

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

緑膿菌バイオフィルムの初期形成過程における  
消毒剤のバイオフィルム形成と  
生菌の代謝活性の抑制効果の検討

2019年度入学

2023年3月15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 HD019002 氏名 菊地原 紀裕

研究指導教員 木村 哲

副研究指導教員 松村 有里子、岩澤 篤郎

論文題目	緑膿菌バイオフィルムの初期形成過程における消毒剤のバイオフィルム形成と生菌の代謝活性の抑制効果の検討
氏名	菊地原 紀裕
所属	東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 感染制御学領域 博士課程
助成金	なし
供試薬	供試薬オキシライトは所属企業シーバイエス株式会社より提供を受けた

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  
博士論文 要旨

緑膿菌バイオフィルムの初期形成過程における消毒剤の  
バイオフィルム形成と生菌の代謝活性の抑制効果の検討

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 HD019002  
氏 名 菊地原 紀裕

### 背景

バイオフィルム形成能を有するグラム陰性桿菌は、水回り等の湿潤環境で担体表面に可逆的に付着し、コロニー形成をしていく過程の中で細胞外高分子物質（**Extracellular polymeric substances : EPS**）が産出され、3次元的な構造体であるバイオフィルムを形成する事で消毒薬に対する抵抗性を獲得するため、化学的作用では除去は困難とされている。これまでに担体表面への可逆的な付着からマイクロコロニー形成に至るバイオフィルム形成の初期過程に対する消毒薬の効果を検討した報告例はほとんどない。

### 目的

バイオフィルム形成の初期過程における過酸化水素（ $H_2O_2$ ）、加速化過酸化水素（**Accelerated hydrogen peroxide : AHP**）、次亜塩素酸ナトリウム（**NaOCl**）および塩化ベンザルコニウム（**Benzalkonium Chloride : BZC**）の影響について、バイオマスとバイオフィルム内に生存する細菌の代謝活性の抑制効果を検討する。

### 方法

緑膿菌はバイオフィルム形成能の高い *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を用い、予めプレ培養を行いバイオフィルムを形成させたものに  $H_2O_2$ 、AHP、NaOCl、または BZC を作用させた。バイオマスは **Biofilm Formation Assay Kit** を用いて、また、バイオフィルム内の生菌の代謝活性は **Biofilm Viability Assay Kit** を用いて評価した。

### 結果及び考察

*P. aeruginosa* は、培養 1 時間までは **Surface naive** な細菌と **Surface sentient** な細菌が共存し、培養 3 時間まではバイオフィルム形成量は微量であった。培養 3 時間から 6 時間では **Surface sentient** な細菌が担体表面に不可逆的に付着する確率が高くなり、培養 6 時間までにマイクロコロニーが形成され、培養 6 時間以降でバイオフィルム形成が加速された。

$\text{H}_2\text{O}_2$  と AHP は、1 時間または 3 時間プレ培養した後に作用すると、バイオフィルム形成とバイオフィルム中の生菌の代謝活性の双方に抑制効果を示したが、6 時間のプレ培養後に作用すると、バイオフィルム形成を抑制しないものの代謝活性には抑制効果を示した。BZC はバイオフィルム形成抑制効果は弱かったが、バイオフィルム中の生菌の代謝活性に対して強い抑制効果を示した。NaOCl はバイオフィルム形成にもバイオフィルム中の生菌の代謝活性に対しても抑制効果を示さなかった。

## 結論

バイオフィルム形成の初期過程において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と AHP はプレ培養 3 時間まではバイオフィルム形成を抑制したことから、汚染後 3 時間以内であればバイオフィルムの形成を抑制し、マイクロコロニー内の生菌に対する代謝抑制効果を示すと考えられた。

## キーワード (Key Words)

バイオフィルム (Biofilm)、バイオフィルム初期形成過程 (Early stage of biofilm formation)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、バイオマス (Biomass)、代謝活性 (Viability)

## 目次

1. 序論	1
2. 実験方法	2
2.1 材料	
2.2 緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果	
2.3 バイオフィーム形成時の緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果	
2.4 緑膿菌の培養時間とバイオマスの関係	
2.5 バイオフィーム形成過程における消毒剤の抑制効果	
2.6 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に対する消毒剤の効果	
2.7 消毒剤の添加量がバイオフィーム形成に及ぼす影響	
2.8 消毒剤の添加量がバイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に及ぼす影響	
3. 結果	5
3.1 緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果	
3.2 バイオフィーム形成時の緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果	
3.3 緑膿菌の培養時間とバイオフィーム形成	
3.4 バイオフィーム形成過程における消毒剤の抑制効果	
3.5 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に対する消毒剤の効果	
3.6 消毒剤の添加量がバイオフィーム形成に及ぼす影響	
3.6.1 消毒剤によりバイオフィーム形成が 50%以上抑制されたもの	
3.6.2 消毒剤によりバイオフィーム形成が 90%以上抑制されたもの	
3.7 消毒剤の添加量がバイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に及ぼす影響	
3.7.1 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性が 50%以上抑制されるもの	
3.7.2 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性が 90%以上抑制されるもの	
4. 考察	10
5. 結論	13
6. 謝辞	14
7. 引用文献	15
表及び図	17
Abstract	33

## 1. 序論

医療環境では、環境表面に様々な微生物が数か月から1年以上の長期間に渡り生存する事が知られており<sup>1)</sup>、その中でも、水回りを介する医療関連感染は、*Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter baumannii* 等のグラム陰性桿菌の微生物が手洗いシンクや浴室等の湿潤環境を温床として分布し、微生物のリザーバーとなることから<sup>2)</sup>、患者あるいは医療従事者の手指を通じて水平伝播する事が課題となっている<sup>3)</sup>。これらの細菌は、湿潤環境において基材表面にバイオフィルムを形成する性質を有している事から長期間生存し、また、多剤耐性緑膿菌(multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP)<sup>4)</sup> や多剤耐性アシネトバクター属菌(multiple drug-resistant *Acinetobacter*, MDRA)<sup>5)</sup>、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(Carbapenem-resistant *Enterobacterales*: CRE)<sup>6)</sup>等の薬剤耐性菌が検出されたとの報告もある。湿潤環境の中でも手洗いシンクを介したアウトブレイクの報告例は多く<sup>4,7-11)</sup>、院内感染の防止には水回りの感染対策が重要である。

手洗いシンク等の水回りの感染防止には化学的作用として清掃用の消毒薬である次亜塩素酸製剤、アルコールや低水準消毒薬が使用されている。しかし、バイオフィルムが形成された箇所では、これらの消毒剤等への抵抗性が高まり化学的作用では除去が出来ないことがある。また、物理的作用として熱水洗浄や高圧洗浄等による除去があるが、専門業者による作業となる事やシンクや配管によっては使用に制約が生じる事がある。それでもアウトブレイクが終息しない場合は、蛇口や配管、シンク等の交換する対策が講じられることがある。これらから、バイオフィルムが形成されて除去が困難となる前の初期形成過程において、化学的作用による汚染除去が可能となれば、水回りを介した医療関連感染の低減につながる事が期待される。

環境表面の消毒については、国内外のガイドラインで用途に合わせて希釈倍率が示されている。消毒と滅菌のガイドライン<sup>12)</sup>では、次亜塩素酸ナトリウムは、環境表面の消毒には200 ppmやウイルスや嘔吐物の消毒では1,000 ppmと定められており、また、塩化ベンザルコニウムは0.2%と示されている。米国疾病予防管理センターの医療施設における消毒と滅菌のためのガイドライン2008年版(2019年一部改訂)には、過酸化水素が高い殺菌活性を示す事が記載され、さらに、過酸化水素をベースに界面活性剤などを配合する0.5%加速化過酸化水素(Accelerated hydrogen peroxide: AHP)が1分間の作用で殺菌活性およびウイルス不活化効果を有し、5分間の作用で殺抗酸菌活性と殺真菌活性を有することが報告されている<sup>13)</sup>。また、過酸化水素に陰イオン界面活性剤や非イオン界面活性剤等の界面活性剤を含むことで、同濃度の過酸化水素単体よりも殺菌効力に相乗効果を示し、5%のウシ血清が添加された*P. aeruginosa*や*Acinetobacter baumannii*、薬剤耐性菌に対して1分間の作用で対数減少値 $>6$ の殺菌効力が示されている<sup>14)</sup>。また、2013年には日本手術医学会の手術医療の実践ガイドライン(2013年改訂版)<sup>15)</sup>にAHPを局所的な手術室の環境整備に使用することが記載され、2019年に発行された改定第三版<sup>16)</sup>においても記載が継続されている。

バイオフィルム形成は、シンクや配管などの担体表面へのSurface naiveな細菌の可逆的な付着から始まり、付着と脱離を繰り返す過程で環状アデノシンリン酸(cyclic adenosine monophosphate: cAMP)レベルが増加し担体表面に不可逆的に付着する<sup>17)</sup>。付着

した細菌は、数時間をかけてコロニーを形成していく過程の中で細胞外多糖類や細胞外タンパク質、細胞外DNA等から成る細胞外高分子物質(Extracellular polymeric substances: EPS) が産生され、ウォーターチャンネルと呼ばれる水路となる空間と併せて3次元的な構造体が形成される。バイオフィルムの構成は、細菌の種類や環境条件によって変わり、3割は菌体で7割以上はEPSで構成される。さらに時間の経過により成長を続けマッシュルーム状の形態となり、環境が変化するとマッシュルーム状のバイオフィルムの一部が脱離し、別の場所に新たなバイオフィルムを形成していく<sup>18,19)</sup>。EPSは、細胞間の接着や基材表面への付着、バイオフィルムの粘着化、水の保持、外的要因からの保護バリア、有機化合物や無機イオンの吸収等の機能を有している<sup>20,21)</sup>。

