

【実施課題番号】

2006B0150

【実施課題名】

XAFS 測定による微生物細胞と金属イオンの相互作用の解明に関する研究
(申請課題：銀イオンのコーティングによる洗濯布の抗菌防臭メカニズムに関する研究)

【実験責任者所属機関および名前】

大阪府立大学大学院工学研究科
物質・化学系専攻 化学工学分野 小西康裕

【使用ビームライン】

BL01B1 (割当シフト数：3 シフト)

【担当コーディネーター】

梅咲則正コーディネーター、大淵博宣 (産業利用推進室)

【利用目的及び実験結果の概要】

銀イオンの抗菌作用に着目し、洗濯布のすすぎの段階で銀イオンをコーティングする洗濯機が商品化されている。しかしながら、銀イオンによる抗菌メカニズムに関しては十分に解明されていない。また、洗濯布に付着しなかった銀イオンはすすぎ水とともに排出されており、排水からの銀イオンの回収は資源循環利用の立場から重要な課題である。

そこで本研究では、銀イオンをコーティングした洗濯布 (木綿製) に対して Ag-K 吸収端における XANES 測定を行い、洗濯布から 1 価銀化合物の XANES スペクトルを検出することに成功した。また、すすぎ排水からの銀イオンのバイオ回収に向けて、溶液中の銀イオンがある種バクテリアの休止細胞によって短時間内に濃集されることを著者は見出していることから、銀イオン水と接触させた細菌細胞を遠心分離した後、細胞懸濁液をポリエチレン袋に密封して Ag-K 吸収端における XANES 測定を行った。その結果、細菌細胞内に濃集された銀の XANES スペクトルを検出し、細胞内の銀は 0 価金属と 1 価化合物として共存していることを明らかにした。

【実験方法】**(1) XANES 測定条件**

XANES の測定は大型放射光施設 SPring-8 ((財)高輝度光科学研究センター) のビームラ

イン BL01B1 にて行った。X 線の光源となる蓄積リングは最大電子エネルギー 8 GeV、蓄積電流 100 mA で運転されており、BL01B1 では偏向電磁石を用いて放射光を得ている。入射 X 線は Si(111) 結晶を用いた傾斜角可変型定位置出射二結晶分光器を用いて単色化され、分光器の前後に設置された曲面ミラーにより高調波を減光して集光した。

洗濯布および銀イオン水に含まれる銀濃度が希薄なため、試料の測定は蛍光法により行なった。入射 X 線に対し 90°に検出器を設置し、検出器の前にポリエチレン製の袋に入れた試料を入射 X 線に対して 45°で設置した（作業状況写真参照）。検出器は 19 素子ゲルマニウム半導体検出器を使用した。銀の K 吸収端付近、25.18~25.64 keV の範囲にわたり、概ね 0.7 eV 刻みで XANES スペクトルを測定した。吸収端付近における 1 ステップの積算時間は 5 秒とした。測定に際し、Shaping time は 0.25 μ 秒とした。数え落とし補正には、予め測定済みの補正係数を用いた。

（2）標準試料

銀に関する標準試料としては、以下の 5 試料を測定した。酸化銀以外の試薬はすべて和光純薬製の試薬特級グレードを使用した。

- Ag(0)：銀粉末 (<45 μ m) 約 30 mg に対し、窒化ホウ素約 200 mg を加え、メノウ乳鉢上で十分混合した後、錠剤整形した。
- AgCl：塩化銀約 3 mg に対し、窒化ホウ素約 200 mg を加え、Ag(0) 試料と同様に錠剤整形した。
- Ag₂S：硫化銀約 3 mg に対し、窒化ホウ素約 200 mg を加え、Ag(0) 試料と同様に錠剤整形した。
- AgNO₃：硝酸銀を脱イオン水に溶解して 100 ppm の水溶液とし、ポリエチレン製の袋に封入した。
- Ag₂O：BL01B1 備え付けの錠剤整形試料を使用した。

各標準試料に対して測定した XANES スペクトルは、バックグランド補正、および吸収端前後の X 線吸収量による規格化処理を施した。これらの処理には XAFS 用解析ソフト REX2000（株リガク）を使用した。

