

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17057

研究課題名（和文）新規高水準消毒法としての水酸化ラジカルの応用：細菌芽胞における殺菌作用機序の解明

研究課題名（英文）Application of hydroxyl radicals as a new high-level disinfection method: elucidation of the bactericidal mechanism for spores

研究代表者

穴戸 駿一（Shishido, Shunichi）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20850613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、過酸化水素光分解殺菌法を新規高水準消毒法として補綴歯科臨床に応用することを目指し、芽胞に対する殺菌効果の検証とその作用機序解明に向けた分析を行った。実験には、*Bacillus subtilis*と*Bacillus cereus*の2菌種を用いた。まずは芽胞の培養法を確立し、位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡（SEM）を使用して、芽胞の観察を行った。過酸化水素光分解殺菌法は、芽胞に対して、波長依存かつ時間依存的に、効率的な殺菌効果を示した。SEMや電子スピン共鳴（ESR）による分析結果から、過酸化水素光分解殺菌法により芽胞の構造の一部が破壊もしくは性質が変化する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酸化水素光分解殺菌法は、これまで一般的な栄養型細菌に対し、短時間で高い殺菌効果を示すことが報告され、主に歯科治療への応用が進められてきた。一方で、歯科治療で用いられる器具の消毒については、滅菌処理ができない材料の場合、高水準消毒が求められる。しかしながら、既存の高水準消毒法では、消毒処理が長時間に及ぶ場合や、作業員への毒性等の問題があった。本研究の成果として、過酸化水素光分解法により細菌芽胞を効率的に殺菌できることが示唆されたことから、本殺菌法は既存の高水準消毒薬と比べて安全な、新規高水準消毒法となりうる。今後は、他の高水準消毒薬との比較や、医療現場への応用へ向けた取り組みを行ってきたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, the hydrogen peroxide photolysis technique was applied as a safe, novel high-level disinfection method in prosthodontic clinical practice. The bactericidal effects of this technique against bacterial spores were evaluated, and the mechanisms of action were analyzed. The experiments utilized two bacterial species: *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Initially, spore cultivation methods were established, and the bacterial spores were observed using phase-contrast microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The hydrogen peroxide photolysis technique demonstrated efficient bactericidal effects on *Bacillus cereus* spores. The bactericidal action was wavelength-dependent and time-dependent. SEM and electron spin resonance (ESR) analyses suggested that the hydrogen peroxide photolysis technique might alter or destroy some structural components of the bacterial spores.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：水酸化ラジカル 芽胞 殺菌 高水準消毒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療過程で取り扱われる印象体や試適後の補綴装置、口腔内スキャナ等は患者の体液で汚染されているため、滅菌・消毒による十分な感染対策が必要である。日本補綴歯科学会の「補綴歯科治療過程における感染対策指針 2019」では、滅菌処理が困難な場合には消毒薬への浸漬が推奨されている。浸漬には原則としてアメリカ疾病管理予防センターのガイドラインで高水準(細菌芽胞を殺菌可能)に分類される消毒薬が求められる。このような感染対策がとられる一方、実際の臨床現場においては様々な課題が存在する。例えば、印象体の消毒の場合、感染予防の基準をクリアするためには長時間(～60分)の浸漬が必要であり、作業者に対する毒性等の問題が存在する。従って、補綴歯科臨床で応用可能な、簡便かつ安全で効果的な新規殺菌消毒方法を確立することが求められている。

我々の研究室では、過酸化水素を青色可視光や紫外線 A 波(UVA)で光分解することで生成される水酸化ラジカルを利用した「過酸化水素光分解殺菌法」を開発してきた。これまでの研究で、本殺菌法が一般的な栄養型細菌(低水準消毒薬の対象)に対して、短時間で高い殺菌効果を示すことを報告してきた<sup>1)</sup>。殺菌作用の本質である水酸化ラジカルは、寿命が非常に短く残留毒性は無視できる。また我々の研究室では本殺菌法を応用した歯周病治療器を開発し、治験により「波長 405 nm、レーザー出力 50 mW、7 分間」の条件で、口腔内への安全性を証明している<sup>2)</sup>。従って、安全性の観点からも、本手法を高水準消毒法として臨床応用することは十分に可能である。

