

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24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659085

研究課題名（和文）

新規滅菌装置の開発：窒素ガスプラズマの生体高分子、微生物由来毒素への効果

研究課題名（英文）

Towards development of a novel low-temperature plasma sterilizer: effects of nitrogen gas plasma on bacterial macromolecules and toxins.

研究代表者

木藤 伸夫 (KIDO NOBUO)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80161511

研究成果の概要（和文）：新規低温滅菌装置を開発する目的で、窒素ガスプラズマの殺菌効率と殺菌メカニズムの検討を行った。*Geobacillus stearothermophilus*、大腸菌、ブドウ球菌の生物指標を用いて滅菌保証時間を決定したところ、30分以内の短時間で滅菌が達成できる可能性が示された。窒素ガスプラズマによる殺菌は、プラズマ発生に用いる高電圧パルスやプラズマ中に発生する紫外線により起こるのではなく、プラズマ中の窒素ラジカルによる殺菌であることが推定された。グラム陰性菌エンドトキシンの不活化能はオートクレーブよりも優れており、エンドトキシンの生理活性も低下した。さらに、プラズマ照射による突然変異誘発率も低いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To develop a novel low-temperature plasma sterilizer using pure nitrogen (N₂) gas as a plasma source, we evaluated bactericidal ability of a prototype apparatus. The decimal reduction value of the biological indicator of *Geobacillus stearothermophilus* endospores was determined as 1.9 min. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were also exposed to the N₂ gas plasma and confirmed to be inactivated within 30 min. Through the evaluation of bactericidal efficiency in a sterilization bag, we concluded that the UV photons in the plasma and the high voltage pulse to generate the gas plasma were not concerned with the bactericidal effect of the N₂ gas plasma. Bactericidal effect might be exhibited by activated nitrogen atoms or molecular radicals. Endotoxins from Gram-negative bacteria were inactivated more efficiently than the autoclave treatment. Moreover, the biological activities of endotoxins also decreased significantly. The Ames test indicated that mutations induced by the plasma irradiation were negligible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,700,000	180,000	2,880,000

研究分野：細菌学、微生物学、生化学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：低温滅菌、プラズマ、大腸菌、ブドウ球菌、エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

現在主要な滅菌法には、高圧蒸気滅菌法、乾熱滅菌法、放射線滅菌法、エチレンオキシサイドガス（EOG）によるガス滅菌法などがある。プラスチック素材の医療器具の滅菌には加熱法が適さないため主として後者二つの方法が用いられているが、EOGは発ガン性を有するため、残留ガスや環境への放出が問題視されている。我が国では1997年に「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善に関する法律」が施行され、その管理対象にEOGが含まれたことから代替法の開発と実用化が喫緊の課題となっている。新規低温滅菌法の候補に低温ガスプラズマを用いる方法があり、世界中で実用化を目指した研究が行われている。過酸化水素のプラズマを用いた滅菌装置が市販されているが、殺菌効果はガス化した過酸化水素によるため、正確には化学薬剤による滅菌法で、プラズマ滅菌法とは言い難い。申請者は日本ガイシ（株）において開発された窒素ガスプラズマ発生装置とそれを応用した滅菌装置の性能を、*Geobacillus stearothermophilus* を指標菌（BI）として評価し、10～15分という比較的短時間で滅菌が完了する可能性を報告した（*Biocontrol Sci.*, **12**: 131-43, 2007）。窒素ガスプラズマの処理温度は60～80℃であり、低温滅菌の条件を満たしている。さらに、グラム陰性菌の最外層に存在するエンドトキシンやウシ血清アルブミンなどを分解する作用を示した（木藤、未発表）。以上の結果から、窒素ガスプラズマを用いた滅菌装置の実用化により、微生物の死滅に加えて対象物を汚染している微生物由来の毒性化合物、すなわちエンドトキシンやタンパク毒素などの分