医療施設の医療関連感染のリザーバーとなる水回りにおいて、細菌の温床となるバイオフィルムの制御は重要と考えるが、完全に除去する事は困難であるため、施設内で日常的あるいは定期的な作業を行う中で、バイオフィルムの形成を遅延させる事は、感染リスクを低減するために有効であると考えられる。バイオフィルムの形成については、様々な研究が報告されており、バイオフィルムが形成された事に関する多くの報告例があるが、形成初期過程についての消毒薬の効果を検討した報告はほとんどない。

本研究では、バイオフィルムに関する研究が報告されている *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を用いてバイオフィルム形成過程を明らかにし、バイオフィルムの形成初期過程における消毒剤の効果について、形成量からバイオフィルムの形成に及ぼす影響を検討し、併せてバイオフィルム中の生菌の代謝活性量を検討することで、バイオフィルム形成初期過程における消毒薬の効果を検討することを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 材料

消毒剤の殺菌効力試験に用いた培地として、Soybean-Casein Digest (SCD) 寒天培地「ダイゴ」(一般細菌用、富士フィルム和光純薬) またはレチシン・ポリソルベート含有 SCD 寒天培地 (SCDLP 培地、富士フィルム和光純薬株式会社) から自家調整したものをを用いた。過酸化水素の中和剤にはカタラーゼ (ウシ肝臓由来、生化学用、和光純薬工業株式会社) を、次亜塩素酸ナトリウムにはチオ硫酸ナトリウム (ナカライテスク株式会社) をを用いた。Trypticase Soy Broth (TSB) 培地は、Trypticase™ Soy Broth (日本 BD) から自家調整したものをを用いた。試験菌株として *P. aeruginosa* ATCC27853 を用い、殺菌効力試験には対数増殖期にあるコロニーを釣菌して滅菌水で約  $10^8$  CFU/mL の菌懸濁液に調整したものをを用い、バイオフィルム形成と生菌の代謝活性の試験には TSB 培地で約  $10^6$  CFU/mL に調整した菌懸濁液を用いた。過酸化水素 (Hydrogen peroxide:  $H_2O_2$ ) は、35%過酸化水素 (株式会社 ADEKA) を純水 (共栄製薬株式会社) で 0.5%、1%、3% に希釈して用い、加速化過酸化水素 (Accelerated hydrogen peroxide: AHP) は 0.5%過酸化水素を含有するオキシライト® (シーバイエス株式会社) を用いた。塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride: BZC) はオスバン S® (日本製薬株式会社) を純水で 0.2% に希釈し、次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) は 12%次亜塩素酸ナトリウム (南海化学株式会社) を純水で 200 ppm と 1,000 ppm に希釈して用いた。過酸化水素と次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウムは、

中水準あるいは低水準消毒剤に分類され、加速過酸化水素は消毒剤には分類されない除菌剤となるが、本研究では便宜上これらの消毒剤と除菌剤を総称して消毒剤として取り扱うこととした。

## 2.2 緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果

各消毒薬に約  $10^7$  CFU/mL になるように菌懸濁液を添加して、一定時間経過後、カタラーゼまたはチオ硫酸ナトリウム<sup>22)</sup>を添加した SCDLP 培地で反応を停止させ、直ちに段階希釈し、SCD 寒天培地に塗抹した。37°C で 24 時間培養して菌数をカウントした。

## 2.3 バイオフィーム形成時の緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果

菌懸濁液 162  $\mu$ L を 96 穴プレートの各ウェルに入れ、37°C で、1、3、6、24 時間培養した。ここに各消毒剤 18  $\mu$ L (菌懸濁液：消毒剤=9:1) を添加して 37°C で 24 時間培養した後、10  $\mu$ L を釣菌し SCD 寒天培地に塗布、37°C で 24 時間培養して菌の発育の有無を判定した。

## 2.4 緑膿菌の培養時間とバイオマスの関係

クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成量・形成阻害測定キット Biofilm Formation Assay Kit (同仁化学研究所) を用いて評価し、試験はプロトコルに準じて行った。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液を 180  $\mu$ L 入れて突起状の 96 peg-Lid (以下、ペグ) を取り付けた後、懸濁液調整直後は室温のまま、37°C で 1~21 時間培養した。培養後のペグを MilliQ 水 (超純水製造装置 Direct-Q<sup>®</sup>3UV、メルク社製) ですすぎ、クリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して MilliQ 水ですすいだ後、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度をバイオマスとした。

## 2.5 バイオフィーム形成過程における消毒剤の抑制効果

クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成量・形成阻害測定キット Biofilm Formation Assay Kit (同仁化学研究所) を用いて評価し、試験はプロトコルに準じて行った。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液を 180  $\mu$ L 入れてペグを取り付けた後、37°C で 1、3、6 時間プレ培養した。プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 162  $\mu$ L と消毒剤 18  $\mu$ L (TSB 培地：消毒剤=9:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°C で 24 時間培養した。一部の実験では TSB 培地 180  $\mu$ L と消毒剤 20  $\mu$ L (TSB 培地：消毒剤=9:1) を入れた 96 穴プレート上に被せて同様に培養した。このペグを MilliQ 水ですすぎ、クリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して MilliQ 水ですすいだ後、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度をバイオマスとして扱った。消毒剤非存在下での吸光度に対して 50% 以下であった場合は、バイオフィーム形成抑制率 50% 以上とし、さらに吸光度が 10% 以下であった場合は、同抑制率 90% 以上とした。

## 2.6 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に対する消毒剤の効果

微生物は細胞内に生命体のエネルギー代謝活動に関与する補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Nicotinamide adenine dinucleotide: NADH) と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) が生成され、電子メディエータ 2-methyl-1,4-naphthoquinone (NQ) を介して水溶性テトラゾリウム塩 (Water-soluble tetrazolium salt: WST) を反応させると、有色の WST ホルマザンへと還元される。この反応は微生物の代謝反応を介して起こり、生きている微生物では代謝が起こり発色するが死んでいる微生物では発色しないことから、生成した色素量は微生物における生菌の代謝活性量を示している<sup>23)</sup>。バイオフィーム内の生菌の代謝活性は、WST 法によりバイオフィーム内微生物に対する薬剤効果を確認するバイオフィーム薬剤効果測定キット Biofilm Viability Assay Kit (同仁化学研究所) を用いて評価し、試験はプロトコルに準じて行った。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液を 180  $\mu$ L 入れてペグを取り付けた後、37°C で 1、3、6 時間プレ培養した。プレ培養後のペグを MilliQ 水ですすいだ後、予め各ウェルに TSB 培地 162  $\mu$ L と消毒剤 18  $\mu$ L を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°C で 24 時間培養した。このペグを MilliQ 水ですすぎ、予め各ウェルに発色試薬液 180  $\mu$ L を入れた 96 穴プレートに被せて 37°C で 24 時間培養した。ペグを取り外し、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度 ( $A$ ) を測定した。各消毒剤における代謝活性の抑制率は、消毒剤を添加した時の吸光度 ( $A_{\text{消毒剤添加}}$ ) に対してコントロールとして消毒剤の代わりに MilliQ 水を添加した時の吸光度 ( $A_{\text{コントロール}}$ ) に対する値から求めた (式 1)。各消毒剤の抑制率について、10~90% の各抑制率を示したペグ数をカウントし評価した。

$$\text{代謝活性の抑制率(\%)} = \frac{A_{\text{消毒剤添加}}}{A_{\text{コントロール}}} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

## 2.7 消毒剤の添加量がバイオフィーム形成に及ぼす影響

バイオフィーム形成量・形成阻害測定キット Biofilm Formation Assay Kit を使用し、プロトコルに準じてバイオフィーム形成量を測定した。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液 180  $\mu$ L を入れてペグを取り付け、37°C で 1、3、6 時間プレ培養した。予め各ウェルに TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (TSB 培地:消毒剤=1:1) または 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (TSB 培地:消毒剤=1:9) の割合で入れた 96 穴プレート上に培養後のペグを被せ 37°C で 24 時間培養した。このペグを MilliQ 水ですすぎ、クリスタルバイオレットで 30 分間染色して MilliQ 水ですすいだ後、エタノール 180  $\mu$ L で抽出してマイクロプレートリーダーで 570 nm における吸光度を測定した。50%以上抑制効果を示すペグ数は、コントロールとして消毒剤の代わりに MilliQ 水を添加した時の吸光度に対する値が 0.5 以下となるものとして評価し、90%以上抑制効果は 0.1 以下となるものとして評価した。

## 2.8 消毒剤の添加量がバイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に及ぼす影響

バイオフィーム薬剤効果測定キット Biofilm Viability Assay Kit を使用し、プロトコルに準じて試験を行った。菌懸濁液 180  $\mu$ L を 96 穴ウェルに入れペグを取り付け、37°C で、1、3、6 時間プレ培養した。予め各ウェルに TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (TSB 培

地:消毒剤=1:1) または 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (TSB 培地:消毒剤=1:9) の割合で入れた 96 穴プレート上にプレ培養後のペグを被せ 37°C で 24 時間培養した。培養後のペグを MilliQ 水ですすぎ、発光試薬液 180  $\mu$ L を入れた 96 穴ウェルに被せて 37°C で 24 時間培養し、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。消毒剤非存在下での吸光度に対して 50% 以下であった場合は、バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性の抑制率 50% 以上とし、さらに吸光度が 10% 以下であった場合は、同抑制率 90% 以上とした。以下の結果の章における消毒剤の濃度及び図における消毒剤の濃度は培養液等に添加する前の消毒剤濃度 (供試濃度) で記載し、表では供試濃度と添加後の最終濃度を併記した。

### 3. 結果

#### 3.1 緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果

消毒剤の殺菌効果を表 1 に示す。過酸化水素の供試濃度が 3% では接触 10 分後の菌数は  $<10^2$  CFU/mL と高い殺菌効果が見られ、0.5% および 1% では  $10^4$  CFU/mL あるいは  $10^3$  CFU/mL と菌の生存が見られた。一方、AHP を作用させた時の菌数は接触 10 秒後から  $<10^2$  CFU/mL となり、同じ過酸化水素の濃度である 0.5% よりも殺菌効果が高く、次亜塩素酸ナトリウムと BZC と同様、 $<10^2$  CFU/mL と高い殺菌効果を示した。

