

■ Original article

緑膿菌バイオフィルムの初期形成過程に対する消毒薬 および殺菌剤の効果

菊地原紀裕^{1,2}、松村有里子^{1*}、岩澤篤郎¹、木村 哲¹¹ 東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科² シーバイエス株式会社 研究開発部

The efficacy of disinfectants against early stage of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Norihiro kikuchihara^{1,2}, Yuriko Matsumura^{1*}, Atsuo Iwasawa¹, Satoshi Kimura¹¹ Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School² R&D Department, CXS Corporation

* Corresponding author

背景：バイオフィルム形成能を有するグラム陰性桿菌は、湿潤環境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。これまでに基材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：緑膿菌バイオフィルム形成の初期段階における加速化過酸化水素（Accelerated hydrogen peroxide：AHP）、過酸化水素（H₂O₂）、塩化ベンザルコニウム（Benzalkonium Chloride：BZC）、および次亜塩素酸ナトリウムの効果について検討する。

方法：緑膿菌は *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を使い、バイオマスは Biofilm Formation Assay Kit を、バイオフィルム内の生菌の代謝活性は Biofilm Viability Assay Kit をそれぞれ用いて評価した。

結果：*P. aeruginosa* は、培養1時間で Surface naive な細菌と Surface sentient な細菌が共存し、培養3から6時間で 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時間でマイクロコロニーが形成され、培養9時間以上でバイオフィルムを形成した。AHP と H₂O₂ は、プレ培養1時間または3時間行った時にバイオフィルム形成の抑制効果が認められたものの、6時間プレ培養ではほとんど抑制効果を示さなかった。生菌の代謝活性は、6時間のプレ培養でも AHP、H₂O₂、BZC で抑制効果が認められた。

結論：バイオフィルム形成の初期過程において、AHP、H₂O₂、BZC のバイオフィルム形成抑制効果は乏しいものの、マイクロコロニー内の生菌に対する殺菌能を有することが示唆された。

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

1. はじめに

手洗いシンクや浴室等の水周りは、*Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter baumannii*、*Serratia marcescens* 等の湿潤環境を好むグラム陰性桿菌の温床となる。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、その他の微生物のリザーバーとなることから¹⁾、病原微生物の手指等を介した水平伝播の原因になる場合がある。医療関連施設の環境表面や

湿潤環境には多くの微生物が広く分布し、長期間生存できることが報告されており²⁾、多剤耐性緑膿菌 (multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP)³⁾ やカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacterales : CRE)⁴⁾ 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^{3, 5-9)}、院内感染の防止には水周りの感染対策が重要である。

手洗いシンク等の水周りの清掃に使用される消毒薬として、アルコール製剤や次亜塩素酸製剤が汎用されているのに加え、ペルオキソー硫酸水素カリウム等の除菌剤も使用されている¹⁰⁾。しかし、バイオフィームが形成されると、消毒薬等への抵抗性が高まり化学的作用では除去できないことが多く、熱水処理や高圧洗浄等による物理的作用による除去を行う。それでもアウトブレイクが終息しない場合には、蛇口や配管、シンク等の交換を行う対策が講じられることもある。そこで、バイオフィームの初期形成段階において、化学的作用による汚染除去が可能になれば、水周りを介した医療関連感染の低減につながることを期待される。

バイオフィーム形成は、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) レベルが増加した Surface sentient と呼ばれる細菌となり、担体表面に不可逆的に付着する¹¹⁾。担体に付着した細菌は、細胞外多糖類や細胞外たんぱく質、細胞外 DNA 等から成る細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substances : EPS) を産生するとともに、ウォーターチャンネルと呼ばれる空間を持つ3次元的な構造体を形成し、さらに成熟するとマッシュルーム状の構造となり、環境の変化に応じてマッシュルーム状のバイオフィームの一部が脱離して別の場所に新たなバイオフィームを形成していく¹²⁾。バイオフィームの形態は、栄養源や生育環境により多様化することが知られており、*P. aeruginosa* のバイオフィームは、ブドウ糖が炭素源であればマッシュルーム状の構造となり、クエン酸が炭素源であれば平坦なバイオフィームを形成する¹³⁾。バイオフィームの制御には、その形態が複雑化しておらず、消毒薬に対して抵抗性を有する EPS の割合が少ない段階での介入が重要であるものと考えられる。これまでに、バイオフィー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なく、抗

