

2MHz 自励発振器によるプラズマ滅菌に関する研究

小嶋 匡人・長沼 孝多・木村 英生・河西 伸一・清水 章良・木島 一広
杉田 良雄*1・中野 佳央*2・入山 裕*2

Study on Plasma Sterilization with Self-Oscillating 2MHz Generator

Masato KOJIMA, Kota NAGANUMA, Hideo KIMURA, Shin'ichi KASAI, Akio SHIMIZU, Kazuhiro KIJIMA,
Yoshio SUGITA*1, Yoshio NAKANO*2 and Yuu IRIYAMA*2

要 約

県内企業が開発を進めている 2MHz 自励発振プラズマ装置は、既存のプラズマ発生装置に必須なマッチングボックスを排除できる回路設計が特徴となっている。この特徴を活かし、医療用の小型殺菌装置としての利用について検討したところ、*Geobacillus stearothermophilus* NBRC13737、*Escherichia coli* JCM1649、*Staphylococcus epidermidis* NBRC100911、*Bolitoglossa diminuta* NBRC14213、*Bacillus atrophaeus* NBRC13721 について 15 分以内での殺菌が可能であった。また本装置の殺菌作用機序について検討したところ、プラズマにより生じる紫外線の寄与が大きいことが示唆された。

1. 緒 言

微生物は人間の活動域のあらゆる場所に存在しており、微生物が完全に排除された環境の構築は非常に難しい。とりわけ食品や医療などの分野では微生物汚染が重大な問題となることから、様々な殺菌方法が開発されてきた。主だったものとしては蒸気滅菌や乾熱滅菌、紫外線やガンマ線の照射滅菌、オゾンやエチレンオキシドといったガス滅菌などがあるが、これらの滅菌法にはそれぞれ長所と短所があり、対象物の変質や殺菌後の毒性残留などの問題があるため、滅菌対象物や用法を考慮し、適切な滅菌方法を選択する必要がある。

一方でプラズマ殺菌は比較的歴史の浅い手法であり、一般的にプラズマ殺菌の殺菌化学種としてはイオン、電子、ラジカル、紫外線などが考えられ、これらのいずれかあるいはそれらの相乗効果で菌が死滅していると考えられるが、現時点では殺菌の明確なメカニズムは確定していない¹⁾。現在のところ、実用段階にあるプラズマを利用した滅菌法としては、過酸化水素プラズマ滅菌²⁾があり米国メーカーから STERRAD の製品名で製品化されている。過酸化水素プラズマ滅菌は医療現場で多用されるエチレンオキシドガス滅菌の代替手法として期待され、日本でも普及してきている。過酸化水素プラズマ滅菌は比較的低温で処理することができ、エチレンオ

キシドに比べて残留毒性の低い殺菌方法といえる。しかしながら、この殺菌法は過酸化水素ガスを用いたガス殺菌の一種で、このガスにより微生物を殺滅し、プラズマにより残存する過酸化水素の分解促進を図るものであると考えられる^{3) 4)}。

本来プラズマ滅菌とは、処理ガス自体に微生物不活性化作用がなく、プラズマ化したときはじめて微生物不活性化作用を有し、微生物を死滅させることである⁴⁾。本報では特殊なガスを用いない小型プラズマ発生装置による殺菌について、評価および殺菌作用の機序について検討した。

2. 実験方法

2-1 2MHz 自励発振プラズマ発生装置

本研究で使用した自励発振電源を用いたプラズマ発生装置（ワイエス電子工業株）の外観を図 1 に、チャンバ内内の概略図を図 2 に示した。

一般に高周波放電によってプラズマを発生させる際、プラズマを負荷としてみた場合のインピーダンスは、抵抗成分のほかにリアクタンス成分も含む。そのため、高周波電源とプラズマ負荷との間の反射波を防ぐためインピーダンス整合を行うマッチングボックスを用いる必要がある。装置が大型化してしまうことが問題であった。一方、自励発振器はプラズマ負荷を含めた全体の系の状態で発振条件が決定するため、マッチングボックスを必要とせず、特に今回使用している自励発振電源は、

