

東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程

次亜塩素酸を中心とした
好中球が利用する酸化剤による殺芽胞機構の検討

2017年度入学

2020年 3月 3日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学

学籍番号 HD017003 氏名 恒川 良太郎

研究指導教員 木村 哲

副研究指導教員 岩澤 篤郎、松村 有里子

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
学位論文 要旨

次亜塩素酸を中心とした好中球が利用する酸化剤による殺芽胞機構の検討

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD017003
氏 名 恒川 良太郎

背景 (Background or Introduction)

白血球の一種である好中球はその貪食作用により体内に侵入した異物を捕獲し、自ら生成した酸化剤によって異物を酸化的に破壊、分解することで、生体防御機能を発揮している。好中球が生成、利用しているとされる酸化剤には次亜塩素酸や活性酸素種である過酸化水素などが挙げられる。その中でも特に次亜塩素酸は、生体がその体内で利用するばかりでなく、その広い殺菌スペクトルと安価で取扱いやすいことなどから広く一般の感染制御に利用されている。昨今次亜塩素酸製剤は単体で使用されるばかりでなく、殺菌効果の向上、薬剤安定性の向上を目的とした pH 調整剤を添加した製剤や、次亜塩素酸を含有する水溶液を電気分解により生成する装置なども市販されている。一方で次亜塩素酸をはじめとするこれら酸化剤による殺菌メカニズムには、未だ不明な点が多い。

目的 (Objective)

好中球の食空胞内における次亜塩素酸の作用に対する活性酸素種の影響を中心に、殺菌機構について検討する。好中球が用いる酸化剤による殺菌機構を明らかにすることによって、生体もしくは環境にとってより高い安全性、より効率の高い殺菌デバイスの開発につなげ公衆衛生の向上に資する。

方法 (Methods)

殺菌対象には殺菌効果をより明確に比較するため、薬剤耐性の高い芽胞形成菌である *Bacillus subtilis* を用いることとした。試験液には、次亜塩素酸ナトリウム水溶液および過酸化水素水を pH 調製して用いた。試験液と菌液を混和し、一定時間接触させた後、生残菌数を評価した。また、過酸化水素水に光照射することでヒドロキシルラジカルを発生させ、ならびに光感受性物質に光照射することで一重項酸素を発生させ、同様に評価した。

結果 (Results)

B. subtilis spore に対して次亜塩素酸ナトリウムが最も即時的な殺芽胞効果を示した。ヒドロキシルラジカルと過酸化水素は殺芽胞効果が見られるのに 10 分以上を要した。これらの殺芽胞効果は pH によって差があった。一重項酸素は pH に関わらず殺芽胞効果が見られなかった。次亜塩素酸ナトリウムと他の酸化剤を併用すると殺芽胞効果が減弱した。

結論 (Conclusions)

pH 6 の次亜塩素酸が最も即時的に高い殺芽胞効果を示した。次亜塩素酸が示した高い殺芽胞効果から、次亜塩素酸の高い殺菌効果は、酸化力、膜透過性、寿命（到達距離）、反応性などの複数の因子によるものと示唆された。また、次亜塩素酸と活性酸素種の併用により殺芽胞効果が減弱したことから、好中球による殺菌機構において利用される化学種に対して、なんらかの選択機構が存在することが示唆された。

キーワード (Key Words)

次亜塩素酸、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、殺菌機構、好中球

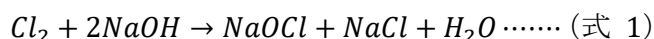
目次

1.	はじめに	1
2.	方法.....	4
2.1.	材料	4
2.2.	三種の光感受性物質から発生する一重項酸素量	5
2.3.	次亜塩素酸または活性酸素種による殺芽胞試験	5
2.4.	活性酸素種共存下での次亜塩素酸による殺芽胞試験	6
2.5.	次亜塩素酸の定量	6
3.	結果.....	7
3.1.	光感受性物質から発生する一重項酸素濃度	7
3.2.	次亜塩素酸の殺芽胞効果	7
3.3.	活性酸素種の殺芽胞効果	7
3.4.	活性酸素種共存下での次亜塩素酸の殺芽胞効果	8
3.5.	次亜塩素酸の紫外可視吸収スペクトルへの過酸化水素の影響	9
4.	考察.....	10
5.	結論.....	15
謝辞		16
引用文献		17
図		20
表		39
Abstract		40
付録		42

1. はじめに

感染症の予防には、古くから塩素の作用を利用した殺菌技術が使用されている。上水道に塩素殺菌を利用した初の報告は、1897 年英国 Maidstone で腸チフスの流行を抑えるために次亜塩素酸ナトリウムが投入されたものであり、それによりチフス患者数は減少した¹⁾。これ以降、塩素化合物は公衆衛生の向上に広く用いられている。現在汎用されている塩素化合物の一つに次亜塩素酸カルシウムがある。次亜塩素酸カルシウムは、塩素ガスを水酸化カルシウムの過飽和水溶液である石灰乳に通ずること得られ、さらし粉と呼ばれている。さらし粉は古くはクロール石灰と呼ばれ感染創の治療や産褥熱の予防に利用された歴史を持つ²⁾。現在では次亜塩素酸カルシウムの含有量を高めた高度さらし粉が、飲用水やプール水、海水の殺菌、畜舎、養魚場、野菜や果実の殺菌などに広く利用されている。

感染対策に重用される次亜塩素酸塩として、次亜塩素酸ナトリウムが挙げられる。工業的に次亜塩素酸ナトリウムは、塩素ガスを水酸化ナトリウム水溶液に通じてアルカリ性の水溶液として製造される(式 1)³⁾。



厚生労働省などが発するガイドラインやマニュアルにおいても感染対策への次亜塩素酸ナトリウムの使用が明示されている。具体的には、「保育所における感染症対策ガイドライン」⁴⁾や「大量調理施設衛生管理マニュアル」⁵⁾において次亜塩素酸ナトリウムを利用する旨が明記されている。次亜塩素酸ナトリウム水溶液はさまざまな環境下で利用されているが、現実にはいくつかの問題が存在する。食品加工や、農畜産、医療における使用では、高濃度の薬剤を適宜希釈して至適濃度の水溶液を調製し、殺菌対象物を浸漬することによって対象物表面を殺菌消毒するのが一般的である。ここでは希釈水溶液作成の手間がかかること、希釈作業での濃度のばらつきが生じやすいことなどが問題点として挙げられる。また、有機物の存在下では有効塩素濃度が殺菌対象としていない有機物との接触により無為に消費されるといった問題も常に存在する。一方で、このような問題を低減する可能性を有したデバイスも登場している。電解水もしくは次亜塩素酸水と呼ばれるもので、塩化物イオンを含む水溶液を電気分解して生成される水溶液であり、2002 年には「次亜塩素酸水」の名称で食品添加物に指定されている⁶⁾。これら電解水あるいは次亜塩素酸水についても、微生物に対する多くの殺菌効果の報告がなされており^{7,8)}、電気分解による次亜塩素酸水は、pH を調整した次亜塩素酸ナトリウム水溶液との比較によって、これとほぼ同様の殺菌効果が得られることが報告され⁹⁾、吸光光度法を用いた検討において、次亜塩素酸ナトリウム水溶液と電気分解による次亜塩素酸水溶液に含まれる次亜塩素酸は同等であると看破された¹⁰⁾。電解水の利用を含めた次亜塩素酸の利用は、昨今ますます多岐にわたるようになってきている。さまざまな pH に調製済みの水溶液が販売され、また、電気分解方式の次亜塩素酸水溶液生成装置が開発、販売されている。これらの水溶液は、pH や濃度を使用者が調整することなくそのまま利用することができる。いずれも殺菌効果や利便性を高めることを目的に開発されたものである。しかし、「次亜塩素酸」という単一の物質名が書かれた水溶液は、しばしば pH が異なりしかも pH の違いによって殺菌に要する時間が数十倍となる¹¹⁾ことがあるため、市場に混乱を生じさせる要因となっている。pH の違いによって殺菌効果の差は、次亜塩素酸の性質である、非解離の次亜塩素酸(HClO)とプロトン(H⁺)が解離した次亜塩素酸イオン(ClO⁻)との間の平衡が大きく影響している(式 2)¹¹⁻¹³⁾。



非解離の次亜塩素酸のほうが、解離型の次亜塩素酸イオンよりも殺菌効果が高く、Marks は pH に依存した非解離の次亜塩素酸の濃度のみが殺芽胞速度に影響すると報告している¹⁴⁾。

殺菌スペクトルの広い次亜塩素酸は、殺菌効果が pH によって異なり、この現象について多くの検討が行われているものの、その殺菌機構は未だ明瞭でない。2020 年 1 月現在一般的に提案されている殺菌機構¹³⁾を以下に示す。非解離の次亜塩素酸は細菌の細胞内へ細胞膜を透過して侵入する。侵入した次亜塩素酸分子は、細胞内小器官や遺伝子、あるいは酵素など代謝に必要な化学物質を酸化破壊し、細胞死の誘引、あるいは増殖阻害をひきおこす。細菌の細胞膜はリン脂質の疎水基が膜内面に、親水基が膜表面に向かって並んだ二重膜を形成しており、電荷を持たない次亜塩素酸分子などの低分子量の物質は、受動拡散によって細胞膜を容易に透過することができる。一方、分子量は同等でも電荷を持つ粒子は、細胞膜を透過して細胞内へ侵入することはできない。したがって、高分子量物質やプロトンが解離して電荷を持った次亜塩素酸イオンのような物質は、もっぱら細胞の外縁から順に酸化破壊する。すなわち、非解離型の次亜塩素酸分子のように細胞内外を同時に破壊するのか、もしくは解離型の次亜塩素酸イオンのように細胞外からの破壊のみであるのか、この違いが殺菌力の違いであり、pH の差による次亜塩素酸水溶液の殺菌力の差であると考えられている。

次亜塩素酸ナトリウムや次亜塩素酸カルシウムなどの次亜塩素酸塩の水溶液は pH が高くアルカリ性を呈し、液中のほぼすべての次亜塩素酸はプロトンが解離した次亜塩素酸イオンの形態をとっている。同等の有効塩素濃度において、次亜塩素酸イオンのほうがプロトンの解離していない次亜塩素酸よりも殺菌力は低い^{14, 15)} 次亜塩素酸イオンの存在比率が高い次亜塩素酸塩の水溶液は、非解離の次亜塩素酸を多く含む水溶液より殺菌力が低いことになる。この点を改良するために、前述のように pH を調節して非解離の次亜塩素酸濃度を高めた製剤や、これと同等の pH と有効塩素濃度を得られる電解水が考案され利用されている。

次亜塩素酸の pH に依存した殺菌力の差、およびそのメカニズムをあらためて精査すると、以下の疑問が生じてくる。(1) 次亜塩素酸は本当に酸化力を保持したまま、厚さ 8 ~ 10 nm の脂質二重層からなる細胞膜¹⁶⁾を透過しているのか。(2) 細胞死をもたらす酸化破壊は、細胞のどの部分で起こるのか。(3) 次亜塩素酸に対する薬剤耐性菌は生じにくいとされるが、事実なのか。(4) 次亜塩素酸が細胞膜を透過するのであれば、それにもかかわらず高等生物には安全性が高いのはなぜか。(5) 細胞膜が存在しないウイルスやプリオンでは感染性不活化効果に pH 依存性はあるのか。(6) 次亜塩素酸とその他の酸化剤の間に損傷菌の発生頻度に差はあるのか。これらの点に対してエビデンスに基づく解答はなく、次亜塩素酸の詳細な殺菌機構は未だ明白とはいえない。

次亜塩素酸の殺菌機構を考えるにおいて、次亜塩素酸を利用する興味深いシステムの一つが、我々のもつ免疫システムである。白血球の一種であり、白血球のうち 50 ~ 70% を占める好中球は¹⁷⁾、次亜塩素酸を利用していることが知られている^{18, 19)}。好中球はアメーバ様運動で盛んに体内に侵入した異物を捕獲し、自らの細胞内に異物を取り込む。異物は好中球自らが産生した各種酸化剤によって殺菌、分解される。この時、好中球が生成、利用している酸化剤には次亜塩素酸や活性酸素種と呼ばれる一群の化学種が挙げられる(図 1)²⁰⁾。活性酸素種は、酸素の代謝過程で生じた酸素分子よりも反応性の高い分子種の総称である。特にスーパーオキシドアニオン(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素($^1\text{O}_2$)を狭義の活性酸素と呼び²¹⁾、それぞれが高い酸化力を持つ。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

(nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate、NADPH)が NADP^+ に酸化される際の電子によって酸素がスーパーオキシドアニオンに還元され、スーパーオキシドアニオンから不均化反応により過酸化水素がつくられる。ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase、MPO)によって過酸化水素と塩化物イオンから次亜塩素酸がつくられ、同じく過酸化水素からラクトフェリンを介してヒドロキシルラジカルが、またスーパーオキシドジスムターゼにより一重項酸素が産生される。過酸化水素からはフェントン反応を介してもヒドロキシルラジカルを生じ、このヒドロキシルラジカルが殺菌作用の中心であるとする報告²²⁾もある。活性酸素阻害剤の存在下では好中球の殺菌能が低下することから、活性酸素種は好中球の殺菌能発現に不可欠な因子である²⁰⁾。しかし、活性酸素種のうちいずれの分子種が中心的な役割を担うかについては議論が続いている。活性酸素種が関与するのは直接的な異物排除ばかりではない。スーパーオキシドアニオン産生能が障害された疾患は慢性肉芽腫症(Chronic Granulomatous Disease : CGD)を呈し、難治性である。次亜塩素酸生成に必須のMPOの欠損症は骨髄性白血病や、重症感染症などで見られる²³⁾。私たちの身体は、好中球をはじめとする多様な防護網を備えていることがうかがわれる。しかし、この防壁因子としての酸化剤が同時多発的に作用するかどうか、作用機序について検討した報告例はない。好中球内のこれらの酸化剤の作用機序が明らかになれば平素の微生物制御においても、これらを模倣的に同時使用することによってより効果的な殺菌手法、衛生管理手法の開発に繋がる可能性が高いと考えられた。これらのことから、ヒトが既に備えている生体防御機構、特に好中球が利用する酸化剤の殺菌機構を解明することは、今後の感染制御、並びに微生物の制御に資するものと考えられた。

好中球は、前述のように次亜塩素酸と活性酸素種を巧みに利用して殺菌を行っているが、これまでに次亜塩素酸と活性酸素種が共存する条件下での殺菌について検討された報告例はない。そこで本博士論文研究では、薬剤に対する抵抗性の最も高い芽胞形成菌を対象として、種々のpH条件下における*in vitro*系での実験結果をもとに、好中球の食空胞内における次亜塩素酸の作用に対する活性酸素種の影響を中心に殺菌機構について検討した。第一に、芽胞形成菌に対する次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素の殺芽胞機構を明らかにすることを目的に検討を行った。第二に、次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果に対する過酸化水素またはヒドロキシルラジカルの影響について検討した。第三に、上記検討を総括して、好中球内の殺芽胞機構について検討した。

