

博士論文

洗浄・殺菌プロセスにおける塩素系酸化剤を用いた海洋性細菌の制御に関する研究

(Studies on the Control of Marine Bacteria using Chlorine-Based Oxidizing Agents in Cleaning and Disinfection Processes)

平成29年9月

三重大学大学院 生物資源学研究科

高橋和宏

目次

序論

第 1 節	緒言	4
第 2 節	本研究論文の構成	10

第 1 章 微生物熱量計を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の増殖速度および付着・未付着の生菌数の測定

第 1.1 節	諸言	12
第 1.2 節	実験方法	14
第 1.3 節	結果	16
第 1.4 節	考察	23
第 1.5 節	結言	25

第 2 章 ステンレス鋼表面への *V. parahaemolyticus* の付着・脱着におよぼす pH の影響

第 2.1 節	諸言	27
第 2.2 節	実験方法	28
第 2.3 節	結果および考察	30
第 2.4 節	結言	35

第 3 章 固体表面に付着および未付着の *V. parahaemolyticus* におよぼす次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の殺菌挙動の動力学的解析

第 3.1 節	諸言	36
第 3.2 節	実験方法	37
第 3.3 節	結果および考察	38
第 3.4 節	結言	41

第 4 章	固体表面に未付着の <i>V. parahaemolyticus</i> および他の細菌におよぼす NaClO ₂ の殺菌効果の動力的解析	
第 4.1 節	諸言	43
第 4.2 節	実験方法	44
第 4.3 節	結果	46
第 4.4 節	考察	53
第 4.5 節	結言	55
第 5 章	固体表面に付着した <i>V. parahaemolyticus</i> におよぼす NaClO ₂ の殺菌効果の動力的解析	
第 5.1 節	諸言	56
第 5.2 節	実験方法	56
第 5.3 節	結果	57
第 5.4 節	考察	59
第 5.5 節	結言	61
第 6 章	ステンレス鋼に付着したタンパク質(BSA)の脱着におよぼす NaClO ₂ の洗浄効果の動力的解析	
第 6.1 節	諸言	62
第 6.2 節	実験方法	63
第 6.3 節	結果	64
第 6.4 節	考察	75
第 6.5 節	結言	79
第 7 章	ステンレス鋼に付着した <i>V. parahaemolyticus</i> の脱着におよぼす NaClO ₂ の洗浄効果の動力的解析	
第 7.1 節	諸言	81

第 7.2 節	実験方法	81
第 7.3 節	結果	83
第 7.4 節	考察	86
第 7.4 節	結言	88
第 8 章	総括	89
	各章発表論文リスト	94
	参考文献	96
	謝辞	108

序論

第 1 節 緒言

食中毒事故の頻発を受け、食品製造業では HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) が義務化される流れになり、食の安全・安心を担保するための微生物制御技術の重要性が増している。微生物制御技術の根幹は、洗浄と殺菌である。現在、食品産業、農業・水産関連産業から医療産業など様々な分野で汎用されている洗浄・殺菌剤は次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) を初めとした塩素系酸化剤である¹⁻⁴⁾。従って洗浄・殺菌技術の高度化のためには、塩素系酸化剤の利活用技術の高度化が重要になる。

NaClO の活性因子は次亜塩素酸 (HClO) である。HClO は、酸化剤であると同時に $pK_a = 7.5$ の弱酸でもある⁵⁾。このため、HClO は水溶液中で解離して ClO^- が生じ、これらの割合は pH に依存して変化する (Fig. 1)^{5, 6)}。非解離型の HClO 分子は電気的に中性な小分子であり、微生物細胞の形質膜を容易に透過

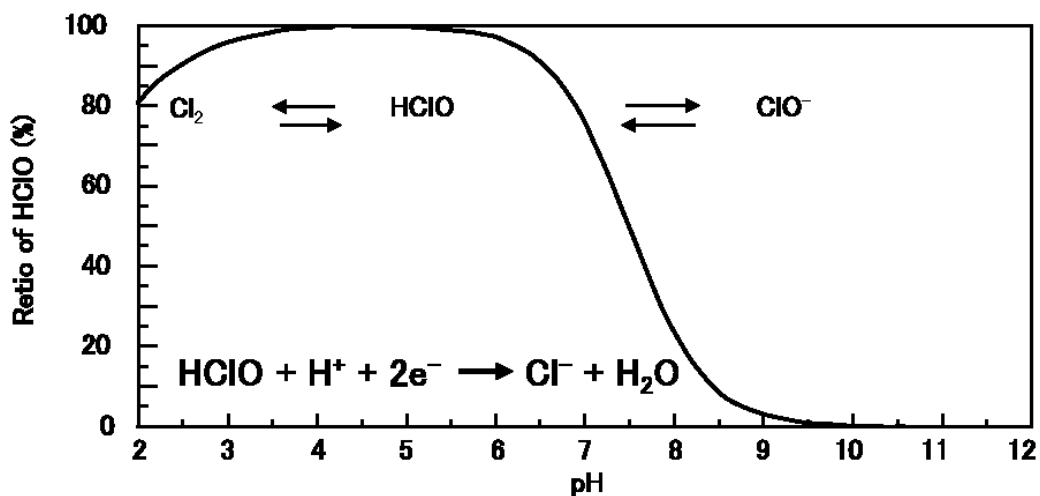


Fig. 1 Ratio of HClO as a function of pH⁶⁾

するため、細胞の中側と外側から酸化作用を及ぼす(Fig. 2)⁶⁾。それに対して解離型の ClO^- 分子は負電荷を帯びているため、形質膜のリン脂質二重層を透過することが出来ないため細胞外側からのみ酸化作用を示す(Fig. 2)⁶⁾。その結果、 HClO 分子は ClO^- 分子よりも高い殺菌効果を示す。

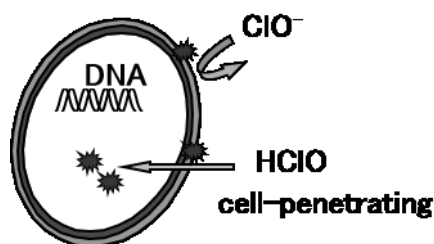


Fig. 2 Action of HClO and ClO^- for bacterial cell⁶⁾.

HClO は、分子中の Cl^+ が求電子種として働き、対象物質から 2 個の電子を奪い Cl^- に還元される過程で酸化作用を示す(Fig.1)^{8, 9)}。 HClO/ClO^- は、有機物中の電子密度が高い部位（例えばアミノ基、システイン残基、ペプチド結合）を求電子攻撃する結果、タンパク質に対して分解作用を示す^{7, 8)}。乳産業ではタンパク質汚れを除去するための助剤として、アルカリ洗浄剤への NaClO の添加(50-200 ppm)が行われている⁹⁾。 OH^- が洗浄効果を示さない pH10 以下の pH 領域で HClO 分子と ClO^- 分子の濃度に着目して洗浄作用を調べた結果、 NaClO の洗浄効果は NaClO の濃度に依存するのではなく ClO^- イオン濃度に依存し、分解作用と吸着置換作用により洗浄効果を示すことが見出された¹⁰⁾。

この様に NaClO は優れた洗浄・殺菌効果を示すが、 NaClO は高い酸化力を持つが故に、有機物の存在下では酸化力を消費して殺菌力を失う^{1, 11)}、反応副生成物が生じやすい¹²⁾、高分子材料や金属材料への腐食性があること^{13, 14)}、揮発性があ

ること¹⁵⁾などが懸念されており、より温和な代替酸化剤が求められていた。

亜塩素酸ナトリウム(NaClO_2)は、 HClO の代替酸化剤として期待されている塩素系酸化剤の一つである。 NaClO_2 の活性因子である亜塩素酸(HClO_2)は HClO にもう一つ酸素が結合した化合物で、4個の電子を奪い酸化力を発揮する (Fig. 3)。 NaClO_2 の産業利用上の利点として有機物存在下で HClO/ClO^- よりも濃度の減少が緩やかなこと、その結果、有機物存在下での殺菌効果が HClO/ClO^- よりも高いこと^{11,16)}、トリハロメタンなどの塩素化物を生成しないことが報告されている^{12, 17)}。また、 HClO_2 は、 $\text{pK}_a=1.86$ の弱酸でもあるため、水溶液

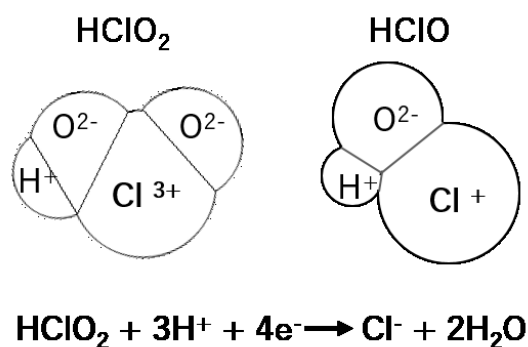


Fig. 3 Chemical structure of HClO_2 and HClO .

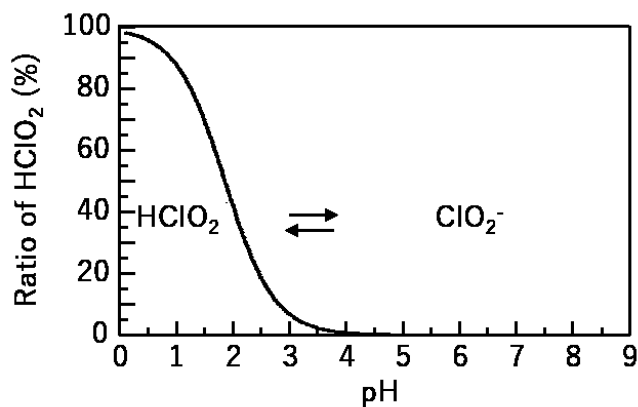


Fig. 4 Ratio of HClO_2 as a function of pH

中で解離して亜塩素酸イオン (ClO_2^-) を生じる (Fig. 4)¹⁸⁾。 NaClO_2 水溶液が pH に依存した殺菌効果を示すことについては多くの研究がある。たとえば小林らは pH2-4 の範囲で、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対する NaClO_2 の殺菌効果を調べ、pH が低いほど殺菌効果が高いことを報告している¹⁹⁾。また長谷川らは、細菌あるいは真菌に対して pH4.0-8.6 で NaClO_2 が静菌作用を示すことを報告している²⁰⁾。pH が 4 より低い NaClO_2 水溶液中に存在する HClO_2 は準安定な物質であるため、塩化物イオンの存在下では、次式のように分解し二酸化塩素 (ClO_2) が生じる¹⁸⁾。



ClO_2 は高い殺菌力を持つため、低 pH (<4) での NaClO_2 の殺菌効果は ClO_2 の作用によると考えられている。実際、アメリカやカナダではクエン酸やリン酸などの食品添加物に指定されている酸で NaClO_2 水溶液の pH を 2.5-3.2 に調整した酸性化亜塩素酸 (Acidified sodium chlorite: ASC) が食品添加物として認可されている²¹⁾。しかし、低 pH では使用対象が限られること、酸性では金属材料の腐食性が増すことなどから、実用上はより高い pH での利用が望ましい。

Vibrio parahaemolyticus は海水中に存在するグラム陰性の海洋性の食中毒細菌で、1950 年に大阪で発生したしらす中毒事件の原因菌として発見された²²⁾。*V. parahaemolyticus* は海水中や魚介類の表面に存在し、その病原因子は耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin: TDH) と耐熱性溶血毒素類似毒素 (TDH-related hemolysin: TRH) であることが知られている²³⁾。*V. parahaemolyticus* が付着した魚介類がまな板や食品製造装置表面と接触すると、これらの表面に容易に移行するため、2次汚染を引き起こす細菌としても知られている²⁴⁾。2次

汚染を低減させるためには固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* の制御技術が必要となる。

表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する薬剤の殺菌効果を調べるためには、固体表面に付着している生菌数の測定が必要となる。付着生菌数の測定は、殺菌前後の固体表面から付着菌を脱着させた後、希釈平板法でコロニー数として測定する方法^{25, 26)}、蛍光試薬の膜透過性の有無を利用して蛍光顕微鏡で計数する方法²⁷⁾などで行われてきた。前者は脱着操作での菌体の回収率が100%でなく、回収操作で生菌数が減少する可能性があること、後者は表面の一部の観察になるため正確性が低く、また顕微鏡観察を行うため簡便性が低いという問題点があった。

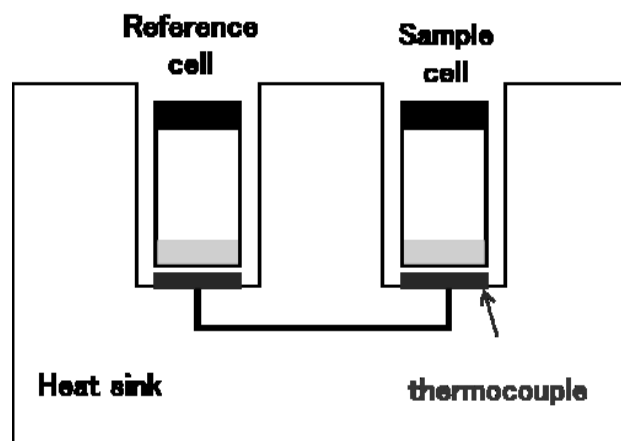


Fig. 5 Scheme of microorganism colorimeter.

微生物熱量計は、菌の増殖にともない生成する熱を経時的に計測することにより、菌の増殖を連続的に測定できる方法である。具体的には、恒温槽内に設置した参照セルと測定セルの温度差をゼーベック効果により熱起電力(単位 μV)として連続的に測定することで、菌の増殖を増殖サーモグラム($g(t)$)として測定できる(Fig. 5)。この方法では、液体や固体、また

食品そのものなどの試料形状を問わず微生物の増殖を測定することができる。従ってサンプル性状をそろえた固体表面に一定数の微生物を付着させ、殺菌前後の試料を培地に入れるだけで増殖検出時間の遅れから生菌数の減少を評価出来ると考えられる²⁸⁾。また微生物熱量計で得られる $g(t)$ 曲線は微分型(積分すると増殖曲線になる)で与えられるため、増殖挙動の変化を鋭敏にとらえることもできる。

NaClO_2 は、酸化力を持つ塩素化合物であり、水溶液の pH によって HClO_2 と ClO_2^- の存在割合が異なるという特徴は NaClO と似ている。そのため NaClO_2 は、殺菌効果だけではなく洗浄効果を示す可能性があるが、 NaClO_2 の洗浄効果を調べた研究例はない。また、 NaClO_2 の殺菌効果に関する研究も pH 4 以下の研究例が多く、 HClO_2 の分解により生じる、 ClO_2 の影響を区別して調べた報告は少ない。

本論文では、主として *V. parahaemolyticus* をモデル微生物として用いて、1) 微生物熱量計を用いて脱着操作なしで付着生菌数を計数する評価系を確立すること、静菌的作用を示す NaCl 添加や pH 変化が $g(t)$ 曲線の形状(比増殖速度)におよぼす影響を明らかにすること、2) *V. parahaemolyticus* のステンレス鋼表面への付着・脱着におよぼす pH の影響を明らかにすること、3) 固体表面に付着・未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO の殺菌効果を明らかにすること、4) ClO_2 が生成しない条件で NaClO_2 の種々の細菌に対する殺菌効果を明らかにすること、5) 固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 の殺菌効果を明らかにすること、6) ステンレス鋼表面に付着したタンパク質(牛血製アルブミン)や細菌(*V. parahaemolyticus*)に対する NaClO_2 の洗浄効果を明らかにすることを目的とした。

第 2 節 本論文の構成

序論では、塩素系酸化剤による洗浄・殺菌機構と *V. parahaemolyticus* の特徴について概説した後、本研究の目的と方針について述べた。

第 1 章では、微生物熱量計を利用した付着生菌数の測定手法の確立、静菌的作用を示す NaCl の過剰な添加が $g(t)$ 曲線の形状を変化させるとともに比増殖速度を低下させること、比較的高濃度の NaCl の存在がアルカリ pH ストレス耐性に寄与することを述べた。

第 2 章では *V. parahaemolyticus* のステンレス鋼表面への付着・脱着現象の基本である pH の影響についてステンレス鋼微粒子を用いた液相微粒子分散系にて調べ、静電的斥力が働く pH でも *V. parahaemolyticus* が自発的かつ不可逆的にステンレス鋼表面に付着すること、最大付着量が *V. parahaemolyticus* の零電荷点付近の pH で得られること、洗浄における脱着量は洗浄液のアルカリ (OH^-) 濃度の上昇とともに増大することを述べた。

第 3 章では 1 章で確立した計数方法を利用して固体表面に付着・未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO の殺菌効果を動力学的に解析し、付着・未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO の殺菌効果について述べた。

第 4 章では固体表面に未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 の殺菌効果を動力学的に解析し、pH と温度の影響について述べるとともに亜塩素酸 (HClO_2) が亜塩素酸イオン (ClO_2^-) よりも高い殺菌効果を示すこと、中性付近の pH において ClO_2^- が種々の細菌に対して有意な殺菌効果を示すことを述べた。

第 5 章では固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対す

る NaClO_2 の殺菌効果を動力的に解析し、 NaClO_2 の殺菌挙動におよぼす pH の影響について述べた。

第 6 章ではモデル担体としてステンレス鋼微粒子を、モデル汚れとして牛血製アルブミン(BSA)を使用した洗浄実験を行い、 NaClO_2 の洗浄効果におよぼす pH と濃度の影響を NaClO の洗浄効果と比較した。また NaClO_2 の洗浄効果の温度依存性を動力的に解析し、 NaClO_2 の洗浄メカニズムについて述べた。

第 7 章ではステンレス鋼表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 の洗浄効果におよぼす pH と濃度の影響を NaClO の洗浄効果と比較した。また NaClO_2 の洗浄効果の温度依存性を動力的に解析し、 NaClO_2 が付着細菌に対しても有意な洗浄効果を持つことを述べた。

第 8 章では本研究で得られた結果を要約した。

第 1 章 微生物熱量計を用いた *V. parahaemolyticus* の増殖速度および付着・未付着の生菌数の測定

第 1.1 節 諸言

V. parahaemolyticus は中温域から熱帯の海洋に広く分布する海洋性の食中毒細菌である^{23, 29)}。*V. parahaemolyticus* は温暖な海岸の海水中、牡蠣、ワタリガニなど様々な海産物から分離される³⁰⁻³²⁾。一般的に *V. parahaemolyticus* は生食あるいは不十分な加熱調理を行った魚介類を経由して感染する。

V. parahaemolyticus は好塩性細菌であり、増殖に最低 0.5% の NaCl を必要とする³³⁾。汽水域あるいは河口付近の海水中に存在する *V. parahaemolyticus* のまわりの塩濃度は不安定である。加えて、*V. parahaemolyticus* は水道水での洗浄や調理中に低塩濃度あるいは高塩濃度にさらされる。食品製造装置を分解洗浄する際には、表面に付着した *V. parahaemolyticus* は弱アルカリ性洗浄液 (pH 8.5-9.0 程度) の洗浄液に接触する。様々な塩濃度における生存および増殖能力を持つ *V. parahaemolyticus* は pH や温度などの環境ストレスへも適応性を示す³⁴⁾。*V. parahaemolyticus* の生菌数を制御するためには、塩濃度変化や pH ストレスに対する耐性と増殖速度に関する情報を得る必要がある。

また、*V. parahaemolyticus* は、魚介類表面に付着した状態または海水中に未付着の状態が存在する。魚介類の表面に存在する *V. parahaemolyticus* はまな板や食品製造装置表面と接触すると容易に他の表面に移行するため、水溶液中に存在する菌だけでなく表面に付着した細菌の生菌数の把握も重要である。水溶液中に未付着の状態が存在する細菌の生菌数は平板寒天法などでコロニー形成単位として計数することが出来る。し

かし、表面付着菌を同じ方法で計数しようとする固体表面上の生菌を生きのまま回収する必要があるが、表面から微生物細胞を100%回収することは難しいため²⁵⁾、表面からの菌の脱着を必要とせず、付着状態のまま生菌数を評価できる方が望ましい。

微生物熱量計は、液体培地²⁸⁾、寒天培地³⁵⁾、食品等³⁶⁾の様々な系における微生物の増殖にともなう熱生成を測定することでリアルタイムに菌の増殖を測定することが出来る。微生物熱量計では微生物の増殖は増殖サーモグラム($g(t); \mu V$)として出力される。この $g(t)$ 曲線は微分型で与えられるため、増殖変化を鋭敏にとらえることが出来る。この $g(t)$ 曲線からは微生物の増殖活性に関する情報だけではなく、初期生菌数に関する情報を得ることも出来る²⁸⁾。具体的には、 $g(t)$ 曲線の対数増殖期に相当する範囲の任意の値(α)に到達するまでの時間の遅れから生菌数の減少を見積もることが出来る²⁸⁾。この測定方法を利用すればサンプル性状をそろえた固体表面に微生物を付着させ、その接種数を変化させれば、 $g(t)$ 曲線の検出時間の変化から付着生菌数の変化を計数するための検量線が導出できると考えられる。

本章では、1) 様々な塩濃度における *V. parahaemolyticus* の $g(t)$ 曲線を取得し、静菌作用を持つ化合物の添加が $g(t)$ 曲線の形状を変化させることを確認することとともに、算出された比増殖速度定数 (μ) を算出すること 2) 担体からの水溶液中への溶出物質がほとんどない表面が平滑なポリエチレンテレフタレート (PET) 樹脂をモデル固体表面として用い、 $g(t)$ 曲線の検出時間の遅れから付着生菌数の変化を計数するための検量線の導出することを目的とする。

第1.2節 実験方法

1.2.1 供試菌、培地および供資材

V. parahaemolyticus NBRC 12711 は製品評価技術基盤機構 (NITE)より入手した。*V. parahaemolyticus* の培養には Tryptic Soy broth (TSB; メルク) を使用した。担体として用いた PET 板 (1 mm 厚) はサンプラテック(株)より購入した。PET 板より試験片打抜きカッター (SDL-100, 株ダンベル)を使用して直径 8 mm の円形のサンプルを切り出し、エタノール中で 15 分間の超音波洗浄を行った後、40℃で乾燥させた³⁷⁾。

1.2.2 *V. parahaemolyticus* の増殖におよぼす NaCl 濃度と pH の影響

V. parahaemolyticus の培養は、50 ml の TSB 培地を入れた 200 ml の三角フラスコで 25℃、24 時間、120 rpm で恒温震盪することにより行った。培養後、培養液を 50 ml の遠沈管に移し、5,350 × g で 20 分間遠心することにより集菌した。上清を取り除き 20 ml の 0.9% NaCl で 2 回洗浄した。回収した菌体を 0.9% NaCl で懸濁して OD₆₆₀ が 2.0 になるように調製し、菌懸濁液とした。

NaCl 濃度を 0.5 から 8.1%に、pH を 7.0 から 9.0 になるように HCl および NaOH で調整した TSB を作成し、5 ml ずつ 30 ml 容積のガラスバイアルに分注し、オートクレーブした。500 μl の菌懸濁液 (OD₆₆₀ = 2.0) を 50 ml の 0.9% NaCl に加え、この希釈液から 50 μl 分取し、前述の 5 ml の TSB 培地に接種し、密栓した。このバイアルを 25℃に設定した微生物熱量計 (Antares; アドバンス理工株) の測定セルに静置し培養を行った。菌の増殖にともなう熱生成を経時的に測定し、 $g(t)$ 曲線を

得た。次式を用いて $g(t)$ 曲線から熱生成曲線 ($f(t)$ 曲線) を算出した。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (1. 1)$$

ここで、 K は熱測定ユニットの熱伝導係数で、 $g(t)$ 曲線よりセル毎に算出される。本実験では K 値は $5.58 \sim 6.97 \text{ h}^{-1}$ であった。 $f(t)$ 曲線は増殖曲線に相当するため、 $f(t)$ 曲線の対数増殖期から付属の解析ソフト (BPCL24ch ver. 2013096) を用いて μ 値を求めた。

1. 2. 3 *V. parahaemolyticus* 付着 PET 試験片の調製

V. parahaemolyticus は 2% の NaCl を添加した後に NaOH で pH 7.5 に調整した 50 ml の TSB (TSB_s) で培養した (25°C、24 時間、120 rpm)。培養後、1. 2. 2 と同様にして、集菌、洗浄後菌懸濁液を調製した ($OD_{660} = 2.0$)。

1 枚の PET 試験片と 5 ml の菌懸濁液を 25 ml 容積のバイアル瓶に入れ、ブチルゴムキャップで密栓した。このバイアルを 25°C の水浴につけ、80 rpm で 2 時間恒温震盪した。2 時間後、試験片を 16 ml 容積の試験管に移し、2 ml の生理食塩水を加えた後にボルテックスし、緩やかに付着した菌体を取り除いた。ボルテックス後、PET 試験片を 1 ml の生理食塩水に漬け、2 時間以内に実験に使用した。

