

過程にわたってトータルに考えられ、ハード面だけでなくソフト面も含めたシステム化の概念が導入されてきていることである。

この特集では、“ネガティブバイオテクノロジー”としての殺菌、洗浄技術について、著者を含めて、それぞれ異なった視点をもつ方々に執筆頂いた。読者には、これらの技術についての新しい知識だけでなく、その研究

の概念や方向性にどのようなものがあるか、どのような技術開発がどう利用されようとしているか、今後どのような発展性が期待できるかなどについても汲み取って頂きたいと思う。そしてこの古くて新しいテクノロジーへの関心が一層高まり、その研究と開発がさらに活発化することを期待したい。

## 殺菌・静菌における“ストレスバイオテクノロジー”とその概念

土戸 哲明\*・松村 吉信

### 1. 殺菌・静菌技術適用の概念における現状と問題

殺菌・静菌技術には各種あり、新しい方法も提唱されてきているが、現行のそれらの適用においては、多くは単位操作としての巨視的な立場から殺菌処理後の結果としての効果のみが重視され、とかく現場では経験的あるいは試行錯誤的な手法に頼る傾向が強い。一方、微生物の殺菌・静菌処理に対する耐性は、環境条件もさることながら、生物特有の適応機能にも依存してさまざまに変動し、その要因も不明なものが多い。そのため、現実にこれまでの経験では予測できない問題や事故も発生し、またそのような事態に対応できる体系的な方法論もなく、対症療法的な措置がとられがちである。このような状況は、裏を返せば現行の理論や概念が処理現場と乖離しており、それらの不十分さを物語るものと言わざるを得ない。

殺菌・静菌を中心とした有害微生物の生存・生育制御技術は、食品、医薬、医療、工業材料、諸環境の微生物学的安全性の確保のために利用されているが、最近では欧米から導入された食品製造における HACCP（危害分析重要管理点）や医薬品の製造におけるバリデーションに見られるような、製品の原料から消費に至るまでの全体にわたる管理システムの一環として、広い視野に立った考え方が導入される時代に入っている。それに伴い、適用される微生物制御・管理技術は、これまで以上に信頼性が高く実用性のある理論に基いていることが要求されている。そして発生の可能性がある危害を予測し、突発的に発生した場合には機敏に対応、修正できる柔軟性と即応性を装備し、そしてその効果が適正に評価、検証され得る高度に組織的で繊細な機能をもつシステムに成

長させることが一層求められるものと予想される。

### 2. 殺菌・静菌の巨視的側面と微視的側面および“ストレスバイオテクノロジー”としての展開

著者ら<sup>1-4)</sup>は、古くから微生物細胞の損傷・回復機構、耐性変動の要因について生理学的な解析を進める一方、近年の分子生物学的研究の進展によって蓄積されつつある成果を取り入れ、巨視的な観点だけでなく、微生物の挙動を把握した微視的な側面からのアプローチが必要であることを指摘してきている。

この微生物細胞内という意味での微視的な立場から言えば、殺菌・静菌処理は微生物をそれぞれ致死のおよび非致死のストレスにさらすことにほかならない。これらのストレスに対して微生物はさまざまな応答機能を発揮し、生存性や増殖能を維持しようとする能力をもつことが知られ、現在そのメカニズムが次第に解明されつつある。そこで、これまでの巨視的な科学技術的手法と連繫させながら、このような微視的立場からのアプローチを図るならば、既往のもの以上に精緻で信頼性の高い理論の構築が可能になるものと期待できよう。<sup>5)</sup>このような微視的科学的としての、いわば“ストレス微生物学”を巨視的な装置や工学的な概念と融合させることによって展開させる技術は、“ストレスバイオテクノロジー”として位置づけることができよう。

“ストレスバイオテクノロジー”の基本概念はもっと広く解釈でき、たとえば乾燥に強い植物の育成や、ストレスタンパク質とその遺伝子の利用、培養系におけるストレス負荷の応用など、細胞へのさまざまなストレスに関係するバイオ科学技術全体を包含すると言える。ここで述べる殺菌・静菌における“ストレスバイオテクノロ

