

令和元年6月10日現在

機関番号：57501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18071

研究課題名(和文)インパルス電圧による健康及び魚病関連微生物の滅菌処理法の開発

研究課題名(英文) Inactivation of Vancomycin-Resistant Enterococci by impulse voltage

研究代表者

上野 崇寿 (Ueno, Takahisa)

大分工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授

研究者番号：30508867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質の利用の拡大に伴い、抗生物質であるバンコマイシンに耐性を持つ薬剤耐性菌が発現し、大きな問題となっている。国内の下水処理場にて用いられる塩素による消毒では、薬剤耐性菌の遺伝子まで不活化できないことが報告されており、耐性遺伝子の伝播による新たな多剤耐性菌の発現が危惧される。

そこで本研究では、滅菌及び耐性遺伝子の不活化を目的として、薬剤耐性菌(VRE)にインパルス電圧の印加を行った。その結果、一定値以上の印加電圧で印加時間を増加させれば、滅菌が可能であることが判り、同様の電圧の条件にてvanA遺伝子の不活化も可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果による微生物の不活性化技術を確立することで、微生物に加え遺伝子損傷による不活性化まで可能となり、耐性遺伝子水平伝播による新たな水環境での薬剤耐性菌の発生を抑制することができる。また、UVやオゾン殺菌に代わる低コストかつ維持管理が容易な水滅菌技術を導入可能であることが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Due to the increased use of antibiotics, drug-resistant strains have appeared that are resistant to the antibiotic vancomycin, and this resistance has become a major problem. While drug-resistant bacteria can be inactivated through disinfection with chlorine, which is the method used in sewage treatment plants in Japan, this method may not be sufficient to inactivate the genes of these bacteria. In the present study, impulse voltages were applied to drug-resistant bacteria in order to inactivate the bacteria. The results show that inactivation is possible with longer application times of applied voltages above a fixed value.

研究分野：パルスパワー

キーワード：高電圧 高電圧パルスパワー 滅菌 薬剤耐性菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、感染症の治療薬として利用されている抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌（Antibiotic Resistant Bacteria：ARB）の発生が問題となっている。

我が国の下水処理場の殺菌方法は、次亜塩素酸を用いた薬剤殺菌が主流となっているが、完全に処理できておらず、河川等の水環境における検出が報告されており、水環境中での ARB による汚染が深刻となっている。

これまで塩素以外の手法として、オゾンや紫外線照射による殺菌方法が提案されてきたが、設備コストが高価であること、対象物の濁度によって殺菌効果が減衰するため十分な殺菌効果が得られない場合があるといった問題が生じており、大規模な普及には至っていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、下水道における健康関連微生物、及び養殖業における魚病関連微生物の不活性化に関する新規の技術を構築することを目指す。具体的には以下の目標をあげた。

- (1) 回路シミュレーション及び滅菌処理の最適条件の確立
- (2) 薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の不活性化効果の解明
- (3) 魚病関連微生物の不活性化効果の解明
- (4) インパルス電圧発生装置の小型化及びリアクタの開発
- (5) 実試料への実証実験及び従来法との比較

3. 研究の方法

グラム陽性菌であるバンコマイシン耐性腸球菌（*Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium*：VRE）を TH 液体培地で 24 時間、グラム陰性菌である大腸菌（*Escherichia coli*：E.coli）を LB 液体培地で 12 時間培養をそれぞれ行った後に、遠心操作により菌体洗浄を行う。その後、滅菌済み milli-Q 水により希釈懸濁を行うことで適当な濃度となるように生菌数調整を行い、菌液を作成した。菌液を図 1 に示す同軸型円筒形のリアクタへと 22 mL 分注を行った後、インパルス電圧印加を行った。また、菌液へのパルス高電界印加時の電圧電流波形を図 2 に示す。一次側コンデンサに電荷を蓄えた後に IGBT をターンオンすることでトランスの二次側へと一次側の電圧が昇圧され加わる。その後二次側のコンデンサへ電荷が蓄えられ、一次側の IGBT がターンオフした後に負荷に向かって放電されることでインパルス電圧を形成し対象に印加する。印加後に寒天培地上に直接塗布を行い、培養後に培地上に形成されたコロニーを計数し、以下の式により不活化前後のコロニー数を対数表現して評価を行った。

$$r = \log_{10}(C_0 / C) \quad \text{式 1}$$

- r : 不活化率
C₀ : 高電界印加前の生菌数 [CFU/ml]
C : 高電界印加後の生菌数 [CFU/ml]