1. 2. 4 PET 付着 *V. parahaemolyticus* の SEM 観察

V. parahaemolyticus が付着した PET 試験片を 10% グルタルアルデヒド水溶液 (固定液、pH 7.4 0.1 M リン緩衝液 (PB)) に 30 分間浸漬した。その後 pH 7.4 の 0.1 M PB で濯ぎ、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% のエタノール水溶液に 10 分間ずつ順番に浸漬して脱水を行った。その後、エタノール

を *t*-ブチルアルコールに置換し、-20℃で 15 分間凍結した。凍結乾燥により *t*-ブチルアルコールを取り除き、Pt スパッタコーティングを行った。PET 表面から 9 か所の電子顕微鏡 (SEM) 写真を撮り、SEM 像より付着微生物数を計数した (Easy access ver.6.7.2.1.23; Euresys 社)³⁷⁾。

1. 2. 5 $g(t)$ 曲線からの初発生菌数の計数

V. parahaemolyticus 菌液 (3.1×10^5 CFU cells/ml) の 10 倍希釈系列を作成した。ここから 80 μ l ずつ分取し 30 ml 容ガラスバイアルに入った 5 ml の TSB_s に接種し、密栓した。このバイアルを微生物熱量計中に設置し、 $g(t)$ 曲線を得た。 $g(t)$ 曲線が検出されるまでの誘導時間は接種菌体数 (N'_0) の減少とともに延長する²⁸⁾。従って、 $g(t)$ 曲線が対数増殖期範囲の任意の一定値 α に到達するまでの培養時間 (t_α) が N'_0 と相関する。付属ソフト (BPCL24ch ver.2013096) を用いて $g(t)$ 曲線を解析し、 t_α を算出した。

PET 表面に付着した *V. parahaemolyticus* の場合、PET 付着試験片を 1/4 および 1/2 にカットした試験片と試験片 1~8 枚を 5ml の TSB_s に入れ、微生物熱量計に設置した。初期菌体数 (N'_0) は接種枚数から算出出来る。PET 表面に付着した菌体の初期生菌数 N'_0 と t_α の相関の関係から検量線を導出した。

第 1. 3 節 結果

1. 3. 1 *V. parahaemolyticus* の増殖におよぼす NaCl の影響

pH 7.5 で NaCl 濃度が 0.5~8.1% の TSB 培地中で静置培養した時の *V. parahaemolyticus* の $g(t)$ 曲線と $f(t)$ 曲線を示す (Fig. 1. 1)。 $g(t)$ 曲線のピーク形状と高さは *V. parahaemolyticus* の増殖活性を反映している (Fig. 1. 1 A)。培地中に 0.5% の NaCl が

含まれる場合、培養 16 時間にピークの最大値が観察されるが、他の $g(t)$ 曲線と比べると相対的に低い値であった。NaCl

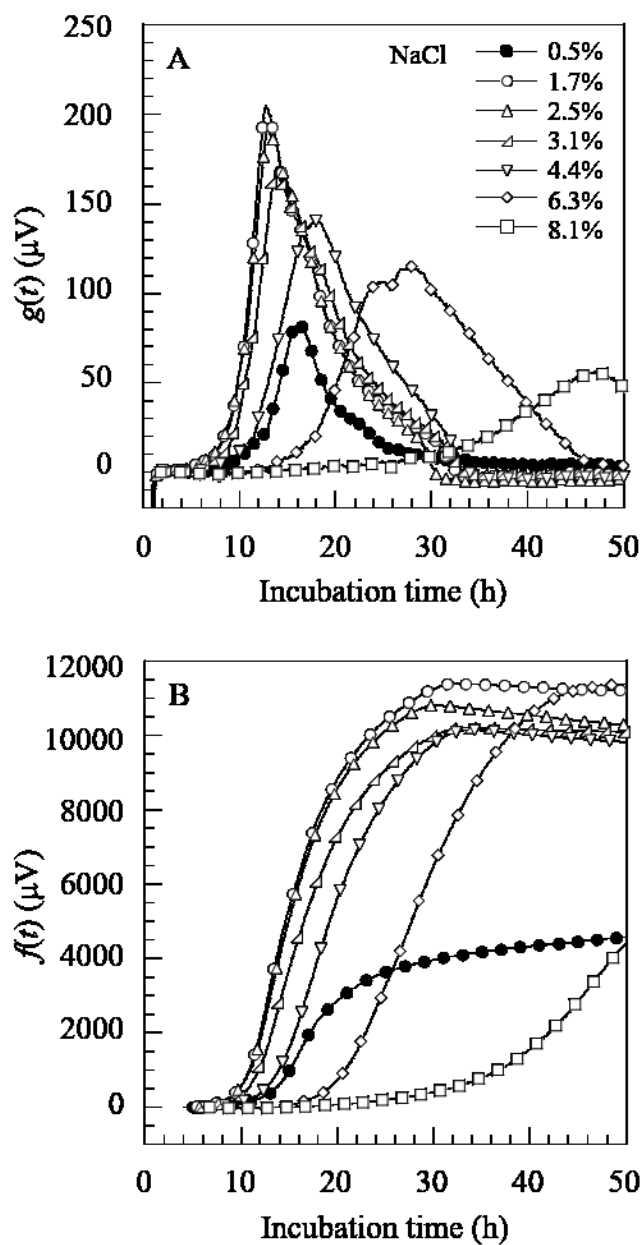


Fig. 1. 1 The $g(t)$ and $f(t)$ curves obtained for the growth of *V. parahaemolyticus* at pH7.5 under various salinity conditions. (A) $g(t)$ curves, (B) $f(t)$ curves. *V. parahaemolyticus* was grown stationally in TSB medium at 25°C .

濃度が 1.7%から 3.0%に増加すると培養 13~14 時間にピークの最大値が確認され、その最大値も高くなった。NaCl 濃度を 4.4%以上に増加させるとピークの高さはだんだんと低下し、それに合わせてピーク検出時間も遅れていった。NaCl は静菌効果を示す化合物で有り、静菌効果により $g(t)$ 曲線の検出時間が遅れる場合 $g(t)$ 曲線の形状の変化をともなうことが確認された。 $g(t)$ 曲線より得られた $f(t)$ 曲線は各塩濃度における *V. parahaemolyticus* の増殖曲線に相当する (Fig. 1.1 B)。NaCl 濃度が 1.7%から 6.3%の範囲では 50 時間の培養後、 $f(t)$ 値は 10,000 μV 以上になった。一方 NaCl 濃度が 0.5%と 8.1%の場合、 $f(t)$ 値は 4,500 μV に留まった。それぞれの $f(t)$ 曲線の前半部分の対数増殖期にあたる部分から μ 値を算出した。同様の実験を pH7.0 および 8.0 でも行い、それぞれの $f(t)$ 曲線から μ 値を算出した。

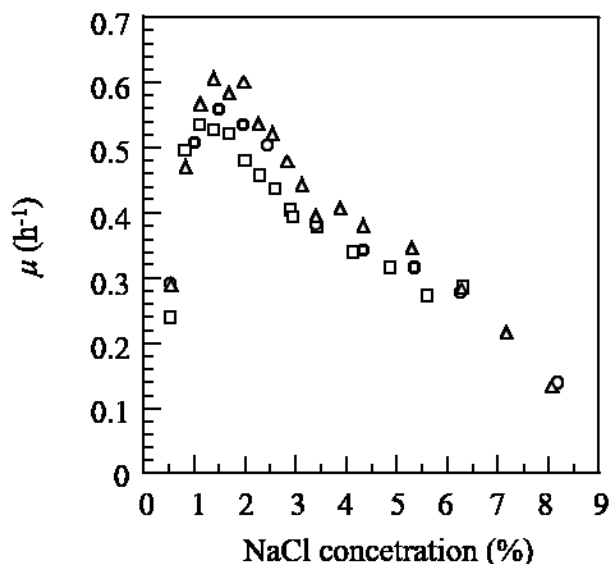


Fig. 1. 2 The μ values obtained at pH 7.0, 7.5, and 8.0 as a function of NaCl. Grown conditions, see legend of Fig. 2. 1. 1. Symbols: \circ , pH7.0; Δ , pH7.5; \square , pH8.0.

Fig. 1.2 に pH 7.0、7.5、8.0 の TSB 培地で静置培養した際に得られた μ 値を培地中の NaCl 濃度に対してプロットした結果を示す。すべての pH において、NaCl 濃度が 0.9 から 3% の範囲で比較的高い μ 値 ($0.4 - 0.6 \text{ h}^{-1}$) が得られており、NaCl が 2%前後の時 μ 値が最大になることが分かった。NaCl 濃度が 0.9 %より小さい、または 4.0%より大きい場合、 μ 値は顕著に減少した。低 NaCl 濃度および高 NaCl 濃度によるストレスは *V. parahaemolyticus* の増殖を抑制した。NaCl 濃度が 0.5%より小さいまたは 8.1%より大きい場合、*V. parahaemolyticus* は増殖しなかった。

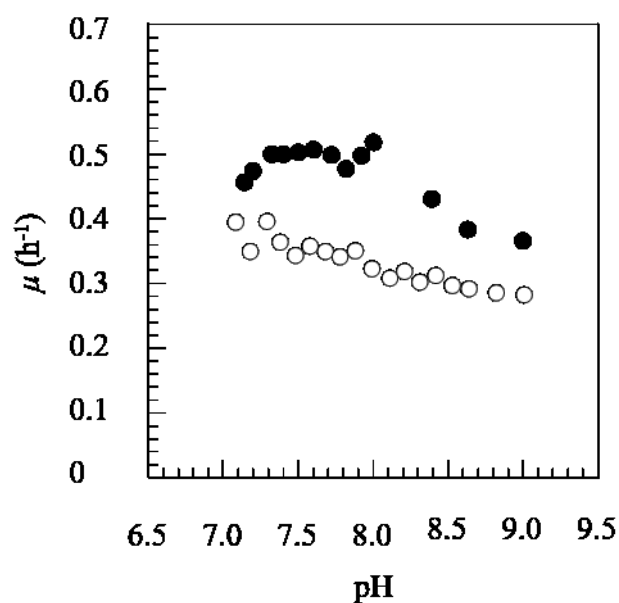


Fig. 1.3 The μ values obtained at 1.5 and 3.0% NaCl as a function of pH. Growth conditions, see legend of Fig. 1. 1. Symbols: ●, 1.5 % NaCl; ○, 3.0% NaCl.

1.3.2 pH の影響

高 pH ストレスに対する NaCl 濃度の影響を調べるため、1.5 %または 3.0 %NaCl を含有する TSB 培地の pH を 7.0 から

9.0 に変化させて *V. parahaemolyticus* の増殖を調べた。Fig. 1. 3 に 1.5 % または 3.0 % の NaCl を含む TSB 培地での *V. parahaemolyticus* の μ 値に対する pH の影響を示す。それぞれの pH 値において、1.5% の NaCl を含有する TSB 培地で培養することにより得られた μ 値は 3.0 % の NaCl を含有する TSB 培地で培養することにより得られた μ 値よりも大きかった。このことから 3.0% という相対的に高い NaCl 濃度は *V. parahaemolyticus* の μ 値を抑制することがわかる。1.5% NaCl の TSB 培地で培養した場合、pH 8.0 以上では μ 値は相対的に大きく減少するのに対して、pH 7.0 から 8.0 の間の pH で培養した場合、 μ 値はほぼ一定の値 ($0.493 \pm 0.018 \text{ h}^{-1}$) であった。また、 μ 値は pH 9.0 のとき 0.365 h^{-1} まで減少した。これに対して 3.0% の NaCl を含有する TSB 培地で培養した場合、pH 7.0 から 9.0 の幅広い pH 範囲において pH の増加にともない μ 値はわずかに減少傾向を示すが、その変化は小さかった ($0.331 \pm 0.035 \text{ h}^{-1}$)。この結果は相対的に高い濃度の NaCl が *V.*

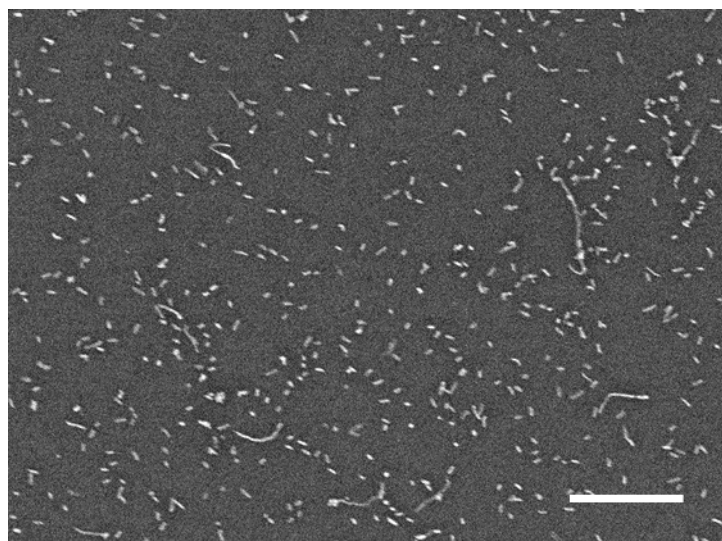


Fig. 1. 4 SEM image of *V. parahaemolyticus* cells attached to PET disc. Bar, 10 μm

parahaemolyticus のアルカリ pH ストレス耐性に影響をおよぼすことを示している。

1.3.3 PET 表面への *V. parahaemolyticus* の付着

Fig. 1.4 に PET 表面に付着した *V. parahaemolyticus* の SEM 像を示す。PET 表面には傷はなく、平滑であった。この SEM 像から *V. parahaemolyticus* は PET 表面に直接付着しているこ

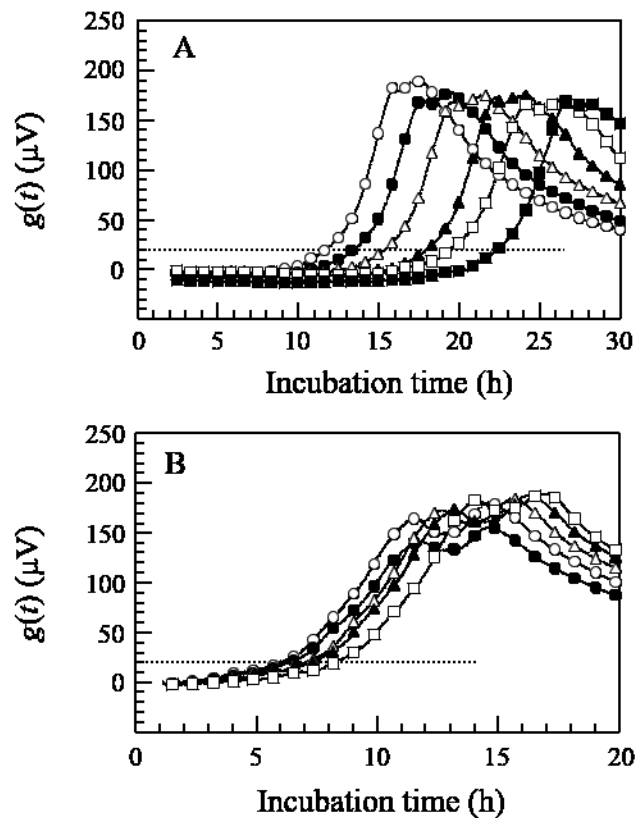


Fig. 1.5 Typical $g(t)$ curves obtained for growth cultures of unattached cells (A) and attached cells (B) at different N'_0 . Dotted lines in panels A and B denote α ($= 20 \mu\text{V}$). Symbols (N'_0 , CFU): (A) ○, 2.5×10^5 ; ●, 2.5×10^4 ; △, 2.5×10^3 ; ▲, 2.5×10^2 ; □, 2.5×10^1 ; ■, 2.5×10^0 ; (B) ○, 2.2×10^7 ; ●, 1.1×10^7 ; △, 5.4×10^6 ; ▲, 2.7×10^6 ; □, 1.4×10^6 .

とがわかる。SEM 像から算出された付着菌体量は $5.4 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$ cells/mm² であり、PET 試験片 1 枚あたりの付着菌体数は 5.4×10^6 cells/disc と計算された。

1.3.4 N'_0 と t_α の関係

Fig. 1.5 に接種菌体量 N'_0 (未付着菌 ; A, 付着菌 ; B) を変えた場合の $g(t)$ 曲線例を示す。 α は対数増殖期に相当する範囲に設定した場合に良好な解析結果が得られることが示されているため、対数増殖期の範囲である 20 μ V を α とした。 N'_0 が減少すると $g(t)$ 曲線の誘導期の延長とともに t_α の遅れが確認された。

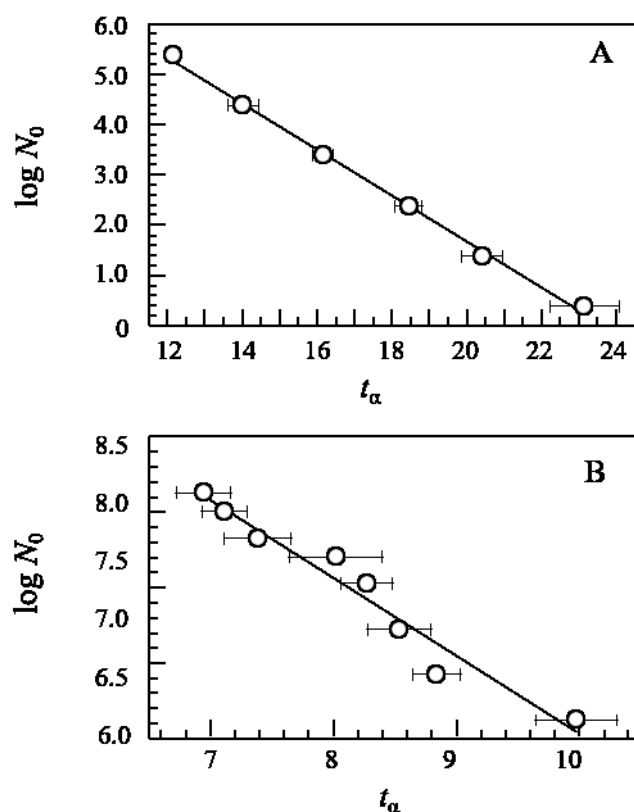


Fig. 1.6 Relationships between the logarithm of N'_0 and t_α for unattached cells (A) and attached cells (B).

Fig. 1. 6 に未付着菌(A)および付着菌(B)の N'_0 の常用対数値と t_a の関係を示す。Fig. 1. 6A および 1. 6B の実線は線形回帰分析により得られた直線を示す。それぞれ良好な直線関係が得られていることがわかる。未付着菌(式 1.2)および付着菌(式 1.3)のグラフから下記の関係が導出された

$$\log N'_0 = 10.8 - 0.46 t_a \quad (R^2=0.997) \quad (1.2)$$

$$\log N'_0 = 11.2 - 0.52 t_a \quad (R^2=0.955) \quad (1.3)$$

これらの式から、未付着菌の場合は t_a の 2.2 時間の延長が、付着菌の場合は 1.9 時間の延長が生菌数の一桁の減少に相当することがわかる。

第 1.4 節 考察

1.4.1 NaCl および pH の影響

V. parahaemolyticus は好塩菌で、増殖するためには少なくとも 0.5~1.5 %の NaCl を要求することから、 Na^+ が菌体内でのエネルギー変換に重要な役割を持つことが示唆される。この理由の 1 つは膜輸送プロセスに Na^+ 勾配が必要であることによると考えられる。*V. parahaemolyticus* は培地中の NaCl 濃度を 9.0%まで増加させても増殖可能であり、他の *Vibrio* 属菌よりも浸透圧耐性であるとの報告がある^{38), 39)}。本研究では 0.9~3.0 %の NaCl 濃度で比較的 μ 値が高く、さらに NaCl 濃度を上昇させると μ 値は徐々に低下することが確認された (Fig. 1.2)。このような μ 値と NaCl 濃度の関係は他の低度好塩菌の増殖においても確認されている^{38), 39)}。高浸透圧環境は多くの細菌にとって有害であるため、好塩性の *V. parahaemolyticus* にとっても好ましくない環境であると考えられる。

一般的に、細菌は高浸透圧環境に対応するための2つのシステムを持つ^{40), 41)}。一つはカリウムイオン (K^+) の取り込みにより外部の高浸透圧を相殺するシステムである。細胞内に高濃度の K^+ が存在する状態は細胞にとって有害であるため、多くの細菌はこのシステムを短時間での応答に利用する。もう一つのシステムは、適合基質と呼ばれる低分子化合物の利用である。高浸透圧環境では菌体内の細胞質に適合基質が蓄積される。これらの適合基質は外部からの取り込みまたは合成により新たに作られ細胞内蓄積される。*V. parahaemolyticus* は四つのベタインカルニチンコリントランスポーター、2つの PRoU ABC トランスポーター、エクチンやグリシンベタインなどの二つの適合基質を合成するシステム等多くの浸透圧耐性システムを持つことが知られている⁴¹⁾。

V. parahaemolyticus はアルカリ耐性細菌でもあり、 μ 値は pH が増加するほど緩やかに低下する傾向を示した (Fig. 1.3)。特に、塩濃度が 1.5% の場合 pH 8.0 以上になると μ 値は速やかに減少した。古賀らは、*V. parahaemolyticus* が大腸菌や *V. cholera* よりもアルカリ感受性が高いことを報告している⁴²⁾。彼らの研究では、1% の NaCl を含有した pH 9.0 の培地中での2時間のアルカリ処理により、1.6~3.2 μm のサイズであった細菌が 1.6~8.8 μm に伸長することが報告されている。この細胞の伸長は環境ストレスに適応するための形態変化の一つと考えられている。これらの結果は低塩濃度環境下で *V. parahaemolyticus* がアルカリストレス感受性であることを示している。

Na^+/H^+ アンチポーターは生物の細胞膜を介しての Na^+ の輸送に重要な役割を果たしている^{43, 44)}。微生物細胞中ではアン

チポーターが H^+ との交換により細胞中から Na^+ を排出し、細胞内の pH をコントロールしている。大腸菌の場合アンチポーター NhaA は $1Na^+/2H^+$ の交換比率で輸送を行う⁴⁵⁾。 *V. parahaemolyticus* は NhaA, NhaB, NhaD などの複数の Na^+/H^+ アンチポーターを持ち、これらが pH 8.5 から 9.0 のアルカリ環境でのみ働くことが報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。3.0%の NaCl を含む培地中での *V. parahaemolyticus* の μ 値は 1.5%の NaCl を含む培地中での μ 値よりも低い、3.0%の NaCl 存在下でもアルカリストレス耐性を示した。細胞内の高濃度の NaCl の存在は菌体外 pH が中性の場合は有害であるが、アルカリ環境では Na^+ の排出による細胞内 pH の維持に有用である。

1.4.2 N'_0 と t_a との関係

$g(t)$ 曲線の検出の遅れ (t_a) から生菌数 (N'_0) を計数するための検量線を導出した。 *V. parahaemolyticus* の次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌効果について平板寒天法と式 1.2 を用いて得られた結果を比較したところ、両者は良く一致した。このことから、導出した式 1.2 と式 1.3 を利用して生菌数の減少を評価することが出来ると考えられた。

第 1.5 節 結言

本章では、様々な塩濃度における *V. parahaemolyticus* の μ 値について微生物熱量計を用いて測定することに成功した。 *V. parahaemolyticus* は 0.9% から 3.0% の NaCl 濃度で良く増殖することが確認された。これらの結果はこの細菌が海水・汽水・河口に広く分布しているという事実と一致する。また *V. parahaemolyticus* が広い塩濃度範囲、pH 範囲で増殖可能であることも確認された。3.0%の NaCl 下で生じるの浸透圧はア

ルカリ pH ストレス耐性の観点から適当な塩濃度で有ると考えられ、それより NaCl 濃度が低下すると高 pH ストレス下での増殖活性が低下した。また $g(t)$ 曲線の検出時間の遅れから付着菌および未付着菌の初発生菌数を計数する検量線の導出に成功した。

第 2 章 ステンレス鋼表面への *V. parahaemolyticus* の付着・脱着におよぼす pH の影響

第 2. 1 節 緒言

微生物の固体表面への付着現象は、微生物汚染に関連する重要な現象である⁴⁹⁾。微生物細胞の付着は自発的または受動的な現象で、微生物細胞は自身の運動性あるいは拡散、重力、または流体力学的な力で液層から表面へ移動する⁵⁰⁾。食品製造装置においては、食品と接触する表面への微生物の付着は結果として食品の汚損や食中毒の原因となる²³⁾。

V. parahaemolyticus は魚介類由来の食中毒性細菌で、温帯及び熱帯の海洋環境に存在し、世界中で感染が確認されている²³⁾。魚介類表面や海水中に存在する *V. parahaemolyticus* はステンレス鋼表面、ガラス表面または他の非生物表面に付着し交差汚染の原因になる^{23), 51)}。従って、固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* は適切な方法で取り除かなければならない。

