

エネルギーフィルタ型透過型電子顕微鏡による 銀イオンと生体との相互作用メカニズム解析

Characterization of the Interaction between Silver Ions and Escherichia Coli by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy

山中 幹 宏*
Mikihito Yamanaka

原 圭 太*
Keita Hara

工 藤 淳*
Jun Kudo

要 旨

銀イオン (Ag^+) による抗菌作用を利用した商品は、洗濯機を始めとして数多く存在するが、銀イオンが生体に対してどのように作用し、抗菌作用を発現しているのか、そのメカニズムの詳細については不明な点が多い。今回は大腸菌 (*E. coli*) を生体モデルとした銀イオンの抗菌作用について、エネルギーフィルタ型透過型電子顕微鏡 (EF-TEM) を用いた解析を行い、その結果、菌の不活化メカニズムとして、従来言われてきた細胞膜 (ペリプラズム空間) に存在する呼吸鎖酵素の失活以外に、銀イオンが、菌体内の細胞質内に含まれるタンパク質代謝の正常な働きを阻害することで、結果として細菌を不活化するメカニズムの可能性について知見を得たので報告する。

Silver ions are widely used in such applications as a washing machine because of the antibacterial functions. However, the insight into detailed mechanisms of these functions are still lacking. In this paper, the interaction of silver ions with *Escherichia coli* used as a model microorganism is characterized by energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). Silver ions are observed at the interior of *E. coli*, rather than at the cell membrane. The present result indicates that the antibacterial functions of silver ions are caused by the interaction with cytoplasmic proteins.

まえがき

日常生活環境において、抗菌という言葉は、広義には「滅菌」(全ての微生物を殺滅)、「殺菌」(微生物を一部でも殺せば殺菌)、「消毒」, 「除菌」, 「制菌」(微生物の増殖阻止)、「静菌」(微生物の増殖抑制)、「防かび」「防腐」という言葉をすべて含む。この機能に着目した抗菌・防黴剤は、無機系(銀, 銅, 亜鉛系, 酸化チタン系)と有機系(合成系, 天然系)に大別される。

これら抗菌性化合物の利用は、産業分野では、紙・パルプ用スライムコントロール剤, 木材防腐分野の他, 水処理, 分離の分野にも広がっている。

生活分野では、冷蔵庫, 洗濯機, 浄水器, 加湿器, 掃除用ゴミフィルタ等あらゆる家電製品に拡がっている他, 便器, バス, 化粧室などの水周り生活用品, まな板などの水周り台所用品, 生理用ナプキン, 歯ブラ

シ等のトイレタリー用品, 鉛筆, 定規等の文房具用品, タンス, 机, カーペット, カーテン等の家具・装飾品など非常に広い範囲で利用されている。

医療分野では、白衣, カーテン等の繊維製品, また壁材等の建材, プラスチック類をはじめとする医療用器具等へ利用されている。

かつては抗菌性化合物といえば、農薬や医薬品の流れを汲む有機系化合物が用いられてきたが、即効性, 殺菌性の面では優れているものの、人や環境に対する安全性が懸念され、近年は銀, 銅, 亜鉛といった抗菌性を有する金属を含んだものや、酸化チタンに代表される光触媒等、無機系抗菌性化合物が主流となっており、有機系でもカテキン等の天然素材の利用が高まってきている。

細菌の増殖抑制の能力に着目すると、銀と水銀イオンが特に活性が高く、亜鉛イオン, 銅イオン, カドミウムイオンがこれに続く。チフス菌の最小発育阻害濃

* 技術本部 デバイス技術研究所 第8研究室

度 (MIC) に着目すれば、銀が 2.0×10^{-6} 、銅が 1.5×10^{-5} 、亜鉛が 1.0×10^{-3} とされており¹⁾、無機系抗菌性化合物は銀を用いるものが殆どである。

上記のような背景より、特に銀は、その抗菌活性の高さ故、食器、お箸等の食器類、歯科治療、口臭清涼剤の仁丹や幼児用の樋屋奇応丸の外装、カステラや洋菓子の外装等にも用いられており、さらには1970年代には粉末活性炭層に銀塩を担持した浄水器が開発され、最近では文房具、タッチパネル、空調フィルタに至るまで幅広く利用されている。

シャープでは、既にこの銀イオンの持つ抗菌作用に注目し、洗濯衣類を「除菌防臭コート」する銀イオンコート洗濯乾燥機として商品化を行っているが、銀イオンによる菌の不活化メカニズムについては定かではなかった。

