

2016年3月9日(水) 愛知県名古屋市
「あいちシンクロトロン光センター成果発表会」

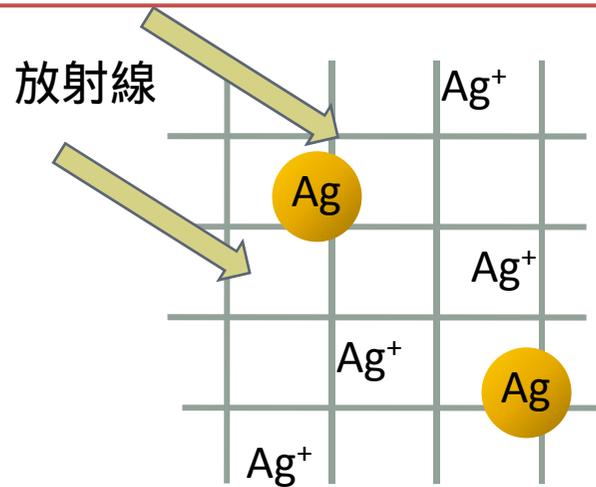
銀ナノ粒子担持抗菌繊維における 銀化学状態の解析

清野智史^{1&2} 中川 貴¹ 山本孝夫¹

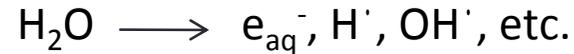
1 大阪大学大学院工学研究科

2 株式会社アクト・ノンパレル

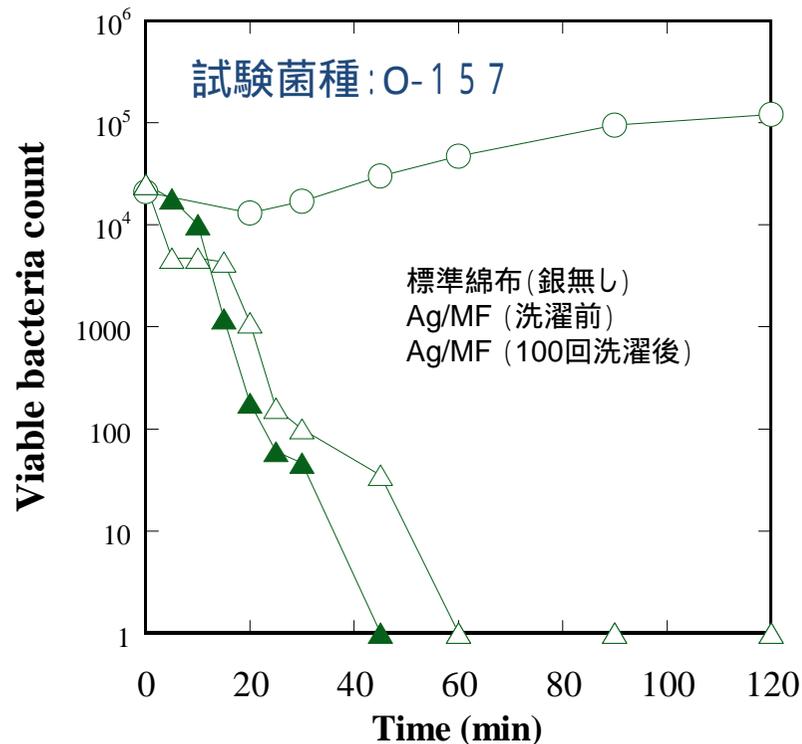
【背景】 放射線還元法による銀ナノ粒子の担持処理



水溶液中における銀の還元反応式



- 水の放射線分解により還元種が生成
- 銀イオンが還元され金属銀ナノ粒子ができる
- バインダー無しで、繊維表面に直接固定化
- 種々の繊維種に適用可能(天然 & 合成)



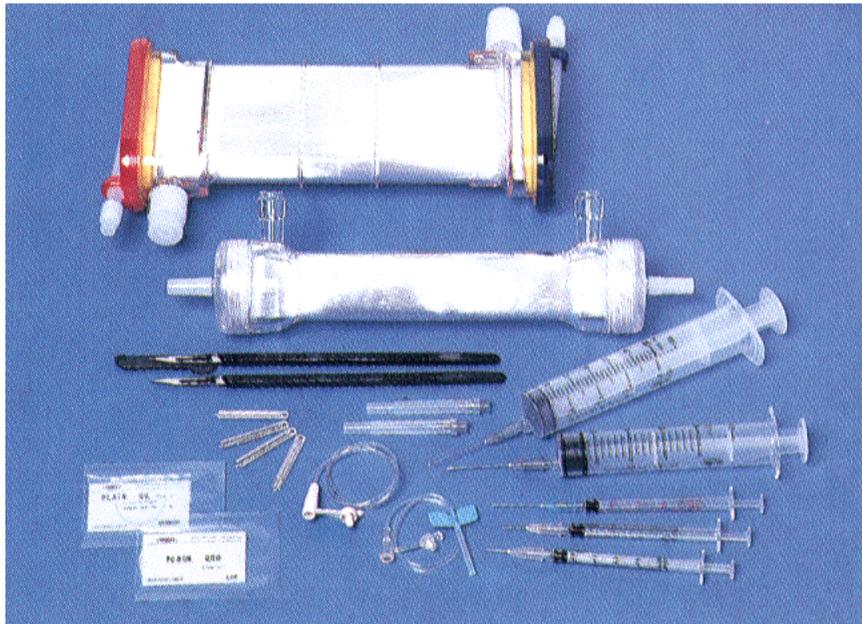
- 接触した大腸菌が1時間以内に検出限界以下に。
- 100回洗濯後にも抗菌性を維持
市販の抗菌製品は10回洗濯程度でも性能が失われる場合が多い。

放射線還元法による銀ナノ粒子担持繊維は、極めて高い抗菌性 & 洗濯耐久性を示す。

銀の材料学的評価は十分に行われていない。

参考：放射線の工業利用状況

放射線：医療器具の滅菌・食品照射・半導体特性改善等に利用されている。



- ガンマ線・電子線は、医療器具の滅菌や食品照射等に用いられている。
 - ✓ 被照射物が放射能を持つことは無い
- 国内に複数の商業用放射線照射施設が存在 & 利用可能

Ag Bullet™

現段階の製品化の例です。

大阪大学共同研究商品

超抗菌マイクロファイバーカウンタークロス

Ag Bullet™

繊維上の無数の銀ナノ粒子が、雑菌の細胞組織を攻撃

大阪大学 特許技術を事業化

強力な 拭き取り性能

食中毒原因菌やMRSAにも 抜群の抗菌効果

環境負荷の 大幅な低減

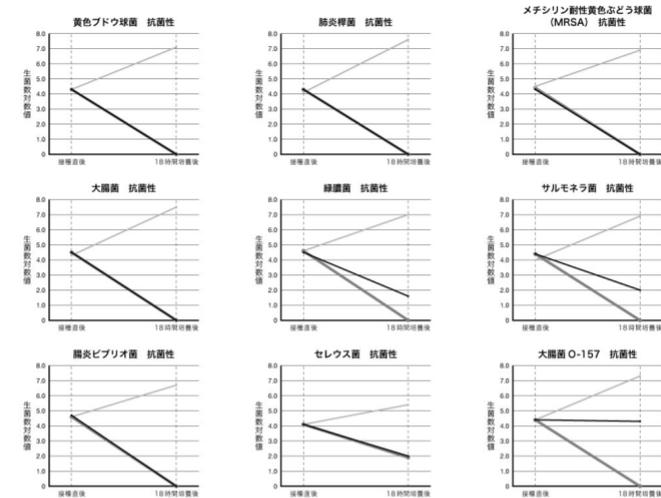
- 本品はマイクロファイバークロスを使用しています。マイクロファイバー糸を構成している糸は、約50本の繊維の集合体であり、その1本1本の繊維を約16分煎らせて作られる超細繊維構造を有しています。通常の綿フェルト等と比べ、非常に優れた拭き取り性能を示します。
- 大阪大学の特許技術により、銀のナノ粒子をクロスに強固に結合させています。テーブルや食器、厨房の食中毒の原因となる大腸菌やサルモネラ菌等を繊維組織が絡まると、クロスに結合した銀による攻撃を受けて死滅します。食中毒の発生・拡大・再発メカニズムの1つである、クロス及び使用者の手を媒介する危険をシャットアウトします。
- 銀は古くから食器やスプーンに使用されている安全な金属です。『Ag Bullet™』は、食毒試験性や食品添加物試験等をクリアした安全なクロスです。
- 『Ag Bullet™』上での、インフルエンザウイルス及びノロウイルスの感染抑制効果も実証しております。
- 衛生管理に配慮する手段として、使い捨ての不織布ワイパーを使用されている場合、本品に切り替えるだけで、大幅な環境負荷低減に繋がります。

製造販売先: (株)アクト・ノンパレル

お問合せ先: (株)ケイ・エス・ブレインズ 石川真由希 大阪大学 076-283-6477

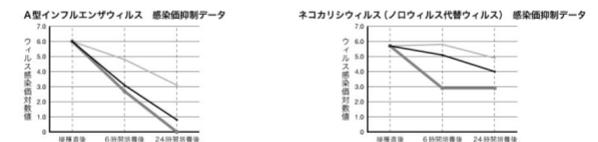
A. 抗菌性試験

大阪大学 ※O-157のみ財団法人日本食品分析センター



B. ウィルス感染抑制試験

財団法人北里環境科学センター



C. 安全性確認試験データ

C-1. 閉鎖性皮膚貼付試験 株式会社生活科学研究所

無加工品・加工品 (洗剤なし) とともに、被験者20名全員に皮膚反応の変化は全く無く、無刺激性 (陰性) と判定

C-2. 食品衛生法食品、添加物等の規格基準 財団法人日本紡績検査協会

項目	規格	適合	基準値
1. カドミウム及び鉛	カドミウム	適合	基準値 (100µg/g) 以下 (定量下限 (0.1µg/g) 以下)
	鉛	適合	基準値 (100µg/g) 以下 (定量下限 (2µg/g) 以下)
2. 重金属	重金属	適合	基準値 (総として1µg/ml) 以下
			32.2µg/ml 基準値 (10µg/ml)
3. 有機物含有量試験	過マンガン酸カリウム消費量	不適合	※食品そのものの基準としては不適合と判定されるが、子供用玩具等の基準値 (50µg/ml) には適合

- 大量処理可能であることを実証済み (10,800枚/Lot)
- 食品衛生現場での使用後にも抗菌性維持 (塩素剤処理 一日3回 × 40日間)

加工工程のイメージ: 反物状繊維への銀イオン含浸工程



某染色工場にて、一般的な染色機を利用して実施

生地 : 約 20 kg (1 ~ 2反)

