

博士学位論文

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

Studies on Analysis and Elimination of Bacteria in Devices  
for Water Circulation

日本大学大学院 生産工学研究科 応用分子化学専攻  
石崎 麗

## 目次

第 1 章 本研究の背景と目的 .....	- 5 -
1-1 循環水装置について .....	- 5 -
1-2 食品分野における衛生管理 .....	- 5 -
1-2-1 国内の食中毒発生状況 .....	- 7 -
1-2-2 食品分野における有害微生物 .....	- 9 -
1-3 食品分野における機械洗浄 .....	- 12 -
1-3-1 日本における業務用食器洗浄機の歴史 .....	- 13 -
1-3-2 業務用食器洗浄機の原理 .....	- 13 -
1-3-3 業務用食器洗浄機の種類 .....	- 14 -
1-3-4 業務用食器洗浄機用洗浄剤 .....	- 19 -
1-3-5 食器洗浄機における洗浄剤の除菌効果 .....	- 20 -
1-3-6 食器洗浄機庫内の汚染実態 .....	- 20 -
1-4 循環浴槽の配管における水環境 .....	- 21 -
1-4-1 レジオネラ感染症 .....	- 21 -
1-4-2 レジオネラ属菌 .....	- 23 -
1-4-3 バイオフィルムとレジオネラ属菌 .....	- 24 -
1-4-4 循環浴槽でのレジオネラ属菌の増殖メカニズム .....	- 25 -
1-4-5 循環浴槽の構造と洗浄 .....	- 26 -
1-4-6 過酸化水素と過炭酸ナトリウム .....	- 27 -
1-4-7 金属錯体の活用 .....	- 27 -
1-5 本研究の目的 .....	- 30 -

1-6	本論文の構成	- 30 -
第 2 章	業務用自動食器洗浄機内の細菌の解析	- 32 -
2-1	緒言	- 32 -
2-2	実験方法	- 36 -
2-2-1	施設別食器洗浄機の使用状況の調査	- 36 -
2-2-2	検体の採取と生菌数測定	- 37 -
2-2-3	16S rRNA 遺伝子解析による菌株の同定	- 39 -
2-2-4	各種細菌に対する食器洗浄機用洗浄剤の除菌試験	- 40 -
2-3	結果および考察	- 42 -
2-3-1	施設別食器洗浄機の使用実態	- 42 -
2-3-2	食器洗浄機の生菌数	- 47 -
2-3-3	16S rRNA 遺伝子解析による菌株の同定	- 51 -
2-3-4	各種細菌に対する食洗機用洗浄剤の除菌効果	- 87 -
第 3 章	過炭酸ナトリウムの除菌力に対する銅錯体の効果	- 93 -
3-1	緒言	- 93 -
3-2	実験方法	- 95 -
3-2-1	MGDA-Cu の調製	- 95 -
3-2-2	各種細菌に対する除菌試験	- 96 -
3-2-3	レジオネラ属菌に対する除菌試験	- 97 -
3-2-4	アルギン酸ナトリウムに対する分解試験	- 98 -
3-2-5	ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸ナトリウムに対する分解試験	- 98 -
3-2-6	実配管を用いた洗浄試験	- 99 -
3-2-7	銅錯体による過酸化水素の分解試験	- 100 -

3-3	結果および考察 .....	- 100 -
3-3-1	各種細菌に対する除菌効果 .....	- 100 -
3-3-2	レジオネラ属菌に対する除菌効果 .....	- 105 -
3-3-3	アルギン酸ナトリウムの粘度への影響 .....	- 106 -
3-3-4	ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のナトリウム粘度への影響 .....	- 107 -
3-3-5	実配管での洗浄効果 .....	- 109 -
3-3-6	銅錯体による過酸化水素の分解効果 .....	- 110 -
第 4 章	循環水環境下で形成したバイオフィルムの菌叢解析 .....	- 113 -
4-2	実験方法 .....	- 115 -
4-2-1	循環水配管モデルにおけるバイオフィルムの形成と採取 (1) .....	- 115 -
4-2-2	循環水配管モデルにおけるバイオフィルムの形成と採取 (2) .....	- 115 -
4-2-3	16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析 .....	- 118 -
4-3	結果および考察 .....	- 118 -
4-3-1	バイオフィルム中の菌叢 .....	- 118 -
第 5 章	総括 .....	- 124 -
参考文献	.....	- 126 -
論文リスト	.....	- 137 -
謝辞	.....	- 138 -

# Studies on Analysis and Elimination of Bacteria in Devices for Water Circulation

Urara Ishizaki

Devices for water circulation are often contaminated by organisms such as bacteria, viruses and fungi, and the hygiene should be maintained especially in washing and bathing facilities. Dishwashers are one of the sources of bacterial contamination in dishes despite they comprise extreme environments such as high temperatures, high pHs, and the presence of detergents during their operation. Viable bacteria were isolated from 6 door-type and 8 conveyor-type dishwashers that were being used in food service facilities. Thermophilic bacteria, which grow at 60°C, were obtained from most sections of door-type rather than conveyor-type tested. The 16S rRNA sequences of the cultured isolates revealed that fewer Gram-negative bacterial strains were found in door-type dishwashers than in conveyor-type dishwashers. The most frequently identified bacterial species in the samples tested were spore-forming bacteria, such as *Bacillus* and *Anoxybacillus* species.

Sodium percarbonate (SP) is often included in pipe cleansers and laundry bleach, although the bactericidal effect is lower than that of chlorine-based agents. Effect of 2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid-chelated copper (MGDA-Cu) on the bactericidal effect of SP was evaluated. The addition of 12 mM MGDA-Cu increased the bactericidal effect of 0.5 wt% SP against *S. aureus* even in the presence of BSA, which is model of organic stain to protect bacteria from SP. MGDA-Cu was effective against *E. coli* only in the absence of BSA and showed little effect against *B. subtilis*. It enhanced the effect of SP to decrease the viscosity of sodium alginate, which is one of the major components of biofilms. The effect of MGDA-Cu on sanitization was also evaluated by 16S rRNA amplicon sequencing of the bacterial flora of the biofilm on an experimental model of a circulating water pipe. The structure of the bacterial flora was more influenced by a cleanser containing both MGDA-Cu and SP than a cleanser with only SP, suggesting that MGDA-Cu increases the sanitization effect.

## 第 1 章 本研究の背景と目的

### 1-1 循環水装置について

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。食品工業分野においては、厨房で使用される業務用食器洗浄機、食品工場で原材料や加工食品を保管・輸送するコンテナを洗浄するための容器用洗浄機、野菜を洗浄する野菜洗浄機、飲料水分野でウォーターサーバーに使われるリターナブルボトル洗浄機などが挙げられる。いずれも装置内に洗浄剤と水を循環させて対象物を洗浄する装置であり、装置本体と循環ラインの衛生保持が課題となっている。食器は人が直接口にする食品と接触するものであるため、これらを洗浄する装置には環境水や食品由来の有害微生物の制御が求められる。循環式浴槽では、浴槽の水をろ過と加温を繰り返し再利用するため、水系由来のレジオネラ属菌が問題となる。レジオネラ属菌によるレジオネラ症を防止するために、薬剤注入による循環水の殺菌維持や、洗浄殺菌による配管内のバイオフィルムの発生制御といった衛生管理が求められる。

### 1-2 食品分野における衛生管理

食品による食中毒事例や事故は後を絶たず、消費者の食の安心・安全に対する関心は益々高まっている。国内では 2018 年に食品衛生法が一部改正され、2020 年 6 月には「食品を取り扱うすべての事業者は、食品衛生上の危害発生防止のために HACCP（Hazard Analysis Critical Control Point: 危害分析重要管理点）に基づく衛生管理について計画を定めなければならない」とする、HACCP の制度化が施行されている。従来の衛生管理は、製造に関わる施設や設備、食材の取り扱い方法等を定め、最終製品のこの基準に対する適合を検査によって確認するもの

であった。HACCPに基づく衛生管理では、製造に関わるだけでなく、原材料の受け入れから、製造、製品の出荷までの各工程において、食中毒などの健康被害を引き起こす可能性のある危害要因を分析する。HACCPはこれらの危害要因を科学的根拠に基づき管理し、最終製品が安全であることを証明する手法である。国内では、1995年に特定の業種を対象とした「総合衛生管理製造過程の承認制度」が、HACCPによる衛生管理のスタートであるが、今般その対象範囲が食品を取り扱う全事業者に広がった。注意すべきは、HACCPによる衛生管理はあくまで手法であり、食品衛生の基本である「一般衛生管理」が土台として浸透していないと意味を成さないという点である。

一般衛生管理は、食品の取り扱いから、従業員、施設設備、機械器具類、使用水、排水・廃棄物の衛生管理に至るまで多岐にわたっている。環境微生物検査は、一般衛生管理の重要な管理手法のひとつであり、測定したデータは汚染源の特定や汚染実態の把握、危害分析、環境改善策の立案、日常の洗浄殺菌作業の効果検証・改善などに役立てられる。食品製造現場で広く用いられる環境微生物検査には、微生物の数や種類を測定する培養法、清浄度を評価する ATP (Adenosine Triphosphate ; アデノシン三リン酸) 測定法、タンパク質測定法などがあり、目的や場面によって使い分けされている。培養法では、表面付着菌や液中微生物、空中浮遊微生物をサンプリングして培養し、菌数や病原菌の有無を調べる。更に汚染源の特定や対策が必要な場合は、属または種レベルまで同定を行う。ATP測定法は、微生物を含む汚れの度合いを測定する方法である。ATPは生きているすべての細胞内に含まれる物質で、熱にも比較的安定なため、生菌体を迅速に検査できる。細菌の ATP 量と菌数には相関性があるため<sup>1)2)3)</sup>、微生物や食品残渣などの汚れの指標となる。ホタルの発光原理を利用し、ATP がルシフェリンと共にルシフェラーゼによって加水分解される際に発光するフォトンを経電計にて測定し、発光量として数値化される。非常に短時間で清浄度の確認ができるため、

迅速検査法として食品製造現場などで最も汎用的に用いられている。タンパク質測定法は、スワブ法により残留タンパク質を検出する簡易検査キットで、洗浄作業の効果確認に用いられる。

### 1-2-1 国内の食中毒発生状況

日本国内における近年の食中毒の発生状況は、発生件数は横ばいで 2019 年は 1,061 件、患者数はやや減少傾向にあり 2019 年は 13,018 人であった (Fig. 1-1)。原因物質別にみると、発生件数はアニサキス、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ、ノロウイルスの順で多く (Fig. 1-2)、患者数はノロウイルス、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ、ウエルシュ菌の順が多かった<sup>4)</sup> (Fig. 1-3)。

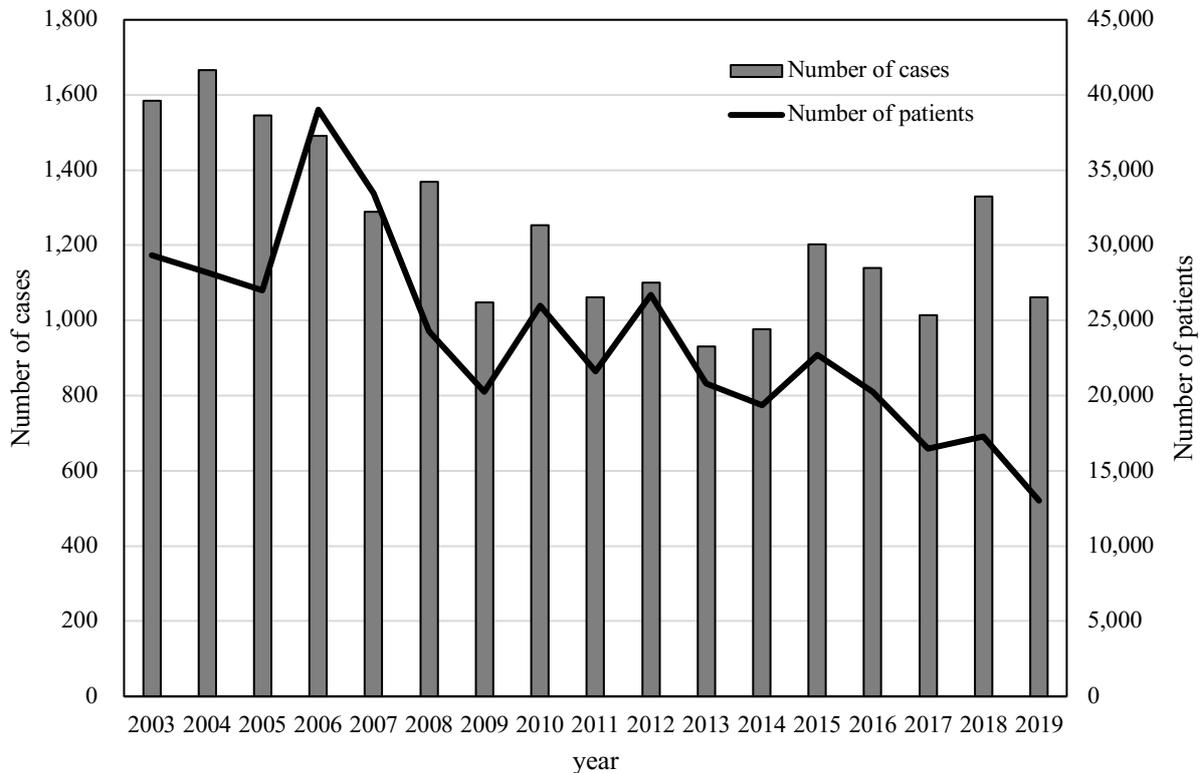


Fig. 1-1. Outbreak of food poisoning in Japan.

The number of food poisoning cases and the number of patients in Japan since 2003 are shown.

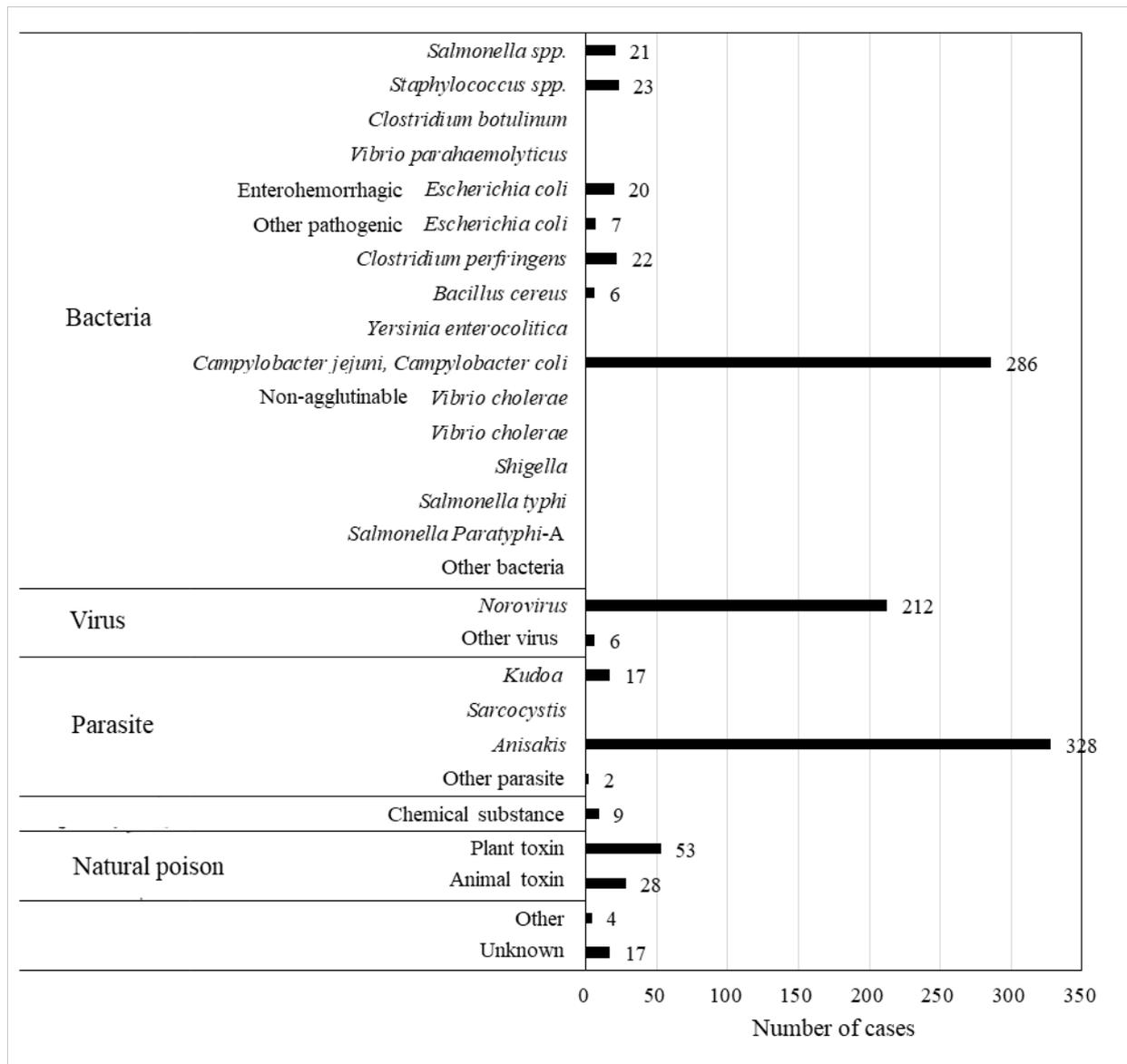


Fig. 1-2. Number of food poisoning cases in 2019.

*Anisakis*, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* caused most cases of food poisoning in 2019.

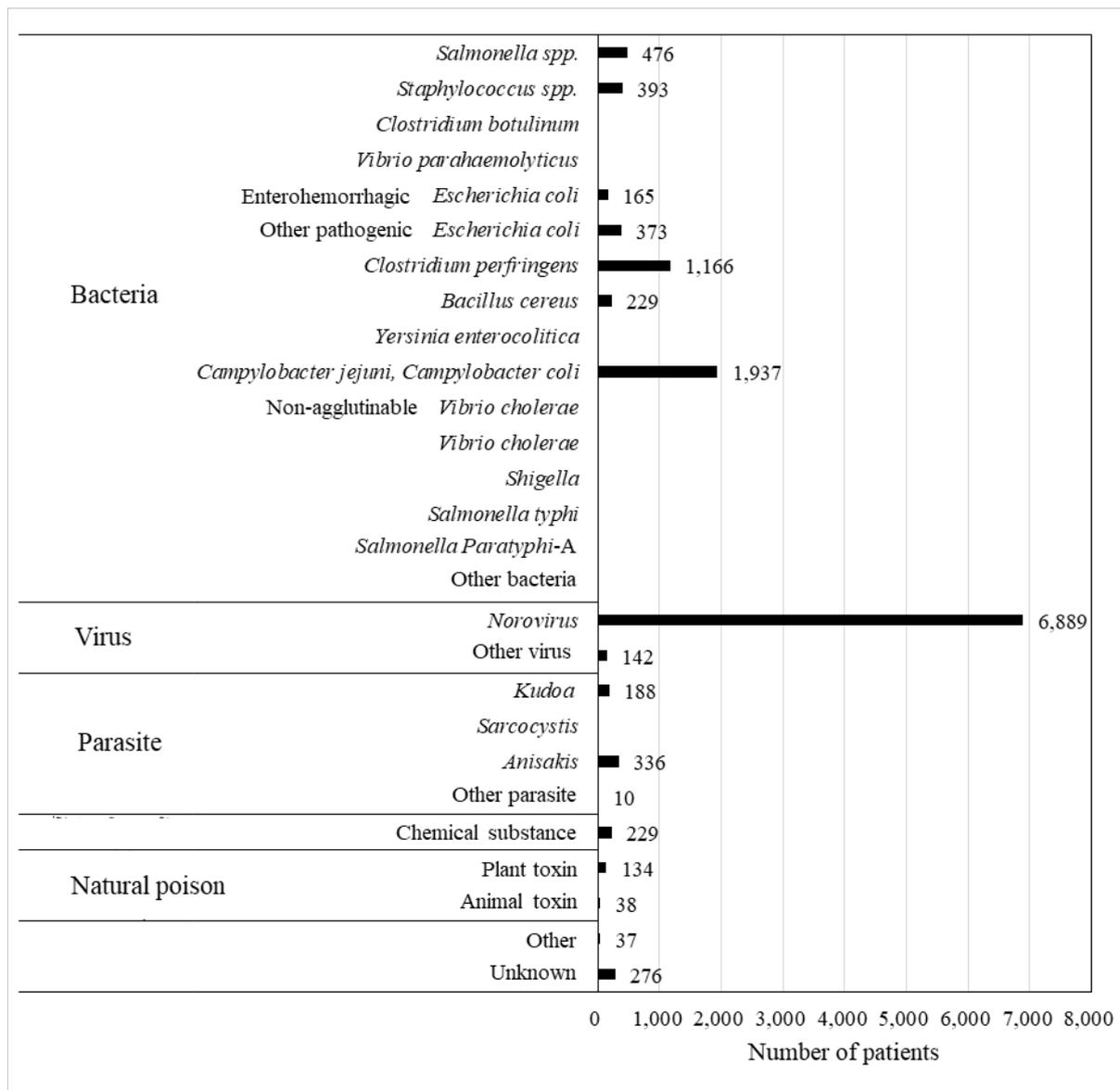


Fig. 1-3. Number of food poisoning patients in 2019.

Most patients of food poisoning are infected with *norovirus*.

### 1-2-2 食品分野における有害微生物

食品において取り上げられる微生物には、食品を腐敗する微生物と人体に影響を与える病原微生物がある。ここでは、食中毒の原因菌となる病原微生物について述べたい。食中毒には細菌性とウイルス性のものがあり、細菌性食中毒には黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ、腸炎ビブリオ、セレウス菌、ウエルシュ菌、ボツリヌス菌など、

ウイルス性食中毒にはノロウイルスが挙げられる。

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒトや動物の皮膚（特に化膿した傷）や鼻腔内、喉などに分布している。健康なヒトでも約 4 割のヒトが鼻や髪の毛、皮膚に本菌を保菌している<sup>5)</sup>。*S. aureus* はグラム陽性球菌で、食品中で増殖する際にエンテロトキシンという毒素を産生し、この毒素によって食中毒が引き起こされる。エンテロトキシンは耐熱性が強く、100℃・20 分の加熱でも分解されない<sup>5)</sup>。潜伏期間は喫食から 30 分から 6 時間で、症状は激しい吐き気・嘔吐・下痢・腹痛などである<sup>5)</sup>。原因食品は、調理従事者の手指を介して汚染された食品（弁当、おにぎり、サンドイッチ、生菓子）が多い。

大腸菌(*Escherichia coli*)はヒトや動物の腸管内に生育しており、グラム陰性桿菌である。*E. coli* の大部分はヒトには無害であるが、病気を引き起こす病原大腸菌が 5 種類あり、腸管出血性大腸菌(*Enterohemorrhagic E. coli*; EHEC)、腸管病原性大腸菌(*Enteropathogenic E. coli*; EPEC)、細胞侵入性大腸菌 (*Enteroinvasive E. coli*; EIEC)、毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic E. coli*; ETEC)、腸管付着性大腸菌 (*Enteroadherent E. coli*; EAEC) に分類される<sup>6)7)</sup>。その中でも強い病原性を持つのが EHEC である。EHEC の血清型は 100 種類以上あり、国内において分離された EHEC の血清型は O157 が最も多く、次いで O26、O111 となっている<sup>7)</sup>。少量の菌量（10 から 100 個程度）で発症するため、食品のみでなくトイレから感染することもある。EHEC 潜伏期間は喫食から 4 から 8 日で、症状は、下痢・血便・激しい腹痛・嘔吐・吐き気・発熱などである<sup>6)</sup>。EHEC が産生するベロ毒素という強力な毒素が大腸の血管壁を破壊し、血便が出る。原因食品は、糞便に汚染された食肉やその加工品、その牛糞堆肥で汚染された土壌・水などである。

サルモネラ属菌(*Salmonella spp.*)は、鶏、豚、牛等の動物の腸管内に分布する、通性嫌気性グラム陰性桿菌である。ヒトから分離されるサルモネラはほとんどが *Salmonella enterica subsp. enterica* で、乾燥に強く、少量の菌で感染すること

もある。サルモネラ属菌の潜伏期間は喫食から 12 から 48 時間で、症状は、腹痛、38 から 40℃の発熱・下痢・嘔吐などである<sup>8)</sup>。原因食品は、卵やその加工品、鶏肉、食肉、内臓肉、ウナギ、スッポンなどである。

カンピロバクター属菌(*Campylobacter spp.*)は、鶏、牛、ペット、野鳥、野生動物などの腸管に生息する、グラム陰性桿菌の微好気性菌である。*Campylobacter spp.* による食中毒は *Campylobacter jejuni*、*Campylobacter coli* によるものが多く、少量の菌量の接種で発症する<sup>6)</sup>。潜伏期間は喫食から 2 から 7 日と比較的長く、症状は腹痛・下痢・発熱・頭痛・嘔吐などである。*Campylobacter spp.* は熱に弱く、増殖温度域は狭いが、*Campylobacter jejuni* は低温でも生存できる<sup>6)</sup>。原因食品は、鶏のたたきや鶏レバーなど調理時に加熱が不十分なものが原因となることが多い。

腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)は、海底の泥の中に生息する細菌で、海水温度が高くなる夏場に海産魚介類などに付着する。*V. parahaemolyticus* は好塩性で、塩分 2 から 5 %で良く生育し、真水に弱く、増殖速度が速いのが特徴である。潜伏期間は喫食から 8 から 24 時間で、症状は激しい腹痛・下痢・発熱・嘔吐などである。原因食品は刺身などの生鮮魚介類やその加工品が多い。

セレウス菌(*Bacillus cereus*)は、土壌や河川など自然界に広く分布する、グラム陽性芽胞形成菌で、強い耐熱性を持つ。*B. cereus* は毒素を産生し、この毒素が食中毒を引き起こす。*B. cereus* による食中毒には嘔吐型と下痢型があり、国内では嘔吐型によるものが大半を占めている。嘔吐型は、食品中で作られるセレウリドと呼ばれる環状ペプチドの毒素によるもので、下痢型は体内に入った菌が小腸で増殖する際に作られる蛋白質の毒素によるものである<sup>6)</sup>。嘔吐型の潜伏期間は喫食から 1 から 5 時間で、症状は嘔吐・吐き気である。下痢型の潜伏期間は喫食から 8 から 16 時間で、症状は下痢・腹痛・腹部痙攣・吐き気である<sup>9)</sup>。原因食品は米や小麦などの穀類が多いが、本菌は様々な原材料から検出される。

ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、土壌、ヒトの動物の腸管内など自然界に広く分布している。*C. perfringens* はグラム陽性芽胞形成菌で、無酸素状態で増殖でき、酸素存在下では増殖できない偏性嫌気性細菌である。本菌は、増殖する際にウエルシュ菌エンテロトキシンという毒素を産生する。この毒素は易熱性のタンパク質で加熱（60℃・10分）により容易に不活化される<sup>10)</sup>。潜伏期間は喫食から6から18時間で、症状は下痢・腹痛である<sup>10)</sup>。原因食品は、大量調理され保存されたカレーやスープなどで、加熱攪拌不足によるものが多い。

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、土壌や河川、海など自然界に広く分布している。*C. botulinum* はグラム陽性芽胞形成桿菌で、偏性嫌気性菌である。非常に毒性の強い神経毒素を作るが、易熱性で、加熱処理（80℃・30分）で失活する<sup>11)</sup>。潜伏期間は、喫食から12から24時間で吐き気、嘔吐、下痢に次いで、脱力感・倦怠感・めまい・嚥下障害・便秘・視力障害・呼吸困難などの神経麻痺症状が起こる<sup>6)</sup>。原因食品は、缶詰め、瓶詰め、真空パック食品、発酵食品などが多い。

ノロウイルス(*Norovirus*)は、プラス1本のプラス鎖RNAを有し、エンベロープを持たないウイルスである。*Norovirus* は細菌よりも小さく、粒子径は30から38 nmで、ヒトの腸管でしか増殖しない。ヒトの腸管内やカキなどの2枚貝に分布している。環境中で抵抗性が強く長期間生存でき、少量のウイルス量（10から100個）で感染する。潜伏期間は、喫食から24から48時間で、下痢・嘔吐・発熱・吐き気・腹痛などである。原因食品は、加熱不足の二枚貝の喫食であるが、調理従事者の手指などを介して二次汚染された食品がこのウイルスによる食中毒の全体の8割を占めている。

### 1-3 食品分野における機械洗浄

食品分野における機械洗浄は多岐にわたる。ホテル、レストラン、事業所給食

などの大量調理施設においては、短時間で大量の食器類を洗浄するための業務用自動食器洗浄機（以下、食洗機と略す）が使用されている。食品工場では、原材料や加工食品を一次保管するための内コンテナや流通で用いられる外コンテナを洗浄するための容器用洗浄機や、ホール野菜やカット野菜洗浄に用いる野菜洗浄機などがある。

本研究では、業務用食洗機の微生物による汚染実態について調査を行った。有害微生物による健康被害としては、細菌性、ウイルス性、カビ毒によるものがあるが、カビ毒による食中毒は限定的であることと、ウイルスは食品中や食洗機等の環境中では増殖しないことから、対象を細菌に絞り分析した。

### 1-3-1 日本における業務用食器洗浄機の歴史

日本において食洗機の普及が本格化したのは第2次世界大戦後のことである。学校給食の普及、事業所や病院での集団給食が始まった頃は、大量の食器を中性洗剤で手洗いを行っていたが、すすぎ作業に労力がかかることから、すすぎ工程で食洗機を利用するようになった。その後、1964年の東京オリンピックを機に国内でホテルブームが起こり、ホテルの厨房内に米国産の食洗機が次々と導入された。現在では、客席数の少ない小規模店舗を除くと、集団給食、ホテル、レストラン、チェーン店での食洗機の普及率はほぼ100%である<sup>12)</sup>。

### 1-3-2 業務用食器洗浄機の原理

現在の食洗機の主流はスプレー（噴射）タイプである。温水の噴射によるウォーターナイフと呼ばれる物理的な力を利用しており、食器表面に付いた汚れを削り取る効果がある。洗浄水は上下の洗浄ノズルから噴射され、温度、水圧（物理力）、洗浄剤（化学力）の3要素の相乗効果によって汚れが落ちる仕組みである。洗浄工程の後、すすぎノズルからすすぎ湯が噴射され、食器表面の洗浄液が

すすがれるすすぎ工程がある。

業務用食洗機の各工程の所要時間は、洗浄工程からすすぎ工程を合わせてもわずか1分程度である。各工程における温度は、洗浄温度が60から70℃、仕上げすすぎ温度が80から85℃に設定されている。洗浄温度が60から70℃に設定されている理由は、油脂、タンパク、デンプンなどの食品汚れが最も効率よく除去できる温度帯であるためである。また、仕上げすすぎの温度が80℃以上になると、食器の乾燥が促進され、熱による除菌効果で食器をより衛生的に保つことが可能となる。

### 1-3-3 業務用食器洗浄機の種類

業務用食洗機は、食器の処理能力によって小型のものから大型のものまで種類は様々であり、バッチ式洗浄とコンベア式洗浄機に分類される。バッチ式には、アンダーカウンタータイプ、フードタイプ、ドアタイプがあり、装置の内側に食器を並べたラックを据え置き、洗浄から仕上げすすぎまでを同区画で行う(Figs. 1-4, 1-5)。洗浄タンクの洗浄水は繰り返し使用され、すすぎ湯(新水)が入ることにより洗浄水がオーバーフローし、一部が置き換わる仕組みとなっている。アンダーカウンターは小型で場所をとらないため、喫茶店などの小規模店やグラス洗浄専用として使用されることが多い。ドアタイプは小規模から中規模の飲食店・レストランなどで幅広く使われており、フードタイプはアンダーカウンターとドアタイプの中間である。

一方、コンベア式には、ラックコンベア、ラックレスタイプがあり、食器はラックまたはコンベアに並べられ、洗浄から仕上げすすぎの各工程を移動しながら洗浄される(Figs. 1-6, 1-7)。機種によっては、洗浄、仕上げすすぎの2工程のものから、予備洗浄、洗浄、循環すすぎ、仕上げすすぎの4工程を備えたものまである。コンベア式の水の流れは向流式となっており、最終工程の仕上げすすぎ

槽にはタンクがなく、使用済みのすすぎ湯は、前工程の循環すすぎタンク、洗浄タンク、前洗いタンクへと戻され再利用される。食器自体が移動するため、連続処理ができるというメリットがあり、短時間で大量の食器を洗浄するホテルの宴会場や、事業所、学校、病院などの給食施設などで利用される。

近年は、省エネや洗浄剤の使用量削減の観点から洗浄タンクの容量が徐々に小さくなり、すすぎ水量も従来の半分以下の節水タイプが主流となってきている。持ち込まれる汚れの量は変わらないため、新水による洗浄水の入れ替わりが少なくなると、洗浄水が汚れやすくなるため、より優れた洗浄力を有する洗浄剤が求められている。また最近では外食産業の人手不足に対応するために、AIロボットなど無人化を手助けできるシステムも開発されている。

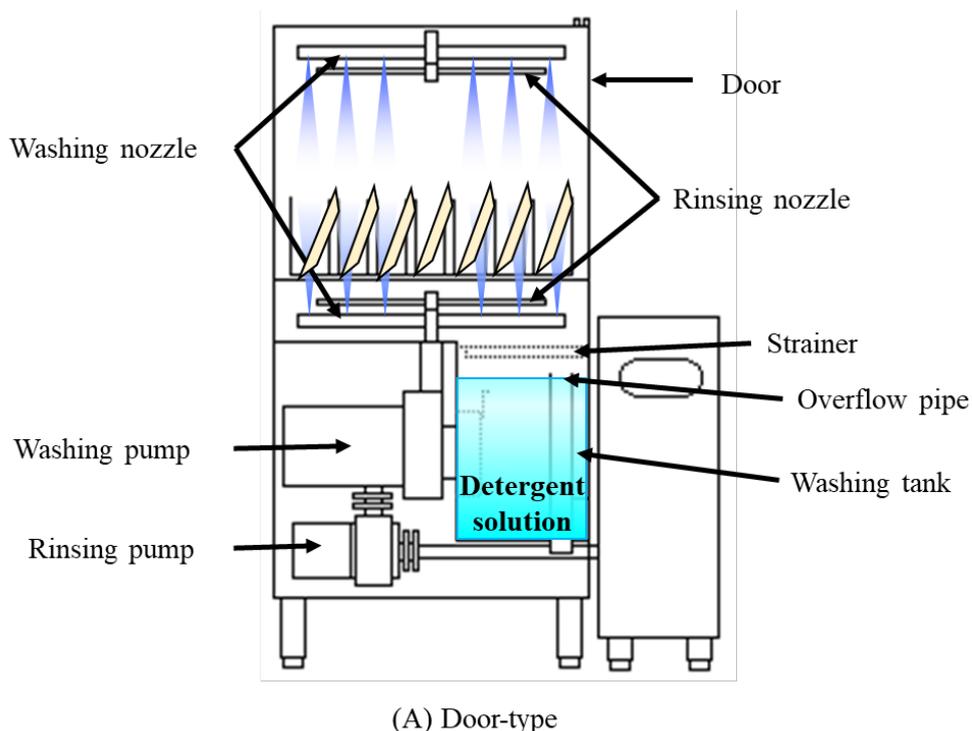


Fig. 1-4. Diagrammatic representation of door-type dishwasher.

Washing process and rinsing process are performed in the same room. In the washing process, the detergent solution of washing tank is ejected from the top and bottom washing nozzles. In the rinsing process, fresh water is ejected from the top and bottom rinsing nozzles. Part of rinse water is reused for the detergent solution.

(a)



(b)



(c)



(d)



Fig. 1-5. Exterior and inside of door-type dishwasher.

(a)Exterior of door-type dishwasher. (b) Inside the door. (c) Washing nozzle and rinsing nozzle.  
(d) Washing tank

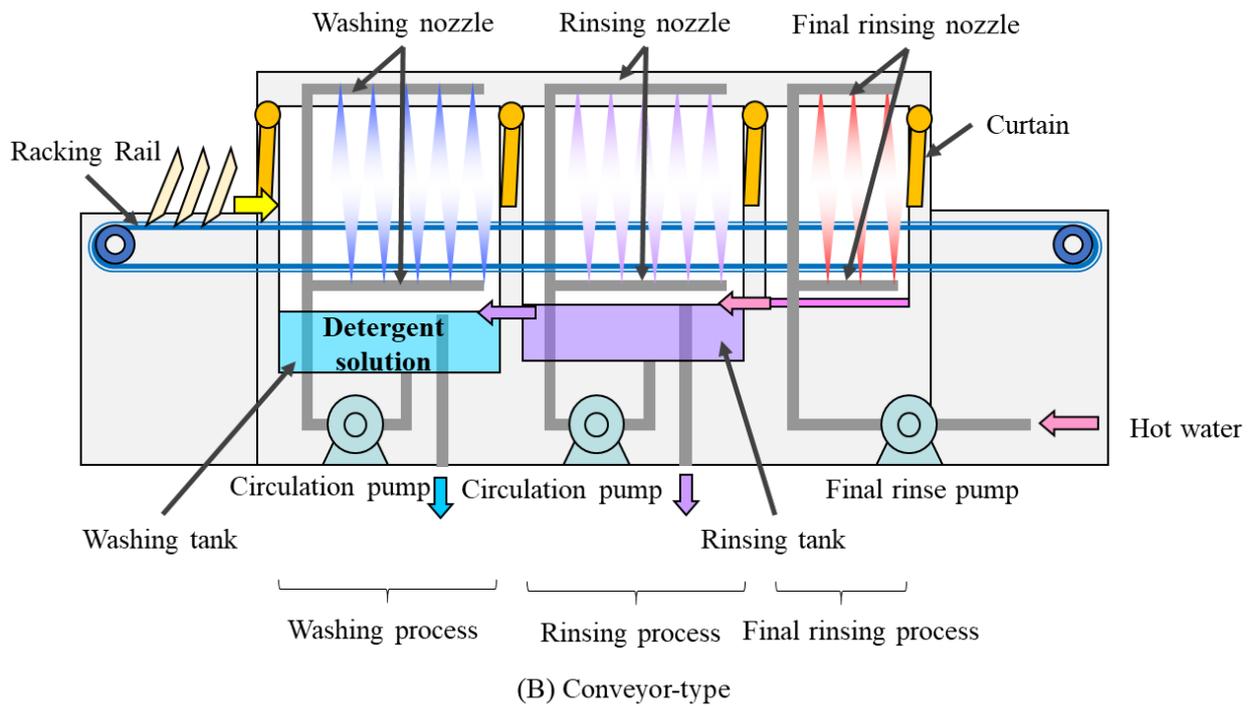


Fig. 1-6. Diagrammatic representation of conveyor-type dishwasher.

Washing process and rinsing process are separated for each process, and the tableware moves on the rack rail. In the washing process, the detergent solution of washing tank is ejected from the top and bottom washing nozzles. In the rinsing process, fresh hot water is ejected from the top and bottom rinsing nozzles. Hot water used for final rinsing process is reused for rinsing process and part of water in the rinsing tank is reused for the detergent solution.

(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



Fig. 1-7. Exterior and inside of conveyor-type dishwasher.

(a) Exterior of rack-conveyor-type dishwasher. (b) Rack rail and washing nozzle of rack-conveyor-type. (c) Exterior of flight-conveyor-type dishwasher. (d) Slot of tableware of flight-conveyor-type. (e) Washing nozzle of flight-conveyor-type. (f) Rail of flight-conveyor-type.

家庭用食洗機と業務用食洗機では、工程とその所要時間が異なる。家庭用の場合は、洗浄、すすぎ、乾燥工程があるが、業務用の場合、洗浄、すすぎ工程のみで乾燥工程はない。所要時間は、食洗機の場合、洗浄工程に 15 から 20 分、すすぎ工程に 20 から 30 分、乾燥工程に 30 分で合計 70 から 80 分かかるのに対し、業務用の場合、洗浄からすすぎまでのすべての工程に必要な時間はわずか 1 分程度である。

#### 1-3-4 業務用食器洗浄機用洗浄剤

業務用食洗機では短時間で大量の食器類を洗浄しなければならないため、洗浄工程では強力な洗浄力を有するアルカリ性の洗浄剤が使用される。洗浄剤が溶けた洗浄液の pH は 10 から 12 と非常に高い。洗浄剤の形状には、液体、粉体、固体（ブロック状の固形、ペレット、タブレットなど）があり、これらは専用の自動供給装置を用いて、食洗機庫内の洗浄タンクに所定量添加される。洗浄剤の濃度は、定量供給方式または電気伝導度による濃度感知方式により制御される。

洗浄液は高圧でスプレー噴射されるため、その泡で機械力を妨げないように、洗浄剤は低起泡性であることが必須条件である。主成分は、水溶性の無機塩（アルカリ）とキレート剤である。アルカリ剤の化学作用により、タンパク質はより低分子量のペプチドやアミノ酸に、油脂はケン化反応により石鹼に分解され除去される。アルカリ剤は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、珪酸塩、炭酸塩などが用いられる。特にタンパク質汚れに対する洗浄力は、アルカリ剤のアルカリ強度や濃度に比例して向上する。キレート剤は水質調整剤の役割を担い、カルボン酸塩などが用いられている。食洗機は高温となるため、使用水中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンの濃度が高い（硬度が高い）と、水分が蒸発した際に庫内に水垢（スケール）が付着しやすくなる。またアルカリ剤自体も空気中の二酸化炭素ガスを吸収して炭酸スケールを生成しやすい。更に、油脂汚れがアル

カリによって鹼化されて生成する石鹼は、水中の金属イオンと結びついて金属石鹼になり、洗浄を阻害する。キレート剤は水を軟化することで、スケール付着防止と洗浄力の維持に寄与している。これらの成分以外にも、分解された汚れによる発泡抑制や洗浄の補助のために低泡性ノニオン界面活性剤を用いたり、食器の漂白やくすみ防止のために塩素系漂白剤を用いたりする場合がある。

すすぎ工程では、食器類をより素早く衛生的に乾燥させるために、すすぎ湯に乾燥仕上げ剤（リンス剤と呼ばれる）を添加することが多い。リンス剤の成分には、グリセリン脂肪酸エステルやソルビタン脂肪酸エステルなどの食品添加物グレードの非イオン型界面活性剤が用いられる。リンス剤は、食器表面に付着したすすぎ水の表面張力を下げて水滴を均一に薄くのばすことで、乾燥の促進とウォータースポットの発生を抑制する効果がある。最近では洗浄剤に表面改質ポリマーを添加して、洗浄と同時にリンス効果（水切れ促進とウォータースポット抑制）を付与させたリンス剤不要洗浄剤も市場に受け入れられている。

### 1-3-5 食器洗浄機における洗浄剤の除菌効果

市販の洗浄剤を用いて、ドアタイプ洗浄機およびコンベアタイプ洗浄機にて、食器に食品汚れと菌液（大腸菌 *E. coli* O55 と土壌菌）を付着させ、その除菌効果を試験した報告例がある。この実験において洗浄後すべての大腸菌は除去されたが、土壌菌はわずかに残存した<sup>12)</sup>。

### 1-3-6 食器洗浄機庫内の汚染実態

家庭用食洗機の衛生実態に関する報告例がいくつかある。浜田らは食器洗い乾燥機のカビ汚染について調査しており、家庭用食洗機では乾燥工程があるものの、パッキン部分や洗浄水からカビの一種である *Exophiala dermatitidis* が多数検出されたと報告した<sup>13) 14)</sup>。検出されたカビは、好温性のものが大多数である

ことが分かっている<sup>13) 14)</sup>。また、Raghupathi らによる研究では、微生物は、食洗機のような高温、高 pH、高塩濃度、洗浄剤がある極限状態でも生育でき、食洗機のゴム製シール部分のバイオフィームからは細菌や真菌が分離されたことが報告されている<sup>15)</sup>。Zupančič によると、ゴム製シール部分に形成されたバイオフィームには多種多様な細菌と真菌が存在し、特定の細菌の組み合わせでバイオフィーム形成の相乗効果が認められ、*Exophiala dermatitidis* が含まれると細菌数と真菌数が増加することが確認されている<sup>16)</sup>。

## 1-4 循環浴槽の配管における水環境

### 1-4-1 レジオネラ感染症

世界で初めてレジオネラ症 (Legionellosis) が認知されたのは、1976 年米国フィラデルフィアの在郷軍人会で集団肺炎が発生したことに遡る<sup>17)</sup>。この感染源として、会場となったホテルの冷却塔が推定されている<sup>18)</sup>。その後、海外ではレジオネラ症の集団感染が毎年のように発生している。国内では 1981 年にレジオネラ肺炎の症例が報告されているが、その認知度が高まったのは 2000 年以降で、届出数が増えてきたのは近年になってからである。

レジオネラ症の病原菌であるレジオネラ属菌は、自然界の水系や土壌に広く存在する。この菌は冷却塔や循環式浴槽、温泉、給水・給湯設備、噴水等の水景施設、人工的な水利用施設 (人工環境水) で増殖し、これらの菌が感染源になることが知られている。

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila* を代表とするレジオネラ属菌による四類感染症で、レジオネラ属菌を含む水しぶき (エアロゾル) や粉塵を吸入することにより感染し発症する。レジオネラ症の潜伏期間は、2 から 10 日である。レジオネラ症には重症の肺炎型と軽症のポンティアック熱型があり、肺炎型では、全身倦怠感、頭痛、食欲不振、筋肉痛などの症状に始まり、咳や 38°C 以上の

高熱、悪寒、胸痛、呼吸困難が見られるようになる。ポンティアック熱型では、発熱、寒気、筋肉痛などの症状で、数日で治ることが多い。肺炎を起こす危険性が高い高齢者や新生児喫煙者、大酒家、透析患者、移植患者、免疫機能が低下している人は、レジオネラ属菌による感染リスクが高いとされている。

日本国内におけるレジオネラ症の発生件数は年々増加傾向にあり、2019年には2,300件に達している (Fig. 1-8)。過去39年間に発生したレジオネラ症の感染源で発生件数が最も多いのは循環式浴槽で、全体の70%を占めている<sup>19)</sup> (Fig. 1-9)。

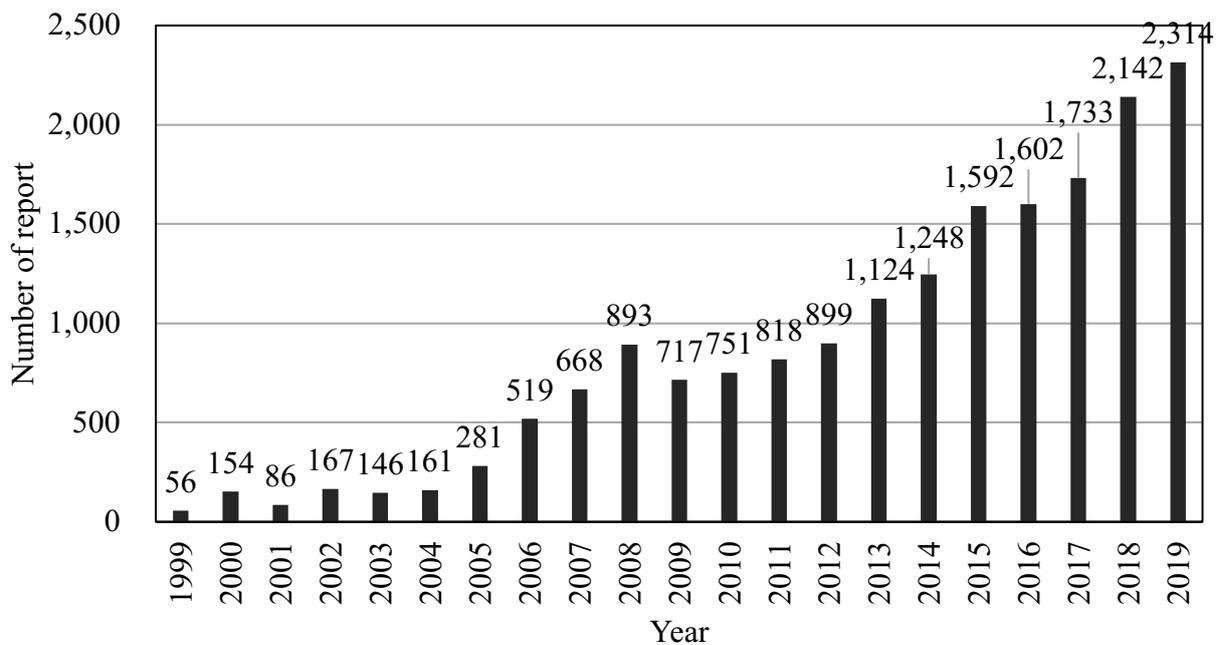


Fig. 1-8. Transition of *Legionella* infection.

