

環境循環型プラズマ滅菌処理装置の開発に関する研究

辻 政雄・木村 英生・秋津 哲也*¹・福島 金平*²

Development of Sterilization Equipment using Plasma and Discharge

Masao TSUJI, Hideo KIMURA, Tetsuya AKITSU*¹ and Kinpei FUKUSHIMA*²

要 約

沿面プラズマオゾン滅菌装置を試作し、各種微生物に対する殺菌効果を検討した。各種微生物は、菌数が約 10^6 CFUとなるように調整し、ステンレス板上に塗布・乾燥後、不織布包材で包装して試験に供した。その結果、*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 及び *Aspergillus niger* はいずれも10分で死滅した。一方、*Bacillus subtilis* では90分、*Bacillus stearothermophilus* はさらに長時間の120分を要した。このように*B. subtilis* や *B. stearothermophilus* のような芽胞菌では死滅させるのに多くの時間を要するが、非芽胞菌の細菌やカビ、酵母では短時間(10分以内)に殺菌できることがわかった。

Abstract

Antimicrobial effect of atmospheric oxygen plasma/ozone generator was studied using *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. Ozone was produced in the electrical discharge which was generated on a coplanar electrodes formed on a ceramic, 5 cm x 10 cm, by a frequency converter driving maximum 10 kV peak to peak voltage at 10 kHz., and injected into the experimental chamber. Each microorganism at the level c.a. 10^6 CFU was put on stainless plate (15mm x 15mm) and dried, packed with nonwoven cloths made from polyethylene. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* and *A. niger* were sterilized within 10 min. While *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* were sterilized in 90 and 120 min, respectively.

1. 緒 言

医療用具やプラスチック器材などの非加熱滅菌に使用されているエチレンオキシド (EO) は、人体に対して非常に毒性が強く¹⁾、皮膚粘膜障害、呼吸器系への炎症、角膜潰瘍などの危険性が指摘されている。また、このEOは「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律、Pollutant Release and Transfer Register (PRTR)」によって環境中への排出が規制されている物質でもある。そこで、著者らは、このEOに替わる安全な酸素、アルゴン及びヘリウムガスを使用し、プラズマや放電を利用した滅菌装置の開発を行っている。今回は、沿面放電プラズマによりオゾンが発生させる滅菌装置を試作し、各種微生物に対する殺菌効果を検討したので報告する。

2. 実験方法

2-1 沿面プラズマオゾン滅菌装置1号機による殺菌実験

2-1-1 沿面プラズマオゾン滅菌装置1号機の概要
本装置の全体概要を図1に示したが、本体部、酸素や窒素ガスの流量を制御する流量計、水蒸気導入装置、オゾン分解フィルターとファンを設けたアクリル板ケース及び制御部からなっている。また本体部の概要は図2に示したが、被殺菌物を収納する処理室、本体上部に設置した紫外線ランプ、オゾン生成の電極部、水蒸気発生用ヒーター、ガス供給口及び排気口から構成されている。なお、処理室はガラス容器でその容積は850ccである。また電極部は、50mm x 100mmの電極板2枚から構成され、電極板間は17mmである。オゾンはこの電極部に10kHzの高電圧をかけ、酸素ガスを流すことにより発生させた。

2-1-2 試験方法

殺菌対象微生物として米国レーベン社の試験紙型バイオロジカルインジケーター (BI) を用いた。このBIは

* 1 山梨大学工学部電子情報工学科

* 2 ヤマトラボテック (株)

B. subtilis var. *niger* ATCC9372の胞子を 1×10^6 CFUとなるようにろ紙に付着させたものをグラシン紙（セロファン紙にワックス処理したもので、約200個/mm²の微細孔が空いているもの）で包装したものである。

滅菌の適否は、日本薬局方無菌試験法³⁾に準拠して実施した。すなわち、処理したBIのグラシン紙を無菌的に除去し、微生物の付着したろ紙をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地100mlの入った三角フラスコに入れ、30～35℃で7日間培養後に培地の濁度を見て判定した。濁りがあるときは殺菌が否となる。

