



Title	感染症における問題点の解決策となるMA-Tの開発
Author(s)	柴田, 剛克
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92979
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

感染症における問題点の解決策となる MA-T の開発

大阪大学大学院薬学研究科

柴田 剛克

目次

目次

緒 論

感染症における2つの問題 パンデミックと薬剤耐性	3
1 パンデミック概要	3
・Covid-19 パンデミック	3
・世界各国が取った対策	4
・今後必要とされる対策	4
2 もうひとつの感染症問題—薬剤耐性	4
・薬剤耐性と抗菌薬の歴史	5
・多剤耐性アシネトバクター	6
・現在の対策と問題点	7
3 消毒剤の有効活用	7

本 論

第1章 MA-Tの安全性および有効性の評価

1.1 緒言	8
1.2 材料と方法	8
1.3 結果	11
1.4 考察	14

第2章 MA-Tの殺菌作用機序解析

2.1 緒言	18
2.2 材料と方法	19
2.3 結果と考察	20

第3章 MA-Tによるマスク再利用のための殺菌試験

3.1 緒言	24
3.2 材料と方法	25
3.3 結果	27
3.4 考察	29

第4章 MA-Tの防護衣やリネン殺菌への応用

4.1 緒言	34
4.2 材料と方法	34

4.3 結果	34
4.4 考察	35
第5章 MA-T を用いた口腔ケアと社会実装	
5.1 緒言	36
5.2 材料と方法	36
5.3 結果	38
5.4 考察	40
5.5 社会実装	42
第6章 MA-T の噴霧使用の可能性の検証	
6.1 緒言	43
6.2 材料と方法	43
6.3 結果	44
6.4 考察	45
第7章 総括と展望	
7.1 総括	47
7.2 展望	47

緒論 感染症における2つの問題 パンデミックと耐性菌

現代における感染症の問題に Covid-19 で記憶に新しいパンデミックと薬剤耐性の問題がある。パンデミックも定期的に繰り返し¹⁾、薬剤耐性も継続的に多くの命を奪っている²⁾。我々はこの2つの問題を解決するために多くの実験と研究開発を重ねてきた。

1 パンデミック概要

WHO は疾病の流行を規模でクラス分けしている。

パンデミックは Covid-19 のような世界的大流行を指し、エピソードは疫病などで明らかに正常な数値を超えた症例が地域や社会で発生していることでアウトブレイクより小規模なものがこれに含まれる。それより規模の小さいマラリアなどの風土病レベルのものはエンデミックと分類されている¹⁾。

表1 近年起きたパンデミックと原因病原体¹⁾³⁾

時期	疾病名	原因病原体	規模	死者数及び備考
1918~1920年	スペイン風邪	インフルエンザウイルス H1N1	全世界	死者約1700万~5000万人
1957~1958年	アジア風邪	インフルエンザウイルス H2N2	全世界	死者約100万人
1968~1969年	香港風邪	インフルエンザウイルス H3N2	全世界	死者約75万人
2009年	A(H1N1)pmd9	インフルエンザウイルス H1N1		死者14,142人 予想に反し小規模で収束
2019~2023年?	Covid-19	SARS-CoV-2	全世界	死者は688万人 WHOの推測では1500万人とも WHOが宣言を出し渋った結果、大流行

2009年はパンデミック誤警告と後に問題になった。

パンデミックは上気道感染を主な感染経路とするエンベロープを持ったウイルスと細菌により引き起こされており、1900年以降においてはすべてエンベロープを持つウイルスである¹⁾。エピソードレベルにおいてはエンベロープを持たないウイルスによるものも確認されているが非常に少ない。これはパンデミックが接触感染と飛沫感染、またはエアロゾル感染という感染の成立が容易な感染経路を持つ病原体によることを示唆している。

「エンベロープを持ったウイルスと細菌」を以後「対象病原体」と表記する。

・ Covid-19 パンデミック

2019年末に発生した SARS-CoV-2 による Covid-19 パンデミックが世界を席卷した。短い時間での世界的大流行に感染防護のためにリモートワークやステイホームなど生活様式まで変化を余儀なくされた。コロナウイルスがパンデミックに至った理由は、その感染力の強さにあると考えられた。今までの呼吸器感染症ウイルスは上気道に感染したが、SARSを始めとするコロナウイルスは唾液腺に感染するのではないかと言われていた。そしてそれ

は歯学研究科阪井教授のグループによる研究で証明されている⁴⁾。唾液腺に感染・増殖するため咳などせずとも日常の会話で簡単に飛沫感染が成立することを示唆している。感染部位が口腔内ということからごく少量のウイルスで感染が成立しパンデミックに至ったと考えられる。

・世界各国が取った対策

ワクチンの効果はかなり高いが、製造までに時間がかかり、多くの国と地域に届くまでに多くの障害があったことが報告された。Covid-19 パンデミックにおいて登場した mRNA ワクチンが完成し使われ始めた頃にはウイルスはすでに変異していたが、細胞性免疫の誘導があったことから効果が確認された⁵⁾。不活化ワクチンでは細胞性免疫は誘導されない為 SARS-CoV-2 のような短いスパンで繰り返される変異には対応できないと考えられた。消毒には中水準以下の消毒剤が用いられた。エタノールは溶菌することで殺菌力を発揮し即効性、医薬品でもあることから最も使用された⁶⁾。次亜塩素酸製剤は塩素系ラジカルであるが、対物だけでなく手指消毒やうがいにも使う人もいた。4級アンモニウム塩は低水準消毒剤であるが細菌類に効果があるということでエタノールの代替品として使用された⁶⁾。

・今後必要とされる対策

mRNA ワクチンには感染予防と重症化予防、2つの働きがあることから世界的に使われたが、感染のピークを平坦化させ医療崩壊を防ぐという目的⁷⁾は達成したと考えられる。それでも国内の感染流行は第八波を数えた。今後パンデミックが起こった場合、その伝播スピードにワクチンが間に合わないということが考えられる。エタノール不足が示したようにパンデミック発生前から準備備蓄ができ、必要なときにすぐ使えるもので対策しなくては間に合わないということが示唆された。今後も繰り返し起こるであろうパンデミックに必要なものは長期間の備蓄が可能、対象病原体に対し効果が高く、為害性の極めて低くかつ安価であるという4つの条件を満たす消毒剤であると考えられる。

2 もうひとつの感染症問題 — 薬剤耐性(AMR)

感染症においてもひとつ問題になっているのは薬剤耐性である。ウイルスも細菌も薬剤耐性を発現するが本論ではより重要度の高い細菌による薬剤耐性について論ずる。日本国内においてだけでなく世界的に抗菌薬を安易に使う傾向が強く、その結果として抗菌薬に対する耐性菌の発生が問題になっている²⁾。抗菌薬を使うことで耐性菌が生まれるという「いたちごっこ」を繰り返してきているが、MRSA や VRE にとどまらず、結核菌も多剤耐性化してきている⁸⁾。2013年現在の AMR に起因する死亡者数は低く見積もって70万人ほどで、何も対策を取らない場合(耐性率が現在のペースで増加した場合)、2050年には1000万人の死亡(現在のがんによる死亡者数を超える)、経済損失は累計100兆ドルが想定される²⁾。

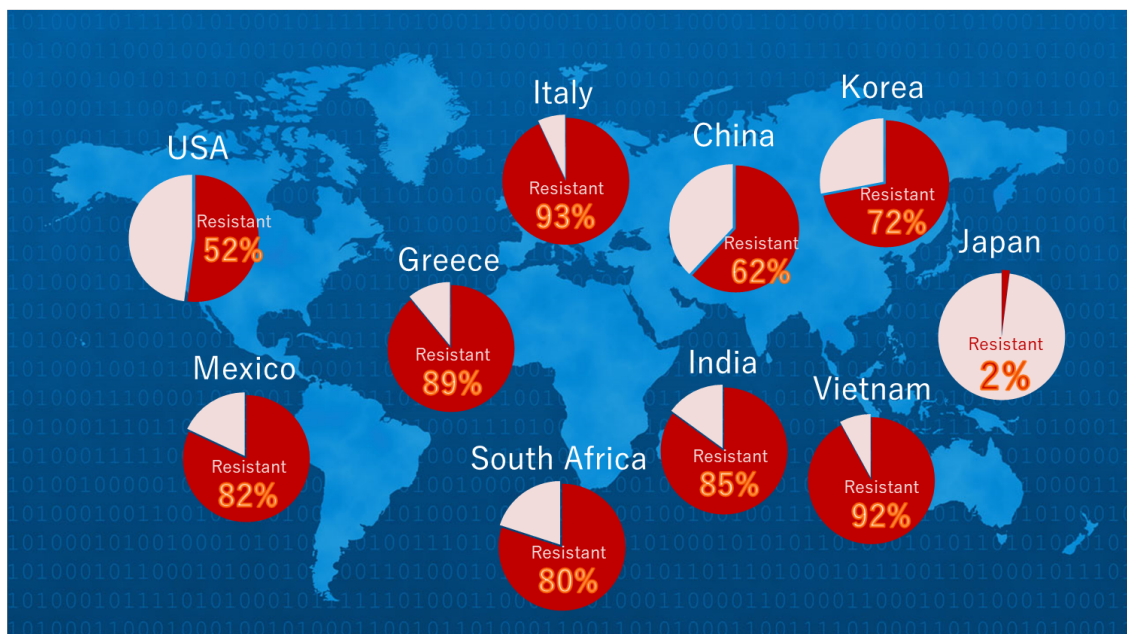
かつて良性と考えられていた感染症を治癒することも問題を生じることが多くなっている。たとえば、薬剤耐性のある淋病株の急速な発生と、医師が処方を選択するための迅速な診断検査がないということは、淋病の治療には「最後の選択」の抗菌薬を使用するしかないことを意味している²⁾。その抗菌薬が効かなくなると、もう治療の選択肢はなくなってしまう。他の感染症の場合、より良い選択肢がなくなった医師たちは、かつては副作用が原因で避けられていた抗菌薬を使用している。例えばコリスチンがこれに当てはまるが、コリスチンは腎不全を引き起こす可能性があるため、長年にわたって患者に投与されることはなかった。しかし過去 10 年にわたって、特に治療が難しいグラム陰性細菌感染症の患者に対する最後の手段として使用されるようになり⁹⁾、すでにコリスチン耐性が出現している。また経済への影響もすでに大きくなっている。米国だけでも、少なくとも第一選択の抗菌薬治療に耐性のある細菌によって年間 200 万件以上の感染症が引き起こされており¹⁰⁾、米国の医療システムには毎年 200 億ドルの過剰なコストがかかっている¹¹⁾。

・薬剤耐性菌と抗菌薬の歴史

薬剤耐性菌の発生は現代で始まったことではなく、400 万年前の洞窟からも見つかっている¹²⁾。第二次世界大戦後は抗菌薬発見の「黄金時代」を迎え、1940 年代後半から 1970 年代前半にかけて、続々と新製品が市場に登場した。それとともに薬剤耐性菌も劇的に増加したのである。しかし、抗菌薬の発見率は 1980 年代以降劇的に低下した。新しい抗菌薬、特に非常に懸念されている薬剤耐性グラム陰性感染症に対して有効な抗菌薬の発見がかつてよりも困難になっている²⁾。容易に単離できる天然の抗菌薬製品という「簡単にできる成果」はなくなり、1990 年代に初めて使用された初期のゲノムスクリーニング技術は、抗菌薬発見における革命という約束を果たせなかった¹³⁾。そして 2003 年から 2013 年の間に医薬品の研究開発に投資されたベンチャーキャピタル 380 億ドルのうち、抗菌薬の研究に投資されたのは薬剤耐性の問題が悪化しているにもかかわらずわずか 18 億ドルであった。¹⁴⁾ 今後各国政府は遅かれ早かれ AMR のコストを負担することになるだろう。政府は今すぐ行動を起こして積極的に行動し、より良い結果に向けてより少ない費用で済むか、あるいは準備ができていないままで、はるかにより悪い結果にもっと多くの税金をつぎ込むことになるかのどちらかである。SARS、豚インフルエンザ、エボラ出血熱などのパンデミックの脅威が生じると、各国政府は多くの場合、急いで世界規模の深刻な健康危機に対応しなければならないという使命感によって無思想的に巨額の資金を支出する。これに引き換え薬剤耐性の増加という世界的な脅威の展開は本質的に予測可能であり、それに対する効果的な先制対応を開始するためのコストは、それが真の公衆衛生上の緊急事態になった後に対応するコストよりも大幅に低くなる²⁾。抗菌薬の開発が捗っていない現状から WHO は新規抗菌薬が早急に必要細菌のリストを発表したが、そのリスト中最も優先度の高いものがカルバペネム耐性アシネトバクター・バウマニーであった¹⁵⁾。

・多剤耐性アシネトバクター・バウマニー

前述のように最も優先度の高いカルバペネム耐性アシネトバクターは日本ではまだ広まっていないが海外ではすでに問題になっていて死者も多い。アシネトバクターのカルバペネム耐性率は日本では2%に過ぎないが韓国では72%、中国では62%、イタリア93%、ベトナム92%、アメリカ52%、インド85%となっており日本だけ例外的に低いことがわかる。



朝野和典教授作製 AMED 申請時資料より抜粋

MRSA と同様、これから日本国内でも問題になることは想像に難くない。MRSA も当初は院内感染が発生した時点で大騒ぎになるものだったが、2011年5,924名2017年に4,224名の死亡者が確認されている。近年、MRSA の分離頻度の減少傾向が多く施設で認められているものの、耐性菌のなかでは最も分離頻度が高く薬剤耐性菌発症患者の94.71%と(公開情報2021年1月～12月年報 院内感染対策サーベランス 全入院患者部門)、感染対策上重視すべき病原体であることに変わりはない¹⁶⁾。多剤耐性アシネトバクターも数年後には国内で当たり前の耐性菌になっている可能性がある。感染防御機能が低下した患者などに、肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位や外傷部位の感染症、カテーテル関連血流感染症、敗血症など、多彩な感染症を起こす^{17,18)}。インフラが発達したことで、感染症が容易に国境を超えることは今回のCovid-19パンデミックで明らかとなった。世界的な視点からパンデミックおよび薬剤耐性に対する対策を講じる必要がある²⁾。

薬剤耐性のメカニズム¹⁸⁾には薬剤を分解したり化学的に修飾する酵素を作り出したり、それによって薬剤を不活性化することでその作用から逃れる「薬剤の分解や修飾」があり、細菌による耐性獲得ではもっとも普遍的に見られる。例えば、ペニシリン耐性大腸菌など、

β -ラクタマーゼを産生してペニシリンを分解することで薬剤耐性を示す。他には標的になる病原体側の分子を変異させ、その薬剤が効かないものにするすることで薬剤の作用から逃れる「薬剤作用点の変異」や、薬剤を細胞外に排出することで細胞内の薬物濃度を下げるグラム陰性菌の RND 型多剤排出ポンプ、細胞膜のポーリンの突然変異により薬剤の侵入を防ぐ機序などがある。

・現在の対策と問題点

対策としては一般人全体、医療、動物、農業等のすべての分野の関係者への啓発・教育やヒトや動物等への抗微生物薬の適正使用などが示されている。耐性菌の問題は個々の国の問題ではなく世界的な問題であること、正しい使い方を教育、啓発していくことは重要である²⁾。多剤耐性菌に対する切り札と言われるコリスチンですら耐性菌が発生した¹⁹⁾。新薬の開発も重要だが、抗菌薬以外の有効なアイテム、方法を導入することが現状を打破する最も効果的な方法であると考えられる。

3 消毒剤の有効活用

今後必要な対策として抗菌薬と消毒剤の使い分けが有効であると考えられる。抗菌剤は特異性が高いことから細菌が体内に存在するときに使用され、消毒剤は特異性が低いことから細菌が環境及び皮膚粘膜に存在するときに使用される²⁰⁾。抗菌薬はその特異性が高さゆえ生体に影響が少ないが耐性菌を生みやすく、消毒剤は特異性が低いため耐性菌を産みにくいが生体にも影響があるという特徴をよく理解して使い分けをするべきである。我が国では予防薬がないが、感染症対策においても今後必要になるのは安全かつ耐性菌を生まない感染予防としての消毒剤であると考えられる。我々はパンデミックや薬剤耐性菌に対応しうる消毒剤の開発に心血を注いできた。そして対象病原体に効果があるのはもちろんのこと、今までなかった「備蓄できる消毒剤」として MA-T の開発に成功した。私は MA-T は今後の感染症対策の中核を担いうる消毒剤であるとの認識より、MA-T の安全性、効果、その応用性などについて博士論文としてまとめた次第である。

第1章 MA-Tの安全性および有効性の評価

1.1 緒言

二酸化塩素ガスは、その殺菌効果と抗ウイルス効果が古くから知られている^{21,22)}。その作用機序は膜酸化^{23,24)}、タンパク質の不活化²⁵⁾、DNAにダメージを与える²⁶⁾ことである。ウイルスや細菌に対する効果があることから、上下水処理だけでなく、環境や食品の消毒、医療用途への応用も検討されている²⁷⁻³¹⁾。しかし、二酸化塩素ガスは毒性が強く、反応を担うラジカルは反応性が高い。米国労働安全衛生局 OSHA は1日8時間の暴露限界を0.1 ppmに設定している³²⁾。酸化剤、漂白剤、局所消毒剤、消毒剤など多くの分野で利用されているが、毒性があり取り扱いには注意が必要である。

MA-T は要時生成型亜塩素酸イオン水溶液と名付けられた亜塩素酸ナトリウムと有機触媒の水溶液である。通常状態ではほとんどが亜塩素酸イオンとして存在し、ラジカルはごくわずかに存在する。細菌やウイルスが存在した場合、下記平衡式は右へ傾き二酸化塩素を生成し対象物質を酸化して効果を示す³³⁾。対象物質が存在しなくなると平衡は左へ傾き速やかに反応が停止する。



その結果、MA-T は従来の塩素系消毒剤よりもはるかに安全で、抗病原体作用が強い消毒剤として期待されている。本研究では、MA-T が安全で効果的な消毒剤であるという仮説に基づいて、MA-T の安全性と有効性を検証した。製品の安全性は、動物および人体における安全性および毒性試験により検証した。有効性については、抗菌活性と抗ウイルス活性を評価した。

1.2 材料と方法

安全性試験

消毒剤は殺菌効果があることはもちろんのこと人体に対する安全性も担保されなければならない。MA-T の安全性を検証するために、GLP 基準に基づいた信頼性基準に従って安全性試験を実施した。単回経口投与毒性試験、眼刺激性試験、一次皮膚刺激性試験、持続皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験、および急性吸入毒性試験を含む試験は、下の表の通り実験動物で実施された。(ヒトパッチテストのみヒト) 動物実験は、医薬品安全性試験センター動物実験倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号; IACUCN17268-1、IACUCN14263、IACUCN16210)。

細菌及び真菌に対する殺菌力試験

専用の培地を必要とする細菌(*Tannerella forsythia*³⁴⁾、*Porphyromonas gingivalis*³⁵⁾ *Treponema denticola*³⁶⁾) は公表されている方法に従って嫌氣的培養を行った³⁴⁻³⁶⁾。

Corynebacterium mastitidis はミューラーヒントンII培地 (Becton Dickinson and Company, NJ, USA) に 5%の馬溶血血液を添加し、35°Cで 48 時間培養した。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は、5% CO₂ 雰囲気 で 0.5%酵母抽出物を含む BHI 培地(Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)で培養した。*Propionibacterium acnes* はBHI 培地で嫌氣的に培養した。他の細菌種は BHI 液体培地で好氣的に培養した。4 種類の真菌類を YPD (ペプトン 2%、酵母エキス 1%、D-グルコース 1%) で 30 °Cで培養した。最小発育阻止濃度(MIC)および最小殺菌濃度 (MBC)は、次の手順に従ってすべて独立して3回実験した。

