

氏名	山本 とも代
(ふりがな)	(やまもと ともよ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 25 年 7 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Disinfective process of strongly acidic electrolyzed product of sodium chloride solution against <i>Mycobacteria</i> (強酸性食塩水電気分解産物の抗酸菌に対する殺菌効果の発現過程)
論文審査委員	(主) 教授 林 秀 行 教授 浮 村 聡 教授 森 脇 真 一

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《研究の目的》

生物毒性の強い化学消毒薬の人体や環境への負荷を軽減するために、近年、食塩水電気分解産物が医療や食品分野の消毒に積極的に用いられている。食塩水電気分解産物には、食塩水の濃度や電気分解の方法の違いにより多くの種類がある。それらのうち、低濃度食塩水を有隔膜槽で電気分解して得られる強酸性食塩水電気分解産物 (EAW) は、殺菌作用の強い遊離塩素分子種を多く含み、ほとんどすべての病原細菌やウイルスを殺菌できることから医療器具の消毒に応用されている。しかし、強い消毒薬抵抗性を示す抗酸菌に対する EAW の殺菌作用は、これまで定性実験法で報告されているだけであり、その殺菌過程の詳細は明らかにされていない。

そこで申請者は EAW の抗酸菌に対する殺菌効果を定量的に明らかにし、殺菌中の抗酸

菌の形態及び菌体内タンパク質と核酸の変性について調べ、殺菌作用の発現過程を明らかにすることを目的として本研究を行った。

#### 《材料と方法》

有隔膜槽を用いて、24 V の定電圧条件で 0.1% 食塩水を室温で電気分解し陽極側から得られた 30 ppm の遊離塩素を含む電気分解産物を EAW として用いた。定量実験に用いた抗酸菌は実験室標準株として *M. bovis* (BCG, Tokyo 株)、*M. smegmatis* (JCM 5866 株)、*M. terrae* (GTC 623 株) を用い、定性実験には 7 種 9 株の抗酸菌臨床分離株 (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. tuberculosis* 3 株) を用いた。これらの細菌は 1% 小川培地で 37°C、4 週間培養し、マイコプロス液体培地に植菌し 1 日 1 回攪拌し 37°C で 1 週間培養した。培養した抗酸菌と EAW を接触させた後、1% 牛血清アルブミン溶液で遊離塩素を中和し、以下の実験に用いた。

EAW の抗酸菌に対する殺菌作用を定量的に調べるために、EAW と接触させた実験室標準株 3 株を 7H11C 平板寒天培地に塗抹し、生残菌数を算定した。またその形態学的変化を明らかにするために、同様に処理した *M. bovis* を Ziehl-Neelsen 染色し光学顕微鏡で観察するとともに、常法にて走査型電子顕微鏡で観察した。菌体内酵素の変性は EAW と接触させた *M. bovis* と urease 試薬をプレート内で 37°C、72 時間反応させたのち吸光度を測定することにより評価した。また菌体内 DNA の傷害は、処理菌体から抽出した核酸について MTB-1、MTB-2 をプライマーとした PCR 法で *M. bovis* の菌種特異的領域の 123 bp を増幅し、電気泳動後のバンドの有無を調べることにより評価した。

#### 《結 果》

EAW による殺菌効果を定量的に明らかにするために、実験室標準株 3 株を EAW に一定時間接触させ生残菌数を測定した。その結果、*M. bovis* と *M. smegmatis* では接触 3 分で生残菌が検出されなくなったが、*M. terrae* では生残菌が検出されなくなるまでに 5 分を要した。抗酸菌のなかには *M. terrae* のように EAW にやや感受性の低いものがあるため、

*M. tuberculosis*を含む7種の抗酸菌臨床分離株については接触時間を5分として検討した。その結果、今回調べた全ての臨床分離株では、接触5分で生残菌は検出されなかった。EAWは今回用いたすべての抗酸菌を5分以内に殺菌することが明らかになった。

このような殺菌作用が発現する過程を明らかにするため、EAWに接触させた*M. bovis*の変化を形態学的に観察した結果、光学顕微鏡による観察ではEAWに接触した菌体は接触時間に依存して抗酸染色性が減弱していた。さらに同菌の細胞壁の変化を走査型電子顕微鏡で観察した結果、接触時間1分間では細胞壁に縦皺と少数のブレブが認められ、*M. bovis*が完全に殺菌された3分間の接触で細胞壁表面には多数のブレブが形成されており、EAWとの接触によって、抗酸菌細胞壁に断裂が生じることが判明した。