解・清浄化も達成できる可能性が示されていた。

2. 研究の目的

本研究では病院での使用を前提に、BIとして使用される *G. stearothermophilus* に加え、病院での分離頻度の高い病原菌である大腸菌、ブドウ球菌を用い、殺菌条件の検討と滅菌装置の評価を行う。さらに、病院での実際の手技に即し、滅菌袋内での殺菌効果についても明らかにする。エンドトキシンの分解について、リムルス試験による定量と、エンドトキシン生理活性の変化から評価を行う。窒素ガスプラズマの殺菌効果は、プラズマ発生に用いる高電圧パルスや、プラズマ中に発生する紫外線（UV）、窒素ラジカルによると考えられているが、これら要因による殺菌メカニズムについても検討する。さらに、プラズマ照射による薬剤耐性菌の出現なども懸念されることから、プラズマによる突然変異の誘発能についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 滅菌条件の決定：市販の *G.*

stearothermophilus のBIを用いて滅菌条件を決定した。照射後55℃で7日間培養し、増殖の有無により滅菌の達成度を判定した。

(2) 殺菌効果の判定：プラズマ照射したBI

より静菌を回収して生存曲線を描き、菌数を十分の一減ずるのに必要なプラズマ照射時間（D値）を決定した。また、大腸菌

（*Escherichia coli* ATCC25922株）、ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus* ATCC29123株）については、自家製のBIを作製し、同様に殺菌効果の判定を行った。

(3) エンドトキシンの不活化：*E. coli*

ATCC25922株のエンドトキシンを熱フェノ

ール法にて抽出・精製し、エンドトキシンの不活化検討に用いた。エンドトキシン水溶液をカバーガラスに塗布・乾燥し、プラズマ処理を行った。照射後エンドトキシンを回収し、エンドスペシー(生化学バイオビジネス)を用いたリムルス試験により定量した。また、エンドトキシン生理活性の変化は、エンドトキシンにより引き起こされるショック症状のメディエーターである一酸化窒素(NO)の産生誘導を、マウスマクロファージ系の培養細胞(RAW264)を用いて測定した。実際の医療現場では器具に付着した菌体から遊離するエンドトキシンが問題となるため、ガラスプレートに塗布・乾燥した菌体にプラズマ照射を行い、遊離するエンドトキシン量の変化を定量した。

(4) 殺菌メカニズム：窒素ガスプラズマによる滅菌メカニズムを明らかにする目的で、プラズマ中の紫外線量の定量と、その殺菌効果を調べた。また、滅菌袋中においたBIの殺菌効果から、殺菌メカニズムを考察した。

(5) 変異誘発能の評価：プラズマ照射が遺伝子へ与える影響を調べるため、変異原性評価に用いられるエームス試験を用い評価を行った。

4. 研究成果

(1) コールドスポットの解消と滅菌条件の決定：日本ガイシより提供された滅菌装置の試作品を用いて基本性能の評価を行った。メーカー指定の条件では装置内に滅菌を達成できない領域(コールドスポット)ができることがわかったため、パルス電圧や周波数の調整によりコールドスポットを解消した。*G. stearothermophilus* BIを用いて本装置の滅菌保証時間を決定した。プラズマ照射時間とBI中の生菌数変化の相関から、濾紙を用いたBIのD値を1.9分と決定した(図1、a)。この値から求められる濾紙担体BIの滅菌

保証時間は23分であった。

(2) 殺菌効果の判定と滅菌メカニズム：担体がステンレスの*G. stearothermophilus*のBIのD値は3.8分と長くなることが明らかとなり、滅菌対象物の材質の違いにより滅菌保証時間が変わる可能性が示された(図1、b)。

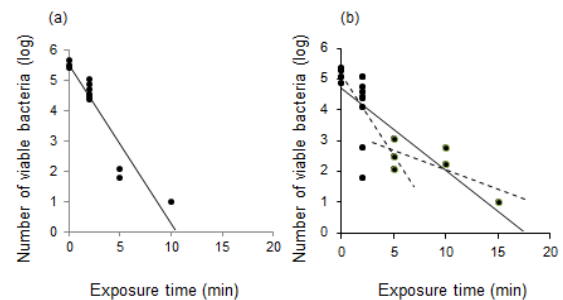


図1. *G. stearothermophilus* BIの生存曲線

濾紙(a)、あるいはステンレス(b)を担体とした

G. stearothermophilus BIの生存曲線。グラフに示した時間の窒素ガスプラズマ照射を行い、菌を回収して生菌数を決定した。

次に、*S. aureus*と*E. coli*を用いてBIを作製し、殺菌効果を検証した(図2)。それぞれ二相性の生存曲線が得られたが、殺菌に必要な時間は*S. aureus*で20分、*E. coli*で30分であった。

