

凝集・合金化処理を利用した抗菌性複合化銀粒子の検討

松 延 剛*¹、服 部 悟*²

[要 旨]

マイクロバブル法で作製した銀ナノ粒子の形状やサイズを凝集や複合化（Ag以外の粒子と混合）等により、粒子状態が変化した時の抗菌効果について検討を行った。凝集により、粒子同士が結合してサイズが大きくなると、粒子単独よりも抗菌効果が向上していた。また、抗菌効果が現れない少量の銀粒子と他の粒子を混ぜ合わせ凝集させると、単独では抗菌効果が現れにくい粒子でも混合させることで、抗菌効果が確認され、凝集粒子の表面状態の違いにより、抗菌効果が変化する可能性があることが分かった。

1 はじめに

昨年度研究¹⁾では、液中パルスプラズマ法（パルスグロー放電）^{2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9)}で、作製した粒径の異なる金属ナノ粒子（Agナノ粒子を中心として10種類）の抗菌効果についての検討を行い、粒子単体では、粒径サイズが小さいほど抗菌効果が高いわけではなく、抗菌効果を高める最適な粒子サイズが存在する可能性があること（図1を参照）や、粒子が凝集すると、抗菌効果が向上する可能性があり、複合化により、形状やサイズ等が変化することで抗菌効果が変わる可能性があることがわかった。

本年度研究では、銀ナノ粒子の形状やサイズを凝集化や複合化（合金化）等により変化させ、粒子状態が変化した時の抗菌効果について研究を行った。

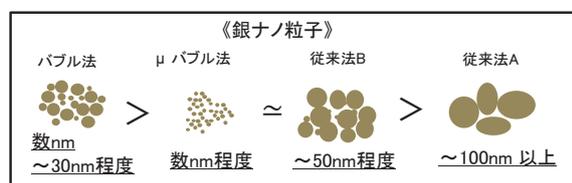


図1 粒子サイズによる抗菌効果の比較

* 1 基盤技術課 主任研究員
(現 応用技術課 主任研究員)

* 2 基盤技術課 主任研究員

2 実験方法

2. 1 実験に使用したナノ粒子について

液中プラズマ法では、電極近辺でジュール熱により暖められた水が気化し、発生した気泡中でプラズマを作り出すことで使用した電極金属のナノ粒子が製造される。バブルを利用した方法では、電極近辺に外部からバブルを導入した状態でプラズマを作り出し、従来よりも小さなナノ粒子が作製される⁸⁾。使用した金属は、Ag、Au、Cu、Al、Fe、Ni、Ti、Ta、Zn、Pt であり、主にバブル法やマイクロバブル法で作製した粒径が小さいナノ粒子での実験を中心に行った。なお、濃縮⁷⁾を行った粒子、作製した粒子にクエン酸処理を施して、粒径サイズを大きくした粒子、そして、バブル法を用いずに作製した従来法での粒子（アンモニア水を使用した場合：従来法A、炭酸水を使用した場合：従来法B）についても実験を行った。また、数 mm 径のバブルを利用した場合をバブル法、数十 μm 径～数百 nm 径のマイクロバブルを利用した場合をマイクロ（μ）バブル法と標記した。

2. 2 液体状態での確認方法について

図2に、液体状態での菌繁殖の確認方法について示した。確認方法は、昨年度と同様で、手に付着した菌を採取し、培養液で菌を繁殖させる。繁

殖した菌数は、約 4×10^8 個/1mL であった。後述する JIS 法 (JIS Z 2801) で使用する菌数の 1000 倍程度の高濃度液である。培養した菌 (1 μ L) を採取し、ナノ粒子液 (50 μ L) と共に培養液 (450 μ L) に加え、1 日程度、恒温槽 (37 度保温) で菌の繁殖を行った。菌の繁殖の有無は、目視にて行った。液に濁りが観測されない場合は、菌の繁殖が「無」とし、濁りが観測されれば、菌の繁殖が「有」とした。

