

研究報告 平成28年度 土木分野No. 1

## インパルス電圧印加による水系感染症を引き起こすふん便性微生物の不活性化技術の開発

Development of inactivation technology of waterborne infectious fecal-microorganisms by applying impulse voltage

大分工業高等専門学校 都市・環境工学科 助教 古川 隼士

### (研究計画ないし研究手法の概略)

#### 1. 概要

常在菌の1種である腸球菌は病原性が弱く、通常、健常者の場合は保菌していても無害である。免疫機能が低下した場合、心内膜炎や敗血症等の重篤な感染症を引き起こす恐れがあり、抗生物質による治療が行われている。しかし、そ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。古川らの報告によると国内の下水処理場にて用いられる塩素による消毒では、薬剤耐性菌の不活化は可能なものの、その遺伝子まで不活化できないことが示唆<sup>2)</sup>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。塩素消毒以外の手法として、紫外線照射やオゾンによる殺菌方法があるが、設備が高価であり、対象の濁度によって減衰するため十分な滅菌が行われない場合がある。

そこで本研究では、代替手法としてインパルス電圧を用いる滅菌法を提案する。これは、電界により菌の細胞壁を物理的に破壊し、菌を不活化するものである。本稿では、滅菌及び耐性遺伝子之不活化を目的として、薬剤耐性菌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を示した。

#### 2. VRE不活化のための実験環境

##### 2. 1 印加対象とする細菌

印加対象としてバンコマイシン耐性腸球菌(ATCC51559, *vanA* 遺伝子保有株)を用いた。バンコマイシン耐性腸球菌(Vancomycin-Resistant Enterococci: VRE)は、抗生物質の1つであるバンコマイシンに対して薬剤耐性を獲得した腸球菌である。健常者の場合は通常、無害であるが、免疫機能が低下した場合に重篤な感染症を引き起こす恐れがあり、VREの持つ *vanA* 遺伝子は、他の遺伝子に比べて水平伝搬しやすい特徴を持つ。

##### 2. 2 インパルス電圧印加のための電極形状

VRE不活化に用いた電極の形状と断面図を図1に示す。構造は同軸円筒型として導体の材質はステンレス鋼材、絶縁体には塩化ビニルを用いた。内部導体の直径は8 mm、外部導体の内径は14.4 mmとし、電極間隔は3.2 mmとした。内部導体を高圧側、外部導体を接地側に結線し、この間に菌液を入れインパルス電圧を印加した。

インパルス電圧発生装置は、磁気パルス圧縮(Magnetic Pulse Compression: MPC)電源を用いた。回路中の一次側回路の線路長を変化させ、立ち上がり時間及び電圧パルス幅を可変することができる。動作周波数は 100 Hzとして、パルス幅(半値全幅)を6.9  $\mu$ s及び1.7  $\mu$ sとして印加を行った。

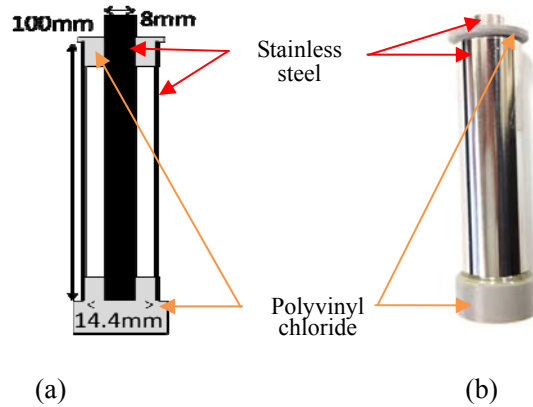


図 1 電極の断面図と写真

(実験調査によって得られた新しい知見)

3. インパルス電圧によるVREの滅菌

3.1 立ち上がりの緩やかなインパルス電圧による滅菌

パルス幅を6.9  $\mu\text{s}$ としてインパルス電圧を印加したときの、電圧電流波形を図2に示す。電圧波形は立ち上がり時間と立ち下がり時間が、ともに約4 $\mu\text{s}$ であった。電流波形は、電圧波形とほぼ一致していることから、抵抗負荷であることが確認できる。