染色液 : 300 ~ 400リットル(工業用水)

銀試薬費は繊維種によって変わるが、数千円程度

放射線照射行程のイメージ(ガンマ線の場合)



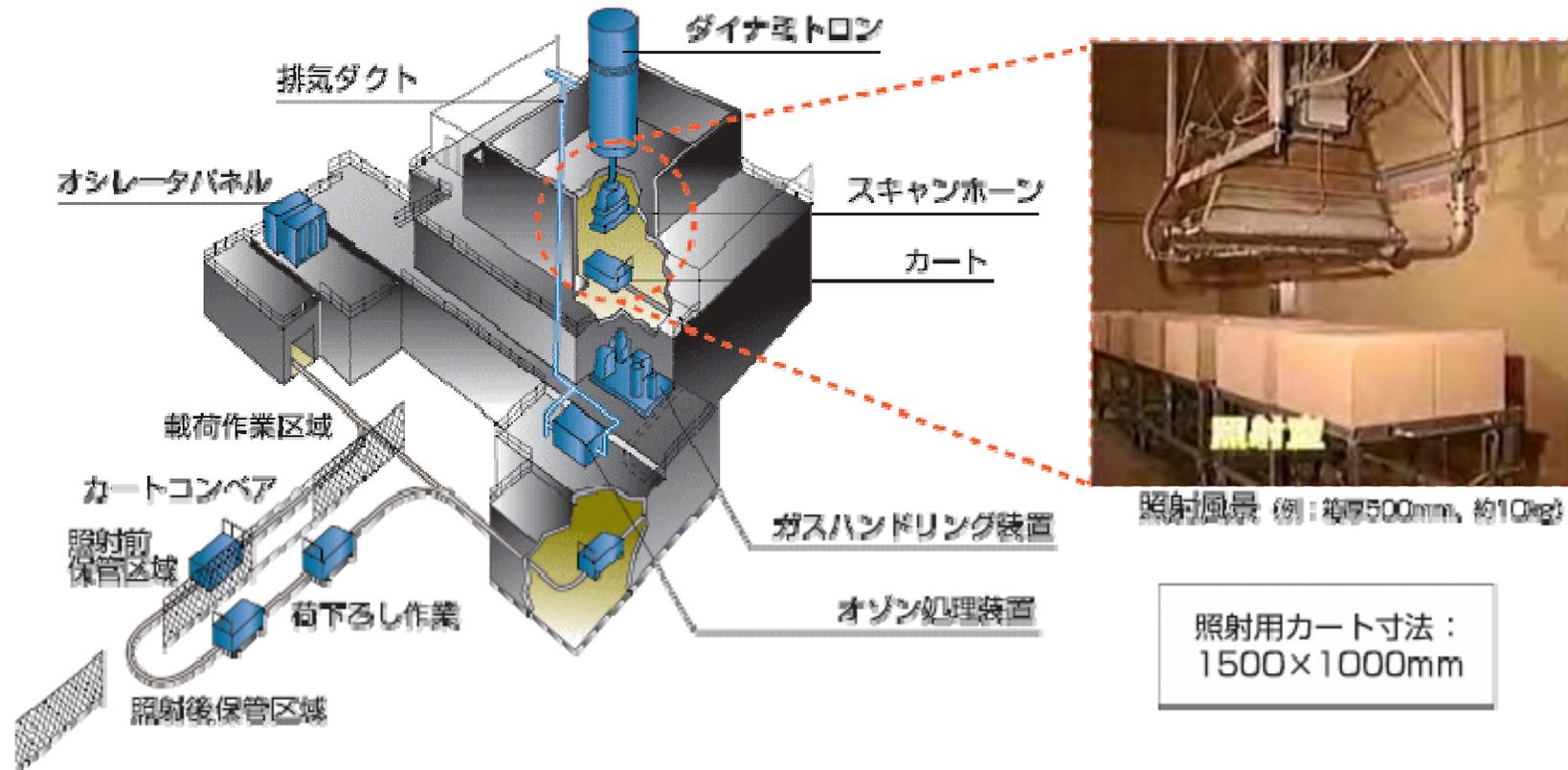
滋賀県・甲賀市 コーガアイソトープ社でのガンマ線照射の例

線量 : 25 kGy (in 6 hours)

照射容器 : 560 × 825 × 1850 mm

照射容器1箱あたり2.4万円、12反程度は投入可能。

放射線照射行程のイメージ(大型加速器電子線の場合)

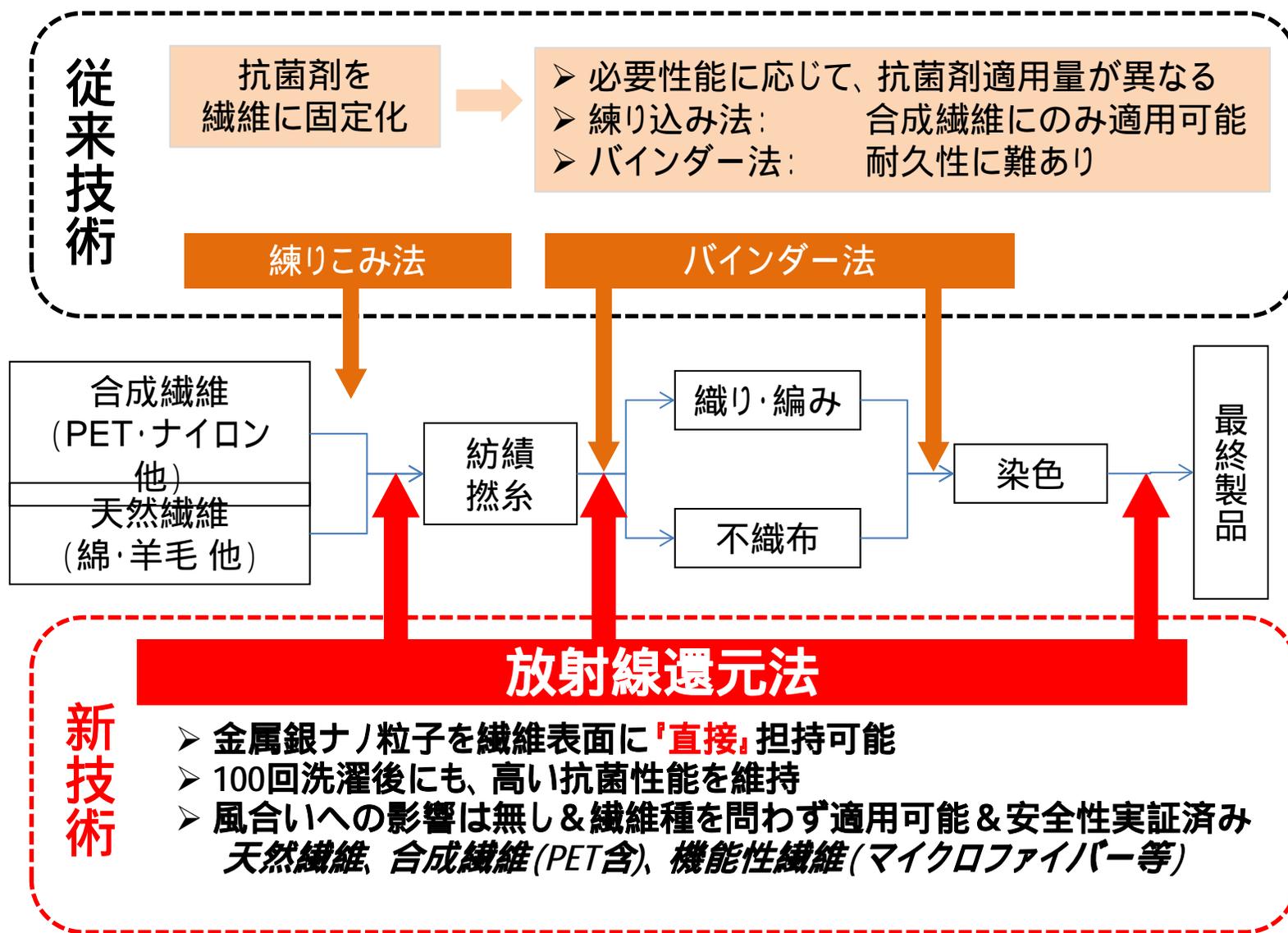


日本電子照射サービス社 HPより抜粋

線量 : 40 kGy (20 kGy × 2 pass, Few minutes.)

カート : 1500 × 1000 mmの台車

従来技術との比較 (抗菌処理方法の観点から)



【課題】 繊維表面に担持した銀の材料学的評価

一般的な抗菌処理法

抗菌剤



+

繊維



➤ バインダー
➤ 練り込み



抗菌繊維



- ✓ この段階での材料評価は比較的容易。
- ✓ 銀ナノ粒子の場合、保護剤で表面被覆されている。

本手法

銀錯体



+

繊維



繊維表面に
直接析出させる



抗菌繊維



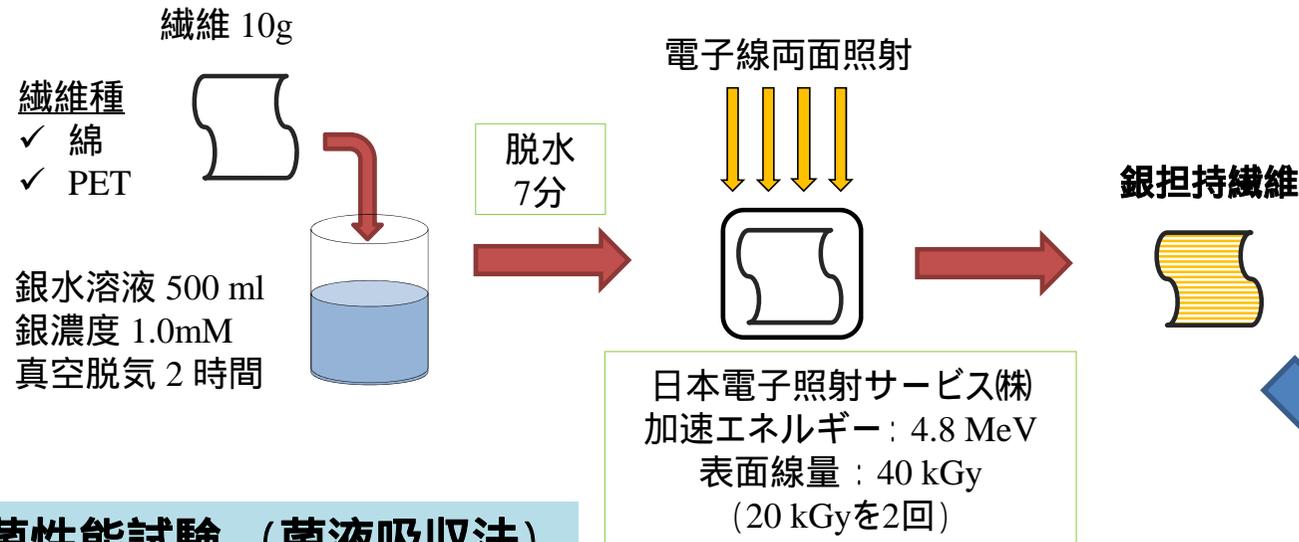
- ✓ 保護材は使用せず。一般的な銀コロイドとは表面状態が異なると考えられる。
- ✓ 繊維に担持した状態のまま材料評価を行う必要有。