【実験結果および考察】

（1）銀に関する標準試料

上記の標準試料に対する XANES スペクトルを、既往の文献データ (Allen, 2001; Shibata *et al.*, 2004; Siper *et al.*, 2004) とともに図 1 に示す。ただし、エネルギー校正が各文献で異なるため、文献スペクトルについては横軸方向に適宜移動した。Ag(0) については、今回測定した標準試料と既往文献のスペクトルに対してピーク・ボトムが小さくなっている。これは測定した標準試料に含まれる Ag(0) の濃度が高すぎたために、試料自体の X 線自己吸収

によってスペクトルが歪んでしまったものと考えられる。既往の文献におけるスペクトルは透過法で測定したものであるため、蛍光法で測定した今回の標準スペクトルとは異なる可能性もあるが、標準試料のスペクトルを合成してパターンフィッティングを試みる場合には注意が必要である。Ag₂Oについても同様の傾向が認められる。ただし、Ag(0)では多重散乱に起因する 25.609 keV 付近のピークが認められるため、試料中に Ag(0)が含まれていれば、ほぼ同じ位置にピークが確認できると考えられる。Ag₂S は妥当なスペクトルが得られた。AgCl については、現在、文献検索中であるが、標準試料中の濃度が Ag₂S と同程度であることから概ね妥当であると思われる。AgNO₃ (aq) は十分に希薄な溶液であることから妥当であると思われる。Shibata *et al.* (2004) が報告した Ag₂SO₄ のスペクトルも同様であるが、これは Ag(I) 原子の電子状態とそれを取り囲む O 原子の配置 (6 配位、原子間距離) が類似しているためと推察される。

(2) 洗濯布試料

銀イオン (防菌防臭剤) コーティング洗濯布 (木綿製) に対して、Ag-K 吸収端における XANES 測定を行った。ただし、25.55 keV より高エネルギー側では、1 ステップの積算時間を 10 秒として S/N 比の改善を図ったが、なおノイズが目立つために Savitzky-Golay フィルターによるスムージング処理を施した。図 2 に示すように、銀イオン水 (Ag 濃度 : 900 ppb) を用いて “すすぎ-乾燥” の工程を 10 回繰り返した布試料に対しては、1 価銀化合物の XANES スペクトルが検出された。次に、標準試料 (金属の Ag、酸化銀 Ag₂O) は自己吸収によりスペクトルが歪んでいる可能性があったので、やむを得ず 25.580 keV より高エネルギー側において各種標準物質のスペクトルを合成して、測定スペクトルにフィッティングさせた。その結果、1 価銀化合物の存在比は、洗濯布 (a) では Ag₂S = 51%, AgNO₃ = 46%, AgCl = 3%、洗濯布 (b) では Ag₂S = 48%, AgNO₃ = 39%, AgCl = 13% となり、洗濯布に付着した銀の存在形態が示唆された。

(3) バクテリア細胞試料

洗濯機すすぎ排水からの銀バイオ回収法の開発をめざして基礎実験を行った。その結果、溶液中の銀イオン (Ag 濃度 : 100 ppb - 108 ppm (1 mM)) が、金属イオン還元細菌の休止細胞によって短時間内に濃集されることを見出した。そこで、細菌細胞に濃集された銀の価数を明らかにするために、硝酸銀水溶液と接触させた細菌細胞を遠心分離した後、細胞懸濁液をポリエチレン袋に密封し、Ag-K 吸収端における XANES 測定に供した。微生物試料の XAFS 測定には、微生物細胞をそのままの状態 (乾燥等の前処理不要、大気圧下) に維持して、細胞中の微量貴金属の化学状態を解析できる大きな特色がある。

①細菌による銀イオン濃集に及ぼす硝酸銀水溶液への添加物（乳酸塩、溶存酸素）の影響

0.1 mM 硝酸銀水溶液（Ag 濃度：10.8 ppm）と接触した細菌細胞に対する銀の XANES スペクトルを図 3 に示す。細菌細胞から銀の XANES スペクトルが検出され、溶液中の極希薄な Ag(I) イオン濃度が細菌細胞に捕集されたことが明確になった。また、嫌気条件下の 2 試料では、吸収端付近の立ち上がりは Ag₂S に類似するが、25.580 keV 付近からは Ag₂O に近い。25.601～25.606 keV 付近になだらかなピークが認められる。これは Ag-metal の多重散乱ピーク（25.609 keV）より低エネルギー側、Ag₂O 多重散乱ピーク（25.599 keV）より高エネルギー側に位置し、電子供与体を添加した試料の方がやや高エネルギー側にシフトしている。したがって、この試料には Ag₂S, Ag₂O, Ag-metal が含まれる可能性があるが、上述したように今回測定した Ag₂O, Ag-metal の標準試料は自己吸収によりスペクトルが歪んでいる可能性があり、特に吸収端付近の立ち上がり部分で文献のスペクトルとの差が大きい。やむを得ず 25.580 keV より高エネルギー側で合成スペクトルによるフィッティングを行い、各成分の存在割合を推定した結果を表 1 に示す。また、細胞の調製条件によって次の点が明らかになった。

