

研究ノート

活性酸素によるナノバブルの殺菌効果

山口政人¹、渡部芳彦¹、馬 騰²、但木大介²、
金高弘恭²、平野愛弓²、庭野道夫¹

¹東北福祉大学 ²東北大学

要旨

大腸菌をモデル細菌として用いてナノバブル (NB) の殺菌活性を調べた。ナノバブルは、ナノスケールの直孔を規則的に配列させた多孔質アルミナ膜を用いて作製した。ナノバブルの殺菌活性を評価するために、NB 懸濁液中に細菌を留置した。殺菌活性は、細菌培地上にコロニー化した生細胞の数から求めた生存率で推定した。二酸化炭素 (CO₂)、酸素 (O₂)、窒素 (N₂) の3種類のガスを含む NB 水に曝露した場合の細菌の生存率を調べた結果、CO₂ を含む NB 水に曝露すると細菌の生存率が有意に低下することがわかった。酸素ガス、窒素ガスを含む NB 水に曝露しても、有意な殺菌効果は認められなかった。O₂ NB 水に曝露した場合には、大腸菌の増殖が観察された。NB 懸濁液中の活性酸素の発生を電子スピン共鳴分光法 (ESR) で調べた。その結果、NB 懸濁液中に発生する活性酸素の主なものは水酸基ラジカル (OH・) であり、活性酸素の発生は CO₂ NB 水の場合に最も強く、殺菌効果測定の結果と一致することがわかった。

キーワード：殺菌作用、バルクナノバブル、大腸菌、活性酸素

1. 緒言

医薬品や食品の製造工程を始め、医療施設や福祉施設の環境管理において、水や空気を清潔に維持することは安全管理、健康管理、生命維持の観点から必要不可欠なプロセスである。特に微生物の混入を阻止するための滅菌や殺菌、消毒というような処理工程は重要であり、作業者の負担の度合い、健康管理、コスト面からも現場の条件に見合うものであることが望ましくこれらの技術開発は常に求められている。

滅菌法や殺菌法には様々なものがあり、芽胞菌の殺滅を目的とした高圧蒸気滅菌のほか、一般的な加熱殺菌もある。また非加熱殺菌として、紫外線やオゾンランプの照射による殺菌、次亜塩素酸などの薬品による殺菌など用途に合わせた方法がある。食品を長期間保存するための、微生物制御法としては紫外線殺菌法や次亜塩素酸とオゾンによる化学法などがよく用いられている。紫外線やオゾンランプを用いる非加熱殺菌法は、コスト面では優れているが、UV-C 領域と言われる254nm や185nm 付近の紫外線を使用している。これは強力な殺菌効果を示すため、医療環境を始め、理工学生命科学の研究分野、食品製造の分野などで使用されている。しかし人体に有害とされる320nm 以下の波長であるため、取り扱いには注意を要する。化学薬品においては、人体に使用できるものとできないもの、使用時に適正な濃度調整が必要であること、揮発性タイプのもの、刺激臭のものなど様々であり、取り扱いに注意を要し、準備や事後処理等の作業面から煩雑である。即ち、紫外線殺菌法は紫外線が人体に有害であり、また化学法は殺菌過程で副生成物を生成するなどの欠点もある。我々は、以前に酸化チタンナノチューブ薄膜の光触媒機能を用いた大腸菌の殺菌作用について報告した^{1,2)}。薬剤が不要である点で有利であるが、紫外線照射を必要とするなど、実際の医療環境で使用するには装置の準備などやや煩雑である。そこで本研究では、より簡便

な殺菌法であるナノバブルを用いた殺菌法を検討した。

近年、新たな殺菌技術としてマイクロバブル（以下 MB）による殺菌法が注目されている。しかし、MB の殺菌効果の作用機序については未解明のままである。マイクロバブルの殺菌メカニズムについては、気泡が外力で崩壊された際に生成した衝撃波によるとされる解釈^{3,4)} や、あるいはフリーラジカルが菌体を破壊するという解釈^{5,6)} などがある。また、MB とオゾンを用いた場合には、MB がオゾンの分解速度を高め、水酸基ラジカル (OH·) の生成を促進する効果があると考えられている^{7,8)}。本研究では MB よりさらに粒径が小さいナノバブル (Nanobubble: NB) を用いた殺菌効果を明らかにすることを目的とした。

NB は直径 1 μm 未満の球状の泡である。NB は非常に長い寿命、高密度の表面電荷などのユニークな特性を持ち、水処理⁹⁾、表面洗浄¹⁰⁻¹²⁾、殺菌¹³⁾ など様々な用途において NB には大きな可能性がある¹⁴⁾。しかしながらその一方で、NB の基本的な特性や様々な応用における NB の効果の作用機序については完全には理解されていない。また、NB の長期安定性には様々な理論的根拠が提案されているが、その安定性の起源はまだ完全には理解されていない。

