

多目的溶存酸素測定装置を用いた細菌に及ぼす 微酸性電解水の効果

本山聖子*^{1,†}・新井貴子*¹・小川智久*¹
佐藤悦子*¹・石川博*²・鴨井久一*²

*¹ 日本歯科大学歯学部歯周病学講座

*² 東京慈恵会医科大学解剖学講座第II

(2003年5月30日受付, 2003年6月30日受理)

微生物に対する電解水の殺菌効果は数多く報告され、歯科領域においてもさまざまな分野で応用されている。細胞培養実験において手指や口腔内の常在菌ならびに器具などに付着している細菌によりしばしばコンタミネーションが起き、これが培養細胞の死につながる大きな問題となっている。本研究において、手指の常在菌の一つである *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) に対する微酸性電解水 (MOW) の殺菌効果について多目的溶存酸素測定装置 (ダイキン (株), DOX-10) を用いて検索した。

供試菌株 *S. aureus* を用い、DOX-10 にて 120 分間、MOW の殺菌効果を溶存酸素量の変化を指標として測定した。測定後、*S. aureus* の懸濁液中の菌数の算定のために BHI 寒天培地に *S. aureus* の懸濁液を播種し、コロニー数の測定を行った。

本研究の結果より、MOW は *S. aureus* に対し、ほぼ完全なる殺菌効果が得られることが判明した。細菌菌数と殺菌効力の相関においては、細菌数が少ないほど MOW の殺菌効果は強く、少なくとも 120 分間は持続的な殺菌効果が得られた。

本研究の結果より、あらかじめ手洗いや含嗽、器具洗いなどを行い、細菌数を減少させた後、MOW を用いることにより、さらなる殺菌効果が得られ、より確実な細胞培養実験につながると考えられた。

キーワード: 多目的溶存酸素測定装置, 微酸性水, *Staphylococcus aureus*, 殺菌効果, 溶存酸素量

序 文

近年、機能水についてはさまざまな報告がなされ^{1)~8)}、その特徴として、「人体に対してはほとんど無害であるにもかかわらず、瞬時に微生物に対して優れた殺菌効果を示す」ことが挙げられる。機能水は医療領域での手指の消毒、農業分野、食品の衛生管理などさまざまな分野で用いられ注目を浴びている^{5), 6)}。歯科領域においても治療前の含嗽、義歯の消毒、器具の滅菌・消毒、歯周病の治療などさまざまな分野で応用されている。機能水は生体や環境に優しく、コストも低いことから⁷⁾、今後その有用性はますます広がるものと考えられる。

細胞培養実験において、手指や口腔内に常在する細菌もしくは器具などに付着している細菌により、しばしば培養液のコンタミネーションが起き、これが培養細胞の死につながる大きな問題となっている。この原因菌の一つである *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) は、通性嫌気性菌であり、化膿性疾患やメチリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*: MRSA) 感染症の原因菌としてよく知られている。*S. aureus* は、医療従事

者の手指などからも高頻度で検出されるため、それが MRSA の感染経路となりうることも報告されている⁹⁾。

近年、細菌の酸素消費量を指標として、酸素電極法により薬剤感受性の判定を迅速化する試みがなされている。液体培地中の溶存酸素量の変化を多目的溶存酸素測定装置 (図 1); DOX-10 (ダイキン工業(株)環境研究所; 筑波) を用いて測定し、細菌の代謝活性の変化をその細菌の呼吸量の変化により薬剤感受性の判定をするものである。すなわち、抗生物質や薬剤の効果を酸素消費量の減少率から判定し評価するというものである。DOX-10 は、通産省の新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の援助を受け、東京慈恵会医科大学、ダイキン工業(株)、通産省工業技術院産業技術融合領域研究所 (融合研) が独自に開発したものである^{10)~12)}。構成は、酸素電極および電圧を調整するポテンショスタット、測定値を解析するコンピューターからなる。測定原理は、参照極が液中電位を規定し、作用極で化学反応 ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$) が起きる。これらの反応に相関する電流量から、細菌培養液中の溶存酸素濃度を CV (変動係数); 10%, 酸素濃度 0~10 ppm の範囲で、リアルタイムに測定し薬剤感受性の判定が短時間で可能となる。すなわち、細菌が行う代謝活性の変化をその酸素呼吸量の変化としてとらえ、溶存酸素量の変化から添加薬剤の効果を判定するのに用いられる。