V. parahaemolyticus はグラム陰性の桿菌で、細胞最表面に外膜を持つ。加えて、*V. parahaemolyticus* は極毛と横鞭毛という 2 種類の鞭毛を持つ。*V. parahaemolyticus* 表面にはリポタンパク質、リン脂質、リポ多糖を含む多くの高分子化合物が存在する。加えて *Vibrio* 属菌は糖、ウロン酸、タンパク質からなる菌体外高分子物質 (EPS) を産生する⁵²⁻⁵⁴⁾。これらの高分子は多価電解質で、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基などの官能基が電荷を帯びる。この酸性と塩基性の両方の官能基が存在するため、細菌表面は両性の性質を示す。これらの官能基のイオン化は周りの pH 変化に依存し、この特性は細胞表面の物理化学的性質に大きな影響を与える。表面を高

分子で覆われた微生物は柔らかいコロイド粒子と考えることが出来るので、これらの付着現象は物理化学的現象として取り扱うことが出来る。

他方、ステンレス鋼の表面電荷密度と極性は水溶液の pH に応じて変化する⁵⁵⁾。コロイド粒子の初期付着には、表面とコロイド粒子に間で働く静電的相互作用が大きく影響すると考えられる。それゆえ、*V. parahaemolyticus* とステンレス鋼微粒子の表面電荷特性は細菌の付着・脱着現象を決定する重要な因子となり得る。

本章では、1) *V. parahaemolyticus* の表面電荷特性を pH の関数として明らかにすること、2) *V. parahaemolyticus* のステンレス鋼表面への初期付着過程における pH の影響を明らかにすること、3) 洗浄過程における *V. parahaemolyticus* に対する OH⁻イオンの洗浄効果を明らかにすることを目的とする。本実験では、細胞の付着・脱着過程における物理化学的特性の影響を議論するためにステンレス鋼微粒子をモデル表面として使用した。

第 2.2 節 実験方法

2.2.1 菌株及び供試材

V. parahaemolyticus NBRC12711 は TSB_s で培養した。培養条件と菌懸濁液 (OD₆₆₀ = 2.0) の調製は 1.2.2 と同様の方法で行った。

ステンレス鋼微粒子 (c.a. 10 μm) はニラコ(株)より購入し、アセトン洗浄、エタノール洗浄後、150℃で乾燥させ、実験に使用した。ステンレス鋼微粒子の比表面積は 0.3 m²/g であった。

2. 2. 2 ステンレス鋼微粒子と *V. parahaemolyticus* の表面電荷密度の測定

ステンレス鋼微粒子と *V. parahaemolyticus* の表面電荷密度を電位差滴定(平沼産業(株); COM-1600)により調べた^{56), 57)}。まず、硝酸を添加して pH を 3.5 に調整した 100 ml の 0.154 M NaCl 水溶液を 0.1 M KOH で pH10 まで滴定した。次に、濃縮した菌懸濁液(7.5 mg dry cell)または 3g のステンレス鋼を 100 ml の 0.154 M NaCl 水溶液(pH3.5)に添加した後 0.1 M NaOH で滴定した。*V. parahaemolyticus* とステンレス鋼微粒子の見掛けの表面電荷密度は、 H^+ と OH^- の相対吸着密度 ($[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]$) を pH の関数として示した。

菌懸濁液を濃縮後、各濃度に生理食塩水で希釈した 5 ml の菌懸濁液と 0.5 g のステンレス鋼微粒子を 25 ml ガラスバイアルに入れ、密栓後、25 °C、120 rpm で恒温震盪 (2h) し、ステンレス鋼表面に *V. parahaemolyticus* を付着させた(付着等温線)。 *V. parahaemolyticus* の付着におよぼす pH の影響を調べるため、 HNO_3 水溶液と NaOH 水溶液で pH を 3 から 10 に調整した菌懸濁液 ($OD_{660}=4.0$) 5 ml と 0.5 g のステンレス鋼微粒子を 25 ml 容積のガラスバイアルへ入れ、前述と同様に *V. parahaemolyticus* を付着させた。*V. parahaemolyticus* が付着したステンレス鋼微粒子を遠心分離 (1,160×g, 1 分) で回収後、生理食塩水で 5 から 8 回濯いだ後、40°C で 16 時間乾燥させた。*V. parahaemolyticus* の付着量は全有機炭素計の個体燃焼装置 (島津製作所(株); TOC-L/SSM-5000) でステンレス鋼微粒子ごと燃焼させ、全炭素として測定した⁵⁸⁾。

2. 2. 3 洗浄実験

洗浄実験は *V. parahaemolyticus* が付着した 0.5g のステンレ

ス鋼微粒子と 5 ml の洗浄液を 25 ml 容積のガラスバイアルに入れ、密栓後、40℃で 2 時間恒温震盪することにより行った(120 rpm)。洗浄液は HNO₃ または NaOH で pH を 1 から 13 に調整した水溶液を用いた。2 時間後、ステンレス鋼微粒子を遠心分離(1,160×g, 1 分)で回収後、5 ml の生理食塩水で 2 回濯ぎ、40℃で 16 時間乾燥させた。残存した *V. parahaemolyticus* 量は前述の通り全有機体炭素量として定量した。除去率は残存量から算出した除去量を初期付着量で除することにより算出した。

第 2.3 章 結果および考察

2.3.1 表面電荷特性

Fig. 2. 1A に *V. parahaemolyticus* 表面への H⁺ と OH⁻ の相対吸着密度曲線 ($[\Gamma_{\text{H}^+} - \Gamma_{\text{OH}^-}]_v$) を Fig. 2. 1B にステンレス鋼微粒子表面(B)への H⁺ と OH⁻ の相対吸着密度曲線 ($[\Gamma_{\text{H}^+} - \Gamma_{\text{OH}^-}]_{\text{ss}}$) を pH の関数として示す。 $[\Gamma_{\text{H}^+} - \Gamma_{\text{OH}^-}]_v$ 曲線は両性の性質を示し、+1.0 から -0.8 μmol/mg dry cell の範囲にあった。見掛けの零電荷点 (pzc_{app}) の pH 値は 6.1 であった。*V. parahaemolyticus* の最表面には EPS が存在し、EPS にはリン酸基、カルボキシル基、アミノ基などの官能基が存在し、*V. parahaemolyticus* の全電荷はこれらの官能基のプロトン化と脱プロトン化の総和として現れるため、pH に依存して変化する。 pzc_{app} では、細胞表面の正と負の電荷の総量が等しくなるため、表面電荷は零となる。

$[\Gamma_{\text{H}^+} - \Gamma_{\text{OH}^-}]_{\text{ss}}$ 曲線も pH に依存して変化する。ステンレス鋼表面には酸性の表面水酸基と塩基性の表面水酸基が存在することが知られている⁵⁴⁾。この表面水酸基は *V. parahaemolyticus* の付着サイトとなる。ステンレス鋼微粒子の

pzc_{app} は 9.6 と算出された。

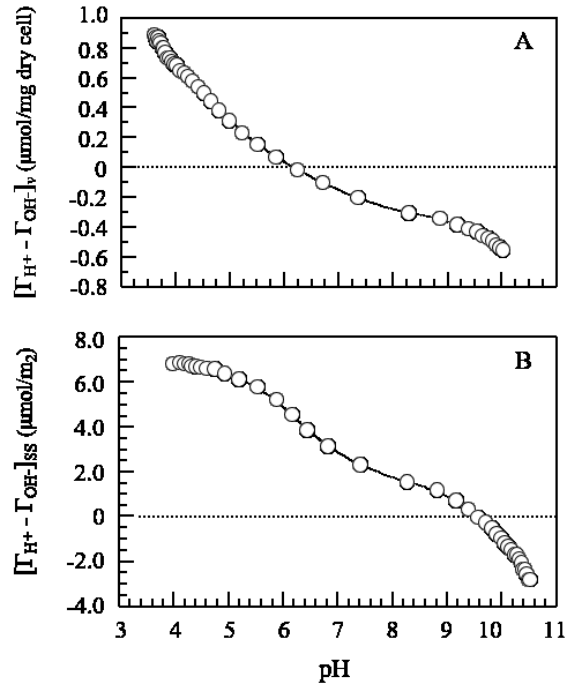


Fig. 2. 1 Curves of the relative adsorption density of H^+ and OH^- on (A) cell surface of *V. parahaemolyticus* ($[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_V$) and (B) stainless steel particles ($[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_{SS}$) as a function of pH. Titration was conducted in the presence of 0.154 M NaCl.

2. 3. 2 *V. parahaemolyticus* の付着等温線

静電的相互作用の影響を最小にするために *V. parahaemolyticus* の pzc_{app} である pH 6.1 で付着実験を行った。Fig. 2. 2 にステンレス鋼微粒子に対する *V. parahaemolyticus* の付着等温線 (25°C) を示す。*V. parahaemolyticus* の付着量 (Γ) は平衡細胞濃度の上昇とともに増大し、飽和付着量 (約 7.0 mg dry cells/m²) に到達した。付着した *V. parahaemolyticus* は

生理食塩水でのボルテックス洗浄でも脱着しなかったことからステンレス鋼表面に不可逆吸着していることがわかる。

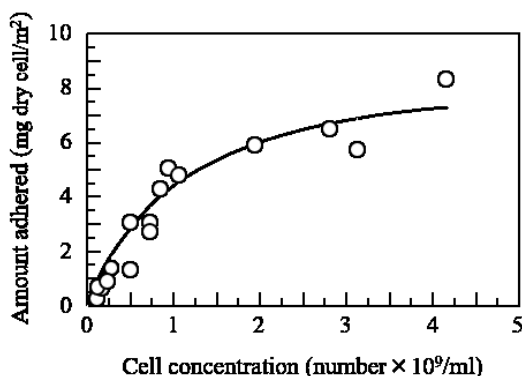


Fig. 2. 2 Isotherm for *V. parahaemolyticus* cells adhesion to stainless steel surfaces at pH 6.1 (25 °C). Adhesion experiment was conducted with reciprocal shaking (120 rpm) at 25 °C for 2 h.

2. 3. 3 *V. parahaemolyticus* の付着におよぼす pH の影響

Fig. 2. 3 に Γ におよぼす *V. parahaemolyticus* 懸濁液の初期 pH の影響を示す。 Γ は初期 pH に依存して大きく変化した。 $[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_V$ が $[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_{SS}$ と同種の電荷を帯びていても自然に付着が起こっていることがわかる。初期 pH が 5~6 の範囲で Γ の大幅な上昇が確認された。付着平衡に達すると菌懸濁液の pH は 5.0 (初期) から 5.6 (平衡) へ、6.0 (初期) から 5.9 (平衡) へとそれぞれ変化した。平衡 pH が *V. parahaemolyticus* の pzc_{app} (6.1) に近づいたことは非常に興味深い。タンパク質や酸性多糖であるペクチンがステンレス鋼やチタン表面に吸着した際にも、タンパク質や酸性多糖類の pzc_{app} 付近の pH で最大吸着量が得られることがわかっている⁵⁹⁻⁶¹⁾。微生物細胞は“柔らかいコロイド粒子”として振る舞う

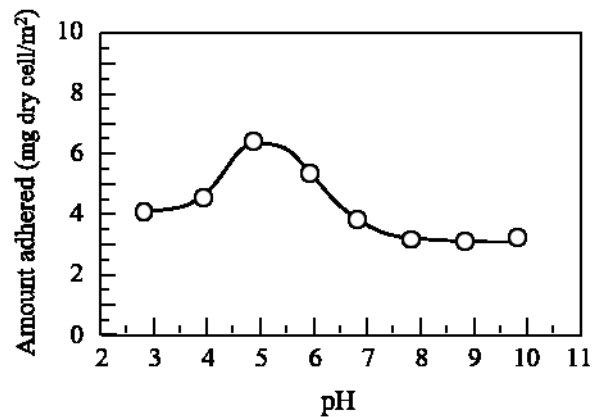


Fig. 2.3 Effect of initial pH on the *V. parahaemolyticus* cells adhesion to stainless steel surfaces. For adhesion conditions, see legend for Fig. 2. 2.

ため、付着の際に働くステンレス鋼表面と微生物間の静電的斥力はきわめて低いか無視できる程度になる⁵¹⁾。全体としての静電力は付着挙動に影響するが、それらの Γ に対する影響は小さい。*V. parahaemolyticus*の付着においては細菌細胞間の静電的反発力が Γ に強く影響していると考えられる。 $[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_V$ から各pHでの細胞間に働く静電的斥力の大きさがわかる。 $[\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}]_V$ の絶対値が小さいと細胞間の静電的斥力が小さくなり、細胞間の距離が小さくなる。それにより細胞密度が高い状態での付着が可能になるため、細胞の pzc_{app} 付近のpHで大きな Γ が得られたと考えられる。

タンパク質と酸性多糖類はカルボキシル基を介して静電的相互作用、水素結合、非静電的な相互作用によりステンレス鋼表面に不可逆吸着していると考えられている⁵⁹⁻⁶¹⁾。これらの結果を踏まえると、*V. parahaemolyticus*は最表面、側鞭毛、またはEPSのカルボキシル基などの官能基を介してステンレス鋼表面へ不可逆的に付着していると考えられる。

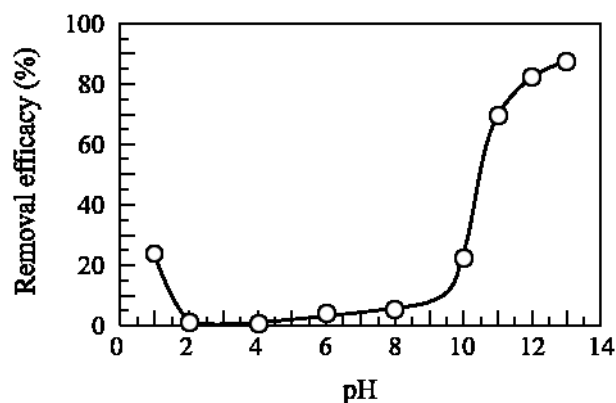


Fig. 2. 4 Effect of pH of cleaning solutions on the removal of *V. parahaemolyticus* cells from stainless steel surfaces. Cleaning was conducted with reciprocal shaking (120 oscillations per min) in a batchwise manner at 40 °C for 2h. The pH of the cleaning solutions was adjusted with HNO₃ or NaOH.

2. 3. 4 付着細胞の洗浄による除去

Fig. 2. 4 にステンレス鋼表面からの *V. parahaemolyticus* の除去におよぼす洗浄液 pH の影響について示す。*V. parahaemolyticus* の初期付着量は 2.9 mg dry cells/m² であった。pH2 から 8 では菌体の除去率は 5%以下に留まったが、pH を 10 以上にすると菌体の除去率は著しく上昇し、pH13 で除去率は 87%に到達した。pH1 では 25%の菌体が除去されたが、低 pH での洗浄効果はアルカリ性での洗浄効果よりも低かった。これらの結果は *V. parahaemolyticus* の菌体の除去が OH⁻の作用により起こることを意味している。Fig. 2. 4 で示された洗浄液 pH と除去率の関係はタンパク質やセラミックスに吸着したタンパク質や酸性多糖類または *Pseudomonas* 属菌の回分洗浄での脱着挙動によく似ていた⁶⁰⁻⁶²⁾。一般的に、高

濃度の OH^- イオンは表面官能基の脱プロトン化をもたらすため、タンパク質や菌体の水中への溶解と分散を促進する。 pzc_{app} (6.1) よりアルカリ性領域において、*V. parahaemolyticus* の酸性の表面官能基が脱プロトン化されている割合は塩基性の表面官能基がプロトン化されている割合よりも高い (Fig. 2. 1)。Liu と Fang は水素生成汚泥や硫酸還元能力のあるバイオフィームから抽出した EPS の官能基の pK_a を調べ、カルボキシル基の pK_a が 4.4 から 4.8 に、カルボキシル基またはリン酸基の pK_a が 6.0 に、リン酸基の pK_a が 7.0 から 7.4 に、チオール基の pK_a が 8.2 にアミン基あるいはフェノール基の pK_a が 9.4 から 9.8 に、水酸基の pK_a が 11.0 であることを報告している⁶³⁾。このデータによれば、EPS の塩基性官能基の脱プロトン化は 8 より高い pH で進行すると考えられる。洗浄液中の OH^- の濃度が増加し、pH がステンレス鋼微粒子の pzc_{app} (6.1) より高くなると *V. parahaemolyticus* 表面とステンレス鋼表面の両方が負電荷を帯びるようになり、これにより両者の間に静電的斥力が生じる。これらにより pH10 以上で NaOH 水溶液中への菌体の除去が進行すると考えられる。

第 2.4 節 結言

本章では、*V. parahaemolyticus* 表面とステンレス鋼微粒子の表面電荷特性を電位差滴定により明らかにした。また、*V. parahaemolyticus* がステンレス鋼表面に不可逆吸着していること、*V. parahaemolyticus* の零電化点 (6.1) 付近の pH で Γ が最大になること、 OH^- 濃度に依存して脱着が促進されることを明らかにした。

第3章 固体表面に付着および未付着の *V. parahaemolyticus* におよぼす次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の殺菌効果の動力学的解析

第3.1節 諸言

V. parahaemolyticus は代表的な海洋性の食中毒細菌の一つで、海水中や魚介類表面に存在する。この菌由来の食中毒は主として病原菌を含んだ魚介類を生あるいは加熱が不十分な状態で食べることで発症する⁶⁴⁾。魚介類の表面に存在する *V. parahaemolyticus* は、まな板や食品製造装置の表面と接触するとこれらの表面に付着し、交差汚染を引き起こす原因となる²³⁾。食中毒の蔓延を防ぐためには固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* を効率的に殺菌することが重要となる。

食品産業では、100年以上にわたって次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) が殺菌剤として使用されてきた。これは、NaClO が広い抗菌スペクトルを持ち速やかに殺菌効果を発揮するなど殺菌剤に求められる多くの要件を満たすためである⁷⁾。しかし、NaClO の殺菌効果は細菌が固体表面に付着している場合、大きく減少することが報告されている²⁵⁾。Lechevallier ら (1988) は様々な固体表面に形成されたバイオフィーム中の細菌は未付着の場合よりも NaClO (pH7) に対して 150 から 3,000 倍の耐性を示すことを報告している²⁵⁾。これは、HClO または ClO⁻ のバイオフィーム内部への浸透性が殺菌効果を律速していることを示唆している。固体表面に付着した細菌に対する NaClO の本質的な殺菌効果を明らかにするためには、NaClO の浸透が制限要素とならない攪拌条件下で NaClO の殺菌効果を明らかにする必要がある。

1章で、固体表面に付着した菌体の生菌数の変化を $g(t)$ 曲線の遅れから算出する検量線(式 1.3)を導出した。本章では、担体として水溶液中への溶出物質がほとんどないポリエチレンテレフタレフタレート (PET) 樹脂を、微生物として *V. parahaemolyticus* を使用して、攪拌条件下における付着菌と未付着菌に対する NaClO の殺菌効果を明らかにすることを目的とした。

第 3.2 節 実験方法

3.2.1 菌株および培養条件および試薬

V. parahaemolyticus NBRC 12711 を使用した。*V. parahaemolyticus* は 50 ml の TSB_s で培養した。培養条件と、菌懸濁液 (OD₆₆₀ = 2.0) の調製は(1.2.3)と同様にして行った。

NaClO 溶液(有効塩素濃度 >5%)は関東化学(株)より購入した。他の試薬は特級のものを使用した。

3.2.2 付着菌および未付着菌の殺菌

V. parahaemolyticus 付着 PET 試験片の作成は(1.2.3)同様にして行った。未付着菌の場合、まず 50 μ l の菌懸濁液 (OD₆₆₀ = 2.0) を 50 ml の 0.1 M リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS; pH5.6 ~ 9.4) に加え、そこから 5 ml を取り出し 13 ml 容積(直径 16.5 mm)の試験管に移した。付着菌の場合は、前述の試験管に 5 ml の 0.1 M PBS を入れ、その中に 1 枚の菌付着 PET 試験片を加えた。これらの試験管に有効遊離塩素濃度 (FAC) 100 mg/l の NaClO 水溶液を最終濃度 0.1 ~ 1 mg/l になるように添加し、直ちに 10 秒間ボルテックスし、10 秒後、速やかに同容量の 8 mM チオ硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₃) 水溶液を添加し直ちに攪拌

した。殺菌後、80 μ l の菌液または PET 試験片を取り出し、5 ml の TSB_s 培地に入れ、微生物熱量計中で培養した。

NaClO の濃度 (C) と作用時間 (t) の積 ($C \cdot t$) に対して生菌率の常用対数値をプロットして殺菌曲線を得た。殺菌曲線の解析には次式の Chick-Watson 式を用い、一次殺菌速度定数を算出した^{65), 66)}:

$$\log(N/N_0) = -kCt \quad (3.1)$$

ここで、 N/N_0 は時間 t における生残率を、 C は FAC 濃度 (mg/l) を、 k は一次の殺菌速度定数を意味する。

第 3.3 節 結果および考察

3.3.1 付着菌および未付着菌の殺菌

付着菌および未付着菌の pH を調整した NaClO に対する感受性を比較するための実験をデザインした。Fig. 3.1 に pH8.3 において、0.2~0.8 mg FAC/l の NaClO 水溶液で 10 秒間殺菌した時の未付着菌 (A) および付着菌 (B) の $g(t)$ 曲線を示す ($Ct = 2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{s}/l$)。付着・未付着に因らず $g(t)$ 曲線の形状は変化せず、検出時間のみ遅れたことから、 HClO/ClO^- が殺菌的作用を示すことが確認された。未付着菌の場合、 Ct に依存した t_a の大幅な延長が確認された。未処理の場合と比べて $CT 8 \text{ mg} \cdot \text{s}/l$ で殺菌処理を行うと t_a はおよそ 8 時間延長した (3.6 桁の減少に相当)。付着菌の場合、同じ $Ct 8 \text{ mg} \cdot \text{s}/l$ での殺菌処理では t_a はおよそ 1.4 時間 (0.7 桁の減少) の延長に留まった。殺菌処理の間に付着菌が脱着しないことが SEM 観察により確認された。以上のことから付着により NaClO に対して抵抗性になっていることがわかる。

NaClO 水溶液の殺菌効果は非解離型の次亜塩素酸 (HClO) の濃度に依存することが知られている。そこで、他の pH (5.6, 7.4,

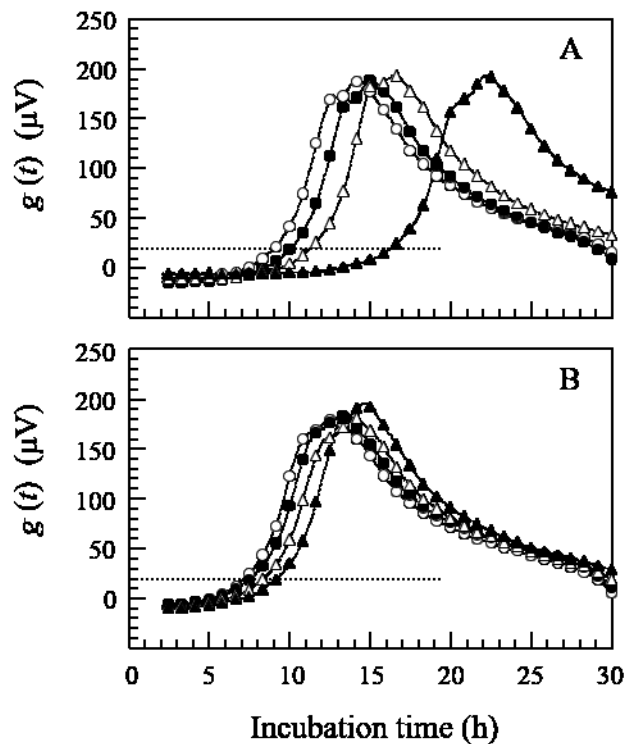


Fig. 3. 1 Typical $g(t)$ curves obtained for growth cultures of unattached cells (A) and attached cells (B) when treated with NaClO solutions of pH 8.3 for 10s. Inactivation experiments were conducted at 25°C and initial FAC concentrations of 0.2 to 0.8 mg/l. Symbols (Ct , mg · s/l): ○, 0; ●, 2; △, 4; ▲, 8.