菌薬 Ciprofloxacin の有用性が報告されているのみである¹⁴⁾。

近年、水処理において水中の溶存物質の分解や殺菌に用いられているオゾンバイオフィーム中の細菌の殺菌とバイオフィームの除去に応用した一連の研究の中で、低濃度オゾン水がバイオフィーム中の細菌に対して殺菌効果を有することが報告された¹⁵⁾。しかし、バイオフィーム構成成分とオゾンとの反応により浸透阻害が生じ、その効果が限定的となることが認められた。さらなる検討で、細胞外多糖類の分解を進めるために、オゾン水と過酸化水素を併用することで相乗的な殺菌効果が認められている¹⁶⁾。日本ではオゾン水の濃度に管理基準はないが、オゾンの作業環境基準値は 0.1 ppm と定められていることから¹⁷⁾、オゾン水から空气中に曝露されるオゾンガスの影響を考えると、より安全な酸素系酸化剤の使用が望まれる。酸素系酸化剤の一つとして加速化過酸化水素 (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 分間の作用で殺抗菌活性と殺真菌活性を有することが報告¹⁸⁾されたのを受けて、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¹⁹⁾に収載され、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)²⁰⁾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²¹⁾においても記載が継続されている。そこで本研究では、バイオフィーム形成能の高い緑膿菌を用いて、バイオフィーム形成の初期段階におけるバイオマスとバイオフィーム内に生存する菌の代謝活性に対する AHP、AHP の主成分である過酸化水素 (H_2O_2)、環境表面の消毒に使用される塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride : BZC)、および次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) の影響について検討した。

2. 方 法

2.1 材料

菌懸濁液は、固形培地に発育した *P. aeruginosa* ATCC27853 のコロニーから Trypticase™ Soy Broth (TSB 培地、日本 BD) で約 10^6 CFU/mL に調整した。AHP は過酸化水素を 0.5% 含有するオキシライト® (シーバイエス (株)) を用いた。 H_2O_2 は 35% 過酸化水素 ((株)

ADEKA) を純水 (共栄製薬 (株)) で 0.5%、1%、3% に希釈して用い、BZC はオスパン S® (日本製薬 (株)) を純水で 0.2% に希釈し、NaOCl は 12% 次亜塩素酸ナトリウム (南海化学 (株)) を純水で 200 ppm と 1000 ppm に希釈して用いた。

2.2 緑膿菌バイオフィルムのバイオマス測定

緑膿菌バイオフィルムのバイオマスは、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィルム薬剤効果測定キット 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。以下に詳細を示す。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液を 180 μ L 入れて突起状の 96 peg-Lid (以下、ペグ) を取り付け付けた後、37°C で 1、3、6 時間プレ培養した。培養後のペグを予め各ウェルに TSB 培地 162 μ L と薬剤 18 μ 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。バイオマスと培養時間との関係を検討する試験では、37°C で培養する操作を 0 ～ 21 時間の間で任意に設定して培養を行い、薬剤の代わりに MilliQ 水 (超純水製造装置 Direct-Q®3UV、メルク社製) を用いた。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 μ 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。薬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、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。

2.3 バイオフィルム内の生菌の代謝活性

バイオフィルム内の生菌の代謝活性は、水溶性テトラゾリウム (water-soluble tetrazolium: WST) を利用したタンパク質濃度測定法である WST 法によりバイオフィルム内微生物に対する薬剤効果を確認するバイオフィル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。以下に詳細を示す。96 穴プレートの各ウェルに菌懸濁液を 180 μ 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。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 μ L と薬剤 18 μ 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 μ 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。抑制を示したペグ数は、式 1 で定義する代謝活性の抑制率において $A_{\text{薬剤添加}}$ を満たすペグとしてその数を数えて各代謝活性の抑制率を示すペグ数とし、供試ペグ数に占める各代謝活性の抑制率を示すペグ数の割合を求めた。

