

銅錯体添加による過炭酸ナトリウムの殺菌効果の向上

日大生産工 (院) ○石崎 麗 日大生産工 高橋 岩仁
日大生産工 佐藤 克己 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

レジオネラ症はレジオネラ属菌による感染症で、レジオネラ菌を含む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。国内では年々増加傾向にあり、その発生件数は2017年には1,700件に達している。レジオネラ属菌は自然界の水系や土壌に広く存在する菌であり、感染源は循環式浴槽が最も多く、全体の7割を占めている。配管内に発生するバイオフィームの中でアメーバに寄生して増殖するため、消毒が不十分であると浴槽中に浮遊してくる。バイオフィームは、微生物が固体表面に作る多糖類やタンパク質から成る構造体で、物理的ストレスに抵抗性を示す。従って、配管の維持管理には、週に1回以上の高濃度塩素あるいは過酸化水素による洗浄消毒に加え、年に1回以上のバイオフィームの除去が必要とされており、2~3%の過酸化水素が推奨されている¹⁾²⁾。過酸化水素は取扱いに危険が伴うこと、ハンドリング性が悪く高価であることから、過炭酸ナトリウム (SP) が代用されるようになっている。

SPは粉末の酸素系漂白剤であり、配管洗浄剤³⁾、洗濯槽クリーナー、食器の漂白剤等に使用されている。水溶液中では炭酸ナトリウムと過酸化水素を生成し、水と酸素に分解するため、塩素系漂白剤と比べると環境負荷が低いというメリットがある。また、塩素系漂白剤と比べ反応が穏やかであるため材質を傷めにくい。一方、SPの漂白効果は温度依存性が高く、高温では高いが、低温になるほど低くなるため⁴⁾、漂白活性化剤と併用されることが多い。

過酸化水素は、銅との相互作用により、ヒドロキシラジカルやヒドロペルオキシラジカルなどの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) を生成する。ROSは非常に反応性が高く、微生物のタンパクやDNAなどを非選択的に酸化し、科学的損傷を引き起こす⁵⁾。銅と過酸化水素によるROSの生成は、キレート剤によって制御できる。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) による銅錯体は、ヒドロキシラジカルの生成を抑制するが、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⁶⁾。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り⁷⁾⁸⁾、pH2~13.5の広範囲で多価イオンと水溶性複合体を形成し、金属イオンとモル比1:1で錯体を形成する⁹⁾。

我々はSPの除菌効果を高めるために、MGDAの銅錯体 (MGDA-Cu) およびクエン酸の銅錯体 (クエン酸-Cu) を選定し、MGDA-Cuについてより詳細な検討を行った。SPにMGDA-Cuを添加した場合の除菌効果について、黄色ブドウ球菌、大腸菌、枯草菌を用いて評価した。更に、バイオフィームの構成成分であるアルギン酸ナトリウムを用いて、SPによる減粘作用を測定した。アルギン酸塩はバイオフィームの重要な構成成分で、緑膿菌¹⁰⁾や *Azotobacter vinelandii*¹¹⁾によって生成される。また、循環水配管の実験モデル系にて付着させたバイオフィームを用い、銅錯体の添加が細菌叢の構成に与える影響について評価を行った。

2. 実験方法および測定方法

2-1. 銅錯体による過酸化水素の分解速度

硬度40 ppmの水道水1,000 mLを53 °Cに加熱しておき、スリーワンモータにて1,000 rpmで攪拌した水中に、35%過酸化水素 (三菱ガス化学(株)) を有効酸素濃度2,700 ppmになるよう添加した。ここに25 μM MGDA-Cuおよび25 μM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。

2-2. 除菌効果

MGDA-Cu添加によるSPの除菌効果を評価した。菌株は、NITE生物資源センターから購入した黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC 12732)、大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC 3972)、および枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC 3134) を用いた。Soybean Casein Digest Agar with Lecithin Polysorbate 80 (SCDLP寒天培地 (日本製薬(株))) で前培養したコロニーを滅菌生理食塩水 (0.85 wt % NaCl) に懸濁し、菌数が $10^7 \sim 10^8$ CFU/

Copper complex enhances bactericidal effect of sodium percarbonate

Urara ISHIZAKI, Iwahito TAKAHASHI, Katsumi SATO
and Kazuaki YOSHIMUNE

mLになるよう調製し菌液とした。検体は、0.5 wt % SP、0.5 wt % SP + 12 μ M MGDA-Cu、12 μ M MGDA-Cuについて実施した。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 % 亜硫酸ナトリウム9 mLに加えて中和した。これを段階希釈し、SCDLP寒天培地で35 $^{\circ}$ 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3種の菌株は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温度は菌株に合わせて調整した。