- (1) 専用の液体培地で適切な細胞密度まで増殖させた菌液 50 μ L を、同液体培地で 190 倍に希釈して混合し、「菌液 A」とした。
- (2) マイクロプレートの 96 ウェルに専用培地、菌液 A、MA-T を加えた。
- (3) 37 °C (真菌の場合は 30 °C)で適切な時間培養した後、マイクロプレートリーダーで MIC を確認した。対照として溶液 A の代わりに無菌液体培地を使用した。
- (4)微生物が増殖している付近のウェルから 10 μ L を取り寒天培地に広げ、37 °C (真菌の場合は 30 °C)で培養し MBC を確認した。

SARS-CoV-2 不活化試験

本実験には、神奈川県立衛生研究所の SARS-CoV-1、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV)、および SARS-CoV-2 (Hu/DP/Kng/19-020) を使用した。VeroE6 細胞 (SARS-CoV-1 および MERS-CoV) および VeroE6-TMPRSS2 細胞 (SARS-CoV-2) を感染細胞として使用し、以下のように独立して 3 回行った。

- (1) 0 μ L のウイルス (TCID₅₀ = 1 x 10⁵) + 30 μ L の MA-T または PBS (コントロール) を混合して 1 分間インキュベートし、10 倍段階希釈液 50 μ L を VeroE6-TMPRSS2 細胞 (1 x 10⁴ cells/50 μ L/well、96 wells)に加えた。
- (2) 3 日後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、Reed-Muench 法により TCID₅₀ を算出した³⁸⁾。

A 型インフルエンザウイルスに対する不活化作用

インフルエンザウイルスは A 型 [Flu、PR8 株 (H1N1)] で、感染細胞は MDCK 細胞 (Madin-Darby 犬腎細胞) です。不活化試験は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科において、独立して 3 回実施された。

- (1) 試験溶液または溶媒をリン酸緩衝液 [PBS(-) free Mg²⁺ and Ca²⁺] で目的の濃度に希釈し、50 μ L の Flu A ストック溶液 (2 x 10⁸ TCID₅₀/mL)を 450 μ L に加えた。25°Cで 1 分間、室温でインキュベートした。
 - (2) インキュベーション終了後、1%ウシ血清アルブミンを含む PBS(-)450 μ L に各混合液 50 μ L を加え、102~105 倍希釈液を調製した(4°C)。
- MDCK 細胞は、10%ウシ胎児血清および抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地

(DMEM)の24ウェルのマイクロプレートで37℃、5% CO₂の存在下で単層培養した。無血清 DMEM で1回洗浄した後、0.1%BSA および 25 µg/mL トリプシンを添加した DMEM(1mL)に MDCK 細胞を添加した。次に、100 µL のウイルス希釈液を加え、細胞を37℃で4日間インキュベートした。

(3) 培養後、細胞を2.5%クリスタルバイオレット溶液で染色し、PBS(-)で3回洗浄して脱色し、UV滅菌下で乾燥させた。

(4) TCID₅₀/mL は Reed-Muench 法により求めた。

ネコカリシウイルスに対する不活化作用

(1) ウイルス溶液の調製

- i .FCV をネコ腎臓由来細胞株 (CRFK 細胞) に接種した。
- ii .37℃で1時間吸着させた後、接種したウイルス溶液を除去し滅菌 PBS で2回洗浄した。
- iii .無血清イーグル MEM 培地を添加し、37℃、5%CO₂ 下で培養した。
- iv .約70~80%の細胞変性効果 (CPE) が観察されたとき (接種後3日)、培養上清を回収した。
- v .回収した培養上清を3000 rpm で30分間遠心分離し、遠心上清を分注し、ウイルス液として-70℃以下で保存した。

(2) 細胞毒性の確認

- i .各 MA-T 溶液は、抗生物質を含む PBS で10倍ずつ段階希釈した。
- ii . CRFK 細胞に、10倍に連続希釈した各試験サンプルを接種した。
- iii .接種5日後、CPEの有無により CRFK 細胞に対する毒性を確認した。

(3) FCV に対する有効性試験

- i .10 mL の MA-T 溶液を試験管に入れ、1/10 量のウイルス溶液を接種した。
- ii .25℃で60分間インキュベートした後、回収して試験溶液として使用した。
- iii .採取した試験溶液を、抗生物質を含む PBS で10倍に段階希釈した。
- iv .CRFK 細胞に10倍段階希釈試験溶液を接種した。
- v .接種後5日目にCPEの有無によるウイルス力価を測定した。

その他のウイルスに対する不活化作用

ウイルス(ロタウイルス A(RV-A)、C型肝炎ウイルス(HCV)、デングウイルス(DENV)、B型肝炎ウイルス(HBV))に対する不活化実験は、大阪大学微生物病研究所で3回独立して実施された。PBSに溶解した血清または精製病原体サンプルを含むウイルス培養上清をMA-T試験サンプルと60秒間反応させ、DMEM培地で希釈し、感受性細胞に接種して残留ウイルス力価を測定した。

1日目

各細胞を1 x 10⁵/mLで調製し、96ウェルプレートにそれぞれ100 µLで播種した。

2 日目

- (1) 細胞培地を 2%FBS DMEM (50 μ L) に交換した。
- (2) ウイルスは $1 \times 10^5/30 \mu\text{L}$ に調整した。
- (3) 30 μ L の試験サンプル(100 ppm の場合は 200 ppm で調整)を採取した。
- (4) (2)と(3)を混合し、60 秒間反応させた。
- (5) 無血清 DMEM を 240 μ L 加えた(合計 300 μ L、5 倍希釈)。混合液を使用して、希釈カラムを調製し、5 日目に細胞を接種した。感染後 4 日目にウイルス力価を測定した。

1.3 結果

安全性試験の結果を表 1 に示す。ラットに対する単回経口投与毒性は 1000 ppm の MA-T を 1000 mg/kg 投与したが、毒性は確認されず LD₅₀ も 1000 mg/kg 以上であった。その他の動物安全性試験においても MA-T 100ppm は毒性がないことが確認されている。眼刺激性試験では後日の試験で 500 ppm でも無刺激性であることが確認されている。500 ppm の急性吸入毒性試験、1000 ppm の一次性皮膚刺激性試験においても毒性のないことが確認されている。100 ppm の染色体異常試験、復帰突然変異試験、ヒトパッチ試験においても毒性のないことが確認された。金属腐食については 500 ppm 濃度で水道水と同等レベルであった。

各種細菌に対する殺菌効果を表 2 に示す。実験は各細菌または真菌に対して独立して 3 回繰り返され、MIC および MBC 値は 3 回の試験すべてで同じであった。MA-T は、多くの細菌と真菌に対して 50 ppm 未満の MIC と MBC を示しました。*Bacillus subtilis* の MIC は 12.5 ppm だったが、MBC は検出できなかった。*Propionibacterium acnes*、*E. coli*O157:H7、*Fusarium oxysporum* の MBC は、次の理由で測定しなかった。*Propionibacterium acnes* は MIC の値が非常に低く、現時点で MBC を測定する理由はないと判断し、省略した。大腸菌 O157:H7 は病原性が高いこと、MBC の値が非病原性大腸菌から推測できるため、MIC のみを測定することとした。*Fusarium oxysporum* は植物病原体であり、MIC は予想よりも充分低かったため、MBC 測定を省略した。

SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス試験の結果を表 3 に示す。試験は独立して 3 回実施し、代表値から TCID₅₀ を示した。SARS-CoV-2 は、50 ppm 以上の濃度の MA-T で 1 分間処理することにより、99.98%の抑制効果を示した。

その他のウイルスに対する抗ウイルス試験の結果

IAV、SARS-CoV-1、MERS-CoV、HCV、および DENV に対しては、100 ppm MA-T で 1 分間処理すると 98%以上の不活化効果を示した。HBV に対しては、同じ処理で 74.5%の抑制効果を示した。RV-A に対する不活化効果は、100 ppm MA-T の 1 分間処理で 33.3%、200 ppm の 1 分間処理で 88.9%であった。すべてのテストは独立して 3 回実行され、データは代表的なテストから示された。

表1 MA-Tの安全性試験各種

試験名	試験機関	MA-T濃度	結果	ガイドライン
ラットを用いる単回経口投与毒性試験	株)薬物安全試験センター	1000 ppm	毒性なし	「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2017」
ウサギにおける眼刺激性試験	食品分析センター	100 ppm	刺激性なし	「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2017」および「化粧品の安全性評価に関する指針 2015」
ウサギにおける皮膚一次刺激性試験	株)薬物安全試験センター	10000 ppm	P.I.I4.1 中程度刺激物	「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2011-12」および「化粧品の安全性評価に関する指針 2015」
ウサギにおける皮膚一次刺激性試験	株)薬物安全試験センター	1000 ppm	無刺激物	「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2011-12」および「化粧品の安全性評価に関する指針 2015」
モルモットにおける連続皮膚刺激性試験	株)生活科学研究所	100 ppm	無刺激	化粧品・医薬部外品の製造販売ガイドブック 2008
モルモットにおける皮膚感作性試験	株)生活科学研究所	100 ppm	皮膚感作性 なし	化粧品・医薬部外品の製造販売ガイドブック 2008
マウスにおける急性吸入毒性試験(全身暴露)	株)薬物安全試験センター	500 ppm	毒性無し	山下法*
マウスにおける急性吸入毒性試験(全身暴露)	株)薬物安全試験センター	100 ppm	毒性無し	山下法*
マウスにおける急性吸入毒性試験(全身暴露)	株)薬物安全試験センター	50 ppm	毒性無し	山下法*
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	株)バイオリサーチセンター	100 ppm	異常誘発性 なし	「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドライン」
細菌を用いる復帰突然変異試験	株)生活科学研究所	100 ppm	陰性	化粧品・医薬部外品の製造販売ガイドブック 2008
24時間閉塞ヒトパッチテスト	株)生活科学研究所	100 ppm	安全品	化粧品の安全性評価に関する指針 2015(日本化粧品工業連合会): 48-49, 2015.
金属を用いた腐食性試験	株)エースネット	500 ppm	水道水と同等	自社基準

* Yamashita M, and Tanaka J. Pulmonary Collapse and Pneumonia Due to Inhalation of a Waterproofing Aerosol in Female CD-1 Mice. *J Toxicol Clin Toxicol.* 33(6):631-7 (1995)

表2 MA-T の細菌及び真菌に対する殺菌効果

菌名	グラム+/-、strain	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i> (vegetative)	Gram +, RIMD0206023	2.5	ND
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative)	Gram +, NDU157	12.5	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram +, RIMD3116001	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +, NDU101	1.56	3.12
<i>Streptococcus mutans</i>	Gram +, M78148 ^{a)}	2.5	15
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram +, β 25 ^{a)}	0.1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram -, NBRC110489	20	20
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Gram -, ATCC29522	35	35
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gram -, RIMD366048	10	10
<i>Corynebacterium bovis</i>	Gram -, RIMD366048	3.12	25
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	Gram -, JCM12269	6.25	25
<i>Escherichia coli</i>	Gram -, MV1184 ^{a)}	10	25
<i>E. coli</i> O157:H7	Gram -, NDU119 ^{a)}	15	NT
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gram -, RIMD0806018	3.5	5
<i>Pasteurella multocida</i>	Gram -, RIMD1657003	3.75	3.75
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gram -, W83 ^{a)}	20	20
<i>Propionibacterium acnes</i>	Gram -, NDU2563 ^{a)}	0.1	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -, NDU315 ^{a)}	20	20
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Gram -, RIMD1933001	2	2
<i>Serratia marcescens</i>	Gram -, RIMD1996001	35	45
<i>Tannerella forsythia</i>	Gram -, NDU2001 ^{a)}	12.5	12.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gram -, RIMD2210001	15	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gram -, RIMD2501001	15	15
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Gram -, RIMD2503010	20	25
<i>Treponema denticola</i>	spirochaeta, NDU1001 ^{a)}	25	25
<i>Candida albicans</i>	fungus (eukaryotic), TIMM5588	5	5
<i>Fusarium oxysporum</i>	fungus (eukaryotic), NBRC9469	2	NT
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	fungus (eukaryotic), NBRC30939	5	10
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	fungus (eukaryotic), NDU1993 ^{a)}	10	10

a): 日本歯科大学微生物学講座, laboratory stock NBRC: National Institute of Technology and Evaluation

ATCC: American Type Culture Collection RIMD: 大阪大学微生物病研究所

TIMM: Teikyo University, Institute of Medical Mycology JCM: Japan Collection of Microorganisms

ND: not determined NT: not tested

表3 MA-T の SARS ウイルスに対する不活化効果

濃度	作用時間	logTCID ₅₀ /50 μL	TCID ₅₀ /mL	不活化率
PBS のみ	1 分	4.25	355656	0.00
70%エタノール	1 分	0.5	63	99.98
MA-T50ppm	1 分	0.5	63	99.98
MA-T100ppm	1 分	0.5	63	99.98
MA-T150ppm	1 分	0.5	63	99.98
MA-T200ppm	1 分	0.5	63	99.98

表4 その他のウイルスに対する不活化効果

ウイルス名	MA-T 濃度 (ppm)	作用時間	不活化率 (%)
インフルエンザ A 型	100	1 分	99.99
ネコカリシ	50	60 分	95.30
SARS	100	1 分	98.22
MERS	100	1 分	99.82
ロタ A	200	1 分	88.9
ロタ A	100	1 分	33.3
C 型肝炎	100	1 分	99.96
デング	100	1 分	98.70
B 型肝炎	100	1 分	74.5

1.4 考察

SARS-CoV-2 のパンデミックにより、手指消毒剤の不足³⁸⁾や消毒剤の誤用^{39,40)}など、世界中で様々な問題が生じているが、エタノールは速効性であり⁴¹⁾、手指消毒剤としても使用できる⁴²⁾が揮発により十分な消毒効果が得られない場合や引火性に注意が必要である。塩素系消毒剤には、金属腐食、粘膜刺激、皮膚刺激などの毒性があり^{43,44)}、適用および使用には細心の注意が必要である。ポビドンヨードはエタノールに比べて細菌との長時間の接触が必要であり⁴⁵⁾、長時間の使用により化学火傷を引き起こす可能性がある⁴⁶⁾。その化学的性質により、従来の消毒剤は誤って使用すると重大な損傷を引き起こす可能性がある。このような状況下、安全で効果的な消毒剤の開発が急務となっており、私達は有機触媒技術により水性ラジカルの発生を制御できる「MA-T」に着目したのである。

動物を用いた経口投与、皮膚一次刺激性、眼刺激性、吸入毒性、染色体異常、復帰突然変異、金属腐食性などさまざまな安全性試験の結果、MA-T は 100 ppm 以下であれば安全に使用できることが証明された。さらに、濃度 1000 ppm における LD₅₀ は 1000 mg/kg 以上というラットを用いた単回経口投与毒性試験の結果、ウサギを用いた皮膚一次刺激性試

験、および 500 ppm でのマウスを用いた急性吸入毒性試験の結果に基づいて、MA-T は、500 ppm や 1000 ppm などの高濃度でも安全性が高いことが示唆された。また MA-T は暴露経路に関係なく安全性の高い薬剤であると推測できる。

我々の研究では、さまざまな細菌に対する MA-T の有効性が、さまざまな細菌の MIC と MBC から示された。口腔疾患の原因となる *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* に対する MA-T の MIC と MBC は 50 ppm 未満であった。芽胞形成細菌である枯草菌の MIC は 12.5 ppm であったが、MBC は測定できなかった。これは細菌の芽胞が消毒剤に対して強い耐性を示すためであり、従来の塩素系消毒剤と同様に芽胞に対する効果を期待するには高濃度の MA-T が必要であると推測される⁴⁷⁻⁴⁹⁾。しかし、芽胞も形成するセレウス菌の場合、MIC と MBC は 2.5 ppm と低かった。この試験で使用された *Bacillus cereus* は、栄養細胞、すなわち芽胞形成前細菌であったと推定される。実験上の理由により、*Propionibacterium acnes*、大腸菌 O157:H7、および *Fusarium oxysporum* については MBC が測定されませんでした。しかし、大腸菌 O157:H7 に対する殺菌効果は、大腸菌に対する殺菌効果から推定することができ、*Propionibacterium acnes* および *Fusarium oxysporum* に対する効果は、それらの MIC 濃度が低いことから推測できる。MA-T は 50 ppm という低濃度で、地域の常在菌だけでなく、食中毒、術後感染、院内感染、多剤耐性獲得などを引き起こす可能性のあるさまざまな病原体に対して効果を発揮した。したがって、MA-T は多くの病原体に対して効果があると推測される。また、今回の細菌培養に用いた BHI 液体培地には有機物が多く含まれていたため、MA-T の殺菌効果は有機物の影響を受けにくいと考えられる。次亜塩素酸の MIC および MBC は、デービス最少培地⁵⁰⁾を用いて大腸菌の貧培地で 10 ppm 程度であるのに対し BHI 培地では 600 ppm 程度であることを確認している (パーソナルコミュニケーション)。

MA-T は、SARS-CoV-2、IAV、SARS-CoV-1、MERS-CoV、RV-A、HCV、DENV、HBV の各ウイルスに対する抗ウイルス活性が確認されており、高い効果が得られた。特に、SARS-CoV-2、IAV、SARS-CoV-1、MERS-CoV、C 型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスに顕著です。一方、ネコカリシウイルスはカリシウイルス科に属するノンエンベロープウイルスであるため、効果が低いと考えて反応時間を 60 分に設定したところ、95.30%減少との結果が得られた。これらの結果は、MA-T がエンベロープを持ったウイルスに対して高い活性を示し、ロタウイルスのようなエンベロープを持たないウイルスに対してはわずかに高い濃度の MA-T を必要とすることを示唆している。現在世界的な脅威となっている SARS-CoV-2 に対して MA-T は高い有効性を示し、この抗ウイルス効果は 70%エタノールで 1 分間処理した結果とほぼ同等であった⁵¹⁾。

消毒剤や殺菌剤にはアルデヒド、塩素、アルコール、第四級アンモニウムなど多くの種類があるが、MA-T はその中でも塩素系消毒剤に分類される。塩素系薬剤は有機物の存在下では殺菌力が低下するが⁵²⁻⁵⁴⁾、MA-T は有機物の存在下でも低濃度で十分な殺菌効果と広い

抗菌・抗ウイルススペクトルを示した。その抗菌および抗ウイルススペクトルは他の塩素剤に匹敵すると考えられている^{55,56)}。さらに、MA-T は SARS-CoV-2、MERS-CoV、SARS-CoV、IAV、および DENV に対して高い有効性を示した。したがって、MA-T は、SARS-CoV-2 を含む世界中で流行している感染症に対する有望な消毒剤となる可能性がある。MA-T では従来の塩素剤の金属腐食、粘膜刺激、皮膚刺激などの毒性は検出できなかった^{43,44)}。これらの結果は、MA-T が SARS-CoV-2 を含む多くの病原体に対して効果的かつ安全に使用できることを示唆している。また、MA-T は水溶液中で安定であり、亜塩素酸水、酸性亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸のように自然分解せず⁵⁷⁾、pH = 7.5 でほぼ中性である。また、エタノールのように発火や揮発することがなく⁴²⁾、開封後も汚染がない限り保存・使用できるため利便性が高い。このように、MA-T は極めて安全性、有効性、利便性の高い消毒剤であり、医療分野をはじめ様々な場面での応用が期待されている。