NB を生成する方法として幾つかの方法が提案されている¹⁴⁾。我々は、多孔質アルミナ薄膜にガス圧を加えることにより、NB を生成する簡単な手法（細孔加圧法）を提案した¹⁵⁾。ガスフィルターとして使用した多孔質アルミナ膜は、陽極酸化によって形成した。このフィルムには、内径が約 100 nm の、まっすぐに規則正しく密に詰まったナノホールがある。多孔質アルミナナノホールからガスが水中に押し出されると NB が形成され、また、多孔質アルミナ薄膜のナノホールサイズが比較的均一であるため、粒径の揃った NB が形成される。この方法の利点は、希ガスを含む様々な種類のガスを含む NB を簡単に形成できることである。この利点を生かして、本研究でも様々なガスを内包した NB の殺菌効果について網羅的に調べることができた。

本稿では、第 2 節で実験方法を、第 3 節で実験結果と考察、そして最終節でこれまでの総括と今後の課題について述べる。

2. 実験方法

2.1 NB 生成法

本研究で NB 発生に使用される多孔質アルミナ膜は、陽極酸化によって形成した。陽極酸化法とは、電解液に浸した金属を陽極、対極を陰極として、両者間に電圧を印加することで多孔質酸化皮膜を形成する電気化学的手法である²⁾。この手法で形成される多孔質酸化被膜として最も典型的な例がポーラスアルミナ (Al_2O_3) である。ポーラスアルミナはセルと呼ばれるナノスケールのチューブ状の酸化物の集合体であり^{16,17)}、この特異的なナノ構造により、他の材料にない様々な特徴を有している。アルマイトの薬缶やアルミサッシの表面は、陽極酸化法によりポーラスアルミナの不動態膜（保護膜）を形成して腐食を防いでいる。アルミサッシが鈍い白色を呈しているのは、このナノスケールのポーラスアルミナが表面を覆っているためである。

我々は、Fig. 1 に模式的に示すように、多孔質アルミナ薄膜にガス圧を加えることにより、NB を生成する簡単な手法を提案する。ガスフィルターとして使用した多孔質アルミナ膜は、陽極酸化によって形成した。このフィルムには、Fig. 1 の右側に示すように、内径が約 100 nm の、まっすぐに規則正しく密に詰まったナノホールがある。多孔質アルミナナノホールからガスが水に押し出されるとバルク NB が形成され、また、多孔質アルミナ薄膜のナノホールサイズが比較的均一であるため、粒径の揃った NB が形成されることが期待される。この方法の利点は、希ガスを含む多様な種類のガスを含む NB を簡単に形成できることである。Fig. 2 に NB 発生器の構造を示す。発生器の中央部に 15mm 径のアルミ板が装着されて

いる。アルミ板の中心部には陽極酸化で形成した5 mm 径のポラスアルミナ膜がある。この膜に下方から1.5～2気圧のガス圧を印加し、膜上部の水の中にNBを発泡させる構造になっている。

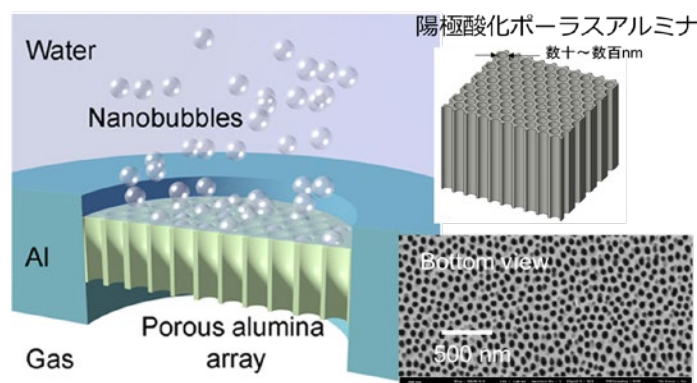


Fig. 1 微細孔式ナノバブル (NB) 発生法. 多孔質アルミナ薄膜に下方から1.5気圧程度のガス圧を加えることにより、膜の上部の水の中にNBを生成する。

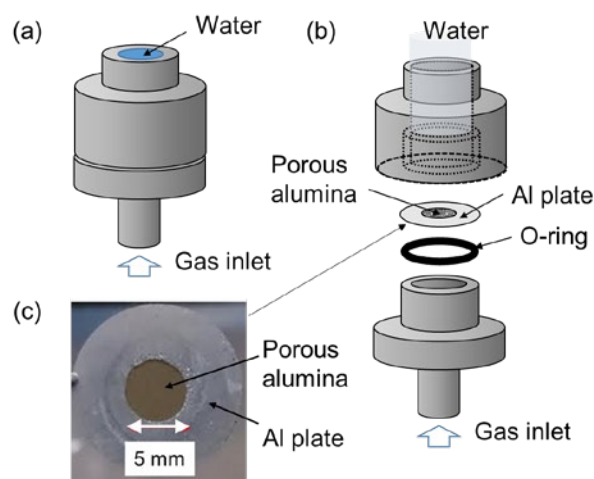


Fig. 2 NB 発生器. (a) 全体図、(b) 分解図、(c) 多孔質アルミナ薄膜板。発生器の中央部に装着した多孔質アルミナ薄膜に下方から圧縮ガスで加圧し、薄膜の上部の水の中に発泡させる。