2. 方法

2.1. 材料

殺菌対象には芽胞形成菌 *Bacillus subtilis* NBRC13722 を用いた。芽胞 (spore) 懸濁液は Soybean-Casein Digest Agar (SCD 寒天培地、富士フィルム和光純薬株式会社) で 10 日間培養した *B. subtilis* NBRC13722 を滅菌蒸留水に懸濁し、56℃で 30 分間処理することで作成し、4℃で保存した。spore 懸濁液を滅菌 PBS(-)で約 10^6 CFU/mL に調整して実験に供した。

次亜塩素酸は次亜塩素酸ナトリウム溶液(化学用、和光純薬工業株式会社)を、過酸化水素は過酸化水素(30%、試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社)をそれぞれ Milli-Q®水(Direct-Q UV 3、メルク株式会社)で適宜希釈して用いた。殺芽胞実験における中和剤として、次亜塩素酸に対してチオ硫酸ナトリウム(チオ硫酸ナトリウム(無水)、ナカライテスク株式会社)を、過酸化水素に対してカタラーゼ(ウシ肝臓由来、生化学用、和光純薬工業株式会社)を用いた。生残菌数測定のための段階希釈には Lecithin と Polysorbate 80 を含有した Soybean-Casein Digest 培地 (SCDLP 培地「ダイゴ」、一般細菌検査用、富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

ヒドロキシラジカルの発生には、歯科重合用光照射器(ペンキュアー®2000、型式 VL-10、出力ピーク波長 460 nm、株式会社モリタ製作所)を用いた。

一重項酸素の発生源の光感受性物質にはメチレンブルー²⁴⁾(メチレンブルー三水和物、試薬特級、和光純薬工業株式会社)、ローズベンガル^{25, 26)}(和光特級、和光純薬工業株式会社)、またはプロトポルフィリン IX²⁷⁾(プロトポルフィリン IX ジメチルエステル、富士フィルム和光純薬株式会社)を用い、励起光源には波長 630 nm の LED(EX-630、オプトコード株式会社)、波長 530 nm の LED(EX-530、オプトコード株式会社)、波長 405 nm の LED(特注品、有限会社パックス)を用いた。光源の照度の測定には照度・輝度・放射照度計(HD 2302.01、デルタオーム社)と光・放射照度プローブ(LP471RAD、デルタオーム社)を用いた。

一重項酸素量の検出には、Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG、Thermo Fisher Scientific)を用いた。蛍光検出には分光蛍光光度計(RF-5300、株式会社島津製作所)を用いた。測定範囲は 475~600 nm、励起波長は SOSG に指定される 504 nm、バンド幅は励起側、蛍光側ともに 3.0 nm とし、セルには 1 cm 角のポリスチレン製ディスポセルを用いた。

pH の調製には 1 mol/L 塩酸(容量分析用、和光純薬工業株式会社)と 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液(容量分析用、和光純薬工業株式会社)を用いた。

pH の測定には pH メーター(PH82、横河電機株式会社)を用いた。有効塩素濃度(Available Chlorine Concentration ; ACC)の測定には高濃度有効塩素計(RC-2、笠原理化工業株式会社)を用いた。紫外可視吸収スペクトルは、1 cm 角の石英セルを用い、紫外可視分光光度計(UV-2600、株式会社島津製作所)で 230~400 nm の範囲で測定した。

2.2. 三種の光感受性物質から発生する一重項酸素量

一重項酸素による殺芽胞効果の実験において光感受性物質の影響を考慮するために、一重項酸素の発生源として三種類の光感受性物質を用いた。SOSG の濃度が $1\ \mu\text{mol/L}$ となるように種々の濃度の光感受性物質水溶液と SOSG 水溶液を混合し、混合液から $2\ \text{mL}$ ずつを 24 穴マイクロプレートに分注し、各光感受性物質に応じた波長の励起光を 1 分間照射した後、蛍光スペクトルを取得した。液面から光照射器までの距離は約 $12\ \text{mm}$ であった。励起光の照度の測定時は、測定器のセンサー部分を光照射器に接触させて測定した。

2.3. 次亜塩素酸または活性酸素種による殺芽胞試験

次亜塩素酸および過酸化水素の殺芽胞試験方法を以下に示す。

次亜塩素酸の試験液は、pH 3、6、および 9 で ACC を 50、250、500 mg/kg (500 mg/kg は $6.7\ \text{mmol/L}$ に相当) とした 9 種を調製した。96 穴マイクロプレート上で試験液 $180\ \mu\text{L}$ と菌液 $20\ \mu\text{L}$ を混和し一定時間作用させた後、 $20\ \mu\text{L}$ を SCDLP 培地 $180\ \mu\text{L}$ に添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈液各 $10\ \mu\text{L}$ を SCD 寒天培地に塗布し、 37°C で 24 時間好気培養して生残菌数を求めた。作用時間は、試験液と菌液を混和後、1、5、10 分間とした。

過酸化水素の試験液は、pH 3、6、および 9 で過酸化水素濃度が 1、5、10 % (w/v、10%は $2.9\ \text{mol/L}$ に相当) とした 9 種を調製し、次亜塩素酸と同様の方法で殺芽胞試験を実施した。作用時間は 1、5、10 分間とした。

ヒドロキシルラジカルと一重項酸素は発生源となる物質を含む水溶液を下記に示す方法で調製して試験液とし、殺芽胞試験を実施した。

ヒドロキシルラジカルは、過酸化水素水に光照射することで発生させた²⁸⁾。試験液は pH 3、6、および 9 に調製した 10 % (w/v) 過酸化水素水を用いた。試験液と菌液を混合した直後に光照射を開始した。1、5、10 分後に光照射を終了してヒドロキシルラジカルの生成を停止し、上述と同様の方法で生残菌数を求めた。

一重項酸素は光感受性物質を含む水溶液に光照射することで発生させた。光感受性物質には、メチレンブルー、ローズベンガル、またはプロトポルフィリン IX を用いた。メチレンブルーを用いた系では、 0.0005% ($1.87\ \mu\text{mol/L}$) 水溶液に波長 $630\ \text{nm}$ の LED 光を照射し、ローズベンガルを用いた系では、 $10\ \mu\text{mol/L}$ 水溶液に波長 $530\ \text{nm}$ の LED 光を照射し、プロトポルフィリン IX はジメチルスルホキシド (DMSO) ストック溶液から $10\ \mu\text{mol/L}$ 水溶液を調製し、波長 $405\ \text{nm}$ の LED 光を照射することで一重項酸素を発生させた。試験液と菌液を混合した直後に光照射を開始し、1 分または 10 分後に光照射を終了して一重項酸素の生成を停止し、上述と同様の方法で生残菌数を求めた。

いずれも殺芽胞試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた。

2.4. 活性酸素種共存下での次亜塩素酸による殺芽胞試験

過酸化水素共存下での次亜塩素酸の殺芽胞試験では、10 % 過酸化水素を含む、ACC 250 mg/kg および 500 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を、pH 3、6、および 9 にあらかじめ調製して試験液とした。殺芽胞試験は、試験液 180 μ L に菌液 20 μ L を加え、1、5、10 分間作用させ、前項と同様に生残菌数を求めた。

ヒドロキシルラジカル共存下での次亜塩素酸の殺芽胞試験は、上述の過酸化水素共存下での殺芽胞試験と同じ試験液を用い、試験液と菌液とを混合した直後に光照射を開始し、前項と同様に 1、5、10 分間の光照射後に生残菌数を求めた。なお、陰性対照として過酸化水素水のかわりに Milli-Q[®]水を用いた。

殺芽胞試験の繰り返し数、統計処理は 2.3 節と同様とした。

2.5. 次亜塩素酸の定量

次亜塩素酸ナトリウム水溶液（終濃度 1.2 mmol/L、ACC 90 mg/kg）と過酸化水素水（終濃度 0.6、1.2 mmol/L、それぞれ 20、40 mg/kg）または Milli-Q[®]水の混合水溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定した。292 nm における吸光度¹⁰⁾を用いて次亜塩素酸濃度の変化を評価した。

3. 結果

3.1. 光感受性物質から発生する一重項酸素濃度

各系で発生した一重項酸素濃度は SOSG からの発光強度で比較した。一重項酸素と反応した SOSG からの蛍光は、510 ~ 600 nm 付近にブロードなスペクトルを示し、その極大波長は 528 nm であった(図 2)。光感受性物質としてメチレンブルーを用いて波長 630 nm で照度 105.7 mW/cm² の LED 光を照射したときの 528 nm における蛍光強度とメチレンブルー濃度との関係を図 3 に示す。メチレンブルー濃度が高くなるとともに蛍光強度は増加し、0.0005 % で最大の 459.764 を示し、さらに濃度が高くなると蛍光強度は低下した。

プロトポルフィリン IX の励起に用いた 405 nm 光源は電流値可変であったので、電源電流値を変化させながら照度を測定すると、0.40 A のときに 108.1 mW/cm² となった。メチレンブルーに用いた 630 nm 光源の照度に近いたため、電流値は 0.4 A とすることとした。プロトポルフィリン IX の濃度を 10 µmol/L とした時の SOSG の蛍光強度は 633.973 であった。

ローズベンガルの励起に用いた 530 nm 光源の照度は 39.2 mW/cm² であった。ローズベンガルの濃度を 10 µmol/L とした時の SOSG からの 528 nm における蛍光強度は 309.824 であった。

3.2. 次亜塩素酸の殺芽胞効果

ACC 50 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、pH 3、6、9 いずれの条件下においても最大 10 分間の作用で *B. subtilis* spore の生残菌数は初期菌数から変化せず、殺芽胞効果は見られなかった(図 4)。ACC 250 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液では、pH 3 条件下で、5 分間の作用で生残菌数は約 3 log CFU/mL 減少し、10 分間の作用でも、5 分間の場合よりも生残菌数は減少したものの検出限界以下とはならなかった(図 5)。pH 6 条件下では 1 分間の作用後に約 3 log CFU/mL を超える生残菌数の減少を観察し、5 分間の作用で検出限界以下となった。pH 9 条件下では、1 分間の作用で約 1 log CFU/mL 減少し、5 分間の作用で検出限界以下となった。ACC 500 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液では pH 3 条件下で、1 分間の作用で約 3 log CFU/mL の生残菌数の減少を観察し、5 分間作用すると生残菌数は検出限界以下となった(図 6)。pH 6 条件下では、1 分間の作用で生残菌数が検出限界以下となった。pH 9 条件下では ACC 250 mg/kg の場合と同様に 1 分間の作用では約 1 log CFU/mL の減少にとどまったものの、5 分間の作用で検出限界以下となった。

3.3. 活性酸素種の殺芽胞効果

1 % 過酸化水素水では pH 3、6、9 いずれの条件下においても最大 10 分間の作用で *B. subtilis* spore の生残菌数は変化しなかった(図 7)。5 % 過酸化水素水では pH 3 において、作用時間に依存して生残菌数の減少がみられ、pH 3 条件下において 10 分間の作用で 約 2 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られた。同じ作用時間において、pH 6 および 9 条件下では pH 3

の場合より減少する生残菌数が少なくなり、10 分間の作用で約 1 log CFU/mL の生残菌数の減少に留まった。(図 8)。10%過酸化水素水では pH に依存せず作用時間に依存した生残菌数の減少がみられ、10 分間の作用で約 2 log CFU/mL を超える生残菌数の減少が見られた(図 9)。ただし、作用前と 10 分間作用後とで有意差検定を行うと、いずれの pH 条件下においても $p = 0.1$ 前後であり、統計的有意差は見られなかった。

ヒドロキシルラジカルは過酸化水素への光照射によって発生させているため系内には過剰の過酸化水素が存在する。本系の pH 3 および 6 の条件下において、5 分までの作用時間では生残菌数の減少は見られなかった。作用時間を 10 分間と長くしたところ、生残菌数の減少が見られ、特に pH 3 の時には検出限界以下となった(図 10)。pH 9 条件下においては、5 分間の作用で約 1 log CFU/mL 弱の生残菌数の減少が見られ、さらに 10 分間の作用後には約 2~3 log CFU/mL の生残菌数の減少を観察した。陰性対照として過酸化水素水の代わりに Milli-Q®水と菌液を混和して 10 分間 LED 光を照射したところ、生残菌数の減少は見られなかった(図 11)。

一重項酸素は、光感受性物質にメチレンブルー、ローズベンガル、プロトポルフィリン IX のいずれを用いても、最大作用時間 10 分では生残菌数の減少は見られなかった(図 12)。

なおデータは提示していないが、LED 照射下で光感受性物質を含まない Milli-Q®水と菌液を 10 分間作用させても、LED 非照射下で光感受性物質と菌液を 10 分間作用させても、生残菌数の減少は見られなかった。

3.4. 活性酸素種共存下での次亜塩素酸の殺芽胞効果

10 %過酸化水素共存下での ACC 250 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞試験では、pH 3 条件下において 10 分間の作用でわずかに 1 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られたのみで、pH 6 および 9 条件下では生残菌数の減少は見られなかった(図 13)。ACC を 500 mg/kg とすると、pH 3 条件下で作用時間に依存した生残菌数の減少が見られ、5 分間で約 1 log CFU/mL、10 分間の作用で約 2 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られた。pH 6 および 9 条件下では生残菌数の減少は見られなかった。(図 14)。

ヒドロキシルラジカルおよび過酸化水素共存下での次亜塩素酸の殺芽胞効果は、ACC 250 mg/kg ではいずれの pH 条件下でも作用時間に依存した殺芽胞効果が見られた。pH 3 条件下では、10 分間の作用で検出限界以下となった。10 分間の作用で pH 6 条件下では約 2 log CFU/mL の生残菌数の減少がみられ、pH 9 条件下では、約 3 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られた(図 15)。ACC 500 mg/kg でも ACC 250 mg/kg の際と同様の傾向を示し、pH 3 条件下では、10 分間の作用で検出限界以下となり、pH 6 条件下では、10 分間の作用で約 3 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られ、pH 9 条件下では、10 分間の作用で検出限界以下となった(図 16)。

陰性対照として過酸化水素を含まない ACC 250 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 460 nm の光照射を行うと、pH 3 条件下では 10 分間の作用で 3 log CFU/mL の生残菌数の減少が見られた。pH 6 条件下では 1 分間の作用で検出限界以下となった。pH 9 条件下でも 5 分間の作用で検出限界以下となった。(図 17・破線)。ACC を 500 mg/kg とすると、検出限界以下となるのに、pH 6 では 1 分間を要し、pH 3 と 9 では 5 分間を要した(図 18・破線)。

3.5. 次亜塩素酸の紫外可視吸収スペクトルへの過酸化水素の影響

次亜塩素酸ナトリウム水溶液と過酸化水素水を混合して紫外可視吸収スペクトルを確認した。1.2 mmol/L 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（ACC 90 mg/kg）では波長 292 nm における吸光度は 0.492 であったが、0.6 mmol/L の過酸化水素（0.002 %、20 mg/kg）が共存すると吸光度は 0.215 へと半減した。さらに高濃度で、次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同じ濃度の 1.2 mmol/L 過酸化水素（0.004 %、40 mg/kg）共存下では吸収ピークは消失し、吸光度は 0.003 となった（図 19）。

