

博士論文

静電霧化法で発生した帯電液滴による

室内環境浄化に関する研究

Research on indoor environment purification using charged
droplet via electrospray method

広島大学大学院工学研究科

化学工学専攻 博士課程後期

須田 洋

2018年 3月

第1章 緒論

| | | |
|-------|--------------------------|----|
| 1.1 | はじめに | 5 |
| 1.2 | 研究背景 | 7 |
| 1.3 | 帯電微粒子水の特徴 | 10 |
| 1.4 | 帯電微粒子水の発生原理 | 13 |
| 1.4.1 | 帯電微粒子水の脱臭効果に関する既往の研究 | 14 |
| 1.4.2 | 帯電微粒子水のウイルスへの効果に関する既往の研究 | 16 |
| 1.4.3 | 帯電微粒子水の肌への効果に関する既往の研究 | 18 |
| 1.5 | 静電霧化装置の変遷 | 22 |
| 1.6 | 本論文の目的と構成 | 25 |
| | 参考文献 | 26 |

第2章 帯電微粒子水曝露による *Serratia sp.* の不活化と形態変化

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | 緒言 | 27 |
| 2.2 | 帯電微粒子水の生成 | 28 |
| 2.3 | 帯電微粒子水中のラジカル発生量の定量 | 30 |
| 2.4 | <i>Serratia marcescens</i> の不活化 | 31 |
| 2.5 | 帯電微粒子水による <i>Serratia marcescens</i> の形態変化 | 32 |
| 2.6 | 結論 | 33 |

| | |
|------|----|
| 参考文献 | 34 |
|------|----|

第3章 静電霧化装置の各種抗菌薬耐性菌に対する殺菌作用に関する検討

| | |
|-----------------|----|
| 3.1 緒言 | 35 |
| 3.2 実験方法 | 35 |
| 3.2.1 試験菌 | 35 |
| 3.2.2 静電霧化装置と原理 | 36 |
| 3.2.3 方法 | 37 |
| 3.3 実験結果 | 39 |
| 3.3.1 ガーゼ試料 | 39 |
| 3.3.2 ポリエチレン片 | 43 |
| 3.4 考察 | 44 |
| 3.5 結論 | 52 |
| 参考文献 | 48 |

第4章 静電噴霧による多価帯電アミノ酸ナノ粒子の生成

| | |
|--------------------------------|----|
| 4.1 緒言 | 49 |
| 4.2 実験 | 52 |
| 4.2.1 溶液の調製 | 52 |
| 4.2.2 アミノ酸ナノ粒子の粒子径分布および帯電数分布測定 | 55 |

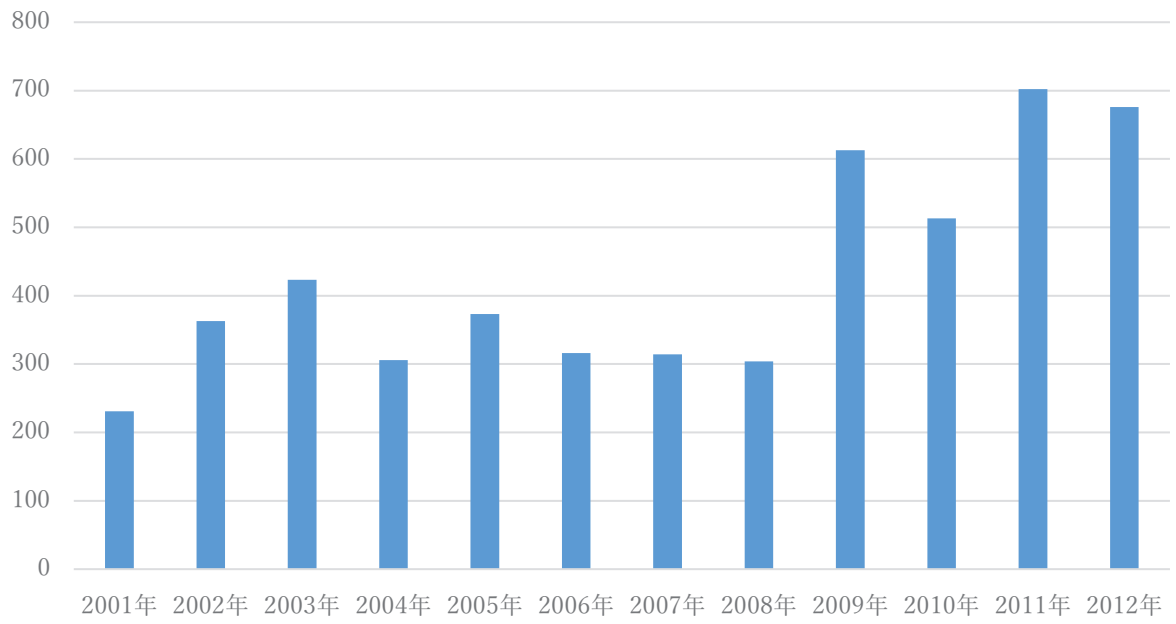
| | | |
|-------|------------------------|----|
| 4.3 | 実験結果および考察 | 57 |
| 4.3.1 | アミノ酸ナノ粒子の粒子径分布および帯電数分布 | 57 |
| 4.3.2 | 多価帯電液滴の分裂過程 | 60 |
| 4.3.3 | 液滴径の推算 | 63 |
| 4.4 | 結論 | 65 |
| | 参考文献 | 66 |
| 第5章 | 総括 | 68 |
| 謝辞 | | 70 |

第1章 緒 論

1.1 はじめに

近年、花粉症などのアレルギー患者の増大、新型インフルエンザウイルスの流行、中国大陸から飛来してくるとされるPM2.5問題など、室内空気環境に対する関心は、依然として高い。その関心の高さに伴い、空気清浄機市場も規模を拡大してきた。(Figure 1-1) また、中国、インド、東南アジアなど深刻な大気汚染問題を抱えている国々も多く、世界的に室内空気環境に対する関心が高くなっている。空気浄化技術として、従来の吸い込み型のフィルター方式による有害物質除去だけでなく、帯電微粒子水や空気イオンを放出する放出型の空気浄化技術も開発されてきた。その放出型の空気浄化技術の一つとして、水に高電圧を印加することで帯電微粒子水を空間中に噴霧する帯電微粒子水には、脱臭、除菌、ウイルスの不活化、ダニや花粉のアレルゲンの不活化などの効果があり、さらに、野菜の鮮度を保持する効果、肌の保湿、髪の毛への効果もあり、空気清浄機、冷蔵庫、ヘアドライヤなど種々の家電製品に応用されている。さらに、抗菌薬耐性菌の出現など、医療機関での院内感染も大きな問題となっており、この帯電微粒子水の効果やそのメカニズムの研究、帯電微粒子水の更なる可能性について調べる必要がある。

空気清浄機国内出荷金額（百万円）



1.2 研究背景

空気清浄機の浄化性能向上に関する研究開発を行っている過程で、従来の吸い込み型のフィルター方式では、カーテンやソファなどに付いた臭い、床面や絨毯に付着しているアレルゲン、テーブルやドアノブなどに付着した菌やウイルスについて対処することは出来ない。そこで、放出型の空気浄化技術の開発の必要性に迫られた。(Figure 1-2) 従来の放出型の空気浄化技術としては、放電により発生させた空気イオンを放出し、埃や塵を帯電させ、空気清浄機のフィルターで集塵するものはあったが、前述の課題に対する解決にはならなかった。また、空気イオンを発生させる方式の多くは、針状の金属電極先端でコロナ放電を起し空気イオンを発生させるため、磨耗や埃付着が生じ、長時間使用するには、不向きであった。筆者らは、家電製品に応用することを念頭に、薬剤を使わずに、安全に実現できる空気浄化技術の開発に着手した。(Figure 1-3) 様々な臭気成分を溶かす水と放電によって発生する活性物質を利用することが出来る静電霧化法に着目し、それによって発生する帯電微粒子水に活性物質が存在するか、また空気浄化効果があるか検証を行なった。

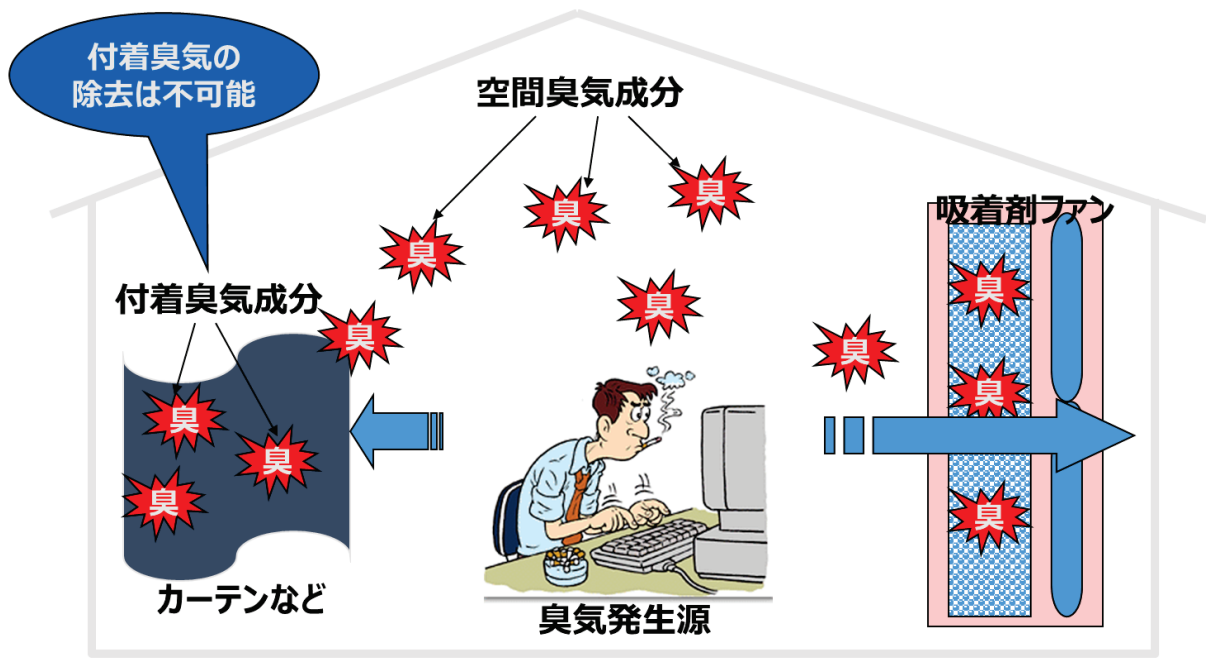


Figure 1-2 フィルター方式の空気浄化技術の限界

| | 静電霧化法 | 空気イオン化法（従来） |
|-------|---|--|
| 概略図 | | |
| 原理 | 霧化電極をペルチェ素子で冷却し、空気中の水分を結露させて、その結露した水に高電圧を印加して、静電霧化を起こし帯電微粒子水を発生 | 針状の金属電極に高電圧を印加して、コロナ放電を起こし空気イオンを発生 |
| メリット | 空気中の水分を使う事でOHラジカルの発生量が多くなる。また、水に高電圧を印加するため、電極の磨耗がない。 | 安価 |
| デメリット | 高価 | 針状の金属電極先端で、コロナ放電が起こるため、磨耗や埃付着が生じ、長時間の使用には不向き |

Figure 1-3 静電霧化法と空気イオン化法比較

1.3 帯電微粒子水の特徴

Figure 1-4に帯電微粒子水のイメージ図を示す。開発した静電霧化装置から発生する帯電微粒子水は、微分型分級器（DMA）で測定した結果、Figure 1-5に示すように5～20ナノメートルの帯電微粒子水であることがわかった。また、Figure 1-6に示すように電子スピン共鳴分析によって、OHラジカルも検出され、活性物質が存在することがわかった。

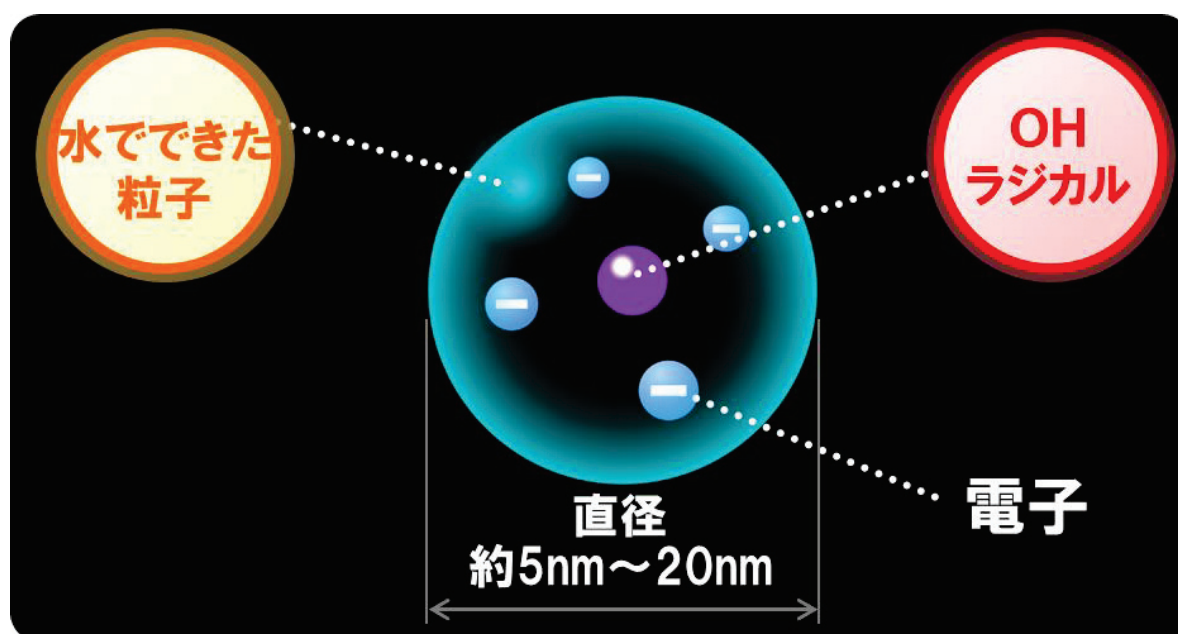
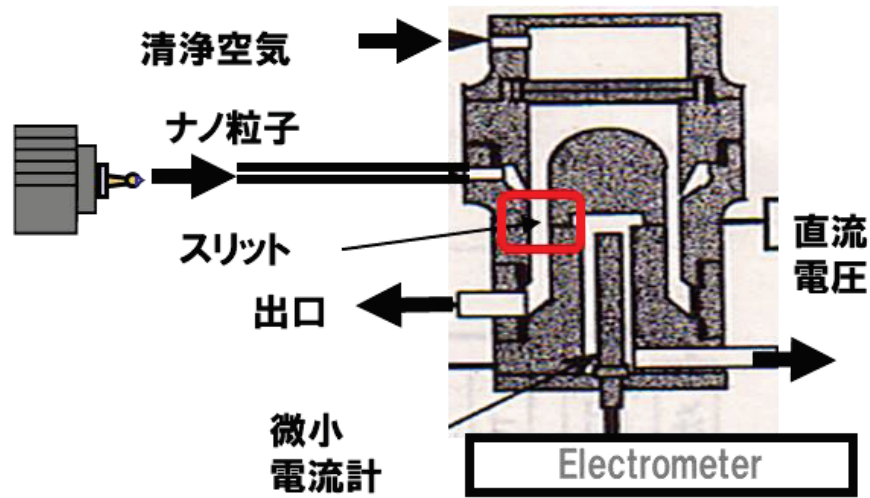
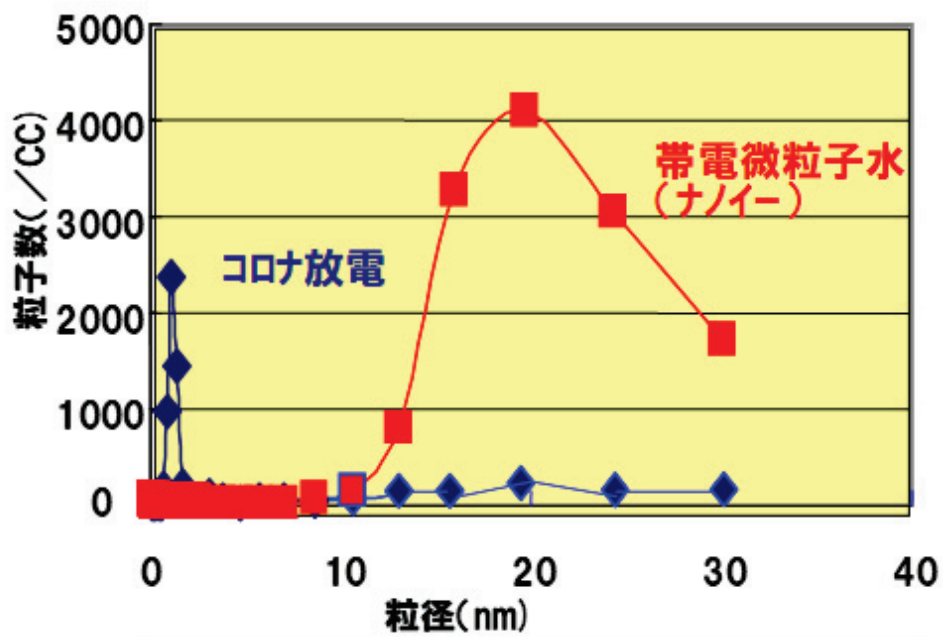