\*著者紹介（代表）関西大学工学部生物工学科（教授）

〒564-8680 吹田市山手町3-3-35 TEL. 06-6368-0880 FAX. 06-6388-8609 E-mail: ttsuchi@ipcku.kansai-u.ac.jp

ジー”は、これらの処理における微生物の死滅と生育阻害の現象論から出発して、細胞における生理、生態学的変化や生存、損傷、修復、阻害、適応応答など、ストレスのメカニズムの細胞レベルさらには分子レベルでの解析に至る科学手法と技術開発を指し、殺菌や静菌の効果の評価や予測、操作条件の最適化や外的変動の解析、新規な制御法の開発、評価・検出・測定原理の開拓などに応用する領域として定義したい。

本稿では、一般的な殺菌・静菌法を概観するのではなく、主に微視的立場から殺菌・静菌処理の効果に関わる2, 3の例を概括的に提示し、“ストレスバイオテクノロジー”の概念の意義を強調することにしたい。なお文献は、誌面の都合で主要なもののみ引用することとした。

### 3. 加熱殺菌における“ストレスバイオテクノロジー”の概念の適用

食品における加熱殺菌では、熱による品質低下を最小限に止める必要性から適正な殺菌条件を導出するための基本理論があり、殺菌プロセスの能力の指標としてF値が一般に利用されている。この巨視的立場の理論では、微生物の熱耐性が熱履歴に影響を受けないことを前提にしているが、著者ら<sup>6,7)</sup>は低温加熱殺菌（パスツリゼーション）において、予備保温温度や昇温速度の影響を受けて熱耐性が予想外に大きく変動することを見だし、その細胞側にある微視的要因を解析した。<sup>6-9)</sup>この結果の概略を簡単に述べる。

37°Cで培養後0°Cの緩衝液に浮遊した大腸菌を、20倍希釈法によって50°Cに急速昇温する方法と毎分0.6°Cの速度で緩慢に昇温する方法によって加熱した場合、その後の50°Cでのみかけの熱死滅におけるD値（90%死滅時間）は4-5倍後の方が大であることがわかった（Fig. 1）。また、急速昇温によって評価した耐熱性は、加熱前の予備保温の温度（0-37°C）に依存し、その挙動が細胞膜脂質の相分離開始温度に相当する温度を境に異なっていた。このことは培養温度の変化および不飽和脂肪酸要求変異株の利用の実験によって確認づけられ、細胞膜にゲル相が現れて相分離が起こるとその割合の増加に対応して熱耐性が低下し、均一な液晶状態の膜をもつ場合には耐熱性は一定になると推察された。また、この耐熱性の予備保温温度依存性は急速昇温による加熱時の希釈率に依存し、相分離開始温度以下の温度で変化するため、昇温速度が大であるほど不連続性になった。すなわち、0-37°Cの範囲内での予備保温効果には細胞膜の脂質相転移、相分離が関与すると推察される。

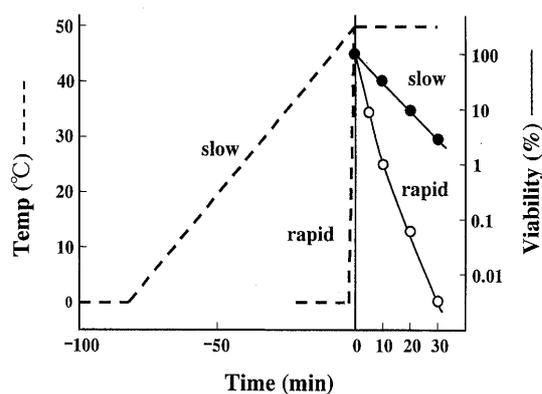


Fig. 1. Effect of rising-temperature process on the heat resistance of *Escherichia coli* cells. Cells were heated slowly from 0 to 50°C at a temperature-rising rate of 0.6°C/min or rapidly by 20-fold dilution method and then kept at 50°C in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.2. Viability was measured by colony count. Cited from ref. 7.

