

展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-6

バイオフィルム成分の洗浄除去メカニズム Mechanism of the Removal of Biofilm Components by Cleaning Operation

福崎智司
Satoshi Fukuzaki

岡山県工業技術センター
食品技術グループ グループ長

1 はじめに

近年、食品及び医療関連施設では、細菌に起因する食性疾患や院内感染の防止が重要な課題となっている。主な汚染源として、細菌群が膜状に集積したバイオフィルムの関与が指摘されている¹⁻⁴⁾。バイオフィルムの形成においては、その初期段階にタンパク質などの有機物によるコンディショニングフィルムが形成され、その上に細菌が付着すると考えられている。さらに、付着した細菌は酸性多糖類やタンパク質から成る細胞外ポリマー (EPS) を生成し、バイオフィルムの成長を促進させる。いったんバイオフィルムが形成してしまうと、細菌群は各種薬剤に対して強い抵抗性を示すようになる。それは、バイオフィルム形成細菌が生成しているEPSや上層に堆積した菌体が保護層となるためである。バイオフィルム形成細菌の次亜塩素酸ナトリウム (pH7.0) に対する抵抗性は、浮遊細菌よりも150～3,000倍も高いという報告がある⁵⁾。

では、どうすればバイオフィルムの形成を阻止することができるのか？ もっとも基本的な対策は、できるだけ早い段階でコンディショニングフィルム成分や付着微生物を排除すること、すなわち洗浄操作の実施である。実際の洗浄では、付着微生物は一般の有機物汚れと同様の離脱挙動を示すため、微生物と有機物汚れの除去には同一の洗浄方法を用いる。食品製造装置の洗浄では、ステンレス鋼などの硬質表面に付着したタンパク質の洗浄除去が基本的な問題となっている。一方、洗浄を行うだけでは微生物数や有機物付着量を完全にゼロにすることは困難である。そのため、後段では微生物の増殖を防止するために殺菌を行う必要がある。洗浄が殺菌に先んずる工程である理由、それは有機物 (コンディショニングフィルム) 成分がない清浄な表面の方が、はるかに殺菌しやすいからである。

バイオフィルムの形成に深く関与するタンパク質や微生物

細胞が、水溶液中においてステンレス鋼表面に付着する過程では、種々の分子間相互作用が働くことになる。この相互作用を理解することは、微生物細胞の付着の抑制や最適な洗浄力要素の選択において基礎的かつ重要な情報を与えてくれる。特に、金属材料の視点から言えば、ステンレス鋼最表面の極性の発現と静電的特性を理解しておくことが重要となる。本稿では、洗浄効率に影響を及ぼす諸因子として、1) ステンレス鋼—水界面の特性と相互作用、2) アルカリ (水酸化物イオン) の洗浄効果、3) ステンレス鋼の熱履歴と洗浄性の関係について概説した後、4) 食品産業や医療現場において殺菌剤としてもっとも汎用されている次亜塩素酸ナトリウムの有効な使用法について触れてみたい。

2 ステンレス鋼—水界面の特性と相互作用

2.1 ステンレス鋼

ステンレス鋼の表面特性や耐食性は、表面に形成する酸化皮膜の物理的・化学的特性に依存する。酸化皮膜は、CrやFeの酸化物や(オキシ)水酸化物から成る非晶質構造であり、さらにその最表面には水の解離吸着によって形成した水酸基が存在しており、固相の一部を形成している⁶⁻⁸⁾。表面は化学的に不均一であり、表面の酸素位置と金属位置によって形成される水酸基の解離特性も異なる (図1)。すなわち、水から解離した水酸基が1個の金属イオンに配位して形成された水酸基①は、金属イオンからの分極が弱い水素を強く結合し、塩基性を示すようになる ((1) 式)。一方、水から解離したH⁺と格子の酸素から形成され、2個の金属イオンに配位した水酸基②は、金属イオンの強い分極の影響で水素の結合力が弱く、酸性の性質を示す ((2) 式)。





このように、ステンレス鋼の表面水酸基が水溶液中でプロトン (H^+) を吸・脱着することにより電荷を生じる。電位決定イオンは水素イオン (H^+) と水酸化物イオン (OH^-) なので、電位差 (pH) 滴定法を用いてステンレス鋼—水相における H^+ と OH^- の表面濃度差 (H^+ の相対吸着量) を定量することにより表面電荷密度を測定することができる。図2Aにステンレス鋼SUS316L (微粒子試料で測定) の見掛けの表面電荷密度曲線を示す。正・負の電荷密度は、pHに依存して変化することがわかる。また、加熱処理や硝酸処理などの前処理により、ステンレス鋼の表面電荷特性は大きく変化する。ステンレス鋼が親水性を示すのは表面水酸基の存在に起因し

