

論文の内容の要旨

論文題目 **Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* in Water by Using Silver and Copper**
(銀及び銅を用いた水中の *Legionella pneumophila* と
Pseudomonas aeruginosa の不活化)

氏名 黄明九

本研究は、肺病の原因となる水系病原細菌である *Legionella pneumophila* および *Pseudomonas aeruginosa* を対象とし、人工水道水における増殖特性、原生動物と共存した場合の細胞内増殖特性、消毒剤としての銀と銅の消毒効果とメカニズムの定量的分析、原生動物の存在が消毒にあたえる影響の評価を目的としている。

本論文は9章から構成されており、第1章では研究の動機と目的ならびに研究の流れを示した。第2章では本研究に関する既存の研究をまとめた。第3章では研究に用いた微生物の種類と培養法や試料採取時期と準備方法、分析方法等を説明した。第4章から第8章では本研究の実験結果と解析を示し、第9章では本研究から明らかになった結論を整理した。

第1章と第2章は本研究の背景である。人間が利用する水の中に病原微生物が存在すると、水系感染症に罹患する危険が生じる。水の消毒法としては、塩素消毒に加え、紫外線処理やオゾン処理、膜処理、他の消毒剤開発等の代替手法が研究されている。その中で、最近、銀と銅の消毒特性についての研究が活発に行われている。特にグラム陰性 *L. pneumophila* は「呼吸を通じて身体へ感染して肺炎の原因となる」と知られている危険な微生物である。生理学的観点で *L. pneumophila* は、環境ストレスに対して VBNC (viable but non cultivable、生命力は有るが増殖は出来ない) という状態に入る特性が報告されている。VBNC 状態にいる *L. pneumophila* は、増殖に適する環境条件(栄養分、ミネラル、pH など)になると再活性化(resuscitation、または再増殖すること)する特性があり、特に *Acanthamoeba polyphage* などの原生動物に寄生するとその細胞中で再活性化することが報告されている。さらに、原生動物の細胞内で再活性化した *L. pneumophila* は、浮遊状態(planktonic state)より消毒剤に高い耐性を示すことが報告されている。

本論文では、銀(Ag^+)と銅(Cu^{++})を消毒剤とし人工水道水(synthetic drinking water, SDW) (pH 7.0, 25°C)に注入して、消毒剤による *Legionella pneumophila* の不活化特性を *Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli* の結果と比較しながら明らかにした。また、3種類の細菌が *Acanthamoeba polyphage* 細胞と共存した場合の特性を調べ、アメーバに寄生した時 (amoeba state)の消毒剤に対する感受性と浮遊状態(planktonic state)での感受性とを比較した。なお、細菌の不活化特性をモニタリングするためにフローサイトメーター(flow cytometer, FCM)の適用可能性を検討した。

以下に、第4章から第8章までの各章で行った研究の内容と、その結果をまとめる。

第4章は、微生物の特性モニタリングするためのフローサイトメーター(flow cytometer, FCM)の適用可能性についての検討である。細菌の Ag^+ と Cu^{++} に対する生存特性と細菌数は、SYTO-9 と propidium iodide (PI)の2種類の核酸染色プローブの細胞膜浸透性を利用して区別でき、FCMを用いて生存微生物数を測定することが可能であることを示した。特に、VBNC状態にある *L. pneumophila* はコロニー(colony)計数法で検出できなかったが、FCMを用いた場合は検出されるという現象を明らかにした。

第5章は、 Ag^+ と Cu^{++} に対する浮遊状態(planktonic state)の細菌の生存特性の評価である。3種類の細菌は、銀(0.1mgAg/L)と銅(1.0mgCu/L)の8時間の接触により、初期濃度 1.0×10^7 cells/ml の菌数から検出限界以下まで不活化されることが観察された。 Ag^+ と Cu^{++} の消毒能力を評価するため、接触時間(T)と菌体あたり蓄積している金属量 C_s 値の積($C_s \times T$ 値)と菌の生残率($\text{Log}N_t/N_0$)の關係に着目して結果を整理した。検出限界以下となるような不活化(7.2 log reduction)に必要な $C_s \times T(7.2)$ 値は、 Ag^+ に対してそれぞれ 10.38×10^{-6} (*L. pneumophila*), 3.12×10^{-6} (*P. aeruginosa*)、 2.04×10^{-6} $\mu\text{gAg}/\text{cell} \times \text{hr}$ (*E. Coli*)と算出された。 Cu^{++} に対しては、それぞれ 64.34×10^{-6} (*L. pneumophila*), 2.30×10^{-6} (*P. aeruginosa*)、 1.45×10^{-6} $\mu\text{gCu}/\text{cell} \times \text{hr}$ (*E. Coli*)と算出された。これらの結果から、*L. pneumophila* が他の微生物より Ag^+ と Cu^{++} に対して耐性が高いことが明らかになった。