過酸化水素光分解殺菌法の一般細菌に対する効果は確認されているが、細菌芽胞に対する効果およびその作用機序はいまだ明らかでない。本殺菌法で細菌芽胞を効率的に殺菌できれば、補綴歯科臨床に応用可能な新規高水準消毒法となりうる。細菌芽胞は、その構造が一般細菌とは大きく異なり、芽胞殻や厚いコルテックス層で囲われている。また、コア内部には熱・紫外線・乾燥等への耐性に寄与するジピコリン酸(DPA)が豊富に存在する<sup>3)</sup>。従って、本殺菌法の作用機序は栄養細菌と異なる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、過酸化水素光分解殺菌法を細菌芽胞に応用し、その殺菌効果を実証することと、殺菌作用機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細菌芽胞培養方法の確立

実験には、*Bacillus subtilis* (JCM1465)、*Bacillus cereus* (JCM2152)の2菌種を用いた。各細菌を Schaeffer's sporulation 寒天培地に播種し、37°Cで培養した。24時間ごとに培地からコロニーを採取して、細菌の観察を行った。観察は、位相差顕微鏡を用いた形態の確認と、Wirtz 染色(Schaeffer-Fulton 染色)の2つの方法を用いて行った。毎回1000個以上の細菌を確認し、細菌全体の90%以上が芽胞になるまで培養を継続した。十分に芽胞が形成されていることを確認したら、コンラージ棒を用いて寒天培地から回収し、滅菌生理食塩水で洗浄後、懸濁液とした。細菌懸濁液中に残存する栄養型細菌のみを死滅させる方法として、Lysozyme(2 mg/ml)処理、EDTA(0.1 M)処理、80°Cで15分間加熱、の3通りの方法を検討した。残存する栄養細菌を死滅させた懸濁液を、細菌芽胞として殺菌試験等に用いた。また、作製した細菌芽胞の形態を、走査型電子顕微鏡(SEM)および透視型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した。

#### (2) 細菌芽胞に対する殺菌試験

*Bacillus subtilis*、および *Bacillus cereus* の細菌芽胞を過酸化水素(終濃度 3%)と混和し、波長 400 nm および 365 nm の LED を放射照度 1 W/cm<sup>2</sup> で照射して殺菌処理を行った。殺菌処理後、BHI 寒天培地を用いた平板寒天法で生菌数を評価した。LED の照射時間を変えながら、最適な殺菌条件を検討した。

#### (3) 殺菌作用機序解明に向けた評価

形態変化の評価として、過酸化水素光分解殺菌法による殺菌処理後の細菌芽胞を、SEM を使用して観察し、殺菌処理前と比較した。また、損傷部位を推定するために電子スピン共鳴(ESR)を使用して評価を行った。4-oxo-TEMPO(終濃度 1 mM)とヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム(終濃度 120 mM)を細菌芽胞と混和し、スペクトル形状を殺菌治療前後で比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌芽胞培養方法の確立

*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus* の2菌種を Schaeffer's sporulation 寒天培地上で培養したところ、5日で90%以上の細菌が芽胞を形成した(図 1, 2)。

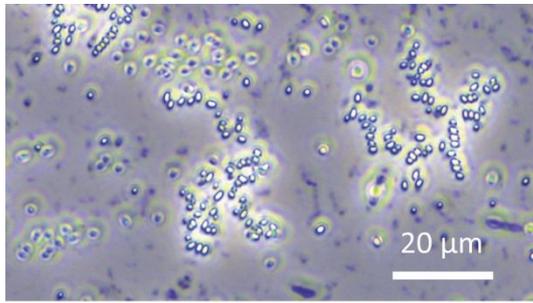


図 1. Schaeffer's sporulation 寒天培地上で 5 日間培養した *Bacillus cereus* の位相差顕微鏡画像。

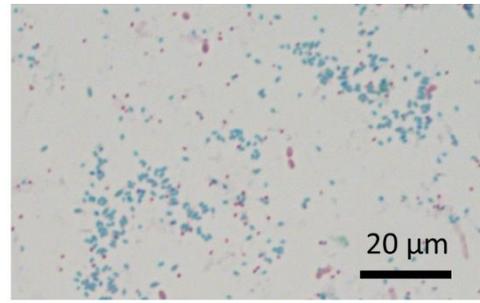


図 2. Schaeffer's sporulation 寒天培地上で 5 日間培養した *Bacillus cereus* の Schaeffer-Fulton 染色画像。赤は栄養型細菌、緑は芽胞を示す。

