

## —共同研究—

# 抗菌・防カビ機能をもつ粘土鉱物系複合材料の作製と循環水におけるレジオネラ属菌抑制

研究企画課 阿部久雄  
研究開発科 高松宏行・木須一正・増元秀子  
長崎県環境保健研究センター 田栗利紹

## 要 約

粘土鉱物のモンモリロナイトの層間に、カフェイン又は銀イオン-カフェイン混合物を複合化することにより無機-有機複合材料を作製し、その抗菌力・防カビ力を評価した。カフェインのみを複合化した試料は抗菌、防カビ活性を示さなかったが、銀イオン-カフェイン混合物を導入した試料の最小発育阻止濃度(MIC)は、大腸菌で25mg/l、黄色ブドウ球菌で25~50mg/l、レジオネラ属菌で12.5mg/l以下と著しい抑制効果を示したほか、真菌類に対してもアオカビで50mg/l、クロコウジカビで50mg/lなど十分な防カビ力を示した。銀-カフェインを複合化した試料を、温浴循環水及び工業循環水を想定した条件でレジオネラ属菌と接触させたところ、いずれも24~48時間でレジオネラ属菌をほぼ完全に抑制することができた。

キーワード：銀、カフェイン、抗菌、防カビ、レジオネラ、温浴、循環水

## 1. はじめに

抗菌剤及びその利用技術は人や自然と共存し、清潔、安全、快適などを求める消費者の需要に応えつつ発展を続けており、大きな市場を形成している。著者らはこれまでに、モンモリロナイトなどの粘土鉱物と金属/有機化合物錯体とを複合化し、抗菌・防カビ機能をもつ粘土鉱物系複合材料を開発した<sup>1)4)</sup>。特に、抗菌力をもつ銀イオンと、防カビ力をもつイミダゾールなど有機化合物をモンモリロナイトと複合化した試料は安定した抗菌・防カビ力を示し、有効成分が水に対して数カ月間にも亘り徐々に溶出する徐放性を有している。

本研究では銀イオンと複合化する有機化合物として、茶抽出物の1成分であるカフェインを用いて複合材料を作製し、その抗菌、防カビ力について調査した<sup>5)</sup>。また、この複合材料の応用として、温浴循環水、工業循環水におけるレジオネラ属菌抑制を想定した試験を実施し、十分な抑制効果が確認されたので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 金属イオン/カフェイン錯体と粘土の複合材料の作製

複合材料の調製にあたり、ホスト化合物に粘土鉱物のモンモリロナイト(クニミネ工業製、クニピアF、以下粘土)を用い、その4gを純水200mlに分散させた。次に、この粘土のイオン交換能(115meq/100g)に対応する硝酸銀0.7814gを純水20mlに溶解させ、これに硝酸銀に対してモル比で2倍量のカフェイン( $C_8H_{10}N_4O_7$ )1.7865gを純水50mlに溶解したものを徐々に加え、硝酸銀とカフェインの混合水溶液を調製した。この混合水溶液を前記の粘土懸濁液に加え、pH4もしくはpH10に調整し、室温もしくは80℃で17h攪拌した。この粘土-硝酸銀-カフェイン混合液を吸引濾過により固液分離し、得られたケーキを凍結乾燥し粉末試料(以下抗菌剤試料：タイプCと記す。)を得た。

### 2.2 試料の基礎物性評価

抗菌剤試料の炭素及び窒素をCHN分析により、その他の成分を蛍光X線分析(以下XRF)により測定した。また粘土の底面間隔の変化を薄膜X線回

折(XRD)により評価した。さらに、各抗菌剤試料の大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する抗菌力を最小発育阻止濃度(以下MIC:抗菌製品技術協議会)により評価した。

### 2.3 循環水におけるレジオネラ属菌抑制効果の評価

#### (1) 温浴施設における循環水を想定した評価試験(以下「温浴循環水評価」)

温浴施設におけるレジオネラ属菌等微生物の抑制効果を確認するため以下の評価を行った。抗菌剤試料には、前記タイプCの他に比較のため、銀/イミダゾール/粘土系抗菌剤(タイプI)を用いた。抗菌剤と温浴水との接触のため12L水槽3台を用い、そのうち2台には水道水を9Lずつ、1台にはアルカリ泉(アルカリ性単純泉:ピュア鉱泉製造)を9L入れ、試験前日から42°Cに加熱循環した(図1参照)。翌朝、水道水の残留塩素が消失していることを確認後、それぞれの水槽に2日間追い炊き入浴した風呂水を3Lずつ入れ、循環攪拌後レジオネラ属菌を終濃度約105cfu/100mlとなるように接種した。これに、前記の抗菌剤3種を、いずれも透水性不織布小袋に3gを封入し、8日間連続して温水を循環し、0日目(0h)、1日目(24h)、5日目

