

〈原 著〉

温水洗浄便座で生成した次亜塩素酸水の緑膿菌に対する除菌効果

伊丹 愛子^{1,3)}・榎原 京子²⁾・堀 賢¹⁾*Eradication Effect of Electrolyzed Hypochlorous Acid Water Produced by Electronic Bidet Toilet Seat System against Pseudomonas aeruginosa*Aiko ITAMI^{1,3)}, Kyoko KUWAHARA²⁾ and Satoshi HORI¹⁾¹⁾Department of Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University,²⁾Department of Microbiology, School of Medicine, Juntendo University, ³⁾Department of Research Institute, TOTO LTD.

(2017年8月10日受付・2017年12月5日受理)

要 旨

近年、温水洗浄便座の汚染が医療関連感染の原因菌を媒介しない衛生的な温水洗浄便座が求められている。最新の温水洗浄便座では、水道水を電気分解して次亜塩素酸水（中性電解水）を生成し、ノズルを洗浄する機能を有している製品がある^{1,2)}。本研究では、次亜塩素酸水生成機能付き便座で生成された低濃度中性電解水を用いて、医療関連感染で問題となりやすい緑膿菌に対する、除菌効果を明らかにすることを目的として本研究を実施した。その結果、緑膿菌臨床分離株、環境分離株とも次亜塩素酸濃度0.5 mg/Lで30秒以上、1.0 mg/Lで5秒以上接触させることで、90%以上の株で菌濃度2桁以上の除菌効果が得られた。以上の結果から、中性電解水は、低濃度でも接触時間と作用間隔を最適化すれば、緑膿菌に対して除菌効果があることが示唆された。

Key words : 温水洗浄便座, 緑膿菌, 中性電解水, 除菌

序 文

温水洗浄便座の世帯普及率は81.2%に達しており、医療現場でも広く普及している。近年、環境を介した水平伝播防止の観点から、温水洗浄便座の汚染が医療関連感染の原因菌を媒介しない衛生的な温水洗浄便座が求められている。最新の温水洗浄便座の一つには、水道水を電気分解して次亜塩素酸水（中性電解水）を生成し、ノズルを洗浄する機能を有している。榎原らの研究³⁾は、事前にノズルを培養液に浸し35℃で2日間培養後、ノズル表面にバイオフィームが付着した状態からの中性電解水の洗浄条件について報告しており、実際の使用条件とは大きく異なっている。私たちは、ノズルに付着した汚染菌が増殖する前に中性電解水で定期的に洗浄すれば、菌の過剰な増殖を抑制できると考えた。本研究では、医療施設で問題となりやすい緑膿菌を用いて、培養時間と菌の増殖の関係及び、液中での中性電解水の除菌効果を

明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 試験菌株

順天堂医院で2015年～2016年に入院患者から分離された緑膿菌臨床分離株44株(このうち、PCR-based ORF Typing (POT法)のみ28株)、水まわり汚れから分離された緑膿菌環境分離株8株を用いた。

2. 菌の前培養

保存菌株から普通寒天平板培地に1白金耳移植し、温度35±1℃で20時間培養した。

3. 試験菌液の調整

試験菌の菌体1白金耳量を500倍に希釈したニュートリエントブロス(以後1/500 NB)にミキサーで均一に分散させる。分光光度計において600 nmの波長で透過率が70%となるように菌液濃度を調製することで、菌液濃度を約10⁸ cfu/mLに調製した。調製した菌液を、1/500 NBを用いて、規定濃度に希釈し試験菌液とした。

¹⁾順天堂大学大学院感染制御科学, ²⁾順天堂大学微生物学, ³⁾TOTO株式会社総合研究所

4. 混釈培養法による菌数測定

菌液をミキサーでよく攪拌後に10倍希釈系列を作製し、標準寒天培地で混釈後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で48時間培養した。培養後、原則として30~300 cfu/シャーレの集落が出現した希釈系列のコロニー数を計測した。