2. 2 NB 粒径解析法

最近ナノ粒子の粒径や濃度を分析する手法として幅広く活用されている方法がナノ粒子トラッキング解析法 (NTA 法) である。その名の示す通り、ナノ粒子の軌跡の分析から粒径や濃度を計測する手法である。よく知られるように、ナノ粒子混濁液中のナノ粒子は水分子の衝突を受けて、いわゆるブラウン運動を行う。アインシュタインはこのブラウン運動の軌跡の解析から分子の存在を実証できることを予言し、その後ジャン・ペランがその予測の下に実験を行い^{18,19)}、デモクリトスの時代から謎であった原子や分子の存在を初めて明らかにした。NTA 法では、Fig. 3 (a) に示すように、液体中のナノ粒子のブラウン運動の軌跡を、紫外レーザー光の散乱を顕微鏡で捉えることにより動画として記録し、得られた動画から一定時間内に動いた距離から、下記のアインシュタイン-ストークスの式に則りナノ粒子の粒径 r を算出する。

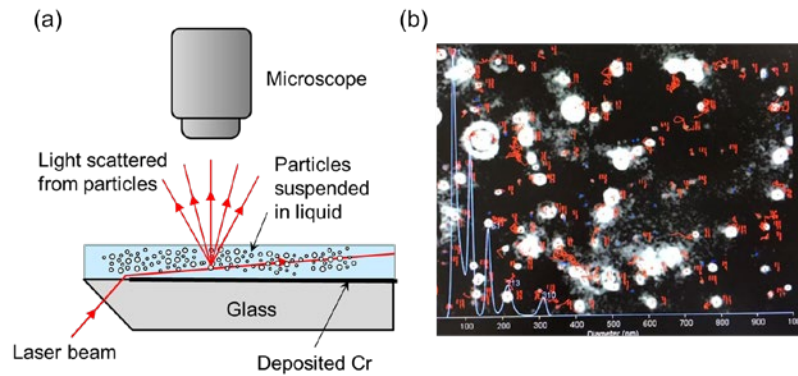


Fig. 3 (a) ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) 法. (b) 水の中のNBのブラウン運動の軌跡.

$$r = \frac{4tk_B T}{6\pi\eta(x^2+y^2)}$$

ここで、 η は水の粘性係数、 k_B はボルツマン定数、 t は軌跡を追跡する時間、 T は絶対温度である。Fig. 3 (b) はナノバブルの散乱光の画像である。散乱光は粒子の粒径が大きいくほど強くなるため、明るい輝点は動きが鈍く、暗い輝点は粒径が小さいために激しいブラウン運動を行う。

2.3 抗菌活性試験法

試験に用いた細菌は大腸菌 *Escherichia coli* ATCC8739 (Microbiologics, Inc.) とした。予め LB Broth (NIPPON Genetics) で培養し、一定菌量 (約 4×10^3 CFU/mL) になるよう滅菌蒸留水で希釈した。一般的に殺菌性能評価試験においての試験菌液は $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL に調整することが多いが、今回、菌数測定に用いた培地が、簡易検査培地のペトリフィルム大腸菌測定用 EC プレート (3 M) であるため、メーカーが推奨する測定菌数の上限値に合わせて調製した。この菌液の一定量を二酸化炭素内包 NB 水 (CO₂NB 水) (ホウケイ酸ガラス製バイアル瓶に入れたもの) に添加し、室温 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) で放置した。一定時間ごとに $50 \mu\text{l}$ を採取し、ペトリフィルム EC プレートに塗布し、 35°C 、24時間インキュベーター内で留置した。その後、ペトリフィルム上に認められた菌数を計測した (Fig. 4)。対照実験では、CO₂NB 水の代わりに滅菌蒸留水を用いて同一条件下で試験した。大腸菌の生存率については、一定時間後のペトリフィルム上に認められた菌数を対象実験の菌数で割った値を百分率 (%) で表した。Fig. 5 に、NB 水放置前後の簡易培地のコロニー数の変化を示す。この図は、CO₂NB 水に入れた場合の結果であり、菌数が減少していることが分かる。