*1 ワイエス電子工業株式会社

*2 国立大学法人山梨大学

MOS 型電界効果トランジスタを用いて 2MHz 帯の発振を可能としており、既存のプラズマ発生装置に比べ小型化されているのが特徴である。また本研究で使用したものは、図 2 のとおり双極子電極を採用しており、給電に関しても平衡給電を採用している。このため、電極間に自己バイアスが印加されないため独立した DC バイアス機構を付加することにより、高周波給電とは独立した直流バイアス制御が可能となっている。

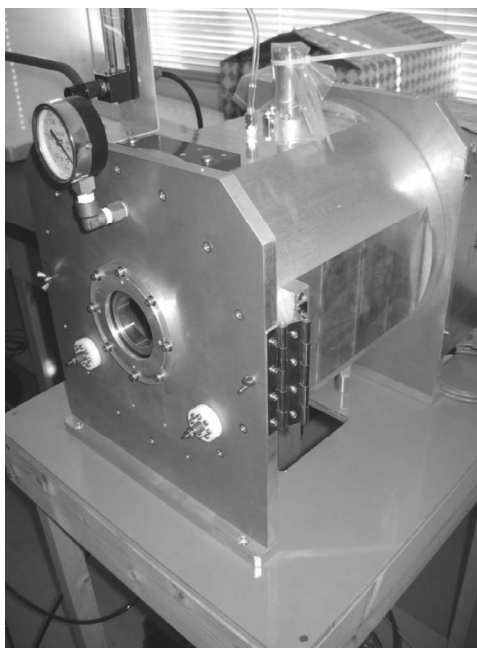


図 1 2MHz 自励発振装置の外観

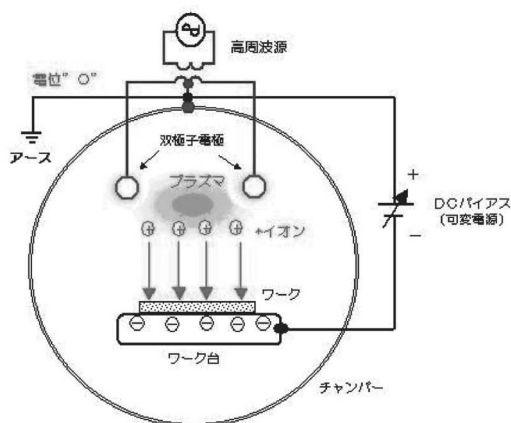


図 2 チャンバー内部の概略図

2-2 殺菌用微生物インジケータの作成

各種微生物に対する殺菌効果を調べるためのインジケータの作成は既報⁵⁾に準じた。すなわち *Geobacillus stearothermophilus* NBRC13737, *Escherichia coli* JCM1649, *Staphylococcus epidermidis* NBRC100911, *Bolitoglossa diminuta* NBRC14213, *Bacillus atrophaeus* NBRC13721 についてそれぞれ以下のようにインジケータ

を作成した。各種微生物を SCD 培地にて 2 回培養後、培養液を SCD 寒天培地に塗末してコロニーを得た。このコロニーを、任意の量の滅菌蒸留水にマクファーランド濁度 2 (OD₆₀₀=約 0.2) となるよう懸濁し、懸濁液 10 μl を乾熱滅菌したカバーガラス (18mm×18mm) に塗末・乾燥させた物をインジケータとした。その後インジケータはシャーレ (ポリスチレン製) または滅菌パウチ (商品名: Tyvek, PET0.06mm および PE 不織布 0.15mm でそれぞれの面が構成されている包装材料) に、シャーレでは塗末した面が上になるよう設置し、滅菌パウチでは塗末した面が PE 不織布側となるよう封入した。微生物の培養と無菌判定は日本薬局方⁵⁾に準拠して行った。すなわち、プラズマ処理したカバーガラスを 100ml の滅菌 SCD 培地 (三角フラスコ) に入れ *G.stearothermophilus* NBRC13737 は 50℃ で、*E. coli* JCM1649 および *S.epidermidis* NBRC100911 は 35℃ で、*B.diminuta* NBRC14213 および *B.atrophaeus* NBRC13721 は 30℃ でそれぞれ 7 日間培養後、培地の濁度を見て無菌状態を判定した。