【本研究の目的】

- ✓ 繊維表面での銀ナノ粒子の化学状態と抗微生物性能との相関を調べる

【実験手順】

繊維への銀ナノ粒子担持（電子線還元法）



抗菌性能試験（菌液吸収法）



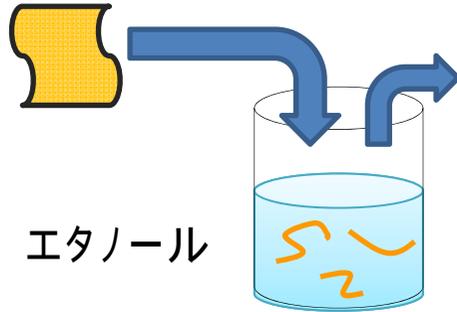
材料評価

TEM観察(銀粒径評価)、ICP化学分析(銀担持量評価)、XANES解析(銀化学状態評価)

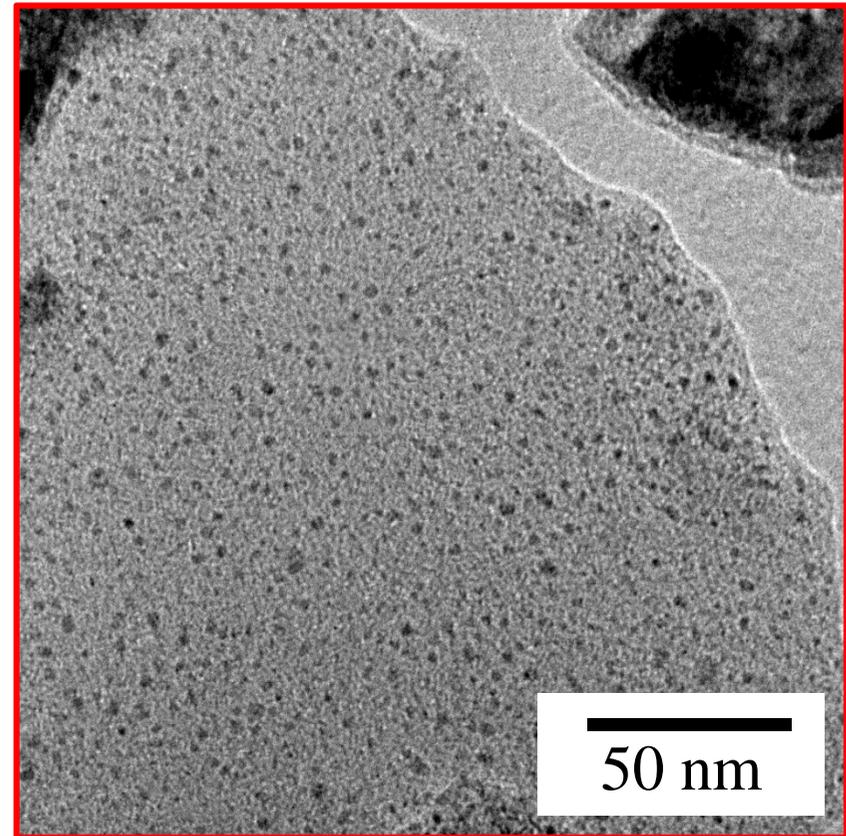
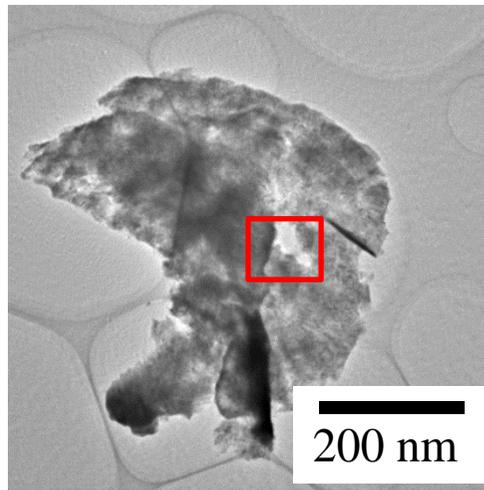
【結果】 繊維表面の銀ナノ粒子のTEM観察

観察用試料の調整

銀担持繊維 (Ag/Cotton)



Cuグリッドに滴下
→ TEM観察
(Hitachi H8100, 200keV)



繊維表面に、数nmサイズの銀ナノ粒子が存在

【結果】 銀担持量と抗菌性能との相関

表 洗濯処理による銀担持量及び抗菌性能の変化

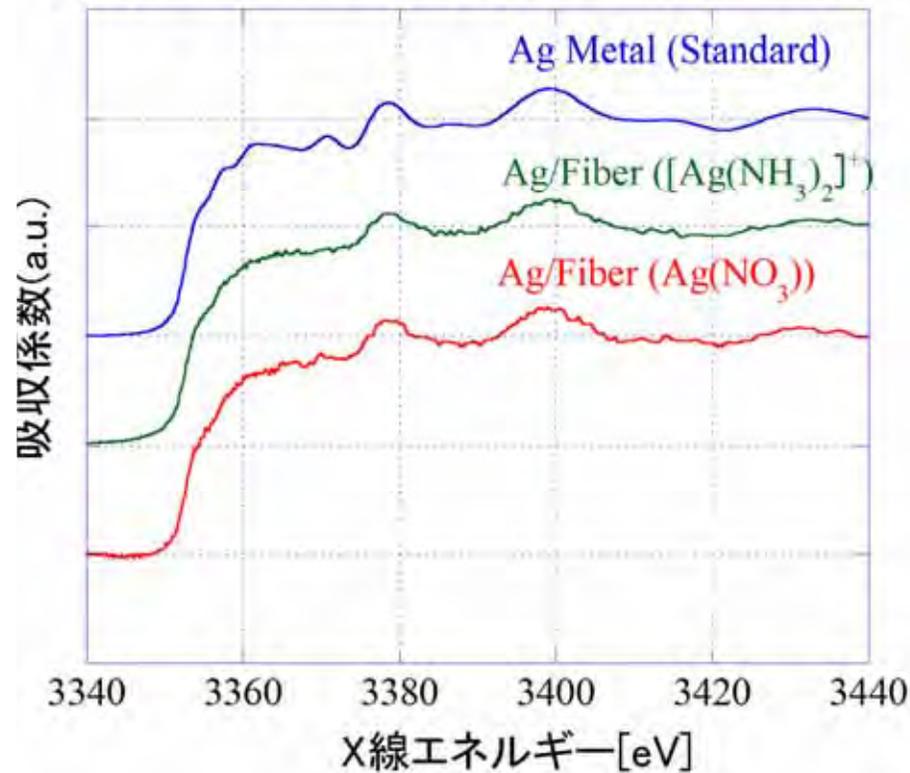
繊維種	Wash回数	銀担持量 [$\mu\text{g-Ag}/0.4\text{g-fiber}$]	静菌 活性値
Cotton	0	23 μg	5.7
	1	15.2 μg	5.7
	10	3.6 μg	5.7
	100	0.1 μg 以下	5.7
PET	0	5.2 μg	5.7
	1	0.1 μg 以下	5.7
	10	0.1 μg 以下	5.7
	100	0.1 μg 以下	5.7

- ✓ 綿には比較的よく銀が担持し、PETにはやや担持しにくい。
- ✓ 洗濯操作により、過剰な銀は脱離していく。
- ✓ 銀量が検出限界以下となっても、銀は抗菌性能を発現している。
- ✓ 繊維に対し数十～数 μg のAgの化学状態をXANES解析で同定する。

