

共同研究寄稿文

銀メッキ材料の抗菌評価とメカニズム検証

国立大学法人 九州工業大学 大学院生命体工学研究科
生体機能応用工学専攻 教授 前田 憲 成

要 約

三島光産社が開発している銀メッキ材料を対象として、殺菌作用の効果検証、およびメカニズム解明に関する調査を行ったところ、殺菌作用を持つこと、その殺菌効果は銀メッキ材料のサイズの大きさと相関して高まることが明らかとなった。銀による殺菌は、溶菌を伴うものでなく、菌自体をそのまま不活性化する形式であることが示唆された。またこの殺菌作用は、好気条件でのみ観測されたことから、銀による殺菌作用には酸素が不可欠であることがわかった。細胞内外の銀の存在量は、好気条件と嫌気条件で、大きな差がないため、銀による殺菌作用が細胞内外のどちらかで起こっているかは特定できなかった。グラム陰性菌の2株、グラム陽性菌の2株を用いた殺菌効果の検証では、グラム陰性菌である緑膿菌、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌はほぼ同程度の殺菌作用を示したことから、銀の殺菌作用はグラム陰性とグラム陽性の細胞表層の構造の違い（細胞壁の丈夫さ、細胞表層の帯電）ではなく、細胞の空間配列によって感受性が変化していることが示唆された。また、複合系微生物に対する銀の殺菌作用の調査から、多くの細菌種が銀によって死滅することが示唆される一方で、*Aquitalea* 属、*Hydrotalea* 属、*Dyella* 属、*Tumebacillus* 属などの菌株は、銀に対して感受性が低い可能性が明らかとなった。

キーワード：大腸菌，銀材料，酸素，細菌群，グラム陰性菌



前 田 憲 成 氏 略 歴

- 平成 13 年 3 月 九州工業大学工学部物質工学科応用化学コース 卒業
- 平成 15 年 3 月 九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻
博士前期課程 修了
- 平成 18 年 3 月 同 博士後期課程 修了
博士（工学）（九州工業大学）
- 平成 18 年 4 月～平成 19 年 9 月
米国テキサスA & M 大学工学部化学工学科博士研究員
- 平成 19 年 10 月～平成 23 年 9 月
九州工業大学大学院生命体工学研究科 助教
- 平成 23 年 10 月～令和 3 年 10 月
同 准教授
- 令和 3 年 11 月～現在
同 教授

主な研究

1. 微生物学的な下水汚泥の資源化
2. 捕食性細菌の分離と特性評価
3. クォーラムセンシングなどによる細菌機能制御
4. 細菌間相互作用に着眼した歯周病抑制技術

1. 緒言

銀は抗菌物質の一つとして古くから知られており、その抗菌作用は衣料品、食料産業、浄水、家庭用電化製品、医療などのさまざまな分野で利用されている。銀は金属、塩、ナノ粒子などのいくつかの形態において抗菌作用を働くことが報告されており、細胞壁・細胞膜の破壊¹⁻²⁾、酵素の機能停止（酵素障害説³⁾、DNAの複製阻害（細胞分裂停止説⁴⁻⁵⁾や活性酸素の生成⁶⁾などのメカニズムが明らかにされつつある。近年では、銀をナノレベルのスケールで粒子として活用する、銀ナノ粒子の研究も進展しており、発現しているすべてのタンパク質を同定・定量し、個々のタンパク質の機能およびタンパク質同士の機能的なつながりを解明するプロテオミクス解析から、主に細胞膜機能および活性酸素種（ROS）関連のタンパク質発現レベルが変化することを見出している⁷⁾。この結果は、銀ナノ粒子によって誘発される細胞膜機能への干渉およびROS生成ストレスが抗菌効果の経路の一つであることを示唆している。

また、銀材料はバイオフィーム（細菌群が凝集して形成される菌膜）に対しても効果があることが報告されている⁸⁾。バイオフィームは多くの感染症の原因の一つになっており、病院における院内感染症の原因の50%以上を占めている⁹⁾。緑膿菌が形成するバイオフィームは特に強固で、抗生物質などの抗菌薬が作用しなくなるという多剤耐性の要因にもなっている¹⁰⁾。そのような背景の中、抗生物質に代わって注目されているのが銀であり、銀材料は緑膿菌が形成するバイオフィームの増殖を阻害すると同時に、形成されたバイオフィームを分散させる効果を持つという実験結果も報告されている⁸⁾。

近年、三島光産社では、ナイロンやゼオライトなどへの素材に対して、銀でメッキ処理を行うという独自の技術を確認させており、銀でメッキした様々な材料の開発、およびその効能評価を進めている。実際に、これらの銀メッキ材料が生け花や農作物の寿命を延ばすなどの効果が明らかになっており、様々な分野への用途展開が期待されている。これらの効能は、銀による微生物に対する抗菌作用によるものと考えられるが、今後の市場への売り込みには、開発した銀メッキ材料においてもきちんと抗菌作用が見られるのか、どのよ