† 連絡先

*¹ 〒102-8153 東京都千代田区富士見 2-3-16

*² 〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8

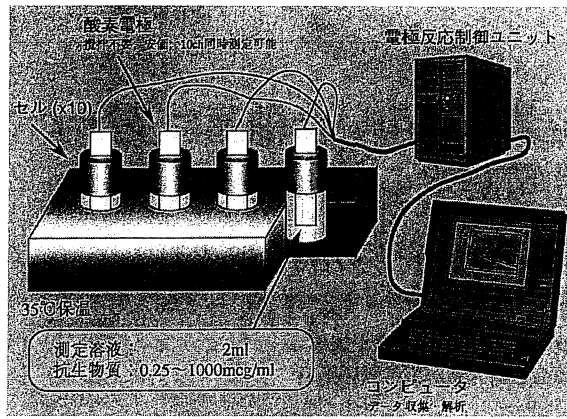


図1 多目的溶存酸素測定装置

そこで本研究は、細胞培養において通常コンタミネーションの原因菌となる、*S. aureus* に対する微酸性電解水(MOW)の殺菌効果について、DOX-10を用いて経時的に検索を行ったので報告する。

材料と方法

1. 微酸性電解水(MOW)の調整

本研究に用いたMOWは、pH調整剤として0.01%コハク酸を含む0.9%NaCl水溶液を原水とし、電気分解により酸性電解水を得た。すなわち、白金コートチタン電極を約500mAで通電し、電極間を3ml/secの流量で前記原水を通水することにより、酸性電解水を得た。得られた酸性電解水はpH 5.0±0.5、有効塩素濃度55±5ppm、ORP 1,200mVであることを確認した。なお実験に用いる際、浸透圧の変化を防ぐためMOWにNaClを0.9%添加して実験に供試した。

2. 供試菌株の調整

標準菌株である*S. aureus* JCM2874(ATCC29213)を用い、0.5% Yeast Extract 添加BHI液体培地に播種後、37℃に保たれた嫌気性チャンバー(80%N₂, 10%H₂, 10%CO₂)において48時間培養を行った。培養後、室温にて3,000rpm, 20分間遠沈を行い、上澄を除去後、0.9%NaClを加えた。*S. aureus*の懸濁液の調整は、McFarland法に準じて、菌液の濃度をPBSにて1×10⁶個/mlに調整した(図2)。

3. 酸素消費量の測定

MOWの殺菌効果の測定は、DOX-10を用いて行った。10本の電極に表1の条件にて0.9%NaCl, MOW, *S. aureus*の懸濁液を加え、各々のセルを総量2mlとし、400mVにて120分間測定を行った(図2, 表1)。

4. *S. aureus*に対する殺菌効果の測定(CFU)

DOX-10にて測定終了後の*S. aureus*の懸濁液をスパイラルマシーン(EDDY JET, IUL INSTRUMENTS)にて10¹~10³まで希釈し、BHI寒天培地に播種後、嫌気性チャンバー(80%N₂, 10%H₂, 10%CO₂)にて72時間インキュ