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

3. 結 果

3.1 緑膿菌バイオフィルムの形成過程

P. aeruginosa ATCC27853 の菌懸濁液にペグを設置して培養した時の、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検出上限値以上の値となった。

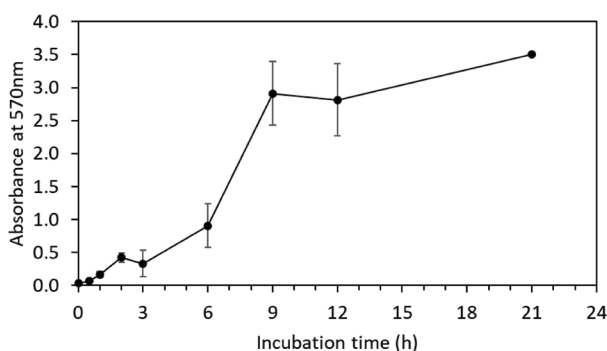


図 1 *P. aeruginosa* バイオフィルムのバイオマスと培養時間との関係

TSB 培地で約 10^6 CFU/mL に調整した *P. aeruginosa* ATCC27853 の菌懸濁液 180 μ L を 96 穴プレートの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 μ 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)

3.2 バイオフィーム形成に対する薬剤の効果

薬剤の作用により、バイオフィーム形成の抑制率 50% 以上を示したペグ数と抑制率 90% 以上を示したペグ数をそれぞれ表 1 に示す。薬剤によるバイオフィーム形成の抑制率が 50% 以上となるペグ数に着目すると、1 時間のプレ培養では、 H_2O_2 と AHP は供試したペグ総数の 8 割以上でバイオフィーム形成を抑制したのに対し、NaOCl と BZC は 4 割弱であった。3 時間のプレ培養でも、 H_2O_2 と AHP は 1 時間のプレ培養と同様に 8 割以上のペグでバイオフィーム形成が抑制されたが、BZC は 3 割、NaOCl は 1 割しか抑制を示さなかった。6 時間プレ培養すると、いずれの薬剤でも抑制率 50% 以上を示したペグ数は減少し、 H_2O_2 は 0.5% と 1% 濃度で 3 割弱のペグが、3% 濃度では 5 割のペグがバイオフィーム形成を抑制した。AHP は 4 割強のペグでバイオフィーム形成が抑制されたが、NaOCl と BZC でバイオフィーム形成が抑制

されたペグは 2 割以下であった。

薬剤によるバイオフィーム形成の抑制率が 90% 以上となるペグ数に着目すると、NaOCl と BZC を作用しても抑制を示したペグはなかったのに対し、 H_2O_2 または AHP を作用すると、1 時間のプレ培養で供試ペグ総数の 4 割から 5 割のペグでバイオフィーム形成の抑制を示した。3 時間プレ培養を行うと、 H_2O_2 作用時には供試ペグ総数の 6 割から 7 割のペグで抑制を示したのに対し、AHP 作用時は 3 割強のペグで抑制が認められた。6 時間プレ培養を行うと、バイオフィーム形成の抑制を示したペグはほとんどなく、3% の H_2O_2 作用時でも供試したペグ総数の 3 割弱であった。

3.3 バイオフィーム中の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。

表 1 薬剤の作用によりバイオフィームの形成が抑制されたペグ数

プレ培養 時間	H ₂ O ₂			AHP
	0.5%	1%	3%	
抑制率 50%以上を示したペグ数				
1H	27/32 (84%)	29/32 (91%)	31/32 (97%)	30/32 (94%)
3H	16/20 (80%)	17/20 (85%)	19/20 (95%)	17/20 (85%)
6H	8/32 (25%)	8/30 (25%)	16/32 (50%)	14/32 (44%)
抑制率 90%以上を示したペグ数				
1H	13/32 (41%)	17/32 (53%)	19/32 (59%)	15/32 (47%)
3H	12/20 (60%)	12/20 (60%)	15/20 (75%)	7/20 (35%)
6H	0/32 (0%)	2/30 (6%)	8/32 (25%)	1/32 (3%)

(つづき)

プレ培養 時間	NaOCl		BZC
	200 ppm	1000 ppm	
抑制率 50%以上を示したペグ数			
1H	13/32 (41%)	9/32 (28%)	12/32 (38%)
3H	3/20 (15%)	0/20 (0%)	6/20 (30%)
6H	5/32 (16%)	5/32 (16%)	5/32 (16%)
抑制率 90%以上を示したペグ数			
1H	0/32 (0%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)
3H	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
6H	0/32 (0%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)