うな菌に対して抗菌活性を発揮するのか、抗菌作用はどのようなメカニズムなのか、などを明らかにする必要がある。

本稿では、三島光産社がナイロン素材に対して、銀メッキ処理を行った商品である Ag Repeller（エージーリペラー：以後は銀メッキ材料という総称で記載）自体、ならびにそこから溶出された銀溶液を用いた研究成果について紹介する。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験材料、使用菌株、菌の培養

本研究では使用した銀メッキ材料、および銀溶液は、三島光産社から提供されたものを使用した。また本研究で用いた一般試薬は、特級規格品を用いた。使用菌株は *Escherichia coli* BW25113 株（大腸菌）、*Pseudomonas aeruginosa* PA14 株（緑膿菌）、*Bacillus subtilis* ATCC6633 株（枯草菌）および *Staphylococcus aureus* 209P 株（黄色ブドウ球菌）であり、これらの菌株の培養には LB 培地¹¹⁾を用いた。はじめに -70℃ の超低温槽に保存しているこれらの菌株のグリセロールストックを LB 寒天培地に塗布した後、37℃ で一昼夜の期間、培養することで菌起こし（シングルコロニーを得る）を行った。そして得られたそれぞれのシングルコロニーを、試験管に無菌的に分注した 5 mL の LB 液体培地に植菌し、37℃、120 rpm の振とう速度で一昼夜培養を行った。その後これらの培養液に対して、遠心分離（13000 rpm で 1 分間）を行った。そして、菌体であるペレットを残し、上清の LB 培地は取り除く、それからそのペレットに対して、新しく M9 緩衝液¹²⁾を加えて懸濁させ、再度遠心分離処理を行った。遠心分離、上清の除去、M9 緩衝液での再懸濁の操作を計 3 回行うことで、菌液の調製を行った。最終的には試験管中に M9 緩衝液に懸濁させた 5 mL の菌液（初期濁度 OD600 = 1.0）を抗菌アッセイに使用した。

2-2. 抗菌アッセイ、成分分析、死菌・生菌判定

UV 滅菌した銀メッキ材料を 0.25 cm³、0.5 cm³、1 cm³ の大きさに切り分けたあと、それぞれを無菌的に 5 mL の菌液の中に加え、37℃、120 rpm の条件で振とう培養した。そして、0 時間、1 時間、3 時間、5 時間、7 時間、24 時間時点におけるサンプルを採取して、

分光光度計による濁度測定、ならびにその段階希釈 ($10^1 \sim 10^7$) したものを、LB 寒天プレート上にスポットプレATING法で塗布した後、37℃で一昼夜の期間、培養した。そして、寒天プレート上に形成しているコロニーの数をカウントして、生菌数を測定した。

加えて、上記の銀メッキ材料で処理した菌液は、遠心分離 (13000 rpm で1分間) を行い、その上清はさらに 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過処理を行い、そのろ過液に対しては Lowry 法¹³⁾ によるタンパク質濃度測定、Qubit システムを用いて DNA 濃度測定を行った。また菌体の生存を視覚的にみるために、Live/Dead 染色試薬を用いて、蛍光顕微鏡を用いて菌の観測も行った。

2-3. 好気・嫌気条件における抗菌アッセイ

2-2 における抗菌試験において、銀メッキ材料と大腸菌液を接触させる条件として、好気および嫌気条件における抗菌試験を行った。嫌気条件を作る前準備として、バイアル瓶に銀メッキ材料 (1 cm^3) を入れて、ゴム栓・アルミキャップで密栓させたもの、バイアル瓶に M9 培地 100 mL とレザズリン 0.1 mL を加えて、ゴム栓・アルミキャップで密閉させたものを 121℃、20 分間のオートクレーブ処理を行った。一方で、上述の通りに洗浄した菌液は、濁度測定を行った後、窒素ガスを直接吹き込み、菌液中の溶存酸素を除去する操作を行った。そして、銀メッキ材料が入ったバイアル瓶に、滅菌処理した M9 緩衝液を 10 mL、菌液を初期濁度 OD600 = 1.0 の条件となるように、注射針を使用して加えた。そしてその最終段階のバイアル瓶に対して、さらに窒素置換処理で酸素を除去する操作を行った後に、37℃の温度条件下、120 rpm の振とう条件で培養した。好気条件のものは、ゴム栓・アルミキャップを使わず、アルミホイルを使い、M9 緩衝液は酸素除去操作を行っていないものを使用し、同様に試験を行った。生菌数は上述と同様な方法で測定した。

