〈原 著〉

抗酸菌およびそのバイオフィルムに対する次亜塩素酸ナトリウムと 二酸化塩素ガス溶存液の殺菌効果

西内由紀子¹⁾・田丸 亜貴²⁾・戸谷 孝洋³⁾

Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorine Dioxide against Mycobacteria and Mycobacterial Biofilm

Yukiko NISHIUCHI¹⁾, Aki TAMARU²⁾ and Takahiro TOTANI³⁾¹⁾Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City University Medical School,²⁾Department of Infectious Diseases, The Osaka Prefectural Institute of Public Health,³⁾Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine

(2015年1月5日 受付・2015年3月27日 受理)

要 旨

塩素系消毒剤の次亜塩素酸は水やプールの消毒に使用され、二酸化塩素ガス溶存液は次亜塩素酸より低濃度で微生物を殺菌することが知られている。非結核性抗酸菌の *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* (MAH) は水道や浴室でバイオフィルムを形成する。MAH は環境から経口感染して播種性 MAH 症を、経気道感染して肺 MAH 症を引き起こす。したがってこれらの消毒法の確立は急務であるが、バイオフィルムに対する効果はあまり知られていない。そこで MAH のバイオフィルムに対する塩素系消毒剤の殺菌作用を液体中の浮遊菌と比較した。浮遊 MAH 菌 (約 10^5 CFU/mL) は結核菌や *M. kansasii* よりも消毒剤に抵抗性を示し、検出限界以下まで殺菌するには次亜塩素酸ナトリウム 1000 mg/L 5 分間または 100 mg/L 30 分間要した。同様に二酸化塩素ガス溶存液は 10 mg/L 濃度 5 分間曝露で検出限界以下まで殺菌した。96 ウェルプレートに形成された MAH のバイオフィルムは、 10^8 – 10^9 CFU/well まで菌数が増加した。これらに対して次亜塩素酸ナトリウム 1000 mg/L は 30 分後に約 90% の菌を死滅させるにとどまった。一方、二酸化塩素ガス溶存液 100 mg/L は 10 分後に 99.99% 殺菌し、30 分後には対数減数値 5–8 を示した。完全に殺菌できないことから浴室等の MAH 除菌効果はさらに検討する必要がある。また環境菌に対する消毒剤の評価はバイオフィルムを考慮する必要がある。

Key words : 抗酸菌, バイオフィルム, 次亜塩素酸ナトリウム, 二酸化塩素, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*

はじめに

多くの細菌が自然界や人工の施設や器具、ヒトを含むあらゆる生物の体表や体内にバイオフィルムを形成することが明らかになってきている。一般にバイオフィルムを形成した細菌は消毒剤や抗菌薬に対する抵抗性が高まることが知られている。そのためバイオフィルムを形成

した菌を消毒するには、消毒剤を高濃度にしたり長時間曝露したりする必要がある。したがって、バイオフィルムを形成した病原性微生物に対する消毒剤や抗菌薬の効果を検証する事は公衆衛生上たいへん重要である¹⁾。

非結核性抗酸菌は、バイオフィルムを形成して浴室や水道水などを汚染する事が知られており^{2–4)}、世界保健機関も水道水を汚染する病原性微生物の一つとして着目している⁵⁾。なかでも非結核性抗酸菌の *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* (MAH) は水道や浴室でバ

¹⁾大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所, ²⁾大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課, ³⁾大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野

イオフィルムを形成して定着している^{2~4)}。MAH は環境から経口感染して播種性 MAH 症を、経気道感染して肺 MAH 症を引き起こすと考えられている⁶⁾。この病原性環境菌の感染を制御するためには感染源となる環境中の菌を除去することが重要である。水道やプールなどの水系の消毒剤の代表は塩素系消毒剤で、100 年以上にわたって世界中で使われている。ところが、この非結核性抗酸菌や結核菌は、細菌の中でも塩素に対する抵抗性が強い事が知られている。Taylor によれば、*M. avium* に対する遊離塩素の CT99.9% (99.9% の菌を殺すことができる消毒剤の濃度 (mg/L) と時間 (分) をかけた値) は大腸菌に比べ 700–3000 倍高い値であると報告している⁷⁾。バイオフィルムを形成するとさらに抵抗性を有すると考えられるが、バイオフィルムを形成した抗酸菌に対する塩素系消毒剤の消毒効果の報告はない。したがって非結核性抗酸菌の MAH が形成するバイオフィルムに対する塩素系消毒剤の消毒効果の検証は必要である。そこで本研究では塩素系消毒剤のうち、よく使用されている次亜塩素酸ナトリウムおよび低濃度で有効であることが知られている二酸化塩素ガス溶存液を用いて MAH の液体浮遊菌とバイオフィルムに対する消毒効果を検討した。まず病原性抗酸菌に対する消毒剤の効果を比較し、次にバイオフィルムを形成した MAH 菌と浮遊 MAH 菌に対する消毒剤の効果を比較した。