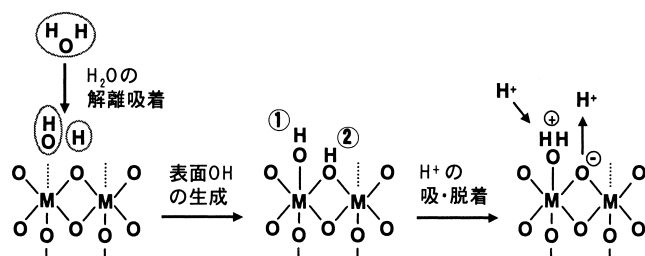


図1 酸化物（皮膜）表面への水の化学吸着と表面電荷

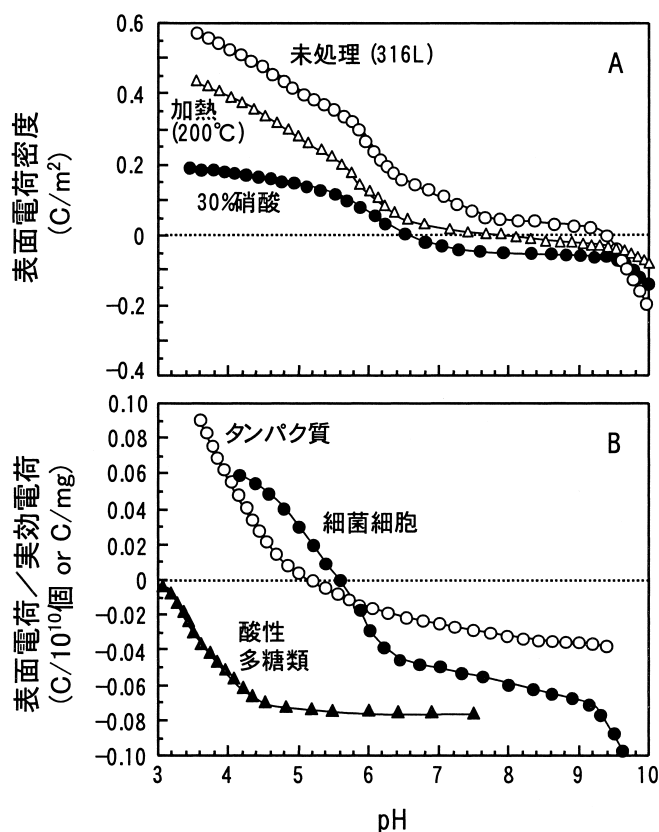
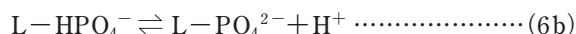
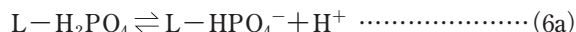
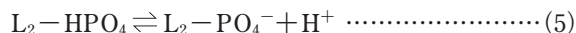
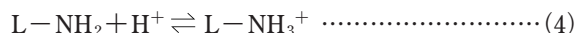
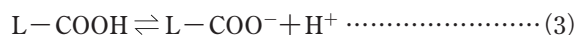


図2 ステンレス鋼及び生物物質の表面電荷とpHの関係
($10^{-1}M$ KNO₃溶液中での滴定曲線から算出)

ており、表面電荷特性や親水性度は、表面水酸基の性質や水酸化化度に支配される。ステンレス鋼の酸化皮膜は化学的・物理的に安定であるが、その最表面は極性であり、極性物質の吸着や脱着が起こる動的な反応場でもある。

2.2 微生物細胞

一般に、微生物細胞の最外部の周囲には細胞壁があり、その内側に形質膜と呼ばれる生体膜がある。細胞壁の構造は微生物の種類によって様々であり、例えば酵母はホスホマンナン—タンパク質複合体が、グラム陽性細菌はペプチドグリカン—テイコ酸が主要構成成分である。また、グラム陰性細菌には、細胞壁の周囲にリポ多糖を主要成分とする外膜が存在する。これらの微生物細胞の表層を構成する物質には、共通してカルボキシル基 ((3) 式)、アミノ基 ((4) 式)、リン酸基 ((5)、(6) 式) 等の数多くの荷電官能基が存在するのが特徴である (Lは細胞壁成分を意味する)。すなわち、微生物細胞の電位決定イオンは H^+ と OH^- であり、表面電荷は水溶液のpHに依存して変化する (図2B)。



同様に、タンパク質は分子内にカルボキシル基 ($-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$) やアミノ基 ($-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$) 等を有する両性電解質であり、酸性多糖類はカルボキシル基の解離によりpH3以上では常に負電荷を示す酸性電解質である (図2B)。

