

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590747

研究課題名(和文) マイクロナノバブル水の抗菌効果の科学的立証と感染予防対策への応用

研究課題名(英文) The antibacterial effect of micro-nano bubble and put to practice use for infection control and prevention

研究代表者

桜井 直美(駒田直美)(Sakurai-Komada, Naomi)

茨城県立医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：10274979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：広く産業へ応用されているマイクロナノバブル水(MN水)単独の抗菌効果について細菌学的に解析した。マイクロナノバブル水と混合した大腸菌や緑膿菌、アシネトバクター・パウマニ、セラチア菌では、菌数の減少が観察されたが、黄色ブドウ球菌やサルモネラ属菌では菌数の減少は確認できなかった。またMN水を調整する際は水質の低い方が短時間で効果が得られた。細菌バイオフィルムに対する剥離効果は観察されたが顕著では無かった。

研究成果の概要(英文)：The unique characteristics of MNBs have been used in numerous applications and studies. However, the antibacterial spectrum and sterilization activity of MNBs are unclear. Therefore, we performed the antibacterial effect of MNBs to some pathogenic bacteria. When each strain was added to MNBs produced with saline, the number of *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marcescens*, and *A. baumannii* was decreased, but *S. aureus* was not. The effects of micronanobubbles water adjusted with water of low quality were obtained in a short time. Micronano bubble water was remove the biofilm, but it was not significant.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健 感染予防 高齢者 マイクロナノバブル水

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

中小規模の医療機関や介護現場、特に入浴や水治療など湿潤環境における感染予防には多くの問題点がある。これらの施設では保菌者への対応が主であり、「常在化」しているという認識から、対応に不備が見られる例が散見されていた。特に、保菌部位があらわになり、湿潤環境でもある入浴や水治療などに使用する物品の衛生管理には注意が必要であるが、消毒の不備や物品の構造上の問題から効果的な消毒が出来ない場合もあり、同一由来と思われる緑膿菌が長期間検出される例も経験した。

また、入浴介護用品や水治療物品は直接皮膚に触れる物であり、使用する消毒薬も人体に影響の少ないものが望まれる。しかし、実際には、入浴介助者でも消毒薬による手荒れが問題となっており、効果的かつ安全性の高いものの開発が望まれていた。そこで、牡蠣養殖のノロウイルス除去にマイクロナノバブル水を応用した事例から消毒薬として使用できないかと着想した。

2. 研究の目的

広く産業分野へ応用されているマイクロナノバブル水の抗菌効果について科学的に立証し、安全で確実な感染予防法として、医療・介護分野へ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロナノバブル水の調整

マイクロナノバブル水は、アスブ社製 AK-II により調整した。調整には、超純水、脱イオン水、蒸留水、水道水を用い、それぞれ、水単独と生理食塩水としてマイクロナノバブル水を調整した。マイクロナノバブル水は装置にそれぞれの水を 30 分間循環させて調整した。

(2) 抗菌効果の有無

抗菌効果の判定には、グラム陽性菌として *Staphylococcus aureus*、グラム陰性菌として、*E. coli*、*Serratia marcescens*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella* Avony、*Salmonella* Infantis、*Salmonella arizonae*、*Klebsiella oxytoca* を用いた。これらの供死菌を、SCD 寒天培地で 37°C 18~24 時間培養後、得られたコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁して 1×10^6 CFU/mL に調整した。

それぞれの純度の水あるいは生理食塩水から調整したマイクロナノバブル水 45mL に菌液 5mL を添加し、0、10、20、30 分後に 1mL 分取し、希釈平板法により菌数算定を行った。

(3) バイオフィームへの効果

バイオフィームは *A. baumannii* を用いて調整した。すなわち、37°C で一晚培養した SCD 寒天培地状のコロニーを LB 10mL に添加して 37°C で対数増殖期まで増殖させた。この培養液を 96 穴マイクロタイタープレートに 100 μ L ずつ添加し、37°C、静置で 24 時間培養してバイオフィームを調整した。