今回は銀イオンとの相互作用を解析する目的で、生体モデル材料として、E. coli (NBRC-3972) を用いて解析を行い、従来の不活化モデルとは異なる抗菌メカニズムの可能性が見出されたので報告する。

1. 従来の不活化モデル

従来、銀イオンによる菌の不活化メカニズムとしては、細菌表面の細胞膜と細胞壁の間 (ペリプラズム空間) に存在する呼吸鎖酵素のうち、チオール基 (SH基) が銀イオンと反応し、その結果として酵素活性が失われ、細菌が不活化すると言われていた^{2), 3)}。

2. リボソーム

リボソームは、ほぼ等しい量のRNAとタンパク質から構成され、タンパク質の合成に働く細胞内小器官である。原核生物のリボソームは、直径23nm程度の大きさを持ち、沈降定数70Sで大小二つのサブユニットからなり、さらに50Sと30Sのサブユニットに分かれる。50Sのサブユニットは、更に23SのRNA (rRNAを含む) と5SのRNAと35種類のタンパク質からなる。一方30Sのサブユニットは16SのRNA (rRNAを含む) と21種類のタンパク質からなっている。リボソームはその構造凝集力を持つために、0.001M程度のマグネシウム (Mg^{2+}) を必要とする。マグネシウムの濃度が10倍になると2個のリボソームが結合してダイマーを作り、逆にマグネシウムの濃度が0.001Mを下回ると、単一のリボソームが可逆的に分離し、サブユニットに分かれる。化学的には、強度に陰性となっており、陽イオンと塩基性色素を結合させるといった特徴を持つ。

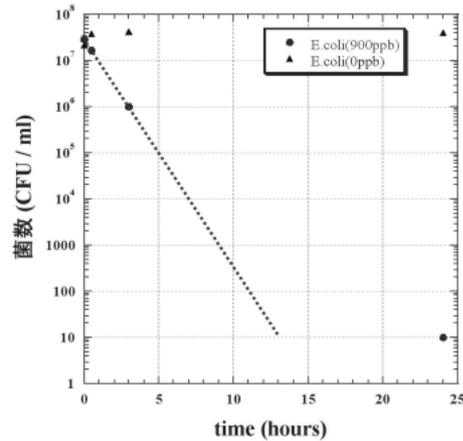


図1 大腸菌の抗菌試験結果

Fig. 1 Antibacterial test of E. coli affected by silver ions.

3. 大腸菌の抗菌試験

菌液として約 $10^7 \sim 10^8$ 個/mLの菌液を準備し、試験水として銀イオンユニットを用いて作製された900ppbの濃度の銀イオン水と所定の時間反応させた。リファレンスとしては銀イオンユニットを動作させないことで調整した銀イオン濃度0ppbの試験水を用意した⁴⁾。用いた水道水中の遊離残留塩素濃度は0.2mg/Lとなるように調整した。この菌液と銀イオン水を、30分、3時間、24時間接触させた後、サンプルを一部採取して、培地に摂取し、数日インキュベータで培養後、菌数を測定した (図1)。

銀イオン水と作用させなかったものは、菌数の増減が殆ど無いが、所定の時間銀イオン水と反応させたものは、反応時間の長さ依存して菌数が減少していく様子が確認された。

4-1. EF-TEM 解析用試料作製

抗菌試験に用いられなかった菌を遠心分離にて沈降させ、これらの菌を4℃の環境下、0.1Mカコジル酸緩衝液と2%のグルタルアルデヒドで固定 (前固定) し、固定液の浸透圧調整、固定液のPH調整を行った。その後、やはり4℃の環境下、0.1Mカコジル酸緩衝液で3回洗浄し、固定液のPHを安定化させた。後固定として、4℃の環境下で、2%四酸化オスミウム水溶液に4時間浸し、細胞内の自己融解の防止、細胞内の各主成分の不動態化を行った。更にアルコールを用いて脱水し、プロピレンオキサイドを用いて、10分間の置換を3回行った。この置換処理により包埋のために利用するエポキシ樹脂が、細胞内へ浸透しやすくなる。包埋はエポキシ系樹脂で行い、60℃の恒温槽に2日間静置した。包埋された試料はウルトラミクロトームにより、厚み50nm程度の超薄切片として切り出さ

れ、補強用にカーボンに10nm程度コートした後、EF-TEMにて観察を行った。構造観察を行う場合に限り、一部、核酸、リン脂質、リボソームを染色する為に2%酢酸ウラン水溶液と脂肪、タンパク質を染色する為にクエン酸鉛染色液にそれぞれ5分染色し、電子顕微鏡観察で得られる像のコントラストを高める場合もある。

