

平成21年4月27日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390503  
 研究課題名 (和文) 生体に安全で環境にクリーンな低温プラズマ滅菌法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of safe and clean sterilization method using low temperature plasma  
 研究代表者  
 玉澤 かほる (TAMAZAWA KAHORU)  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：00124602

## 研究成果の概要：

生体に安全な物質を用いて、プラズマ本来の効果による低温滅菌法の開発を目指して研究を遂行した。その結果、窒素、酸素、水、またこれらを混合して生成されたプラズマは、いずれも、ガス流量、ガス圧が適正であれば、滅菌効果やエンドトキシン不活化効果が高くなった。しかし、滅菌効果と素材の適合性が共に最上位である処理条件はみいだせなかった。器材の温度を最優先させるならば、水プラズマが有利であり、試料の変色や真空排気系の結露などの課題が解決されるならば、低温滅菌法の実用化が達成できると思われた。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 4,600,000  | 1,380,000 | 5,980,000  |
| 2007年度 | 8,600,000  | 2,580,000 | 11,180,000 |
| 2008年度 | 2,000,000  | 600,000   | 2,600,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

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 滅菌 低温 酸素 水 窒素 エンドトキシン 発光スペクトル

## 1. 研究開始当初の背景

E Oガス滅菌法は、非常に毒性が強く、発ガン性があることから、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、E O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の一つとなっていた。

現在、E O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、この滅菌法の滅菌機序は、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た (玉澤ら, 医科器械学, 2001; Tamazawa et, IADR, 2006)。すなわち、E Oガス滅菌の問題点を解決した低温プラズマ滅菌法は未だ開発されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、E Oガス滅菌法に代わる低温滅菌法を開発することであり、過酸化水素ガスなどの有害物質を用いず、生体に安全な物質を用いて、プラズマ本来の効果で、環境にクリーンな低温滅菌法を開発することである。

## 3. 研究の方法

## (1) 装置内部と試料の温度

プラズマ装置として、工業用アッシング装置 (PACK3, 13.56MHz, 対向電極, ワイエイシイ) を用いた。滅菌効果は温度に依存するため、装置内部と試料の温度について検討した。

## ①装置内部の温度分布

プラズマ装置に石英棚を置き、1段目、13段目、24段目に載せたガラストレーに、サー

モラベル (ミクロン (株)) を貼り付けた試料台を、小型のガラスシャーレに入れて配置し (図 1)、プラズマ処理 (出力: 150W; O<sub>2</sub> ガス圧力: 25Pa; ヒーター温度: 60°C) 中のチャンバと試料の温度を測定した。

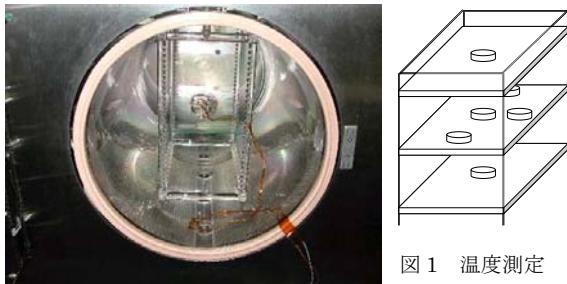


図 1 温度測定

## ②装置起動直後の温度変化

装置起動後の温度変化を、大気圧処理中と真空排気後のプラズマ放電処理中について計測した。試料台を設置した後、パーズあるいは真空排気した後、測定を開始し、測定開始 10 秒後にヒーター ON とした。試料台を、石英棚 13 段目 (前項の結果から得られたコールドスポット段) にガラストレーを載せ、その中央に試料台を置き、試料台の温度を熱電対 (T-35 型シーズ熱電対 K タイプ、坂口電熱 (株)) を用いて計測し、データロガー (NR-1000, キーエンス (株)) にて記録した。また、同時に本体の表示温度も検討した。熱電対はプラズマからの電氣的な影響を避けるため、測定部を含め全て絶縁体 (カプトンテープ) で覆い、回路にはローパスフィルタを設けた。