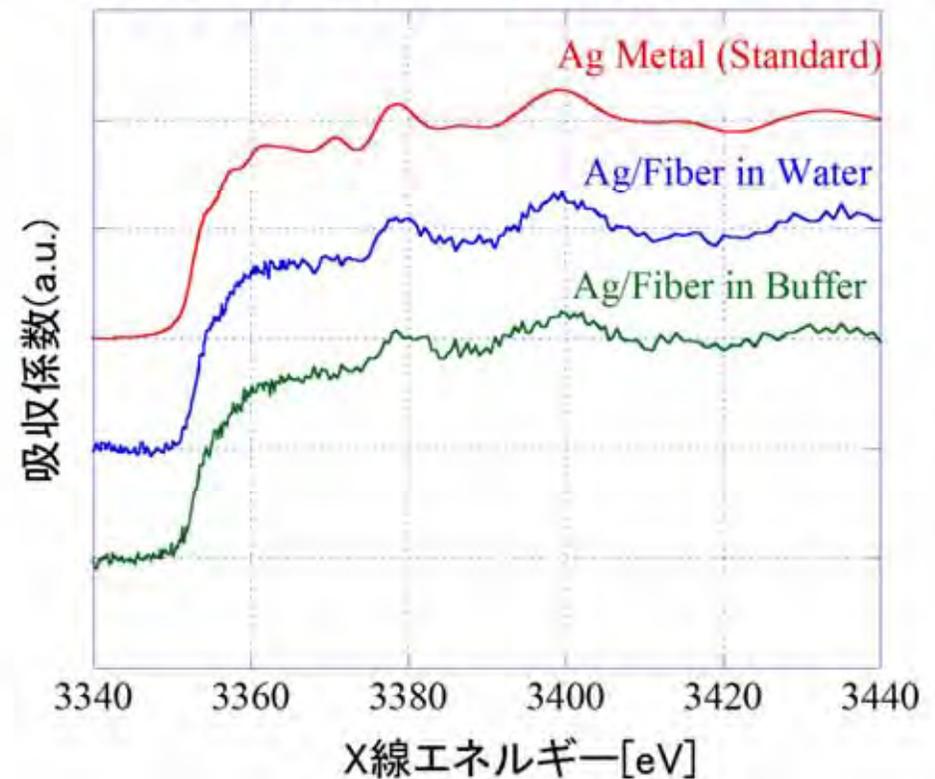
【結果】 銀化学状態のXANES解析

BL6Nでの蛍光法によるAg-L_{III}端測定

繊維表面に担持したAgナノ粒子



抗菌試験液中でのAgナノ粒子



✓ 出発原料銀イオン種によらず、繊維表面には金属状態の銀のみが担持している。

✓ 水中、バッファ溶液中においても、銀は金属状態を維持している。

一般論：抗菌剤の作用部位

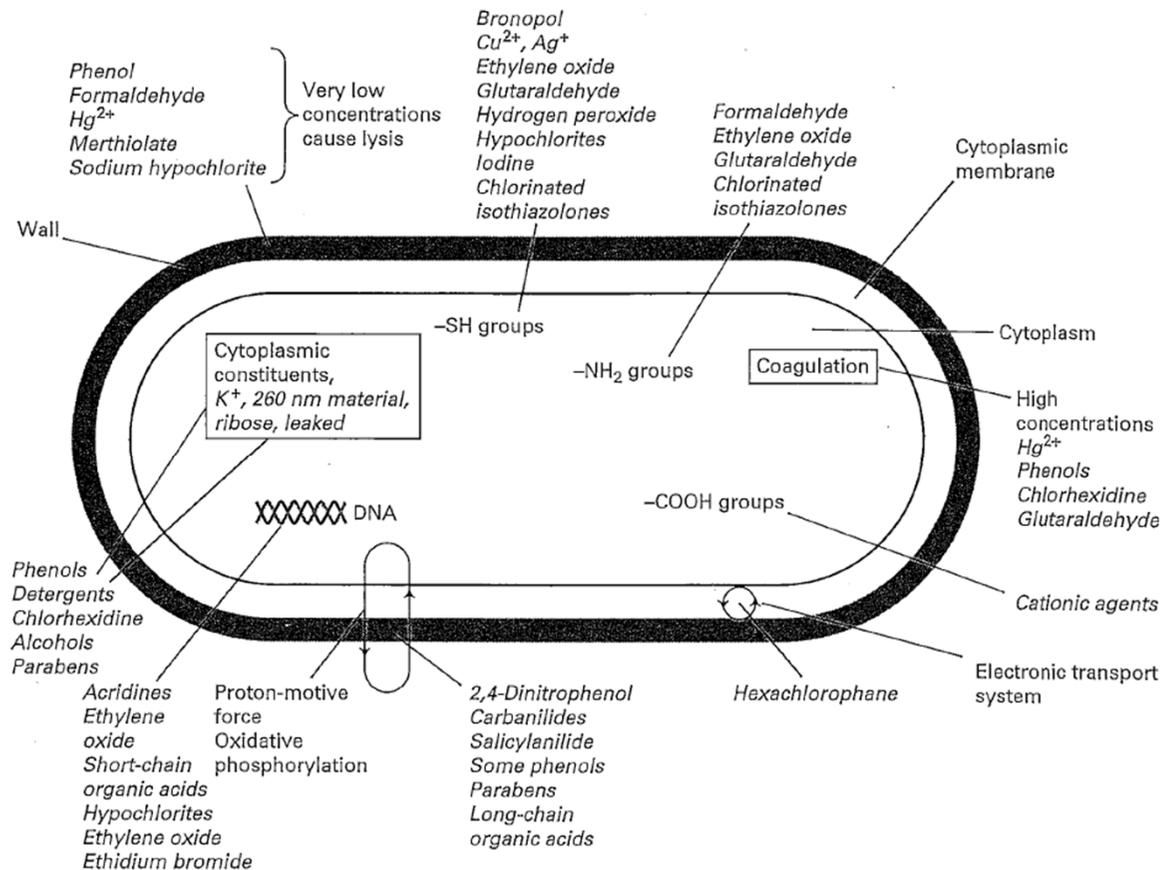
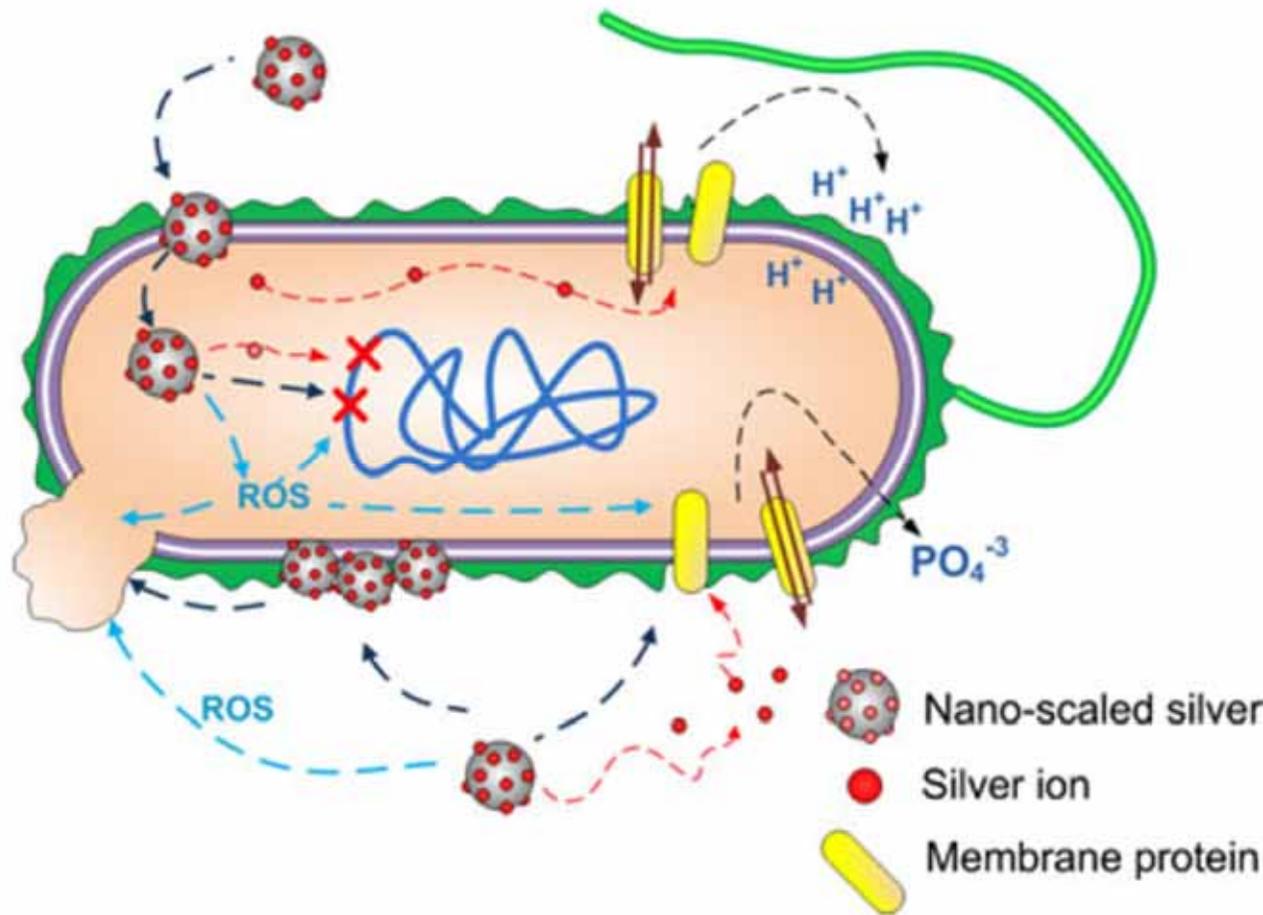


Figure 5.1 Sites of action of biocides.

- 種々の抗菌剤が、バクテリアのどの部位に作用するかが報告されている。
- 銀による抗菌作用は、一般的には銀イオンに由来すると解釈されています。
- 銀イオンは、バクテリア中のSH基に作用することで、抗菌性を発現するとされています。

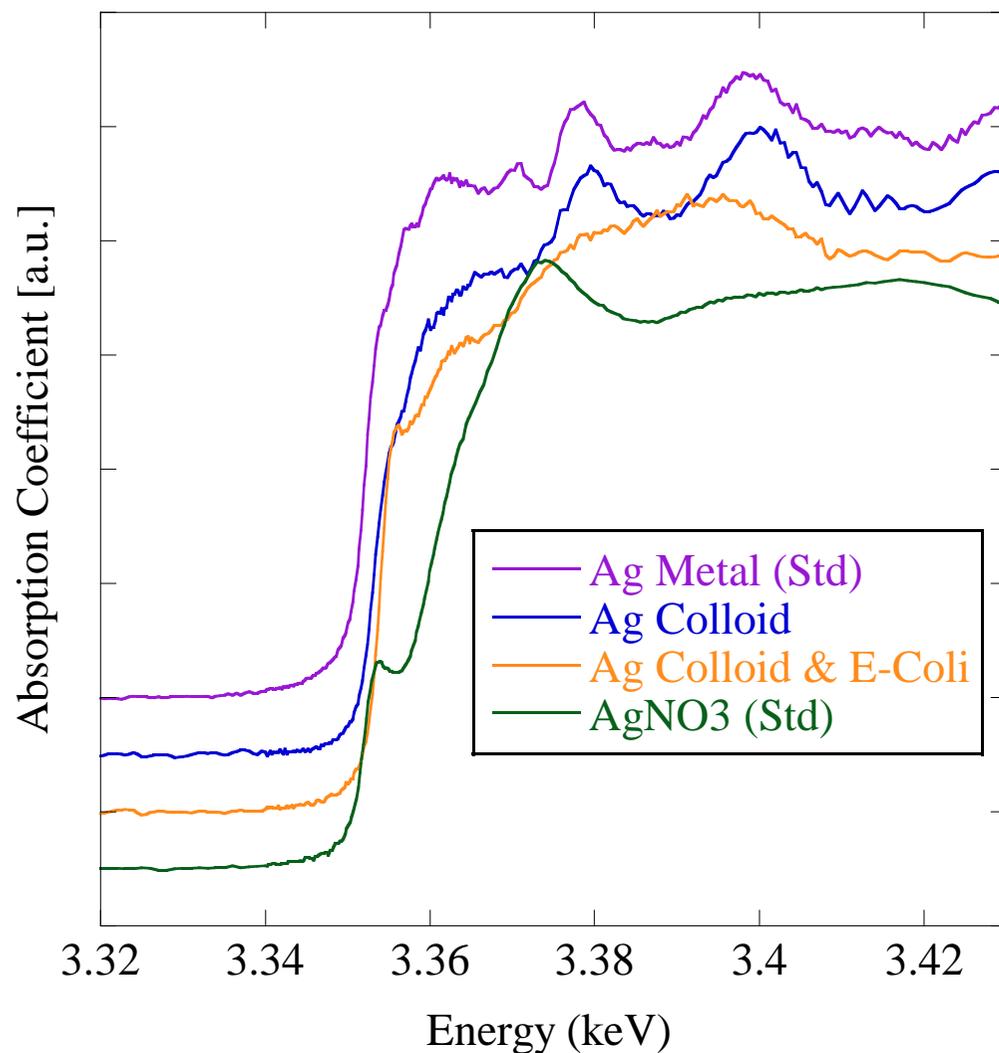
一般論：銀ナノ粒子の抗菌作用部位は？



銀ナノ粒子から遊離した銀イオンが攻撃する
バクテリア表面に吸着した銀ナノ粒子(もしくは銀イオン)が攻撃する
バクテリア内部に取り込まれた銀ナノ粒子(もしくは銀イオン)が攻撃する