我々の研究には以下のような制約がある。1 つ目は芽胞形成細菌に対する影響である。MA-T は従来の塩素系消毒剤と同様にラジカル反応の作用により殺菌効果を発揮するが、現在市販されている製品 (A2Care[®] : 100 ppm MA-T、BACT-O[®] : 150 ppm MA-T) では安全性に重きを置いている。これらはエンベロープウイルスおよび芽胞を形成しない細菌に対しては高い効果を発揮するが、芽胞を形成する細菌に対しては効果が低いと推定されている。したがって、クロストリジウム属やバチルス属などの病原菌が懸念される状況での使用は避けるべきである。加えて MA-T は他の消毒剤と同様に病原菌にさらされることで殺菌効果を発揮する^{41,58)}ため、噴霧、拭き取り、浸漬などの使用方法と曝露時間を適切に保つ必要がある。この研究では 1 分未満のデータはないが、MA-T は揮発しないため、エタノールほど問題にならない。2 つ目の制約は、平衡定数を高めるために触媒を変更するか、生成された二酸化塩素ラジカルをさらに活性化する方法を開発することによってすでに克服されている(未発表データ)。今後、MA-T をさまざまな用途に利用できるような条件を整備する必要がある。3 つ目に、MA-T は pKa = 1.9 を有し強酸性下では二酸化塩素を生成する。しかし日常生活においてこのような高酸性状態になることは稀であり、想定される事態は空腹時の誤飲時のみである。

MA-T が安全で効果的な消毒剤であるという仮説は証明された。MA-T は従来の塩素系消毒剤の弱点を克服し、高い安全性と高い抗病原菌活性を兼ね備えた次世代の塩素系消毒剤です。MA-T は消毒剤として塩素剤やエタノールが使用されているさまざまな分野において、より安全で効果的、かつ利便性の高い消毒剤としての応用が期待される。MA-T はその性質上他の消毒剤が適用できなかった分野でも重要な役割を果たすことが期待される。さらに、MA-T はエタノールと同等の SARS-CoV-2 予防効果があるが揮発しにくい消毒剤として、SARS-CoV-2 の予防に重要な役割を果たすことが期待されている。

一般の人老人でも子供でも安心して使えるよう安全性を重視した濃度 50 ~ 100 ppm の製品では芽胞に効果はないが、医療現場などで使うため芽胞殺菌できる MA-T もすでに開発済みである。

MA-T の保存安定性は消毒剤の中では非常に優れており、10 年間室温保存した製品(100 ppm)について毎年殺菌力評価を行っているが、現在も殺菌力を維持している。100 ppm 製品の 400 倍濃度の原液を水道水で 100 ppm に希釈したサンプルについて 40°C で加速試験を行った結果、100 日経過しても濃度、殺菌力ともに維持していることが確認されている。これらのことから MA-T は長期間の備蓄に耐え、精製水が入手困難なシビアな地域でも活用しやすい消毒剤であると考えられる。

第 2 章 MA-T の殺菌作用機序解析

2.1 緒言

公衆衛生上、感染症の蔓延を阻止することは、過去数十年にわたって重要度が増している。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来疾患、薬剤耐性結核、コレラ菌によるコレラ、大腸菌による出血性大腸炎、2019 年コロナウイルス感染症（新型コロナウイルス）など、新興・再興感染症の多くの例が出現している^{59,60}。人体に悪影響を与えることなく微生物を不活化できる効果的な消毒剤が明らかに必要とされている。第 1 章を見る限り安全性と有効性が両立したまさに望まれていた消毒剤である MA-T だが、MA-T の作用メカニズムなどはまだ解明されていなかった。他の外用として使用可能と思われる消毒剤についても作用メカニズムは完全に解明されてはおらず、曖昧さが残っているままであるが分っている範囲での作用メカニズムを示す。エタノールは容易に細菌類の生体膜を透過して細胞膜やタンパク質を変性させるとともに、蒸発する際に細菌類の水分を奪うことで殺菌力を発揮する。致死量に達する次亜塩素酸は ATP 産生の減少を引き起こすと考えられている。4 級アンモニウム塩は膜のリン脂質およびタンパク質に不可逆的に結合するため、透過性が損なわれることで殺菌力を発揮すると考えられている。過酸化水素は微生物のタンパク質や脂質を酸化および変性させ、膜の破壊を引き起こすと考えられている。ヨウ素は微生物の呼吸鎖を阻害する。また細胞質膜のタンパク質に優先的に作用する⁶¹。MA-T は二酸化塩素を生成する消毒剤である。食品産業で一般的に使用される消毒剤や漂白剤である二酸化塩素と塩素は強力な塩素化剤であり、強力な酸化活性を持つ試薬である二酸化塩素は最も効率的な消毒剤の 1 つである⁶²。塩素の代わりに前酸化剤を使用すると、塩素化後のトリハロメタンの生成を最小限に抑える効果があることが知られている^{63,64}。二酸化塩素の溶解度は塩素の 5 倍であり、酸化活性は約 3 倍である。ClO₂ ラジカルは強力な 1 電子酸化剤であり、936 mV の酸化還元電位を持ち⁶⁵、無機種と有機種の両方を酸化する能力で知られている^{65,66}。塩素 二酸化塩素は、抗菌性と抗ウイルス性でも知られている⁶⁶。二酸化塩素は、酵素やタンパク質の変性を引き起こす可能性があり⁶⁷、タンパク質の同化経路を破壊し、細菌やウイルス、真菌類などの微生物の増殖を阻害する。

市販の消毒剤である MA-T (α または γ 、A2-care, Co., Ltd. 東京) は、安定で穏やかな ClO₂ 生成試薬である。MA-T には、亜塩素酸ナトリウムが含まれており、ClO₂ の生成を触媒するルイス酸として機能する 2 種類のカチオン性界面活性剤のうちの 1 つと組み合わせて含まれている。(両方のルイス酸性度は (α : LUMO (最低空分子軌道) = -4.12 eV) および (γ : LUMO = -4.02)、参考文献⁶⁸ の未発表の観察結果に従って測定)、溶液を中性 pH に安定化させる緩衝液中で測定。特に、MA-T では保管中または使用前に ClO₂ が検出されない。MA-T はこの消毒剤の標的である生菌により ClO₂ の生成を誘導され殺菌力が発揮される。この論文では、今まで解明されていなかった MA-T の標的の 1 つが細菌の呼吸鎖であることを示すデータを報告する。

2.2 材料と方法

細菌の増殖条件

大腸菌 (W3110、K-12 株由来) を BHI (Bacto Brain Heart Infusion; Beckton, Dickinson and Company, MD, USA) 液体培地で 37 °C で振盪培養した。黄色ブドウ球菌 (NDU-112、実験用ストック、臨床株由来) および *A. actinomycetemcomitans* (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション株 ATCC29522、東京のサミット・ファーマシューティカル・インターナショナルから購入) を 5%CO₂ 雰囲気での BHI 液体培地中で 37 °C で培養した。細菌に存在する主要なキノンドヒドロゲナーゼ、キノールオキシダーゼがこの 3 種の細菌で網羅される。細菌を対数期中期まで増殖させたのち MA-T 溶液と混合し、25 °C で 30 分間静置培養した。MA-T 処理後、処理した培養物をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で段階希釈し、希釈物したものを BHI 寒天培地に広げ、37 °C で一晩培養し CFU/mL の数を計測した。(必要に応じて CO₂ の存在下または非存在下で)、プレートあたりのコロニー数を数える。

膜小胞の調製

MA-T α または MA-T γ で処理した細菌を遠心分離機により沈殿させ、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄して再び遠心分離機により沈殿させ、その後新鮮な 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に再懸濁した。得られた懸濁液を氷浴中で冷却しながら Violamo Sonicator 85 (アズワン、大阪) を用いて超音波処理した。超音波処理したライセートを 20,000 \times g で 20 分間遠心分離し、得られた上清を 100,000 \times g で 1 時間遠心分離した。沈殿物を 100,000 \times g で 1 時間遠心分離し、10 mM Tris-HCl (pH7.5) で 2 回洗浄したのち新しい緩衝液に懸濁した。上記すべてのステップは 4 °C で実行された。得られた膜小胞懸濁液を呼吸鎖関連酵素の活性について測定した。

オキシダーゼ活性のアッセイ

ユビキノール-1:O₂ オキシドリダクターゼ (Q₁H₂ オキシダーゼ) 活性は、前述のとおり分光光度法で測定した⁶⁹⁾。NADH:O₂ オキシドリダクターゼ (NADH オキシダーゼ) の活性は、Clark 型酸素電極 (ランク・ブラザーズ、ケンブリッジ、英国) を使用する kasahara と anraku の方法⁷⁰⁾ に従って測定した。

NADH デヒドロゲナーゼ活性の測定

NADH: フェリシアニド酸化還元酵素 (NADH-フェリシアニドデヒドロゲナーゼ) および NADH: ユビキノール-1 酸化還元酵素 (NADH-Q₁ デヒドロゲナーゼ) の活性をそれぞれ Dancey ら⁷¹⁾ および Hatefi⁷²⁾ の方法により測定した。

統計分析

すべてのアッセイは、n = 6 で実行した。特に指定のない限り、値は平均 \pm 標準偏差 (SD)

として表示された。統計的差異は、対応のない両側ステューデントの t 検定によって決定された。MA-T 処理値を未処理対照の値と比較した。p ≤ 0.05 は有意であるとみなされ、*と**はそれぞれ p ≤ 0.05 と p ≤ 0.01 を示す。すべてのデータは StatMate(アトムス株式会社、東京)を使用して処理された。

2.3 結果と考察

細菌ゲノムデータベースに基づいて、3 つの細菌種間(大腸菌、黄色ブドウ球菌、および *A. actinomycetemcomitans*)の NADH キノンデヒドロゲナーゼとキノールオキシダーゼの分布を表 1 に示す。これら 3 種は真核生物のミトコンドリアのシトクロム *bcl*(複合体 III) およびシトクロム C オキシダーゼ(複合体 IV)と同様の酵素の遺伝子が存在しないと推定される。表 2 に示すように 25 °Cにおいて 40 ppm MA-T で 30 分間処理した後、大腸菌の CFU/mL は 1000 分の 1 以下に減少した。20 ppm MA-T α または MA-T γ による処理で細胞密度は初期値の 2.78×10^8 CFU/mL からそれぞれ 2.60×10^7 (9.35%)および 4.2×10^6 (1.5%) CFU/mL に減少した。NADH オキシダーゼ活性は、129 nmoles O₂/min/mg protein から 13.0 (MA-T α 、10.1%)または 2.63 (MA-T γ 、2.0%) nmoles O₂/min/mg protein に低下した(表 3)。NADH-Q₁ デヒドロゲナーゼ活性は(1.66 μ mol/分/mg、未処理)から 0.194 (MA-T α 、11.7%)または 0.073(MA-T γ 、4.4%) μ mol/min/mg に減少した。一方、NADH-フェリシアニドオキシダーゼ活性は、MA-T 処理による大きく変化は確認されなかった。MA-T 処理後、Q₁H₂ オキシダーゼ活性は 10.2 μ mol/min/mg から 4.11(MA-T α 、40.3%)または 3.64(MA-T γ 、35.7%) μ mol/min/mg に変化した。しかし、MA-T 処理時間を延長すると Q₁H₂ オキシダーゼ活性はさらに減少し、ほぼゼロになった。さらに MA-T で処理していない大腸菌から調製した膜小胞の NADH オキシダーゼ活性は MA-T 処理によって顕著な影響を受けなかった。このことは MA-T が生きている細菌における膜電位の生成を攻撃する可能性があることを示唆している。

大腸菌の好気性呼吸鎖は NADH デヒドロゲナーゼ I (NDH-1、複合体 I、または I 型 NADH:ユビキノノキシドリダクターゼ)と NADH デヒドロゲナーゼ II (NDH-2、または II 型 NADH:ユビキノノキシドリダクターゼ)を電子の入力側に属し、2 つのユビキノノキシダーゼ (*bd* 型および *bo* 型)のいずれかを有する。⁷³⁾大腸菌 NDH-1 は、酸化還元エネルギーを利用して膜を介してプロトンを送り出す。また 13 個のサブユニットで構成されており、すべて *nuo* オペロンによってコードされている。⁷⁴⁻⁷⁷⁾

複合体 I については、NADH デヒドロゲナーゼモジュールが NADH 酸化部位と人工電子受容体(フェリシアニドなど)還元部位を持ち、3 つのサブユニット、FMN、および 6 つの [Fe/S] クラスターで構成されるモジュール構造が示唆されている。ヒドロゲナーゼモジュールにはユビキノノ還元部位があり、6 つのサブユニットと 3 つの [Fe/S] クラスターで構成されている。トランスポーターモジュールは膜内に 4 つのプロトン輸送部位を持ち、3 つのサブユニットで構成されている。NADH デヒドロゲナーゼモジュールと同じサブユニットお

よび補因子からなる NADH デヒドロゲナーゼフラグメントは、大腸菌複合体 I を界面活性剤 Triton X-100 で分離することによって生化学的に得られる⁷⁸⁾。この可溶性モジュールは NADH フェリシアニドデヒドロゲナーゼ活性を持っている。特に MA-T によって標的とされる NDH-1 内の部位はヒドロゲナーゼモジュール内に含まれる。大腸菌の呼吸鎖では、別のデヒドロゲナーゼである NDH-2(またはロテノン非感受性 NADH デヒドロゲナーゼ)が知られており、補欠分子族として FAD を含む単一のポリペプチドで構成されている。NDH-2 は NADH からユビキノンへの電子の移動を触媒するが、複合体 I とは異なり、反応をプロトン移動に結びつけない⁷⁹⁾。我々の結果は、NDH-2 も MA-T の標的であることを示している。NDH-2 はモジュール構造を持たず、MA-T の標的領域は FAD 部位ではなくユビキノン結合部位に近い可能性がある。好気条件下では NDH-2 が呼吸鎖への電子の主要な入力酵素であるが、嫌気生育条件下では NDH-1 が優先的な NADH デヒドロゲナーゼである^{80,81)}。言い換えれば、NADH デヒドロゲナーゼ、特に NDH-1 は嫌気性電子伝達系に使用され、したがって MA-T は嫌气的条件下での細菌の増殖を阻害すると考えられる。

シトクロム *bo3* オキシダーゼは、キノールから電子を受け取り酸素分子に伝達するキノールオキシダーゼである。この酵素にはヘム-Cu 補因子が含まれており、酸素が高濃度で存在する場合に不可欠である。シトクロム *bo3* オキシダーゼは、4 つのサブユニットを含むタンパク質複合体である⁸²⁾。低酸素分圧好気条件下では、酸素高親和性シトクロム *bd* オキシダーゼが優先的な末端リダクターゼである。構成成分は *cydAB* にコードされ、結果として生じるタンパク質はヘテロ二量体を形成する⁸³⁻⁸⁵⁾。大腸菌には 3 番目の末端オキシダーゼが存在する。*cyxAB* 遺伝子によってコードされるこの酵素は *bd* 型オキシダーゼ (*bd*-II) だが、その機能はまだ明らかになっていない^{86,87)}。我々の結果は、シトクロム *bo3* と *bd* の両方が MA-T 処理によって障害されることを示した。

表 2 に示すように、気温 25°C の下 20ppmMA-T で 30 分間処理した後、黄色ブドウ球菌の CFU/mL は 1/1000 より減少した。15ppmMA-T α または MA-T γ で処理すると、密度が初期値の 5.16×10^8 CFU/mL からそれぞれ 2.28×10^7 (4.4%)、 8.97×10^7 (17.4%) CFU/mL に減少した。MA-T 処理により、酸素消費活性(NADH オキシダーゼ活性)が初期値 316 nmoles O₂/min/mg protein から 7.26(MA-T α 、2.3%)または 29.5 (MA-T γ 、9.3%) nmoles O₂/min/mg protein に減少した。(表 3)NADH-フェリシアニドリダクターゼ活性は 5.11(μ mol/min/mg : 未処理)から 0.382(MA-T α 、7.5%)または 1.97(MA-T γ 、38.6%) μ mol/min/mg に減少した。NDH-2 は、黄色ブドウ球菌に存在する NADH-フェリシアニドデヒドロゲナーゼ活性を持つ唯一の酵素である。NDH-2 は補欠分子族として FAD を、基質として NADH を使う⁸⁸⁾。この酵素は NADH:人工電子受容体 (フェリシアニドやメナジオンなど) オキシドリダクターゼ活性が高くなるが、制限段階が FAD からユビキノンへの電子移動であるため、NADH-ユビキノンデヒドロゲナーゼ活性ははるかに低くなる⁹⁰⁾。したがって、NADH デヒドロゲナーゼ活性の電子受容体としてフェリシアニドのみをテストした。MA-T 処理後、Q₁H₂ オキシダーゼ活性は 1.74 μ mol/min/mg から 0.240(MA-T α 、

13.8%)または0.684(MA-T γ 、39.3%) $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ に変化した。インキュベーション時間を延長すると、 Q_1H_2 オキシダーゼ活性はほぼゼロに低下した。黄色ブドウ球菌の呼吸鎖では、末端電子受容体酸素の還元は2つの末端キノールオキシダーゼによって行われる。通常好気条件下で機能するプロトン移動オキシダーゼであるシトクロム *aa3* オキシダーゼと^{89,90)}微好気条件下で発現しプロトンを移動させないシトクロム *bd* オキシダーゼ^{90,91)}である。

表2に示すように、*A. actinomycetemcomitans* のCFU/mLは、25 °Cにおいて30 ppm MA-Tで30分間の処理後に1000分の1以下に減少した。20 ppm MA-T α またはMA-T γ で処理すると、細胞密度が初期値 1.37×10^8 CFU/mL からそれぞれ 1.43×10^7 (10.4%) または 1.30×10^7 (9.5%) CFU/mL に減少した。NADH オキシダーゼ活性は、110 nmoles $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protein から11.5(MA-T α 、10.5%) または17.1(MA-T γ 、15.5%) nmoles $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protein (表3)。ただし、NADH- Q_1 はデヒドロゲナーゼ活性とNADH-フェリシアニドデヒドロゲナーゼ活性はMA-T処理によって有意な変化は確認されなかった。MA-T処理後、 Q_1H_2 オキシダーゼ活性は $7.66 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ から0.418(MA-T α 、5.5%) または0.591(MA-T γ 、7.7%) $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ に変化した。表1に示すように、*A. actinomycetemcomitans* は、NDH-2、シトクロム *bd*、およびロテノン感受性 Na^+ 転位NADH:キノンオキシドリダクターゼ(NQR)を保有している可能性がある。事実ロテノン感受性のNADH- Q_1 デヒドロゲナーゼ活性は、300 mM NaClの存在下で約3倍増強され、この相加的なデヒドロゲナーゼ活性がNQRに由来する可能性があることが示された。しかし、NQR活性はMA-T α または γ に対して感受性は確認されなかった。(データは示されていない)。

総合すると、MA-Tの標的の1つが3種類の細菌の呼吸鎖であることがわかった。

表1 NADHの分布：試験した3種類の細菌種間のキノンオキシドリダクターゼおよびターミナルキノールオキシダーゼ (KEGG GENOME データベースから得たデータ)

菌種	NADH:quinone oxidoreductase			quinol: O_2 oxidoreductase		
	NDH-1	NDH-2	NQR ^{b)}	<i>Bo3</i>	<i>bd</i>	<i>aa3</i> ^{c)}
<i>E. coli</i>	○	○	—	○	○ ^{d)}	—
<i>S. aureus</i>	— ^{e)}	○	—	—	○	○
<i>A. a</i> ^{a)}	—	○	○	—	○	—