## (2) 滅菌効果の検討

### ①培養用試料

滅菌したステンレス製円柱状試料台 (直径 12 mm, 高さ 5mm) のくぼみ (直径 10mm, 高さ 1mm) に、市販 BI (Biological Indicator) の原液あるいは希釈液 (10 倍, 100 倍) を 10 μl ~ 100 μl 滴下して乾燥して、培養用試料を作製した。培養用試料を、装置内に設置した石英棚 13 段目 (コールドスポットに相当する段) のガラストレーに均等に 6 個配置して、プラズマ処理して滅菌効果を検討した。BI には、*G. stearothermo-philus* (ATCC#7953, 2.2×10<sup>6</sup>, Spores/0.1ml, NAMSA), *B. atrophaeus* (旧称, *B. subtilis*, ATCC#9372, 2.2×10<sup>6</sup>, Spores/0.1ml, NAMSA), *B. pumilus* (ATCC#7953, 2.2×10<sup>6</sup>, Spores/0.1ml, NAMSA) の 3 種を用いた。

### ②プラズマ処理条件

プラズマ処理は、対向電極, 出力 150W, 60°C, 10 分処理を基本条件としてガス圧 (9 ~ 100Pa), ガス種 (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) をパラメータとして、滅菌効果を検討した。H<sub>2</sub>O は、バブリング法 (O<sub>2</sub> ボンベより, ガラス瓶中に蓄えた蒸留水中を通過させて導入) ある

いは加熱気化式水供給装置 (堀場エステック (株)) を用いて装置内に導入した。

### ③滅菌効果の判定

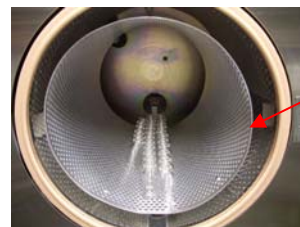
プラズマ処理後の培養用試料は 3 種とも Trypticase Soy™ Broth (Soybean-Casein Digest Medium, BBL) に投入して、*G. stearothermophilus* は 58°C, *B. atrophaeus* と *B. pumilus* は 32°C にて 72 時間培養して、肉眼にて培地に濁りが認められる場合を培養陽性 (+), 濁りが認められない場合を培養陰性 (-) と判定した。培養用試料の一部は、滅菌蒸留水中に浸漬し、その液を、寒天平板培地に播種して、培養し生残菌数を検討した。

### (3) 発光スペクトル解析

プラズマ処理中、培養試料をピンポイントとして発光スペクトルを測定した (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 (株))。

### (4) エンドトキシンの不活化効果

対向電極から同軸電極 (図 2) に交換して、同軸電極におけるエンドトキシンの不活化効果について検討した。N<sub>2</sub> プラズマにて 5 分間処理したガラス製バイアルに、LPS (55000 EU, *E. coli* 055 : B5, 和光純薬) を 10 μl 滴下し、37°C で 60 分乾燥したもののエンドトキシン試料 (550EU/バイアル) とした。エンドトキシン試料はプラズマ処理後、1ml の注射用水 (日本薬局方, 大塚製薬) を加えて、2 分間ボルテックスミキサーで攪拌し、リムルス E S II 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) にて、比濁時間分析法を用い、エンドトキシン量を測定した。



アルミトンネル

図 2 同軸電極におけるバイアル瓶のプラズマ処理

### (5) 芽胞細胞の形態変化

スライドガラス, 石英板, あるいはステンレス板を N<sub>2</sub> プラズマにて 5 分間処理した後、前項の滅菌効果の検討に用いた 3 種の市販 BI, さらに自家製の *B. Megaterium* と *B. Cereus* の芽胞懸濁液をそれぞれ 5 μl 滴下し、37°C にて 60 分乾燥後、顕微鏡用試料とした。試料は基本条件でプラズマ処理をして、処理前後の芽胞形態について、位相差顕微鏡 (BX51, オリンパス) あるいはマイクロスコープ (VC7700R, オムロン) にて観察した。

### (6) 器材表面の損傷

歯科切削用スチールバー (ベルデンタ MG バー, MG ST2 HP O16, ベルデンタサプライ) とプラスチック製ハンドル付きメス (フェザーディスクポザブルスカルペル #11) を

それぞれ、プラズマ処理し、マイクロスコープ (VC7700R, オムロン) にて、器材の表面を観察した。

#### 4. 研究の主な成果

##### (1)装置内部の温度分布と試料の温度

###### ①装置内部の温度分布 (表 1)

放熱による損失が高い手前の側ほど低温で、外周部ほど高温になる傾向があり、また、上下方向よりヒーターが設置してある横方向での温度が高く、コールドスポットは、チャンバーの中央であった。