4-2. EF-TEMを用いた銀イオン-生体相互作用解析

図2に典型的な大腸菌のEF-TEM(ゼロロス)像を示す。ゼロロス像とは、非弾性散乱電子を除外した弾性散乱電子にて選択的な結像を行い、電子顕微鏡像の色収差を除外して得られる高コントラストの像のことである。図より明らかな通り、原核生物の一種である大腸菌には、明瞭な核も存在せず、リボソームが高密度に満たされている細胞質中に、繊維状構造として核質が観察されるに過ぎない。

図3に細胞膜付近の拡大像を示す。外膜と細胞質膜(内膜)の間に、約10nm厚さ程度のペリプラズム空間が存在している。上述の通り、このペリプラズム空間内に呼吸鎖酵素が存在していると言われている。ペリプラズム空間は、黒いコントラストで見られる厚さ2nm程度のペプチドグリカンからなる特徴的な高分子ポリマーを含んでいる。

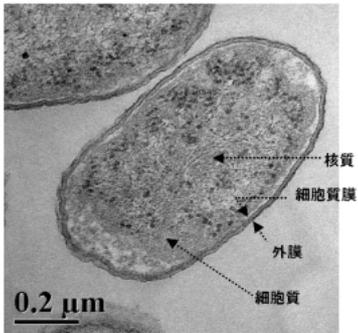


図2 典型的な大腸菌のEF-TEM像(ゼロロス像)
Fig. 2 Typical the zero loss TEM image of E. coli.

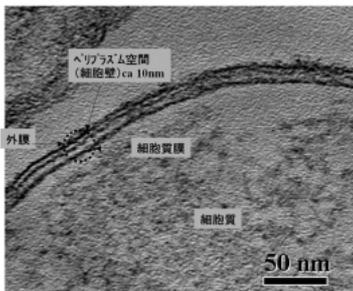


図3 細胞質膜周辺のEF-TEM像(ゼロロス像)
Fig. 3 The zero loss TEM image around a cell membrane.

分類	細胞壁		代表的な菌種
グラム陰性菌	外膜	リポタンパク質、リポ多糖、リン脂質等から構成。	大腸菌、プロテウス属、緑膿菌、百日咳菌、菌叢、スピロヘータ、李菌属、デブス属、サルモネラ属、腸桿菌属、淋菌、多くの病原性腸内細菌
	内膜	ペプチドグリカン層(2~3nm)により構成。	
グラム陽性菌	外膜は存在せず、ペプチドグリカン(20~80nm)やテイコ酸(ポリオールン-糖類)により構成。 テイコ酸のマイナス電荷により金属イオンが保持される。		黄色ブドウ球菌、乳酸菌、クロストリウム、結核菌、ウチ菌、シジヤリ菌

図4 原核生物の分類
Fig. 4 Classification table of procaryotes.

このペプチドグリカン層の厚みによって原核生物を二つのグループに分類することが出来る(図4)。大腸菌のような薄いペプチドグリカン層を持つものは、グラム陰性(Gram-negative)菌と呼ばれ、1885年にChristian Gramが発見したように、これらの細菌を、エタノールやアセトン等の有機溶媒で洗浄すると、クリスタルバイオレット-ヨード染色複合体を保持できなくなる性質がある。一方、グラム陽性(Gram-positive)菌は有機溶媒で洗浄しても、染色複合体を失わない原核生物であり、代表的な細菌として、黄色ブドウ球菌、乳酸菌等が含まれ、ペプチドグリカン層の厚さは20~80nm程度存在する。

図5に示すように、銀イオン水と所定の時間反応させた菌体の細胞質膜周辺を注意深く観察すると、外膜は残っているが細胞質膜が一部消失している領域が観察される。

細胞質膜が消失する傾向は、特に銀イオン水を24時間反応させた試料で数多く観察される。本来、銀を作用させない大腸菌では、外膜、ペリプラズム空間、細胞質膜の3層が観察されるが、銀の作用により、特に細胞質膜の消失している箇所が増えて(図6)、最終的には外膜も消失することで、細胞質が菌体外に溶出されると思われる(図7)。図6においては向かって右側は一重膜、左側が三重膜となっており、特に一重膜側では形態も歪になっている。図7においては、

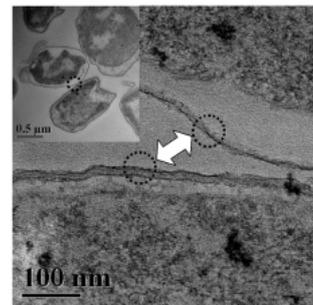


図5 銀イオンにより形態異常が確認された細胞質膜
Fig. 5 The damage of cell membrane affected by silver ions, respectively.

