

内視鏡を介しての感染リスクの高い細菌・ウイルスに対する電解水の効果： *in vitro* 汚染除去試験

土井教生¹、広中伸治²、駒形安子³、野島康弘⁴、小宮山寛機⁴

¹公益財団法人結核予防会結核研究所、²興研株式会社、³北里大学生命科学研究所、

⁴財団法人北里環境科学センター

2012.2.13 受付、2012.3.15 受理

キーワード： 消化器内視鏡、抗酸菌、*Helicobacter pylori*、C型肝炎ウイルス、殺菌効果

1. はじめに

強酸性電解水を洗浄消毒に使用する内視鏡洗浄消毒装置がこれまでに3種薬事認可されている。強酸性電解水は高水準消毒薬に準ずる有効性をもつとされており¹⁾、擬似実使用条件において多様な細菌、真菌、ウイルスに対する消毒効果²⁾やB型肝炎ウイルス不活化活性³⁾などが報告されている。その一方で、有機物存在下における殺菌力の低下という弱点が指摘されている⁴⁾。そのため、強酸性電解水による洗浄消毒効果を発揮させるためには、まず内視鏡に付着している有機物をブラッシング洗浄により十分除去しなければならない。こうしたことを踏まえて、上記の医療機器内視鏡洗浄装置の一つは自動ブラッシング機構を備えており、さらにブラッシングの際に有機物除去をより確実にするために、優れた有機物溶解作用を示す強アルカリ性電解水と組合せて洗浄する方式を採っている。

本研究では、この方式の有効性を検証するために、臨床使用内視鏡を介しての感染事故³⁾のリスクが高いと言われている抗酸菌、*Helicobacter pylori*、C型肝炎代替ウイルスで人為的に汚染したセラミックキャリアや消化管内視鏡を、強アルカリ性電解水と強酸性電解水を組合せて洗浄した場合の効果について試験したので報告する。

2. 実験材料と方法

1) 細菌およびウイルス

①抗酸菌： ヒト型結核菌として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株 (ATCC27294)、遅育成非結核性抗酸菌として *M. avium* ATCC25291, *M. intracellulare*

ATCC13950, *M. kansasii* ATCC12478、迅速発育性の非結核性抗酸菌として *M. fortuitum* ATCC6481, *M. chelonae* ATCC35752, *M. abscessus* ATCC19977 を用いた。炭素源として0.5%グリセロール、ウシアルブミン fraction V を含むADC-enrichment (BBL) を10%の割合に加えた7H9液体培地 (BBL) で同調培養を3~4回繰り返し、対数増殖期 (OD₅₆₀ 0.08~0.09) に達した菌液を-80°Cで凍結保存した。これを用時溶解し、約10⁸cfu/ml濃度の菌懸濁液に調整して実験に供した。菌の取扱はすべてP3実験施設で実施した。

②*Helicobacter pylori* ATCC43504： 本菌株を接種したCDC嫌気用ヒツジ血液培地を微好気アネロパック (三菱ガス化学株) に入れ、それを嫌気培養用ジャー内にて37°C、6日間培養した。培養後、菌を掻き取りブレンハートインフュージョン (BHI) 培地に懸濁し、約1.0×10⁷cfu/mlに調整したものを供試菌液とした。

③Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV ; C型肝炎代替ウイルス)： ウシ腎臓由来細胞株 (Madin-Darby Bovine Kidney; MDBK) を10%FBS含有Eagle's minimal essential medium (EMEM) で培養した。これを感染前日にT75フラスコ1枚あたり5×10⁶cells播種し、37°C、5%CO₂の条件で一晩培養した。このMDBK細胞にMOI=1でウイルスを接種し、37°C、60分間インキュベートした。次いで、フラスコに0.2%FBS含有EMEMを12ml加え、37°C、5%CO₂の条件で3日間培養し、ウイルスを増殖させた。細胞培養液を3,000rpm、15分、4°Cで遠心分離し、上清を回収してウイルス溶液とした。

2) 電解水

全自動内視鏡洗浄消毒装置（興研機製「鏡内侍」：承認番号 21800BZZ10014000）から生成した強酸性電解水（pH2.5, 有効塩素濃度 30ppm； SAD）と強アルカリ性電解水（pH11.0； AKD）を使用した。なお、強アルカリ性電解水は、水素を含み、おおよそ 0.001N（0.004%＝40ppm）水酸化ナトリウム（NaOH）水溶液と同等性があり、一定の油脂乳化力、タンパク質除去力を有している。

3) *in vitro* 汚染除去試験

①抗酸菌：滅菌済の円筒形セラミックキャリア（Fischer社製 penicylinders-porcelain； 直径 8mm、長さ 10mm）を抗酸菌液（約 10^8 cfu/ml）中に 15 分間浸漬後、40 分間風乾したものを抗酸菌汚染セラミックキャリア（ 10^4 ～ 10^6 cfu/キャリア）とし、以下のように除菌試験を行った。試験液として、強酸性電解水（SAD）、強アルカリ性電解水（AKD）、または蒸留水を 10ml 入れたキャップ付きプラスチック試験管中に抗酸菌汚染キャリアを所定時間浸漬した。試験液は単独または組合せて使用した。浸漬は、試験管を静置または回転（30rpm）させながら行った。浸漬操作終了後、汚染キャリアを 2ml 蒸留水中に移し、20 秒間 Vortex 攪拌→20 秒間超音波処理→20 秒間 Vortex 攪拌してキャリア付着菌体を洗い出し、生菌数を計測した。なお、SAD 浸漬した場合、汚染キャリアを 0.1%チオ硫酸ナトリウム液に入れて SAD 活性を停止させてから 2ml 蒸留水中へ入れた。

②*Helicobacter pylori* および BVDV：消化管内視鏡（オリンパス GIF-XP260N）の外表面およびチャンネル内腔に一定濃度の *H. pylori* または BVDV を付着させた。これらの汚染消化管内視鏡を全自動内視鏡洗浄消毒装置にセットして洗浄消毒（工程実施時間 5 分間）を実施したのち、付着菌体を培地により回収し生菌数を計測した。

3. 結果と考察

1) *M. tuberculosis* 汚染セラミックキャリアに対する除菌効果

M. tuberculosis の浮遊菌液を用いた試験を最初に行った。その結果、 2.4×10^5 cfu/ml および 2.4×10^6 cfu/ml の菌液 0.2ml を SAD 1.8ml に混和静置したとき、菌液はそれぞれ 30 秒および 5 分で生育が認められなくなった。 10^6 オーダーの菌液に対する活性は、従来の報告⁵⁾と同レベルであった。

続いて、*M. tuberculosis* で汚染したセラミックキャリアを用いての除菌試験を行った（図 1）。静置浸漬条件では抵抗性が高くなり、汚染した菌（ 1.3×10^5 ）の生残がなくなくなるのに SAD 単独浸漬処理で 5 分を要した。同じ 5 分浸漬条件で、蒸留水（DW）では 5.6×10^3 の生残が認められた。一方、組合せ静置浸漬の場合、AKD で 30 秒処理後 SAD 処理すると 30 秒で 2.7×10^4 生残したが 1 分で検出されなくなった。AKD 30 秒処理後 DW 処理すると 30 秒で 3.9×10^4 、1 分でも 3.0×10^4 の生残が認められた。この生

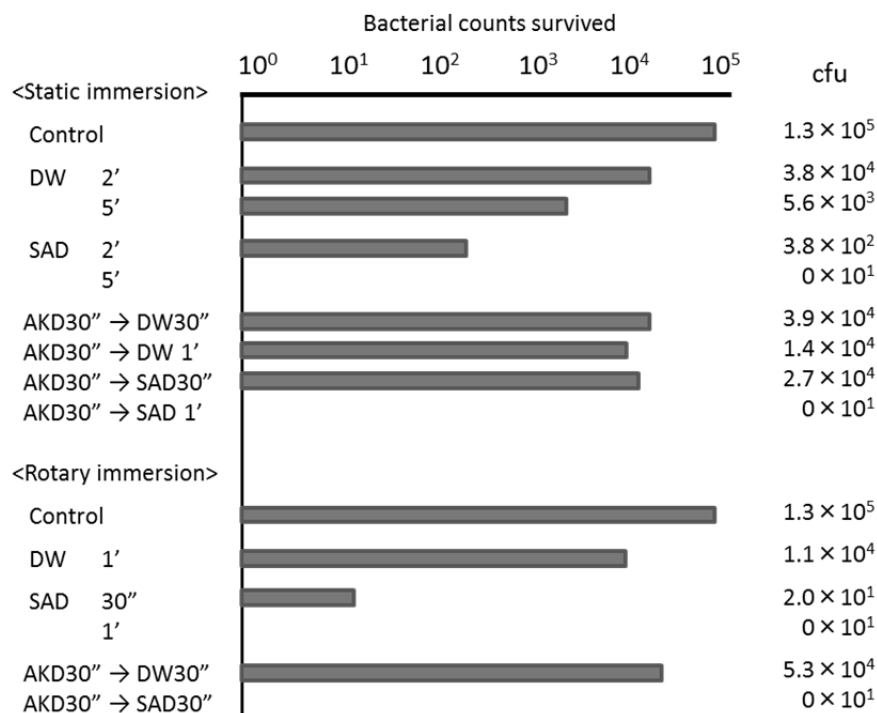


Fig.1. Elimination of *M. tuberculosis* attached to the ceramic cylinder surface by washing with acidic electrolyzed water (SAD) following alkaline electrolyzed water (AKD).

Table 1. Eliminating effect of strongly acidic electrolyzed water (SAD) on acid-fast bacteria attached to the ceramic carrier surface.

Strains tested		Bacteria attached (cfu)	Treatment*			
			AKD30''→SAD		SAD30''→DW	AKD30''→DW
			30''	1'	1'	1'
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC27294	1.3×10 ⁵	nd	nd	2.0×10 ¹	1.4×10 ⁴
<i>M. avium</i>	ATCC25291	1.2×10 ⁵	nd	nd	2.0×10 ¹	3.5×10 ⁴
<i>M. intracellulare</i>	ATCC13950	2.5×10 ⁶	9.2×10 ²	2.0×10 ²	1.2×10 ⁴	5.2×10 ⁵
<i>M. kansasii</i>	ATCC12478	1.6×10 ⁵	1.5×10 ¹	nd	3.0×10 ¹	3.2×10 ³
<i>M. fortuitum</i>	ATCC6481	1.3×10 ⁴	nd	nd	nd	2.2×10 ²
<i>M. chelonae</i>	ATCC35752	1.3×10 ⁴	nd	nd	nd	5.8×10 ¹
<i>M. abscessus</i>	ATCC19977	1.0×10 ⁵	nd	nd	3.5×10 ¹	3.6×10 ³

*The acid-fast bacteria attached ceramic carriers were subjected to the following treatment.

AKD30''→SAD: exposure to SAD for 30sec. and 1min. after exposing to AKD for 30sec.

SAD30''→DW and AKD30''→DW: exposure to DW (deionized water) for 1 min. after exposing to SAD for 30sec.

AKD for 30sec, respectively.

nd: not detected.

残は、DW 単独で同じ時間処理したときの生残と同レベルで、AKD 単独では殺菌効果がほとんどないと判断された。

回転混和条件下では、除菌効果が高くなり、生残数は SAD 単独浸漬 30 秒で 10¹ となり、1 分後には検出されなくなった。さらに、組合せ回転混和条件では、AKD30 秒浸漬後に SAD に 30 秒浸漬したところ生残は検出されなくなった。

抗酸菌の中では、結核菌の *M. tuberculosis* は消毒薬に比較的抵抗性が低いと言われているのに対して、*M. avium*、*M. kansasii*、*M. intracellulare* などの非結核性（非定型）抗酸菌は抵抗性が高いと言われている。そこで、これらの菌を対象に回転混和条件下で汚染キャリアを用いて AKD30 秒次いで SAD30 秒または 1 分の浸漬処理を行った。その結果（表 1）、いずれの菌株でも 4 log 以上の減少が認められたが、*M. intracellulare* は比較的抵抗性が高く、1 分後も若干の生残が認められた。一方、SAD 浸漬（SAD30 秒→DW）では、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. avium* および *M. abscessus* の生残が認められ、中でも *M. intracellulare* の抵抗性が高かった。*M. tuberculosis*、*M. fortuitum*、*M. chelonae* は SAD 浸漬（SAD30 秒→DW30 秒）で生残しなくなり、これらは SAD に対して抵抗性が比較的低いことが明らかとなった。AKD は単独では微弱な除菌力しか発揮しない。しかしながら、AKD は抗酸菌の SAD 抵抗性を弱める潜在的な作用をもっていると判断できる。これら

のことから、全自動内視鏡洗浄消毒装置で採用されている方式、すなわち、AKD で処理後 SAD を作用させる方式は、消毒薬抵抗性がより高いといわれる非定型抗酸菌の洗浄消毒に対しても効果的と判断された。

AKD は、化学的にみて希薄な NaOH 溶液とみなせることから、油脂を乳化したり蛋白質を分解したりすることが予想される。そこで、JIS K 3362 の合成洗剤試験方法に準じて強アルカリ性電解水の油脂（マヨネーズ）、豚レバーの除去能について水道水および酵素入り洗剤と比較試験した。その結果、水道水より明瞭に高く、酵素入り洗剤に勝るとも劣らない効果を示すことが確認された（表 2）。AKD のこうした性状によって抗酸菌の細胞壁に含まれる脂質（ミコール酸など）が反応して除去される結果、SAD に対する抗酸菌の抵抗性が低下することが考えられる。

一方、*H. pylori* と BVDV に対する効果は、消化管内視鏡を汚染させて実験した（表 3）。

SAD の *H. pylori* に対する殺菌効果を 2.0×10⁶ /ml の菌液を用いて確認した後、消化管内視鏡を約 10⁶cfu の *H. pylori* で汚染し、全自動内視鏡洗浄消毒装置にて洗浄消

Table 2. Organic material removing effect of alkaline electrolyzed water (AKD)

Treatment with	JIS debris	Mayonnaise	Swine lever
Tap water	8.2 %	54.3 %	22.2 %
Detergent with enzyme	12.3 %	54.9 %	40.8 %
AKD* pH10.0	11.5 %	70.9 %	33.9 %
pH11.8	15.5 %	94.2 %	62.3 %

*AKD with different pH was prepared under different electrolysis conditions.

Table 3. Eliminating effect of the automatic endoscope washing- and disinfecting- procedure on *H. pylori* and BVDV contaminated *in vitro*.

	<i>H. pylori</i>		BVDV	
	before(cfu)	after(cfu)	before(cfu)	after(cfu)
Outer surface	1.34×10 ⁴	nd	2.5×10 ³	nd
Channel A	7.36×10 ⁶	nd	9.5×10 ³	nd
Channel B	3.28×10 ⁶	nd	1.2×10 ⁴	nd

cfu: bacterial counts before and after performing the washing-and disinfecting- procedure.

毒を実施した。洗浄消毒終了後、内視鏡外表面、チャンネル内腔からの菌の検出は認められなかった(表3)。辻らは*H. pylori*感染者の検査に使用した内視鏡から約70%の頻度で*H. pylori ureA*遺伝子が検出されたが、強酸性電解水による消毒が有効であったと報告している⁶⁾。また、品川らも、本研究で用いたものと同型の全自動内視鏡洗浄機を用いた研究で、*H. pylori*に対する消毒効果を報告している⁷⁾。これらのことや*H. pylori*がSADに弱いことを踏まえると、本汚染除去実験において*H. pylori*が効果的に除去された結果は、当然のことといえるであろう。ただ、中尾ら⁸⁾は、*H. pylori*のcoccoid formが強酸性電解水に抵抗性がある可能性を指摘していることに留意する必要があるかと思われる。

BVDVに関しては、予備試験において1.6×10⁵ pfu/mlに対するSADの不活化効果を確認後、内視鏡を3.8×10⁵ pfu/mlのBVDVで汚染させ、洗浄消毒効果を試験した。その結果、内視鏡(n=3)の外表面(2.5×10³ pfu)、チャンネルA(9.5×10³ pfu)、チャンネルB(1.2×10⁴ pfu)を汚染したBVDVは、全自動内視鏡洗浄消毒装置にて洗浄することによっていずれもBVDVは検出されなくなった。

櫻井らは、HBV陽性e抗原陽性献血者血液により汚染させた消化器内視鏡に対しSADによる消毒試験を行ったところ、PCR法でHBV遺伝子が陰性となったことを報告している⁹⁾。また、1997年から1999年にかけて、HBVおよびHCVの抗原陽性患者の検査に使用した内視鏡の消毒に強酸性電解水を用いた結果、洗浄消毒後には全ての内視鏡で陰性を確認したと報告している¹⁰⁾。

以上を総合すると、臨床使用内視鏡を介しての感染リスクが高いとされている細菌・ウイルスを含めて多様な微生物汚染を受ける内視鏡の洗浄消毒において、強アルカリ性電解水(AKD)を組合せた自動ブラッシングに続く強酸性電解水(SAD)による洗浄消毒方式は実使用においても有効性が高いと期待される。また、使用電解水の安全性が高いので、内視鏡洗浄消毒作業に伴う健康被害問題も大きく改善されると思われる。

<謝辞>

本論文を草するに当たり、種々アドバイスをいただいた堀田国元博士(機能水研究振興財団)に感謝いたします。

<参考文献>

- 1) 消化器内視鏡の洗浄・消毒マルチソサエティガイドライン作成委員会: 消化器内視鏡の洗浄・消毒マルチソサエティガイドライン(第1版). 2008.
- 2) 岩沢篤郎、古田美香、庭野吉己ほか: 内視鏡洗浄用消毒装置CM-5の洗浄消毒効果. *機能水研究*, **6**, 15-25, 2011.
- 3) 櫻井幸弘: 医療機器を介する感染症の予防に関する研究 厚生科学研究費補助金(厚生科学研究事業). 厚生科学特別研究事業総括研究報告書. 1999.
- 4) 大久保憲、新太喜治、小林寛伊ほか: 電解酸性水に関する調査報告. *手術医学*, **15**, 508-519, 1994.
- 5) 田澤庸子、橋本裕美、古畑由紀江ほか: 強酸性電解水の抗酸菌に対する殺菌効果の基礎的検討. *機能水研究*, **1**(1), 54, 2002.
- 6) Tsuji S, Kawano S, Oshita M; Endoscope disinfection using acidic electrolytic water. *Endoscopy*, **31**(7): 528-535, 1999.
- 7) 品川慶、徳毛宏則、光井富貴子ほか: 全自動内視鏡洗浄機を用いた上部消化管内視鏡の洗浄消毒効果. *広島医学*, **57**(11), 876-879, 2004.
- 8) 中尾美幸、横田憲治、高井研一ほか: *Helicobacter pylori*に対する電解機能水の殺菌効果. *感染症学雑誌*, **74**(2), 120-127, 2003.
- 9) Sakurai Y, Ogoshi K, Okubo T. *et al.*: Strongly acidic electrolyzed water: Valuable disinfectant of endoscopes. *Digestive Endoscopy* **14**, 61-66, 2002.
- 10) Sakurai Y, Nakatsu M, Sato Y *et al.*: Endoscope contamination from HBV- and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/ disinfecting method using strongly acid electrolyzed water. *Digestive Endoscopy*, **15**, 19-24, 2003.

Eliminating effect of electrolyzed water-washing on the ceramic cylinder and endoscope contaminated *in vitro* with mycobacteria, *Helicobacter pylori* and bovine viral diarrhea virus as an alternative of hepatitis C virus.

**Norio DOI¹, Nobuharu HIRONAKA², Yasuko KOMAGATA³, Yasuhiro NOJIMA⁴,
Kanki KOMIYAMA⁴ and Kunimoto HOTTA⁵**

¹Research Department, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

²Koken Ltd. ³Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University. ⁴Kitasato Research Center of Environmental Science,

⁵Functional Water Foundation

Abstract

We investigated the acidic and alkaline electrolyzed waters generated in an approved automatic endoscope-washing and -disinfecting apparatus for their eliminating effect on the ceramic cylinder and endoscope which were contaminated with *in vitro* with mycobacteria, *Helicobacter pylori* and bovine viral diarrhea virus as an alternative of hepatitis C virus. It turned out that washing with the acidic electrolyzed water (pH2.5; 30ppm available chlorine) following the alkaline electrolyzed water (pH11.0) was effective for the elimination of the contaminated bacterial species and virus. The results suggested the approved endoscope-washing and -disinfecting apparatus should work well in its clinical use.