材料と方法

1. 被験菌

Mycobacterium avium subsp. *hominissuis* の環境分離株 OCU806 (MAH806)、標準株 104 (MAH104) および臨床分離株 (MAH) を用いた。その他の抗酸菌として *M. tuberculosis* H37Rv (結核菌)、多剤耐性結核菌 (isoniazid, rifampicin, streptomycin, kanamycin, ethambutol, ニューキノロン耐性)、*M. intracellulare*, *M. kansasii* の各臨床分離株も用いた。本実験は 2010 年から 2013 年にかけて大阪府立公衆衛生研究所の P3 レベル実験室および大阪市立大学大学院医学研究科の P2 レベル実験室において実施した。実験にあたり、大阪府立公衆衛生研究所運営審査会病原体等取扱安全管理審査部会より結核菌および非結核性抗酸菌の使用を、大阪市立大学バイオセーフティ委員会より BSL2 の微生物の使用を承認されている。

2. 培養とバイオフィルム形成

抗酸菌は前培養後、増殖期の菌を McFarland 2 に調整したのち生理食塩水で 50 倍希釈して試料菌液とした。高濃度菌液は試験管用分光光度計 mini photo 518R (TAITEC) を用いて濁度 (660 nm) 0.5 に調整し、これを試料菌液とした。またバイオフィルムを形成した菌液は次のように調整した。前培養後、増殖期の菌の濁度を

図1 96ウェルプレートに形成されたバイオフィルム
培養2週間後のバイオフィルム(左)と培養液除去後の
バイオフィルム(右)

0.1 に調整したのち Middlebrook 7H9 液体培地で 100 倍希釈して 96 ウェルプレートに 200 μ L ずつ播種し、山崎らの方法を一部改変してバイオフィルムの形成をおこなった⁸⁾。プレートインキュベーター内で 5% O_2 , 37°C, 2 週間培養した。培養液を除去しウェル内に残存した菌塊をバイオフィルムとした (図 1)。

3. 被検消毒剤と有効成分濃度および pH の測定

500 mg/L 二酸化塩素ガス溶存液 (クレベリン L[®], 大幸薬品株) および 12.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (和光純薬工業株) を用いた。これらの被験薬は大幸薬品株より供与された。被験薬は冷蔵庫に保管し、使用直前に被験薬の有効成分濃度を測定した。二酸化塩素ガス溶存液の有効成分濃度測定は、蒸留水で希釈した後に Sjoestroem らの方法にしたがって 400 nm における吸光度を分光光度計 V-560 (日本分光株) を用いて測定した。その結果からモル吸光係数 590 L/mol $\cdot$ cm により濃度を求めた⁹⁾。次亜塩素酸ナトリウムの濃度は上水試験法に基づいて行った。簡潔に述べると、1000 倍希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 mL にヨウ化カリウム 0.04 g および 1 mol/L 硫酸 0.6 mL を加え、ここに生じた黄色が消えるまで 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、有効塩素濃度を算出した¹⁰⁾。二酸化塩素ガス溶存液の pH は 6.0, 100 mg/L および 10 mg/L 濃度液の pH はそれぞれ 6.3, 6.5 であった。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液の pH は、原液 12.8, 1000 mg/L 11.1, 100 mg/L 10.0 であった。次亜塩素酸は保管温度が高いと急速に分解して有効塩素濃度が低下することが知られているが¹¹⁾、二酸化塩素ガス溶存液を 35.4°C 条件下に 32 日間保管したところ、初期濃度測定値 500 $\pm$ 12 mg/L (平均 $\pm$ S.D.) から保管後の測定値 509 $\pm$ 12 mg/L となり濃度変化せず安定であった。

