



DIVISION OF MEDICAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF INFECTIOUS DISEASES
KYORIN UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan
Tel. 0422-47-5511 Ext. 3462, 3463, 3464, 3469 Fax. 0422-44-7325

平成17年9月22日

研究報告書

【研究課題】：ナノテクビームとマイナスイオンの病原性細菌に対する効果の研究

【研究代表者】：杏林大学医学部感染症学講座教授 神谷 茂



【研究協力者】：杏林大学医学部感染症学講座助教授 田口 晴彦

杏林大学医学部感染症学講座助手 大崎 敬子

杏林大学医学部感染症学講座助手 蔵田 訓

杏林大学医学部感染症学講座助手 満足 滝

【研究実施期間】 平成17年6月1日ー平成17年7月31日

【実験方法】

(1) 被検菌種

以下の菌種を使用した

1. MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)
2. MSSA (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)
3. EHEC O157:H7 (腸管出血性大腸菌)
4. *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)
5. *Shigella flexneri* (B群赤痢菌)
6. *Salmonella* Typhimurium (ネズミチフス菌)
7. *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)
8. *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌)
9. *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌)
10. *Mycoplasma pneumoniae* (肺炎マイコプラズマ)

(2) 使用培地

以下の培地を各種細菌の希釈および培養に使用した。

i)液体培地

ブレインハートインフュージョンブイヨン [ニッセイ]：接種菌の希釈に使用した。

PPLO ブイヨン (MYCOPLASMA BROTH BASE) [OXOID]： *Mycoplasma pneumoniae*



DIVISION OF MEDICAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF INFECTIOUS DISEASES
KYORIN UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan
Tel. 0422-47-5511 Ext. 3462, 3463, 3464, 3469 Fax. 0422-44-7325

の前培養に使用した。

ii) 固形培地

トリプトソーヤ寒天培地 (SCD 寒天培地) [ニッスイ]: MRSA, MSSA, EHEC O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae* の培養に使用した。

血液寒天培地 (5%ウマ脱繊維素血加トリプトソーヤ寒天培地): *Streptococcus pneumoniae* の培養に使用した。

チョコレート寒天培地: *Haemophilus influenzae* の培養に使用した。

PPLO 寒天培地 (MYCOPLASMA AGAR BASE) [OXOID]: *Mycoplasma pneumoniae* の培養に使用した。

(3) マイナスイオンの作用の評価

i) 菌種 No.1~7 の場合

ブレインハートインフュージョンブイオンで 37°C・24 時間培養した被検菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて希釈後、トリプトソーヤ寒天培地に塗抹した。マイナスイオンをデシケータ内で一定時間作用させ、37°C・30 時間好気培養した後にコロニー数を算定した。対照はデシケータ内に入れず、室温にて規定時間静置した後、培養を行った。

ii) 菌種 No.8 の場合

血液寒天培地にて培養した被検菌を PBS に浮遊し希釈後、血液寒天培地に塗抹した。マイナスイオンをデシケータ内で一定時間作用させ、37°C・30 時間・5%炭酸ガス環境下にて培養した後にコロニー数を算定した。対照はデシケータ内に入れず、室温にて規定時間静置した後、培養を行った。

iii) 菌種 No.9 の場合

チョコレート寒天培地にて培養した被検菌を PBS に浮遊し希釈後、チョコレート寒天培地に塗抹した。マイナスイオンをデシケータ内で一定時間作用させ、37°C・30 時間・5%炭酸ガス環境下にて培養した後にコロニー数を算定した。対照はデシケータ内に入れず、室温にて規定時間静置した後、培養を行った。

iv) 菌種 No.10 の場合

PPLO ブイオンにて 37°C・1 週間・5%炭酸ガス環境下にて培養した被検菌液を PPLO ブイオンで希釈後、PPLO 寒天培地に 10 μ l 滴下した。マイナスイオンをデシケータ内で一定時間作用させ、37°C・1 週間・5%炭酸ガス環境下にて培養した後に光学顕微鏡



DIVISION OF MEDICAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF INFECTIOUS DISEASES
KYORIN UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan
Tel. 0422-47-5511 Ext. 3462, 3463, 3464, 3469 Fax. 0422-44-7325

を用いてコロニー数を算定した。対照はデシケーター内に入れず、室温にて規定時間静置した後、培養を行った。

【実験結果】

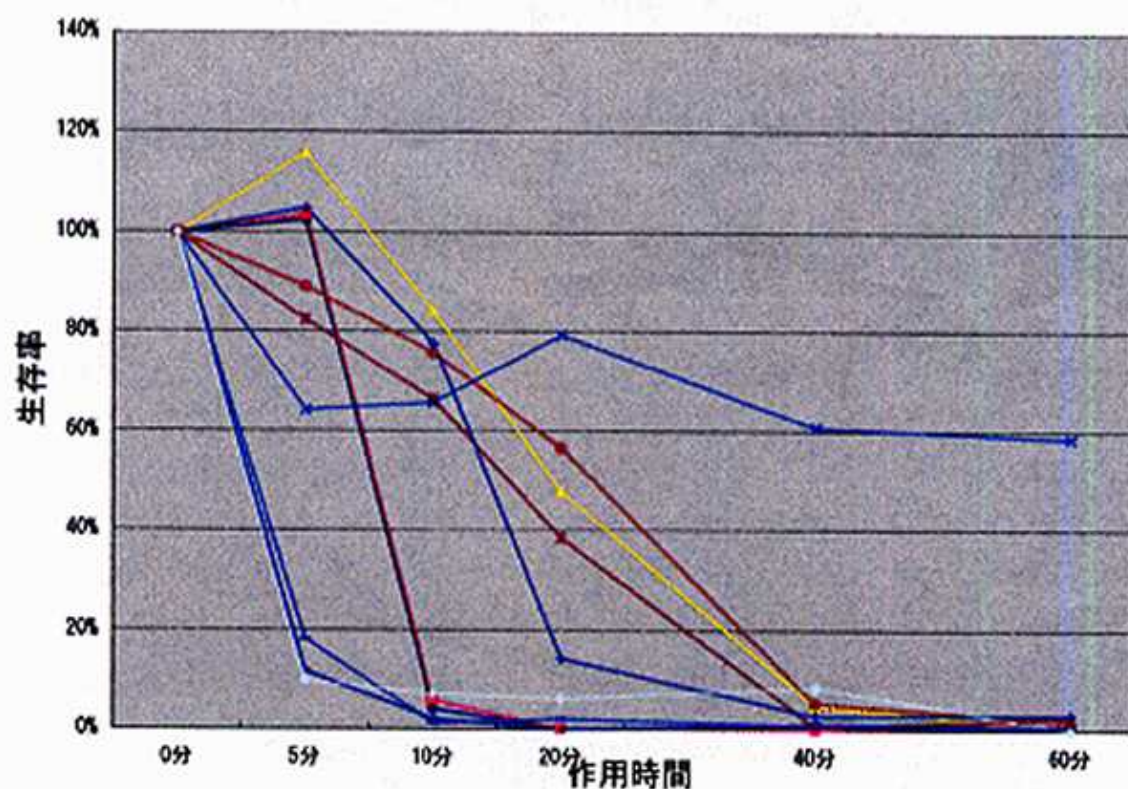
10 種類の病原細菌を各々の培養用寒天培地に接種した。マイナスイオンを処理しない対照群での形成コロニー数は 140-1171 個であった (表 1)。これらのコロニー数の病原菌はマイナスイオン処理により殺菌された。最もマイナスイオンに感受性の強い病原菌は MRSA, MSSA, *Streptococcus pneumoniae* であり、マイナスイオン処理 20 分により接種された菌数の 99%以上が殺菌された (表 2, 図 1)。マイナスイオン処理 40 分および 60 分により、被験 10 菌株のうちそれぞれ 7 菌株および 9 菌株においてその菌数の 95%以上が殺菌された。被験 10 菌株のうちマイナスイオン処理に最も抵抗性であったのは *Pseudomonas aeruginosa* であったが、60 分間のマイナスイオン処理により約半数の *Pseudomonas aeruginosa* は殺菌された。