2-3. アルギン酸ナトリウムに対する減粘効果
アルギン酸ナトリウム (キミカアルギンIL-6、(株)キミカ) を用いて1.5 wt %水溶液を調製し、40 $^{\circ}$ Cに調温した。ここに1 wt % SP、1 wt % SP+25 μ M MGDA-Cu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。

2-4. 循環水パイプの実験モデルにおけるバイオフィルムの菌叢解析

長さ2 m、幅10 cmの横型U字型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上に、流速0.2 m/s、流量0.4 L/sのポンプ (Fig. 1) を用いて、200 mg/mLのスキムミルク水溶液70 Lを16 $^{\circ}$ Cで10日間循環させ、バイオフィルムを形成させた。これを洗浄前サンプルとして湿重量5 g採取した。1 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10日間循環させ、形成されたバイオフィルムを採取した (SP処理サンプル)。続いて、12 μ M MGDA-Cuを含む1 wt % SP水溶液でも同様の操作を行い、サンプルを採取した (SP+MGDA-Cu処理サンプル)。

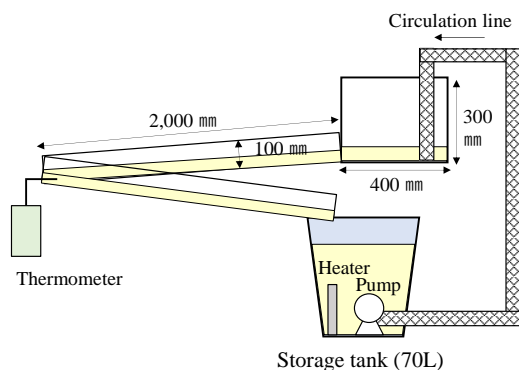


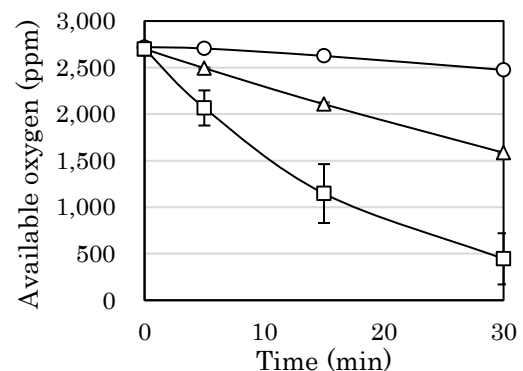
Fig. 1 循環パイプの実験モデル

これらのバイオフィルムサンプルについて、ISOIL (株)ニッポンジーン) 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プライマーを使用し、16S rRNAのV4領域を増幅させた。増幅産物は、Bioengineering Lab株式会社にて、MiSeq装置とMiSeq 試薬キット v2 (300 サイクル) (Illumina) を使用してシーケンス解析を行った。

3. 実験結果および考察

3-1. 銅錯体による過酸化水素の分解速度

銅錯体が未添加の場合、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にまで分解された (Fig. 2)。過酸化水素の分解によって生じるヒドロキシラジカルが最も反応性が高いことから、適度な速度での分解が除菌力の点から好ましいと考えられる。有機物汚れの多い配管洗浄においては、過酸化水素の分解が更に加速すると予想されるため、MGDA-Cuを選定した。



○ : 未添加, △ : MGDA-Cu, □ : クエン酸-Cu

Fig. 2 銅錯体による有効酸素濃度の変化

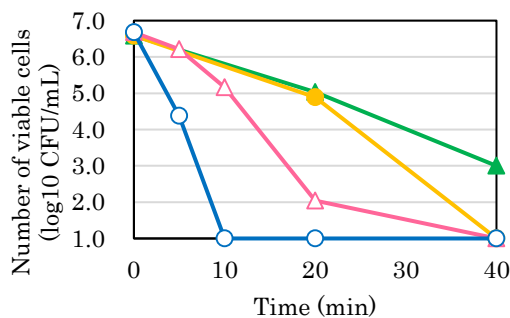
3-2. 除菌効果

*S. aureus*に対する除菌活性値は、35 $^{\circ}$ C・10分間のSP処理では1.5であったのに対し、SP+MGDA-Cu処理では5.0以上であった。一方、BSA存在下ではSPの殺菌効果は低下し、20分間のSP+MGDA-Cu処理でも1.7にとどまった。40分間の処理では効果に差が見られ、SP処理では3.6に対し、SP+MGDA-Cu処理では5.0以上であった (Fig. 3)。これらの結果は、MGDA-Cuの添加が*S. aureus*に対するSPの殺菌効果を高めることを示唆している。