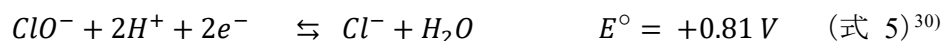
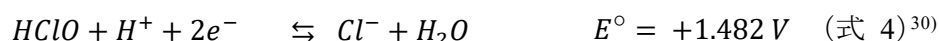
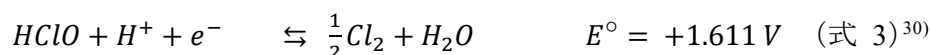
4. 考察

好中球は、次亜塩素酸や活性酸素種を自身で生成して殺菌等の異物除去を行っている。本研究では、弱アルカリ性から弱酸性の pH 条件下で次亜塩素酸イオンと次亜塩素酸の存在割合を変化させ、次亜塩素酸の殺菌効果に対して活性酸素種が及ぼす影響について検討した。

殺芽胞効果の検討に先立ち、3 種類の光感受性物質から光照射により生成させた一重項酸素量について検討を行った。生成した一重項酸素量は SOSG を用いて蛍光強度により評価した。照射光強度を 105.7 mW/cm^2 に固定して、一重項酸素の発生源であるメチレンブルーの濃度を変化すると、 0.0005% ($1.87 \mu\text{mol/L}$) 以上の濃度で、一重項酸素発生量は低下傾向を示した(図 3)。これは青色のメチレンブルー水溶液が可視光域に吸収を有し、一定の濃度以上になると水溶液の光透過率が下がることから、照射光が溶液全体へ届きにくくなり一重項酸素の発生効率が低下したこと、または、蛍光測定時にサンプル濃度が高いため発光が検出器まで届かず測定値が低減する現象である濃度減衰が起こったことにより生成した一重項酸素を定量できなかったことが要因として考えられた。一重項酸素の発生効率の低下が懸念されることから、殺芽胞実験ではメチレンブルーの濃度は 0.0005% とした。光感受性物質であるローズベンガルとプロトポルフィリン IX は、既報^{26, 27)} に従いそれぞれ $10 \mu\text{mol/L}$ の溶液に光照射することとした。

まず、*B. subtilis* spore への次亜塩素酸および活性酸素種である過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素による殺芽胞効果について比較検討した。活性酸素種である過酸化水素水は、pH によらず 1% (10 g/kg) ではほとんど殺芽胞効果は見られず、高濃度条件下でわずかに殺芽胞効果が認められ(図 7~9)、ヒドロキシルラジカルと過酸化水素共存下では pH 3 条件下において 10 分間の作用で検出限界以下になり(図 10)、一重項酸素は、用いた光感受性物質の違いによらず、殺芽胞効果は認められなかった(図 12)。一方次亜塩素酸は、ACC 50 mg/kg ではいずれの pH 条件下でも、作用時間によらず殺芽胞効果が見られなかった(図 4)。なお pH 12 条件下でも ACC 50 mg/kg では *B. subtilis* spore に対する殺芽胞効果が見られないことが報告されている²⁹⁾。次亜塩素酸は ACC 500 mg/kg においていずれの pH 条件下でも 5 分間の作用時間で検出限界以下まで生残菌数は減少した(図 6)。特に pH 6 条件下においては ACC 250 mg/kg でも作用時間 1 分間で $3 \log \text{ CFU/mL}$ を超える生残菌数の減少が見られ、ACC 500 mg/kg とすると同じく 1 分間で検出限界以下となった。次亜塩素酸はいずれの pH 条件下においても過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素よりも高い殺芽胞効果を示した。対象とした化学種の殺芽胞効果に寄与する因子として、酸化力、電荷、膜透過性、寿命、反応性などが挙げられる。

本研究で対象とした化学種の酸化力は、標準酸化還元電位により評価できる。以下に、各化学種の標準酸化還元電位を示す。





一電子あたりの標準酸化還元電位は、ヒドロキシルラジカルが +2.33 V と最も高く、次いで、次亜塩素酸が +1.611 V、過酸化水素が +0.888 V (+1.776 V / 2e⁻)、一重項酸素が +0.65 V である。次亜塩素酸は、酸化力がヒドロキシルラジカルよりも小さいにもかかわらず、これよりも短時間で殺芽胞作用を示した。活性酸素種では、酸化力の高い順に殺芽胞効果は弱くなり、酸化力が殺芽胞作用の要因の一つであることが示唆された。

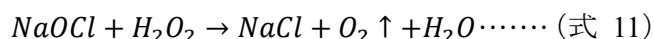
次に、化学種の電荷および膜透過性と殺芽胞効果との関係について検討する。次亜塩素酸 (HClO) は、分子量が 52.46 と小さく、非解離型分子であり電荷を有しないことから、対象の細胞膜を透過して内部を直接破壊することで、細胞膜を透過できない次亜塩素酸イオン (ClO⁻) よりも高い殺菌効果を発揮する¹³⁾。本論文でも、次亜塩素酸は pH に依存した殺芽胞効果を示した。しかし他方では、次亜塩素酸と同様に電荷を持たず低分子量である過酸化水素 (分子量 34.01) は、膜透過が容易³²⁾ であるにもかかわらず、明瞭な殺芽胞効果は観察されなかった。ACC 500 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液はモル濃度で表記すると 6.7 mmol/L となり、10% 過酸化水素水溶液はモル濃度で表記すると 2.9 mol/L に相当する。次亜塩素酸に比して過酸化水素は 430 倍の高いモル濃度であるにもかかわらず、高い殺芽胞効果を示さなかった。酸化剤などの化学種が殺芽胞を達成するためには、芽胞殻を破壊または透過すること等により細胞膜に到達する必要がある。芽胞殻は細胞膜の外側に形成され、外層部と内層部からなる。この芽胞殻は発芽や機械的な破壊により構造変化を受けない限り、ほぼすべての物質を透過させないものと考えられていることが既報³³⁾ において紹介されている。しかし、同報文では、過酸化水素が *B. subtilis* spore の芽胞殻外層部には化学的变化を与えない反面、芽胞殻内層部には化学的变化を与え、結果として芽胞の死滅を観察しており、「芽胞の透過機構が過酸化水素によって障害を受け、芽胞を死滅させるものと考えられる」と考察している。すなわち、過酸化水素は芽胞殻外層部に影響を与えないまま、芽胞殻内層部に到達し、内層部に障害を与え、細胞膜に到達していることを示唆している。このことから、過酸化水素は芽胞殻に対して膜透過性を有するものと考えられる。ヒドロキシルラジカルと一重項酸素はいずれも光照射により生成しているため、殺芽胞機構における芽胞殻の膜透過性に関しては検討できない。しかし後述のように生細胞内では寿命が短く到達可能距離も短いため、ヒドロキシルラジカルと一重項酸素の殺芽胞効果に寄与する膜透過性の比重は軽微であると考えられた。

次にこれら化学種の生細胞内での寿命について検討する。生細胞内における活性酸素種の寿命はヒドロキシルラジカルが 8 ns、一重項酸素が 4 μs、過酸化水素が 4 ms であり、その反応性はヒドロキシルラジカルが最も高いことが知られている³⁵⁾。次亜塩素酸の生細胞内における寿命は不

明である。一般に、細胞内に物質が能動的または受動的に侵入すると 1 ms 以内に細胞内に十分拡散される。ヒドロキシルラジカルの発生源として用いた過酸化水素は好気性細胞内でよく知られた代謝物であり、過剰量添加した過酸化水素は、数十 μm 拡散することができるため^{40, 41)}、光照射前に細胞内に行き渡ることが可能である。そのため、細胞外に存在する過酸化水素に加えて、細胞内に存在する過酸化水素からも光照射によりヒドロキシルラジカルは生成するものと考えられる。細胞外で生成したヒドロキシルラジカルは、その高い酸化力で芽胞殻を外側から酸化破壊することに加えて、細胞内でも酸化破壊が起こると考えられた。しかしヒドロキシルラジカルが発生源である過酸化水素の形で細胞内に侵入し、細胞内でも継続的にヒドロキシルラジカルによる酸化破壊が起きているのだとすると、ヒドロキシルラジカルによる殺芽胞効果試験において、5 分の作用時間では生残菌数が減少せず、10 分の作用時間では大きく生残菌数が減少したという結果と矛盾する。そこで、特に作用時間 5 分における生残菌数の減少が、過酸化水素よりもヒドロキシルラジカルで小さかったことに注目した。ここで、活性酸素種の生細胞内における寿命と物質拡散にかかる時間を列挙すると、ヒドロキシルラジカルの寿命が 8 ns 程度であること、これによりヒドロキシルラジカルは生成サイトから数オングストローム以内で除去されること^{36, 37)}、細胞内に侵入した物質が細胞内に十分拡散されるのに必要な時間が 1 ms 以下とされることなどが挙げられる。さらに化学物質が受動拡散により芽胞殻や細胞膜を透過するには一定の時間を要するであろうことを考慮すると、ヒドロキシルラジカルの寿命よりも過酸化水素が細胞内へ侵入するのにかかる時間のほうがはるかに長いと推察される。この過酸化水素が細胞内へ侵入・拡散するのに要した時間が本論文におけるヒドロキシルラジカルによる殺芽胞の律速となったと考えられた。すなわち、光照射前に細菌細胞内に拡散した過酸化水素は光照射によってヒドロキシルラジカルに変換され消費される。その後は、細胞膜外から受動拡散によって過酸化水素の供給がなされても光照射は続いているためすぐにヒドロキシルラジカルに変換されて消費され、細胞膜内は過酸化水素濃度もヒドロキシルラジカル濃度も低い状態となる。このため、ヒドロキシルラジカルと過酸化水素の共存下では作用時間 5 分における生残菌数の減少量が小さくなったと考えた。しかし、光照射が続く限り、細胞膜外にはヒドロキシルラジカルが生成され存在するため、細胞膜外からは過酸化水素に加えてヒドロキシルラジカルによる酸化破壊が行われる。*B. subtilis* spore は薬剤に耐性が高いため、高い酸化力を持つヒドロキシルラジカルでも殺芽胞効果を示し始めるのに一定の時間が必要で、この殺芽胞に必要な一定の時間が 5 分と 10 分の間に存在したことが示唆された。厚さ 8 ~ 10 nm の脂質二重層からなる細胞膜¹⁶⁾ を生成サイトから数オングストローム以内で除去されるヒドロキシルラジカル^{36, 37)} が反応性を保ったまま透過することも困難と考えられ、このことからヒドロキシルラジカルによる酸化破壊は外部から起こると考えられる。細胞外ではヒドロキシルラジカルの発生源である過酸化水素の供給が速やかに行われるため、ヒドロキシルラジカルによる芽胞殻の破壊が過酸化水素によるヒドロキシルラジカルの還元を上回り、10 分間の作用時間における高い殺芽胞効果となって現れたものと考えられた。なお、過酸化水素は pH の上昇に伴って安定性を減ずる⁴²⁾ ことから、pH 3 条件下に比べて、pH 6 および 9 の条件下においては安定性が低い。過酸化水素およびヒドロキシルラジカルによる殺芽胞試験において pH により殺芽胞効果が異なる系があったことの一因になった可能性が考えられたが、詳細にはさらに検討が必要と考えられた。なお、ヒドロキシルラジカルはその反応性の高さから、過剰に存在するとラジカル 2 分子による再結合や不均化反応も増加し、ラジカル分子数を減ずるため、これも殺芽胞に要する時間が長くなる一因となると考えられる。一重項酸素は *B. subtilis* spore に対して殺芽胞効果を示さなかったが、ヒドロキシルラジカル同様

に考えることができる。生細胞内における一重項酸素の寿命は 4 μ s であり、光感受性物質に膜透過性が有ると仮定した場合においても、光照射が続く間の細胞内は一重項酸素濃度が低い状態となり、一重項酸素による酸化は細胞外部からが主となる。次亜塩素酸は過酸化水素よりもはるかに少ない分子数で、高い殺芽胞効果を認めたことから、その生細胞内における寿命は、3 種類の活性酸素種の中では過酸化水素により近く、少なくとも一重項酸素よりは長いと推察される。さらに次亜塩素酸はヒドロキシルラジカルより酸化還元電位が低いにもかかわらず高い殺芽胞効果を示したこと、同様に酸化還元電位の低い過酸化水素が芽胞殻透過性を持つことから類推して、次亜塩素酸も芽胞殻透過性を持つと考えられた。また次亜塩素酸は *B. cereus* spore を用いた殺芽胞機構の検討において、pH 2.56 で ACC 50 mg/kg の次亜塩素酸を主成分とする強酸性電解水で 10 分間処理すると、電子顕微鏡写真による形態観察の結果より芽胞殻が破壊されて次亜塩素酸が細胞膜に到達していることが報告されている³⁴⁾。このことから次亜塩素酸は芽胞殻を透過しかつ芽胞殻を酸化破壊することで、高い殺芽胞効果を発揮すると考えられた。

次に反応性について検討した。過酸化水素を含む次亜塩素酸ナトリウム水溶液が生残菌数を減ずるのに要する時間は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液のみの条件下よりも長くなった。ACC が 250 mg/kg の場合(図 13)でも 500 mg/kg の場合(図 14)でも同様であった。そこで、紫外可視吸収スペクトルで次亜塩素酸ナトリウム水溶液と過酸化水素水を混合した水溶液中の次亜塩素酸の定量を行った。紫外可視吸光スペクトルを確認したところ、次亜塩素酸存在下では現出する 292 nm にピークのある吸収帯が、過酸化水素の量の増加に伴って消失することが分かった(図 19)。過酸化水素は活性酸素の一種であり高い酸化力を持つが、対象によっては還元的にも働く³⁸⁾。これらのことから、次亜塩素酸と過酸化水素は(式 11)の反応で共にその殺芽胞力を失ったものと考えられた。さらに、500 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 10 % 過酸化水素を混和した試験(図 14)からは(式 11)の反応に加え、これ以外の反応が起こっていることが示唆された。この系では、次亜塩素酸は 6.7mmol/L、過酸化水素は 2.9 mol/L に相当し、過酸化水素大過剰となっている。(式 11)を考慮すると、殺芽胞試験においては過酸化水素のみを用いた試験の結果と極微量(モル比 430 倍)の次亜塩素酸ナトリウムを混和した試験の結果は同様になることが推測される。ところが、pH 6 および 9 条件下において 2.9 mol/L (10 %) 過酸化水素、10 分間の作用で見られていた約 2 log CFU/mL の生残菌数の減少(図 9)が、微量の次亜塩素酸を混和した系では見られなくなった。このことから微量の次亜塩素酸が過酸化水素の殺芽胞効果を減弱したことが明らかとなった。詳細について検討を行う必要があると考えられた。



最後に好中球内の殺菌機構について検討した。これまでの知見は、好中球は各種の活性酸素を殺菌、あるいは解毒に利用しているという見方である¹⁹⁾。ヒドロキシルラジカルが殺菌活性の中心を担うという見方も強い²⁰⁾。実際にヒドロキシルラジカルは本論文でも殺芽胞効果を示したが、次亜塩素酸よりも生残菌数を減少させるのに要した時間が長くなった。またヒドロキシルラジカルはその酸化力の強さから生体に様々な障害をもたらす要因となっていることが知られている²⁵⁾。このことは好中球内で次亜塩素酸が利用されるようになった一因ではないかと考えられた。