【考察】

マイナスイオン処理はグラム陽性細菌 (被験菌のうち、MRSA, MSSA, *Streptococcus pneumoniae* がグラム陽性菌) に極めて強い殺菌効果を示した。グラム陽性菌とグラム陰性菌とは細胞壁の構造上の点で違いがある。グラム陽性菌では厚いペプチドグリカン層を有するのに対して、グラム陰性菌では薄いペプチドグリカン層の上にペリプラスマおよび外膜が存在する。このような細胞壁の違いがどのようにマイナスイオンに対する反応性が生じるかについては今後検討する必要がある。

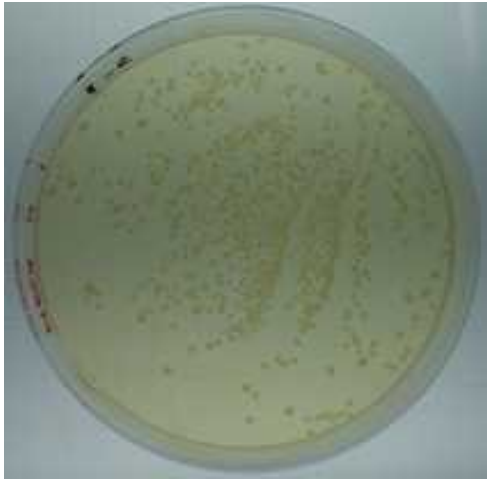
現在も尚、MRSA および MSSA は院内感染症の重要な起因菌であり、これらの病原細菌による感染症に対する治療および予防は極めて重要である。今回の研究ではマイナスイオンの病原細菌に対する殺菌メカニズムは解明され得なかったが、20 分間の処理により MRSA および MSSA の 99.9%が殺菌されたという実験結果は注目に値する。今後臨床応用を含めた検討が望まれる。

マイナスイオンの殺菌効果

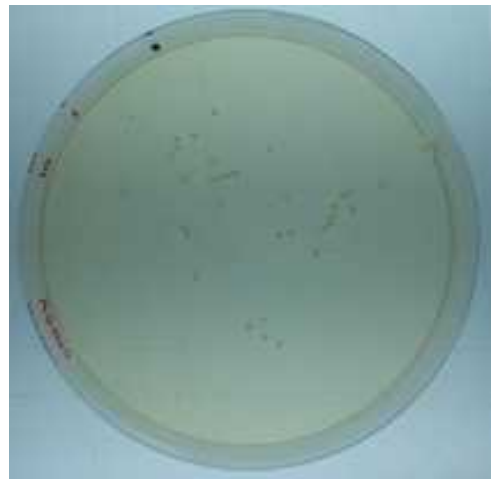


	0分	5分	10分	20分		40分		60分
MRSA	100.0%	102.5%	4.1%	0.1%		0.7%		0.8%
MSSA	100.0%	103.4%	5.7%	0.1%		0.1%		1.0%
EHEC O157:H7	100.0%	115.8%	84.2%	47.8%		4.8%		0.0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100.0%	64.3%	65.7%	79.3%		60.7%		58.6%
<i>Shigella flexneri</i>	100.0%	82.4%	66.5%	38.5%		0.6%		2.3%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	100.0%	89.1%	75.7%	56.5%		5.1%		1.9%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100.0%	104.8%	77.6%	14.3%		2.7%		3.1%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100.0%	11.7%	2.1%	0.0%		1.2%		0.7%
<i>Haemophilus influenzae</i>	100.0%	18.1%	1.2%	2.1%		0.8%		0.4%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100.0%	9.9%	7.1%	6.1%		8.5%		0.0%

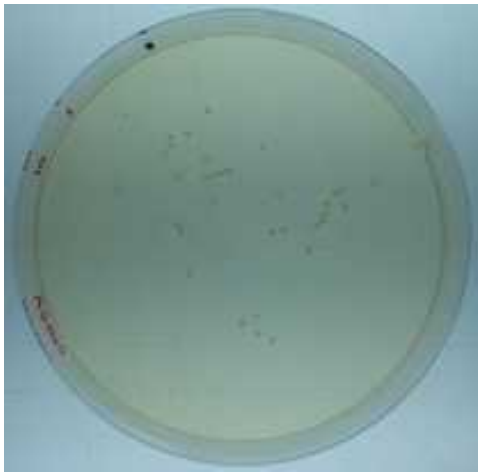
Staphylococcus aureus (MRSA)
(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)