The increase in the number of reports of *Legionella* infection in Japan.

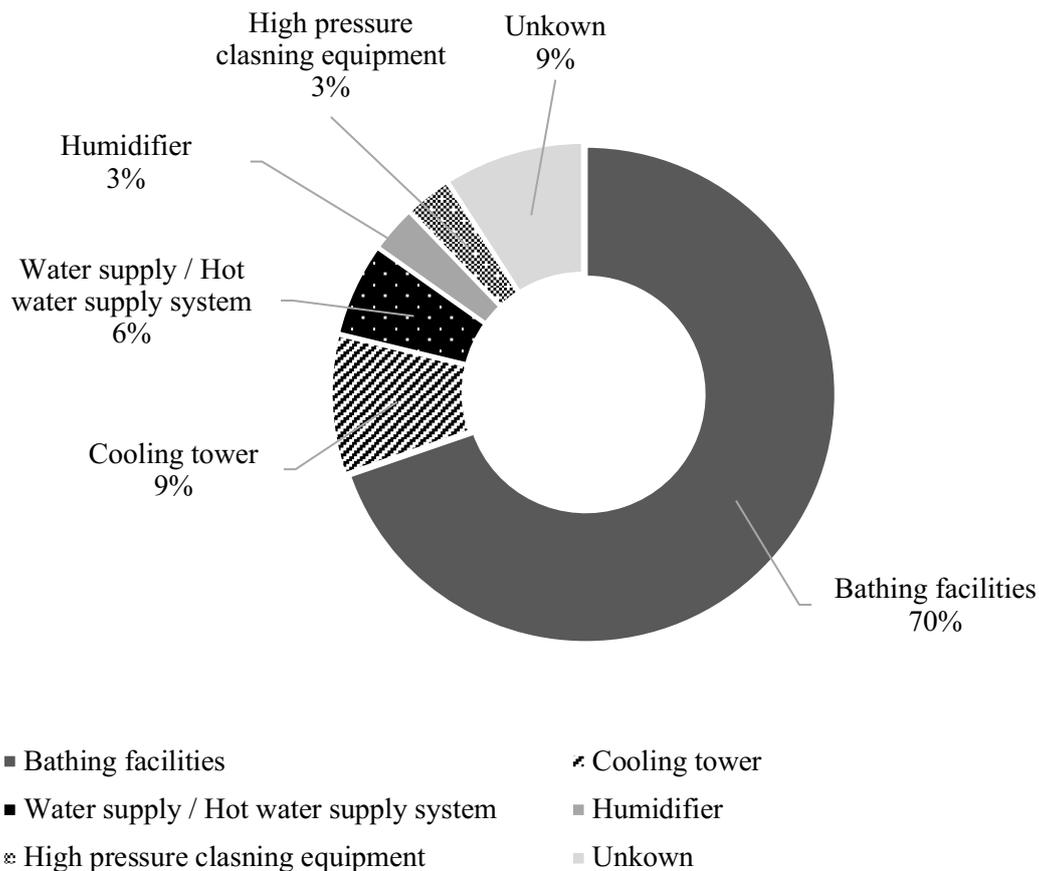


Fig. 1-9. Source of infection for Legionnaires' disease (1980-2018).

Sources of infection for Legionnaires' disease during 39 years are shown. More than 70% of the infections occurred in bathing facilities.

#### 1-4-2 レジオネラ属菌

レジオネラ属菌は好気性のグラム陰性桿菌であり、鞭毛を持つ。レジオネラ菌は河川、池、沼、温泉、土壌などに広く分布し、環境中ではアメーバなどの原虫や藻類内に寄生して増殖するのが特徴である。この菌の至適発育 pH は  $6.9 \pm 0.1$ 、至適発育温度は  $36^{\circ}\text{C}$  前後で、 $45^{\circ}\text{C}$  から  $50^{\circ}\text{C}$  以上では増殖しないか死滅する。これまでに報告されているレジオネラ属菌の菌種は 60 種類を超えており、その中でも冷却塔水や温泉水、循環式浴槽から検出される頻度が高いのが *Legionella pneumophila* である。感染菌としてヒトから分離される菌種もこの *L. pneumophila* が多い。

### 1-4-3 バイオフィルムとレジオネラ属菌

バイオフィルム (Biofilm) とは、微生物が固体表面に付着して増殖する時に形成する、生物膜である。バイオフィルムは、多糖類、タンパク質、DNA などの細胞外高分子基質 (EPS ; Exopolymeric substances) や無機塩類などが、微生物細胞を包み込んだ構造を有している。固体表面におけるバイオフィルムの形成過程について示す。まず固体表面が汚れ等によって微生物が付着しやすい状態になると、コンディショニングフィルムが形成され、微生物が更に可逆的に付着できるようになる。微生物は鞭毛運動やブラウン運動によって表面に近づき、その運動を停止し、より強い不可逆的付着に移行する。そこで細胞外に多糖やタンパク質、DNA などの EPS を排出し、マイクロコロニーからバイオフィルムへと成長していく。バイオフィルムは巨大化すると崩壊し、微生物は新しい環境に移動する<sup>20)</sup>。EPS は微生物細胞同士や微生物細胞と固体表面の接着、抗菌剤耐性に関わっている。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の EPS に含まれる細胞外多糖の主成分は、アルギン酸塩 (D-マンヌロン酸と L-グルロン酸が直鎖重合したポリマー) と Psl 多糖 (グルコース高含有するポリマー)、Pel 多糖 (D-グルコース、D-マンノース、L-ラムノースから成る分岐状の 5 多糖体ポリマー) である<sup>21)</sup>。

バイオフィルムは、細菌や真菌、原生動物などの微生物の温床となり、レジオネラ属菌にとって格好の増殖の場となる。バイオフィルム内部に生育する微生物は、その膜に守られているため、洗浄剤の除菌作用が低下し、物理的ストレスにも抵抗性を示す。よって、バイオフィルムを制御するためには、形成を抑制する環境を保持するか、物理的な除去あるいは化学的な洗浄除菌しか方法がない。

#### 1-4-4 循環浴槽でのレジオネラ属菌の増殖メカニズム

レジオネラ属菌は、循環式浴槽では配管内に発生するバイオフィルムの中でアメーバに寄生し増殖するため、除菌が不十分だと浴槽中に浮遊し出てくる。循環式浴槽におけるレジオネラ属菌の増殖メカニズムについて示す (Fig. 1-10)。水中には細菌や汚れが多く存在する。まず、一般細菌や従属栄養細菌が増殖し、バイオフィルムが付着し始める。徐々にバイオフィルムは厚くなり、アメーバが定着する。アメーバは食胞内にレジオネラ属菌を取り込んでいくが、レジオネラ属菌は消化を免れ、食胞内で増殖を開始する。レジオネラ属菌の増殖により、食胞は大きくなり、宿主アメーバは細胞としての機能を失い破裂する。これにより、レジオネラ属菌はアメーバの外に放出され、再び新しい宿主へと感染するというサイクルを繰り返す。

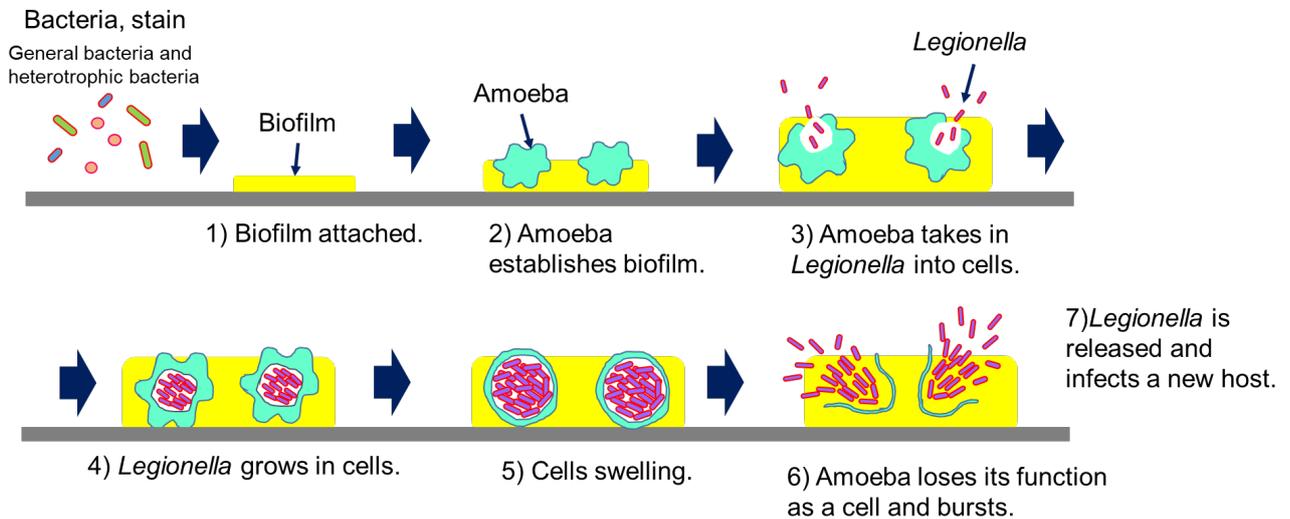


Fig. 1-10. Growth of *Legionella* in the circulating bath.

The growing process of *Legionella* in the circulating bath is shown. 1) First, general bacteria and heterotrophic bacteria grow and biofilm starts to attach. 2) Biofilm thickens and amoeba settles. 3) Amoeba uptakes *Legionella* into cells. 4) *Legionella* starts to grow in cells. 5) Cells swell by the growth of *Legionella*. 6) The host amoeba loses its function as a cell and bursts. 7) *Legionella* is released and infects a new host.

#### 1-4-5 循環浴槽の構造と洗浄

循環式浴槽の模式図を示す (Fig. 1-11)。浴槽のお湯は、集毛器、循環ポンプ、ろ過装置を通り、熱交換器で加温されて再び浴槽に戻る。配管内には、皮脂汚れ、石鹸カス、スケールなどの汚れが蓄積しているため、バイオフィームが多く付着していることが多い。通常時に浴槽水に注入される塩素濃度 (0.2 から 1.0 mg/L) では、バイオフィーム中のレジオネラ属菌の除菌には不十分であるため、日常的にバイオフィームの除去を行うことが重要である。

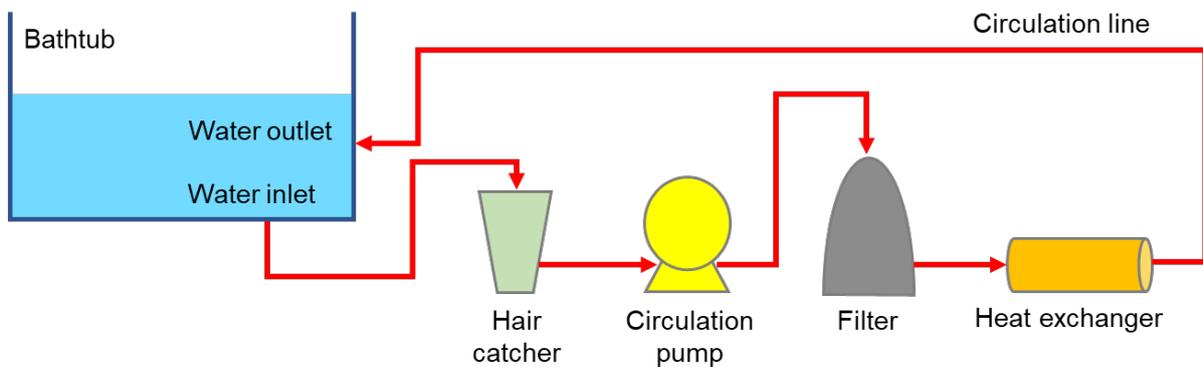


Fig. 1-11. Schematic diagram of circulating bath.

The hot water in the bath is passed through the hair catcher, circulation pump, and filter, is warmed by the heat exchanger, and is returned to bathtub. In the circulation line, a biofilm includes a large amount of dirt such as sebum stain, soap scum, scale.

循環浴槽の維持管理において、週に 1 回以上の高濃度塩素あるいは過酸化水素を配管内に注入して洗浄・消毒することがレジオネラ症予防指針に定められている<sup>22)</sup>。また、循環配管内にはバイオフィームが形成されやすいため、年に 1 回以上のバイオフィーム除去が必要とされ、過酸化水素 (Hydrogen peroxide) (2 から 3 %使用) による処理が推奨されている<sup>23)</sup>。しかしながら、過酸化水素は毒物及び劇物取締法で劇物に指定されており取り扱いに注意が必要であること、コスト面で高価であるといった課題がある。

#### 1-4-6 過酸化水素と過炭酸ナトリウム

過酸化水素は、化学式  $\text{H}_2\text{O}_2$  で示される無色透明の液体である。家庭用では衣料用漂白剤や工業分野では循環浴槽の配管洗浄剤や飲料用ボトルの殺菌剤などとして広く使用されている。炭酸ナトリウム過酸化水素付加物（Sodium carbonate-hydrogen peroxide (2/3)）は、通称、過炭酸ナトリウム（Sodium percarbonate；以下、SP）と呼ばれる。化学式  $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$  で示され、炭酸ナトリウムと過酸化水素が 2 mol : 3 mol の比率で混合された付加化合物である。SP は、水に溶解すると炭酸ナトリウムと過酸化水素に解離し、1%水溶液はアルカリ性（pH 10.5）を示す。過酸化水素は水中で水と酸素に分解するため、塩素系漂白剤と比較して環境負荷が低い。

SP は、粉末状の固体であるため、液体の過酸化水素に比べて安全性とハンドリング性に優れている。このため SP は、洗濯機の洗濯槽クリーナーや浴槽のパイプクリーナーとしてよく使用されている<sup>24)</sup>。綿の漂白工程における SP の適切な使用濃度は、0.6 wt%である<sup>25)</sup>。食品業界では、SP は食器類の漂白剤として使用されている。SP の漂白効果は高温では高いが、低温では低下する<sup>26)</sup>。SP の酸化能力は塩素系漂白剤よりも弱いため、衣類用途では漂白活性化剤と併用されることが多い。漂白活性化剤は、それ自体は漂白効果を持たない安定な化合物であるが、過酸化水素や SP と併用すると酸化力の高い有機過酸が生成し、この有機過酸が漂白効果を発揮する<sup>27)</sup>。

#### 1-4-7 金属錯体の活用

漂白活性化剤は、過酸化水素や SP と化学量論的反応によって漂白効果を高めるのに対し、金属錯体は触媒的にその効果を高める。金属錯体は、鉄、マンガン、亜鉛、銅などの金属イオンに配位子が結合した化合物である。配位子としてエチ

レンジアミン四酢酸 (EDTA) などのキレート剤が用いられる。衣類用洗浄分野では、漂白効果を高めるために漂白活性化剤が活用されてきたが、更に除菌活性向上のため金属錯体が併用されている。真島らは、過酸化水素と、漂白活性化剤のひとつであるアルカノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム (OBS)、および亜鉛とメチルグリシン二酢酸 2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid (MGDA) の錯体 (MGDA-Zn) との併用効果について報告している<sup>28)</sup>。OBS は過酸化水素との反応により有機過酸を生成するが、この報告において MGDA-Zn は、有機過酸の菌体への細胞膜透過を促進させ、有機過酸を分解する菌体内酵素の活性を阻害することが示された<sup>28)</sup>。また、錯体を形成するキレート種については、EDTA やニトリロ三酢酸 (NTA)、クエン酸、イミノ二酢酸 (IDA) などが検討されているが、MGDA が最も膜透過率が高いことを示している<sup>28)</sup>。

今回循環洗浄用途として着目した金属錯体は、除菌活性向上とキレート剤の生分解性の点から、MGDA と銅の錯体 MGDA-Cu (2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid-chelated copper) である。除菌効果を発揮するのは、過酸化水素が分解する際に生成するヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) やヒドロペルオキシラジカル ( $\cdot\text{OOH}$ ) などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) である。ROS の生成は、過酸化水素単独では進行しにくいですが、銅イオンの触媒作用により促進される。この反応速度は配位子となるキレート種によって制御ができる。ROS は反応性が高く、微生物のタンパクや DNA などの周囲の化学物質を非選択的に酸化し、損傷を与える<sup>29) 30)</sup>。銅錯体は、過酸化水素が存在する限り、触媒として ROS の生成に繰り返し使用される。汚れを分解した過酸化水素は、最終的に酸素と水に分解されるため、非常にクリーンな洗浄方法である (Fig. 1-12)。

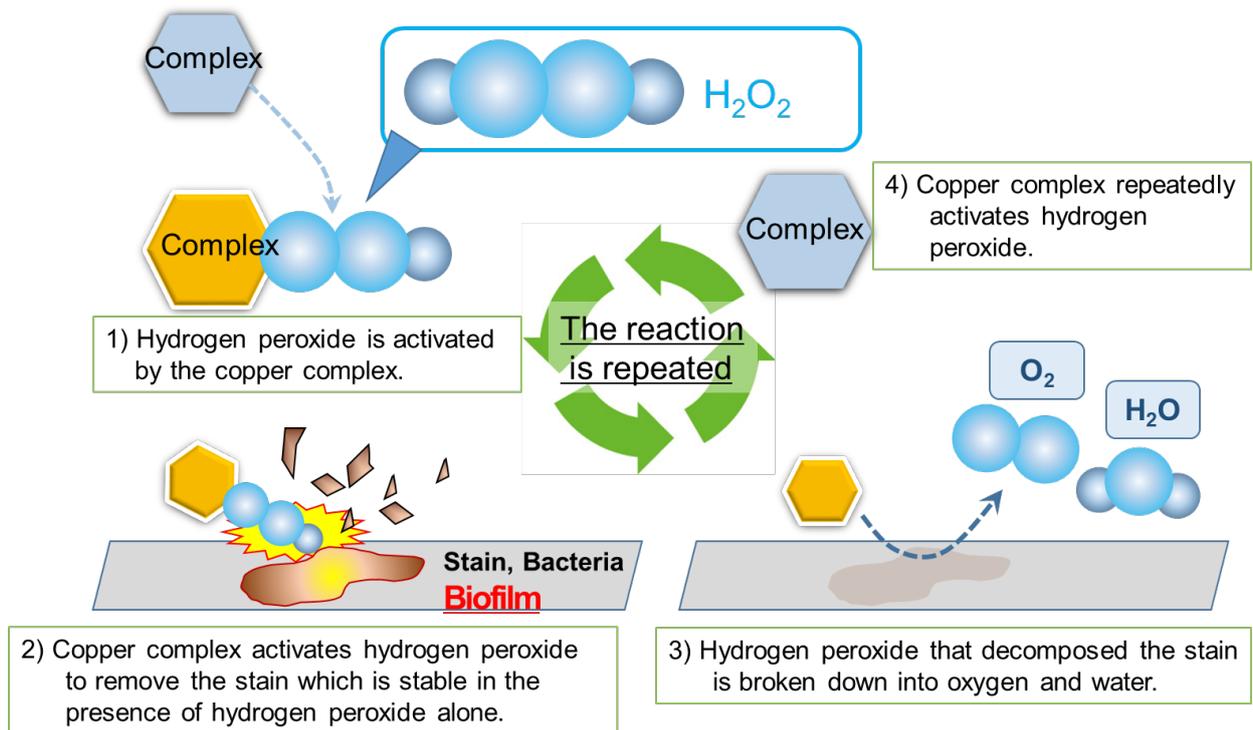


Fig. 1-12. Formation of reactive oxygen species by hydrogen peroxide and MGDA-Cu.

1) First, hydrogen peroxide is activated by the copper complex. 2) Next, copper complex activates hydrogen peroxide to remove the stain which is stable in the presence of hydrogen peroxide alone. 3) Next, the hydrogen peroxide that decomposed the stain is broken down into oxygen and water. 4) Copper complex repeatedly activates hydrogen peroxide.

## 1-5 本研究の目的

国際社会においては、2015年に持続可能な開発目標（SDGs）が国連サミットで採択され、日本も積極的に取り組んでいる。循環水装置の衛生保持を研究することは、すべての人々に健康な生活と安全な水を提供するという点で貢献できると考える。そこで本研究では、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と題し、業務用自動食器洗浄機および循環式浴槽に着目し、その微生物環境を解析し、衛生保持に有効な洗浄について提唱することを目的とする。

業務用食洗機では、食品衛生の観点から食洗機をより衛生的に保持し使用するために、実際の厨房で使用されている業務用食洗機を対象に、その汚染実態について調査した。培養によって得られた菌株の同定を行うことによって、食洗機の部位毎に生育する微生物の種類を解析し、ヌメリの付着要因の解明に役立てる。更にそれらの細菌に対する洗浄剤の制御効果を評価する。

循環式浴槽では、レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌が産生するバイオフィルムの除去が課題となっている。循環浴槽の配管に付着するバイオフィルムの除去には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。そこで、過酸化水素に代わる洗浄方法を提唱するために、過炭酸ナトリウムとその除菌効果を高める銅錯体について検討し、銅錯体の効果を菌体への除菌効果とバイオフィルム除去の側面からアプローチする。更に、モデル配管で作成したバイオフィルムを用い、銅錯体の有無が菌叢に与える変化を解析する。

## 1-6 本論文の構成

本論文は以下の第1章から第5章にて構成されている。

第1章 本研究の背景と目的

第2章 業務用自動食器洗浄機内の細菌の解析

第3章 過炭酸ナトリウムの除菌能力に対する銅錯体の効果

## 第 4 章 循環水環境下で形成したバイオフィルムの菌叢解析

## 第 5 章 総括

第 2 章では、2 つのタイプの異なる業務用食洗機 14 台（ドアタイプ、コンベアタイプ）から汚れを採取し、培養法によって中温細菌、好熱性細菌、真菌の菌数を測定した。さらに生育したコロニーを単離した株を 16S rRNA 遺伝子解析によって属を同定した。同定された株を食洗機の区画や工程別に菌叢解析し、その傾向を考察した。

第 3 章では、過炭酸ナトリウムに対する銅錯体の添加効果について、大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌、レジオネラ菌を用いて検証した。またバイオフィルムの構成成分であるアルギン酸ナトリウムを用い、銅錯体の添加有無によるバイオフィルム分解速度への影響を検証した。更に、実際の循環浴槽配管をサンプリングし、付着したバイオフィルムでの除去試験を行った。

第 4 章では、循環水実験モデルを用いてバイオフィルムを形成させ、過炭酸ナトリウムのみの場合と過炭酸ナトリウムに銅錯体を併用した場合とで循環洗浄を行い、バイオフィルム中の菌叢の比較を行った。菌叢解析は、培養が不要でかつ網羅的な遺伝子解析ができる次世代シーケンサー（アンプリコンシーケンシング）を用いた。

第 5 章では、総括として本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。

## 第2章 業務用自動食器洗浄機内の細菌の解析

### 要約

業務用自動食器洗浄機は、家庭用のものと比較して、より高い pH の洗浄剤で且つ高い温度で洗浄される。細菌にはこのような過酷な環境でも生育できるものがあり、これら細菌は被洗物を汚染する可能性がある。ホテル、レストラン、病院などで使用されているドアタイプ 6 台とコンベアタイプ 8 台の計 14 台の業務用食洗機をふき取りし、SCDLP 寒天培地で 35°C および 60°C で培養し生菌数を測定した。得られた細菌 (94 株) の 16S rRNA の遺伝子解析を行ったところ、23 属 84 株に分類された。ドアタイプではグラム陽性菌が 9 属 31 株、グラム陰性菌が 3 属 8 株であり、コンベアタイプではグラム陽性菌が 10 属 27 株、グラム陰性菌が 7 属 18 株であった。ドアタイプはコンベアタイプよりもグラム陰性菌が少ないことが明らかとなった。高温 (60°C) で生育可能な好熱性細菌はドアタイプから 4 属 14 株が得られたが、コンベアタイプからは 1 属 1 株のみ得られた。今回調査したサンプルにおいて、検出頻度が高かった細菌は *Bacillus* 属や *Anoxybacillus* 属などの芽胞形成菌であった。グラム陰性菌に対しては、すすぎ工程の高温や水圧によって抑制が可能と考えられるが、グラム陽性菌の制御は難しく、食洗機用アルカリ洗浄剤による除去効果も低い。

### 2-1 緒言

食中毒の原因のひとつに、二次汚染によるものが多く見られる。これは食材を取り扱った調理器具類の洗浄殺菌が不十分であったことにより、そこで有害微生物が増殖し、それを介して他の食品を汚染するというものである。直接口に入る食材の衛生的な取扱い方法はマニュアル化され定着してきているが、食器や調理器具類の洗浄などのサニテーションに関わる部分については疎かになりやすい。そういった中で、調理器具類を洗浄するための食洗機については、特に清

掃が十分に行き届いていないことが多く、庫内にピンクから赤色のヌメリが付着しているケースが多く見られる。これらはバイオフィームであり、通常の洗浄工程では除去できずに残っていると考えられる。そのため食器類などの被洗物を介して人体に入った場合の有害性が懸念される。実際に、Wernersson らや Francis らの研究では、病院での食器洗浄機の使用において、食洗機の汚れが食器類に移り、交差汚染を招くことも報告されている<sup>1)2)</sup>。Yoshida らは、レジオネラ属細菌により汚染された水道管の蛇口と接続した食洗機からの *Legionella* spp.の検出について報告しており、食洗機がレジオネラ属細菌の潜在的な汚染源になる可能性を示唆している<sup>3)</sup>。したがって、食洗機とその中で洗浄される食器類の衛生状態を維持する必要がある<sup>4)</sup>。業務用食洗機は、高温、高 pH であり、細菌にとっては極限な環境下であるにもかかわらず、菌株が分離されている。家庭用食洗機のゴム製シールから分離されたバイオフィームから、微生物叢が 16S rRNA の次世代シーケンシングを使用して分析されている<sup>5)</sup>。微生物叢には多種多様な細菌および真菌の存在が示唆されており<sup>6)7)8)</sup>、その構成は食洗機の種類によって異なっていた<sup>9)</sup>。しかしながら、様々なタイプの食洗機での細菌汚染の傾向に関する報告はない。細菌汚染を効果的に予防するには、細菌の菌叢と食洗機のタイプとの関係を解明する必要がある。

庫内の清浄度調査を行うにあたり、食洗機はドアタイプとコンベアタイプの2つの異なるタイプをパーツ別に実施した。アルカリ洗浄剤による微生物の発育抑制割合を把握するため、洗浄水との接液部分と非接液部分を比較した。また、80℃でのすすぎ工程の除菌効果を把握するため、洗浄とすすぎが同庫内で行われるドアタイプ洗浄機と、洗浄とすすぎが仕切られているコンベアタイプ洗浄機との違いも調査した。

環境微生物の測定と菌叢解析にあたり、その測定方法について述べる。食品衛生法に基づく細菌数の指標のひとつに生菌数がある。生菌数は、食品や製造環境

の微生物汚染の程度を示す汚染指標菌、且つ衛生的品質を示す衛生指標菌とされており、菌数の多少が評価軸とされている。生菌数は、標準寒天培地を用いて好気的な条件で発育した中温性の細菌数のことで、一般生菌数と呼ばれている。今回は食洗機の汚染菌を調査するために、この方法に則り一般生菌数の測定を行った。尚、食洗機では洗浄剤が使用されることから、その除菌成分が細菌の生育を阻害する懸念がある。そのため、除菌成分を中和するための不活化剤(Lecithin、Polysorbate)が配合された Soybean Casein Digest Agar with Lecithin & Polysorbate 80 (SCDLP 寒天培地) を用いている。

次に微生物の分類について述べる。微生物は細胞学的に分類すると、真核生物と原核生物に分けられる。真核生物には、核や細胞内器官があり、藻類(algae)や原生生物(protozoa)、菌類(真菌)(fungi)がそれに該当する。原核生物には核や細胞内器官はなく、細菌(bacteria)と古細菌(archaea)が該当する。リボソーム RNA の塩基配列に基づく進化系で分類すると、細菌、古細菌、真核生物の3つのドメインに分類される。ウイルスは、核酸とそれを包むタンパク質から成り、自己複製ができないため非生物である。細菌の分類体系は、上位から界(kingdom)、門(phylum)、綱(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、種(species)となっており、種が最小単位である。例えば枯草菌(*Bacillus subtilis*)の場合、門は Firmicutes、綱は Bacilli、目は Bacillales、科は Bacillaceae、属は *Bacillus*、種は *subtilis* の様に概念的なものである。菌株の株(strain)は、実在する個体を指している。

細菌の同定は、培養により培地上に生育したコロニー形状の観察から始まり、光学顕微鏡による形態観察やグラム染色、生理・生化学的性状、化学分類的性状に基づいて行われてきた。生化学性状を元に同定するキット(アピ(バイオメリュー・ジャパン株)や BBL CRYSTAL(日本ベクトンディッキンソン株)、ID テスト(日水製薬株)など)も多く市販されている。

近年では、遺伝子解析手法の発達により、系統解析による分類がされるようになってきている。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology には、これまでに発見されたすべての真正細菌と古細菌がリスト化されており、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析に基づき作成した系統樹を元に分類がされている。

原核生物に存在する 16S rRNA 遺伝子は、リボゾーム遺伝子である。リボゾームはタンパク質の合成に関わる器官ですべての生物細胞に存在する。小サブユニット (SSU) と大サブユニット (LSU) に分かれ、それぞれリボゾームタンパク質とリボゾーム RNA (rRNA) の複合体として構成される。細菌では、SSU は 16S rRNA と 21 種のタンパク質、LSU は 23S rRNA と 5S rRNA および 34 種のタンパク質から構成される。リボゾーム遺伝子は、すべての生物細胞内に存在する、適度な保存性 (共有性) があり、ほぼすべての微生物種を網羅することができる、ある程度離れた系統間の比較ができる、配列中に適当な可変領域があり種レベルでの識別できる、塩基配列の長さが適度に長く系統解析に十分な情報量を持つ、データベースが充実している、といった利点があり遺伝子解析に適している。16S rRNA 遺伝子はおよそ 1,500 の塩基配列から成り、種間で変化に富んだ可変領域 (v1 から v9) を持つため、この部分を PCR プライマーで増幅させ遺伝子配列を解析することで同定が可能となる<sup>10)</sup>。

カビや酵母などの真菌の場合、SSU は 18S rRNA と 33 種のタンパク質、LSU は 5S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA および 50 種のタンパク質で構成される。真菌では、5.8S rRNA とその前後にある ITS (Internal transcribed spacer) 領域、あるいは 28S rRNA が種間で変化に富むため、これらの部分の遺伝子配列解析が用いられている<sup>10)</sup>。

遺伝子解析法による同定の主な手順は、DNA の抽出、PCR (Polymerase Chain Reaction) による増幅、増幅産物の確認 (アガロースゲル電気泳動)、PCR 増幅産物の精製とシーケンス反応、シーケンサーによるシーケンス解析、塩基配列の決

定、相同性検索となる。相同性検索では、細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を用いた場合、一般的には 98.7 %以上の相同率を示すと同種の可能性が高いと考えられている<sup>11)</sup>。ただし、この手法は細菌の「属」レベルまでの同定であり、「種」を同定するためには、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法により 70 %以上の相同性を示すものと定義とされている<sup>12) 13)</sup>。一般的に 16S rRNA 遺伝子解析で 98.7%に満たない場合、DDH 法では 70%を超えないことが知られている<sup>11)</sup>。

食洗機の汚染度調査では、スワブ法（ふき取り法）によって回収したサンプルを培養法にて一般生菌数の測定を行った。更に培養によって得られたコロニーから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析により相同性の高いものを属として決定し、部位別に検出菌の特徴を考察した。

更に、実際に使用されている食洗機用アルカリ洗浄剤の除菌効果を検証するため、最も検出頻度の高かった枯草菌 (*Bacillus subtilis*) と、食品衛生におけるグラム陰性菌とグラム陽性菌の代表である大腸菌 (*Escherichia coli*) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を用いて評価を行った。

## 2-2 実験方法

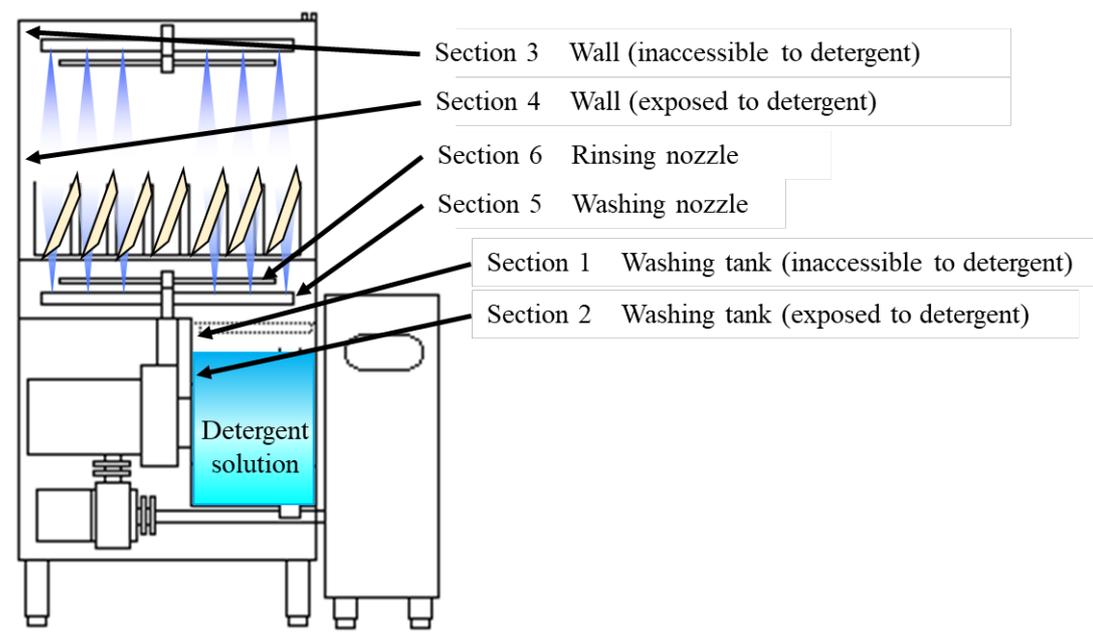
### 2-2-1 施設別食器洗浄機の使用状況の調査

業務用食洗機の微生物汚染の実態を把握するため、ホテル（4 施設）、旅館（1 施設）、居酒屋（1 施設）、社員食堂（5 施設）、病院給食（1 施設）、デリバリー（2 施設）など 14 施設の食洗機を対象に調査を行った。食洗機のタイプによる汚染度合いと汚染部位の違いを検証するため、ドアタイプ 6 台とコンベアタイプ 8 台を選定した。検体採取前に、食洗機庫内の清浄度を目視により確認し、食洗機の使用頻度と使用洗浄剤についてヒアリングした。

### 2-2-2 検体の採取と生菌数測定

食洗機庫内の環境は、洗浄液との接触の有無や、洗浄工程とすすぎ工程での湯温の違いがあるため、食洗機のパーツ毎に検体を採取した。ドアタイプ洗浄機では、洗浄液が溜まる洗浄タンク（洗浄液との非接液部分（Section 1）、洗浄液との接液部分（Section 2））、庫内の壁面（洗浄液が当たらない部分（Section 3）、洗浄液が当たる部分（Section 4）、洗浄ノズル（Section 5）、すすぎノズル（Section 6）を対象とした（Fig. 2-1）。コンベアタイプ洗浄機では、洗浄タンク（洗浄液との非接液部分（Section 1）、洗浄液との接液部分（Section 2））、洗浄槽の壁面（Section 3）、洗浄ノズル（Section 4）、すすぎタンク（Section 5）、すすぎ槽の壁面（Section 6）、すすぎノズル（Section 7）、食器類を並べるラックレール（Section 8）、洗浄槽とすすぎ槽を仕切るカーテン（Section 9）を対象とした（Fig. 2-2）。対象箇所をふきふきチェックII（栄研器材株式会社、東京、日本）を用いてスワブ法にて実施した（拭き取り面積は約 100 cm<sup>2</sup>）。

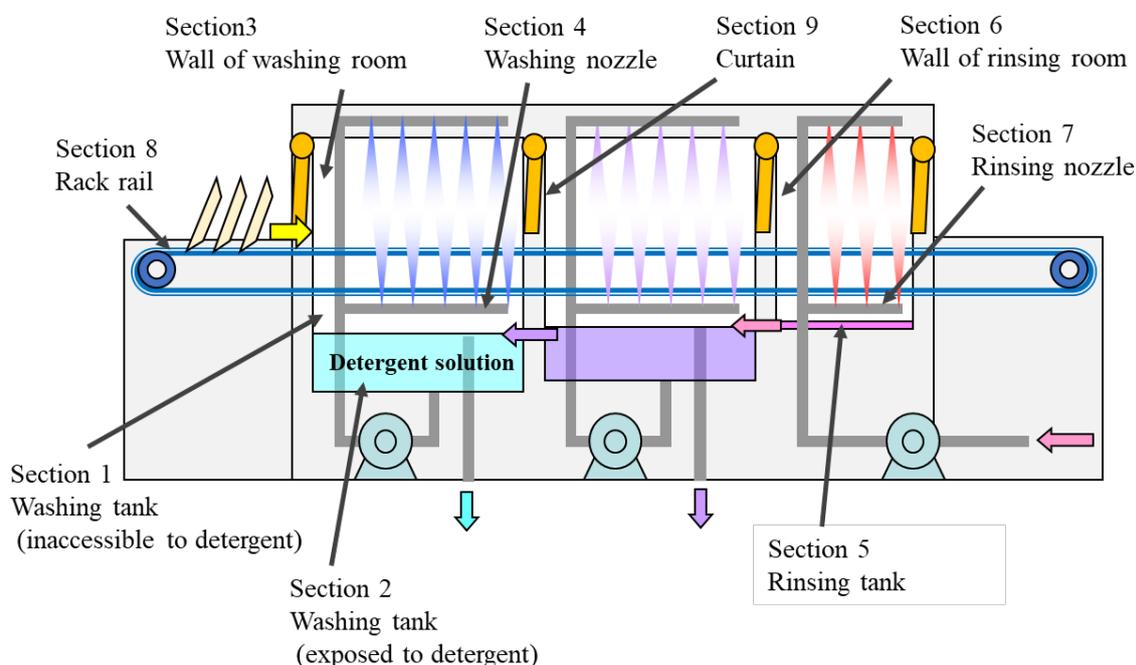
得られた検体を滅菌生理食塩水で適宜段階希釈し、その懸濁液 0.1 mL を平板培地に塗抹し、生育したコロニー数を測定した。一般細菌数測定には、Soybean Casein Digest Agar with Lecithin & Polysorbate 80（以下、SCDLP 寒天培地（日本製薬株式会社、東京、日本））を用い、培養温度は、35°Cおよび食洗機の洗浄温度に合わせた 60°Cでそれぞれ 1 から 5 日間培養した。真菌数測定には、Potato Dextrose Agar with Chloramphenicol（以下、CP 加 PDA 培地（Merck 株式会社、東京、日本））を用い、25°Cで 7 日間培養した。



(A) Door-type

Fig. 2-1. Sampling parts of door-type dishwasher.

Samples were collected from each section and their accessibilities to the detergent are labelled in the figures.



(B) Conveyor-type

Fig. 2-2. Sampling parts of conveyor type dishwasher.

Samples were collected from each section and their accessibilities to the detergent are labelled in the figures.

### 2-2-3 16S rRNA 遺伝子解析による菌株の同定

SCDLP 寒天培地上に生育したコロニーから、サイズ、形状、色に基づき形態的に異なるコロニーを釣菌し、94 サンプルを単離培養した。この 94 サンプルについて、InstaGene DNA 精製マトリックス（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社、東京、日本）を用いて抽出したゲノムを鋳型とし、Bacterial 16S rDNA PCR Kit（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いて、16S rRNA 遺伝子断片の増幅を行った。PCR 酵素は「*Premix EX Taq*」、プライマーは「Primer 10F」および「Primer 800R」（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いた。PCR 反応条件は、94°C 30 秒（変性）、55°C 60 秒（アニーリング）、72°C 60 秒（伸長）を 30 サイクルとし、Step One Plus Real-Time PCR System（ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京、日本）を用いて行った。増幅した PCR 産物のサイズは、アガロースゲル電気泳動により約 800 bp であることを確認した。この PCR 増幅産物を精製し、塩基配列を決定した（株式会社マクロジェン・ジャパン、京都、日本）。決定した 16S rRNA 遺伝子配列は、Microseq®（ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京、日本）を用いて妥当性を確認した後、データベース「アポロン DB-BA9.0（株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡、日本）」およびオンライン上の Basic Local Alignment Search Tool「BLAST®」（National Center for Biotechnology Information; NCBI）を用いて比較し、98.7%以上の相同性を持つものを属として同定した<sup>14)</sup>。

尚、CP 加 PDA 培地上に生育した 2 株のカビについては、InstaGene DNA 精製マトリックスより抽出したゲノムを鋳型とし真菌用のプライマー ITS1F およびプライマー ITS1R（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いて PCR 反応を行い、ITS-5.8S rRNA 領域の遺伝子解析を試みたが、遺伝子配列を決定できなかったため同定ができなかった。

#### 2-2-4 各種細菌に対する食器洗浄機用洗浄剤の除菌試験

食洗機の洗浄工程で使用されているアルカリ洗浄剤の除菌効果を調べるため、2-2-3にて分離株数が最も多かった枯草菌、食品衛生の代表的な指標菌である大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する除菌試験を行った。

試験サンプルは、市販品を含む固形タイプのアルカリ洗浄剤について試験した (Table. 2-1)。洗浄剤の主な成分は、アルカリ剤とキレート剤であるが、アルカリ剤の種類による違いを検証するため、水酸化ナトリウム (洗浄剤 a)、珪酸ナトリウム (洗浄剤 b)、炭酸ナトリウム (洗浄剤 c) の3組成を選定した。アルカリの強さは水酸化ナトリウム、珪酸ナトリウム、炭酸ナトリウムの順に強度が高い。更に、除菌力向上を目的として、トリクロロイソシアヌル酸 (ネオクロール 90G、四国化成工業株式会社、香川、日本) の効果についても検証するため、これを併用した洗浄剤 (洗浄剤 c, d, f) とトリクロロイソシアヌル酸単独 (洗浄剤 g) とで比較した。トリクロロイソシアヌル酸は塩素化イソシアヌル酸の一種で、固体の化合物であるが、水中で加水分解して次亜塩素酸になり、漂白や除菌効果が期待できる。これらの洗浄剤を、実際の食洗機で使用される濃度範囲 (0.1 から 0.2 wt%) で希釈したものを試験検体とした。表中に、各洗浄剤の希釈濃度、希釈時の pH、およびトリクロロイソシアヌル酸を添加した洗浄剤については希釈時の有効塩素濃度示した (Table 2-1)。希釈には 54 ppm の硬度水を使用した。

菌株は、NITE 生物資源センター (東京、日本) から購入した *S. aureus* NBRC 12732、*E. coli* NBRC 3972、および *B. subtilis* NBRC 3134 を用い、Soybean Casein Digest Agar with Lecithin Polysorbate 80 (SCDLP 寒天培地 (日本製薬株式会社、東京、日本)) で前培養したものをを用いた。発育したコロニーをかき取り、滅菌生理食塩水 (0.85 wt% NaCl) に懸濁して、濁度で菌数が  $10^8$  から  $10^9$  CFU/mL になるように調製したものを菌液とした。*B. subtilis* については、総菌数  $1.3 \times 10^8$

CFU/mL 中に、芽胞数を  $4.6 \times 10^5$  CFU/mL (芽胞数は、菌液を 75°C・30 分加熱処理した後に残存した菌数より算出) を含む菌液を使用した。まず、所定温度 (25°C、60°C) に調温した試験検体 9 mL に、菌液 0.5 mL と 3 wt% のウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin ; BSA) 0.5 mL を混合し、5 分間接触させた。その試験液 2.5  $\mu$ L を、247  $\mu$ L の Soybean Casein Digest Broth with Lecithin Polysorbate 80 (SCDLPB 培地 (日本製薬株式会社、東京、日本)) の入った 96 ウェルマイクロプレートに添加し中和した。これを SCDLPB 培地で段階希釈し、35 °Cにて 24 から 48 時間培養し、培地の濁りにより菌の生育の有無を判定した。

Table 2-1. Composition of detergents used in the sterilization test.

