論文の内容の要旨

氏名：石　﨑　　麗
博士の専攻分野の名称：博士（工学）
論文題名：循環水装置に存在する細菌の分析および除去に関する研究

循環水装置には、水を循環させて利用する業務用洗浄機と浴場施設で設置されている循環式浴槽等が含まれる。業務用洗浄機は、人が直接口にする食品と接触する食器や調理器具、容器等を洗浄対象としているため、食中毒の原因となる有害微生物の除去と装置本体や洗浄水の衛生保持が求められる。循環式浴槽は浴槽の水をろ過と加温を繰り返し再利用する方式であり、この設備の衛生管理が不十分であるとレジオネラ症等の感染症を引き起こすこともある。そこで本研究では、業務用自動食器洗浄機庫内および循環式浴槽の細菌の菌叢解析を行い、それらの制御方法について検討した。この結果、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物に金属錯体を添加して活性酸素種を生成させることで、より高い除菌効果が得られることを明らかにした。

食中毒の原因のひとつに調理器具類の洗浄不良による二次汚染がある。食洗機自体が微生物の温床になると、そこから被洗物への移菌のリスクが高まるという報告もある。業務用食洗機は、高 pH のアルカリ洗浄剤と高温（洗浄 60℃、すすぎ 80℃）で洗浄されるが、庫内に赤色のヌメリが付着し不衛生な状態となっている食洗機が多く見られる。そこで、ホテル、レストラン、病院などで実際に使用されている食洗機 14 台（ドアタイプ 6 台、コンベアタイプ 8 台）を対象に、微生物の汚染実態を調査した。ドアタイプは（洗浄タンク（洗浄水と接液/非接触部分）、庫内壁面（洗浄水との接液/非接液部分）、洗浄ノズル、すすぎノズル）計 6 か所、コンベアタイプは（洗浄タンク（洗浄水との接液/非接液部分）、洗浄槽壁面、洗浄ノズル、すすぎ槽、すすぎ槽壁面、すすぎノズル、食器を並べるラックレール、各槽を仕切るカーテン）計 8 か所をスワブ法により採取した。これらを 25℃、35℃および 60℃で培養し生菌数を測定したところ、平均で 10^2～10^3 CFU/100 ㎝ ^{2}、最も多いパーツで 10^5～10^6 CFU/100cm^2 検出された。ドアタイプでは 35℃で生育する中温細菌と 60℃で生育する好熱性細菌の両方が検出され、洗浄タンク（洗浄水接液部分）と壁面（洗浄水非接液部分）で菌数が多い傾向が見られた。コンベアタイプでは中温細菌が多く検出され、すすぎ槽よりも洗浄槽の菌数が多い傾向が見られた。細菌は洗浄水の噴射により汚れとともにエアロゾルとなり庫内表面に付着し、経時で堆積していくと考えられ、菌数が少なかったパーツは、すすぎ湯により物理的に洗い流されている可能性が高い。

生育した細菌の菌叢把握のため、16S rRNA 遺伝子解析を用いて同定を行った。細菌が持つリボソーム遺伝子の中でも 16S rRNA 遺伝子は進化速度が遅く、種のレベルにおいて高い相同性を示す。単離培養によって得た 94 株から相同率 98.7 %以上で同定できた株は 84 株で 23 属に分類できた。これらをグラム陽性菌とグラム陰性菌に分類すると、ドアタイプではグラム陽性菌が多く、コンベアタイプでは両者が同等に分離された。好熱性細菌は、ドアタイプでは 4 属 14 株分離されたのに対し、コンベアタイプでは 1 属 1 株のみであった。芽胞形成菌は 3 属分離され、*Bacillus* 属はほとんどの食洗機から分離された。*Bacillus subtilis* は、広範囲の環境下で生存することができ、薬剤耐性を持つバイオフィルムや芽胞を形成する。グラム陽性菌はほとんどのパーツから分離されたのに対し、グラム陰性菌はすすぎ水が当たるすすぎノズルと壁面からは検出されなかった。グラム陰性菌は細胞壁が薄く弱いため機械的ストレスを受けやすく、すすぎ工程が菌数低下に有効に働いたと考えられる。好熱性細菌はドアタイプのほとんどのパーツから検出されている。ドアタイプは庫内温度がすすぎ工程で 80℃に上昇するため、好熱性細菌にとって最適な環境になっていると考えられる。今回食中毒の原因菌は検出されなかったが、日和見感染の原因菌となり得る細菌に近縁関係が近しい属が確認されたため、洗浄剤による制御が重要である。

そこで、グラム陰性菌の大腸菌 *Escherichia coli*、グラム陽性菌の黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、および検出数が多かった *B. subtilis* の標準菌株を用い、既存の食洗機用アルカリ洗浄剤の除菌効果を調べた。温度 60℃・5 分間の接触条件下において、*E. coli* では菌数が 1/100～1/10,000 に低下したが、*S. aureus* では 1/10～1/100 の低下に止まり、*B. subtilis* に対してはほとんど効果が認められなかった。*B. subtilis*