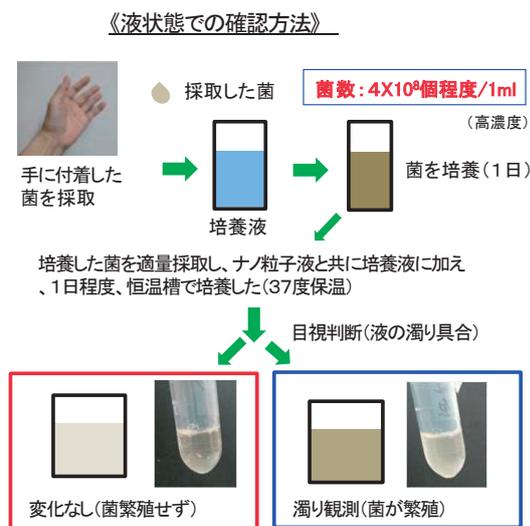


図2 液状態での菌繁殖の確認方法

2. 3 凝集効果の検討方法について

凝集効果の検討では、「熱による凝集」、「クエン酸による化学的な凝集」、そして「時間経過による凝集」の3つの効果について検討を行った (図3を参照)。また、「クエン酸による化学的な凝集」では、凝集を更に進行させた場合についての検討も行った。凝集を行った粒子の抗菌効果

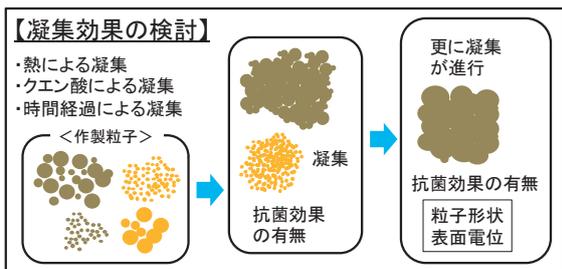


図3 凝集効果の確認方法

以外に、粒子の形状変化や表面電位についての確認も行った。

2. 4 複合化効果の検討方法について

複合化効果の検討では、抗菌効果が一番高かったバブル法で作製した銀粒子とその他のナノ粒子 (銀 (μ バブル法、従来法A、従来法B)、Al、Fe、Cu、Au、Ta、Ti、Ni) を、混合量を変えて複合化させ、抗菌効果の確認を行った (図4を参照)。銀粒子 (バブル法) の量は、昨年度の抗菌効果試験で使用した量の 1/10 とし、他の粒子の量を 9/10 として混合させた。なお、混合した両粒子ともに、単独では、高濃度液での抗菌効果は、確認されなかった。また、複合化を行った粒子の抗菌効果以外に、粒子の形状変化や表面電位についての確認も行った。

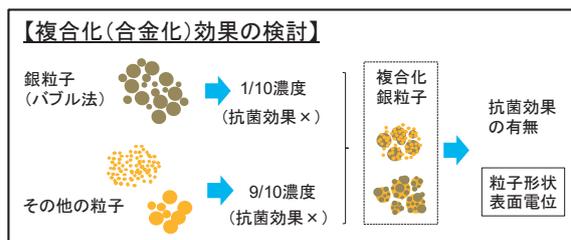


図4 複合化効果の確認方法

2. 5 粒子形状の確認方法について

粒子形状の確認方法として、FE オージェ電子分光分析装置 (PHI-700 : アルバック・ファイ製) による、SEM 観察および、元素分析を行った。

2. 6 表面電位の確認方法について

粒子の表面電位測定は、走査型プローブ顕微鏡 (SPM-9700HT : 島津製作所製) の表面電位 (KFM) モードにて行った。表面電位モードでは、導電性のカンチレバーに交流電気信号を印可し、試料表面とカンチレバーとの間に働く静電気力を検出することにより、試料表面の電位を測定することができる。この方法では、試料表面の凹凸像と電位