No.	Detergents	Dosage of detergents (wt%)	pH of diluted solution	Effective chlorine concentration in diluted solution (ppm)
a-1	Sodium hydroxide 38 wt%	0.1	11.5 - 12.5	-
a-2		0.2		-
b	Sodium silicate 25 wt%	0.15	12	-
c	Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%	0.15	12	12
d	Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%	0.15	12	24
e-1	Sodium carbonate 44 wt%	0.1	10.5 - 11.5	-
e-2		0.2		-
f-1	Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%	0.1	10.5 - 11.5	20
f-2		0.15		30
f-3		0.2		40
g	Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%	0.15	6.8	24

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 施設別食器洗浄機の使用実態

食洗機のタイプ別に、庫内の汚れ具合と洗浄剤の使用状況を示す (Table 2-2, Figs. 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7)。目視での庫内の汚染状況は、食洗機 N (旅館) で赤色ヌメリが発生し最も汚れており、食洗機 A (居酒屋) と食洗機 I (社員食堂 C)、食洗機 M (ホテル D) で汚れの付着が見られた。それ以外の施設では清潔に保たれていた。食洗機の使用頻度は、食洗機 L (ホテル C) と食洗機 M (ホテル D) が不定期であるのに対し、それ以外はほぼ毎日～毎日使用していた。洗浄剤の使用濃度は、食洗機 N (旅館) では推奨濃度を大きく下回っており、食洗機 B (社員食堂 D)、食洗機 C (デリバリー A) と食洗機 D (デリバリー B)、食洗機 G (社員食堂 A)、食洗機 J (社員食堂 E) ではやや低め、それ以外の施設では適正濃度で使用されていた。食洗機の使用頻度に関わらず、洗浄剤の使用濃度が低いと庫内に汚れが蓄積しやすい傾向にあることが分かった。

Table 2-2. Operating conditions of dishwashers by users.

	Users	Dishwasher type	Visible cleanliness	Using frequency	Detergent dosage
A	Bar	Door	A little bad	Everyday	Reasonable
B	Cafeteria D	Door	Good	Almost everyday	Low
C	Delivery A	Door	Good	Everyday	Low
D	Delivery B	Door	Good	Everyday	Low
E	Hotel A	Door *	Good	Everyday	Reasonable
F	Hotel B	Door *	Good	Everyday	Reasonable
G	Cafeteria A	Flight-conveyor	Good	Almost everyday	Low
H	Cafeteria B	Flight-conveyor	Good	Almost everyday	Reasonable
I	Cafeteria C	Flight-conveyor	A little bad	Almost everyday	Reasonable
J	Cafeteria E	Rack-conveyor	Good	Almost everyday	Low
K	Hospital	Flight-conveyor	Good	Everyday	Reasonable
L	Hotel C	Rack-conveyor	Good	Irregularly	Reasonable
M	Hotel D	Flight-conveyor	A little bad	Irregularly	Reasonable
N	Japanese-style hotel	Rack-conveyor	Bad (Red slime)	Everyday	Very low

(\*): The same model of dishwasher. Different models of dishwashers except as otherwise noticed.

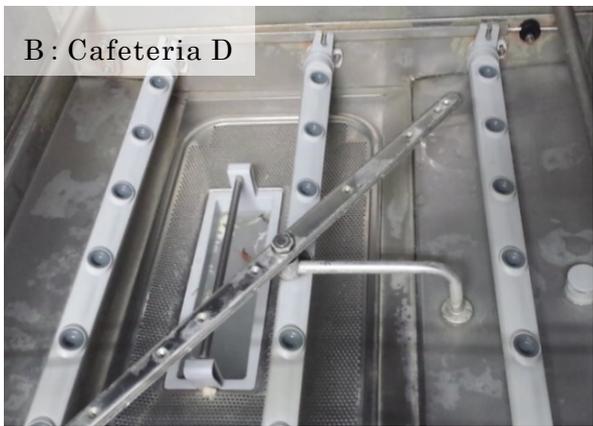
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



Fig. 2-3. Inside of dishwashers (Door-type A, B, C).

(a): Washing tank of dishwasher-A, (b): Wall, washing nozzle and rinsing nozzle of dishwasher-A, (c): Washing tank of dishwasher-B, (d): Wall, washing nozzle and rinsing nozzle of dishwasher-B, (e): Washing tank of dishwasher-C, (f): Washing nozzle of dishwasher-C.

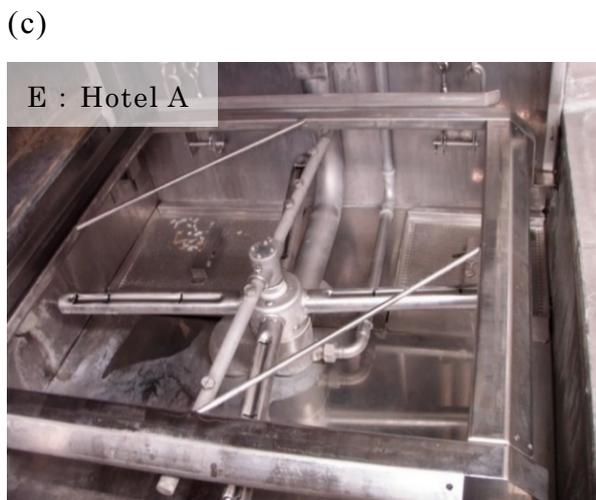


Fig. 2-4. Inside of dishwashers (Door-type D, E, F).

(a): Washing nozzle of dishwasher-D, (b): Washing tank of dishwasher-D, (c): Washing tank of dishwasher-E, (d): Wall, washing nozzle and rinsing nozzle of dishwasher-E, (e): Washing tank of dishwasher-F, (f): Wall, washing nozzle and rinsing nozzle of dishwasher-F.

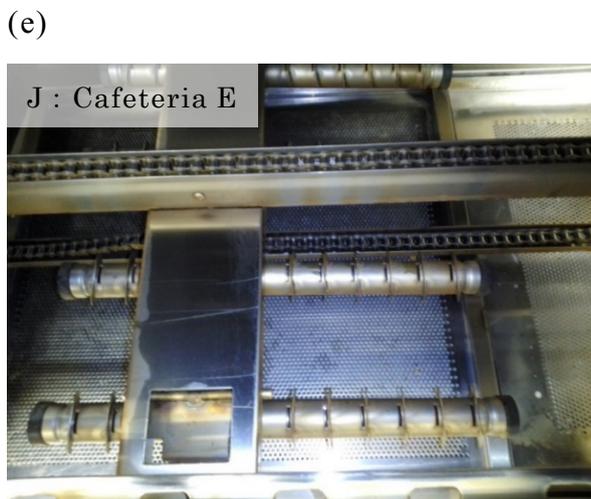
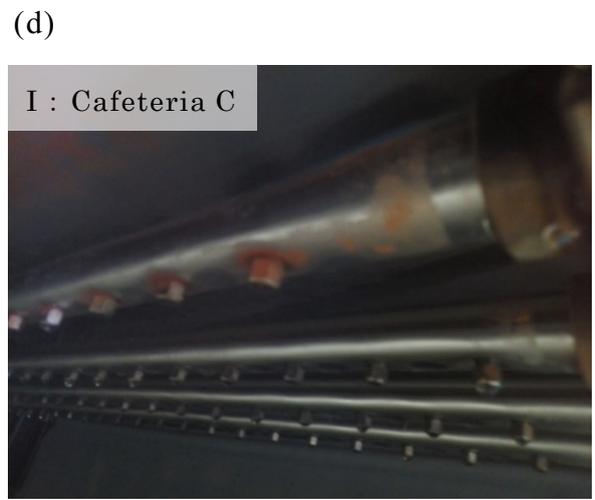
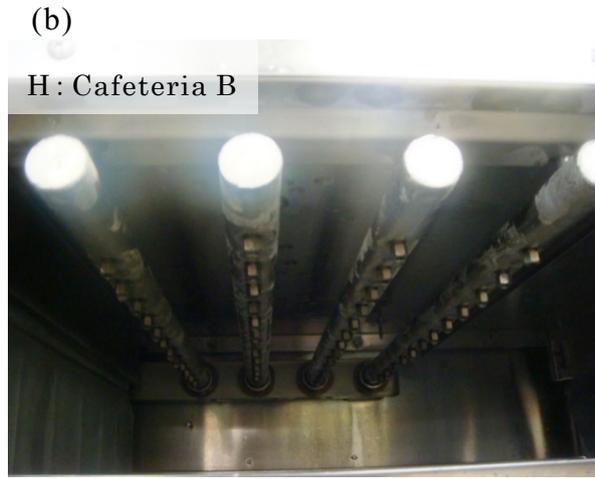


Fig. 2-5. Inside of dishwashers (Conveyor-type H, I, J).

(a): Washing tank of dishwasher-H, (b): Washing nozzle of dishwasher-H, (c): Wall of washing room of dishwasher-I, (d): Washing nozzle of dishwasher-I, (e): Washing nozzle of dishwasher-J, (f): Wall of washing room of dishwasher-J.

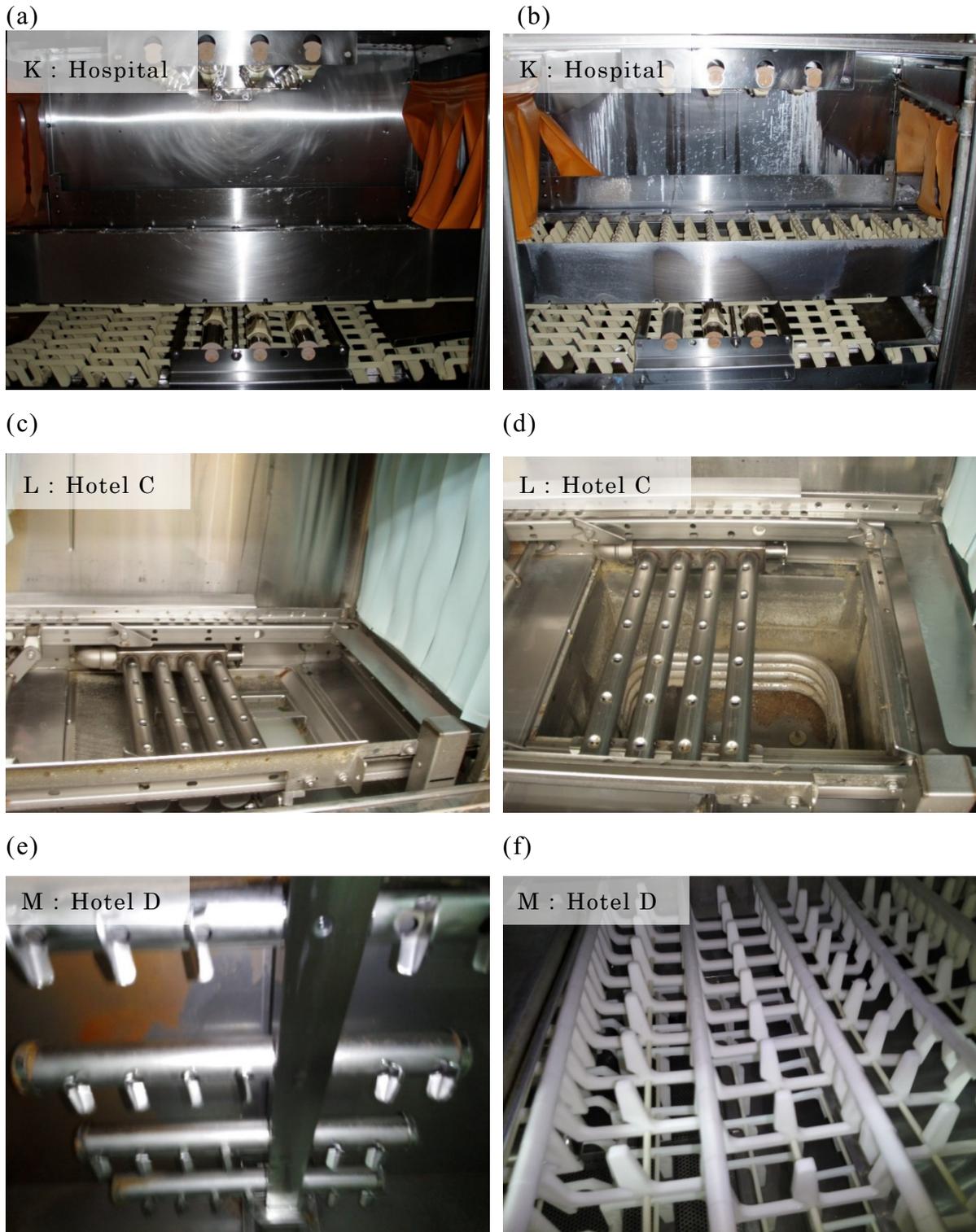


Fig. 2-6. Inside of dishwashers (Conveyor-type K, L, M).

(a): Washing tank of dishwasher-K, (b): Rinsing tank of dishwasher-K, (c): Washing room of dishwasher-L, (d): Washing tank and washing nozzle of dishwasher-L, (e): Washing nozzle of dishwasher-M, (f): Rack rail of dishwasher-M.

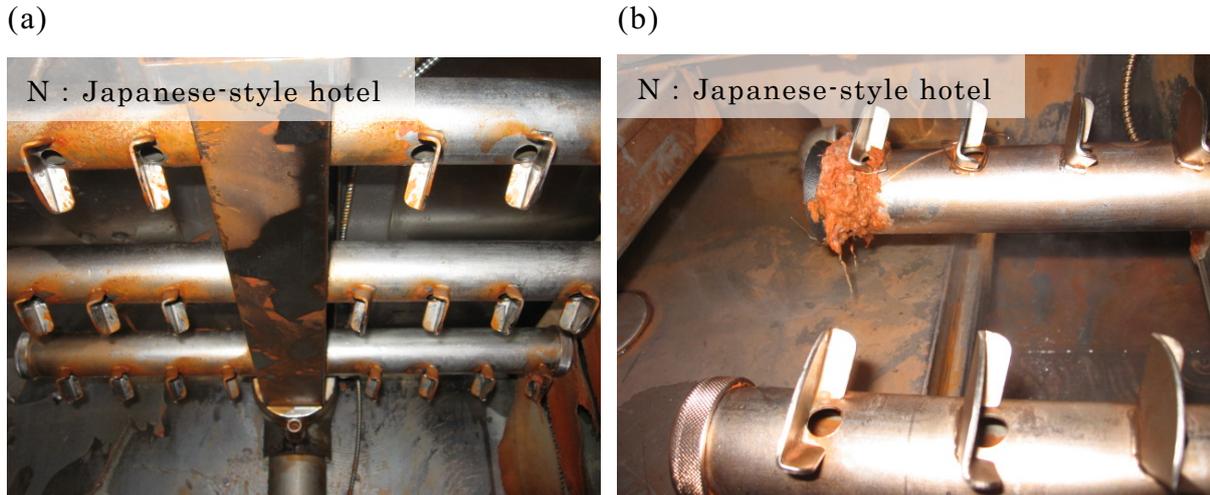


Fig. 2-7. Inside of dishwashers (Conveyor-type N).

(a): Washing nozzle of dishwasher-N, (b): Washing tank of dishwasher-N.

### 2-3-2 食器洗浄機の生菌数

各施設の食洗機庫内をパーツ毎に拭き取りした検体を 25°C、35°C および 60°C の条件で培養し、生育した菌数を示す (Tables 2-3, 2-4, 2-5, 2-6)。汚れや赤色ヌメリの付着が見られた食洗機 A、I、M、N では、生菌数が  $10^4$  CFU/100 cm<sup>2</sup> 以上と高い傾向が見られた。目視による清浄度が高かった食洗機 B、C、D、E、F、G、H、J、K、L では、生菌数は平均  $10^2$  から  $10^3$  CFU/100 cm<sup>2</sup> 程度で、その中でも食洗機 E、L、K は検出限界以下であった。汚れの付着度合いと菌数には、ある程度相関性があることが確認された。

中温細菌が生育する 35°C 培養では、ドアタイプ洗浄機の洗浄タンク (洗浄水接触部分 (Section 2)) とドア壁面 (洗浄水非接触部分 (Section 3)) から多数細菌が検出された (Table 2-3)。コンベアタイプでは、洗浄槽タンクの洗浄水非接触部分 (Section 1) と洗浄水接触部分 (Section 2)、洗浄槽壁面 (Section 3)、洗浄ノズル (Section 4) から比較的多く検出された (Table 2-4)。ドアタイプもコンベアタイプも菌数が多い区画は洗浄槽に集中した。

ドアタイプ洗浄機において、洗浄タンクでは、洗浄水と接液していない部分

(Section 1) よりも洗浄水と接液している部分 (Section 2) からより多くの細菌が検出され、壁面では、洗浄水の当たる部分 (Section 4) よりも洗浄水が当たらない部分 (Section 3) から多くの細菌が検出された (Table 2-3)。常時洗浄水にさらされている洗浄タンクは、60℃の高温とアルカリ洗浄剤による高 pH により汚染が抑制されていると予想していたが、これらの結果は洗浄剤の効果が低いことを示している。業務用食洗機では、洗浄水の入れ替えは 1 日に 1 から 2 回程度である。洗浄水は、すすぎ湯が入った分だけ一部がオーバーフローして入れ替わる構造になっているが、被洗物から持ち込まれる食品汚れが多いと汚れやすい。この洗浄水が洗浄工程で庫内に噴射されると、その中に含まれる細菌がエアロゾルとなって庫内表面に付着し、時間の経過とともに堆積していくと考えられる。洗浄水が当たらない壁面では、これらの付着菌が洗浄水によって除去される可能性が低い。

中温細菌は、ドアタイプ洗浄機の洗浄剤の当たる壁面 (Section 4) と洗浄ノズル (Section 5)、およびすすぎノズル (Section 6) からの検出数は少なかった (Table 2-3)。ドアタイプ洗浄機においては、洗浄後の食器類をすすぐために使われる真水が、洗浄に再利用されるということが注目すべき点である。従って、清浄なすすぎ水によって、壁面や洗浄ノズル、すすぎノズルの細菌は洗い流される可能性がある。細菌によるドアタイプ洗浄機の汚染は、すすぎ工程により抑制されている可能性が高い。

好熱性細菌が生育する 60℃の培養条件においては、ドアタイプではほとんどの部位から細菌が検出され、多くは洗浄水と接触する洗浄タンク (Section 2)、洗浄水が当たらない壁面 (Section 3) に集中した (Table 2-3)。コンベアタイプでは、食洗機 I のすすぎノズル (Section 4) からのみの検出であった (Table 2-4)。ドアタイプ洗浄機は、庫内全体がすすぎ工程で 80℃の高温になり、コンベアタイプよりも高い。この高温環境は好熱性細菌にとって最適な条件であると考え

られる。

カビや酵母が生育する 25°Cの培養条件においては、食洗機 B、D、E、I、J、M、Nにおいてコロニーの生育が認められた (Tables 2-5, 2-6)。このうち、食洗機 E および N からは、カビが 10<sup>2</sup> CFU/100 cm<sup>2</sup> 程度検出された。

Table 2-3. Number of viable bacteria obtained from door-type dishwashers.

	Section 1		Section 2		Section 3		Section 4		Section 5		Section 6	
	35°C	60°C										
A	3.1	-	6.4	-	4.1	-	2.0	-	3.0	-	-	-
B	-	-	5.3	5.4	4.1	4.6	<1.0	<1.0	2.0	<1.0	2.0	3.8
C	3.0	<1.0	2.8	2.7	5.4	2.7	<1.0	2.0	2.0	<1.0	2.3	2.3
D	<1.0	2.0	6.0	5.4	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
E	<1.0	-	-	-	<1.0	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-	-

The number of viable bacteria present over an area of 100 cm<sup>2</sup> on each section of door-type dishwashers are presented as Log<sub>10</sub> (CFU/100 cm<sup>2</sup>) where CFU represents colony forming units at 35 and 60°C. (-): not tested. The sections of door-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall (inaccessible to detergent), 4: Wall (exposed to detergent), 5: Washing nozzle, 6: Rinsing nozzle.

Table 2-4. Number of viable bacteria obtained from conveyor-type dishwashers.

	Section 1		Section 2		Section 3		Section 4		Section 5		Section 6		Section 7		Section 8		Section 9	
	35°C	60°C																
G	4.5	-	-	-	4.5	-	-	-	5.1	-	3.8	-	-	-	3.9	-	-	-
H	2.3	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	<1.0	-	-	-	<1.0	-	2.5	-
I	-	-	4.1	<1.0	3.0	<1.0	3.9	4.0	3.6	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	4.6	<1.0	-	-
J	-	-	4.1	<1.0	3.4	<1.0	3.5	<1.0	2.8	<1.0	3.8	<1.0	3.0	<1.0	2.7	<1.0	-	-
K	-	-	-	-	<1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<1.0	-	<1.0	-
L	-	-	-	-	<1.0	-	-	-	-	-	<1.0	-	-	-	-	-	-	-
M	-	-	5.7	<1.0	3.6	<1.0	5.5	<1.0	3.9	<1.0	<1.0	<1.0	2.0	<1.0	3.4	<1.0	-	-
N	4.0	-	-	-	4.1	-	3.5	-	-	-	-	-	-	-	4.3	-	4.0	-

The number of viable bacteria present over an area of 100 cm<sup>2</sup> on each section of conveyor-type dishwashers are presented as Log<sub>10</sub> (CFU/100 cm<sup>2</sup>) where CFU represents colony forming units at 35 and 60°C. (-): not tested. The sections of conveyor-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall of washing room, 4: Washing nozzle, 5: Rinsing tank, 6: Wall of rinsing room, 7: Rinsing nozzle, 8: Rack rail, 9: Curtain.

Table 2-5. Number of viable bacteria and fungi obtained from door-type dishwashers.

	Section 1 25°C	Section 2 25°C	Section 3 25°C	Section 4 25°C	Section 5 25°C	Section 6 25°C
A	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	-
B	-	<1.0	<1.0	<1.0	2.0	<1.0
C	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
D	<1.0	3.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
E	<1.0	-	2.0	-	-	-
F	-	-	<1.0	-	-	-

The number of viable bacteria and fungi present over an area of 100 cm<sup>2</sup> on each section of door-type dishwashers are presented as Log<sub>10</sub> (CFU/100 cm<sup>2</sup>) where CFU represents colony forming units at 25°C. (-): not tested. The sections of door-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall (inaccessible to detergent), 4: Wall (exposed to detergent), 5: Washing nozzle, 6: Rinsing nozzle.

Table 2-6. Number of viable bacteria and fungi obtained from conveyor-type dishwashers.

	Section 1 25°C	Section 2 25°C	Section 3 25°C	Section 4 25°C	Section 5 25°C	Section 6 25°C	Section 7 25°C	Section 8 25°C	Section 9 25°C
G	<1.0	-	<1.0	-	<1.0	<1.0	-	<1.0	-
H	<1.0	-	<1.0	-	-	<1.0	-	<1.0	<1.0
I	-	3.9	<1.0	3.6	4.0	<1.0	2.0	4.0	-
J	-	4.0	3.4	3.3	3.6	3.6	2.6	2.7	-
K	-	-	<1.0	-	-	-	-	<1.0	<1.0
L	-	-	<1.0	-	-	<1.0	-	-	-
M	-	2.3	<1.0	2.3	2.3	<1.0	<1.0	<1.0	-
N	<1.0	-	<1.0	<1.0	-	-	-	2.0	<1.0

The number of viable bacteria and fungi present over an area of 100 cm<sup>2</sup> on each section of conveyor-type dishwashers are presented as Log<sub>10</sub> (CFU/100 cm<sup>2</sup>) where CFU represents colony forming units at 25°C. (-): not tested. The sections of conveyor-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall of washing room, 4: Washing nozzle, 5: Rinsing tank, 6: Wall of rinsing room, 7: Rinsing nozzle, 8: Rack rail, 9: Curtain.

### 2-3-3 16S rRNA 遺伝子解析による菌株の同定

SCDLP 寒天培地に生育したコロニーから、微生物株を 94 株単離した。この 94 株を 16S rRNA 遺伝子解析により同定した結果、相同率 98.7%以上で同定できたのは 84 株であり、これらは 23 属に分類された。

同定できた 84 株を、ドアタイプとコンベアタイプで食洗機の区画別に整理した (Tables 2-7, 2-8)。ドアタイプにおいては、*Anoxybacillus* 属、*Bacillus* 属、*Geobacillus* 属、*Micrococcus* 属などのグラム陽性菌が 9 属 31 株と、*Acinetobacter* 属などのグラム陰性菌が 3 属 8 株分離された (Table 2-7)。コンベアタイプにおいては、*Bacillus* 属、*Isophtericola* 属、*Micrococcus* 属などのグラム陽性菌が 10 属 27 株と、*Acinetobacter* 属、*Paracoccus* 属などのグラム陰性菌が 7 属 18 株分離された (Table 2-8)。ドアタイプではグラム陽性菌の割合が高く、コンベアタイプではグラム陽性菌とグラム陰性菌がいずれも同等に分離される傾向が見られた。好熱性細菌は、ドアタイプから *Anoxybacillus* 属、*Geobacillus* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、*Meiothermus* 属の 4 属 14 株得られたが (Table 2-7)、コンベアタイプからは *Anoxybacillus* 属の 1 属 1 株のみであった (Table 2-8)。分離された株の中で芽胞形成菌に該当するのは *Anoxybacillus* 属、*Bacillus* 属、*Geobacillus* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、*Meiothermus* 属であった。

*Bacillus* 属はドアタイプ洗浄機とコンベアタイプ洗浄機のほぼすべての部位から分離された (Tables 2-7, 2-8)。*Bacillus subtilis* は国内で良く喫食される発酵大豆を含む食品由来である可能性がある。納豆菌は *B. subtilis* の一種で、生で喫食する機会が多い。また、*B. subtilis* は土壌に多く存在する細菌でもあるため、食材に付着した状態で厨房内に持ち込まれる。*B. subtilis* は、強いストレス応答を示し<sup>15)</sup>、耐熱性の芽胞を形成することができる<sup>16)</sup>。したがって、食材に付着した *B. subtilis* の芽胞は、調理工程でも残存したままであり、これらを盛りつけた食器類を洗浄する際に食洗機庫内に持ち込まれると推察される。芽胞形成菌は、

耐性を持つバイオフィルムと芽胞を形成することで、広範囲の環境下で生存することができる<sup>17)</sup>。*B. subtilis*には、バイオフィルムの形成能が高い株があることが報告されている<sup>18)</sup>。これらの特徴は、食洗機の高湿環境下で *Bacillus* 属が生存できることを示している。*Bacillus* 属に加え、2種類の芽胞形成好熱性細菌 (*Anoxybacillus* 属、*Geobacillus* 属) が4つのドアタイプ食洗機から分離された (Table 2-7)。いずれの株も様々な硬表面にバイオフィルムを形成することから<sup>19) 20) 21)</sup>、洗浄水の噴射が届きにくい区画を中心に、食洗機庫内の汚れを栄養源にバイオフィルムヌメリとなって付着していると考えられる。従って、食洗機の衛生状態を改善するためには、バイオフィルムと芽胞の効果的な除去の更なる研究が必要である。

Table 2-7. Bacterial flora of door-type dishwashers.

	Section 1		Section 2		Section 3		Section 4		Section 5		Section 6	
	35°C	60°C										
Gram-positive bacteria												
<i>Anoxybacillus</i> * <sup>a</sup>	-	D	B	B,D	-	B(2)	-	-	A	-	-	B(2)
<i>Bacillus</i> *	A	-	C	-	B,F(2)	-	-	-	B	-	C	-
<i>Geobacillus</i> * <sup>a</sup>	-	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Barrientosiimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i>	-	-	-	-	C(2)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Isoptricola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	A	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-
<i>Pseudoxanthomonas</i> <sup>a</sup>	-	-	D(2)	D	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram-negative bacteria												
<i>Acinetobacter</i>	C(2)	-	A	-	-	-	-	-	C	-	-	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caulobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Meiothermus</i> <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	B(3)	-	-	-	-	-	-
<i>Moraxella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paracoccus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petrobacter</i>	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified	-	-	-	-	A,C(2)	-	-	-	-	-	-	-

(\*): Spore-forming bacteria. (a): Thermophilic bacteria grown at 60°C. (-): not detected.

The alphabet represents the dishwasher shown in Table 7. The number in parentheses shows the number of isolated bacteria that were assigned to the same genus, grown at the same temperature, and isolated from the same section of the same dishwasher. No strains were satisfactorily identified from the dishwasher of E: Hotel. The sections of door-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall (inaccessible to detergent), 4: Wall (exposed to detergent), 5: Washing nozzle, 6: Rinsing nozzle.

Table 2-8. Bacterial flora of conveyor-type dishwashers.

	Section 1		Section 2		Section 3		Section 4		Section 5		Section 6		Section 7		Section 8		Section 9	
	35°C	60°C																
Gram-positive bacteria																		
<i>Anoxybacillus</i> * <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> *	H	-	I	-	H,J	-	I,N	-	G,I	-	G,J	-	M	-	I,J	-	-	-
<i>Geobacillus</i> * <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Barrientosiiimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Isoptricola</i>	H	-	-	-	G,N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-
<i>Micrococcus</i>	-	-	M(2)	-	-	-	I	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-
<i>Pseudoxanthomonas</i> <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram-negative bacteria																		
<i>Acinetobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	N	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-
<i>Caulobacter</i>	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Meiothermus</i> <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Moraxella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	H	-
<i>Paracoccus</i>	G	-	-	-	M	-	I,M	-	M	-	-	-	-	-	M(3)	-	-	-
<i>Petrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N	-
<i>Psychrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	N	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified	-	-	M	-	I,M(3)	-	M	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-

(\*): Spore-forming bacteria. (a): Thermophilic bacteria grown at 60°C. (-): not detected.

The alphabet represents the dishwasher shown in Table 8. The number in parentheses shows the number of isolated bacteria that were assigned to the same genus, grown at the same temperature, and isolated from the same section of the same dishwasher. No strains were satisfactorily identified from the dishwashers of K: Hospital and L: Hotel. The sections of conveyor-type dishwasher include 1: Washing tank (inaccessible to detergent), 2: Washing tank (exposed to detergent), 3: Wall of washing room, 4: Washing nozzle, 5: Rinsing tank, 6: Wall of rinsing room, 7: Rinsing nozzle, 8: Rack rail, 9: Curtain

菌株の同定において、16S rRNA 遺伝子解析では「属」までの同定であるが、系統樹を作成することにより、データベースに登録されている菌種との近縁関係が推定できる。相同率 98.7%以上で同定できた 84 株について「アポロン DB-BA9.0」で作成した系統樹を示す (Figs. 2-8~2-34)。ここで示した系統樹は既知の標準株で作成したものである。図中の赤い枠線で示した標準株が、単離株と最も高い相同性を示した株である。図中の標準株の右横に、単離株が検出された食洗機とその区画、標準株との相同率を記した。図中の数値 (ブートストラップ値) は系統枝の信頼度 (%) (再現性) を示し、100 に近いほど信頼度が高い。枝の長さは進化の距離を示し、左下のスケールバーの数値は塩基置換の起こり得る確率を示す (0.01 の場合、100 塩基内に 1 塩基の塩基置換が起こり得る)。

*Acinetobacter* 属は、*A. lwoffii*, *A. ursingii*, *A. junii*, および *A. haemolyticus* の 4 種 (Fig. 2-8)、*Anoxybacillus* 属は、*A. kamchatkensis*, *A. thermarum*, *A. flavithermus subsp. flavithermus*, および *A. flavithermus subsp. yunnanensis* の 4 種 (Fig. 2-10)、*Bacillus* 属は、*B. subtilis subsp. subtilis*, *B. flexus* および *B. thuringiensis* の 3 種 (Figs. 2-11, 2-12, 2-13)、*Kocuria* 属は、*K. varians* および *K. rhizophila* の 2 種 (Fig. 2-21)、*Micrococcus* 属は、*M. endophyticus* および *M. yunnanensis* の 2 種 (Fig. 2-22)、*Microbacterium* 属は、*M. lacticum* および *M. aurum* の 2 種 (Fig. 2-24)、*Paracoccus* 属は、*P. yeei* および *P. aestuarii* の 2 種 (Figs. 2-26, 2-27)、*Staphylococcus* 属は、*S. saprophyticus subsp. bovis* および *S. epidermidis* の 2 種 (Figs. 2-33, 2-34) と近縁関係が近いと予測された。

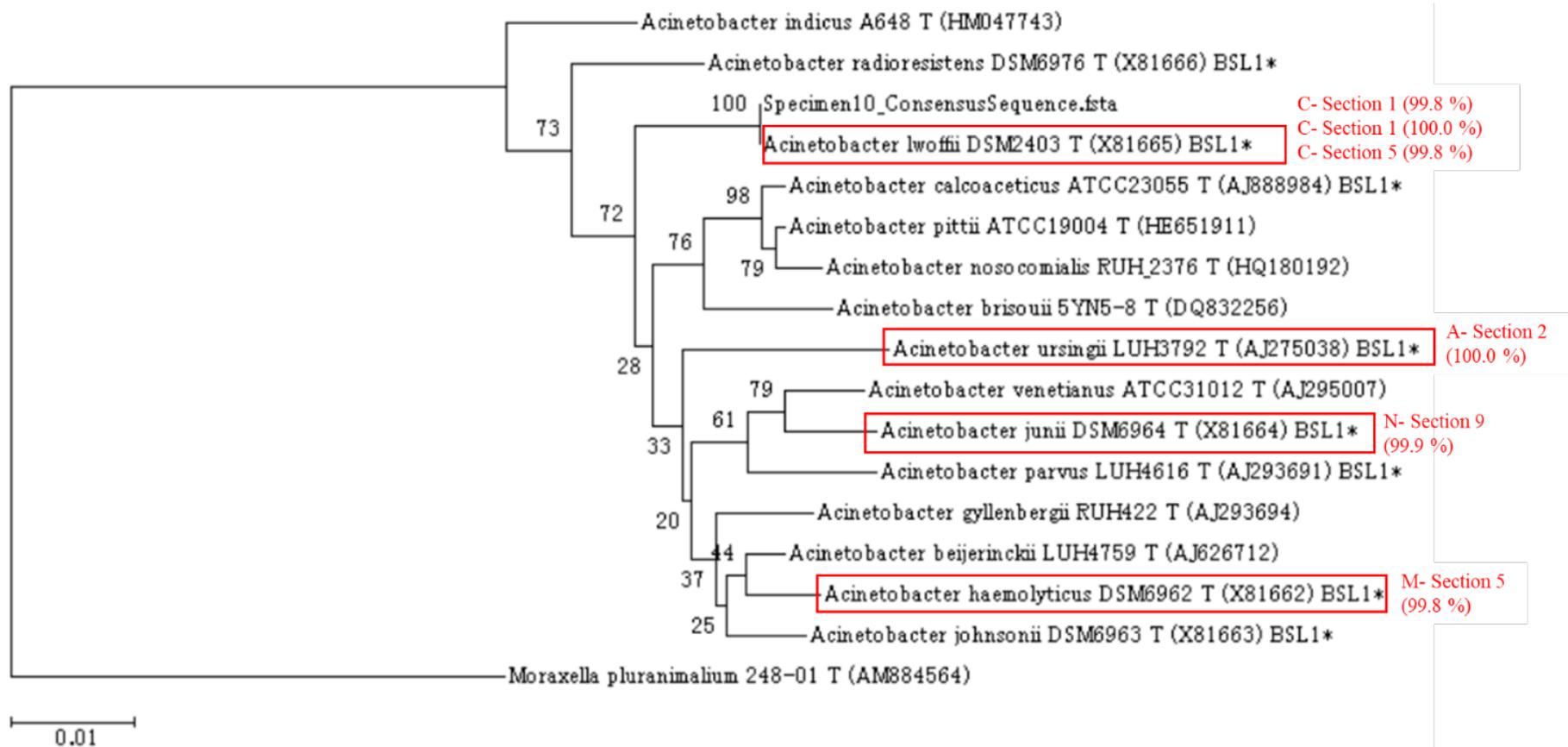


Fig. 2-8. The phylogenetic tree of *Acinetobacter* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type A (section 2), door-type C (section 1, 1, 5), conveyor-type M (section 5) and conveyor-type N (section 9) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

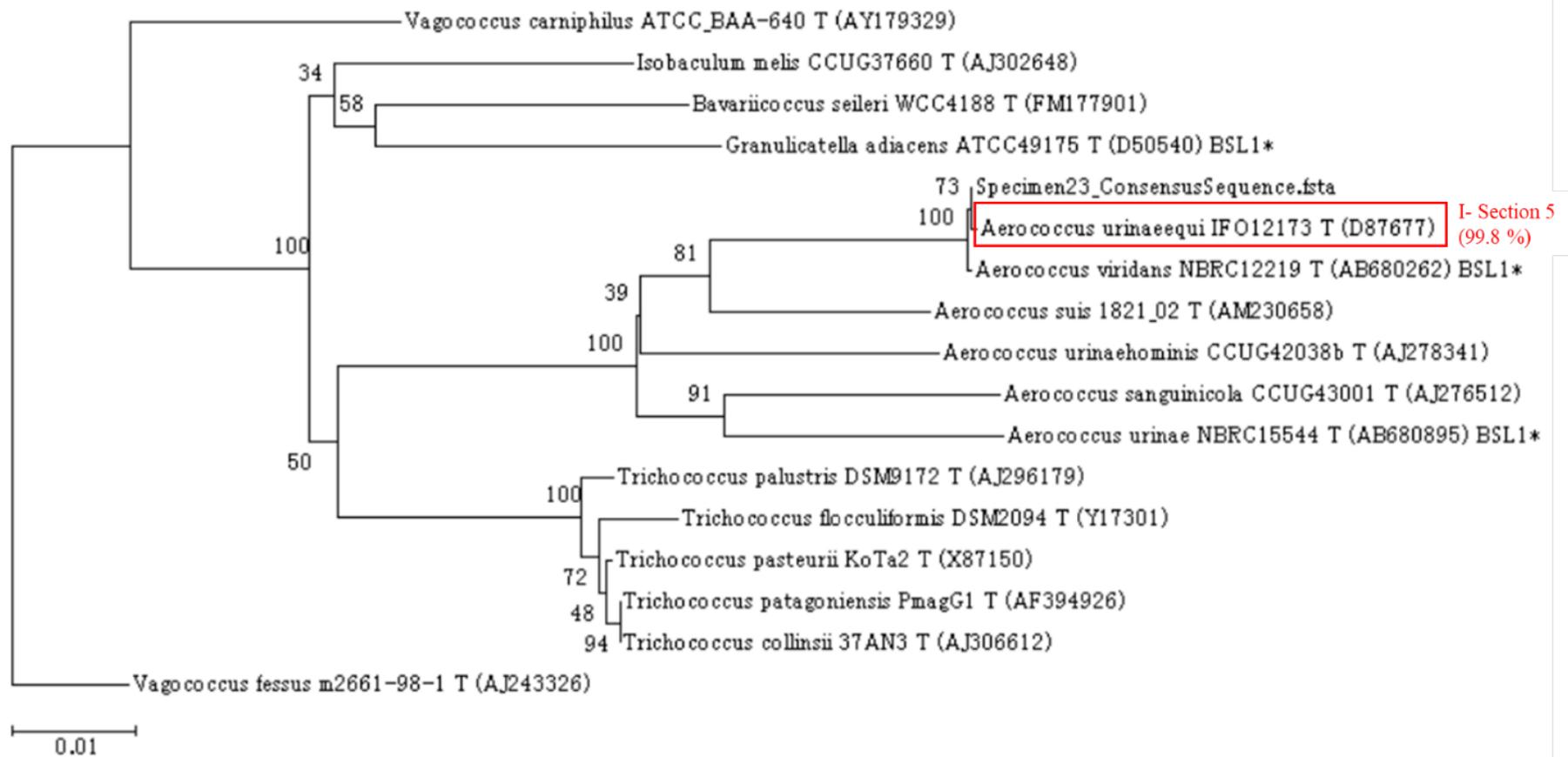


Fig. 2-9. The phylogenetic tree of *Aerococcus* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type I (section 5) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

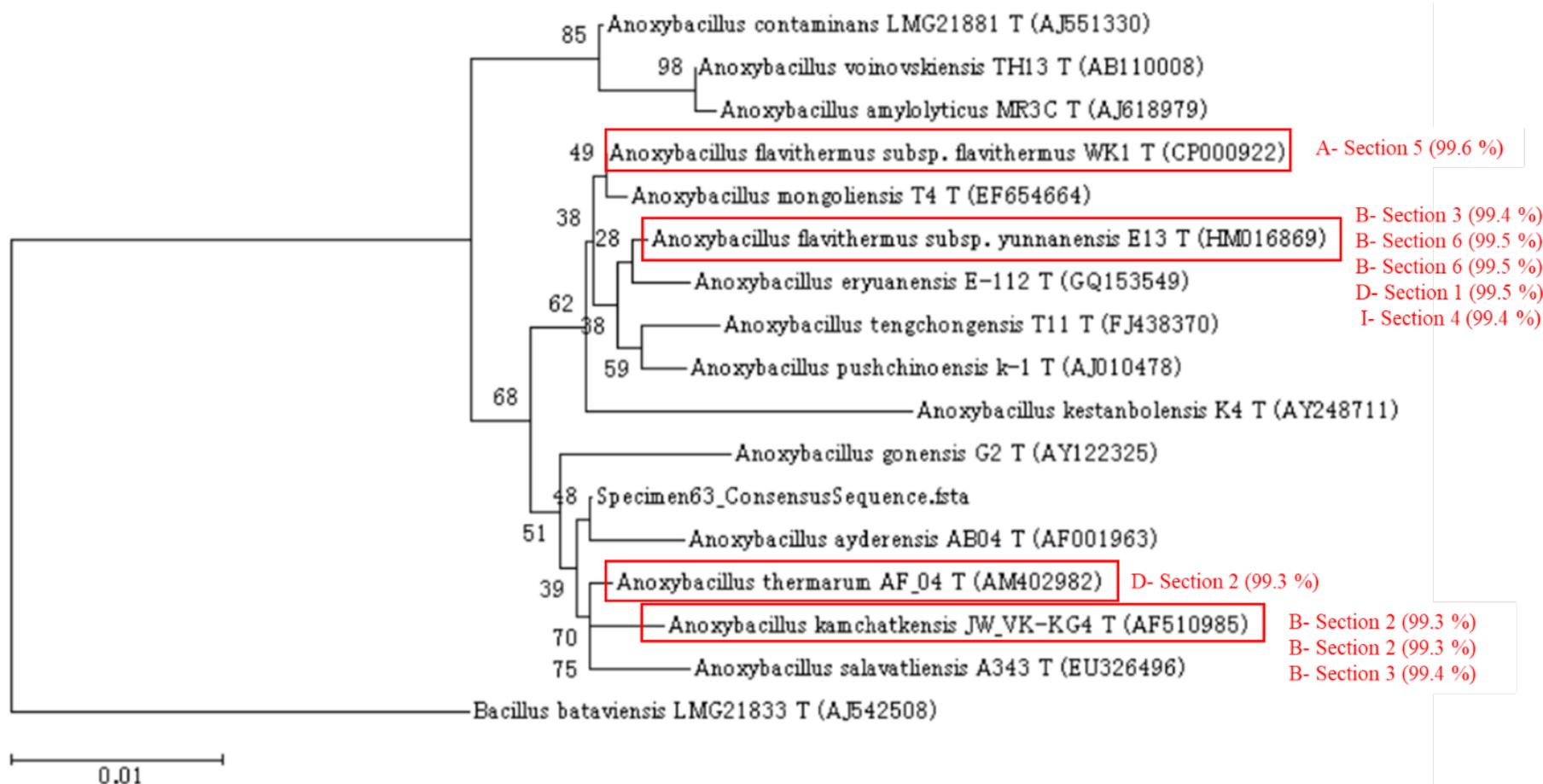


Fig. 2-10. The phylogenetic tree of *Anoxybacillus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type A (section 5), door-type B (section 2, 2, 3, 3, 6, 6), door-type D (section 1, 2) and conveyor-type I (section 1) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