ところが、37°C以上の高温で予備保温するとそれ以下の場合と様相が一変し、耐熱性の変化は予備保温時間の延長とともに上昇しつづけ、この場合の耐熱性変動の要因は熱ショック応答であることが示唆された。したがって、先の昇温プロセスの効果には少なくともこれら2つの要因が関与することが示唆され、加熱殺菌プロセスにおいては、加熱前の微生物の温度履歴を考慮する必要があることを指摘した。

また著者ら<sup>3)</sup>は、最近、好気下で加熱処理した大腸菌の呼吸活性低下の要因解析から細胞膜酵素のNADH脱水素酵素の失活と熱死滅との関係、シャペロン機能をもつ低分子量熱ショックタンパク質のIbpA, IbpBの機能解析から加熱による細胞内タンパク質の凝集と熱死滅との関係、また大腸菌の熱による外膜損傷の解析から疎水性化合物の細胞内透過と細胞感受性化との関係を示唆している。

これら微視的解析に基づく研究の進展は、細菌の耐熱性の変動要因についてより説得力のある解釈を導出し、巨視的な立場における殺菌条件設定理論の修正・構築にフィードバックさせることができるはずである。著者ら<sup>10)</sup>は、加熱加工食品の賞味期限設定のための数学的な殺菌予測のためのデータベース化プロジェクトにおいて、細胞損傷や熱抵抗性化現象を考慮した実験計画に基づいてデータを取得、蓄積中である。

### 4. 酸化剤殺菌における“ストレスバイオテクノロジー”の概念の適用

微生物は一般に酸化的環境に曝されると増殖阻害を起こしたり死滅する。過酸化水素や、過酢酸、オゾンなど

の過酸化物を含む酸化剤による殺菌はこのストレス作用を利用したもので、一般に医療面、食品製造における環境、機器、用具の消毒殺菌や産業廃水などの殺菌に利用されている。

著者ら<sup>11)</sup>はそれら酸化剤の効力を解析し、過酢酸の殺菌作用への共存物質の影響については、数種のアミノ酸や金属塩による殺菌阻害は過酢酸分解の促進の結果であること、しかし、分解促進物質の中でも（単独では殺菌効力を示さないが）細胞傷害性の物質には殺菌効力に影響を及ぼさないものもあることを認めている。

細菌に微弱な酸化ストレスを予め付与すると、細胞のストレス適応応答により、その後の致命的な酸化剤処理に対して耐性化する。<sup>12)</sup> この応答では、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼなどの活性酸素消去タンパク質が誘導合成されてそれらの細胞内のレベルが顕著に上昇する。したがって過酢酸などの酸化剤系の殺菌剤では、これら酵素のレベルが殺菌効力に影響を及ぼすこと、殺菌処理の有効性向上のためには微視的観点からの対象細菌の生理状態を考慮する必要があることを指摘でき、<sup>12)</sup> これら適応応答の阻害が殺菌効率の上昇につながる可能性が示唆される。

また枯草菌の酸化剤系抗菌剤に対する耐性における SOD とカタラーゼの機能について、それらの欠損株を作製して解析した。枯草菌のカタラーゼは対数増殖期に発現する KatA, 定常期に発現する KatE, および胞子内に存在する KatX の 3 種類が知られているが、活性が検出できる SOD は栄養細胞および胞子で同一のもの 1 種類 (SodA) しかないことを明らかにした。<sup>13)</sup> これら遺伝子の単一変異株を作製し、増殖能への影響を検討したところ、*sodA*, *kataA*, *katE*, *katX* の各欠損株は栄養豊富な培地では正常に増殖したが、*sodA* 欠損株は最少培地中で  $Mn^{2+}$  を要求し、このイオンは胞子形成にも必要であった。<sup>13)</sup>

さらに、これら単一欠損変異株の活性酸素発生性の化合物や酸化剤に対する感受性の検討から、これらの酵素が栄養細胞の酸化ストレス耐性に機能していることが確認された。<sup>13)</sup> しかし、SOD やカタラーゼ単独の欠失は成熟胞子の酸化ストレス耐性には影響がなく、発芽時の耐性に関与することが示された。<sup>13)</sup> また SOD に加えて  $Mn^{2+}$  が第二のスーパーオキシド消去物質であることも判明した。<sup>14)</sup> 酸化剤系抗菌剤以外の殺菌処理でも活性酸素の関与が示唆されているものが多くあるが、銀系抗菌剤でもこのことが確認できた。<sup>15)</sup>