9.4)における付着菌および未付着菌に対する NaClO の殺菌効果を調べた。Fig. 3. 2 に Ct 値と相対生残率の対数值($\log(N/N_0)$)との関係を示す。実験に先立ち、同様の殺菌試験後の菌液中の生菌数を平板寒天法で調べたところ、 t_a の延長より算出された生菌数と良く一致した。pH5.9 から 9.4 の範囲において、未付着菌および付着菌の殺菌曲線は見掛け上一次殺菌反応で表されることがわかった。Fig. 3. 2 中の実線は式 3. 1 を線形回帰分析により適合させた結果得られた直線を示す。す

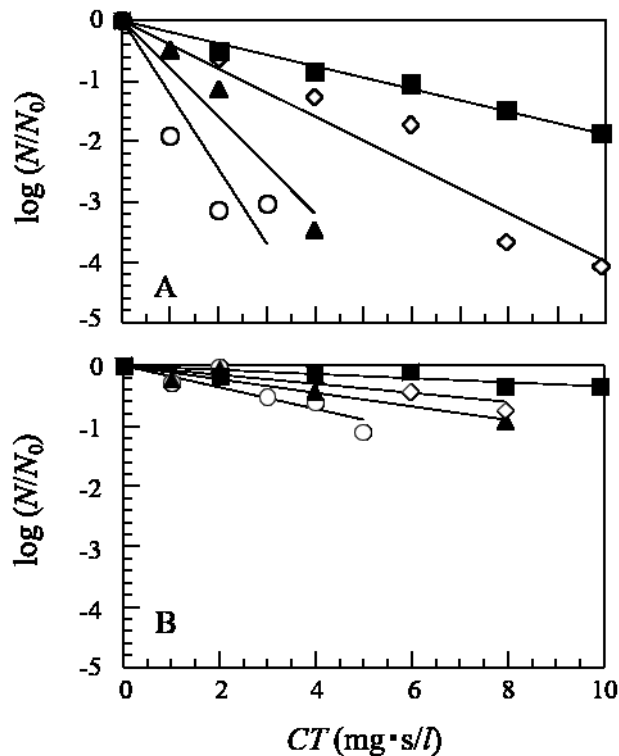


Fig. 3. 2 Inactivation of *V. parahaemolyticus* unattached (B) and attached (A) to PET plate by the pH-controlled NaClO solutions as a function of *Ct* values.

Inactivation conditions see legend of Fig. 4.

Symbols: ○, pH 5.6; ▲, pH 7.4; ◇, pH 8.3; ■, pH 9.4.

すべての殺菌曲線において、殺菌までの誘導期は存在しないことから、攪拌条件では HClO/ClO^- の拡散が殺菌の制限因子ではないことがわかる。pH 5.6 において Ct 2.5 $\text{mg}\cdot\text{s}/\text{l}$ の NaClO による殺菌処理により未付着菌の生菌数はおよそ 3 桁減少したのに対して、付着菌の生菌数は同じ処理によって 0.4 桁の減少に留まった。これらのデータからも付着菌の方が未付着菌よりも NaClO 感受性が低いことが明確に示された。

付着菌 (k_{unattach}) および付着菌 (k_{attach}) の殺菌速度定数を Table 3.1 に示す。pH5.6~9.4 の範囲において k_{unattach} は k_{attach} の 5~7 倍高かった。SEM 像 (Fig. 1. 4) から *V. parahaemolyticus* の周りには明確な EPS の存在は確認できない。このことから付着菌に対しても NaClO は直接作用したと考えられるが、 k_{unattach} は k_{attach} と比べると低かったであった。付着により菌体の見掛けの表面積は約半分になる。これは付着により NaClO に対する耐性が変化しなくても、PET 表面への付着により菌の付着が HClO あるいは ClO⁻ の作用をおよそ半分程度低減させることを意味する。 k_{unattach} と k_{attach} の差は 2 倍以上であるため、詳細は不明であるが PET 表面への 2 時間の付着の間に HClO あるいは ClO⁻ に対する抵抗性を獲得したことがわかる。

TABLE 3. 1 The inactivation rate constants estimated for unattached and attached cells

pH	k_{unattach}	k_{attach}	$k_{\text{unattach}}/k_{\text{attach}}$
	(l/mg·s)		
5.6	1.23	0.18	6.8
7.4	0.79	0.11	7.2
8.3	0.40	0.07	5.7
9.4	0.19	0.03	6.3

第 3. 4 章 結言

PET 表面に付着・未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO の殺菌効果を NaClO の拡散の影響のない攪拌条件において調べた。付着菌および未付着菌に対する NaClO の殺菌効果は pH 依存性を示し、未付着菌に対する殺菌速度は付着菌

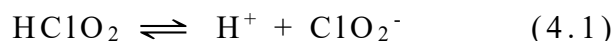
に対する殺菌速度の 5～7 倍であり、付着菌の方が未付着菌よりも NaClO 感受性が低かった。

第4章 固体表面に未付着の *V. parahaemolyticus* および他の細菌およびす NaClO_2 の殺菌効果の動力学の解析

第4.1節 諸言

ここまで、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)が様々な産業で殺菌と洗浄に利用されていることを説明してきた。 NaClO は優れた特性を持つ反面、有機物が多量に存在する場合殺菌効果が減少する¹⁾、継続的な使用は、しばしば金属材料の腐食の原因となる¹⁴⁾などの問題点も指摘されている。従って、食品製造環境の衛生管理技術を向上させるためには NaClO の弱点を補う温和な殺菌剤も必要となる。

亜塩素酸ナトリウム(NaClO_2)は有機物との反応性が低く、有機物存在下でも殺菌効果が持続することが報告されている塩素系酸化剤である^{16), 20)}。 NaClO_2 の殺菌効果は水溶液の pH に依存することが報告されている¹⁹⁾。 NaClO_2 水溶液の pH を食品添加物に指定されている酸(クエン酸、リン酸など)を用いて酸性に調整した酸性化亜塩素酸(ASC)が高い殺菌効果を示すことも示されている^{21), 67)}。 NaClO_2 水溶液の pH を酸性にすると亜塩素酸イオン(ClO_2^-)のプロトン化により亜塩素酸(HClO_2)が生じる。 HClO_2 は pK_a が 1.86 の酸で、 HClO_2 と ClO_2^- との間に次式のような平衡関係が成立する¹⁸⁾。



ASC 水溶液中では HClO_2 が主たる殺菌因子と考えられている。ASC は食品の種類に応じて pH2.5 から 3.2、濃度 50 から 1,200 mg/l の範囲のものが使用される²¹⁾。この様な酸性条件下では HClO_2 は準安定状態であるため、二酸化塩素(ClO_2)への急速な変換が生じる。 ClO_2 は揮発性が高く、大気中に発散して消失する。ASC は高い殺菌効果を持つ反面、保存が難しいため使用ご

とに調製する必要がある。それゆえ、弱酸性 pH 領域で ClO_2 の生成がなく殺菌効果を示す方が望ましい。

そこで本章では、1) *V. parahaemolyticus* をモデル微生物として、未付着菌に対する弱酸性 pH 領域での NaClO_2 の殺菌速度に及ぼす pH と温度の影響を明らかにすること、2) 中性付近の pH 値 (6.5) において、*V. parahaemolyticus* 以外の細菌に対しても NaClO_2 が有効な殺菌効果を持つことを明らかにすることを目的とした。実験は pH4.0 から 6.5 に調整した 0.1 M リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 中で行った。本章では *V. parahaemolyticus* の見かけの一次殺菌速度定数が pH の減少にともない指数関数的に増加すること、一次殺菌速度定数が Arrhenius 型の温度依存性を示すこと、 HClO_2 が主たる殺菌因子であることを示すとともに、中性付近の pH6.5 の NaClO_2 水溶液でも海洋性細菌である *Pseudomonas fluorescens* や抗菌性試験における指標菌である *Staphylococcus aureus* と *Escherichia coli* に対して有意な殺菌効果を持つことを示す。

第 4.2 節 実験方法

4.2.1 菌株および試薬

V. parahaemolyticus の培養と菌懸濁液 ($\text{OD}_{660}=2.0$) の調製は (1.2.3) および (3.2.1) と同様の方法で行った。*P. fluorescens* NBRC 14160 と *S. aureus* NBRC 12732 および *E. coli* NBRC3972 は 50 ml の TSB で培養後、*V. parahaemolyticus* と同様の方法で菌懸濁液 ($\text{OD}_{660}=2.0$) を調製した。 NaClO_2 (FW: 90.44 ; 純度 >79%) は関東化学(株)より購入した。他の試薬は特級のものを用いた。

4.2.2 NaClO_2 水溶液の調製

13g の NaClO_2 を 200 ml の超純水に溶解し、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター（アドバンテック(株)）で濾過した。 NaClO_2 の濃度はヨウ素滴定法で測定した。 NaClO_2 水溶液から $100 \mu\text{l}$ 分取し、脱イオン水で 30 ml にメスアップした。これを 50 ml ガラスビーカーに移した後、1.7 M 硫酸水溶液を 3.5 ml、20%ヨウ化カリウム水溶液を 4 ml 添加後、0.1 M チオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 水溶液で滴定した (COM-1600, 平沼産業(株))。この水溶液の NaClO_2 濃度は 563 mM (50,900 mg/l) であった。

4. 2. 3 NaClO_2 水溶液による *V. parahaemolyticus* の殺菌

V. parahaemolyticus の殺菌は以下の方法で行った。pH4.0～6.5 に調整した 50 ml の 0.1 M PBS を 50 ml ガラスビーカーに入れ、恒温水槽内 ($5\sim 40^\circ\text{C}$) に設置したマグネチックスターラー上に置き、400 rpm で攪拌した。菌懸濁液から $500 \mu\text{l}$ を分取し、50 ml の PBS に添加した。菌体が十分攪拌された後に、 $500 \mu\text{l}$ のサンプルをとり、0.1 M の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を含有した 4.5 ml の PBS (pH 8.3) に移した。その後、最終濃度 1.1 mM (pH 4.0)、2.2 mM (pH 4.5)、5.57 mM (pH 5.2)、22 mM (pH 5.6 または 6.5) になるように 563 mM NaClO_2 水溶液を添加し、殺菌をスタートさせた。殺菌処理の間に経時的に $500 \mu\text{l}$ ずつサンプリングし、4.5ml の 0.1 M PBS 水溶液 (pH 8.3, 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) に移し、殺菌を終了させた。*V. parahaemolyticus* の生菌数 (N) の変化は式 1. 2 を利用して $g(t)$ 曲線の検出の遅れから算出した。それぞれの条件で殺菌実験を 2～4 回行った。

殺菌曲線の解析には、生残率の減少が NaClO_2 濃度 (C ; mM) と作用時間 (t ; min) の積 (Ct) に依存するとする Chick-Watson 式 (式 3.1) を用いた。ここで k の単位は $l/\text{mmol}\cdot\text{min}$ である。

4. 2. 4 NaClO₂ による *P. fluorescens*, *S.aureus*, *E.coli* の殺菌

25℃に設定した恒温水槽内に 50 ml の pH 6.5 PBS を入れた褐色メディウム瓶を設置し、マグネチックスターラーで攪拌した(400 rpm)。温度が 25℃で安定した後、500 μl の菌懸濁液を加えた。攪拌後、500 μl の菌液を分取し、4.5 ml の 0.1 M Na₂S₂O₃ を含有する生理食塩水に混和した(N_0)。その後 1 ml の 563 mM NaClO₂ 水溶液を添加し、殺菌を開始した(最終濃度 11 mM)。経時的に 500 μl ずつサンプリングし(5~150 分)、0.1 M Na₂S₂O₃ を含有した生理食塩水と混和し殺菌を終了させた。ここから 50 μl を分取し 5 ml の TSB 培地に植菌後、微生物熱量計中で培養し、 $g(t)$ 曲線を得た。 $g(t)$ 曲線の遅延時間(t_a)から殺菌曲線を導出し、式 3.1 を適合させることにより見掛けの一次殺菌速度定数(k)を算出した。

4. 2. 5 ClO₂ の生成

殺菌実験中の ClO₂ の生成を分光光度計(島津製作所 UV-3100PC)で測定した。分光光度計の石英セル(光路長 10 mm)に 3.5 ml の 0.1 M PBS (pH 4.5~6.5)とスターラーバーを入れ攪拌した。次に 35 μl の菌液(OD₆₆₀=2.0)を入れ十分攪拌した。その後、563 mM NaClO₂ を殺菌実験と濃度が等しくなるように添加し、260 nm(HClO₂/ClO₂⁻)と 360 nm(ClO₂)の吸光度変化を 12.5 秒間隔で 5 分間測定した。

第 4. 3 節 結果

4. 3. 1 *V. parahaemolyticus* の殺菌に及ぼす pH の影響

Fig. 4. 1 に pH 4.0~6.5 における *V. parahaemolyticus* の殺菌曲線(Ct 値に対して生菌率の対数減少($\log(N/N_0)$)をプロット)を示す(25℃)。pH 4.0~5.6 における殺菌試験で得られた殺

菌曲線には約 30 秒間の短い誘導期の後に直線的に減少する領域が存在した。直線部分に対して式 3.1 を適合させることにより k 値を算出した。pH 6.5 で殺菌を行った場合、誘導期はなく生残率は緩やかに低下した。全ての pH において、生菌数は初発の生菌数に比べて 4 桁以上減少した。pH が減少すると殺菌速度が急激に上昇した。 k 値と生菌数の 3 桁の減少に必要な最小 Ct 値を Table 4.1 に示した。 k 値は明らかに溶液の pH 値に依存していた。pH 6.5 では k 値は $0.107 \text{ l/mmol}\cdot\text{min}$ と非常に低い値であったが、pH4.0 では $3.54 \text{ l/mmol}\cdot\text{min}$ と pH6.5 の k 値の 33 倍に上昇していた。生菌数を 3 桁減少させるための最小の Ct 値 $44.1 \text{ mmol}\cdot\text{min/l}$ (pH 6.5)から $1.29 \text{ mmol}\cdot\text{min/l}$ (pH 4.0)へと pH の減少にともない急激に減少し

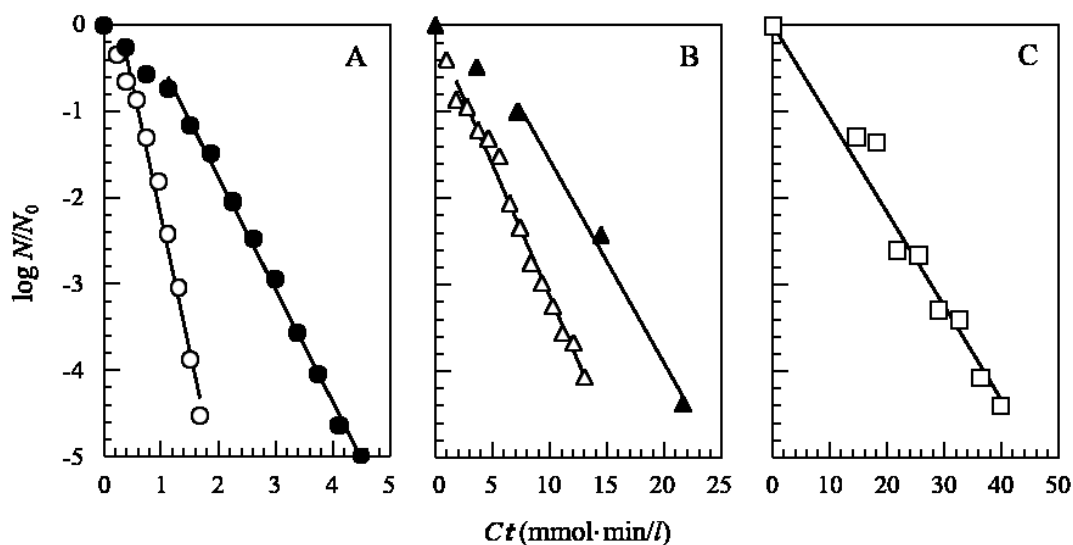


Fig. 4. 1 Effect of pH on the inactivation of *V. parahaemolyticus* in NaClO_2 solutions of various pH at 25°C . The results were representative of a set of two to four independent experiments. Symbols: (A) \circ , pH 4.0; \bullet , pH 4.5; (B) Δ , pH 5.2; \blacktriangle , pH 5.6; (C) \square , pH 6.5.

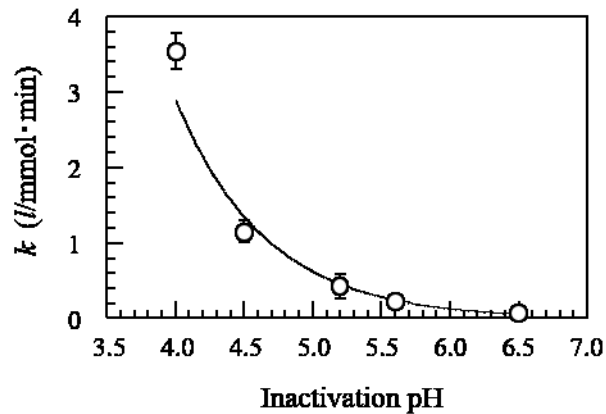


Fig. 4. 2 The relationship between the solution pH and the k values at 25°C.

た。Table 4.1 のデータは弱酸性の NaClO_2 水溶液が中性の NaClO_2 水溶液よりも殺菌効果が高いという点で従来の知見と一致する。

Fig. 4. 2 に NaClO_2 水溶液の pH と k 値の関係を示す。pH の減少にともない k 値は指数関数的に増加することがわかる。pH と k 値との関係を次式に示す (Fig.4. 2 中の実線) :

$$k = 686 \times \exp(-1.39 \cdot \text{pH}) \quad (R^2=0.966) \quad (4. 1)$$

TABLE 4. 1. Kinetics of the inactivation of *V. parahaemolyticus* in NaClO_2 solutions of various pH.

pH	k	Minimum Ct to achieve at least a 3-log reduction
	(l/mmol·min)	(mmol·min/l)
4.0	3.54	1.29
4.5	1.15	3.67
5.2	0.425	10.8
5.6	0.228	15.5
6.5	0.107	44.1

The k values and minimum Ct values to achieve at least a 3-log reduction were averages of data from two to four independent experiments. Inactivation experiments were conducted at 25°C.

式 4. 1 から pH が 1 減少すると k 値がおおよそ 4 倍になることがわかる。

4. 3. 2 温度の影響

Fig. 4.3 に pH 5.6 における 21.7 mM の NaClO_2 水溶液の殺菌効果におよぼす温度の影響を調べた結果を示す。各殺菌曲線には誘導期の後、生菌率が直線的に減少する領域が存在した。殺菌温度を 5°C から 35°C に上昇させると、温度の上昇にともなう誘導期の減少と殺菌速度の上昇が確認された。直線領域の傾きから k 値を算出した。算出された k 値と生菌数の 3 桁の減少に必要な最小 Ct 値を Table 4.2 に示した。殺菌温度が 5°C から 40°C に上昇すると k 値は 8.3 倍増加し、 Ct 値は $1/7.6$ に減少した。これらの結果から NaClO_2 水溶液の温度が殺菌効果の促進に重要な因子であることが明らかとなった。

殺菌温度と k 値の関係を次式に示す Arrhenius 式に基づいて再プロットした結果を Fig. 4. 4 に示す：

$$\ln k = -E_a / RT + \ln A \quad (4.2)$$

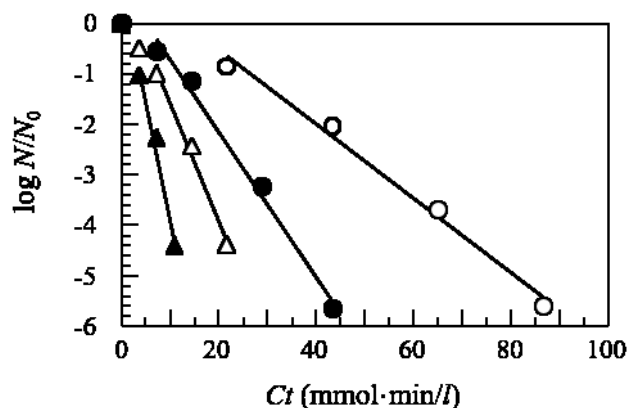


Fig. 4. 3 Effect of temperature on the inactivation of *V. parahaemolyticus* in NaClO_2 solution at pH 5.6. Initial NaClO_2 concentration was 21.7 mM. Symbols: ○, 5°C ; ●, 15°C ; △, 25°C ; ▲, 35°C .

ここで E_a は見かけの活性化エネルギー (J/mol)、 R は気体定数 (8.314 J/K·mol)、 T は殺菌温度 (K)、 A は頻度因子 (l/mmol·min) である。 $\ln k$ と $10^3/T$ の間に直線関係があり、こ

TABLE 4. 2. Kinetics of the inactivation of *V. parahaemolyticus* in NaClO₂ solutions at various temperatures.

Temperature (°C)	k (l/mmol·min)	Minimum Ct to achieve at least a 3-log reduction (mmol·min/l)
5	0.0733	53.7
10	0.0918	43.1
15	0.144	25.9
20	0.169	24.9
25	0.228	15.5
30	0.287	14.4
35	0.467	8.14
40	0.606	7.05

The k values and minimum Ct values to achieve at least a 3-log reduction. Inactivation experiments were conducted in the NaClO₂ solution of 21.7 mM and pH 5.6.

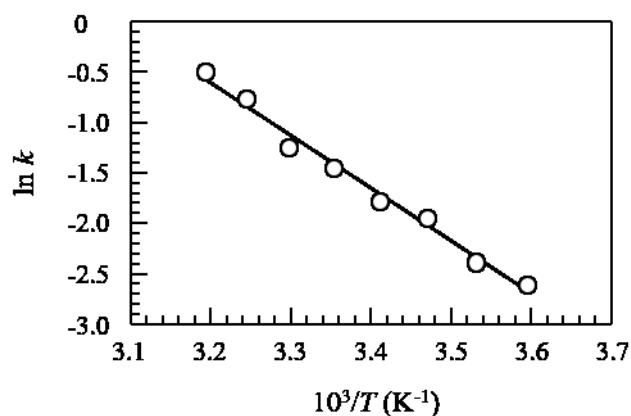


Fig. 4. 4 Arrhenius plot of the k values. For inactivation conditions, see the legend of Fig. 4. 3.

の直線の傾きから E_a は 43.5 kJ/mol と算出された。これは 5°C から 40°C の温度範囲において、殺菌温度の 10°C の上昇にともない殺菌速度がおよそ 1.8 倍に増加することを意味する。

4. 3. 3 ClO₂ 生成の計測

Fig. 4. 5 に pH4.0、25°C での殺菌過程において ClO₂(Abs.360) と HClO₂/ClO₂⁻の消長を分光光度計でモニタリングした結果を示す。5 分間の殺菌過程においてわずかに Abs.360 が減少したが Abs.260 に変化は見られなかった。同様の結果は pH4.5 から 6.5 での殺菌過程でも確認された。これらの結果から、殺菌過程において ClO₂ が生成していないことが確認された。

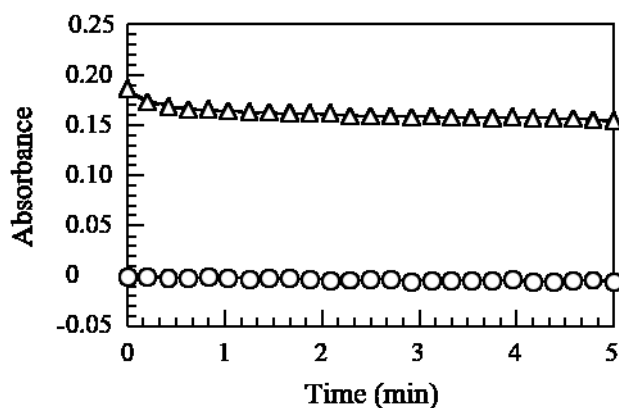


Fig. 4. 5 The time course of concentrations of ClO₂ (Abs.360) and HClO₂/ClO₂⁻ (Abs.260) under the inactivation conditions. Experiment was conducted at pH4.0 and 25°C. Symbols: ○, ClO₂ (Abs.360); △, HClO₂/ClO₂⁻ (Abs.260).

4. 3. 4 NaClO₂ の *P. fluorescens*, *S. aureus*, *E.coli* に対する殺菌効果

$g(t)$ 曲線から得られた各菌の接種生菌数 (N'_0) と t_α の関係を次式に示す。

$$P. fluorescens; \log(N'_0) = 9.92 - 0.35 t_\alpha \quad (4.3)$$

$$E. coli \quad ; \log(N'_0) = 8.81 - 0.46 t_\alpha \quad (4.4)$$

$$S. aureus \quad ; \log(N'_0) = 7.01 - 0.18 t_\alpha \quad (4.5)$$

pH6.5 において NaClO_2 水溶液で殺菌すると(最終濃度 11mM の)、処理時間の増加にともない t_α は顕著に延長した。得られた t_α を前述の式に代入し、殺菌曲線を導出した (Fig. 4. 6)。用いた 3 種類の全ての菌の生菌数の減少が Ct 値の増加に対して直線的に減少することが確認された。また生菌数が 3 桁以上減少したことからも、pH6.5 において NaClO_2 が有意な殺菌効果を持つことが示された。Fig. 4. 2 に式 3. 1 を適合させて算出して得られた k 値は $4.80 \times 10^{-3} \text{ l /mmol} \cdot \text{min}$ (*P. fluorescens*)、 $4.18 \times 10^{-3} \text{ l /mmol} \cdot \text{min}$ (*E. coli*)、 $3.38 \times 10^{-3} \text{ l /mmol} \cdot \text{min}$ (*S. aureus*)であった (Table 4. 3)。また、3 桁の生菌数の減少に必要な Ct 値は $626 \text{ mmol} \cdot \text{min/l}$ (*P. fluorescens*)、

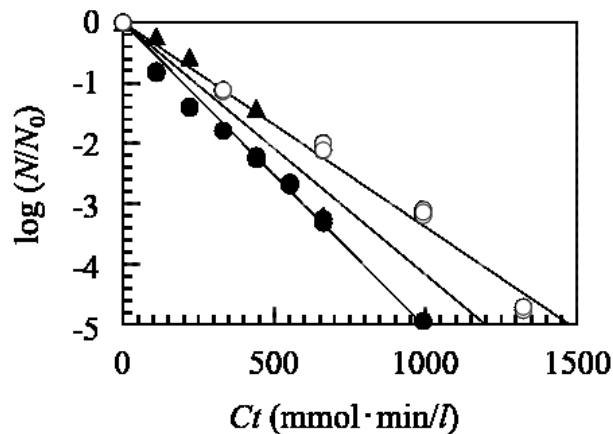


Fig. 4. 6 Effect of Ct of NaClO_2 solution at pH 6.5 on the inactivation of *P. fluorescens* (\bullet), *S. aureus* (\circ), and *E. coli* (\blacktriangle).