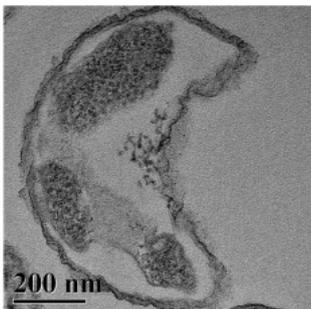


図6 銀イオンにより形態異常が確認された細胞質膜
 Fig. 6 The zero loss TEM image of the cell membrane it suffered damage from silver ions.

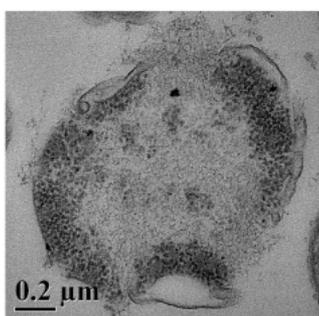


図7 細胞膜の構造異常に伴う細胞質の溶出
 Fig. 7 The elution image of cytoplasm caused by structure destruction of cell membrane.

細胞膜がもはや不連続となっており、一部細胞質が溶出している様子が観察される。

4-3. 銀の元素分析結果

大腸菌を900ppbの銀イオン水とそれぞれ30分、3時間、24時間反応させた後の試料を、走査透過電子顕微鏡（STEM）法で観察し、試料の各分析点において銀の検出を行った。ここでSTEM像とは、サブnm～1nmのビーム径に絞った電子線プローブを薄膜試料上で走査し、試料の一点一点から得られる透過波（または回折波）の強度を、円盤状の検出器で受け、その強度を走査領域に同期させて得られた像のことである。この円盤状の検出器にHAADF; High-angle annular dark-field 検出器を用いたものをHAADF-STEMと呼び、試料中で弾性散乱を受けた電子が比較的大きな散乱角に分布し、その強度が原子番号の2乗に比例することから、Z-コントラスト像とも呼ばれ、元素の種類に依存したコントラストが得られるという特徴を持つ。銀の検出には、EDS: energy-dispersive X-ray spectroscopy 分析器を用いた。EDSは、試料から発生した特性X線を直接半導体検出器で検出し、電気信号に変えて分光分析する手法である。検出した特性X線のエネルギーに比例したパルス電流を生じさせ、これを多チャンネル波高分析器で選別して測定する装置である。

図8に、900ppbのAgイオン水に30分間反応させた後の、比較的形態変化を起こしていない大腸菌のa) HAADF-STEM像、b), c)各点からの元素分析結果を示す。形態変化を起こしたものは、菌体によっては、細胞膜が欠損している可能性もある為、比較的、形態変化の無いものについて分析を行った。図より菌体の周

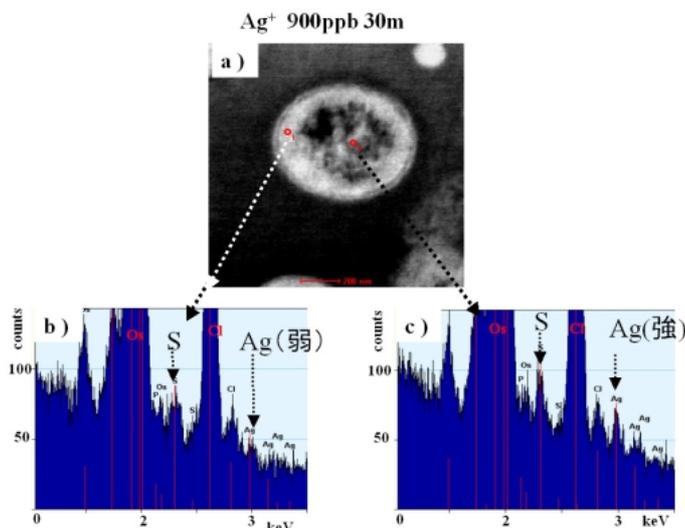


図8 900ppbの銀イオン水で30分間処理された大腸菌の元素分析結果 (a) HAADF-STEM像、(b), (c) 元素分析結果
 Fig. 8 HAADF-STEM image a) and the EDS results b),c) obtained from E. coli sample treated with silver ions which concentration is 900 ppb for 30 minutes.