どの過程が支配的かは、明らかにされていません。

大腸菌液中での銀ナノ粒子の化学状態評価



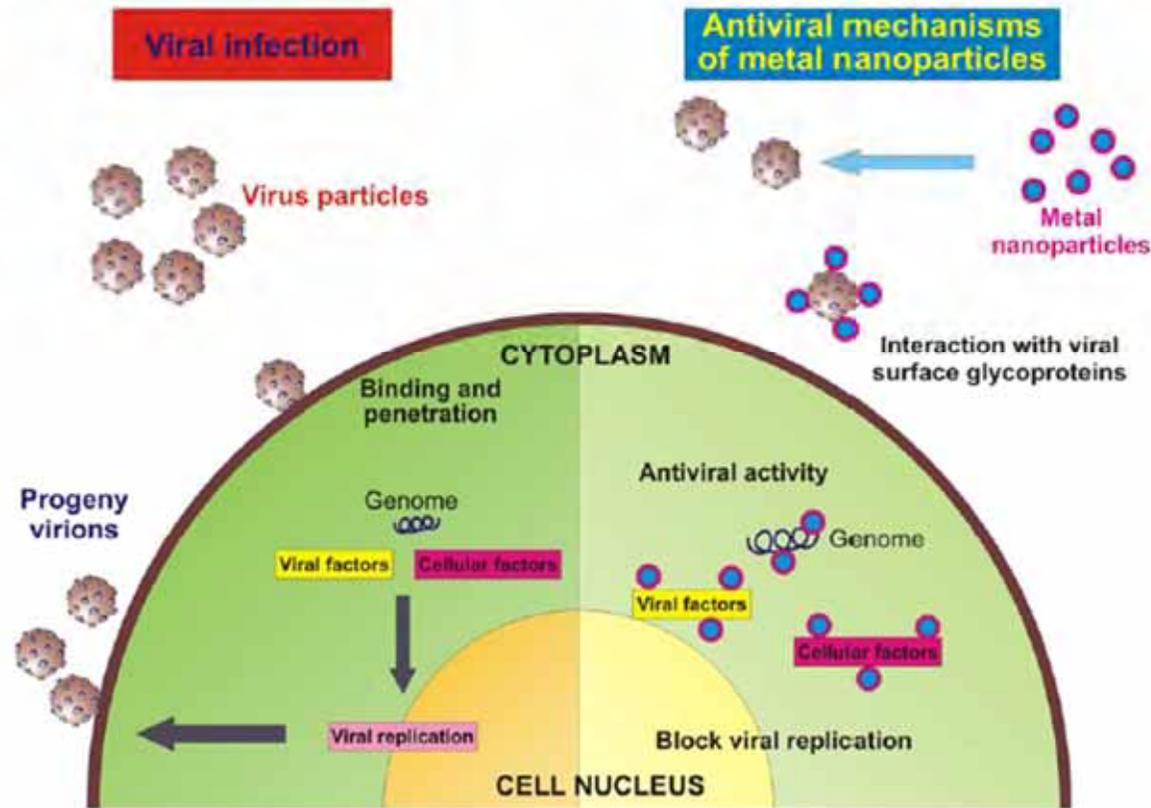
実験手順

大腸菌液と銀コロイドを混合
遠心分離で濃縮しスラリーを得る
スラリーを密閉&湿潤状態で測定

- ✓ 高濃度の大腸菌液と接触した銀ナノ粒子は、金属状態とは異なる化学状態をとる。
 - ✓ 準備した標準試料では説明できず (AgNO_3 , AgCl , Ag_2O , AgO)
 - ✓ 敢えて言うなら Ag_2S に近い
- ✓ 大腸菌表面もしくは内部の硫黄と結合することで、抗菌機構を発現している可能性が示唆

銀ナノ粒子の抗ウイルス性に関する報告

Figure 2. Schematic model of a virus infecting an eukaryotic cell and antiviral mechanism of metal nanoparticles.



- 銀ナノ粒子が抗ウイルス性を示すことは数多く報告されている。
- その抗ウイルス機構は、大別すると以下の2説で説明されている。
ウイルス表面に銀ナノ粒子が結合し、細胞への感作を抑制する
細胞内部に存在する銀ナノ粒子が、細胞核への遺伝子送達を妨げる

抗ウイルス試験法 (ISO 18184)

2014年9月1日 成立

プラック測定法

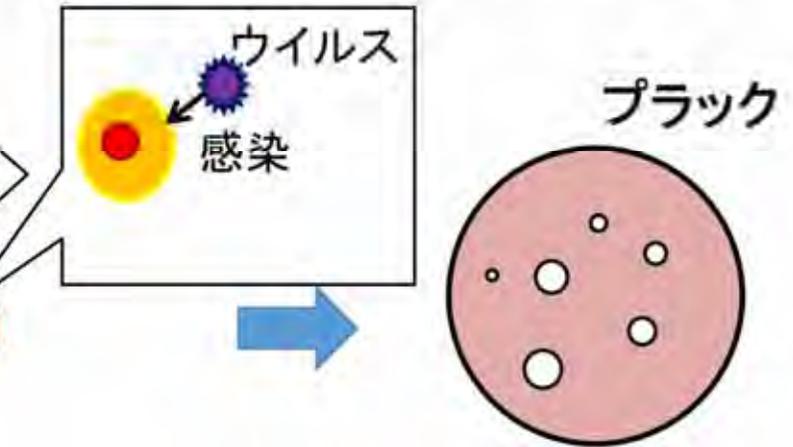
金属銀ナノ粒子
担持繊維 (0.4 g)

洗い出し液を加える
(SCDLP培地)

25°C, 2時間
培養

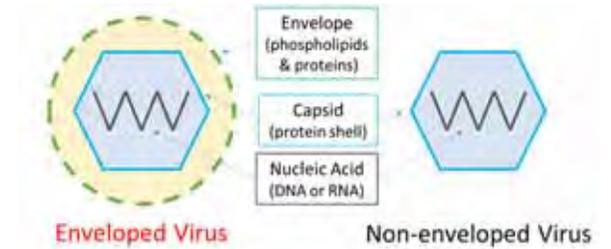
ウイルス液を
0.2 ml接種

宿主細胞: ウイルス種に応じて選択
ウイルス液懸濁液: EMEM(Eagle's minimal essential medium)



細胞がウイルスによって死滅すると生じるプラックの数でウイルスの感染価を求める。

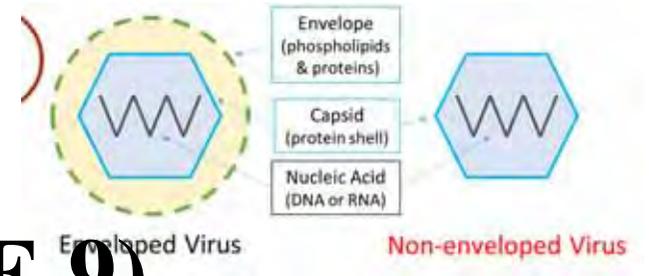
抗ウイルス性能試験結果



A型インフルエンザウイルス(H3N2)

EMEM conc.	Samples	Viral infectivity titer (PFU/sample)	
		0 h	2 h
1/1 EMEM	Cotton	0 h	1.3×10^7
	Ag/Cotton	2 h	5.5×10^6
			1.4×10^6
1/10 EMEM	Cotton	0 h	2.6×10^6
	Ag/Cotton	2 h	7.4×10^5
			$< 2.0 \times 10^2$
1/100 EMEM	Cotton	0 h	1.6×10^7
	Ag/Cotton	2 h	2.0×10^6
			$< 2.0 \times 10^2$

抗ウイルス性能試験結果



ネコカリシウイルス(F-9)

EMEM conc.	Samples	Viral infectivity titer (PFU/sample)	
		Time	Titer
1/1 EMEM	Cotton	0 h	4.2×10^6
		2 h	1.1×10^6
	Ag/Cotton	2 h	6.0×10^5
1/10 EMEM	Cotton	0 h	4.1×10^6
		2 h	3.2×10^6
		18 h	8.5×10^5
	Ag/Cotton	2 h	8.0×10^5
		18 h	$< 2.0 \times 10^2$

抗ウイルス性試験用培地液の組成

➤ アミノ酸

- ✓ シスチン・メチオニンを含むアミノ酸
- ✓ それぞれ数十mg/L

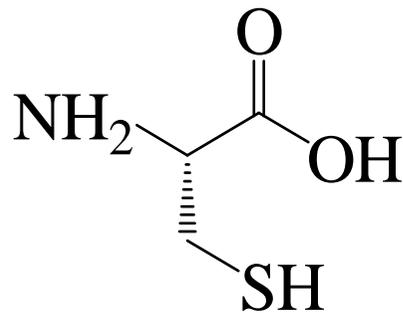
➤ 塩

- ✓ 塩化カルシウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、ナトリウム塩化物、リン酸二水素ナトリウム 等
- ✓ それぞれ数百～数千 mg/L