5. 緑膿菌増殖試験方法

JIS Z2801 抗菌加工製品—抗菌性試験方法⁴⁾に準拠して増殖を観察した。

1) 試験片の清浄化

5 cm 角のABSプレートを、99%エタノールを吸収させた脱脂綿で軽く2~3回拭いた後、十分乾燥し試験片とした。

2) 菌液の接種

約 10^4 cfu/mLに調製した試験菌液をピペットで試験片1枚当たり300 μL 接種した。ピンセットを用いて4 cm 角ストマッカーフィルムをのせ、試験菌液がフィルム全体に行きわたるようにピンセットで軽く押さえつけた後、培養した。

3) 培養

試験菌液を接種した試験片の入ったシャーレを $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度90%以上で4, 8, 12時間培養した。

4) 菌液の回収

規定時間培養後、試験片を滅菌済ストマッカー袋内にいれ、これにピペットで生理食塩水9 mLを加えて十分にもみ、試験菌を洗い出した。洗い出し液の1 mL当たりの菌数を混釈培養法により測定した。

6. 中性電解水殺菌試験方法⁵⁾

1) 中性電解水の調製

実機カットモデル内の白金系触媒をコーティングした次亜塩素酸生成電極を有する電解槽に、遊離残留塩素を除去した神奈川県茅ヶ崎市が供給する水道水(pH 7.5 \pm 0.1に調製)を通水し、中性電解水を生成した。実際の温水洗浄便座では、水質、温度、使用期間等によって生成される次亜塩素酸濃度は変動するが、本研究では0.3 mg/L、0.5 mg/L及び1.0 mg/Lの中性電解水を生成した。

2) 菌液の接種

約 10^7 cfu/mLに調整した試験菌液を、磁性スターラーで攪拌している中性電解水49.5 mLに0.5 mL接種した。

3) 菌液の回収

5, 30, 60秒反応させた後、10%チオ硫酸ナトリウム50 μL が入った滅菌シャーレに1 mL分取した。それと同時にさらに1 mLを分取し、0.1%チオ硫酸ナトリウムを含有した生理食塩水9 mLに加えてよく攪拌した。この回収液の1 mL当たりの菌数を混釈培養法により測定した。

7. PCR-based ORF Typing (POT) 法によるタイピング

1) 遺伝子抽出と遺伝子増幅法

シカジーニース[®]DNA抽出試薬(関東化学株式会社、東京)を用いて緑膿菌臨床分離株及び環境分離株の遺伝子抽出を行った。緑膿菌用シカジーニース[®]分子疫学解析POTキット(関東化学、東京)を用いてPCRを行った。

2) アガロースゲル電気泳動

1 \times TBE緩衝液を用いた4%アガロースゲルを用いて、120 Vで約1時間電気泳動を行った。その後、臭化エチジウム溶液に30分浸漬後、UVトランスイルミネーター下でゲルの写真撮影を行った。

3) POT型の決定

電気泳動後のバンドパターンから、緑膿菌用シカジーニース分子疫学解析POTキット(関東化学)の取扱説明書に従いPOT型を決定した。

結 果

1. 緑膿菌増殖試験

緑膿菌臨床分離株44株、緑膿菌環境分離株8株を、培養時間が4, 8, 12時間の時点で10倍あるいは100倍以上(cfu/cm²)増殖した菌株の割合を示す(図1)。

臨床分離株は、4時間では10倍以上増殖した株は0%(0/44株)であった。8時間では、増殖10倍未満の株が89%(39/44株)、10倍以上100倍未満増殖した株が11%(5/44株)であった。12時間では、増殖10倍未満の株が43%(19/44株)、10倍以上100倍未満増殖した株が27%(12/44株)となり、100倍以上増殖した株が34%(15/44株)であった。

一方環境分離株は、4時間では10倍以上増殖した株は0%(0/8株)であった。8時間では、10倍以上100倍未満増殖した株が13%(1/8株)であった。12時間では、10倍以上100倍未満増殖した株が38%(3/8株)となり、100倍以上増殖した株が63%(5/8株)となった。

2. 中性電解水殺菌試験

中性電解水での緑膿菌臨床分離株及び環境分離株の殺菌試験の結果を示す(図2)。生菌数が2桁(cfu/ml)以上減少した場合に「除菌された」と定義し、各濃度での除菌に至らなかった株の割合を生存率として示した。