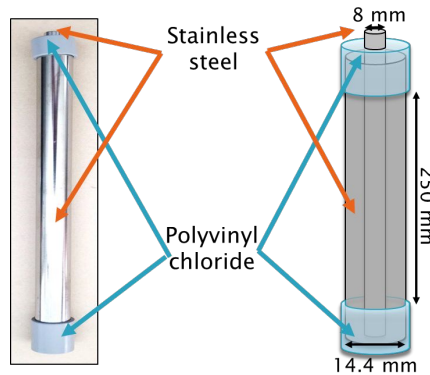


図 1. 同軸円筒型リアクタ

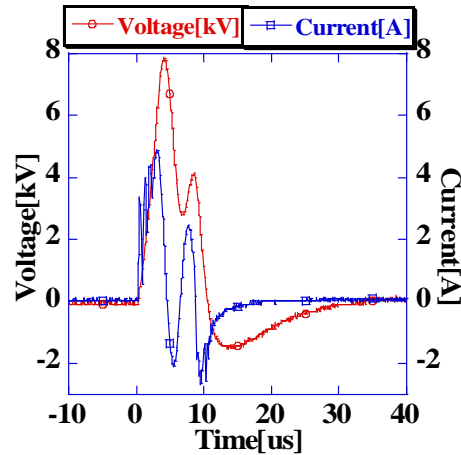


図 2. 印加電圧電流波形

4. 研究成果

4.1 印加電圧変化に対する滅菌率

菌濃度を 10^5 CFU/mL と調整し、電圧値を各値 1.6 から 8kV に変化させた際の滅菌を確認した。印加電圧 1.6kV では、印加時間によらず滅菌率は変化しなかったものの電圧 6.6kV 及び 8kV では印加時間の増加に従って滅菌率が増加した。

4.2 印加周波数変化に対する滅菌率

次に菌濃度 10^5 CFU/mL、印加電圧 8kV 一定とし、印加時の周波数を 100 から 1kHz に変化させた際の滅菌率の変化を確認した。印加周波数を変化させた場合、滅菌率に差異はみられず時間経過に従って滅菌率が増加した。このことから印加周波数そのものが滅菌率へ及ぼす影響は少ないことが確認された。

4.3 インピーダンス変化に対する滅菌率

印加電圧 8kV 一定、印加周波数 100Hz 一定とし、菌液分注後の電極のインピーダンスを変化させた際の菌液温度の変化並びに滅菌率を確認した。

印加電圧一定のため、インピーダンスが低いほど電流値が大きくなっており、印加時の菌液温度が高くなった。またインピーダンスが低いほど滅菌率が増加し、インピーダンスが $1.6k\Omega$ の条件では 12×10^4 パルスで生菌数が検出下限値以下となることが確認された。この結果より印加時の菌液温度が滅菌率に影響を及ぼす可能性が示唆された。

4.4 菌液温度一定時の滅菌率

前節の結果より、インパルス高電界印加時の菌液温度が滅菌率に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。文献においても電界による滅菌を行う際、印加時の温度が高いほど細胞壁内の流動性が上がり細胞壁が破壊されやすくなることが判っている。このことから印加時の菌液温度と滅菌率の関係性を明らかにするため、その関係性を調査した。

本実験では、菌液温度を一定に保つためにフロー装置を作成した。本装置はポンプを用いて管内の水を循環させることによりリアクタを冷却し印加時の温度上昇を抑える仕組みとなっている。フロー装置により菌液温度を一定に保ち、印加時間を変化させた際の滅菌率の変化を図 3 に示す。このとき、印加電圧を 8kV、印加周波数を 100Hz 一定とした。菌液温度が高くなるほど滅菌率が増加し、菌液温度が 40 以下であれば、温度調整を行っていない場合の滅菌率とほぼ同程度であることが確認された。以上から菌液温度によって滅菌率が変化し、一定の温度以上であれば、十分に不活化できることが確認された。

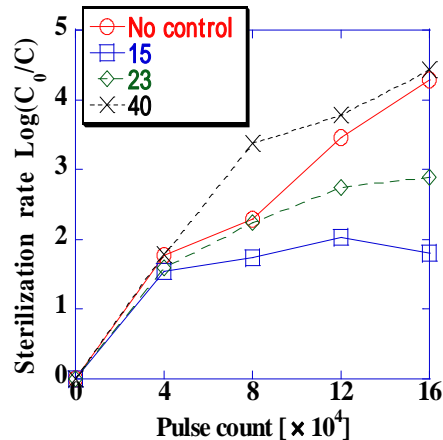


図 3.菌液温度調整時の滅菌率の変化

4.5 vanA 遺伝子の不活化

インパルス電圧を印加した VRE に対して遺伝子の検出を行った。印加時間は 2 分、5 分、10 分として各菌濃度(10³ CFU/mL, 10⁵ CFU/mL)における vanA 遺伝子を PCR 法にて検出した。結果を表 1 に示す。完全に滅菌できなかった印加電圧 1.5kV の時、印加時間に関わらず vanA 遺伝子が検出された。印加電圧 4.5kV と 7.5kV においては、印加時間 2 分のときは vanA 遺伝子が検出されている場合もあるものの、印加時間を 5 分以上とすれば vanA 遺伝子を不活化できることが確認できた。