表 1 温度分布

|         | 前後方向(°C) |       |       | 左右方向(°C) |
|---------|----------|-------|-------|----------|
|         | 手前       | 中央    | 奥     | 右        |
| 上段(24段) |          | 88-93 |       |          |
| 中段(13段) | 77-82    | 82-88 | 88-93 | 99-104   |
| 下段(1段)  |          | 88-93 |       |          |
| 平均      | 85.6     |       |       |          |

###### ②装置起動直後の温度変化と試料温度 (図 3)

真空時の装置起動直後の温度は、設定温度に達した後、一時的に温度が上昇し続け、その温度上昇は、大気圧時に比べ、より高く、安定するまで 30 分要した。

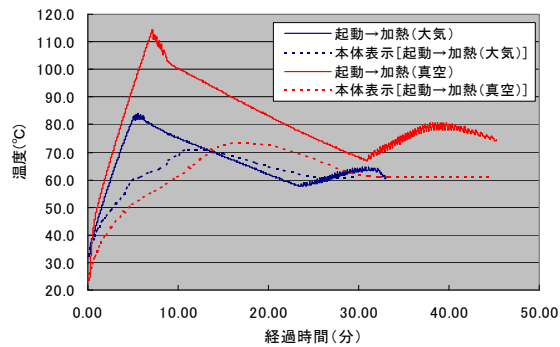


図 3 装置起動直後の温度変化と試料温度変化

##### (2)滅菌効果の検討

###### ①N<sub>2</sub>プラズマ

N<sub>2</sub>プラズマの *G. steaothermophilus* 芽胞に対する滅菌効果は、O<sub>2</sub>プラズマや"O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O"プラズマと比較すると小さかった。

###### ②O<sub>2</sub>プラズマ (表 2)

O<sub>2</sub>プラズマでは、ガス圧は低い方が滅菌効果が高く、13Pa で 10 分処理すると 10<sup>6</sup>個の *G. steaothermophilus* 試料はすべて陰性培養を示した。25Pa の条件下では、*B. pumilus* への滅菌効果は、*B. atrophaeus*, *G. steaothermophilus* より高かった。

表 2 O<sub>2</sub>プラズマの滅菌効果

| プラズマ処理条件       |                | 菌種              | 菌量              | 試料台のポジション |   |   |   |   |   | 培養陽性数 |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------|---|---|---|---|---|-------|
| ガス種            | ガス圧            |                 |                 | 1         | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |       |
| O <sub>2</sub> | 12Pa           | <i>G. stea</i>  | 10 <sup>5</sup> | -         | - | - | - | - | - | 0     |
|                | 25Pa           |                 |                 | -         | - | - | - | - | - | 0     |
|                | 50Pa           |                 |                 | +         | + | + | + | + | + | 6     |
|                | 100Pa          |                 |                 | +         | + | + | + | + | + | 6     |
| 25Pa           | <i>G. stea</i> | 10 <sup>6</sup> | +               | +         | + | + | + | + | 5 |       |
|                |                |                 | <i>B. atro</i>  | -         | - | + | + | + | - | 3     |
|                |                |                 | <i>B. pumi</i>  | -         | - | + | + | + | - | 2     |

###### ②O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>Oプラズマ (表 3)

O<sub>2</sub>にバブリング法にて H<sub>2</sub>O を加えた場合は、O<sub>2</sub>プラズマより、滅菌効果が高かった。一方、O<sub>2</sub>に気化式水供給装置を用いて H<sub>2</sub>O を加えた場合 (O<sub>2</sub>: 40~44 sccm, H<sub>2</sub>O: 6~10 sccm)は、O<sub>2</sub>プラズマより滅菌効果が低かった。

表 3 O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>Oプラズマの滅菌効果

| プラズマ処理条件   |                     | 菌種             | 菌量              | 試料台のポジション |   |   |   |   |   | 培養陽性数 |
|--|---------------------|----------------|-----------------|-----------|---|---|---|---|---|-------|
| ガス種  | ガス圧                 |                |                 | 1         | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |       |
| O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O<br>バブリング<br>法   | 12Pa                | <i>G. stea</i> | 10 <sup>5</sup> | -         | - | - | - | - | - | 0     |
|  | 25Pa                |                |                 | -         | - | - | - | - | - | 0     |
|  | 50Pa                |                |                 | -         | - | + | + | + | + | 3     |
|  | 100Pa               |                |                 | +         | + | + | + | + | + | 6     |
| O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O<br>気化式<br>水供給装置 | 25Pa                | <i>G. stea</i> | 10 <sup>6</sup> | +         | + | + | + | + | + | 6     |
|  | (70Pa)<br>→<br>35Pa | <i>B. atro</i> | +               | +         | + | + | + | + | - | 5     |
|  |                     | <i>B. pumi</i> | +               | +         | + | - | + | - | - | 4     |