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 (%)

AHP：過酸化水素を 0.5% 含有するオキシライト®

BZC：0.2% 濃度

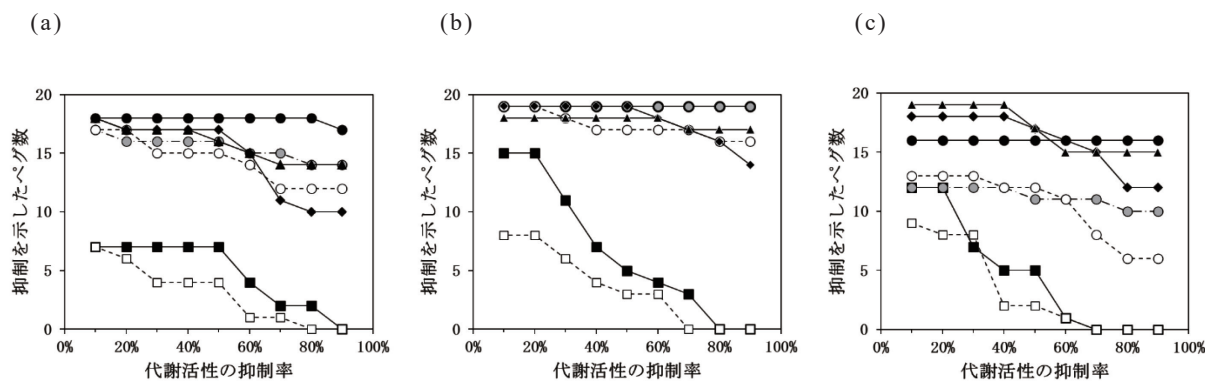


図2 代謝活性の各抑制率において抑制を示したベグ数 (n=19)

(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% H₂O₂、●: 1% H₂O₂、●: 3% H₂O₂、□: 200 ppm NaOCl、■: 1000 ppm NaOCl、▲: 0.2% BZC.

1時間プレ培養したベグにH₂O₂、AHP、またはBZCを作用すると、図2(a)に示すように、ほとんどのベグで代謝活性が抑制され、90%の抑制率でも0.5% H₂O₂では供試ベグ19個中12個で抑制効果が認められ、H₂O₂の濃度が高くなるとともにその数は増加した。一方、NaOClを作用すると、90%の抑制率で抑制を示したベグはなく、50%の抑制率では供試ベグ19個中、1000 ppm NaOClの作用で7個、200 ppm NaOClの作用で4個に抑制効果が認められた。

3時間プレ培養したベグにH₂O₂またはBZCを作用すると、図2(b)に示すように、抑制率によらずほとんどのベ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ベグ数は減少し、90%の抑制率で供試ベグ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時間プレ培養したベ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1000 ppmでは20%以下の抑制率において、供試ベグ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ベグ数は減少し、80%以上の抑制率では抑制効果を示したベグはなかった。

6時間プレ培養したベグにH₂O₂を作用すると、図2(c)に示すように、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ベグ数は供試ベグ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ベグ数は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%まではほぼ全てのベグで抑制を示したが、70%までは徐々に減少して15個となり、さらに80%以上では12個となった。BZCを作用すると、40%以下の抑制率では全てのベ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ベグ数は減少し、60%の抑制率で供試ベグ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ベグ数は変わらなかった。NaOClを作用すると、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ベグはなく、40%～60%の抑制率で供試ベグ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ベグ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1000 ppmでは、20%以下の抑制率では抑制効果を示したベグは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。

4. 考 察

水周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微生物の手指等からの水平伝播が挙げられる。特に、バイオフィーム形成能を有するグラム陰性桿菌は、湿潤環境においてバイオフィームを形成する事で消毒薬に対する抵抗性を獲得する。結果として、水平伝播経路の遮断に使用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ームの殺菌・除去が困難となっている。冷却塔に発生したバイオフィーム材料には多種多様な細菌が生息しており、その中でも