2.3 界面における相互作用

タンパク質や微生物細胞とステンレス鋼の間に働く相互作用として、遠距離ではvan der Waals力、静電的相互作用、疎水性相互作用がある。二つの表面電荷の符号が異なるときは、強い引力が働き、異符号の場合は斥力が働く。細胞外ポリマーを有する微生物細胞⁹⁾や“柔らかい”構造のタンパク質¹⁰⁾は、基質との静電的斥力にかかわらず基質表面に吸着することが知られている。また、近距離で働く主な相互作用には、双極子—双極子相互作用、イオン結合、水素結合、共有 (配位) 結合がある。タンパク質—ステンレス鋼、微生物—ステンレス鋼に働く相互作用力は、上記の分子間力の総

和で与えられるが、いずれが支配的となるかは、ステンレス鋼の酸化皮膜の化学組成や表面電荷密度によって変化する。一般に、ステンレス鋼や酸化物に対するタンパク質や酸性多糖類の吸着の場合、分子鎖の酸性アミノ酸残基(カルボキシル基等)が吸着に関与することが報告されており¹¹⁻¹⁵⁾、複数のセグメントによる静電的相互作用(イオン結合)、水素結合、共有(配位)結合等が不可逆吸着に寄与すると考えられている。また、微生物の不可逆付着においても、細胞表層及びEPSのカルボキシル基やリン酸基を介する結合形態が示唆されている^{16, 17)}。

3 アルカリの洗浄効果

固液界面での洗剤の役割は、洗剤成分が、汚れ及び固体表面に吸着して汚れ-固体間の吸着力を最小にすることであり、洗剤成分が汚れと置き換わって固体表面に吸着する置換反応が主要な洗浄メカニズムの一つであると考えられている¹⁸⁾。水酸化物イオン(OH^-)は、タンパク質、多糖類、油脂類等の広範囲の有機性汚れに対して優れた溶解力を示すこと、さらに付着物質ならびにステンレス鋼表面に大きな負電荷を帯電させ吸着親和性を減少させることから、ステンレス鋼の洗浄では重要な洗浄力である。

図3に、ステンレス鋼(316L粒子)に付着したタンパク質(牛血清アルブミン; BSA)及び大腸菌(*Escherichia coli*)の除去に及ぼす洗浄液のpHの影響を示す。タンパク質及び大腸菌は、いずれも水の溶解力だけでは洗浄除去できない形

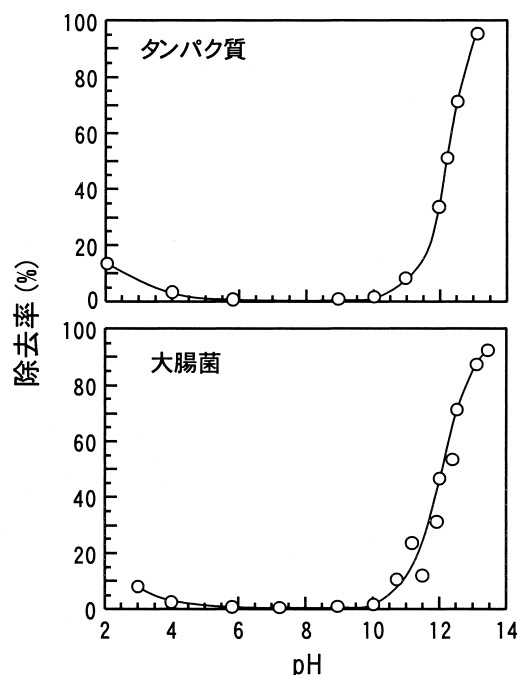


図3 ステンレス鋼表面に付着したタンパク質及び大腸菌の除去に及ぼす洗浄液のpHの影響 (40℃)

態で不可逆付着しているモデル汚れである。タンパク質の除去率は、アルカリ性のpH領域、特にpH11～pH13.5の範囲においてpHの増加(OH^- 濃度の増加)とともに著しく向上する。一方、弱酸性～弱アルカリ性の範囲では、不可逆吸着したタンパク質はほとんど離脱しない。強酸性溶液ではpHの減少とともに除去率はわずかに増加する傾向を示すが(離脱分子はステンレス鋼の溶解に起因する)、アルカリ性溶液と比較すると洗浄効率は低い。大腸菌に対するpHと除去率の関係は、タンパク質と同様な傾向を示しており、 OH^- 濃度の増加とともに洗浄性は向上する。この洗浄除去特性から、ステンレス鋼に対する細菌細胞の吸着形態及び離脱過程は、タンパク質と類似のメカニズム(相互作用)であることが推察される。