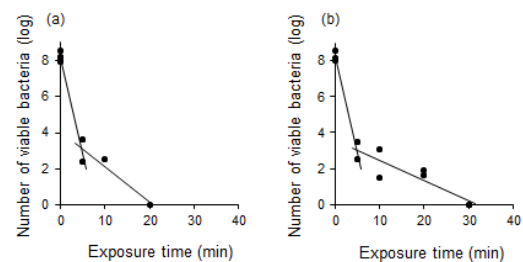


図2. 野生型細菌の生存曲線

S. aureus(a)、あるいは*E. coli*(b)、それぞれ 10^8 個をスライドガラスに塗布・乾燥後、プラズマ照射を行い、生菌数の変化を調べた。

さらに滅菌バッグ中での滅菌を試みた(表1)。UVを透過しない滅菌バッグ内においても、袋の両端が開封されていれば*G. stearothermophilus*は20分で殺菌されること

が明らかになった。他の包装資材でも、一部が開封されていれば殺菌が可能であった。

表 1. 滅菌袋、あるいは包装内の殺菌効果

Bag or wrapping materials	Conditions	Inactivation
Sterilization bag	Not sealed	O
	Sealed	X
Dialysis tube (cellulose)	Not sealed	O
	Sealed	X
Cellulose	Wrapped	X
Wiper (paper)	Wrapped	X

After the plasma exposure for 20 min, BI were cultivated at 55°C for 7 days. BI in duplicate were used for each judgment. O, inactivated; X, not inactivated.

滅菌バッグのポリエステルフィルム部分は 305 nm 以下の波長の UV を透過しないことから、UV の殺菌への関与は少ないと考えられた。さらに、窒素ガスプラズマ中の UV 量を測定し、UV 量が低いこと、同量の UV では十分な殺菌効果を得られないことを確認した。以上の結果から、窒素ガスプラズマ滅菌においては、プラズマ中に生ずる UV は殺菌効果に貢献しないと結論した。さらに、絶縁体である薄い紙で密封包装された BI で殺菌効果が見られなかったことから、プラズマ発生に用いた高電圧パルスによっても殺菌は起こらないことが確認できた。プラズマによる殺菌には包装容器の一部が開封されていることが必須で、これはプラズマ中の分子種と、BI 中の細菌が直接接することが殺菌の必要条件であることを示唆している。以上の結果から、窒素ガスプラズマによる殺菌には、プラズマ中の窒素ラジカル、あるいは窒素イオンラジカルが関与していると推測できた。

(3) エンドトキシンの不活化: *E. coli* ATCC25922 株より熱フェノール法にて抽出・精製したエンドトキシンにプラズマ照射を行い、エンドトキシン量の変化を定量した。プラズマ照射により、ガラスプレートから遊離するエンドトキシン量が、未照射に比べて 0.8% に減少することが明らかになった。オー

トクレーブ処理では、およそ三分の一量のエンドトキシンが遊離した。一方、 10^5 個の *E. coli* 菌体をガラスプレートに付着させて同様の実験を行うと、プラズマ処理でもオートクレーブ処理においても、遊離するエンドトキシン量の減少はあまり見られなかった。次に、二種類の初期菌数で同様の実験を行ったところ、菌数が多い場合 (10^7 個) ではオートクレーブ処理の方が遊離するエンドトキシン量は少なかったが、初期菌数が 10^5 の場合には同程度のエンドトキシンが遊離することがわかった。実際の医療現場では器具の洗浄後本装置が使用されるため、器具に付着している菌量は、 10^3 程度だと推定されている。少量の菌数での比較を行う必要がある。

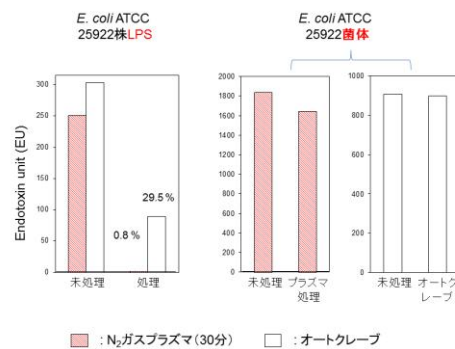


図 3. 注射用水中に遊離するエンドトキシン量の変化
E. coli ATCC25922 株のエンドトキシン (LPS, 100 ng)、あるいは菌体 (10^5 CFU) をガラスプレートに塗布し、オートクレーブ、あるいはプラズマ照射処理を 30 分行った後、注射用水中に遊離するエンドトキシン量をリムルス試験により定量・比較した。

エンドトキシンにより引き起こされるショック症状の有力なメディエーターと考えられている一酸化窒素 (NO) の産生誘導能を、未照射とプラズマ照射したエンドトキシンで比較した。エンドトキシンの定量と同様の方法で注射用蒸留水中に遊離させたエンドトキシンで培養した RAW264 を刺激し、培地中に放出された NO より生ずる亜硝酸イオン (NO_2^-) を Griess 法で測定した (図 4)。プラズマ照射したエンドトキシンでは、未照射 (control)