4. 消毒効果の検討

バイオフィルムを形成させたウェルから菌液を取り除き、二酸化塩素ガス溶存液 100 mg/L、次亜塩素酸ナトリウム 1000 mg/L を 250 μ L 添加した。室温で 5, 10, 30, 60 分間反応させた後、30 mM または 200 mM チオ硫酸ナトリウム含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5, チオ硫酸 Na 緩衝液) を 50 μ L 添加して中和し反応を停止

した．対照は被検葉のかわりに滅菌精製水 250 μ L 添加した．消毒終了後，ウェルの壁に付着している菌を滅菌綿棒で擦過し，菌を混和した中和消毒液を別のチューブに移した．滅菌精製水 200 μ L をウェルに添加して残存している菌を集めて中和消毒液と一緒にした．この菌液の生菌数を測定した．対照の生菌数を消毒前の生菌数とした．消毒後の生菌数の減少度を%または対数減数値として表し，消毒効果を解析した．

浮遊菌に対する消毒効果は，試料菌液に被検葉を終濃度 10, 100, 1000 mg/L となるように加えて混和し，1, 5, 10, 30, 60 分間室温にて作用させた後に 30 mM または 200 mM チオ硫酸 Na 緩衝液を添加して中和した．中和後の残存生菌数を測定した．

5. 生菌数の定量および観察

生菌数は菌液を 10 倍希釈系列で希釈し，希釈液 10 μ L を Middlebrook 7H11 0.2% glycerol, 10% oleic acid-ADC (OADC, BD) 平板培地に塗抹して 37°C で培養した．一週間後に実体顕微鏡下で形成コロニー数を数えて生菌数 (CFU) を求めた．

結 果

1. 病原性抗酸菌に対する消毒剤の効果

病原性抗酸菌に対する次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果を検討したところ，10 mg/L の次亜塩素酸ナトリウムに 30 分間曝露しても結核菌や MAH に対して殺菌作用を示さなかった (図 2)．100 mg/L 次亜塩素酸ナトリウムを用いると，*M. kansasii*, *M. intracellulare* は 5 分以内に，*M. tuberculosis* は 10 分以内に検出限界以下まで殺菌されたが，MAH を検出限界以下まで殺菌するためには 30 分要した (図 2)．1000 mg/L の次亜塩素酸ナトリウムは 5 分以内に検出限界以下まですべて殺菌した (図 2)．この時の菌液濃度は $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ CFU/mL であった．抗酸菌は高度塩素耐性であると言われているが，病原性抗酸菌のなかでも MAH はもっとも塩素抵抗性であることがわかった．一方，二酸化塩素ガス溶存液は，10 mg/L 濃度で 5 分以内に検出限界以下まで抗酸菌を減少させることができた (図 2)．

2. 液体培地で培養した MAH の高濃度菌液に対する消毒剤の効果

バイオフィーム形成時の菌は高濃度集積した状態で生息していることが知られている (図 1)．浮遊した菌液も高濃度であれば，消毒剤の効果が異なると考えられる．そこで浮遊菌液を約 100 倍濃い $1.7 - 6.6 \times 10^7$ CFU/mL の濃度に調整して消毒効果を検討した．その結果，次亜塩素酸ナトリウム 1000 mg/L は 10 分で 99-99.9% の菌を殺菌したが，検出限界以下まで殺菌するためには 30 分かかり (図 3 A)，次亜塩素酸ナトリウムによる高濃度 MAH 菌液の殺菌には長時間要することがわかった．

図 2 病原性抗酸菌に対する塩素系消毒剤の効果
MAH, *M. tuberculosis*, 多剤耐性 *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* 菌液に対する次亜塩素酸 (NaClO) 10 mg/L (灰色破線), 100 mg/L (灰色一点鎖線), 1000 mg/L (灰色実線), 二酸化塩素ガス溶存液 (ClO₂) 10 mg/L (黒色破線), 100 mg/L (黒色実線) を各時間曝露後の生菌数を示す．

