤としての利用も検討されている。種々の銀イオン系抗微生物剤が開発されているが、化学的安定性や耐光性が低いという課題があった。金属銀ナノ粒子はこれらの課題を克服できることから着目されている。特に、抗菌剤としての利用についての検討事例は多く、その抗菌機構に関する研究も数多くなされている。有力な説として『金属銀の表面が一部酸化』され、『酸化銀の一部が溶液中で溶解し銀イオンとして作用する』との機構である。一方で、カビやウイルスを対象とした場合、その作用機構に関する報告は殆ど無く、菌に対する作用と同様として議論されている場合が多い。

2. 研究の目的

金属銀ナノ粒子の抗微生物機構は、従来研究では化学的・微生物学的観点からなされてきたが、未だ不明な点が多い。

本申請では、銀ナノ粒子の抗微生物機能の解明に向け、材料学的解析手法を利用したアプローチを試みる。銀ナノ粒子の微生物への作用位置（微生物表面 and/or 微生物内部）を、電子顕微鏡観察により特定する。抗微生物試験中の銀化学状態の変化を、シンクロトロン放射光を用いた XANES 解析により追跡する。金属銀ナノ粒子の粒子径や濃度をパラメータとして試験を実施し、適用する微生物種の生物学的特徴を踏まえて、金属銀ナノ粒子による作用機構についての知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試験に供する銀ナノ粒子の合成は、申請者らが開発した放射線還元法により行う。銀イオン水溶液に医療器具の滅菌等に利用されているガンマ線もしくは加速器電子線を照射する。水の放射線分解により生成する還元種により銀イオンが還元され、金属銀ナノ粒子が生成する。ICP 化学分析により銀量を定量する。透過型電子顕微鏡 (TEM) により銀ナノ粒子径を評価する。XANES 解析により金属銀であることを確認する。

(2) 銀ナノ粒子担持繊維の抗微生物試験は、原則として ISO 規格に準拠して実施する。非病原性大腸菌をモデル菌種として用い、バッファー液種・濃度、作用時間・温度等といった試験条件をパラメータとして検討を行う。

(3) XANES 測定はあいちシンクロトロンでの Ag-L_{III} 端測定により行う。バッファー液種、菌液との接触時間、銀ナノ粒子量や粒子径をパラメータとして評価を進める。

(4) 銀ナノ粒子により殺傷された菌の SEM 観察による形状観察により、機構解明にむけ

た情報を得る。

4. 研究成果

(1) 合成した銀ナノ粒子

合成した銀ナノ粒子の TEM 像を図 1 に示す。平均粒径約 5nm の銀ナノ粒子が得られた。水分散コロイドの UV-vis 吸光度分析結果を図 2 に示す。波長 400 nm 近傍に、金属銀の特徴である表面プラズモンピークが見られている。合成 1 か月後にもスペクトルに変化はなく、極めて安定なコロイドを得ることができた。この銀コロイドは合成時に還元剤等を使用しておらず、金属銀ナノ粒子の抗菌性のみを評価することができると言える。この銀ナノ粒子を用いて、以降の検討を実施した。

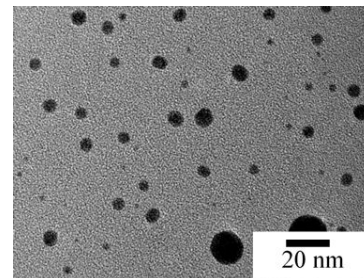


図 1 合成した銀ナノ粒子の TEM 像

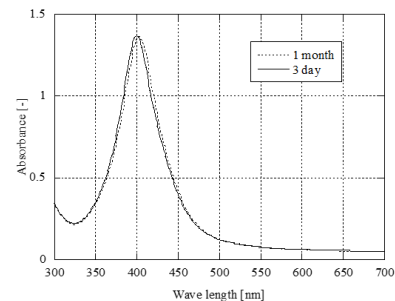


図 2 合成した銀コロイドの吸光度分析

(2) 含硫黄物質との相互作用の検討

金属銀ナノ粒子は高い抗菌性を有するが、特定の使用条件下ではその性能が失活する場合があった。その要因の解明にむけ、試験環境に存在する含硫黄分子との相互作用を XANES 解析により評価した。以下、システインとの相互作用を評価した結果を例として示す。

あいちシンクロトロンのビームライン BL6N1 を利用した Ag-L_{III} 端の XANES 解析により行った。硝酸銀水溶液とシステイン水溶液を混合することで得た白色沈殿 (Ag-cys) を標準試料として用いた。金属銀ナノ粒子と抗微生物試験環境中の -SH 基との相互作用を模擬するため、金属銀コロイドとシステイン水溶液を混合する試験を行った。一定時間静置した際の UV-vis スペクトルの経時変化を追跡し、また長時間静置した後に得られた沈殿生成物の XANES 解析を行い、その化学状態を評価した。

金属銀コロイドとシステインの混合水溶液

の UV-vis スペクトルは、混合後数時間では殆ど変化しない。しかし、1 日後には金属銀ナノ粒子の表面プラズモンピークがほぼ消失しており、さらに数日間静置すると沈殿物 (Ag NPs + Cys) が析出したことから、金属銀ナノ粒子が何らかの化学状態変化を受けたものと考えられる。