寒天培地から回収した細菌懸濁液から、残存する栄養型細菌のみを殺菌する方法として、Lysozyme (2 mg/ml) 処理、EDTA (0.1 M) 処理、80°C で 15 分間加熱、の 3 通りの方法で栄養型細菌を処理し、平板寒天法で生菌数を評価した結果、80°C で 15 分間加熱処理をすることで検出下限 (5 log 以上) まで殺菌することができたが、lysozyme (2 mg/ml) や EDTA (0.1 M) では十分に殺菌することができなかった (図 3)。また、Schaeffer's sporulation 寒天培地上で 25 日間培養した細菌芽胞培養液に対して 80°C で 15 分間加熱処理を行ったところ、生菌数はほとんど変化しなかった (図 4)。この結果から、80°C で 15 分間加熱処理を行うことで、栄養型細菌のみを選択的に殺菌できることが示唆された。以上の結果から、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus* の 2 菌種を Schaeffer's sporulation 寒天培地上で 5 日間培養し、回収した細菌懸濁液を 80°C で 15 分間加熱処理し、発芽を防ぐために急冷したものを細菌芽胞として以後の実験に用いた。

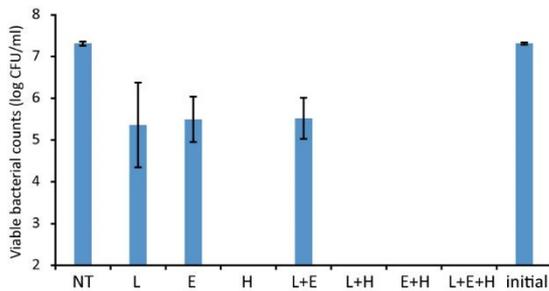


図 3. 栄養型細菌への各種殺菌効果検討。  
NT: 処理なし、L: lysozyme (2 mg/ml)、  
E: EDTA (0.1 M)、H: 加熱処理 (80°C、15 分)。

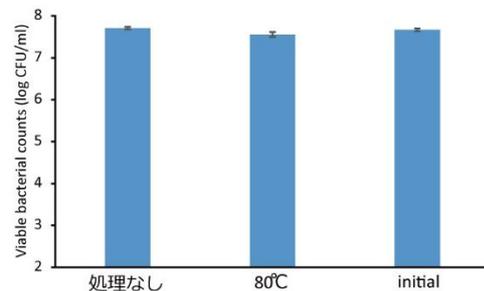


図 4. 細菌芽胞懸濁液への 80°C、15 分間の加熱処理の影響。

また、得られた細菌芽胞を SEM (図 5) および TEM で観察したところ、芽胞殻等、細菌芽胞に特有の構造を確認した。

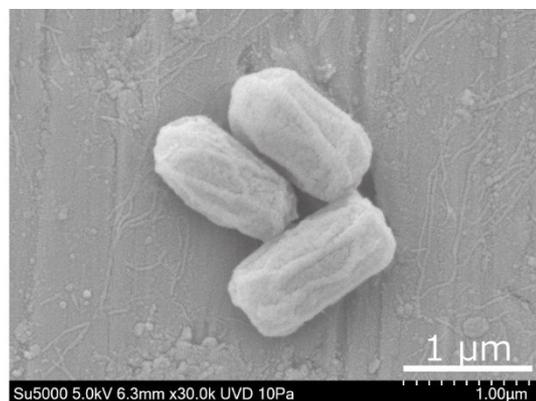
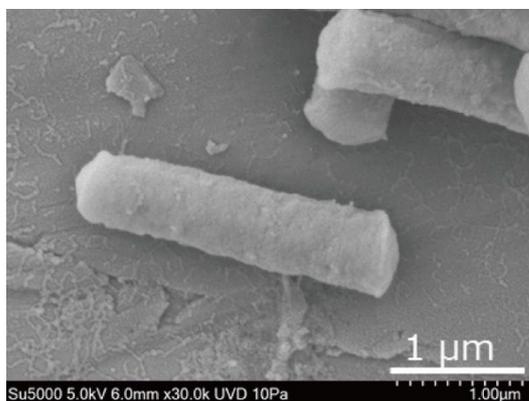


