

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号: 1 1 3 0 1 研究種目:基盤研究(B) 研究期間:2010~2012 課題番号:22390356

研究課題名(和文) 水プラズマによる生体に優しい低温滅菌法の開発と実用化

研究課題名(英文) Development of safe and clean low-temperature sterilization using

water vapor plasma

研究代表者

玉澤 かほる (TAMAZAWA KAORU)

東北大学・病院・講師 研究者番号: 00124602

研究成果の概要(和文):

生体に優しい低温滅菌法を目指して、水のみで生成されたプラズマについて検討した。その結果、 1) 超極微量用のマスフロメーター (0.02g/min) と給・排気のタイミングの適正化により水プラズマの安定した生成が可能となった 2) 包装されているバイオロジカルインジケータ (BI、10⁶ 個の G. stearothermophilus 芽胞)を完全に死滅できた。3) 水プラズマ処理後の多孔質金属円板の細胞生体適合性試験基準の達成を確認した。

研究成果の概要 (英文):

The aim of this study was to generate stable H_2O plasma and to evaluate its efficacy of sterilization and biomaterial compatibility. As the results of that, 1) stable generation of H_2O plasma was possible by optimization the timing of air supply and an exhaust gas and application of ultra low-volume mass flow controller (0.02 g/min). 2) H_2O plasma showed high sterilization effect to kill 10^6 G. stearothermophilus spores wrapped with tyvec^R at 60° C in 10 min. 3) porus metal disc treated with H_2O plasma cleared standard cell compatibility.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合	計	
2008 年度	3, 000, 000	900, 000			3, 900, 000
2009 年度	2, 400, 000	720,000			3, 120, 000
2010 年度	1, 900, 000	570,000			2, 470, 000
年度					
年度					
総計	7, 300, 000	2, 190, 000			9, 490, 000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:歯学・保存治療系歯学

キーワード:プラズマ、水、低温滅菌、芽胞、エンドトキシン、生体親和性

1. 研究開始当初の背景

EOガス滅菌法は、発ガン性があり毒性が強いことから、WHOでは1994年から、日本でも2001年より法的規制が施行されており、EOガス滅菌法に代わる低温滅菌法の開発は、世界各国の緊急課題である。

現在、EOガス滅菌法の代替え滅菌法として、"プラズマ滅菌法"あるいは"ステラッド"と通称される過酸化水素ガス低温プラズマ滅菌法(ジョンソン&ジョンソン)が普及している。しかし、この滅菌法の機序はプラズマ効

果ではなく、過酸化水素ガスの毒性に依存している(玉澤ら、医科器械学、2001; Tamazawa etc、IADR、2006)。すなわち、EOガス滅菌の問題点が解決された低温プラズマ滅菌法は未だ開発されていない。

最近、真空ポンプが不要な大気圧プラズマを用いた滅菌法の開発や研究が盛んに行われている。この方法は装置を小型化できる大きなメリットがある。しかし、オゾンやNOXなどが生成され、強烈な臭いも伴うことがあるため、生体への安全性や環境汚染の問題を解

決する必要がある。

研究代表者は、これまで、プラズマは毒ガスのような浸透性がなく、効果が表面的であるため、プラズマの特性を考慮して、細菌を薄く均一に付着させた自家製の試料を用いてきた。また、細菌試料は包装せずにプラズマ処理し、液体培地にて培養陰性、陽性を判定して、滅菌効果を評価してきた。滅菌法の実用化に向けて、他の方法と比較するため、滅菌効果について客観的評価ができる市販品を使用する必要がある。

プラズマは、高いエネルギーを持ち反応性が非常に高いが、マクロの視点ではその効果は表層である。そのため、プラズマによるるの報告があるものの、そのほとんどが直接プラズマを菌に照射した場である。包装器材をプラズマを用せるの結果である。包装表面に電を密着している(永津、J. Plasma Fusion Res、2007)。実際の治療においては、滅菌袋に入った器材を使用するため、包装された細菌試料を滅菌である。