#### 3.2 バイオフィーム形成時の緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果

一定時間プレ培養した菌懸濁液に各種濃度の消毒剤を入れて 24 時間培養した液の一部を SCD 寒天培地に塗抹して 37°C で 24 時間培養した時の菌の発育の有無を表 2 に示す。1 時間または 3 時間プレ培養した後に過酸化水素を添加してさらに 24 時間培養したものから採取し SCD 寒天培地で培養したものは、いずれの濃度でも菌の発育はなく、AHP と BZC も同様の結果となった。それに対して NaOCl はいずれの濃度でも菌の発育が見られた。6 時間プレ培養したものでは、過酸化水素の供試濃度が 3% では菌の発育は見られなかったが、1% と 0.5% では菌の発育が見られた。AHP は 10 個未満の菌の発育が見られ、BZC は 10 個から 100 個未満の菌の発育が見られた。一方で、NaOCl はいずれの濃度でも菌の発育が見られた。24 時間プレ培養したものでは、全ての消毒剤で菌の発育が見られた。

#### 3.3 緑膿菌の培養時間とバイオフィーム形成

*P. aeruginosa* ATCC27853 の菌懸濁液にペグを取り付けて培養した時の、培養時間とクリスタルバイオレット染色法で求めた 570 nm の吸光度との関係を図 1 に示す。570 nm の吸光度は、菌懸濁液とペグの接触直後は  $0.04 \pm 0.00$  (平均値  $\pm$  標準偏差) であったが、培養時間が長くなるにつれて吸光度は徐々に高くなり、3 時間の培養で  $0.33 \pm 0.20$  となった。さらに培養時間が長くなると吸光度の上昇率は大きくなり、6 時間の培養で  $0.91 \pm 0.33$ 、9 時間の培養では 3 以上の値となり、21 時間以上培養すると測定域を超えた値となった。

### 3.4 バイオフィーム形成過程における消毒剤の抑制効果

TSB 培地と消毒剤の比率を 9:1 として消毒剤を作用させ、50%以上の抑制効果を示したペグ数を表 3 に示す。1 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%と 1%では供試したペグの 8 割で抑制効果を示し、供試濃度が 3%では供試したペグの 9 割以上で抑制効果を示した。また、AHP も過酸化水素と同様に 9 割以上で抑制効果を示した。一方、供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm では供試したペグの 4 割で抑制効果を示し、1,000 ppm では 3 割弱であった。BZC では供試したペグの 3 割が抑制効果を示した。3 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%では供試したペグの 8 割が抑制効果を示し、1%では 9 割弱となり、3%では 9 割以上が抑制効果を示した。AHP で抑制効果を示したペグは供試したペグの 9 割弱であった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm では抑制効果を示したペグは供試したペグの 1 割となり、1,000 ppm では抑制効果を示すペグは無かった。BZC で抑制効果を示したペグは供試したペグの 2 割であった。6 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%と 1%で供試したペグの 3 割で抑制効果を示し、3%では供試したペグの 6 割が抑制効果を示した。AHP で抑制効果を示したペグは供試したペグの約 5 割であった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm では共に供試したペグの 1 割であった。BZC で抑制効果を示したペグも同様に供試したペグの 1 割程度であった。

90%以上の抑制効果を示したペグ数を表 4 に示す。1 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%では供試したペグに対して 3 割が抑制効果を示し、1%と 3%では供試したペグの 5 割であった。AHP では供試したペグの 4 割が抑制効果を示した。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm では抑制効果を示すペグは無かった。また、BZC も同様に抑制効果を示すペグは無かった。3 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%と 1%では抑制効果を示したペグは共に供試したペグの 5 割であり、3%では 6 割であった。AHP で抑制効果を示したペグは供試したペグの約 3 割であった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm では抑制効果を示すペグは無かった。また、BZC も同様に抑制効果を示すペグは無かった。6 時間のプレ培養では、過酸化水素の供試濃度が 0.5%では抑制効果を示すペグはなく、1%では供試したペグの 1 割弱で抑制効果を示し、3%では 2 割であった。AHP では抑制効果を示したペグは供試したペグの 1 割弱であり、供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm では抑制効果を示すペグは無かった。また、BZC も同様に抑制効果を示すペグは無かった。

### 3.5 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に対する薬剤の効果

バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に対する薬剤の効果を図 2 に示す。1 時間プレ培養したペグに過酸化水素、AHP、または BZC を作用させると、図 2(a)に示すように、ほとんどのペグで代謝活性が抑制され、90%の抑制率でも供試濃度が 0.5%の濃度の過酸化水素では供試ペグ 19 個中 12 個で抑制効果が認められ、過酸化水素の濃度が高くなるとともにその数は増加した。一方、NaOCl を作用させると、90%の抑制率で抑制を示したペグはなく、50%の抑制率では供試ペグ 19 個中、供試した NaOCl の有効塩素濃度 1,000 ppm で 7 個、200 ppm で 4 個に抑制効果が認められた。

3 時間プレ培養したペグに過酸化水素あるいは BZC を作用させると、図 2(b)に示すよう

に、抑制率によらずほとんどのペグで代謝活性が抑制されたが、AHP 作用時には、抑制率が 60%以上になると抑制を示したペグ数は減少し、90%の抑制率で供試ペグ 19 個中 14 個に抑制効果が認められた。有効塩素濃度 200 ppm の NaOCl を作用すると、代謝活性の抑制率によらず 1 時間培養したペグに対する効果とほぼ同様の結果であったが、有効塩素濃度 1,000 ppm では 20%以下の抑制率において、供試ペグ 19 個中 15 個で抑制効果が認められたものの、抑制率が高くなるほど抑制効果を示したペグ数は減少し、80%以上の抑制率では抑制効果を示したペグは無かった。

6 時間プレ培養したペグに過酸化水素を作用させると、図 2(c)に示すように、供試濃度が 3%の濃度では代謝活性の抑制率によらず抑制効果を示したペグ数は供試ペグ 19 個中 16 個であるが、1%濃度では 10%の抑制率で 12 個から 90%の抑制率で 10 個とわずかに減少した。0.5%濃度で作用させると、60%以下の抑制率では抑制効果を示したペグ数は 1%濃度作用時とほぼ同数であったのに対し、70%の抑制率では 8 個に、80%の抑制率では 6 個になり、90%の抑制率でも 80%と同じ 6 個であった。AHP を作用させると、抑制率が 40%まではほぼ全てのペグで抑制効果を示したが、70%までは徐々に減少して 15 個となり、さらに 80%以上の抑制率では 12 個となった。BZC を作用させると、40%以下の抑制率では全てのペグで抑制効果を示したが、抑制率が高くなると抑制効果を示すペグ数は減少し、60%の抑制率で供試ペグ 19 個中 15 個となるものの、さらに高い抑制率でも抑制効果を示したペグ数は変わらなかった。NaOCl を作用させると、有効塩素濃度 200 ppm では 70%以上の抑制率では抑制効果を示したペグはなく、40%~60%の抑制率で供試ペグ 19 個中 1~2 個に抑制効果が認められ、30%以下の抑制率では供試ペグ 19 個中 8~9 個に抑制効果が認められた。一方、有効塩素濃度 1,000 ppm では、20%以下の抑制率では抑制効果を示したペグは 12 個であったが、30%の抑制率で 7 個に減少し、50%の抑制率で 5 個となり、60%以上の抑制率ではほとんど抑制効果を示さなかった。

### 3.6 消毒剤の添加量がバイオフィーム形成に及ぼす影響

#### 3.6.1 消毒剤によりバイオフィーム形成が 50%以上抑制されたもの

試験数が少ないが消毒剤の濃度を高めた場合の実験を行ない、消毒剤の添加によりバイオフィームの形成が 50%以上抑制されたペグ数を表 5 と 6 に示す。TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (1:1) とすると、表 5 に示すように、1 時間プレ培養したものでは、過酸化水素は供試濃度によらず全てのペグでバイオフィームを 50%以上抑制した。AHP で抑制効果を示したペグは供試ペグの半数の 2 個であった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm で抑制効果を示すペグは無く、1,000 ppm では全ての供試ペグで抑制効果を示した。また、BZC で抑制効果を示すペグは無かった。3 時間プレ培養したものでは、供試した過酸化水素の濃度が 0.5%と 1%では供試ペグの 3 個で抑制効果を示し、3%では抑制効果を示したペグは 2 個であった。AHP で抑制効果を示したペグは無かった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm で抑制効果を示すペグは無く、1,000 ppm では 3 個であった。また、BZC では抑制効果を示すペグは無かった。6 時間プレ培養したものでは、過酸化水素は供試濃度によらず抑制効果を示したペグは 3 個であった。一方、AHP では抑制効果を示すペグは無かった。供試した NaOCl の有効塩素濃度が 200 ppm では抑制効果を

示すペグは無く、1,000 ppm では供試したペグの 3 個が抑制効果を示し、BZC では抑制効果を示すペグは無かった。

TSB 培地と消毒剤を 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (1:9) とすると、表 6 に示すように、1 時間プレ培養したものでは、過酸化水素の濃度によらず全てのペグでバイオフィーム形成を 50%以上抑制した。一方、AHP で抑制効果を示したペグは 3 個であった。NaOCl と BZC で抑制効果を示したペグは供試ペグ全数の 4 個であった。3 時間プレ培養したものでは、全ての濃度の過酸化水素で抑制効果を示したペグは供試ペグ全数の 4 個であった。AHP も同様に供試ペグ全数のペグで抑制効果を示した。また、NaOCl もいずれの有効塩素濃度でも供試ペグ全数で抑制効果を示したが、BZC では抑制効果を示すペグは 3 個であった。6 時間プレ培養したものは、全ての濃度の過酸化水素で抑制効果を示したペグは供試ペグ全数の 4 個であった。一方、AHP は抑制効果を示すペグは無かった。有効塩素濃度が 200 ppm の NaOCl を作用させると全ての供試ペグで抑制効果を示したが、1,000 ppm では抑制効果を示すペグはなく、BZC も同様には抑制効果を示すペグは無かった。