このような微視的立場の解析から、酸化剤による殺菌

・静菌技術の有効性が対象細菌の活性酸素防御システムの特性や誘導能に強く依存することが明らかで、その関係についての解析は効果の評価や予測に貢献するであろう。さらに、好気下での加熱などの物理的ストレスによって非特異的に発生するいわゆる損傷菌が、カタラーゼやピルビン酸ナトリウムの添加によって蘇生する現象が知られるが、これはおそらく細胞膜に局在する電子伝達系の損傷によって発生するとみられる活性酸素に起因し、この二次的作用も殺菌効果発現に意義をもつことを付言しておく。<sup>3,4)</sup>

## 5. その他の“ストレスバイオテクノロジー”の 応用と将来展望

上述のように、今後の殺菌・静菌の一つのアプローチとして、微視的側面から展開される“ストレスバイオテクノロジー”の概念の導入が考えられよう。それによって制御方法のより精細な有効性評価や効果の予測、各種因子の影響の把握のほか、新規な殺菌・静菌法の開発につながる可能性もある。著者ら<sup>16)</sup>は枯草菌や緑膿菌を対象に、通常その活性が制御されている自己溶菌酵素のオートリシンを活性化し、自己溶菌を誘発させることによって殺滅させる自殺殺菌法の有効性を検討している。

“ストレスバイオテクノロジー”の概念は新たな殺菌・静菌効果の評価法の開発にも適用でき、食品、医薬・医療、環境などへの利用が期待できよう。著者ら<sup>17)</sup>は、大腸菌のタンプリング能欠損株を用い、有害物質による細胞エネルギーレベルの低下に基づく運動性低下を画像解析装置によって計測し、迅速、簡便なバイオアッセイ法として、水の汚染評価や抗菌性化合物のスクリーニングへの応用の可能性を示唆している。

実用的な殺菌・静菌処理のためには微生物生態学的なアプローチも要求されてこよう。最近この分野で話題の培養不能生存細胞やバイオフィームは、医療や食品分野の殺菌・静菌においても問題化しており、<sup>18)</sup>微生物集団の特性について、固定した単純な実験系での解析を基本とした既往の概念だけに頼るのではこれらの根本的な解決は望めず、今後生理学、分子生態学などの微視的科学研究手法による解析が一層必要である。

著者らは、今後も巨視的な実験によって得られた現象を微視的に解析し、その成果を再び巨視的なレベルにフィードバックする作業 (Macro, Micro, and Cyclo) を通じ、殺菌・静菌を中心とする微生物制御分野における“ストレスバイオテクノロジー”の学理構築とともに、その応用への理論形成や基準作成に貢献したいと念じている。

## 文 献

- 1) 土戸哲明：防菌防黴，**21**, 293 (1993).
- 2) 土戸哲明：食品工業，**41**(10), 16 (1998).
- 3) 土戸哲明：熱殺菌のテクノロジー（高野光男，土戸哲明編），p. 33, サイエンスフォーラム (1997).
- 4) 土戸哲明：日食科工，**46**, 1 (1999).
- 5) 土戸哲明：食品微生物制御技術の進歩（河端俊治，春田三佐夫監修），p. 48, 中央法規出版 (1998).
- 6) Tsuchido, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 788 (1974).
- 7) Tsuchido, T. et al.: *J. Antibact. Antifungal Ag., Jpn.*, **10**, 105 (1982).
- 8) Katsui, N. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **122**, 357 (1982).
- 9) Tsuchido, T. et al.: *J. Antibact. Antifungal Ag., Jpn.*, **20**, 131 (1992).
- 10) 土戸哲明ら：日本防菌防黴学会年次大会要旨集，p. 26 (1998).
- 11) 松村吉信ら：日本防菌防黴学会年次大会要旨集，p. 108 (1999).
- 12) 土戸哲明：防菌防黴，**26**, 565 (1998).
- 13) Inaoka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **180**, 3697 (1998).
- 14) Inaoka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **181**, 1939 (1999).
- 15) 芳片邦聡ら：日本防菌防黴学会年次大会要旨集，p. 44 (1998).
- 16) Tsuchido, T. et al.: *Biocontrol Sci.*, **1**, 19 (1996).
- 17) 土戸哲明ら：バイオサイエンスとインダストリー，**54**, 39 (1996).