像を同時に観察することができるため、試料表面形状に対する電位分布を知ることができる。

2. 7 JIS 法での確認方法について

JIS 法では、抗菌加工品と無加工品の 24 時間培養後の細菌の数を比較し、抗菌加工品の細菌の増殖割合が無加工品の 100 分の 1 以下（抗菌活性値 2 以上）である場合、その製品に抗菌効果があると規定している（JIS Z 2801）。JIS 法に準拠した方法でのナノ粒子液の抗菌効果については、外部機関で実験を行った。試験液 1 mL に 10^6 の菌液 0.1 mL を接種し、25 °C で作用させ経時的に生菌数を測定した。初期菌数は、リン酸緩衝液（1/15 M pH7.2）1 mL に菌液 0.1 mL 接種しこれより生菌数を測定した。なお、使用した菌は、黄色ブドウ球菌および大腸菌である。

3 結果及び考察

3. 1 銀ナノ粒子の抗菌メカニズムについて

様々な実験で銀ナノ粒子の抗菌効果は、確認されているが、抗菌メカニズムに関する確定した定説は、まだ確立されていない。現在までに考えられている銀ナノ粒子の抗菌メカニズムとしては、以下のようなものがある¹⁾。

(1) 溶出した銀イオンの効果

- ① 水中の溶存酸素が銀イオンの触媒作用で活性酸素（ $\cdot\text{OH}$ ）に変わり、活性酸素が細菌の外皮（細胞膜）に穴を開けることで、細菌の細胞質が流出し、菌を死滅させる。
- ② 細菌の内部に浸入し、栄養を取り入れる酵素の働きを停止させ、細菌の生命活動に障害を起し、菌を死滅させる。
- ③ 浸入した銀イオンが、タンパク質等に結合し、細胞分裂（増殖）の機能が停止し、菌を死滅させる。

(2) 表面電位の効果

負電荷を帯びている細菌の表面に、正電荷を帯びている銀ナノ粒子が吸着し細胞膜を破壊して菌を死滅させる。

(3) 細胞内への浸入効果

細胞内に銀ナノ粒子が入り込み、タンパク質等に結合し、細胞の機能を停止させ、菌を死滅させる。

ナノ粒子では、(1)、(2)、(3)の説が複合的に関わっていると考えられている。凝集した粒子や複合化した粒子での抗菌メカニズムとしては、粒子サイズから考えて、(1)や(2)の効果が大きく関わっていると予想される。

3. 2 凝集状態での菌繁殖について

図 5、6、7、8 に凝集状態での菌繁殖の結果を示した。菌の繁殖が見られなかった場合を（無）、菌の繁殖が見られた場合を（有）と標記した。

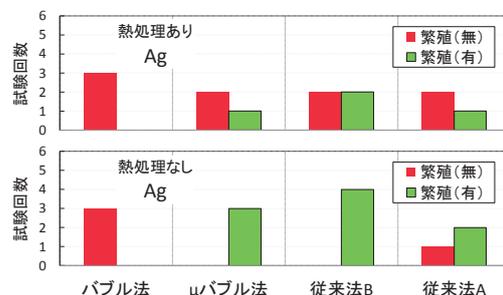


図5 4種の銀ナノ粒子の凝集効果

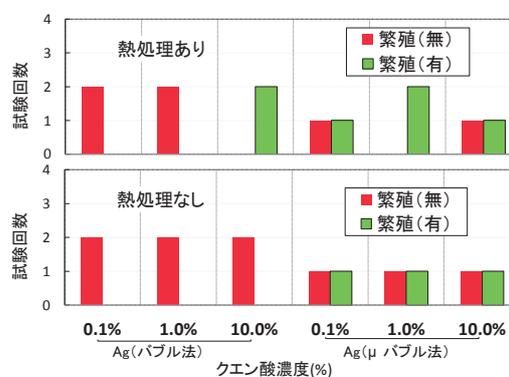


図6 クエン酸による凝集効果

図5では、熱処理前後での4種の銀ナノ粒子の菌繁殖の結果を示した。図6では、クエン酸による化学凝集(1 mLのナノ粒子液(銀粒子(バブル法、μバブル法)に、10 μLのクエン酸(0.1%、1%、10%)を添加)を行い、熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。図7では、濃度変化させた銀ナノ粒子液(バブル法、μバブル法、従来法B)の熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。図8では、銀粒子以外の粒子(Al、Fe、Cu、Au、Ta、Ti、Ni、Zn、Pt)の熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。なお、図5、6、7、8の縦軸は、菌繁殖の試験回数とした。