Figure 1-4 帯電微粒子水のイメージ図

○帯電微粒子水の粒子径



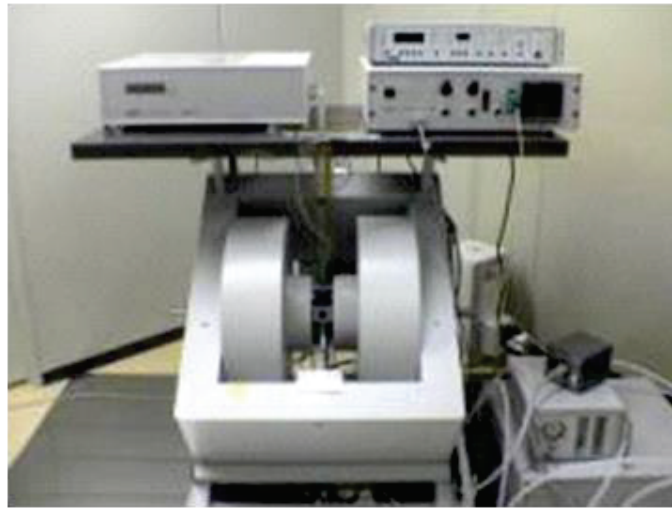
微分型電気移動度計測



ナノ粒径計測で20nmを確認

Figure 1-5 帯電微粒子水の粒子径測定結果

○帯電微粒子水のラジカル



ESR分析装置
(ELLEXSYS E500)

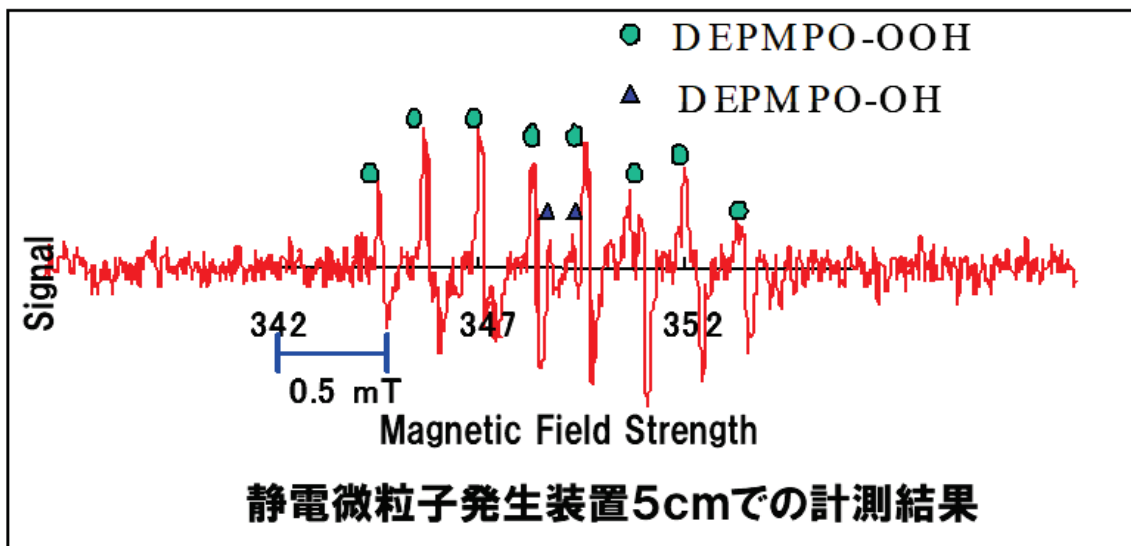


Figure 1-6 帯電微粒子水のラジカルのESR分析結果

1.4 帯電微粒子水の発生原理

Figure 1-7に静電霧化装置と帯電微粒子水の発生原理を示す。帯電微粒子水発生装置は、ペルチェ素子冷却側に放電電極とその先端部上方に同心円対極が配置されており、ペルチェ素子が冷却されることで水蒸気が放電電極先端部に結露し、放電極間に高電圧をかけると電極先端部の結露水の微小領域で電荷集中が生じる。その際、対極に向けて作用する静電気力が表面張力や重力を上回ることで帯電微粒子水が空間中に放出される。

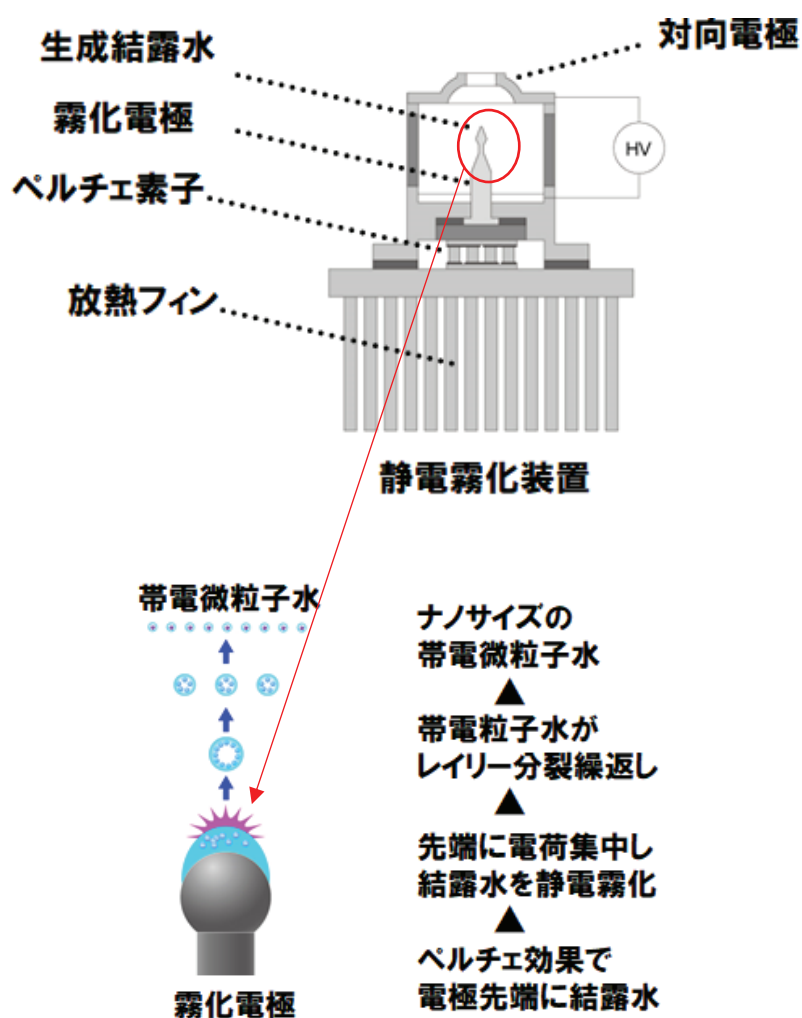


Figure 1-7 静電霧化装置と帯電微粒子水の発生原理

1.4.1 帯電微粒子水の脱臭効果に関する既往の研究

帯電微粒子水の室内付着臭気の脱臭効果を検証されている。実験は、0.25m³ボックス内にカーテン片（ポリエステル製10cm×10cmを吊るし、密閉後タバコ（マイルドセブン）1本燃焼させ、カーテン片にタバコ臭気を付着させ、そのカーテン片を付着臭サンプルとしている。Figure 1-8 に示すとおり22m³チャンバー内に付着臭サンプルを吊るし、約3.6mは慣れた場所で、空気清浄機（パナソニック製）を設置作動した。実験は帯電微粒子水の噴霧有無の2条件で行なっている。なお、付着臭の臭いの強さは6段階臭気強度法を用い、被検者6人で評価が行われている。その結果、帯電微粒子水の噴霧がない場合、2時間後の付着臭サンプルの臭気強度は3.9に対し、帯電微粒子水の噴霧がある場合、臭気強度は2.6で1段階以上の脱臭効果が認められた。

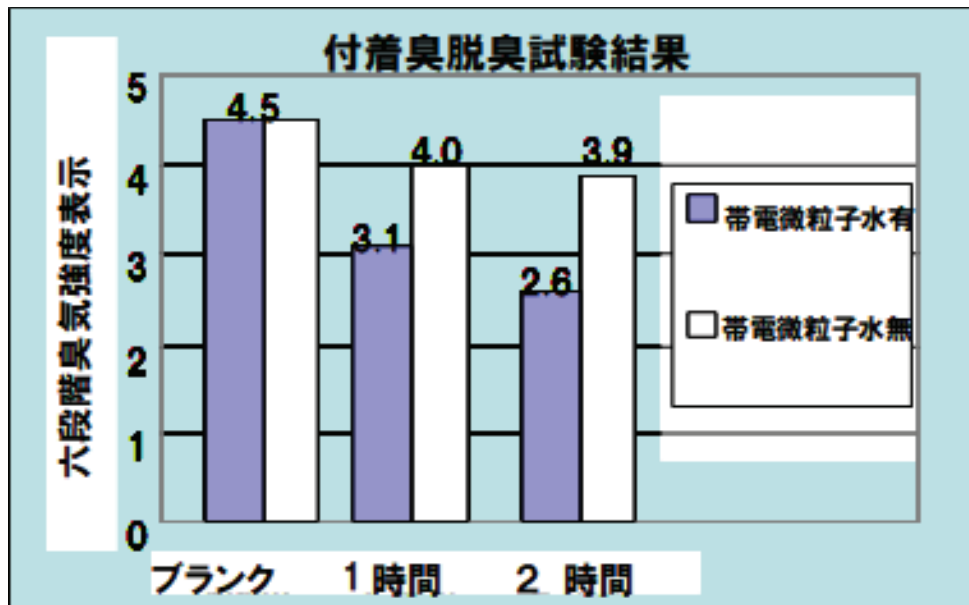
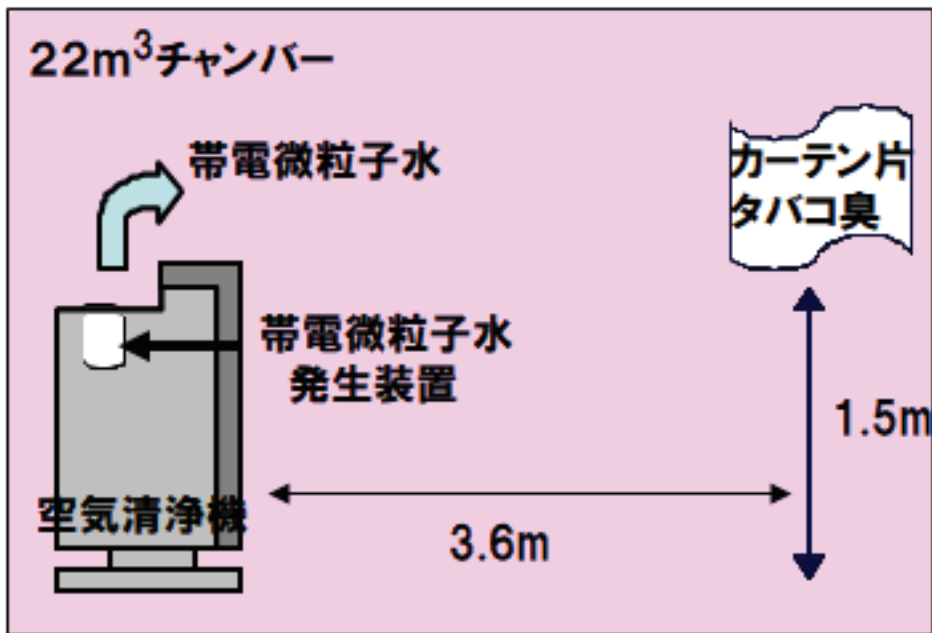


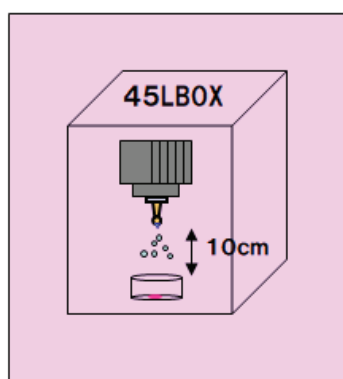
Figure 1-8 脱臭効果

1.4.2 帯電微粒子水のウイルスへの効果に関する既往の研究

帯電微粒子水の新型インフルエンザウイルスへの効果を検証した。実験は、バイオセーフティレベル2の実験室内の安全キャビネットに設置できるボックス（外寸350×350×400mm、容積約45L）内に、静電霧化装置を設置し行なった。試験ウイルスは、新型インフルエンザウイルス（Swine-origin influenza A/Narita/2009(H1N1)pdm）を用い、帯電微粒子水を6時間曝露した。コントロールとして、帯電微粒子水非曝露を用意した。ウイルス液生成方法は、ウイルスを発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、約37°Cで3日間培養後に尿腔液を回収する。この尿腔液を超純水で10倍に希釈して実験用のウイルス液として用いた。ウイルス力価の測定は、ウイルス処理開始から6時間後にウイルス液を回収し、燐酸緩衝生理食塩水で10倍階段希釈して発育鶏卵に接種し、約37°Cで3日間培養する。これらの鶏卵から得られた尿腔液に観察された赤血球の凝集反応をもとに、ウイルス力価（50%卵感染量：logEID₅₀/0.1mL）を算出した。その結果、帯電微粒子水を曝露した場合は、コントロールと比較してウイルス力価を99%低減する効果があることが認められた。

(Figure1-9)

○ウイルス抑制効果



結果

| 試験条件 | ウイルスカ価 Log EID ₅₀ /0.1ml |
|-----------------|--|
| コントロール (非曝露) | 6.5 |
| 帯電微粒子水 (曝露) | 4.5 |

ウイルスカ価

ウイルスの感染力を示す定量値

ウイルス抑制率の計算式

$$\text{抑制率} = (1 - 0.1^{(\text{非曝露} - \text{曝露})}) \times 100\% = (1 - 0.1^{(6.5 - 4.5)}) \times 100\% = 99\%$$

Figure 1-9 ウイルス抑制効果

1.4.3 帯電微粒子水の肌への効果に関する既往の研究

帯電微粒子水の肌への効果を検証した。実験は、帯電微粒子水を短期間曝露実験と長期間曝露実験で検証した。短期間曝露実験では、被検者6名（30～49歳の女性）に対し、90分安静、60分帯電微粒子水曝露、60分安静という方法で、90分安静後から、表皮角層水分量測定装置（SKICON-200EX アイ・ビー・エス株式会社製）を用いて、表皮角層水分量を測定し、帯電微粒子曝露の有無で比較した。また、曝露した条件は、静電霧化装置から被検者までの距離は2.5mであり、室温 $23^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度30～40%RH、12畳の空間で実施した。結果は、帯電微粒子水曝露開始から30～60分後で、表皮角層水分量が増加し、帯電微粒子水曝露停止から60分後まで、表皮角層水分量が保持された。（Figure 1-10） 長期間曝露実験では、被検者は、1群各10名（38～42歳の女性）に対し、被検者の自宅にて、静電霧化装置を終日運転させ、昼間は主に被検者が居住する空間に設置し、睡眠時は寝室に設置した。4週間の曝露実験を行い、二重盲検法を用いた2群比較試験で、経皮水分蒸散量（TEWAMETER TM300 Courage+Khazaka社製）と肌のキメ（ダイレクトスキンセンサー NEC製）を測定した。また、試験は、株式会社エフシージー総合研究所で行なった。結果は、帯電微粒子水曝露を曝露することで、経皮水分蒸散量が減少した。（Figure 1-11） また、肌のキメも整った。（Figure 1-12） この2つの実験の結果を受けて、メカニズムを考察するために、帯電微粒子水曝露による皮脂の変化を計測した。被検者は、30代男性（頬部・前腕部皮脂採取）に、5mmの距離から5分間帯電微粒子水を曝露し、皮脂を採取し、FT-IR（本体：Magna 550、Thermo-Nicolet社製）で計測した。結果は、曝露した皮脂は、非曝露に比べ、 $-\text{HC}=\text{CH}-$ （2重結合）が減少し、 $-\text{OH}$ （ヒドロ