2-4. 菌体内外の銀の定量

2-3 で述べたサンプルを用いて、菌体内外の銀の定量を行った。菌体外の銀濃度の測定には、培養後のサンプルを遠心分離 (13000 rpm で1分間) し、その上清をさらに 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過処理し、最終的には 10 mL のろ液に金属分析用 30% 硝酸を 0.1 mL 加えたものを測定サンプルとして使用し

た。菌体内の銀濃度測定には、遠心分離 (13000 rpm で1分間) 後の菌体ペレットを生理食塩水で3回洗浄 (遠心分離と再懸濁の繰り返し) した後、最終的な菌体ペレットに、銀メッキ材料と大腸菌液を接触させる条件として、1 mL の硝酸 (1.38) を加え、菌体ペレットを溶解させた。さらに 99 mL の精製水に溶解液 1 mL をゆっくり滴下し、最終的には 0.2 μm メンブレンフィルターを用いて懸濁液をろ過した液を測定サンプルとした。それぞれのサンプルは、マルチタイプ ICP 発光分光分析装置 (ICPE-9820) を用いて測定した。

2-5. 複合系微生物を用いた銀の抗菌スペクトル評価

銀メッキ材料がどのような微生物に対して作用を発揮しているのか、その抗菌スペクトルを明らかにするため、複合系微生物に対する銀メッキ材料の影響を調査した。一つは生菌数評価、もう一つは細菌群集構造解析である。複合系微生物としては多種多様な細菌群を保持していることが知られている下水汚泥とした。本研究に使用した下水汚泥は、北九州市の下水処理場から採取したものを使用し、1週間以内のものを使用した。採取した汚泥は使用する直前まで冷温室 (4℃) で静置保存し、実験系を仕込む直前に下記の操作で調整したものを使用した。下水汚泥を遠心管に移し、遠心分離 (8000 g, 4℃, 10 min) し、上澄み液を捨てた。その後、蒸留水を加え汚泥のペレットを再懸濁し、再び同条件で遠心分離して、上澄み液を捨てることで洗浄操作を行った。この洗浄操作を計3回行い、最後に残ったペレットを精製水で4倍希釈することで、25% (w/v) 下水汚泥とした。この汚泥をもとに、最終的には下水汚泥の濃度を 0.2% (w/v) に調整した。125 mL の調製汚泥 (0.2% (w/v)) に、銀溶液を 300 ppm となるように加え、その後 37℃、120 rpm で2日間培養した。培養後の汚泥を使い、生菌数測定、および DNA 抽出、ならびに次世代シーケンサー MiSeq による菌叢解析を行った。DNA 抽出¹⁴⁾ および MiSeq による菌叢解析¹⁵⁾ の手法は以前に研究室で確立された手法と同様に実施した。得られたシーケンスデータをもとに、QIIME 2 などの情報処理技術を使い、細菌群集の構造を調べた。

3. 結果および考察

3-1. 銀メッキ材料の大きさと抗菌活性の関係性調査

はじめに、本抗菌試験においては、試験菌株の培養に用いられる LB 培地ではなく、M9 緩衝液に再懸濁させた菌液を用いた。その理由として、LB 培地の用いた場合、LB 培地の成分を使って試験菌株が増殖する可能性があるためである。仮に銀メッキ材料による効果が確認された場合に、増殖阻害の効果が菌の増殖を抑制したことであるのか、あるいは殺菌したことであるのかを区別することが難しいためである。M9 緩衝液に再懸濁させた菌液中では、菌は栄養分がないため、増殖できない¹²⁾。そのため、M9 緩衝液を用いたアッセイ系における生菌数の減少は、殺菌作用によるものと評価することができる。このアッセイ系で、0.25 cm³、0.5 cm³、1 cm³ の銀メッキ材料を用意し、これらをそれぞれ M9 緩衝液に再懸濁させた大腸菌の菌液に加え、培養して、経時的に生菌数変化を調べた (図

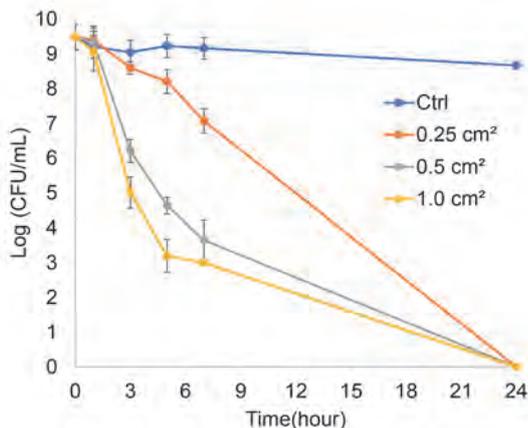


図 1. 異なったサイズの銀メッキ材料を用いた大腸菌の殺菌作用

1)。銀メッキ材料を添加していないコントロール (Ctrl) では、栄養をほとんど含まない貧栄養環境であるので、生菌数が変化せずに一定になっていることが分かった。その一方で、三島光産社が独自に開発した銀メッキ材料は殺菌作用を持つこと、さらにその材料の使用面積が大きいと顕著に生菌数も減少していることが分かった。銀材料のサイズが大きくなるほど、生菌数が速く減少していること、ならびに生菌数の減少スピードは銀メッキ材料の大きさ・表面積に依存していた。また、いずれの大きさの銀メッキ材料においても 24 時間後の生菌数はゼロになった。これらの結果は、抗菌活性の強さが銀メッキ材料上の銀の量と関連していることを意味する。殺菌作用を及ぼす因子としては、銀メッキ材料から漏出してくる銀成分 (銀イ