調整したバイオフィームにそれぞれの純度の水あるいは生理食塩水から調整したマイクロナノバブル水を添加し、バブル化していない水あるいは生理食塩水を添加した場合とのバイオフィームの剥離をクリスタルバイオレット法で測定した。

(4) マイクロナノバブル水を曝露した細菌の SEM による形態観察

マイクロナノバブル水の作用機序を解析する一助として、*P. aeruginosa*、*A. baumannii*、*E. coli* について、マイクロナノバブル水への曝露前後での形態学的な変化について SEM を用いて観察した。

上記 3 菌種を $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL に調整し、マイクロナノバブル水作用前後で $\phi 0.22 \mu\text{m}$ オムニポアメンブレンフィルター (Millopore) で濾過し、乾燥、固定、蒸着後、SEM (日本電子、JSM-5800LV 型) により観察した。

4. 研究成果

(1) マイクロナノバブル水による抗菌効果の観察

脱イオン水を溶媒として作製した生理食塩水を曝気した場合には、*E. coli*、*S. marcescens*、*A. baumannii*、*P. aeruginosa* において菌数の減少が観察されたが (図 1)、*S. aureus*、*Salmonella* 属菌、*K. oxytoca* では菌数が減少しなかった (図 2)。

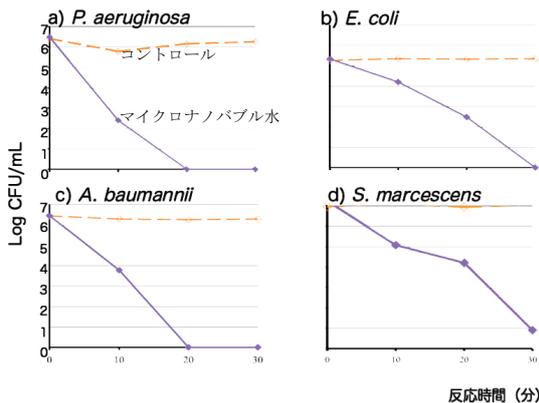


図 1 各種細菌に対するマイクロナノバブル水の効果 1

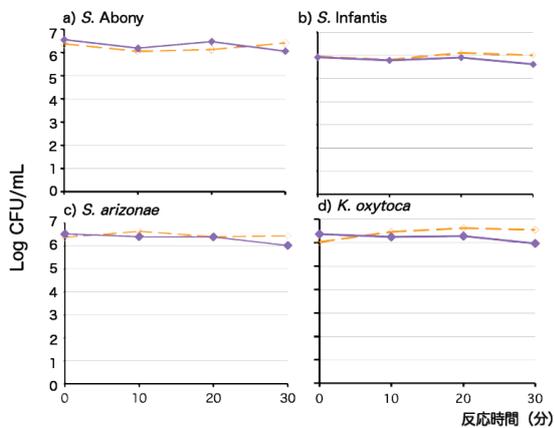


図 2 各種細菌に対するマイクロナノバブル水の効果 2

曝気させる溶媒により効果に差異が見られるか観察したところ、超純水から調整したマイクロナノバブル水は抗菌効果が低いことが観察された (図 3a~c)。

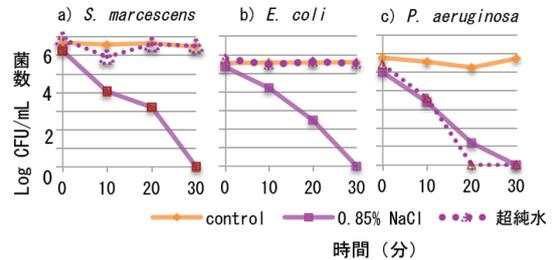


図 3 水質の違いによる抗菌効果の差異

しかし、純度の高い水でも、長時間細菌に作用させた場合は、菌数が減少する事が観察された (図 4)。

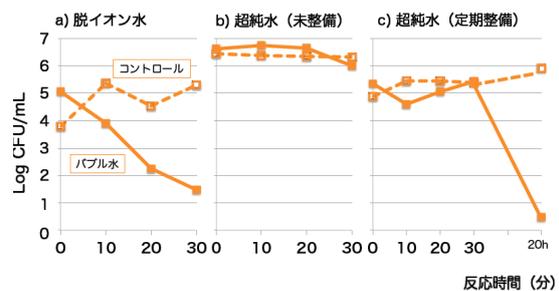


図 4 *P. aeruginosa* に対するマイクロナノバブル水の水質による抗菌効果の違い

実際に、医療や介護の現場で使用するためには、マイクロナノバブル水がどの程度活性を持った状態で保存できるかが重要異なるため、保存安定の確認を行った。マイクロナノバブル水を 37、25、4°C で 36 時間保管後に抗菌作用を観察したが、その保存安定性は低かった (図 5)。

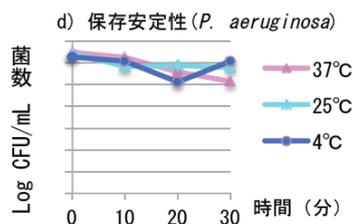


図 5 マイクロナノバブル水の保存安定性

(2)SEMによる形態観察