(120h)、8日目(192h)に検水を採取した。得られた検水100ml中のレジオネラ数を濃縮法(新版レジオネラ防止指針<sup>6)</sup>)により測定した。また、検水の一般細菌、色度、濁度、銀濃度(いずれも水道法施行規則に定める検査方法)を8日目のみ測定した。

#### (2) 冷却塔や工業施設の循環水を想定した評価試験(以下「冷却循環水評価」)

工業施設の冷却水など工業循環水における、抗菌剤による微生物抑制効果を確認するため以下の評価を実施した。12L水槽2台に水道水を10Lずつ入れ、試験前日から25°Cに温度調節した(装置は(1)に同じ)。翌日の朝、水道水の残留塩素が消失していることを確認後、それぞれの水槽にレジオネラ属菌を終濃度約105cfu/100mlとなるように接種した。上記のうち水道水1台には(1)と同様に抗菌剤2種をいずれも透水性小袋に各3gを封入してセットし、別の水道水1台には抗菌剤をセットせず対照とした。装置における冷水循環を2日間連続して行い、0、1、6、24および48時間後に検水を採取し、検水100ml中のレジオネラ属菌数を前記濃縮法により測定した。また、検水中の銀濃度を2日目のみ測定した。

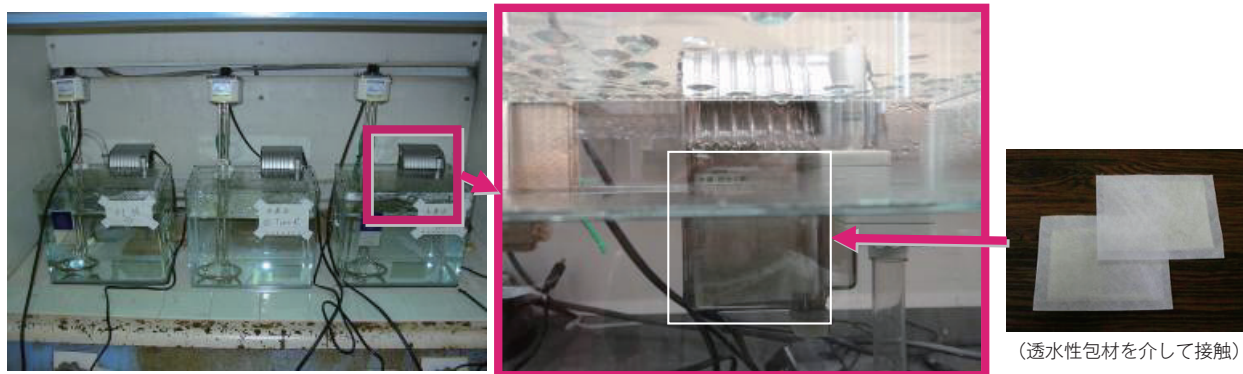


図1 温浴・冷却循環水評価試験に用いた装置 (左:装置全体、右:抗菌剤接触部)

表1 硝酸銀-カフェインと粘土の接触により得られた試料の分析結果

試料名	N (mass%)	C (mass%)	Ag <sub>2</sub> O (mass%)	カフェイン (mol)	Ag (mol)	カフェイン/銀比 (mol/mol)
C-1	4.66	8.20	6.74	0.085	0.058	1.5
C-2	4.74	8.25	6.75	0.086	0.058	1.5

(抗菌剤試料の作製条件は、C-1 : pH4-80°C、C-2 : pH10-80°C)

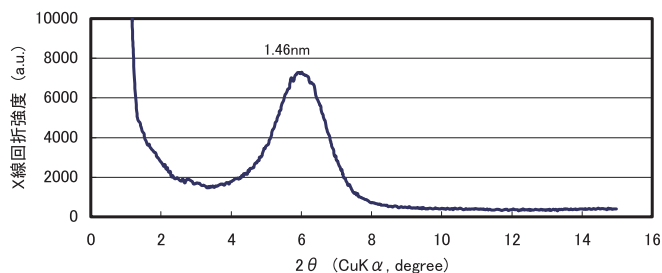
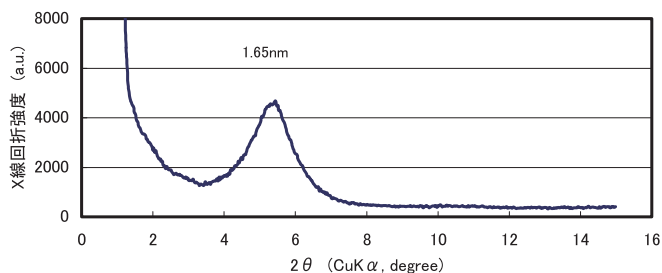