一方，二酸化塩素ガス溶存液は高濃度 MAH 菌液に対しても急速に作用し，100 mg/L 5 分間曝露で検出限界以下まで減少させた (図 3 A)．

3. バイオフィーム形成菌に対する消毒剤の効果

バイオフィームを形成すると (図 1)，MAH806 は $7.4 - 11 \times 10^8$ CFU/well，標準株 MAH 104 は $1.9 - 2.3 \times 10^8$ CFU/well の菌数であった．図 3 B, C にバイオフィームに対する消毒剤の効果を 2 回行った結果を示す．一旦バイオフィームを形成すると図 3 A に示す浮遊菌に比べ塩素系消毒剤の殺菌効果は著しく低下した．1000 mg/L の高濃度の次亜塩素酸ナトリウムは，バイオフィームを形成した標準株に対して 10 分間曝露で 90% 殺菌，30-60 分間曝露で 99.9%-99.99% 殺菌したが，環境分離株に対して 10 分間曝露で 10% 未満の菌を殺菌した．従って環境から分離した MAH に対して殺菌効果が低かった．また 1 時間曝露しても 0.5-3.5% の菌が生き残った (対数減数値 2.28, 1.46)．

一方，二酸化塩素ガス溶存液は標準株に対して 5 分間曝露で対数減数値 5-6 を，環境分離株に対しても 10 分間曝露で対数減数値 4 を示して 99.99% 以上の殺菌作用を示した．この結果から浮遊菌に対するのと同様急速に死滅させる効果が認められた (図 3 B, C)．しかしながら 60 分後も 0.001% の菌が生残した (図 3 B)．MAH の

図3 浮遊性およびバイオフィルムを形成した MAH に対する塩素系消毒剤の効果

浮遊性 MAH (A) およびバイオフィルム形成 MAH (B, 1 回目, C, 2 回目) に 1000 mg/L 次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) および 100 mg/L 二酸化塩素ガス溶存液 (ClO_2) の環境分離株 MAH806 (806) および標準株 MAH104 (104) に対する殺菌効果を示す。

バイオフィルムは浮遊菌よりも極めて強い抵抗性を示し、完全に除去する事が難しい事を示している。

考 察

一般に抗酸菌は細胞壁に脂質成分が多いため種々の環境変化に強く、塩素に対しても抵抗性があると言われている¹²⁾。大腸菌 O157 に対して 0.25 mg/L 次亜塩素酸ナトリウム 1 分曝露で 10^7 CFU/mL 前後の菌をほぼ殺菌し¹³⁾, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* に対して 100 mg/L 次亜塩素酸ナトリウム 10 分間曝露で 10^6 – 10^7 CFU/mL の菌を検出限界以下にまで殺菌することが知られている¹⁴⁾。今回、 10^5 CFU/mL 前後の抗酸菌を検出限界以下まで殺菌するためには、100 mg/L 次亜塩素酸ナトリウムを 10 分間曝露、MAH に対してはさらに高濃度 (1000 mg/L 10 分) 曝露する必要がある。高濃度の MAH 菌液 (10^6 – 10^7 CFU/mL) を検出限界以下にまで殺菌するためにはさらに高濃度長時間 (1000 mg/L 30 分) 曝露する必要がある。これらの結果から抗酸菌は緑膿菌、大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラなどの細菌よりも塩素に対して抵抗性があり、抗酸菌の中でも MAH は 10 倍以上塩素抵抗性が強いことがわかった。

バイオフィルムを形成すると、各種消毒剤や抗菌薬に抵抗性を有するようになることが知られている。今回、MAH バイオフィルムに対して 1000 mg/L 次亜塩素酸ナトリウムを 1 時間曝露しても 0.5–3.5% の菌が生き残って検出限界以下にならなかった。一方、100 mg/L の二酸化塩素ガス溶存液は浮遊菌およびバイオフィルム形成菌ともに急速に殺菌作用が認められ、10 分以内に 99.99% 以上殺菌した。このことから、二酸化塩素ガス溶存液 100 mg/L 10 分の消毒は有効であるといえる。ただし 60 分後にも 0.001% の菌が生き残って完全に殺菌することは難しかった。

これは一旦バイオフィルムを形成すると次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素ガス溶存液では完全に殺菌できないことを示している。この事実は次亜塩素酸や二酸化塩素ガス溶存液による消毒が周りの雑菌を殺菌して、残った抗酸菌にとっては増殖しやすい環境になる可能性がある。実際、家庭用塩素系漂白剤でシャワーヘッドを除菌すると、シャワーヘッドの抗酸菌がその後増加したとの報告がある¹⁵⁾。すなわち、安易な消毒剤の使用はかえって非結核性抗酸菌の定着を促すことにつながりかねない。