臨床分離株は、次亜塩素酸濃度が0.3 mg/Lにおいては、接触時間が5秒間では2%(1/44株)、30秒間では95%(42/44株)の株が除菌された。また、0.5 mg/Lにおいては、5秒間で68%(30/44株)、30秒間では100%(44/44株)の株が除菌された。1.0 mg/Lにおいては、5秒間で100%の株が除菌された。

一方環境分離株は、次亜塩素酸濃度が0.3 mg/Lにお

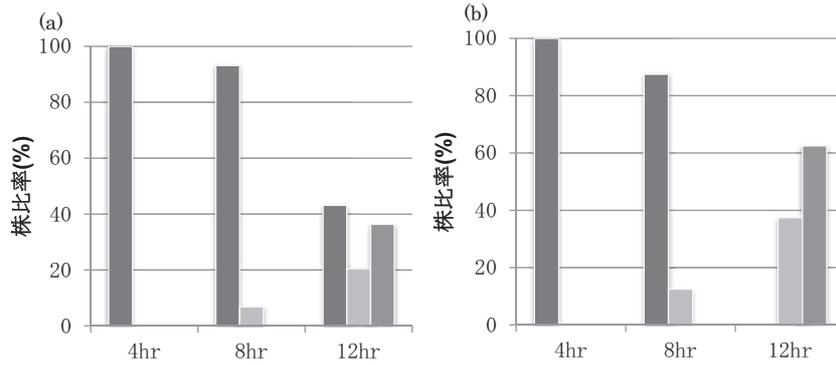


図1 緑膿菌増殖試験結果

培養開始後の増殖の様子を経時的に示す。(a) 緑膿菌臨床分離株, (b) 緑膿菌環境分離株であり, 増殖の程度は, ■ 10倍未満, ■ 10倍以上100倍未満, ■ 100倍以上で表記している。

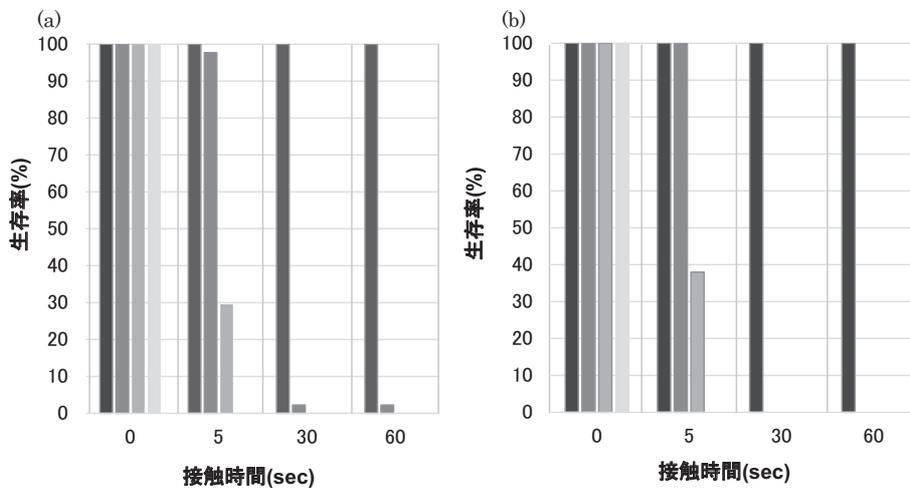


図2 中性電解水による殺菌試験

中世電解水による除菌試験結果を示す。(a) 緑膿菌臨床分離株, (b) 緑膿菌環境分離株であり, 次亜塩素酸濃度はそれぞれ, ■ 0.0mg/L, ■ 0.3mg/L, ■ 0.5mg/L, ■ 1.0mg/Lで表記してある。

いては, 接触時間 30 秒間で 100% (8/8 株) の株が除菌された。また, 0.5 mg/L においては, 5 秒間で 38% (3/8 株), 30 秒間では 100% (8/8 株) の株が除菌された。1.0 mg/L においては, 5 秒間で 100% (8/8 株) の株が除菌された。