印加時間を60秒までとして電圧値を変化させた時の不活化率を対数表示で図3に示す。いずれの印加電圧及び印加時間においても菌の不活化率は非常に低い傾向であり、その不活化率は2.0log未満であった。菌濃度にかかわらず、60秒以内のインパルス電圧の印加時間では、滅菌が困難であることが示された。

続いて印加時間を10分まで増加させたときの不活化率を図4に示す。印加時間の増加に従って不活化率が増加した。また、印加電圧4.5kVと1.5kVの間を閾値として、不活化率に差が生じた。印加時間10分の時、菌濃度 $10^3$  CFU/mLにおいて1.1logの差、菌濃度 $10^5$  CFU/mLにおいて、4.4logの差となった。印加電圧が1.5kVのとき、印加時間に関わらず不活化率は一定値以上に増加しないため、完全に滅菌できていないことがわかる。

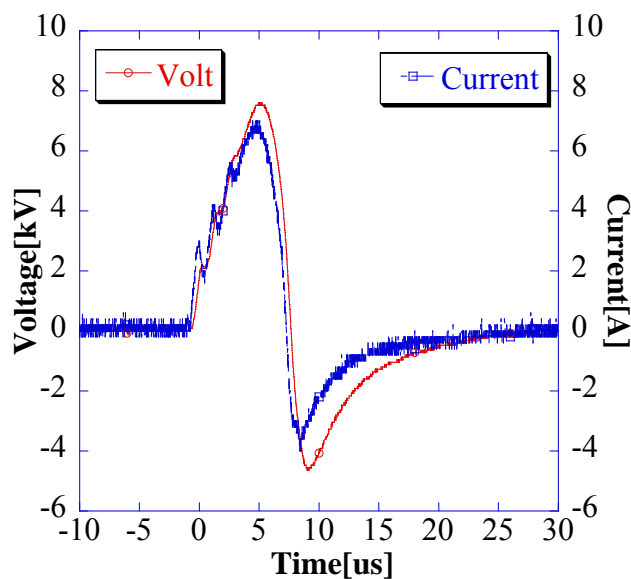
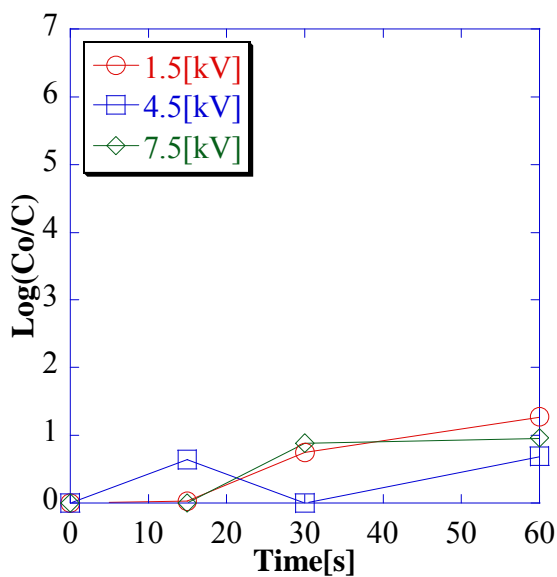
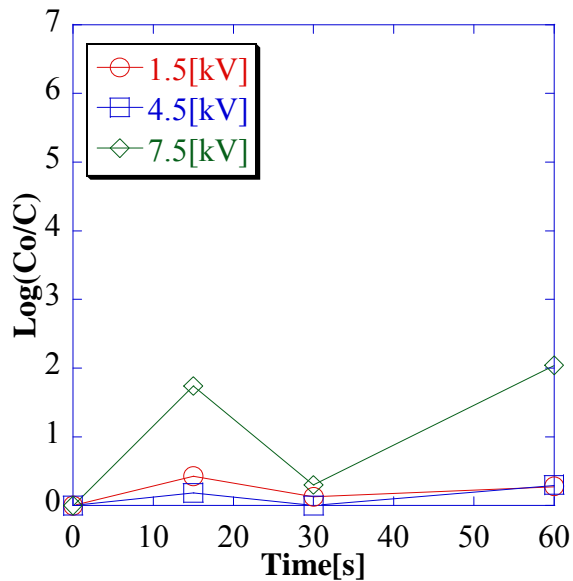