キシ基)が増加した。(Figure 1-13) この結果から、帯電微粒子水曝露により、皮脂の親水性が高くなることによって、肌への効果が発現したと考えられた。

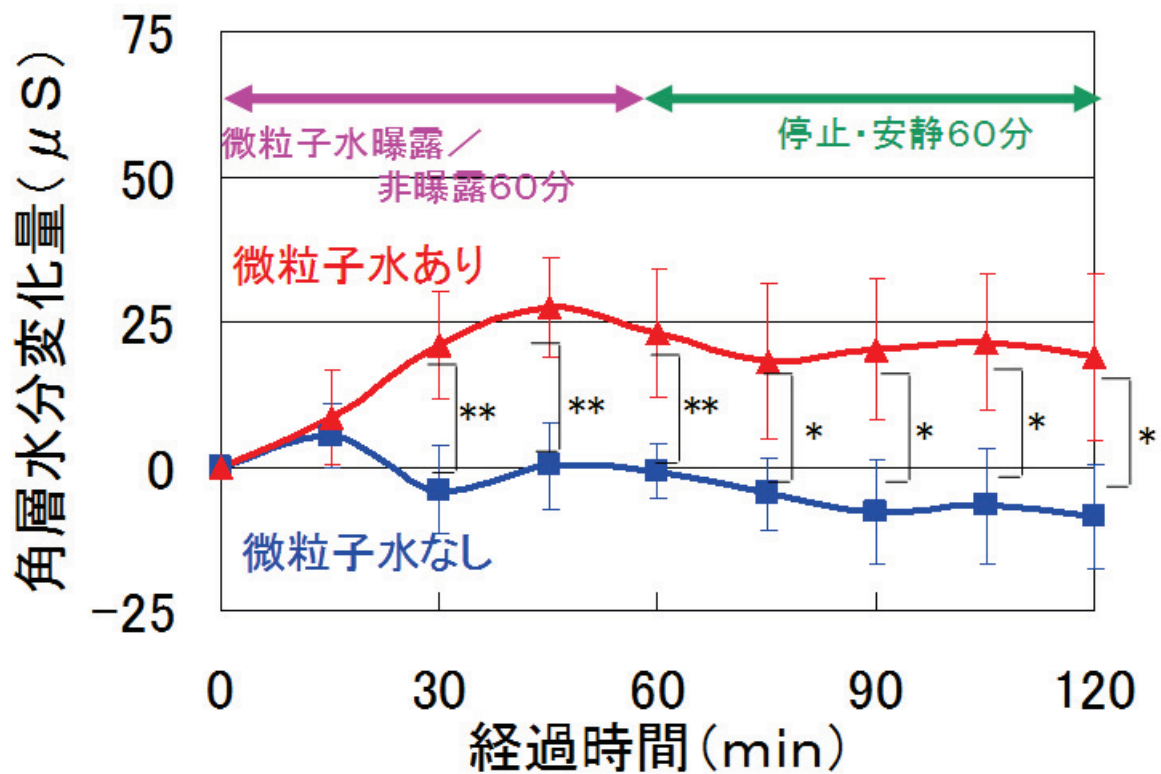


Figure 1-10 表皮角層水分量

経皮水分蒸散量の変化

*: $p < 0.05$

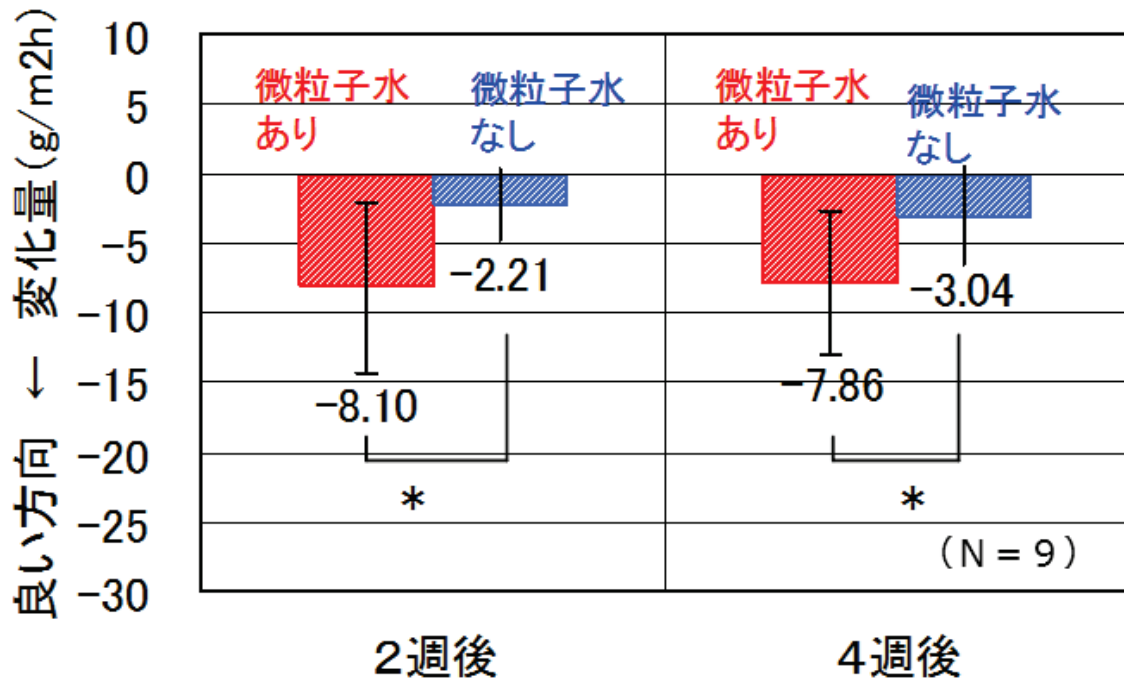


Figure 1-11 経皮水分蒸散量

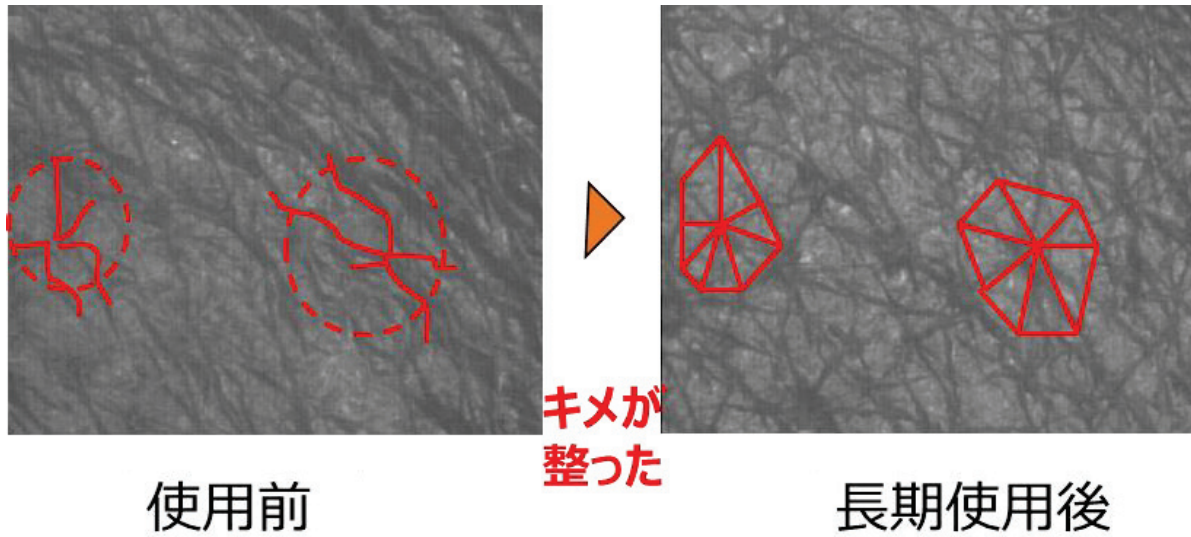


Figure 1-12 肌の拡大画像

皮脂成分変化

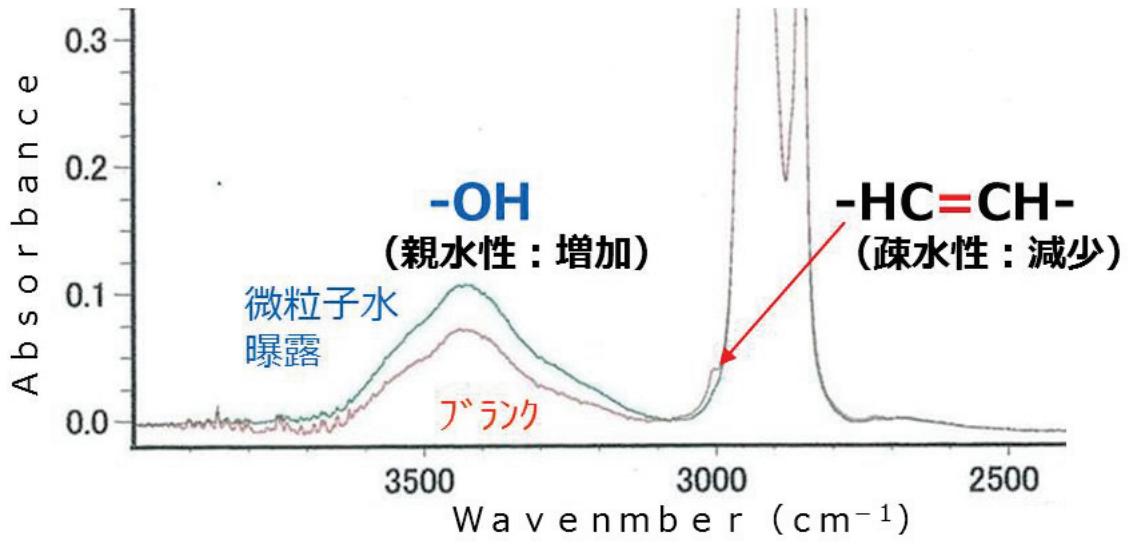


Figure 1-13 FT-IRによる皮脂分析

1.5 静電霧化装置の変遷

2003年に空気清浄機に搭載した静電霧化装置は、タンクに入れた水を多孔質のセラミックの一端から吸い上げ、もう一端のセラミック先端とそれに対向して設置した電極に高電圧（約-6kV）を印加することで、静電霧化現象を起こし、帯電微粒子水を発生させた。しかし、一定期間を経るとタンクに水を入れる必要があり、その作業を容易に出来ない機器には、静電霧化装置を搭載できないという問題があった。その問題を解決する為に、ペルチェ素子を用いて、空気中の水分を結露させ、その結露した水を静電霧化することに2005年に成功した。このペルチェ素子を用いた静電霧化装置は、エアコンや冷蔵庫をはじめ種々の家電製品に搭載されることになった。また、静電霧化現象について高速度カメラを用いた解明などを通して、対向電極の形状を3次元化することにより、静電霧化装置から発生するラジカル量を増大させる事に成功した（2008年）。さらに搭載機器を増やす為に、霧化電極に高電圧を印加していた為に、この霧化電極を冷やす為のペルチェ素子と間には、電氣的絶縁性を確保する為に、セラミックを使用していた。ただし、このセラミックは、非常に熱伝導性が悪く、霧化電極を冷やすために多くのペルチェ素子を必要とした。そこで、対向電極をプラスの高圧に、霧化電極をGNDにすることで、霧化電極をペルチェ素子で直接冷やすことが可能になり、電氣的絶縁のためのセラミックをなくし、ペルチェ素子を減らすことができ、安価な静電霧化装置を開発する事に2011年に成功した。(Figure 1-14)このように、静電霧化装置を開発・改良を行い、静電霧化装置は、2003年に年間17万台を生産するに過ぎなかったが、2016年には、年間600万台を生産するに至った。(Figure 1-15) また、静電霧化装置搭載商品は、空気清浄機に始まり、ヘアドライヤ、冷蔵庫、空気清浄機のような電気製品か

ら、自動車、鉄道などのモビリティ、エレベータ等の公共施設にも搭載・設置されるようになった。(Figure 1-16)


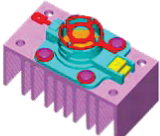
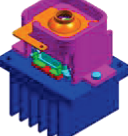

| | 2003年 | 2005年 | 2008年 | 2011年 |
|-------------------|---|---|--|---|
| 概観 |  |  |  |  |
| ラジカル発生量 [億個/秒] | 800 | 800 | 3200 | 4800 |
| サイズ [cc] | 300 | 90 | 30 | 8 |
| 特徴 | 水を入れて発声 | ペルチエ式 | 対極形状3D化でラジカル4倍化 冷却特性上昇による フィン小型化 | 放電極性反転による 冷却特性最大化で フィンレス化 部品点数削減究極化 |

Figure 1-14 静電霧化装置の進化の変遷



Figure 1-15 静電霧化装置の生産台数



Figure 1-16 静電霧化装置搭載商品

1.6 本論文の目的と構成

本論文の目的は、帯電液滴の様々な効果について検証を行い、事業も大きく発展してきたが、更なる事業の発展のために、効果のメカニズム検証、新たな空気環境への脅威への効果検証、更に、帯電液滴の他分野への応用展開の可能性を明らかにする。

本論文の構成は、第1章では、静電霧化装置を開発した背景、その静電霧化法から帯電微粒子水の特性、効果について述べ、また静電霧化装置の開発の変遷、搭載商品について述べた。

第2章では、帯電微粒子水が細菌に対し殺菌的に作用することは既に検証されていたが、本章では、細菌のどの部位に作用しているかを、電子顕微鏡を用いて検証した。

第3章では、静電霧化装置から発生したナノサイズの帯電微粒子水は、様々な細菌に対して効果があることが検証されてきたが、近年大きな社会問題となっている各種の抗菌薬耐性菌に対する効果を実験的に検証した。

第4章では、室内環境をより快適、安全、健康にするための可能性を探る手段として、人体に有用なアミノ酸をナノ粒子として噴霧する可能性を検討した。

第5章では、本研究で得られた成果を総括した。

1.7 参考文献

- 1) 機械情報産業カレント分析レポート No.110 (2013年5月)
- 2) 岩本成正、須田洋、松井康訓、山内俊幸、奥山喜久夫 (2003) 第20回エアロ
ゾル科学・技術討論会
- 3) パナソニック電工株式会社ニュースリリース 2009年10月20日
- 4) 浅野幸康、関太輔、山内俊幸 (2008年) 第34回美容皮膚科学会総会

第2章 帯電微粒子水曝露による *Serratia sp.* の不活化と形態変化

2.1 緒言

これまでに静電霧化¹⁾による帯電微粒子水発生装置を空気清浄機に搭載することで、帯電微粒子水が衣類やカーテンに付着した臭いの脱臭や菌およびウイルスの不活化、花粉やダニアレルゲンを不活化するなど、室内の空気環境浄化に応用可能な技術を報告してきた²⁾。また、帯電微粒子水が水を含んだ微粒子であることから、肌水分量の保持や水分蒸散量の低下のみならず、うねりの少ない、まとまりのある美しい髪を保つ効果を有していることもすでに実証されている^{3,4)}。上述の各種作用の検証に加えて、本検討で用いた帯電微粒子水発生装置から発生する帯電微粒子水が多荷電を有していること⁵⁾、および帯電微粒子水が周期的に発生していること⁶⁾を明らかにしてきた。また帯電微粒子水には上述の付着臭脱臭作用や菌不活化作用があることから、ラジカルが含まれていると考えられるが、空気中のラジカルは一般に短寿命であるのに対して帯電微粒子水が室内空間において発生装置から離れた場所にも作用することから、ラジカルが帯電微粒子水中に含まれているという仮説および菌の不活化作用メカニズムについてはこれまで未検証であった。本報告は、帯電微粒子水の菌に対する不活化作用のメカニズム検証を目的とした。

2.2 帯電微粒子水の生成

帯電微粒子水発生装置 (Figure 2-1) は、ペルチェ素子冷却側に放電電極とその先端部上方に同心円対極が配置されており、ペルチェ素子が冷却されることで水蒸気が放電電極先端部に結露し、放電電極間に高電圧をかけると電極先端部の結露水の微小領域で電荷集中が生じる。その際、対極に向けて作用する静電気力が表面張力や重力を上回ることで帯電微粒子水が空間中に放出される。また、Figure 2-2に微分型電気移動度計測装置を用いて帯電微粒子水の粒径ピークを計測した結果について示す。帯電微粒子水の粒径は約18 nm であることが分かった。