Pseudomonas 属の細菌が富栄養培地において増殖速度の速い微生物であることが報告されている²²⁾。本研究では、シンクや浴室等の湿潤環境が富栄養状態にあるものと考え、増殖速度の速い *Pseudomonas* 属の中でもバイオフィームに関する報告例の多い *P. aeruginosa* ATCC27853 を用いて検討することとした。

バイオフィーム形成は Surface naive な細菌の担体表面へ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 cAMP レベルの増加した Surface sentient な細菌となり、担体表面に不可逆的に付着する¹¹⁾。この付着した細菌が EPS を放出してマイクロコロニーを形成し、成熟して最終的に 3 次元的構造体であるバイオフィームを形成する¹²⁾。可逆的な付着過程において、*P. aeruginosa* PA14 は Surface naive な細菌の cAMP レベルが増加し、cAMP レベルの高い Surface sentient な細菌となるのに、5 時間ほどを要することが報告されている¹¹⁾。当報告の *P. aeruginosa* PA14 と本研究で用いた *P. aeruginosa* ATCC27853 が同様の挙動を示すと仮定し、図 1 に示した *P. aeruginosa* ATCC27853 の培養時間とバイオマスの関係からそのバイオフィーム形成過程を推測すると、培養 3 時間までのバイオマスの緩やかな増加は担体であるペグ表面に付着した菌体の増加を意味しており、Surface naive な細菌から Surface sentient な細菌となる過程に相当するものと考えられる。培養 3 時間から 6 時間でバイオマスの増加率が高くなったことは、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、不可逆的に付着した細菌から EPS が放出された結果として解釈され、マイクロコロニー形成過程に相当するも

のと考えられる。その後、培養 9 時間でバイオマスが増大したことは、Surface sentient な細菌からの EPS 放出量が多くなり、マイクロコロニーが 3 次元的構造体であるバイオフィームを形成したものと解釈され、培養 9 時間以降がバイオフィーム形成に相当するものと考えられる(図 3)。本論文では、*P. aeruginosa* ATCC27853 のバイオフィーム初期形成過程を、マイクロコロニーの形成が示唆された 6 時間の培養時間までとして取り扱うこととした。

可逆的な付着過程では Surface naive な細菌が多く存在することから、殺菌効果を有する消毒薬により殺菌されることでバイオフィーム形成は抑制され、生菌の代謝活性は消毒薬の殺菌効果に依存して抑制されるものと考えられる。AHP と H_2O_2 を作用すると、抑制率 50% 以上ではほぼすべてのペグでバイオフィーム形成と代謝活性に抑制効果が認められた(図 4 (a))。一方、抑制率 90% 以上ではバイオフィーム形成の抑制効果が認められるペグは供試ペグ数の 4~5 割程度であり、代謝活性の抑制効果が認められるペグ数は供試ペグ数の 6~8 割程度であった(図 4 (d))。AHP は *P. aeruginosa* ATCC15442 に対して 1 分間の作用で殺菌効果が認められている¹⁸⁾。そのため Surface naive な細菌は AHP により殺菌されることが示唆された。代謝活性の抑制効果を示さないペグが存在することから、1 時間のプレ培養時間でも Surface sentient な細菌が存在することが示唆された。Surface sentient な細菌の存在確率が高い 3 時間のプレ培養時間でも、抑制率 50% では 1 時間のプレ培養時と同様の傾向を示し、抑制率 90% 以上ではバイオフィーム形成の