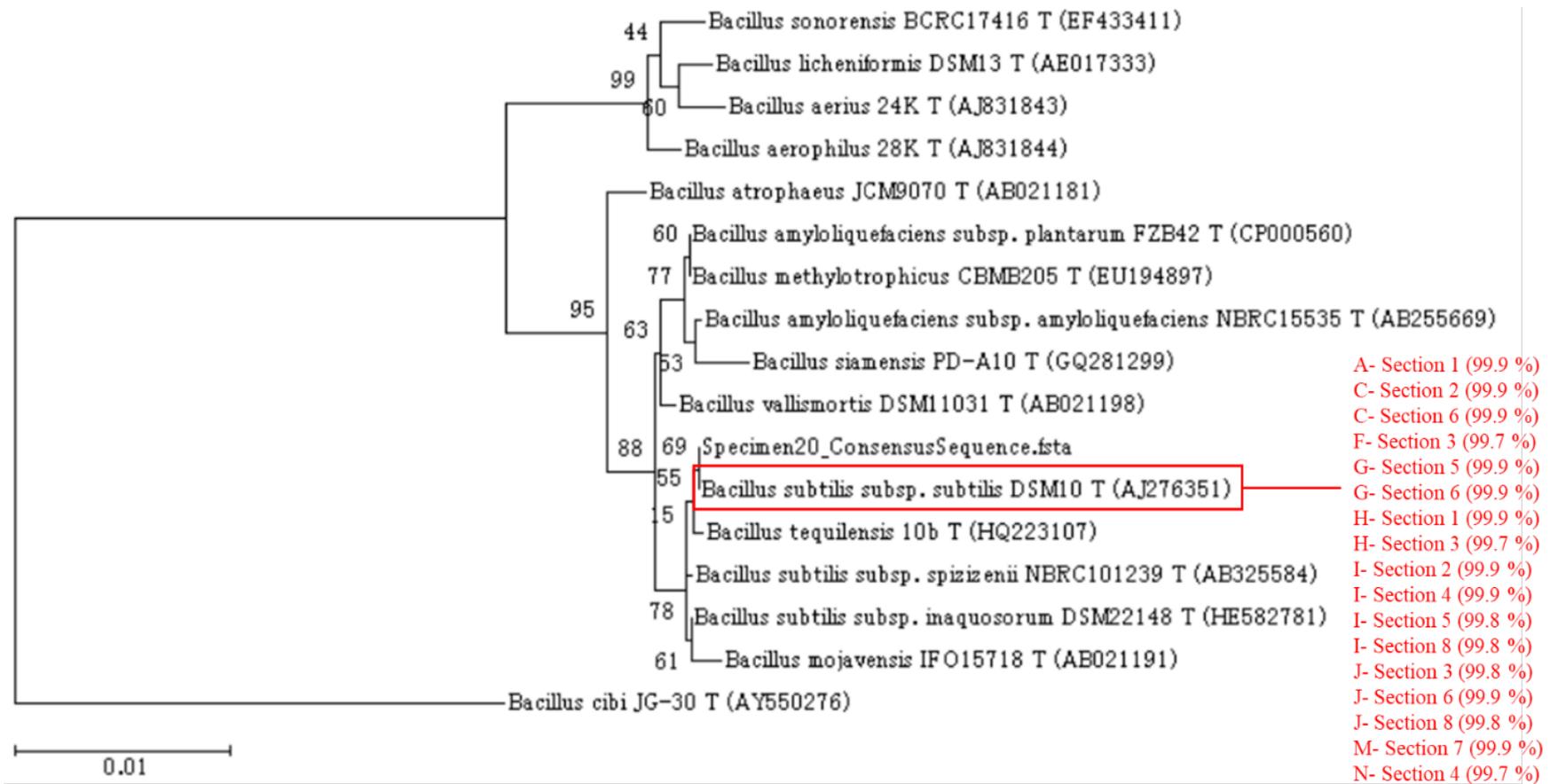


Fig. 2-11. The phylogenetic tree of *Bacillus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type A (section 1), door-type C (section 2, 6), door-type F (section 3), conveyor-type G (section 5, 6), conveyor-type H (section 1, 3), conveyor-type I (section 2, 4, 5, 8), conveyor-type J (section 3, 6, 8), conveyor-type M (section 7) and conveyor-type N (section 4) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

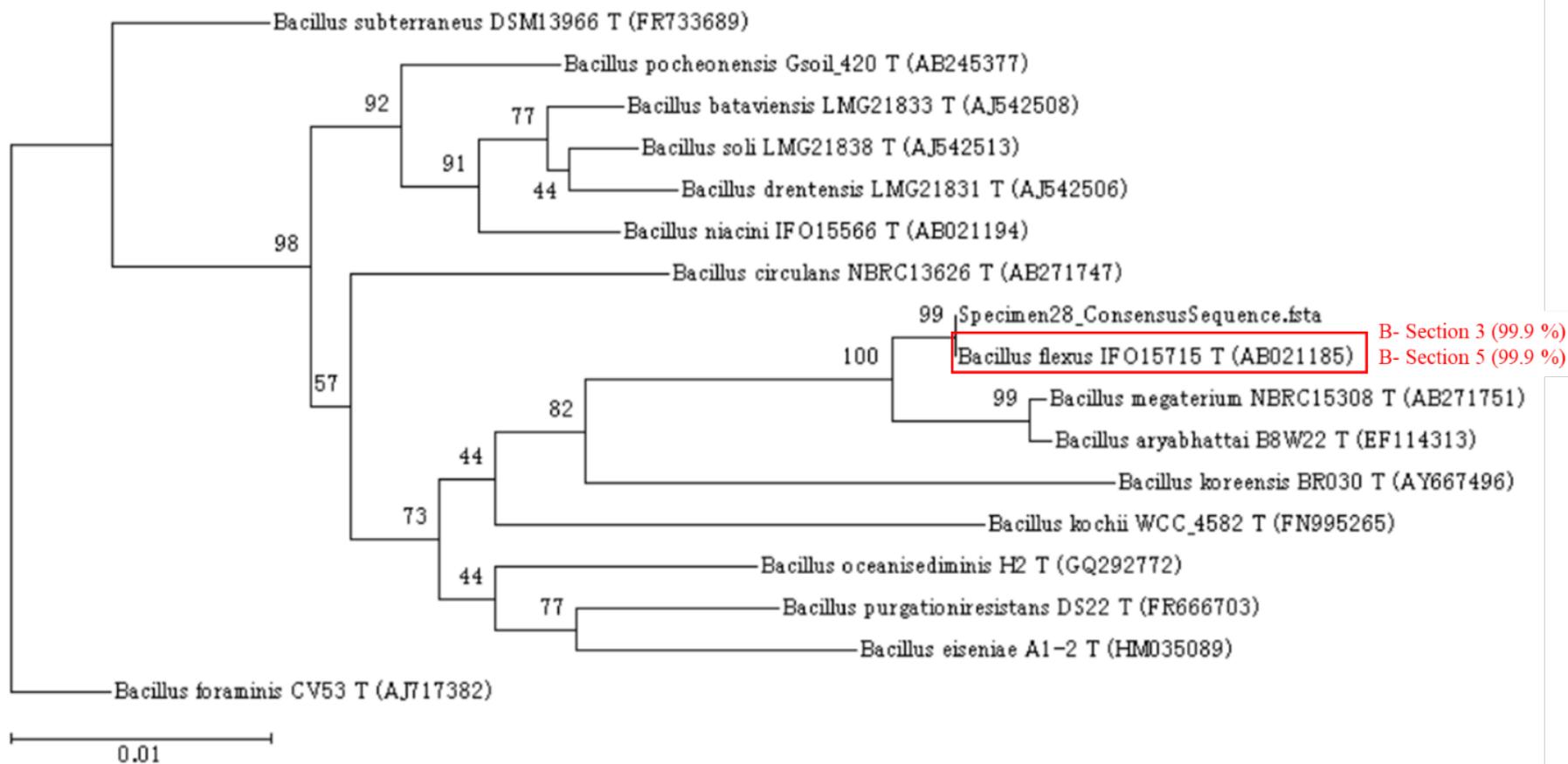


Fig. 2-12. The phylogenetic tree of *Bacillus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type B (section 3, 5) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

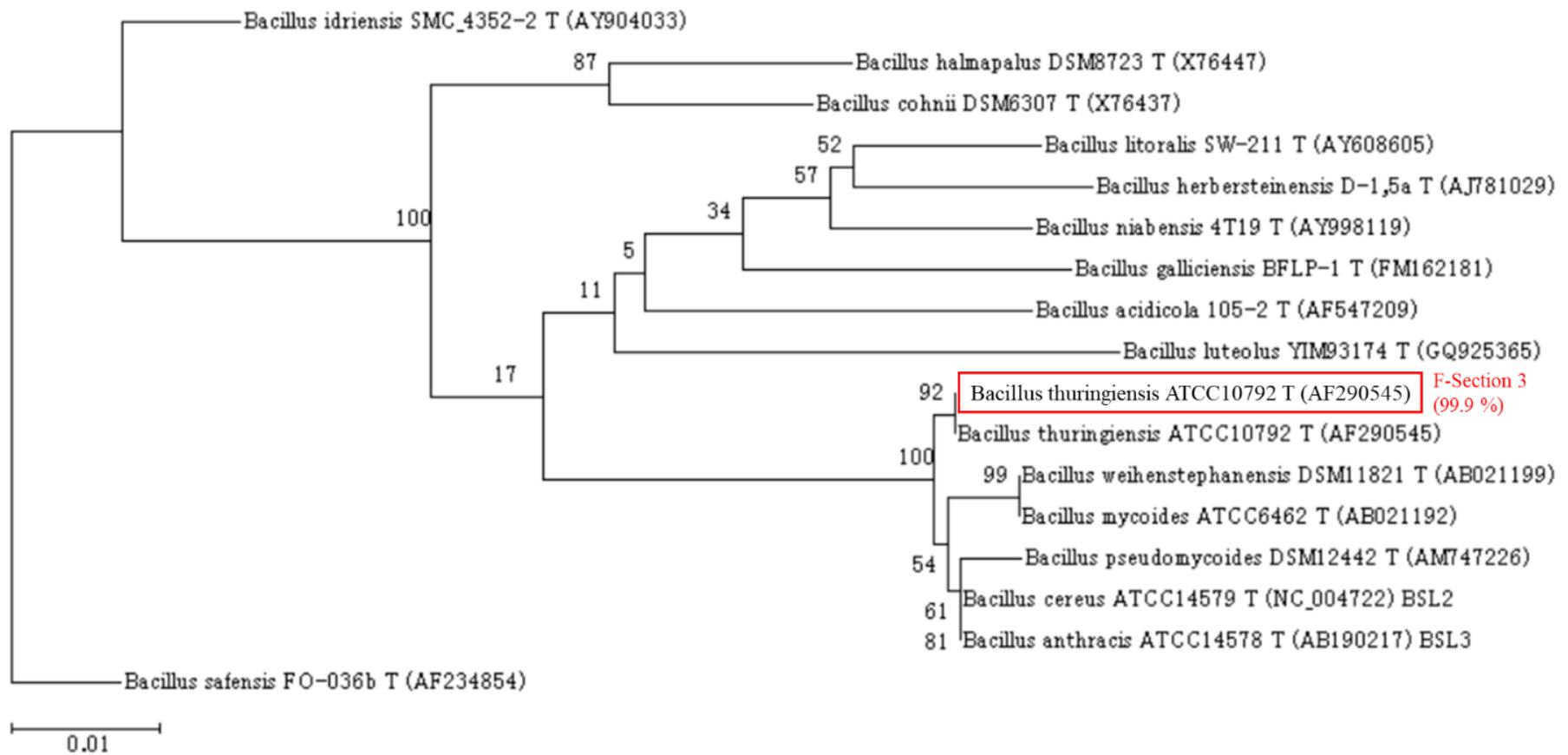


Fig. 2-13. The phylogenetic tree of *Bacillus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type F (section 3) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

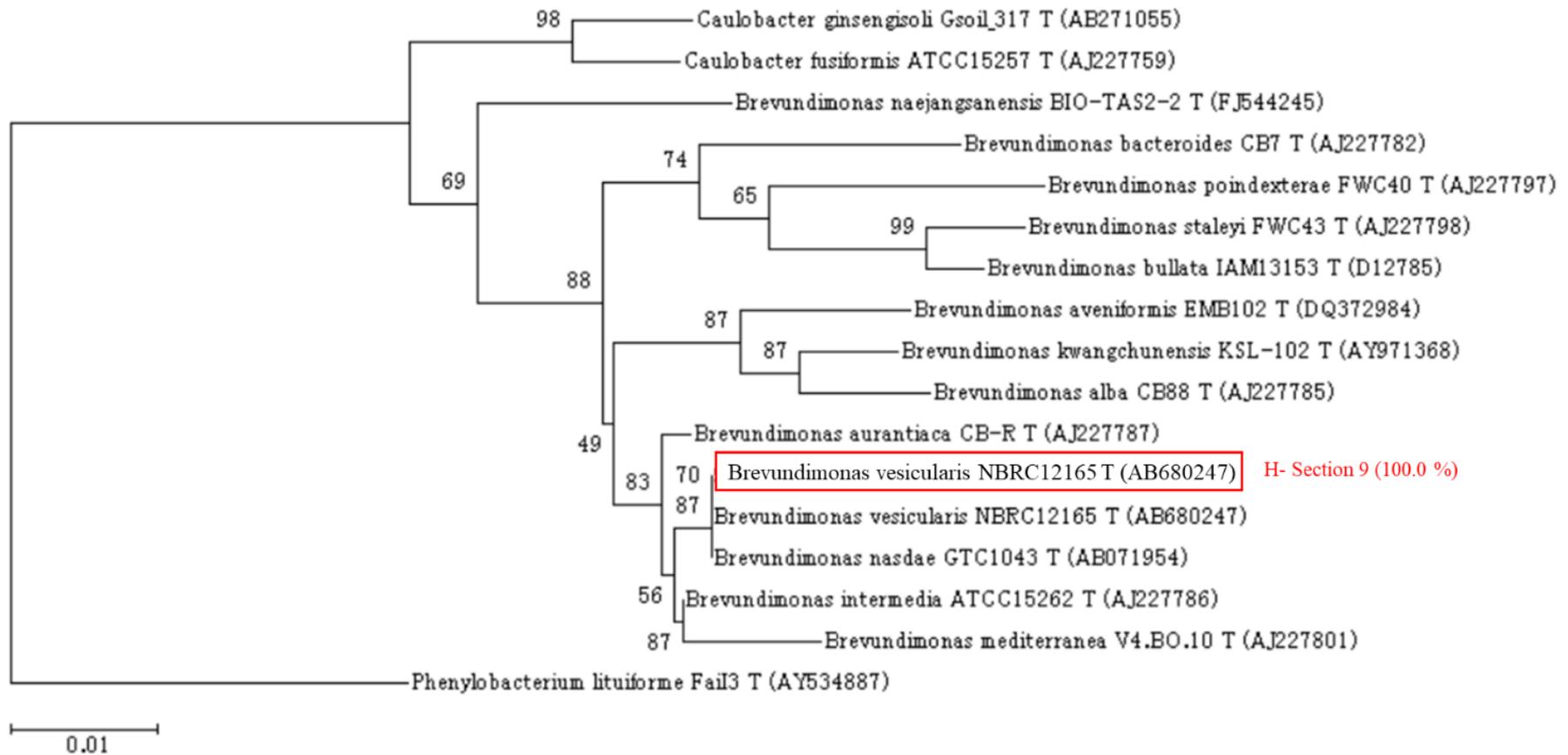


Fig. 2-14. The phylogenetic tree of *Brevundimonas* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type H (section 9) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

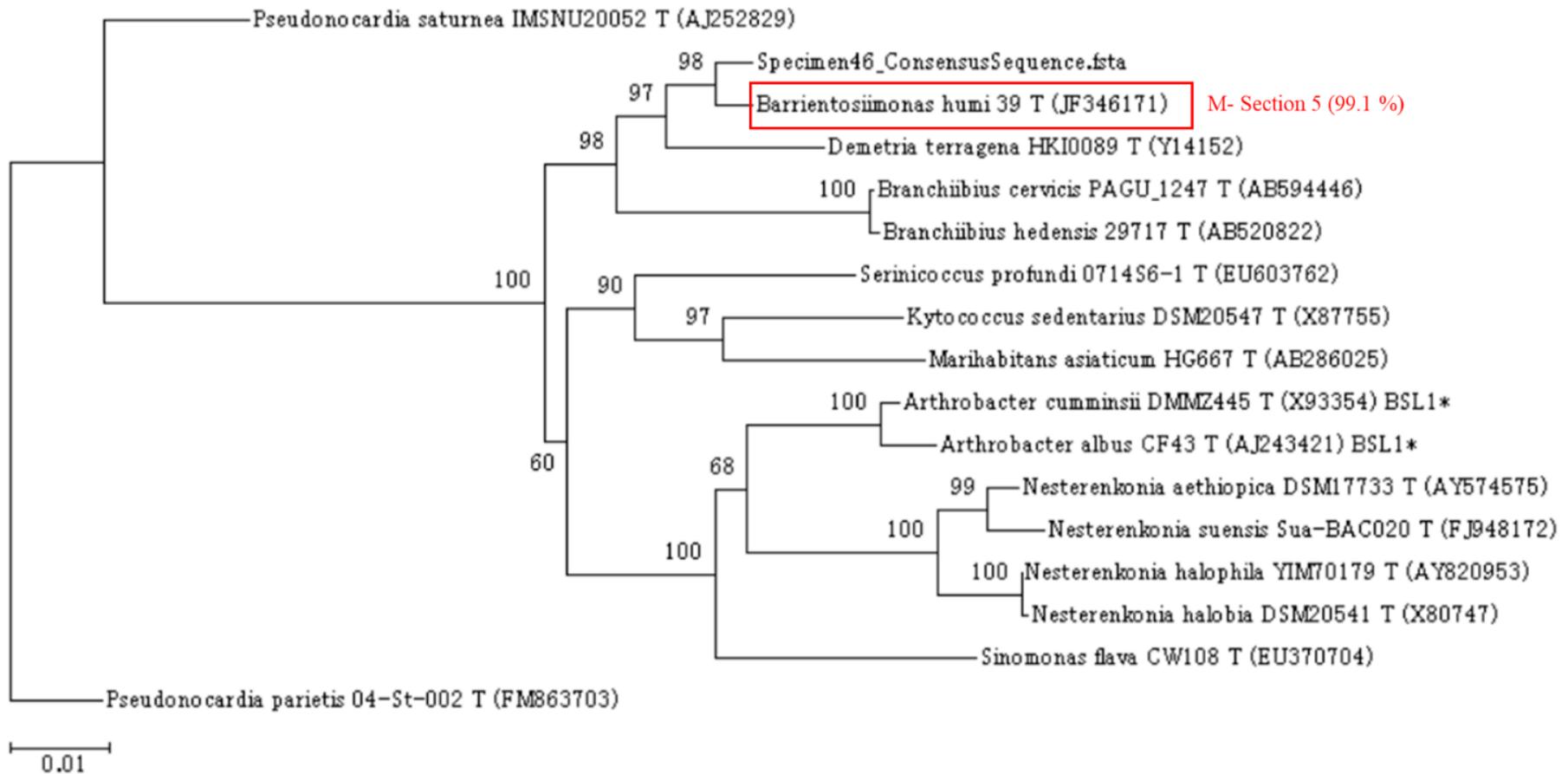


Fig. 2-15. The phylogenetic tree of *Barrientosiimonas* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type M (section 5) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

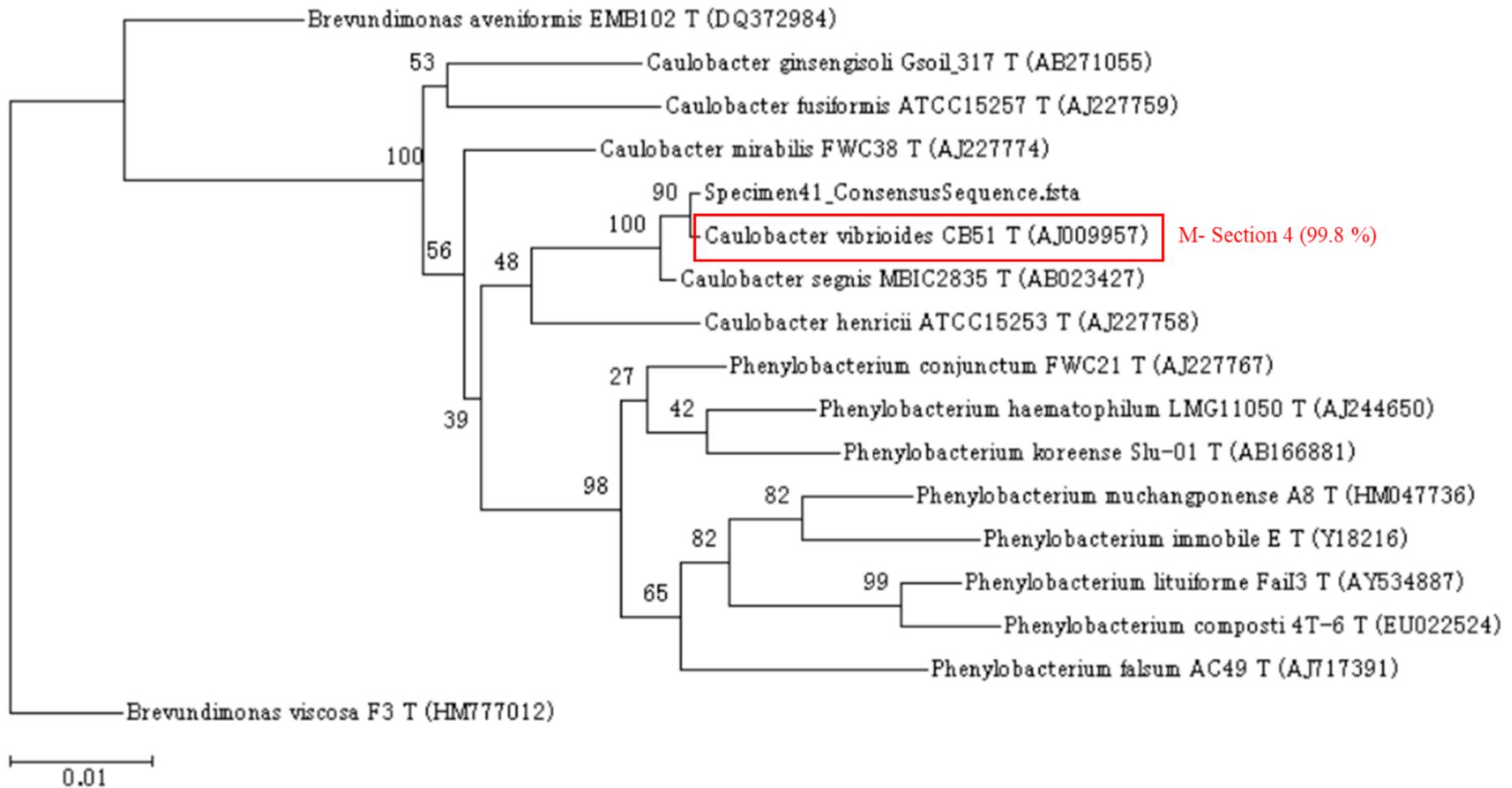


Fig. 2-16. The phylogenetic tree of *Caulobacter* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type M (section 4) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

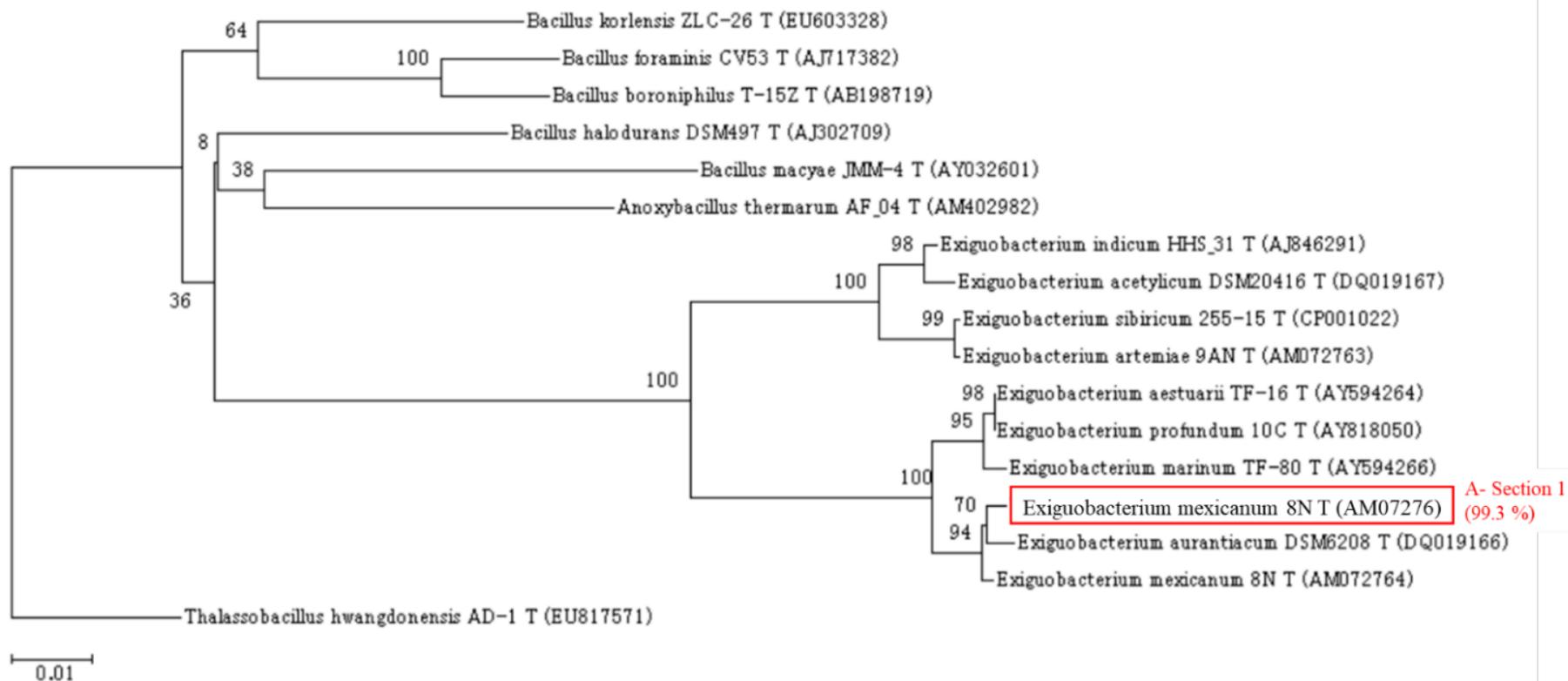


Fig. 2-17. The phylogenetic tree of *Exiguobacterium* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from door-type A (section 1) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.



Fig. 2-18. The phylogenetic tree of *Geobacillus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type C (section 2, 3, 4) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

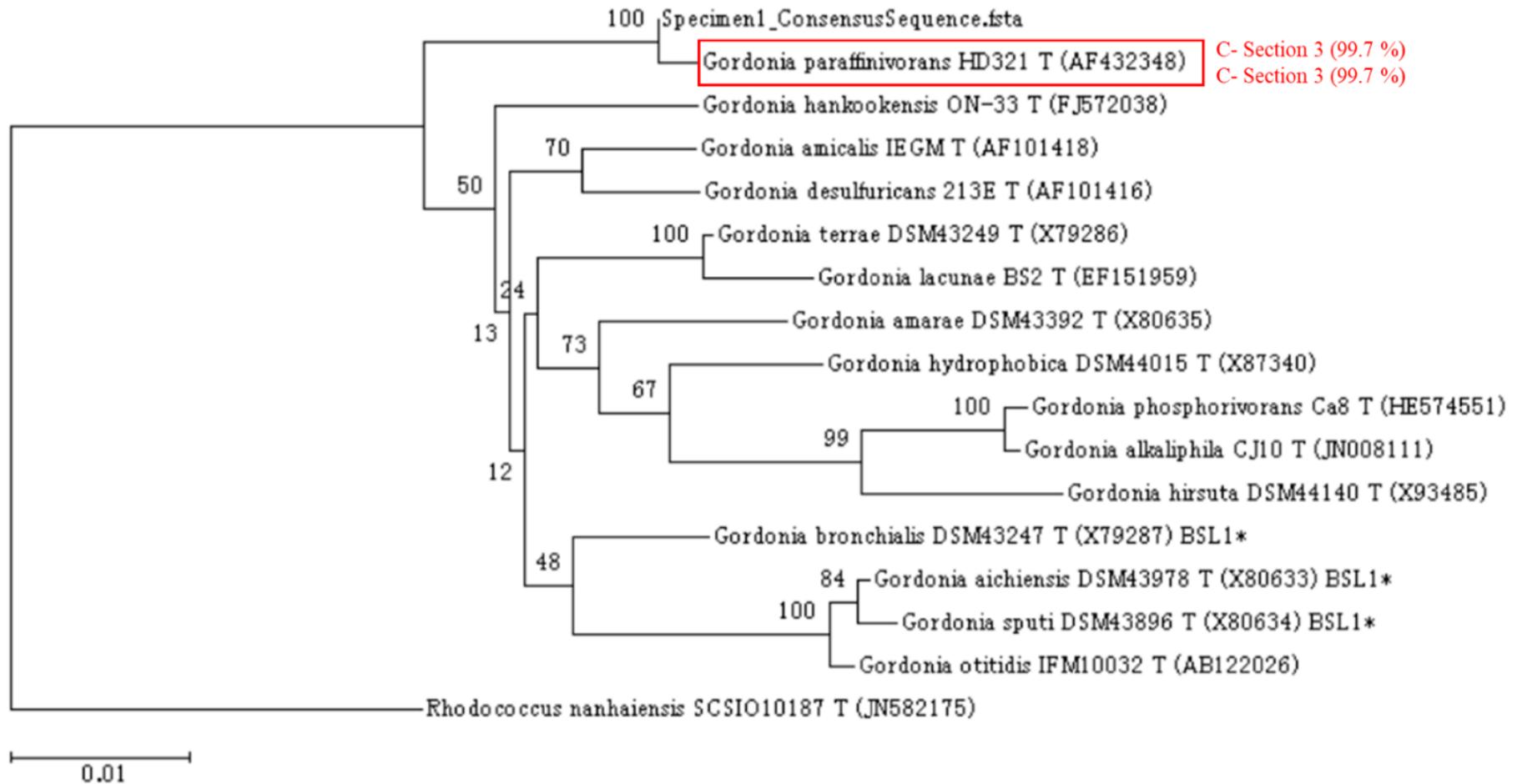


Fig. 2-19. The phylogenetic tree of *Gordonia* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type C (section 3, 3) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

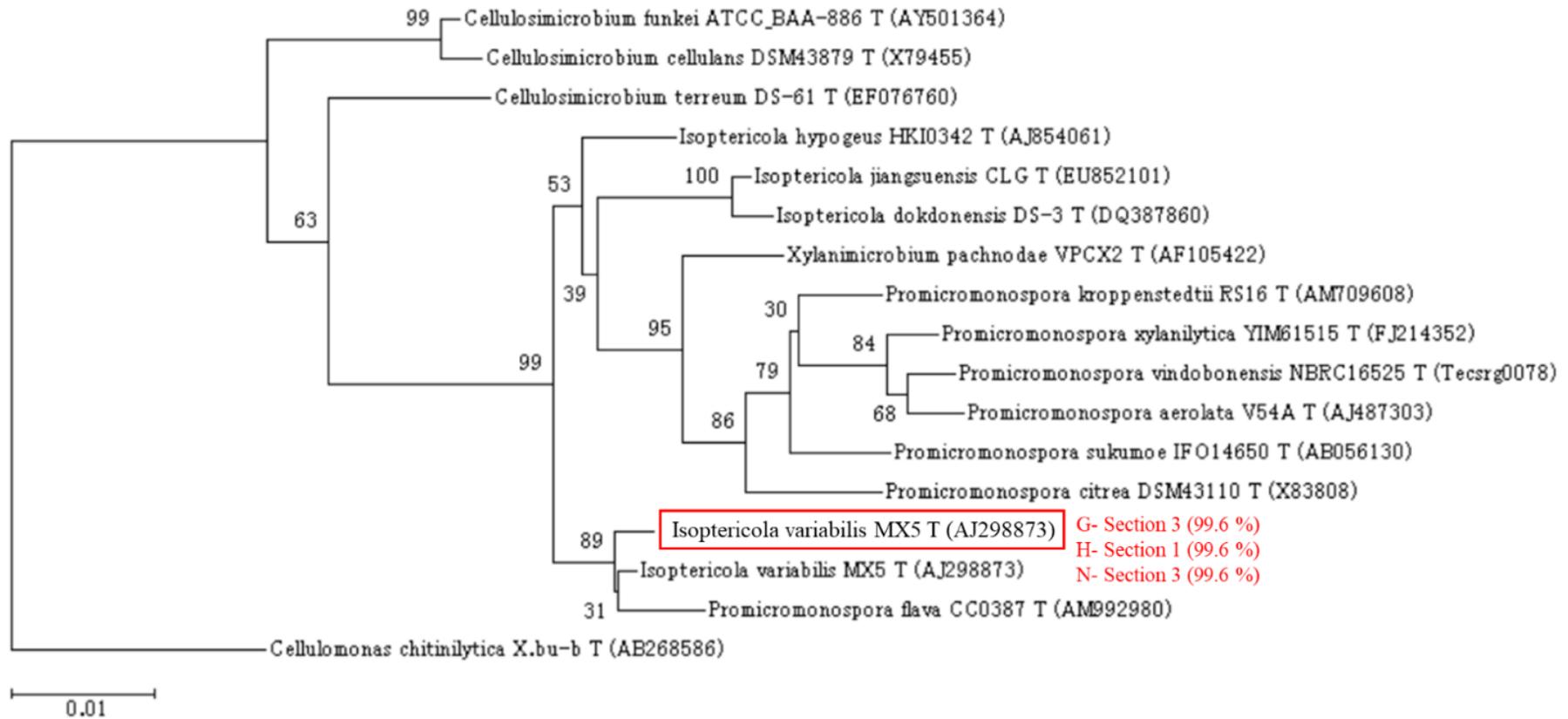


Fig. 2-20. The phylogenetic tree of *Isoptericola* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type G (section 3), conveyor H (section 1) and conveyor N (section 3) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

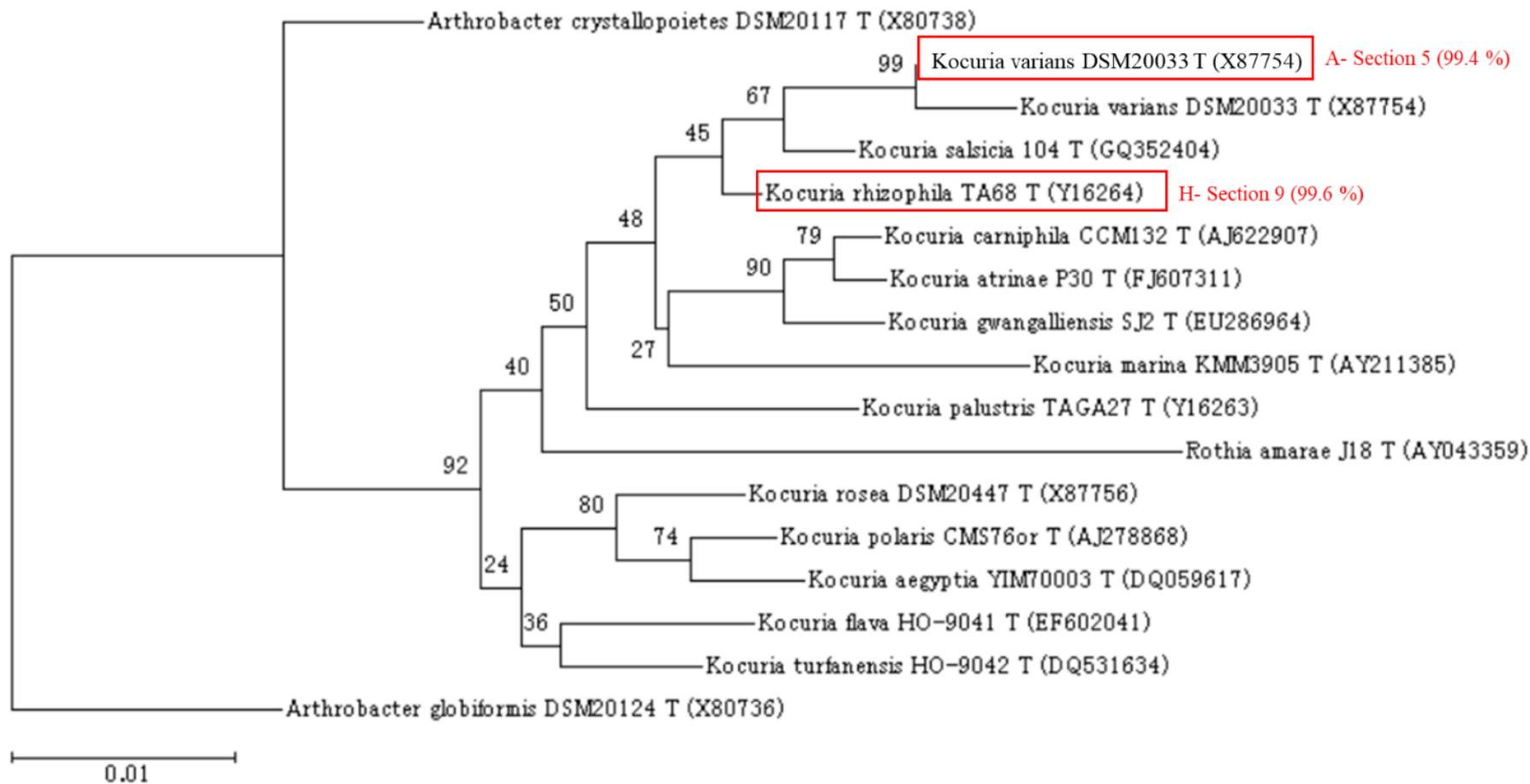


Fig. 2-21. The phylogenetic tree of *Kocuria* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type A (section 5) and conveyor H (section 9) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

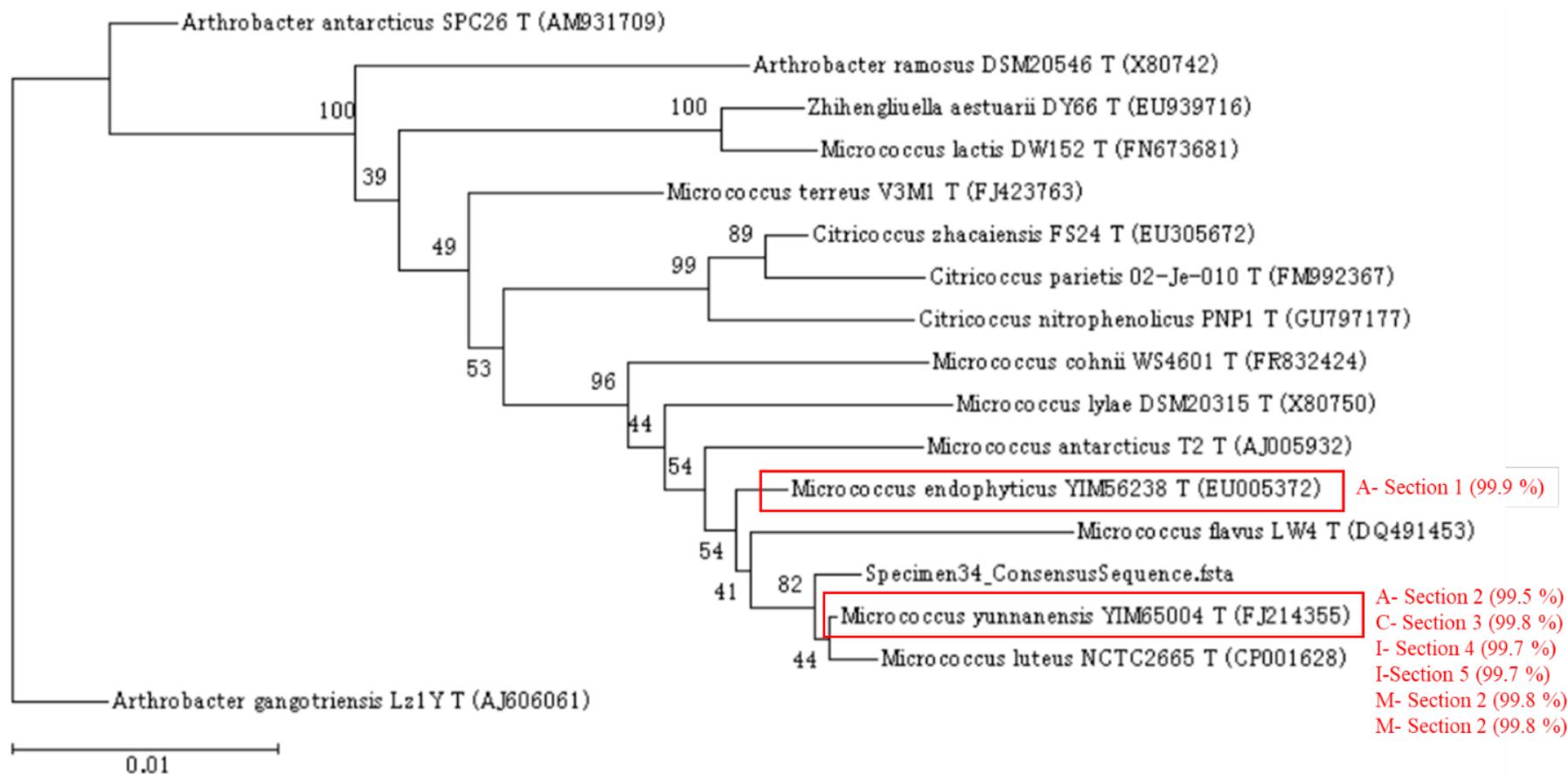


Fig. 2-22. The phylogenetic tree of *Micrococcus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type A (section 1, 2), door-type C (section 3), conveyor-type I (section 4, 5) and conveyor M (section 2, 2) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

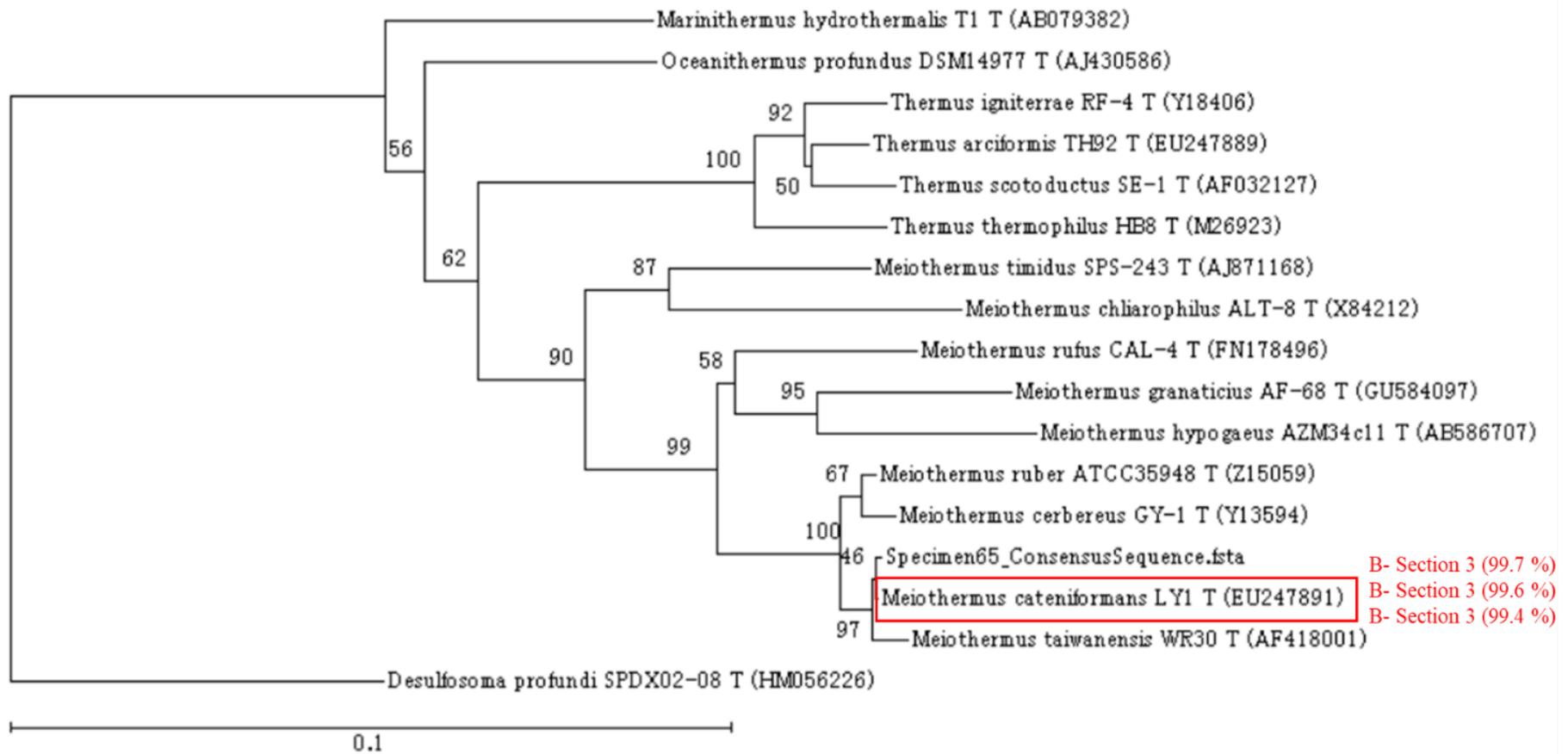


Fig. 2-23. The phylogenetic tree of *Meiothermus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type B (section 3, 3, 3) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