3. 結果

3-1 殺菌に適したプラズマ処理方法

3-1-1 インジケータ菌株の選択

既報⁵⁾では温度上昇による殺菌に言及しているが、PE 不織布内に封入したインジケータを殺菌できること、DC バイアス電圧の印加が必須であったことから、温度上昇のほかプラズマ雰囲気中の活性ガスおよび、イオン bombardment の関与が考えられる。また既報では *E.coli* JCM1649 を用いてインジケータを作成したが、本株の耐熱性についての十分な検討が行われていない。そこで、滅菌パウチ内に封入した同株について、既報の実験条件と同じ 76℃、15 分間の乾熱殺菌試験を行ったところ、同株の殺菌は可能であった (データは示していない)。

一方、蒸気滅菌および過酸化水素プラズマ滅菌の指標菌として使用されている *G.stearothermophilus* NBRC13737 は 100℃、15 分間の乾熱殺菌試験でも殺菌は不可能であった (データは示していない) ことから、以降の殺菌条件の検討には同株を用いることとした。

3-1-2 プラズマ処理時のインジケータの形態

プラズマ処理を行う際、既報⁵⁾では滅菌パウチ内に封入したインジケータの殺菌が可能であったが、3-1-1 によりプラズマ処理時に発生する温度上昇によって殺菌された可能性があることが分かった。そこで、インジケータを滅菌パウチ内、シャーレ内、直接暴露の 3 形態

表1 インジケータの形態および
DC バイアス電圧印加が殺菌に与える影響

	DC バイアス電圧 (V)		
	0	150	300
滅菌パウチ内	+	+	+
シャーレ内	+	+	+
直接暴露	-	-	-

※菌増殖なし:- 菌増殖:+

でプラズマ処理し、併せて DC バイアス電圧印加についても検討した結果を表 1 に示した。なお既報⁵⁾に従い、プラズマ処理のプロセスガスは空気、チャンパー内気圧は 200Pa とした。

滅菌パウチ内およびシャーレ内のインジケータはいずれも殺菌することができなかつた。一方、プラズマ雰囲気中に直接暴露したインジケータについては殺菌ができたことから、本装置によるプラズマ殺菌作用は PE 不織布およびポリスチレンにより失われることが分かった。また、DC バイアス電圧についてはいずれの条件でも殺菌結果に影響を与えないことが分かった。

この結果から以降の実験ではインジケータをプラズマ雰囲気中に直接暴露し、DC バイアス電圧は印加しないこととした。

3-2 各種菌株のプラズマ殺菌評価

3-1-2 で決定した方法による各種菌株の殺菌について発振器入力電圧および処理時間の影響について評価した結果を表 2 に示した。

Bolitoglossa diminuta NBRC14213 については発振器入力電圧にかかわらず 5 分以内に殺菌することが可能であった。また、*G.stearothermophilus* NBRC13737, *E.coli* JCM1649, *S.epidermidis* NBRC100911, については、発振器入力電圧にかかわらず 15 分間のプラズマ処理により殺菌することが可能であった。一方、*Bacillus atrophaeus* NBRC13721 については発振器入力電圧 200V

のとき 15 分間のプラズマ処理により殺菌することができた。以上の結果から、発振器入力電圧 200V で 15 分間のプラズマ処理を行うことで今回供試した 5 種の菌株をすべて殺菌することができることが分かった。

3-3 プラズマ発生時の励起光中の紫外線

プラズマ発生時にはチャンパー内で図 3 の様に双極子電極を中心として発光が観測される。この発光についてスペクトル分析したところ、図 4 に示すとおりさまざまな励起に起因するとみられる波長の励起発光が起こっていることがわかった。光はその波長により 400nm 以下の波長の光を紫外線、400nm~700nm の波長の光を可視光線、700nm 以上の波長の光を赤外線と呼ぶ。核酸やタンパクは紫外領域に吸収極大を持つことから紫外線には殺菌作用があることが古くから知られている。そこで本装置のプラズマ処理により発生する紫外線の殺菌作用への寄与について検討するため、光の透過性の異なるガラスフィルターUG5, BG3, BG40, VG9 (渋谷光学, 図 5~8) を双極子電極とインジケータの間に設置しそれぞれ異なる波長の紫外線を遮断してプラズマ照射した。各ガラスフィルターを透過するプラズマ励起光(図 9~12) と殺菌結果について比較した結果を表 3 に示した。