### 3.6.2 消毒剤によりバイオフィーム形成が 90%以上抑制されたもの

試験数が少ないが消毒剤の濃度を高めた場合の実験を行ない、消毒剤の添加によりバイオフィームの形成が 90%抑制されたものを表 7 と 8 に示す。TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (1:1) とすると、表 7 に示すように、1 時間プレ培養したのものに対してバイオフィーム形成を 90%抑制したものは、全ての濃度の過酸化水素と AHP で抑制効果を示したペグは無かった。NaOCl と BZC も同様に抑制効果を示すペグは無かった。3 時間プレ培養と 6 時間プレ培養したものも、1 時間プレ培養したものと同様に全て濃度の過酸化水素、AHP、NaOCl と BZC で抑制効果を示したペグは無かった。

TSB 培地と消毒剤を 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (1:9) とすると、表 8 に示すように、1 時間プレ培養したのものに対してバイオフィーム形成を 90%抑制したものは、全ての濃度の過酸化水素と AHP で抑制効果を示したペグは無かった。NaOCl と BZC も同様に抑制効果を示すペグは無かった。3 時間プレ培養と 6 時間プレ培養したものも、1 時間プレ培養したものと同様に全て濃度の過酸化水素、AHP、NaOCl と BZC で抑制効果を示したペグは無かった。

## 3.7 消毒剤の添加量がバイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性に及ぼす影響

### 3.7.1 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性が 50%以上抑制されるもの

試験数が少ないが消毒剤の濃度を高めた場合の実験を行ない、消毒剤の添加によりバイオフィーム中の生菌の代謝活性が 50%抑制されたものを表 9 と 10 に示す。

TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (1:1) とすると、表 9 に示すように、1 時間プレ培養したものでは、全ての濃度の過酸化水素と AHP は供試ペグの全数で抑制効果を示した。有効塩素濃度が 200 ppm の NaOCl を作用しても抑制効果を示したペグは無かったが、1,000 ppm を作用させると供試ペグ全数の 4 個が抑制効果を示した。また、BZC も同様に供試ペグ全数の 4 個であった。3 時間プレ培養したものでは、供試した過酸化水素の濃度が 0.5%では供試ペグの 3 割で抑制効果を示し、1%と 3%では供試ペグの全数で抑制効果を示した。また、AHP も供試ペグ全数で抑制効果を示した。有効塩素濃度が 200 ppm の NaOCl を作用

しても抑制効果を示すペグは無かったが、1,000 ppm を作用させると供試ペグの全数で抑制効果を示した。また、BZC も同様に供試ペグの全数で抑制効果を示した。6 時間プレ培養したものは、全ての濃度の過酸化水素の全供試ペグで抑制効果を示した。また、AHP も同様に供試ペグの全数で抑制効果を示した。有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm の NaOCl を作用しても抑制効果を示すペグは無かった。BZC では全ての供試ペグで抑制効果を示した。

TSB 培地と消毒剤を 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (1:9) とすると、表 10 に示すように、1 時間プレ培養したものでは、全ての濃度の過酸化水素と AHP、NaOCl、BZC で、全ての供試ペグで抑制効果を示した。3 時間プレ培養したものと 6 時間プレ培養したものも同様に全ての濃度の過酸化水素と AHP、NaOCl、BZC で、供試ペグの全数で抑制効果を示した。

### 3.7.2 バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性が 90%以上抑制されるもの

試験数が少ないが消毒剤の濃度を高めた場合の実験を行ない、消毒剤の添加によりバイオフィームの生菌の代謝活性が 90%以上抑制されたものを表 11 と 12 に示す。

TSB 培地と消毒剤を 100  $\mu$ L : 100  $\mu$ L (1:1) としたとき、バイオフィームの生菌の代謝活性を 90%以上抑制したペグ数は表 11 に示すように、1 時間プレ培養したものは、全ての濃度の過酸化水素では供試ペグの全数で抑制効果を示した。また、AHP も同様に供試ペグ全数で抑制効果を示した。有効塩素濃度が 200 ppm の NaOCl を作用させても抑制効果を示すペグは無かったが、1,000 ppm を作用させると供試ペグの全数で抑制効果を示した。BZC を作用させると供試ペグの 3 割弱で抑制効果を示した。3 時間プレ培養したものでは、供試した過酸化水素の濃度が 0.5%では供試ペグの 3 割で抑制効果を示し、1%と 3%では供試ペグの全数で抑制効果を示した。AHP の抑制効果は供試ペグの 7 割であった。有効塩素濃度が 200 ppm の NaOCl を作用させても抑制効果を示すペグはなく、1,000 ppm を作用させると供試ペグの全数で抑制効果を示した。また、BZC も同様に供試ペグの全数で抑制効果を示した。6 時間プレ培養したものは、全ての濃度の過酸化水素で、供試ペグの全数が抑制効果を示した。また、AHP も同様に供試ペグの全数で抑制効果を示した。有効塩素濃度が 200 ppm と 1,000 ppm の NaOCl を作用させても抑制効果を示したペグは無かった。BZC では、供試ペグの半数が抑制効果を示した。

TSB 培地と消毒剤を 20  $\mu$ L : 180  $\mu$ L (1:9) としたとき、バイオフィームの生菌の代謝活性を 90%以上抑制したペグ数は表 12 に示すように、1 時間プレ培養したものは、供試した過酸化水素の濃度が 0.5%では供試ペグの半数が抑制効果を示し、1%と 3%では供試ペグの全数で抑制効果を示した。AHP では、供試ペグの 3 割で抑制効果を示した。NaOCl ではいずれの濃度で作用しても抑制効果を示したペグは供試ペグの 3 割であった。BZC を作用しても抑制効果を示すペグは無かった。3 時間および 6 時間プレ培養したものは、全ての消毒剤で供試ペグの全数が抑制効果を示した。

## 考察

水回りを介した医療関連感染の原因の一つとして、湿潤環境に生息する病原性微生物による水平伝播が挙げられる。グラム陰性桿菌は湿潤環境下でバイオフィルムを形成する事で消毒薬に対する抵抗性を獲得する。その結果、水平伝播を遮断する消毒薬の化学的作用が減弱され、消毒薬によるバイオフィルムの殺菌・除去が困難となっている。本研究では、シンクや浴室等の湿潤環境における医療関連感染の事例報告がある *Pseudomonas* 属<sup>7)</sup> について着目し、その中でもバイオフィルムに関する報告例の多い *P. aeruginosa* ATCC27853 株を用いて検討することとした。

バイオフィルムの形成は、液中で浮遊している細菌が基材表面に付着し数時間をかけてコロニーを形成していく過程の中で、細胞外多糖類や細胞外タンパク質、細胞外 DNA 等から成る細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substances : EPS) が産生され、ウォーターチャンネルと呼ばれる水路となる空間と併せて 3 次元的な構造体から構成される。本研究では、*P. aeruginosa* ATCC27853 の培養時間に対するバイオフィルム形成量を測定 (図 1) したところ、培養直後から 3 時間ではバイオフィルム形成が少ないことから、菌体の基材表面への付着がまだ僅かで、徐々に増加している時期と推定された。培養 3 時間から 6 時間で形成量の増加が見られ、付着した細菌から EPS の放出量が多くなりマイクロコロニーを形成していると考えられる。さらに、9 時間を過ぎると測定限界値を超える量のバイオフィルム形成が見られ、いわゆる 3 次元の構造を持つバイオフィルムの形成<sup>20)</sup> が進んでいると推定された (図 3)。これらの結果から、本研究では、*P. aeruginosa* ATCC27853 によるバイオフィルム初期形成過程を 6 時間の培養時間までとして取り扱うこととした。液中に浮遊している細菌が可逆的な付着過程である Surface naive で多く存在している状態のときは消毒剤の殺菌効果が発揮されるが、時間が経過し不可逆的な付着の存在が増えると消毒剤は、マイクロコロニーが形成され EPS が産生されて消毒剤の効果が阻害され、消毒薬の効果が期待できなくなるので、可逆的な付着が多く不可逆的な付着の比率が低い段階で消毒剤を作用させることは、液中の菌数を減らすことができ、その後のバイオフィルム形成の抑制に有効と考える。

図 4 は、供試ペグ数に対して消毒剤によりバイオフィルム形成が抑制されたペグ数の割合と代謝活性が抑制されたペグ数の割合との関係を視覚的に示すために作成したものである。この図では、消毒剤の作用によりバイオフィルムの形成が 50%以上抑制されたペグ数 (表 3) と消毒剤の作用によりバイオフィルムの形成が 90%以上抑制されたペグ数 (表 4) から各抑制率に対するペグ数の割合をグラフ左 (赤) に示し、また、代謝活性の抑制率における抑制を示したペグ数 (図 2) から、50%以上抑制と 90%以上抑制したペグ数の割合をグラフ右 (黒) に示している。

この図からバイオフィルム形成が微量なプレ培養 1 時間及び 3 時間では、過酸化水素と AHP の存在によりバイオフィルム形成と生菌の代謝活性の両方が強く抑制されたことが読み取れる (図 4 (a)、(b))。NaOCl は両者に対し抑制効果が弱く、BZC はバイオフィルム形成には効果が弱かったが、代謝活性を強く抑制した。一方、バイオフィルム形成がある程度進んだプレ培養 6 時間後ではいずれの消毒剤でもバイオフィルムの形成抑制効果が減弱していた (図 4 (c))。