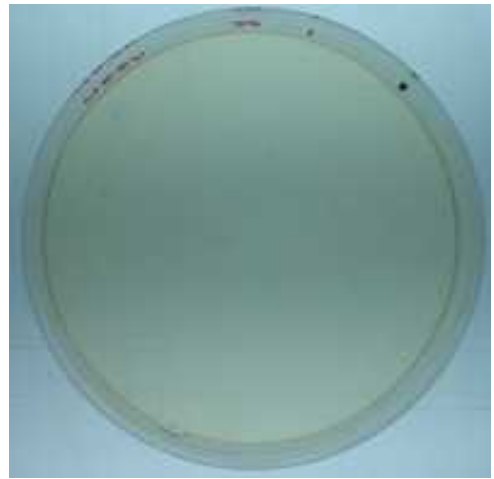
0分(対照)887個



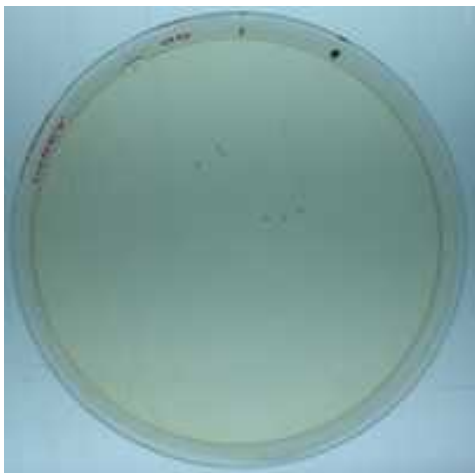
5分 909個



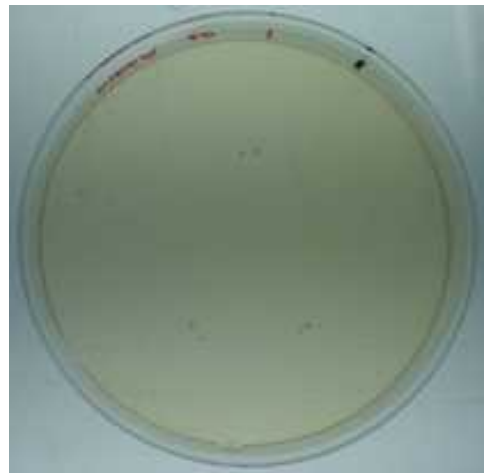
10分 36個



20分 1個



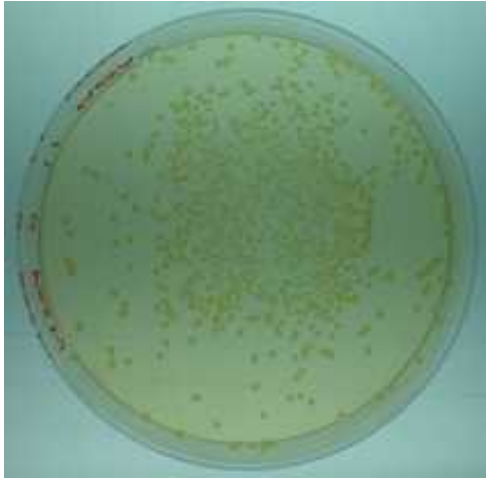
40分 6個



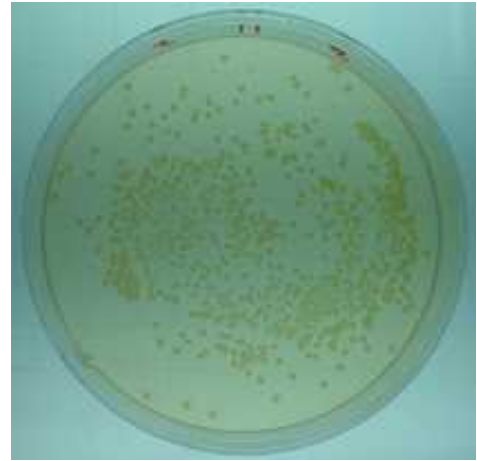
60分 7個

Staphylococcus aureus (MSSA)

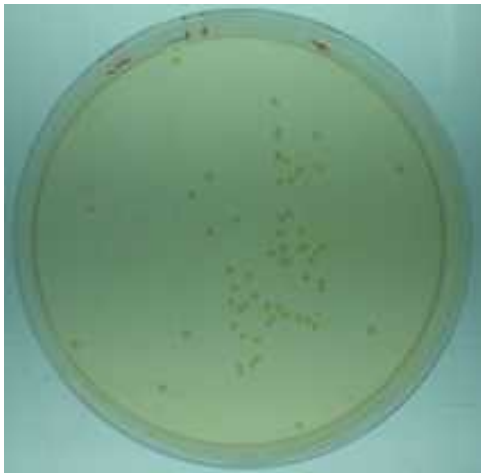
(メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)



