

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
中嶋 則人	主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 河野 公一 副査 教授 勝 健一 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 鏡山 博行
主論文題名  <b>Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis</b> (電気分解を用いた遊離型塩素再活性化による貯留水道水消毒法の評価)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>水道水はときに院内感染の原因となる。細菌、特にグラム陰性桿菌は水道蛇口周辺の水滴中で生息、増殖できる。水道水の消毒には <b>0.2 ppm</b> の遊離型塩素濃度を維持することが必要であるが、水道水はタンクに貯留され、蛇口に供給されることもあり、貯留により遊離型塩素濃度が低下するため、上水道蛇口での消毒に有効な遊離型塩素濃度を保証するには、水道水の総塩素濃度は <b>0.4-1.5 ppm</b> 程度必要であるとされている。しかし、塩素の副産物には毒性を示すものがあるため、塩素濃度は低い方が望ましく、総塩素量を制限しながら、蛇口付近の水道水の遊離型塩素濃度を維持するのは難しい。</p> <p>そこで申請者は、電気分解法により水道水中の少量の塩素を再活性化し、水道水中の細菌を殺菌できるか否かを検証し、さらに得られた電気分解産物の殺菌効果と、電気分解による殺菌のメカニズムについて検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <p><u>細菌と培養</u>: 実験には、緑膿菌、大腸菌、レジオネラ、黄色ブドウ球菌、枯草菌を用いた。レジオネラは、<b>37°C</b>で3日間、<b>B-CYE<math>\alpha</math></b>培地で、その他の細菌は、<b>37°C</b>で1日間、<b>heart infusion agar(HIA)</b>で培養したものを、さらに<b>heart infusion broth(HIB)</b>で、<b>37°C</b>、3時間振盪培養して用いた。それぞれの細菌を濾過滅菌した水道水に浮遊させ、濁度 <b>McFarland #0.5</b> の菌液を作製した。</p> <p><u>電気分解処理</u>: 電気分解処理は、高電圧タイプ直流安定化電源装置で定電流モードにて、白金イリジウム製電極を <b>10 ml</b> 試験管に留置して行った。電気分解後、緑膿菌とレジオネラ浮遊液をそれぞれ <b>HIA</b> 寒天培地と <b>B-CYE<math>\alpha</math></b>培地に接種し、緑膿菌は <b>18</b> 時間、レジオネラは <b>3</b> 日間培養し、その他の細菌は、混釈法にて <b>HIA</b> 寒天培地で <b>48</b> 時間培養した後に、生残菌数を測定した。また細菌浮遊水道水を電気分解した産物が持つ殺菌効果をみるために、同産物に緑膿菌を接触させ生残菌数を測定した。</p> <p><u>遊離型塩素濃度、pH、温度測定</u>: 電極を <b>10 ml</b> 試験管に留置し、<b>10~50 mA</b> の電流で、<b>5~30</b> 分間水道水を電気分解し、遊離型塩素濃度、pH、温度を測定した。</p> <p><u>殺菌メカニズム解析</u>: 緑膿菌を浮遊させた水道水を電気分解したのち回収した菌について、電子顕微鏡による形態観察、パルスフィールド電気泳動法によるゲノム DNA 断片の確認、DNA ポリメラーゼ活性および硝酸塩還元酵素活性の測定を行った。</p> <p>《結果》</p> <p>水道水中の遊離型塩素濃度は電気分解によって経時的に増加したが、温度と pH には殺菌的に作用するような変化は見出せなかった。細菌浮遊水道水の電気分解では、緑膿菌、大腸菌、レジオネラ、黄色ブドウ球菌は、<b>20~30 mA</b>、<b>5</b> 分間の電気分解で殺菌されることを明らかにした。また、枯草菌浮遊液 (<b>10<sup>6</sup> CFU/ml</b>) では <b>50 mA</b>、<b>5</b> 分間の電気分解で多くの芽胞が形成され完全に殺菌できないが、それ</p>	

より低い密度の菌液 ( $10^5$  CFU/ml) においては 50 mA、5 分間の電気分解で芽胞形成はみられるものの完全に殺菌できることを明らかにした。さらに模擬汚染水道水(細菌浮遊水道水)を電気分解した産物にも非汚染水道水の場合と同様に殺菌効果を認めている。

水道水に浮遊させ電気分解した緑膿菌には細胞壁にブレブが形成され、細胞質内容が菌体辺縁部に凝集する像を認め、これは電気分解によって生成した遊離型塩素が細胞壁直下でタンパクを変性させていることを示唆するものであると考えた。そこで細胞内酵素および核酸の変性について検討した結果、細胞膜直下に存在する酵素である硝酸塩還元酵素は不活化されるが、細胞内深部に存在すると考えられるゲノム DNA や DNA ポリメラーゼ活性は完全には障害されないことを明らかにした。

#### 《考按》

本研究では電気分解によって水道水中の一般病原細菌を殺菌できることを明らかにし、芽胞形成菌については、一定密度以下の菌に対しては芽胞形成を誘導するものの殺菌的に作用し、電気分解によって芽胞を殺菌できるものと考えている。また細菌浮遊水道水を電気分解したものは、非汚染水道水を電気分解したものと同様に殺菌作用を示した。このことから申請者は、電気分解は貯留水道水の汚染細菌を殺菌するのみならず、その電気分解産物にも殺菌作用が残ると考えた。また、この水道水電気分解産物の遊離型塩素以外の物性値は大きな変化を示していないことから、遊離型塩素が殺菌的に作用しているものと考えた。更に申請者は、このような電気分解産物による殺菌のメカニズムは、細菌細胞壁の部分的破壊に続いて細胞壁直下でおこる酵素などの一部のタンパクの不活化であって、すべての菌体内成分の変性や、菌体自体の破壊は必要ないことを明らかにしている。

以上のことから水道水の電気分解産物は細菌の酵素を不活化することによって殺菌作用を発揮するもので、その産物は、手術用手洗いに用いる無菌水や、免疫機能の低下した患者の入浴水の殺菌など、院内感染対策に応用できる可能性があると考えている。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第970号	氏名	中嶋 則人
論文審査担当者		主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 河野 公一 副査 教授 勝 健一 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 鏡山 博行	
主論文題名			
<b>Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis</b> (電気分解を用いた遊離型塩素再活性化による貯留水道水消毒法の評価)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は水道水中の塩素を電気分解によって再活性化し、水道水を再消毒できる可能性があると考え、各種細菌を浮遊させた水道水を電気分解し、その殺菌作用を検討した。その結果、水道水中の大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レジオネラを短時間の電気分解によって殺菌できるだけでなく、枯草菌芽胞をも殺菌できることを明らかにした。また、この細菌浮遊水道水(模擬汚染水道水)の電気分解産物は、非汚染水道水の電気分解産物と同様に殺菌作用を持っていることを証明し、汚染、非汚染を問わず、水道水電気分解産物を医療分野に応用できる可能性を示唆している。申請者は更に、超微形態変化と細菌酵素の不活化の状態から、電気分解による殺菌作用のメカニズムは細胞壁の変性とそこから侵入した遊離型塩素による一部の細菌酵素の不活化であることを明らかにした。</p> <p>本研究は、電気分解法を医療に応用するために、水道水消毒における電気分解法の有用性とその殺菌のメカニズムを明らかにした基礎研究であり、医療現場で水道水の細菌汚染を減らす目的のみならず、消毒剤としての用途も含め、幅広い応用が期待できることを示唆しており、今後の医療応用研究に資するものと考えられる。</p> <p>以上により、本論文が本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)  <b>Journal of Microbiological Methods 57: 163-173, 2004</b></p>			