

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
横山 勲	主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 河野 公一 副査 教授 田窪 孝行 副査 教授 木下 光雄
主論文題名 Establishment of gold standard for electrolyzed sodium chloride solution in disinfection (食塩水電気分解産物の消毒効果比較検討に用いる標準の確立)	
学位論文内容の要旨	
<p>【研究の目的】 現在、消毒薬による環境負荷が問題になっている。食塩水電気分解産物(電解水)は毒性が少なく、環境に与える影響が小さいという特長をもつため、近年消毒薬として広く用いられている。電解水のうち消毒効果が示されているものには強酸性電解水、弱酸性電解水、微酸性電解水がある。現在報告されているこれらの電解水は食塩濃度、pH、遊離塩素濃度等が異なっており、その性状は一定ではない。</p> <p>電解水には主に HClO, OCl⁻, Cl₂ の分子種が含まれており、その濃度比によって殺菌力が異なるとされている。その濃度比は電解水の食塩濃度、pH によって異なると考えられるが、それぞれの分子種の測定法がないため、総遊離塩素濃度をもって評価している。この総遊離塩素濃度は必ずしも殺菌力とは比例しないため様々な電解水を評価するためには基準となる標準物質が必要であるが、現在その基準は定められておらず、文献的に複数の電解水を比較できない。</p> <p>そこで本研究では、医学・生物学分野で最も一般的な食塩水である生理食塩水(生食)の電気分解産物(ES)を標準物質とするために、その特性を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【材料と方法】 高電圧電気分解装置と白金イリジウム電極を用いて生食(0.9%塩化ナトリウム水溶液)を電気分解したものをESとして用いた。細菌はグラム陰性菌として緑膿菌を、グラム陽性菌として黄色ブドウ球菌を用いた。これらの細菌はHIB培地で37℃、振とう培養し、ESと反応させたあと残存遊離塩素を牛血清アルブミンで中和し、以後の実験に用いた。</p> <p>細菌の形態変化を観察するために、ESと反応させた細菌の浮遊液をスライドガラスに滴下しグラム染色し鏡検した。また同様に処理した菌を常法に従い透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡で観察した。</p> <p>細菌の硝酸塩還元酵素活性は Api20NE プレートの NO₃ ウェルの色相変化で評価した。プレートは37℃で1時間反応させウェル内の液を取り出して遠心分離し、上清をマイクロプレートに移し吸光度を測定した。</p> <p>【結果】 電気分解によって生食中の遊離塩素濃度は時間依存的に増加し、pHは徐々に上昇し5分で8.4に</p>	

なった。一定の条件で再現性よく安定した産物が得られたため、電解水の殺菌効果判定の標準とすることができると考えた。

そこで、ES による殺菌効果を明らかにするため、黄色ブドウ球菌、緑膿菌を ES に一定時間接触させ生菌数を測定した。その結果、遊離塩素濃度 10 ppm の場合、黄色ブドウ球菌は3分間の接触で完全に殺菌されたが緑膿菌は5分間の接触でも完全には殺菌されなかった。遊離塩素濃度 20 ppm の場合、黄色ブドウ球菌は1分以内に完全に殺菌されたのに対し、緑膿菌が完全に殺菌されるのには5分間を要した。これらのことより ES は緑膿菌よりも黄色ブドウ球菌に対してより強い殺菌作用を示すことが明らかになった。

このような ES の菌種依存的な殺菌作用の強弱はそれぞれの細菌が分泌する物質による遊離塩素の不活化によるのではないかと考え、細菌に ES を一定時間接触させたあとの残留遊離塩素濃度を測定した。その結果黄色ブドウ球菌・緑膿菌いずれの場合においても同様な遊離塩素濃度の減衰を認め、緑膿菌が遊離塩素を不活化する物質を分泌するのではないことが明らかになり、緑膿菌は菌体内の構造が ES に抵抗する因子を保有しているのではないかと考えた。

そこで ES に接触させた細菌について、菌体内酵素のひとつである硝酸塩還元酵素不活化について検討した。その結果、黄色ブドウ球菌の場合、硝酸塩還元酵素活性は ES との接触時間に依存して不活化されたが、緑膿菌の場合、接触1分後に一時的に酵素活性の上昇がみられ、そのあと急激に不活化されることが示された。本酵素は細胞膜直下に存在することを考え合せると、ES によるグラム陽性菌とグラム陰性菌の殺菌作用の差は細胞壁の傷害時にあるものと推定した。