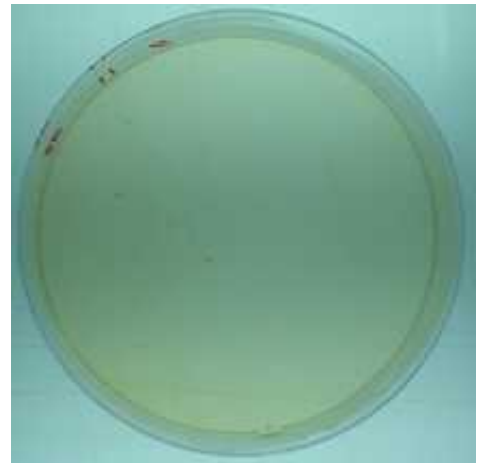
0分(対照) 1171個



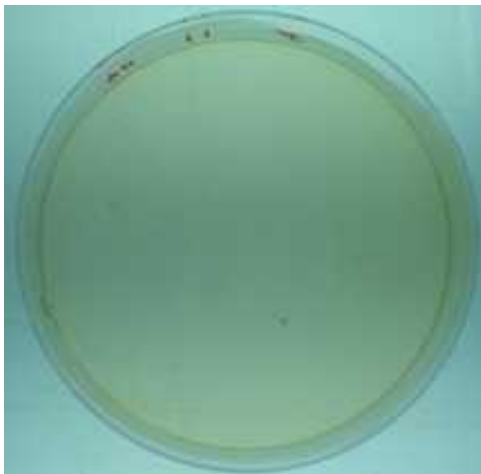
5分 1211個



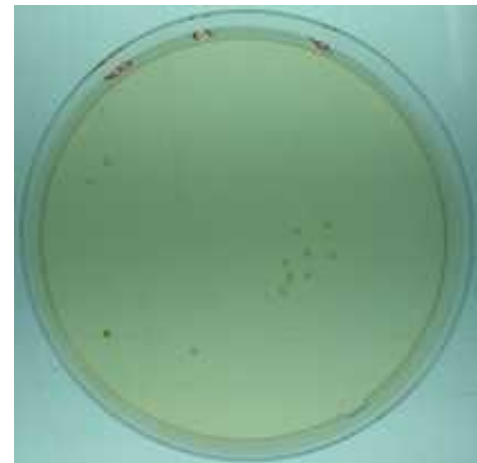
10分 67個



20分 1個

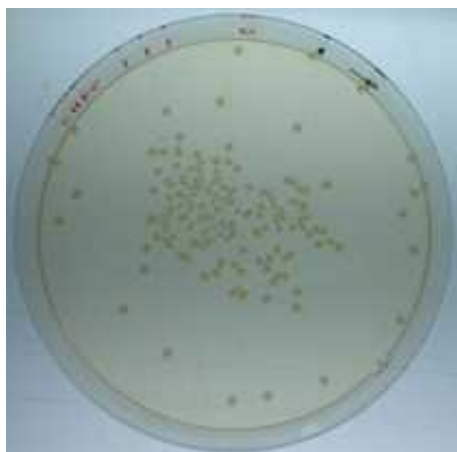


40分 1個

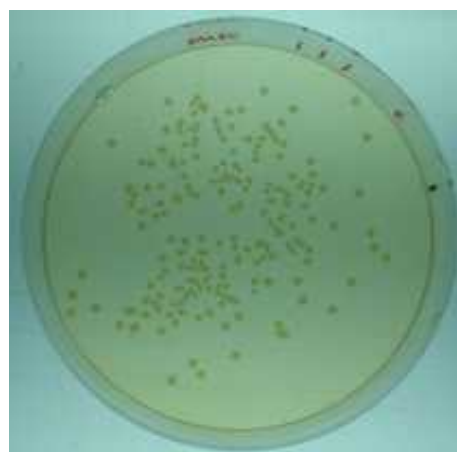


60分 12個

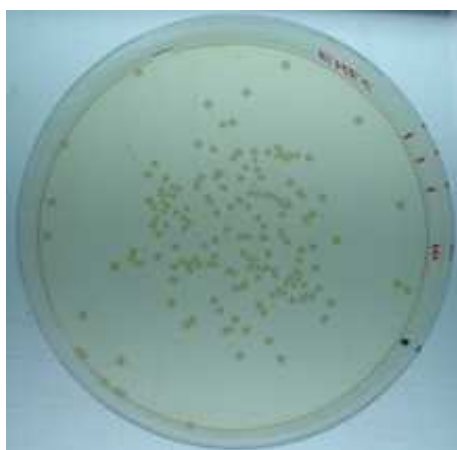
Escherichia coli O157:H7 (腸管出血性大腸菌)