現在、使用されている滅菌法の中では、オートクレーブ滅菌が、効果の確実性や生体への安全性などの観点から最も優れている。しかし、医療の先端化・高度化に伴い、オートクレーブで対応できない低温低湿下で滅菌処理の必要な繊細な器材が増加しており、新しい滅菌法の開発が必要とされている。また、毒ガスによる低温滅菌法では、処理器材に、処理器材の生体親和性も滅菌法の開発に際して考慮すべき要件である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プラズマ滅菌の実用化を 視野に入れて、ガスボンベを必要とせずに環 境に優しく安全性を確保できるキャリアガス として水に注目し、水のみで生成されるプラ ズマを用いた低温滅菌法を開発することにあ る。水のみで滅菌に有効なプラズマを生成で きればガスボンベが不要になるので装置の小 型化が可能であり、水より 0。だけでなく Hや OHなどの活性種生成が期待できる。また、酸 素ガスのように可燃性がないため、環境に対 しても安全性が高まる。水プラズマを安定し て生成できるシステムを確立するために、水 蒸気の給・排気系の結露を抑制できる水の適 正供給量、供給方法について検討する。また、 プラズマ滅菌の実用化を図るために、市販品 の包装された細菌試料を用いて、滅菌できる 処理条件の効果を検討する。また、プラズマ 処理器材の生体親和性の確認と、発熱作用の 強力なエンドトキシンの不活化効果について

検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 水プラズマの安定生成

工業用プラズマエッチング装置(PACKIII、 ワイエイシイ、同軸電極)と気化式水供給装 置(図 1)を用いて、水プラズマの安定生成 と給排気系の結露防止策について検討した。



図1 気化式水供給装置

(2) 滅菌効果の検討

①使用した細菌試料

細菌試料として、ステンレスディスクに塗布された芽胞が樹脂袋で包装された芽胞数 10⁶ の市販の BI(バイオロジカルインディケータ(SGM ディスク、メルクおよびレーベンジャパン)を用いた(図 2)。



図2 細菌試料

②滅菌効果の評価

③プラズマ処理条件

これらの BI をプラズマ装置のチャンバに 設置して出力 150W, チャンバ温度 60° を基本条件として、水の流量($5\sim20\mathrm{ml/min}$)、CCV (コントロールバルブの開閉角度 ($20\sim80^{\circ}$)、処理時間 $10\sim30$ 分、BI の包装状態をパラメータとしてプラズマ処理した。BI は BI を包装した状態と、包装を外して SUS 円板を露出させた状態の 2 通りでプラズマ処理した。対照として 0_2 プラズマや N_2 プラズマについても検討を加えた。

④芽胞細胞の形態変化

BI 試料の一部は芽胞の形態変化を走査型電子顕微鏡(電界放出型、日立 S-4700) にて加速電圧 3kV、倍率×20k で観察し、滅菌機序推察の一助とした。

⑤発光スペクトル解析

滅菌効果の検討に用いたプラズマ処理条件について、処理中の発光状態をプラズマプロセスモニター(C7460-02、UV対応レンズ、位置確認用アダプタ、浜松ホトニクス)を用いて、5つの窓が付与された開閉装置に、発光ファイバーの位置を精密に制御できる XYZ 軸ステージとα軸ゴニオステージを取り付けて発光スペクトルを計測した(図3)。

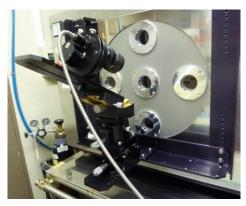


図3 発光スペクトル測定

(3) ET 不活化効果①ET 試料と ET 定量

1)ET 試料:

担体は特注した3種(ガラス、SUS、ポリイミド)の円板(直径10mm、厚さ2mm)とした。担体にETインジケーター(E. coli055: B5、和光純薬工業、10,000,000EU/vial)を10 μ L負荷(500 EU/担体)して一晩風乾した後、ET負荷面を上にしてガラスバイアルに入れ、アルミホイルで蓋をしたものをET試料とした。2)ET 定量:プラズマ処理後のET試料は、ET試験用水を2mL入れ、60分静置後15分超音波処理した。その後、ボルテックスミキサーで1分間撹拌後、リムルスESIシングルテスト(和光純薬工業)とトキシノメーターET-5000(和光純薬工業)を用いて、比濁時間分析法にて残留ET量を測定した。使用する器

