

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591494

研究課題名(和文)新規消毒薬二酸化塩素の抗芽胞作用に関する研究

研究課題名(英文)Study on the bactericidal effect of chlorine dioxide against bacterial spores.

研究代表者

山田 作夫 (Yamada, Sakuo)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00122458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二酸化塩素の抗芽胞作用についてBacillus cereus芽胞を二酸化塩素で処理後の残存生菌数を求めて検討した。その結果、二酸化塩素はB. cereus芽胞に対して常用量(0.01%)以上で強い抗B. cereus芽胞効果を示し、その効果は次亜塩素酸ナトリウム(Na)よりも強いことが明らかとなった。さらに、処理菌における超微形態変化を電子顕微鏡観察した結果、次亜塩素酸Na処理菌では芽胞殻の変化が観察されるのに比べ、二酸化塩素処理菌では大きな変化は認められず、二酸化塩素の抗芽胞作用は次亜塩素酸Naの作用とは異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bactericidal activity of chlorine dioxide (ClO₂) against Bacillus cereus spores was evaluated using the viable cells count method. The results demonstrated that the number of viable cells was decreased to approximately 1/1000 following 1 min of treatment. In contrast, in contrast, no bactericidal effect was observed when the spores were treated for 15 min with a 0.02% (w/v) solution of sodium hypochlorite (NaOCl), suggesting that ClO₂ was more effective in terms of its sporicidal effect than NaOCl. When the spores treated with NaOCl were observed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, it was clear that the coats of these spores had been partially damaged by the treatment process, whereas no significant morphological changes were induced by the ClO₂ treatment, even at a high concentration of ClO₂. These morphological analyses suggested that the mechanism of the bactericidal activity of ClO₂ towards B. cereus spores was different from that of NaOCl.

研究分野：微生物学

キーワード：芽胞 消毒薬 二酸化塩素 次亜塩素酸ナトリウム 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

Bacillus 属および *Clostridium* 属の細菌は栄養が枯渇した状況になると熱や乾燥に強く一般的な消毒薬に対して抵抗性を示す芽胞を形成する。そのため、これら芽胞形成菌による感染症の予防に用いる消毒薬としては、芽胞に有効な消毒薬を選択して用いることが必要となる。この芽胞に有効な消毒薬として次亜塩素酸ナトリウム (Na) が知られているが、刺激が強いため手指消毒には使用できない。

一方、最近臨床現場で着目され始めている新規消毒薬である二酸化塩素は、刺激が少ないことが特徴で、しかも抗菌スペクトルが広く、ウイルスにも有効であることが知られ、芽胞に対しても有用性が期待されている。

2. 研究の目的

そのため、芽胞形成菌による疾病の予防あるいは制御を目指して、様々な臨床現場における消毒薬としての応用に寄与するために、まず、芽胞形成菌で病原性のない *Bacillus subtilis* を対象とし、二酸化塩素の抗芽胞効果を確認した結果に基づき、食中毒等の起因菌として知られる *B. cereus* 芽胞に対する二酸化塩素の抗菌作用について、二酸化塩素の抗菌作用メカニズムを明らかにすることを最終目的に、*B. cereus* 芽胞に対する二酸化塩素の抗菌効果について以下の点について検索した。

- (1) まず、*B. cereus* の栄養型菌と芽胞との間における二酸化塩素の抗菌効果の相違について検討した。
- (2) 二酸化塩素で処理した後の残存生菌数を継続的に生菌数測定法により定量的に検討した。
- (3) 二酸化塩素の芽胞への作用点を超微形態的に走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察によって追究した。
- (4) 従来より芽胞に有効とされている次亜塩素酸ナトリウム (Na) についても同様に検索し、両消毒薬間で抗芽胞作用について比較検討した。

3. 研究の方法

①使用菌種と菌液の調製

B. cereus (NBRC 15305 株) を普通寒天培地 (日水) にて 30°C で培養し、芽胞が形成されることが確認できた 10 日間培養菌を実験に供した。培養した芽胞菌を平板培地上より白金耳でかきとり、滅菌蒸留水に浮遊させて吸光度計 (CO7500、WPA) にて O. D. =2.0 に調整した。一方、栄養型菌については標準株を TSB 10 ml で 37°C 一晩培養して得られた栄養型菌体を集菌 (4,300×g、3 分) し、O. D. =2.0 になるように調整した。