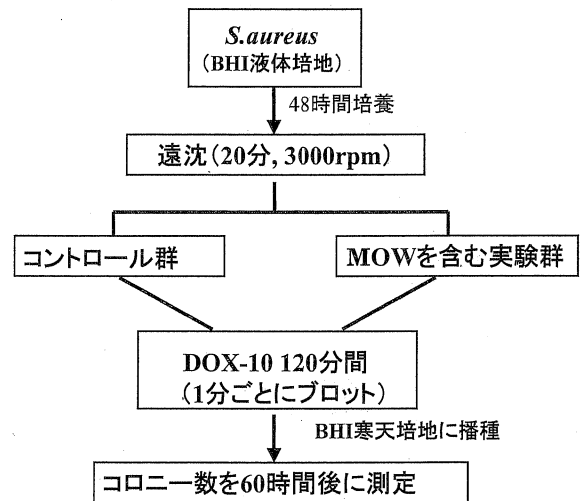
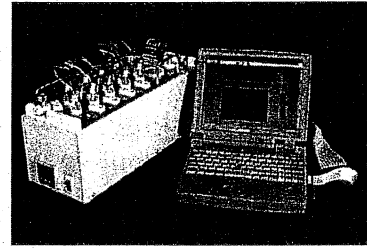


図2 実験の流れ

表1 各電極の条件

電極	MOW および <i>S. aureus</i> の有無	各群の詳細
0	Calibration	0.9%NaClのみ
1	Calibration (MOW)	MOWのみ
2, 3	MOW + <i>S. aureus</i> 100 μ l	MOW (0.9%NaCl)+ <i>S. aureus</i> 100 μ l
4, 5	<i>S. aureus</i> 100 μ l	電極2, 3のコントロール 0.9%NaCl+ <i>S. aureus</i> 100 μ l
6, 7	MOW + <i>S. aureus</i> 10 μ l	MOW (0.9%NaCl)+ <i>S. aureus</i> 10 μ l
8, 9	<i>S. aureus</i> 10 μ l	電極4, 5のコントロール 0.9%NaCl+ <i>S. aureus</i> 10 μ l