3. 実験結果と考察

3.1 NB の粒径分布

Fig. 2 に示した NB 発生器を使用して純水の中に発泡し、NB 懸濁液を作製した。その NB 懸濁液 (「NB 水」と呼ぶ) の中に分散している NB の粒径分布を NTA 法で計測した。CO₂ ガス注入により作製した NB 水の中の NB の典型的な粒径分布を Fig. 6 (a) に示す。図に示された 2 つの分布プロファイルは、NB 水の 2 つの異なる場所からサンプリングされたものである。Fig. 6 (a) から、NB の粒径が $50 \sim 200$ nm の範囲にあり、気泡形成用のガスフィルターとして使用した多孔質アルミナ膜のナノホールの直径にほぼ等しいことが分かる。ただし、NB の粒径とナノホールの口径は完全に一致することはないと推測される。ナノホールから NB が放出される際には、吹き出し口の気泡の大きさがナノホールの径より何倍か大きくなった時にアルミナ薄膜から剥離して NB となり、その後収縮して 100 nm 程度の大きさになる

と考えられる。この NB 生成の詳細なメカニズムについては、その解明は今後の研究課題である。

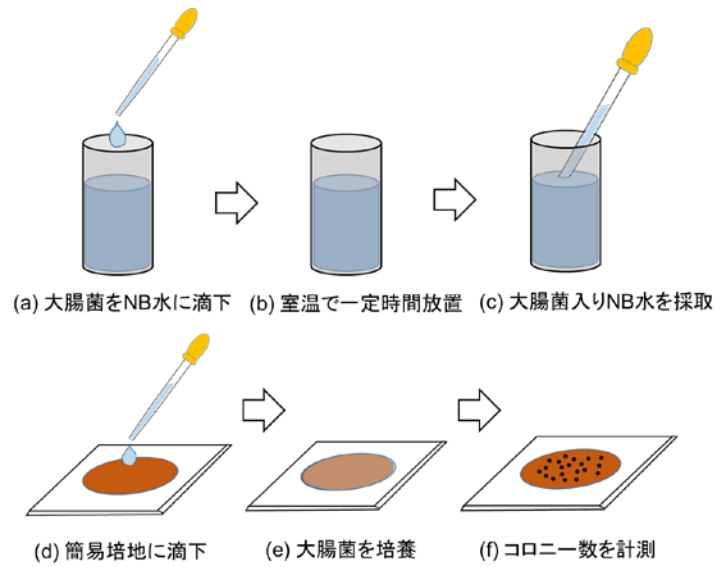


Fig. 4 抗菌活性試験法

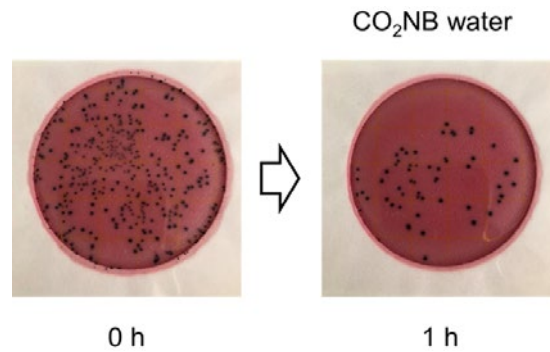


Fig. 5 大腸菌生存率計測法 (二酸化炭素 NB の計測例). NB 懸濁液中に大腸菌を一定時間留置後に簡易培地上に懸濁液を滴下し、培養後の菌数を計測した。

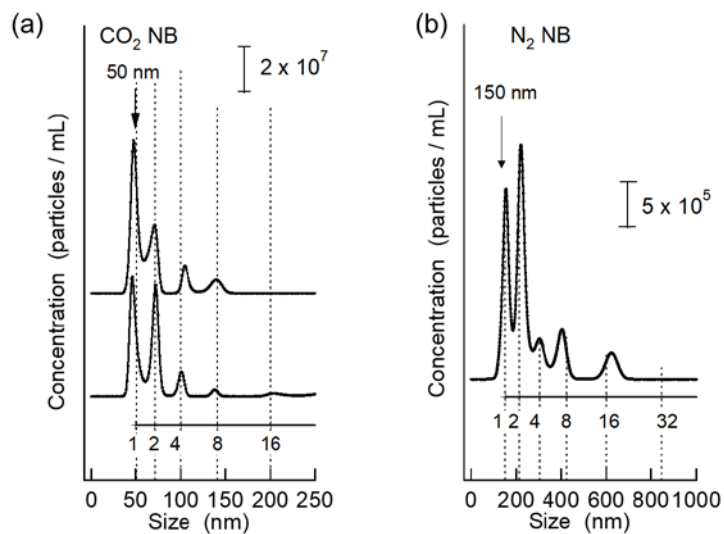


Fig. 6 (a) 二酸化炭素内包 NB と (b) 窒素内包 NB の粒径分布

Fig. 6 (a) の粒径分布をよく見ると、粒径の値が離散的になっている。即ち、ある決まった粒径のNBが存在する。この離散的な粒径のNBの生成は、同じ粒径の二つのNBが選択的に合体することによって解釈できる¹⁵⁾。このような合体が起きると、簡単な計算から隣同士の粒径の比は $\sqrt{2}$ となり、実際にFig. 6 (a) の粒径分布の粒径比は $\sqrt{2}$ になっている。図中に示された1、2、4、・・・の番号は、最小粒径のNBが何個合体したかを示した数である。32個分合体したNBが観測されている。