➤ グルコース

➤ ビタミン

- ✓ 葉酸、ニコチンアミド、リボフラビン、B12



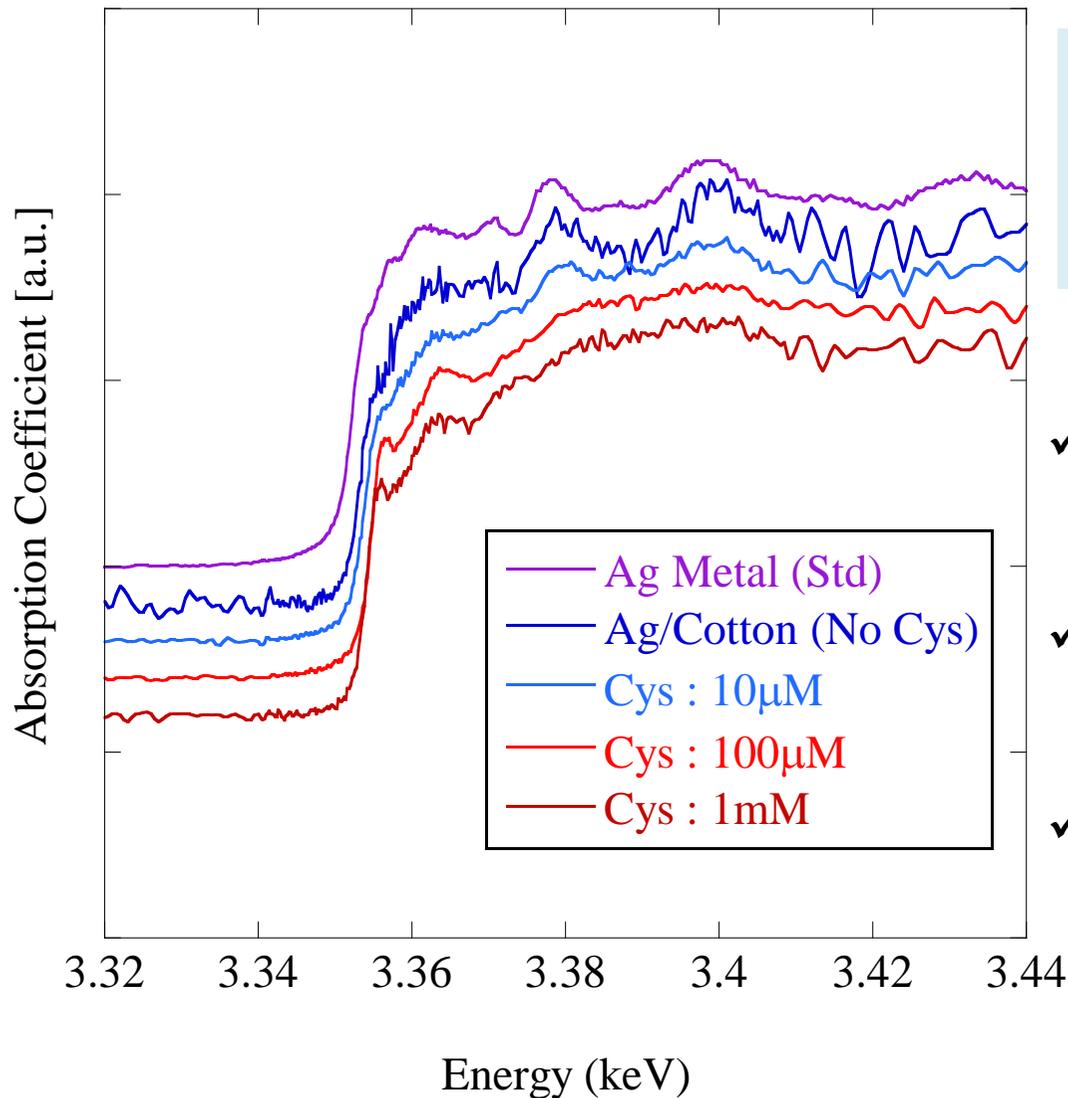
システイン

1/1 EMEM → Cystine 260 μM

1/10 EMEM → Cystine 26 μM

1/100 EMEM → Cystine 2.6 μM

システイン水溶液の銀化学状態の評価



実験手順

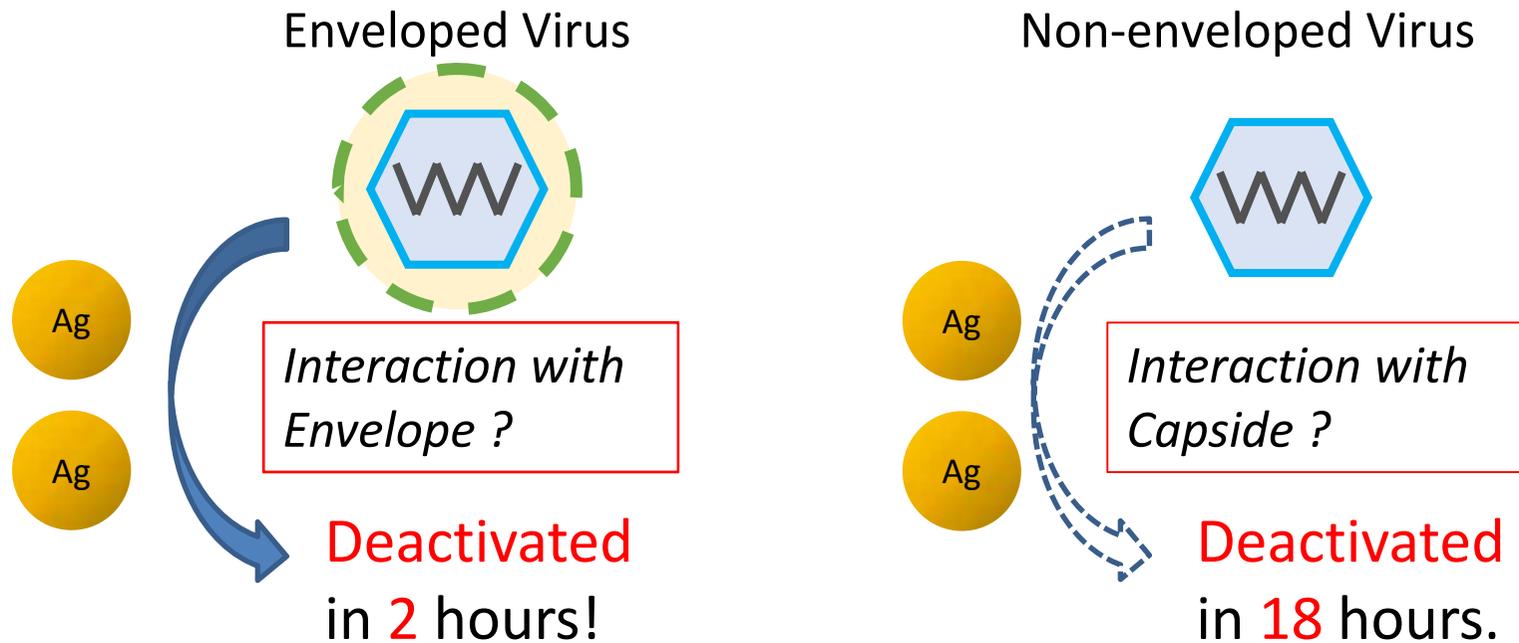
銀ナノ粒子担持繊維をシステイン溶液に浸漬、フィルム内に密封
湿潤状態のままXAFS測定

- ✓ システイン溶液濃度が低い場合、銀は金属状態を維持する
- ✓ システイン溶液濃度が濃くなると、金属状態から変化する
- ✓ Ag_2S に近い化学状態と推測されるが、要検証

- ✓ 銀ナノ粒子の化学状態の変化が、抗ウイルス性の失活要因である可能性

想定される抗ウイルス機構(1)

Low EMEM conc.



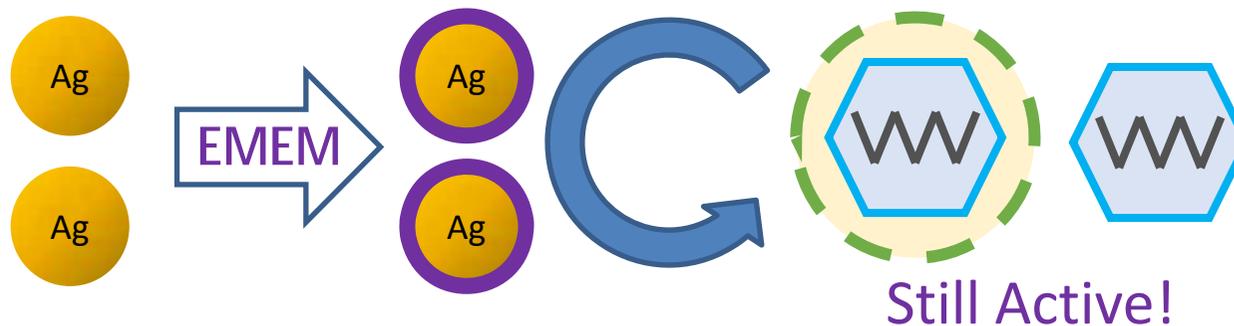
- ✓ High antiviral activity against Influenza A virus is explained by the interaction of Ag nanoparticles with envelope surface.
- ✓ On the other hand, antiviral activity against Feline calicivirus was relatively low.

想定される抗ウイルス機構(2)

High EMEM conc.

*Surface passivation
suppressed the activity?*

Enveloped & Non-enveloped Virus



- ✓ Surface passivation by the inhibitory agents in EMEM might have suppressed the contact with viruses or Ag release from NPs.

【結論】

- 繊維表面に固定化された金属銀ナノ粒子の化学状態と抗微生物機構との関係性を評価した。
- 金属銀ナノ粒子の化学状態は、抗微生物試験環境において変化していることが確認された。
- 放射光を用いたXAFS解析により、銀ナノ粒子の抗微生物機構を明らかにする手がかりを得ることができた。

【今後の課題】

◆ 金属銀ナノ粒子による抗微生物機構のさらなる解明

一般的に想定される銀ナノ粒子のサイズ効果

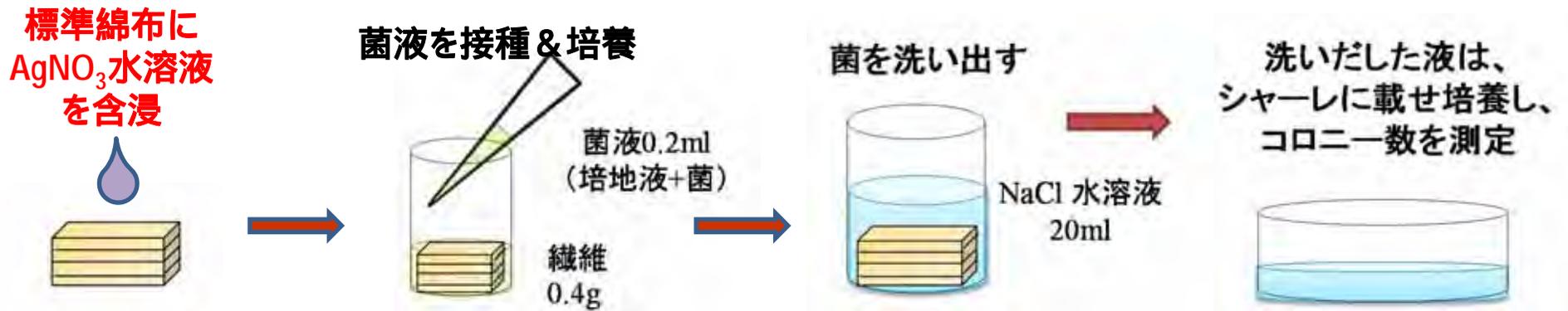
- ✓ 比表面積の増加？ 接触確率増加 and/or イオン化の促進？
- ✓ 量子サイズ効果の発現？ 活性酸素種の生成？
- ✓ 菌・ウイルスへの付着 and/or 取り込みが促進？