辺よりも中央付近から銀の検出が顕著であることが分かる。つまり、銀は細胞膜周辺に存在する呼吸鎖酵素だけに捕集されるのでは無く、30分という比較的短時間に、菌体中央部付近まで進入しており、細胞質が銀イオンによって攻撃されている可能性が高い。特に細胞質には多量のリボソームが存在しており、銀と相互作用することでこのリボソームの持つタンパク質合成機能が不全となることも予想される。その結果、生体エネルギーであるアデノシン三リン酸;ATPを合成する為に必要なATP合成酵素の生産が停止し、細胞膜のペリプラズム空間で行われるATPの合成が阻害され、結果として細胞質膜、最終的には外膜までが不活化して、細胞形態を維持できなくなるものと思われる。

図9に900ppbのAgイオン水に3時間反応させた後の、比較的形態変化を起こしていない大腸菌のa) HAADF-STEM像、b)元素分析結果を示す。やはり図8と同様に菌体中央から銀が検出されている。

図10に900ppbのAgイオン水に24時間反応させた後の、比較的形態変化を起こしていない大腸菌のa) HAADF-STEM像、b)元素分析結果を示す。図8、9と同様に菌体中央から銀が検出されている。厳密には、各試料の厚みや元素分析時における電子線の照射条件が、全く等しいとは言えないが、他に検出される元素の強度と相対的に比較して、銀の検出強度が、銀

イオン処理時間の延長と共に劇的に増加しているわけではない事を加味すると、細胞質内への銀の取り込みは、30分～1時間程度の反応時間で飽和しており、その後のリボソームでのATP合成酵素の生成阻害に伴い、徐々に形態異常を招くと考えると、銀の抗菌作用の遅延性とも大きな矛盾が無い。

謝辞

本研究開発テーマは電化システム事業本部電化商品開発センター第3研究室との協創テーマとして推進されました。抗菌試験については、社団法人京都微生物研究所の松浦課長様、荒川様にご協力頂きました。

また、菌の不活化状態の電子顕微鏡用試料作製では株式会社花市電子顕微鏡技術研究所の花市社長様にご協力頂きましたので、ここに感謝致します。

参考文献

- 1) 新殺菌工学実用ハンドブック, サイエンスフォーラム, pp.467 (1991).
- 2) 大谷朝男:多様化する無機系抗菌剤と高度利用技術, アイピーシー, pp.31-32 (1997).
- 3) 内田眞志, 山本達雄, 谷口明男, 中田真一, 中川善兵衛:銀イオンと各種アミノ酸の反応, 防菌防黴, pp.695-704 (2003).
- 4) シャープ技報 第86号, pp.16-20 (2003).

(2005年1月26日受理)

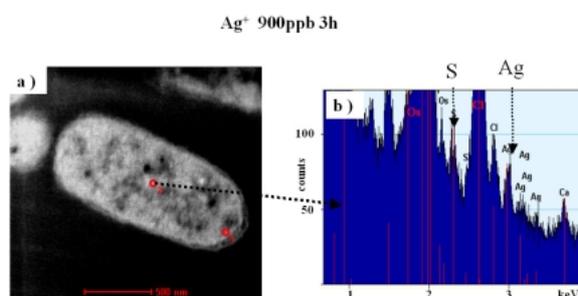


図9 900ppbの銀イオン水で3時間処理された大腸菌の元素分析結果 (a) HAADF-STEM像, (b) 元素分析結果
Fig. 9 HAADF-STEM image a) and the EDS results b) obtained from E. coli sample treated with silver ions which concentration is 900 ppb for 3 hours.

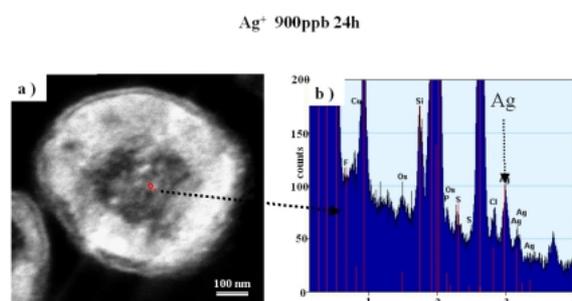


図10 900ppbの銀イオン水で24時間処理された大腸菌の元素分析結果 (a) HAADF-STEM像, (b) 元素分析結果
Fig. 10 HAADF-STEM image a) and the EDS results b) obtained from E. coli sample treated with silver ions which concentration is 900 ppb for 24 hours.