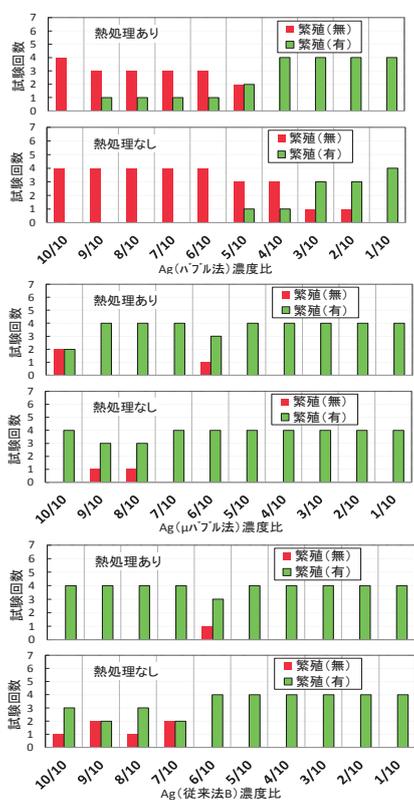


図7 濃度変化による凝集効果

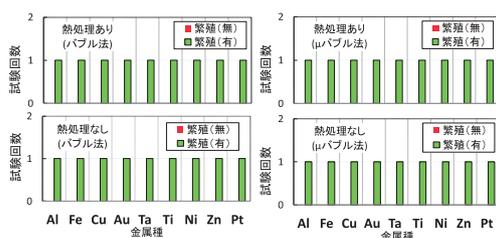


図8 他の粒子での凝集効果

凝集状態での菌繁殖についてまとめると以下の通りである。

- (1) 熱処理により、粒径が大きい粒子でも抗菌効果が向上する可能性がある。
- (2) 凝集が進みすぎると、抗菌効果が低下してしまう可能性がある。
- (3) 濃度の違いで、抗菌効果に違いが現れた。
- (4) 濃度によっては、熱処理により、抗菌効果を低下させてしまう可能性がある。
- (5) 粒径・濃度の違いで、熱処理により、抗菌効果を低下または向上させることがある。
- (6) 他のナノ粒子(単品)では、熱処理の効果が確認されなかった。

3.3 複合化状態での菌繁殖について

図9、10、11、12に複合化状態での菌繁殖の結果を示した。凝集の場合と同様に、菌の繁殖が見られなかった場合を(無)、菌の繁殖が見られた場合を(有)と標記した。図9では、粒子作製後にすぐに混合させた場合の時間経過による熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。図10では、時間経過後に混合させた場合の時間経過による熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。図11では、濃度変化させて混合化した場合の熱処理前後での菌繁殖の結果を示した。図12では、単品同士を熱処理した後混合した場合の菌繁殖の結果を示した。