殺菌作用において次亜塩素酸により惹起される化学反応として、酸化反応の他にも塩素化反応も考慮する必要がある³⁹⁾。次亜塩素酸は広義の活性酸素種(ROS; reactive oxygen species)であると同時に、活性ハロゲン種(RHS; reactive halogen species)としての一面も持つ⁴⁰⁾。今後酸化作用だけでなく、塩素化の面からの殺菌作用の議論も必要であると考えられた。ここまでに論じた次

亜塩素酸およびその他の活性酸素種について殺菌効力に關与する特性を表 1 にまとめた。

今回の試験結果からは、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素が好中球による殺菌において果たし得る、直接的な殺菌の役割を否定することはできない。一方で、好中球が利用している酸化剤が同時に存在した場合、その殺菌効力が低下もしくは相殺されうることも示された。このことから、好中球の食空胞の内部にて複数の酸化剤が混然と利用される可能性は低いと考えられた。すなわち好中球が排除すべき異物に応じてこれら酸化剤を利用するタイミングや場所をずらすなど、何らかの選択機構の存在が考えられた。いずれの酸化剤も好中球内で産生され利用されていることを否定することは出来ないものの、殺菌力を減弱してしまう可能性のある次亜塩素酸と他の活性酸素の共存は避ける必要がある。したがって好中球にはそのための機構をあらかじめ備えている可能性がある。考えられる機構の第 1 として、過酸化水素は生成と同時にミエロペルオキシダーゼによって次亜塩素酸への変換が逐次的に行われ、過酸化水素の存在時間を極力短縮し、次亜塩素酸によって殺菌が行われる、といったものが考えられた。あるいは第 2 には、次亜塩素酸が産生されるまでに過酸化水素で殺菌が完了すれば次亜塩素酸が作られず、過酸化水素で殺菌が完了しない場合に限って次亜塩素酸が産生されこの時に過酸化水素と次亜塩素酸は協働しない、といった機構も考えることができた。実際に、過酸化水素と塩化物イオンから次亜塩素酸を作る酵素であるミエロペルオキシダーゼは、好中球中のアズール顆粒に由来し⁴¹⁾、アズール顆粒が食空胞と融合することによって食空胞内に供給される。このタイミングを調節することができるのであれば、次亜塩素酸の発生タイミングをコントロールできることになる。また炎症時には MPO が亢進することが分かっており、このことから第 3 として、好中球が置かれている状況に応じて産生される酸化剤の種類や量が柔軟に変化するという機構が可能と考えられた。

今回、次亜塩素酸は、その殺菌メカニズムの更なる解明、効果的な利用方法の開発を含めて、再注目に値するものと考えられた。耐性菌との抗生物質による戦いを収束させるためにも、One World – One Health の観点⁴²⁾からも、病原微生物の感染制御・感染予防の重要性は今後ますます高まる。安全性においては、次亜塩素酸を利用する消毒資材である強酸性電解水は細胞毒性が低く、生体消毒剤として使用されるポピドンヨード製剤などと比較しても有用性が認められることが報告されている⁴³⁾。次亜塩素酸の効果的な利用法を検討することで、生体や環境にとってより安全性と効率を両立した殺菌手法の開発に繋がると考えられた。

好中球内に存在する活性酸素種の中で、今回スーパーオキシドアニオンに関しては検討を行わなかった。好中球における活性酸素の生成カスケードの中で、スーパーオキシドアニオンは NADPH オキシダーゼから生成された後、速やかに不均化反応を起こし過酸化水素に変化するため⁴¹⁾、殺菌作用への直接の關与が小さいと考えて除外した。また今回、*in vitro* での検討であるため *in vivo* 環境との乖離の程度も検討に値するものと考えている。殺菌剤の実用においては殺菌阻害要因の存在は考慮を避けられず、実社会への貢献のためには必然検討対象とすべきと考えている。特に菌、試薬双方について濃度による殺菌効果への影響変化は懸念されるところであり、今後検討を重ねたい要素である。

また副次作用の少ない環境衛生資材の利用促進、普及の為には説得力ある証拠の提示が必要と考えられる。誰でも一目で理解できるような画像や映像を用いた説得材料の構築も必要であると考えられた。顕微鏡画像や、活性酸素を可視化する蛍光プローブを用いた殺菌メカニズム研究といった光学的な手法にも、潜在的な可能性と必要性があると考えており、今後の課題である。

5. 結論

薬剤耐性が高い芽胞形成菌を試験対象に用いたところ、次亜塩素酸はヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素よりも高い殺芽胞効果を示した。次亜塩素酸分子は分子量が小さく電荷を持たないことによって膜透過性を持ち、高い酸化力を持ち、長い到達距離を持つ、といった複数の特徴を高い次元で併せ持つことにより、総合的に高い殺菌力を示すものと考えられた。したがって次亜塩素酸の殺菌効果が高い理由を、膜透過性のみに帰属することには困難が伴うと考えられた。一方、高い酸化力をもつヒドロキシルラジカルは、その酸化力の高さのために到達距離が短く、薬剤耐性の高い芽胞に対しては却って殺芽胞に時間を要した。一重項酸素の酸化力はヒドロキシルラジカルには及ばず、殺芽胞効果を示さなかった。過酸化水素と次亜塩素酸は即座に反応するため、過酸化水素の共存下では次亜塩素酸の殺芽胞効力が無効化された。

より効果的な殺菌作用を実現するために、好中球にはこれらの酸化剤を混然と使用しないための、酸化剤の選択機構が存在することが示唆された。好中球内食作用においてこれまで、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、次亜塩素酸、一重項酸素がいずれも殺菌に関与するという説²⁴⁾、酸化力の高いヒドロキシルラジカル、次亜塩素酸が主に関与するとする説⁴⁵⁾など様々の説が提案されているが、今回次亜塩素酸は好中球内殺菌機構の中でもより中心的な役割を果たしていることが示唆された。生体内作用である好中球の食作用における次亜塩素酸が、これまで考えられていたよりも高い重要性を持つと認識されるものであれば、*in vitro* においても次亜塩素酸が果たすことができる役割は今よりも大きいものであると考えられ、持続可能性が高く環境負荷の小さい感染制御手法を考えるにあたり、次亜塩素酸の重要性と利便性はより高いものとして注目に値すると考えられた。

謝辞

本研究を実施する機会と気づきを与えて下さり、根気よくご指導賜りました、東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 感染制御学専攻の岩澤篤郎教授に、深い感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、最適なタイミングでの助言とご指導、励ましを頂きました、感染制御学専攻 松村有里子准教授にも心から御礼申し上げます。

折に触れ研究のヒントと気づきを与えて下さった東京医療保健大学大学院 感染制御学専攻の菅原えりさ教授、吉田理香教授、そして最後まで丁寧にご指導いただいた、木村哲先生に心から感謝いたします。学友の皆さんにも、時に助けられ、時に刺激を受けることで、勇気づけられ、論文の作成に至ることが出来ました。本当にありがとうございました。

最後に笑顔で研究の場に送り出してくれた職場の皆さんと、家族にも心からの謝意をささげたいと思います。皆さんがいなければ、完成しえない仕事であったことには疑問の余地がありません。浅学菲才な私に様々な形で関わりを持っていただいたすべての方々へ、心からの感謝を述べたいと思います。本当にありがとうございました。

引用文献

- 1) "The epidemic of typhoid fever at Maidstone", *The Lancet*, vol. 150, no. 3864, pp. 947-950, 1897.
- 2) 白石正, "消毒薬の適正使用 -今昔物語-", *環境感染誌*, vol. 31, no. 4, pp. 224-229, 2016.
- 3) 小方芳郎、木村眞, "次亜ハロゲン酸塩による酸化-廃水浄化に関連して-", *有機合成化学*, vol. 37, no. 7, pp. 581-594, 1979.
- 4) 厚生労働省, "保育所における感染症対策ガイドライン(2018 年改訂版)", pp. 68-70, 2018.
- 5) 厚生労働省, "大量調理施設衛生管理マニュアル", [Online]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenshu/0000168026.pdf>. [Accessed 10 1 2020].
- 6) 厚生労働省, "次亜塩素酸水の食品添加物指定に関連する資料", [Online]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/08/dl/s0819-8m.pdf>. [Accessed 4 12 2019].
- 7) 岩沢篤郎ほか, "臨床分離株に対するアクア酸化水の効果", *環境感染*, vol. 8, no. 2, pp. 11-16, 1993.
- 8) 太刀川貴子ほか, "各種病原微生物に対する弱酸性電解水の効果", *環境感染*, vol. 14, no. 4, pp. 255-263, 1999.
- 9) 岩沢篤郎、中村良子, "酸性電解水と擬似的酸性水との殺菌効果の比較検討", *感染症学雑誌*, vol. 70, no. 9, pp. 915-922, 1996.
- 10) S. Nakagawara, "Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity of the Aqueous Chlorine Solution", *Anal. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 691-698, 1998.
- 11) G. M. Fair, J. C. Morris, S. L. Chang, I. Weil, R. P. Burden, "The Behavior of Chlorine as a Water Disinfectant", *J. AWWA.*, vol. 40, no. 10, pp. 1051-1061, 1948.
- 12) 岩沢篤郎ほか, "強酸性電解水の殺菌効果に対する pH 及び共存塩濃度の影響", *防菌防黴*, vol. 32, no. 6, pp. 301-306, 2004.
- 13) S. Fukuzaki, "Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes", *Biocontrol Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 147-157, 2006.
- 14) H. C. Marks, O. Wyss, F. B. Strandkov, "Studies on the Mode of Action of Compounds Containing Available Chlorine", *J. Bacteriol.*, vol. 49, no. 3, pp. 299-305, 1945.
- 15) S. Fukuzaki, "Effect of pH on the Efficacy of Sodium Hypochlorite Solution as Cleaning and Bactericidal Agents", *J. Surface Finish. Soc. Jpn.*, vol. 58, no. 8, pp. 465-469, 2007.
- 16) 高桑雄一, "生体膜の構造と機能", *膜*, vol. 20, no. 2, pp. 92-102, 1995.
- 17) 日本検査血液学会編, *スタンダード検査血液学第3 版*, 医歯薬出版, 2014, 第 II 章, 1, B 白血球, 松野一彦, p. 43.

- 18) B. M. Babior, "Oxygen-Dependent Microbial Killing by Phagocytes", *N. Engl. J. Med.*, vol. 298, no. 12, p. 659-668, 1978.
- 19) 小田島武志, "ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-ハロゲン系による殺菌(解毒)作用機構 III.ミエロペルオキシダーゼ系による核酸とその構成成分の酸化分解", *歯科基礎医学会雑誌*, vol. 22, no. 3, pp. 502-512, 1980.
- 20) 笠田昌孝, "好中球食殺菌と活性酸素", *炎症*, vol. 4, no. 4, pp. 596-598, 1984.
- 21) 吉川敏一, "フリーラジカルの医学", *京府医大誌*, vol. 120, no. 6, pp. 381-391, 2011.
- 22) 中野稔、牛島義雄, "好中球の殺菌作用と活性酸素", *炎症*, vol. 4, no. 3, pp. 191-200, 1984.
- 23) 立澤宰, "易感染傾向(その1)-好中球機能不全-", *耳展*, vol. 38, no. 3, pp. 349-357, 1995.
- 24) C. Komine, Y. Tsujimoto, "A Small Amount of Singlet Oxygen Generated via Excited Methylene Blue by Photodynamic Therapy Induces the Sterilization of *Enterococcus faecalis*", *J. Endod.*, vol. 39, no. 3, pp. 411-414, 2013.
- 25) P. J. Rolim, "The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers", *J Photochem Photobiol B.*, vol. 106, pp. 40-46, 2012.
- 26) K. Ishiyama, "Bactericidal Action of Photogenerated Singlet Oxygen from Photosensitizers Used in Plaque Disclosing Agents", *PLoS One*, vol. 7, no. 5, e37871, 2012.
- 27) M. Grinholc, "Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers", *Acta Biochimica Polonica*, vol. 54, no. 3, pp. 665-670, 2007.
- 28) H. Ikai, K. Nakamura, S. Midori, T. Kanno, A. Iwasawa, K. Sasaki, Y. Niwano, M. Kohno, "Photolysis of Hydrogen Peroxide, an Effective Disinfection System via Hydroxyl Radical Formation", *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 12, pp. 5086-5091, 2010.
- 29) 千草尚ほか, "次亜塩素酸水の pH および有効塩素濃度が及ぼす殺菌効果と腐食性への影響", *J. Antibact. Antifung. Agents*, vol. 45, no. 12, pp. 585-593, 2017.
- 30) D. R. LIDE, *CRC Handbook of Chemistry and Physics 89th Edition*, CRC Press, 2008, section 8 Analytical Chemistry, pp. 20-29.
- 31) G. R. Buettner, "The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 300, no. 2, pp. 535-543, 1993.
- 32) 藤田直, "活性酸素, 過酸化脂質, フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用", *YAKUGAKU ZASSHI*, vol. 122, no. 3, pp. 203-218, 2002.
- 33) 川崎近太郎ほか, "過酸化水素の殺菌機構について", *食衛誌*, vol. 11, no. 3, pp. 155-160, 1970.
- 34) 岩沢篤郎ほか, "強酸性電解水の抗微生物効果 (III) 電子顕微鏡的観察", *環境感染*, vol. 10, no. 3, pp. 53-57, 1995.

- 35) R. W. Redmond, I. E. Kochevar, "Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review", *Photochem. and Photobiol.*, vol. 82, no. 5, pp. 1178-1186, 2006.
- 36) W. A. Pryor, "Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions", *Ann. Rev. Physiol.*, vol. 48, pp. 657-667, 1986.
- 37) C. C. Winterbourn, "Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species", *Nat Chem Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 278-286, 2008.
- 38) 小方芳郎、田伏岩夫, "過酸化水素による有機物の酸化反応", *有機合成化学協会誌*, vol. 18, no. 6, pp. 368-387, 1960.
- 39) 吉川敏一, *フリーラジカルの科学*, 講談社サイエンティフィク, 1997, p. 14.
- 40) O. M. Panasenko, "Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems", *Biochemistry (Moscow)*, vol. 78, no. 13, pp. 1466-1489, 2014.
- 41) 水上令子、武谷立、住本英樹, "食細胞による微生物の取り込みと殺菌", *蛋白質 核酸 酵素*, vol. 51, no. 2, pp. 109-117, 2006.
- 42) R. A. Cook, W. B. Karesh and S. A. Osofsky, "The Manhattan Principles on "One World, One Health", " Cornell University College of Veterinary Medicine, [Online]. Available: http://www.wcs-ahead.org/manhattan_principles.html. [Accessed 4 12 2019].
- 43) 岩沢篤郎、中村良子, "生体消毒薬の細胞毒性: *in vitro*, *in vivo* における強酸性電解水、ポピドンヨード製剤、グルコン酸クロルヘキシジン製剤、塩化ベンザルコニウム製剤の比較検討", *感染症学雑誌*, vol. 77, no. 5, pp. 316-322, 2003.