720 mmol·min/l (*E. coli*)、886 mmol·min/l (*S. aureus*)であった (Table 4.3)。以上のことから、中性付近の pH 値でも比較的高

Table 4.3. Kinetics of the inactivation of various bacteria in NaClO₂ solutions at pH6.5 at 25°C.

Bacteria	<i>k</i>	Minimum <i>Ct</i> to achieve at least a 3-log reduction
	(l/ mmol·min)	(mmol·min/l)
<i>P. fluorescens</i>	4.80 × 10 ⁻³	626
<i>E. coli</i>	4.18 × 10 ⁻³	720
<i>S. aureus</i>	3.38 × 10 ⁻³	886

The *k* values and minimum *Ct* values to achieve at least a 3-log reduction. Inactivation experiments were conducted in the NaClO₂ solution of 11 mM.

Ct 値の場合 NaClO₂ が種類の異なる様々な細菌に対して有効な殺菌効果を持つことが示された。

第 4.4 節 考察

弱酸性の NaClO₂ 水溶液の *V. parahaemolyticus* に対する殺菌効果が pH の影響を強く受けることを確認した。*k* 値は水溶液の pH 値が低下するほど指数関数的に上昇した。実験した範囲内では、ClO₂ の生成は見られなかったことから ClO₂ による殺菌効果は無視できると考えられる。NaClO₂ の殺菌効果が pH 依存性を示すことについては、基本的に水溶液中での HClO₂ – ClO₂⁻ の平衡関係から説明できる。HClO₂ の p*K*_a が 1.86 であることから、NaClO₂ 水溶液中での HClO₂ の割合は pH 6.5 の 0.0023% (0.50 μM) から pH 4.0 の 0.72% (8.1 μM) に上昇すると計算される。これらのことから、HClO₂ が *V. parahaemolyticus* の殺菌における活性種であることがわかる。HClO や HClO₂ などの電氣的に中性な非解離型のオキシクロ

ロ化合物は形質膜を透過し微生物細胞内に侵入するため、強い殺菌効果を持つと考えられている^{1,7,10)}。結果として、 HClO_2 は細胞内の成分に酸化作用をおよぼす結果、強い殺菌効果を示すと考えられる。

一方、 ClO_2^- の殺菌効果も無視することは出来ない。例えば、pH 6.5において 21.7 mMの NaClO_2 水溶液中には 0.50 μM しか HClO_2 が含まれていないが、pH 4.0の場合よりも緩慢な殺菌効果を示し、最終的に4桁以上の生菌数を減少させる。このことから、濃度が高い場合 ClO_2^- が *V. parahaemolyticus* に対して殺菌効果を示すと考えられる。このことは pH 6.5において NaClO_2 が *P. fluorescens*、*S. aureus*、*E. coli* に対しても有意な殺菌効果を示すことから明らかである。 ClO_2^- は標準酸化還元電位 (E^0)が 0.76Vの酸化剤である⁶⁸⁾。電荷を持つ ClO_2^- は細菌の形質膜を透過せず、細胞の外側からのみ酸化作用を示す。これまでの研究で、 ClO_2^- が HClO_2 よりも圧倒的に多量に存在する pH 7.2~8.0の範囲で NaClO_2 が細胞膜のリン脂質よりもグルタチオンを酸化することが報告されている⁶⁹⁾。この研究では、生体外で示された NaClO_2 の効果が生体内でも同様に作用することを確認している。また、 HClO ストレス下にある大腸菌はスルフヒドリル基の酸化により生理機能を失うことも報告されている⁷⁰⁻⁷²⁾。現在、 ClO_2^- の作用メカニズムは不明瞭であるが、高濃度の ClO_2^- は硫黄を含む膜タンパクの酸化や細胞表面の酸化により殺菌効果を示すと考えられる。

一般的に、酸化をはじめとした化学反応は温度依存性を示す。本研究では k 値は Arrhenius 型の温度依存性を示し、 E_a は 43.5 kJ/mol と算出された。これは私の調べた範囲において NaClO_2 の殺菌に関する最初の E_a 値の報告である。 E_a 値が比較的高いことから、殺菌には熱との併用が効果的であること

がわかる。水溶液中での大腸菌の殺菌に関する E_a 値について ClO_2 場合は $50.4\text{kJ/mol}^{73)}$ 、オゾンの場合は $37\text{kJ/mol}^{74)}$ と報告されている。また pH を制御した NaClO による *P. fluorescens* の殺菌において、 E_a 値が 56.8 から 59.9kJ/mol であることも報告している⁷⁵⁾。本実験の結果はこれらの文献値と良く一致している。 E_a がおよそ 30kJ/mol 以下の場合反応は拡散律速であると言われている。それゆえ、これらのオキシクロロ化合物の E_a 値は $40\sim 60\text{kJ/mol}$ と相対的に高い値であり律速過程が化学反応であることがわかる⁷⁴⁾。以上のことから ClO_2^- の酸化作用による機能の消失が *V. parahaemolyticus* の殺菌を律速していると考えられた。

第 4.5 節 結言

V. parahaemolyticus の殺菌過程において NaClO_2 水溶液の pH の減少にともない殺菌速度は指数関数的に上昇した。 HClO_2 は低濃度でも殺菌効果を発揮した。高濃度の ClO_2^- を含有する弱酸性の NaClO_2 水溶液により調べた 4 種類の細菌の生菌数は 3 桁以上有意に低下することが確認された。*V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 殺菌効果は温度の上昇ともに上昇した。これらの結果は、高 Ct 値において NaClO_2 が有効な殺菌剤として利用できることを示した。

第 5 章 固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* におよぼす NaClO₂ の殺菌効果の動力的解析

第 5.1 節 緒言

第 4 章で表面に未付着の *V. parahaemolyticus* に対する NaClO₂ の殺菌効果に対する pH と温度の影響を動力的に解析し、 k 値を算出するとともに ClO₂ が生成しない場合でも pH が低いほど殺菌効果が高いことを示した。固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* は、未付着菌と比べて NaClO に対する抵抗性が 6~7 倍上昇することも明らかとなっている（第 3 章）。本章では、固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対しても NaClO₂ が有効な殺菌効果を持つことを明らかにすることを目的とした。

第 5.2 節 実験方法

V. parahaemolyticus の培養方法、菌懸濁液 (OD₆₆₀ = 2.0) の作成、*V. parahaemolyticus* が付着した PET 試験片の調製は (1.2.3) と同様にして行った。

殺菌試験は、以下の方法で行った。50 ml 容積のガラスビーカーに 50 ml の 0.1 M PBS (pH 4.0~6.5) を入れ、恒温水槽内 (25℃) に設置し、マグネチックスターラーで攪拌した。温度が 25℃ で安定した後、5ml の PBS を分取し、15 ml のポリプロピレン (PP) 試験管に移し、恒温水槽につけた。次に最終濃度 1.1~22 mM になるように NaClO₂ 溶液を添加後 vortex し、恒温水槽につけた。この PP 試験管に *V. parahaemolyticus* 付着 PET 試験片を穏やかに 1 枚入れ、殺菌試験を開始した。10~360 秒間の殺菌試験後 PET 試験片を取り出し 0.1 M チオ硫酸ナトリウムを含有した 0.1 M PBS (pH8.3) に漬けて殺菌を終了させた。

この PET 試験片を 5 ml の TSB_s 培地に移し、微生物熱量計中で 24 時間培養した。増殖の遅延時間 (t_a) と式 3.3 から殺菌曲線を導出した。

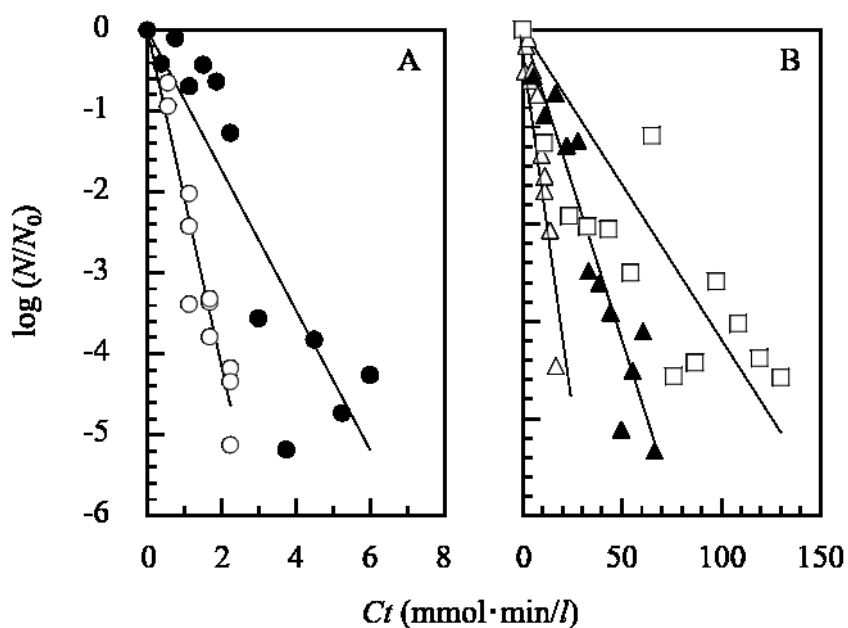


Fig. 5. 1 Effect of pH on the inactivation of *V.*

parahaemolyticus attached on PET disc in NaClO₂ solutions of various pH at 25°C. The results were representative of a set of two to three independent experiments. Symbols: (A) ○, pH 4.0; ●, pH 4.5; (B) △, pH 5.2; ▲, pH 5.6; □, pH 6.5.

第 5.3 節 結果

Fig. 5. 1 に PET 付着 *V. parahaemolyticus* の殺菌曲線を示す (25°C)。殺菌開始から直線的に生菌数が減少する傾向が確認された。pH の減少に伴い殺菌速度が急激に上昇し、高い殺菌効果が得られることがわかった。全ての pH 値で、Ct 値を増加にともない、生菌数が 4 桁以上減少した。

次に、殺菌曲線に対して式 3.1 を適合させて k 値を算出した。Table 5.1 に、各 pH で得られた k 値と生菌数の 3 桁の減少に必要な最小 Ct 値を示す。 k 値は明らかに溶液の pH 値に依存していた。pH6.5 では k 値は $0.039 \text{ l/mmol}\cdot\text{min}$ と非常に低い値であったが、pH4.0 では $1.65 \text{ l/mmol}\cdot\text{min}$ と pH6.5 の k 値の 42 倍と急激に上昇していた。生菌数を 3 桁減少させるための最小の Ct 値も $140 \text{ mmol}\cdot\text{min/l}$ (pH6.5) から $1.9 \text{ mmol}\cdot\text{min/l}$ (pH4.0) へと pH の減少にともない急激に減少した。この結果から、固体表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対して中性の NaClO_2 水溶液よりも弱酸性の NaClO_2 水溶液の方が高い殺菌効果を持つことが示された。

Fig. 5.2 に NaClO_2 水溶液の pH と k 値の関係を示す。pH の減少にともない k 値は指数関数的に増加することがわかる。

Fig. 5.2 中の実線で示される pH と k 値の関係を次式に示す：

$$k = 710 \times \exp(-1.56 \cdot \text{pH}) \quad (R^2=0.997) \quad (5.1)$$

式 5.1 は pH が 1 減少すると k 値がおおよそ 4.5 倍になること

TABLE 5.1. Kinetics of the inactivation of *V. parahaemolyticus* in NaClO_2 solutions of various pH.

pH	k	Minimum Ct to achieve at least 3 log reduction
	($\text{l/mmol}\cdot\text{min}$)	($\text{mmol}\cdot\text{min/l}$)
4.0	1.65	1.9
4.5	0.73	4.2
5.2	0.16	20
5.6	0.086	38
6.5	0.039	140

The k values and minimum Ct values to achieve at least 3-log reduction were average data from two or three independent experiments. Inactivation experiments were conducted at 25°C.

を意味する。この関係は未付着菌の殺菌で得られた式 4.2 の関係とほぼ同じであった。

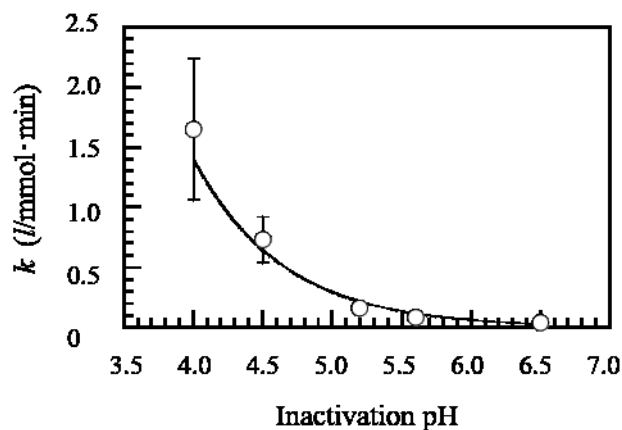


Fig. 5.2 The relationship between the solution pH and the k values at 25°C.

第 5.4 節 考察

PET 表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する弱酸性の NaClO_2 水溶液の殺菌効果が pH の影響を強く受けることを確認した。付着菌に対する殺菌曲線から得られた k 値の pH 依存性は、未付着菌の殺菌曲線から得られた k 値の pH 依存性と同程度であった。これは、付着菌と未付着菌に対す NaClO_2 水溶液中の活性種が同一であることを意味しており、付着菌に対しても HClO_2 が主たる殺菌因子であると考えられた。

pH 4.0 から 6.5 の範囲において、付着菌の殺菌曲線から得られた k 値は未付着菌の殺菌曲線から得られた k 値のおよそ 1/2 であった。付着により見掛けの表面積が半分になっていたことを考えると、実質的には付着により NaClO_2 に対する抵抗性は変化していないことになる。これに対して、*V. parahaemolyticus* は PET 表面への付着により、未付着の場合

よりも NaClO に対して 6~7 倍の抵抗性を獲得していた (3 章)。酸化剤としての NaClO₂ と NaClO の違いは、NaClO₂ が有機物との反応性が低く、NaClO と比べると殺菌に要する Ct 値が高いという点にある。例えば pH 5.6 において、未付着の *V. parahaemolyticus* の生菌数の 3 桁の減少に必要な NaClO の Ct 値はおよそ 2.5 mg FAC·s/l (0.59 μmol·min/l) である (Fig. 3. 2) が、NaClO₂ では同 Ct 値は 15.5 mmol·min/l であり、約 26,000 倍の違いがある。LeChevallier らはバイオフィルムを形成した菌は、未付着の場合よりも NaClO に対する抵抗性が 150~3,000 倍、モノクロラミンに対する抵抗性が 2~100 倍増加することを報告している²⁵⁾。有機物との反応性は NaClO の方がモノクロラミンよりも高く⁷⁶⁾、この結果はバイオフィルム形成菌(付着菌)が有機物と低反応性のモノクロラミンよりも高反応性の NaClO に対して高い抵抗性を獲得していることを意味する。また、ムコイド生産、非生産の *Pseudomonas aeruginosa* への抗生物質の取り込みを比べたところ、抗菌剤と結合性のあるムコイドが細胞表面にある場合、抗菌剤の細胞への取り込みが阻害されることが報告されている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。一般的に微生物は固体表面に付着した後、EPS を生産しバイオフィルムを形成する^{23), 53)}。本実験での付着時間は 2 時間であったため明確な EPS は確認されないが、EPS の産生が始まっていた可能性がある。こう考えると、反応性が高く、水溶液中の濃度が約 4 μM と低濃度の NaClO は EPS との反応で消失し細胞への到達が阻害された可能性があり、結果として NaClO に対する抵抗性が増大した可能性がある。それに対して、反応性の低い NaClO₂ の場合は水溶液中に 11 mM と多量に存在するため、EPS とわずかに反応したとしても大部分の NaClO₂ は EPS に邪魔されずに菌体まで到達するため、付着により抵抗性が

変化しなかったと考えられた。

第 5.5 節 結言

PET 表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 の殺菌効果が pH の影響を強く受けること、 HClO_2 が主たる殺菌因子であることを示した。PET 表面への付着により未付着菌と比べて k 値は約半分になった。

第 6 章 ステンレス鋼に付着したタンパク質(BSA)の脱着に およぼす NaClO_2 の洗浄効果の動力的解析

第 6.1 節

これまで、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)が汎用されている殺菌剤であることを述べてきた。 NaClO の強い酸化力は、殺菌操作だけではなく洗浄操作にも用いられている¹⁾。例えば、乳の製造機器の洗浄では、タンパク質分解剤として遊離有効塩素(FAC)濃度 75-200 ppm となるようにアルカリ洗浄液に NaClO が添加されている⁹⁾。

HClO は弱酸であり($\text{p}K_a=7.5$)⁵⁾、水溶液の pH に依存して HClO と次亜塩素酸イオン(ClO^-)の存在割合は変化する。水で希釈された NaClO 水溶液を用いる場合、硬質表面に付着した有機物汚れに対する洗浄力は ClO^- の濃度に依存して増大し、強アルカリ性洗浄液中では水酸化物イオン(OH^-)と協働して相加・相乗的に洗浄力を増大させる^{10), 62), 80)}。一方、弱酸性水溶液中(pH 5.0~6.5)で存在割合が大きい非解離型 HClO は、強い殺菌力を示すが、固体表面に不可逆吸着した有機物汚れに対する洗浄力は小さい^{10), 62), 80)}。弱酸性領域で HClO 濃度を増大させると、ゴム製シール剤への浸透と劣化^{13), 81-83)}やステンレス鋼の腐食¹⁴⁾、有効塩素の揮発¹⁵⁾を誘発する原因となりやすい。このように、 NaClO 水溶液の洗浄力と殺菌力は異なる pH 領域に最適条件が存在し、弱酸性水溶液を高濃度で使用すると機器部材への影響が懸念されることになる。

亜塩素酸ナトリウム(NaClO_2)は、 NaClO よりも穏和な酸化剤であり、有機物の存在下でも殺菌力を維持し、水溶液の臭気(揮発性)も少ないという特性がある^{20), 67), 84)}。 HClO_2 は HClO よりも強い酸であり($\text{p}K_a=1.86$)¹⁸⁾、pH 2~3 の低 pH 水溶

液にすると非解離型 HClO_2 の存在割合が大きくなるため殺菌力は大きくなる。一方、強酸性下では HClO_2 は二酸化塩素 (ClO_2) に変化して揮発性が高まる。そのため、実用的には pH 4~6 の弱酸性水溶液を高濃度で使用する方が殺菌処理には好ましいとされている^{20), 67), 84)}。 NaClO_2 は、 NaClO と同じ塩素系酸化剤であるため、殺菌効果だけでなく洗浄効果を持つ可能性があるが、固体表面に付着した有機物汚れに対する NaClO_2 の洗浄力を検討した報告はない。

本節では、ステンレス鋼表面に不可逆吸着したタンパク質を対象として、弱酸性から弱アルカリ性 (pH 4.0~10.0) の NaClO_2 水溶液の洗浄効果を明らかにすることを目的とした。不可逆吸着したタンパク質は、硝酸または水酸化ナトリウムで pH4.0~10.0 に調整した水溶液を用いた洗浄では除去が起らないモデル汚れである。本章では、高濃度の NaClO_2 水溶液を用いた洗浄において、洗浄力は水溶液の pH の低下とともに著しく増大すること、洗浄効果は非解離型 HClO_2 による酸化分解作用に起因することを報告する。

第 6.2 節 実験方法

6.2.1 試薬と材料

タンパク質にはウシ血清アルブミン結晶 (BSA) を、ステンレス鋼には SUS 316L の微粒子 (比表面積: $0.3 \text{ m}^2/\text{g}$) を用いた。 $\text{NaClO}_2 (>79\%)$ および $\text{NaClO} (\text{min}>5\%)$ は関東化学 (株) から購入した。その他の試薬は特級規格のものを使用した。

6.2.2 BSA の吸着

10^{-3}M 硝酸カリウム (KNO_3) 水溶液で調製した 50 ml の BSA 溶液 (2 g/l) と 5g のステンレス鋼微粒子を 120 ml 容積のガラ

バイアルに入れ、25°C で 2 時間恒温震盪した(140 rpm)。BSA が吸着した粒子は、 10^{-3} M KNO_3 溶液(pH 5.6)で懸濁と遠心分離($1,160\times g, 1 \text{ min}$)によって 5 回すすいだ後、40°C で 16 時間乾燥させて洗浄実験に用いた。BSA の初期吸着量は 2.3 mg/m^2 であり、ステンレス鋼表面に直接吸着する単分子吸着量に相当した。この BSA は KNO_3 水溶液(pH 5.8)では脱着しない不可逆吸着層を形成していた。

6. 2. 3 洗浄実験

回分式洗浄実験は、BSA が吸着した 0.5 g のステンレス鋼微粒子と 5 ml の洗浄液を 25 ml 容ガラスバイアルに入れ、40°C で 2 時間恒温震盪(140 rpm)することにより行った。2 時間後、遠心分離($1,160\times g, 1 \text{ min}$)によりステンレス鋼微粒子を回収した。回収したステンレス鋼微粒子を 5 ml の 10^{-3} M KNO_3 水溶液で 2 回すすぎ、40°C で 16 時間乾燥させた。洗浄液には、 HNO_3 水溶液および NaOH 水溶液を用いて pH 4.0~10.0 に調整した脱イオン水、 NaClO_2 水溶液(0.09, 0.54, 2.1 M)、 NaClO (3, 30 mM) 水溶液を使用した。

連続式洗浄実験は、BSA の脱着速度に及ぼす温度の影響を解析するために行った。BSA が吸着したステンレス鋼微粒子 2.0 g をステンレス鋼製カラム(内径 4 mm×長さ 50 mm)に充填した後、カラムを恒温槽内(40~80°C)に垂直方向に設置した。洗浄液は、HPLC 用定量ポンプにより、カラム底部より 0.1 ml/min (空間時間: 3.8 min)の流速で供給した。カラム出口から排出される洗浄液を経時的に分取した⁸⁵⁾。

BSA の脱着曲線—“残存 BSA 量(Γ)の自然対数值($\ln\Gamma$) vs 時間 [t]”—の速度論的解析には、「異なる速度で独立かつ同時に脱着する 2 種類の BSA 分子の存在」を仮定して誘導した脱着

モデル(式 6. 1)を用いた⁸⁵⁾。

$$\ln\Gamma = \ln\{\exp(\ln\Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln\Gamma_0^s - k^s t)\} \quad (6. 1)$$

ここで、 Γ_0^f と Γ_0^s は、速く脱着する BSA 分子(BSA^f)と遅く脱着する分子(BSA^s)の初期吸着量 (mg/m^2)、 k^f と k^s は、 BSA^f と BSA^s の一次脱着速度定数(min^{-1})を示す。なお、脱着曲線が直線近似できる場合は、 BSA^f と BSA^s は同一と見なし、次式のモデル式を用いた。

$$\ln\Gamma = \ln\Gamma_0^f - k^f t \quad (6. 2)$$

洗浄液中に除去された BSA およびステンレス鋼表面に残存した BSA は、全有機体炭素計を用いて定量した⁵⁸⁾。

6. 2. 4 分子量の測定

回分洗浄で脱着した BSA 分子の分子量(MW)を測定するため、タンパク質と類似の紫外領域に吸収を持つ NaClO_2 と NaClO の除去(脱塩処理)を行った。4 ml の洗浄液を遠心式フィルターユニット (Amicon Ultra-4, 3K, Millipore, USA) に移し、遠心分離($2,400\times g$, 60 min)を行った。遠心チューブにろ過された NaClO_2 と NaClO を含む水溶液は取り除き、フィルターデバイスに濃縮された BSA 画分に 3.8 ml の超純水を加え、再び遠心分離($2,400\times g$, 60 min)を行った。この脱塩処理は、回収チューブ内の水溶液に波長 278 nm の吸収が検出されなくなるまで繰り返した。