すべての群は総量を2mlとする

ベート後、コロニー数を測定した。

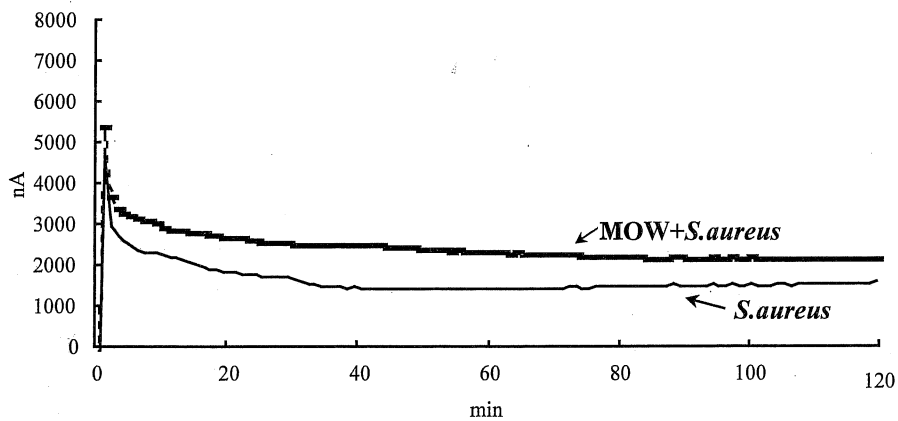


図3 *S. aureus* 100 μ l を含む培地中の溶存酸素量の経時的変化

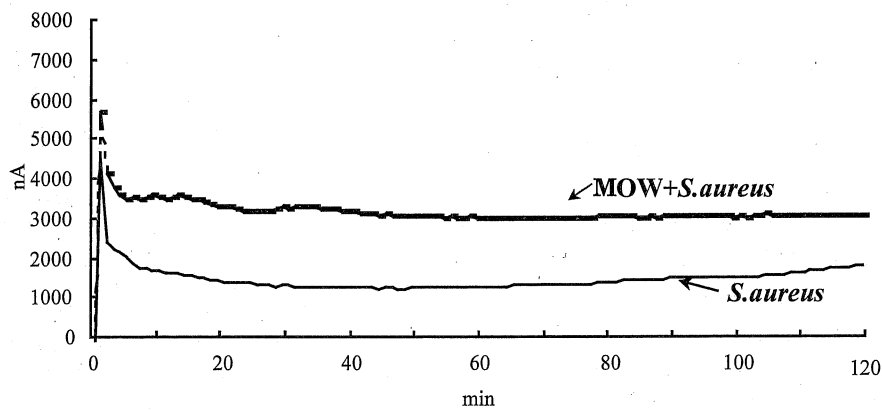


図4 *S. aureus* 10 ml を含む培地中の溶存酸素量の経時的変化

表2 *S. aureus* に対する殺菌効果

MOW および <i>S. aureus</i> の有無	(cfu/ml)
MOW + <i>S. aureus</i> 100 μ l	0
<i>S. aureus</i> 100 μ l	10^8 以上
MOW + <i>S. aureus</i> 10 μ l	0
<i>S. aureus</i> 10 μ l	10^8 以上

(n=5)

結 果

1. *S. aureus* 100 μ l を含む培地中の溶存酸素量の経時的変化

S. aureus 100 μ l を含む (1×10^5 含有) 培地に MOW を加えると、溶存酸素量を示すグラフは経時的に高い値を示した (図3)。すなわち、細菌の呼吸量は抑制されていた。

2. *S. aureus* 10 μ l を含む培地中の溶存酸素量の経時的変化

S. aureus 10 μ l を含む (1×10^4 含有) 培地に MOW を加えると、溶存酸素量の減少は少なかった (図4)。120分

の経過の中で、*S. aureus* 100 μ l を含む培地と *S. aureus* 10 μ l を含む培地を比較した場合、MOW の効果は *S. aureus* 10 μ l の方が高かった。

3. *S. aureus* に対する殺菌効果の測定 (CFU)

DOX-10 にて測定終了後、コントロール群においては、 10^8 CFU/ml 以上のコロニーが認められた。一方、MOW の添加群の *S. aureus* 100 μ l を含む培地、*S. aureus* 10 μ l を含む培地での殺菌効果は 0 CFU/ml であった (表2)。

考 察

S. aureus は、黄色ブドウ球菌属の中で最も病原性が強いが、易熱性であり、よって通常の煮沸消毒では1分以内に死滅することが知られている¹³⁾。本研究の結果より MOW の *S. aureus* に対する殺菌効果が認められたことから手指の消毒はもちろん、煮沸消毒が不可能である器具などにおいても、MOW は大変有用であることが示唆された。しかしながら、MOW は pH が低いために金属の酸化を促進する危険性がある^{3),4)}。そのため、実験器具などの金属製品に用いる場合には、使用后、十分に水洗する必要がある。

MRSA は、1961年欧州にて初めて報告されたが¹⁴⁾、抗生物質の普及とともに急速に増加し、いまなお院内感染の原因として大きな問題となっている。MRSA は、ペニシリン誘導体メチシリン (DMPPC) に耐性を示すブドウ球菌に

よる感染症であり、宿主の感染防御機能の低下時に発症するが、現在、MRSAに十分な抗菌力を有する薬剤は極めて少ない。院内の環境整備においては、強酸性水を用いて行った結果、院内各所の細菌汚染が改善されたという報告もある⁹⁾。MRSAの検出は、患者のみならず、医師、看護師をはじめとする医療従事者からも高く検出され、特に手指、鼻腔、咽頭、喀痰からは高く検出されるとの報告がある^{9), 15), 16)}。MRSA感染患者を看護した際、約50%の人の手指からMRSAが検出されたという報告もある¹⁷⁾。本研究の結果から*S. aureus*に対するMOWの殺菌効果はほぼ完全であり、MRSA感染予防対策においても手洗い、含嗽にMOWを用いることは有用であることが示唆される。しかしながら、実際に院内感染防止に強酸性水を用いた研究によると手指消毒においては強酸性水の使用のみではなく、速乾性擦り込み式手指消毒剤(ウエルパス)を含めた衛生的手洗いの施行を重要とするという報告もある⁹⁾。