表 1 合成スペクトルに基づく各成分の存在割合

細胞の調製条件	Ag(0)	Ag ₂ O	Ag ₂ S	カーブフィッティング 相関係数
嫌气的条件、電子供与体（乳酸塩）添加	50 %	50 %	-	0.884
嫌气的条件、電子供与体（乳酸塩）なし	-	60 %	40 %	0.808
好气的条件、電子供与体（乳酸塩）添加	-	100 %	-	0.950

- 嫌气的条件、電子供与体（乳酸塩）を添加した場合
細胞中に存在する銀のうち、金属の銀（Ag(0)）が 50%程度存在しており、Ag(I)が Ag(0)にバイオ還元されたことが明らかになった。また、別途に行った TEM-EDX の分析（図 4）では、細菌細胞に多数の銀ナノ粒子の存在が確認されており、XANES 測定結果の妥当性が確認できた。
- 嫌气的条件、電子供与体（乳酸塩）が無添加の場合
細胞中の銀は Ag(I)（Ag₂O と Ag₂S）として存在しており、液相 Ag(I)イオンが細胞に収着され、Ag(I)の還元は起こっていないと考えられる。細胞内に捕集された Ag(I)は、細胞の構成成分である各種アミノ酸などと化学反応を起して、システイン銀として存在する可能性がある。このようなことを推測して、銀に関する標準物質としてシステイン銀などに着目し、その XANES スペクトルを測定すべきであった。

- 好氣的条件、電子供与体（乳酸塩）を添加した場合

細胞からは金属の銀（Ag(0)）が検出されず、酸素が存在すれば Ag(I) イオンの還元が起こらないことがわかった。本細胞試料においても、吸収端付近の立ち上がりは Ag₂S に類似するが、25.580 keV 付近からは Ag₂O に近い。同様に 25.580 keV より高エネルギー側で合成スペクトルによるフィッティングを行なうと、Ag₂O 以外の要素は排除された。しかし、Ag₂O 標準試料に見られる 25.599 keV 付近のピークは不明瞭であり、試料内の Ag が全て Ag₂O であるとはいえない。

② 細菌による銀イオン濃集に及ぼす硝酸銀水溶液の初期銀イオン濃度の影響

嫌気条件、乳酸塩の存在下で初期 Ag イオン濃度を変えて細菌細胞による銀イオンの濃集実験を行い、細菌細胞の XANES スペクトルを測定した。（図 5）。ただし、10.8 ppm の細胞試料は、前述の「嫌気条件下、電子供与体添加」試料（図 4）のことである。初期 Ag イオン濃度が 100 ppb、および 108 ppm（1 mM）の細胞試料では、吸収端付近の立ち上がりは Ag₂S に類似するが、25.580 keV 付近からは Ag₂O に近い。Ag-metal の多重散乱ピーク（25.609keV）が認められない。25.580 keV より高エネルギー側で合成スペクトルによるフィッティングを行なった結果を表 2 に示すが、両試料とも Ag-metal の存在は殆ど認められず、Ag(I) イオンの Ag(0) へのバイオ還元は確認できなかった。初期 Ag(I) イオン濃度が 10.8 ppm（0.1 mM）の場合には Ag(0) の存在が確認できており、Ag(I) イオンのバイオ還元における銀イオン濃度の影響については検討が必要である。ただし、液相銀イオンの初期濃度が 100 ppb と極希薄な状態であっても、細菌細胞から銀の XANES スペクトルが明確に検出できることは明らかになった。

表 2 合成スペクトルに基づく各成分の存在割合
（嫌氣的条件、電子供与体（乳酸塩）添加）

液相銀イオンの初期濃度	Ag(0)	Ag ₂ O	Ag ₂ S	カーブフィッティング 相関係数
100 ppb	-	100	-	0.950
10.8 ppm（0.1 mM）	50	50		0.884
108 ppm（1 mM）	-	75	25	0.919