UG5 では発振器入力電圧にかかわらず 15 分間のプラズマ処理により殺菌することが可能であった。一方、BG3 では発振器入力電圧 100V では殺菌することができなかつた。また BG40 および VG9 では発振器入力電圧にかかわらず殺菌することができなかつた。

一般的に紫外線の殺菌効果は 254nm 付近で極大をとることが知られており、UG5 の 260nm における光の透過率は約 88%, BG3 では約 10%である。一方 BG40 および VG9 はいずれも 300nm 以下の波長の光の透過率は 10⁻³以下である。このことから本装置の殺菌作用の機序にはプラズマ発生時の励起光に含まれる紫外線が寄与しており、殺菌の可否には特に 300nm 以下の短波長の紫外線が大きく寄与していることが示唆された。

表2 各種菌株の殺菌

発振器入力電圧 (V)	200			100		
	5	10	15	5	10	15
<i>G.stearothermophilus</i> NBRC13737	+	+	-	+	+	-
<i>E.coli</i> JCM 1649	+	-	-	+	+	-
<i>S.epidermidis</i> NBRC100911	+	+	-	+	+	-
<i>B. diminuta</i> NBRC14213	-	-	-	-	-	-
<i>B. atrophaeus</i> NBRC13721	+	+	-	+	+	+

※菌増殖なし:- 菌増殖:+

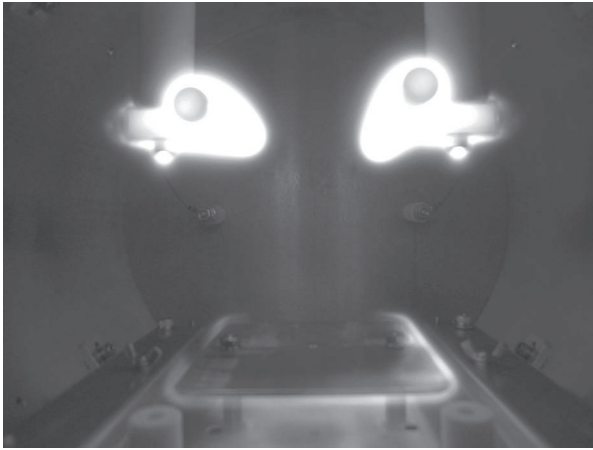


図3 プラズマ発生中のチャンバー内の様子

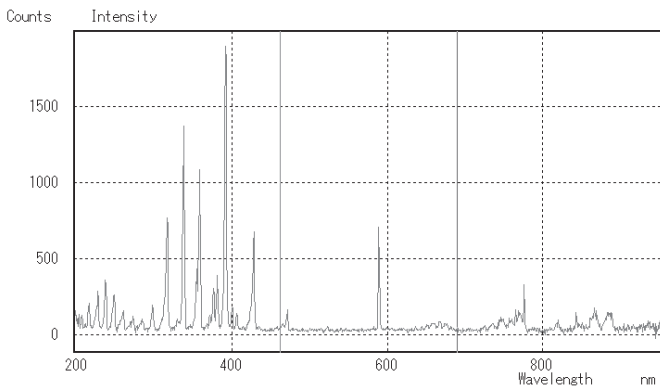


図4 プラズマ発光の分光スペクトル

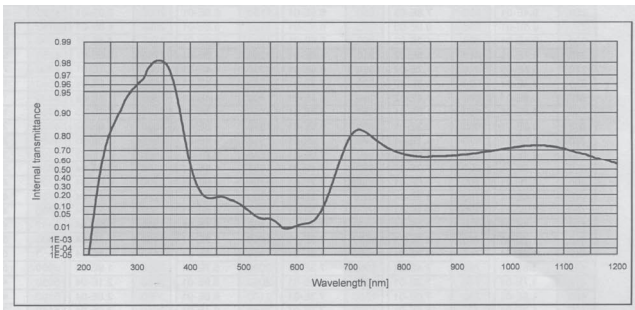


図5 UG5の光の透過率

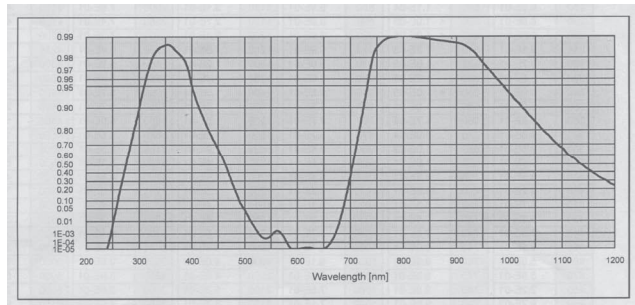


図6 BG3の光の透過率

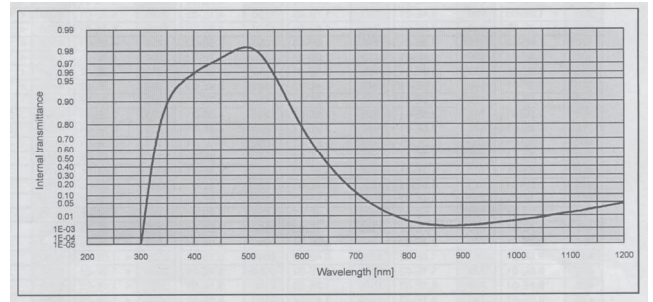


図7 BG40の光の透過率

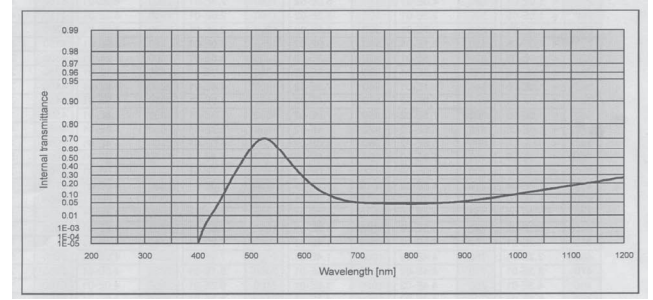


図8 VG9の光の透過率

表3 ガラスフィルター透過光による殺菌

発振器入力電圧 (V)	UG5	BG3	BG40	VG9
200	-	-	+	+
100	-	+	+	+

※菌増殖なし：- 菌増殖+

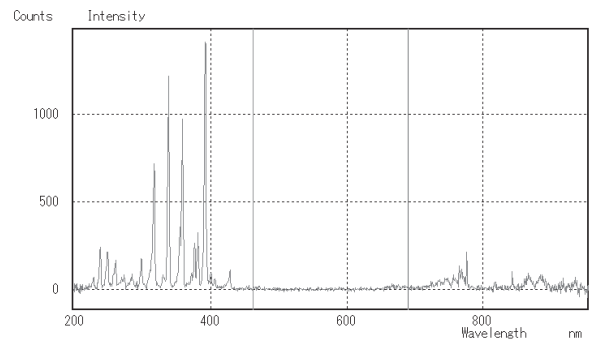


図9 UG5を透過したプラズマ励起光

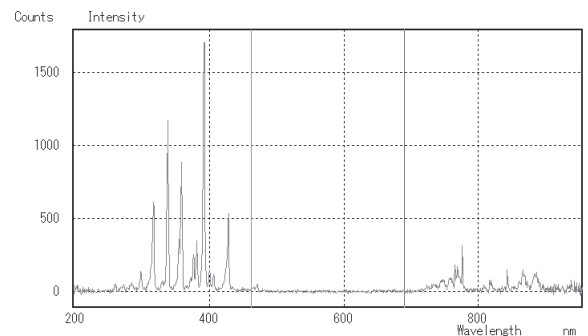


図10 BG3を透過したプラズマ励起光

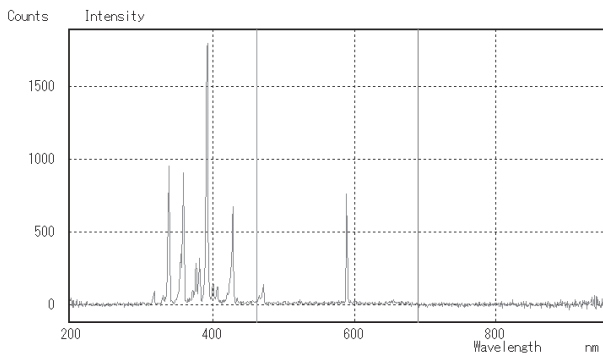


図 11 BG40 を透過したプラズマ励起光

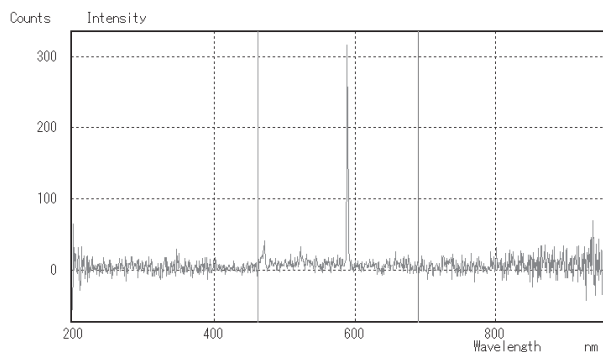


図 12 VG9 を透過したプラズマ励起光

4. 考 察

プラズマとは固体、液体、気体の次の第 4 の物質状態とよばれ、正と負の荷電粒子と中性粒子が混在し、全体的にはほぼ中性の集団である。プラズマ殺菌では安定したガスを励起することでさまざまな活性種を発生させ微生物の殺菌を行う。プラズマ中ではイオンや電子、ラジカル、励起光などの活性種がそれぞれが単独あるいは相互に作用することで微生物菌体に傷害を与えていると考えられているが、現在のところ殺菌作用の機序は確定されていない。

ワイエス電子工業(株)で開発を進めている 2MHz 自励発振プラズマ発生装置はプラズマ負荷を含めた全体の系で発振条件が決定するため、インピーダンス整合が容易であり、マッチングボックスが不要であることから装置を小型化することができる。本装置を使用したプラズマ殺菌について検討するため、*G.stearothermophilus* NBRC13737、*E.coli* JCM1649、*S.epidermidis* NBRC100911、*B.diminuta* NBRC14213、*B.atrophaeus* NBRC13721 の 5 種類の菌株を用いて検討した。この結果、プロセスガスを空気としてチャンバー内気圧 200Pa、発振器入力電源 200V、処理時間 15 分間で、菌体をプラズマに直接暴露することで 5 種の菌株を殺菌できることが明らかとなった。また DC バイアス電圧の印加が殺菌に必須ではなかったことから、処理温度も 50℃以下と

することができ、さまざまな素材の殺菌が可能であると考えられた。

本装置の殺菌作用の機序は、PE 不織布内の殺菌ができないこと、DC バイアス電圧が必須でないことから活性ガスおよびイオンボンバードメントについては寄与度は小さいと考えられた。一方、プラズマ発光中の紫外線の制御により殺菌結果が左右されたことから、殺菌作用には短波長の紫外線が大きく寄与していることが分かった。

本装置は小型化が容易であることに加え、プロセスガスを空気として殺菌が可能であったことから、チャンパー内へガスを充填する操作が不要であることや、ガスの無毒化処理が必要ないことから、小型・迅速・安全な殺菌装置として利用できる可能性があることが分かった。一方で PE 不織布包材内の殺菌ができないなどの点については改善の余地があり、現在それらの課題の解決にむけて装置の改良を進めている。

5. 結 言

2MHz 自励発振プラズマ発生装置を殺菌装置として評価および殺菌作用の機序について検討した。

- (1) 2MHz 自励発振プラズマ発生装置はプロセスガスを空気としてチャンパー内気圧 200Pa、発振器入力電源 200V、処理時間 15 分間で、菌体をプラズマに直接暴露することで 50℃以下の処理温度で 5 種の菌株を殺菌できる。
- (2) 本装置の殺菌作用の機序には 300nm 以下の短波長の紫外線が大きく寄与していることが示唆された。

参考文献

- 1) 新谷 英晴, 作道 章一: 防菌防黴, 38, 7, p.447-454 (2010)
- 2) P. T. Jacobs and S. M. Lin, : sterilization and preservation, Ed. S. S. Block, 5th ed. (Lippincott Williams & Wilkins, 2000) Chap. 38, p. 747
- 3) Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tarbizian and L' H. Yahia : Int. J. Pharm, 226, 1, (2001)
- 4) 玉澤かほる: 防菌防黴, 32, 1, p.13-30 (2004)
- 5) 木島 一広, 長沼 孝多, 河西 伸一, 清水 章良, 杉田 良雄, 長谷川 均, 関谷 英治, 中込 章公: 山梨県工業技術センター研究報告, No.24, p.111-113 (2011)