

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）電気細菌学に基づくバイオフィilm殺菌装置の基盤技術研究

（プログラム名）（英語）Study of Biofilm Sterilization Technology using Electric Metabolism Inhibition

実施期間：令和2年10月1日～令和4年3月31日(予定)

補助事業担当者 氏名：（日本語）岡本 章玄  
（英語）OKAMOTO Akihiro

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点  
電気化学ナノバイオテクノロジーグループ グループリーダー

（英語）National Institute for Materials Science, International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA),  
Electrochemical nanobiotechnology group, Group Leader

## II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

和文：2 ページ以上

英文：1 ページ程度

現在、抗生物質の不適切な使用による薬剤耐性菌の出現や、細菌集団が作り出すバイオフィームによって、医療現場における感染症の管理が世界規模で問題になっている。抗生物質の不適切な使用による薬剤耐性菌の出現により 2050 年には世界で 1000 万人が薬剤耐性菌によって亡くなると推測されており（オニオールレポート）、医療機器の感染管理においても深刻な問題になってきている。一方で、化学的手法を超える殺菌技術は長年にわたり開発されていない。近年、「電気細菌」と呼ばれる細胞内の余剰なエネルギーを細胞外へ電子として排出する環境中細菌が世界的に注目されている。研究代表者の岡本らは革新的先端研究開発支援事業（微生物叢と宿主の相互作用・共生の理解と、それに基づく疾患発症のメカニズム解明）における AMED-PRIME 研究（平成 28 年度開始）を通して、口腔や腸内のバイオフィーム病原細菌の多くが電気細菌としての性質を有しており、微弱な電位を印加することで不活化できることを見出した。電極を利用して代謝を行う電気細菌の性質を逆手に取り、電子を注入することで代謝を抑制することで不活化できた可能性が考えられ、既存技術とは全く異なる原理に基づくバイオフィーム殺菌法としてのポテンシャルがある。さらに、物理化学的に代謝を抑制するのであれば、バイオフィームに潜む薬剤耐性菌への効果も期待できる。しかし、電気化学測定のスループットは限られていることから、その機構や現象の普遍性の検証は従来の解析技術では実質不可能であった。最近、岡本らは従来の 100 倍のスループットを持つ電気化学測定系を開発し、高精度な測定から電極条件の網羅的比較が可能であることを示した[Miran W. *et al*, *Patterns*, 2022, 100610]。本研究でこの独自の測定系を用いて、見出した電気殺菌現象の原理解明、技術の汎用性の検証を行い、感染管理・予防医療機器の開発へと繋げることを目的とした。具体的には、この独自の測定系を最大限に活用するためのアルゴリズム・プロトコル開発を行い、薬剤耐性菌や、消毒剤に高い抵抗性を示す細菌を含む 5 株に対して印加する電極電位、時間、電解液組成の影響を網羅的に測定し、殺菌効果が最大化する電極条件を特定した。その後、遺伝子発現解析や遺伝子破壊株ライブラリを活用することで、殺菌原理の遺伝子レベルの機構解明を行った。更に、医療機器材料として重要なステンレス（SUS304）や Polytetrafluoroethylene (PTFE) 表面に、残留が問題になっている細菌のバイオフィームを培養し、殺菌効果の検証を行った。以下に具体的な成果の内容を示す。

既に測定系が確立しており、電位印加による殺菌効果を確認しているグラム陰性細菌 *Klebsiella pneumoniae* KPNIH1 株（肺炎桿菌）をモデル細菌として電位印加の効果を生電流生成の時間変化で評価することが出来る解析アルゴリズムを開発した。バイオフィームを電極上で形成する細菌の代謝活性は生成電流によって見積もることが可能である。そこで、生成電流の時間変化を追跡することで殺菌効果の評価が可能な解析アルゴリズムを開発した。具体的には、特徴量抽出を行い複雑な形状の電流生成の時間プロファイルから代謝活性を定量化した。そして、既に電位印加の効果を確認している *K. pneumoniae* KPNIH1 株において、まず電流生成中に電極上バイオフィームを形成させ、その後電流生成が出来なくなる定電位を一定時間印加、その後再び電流生成値を測定することで電位印加後の代謝活性を評価した。代謝活性の減少は、細菌への染色・溶出法によってバイオフィーム量、RNA 量、さらに生死判定蛍光色素で検証した。その結果、殺菌処理後にはバイオフィームが著しく除去されていることが電流値の結果とよく一致することを確認できた。

