(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年6月13日(13.06.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/122522 A1

(51) 国際特許分類:
A61L 2/18 (2006.01) *A61L 2/03* (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01) *C02F 1/461* (2023.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/043383

(22) 国際出願日： 2023年12月5日(05.12.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-196933 2022年12月9日(09.12.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人物質・材料研究機構 (**NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE**) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ Ibaraki (JP).

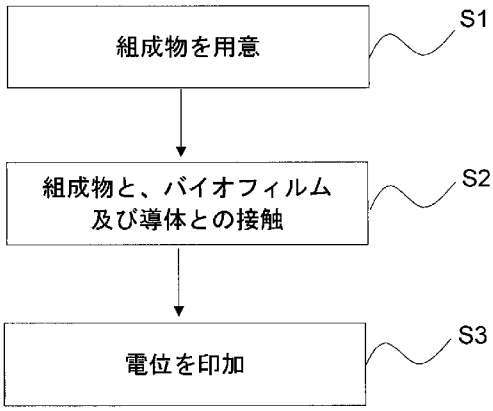
(72) 発明者: イムラン モハメド ヨウセフ マフムード (**EMRAN Mohammed Youssef Mahmoud**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 岡本 章玄 (**OKAMOTO Akihiro**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小野 悠樹 (**ONO Yuki**); 〒1020083 東京都千代田区麹町１丁目８－１ 半蔵門ＭＫビル６階 Tokyo (JP).

(54) **Title:** STERILIZATION METHOD AND COMPOSITION USED IN STERILIZATION METHOD

(54) 発明の名称： 殺菌方法、及び殺菌方法に用いる組成物

[図1]



S1 Ready composition
S2 Bring composition, and biofilm and conductor, into contact
S3 Apply potential

(57) **Abstract:** This method for sterilizing bacteria contained in a biofilm includes: readying a composition containing an organic compound having a standard redox potential (pH7) of -0.7 V to -0.2 V, and water; bringing the composition, and the biofilm and a conductor, into contact with each other; and applying, to the conductor, a potential that exceeds the lower limit of the potential window and that is equal to or below -0.4 V based on a silver/silver chloride electrode.

(57) 要約：バイオフィルムに含まれる細菌の殺菌方法であって、標準酸化還元電位（ｐＨ７）が－０．７Ｖ～－０．２Ｖである有機化合物と、水とを含む組成物を用意することと、前記組成物と、前記バイオフィルム及び導体とを接触させることと、前記導体に電位窓の下限値を超えて、銀／塩化銀電極基準で－０．４Ｖ以下の電位を印加することと、を含む。

WO 2024/122522 A1

[続葉有]

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

明　細　書

発明の名称 ： 殺菌方法、及び殺菌方法に用いる組成物

技術分野

[0001]　本発明は、殺菌方法、及び殺菌方法に用いる組成物に関する。

背景技術

[0002]　現在、細菌集団が作り出すバイオフィルムによって、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。

[0003]　細菌に対しては、抗生物質等を用いる化学的手法が広く知られている。しかし、抗生物質は、その不適切な使用による薬剤耐性菌の出現が問題視されている。そこで、化学的手法以外の殺菌技術も、長年にわたり研究されている。例えば、非特許文献１～４では、ステンレスやチタンなどの導体（電気伝導体）に高電位（例えば、７Ｖ程度）を印加することにより、H_2の発生と、負－負表面反発とによって、導体表面に形成されたバイオフィルムを除去する方法が報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Current Opinion in Solid State and Materials Science, Vol. 25, Issue 4, August 2021, 100926.

非特許文献2：Applied Sciences, 2022, Vol. 12, Issue 13, 6320.

非特許文献3：Bioelectrochemistry 121 (2018) p.84-94.

非特許文献4：Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 117, 1, May 2014, p.152-157.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　しかし、非特許文献１～４に開示される技術は、薬剤耐性菌の問題は生じないものの、溶媒等の電気分解が生じる激しい条件下で実施する必要があった。このような激しい条件下での殺菌は、多くの消費エネルギーを必要とす

るためコスト高であり、また、副反応により人体に悪影響を及ぼす活性化学種が生じる虞もある。

[0006] そこで、本発明は、より穏やかな条件下において、より効率的に行うことができ、人体への悪影響を低減できる、バイオフィルムに含まれる細菌の殺菌方法、及び該殺菌方法に用いる組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意検討した結果、以下の構成により上記課題を達成することができることを見出した。

[0008] ［１］バイオフィルムに含まれる細菌の殺菌方法であって、標準酸化還元電位（ｐＨ７）が－０．７Ｖ～－０．２Ｖである有機化合物と、水とを含む組成物を用意することと、前記組成物と、前記バイオフィルム及び導体とを接触させることと、前記導体に電位窓の下限値を超えて、銀／塩化銀電極基準で－０．４Ｖ以下の電位を印加することと、を含む、殺菌方法。

［２］前記導体に印加する前記電位が、－１．２Ｖ～－０．８Ｖである、［１］に記載の殺菌方法。

［３］前記有機化合物が、ジピリジン構造を有する化合物である、［１］又は［２］に記載の殺菌方法。

［４］前記有機化合物が、メチルビオロゲンである、［３］に記載の殺菌方法。

［５］前記組成物がカチオンを更に含む、［１］～［４］のいずれかに記載の殺菌方法。

［６］前記組成物が銀イオンを更に含む、［１］～［５］のいずれかに記載の殺菌方法。

［７］前記バイオフィルムが前記導体上に形成されている、［１］～［６］のいずれかに記載の殺菌方法。

［８］前記バイオフィルムが、前記導体とは異なる基材上に形成されている、［１］～［６］のいずれかに記載の殺菌方法。

［９］前記基材が、絶縁体である、［８］に記載の殺菌方法。

［１０］前記基材が、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）である、［９］に記載の殺菌方法。

［１１］前記バイオフィルムが形成されている導体、又は前記基材が、生体内に埋め込んで用いられる医療器具、又は、生体の粘膜を超えて、若しくは、直接接触させて用いられる医療器具である、［７］～［１０］のいずれかに記載の殺菌方法。

［１２］前記細菌が、肺炎桿菌、表皮ブドウ球菌、及び緑膿菌からなる群より選択される少なくとも１種である、［１］～［１１］のいずれかに記載の殺菌方法。

［１３］前記細菌が、グラム陰性桿菌である、［１］～［１１］のいずれかに記載の殺菌方法。

［１４］前記グラム陰性桿菌が、腸内細菌科に属する細菌である、［１３］に記載の殺菌方法。

［１５］標準酸化還元電位が、－０．７Ｖ～－０．２Ｖである前記有機化合物と、前記水と、を含む、［１］～［１４］のいずれかに記載の殺菌方法に用いる組成物。

［１６］前記有機化合物が、ジピリジン構造を有する化合物である、［１５］に記載の組成物。

［１７］前記有機化合物が、メチルビオロゲンである、［１６］に記載の組成物。

［１８］前記組成物がカチオンを更に含む、［１５］～［１７］のいずれかに記載の記載の組成物。

［１９］前記組成物が銀イオンを更に含む、［１５］～［１８］のいずれかに記載の記載の組成物。

発明の効果

[0009] 本発明は、穏やかな条件下において、効率的に行うことができ、人体への悪影響を低減できる、バイオフィルムに含まれる細菌の殺菌方法、及び該殺菌方法に用いる組成物を提供する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本実施形態の殺菌方法を説明するフローチャートである。

[図2]本実施形態の殺菌方法の推測されるメカニズムを説明する模式図である。

[図3]本実施形態の変形例の殺菌方法の推測されるメカニズムを説明する模式図である。

[図4A]実験１で得られた、時間－電流曲線（ＣＡダイアグラム）である。

[図4B]実験２－１で得られた、時間－電流曲線（ＣＡダイアグラム）である。

[図4C]実験１、実験２－１、及び実験３－１の殺菌効果の評価結果（コロニーの数）を示す図である。

[図4D]実験１、及び実験２－１の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

[図5A]実験２－１～２－４、及び実験４－１～４－４の殺菌効果の評価結果（コロニーの数）を示す図である。

[図5B]実験２－１～２－４の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

[図6]実験５－１～５－２の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

[図7A]実験６－１～６－３の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

[図7B]実験７－１～７－２の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

[図8A]実験８－１～８－９の殺菌効果の評価結果（コロニーの数）を示す図である。

[図8B]実験８－１～８－８の殺菌効果の評価結果（細菌減少量）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明について詳細に説明する。

以下に記載する構成要件の説明は、本発明の代表的な実施形態に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施形態に制限されるものではない。

なお、本明細書において、「～」を用いて表される数値範囲は、「～」の前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む範囲を意味する。すなわち、「Ａ～Ｂ」は、Ａ以上Ｂ以下を示す。

[0012] 図１に示すフローチャートに従って、本実施形態の殺菌方法について説明する。本実施形態の殺菌方法は、以下の工程Ｓ１～Ｓ３を含む。

工程Ｓ１：標準酸化還元電位（ｐＨ７）が－０．７Ｖ～－０．２Ｖである有機化合物（以下、適宜「特定有機化合物」と記載する）と、水とを含む組成物（以下、適宜、「殺菌用組成物」と記載する）を用意する工程、

工程Ｓ２：殺菌用組成物と、バイオフィルム及び導体とを接触させる工程、及び、

工程Ｓ３：導体に所定範囲内の電位を印加する工程。

[0013] 図２は、本実施形態の殺菌方法の推測されるメカニズムを説明する模式図である。細菌細胞（細菌）１を含むバイオフィルム１０が、導体２上に付着している。この細菌細胞１が有機化合物を分解してエネルギーを得る過程では（特に嫌気状態では）、有機化合物の分解に使われたＮＡＤ$^+$からＮＡＤＨが生じ、電子伝達系を介して、ＮＡＤＨから電子受容体である導体２へと電子が渡され（矢印４）、ＮＡＤ$^+$に戻り、再度エネルギーの獲得に使われる。

[0014] 本発明者らは、驚くべきことに、特定有機化合物５を含む組成物中で、導体２に負の電位を印加することで、バイオフィルム１０中の細菌細胞１の活性を低下させ、最終的に殺菌できることを見出し、本発明に至った。しかも、導体２に印加する負の電位は電位窓の範囲内の微弱な電位で十分である。これにより、溶媒（水）の電気分解が生じることのない、穏やかな条件下での殺菌が可能となる。導体２に負の電位を印加すると、細菌細胞１から導体２への電子の移動（矢印４）が制限される。特に、銀／塩化銀電極基準で－

０．４Ｖ以下の電位を印加することで、導体２から細菌細胞１へと電子が移動（矢印３）する。そして、導体２から細菌細胞１へと電子が移動することで、細胞のエネルギー獲得が阻害されて活性は更に低下し、最終的に細菌を死滅させる（殺菌する）ことができる。特定有機化合物５は、電子メディエータとして、導体２と細菌細胞１との間の電子移動を効率化すると推測される。このため、導体２から細菌細胞１への電子移動（矢印３）がスムーズとなり、微弱な印加電位であっても、効率的な殺菌が可能となる。細菌１の代謝を熱力学的に抑制する本原理は、バイオフィルム１０に潜む薬剤耐性菌への継続的な効果が期待できる革新的なものである。尚、以上に説明したメカニズムは推測であり、本発明の範囲に何ら影響を与えるものではない。