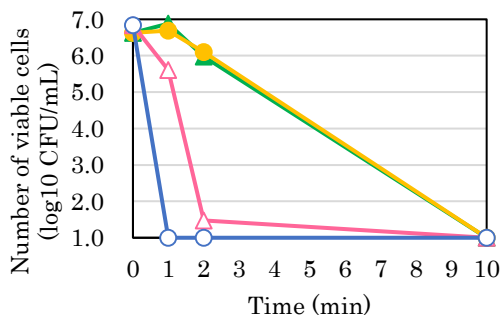
*E. coli*は、*S. aureus*よりもSPに対する感受性が高く、SP+MGDA-Cuでは1分間の処理で除菌活性値5.0以上であった。BSA存在下では、いずれも*E. coli*に対する耐性が高まり、10分間の処理で5.0以上となった(Fig 4)。*E. coli*は、SPに対して不安定であったため、今回の試験条件ではMGDA-Cuの添加効果は比較できなかった。

*B. subtilis*は、BSA存在下で35℃・30分間、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。そこで、MGDA-Cuの効果を評価するために接触温度を60℃に上げたが、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(Fig. 5)。

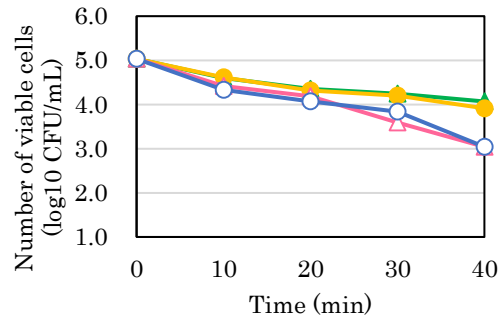
*B. subtilis*や*S. aureus*などのグラム陽性菌は細胞壁が厚いため、*E. coli*などのグラム陰性菌と比べて、ROSに対する耐性が高い¹²⁾。従って、SPに対するMGDA-Cuの添加効果は、細菌のROSや環境に対する耐性に依存している可能性がある。



▲ : SP (+BSA), ● : SP+MGDA-Cu (+BSA),
△ : SP, ○ : SP+MGDA-Cu
Fig. 3 *S. aureus*に対する除菌効果 (35°C)

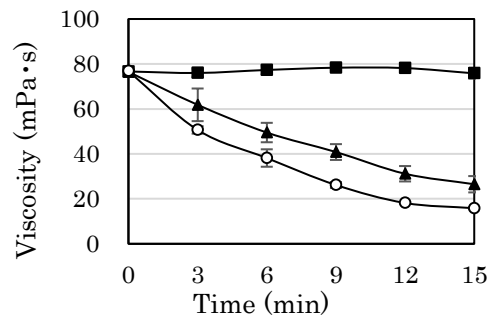


▲ : SP (+BSA), ● : SP+MGDA-Cu (+BSA),
△ : SP, ○ : SP+MGDA-Cu
Fig. 4 *E. coli*に対する除菌効果 (35°C)



▲ : SP (+BSA), ● : SP+MGDA-Cu (+BSA),
△ : SP, ○ : SP+MGDA-Cu
Fig. 5 *B. subtilis*に対する除菌効果 (60°C)

3-3. アルギン酸ナトリウムに対する減粘効果
SPのみの処理と比較し、SP+MGDA-Cu処理では更に大幅な減粘効果が確認された(Fig. 6)。この結果は、MGDA-CuがSPの解重合効果を高め、SPの殺菌効果を向上させることを示唆している。



▲ : SP, ○ : SP+MGDA, ■ : MGDA-Cu
Fig. 6 アルギン酸ナトリウムの粘度変化

3-4. バイオフィーム中の細菌叢への影響

バイオフィームから得られたシーケンス配列は、洗浄前で36,834、SP処理後で33,576、SP+MGDA-Cu処理後で43,741読み取ることができた。これらの得られた配列は、8つの細菌門に割り当てられ、ほとんどがプロテオバクテリア門とバクテロイデス門であった。SP処理と比較して、SP+MGDA-Cu処理ではこの2つの門を構成する細菌の組成に大きな変化が見られた(Fig. 7)。殺菌剤は微生物の組成を変化させることから¹³⁾、MGDA-Cuの添加は、SPの除菌活性を増加させ、バイオフィームの細菌叢に大きな変化を与えていると考えられる。