図 5. 細菌の走査型電子顕微鏡画像。左: Schaeffer's sporulation 寒天培地播種前の栄養型細菌、右: Schaeffer's sporulation 寒天培地での培養 5 日後の細菌芽胞。

## ( 2 ) 細菌芽胞に対する殺菌試験

*Bacillus cereus* の細菌芽胞に対して過酸化水素光分解殺菌法による殺菌処理を行った結果、波長 400 nm では 15 分間で 5 log 以上の細菌数減少を認めた ( 図 6 )。また、波長を 365 nm にして同様に処理したところ、10 分間でおおよそ 5 log の生菌数減少を認めたことから、細菌芽胞に対する本殺菌法の殺菌効果は波長依存性的であることが示唆された ( 図 6 )。

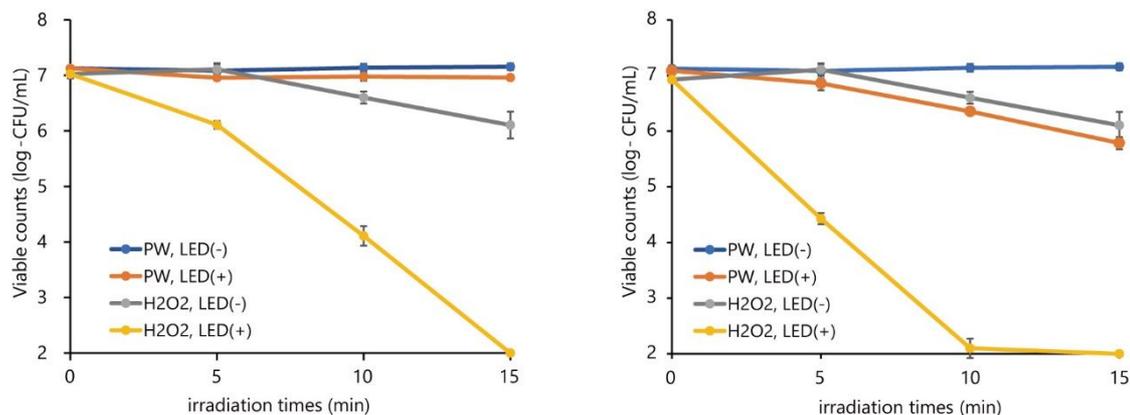


図 6. *Bacillus cereus* 細菌芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の効果。  
左 : LED 波長 400 nm、右 : LED 波長 365 nm。

## ( 3 ) 殺菌作用機序解明に向けた評価

*Bacillus cereus* の細菌芽胞に殺菌処理を行った後に SEM で観察したところ、細菌の一部が破壊されていることを示唆する所見が得られた。この結果から、本殺菌法により生じた水酸化ラジカルが芽胞殻等の構造を物理的に破壊することで芽胞の殺菌に寄与している可能性が考えられる。また、ESR を使用した予備実験では、正常な細菌芽胞と殺菌処理後の細菌芽胞ではスペクトル形状に違いがみられた。この結果は、水酸化ラジカルが芽胞内部構造の性質 ( 粘性等 ) を変化させていることを示唆している。今後、より詳細なスペクトルの分析を行い、芽胞内部構造の性質の評価や、殺菌処理により芽胞が損傷されている部位の特定を行いたいと考えている。

## 引用文献

- 1) Ikai H, Nakamura K, Shirato M et al. Antimicrob Agents Chemother. 54:5086-5091, 2010
- 2) Kanno T, Nakamura K, Ishiyama K et al. Sci Rep. 7:12247, 2017
- 3) Setlow P. Microbiol Spectr. 2, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穴戸駿一、白土 翠、倉内美智子、中村圭祐、菅野太郎、庭野吉己
2. 発表標題 Bacillus cereus芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の殺芽胞効果
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第49回年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------