[0015] 以下に、本実施形態の殺菌方法の各工程について、詳細に説明する。尚、本願明細書において、「殺菌」とは、バイオフィルム中の細菌を全滅させることのみならず、バイオフィルム中の細菌の一部を死滅させる（即ち、バイオフィルム中の細菌数を減少させる）ことも含む。

[0016] ［工程Ｓ１］

工程Ｓ１：

まず、標準酸化還元電位（ｐＨ７）が、－０．７Ｖ～－０．２Ｖである有機化合物（特定有機化合物）と、水とを含む殺菌用組成物を用意する。

[0017] 特定有機化合物の標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、－０．７Ｖ～－０．２Ｖの範囲であれば特に限定されないが、より高い殺菌効果を得る観点からは、－０．６Ｖ～－０．３Ｖが好ましく、－０．６Ｖ～－０．４Ｖがより好ましい。

[0018] 特定有機化合物は、標準酸化還元電位が上記範囲内である有機化合物であれば、特に限定されないが、例えば、窒素を含む芳香族複素環を含む化合物、中でもジピリジン構造を有する化合物が好ましい。具体的な化合物としては、表１に示す化合物、及びこれらの誘導体が挙げられ、中でも、より高い殺菌効果を得る観点からは、メチルビオロゲン、及びその誘導体が好ましく、メチルビオロゲンがより好ましい。特定有機化合物は、単独の化合物から

構成されてもよいし、２種類以上の化合物から構成されてもよい。

[0019] 特定有機化合物における標準酸化還元電位は、三電極系を用いた電位掃引による電気化学測定によって直接的に計測できるほか、以下の文献１～３に記載の値を参照して求めた。

文献１：Ryo Nakagawa and Yuta Nishina, “Simulating the redox potentials of unexplored phenazine derivatives as electron mediators for biofuel cells” J. Phys. Energy 3 (2021) 034008

文献２：Mary Lou Fultz and Richard A. Durst, “Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation” Analytica Chimica Acta, 140 (1982) 1-18. Elsevier Scientific Publishing Company

文献３：Octavio Reyes-Salas et al. “Titrimetric and Polarographic Determination of Carminic Acid and its Quantification in Cochineal (Dactylopius coccus) Extracts” J. Mex. Chem. Soc. 2011, 55(2), 89-93

[0020]

[表1]

特定有機化合物	標準酸化還元電位（pH7）[V]
Anthraquinone-2-sulfonate （ＡＱＳ）	-0.225
サフラニン Safranin T	-0.289
インデュリン・スカーレット Indulin Scarlet (CAS No. 2611-49-6)	-0.299
ナチュラル・レッド Natural red (CAS No. 553-24-2)	-0.325
ベンジルビオロゲン 1,1'-dibenzyl-4,4'-bipyridinium dichloride (Benzyl viologen)	-0.358
Phenazine-1,6-dicarboxylic acid	-0.36
インジゴカルミン Indigo carmine	-0.36
ジクワット イオン 1,1'-Ethylene-2,2'-bipyridylium ion (Diquat ion)	-0.361
1,1'-Bis(2-hydroxyethyl)-4,4'-bipyridinium	-0.408
メチルビオロゲン 1,1' -dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (methyl viologen)	-0.440
1,1' -diheptyl-4,4'-bipyridinium	-0.48
エチルビオロゲンジブロミド 1,1' -Diethyle-[4,4'-bipyridine]-1,1'-diium bromide (Ethylviologen Dibromide)	-0.495
1,1'-ジイソプロピル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド 1,1' -di isopropyl-4,4'-bipyridinium dichloride	-0.495
1,1'-トリメチレン-2,2'-ビピリジル 1,1' -trimethylene-2,2'-bipyridyl	-0.540
5,5' -diemethyl-2,2'-bipyridyl	-0.664
カルミン酸 Carminic acid （ＣＡＭＡ）	-0.519

[0021] 殺菌用組成物中の特定有機化合物の含有量は特に限定されないが、より高い殺菌効果を得る観点からは、例えば、１μＭ（Ｍ＝ｍｏｌ／Ｌ）～１０００μＭであり、好ましくは１０μＭ～２００μＭである。

[0022] 殺菌用組成物に含まれる水は、特に限定されず、純水、蒸留水、イオン交換水等であってよい。殺菌用組成物中の水の含有量は特に限定されないが、例えば組成物全体を１００質量％としたとき９０．０質量％～９９．９質量％

である。

[0023] また、殺菌用組成物は、陽イオン（カチオン）を更に含有してもよい。特定有機化合物と、カチオンとを併用することにより、相乗効果が生じ、殺菌効果をより高めることができる。このメカニズムは定かではないが、以下のように推測される。特定有機化合物５を含む組成物中で、導体２に負の電位を印加することで、細菌１への電子の移動が促進される（図２の矢印３）。このとき、殺菌用組成物中にカチオンが含有されていると、カチオンが細菌細胞１内部へ流入する。これにより、細菌細胞１内で浸透圧異常が生じ、細菌１の活性が低下し、最終的に殺菌できる。また、カチオンが、細菌１内のＤＮＡや酵素にダメージを与える特性を有する場合には、更に、殺菌効果を高められる。尚、以上説明したメカニズムは推測であり、本発明の範囲に何ら影響を与えるものではない。

[0024] カチオンとしては、特に限定されず、例えば、金属イオンもしくは錯イオン等の金属を含有するカチオン、または、薬剤等から生成する有機カチオンが挙げられる。金属イオン及び金属を含有するカチオンに含まれる金属としては、例えば、銀（Ａｇ）、銅（Ｃｕ）、コバルト（Ｃｏ）、アルミニウム（Ａｌ）、ニッケル（Ｎｉ）、亜鉛（Ｚｎ）、モリブデン（Ｍｏ）、バナジウム（Ｖ）、ジルコニウム（Ｚｒ）、タングステン（Ｗ）、パラジウム（Ｐｄ）、白金（Ｐｔ）等が挙げられ、より殺菌効果を高める観点からは、銀イオン（Ag^{+}）、銅イオン（Cu^{+}，Cu^{2+}）が好ましく、銀（Ag^{+}）がより好ましい。また、カチオンは、所謂、生理学上の電解質由来のカチオンであってもよく、生理学上の電解質由来のカチオンとしては、例えば、ナトリウムイオン（Na^{+}）、カリウムイオン（K^{+}）、カルシウムイオン（Ca^{2+}）、マグネシウムイオン（Mg^{2+}）等が挙げられる。陽イオン（カチオン）としては、１種類のカチオンを用いてもよいし、２種類以上のカチオンを用いてもよい。

[0025] 殺菌用組成物は、カチオンの対イオンとなる、陰イオン（アニオン）を更に含んでよい。アニオンは、特に限定されず、例えば、フッ素、塩素、臭素

、ヨウ素等のハロゲン化物イオン等が挙げられる。

カチオンは、カチオンとアニオンからなる塩由来のイオンであってもよい。好ましい塩としては、例えば、塩化銀、塩化銅等のハロゲン化金属が挙げられる。殺菌用組成物中に、これらの塩を分散、又は溶解（一部溶解を含む）することで、殺菌用組成物中にカチオンを導入することができる。

[0026] 殺菌用組成物中のカチオンの濃度は、特に限定されず、本実施形態の効果を奏する範囲で適宜調整することができる。より高い殺菌効果を得る観点から、例えば、殺菌用組成物中のカチオンの濃度は、好ましくは１μＭ～１Ｍであり、より好ましくは１０μＭ～２００ｍＭである。殺菌用組成物中のアニオンの濃度は、特に限定されず、カチオンの濃度と同様に、より高い殺菌効果を得る観点からは、好ましくは１μＭ～１Ｍであり、より好ましくは１０μＭ～２００ｍＭである。

[0027] 殺菌用組成物は、特定有機化合物及び水のみから構成されてもよいし、本実施形態の効果を奏する範囲内において、特定有機化合物及び水以外の、その他の成分を含有してもよい。その他の成分としては、上述のカチオンおよびアニオンが挙げられるが、それ以外に、例えば、特定有機化合物以外の電子メディエータ、電子源化合物、緩衝化剤、及び、凝固剤等が挙げられる。電子源化合物は、細菌の代謝に用いられる化合物であり、特に制限されないが、例えば、有機化合物（アミノ酸、糖、及び、有機酸等）が挙げられる。緩衝化剤としては、特に制限されないが、ホウ酸塩、重炭酸塩、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、リン酸塩、及び、酢酸塩等が挙げられる。凝固剤としては、寒天、ゼラチン、及び、アガー等が挙げられ、アガーが好ましい。

[0028] 殺菌用組成物は、特定有機化合物と、水と、必要に応じて、その他の成分とを汎用の方法により均一に混合することにより調製できる。

[0029] また、殺菌用組成物は、汎用の培地（液体培地、固体培地）、緩衝液および生理食塩水等を含む組成物（以下「培地組成物」ともいう）に、所定量の特定有機化合物を添加して調製してもよい。培地、緩衝液および生理食塩水

等は、市販のものを用いてもよい。培地は、例えば、Lysogeny broth（LB培地)が用いられる。培地組成物は、水と上述のその他の成分を含有している。したがって、本実施形態の殺菌用組成物は、特定有機化合物と、培地組成物との混合物であってもよい。なお、培地組成物が緩衝液および生理食塩水を含まなくてもよい。殺菌組成物中に含まれる水の含有量には、培地組成物に含まれる水も加味される。

[0030] ［工程Ｓ２］

工程Ｓ２：

次に、殺菌用組成物と、バイオフィルム及び導体とを接触させる。

[0031] バイオフィルムに含有される細菌、即ち、本実施形態の殺菌対象となる細菌は特に限定されず、例えば、グラム陽性菌およびグラム陰性菌のうち何れかの菌である。例えば、内視鏡汚染に重大な影響を与える菌として米国食品医薬品庁（ＦＤＡ）が定める肺炎桿菌（グラム陰性菌）、緑膿菌（グラム陰性菌）、表皮ブドウ球菌（グラム陽性菌）に対しても、本実施形態の殺菌方法は有効である。

[0032] また、本実施形態の殺菌方法は、バイオフィルムに含有される細菌が、グラム陰性桿菌、特に、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌であると、電子移動（図２中の矢印３）がより効率化され、より優れた殺菌効果が得られる。腸内細菌科に属する細菌としては、例えば、上述の肺炎桿菌（クレブシエラ属菌）、エンテロバクター属菌、エスケリキア属菌、サルモネラ属菌、セラチア属菌、赤痢属菌、及び、エルシニア属菌等が挙げられる。