②使用消毒薬

二酸化塩素はクレベリン F[®] (大幸薬品、0.05% ; w/v : 以下同様) を、対照消毒薬として用いた次亜塩素酸 Na はピューラックス[®] (オーヤラックス、6%) を実験に供した。

③生菌数測定法

芽胞菌液あるいは栄養型菌液をそれぞれマイクロチューブ内で、菌液と同量の滅菌蒸留水で所定の濃度に調整した各消毒薬を混和後、室温で反応後 1 分、5 分、15 分毎に、処理菌液をサンプリングし、適宜希釈した菌液 1 ml に普通寒天培地を加え、一晩培養後に生じたコロニー数 [colony forming units (CFU/ml)] をカウントして得られる生菌数測定法を実施し、残存細菌数を求めた。

④処理菌体の電子顕微鏡観察

- i) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 用試料の作製
消毒薬処理した芽胞菌液を対象に従来の方法に準じて SEM 観察用試料を作製し、SEM (JEM-6340F、JEOL) にて観察した。
- ii) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 用試料の作製法
消毒薬処理した芽胞菌液を対象に、従来の方法に準じ、TEM 観察用試料を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM : JEM-1400、日本電子) 観察に供した。

4. 研究成果

- (1) *B. cereus* 栄養型菌に対する二酸化塩素の抗菌効果

B. cereus の栄養型菌体を常用量(0.01%)の二酸化塩素で処理すると、残存生菌数は1分で検出限界以下となることが判明した。また、常用量の1/2濃度の0.005%で処理すると残存生菌数は1分で約 $1/10^4$ に、5分で約 $1/10^6$ に減少し、1/4濃度(0.0025%)でも15分で約 $1/10^6$ に減少し、二酸化塩素は*B. cereus* 栄養型菌に対して顕著な抗菌効果を有することが認められた。なお、1/8濃度(0.00125%)では、その抗菌効果はほとんど認められなかった。一方、常用量(0.02%)の次亜塩素酸Naで処理すると、処理1分で残存生菌数は検出限界以下となった。また、常用量の1/2濃度の0.01%で処理すると残存生菌数は1分で約 $1/10^4$ に、15分で約 $1/10^6$ に減少し、次亜塩素酸Naは*B. cereus* 栄養型菌に対して顕著な抗菌効果を有することが認められた。なお、常用量の1/4濃度(0.005%)ならびに1/8濃度(0.0025%)では、ほとんど抗菌効果は認められていない。以上の結果から、*B. cereus* 栄養型菌に対して両消毒薬は同程度に有効であることが確かめられた。

(2) *B. cereus* 芽胞に対する二酸化塩素の有用性

B. cereus 芽胞を常用量(0.01%)の二酸化塩素で処理すると、残存生菌数は1分で約 $1/10^3$ に、5分で約 $1/10^6$ に、15分では検出限界以下となり、常用量処理での有用性が示された。また、高濃度の0.02%で処理すると、5分で全ての芽胞が死滅した。一方、次亜塩素酸Naは常用量(0.02%)で15分処理しても残存生菌数は変化せず、常用量の次亜塩素酸Naはほとんど抗芽胞効果のないことが認められた。そこで、常用量の10倍濃度の0.2%で処理すると、5分後には約 $1/10$ に、15分後には約 $1/100$ に残存生菌数が減少し、0.4%ならびに0.8%で5分処理すると約 $1/10^6$ に減少し、0.2%以上の濃度でないと抗芽胞効果が発揮されないことが明らかとなった。以上の結果から、*B. cereus* 芽胞に対しては次亜塩素酸Na

に比べ、二酸化塩素が有効であることが判明した。

(3) 両消毒薬の*B. cereus* 芽胞に対する作用における標的部位の超微形態解析

両消毒薬の標的部位について走査型電子顕微鏡(SEM)観察ならびに透過型電子顕微鏡(TEM)観察による超微形態解析により追究した。未処理芽胞の*B. cereus* をSEMにて観察したところ、正常*B. cereus* 芽胞は $1 \times 1.5 \mu\text{m}$ 程度の卵型から楕円形を呈することが観察できた