図3に次亜塩素酸濃度と接触時間を掛け合わせた値(以下CT値)と除菌可能な緑膿菌株の割合を示した。その結果から, CT値がある一定以上を超えると急激に除菌可能な株の割合が上昇し, 約0.07 (mg・min/L) 以上の時, 除菌可能な株の割合が90%を超えることが示された。

3. POT法による遺伝子タイピング

表1に臨床分離株及び環境分離株の同一POT型の検出株数と, 同一POT型の検出頻度を示した。POT1, POT2ともに同一の値の場合同一の株とみなした。臨床分離株(分離原E)では, 36% (10/28株)の株につい

て同一の株が得られたのに対し, 環境分離株(分離原C)では, 13% (1/8株)について同一の株が得られた。

考 察

緑膿菌増殖試験において, 緑膿菌臨床分離株と環境分離株を比較すると, 培養時間4時間, 8時間では培養挙動に違いが見られなかったが, 12時間培養時点で増殖一桁未満の株が, 臨床分離株では43% (19/44株)であったのに対し, 環境分離株では0% (0/8株)であり, 環境分離株は臨床分離株と比べより多くの株で増殖することが示された。本研究の試験条件が, 栄養レベルを低く抑えた状態での, 増殖挙動である。そのことから, 人から分離された臨床分離株と比較して, 水まわり環境から分離された環境分離の方が低栄養条件において, 増殖速度が早いことが示唆された。

中性電解水殺菌試験では, 次亜塩素酸の濃度が上がる

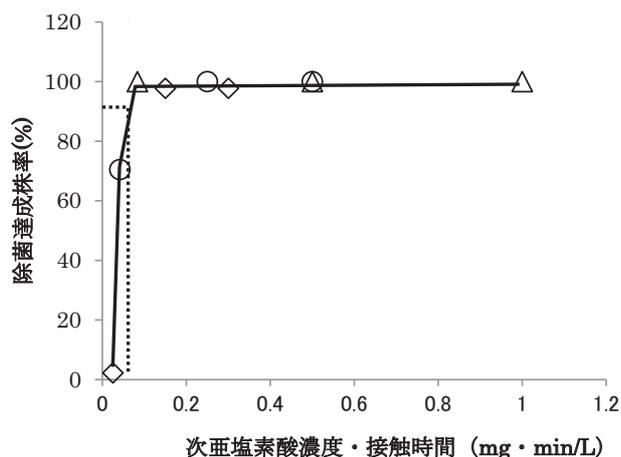


図3 次亜塩素酸濃度別の接触時間と除菌の程度

次亜塩素酸との接触時間と2桁以上の除菌を達成できた菌株の割合を次亜塩素酸濃度別に示す。次亜塩素酸は、◇0.3mg/L, ○0.5mg/L, △1.0mg/Lで表記してある。

に従って除菌可能な株の割合が増えることが示されたが、緑膿菌環境分離株と臨床分離株では明確な違いは見られなかった。本研究のような水道水を電気分解して得られる低濃度の中性電解水においても、CT値を規定値以上とすることによって、緑膿菌に対して除菌効果があると推察された。

一方で、POT法を用いた遺伝子タイピングによる遺伝的多様性の検討では、緑膿菌臨床分離株は環境分離株と比べて同一株が検出される割合が高くなった。本研究で使用した環境分離株は8株と少ないため、明確な有意差は見られないものの、環境分離株の方が臨床分離株と比較して、遺伝的多様性が大きいことが示唆された。過去の知見からも同じ病院内で分離された細菌と比較して、市中で分離された細菌は遺伝的多様性が大きいとの報告がある⁵⁾。つまり当院においては、感染経路は特定できないが、通院患者間で緑膿菌が水平伝播した可能性も否定できない。そのことから、中性電解水のノズル洗浄機能を導入することで水平伝播のリスクを低減する効果があると考えられる。

結 論

臨床分離株、環境分離株ともに培養時間8時間では、2桁以上増殖した株が0% (0/44株, 0/8株)であったのに対し、培養時間12時間では、2桁以上増殖した株が40%以上 (18/44株, 5/8株)となった。以上から中性電解水での温水洗浄便座ノズルの洗浄間隔は、菌が2桁以上増殖する前の8時間以下とすることが望ましいと考えられた。