##### (3) 発光スペクトル

図 4 に N<sub>2</sub>プラズマ, O<sub>2</sub>プラズマ, "O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O"プラズマで測光された発光スペクトルの一例を示す。

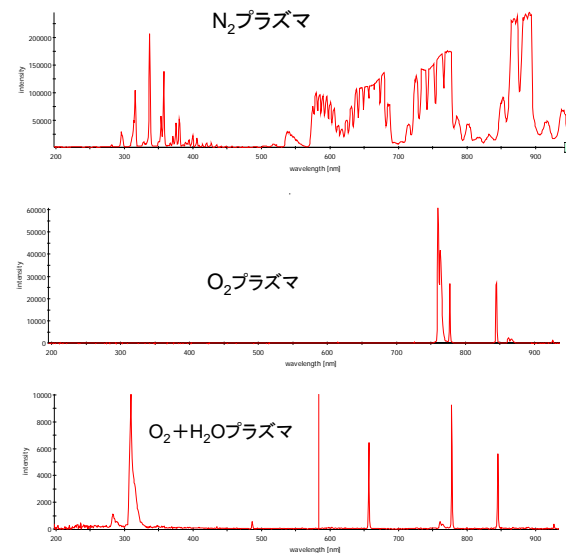


図 4 3種のプラズマにおける発光スペクトル

N<sub>2</sub>プラズマは、紫外域、可視域共に発光強度の高いスペクトルが多数検出された。

O<sub>2</sub>プラズマは、低圧域で 777nm の発光強度が高く、滅菌効果も低圧条件で高かった。これより、777nm の発光強度は、滅菌効果の指標として活用できる可能性が示唆された。

"O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O"プラズマでは、H<sub>2</sub>O の供給方法や供給量によって、発光強度の高い波長域すなわち、スペクトルパターンが異なった。O<sub>2</sub>に H<sub>2</sub>O をバブリング法で供給し、10 分放電した場合は、308nm(OH), 656nm(H), 777nm(O)にピークが検出され、発光強度の経時変化はほとんど認められなかった。それに対し、気化式水供給装置を用いた場合は、スペクトルパターンや発光強度において経時変化が大きく (図 5), H<sub>2</sub>O 状態の不安定が示唆された。気化式水供給装置を用いた場合、

滅菌効果が低かった原因の一つとして、この H<sub>2</sub>O 状態の不安定が影響しているものと考えられる。H<sub>2</sub>O 状態の不安定だけでなく、真空排気系に結露が発生し、メンテナンスに時間と労力を要したため、現在、H<sub>2</sub>O の供給量、供給方法について検討中である。