◆ 銀ナノ粒子の応用場面と機能発現との関係

標準試験法のみでは、「真の性能」を評価することは難しい

【実験】：『銀イオン化説』の検証

『 AgNO_3 が抗菌作用を発現する限界濃度』と、
『繊維表面に担持している銀ナノ粒子量』を比較する。



✓ 菌液吸収法の条件下での、 AgNO_3 濃度と抗菌性能との相関を評価した。

オートクレーブ済みの標準綿布に、 AgNO_3 溶液を滴下

➤ AgNO_3 濃度：0.05 ppm ~ 50 ppm

銀含浸繊維に菌液(肺炎桿菌)を接種し、18時間培養

NaCl溶液で菌を洗い出し、生菌数を定量分析

【結果 & 考察】：『銀イオン化説』の検証

『AgNO₃が抗菌作用を発現する限界濃度』と、
『繊維表面に担持している銀ナノ粒子量』を比較する。

表 硝酸銀濃度と殺菌活性値との相関（肺炎かん菌）

線維	AgNO ₃ 濃度 [ppm]	Ag量 [ug-Ag/0.4g-Fiber]	殺菌 活性値
標準綿布 + Ag(NO ₃)	50 ppm	10μg	2.8
	5 ppm	1 μg	2.8
	0.5 ppm	0.1 μg	-3.6
	0.05 ppm	0.01 μg	-3.6
Ag/綿/100wash	---	0.1 μg 以下	3.1
Ag/PET/100wash	---	0.1 μg 以下	3.1

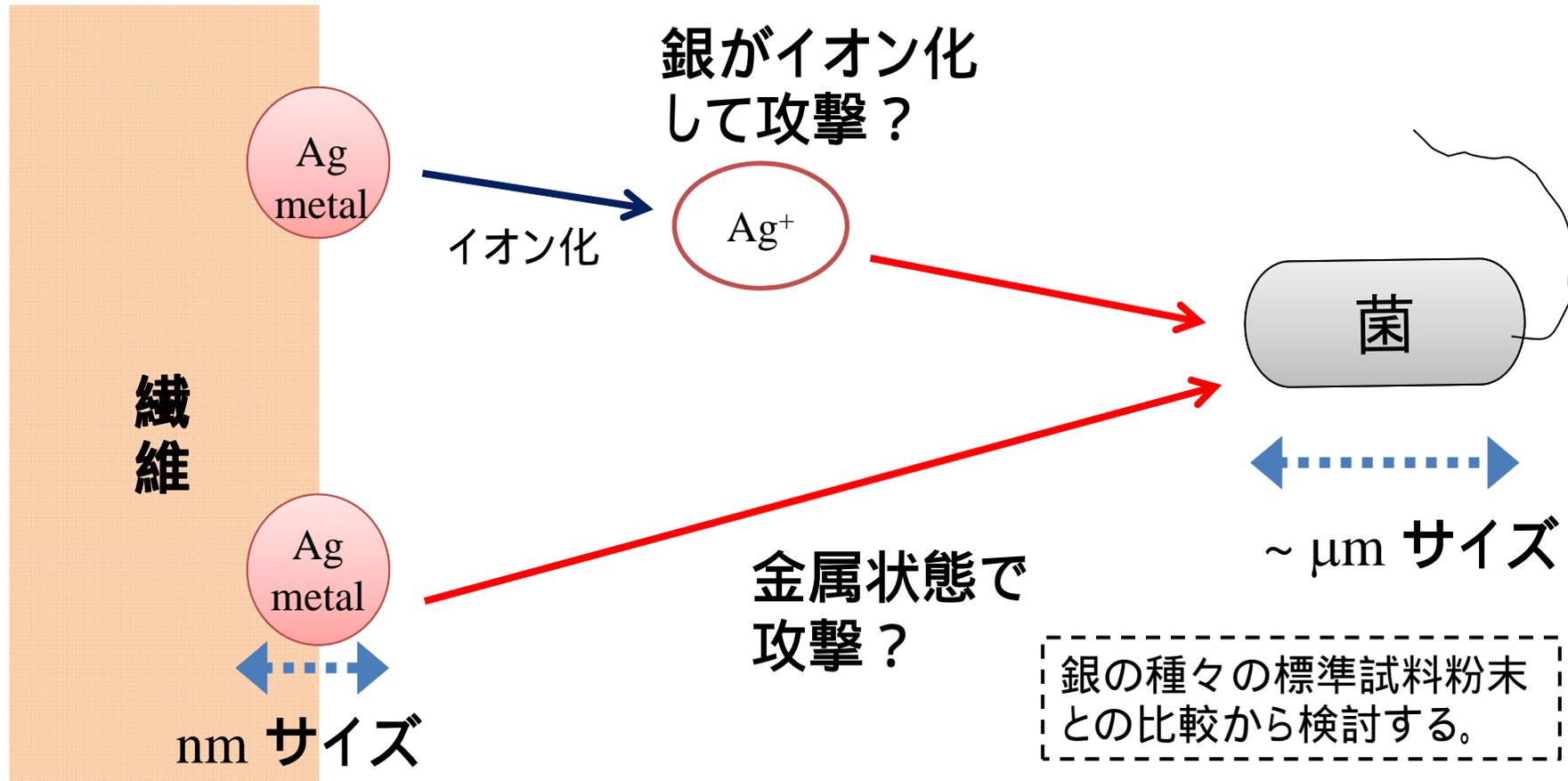
- AgNO₃は、菌液吸収法の条件下では0.1μg(0.5ppm)では抗菌性を発現しない。
- Agナノ粒子担持繊維では、**Ag量が0.1μg以下でも抗菌性を示す。**
 - ✓ Agナノ粒子が全てイオン化したとしても、溶液中のAg量は0.1μg以下
 - ✓ 培養液中では、Ag金属は殆どイオン化しないことも確認済

Agナノ粒子の抗菌性は、単純なイオン化機構のみでは説明できない。

【考察】 金属銀ナノ粒子の抗菌機構

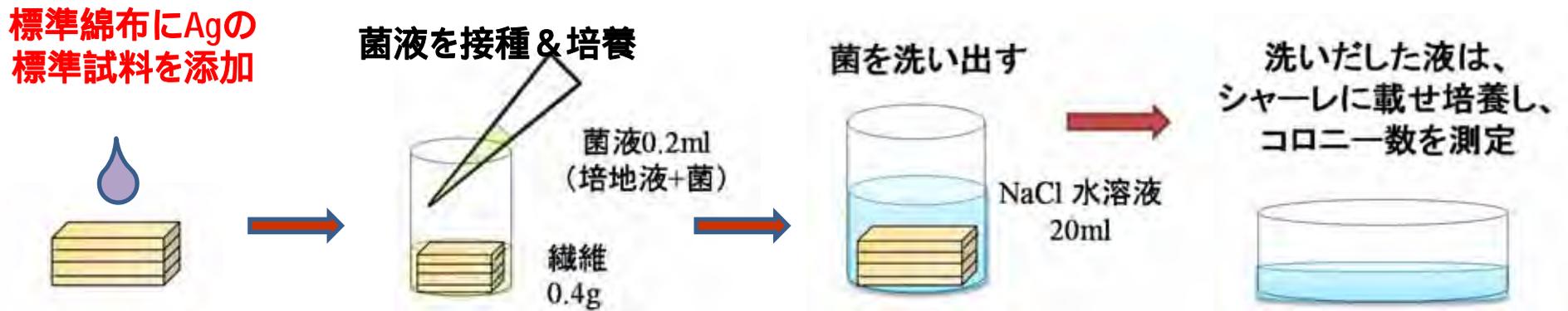
【材料解析結果のまとめ】

- ✓ 繊維表面において、銀は金属銀ナノ粒子として担持している。
- ✓ 銀担持量がICP分析の検出限界以下となっても、抗菌性能を維持している。



【実験】：銀標準試料の抗菌性能試験

『Ag金属の標準試料が抗菌作用を発現する量』と、
『繊維表面に担持している銀ナノ粒子量』を比較する。



✓ 菌液吸収法の条件下での、Ag金属標準試料と抗菌性能との相関を評価した。

オートクレーブ済みの標準綿布に、Ag標準試料粉末を添加

➤ Ag金属、Ag₂O、AgCl、etc.

銀含浸繊維に菌液(肺炎桿菌)を接種し、18時間培養

NaCl溶液で菌を洗い出し、生菌数を定量分析

【結果 & 考察】 銀標準試料との比較

『Agの標準試料粉末が抗菌作用を発現する量』と、
『繊維表面に担持している銀ナノ粒子量』を比較する。

表 銀標準粉末試料の殺菌活性値 (肺炎かん菌)

Ag量 (/g-fiber)	Ag metal (Bulk)	Ag ₂ O (Bulk)	AgCl (Bulk)	Ag/Fiber (NP)
10 μg	2.8	2.8	2.8	2.8
1 μg	-1.3	2.8	2.8	2.8
0.1 μg	-2.5	2.8	2.8	2.8

- Ag金属標準試料粉末は、1 μg以下では抗菌性能を発現しない。
(Ag₂O、AgClは、0.1 μg以下でも抗菌性を発現する。)
- Agナノ粒子担持繊維では、Ag量が0.1μg以下でも抗菌性を示す。
銀ナノ粒子のサイズ効果が高い抗菌活性の要因であると推察される

【結論】

【材料解析結果】

- ✓ 繊維表面において、銀は金属銀ナノ粒子として担持している。
- ✓ 銀担持量がICP分析の検出限界以下となっても、抗菌性能を維持している。

【金属銀ナノ粒子の抗菌作用】

- 単純な「イオン化モデル」のみでは説明できない。
- 「ナノサイズ」に由来する抗菌作用が存在する可能性が高い。

【今後の課題】

◆ 金属銀ナノ粒子による抗菌メカニズム機構のさらなる解明

一般的に想定される銀ナノ粒子のサイズ効果

- ✓ 比表面積の増加？ 接触確率増加 and/or イオン化の促進？
- ✓ 量子サイズ効果の発現？ 活性酸素種の生成？
- ✓ 細胞への付着 and/or 取り込みが促進？

結果 & 考察 抗菌性試験結果 / 【菌スペクトル】

試験布 : Ag担持マイクロファイバー (ポリエステル80% / ナイロン20%)
 試験菌種: 黄色ブドウ球菌、肺炎桿菌、MRSA、大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌、
 腸炎ビブリオ、セレウス菌
 試験方法: JIS L 1902 定量試験、静菌活性値評価 (抗菌防臭SEK: 2.2以上で効果有)