2-1-3 試験条件

処理室にBIを3枚縦に並べ、酸素流量を100～300ml/min、水蒸気の有無及びUV照射の有無を組み合わせた様々な試験条件を設定した。

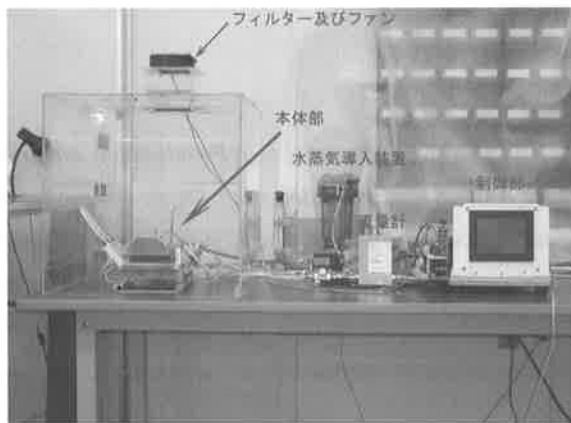


図1 沿面プラズマオゾン滅菌装置1号機の全体概要

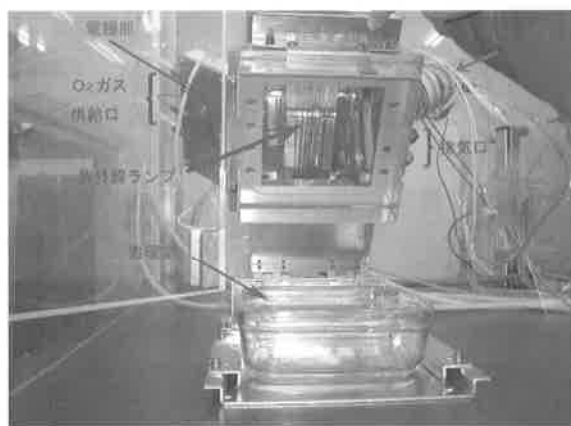


図2 沿面プラズマオゾン滅菌装置1号機の本体部

2-2 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機による殺菌実験

2-2-1 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機の概要
本装置の全体概要を図3に示したが、1号機を基本コンセプトとして処理室を大きくするとともにコンパクトな構造とした。本装置は被殺菌物を取納するチャンバー、手動

ドア、オゾンを発生させる沿面放電電極部、エキシマランプ（最大波長172nm）、ガス供給系統、水蒸気発生装置及び操作パネルから構成されている。チャンバーの大きさは図4に示したように360mm（W）×270mm（D）×320mm（H）で、約31Lである。また、沿面放電電極部は、50mm×100mmの電極板2枚を17mm幅を持たせて重ね合わせ、本装置の左右2カ所に取り付けた。そして電極部に10kHzの高電圧をかけ、酸素ガスを流すことでオゾンが発生させる構造とした。

2-2-2 試験条件

酸素ガスを両電極部に400ml/minの流量、合計800ml/minを流し、発生したオゾンチャンバー内に導入した。また水蒸気発生装置を120℃に加熱し、蒸留水を0.5ml/minの流量で流しながら、チャンバー内に水蒸気を注入した。チャンバー内の温度は50℃に設定した。なお、温度による殺菌効果の影響を見るために30℃と70℃の試験区も設定した。被殺菌物はチャンバー底部から140mmのところにおいて実施した。



図3 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機の全体概要

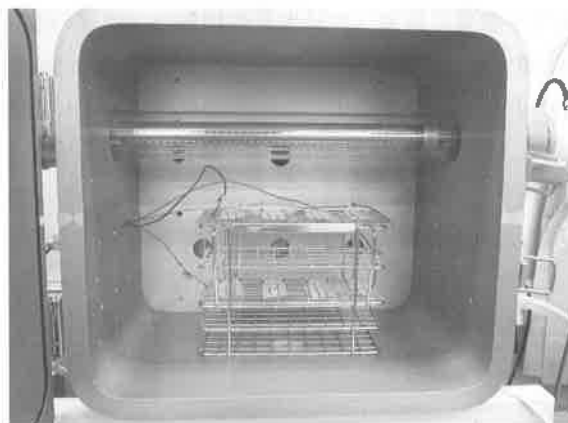


図4 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機のチャンバー内部

2-2-3 オゾン濃度の測定方法

チャンバー内の被殺菌物を置いた箇所、測定センサー

を設置し、(株)ロキテクノ製オゾンガス濃度計ZM20/200で経時的に測定した。

2-2-4 バイオロジカルインジケーター (BI) の作製
殺菌対象微生物として使用した *B. subtilis* ATCC9372 は、ろ紙 (6 mm×38 mm) にこの菌の芽胞を染み込ませた米国レーベン社の試験紙型 BI で、その菌濃度は 2.0×10^6 CFU であった。また、各種微生物を塗布・乾燥させたステンレスバイオロジカルインジケーター (SUS BI) も使用した。この SUS BI の作製は以下の方法で行った。はじめに、厚さ 1.5 mm のステンレス 304 を 15 mm×15 mm の大きさに切断し、洗浄、乾燥、アルミ包装後に乾熱処理した。次に、各種微生物はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCD 培地) (ベクトン・ディッキンソン社) で 2 回培養後、その 0.01 ml を SCD 寒天培地に塗抹して培養し、その 1 白金耳を蒸留水に懸濁し、約 10^6 CFU となるように調整したものを滅菌 SUS304 に塗布した。風乾後、滅菌パウチ⁴⁾ (商品名 Tyvek) ((PET (0.06 mm) と PE 不織布 (0.15 mm) でそれぞれの側面が構成されている包装材料、以下タイベック包材と記す) で密封した。