図4に、 OH^- によるタンパク質の洗浄除去メカニズムのモデル図を示す。強アルカリ性の OH^- 濃度が高い条件下では、 OH^- はタンパク質に吸着(= H^+ の脱着)し、タンパク質分子鎖及び細胞表層が負電荷を帯びることで水和、膨潤、溶解、分散が促進される。さらに、 OH^- は親水性のステンレス鋼表面にも吸着し、タンパク質とステンレス鋼の表面電荷がともに大きな負電荷を帯びるようになる。その結果、タンパク質との間に静電的斥力が起こることにより、吸着力が消失していき離脱の方向に動的平衡が傾く。最終的には、タンパク質の吸着官能基の位置に OH^- が吸着し、離脱に至る。すなわち、ステンレス鋼-水界面では OH^- による吸着置換反応が洗浄の進行に重要な役割を果たしていると考えられる^{18, 19)}。

一方、プラスチックのような疎水性表面では、 OH^- の吸着サイト数が少なく負電荷密度が著しく小さいため、静電的斥力や OH^- の吸着置換による離脱促進作用は期待できない。この場合、界面活性剤を併用して固液界面への OH^- の浸透を起しやすくさせることで洗浄性は改善される²⁰⁾。

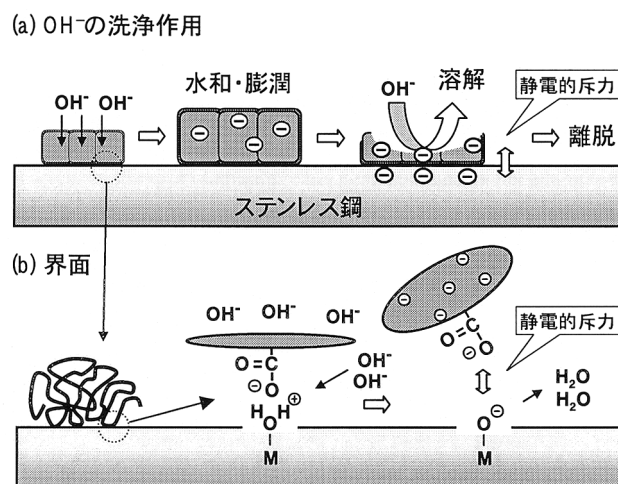


図4 OH^- によるタンパク質の洗浄除去メカニズムのモデル図

図5に、タンパク質 (BSA) が吸着したステンレス鋼 (316L粒子) を種々の濃度のNaOH溶液で洗浄 (40℃) したときの洗浄曲線を示す。グラフは、洗浄時間に対して残存タンパク質量 (Γ) の自然対数值 ($\ln \Gamma$) をプロットしたものである。OH⁻濃度が0.01 M (pH12) から0.3 M (pH13.5) に増加するとともに、洗浄速度ならびに洗浄効率は著しく増加していることがわかる。筆者らは、洗浄速度を定量的に評価するために、吸着タンパク質分子の脱着が速度論的に2種類の機構 (速い脱着と遅い脱着) で起こっていると仮定し、以下の脱着モデルを誘導して解析に用いている^{14, 21)}：

$$\ln \Gamma = \ln \{ \exp(\ln \Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln \Gamma_0^s - k^s t) \} \quad \cdots (7)$$

ここで、 t は洗浄時間、 Γ は時間 t でのタンパク質の残存量、 Γ_0 は $t=0$ での初発タンパク質吸着量、 k は Γ に関する一次離脱速度定数、添え字 f と s は、各々速い脱着と遅い脱着を意味する。

図5の各測定点を結ぶ実線は、(7)式と非線形最小二乗法を用いて解析した結果であり、脱着データと良好な適合性を示している。(7)式を用いた解析では、NaOH濃度が0.01 Mから0.3 Mに増加すると、 k^f は2.3倍増加し、 k^s は8.5倍増加すると概算される。このように、ステンレス鋼に吸着したタンパク質の洗浄除去は、平衡論及び速度論の両側面からOH⁻濃度に依存する。

水酸化ナトリウム (OH⁻) と熱の併用は、汚れ層の膨潤・溶解と加水分解を促進させて相乗的に洗浄速度を高める。熱は比較的安価で有効な物理的作用力であるから、最大限に利用することが好ましい。一次離脱速度定数 k^f は、Arrhenius型の温度依存性を示すことが経験的に知られており、洗浄温度が10℃上昇する毎に離脱速度定数は約1.4～1.6倍増加すると概算されている^{21, 22)}。タンパク質汚れが熱変性している場合や脂肪と複合汚れを形成している場合は、熱エネルギー

ギーへの依存性はさらに高くなる。

4 ステンレス鋼の熱履歴と洗浄性

ステンレス鋼を高温で加熱処理すると酸化皮膜中でのFeの濃縮、不動態皮膜中の水和物の酸化 (酸化物層の形成) ならびに表面水酸基の縮合脱水が起こる。その結果、表面水酸化基化度の低いFe₂O₃を主体とする酸化皮膜が形成される²³⁾。さらに、500～850℃に一定時間保持すると、結晶粒界部にクロム炭化物 (Cr₂₃C₆) が生成して粒界近傍 (熱影響部) にCr欠乏層を生じる現象 (鋭敏化) が起こる。このようなステンレス鋼の表面変化は、タンパク質に対する吸着親和性や洗浄性に大きな変化をもたらす。