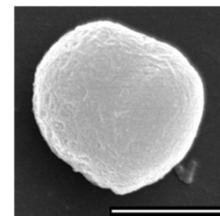


図1

(図1; 図1~3のバーは $1 \mu\text{m}$)。

次に、二酸化塩素0.005%で処理した*B. cereus* 芽胞をSEM観察したところ、顕著な形態変化は観察できなかった(図2-左)。さらに、倍濃度の0.01%(常用量)で5分処理した菌体を観察すると、残存生菌数は約 $1/10^6$ に減少したにもかかわらず、SEM観察では未処理芽胞同様な像が観察され(図2-右)、顕著な形態変化は示されなかった。

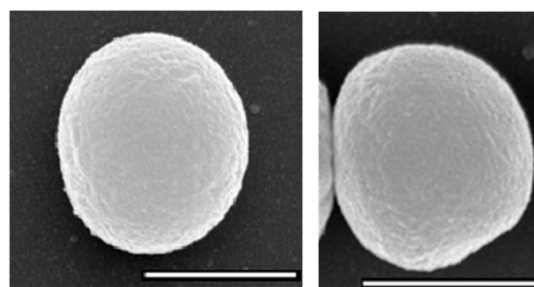


図2

次亜塩素酸Naの残存生菌数が約 $1/10$ に減少する条件である0.2%で5分処理すると、*B. cereus* 芽胞表面が正常ではなくイレギュラー化をきたすという超微形態変化がSEMにて観察できた(図3-左)。また、残存生菌数が約 $1/10^6$ にまで減少する0.4%処理菌では、さらに表面の波状化の進行した像が確認できた(図3-右)。

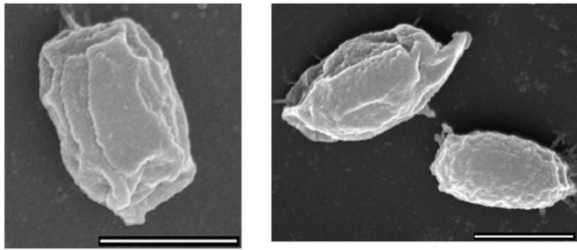


図 3

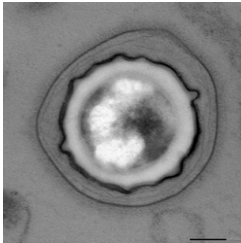


図 4

処理菌においては、残存生菌数の減少および SEM 観察での超微形態変化が認められな

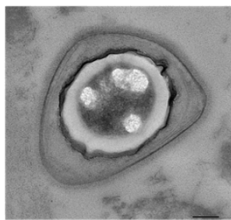


図 5

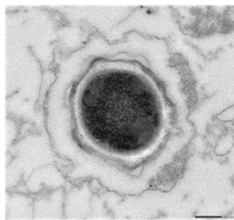


図 6

かった (図 6)。また、処理濃度を 0.01% に上げて処理してみたが、15 分処理で完全に死滅する場合 (図 7) でも、エキソスポリウムのわずかな超微

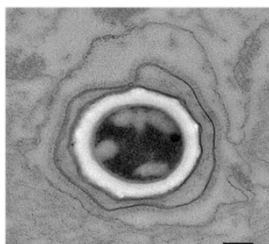


図 7

一方、処理菌の TEM 観察では、(図 4~図 9 のバーは 200 nm) 図 4 に示す *B. cereus* 芽胞の正常菌に比べ、二酸化塩素で処理した *B. cereus* 芽胞では、0.005% で 5 分

処理菌においては、残存生菌数の減少および SEM 観察での超微形態変化が認められなかったのと同様に、TEM 像でも未処理芽胞とほとんど変わらない像を示し (図 5)、顕著な形態変化は観察できなかつた。また、15 分処理菌では全ての芽胞が死滅するが、未処理芽胞に比べエキソスポリウムがイレギュラー化はしているものの、芽胞殻より内側では大きな超微

形態変化は認められなかった (図 6)。また、処理濃度を 0.01% に上げて処理してみたが、15 分処理で完全に死滅する場合 (図 7) でも、エキソスポリウムのわずかな超微