2-2-5 BI の培養と無菌判定

日本薬局方の無菌試験法⁵⁾ に準拠して行った。すなわち、処理した BI を 100 ml 滅菌 SCD 培地 (三角フラスコ) に入れ、*B. stearothermophilus* は 55~60℃、その他の細菌は 30~35℃、カビ・酵母は 25℃ でそれぞれ 7 日間培養後、SCD 培地の濁度を見て判定した。

3. 実験結果及び考察

3-1 沿面プラズマオゾン滅菌装置 1 号機による微生物の殺菌評価

実験結果を表 1 に示した。はじめに酸素流量を 300 ml/

min とし、処理時間の影響 (A-1, A-2 及び A-3) を見ると、20 分及び 40 分では殺菌効果が見られなかったが、60 分では死滅していた。次に、処理時間を 60 分とし、酸素流量の影響 (A-3, A-4 及び A-5) を見ると、100 ml/min では殺菌効果が見られないが、200 または 300 ml/min では効果が認められた。水蒸気の影響 (A-3 及び D) を見ると、水蒸気を導入しない試験区では殺菌できなかった。また、殺菌効果を持つ紫外線 (254 nm)⁶⁾ の併用効果 (A-3 及び B) を検討したところ、殺菌効果が見られなかった。これは 254 nm の紫外線はオゾン分解波長⁶⁾ と言われていることから、オゾン分解が進行し、殺菌効果を低下させる方向に作用させたものと思われる。

以上のように、酸素ガスを 200 ml/min 以上の流量で流しながら、生成したオゾン処理室に入れ、飽和蒸気のもとで処理すると、*B. subtilis* 芽胞菌は 60 分で死滅することがわかった。一方、紫外線照射を併用するとオゾン分解が促進にされるため、殺菌作用に及ぼす相乗効果は認められなかった。

3-2 沿面プラズマオゾン滅菌装置 2 号機による微生物の殺菌評価

3-2-1 チャンバー内のオゾン濃度変化

はじめにチャンバー内のオゾン濃度を経時的に測定し、図 5 に示した。その結果、対数的に濃度が上昇し、10 分、20 分、30 分及び 60 分では、それぞれ約 7500 ppm, 13,000 ppm, 17,000 ppm 及び 21,250 ppm の濃度を示し、80 分以後はほぼ 22,500 ppm の一定濃度で推移していた。

3-2-2 *B. subtilis* ATCC9372 芽胞菌に対する殺菌評価

試験紙型 *B. subtilis* ATCC9372 (2.0×10^6 CFU) をタイベック包材で包装した BI を用い、2-2-2 の試験条件で滅

表 1 各種殺菌条件による *B. subtilis* ATCC9372 芽胞菌の殺菌評価

試験区	酸素流量 (ml/min)	水蒸気	紫外線照射	処理時間 (分)	BI-1	BI-2	BI-3
A-1	300	○	×	20	+	+	+
A-2	300	○	×	40	+	+	+
A-3	300	○	×	60	-	-	-
A-4	200	○	×	60	-	-	-
A-5	100	○	×	60	+	+	+
B	300	○	○	60	+	+	+
C	300	×	○	60	+	+	+
D	300	×	×	60	+	+	+
E	0	×	○	60	+	+	+
F	0	○	○	60	+	+	+