## 環境調和型殺菌剤の開発とその作用

高麗 寛紀\*・前田 拓也

人類が健康で快適な長寿社会を維持するためには環境中の有害微生物を効果的に制御し、感染の危険性を低下させることは非常に重要である。一方、1990年に起こったスペースシャトルの排水系ステンレスパイプラインに細菌腐食による穴の発生事故などの金属材料、無機材料、プラスチック、石油製品、電子材料、接着剤、塗料、繊維、ゴム、香料、油脂、医薬・化粧品、木材、皮革、食品および紙製品などが微生物劣化により多大の経済的損失を被っている。これらを防止するのが殺菌剤あるいは抗菌剤の役割である。しかし、殺菌剤は少なからず毒性を有している。今世紀後半、低毒性で生態系に優しい殺菌剤が求められ、環境調和型殺菌剤の開発が著しく進展した。主なものは、物質表面に共有結合で殺菌剤を固定化し、環境への拡散を防止した固定化殺菌剤、無毒性の無機結晶物質に銀を強固に担持させた固体殺菌剤および通常的环境条件下で速やかに化学変化して生分解性構造に変化するダイマー型第四アンモニウム塩殺菌剤などがそれである。本稿では環境に優しい殺菌剤の開発の現状およびその作用機構について紹介する。

## 1. 固定化殺菌剤

固定化殺菌剤は1972年 Isquith らりによって最初に開発された。ガラス板の表面に3-(トリメトキシシリル)-プロピルジメチルオクタデシルアンモニウムクロライドを脱メタノール反応により結合させたものであり、殺菌剤が溶出することなく殺菌活性を示す。このような固定化殺菌剤は繊維製品の抗菌防臭加工薬剤として使用されており、我が国における最初の応用例でもある。<sup>2)</sup>近年、

シリコン型固定化殺菌剤、<sup>3-7)</sup>高分子鎖にペンダント型に殺菌活性分子が結合している不溶性架橋ポリマー型固定化殺菌剤、<sup>8,9)</sup>微生物やウイルスに対して強い吸着除菌活性を示すポリマー型の薬剤<sup>10-24)</sup>の報告がある。固定化殺菌剤に適した薬剤とは固体表面に結合状態で殺菌活性を示す薬剤でなければならない。なお、固定化殺菌剤の詳細は著者がすでに総説<sup>25,26)</sup>としてまとめたので省略する。

## 2. 固体殺菌剤

固体殺菌剤は通常的环境下では溶解せず、固体粒子から殺菌剤が溶出することなく殺菌活性を示す殺菌剤である。このような固体殺菌剤はアナターゼ型酸化チタンおよび銀担持リン酸ジルコニウムセラミック (Fig. 1) である。<sup>27,28)</sup>酸化チタンはブラックライト領域の光照射によりヒドロキソラジカルとスーパーオキシドアニオンラジカルを生成し、これらの活性分子が高い殺菌活性、抗菌活性、グラム陰性細菌外膜のエンドトキシン (LPS) の失活、ガン細胞に対する殺細胞活性および抗ウイルス活性を示すことが砂田らによって総説されている。<sup>29)</sup>

ここでは著者らが開発した銀担持リン酸ジルコニウムセラミックについて概説する。このセラミック粒子は一边0.3~0.5  $\mu\text{m}$ の立方体であり、銀イオンを溶出することなく高い殺菌活性を示し、急性経口毒性はLD<sub>50</sub>: >2,000 mg/kg (マウス) である。グラム陽性細菌、陰性細菌および酵母に対し、広い静菌スペクトルを有するが、細菌芽胞には発芽阻害作用を示さず、発芽した後の栄養細胞に対しては強い殺菌効果を示す (Table 1)。暗室窒素雰

\*著者紹介 (代表) 徳島大学工学部生物工学科 (教授)

〒771-8506 徳島市南常三島町2-1 TEL. 088-656-7408 FAX. 088-656-9148 E-mail: kourai@bio.tokushima-u.ac.jp