したがってバイオフィルムの除去には物理的にバイオフィルムを除去した上で消毒することが効果的であるかもしれない。ところが MAH が高頻度に分離される浴室では、シャワーヘッドの内側や浴槽の注水口など掃除のしにくい場所に MAH が定着している事が指摘されている^{2,3)}。これらの場所は物理的な除去が難しい。そのためこれらの場所の消毒には、消毒剤による除去を行う必要があるが、次亜塩素酸よりも二酸化塩素ガス溶存液による消毒が有効な手段であるといえる。ただし上述したように安易な消毒剤の使用をさけ、繰り返し消毒するなど生残した菌の増殖を防ぐ必要があるだろう。また次亜塩素酸ナトリウムは 500 mg/L 以上で腐食作用を示す¹⁴⁾ので、1000 mg/L で 1 時間曝露する除菌方法は浴室の除菌には適していない。二酸化塩素ガス溶存液にも腐食作用があることが知られているが、中性の 100 mg/L 二酸化塩素ガス溶存液 10 日間曝露はステンレスに対して腐食作用を示さなかった¹⁶⁾。したがって二酸化塩素ガス溶存液を 100 mg/L 10 分曝露する消毒方法による腐食作用の危険性は低いと推測される。さらにガス状の二酸化塩素は気管に刺激性があること¹⁷⁾、次亜塩素酸は酸性条件下では有毒な塩素ガスを発生する事が知られている。本消毒は高濃度の次亜塩素酸や二酸化塩素溶存液を使用する。この濃度で実際に使用しているデータにおける安全性は確立していないため、取り扱い

には十分注意する必要がある。使用にあたっては換気を十分に行うことさらに手袋の着用を勧める。

バイオフィルムを形成するとほぼ同じ濃度の浮遊菌に比べて MAH は著しく塩素系消毒剤に抵抗性を有するようになった。また環境から感染する病原性細菌には *P. aeruginosa* など院内感染を起こす菌が少なからずある。これらの菌は環境中でバイオフィルムを形成してより消毒剤に対して抵抗性になっていると推測される。したがってこれらの環境菌の消毒剤の評価にはバイオフィルムに対する効果を検討することが重要である。

飲料水系を汚染する微生物のうち非結核性抗酸菌は最も塩素系消毒剤に耐性で、なかでも MAH は最も耐性であることが今回判明した。アメリカの食品医薬品局の定義によれば、器具等の高度消毒とは殺菌性消毒剤を短い時間接触させて、適切な抗酸菌に対し対数減数値 6 の殺菌性を示すことであるとしている¹⁴⁾。これらの結果から、殺菌性消毒剤の高度消毒の評価には MAH を用いることが適切であると考えられる。

バイオフィルムを形成したときの消毒剤の効果を評価する方法は、緑膿菌で標準化されているが¹⁸⁾、その他の菌については知られていない。バイオフィルムは菌種や生育環境によって多様性があるので、それぞれの菌種や生育条件に応じた評価系の標準化が望まれる。本研究では抗酸菌のバイオフィルムに対する消毒剤の評価系の一案を示している。本方法は 96 ウェルプレートに形成されるバイオフィルムに対する効果を検討したもので、簡便で特別な機器や器具を使用せずにできるため、P2 レベルの実験室であれば多くの施設で応用できる。また図 3 B, C に示したように再現性も認められた。これらの点で本方法は有用であると考えられるが、今後抗酸菌のバイオフィルム形成の研究が進展すれば、MAH のバイオフィルムの形成に寄与する要因を考慮した評価系が考案されるかもしれない。バイオフィルムの消毒剤を評価する系の議論を重ねて評価系の標準化がすすめば、種々の消毒剤のより適正な評価につながると考えられる。