【今後の XANES 測定に向けての検討事項】

（1）銀および銀化合物の標準試料に関して

- XAFS 測定の対象とする銀化合物の標準試料数を増やしてデータベースを充実させ

る必要がある。例えば、微生物細胞内のアミノ酸と銀イオンとの反応を想定し、今回は測定しなかった標準試料（銀-アミノ酸化合物）について XAFS 測定を行う必要がある。

- ・ 今回測定した標準試料のうちで、銀（Ag(0)）は標準試料を調製する際に銀の濃度が高すぎたため、試料自体の X 線自己吸収によって XANES スペクトルが歪んでしまった。また、酸化銀 Ag₂O についても同様の傾向が認められた。これらの標準試料については、XAFS 測定を再度行なう必要がある。

（2）高感度測定の実施に関して

今回の測定では、洗濯試料の銀濃度が非常に低いため、S/N 比が悪く、十分な解析が行えなかった。その解決策としては、パラジウムフィルターを用いて弾性散乱 X 線をカットし、さらにフィルターからの蛍光 X 線をソーラースリットでカットすることでバックグラウンドを下げるができる。バックグラウンドが低くなれば、XAFS 時間をかけることによって S/N 比を改善することができる。測定には BL01B1 の他にも、光源の X 線強度が高い BL37XU が適するのかもしれない。

【おわりに】

銀イオンは、その抗菌活性が高いことが経験的に知られており、抗菌剤として幅広く使われているが、その抗菌メカニズムに関しては十分に解明されていないのが現状である。この度の XAFS 測定（3 シフト、24 時間）においては、極希薄試料（洗濯布、細菌細胞）であっても銀の XANES スペクトルが検出できることが明らかになった。従って、今回の測定における反省点である上記の検討事項については改善を図り、できる限り近い時期に、銀イオンコート洗濯衣類や銀イオン水で処理したバクテリア細胞に対して、銀の XAFS 測定を行いたい。今後は、各種の微生物に対する銀の XAFS 測定を行うことによって細胞内での銀の存在形態に関する情報を集めて、微生物細胞と銀イオンとの相互作用、さらには銀イオンによる抗菌のメカニズムについて解明を進めていきたい。

【参考文献】

- P. G. Allen, A. E. Gash, P. K. Dorhout, S. H. Strauss: XAFS Studies of Soft Heavy Metal Ion Intercalated $M_x\text{MoS}_2$ ($M = \text{Hg}^{2+}, \text{Ag}^+$) Solids, *Chem. Mater.*, 13, 2257-2265 (2001).
- Siper, G. Dalba, F. Rocca: Ordered and disordered models of local structure around Ag cations in silver borate glasses based on x-ray absorption near-edge structure spectroscopy. *Phys. Rev. B*, 69, 134201 (2004).
- J. Shibata, K. Shimizu, Y. Takada, A. Shichi, H. Yoshida, S. Satokawa, A. Satsuma, T. Hattori: Structure of active Ag clusters in Ag zeolites for SCR of NO by propane in the presence of hydrogen, *J. Catal.*, 227, 367–374 (2004).