CO₂以外のガスについてもこの方法でNBの粒径分布を計測した。Fig. 6 (b) は窒素ガス (N₂) を用いて生成したNBの粒径分布を示す。酸素の場合もほぼ同じ粒径分布を示した。二酸化炭素に比べて粒径はやや大きい100 nm程度の粒径のNBが生成できていることがわかる。二酸化酸素の場合に粒径が小さくなるのは、二酸化炭素の水に対する溶解度が酸素や窒素などに比べて二桁程度大きいことが原因している¹⁵⁾。

本研究では、このような100 nm程の粒径のNBが大腸菌にどのような影響を及ぼすかを調べた。これまでにマイクロバブルを用いた殺菌効果の研究はあるが、ナノバブルの殺菌効果の研究は殆どない。しかも、粒径をある程度揃えたナノバブルについては殆ど報告がない。

3. 2 NB水が大腸菌に与える殺菌作用

大腸菌をNB水と蒸留水にそれぞれ留置した試料について、時間の経過と共に変化する大腸菌の増殖の度合いを簡易培地上の大腸菌のコロニー数の計測から調べた。まず、二酸化炭素NBを用いた結果をFig. 7 (a) に示す。この図にはNB水と滅菌蒸留水に1時間留置した場合の比較を示している。蒸留水に比べてNB水に留置した場合の方が、コロニー数が大きく減少していることが分かる。この結果は、CO₂NB水が大腸菌に対する殺菌作用があることを示している。

一方、酸素ガス内包NB水 (O₂NB水) に留置した場合についてはFig. 7 (b) に示すように、蒸留水中に比べて大腸菌の不活性化が進まず、逆に増殖している場合も観測された。酸素NB水の場合には、大腸菌の増殖を活発化する作用があることを示している。酸素NB水から供給される酸素ガスによって大腸菌の代謝が高まると推測している。N₂NB水の場合には、殺菌作用が認められたが、留置時間が長くなるとやや増殖する傾向が見られた。詳細については次項で述べる。

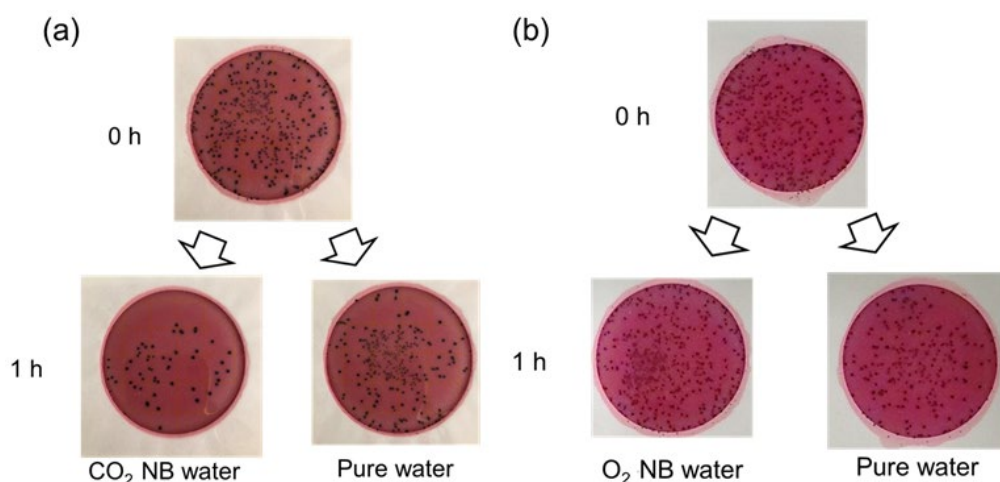


Fig. 7 (a) CO₂NB水と (b) O₂NB水に1時間留置した大腸菌の簡易培地上のコロニー数の変化.