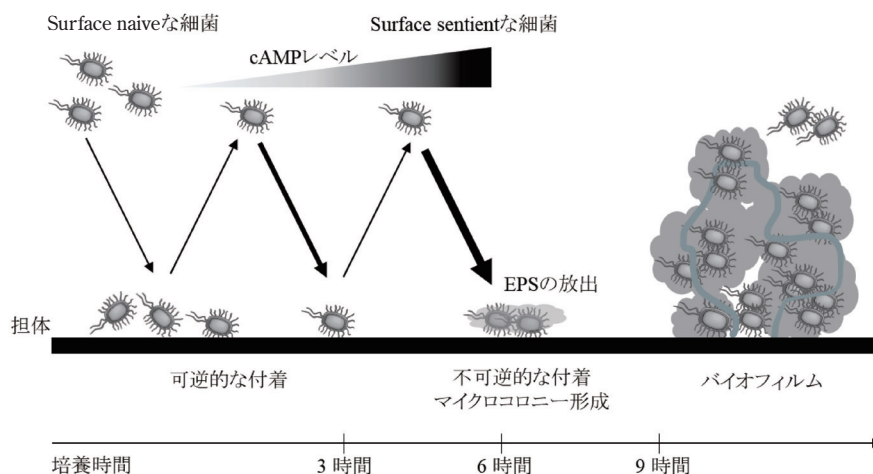


図 3 *P. aeruginosa* ATCC27853 のバイオフィーム形成過程の模式図^{11,12)}

抑制効果は低下した (図 4 (b)(e))。以上より、AHP と H_2O_2 はペグに付着した Surface sentient な細菌への殺菌能を有することが明らかとなった。マイクロコロニーを形成している 6 時間のプレ培養では、抑制率 50% 以上でもバイオフィーム形成の抑制効果が認められるペグ数は 0.5% H_2O_2 と 1% H_2O_2 では供試ペグ数の 2 割程度であり、AHP と 3% H_2O_2 では 4～5 割であったのに対し、代謝活性の抑制効果が認められるペグは 0.5% H_2O_2 と 1% H_2O_2 では供試ペグ数の 6 割程度であり、AHP と 3% H_2O_2 では 8～9 割であった。抑制率 90% ではバイオフィーム形成の抑制効果が認められるペグはほとんどなく、3% H_2O_2 で供試ペグの 2 割で抑制効果が認められた。代謝活性の抑制効果を示したペグは、AHP で供試ペグ数の 6 割、3% H_2O_2 で 8 割、1% H_2O_2 で 5 割、0.5% H_2O_2 で 3 割となった。このことは、AHP と H_2O_2 はマイ

クロコロニー内に存在する細菌への殺菌能を有し、0.5% H_2O_2 を含有する AHP は、0.5% H_2O_2 より高い効果を示すことを意味している。以上より、 H_2O_2 を含む酸素系酸化剤ではマイクロコロニーの除去はできないものの、マイクロコロニー内に生息する細菌を殺菌できることが示唆された。

NaOCl を作用すると、1 時間のプレ培養時間においてバイオフィーム形成の抑制を示すペグは、抑制率 50% 以上で供試ペグ数の 4 割であるのに対し、抑制率 90% 以上では 0 であり、代謝活性の抑制を示すペグは抑制率 50% 以上で供試ペグの 2～4 割、抑制率 90% 以上では 0 となった (図 4 (a)(d))。これは、TSB 培地により NaOCl が不活化され、有効塩素濃度が低下したためと解釈された。バイオフィームの初期形成過程に対する NaOCl の効果を検討するためには、作用前に有効塩素