に比べ顕著なNO産生誘導の低下が見られた (ATCC LPS、Plasma)。見られた活性は、エンドトキシンの不活化に用いられる250℃の加熱処理を行った試料と同程度であった (250C)。

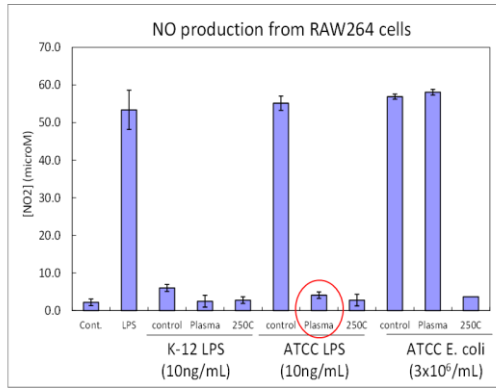


図4. N₂プラズマ処理によるエンドトキシン生理活性の変化

抽出・精製したエンドトキシン (ATCC LPS)、あるいは菌体から遊離するエンドトキシン (ATCC E. coli) の刺激により RAW264 細胞の培養上清中に産生される NO を定量し、250℃の加熱処理を行ったと比較した。

菌体へのプラズマ照射では (ATCC E. coli)、NO産生の顕著な低下は見られなかった。エンドトキシンの失活、除去に使用される250℃の加熱処理では、菌体においても顕著なNO産生誘導の低下が見られた (図4、250C)。

(4) 変異誘発能の評価:最後にプラズマ照射による突然変異の誘発について検討した。プラズマ中に発生するUVや窒素ラジカルによる突然変異誘発の頻度を検討した。突然変異体の出現率は、薬物などの化学物質の変異原性を評価するためのバイオアッセイ試験法、Ames試験で評価した (図5)。試験にはフレームシフト型の変異検出に使用される *Salmonella enterica* TA98株と、塩基置換型の変異検出に使用されるTA100株を用いた。対照実験から、TA98株ではUV照射によるフレームシフト型変異が感度良く検出され、TA100株ではアジ化ナトリウム処理による塩基置換型の変異が検出されたが (図5、左)、

プラズマ照射 (1分) ではバックグラウンド以上の突然変異体の出現は観察されなかった

(図5、右、N₂)。UV照射による突然変異体の出現率は、UV照射量の増加に伴い一度上昇し、その後死滅する菌数の増加に伴って減少する。今回N₂プラズマ照射は1分という条件で行ったが、同装置による最初の5分間の処理で10⁵程の生菌数の減少が見られることから、処理時間を延長しても突然変異体の出現効率はそれほど上がらないものと推察された。

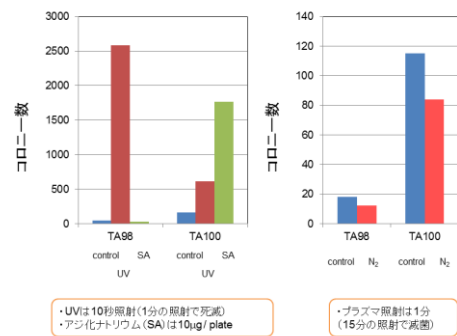


図5. Ames 試験による変異率決定

Salmonella enterica TA98 株 (フレームシフト型) と TA100 株 (塩基置換型) を用い、プラズマ照射による突然変異体の出現数を、UV 照射 (UV) やアジ化ナトリウム (SA) の突然変異誘発率と比較した。縦軸は突然変異を起こし選択培地に生着した菌数を表す。

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1件)

Kumiko Kawamura, Ayaka Sakuma, Yuka Nakamura, Tomoko Oguri, Natsumi Sato, and Nobuo Kido、Evaluation of bactericidal effects of low-temperature nitrogen gas plasma towards application to short-time sterilization, *Microbiol. Immunol.*、査読有、2012、印刷中

[学会発表] (計1件)

川村久美子、小栗智子、佐藤夏巳、新谷英晴、今西雄一郎、清水尚博、木藤伸夫、新規滅菌

装置の開発：低温窒素ガスプラズマを用いた
病原細菌の滅菌、日本防菌防黴学会第 38 回
年次大会、2011

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木藤伸夫 (KIDO NOBUO)

研究者番号：80161511

(2) 研究分担者

川村久美子 (KAWAMURA KUMIKO)

研究者番号：30335054

(3) 連携研究者 なし