

塩素消毒およびインパルス電圧印加による薬剤耐性菌の不活化技術に関する基礎的検討

大分高専専攻科 学生員 ○軸丸淳史

大分高専 正会員 古川隼士

非会員 上野崇寿

非会員 川野航平

1. はじめに

近年、院内感染の原因菌として危険視されていた薬剤耐性菌 (Antibiotic Resistant Bacteria : ARB) であるが、今日までに河川等の水環境からの検出・感染事例も報告され始めており、水環境での ARB による汚染が深刻となっている。これまで、ARB の主要な排出源とされる下水処理場を対象とした調査研究において、各処理プロセスから ARB および薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic Resistant Genes : ARGs) が検出され、特に ARGs は塩素消毒槽を経ても残存することが示唆されている¹⁾。すなわち、消毒法として汎用されている塩素では、ARB は不活化できても細胞内の ARGs まではその効果が至らないことが考えられる。

一方で、近年、インパルス電圧を用いた各種微生物の消毒・滅菌技術が、主に食品等の非加熱滅菌法として提案され研究が行われている²⁾。インパルス電圧は立ち上がり、立ち下り時間が非常に短い矩形波で、微生物細胞を物理的に破壊するという特徴を有しているため、細胞内の DNA にも損傷を与える可能性が考えられる。さらに、耐塩素性微生物も不活化できる可能性があるため、各種水処理における新たな消毒・滅菌技術としての応用が期待できる。

そこで本研究では、ARB の中でも最も危険視されている一つであるバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin Resistant Enterococci : VRE) をモデル微生物として、はじめに①従来の主要な消毒・滅菌技術である塩素消毒法による VRE およびその耐性遺伝子であるバンコマイシン耐性遺伝子 (Vancomycin Resistant Genes : VRGs) の不活化効果を確認した。さらに、②インパルス電圧印加技術を用いて VRE の不活化効果を明らかにし、本手法の新規消毒・滅菌技術としての有用性を検討した。

2. 実験方法と材料

2. 1 塩素消毒による VRE の不活化実験

ARB のモデル細菌として、*Enterococcus faecium* ATCC 51559 (*vanA* 遺伝子保有株) を用いた。前培養した *E.*

faecium 株を 10^7 CFU/mL となるように滅菌済 PBS 溶液で調整したものを実験試料とし、100 mL をビーカーに分注した。各ビーカーに初期塩素濃度 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 および 3.0 mg Cl_2 /L となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、500 rpm で所定の時間 (3, 5, 10, 20, 40, および 60 分) 攪拌した。攪拌後、中和のため 0.025M チオ硫酸ナトリウムを添加し、3 分間攪拌を行い、塩素消毒を終えた。消毒後、適切な細菌濃度となるように希釈した試料 100 μL および 1000 μL を m Enterococcus 寒天培地 (mE 培地, Difco) に直接塗布し、 35 ± 1.0 °C で 48 時間培養した。培養後、培地上に形成された赤色のコロニーを計数した。消毒後の試料について、PCR 法により VRGs の有無を確認した。

2. 2 インパルス電圧印加による VRE の不活化実験

本実験は同軸円筒電極型リアクタを用いて実施した。電極はステンレス製のものを用い、電極の固定は塩化ビニル樹脂を使用した。インパルス電圧発生装置は MPC 電源 (定格 16 kV) を用いた。動作周波数は 100 Hz でパルス幅 (半値全幅) を 6.9 μs とした。

ARB のモデル細菌は *Enterococcus faecium* ATCC 51559 (*vanA* 遺伝子保有株) を用いた。前培養した *E. faecium* 株を 10^5 CFU/mL となるように滅菌済 Milli-Q 水で調整したものを実験試料とし、8.0 mL をリアクタに分注した。その後、1.6, 6.6 および 8.0 kV のインパルス電圧を各時間 (1, 3, 5 および 8 分) 印加した。また、印加前と印加後に試料の温度を計測した。印加後の試料は 2. 1 と同様に培養を行い、計数を行った。各条件の実験はそれぞれ 3 回ずつ実施した。

3. 結果と考察

3. 1 塩素消毒による不活化効果

図-1 に塩素消毒実験の各条件における腸球菌 (ENT) の不活化率を対数表示で示す。0.1 および 0.3 mg Cl_2 /L での不活化率の最大値は、それぞれ 0.1 および 1.46log であった。0.5 mg Cl_2 /L 以上では、7.5log 以上の不活化率であ

り、確実に ENT は削減された。ENT の不活化率は塩素濃度および消毒時間が大きくなるほど高くなった。塩素消毒実験後の試料に対して PCR によって *vanA* 遺伝子の有無を確認した。その結果、すべての試料から塩素濃度および消毒時間に関係なく、*vanA* 遺伝子が検出された。特に不活化率が上限に達し、CFU 値が検出下限値以下（検出下限値：1 CFU/mL）であった条件でさえも、*vanA* 遺伝子が検出された。このことから、塩素消毒では ARB 自体は不活化されるが、ARGs は不活化せずに残存することがわかった。