のような芽胞形成菌では、芽胞の最外層のアウターコートが化学物物質の透過性をバリアしていると考えられ、アルカリ洗浄剤での除菌には限界があることを示している。

循環浴槽では、レジオネラ属菌が産生するバイオフィルムの除去に、2～3 %過酸化水素が推奨されているが、高価でハンドリング性が悪いという欠点がある。そこで、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物（過炭酸ナトリウム（Sodium percarbonate；以下 SP））と金属錯体に着目した。SP は比較的安定な粉末であり、水に溶解すると炭酸ナトリウムと過酸化水素に解離するため、酸素系漂白剤や洗浄剤として使用されている。SP は塩素系漂白剤と比較して環境負荷が小さいが、除菌効果が低いという問題がある。SP の除菌効果を向上させるために、銅イオンにメチルグリシン二酢酸（MGDA）を配位させた錯体 2-[Bis(carboxymethyl)amino]propanonic acid-chelated copper（MGDA-Cu）について検討した。過酸化水素は銅との相互作用により、ヒドロキシルラジカルやヒドロペルオキシラジカルをなどの活性酸素種（ROS）を生成し、これが菌体のタンパクや DNA などを酸化し、損傷を与えるとされている。

まず、SP と MGDA-Cu の菌体への除菌効果を調べるため、*S. aureus*、*E. coli*、*B. subtilis*、グラム陰性菌のレジオネラ属菌（*Legionella pneumophila*）を用いて評価した。試験条件は循環式浴槽の水温に合わせ 35℃で接触時間 30 分を基準に、0.5 wt% SP 単独、0.5 wt% SP と 12 µM MGDA-Cu 併用とで比較した。*S. aureus* に対しては、汚染有機物のモデルであるウシ血清アルブミン（BSA）の有無にかかわらず、MGDA-Cu の添加により SP の除菌効果が向上した。*E. coli* は SP の感受性が高すぎたため接触時間を 1～2 分に調整した。BSA 非存在下では MGDA-Cu の添加による除菌効果の向上が見られ、BSA 存在下では添加効果が確認できなかった。*B. subtilis* に対しては、35℃で除菌効果が得られなかったため接触温度を 60℃に引き上げたが、1/10 程度の菌数低下に留まり、MGDA-Cu の添加効果は確認できなかった。*L. pneumophila* に対しては、BSA 存在下で MGDA-Cu の添加効果が認められた。グラム陽性菌はグラム陰性菌と比べると細胞壁が厚く、ROS に対する耐性が高いため、MGDA-Cu の添加効果は、細菌の ROS や環境に対する耐性に依存すると考えられる。

次に、SP と MGDA-Cu のバイオフィルムに対する分解効果を、アルギン酸ナトリウムを用いて調べた。バイオフィルムを構成する成分には、多糖類、タンパク質、DNA などの細胞外高分子基質（EPS）があり、EPS に含まれる細胞外多糖の成分のひとつがアルギン酸塩である。アルギン酸ナトリウム水溶液に対する減粘効果は 1 wt% SP でも認められたが、24 µM MGDA-Cu の添加によってその効果が高められた。MGDA-Cu により ROS の生成量が増え、ROS がアルギン酸ナトリウムを解重合し低分子化させたと考えられる。

MGDA-Cu には SP の除菌効果とバイオフィルムの除去能を高める効果があることが示されたが、実際の配管におけるバイオフィルムの細菌叢は複雑であることから、循環配管モデルを用いてバイオフィルムモデルを作成した。この循環パイプを、0.5 wt% SP、および 0.5 wt% SP に 12 µM MGDA-Cu を加えた場合とで循環洗浄し、形成されたバイオフィルム中の菌叢解析を 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析により行った。アンプリコンシーケンス解析は、解読塩基長は短いが、1 回のシーケンスランで大量の塩基配列情報が解読できるのが特徴である。バイオフィルムから得られたシーケンス配列は、洗浄前で 36,834 配列、SP 処理後で 33,576 配列、SP と MGDA-Cu 併用処理後で 43,741 配列決定できた。これらの配列は 8 つの細菌門に割り当てられ、その大半が Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門に属していた。Proteobacteria 門にはグラム陰性菌が属しており、*Escherichia* 属や *Legionella* 属などが含まれる。Bacteroidetes 門には偏性嫌気性グラム陰性菌が属している。SP のみの洗浄では、洗浄前と比較して門の構成に大きな変化は見られなかったが、SP と MGDA-Cu 併用処理ではこの 2 つの門で大きな組成変化が見られた。殺菌剤は微生物の組成を変化させることから、MGDA-Cu の添加は SP の除菌活性を増加させ、バイオフィルムの細菌叢に大きな変化を与えていると推察される。

食洗機と循環式浴槽の配管における衛生保持には、芽胞形成菌とバイオフィルムの除去が重要であり、SP と MGDA-Cu を用いた洗浄技術を活用することにより制御できる可能性が見出された。

以上