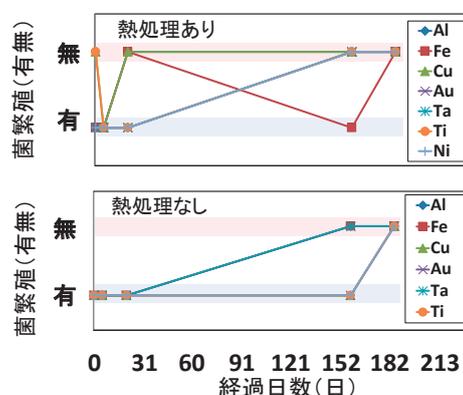


図9 粒子作製後すぐに混合した場合の複合化効果

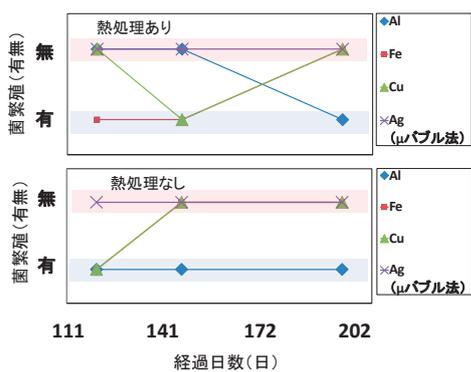


図10 時間経過後に混合した場合の複合化効果

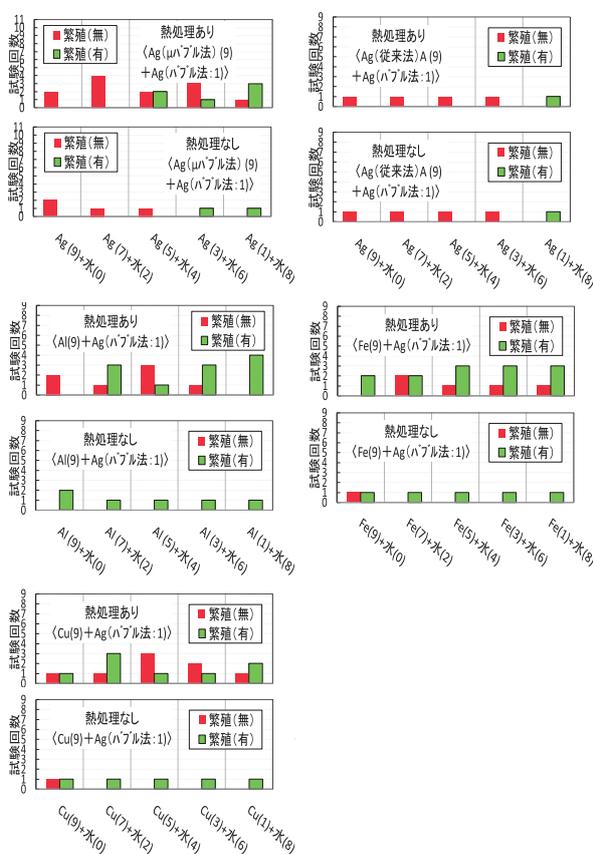


図11 濃度変化させて混合した場合の複合化効果

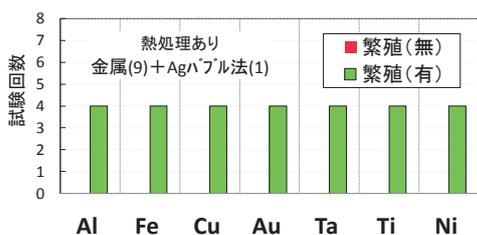


図12 混合条件を変えた場合の複合化効果

複合化状態での菌の繁殖についてまとめると以下の通りである。

- (1) 単品では抗菌効果が現れなくても、銀粒子（バブル法）を少し加えることで、抗菌効果が発現し、時間経過、熱処理により、抗菌効果が向上する可能性がある。
- (2) 混合する濃度により、熱処理を加えることで、抗菌効果が変化した。
- (3) 複合化の時間経過の違いにより、凝集状態が変化した、抗菌効果も変化した。
- (4) 熱処理も、混ぜ合わせ方法（単品同士を熱処理後に混ぜ合わせる）が異なると、抗菌効果が低下する可能性がある。

3. 4 凝集化による粒子形状変化について

図13、14、15に凝集化状態での形状変化（SEM像）を示した。図中の記号（○：繁殖無、×：繁殖有、△：若干繁殖有）は菌繁殖の状態を示している。

図13では、粒子作製後、時間（数か月）が経過した場合のSEM像を示した。図14では、熱処理を行った場合のSEM像を示した。図15では、クエン酸添加後のSEM像を示した。

凝集化による粒子形状変化についてまとめると以下の通りである。

- (1) 時間経過、熱処理、クエン酸添加で、粒子同士が結合し、粒子の大きさが増大した。
- (2) 粒径の大きな粒子でも凝集が進むと、抗菌効果が現れる可能性がある。
- (3) 凝集が進行すると、凝集化粒子の凹凸度合いが増えていた。
- (4) 凝集が進行し大きさが増大しすぎると、抗菌効果が低下した。