3.3 NB 水中の大腸菌の生存率の時間依存性

大腸菌を CO₂NB 水と蒸留水にそれぞれ留置して、時間の経過に伴う大腸菌の生存率の変化を調べた結果を Fig. 8 (a) に示す。7～8 回測定した結果の中から典型的な測定結果の 2 例を示す。蒸留水に留置した場合には、生存率は時間の経過と共に減少し、その減衰はほぼ指数関数的である。一方、NB 水に留置した場合には、留置の初期段階で急激に減少して、その後は蒸留水の場合と同様に、ほぼ指数関数的に減少している。この結果から NB の殺菌効果は、大腸菌が NB 水に接触した比較的短時間のうちに発揮されると推測される。今回の生存率評価の実験は、ある限られた数の NB の中に大腸菌が浮遊しているという条件で行った。従って、大腸菌の増殖抑制に有効な殺菌成分が留置初期の段階で消費されたと推測される。ここでは詳細は述べないが、この仮定によるシミュレーションを行った結果、生存率の時間変化をほぼ再現した。その結果については他所で報告する予定である。

O₂NB 水と N₂NB 水について生存率の時間変化を測定した結果をそれぞれ Fig. 8 (b) と Fig. 8 (c) に示す。二酸化炭素の場合と同様に、それぞれ 7～8 回測定した結果の中から典型的な測定結果 2 例を示す。O₂NB 水の場合には生存率が殆ど変化しない、あるいはむしろ若干増加している。前述の通り、生存率が増加するあるいは変化しない原因は、O₂NB 水から放出される酸素ガスが大腸菌を活性化するためと思われる。N₂NB 水の場合には、CO₂NB 水と O₂NB 水の場合の中間の変化を示している。NB 留置初期段階では生存率は減少するが、その後増加している。生存率減少の原因は殺菌成分に依ると考えてよい。一方、生存率が増加する要因は酸素ではなく、他の活性化成分によると考えられる。一つの可能性は窒素由来の一酸化窒素 (NO) である。NO は殺菌作用があるばかりでなく、細胞内感染防御の働きもあるとされている²⁰⁾。N₂NB が大腸菌に吸着した時にバブルが破裂するなり合体するなりした時に、周りの水分子と反応して NO が生成され、生成された NO が殺菌や活性化をもたらした可能性がある。しかし、現時点で NO が生成されたことを示す実験結果は得られていない。N₂NB の殺菌あるいは活性化作用についても今後の研究課題である。

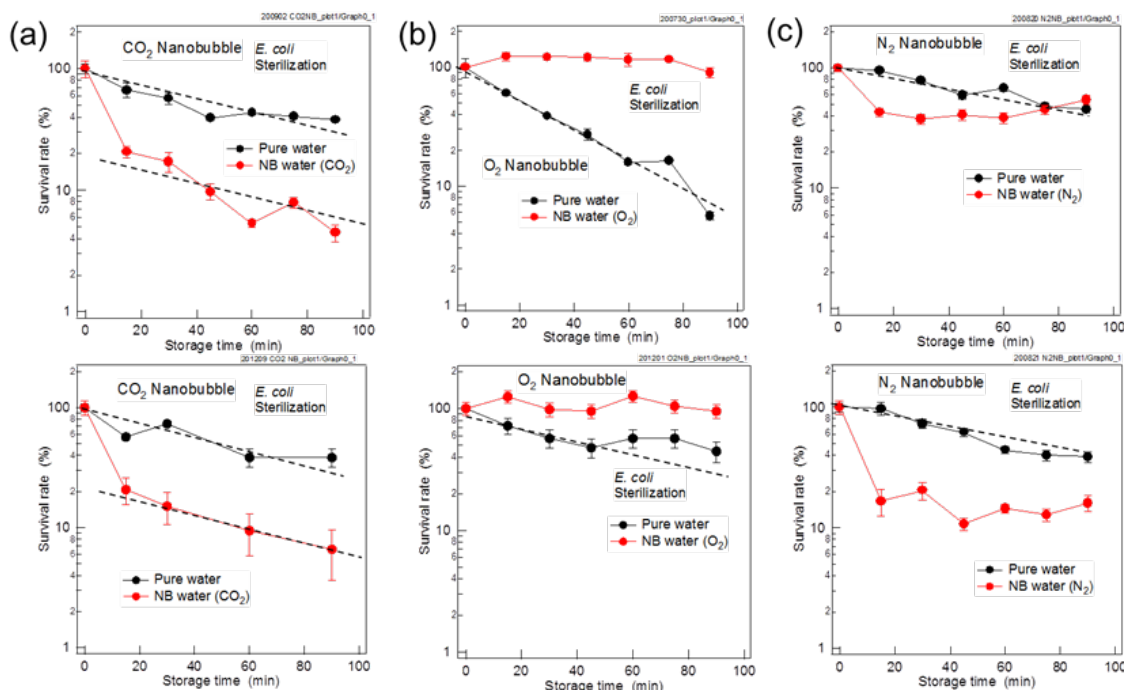


Fig. 8 (a) CO₂NB 水、(b) O₂NB 水と (c) N₂NB 水に留置した大腸菌の生存率の留置時間依存性。

3. 4 NB 水中の活性酸素種

NB 水の殺菌作用の原因を調べるために、電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて NB 水のラジカル種の測定を行った。この手法は不対電子を検出する分光法の一つであり、遷移金属イオンもしくは有機化合物中のフリーラジカルの検出に幅広く用いられる。我々は、以前に、酸化チタン薄膜の光触媒機能による殺菌効果の原因をこの手法を用いて調べ、殺菌作用が水酸基ラジカル ($\text{OH}\cdot$) によることを明らかにしている²⁾。