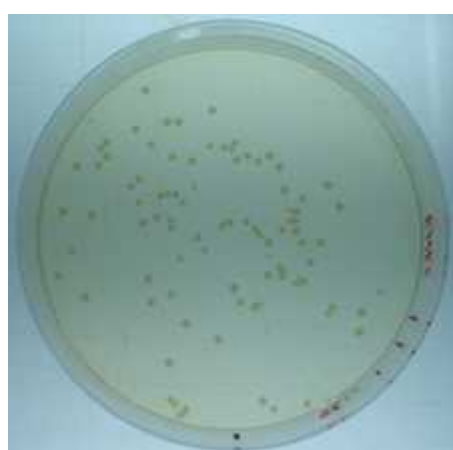
0分(対照)209個



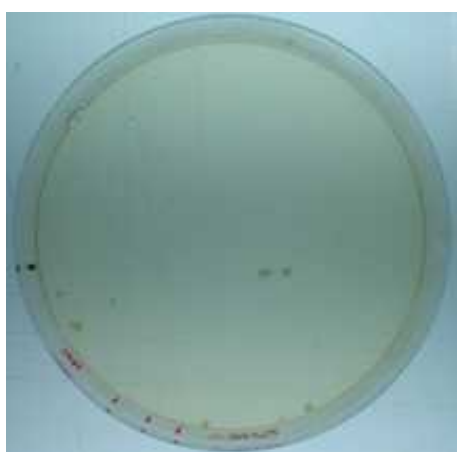
5分 242個



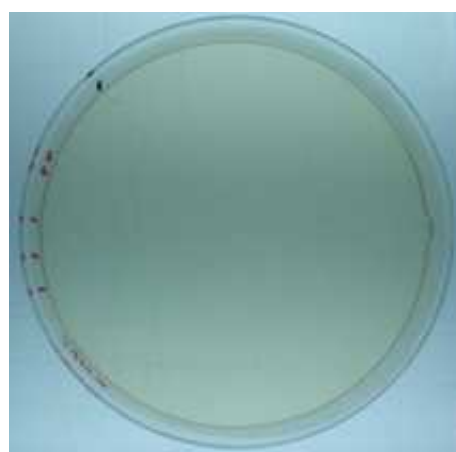
10分 176個



20分 100個

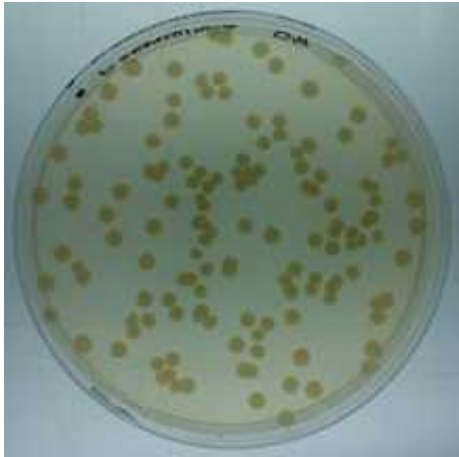


40分 10個

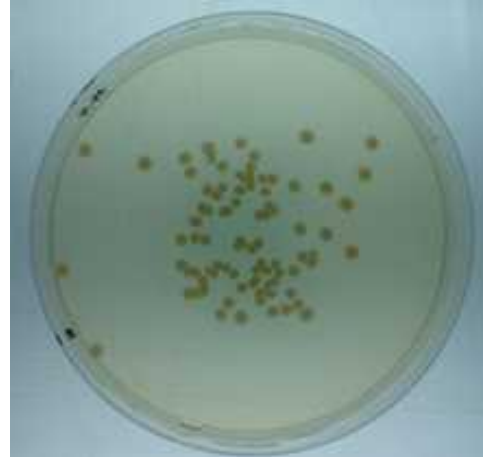


60分 0個

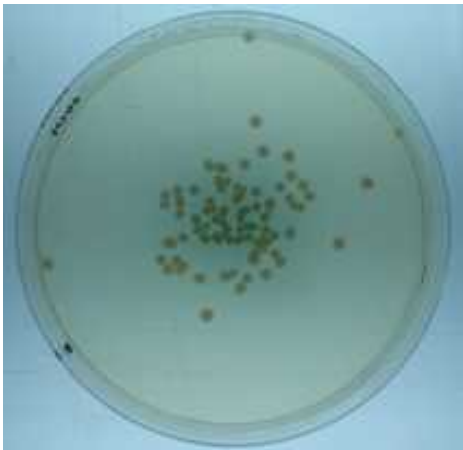
Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)



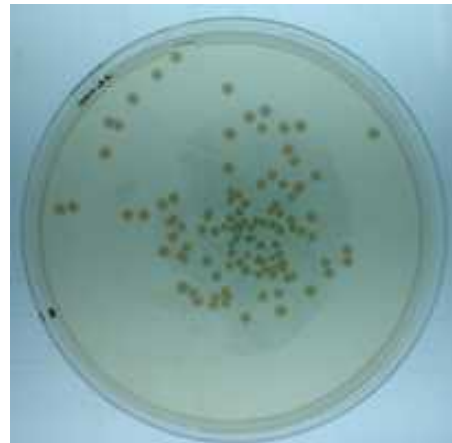
0分(対照) 140個



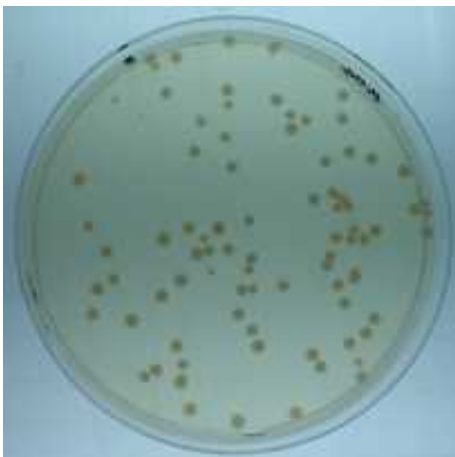
5分 90個



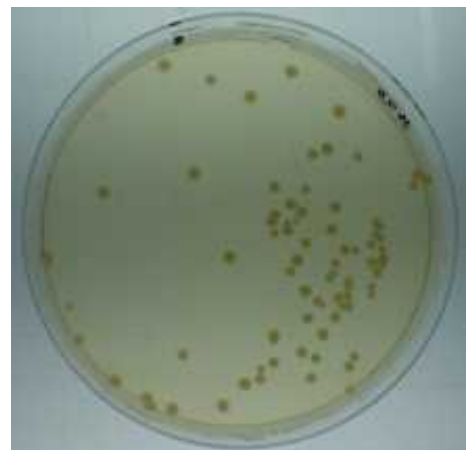
10分 92個



20分 111個

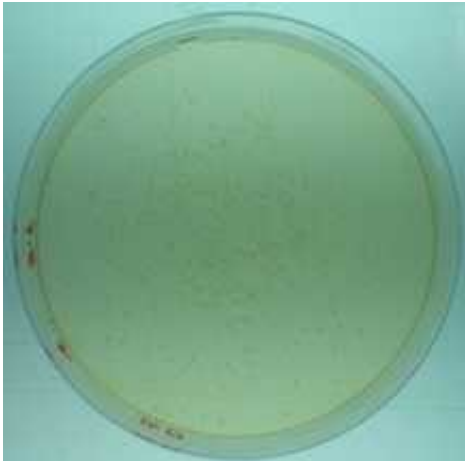


40分 85個

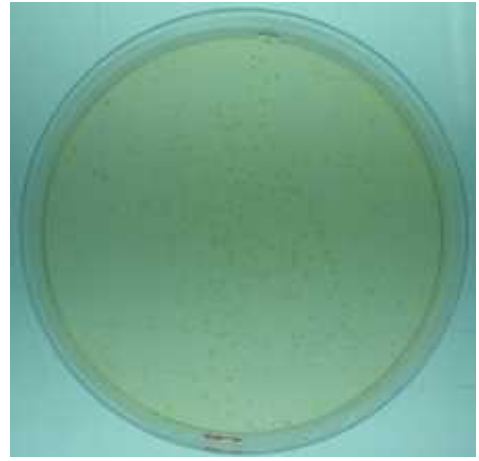


60分 82個

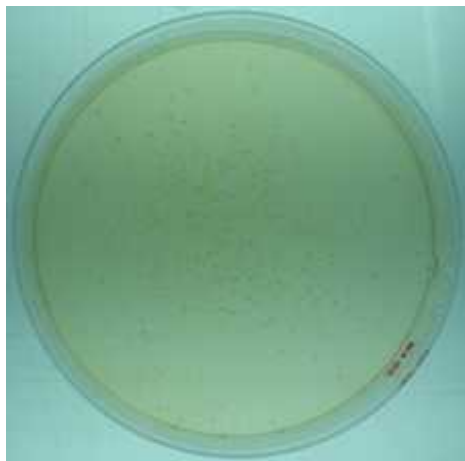
Shigella flexneri(B群赤痢菌)