CT値を0.07以上とすることで、除菌効果が得られたことから、適正な濃度と洗浄時間を設定することで、ノズルを除菌可能であることが示唆された。

表1 臨床分離株の同一POT型の検出株数をPOT型別に表示する。

分離原	POT1	POT2	検出株数 (株)
C	387	32	3
C	472	0	2
C	201	16	2
C	46	0	2
C, E	105	16	2
C	574	16	1
C	574	0	1
C	123	0	1
C	118	0	1
C	44	0	1
C	575	0	1
C	383	0	1
C	314	48	1
C	93	0	1
C	125	16	1
C	54	0	1
C	121	0	1
C	415	0	1
C	636	48	1
C	392	0	1
C	894	0	1
C	319	4	1
C	294	0	1
E	538	48	1
E	223	18	1
E	894	48	1
E	206	20	1
E	895	48	1
E	887	18	1
E	392	50	1
Total			36

検出頻度は、総検体数に占める各POT型の割合である。

臨床分離株を分離原C、環境分離株を分離原Eとした。

利益相反自己申告：

伊丹愛子は TOTO 株式会社の社員である。

堀賢は TOTO 株式会社から研究資金援助を受けている。

文 献

- 1) 石井克典, 佐藤基和, 梅本 渉, 林 香里: トイレ機器の衛生管理に用いる水道電解水の水質安全性. 機能水研究 2016; 12: 1-2.
- 2) 日本機能水学会編, 次亜塩素酸水生成装置に関する指針, 第2版-追補, 機能水研究振興財団, 2013.
- 3) 乗原京子, 左 弁, 堀 賢: 温水洗浄便座の洗浄ノズルの除菌条件の検討. 日本環境感染学会 2017; 32: 127-30.
- 4) 日本工業標準調査会: 抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果 (Z2801). 日本工業規格.
- 5) 児玉佑希子, 渡辺瑞希, 竹下朱美, 小島栄一, 庄野伸浩, 森山康司: 水道水の電解水による環境微生物の殺菌効果. 防菌防黴 2011; 39: 279-83.

- 6) Grundmann H, Hori S, Tanner G: Determining Confidence Intervals When Measuring Genetic Diversity and the Discriminatory Abilities of Typing Methods for Microorganisms. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39: 4190-2.

[連絡先 : 〒253-8577 神奈川県茅ヶ崎市本村 2-8-1
TOTO 株式会社総合研究所分析技術第一 G 伊丹愛子
E-mail: aiko.itami@jp.toto.com]

Eradication Effect of Electrolyzed Hypochlorous Acid Water Produced by Electronic Bidet Toilet Seat System against *Pseudomonas aeruginosa*

Aiko ITAMI^{1,3)}, Kyoko KUWAHARA²⁾ and Satoshi HORI¹⁾

¹⁾*Department of Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University,*

²⁾*Department of Microbiology, School of Medicine, Juntendo University,* ³⁾*Department of Research Institute, TOTO LTD.*

Abstract

In recent years, specifications with more stringent hygienic requirements have been needed for toilet seats with electronic bidet sprayers to prevent their contamination and transmission of pathogens responsible for healthcare-associated infections. Some of the latest models of bidet toilet seats are designed to electrolyze tap water and produce hypochlorous acid water (neutral electrolyzed water) to cleanse the spray nozzles^{1, 2)}. This study was performed to clarify the optimal conditions of nozzle cleansing eradication of bacteria effect with low-concentration neutral electrolyzed water using clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* as a common pathogen causing healthcare-associated infection. Exposure to neutral electrolyzed water having a chlorine concentration of 0.5 mg/L for 30 s or longer, or of 1.0 mg/L for 5 s or longer, led to a 2-log or more decrease in the level of *P. aeruginosa* for 90% or more of the strains of both clinical and environmental isolates, thereby demonstrating the eradication of bacteria effect. The results suggest that, for eradication of bacteria against *P. aeruginosa*, neutral electrolyzed water is effective even at low concentrations, provided that the exposure time and intervals are optimized.

Key words: electronic bidet toilet seat, *Pseudomonas aeruginosa*, neutral electrolyzed water, eradication of bacteria