図2 抗菌剤試料の薄膜XRDプロファイル(調製時のpH:4(左)、10(右))

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 抗菌剤試料の基本物性

硝酸銀-カフェイン水溶液を粘土に接触させて得られた抗菌剤試料の分析値を表1に示す。試料のN/C比(重量比)はいずれも0.58で、これはカフェインのN/C比である0.58に等しい。試料中の炭素が全てカフェインによるものとしてカフェイン/銀比(モル比)を求めると、いずれも1.5であった。粘土へ添加した時のカフェイン/銀比は2であったことから、抗菌剤試料を生成する際に両者の比が変化していることが分かる。薄膜XRDより求めた試料の層間隔(図2)は、1.65nm(pH4)、1.46nm(pH10)と、調製時のpHにより一定ではなかったが、粘土層間に水分子があるときの1.28nmよりいずれも大きく、表1の結果と併せ、粘土の層間に銀及びカフェインが進入(複合化)した結果と考えられる。

#### 3.2 試料の抗菌力

各試料の大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する最

表2 各試料の抗菌活性(MIC値(液体))

試料名	大腸菌	黄色ブドウ球菌
タイプC-1	25	25
タイプC-2	25	50
カフェイン(参考)	>3200	>3200

表3 銀-カフェイン複合試料(C-2)の抗菌力の水中持続性(大腸菌)

時間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	16
抗菌力 (MIC: mg/l)	50	50	50	100	50	100	100	100	100	100	100	100

小発育阻止濃度(MIC)値を表2に示す。カフェイン-銀複合試料の抗菌力は、大腸菌:25mg/l、黄色ブドウ球菌:25~50mg/lと十分に強い。粘土にカフェインを導入した試料のMIC値を参考として示したが、カフェイン-銀複合試料の抗菌力には及ばないことから、試料の抗菌力は銀イオンによってもたらされたものであることが分かる。また、抗菌剤試料C-2の抗菌力は水中に浸漬すると、はじめは50mg/lを示し、4週目に100mg/lと一旦低下したが、その後は浸漬16週を経ても100mg/lを維持しており、その持続性が高いことが分かる(表3)。抗菌剤試料C-2のレジオネラ属菌に対する抑制効果と持続性を表4に示す。抗菌剤試料のレジオネラ属菌抑制力は非常に強く、試料を水中に50日間浸漬し続けた場合でも12.5mg/lであった。

抗菌剤試料C-2のカビに対する抑制効果はMIC値で50~200mg/lであったが、カフェインのみを導入した試料では防カビ活性は認められなかった(表5)。一般に銀イオンの防カビ力は低く有機系防カビ剤と併用される<sup>7)</sup>。本研究で用いた抗菌剤試料タイプIも銀イオンと防カビ剤イミダゾールの複合体である。今回のように防カビ力のないカフェインと銀イオンの組み合わせにより強い防カビ力が得られたことは興味深く、カフェイン-銀の相乗効果が示唆される。

#### 3.3 温浴循環水でのレジオネラ属菌抑制

レジオネラ属菌を接種した温浴循環水に対し、透

表4 銀-カフェイン複合試料(C-2)のレジオネラ属菌抑制活性

浸漬時間(日)	1	20	40	50
寒天MIC値(mg/l)	<1.56	≤12.5	6.25	12.5

表5 銀-カフェイン複合試料の防カビ活性(表中の単位はmg/l)

カビ菌種	試料名	
	C-2	カフェイン
クロカワカビ NBRC6348	200	>1600
クロコウジカビ NBRC6341	50	>1600
アオカビ NBRC6352	50	>1600

表6 温浴循環水中のレジオネラ属菌数の変化

試料/温浴水	時間	0日後(0h)	1日後(24h)	5日後(120h)	8日後(192h)
対照(水道水)		$5.9 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$
タイプC/水道水		$4.3 \times 10^5$	<10	<10	<10
タイプC/アルカリ泉		$4.7 \times 10^5$	10	<10	<10
タイプI/水道水		$4.1 \times 10^5$	10	10	10
タイプI/アルカリ泉		$4.9 \times 10^5$	<10	<10	<10

表7 温浴循環水の水質(8日目)

試料(試験水)	項目	一般細菌(個/ml)	色度(度)	濁度(度)	銀濃度(mg/l)
対照(水道水)		$5.2 \times 10^3$	2.5	0.3	<0.01
タイプC(水道水)		$3.0 \times 10^1$	2.9	<0.2	0.02
タイプC(アルカリ泉)		$2.8 \times 10^1$	1.8	<0.2	0.03
タイプI(水道水)		$7.5 \times 10^1$	1.4	0.6	0.02
タイプI(アルカリ泉)		$2.0 \times 10^1$	2.2	0.8	0.03