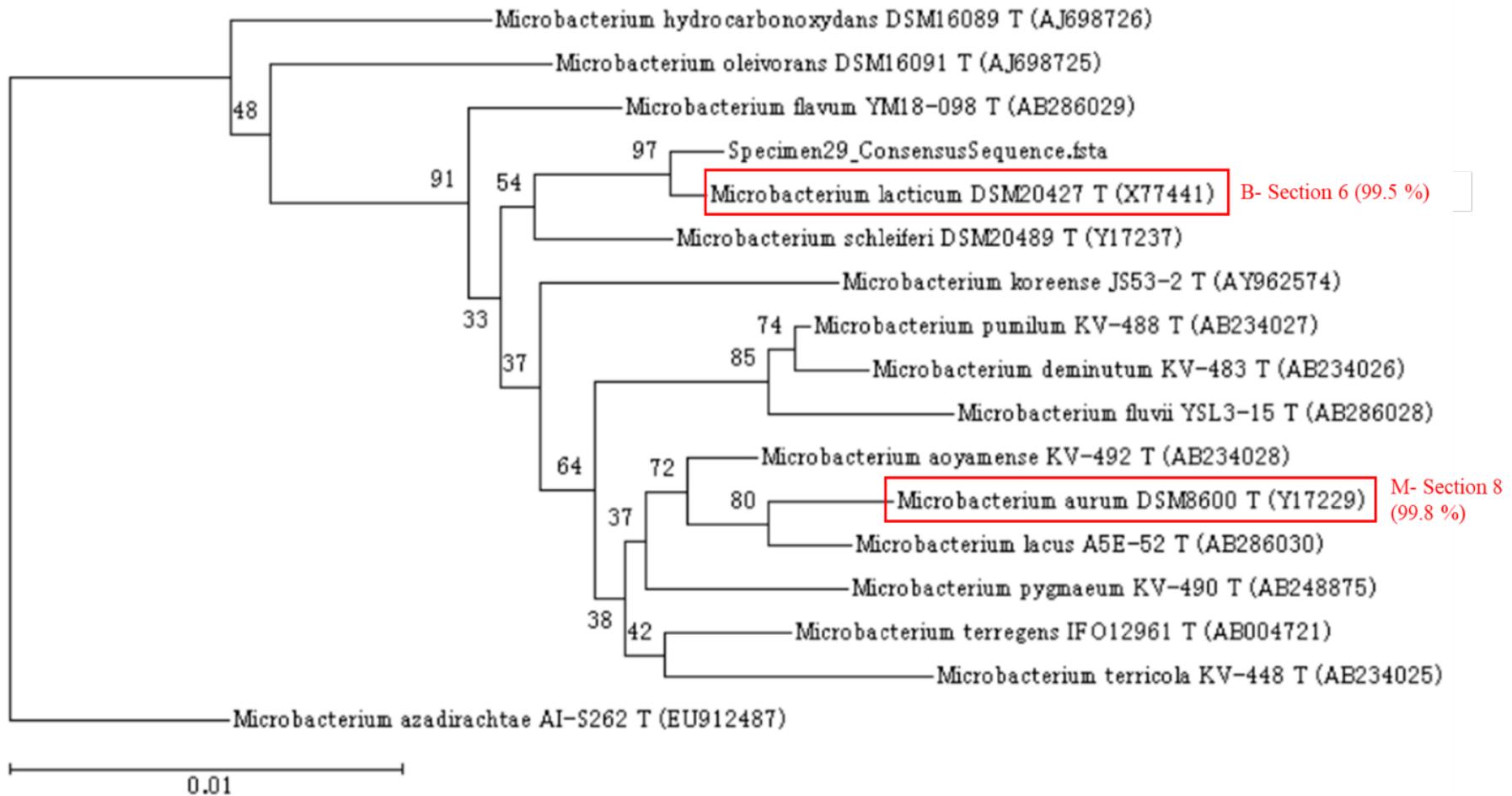


Fig. 2-24. The phylogenetic tree of *Microbacterium* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type B (section 6) and conveyor-type M (section 8) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

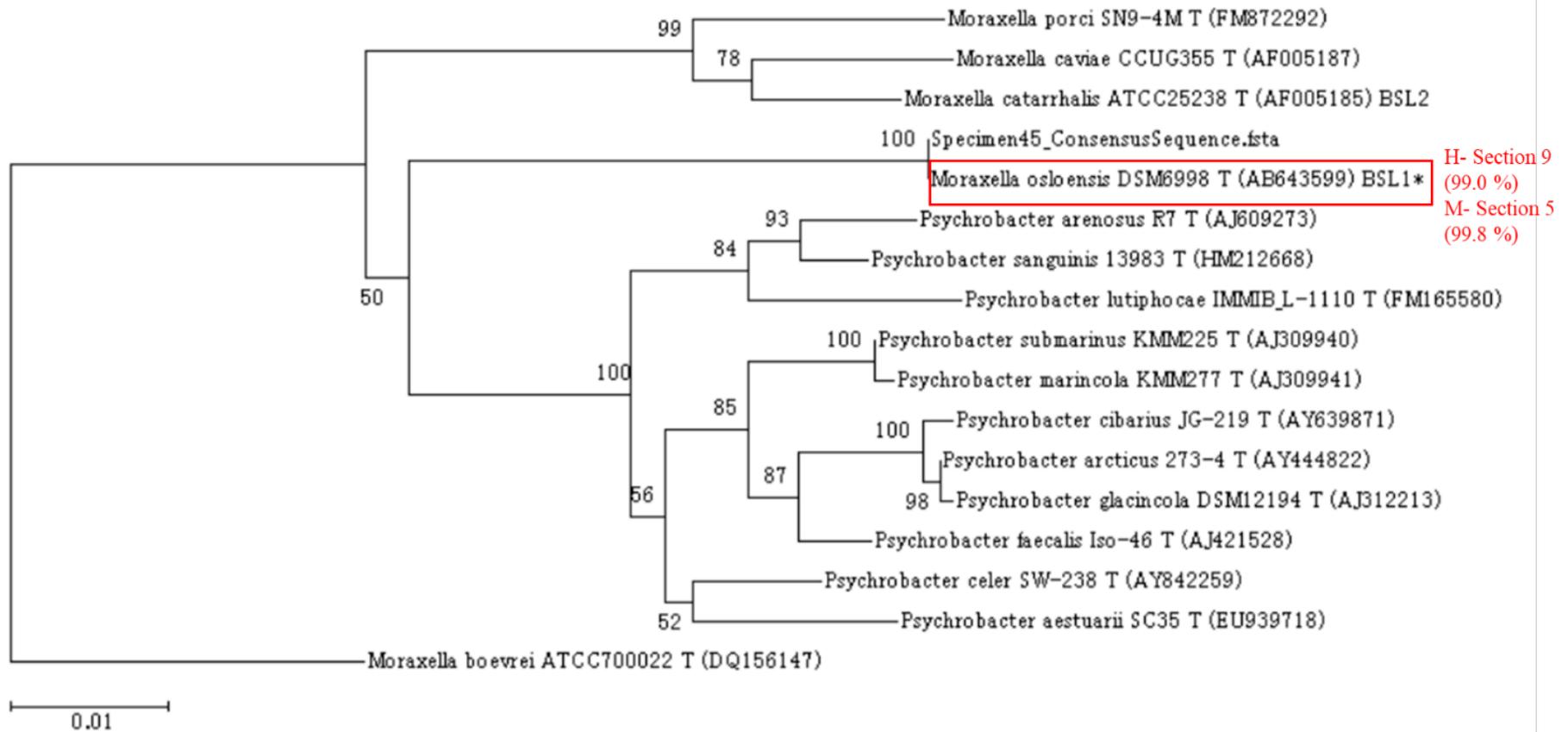


Fig. 2-25. The phylogenetic tree of *Moraxella* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type H (section 9) and conveyor-type M (section 5) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

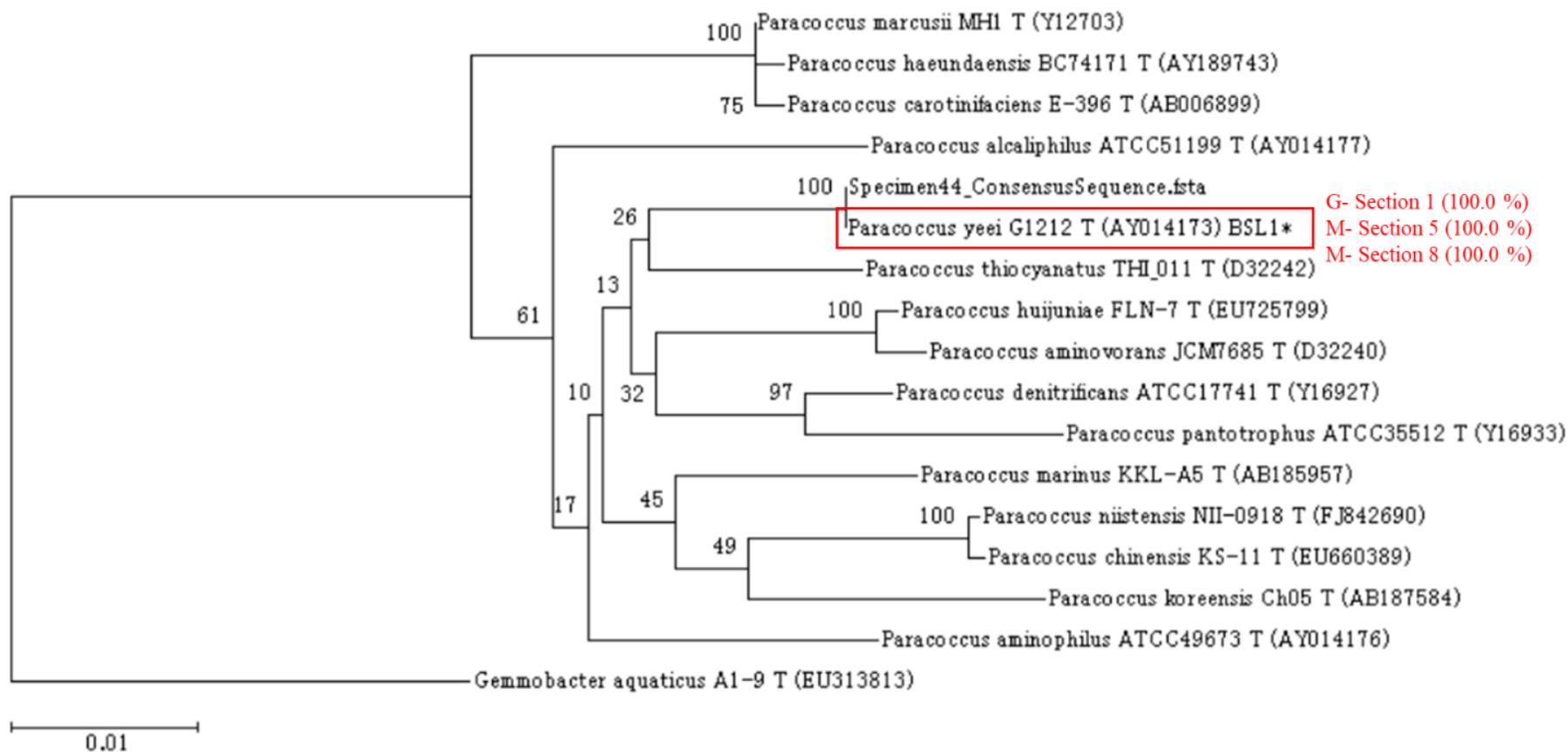


Fig. 2-26. The phylogenetic tree of *Paracoccus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type G (section 1) and conveyor-type M (section 5, 8) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

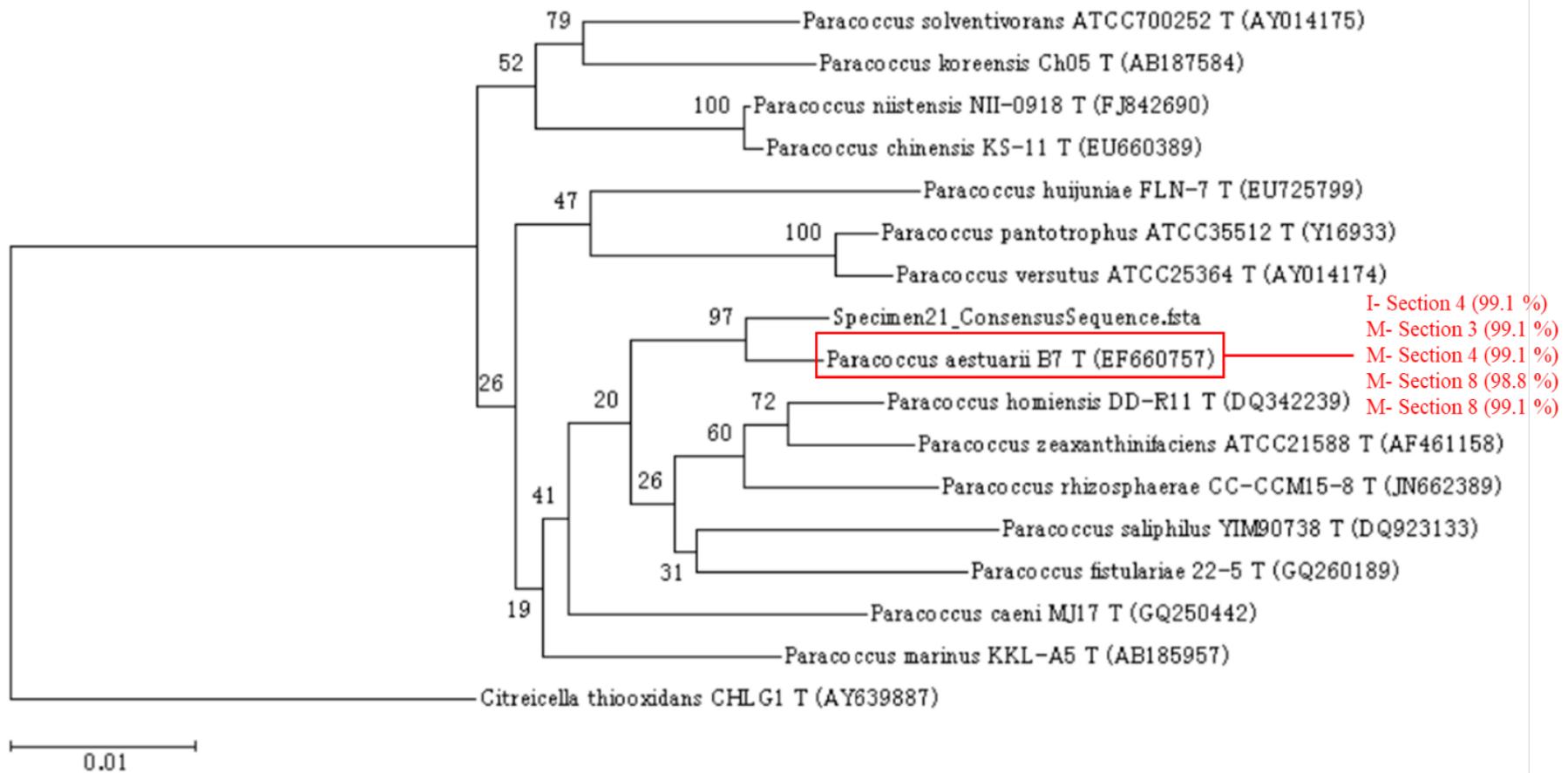


Fig. 2-27. The phylogenetic tree of *Paracoccus* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type I (section 4) and conveyor-type M (section 3, 4, 8, 8) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

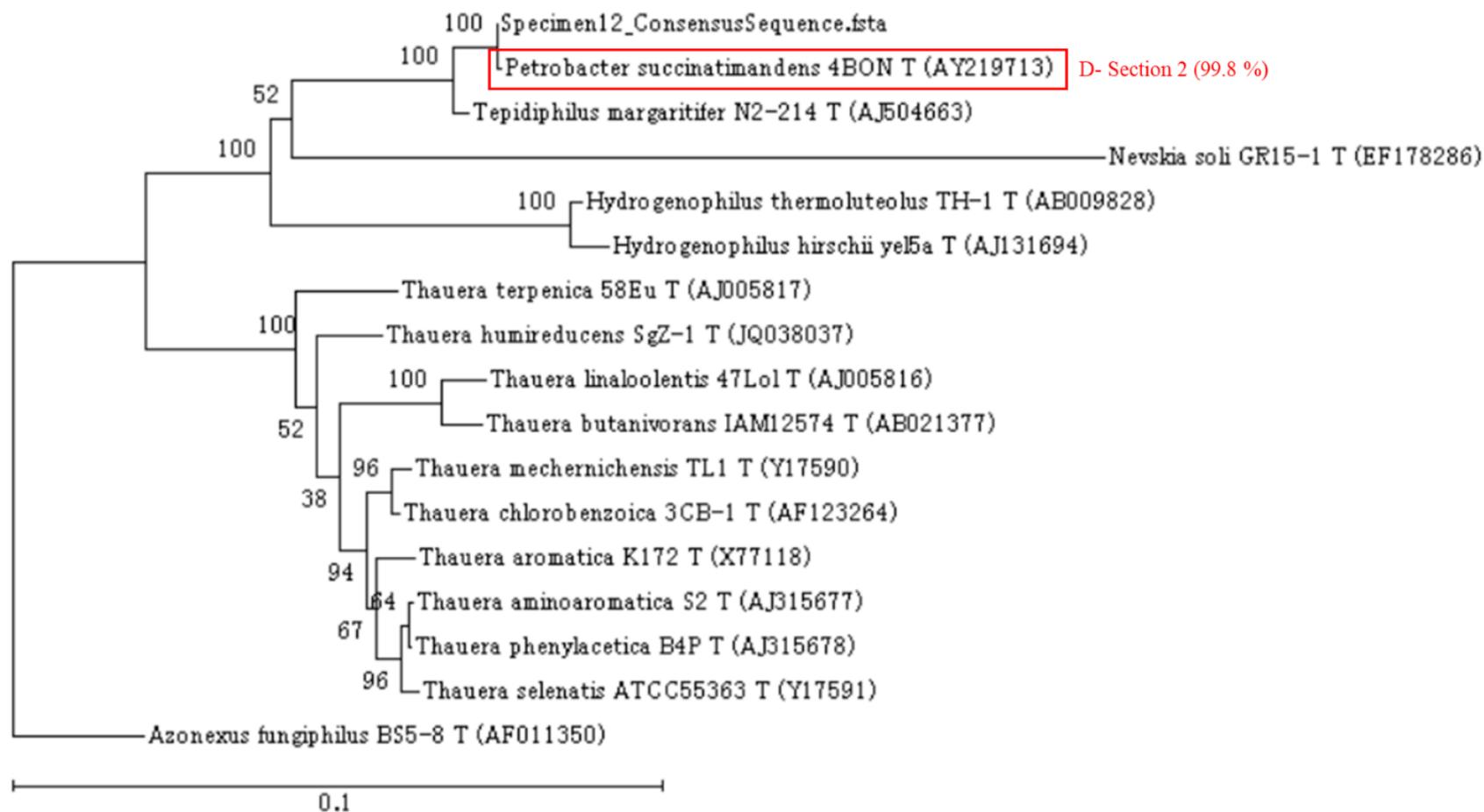


Fig. 2-28. The phylogenetic tree of *Petrobacter* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from door-type D (section 2) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

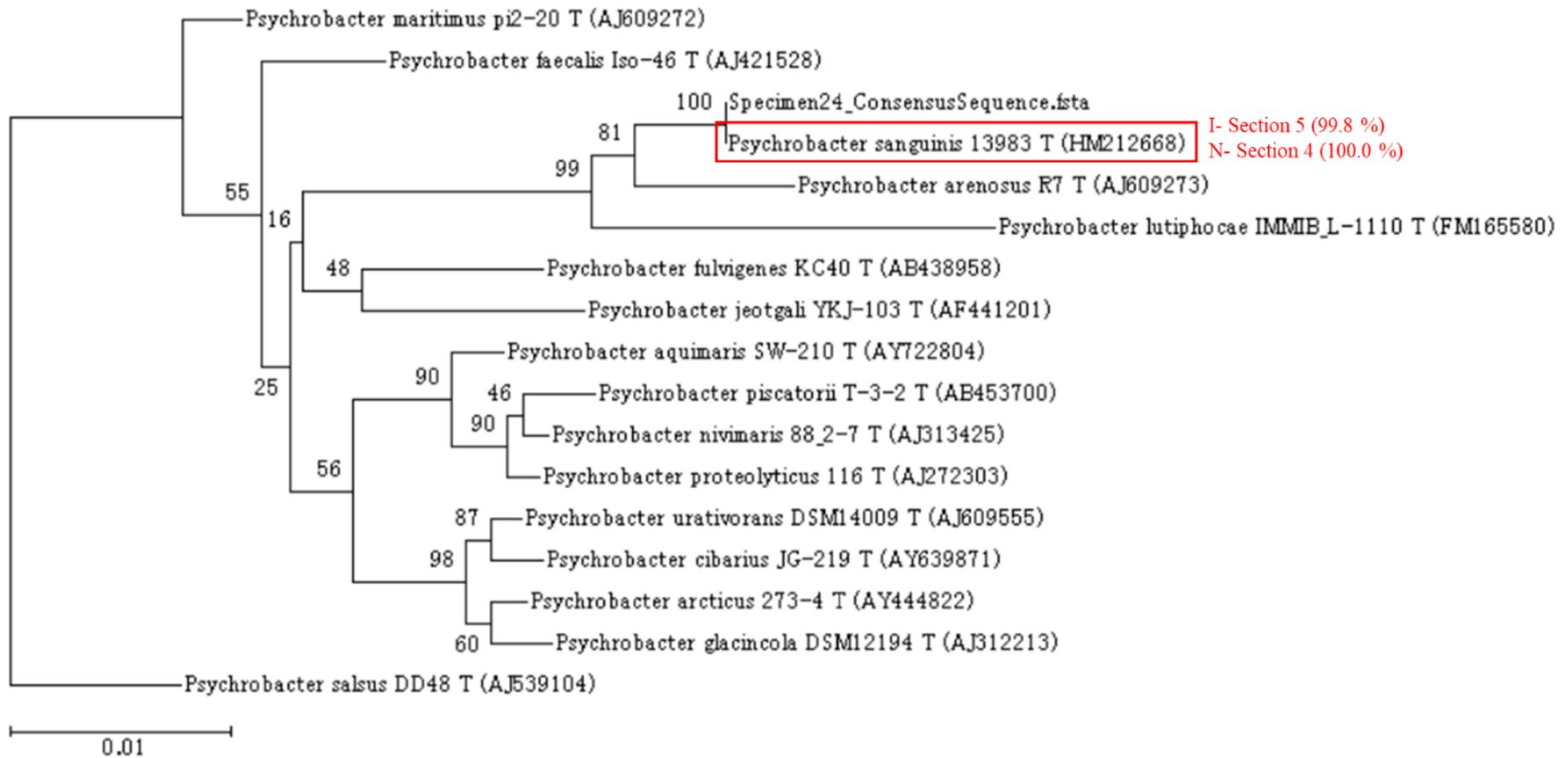


Fig. 2-29. The phylogenetic tree of *Psychrobacter* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type I (section 5) and conveyor-type N (section 4) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

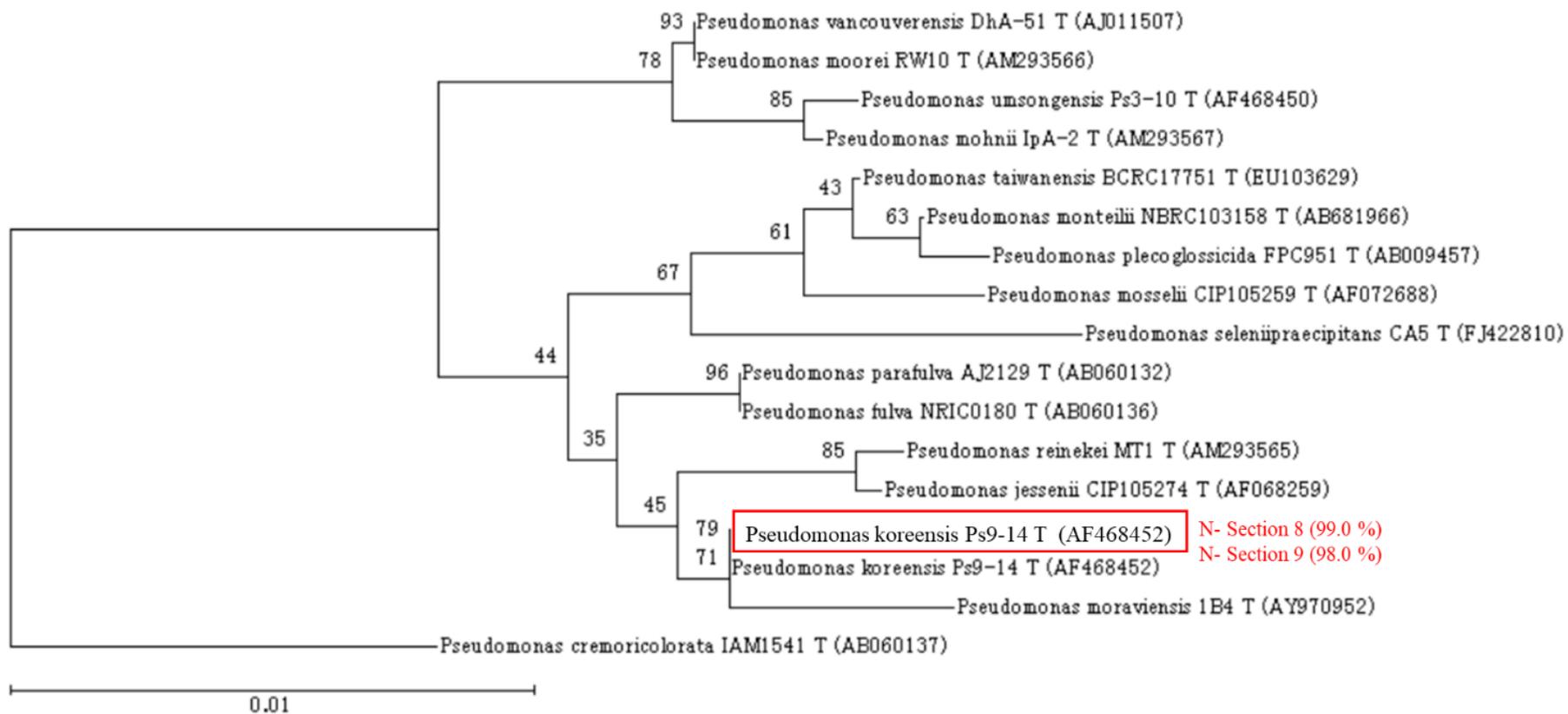


Fig. 2-30. The phylogenetic tree of *Pseudomonas* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from conveyor-type N (section 8, 9) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

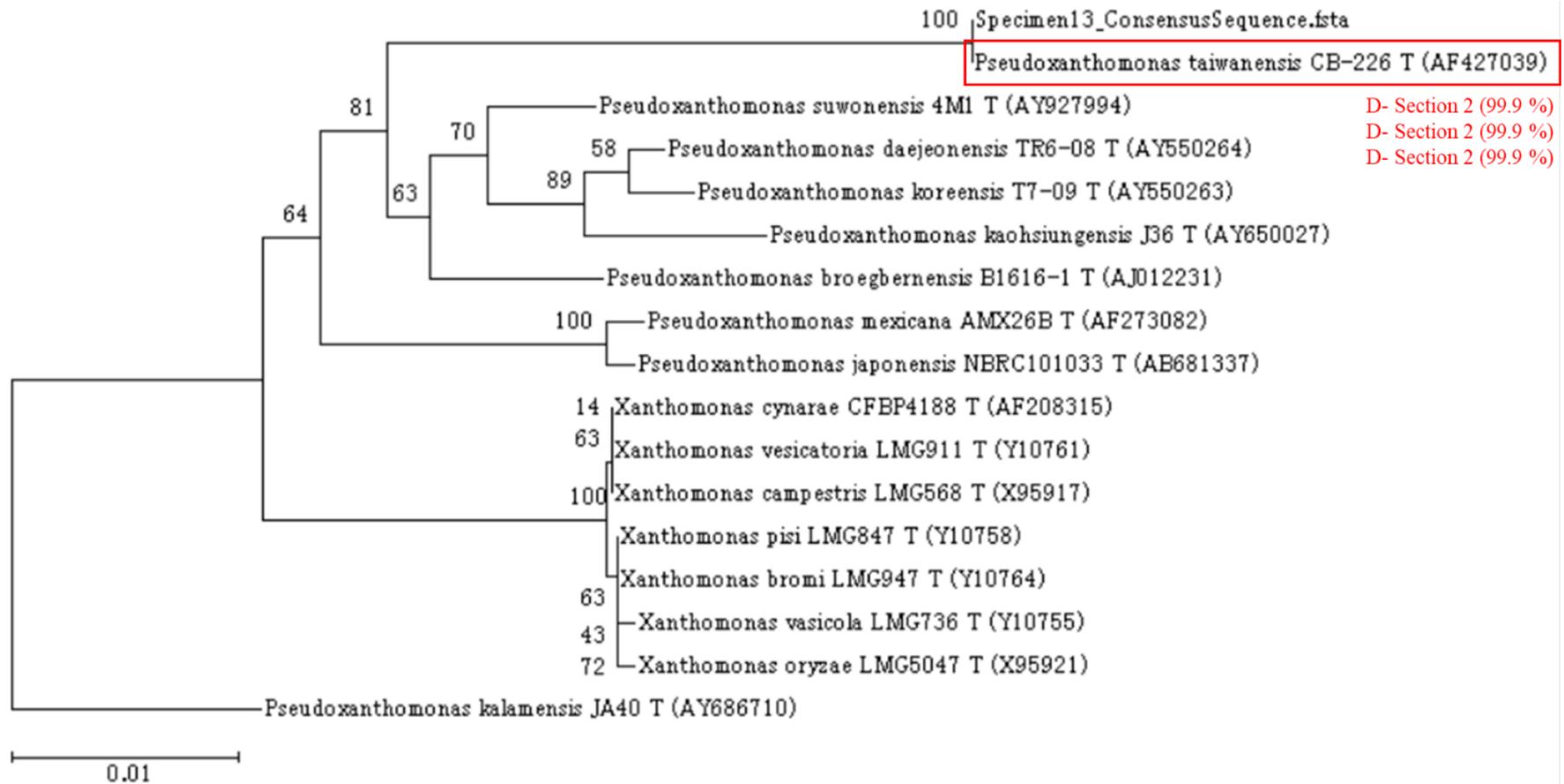


Fig. 2-31. The phylogenetic tree of *Pseudoxanthomonas* isolated.

Type strains which have the highest homologies with the isolated strains from door-type D (section 2, 2, 2) are marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

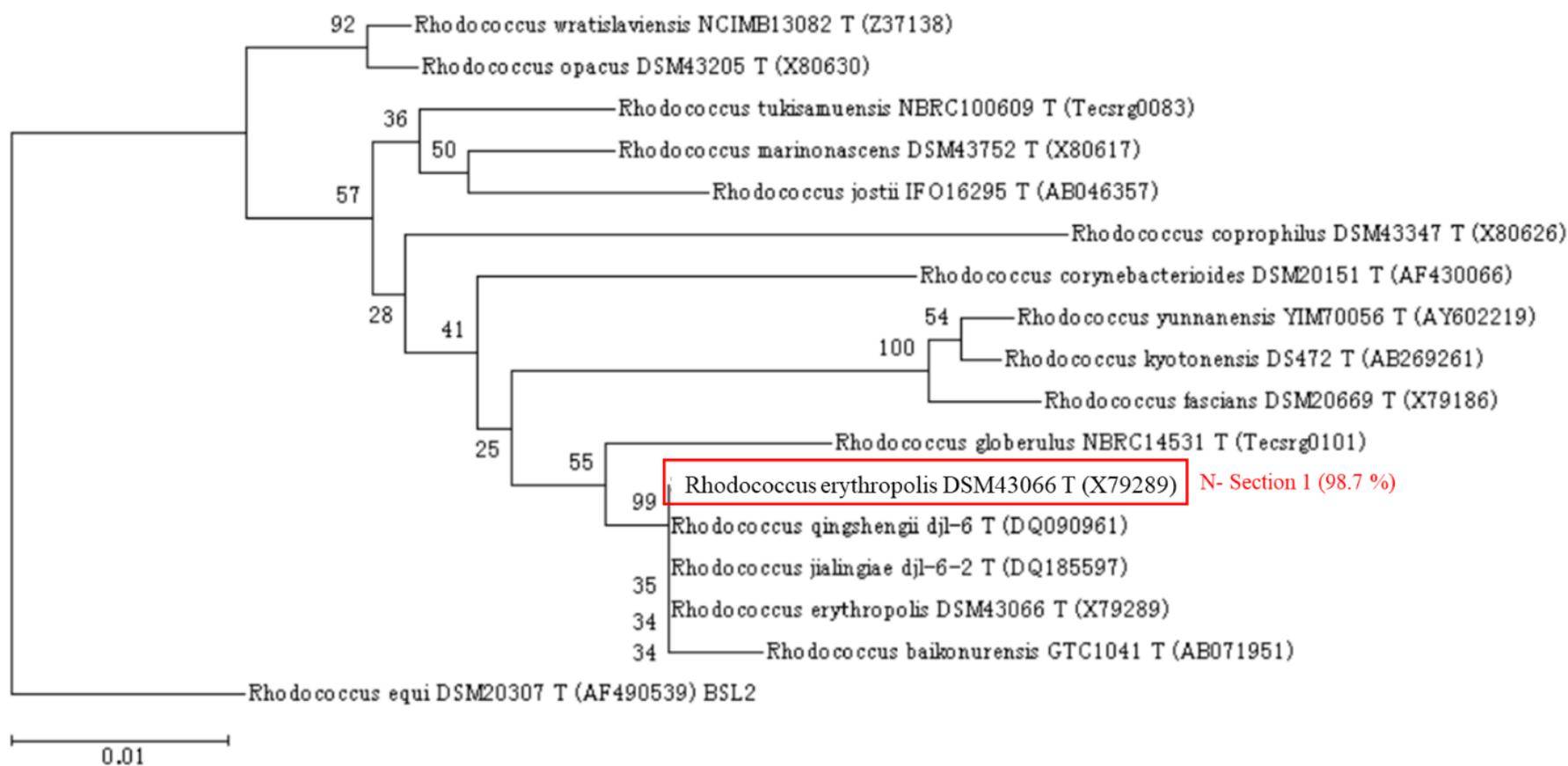


Fig. 2-32. The phylogenetic tree of *Rhodococcus* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type N (section 1) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

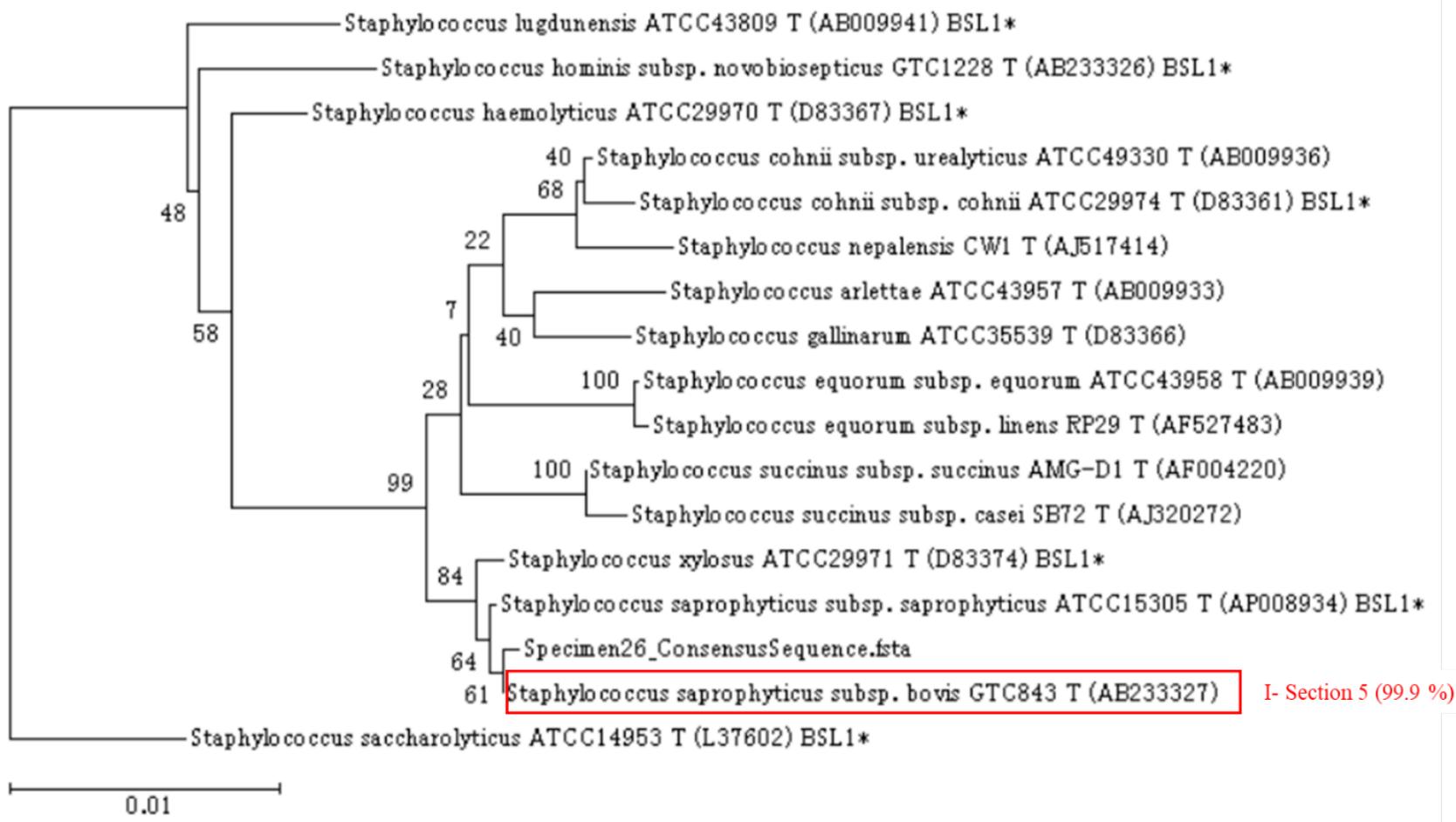


Fig. 2-33. The phylogenetic tree of *Staphylococcus* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from conveyor-type I (section 5) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

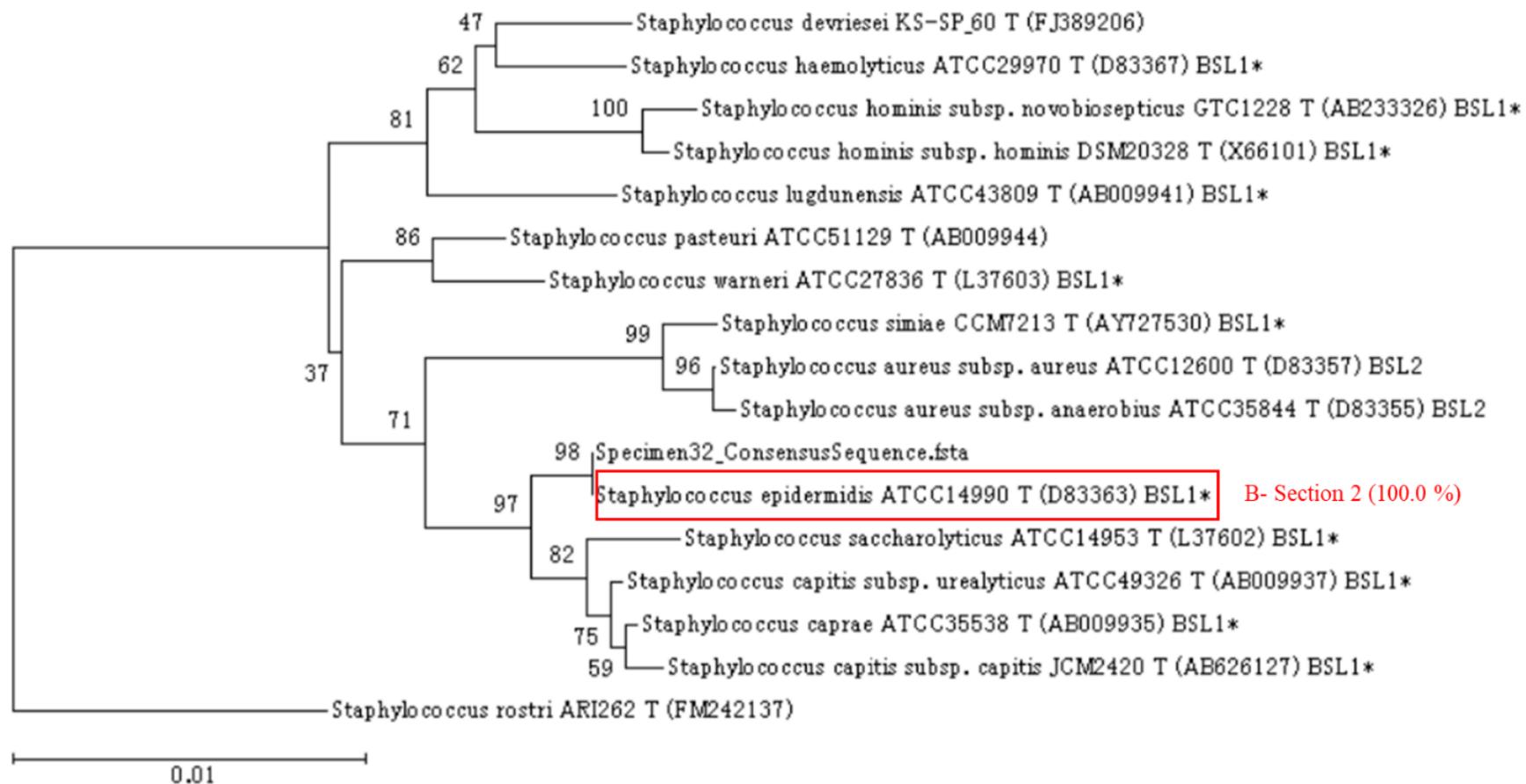


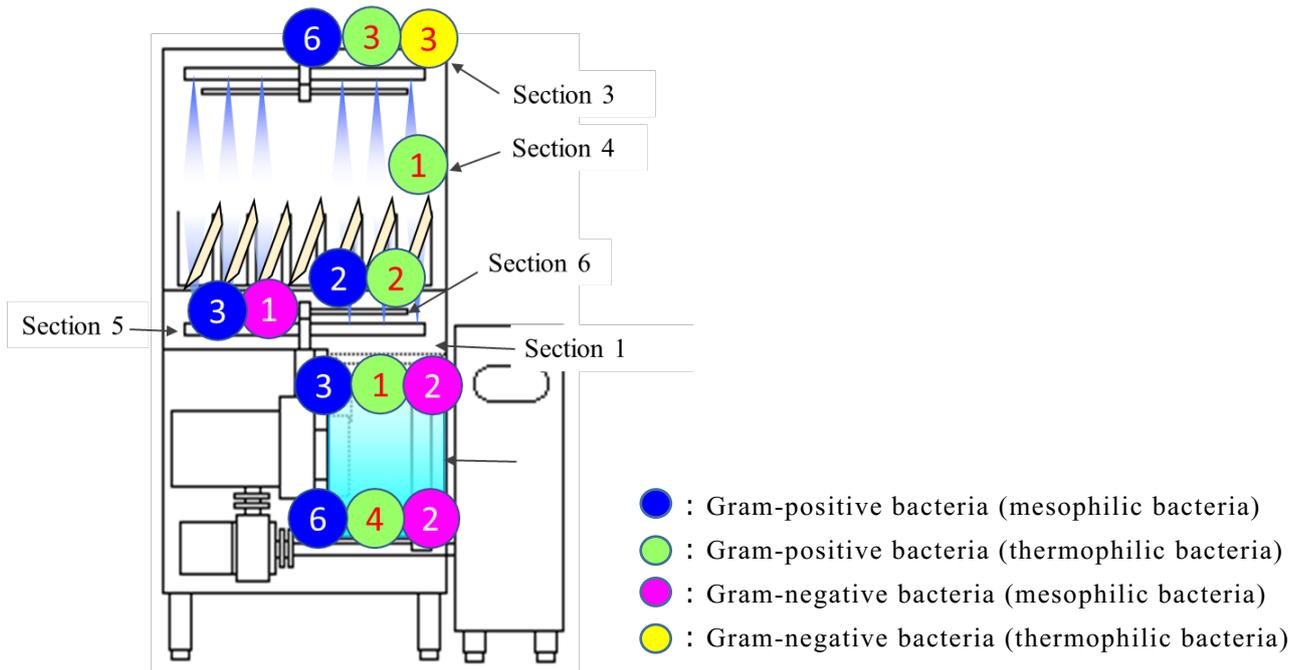
Fig. 2-34. The phylogenetic tree of *Staphylococcus* isolated.