プレ培養時間の違いによる消毒剤の緑膿菌の発育に与える影響を見ると、1 時間または 3 時間プレ培養した後に過酸化水素を添加してさらに 24 時間培養したのから採取し SCD 寒天培地で培養したものは、いずれの濃度でも菌の発育はなく、AHP と BZC も同様の結果となった。それに対して NaOCl はいずれの濃度でも菌の発育が見られた。6 時間プレ培養したものでは、過酸化水素の供試濃度が 3% では菌の発育は見られなかったが、1% と 0.5% では菌の発育が見られた。AHP は 10 個未満の菌の発育が見られ、BZC は 10 個から 100 個未満の菌の発育が見られた。一方で、NaOCl はいずれの濃度でも菌の発育が見られた。24 時間プレ培養したものでは、全ての消毒剤で菌の発育が見られた。(表 2)。図 1 から、1 時間と 3 時間のプレ培養ではバイオフィーム形成が少なく、菌体の基材表面への付着が僅かであると推察され、過酸化水素、AHP 及び BZC は菌の発育を抑えたと考えられる。そして、6 時間のプレ培養以後はバイオフィーム形成量が増加し、付着した細菌から EPS の放出量が多くなりマイクロコロニーを形成していると推察され、消毒剤の殺菌効果が減弱したと考えられる。

バイオフィーム形成初期過程において、今回検討した緑膿菌が湿潤環境に存在すると想定した実用濃度の 1/10 濃度で作用させた実験系では、消毒剤としては過酸化水素及び AHP が、NaOCl や BZC より有効であることが示唆された。併せて、過酸化水素及び AHP がバイオフィーム形成を抑制するのは、緑膿菌汚染後 3 時間以内に作用させることが有効であることも示唆された。

また、消毒剤により、バイオフィーム形成と代謝活性を抑制する作用に違いが見られた(図 4)。過酸化水素及び AHP はバイオフィーム形成と生菌の代謝活性の両方に対して抑制効果を有し、BZC は生菌の代謝活性に対する抑制効果を有するがバイオフィーム形成に対する抑制効果が弱く、NaOCl はバイオフィーム形成ならびに生菌の代謝活性には抑制効果が弱いことが示唆された。

NaOCl は有機物が大量に存在する実験系では十分な薬効を示さない事は周知されており、0.05% のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) 存在下で 18 時間菌と接触をさせても殺菌効果が認められない<sup>24)</sup> ことから、今回の検討では TSB 培地と NaOCl を混合した時点で有機物により殺菌効果が低下していると推察され、また、有機物である EPS から構成されるバイオフィームに対しては殺菌効果を発揮することは難しいと推察される。本研究の限界として NaOCl の効果を検討するためには、作用前に有効塩素濃度が低下しない新たな実験系を採用する必要がある。

今回の検討では、プレ培養時間に形成されたバイオフィームをペグに付着させ消毒剤の有効性を見る上で、バイオフィーム形成量を半減できる効果として抑制率 50% 以上を、バイオフィーム形成を抑制する効果として抑制率 90% 以上を検討することで消毒剤による抑制作用の強度を評価した。しかし、バイオフィームが形成された状況で抑制率 90% 以上の殺菌性を発揮することは困難であり、バイオフィームの形成を遅延させることが次善の策として求められると考える。

「消毒と滅菌のガイドライン」<sup>12)</sup> では、消毒剤を効果的に作用させる必要条件として、消毒剤の濃度と作用時間、温度が示されており、表 3、表 5 及び表 6 が示すように消毒剤の添加量の増加に伴いバイオフィーム中の生菌の代謝活性に対する抑制効果が高くなること

が示唆され、消毒剤の濃度を高くすること、または、バイオフィームに対する消毒剤の使用量を増やすことも有効であると考えられる。本研究においても過酸化水素及びAHPの濃度を高めることで抑制効果が強くなることが窺えた。しかし、消毒剤を高濃度で使用することは、基材表面への腐食や取り扱い上の注意が必要となるため、ガイドラインに示された希釈濃度の消毒剤を有効に作用させるための適正使用量の検討が必要である。

過酸化水素とAHPは、バイオフィームに対して初期に形成と代謝活性の両方に抑制効果を示しており、AHPは過酸化水素の濃度が0.5%で且つ界面活性剤と溶剤が含まれていることから、濃度が0.5%の過酸化水素よりもバイオフィーム形成と生菌の代謝活性に対して高い効果を示し3%の過酸化水素に相当する結果が得られた。

次亜塩素酸ナトリウムやエタノールをはじめとする消毒剤の作用機序は、微生物を構成するタンパクに作用しタンパク変性や核酸の破壊、酵素阻害がある。中でも特に低水準消毒剤であり陽イオン界面活性剤である第四級アンモニウム塩もタンパクに影響して殺菌効果を示している<sup>12)</sup>。界面活性剤は、親水基と親油基を持ち、そのイオン性から陰イオン界面活性剤や陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤に分類され、その特長は、水溶液の表面張力を低下させ、また、乳化、分散、可溶化、浸透、湿潤、泡立ち等の現象を引き起こすものであり<sup>25,26)</sup>、第四級アンモニウム塩である陽イオン界面活性剤は、殺菌効力を有し、且つ材質を傷めにくく汎用性がある事から低水準消毒剤として使用されている<sup>12)</sup>。一般的には陽イオン界面活性と両性界面活性が殺菌性を有し、他の界面活性剤は殺菌性をほとんど示さないとされているが、脂質やタンパクのような親油性のものに対して浸透、吸着作用を示し殺菌性が期待できる<sup>26,27)</sup>。これに加えて、界面活性剤はEPSを構成する細胞外多糖類やタンパク質に対する浸透作用を向上させると考えられる。

BZCは、バイオフィーム形成に対する抑制効果は低い傾向が見られたが、生菌の代謝活性に対しては総じて高い効果を示した。BZCは、殺菌効果を有する陽イオン性界面活性剤である、親油性であるEPSを含むバイオフィームに対して作用したと考えられる。

本研究では、バイオフィーム形成量をクリスタルバイオレット法により測定し、抑制効果を検討した。これは、不可逆的付着によりマイクロコロニーを形成したSurface sentientな生菌状態の細菌と細菌により放出されたEPSならびに消毒剤により不活化された死菌についても測定している。また、生菌の代謝活性の抑制はWST法により検討した。これは、バイオフィーム中の生菌数と生菌の代謝活性の総和を測定しており、生存している細菌もしくは生存している細菌の代謝機能の低下度合いを反映しているものと考えられる。

今後の課題は、本研究ではバイオフィームに関する研究が報告されている*P. aeruginosa* ATCC27853を用いてバイオフィームの形成と生菌の代謝活性について検討を行ったが、実際のバイオフィームは複数の細菌が共存し互いにコミュニケーションを取り、バイオフィーム形成と生菌の代謝活性はより複雑になると考えられ、他の細菌ならびに複数の細菌を組み合わせた実験系による検討が必要と思われる。また、細菌を取りまく環境、栄養やストレスによるバイオフィーム形成への影響を踏まえた別条件で形成されたバイオフィームに対する検討も必要と思われる。更に、バイオフィーム中の生菌の代謝活性について生菌数あるいは菌の代謝機能に起因するかの判定がされていないため、生菌数と代謝機能の影響に関する評価方法の検討も必要と思われる。これらの課題検討に取り組むたいと考える。

## 5. 結論

医療施設の医療関連感染のリザーバーとなる水回りにおいて、細菌の温床となるバイオフィルムの制御は重要と考えるが、完全に除去する事は困難であるため、施設内で日常的あるいは定期的な作業を行う中で、バイオフィルムの形成を遅延させる事は、感染リスクを低減するために有効であると考えられる。

本研究では、バイオフィルムに関する研究が報告されている *P. aeruginosa* ATCC27853 を用いて、バイオフィルム形成過程を明らかにし、バイオフィルムの形成初期過程における消毒剤の効果について、形成量からバイオフィルムの形成とその除去性を検討し、併せてバイオフィルム中の生菌の代謝活性量から、バイオフィルム形成初期過程における消毒剤の効果を検討した。

*P. aeruginosa* ATCC27853 を用いてバイオフィルム形成過程を検討した結果、1 時間培養では、液中で浮遊している細菌は、可逆的な付着 Surface naive な細菌と Surface sentient な細菌が共存し、3 時間培養では Surface sentient な細菌が増え不可逆な付着が増え、6 時間培養ではマイクロコロニーが形成されて EPS の放出がされ、6 時間培養以後ではバイオフィルムが急速に成長することが明らかになった。バイオフィルムの形成の極初期過程における消毒剤によるバイオフィルムの形成抑制効果を確認したところ、酸素系酸化剤である過酸化水素と加速化過酸化水素 (Accelerated hydrogen peroxide : AHP) にバイオフィルム形成抑制効果が認められ、または塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride : BZC) が、マイクロコロニー内の生菌に対する代謝抑制作用を有することが明らかとなった。

## 謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆する上で、多くの皆様にご指導ならびにご助力を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

研究活動全般にわたり、東京医療保健大学名誉学長で研究指導教員である木村哲 名誉学長からは格別なる御指導と御高配を賜りました。研究ゼミでは研究の進め方や結果についてご指導いただきました。特に、論文全体の構成から細かい部分に至るまで、ご多忙の中にもかかわらず、お時間を割いていただき、丁寧にご指導いただきましたこと深く感謝申し上げます。

研究活動全体をご指導いただいた岩澤篤郎 教授と松村有里子 准教授に、心から感謝申し上げます。

岩澤篤郎 教授には、実験を進めるにあたり、微生物ならびに機器の取り扱い、そして、バイオフィルムについて、ご指導いただきましたこと心より感謝申し上げます。細菌やウイルスに対する知識と実務を分かりやすくご指導いただき、特に今回研究テーマとなりましたバイオフィルムの奥深さと面白さ、そして、難しさを知ることが出来ました。実験の進め方についても、様々なアイデアをいただきましたこと、感謝申し上げます。