○：存在する —：存在しない

a) *A. actinomycetemcomitans* b) Na^+ 移行 NADH: キノンオキシドリダクターゼ

c) 黄色ブドウ球菌のシトクロム *aa3* は、真核生物のミトコンドリアに含まれるシトクロム *c* オキシダーゼではなく、キノールオキシダーゼである。d) 2種類のシトクロム *bd* (*bd*-I、*bd*-II) が報告されているが、*bd*-IIの生理機能は知られていなかった。e) "—": NDH-1様 protein をコードする遺伝子がいくつかあるが、その電子供与体および/または触媒サブユニットは不明。つまり、フラボプロテインのサブユニット (*nqo1*、*nqo2*、および/または *nqo3*) をコードする1つ以上の遺伝子が欠如している。

表2 MA-T を 30 分作用させた後の生存率

菌種	MA-T 濃度	未処理	MA-T α	MA-T γ
		(CFU/mL \pm SD) $\times 10^8$		
<i>E. coli</i>	40 ppm	2.84 \pm 0.139	**0.001 >	**0.001 >
	20 ppm	2.78 \pm 0.146	**0.260 \pm 0.0317	**0.042 \pm 0.0050
	10 ppm	3.55 \pm 0.750	3.21 \pm 0.526	2.95 \pm 0.0724
<i>S. aureus</i>	20 ppm	3.04 \pm 0.549	**0.001 >	**0.001 >
	15 ppm	5.16 \pm 0.843	**0.228 \pm 0.436	**0.897 \pm 0.149
	10 ppm	5.22 \pm 0.793	**1.58 \pm 0.841	**1.71 \pm 0.434
<i>A. a</i> ^{a)}	30 ppm	1.81 \pm 0.417	**0.001 >	**0.001 >
	20 ppm	1.37 \pm 0.224	**0.143 \pm 0.0248	**0.130 \pm 0.0217
	10 ppm	0.710 \pm 0.794	**0.365 \pm 0.0455	*0.590 \pm 0.0732

a) *A. actinomycetemcomitans*

表3 MA-T を 30 分作用させた後の細菌の呼吸活性

菌種		未処理	MA-T α	MA-T γ
<i>E. coli</i>	NADH-O ₂ ^{b)}	129 \pm 7.87	**13.0 \pm 1.26	**2.63 \pm 0.183
	NADH-ferricyanide ^{c)}	3.34 \pm 0.173	3.29 \pm 0.355	3.35 \pm 0.196
	NADH-Q ₁ ^{d)}	1.66 \pm 0.129	**0.194 \pm 0.0114	**0.073 \pm 0.010
	NADH-O ₂ (membrane) ^{e)}	96.2 \pm 5.03	96.5 \pm 2.92	66.9 \pm 5.31
<i>S. aureus</i>	Q ₁ H ₂ -O ₂ ^{f)}	10.2 \pm 0.930	**4.11 \pm 0.170	**3.64 \pm 0.233
	NADH-O ₂	316 \pm 12.9	**7.26 \pm 0.767	**29.5 \pm 3.45
	NADH-ferricyanide	5.11 \pm 0.073	**0.382 \pm 0.0125	**1.97 \pm 0.0933
<i>A. a</i> ^{a)}	Q ₁ H ₂ -O ₂	1.74 \pm 0.155	**0.240 \pm 0.0225	**6.84 \pm 0.0254
	NADH-O ₂	110 \pm 10.9	**11.5 \pm 0.881	**17.1 \pm 1.38
	NADH-ferricyanide	5.11 \pm 0.115	4.95 \pm 0.105	5.01 \pm 0.0844
	NADH-Q ₁	4.43 \pm 0.239	4.48 \pm 0.293	4.32 \pm 0.142
	Q ₁ H ₂ -O ₂	7.66 \pm 0.251	**0.418 \pm 0.0167	**0.591 \pm 0.0143

a) *A. actinomycetemcomitans* b) NADH: O₂ 酸化還元酵素 (nmol O₂/min/mg protein)

c) NADH: フェリシアニドオキシドリダクターゼ (μ mol/min/mg protein)

d) NADH: ユビキノ-1 オキシドリダクターゼ (μ mol/min/mg protein)

e) 「材料と方法」セクションの「膜小胞の調製」と同様に大腸菌の膜小胞を未処理の細菌から調製した。膜小胞は、エネルギー付与のために 1 mM NADH の存在下、25 °C で 30 分間 MA-T とインキュベートし、MA-T を除去するために遠心分離により膜小胞を洗浄した後に活性を測定した。

f) ユビキノール-1: O₂ オキシドリダクターゼ活性 (μ mol/min/mg protein)

MA-T の濃度は表 2 に準ずる。

第3章 MA-Tによるマスク再利用のための殺菌試験

3.1 緒言

我々が耐性菌、特に多剤耐性アシネトバクターに関する研究を進めていたときに Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2)による Coronavirus disease 2019 (COVID-19)パンデミックが発生した。海外のグループと共同研究を進めていた我々の研究も多大な影響を受け研究の中断、方向転換を余儀なくされた。我々はパンデミックにより起こる数々の問題を予測、MA-Tによるコロナウイルスに対する感染防御策の証明実験を開始した。第1章で述べたように SARS ウイルス、MERS ウイルスに対しては以前に不活化効果が確認されていたことから、大阪大学微生物病研究所において SARS-CoV-2 に対する不活化効果の速やかな確認ができた。続いて予測したとおり、マスク、ガウン、フェイスシールド、その他の個人用保護具(PPE)の世界的不足が引き起こされた。PPEの不足は医療システムが十分に機能していない発展途上国でより深刻であった^{92,93)}。歴史的に、世界はペスト、コレラ、インフルエンザ、あるいは腸チフス、エボラ出血熱、SARS、MERS^{94,95)}などの数多くの感染症の世界的な大流行を何度も経験してきた。感染症の歴史は繰り返されると予想されており、PPEは今後も感染予防に不可欠な装備であり続ける。COVID-19パンデミックではマスクや消毒剤の不足など数多くの問題点が明らかになったが、医療従事者を守り医療崩壊を防ぎ医療体制を維持することが患者を守ることに繋がり、そしてそれが社会を維持することに繋がる⁷⁾。感染防護服、特にマスクは使い捨てが一般的である。SARS-CoV-2のパンデミックを受けて、安全に再利用するためのさまざまな方法が試みられているが、確立された方法はまだ存在しない。米国疾病管理予防センター(CDC)は、N95フィルター付き面体マスク(FFR)の最も有望な除染方法として、UV殺菌照射、過酸化水素蒸気、湿熱滅菌が提案されていると報告している⁹⁶⁾。

亜塩素酸はヨーロッパでは水道水の消毒に使用されており、その一部は二酸化塩素として働く。二酸化塩素は古くから優れた消毒効果が知られており^{21,22)}、反応機構の1つとして細胞膜の破壊^{23,24)}、その他にタンパク質の変性^{25,26)}が考えられている。細菌やウイルスに対する効果から、飲料水や廃水処理だけでなく、環境や食品の消毒、医療への応用も検討されている²⁷⁻³¹⁾。MA-Tにおける二酸化塩素の生成は、標的微生物の存在下での触媒反応によって誘発される。第2章で明らかになったようにMA-Tは呼吸鎖内の生きた細菌のみを攻撃する。我々は第1章で述べたとおり、MA-Tが細菌、真菌、ウイルスを含むさまざまな微生物に対して有効であり、人体にも安全に使用できることを証明した。さらに、MA-Tはエタノールのように蒸発・発火せず、他の塩素系消毒剤と異なり金属を腐食させないため、医療分野での活躍が期待されている。

この研究では、MA-Tによる消毒後はマスクを安全に再利用できるという仮説に基づいてマスクの消毒がテストされた。

3.2 材料および方法

1)大腸菌で汚染されたサージカルマスクに対する MA-T スプレーを使用した消毒試験

サージカルマスクを 3.5×5 cm の同一の大きさに分割した。2.70×10⁸CFU/mL で調製した 100 μL の大腸菌を各マスク片に加えた。次に、すべてのマスク片を乾燥させた。大腸菌を含むマスク片に 100 ppm MA-T 0.5 mL を噴霧し、15 分間静置した。同様の処理を施した 12 枚を用意し、マスク外側表面の細菌検査用に 6 枚、マスク全体つまり内外両表面と繊維内部について細菌検査用に 6 枚を使用するものとした。次に、マスクの外面を BHI 寒天培地の表面にスタンプし、37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。マスク全体の細菌培養は、消毒したマスク片を生理食塩水 3 mL に浸漬し、そのうちの 300 μL を滅菌されたバクテリアスプレッダーで BHI 寒天培地上に広げ、37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。対照として、MA-T の代わりに生理食塩水を噴霧し、マスク表面の細菌を培養することを 6 回繰り返した。培養後に、各 BHI 寒天培地上のコロニー数(CFU/mL)を計測した。

2)大腸菌に汚染されたサージカルマスクの MA-T 浸漬による消毒試験

用意した 3.5×5 cm のマスク片をサージカルマスクに対する MA-T スプレーを使用した消毒試験と同様の手順にて大腸菌で人工的に汚染した。6 片は 100 ppm MA-T 30 mL に浸漬し、対照として 6 個は生理食塩水 30 mL に浸漬し、15 分間静置した。マスク片を取り出した後、残った溶液を 9000×g で 5 分間遠心分離し、沈殿を 250 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した。MA-T 処理した懸濁液 (250 μL) を滅菌されたバクテリアスプレッダーを用いて BHI 寒天培地上に広げた。対照懸濁液を生理食塩水で 10⁵ 倍に希釈し、そのうちの 250 μL を BHI 寒天培地上に広げ 37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。

3)医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T スプレーによる消毒試験

日常的に細菌検査や患者からの採血を行っている同じ臨床検査技師が臨床現場で 8 時間使用したサージカルマスクを用意した。マスクを滅菌したハサミで 6 つの 3.5×5 cm の小片に切断した。100 ppm の MA-T を 0.5 mL 噴霧し、対照には生理食塩水を噴霧し、いずれも 15 分間静置した。マスク外面の細菌培養は、6 枚 MA-T をスプレーし、残りの 6 枚に生理食塩水をスプレーした。マスクの外面を BHI 寒天培地の表面にスタンプし、37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。両表面および内側を含めたマスク全体の細菌培養は、MA-T を噴霧した 6 枚と生理食塩水を噴霧した 6 枚を生理食塩水 3 mL に浸漬し、そのうちの 1 mL を滅菌したバクテリアスプレッダーで BHI 寒天培地に塗布したのち 37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。

4)医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T 浸漬による消毒試験

上記の消毒試験と同じ医療従事者が使用したものと同一種類のサージカルマスクを用意した。マスクを滅菌したハサミで 6 つの 3.5×5 cm の小片に切断した。

6片は 100 ppm MA-T 30 mL に浸漬し、対照として 6 個は生理食塩水 30 mL に浸漬し 15 分間静置した。マスク片を取り出した後、残った溶液を 9000 ×g で 5 分間遠心分離し、沈殿を 250 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した。得られた懸濁液 (250 μL) を滅菌されたバクテリアスプレッターを用いて BHI 寒天培地上に広げたのち 37 °C のインキュベータで 24 時間培養した。

5)MA-T 処理前後のマスク性能試験

試験は (財) 産業安全技術センター (埼玉県) において防じんマスクの規格に準拠して実施された⁹⁷⁾。以下のテストは、MA-T で処理されていない未使用の N95 マスクと、150 ppm MA-T に 30 分間浸漬した未使用の N95 マスクに対して実施された。

(1) 吸気抵抗試験

マイクロマノメータ (130-1Kp-DGR、サヤマコーポレーション、東京、日本) に取り付けられた防塵マスクに毎分 40 L の流量で空気を通過させたときのマスクの内側と外側の圧力差を測定した。

(2) 粒子捕集効率 (PFE) 試験

防じんマスク試験装置 (AP-9000-AP632、柴田科学) に取り付けられたマスクの内側に食塩を含む空気を毎分 85 L の流量で通過させ、マスク通過前後の食塩濃度を濾材に供給した食塩量が 100 mg に達するまで散乱光法による食塩濃度分析装置により連続して測定した。塩化ナトリウムを含む空気では、塩化ナトリウム粒子の粒度分布の中央値が 0.06 ~ 0.1 μm、幾何標準偏差 (SD) が 1.8 以下、塩化ナトリウム濃度が 50 mg/m³ 以下、変動がプラスマイナス 15% 以下であった。粒子捕集効率は以下の式により算出した。

Particle filtration efficiency (%)

$$= \{1 - (D2) / (D1) \times \text{blank value}\} \times 100$$

NaCl particle mass concentration (mg/m³) = (D1) × K-value / 1000

D1: Upstream Detector Count (CPM)

D2: Downstream Detector Count (CPM)

Blank value: (D1/D2) Sensitivity ratio of the detector

K-value: mass conversion count {(μg/m³)/(CPM)}

統計分析

対照サンプルと MA-T で処理したサンプル間の細菌数の比較はマン・ホイットニーの U 検定で実行された。すべての統計検定結果の有意水準は、両側アルファレベル 0.05 で評価された。統計解析は SPSS ver.26 で行った。

3.3 結果

人工的に大腸菌で汚染させたサージカルマスクを MA-T スプレーで消毒した結果を表 1 に示す。マスク表面の細菌を BHI 寒天培地上で培養し CFU を計測したところ、コロニーの平均数は 53.2 個で SD は 49.4 であった。マスク全体について、寒天培地上の実際のコロニー数を 10 倍した後の CFU の平均数は 168、SD は 173 であった。寒天培地の画像を補足図 S1 に示す (6 枚のプレートのうち代表的な 2 枚のみ C、D、を示した)。対照における CFU の数は 3000 以上であった (補足図 S1A、B)。適用された細菌の CFU は 2.70×10^7 ($\log_{10}\text{CFU} = 7.43$)、MA-T 処理されたマスク全体の CFU は 168 ($\log_{10}\text{CFU} = 2.23$) であるため、MA-T スプレー処理によるマスク全体の CFU の \log_{10} 減少は 5.2 である。

大腸菌に汚染されたサージカルマスク MA-T 浸漬による消毒試験結果を表 2 に示す。生理食塩水浸漬では、CFU の平均数は 2.53×10^7 であり、SD は 0.63×10^7 であった。一方、MA-T 浸漬後の CFU はすべて 0 (または 1 >, $p = 0.002$) であった。コントロールの CFU は 2.53×10^7 ($\log_{10}\text{CFU} = 7.40$) であり、MA-T に浸漬したマスクの CFU は 1 未満 ($\log_{10}\text{CFU} < 0$) であることから、MA-T 浸漬処理によるマスク全体の CFU の \log_{10} 減少は > 7.40 である。

表 3 は、医療従事者が使用するサージカルマスクに対する MA-T スプレーによる消毒試験の結果を示している。使用済みマスクに MA-T をスプレーした後、マスクの表面から細菌は検出されなかった (1 >) 一方で、コントロールのマスクでは平均 21.2 個 S.D. 19.4 ($p = 0.002$) が検出された。代表的な BHI 寒天培地の画像を補足図 S2 に示す。MA-T スプレー後のマスク全体の CFU の平均値は 5 個 (SD 3.6) であったが、コントロールのマスクの平均値は 236 個 (SD 156) であり有意な減少であった ($p = 0.002$)。

表 4 は医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T 浸漬による消毒試験の結果である。MA-T に浸漬した後は細菌 (1 >) が検出されなかったが、コントロールでは平均 295 個のコロニーが検出された。MA-T 処理前後のマスク性能テストの結果を表 5 と補足図 S3 に示す。未使用および MA-T 未処理の N95 マスクでは、累積粒子供給による吸気抵抗の増加はわずかで、濾過効率は 99% 以上を維持した。150 ppm MA-T に 30 分間浸漬したマスクは、粒子の累積供給により吸気抵抗がわずかに増加した。捕集効率は MA-T 未処理の N95 マスクより若干劣るものの、95% 以上であった。

表 1 大腸菌汚染したサージカルマスクへの MA-T スプレーによる消毒試験

マスクの 部位	検体番号						平均 (SD)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	
表面	4	5	35	70	71	134	53.2(49.4)
全体	40	70	90	140	160	510	168(173)

a) 各 BHI 寒天培地上のコロニーの数

b) 材料と方法の「大腸菌汚染したサージカルマスクへの MA-T スプレーによる消毒試験」に示されているように、3 mL のうち $300 \mu\text{L}$ を寒天培地に散布したため、BHI 寒天平板上の細菌コロニーの数は 10 倍である。補足図 S1 の A と B に示すように、コントロールの CFU は計測できないほど多かった。

表2 大腸菌汚染したサージカルマスクへの MA-T 浸漬による消毒試験

処理剤	検体番号						平均 (SD)	p
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6		
Control ^{a)}	1.83×10 ⁷	1.97×10 ⁷	2.30×10 ⁷	2.57×10 ⁷	3.12×10 ⁷	3.41×10 ⁷	2.53×10 ⁷ (0.63×10 ⁷)	0.002
MA-T ^{b)}	0	0	0	0	0	0	0	

p 値は、マンホイットニーの U 検定の結果

a) 材料と方法の「大腸菌で汚染されたサージカルマスクの MA-T 浸漬による消毒試験」に示されているように、10⁵ 倍に希釈した懸濁液を寒天プレート上に展開したため、値は BHI 寒天培地上の細菌コロニーの 10⁵ 倍を示しました。その結果、コロニー数の実際の平均値は 253 であった。

b) 6 つのサンプルの実際の値は 0 であり、これは 1 未満(1 >)を意味し、S.D. は示さない。

表3 医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T スプレーによる消毒テスト (N=6)

マスクの部位	処理	検体番号						平均(SD)	p
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6		
表面	control	2	11	13	17	27	57	21.2(19.4)	0.002
	MA-T ^{b)}	0	0	0	0	0	0	0	
全体 ^{a)}	control	72	75	189	288	312	477	236(156)	0.002
	MA-T	0	3	3	6	9	9	5(3.6)	

p 値は、マンホイットニーの U 検定の結果。

a) 材料と方法の「医療提供者が使用するサージカルマスクに MA-T スプレーを使用した消毒試験」に示されているように 3 mL のうち 1 mL を寒天培地に塗布したため、BHI 寒天培地上のコロニーの 3 倍の数を示した。b) 6 つのサンプルの実際の値は 0 で、これは 1 未満(1 >)を意味し、S.D. は示さなかった。

表4 医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T 浸漬による消毒テスト (N=6)

処理	検体番号						平均 (SD)	p
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6		
Control	88	174	216	262	489	543	295(181)	0.002
MA-T ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	

p 値は、マンホイットニーの U 検定の結果。

a) 6 つのサンプルの実際の値は 0 で、これは 1 未満(1 >)を意味し、SD を表記しなかった。

表5 N95 マスクの MA-T 処理前後の性能試験

	吸気抵抗試験		粒子捕集効率試験			
	流量 (L/min)	吸気抵抗 (Pa)		捕集効率 (%)	吸気抵抗 (Pa)	累積粒子供給量 (mg)
処理なし	40	23	初期	99.45	46	2.46
N95 マスク			最小	99.36	72	68.17
MA-T 処理	40	22	初期	97.53	46	2.41
N95 マスク			最小	96.94	51	16.87

3.4 考察

COVID-19 は、SARS-CoV-2 によって引き起こされ、SARS-CoV-2 は主にアンジオテンシン変換酵素 2(ACE-2)を受容体として細胞に侵入すると報告されている⁹⁸⁾。ACE-2 は、唾液腺の管上皮および他のいくつかの組織に存在することが判明した⁴⁾。この事実は、唾液腺および口腔感染の可能性を高める。したがって、唾液による汚染を防ぐために、PPE を適切に着用することが非常に重要である。マスクは感染予防のために古くから使われてきたが、近年その有効性が見直されている。その結果、マスクは飛沫やエアロゾルによって広がる感染症に対して特に効果的であることが証明された。マスクのフィルター機能により飛沫の飛散を防ぎ、外部からの細菌やウイルスの侵入を防ぐ。マスク着用後に最も汚染される領域はマスクの外側表面であることが知られている。この部分からの接触感染を考慮すると、マスクを再使用する際にはマスク外側の消毒が最優先となる。