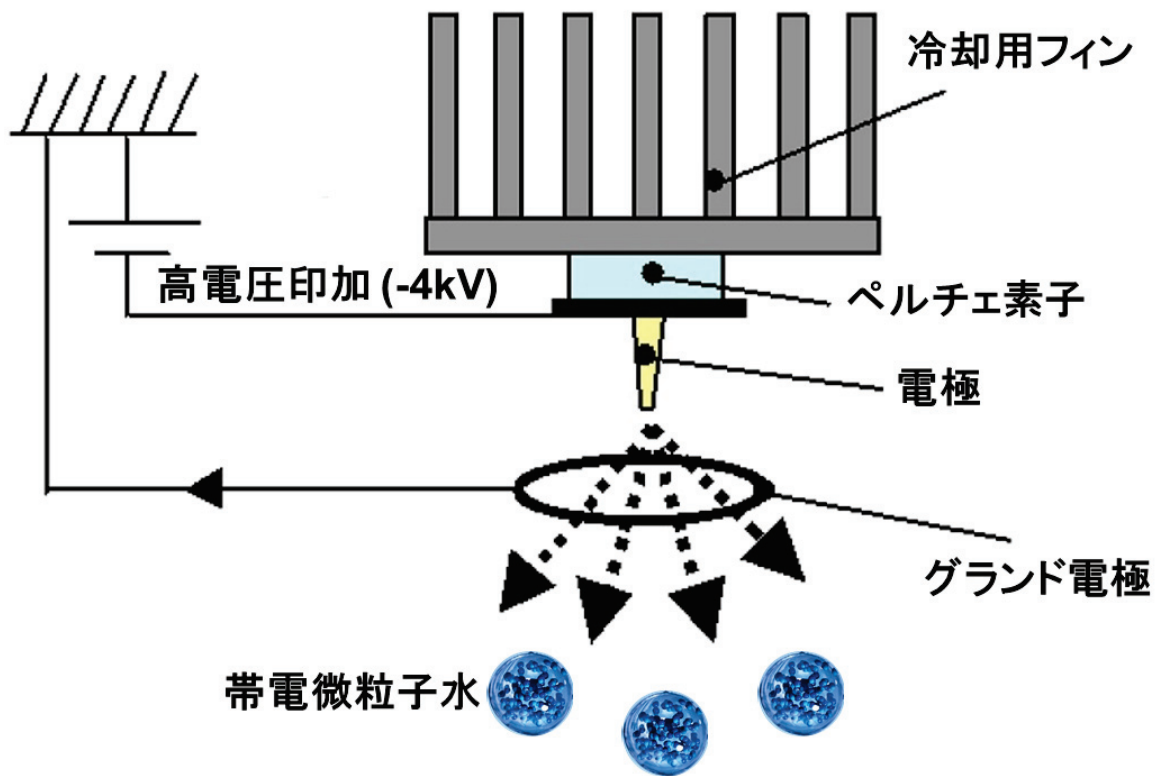


Figure 2 - 1 帯電微粒子水発生装置の概略図

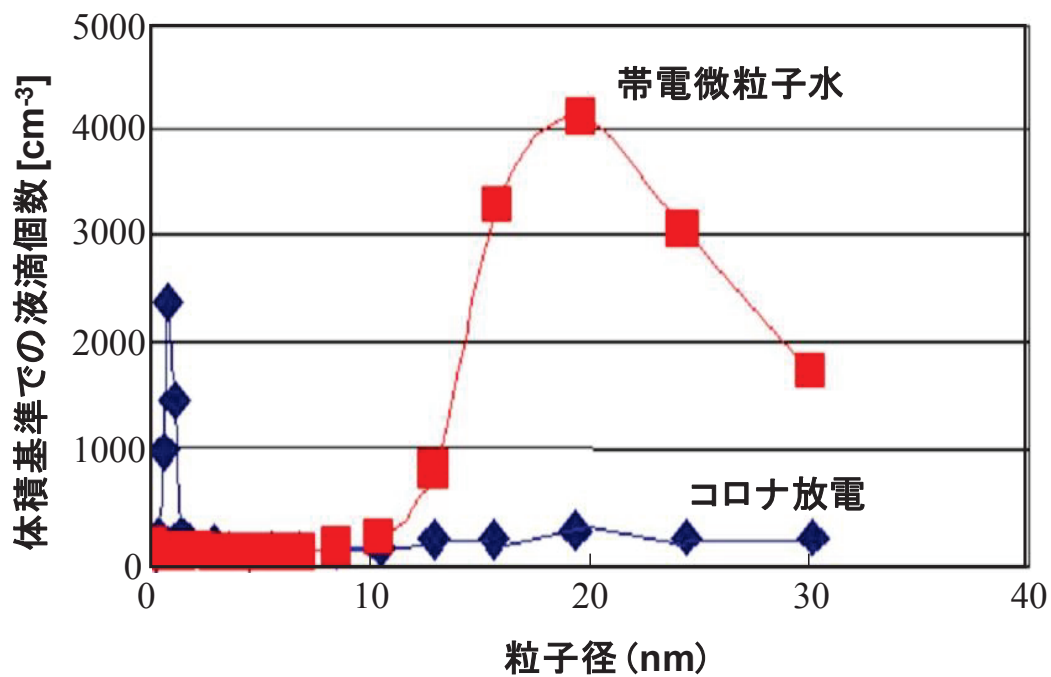


Figure 2 - 2 微分型電気移動度計測装置による帯電微粒子水の粒子径測定結果

2.3 帯電微粒子水中のラジカル発生量の定量

帯電微粒子水には付着臭脱臭や菌不活化作用があることから、ラジカルが含まれていると考えられる。そこで、スピントラップ剤を用いた電子スピン共鳴（以下ESR）分析法を用いて、静電霧化により生成する帯電微粒子水中のラジカル量を定量した。スピントラップ剤5,5-Dimethyl-2-oxo-2λ5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole1-oxide（以下CYPMPO ラジカルリサーチ社製）を1/15 Mリン酸緩衝液（pH 7.4 和光純薬（株）製）を用いて20 mM に調製した。調製したCYPMPO 溶液1 cm³に対して、5 cm の距離から帯電微粒子水を20 min 曝露した。その後、ESR 分析(Bruker 社製E500)を実施した。既知濃度の標準物質(TEMPOL)の測定で得られたESR スペクトルの面積値と帯電微粒子水発生装置から発生するラジカルのESR スペクトルの面積値の比較から、帯電微粒子水発生装置から発生した帯電微粒子水のラジカル量は 4.8×10^{11} 個s⁻¹ であると算出された (Figure 2-3)。

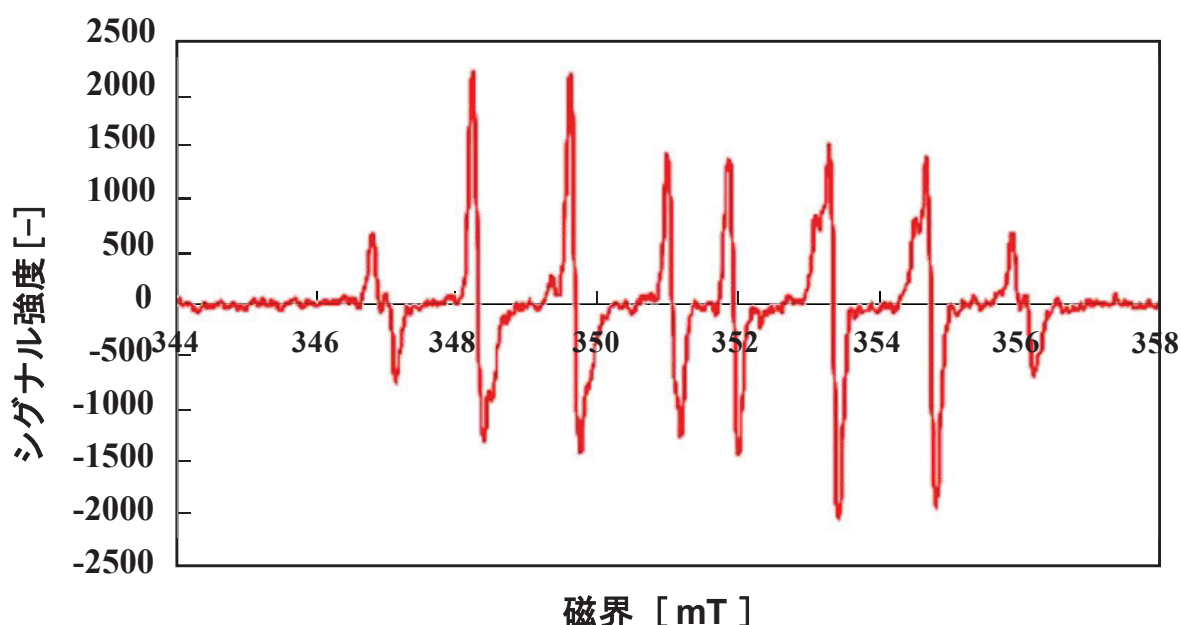


Figure 2 - 3 ESR 分析によるラジカル濃度測定結果

2.4 *Serratia marcescens* の不活化

不活性化実験の対象菌として、院内感染や日和見感染症の原因菌として問題となる 7) *Serratia marcescens* を用いた。45 × 10⁻³ m³ チャンバー内に *Serratia marcescens* の菌液0.1 ml (菌体濃度10⁶ CFU cm⁻³) をステンレス板に滴下し、30 分間静置乾燥させた後に床面に設置し、帯電微粒子水を30 min, 60 min, 90 min 曝露した。なお、菌液を滴下する板の材質としてステンレス鋼を使用した根拠は、ステンレス板の表面上では、特に菌の増殖が阻害される心配はないからである。帯電微粒子水発生装置はステンレス板から5 cm の高さに設置した。また、同一条件で帯電微粒子水を曝露せずに30 min, 60 min, 90 min 静置したものをコントロールとした。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いてステンレス板から菌を抽出した。抽出液0.1 ml をNutrient培地 (Difco 社製品番213000) に滴下し、25° C で48 時間培養した後、菌体液を平板希釈して生菌数をカウントした。*Serratia marcescens* に対して、帯電微粒子水を曝露させた場合と帯電微粒子水を曝露させずに静置した場合 (コントロール) の生菌数をFigure 2-4 に示した。これより、帯電微粒子水を90 min 曝露させることで*Serratia marcescens* を98.7%不活化できることを確認できた。

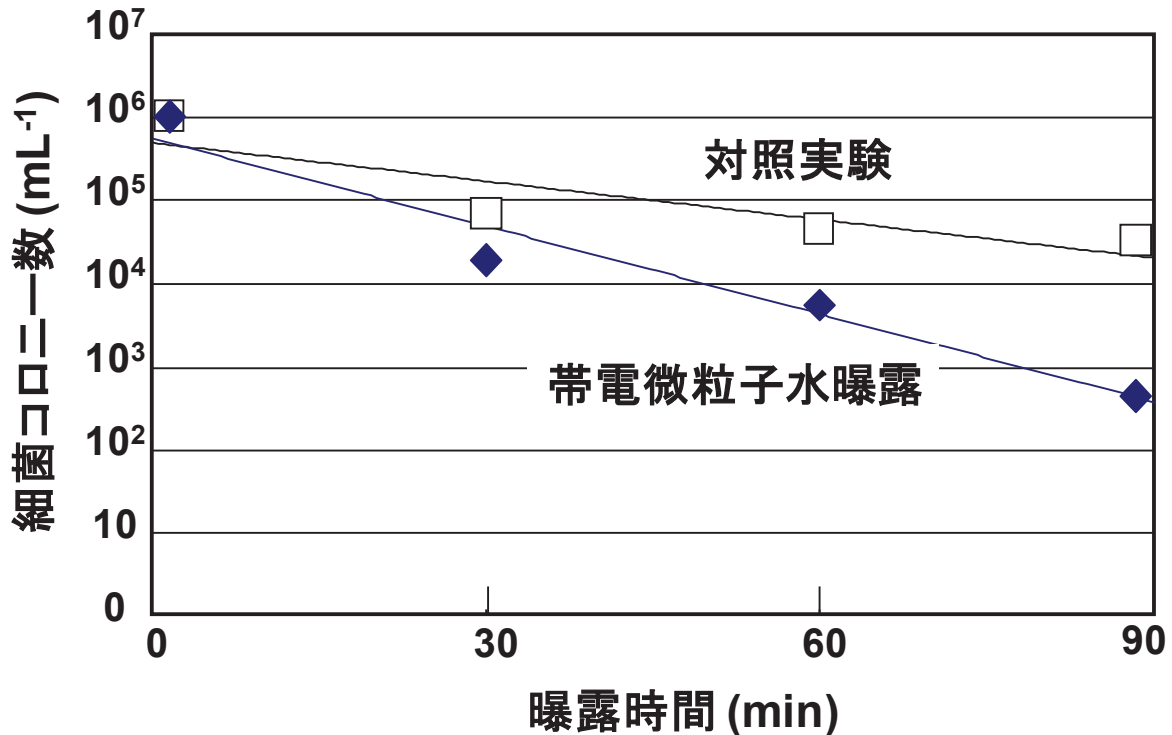


Figure 2 - 4 帯電微粒子水による *Serratia marcescens* の不活性化

2.5 帯電微粒子水による *Serratia marcescens* の形態変化

2.3 と同一条件で、帯電微粒子水を90 min 曝露したものと、帯電微粒子水を曝露せずに90 min 静置したもの（コントロール）を用いて、*Serratia marcescens* の形態観察を行った。透過型電子顕微鏡（以下TEM）を用いて形態観察を行うため、90 min 曝露および90 min 静置したステンレス板から、2.3 と同じ方法で菌液を抽出し、TEM 観察用の生物試料作製手順に従い、菌の前固定、固定液の洗浄、後固定、脱水、置換、包埋の工程を経た後、マイクロトームを用いて試料を薄切し、TEM (JEM-1200EX JEOL 社製) による形態観察を行った。帯電微粒子水を90 min 曝露させた *Serratia marcescens* の TEM 画像を Figure 2-5 に示す。帯電微粒子水を曝露しなかった

Serratia marcescens の画像と比較して、菌の細胞膜周辺の形態が変化し、外殻の著しい損傷が確認できた。

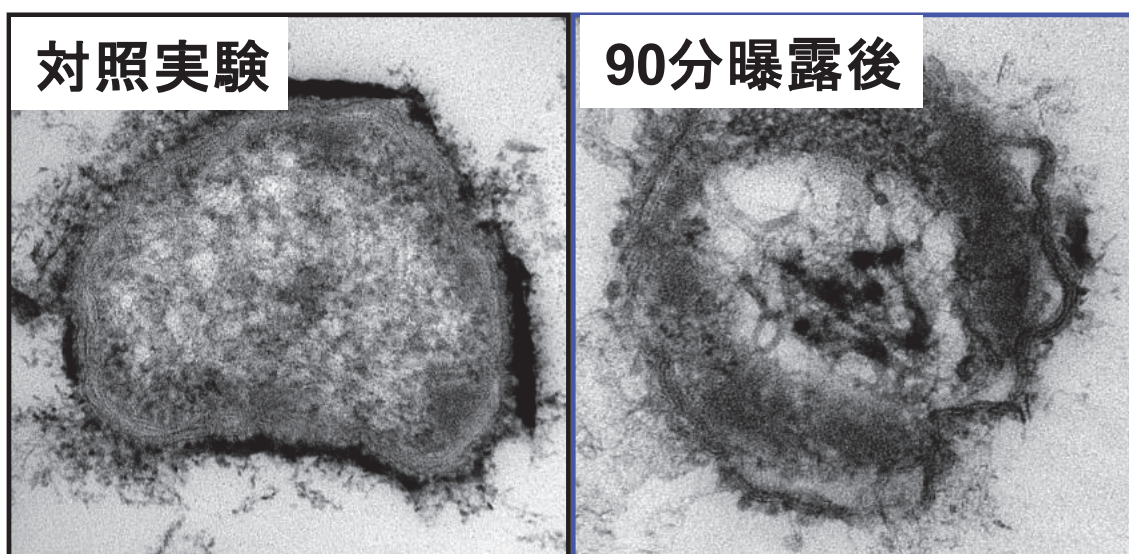


Figure 2 - 5 帯電微粒子水暴露による *Serratia marcescens* 細胞の変化

2.6 結論

本検討では、帯電微粒子水を90 min 曝露させることで *Serratia marcescens* の98.7%を不活化し、その形態変化を確認した。この結果より、帯電微粒子水中に含まれると考えられるラジカル成分が *Serratia marcescens* の細胞膜に作用していることが示唆された。生化学的にどの部位に作用しているのかについてメカニズムを解明することが今後の課題である。

2.7 参考文献

- 1) Lenggoro, I. W. and Okuyama, K.: Generation of Droplets and Ions by Electropray, *Journal of the Society of Powder Technology*, **37**, 753–760 (2000) (in Japanese)
- 2) Yamauchi, T., Suda, H. and Matsui, Y.: Development of Home Appliances Using Electrostatic Atomization, *Erozoru Kenkyu*, **22**, 5–10 (2007) (in Japanese)
- 3) Fujiwara, Y., Nakano, A., Matsui, Y., Yamauchi, T., Nagahiro, R. and Seki, D.: Hair Damage Mitigation Action Using Electrostatic Atomization, *The 31th Japanese Cosmetic Science Society* (2006) (in Japanese)
- 4) Katsuyama, M., Okumoto, S., Matsui, Y., Yamauchi, T. and Seki, D.: The Head Leather Fat Resolvability and the Detergency Effect by Electrostatic Atomization, *The 31th Japanese Cosmetic Science Society* (2006) (in Japanese)
- 5) Yamauchi, T., Maekawa, T., Seto, A., Soon-Bark, K. and Okuyama, K.: Analysis of the Number of Charge in the Fine Water Droplets Produced by Electrostatic Atomization, *Erozoru Kenkyu*, **23**, 34–39 (2008) (in Japanese)
- 6) Yamauchi, T., Yamana, M., Mitsutake, Y., Maekawa, T., Suda, H. and Okuyama, K.: Analysis of Discharge Mechanism on Electrostatic Atomization, *Erozoru Kenkyu*, **23**, 263–268 (2008)
- 7) Sasakawa, C. and Hayasi, T.: Medical bacteriology (The 4th edition), NANKODO, 363 (2008) (in Japanese)

第3章 静電霧化装置の各種抗菌薬耐性菌に対する殺菌作用に関する検討

3.1 緒言

近年、静電霧化装置から発生するナノサイズの帯電微粒子水 (electrostatic atomized water particles) に花粉抗原やダニ抗原の不活化作用があることが報告され¹⁾、健康利用機器などに応用されている。これらは霧化電極をペルチェ素子で冷却し、霧化電極に空気中の水蒸気を結露させて水を作り、霧化電極と対向電極間に高電圧を印加することにより、約5~30 nmの大きさの帯電微粒子水が発生する原理を用いている。一方で、帯電微粒子水は防カビなど各種微生物に対する不活化作用があることが報告されている¹⁾。今回、静電霧化装置の各種抗菌薬耐性菌に対する効果を実験的に検証したので報告する。

3.2 実験方法

3.2.1 試験菌

試験菌として主に喀痰および尿より分離された各種抗菌薬耐性菌 *Pseudomonas aeruginosa*(multidrug-resistant P. aeruginosa: MDRP) 、 *Acinetobacter baumannii*(Multidrug-resistant A. baumannii:MDRAB) 、 *Klebsiella pneumoniae*(*K.pneumoniae* carbapenemase:KPC産生)、 *Serratia marcescens* (metallo- β -lactamase:MBL産生)、 *Proteus mirabilis*(extended-spectrum β -lactamase:ESBL産

生)の5菌種、各1株および *Staphylococcus aureus*(methicillin resistant S.aureus:MRSA) は標準株のATCC43504の合計6菌種用いた。

3.2.2 静電霧化装置と原理

静電霧化装置はelectrostatic atomizing device(Figure 3-1, 3-2) を用いた。装置にはペルチェ素子冷却側に放電電極とその先端部上方に同心円対極が配置されており、ペルチェ素子が冷却されることで空気中の水蒸気が放電電極先端部に結露する。電極間に約-4 kVの高電圧をかけると放電電極先端部の結露水の微小領域で電荷集中が生じる。その際、対極に向けて作用する静電気力が表面張力や重力を上回ることで帯電微粒子水が空間中に放出される原理を有する。