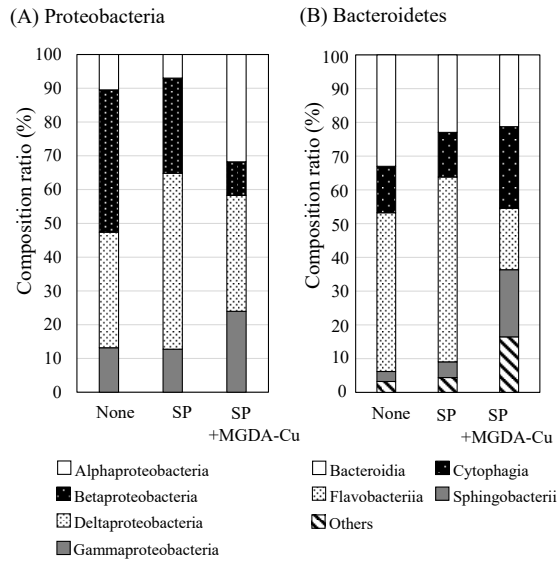


Fig. 7 洗浄によるバイオフィルムの菌叢変化

4. まとめ

MGDA-Cuおよびクエン酸-Cuは、過酸化水素の分解を適度に促進させた。SPへのMGDA-Cuの添加は、*S. aureus*および*E. coli*に対する除菌効果を高めたが、*B. subtilis*に対してはほとんど効果を示さなかった。その増強効果は、細菌の種類によって異なると考えられる。一方、MGDA-Cuの添加はSPのアルギン酸ナトリウムの解重合を促進させた。バイオフィルムの除去には、これらの構成分子と菌体の両方に作用することが重要であり、MGDA-Cuはその効果を高められる可能性を示唆している。

循環水パイプの実験モデルでは、MGDA-Cuを添加したSPでの洗浄により、バイオフィルムを構成する細菌の構成が大きく変化したことが確認できた。今後は実際の循環浴槽施設での銅錯体の添加効果を検証していく。

参考文献

- 1) 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, 厚生労働省告示第297号 (2018) pp. 1-6.
- 2) 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) pp. 22-24.
- 3) Patel, M., Desai, J., and Owen, P. The efficacy of disinfectants in the decontamination of dental unit water lines: an in vitro laboratory study. *BDJ Open*, 2 (2016) p. 16003.
- 4) 大浦律子, 吉川清兵衛, 過酸化系漂白剤の漂白効果 (第1報) 過炭酸ナトリウムの分

解と漂白力におよぼすpHの影響, 家政学雑誌, 36 (1985) pp. 497-502.

- 5) Pecci, L., Montefoschi, G., and Cavallini, D. Some new details of the copper-hydrogen peroxide interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235 (1997) pp. 264-267.
- 6) Hodes, J., Sielaff, P., Metz, H., Kessler-Becker, D., Gassenmeier, T., and 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.*, 129 (2018) pp. 194-201.
- 7) Kos, B., and 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*, 253 (2003) pp. 403-411.
- 8) Cao, A., Carucci, A., Lai, T., Colla, L. P., and Tamburini, E. Effect of biodegradable agents on heavy metals phytoextraction with *Mirabilis jalapa* and on its associated bacteria. *Eur. J. Soil Biol.*, 43 (2007) pp. 200-206.
- 9) Pinto, I. S. S., Neto, I. F. F, and Soares, H. M.V.M. Biodegradable chelating agents for industrial, domestic, and agricultural applications-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 21 (2014) pp. 11893-11906.
- 10) Mann, E. E., and Wozniak, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36 (2012) pp. 893-916.
- 11) Clementi, F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 17 (1997) pp. 327-361.
- 12) Foster, H. A., Ditta, I. B., Varghese, S. and Steele, A., Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90 (2011) pp. 1847-1868.
- 13) Chatzigiannidou, I., Teughels, W., Van de Wiele, T. and Boon, N., Oral biofilms exposure to chlorhexidine results in altered microbial composition and metabolic profile. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 6 (2020) p. 13.