材はすべて注射用水で洗浄し、250℃2 時間乾 熱滅菌して用い、希釈は ET 試験用水を用いた。 ②プラズマ処理

(4) 生体親和性の検討

毒ガスによる低温滅菌法では、毒ガスが器材内部の深部に取り込まれた場合は、エアレーションしても除去が困難であることから、生体への影響が懸念されている。このような背景をもとに、プラズマ処理後の器材について生体親和性を検討するために、多数の気孔を有する SUS 円板を特注して検討した。
①試料:焼結多孔質 SUS 円板(特注、気孔径

- ①試料:焼結多孔質 SUS 円板(特注、気孔径 100 μm、Ø10mm、SUS316、 富士ケミカル)。
- ②細胞の準備: L29 細胞を 1 ml の MEM (minimal essential medium) に 10% (v/v) 牛血清、ペニシリン (50U/ml)、 ストレプトマイシン ($50\mu g/ml$) を添加した培地で増殖させた。
- ③プラズマ処理(ガス種: H_2O 、 O_2 、 N_2) 対照はオートクレーブ滅菌処理(135 $^{\circ}$ C、12 分、VS シリーズ、サクラ精機)とした。

④細胞適合性試験

1 ウエルに L929 cells の懸濁液(1×10^4)を入れ、プラズマ処理した SUS 円板を投入して、 37° C、5% CO₂、95% air、相対湿度 100%の条件下で培養した。48 時間後、自動セルカウンター(TC10、Bio-Rad)で細胞数を計測し、オートクレーブ処理後の細胞数に対する相対細胞増殖率 (RGR) を算出し、SUS の JIS 細胞適合性試験の基準を満たすかを検討した。

⑤バーの表面変化

スチール製の歯科用切削バーを 10 回プラズマ処理し、表面性状を電界放出型走査型電子顕微鏡 (S-4700、日立) と EDX (エネルギー分散型 X 線分析、アメテック) を用いて検討した。プラズマ処理条件は、出力 150W、チャンバ温度 60 \mathbb{C} 、処理時間 10 分、水の流量 5~20 ml/min として、対照はオートクレーブ処理 <math>(121 \mathbb{C} \mathbb{C} 20 9 0 、乾燥 10 9 0 とした。

4. 研究成果

(1) 水プラズマの安定生成

超極微量用の液体微小マスフロメーター $(0.02g/min, H_20$ 流量最大 25ml/min) を用いて、給・排気のタイミングの最適化により、長時間稼働させても給排気系に結露を生じることなく H_20 プラズマの安定した生成が可能となった。

水導入前のチャンバの真空度は、高いほど 安定した水プラズマが生成された。

チャンバの真空度を高めるためには、他のガスとは異なり、RF 放電よりパージが有効で

あった。パージにより、給気・排気系が空気 で洗浄されるためと推察された。

(2) 滅菌効果

①水プラズマの滅菌効果(表1)

10 分間の水プラズマ処理により、ガス流量 10 あるいは 20ml/min で、 10^6 の芽胞の BI を 完全に滅菌できた。しかし、同条件のガス流量とガス圧で処理したときに完全滅菌できない場合もあった。

 0_2 や N_2 などでは CCV (conductance control valve、ガス流量コントロールバルブ) の開閉 角度とガス流量を設定するならば、一定のガス圧が得られるが、水プラズマでは CCV と流量だけではガス圧の安定化が困難な場合があった。ガスを導入する前のチャンバのガス圧をバキューム操作で小さくでき、また、RF 放電中のガス圧の変化が小さい時に滅菌効果が高くなる傾向があった。

表1 水プラズマの滅菌効果

プラズマ処理条件					滅菌効果		
処理日	ガス種	CCV*	ガス流量	処理後の	BI**生残菌数(CFU**)		
		(°)	(ml/min)	温度(℃)	mean ± SD		
cc/dd	H ₂ O	40	10	70	0 ± 0		
ee/ff	H ₂ O	40	20	70	0 ± 0		
aa/bb	H ₂ O	80	20	67	0 ± 0		
aa/bb	H ₂ O	80	10	67	3 ± 6		
aa/bb	H ₂ O	40	20	70	7 ± 6		
aa/bb	H ₂ O	80	5	67	13 ± 15		
ii/jj	H ₂ O	40	20	70	43 ± 35		
ii/jj	H ₂ O	80	20	63	47 ± 23		
gg/hh	H ₂ O	80	2.5	68	60 ± 26		
gg/hh	H ₂ O	80	5	67	67 ± 15		

