

知っておきたい殺菌・除菌・滅菌技術

松村 吉信^{1,2*}・中田 訓浩²

生物の有効利用を大きな目的としている本学会では異質な響きを与えるかもしれない技術、「殺菌」「除菌」「滅菌」について、これらを統合した抗菌技術とともに今回は紹介したいと思う。当然、これらの技術の根幹は、「生物学」ではない。一般に、抗菌技術における微生物細胞の不活化とは細胞内に存在するDNAまたは酵素（タンパク質）、細胞構造（膜機能）を破壊することであり、抗菌剤を利用する場合はその構造と合成法の基礎となる「化学」、熱や圧力、電磁波を利用する場合は「物理学」や「物理化学」となる。「(微)生物学」が必要とされる部分はタンパク質やDNA、細胞膜の構造であり、大半の「生物学」や「生化学」の教科書で記述されている基礎知識以外は必要としない。言い換えると、抗菌処理とは生物という“物質”を「化学」や「物理学」、「物理化学」を利用して無秩序に変化させる技術であり、「微生物学」が得意とする細胞や生体を“秩序を持って”「生きる・活かす」技術とはかけ離れたものとなっている。このようなことから、現時点では抗菌技術に関する「微生物学」の関与はあまり大きいわけではなく、「微生物学」から見ると多くの抗菌技術が成熟したものとして取扱われている。

一方で、微生物が引き起こす事故も毎年のように世間を賑わしている。病原性大腸菌などによる食中毒事故（事件？）、レジオネラによる日和見感染症事故、抗生物質耐性菌による院内感染、これらは微生物が引き起こした事故であり、「殺菌」「除菌」「滅菌」技術に盲点があるために生じたものとも考えられる。一部には人為的ミスも含まれているが、盲点がなければミスも生じにくい。つまり、「化学」や「物理学」「物理化学」で対応している現在の抗菌技術には現実問題としての盲点や限界があり、現状では対応できない事象があることを意味している。そこで、もう一度、(微)生物を対象としている研究者が現状の抗菌技術の問題点やその解決方法を探る必要があると考えている。

人々は「安全」や「安心」を一つの尺度として新しい技術を評価する気運が高まっている。「生物の有効利用」という新しい技術に対しても「安全・安心」の技術と組み合わせる必要が生じているのではないだろうか。そこ

で改めて、この機会に抗菌技術を評価してみたい。また、「殺菌」「除菌」「滅菌」にかわる「微生物制御」についても考えてみたい。

よく利用される殺菌・除菌・滅菌法

抗菌技術とは まず、微生物制御に関わる言葉を定義したい¹⁾。「抗菌（技術）」とはもっとも広義に使われる言葉であり、「微生物細胞を殺菌・除菌・滅菌・静（制）菌・増殖阻害する状態（技術）」と定義される¹⁾。つまり、微生物細胞が増殖しようとする能力を阻害して殺滅する技術と、ある特定の環境から微生物を除去する技術とを合わせたものである。その中でも「殺菌」とは微生物細胞を「殺滅」する技術で、ある環境中の微生物を完全に殺滅させる場合を特に「滅菌」と呼ぶ。たとえば、研究室などで利用するオートクレーブ処理などは滅菌処理となる。「静（制）菌」とは微生物の増殖を阻害し、生きた細胞が増えない状態を示し、高度な「増殖阻害」状態と考えることができる。たとえば、低温貯蔵技術などは静菌処理に近いものである。一方、「除菌」とはある特定の環境から微生物細胞を「除去する」あるいは「少なくする」ことを意味する。このため、「除菌」にはフィルターなどによる濾過や洗浄処理などが含まれる。また、