脱塩・濃縮処理で得られた BSA 画分の分子量は、ゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)で測定した(LC-10Avp; 島津製作所 株)。分析カラム (Shodex KW-802.5; 昭和電工 株)は、 40°C に設定したカラムオーブンに装着し、0.3 M NaCl を添加した 50 mM PB (pH7.0)を移動相として 1.0 ml/min の流速で送液して測定した。タンパク質の検出には UV 検出器 (278nm) を用い

た。分子量マーカーとして、BSA(MW=67,000)、卵白アルブミン(MW=44,000)、ミオグロビン (MW=17,800)、シトクロム C (MW=12,400)、アプロチニン(MW=6,500)を用いた。

6. 2. 5 NaClO₂ と NaClO の吸着と金属イオンの溶出

NaClO₂ および NaClO のステンレス鋼表面への吸着量は、吸着分子の有効塩素量としてヨウ素滴定法で定量した(4. 2. 2)。0.5 g のステンレス鋼微粒子と洗浄実験で使用した pH 4.0 および 10.0 に調整した NaClO₂ 水溶液(0.09~2.1 M)または NaClO 水溶液(0.003~0.09 M)の 5 ml を 25 ml 容ガラスバイアルに入れ、40℃で 2 時間恒温震盪した(140 rpm)。2 時間後、遠心分離 (1,160×g, 1 min) によりステンレス鋼微粒子と、NaClO₂ 水溶液および NaClO 水溶液を別々に回収した。回収したステンレス鋼微粒子は、10 ml の脱イオン水で 3 回すすいだ後、30 ml の脱イオン水を入れた 50 ml のビーカーに移し、0.0.1 M Na₂S₂O₃ 水溶液で滴定した。

回収した NaClO₂ 水溶液および NaClO 水溶液に溶出した Fe, Cr, Ni の濃度は、誘導結合プラズマ発光分析装置(iCAP 6000; Thermo Fisher Scientific)で定量した⁸⁶⁾。金属イオンの溶出量は、Fe、Cr、Ni の合計量として算出した。

第 6.3 節 結果

6. 3. 1 NaClO₂ の洗浄効果

Fig. 6. 1 に、BSA が不可逆吸着したステンレス鋼微粒子を pH 4.0~10.0 に調整した NaClO₂ 水溶液で回分洗浄したときの除去率を示す。NaClO₂ 未添加の場合、この pH 範囲では除去率は 4 ± 1% であり、BSA の脱着はほとんど起こらなかった。各 pH の洗浄液に 0.09, 0.54, 2.1 M の NaClO₂ を添加すると、

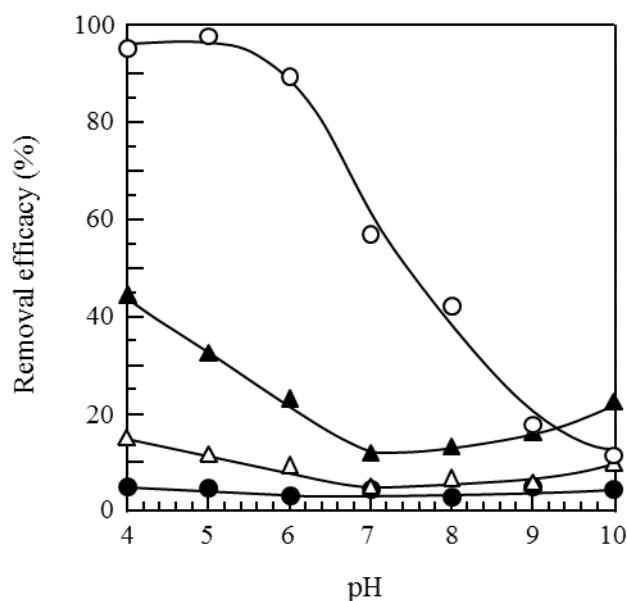


Fig. 6. 1 Effect of pH of NaClO₂ solution on the removal efficacy of BSA from stainless steel surfaces during batchwise cleaning for 2h at 40°C. Symbols: ●, Dilute HCl or NaOH solution alone; △, 0.09 M NaClO₂; ▲, 0.54 M NaClO₂; ○, 2.1 M NaClO₂.

添加濃度に依存して除去率が上昇した。2.1 M の NaClO₂ を添加した系に着目すると、除去率は pH の低下とともに著しく上昇し、pH 6.0 で 89.4%、pH 4.0～5.0 では 95%以上の値に達した。この結果は、高濃度の弱酸性 NaClO₂ 水溶液が BSA の除去に対して強い洗浄力を持つことを示している。

次に、pH 4.0 の 0.09 M NaClO₂ 水溶液に 2.0 M NaCl を添加して、2.1 M NaClO₂ 水溶液とイオン強度を合わせて洗浄を行った。その結果、除去率は 12.0%から 18.0%に上昇したが、イオン強度の影響は軽微であった。

Fig. 6. 2 に、pH 4.0 に調整した 0.09 M NaClO₂ 水溶液を用いて 40～80°C で連続洗浄したときの BSA の脱着曲線を示す。40°C で洗浄を行った場合、BSA の脱着は緩やかであり、20～

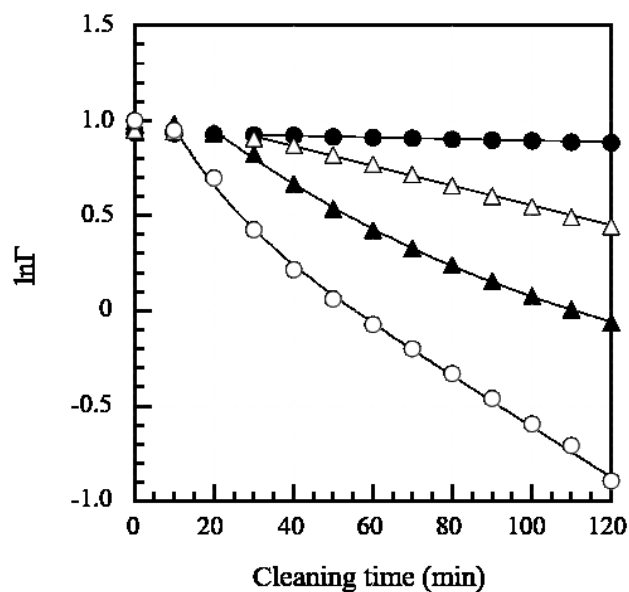


Fig. 6. 2 Effect of temperature on BSA removal from stainless steel surfaces during continuous cleaning with 0.09 M NaClO₂ solution of pH 4. Symbols: ●, 40°C ; △, 60°C ; ▲, 70°C ; ○, 80°C.

120 分間はほぼ直線で近似できる脱着曲線を示した。60°Cでも類似の直線で近似される脱着曲線が得られており、BSAの脱着速度は40°Cよりも上昇した。また、温度が70~80°Cに上昇すると、脱着が起こり始めるまでの誘導期間が短縮し、脱着速度は温度に依存して著しく上昇した。そして、脱着曲線には速い脱着期と遅い脱着期が見られた。

洗浄初期の脱着速度を反映する k^f 値の算出のために、40°Cと60°Cの脱着曲線には式 6. 2 と線形最小二乗法を用いて、70°Cと80°Cの脱着曲線には 6. 1 と非線形最小二乗法を用いて適合させた。Fig. 6. 2 の実線は、式 6. 1 または式 6. 2 を適合させて得られた曲線である。 k^f 値は、 $4.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (40°C)、 $5.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (60°C)、 $2.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (70°C)、 $8.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (80°C) と算出された。

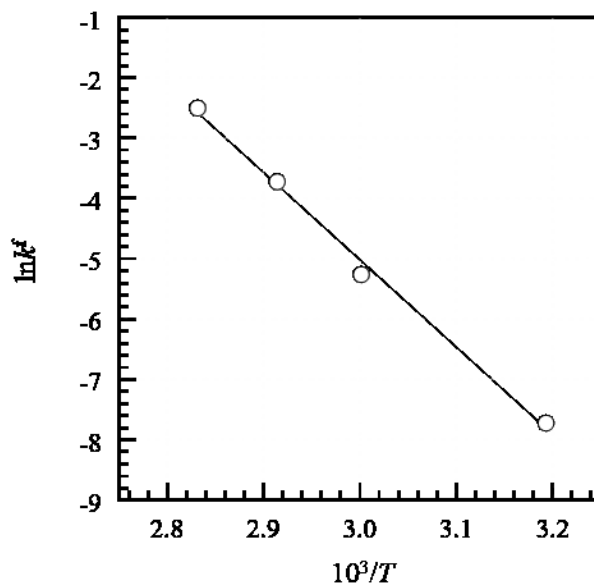


Fig. 6.3 Arrhenius plot of k^f values derived from cleaning curves obtained at various temperatures.

Fig. 6.3 は、脱着曲線の解析で得られた k^f 値の Arrhenius プロットである。良好な直線関係が得られており、 k^f は Arrhenius 型の温度依存性を示すことがわかった。グラフの傾きから、見掛けの活性化エネルギー (E_a) は 120 kJ/mol と概算された。

6.3.2 脱着した BSA 分子の分子量

Fig. 6.4 に、0.54 M NaClO₂ 水溶液 (pH 4.0~10.0) を用いた回分洗浄により脱着した BSA 分子の GFC クロマトグラムを示す。GFC 分析では、保持時間 (RT) が長いほど分子量が小さいことを意味する。なお、各分析試料は脱塩処理で濃縮されているため、ピークの高さと濃度には相関性はない。

未分解の BSA のクロマトグラムには、単量体の BSA (MW: 67,000) に相当する鋭敏なピーク (RT: 8.7 min) と、二量体とみ

られる小さなピーク (RT: 7.8 min)が見られた (Fig. 6. 4a)。 pH

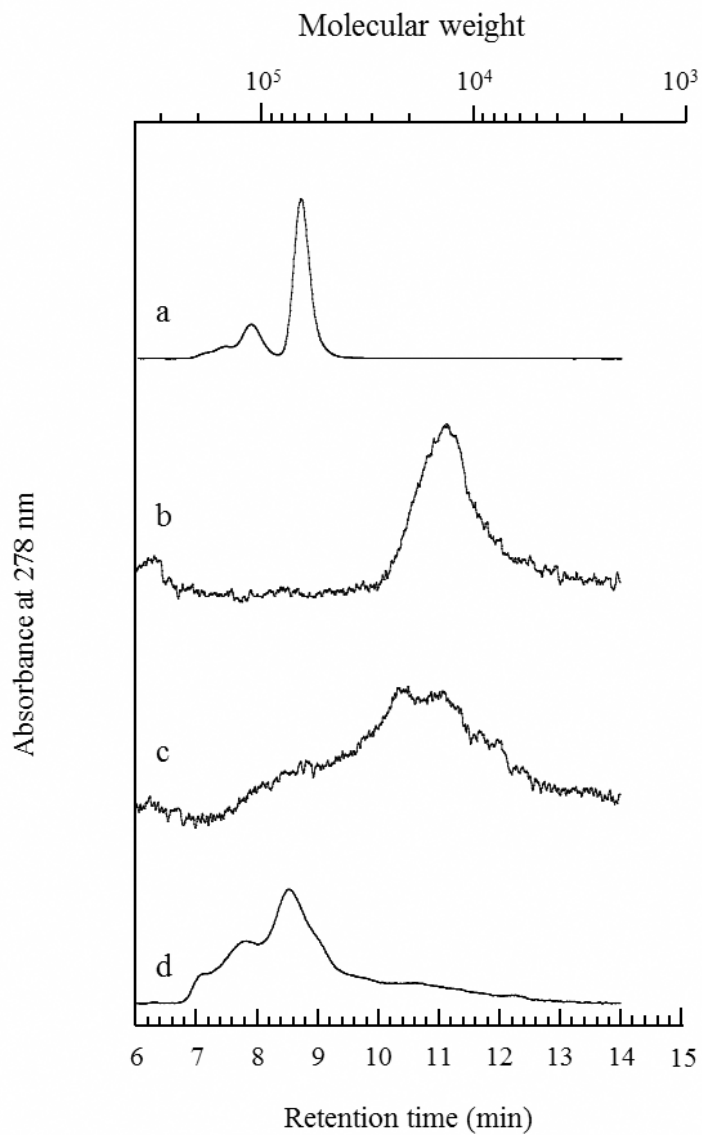


Fig. 6. 4 GFC chromatograms of BSA removed from stainless steel surfaces during batchwise cleaning with 0.54 M NaClO₂ solutions of different pH. Curves: (a) native BSA; (b) pH 4.0; (c) pH 7.0; (d) pH 10.0. Cleaning solution containing BSA removed was desalinated and concentrated by using a centrifugal filter device (Amicon ultra-4, 3K).

4.0 の NaClO_2 水溶液で脱着した BSA（除去率：44.5%）のクロマトグラムでは、BSA よりもかなり長い RT (11.2 min) にピークが見られ、MW は約 12,000 に相当した (Fig. 6. 4b)。pH 7.0 の洗浄で脱着した BSA（除去率：12.0%）のクロマトグラムでは、RT = 10.4~11.2 min に幅広のピークが見られた (Fig. 6. 4c)。そして、pH 10.0 の洗浄で脱着した BSA (除去率：22.4%) のクロマトグラムでは、未分解 BSA の RT よりも前 (7.1~8.5 min) に 3 つのピークが見られた (Fig. 6. 4d)。

また、pH 4.0 の 0.09 M NaClO_2 水溶液で一次洗浄後、0.1 M NaOH 水溶液を用いた二次洗浄で脱着した BSA の場合、未分解 BSA の RT の前後 (7.0~11.6 min) に幅広のピークが見られた (Fig. 示さず)。

これらの結果は、pH 4.0~7.0 の NaClO_2 水溶液で除去された BSA 分子は NaClO_2 の酸化作用によって低分子断片に分解されて除去されたことを示している。

6. 3. 3 NaClO の洗浄効果との比較

Fig. 6. 5 に、 NaClO_2 を用いた洗浄実験 (Fig. 6. 1) と同様に、BSA が不可逆吸着したステンレス鋼微粒子を対象に pH 4.0~10.0 に調整した NaClO 水溶液を用いて回分洗浄したときの BSA の除去率を示す。0.003 M および 0.03M の NaClO を添加した場合、pH 4.0~6.0 の pH 範囲では除去率は $11 \pm 3\%$ 程度であり、いずれの濃度でも添加効果は殆ど見られなかった。pH 6.0~10.0 の範囲では、除去率は pH の上昇とともに、また NaClO 濃度に依存して著しく上昇した。pH 10.0 の洗浄では、0.003 M および 0.03M NaClO の添加により除去率は各々 67.0% および 97.2% に達した。この結果は、 NaClO_2 水溶液とは異なり、アルカリ性の NaClO 水溶液の方が強い洗浄力を持つことを示

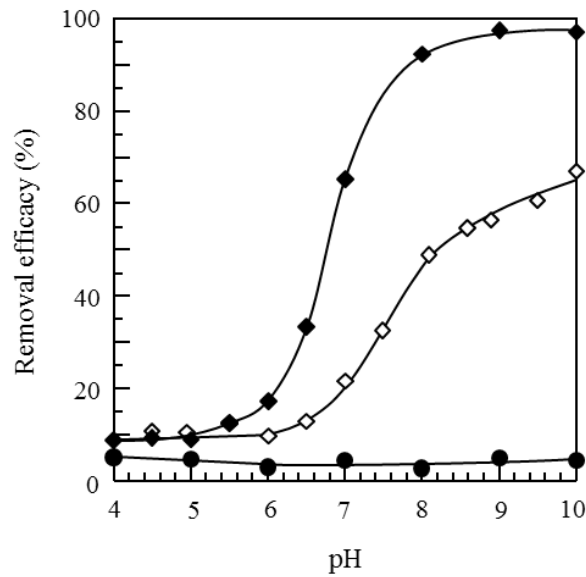


Fig. 6. 5 Effect of pH of NaClO solution on the removal efficacy of BSA from stainless steel surfaces during batchwise cleaning for 2h at 40°C. Symbols: ●, Dilute HNO₃ or NaOH solution alone; ◇, 0.003M NaClO; ◆, 0.03M NaClO.

している。

Fig. 6. 6 に、0.003 M NaClO 水溶液 (pH 4.0, 10.0) を用いた回分洗浄により脱着した BSA 分子 GFC クロマトグラムを示す。pH 4.0 の NaClO 水溶液で脱着した BSA (除去率: 10.8%) のクロマトグラムでは、一つの鋭敏なピークが未分解 BSA よりも低分子量領域 (RT = 11.6 min) に見られ、MW は約 10,000 に相当した (Fig. 6. 6b)。また、pH 10.0 の洗浄で脱着した BSA (除去率: 67.0%) のクロマトグラムにも、pH 4.0 のクロマトグラムと同じ RT に幅広のピークが見られた (Fig. 6. 4c)。この結果から、NaClO による BSA 分子鎖の酸化分解は pH に関係なく特定の部位 (電荷の偏りがある部位) で起こり、洗浄液中に脱着する分子鎖断片の分子量分布は pH 10.0 では比較

的広く、pH 4.0 では限定的であることが示唆された。

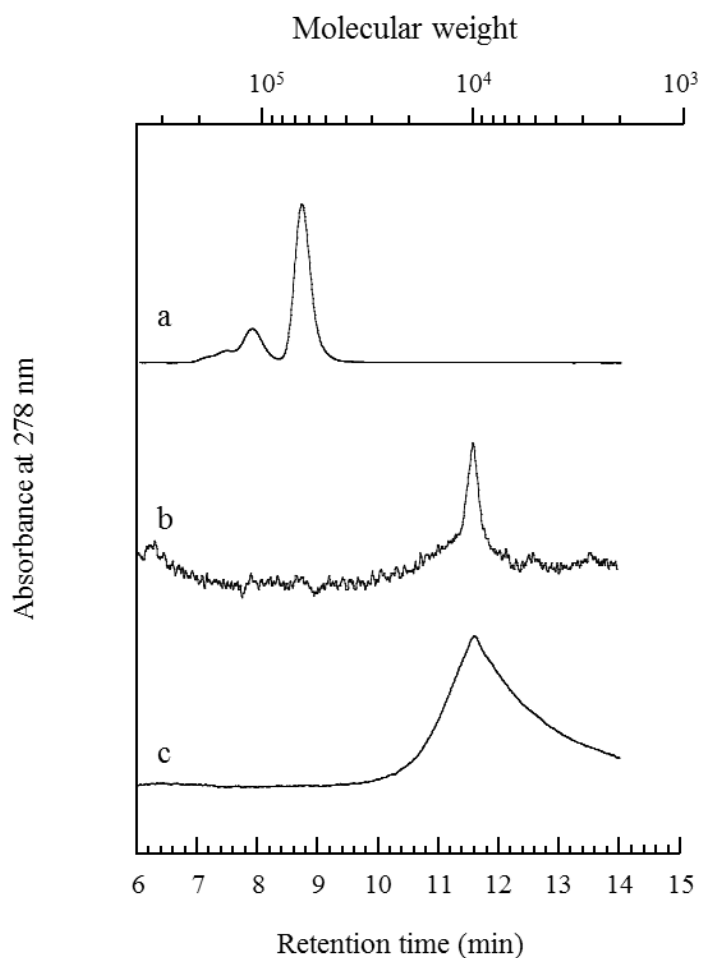


Fig. 6. 6 GFC chromatograms of BSA removed from stainless steel surfaces during batchwise cleaning with 0.003M NaClO solutions of different pH. Curves: (a) native BSA; (b) pH 4.0; (c) pH 10.0. Cleaning solution containing BSA removed was desalinated and concentrated as mentioned in the legend for Fig. 4. Symbols: ●, Dilute HNO₃ or NaOH solution alone; ◇, 0.003M NaClO; ◆, 0.03M NaClO.

6. 3. 4 NaClO₂ と NaClO の吸着

Table 6.1 に、洗浄操作と同じ条件下でステンレス鋼微粒子と NaClO₂ 水溶液および NaClO 水溶液を接触させたときの NaClO₂ と NaClO の吸着量を示す。NaClO₂ の吸着量は、検討した濃度と pH において 5.3~6.6 μmol/m² とほぼ一定の値が得られた。また、NaClO の吸着量も 10~15 μmol/m² の範囲にあり、濃度および pH の影響をあまり受けなかった。NaClO₂ の吸着量は、NaClO の約 1/2 の値であった。本研究では、ヨウ素滴定法による Na₂S₂O₃ の滴下量から吸着量を算出しており、NaClO₂ と NaClO が酸化力を維持したままステンレス鋼表面に吸着していることがわかった。

TABLE 6. 1 Amounts of NaClO₂ and NaClO adsorbed on stainless steel surfaces at pH 4.0 and 10.0.

Chlorinated compound	conc. (M)	Amount adsorbed (μmol/m ²)	
		pH 4.0	pH 10.0
NaClO ₂	0.09	6.0	5.7
	0.54	6.5	5.3
	2.1	6.2	6.6
NaClO	0.003	12	10
	0.03	15	12
	0.09	13	14

Adsorption experiment was conducted at 40°C for 2h.

6. 3. 5 ステンレス鋼からの金属イオンの溶出

Table 6. 2 に、洗浄操作と同じ条件下でステンレス鋼微粒子と NaClO₂ 水溶液および NaClO 水溶液を接触させたときの金属イオンの溶出量を示す。NaClO₂ 水溶液の場合、濃度を 0.09 M から 2.1 M に増加させると、金属イオン溶出量は pH 4.0 では 24~34 μg/m²、pH 10.0 では 3.1~38 μg/m² と相対的に低い

値であった。一方、NaClO 水溶液の濃度を 0.003 M から 0.09 M に増加させると、金属イオン溶出量は pH4.0 では 58 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ から 470 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ に増加し、pH 10.0 では 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ から 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ に増加した。ステンレス鋼に対する腐食作用は、NaClO 水溶液の方が明らかに大きく、特に pH 4.0 では濃度に依存して顕著であった。

TABLE 6.2 Amounts of metal ions dissolved from stainless steel particles during 2-h immersion in NaClO₂ and NaClO solutions at pH 4.0 and 10.0.

Chlorinated compound	conc. (M)	Amount dissolved ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	
		pH 4.0	pH 10.0
NaClO ₂	0.09	28	3.1
	0.54	24	5.5
	2.1	34	38
NaClO	0.003	58	30
	0.03	220	88
	0.09	470	120

The amounts of metal ions dissolved were expressed as the sum of those of Fe, Cr, and Ni ions. Dissolution experiment was conducted at 40°C for 2h.