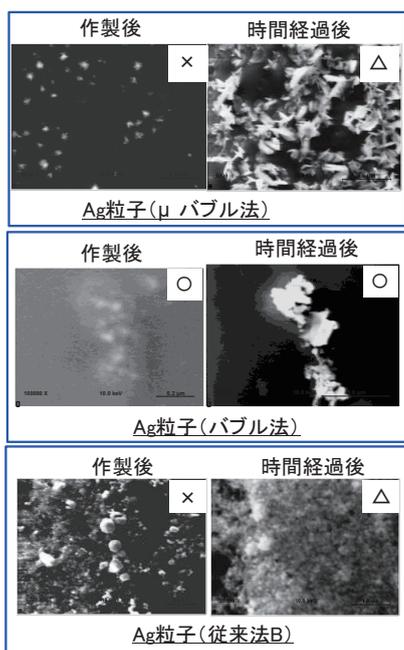


図13 時間経過後の粒子の形状変化

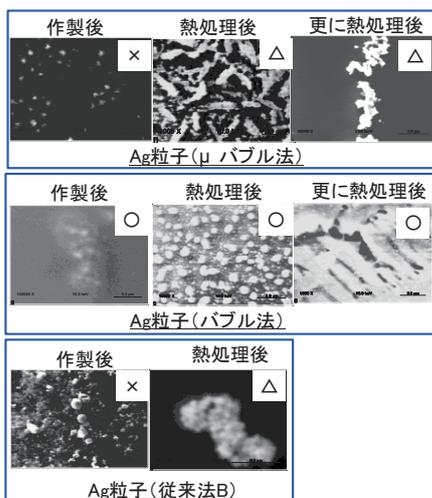


図14 熱処理後の粒子の形状変化

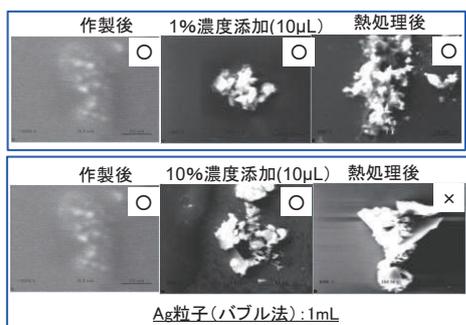


図15 クエン酸添加後の粒子の形状変化

3. 5 複合化による粒子形状変化について

図16、17に複合化状態での形状変化 (SEM像、元素分布像) を示した。なお、図中の記号 (○: 繁殖無、×: 繁殖有) は菌繁殖の状態を示している。

図16では、銀粒子 (μバブル法、従来法A、従来法B) に少量の銀粒子 (バブル法) を複合化させた場合の熱処理前後での形状変化 (SEM像、元素分布像) を示した。図17では、他の粒子 (Al、Fe、Cu) に少量の銀粒子 (バブル法) を複合化させた場合の熱処理前後での形状変化 (SEM像、元素分布像) を示した。

複合化による粒子形状変化についてまとめると以下の通りである。

- (1) 複合化後に熱処理をすることで、小さな粒子同士が結合し合い、表面の凹凸度合いが、増大していた。
 - (2) 熱処理後では、粒径の小さい他の粒子 (Al、Fe、Cu) が粒径の大きな銀粒子に多く付着し、表面の凹凸度合いが、増大していた。
- 凝集化や複合化により、小さな粒子が凝集することで、表面の凹凸度合いが増大し、抗菌効果に影響を与えている可能性があることがわかった。