松村有里子 准教授には、先行研究の文献の検索方法、実験データの理解とまとめ方、そして、論文を作成していくこと全体をご指導いただきましたこと心から感謝申し上げます。データのまとめや論文作成の際は、連日の Zoom ならびに対面での面談を通じて丁寧に繰り返しご指導いただきましたこと心から感謝申し上げます。特に、論文にまとめることが思うように進まず、何回か諦めかけた中で論文が作成出来たことは、松村先生にご指導いただいたからと思います。心から感謝申し上げます。

感染制御学 菅原えりさ 教授と吉田里香 教授には、研究ゼミで先生方の視点からご指導をいただきましたこと、心から感謝申し上げます。

研究活動を進めるにあたり業務との両立に苦労しましたが、多くの方に支えていただき、博士課程を修了することが出来ました。この大学院博士課程で得られた経験を、今後の業務ならびに研究に活かしていきたいと考えます。

大学院進学そして学生生活に協力いただきました方々に、心から感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Kramer A, Schwebke I, Kampf G: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 130.
- 2) Chia PY, Sengupta S, Kukreja A, Ponnampalavanar SSL, Ng OT, Marimuthu K. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gramnegative organisms. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; 9:29(1-11).
- 3) Lankford MG, Collins S, Youngberg L, Rooney DM, Warren JR, Noskin GA. Assessment of materials commonly utilized in health care: Implications for bacterial survival and transmission. *Am J Infect Control* 2006; 34:258-263.
- 4) Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect* 1998; 39: 53-62.
- 5) Kanamori H, Weber D, Rutala W: Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 62 (11): 1423-1435
- 6) Weber DJ, Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Sickbert-Bennet EE. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Frequency of hospital room contamination and survival on various inoculated surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36: 590-593.
- 7) Fred AP, Flournoy DJ. Prevalence of gentamicin-and amikacin-resistant bacteria in sink drains. *J Clin Microbiol* 1980; 12(1): 79-83.
- 8) Blanc DS, Nahimana I. Petignat C, Wenger A. Bille J. Francioli P. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1964-1968.
- 9) Roux D, Aubier B, Cochard H, Quentin R, van der Mee-Marquet N. Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the patient environment, *J Hosp Infect* 2013; 85: 106-111.
- 10) Umezawa K, Asai S, Ohshima T, Iwashita H, Ohashi M, Sasaki M. et al. Outbreak of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST219 caused by oral care using tap water from contaminated hand hygiene sinks as a reservoir. *Am J Infect Control* 2015; 43(11): 1249-1251.
- 11) Amoureux L, Riedweg K, Chapuis A, Bador J, Siebor E, Pechinot A, et al. Nosocomial infections with IMP-19-producing *pseudomonas aeruginosa* linked to contaminated sinks, *France Emerg Infect Dis* 2017; 23: 304-307.
- 12) 大久保憲・尾家重治・金光敬二 編集. [2020年版] 消毒と滅菌のガイドライン. へるす出版, 2020. 11
- 13) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 Update: May 2019; 47-48.

<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/>: 2022年11月16日現在.

- 14) Omidbakhsh N., Sattar SA. Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. *Am J Infect Control* 2006; 34: 251-257.
- 15) 手術医療の実践ガイドライン (2013年改訂版). 第7章 手術と感染防止 (5)手術室環境整備. *手術医学* 2013; 34 (suppl): S89-S91.
- 16) 手術医療の実践ガイドライン(改定第三版). 第9章手術室環境整備. *手術医学* 2019; 40 (Suppl): S117-S119.
- 17) Lee CK, de Anda J, Baker AE, Bennett RR, Luo Y, Lee EY, et al. Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities. *PNAS* 2018; 115(17): 4471-4476.
- 18) Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology* 2007; 5(11): e307.
- 19) 清川達則, 八幡穰, 豊福雅典, 内山裕夫, 野村暢彦: 嫌気脱室環境下における緑膿菌の Biofilm 形成メカニズムの解析. *環境バイオテクノロジー学会誌*, 2012; 12(2): 123-128
- 20) 松山洋平: バイオフィルムの生物学. *Microbes and Environments*, 1999; 14(3): 163-172
- 21) Flemming HC, Wingender J: The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010; 2(8): 623-633
- 22) 大久保耕嗣, 浦上弘, 多村憲: 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の殺菌効果の比較. *環境感染誌*, 1998; 13(3): 184-188
- 23) 塚谷忠之: 水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物検出法の開発と食品分野の応用. *日本食品科学工学会誌*, 2015; 62 (7) : 321-327
- 24) 小林由佳, 吉澤重克, 金子誠二, 清水敏克: 亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの有機物存在下における殺菌効果およびウイルス不活化効果. *日本環境感染学会誌*, 2016 ; 31 (3) : 158-164
- 25) 藤本武彦, 界面活性剤入門. *三洋化成工業*, 2014; 28-35
- 26) 渡辺昭一郎, 抗菌性界面活性剤の現状と動向. *油化学*, 1980; 29(8): 536-542
- 27) 小谷新太郎, 千葉裕典, 千葉昭二, 内田和子, 田中平夫: 各種界面活性剤の細菌発育阻止効果に関する検討. *食品衛生学雑誌*, 1966 ; 7 (6) : 503-508

☒

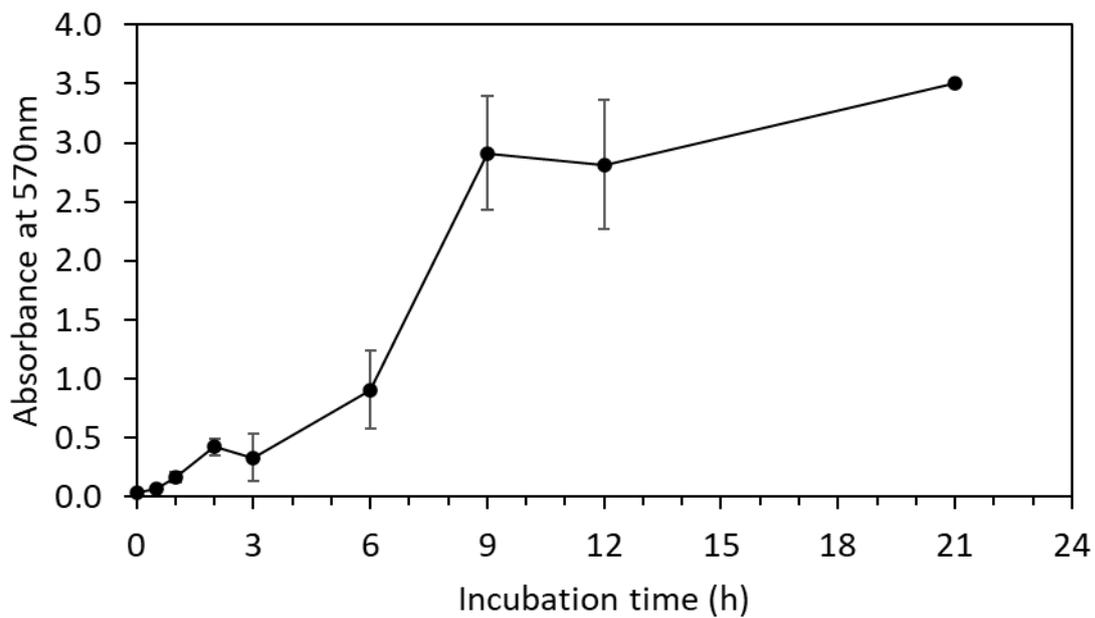
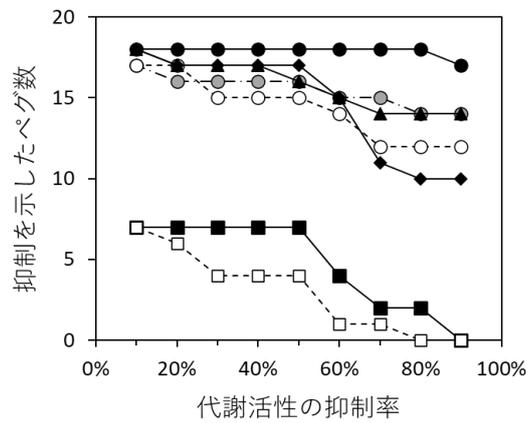


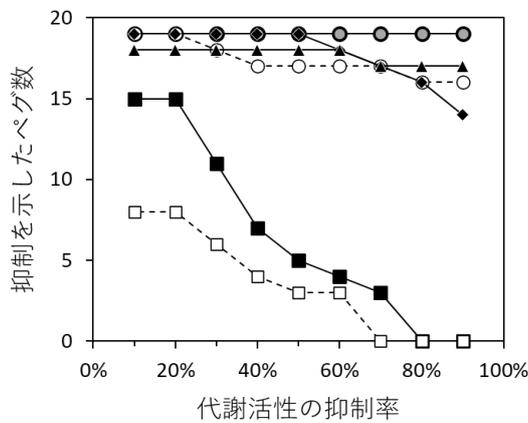
図1 *P. aeruginosa* バイオフィルムのバイオマスと培養時間との関係

TSB 培地で約  $10^6$  CFU/mL に調整した *P. aeruginosa* ATCC27853 の菌懸濁液 180  $\mu$ L を 96 穴プレート各ウェルに入れてペグを取り付けた後、37°C で培養した。ペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して水洗後、エタノール 180  $\mu$ L で抽出して 570 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。(n=8)

(a)



(b)



(c)

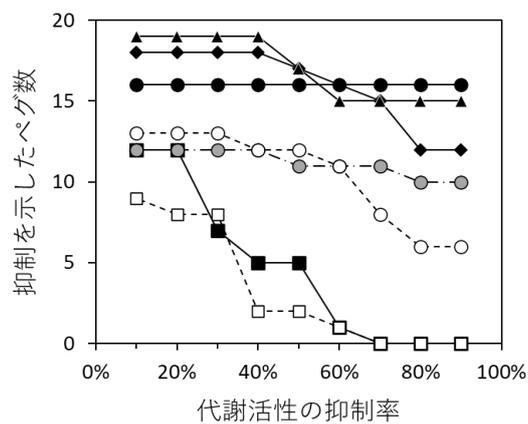


図2 代謝活性の抑制率における抑制を示したペグ数 (n=19)

(a) 1時間プレ培養、(b) 3時間プレ培養、(c) 6時間プレ培養

◆: AHP、○: 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、●: 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、●: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、□: 200 ppm NaOCl、  
■: 1,000 ppm NaOCl、▲: 0.2% BZC.