形態変化以外に大きな変化は認められなかった。

一方、次亜塩素酸 Na 処理において残存生数 残生菌数が約 1/10 の減少が認められた 0.2% 濃度で 5 分処理した芽胞を TEM 観察すると、芽胞殻の一部が断裂化して皮層から解離し、エキソスポリウムは部分的にしか存在していなかった (図 8-左)。さらに、同濃度で 15 分処理して約 1/100 にまで残存生菌数減少が認められた芽胞では、芽胞殻が障害を受 μm 程度の卵型から楕円形を呈することが観察できた (図 8-右)。さらに、

一方、次亜塩素酸 Na 処理において残存生数 残生菌数が約 1/10 の減少が認められた 0.2% 濃度で 5 分処理した芽胞を TEM 観察すると、芽胞殻の一部が断裂化して皮層から解離し、エキソスポリウムは部分的にしか存在していなかった (図 8-左)。さらに、同濃度で 15 分処理して約 1/100 にまで残存生菌数減少が認められた芽胞では、芽胞殻が障害を受 μm 程度の卵型から楕円形を呈することが観察できた (図 8-右)。さらに、

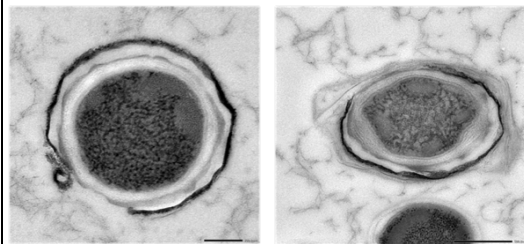


図 8

の次亜塩素酸 Na で処理してみると、約 $1/10^6$ まで残存生菌数が減少する 5 分処理菌では芽胞殻の断裂化が進行し (図 9-左)、15 分処理菌においても芽胞殻の断裂化が進行している像が観察できた (図 9-右)。

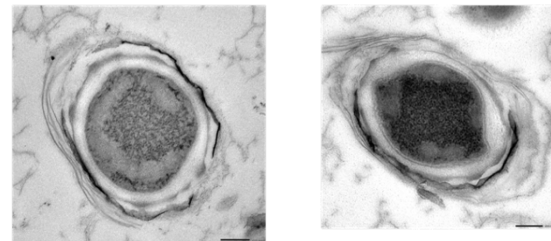


図 9

以上の処理芽胞の超微形態変化の結果から、二酸化塩素は芽胞に対して次亜塩素酸 Na とは異なる作用機序により抗芽胞効果を惹起することが示唆された。

そこで、二酸化塩素処理芽胞を新たな培地に接種後、5 時間培養して得られた菌体を SEM にて観察したところ、未処理芽胞では発芽にいたる芽胞が観察できたのに比べ、処理芽胞では発芽は全く観察されなかった。これらの結果から、二酸化塩素は *B. cereus* 芽胞に対して、構造上の顕著な障害

を惹起しないが発芽を阻害することが判明し、次亜塩素酸 Na の芽胞殻への直接的な障害作用とは全く異なることが強く示唆された。

なお、これらの結果に基づき、二酸化塩素の抗芽胞作用メカニズムについて、生化学的解析を遂行したが、本研究で対象としている *B. cereus* をはじめとした芽胞形成菌は、加熱や乾燥にも強く、物理的、化学的処理に対して抵抗性を示すという特性を有することから、芽胞形成菌を溶菌化して、抽出液を対象に生化学的手法に供する段階において芽胞形成菌の溶菌化が十分に達成できていない状況ではあったが、その方法を確立し、処理菌体を溶解後、SDS-PAGE にて展開してみた。その結果、現在のところ未処理菌との間に大きな相違は認められていないが、二次元電気泳動法による解析が必要であると思われる。また、二酸化塩素が *B. cereus* 芽胞の発芽を抑制することが示唆されたことから、発芽に関与する遺伝子 (*ger* 遺伝子や *spo* 遺伝子) への影響に関する解析が二酸化塩素の抗芽胞作用メカニズムの解明に有用であることが考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 若狭麻美, 福辻賢治, 齊藤峰輝, 大毛宏樹, 山田作夫: *Bacillus cereus* 芽胞に対する二酸化塩素の抗菌効果. 日本臨床腸内微生物学会誌. 査読あり. 16(1): 54-63, 2014.
- ② 山田作夫: 消毒薬抵抗菌に対する消毒薬の選択と殺菌効果—とくに芽胞形成菌に対して—感染防止, 査読なし, 24(2): 11-14, 2014.
- ③ Nobuyuki Fukunishi, Shinya Murakami, Akane Ohono, Naoya Yamanaka, Nobuaki

Matsui, Kenji Fukutsuji, Sakuo Yamada, Kouji Itoh, Masaaki Akagi: Does beta-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of beta-hexosaminidase in mast cell granules. *Journal of Immunology*, 査読あり, 193: 1886-1894, 2014.