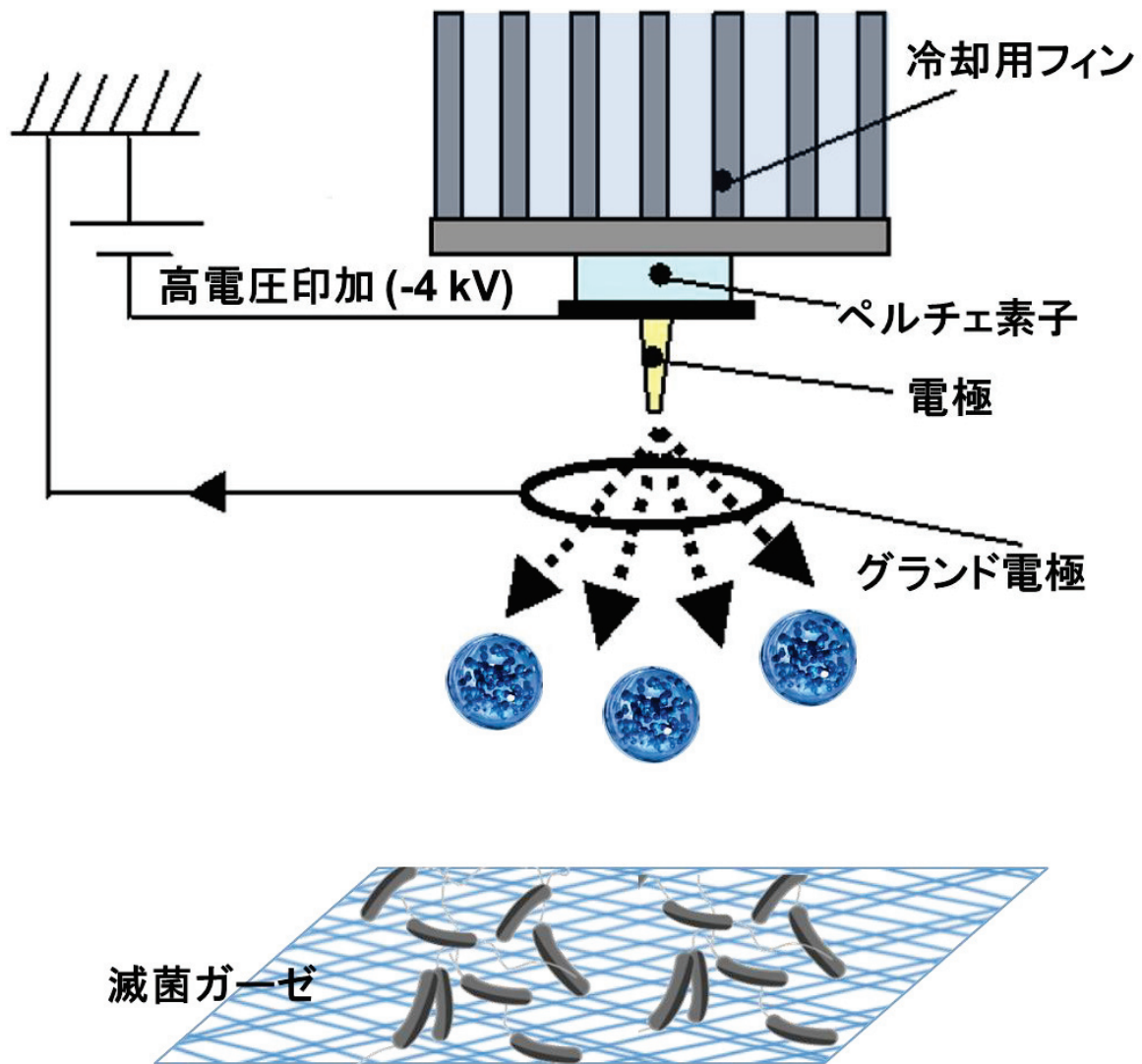


Figure 3-1 静電霧化装置概略図

3.2.3 方法

Trypticase Soy Agar (日本ベクトン・ディッキンソン) で35°C、18時間前培養を行った各試験菌を滅菌生理食塩液に懸濁させ同液で希釈し、各菌の菌量が 10^6 CFU/mLとなるように調製し被検菌液とした。その1 mLを滅菌ガーゼ (5 cm×5 cm：川本産業) に接種し試料とした。実験は今井ら²⁾の方法に準じ、45 Lの密閉ボックス内で行

い、静電霧化装置の出力部位より垂直15 cmの距離に試料を置き、連続して2時間曝露した (Figure 3-2) 。0.5、1および2時間後にガーゼを回収し、10 mLの滅菌生理食塩液に浸漬後、ボルテックスミキサーにて激しく混和し試料中の菌を浮遊させた。この再浮遊液を滅菌生理食塩液にて10倍希釈系列を作製しTrypticase Soy Agarに0.2 mL滴下しコンラージ塗抹を行った。これらの培地を35°C、18時間培養後生菌数を測定した。コントロールとして静電霧化装置のない同じサイズのボックス内で並行して同様に実施した。*S.aureus*および*A.baumannii*については、前述同様に 10^6 CFU/mLとなるように調製した菌液を滅菌生理食塩液で10倍希釈し、滅菌ポリエチレン片 (sterile polyethylene:SPE 2 cm×2 cm) 表面に20 μ L、約 2×10^3 CFUとなるように試験菌を付着させ同様な実験を行った。さらに、これらのSPE試料については静電霧化装置の出力部位垂直より15 cm離れた位置に放置し (Figure 3-2) 、2時間後の生菌数を同様に測定した。コントロールについてもガーゼの実験と同様、静電霧化装置のない同じサイズのボックス内で並行して実施した。実験中のボックス内の温度および湿度はThermo Recorder(TR-72U、T&R Corp.)を用いて測定した。

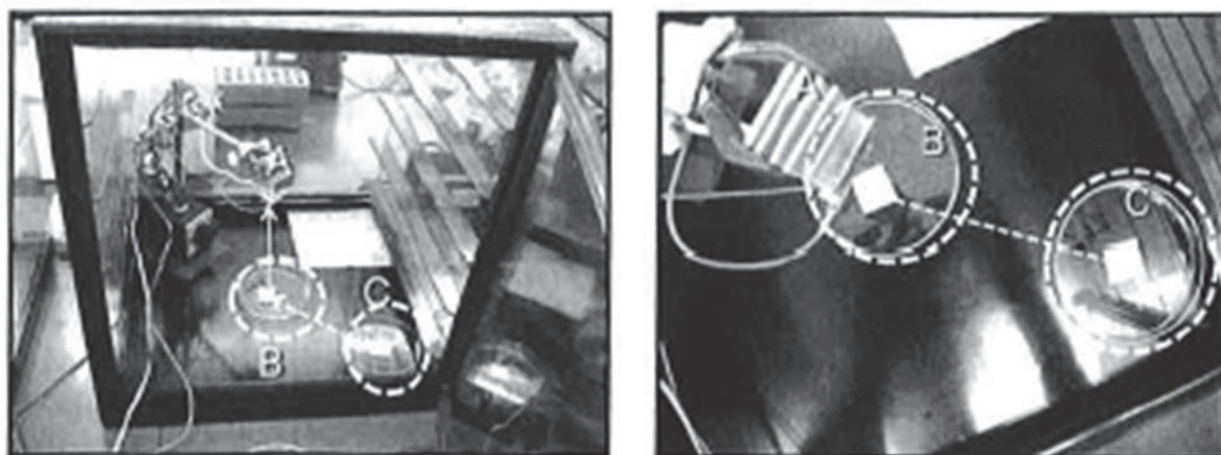


Figure 3-2 静電霧化装置 (A: 出力部、B: 出力部より垂直15 cm離れた位置のポリエチレン片、C:出力部垂直より15 cm離れた位置のポリエチレン片)

3.3 実験結果

3.3.1 ガーゼ試料

滅菌ガーゼに接種した *S.aureus* に対しては、静電霧化装置の照射曝露により経時的に生菌数の減少が認められ、2時間後には検出限界以下となり、非曝露のコントロールに比べ明らかな菌数の減少を示した。(Figure 3-3) *K.pneumoniae*、*S.maracescens* および *P.mirabilis* の腸内細菌に対しては静電霧化装置の照射曝露によって1時間までコントロールに比べ若干の減少が見られたのみであったが、2時間後ではいずれも明らかな生菌数の減少が認められた。(Figure 3-4) *P.aeruginosa* および *A.baumannii* に対する影響は顕著で曝露2時間後では検出限界以下まで生菌数は減少した。(Figure 3-5) なお、実験中の温度および湿度は $22.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0$ 、 $60\% \pm 10\%$ であった。

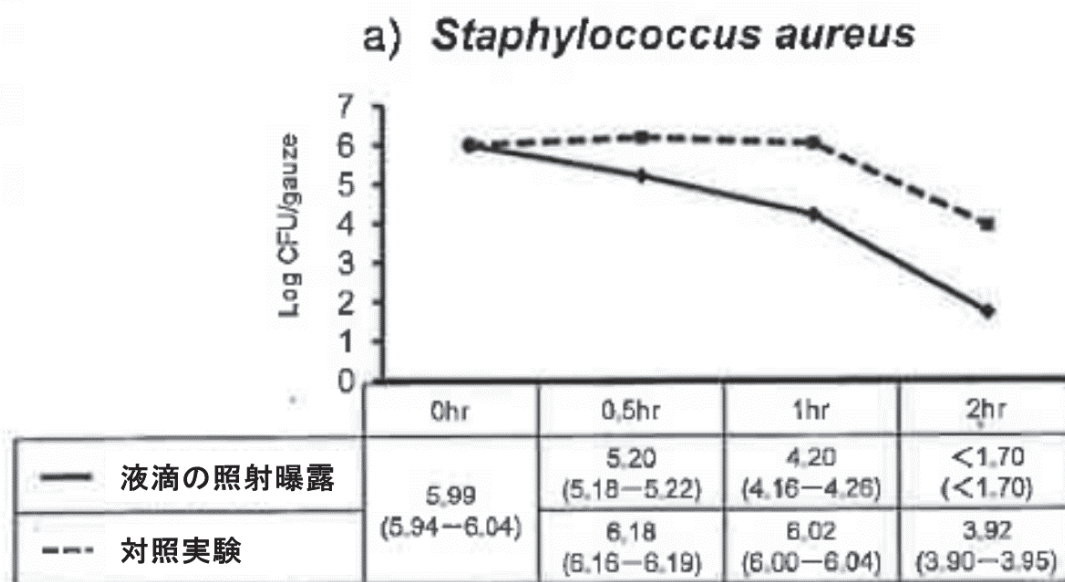
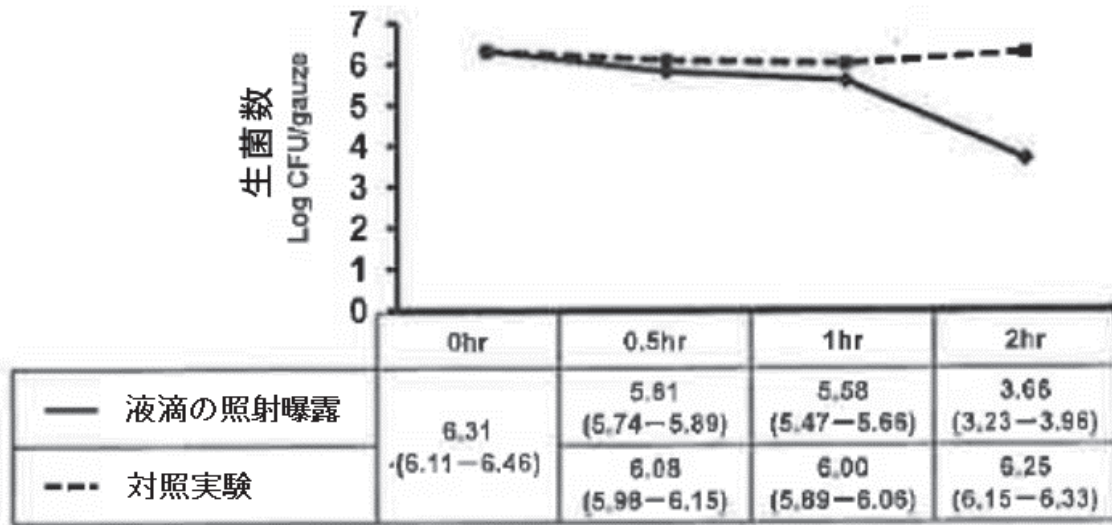
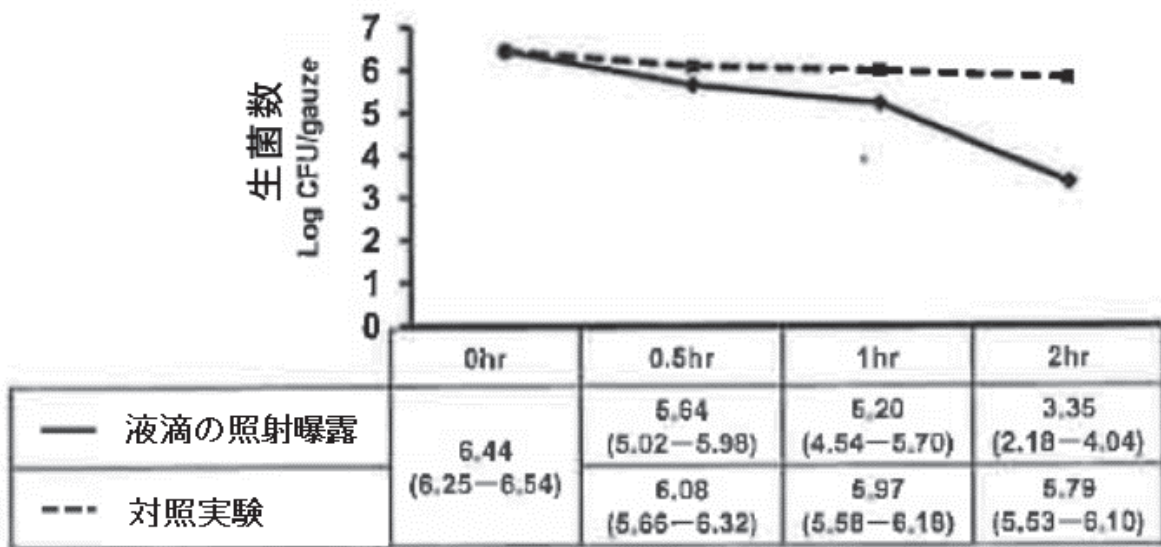


Figure 3-3 メチシリン耐性黄色におけるブドウ球菌生菌数と曝露時間の関係
(*Staphylococcus aureus*)

b) *Klebsiella pneumoniae*



c) *Serratia marcescens*



d) *Proteus mirabilis*

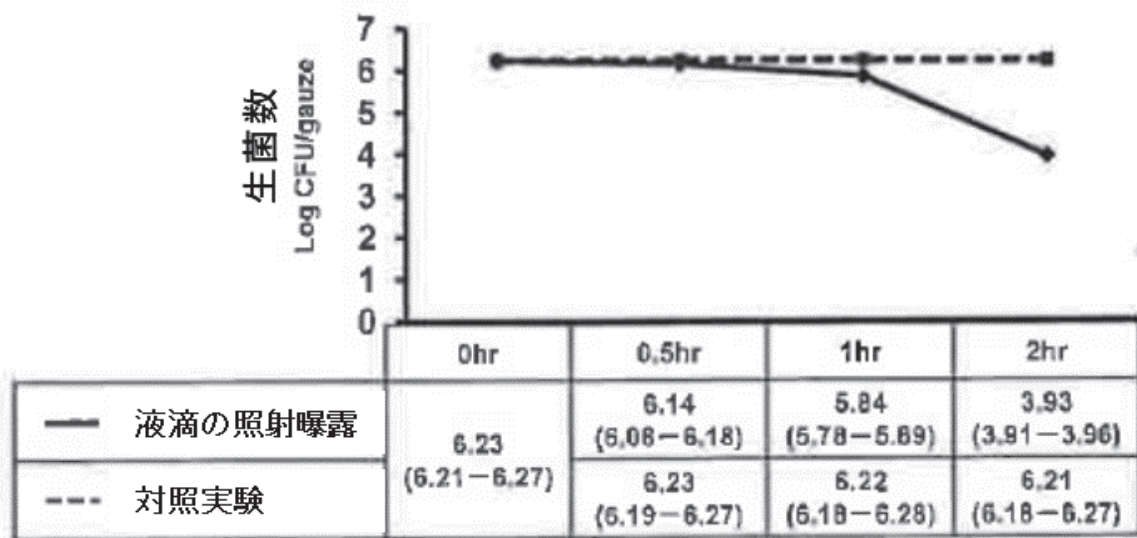


Figure 3-4 腸内細菌における生菌数と曝露時間の関係 (*Klebsiella pneumoniae*,
Serratia marcescens, *Proteus mirabilis*)

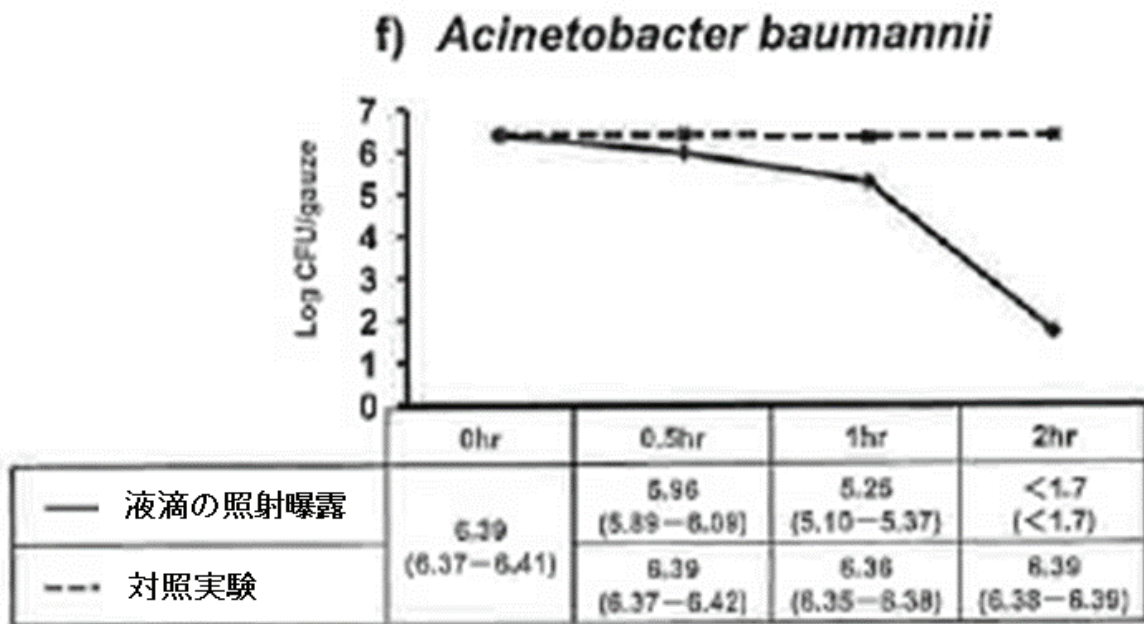
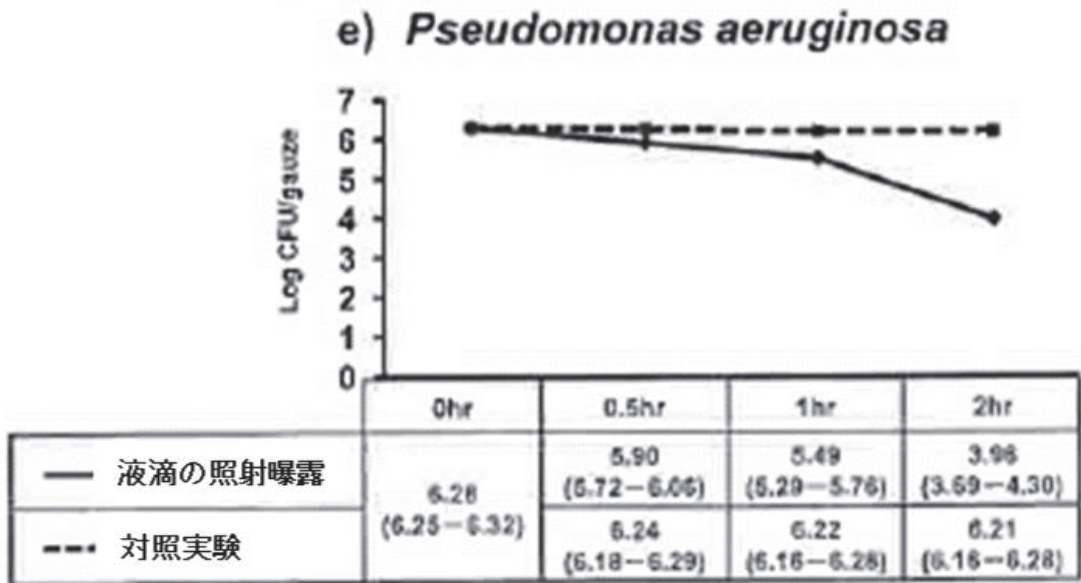


Figure 3-5 ブドウ糖非発酵菌における生菌数と曝露時間の関係 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*)

3.3.2 ポリエチレン片

SPEに付着させた*S.aureus*および*A.baumannii*に対しては垂直で静電霧化装置による照射曝露（直接）した条件と15 cm離して曝露（間接）した条件ともに両試験菌は2時間で検出限界以下となった。また、垂直で静電霧化装置による照射曝露（直接）した条件では測定した1時間において両試験菌ともに検出限界以下となった。

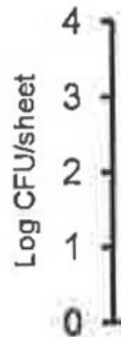
(Figure 3-6)

a) *Staphylococcus aureus*



| | 0hr | 1hr | 2hr |
|---------------------|------|------|------|
| —●— 液滴の照射曝露(直接) | 3.34 | <1.3 | <1.3 |
| - - -■- 液滴の照射曝露(間接) | | 2.2 | <1.3 |
|▲..... 対照実験 | | 3.16 | 3.36 |

b) *Acinetobacter baumannii*



| | 0hr | 1hr | 2hr |
|---------------------|------|------|------|
| —●— 液滴の照射曝露(直接) | 3.79 | <1.3 | <1.3 |
| - - -■- 液滴の照射曝露(間接) | | 2.5 | <1.3 |
|▲..... 対照実験 | | 3.26 | 2.83 |

Figure 3-6 ポリエチレン片における生菌数と曝露時間の関係

(*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*)

3.4 考察

今回、病院感染対策上問題となっている各種抗菌薬耐性菌を対象として静電霧化装置の殺菌作用について検討した。その結果、いずれの耐性菌種に対しても曝露30分から生菌数の減少が見られ経過時間とともに減少し、曝露2時間後では全ての菌種は非曝露コントロールと比べ100分の1 (99%以上) 以下にまで減少する事が確認された。

静電霧化装置から発生した帯電微粒子水はアレルギーの原因となる花粉抗原やダニ抗原を不活化する作用が報告され、その作用機序として帯電微粒子水発生時に同時発生する酸素含有ラジカル O^2 、 $\cdot HO$ が寄与していると考えられる¹⁾。

この酸素含有 $\cdot HO$ はhydroxyl radicalと称され、いわゆる活性酸素と呼ばれる分子種の中で最も反応性と酸化力が強いとされている³⁾。また、タンパク質など多くの物質と反応し不活化することが知られている¹⁾。本実験で得られた静電霧化装置による比較的短時間での殺菌作用もhydroxyl radicalによるタンパク変性によるものと考えられる。今回の実験で、菌種によって殺菌作用の強さに差が見られた現象は菌の表層構造によるものと推測される。実際、今回同様な実験を3回行いその平均を比較したが、実験毎の差はほとんどなかった。

今回さらに病原体によって汚染された環境を想定して、環境材質として比較的多く利用されているポリエチレン材に病院感染で問題視されている*S.aureus*および*A.baumannii*を付着させ同様な実験を行った。その結果、滅菌ガーゼにおける結果と同様に両菌種とも 10^3 CFUの初期菌量が1時間以内で検出限界以下となった。今井ら²⁾は用いた材質は異なるもののステンレス片に*S.marcescens*を付着させ、帯電微粒子水を90分間、曝露させることによって非曝露コントロールに比べ98.7%の生菌数

の不活化を認めている。さらに、曝露後の試験菌を電子顕微鏡レベルで観察した結果、細胞膜周辺の形態が変化し、外殻の著しい損傷を確認している。これらのことから帯電微粒子水に含まれるラジカル成分が細胞膜へ直接作用していると考察している。今回我々が実施した検討において、さらに興味深い新しい事実として静電霧化装置を直接照射曝露させなかった試験片においてもそくていした2時間で検出限界以下となった。このことは密閉された空間であれば静電霧化装置は周辺環境にも作用することが示唆された。これらの実験に関連して西村⁴⁾は市販の各種イオン発生電気製品を用い空中に浮遊させたインフルエンザウイルスの不活化について検討し、一部の機種を除きその効果は認めれなかったと報告している。しかし、その中で、唯一コントロールに比べ活性ウイルス量を低下させた機種は、今回我々が用いた装置と同様な原理を有するものであることから、病原微生物に対する効果を支持する成績であると考えられた。ただし、西村はその効果についてフィルターによる影響も否定できないと考察していることから実験方法のちがいについても考慮しなければならない。

近年、日本において各種耐性菌による大規模なアウトブレイクが散発的に発生し、社会的な問題まで発展している。病院感染において最も重要な対策は感染経路の遮断である。これには医療従事者の手指消毒による衛生管理に重点が置かれている。加えて我々医療従事者が業務上高頻度に利用する携帯端末器の汚染経路について明らかにし、手指とともに衛生管理の必要性を指摘した⁵⁾。しかし、これらの医療器具について化学的消毒法では限界があり、新しい管理法が望まれている。今回、実験に用いた静電霧化装置は密閉空間の耐性菌による汚染環境を1～2時間の比較的短時間で殺

菌する作用を有することから、医療器具などの衛生管理、ひいては病院感染対策への新しい技術として期待できると考えられた。

3.5 結論

静電霧化装置は病院感染を引き起こす主な耐性菌に対して1～2時間の比較的短時間で殺菌的に作用することが判明した。このことから静電霧化装置は病院環境に付着した細菌を殺菌し接触感染経路の遮断に応用が可能であると考えられた。

3.6 参考文献

- 1) 山内俊幸、須田洋、松井康訓(2007) 静電微粒子水を利用した家電機器の開発、エアロゾル研究、22,5-10
- 2) 今井健之、須田洋、浅野幸康、山内俊幸 (2011) 帯電微粒子水曝露による *Serratia sp.* の不活化と形態変化、エアロゾル研究、27,78-80
- 3) 吉川敏一、野原一子、河野雅弘 (2009) 活性酸素・フリーラジカルのすべてー健康から環境汚染まで 丸善、東京
- 4) 西村秀一 (2011) 高性能の空中浮遊インフルエンザウイルス不活化を謳う市販各種電気製品の性能評価、感染症誌、85,537-539
- 5) Kobayashi, I., Shindo, M., Omura, R., Kanayama, A., (2010) Are Mobile Phones of Healthcare Providers a Source of Hospitalacquired Infections? *American Society for Microbiology General Meeting*,L-2197

第4章 静電噴霧による多価帯電アミノ酸ナノ粒子の生成

4.1 緒言

静電噴霧は、質量分析器の液体試料導入インターフェイスや空気清浄の目的で広く用いられている溶質のイオン化方法である (Fenn *et al.*, 1989, Yamauchi and Suda, 2010)。静電噴霧の生成物である帯電ナノ液滴は、**Figure 4-1** に示すように溶媒の蒸発とレイリー分裂を繰り返しながら、最終生成物として、溶質の分子イオンが生成されることが知られている (de la Mora, 2000)。また、Tang と Smith (1999)は、静電噴霧によって生成された液滴が不均一に分裂していることを観察し、その液滴の粒子径分布を位相ドップラー法によって詳細に測定した。その結果、レイリー分裂により液滴は、1つの粗大な親液滴と複数の微小な娘液滴とに分裂しており (Figure 4-1 参照)、親液滴および娘液滴のサイズと帯電数を見積もるモデルを提案している。

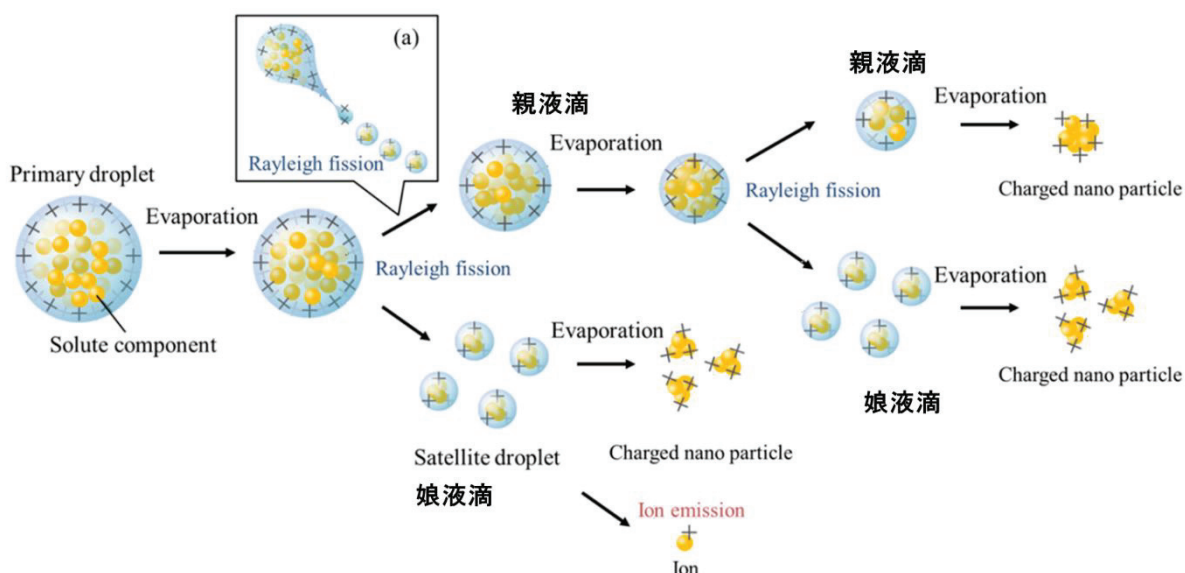


Figure 4-1 静電噴霧による液滴の発生機構

ここで、溶液濃度が高いと蒸発過程において溶質が析出することで分裂が停止することが報告されており (Higashi *et al.*, 2015)、このときの生成物は、溶質分子の集合体であるクラスターやナノ粒子である。Maekawa *et al.* (2014)は、ポリエチレングリコール (PEG) を溶質として、静電噴霧の残渣として生成したこれらのナノ粒子の帯電量分布を計測することで、静電噴霧過程における液滴の分裂過程を考察した。その結果、初期液滴 (親液滴) 表面から、Figure 4-1 (a)に示すように、より微小な液滴 (娘液滴) が分裂して生成し、さらにこれらの生成物は限界帯電量に近い電荷を有していることを明らかにした。ここで、限界帯電量とは液滴が保持することのできる最大帯電数のことで、液滴が蒸発すると、サイズが減少し、液滴に含まれる電荷同士の反発力が強くなる。液滴に含まれる電荷同士の反発力が強くなると、液滴は形状を保つことができなくなり、レイリー分裂と呼ばれる分裂を起こす。一方、液滴径が比較的小さい場合には、液滴表面から溶媒和されたイオンが放出される現象が報告されている (Iribarne and Thomson, 1975)。Hogan *et al.* (2009a)は、固体ナノ粒子懸濁液、シヨ糖および PEG (分子量 8,000) のメタノール水溶液を静電噴霧することで多価に帯電したナノ粒子を生成し、その電気移動度分布をタンデム DMA 法によって測定し、帯電ナノ粒子の帯電数と粒子径の関係を実験的に解析した。その結果、粒子径と帯電数の関係は、溶質やコロイド粒子の種類によらず溶媒の物性に依存し、液滴径が 40 nm より大きい場合にはレイリー限界の理論線に従い、液滴径が 40 nm より小さい場合にはイオン放出限界の理論線に従うことを示した。このように、静電噴霧法は様々な機能性物質のナノ粒子化に用いることができる。また、生成物であるナノ液滴やナノ粒子は、非常に多価に帯電しているため、電界を用いてその輸送過程を制御できる可能性がある。

本研究では、機能性物質として、アルギニン、システイン、リジンの3種類のアミノ酸を用いた。アルギニンは、準必須アミノ酸であり、筋肉や骨格の成長、疲労回復などを促進する物質である。システインも準必須アミノ酸であり、爪や皮膚、髪の毛などに多く存在する。リジンはタンパク質を作るために必要な必須アミノ酸である。一方、医薬分野ではナノ粒子を薬物運搬体として利用し、そのサイズや物性に応じて薬物の安定性、吸収性の向上および体内動態の制御が試みられている。近年では、ナノ粒子の利用は薬物運搬体にとどまらず、医薬品製剤における nm オーダーの微細構造を意図的に設計・制御することで新たな機能の発現につながる可能性がある (Ichikawa, 2010)。このため、これらのアミノ酸を微粒子化することにより、溶解性ならびに吸収性の向上が期待でき、体内に取り込まれた際の体の成長や疲労回復効果の促進だけでなく、ナノ構造制御による新機能発現が期待される。そこで、本研究では、これら3種類のアミノ酸溶液の静電噴霧により、アミノ酸からなるナノ粒子を発生させ、タンデム DMA 法によりそれらの粒子径分布および帯電数を実験的に評価した。さらに、質量分析により、イオン放出過程を解析し、液滴の蒸発分裂によるナノ粒子の生成メカニズムと帯電量分布について考察を行った。

4.2 実験

4.2.1 溶液の調製

本研究で用いた3種類のアミノ酸（アルギニン、システイン、リジン）の分子量および分子構造を **Table 4-1** に示す。これら3種類のアミノ酸を溶質とし、Table 4-1 に示すような溶媒および溶液濃度の試料をそれぞれ調製した。また、それぞれの溶液の電気伝導率、表面張力、粘度を測定した。測定結果を **Table 4-2** に示す。

Table 4-1 本研究で用いたアミノ酸

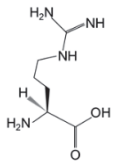
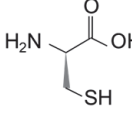
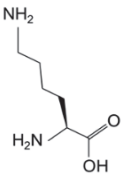
| Sample name | Chemical eq. | Molar mass [g mol ⁻¹] | Solvent [vol%] | | Mass fraction [wt%] | Structure |
|-------------|--|-----------------------------------|------------------------------|-------|---------------------|---|
| | | | Methanol | Water | | |
| | | | Density [kg/m ³] | | | |
| L-Arginine | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 175 | 20 | 80 | 0.1~1.0 |  |
| | | | 973.3 | | | |
| L-Cysteine | C ₃ H ₇ NO ₂ S | 122 | 15 | 85 | 0.1~1.0 |  |
| | | | 979.0 | | | |
| L-Lysine | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 147 | 30 | 70 | 0.1~1.0 |  |
| | | | 960.8 | | | |