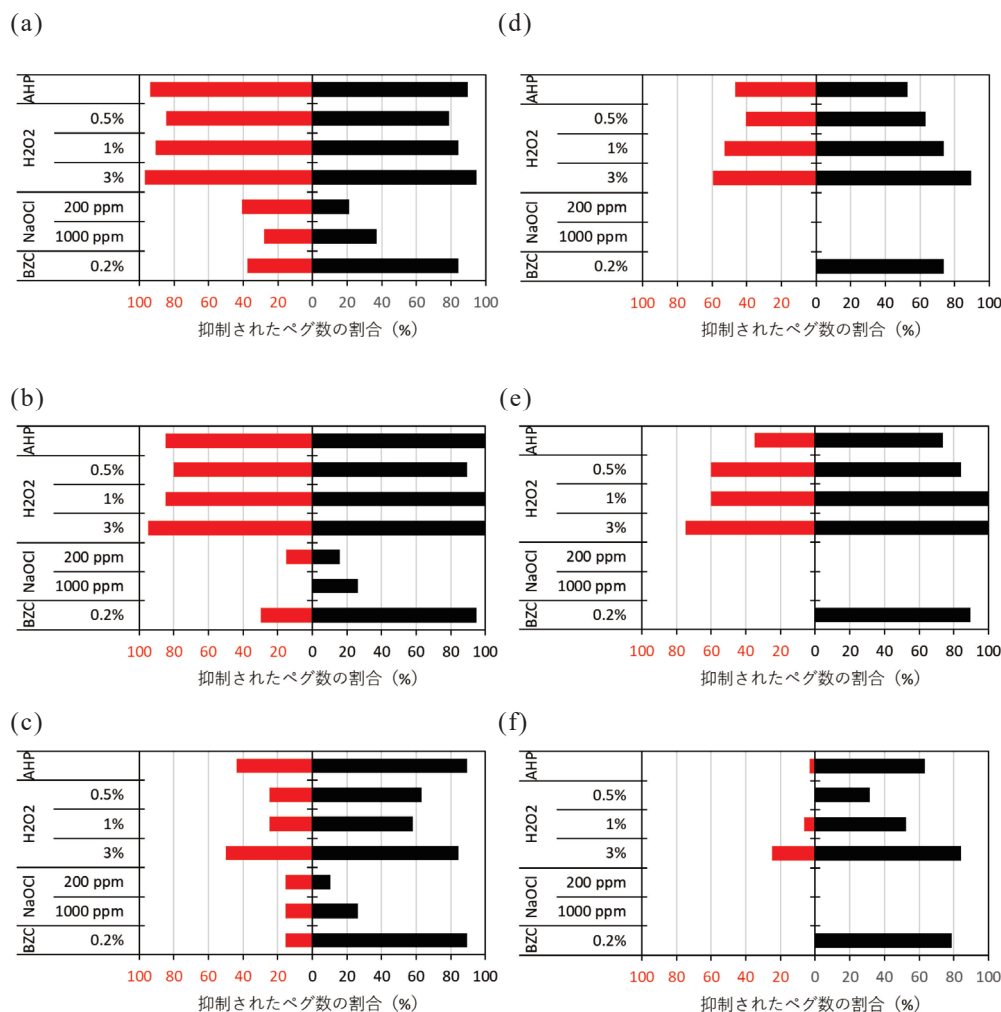


図 4 薬剤の作用により供試ペグ数に対して抑制されたペグ数の割合

(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
赤：バイオフィーム形成の抑制、黒：代謝活性の抑制

濃度が低下しない新たな実験系を採用する必要がある。

0.2%BZC を作用すると、1 時間のプレ培養時間において、抑制率 50% 以上ではバイオフィーム形成の抑制を示すペグは供試ペグ数の 4 割であるのに対し、代謝活性の抑制を示すペグは供試ペグの 8 割であった。抑制率 90% 以上ではバイオフィーム形成の抑制を示すペグはなく、代謝活性の抑制を示すペグは供試ペグの 8 割であった。さらにプレ培養時間を長くしても、代謝活性の抑制を示すペグは供試ペグの 8 ～ 9 割を維持した。このことは、BZC はバイオフィーム形成の抑制効果は高いものの、バイオフィーム形成初期過程において、マイクロコロニー内に存在する細菌に対して殺菌能を有することが示唆された。

水周りに存在するバイオフィームは、バイオフィーム形成初期過程を経て 3 次元的な構造体であるバイオフィームへと成熟するが、バイオフィームの生育環境は富栄養状態から貧栄養状態まで多岐にわたることに加えて、単一菌種のみが存在することはなく、バイオフィーム内に生息する細菌の種類も多種多様である。本研究では、単一の *P. aeruginosa* を用いており、実環境を模倣した実験系ではないが、可逆的な付着過程からマイクロコロニーの形成に至るバイオフィーム形成の初期過程において、酸素系酸化剤である H_2O_2 や AHP、低水準消毒薬である BZC がマイクロコロニー内の生菌への殺菌能を有することが示唆された。このことは、マイクロコロニーを成長させる生菌が減少することで EPS の放出量が減少し、結果としてコロニー発達の遅延につながり、最終的にはバイオフィーム形成の遅延につながることが期待される。一方で、クリスタルバイオレット染色法で求めたバイオマスは、細菌の生死にかかわらずペグに付着した細菌と EPS 等の量を包括的に示している。バイオフィーム形成の抑制効果が認められず代謝活性の抑制効果が認められることは、バイオフィーム内の生菌への殺菌能を有するが、ペグに付着したバイオマスの除去能は乏しいことを意味しており、浮遊細菌の温床になるリスクは保持しているといえる。水周りの感染対策としてバイオフィームの除去が最も有効な手段であるが、バイオフィーム形成初期段階に酸素系酸化剤や BZC の化学的作用を活用した日常清掃を行うことが推奨される。さらに、本研究では、2 つの指標としてバイオマスおよびバイオフィーム内部に存在する微生物の活性状態の把握に着目することで、バイオフィーム形成初期段階への介入の有