利益相反自己申告：本研究は産官学の共同研究で、著者西内由紀子および田丸重貴は、大幸薬品㈱から資金援助を受けている。

文 献

- Dickschat JS: Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* 2010; 27(3): 343-69.
- Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, *et al.*: The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis* 2007; 45(3): 347-51.
- Nishiuchi Y, Tamaru A, Kitada S, Taguri T, Matsumoto S, Tateishi Y, Yoshimura M, *et al.*: *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 182-6.
- 西内由紀子, 立石善隆, 松本壮吉: 生活環境における非結核性抗酸菌の分布. *化療の領域* 2010; 26(12): 2405-13.
- WHO: Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. 2011: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/ accessed August 6, 2014.
- Falkinham JO 3rd: Surrounded by mycobacteria: non-tuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009; 107(2): 356-67.
- Taylor RH, Falkinham JO 3rd, Norton CD, LeChevallier MW: Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4): 1702-5.
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Macnab M, Bermudez LE: *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 819-25.
- Sjostrom L, Tormund D: Determination of inorganic chlorine compounds and total chlorine in spent bleaching liquors. 2. Spectrophotometric methods for chlorine dioxide and chlorine. *Sven Papperstidn* 1978; 81: 114-20.
- 安藤正典: 上水試験方法 2001. 17 残留塩素, 日本水道協会, 東京. 2001. p. 254-5.
- 日本水道協会: 水道用薬品等基準に関する調査委員会. 水道用次亜塩素酸ナトリウムの取り扱い等の手引き(Q&A). 2008; http://www.jwwa.or.jp/houkokusyo/pdf/200803_suidouyou_guideline.pdf/ accessed August 6, 2014.
- Brennan PJ, Nikaido H: The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 29-63.
- Zhao T, Doyle MP, Zhao P, Blake P, Wu FM: Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in water. *Journal of food protection* 2001; 64: 1607-9.
- Rutala WA, Weber DJ, HICPA Committee: 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008: http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf accessed August 6, 2014.
- Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR: Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(38): 16393-9.
- Bohner HF, Bradley RL: Corrosivity of chlorine dioxide used as sanitizer in ultrafiltration systems. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3348-52.
- Patel Y, Wong D, Ingerman L, McGinnis P, Osier M: Toxicological review of chlorine dioxide and chlorite. U.S. Environmental Protection Agency 2000; EPA/635/R-00/007. <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0496tr.pdf> accessed December 23, 2014.
- ASTM E2799-12, Standard test method for testing disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using the MBEC Assay, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012, www.astm.org

〔連絡先〕 〒560-8552 大阪府豊中市刀根山 5-1-1
 大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所
 西内由紀子 E-mail: nishiuchi@med.osaka-cu.ac.jp

Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorine Dioxide against Mycobacteria and Mycobacterial Biofilm

Yukiko NISHIUCHI¹⁾, Aki TAMARU²⁾ and Takahiro TOTANI³⁾

¹⁾*Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City University Medical School,*

²⁾*Department of Infectious Diseases, The Osaka Prefectural Institute of Public Health,*

³⁾*Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine*

Abstract

Mycobacterium avium subspecies *hominissuis* (MAH), a nontuberculous mycobacterium, is sometimes detected in drinking water systems and bathrooms where it forms biofilm. MAH causes pulmonary disease, disseminated infections, and lymphadenitis in small children, transmitted from the environment to the human body *via* ingestion and inhalation of contaminated water and aerosols. Therefore, methods for disinfecting environmental biofilm-forming MAH are essential. Sodium hypochlorite is a chlorination agent widely used to disinfect water in drinking water systems and swimming pools, and chlorine dioxide also has potent bactericidal activity. However, the bactericidal activity of chlorine compounds against biofilm-forming MAH remains unclear. Therefore, we compared the disinfectant activities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide against planktonic growing and biofilm-forming MAH cells. Concentrations of 100 and 1000 mg/L of sodium hypochlorite killed planktonic MAH cells (about 10⁵ CFU/mL) within 30 and 5 min, respectively, whereas 10 mg/L of chlorine dioxide killed these cells within 5 min. MAH biofilm had cell counts of up to 10⁸–10⁹ CFU/well. Although 1000 mg/L of hypochlorite applied to MAH biofilm killed only 90% of these cells in 30 min, 100 mg/L of chlorine dioxide killed 99.99% of cells in 30 min. Therefore, chlorine dioxide is superior to sodium hypochlorite for the eradication of environmental MAH. However, MAH biofilm caused reduction in the bactericidal activity of chlorine-based disinfectants. Therefore, structural and functional analyses of MAH biofilm prepared using environmental isolates may facilitate eradication of environmental bacilli.

Key words : mycobacteria, biofilm, sodium hypochlorite, chlorine dioxide, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*