図6に、種々の温度 (150～500℃) で加熱したステンレス鋼 (316L粒子) 及び鋭敏化熱処理 (700℃) を施したステンレス鋼 (316L粒子) にタンパク質を吸着させた後、0.1 M水酸化ナトリウム溶液で洗浄したときの洗浄曲線を示す。高温で加熱処理したステンレス鋼ほど、洗浄によるタンパク質の離脱速度は緩慢であり、120分の洗浄終了時の残存量も多い結果となった。洗浄性の低下は、表面のFeの濃縮及び水酸化基化度の減少と相関する変化であるが²³⁾、詳細は明らかになっていない。一方、700℃ (鋭敏化温度域) で加熱処理されると洗浄性の低下が著しく、吸着タンパク質の除去は容易ではないことがわかる。鋭敏化した材料は、耐食性の低下ばかりでなく、洗浄性にも劣るのである。

筆者らの研究室では、オゾンガスの酸化力を利用してステンレス鋼の表面電荷特性を改質し、洗浄性を改善する研究を進めている^{15, 19, 24, 25)}。図7に、0.2 vol%オゾン処理ステンレス鋼及び未処理ステンレス鋼 (いずれも316L粒子) にタンパク質を吸着させた後、0.1 M水酸化ナトリウム溶液で洗浄したときの洗浄曲線を示す。オゾン処理ステンレス鋼に吸着し

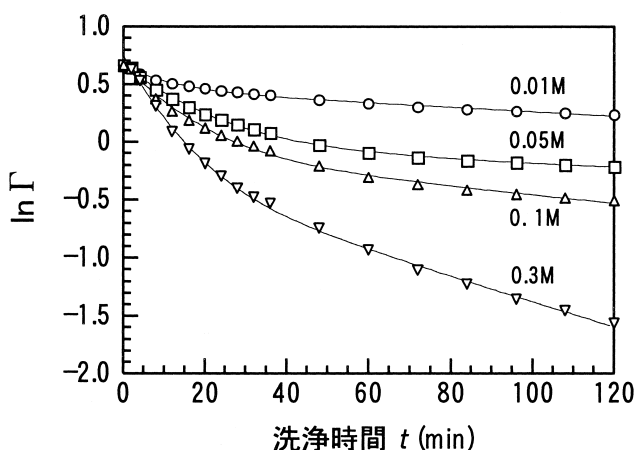


図5 ステンレス鋼表面からのタンパク質の除去速度に及ぼす水酸化ナトリウム濃度の影響 (40℃)

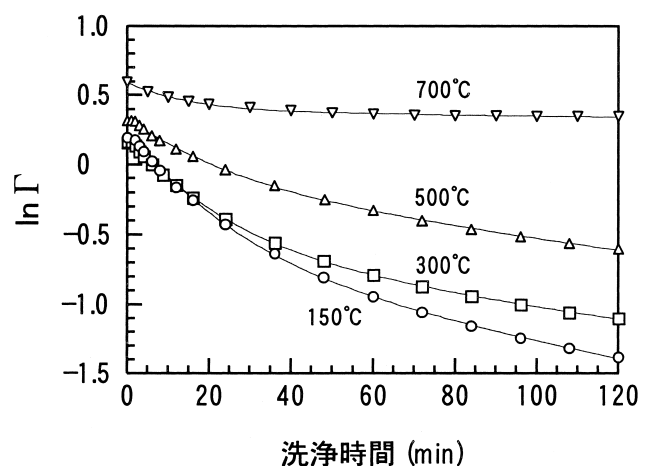


図6 ステンレス鋼の洗浄効率に及ぼす加熱処理の影響 (40℃)

たタンパク質の場合、未処理と比較すると、より速やかな離脱が起こっており、洗浄効率も向上する結果となる。(7)式を用いて解析すると、オゾン処理によって k^1 は約2倍増加し、 k^2 は約1.2倍増加すると概算される。図7の挿入図は、ステンレス鋼を0.2vol%オゾンで表面処理したときの表面電荷密度の変化を示している。このオゾン処理では、ステンレス鋼の酸化皮膜の化学組成はほとんど変化しないまま、正の電荷密度が減少し、アルカリ性側での負電荷密度が増加する変化を示す。タンパク質はカルボキシル基を介して吸着する傾向が強いことから、オゾン処理による表面電荷の改質がタンパク質相互作用力の低下の要因となり、アルカリ洗浄での離脱性の向上をもたらしたと考えられる。