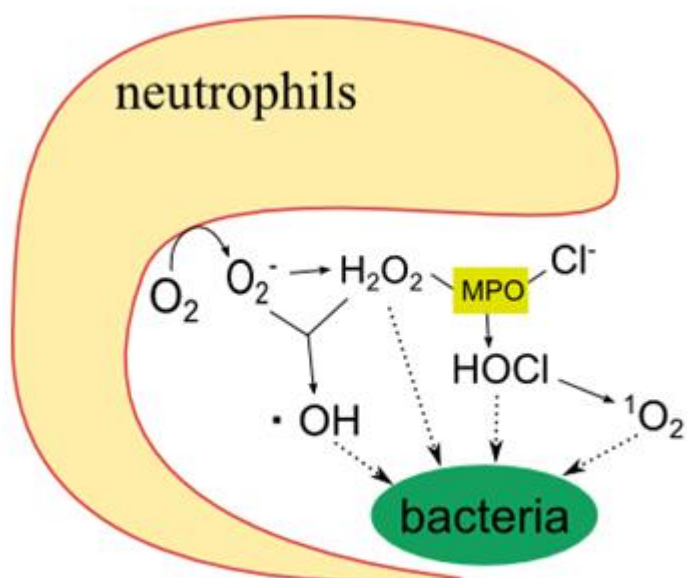


図 1 好中球内の殺菌機構

酸素 (O_2) を還元して生成したスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot -}$) を起点としてヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を介して次亜塩素酸 ($HOCl$)、一重項酸素 (1O_2) が生成され、異物の酸化・殺菌に利用される。

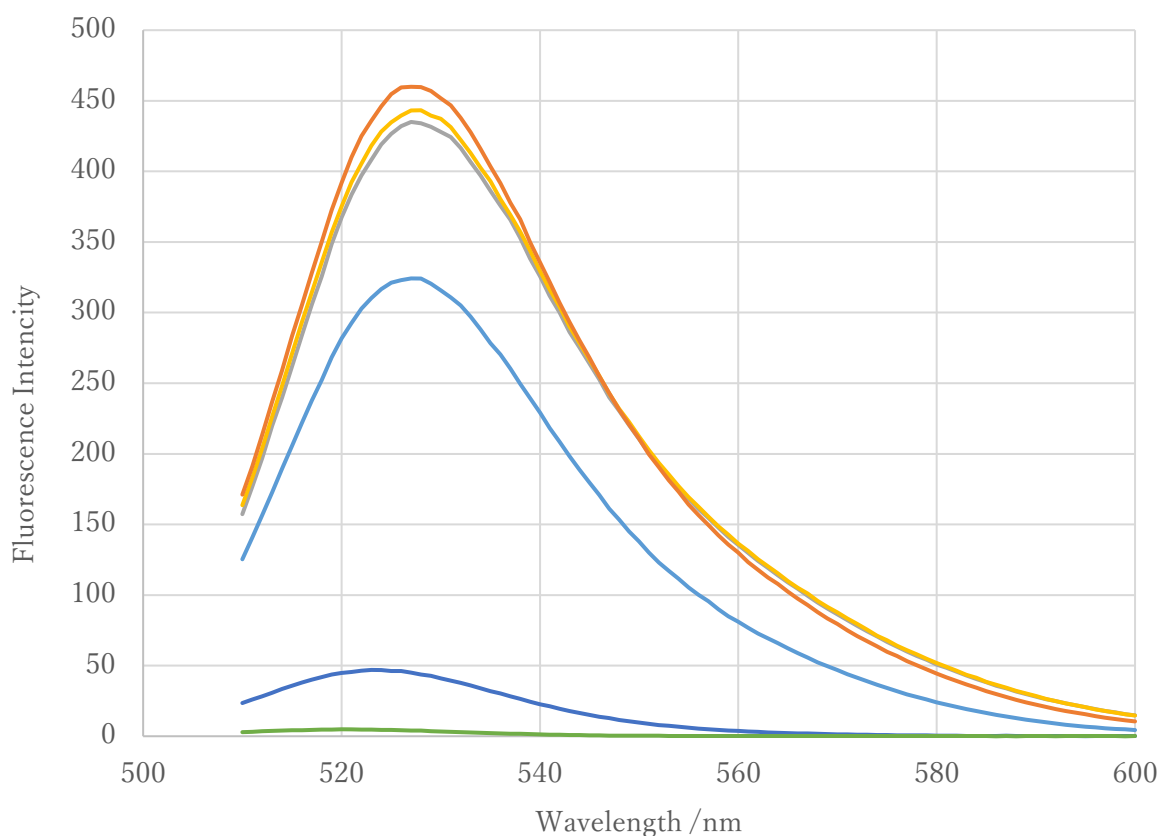


図 2 メチレンブルーへの光照射により発生する一重項酸素と反応した SOSG の蛍光スペクトル

メチレンブルー濃度； 0.0001 % (—)、0.0002 % (—)、0.0005 % (—)、0.001 % (—)、0.005 % (—)、0.01 % (—)

0.0005 % メチレンブルー溶液は 1.87 $\mu\text{mol/L}$ に相当する。種々の濃度のメチレンブルー水溶液に 1 $\mu\text{mol/L}$ となるよう SOSG 溶液を加え、波長 630 nm の LED 光を 1 分間照射して一重項酸素を発生させた後、分光蛍光光度計で励起波長 504 nm として SOSG の蛍光スペクトルを得た。1 cm 角セルを用いた。

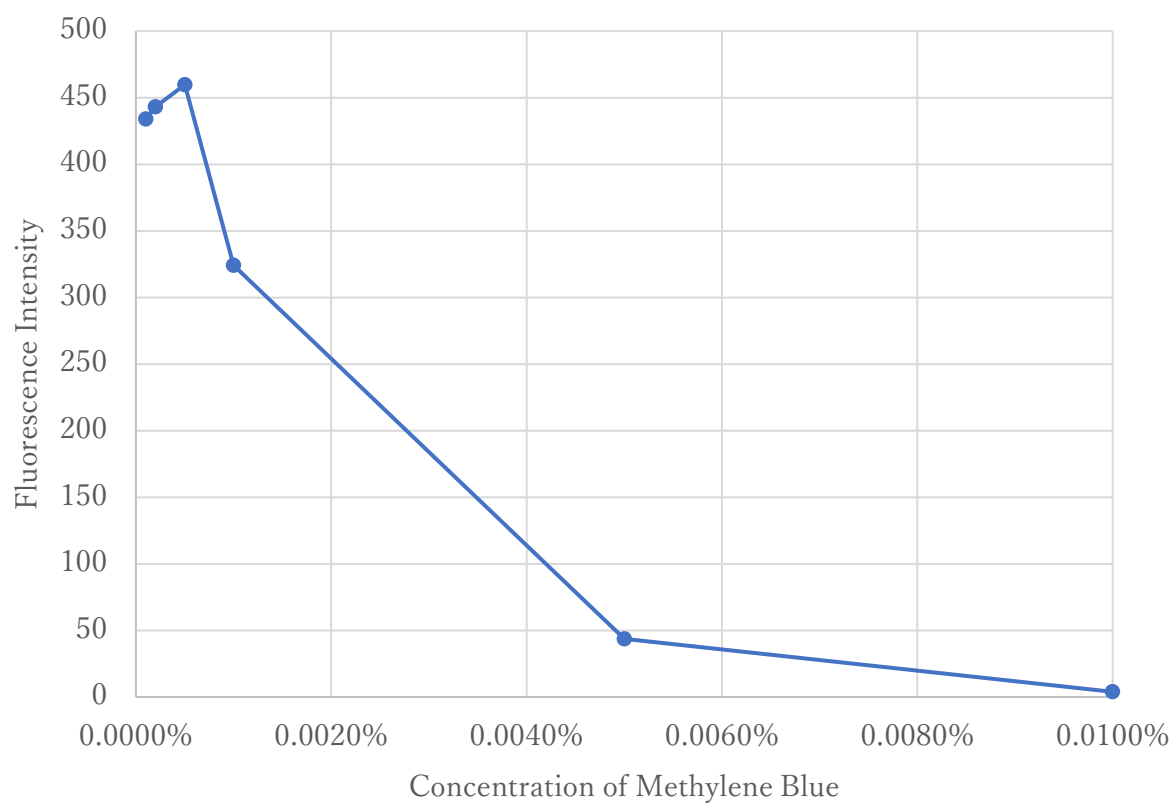


図 3 メチレンブルーの濃度と SOSG からの蛍光強度との関係

図 2 に示した一重項酸素を捉えた SOSG からのスペクトルの 528 nm における蛍光強度をメチレンブルー濃度に対してプロットした。

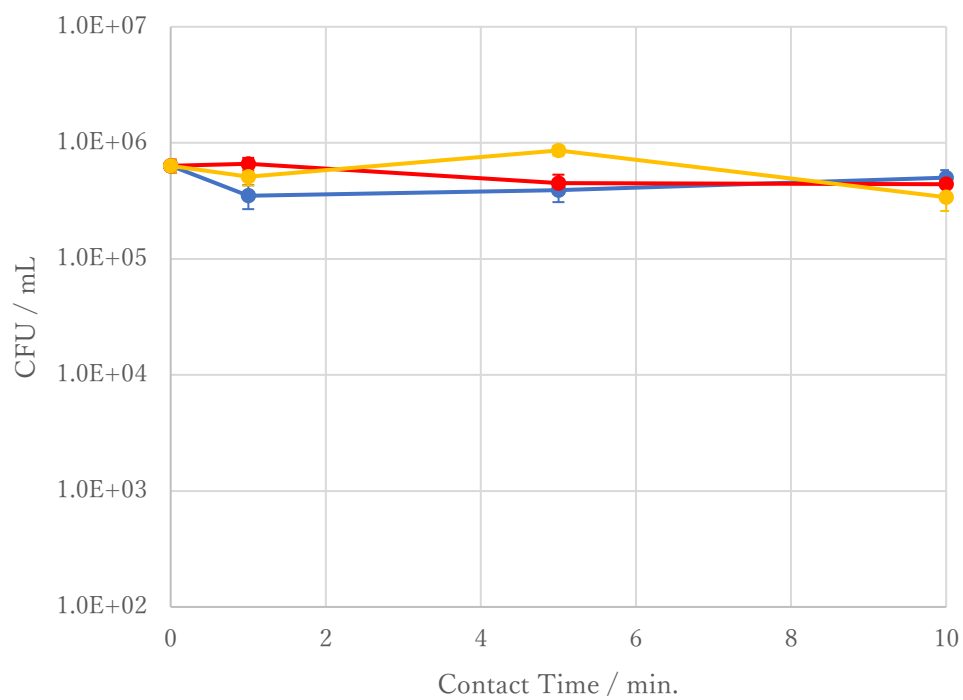


図 4 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する有効塩素濃度 50 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果

pH 3 (●)、pH 6 (●)、pH 9 (●)、エラーバーは SD、n=3

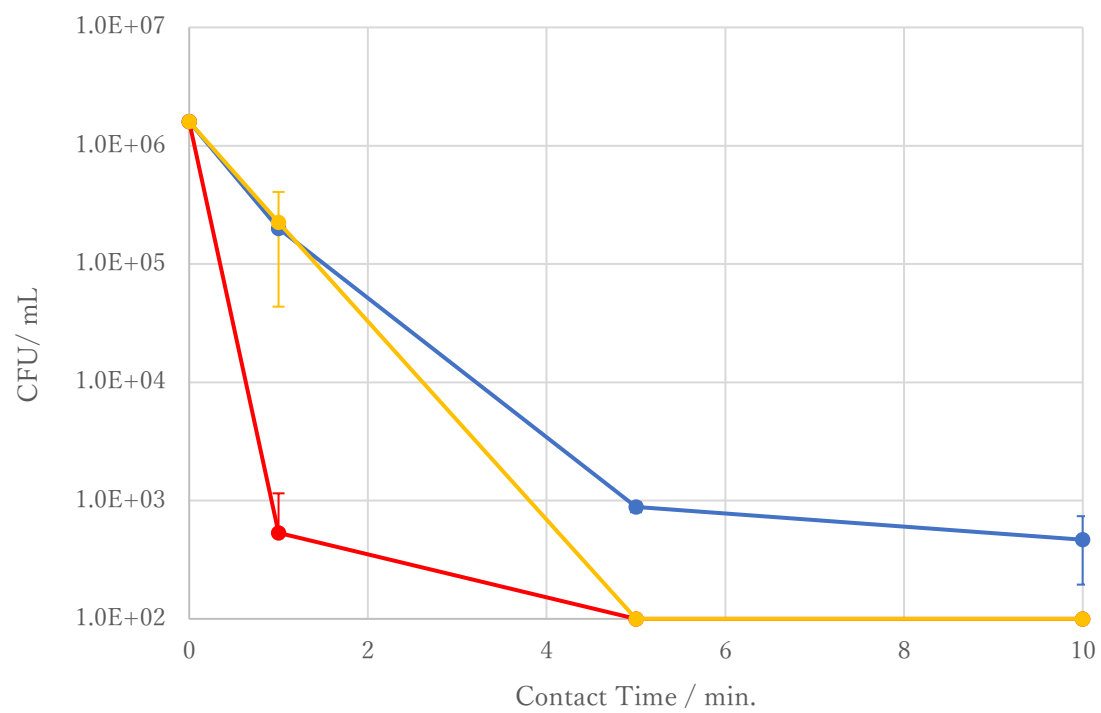


図 5 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する有効塩素濃度 250 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果

pH 3 (●)、pH 6 (●)、pH 9 (●)、エラーバーは SD、n=3

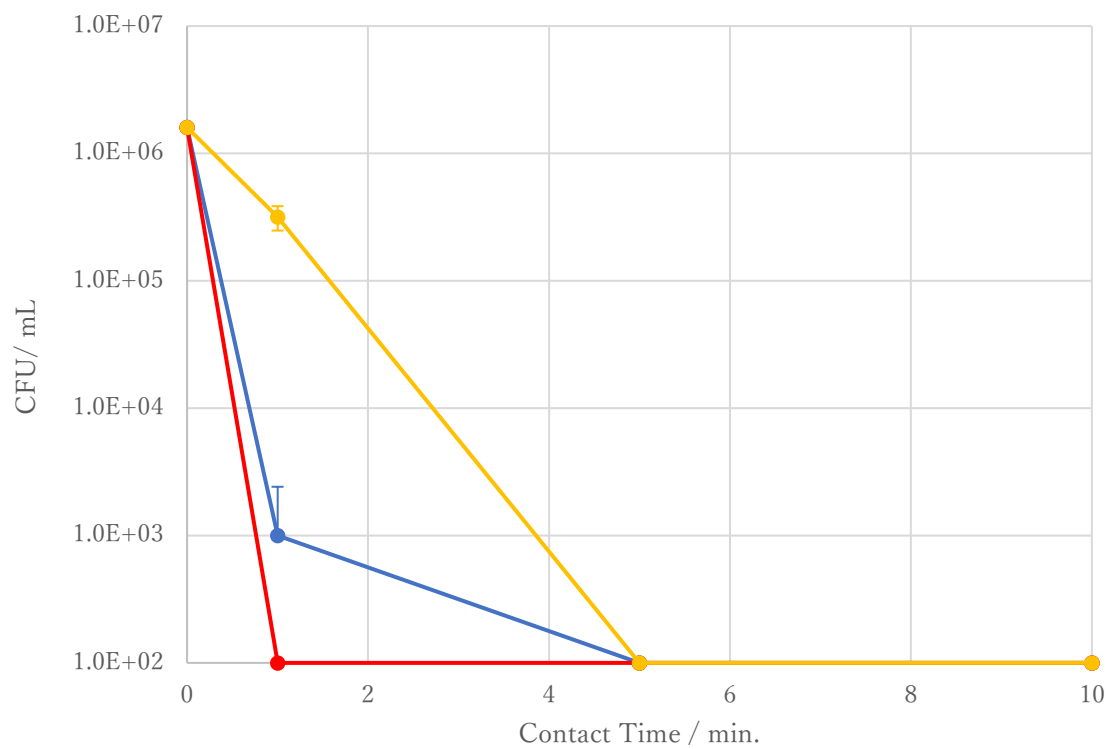


図 6 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する有効塩素濃度 500 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果
pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