Table 4-2 アミノ酸溶液の物性値

| | Amino acid concentration [wt%] | Electrical conductivity [mS/m] | Surface tension [mN/m] | Viscosity [mPa s] |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| L-Arginine | 0.1 | 2.44 | 40.3 | 1.57 |
| | 0.5 | 4.40 | 40.4 | 1.64 |
| L-Cysteine | 0.1 | 0.57 | 45.2 | 1.41 |
| | 0.5 | 0.74 | 44.7 | 1.44 |
| L-Lysine | 0.1 | 3.28 | 34.6 | 1.95 |
| | 0.5 | 10.98 | 34.3 | 1.96 |

4.2.2 アミノ酸ナノ粒子の粒子径分布および帯電数分布測定

Figure 4-2 に実験経路を示す。静電噴霧装置は、ステンレス製のクロス型容器内にメタルハブ付交換針（ジーエルサイエンス（株）：0.11 mm I.D., 0.24 mm O.D., $L = 25$ cm）を噴霧用キャピラリーとして設置したものを用いた。シリンジポンプ（Harvard Apparatus：70-2205）を用いて、100 または 200 $\mu\text{L/hr}$ の流量で前述の試料をキャピラリーに定量供給し、高電圧電源（Keithley Corporation：model 241）を用いて 2.5 kV の電圧を印加することで噴霧を行った。噴霧状態は CCD カメラ（SONY Co.：XC-75）を用いて観察し、安定なテーラーコーンの形成を確認した。なお、キャリアガスとしてマスフローコントローラー（MFC）で 3 L/min となるように調整した清浄空気を用いた。

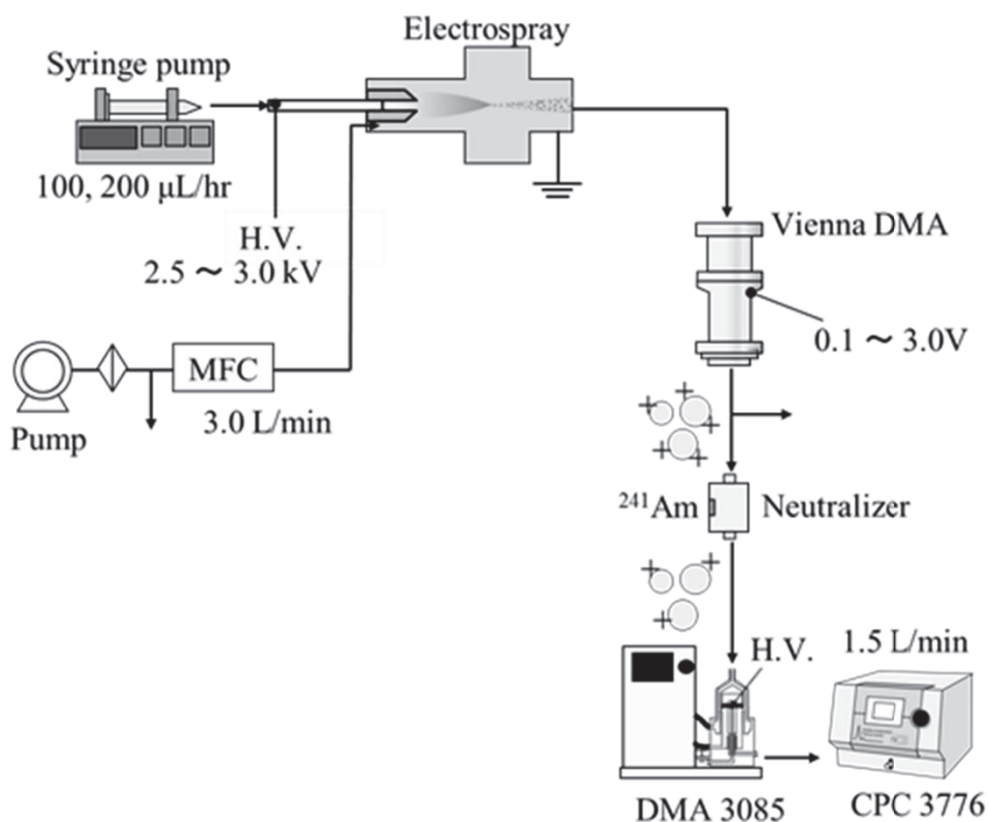


Figure 4-2 アミノ酸ナノ粒子合成装置およびサイズ、電荷分布の測定装置

生成物の気中粒子径分布と帯電数の評価は2台の静電分級器（DMA）を用いたタ
ンデム DMA 法により行った。まず、上述の方法で生成した粒子を1台目の DMA
（Vienna 型 DMA）に導入した。ここで、DMA で分級される粒子の電気移動度 Z_{p1}
は、粒子径 D_p ならびに帯電数 n の関数として、以下の式で与えられる。

$$Z_p = \frac{neC_c}{3\pi\mu D_p} \quad (1)$$

ここで、 Z_p は電気移動度 [$m^2/(V \cdot s)$]、 e は電気素量 ($=1.6021766208 \times 10^{-19} \text{ C}$)、 μ
は空気の粘度 ($=1.822 \times 10^{-5} \text{ Pa s}$ 、 20°C) をそれぞれ表している。また、 C_c はカニン
ガムの補正係数[-]であり、式(2)で与えた (Davies, 1945)。

$$C_c = 1 + \frac{\lambda}{D_p} \left\{ 2.514 + 0.800 \exp\left(-0.55 \frac{D_p}{\lambda}\right) \right\} \quad (2)$$

ここで、 λ は空気の平均自由行程 ($=6.7 \times 10^{-8} \text{ m}$ 、 101.3 kPa) である。

式(1)より、粒径、帯電数ともに小さい粒子と、多価に帯電した粗大粒子は、1台目
の DMA では、同じ電気移動度を有する粒子群として分級されることがわかる。つぎ
に、これらの粒子群を ^{241}Am を用いたエアロゾル荷電中和器に導入した。荷電中和器
では両極イオンによる拡散荷電によって、粒子は平衡荷電状態となる。これらの粒子
を2台目の DMA (TSI 社製：model 3085) ならびに、凝縮核計数器 (CPC, TSI 社
製：model 3776) に導入し、その粒度分布の測定を行った。2台目の DMA では、平
衡荷電分布を考慮して粒度分布解析が行われているため、1台目の DMA で分級され
た粒子 (電気移動度 Z_p) の物理的大きさ (D_p) の分布を求めることができる。これ
より、式(1)から帯電数 n の分布を求めることができる。

実験では、1 台目の DMA の印加電圧を調整して分級する粒子群の電気移動度 Z_{p1} を変えてそれぞれの電気移動度における帯電数分布を求め、最終的に粒子径と帯電数の分布に関する三次元プロットを行った。また、その結果より、同じ粒子径を有する（帯電数 n は異なる）粒子群の $d(dN/d\log D_p)/d\log n$ [cc^{-1}] を帯電数方向へ積分することで生成した全粒子の粒子径分布を求めた。

4.3 実験結果および考察

4.3.1 アミノ酸ナノ粒子の粒子径分布および帯電数分布

Figure 4-3 に得られた粒子径分布および帯電数分布の結果を示す。それぞれの 3 次元プロットの縦軸は帯電数、横軸は粒子径をそれぞれ対数軸で示しており、 $d(dN/d\log D_p)/d\log n$ を色分けで示している。それぞれのグラフの上を示した分布は帯電数方向へ積分して得られた粒子径分布である。実線は対数正規分布を用いて行ったフィッティングの結果を示している。

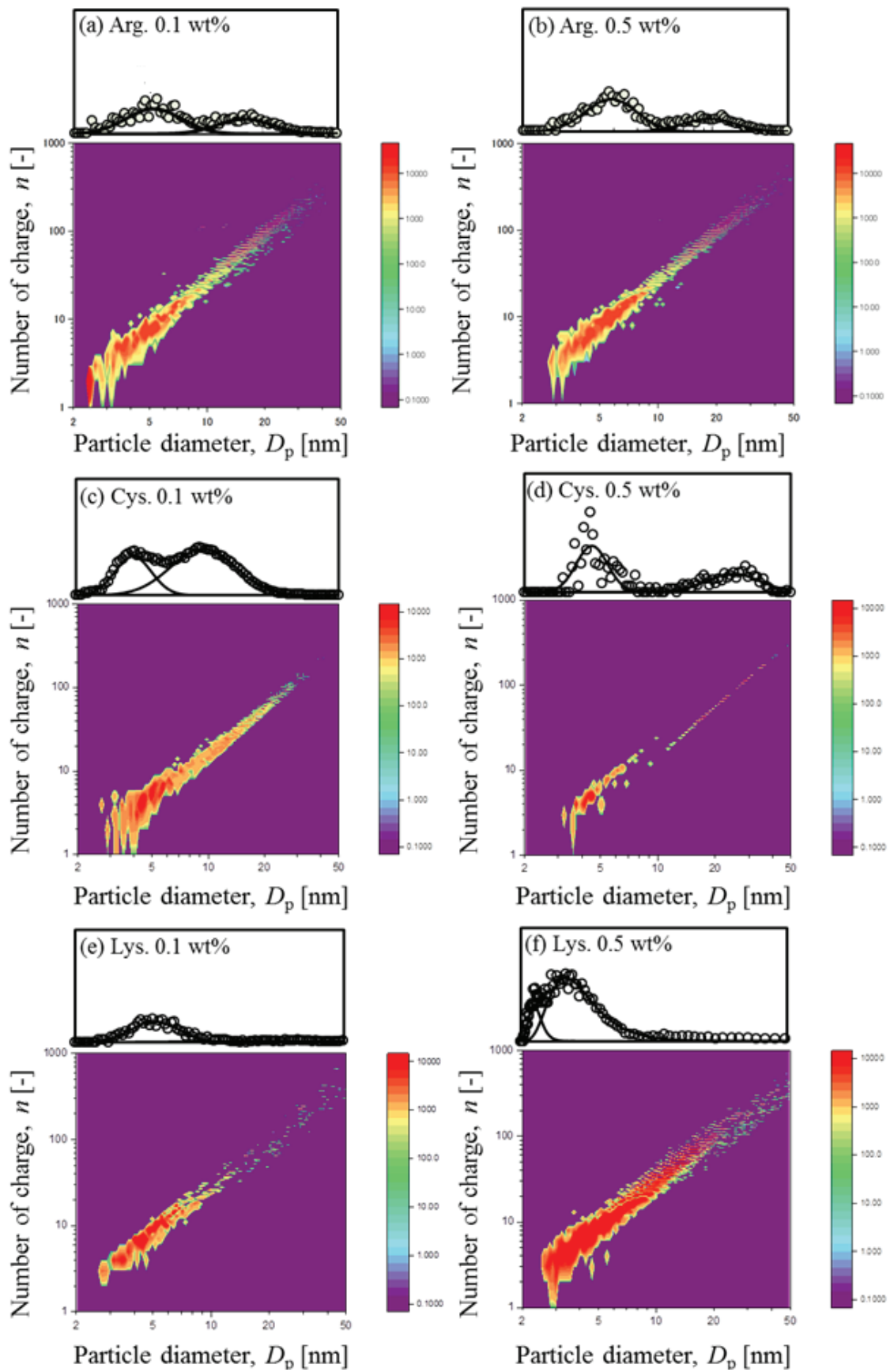


Figure 4-3 得られた粒子径分布および帯電数分布

いずれの粒子径分布においても二峰性を示しており、レイリー分裂による液滴の分裂過程は Figure 4-1 で示したように、1つの粗大な親液滴と複数の微小な娘液滴とに分裂していることを示唆している。なお、Figure 4-3 の 8(d)システインの微小ピークのデータのばらつきの原因は、システインの溶解性が低いために、高濃度での測定において対向極での析出のため詰まりが発生することがあり、測定感度が落ちてしまったためと考えられる。

ここで、微小側の娘液滴のピークに着目すると、いずれのアミノ酸においても 5 nm 程度の非常に微細なナノ粒子が生成されている。一方、粗大側の親液滴のピークは、およそ 10~30 nm にピークを有している。アミノ酸の種類によって異なる濃度のエタノール水溶液を使用していることもあり、アミノ酸の種類に依存した系統的な傾向が見られないが、アミノ酸の種類によって各液滴の粒子径分布に差が生じた理由としては、アミノ酸の構造に起因する因子とエタノール水溶液の濃度およびアミノ酸濃度の違いによる溶液物性（電気伝導率、表面張力、密度および粘度）の影響との重畳効果によるものと思われる。また、0.1 wt%と 0.5 wt%を比較すると、微小側ならびに粗大側のピークはともに溶液濃度の増加にともない粗大粒子側へピーク位置がシフトしている。

3次元プロットに着目するといずれの結果においても、粒子径の増大とともに帯電数が増加している傾向が見られ、両対数プロットにおいて傾き 1.5~2 の直線となっている。これは液滴の分裂が限界帯電において生じているためであると考えられ、このことについては、次節で詳細に検討する。

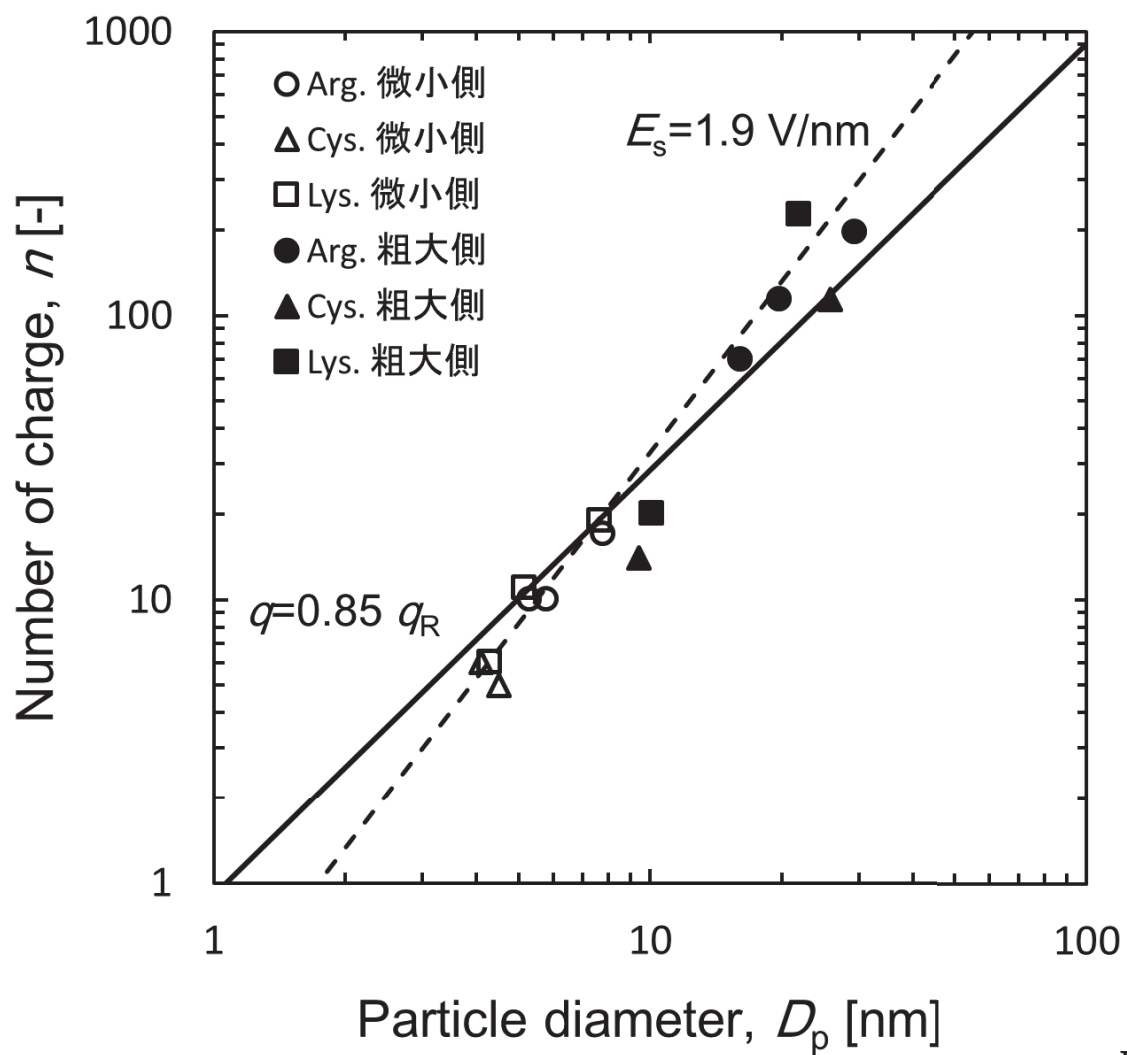
4.3.2 多価帯電液滴の分裂過程

静電噴霧によって生成したアミノ酸を含む多価帯電液滴の分裂過程をより詳細に検討するために、Figure 4-3 の微小側および粗大側のピーク粒子径を帯電数に対してプロットした結果を **Figure 4-4** に示す。Figure 4 にはアミノ酸濃度 1.0 wt%での結果も一部合わせて示してある。

$$q_R = \frac{\pi\sqrt{8\gamma\epsilon_0}D_p^3}{e} \quad (3)$$

$$q_E = \frac{\pi\epsilon_0 D_p^2 E_s}{e} \quad (4)$$

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率 ($=8.85418782 \times 10^{-12}$ F/m)、 γ は表面張力 ($=41.7$ mN/m : 20 vol%エタノール水溶液、20°C) であり、 E_s は表面における電界強度 [V/m]を表す。図よりおよそ 10 nm おいて、レイリー限界とイオン放出限界の線が交わっており、この点より大きな粒子はレイリー分裂、小さい粒子はイオン放出が支配的な分裂メカニズムであることが分かる (Maekawa *et al.*, 2014)。式(3), (4)は液滴径と液滴の限界帯電数の関係を示すものであるが、この関係は液滴が球形でかつ電荷が均等に配置された理想的な場合のものであり、実際には液滴の変形や電荷の偏りが存在するために、粒子径が大きく帯電数が小さい状態で液滴の分裂が起きていると考えられる。また、最終的な粒子径と帯電数は、ドライアップ直前の液滴径と帯電数の関係を反映していると思われるため、本研究では、最終生成物の粒子径と帯電数の関係を式(3), (4)から得られる結果と比較した。図中の白抜きのプロットが微小側のピーク、黒塗りのプロットが粗大側のピークの実験結果を表している。