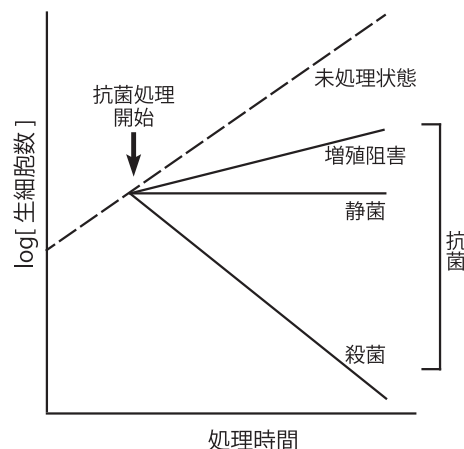


図1. 抗菌処理の概念図。増殖している微生物細胞に抗菌処理を施した場合を示す。点線は抗菌処理を施さない場合の生細胞数変化である。

* 著者紹介 ¹ 関西大学化学生命工学部生命・生物工学科（准教授） E-mail: ymatsu@kansai-u.ac.jp
² 関西大学先端科学技術推進機構（ポスト・ドクトラル・フェロー）

最近では強い殺菌作用は示さないが、抗菌作用は持つ処理にもしばしばこの言葉が使われている。たとえば、家庭用洗剤に抗菌効果を付加したものを除菌洗剤として市販されている。これらの定義を細胞の生残数と合わせて図1に示した。

このように“抗菌”には多様な意味が含まれていることをご理解いただけたと思う。次に、微生物を研究している方々には“釈迦に説法”ではあるが、「抗菌」を考える上で重要となる微生物の生活相について考えてみよう。一般に、微生物には細胞増殖に適した環境条件がある。周辺環境の栄養状態や温度、pH、水分活性、酸化還元電位などに最適条件が存在している。この適した周辺環境から逸脱すると微生物細胞は増殖を停止し、場合によっては死滅に向かう。この増殖が停止し細胞が死滅する環境は広い意味で抗菌的環境とも言える。図2には、ある微生物細胞を閉ざされた最適な環境に少数放した（植菌した）場合を示す。微生物細胞はまず放たれた環境に馴染む“誘導期”を経て“対数増殖期”に移行して活発にその細胞数を増やす。その後、栄養状態などの周辺環境が悪化し、微生物細胞の増殖が停止する“定常期”に移り、その後、死滅する。一部の微生物では、“定常期”に孢子などの休眠型細胞に変化するものも知られている。図1と2を合わせて考えると現実的な抗菌技術が見えてくる。つまり、抗菌技術とは、「増殖させない周辺環境」または「細胞を殺滅する周辺環境」を作り出す技術と言い換えることもできる。さらに、「殺滅」あるいは「増殖阻害」のどちらを選択するのは製品の品質や製品が使用・貯蔵される環境によってかわる。次に、さまざまな抗菌技術について紹介する(表1)²⁾。

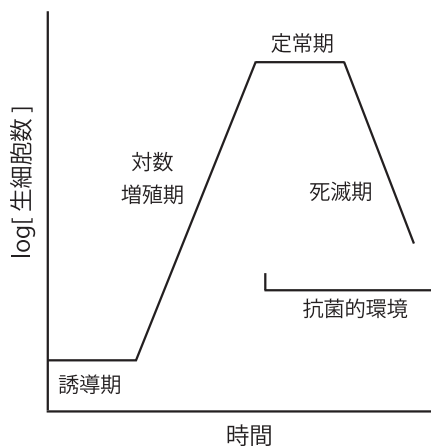


図2. 微生物の生活相の変化。少数の微生物細胞を最適な環境条件に放った場合の生細胞数の変化の概念図。

表1. 実用化されている抗菌技術

物理的技術
加熱処理, 低温(冷凍)処理, 電子波処理(マイクロ波, 赤外線, 紫外線, ガンマ線), 超音波処理, 加圧・減圧処理, ろ過, 遠心分離
物理化学的技術
水分活性調整, pH調整, 温度調節(冷蔵), 酸化還元電位(酸素濃度)調節
化学的技術
抗生物質
抗菌剤
有機系抗菌剤【第4アンモニウム塩, アルコール・アルデヒド類, カルボン酸類, エステル類, フェノール類, 塩素化合物, 過酸化水素など】
無機系抗菌剤【銀イオン類, 銅イオン類, 酸化チタン, ナノ粒子など】
その他【次亜塩素酸塩, 過酸化水素, 酸性電解水, オゾンなど】