[0033] バイオフィルムは、固相（基材）表面に接着した細菌が形成した高次構造体であり、例えば、細菌が生産する多糖類によって覆われている。図２に示すように、バイオフィルム１０は、導体２（基材の例示）上に形成されていてもよい。

[0034] 導体は、バイオフィルムとの間で電子を授受できるものであれば材質、形状、及び、大きさは特に制限されない。材料としては、例えば、銀、銅、アルミニウム、ニッケル、鉄、及びこれら金属を含むの合金（例えば、ステン

レス鋼（ＳＵＳ））等の金属材料、アモルファスカーボン、グラファイト、カーボンナノチューブ等の炭素材料が挙げられる。

[0035] 導体の一例としては、生体内に埋め込んで用いられる医療器具（医療用インプラント等）、生体の粘膜を超えて用いられる医療器具（鉗子等）、及び、生体の粘膜に直接接触させて用いられる医療器具（内視鏡等）が挙げられる。導体としてこのようなものを用いれば、本実施形態の殺菌方法は、医療器具、及び、医療用インプラント等の清掃、洗浄方法としても活用できる。

[0036] 殺菌用組成物と、バイオフィルム及び導体とを接触させる方法としては特に制限されないが、例えば、殺菌用組成物が液体である場合、バイオフィルム及び導体を殺菌用組成物に浸漬させる方法、及び、バイオフィルム及び導体に殺菌用組成物を滴下する方法が使用できる。また、殺菌用組成物が固体である場合（例えば培地が固体である殺菌用組成物の場合）、殺菌用組成物を導体に加圧又は無加圧で直接接触させる方法が挙げられる。直接接触させるとは、導体が平板である場合には、典型的には、バイオフィルムが形成されている側の面を殺菌用組成物と接触させることを意味する。

[0037] ［工程Ｓ３］

工程Ｓ３：

次に、導体に電位窓の下限値を超えて、銀／塩化銀電極基準で－０．４Ｖ以下の電位を印加する。

[0038] 発明者らは、細菌の種類のよらず、本実施形態の殺菌用組成物を用いれば、－０．４Ｖ以下の微弱な電位を印加することで、導体２から細菌細胞１への電子移動（図２の矢印３）が促進され、細胞のエネルギー獲得を阻害し、最終的に殺菌できることを見出した。より高い殺菌効果を得る観点からは、好ましくは－０．６Ｖ以下であり、より好ましくは－０．８Ｖ以下であり、さらに好ましくは－０．９Ｖ以下の電位を導体に印加することが好ましい。また、導体に印加する負の電位の下限値は、電位窓の下限値を超えていれば特に制限されない。電位窓の下限値は、殺菌用組成物の成分、殺菌用組成物のｐＨ、及び、電極の材質等によって定まる値であり、当業者にとっては明

らかである。印加する電位が電位窓の下限値を超えることで、溶媒（水）の電気分解の生じない穏やかな条件での殺菌が可能となる。本実施形態の殺菌方法は、消費エネルギーを抑えられるため低コストであり、人体に悪影響を及ぼす活性化学種が発生する虞がある副反応も抑制できる。更に、高い電位を印加して水の電気分解が生じると、水素発生等の反応が優先され、導体２から細菌細胞１への電子移動（図２の矢印３）が抑制される虞もある。本実施形態では、印加する電位が微弱であるため、水素等の発生は生じず、細菌１の代謝を効率的に抑制して殺菌できる。導体に印加する電位の下限値は、例えば、銀／塩化銀電極基準で、－１．４Ｖ以上、好ましくは－１．２Ｖ以上であり、より好ましくは－１．１Ｖ以上である。

[0039] 導体に電位を印加する方法としては特に制限されない。例えば、作用電極、参照電極、及び対電極を殺菌用組成物に接触させ、更に、作用電極を上述の導体に接触させた状態で、これらの電極セット（作用電極、対電極、及び参照電極）をポテンショスタットに接続し、これを制御して、作用電極に所定の電位を印加する方法が挙げられる。作用電極、対電極、及び参照電極の材質としては特に制限されず、電気化学測定用等として公知の作用電極、対電極、参照電極を用いることができる。尚、参照電極は、銀／塩化銀電極が好ましい。また、作用電極を別途用意するのではなく、バイオフィルムが形成されている導体を作用電極として用いてもよい。

[0040] 殺菌用組成物は、液体であっても、固体であってもよいが、液体である場合、電極セット（作用電極、対電極、及び参照電極）を殺菌用組成物に浸漬させればよい。また、プリンテッドエレクトロニクス等によって作製された上記電極セットに触れるように殺菌用組成物を滴下する形態であってもよい。また、殺菌用組成物が固体である場合には、上記導体と同様に、作用電極、対電極、及び参照電極とを殺菌用組成物に直接接触させればよい。

[0041] 本工程（工程Ｓ３）は、酸素を含まない嫌気条件下（例えば、窒素雰囲気）で実施してもよいし、酸素を含む好気性条件下（例えば、大気中）で行ってもよい。雰囲気が嫌気性条件下に限定されないため、本実施形態の殺菌方

法は、より簡便な設備で実施可能である。

[0042] 本工程（工程Ｓ３）実施中の温度（殺菌温度）は、特に限定されず、例えば、０℃～１００℃、又は、室温としてよい。また、電位印加時間（殺菌時間）も、特に限定されず、特定有機化合物の種類、細菌の種類、導体の種類及び大きさ等に応じて適宜調整してよいが、例えば、３０分～２４時間としてよい。

[0043] 以上説明した本実施形態の殺菌方法によれば、導体に微弱な電位を印加するだけで、バイオフィルム中の細菌の活性を低下させ、遂にはバイオフィルム中の細菌の全部又は一部を死滅させる（殺菌する）ことができる。このため、バイオフィルムに潜む薬剤耐性菌への継続的な効果が期待できる。また、本実施形態の殺菌方法を用いることで、抗菌剤が不要となるか、又は、抗菌剤の使用量を低減できるため、新たな薬剤耐性菌の発生も抑制できる。

[0044] また、本実施形態の殺菌方法は、導体が医療器具や医療用インプラント等である場合には、形状が複雑である等の理由で機械的清掃が難しくても、バイオフィルム中の細菌を死滅させることができ、細菌感染の予防効果が期待できる。また、導体が、生体内に埋め込んで用いられる医療器具（例えば、歯科インプラント等の各種インプラント）、又は、生体の粘膜を超えて、若しくは、直接接触させて使用される医療器具（例えば、鉗子、及び、内視鏡等）である場合、機械洗浄が行き届かない細部にバイオフィルムが発生する場合もある。このようなバイオフィルム中の細菌も、本実施形態の殺菌方法により死滅させる（殺菌する）ことができる。

[0045] ＜変形例＞

上述の実施形態では、図２に示すように、バイオフィルム１０は導体２上に形成されているが、本発明はこれに限定されない。例えば、図３に示すように、バイオフィルム１０は、導体２とは異なる基材１２上に形成されていてもよい。尚、本変形例で説明する殺菌方法は、バイオフィルム１０が基材１２に形成されていること以外は、上記実施形態で説明した殺菌方法と同様であり、同様の効果を奏する。同様の内容については、説明を省略する。

[0046] 本変形例においても、特定有機化合物５は、導体２から細菌細胞１への電子移動（図３の矢印３）を効率化する。このため、導体２に負の電位を印加することで、基材１２に直接、電位を印加せずとも、基材１２上のバイオフィルム１０中の細菌１を死滅させる（殺菌する）とこができる。

[0047] 基材１２の材料は、特に限定されないが、電位を印加する必要がないことから、樹脂（プラスチック）等の絶縁体を用いることができる。樹脂としては、例えば、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、ポリエチレンテレフタラート（ＰＥＴ）、ポリカーボネート（ＰＣ）、ポリ塩化ビニル（ＰＶＣ）、ポリプロピレン（ＰＰ）、ポリエチレン（ＰＥ）、ポリスチレン（ＰＳ）等が挙げられる。

[0048] 基材１２の一例としては、生体内に埋め込んで用いられる医療器具（医療用インプラント等）、生体の粘膜を超えて用いられる医療器具（鉗子等）、及び、生体の粘膜に直接接触さて用いられる医療器具（内視鏡等）が挙げられる。基材１２としてこのようなものを用いれば、本変形例の殺菌方法は、医療器具、及び、医療用インプラント等の清掃、洗浄方法としても活用できる。

[0049] 本変形例において、導体２は、例えば、電極（作用電極）そのものであってもよい。

[0050] 導体２と基材１２とは、図３に示すように非接触状態であってもよいし、接触していてもよい。導体２と基材１２との最短距離は、例えば、０（接触状態）～１ｍとしてよい。導体２と基材１２との最短距離が上記範囲内であれば、バイオフィルム１０中の細菌１を効率よく死滅させる（殺菌する）ことができる。

[0051] 本変形例の殺菌方法によれば、電位を印加できない、ＰＴＦＥ等の絶縁体（基材１２）上に形成されたバイオフィルムの殺菌が可能である。したがって、本変形例の殺菌方法は、絶縁体で形成された医療器具の殺菌、洗浄に応用できる。

実施例

[0052] 以下に実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す実施例により限定的に解釈されるべきものではない。

[0053] ［実験１］

本実験では、導体としてステンレス鋼（ＳＵＳ３０４）チューブを用い、ＳＵＳチューブ上に形成されたバイオフィルム中の肺炎桿菌（ＫＰ：Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）の殺菌を行った。特定有機化合物としては、メチルビオロゲン（ＭＶ）を用いた。

[0054] （１）バイオフィルムの形成

ＴＳＢ培地（トリプトンソイブイヨン培地）に肺炎桿菌（ＫＰ）を添加し、細胞光学濃度OD_{600nm}＝１．０となるように調整した。この培地にＳＵＳチューブを浸漬し、３７℃で２４時間培養した。これにより、ＳＵＳチューブ表面に肺炎桿菌（ＫＰ）を含むバイオフィルムが形成された。

[0055] （２）殺菌用組成物の用意（調製）

ＤＭ（ｄｅｆｉｎｅｄ　ｍｅｄｉｕｍ、液体培地）に、メチルビオロゲン（ＭＶ）を１００μＭの濃度となるように添加して均一に混合した。メチルビオロゲンの標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、表１に示される通り、－０．４４０Ｖである。

[0056] （３）電位印加

作用電極としてチタン（Ｔｉ）ワイヤ、対電極として白金（Ｐｔ）ワイヤ、参照電極として銀／塩化銀電極を有する３電極電気化学セルを用意し、作用電極（チタンワイヤ）にバイオフィルムが形成されたＳＵＳチューブを電気的に接続した。３電極電気化学セル内にＭＶ含有培地（ＤＭ）を注ぎ、ＭＶ含有培地（ＤＭ）と、電極セット（作用電極、対電極、及び参照電極）、及びバイオフィルムが形成されたＳＵＳチューブとを接触させ、室温で、作用電極の電位を－１．０Ｖ（ｖｓ　Ａｇ／ＡｇＣｌ）とし、嫌気性条件下（窒素雰囲気）で１時間、クロノアンペロメトリー（ＣＡ）の測定を行った。即