Type strain which has the highest homology with the isolated strain from door-type B (section 2) is marked in red line. The number in parenthesis represents their homology of the 16S rRNA genes.

次に、分離した 84 株をグラム陽性菌（中温・好熱性）とグラム陰性菌（中温・好熱性）で分類し、それぞれを検出された食洗機の区画毎にマッピングし、その株数を図中に示した（Fig. 2-35-(a),(b)）。ドアタイプの壁面（Section 4）とすすぎノズル（Section 6）、コンベアタイプのすすぎノズル（Section 7）とすすぎ槽壁面（Section 7）からグラム陰性菌が分離されなかったことは興味深い。この結果は、洗浄工程ではなくすすぎ工程がグラム陰性菌の数を減らすために重要であることを示している。グラム陰性菌の細胞壁は、グラム陽性菌の細胞壁よりも薄く弱い。また、グラム陰性菌は物理的ストレスによるダメージを受けやすいが<sup>22)</sup>、外膜を持つために抗生物質に対して耐性があり、その外膜が細胞への透過性低下に寄与している<sup>23)</sup>。80℃のすすぎ工程は、グラム陽性菌よりもグラム陰性菌に対しての方が有害である可能性がある。コンベアタイプのラックレール（Section 8）およびカーテン（Section 9）から中温グラム陰性菌が分離されていることにも注目したい。これらの部位は高温に暴露されることが少なく、ドアタイプ洗浄機にはない。

今回の研究で分離されたすべての細菌は、好気性条件下で増殖した。同定された 23 属 84 株のうち、20 属 79 株がカタラーゼ陽性株に分類された。多くのカタラーゼ陽性株は好気性細菌もしくは通性嫌気性菌であることから、今回の実験条件において偏性嫌気性菌は得にくいことが分かった。異なる培養条件（嫌気性条件下や選択培地の使用）で試験すると、外食産業の食洗機内でバイオフィルムを形成する細菌叢が明らかになるはずである。

(a) Door-type



(b) conveyor-type

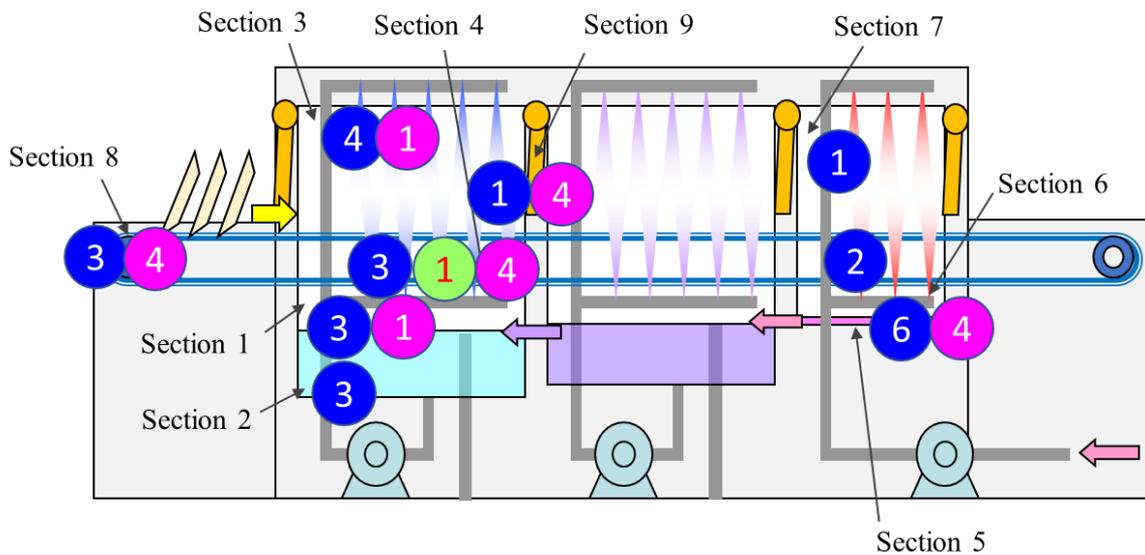


Fig. 2-35. Mapping of isolated bacteria.

The identified strains were classified into gram-positive bacteria (mesophilic bacteria), gram-positive bacteria (thermophilic bacteria), gram-negative bacteria (mesophilic bacteria) and gram-negative bacteria (thermophilic bacteria), and mapped to the dishwasher section. The number in the circle shows the number of isolated strains.

続いて分離株について詳細な解析を行った。生菌数測定結果と菌種の同定結果より、各細菌の占有率を算出した (Fig. 2-36)。最も検出頻度が高かった細菌は、*Bacillus* 属で 22 %、次いで *Anoxybacillus* 属 11 %、*Acinetobacter* 属 7 %、*Micrococcus* 属 7 %、*Paracoccus* 属 7 %、*Staphylococcus* 属 5 % の順であった。*Bacillus* 属は、今回調査した食洗機全体の数の約 7 割から検出された。食洗機全体で、グラム陰性菌よりもグラム陽性菌が占める割合が高いと言える。

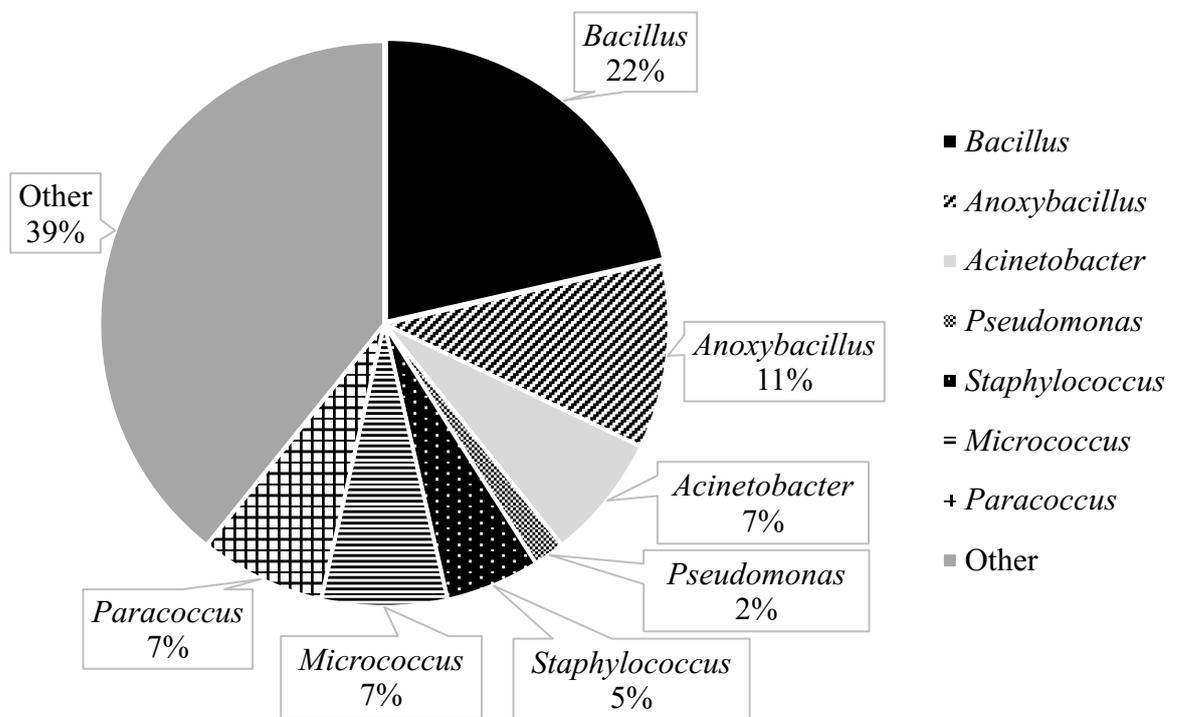


Fig. 2-36. Genera of isolated strains.

Pie chart shows isolation frequency of viable bacteria.

*Anoxybacillus* 属、*Geobacillus* 属、*Meiothermus* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、および *Petrobacter* 属は高温 (50 から 60°C) で生育可能な好熱性細菌に分類され、*Anoxybacillus* 属および *Exiguobacterium* 属は好アルカリ細菌に分類される。

*Anoxybacillus* 属は通性嫌気性のグラム陽性桿菌である。その多くが好アルカリであり、pH 8.0 から 10.5 で生育が可能で、すべての種が 50 から 62°C に至適生育温度を持っている<sup>24)</sup>。*Geobacillus* 属はグラム陽性桿菌で、至適生育 pH は 6.0 から 8.5、至適生育温度は 55 から 65°C であり、35 から 75°C の範囲で生育が可能である<sup>24)</sup>。*Meiothermus* 属は好気性のグラム陰性桿菌で、pH 7.5 から 8.0 に至適 pH を持ち、30 から 66°C に至適生育温度を持つ。*Pseudoxanthomonas taiwanensis* は好気性のグラム陽性桿菌で、50 から 60°C で生育可能である。*Exiguobacterium* 属は通性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、pH 6.5 から 11.5 で生育可能であるが、至適生育温度は 37°C 付近である<sup>24)</sup>。*Gordonia* 属、*Kocuria* 属は放線菌の一種である<sup>26) 27)</sup>。

また、系統樹の作成により近縁種として挙げた、*Acinetobacter* 属の *Acinetobacter haemolyticus*、*Acinetobacter junii*、*Acinetobacter lwoffii*、*Moraxella* 属の *Moraxella osloensis*、*Paracoccus* 属の *Paracoccus yeei*、*Staphylococcus* 属の *Staphylococcus saprophyticus*、*Staphylococcus epidermidis* は、日和見感染の原因菌であるとの報告がある<sup>25) 28)</sup>。健常人にとっては問題とならない細菌でも、免疫不全患者や易感染患者に感染すると重篤な感染症を引き起こす場合があるため、日和見感染菌と同属の細菌が病院、高齢者施設で検出されることは好ましくない。

今回の調査では食中毒菌は検出されなかったが、食洗機の高温度・高 pH 環境下でも、中温菌や好熱性細菌など様々なタイプの細菌が生育できることが分かった。食中毒の原因となる有害微生物の増殖も十分に起こり得るため、しっかりとした衛生対策が必要である。そこで次に、食洗機の洗浄工程で使用されるアルカリ洗浄剤の各種細菌に対する除菌効果について詳しく検証した。

#### 2-3-4 各種細菌に対する食洗機用洗剤の除菌効果

食洗機の細菌汚染を抑制するために効果的な洗剤の処方を、既存の食洗機用アルカリ洗剤と併せて比較検討した (Table 2-1)。評価対象とした細菌は、グラム陰性菌として *E. coli*、グラム陽性菌として *S. aureus* および 2-2-3 の調査で最も多く検出された *B. subtilis* を用いた。

*E. coli* に対しては、アルカリ成分 (水酸化ナトリウム、珪酸ナトリウム、炭酸ナトリウム) の配合された洗剤サンプル a から f において、25°C、60°C いずれの温度においても生菌数は 1/100~1/10,000 に低下した (Figs. 2-37, 2-38)。アルカリ剤のアルカリ強度は、水酸化ナトリウム、珪酸ナトリウム、炭酸ナトリウムの順で高い。除菌効果は、アルカリ強度が高く (a>b, c, d>e, f)、且つ洗剤濃度が高いほど ((e-1>e-2), (f-1>f-2>f-3))、向上した (Fig. 2-37)。塩素系漂白剤であるトリクロロイソシアヌル酸は、アルカリ成分が未添加の洗剤 g では、25°C で除菌効果を示さなかった (Fig. 2-38)。*E. coli* に対しては、洗剤がアルカリ性であることが有効と考えられる。

*S. aureus* に対しては、25°C ではいずれの洗剤も除菌効果が得られなかったが (Fig. 2-40)、60°C では生菌数が 1/10~1/100 に低下した (Fig. 2-39)。この結果は、*S. aureus* が *E. coli* よりもアルカリ洗剤に対して耐性が高く、60°C の温度がかからないと洗剤が効きにくいを示している。また、60°C における除菌効果は、トリクロロイソシアヌル酸の濃度が高くなるほど (d>c>b) 向上した (Table 2-1, Fig. 2-39)。トリクロロイソシアヌル酸は、水中で加水分解して次亜塩素酸になり、この次亜塩素酸が除菌効果を示したと考えられる (Fig. 2-43)。

*B. subtilis* に対しては、25°C、60°C いずれの条件においても除菌効果がほとんど認められなかった (Figs. 2-41, 2-42)。芽胞と栄養細胞の混合菌液を使用した。栄養細胞に対しても除菌効果は得られなかった。アルカリ洗剤もトリクロロイソシアヌル酸も芽胞形成菌に対して除菌効果が低いと考えられる。孢子 (芽

胞)は、外層からエキソスポニウム、孢子殻(コート)、フォアスポア外膜、コルテックス、孢子細胞壁、フォアスポア内膜、コアから構成される。コート部分はタンパク質から成り、*B. subtilis*では高密度のアウターコートとラメラ構造のインナーコートから成る<sup>29)</sup>。インナーコートはアルカリによって可溶化するが、アウターコートは難溶性のタンパク質で構成される。アウターコートが化学物質の透過性をバリアし<sup>30)</sup>、薬剤抵抗性を示したと考えられる。

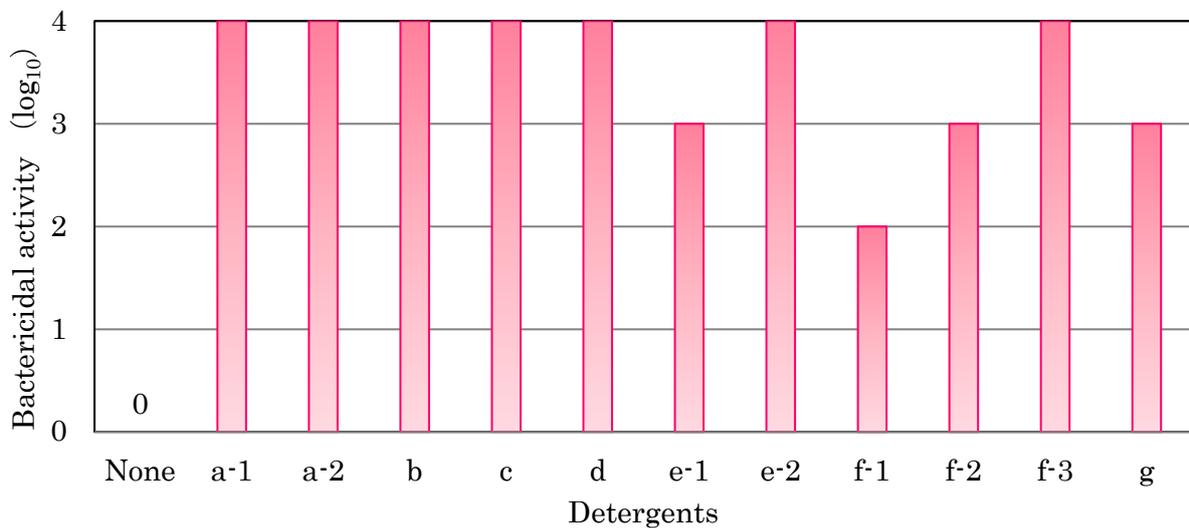


Fig. 2-37. Bactericidal activity on *E. coli* (60°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *E. coli* at 60°C for 5 min is shown. None: Control, (a-1): Detergent (Sodium hydroxide 38 wt%) 0.1 wt% solution, (a-2): Detergent (Sodium hydroxide 38wt%) 0.2 wt% solution, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (e-1):Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.1 wt% solution, (e-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.2 wt% solution, (f-1): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.1 wt% solution, (f-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.15 wt% solution, (f-3): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.2 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

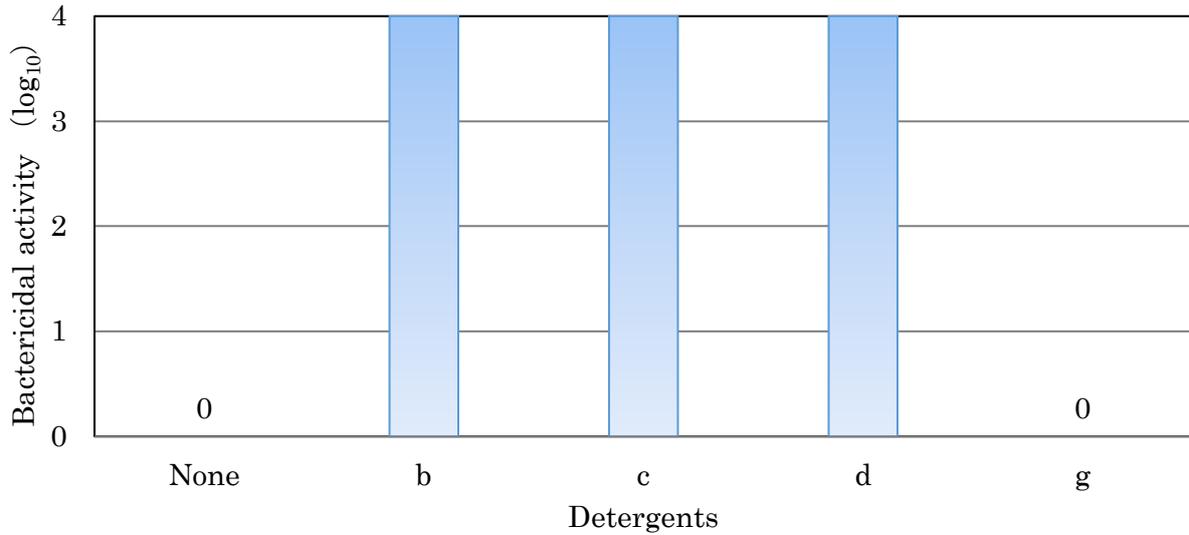


Fig. 2-38. Bactericidal activity on *E. coli* (25°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *E. coli* at 25°C for 5 min is shown. None: Control, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

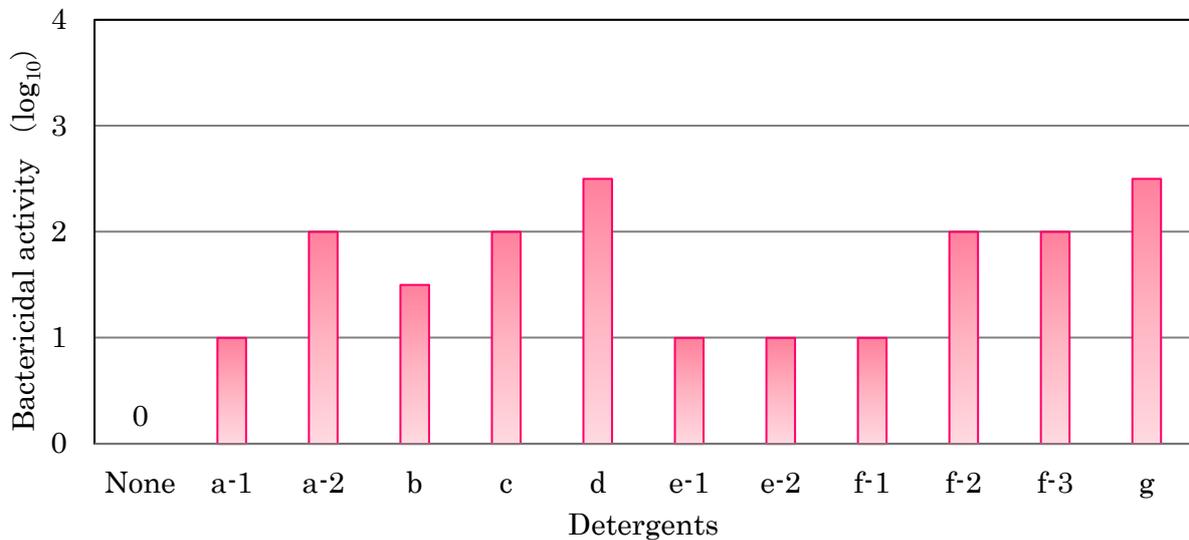


Fig. 2-39. Bactericidal activity on *S. aureus* (60°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *S. aureus* at 60°C for 5 min is shown. None: Control, (a-1): Detergent (Sodium hydroxide 38 wt%) 0.1 wt% solution, (a-2): Detergent (Sodium hydroxide 38 wt%) 0.2 wt% solution, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (e-1): Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.1 wt% solution, (e-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.2 wt% solution, (f-1): Detergent (Sodium carbonate

44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.1 wt% solution, (f-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.15 wt% solution, (f-3): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.2 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

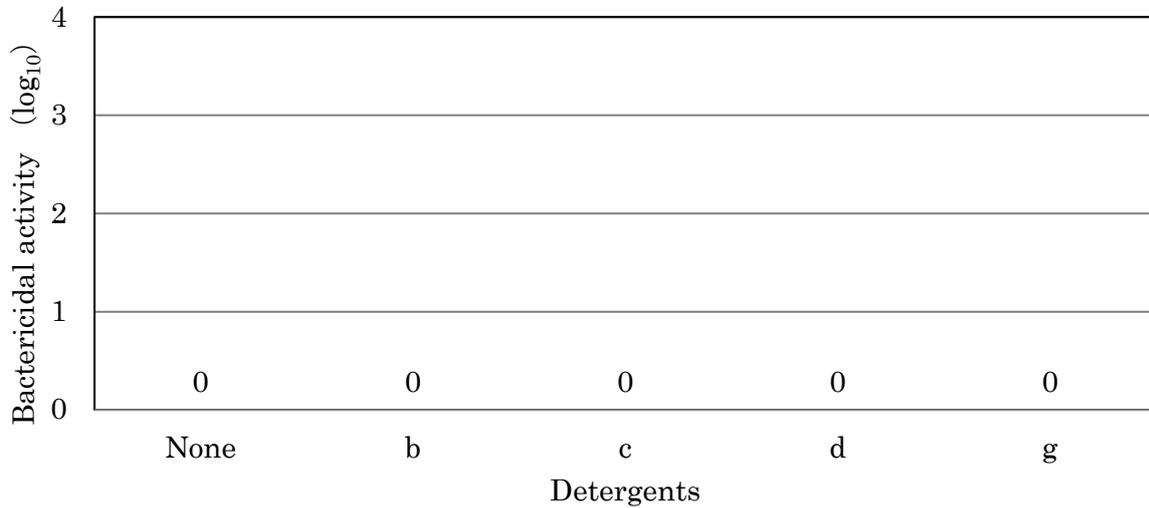


Fig. 2-40. Bactericidal activity on *S. aureus* (25°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *S. aureus* at 25°C for 5 min is shown. Not sterilizing effect was observed in all sample. None: Control, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

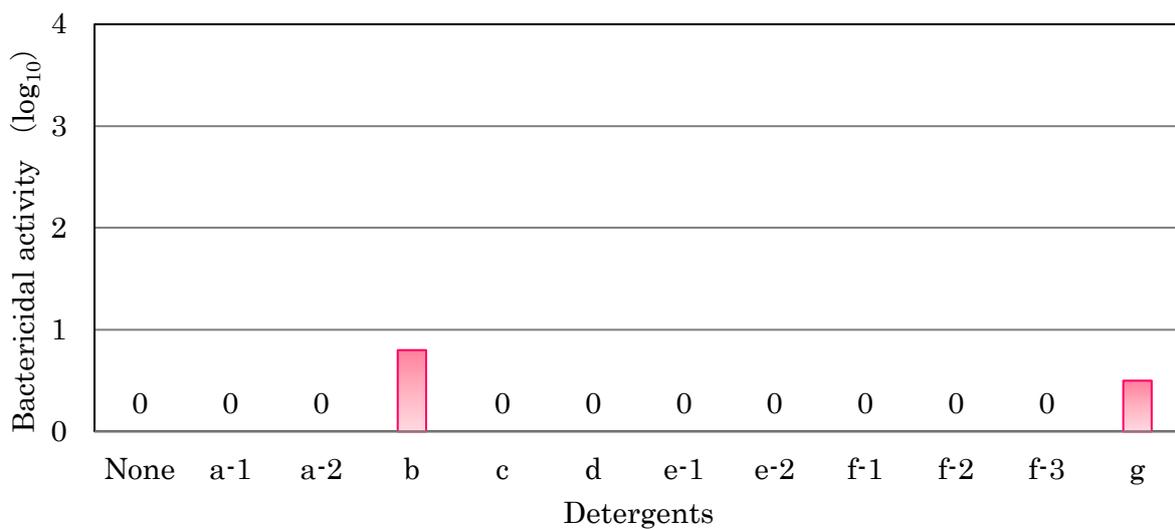


Fig. 2-41. Bactericidal activity on *B. subtilis* (60°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *B. subtilis* at 60°C for 5 min is shown. None: Control, (a-1): Detergent (Sodium hydroxide 38 wt%) 0.1 wt% solution, (a-2): Detergent (Sodium hydroxide 38 wt%) 0.2 wt% solution, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (e-1): Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.1 wt% solution, (e-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt%) 0.2 wt% solution, (f-1): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.1 wt% solution, (f-2): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.15 wt% solution, (f-3): Detergent (Sodium carbonate 44 wt% + Trichloroisocyanuric acid 2.0 wt%) 0.2 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

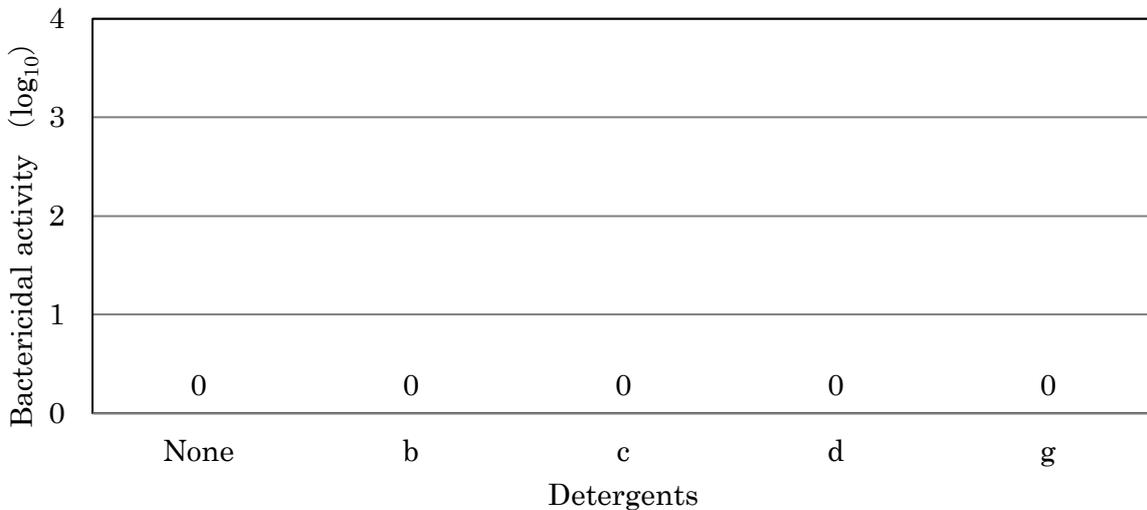


Fig. 2-42. Bactericidal activity on *B. subtilis* (25°C).

The sterilizing activity of each cleaning agent against *B. subtilis* at 25°C for 5 min is shown. Not sterilizing effect was observed in all sample. None: Control, (b): Detergent (Sodium silicate 25 wt%) 0.15 wt% solution, (c): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 0.8 wt%) 0.15 wt% solution, (d): Detergent (Sodium silicate 25 wt% + Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution, (g): Detergent (Trichloroisocyanuric acid 1.6 wt%) 0.15 wt% solution.

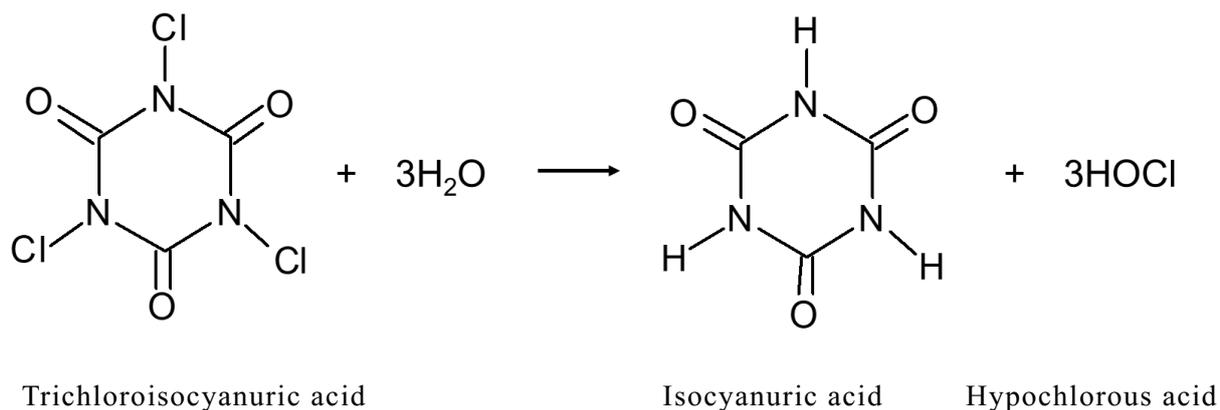


Fig. 2-43. Hydrolysis of trichloroisocyanuric acid.

Trichloroisocyanuric acid dissolves in water and decomposes into isocyanuric acid and hypochlorous acid.

グラム陰性菌の制御にはアルカリ洗浄剤が有効であり、グラム陽性菌の制御には塩素系漂白剤の活用が有効であった。一方、芽胞形成菌には、一般的なアルカリ洗浄剤の除菌効果は低かった。食洗機からの分離株にグラム陽性菌や芽胞形成菌が多かったという点は、アルカリ洗浄剤のみでの制御に限界があることを示している。そこで第3章では、金属錯体について検討した。

### 第3章 過炭酸ナトリウムの除菌力に対する銅錯体の効果

#### 要約

炭酸ナトリウム過酸化水素付加物 (Sodium carbonate-hydrogen peroxide (2/3)) は、通称、過炭酸ナトリウム (Sodium percarbonate ; 以下 SP) と呼ばれており、比較的安定な粉末で、酸素系の漂白剤や洗浄剤として使用されている。SP は塩素系のものと比較して環境負荷が小さいが、除菌効果が低い。SP の殺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 (2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid ; 以下 MGDA) を配位させた錯体 2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid-chelated copper (以下 MGDA-Cu) を SP に添加して、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、大腸菌 *Escherichia coli*、枯草菌 *Bacillus subtilis*、の除菌試験を行った。MGDA-Cu の添加は、汚染有機物のモデルである BSA の有無にかかわらず、SP の *S. aureus* に対する除菌効果を向上させた。一方、*E. coli* に対しては BSA 非存在下の時だけに効果が見られ、*B. subtilis* に対してはほとんど効果が認められなかった。レジオネラ属菌の一種である *Legionella pneumophila* に対しては BSA 存在下で MGDA-Cu の添加効果が認められた。SP はバイオフィルムの構成成分の一つであるアルギン酸ナトリウムと、*B. subtilis* の粘質物であるポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のナトリウム塩の粘度を低下させる効果があり、MGDA-Cu 添加によってその効果は向上した。

#### 3-1 緒言

過酸化水素や SP の除菌力や漂白力を高めるために活性化触媒として金属錯体 が利用されていることを第1章で述べた。また、アルカリ洗浄剤はグラム陽性菌 や芽胞形成菌に対して十分な除菌効果を得にくいことが第2章で示されたため、SP と金属錯体について検討を行った。

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 ( $\cdot\text{OH}$ ) やヒド

ロペルオキシラジカル ( $\cdot\text{OOH}$ ) などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) を生成する。ヒドロキシラジカルおよびヒドロペルオキシラジカルは、酸性 pH 領域で過酸化水素に金属イオン ( $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{Cu}^+$ ) を触媒的に反応させて起こるフェントン反応 (式 1、2) により生成する<sup>1)2)</sup>。



ROS は非常に不安定で半減期が短い、反応性が高く、微生物のタンパクや DNA などの周囲の化学物質を非選択的に酸化し、生物学的損傷を引き起こす<sup>1)2)</sup>。銅と過酸化水素による ROS 生成は、キレート剤によって部分的に制御できる。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) による銅のキレートは、ヒドロキシラジカルの生成を減少させるが、過酸化水素の存在下でヒドロペルオキシラジカルを増加させる<sup>3)</sup>。メチルグリシン二酢酸 (MGDA) は、EDTA よりも高い生分解性を持つキレート剤である<sup>4)5)</sup>。MGDA は、自然環境では EDTA より 2 倍の速さで分解されていく<sup>6)7)</sup>。MGDA は、pH 2 から 13.5 の広い pH 範囲で多価イオンと水溶性の複合体を形成する<sup>8)</sup>。MGDA と金属イオンは通常、1 : 1 のモル比で錯体を形成する<sup>8)9)</sup>。

レジオネラ症は主に *Legionella pneumophila* によって引き起こされる重度の呼吸器疾患であるが、その発生はバイオフィルムの存在と相関している<sup>10)</sup>。バイオフィルムの重要な構成成分は EPS であり、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ことを第 1 章 (1-4-3) で述べた。アルギン酸塩は、*Pseudomonas aeruginosa* や *Azotobacter vinelandii* によって生成される<sup>11)12)</sup>。過酸化水素から生成されたラジカルによって分解され、低分子量のアルギン酸塩<sup>13)</sup> とカルボン酸<sup>14)</sup> を生成する。SP は、黄色ブドウ球菌と緑膿菌が形成するバイオフィルムに対しても、次亜塩素酸ナトリウムと同等の除菌効果を示す<sup>15)</sup>。

循環配管のバイオフィルムの除去には過酸化水素が推奨されているが、ハン

ドリリング性やコスト面で課題があることから、本章では SP を中心に、MGDA-Cu 添加による各種細菌に対する除菌効果とバイオフィルムに対する除去効果を評価した。菌体に対する除菌効果の検討は、芽胞形成菌の *B. subtilis* (芽胞に対する効果検証のため)、グラム陽性菌の *S. aureus*、グラム陰性菌の *E. coli* および *L. pneumophila* を用いた。バイオフィルムの除去検討は、アルギン酸ナトリウムの分解による粘度を測定することによって評価した。

*B. subtilis* が産生する粘質物にポリ- $\gamma$ -グルタミン酸 (Poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA)) がある<sup>16)</sup>。 $\gamma$ -PGA は納豆の糸引き成分であり、*B. subtilis* の一種である納豆菌によって作られる高分子である。この  $\gamma$ -PGA は、納豆菌が対数増殖期から増殖が止まる定常期に入ると合成が開始され、クオラムセンシング (Quorum sensing) と呼ばれる細胞密度応答機構の制御下にある<sup>17)</sup>。クオラムセンシングは、EPS 産生やバイオフィルムの立体構造形成の開始を司る。そこでアルギン酸ナトリウムに加え、ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸ナトリウムについても検討した。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 MGDA-Cu の調製

MGDA-Cu は、108 mmol/L MGDA・3Na (Trilon M liquid, BASF ジャパン株式会社、東京、日本) および 13 mmol/L 硫酸銅 (II) (ユピノーグ、JX 金属株式会社、東京、日本) を溶解した水溶液を調製した (Fig. 3-1)。この混合物を 13 mmol/L MGDA-Cu 水溶液として保存した。

銅錯体は、MGDA と銅イオンが 1 : 1 のモル比で錯体を形成する (Fig. 3-1)。銅の配位数は 4 であり、銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) を中心に MGDA の解離した  $\text{COO}^-$  部分が配位結合する。

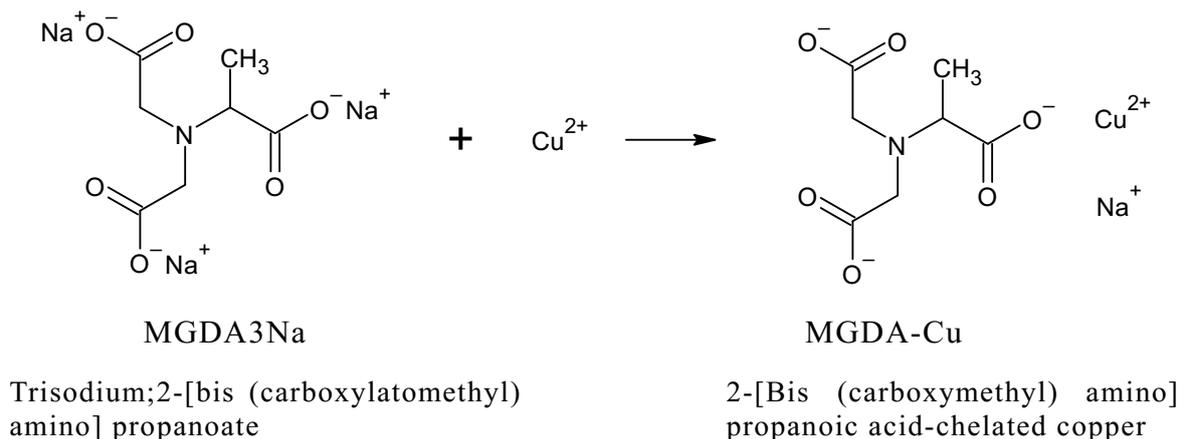


Fig. 3-1. MGDA-Cu.

MGDA-Cu was obtained by mixing MGDA3Na and copper (II) sulphate, 5-hydrate. MGDA-Cu forms a complex of MGDA and copper ion at a ratio of 1:1.

### 3-2-2 各種細菌に対する除菌試験

MGDA-Cu 添加による、SP (SPC, Zhejiang Jinke Household Chemical Materials Co., Ltd., 浙江省、中国) の黄色ブドウ球菌、大腸菌および枯草菌に対する除菌効果を評価した。菌株は、NITE 生物資源センター (東京、日本) から購入した *S. aureus* NBRC 12732、*E. coli* NBRC 3972、および *B. subtilis* NBRC 3134 を用い、Soybean Casein Digest Agar with Lecithin Polysorbate 80 (SCDLP 寒天培地 (日本製薬、日本)) で前培養したものを用いた。発育したコロニーをかき取り、滅菌生理食塩水 (0.85 wt% NaCl) に懸濁して、濁度で菌数が 10<sup>7</sup> から 10<sup>8</sup> CFU/mL になるように調製したものを菌液とした。検体は、0.5 wt% SP、12 μmol/L MGDA-Cu を添加した 0.5 wt% SP、12 μmol/L MGDA-Cu について評価を行った。SP の濃度 (0.5 wt%) は、0.12 wt% SP が 3 wt% ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下で黄色ブドウ球菌の生育にほとんど影響しないことを示す研究結果に基づき決定した<sup>18)</sup>。MGDA-Cu の濃度は、ROS を生成する過酸化水素の分解に基づいて決定した。MGDA-Cu の濃度は高い方が SP に対する触媒効果は上がるが、銅は環境に有毒

な汚染物質であるため、より低濃度であることが望ましい<sup>19)</sup>。したがって、銅の排水基準の 3 mg/L を超えないように希釈濃度を設定した。

まず、所定温度に調温した検体 9 mL に、菌液 0.1 mL と 3 wt%ウシ血清アルブミン (BSA) 1 mL とを混合し所定時間接触させた後、その試験液 1 mL を 5 wt% 亜硫酸ナトリウム 9 mL に加えて中和した。これをダルベッコ PBS (-) 粉末「ニッスイ」(日水製薬株式会社、東京、日本) で段階希釈し、SCDLP 寒天培地で 35°C にて 48 時間培養し、生育したコロニー数カウントした。これらの 3 つの菌株は SP に対して異なる耐性を示したため、試験液との接触時間および接触温度については、菌株に合わせて調整した。基準温度と時間は、循環浴槽の湯温と、想定させる洗浄時間を考慮し、35°C・30 分に設定し試験したが、*B. subtilis* においては SP が除菌効果をほとんど示さなかった。そこで SP の除菌効果が得られる条件として接触温度を 60°C に設定した。また、*B. subtilis* は芽胞と栄養細胞とで薬剤の効きやすさが異なるため、試験菌液中の芽胞数の割合を調整した。芽胞数は 75°C で 30 分間処理した菌液の生菌数をカウントすることによって算出した。*E. coli* は SP に対する感受性が高かったため、接触時間を 1 から 2 分に設定した。更に、BSA の存在の有無で SP の除菌効果が大きく左右されることが判明したため、試験液は BSA 添加の有無で比較を行った。

### 3-2-3 レジオネラ属菌に対する除菌試験

菌株は、*Legionella pneumophila* ATCC33153 SG1 を用い、BCYE 寒天培地にて 36°C で 3 日間前培養したものをを用いた。発育したコロニーをかき取り、0.1 wt% Tryptone 添加滅菌生理食塩水に懸濁して、菌数が約 10<sup>8</sup> CFU/mL になるように調製したものを菌液とした。検体は、0.5 wt% SP、12 μmol/L MGDA-Cu を添加した 0.5 wt% SP について評価を行った。検体の希釈は、JIS 硬水を用いた。3 wt% BSA 1 mL に菌液 1 mL を加えて混合し、35°C に調温後、試験液 8 mL を加え、1 分間、

5 分間、10 分間作用させた。所定時間作用後 1 mL を不活化剤 8 mL と滅菌水 1 mL の遠沈管に添加して反応を停止させた。反応液を、滅菌生理食塩水を用いて段階希釈し、Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京、日本)) にて 36°C で 7 日間培養し、生育したコロニー数をカウントした。*L. pneumophila* を用いた本試験は、一般財団法人北里環境科学センターに依頼した。

#### 3-2-4 アルギン酸ナトリウムに対する分解試験

バイオフィルムを構成する成分のひとつであるアルギン酸ナトリウムを用い、SP による分解を減粘速度の測定により検証した。アルギン酸ナトリウム (キミカアルギン IL-6、株式会社キミカ、東京、日本) を濃度 1.5 wt% になるよう溶解し、40°C に保温した。この水溶液に、SP 1 wt%、MGDA-Cu 25 μmol/L、SP 1 wt% および MGDA-Cu 25 μmol/L になるように添加し、3 分おきに水溶液の粘度を測定した。粘度は JIS 8803 に規定された回転粘度計 (ローター No. 2、ローター回転数 60 rpm) を用いて測定した。

#### 3-2-5 ポリ-γ-グルタミン酸ナトリウムに対する分解試験

*B. subtilis* の一種である納豆菌によって産生される γ-PGA の代替として、ポリ-γ-グルタミン酸ナトリウムを用い、SP による分解を減粘速度の測定により検証した。ポリ-γ-グルタミン酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を濃度 3.75 wt% になるよう溶解し、40°C に保温した。この水溶液に SP 1 wt%、MGDA-Cu 25 μmol/L、SP 1 wt% および MGDA-Cu 25 μmol/L、3 wt% 過酸化水素になるように添加し、3 分おきに水溶液の粘度を測定した。粘度は JIS 8803 に規定された回転粘度計 (ローター No. 2、ローター回転数 60 rpm) を用いて測定した。

### 3-2-6 実配管を用いた洗浄試験

実配管に付着したバイオフィルムに対する洗浄効果を検証するため、黒色のバイオフィルムが付着した循環式浴場施設の配管の一部をカットし、モデルラインを作成した (Fig. 3-2)。試験に用いたサンプルは、0.5 wt% SP に 12  $\mu\text{mol/L}$  MGDA-Cu を添加した水溶液と、比較対照として 3 wt% 過酸化水素水溶液とで行った。カットした配管に循環ポンプを接続し、流速 16.7 L/min で水温 40°C に調温したサンプル水溶液を配管内に 60 分間循環させ、配管内の汚れの除去効果を検証した。黒色バイオフィルムの除去度合いはマイクروسコープを用いて観察を行った。

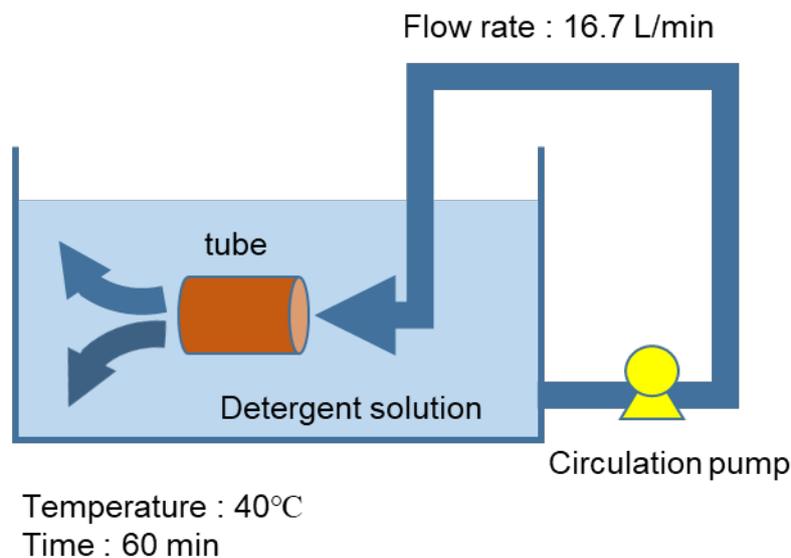


Fig. 3-2. Schematic diagram of the experimental model for tube cleaning.