* + ; 菌増殖 - ; 菌増殖なし

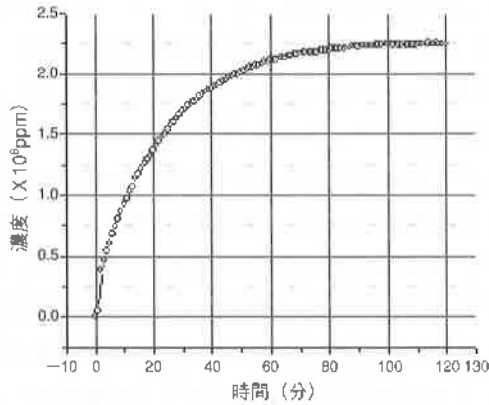


図5 チャンバー内のオゾン濃度変化

表2 *B. subtilis* ATCC9372の殺菌評価

試験区	処理時間 (分)	
	60	90
1) オゾン区のみ	-	-
2) オゾン+エキシマランプ区	+	+

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし

** 菌数: 2.0×10^6 CFU

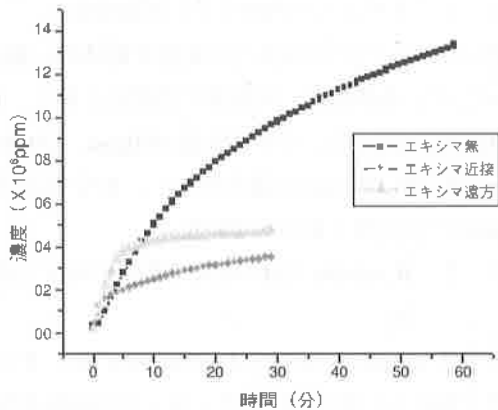


図6 エキシマランプ照射時のチャンバー内のオゾン濃度変化

表3 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機による*B. subtilis*の殺菌に及ぼす包装材料の影響

包材	厚さ (mm)	BI	滅菌時間 (分)		
			60	90	120
A) ポリエチレン (PE)	0.02	ろ紙	+	+	+
B) "	0.03	"	+	+	+
C) "	0.04	"	+	+	+
D) "	0.08	"	+	+	+
E) ポリプロピレン (PP)	0.04	"	+	+	+
F) グラシン紙	0.05	"	+	+	-
G) タイバック包材	0.06//0.15	"	-	-	-

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし, ** *B. subtilis* ATCC9372の菌数: 2.0×10^6 CFU

*** 庫内温度, 湿度: 50°C , 72%

菌試験を行った。また、エキシマランプ（最大波長172nm）の相乗効果を確かめるために、25分照射、5分休止の処理を併用した試験区も設定した。処理時間を60分及び90分で実施した結果を表2に示したが、エキシマランプの照射を併用した試験区は、いずれの時間でも殺菌効果が見られなかった。しかし、エキシマランプを併用しない場合には、60分でも殺菌可能であった。一方、エキシマランプ併用時のオゾン濃度を、エキシマランプから10mmの近傍及び200mmの遠方で測定したところ、図6に示したように、照射10分以後に無照射のものに比較して、オゾン濃度が低位で一定となり、オゾンの上昇は見られなかった。このことから、エキシマランプの照射はオゾンの増加を抑制させる方向に作用するため、オゾンによる殺菌効果が低下することが認められた。

3-2-3 包材材料の種類が*B. subtilis* ATCC9372芽胞菌の殺菌に及ぼす影響

ポリエチレン、ポリプロピレン、グラシン紙及びタイベック包材で包装した*B. subtilis* ATCC9372芽胞菌の殺菌評価を表3に示した。その結果、ポリエチレンやポリプロピレンは包材の厚さに関わらず、120分の処理時間においても殺菌できなかった。グラシン紙はレーベン社の試験紙型BIを包装材料で、セロファン紙にワックス処理したもので、1mm当たり200個の微細孔が空いているものであるが、これでは60分、90分では殺菌できなかったが、120分では死滅していた。一方、タイベック包材では、60分で殺菌可能であった。

以上のことは、オゾンガスがPEやPPではほとんど通過せず、グラシン紙では徐々に通過するが、タイベック包材では不織布を通してオゾンが急速に包材内に浸透したもので、図7に示すようにタイベック包材では無包装区とほぼ同じ速度でオゾン濃度が上昇することからも理解できる。

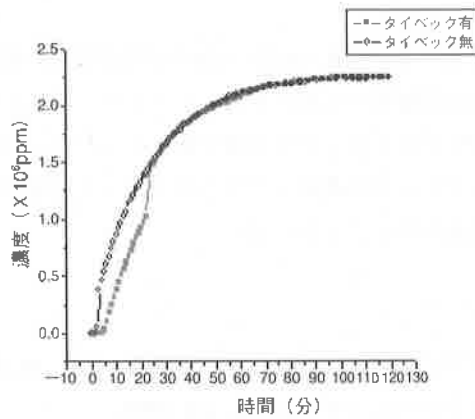


図7 タイベック包材 (PET//PE不織布) 内のオゾン濃度変化

3-2-4 チャンバー内温度が*B. subtilis* ATCC9372 芽胞菌の殺菌に及ぼす影響

表4にグラシン紙とタイベック包材を用いて、チャンバー内温度を30~70℃に変えて行った殺菌実験の結果を示した。グラシン紙では室内温度が上昇するのに伴い、減菌時

間が短縮される傾向であったが、タイベック包材では、いずれの温度でも60分以上であれば減菌可能で、温度による影響は見られなかった。これは、グラシン紙では温度上昇に伴い、オゾンの浸透速度が早まるが、不織布を持つタイベック包材では、オゾン浸透が温度に影響されずに、急速に浸透するものと思われた。