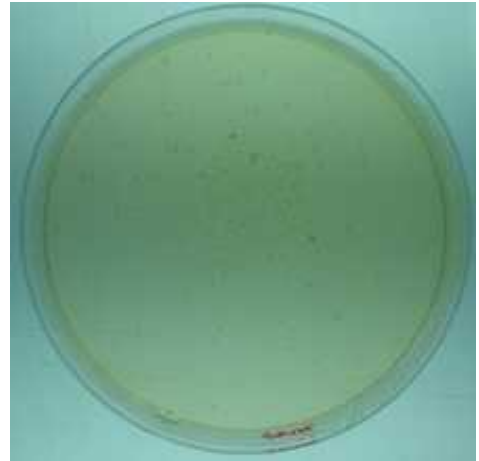
0分(对照) 689個



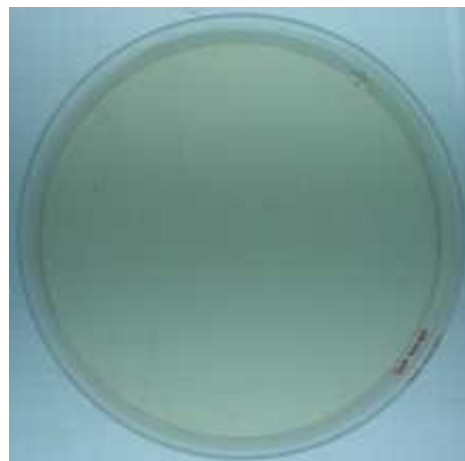
5分 568個



10分 458個



20分 265個

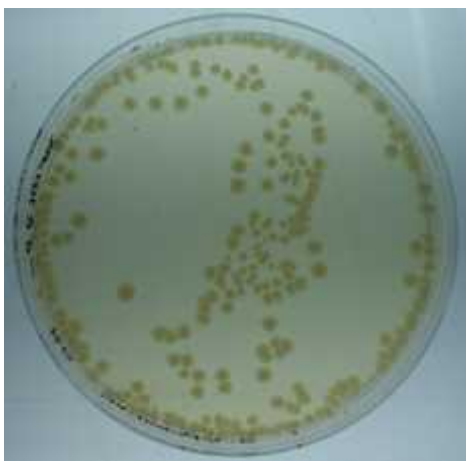


40分 4個

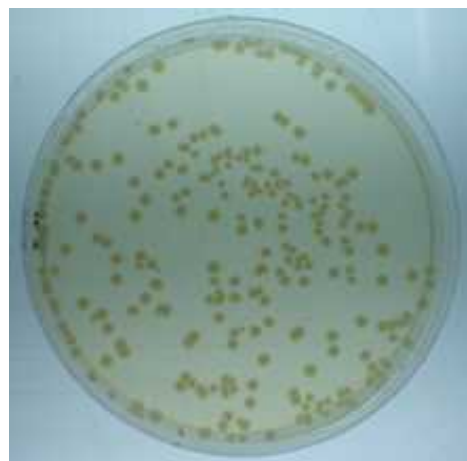


60分 16個

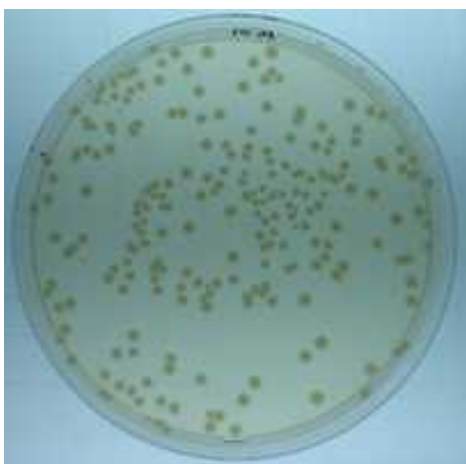
Salmonella Typhimurium (ネズミチフス菌)