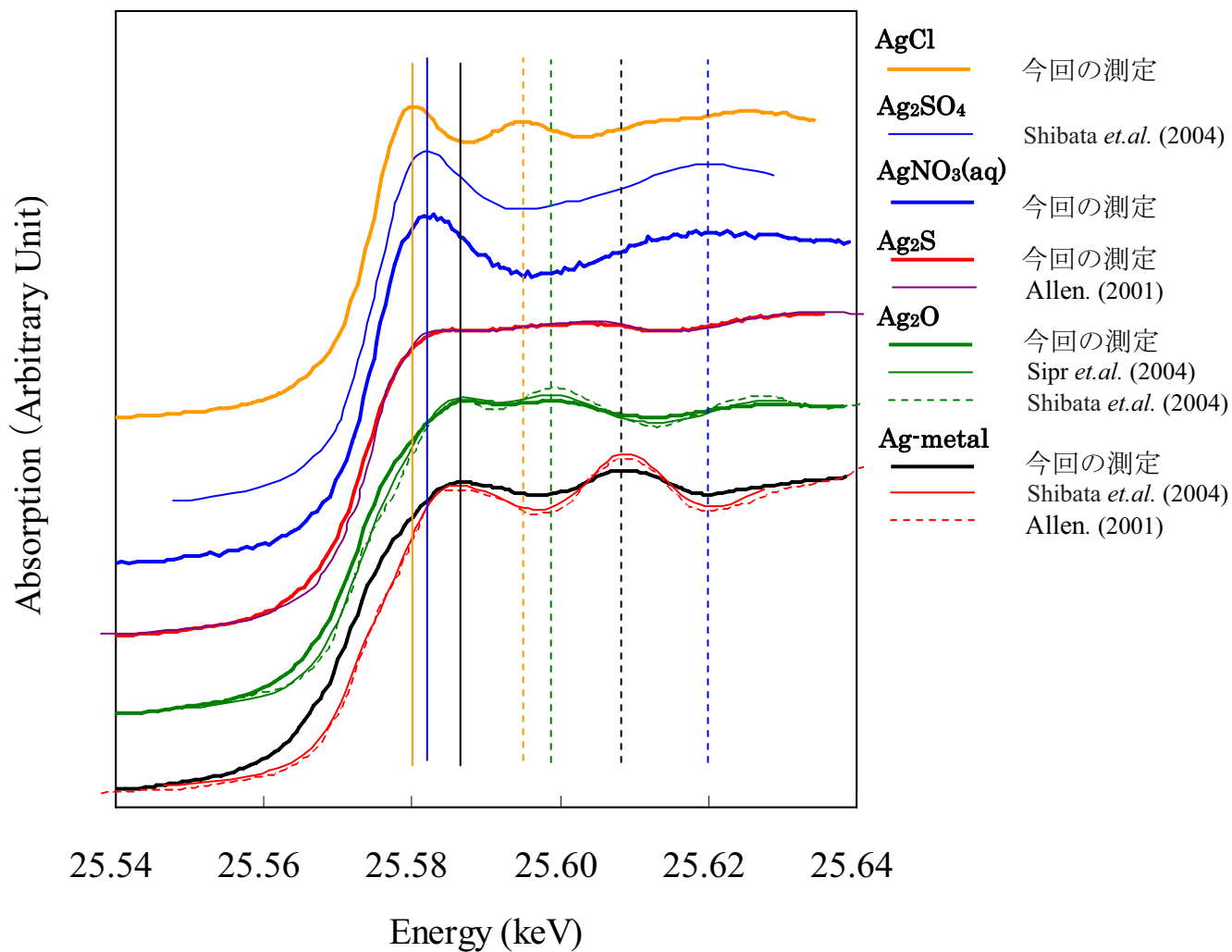


図1 銀に関する標準物質の XANES スペクトル
 (引用文献のスペクトルについては、横軸方向に適宜シフトさせた)