3. 2 インパルス電圧印加による不活化効果

図-2 にインパルス電圧を用いた消毒実験の各条件における ENT の不活化率を対数表示で示す。各電圧における不活化率の最大値は印加時間 8 分のときであり、3 回の実験を平均して、1.6 kV および 6.6 kV でそれぞれ約 0.2log および約 3.0log であり、8.0 kV では 5.0log 以上であった。

1.6 kV では印加時間に関係なく不活化率に変化はほとんど見られなかった。6.6 kV および 8.0 kV では印加時間が長くなるほど不活化率は高くなり、8.0 kV の印加時間 8 分に達した際には CFU 値が検出下限値以下となった。

ENT の不活化率は、電圧および印加時間が大きくなるほど高くなった。印加前と印加後に試料の温度を計測した結果、試料の温度は電圧および印加時間が大きくなるほど高くなった。また、同じ印加条件では、試料の温度が高いものほど ENT の不活化率も高くなった。実験試料の量や細菌濃度に違いはあるものの、インパルス電圧印加と塩素消毒の不活化効果を最も不活化率が高かった 8.0 kV で比較してみると、8.0 kV は塩素濃度 0.1-0.5 mg Cl₂/L 以上で、1.0-3.0 mg Cl₂/L 以下の不活化率であった。また、印加時間 8 分は塩素濃度 1.0 mg Cl₂/L で接触時間 3 分と同等の不活化率であった。これらより、8.0 kV のインパルス電圧印加は塩素消毒に比べて、処理能力は高くないが、確実に ENT を削減できることがわかった。

4. まとめ

- 1) 塩素消毒では、塩素濃度および消毒時間が大きくなるほど ENT の不活化率は高くなることが確認され、0.5 mg Cl₂/L 以上では 7.5log 以上の不活化率を示した。また、ARB 自体は不活化するが、ARGs は不活化せずに残存することがわかった。
- 2) インパルス電圧を用いた消毒では、電圧および印加時間が大きくなるほど ENT の不活化率は高くなり、8.0

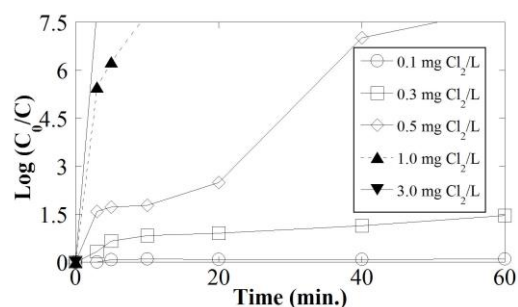


図-1 塩素消毒によるENTの不活化率

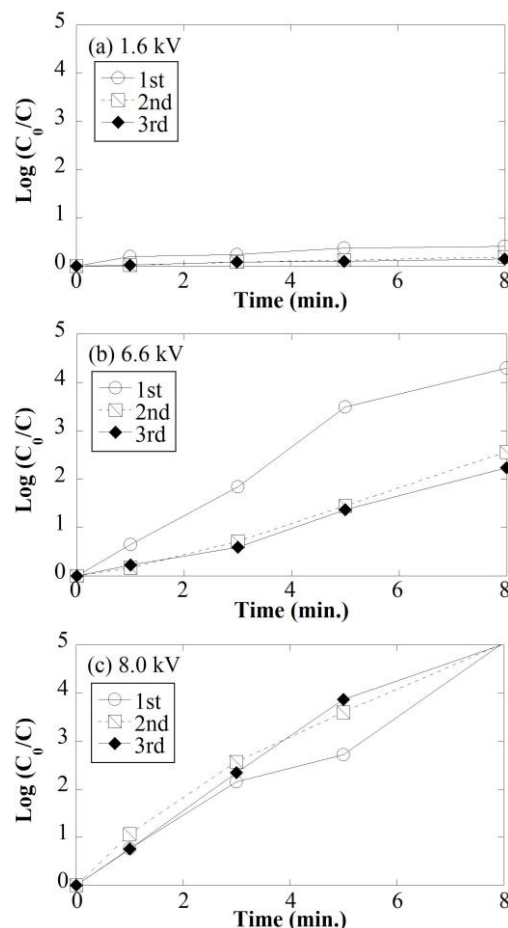


図-2 インパルス電圧印加によるENTの不活化率

kV では 5.0log 以上の不活化率を示した。また、同じ印加条件でも試料の温度が高いほど ENT の不活化率は高くなることがわかった。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（若手研究（B）、研究代表者：古川隼士、課題番号：15K21596）、および前田記念工学振興財団の研究助成によって行われた。

参考文献

- 1) Furukawa, T., Hashimoto, R., and Mekata, T.: Quantification of vancomycin-resistant enterococci and corresponding resistance genes in a sewage treatment plant, J. Environ. Sci. Health, Part A, 50, 989-995, 2015.
- 2) 五十部誠一郎.: 非加熱殺菌法を中心とした新規滅菌技術, 日本食品微生物学会誌, 27(3), 115-122, 2010.