オンや銀粒子など)、あるいは銀がメッキによって固定化している材料表面自体、またはその両方が殺菌因子となっていることが考えられる。

3-2. 銀メッキ材料で処理した大腸菌液の調査

殺菌作用が確認された大腸菌の菌液に対して、濁度測定、上清中のタンパク質濃度測定、DNA 濃度測定を行った。これは、銀メッキ材料による殺菌が溶菌を伴うものかを確認するためである。例えば、リゾチームなどの酵素のように、細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンに切断し、細胞壁の破壊を及ぼす¹⁶⁾作用の場合、最終的には細菌の細胞が破裂し、細胞質などからタンパク質や DNA などの生体分子が細胞外内に漏出することが考えられる。細菌が溶菌して濁度が低下しているのか、細菌の溶菌によってタンパク質や DNA などが漏出しているのか、これらについて確認したところ、濁度は 24 時間後も初期の濁度 OD600 = 1.0 から最大で 0.9 に低下している程度で、大きな減少は見られなかった。この結果と相関して、上清中のたんぱく質濃度は銀メッキ材料のありなしで 128 μg/mL および 131 μg/mL、DNA 濃度は 0.062 ng/μL および 0.063 ng/μL と同程度であった。これらの結果から、銀メッキ材料による作用は、溶菌を伴わない殺菌であることが明らかとなった。

続いて、大腸菌が死滅していることを生菌数測定以外の手法で検証するために、Live/Dead 染色試薬による評価を行った。これは SYTO 9 と PI と呼ばれる試薬をそれぞれ使用する評価法で、生細胞と死細胞における色素の透過性の違いを区別して評価する手法となっている。具体的には正常な膜を持つ生きた細菌は、

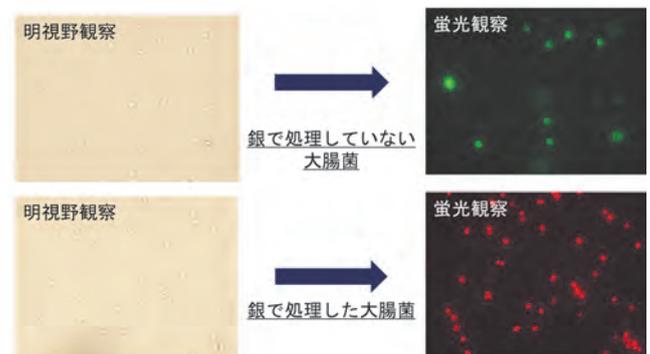


図 2. 銀メッキ材料で処理した大腸菌に対する死菌・生菌判定 (銀ありなしの条件で、24 時間処理した大腸菌を用いた観測)

SYTO 9によって緑色に染色される一方、膜が損傷した死菌はPIに結合し、赤色に染色されるため、緑色は生菌、赤色は死菌を示すことになる。銀メッキ材料で24時間処理した大腸菌の菌液を Live/Dead 染色試薬を使い、蛍光顕微鏡によって評価した。その結果、図2に示したように、銀メッキ材料を使用していないコントロールの系の大腸菌の細胞はそのほとんどが生菌を示す緑色を呈する細胞が計測されるのに対し、銀メッキ材料で処理した大腸菌の細胞はすべてが赤色となっており、死滅していることがわかった。

3-3. 銀メッキ材料による抗菌作用における酸素の必要性

銀の殺菌の要因の一つとして、活性酸素種の生成が考えられている。基本的に活性酸素種は溶液中に含まれる溶存酸素から生成されると言われているため、銀が何らかの働きによって溶存酸素を活性酸素種に変換している可能性がある。そこで、溶存酸素がなく、酸素供給が遮断された環境である嫌気条件で、銀メッキ材料の抗菌活性が確認できるのか検証を行った。本試験で使用する大腸菌は、通性嫌気性菌である（酸素があってもなくても生存できる）ため、嫌気条件にすることで大腸菌が死滅することはない。本実験を行う上で、M9 緩衝液の中にレサズリンと呼ばれる試薬を添加した。この試薬を含んだ溶液は、好気条件で青あるいはピンク色、嫌気条件で無色透明に呈色する¹⁷⁾ため、緩衝液中の酸素の有無を視覚的に視ることが可能となる。図3-Aは嫌気あるいは好気条件においた銀メッキ材料のアッセイ系の写真となっている。嫌気環境ではレサズリンが透明化しているため、菌液の濁度を示