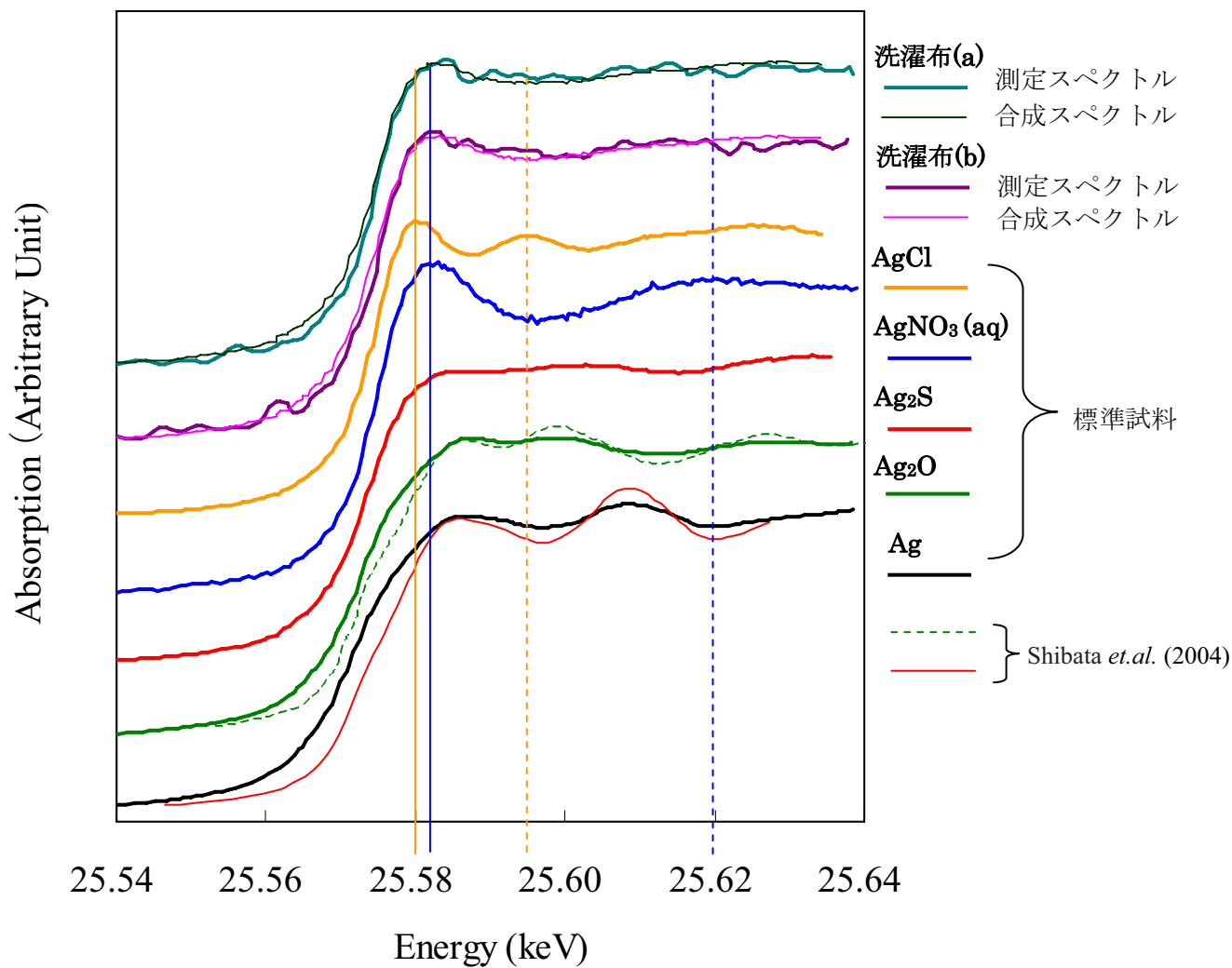


図2 洗濯布試料に関する銀の XANES スペクトル

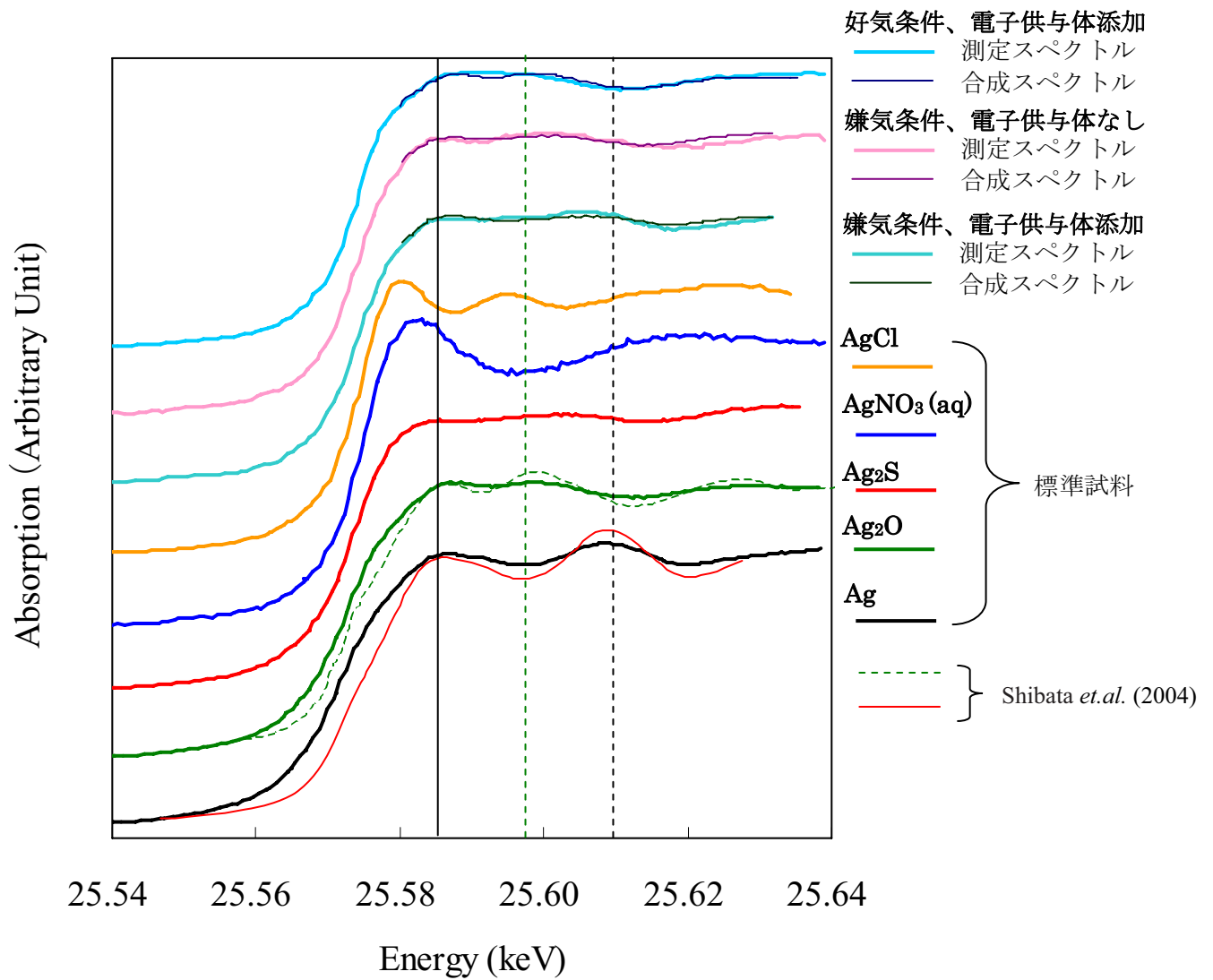


図3 硝酸銀水溶液と接触させた細菌細胞に関する銀の XANES スペクトル