図 2 インパルス電圧のパルス幅 6.9 $\mu\text{s}$  時の電圧電流波形

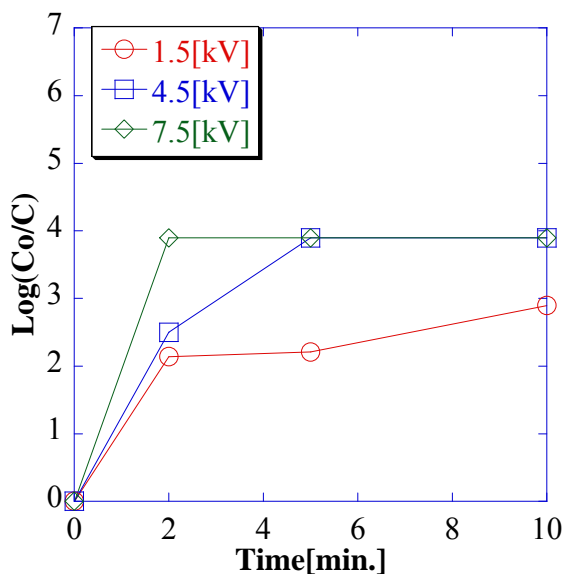


(a)  $C_b=10^3$  CFU/mL

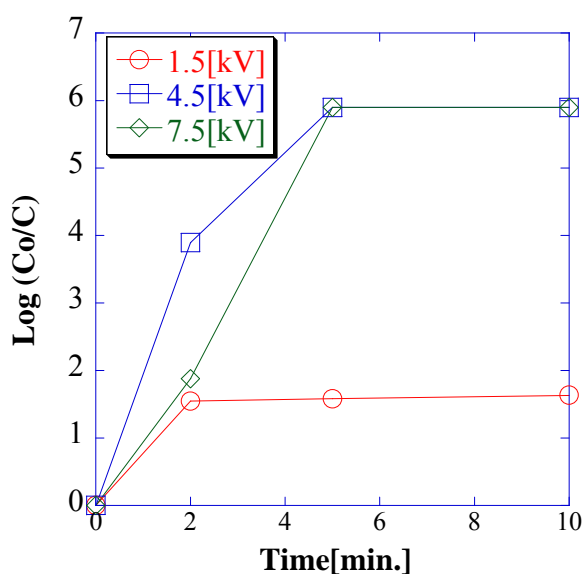


(b)  $C_b=10^5$  CFU/mL

図3 インパルス印加時間 60 秒までの VRE 不活化率



(a)  $C_b=10^3$  CFU/mL



(b)  $C_b=10^5$  CFU/mL

図4 インパルス印加時間 10 分までの VRE 不活化率

### 3.2 立ち上がりの急峻なインパルス電圧による滅菌

次にインパルス電圧発生装置の回路構成を変更し、立ち上がりの急峻なインパルス電圧をVREに印加した。図5に電圧電流波形を示す。電圧波形の立ち上がり時間は $0.2\mu\text{s}$ 、立ち下がり時間は $4\mu\text{s}$ であり、3.1節の結果の場合と比べて立ち下がり時間は変わらないものの、立ち上がり時間が非常に短くなっている。電流波形は、電圧波形と比べてその波形の形状が一致しており、3.1節と同様に抵抗性負荷であることが示された。

各菌濃度における、インパルス電圧を印加した時の不活化率を図6に示す。印加電圧が高い程、不活化率が増加した。印加電圧 $7.5\text{kV}$ 及び $4.5\text{kV}$ の場合と $1.5\text{kV}$ の場合では、不活化率に大きな差がでた。特に印加電圧 $1.5\text{kV}$ のときは、完全に滅菌できなかった。これは3.1の結果と同様であった。

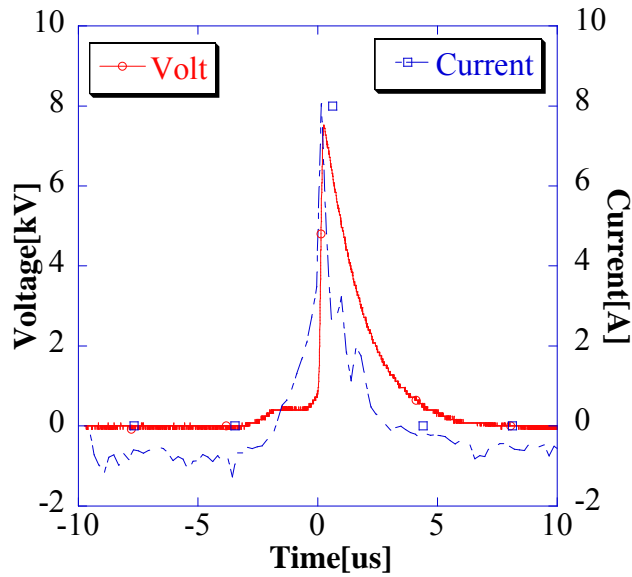
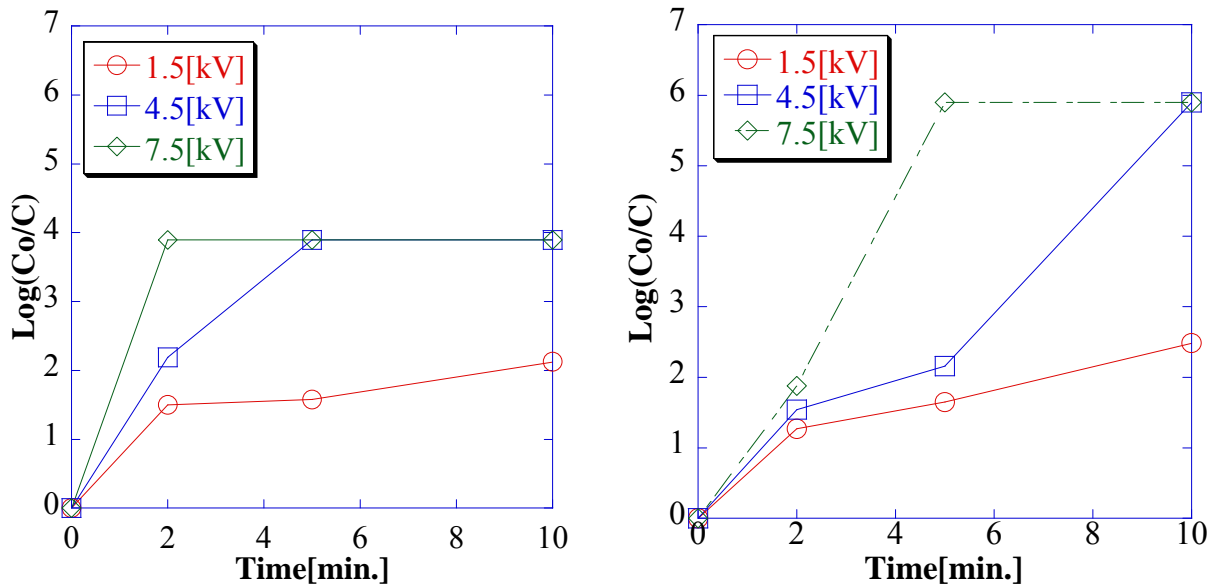


図5 インパルス電圧パルス幅 1.7 $\mu$ s 時の電圧電流波形



(a) 菌濃度  $10^3$  CFU/mL

(b) 菌濃度  $10^5$  CFU/mL

図6 インパルス印加時間 10 分までの VRE 不活化率

### 3.3 インパルス電圧印加時の菌液の温度変化

各インパルス電圧を印加したときの菌液の温度変化を図7に示す。印加時間に従って菌液の温度が上昇し、印加電圧及びパルス幅に増加させると温度が高くなった。印加開始から10分後には、印加電圧7.5kVの時は温度が70 $^{\circ}$ Cを超えているが、印加電圧4.5kVにおいては、40 $^{\circ}$ C前後となった。今回実験に用いた *E.faecium* は、50 $^{\circ}$ Cを超える温度下では、その発現を維持できなくなったという報告がある<sup>7)</sup>。今回の実験では、菌液温度50 $^{\circ}$ C未満の条件下でも菌の不活化が行われていることから、菌の死滅が熱だけでなく電界による影響であることが示唆された。

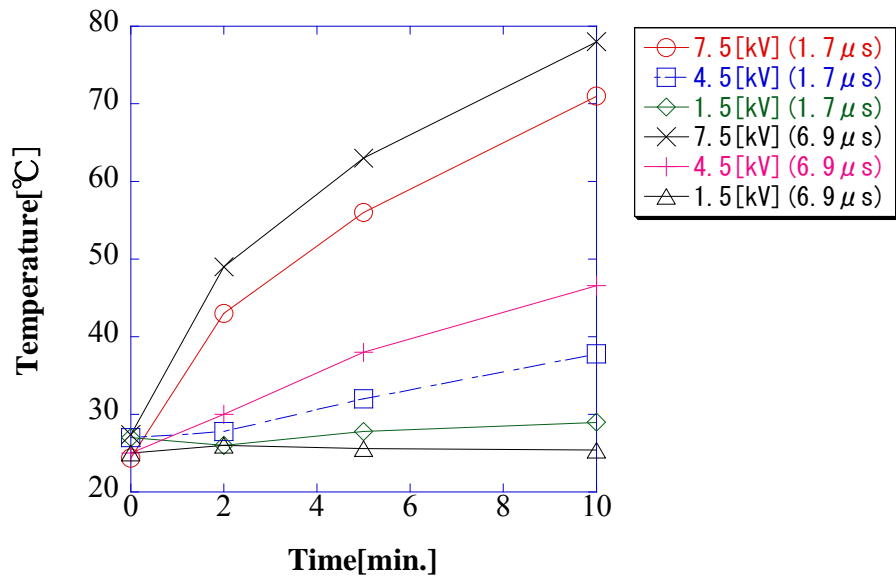


図7 菌濃度  $10^3$  CFU/mL 時の温度変化

#### 4. まとめ

本研究ではVREの不活化を目的としたインパルス電圧の印加を行った。以下に得られた結果をまとめる。

- (1) 立ち上がり時間が異なる2種類のインパルス電圧をVREに印加した。電流波形は、電圧波形とほぼ一致していることから、菌液は抵抗負荷であることが示された。
- (2) 印加したインパルス電圧の値によってVREの不活化率に差が生じた。印加電圧が7.5kV及び4.5kVの時、印加時間を増加させれば完全に滅菌させられることが示された。
- (3) インパルス電圧印加時の菌液の温度を測定した。印加電圧7.5kVの時は温度が70°Cを超えるものの、印加電圧4.5kVにおいては、40°C前後となった。対象とする腸球菌は、温度が50°C以上でその発現が維持できないとされる。本結果から、40°C前後でも不活化できている結果を得ており、VREの不活化が温度だけでなく電界の影響であることが示唆された。

#### (発表論文)

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.6, 2017(掲載決定)
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)高専研究講演会, A8, 2017
3. Takahisa Ueno, Takashi Furukawa, Kohei Kawano, Atsushi Jikumaru, Takashi Sakugawa, Hidenori Akiyama “Inactivation of Vancomycin-Resistant Enterococci by Pulsed Electric Field”, International Research Conference on Engineering and Technology, 2017(掲載決定)
4. 軸丸淳史, 古川隼士, 上野崇寿, 川野航平, 「塩素消毒およびインパルス電圧印加による薬剤耐性菌の不活化技術に関する基礎的検討」, 平成28年度土木学会西部支部研究発表会, 2017