②最抵抗性菌

これまでプラズマ滅菌の指標菌は B. stearothermophilus とされてきたが、今回の検討でガス種により最抵抗性菌が異なることが明らかとなった。水プラズマと 0_2 プラズマは B. atrophaeus であることがわかった。 B. stearothermophilus は、最も高い耐熱性を示すことから、通常、高庄蒸気滅菌用の指標菌として用いられているが、この菌に対しては、水プラズマと 0_2 プラズマは 10^6 個の芽胞を 10分で死滅できる強力な滅菌効果を有した。 しかし、 B. pumilus に対しては 10^6 芽胞を包装した状態で処理した場合の生残菌数は $10^4 \sim 10^5$ であった。

③芽胞細胞の形態変化と包装

同一のガス種でも、ガス圧力、包装の有無によって、芽胞の形態変化が異なった。水プラズマでは包装の有無で芽胞の形態に差が認められなかった。一方、0gプラズマでは、包装を外して処理した場合はアッシング効果による細胞の縮小化が認められた。しかし、包装を外した BI で細胞の縮小化は認められなかった。また、包装 BI が、未包装 BI より滅

菌効果が必ずしも劣るとは限らず、その逆の 例も存在した。包装はプラズマ浸透を阻害し、 滅菌効果が低下するが、処理条件によっては 包装による物理的あるいは化学的な効果が存 在する可能性が示唆された。

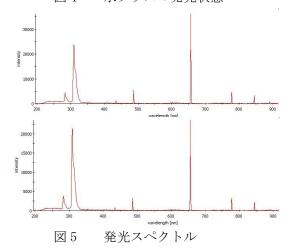
④発光スペクトル

水プラズマの発光スペクトルは、309nm、487nm、657nm などに水由来のピークが認められ、また、パージ時に取込まれた空気由来のピークもみられた。これらのピーク強度と滅菌効果との関係については明らかにすることはできなかった。また、水蒸気量および CCV 角度とのバランスが最適化されたときに、滅菌に有効な活性種が多量生成されて、滅菌効果が高くなると推察される。また、同一の水蒸気量と CCV であっても、発光の色(図4はともに 20m1/min、CCV80°)が異なる場合があった。水の量が多くなると 309nm のピーク強度が高くなる傾向にあった。(図5上:10m1/min、CCV80°、図5下:20m1/min、CCV80°)





図4 水プラズマ発光状態



(3) ET 不活化効果

水プラズマ処理後の残留 ET を定量して ET 不活化率を算出した。その結果、 ET 試料よりアルミホイルの蓋を外して水プラズマ処理 (流量 20 ml/min) した場合には、SUS 円板で99%、ガラス円板で95%、ポリイミド円板で59%であった。一方、対照としたオートクレー

ブ処理では SUS が 68%、ガラスとポリイミドはともに 99%であった。 SUS 円板においては水プラズマはオートクレーブ処理より ET 不活化効果が高かった。

(4) 生体親和性の検討

図 6 はプラズマ処理あるいはオートクレーブ処理後の SUS 円板に増殖できた細胞数を示す。 SUS の JIS 細胞適合性試験基準は、オートクレーブ処理後の RGR (相対細胞増殖率)の 0.7 以上とされており、各処理後の RGR を算出すると、 H_2 0 プラズマは 0.95、 0_2 プラズマでは 0.97、 N_2 プラズマでは 0.95 であり、プラズマ処理後の試料の RGR は、ガス種を問わず 0.7 以上を示した。以上より、 H_2 0 プラズマは多孔体の SUS 試料において JIS 細胞適合性試験をクリアできた。