 (硝酸銀水溶液への添加物 (乳酸塩、溶存酸素) の影響)

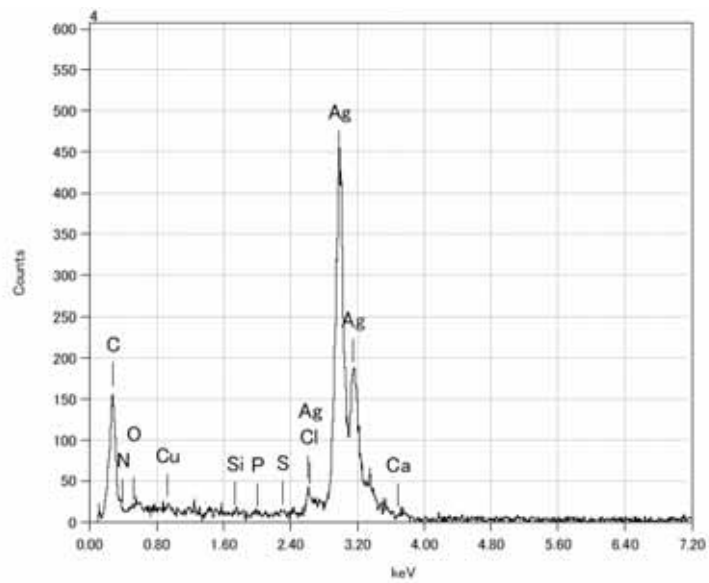
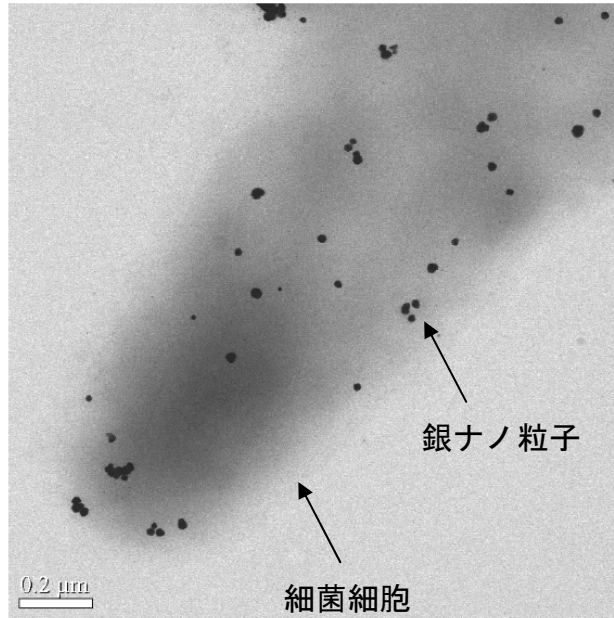