物理的抗菌技術 この技術では環境を微生物が好まないものに急激に変化させる方法が用いられる。代表的なものとして加熱処理(湿熱殺菌や乾熱殺菌など)や低温処理, 超音波処理, 加圧・減圧処理, 高電圧処理, 紫外線やガンマ線処理, マイクロ波や赤外線処理などが知られている。加熱処理やマイクロ波・赤外線処理ではタンパク質の熱変性や膜構造の破壊, 超音波処理や加圧・減圧処理では主に膜構造の破壊, 紫外線やガンマ線ではDNAの修飾(変異)や切断が処理細胞で確認されている。しかしながら, これら細胞で起こる変化と抗菌性との関連についての詳細は明らかとなっていない。さらに, どの程度の処理強度(時間)が要求される抗菌効果に必要な処理環境に大きく依存するため, 結果としてどの物理的抗菌技術が最適かは経験に因るところが大きい。

物理化学的抗菌技術 微生物の生育環境からはずれた環境(図2, 抗菌的環境)では, 増殖は停止し, 死滅する。このような環境も“抗菌処理”として利用できる。上述したように水分を制限すると抗菌効果が得られることが知られている。この場合, 水分の絶対量が重要ではないようだ。環境中の水をその状態で分類すると自由水と結合水に分けられる。自由水とは水以外の他の化合物と結合していない自由に活用できる水と考えることができる。自由水の割合を示す指標として水分活性 A_w (water activity)が用いられ, 微生物の増殖可能な A_w 値はその種類によって決まっている。たとえば, 一般的な細菌や酵母の最低 A_w 値は0.86~0.97, カビでは少し低く0.83~0.92, 好塩性菌では約0.75, 耐塩性酵母で0.60, 好乾性カビで0.65~0.75である。言い換えると A_w 値0.6以下の環境では微生物は生育できない³⁾。この考えは古

くから塩漬けや糖を多量に含むジャムなどの食品保存技術として応用されている。

水分活性と並び重要となる環境因子にpHがある。細菌での増殖に最適なpHは7.0付近、カビや酵母ではpH4.0～6.0となる。このような微生物の増殖特性から、食品貯蔵ではpH制御も抗菌処理法として利用可能である。しかし、一部の微生物でpH1.0以下やpH13以上でも生育可能なものが知られている。このような特殊な微生物が生育する場合には注意が必要である。

さらに、AwやpH制御以外に酸化還元電位調節（酸素濃度調節）も好気性微生物の制御に応用可能であり、除酸素剤の使用や除酸素包装はこの考え方を利用したものである。

このような物理化学的抗菌技術は、殺菌・滅菌を期待するものではなく、多くの場合、増殖阻害や静（制）菌効果を期待するものが多い。

化学的抗菌技術 一部の化合物や塩、イオンでは微生物に対する殺滅や増殖阻害効果を示すものが知られている。この効果を利用したものに殺菌剤や食品保存料、抗生物質などの抗菌剤がある²⁾。それぞれの抗菌剤の微生物細胞に対する作用はさまざま、生物の特異的な機能を阻害する抗生物質や、銀イオンや第4アンモニウム塩などでは酵素を含むさまざまな生物機能を阻害すると考えられている薬剤もある。これら抗菌剤の作用は周囲の環境によってその効力に影響を及ぼすことが知られている。特に、抗菌剤の作用には最適温度や最適pHが知られており、さらに、有機物や金属イオンの存在は本来の能力（抗菌力）を低下させる場合が多い。抗菌剤を効果的に使用するには、その使用環境における抗菌力調査を前もって確かめておくことが重要なポイントとなる。