第6章と第7章は、栄養分が制限された環境(消毒剤は含まず)においてVBNC状態に入る細菌の生理学的特性と、*A. polyphage* 細胞中での再活性化(resuscitation)特性の調査である。VBNC状態の菌数はSYTO-9とPIを適用したFCM分析で計測し、増殖可能状態の菌数はコロニー計数法(CFU counting)を用いて計測し、両者を比較した。*P. aeruginosa* の場合は、SDW環境でも 5.5×10^4 から 1.7×10^6 CFU/ml に細菌数が増えたが、*L. pneumophila* の場合、細菌を注入してからすぐに増殖可能状態の菌数は減少し、30日後にはコロニー計数法では不検出となった。しかし、増殖可能状態の菌数とは異なり、FCMによるVBNC状態の菌数は190日の培養期間において一定に維持された。

VBNC状態に入っていた *L. pneumophila* は、*A. polyphage* と共存するとアメーバの細胞中で増殖可能性を回復し(再活性化)、SDW環境でもアメーバ細胞内では増殖 (intracellular multiplication) することが明らかになった。VBNC状態に入っていてコロニー計数法では検出

限界以下であった *L. pneumophila* は、7 日間でアメーバ細胞内において 1.7×10^7 CFU/ml まで増殖した。この実験結果と類似の結果が *P. aeruginosa* の実験でも見られたが、*E. coli* の場合は、*A. polyphage* と共存すると細菌数が減少した。

第 8 章は、*L. pneumophila* と *P. aeruginosa* が *A. polyphage* の細胞内に存在する状態(amoeba state) と浮遊状態(planktonic state)における、 Ag^+ (0.1mgAg/L)、 Cu^{++} (1.0mgCu/L) と Ag^+ と Cu^{++} 混合による消毒特性を比較研究した。消毒剤を注入してから 1 時間以内で、浮遊状態の *L. pneumophila* と *P. aeruginosa* は、初期濃度 (約 2×10^7 CFU/ml) から 24 時間以内で検出限界以下まで不活化されたが、アメーバ細胞内に存在する細菌数は、消毒剤注入から 7 日後にも 5.6×10^1 CFU/ml 以上生残していることが観察された。注入した消毒剤を分画して定量した結果、約 30~40% が残留消毒剤として水中に残り、約 40~50% の Ag^+ と Cu^{++} はアメーバ細胞に蓄積し、約 20% が浮遊状態の細菌に蓄積し、約 0.2~0.5% の Ag^+ と Cu^{++} がアメーバ細胞内の細菌に蓄積していることが明らかとなった。第 5 章で観察された $\text{Cs} \times \text{T}$ (7.2) 値と、本章での浮遊状態の菌およびアメーバ細胞内に存在している菌の $\text{Cs} \times \text{T}$ 値の比較を行った。接触開始から 1 日後の浮遊状態の $\text{Cs} \times \text{T}$ 値は $\text{Cs} \times \text{T}$ (7.2) 値より大きく、検出限界以下まで不活化された。 Ag^+ と Cu^{++} 個別に加えた場合について、アメーバ細胞内に存在する細菌については 7 日後の $\text{Cs} \times \text{T}$ 値は $\text{Cs} \times \text{T}$ (7.2) 値以下であり、生残していた。 Ag^+ と Cu^{++} の両方を加えた場合について、細胞内に存在する細菌の 7 日後の $\text{Cs} \times \text{T}$ 値は Ag^+ と Cu^{++} の両方を加えた場合の $\text{Cs} \times \text{T}$ (7.2) 値より大きく、検出限界以下まで不活化された。この結果から、水中のみならずアメーバに寄生している状態の細菌についても、 $\text{Cs} \times \text{T}$ 値を用いることにより Ag^+ と Cu^{++} による不活化特性を説明できることを示した。*L. pneumophila* と *P. aeruginosa* の生存と増殖特性に対するアメーバの役割は、細菌の増殖の場を提供するだけでなく、消毒剤や環境ストレスを緩和する保護膜としても作用することが明らかになった。

第 9 章は、本研究の結果から得た結論の取りまとめである。水中に存在する微生物をモニタリングするためのフローサイトメーター(FCM)の適用は、コロニー係数法より迅速で正確な結果を出すことが明らかになった。消毒剤としての Ag^+ と Cu^{++} は、浮遊微生物だけでなく原生動物の細胞内に寄生している微生物の不活化にも高い効果を示した。微生物に蓄積している Cs と $\text{Cs} \times \text{T}$ 値を通じて、消毒メカニズムや消毒に対するアメーバの役割等を定量的に解析することが出来た。*L. pneumophila* は、*P. aeruginosa* や *E. coli* より Ag^+ と Cu^{++} に対する耐性が高いことが分かった。また、*L. pneumophila* は、栄養分が少ない水道水等の環境に適応して、VBNC 状態に入って生命力を維持することが明らかになった。さらに、*A. polyphage* に寄生すると、アメーバの細胞内で再活性化して増殖することが明らかになった。同時に、消毒剤に対する耐性も浮遊状態より非常に高くなることを明らかにした。