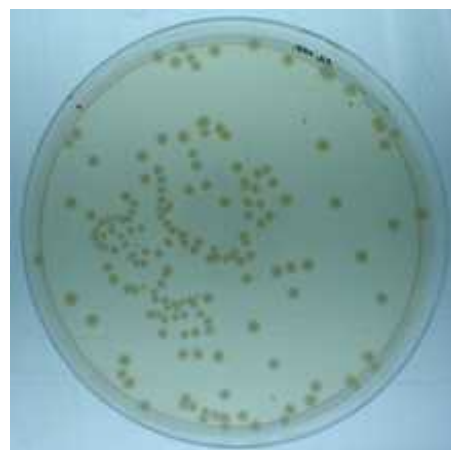
0分(対照) 313個



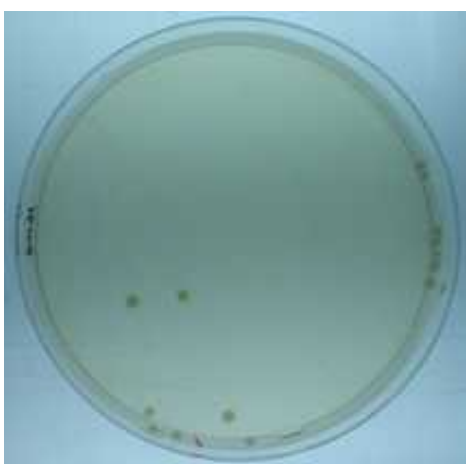
5分 279個



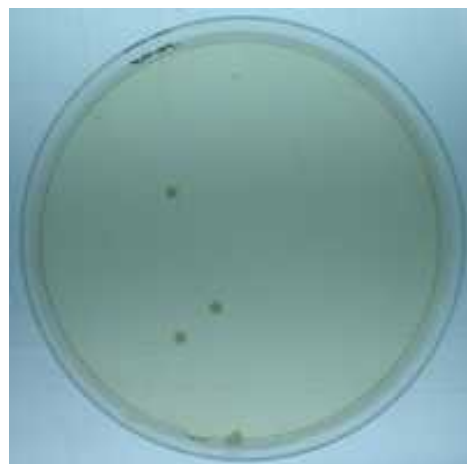
10分 237個



20分 177個

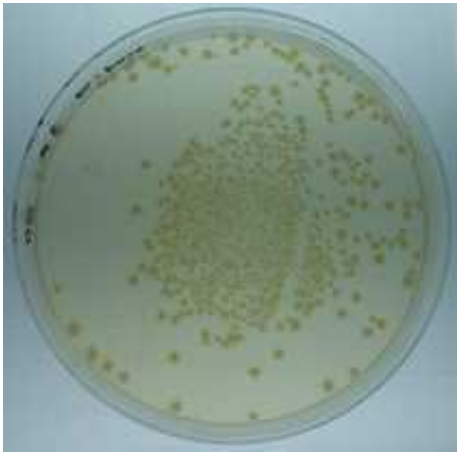


40分 16個

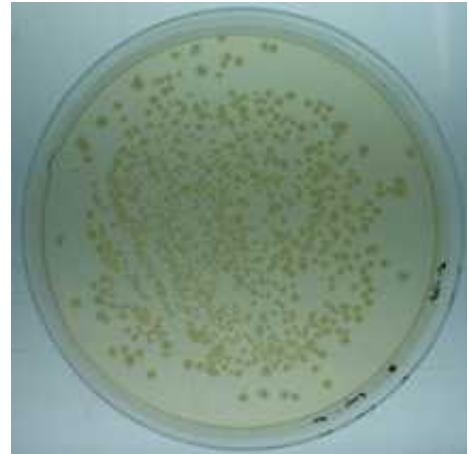


60分 6個

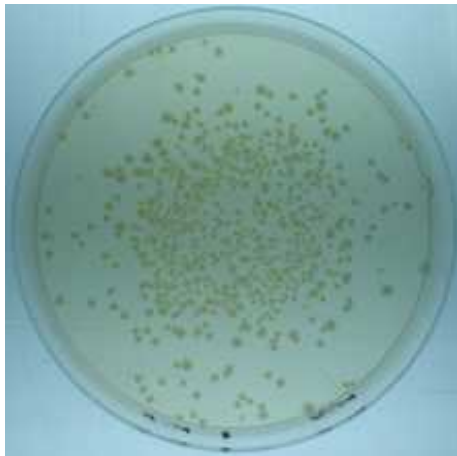
Klebsiella pneumoniae(肺炎桿菌)



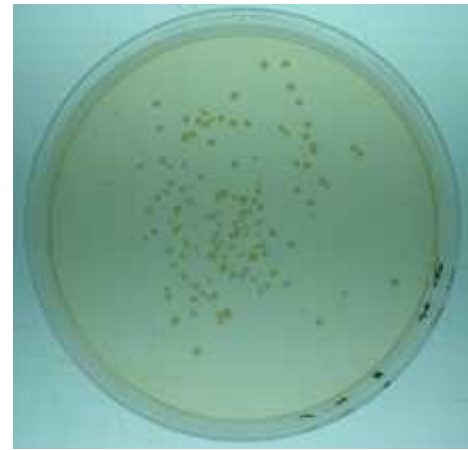
0分(对照) 1038個



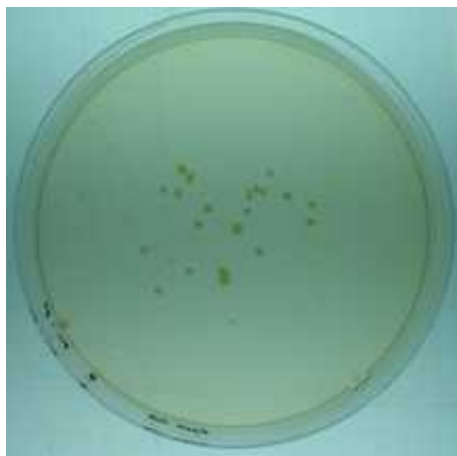
5分 1088個



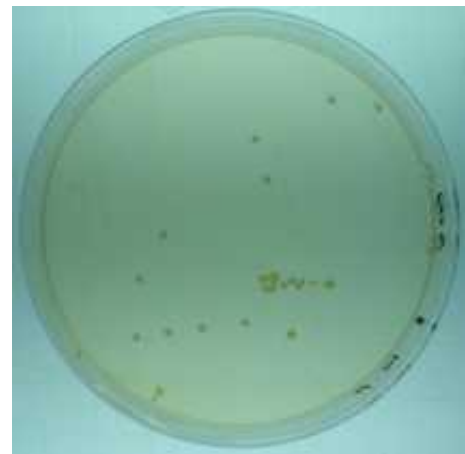
10分 805個



20分 148個

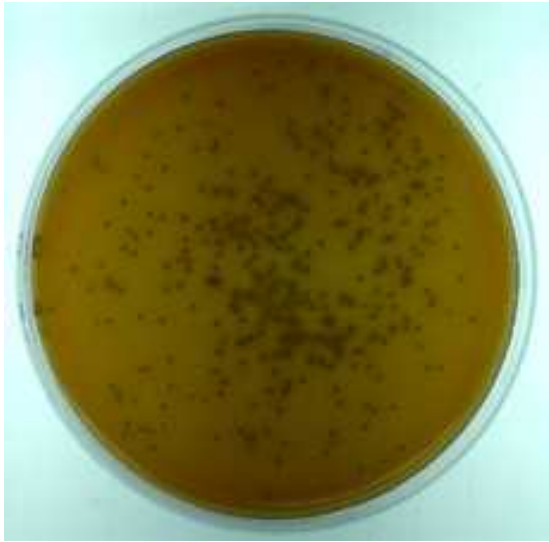


40分 28個

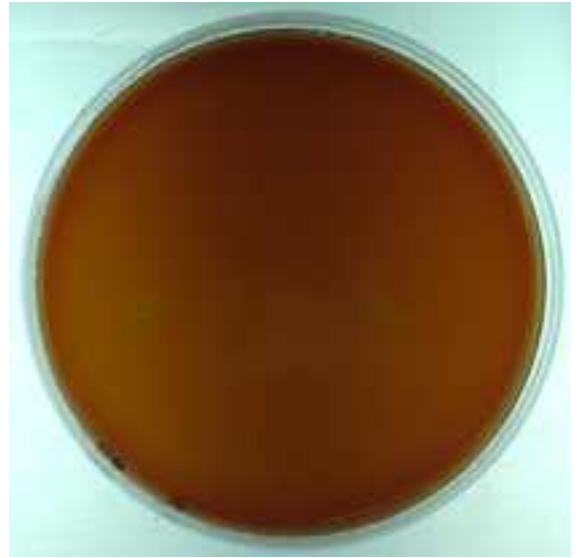


60分 32個

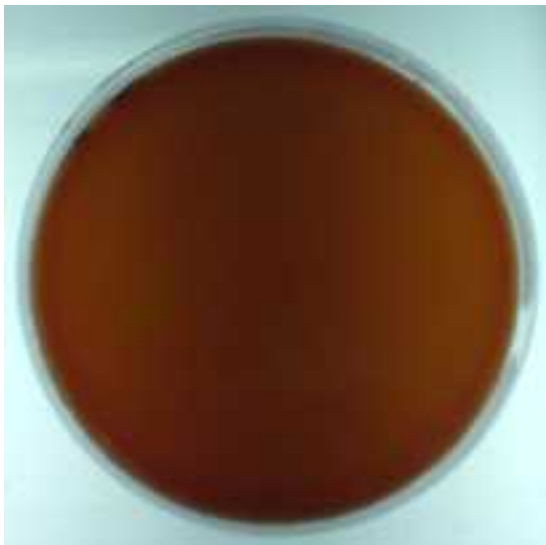
Streptococcus pneumoniae
(肺炎球菌)