各種菌種へのマイクロナノバブル水の効果が、菌体そのものへのダメージの結果であるかどうかを確認するため、SEMによりその表面形態の違いを観察した。マイクロナノバブル水と反応させた細菌は形態の変化が見られた場合もあったが、特徴的な形態を見いだす事はできなかった。

(3)細菌バイオフィルムに対する作用

産業分野への応用の1つとして、排水管のバイオフィルムの除去に用いている場合があるため、菌体そのものへの効果ではなく、バイオフィルムの剥離作用の有無について検討を加えた。

バイオフィルムに対する作用としては、マイクロナノバブル水を添加したものでは、曝気しなかった対照と比較して、バイオフィルムを剥離している効果が観察された。また、バイオフィルム中の菌数も対照と比較して減少している事が観察され、菌体への直接的な抗菌効果よりは、バイオフィルムの剥離効果として有効であると考えられた。

以上の結果より、マイクロナノバブル水単体での抗菌効果は菌種による差異が大きいが、効果の見られる菌種もあり、何らかの作用を有すると考えられる。その作用は、菌体への直接的な作用でないことがSEMの結果から判明したが、菌体数も少ないため更なる観察が必要であると考えられる。

効果の見られる菌種には、医療関連感染で問題になるいわゆる日和見病原菌が含まれており、消毒薬の残留が問題になる箇所等への適応が期待された。特に、これらの菌種はバイオフィルムを形成して環境中に定着している事が知られており、バイオフィルムの剥離効果を含めて、実地への応用の基礎検討

が整備されたと考えられる。しかし、実際の医療・介護現場での実地調査がなされていない事から、安易な応用は避け、さらに詳細な検討が必要になると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Naomi Sakurai-Komada, Kazuko A Koike Antibacterial Effect of Micro-Nano Bubbles. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress、2011年9月7日、札幌
- ② 桜井直美、小池和子、マイクロナノバブル水の特性と抗菌効果への影響、第26回日本環境感染学会総会、2012年2月3日、福岡
- ③ 桜井直美、小池和子、マイクロナノバブル水の特性と菌体への作用、第85回日本細菌学会、2012年3月27日、長崎
- ④ 桜井直美、小池和子、マイクロナノバブル水が細菌へ与える影響、第27回日本環境感染学会総会、2013年3月2日、横浜
- ⑤ 桜井直美、小池和子、マイクロナノバブル水の細菌への効果、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日、幕張

6. 研究組織

(1)研究代表者

桜井 直美(駒田直美) (SAKURAI-KOMADA, Naomi)

茨城県立医療大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：10274979

(2) 研究分担者

小池 和子 (KOIKE, Kazuko)

植草学園大学・保健医療学部・教授

研究者番号：60110508