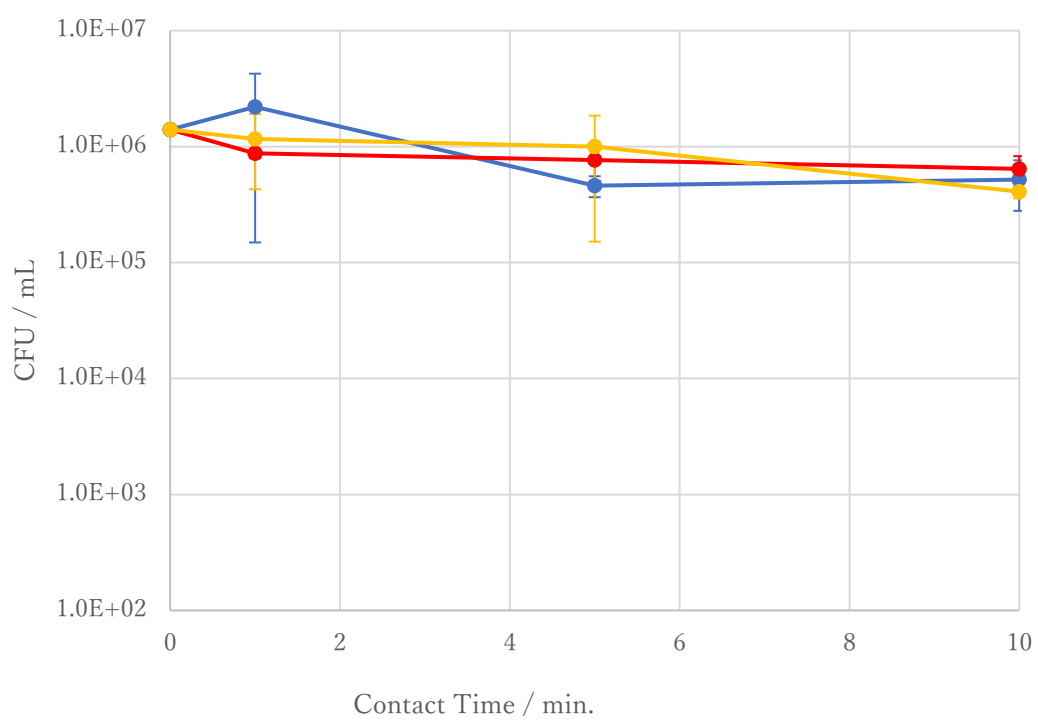


図 7 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対する 1 % 過酸化水素水の殺芽胞効果

pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

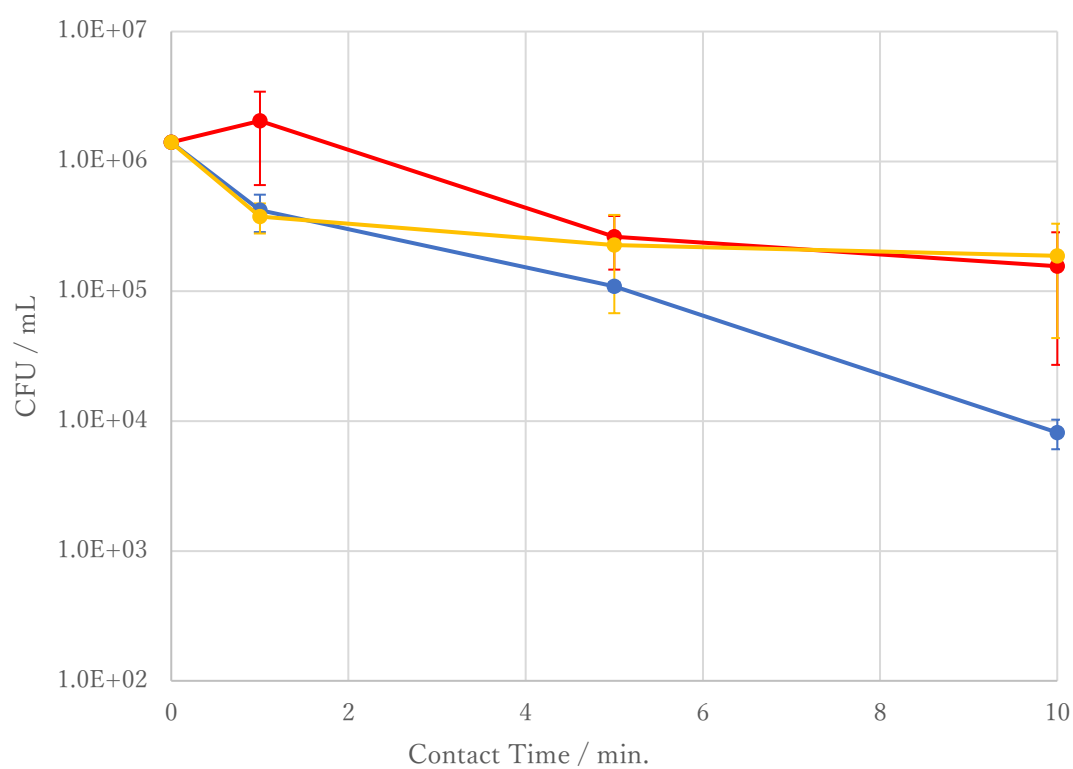


図 8 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する 5 % 過酸化水素水の殺芽胞効果

pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

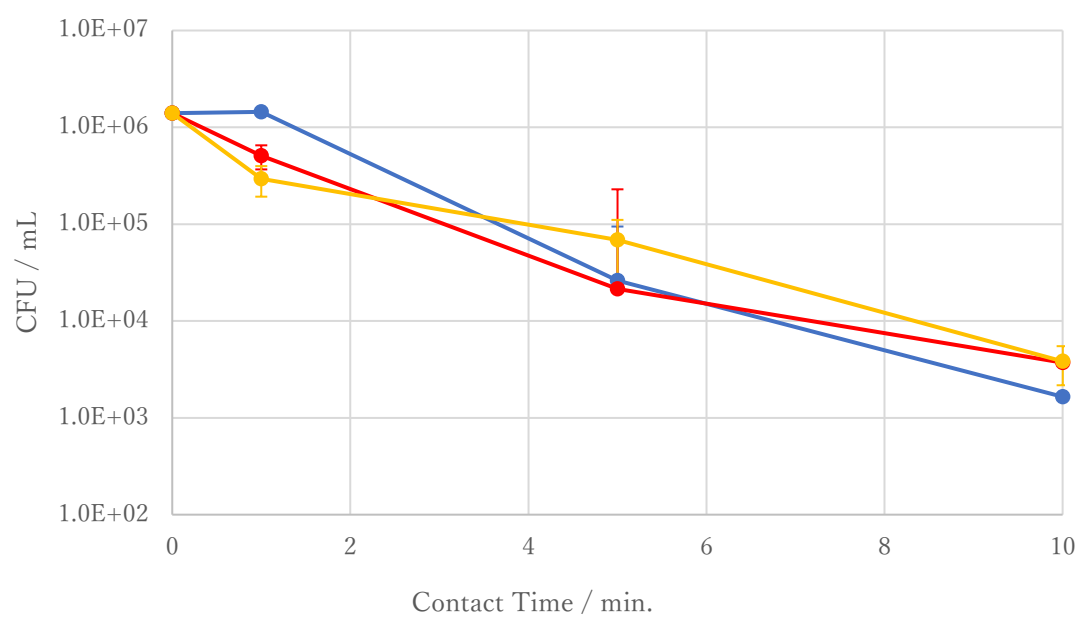


図 9 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対する 10 % 過酸化水素水の殺芽胞効果

pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

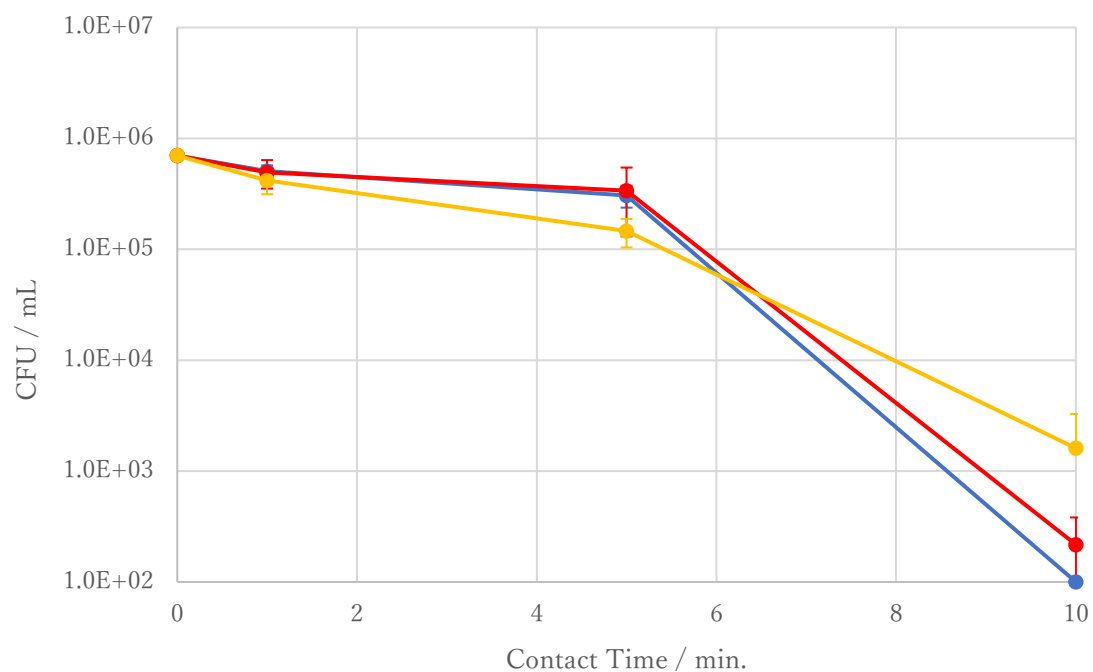


図 10 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対するヒドロキシラジカルの殺芽胞効果

pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

10 % 過酸化水素水溶液に菌液を加え、波長 460 nm の LED 光を照射してヒドロキシラジカルを生成した。

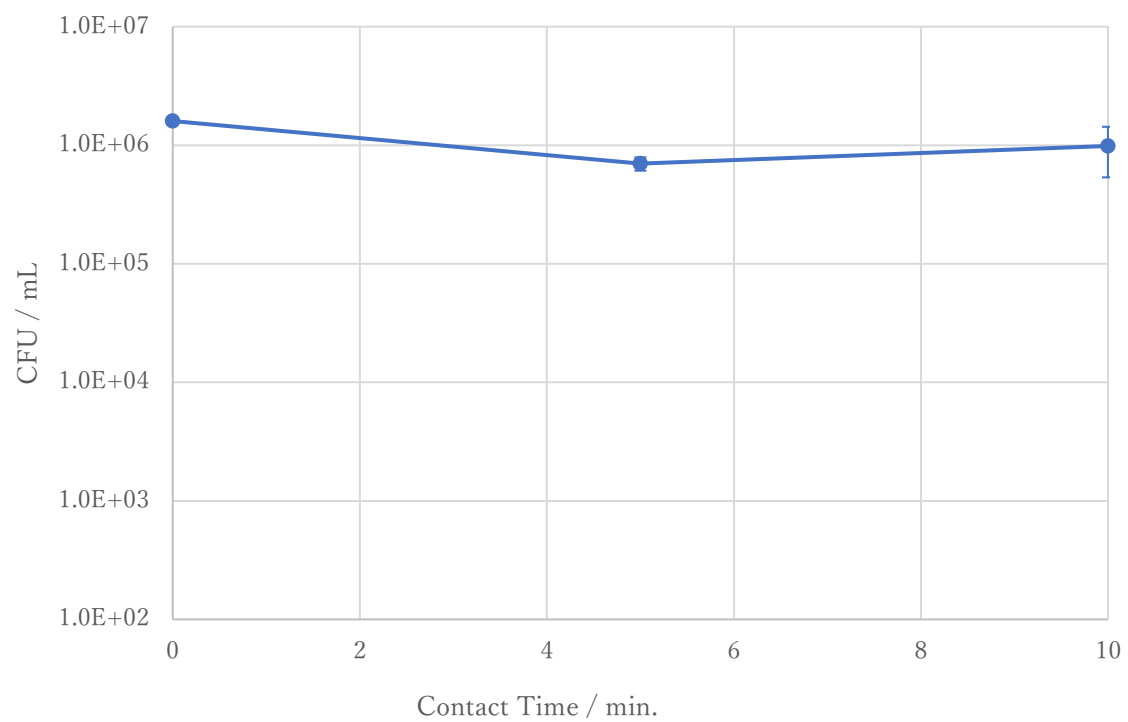


図 11 *Bacillus subtilis* spore に対する 460 nm の LED 光の影響
 Milli-Q®水に菌液を混和し、光照射した。

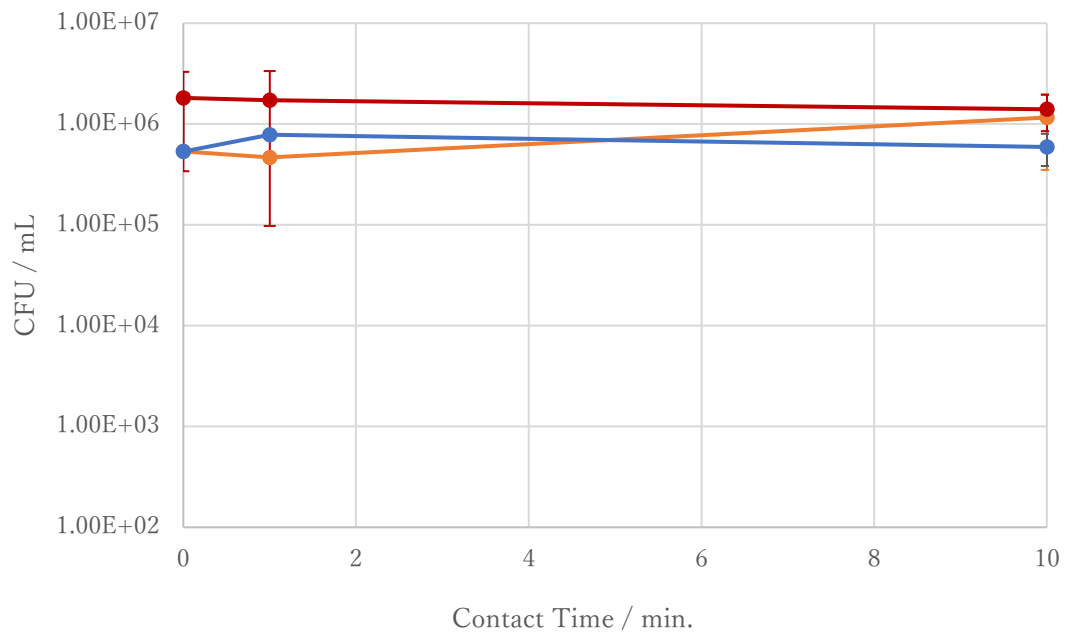


図 12 *Bacillus subtilis* spore に対する一重項酸素の殺芽胞効果

10 $\mu\text{mol/L}$ ローズベンガル試験液を 530 nm の LED 光で励起したもの(—○—)、0.0005 % メチレンブルー (1.87 $\mu\text{mol/L}$) を 630 nm の LED 光で励起したもの(—●—)、10 $\mu\text{mol/L}$ プロトポルフィリン IX を 405 nm の LED 光で励起したもの(—●—)