第 6.4 節 考察

pH 4.0~10.0 の範囲において、BSA が不可逆吸着したステンレス鋼微粒子を対象に NaClO₂ 水溶液を用いて洗浄した結果、BSA の除去率は NaClO₂ 水溶液の pH の低下とともに、また NaClO₂ 濃度の上昇とともに著しく上昇した。さらに、BSA の初期脱着速度は、洗浄温度に大きく依存して上昇した。弱酸性の NaClO₂ 水溶液を用いた洗浄で脱着した BSA 分子は、低分子断片に分解されていることも確認された。以上の結果

は、 NaClO_2 の主たる洗浄効果力は酸化分解作用であることを示している。

pHの低下とともにBSAの除去率が上昇するという現象は、酸性pH領域において NaClO_2 水溶液中にBSAの除去を促進する洗浄力成分が増加することを意味している(Fig. 6. 1)。 NaClO_2 水溶液中では、非解離型 HClO_2 と解離型 ClO_2^- の間に式4.1で示したpHに依存した解離平衡が存在する。 HClO_2 ($\text{p}K_a=1.86$)の割合は、pHの低下にともない徐々に大きくなる。pH 4.0の NaClO_2 水溶液中に HClO_2 は全濃度の約0.7%しか存在しないが、2.1 Mの高濃度水溶液中には14.7 mM(約1,000 mg/l)の HClO_2 が含有されることになる。同時に、 NaClO_2 の高濃度化はイオン強度の増加を伴う。低濃度の NaClO_2 水溶液(pH 4.0)の洗浄において、 NaCl の添加によるイオン強度の増加の影響は軽微であった。以上のことから、 NaClO_2 水溶液の洗浄力を決める因子は非解離型 HClO_2 濃度であり、 HClO_2 の酸化作用の増強が洗浄力の増大をもたらしたといえる。

ここで、水溶液中の HClO_2 は準安定な物質であり、二酸化塩素(ClO_2)や塩素酸イオン(ClO_3^-)への変換が起こる¹⁸⁾。 ClO_2 は、アミノ酸、ペプチド、タンパク質に対して酸化作用を及ぼすことが知られている^{87), 88)}。本研究では、 NaClO_2 水溶液を用いた2時間の洗浄過程において ClO_2 が生成していることを定量的に確認していないが、微量の ClO_2 が生成して洗浄力に寄与したとする仮説も完全には否定できない。いずれにしても、 NaClO_2 洗浄液に HClO_2 が存在することがBSAの低分子化と除去に必要なことに違いない。

pH 10.0の0.54 M NaClO_2 水溶液を用いた洗浄では、未分解BSAよりも高分子量の分子が脱着液中に見られた。pH 10.0では、ほとんどの亜塩素酸分子は ClO_2^- の形で存在している。ま

た、同様の現象は pH 4.0 の低濃度 NaClO_2 水溶液 (0.09 M) を用いた洗浄でも見られた。一般に、 HClO やオゾン (O_3) のような酸化剤はタンパク質分子鎖のペプチド結合を開裂させる作用を持つが、その一方でタンパク質分子間を架橋することで、二量体化あるいは凝集させることも報告されている^{89, 90)}。おそらく、 ClO_2^- および低濃度の HClO_2 の弱い酸化力によって吸着 BSA の一部が二量体化あるいは凝集体へと変化し、その結果として脱着が抑えられて低い除去率の原因となったのではないかと推測される。

pH 4.0 の 0.09 M NaClO_2 水溶液で一次洗浄後に残存した BSA を対象に 0.1 M NaOH 水溶液で二次洗浄すると、脱着した BSA 分子の中には低分子化されたものも含まれていた。すなわち、低濃度の HClO_2 で BSA の分子鎖が部分的に分解されても、その多くはステンレス鋼表面に残存していたことがわかる。これは、弱酸性下での一次洗浄では BSA 分子の三次元構造を維持するアミノ酸残基同士の静電的相互作用が機能して分解された分子鎖断片の脱着を抑えるが、強アルカリ性条件下では静電的相互作用が弱められ、分子鎖断片の脱着が促進されたのではないかと考えられる。

洗浄過程では、固体表面からの汚れ分子の脱着反応が複雑なメカニズムで進行する。種々の温度で洗浄する場合、系全体の律速となる素過程の温度依存性が熱の影響を強く反映する。Gallot-Lavallée と Lalande は⁹¹⁾、全乳の低温殺菌機に付着した熱変性乳汚れを対象とした NaOH 洗浄 (0.1~3.9%) において、汚れ層が脱着に至る過程を水酸化物イオン (OH^-) の汚れ層への拡散、汚れ層の膨潤と溶解、そして液流よる洗浄液 (バルク) への拡散をモデル化して解析し、67~138 kJ/mol の大きな E_a 値を得ている。この脱着過程では、汚れ層の膨潤が律

速段階と考えられており、 E_a 値は OH^- による熱変性タンパク質の可溶化（膨潤、加水分解）における温度依存性を反映している。本研究では、BSA の初期脱着速度を反映する k^f 値は、Arrhenius 型の温度依存性を示し、 E_a は 120 kJ/mol と概算された。この E_a 値は、上述の熱変性乳汚れのアルカリ洗浄除去で得られた数値（ $67 \sim 138 \text{ kJ/mol}$ ）と同等であった。また、GFC クロマトグラフィー分析の結果、pH 4.0 の NaClO_2 水溶液の洗浄で除去された BSA 分子は低分子断片に分解されていた。これらの事実は、pH 4.0 の NaClO_2 水溶液による洗浄過程の律速が、拡散過程ではなく、酸化分解（化学反応）過程であることを示唆している。

NaClO を用いた洗浄の場合、洗浄液の pH と BSA 除去率の関係が、 NaClO_2 とは対照的である点が興味深い。pH 6.0～10.0 の範囲において pH の上昇とともに洗浄力は増大した (Fig. 6. 5)。この結果は、 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 表面に不可逆吸着した BSA、ペクチンおよび *Pseudomonas fluorescens* に対する洗浄力が ClO^- の濃度に依存するという従来現象と一致していた^{10, 62)}。pH 10.0 では、 ClO^- は全濃度の約 99.7% を占めており、 ClO^- が主たる洗浄力因子であることがわかる。一方で、pH 4.0 と pH 10.0 の洗浄で脱着した BSA 分子の分子量を比較すると、 ClO^- (pH 10.0) による低分子化のレベルが HClO (pH 4.0) よりも著しく大きいわけではなかった (Fig. 6. 6)。以前行った研究では、ステンレス鋼に不可逆吸着した BSA を対象に NaOH 水溶液 (pH 13) および NaClO 水溶液 (pH 9.0) を用いた洗浄における温度依存性を調べ、 $30 \sim 33 \text{ kJ/mol}$ の E_a 値を得ている^{75, 85)}。そして、この系における OH^- および ClO^- の洗浄機構は、化学反応過程よりも拡散過程が律速であること、そして ClO^- は分解作用を發揮する一方で、固液界面では OH^- の作用と同様に吸着置換

作用によって BSA を脱着させていると考察した。本研究においても、ステンレス鋼表面への HClO/ClO^- の吸着量は $10\sim 15\ \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、高い吸着親和性を持つことがわかった (Table 6. 1)。これと比較して、 $\text{HClO}_2/\text{ClO}_2^-$ の吸着量は約 1/2 の $5.3\sim 6.6\ \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、吸着量に及ぼす濃度の影響も見られなかった。これらの結果から、 ClO^- の洗浄効果は BSA-ステンレス鋼の接触界面における酸化分解と吸着置換が主であるのに対して、 HClO_2 水溶液による洗浄効果は BSA の酸化分解が主で、吸着置換反応の果たす役割は小さいと考えられた。

酸化力を持つ塩素系化合物は、金属の腐食を誘発する物質の一つである。特に、 NaClO の使用はしばしば腐食の原因となっている。しかし、高濃度の OH^- の存在下では NaClO の金属腐食性は著しく低減する¹⁴⁾。これは、 OH^- がステンレス鋼表面に優先的に吸着し、 HClO/ClO^- とステンレス鋼の接触を拮抗阻害するためである。事実、pH 10.0 の NaClO_2 水溶液および NaClO 水溶液における金属イオン溶出量は、pH 4.0 と比較すると低く抑えられていた (Table 6. 2)。この傾向は、腐食性の高い NaClO 水溶液で顕著であった。pH 4.0 の $0.09\sim 2.1\ \text{M}$ NaClO_2 水溶液の場合、金属イオン溶出量はほぼ一定であり、相対的に低い値であった ($24\sim 34\ \mu\text{g}/\text{m}^2$)。特に、洗浄力が大きい pH 4.0 の $2.1\ \text{M}$ NaClO_2 水溶液では、通常の使用濃度である $0.003\ \text{M}$ NaClO (pH 4.0, 10.0) の水溶液と比較すると、濃度が 3 桁も高いにもかかわらず金属イオン溶出量は同等かそれ以下の値であった。弱酸性の高濃度 NaClO_2 水溶液を使用しても、ステンレス鋼の実質上の腐食の危険性は低いことがわかった。

第 6.5 節 結言

本章では、弱酸性の高濃度 NaClO_2 水溶液がタンパク質汚れに対して強い洗浄力を持つことが明らかとなった。また、ステンレス鋼に対する腐食性も低いことが示された。これらの特性は、弱酸性 NaClO 水溶液との大きな相違点であり、対象によってはより実用的な洗浄・殺菌剤となりうる可能性を示唆している。

次節では、タンパク質よりも遙かに大きい微生物細胞に対する NaClO_2 水溶液の洗浄効果を調べ、 NaClO_2 の洗浄剤としての実用性についてさらに検討した。

第 7 章 ステンレス鋼に付着した *V. parahaemolyticus* の脱着 におよぼす NaClO₂ の洗浄効果の動力的解析

第 7.1 節 緒言

水系洗浄において、水溶液の溶解力は最も基本的な洗浄力要素である。第 6 章では、HNO₃ と NaOH で pH を 4-10 に調整した水溶液で脱着しないステンレス鋼表面に不可逆吸着した BSA の脱着におよぼす NaClO₂ の洗浄効果を調べ、pH が低いほど洗浄効果が高いこと、その洗浄効果が HClO₂ の分解作用に起因することを述べた。

また、第 5 章では PET 表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対する NaClO₂ の殺菌効果は HClO₂ 濃度に依存し、浮遊菌とほぼ同等の作用効果であると結論付けた。ここで、HClO₂ が付着菌の洗浄除去にも寄与していたと仮定すると、HClO₂ は付着菌に対して殺菌かつ洗浄作用を示すことで PET 表面上の生菌数を減少させたことになる。NaClO₂ 濃度は、殺菌 (1.1~44 mM) と洗浄 (90~2,100 mM) では異なるものの、確認しておく必要がある。

本章では、BSA の分子サイズよりもはるかに大きい *V. parahaemolyticus* 細胞に対する NaClO₂ の洗浄効果を明らかにすることを目的とした。

第 7.2 節 実験方法

7.2.1 材料と供試菌および培養方法

ステンレス鋼微粒子 (0.3 m²/g) と NaClO₂ は前節と同じ試薬を用いた。*V. parahaemolyticus* の培養および菌懸濁液 (OD₆₆₀=2.0) の調製方法は第 3 章に示した。

7. 2. 2 *V. parahaemolyticus* 付着ステンレス鋼微粒子の調製

2倍濃縮した菌懸濁液(OD₆₆₀=4.0) 25 ml と 5 g のステンレス鋼微粒子を 125 ml 容積のガラスバイアルに入れ、密栓後、25℃に設定した恒温水槽に入れ、120 rpm で 2 時間恒温震盪し、*V. parahaemolyticus* 付着ステンレス鋼微粒子を調製した。2 時間後、遠心管に移し、遠心分離(1,160×g, 1min)によりステンレス鋼微粒子を回収した。ステンレス鋼微粒子を 20 ml の 0.9% NaCl で 5 回濯ぎ、40℃で 16 時間乾燥させた後に実験に使用した。

7. 2. 3 洗淨実験

回分洗淨は、*V. parahaemolyticus* が付着した 0.5 g のステンレス鋼微粒子と 5 ml の洗淨液を 25 ml のガラス製バイアルに入れ 40℃で 2 時間恒温震盪することにより行った。洗淨液として NaClO₂ 水溶液(0.09~2.1 M)を使用した。洗淨液 pH は HNO₃ 水溶液で pH4~10 の範囲に調整した。洗淨後の濯ぎ、*V. parahaemolyticus* の定量については(2. 2. 3)と同様にして行った。

連続洗淨実験は、*V. parahaemolyticus* が付着した 1.8 g のステンレス鋼微粒子を(5. 2. 3)に示したステンレス鋼製カラムに入れ、カラム底部より 0.1 ml/min の流速で洗淨液(0.09 M NaClO₂, pH 4.0)を送液することで行った(空間時間 τ=4 分)。洗淨温度は 40℃~80℃とした。脱着した *V. parahaemolyticus* が含まれる洗淨液を経時的に採取し、採取した洗淨液 900 μl に対して 100 μl の 1 M NaOH 水溶液を添加し、30 分間反応させることで菌体を完全に溶菌させた。*V. parahaemolyticus* を完全に溶菌させた。脱着 *V. parahaemolyticus* 量は Lowry-Folin 法で全タンパク質量として定量した^{57, 92)}。残存 *V.*

parahaemolyticus 量は全炭素量として有機体炭素測定装置で定量した。洗浄時間に対して、*V. parahaemolyticus* の残存量 (Γ) の自然体数値 ($\ln\Gamma$) をプロットし脱着曲線を得た。得られた脱着曲線は式 6.1 または式 6.2 により解析した。

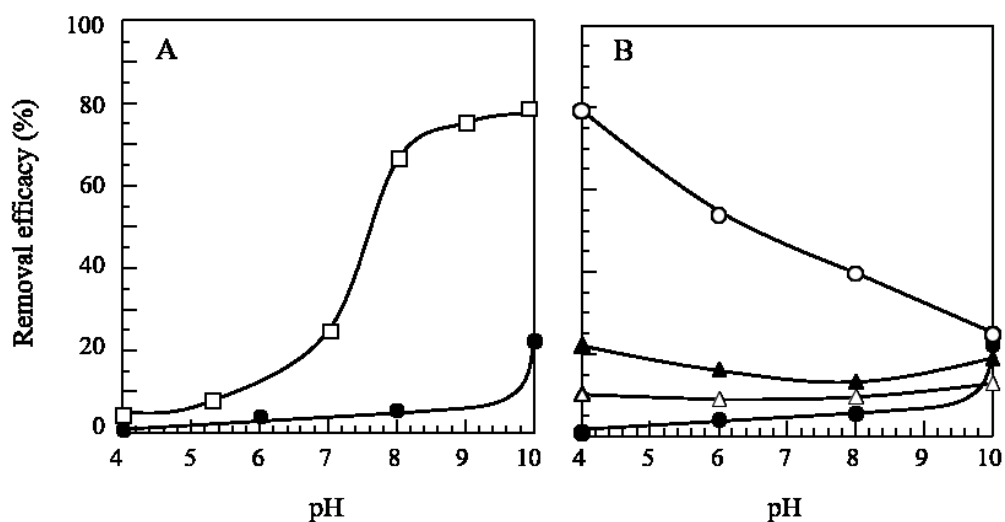


Fig. 7. 1 Effect of pH of NaClO (A) and pH and concentration of NaClO₂ (B) on the removal efficacy of *V. parahaemolyticus* from stainless steel particles during batch cleaning for 2h at 40 °C. The pH values of NaClO and NaClO₂ solutions were adjusted with HNO₃. NaClO concentrations were 0 (●) and 3 mM (□) and NaClO₂ concentration were 0 (●), 0.09 M (△), 0.54 M (▲), and 2.1 M (○).

第 7.3 節 結果

7.3.1 *V. parahaemolyticus* の除去におよぼす NaClO₂ 水溶液の pH と濃度の影響

Fig. 7. 1 に *V. parahaemolyticus* の除去におよぼす NaClO 水

溶液の pH の影響および NaClO₂ 水溶液の pH と濃度の影響を示す。 *V. parahaemolyticus* の初期付着量は 2.9 mg dry cells/m² であった。 NaClO と NaClO₂ 未添加の場合、 pH 4-8 では *V. parahaemolyticus* の除去率は 5%未満であったが、 pH 10 では 22%に達した。 3 mM の NaClO を添加した場合は pH の増加とともに除去率は向上し pH 10 の場合 77.0%に到達した (Fig. 7. 1A)。 NaClO₂ 水溶液で洗浄を行った場合、 pH 4-8 の範囲では 0.09 M から 2.1 M に NaClO₂ 濃度を増加させると濃度に依存した除去率の向上が見られ、 pH4 で 2.1 M の NaClO₂ を添加した場合、除去率は 79.9%まで到達し、 NaClO と同等の洗浄効果が得られた (Fig. 7. 1B)。

なお、第 5 章での pH 4.0~6.0 の NaClO₂ 水溶液 (1.1~22 mM) は、 *V. parahaemolyticus* の除去に影響しないことが確認された。

7. 3. 2 *V. parahaemolyticus* の除去におよぼす NaClO₂ 水溶液の温度の影響

Fig. 7. 2 に、 *V. parahaemolyticus* が付着したステンレス鋼を 0.09 M NaClO₂ 水溶液 (pH 4.0) を用いて 40~80℃ で連続洗浄したときの菌体の脱着曲線を示す。 *V. parahaemolyticus* の初期付着量は 1.9 mg dry cells/m² であった。 40℃ で洗浄を行った場合、 *V. parahaemolyticus* は非常に緩慢に直線的に脱着した。 洗浄温度を 60℃ に上昇させると、洗浄時間 40 分までは 40℃ で得られた脱着曲線と一致したが、徐々に脱着が促進され、80 分以降から直線状に脱着する領域が見られた。 洗浄温度を 70℃ ~80℃ に上昇させると温度の上昇に依存して脱着誘導期が短縮し、その後速やかに脱着する領域と緩やかに脱着する領域が確認された。 洗浄初期の脱着速度を反映する

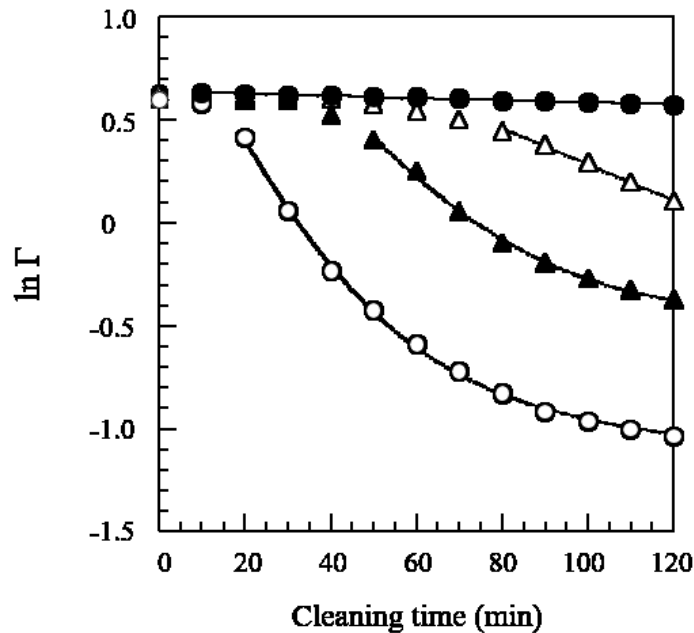


Fig. 7. 2 Effect of temperature of 0.09 M NaClO₂ solution at pH4 on the time course of *V. parahaemolyticus* removal from stainless steel particles. Temperatures were 40 (●), 60 (△), 70 (▲), and 80 °C (○).

k^f 値の算出のために、40°Cと60°Cで得られた脱着曲線には式6.2を、70°Cと80°Cで得られた脱着曲線には式6.1を適合させた。Fig. 7.2の実線は式6.1または式6.2を適合させて得られた曲線である。適合の結果、 k^f 値は $5.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (40 °C)、 $8.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (60 °C)、 $3.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (70 °C)、 $4.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (80 °C)と算出された。

7.3 Arrhenius プロット

Fig. 7.2より得られた k^f 値を Arrhenius 式に従い再プロットした結果を Fig. 7.3 に示す。良好な直線関係が得られており k^f が Arrhenius 型の温度依存性を示すことが確認された。この直線の傾きから E_a 値は 100 kJ/mol と概算された。

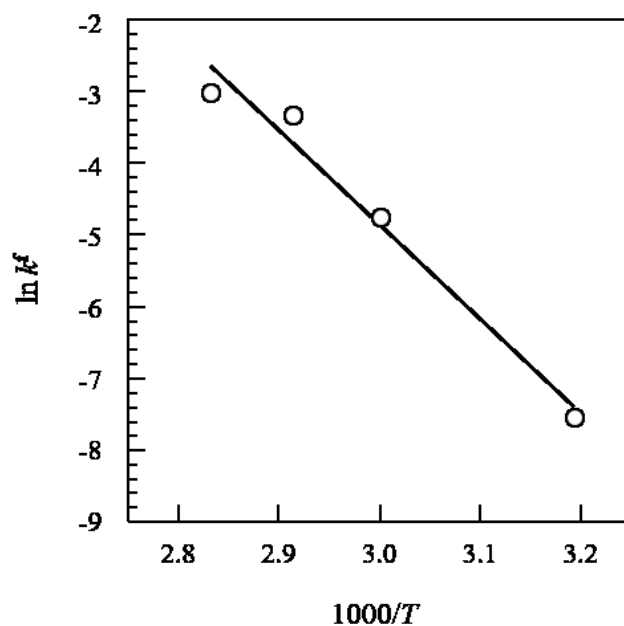


Fig. 7.3 Arrhenius plot of k^f values derived from cleaning curves at various temperatures.

第 7.4 節 考察

V. parahaemolyticus はリポタンパク質、リポ多糖、リン脂質などの高分子が菌体の最表面に存在するグラム陰性細菌であり、EPS（アミノ基、リン酸基、カルボキシル基など）を生成することが知られている。一章ではステンレス鋼表面と *V. parahaemolyticus* 表面はどちらも水溶液中で電氣的に両性の性質を示し、*V. parahaemolyticus* は前述の官能基を介してステンレス鋼表面に不可逆的に付着すること、そしてアルカリ性水溶液 (pH 10~13) による洗浄作用はこれらの官能基とステンレス鋼表面に水酸化物イオン (OH^-) が吸着し、結果として静電的反発力が增大することにより発揮されることを報告した。

OH^- の洗浄力が発現しない pH 領域 (pH 4.0~10.0) において、

V. parahaemolyticus の付着菌体に対する NaClO と NaClO_2 の洗浄効果における pH 依存性は対照的であった (Fig. 7. 1)。 NaClO 水溶液の洗浄の場合、除去率は pH が上昇するほど増大した。すなわち、*V. parahaemolyticus* に対する洗浄力は ClO^- 濃度に依存しており、 HClO は洗浄力を持たないことを意味している。一方、高濃度 (2.1 M) の NaClO_2 水溶液の洗浄では、除去率は pH が低下するほど増大した。これは、*V. parahaemolyticus* に対する NaClO_2 水溶液の洗浄力因子が HClO_2 であることを示している。ここで得られた NaClO_2 洗浄の pH 依存性は、ステンレス鋼に不可逆吸着した BSA を洗浄対象とした系で得られた結果と類似していた (6 章)。6 章では、 HClO_2 による BSA 分子の酸化分解 (低分子化) が主要な除去メカニズムであることが明らかとなっている。

V. parahaemolyticus に対する HClO_2 の洗浄作用の律速段階は、 k^f 値の熱依存性から考察できる。pH 4.0 の NaClO_2 水溶液による *V. parahaemolyticus* の洗浄効果の動力的解析により得られた k^f 値は Arrhenius 型の温度依存性を示し、 E_a 値は 100 kJ/mol と概算された。この値は、 NaClO_2 水溶液を用いた BSA の除去において得られた 120 kJ/mol と近似した値であった (6 章)。この相対的に大きい E_a 値は、全乳の熱変性タンパク質汚れが OH^- と熱により可溶化 (膨潤、加水分解) されて除去される洗浄過程で得られた値 (67~138 kJ/mol) と同等であった。一般に、系全体の律速となる素過程の温度依存性が E_a 値に反映されることから、pH 4.0 の NaClO_2 水溶液による洗浄過程の律速が、拡散過程ではなく、酸化分解 (化学反応) 過程であることを示唆している。 HClO_2 が *V. parahaemolyticus* の細胞表層の官能基とステンレス鋼表面間の吸着相互作用にどのように作用するかは不明であるが、 HClO_2 の酸化分解作用が *V.*

parahaemolyticus の脱着の促進に大きく関与していることが示唆された。

第 7.5 節 結言

ステンレス鋼表面に付着した *V. parahaemolyticus* の NaClO_2 の洗浄効果を pH4-10 の範囲で調べ、弱酸性の高濃度 NaClO_2 水溶液がステンレス鋼表面に付着した *V. parahaemolyticus* に対して洗浄作用を持つことが明らかとなった。低 pH 領域で HClO_2 が殺菌効果ばかりでなく洗浄効果を示すという特徴は、 HClO との大きな相違点である。また NaClO_2 の腐食性は NaClO よりも低いこともわかっている。これらの特徴から、洗浄対象が耐食性の低い材料である場合、 NaClO_2 が実用的な洗浄・殺菌剤となる可能性が示された。

第 8 章 総括

本論文では、水産加工業をはじめとする食品産業全般における洗浄・殺菌技術の最適化を目的に、海洋性食中毒菌である *V. parahaemolyticus* と牛血清アルブミン(BSA)を処理対象として、食品添加物に指定された塩素系酸化剤である次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)および亜塩素酸ナトリウム(NaClO_2)の固液界面における作用機序の解明と効率的な利用技術の開発に取り組んだ。

微生物は、自然界のあらゆる所に生息している。当然ながら水産物、農産物、畜産物は無菌生物ではなく、一般細菌を含めて比較的多くの微生物が混在している。これらの原材料を貯蔵し、加工処理する場合、取り扱う環境によっては変質、変敗が起こることがある。また、加工処理時に原材料中の病原菌が製造機器（機械、装置、器具）やふきん、加工従事者等を介して製品に混入し、二次汚染を引き起こす危険性がある。このように、実際の食品加工現場では水溶液中に浮遊状態で存在する微生物のみならず、固体表面に付着した微生物を対象とする洗浄・殺菌処理の最適化が課題となっている。

微生物の多くは、界面を住処としている。そして、水のあるところに微生物は増殖し、やがてバイオフィルムを形成して各種薬剤に対して抵抗性示すようになる。そのため、できるだけ早い段階で栄養源となる有機物や微生物を除去するか殺菌する必要がある。この点において、周期的に繰り返し実施する洗浄および殺菌操作の果たす役割はきわめて大きい。

二次汚染対策を目的とする洗浄・殺菌操作の最適化を探る研究においては、界面に存在する微生物の生菌数を正確に測定する技術が求められる。この方法として、第 1 章では微生物熱量計を用いることにより、未付着（浮遊）状態の *V.*

parahaemolyticus の比増殖速度に及ぼす環境因子の影響を測定することが可能であることを示すとともに、付着状態の *V. parahaemolyticus* に対しては脱着操作なしで生菌数を正確に測定できることを実証した。