す白の色を示しているのに対し、好気環境ではレサズリンがピンク色に呈していることがわかる。この条件で、24時間後、48時間後における生菌数を比較したところ、好気条件では24時間、48時間の時間経過とともに、生菌数が減少しているのに対し、嫌気環境では48時間までの期間、生菌数の減少は見られなかった（図3-B）。銀が存在している条件でも、嫌気環境では殺菌作用が見られないことから、活性酸素の発生源と考えられる酸素が抗菌作用には不可欠であることが明らかとなった。

3-4. 銀メッキ材料で処理した大腸菌液における銀の動態調査

大腸菌の細胞に、どれくらい銀が取り込まれているのか明らかにするため、銀メッキ材料で24時間処理した大腸菌の菌液を用いて ICP 発光分光分析装置による銀の定量を行った。この調査において、菌液の上清中の銀を定量することで、細胞外にどれくらいの銀が存在しているのか、大腸菌の菌体のみを回収してその菌体を対象として銀濃度を測定することで細胞内にどれくらいの銀が存在するのかを調べた。図4は細胞内外の銀の定量の結果である。好気環境、嫌気環境に関わらず、銀は細胞内よりも細胞外の方に多く存在していること、殺菌作用がある好気環境では、嫌気環境よりも多く銀を取り込んでいることがわかった。その一方で、銀の検出量は嫌気・好気で大きな差がないため、活性酸素種が細胞内、細胞外のどちらで発生しているのかは現時点では不明である。活性酸素種群を検出するキットを用いて、銀メッキ材料および M9 緩衝液のみが存在する条件で活性酸素種が発生しているか

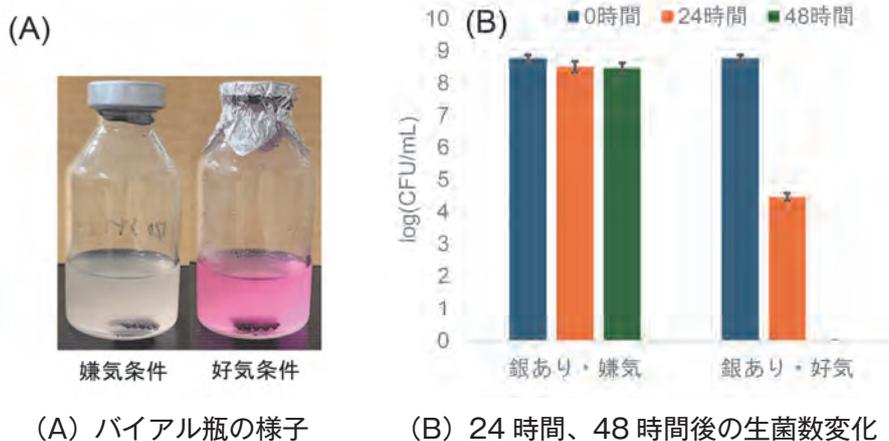


図3. 嫌気条件および好気条件における銀メッキ材料による大腸菌への殺菌作用の検証

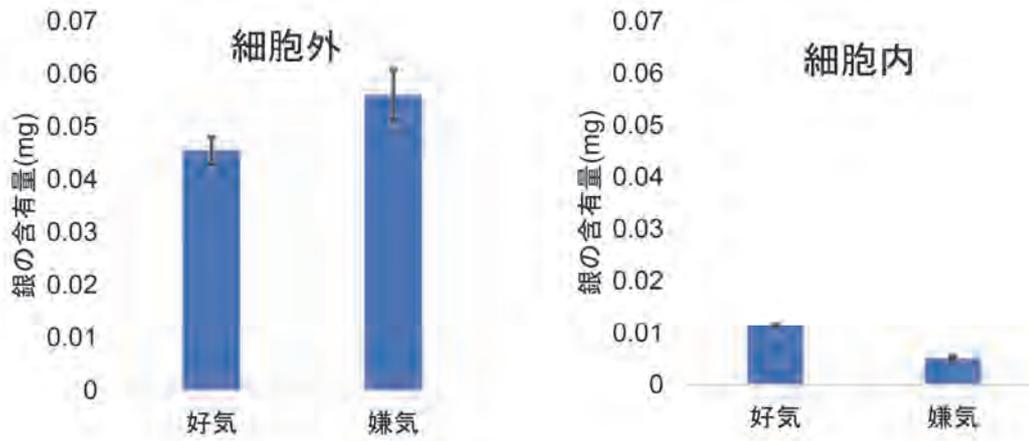


図4. 銀メッキ材料で処理した大腸菌の菌液（24時間後）における細胞内外の銀の動態

確認したが、活性酸素種群は発生しなかったことから、細菌が保持する代謝経路と関係して活性酸素種群を発生させている可能性がある。その場合、代謝系の酵素群は基本細胞内に保持していることから、銀の抗菌作用は細胞内で発現していることが示唆される。今後、銀メッキ材料の活性酸素種群の発生のメカニズムを明らかにする必要がある。