MA-T に含まれる塩素系化合物の中で最も多く含まれるのは亜塩素酸イオンである。MA-T の亜塩素酸イオン量は室温で数年間安定しており、保存中に二酸化塩素は検出されない。FAO/WHO 食品添加物合同専門委員会(JECFA)は、亜塩素酸イオンの一日許容摂取量(ADI)を 0.03mg/kg 体重/日と設定しており⁹⁹⁾、WHO の飲料水水質ガイドラインでは、飲料水中の亜塩素酸塩の健康に基づく暫定ガイドライン値 0.7 mg/L が定められている¹⁰⁰⁾。これはこの研究で使用された 100 または 150ppm の MA-T が人間にとって安全であることを意味する。微生物などの消毒対象がある場合、ルイス酸の触媒作用により亜塩素酸イオンが必要最小限の殺菌作用のある二酸化塩素に変化する。また、MA-T の安全性と細菌、真菌、ウイルスに対する有効性は第 1 章で実証されており、SARS-CoV-2 や各種微生物に対しても充分効果的であることがわかっている。MA-T は現在、A2Care (MA-T : 100 ppm) および BACT-¹O₂ (MA-T : 150 ppm) として市販されており、日本の飛行機やホテルでは除菌・消臭剤として使用されている。これまでのところ、MA-T による健康被害の報告はない。そこでマスクの再利用に MA-T を活用することを考えたのである。

本研究では、大腸菌は各種細菌の中でも最小発育阻止濃度(MIC)が高く、他の細菌に対する抗菌活性を代表すると考えられたため、まず大腸菌に汚染されたサージカルマスクを用いた MA-T の消毒試験を実施した。コントロールにおける CFU は 3000 をこえたのに対

し、MA-T をスプレーしたマスクではマスク表面およびマスク全体の CFU が大幅に減少したが、その数をゼロにすることは不可能だった。また、CFU は 6 つのサンプル間で大きなばらつきがあった。マスクの折り目部分に MA-T が接触せず、不織布の撥水性により MA-T がマスク内部に浸透しにくいものと推測された。一方、汚染されたマスクを MA-T に浸漬消毒したところ、細菌は全く検出されなかった。これらの結果は、マスクを MA-T スプレーで消毒、浸漬で滅菌できることを示唆している。使用済みサージカルマスクの除菌テストにおいて、MA-T スプレーはマスク表面の菌をゼロにすることができ、マスク全体の菌を大幅に減少させることができた。意図的に汚染されたマスクとは異なり、通常使用されているマスクには多くの細菌が含まれていないため、マスクの表面を滅菌することができた。マスク表面に触れた手からの感染を想定した場合、MA-T をスプレーするだけでマスクを消毒でき、感染を防ぐことができる。表 3 のコントロールに大きなばらつきがある理由は、マスクを使用した医療スタッフの環境と行動による可能性に留意すべきである。また、MA-T で消毒したマスク全体のばらつきが大きいのは、マスクの折り目や不織布の撥水性の影響である可能性がある。使用済みのマスクを MA-T に浸漬したところ、細菌は検出されず、滅菌が可能であった。150 ppm MA-T に 30 分間浸漬した N95 マスクは、累積粒子供給による吸気抵抗のわずかな増加のみを示したものの、これは MA-T 未処理の N95 マスクとほぼ同じ増加であった。MA-T 処理された N95 マスクの PFE は常に 95% 以上であり、MA-T 未処理の N95 の PFE よりわずかに低かった。今回の試験では、N95 マスクを 150 ppm MA-T に 30 分間浸漬したが、消毒試験で使用した 100 ppm MA-T に 15 分間浸漬にするとマスクの捕集性能がさらに保証されると推測される。これらの結果から、MA-T はエタノールによる消毒とは異なり、マスクの捕集性能を損なうことなくマスクの消毒・滅菌に使用できることが示唆された^{101,102)}。

この研究には 4 つの制約がある。1 つ目は、芽胞に対する二酸化塩素の有効性が低いことである。クロストリジウム属およびバチルス属に属する一部の細菌（炭疽菌、セレウス菌、ボツリヌス菌、クロストリジウム・ディフィシル、ウェルシュ菌など）は、腸炎や食中毒の原因物質となる可能性がある。MA-T は、他の塩素系薬剤と同様、芽胞形成細菌に対する効果が低いため、そのような細菌に感染した患者の糞便や嘔吐物、またはそのような患者のケアに使用される PPE の消毒に MA-T を使用すべきではない。2 つ目はテストしたマスクの種類が限られていることである。この研究で使用されたもの以外のメーカーの N95 マスクまたはサージカルマスクでは、異なる結果が得られる可能性がある。しかし、MA-T の消毒効果は以前の研究から明らかであり、細菌が MA-T に暴露されることがその殺菌作用の鍵となる。したがって、通常使用時には MA-T をスプレーし、滅菌が必要な場合には MA-T に浸漬することでマスクの再利用が可能であると確信している。今後、異なるメーカーの製品についても同様の試験を実施することが望ましい。3 つ目の制約は、MA-T によって消毒されたサージカルマスクの性能テストが不足していること。サージカルマスクのマスク性能試験を行えば、再利用に向けた良い情報が得られるだろう。今回の研究では、性能面で最

も重要でありながら、医療現場で最も不足している N95 マスクに焦点を当てた。今後はサージカルマスクの性能試験を実施することが望ましい。最後の制限は、実験で使用される細菌が限定されているか、特定されていないこと。人工的に汚染させたマスクの消毒試験で使ったのは大腸菌のみである。黄色ブドウ球菌、エンテロコッカス・フェカリス、アシネトバクター・バウマニー、緑膿菌などの他の日和見病原体に対する同様の試験を行えば、マスク消毒に MA-T を使用するさらなる利点を得られる。使用済みマスクの消毒実験で我々は実験で使用した培地は多くの細菌を増殖させることができ、また以前の研究では多くの微生物に対して MA-T が効果的であることがわかっていたことから菌種を同定しなかった。MA-T の除菌効果をより明確に把握するためには、今後使用済みマスクの試験において菌種同定を実施することが有用であると考えられる。

新型コロナウイルス感染症によるマスク不足により、医療従事者をはじめとするさまざまな団体の需要に応えられず、マスクの入手が困難になった。さらにマスクの価格も高騰し、病院や一般家庭の家計を圧迫することとなった。省エネルギー・省資源などの環境配慮から、一度の使用で廃棄されていたマスクの再利用需要は今後も高まることが予想される。この研究結果は、MA-T がこれらの問題を解決するための鍵となる薬剤である可能性を示唆している。

結論として、この研究の仮説 —MA-T によるマスクの消毒により再利用が可能になる— は強く支持された。MA-T 浸漬による消毒はマスクだけでなく、白衣や防護服、リネンなどにも応用できる可能性があり、これらの消毒や再利用についての更なる研究が期待される。また、新たな感染症による PPE 不足や、発展途上国や医療制度が機能不全に陥っている国々での PPE 不足に対処するために MA-T が活用されることも期待されている。

補足資料

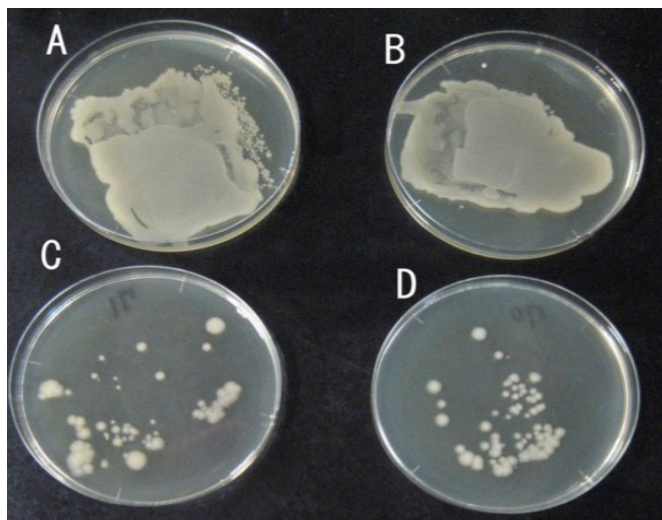


図 S1. 大腸菌汚染したサージカルマスクへの MA-T スプレーによる消毒試験

CとDは6枚のシャーレのうち2枚で、マスクを大腸菌で汚染し、MA-Tを0.5mL噴霧し、マスク表面をシャーレに貼り付けて37°Cで1日間培養したものである。CFUは70個と71個であった。AとBは、MA-Tの代わりに生理食塩水を使用した対照の6つのうちの2つである。

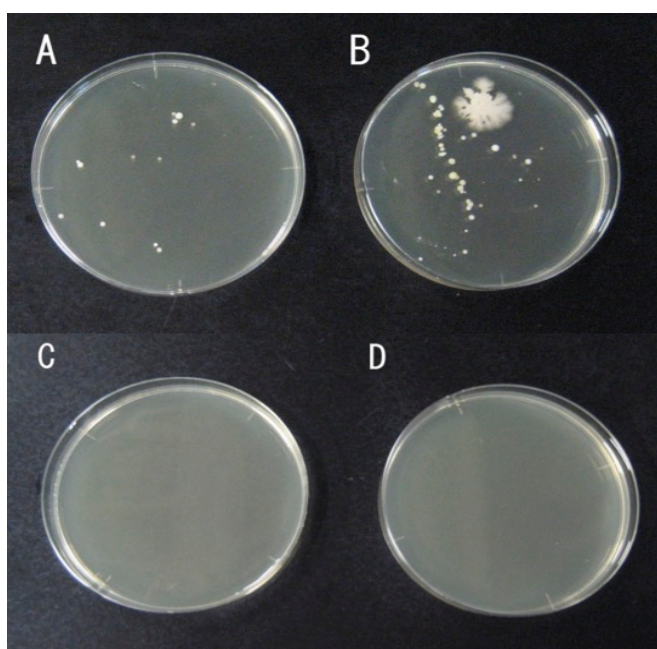
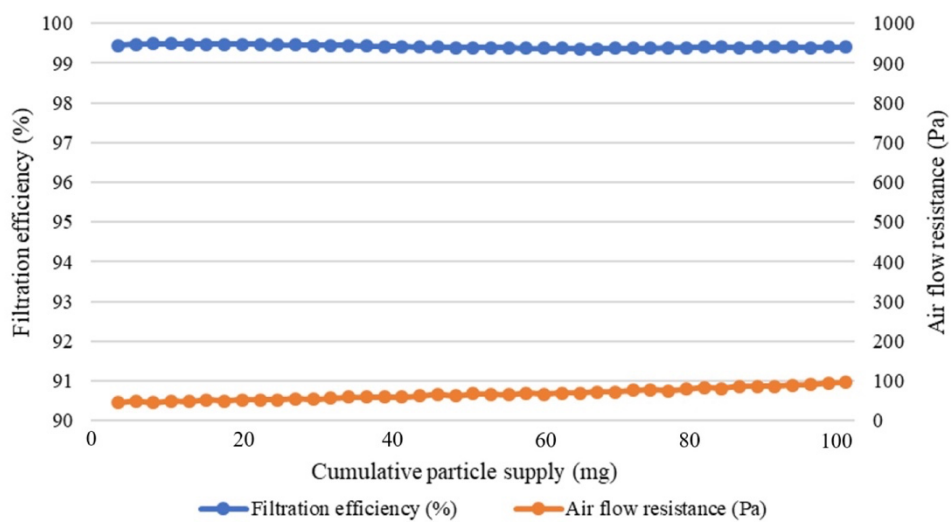


図 S2. 医療従事者が使用したサージカルマスクの MA-T スプレーによる消毒テスト

CとDは使用済みマスクにMA-Tを0.5mLスプレーした6枚のうち2枚であり、一方、AとBは6枚のシャーレのうち2枚でMA-Tの代わりに生理食塩水をスプレーした。

未処理 N95 マスク



MA-T 処理 N95 マスク

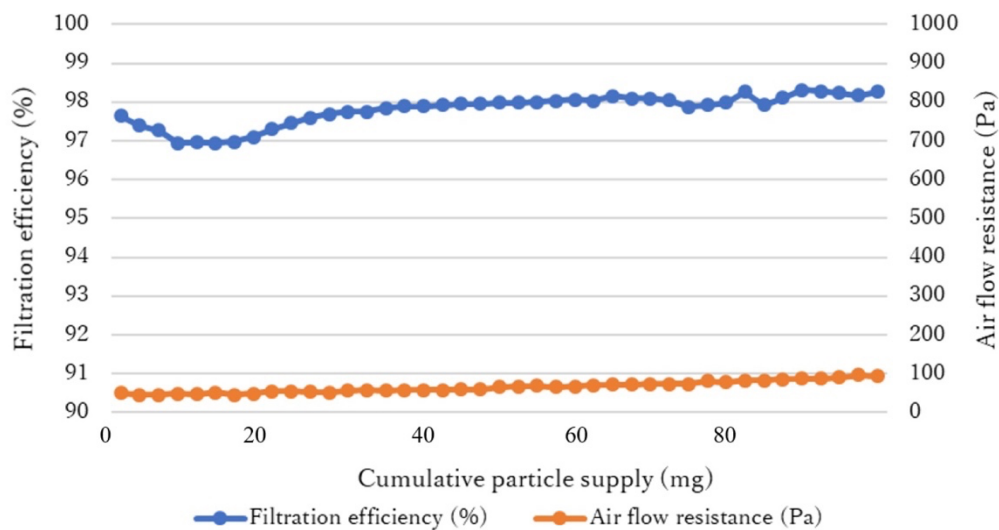


図 S3. 粒子の累積供給による濾過効率と吸気抵抗の時間の経過に伴う変化

第4章 MA-T の防護衣やリネン殺菌への応用

4.1 緒言

MA-T は繊維や皮革を腐食しないのでマスクの他にも広く応用できると考えられる。例えば医療現場でガウン（防護衣）を裏返し脱いで表面に触らないようにしてもウイルスの飛散を完全に防ぐことは困難であるが、MA-T に浸漬することで再使用を可能にし、ウイルス飛散による二次汚染も予防できると考えられる。その実証のために我々は実験を繰り返してきたが医療用ガウン殺菌試験もその1つである。

4.2 材料と方法

使用済み医療用ガウンの MA-T 浸漬殺菌実験

- ① *E. coli* を BHI 液体培地で 37 °C 24 時間培養する。
- ② 濁度を測定し、増殖がほぼ終了していることを確認する。また菌数を確認したところ 1×10^8 個であった。
- ③ ①より 200 μ L を 5 cm 角に切り取ったガウンに塗布し乾燥する。
- ④ ③を MA-T 20 mL に一定時間浸漬する。
- ⑤ ④の MA-T 20 mL すべてをシリンジで取り、分解式シリンジフィルターでろ過する。
- ⑥ ガウンの表面をスタンプ培地でスタンプし、37 °C で 24 時間培養する。
- ⑦ ⑤のフィルターを分解し、中のフィルターを BHI 寒天培地にスタンプし 37 °C で 24 時間培養する。
- ⑧ 同工程を MA-T の代わりに精製水を用いて行ったものを対照とする。

洗濯機を用いた MA-T によるリネン殺菌実験

- ① *E. coli* を BHI 液体培地で 37 °C で 24 時間培養する。
- ② ①の濁度を測定し、増殖がほぼ終了していることを確認する。また、菌数を確認したところ 10^8 個であった。
- ③ ①より 1 mL を布（シーツ）に塗布し乾燥する。
- ④ ③を MA-T 20 L を入れた小型洗濯機に一定時間浸漬攪拌する。
- ⑤ ④の排水 1 L より 100 mL シリンジで取り、分解式シリンジフィルターでろ過する。
- ⑥ ⑤のフィルターを分解し、中のフィルターを BHI 寒天培地にスタンプし 37 °C で 24 時間培養する。
- ⑦ コロニー数を計測する。

4.3 結果

使用済み医療用ガウンの MA-T 浸漬殺菌実験

MIC が 15 ppm の大腸菌に対して 25 ppm (3 分間) では殺菌できなかったが、50 ppm の液剤で充分殺菌できることが確認された。

条件	フィルター	ガウン表	ガウン裏
MA-T100ppm、菌液 200 μ L、3 分	0	0	0
同上	0	0	0
MA-T50ppm、菌液 300 μ L、3 分	0	0	0
対照：水	計測不能 (大量)	計測不能 (大量)	未確認
	計測不能 (大量)	計測不能 (大量)	未確認

続いて更に低濃度での可能性を模索した結果下記の通りとなった。

条件	フィルター	スタンプ (ガウン表)
50ppm、3 分	0	0
同上	0	0
25ppm、3 分	500	0

洗濯機を用いた MA-T によるリネン殺菌実験

50 ppm でも水量を増やして試験品がしっかり浸かれば 10 の 6 乗が 1 桁ということで 5 桁落ちている。殺菌として十分な能力が確認された。

条件	cfu
MA-T50ppm、水 10L、1 分	1000 \uparrow
MA-T100ppm、水 10L、3 分	0
MA-T50ppm、水 10L、5 分	1000 \uparrow
MA-T50ppm、水 20L、5 分	7

4.4 考察

上記の結果より医療用ガウン、リネン等衣類が対象病原体により汚染されても MA-T 浸漬によって二次感染からの防護を可能にし、これら衣類の再利用を可能にすることが示唆された。

第5章 MA-T を用いた口腔ケアと社会実装

5.1 緒言

SARS 感染者の MA-T マウスウォッシュで唾液中のウイルス量の変化を確認した実験で、唾液腺に感染する SARS-CoV-2 に対してはウイルス不活化作用のある MA-T マウスウォッシュの使用が有効な対策であることが分かった（未発表データ）。インフルエンザについても上気道に感染するウイルスであることから、ウイルス不活化作用のある MA-T マウスウォッシュがより有効であると考えられる。現在、うがい薬/洗口液として医薬品の認可を受けているものは、皮膚用消毒剤の濃度等を変更して転用したイソジンや 4 級アンモニウム製剤がほとんどで、洗口液用に開発されたものは少ない。しかし、口腔細菌には真菌類も存在し、既存の殺菌剤では効果的ではないと考えられる。

MA-T は第 1 章の試験結果に示すとおり、歯周病菌に対しても低濃度で高い殺菌作用を持ち、安全性も高い。歯周病菌治療の洗口液としても最適な薬剤である。MA-T は使いやすく、効果と安全性が高いことから、歯周病治療だけではなく口腔細菌叢の細菌数を減少させることで誤嚥性肺炎のリスクを減らし、高齢者の医療費削減を推進できると期待されている。口腔内に存在する多くの細菌やウイルスは、肺炎¹⁰³や感染性心内膜炎¹⁰⁴などの感染症だけでなく、アテローム性動脈硬化性心血管疾患、糖尿病、リウマチなどの全身疾患にも関連していることが報告されている¹⁰⁵⁻¹⁰⁹。肺炎¹¹⁰、がんの周術期¹¹¹、脳卒中患者¹¹²などの予防的口腔ケアの重要性が指摘されており、口腔細菌をコントロールすることは老後健康で過ごす上でも不可欠な要素であり、今後は口腔感染症だけでなく全身疾患の予防としても口腔ケアが一層注目されると推測される。