用性を示唆することができた。これらの指標は、今後のバイオフィーム研究やその対策への一助になることが期待される。

5. 結 論

P. aeruginosa ATCC27853 のバイオフィーム形成過程は、培養 1 時間で Surface naive な細菌と Surface sentient な細菌が共存し、培養 3 時間から 6 時間で 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 時間でマイクロコロニーが形成され、培養 9 時間以上でバイオフィームが形成されることが示唆された。可逆的な付着過程からマイクロコロニーの形成に至るバイオフィーム形成の初期過程において、本研究で用いた消毒薬および殺菌剤はいずれもバイオフィーム形成に対する抑制効果は乏しいが、酸素系酸化剤である H_2O_2 と AHP、または BZC はマイクロコロニー内の生菌に対する殺菌能を有することが明らかとなった。

■利益相反

菊地原紀裕はシーバイエス株式会社の社員である。

■引用文献

- 1) 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).
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Fred AP, Flournoy DJ. Prevalence of gentamicin-and amikacin-resistant bacteria in sink drains. *J Clin Microbiol* 1980; 12(1): 79-83.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
 - 10) Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* 2019; 7: 824 (1-17).
 - 11) 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.
 - 12) Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology* 2007; 5(11): e307.
 - 13) Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants, *Mol. Microbiol.* 2003; 48(6): 1511-1524.
 - 14) Issa R, Chanishvili N, Caplin J, Kakabadze E, Bakuradze N, Makalata K, et al. Antibiofilm potential of purified environmental bacteriophage preparations against early stage *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 2019; 126: 1657-1667.
 - 15) Tachikawa M, Yamanaka K, Nakamuro K. Studies on the Disinfection and Removal of Biofilms by Ozone Water Using an Artificial Microbial Biofilm System. *Ozone: Sci. Eng.* 2009; 31: 3-9.
 - 16) Tachikawa M, Yamanaka K. Synergistic disinfection and removal of biofilms by a sequential two-step treatment with ozone followed by hydrogen peroxide, *Water Res.* 2014; 64: 94-101.
 - 17) 日本産業衛生学会. 許容濃度の勧告 (2020 年度). *産衛誌*. 2022; 64(5): 253-285.
 - 18) 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.
 - 19) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 Update: May 2019; 47 — 48. <https://www.cdc.gov/infection-control/guidelines/disinfection/>: 2022 年 11 月 16 日現在.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 古畑勝則, 福山正文. バイオフィーム構成菌に関する基礎的検討. *麻布大学雑誌* 2008; 17-18: 145-149.

The efficacy of disinfectants against early stage of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Norihiro Kikuchihara^{1,2}, Yuriko Matsumura^{1*}, Atsuo Iwasawa¹, Satoshi Kimura¹

¹ Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School

² R&D Department, CXS Corporation

* Corresponding author

Abstract

Background

Gram-negative bacilli showing biofilm forming ability provide a resistance to disinfectants by forming biofilms around the aqueous environments. There have been few reports on the effect of disinfectants on the early steps in biofilm formation

Objective

The effect of accelerated hydrogen peroxide (AHP), hydrogen peroxide (H₂O₂), Benzalkonium Chloride (BZC), and sodium hypochlorite on the early stage of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Methods

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

Results

In the formation process of *P. aeruginosa* ATCC 27853 biofilms, Surface-naïve and Surface-sentient bacteria coexist in 1 hour of incubation, and Surface-sentient bacteria irreversibly adhere to the substrate surface in 3 to 6 hours of incubation. Microcolonies were formed after 6 hours of incubation, and biofilms were formed after 9 hours of incubation. AHP and H₂O₂ 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. AHP, H₂O₂, and BZC showed the inhibitory effect on the viability of the biofilm.

Conclusions

It was suggested that AHP, H₂O₂, or BZC had bactericidal activity against viable bacteria in microcolony in the early steps in biofilm formation, although the biofilm formation inhibitory effect was poor.