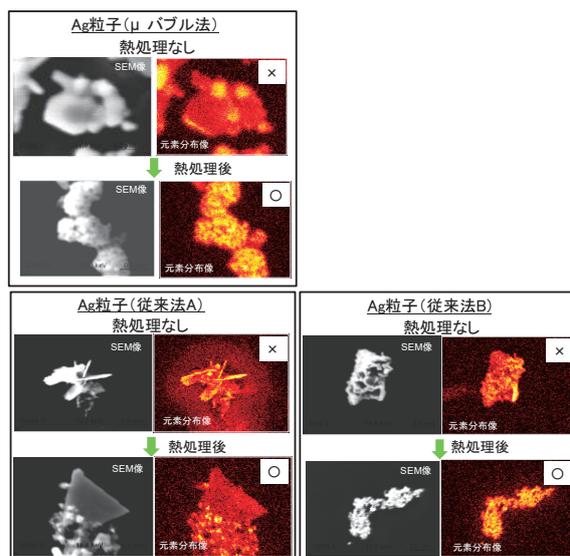


図16 銀粒子を複合化した場合の形状変化

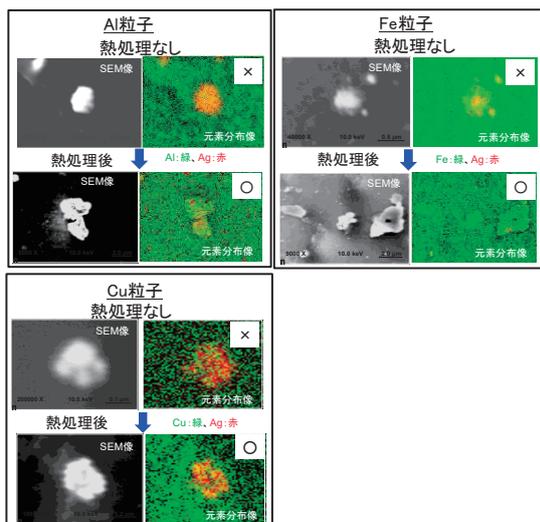


図17 他の粒子を複合化した場合の形状変化

3.6 粒子の表面電位変化について

図18に粒子の表面電位の測定結果を示した。図18では、銀粒子(μバブル法)単品の熱処理前後、他の粒子(Al、Fe、Cu)に銀粒子(バブル法)を少量混ぜ合わせた複合化粒子の表面形状に対する電位分布を示している。

表面電位測定についてまとめると以下の通りである。

- (1) 表面の凹凸状態により、表面電位に差が観測された。
- (2) 形状が小さいほど、表面電位差の変化が大きかった。

表面電位測定により、形状が変化すると表面電位に影響を及ぼす可能性があることがわかった。

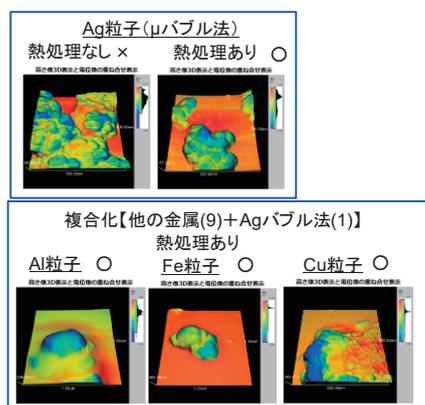


図18 粒子の表面電位の測定結果

3.7 JIS法での菌繁殖結果について

図19、20にJIS法(JIS Z 2801)準拠で実験したナノ粒子の菌繁殖の結果を示した。図19では、大腸菌と黄色ブドウ球菌、図20では、黄色ブドウ球菌での菌繁殖結果である。凝集化や複合化の実験で使用した液の1/100~1/1000濃度に薄めたナノ粒子液を使用してJIS法準拠の実験を行った。JIS法では、抗菌加工品の細菌の増殖割合が無加工品の100分の1以下(抗菌活性値2以上)である場合、その製品に抗菌効果があると規定している。今回の実験では、1/100~1/1000濃度に薄めて実験を行っているが、低濃度液でも抗菌効果があることがわかった。

JIS法で確認した菌繁殖についてまとめると以下の通りである。

- (1) 作製法の違いで、抗菌効果に差が見られた。
- (2) 菌種により、効果が異なっていた。
- (3) AlやCuの単品のナノ粒子でも抗菌効果が確認された。
- (4) 実験に使用したナノ粒子の全てで、ブランクよりも菌数が減少していた。
- (5) 熱処理や複合化により抗菌効果に変化していた。