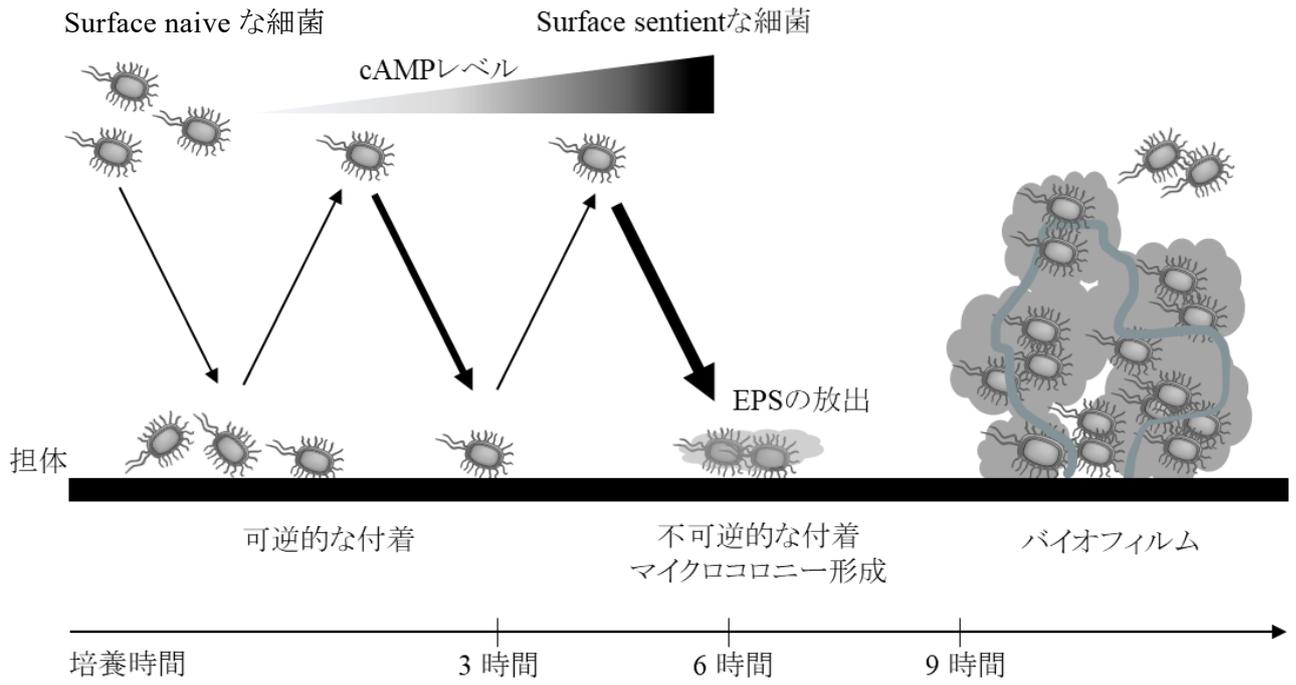


図3 *P. aeruginosa* ATCC27853 のバイオフィルム形成過程の模式図<sup>17,18)</sup>

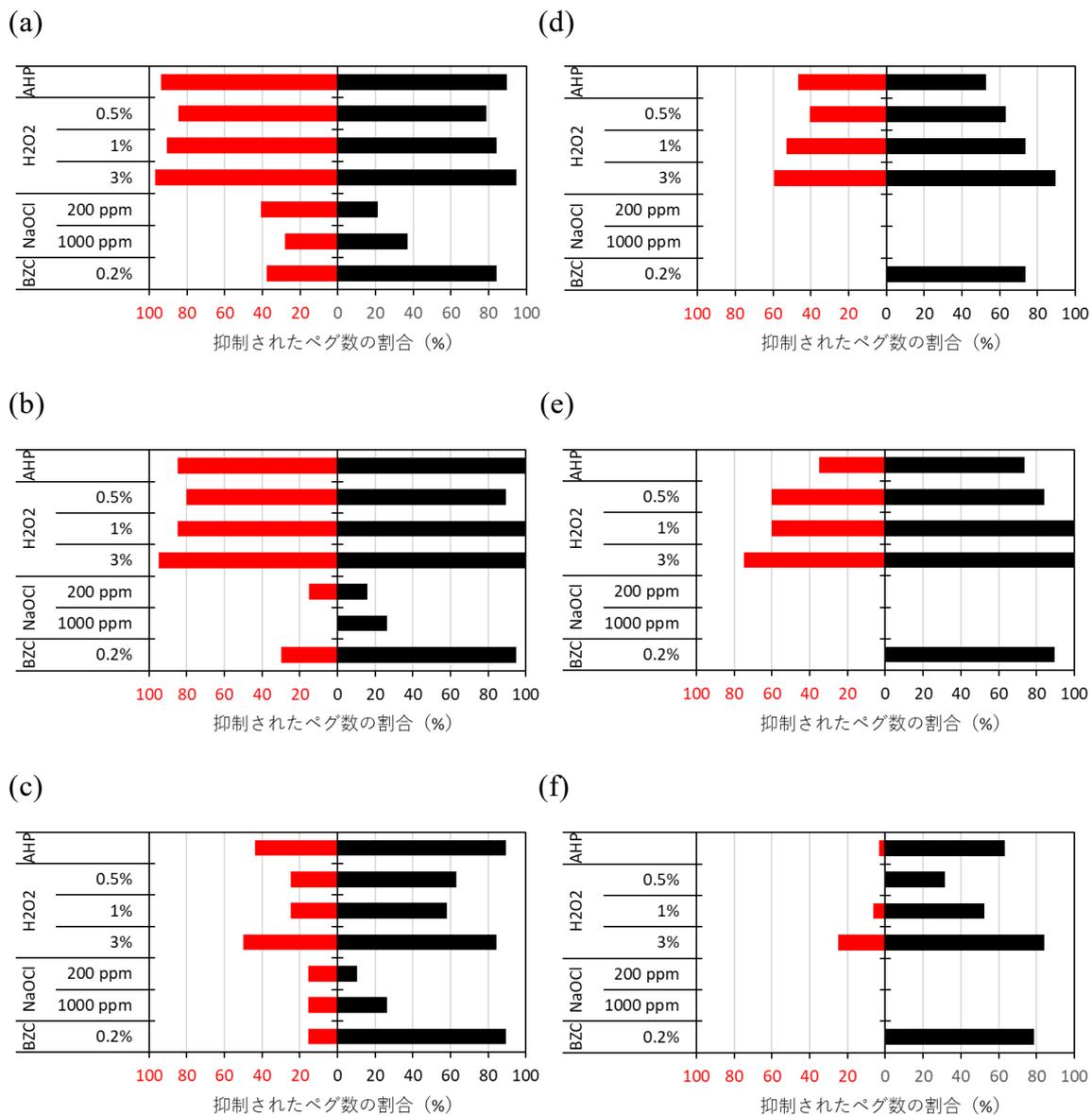


図4 供試ペグ数に対して消毒剤によりバイオフィーム形成が抑制されたペグ数の割合（赤）と代謝活性が抑制されたペグ数の割合（黒）との関係  
 図中の消毒剤の記載は供試濃度であり、TSB培地と消毒剤を180 μL : 20 μL (TSB培地:消毒剤=9:1) で作用させた。(a) 1時間プレ培養, 抑制率50%以上、(b) 3時間プレ培養, 抑制率50%以上、(c) 6時間プレ培養, 抑制率50%以上、(d) 1時間プレ培養, 抑制率90%以上、(e) 3時間プレ培養, 抑制率90%以上、(f) 6時間プレ培養, 抑制率90%以上

表

表 1 緑膿菌に対する消毒剤の殺菌効果

		(CFU/mL)						
供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.5%	200 ppm	1,000 ppm	0.2%
最終濃度		0.05%	0.1%	0.3%	0.05%	20 ppm	100 ppm	0.02%
接触 時間	0	1.6×10 <sup>7</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	2.6×10 <sup>7</sup>	2.6×10 <sup>7</sup>	2.6×10 <sup>7</sup>
	10 sec	5.0×10 <sup>7</sup>	3.8×10 <sup>7</sup>	5.8×10 <sup>6</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
	1 min	4.5×10 <sup>7</sup>	3.5×10 <sup>7</sup>	2.4×10 <sup>6</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
	5 min	1.5×10 <sup>6</sup>	7.0×10 <sup>6</sup>	7.5×10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
	10 min	3.5×10 <sup>4</sup>	6.5×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>				

供試菌株： *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

菌懸濁液に各薬剤を添加して一定時間経過後、カタラーゼまたはチオ硫酸ナトリウムを添加した SCDLP 培地で反応を停止させたものを段階希釈し、SCD 培地に塗抹した。37℃で 24 時間培養して菌数を測定した。

表2 プレ培養時間の違いが消毒剤の緑膿菌の発育に与える影響

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.5%	200 ppm	1,000 ppm	0.2%
最終濃度		0.05%	0.1%	0.3%	0.05%	20 ppm	100 ppm	0.02%
プレ 培養 時間	1H	—	—	—	—	+	+	—
	3H	—	—	—	—	+	+	—
	6H	+++	+++	—	+	+++	+++	++
	24H	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

予め各ウェルに菌懸濁液 162 μL を入れ 37°C で一定時間プレ培養した 96 穴プレートに、各消毒剤 18 μL を添加させ 24 時間培養した液から、10 μL をとり SCD 培地に塗抹し 37°C で 24 時間培養した時の菌の発育の有無を確認した。(n=2)