(水道法飲料水基準 一般細菌：100 個/ml 以下、色度：5 以下、濁度：2 以下)

水性小袋を介して抗菌・防カビ剤各試料を接触させたときの抑制効果を表6に示す。タイプC(C-2)、タイプIを接触させた温浴循環水では、水道水、アルカリ泉の別を問わず、接触24時間後の菌数が既に10cfu/100ml以下になっており、レジオネラ属菌に対する強い抑制効果が示された。

抗菌剤との接触8日目の温浴循環水の状態を調べた結果を表7に示す。温浴循環水中の一般細菌数は、

タイプC、タイプIを接触した場合、対照の概ね1/100程度になっており、水道水の基準(100 個/ml以下)を満たした。

いずれの温浴水でも色度は3以下、濁度は0.8以下であり、これらは水道法水質基準(色度5度以下、濁度2度以下)を満たしている。また、銀濃度はいずれの温浴循環水においても0.02~0.03mg/lであり、安全上の問題はないと考えられる(米国

表8 冷却循環水におけるレジオネラ属菌の抑制

試料(試験水)	時間	0時間後	1時間後	6時間後	24時間後	48時間後	銀濃度(mg/l)
対照(水道水)		$3.5 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	<0.01
タイプC(水道水)		$6.5 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$7.4 \times 10^2$	<10	0.01
タイプI(水道水)		$3.5 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	<10	<10	0.02
市販抗菌剤(水道水)		$5.0 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$	$5.1 \times 10^5$	<0.01

FDAの飲料水基準：0.1mg/l以下。日本国内の基準はない。)

### 3.4 冷却循環水でのレジオネラ属菌抑制

冷却循環水を模して、レジオネラ属菌を接種した水道水に抗菌剤試料を接触させたときの抑制効果を表8に示す。冷却循環水中のレジオネラ属菌は、抗菌剤タイプI、タイプCを接触させた場合、それぞれ24時間後、48時間後に10cfu/100ml以下になった。市販の銀系抗菌剤では48時間後も菌数の減少は全く認められなかった。循環水中の銀濃度はいずれも0.02mg/l以下で、前記の飲料水基準と比べても十分に低かった。

## 4. まとめ

(1) 銀イオン-カフェイン混合水溶液を粘土鉱物のモンモリロナイトに接触させ抗菌剤を作製した。この抗菌剤は、大腸菌、黄色ブドウ球菌、各種のカビの他、レジオネラ属菌に対しても強い抑制効果を有していた。

(2) 温浴循環水中にレジオネラ属菌を接種して抗菌剤による抑制効果を調べたところ、レジオネラ属菌は接触24時間後にほとんど死滅した。冷却循環水に対しても同様の試験を行ったところ、レジオネラ属菌は24~48時間でほぼ死滅することが分かった。

(3) 抗菌剤接触後の温浴循環水及び冷却循環水中の色度、濁度、銀濃度はいずれも飲料水基準を満たしていた(銀濃度は米国FDA基準)。

## 謝辞

本報告のうち抗菌剤作製に関する部分は平成16~18年度に実施した長崎県連携プロジェクト研究において行われた未発表分を含む。また、循環水

中のレジオネラ属菌に対する抑制試験に関する部分は平成22年度長崎県課題公募型共同研究の中で行われた。ここに記して、関係者に深く謝意を表する。

- 長崎県連携プロジェクト研究連携機関：長崎県環境保健研究センター・長崎県農林技術開発センター、長崎大学、長崎県立大学、産業技術総合研究所、微研テクノス
- 課題公募型共同研究連携機関：長崎県環境保健研究センター、T.Mエンタープライズ

## 参考文献

- 1) 阿部久雄、田栗利紹、大橋文彦、陶磁器製品用抗菌剤の製造方法、特許第3579636。
- 2) 阿部久雄、木須一正、田栗利紹、他3名、生理活性機能をもつ粘土鉱物系複合材料の製造方法、特許第4759662。
- 3) 阿部久雄、高松宏行、木須一正、「生理活性ナノシートの開発並びにその応用加工技術の研究」、平成17年度長崎県窯業技術センター研究報告、8-12、2006。
- 4) 阿部久雄、高松宏行、木須一正、田栗利紹、大橋文彦、浦川隆治、「有機金属錯体/モンモリロナイト複合材料の抗菌・防カビ特性」、平成18年度日本セラミックス協会九州支部秋季合同研究発表会要旨集、2006年12月。
- 5) 阿部久雄、田栗利紹、松尾和敏、他4名、粘土鉱物系抗微生物材料、特開2009-242337。
- 6) 厚生労働省健康局生活衛生課、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて」(健衛発第95号)、2001年9月11日。
- 7) 西野敦、富岡敏一、富田勝巳、小林晋、抗菌剤の科学、工業調査会、57-79、1996。