JIS法で使用した菌数は、凝集化や複合化で使用した菌数よりも低濃度であり、高濃度で得られた結果と一部異なる傾向が現れていた。低濃度と

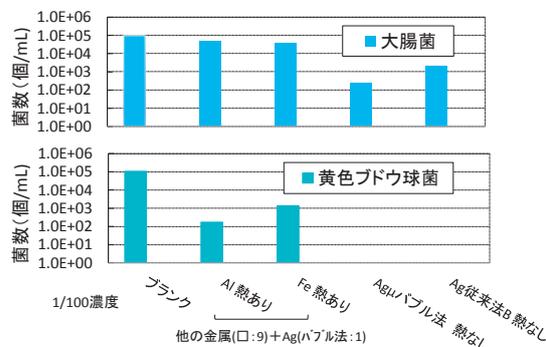


図19 JIS法での菌繁殖結果 (大腸菌、黄色ブドウ球菌)

高濃度で抗菌メカニズムが若干異なる可能性も考えられ、試験数を増やすなどの検討が今後の課題である。

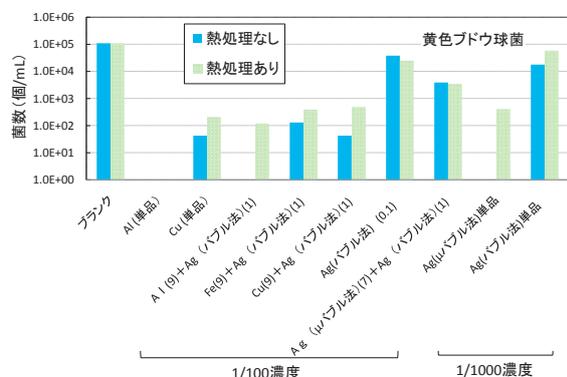


図 20 JIS 法での菌繁殖結果 (黄色ブドウ球菌)

4 まとめ

液中パルスプラズマ法で作製した銀ナノ粒子の形状やサイズを凝集化や複合化 (合金化) 等により変化させ、粒子状態が変化した時の抗菌効果について検討した結果、以下の知見が得られた。

- (1) 小さな粒子の凝集で、粒子の大きさが増大 (表面の凹凸が増加) し、抗菌効果を向上させる可能性があることがわかった。
- (2) 粒子の複合化後に熱処理をすることで、凹凸度合いが増大し、抗菌効果を向上させる可能性があることがわかった。

最後に、粒子が時間の経過により沈殿した試料での抗菌試験を行った。数 nm 以上の粒子が沈殿した液の上澄み液 (数 nm 未満の粒子とイオンを含む液) と、沈殿した粒子を攪拌させて大部分のナノ粒子とイオンが含まれた液の抗菌試験を行うと、上澄み液のほうが、抗菌特性が悪いことが確認できた。抗菌メカニズムでは、イオンの効果もあるが、ナノ粒子の場合、イオンの効果以外にもナノ粒子その物の効果 (表面凹凸の存在) も、今回の凝集や複合化の実験結果を踏まえて考えると、抗菌効果に寄与していると考えられる。

今後、産業利用を進めるにあたっては、「抗菌

効果と形状」の詳細な調査や「凹凸部の表面電位」の微細部観察などの継続した研究が必要と考えている。

(謝 辞)

本研究を行うにあたり、様々なご助言を頂いた (株) 栗田製作所の杉原氏、ファイテン (株) の赤野氏に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 46, 8-13 (2018)
- 2) 高井治: ソリューションプラズマによるナノ粒子合成と界面制御, 粉砕, No. 51, P30 (2008)
- 3) O.Takai et.al., Plasma Fusion Res, Vol. 84, No. 10, 674(2008)
- 4) 成島 隆, 吉岡 隆幸, 宮崎 英機, 菅 育正, 佐藤 進, 米澤 徹: マイクロ波液中プラズマ法による銅微粒子の合成, 日本金属学会誌第 76 巻第 4 号, P229(2012)
- 5) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 41, 32-37 (2013)
- 6) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 42, 39-43 (2014)
- 7) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 43, 32-37 (2015)
- 8) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 44, 7-13 (2016)
- 9) 松延 剛 他, 京都府中小企業技術センター技報, No. 45, 1-8 (2017)