ち、作用電極を介してＳＵＳチューブに電位を印加した。図４Ａに時間－電流曲線（ＣＡダイアグラム）を示す。

[0057] ［実験２－１］

本実験では、好気性条件下（大気中）で電位を印加したこと以外は、実験１と同様に実験を行った。図４Ｂに時間－電流曲線（ＣＡダイアグラム）を示す。

[0058] ［実験２－２］～［実験２－４］

実験２－２～２－４では、肺炎桿菌（ＫＰ）に代えて、それぞれ、別株の肺炎桿菌（ＫＰｔ）、表皮ブドウ球菌（ＳＥ：Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）、及び緑膿菌（ＰＡ：Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）を用い、それ以外は、実験２－１と同様に実験を行った。即ち、実験２－２～２－４では、実験２－１と同様に好気性条件下（大気中）で電位を印加した。

[0059] ［実験３－１］

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を用いず、また、電位も印加しなかった。まず、実験１と同様の方法でＳＵＳチューブ上に、ＫＰを含有するバイオフィルムを形成した。そして、バイオフィルムが形成されたＳＵＳチューブをリン酸緩衝液（ＰＢＳ）で３回洗浄した後、電位を印加せずに、ＤＭ（ＭＶ含まず）中で、室温で１時間、培養した。

[0060] ［実験３－２］～［実験３－４］

実験３－２～３－４では、肺炎桿菌（ＫＰ）に代えて、それぞれ、別株の肺炎桿菌（ＫＰｔ）、表皮ブドウ球菌（ＳＥ）、及び緑膿菌（ＰＡ）を用い、それ以外は、実験３－１と同様に実験を行った。即ち、実験３－２～３－４では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を用いず、また、電位も印加しなかった。

[0061] ［実験４－１］

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を用いたが、電位は印加しなかった。

まず、実験１と同様の方法でＳＵＳチューブ上に、ＫＰを含有するバイオフィルムを形成した。そして、バイオフィルムが形成されたＳＵＳチューブをＰＢＳで３回洗浄した後、電位を印加せずに、メチルビオロゲン（ＭＶ）を１００μＭの濃度で含むＤＭ中で、室温で１時間、培養した。

[0062] ［実験４－２］～［実験４－４］

実験４－２～４－４では、肺炎桿菌（ＫＰ）に代えて、それぞれ、別株の肺炎桿菌（ＫＰｔ）、表皮ブドウ球菌（ＳＥ）、及び緑膿菌（ＰＡ）を用い、それ以外は、実験４－１と同様に実験を行った。即ち、実験４－２～４－４では、特定有機化合物（ＭＶ）を用いたが、電位は印加しなかった。

[0063] ［殺菌効果の評価方法］

各実験において、ＳＵＳチューブをＤＭ（液体培地）から取り出してＰＢＳ（ｐＨ＝７．２）で３回洗浄した。容器内に、洗浄したＳＵＳチューブと１ｍＬのＰＢＳを入れ、ボルテックスシェーカーによる強振とう（３０秒間）、超音波処理（７分間）、及び再度の強振とう（３０秒間）を行い、ＳＵＳチューブからバイオフィルムを剥離した。剥離したバイオフィルムを含むＰＢＳを１００倍に希釈した。希釈したバイオフィルム含有ＰＢＳ１００μＬをＴＳＢ－寒天培地プレートに広げた試料を２個作製し、３７℃で一晩培養した。培養後、２個の試料において、形成されたコロニーの数をそれぞれ数え、平均値を求めた。この平均値から各実験のコロニー数（コロニー形成単位（ＣＦＵ（Ｃｏｌｏｎｙ　Ｆｏｒｍｉｎｇ　Ｕｎｉｔ）／ｍＬ））を求めた。

[0064] ［評価結果］

＜殺菌効果に及ぼす雰囲気の影響＞

図４Ｃに、実験１（ＭＶ有り、嫌気性条件下で電位印加有り）、実験２－１（ＭＶ有り、好気性条件下で電位印加有り）、及び実験３－１（コントロール、ＭＶ無し、電位印加無し）の結果（コロニーの数）を示す。

[0065] 実験３－１（コントロール）と比較して、実験１及び２－１では、細菌のコロニーの数が減少していた。これから、電位印加時の雰囲気によらず、Ｍ

Ｖを含む組成物中でＳＵＳチューブに電位を印加することで、バイオフィルム中の細菌を殺菌できることが分かった。特に、好気性条件下で電位を印加した実験２－１では、細菌の数を劇的に減少させることができた。

[0066] 実験１及び２－１の結果をより明確に比較するために、図４Ｄに、実験１及び２－１それぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、図４Ｃに示す、実験３－１（コントロール）のコロニー数から、各実験のコロニー数を減じた差である。図４Ｄに示すように、好気性条件下（実験２－１）では、嫌気性条件下（実験１）と比較して、１００倍以上の殺菌効果が得られた。

[0067] ＜各種細菌が形成したバイオフィルムにおける殺菌効果＞

表２に、それぞれ異なる種類の細菌を使用した実験２－１～２－４（ＭＶ有り、好気性条件下で電位印加有り）における殺菌効率を示す。殺菌効率は、各実験２－１～２－４におけるコロニー数を「Ｘ」、これらに対応する同じ種菌を使用した各実験３－１～３－４（コントロール、ＭＶ無し、電位印加無し）おけるコロニー数を「Ｙ」としたとき、下記式で表される。

殺菌効率（％）＝｛（Ｙ－Ｘ）／Ｙ）｝×１００

[0068] [表2]

実験 （好気性条件下で電位印加）	細菌	殺菌効率（％）
２－１	ＫＰ	１００
２－２	ＫＰｔ	９８．７
２－３	ＳＥ	９８．６
２－４	ＰＡ	１００

[0069] 表２に示すように、菌の種類によらず、実験２－１～２－４のいずれにおいても、１時間という短い殺菌時間で、９５％以上の高い殺菌効率が得られた。

[0070] また、図５Ａに、実験２－１～２－４と、これに対応した各種菌を使用した実験４－１～４－４（コントロール、ＭＶ有り、電位印加無し）の結果を示す。菌の種類によらず、実験２－１～２－４のいずれにおいても、実験４

－１～４－４（コントロール）と比較して、細菌のコロニーの数が著しく減少した。この結果から、ＭＶを含む組成物にバイオフィルムを単に浸漬するだけでは殺菌効果は得られず、ＳＵＳチューブに電位を印加することにより殺菌効果が得られることが確認できた。

[0071] 実験２－１～２－４の結果をより明確に比較するために、図５Ｂに、実験２－１～２－４それぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、図５Ａに示す、実験４－１～４－４（コントロール）のコロニー数から、それぞれに対応する実験２－１～２－４のコロニー数を減じた差である。図５Ｂに示すように、グラム陽性菌（ＳＥ）よりも、グラム陰性菌（ＫＰ、ＫＰｔ、ＰＡ）に対して、より高い殺菌効果が得られた。

[0072] [実験５－１]

本実験では、ＳＵＳチューブに代えて、絶縁体であるＰＴＦＥ製チューブを用いたこと以外、実験２－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、ＰＴＦＥ製チューブに肺炎桿菌（ＫＰ）を含むバイオフィルムを形成し、メチルビオロゲン（ＭＶ）を含有するＤＭ（液体培地）中で、ＰＴＦＥ製チューブに接触させた作用電極ＷＥ（チタンワイヤ）に、好気性条件下（大気中）で電位を印加した。本実験では、作用電極（チタンワイヤ）そのものが、電位を印加する「導体」に相当する。

[0073] [実験５－２]

本実験では、電位を印加しなかったこと以外、実験５－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、電位を印加せずに、チルビオロゲン（ＭＶ）を含むＤＭ中で、肺炎桿菌（ＫＰ）を含むバイオフィルム付きＰＴＦＥ製チューブを室温で１時間、培養した。

[0074] [実験５－３]

本実験では、まず、実験５－１と同様の方法でＰＴＦＥ製チューブ上に、ＫＰを含有するバイオフィルムを形成した。本実験では、それ以上の操作は行わなかった。

[0075] ［殺菌効果の評価］

実験５－１及び５－２について、上述の「殺菌効果の評価方法」と同様の方法により、各実験のコロニー数（コロニー形成単位（ＣＦＵ／ｍＬ））を求めた。

実験５－３においても、バイオフィルムを形成したＰＴＦＥ製チューブをＴＳＢ培地から取り出した後、上述の「殺菌効果の評価方法」と同様の方法により、各実験のコロニー数（コロニー形成単位（ＣＦＵ／ｍＬ））を求めた。

[0076] 図６に、実験５－１及び５－２それぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、実験５－３（コントロール）のコロニー数から、各実験のコロニー数を減じた差である。図６に示すように、実験５－１（ＭＶ有り、電位印加有り）は、実験５－２（ＭＶ有り、電位印加無し）と比較して、細菌減少量が非常に大きかった。この結果から、バイオフィルムが形成された基材が絶縁体（ＰＴＦＥ）である場合も、殺菌用組成物中で導体に電位を印加することで高い殺菌効果が得られることが確認できた。

[0077] [実験６－１]

本実験では、肺炎桿菌（ＫＰ）に代えて、緑膿菌（ＰＡ）を用いた以外は、実験５－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を含有するＤＭ（液体培地）中で、ＰＴＦＥ製チューブ上に形成されたバイオフィルム中の緑膿菌（ＰＡ）の殺菌を行った。

[0078] [実験６－２]

本実験では、１００μＭのメチルビオロゲン（ＭＶ）と共に、２０μＭの塩化銀を含有するＤＭ（液体培地）を殺菌用組成物として用いた。それ以外は、実験６－１と同様に実験を行った。

[0079] [実験６－３]

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を含まず、代わりに、塩化銀（ＡｇＣｌ）を２０μＭ含有するＤＭ（液体培地）を殺菌用組成物として用いた。それ以外は、実験６－１と同様に実験を行った。

[0080] [実験６－４]

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）及び塩化銀を用いず、また、電位も印加しなかった。それ以外は、実験６－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、電位を印加せずに、ＤＭ中で、緑膿菌（ＰＡ）を含むバイオフィルム付きＰＴＦＥ製チューブを室温で１時間、培養した。

[0081] [実験７－１]

本実験では、肺炎桿菌（ＫＰ）に代えて、表皮ブドウ球菌（ＳＥ）を用いた以外は、実験５－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）を含有するＤＭ（液体培地）中で、ＰＴＦＥ製チューブ上に形成されたバイオフィルム中の表皮ブドウ球菌（ＳＥ）の殺菌を行った。

[0082] [実験７－２]

本実験では、１００μＭのメチルビオロゲン（ＭＶ）と共に、２０μＭの塩化銀を含有するＤＭ（液体培地）を殺菌用組成物として用いた。それ以外は、実験７－１と同様に実験を行った。

[0083] [実験７－３]