抗菌剤を使用するにあたってもう一つ注意することがある。近年、抗生物質耐性菌の出現がニュースでよく取り上げられる。この発生のメカニズムは不明であるが、経験的に、新しい抗生物質が開発・使用され、5年程度経過するとその耐性菌が出現している。この耐性菌の能力は時間とともに伝播するとも考えられていることから、抗菌剤を使用する場合、注意が必要である。最近、抗生物質を含む抗菌剤の作用に活性酸素の発生やその作用が大きく関わっていることが報告されている^{4,5)}。また、この発生した活性酸素がゲノム変異の誘発や細胞のコンピテンス能に影響を及ぼす可能性が推測され、耐性菌出現に関わっているのかもしれない。

生物的抗菌技術 実用化された方法ではないが、生物が持つ能力を“抗菌”に利用する研究も行われている。バクテリオファージは特定の細菌に感染し、一定期間後、

宿主となった細胞を破壊する能力を持っている。この能力は特定の細菌のみを攻撃し、殺滅することができる特徴を有している⁶⁾。また、細胞自身が持つヌクレアーゼや細胞壁分解酵素、プロテアーゼは自身をも溶解する可能性を含んでいる。実際には、そのようなことが起こらないようにその機能は制御されているが、これを脱制御すれば“抗菌技術”として活用できると考えられる。一例として、枯草菌では脂肪酸や低温ショック処理でオートリシンが活性化され、自己溶菌を引き起こすことが報告されている⁷⁾。

微生物細胞死滅の反応速度論¹⁾

抗菌処理の中でも、殺菌処理については処理中の生残細胞数変化を予測したい場合が多い。これは、商品を殺菌・製造する過程でどの程度の処理が必要かを事前に把握し、できるだけ必要最小限の処理に留めたい場合が多いためである。そこで、殺菌処理を生細胞（生きた細胞）から死細胞（死んだ細胞）への化学反応として捉え、処理時間とともに変動する生残細胞数を測定すると経験的に図3（実線）のように近似できる。

このように直線近似で示される生存曲線から微生物細胞死滅の反応は一分子反応に似ていると予想され、生残細胞数（ N ）は次式で表せる。

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

ここで、 t は処理時間、 k は死滅速度定数を示す。さらに、初発生細胞数を N_0 、 t 時間処理後の生残細胞数を N_t とすると、

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

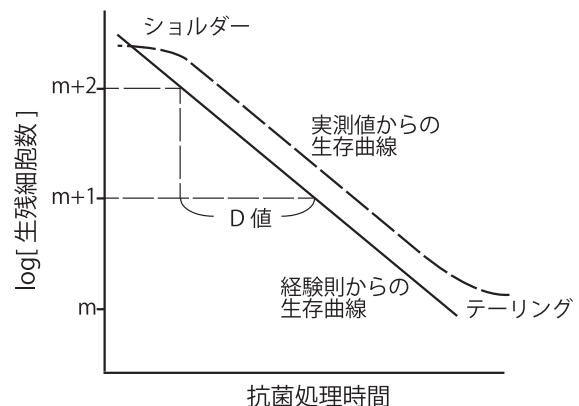


図3. 抗菌処理中の微生物細胞の生存曲線。実線は経験則から予想される生存曲線、点線は実測値から得られる生存曲線。

または、

$$\log N_t = \log N_0 - (k/2.303) \cdot t$$

と表せる。また、微生物の耐性を示す指標となるD値 (decimal reduction time) は、

$$D = 2.303/k$$

となり、生残細胞数を1/10低下させるのに必要な抗菌処理時間を意味する。

抗菌処理工程における微生物死滅レベルを示す指標として次式の不活性化ファクター (IF) や減少指数 (n) も用いられる。

$$IF = 10^{nD} = 10^n$$

加熱処理でのD値は処理温度の影響を受け、図4となることが経験的に知られている。そこで、D値を1/10に低下するのに必要となる温度差をZ値とよび、加熱処理における温度依存性の指標となる。