EAWとの接触により障害を受けた細胞壁を通して細胞内に侵入した遊離塩素が菌体内の酵素や核酸を変性させるのではないかと考え、EAW処理した*M. bovis*のurease活性の測定と転写可能な核酸の検出を行った。その結果、EAWとの接触時間に依存してurease活性は経時的に減少し、*M. bovis*の生残菌が検出できなくなる3分間の接触で酵素活性はほぼ消失していた。一方、PCR法で検出可能なDNAはすべての検体から検出され、生残菌が観察できなくなる条件でもDNAは転写可能な状態に保たれていることが明らかになった。

#### 《考 察》

本研究ではEAWが、今回検討した全ての抗酸菌に対して殺菌作用を示すことを明らかにした。EAW処理した*M. bovis*の抗酸染色性が減弱していたこと、超微形態学的に少数のブレブ様構造物を形成する細胞壁表面に菌体全長に亘る大きな縦皺が認められたことから、EAWによって微細に障害された細胞壁を通して、菌体内に水が侵入し膨化した菌体に試料作製時の脱水操作を加えたためにこのような超微形態変化が認められたのではないかと考えた。この縦皺が形成される過程に関する説明に関して、桿状構造物の表面を膜で覆った抗酸菌細胞のモデルを使った別の実験で、一旦膨化した桿状構造物の表面には収縮後縦皺が形成されることが示されたことは、この推論を支持するものである。

以上のことから、EAWの短時間の接触によって抗酸菌細胞壁に微細な断裂が生じ、水の透過に伴って遊離塩素が菌体内へ流入するのではないかと推定した。さらに、時間が経過すると、細胞壁表面に多数のブレブ様構造物が形成されたこと及び細胞内の酵素が不活化されたことから、細胞内に侵入した遊離塩素は細胞内のタンパク質を変性させると同時に細胞壁構造の破壊を来して、殺菌作用を発揮するものと考えた。

EAWの緑膿菌に対する殺菌作用の発現過程において緑膿菌の細胞壁にブレブが形成され、菌体内酵素は不活化されるが核酸の破壊は必須ではないとの報告がある。今回の結果から抗酸菌に対しても、EAWはグラム陰性菌に対するのとほぼ同様の過程を経て殺菌作用を発揮するものと考えた。

医療分野において用いられる高水準消毒薬には毒性、変異原性の高いものが多く、EAWのような毒性、変異原性の低い消毒薬が注目されている。今回、EAWの消毒薬抵抗性の強い抗酸菌への殺菌作用及び殺菌作用の発現過程を明らかにしたことは、医療機器消毒分野においてEAWをより積極的に用いるためのエビデンスを提供するものと考えた。

## 論文審査結果の要旨

現在、医療分野の高水準の消毒には、グルタルアルデヒドを代表とする毒性、変異原性の高い消毒薬を用いているが、それらの消毒薬の作業員への曝露や廃棄時の環境負荷が問題となっている。この問題を解決するために、毒性や変異原性の極めて低い食塩水電気分解産物の様々な病原体に対する殺菌効果が明らかにされ、医療分野への応用が進んでいる。しかし消毒薬抵抗性を示す抗酸菌に対する強酸性食塩水電気分解産物（EAW）の殺菌作用等を詳細に検討した報告はない。そこで申請者は食塩水電気分解産物の代表である EAW の抗酸菌に対する殺菌作用とその殺菌作用の発現過程を定量的培養法、形態学的手法、酵素活性測定法、PCR による核酸検出法を用いて明らかにしようとした。

その結果 EAW は接触時間に依存して抗酸菌を殺菌し、今回用いた抗酸菌をすべて 5 分以内に殺菌することを明らかにした。EAW に接触した抗酸菌は、抗酸染色性の低下が認められ、超微形態学的に細胞壁のブレブ様変性を来し、その菌体内には転写可能な核酸は検出されるものの細胞内酵素が不活化されることを明らかにした。

以上のことより、EAW の殺菌作用の発現過程は、細胞壁の多数の小さな断裂部分を生じさせ、そこから遊離塩素が菌体内に侵入し、その遊離塩素が菌体内の酵素を不活化すると同時に細胞壁を破壊するものと考えた。

本研究は、消毒薬抵抗性細菌である抗酸菌に対する EAW の殺菌作用及び殺菌作用の発現過程を明らかにしたもので、毒性、変異原性の高い消毒薬の代替として EAW を医療分野でさらに積極的に用いるためのエビデンスを付与するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Medical Molecular Morphology 45(4): 199-205, 2012