A part of the tube of an actual bathing facility was used for the model. Cleaning was performed at 40 degrees for 60 minutes in the presence of SP and MGDA-Cu or 3 wt% hydrogen peroxide.

### 3-2-7 銅錯体による過酸化水素の分解試験

キレート種の違いによる銅錯体の活性化触媒効果を検証するため、過酸化水素の分解速度を測定した。硬度 40 ppm の水道水 1,000 mL を 53°C に加温しておき、スリーワンモータにて 1,000 rpm で攪拌した水中に、35 wt% 過酸化水素（三菱ガス化学株式会社、東京、日本）を有効酸素濃度 2,700 ppm になるよう添加した。ここに 25  $\mu\text{mol/L}$  MGDA-Cu および 25  $\mu\text{mol/L}$  クエン酸-Cu をそれぞれ添加し、経時で有効酸素濃度を測定した。有効酸素濃度は、過マンガン酸カリウムによる滴定により算出した。各サンプル水溶液の pH は、銅錯体無添加の 2,700 ppm 過酸化水素では中性（pH 6.5）に調整し、MGDA-Cu およびクエン酸-Cu を添加した 2,700 ppm 過酸化水素では炭酸ナトリウムを用いて pH 10 に調整した。

## 3-3 結果および考察

### 3-3-1 各種細菌に対する除菌効果

MGDA-Cu の添加効果は、*S. aureus*、*E. coli*、*B. subtilis* を用いた除菌効果試験において確認された。

*S. aureus* は、35°C・10 分間の条件において、SP 処理では生菌数が  $10^{5.2}$  CFU/mL までしか減少しなかったのに対し、SP+MGDA-Cu 処理では検出限界以下（10 CFU/mL 以下）に低下した（Fig. 3-3）。有機物汚れの試験モデルである BSA 存在下では、SP の除菌効果は低下した。BSA 存在下・20 分間の SP 処理の生菌数（ $10^{5.0}$  CFU/mL）は、BSA 非存在下・10 分間の SP 処理の生菌数（ $10^{5.2}$  CFU/mL）と同等であった（Figs. 3-3, 3-4）。SP に MGDA-Cu を添加した場合も同様に、BSA による除菌力低下の影響が認められた。BSA 存在下で 40 分間接触させると、SP 処理では生菌の残存が認められたが（ $10^{3.0}$  CFU/mL）、SP+MGDA-Cu 処理では検出限界以下であった（Fig. 3-4）。これらの結果は、MGDA-Cu の添加が *S. aureus* に対する SP の除菌効果を高めることを示している。

*E. coli* は *S. aureus* よりも SP に対し感受性が高く、BSA 非存在下・1 分間の条件で、SP+MGDA-Cu 処理の生菌数が検出限界以下となった (Fig. 3-5)。BSA 存在下では、SP も SP+MGDA-Cu も *E. coli* に対する耐性が高まり、両者とも 10 分間の処理で生菌数が検出限界以下となった (Fig. 3-6)。*E. coli* は SP に対して不安定であったため、今回の試験条件では MGDA-Cu の添加効果は比較できなかった。

*B. subtilis* の栄養細胞は、BSA 存在下・35°C・30 分間の条件で SP 処理した後も生存し、MGDA-Cu は SP の除菌活性にほとんど影響を与えなかった (データは示さず)。そこで、MGDA-Cu の添加効果を評価するために、接触温度を 35°C から 60°C に上げた。しかしながら、MGDA-Cu の添加は、SP の殺菌活性にほんの僅かしか影響を示さなかった (Figs. 3-7, 3-8)。試験に使用した *B. subtilis* の菌液中の芽胞数は、芽胞と栄養型細胞を含む菌液 (初発菌数  $10^5$  CFU/mL) 中に  $10^4$  CFU/mL であった。薬剤が作用しやすいのは栄養型細胞からであるため、芽胞まで作用させるためには、最低でも生菌数を 1/10 に減少させる必要がある。SP 処理と SP+MGDA-Cu 処理いずれも、BSA 非存在下では 60°C・20 分以上、BSA 存在下では 60°C・40 分以上の作用時間が必要である。

*B. subtilis* や *S. aureus* などのグラム陽性菌は細胞壁が厚いため、*E. coli* などのグラム陰性菌と比べて、活性酸素種 (ROS) に対する耐性が高い<sup>20)</sup>。従って、SP に対する 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可能性がある。BSA 存在下で SP の除菌効果が低下した点については、BSA のような汚濁物質は過酸化水素と菌体との接触面を減少させ<sup>21)</sup>、殺菌剤から保護する方向に働くと考えられる。また、BSA が ROS によって酸化されることで ROS を還元分解し、その効果を低下させていることが考えられる。

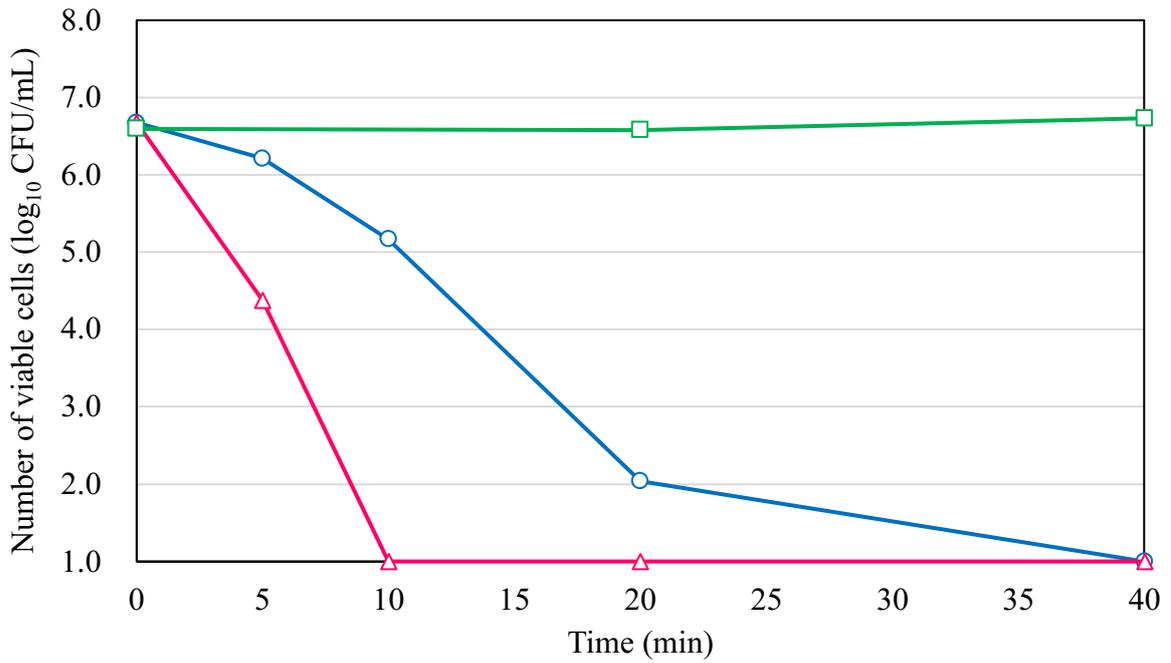


Fig. 3-3. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *S. aureus*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP (○), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA (Δ), or MGDA-Cu (□) at 35°C.

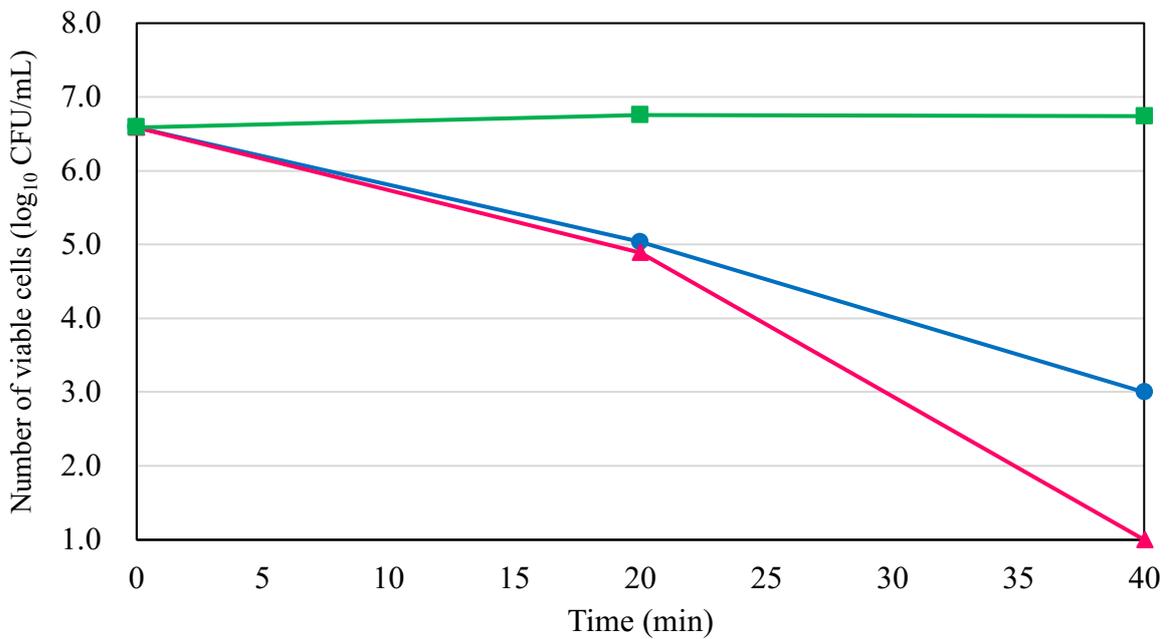


Fig. 3-4. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *S. aureus*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP in BSA (●), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA in BSA (▲), or MGDA-Cu in BSA (■) at 35°C.

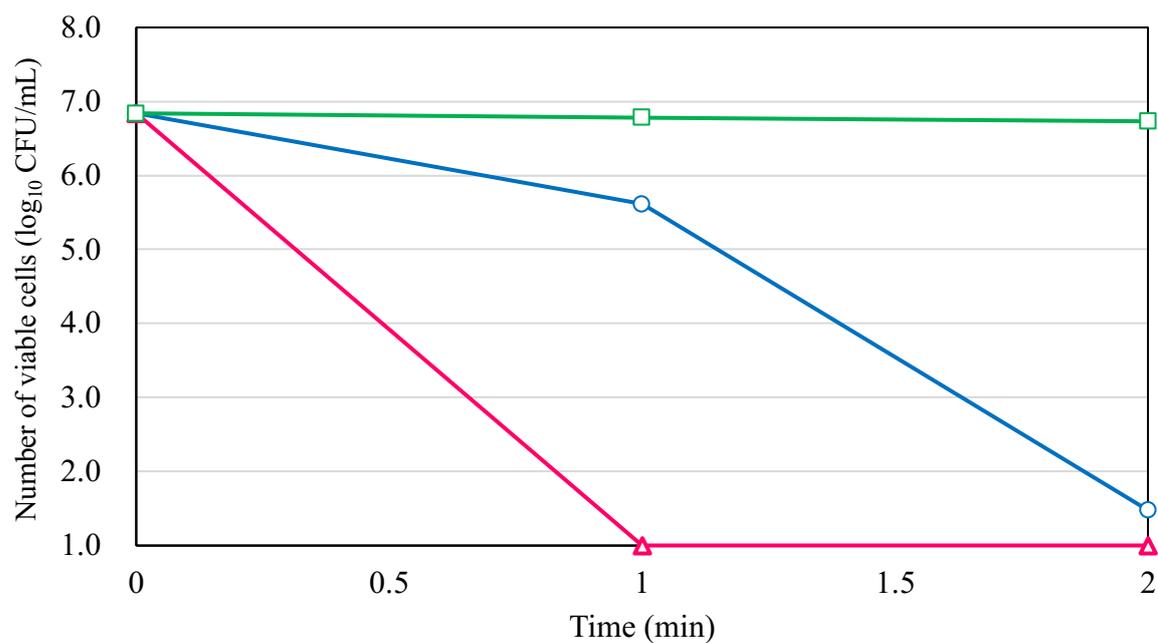


Fig. 3-5. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *E. coli*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP (○), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA (Δ), or MGDA-Cu (□) at 35°C.

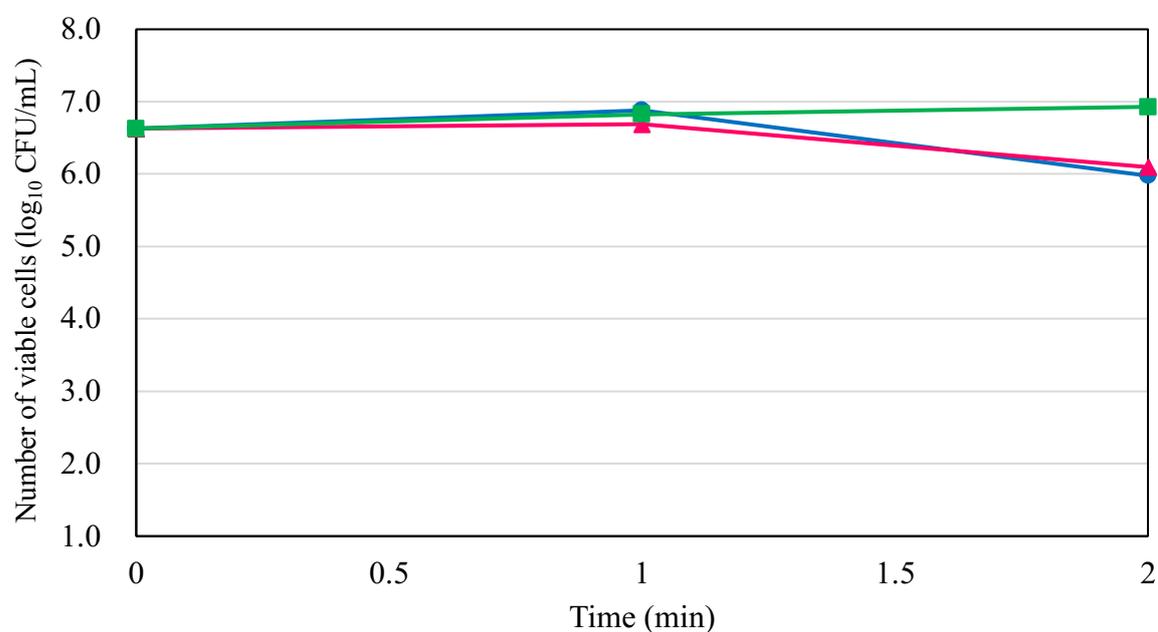


Fig. 3-6. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *E. coli*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP in BSA (●), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA in BSA (▲), or MGDA-Cu in BSA (■) at 35°C.

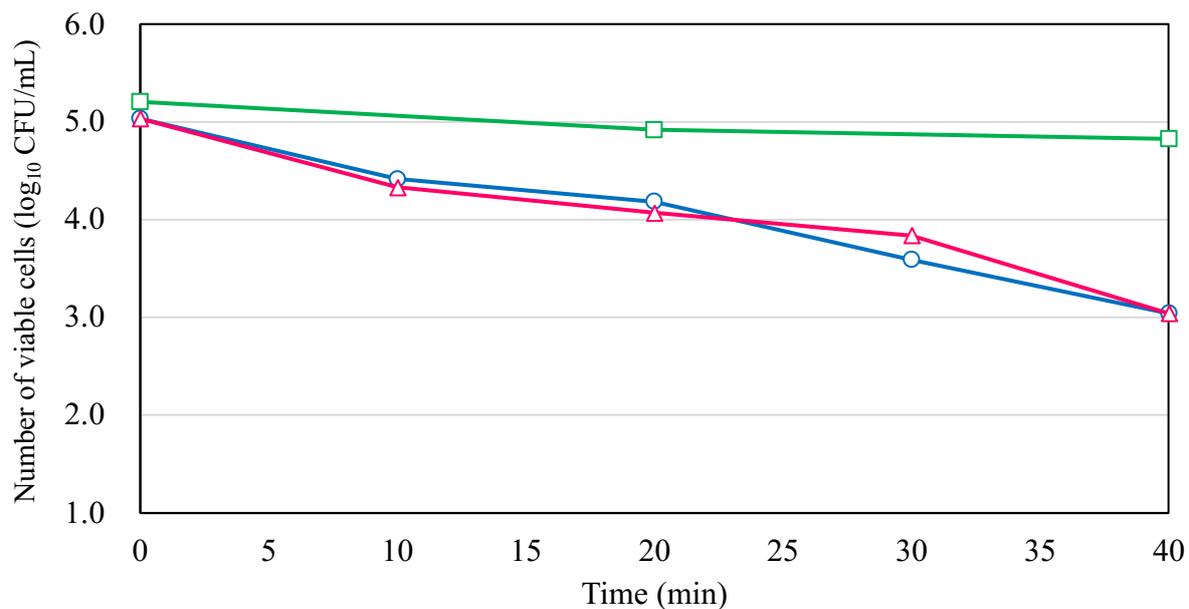


Fig. 3-7. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *B. subtilis*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP (○), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA (Δ), or MGDA-Cu (□) at 60°C.

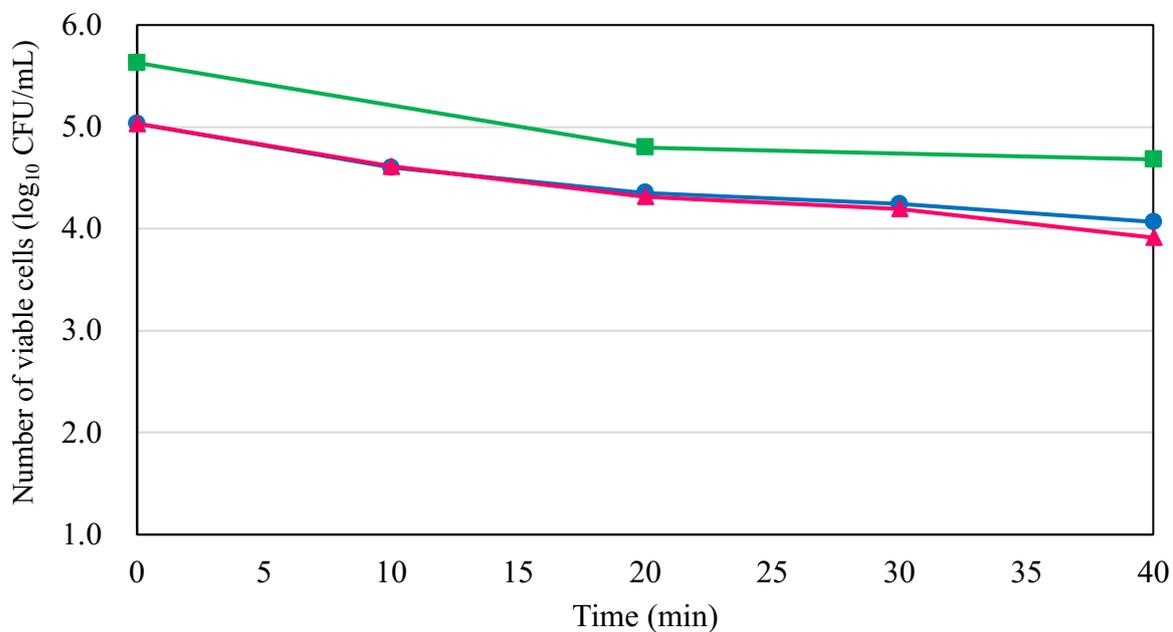


Fig. 3-8. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *B. subtilis*.

The viable cells were incubated with 0.5 wt% SP in BSA (●), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA in BSA (▲), or MGDA-Cu in BSA (■) at 60°C.

### 3-3-2 レジオネラ属菌に対する除菌効果

レジオネラ属菌である *L. pneumophila* における、SP に対する MGDA-Cu の添加効果を示す (Fig. 3-9)。SP は 35°C・5 分間の作用で生菌数が  $10^3$  CFU/mL まで低下したのに対し、MGDA-Cu 添加では検出限界以下 ( $10^2$  CFU/mL) にまで減少した。一方、3 wt% 過酸化水素では、35°C・1 分の作用で生菌数は検出限界以下に減少した。SP と MGDA-Cu を併用し 5 分間作用させることで、レジオネラ症防止対策マニュアルにて推奨されている 2 から 3 wt% 過酸化水素と同等の除菌効果が得られた。

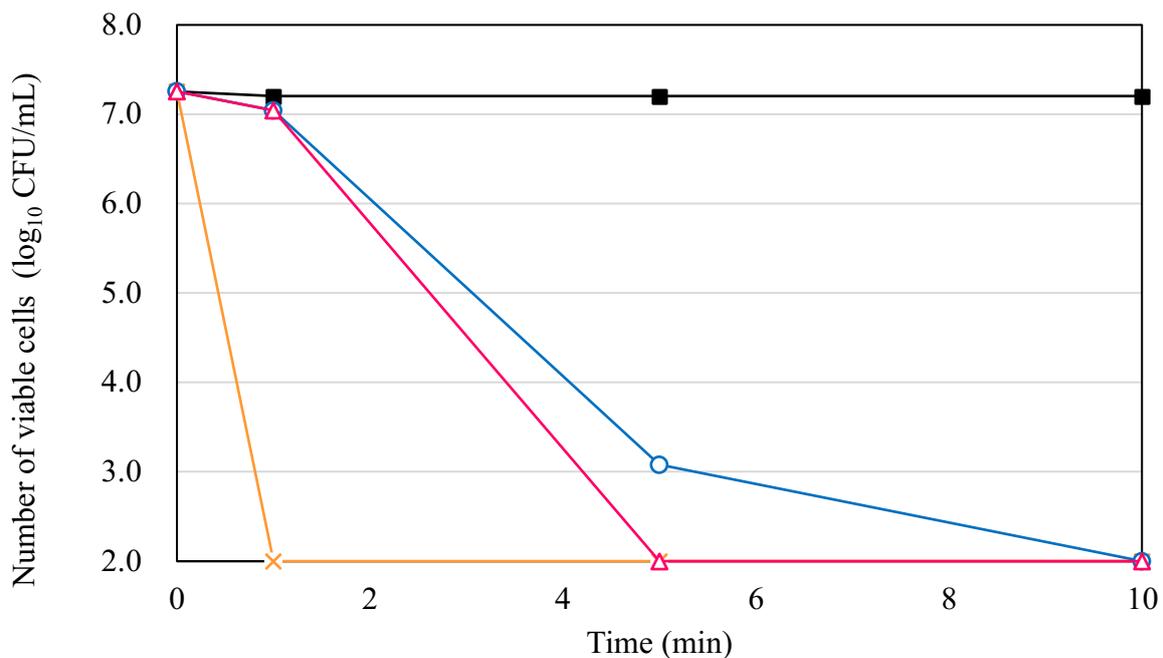


Fig. 3-9. Effect of MGDA-Cu on the bactericidal activity of SP against *Legionella*.

The viable cells were incubated with control (sterilized saline) (■), 0.5 wt% SP (○), 0.5 wt% SP and 12 μmol/L MGDA (Δ), or 3 wt% hydrogen peroxide (×) at 35°C.

### 3-3-3 アルギン酸ナトリウムの粘度への影響

アルギン酸塩はバイオフィルムのマトリックス分子のひとつである。従って、アルギン酸塩の分解により SP のバイオフィルム除去効果を評価できる。アルギン酸は D-マンヌロン酸と L-グルロン酸が 1,4-グリコシド結合し直鎖重合した構造である (Fig. 3-10)。SP によるアルギン酸ナトリウムの解重合に対する MGDA-Cu の効果を示す (Fig. 3-11)。MGDA-Cu のみの場合、アルギン酸ナトリウムの粘度の低下は見られなかったが、1.0 wt%SP 処理および 1.0 wt% SP+25  $\mu\text{mol/L}$  MGDA-Cu との併用処理では粘度の低下が見られ、MGDA-Cu は SP による減粘効果を更に高めた。ヒドロキシルラジカルなどの ROS は、セルロースやグルコースなどのヒドロキシル基を酸化し、導入されたカルボニル基に起因する  $\beta$ -アルコキシ脱離反応によりグリコシド結合が開裂する<sup>22)23)</sup>。SP から生成した ROS によってアルギン酸塩のグリコシド結合が開裂し、低分子量のアルギン酸に分解されたと考えられる<sup>13)</sup>。アルギン酸ナトリウムの解重合により、0.2 から 0.9 % の水溶液粘度は低下し、それに伴い数平均分子量と質量平均分子量が低下することが確認されている<sup>24)</sup>。

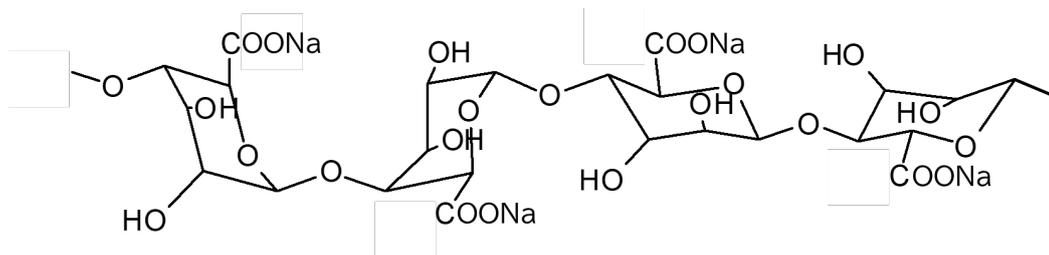


Fig. 3-10. Structure of sodium alginate.

Sodium alginates are polymers consisting of  $\beta$ -(1,4) linked D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -(1,4) linked L-glucuronic acid (G).

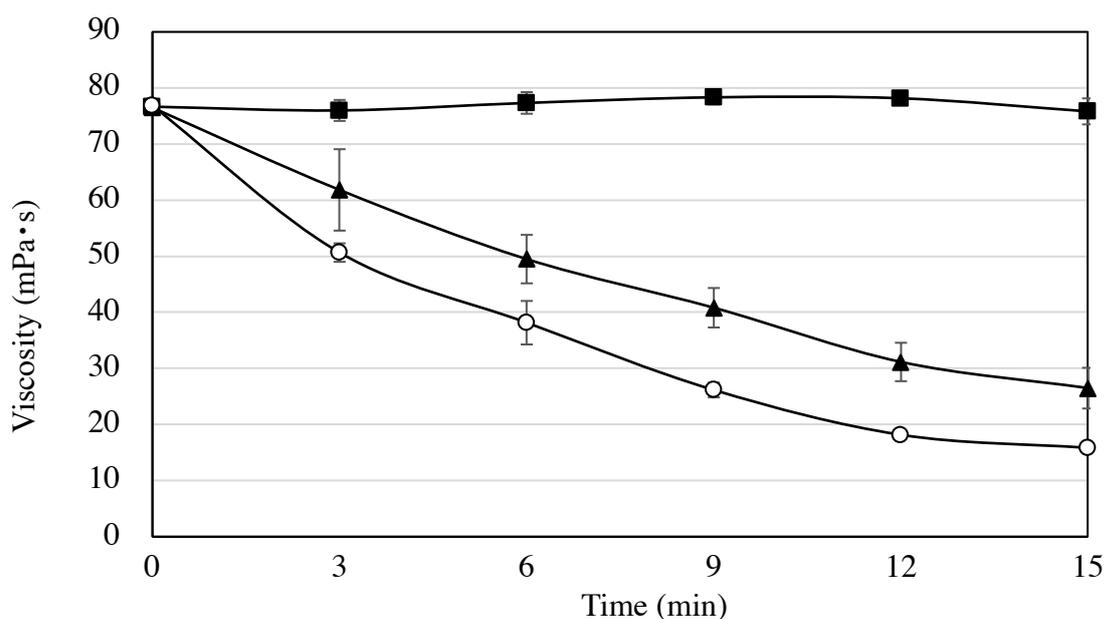


Fig. 3-11. Effect of SP and MGDA-Cu on the viscosity of sodium alginate.

Sodium alginate (1.5 wt%) was incubated in the presence of 1 wt% SP(▲), 25 μmol/L MGDA-Cu (○), or 1 wt% SP and 25 μmol/L MGDA-Cu (■).

### 3-3-4 ポリ-γ-グルタミン酸のナトリウム粘度への影響

*B. subtilis* が産生する粘質物である γ-PGA (Fig. 3-12) のナトリウム塩に対し、25 μmol/L MGDA-Cu および 3 wt% 過酸化水素は減粘効果を示さなかったのに対し、1 wt% SP は減粘効果を示し、1 wt%SP+25 μmol/L MGDA-Cu 併用処理では更にその効果が促進された (Fig. 3-13)。アルギン酸ナトリウムの場合と同様に、ポリ-γ-グルタミン酸ナトリウムにおいても SP から生成した ROS により解重合が起こり、低分子化されたと考えられる。γ-PGA は *B. subtilis*, *B. licheniformis*, および *B. anthracis* を含む *Bacillus* 属の一部の細菌が産生する生体高分子であり<sup>25)</sup>、バイオフィルムの形成過程にも関与する成分であるため、SP と MGDA-Cu の併用は *B. subtilis* が形成するバイオフィルムの分解に有効と考えられる。

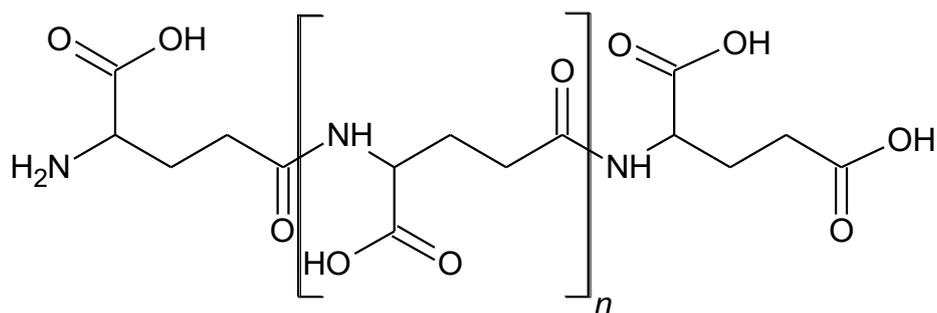


Fig. 3-12. Structure of poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA).

Poly- $\gamma$ -glutamic acid is a polymer in which a carboxyl group at the  $\gamma$ -position and an amino group at the  $\alpha$ -position are peptide-bonded.

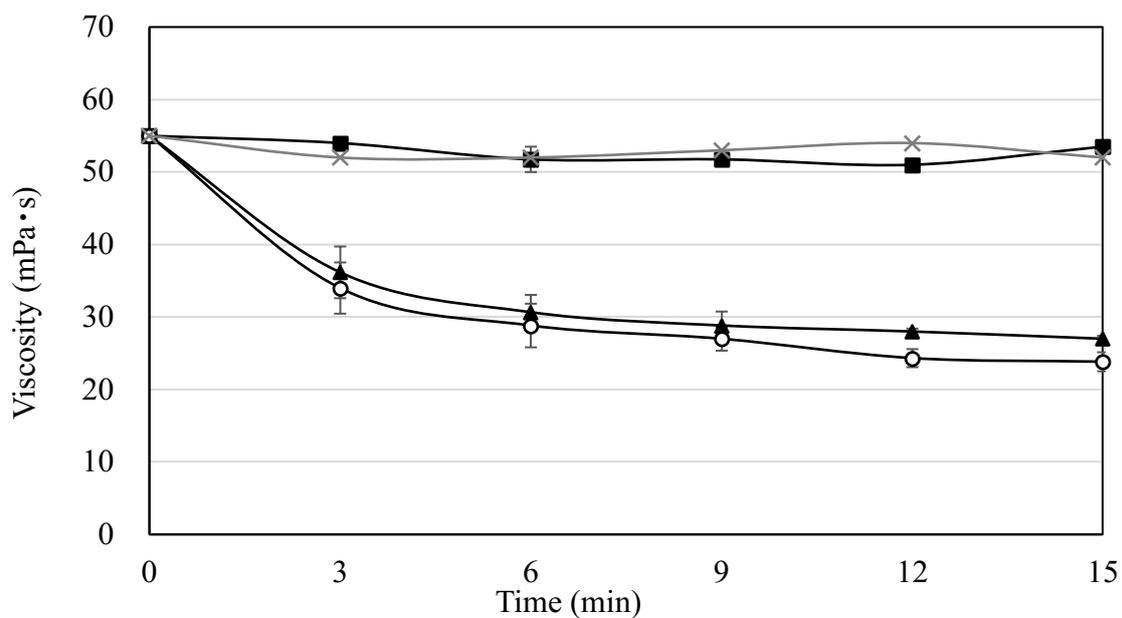


Fig. 3-13. Effect of SP and MGDA-Cu on the viscosity of poly- $\gamma$ -glutamic acid sodium salt.

Poly- $\gamma$ -glutamic acid sodium salt (3.75 wt%) was incubated in the presence of 1 wt% SP (▲), 25  $\mu$ mol/L MGDA-Cu (○), 1 wt% SP and 25  $\mu$ mol/L MGDA-Cu (■), or 3 wt% hydrogen peroxide (×).

### 3-3-5 実配管での洗浄効果

SP と MGDA-Cu 併用系での除菌効果とアルギン酸ナトリウムに対する分解効果が確認できたため、実際の配管に付着したバイオフィルムを含む汚れに対する洗浄効果を検証した。循環式浴場施設の洗浄前の実配管をカットし、配管内をマイクروسコープにて観察したところ、黒色のバイオフィルムが確認された。この実配管を用いて作成したモデルラインでの洗浄試験において、3 wt%過酸化水素では黒色汚れがほとんど除去されなかったのに対し、SP と MGDA-Cu の併用系では汚れの大部分が除去され、配管のオレンジ色の地が確認された (Fig. 3-14)。実バイオフィルム汚れに対する除去効果は、過酸化水素よりも MGDA-Cu を添加した SP の方が高いことを示している。

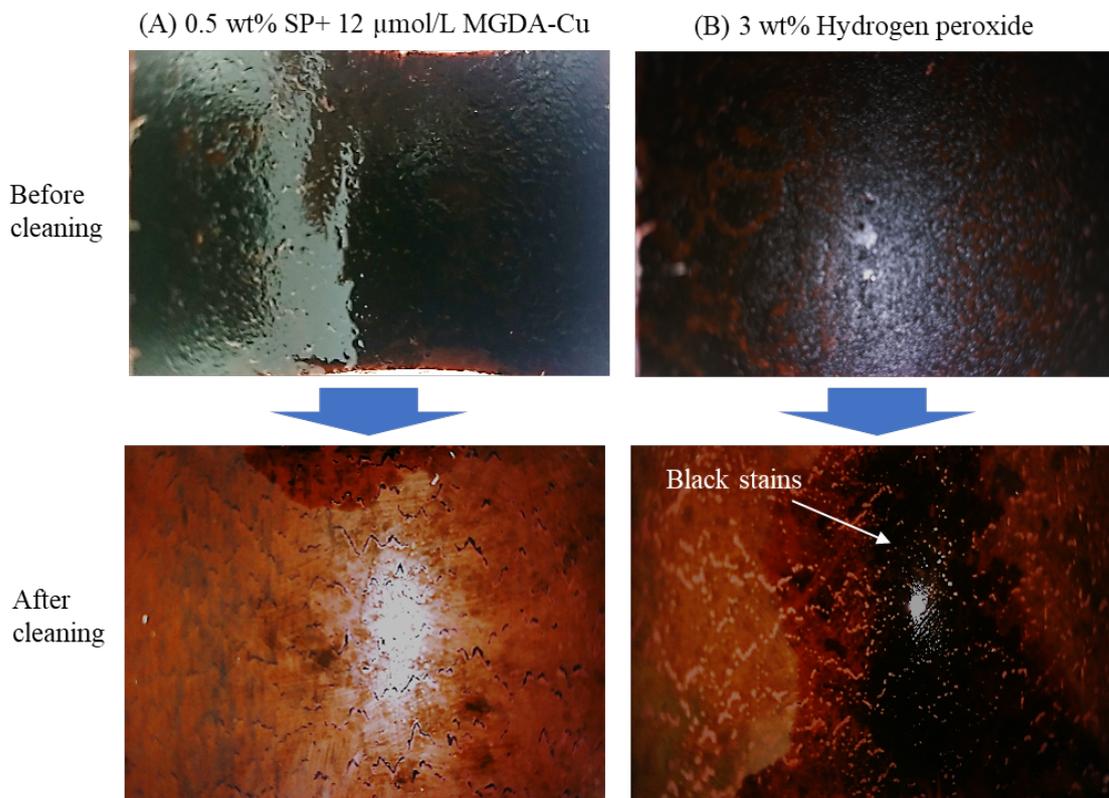


Fig. 3-14. Pictures of inside of the tube by microscope.

The inside of tubes before and after cleaning was observed with a microscope. Black stains were removed by washing using MGDA-Cu and SP. However, black stains remained after washing using hydrogen peroxide.

この除去率の違いは、SP と過酸化水素の pH によるものと推察している。SP は水に溶けて炭酸ナトリウムと過酸化水素に遊離し、炭酸ナトリウムが過水分解することによって弱アルカリ性 (pH 10 から 11) を示す。一方、3 wt% 過酸化水素の pH は 6.5 付近で中性である。アルカリ剤は、タンパク質や多糖類、油脂に対し、加水分解や鹼化といった分解型の作用を示す。ステンレス表面に付着した種々のタンパク質や細菌類に対する除去力は pH が高くなるほど (pH 11 以上) 増加する傾向がある<sup>26)</sup>。従って、タンパク質や微生物を含む有機物汚れが主体のバイオフィルムには、アルカリ性である SP の方が有利と推察される。

### 3-3-6 銅錯体による過酸化水素の分解効果

過酸化水素に対する銅錯体の活性化触媒効果を、銅錯体無添加の場合と、錯体を形成するキレート種を MGDA とクエン酸にした場合とで比較した。銅錯体無添加の場合、30 分後に過酸化水素がほとんど分解されず残存していたのに対し、MGDA-Cu では約 3 / 5、クエン酸-Cu では約 1 / 5 に分解された (Fig. 3-15)。錯体の安定性はクエン酸-Cu よりも MGDA-Cu の方が高く、銅錯体の安定性と ROS の生成能は反比例すると考えられる。過酸化水素が分解される際に発生するヒドロキシルラジカル等の ROS は反応性が高いことから、適度な速度で過酸化水素を分解することが除菌力の点より好ましい。キレート種によって ROS の生成速度は異なるため、使用条件に見合ったキレート種を選定することが必要である。前述の 3-3-1 および 3-3-2 において、MGDA-Cu は *E. coli* や *L. pneumophila* といったグラム陰性菌に対し十分な除菌力を示した (Fig. 3-5, 3-9)。ROS に高い耐性を示すグラム陽性菌等に対しては、キレート種をクエン酸のような安定性の低い錯体にし、ROS の生成量を増やすことで、除菌力を向上できる可能性がある。

本試験では、銅錯体無添加の過酸化水素（pH 6.5）に対し、MGDA-Cu およびクエン酸-Cu を添加した水溶液は、炭酸ナトリウムを用いて pH を約 10 に調整した。第 3 章の緒言 (3-1) に示したフェントン反応は pH の影響を受けやすく、酸性側で反応が進みやすいとされているが、弱アルカリ性でも過酸化水素の分解促進が確認された。

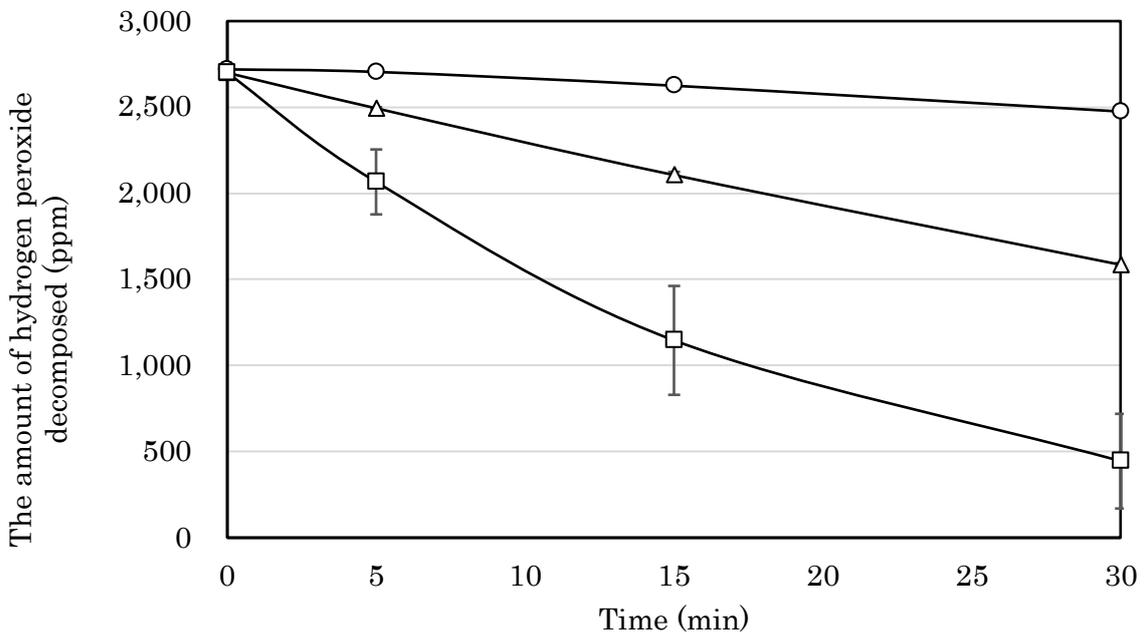


Fig. 3-15. Decomposition of hydrogen peroxide.

Hydrogen peroxide was decomposed to produce ROS in the presence of MGDA-Cu ( $\Delta$ ) or citric acid-Cu ( $\square$ ) and its absence ( $\circ$ ).