一方、抗菌剤処理においては処理濃度に依存する。その状態は次式で表される。

$$k = AC^n$$

ここでの n は殺菌濃度指数、 A は比例定数となり、 n 値が大きいものほど、低濃度での効果が低く、殺菌濃度指数が小さいものほど濃度効果が低いことを意味する。

このような微生物死滅の反応速度論での検証から、抗菌処理では生残する微生物細胞を0個にすることが不可能であることを示している。そこで、生存細胞数を何桁低下させるのかを示す減少指数 n が重要となる。一般に抗菌処理の指標として $n=6$ や 12 が用いられる。また、実際には図3 (点線) のように生存曲線が一分子反応に従わない場合が多い。つまり、抗菌処理初期や後期にお

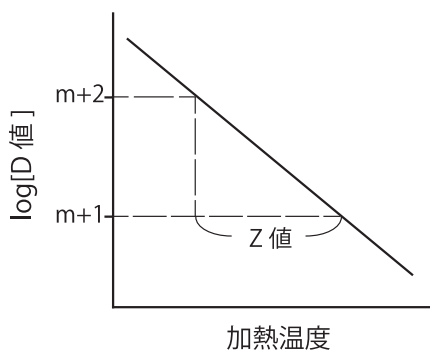


図4. 熱耐性曲線

ける死滅速度の低下 (ショルダーやテーリング) が確認されている。これは、微生物細胞が均一の生理状態でないことや処理中に変化するためであると思われるが、詳細は不明であり、この現象が安全性において問題となると認識されている。

抗菌処理に影響を及ぼす微生物細胞の生理状態

最初に、抗菌処理に生物学的知識がほとんど必要ないと書いた。これは、用いる技術が物理的技術や化学的技術が主であり、死滅過程は一分子反応に従うと経験的に知られているためである。しかしながら、抗菌処理を実際行くと、経験的に構築された微生物細胞の死滅反応速度論に従わない場合が非常に多いことに気づく (図3点線)。つまり、現状の抗菌技術では対応できない事象があることを意味する。このような事象は、微生物細胞の生理的状态が変化することに起因する場合が多い。さらに、一般的な環境ではさまざまな生理状態の細胞が混在している。最近では温和な条件での抗菌処理が施されるようになり、処理中に細胞が変化 (適応) する場合も予想される。

休眠細胞 (dormant cell) 生物は、栄養が枯渇するなど、細胞増殖または生長が困難になるとそれを停止し (図2定常期)、一部の微生物では孢子 (芽胞) などの休眠細胞を形成する。この細胞では新しいタンパク質合成は行われず、さまざまな環境ストレスに耐性となることが知られている。たとえば、枯草菌栄養細胞の溶液中の80°CでのD値は0.1~0.3分であるのに対して、その芽胞の121.1°Cの湿熱状態でのD値は0.48分、さらに120°Cの乾熱状態でのD値は25~30分と、芽胞の耐熱性が極端に高い⁸⁾。一般環境では休眠細胞が必ず一定数含まれていることから休眠細胞の耐熱性を理解することは重要である。また、乾燥状態が孢子の耐熱性を高める要因であることも知られており⁹⁾、油を含む食品では特に孢子の生残性に気をつける必要が生じる。

ストレス適応 (adaptation) 栄養細胞も抗菌処理に対して常に同じ耐性を示すわけではない。特に、生育できる環境下での抗菌処理や抗菌処理前の環境によって栄養細胞の耐性度も大きく変わる。一般に、微生物細胞は周りの環境に合わせてその生理状態を変化させることが知られている。特に、生育条件からかけ離れた場合、細胞はストレス状態へと移行する。このストレス状態が長期間続くと細胞に障害が蓄積し、生育できない状態、つまり死滅すると考えられている。この時蓄積する障害にはタンパク質変性やDNA損傷、膜脂質の過酸化や相転移、細胞内浸透圧の上昇や抗菌剤などの化合物の蓄積

などが挙げられる。しかし、このような障害が軽度の場合、細胞はストレス環境に適応し、同時にさまざまな遺伝子発現を変化させる(ストレス応答)。たとえば、シャペロンなどのヒートショックタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼなどの活性酸素消去酵素、薬剤ポンプなどの排出システム、DNA修復酵素などの発現量の増加、ヌクレアーゼやプロテアーゼなどの障害を受けた生体成分の分解酵素の活性化などがこれにあたる。このような適応応答は結果として抗菌処理に対する耐性度合を高めると考えられている。つまり、抗菌処理前や抗菌処理中の環境が微生物細胞の耐性度合に影響する。