固液界面への有機物汚れや微生物の付着は、自発的に起こる。洗浄操作の効率を向上させるためには、微生物と被洗浄体（本論文ではステンレス鋼）の表面特性や吸着相互作用の形態、そして固液界面における各洗浄力要素の作用機序に対する正しい理解が必要である。第 2 章では、液相微粒子分散系において、コロイド化学の分析手法である電位差滴定法を用いて、ステンレス鋼（粒子）および *V. parahaemolyticus* の細胞表層の表面電荷密度を pH の関数として測定し、付着・脱着挙動におよぼす pH の影響を静電的相互作用の観点から考察することができた。*V. parahaemolyticus* は、ステンレス鋼表面との間に斥力が働く pH でも自発的かつ不可逆的に付着すること、最大付着量が *V. parahaemolyticus* の零電荷点の pH 付近で得られること、そして OH⁻イオンの増加により脱着が促進されることを示し、タンパク質や多糖類、ムチン（糖タンパク質）の脱着挙動と一致することが明らかとなった。すなわち、有機物汚れと付着微生物の洗浄条件は同一条件で良いという従来の認識を再確認することができた。

次亜塩素酸(HClO)は、水溶液の pH に依存して次亜塩素酸イオン(ClO⁻)と水素イオン(H⁺)に解離する。本論文でも示したように、非解離 HClO は微生物細胞の形質膜に対する膜透過性があるため *V. parahaemolyticus* に対して強い殺菌効果を持つが（第 3 章）、ステンレス鋼表面上の *V. parahaemolyticus* や BSA に対する洗浄力を持たない（第 6 章、7 章）。一方、ClO⁻ は酸化分解と吸着置換反応により強い洗浄効果を持つことを

示した。このように、pH に依存する HClO と ClO^- の割合ならびに濃度の調整が次亜塩素酸水溶液の産業利用上の鍵となるが、 NaClO の殺菌力と洗浄力が異なる pH 領域に最適条件が存在することが作業効率の上で一つの壁となっていた。

また、メカニズムは不明であるが、微生物は固体表面に付着することにより HClO に対する抵抗性が向上することが経験的に知られている。第 3 章では、PET 表面に付着するだけで NaClO に対する抵抗性が 6~7 倍向上することを明らかにした。 HClO 濃度を高めると殺菌効果は増大するが、弱酸性領域で高濃度の HClO を用いると金属腐食性が著しく高まるという問題も抱えている。そのため、付着菌に対しては、殺菌の前に洗浄操作でできるだけ除去する必要がある。

この点において、 NaClO の代替酸化剤として穏和な酸化剤である NaClO_2 の洗浄・殺菌効果を検討した結果、弱酸性かつ高濃度の NaClO_2 水溶液が *V. parahaemolyticus* に対して強力な殺菌作用を持つこと（第 4 章、5 章）、そしてステンレス鋼表面上の BSA や *V. parahaemolyticus* に対する洗浄力を持つことが明らかとなった（第 6 章、7 章）。また、 NaClO_2 水溶液 (pH6.5) の有意な殺菌効果は、魚肉練り製品の腐敗菌である *Pseudomonas* 属菌や、グラム陽性菌 (*S. aureus*)、グラム陰性菌 (*E. coli*) に対しても実証された。すなわち、 NaClO_2 の洗浄・殺菌効果を示す最適 pH が同じ弱酸性領域にある点で、殺菌兼用の洗浄操作が行えることになる。また、弱酸性の高濃度 NaClO_2 水溶液は付着菌に対しても NaClO と比較すると殺菌効果は大きく減少することはない（第 5 章）、さらにステンレス鋼の実質上の腐食の危険性は低いことが示された。本論文は、非解離 HClO_2 が主たる殺菌因子であるばかりでなく、洗浄因子でもあることを示した初めての研究である。

従来、塩素系酸化剤を用いた洗浄・殺菌操作は、金属腐食性や揮発性、作業員の安全を考慮して低温で行われることが多かった。特に、生鮮魚介類やカット野菜の洗浄・殺菌処理の場合、チラー水（5℃前後）に塩素系酸化剤を添加して実施されているケースが多い。一方、 NaClO_2 による酸化反応は化学反応の一つであり、基本的に熱によって促進される。洗浄と殺菌を目的とするのであれば、水溶液を冷却するほど作用効果は減少することになる。

洗浄・殺菌効率を図る因子の一つとして、所望する清浄度を得るまでの「時間」がある。洗浄速度および殺菌速度が大きいほど、操作効率は向上することになる。そこで、本論文では、 NaClO_2 による洗浄・殺菌効果に及ぼす温度の影響を速度論的に明らかにした。まず、*V. parahaemolyticus* に対する弱酸性の NaClO_2 水溶液の殺菌効果では、一次殺菌速度定数は Arrhenius 型の温度依存性を示し、見掛けの活性化エネルギー (E_a)は 43.5 kJ/mol と概算され、殺菌速度は 10℃ 毎に約 1.8 倍増加することを示した（第 4 章）。また、弱酸性の NaClO_2 水溶液を用いた洗浄における BSA と *V. parahaemolyticus* の一次脱着速度定数は、いずれも Arrhenius 型の温度依存性を示し、 E_a は 100～120 kJ/mol と概算され、洗浄速度は 10℃ 毎に約 3.0～3.7 倍増加することも示した（第 6 章、7 章）。そして、過去の ClO^- の洗浄に関する先行研究と、本論文の脱着速度の熱依存性および脱着したタンパク質の低分子化データに基づいて、 ClO^- の洗浄効果は固液界面における汚れの酸化分解と吸着置換が主であるのに対して、 HClO_2 水溶液による洗浄効果は汚れの酸化分解作用が主で、吸着置換反応の果たす役割は小さいと結論付けた。

以上、本論文において、微生物熱量計を用いて浮遊菌および付着菌の生菌数ならびに増殖活性を測定する評価系を構築し、 NaClO と NaClO_2 の殺菌効果に及ぼす pH および温度の影響を首尾良く解析することができた。そして、 NaClO の洗浄力（アルカリ性）と殺菌力（弱酸性）は異なる pH 領域に最適条件が存在することを示す一方で、 NaClO_2 の洗浄・殺菌力においてはいずれも HClO_2 （弱酸性）が主たる活性因子であることを示した。さらに、 HClO_2 の洗浄・殺菌効果を引き出すには、温度の併用が極めて効果的であることを明らかにした。本論文は、あくまで実験室レベルの洗浄・殺菌系に基づく結果ではあるものの、製造現場で効率的な洗浄・殺菌操作を実施するための学術的かつ実用的な知見が取得できたと考えている。本論文で明らかにした知見が、食品加工現場における多くの塩素系酸化剤（高度さらし粉、塩素化イソシアヌル酸ナトリウム、次亜塩素酸水、結合塩素、二酸化塩素等）の利用法の改善、さらには新規技術の発展に少しでも役立てば幸いである。

各章発表論文リスト

第 1 章

- 1) Takahashi, K., Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2016) Measurement of the growth rate of *Vibrio Parahaemolyticus* under various salinity, *J. Environ. Control Technique*, **34**, 73-79.

第 2 章

- 2) Takahashi, K. Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2016) Adhesion of *Vibrio parahaemolyticus* to stainless steel surfaces and its removal by caustic alkali cleaning, *J. Environ. Control Technique*, **34**, 240-245.

第 3 章

- 3) Takahashi, K., Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2016) Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* unattached and attached to a solid surface in pH-controlled sodium hypochlorite solutions. *Biocontrol Sci.*, **21**, 265-268.

第 4 章

- 4) Takahashi, K. Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2017) Kinetics of the Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in weakly acidic sodium chlorite solution, *Biocontrol Sci.*, **22**, 25-30.

第 5 章

- 5) Takahashi, K. Tanaka, R., and Fukuzaki, S. Kinetics of the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* attached to a solid

surface in weakly acidic sodium chlorite solution, 投稿準備中.

第 6 章

- 6) 高橋和宏, 田中礼士, 福崎智司 (2017) ステンレス鋼表面に吸着したタンパク質の除去における亜塩素酸ナトリウムの洗浄効果, 日本防菌防黴, **45**, 437-444.

第 7 章

- 7) 高橋和宏, 田中礼士, 福崎智司, (2017) ステンレス鋼表面に付着した *Vibrio parahaemolyticus* の除去における亜塩素酸ナトリウムの洗浄作用, 日本防菌防黴, **45**, 印刷中.

参考文献

- 1) Wei, C. I., Cook, D. L., and Kirk, J. R. (1985) Use of chlorine compounds in the food industry. *Food Technol.*, **39**, 107-115.
- 2) Chmielewski, R. A. N., and Frank, J. F. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **2**, 22-32.
- 3) Sauer, D. B., and Burroughs, R. (1986). Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology*, **76**, 745-749.
- 4) J. S. Lee, (1973) Cleaning and sanitizing agents for seafood processing plants, Oregon State University Extension Service.
- 5) Morris, J. C. (1966) The acid ionization constant of HClO from 5 to 35, *J. Phys. Chem.*, **70**, 3798-3805.
- 6) Fukuzaki, S. (2006) Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci.*, **11**, 147-157.
- 7) Wojotowicz, J. A. (1979) Chlorine oxygen acid and salt: chlorine monoxide, hypochlorites. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 5, 3rd ed. (Mark, H. F., Othmer, D. F., Overberger, C. G., Seaborg, G. T., and Grayson, M. eds.), pp.580-611, John Willy & Sons, New York.
- 8) Nightingale, Z. D., Lancha, A. H., Handelman, S. K., Dolnikowski, G. G., Busse, S. C., Dratz, E. A., and Handelman, G. J. (2000) Relative reactivity of lysine and other peptide-bound amino acids to oxidation by hypochlorite. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 425-433.

- 9) Reinemann, D. J., Wolters, G. M. V. H., Billon, P., Lind, O., and Rasmussen, M. D. (2003) Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. *Bullet. Int. Dairy Fed.*, **381**, 4-19.
- 10) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005) The mode action of sodium hypochlorite in the cleaning process, *Biocontrol Sci.*, **10**, 21-29.
- 11) 長谷川 ゆかり, 中村 優美子, 外海 泰秀, 伊藤 誉志男 (1989) 亜塩素酸ナトリウムの細菌, 酵母及び真菌 9 菌種に対する抗菌作用の検討, 日本化粧品技術者会誌, **22**, 245-253.
- 12) 今枝 一男, 山本 大路, 渡辺 卓穂, 吉村 吉博, 内山 一美, 加藤 嘉代子, 大沢 敬子. (1994). 豆腐製造過程におけるトリハロメタンの生成. 衛生化学, **40**, 527-533.
- 13) 岩 蒨 仁, 石田 拓也, 福崎 智司 (2013) 次亜塩素酸による EPDM の劣化に関する研究 第 1 報 次亜塩素酸の解離が EPDM の表面形態に及ぼす影響, 日本ゴム協会誌, **86**, 125-132.
- 14) Fukuzaki, S. (2015) Chemical cleaning. In *Biofilm and Materials Science* (Kanematsu, H. and Barry, D. M. eds.), 155-162, Springer International Publishing, Cham.
- 15) 吉田 真司, 村松 隆, 福崎 智司 (2016) 強制通風気化システムにおける水溶液含浸繊維フィルタからの次亜塩素酸の揮発, 防菌防黴, **44**, 113-118.
- 16) 細井 正春, 吉田 雅之, 高畠 俊弘, 星野 俊明, 今田 勝美. (1990) 食中毒起因細菌に対する亜塩素酸ナトリウムの発育阻止効果, 食品衛生学雑誌, **31**, 469-473.
- 17) Cohl, M., Lazar, L., Cretescu, I., and Balasanian, I. (2015)

- Trihalomethanes Issues Drinking Water After Chlorination Treatment. *Rev. Chim.*, **66**, 1282-1287.
- 18) Horváth, A. K., Nagypál, I., Peintler, G., Epstein, I. R., and Kustin, K. (2003) Kinetics and mechanism of the decomposition of chlorous acid. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 6966-6973.
- 19) 小林正枝, 秋山茂, 岩下正人, 鈴木昭, 中島英夫. (1990) 亜塩素酸ナトリウムの殺菌効力に関する検討, 食衛誌, **31**, 491-498.
- 20) 長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 小島満子, 伊藤誉志男 (1989) 細菌及び酵母に対する亜塩素酸ナトリウムの抗菌作用. 食品衛生学雑誌, **30**, 240-249.
- 21) Benford, D. J., Hill, M. F., Jackson, M. P., and Larsen, J. C. (2008) Acidified sodium chlorite. In *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*, pp. 3-54, World Health Organization, Geneva.
- 22) 藤野恒三郎, 奥野良臣, 中田大輔, 青山章, 深井孝之助, 向井貞三, 上保俊男 (1951) シラス中毒事件の細菌学的検査報告, 日伝病誌, **25**, 11-12.
- 23) Wong, H. C., Chung, Y. C., and Yu, J. A. (2002) Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. *Food Microbiol.*, **19**, 341-350.
- 24) 松田重輝 (2013) 耐熱性溶血毒および類似毒素の作用機序, “腸炎ビブリオ第IV集”, 篠田純男, 甲斐明美, 山本重雄, 土屋友房, 西渕光昭, 荒川英二, 飯田哲也編集, pp270-276, 近代出版, 東京.

- 25) LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., and Lee, R. G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2492-2499.
- 26) Camper, A. K., LeChevallier, M. W., Broadaway, S. C., McFeters, G. A. (1985) Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon, *J. Microbiol. Methods*, **3**, 187-198.
- 27) Auty, M. A., Gardinar, G. E., McBreaety, S. J., O'sullivan, E. O., Mulvihill, D. M., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., and Ross, R. P. (2001) Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 420-425.
- 28) Hashimoto, M., and Takahashi, K. (1982) Calorimetric studies of microbial growth: quantitative relation between growth thermograms and inoculum size. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1559-1564.
- 29) Katsui, N., Kato, N., Asada, S., and Kita, E. (1999) Bleb formation on the cell envelope of osmotic shocked cells of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biocontrol Sci.*, **4**, 31-34.
- 30) Colwell, R. R., and Kaper, J. (1977) *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other *Vibrios*: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, **198**, 394-396.
- 31) Grimes, D. J., Brayton, P., Colwell, R. R., and Gruber, S. H. (1985) *Vibrios* as autochthonous flora of neritic sharks. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 221-226.
- 32) Huq, A., and Colwell, R. R. (1995) *Vibrios* in the marine and estuarine environments. *J. Mar. Biotechnol.* **3**, 60-63.

- 33) Palasuntheram, C. (1981) The halophilic properties of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 427-428.
- 34) Whitaker, W. B., Parent, M. A., Naughton, L. M., Richards, G. P., Blumerman, S. L., and Boyd, E. F. (2010) Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4720-4729.
- 35) Koga, K., Nishizawa, Y., Matsumoto, Y., Hara, T., and Takahashi, K. (2004) Evaluation of the growth activity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* colonies on solid medium using microbial calorimetry. *Biocontrol Sci.*, **9**, 21-28.
- 36) Koumoto, Y., Arimoto, N., Fukada, H., Nitta, Y., Takahashi, K., and Kawasaki, H. (1996) Calorimetric study of the action of preservatives on the putrefaction process of boiled soybeans (in Japanese). *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 321-328.
- 37) 高橋和宏, 福崎智司 (2012) ポリエチレンテレフタレート表面の塩素併用アルカリ洗浄における付着細菌の除去および死滅挙動, 防菌防黴, **40**, 405-413.
- 38) Adams, R., Bygraves, J., Kogut, M., and Russell, N. J. (1987) The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1861-1870.
- 39) Lowrie, D. B., Pearce, J. H., and Kennedy, J. F. (1974) The effect of osmotic variation upon the growth of *Vibrio fetus*. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 541-548.
- 40) Naughton, L. M., Blumerman, S. L., Carlberg, M., and Boyd, E. F. (2009) Osmoadaptation among *Vibrio* species and

- unique genomic features and physiological responses of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2802-2810.
- 40) Whitaker, W. B., and Boyd, E. F. (2012) Adaptations to environmental changes: stress response mechanisms among *Vibrio* species, p. 201-228. In *Stress Response in Microbiology* (Requena, J. M. ed.), Caister Academic Press, Norfolk.
- 42) Koga, T., Katagiri, T., Hori, H., and Takumi, K. (2002) Alkaline adaptation induces cross-protection against some environmental stresses and morphological change in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Res.*, **157**, 249–255.
- 43) Krulwich, T. A. (1983) Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 245–264.
- 44) Padan, E., and Schuldiner, S. (1994) Molecular physiology of Na⁺/H⁺ antiporters, key transporters in circulation of Na⁺ and H⁺ in cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1185**, 129–151.
- 45) Taglicht, D., Padan, E., and Schuldiner, S. (1993) Proton-sodium stoichiometry of NhaA, an electrogenic antiporter from *Escherichia coli*.. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5382–5387.
- 46) Kuroda, T., Shimamoto, T., Inaba, K., Tsuda, M., and Tsuchiya, T. (1994) Properties and sequence of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Biochem.*, **116**, 1030–1038.
- 47) Nozaki, K., Inaba, K., Kuroda, T., Tsuda, M., and Tsuchiya, T. (1996) Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 774–779.

- 48) Nozaki, K., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1998) A new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 213–220.
- 49) Mattila-Sandholm, T., and Wirtanen, G. (1992) Biofilm formation in the industry: a review. *Food Rev. Int.*, **8**, 573-603.
- 50) Kumar, C. G., and Anand, S. K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **42**, 9-27.
- 51) Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E., and Kogure, K. (1999) The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology*, **145**, 2797-2802.
- 52) Bramhachari, P. V, Kavi Kishor, P. B., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B. R., Dubey, S. K. (2007) Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 44-51.
- 53) Kavita, K., Mishra, A., and Jha, B. (2011) Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*, **27**, 309-317.
- 54) Kavita, K., Mishra, A., and Jha, B. (2013) Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydr. Polym.*, **94**, 882-888.
- 55) Fukuzaki, S., Takehara, A., Takahashi, K., Hiramatsu, M., and Koike, K. (2003) Control of the surface charge and

- improved corrosion resistance of stainless steel by the combined use of gaseous ozone and heat. *J. Surface Finish. Soc. Jpn.*, **54**, 1034-1042.
- 56) Urano, H. and Fukuzaki, S. (2000) Conformation of adsorbed bovine serum albumin governing its desorption behavior at alumina-water interfaces. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 105-111.
- 57) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2002) Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to alumina surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *Biocontrol Sci.*, **7**, 131-137.
- 58) Takahashi, K., Koike, K., and Fukuzaki, S. (2003) Comparison of the efficacies of gaseous ozone and sodium hypochlorite in cleaning stainless steel particles fouled with proteins. *Biocontrol Sci.*, **8**, 87-91.
- 59) Fukuzaki, S., Urano, H., and Nagata, K. (1995) Adsorption of protein onto stainless-steel surfaces. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 6-11.
- 60) Takahashi, K., and Fukuzaki, S. (2008) Cleanability of Titanium and Stainless Steel Particles in Relation to Surface Charge Aspects. *Biocontrol Sci.*, **13**, 9-16 (2008).
- 61) Takehara, A, and Fukuzaki, S. (2002) Effect of the surface charge of stainless steel on adsorption behavior of pectin. *Biocontrol Sci.*, **7**, 9-15.
- 62) Fukuzaki, S., Urano, H., and Yamada, S. (2007) Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *J. Surface Finish. Soc. Jpn.*, **58**, 465-469.

- 63) Liu, H., and Fang, H. H. P. (2002) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**, 806-811.
- 64) Su, Y. C., and Liu, C. (2007) *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food microbial.*, **24**, 549-558.
- 65) Chick, H. (1908) An investigation of the laws of disinfection. *J. Hyg.*, **8**, 92-158.
- 66) Watson, H. E. (1908) A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *J. Hyg.*, **8**, 536-542.
- 67) Horiuchi, I., Kawata, H., Nagao, T., Imaohji, H., Murakami, K., Kino, Y., Yamasaki, H., Koyama, H., Fujita, Y., Goda, H., and Kuwahara, T. (2015) Antimicrobial activity and stability of weakly acidified chlorous acid water. *Biocontrol Sci.*, **20**, 43-51.
- 68) Weast, R. C. (1988) *CRC handbook of chemistry and physics*, 1st student edition, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- 69) Ingram, P. R., Homer, N. Z., Smith, R. A., Pitt, A. R., Wilson, C. G., Olejnik, O., and Spickett, C. M. (2003) The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 121-133.
- 70) Albrich, J. M., McCarthy, C. A., and Hurst, J. (1981) Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 210-214.

- 71) Dukan, S., Belkin, S., and Touati, D. (1999) Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **367**, 311-316.
- 72) Thomas, E. L. (1979) Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride antimicrobial system: effect of exogenous amines on antibacterial action against *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **25**, 110-116.
- 73) Benarde, M. A., Snow, B., Olivieri, V. P., and Davidson, B. (1967) Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl. Microbiol.*, **15**, 257-265.
- 74) von Gunten, U. (2003) Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Res.*, **37**, 1469-1487.
- 75) 福崎智司, 浦野博水, 高橋和宏, 山田貞子, 高木明彦 (2009) 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄および殺菌作用に及ぼす温度の影響の速度論的研究, 防菌防黴, **37**, 253-262.
- 76) White, G. C. (2010) *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp155-158.
- 77) Gordon, C. A., Hodges, N. A., and Marriott, C. (1988) Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **22**, 667-674.
- 78) Nichols, W. W., Evans, M. J., Slack, M. P., and Walmsley, H. L. (1989) The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1291-1303.

- 79) Gordon, C. A., Hodges, N. A., and Marriott, C. (1991) Use of slime dispersants to promote antibiotic penetration through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob agents Chemother.*, **35**, 1258-1260.
- 80) Clegg, L. F. L. (1962) Cleaning and sterilization of milking equipment on the farm. In *Milk Hygiene* (F.A.O./W.H.O.), pp.195-220, World Health Organization, Geneva.
- 81) 岩 蒨 仁, 福 崎 智 司 (2010) エチレンプロピレンゴムへの非解離型次亜塩素酸の浸透と拡散. 防菌防黴, **38**, 143-148.
- 82) 石田拓也, 岩 蒨 仁, 福 崎 智 司 (2014) 次亜塩素酸によるEPDMの劣化に関する研究 第2報 非解離型次亜塩素酸によるカーボンブラック充てん EPDM 架橋物の劣化機構, 日本ゴム協会誌, **87**, 107-114.
- 83) 石田拓也, 岩 蒨 仁, 福 崎 智 司 (2015) 次亜塩素酸によるEPDMの劣化に関する研究 第3報 表面劣化層の形成がカーボンブラック充填 EPDM 架橋物の強度に及ぼす影響, 日本ゴム協会誌, **88**, 75-79.
- 84) 小林正枝, 秋山茂, 岩下正人, 鈴木昭 (1989) 亜塩素酸ナトリウム製剤の殺菌効力に関する検討. 食品衛生学雑誌, **30**, 367-374.
- 85) Takahashi, K., and Fukuzaki, S. (2003) Kinetic approach to the nonlinear curve of bovine serum albumin desorption from stainless steel surfaces, *Biocontrol sci.*, **8**, 111-117.
- 86) 小池国彦, 栗山寛繁, 井上吾一, 山本 剛, 福崎智司 (2002) 高濃度オゾン酸化によるステンレス表面からの純水中への溶出金属量低減効果. 化学工学論文集, **28**, 73-76.
- 87) Ogata, N. (2007) Denaturation of protein by chlorine

- dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*, **46**, 4898-4911.
- 88) Sharma, V. K., and Sohn, M. (2012) Reactivity of chlorine dioxide with amino acids, peptides, and proteins. *Environ. Chem. Lett.*, **10**, 255-264.
- 89) Hawkins, C. L., Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, **25**, 259-274.
- 90) Verweji, H., Christianse, K., and van Steveninck, J. (1982) Ozone-induced formation of *O,O'*-dityrosine cross-links in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **701**, 180-184.
- 91) Gallot-Lavallée, T., and Lalande, M. (1985) A mechanistic approach of pasteurized milk deposit cleaning. In *Fouling and Cleaning in Food Processing* (Lund, D., Plett, E., Sandu, C. eds.), pp. 374-394, University of Madison, Wisconsin.
- 92) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. boil. Chem.*, **193**, 265-275.

謝辞

本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた指導教官の三重大学大学院生物資源学科教授福崎智司先生に厚くお礼申し上げます。同学科栗冠和郎教授、橋本篤教授には副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導を頂いたことに厚くお礼申し上げます。

また、本研究の実施に便宜を与えられました岡山県工業技術センター元所長橋本亮一氏および研究開発部長川端浩二博士ならびに本研究の遂行に際し、数々の助言と協力を頂きました竹原淳彦専門研究員、浦野博水専門研究員に謝意を表します。

さらに、本研究にご協力してくださいました岡山県工業技術センターの化学・新素材グループの皆様方、三重大学大学院生物資源学研究科海洋微生物研究室の皆様方に感謝の意を表します。

おわりに、この3年間陰ながら支えてくれた妻と応援してくれた2人の子供、ありがとうございました。

今後、この3年間の経験を生かし、研究活動に取り組んでいきたいと思っております。