3-5. 各種菌株に対する銀メッキ材料の殺菌作用の調査

これまで、本研究では大腸菌を試験菌株とした調査を行ってきた。その一方で、その他の菌株に対して、銀メッキ材料がどのような効果をもたらすのかを検証した。新たな試験菌株として、緑膿菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌を用いた。緑膿菌は大腸菌と同様にグラム陰性菌、枯草菌と黄色ブドウ球菌はグラム陽性菌であるため、これらの菌株の抗菌作用の効果を比較することで、細胞表層の違いが殺菌作用にどのように影響するのかを評価することができる。一般的に、グラム陽性菌はグラム陰性菌よりも厚いペプチドグリカン構造を保持している¹⁸⁾。またグラム陰性菌の細胞表層はリポ多糖で構成されており、リンがあるため、細胞表面は負に帯電していることが報告されている¹⁹⁾。そのため、細胞壁の強度の違い、細胞表層の電荷の違いがどのように殺菌作用に影響するのかを調べることができる。大腸菌、緑膿菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌の菌株を使って、銀メッキ材料による殺菌効果を評価した(図5)。その結果、いずれの菌株も、最終的には時間変化とともに、生菌数が減少しており、大腸菌と同様に殺菌作用があることが明らかとなった。その一方で、銀メッキ材料に対する感受性は、菌株によって異

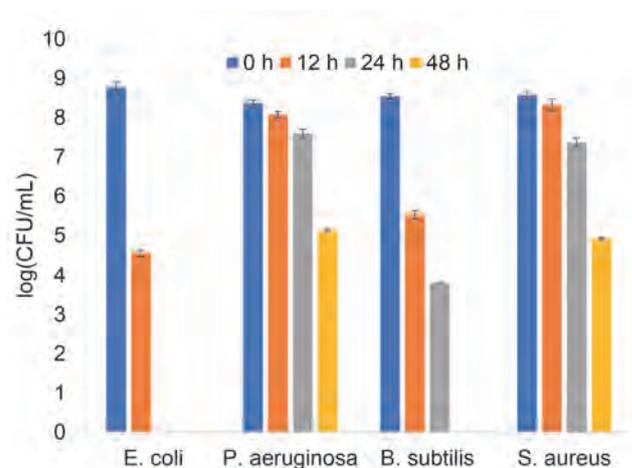


図5. 大腸菌、緑膿菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌に対する銀メッキ材料の殺菌作用の評価 (E. coli : 大腸菌、P. aeruginosa : 緑膿菌、B. subtilis : 枯草菌、S. aureus : 黄色ブドウ球菌)

なっており、大腸菌は銀メッキ材料に対して最も感受性の高い菌株であった。大腸菌と同じグラム陰性菌である緑膿菌は銀メッキ材料によって死滅しにくいこと、グラム陽性菌である枯草菌と黄色ブドウ球菌では枯草菌は比較的死滅しやすいのに対し、黄色ブドウ球菌は緑膿菌と同程度の殺菌効果を持つことなどから、銀メッキ材料による殺菌作用において、細胞壁の強度と細胞表層の電荷はあまり関係がないことが示唆された。その一方で、緑膿菌は多剤耐性菌としても知られているように、強固なバイオフィルムを形成する⁷⁾菌株、黄色ブドウ球菌はグラム染色後の顕微鏡観察でも観察されるように、空間配列としてブドウ状の形態をとる²⁰⁾菌株である。そのため、細胞自体の構造よりも、細胞間の凝集度が銀メッキ材料に対して殺菌のされにくさ

に関係していることが考えられる。今後、これらの4株の菌株以外にも、同様に銀メッキ材料に対する感受性評価を行い、上述の考えの裏付けを行う必要がある。

3-6. 複合系微生物に対する銀メッキ材料の効果検証

三島光産社が開発した銀メッキ材料が、すでに生け花や農作物の枯れ防止などに使用されている背景を考えると、単一でなく、複数の微生物群が存在している複合系微生物に対して、銀メッキ材料がどのような影響を及ぼすのか、どのような菌を不活性化でき、どのような菌には殺菌作用がないのかを明らかにしておく必要がある。そこで、多種多様な微生物種が存在していることが知られている下水汚泥を微生物源として、銀材料の効果の検証を行った。下水汚泥中に銀溶液を