5 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄作用

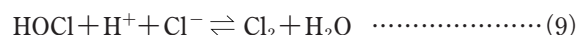
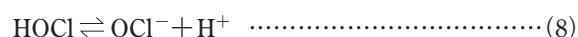
5.1 次亜塩素酸ナトリウムの化学的特性

市販の次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)の濃厚溶液は、一般に5～12%の遊離有効塩素を含む強アルカリ性溶液(pH12.5～13.5)である。次亜塩素酸ナトリウム溶液の主成分は次亜塩素酸(HOCl)と水酸化ナトリウム(NaOH)であり、いずれも解離型として存在する。

次亜塩素酸(HOCl)の第一の特性は、酸化作用を示すことである。次亜塩素酸は、水分子(HOH)の1つの水素(H)が塩素(Cl)に置換された物質である。HOCl分子中の塩素原子の酸化数は+1であり、 Cl^+ として強い求電子種として作用する²⁶⁾。すなわち、 Cl^+ はC=C、C=N、C-N(ペプチド結合を含む)、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 等の電子密度の高い結合部位(δ^-)を選択的に攻撃することになる。その結果、 Cl^+ は他の物質から2個の電子($2e^-$)を奪い、自ら Cl^- となる過程で殺菌、洗浄、漂白、脱臭等の作用を示す。

次亜塩素酸の第二の特性は、弱酸であり(解離定数：

$pK_a=7.5$)、溶液のpHに依存して次亜塩素酸イオン(OCl^-)と水素イオン(H^+)に解離することである。通常の使用濃度(50～200 mg/L)に希釈された次亜塩素酸ナトリウム溶液は弱アルカリ性(pH8～10)であるため、次亜塩素酸は主として OCl^- として存在する。一方、弱酸性領域(pH4～6)では非解離型のHOClが高比率で存在する。さらにpHが酸性側に傾くと、HOClの一部は溶存塩素(Cl_2)に変化する。



HOClの解離平衡成分であるHOCl、 OCl^- 、 Cl_2 はいずれも殺菌効力を有しており、これらを総称して遊離有効塩素(available chlorine：AC)という。

5.2 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄作用

次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果は、水溶液中での全遊離有効塩素濃度ではなく非解離型HOClの濃度に強く依存することはよく知られている。これは、電気的に中性であるHOClは、微生物の細胞壁と形質膜を容易に透過して細胞の内部に進入し、細胞内部から生理的機能に損傷を与えるためである²⁶⁾。昨今話題となった強酸性及び微酸性電解水が優れた殺菌効果を示すのは、非解離型HOClの存在比率が高いことに起因している。

一方、有機物汚れに対する次亜塩素酸ナトリウムの洗浄力は解離型 OCl^- の濃度に強く依存する²⁶⁾。この事実は、 OH^- の作用のみでは付着汚れの除去がほとんど起こらないpH領域において、汚れの除去率を OCl^- 濃度の関数として整理すると明白になる。

図8に、タンパク質(BSA)が不可逆吸着したステンレス鋼(316L粒子)を、種々のpH(4～11)及び有効塩素濃度

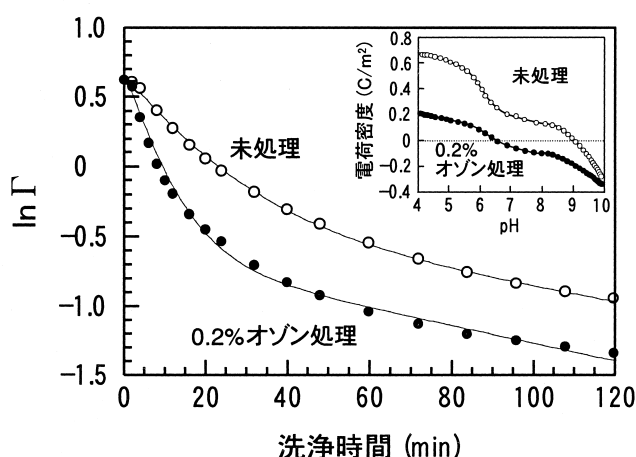


図7 ステンレス鋼の洗浄効率に及ぼすオゾン処理の影響(40℃) 挿入図はオゾン処理による表面電荷密度変化を示す

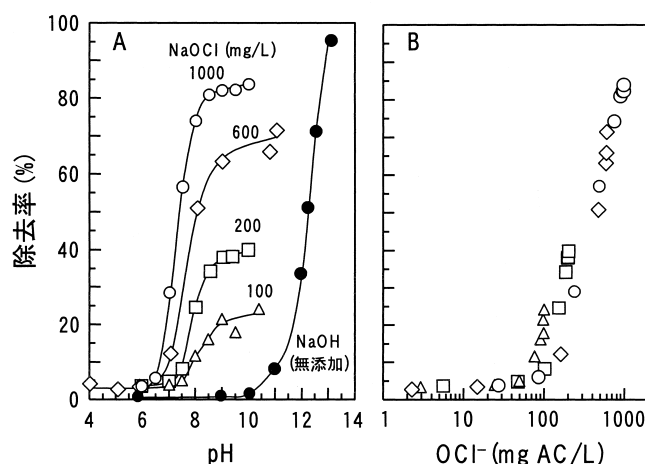


図8 ステンレス鋼表面に吸着したタンパク質の除去に及ぼす次亜塩素酸ナトリウム溶液のpHと濃度の影響(40℃)