この沈殿物中の Ag-L_{III} 端の XANES スペクトルを図 3 に示す。比較の為、金属銀ナノ粒子 (Ag Metal NPs)、硝酸銀 (AgNO₃)、及び硝酸銀とシステインを混合して生成した沈殿物 (Ag-Cys) のスペクトルを示している。Ag-Cys のスペクトルは、銀イオンとシステイン中の-SH 基が相互作用し結合した状態を反映していると考えられる。Ag NPs + Cys と Ag-Cys のスペクトルが一致していることから、高濃度の-SH 基が存在する条件下において金属銀ナノ粒子はほぼ全て失われ-SH 基と結合した状態となることが示唆された。

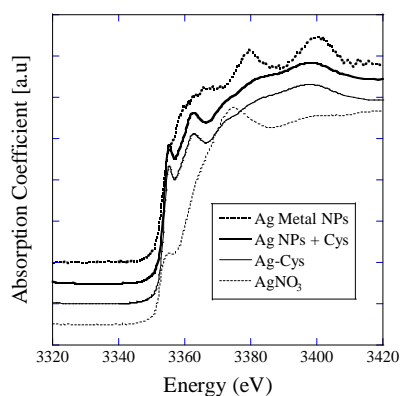


図 3 銀とシステインを混合して得た試料の Ag-L_{III} 端 XANES スペクトル

金属銀ナノ粒子が-SH 基と相互作用することは S-K 端の XANES 解析からも支持されており、またシステイン以外の含硫黄物質でも同様の結果が得られている。これらの結果は、試験環境中に存在する含硫黄物質により金属銀表面が喪失することを意味している。

微生物を培養するために用いられる培地液濃度が過剰に濃い場合、金属銀ナノ粒子の抗菌性が失われることを実験的に確かめた。このような培地条件下において、銀の化学状態が変化することも XANES 解析により確認されている。これらの結果から、培地液に含まれる含硫黄物質により金属銀ナノ粒子の化学状態が変化し、抗菌性の失活に繋がったものと考えられる。

(3) 抗菌試験後の菌の形態変化

試験条件を適宜調整し生菌数の経時変化を追跡できる実験系を確立した後、銀ナノ粒子で処理された大腸菌の SEM 観察を行った。銀ナノ粒子の処理前後において菌の形態や表面状態に変化は見られなかった。比較対象として実施した硝酸銀での試験でも同様の結

果が得られた。また作用機構が既知の抗菌処理剤 (アルコール、次亜塩素酸等) では、それぞれの機構に対応した菌形態変化が観察されている。これらの結果から、金属銀ナノ粒子の作用機構は膜破壊ではないことが確かめられた。

(4) 結論

従来は生物学的見地から行われていた金属銀ナノ粒子の抗菌作用機構について、材料学的見地から新たな情報を得ることができた。これらの解析手法を援用することで、カビやウイルスといった微生物への作用機構の議論にも活用できると考える。

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 4 件)

Satoshi Seino, Yasuo Imoto, Tomoya Kosaka, Tomoki Nishida, Takashi Nakagawa, Takao A. Yamamoto, Antiviral Activity of Silver Nanoparticles Immobilized onto Textile Fabrics Synthesized by Radiochemical Process, MRS Advances, 査読有, Vol. 1, 2016, 705-710.

DOI: 10.1557/adv.2016.43

Yasuo Imoto, Satoshi Seino, Takashi Nakagawa, Takao A. Yamamoto, Comparison of Quantitative Antifungal Testing Methods for Textile Fabrics, Biocontrol Science, 査読有, 22, 2017, 47-53.

DOI: <https://doi.org/10.4265/bio.22.47>

Yasuo Imoto, Satoshi Seino, Takashi Nakagawa, Takao A. Yamamoto, Quantitative Methods for Testing Antiviral Activities of Textile Fabrics, Journal of Antimicrobial Agents, 査読有, Vol.3, 2017, 1000146.

DOI: 10.4172/2472-1212.1000146

清野智史, 金属銀ナノ粒子の抗菌作用機構, ケミカルエンジニアリング, 査読無, Vol.63 (2018) 293-298.

[学会発表](計 5 件)

清野智史, 大久保雄司, 久貝潤一郎, 中川貴, 山本孝夫, 放射線還元法による貴金属ナノ粒子担持材料の合成, 日本金属学会 2017 年秋季 (第 161 回) 講演大会 (招待講演)

豊田桃子, 清野智史, 射本康夫, 西田倫希, 中嶋絵里, 中川貴, 山本孝夫, 銀ナノ粒子の抗菌作用機構の検討, ナノ学会第 15 回大会, 2017 年 5 月

清野智史, 豊田桃子, 射本康夫, 中川貴, 山本孝夫, 抗微生物試験環境にお

ける銀ナノ粒子の化学状態，第 20 回 XAFS 討論会，2017 年 8 月
射本康夫，西田倫希，清野智史，中川貴，山本孝夫，滅菌、消毒処理による細菌の形態変化観察，日本防菌防黴学会第 44 回年次大会，2017 年 9 月
清野智史，豊田桃子，射本康夫，中川貴，山本孝夫，抗菌試験環境における銀ナノ粒子の化学状態，第 7 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム，2018 年 1 月

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 智史 (SEINO, Satoshi)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：9 0 4 3 2 5 1 7

(4) 研究協力者

射本 康夫 (IMOTO, Yasuo)

西田 倫希 (NISHIDA, Tomoki)