バイオフィーム (biofilm) これまでの微生物細胞の耐性度合は研究室で使用する培地で培養した浮遊細胞を用いて検証している。しかしながら、実際に微生物が生育している環境を観察すると細胞が単独で生育している場合は比較的少なく、固形物表面に付着して集団を形成していることが多い。このような集団をバイオフィームと呼ぶ。バイオフィームでは、微生物細胞のみが密接に接着しているのではなく、菌体外多糖や核酸、タンパク質なども絡み合ったネットワーク構造を形成し、細胞単独で存在している浮遊細胞に比べて環境ストレスや抗生物質に対して耐性が非常に高いことが知られている¹⁰⁾。

おわりに

微生物細胞を「殺滅する」あるいは生育を「抑制する」など、微生物を制御する技術である抗菌技術(微生物制御技術)は、たとえば、食品の加熱調理や乾燥処理など、ヒトは古くから経験的に利用している。また、生物系の研究者は研究室で常にオートクレーブ処理などで生残細胞数“ゼロ”を可能とする完全な殺滅方法に触れ、また、クリーンベンチや安全キャビネットなどのほぼ完全な除菌システムを簡便に使用している。このような環境では、現在の抗菌技術の問題点を肌で感じることは難しいかもしれない。一方、新聞では感染症の発生や抗生物質耐性菌の出現など、生活の「安全・安心」を揺るがす事故や事件が報道されているが、多くの場合、人為的なミス

伺わせる事例として報告される場合が多く、微生物学の研究者が興味を示すまでには至っていない。しかしながら、現在求められている“庶民レベル”の「安全・安心」は以前に増して高いものとなり、人為的なミスが限りなく低い抗菌技術の開発が求められている。このような技術においては、抗菌技術に関する教育だけではなく、生きている細胞数のチェック方法の確立、抗菌処理で生じた微生物細胞の損傷状態とその後の生死への関連性や抗菌処理で生じる細胞の変化なども解明する必要がある。このような研究は化学や物理学、物理化学を専門とされている研究者では難しい。近年、抗菌性界面活性剤が細胞に及ぼす影響解析結果から、活性酸素の発生が細胞死滅に関係していること、活性酸素ストレス応答性の向上が細胞耐性度合を高めることが報告された⁴⁾。また、殺菌性の抗生物質処理においても活性酸素の発生が死滅要因であることが報告され、活性酸素発生で生じるDNA障害が耐性菌出現の引き金になっている可能性も同時に予想されている⁵⁾。今後は、抗菌処理と耐性菌出現との関連性にも注意を払う必要がある。つまり、抗菌処理における微生物細胞の生理状態のコントロールも考慮した新しい「微生物制御」が必要であると考えられ、微生物系研究者の活躍が期待されるのではないだろうか。

文 献

- 1) 土戸哲明ら：微生物制御 科学と工学，講談社サイエンスティフィク(2002)。
- 2) 芝崎 勲(監修)：環境衛生管理技術体系 有害微生物管理技術，フジ・テクノシステム(2000)。
- 3) Smith, J. S. *et al.*: *Crit. Rev. in Food Sci.*, **44**, 19 (2004)。
- 4) Nakata, K. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 568 (2011)。
- 5) Kohanski, M. A. *et al.*: *Cell*, **130**, 797 (2007)。
- 6) Hermoso, J. A. *et al.*: *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 461 (2007)。
- 7) Tsuchido, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **162**, 42 (1985)。
- 8) Molin, G.: *J. Gen. Microbiol.*, **101**, 227 (1977)。
- 9) Kanagawa, K. *et al.*: *Biocontrol Sci.*, **3**, 87 (1998)。
- 10) Mah, T.-F. and O'Toole, G. A.: *Trends Microbiol.*, **9**, 34 (2001)。