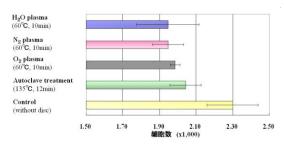


図6:各処理法と増殖細胞数

(5) バーの表面変化

スチールバーを水プラズマで処理した場合には、10回処理後でも変色や腐食は認められず、EDXのスペクトルピーク強度比"0/Fe"は低値であった。一方、オートクレーブ処理では、1回の処理で変色や腐食がみられ、ピーク強度比"0/Fe"の増大がみられた(図 7)。この地理回数とともに腐食が進行し、ピーク強度比"0/Fe"の増大がみられた(図 7)。こののサールバーは、切れ味に優れることからこのが見いると腐食や錆が生じることからこの対応には労力を要している。水プラズマは、10回型すると腐食や錆が生じることがられなかったことが見ても表面に変化が認められなかったこ温に耐性の低い器材に対して実用性の高い減菌処理法になり得ると思われた。

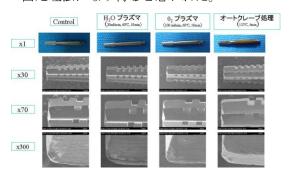


図7 各処理法とバーの表面変化

(6) 今後の展望

本研究により、水のみで生成したプラズマ により、包装された 10⁶ 芽胞の BI を 10 分で 完全に死滅することができた。しかし、同じ 条件で処理しても完全滅菌が得られなかった 場合があった。今回、制御できたパラメータ は、出力、チャンバ温度、処理時間、水の供 給量、CCV の開閉角度である。滅菌効果の確 実化に必要なパラメータについて見落としが あるのかもしれない。この問題解決には生成 されたプラズマの計測項目の追加が必要と考 え、プローブによるプラズマ密度計測を試み た。しかし、本装置はプラズマ密度が低いた め、プローブ計測は有効な手段にはなり得な かった。また、発光スペクトルのピーク波長 とピーク強度においても、滅菌効果との対応 をとり検討したが、明らかな関係を見い出せ なかった。0。やNoなどと異なり、水プラズマ では CCV と流量だけではガス圧の安定化が困 難なことも滅菌効果に影響を与えていると考 えられる。H₂0 は常時ガス体でなく、液体と ガスの両方の状態をとること、給気・排気系 に残留した水の状態と量により、その挙動変 化があること、また、チャンバ温度やパージ 時に取り込まれる空気との相互作用も関与し ていると推察される。滅菌効果の確実化には これらの状態を計測・制御できるシステムが 必要と思われた。

水のみで生成されたプラズマは、包装された 10⁶ 芽胞を 60℃、10 分で滅菌でき、エンドトキシンに対しても高い不活化作用を有し、 生体親和性も高かったことから次世代の新しい滅菌法になり得ると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

〔雑誌論文〕(計 5件)

- ①<u>玉澤佳純、玉澤かほる</u>、岩松正明: 脊柱湾 曲症患者対応のデンタルチェアーの開発;日 本老年歯科医学会雑誌、373~384、2013、査 読あり.
- ②<u>玉澤佳純、玉澤かほる</u>、岩松正明、山口哲史:高齢者の歯科治療の最適時間帯を探るーアンケート調査からの考察一;日本老年歯科医学会雑誌、69-76、2012、査読あり.
- https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsg/27/2/27_69/_pdf
- ③<u>玉澤かほる</u>: 医療は安全が第一 ラバーダム して根管治療をしよう!; Quintessence、30、 2157-2159、2011、査読なし.
- ④<u>玉澤 佳純、玉澤 かほる</u>, 高橋 正美、國島 広之:眼への血液・体液曝露事例の原因と対 策;日本環境感染学会誌、26、222-227、2011、 査読あり、doi:10.4058/jsei.26.222.
- ⑤玉澤かほる:プラズマ講座「プラズマによ

るエンドトキシンの不活化効果」;防菌防黴誌、39(2)、99-111、2011、査読なし.

http://saaaj.jp/legacy/magazine/abstract/magazine_3902abstract05.html (要約)

[学会発表] (計10 件)