そこで電解水による細菌細胞壁の破壊機序を明らかにするために、電解水を作用させた菌の形態的解析を試みた。グラム染色鏡検では ES と接触した菌の染色性が低下したことより、ES が細胞壁の構造を破壊しているものと考えられた。走査型電子顕微鏡による観察の結果、黄色ブドウ球菌では ES の処理により菌体表面が粗ざう化し、また微小なノブ様構造物が観察された。一方緑膿菌では ES 処理により表面が平滑化することが観察された。さらに透過型電子顕微鏡観察の結果、ES 処理黄色ブドウ球菌の細胞壁表面が粗ざうで境界不明瞭となりペプチドグリカン層が膨化し、細胞質に電子密度の高い領域が見られた。一方緑膿菌では ES 処理菌体の細胞壁が薄く特にペプチドグリカン層の電子密度が高くなり、細胞質に電子密度の高い斑点状の沈着物が観察され、グラム陽性菌とグラム陰性菌では細胞壁表層の傷害には差があることが明らかになった。

【考察】

さまざまな電解水を広く評価するには基準となる電解水が必要である。その標準物質として ES を安定して作製することができることおよび標準としてのその性質を明らかにすることを目的とし実験を行った。ES は一定の条件で再現性よく安定した産物が得られることが明らかとなり、標準物質として利用できると考えた。

ES を標準とする場合、その特性を明らかにする必要があると考え、その殺菌効果を調べた。その結果、黄色ブドウ球菌と緑膿菌では殺菌効果に差があることが明らかとなった。黄色ブドウ球菌と緑膿菌に対する殺菌能を検討したところ ES は緑膿菌を殺菌する能力が低かったが遊離塩素の消費に差はなく、細胞壁の破壊メカニズムに差異があるものと考えられた。

そこで菌体内細胞膜直下に存在する酵素の活性を測定したところ、ES は黄色ブドウ球菌・緑膿菌ともにその酵素を不活化した。緑膿菌の場合一過性に酵素活性が上昇し、そのあとすみやかに低下した。その機序として、ES が外膜を壊し、酵素基質が容易に菌体内酵素へ到達できるようになったものと考えた。さらに ES との接触によって、ES がペリプラズム・内膜を壊し、細胞質の酵素に到達し酵素を不活化する。この時間的な差が見かけ上、一過性の活性上昇として観察されたものと考えた。一方、黄色ブドウ球菌には外膜がないため、酵素活性の一過性の上昇が見られなかったものと考えられる。すなわち、グラム陽性菌、グラム陰性菌に対する細菌細胞壁の破壊機序が異なることが示唆され、超微形態的観察によってその根拠が明らかになった。ES では緑膿菌の菌体表面にブレブ形成は見られなかったが、低濃度食塩水電気分解産物および水道水電気分解産物を用いた以前の研究ではブレブ形成が見られ

た。この違いは、遊離塩素による細胞壁の破壊は共通しているが、そのあと低張液の場合浸透圧による二次的変化でブレブが形成されたものと考えた。

内視鏡や医療器具の消毒に用いられるグルタルアルデヒドは広い抗微生物スペクトラムをもつ優れた消毒薬であるが、毒性が高く取り扱いに注意を要する。そのためグルタルアルデヒドの代替品として電解水が注目されており、現在用いられているさまざまな電解水の評価が急務である。今回の実験で ES の殺菌効果を明らかにでき、以前の研究との文献的比較もできたことから ES は電解水の評価するための標準物質として利用できるものと考えた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	横山 勲
論文審査担当者		主 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 玉 井 浩 副 査 教授 河 野 公 一 副 査 教授 田 窪 孝 行 副 査 教授 木 下 光 雄	
主論文題名 Establishment of gold standard for electrolyzed sodium chloride solution in disinfection (食塩水電気分解産物の消毒効果比較検討に用いる標準の確立)			
論文審査結果の要旨			
<p>グルタルアルデヒドは広い抗微生物スペクトラムをもつ優れた消毒薬であり、内視鏡や医療器具の消毒に広く用いられてきた。ところがグルタルアルデヒドの細胞毒性、変異原性等が明らかとなり、使用が制限される。そこでグルタルアルデヒドの代替品を開発することが急務となった。電解水は比較的広い抗微生物スペクトラムを有するが、毒性が低いという特長をもち、さらに環境に与える影響が小さいことから、グルタルアルデヒドの代替品として注目されている。電解水の消毒効果については多数の論文が発表されているが、研究に使用した電解水の性状が一定ではなかったため、電解水の消毒効果を比較するための標準物質が求められていた。</p> <p>申請者は、医学・生物学領域で入手が容易な生理食塩水(生食)を電気分解することで、再現性よく安定した物質が得られることを示し、電解水の消毒効果を比較する際の標準物質として利用できると考えた。そこで生食電気分解産物(ES)の殺菌効果を示し、さらにグラム陽性菌とグラム陰性菌では殺菌効果が異なることを明らかにし、その原因が両者の細胞壁破壊メカニズムの違いであることを超微形態学的に明らかにした。</p> <p>本研究は、電解水の研究をさらに進める際に必須となる標準物質を提案し、その性質を明らかにしたことで、電解水の臨床応用にエビデンスを与える研究を推進する意味で、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、本論文は本学学位規程第9条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) Bulletin of the Osaka Medical College 53 (1): 000-000, 2007 (in press)</p>			