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）及び塩化銀を用いず、また、電位も印加しなかった。それ以外は、実験７－１と同様に実験を行った。即ち、本実験では、電位を印加せずに、ＤＭ中で、表皮ブドウ球菌（ＳＥ）を含むバイオフィルム付きＰＴＦＥ製チューブを室温で１時間、培養した。

[0084] ［殺菌効果の評価］

実験６－１～６－４、及び７－１～７－３について、上述の「殺菌効果の評価方法」と同様の方法により、各実験のコロニー数（コロニー形成単位（ＣＦＵ／ｍＬ））を求めた。

[0085] 図７Ａに、緑膿菌を用いた実験６－１～６－３それぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、実験６－４（コントロール）のコロニー数から、各実験のコロニー数を減じた差である。図７Ａから分かるように、実験６－１（ＭＶのみ）および実験６－２（ＭＶとＡｇＣｌとの併用）の何れについても、実験６－３（ＡｇＣｌのみ）と比較して、細菌減少量が大きかった。さらに、実験６－２（ＭＶとＡｇＣｌとの併用）は、実験６－１（ＭＶのみ

）と比較すると、さらに細菌減少量が大きかった。以上の結果から、殺菌用組成物が緑膿菌（ＰＡ）に対しても高い殺菌効果が得られることが確認でき、さらに、殺菌用組成物においてＭＶとＡｇ$^{+}$を併用することで相乗効果が生じ、より高い殺菌効果を得られることが確認できた。

[0086] 図７Ｂに、表皮ブドウ球菌（ＳＥ）を用いた実験７－１及び７－２それぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、実験７－３（コントロール）のコロニー数から、各実験のコロニー数を減じた差である。図７Ｂに示す実験７－１の結果から分かるように、絶縁基材（ＰＴＦＥ）上の表皮ブドウ球菌（ＳＥ）（実験７－１）に対しても、絶縁基材（ＰＴＦＥ）上の肺炎桿菌（ＫＰ）（図６、実験５－１）、緑膿菌（ＰＡ）（図７Ａ、実験６－１）と同様に殺菌効果を確認できた。また、実験７－２（ＭＶとＡｇＣｌとの併用）は、実験７－１（ＭＶのみ）と比較して、細菌減少量が大きかった。この結果からも、殺菌用組成物においてＭＶとＡｇ$^{+}$を併用することで、より高い殺菌効果を得られることが確認できた。

[0087] ［実験８－１］

本実験では、メチルビオロゲン（ＭＶ）の代わりに、カルミン酸（ＣＡＭＡ）を用いたこと以外は、実験２－１と同様に実験を行った。すなわち、ＳＵＳチューブ表面に形成されたバイオフィルム中の肺炎桿菌（ＫＰ）を好気性条件下（大気中）で殺菌した。ただし、バイオフィルは、ＴＳＢ培地に肺炎桿菌（ＫＰ）を添加し、細胞光学濃度OD_{600nm}＝０．０１となるように調整し、この培地にＳＵＳチューブを浸漬し、３７℃で３日間培養することで、形成した。なお、カルミン酸の標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、表１に示される通り、－０．５１９Ｖである。

[0088] ［実験８－２］

本実験では、カルミン酸（ＣＡＭＡ）の代わりに、Anthraquinone-2-sulfonate（ＡＱＳ）を用いたこと以外は、実験８－１と同様に実験を行った。なお、Anthraquinone-2-sulfonateの標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、表１に示される通り、－０．２２５Ｖである。

[0089] ［実験８－３］

本実験では、カルミン酸（ＣＡＭＡ）の代わりに、1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium（ＤＢＰＤＢ）を用いたこと以外は、実験８－１と同様に実験を行った。なお、1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridiniumの標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、表１に示される通り、－０．４８Ｖである。

[0090] ［実験８－４］

本実験では、カルミン酸（ＣＡＭＡ）の代わりに、ベンジルビオロゲン（ＢＶ）を用いたこと以外は、実験８－１と同様に実験を行った。なお、ベンジルビオロゲンの標準酸化還元電位（ｐＨ７）は、表１に示される通り、－０．３５８Ｖである。

[0091] ［実験８－５］～［実験８－８］

実験８－５～実験８－８では、実験８－１～実験８－４にそれぞれ対応する実験であり、実験８－１～実験８－４と同様の特定有機化合を用いたが、電位は印加しなかった。

[0092] ［実験８－９］

本実験（コントロール）では、特定有機化合物を用いず、また、電位も印加しなかった。実験８－１と同様の方法でＳＵＳチューブ上に、ＫＰを含有するバイオフィルムを形成した。そして、バイオフィルムが形成されたＳＵＳチューブを、電位を印加せずに、ＤＭ（特定有機化合物を含まず）中で、室温で１時間、培養した。

[0093] ［殺菌効果の評価方法］

各実験において、ＳＵＳチューブをＤＭ（液体培地）から取り出してＰＢＳ（ｐＨ＝７．２）で３回洗浄した。容器内に、洗浄したＳＵＳチューブと１ｍＬのＰＢＳを入れ、ボルテックスシェーカーによる強振とう（３０秒間）、超音波処理（７分間）、及び再度の強振とう（３０秒間）を行い、ＳＵＳチューブからバイオフィルムを剥離した。剥離したバイオフィルムを含むＰＢＳを１００倍に希釈した。希釈したバイオフィルム含有ＰＢＳ１００μＬをＴＳＢ－寒天培地プレートに広げた試料を３個作製し、３７℃で一晩培

養した。培養後、３個の試料において、形成されたコロニーの数をそれぞれ数え、平均値を求めた。この平均値から各実験のコロニー数（コロニー形成単位（ＣＦＵ（Ｃｏｌｏｎｙ　Ｆｏｒｍｉｎｇ　Ｕｎｉｔ）／ｍＬ））を求めた。

[0094] ［評価結果］

図８Ａに、実験８－１～８－９のコロニー数を示す。図８Ｂに、実験８－１～８－８のそれぞれにおける細菌減少量を示す。細菌減少量は、図８Ａに示す、実験８－９（コントロール）のコロニー数から、各実験のコロニー数を減じた差である。図８Ａおよび図８Ｂに示される通り、実験８－１～８－４（特定有機化合物有り、電位印加あり）は、実験８－５～８－８（特定有機化合物有り、電位印加なし）と比較して、細菌減少量が大きく、より高い殺菌効果が得られたことが確認できた。

産業上の利用可能性

[0095] 本発明の殺菌方法は、医療器具や医療用インプラントに起因する感染症予防のための洗浄・清掃に利用できる。

符号の説明

[0096] １　細菌細胞（細菌）

２　導体

５　特定有機化合物

１０　バイオフィルム

１２　基材

請求の範囲

[請求項1] バイオフィルムに含まれる細菌の殺菌方法であって、

標準酸化還元電位（ｐＨ７）が－０．７Ｖ～－０．２Ｖである有機化合物と、水とを含む組成物を用意することと、

前記組成物と、前記バイオフィルム及び導体とを接触させることと、

前記導体に電位窓の下限値を超えて、銀／塩化銀電極基準で－０．４Ｖ以下の電位を印加することと、を含む、殺菌方法。

[請求項2] 前記導体に印加する前記電位が、－１．２Ｖ～－０．８Ｖである、請求項１に記載の殺菌方法。

[請求項3] 前記有機化合物が、ジピリジン構造を有する化合物である、請求項１又は２に記載の殺菌方法。

[請求項4] 前記有機化合物が、メチルビオロゲンである、請求項３に記載の殺菌方法。

[請求項5] 前記組成物がカチオンを更に含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項6] 前記組成物が銀イオンを更に含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項7] 前記バイオフィルムが前記導体上に形成されている、請求項１～６のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項8] 前記バイオフィルムが、前記導体とは異なる基材上に形成されている、請求項１～６のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項9] 前記基材が、絶縁体である、請求項８に記載の殺菌方法。

[請求項10] 前記基材が、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）である、請求項９に記載の殺菌方法。

[請求項11] 前記バイオフィルムが形成されている導体、又は前記基材が、生体内に埋め込んで用いられる医療器具、又は、生体の粘膜を超えて、若しくは、直接接触させて用いられる医療器具である、請求項７～１０

のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項12] 前記細菌が、肺炎桿菌、表皮ブドウ球菌、及び緑膿菌からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項13] 前記細菌が、グラム陰性桿菌である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の殺菌方法。

[請求項14] 前記グラム陰性桿菌が、腸内細菌科に属する細菌である、請求項１３に記載の殺菌方法。

[請求項15] 標準酸化還元電位が－０．７Ｖ～－０．２Ｖである前記有機化合物と、

前記水と、を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の殺菌方法に用いる組成物。

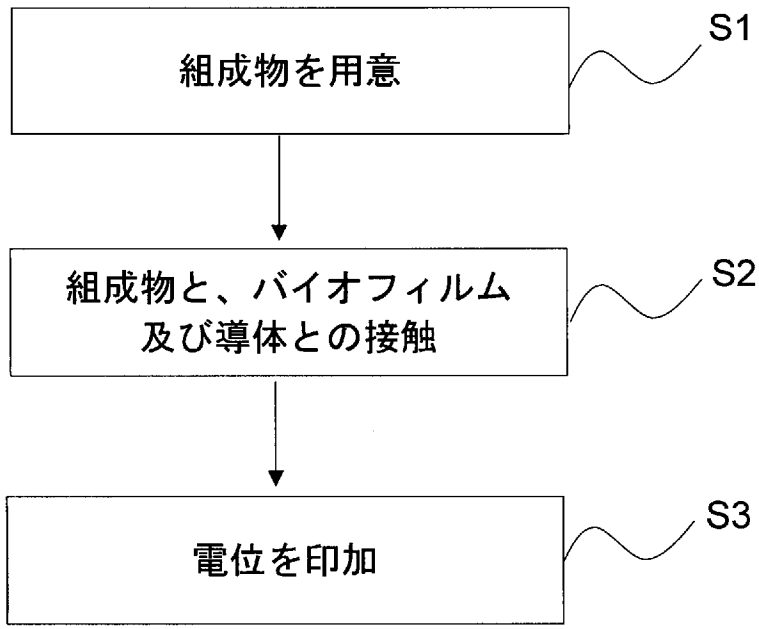
[請求項16] 前記有機化合物が、ジピリジン構造を有する化合物である、請求項１５に記載の組成物。

[請求項17] 前記有機化合物が、メチルビオロゲンである、請求項１６に記載の組成物。

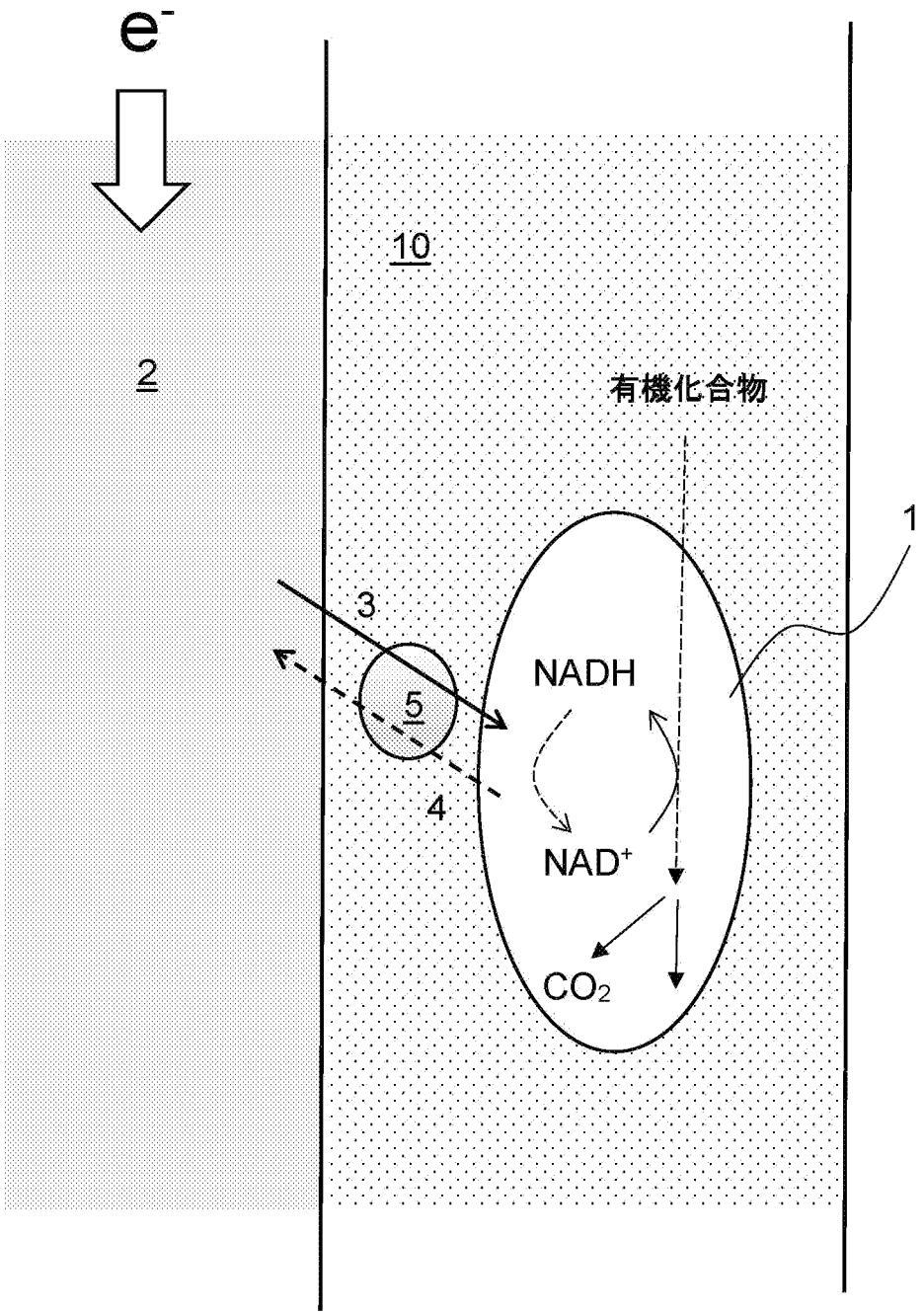
[請求項18] 前記組成物がカチオンを更に含む、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項19] 前記組成物が銀イオンを更に含む、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の組成物。

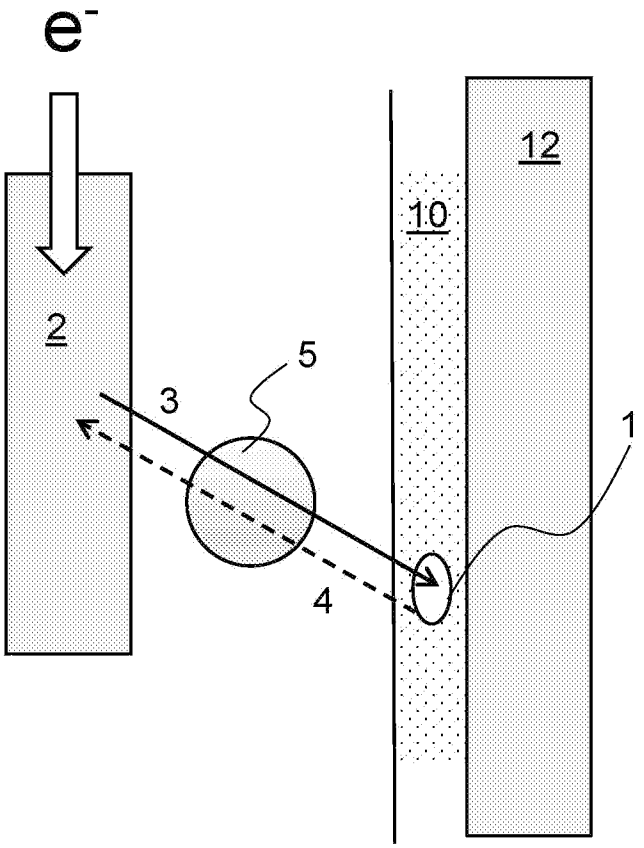
[図1]



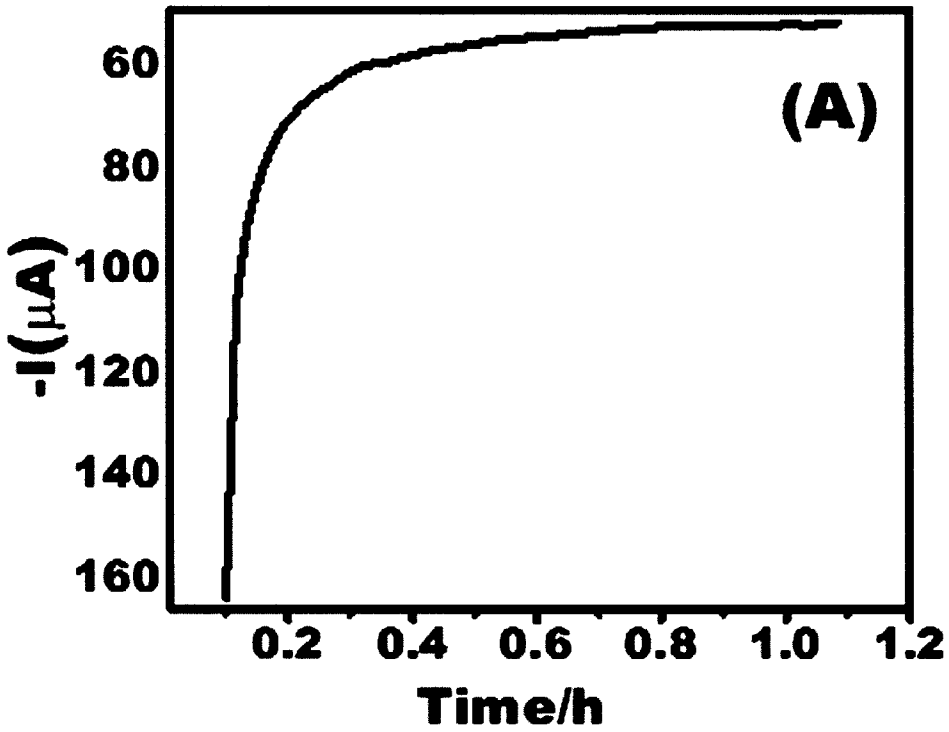
[図2]



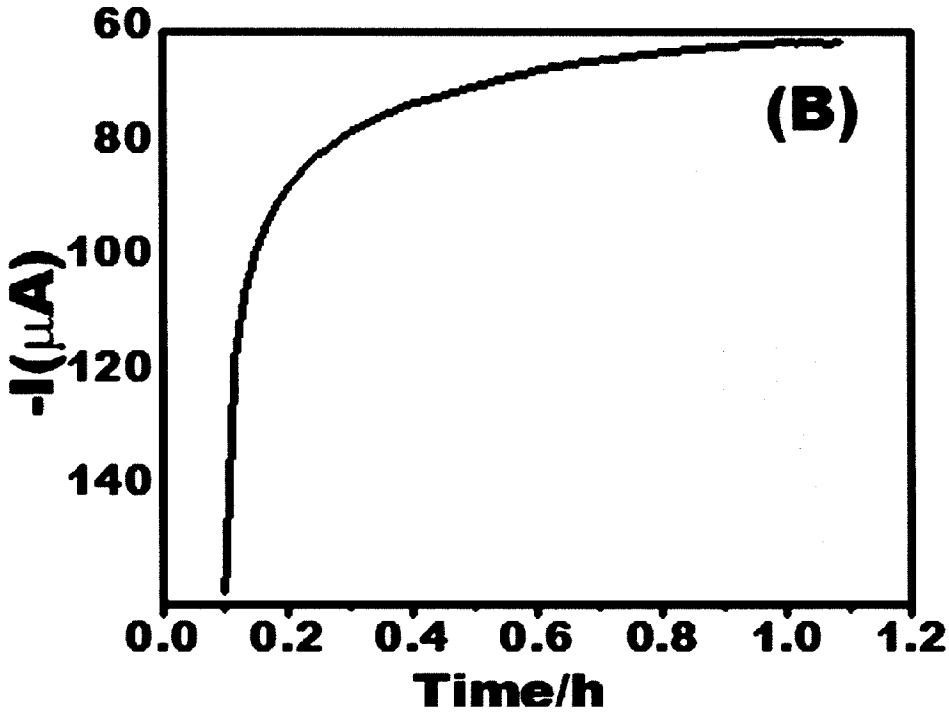
[図3]



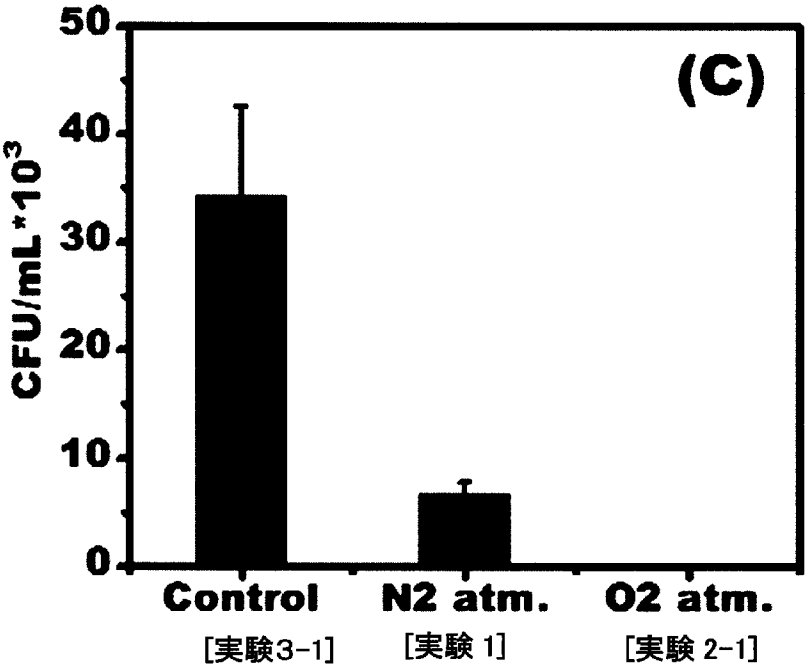
[図4A]


(A)
60
80
100
120
140
160
-I(μA)
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
Time/h

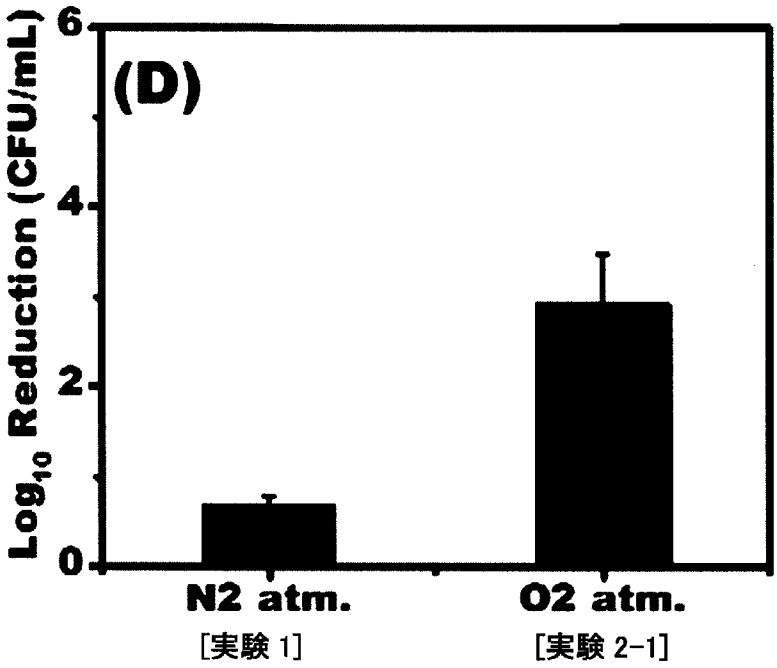
[図4B]


(B)
60
80
100
120
140
-I(μA)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
Time/h

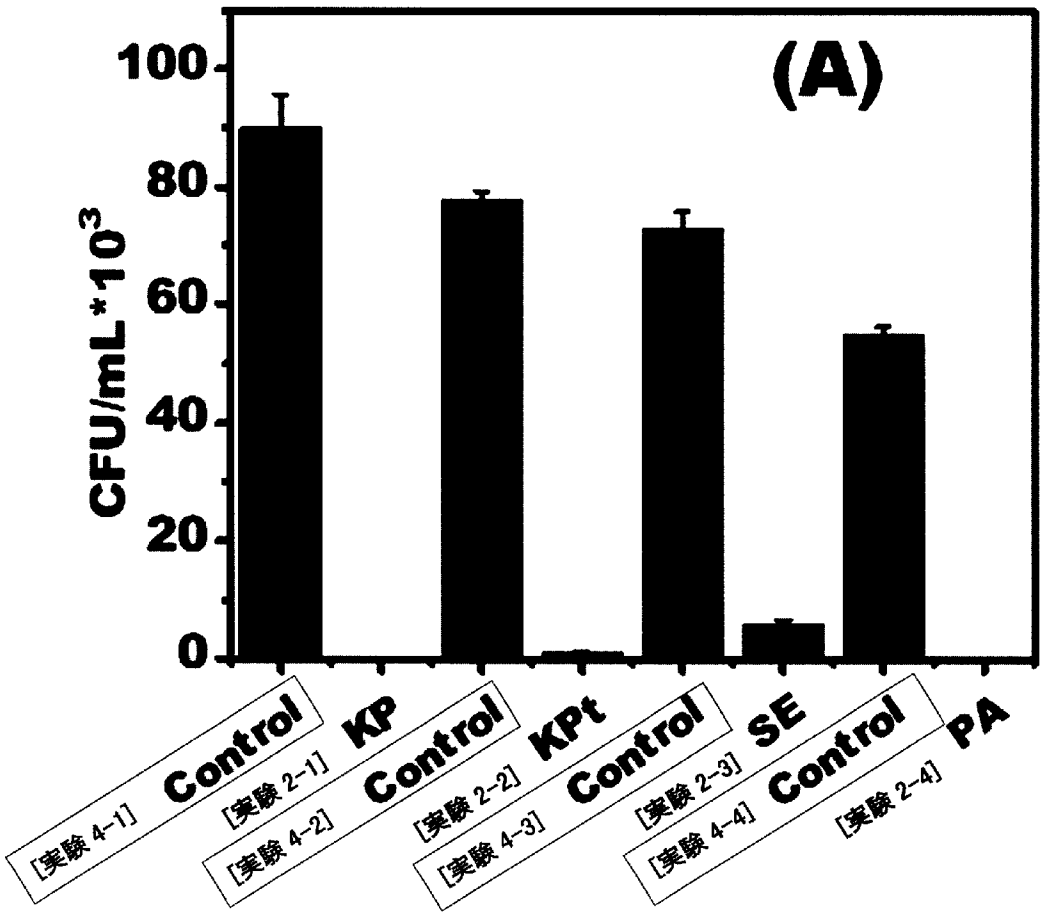
[図4C]


(C)
CFU/mL*10^3
50
40
30
20
10
0
Control
N2 atm.
O2 atm.
[実験3-1]
[実験 1]
[実験 2-1]

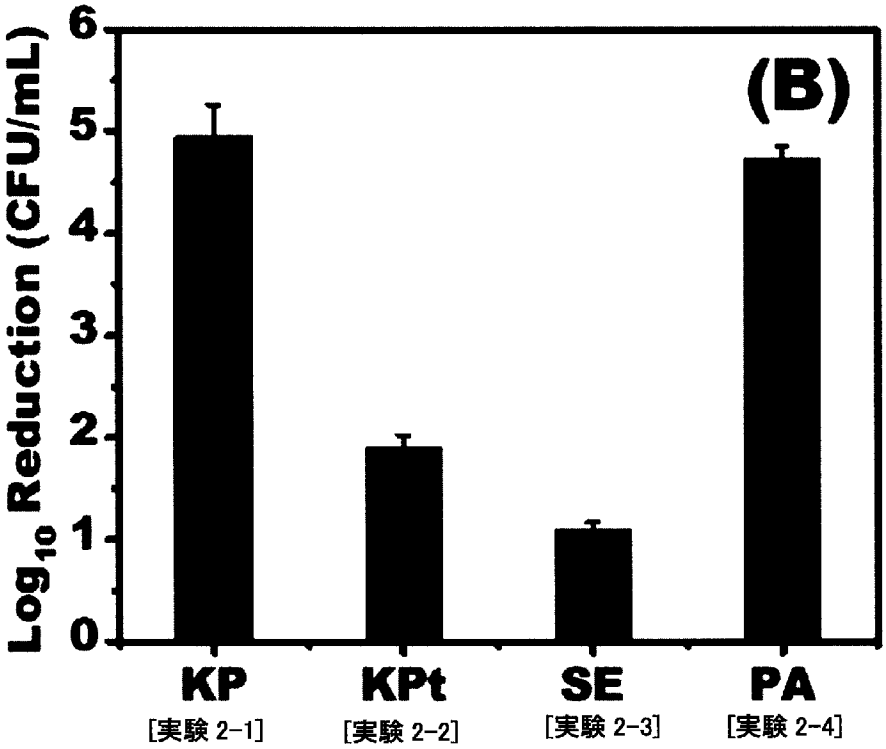
[図4D]


(D)
Log10 Reduction (CFU/mL)
6
4
2
0
N2 atm.
O2 atm.
[実験 1]
[実験 2-1]

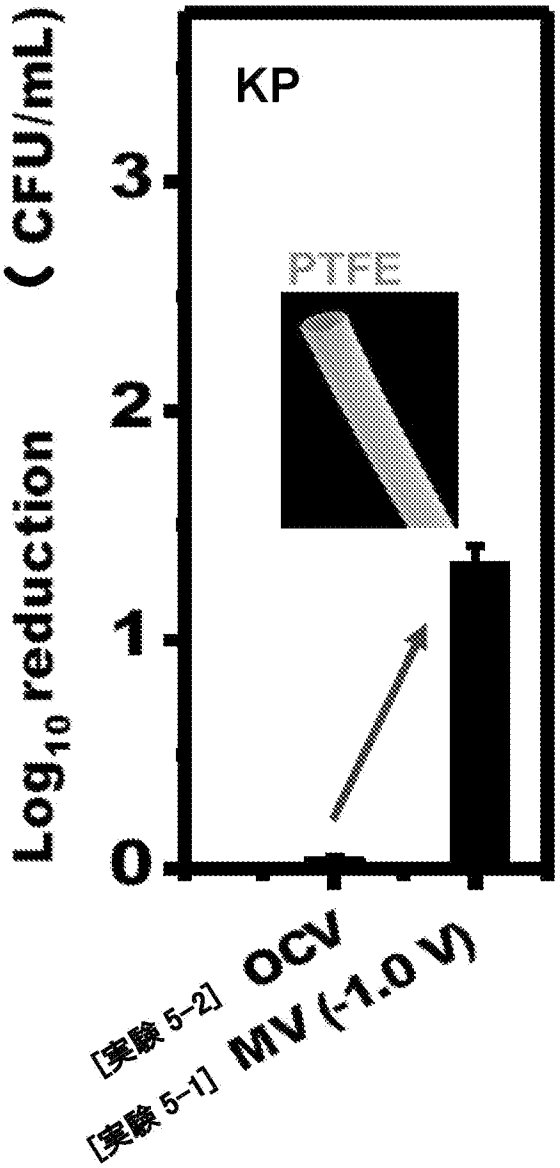
[図5A]


(A)
CFU/mL*10^3
100
80
60
40
20
0
[実験 4-1] Control
[実験 2-1] KP
[実験 4-2] Control
[実験 2-2] KPt
[実験 4-3] Control
[実験 2-3] SE
[実験 4-4] Control
[実験 2-4] PA