—：菌の発育なし、+：10 個未満、++：菌の発育 10 個以上 100 個未満、+++：100 個以上

表3 消毒剤の作用によりバイオフィルムの形成が50%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		AHP		NaOCl		BZC
供試濃度		0.50%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.05%	0.10%	0.30%	0.05%	20 ppm	100 ppm	0.02%
プレ培養 時間	1H	30/36	31/36	34/36	33/36	16/36	10/36	12/36
		(83%)	(86%)	(94%)	(92%)	(44%)	(28%)	(33%)
	3H	20/24	21/24	23/24	21/24	3/24	0/24	6/24
		(83%)	(88%)	(96%)	(88%)	(13%)	(0%)	(25%)
	6H	12/36	12/34	20/36	17/35	5/36	5/36	5/36
		(33%)	(35%)	(56%)	(49%)	(14%)	(14%)	(14%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 162  $\mu$ L と消毒剤 18  $\mu$ L と一部の試験では培地 180  $\mu$ L と消毒剤 20  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=9:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37℃で 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 50%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 50%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表4 消毒剤の作用によりバイオフィルムの形成が90%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		AHP		NaOCl		BZC
供試濃度		0.50%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.05%	0.10%	0.30%	0.05%	20 ppm	100 ppm	0.02%
プレ培養 時間	1H	13/36	17/36	19/36	15/36	0/36	0/36	0/36
		(36%)	(47%)	(53%)	(42%)	(0%)	(0%)	(0%)
	3H	12/24	12/24	15/24	7/24	0/24	0/24	0/24
		(50%)	(50%)	(63%)	(29%)	(0%)	(0%)	(0%)
	6H	0/36	2/34	8/36	1/35	0/36	0/36	0/36
		(0%)	(6%)	(22%)	(3%)	(0%)	(0%)	(0%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 162  $\mu$ L と消毒剤 18  $\mu$ L と一部の試験では培地 180  $\mu$ L と消毒剤 20  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=9:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37℃で 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 10%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 90%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 5 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) によりバイオフィルムの形成が 50%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.25%	0.50%	1.50%	0.25%	100 ppm	500 ppm	0.10%
プレ培養時間	1H	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	4/4	0/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(50%)	(0%)	(100%)	(0%)
	3H	3/4	3/4	2/4	0/4	0/4	3/4	0/4
		(75%)	(75%)	(50%)	(0%)	(0%)	(75%)	(0%)
	6H	3/4	3/4	3/4	0/4	0/4	3/4	0/4
		(75%)	(75%)	(75%)	(0%)	(0%)	(75%)	(0%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 100 μL と消毒剤 100 μL (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180 μL で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 50%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 50%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 6 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) によりバイオフィルムの形成が 50%以上抑制されたペグ数

供試薬	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC	
供試濃度	0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%	
最終濃度	0.45%	0.90%	2.7%	0.45%	180 ppm	900 ppm	0.18%	
プレ培養時間	1H	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(75%)	(100%)	(100%)	(100%)
	3H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(75%)
	6H	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4	0/3	0/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(100%)	(0%)	(0%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 20  $\mu$ L と消毒剤 180  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 50%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 50%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 7 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) によりバイオフィルムの形成が 90%以上抑制されたペグ数

供試薬	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC	
供試濃度	0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%	
最終濃度	0.25%	0.50%	1.50%	0.25%	100 ppm	500 ppm	0.10%	
プレ培養時間	1H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	
	3H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
	6H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 100  $\mu$ L と消毒剤 100  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180  $\mu$ L で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 10%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 90%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 8 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) によりバイオフィルムの形成が 90%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.45%	0.90%	2.7%	0.45%	180 ppm	900 ppm	0.18%
プレ培養時間	1H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
	3H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
	6H	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4
		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 20 μL と消毒剤 180 μL (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°C で 24 時間培養した。このペグをクリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色して、エタノール 180 μL で抽出した。抽出液の 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、得られた吸光度を消毒剤非存在下での吸光度に対して 10%以下であった場合は、バイオフィルム形成抑制率 90%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表9 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) によりバイオフィーム中の生菌の代謝活性が50%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.25%	0.50%	1.50%	0.25%	100 ppm	500 ppm	0.10%
プレ培養時間	1H	4/4	4/4	4/4	4/4	0/3	4/4	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(100%)	(100%)
	3H	1/3	4/4	4/4	3/3	0/3	3/3	4/4
		(33%)	(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(100%)	(100%)
	6H	4/4	4/4	4/4	3/3	0/4	0/3	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(0%)	(100%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 100  $\mu$ L と消毒剤 100  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグを WST 法により発光試薬液 180  $\mu$ L を入れた 96 穴ウェルに被せて 37°Cで 24 時間培養した。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した消毒剤非存在下での吸光度に対して 50%以下であった場合は、バイオフィーム中に存在する生菌の代謝活性の抑制率 50%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 10 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) によりバイオフィルム中の生菌の代謝活性が 50%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.45%	0.90%	2.7%	0.45%	180 ppm	900 ppm	0.18%
プレ培養時間	1H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	3H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	6H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 20  $\mu$ L と消毒剤 180  $\mu$ L (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグを WST 法により発光試薬液 180  $\mu$ L を入れた 96 穴ウェルに被せて 37°Cで 24 時間培養した。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した消毒剤非存在下での吸光度に対して 50%以下であった場合は、バイオフィルム中に存在する生菌の代謝活性の抑制率 50%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 11 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) によりバイオフィルム中の生菌の代謝活性が 90%以上抑制されたペグ数

供試薬	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC	
供試濃度	0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%	
最終濃度	0.25%	0.50%	1.50%	0.25%	100 ppm	500 ppm	0.10%	
プレ培養時間	1H	4/4	4/4	4/4	4/4	0/3	4/4	1/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(100%)	(25%)
	3H	1/3	4/4	4/4	2/3	0/3	3/3	4/4
		(33%)	(100%)	(100%)	(67%)	(0%)	(100%)	(100%)
	6H	4/4	4/4	4/4	3/3	0/4	0/3	2/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(0%)	(0%)	(50%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 100 μL と消毒剤 100 μL (TSB 培地 : 消毒剤=1:1) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37℃で 24 時間培養した。このペグを WST 法により発光試薬液 180 μL を入れた 96 穴ウェルに被せて 37℃で 24 時間培養した。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した消毒剤非存在下での吸光度に対して 10%以下であった場合は、同抑制率 90%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

表 12 消毒剤添加 (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) によりバイオフィルム中の生菌の代謝活性が 90%以上抑制されたペグ数

供試薬		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			AHP	NaOCl		BZC
供試濃度		0.5%	1%	3%	0.50%	200 ppm	1,000 ppm	0.20%
最終濃度		0.45%	0.90%	2.7%	0.45%	180 ppm	900 ppm	0.18%
プレ培養時間	1H	2/4	4/4	4/4	1/4	1/4	1/4	0/4
		(50%)	(100%)	(100%)	(25%)	(25%)	(25%)	(0%)
	3H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	6H	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	4/4
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)

一定時間プレ培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 20 μL と消毒剤 180 μL (TSB 培地 : 消毒剤=1:9) を入れた 96 穴プレート上に被せ、37°Cで 24 時間培養した。このペグを WST 法により発光試薬液 180 μL を入れた 96 穴ウェルに被せて 37°Cで 24 時間培養した。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した消毒剤非存在下での吸光度に対して 10%以下であった場合は、同抑制率 90%以上とした。

抑制効果を示したペグ数/供試ペグ数、括弧内は供試ペグ数に対する割合 (%)

## Abstract

The study on the inhibitory effects of disinfectants against early stage of biofilm formation and viability in *Pseudomonas aeruginosa*

Norihiro Kikuchihara

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

## BACKGROUND

Gram-negative bacilli showing biofilm forming ability adhere reversibly to carrier surfaces around aqueous environments and produce Extracellular polymeric substances (EPS) during colonization. Biofilms which are formed three dimensional structures by using EPS provide a resistance to disinfectants. Hence, it is difficult to remove them with chemical reaction. There have been few reports on the effect of disinfectants on the early stage in biofilm formation.

## OBJECTIVE

The study was evaluated the inhibitory effects of biofilm biomass and viability against disinfectants of Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), Accelerated hydrogen peroxide (AHP), Benzalkonium chloride (BZC), and Sodium hypochlorite (NaOCl) on the early stage of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

## METHODS

The biomass and viability of *P. aeruginosa* ATCC27853 biofilms which were pre-incubate were evaluated using Biofilm Formation Assay Kit and Biofilm Viability Assay Kit, respectively.

## RESULTS and DISCUSSION

In the formation process of *P. aeruginosa* ATCC 27853 biofilms, Surface-naive and Surface-sentient bacteria coexist in 1 hour of pre-incubation, and Surface-sentient bacteria irreversibly adhere to the substrate surface in 3 to 6 hours of pre-incubation. Microcolonies were formed after 6 hours of pre-incubation, and biofilms were formed after 9 hours of pre-incubation.  $H_2O_2$  and AHP showed the inhibitory effect on biofilm formation, on the other hand it showed little inhibitory effect on biofilm formation when pre-incubated for 6 hours.  $H_2O_2$ , AHP, and BZC showed the inhibitory effect on the viability of the biofilm. In the viability process,  $H_2O_2$ , AHP, and BZC showed the inhibitory effects in 6 hours of pre-incubation, on the other hand NaOCl didn't perform the inhibitory effect.

## CONCLUSIONS

It is difficult to remove the formed biofilms with chemical reaction. Therefore, delaying the biofilm formation by daily cleaning operation is effective to reduce infection risk. It was suggested that  $H_2O_2$ , AHP, or BZC had bactericidal activity against viable bacteria in microcolony in the early stage in biofilm formation, although the biofilm formation inhibitory effect was poor.