- ①<u>玉澤かほる</u>、高岡文、伊東久美子、<u>玉澤佳</u>純、島内英俊:水プラズマによるエンドトキシン不活化効果とバーの表面変化;日本防菌防黴学会、2013年9月10日~11日、千里ライフサイエンスセンター、大阪(発表確定).②<u>玉澤かほる、玉澤佳純、根本英二</u>、島内英俊:水プラズマによる低温滅菌法;日本歯科保存学会、2012年11月22日~2012年11月23日、広島国際会議場、広島.
- ③玉澤かほる、玉澤佳純、山田則一、伊東久美子、越川富比古、島内英俊:水プラズマによる滅菌効果と細胞毒性評価および器材表面の性状変化;日本防菌防黴学会、2012 年 09月11日~2012年09月12日、東京、きゅりあん.
- ④T. Chikazawa, S. Kataoka, Y. Shimabukuro, H. Masunaga, Y. Ogata, <u>K. Tamazawa</u>, H. Shimauchi, T. Nishida, K. Ito, T. Yamamoto, S. Murakami: Effects of L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt on gingivitis: a blinded, randomized-control clinical trial; Europerio 7, 2012 年 06 月 06 日~2012 年 06 月 9 日, Vienna, Austria.
- ⑤ <u>K. Tamazawa</u> and <u>Y. Tamazawa</u>: Sterilization effect and biomaterial compatibility of H_2O plasma; Journal of clinical periodontology; Europerio 7, 2012 年 06 月 06 日~2012 年 06 月 9 日, Vienna, Austria.
- ⑥<u>玉澤佳純、玉澤かほる</u>:眼への血液・体液 曝露後の対応の問題;日本環境感染学会、2012 年2月4日、福岡市:福岡国際会議場.
- ⑦玉澤かほる、玉澤佳純、島内英俊:生体に安全なガスで生成されるプラズマの滅菌効果と芽胞の形態変化;第54回秋季日本歯周病学会、2011年9月24日、下関市:海峡メッセ下関。
- ⑧<u>玉澤かほる</u>、<u>玉澤佳純</u>、石田欣二、花坂智人、松浦絵里、小笠原勝利:プラズマ処理後の芽胞の形態変化;日本顕微鏡学会 第 67 回学術講演会、2011 年 5 月 16 日、福岡市:福岡国際会議場.
- <u>Maoru Tamazawa</u>, <u>Yoshinori Tamazawa</u> and Hidetoshi Shimauchi: Sterilization effect in low pressure discharge plasma using non-toxic Gas; The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, March 8, 2011, Sendai, JAPAN.
- M. TAMAZAWA, Y. TAMAZAWA, and H. SHIMAUCHI: Effect of Plasma Sterilization on Geobacillus Spores

Using Non-toxic Gas; 88th General Session & Exhibition of the IADR, July 15, Barcelona, SPAIN, 2010.

[図書] (計 3件)

- ①玉澤かほる、玉澤佳純、(作道章一編著): 食と安全の安全:食と健康の高安全化一殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術ー: 第6章3節一歯科施設の感染対策一;S&T出版、東京、363-384、2012.
- ②<u>玉澤かほる</u>:従来法のエンドトキシン除去効果とプラズマを用いたエンドトキシン不活化効果;「プラズマ照射による医療用品の滅菌、エンドトキシンならびにプリオン不活性化法と応用」に関する研究開発専門委員会報告書、日本学術振興会「プラズマ照射による医療用品の滅菌、エンドトキシンならびにプリオン不活性化法と応用」に関する研究開発専門委員会、16-19、2011.
- ③ <u>Kaoru Tamazawa</u>: Inactivation of endotoxin by low-pressure plasma; In, Akikazu Sakudo and Hideharu Shintani, Sterilization and Disinfection by Plasma: Sterilization Mechanisms, Biological and Medical Applications, Nova Science Publishers Inc, New York, 19-31, 2011.

[産業財産権]

- ○出願状況(計 0件)
- ○取得状況(計 0件)

〔その他〕 ホームページ等

- 6. 研究組織
- (1)研究代表者

玉澤 かほる (TAMAZAWA KAORU) 東北大学・病院・講師 研究者番号: 00124602

(2)研究分担者

玉澤 佳純(TAMAZAWA YOSHINORI) 東北大学・病院・准教授 研究者番号:10124603

根本 英二(NEMOTO EIJI) 東北大学・大学院歯学研究科・准教授 研究者番号:40292221

(3) 連携研究者