

論文審査の結果の要旨

氏名：石 崎 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

審査委員：(主 査) 教授 吉 宗 一 晃

(副 査) 教授 柏 田 歩 教授 坂本 恵一

教授 津 野 孝

日本大学教授 西 村 克 史

水を循環させる循環水装置には微生物が生育しやすいため、間接的に人が触れることになる食器洗浄機や循環式浴槽の衛生管理は特に重要である。本論文では特に報告例の少ない業務用食器洗浄機の微生物汚染に注目し、その微生物汚染の実態を分子生物学的に明らかにした。また炭酸ナトリウム過酸化水素付加物に銅イオン錯体を反応させてフェントン反応により活性酸素種を生成させ汚染細菌を効率的に除去する洗浄剤の開発を行い、その除去効果を循環水モデル装置上に生育させたバイオフィームを使ってアンプリコンシーケンスを用いた菌叢の網羅的解析により検証した。

循環水装置内の循環水は一度微生物により汚染されると除去されないだけでなく、その中で微生物が増殖する。この微生物の一部は物理的及び化学的な洗浄に抵抗性を持つバイオフィームを形成し、長期間装置内で生育することになる。この様な衛生管理が不十分な食器洗浄機において食器への細菌汚染が報告されている。また、循環式浴槽においてはエアロゾルとなった循環水に含まれるレジオネラ属菌を吸引することで、肺炎などのレジオネラ症を引き起こす例がしばしば報告されている。

業務用の食器洗浄機は家庭用のものと比較してより高温で使用され、使用される洗浄剤の pH も高いため、微生物にとってはより生育しにくい環境であると考えられている。このため、業務用食器洗浄機の細菌汚染に関する報告は家庭用のものと比較して非常に少ない。本論文では業務用食器洗浄機のパーツごとに付着している微生物を培養し、その生菌数を測定した。さらに単離された細菌の 16S rRNA 遺伝子を決定することで、菌体の同定を行った。この結果、生菌数は洗浄剤の使用濃度が低いと増加する傾向にあり、洗浄剤の適切な使用が必要であることを示した。一方で、洗浄剤が直接触れない部分からより多くの生菌体が検出され、エアロゾルによる食器洗浄機庫内の細菌の拡散が確認された。単離された菌体はグラム陽性菌がグラム陰性菌よりも多く、相対的に厚いペプチドグリカン層を持ち機械的ストレス耐性を持つグラム陽性菌が食器洗浄機庫内で優位に生育すると推察された。またほとんどの食器洗浄機において枯草菌 *Bacillus subtilis* に近縁の細菌が多く検出された。この原因として、枯草菌が物理的因子や化学的因子に強い耐性を持つバイオフィームや芽胞を形成することや、納豆の発酵に使われた枯草菌が食器に付着して持ち込まれたことが考えられた。枯草菌は食器用洗浄剤のアルカリ性や塩素系漂白剤であるトリクロロイソシアヌル酸等にも高い耐性を示したため、アルカリ洗浄剤だけによる除菌には限界があることが示唆された。

洗浄剤の除菌効果を高めるため、酸素系洗浄剤である炭酸ナトリウム過酸化水素付加物に銅イオンを反応させてフェントン反応により活性酸素種を生成させた。この際にフェントン反応を抑制する目的で銅イオンを錯体とすることで、活性酸素種を持続的に生成させ除菌効果を著しく高めることができた。これによって、枯草菌 *B. subtilis* だけでなく、大腸菌 *Escherichia coli*、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する除菌効果が向上することを明らかにした。またこの方法により生成した活性酸素種はバイオフィームの主要な成分であるアルギン酸やポリグルタミン酸を分解することも示し、機械的及び化学的な洗浄に耐性を持つバイオフィームを形成する菌に対しても効果を有することを示唆した。

この活性酸素種を生成する洗浄剤の除菌効果を確認するために、実際に大型の循環式浴槽施設で用いられていた配管を効果的に洗浄できることを示した。さらに循環水装置モデルを作製し、その配管にバイオフィームを形成させ、開発した洗浄剤の効果を菌叢解析により確認した。菌叢解析は次世代 DNA シーケ

ンサーを用いたアンプリコンシーケンスにより行い、バイオフィルム中の 16S rRNA 遺伝子を 3 万以上解析することで行った。この結果、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物を含む洗浄剤に銅イオン錯体を添加することで、菌叢が大きく変化することが示され、この洗浄剤がバイオフィルムを構成する細菌にも除菌効果があることを示唆した。

本論文は全 5 章から構成されている。

第 1 章では研究の背景と目的を説明し、業務用の洗浄機と浴場施設に設置されている循環水装置及びその微生物汚染について説明している。

第 2 章ではドアタイプとコンベアタイプの業務用自動食器洗浄機に付着する細菌を培養し、それらの 16S rRNA 遺伝子解析による菌の同定結果と既存の洗浄剤の除菌効果について述べている。

第 3 章では炭酸ナトリウム過酸化水素付加物に銅イオン錯体を反応させて活性酸素種を生成することによる除菌効果の向上について述べている。この方法で生成した活性酸素種によってバイオフィルムの構成成分であるアルギン酸やポリグルタミン酸が分解されることを示唆した。

第 4 章では実際に大型の循環式浴場施設で用いられていた配管や作製した循環水装置モデルに形成させたバイオフィルムを用いて開発した洗浄剤の除菌効果を示した。

第 5 章では研究をまとめ、業務用循環水装置の衛生管理の問題点と改良点について述べている。

この成果は、生産工学、特に業務用循環水装置の衛生管理学に寄与するものと評価できる。

よって本論文は、博士（工学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令 和 3 年 3 月 4 日