DOI:10.4049/jimmunol.1302520

- ④ 兵行義, 石松昌己, 河口豊, 山田作夫, 齊藤峰輝, 原田保: ブロー液における抗菌効果の細菌学および超微形態学的検討. 日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会誌, 査読あり, 3(1): 28-32, 2015.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 亀崎彩紗, 齊藤峰輝, 山田作夫: 黄ニラの抗 *Candida albicans* 効果に関する検討. 第36回日本食品微生物学会学術総会. 2015年11月13日, 神奈川県川崎市, 川崎市教育文化会館.
- ② Hajim O. Khalifa, Sakuo Yamada, Shiori Ujimine, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto: Antimicrobial effects of maqui berry and pomegranate extracts. 第68回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2015年10月3日, 岡山県岡山市, 岡山大学鹿田キャンパスMUSCAT CUBE.
- ③ 山田作夫, 亀崎彩紗, 齊藤峰輝: *Candida albicans* に対する黄ニラの抗菌作用における超微形態学的解析. 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2015年9月19日, 長崎県長崎市, 長崎大学医学部良順会館・ボンベ会館.
- ④ 亀崎彩紗, 齊藤峰輝, 山田作夫: 黄ニラの抗 *Candida albicans* 作用における超微形態学的検討. 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015年5月13日, 京都府京都市, 京都国際会議場.
- ⑤ 亀崎彩紗, 山田作夫: *Candida albicans* に対する黄ニラの抗菌作用に関する検討. 第30

回日本環境感染学会総会・学術集会, 2015年
2月21日, 兵庫県神戸市, 神戸国際展示場.

- ⑥ 氏峰栞里, 山田作夫, 齊藤峰輝: 二酸化塩素
の抗黄色ブドウ球菌作用機序に関する検討.
第62回日本化学療法学会西日本支部総会・第
57回日本感染症学会中日本地方会学術集会・
第84回日本感染症学会西日本地方会学術集
会, 2014年10月23日, 岡山県岡山市岡山コ
ンベンションセンター.
- ⑦ 山田作夫, 氏峰栞里, 齊藤峰輝, 刀裨重信:
二酸化塩素の黄色ブドウ球菌に対する作用
メカニズムに関する超微形態的解析. 第46回
日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2014
年10月17日, 東京都, TKP市ヶ谷カンファレ
ンスセンター.
- ⑧ Ujimine Siori, Tone Shigenobu, Saito
Mineki, Yamada Sakuo: The mechanism
of bactericidal action of sodium
hypochlorite against *Staphylococcus*
aureus. 18th International microscopy
congress, 2014年9月1日, Prague, Czech.
- ⑨ Junzo Hisatsune, Teruaki Murakami,
Nobuyuki Tatsukawa, Ikue Hayashi,
Sakuo Yamada, Motoyuki Sugai: Skip, a
cell wall protein of *S. aureus* for biphasic
skin adhesion strategie 16th International
Symposium on Staphylococci and
Staphylococcal Infections (ISSSI), 2014年8
月26日, Chicago, USA.
- ⑩ 氏峰栞里, 葛西祐依, 佐藤亜美, 今川未希子,
岡本あすか, 重政綾, 齊藤峰輝, 山田作
夫: ポビドンヨードの抗黄色ブドウ球菌効果
に関する検討. 第31回中国四国インフェク
ションフォーラム, 2014年7月26日, 岡山市,
アークホテル.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
川崎医科大学微生物学教室ホームページ
<http://kawasakim.ac.jp/microbiology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 作夫 (Yamada Sakuo)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 122458

(2)研究分担者

大毛 宏喜 (Ohge Hiroki)
広島大学・医学部・教授
研究者番号: 70379874

(3)連携研究者

()

研究者番号: