

電気刺激に基づいた病原性微生物の消毒効果に関する基礎的検討

北里大学医療衛生学部 正会員 ○古川 隼士
 大分工業高等専門学校 非会員 上野 崇寿
 北里大学医療衛生学部 正会員 清 和成

1. はじめに

我が国では、上下水道、浄化槽、および各種廃水処理の整備、ならびに法令等の設置によって、水環境へ及ぼす水系感染性微生物による汚染は劇的に軽減・改善されているといえる。しかしながら、各処理施設において病原性微生物を完全に除去・不活性化することは困難とされており、依然として水系感染症を引き起こす微生物が水環境から検出されている。さらに、近年では薬剤耐性菌 (antibiotic-resistant bacteria : ARB) の水環境における検出・感染事例が報告され、世界的に関心が高まっている。ARB は通常、生活排水や畜産等の産業排水に含まれる可能性があり、各種水処理施設を介して水環境に流入する。したがって、下水処理場は ARB 蓄積の場となり、水環境への主要な ARB の排出源となることが指摘されている。また、下水処理場には、豊富な栄養塩類、多種多様な微生物叢が存在するのに加え、排泄された未代謝の抗生物質も流入することから、ARB の発生だけでなく、微生物間による耐性遺伝子の水平伝播のホットスポットであるといわれている¹⁾。すなわち、薬剤耐性を獲得した新たな病原性微生物の出現と水環境への拡散が危惧される。

一方で、我が国の下水処理場における消毒のほとんどは塩素消毒であるが、著者らは塩素を用いたバッチ式の消毒実験において、ARB は不活化されても、細胞内の耐性遺伝子には消毒効果がなく処理水から検出されることを明らかにしている²⁾。そこで著者らは、ARB だけでなく細胞内の耐性遺伝子の不活化も可能とする消毒技術として、インパルス電圧印加法に着目した。本研究では、インパルス電圧印加法を下水処理場における消毒法として応用するために、本手法による ARB の不活化効果を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法と材料

2. 1 細菌懸濁液の調整

インパルス電圧印加法による消毒実験には、ARB のモデル微生物としてバンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci : VRE, ATCC51559, *vanA* 遺伝子保有株) を用いた。本菌株を Todd Hewitt 培地 (Difco) に植菌し、 37 ± 1.0 °C で 12~14 時間の振とう培養 (120 rpm) を行った。5.0 mL の細菌培養液を遠心分離 (20,000×g, 3分) して、上澄みを除去後、10 mL の滅菌済 Milli-Q 水を添加してボルテックスにて細菌ペレットを洗浄した。この洗浄作業を 2 回行った後、滅菌済 Milli-Q 水に再懸濁した。この試料の吸光度 (OD_{600}) を測定し、約 10^5 CFU/mL となるように調製したものを細菌懸濁液とした。調製済みの細菌懸濁液は、初期水温の変化を抑えるために、消毒処理実験に用いるまで 25 ± 1.0 °C に設定したインキュベータ内で保存した。

2. 2 インパルス電圧印加による消毒実験

インパルス電圧発生装置は磁気パルス圧縮電源 (定格 16 kV) を用いた。消毒実験に用いたリアクタを図 1 に示す。陽極および陰極はステンレス鋼を用い、ポリ塩化ビニル樹脂に固定して同軸円筒状の消毒実験用リアクタを作製した。本リアクタに 22 mL の細菌懸濁液を添加し、インパルス電圧発生装置に接続した。消毒実験は、パルス幅 (半値全幅) を 6.9 μ s とし、初期電圧値 (0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 kV)、周波数 (100 Hz, 400 Hz) および処理時間 (0~15 分) を変化させて実施した。印加後、直ちに細菌懸濁液の水温をデジタル温度計 (AS ONE, WT-300) を用いて測定した。

2. 3 細菌計数方法および削減率の算出

消毒処理前後における細菌懸濁液の腸球菌数は、平板塗抹法に従いクロモカルト腸球菌寒天培地 (Merck) を用いて測定した。細菌濃度が高いと予測される試料は、滅菌済リン酸緩衝生理食塩水で適切な濃度になるように希釈した試料を調製した。試料を塗布した培地は 37 ± 1.0 °C で培養した後、培地上のコロニー数を計数した。

腸球菌の削減率は、処理前後の腸球菌濃度から対数削減率 (log reduction value : LRV) を算出して評価した。

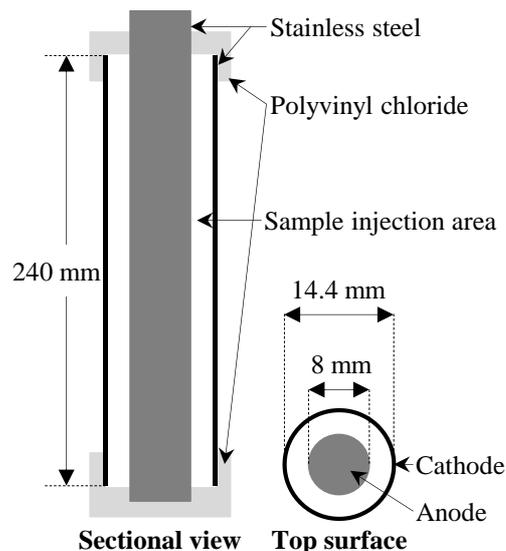


図 1 消毒実験用リアクタ

キーワード インパルス電圧印加, 消毒, 下水, 薬剤耐性菌, バンコマイシン耐性腸球菌

連絡先 〒252-0203 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1 TEL 042-778-8074 E-mail tfuruka@kitasato-u.ac.jp

3. 結果と考察

3. 1 各電圧値における VRE の LRV (100 Hz)

図 2 に電圧値を変化させた時の細菌懸濁液の水温の変化を示す。なお、消毒実験前の細菌懸濁液の水温は、23.7 ~ 24.3 °C であった。4.0 kV では電圧印加による水温上昇はほとんどなかったが、6.0, 8.0, および 10.0 kV では電圧および処理時間の増加にともなって、水温も上昇した。細菌懸濁液の水温の最大値は、電圧値 10.0 kV, 処理時間 15 分のときに 55.4 °C であった。このときの VRE の削減率を図 3 に示す。電圧値 4.0 および 6.0 kV における VRE の削減率は、処理時間が増加してもほとんど変化せず、LRV は処理時間 15 分後も 1.0 以下であった。電圧値 8.0 kV では処理時間 10 分以降で LRV の値が上昇し、15 分の LRV は 2.82 を示した。電圧値 10.0 kV においても処理時間とともに LRV が上昇し、周波数を 100 Hz にした場合の最大 LRV は、電圧値 10.0 kV, 処理時間 15 分において、4.20 であった。

3. 2 電圧 10 kV, 400Hz における VRE の LRV

周波数を 100 Hz にした場合のインパルス電圧印加法による消毒実験において電圧値 10.0 kV のときに最大 LRV を示したことから、電圧値を 10.0 kV に固定し、周波数を 400 Hz に変更して同様に消毒実験を実施した (図 4)。100 Hz における処理実験とは異なり、極めて短時間で水温が上昇した (最大水温 57.9 °C)。LRV は処理時間の増加とともに大きくなり、3 分で 4.37 を示した。さらに、処理時間 4 分では、VRE は検出下限値 (1 CFU/mL) 以下まで削減された。以上のことから、インパルス電圧印加法は電圧値および周波数を大きくすることで VRE の消毒効果を高めることができ、消毒処理時間の短縮を図ることができる可能性が示唆された。

インパルス電圧印加法による細菌の殺菌機序は、電圧印加によって細胞膜に電位差が生じ、細胞膜上の誘導電荷が互いに引き合うことで、細胞膜を不可逆的に破壊し、細胞が壊死すると考えられている³⁾。本法は主に液状食品の非加熱殺菌技術として提案されており、これまでの研究において全乳に懸濁させた大腸菌や緑膿菌等の殺菌効果が示されている⁴⁾。本研究で用いたグラム陽性細菌の VRE もこれらのグラム陰性細菌と同様にインパルス電圧印加法によって効果的に削減できることがわかった。今後は、さらに詳細に電氣的パラメータを変動させ、最適な消毒処理条件を見出すとともに、耐性遺伝子の不活化効果についても明らかにする。