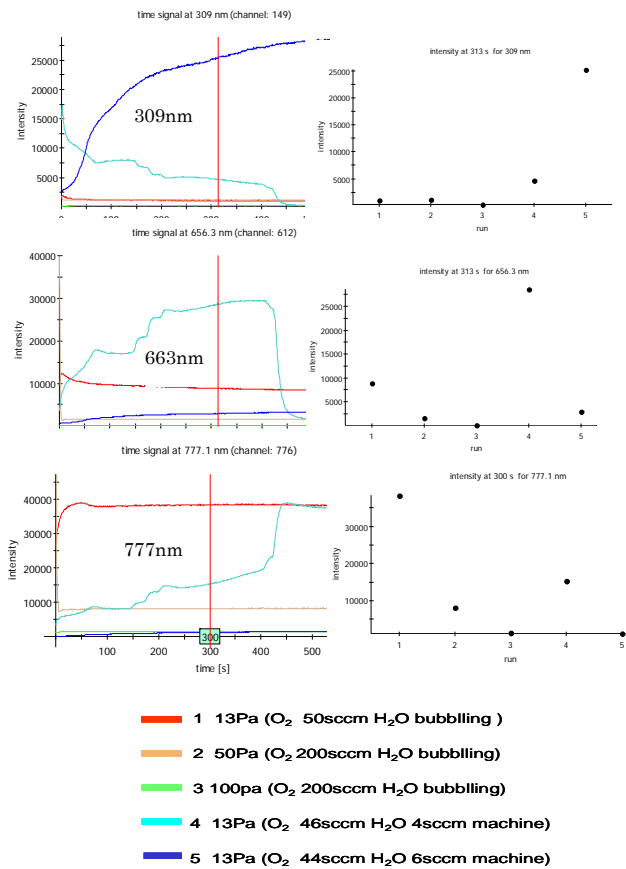


図5 O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O プラズマの発光強度の経時変化

#### (4) エンドトキシンの不活化効果

同軸電極におけるプラズマ処理後の残留エンドトキシン量は、O<sub>2</sub> ガス、ガス圧 18Pa の処理条件で最小値を示し、プラズマ処理前より 4 桁減少した。N<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>O プラズマでも 3 桁の減少がみられ、プラズマ処理はエンドトキシンの実用的な不活化法になり得ると推察された。

2004 年(玉澤ら、医科器械学)に報告した結果(対向電極で検討)と比較すると、エンドトキシンの不活化効果が高かった。その理由として、N<sub>2</sub> プラズマ処理により、バイアル底面の表面張力を減少させ、濡れ性の改善により、LPS 液を均一に薄く滴下できたためと推察される。また、同軸電極では、アルミトンネルによりイオンがトラップされるため、ラジカル比率が高くなるが、この高いラジカル比率が関与しているのかもしれない。

#### (5) 芽胞細胞の形態変化

位相差顕微鏡(図6)、マイクロスコープ(図7)のいずれも、プラズマ処理前後の芽胞の形態変化を明瞭に捉えることができた。

N<sub>2</sub> プラズマ処理では、芽胞の形態変化はほとんど認められなかったが、一部の芽胞で断裂した像が認められた。一方、O<sub>2</sub> あるいは "O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O" プラズマで処理した場合は、芽胞特有の光屈折性が認められず、黒っぽく見え、芽胞の縮小化が認められた。O<sub>2</sub> および "O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O" プラズマの滅菌機序はエッチング効果によるものと推察された。

マイクロスコープは、電子顕微鏡や生物顕微鏡に比べると、解像能は劣るが、担体がスライドガラスでも金属でも素材を問わず観察できる利点がある。また、プラズマ処理後の乾燥している芽胞を、水の滴下なしに、カバーガラスで圧接せずに観察できる利点があり、工夫して応用するならば、滅菌機序の解明に有用な手段になりえると思われた。

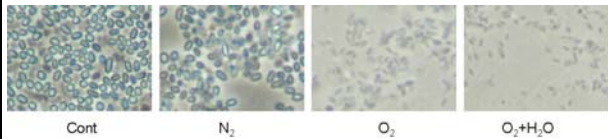


図6 位相差顕微鏡で観察した芽胞形態

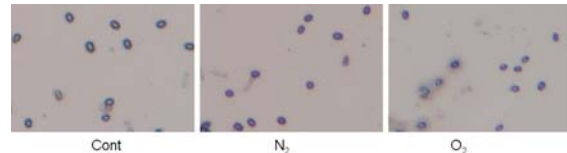


図7 マイクロスコープで観察した芽胞形態

#### (6) 器材表面の損傷

ディスプレイブルメスを O<sub>2</sub> プラズマ、22Pa で 10 分処理すると、対向電極の場合は、プラスチックのハンドル部分に変形がみられ、ステンレスメスの先端の一部に溶融が認められた。一方、同軸電極では、対照とした処理前とメスの状態とは変化はなく、変形や溶融は認められなかった。メスやバーの金属製器材の表面を観察すると、N<sub>2</sub> プラズマでは、ほとんど変化が見られなかったが、O<sub>2</sub> プラズマでは薄い白金色に、"O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O" プラズマでは濃い白金色に変化した。



図8 マイクロスコープによる器材表面観

#### (7) 今後の展望

本研究では、生体に安全な物質を用いて、プラズマ本来の効果による低温滅菌法の開発を目指して研究を遂行した。その結果、窒素、酸素、水、またこれらのガスを混合して生成されたプラズマは、いずれも、ガス流量、ガス圧が適正であれば、滅菌効果やエンドトキ