Fig. 9 に CO_2 NB 水、 O_2 NB 水の ESR スペクトルを示す。比較のために、酸化チタンの照射で生成された $\text{OH}\cdot$ の ESR スペクトル²⁾ も併せて示している。この図から、 CO_2 NB 水に $\text{OH}\cdot$ が生成していることがわかる。 O_2 NB 水にも僅かであるが $\text{OH}\cdot$ が生成されているが、 CO_2 NB 水と比べると量的には少ない。 $\text{OH}\cdot$ は酸化チタン光触媒作用で見られたように強い殺菌効果がある。従って、 CO_2 NB 水で観測された殺菌作用は、主にこの $\text{OH}\cdot$ に起因していると推測できる。 O_2 NB 水で安定した殺菌作用が観測できなかったことも、十分な水酸基ラジカルが生成されなかったことが原因と思われる。

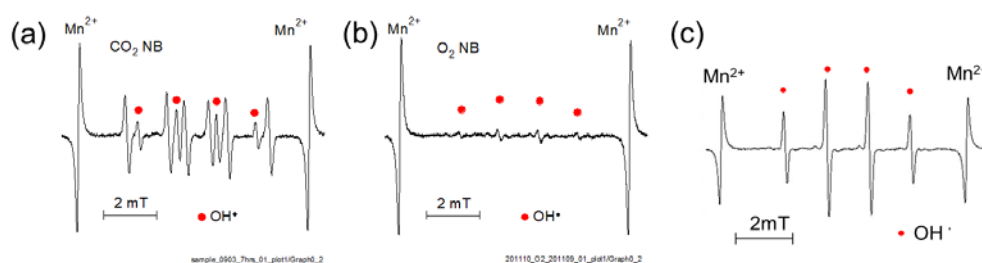


Fig. 9 (a) CO_2 NB 水と (b) O_2 NB 水の ESR スペクトル. (c) は酸化チタン光触媒で生成された活性酸素の ESR スペクトル.

CO_2 NB 水の場合に $\text{OH}\cdot$ が生成された理由については、今のところ明確な原因は特定できないが、一つの可能性として、二酸化炭素 NB の場合の反応性の高さが原因していると思われる。Fig. 9 の CO_2 NB 水の ESR スペクトルを見ると、酸化チタン光触媒の場合のスペクトルに現れていないサイドピークが現れている。これらのピークは ESR 測定に用いたトラップ剤の分解によると考えられる。このことは、 CO_2 NB が分子と会合した時に様々な反応生成物やラジカルが生成されやすいことを示している。 CO_2 NB 中の内包ガスの圧力は一説によると 10 気圧程度である。そのような高圧の NB が破裂すると二酸化炭素と水分子が反応して $\text{OH}\cdot$ が生成される可能性は十分にある。

4. 結言

モデル細菌である大腸菌を用いてナノバブル (NB) の殺菌活性を調べた。NB は、ナノスケールの直孔を規則的に配列させた多孔質アルミナ膜を用いて作製した。NB の殺菌活性を評価するために、NB 懸濁液中に細菌を留置し、殺菌活性は、細菌培地上にコロニー化した生細胞の数に由来する生存率で推定した。 CO_2 、 O_2 、 N_2 の 3 種類のガスを含む NB に曝露した場合の細菌の生存率を調べた。その結果、 CO_2 を含む NB 水に曝露することにより、細菌の生存率が有意に低下することがわかった。酸素、窒素ガスを含む NB 水には、有意な殺菌効果は認められなかった。 O_2 NB 水に曝露した場合には、大腸菌の増殖が観察された。NB 懸濁液中の活性酸素の発生を ESR 分光法で調べた結果、NB 懸濁液中に発生する活性酸素の主なものは水酸基ラジカル ($\text{OH}\cdot$) であり、活性酸素の発生は CO_2 NB 水の場合に最も強く、抗菌活性試験の結果と符合した。

今後は NB 水の殺菌作用の応用を追究すべく他の細菌種による殺菌効果を調べると共に殺菌機構を解明

したい。現在介護の現場で多用されている、次亜塩素酸による消毒は強力であるが、人体に与える影響は大きいため、薬液を用いない殺菌法は今後重要になる。ナノバブルを用いた殺菌法は今後活用が期待される。また、最近の研究から加湿器から噴霧されるミストにナノバブルが含まれていることが分かった。加湿器から放出されるナノバブル水を用いることができれば、幅広い分野で応用できる。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科研費基盤研究 (B) (18H01874 研究代表者 庭野道夫) 及び東北福祉大学感性福祉研究所において文部科学省の施設運営支援の助成を得て行なわれた研究プロジェクト『3.11を契機とする地域の健康福祉システムの再構築 - 「集中復興期間」後の展開』の研究成果である。