(AC: 100~1,000ppm) に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄したときの除去率を示す。水酸化ナトリウム溶液 (OH^- の作用) 単一の洗浄と比較すると、次亜塩素酸ナトリウムの存在により、比較的低いアルカリ性 pH 領域において高い除去率が得られる (図 8A)。次亜塩素酸ナトリウムの効果は、有効塩素濃度が高いほど、また pH が高くなるほど顕著に現れる。一方で、有効塩素濃度が 1,000ppm と高濃度で存在しても、弱酸性の pH 溶液であれば次亜塩素酸ナトリウムの洗浄効果は期待できないことが理解できる。ここで、図 8A において OH^- の作用のみではタンパク質除去が起こらない pH 4~10 の領域に着目し、タンパク質の除去率を OCl^- 濃度の関数として再プロットすると、異なる pH 及び有効塩素濃度で得られたタンパク質の除去率は、 OCl^- 濃度に対して一本の線上に集約される結果となる (図 8B)。この関係は、次亜塩素酸ナトリウムの洗浄力が解離型 OCl^- の濃度に強く依存することを示す結果である。

図 9 は、シュードモナス属菌 (*Pseudomonas fluorescens*) が不可逆付着した親水性のセラミックス (Al_2O_3) を、種々の pH (4~10) 及び有効塩素濃度 (120~1,000ppm) に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄したときの、 OCl^- 濃度と除去率の関係をまとめたものである²⁶⁾。図中のシンボルは、実験時の全有効塩素濃度の違いを示している。この図からも、シュードモナス属菌の除去率は OCl^- 濃度に依存して増加することが明らかであり、洗浄操作における次亜塩素酸の活性因子は OCl^- であることを示している。また、セラミックス (Al_2O_3) に吸着したタンパク質及び酸性多糖類の一次離脱速度定数 ((7) 式の k^f) は、 OCl^- 濃度に対して指数的に増加することが確かめられており²⁷⁾、次亜塩素酸ナトリウムの洗浄力も平衡論及び速度論の両側面から OCl^- 濃度に依存する。当然のことながら、強アルカリ性溶液 (pH > 12) と次亜塩素酸ナトリウムを併用すると、 OH^- と OCl^- の相乗作用により洗浄力は著しく増加する。特に、タンパク質系汚

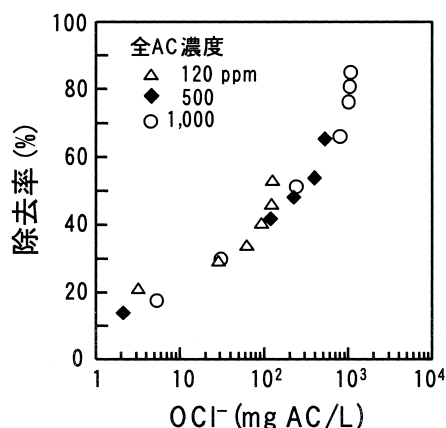


図9 セラミックス表面に付着したシュードモナス属菌の除去に及ぼす次亜塩素酸イオン濃度の影響²⁶⁾

れには効果が大きく、牛乳や飲料の殺菌工程の熱交換器の表面に固着した熱変性タンパク質汚れの洗浄・除去に適用されている。ちなみに、 OH^- は Cl^- と拮抗して腐食作用を抑制する効果を有しており²⁸⁾、 OCl^- による金属腐食作用も適度な OH^- 濃度の存在下では低減する。

このように、バイオフィーム形成の初期段階に見られるコンディショニングフィルムや付着細菌細胞の洗浄除去には、解離型 OCl^- を基盤とする洗浄が有効である。一方、弱酸性の次亜塩素酸水 (酸性電解水) の使用は、洗浄操作後の殺菌に限定することが望ましく、不可逆付着をした有機物や微生物細胞に対しては有効な洗浄力を示さないことに留意する必要がある。