シン不活化効果が高くなった。しかし、滅菌効果と素材の適合性が共に最上位である処理条件はみいだせなかった。器材の温度を最優先させるならば、水プラズマが有利であり、試料の変色や真空排気系の結露などの課題が解決されるならば、低温滅菌法の実用化が達成できると思われた。いずれにしても、プラズマの効果は表在性であり浸透性が小さいので、高度な微生物汚染には不向きであり、また、表面改質効果の大きい素材も不適と考えられるため、プラズマ滅菌の適用は限定されると推察される。

現在、EO ガス滅菌法に代わる低温滅菌を目指して、国内外を問わず、プラズマを応用した滅菌研究が多数報告されている。しかし、EO ガス滅菌法の問題点を解決できる画期的なプラズマ処理法は未だ報告されていない。低温滅菌法の要件として、滅菌効果においては、温度依存性ではない、オゾンなどの毒性依存がない、再現性の高い確実な効果を有するなどが必須とされる。さらに、医療用滅菌では、袋内部のガスのプラズマ化も必要である。本研究では、金属製の内部電極(棚)を設置して検討したが、袋内部器材の滅菌は達成できなかった。今後、プラズマ活性種について基礎的研究を積み重ねて、プラズマ滅菌の機序と、活性種が袋表面の穴を通過できる処理条件について検討していく予定である。

## 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 3 件)

- ①新谷英晴, 清水尚博, 今西雄一郎, 玉澤かほる, 木藤伸夫: 窒素ガスプラズマを用いた滅菌, エンドトキシン不活化, 素材ならびに機能適合性の確保: 医療機器学, 78(10), 224-225, 2008, 査読あり.
- ②玉澤かほる, 玉澤佳純: 歯科用タービンハンドピースの感染対策; 医療機器学, 78(10), 78-79, 2008, 査読あり.
- ③HIDEHARU SHINTANI, NAOHIRO SHIMIZU, YUICHIRO IMANISHI, TAKAYUKI SEKIYA, KAHORU TAMAZAWA, AKIRA TANIGUCHI and NOBUO KIDO: Inactivation of Microorganisms and Endotoxins by Low Temperature Nitrogen Gas Plasma Exposure; Biocontrol Science, 12(4), 131-143, 2007, 査読あり.

[学会発表] (計 7 件)

- ①玉澤かほる, 越川富比古, 玉澤佳純:

生体に安全な処理ガスを用いたプラズマの滅菌効果, 日本防菌防黴学会 第 35 回年次大会, 2008 年 9 月 11 日, 浜松.

- ②新谷英晴, 清水尚博, 今西雄一郎, 関谷高幸, 玉澤かほる, 木藤伸夫: 窒素ガスプラズマを用いた滅菌, エンドトキシン不活化, 素材ならびに機能適合性の確保: 日本防菌防黴学会 第 35 回年次大会, 2008 年 9 月 11 日, 浜松.

- ③玉澤かほる: シンポジウム医療現場で実施されている感染防止対策一; 日本防菌防黴学会 第 35 回年次大会, 2008 年 9 月 11 日, 浜松.

- ④新谷英晴, 清水尚博, 今西雄一郎, 玉澤かほる, 木藤伸夫: 窒素ガスプラズマを用いた滅菌, エンドトキシン不活化, 素材ならびに機能適合性の確保: 第 83 回日本医療機器学会大会, 2008 年 5 月 30 日, 東京, 学会予稿集: 324.

- ⑤玉澤かほる, 玉澤佳純: 歯科用タービンハンドピースの感染対策一 オイルスプレーによる洗浄効果一 第 83 回日本医療機器学会大会, 2008 年 5 月 30 日, 東京, 予稿集 115.

- ⑥玉澤かほる, 玉澤佳純, 安倍 敏, 野口武史: 生体に安全なガスをキャリアガスとした低密度・低エネルギープラズマの滅菌効果, 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 大阪, 2007 年 8 月 30 日, 要旨集: 36.

- ⑦玉澤かほる: 歯科における感染対策のポイントと問題点, 第 25 回北海道中材業務研究会, 札幌, 2007 年 7 月 7 日.

## 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・講師  
研究者番号: 40292221  
金谷 聡介(KANAYA SOUSUKE)  
東北大学・病院・医員  
研究者番号: 80375097