接種し、1日間、2日間と培養して生菌数を測定したところ、図6-Aの写真に示したように、時間変化とともに、銀溶液を加えた下水汚泥において、生菌数が減少していることが分かった。2日目の下水汚泥の試料を対象に、細菌群集の構造を比較したところ、多種多様な細菌種が計測されるコントロール（銀溶液を接種していない）系と比べて、銀溶液を接種した系では検出される細菌種が減少していることが明らかとなった（図6-B）。この結果は多くの細菌群が銀による作用で死滅していることを示している。また、銀溶液を接種した系では、*Aquitalea* 属、*Hydrotalea* 属、*Dyella* 属、*Tumebacillus* 属などの菌群の存在率が顕著に増加しており、これらの菌群は銀による殺菌作用を受けにくい

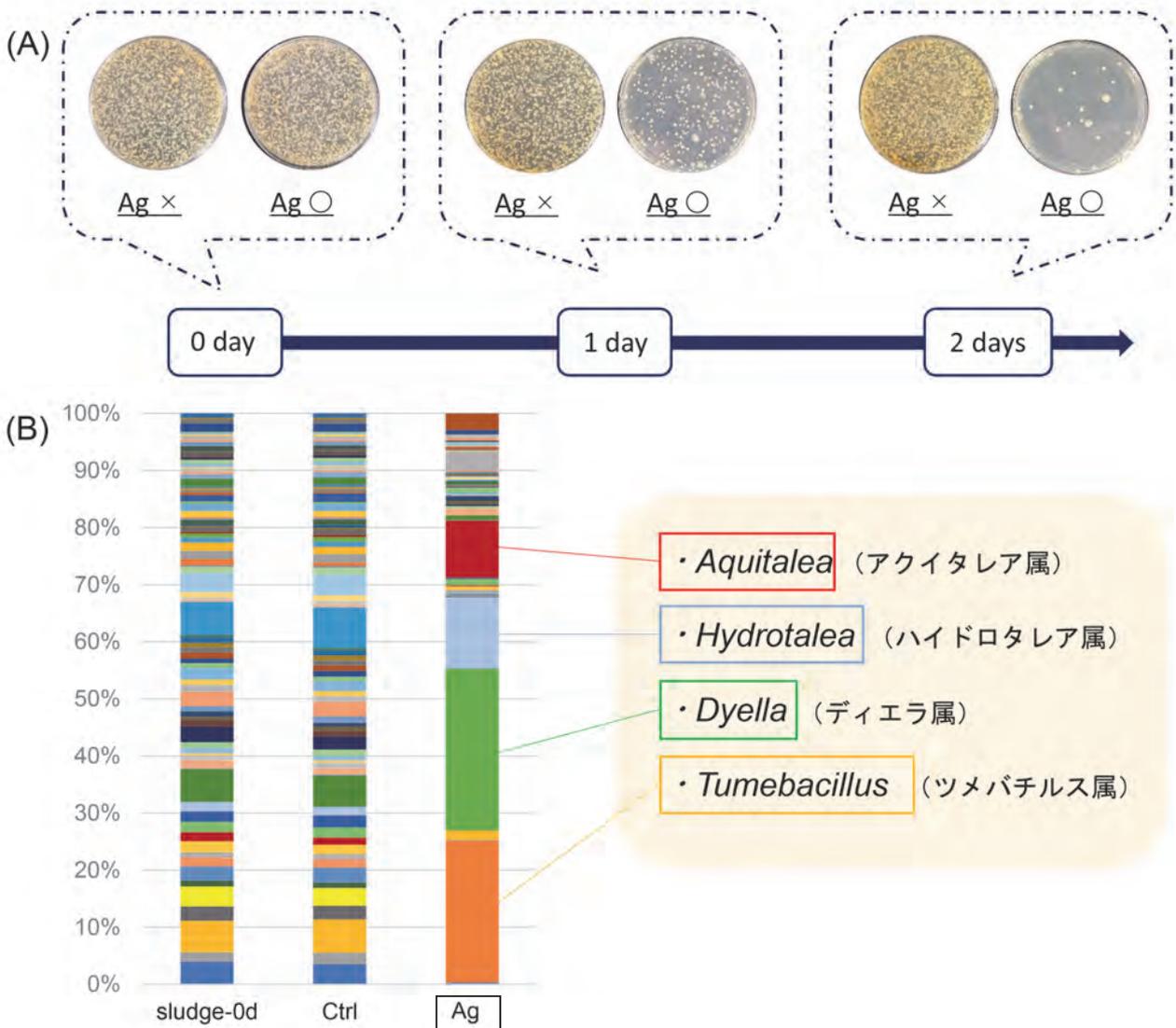


図6. 複合系微生物に対する銀材料の効果
 A：培養時間の変化に伴う寒天培地上のコロニーの様子
 B：二日後の細菌群集構造の変化（左から、初期汚泥、銀なし、銀あり）