一重項酸素の発生量は SOSG を用いてモニターした。

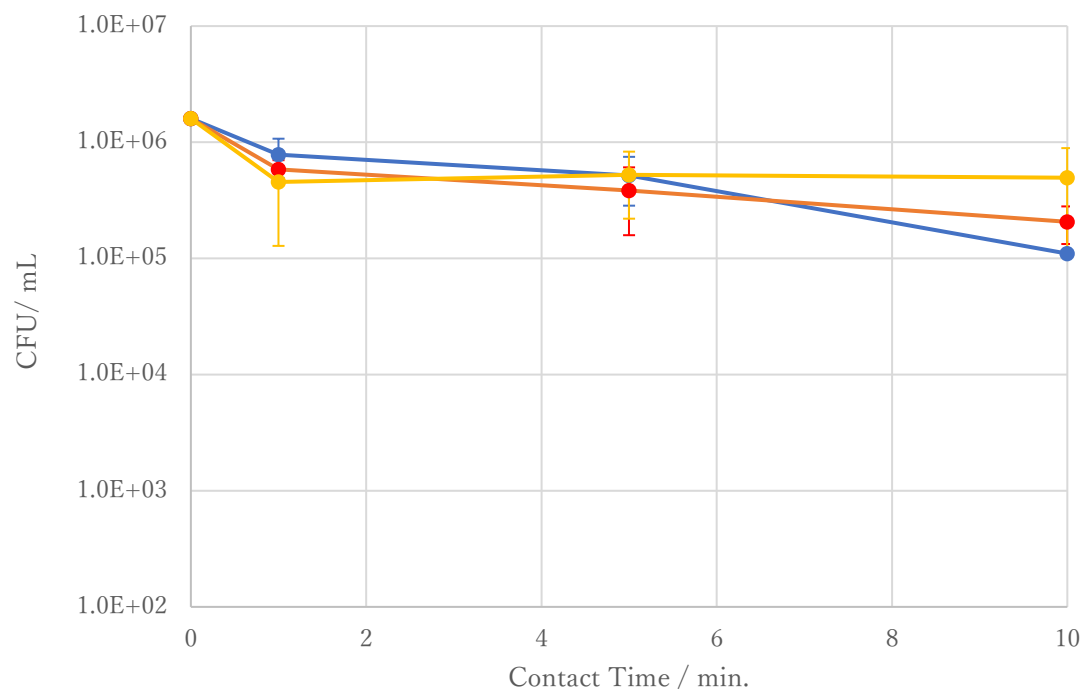


図 13 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する 10 % 過酸化水素を含む ACC 250 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果
pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

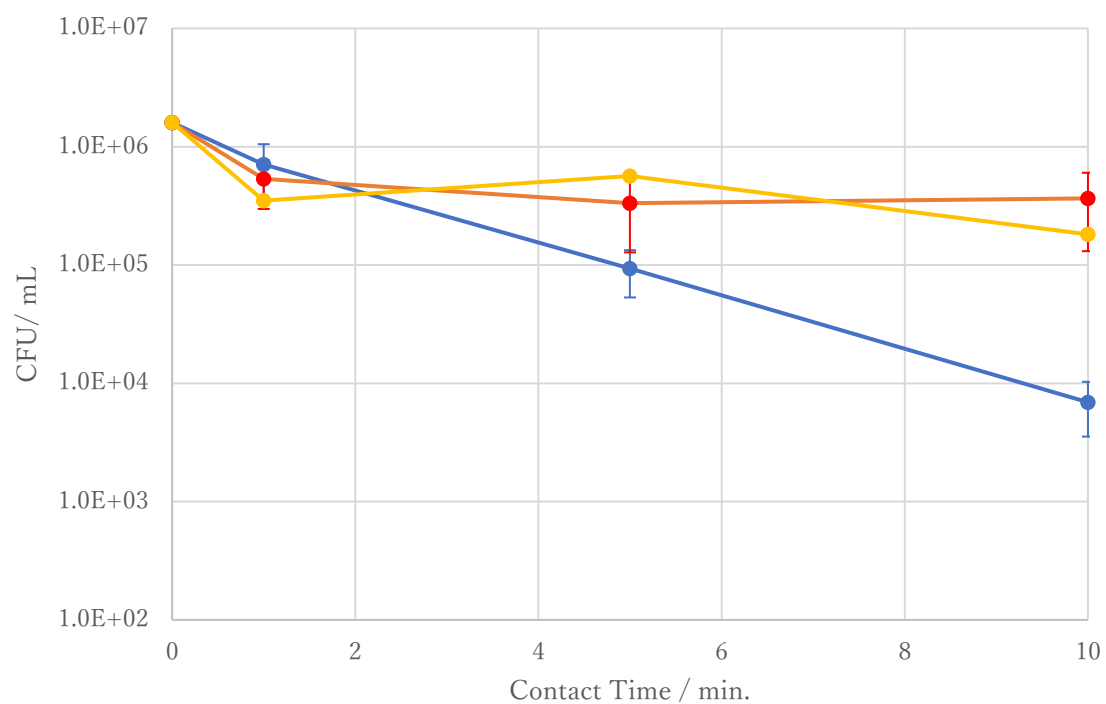


図 14 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対する、10 % 過酸化水素を含む ACC 500 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果
pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

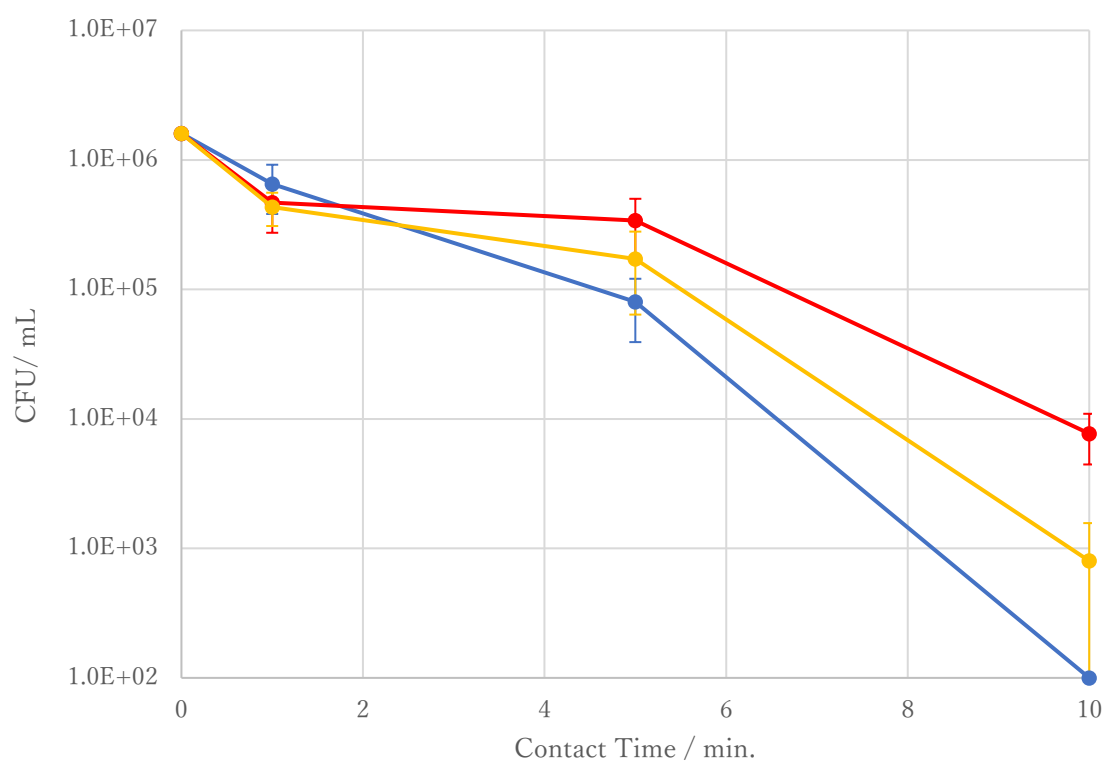


図 15 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対するヒドロキシラジカルを含む ACC 250 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果

pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3

10 % 過酸化水素を含む ACC 250 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に波長 460 nm の LED 光を照射した。

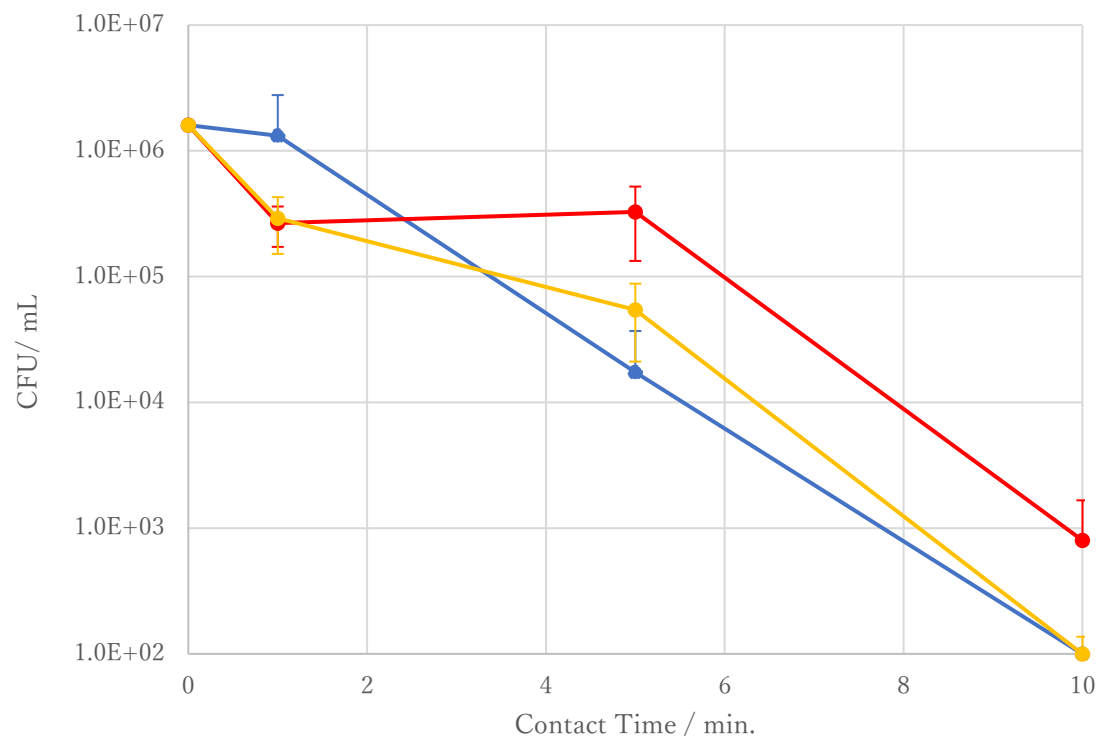


図 16 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対する、ヒドロキシルラジカルを含む ACC 500 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果
 pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、エラーバーは SD、n=3
 10 % 過酸化水素を含む ACC 500 mg/kg の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に波長 460 nm の LED 光を照射した。

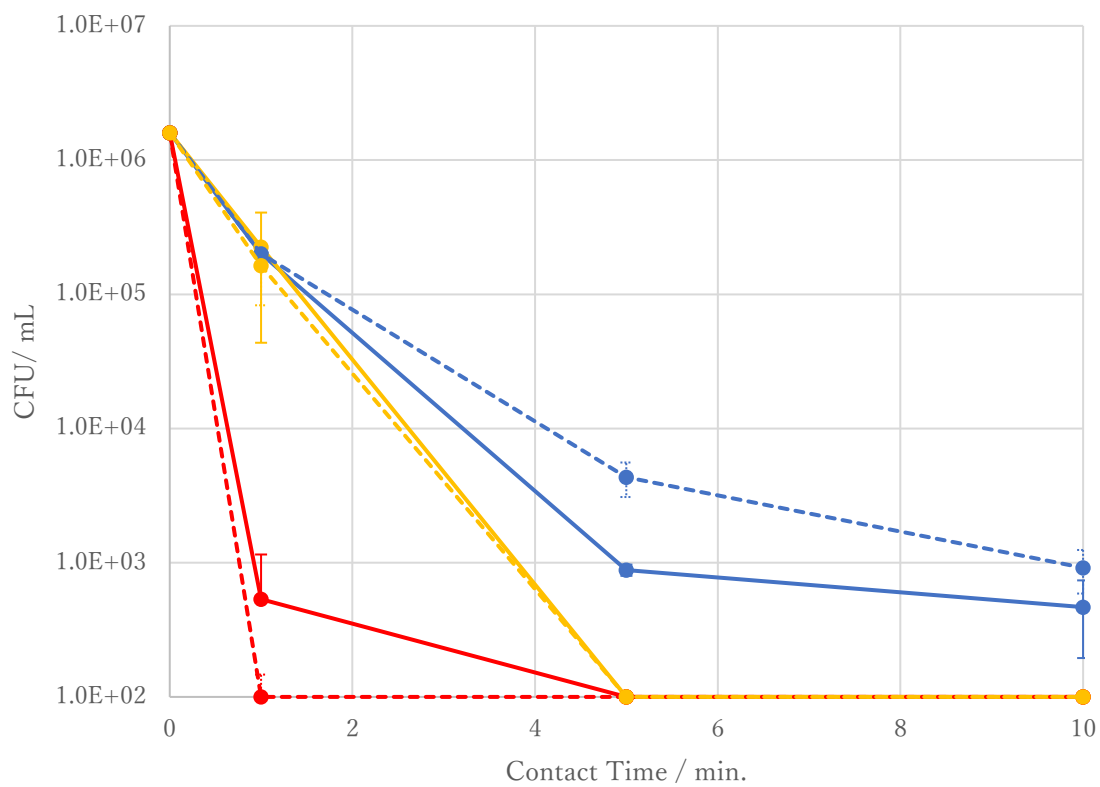


図 17 種々の pH 条件下における、*Bacillus subtilis* spore に対する ACC 250 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果への 460 nm LED 照射の影響