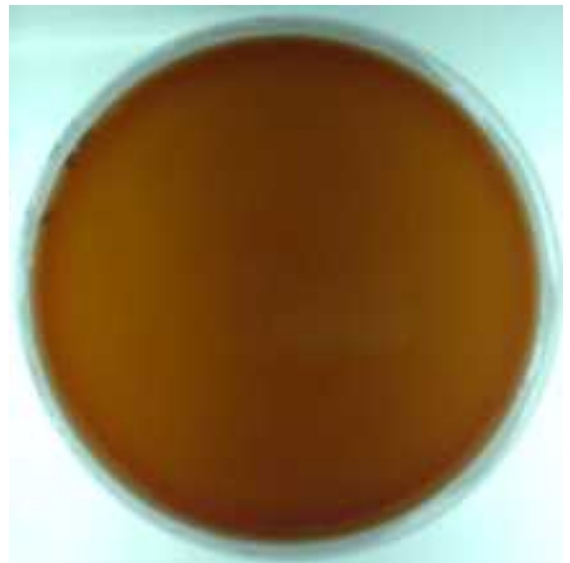
0分(对照)404個



20分 2個



40分 3個



60分 0個

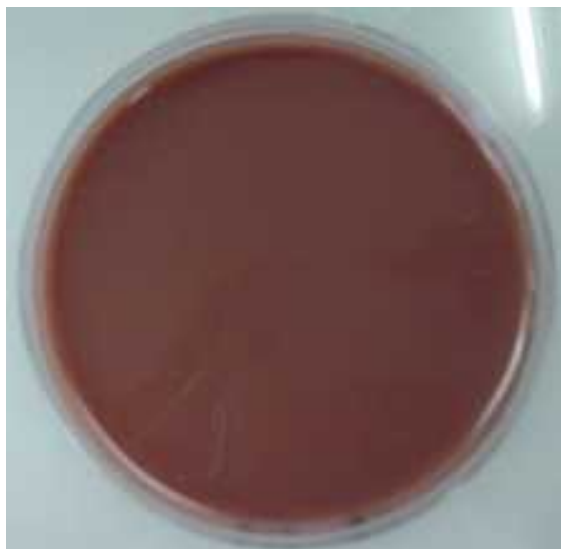
Haemophilus influenzae
(インフルエンザ菌)



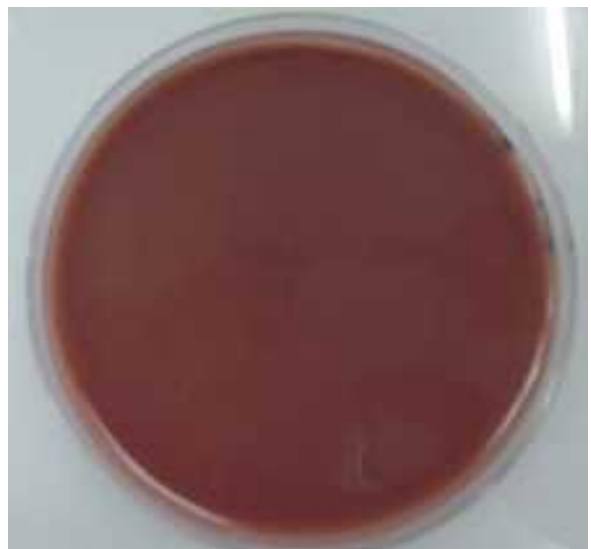
0分(対照)885個



20分 1個

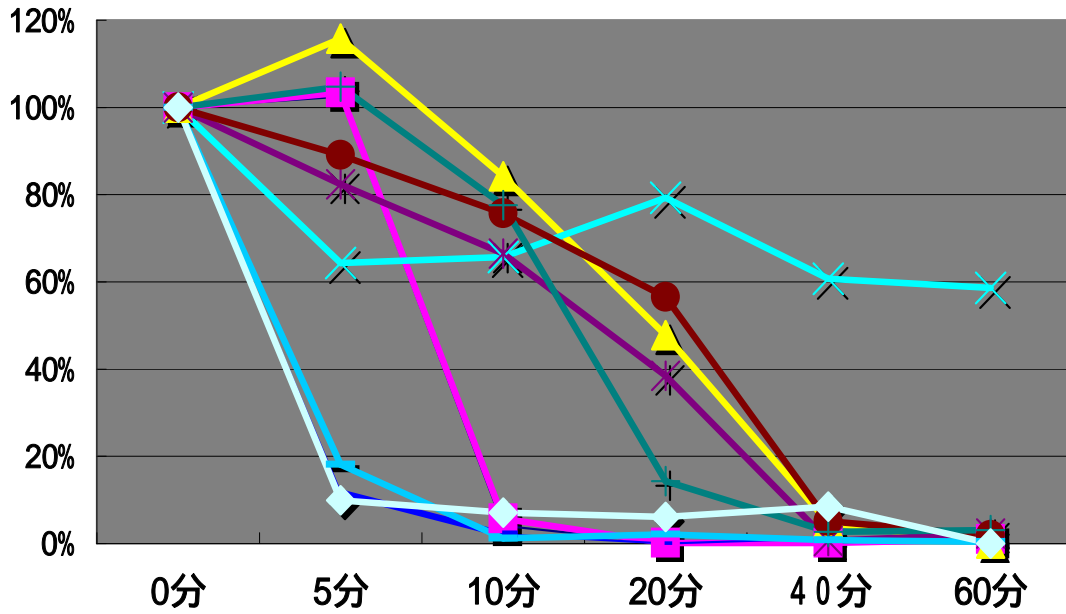


40分 0個



60分 0個

ナノテクビーム 杏林大学試験結果



- | | |
|------------------|-------------------|
| ◆ メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 | ■ メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 |
| ▲ O157腸管出血性大腸菌 | × 緑膿菌 |
| ✱ B群赤痢菌 | ● ネズミチフス菌 |
| ⊕ 肺炎桿菌 | — 肺炎球菌 |
| — インフルエンザ菌 | ◇ 肺炎マイコプラズマ |