4. まとめ

本研究は、インパルス電圧印加法を下水処理場の消毒法として応用するために、ARB の 1 つである VRE の消毒効果について明らかにすることを目的とした。以下に得られた知見を示す。

(1) 電圧値および処理時間の増加とともに、VRE の削減率は上昇し、周波数が 100 Hz の場合、電圧値 10.0 kV, 処理時間 15 分で LRV は 4.20 を示した。

(2) 電圧値 10.0 kV で周波数を 400 Hz にすることによって、処理時間 4 分で VRE を検出下限値 (1 CFU/mL) 以下まで削減できた。周波数を上げることで処理時間を短縮することができ、より効率的に ARB を削減できることがわかった。

参考文献

- 1) Rizzo, L. et al.: *Sci. Total Environ.*, **447**, 345-360, 2013.
- 2) Furukawa, T. et al.: *Water*, **9**, 547, 2017.
- 3) Zimmermann, U.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **105**, 175-256, 1986.
- 4) Sharma, P. et al.: *Int. Dairy J.*, **35**, 49-56, 2014.

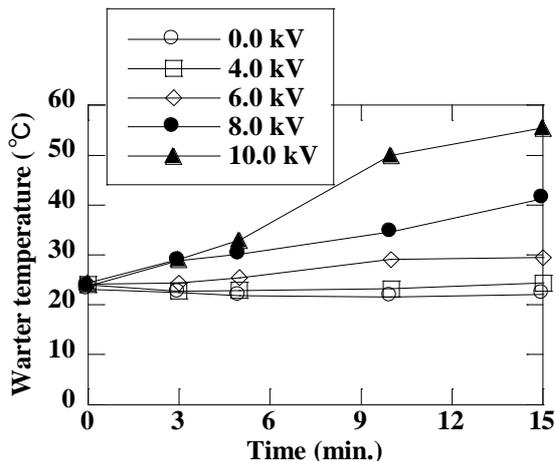


図 2 各電圧値における水温変化

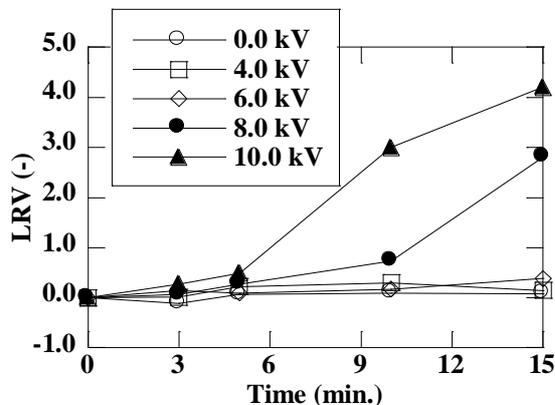


図 3 各電圧値における削減率

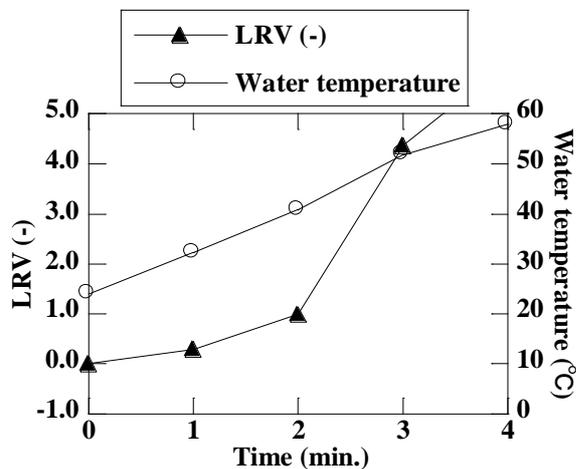


図 4 10.0 kV, 400 Hz における水温, 削減率