開発したアルゴリズムを用いて、*K. pneumoniae* KPNIH1 株と追加モデル細菌としてグラム陽性細菌 *Streptococcus mutans* 株を用いて 96 well システムで利用することが出来るカーボン電極上で、バイオフィーム培養後に印加する電極電位、その時間、添加剤の影響を網羅的に測定し、効果が最大化する電極条件を特定した。ここで、当初は電流の減少が 40~50%程度であったが、電子注入を加速する添加剤を使うことによって、細菌代謝に由来する電流値がバックグラウンド電流と変わらないところまで減少し、これまで 12 時間必要だったのが 1 時間でより効果が得られるようになった。同様の効果は Tin-doped

Indium Oxide (ITO) 電極で得られており、電極材料が異なっても電位印加の効果が見られることを示している。特定した添加剤、電子ミディエーターは電気殺菌アジュバントとして特許出願中である。次に、内視鏡でも使われているステンレス (SUS304) で電気殺菌の効果を米国で標準的な消毒効果を示す試験法が記載されているガイダンス (Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 Update) に準拠した方法で検証した。具体的には、SUS304 管を約  $10^7$  CFU (colony forming unit)/mL の菌液に 24 時間浸けておき、肺炎桿菌 *K. pneumonia* KPNIH1 株のバイオフィーム形成、リン酸緩衝液でリンスした後に、電解液が入った反応容器内に移動させ、その後端子を SUS304 に接続し電位を 1 時間印加、その後再びでリンスした後にリン酸緩衝液中で超音波をかけて付着している細菌と SUS304 を分離、寒天培地上で培養、CFU を計測することで生菌数を得た。同様の操作で、電位印加プロセスを除いたものを電位印加前の生菌数として、killing efficiency (%) 殺菌効率 (より正確には「殺菌とバイオフィームを除去する効率の掛け算に相当する値」) を得た。電位を印加すると時間と共に減衰する高い還元電流が見られ、99%を超える高い殺菌効率が高い再現性で確認された。また、酸素存在下での実験を行ったところ殺菌効率はさらに上がった。洗浄装置や医療現場において嫌気状態を保つことは難しいため、この酸素濃度がポジティブな効果を示す成果によって医療現場で利用できる可能性が大きく高まった。

電気殺菌アジュバントによって大幅に殺菌効率が向上したため、同条件下での原理解明を進めた。すると、当初予想していた代謝抑制だけではない様々な異なる事象が関わっていることがわかった。遺伝子発現解析を行うと、細菌内部に電子を注入することで電荷補償のためのイオンも細胞内に過剰に導入され、浸透圧で殺菌されるという全く新規な殺菌原理であることを示唆する結果が得られた。イオンチャンネルに対応する遺伝子破壊株を用いて実験を行ったところ、電気殺菌の効果が野生株よりも顕著となり、イオン注入が重要な殺菌機構であることが強く示唆された。また、電子顕微鏡を用いた元素分析を行うと一細胞レベルでも大過剰な金属イオンの蓄積が見られた。以上の結果は、電極による活性酸素の発生やアジュバントによる生理的な効果が副次的に殺菌効果をもたらしているのではなく、イオンの蓄積による浸透圧等の影響で細菌が死滅していることを示す直接的な証拠であり、薬剤耐性菌や毒性を生み出さない安全かつ汎用性の高い新機構であることが強く示された。

本技術を適用する対象の 1 つとして、内視鏡内に残存するバイオフィームが適当である。内視鏡は、種々の病気の診断に必須の医療機器であり世界で 6000 万/年以上の症例がある。特に、十二指内視鏡による医療手技は、胆嚢・肝臓・膵臓の病気の診断・治療に必須であり、他の医療機器を用いた手技では代替できない。しかし、内視鏡は繰り返し使用されるリユースの医療機器であり、複数の工程を経て再利用されるがゆえに、ヒューマンエラーによる洗浄不足が起こりやすい。そこで、内視鏡に汚染において重要な細菌として FDA が定める 3 種類のモデル細菌肺炎桿菌 NBRC13277、緑膿菌 NBRC 13736、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) に対する効果を、内視鏡管路材料である SUS304 と PTFE チューブを用いて検証した。いずれの系でも上述した米国で消毒効果を示すための試験法を用いて実験を行った。1 時間の処理で 99-100% 程度の高い殺菌効果が両方の材料で確認された。以上の結果は、本手法の汎用性を示しており、内視鏡消毒への適用可能性を示している。また、解明した物理的な殺菌機構ともよく一致する。今後は、内視鏡洗浄に応用するための要求仕様を満たすアジュバント材の探索を行い、実用化を目指す。

本事業の開発サポートの協力の元、医療現場での感染症に対するヒアリングを通して、様々な応用展開が見えてきた。そこで、医療現場での応用試験や事業化に向けた取り組みに不可欠となるデデモ装置・ソフトウェアのデザイン・開発を行った。従来装置は、大型で電源や端末の配線での接続が必須であったが、無線でノートパソコンやスマートフォン等の端末と接続できることや、充電式で電源が必要ないなどの仕様を盛り込んだ装置を開発した。本研究によって従来不可であったバイオフィームへの継続的

殺菌効果が実現すれば、内視鏡、さらに今後益々発展する医療ロボティクスにおける交差感染のリスクが大きく減少することが考えられる。さらに、医療機器のバイオフィーム除去クレームとして一般化されれば、インプラントや創傷中に潜むバイオフィームの治療技術への展開も期待される。

Development and production of advanced technology for bacterial disinfection using simple, easy-to-use, on-site treatment, high efficacy, and fast mode of action is urgently needed. Bacterial disinfection is one of the interesting fields due to the high human health risk. The fast growth of the human population, lack of health care facilities, multiple uses of various medical devices, and high demand with the fast growth of high-tech technologies such as wearable and portable devices may increase the high-risk infection of various pathogens. In our project, we have developed bacterial disinfection using an electrochemical approach. The electrochemical approach overcomes most of the disinfection drawbacks such as treatment time, use of continuous and high doses of the drug, and low drug efficacy on drug-resistant pathogens. We studied the effective using the electrochemical approach for killing pathogens, especially biofilm-related bacteria (drug-resistant bacteria). It was reported that the drug-resistant bacteria phenomena are related to the ability of biofilm formation, and it needs high antibiotic concentrations (500-5000 times higher than needed for killing the planktonic bacterial cells). We studied the suitability of using electrochemistry for killing and suppressing biofilm-related bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* (KP). KP is one of the drug-resistant bacteria that can form a biofilm on various surfaces, and it was isolated from various human body organs such as the urinary tract, human skin, and lungs. We studied the various factors of different applied potential and use of redox mediators. This approach was possible due to our high-throughput electrochemical system with low deviation [Miran W. *et al*, *Patterns*, 2022, 100610]. The applied potential of  $-1.0$  V showed the most efficient bacterial killing and biofilm suppression. Besides, we discovered the effect of adjuvant that enhanced the killing efficiency of negative poisoning (99% killing efficiency at indium tin-doped oxide (ITO) electrode as biofilm substrate and working electrode). The KP biofilm suppression and killing efficiency have been screened at various substrates of carbon, ITO, and stainless-steel surfaces. We also confirm the same level of disinfection effect on high-concern biofilm bacteria KP NBRC13277, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13736, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. The data showed high killing efficiency for all three bacteria (more than 99%). Achieving a continuous bactericidal effect against drug-resistant bacteria present in biofilms, which was impossible in the past, would greatly reduce the risk of cross-infection of endoscopes and medical robotics. The demand for this will promisingly increase in the future. Furthermore, with the cooperation of the project's development support team (Japan Biodesign), our disinfection method can be applied to various medical field. Therefore, we designed and developed a demo device and software that would be indispensable for application testing and commercialization efforts. Conventional devices were large and required a power supply and terminal wiring connection, but we developed a device that incorporates specifications such as wireless connection to notebook PCs, and smartphones with a rechargeable battery. The risk of cross-infection in endoscopes and the ever-growing field of medical robotics will be greatly reduced by our method. Furthermore, if this technology is generalized as a biofilm removal claim for medical devices, it is expected to be applied to the treatment of biofilms hidden in implants and wounds. In conclusion, we have developed a novel approach based on electrochemistry for bacterial disinfection of drug-resistant bacteria with high efficiency and at various substrates. In addition, this technology could be widely used for bacterial disinfection in various medical and wearable devices to decrease the health risk of pathogen infection.