菌株を用いた除菌試験とアルギン酸ナトリウムを用いたバイオフィルムモデルを使った実験にて、MDGA-Cuの菌体に対する直接的な除去効果と、菌体と共存するバイオフィルムに対する分解促進効果が認められた。銅錯体によるROSが菌体の細胞膜内に侵入し細胞を破壊し<sup>27)</sup>、バイオフィルムを構成する細胞外多糖を分解したと考えられる。一方、実配管を用いた試験では洗浄効果は実証できたものの、バイオフィルム中の細菌の種類の特特定まには至らなかった。実際の循環浴槽配管の細菌叢は複雑であると考えられるため、バイオフィルムモデル実験系を構築し、細菌叢に与える効果を実証する必要がある。

## 第 4 章 循環水環境下で形成したバイオフィルムの菌叢解析

### 要約

第 3 章では、SP への MGDA-Cu の添加により、SP の各種細菌に対する除菌力と、バイオフィルムの分解および洗浄効果が増強されることが実験室レベルで確認できた。しかしながら実際の環境中に形成されるバイオフィルムはより複雑であるため、モデル実験系の構築が必要である。そこで、循環水配管モデルを用いて配管内にバイオフィルムを形成させ、SP と、SP に MGDA-Cu を添加した場合とで循環洗浄を行い、洗浄前後のバイオフィルムの菌叢解析を行った。菌叢解析は、試料中に含まれる細菌の DNA を直接且つ大量に解析できる 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を用いた。SP に MGDA-Cu を加えると、SP のみの時よりもバイオフィルムの菌叢構成（Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門に属する細菌の組成）が大きく変化することが示された。

### 4-1 緒言

第 3 章では、MGDA-Cu が SP の殺菌効果を高め、バイオフィルムの構成成分であるアルギン酸ナトリウムの減粘を促進させることが分かった。そこで、循環水配管モデルを用いてバイオフィルムを形成させ、SP のみで洗浄した場合と、MGDA-Cu を添加した SP で洗浄した場合とで、バイオフィルム中の菌叢変化を解析した。菌叢解析には、分子生物学的手法である次世代シーケンサーによる 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を用いた。

環境中の微生物をモニタリングする場合、対象とする環境中の微生物の種類と数を把握することが重要である。近年 DNA 解析技術として革新が進んでいるのが次世代シーケンサーである。これまでの方法は、16S rRNA 遺伝子情報に基づき、クローニング法や DGGE 法による解析を行い、得られた遺伝子配列をデータベースと照合して同定を行っていた。しかしこれらは定性的な解析である

ため、定量的な解析を行う場合には、標的対象微生物を決めて定量的 PCR 法などで解析し定量する、といった 2 段階のステップを踏む必要があった。次世代シーケンサーでは、1 回のシーケンスランで解読できる核酸分子の塩基配列情報が数十万から数十億塩基対に増えた<sup>1)</sup>。定性的な解析と定量的な解析が一度にできるのが次世代シーケンサーの最大の利点である。次世代シーケンサーの解析方法には、アンプリコンシーケンシングとショットガンシーケンシングとがある。アンプリコンシーケンシングは、16S rRNA のような特定のマーカー遺伝子を PCR で増幅させ、その増幅産物の DNA を 1 分子単位で大規模に並列解析する方法である<sup>1)</sup>。ショットガンシーケンシングは、PCR による増幅を行わずに、試料中に存在する DNA を断片化し直接網羅的に解析する方法である<sup>1)</sup>。ショットガンシーケンシングは、PCR で増幅が困難なウイルスやファージの解析ができるが、アンプリコンシーケンシングよりも 1 試料あたりに必要とされる解読塩基数が多くなる。

今回解析に使用した Illumina 社の次世代シーケンサーは、可逆的ターミネーター法が用いられており、解読塩基長が 150 bp~250 bp (ペアエンド解析の場合はその 2 倍) と短めであるが、1 回の解析で得られるリード数が多いのが特徴である。一方、解析解読塩基長が短いため、同定の精度は第 2 章 (2-1) に示した 16S rRNA 遺伝子解析 (解読塩基長は約 800 bp) と比べると悪くなる。したがって、16S rRNA 遺伝子解析では属レベルまで同定できるが、アンプリコンシーケンスでは、門レベルから綱レベルで菌叢を比較するのが妥当である。

本章では、循環水パイプの実験モデルのバイオフィームを用いて、SP 処理と MGDA-Cu を添加した SP 処理を行い、バイオフィーム中の細菌叢の構造の変化をアンプリコンシーケンス解析にて評価した。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 循環水配管モデルにおけるバイオフィルムの形成と採取 (1)

長さ 2 m、幅 10 cm の横型 U 字プラスチックパイプで構成される循環水パイプの実験モデルを準備した (Fig. 4-1)。流速 0.2 m/s、流量 0.4 L/s のポンプを使用し、パイプ内に 500 mg/L のスキムミルク水溶液 70 L を 16°C で 10 日間循環させ、パイプ上にバイオフィルムを形成させ (スキムミルク水溶液は 7 日後に新しい溶液と交換した) (Fig. 4-2)、10 日後に湿重量 5 g を採取した (洗浄前サンプル①)。バイオフィルムが付着した循環パイプを、12  $\mu\text{mol/L}$  MGDA-Cu を含む 0.5 wt% SP 水溶液 70 L で 1 時間洗浄し、直後のバイオフィルムを採取した (SP+MGDA-Cu 洗浄後サンプル)。上記と同様の方法でバイオフィルムを再形成させ、10 日後にバイオフィルムを採取した (洗浄前サンプル②)。パイプを 0.5 wt% SP 水溶液 70 L で 1 時間洗浄し、直後のバイオフィルムを採取した (SP 洗浄後サンプル)。

### 4-2-2 循環水配管モデルにおけるバイオフィルムの形成と採取 (2)

前記の 4-2-1 と同様の装置を用い、パイプ内に 500 mg/L のスキムミルク水溶液 70 L を、16°C で 10 日間循環させ、形成されたバイオフィルムを採取した (洗浄前サンプル)。バイオフィルムが付着した循環パイプを、0.5 wt% SP 水溶液 70 L で 1 時間洗浄し、洗浄水を排出後にスキムミルク溶液を上記と同じ方法で循環させ、10 日後に形成されたバイオフィルムを採取した (SP 洗浄後サンプル)。パイプを 12  $\mu\text{mol/L}$  MGDA-Cu を含む 0.5 wt% SP 水溶液 70 L で 1 時間洗浄した。洗浄水を排出後、同様にバイオフィルムを形成させ、10 日後に形成されたバイオフィルムを採取した (SP+MGDA-Cu 洗浄後サンプル)。前述の 4-2-1 では洗浄直後のバイオフィルムを採取したのに対し、4-2-2 では洗浄後 10 日間放置した後に採取した。

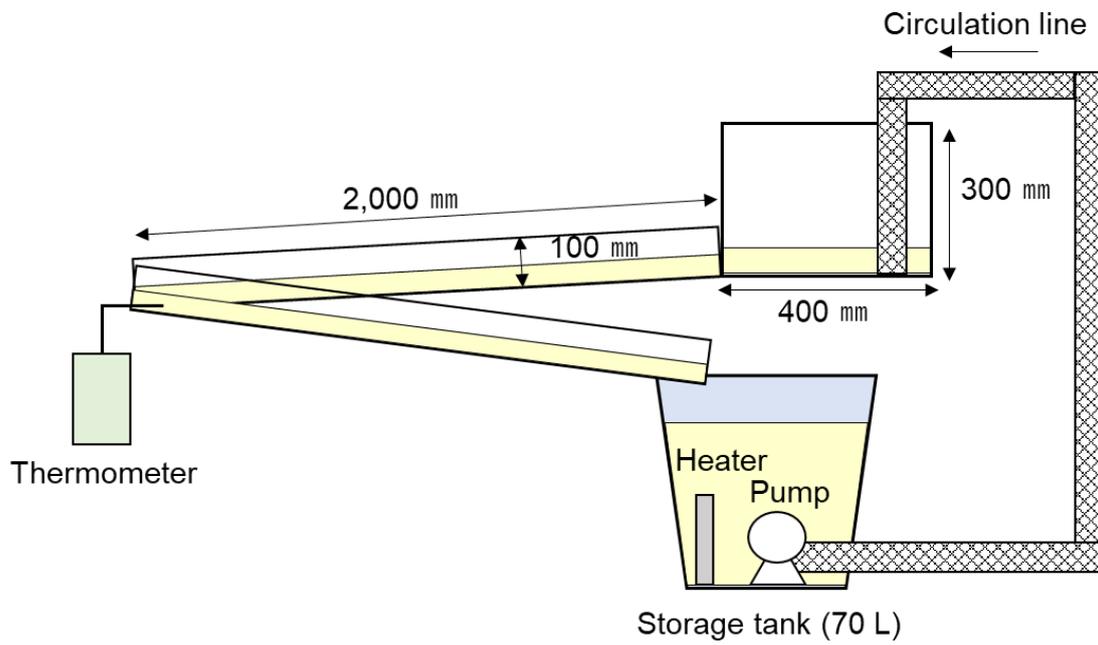


Fig. 4-1. Schematic diagram of the experimental model of circulating water pipe.

The experimental model of the circulating water pipe consists of a horizontal U-shaped plastic pipe 2 m long and 10 cm wide.

(a)



(b)



(c)



Fig. 4-2. The experimental model of circulating water pipe and biofilm.

(a) Biofilms formed on the experimental model (b) The experimental model was washed with SP with or without MGDA-Cu. (c) Biofilms were collected after the stream was stopped.

### 4-2-3 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析

循環水パイプの実験モデル(4-2-1, 4-2-2)から採取したバイオフィルムサンプル（洗浄前、SP による洗浄後、SP と MGDA-Cu 併用による洗浄後）について、ISOIL（株式会社ニッポンジーン、東京、日本）を使用し、メーカーの手順に従い、バイオフィルムから DNA を抽出した。515F / 806R プライマー<sup>2)</sup> を使用し、16S rRNA の V4 領域を増幅させた。サンプルごとに 6 つ複製した増幅産物を、Bioengineering Lab 株式会社（神奈川、日本）にて、MiSeq 装置と MiSeq 試薬キット v2（300 サイクル）（Illumina, San Diego, CA, USA）を使用してシーケンス解析を行った。

## 4-3 結果および考察

### 4-3-1 バイオフィルム中の菌叢

前述の 4-2-1 および 4-2-2 にて 2 回の試験を実施したが、SP 洗浄後と SP+MGDA 洗浄後で循環水パイプ上に形成されたバイオフィルムは、付着量などの外観上の大きな違いは認められなかった。

採取したバイオフィルム中の 16S rRNA 遺伝子を、アンプリコンシーケンスによって分析した。まず 4-2-1 の試験においてバイオフィルムから得られたシーケンス配列は、洗浄前①で 49,602 配列、SP+MGDA-Cu 洗浄後で 50,695 配列、洗浄前②で 44,525 配列、SP 洗浄後で 61,720 配列決定できた（Table 4-1）。細菌の分類体系は、上位から界、門、綱、目、科、属、種となっている。これらの得られた配列を門レベルで分類すると、12 の細菌門（Proteobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門、Actinobacteria 門、Verrucomicrobia 門、Armatimonadetes 門、Acidobacteria 門、Cyanobacteria 門、Chloroflexi 門、Planctomycetes 門、Lentisphaerae 門、Spirochaetes 門）に割り当てられ、Proteobacteria 門、Bacteroidetes 門および Firmicutes 門が大半を占めた（Table 4-1）。配列数の多かった上位 5 つの門を構成

比で示した (Fig. 4-3-(A))。洗浄前①と SP+MGDA-Cu 洗浄後、洗浄前②と SP 洗浄後では、いずれも洗浄前後で僅かな菌叢変化は認められたものの、大きな菌叢変化は認められなかった (Fig. 4-3-(A))。

これら 3 つの門を綱レベルで解析した (Figs. 4-3-(B), 4-4-(C),(D))。Proteobacteria 門は、Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Deltaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、および Epsilonproteobacteria 綱に分類された。Proteobacteria 門にはグラム陰性菌が属しており、Gammaproteobacteria 綱には *Escherichia* 属、*Legionella* 属、*Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属、*Salmonella* 属が含まれる。Proteobacteria 門では、洗浄前後で僅かな菌叢変化は見られたものの、大きな菌叢変化は認められなかった (Fig. 4-3-(B))。Bacteroidetes 門は、Bacteroidia 綱、Cytophagia 綱、Flavobacteriia 綱、および Sphingobacteriia 綱に分類された。Bacteroidetes 門には偏性嫌気性グラム陰性菌が属している。Bacteroidetes 門においては、SP による洗浄では僅かな菌叢変化のみで大きな菌叢変化は認めなかったが、SP+MGDA-Cu 洗浄では Flavobacteriia 綱の割合の減少が認められた (Fig. 4-4-(C))。Firmicutes 門は、Bacilli 綱、Clostridia 綱、Erysipelotrichia 綱、Thermolithobacteria 綱、Negativicutes 綱に分類される。Firmicutes 門にはグラム陽性菌が属しており、Bacilli 綱には *Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属、Clostridia 綱には *Clostridium* 属が含まれる。分類されたのは Bacilli 綱と Clostridia 綱のみであり、SP も SP+MGDA-Cu のいずれも、洗浄前後で菌叢変化は認められなかった (Fig. 4-4-(D))。

試験 4-2-1 において洗浄前後で菌叢変化が観察できなかった要因として、バイオフィルムのサンプリングのタイミングを洗浄直後に実施したためと考えた。配管内に洗浄水を循環したのみであるため、洗浄直後の死菌体の DNA も検出したと考えられる。そこで試験 4-2-2 では、洗浄後に 10 日間放置して形成させたバイオフィルムを洗浄後サンプルとして採取し分析を行った。

試験 4-2-2 では、洗浄前後でバイオフィルム中の菌叢変化が観察できた。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+MGDA-Cu 処理後で 43,741 配列決定できた (Table 4-2)。これらの得られた配列は、8 つの細菌門 (Proteobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門、Acidobacteria 門、Verrucomicrobia 門、Cyanobacteria 門、Chloroflexi 門) に割り当てられ、Proteobacteria 門および Bacteroidetes 門が大半を占めた (Table 4-2)。配列数の多かった上位 5 つの門の構成比を示した (Fig. 4-5-(A))。SP+MGDA-Cu 処理による循環洗浄では、SP 単独と比較して、Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門で大きな組成変化が確認された (Fig. 4-5-(A))。この 2 つの門を綱レベルで解析した (Fig. 4-5-(B), (C))。SP+MGDA-Cu 洗浄では、SP 単独と比較して、Proteobacteria 門の Betaproteobacteria 綱 (Fig. 4-5-(B)) と、Bacteroidetes 門の Flavobacteriia 綱の割合が大幅に減少した (Fig. 4-5-(c))。Firmicutes 門は得られたシーケンス配列が少なかったため、綱レベルでの比較ができなかった。

本実験モデルで形成されたバイオフィルムは、大半がグラム陰性菌で構成されていた。第 3 章 (3-3-1 から 3-3-5) において、MGDA-Cu は SP のグラム陰性菌に対する除菌効果を高めた。銅イオンや ROS は、グラム陰性菌の細胞膜、DNA などに損傷を与えやすく<sup>3)4)</sup>、ROS による細胞外多糖類の分解促進との相乗効果により、菌叢変化が起こったと考えられる。

除菌剤は微生物の組成を変化させることから<sup>5)</sup>、MGDA-Cu は SP の除菌活性を増加させ、バイオフィルムの細菌叢の構成に大きな変化を与えることを結論付けることができた。

Table 4-1. Number of sequences assigned to bacterial phyla.

	None①	SP+MGDA-Cu	None②	SP
Proteobacteria	32,872	32,698	30,466	44,494
Bacteroidetes	7,076	7,560	9,943	13,806
Firmicutes	5,493	5,379	3,710	2,537
Actinobacteria	2,614	3,424	35	74
Verrucomicrobia	474	755	169	248
Armatimonadetes	137	348	40	87
Acidobacteria	287	348	15	290
Cyanobacteria	266	38	6	3
Chloroflexi	186	0	0	3
Planctomycetes	74	25	76	135
Lentisphaerae	68	77	0	0
Spirochaetes	55	43	65	43
Total	49,602	50,695	44,525	61,720

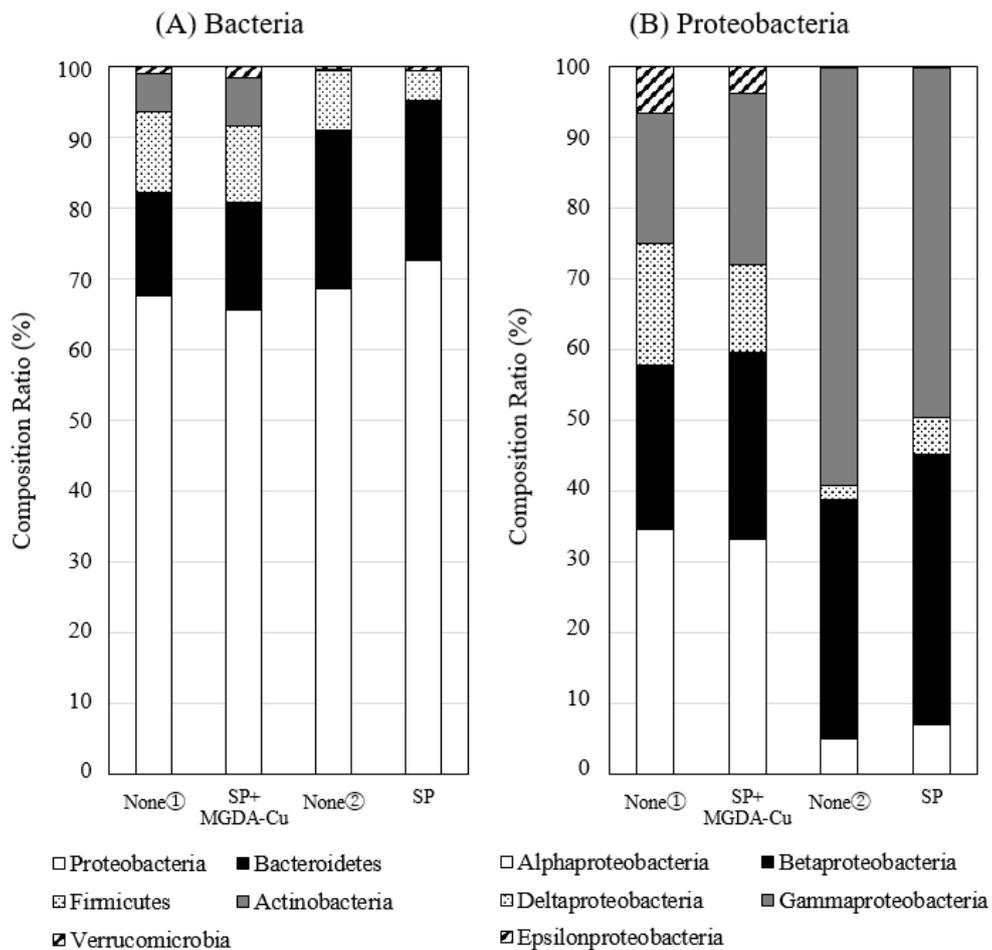


Fig. 4-3. Composition ratio of bacterial flora in the biofilm.

The biofilms on the experimental model of circulating water pipe before washing (None①), after washing by SP and MGDA-Cu (SP+MGDA-Cu), before washing (None②), and the mixture of SP (SP) were analyzed by amplicon sequencing of prokaryotic 16S rRNA genes. (A) The ratio of bacterial phyla shown in Table 4-1. (B) Proteobacteria phylum is further divided into five classes.

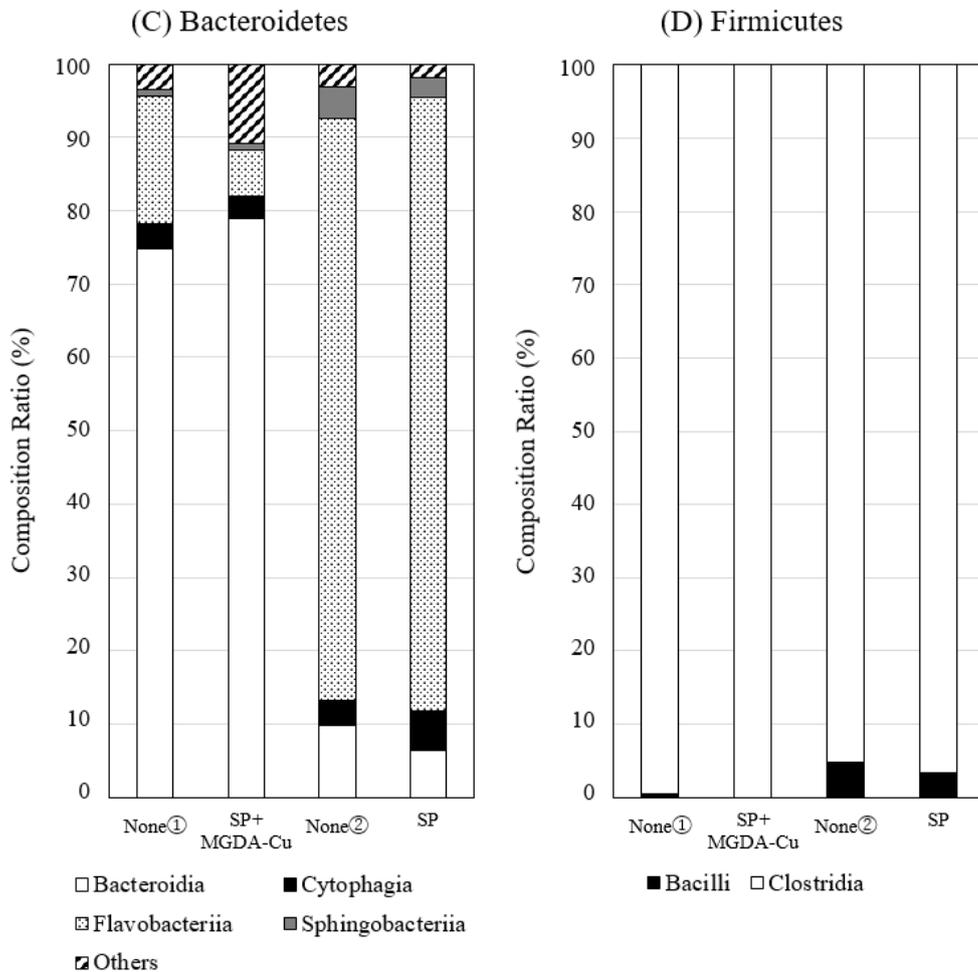


Fig. 4-4. Composition ratio of bacterial flora in the biofilm.

The biofilms on the experimental model of circulating water pipe before washing (None①), after washing by SP and MGDA-Cu (SP+MGDA-Cu), before washing (None②), and the mixture of SP (SP) were analyzed by amplicon sequencing of prokaryotic 16S rRNA genes. (C) Bacteroidetes phylum is further divided into four classes and others which cannot classified. (D) Firmicutes phylum is further divided into two classes.

Table 4-2. Number of sequences assigned to bacterial phyla.

	None	SP	SP+MGDA-Cu
Proteobacteria	22,038	20,842	21,709
Bacteroidetes	12,046	11,329	19,101
Firmicutes	2,179	818	1,771
Actinobacteria	212	383	888
Verrucomicrobia	287	153	206
Armatimonadetes	28	12	45
Cyanobacteria	0	7	21
Chloroflexi	44	32	0
Total	36,834	33,576	43,741

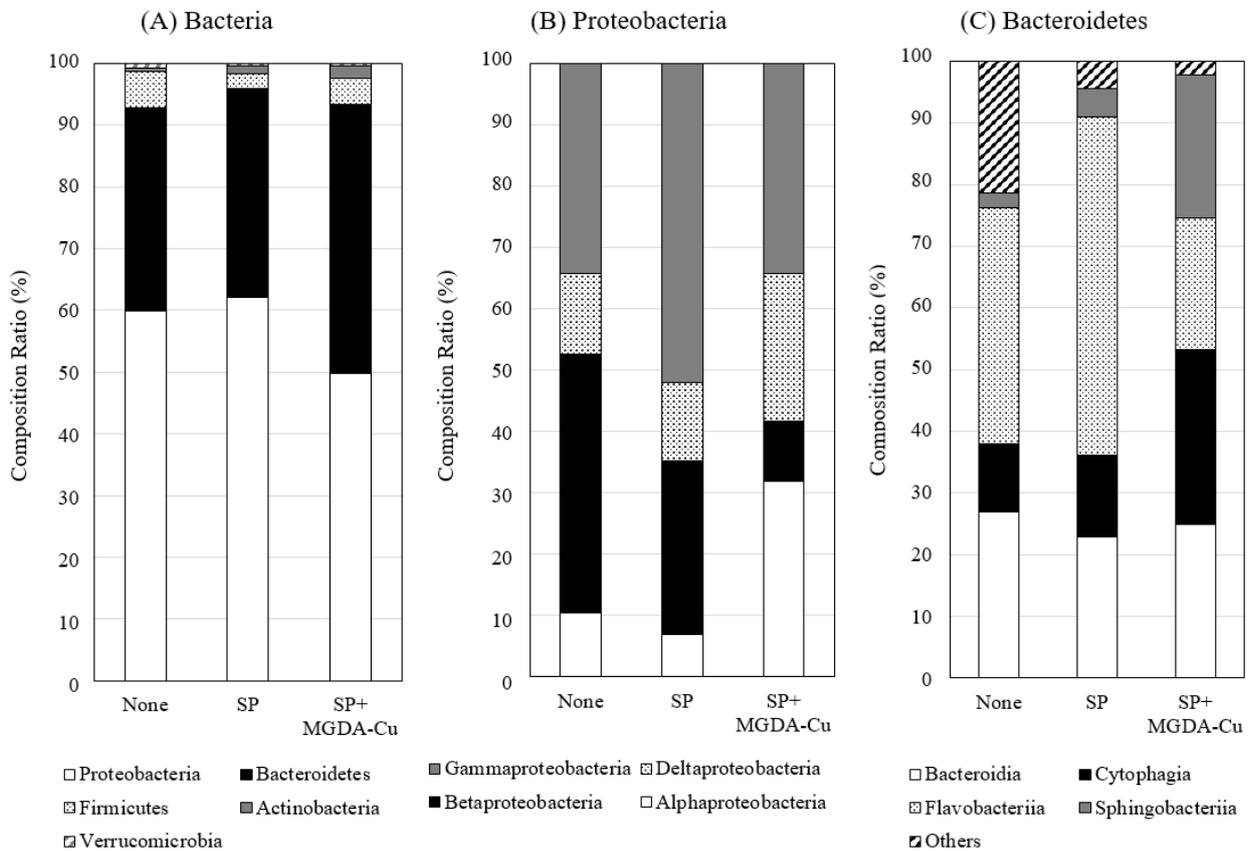


Fig. 4-5. Composition ratio of bacterial flora in the biofilm.

The biofilms on the experimental model of circulating water pipe before washing (none), after washing by SP (SP), and the mixture of SP and MGDA-Cu (SP+MGDA-Cu) were analyzed by amplicon sequencing of prokaryotic 16S rRNA genes. (A) The ratio of bacterial phyla shown in Table 4-2. (B) Proteobacteria phylum is further divided into four classes. (C) Bacteroidetes phylum is further divided into four classes and others which cannot classified.

## 第 5 章 総括

本研究では、循環水環境として業務用食洗機と循環浴槽配管に着目し、その衛生保持を目的として、細菌の菌叢解析と除去方法を検討した。

本研究にて得られた知見を各章毎に総括する。

第 2 章では、構造の異なる実際に用いられている食洗機（ドアタイプとコンベアタイプ）の庫内を区画別にサンプリングし、中温・高温で生育する菌数を調査し、生育したコロニーを 16S rRNA 遺伝子解析を用いて菌株の同定を行った。ドアタイプもコンベアタイプも部位によって細菌による汚染度が異なり、すすぎ槽よりも洗浄槽を中心に汚染が高い傾向が見られた。ドアタイプでは中温細菌よりも好熱性細菌が多く検出され、高温環境特有の菌株が分離された。食洗機全体では、グラム陰性菌よりもグラム陽性菌が多く分離された。グラム陰性菌は細胞壁が弱く機械的ストレスや薬剤によるダメージを受けやすいため、食洗機の物理的な力（水圧）や 80°C の高温によって制御されていることが示された。調査をした食洗機の大部分から芽胞形成菌の *Bacillus* 属が検出され、好熱性芽胞形成菌も得られている。これらはバイオフィルムを形成するため、食洗機のバイオフィルム除去にはこれらの細菌の制御が必要である。

第 3 章では、*Bacillus* 属の除去と循環浴槽のレジオネラ症対策に過炭酸ナトリウム (SP) を活用するため、その除菌力向上剤として銅錯体の効果を検証した。レジオネラ属菌はバイオフィルムを形成することから、菌体に対する除菌効果と、バイオフィルムを構成する細胞外多糖の主成分であるアルギン酸ナトリウムをモデルとしてその分解力を評価した。SP に MDGA-Cu を添加することで、*B. subtilis* や *L. pneumophila* 含む各種細菌に対する SP の除菌力は向上し、汚れの存在下でもその除菌力が阻害されにくくなることが分かった。MGDA-Cu は SP のアルギン酸ナトリウムに対する粘度低下を促進させたことから、バイオフィ

ルムの分解能を高められる。

第 4 章では、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、バイオフィルムモデルの作成を検討した。循環水配管モデルを用い、その環境下で実際に形成させたバイオフィルムを用いて実証試験を行った。SP 単独、SP に MGDA-Cu を加えた場合とで循環洗浄を行い、銅錯体がバイオフィルムの菌叢に与える変化を次世代シーケンサー（アンプリコンシーケンス解析）にて調査した。SP のみでは菌叢に大きな変化が見られなかったが、SP に MGDA-Cu を添加することにより、Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門の細菌のクラスで大きな菌叢の変化が認められた。MGDA-Cu はバイオフィルムの細菌叢の構成にも大きな変化を与えた。

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、バイオフィルムを構成する菌叢構成への作用が重要であり、これらを兼ね備えた SP と MGDA-Cu 錯体による洗浄技術を活用することにより制御できる。

本研究にて提唱した洗浄技術は、生分解性に配慮したキレート剤を使用した金属錯体で、SP や過酸化水素は最終的に酸素と水に分解されるため、環境負荷の少ない洗浄方法である。国際的な取り組みである SDGs(持続可能な開発目標)の中に掲げられた、すべての人への健康と福祉、安全な水の提供の一助ともなる。洗浄剤の水環境への負荷低減を更に推進し、人々にとって有害となる微生物から命を守り水環境の生活衛生の向上に寄与することが本研究の価値創造に繋がると考える。

## 参考文献

### 第 1 章の参考文献

- 1) 厚生労働省監修, 「食品衛生検査指針微生物編」 日本食品衛生協会 **2004**, 71-74.
- 2) 伊藤武, ATP ふき取り迅速研究会監修, 「ATP ふき取り検査」 鶏卵肉情報センター **2002**, 3-11.
- 3) 本間茂, ATP 測定を利用した迅速衛生検査—”ATP ふき取り検査”と”ATP 法による迅速微生物検査”—. 日本防菌防黴学会誌. **2014**, 42, 299-308.
- 4) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課, 令和元年食中毒発生状況. 食品衛生研究. **2020**, 70, 104-196.
- 5) 重茂克彦, 黄色ブドウ球菌とエンテロトキシン. 食品衛生研究. **2009**, 59, 17-23.
- 6) 清水潮, 「食品微生物 I -基礎編 食品微生物の科学」 幸書房 **2001**, 54-60.
- 7) 食品安全委員会, 食品健康影響強化のためのリスクプロファイル～牛肉を主とする食肉中の腸管出血性大腸菌～ (改訂版) . **2010**, 1-35.
- 8) 食品安全委員会, 食品健康影響強化のためのリスクプロファイル～鶏肉におけるサルモネラ属菌～ (改訂版) . **2012**, 1-27.
- 9) 安形則雄, セレウス菌とその毒素:嘔吐毒素とエンテロトキシン. 食品衛生研究. **2010**, 60, 27-35.
- 10) 門間千枝, ウエルシュ菌とエンテロトキシン. 食品衛生研究. **2010**, 60, 15-23.
- 11) 高橋元秀, 鎌田洋一, ボツリヌス菌と神経毒素. 食品衛生研究. **2010**, 60, 7-14.
- 12) 日本食品洗浄剤衛生協会, 食品衛生に活躍する食器洗浄機用洗浄剤. **2006**, 1-38.

- 13) 浜田信夫, 阿部仁一郎, 食器洗い乾燥機のカビ汚染の現状. 日本防菌防黴学会誌. **2013**, *41*, 527-534.
- 14) 浜田信夫, 食器洗い乾燥機のカビ汚染に影響する要因. 日本防菌防黴学会誌. **2013**, *41*, 585-593.
- 15) Raghupathi, P. K.; Zupančič, J.; Brejnrod, A. D.; Jacquiod, S.; Houf, K.; Burmølle, M.; Gunde-Cimerman, N.; Sørensen, S. J. Microbial diversity and putative opportunistic pathogens in dishwasher biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02755-17.
- 16) Zupančič, J.; Raghupathi, P. K.; Houf, K.; Burmølle, M.; Sørensen, S. J.; Gunde-Cimerman, N. Synergistic interactions in microbial biofilms facilitate the establishment of opportunistic pathogenic fungi in household dishwashers. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 21.
- 17) Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Orenstein, W.; Parkin, W. E.; Beecham, H. J.; Sharrar, R. G.; Harris, J.; Mallison, G. F.; Martin, S. M.; McDade, J. E.; Shepard, C. C.; Brachmanet, P. S. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *New Engl. J. Med.* **1997**, *297*, 1189-1197.
- 18) Brenner, D. J.; Steigerwalt, A. G.; McDade J. E. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* **1979**, *90*, 656-658.
- 19) 倉文明, 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 3 レジオネラ症の国内外の動向. 日本防菌防黴学会誌. **2018**, *46*, 365-376.
- 20) Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* **2002**, *184*, 1140-1154.
- 21) Ma, L.; Wang, J.; Wang, S.; Anderson, E. M.; Lam, J. S.; Parsek, M. S.; Wozniak,

- D. J. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 1995-2005.
- 22) 厚生労働省, レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針. **2003**
- 23) 厚生労働省, 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル. **2019**, 22-23.
- 24) Patel, M.; Desai, J.; Owen, P. The efficacy of disinfectants in the decontamination of dental unit water lines: an in vitro laboratory study. *BDJ Open* **2016**, *2*, 16003.
- 25) Li, Z.; Wang, Y.; Wang, Z. Study on Bleaching Technology of Cotton Fabric with Sodium Percarbonate. *MATEC Web Conf.* **2016**, *67*, 06048.
- 26) Murayama, H.; Hayashi, M.; Yabe, A. Bleaching Effect of Sodium Percarbonate. *J. Home Econ. Jpn.* **1971**, *22*, 113-117.
- 27) 皆川基, 藤井富美子, 大矢勝, 「洗剤・洗淨百科事典(新装版)」(株朝倉出版 **2007**, 108-114.
- 28) 真島利明, 森田靖之, 大谷正彦, 末國智成, 久保園隆康, 岡野知道, 衣類洗淨における亜鉛化合物の除菌機能について. 第 43 回洗淨に関するシンポジウム 要旨集. **2011**, 19
- 29) Pecci, L.; Montefoschi, G.; Cavallini, D. Some new details of the copper-hydrogen peroxide interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 264-267.
- 30) Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65-87.

## 第 2 章の参考文献

- 1) Wernersson, E. S.; Johansson, E.; Håkanson, H. Cross-contamination in dishwashers. *J. Hosp. Infect.* **2004**, *56*, 312-317.
- 2) Francis, J.; Newsom, S. W. B. Evaluation of dishwashing machines in four hospitals. *J. Hosp. Infect.* **1987**, *9*, 294-297.
- 3) Yoshida, M.; Furuya, N.; Hosokawa, N.; Kanamori, H.; Kaku, M.; Koide, M.; Higa, F.; Fujita, J. *Legionella pneumophila* contamination of hospital dishwashers. *Am. J. Infect. Control.* **2018**, *46*, 943-945.
- 4) Ebner, W.; Eitel, A.; Scherrer, M.; Daschner, F. D. Can household dishwashers be used to disinfect medical equipment? *J. Hosp. Infect.* **2000**, *45*, 155-159.
- 5) Raghupathi, P. K.; Zupančič, J.; Brejnrod, A. D.; Jacquiod, S.; Houf, K.; Burmølle, M.; Gunde-Cimerman, N.; Sørensen, S. J. Microbial diversity and putative opportunistic pathogens in dishwasher biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02755-17.
- 6) Zupančič, J.; Novak, Babič, M.; Zalar, P.; Gunge-Cimerman, N. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148166.
- 7) Zalar, P.; Novak, M.; de Hoog, G.S.; Gunde-Cimermanaf, N. Dishwashers-a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 997-1007.
- 8) Döğen, A.; Kaplan, E.; Oksüz, Z.; Serin, M. S.; Ilkit, M.; de Hoog, G. S. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. *Med Mycol.* **2013**, *51*, 493-498.
- 9) Zupančič, J.; Raghupathi, P. K.; Houf, K.; Burmølle, M.; Sørensen, S. J.; Gunde-Cimerman, N. Synergistic interactions in microbial biofilms facilitate the establishment of opportunistic pathogenic fungi in household dishwashers. *Front.*

*Microbiol.* **2018**, *9*, 21.

- 10) 西島美由紀ら, 「微生物の簡易迅速検査法」 (株)テクノシステム 五十嵐静信, 江崎孝行, 高鳥浩介, 土戸哲明監修, **2013**, 29-41.
- 11) Stackebrandt, E.; Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, **2016**, *33*, 152-155.
- 12) Tindall, B. J.; R. Rosselló-Móra, R.; Busse, H.-J.; Ludwig, W.; P. Kämpfer. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 249–266.
- 13) Wayne, L. G.; Brenner, D. J.; Colwell, R. R.; Grimont, P. A. D.; Kandler, O.; Krichevsky, M. I.; Moore, L. H.; Moore, W. E. C.; Murray, R. G. E.; Stackebrandt, E.; Starr, M. P.; Truper, H. G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1987**, *37*, 463-464.
- 14) Olsen, G.J.; Lane, D.J.; Giovannoni, S.J.; Pace, N. R.; Stahl, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **1986**, *40*, 337-365.
- 15) Bandow, J. E.; Brötz, H.; Hecker, M. *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the sigma (B)-dependent general and multiple stress response. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 459-467.
- 16) Hecker, M.; Völker, U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol.* **2001**, *44*, 35–91.
- 17) Gauvry, E.; Mathot, A. G.; Leguérinel, I.; Couvert, O.; Postollec, F.; Broussollec, V.; Coroller, L. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res. Microbiol.* **2017**, *168*, 369-378.
- 18) 榑原 祥清, 枯草菌株間におけるバイオフィルム形成能の比較, 食総研報 **2007**, *71*, 45-49.

- 19) Karaca, B.; Buzrul, S.; Cihan, A. C. *Anoxybacillus* and *Geobacillus* biofilms in the dairy industry: effects of surface material, incubation temperature and milk type. *Biofouling*. **2019**, *35*, 551-560.
- 20) Somerton, B.; Lindsay, D.; Palmer, J.; Brooks, J.; Flint, S. Changes in sodium, calcium, and magnesium ion concentrations that inhibit *Geobacillus* biofilms have no effect on *Anoxybacillus flavithermus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 5115-5122.
- 21) Burgess, S. A.; Brooks, J. D.; Rakonjac, J.; Walker, K. M.; Flint, S. H. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1012-1018.
- 22) Shiu, C.; Zhang, Z.; Thomas, C. R. A comparison of the mechanical properties of different bacterial species. In “*Applied Microbiology*”, Eds. Durieux, A.; Simon, J. P. Netherland, Kluwer Acad. Pub. **2001**, 155-162.
- 23) Taubes, G. The bacteria fight back. *Science*, **2008**, *321*, 356-361.
- 24) De Vos, P.; Garrity, G. M.; Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Ed.* New York, Springer **2001**, *3*, 134-141.
- 25) 江崎 孝行, 大楠 清文, 病原性細菌の正式発表菌名リスト, 日本臨床微生物学雑誌 **2007**, *17*, 53-108.
- 26) Kovacs, G.; Burghardt, J.; Pradella, S.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Marialigeti, K. *Kocuria palustris* sp. nov, and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999**, *49*, 167-173.
- 27) Xue, Y.; Sun, X.; Zhou, P.; Liu, R.; Liang, F.; Ma, Y. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well.

*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 1643-1646.

- 28) Bard, J. D.; Lewinski, M.; Summanen, P. H.; Deville, J. G. Sepsis with prolonged hypotension due to *Moraxella osloensis* in a non-immunocompromised child. *J. Med. Microbiol.* **2011**, *60*, 138-141.
- 29) Driks, A. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 1-20.
- 30) Nisholuson, W. L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H. J.; Setlow, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 548-572.

### 第3章の参考文献

- 1) Pecci, L.; Montefoschi, G.; Cavallini, D. Some new details of the copper-hydrogen peroxide interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 264-267.
- 2) Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65-87.
- 3) Hodes, J.; Sielaff, P.; Metz, H.; Kessler-Becker, D.; Gassenmeier, T.; Neubert, R. H. H. The role of chelating agents and amino acids in preventing free radical T formation in bleaching systems. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *129*, 194-201.
- 4) Tandy, S.; Bossart, K.; Mueller, R.; Ritschel, J.; Hauser, L.; Schulin, R.; Nowack, B. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 937-944.
- 5) Cao, A.; Cappai, G.; Carucci, A.; Lai T. Heavy metal bioavailability and chelate mobilization efficiency in an assisted phytoextraction process. *Environ. Geochem. Health* **2008**, *30*, 115-119.
- 6) Kos, B.; Lestan, D. Influence of a biodegradable ([S, S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb

- phytoextraction and leaching. *Plant Soil* **2003**, *253*, 403-411.
- 7) Cao, A.; Carucci, A.; Lai, T.; Colla, L. P.; Tamburini, E. Effect of biodegradable agents on heavy metals phytoextraction with *Mirabilis jalapa* and on its associated bacteria. *Eur. J. Soil Biol.* **2007**, *43*, 200-206.
- 8) Pinto, I. S. S.; Neto, I. F. F.; Soares, H. M. V. M. Biodegradable chelating agents for industrial, domestic, and agricultural applications-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2014**, *21*, 11893-11906.
- 9) BASF, Technical information WF-No. 3160 Trilon® M types. **2013**.
- 10) Abdel-Nour M.; Duncan C.; Low, D. E.; Guyard, C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21660-21675.
- 11) Mann, E. E.; Wozniak, D. J.; Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 893–916.
- 12) Clementi, F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1997**, *17*, 327–361.
- 13) Mao, S.; Zhang, T.; Sun, W.; Ren, X. The depolymerization of sodium alginate by oxidative degradation. *Pharm. Dev. Technol.* **2012**, *17*, 763–769.
- 14) Li, X.; Xu, A.; Xie, H.; Yu, W.; Xie, W.; Ma, X. Preparation of low molecular weight alginate by hydrogen peroxide depolymerization for tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 660-664.
- 15) Lineback, B. C.; Nkemngong, A. C.; Wu, T. S.; Li, X.; Teska, J. P.; Oliver, F. H. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2018**, *7*, 154.
- 16) Kimura, K.; Itoh, Y. Characterization of poly- $\gamma$ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis*

- encapsulated with poly- $\gamma$ -glutamate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2491–2497.
- 17) Tran, L. S. P.; Nagai, T.; Itoh, Y., Divergent structure of the Com-QXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 1159-1171.
- 18) Hiura, T.; Koseki, H.; Shiraishi, K.; Asahara, T.; Tsurumoto, T.; Shindo, H.; Baba, K.; Taoda, H.; Terasaki, N. Photocatalytic TiO<sub>2</sub> particles confer superior antibacterial effects in a nutrition-rich environment: an *in vitro* study. *Biomed. Res.* **2010**, *31*, 151-154.
- 19) Yuan, Z.; Cai, N.; Du, Y.; He, Y.; Yeung, E. S. Sensitive and selective detection of copper ions with highly stable polyethyleneimine-protected silver nanoclusters. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 419-426.
- 20) Foster, H. A.; Ditta, I. B.; Varghese, S.; Steele, A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1847-1868.
- 21) Sadeghi, S.; Abdollahi, S.; Tarighi, P., Samadi, N. Comparative evaluation of hydrogen peroxide sporicidal efficacy by different standard test methods. *Iran. J. Microbiol.* **2020**, *12*, 113-120.
- 22) 村中陽介, 化成品の選択的製造を目指したバイオマスの多段水熱分解法に関する研究. 京都大学, **2015**, 博士論文
- 23) Yu, Z.; Thompson, Z.; Behnke, S. L.; Fenk, K. D.; Huang, D.; Shafaat, H. S.; Cowan, J. A. Metalloglycosidase mimics: oxidative cleavage of saccharides promoted by multinuclear copper complexes under physiological conditions. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 11218–11222.
- 24) Watthanaphanit, A.; Sato, N. Effect of polymer concentration on the

- depolymerization of sodium alginate by the solution plasma process. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98*, 1072-1080.
- 25) Hsueh, Y. H.; Huang, K. Y.; Kunene, S. C.; Lee, T. Y. L. Poly- $\gamma$ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2644.
- 26) 福崎智司, バイオフィルム制御と洗浄技術, 松村吉信監修, バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程 = Biofilm structure and formation for biocontrol and countermeasure of biofilm and its growth : 特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ. シーエムシー出版. **2017**, 121-132.
- 27) Kawano, A.; Yamasaki, R.; Sakakura, T.; Takatsuji, Y.; Haruyama, T.; Yoshioka, Y.; Ariyoshi, W. Reactive oxygen species penetrate persister cell membranes of *Escherichia coli* for effective cell killing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 496

#### 第4章の参考文献

- 1) 野田尚宏, 蔵田信也, 関口勇地, 鎌形洋一, 「微生物の簡易迅速検査法」 (株) テクノシステム 五十嵐静信, 江崎孝行, 高鳥浩介, 土戸哲明監修, **2013**, 97-106.
- 2) Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C. A.; Turnbaugh, P. J.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 4516-4522.
- 3) Hua, X.; Wang, L.; Zhang, L.; Dong, D.; Guo, Z. Effects of heavy metal species, concentrations, and speciation on pentachlorophenol sorption by river biofilms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 20782-20791.

- 4) Kawano, A.; Yamasaki, R.; Sakakura, T.; Takatsuji, Y.; Haruyama, T.; Yoshioka, Y.; Ariyoshi, W. Reactive oxygen species penetrate persister cell membranes of *Escherichia coli* for effective cell killing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 496
- 5) Chatzigiannidou, I.; Teughels, W.; Van de Wiele, T.; Boon, N. Oral biofilms exposure to chlorhexidine results in altered microbial composition and metabolic profile. *NPJ Biofilms Microbiomes.* **2020**, *6*, 13.

## 論文リスト

### 主論文を構成する論文

1. Evaluation of contaminated bacteria inside door- and conveyor-types of dishwashers used in food service facilities

石崎麗, 神野英毅, 吉宗一晃

*Journal of Biological Macromolecules* **2020**, 20, 25-31

2. 業務用ドア型およびコンベア型自動食器洗浄機の細菌汚染の評価

石崎麗, 神野英毅, 吉宗一晃

日本大学生産工学部研究報告 A, **2020**, 53, 1-7

3. 2-[Bis (carboxymethyl) amino] propanoic acid-chelated copper chelate enhances bacterial elimination by sodium percarbonate

石崎麗, 高橋岩仁, 佐藤克己, 吉宗一晃

*Biocontrol Science* **2021**, 26 (in press)

## 謝辞

本論文の執筆にあたり、全般にわたり多大なるご指導、ご教授を賜りました日本大学生産工学部応用分子化学科教授 吉宗一晃先生に心より感謝申し上げます。論文審査にあたり、懇親丁寧なご指導を賜りました日本大学生産工学部応用分子化学科教授 津野孝先生、同教授 柏田歩先生、日本大学生産工学部環境安全工学科教授 坂本恵一先生、日本大学理工学部物質応用化学科教授 西村克史先生、ならびに応用分子化学科の先生方に深く御礼申し上げます。

また、共同研究者として、研究を共に推進し、研究成果の創出にご協力いただきました日本大学生産工学部土木工学科教授 高橋岩仁先生、同准教授 佐藤克己先生に心より御礼申し上げます。

さらに、長年にわたりご指導と激励を賜りました星薬科大学理事 神野英毅先生、日本大学生産工学部環境安全工学科准教授 小森谷友絵先生に厚く御礼申し上げます。

学位取得に向けて奨励とご配慮を賜りましたライオン・スペシャリティ・ケミカルズ株式会社 平井研究所所長 久保園隆康氏、ライオンハイジーン株式会社 企画開発部第1研究所所長 蓼沼裕彦氏に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究に携わったすべての方々に深く感謝申し上げます。