本研究において、溶存酸素測定装置を用いてMOWの*S. aureus*に対する殺菌効果について経時的に評価を行った結果、投与直後よりMOWの殺菌効果が認められた。少なくともその効果は120分間持続した。さらにMOWの殺菌効果は、細菌数の少ない*S. aureus* 10 μ lを含む培地においてより有効であった。よってあらかじめ手洗いや含嗽、器具洗いなどを行い、細菌数を減少させた後、MOWを用いることにより、さらに殺菌効果が得られると思われる。また、器具などの滅菌に用いる際は、瞬時よりも長時間の浸水の方がより効果的であると考えられた。

本研究で用いたDOX-10は、薬剤の細菌に対する効果を迅速に判定することが可能であり、酸素呼吸を指標として細胞に対する化学物質の毒性評価にも使用されている^{12), 18)}。DOX-10による測定後のCFUの測定結果より、MOWを添加した群においてほとんどコロニーは認められなかったことから、*S. aureus*の酸素消費量の低下は、代謝活性の低下や呼吸量の減少などによるものではなく、MOWによる*S. aureus*殺菌効果であったと考えられる。また、DOX-10にてMOWの効果を判定する際、MOWに含まれる塩素が電極へ影響を及ぼし測定値を乱すことも考えられたが、MOWまたは0.9%NaClのみの溶存酸素量はほぼ同じ値を示し、電極に及ぼす影響はなかった。このことから、今後もMOWの殺菌効果をDOX-10にて評価することは可能であると思われる。現在、*S. aureus*に対する殺菌法として、エチレンオキサイドガス、コバルト60からの γ 線、70%エチルアルコール、フェノール2~5%水溶液、クレゾール石鹼液1~3%などが使用されている。本研究では*S. aureus*に対するMOWのみの殺菌効果を判定したが、実際の手指には*S. aureus*以外にもさまざまな細菌が付着していると考えられる。今後は、*S. aureus*に加え、さまざまな菌の混合感染を想定し、それに対するMOWの殺菌効果、さらには他の薬剤を併用した際の相乗効果あるいは相殺効果を測定することも可能であると考えられ、今後検討していきたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座・町田勝彦教授、国立保健医療科学院口腔保健部・今井 奨先生に深謝いたします。ならびに、ご協力いただいた日本歯科大学歯学部歯周病学講座、東京慈恵会医科大学解剖学講座第IIの医局員各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 鴨井久一, 沼部幸博, 小延裕之, 他: 強酸性水の臨床応用の可能性—歯周領域への応用. *J. Dent. Eng.* 115: 23-25, 1995.
- 2) 河野立士, 小川智久, 鴨井久一, 他: 電解水を用いた手指の消毒. *機能水医療研究*, 1(1): 33-36, 1999.
- 3) 伊藤芳秋, 吉田隆一, 長谷川 緑: 電解酸性水に浸水したときの市販歯科用合金と液の変化. *歯学*, 84(1): 30-44, 1996.
- 4) 吉田隆一: 「歯科用機械・器具の消毒を目的として酸性水を作用させたときの変色や耐蝕性について」. *日歯医誌*: 1-19, 1997.
- 5) 鈴木鐵也: 食品分野における電解水利用の実際と安全性. *月刊フードケミカル*, 5: 35-42, 1998.
- 6) 櫻井幸弘: 強酸性水による簡便な内視鏡の洗浄・消毒. *消内視鏡*, 12: 541-547, 2000.
- 7) 大久保 憲, 新 太喜治, 小林寛伊, 他: 電解酸性水に関する調査報告. *手術医学*, 15(4): 508-520, 1994.
- 8) 佐々木理恵, 川崎純子, 切替照雄, 他: 強酸性水を用いた院内環境整備とMRSA院内感染防止対策. *医療*, 56(6): 363-370, 2002.
- 9) 大森明美, 高橋 淳, 渡辺貴和雄, 他: 市中救急病院における入院患者, 職員, 環境分離菌からのMRSAの検出状況とそれらの関連性について. *感染症*, 66(10): 1396-1403, 1992.
- 10) 新井潤一郎, 山田恭輔, 石川 博, 他: 汎用溶存酸素測定装置による抗ガン剤薬剤感受性試験方法. *HUMAN CELL*, 11: 175-177, 1998.
- 11) 手塚健二, 稲田全規, 鴨井久一, 他: 溶存酸素測定装置を用いた歯周病原性細菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* に対する抗生物質の迅速感受性試験の検討. *日歯周誌*, 41(2): 201-209, 1999.
- 12) 新井潤一郎, 石川 博, 河野 緑, 他: 酸素電極を用いた新しい細胞毒性試験の検討. *日本香粧品学会誌*, Suppl., 65, 1997.
- 13) 竹田美文, 林 英生: *細菌学*, pp.160-168, 朝倉書店, 東京, 2002.
- 14) Crossley K, Loesch D, Strate R, et al.: An Outbreak of Infections Caused by Strains of *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin and Aminoglycosides. I. Clinical Studies. *J. Infect. Dis.*, 139: 273-279, 1979.
- 15) 大森明美, 高橋 淳, 渡辺貴和雄, 他: 市中救急病院における入院患者, 職員, 環境分離菌からのMRSAの検出状況とそれらの関連性について. *感染症*, 66(10): 1396-1403, 1992.
- 16) 中浜 力, 黒川幸徳, 副島林造, 他: MRSA院内流行と呼吸器感染. *最新医学*, 44: 2522-2527, 1989.
- 17) 中野寿夫, 吉岡守正, 鈴木敦子, 他: 看護婦の手指から分離されたメシチリン耐性黄色ブドウ球菌の性状と薬剤感受性. *東京女子医科大学看護短期大学研究紀要*, 14: 1-7, 1992.
- 18) 新井潤一郎, 河野 緑, 保科定頼, 他: 酸素電極を用いた新しい癌薬剤感受性試験法の検討. *HUMAN CELL*, 10(2): 75-76, 1997.