表 1 vanA 遺伝子検出結果

(a) 菌濃度 10³ CFU/mL

Time(min.)	vanA detection(-)		
	1.5*	4.5*	7.5*
2	+***	- **	-
5	+	-	-
10	+	-	-

(b) 菌濃度 10⁵CFU/mL

Time(min.)	vanA detection(-)		
	1.5*	4.5*	7.5*
2	+	-	+
5	+	-	-
10	+	-	-

*impluse voltage (kV)

**+means vanA was amplified by PCR

*** - means vanA was not amplified by PCR

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

(1). 上野崇寿, 古川隼士, 江畑雄大, 市来龍大, 佐久川貴志, 秋山秀典, 「磁気パルス圧縮回路の小型化及び自動制御に関する研究」, 電気学会論文誌 A ,Vol.137.6, No.3, pp.242-248 (2017)

(2).Takashi Furukawa, Atsushi Jikumaru, Takahisa Ueno, ” Inactivation of vancomycin-resistant enterococci and their resistance gene using chlorine disinfection” , *Proceedings of The 12th International Symposium on Southeast Asian Water Environment (SEAW2016)* ,(2016)

(3). T.Ueno, J.Ninomiya, N.Takamura, T.Sakugawad and S.Katsuki, “Study on Inactivation of *Vibrio fischeri* by Pulsed Electric Field”, *Proceedings of Global Conference on Engineering and Applied Science*, Vo1, pp.343-351(2017).

4).T.Ueno, T.Furukawa, K. Kawanoa, A.Jikumaru, T.Sakugawa and H.Akiyama,“Inactivation of Vancomycin-Resistant Enterococci by Pulsed Electric Field”, *Asian Journal of Applied Sciences*,Vol.04,Issue 05,pp121-128 (2017).

〔学会発表〕(計 11 件)

(1).上野崇寿,「インパルス電圧による遺伝子不活化を目的とした健康関連微生物の滅菌処理法の開発」, International Symposium on Interdisciplinary Pulsed Power & Collaborative Research Meeting (2017)

(2). 川野航平,古川隼士, 上野崇寿,「高電圧インパルスによる薬剤耐性菌の遺伝子不活性化に関する研究」, 平成 28 年度(第 7 回)電気学会九州支部高専研究講演会, A8(2017)

(3). 杉原勇也, 上野崇寿,「発光細菌を用いた水質汚染の評価の検討」, 第 3 回大分高専・大分大学合同研究発表会, No.20 (2017)

(4). 上野崇寿,佐藤建,川野航平,古川隼士,佐久川貴志,勝木淳,「パルスパワーによる薬剤耐性菌の不活性化に関する研究」H29 年度パルスパワー放電研究会論文集 PST-17-087,PPT-17-068,ED-17-105(2017)

(5). 上杉 遼, 古川 隼士, 佐久川 貴志, 勝木 淳, 上野 崇寿,「PEF による薬剤耐性菌滅菌のための電源開発に関する研究」, 平成 29 年度電気学会九州支部高専研究講演会, B13(2018)

(6). 平川 康平, 上野 崇寿,「インパルス滅菌のための菌液のインピーダンス測定」平成 29 年度電気学会九州支部高専研究講演会, B14(2018)

(7).PEF によるタンパク質溶液中の微生物滅菌のための電源開発,平成 30 年度 第 35 回 プラズマ・核融合学会, 上野崇寿, 川野航平, 佐藤建, 古川隼士, 勝木淳, 4Ca03 (2018)

(8).VRE 懸濁液インピーダンスのモデリング及びその殺菌効果の検証, 電気・情報関係学会九州支部第 71 回連合大会 佐藤建 上野崇寿,川野航平,古川隼士,勝木淳, 05-2P-07(2018)

(9).インパルス発生装置開発のための SiC デバイス特性試験, 電気・情報関係学会九州支部第 71 回連合大会 川野航平, 上野崇寿, 佐久川貴志, 勝木 淳, 05-2A-08 (2018) D3.SiC 製半導体スイッチを用いたインパルス電源の開発, 平成 30 年度(第 9 回)電気学会九州支部高専研究講演論文集, 後藤兼蔵, 勝木淳, 上野崇寿, B4, pp.41-42 (2019)

(10).エアロゾル中の病原性微生物補足のための高電圧捕集装置の開発,平成 30 年度(第 9 回)電気学会九州支部高専研究講演論文集, 宇都宮 玄, 古川隼士, 上野崇寿, B2, pp.37-38 (2019)

(11).高電界を用いたエアロゾル中の病原細菌の不活化効果に関する研究,平成 30 年度(第 9 回)電気学会九州支部高専研究講演論文集, 柴山 信之介,古川隼士,勝木淳, 上野崇寿, B3, pp.39-40 (2019)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。