実線： pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、光照射なし、図 5 再掲

破線： pH 3 (---●---)、pH 6 (---●---)、pH 9 (---●---)、光照射あり、エラーバーは SD、n=3

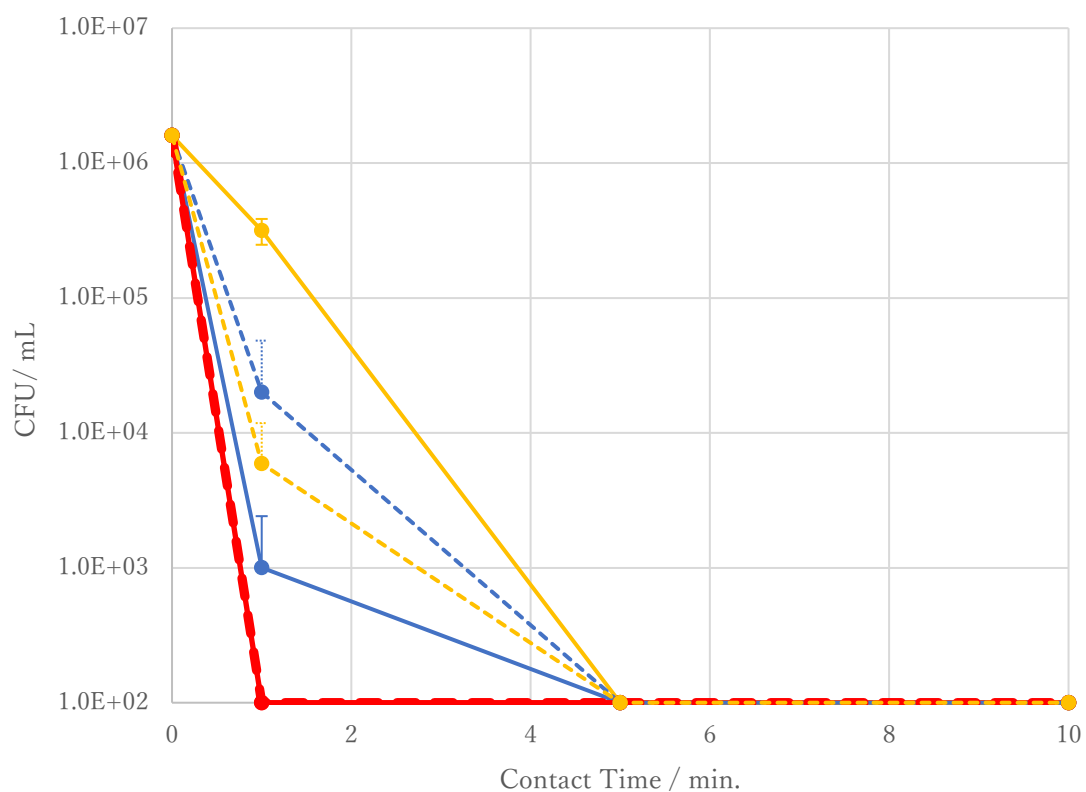


図 18 種々の pH 条件下における *Bacillus subtilis* spore に対する ACC 500 mg/kg 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の殺芽胞効果への 460 nm LED 照射の及ぼす影響

実線: pH 3 (—●—)、pH 6 (—●—)、pH 9 (—●—)、光照射なし、図 6 再掲

破線: pH 3 (---●---)、pH 6 (---●---)、pH 9 (---●---)、光照射あり、エラーバーは SD、n=3

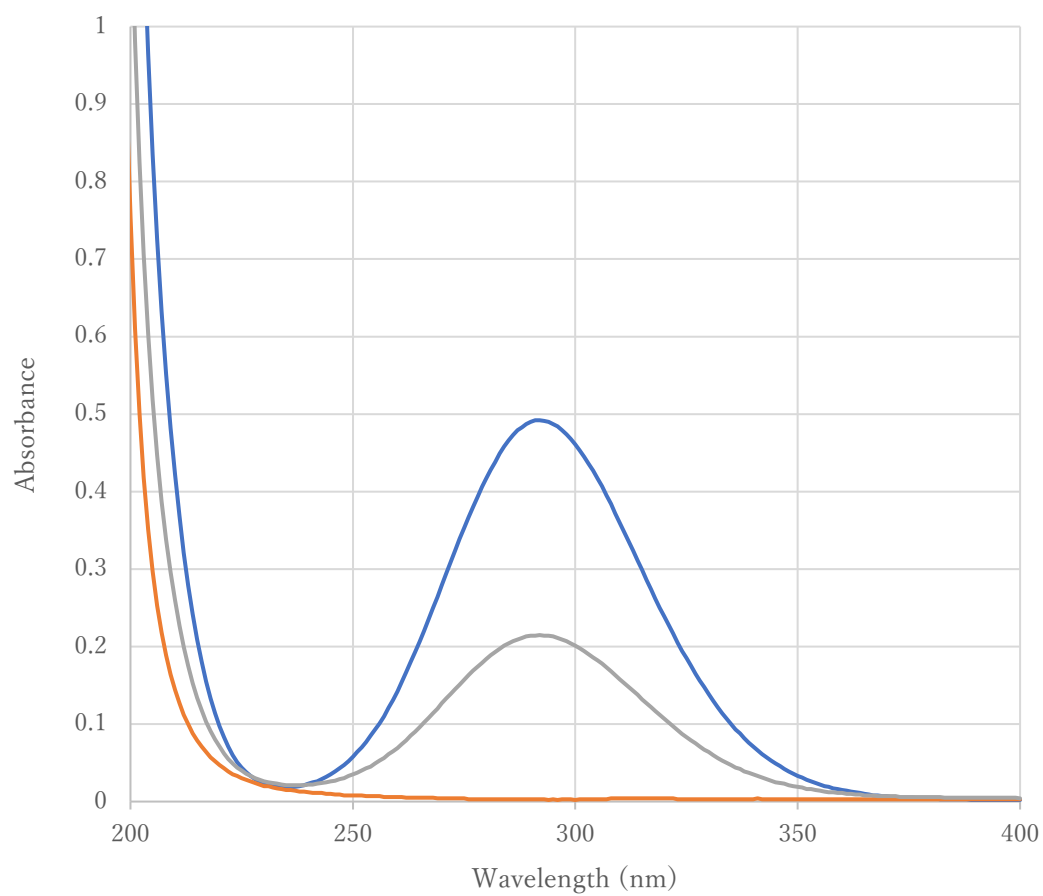


図 19 次亜塩素酸の紫外可視吸収スペクトルへの過酸化水素の影響

1.2 mmol/L NaClO (—)、1.2 mmol/L NaClO + 0.6 mmol/L H₂O₂ (—)、1.2 mmol/L NaClO + 1.2 mmol/L H₂O₂ (—)

1.2 mmol/L NaClO は ACC 90 mg/kg に相当。0.6、1.2 mmol/L 過酸化水素水はそれぞれ 20、40 mg/kg に相当する。

表

表 1. 化学種が持つ殺菌効力に関与する特性

化学種	酸化還元電位 (1 電子あたり)	芽胞殻への作用	膜透過性	生体内寿命
次亜塩素酸	+1.611 V	破壊 ³⁴⁾	あり	長い
過酸化水素	+0.888 V	外層には作用せず 内層には作用する ³³⁾	あり	長い (4 ms)
ヒドロキシル ラジカル	+2.33 V	破壊できる	?	短い (8 ns)
一重項酸素	+0.65 V	破壊できない	?	短い (4 μs)

Abstract

Title The evaluation of the sporicidal mechanisms of oxidants used by neutrophils, mainly hypochlorous acid

Ryotaro Tsunekawa

Division of Infection Prevention and Control, Department of Healthcare, Postgraduate School of Healthcare, Postgraduate School, Tokyo Healthcare University

BACKGROUND. Neutrophils, a type of white blood cells, provide biological protection by capturing foreign substances, destroying or decomposing the foreign substances with oxidants generated by themselves. Hypochlorous acid and reactive oxygen species are examples of oxidants that are said to be produced and used by neutrophils. These oxidants are used as disinfectants in many places for human health and hygiene, including medical care. Hypochlorous acid solution, one of these oxidants, is widely used because of its wide sterilization spectrum, low cost and easy handling. Furthermore, many commercially available disinfectants are adjusted for pH or supplemented with various stabilizers in order to improve the bactericidal efficacy and drug stability. However, the sterilization mechanisms by these oxidizing agents still have many unclear points both *in vivo* and *in vitro*.

OBJECTIVE. The objective is to understand better the disinfection mechanisms of disinfectants with reference to the disinfection mechanism of neutrophils. This will help to develop more efficient and safer disinfectants for organisms or the environments and improve public health. The development of better disinfectants will refine infection control, including measures against hospital-acquired drug-resistant bacteria.

METHODS. *Bacillus subtilis*, a spore-forming bacterium with high drug resistance, was used. Hypochlorous acid was used by diluting sodium hypochlorite with pure water. Hydrochloric acid or sodium hydroxide were used to adjust pH to 3, 6 and 9. Hydroxyl radicals were generated by irradiation of light to hydrogen peroxide water. Singlet oxygen was generated by irradiation of light to photosensitive materials.

RESULTS. Hypochlorous acid showed the fastest sporicidal effect on *B. subtilis* spore. Hydroxyl radical took more than 10 minutes to show the sporicidal effect. These sporicidal effects were affected by pH. Hydrogen peroxide and singlet oxygen showed no sporicidal effect regardless of pH in 10 minutes contact. The sporicidal effect has diminished when hypochlorous acid and other oxidizing agents were used in combination.

CONCLUSIONS. The sporicidal mechanism of hypochlorous acid may be attributed to its penetrance into spores to destroy them. Moreover, the sporicidal effect was attenuated by the

combined use of other oxidants, suggesting that there is some selection mechanism for the chemical species when used in the neutrophil sterilization. It was suggested that hypochlorous acid plays a central role in the neutrophil bactericidal mechanism and useful disinfectants for the sustainability.

付録

本論文の結論から得た、社会通念上留意すべきと思われる事項を記述する。

殺菌消毒剤を使用する現場において、使用者の安全と被殺菌対象物の清浄を同時に担保するために、使用される殺菌消毒剤の特性を使用者に周知徹底することが重要と考えられた。米国疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention : CDC) の「医療施設における消毒と滅菌のガイドライン⁴⁴⁾」では本論文で使用した過酸化水素と同じ 10% 過酸化水素は、 10^6 の *Bacillus species spore* を 60 分間の作用によって完全に殺滅できるとし、7.5 % 安定化過酸化水素がクリティカル器具に使用できる高水準消毒薬に指定されている。一方、本論文では、酸化剤の併用が殺芽胞効果を減じる例が示された。次亜塩素酸と過酸化水素は化学反応し、双方の殺芽胞効果を減弱した。より高い殺菌効果を求めて複数の薬剤をやみくもに同時使用することは必ずしも求める結果を導かない。それぞれの薬剤の特性を理解した上で利用することが肝要であることが改めて示された。

病原微生物制御に、副次作用を最大限抑え、目的箇所の殺菌のみを行うことができる方法を用いることは、持続可能な開発目標にも合致するところである。持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals, SDGs)⁴⁵⁾ は 2015 年 9 月の国連サミットで採択されたもので、国連加盟 193 か国が 2016 年から 2030 年の 15 年間で達成するために掲げた目標である。17 の目標、169 のターゲット、さらにその下に 232 の指標があり、加盟国はこれらを自らモニタリングし自分たちで報告をしていくという点で、非常に主体的で力強い宣言であるといえる。目標の 3 には「あらゆる年齢のすべての人々の健康的な生活を確保し、福祉を促進する」があり、この下のターゲット 3.3 には「2030 年までに、エイズ、結核、マラリア及び顧みられない熱帯病といった伝染病を根絶するとともに肝炎、水系感染症及びその他の感染症に対処する。」と謳われている。また目標の 12 には「持続可能な生産消費形態を確保する」が設定され、その下のターゲット 12.4 には「2020 年までに、合意された国際的な枠組みに従い、製品ライフサイクルを通じ、環境上適正な化学物質や全ての廃棄物の管理を実現し、人の健康や環境への悪影響を最小化するため、化学物質や廃棄物の大気、水、土壌への放出を大幅に削減する。」と明示されている。医療における感染制御のみならず、農業、畜産業、食品加工業においても、SDGs を念頭において殺菌剤を選択し利用することの重要性は高まっているといえる。また、本論文の範囲内では *B.subtilis spore* に対して殺芽胞効果が見られなかった一重項酸素も、光線力学療法や歯科への応用のための検討^{24, 25)} から、適用対象によっては有効に作用することが明らかになっている。その目的に応じて最適な殺菌剤の選択がなされることが重要であると考えられた。

これらのことを前提としつつ、次亜塩素酸を利用促進、有効利用していくことは感染制御のみならず環境保護の観点からも有用であると考えられる。次亜塩素酸は殺菌効率が高いため、比較的少量の使用で多くの目的を達成できると期待される。さらに目的の箇所の殺菌のみを行い、予期しない副反応を抑制できれば、環境への放出、蓄積による悪影響も最小限にとどめられる可能性が高い。

ヒトが自然から享受している恩恵は、発酵食品をはじめ微生物の関与するところが大きい。それと同時に自然から受ける最大の脅威の一つが細菌やウイルスなどの病原微生物である。また近年では、体内、とくに腸内に共生する細菌の働きが私たちの免疫や健康、神経や脳の働き、ひいて

は行動にまで影響することが明らかになって来ている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。近い将来、腸内細菌叢に介入することによって、医学、農畜産業により深く関与できる可能性がある。いずれも、微生物制御の知見が医療や環境など幅広い分野に貢献できることの証左であると考えられた。

付録 引用文献

- 44) CDC, "Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008)," 2008. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf>. [Accessed 11 1 2020].
- 45) 総務省, “持続可能な開発目標 仮訳”, 2019, [Online]. Available: https://www.soumu.go.jp/main_content/000562264.pdf. [Accessed: 21 12 2019].
- 46) S. Reardon, "Gut-brain link grabs neuroscientists", *Nature*, vol. 515, pp. 175-177, 2014.
- 47) W. D. Kang, "Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children", *PLoS ONE*, vol. 8, e68322, 2013.
- 48) R. D. Heijtz, "Normal gut microbiota modulates brain development and behavior", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 108, no. 7, p. 3047-3052, 2011.