Figure

Figure 4-4 粒子径と粒子帯電量の相関

娘液滴に属する微小側のピークは 4 nm から 7 nm の粒子径範囲で 5 価から 8 価の帯電数を持ち、親液滴に属する粗大側のピークは 10 nm から 30 nm の粒子径範囲で 10 価から 22 価の帯電数を有しており、それぞれレイリー限界の 85%の帯電数で分裂した場合 (Hiraoka, 2010) の実線あるいは、Es を 1.9 V/nm としたとき (Horgan et al., 2009b) の破線とほぼ一致している。

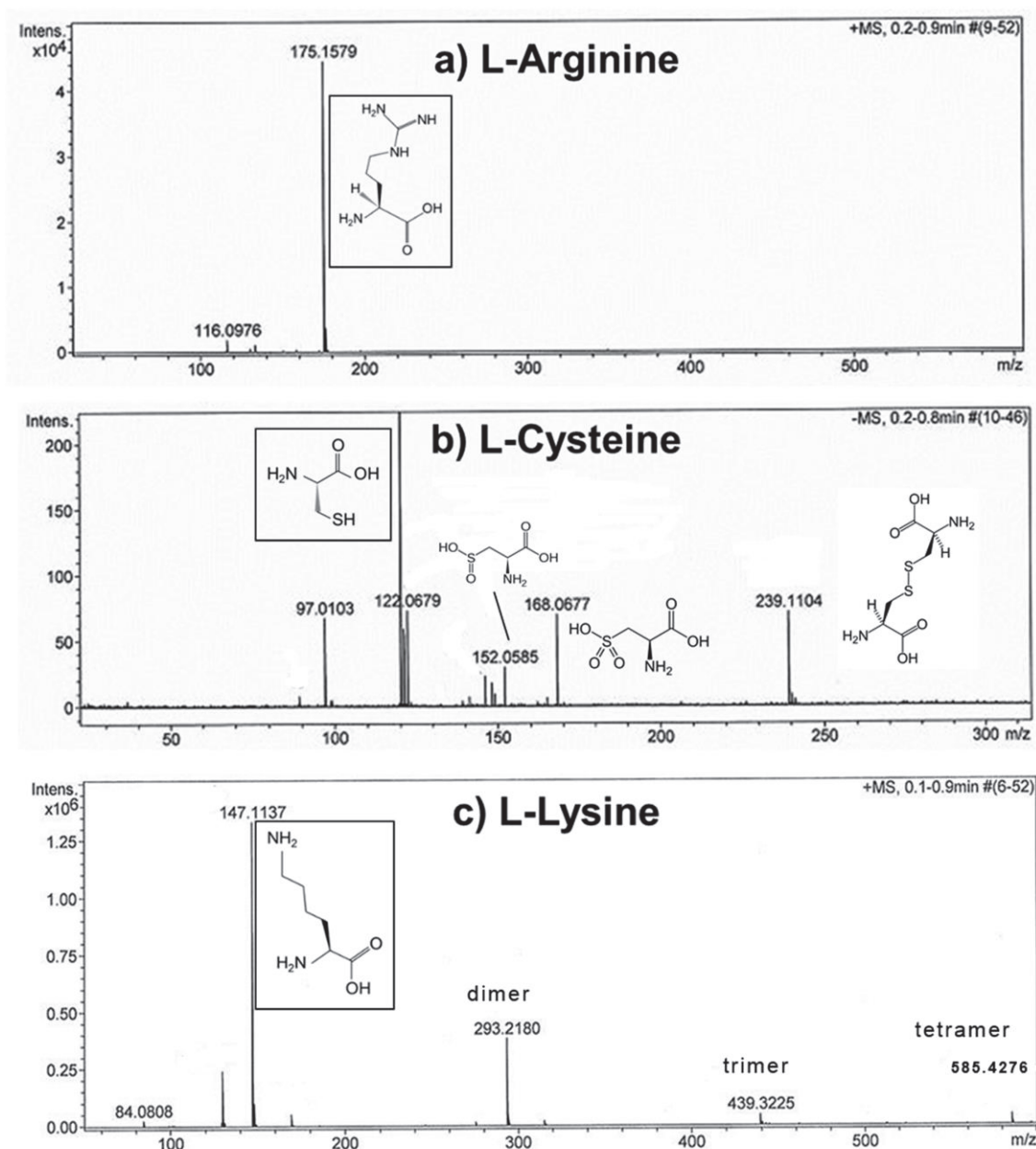


Figure 4-5 アミノ酸溶液の質量分析結果

すなわち、静電噴霧によって生成した多価に帯電した液滴は、レイリー分裂によって粗大な親液滴と微小な娘液滴に分裂し、娘液滴については、イオン放出により最終的な帯電数が決定されている。この過程において質量分析で見られるようなアミノ酸の分子イオンが放出されていると予測される。実際に、質量分析器（ブルカー社製：microTOF II、試料注入量：70 μ L/h、検出モード：ESI-negative, ESI-positive、質量範囲： $m/z=50-1000$ ）で測定したところ **Figure 4-5** に示すように分子量 175、120、147 に単一分子イオンのピークがそれぞれ検出された。

4.3.3 液滴径の推算

液滴の分裂過程に及ぼす溶液濃度の影響を検討するために、以下の式を用いて、微小側および粗大側それぞれのピーク粒子径ならびにそれに対応する溶液濃度から液滴の直径を推算した。

$$D_p = \left(\frac{\rho_d}{\rho_p} \right)^{1/3} D_d \times C^{1/3} \quad (4)$$

ここで、 ρ_d は溶媒の密度 [kg/m^3]、 ρ_p は溶質の密度 [kg/m^3]、 D_d は液滴径 [m]、 C は質量分率 [-] をそれぞれ表している。

結果を **Figure 4-6** に示す。Figure 4-6 にはアミノ酸濃度 1.0 wt% での結果も一部合わせて示してある。図中の白抜きのプロットが微小側ピーク、黒塗りのプロットが粗大側ピークの実験結果を表している。図中の実線ならびに点線は、それぞれ液滴径 D_d を 40 nm ならびに 140 nm としたときの式(4)から求められる理論推定線である。実験点は、それぞれの理論推定線とほぼ一致していることから、親液滴、娘液滴ともに

実験の範囲内においては、溶質の種類ならびに溶液濃度によらず、おおむね同程度の大きさの液滴が分裂により生じていることが明らかとなった。

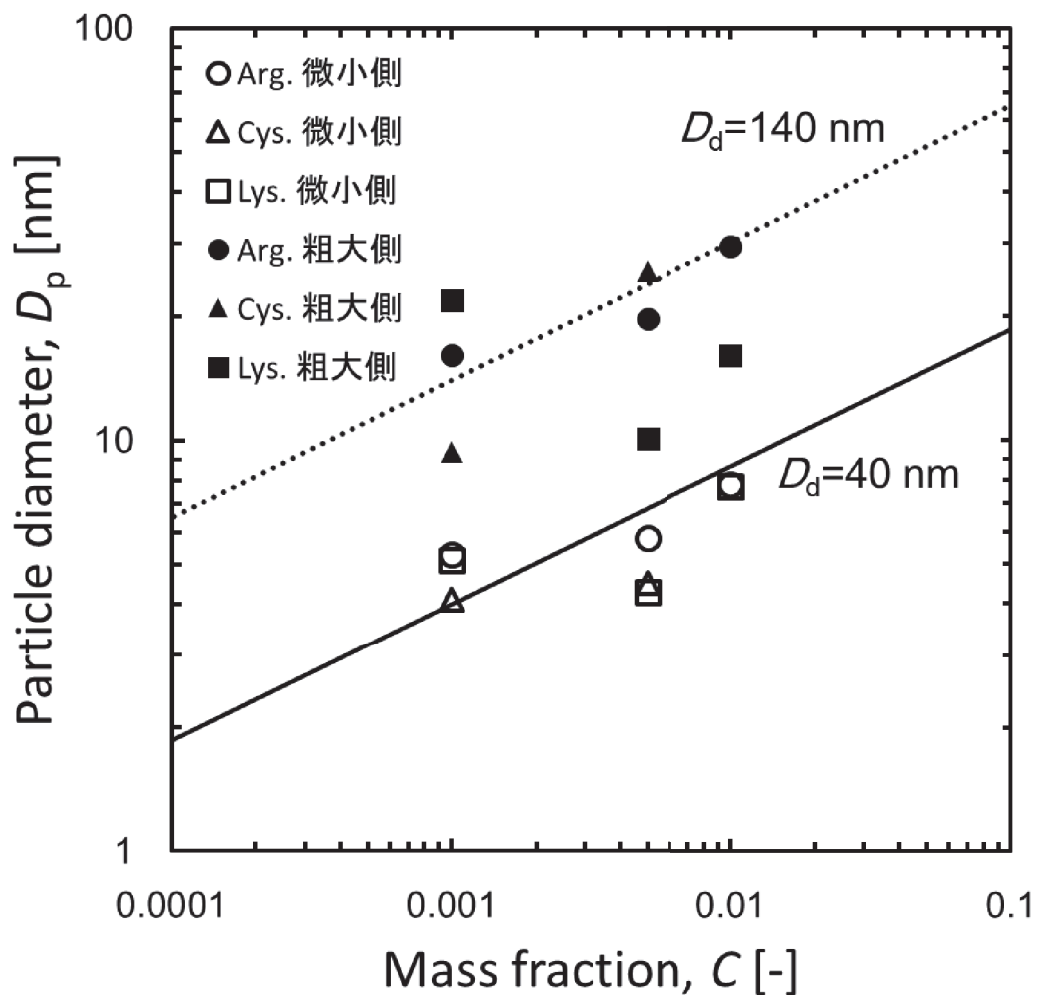


Figure 4-6 質量分率と粒子径の相関

4.4 結言

静電噴霧によりアミノ酸（アルギニン、システイン、リジン）のナノ粒子を生成し、それらの粒子径分布および帯電数分布の測定結果から、多価に帯電した液滴の分裂過程を推測し、以下の知見を得た。

- 1) 噴霧直後の液滴は、溶媒の蒸発によりその液滴が持てる限界帯電数まで液滴が小さくなると、レイリー分裂が生じ、親液滴（粗大側ピーク）と娘液滴（微小側ピーク）に分かれる。
- 2) 分裂により生じる親液滴の直径はおよそ 140 ± 80 nm、娘液滴の直径はおよそ 40 ± 15 nm であり、溶質濃度に応じて 4~30 nm の極めて微小なナノ粒子を多価に帯電した状態で生成することができる。
- 3) 一部の親液滴および娘液滴は、約 10 nm 以下のイオン放出領域に存在し、これらの極微小液滴からアミノ酸の単一分子イオンが放出されていると推定される。

これらの知見により、静電噴霧法は機能性物質を多価に帯電したナノ粒子やイオンとして生成することが可能であるため医療健康、空気清浄分野などにおいてさらなる応用が期待できる。

4.5 参考文献

- Davies, C. N.: Definitive Equations for the Fluid Resistance of Spheres, *Proc. Phys. Soc.*, **57**, 259-270 (1945)
- de la Mora, J. F.: Electrospray Ionization of Large Multiply Charged Species Proceeds via Dole's Charged Residue Mechanism, *Anal. Chim. Acta*, **406**, 93-104 (2000)
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M.: Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science*, **246**, 64-71 (1989)
- Higashi, H., Tokumi, T., Hogan, Jr. C.J., Suda H., Seto, T. and Otani, Y.: Simultaneous Ion and Neutral Evaporation in Aqueous Nanodrops: Experiment, Theory, and Molecular Dynamics Simulations, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 15746-15755 (2015)
- Hiraoka, K.: Fundamentals of Mass Spectrometry –Fundamentals of Electrospray–, *J. Mass Spectrom. Soc. Japan*, **58**, 139-154 (2010)
- Hogan Jr. C. J., Biswas, P. and Chen, D.-R.: Charged Droplet Dynamics in the Submicrometer Size Range, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 970-976 (2009a)
- Hogan Jr., C. J., Carroll, J. A., Rohrs, H. W., Biswas, P. and Gross, M. L.: Combined Charged Residue-Field Emission Model of Macromolecular Electrospray Ionization, *Anal. Chem.*, **81**, 369-377 (2009b)
- Ichikawa, H.: Development of Nanoparticulate Systems for Biomedical Use, *J. Surface Sci. Soc. Japan*, **31**, 543-550 (2010) (in Japanese)

- Iribarne, J. V. and Thomson, B. A.: On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287-2294 (1975)
- Maekawa, T., Tokumi, T., Higashi, H., Seto, T. and Otani, Y.: Effect of Solution Concentration on Breakup of Electro-Sprayed Droplets and Emission of Solute Ions, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **40**, 5-11 (2014) (in Japanese)
- Tang, K. and Smith, D.: Theoretical Prediction of Charged Droplet Evaporation and Fission in Electrospray Ionization, *Int. J. Mass Spectrom.*, **185/186/187**, 97-105 (1999)
- Yamauchi, T. and Suda H.: Air purification technology using electrostatic atomization, *J. Japan Air Cleaning Associ.*, **45**, 12-17 (2010) (in Japanese)

第5章 総括

本論文は、第1章では、静電霧化装置を開発した背景、その静電霧化法から帯電微粒子水の特性、効果について述べ、また静電霧化装置の開発の変遷、搭載商品について述べた。

第2章では、帯電微粒子水が細菌に対し殺菌的に作用することは既に検証されていたが、本章では、細菌のどの部位に作用しているかを、電子顕微鏡を用いて検証した。帯電微粒子水を *Serratia marcescens* に90分間曝露させた。その結果 *Serratia marcescens* の98.7%を不活化し、その形態変化を電子顕微鏡によって観察した。観察した結果、細胞膜の損傷が確認できた。この結果より、帯電微粒子水中に含まれると考えられるラジカル成分が *Serratia marcescens* の細胞膜に作用していることが示唆された。生化学的に、どの部位に作用しているかについてメカニズムを解明することが今後の課題である。

第3章では、静電霧化装置から発生したナノサイズの帯電微粒子水は、様々な細菌に対して効果があることが検証されてきたが、近年大きな社会問題となっている各種の抗菌薬耐性菌に対する効果を実験的に検証した。その結果、帯電微粒子水は病院感染を引き起こす耐性菌種に対しても暴露30分から生菌数の減少が見られ経過時間とともにより減少し、暴露2時間後では全ての菌種は非暴露コントロールと比べて100分の1(99%以上)以下にまで減少することが確認された。これは、帯電微粒子ス発生時に同時に発生する酸素含有ラジカル(ヒドロキシルラジカル)によるたんぱく質変性によるものと考えられる。このことから帯電微粒子水は

病院環境に付着した細菌を殺菌し接触感染経路の遮断に応用が可能であると考えられた。

第4章では、室内環境をより快適、安全、健康にするための可能性を探る手段として、人体に有用なアミノ酸をナノ粒子として噴霧する可能性を検討した。静電噴霧によりアミノ酸（アルギニン、システイン、リジン）のナノ粒子を生成し、それらの粒度分布および帯電数分布の測定結果から、多価に帯電した液滴の分裂過程を推測し、次の知見を得た。まず、噴霧直後の液滴は、溶媒の蒸発によりその液滴が持てる限界帯電数まで液滴が小さくなると、レイリー分裂が生じ、親液滴（sub ピーク）と娘液滴（main ピーク）に分かれることが明らかとなった。また、アミノ酸が析出する直前の親液滴の直径はおよそ 150 nm、娘液滴の直径はおよそ 40 nm であり、溶質濃度に応じて 4~30 nm の極めて微小なナノ粒子を多価に帯電した状態で生成することができることがわかった。さらに、一部の親液滴および娘液滴は、約 10 nm 以下のイオン放出領域に存在し、これらの極微小液滴からアミノ酸の単一分子イオンが放出されていると推定されることを確かめた。これらの知見により、静電噴霧法は機能性物質を多価に帯電したナノ粒子やイオンとして生成することが可能であるため医療健康、空気清浄分野などにおいてさらなる応用が期待できる。

謝 辞

本論文をまとめることを勧めて頂き、また長年にわたりご指導戴いた広島大学大学院工学研究科奥山喜久夫特任教授に心から厚く感謝を申し上げます。また、本論文をまとめるに当たり、懇切丁寧にご指導戴いた広島大学大学院工学研究科荻崇准教授に深く感謝致します。

また、長年帯電微粒子水の物性解明でご指導を戴いた、金沢大学大学院理工研究域瀬戸章文教授、東秀憲准教授に深く感謝致します。また、静電霧化装置の発生メカニズム解明でご指導戴いた、山形大学工学部東山禎夫教授に深く感謝致します。

さらに、本論文をまとめることにご賛同、ご配慮を戴いたパナソニック株式会社アプライアンス社技術本部本橋良所長、中山敏部長、並びにパナソニック株式会社の関係者皆様に感謝致します。