MA-T は第 1 章で述べたように優れた安全性とさまざまな抗菌効果を備えている。MA-T は有機物が豊富な培地中でも 100 ppm で十分な抗菌効果を示し、暴露経路に関係なく同じ濃度またはさらに高い濃度でも安全であることが証明された。また MA-T は可燃性、揮発性、腐食性がないため、従来の消毒剤が使用できない状況での活躍も期待されている。

本研究では、歯周病、虫歯、その他の口腔疾患に関連する *Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Streptococcus mutans* および *Candida albicans* に対する MA-T の効果について検証した¹¹³⁻¹¹⁶。MA-T が口腔衛生に効果的であるという仮説に基づいて、我々は参加者に MA-T マウスジェルと MA-T マウスウォッシュを使用して、これらの病原体に対する MA-T の有効性を検証した。

5.2 材料と方法

研究課題の選定

第 75 回日本口腔科学会総会（2021 年 5 月 13 日・14 日開催）に参加し、ボランティアとして本研究に参加した方が対象となった。資格基準は、最低年齢が 20 歳であること、およ

び治験実施計画書の遵守に関する質問に答える十分な能力があることである。プロトコルに従わなかった参加者は除外された。重度の糖尿病、免疫疾患を患っている被験者、または免疫抑制剤を使用している被験者はいなかった。全ての被験者には本研究について口頭および書面による説明が行われ、書面による同意を得た。

初日の朝食後、通常の歯磨き粉で歯磨きしてから少なくとも 30 分後に唾液を採取した。歯磨きと唾液採取の間は水以外の飲食を禁止した。唾液採取後、被験者には MA-T マウスジェル (MA-T 100 ppm 含有) と MA-T マウスウォッシュ (MA-T 50 ppm 含有) が配布され、MA-T マウスジェルで歯磨き必要に応じてうがい薬でうがいを行った。2 日目の朝食後、被験者は通常の歯磨き粉の代わりに MA-T マウスジェルを使用して歯を磨き、30 分以上待った後に唾液を採取した。歯磨きと唾液採取の間は、水以外の飲食は禁止した。初日と 2 日目の唾液採取前に、アンケートによりプロトコル遵守を確認した。唾液サンプルは採取後すぐに遠心管に 2°C~8°C で保存され、4 時間以内に細菌数の測定に使用された。

倫理審査

本研究計画は大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会により承認された (承認番号: R2-E40-2)。

細菌測定方法

初日と 2 日目に採取した唾液サンプルを使用して、以下の手順に従って細菌の総数と *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *S. mutans* および *C. albicans* の数を測定した。

(1) 総細菌数、*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* の菌数

すべての細菌数は、BML, Inc.(東京)の Invader PLUS テクノロジーによって測定された。細菌のゲノム DNA を、MagNA Pure LC 2.0 システムによって 0.5 mL の唾液サンプルから抽出し、核酸の定量と検出を ABI PRISM 7900 配列検出システム (Applied Biosystems、マサチューセッツ州、米国) によって行った。すべての手順は以前のレポートを参照して実行された^{117,118)}。

(2) *S. mutans* の数

Difco Mitis Salivarius 寒天培地 (Becton Dickinson and Company、ニュージャージー州、米国) に 10% スクロース、0.001% 亜テルル酸カリウム、および 0.2 IU/mL のバシトラシンを加えた MSB 寒天培地^{119,120)}を、唾液に含まれる *S. mutans* のコロニー形成単位 (CFU) のカウントに使用した。唾液 100 μ L を MSB 寒天培地に塗布し、37°C で 2 日間好気培養した。

(3) *C. albicans* の数

BBL CHROMager II 寒天培地 (Becton Dickinson) を、唾液中の *C. albicans* の CFU の計測に使用した。培地上に唾液 100 μ L を塗布し、35°C で 2 日間好気培養した。

統計分析

ウィルコクソンの符号順位検定を実行して、初日と 2 日目の唾液サンプルから得られた総細菌数、*T. forsythia*、*S. mutans*、*T. denticola* の数の中央値変化を検定した。すべての統計検定の有意水準は、両側アルファレベル 0.05 で評価された。統計分析は SPSS バージョン 26 によって処理した。

5.3 結果

合計 23 名の会議参加者が参加に同意し、この研究に参加した。被験者の背景とプロトコル遵守状況を表 1 にまとめた。1 人の被験者はプロトコルからの離脱により除外されたため、残りの 22 人の被験者に対して分析を実行した。初日と 2 日目の間の総細菌数の変化の中央値を図 1 に示した。2 日目の数は初日よりも有意に低かった ($p < 0.001$)。初日と 2 日目の *T. forsythia*、*T. denticola* および *S. mutans* の数の差を表 2 に示した。2 日目の *T. forsythia* は初日よりも有意に低かった ($p = 0.0186$)。 *T. denticola* の結果は、初日は 8 名、2 日目は 1 名追加の 9 名が検出感度未満で、残りの 13 名は両日とも検出可能レベルであった。13 人の患者からの結果は、統計的に有意ではないものの ($p = 0.100$)、*T. denticola* の数が初日より 2 日目の方が少ない傾向があることを示した。ちなみに、細菌数が著しく高い 1 つのサンプルを 12 人の患者の分析で外れ値として使用した場合、細菌数の減少は有意になった ($p = 0.0186$)。 *P. gingivalis* は初日は 17 名、2 日目は 19 名で検出感度を下回っており、両日とも 2 名のみ測定できたため解析できなかった。 *S. mutans* の結果については、統計的に有意な差はなかったが初日に比べ 2 日目の菌数が減少する傾向が見られた ($p = 0.251$)。 *C. albicans* に感染した 3 人の被験者の試料の画像を図 2 に示す。

表 1 被験者の背景とプロトコルへの準拠

被験者数	N=23
年齢	
平均 (SD)	49.09 (10.23)
性別	
男性 n(%)	14(60.9)
女性 n(%)	9(39.1)
プロトコル準拠	
Yes n(%)	22(95.7)
No n(%)	1(4.3)

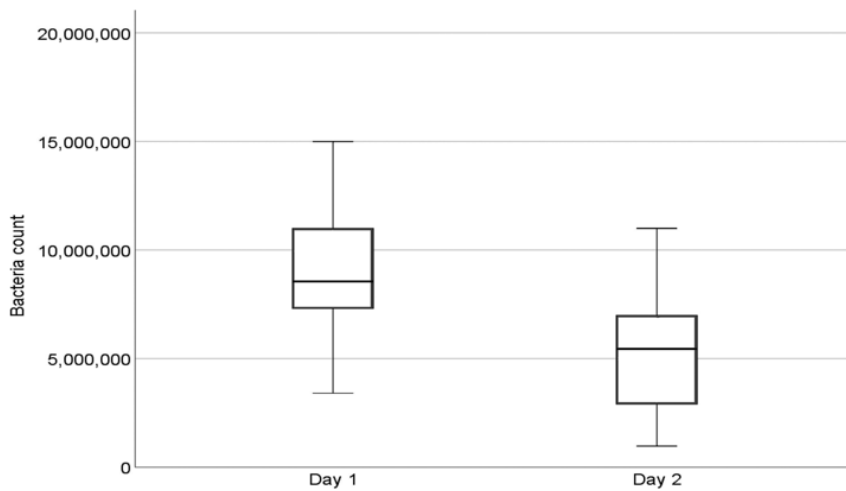


図1 初日と2日目の間の総細菌数の変化の中央値比較

初日と2日目の総細菌数の中央値は、Wilcoxon 符号順位和検定を使用して処理された。(N=22、p=0.000177)

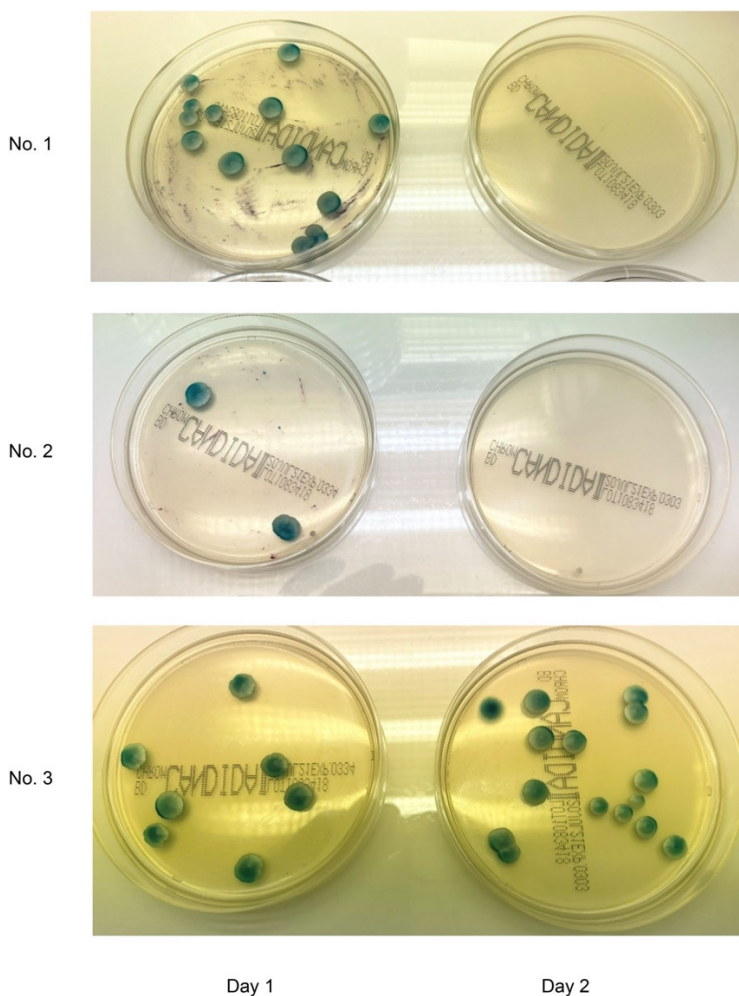
表2 初日と2日目の *T. forsythia*、*T. denticola* および *S. mutans* の数の中央値変化

菌種	検体数	細菌数の中央値 (四分位範囲)		
		初日	2日目	P 値
<i>T. forsythia</i>	22	555(245-2725)	405(125-1425)	0.0189
<i>T. denticola</i>	13	360(125-1100)	200(95-585)	0.100
<i>S. mutans</i>	22	10(0-51)	8(0-25)	0.251

注:初日と2日目の総細菌数の中央値の比較は、Wilcoxon 符号順位和検定を使用して処理された。

略語 *S. mutans*; *Streptococcus mutans*; *T. denticola*, *Treponema denticola*; *T. forsythia*, *Tannerella forsythia*.

図 2 *C. albicans* に感染した 3 人の被験者の試料の画像。



No.1：初日に 14 個のコロニーが確認されたが、2 日目にはコロニーが確認されなかった。

No.2：初日に 2 個のコロニーが確認されたが、2 日目にはコロニーが確認されなかった。

No.3：初日と 2 日目にそれぞれ 7 個のコロニーと 14 個のコロニーが確認された。

5.4 考察

細菌性歯垢を除去し歯や歯肉に蓄積するのを防ぎ口腔を清潔に保つことは、口腔の健康を維持するために重要である¹²¹⁾。さらに、口腔ケアは口腔および全身感染症のリスクを軽減するだけでなく、感染症以外の全身疾患の予防にも非常に重要である¹²²⁾。口腔ケアには、機械的洗浄方法と化学的洗浄方法の 2 種類があり、機械的洗浄方法は効果的であるが、高度なスキルとモチベーションを必要とする¹²³⁻¹²⁵⁾。一方、化学的洗浄方法は強いモチベーションや手先の器用さを必要とせず、簡単に実行できる。化学的洗浄方法は、口腔衛生を改善するために機械的洗浄方法と組み合わせて実行できる¹²⁷⁻¹²⁹⁾。化学的洗浄方法で最もよく使用される薬剤の 1 つはグルコン酸クロルヘキシジンだが、その有効性についてはさらなる研究が必要であり、副作用についての懸念もある¹³⁰⁻¹³²⁾。その中でアロエベラ、緑茶、天然

抽出物などのさまざまな物質が口腔ケア製品のクロルヘキシジンの代替品として検討されており¹³³⁻¹³⁶⁾、最近では二酸化塩素が注目を集めている^{137,138)}。

これは口腔衛生に MA-T を使用した最初の研究である。口腔衛生に二酸化塩素を使用する研究はいくつかある。他の口腔衛生方法と同様に歯垢や細菌数の減少に寄与すると考えられているがまだエビデンスは充分ではない¹³⁹⁾。この研究で使用された MA-T は、亜塩素酸塩水溶液からガス状成分として得られる従来の安全ではない二酸化塩素とは異なる。MA-T は触媒作用により化学平衡を調整し、水性ラジカルの発生を最小限に抑えた薬剤である³³⁾。それにより、第 1 章で述べたように優れた安全性を実現し口腔などの有機物濃度の高い環境下でも優れた抗菌活性を示すことが実証された。この研究では、MA-T を使用することで口腔病原菌を最小限に抑えられるか調べた。その結果、総細菌数と *T. forsythia* は MA-T の使用後に有意に減少したが、*T. denticola* と *S. mutans* は MA-T の使用後有意ではないものの減少傾向にあることが確認された。これは、毎日の口腔ケアに MA-T を使用することで、歯周病やう蝕の原因となる細菌を減らせるということを示唆している。さらに、*C. albicans* は MA-T 使用後に 2 人の患者で消失しましたが、1 人の患者では増加した。増加した 1 人の被験者では *S. mutans* も増加しており、2 日目の口腔ケアが適切でなかった可能性があることが示唆された。これらの結果は、MA-T を使用した口腔ケアが通常の口腔ケアよりも歯周病、う蝕、その他の口腔感染症を軽減する可能性が高いことを示唆している。

この研究には 4 つの制約が考えられる。1 つ目は被験者の選択バイアスである。本研究は第 75 回日本口腔科学会総会参加者を対象として実施され、歯科医療に多少なりとも携わっている方々が対象となった。そのため、口腔ケアへの関心が高い人や、もともと適切な口腔ケアを受けていた人が本研究の対象となったことで、検出率の低下につながった可能性がある。2 つ目は、盲検法でないことによる情報の偏りである。被験者は MA-T について認識したうえで口腔ケアを行っており、普段の口腔ケアとは異なるアプローチになった可能性がある。3 つ目はサンプルサイズである。N = 22 という小さなサンプルサイズでは、総細菌数と *T. forsythia* には有意な差を示すことができたが、*T. denticola* と *S. mutans* では示せず、*P. gingivalis* と *C. albicans* については統計分析を実行できなかった。以上のことから、さらなる調査のためには、より多くの患者または健常者を対象とした盲検試験を実施する必要があると考えます。最後は、MA-T を使用した口腔ケアの有効性を評価するための口腔衛生指標が不足していることである。この研究の結果に基づき MA-T を使用した口腔ケアの口腔細菌に対する有効性について検討することができるが、口腔の健康への貢献を示すには追加の調査が必要である。したがって、Covid-19 パンデミック後には、口腔衛生指標を用いたさらなる調査が期待される。

口腔衛生と全身疾患の関係が注目されているが、MA-T による口腔ケアは全身疾患の予防につながる可能性がある。高齢者やドライマウス患者は、唾液分泌量の減少により口腔環境が乱れているため、効果的に口腔環境を改善する口腔衛生用品が求められている。MA-T は抗菌活性があるため、そのような患者に対しての使用は効果的な可能性がある。さらに、

MA-T は、最近世界的な脅威となっている SARS-CoV-2 に対して優れた抗ウイルス活性を持っている。口腔は SARS-CoV-2 感染の重要な部位であり、唾液は SARS-CoV-2 感染経路の可能性があるため¹⁴⁰⁾、MA-T による口腔ケアは SARS-CoV-2 感染予防に貢献する可能性がある。

5.5 社会実装

本研究において使用された口腔ジェルは、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能治療学教室阪井教授との共同研究としてスタートした。阪井教授が臨床研究としての倫理審査申請と承認を済ませて、介護現場での実用テストと研究室での累計 200 種類以上にのぼる試作を繰り返した。実用テストを並行して開始した。図3のように胃瘻や TPN(中心静脈栄養)で栄養を摂取している患者の口腔内の汚染は著しく、喀痰・血餅・剥離上皮が何層も口蓋・舌・歯・歯肉に蓄積し、簡単には除去できなくなり、剥離上皮はバイオフィルムの塊であるため、細菌による肺炎や気道閉塞による窒息を引き起こす危険性もある。1年以上に渡り連日使用しフィードバック、試作を繰り返す研究の結果、喀痰・剥離上皮・血餅・プラーク(バイオフィルム)がとれやすく、口腔ケアの安全性と時短に貢献できるサンプルが出来上がった。最終的にアース製薬が増粘剤について検証を行い、2022年2月革新的な口腔ケア用品として社会実装に至ったのである。

図3 剥離上皮



大阪大学歯学研究科阪井教授提供

第 6 章 MA-T の噴霧使用の可能性の検証

6.1 緒言

第 4 章で述べた通り既存の消毒剤としての使用方法だけでなく MA-T はその性質上、他の消毒剤が適用できなかつた分野でも重要な役割を果たすことが期待される。例えば噴霧により病室や診療室の殺菌及びウイルス不活化が可能になれば環境整備の効率化が図れる。しかし、消毒剤噴霧には生体に対する有害性という懸念がある。それは噴霧できる消毒剤がなかつたことによるものと考えられる。そこで我々は危険が伴う高水準消毒剤を除外し、既存の中水準以下の消毒剤について実験と検証を行った。さらに MA-T を空間に噴霧し室内の殺菌が可能か確認実験を行った。

6.2 材料と方法

消毒用エタノールは殺菌作用が速く、現在、医療従事者、特に看護師の手指消毒にひんぱんに使用されているが、可燃性であり備蓄に向かず大量保存は禁止されている。4 級アンモニウム塩製剤は真菌・ウイルスには効果が出にくい。またゴム、皮革は変色、変質させることがある。塩素系消毒剤は基本的にラジカルであるため為害性と保存安定性が問題になる。またラジカルは多くの有機物、無機物（金属）と反応するため皮膚刺激、粘膜刺激、金属腐食などを引き起こす^{43,44}。また反応性の高さから有機物の存在で殺菌力は極端に低下し（有機物と反応してしまう）、時間の経過とともに分解するため⁵⁷備蓄には適さない。これらの検証のために入手しやすい次亜塩素酸を用いて各種確認実験を行った。

MA-T と次亜塩素酸ナトリウム水溶液の MIC 確認試験

プロトコルは第 1 章「細菌、真菌に対する殺菌力試験」に準じた。

次亜塩素酸水による腐食性確認試験

銀歯を次亜塩素酸水 50 ppm に浸漬し、24 時間後に状態を確認した。

大腸菌を用いた次亜塩素酸 Na 水溶液(pH6.0)の MIC 確認試験

吸光度を測定し、濃度を正確に測定した 10000 ppm の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を希釈し PBS で pH を 6.0 に調製した試験品を用いて BHI 液体培地における MIC を確認した。

MA-T 噴霧による殺菌実験

試験菌を BHI 液体培地で 37 °C 24 時間培養したものを試験菌液 A とする。菌数は 10⁹ 個/mL であった。BHI 液体培地を精製水で 10 倍希釈し、そこへ試験菌液 A を 1/100 加えたものを試験菌液 B とする。シャーレにおいたカバーガラスに試験菌液 B を 20 μL 滴下したのちクリーンベンチ内で乾燥させる。実験室に任意の場所にカバーガラスを入れたシャ

ーレを設置し、MA-Tを噴霧する。歯学部PCR検査ドーム（約7 m²）、歯学部病院診察室では大腸菌、歯学部P2実験室（約11 m²）では *A. baumannii* を用いた。