表 放射線還元法で得た銀担持繊維の100回洗濯前後の静菌活性値

	黄色 ブドウ球菌	肺炎 かん菌	MRSA	大腸菌	緑膿菌	サルモネ ラ菌	腸炎 ビブリオ	セレウス菌
本技術 洗濯前	5.5	6.5	5.5	6.4	5.7	6.0	5.4	3.5
本技術 洗濯100回後	5.5	6.5	5.5	6.4	5.3	5.3	5.4	3.4
(参考)市販品 洗濯前	4.7	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 黄色: 菌数が検出限界以下 </div>						
(参考)市販品 洗濯10回後	3.2							

抗菌性試験 JIS L 1902 定量試験 (菌液吸収法)
 洗濯方法 JIS L 0217 103 号準拠 吊干し (JAFET 標準洗剤使用)

* 参考データは他社ホームページ公開情報から引用

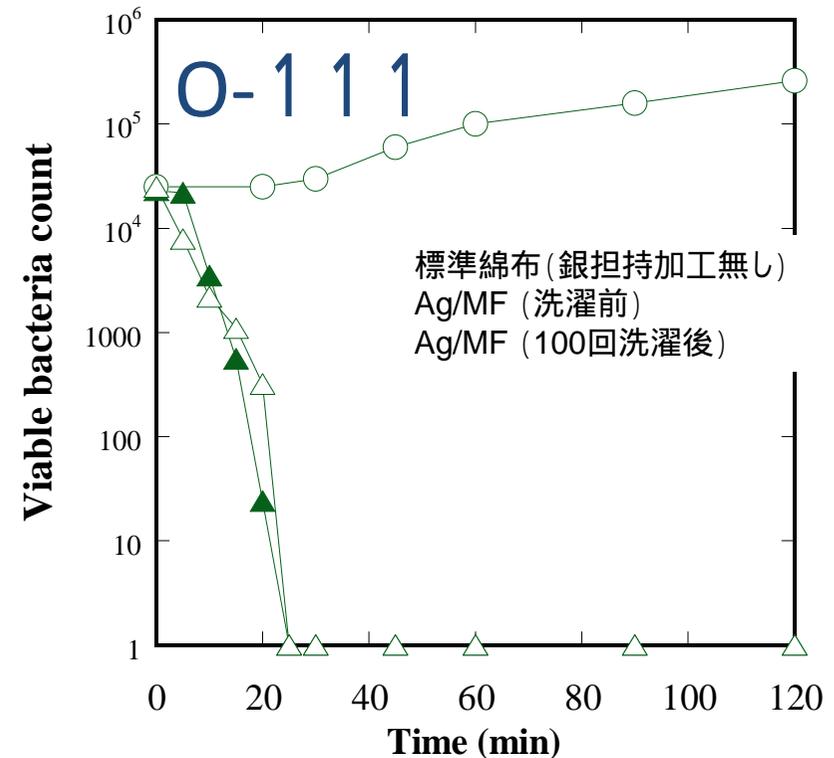
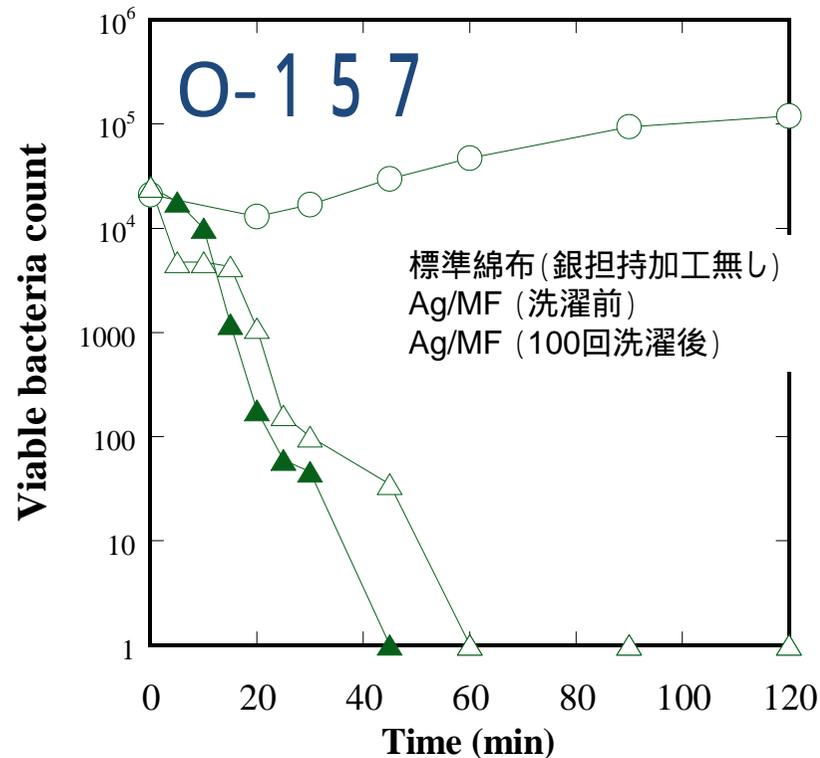
- 幅広い菌種に対し抗菌性/殺菌性を示す
 (グラム陽性菌には若干効果低)
- 100回洗濯後にも性能を維持

結果 & 考察 抗菌性能 / 【生菌数】 vs 【培養時間】 8/13

試験布 : Ag担持マイクロファイバー (ポリエステル80% / ナイロン20%)

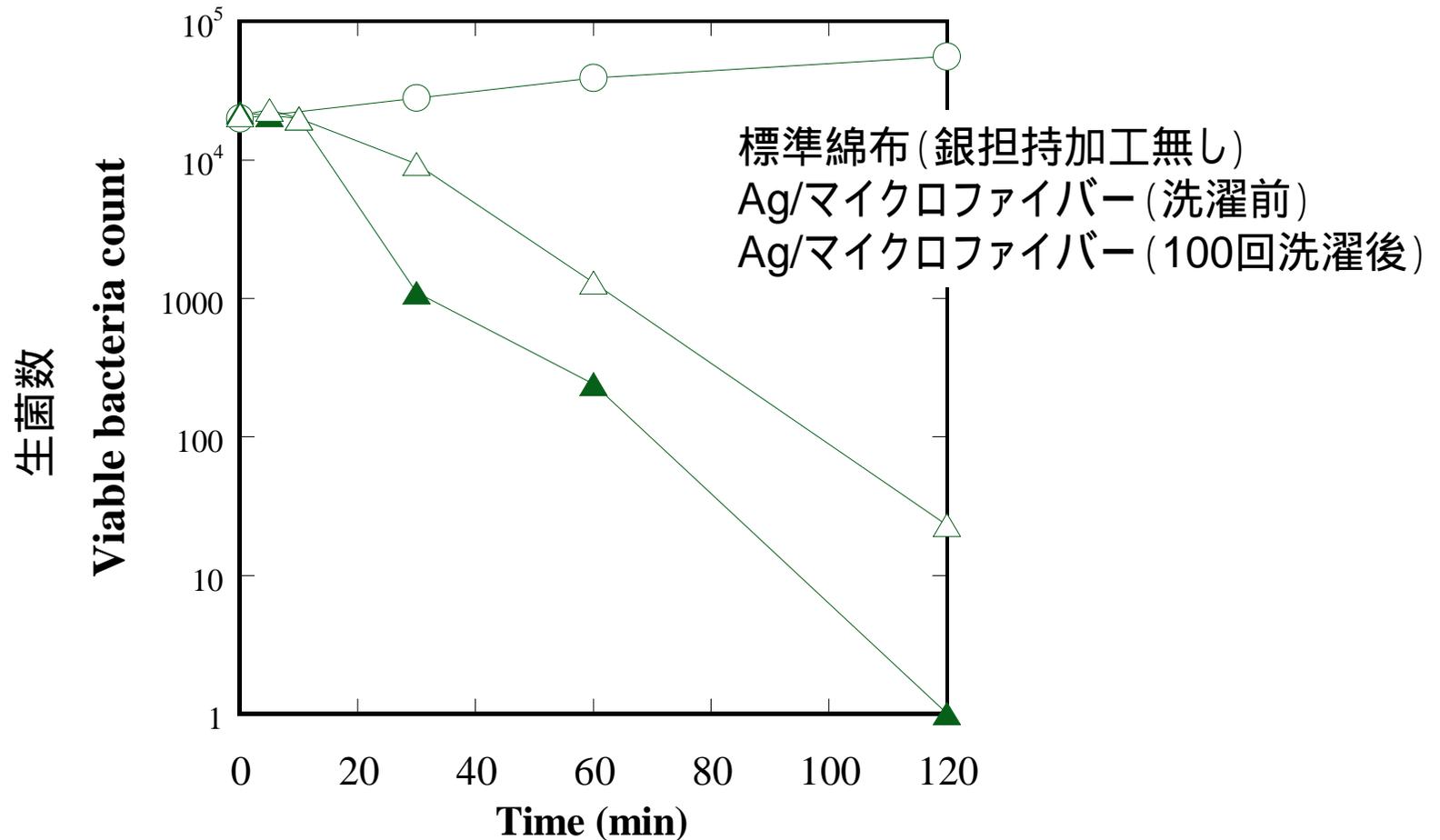
試験菌種: 大腸菌O-157、O-111

試験方法: 菌液吸収法、培養0~120分、生菌数評価



- 大腸菌O-157, O-111は1時間以内で検出限界以下に。
- 100回洗濯後もその性能は殆ど低下していない。

抗菌性試験の例 (黄色ブドウ球菌)



- 黄色ブドウ球菌は数時間で検出限界以下に
- 菌種によって効果は若干異なる

閉鎖性皮膚貼布試験 (株式会社生活科学研究所)

無加工品・加工品(洗濯なし)ともに、被験者20名全員に皮膚反応の変化は全く無く、無刺激性(陰性)と判定。

食品衛生法食品、添加物等の規格基準 (財団法人日本紡績検査協会)

1. カドミウムおよび鉛

カドミウム … 適合：基準値(100 μ g/g)以下(定量下限(0.1 μ g/g)以下)

鉛 … 適合：基準値(100 μ g/g)以下(定量下限(2 μ g/g)以下)

2. 重金属

重金属 … 適合：基準値(鉛として1 μ g/ml)以下

3. 有機物含有量試験

過マンガン酸カリウム消費量 … 不適合(32.2 μ g/ml)：基準値(10 μ g/ml)

食品そのものの基準としては不適合と判定されるが、子供用玩具等の基準値(50 μ g/ml)には適合。

➤ 本技術による銀ナノ粒子担持繊維の安全性は高い