Effects of Micro Oxidizing Electrolyzed Water on Bacteria Monitored Using a General-purpose Dissolved Oxygen Measuring System with Electrode Sensor

Shoko MOTOYAMA*¹, Takako ARAI*¹, Tomohisa OGAWA*¹, Etsuko SATO*¹,
Hiroshi ISHIKAWA*², and Kyuichi KAMOI*¹

*¹ *Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University,
2-3-16 Fujimi, Ciyoda-ku, Tokyo 103-8153, Japan*

*² *Department of Anatomy (II), The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi,
Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan*

The antibacterial effects of electrolytic water on microorganisms have been reported in many studies, and in dentistry, use of electrolytic water also has many applications. Culture studies have shown that normal bacteria flora on the fingers, in the mouth, or on the surfaces of equipment can occasionally contaminate and even kill cell cultures. In the present research, the antibacterial effects of micro oxidizing electrolyzed water (MOW) on *Staphylococcus aureus*, one of the common bacteria found on the fingers, were investigated by monitoring the level of dissolved oxygen for 120 minutes using a general-purpose dissolved oxygen measuring system with electrode sensor (DOX-10). Following the DOX-10 assay, *S. aureus* was plated on BHI agar to assess the viability of the colonies.

The results of the present study showed that MOW exhibited a potent antibacterial effect on *S. aureus*. Also, the results of bacterial culture tests following the DOX-10 assay confirmed almost complete antibacterial action. In MOW disinfection, treatments with lower initial bacteria counts were more effectively disinfected and the antibacterial effects were maintained for at least 120 minutes.

The results of the present study suggest that culture studies can be conducted with better results if the technicians practice hand washing and gargling and if equipment is washed and then subjected to MOW treatment to kill residual bacteria.