図4 硝酸銀水溶液と接触させた細菌細胞（乳酸塩の共存下）の TEM 写真
および生成ナノ粒子の EDX 元素分析

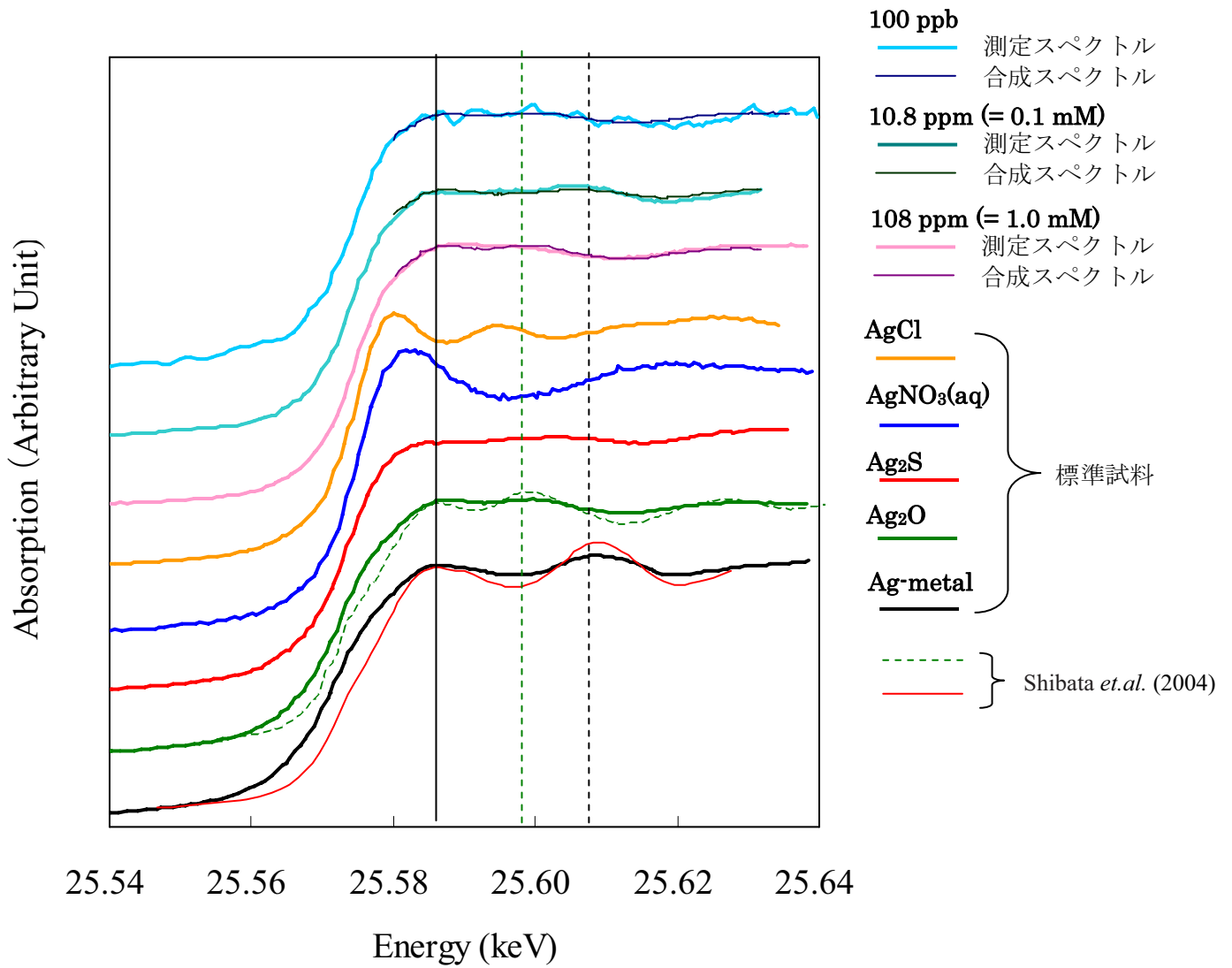


図5 硝酸銀水溶液と接触させた細菌細胞に関する銀の XANES スペクトル
 (液相銀イオンの初期濃度の影響)