大型噴霧器 DryFog を用いる実験では間欠噴霧、ハンディ噴霧器は時間あたりの噴霧量が少ない為連続噴霧とした。噴霧後カバーグラスを試験管に入れ生理食塩水 2 mL を注入し振盪、200 μ L を BHI 寒天培地に撒きインキュベータで 37 $^{\circ}$ C 24 時間培養した後それぞれのコロニー数を計測する。

6.3 結果

MA-T と次亜塩素酸ナトリウム水溶液の MIC 確認試験

次亜塩素酸の Na 水溶液の有機物が多い BHI 液体培地における MIC は、有機物の少ない DM 培地に比べ大きな差があり、次亜塩素酸が有機物の存在下では殺菌効果が非常に落ちることが確認された。

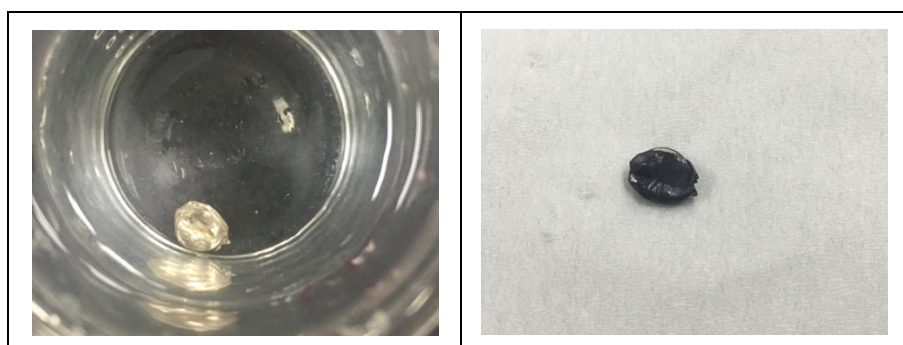
表 1 MA-T と次亜塩素酸ナトリウム水溶液の培地の違いによる MIC (ppm)

菌種 (使用培地)	<i>S. aureus</i> (BHI 液体培地)		<i>E. coli</i> MV1184 (BHI 液体培地)		<i>E. coli</i> MV1184 (DM 液体培地)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
試験品						
MA-T	1.56	3.12	12.5	20	3.50	3.50
次亜塩素酸 Na 水溶液	300	300	220	220	12.89	12.89

次亜塩素酸水による腐食性試験

浸漬スタート時

浸漬 24 時間後



腐食され黒変した。次亜塩素酸は腐食性が強いことが確認された。

MA-T と次亜塩素酸 Na 水溶液の pH6.0 における MIC 比較試験

表 2 のとおり次亜塩素酸は弱酸性においても殺菌力は変わらず、また有機物の影響を強く受けたことが確認された。これらの結果は実験を再構成の上実施され本年論文化された。Takekatsu Shibata, Ryuta Urakawa, Takayoshi Sakai, and Kiyoshi Konishi. Bactericidal Effect of MA-T Against *Escherichia coli* in Davis Minimal Medium in the Presence of Organic Materials, Compared to Perchlorous Acid as a Control. *BPB Reports* 6, 122-125 (2023).

表2 MA-T と次亜塩素酸 Na 水溶液の pH6.0 における MIC 比較

	使用菌種： <i>E. coli</i> MV1184 使用培地： (BHI 液体培地)
試験品	MIC
MA-T	12.5 ppm
次亜塩素酸 Na 水溶液(pH6.0)	600 ppm

MA-T 噴霧による殺菌実験

安定していい結果が得られた。MA-T 噴霧による殺菌は有効であることが確認された。

表3 MA-T 噴霧による殺菌実験結果

実験場所	液剤濃度	設置場所とコロニー数			
		椅子	床	遠心機	机
P2 実験室	100 ppm	37	2	7	0
診察室	100 ppm	1	0	—	0
ドーム	100 ppm	0	0	0	0
診察室	100 ppm	0	以降割愛	—	1
ドーム	100 ppm	0	—	0	0
診察室	100 ppm	0	—	—	0
P2 実験室	150 ppm	0	—	0	0
P2 実験室	150 ppm	0	—	0	0
P2 実験室	150 ppm	0	—	0	0

6.4 考察

昨今、次亜塩素酸は次亜塩素酸ナトリウムと違い、安全でかつ殺菌効果が高いという記述をよく見かけるが両者の違いは pH だけである。ClO⁻は危険で HClO は安全かつ殺菌力は ClO⁻の 80 倍強いから次亜塩素酸水を推奨するという論理らしいがその「80 倍云々」は厚労省の資料「次亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの同類性に関する資料」に明記されている。HClO の pKa は 7.5 であるので pH6.0 の場合ヘンダーソンハッセルバルヒの式よりモル比で [HClO] : [ClO⁻] = 31.6 : 1 となり HClO が大半を占める状態で MIC が 600 ppm であった。このことは次亜塩素酸水と次亜塩素酸 Na 水溶液の殺菌力はあまり変わらないことを示唆している。同資料表 2 において 40 ppm でノロウイルスを不活化できると記載されているが、あくまでも有機物がまったく存在しない状況を設定した実験においてのみの現象であることが示唆された。検証と実験の結果より表 4 に MA-T と他の消毒剤の比較をまとめた。MA-T には表 4 からわかるとおり他の消毒剤にある問題点がないと考えられる。特に安全性については第 1 章の各種安全性試験において検証されており、さらにマウスを用いた高濃度の MA-T による飲水実験においてもその高い安全性が確認されているため¹⁴¹⁾、

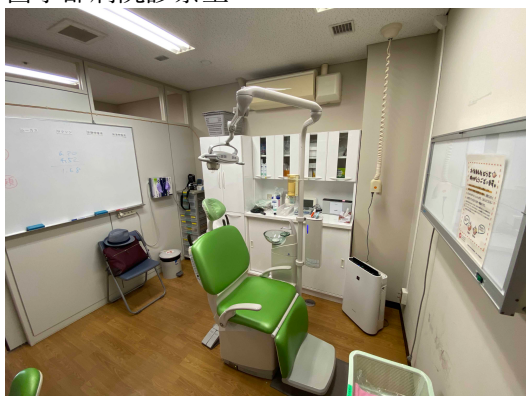
人体に影響なく安全に噴霧が行えると判断し、噴霧による殺菌試験へ移行した。

表4 各消毒剤の比較

	MA-T	消毒用エタノール	次亜塩素酸	次亜塩素酸ナトリウム	4級アンモニウム
除菌効果	◎	○ スプレー・不向き	○ 有機物存在時×	○ 有機物存在時×	○ 真菌・ウイルスには効果が低い
消臭効果	◎	×	△	△	×
抗菌効果	○	×	×	×	○
安全性	◎	×	△	×	△
皮膚刺激	無	有	弱	有	無
腐食性	無	有	有	有	ゴム・皮革
安定性	◎	△揮発性	×	△	◎

我々は噴霧による殺菌試験に積極的に取り組んでいる。表3のように数多くの噴霧実験を繰り返したがパンデミック対策、薬剤耐性菌対策として有用であることが示唆された。タイの実際の病室で検出された *A. baumannii* は平均 $2.1 \sim 1.4 \times 10^2$ 個程度、最大でも 6.6×10^2 個であったことから考えて殺菌力は充分であると考えられた。

歯学部病院診察室



現在、噴霧使用を進めるための MA-T 空間散布ワーキンググループが発足し、実用化に向けて研究及び安全性の確認を進めている。

現在「腐食性がないことから精密機器等にも悪影響を及ぼさず、無人環境では問題なく使用が可能である」との評価を受け、有人環境における使用については長期反復吸入試験などを行い、各臓器への影響を確認中である。

第7章 総括と展望

7.1 総括

パンデミックに対応できる消毒剤の条件の1つとして保存安定性が重要であると考えられる。アウトブレイクに速やかに対応するためには、備蓄でき必要な時に直ちに使えることが必須条件である。パンデミック時に最も使われたのはエタノールと4級アンモニウム塩製剤であったがこの2つには大きな弱点がある。可燃性のエタノールは大量に備蓄できないため通常時であれば問題にならないがパンデミックのような異常時に不足してしまう。実際にCovid-19パンデミックで世界的に不足した。またPPE再利用のための殺菌にはPPEの粒子捕集能力を落としてしまうため不向きである。世界的にエタノール頼みになっていたがあつたが、対象病原体に効果があるのはもちろんだが「備蓄可能」という観点から消毒剤を見直すときに来ている。4級アンモニウムは主にエタノールでアレルギーを起こす人に使用された。可燃性もないため輸送が比較的簡単であり消毒剤が不足している地域で使われたが、そもそも真菌やウイルスへの効果が弱いとの指摘がある。また感受性の低い黄色ブドウ球菌も見つかっている¹⁴²⁾。

本研究の結果より、MA-Tは安全性と対象病原体に対する有効性を両立した今までにない消毒剤である。伝播スピードの速いパンデミックや対策を取らなければ世界的に健康や経済に大打撃を与える薬剤耐性問題に対応できる最上の対応策と考えられる。

7.2 展望

MA-Tは両立された殺菌力と安全性から除菌消臭剤として販売されており、広く普及してきた。雑貨としてはA2Careとして全国のニトリ、セレクトショップで販売中。可燃性、腐食性がないことから日本の航空会社に採用され飛行機に搭載され使用されている。また除菌と消臭が1本で行えるという利点から全国のホテル等で利用が拡大している。人体に使えるものが欲しいとの要望から化粧品としてうがい用のA2Careマウスウォッシュ、皮膚に使えるA2Careスキンケアを開発し上市した。マウスウォッシュは第4章の口腔科学会の研究でも使用され有効性が確認されており、ランキングサイト「my best」においてマウスウォッシュ部門で第1位となっている。

第4章で紹介した口腔ゲルは口腔科学会にて発表、研究にも使用され、現在歯科専売品として歯科医院を中心に販売。今後介護施設へ拡大していく予定である。

医療分野においても殺菌力、使用用途の多様性、保存安定性に秀でており、早期の医薬品化が望まれる。現時点においてすでに極めて安定安全かつ有効な殺菌剤であることは解っているが、最大限貢献するためには「医薬品」分類とすることが必要である。

そして現在進行中の第3章と第4章、第6章の研究が進めば人の健康を守り、命を救うという社会に対する貢献度は大きい。第3章、第4章については実験室レベルで証明できる基礎的な研究は終了し、実用化に向けた関連企業との共同研究を進める段階に来ている。第

6章 噴霧使用の研究は噴霧による耐性菌殺菌の将来性の高さから AMED の「地球規模保健課題解決推進のための研究開発事業、低・中所得国の健康・医療改善に向けた、医薬品・医療機器・医療技術等の海外展開推進のための国際共同臨床試験」に採択された。日本国内における第1相実験の「噴霧使用のプロトコル設定」まで順調に進んでいた。その後、実験場所をタイの病院に移し、実際の病室での噴霧試験を行う準備が整ったところで Covid-19 パンデミックにより長期の延期を経て中止となった。非常に悔しくもったいない結果であるが、我々は今後自力で第2相の実験を進める予定である。

持続可能な社会を次の世代へつなぐことは人類が達成しなければならない責務である。MA-T の研究が今後発展すれば人類の未来に大きな貢献ができる。本研究で述べた MA-T は消毒剤としてであるが、本来 MA-T はシステム名であり、亜塩素酸とルイス酸や光による触媒反応を根源とする酸化反応の総称である。その応用の場は医療関係のみならず、農業関連（畜産、植物病対策）、工業関連（エネルギー、接着、めっき）研究関連（クライオ電顕）など多岐にわたる。それぞれの分野でめざましい結果を上げ、早期の実用化が期待されている。エネルギー分野においては超高難度でドリム反応とまで言われた「常温常圧におけるメタン→メタノール反応」を発見し、実用化実験が北海道興部町で進められている¹⁴³⁾。世界で新たにエネルギーを開発すべく水素など様々な研究が進んでいるが、現在すでに発生し続けそのまま捨てられている家畜由来のメタン、これを効率よく有効活用できる技術は他にない。エネルギー分野は様々な国や企業体の思惑が作用する。10年先を考え研究開発に身を投じた我々としてはよりよい未来がそこにあることを切に願う。

このように MA-T 研究の発展は 2015 年に国連が提唱した持続可能な開発目標（SDGs）17 項目のうち

3 すべての人に健康と福祉を。－伝染病をなくす。

7 エネルギーをみんなにそしてクリーンに。－エネルギー効率を上げる

9 産業と技術革新の基盤を作ろう－資源をより無駄なく使う

13 気候変動に具体的な対策を－気候変動のスピードを緩める

14 海の豊かさを守ろう－海洋酸性化の原因である CO2 削減

上記の 5 項目に貢献する「これから」に不可欠な技術体系なのである。今後も MA-T の研究が更に進み社会実装が広く展開し、人々の豊かな暮らしと持続可能な社会の両立が実現することを願う。

引用

- 1) Pandemic Influenza Risk management: WHO Interim Guidance
https://www.who.int/influenza/preparedness/pandemic/GIP_PandemicInfluenzaRiskManagementInterimGuidance_Jun2013.pdf
- 2) O'neill J, Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance* (2016)
- 3) "Weekly epidemiological update on COVID-19-20 April 2023". WHO.2023.
<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-april-2023>
- 4) Usami Y, Hirose K, Okumura M, Toyosawa S, Sakai T. Brief communication: immunohistochemical detection of ACE2 in human salivary gland. *Oral Sci. Int.*, 18: 101–104 (2021).
- 5) Kramps T, Elbers K, Introduction to RNA Vaccines RNA Vaccines. *Methods in Molecular Biology*. 1499. pp. 1–11(2017).
- 6) 谷野雅昭 消毒と滅菌 日臨麻会誌 Vol.37,No5:702-705(2017).
- 7) Anderson RM, Heesterbeek H, Klinkenberg D, Hollingsworth TD (March 2020). "How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic?". *The Lancet*. 395 (10228): 931–934.
- 8) 阿部千代治 「日本および世界の薬剤耐性結核の現状」 結核,76: 699–706(2001).
- 9) Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JR Jr, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases.*, 41, 1-12(2009).
- 10) Centres for Disease Control and Prevention, Antibiotic Resistant threats in the United States, US Department of Health and Human Services. (2013)
- 11) Smith R, Coast J, The true cost of antimicrobial resistance, *BMJ*, 346, f1493(2013)
- 12) Bhullar K, et al.: Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 7(4):e34953(2012).
- 13) Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano D, Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery, *Nature Reviews Drug Discovery* (2007).

- 14) Renwick MJ, Brogan DM, Mossialos E, A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics, *The Journal of Antibiotics*, 69, 73-88. (2016).
- 15) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed 27 FEBRUARY 2017
<https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 16) MRSA 感染症治療ガイドライン 2019 改訂版
https://www.kansensho.or.jp/uploads/files/guidelines/guideline_mrsa_2019revised-booklet.pdf
- 17) 平潟洋一, アシネトバクテリア感染症, 感染症学雑誌, 85:340-346(2011).
- 18) 矢野寿一, 平潟洋一, 賀来満夫: 総説海外における薬剤耐性グラム陰性桿菌の動向. 日治療会誌 59:8-16.(2011).
- 19) Yamamoto Y, Kawahara R, Fujiya Y, Sasaki T, Hirai I, Khong DT, Nguyen TN, Nguyen BX, Wide dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* with the mobile resistance gene *mcr* in healthy residents in Vietnam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2018).
- 20) Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R, Gálvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol.*, Mar 1;162(1):13-25(2013).
- 21) Benarde MA, Israel BM, Olivieri VP, Granstrom ML. Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. *Appl. Microbiol.*, 13, 776–780 (1965).
- 22) Benarde MA, Snow WB, Olivieri VP, Davidson B. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl. Microbiol.*, 15, 257–265 (1967).
- 23) Ofori I, Maddila S, Lin J, Jonnalagadda SB. Chlorine dioxide oxidation of *Escherichia coli* in water - A study of the disinfection kinetics and mechanism. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 52, 598–606 (2017).
- 24) Young SB, Setlow P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 54–67 (2003).
- 25) Ogata N, Shibata T. Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection. *J. Gen. Virol.*, 89, 60–67 (2008).
- 26) Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Res.*, 38, 1514–1519 (2004).

- 27) Hubbard H, Poppendieck D, Corsi RL. Chlorine dioxide reactions with indoor materials during building disinfection: surface uptake. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 1329–1335 (2009).
- 28) Yu CH, Huang TC, Chung CC, Huang HH, Chen HH. Application of highly purified electrolyzed chlorine dioxide for tilapia fillet disinfection. *ScientificWorldJournal*, 2014, 619038 (2014).
- 29) Choi S, Park S, Kim Y, Kim B, Beuchat LR, Hoikyung K, Ryu J. Reduction of *Salmonella enterica* on the surface of eggshells by sequential treatment with aqueous chlorine dioxide and drying. *Int. J. Food Microbiol.*, 210, 84–87 (2015).
- 30) Hsu MS, Wu MY, Huang YT, Liao CH. Efficacy of chlorine dioxide disinfection to non-fermentative Gram-negative bacilli and non-tuberculous mycobacteria in a hospital water system. *J. Hosp. Infect.*, 93, 22–28 (2016).
- 31) Yeturu SK, Acharya S, Urala AS, Pentapati KC. Effect of Aloe vera, chlorine dioxide, and chlorhexidine mouth rinses on plaque and gingivitis: A randomized controlled trial. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.*, 6, 54–58 (2016).
- 32) United States Department of Labor. Occupational Safety and Health Administration. By Standard Number 1910.1000 TABLE Z-1-TABLE Z-1 Limits for Air Contaminants. Available from:
<https://www.osha.gov/lawsregs/regulations/standardnumber/1910/1910.1000TABLEZ1>
- 33) Ohkubo K, Hirose K, Shibata T, Takamori K, Fukuzumi S. Dihydroxylation of styrene by sodium chlorite with scandium triflate. *J. Phys. Org. Chem.*, 30, e3619 (2017).
- 34) Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ, Sharma A. Development of a gene inactivation system for *Bacteroides forsythus*: construction and characterization of a BspA mutant. *Infect. Immun.*, 69, 4686–4690 (2001).
- 35) Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A, Yoshikawa M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect. Immun.*, 68, 716–724 (2000).
- 36) Ohta K, Makinen KK, Loesche WJ. Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. *Infect. Immun.*, 53, 213–220 (1986).
- 37) Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493–497 (1938).
- 38) Berardi A, Perinelli DR, Merchant HA, Bisharat L, Basheti IA, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. Hand sanitizers amid CoViD-19: A critical review of alcohol-based products on the market and formulation approaches to respond to increasing demand. *Int. J. Pharm.*, 584, 119431 (2020).