参考文献

- 1) 山口政人, 阿部宏之, 馬 騰, 庭野道夫「酸化チタンナノチューブ薄膜の光触媒能による殺菌作用」『感性福祉研究所年報』20, 113-121, 2019
- 2) Masato Yamaguchi, Hiroyuki Abe, Teng Ma, Daisuke Tadaki, Ayumi Hirano-Iwata, Hiroyasu Kanetaka, Yoshihiko Watanabe, and Michio Niwano, "Bactericidal Activity of TiO₂ Nanotube Thin Films on Si by Photocatalytic Generation of Active Oxygen Species," *Langmuir* 36, 12668–12677, 2020
- 3) Jyoti, K. K. and A. B. Pandit; "Ozone and Cavitation for Water Disinfection," *Biochem. Eng. J.*, 18, 9–19, 2004
- 4) Sawant, S. S., A. C. Anil, V. Krishnamurthy, C. Gaonkar, J. Kolwalkar, L.Khandeparker, D. Desai, A. V. Mahulkar, V. V. Rande and A. B. Pandit; "Effect of Hydrodynamic Cavitation on Zooplankton: A Tool for Disinfection," *Biochem. Eng. J.*, 42, 320–328, 2008
- 5) Bancroft, K., P. Chrostowski, R. L. Wright and I. Suffet; "Ozonation and Oxidation Competition Values." *Water Res.*, 18, 473–478, 1984
- 6) Takahashi, M., K. Chiba and P. Li; "Free-Radical Generation from Collapsing Microbubbles in the Absence of a Dynamic Stimulus," *J. Phys. Chem. B*, 111, 1343–1347, 2007
- 7) Takahashi, M., K. Chiba and P. Li; "Formation of Hydroxyl Radicals by Collapsing Ozone Microbubbles under Strongly Acidic Conditions," *J. Phys. Chem. B*, 111, 11443–11446, 2007
- 8) Chu, L. B., S. T. Yan, X. H. Xing, A. F. Yu, X. L. Sun and B. Jurcik; "Enhanced Sludge Solubilization by Microbubble Ozonation," *Chemosphere*, 72, 205–212, 2008
- 9) A. Agarwal, W.J. Ng, Y. Liu, "Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment", *Chemosphere*, 84, 1175-1180, 2011
- 10) Z. Wu, H. Chen, Y. Dong, H. Mao, J. Sun, S. Chen, V.S.J. Craig, J. Hu, "Cleaning using nanobubbles: Defouling by electrochemical generation of bubbles", *J. Colloid Interface Sci.* 328, 10-14, 2008
- 11) S. Yang and A. Duisterwinkel, "Removal of nanoparticles from plain and patterned surfaces using nanobubbles", *Langmuir* 27, 11430-11435, 2011
- 12) M. Takahashi, H. Ishikawa, T. Asano, H. Horibe, "Effect of microbubbles on ozonized water for photoresist removal", *J. Phys. Chem. C* 116, 12578-12583, 2012
- 13) S. Hayakumo, S. Arakawa, M. Takahashi, K. Kondo, Y. Mano, and Y. Izumi, "Effects of ozone nanobubble water on periodontopathic bacteria and oral cells – in vitro studies", *Sci. Technol. Adv. Mater.* 15, 055003, 2014

- 14) 寺坂宏一, 氷室昭三, 安藤景太, 秦隆志『ファインバブル入門』(ファインバブル学会連合編), 日刊工業新聞社, 2016
- 15) Teng Ma, Yasuo Kimura, Hideaki Yamamoto, Xingyao Feng, Ayumi Hirano-Iwata and Michio Niwano, "Characterization of Bulk Nanobubbles Formed by Using a Porous Alumina Film with Ordered Nanopores," *J. Phys. Chem. B*, 124, 5067–5072, 2020
- 16) H. Shiraki, Y. Kimura, H. Ishii, S. Ono, K. Itaya, and M. Niwano, "Investigation of formation process of an anodic porous alumina film on a silicon substrate", *Appl. Surf. Sci.* 237, 369-373, 2004
- 17) A. Hirano-Iwata, T. Taira, A. Oshima, Y. Kimura, and M. Niwano, "Improved stability of free-standing lipid bilayers based on nanoporous alumina films", *Appl. Phys. Lett.* 96, 213706, 2010
- 18) ジャン・ペラン著, 玉蟲文一訳『原子』, 岩波文庫, 1978.
- 19) 江沢洋『だれが原子を見たか』岩波現代文庫, 2013
- 20) Takaaki Akaike, Tatsuya Okamoto, Md Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, and Tomohiro Sawa, "New paradigm of host defense against intracellular pathogens by nitric oxide (in Japanese)," *Jpn. J. Leprosy* 78, 41-47, 2009