6 おわりに

ここでは、バイオフィームの形成を防止するための基本的な対策として、洗浄によるバイオフィーム成分の除去メカニズムを概説した。親水性 (極性) で耐食性の高いステンレス鋼表面から不可逆付着したバイオフィーム成分を取り除くには、水酸化物イオン (OH^-) と次亜塩素酸イオン (OCl^-) の洗浄作用を利用することが効果的である。バイオフィーム形成細菌の薬剤抵抗性は、浮遊細菌よりも著しく高い。それゆえ、バイオフィームが成熟した後に殺菌剤をやみくもに使用しても本来の殺菌効果を得ることはできない。食品工場や医療関連施設では、洗浄操作によってバイオフィームの足がかりとなるコンディショニングフィルム成分や初期付着微生物を、早期にかつ効率的に除去することが肝要である。

バイオフィームの構造や機能が環境によって変化するように、ステンレス鋼の酸化皮膜の表面電荷特性も変化する。本稿では、高温加熱処理によりステンレス鋼の洗浄性が低下する事例を紹介したが、このような表面特性の変化は必ずしも負の効果ばかりをもたらすわけではない。逆に言えば、ステンレス鋼を適切な環境条件に曝すことにより、人為的な改質が可能であることを示唆している。オゾンガス処理による洗浄性の改善は、その一例である。ステンレス鋼—水界面におけるバイオフィーム成分の相互作用を十分理解したうえで、バイオフィーム防止のための好ましい“顔”に変えるのは我々人間の仕事である。

参考文献

- 1) J. W. Costerton, K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta and T. J. Marrie: Annu. Rev. Microbiol., 41 (1987), 435.
- 2) 門田晃一, 公文裕巳: 日本化学療法学会雑誌, 51 (2003), 426.

- 3) S. J. Lewis and A. Gilman : J. Appl. Bacteriol., 62 (1987), 327.
- 4) M.-T. Criado, B. Suárez and C. M. Ferreirós : Food Technol., 48 (1994), 123.
- 5) M. W. LeChevallier, C. D. Cawthon, and R. G. Lee : Appl. Environ. Microbiol., 54 (1988), 2492.
- 6) H. P. Boehm : Disc. Faraday Soc., 52 (1971), 264.
- 7) T. Hiemstra and W. H. Van Riemsdijk ; *J. Colloid Interface Sci.*, 179 (1996), 488.
- 8) S. Fukuzaki, A. Takehara, K. Takahashi, M. Hiramatsu and K. Koike : J. Surface Finish Soc. Jpn., 54 (2003), 1034.
- 9) 森崎久雄 : バイオフィルム, サイエンスフォーラム, 東京, (2000), 40.
- 10) K. Nakanishi, T. Sakiyama and K. Imamura : J. Biosci. Bioeng., 91 (2001), 233.
- 11) S. Fukuzaki, H. Urano and M. Hiramatsu : J. Surface Finish. Soc. Jpn., 49 (1998), 915.
- 12) H. Urano and S. Fukuzaki : J. Biosci. Bioeng., 90 (2000), 105.
- 13) T. Sakiyama, K. Tanino, M. Urakawa, K. Imamura, T. Takahashi, T. Nagai and K. Nakanishi : J. Biosci. Bioeng., 88 (1999), 536.
- 14) H. Urano and S. Fukuzaki : J. Colloid Interface Sci., 252 (2002), 284.
- 15) A. Takehara and S. Fukuzaki : Biocontrol Sci., 7 (2002) 9.
- 16) M. F. DeFlaun, A. S. Tanzer, A. L. McAteer, B. Marshall and S. B. Levy : Appl. Environ., Microbiol., 56 (1990), 112.
- 17) S. Fukuzaki, H. Urano and S. Yamada : J. Surface Finish. Soc. Jpn., 58 (2007), 465.
- 18) W. G. Jennings : Advances in Food Research, ed. by Chichester, C. O. and Mark, E. M., Academic Press, Inc., New York, 14 (1965), 325.
- 19) K. Takahashi and S. Fukuzaki : J. Surface Finish. Soc. Jpn., 57 (2006), 290.
- 20) S. Fukuzaki, A. Takehara and K. Takahashi : Biocontrol Sci., 11 (2006), 1674.
- 21) K. Takahashi and S. Fukuzaki : Biocontrol Sci., 8 (2003), 111.
- 22) W. G. Jennings : J. Dairy Sci., 42 (1959), 1763.
- 23) K. Takahashi and S. Fukuzaki : Biocontrol Sci., 11 (2006), 61.
- 24) S. Fukuzaki, H. Urano, M. Hiramatsu and A. Takehara : Biocontrol Sci., 6 (2001), 87.
- 25) S. Fukuzaki : Ozone Sci. Eng., 28 (2006) 303.
- 26) S. Fukuzaki : Biocontrol Sci., 11 (2006), 147.
- 27) H. Urano and S. Fukuzaki : Biocontrol Sci., 10 (2005), 21.
- 28) H. P. Leckie and H. H. Uhlig : J. Electrochem. Soc., 113 (1966), 1262.

(2007年5月31日受付)