3-2-5 各種微生物に対する殺菌効果

SUS304に各種微生物を塗布、乾燥後、タイベック包材で密封包装した後に殺菌操作を行った結果を表5に示した。*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 及び *Aspergillus niger* はいずれも10分で殺菌可能であった。一方、*Bacillus subtilis* は両菌株とも殺菌には90分を要し、また *Bacillus stearothermophilus* はさらに長時間の120分を要した。このように *Bacillus subtilis* や *Bacillus stearothermophilus* のような芽胞菌では殺菌に多くの時間を要するが、非芽胞菌の細菌やカビ、酵母では短時間(10分以内)に殺菌できることがわかった。

表4 チャンバー内温度が*B. subtilis* ATCC9372 芽胞菌の殺菌に及ぼす影響

包材	室内温度	BI	殺菌時間(分)			
			30	60	90	120
A) グラシン紙	30℃	ろ紙		+	+	+
B) 〃	50℃	〃	+	+	+	-
C) 〃	70℃	〃	+	+	-	-
D) タイベック包材	30℃	〃		-	-	-
E) 〃	50℃	〃	-	-	-	-
F) 〃	70℃	〃	+	-	-	-

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし ** *B. subtilis* ATCC9372 の菌数: 2.0×10^8 CFU

表5 沿面プラズマオゾン滅菌装置2号機による各種微生物の殺菌試験

菌種 (菌数)	殺菌時間(分)					
	10	20	30	60	90	120
1) <i>Escherichia coli</i> JCM1649 (1.0×10^8 CFU)	-	-	-			
2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027 (3.36×10^8 CFU)	-	-	-			
3) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 (5.48×10^8 CFU)	-	-	-			
4) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (1.32×10^8 CFU)	-	-	-			
5) <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 (7.83×10^8 CFU)	-	-	-			
6) <i>Bacillus subtilis var niger</i> ATCC9372 (8.48×10^8 CFU)			+	+	-	
7) <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (1.58×10^8 CFU)			+	+	-	
8) <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 (1.76×10^8 CFU)				+	+	-

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし ** ; チャンバー内の温度, 湿度: 50℃, 72%

4. 結 言

沿面プラズマ放電によりオゾンガスを発生させる滅菌装置を試作し、各種微生物に対する殺菌評価を実施した。

- 1) 処理室が850ccの1号機では、酸素ガスを200ml/min以上の流量で流しながら、生成したオゾン処理室に入れ、飽和蒸気のもとで処理すると、*B. subtilis* 芽胞菌が60分で死滅することがわかった。
- 2) 処理室(チャンバー)が約31Lの2号機では、各種微生物の菌数を約10⁶CFUとなるように調整し、ステンレス板上に塗布・乾燥後、不織布包材で包装して試験に供した。その結果、*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 及び *Aspergillus niger* はいずれも10分で死滅した。一方、*Bacillus subtilis* では90分、*Bacillus stearothermophilus* はさらに長時間の120分を要した。このように *B. subtilis* や *B. stearothermophilus* のような芽胞菌では死滅させるのに多くの時間を要するが、非芽胞菌の細菌やカビ、酵母では短時間(10分以内)に殺菌できることがわか

った。

- 3) 2号機によって *B. subtilis* ATCC9372 芽胞菌の殺菌に及ぼす包装材料の影響を検討したところ、ポリエチレンやポリプロピレンでは殺菌できなかったが、片面がポリエチレンの不織布でできたタイベック包材では60分で死滅させることができた。

文献

- 1) 新太喜治, 永井勲, 大久保憲, 三宅寿美著: 改訂三版 滅菌・消毒ハンドブック, メディカ出版, p20 (2000)
- 2) 佐々木次雄・中村晃忠・三瀬勝利編著: 滅菌法及び微生物殺滅法, 日本規格協会, p215 (1998)
- 3) 第14改正日本薬局方解説書1, 廣川書店, p B-628 (2001)
- 4) ヤマト科学(株): 総合カタログ2003-2004, p103 (2002)
- 5) 佐々木次雄・中村晃忠・三瀬勝利編著: 滅菌法及び微生物殺滅法, 日本規格協会, p260 (1998)
- 6) 佐々木次雄・中村晃忠・三瀬勝利編著: 滅菌法及び微生物殺滅法, 日本規格協会, p280 (1998)