菌群であることを示唆している。

4. 結論

以上の結果より、本研究調査の結論を以下のようにまとめる。

1. 三島光産社が開発している銀メッキ材料は、殺菌作用を持つこと、その殺菌作用は銀メッキ材料の面積が大きいほど、強くなる。
2. 酸素が銀メッキ材料の殺菌作用には不可欠である。
3. 大腸菌のほか、緑膿菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌に対しても、銀メッキ材料の殺菌作用がある。その一方で、グラム陰性菌である緑膿菌、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌は同程度の殺菌作用を示し、グラム陰性菌とグラム陽性菌の細胞表層の構造よりも、細胞の空間配列が銀の感受性に影響している。
4. 銀材料は、多くの細菌種に殺菌効果を持つ。その中で、*Aquitalea* 属、*Hydrothalea* 属、*Dyella* 属、*Tumebacillus* 属などの菌群は、銀に対する感受性が低い。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、各種の実験を実施してくれた当室の大学院生、富吉功祐氏、ならびに定期的に研究の進捗に関して議論に加わっていただいた、三島光産社の方々に深謝する。

参考文献

- 1) Yin I.X., Zhang J., Zhao I.S., Li Q., Chu C.H., The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry, *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 2020:15, 2555-2562, 2020.
- 2) More P.R., Pandit S., Flippis A.D., Franci G., Mijakovic I., Galdiero M., Silver nanoparticles: bactericidal and mechanistic approach against drug resistant pathogens, *Microorganisms*, Vol. 11, No. 2, 369, 2023.
- 3) Matsumura Y., Yoshitaka K., Kunisaki S.-I., Tsuchida T., Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 7, 4278-4281, 2003.
- 4) Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 52, No. 4, 662-668, 2000.
- 5) Tao Y., Aparicio T., Li M., Leong K.W., Zha S., Gautier J., Inhibition of DNA replication initiation by silver nanoclusters, *Nucleic Acids Research*, Vol. 49, No. 9, 5074-5083, 2021.
- 6) Naik L.S., Revi C.V.R., Phyto-fabricated silver nanoparticles inducing microbial cell death via reactive oxygen species-mediated membrane damage, *IET Nanobiotechnology*, Vol. 15, No. 5, 492-504, 2021.
- 7) Yan X., He B., Liu L., Qu G., Shi J., Hu L., Jiang G., Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach, *Metallomics*, Vol. 10, No. 4, 557-564, 2018.
- 8) Ghezzi D., Boi M., Sassoni E., Valle F., Giusto E., Boanini E., Baldini N., Cappelletti M., Graziani G., Customized biofilm device for antibiofilm and antibacterial screening of newly developed nanostructured silver and zinc coatings, *Journal of Biological Engineering*, Vol. 17, 18, 2023.
- 9) Cangui-Panchi S.P., Ñacato-Toapanta A.L., Enríquez-Martínez L.J., Reyes J., Garzon-Chavez A.M., Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: a systematic review, *Current Research in Microbial Sciences*, Vol. 3, 100175, 2022.
- 10) Elfadadny A., Ragab R.F., AlHarbi M., Badshah F., Ibáñez-Arancibia E., Farag A., Hendawy A.O., De los Ríos-Escalante P.R., Aboubakr M., Zakai S.A., Nageeb W.M., Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies, *Frontier in Microbiology*, Vol. 15, 1374466, 2024.

- 11) Bertani G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, Vol. 62, No. 3, 293-300, 1951.
- 12) Luria S.E., Delbrück M., Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, Genetics, Vol. 28, No. 6, 491-511, 1943.
- 13) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R., Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, No. 1, 265-275, 1951.
- 14) Roy C.K, Hoshiko Y., Toya S., Maeda T., Effect of different concentrations of sodium selenite on anaerobic digestion of waste sewage sludge, Environmental Technology & Innovation, Vol. 27, 102403, 2022.
- 15) Mustapha N.A., Sakai K., Shirai Y., Maeda T., Impact of different antibiotics on methane production using waste-activated sludge: mechanisms and microbial community dynamics, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 100, 9355-9364, 2016.
- 16) Fleming, A., On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character, Vol. 93, No. 653, 306-317, 1922.
- 17) Sychev A.V., Lavrova A.I., Dogonadze M.Z., Postnikov E.B., Establishing compliance between spectral, colourimetric and photometric indicators in resazurin reduction test, Bioengineering, Vol. 10, No. 8, 962, 2023.
- 18) Silhavy T.J., Kahne D., Walker S., The bacterial cell envelope, Cold Spring Harbor perspectives in biology, Vol. 2, No. 5, a000414, 2010.
- 19) Wilson W.W., Wade M.M., Holman S.C., Champlin F.R., Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements, Journal of Microbiological Methods, Vol 43, No. 3, 153-164, 2001.
- 20) Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P., Brock Biology of Microorganisms, Global Edition, The 16th edition, Pearson.