- 39) Mahmood A, Eqan M, Pervez S, Alghamdi HA, Tabinda AB, Yasar A, Brindhadevi K, Pugazhendhi A. COVID-19 and frequent use of hand sanitizers; human health and environmental hazards by exposure path- ways. *Sci. Total Environ.*, 742, 140561 (2020).
- 40) Chang A, Amy H. Schnall, Royal Law, Alvin C Bronstein, Jeanna M Marraffa, Henry A Spiller, Hannah L. Hays, Alexandra R. Funk, Maria Mercurio-Zappala, Diane P. Calello, Alfred Aleguas, Douglas J. Borys, Tegan Boehmer, Erik Svendsen. Cleaning and disinfectant chemical exposures and temporal associations with COVID-19— National Poison Data System, United States, January 1, 2020–March 31, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69, 496–498 (2020).
- 41) Kampf G. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *J. Hosp. Infect.*, 98, 331–338 (2018).
- 42) Macinga DR, Shumaker DJ, Werner HP, Edmonds SL, Leslie RA, Parker AE, Arbogast JW. The relative influences of product volume, delivery format and alcohol concentration on dry-time and efficacy of alcohol-based hand rubs. *BMC Infect. Dis.*, 14, 511 (2014).
- 43) Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin. Toxicol. (Phila.)*, 57, 303–311 (2019).
- 44) Stratilo CW, Crichton MK, Sawyer TW. Decontamination Efficacy and Skin Toxicity of Two Decontaminants against *Bacillus anthracis*. *PLoS One*, 10, e0138491 (2015).
- 45) Haley CE, Marling-Cason M, Smith JW, Luby JP, Mackowiak PA. Bactericidal activity of antiseptics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 991–992 (1985).
- 46) Corazza M, Bulciolu G, Spisani L, Virgili A. Chemical burns following irritant contact with povidone-iodine. *Contact Dermat.*, 36, 115– 116 (1997).
- 47) Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1325–1329 (2011).
- 48) Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Inactivation of *Clostridium difficile* spores by disinfectants. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 14, 36– 39 (1993).
- 49) Brazis AR, Leslie JE, Kabler PW, Woodward RL. The inactivation of spores of *Bacillus globigii* and *Bacillus anthracis* by free available chlorine. *Appl. Microbiol.*, 6, 338–342 (1958).
- 50) Bernard D. Davis, Elizabeth S. Mingioli. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.*, 60, 17– 28 (1950).

- 51) Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J. Hosp. Infect.*, 104, 246–251 (2020).
- 52) Bloomfield SF, Uso EE. The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J. Hosp. Infect.*, 6, 20–30 (1985).
- 53) Coates D. A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. *J. Hosp. Infect.*, 6, 31–40 (1985).
- 54) Coates D. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate disinfectants: neutralization by serum. *J. Hosp. Infect.*, 11, 60–67 (1988).
- 55) Bloomfield SF. Chlorine and iodine formulations. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. (Ascenzi J M, ed.). 1st ed. CRC Press, Florida, pp. 133–158 (1995).
- 56) Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. *Disinfection, sterilization, and preservation*. (Block S S, ed.) 4th ed. Lea & Febiger; Philadelphia, pp. 131–151 (1991).
- 57) Nakatsugawa I, Uehara Y, Asakura S. Corrosion of iron and aluminum by swimming pool disinfectants. *J. Jpn. Soc. Saf. Eng.*, 27, 150–156 (1988). Available from https://www.jstage.jst.go.jp/article/safety/27/3/27_150/_pdf/-char/en.
- 58) Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19. WHO Interim guidance. 2020 May 15. Available from: <https://www.paho.org/en/documents/cleaning-and-disinfection-environmental-surfaces-context-covid-19>
- 60) El-Sayed A, Kamel M. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 27, 22336–22352 (2020).
- 61) Wang J, Shen J, Ye D, Yan X, Zhang Y, Yang W, Li X, Wang J, Zhang L, Pan L. Disinfection technology of hospital wastes and wastewater: suggestions for disinfection strategy during coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic in China. *Environ. Pollut.*, 262, 114665 (2020).
- 62) Marris M. Modes of action of disinfectants *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 14 (1), 47-55 (1995)
- 62) Wang Y. Study of wastewater advanced treatment and reclaimed water reuse for a large general hospital. *Meteorol. Environ. Res.*, 7, 37–39 (2016).
- 63) Graham NJD, Reynolds G, Buckley D. Laboratory simulation of disinfection regimes for trihalomethane control. *J. Inst. Water Environ. Manag.*, 3, 604–611 (1989).
- 64) Long BW, Miller RF, Rosenblatt AA. Pilot study: the use of high-purity, chlorine-free chlorine dioxide to minimize trihalomethane formation. *Chem. Oxid.*, 6, 126–133 (1997).

- 65) Ison A, Odeh IN, Margerum DW. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorg. Chem.*, 45, 8768–8775 (2006).
- 66) Noss CJ, Hauchman FS, Olivieri VP. Chlorine dioxide reactivity with proteins. *Water Res.*, 20, 351–356 (1986).
- 67) Ogata N. Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*, 46, 4898–4911 (2007).
- 68) Fukuzumi S, Ohkubo K. Quantitative evaluation of Lewis acidity of metal ions derived from the g values of ESR spectra of superoxide: metal ion complexes in relation to the promoting effects in electron transfer reactions. *Chemistry*, 24, 4532–4535 (2000).
- 69) Kita K, Konishi K, Anraku Y. Terminal oxidase of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. I. purification and properties of cytochrome *b562-o* complex from cells in the early exponential phase of aerobic growth. *J. Biol. Chem.*, 259, 3368–3374 (1984).
- 70) Kasahara M, Anraku Y. Succinate and NADH oxidase system of *Escherichia coli* membrane vesicles. Mechanism of selective inhibition of the systems by zinc ions. *J. Biochem.*, 72, 967–976 (1974).
- 71) Dancy GF, Levine AE, Shapiro BM. *J. Biol. Chem.*, 251, 5911 (1976).
- 72) Hatefi Y. Preparation and properties of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), EC 1.6.5.3. *Methods Enzymol.* (Fleischer S, Packer L ed.) Vol. 53, Academic Press, New York, pp. 11-14 (1978).
- 73) Calhoun MW, Oden KL, Gennis RB, de Mattos MJ, Neijssel OM. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.*, 175, 3020–3025 (1993).
- 74) Yagi T, Matsuno-Yagi A. The proton-translocating NADH quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry*, 42, 2266–2274 (2003).
- 75) Sazanov LA. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*, 46, 2275–2288 (2007).
- 76) Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 69–92 (2006).
- 77) Friedrich T, Dekovic DK, Burschel S. Assembly of the *Escherichia coli* NADH: ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I). *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 214–223 (2016).
- 78) Leif H, Sled VD, Ohnishi T, Weiss H, Friedrich T. Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 230, 538–548 (1995).

- 79) Bjorklof K, Zickermann V, Finel M. Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. *FEBS Lett.*, 467, 105–110 (2000).
- 80) Price CE, Driessen AJM. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1803, 748–766 (2010).
- 81) Tran QH, Bongaerts J, Vlad D, Uden G. Requirement for the proton- pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. *Eur. J. Biochem.*, 244, 155–160 (1997).
- 82) Saiki K, Mogi T, Anraku Y. Heme O biosynthesis in *Escherichia coli*: the *cyoE* gene in the cytochrome *bo* operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 1491– 1497 (1992).
- 83) Kita K, Konishi K, Anraku Y. Terminal oxidase of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. purification and properties of cytochrome *b558-d* complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron-carrying systems. *J. Biol. Chem.*, 259, 3375–3381 (1984).
- 84) Green GN, Fang H, Lin RJ, Newton G, Mather M, Georgiou CD, Gennis RB. The nucleotide sequence of the *cyd* locus encoding the two subunits of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 263, 13138–13143 (1988).
- 85) Green GN, Kranz JE, Gennis RB. Cloning the *cyd* gene locus coding for the cytochrome *d* complex of *Escherichia coli*. *Gene*, 32, 99–106 (1984).
- 86) Dassa J, Fsihi H, Marck C, Dion M, Kieffer-Bontemps M, Boquet PL. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol. Gen. Genet.*, 229, 341 (1991).
- 87) Sturr MG, Krulwich TA, Hicks DB. Purification of a cytochrome *bd* terminal oxidase encoded by the *Escherichia coli* *app* locus from a *Δcyo Δcyd* strain complemented by genes from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.*, 178, 1742–1749 (1996).
- 88) Sena FV, Batista AP, Catarino T, Brito JA, Archer M, Viertler M, Madl T, Cabrita EJ, Pereira MM. Type-II NADH: quinone oxidoreductase from *Staphylococcus aureus* has two distinct binding sites and is rate limited by quinone reduction. *Mol. Microbiol.*, 98, 272–288 (2015).
- 89) Sena FV, Sousa FM, Oliveira ASF, Soares CM, Catarino T, Pereira MM. Regulation of the mechanism of Type-II NADH:Quinone oxidoreductase from *S. aureus*. *Redox Biol.*, 16, 209–214 (2018).
- 90) Hammer ND, Reniere ML, Cassat JE, Zhang Y, Hirsch AO, Indriati Hood M, Skaar EP. Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *mBio.*, 4, e00241–13 (2013).

- 91) Clements MO, Watson SP, Poole RK, Foster SJ. CtaA of *Staphylococcus aureus* is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 181, 501–507 (1999).
- 92) Mikhael EM, Al-Jumaili AA. Can developing countries face novel coronavirus outbreak alone? The Iraqi situation. *Public Health in Practice.*, 1, 100004 (2020).
- 93) Carneiro A, Wroclawski ML, Nahar B, Soares A, Cardoso AP, Kim NJ, Carvalho FT. Impact of the COVID-19 pandemic on the urologist's clinical practice in Brazil: a management guideline proposal for low- and middle-income countries during the crisis period. *Int. Braz. J. Urol.*, 46, 501–510 (2020).
- 94) Lederberg J. Infectious history. *Science*, 288, 287–293 (2000).
- 95) de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14, 523–534 (2016).
- 96) Centers for Disease Control and Prevention. “Implementing filtering facepiece respirator (FFR) reuse, including reuse after decontamination, when there are known shortages of N95 respirators.”: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/ppe-strategy/decontamination-reuse-respirators.html>
- 97) Notification number 19 of Ministry of Labor, Japan. “Standard for Dust Masks. March 30, 1988.”
- 98) Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.*, 46, 586–590 (2020).
- 99) Food and Agriculture Organization of the United Nations. “Compendium of food additive specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 68th meeting 2007. FAO JECFA monographs 4.”:
- 100) WHO. “Chlorine dioxide, chlorite and chlorate in drinking-water— background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.”: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/chlorine-dioxide-chlorite-chlorate-background-jan17.pdf?sfvrsn=cab527bb_5
- 101) Grinshpun SA, Yermakov M, Khodoun M. Autoclave sterilization and ethanol treatment of re-used surgical masks and N95 respirators during COVID-19: impact on their performance and integrity. *J. Hosp. Infect.*, 105, 608–614 (2020).
- 102) Lin TH, Chen CC, Huang SH, Kuo CW, Lai CY, Lin WY. Filter quality of electret masks in filtering 14.6-594nm aerosol particles: Effects of five decontamination method
- 103) Scannapieco FA, Shay K. Oral health disparities in older adults: oral bacteria, inflammation, and aspiration pneumonia. *Dent Clin N Am.*, 58(4),771–82(2014).

- 104) Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, et al. Biology of oral streptococci. *Microbiol Spectr.*, 6,5(2018).
- 105) Dietrich T, Webb I, Stenhouse L, et al. Evidence summary: the relationship between oral and cardiovascular disease. *Br Dent J.*, 222(5),381–5(2017).
- 106) Leite RS, Marlow NM, Fernandes JK, Hermayer K. Oral health and type 2 diabetes. *Am J Med Sci.*, 345(4),271–3(2013).
- 107) Treister N, Glick M. Rheumatoid arthritis: a review and suggested dental care considerations. *J Am Dent Assoc.*, 130(5),689–98(1999).
- 108) Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res.*, 92(6),485–91(2013).
- 109) Kumar PS. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol.*, 595(2),465–76(2017).
- 110) Kaneoka A, Pisegna JM, Miloro KV, et al. Prevention of healthcare-associated pneumonia with oral care in individuals without mechanical ventilation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 36(8),899–906(2015).
- 111) Aoyama T, Tamagawa A. Clinical impact of perioperative oral/dental care on cancer surgery outcomes. *Anticancer Res.*, 39(6),2711–4(2019).
- 112) Fatahzadeh M, Glick M. Stroke: epidemiology, classification, risk factors, complications, diagnosis, prevention, and medical and dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 102(2),180–91(2006).
- 113) Patini R, Staderini E, Lajolo C, et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 22(18),5775–88(2018).
- 114) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 369(9555),51–9(2007).
- 115) Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.*, 26(3),229–42(2018).
- 116) Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.*, 78(922),455–9(2002).
- 117) Tadokoro K, Yamaguchi T, Kawamura K, et al. Rapid quantification of periodontitis-related bacteria using a novel modification of invader PLUS technologies. *Microbiol Res.*, 165(1),43–9(2010).

- 118) Yashima A, Gomi K, Maeda N, Arai T. One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *J Periodontol.*, 80(9),1406–13(2009).
- 119) Tanzer JM, Börjesson AC, Laskowski L, Kurasz AB, Testa M. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol.*, 20,653–9(1984).
- 120) Gutiérrez de Annan S, Ruíz de Valladares RE, Benito de Cárdenas IL. Mitis salivarius-bacitracin 10% saccharose agar for oral streptococci and *Streptococcus mutans* counts. *Acta Odontol Latinoam.*, 10,47–53(1997).
- 121) Choo A, Delac DM, Messer LB. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust Dent J.*, 46(3),166–73(2001).
- 122) Tavares M, Lindefjeld Calabi KA, San Martin L. Systemic diseases and oral health. *Dent Clin N Am.*, 58(4),797–814(2014).
- 123) Lang NP, Cumming BR, Løe H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *J Periodontol.*, 44(7),396–405(1973).
- 124) Sälzer S, Graetz C, Dörfer CE, Slot DE, Van der Weijden FA. Contemporary practices for mechanical oral hygiene to prevent periodontal disease. *Periodontol 2000.* 84(1),35–44(2000).
- 125) Carter-Hanson C, Gadbury-Amyot C, Killoy W. Comparison of the plaque removal efficacy of a new flossing aid (quik floss) to finger flossing. *J Clin Periodontol.*, 23(9),873–8(1996).
- 126) Pollick H. The role of fluoride in the prevention of tooth decay. *Pediatr Clin North Am.*, 65(5),923–40(2018).
- 127) Walsh T, Worthington HV, Glennly AM, Marinho VC, Jeroncic A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.*, 3(3), CD007868(2019).
- 128) Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of *mutans streptococci* in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J Dent.*, 35(5),359–70(2007).
- 129) Wilder RS, Bray KS. Improving periodontal outcomes: merging clinical and behavioral science. *Periodontol 2000.* 71(1),65–81(2016).
- 130) James P, Worthington HV, Parnell C, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.*, 3(3), CD008676(2017).
- 131) da Costa LFNP, Amaral CDSF, Barbirato DDS, Le~ao ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Am Dent Assoc.*, 148(5),308–18(2017).

- 132) Tartaglia GM, Tadakamadla SK, Connelly ST, Sforza C, Martín C. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf.*, 10,2042098619854881(2019).
- 133) Kamath NP, Tandon S, Nayak R, Naidu S, Anand PS, Kamath YS. The effect of aloe vera and tea tree oil mouthwashes on the oral health of school children. *Eur Arch Paediatr Dent.*, 21(1),61–6(2020).
- 134) Gupta D, Bhaskar DJ, Gupta RK, et al. Effect of Terminalia chebula extract and chlorhexidine on salivary pH and periodontal health: 2 weeks randomized control trial. *Phytother Res.*, 28(7),992–8(2014).
- 135) Ernst CP, Canbek K, Dillenburger A, Willershausen B. Clinical study on the effectiveness and side effects of hexetidine and chlorhexidine mouthrinses versus a negative control. *Quintessence Int.*, 36(8),641–52(2005).
- 136) Parikh-Das AM, Sharma NC, Du Q, Charles CA. Superiority of essential oils versus 0.075% CPC-containing mouthrinse: a two-week randomized clinical trial. *J Clin Dent.*, 24(3),94–9(2013).
- 137) Frascella J, Gilbert RD, Fernandez P, Hendler J. Efficacy of a chlorine dioxide-containing mouthrinse in oral malodor. *Compend Contin Educ Dent.*, 21(3),241–4. quiz 256(2000).
- 138) Yeturu SK, Acharya S, Urala AS, Pentapati KC. Effect of Aloe vera, chlorine dioxide, and chlorhexidine mouth rinses on plaque and gingivitis: a randomized controlled trial. *J Oral Biol Craniofac Res.*, 6(1),54–8(2016).
- 139) Kerémi B, Márta K, Farkas K, et al. Effects of chlorine dioxide on oral hygiene—a systematic review and meta-analysis. *Curr Pharm Des.*, 26(25):3015–25(2020).
- 140) Huang N, Pérez P, Kato T, et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med.*, 27(5):892–903(2021).
- 141) Takahiro Noguchi, Keisuke Tachibana, et al.” Safety evaluation of MA-T after ingestion in mice”, *Toxicology.* 477, 153254 (2022)
- 142) 野口雅久 消毒薬耐性とは? *Journal of Healthcare-associated Infection.* 13: 1-7 (2020).
- 143) Ohkubo, K.; Hirose, K. Light-Driven C–H Oxygenation of Methane into Methanol and Formic Acid by Molecular Oxygen Using a Perfluorinated Solvent *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 2126(2018).

謝辞

本研究は大阪大学大学院薬学研究科において行われたものであります。終始、ご指導およびご鞭撻を賜りました井上豪教授に心より感謝の意を表するとともに御礼の言葉を申し上げます。

本論文の作成にあたり、貴重な時間を割いて直接のご指導、ご助言を賜りました辻川和丈教授、近藤昌夫教授に深謝の意を表します。

本研究に至るまで適切かつ有益なご指導とご高配を賜りました内山公男先生（国立病院機構栃木医療センター口腔外科部長（当時））に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、適切かつ有益なご指導、ご助言、および多大なご協力を賜りました古西清司特任教授に感謝の意を表します。

共同研究開始にあたりご指導とご高配を賜りました土井健史教授（創薬基盤科学研究部門長（当時））、井上豪教授（創薬基盤科学研究部門副部門長（当時））、辻川和丈教授（薬学研究科）、竹田潔教授（医学系研究科）、福住俊一名誉教授（工学研究科）、大阪大学高等共創研究院大久保敬教授ほか諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり SARS-Co-V をはじめとするウイルス、病原菌の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました大阪大学微生物病研究所、大阪大学感染症総合教育研究拠点松浦善治教授、大阪大学感染症総合教育研究拠点小野慎子特任准教授ほか諸先生方に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり口腔関連および SARS-Co-V 関連の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能治療学教室阪井丘芳教授、歯学部病院薬剤部長浦川龍太博士、大阪大学安全衛生管理部山本仁教授、イノベーション・デンティストリー戦略室十河基文教授、大阪大学大学院歯学研究科口腔細菌学教室川端重忠教授、ほか諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり薬剤耐性菌に対する噴霧実験の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所朝野和典理事長、国立感染症研究所細菌第一部明田幸宏部長、大阪大学大学院医学系研究科感染制御学濱口重人准教授、ほか諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり酵母関連の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました東京工業大学大隅良典栄誉教授、研究室の皆様へ深く感謝いたします。

株式会社エースネット代表取締役高森清人氏、専務取締役高森大治氏、常務取締役長屋喜彦氏には大阪大学にて研究の場を与えてくださり、また本論文をまとめる機会を与えていただき、謹んで感謝の意を表します。

株式会社アプリコット代表取締役社長荻原弘子氏には薬学研究科4号館という素晴らしい研究の場を与えていただき深く感謝いたします。

大阪大学との共同研究において初期から今日に至るまで多大なご協力をいただきました株式会社アズワン代表取締役社長井内卓嗣氏、株式会社 dotAqua 代表取締役社長安達宏昭氏、及び皆様へ深く感謝いたします。

研究遂行及び社会実装に多大なご助言、ご協力をいただきましたアース製薬株式会社の皆様へ深く感謝いたします。

本研究は、以上に挙げきれなかった多くの方々からのご協力、ご指導、ご鞭撻により達成されたものであり、心より御礼申し上げます。

最後に、今まで励まし、論文の完成に導いてくれた両親に厚く御礼申し上げます。

令和5年8月

柴田 剛克