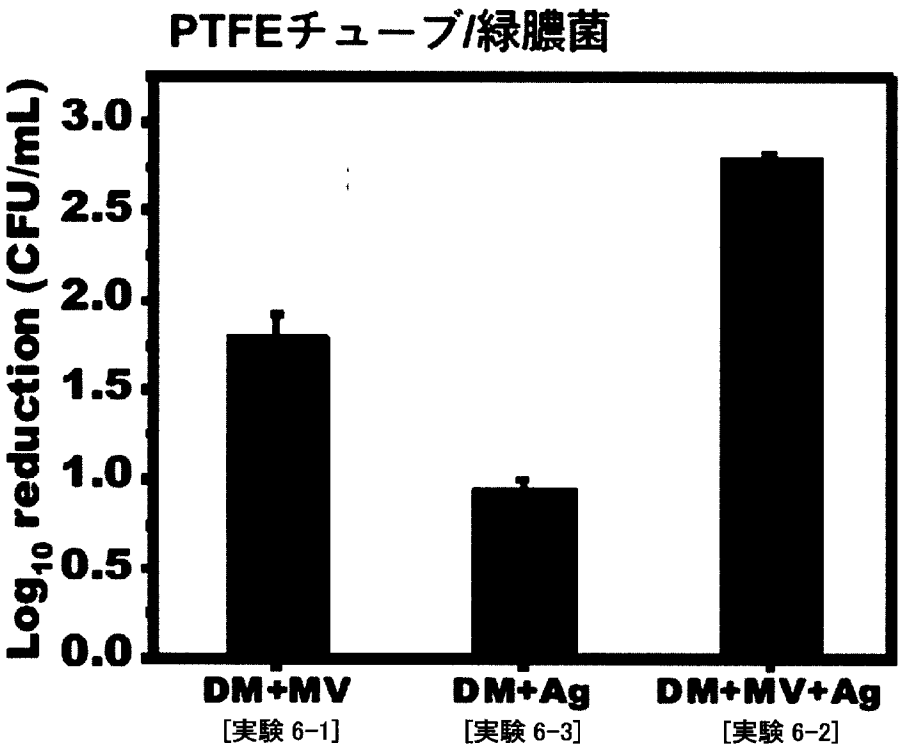
[図5B]


(B)
Log10 Reduction (CFU/mL)
0
1
2
3
4
5
6
KP
[実験 2-1]
KPt
[実験 2-2]
SE
[実験 2-3]
PA
[実験 2-4]

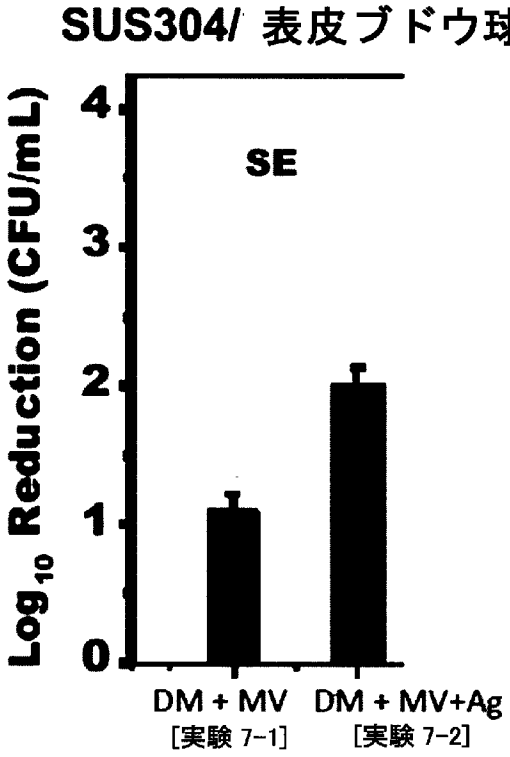
[図6]



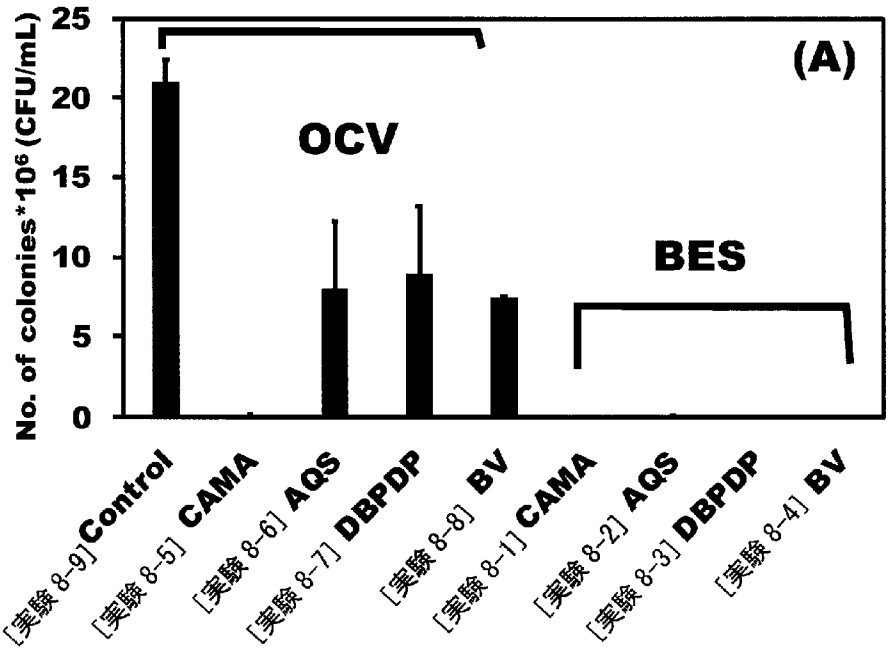
[図7A]


PTFEチューブ/緑膿菌
Log10 reduction (CFU/mL)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DM+MV
[実験 6-1]
DM+Ag
[実験 6-3]
DM+MV+Ag
[実験 6-2]

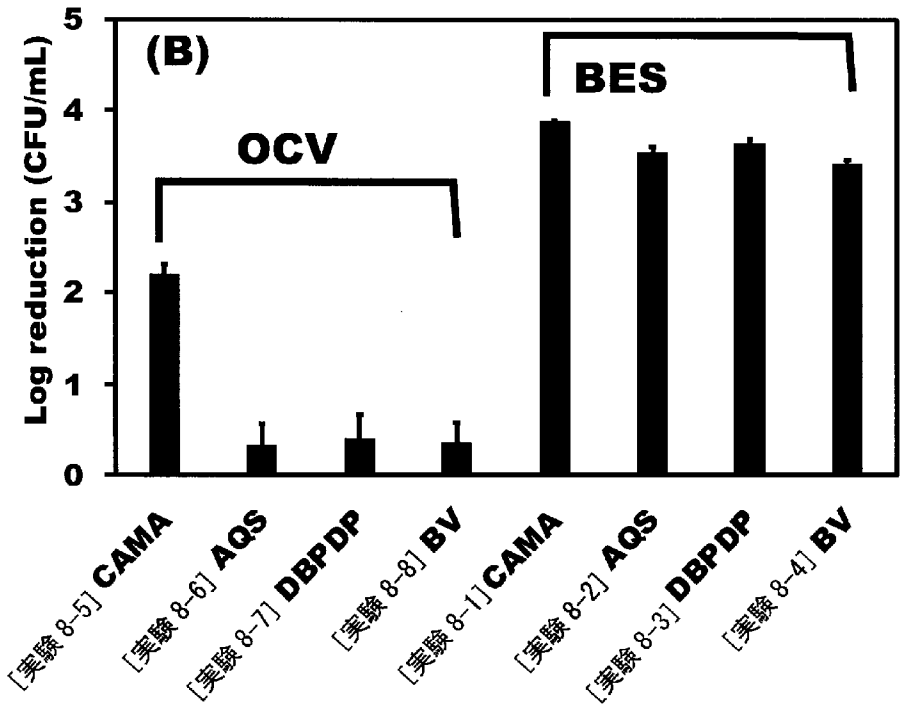
[図7B]


SUS304/ 表皮ブドウ球菌
Log10 Reduction (CFU/mL)
SE
4
3
2
1
0
DM + MV
[実験 7-1]
DM + MV+Ag
[実験 7-2]

[図8A]


(A)
OCV
BES
No. of colonies*10⁶ (CFU/mL)
25
20
15
10
5
0
[実験8-9]Control
[実験8-5] CAMA
[実験8-6] AQS
[実験8-7] DBPDP
[実験8-8] BV
[実験8-1] CAMA
[実験8-2] AQS
[実験8-3] DBPDP
[実験8-4] BV

[図8B]


(B)
OCV
BES
Log reduction (CFU/mL)
5
4
3
2
1
0
[実験8-5] CAMA
[実験8-6] AQS
[実験8-7] DBPDP
[実験8-8] BV
[実験8-1]CAMA
[実験8-2] AQS
[実験8-3] DBPDP
[実験8-4] BV

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/043383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 2/18(2006.01)i; ***A01N 43/40***(2006.01)i; ***A01P 3/00***(2006.01)i; ***A61L 2/03***(2006.01)i; ***C02F 1/461***(2023.01)i
FI: A61L2/18; A01P3/00; A61L2/03; C02F1/461 Z; A01N43/40 102

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L2/00; A01N43/40; A01P3/00; C02F1/461

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0073491 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 12 March 2015 (2015-03-12) paragraphs [0028], [0037], [0041]-[0043], [0052], [0053], [0060], [0063], fig. 8	1-5, 7-18
A	same as above	6, 19
Y	JP 6-285138 A (MATSUNAGA, Tadashi) 11 October 1994 (1994-10-11) claim 1, paragraphs [0002], [0003], [0010]	1-5, 7-18
A	JP 2012-34576 A (KAJIMA CORP.) 23 February 2012 (2012-02-23) paragraph [0038]	4, 17
A	US 5312813 A (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 17 May 1994 (1994-05-17) claims	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 January 2024	**23 January 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/043383

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2015/0073491 A1	12 March 2015	US 2011/0029080 A1	
		US 2017/0000918 A1	
		US 2019/0105414 A1	
		US 2015/0076000 A1	
		WO 2013/159107 A1	
JP 6-285138 A	11 October 1994	(Family: none)	
JP 2012-34576 A	23 February 2012	(Family: none)	
US 5312813 A	17 May 1994	WO 1992/019286 A1	
		AU 1672492 A	
		CA 2109084 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/043383

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61L 2/18(2006.01)i; A01N 43/40(2006.01)i; A01P 3/00(2006.01)i; A61L 2/03(2006.01)i; C02F 1/461(2023.01)i
FI: A61L2/18; A01P3/00; A61L2/03; C02F1/461 Z; A01N43/40 102

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61L2/00; A01N43/40; A01P3/00; C02F1/461

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	US 2015/0073491 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 12.03.2015 (2015-03-12) 段落0028,段落0037,段落0041-段落0043,段落0052-段落0053,段落0060,段落0063,図8	1-5,7-18
A	同上	6,19
Y	JP 6-285138 A (松永 是) 11.10.1994 (1994-10-11) 請求項1,段落0002-段落0003,段落0010	1-5,7-18
A	JP 2012-34576 A (鹿島建設株式会社) 23.02.2012 (2012-02-23) 段落0038	4,17
A	US 5312813 A (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 17.05.1994 (1994-05-17) 特許請求の範囲	1-19

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
11.01.2024	23.01.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
齊藤　光子 4V 3030

電話番号 03-3581-1101 内線 3483

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/043383

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2015/0073491 A1	12.03.2015	US 2011/0029080 A1	
		US 2017/0000918 A1	
		US 2019/0105414 A1	
		US 2015/0076000 A1	
		WO 2013/159107 A1	
JP 6-285138 A	11.10.1994	（ファミリーなし）	
JP 2012-34576 A	23.02.2012	（ファミリーなし）	
US 5312813 A	17.05.1994	WO 1992/019286 A1	
		AU 1672492 A	
		CA 2109084 A1	