〔Note〕

Sterilization Conditions of the Autoclave Equipped in the Breeding Section of Laboratory Animal Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo.

Kazuyoshi MAEJIMA, Kiyoshi SUZUKI, Rizo KOBAYASHI,
Katsuko SUDO and Kikuji ITOH

Institute of Medical Science, University of Tokyo, Takanawa P. O., Tokyo

(Received for publication : December 5, 1972)

The conditions of sterilization were examined for preparing the aseptic materials using the autoclave equipped in the Breeding Section of Laboratory Animal Center. Sterilized diets could be prepared by autoclaving at 115°C for 30 min, at 120°C for 20 min or at 125°C for 15 min. Food intake and body weight increase in mice given the autoclaved diet were not different from those given untreated diet, although dietary vitamin B₁ contents reduced to 20-50% of untreated diet after autoclaving. A longer period of autoclaving was necessary to sterilize the drinking water, because of a large value in the specific heat of water. In practice, sterilization of water was required for autoclaving at 120°C for 90 min, while the sterilization of bedding, cage and other materials as well as diet for autoclaving at 120°C for 20 min. [Exp. Animals, 22(1), 31-36, 1973]

東京大学医科学研究所動物センター繁殖室に設置された オートクレーブの滅菌条件に関する検討

前島 一淑・鈴木 潔・小林 理造・須藤カツ子・伊藤喜久治
東京大学医科学研究所

(1972年12月5日 受付)

1970年12月に竣工した東大医科研動物センター（以下センター）の4階は、SPFならびに無菌動物の繁殖室にあてられ、そこに供給される器材の滅菌のため日東理科工業製の両扉式全自動高圧蒸気滅菌装置、ユニクレーブ UC-202B（以下オートクレーブ）が設置されている。ここの運営は1971年12月からはじまったが、将来無菌動物のために、200台以上のアイソレータが用いられると予想される。そこで、ここのオートクレーブで各種の器材を滅菌する方法について、あらかじめ十分な検討を加えておくことにした。えられた知見にはセンター内部でのみ通用するデータもあるが、無菌動物の飼育を新しくはじめようとするときに役立つデータもすくなくないと

考え、その大要を記述することにした。

まず、滅菌操作について簡単に説明しておく。固型飼料は金アミ製の棚に一層にならべ、床敷き（おがくず）は布製の袋に軽くつめ、飲水は500～700mlの角ビンにいれケージに立て、それぞれ315mm径のフィルターメディアを巻いたステンレス鋼製の缶（以下滅菌缶）に納め、口をマイラー膜で封じる。その操作は、医科研で日常化されている作業手順（前島他：ビニールアイソレータの組立と操作。瑞穂印刷，1969）に従っている。

オートクレーブは全行程が自動である。始動ボタンを押すとオートクレーブ内筒が減圧され、内圧－55～65 cmHgの状態が5分保たれ、ついで2 kg/cm²程度に減

Table 1. Bacteriological checking on the autoclaved diets 1.

Series of examination		I	II	III	IV	V	Total
Autoclaving							
110°C for 20 min.		20/20*	20/20	— **	—	—	40/40
"	30	20/20	20/20	—	—	—	40/40
115	15	4/20	7/20	20/20	—	—	31/60
"	20	16/20	3/20	0/20	—	—	19/60
"	25	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100
"	30	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100
120	10	0/20	12/20	14/20	—	—	26/60
"	15	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100
"	20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100
125	5	20/20	3/20	7/20	—	—	30/60
"	10	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100
"	15	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/100

* No. positive / examined.

** Not examined.

Table 2. Bacteriological checking on the autoclaved diets 2.

Medium		Thioglycollate medium		Cooked meat medium		Potato dextrose broth
Incubation temperature (for 14 days)						
Autoclaving		37°C	Room temp.	37°C	Room temp.	Room temp.
115°C for 30 min.		0/60*	0/60	0/60	0/60	0/60
120	20	2/120**	0/120	0/120	0/120	0/120
125	15	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60

* No. positive / examined.

** Heat labile gram positive cocci and cocco-bacilli.

圧された蒸気が外筒に導入される。外筒で凝縮された水はそのままオートクレーブ外に排出され、飽和蒸気のみがゆっくり内筒へ導入される。内筒の温度があらかじめ設定された温度になると、蒸気の導入は一時的にとまりタイマーが作動する。内筒温度が下ると入気弁が開き、上れば閉じ、温度による蒸気圧制御がおこなわれる。所定の時間になれば入気弁は閉じ、蒸気は排気機構の作動で排出され、汙過無菌空気が急速に導入される。

固型飼料の滅菌：まず、110, 115, 120, 125°C と 5, 10, 15, 20, 25, 30分の処置をくみあわせた12種の条件を定め、オリエンタル酵母製の NMF 飼料の滅菌を試みた。各処置ごとに20コの飼料を別々の20本の heart infusion broth (Difco, 20ml, 以下 H I ブイヨン) に投じ、37°C 7日の好氣的培養をおこなった。この検索は2, 3ないし5回くりかえしたので、各処置ごとの培養試料数は40, 60ないし100である。

Table 1. はその成績のまとめであるが、110°C では

30分のオートクレーブ処置を加えても40/40コの飼料から菌が検出された。また、115°C 20分で19/60コ、120°C 10分で26/60コ、125°C 5分で30/60コの飼料が培養試験陽性であった。陽性186例について菌が検出されるまでの培養日数をみると、1, 2, …… , 7日の累積陽性数は27, 72, 110, 136, 154, 184, 186で、ここで陰性とされた試料からもさらに長時間培養すれば、菌が検出されたかもしれない。そこでとりあえず、各温度ごとに5分の安全巾をみこみ、固型飼料が滅菌できるオートクレーブ処置は115°C 30分、120°C 20分または125°C 15分とした。

これらの条件によるオートクレーブ処置を、NMF 飼料のほかにオリエンタル酵母製の CMF 飼料、船橋農場製の F I ならびに F II 飼料の4種類の固型飼料について試み、各20コずつの試料を別々の20本の H I ブイヨンに投じ、37°C で好氣的に14日培養した。この検索は各飼料とも3 lot についておこなったが全例陰性であった。

以上の検索は H I ブイヨンによる好氣的培養だけでおこなわれ、必ずしも十分な培養試験とはいえない。そこで、実験動物研究会・無菌試験の規準に関する委員会の試案（実験動物，21，35～38，1972）に準拠し，clinical thioglycollate medium (Eiken)，0.1%寒天加 cooked meat medium (Eiken)，potato dextrose broth (PD agar, Eiken から寒天を除いたもの) を用意し，37°C および室温（24～26°C）で培養を試みた。被検試料は NMF 飼料のみで，その成績は Table 2. に示したが，120°C 20分処置試料を thioglycollate medium で 37°C 培養した場合にのみ 2/120 例が陽性であった。しかしここでえられた菌は，グラム陽性球菌とグラム陽性球桿菌で，いずれも 60°C 30 分の加熱に抵抗できず，培養操作時の汚染菌と思われる。

ところで，培養試験において試料は砕くことなく液体培地に投じそのまま培養するため，運動性を欠く菌が飼料の内部に生残した場合検出できないかもしれない。しかし，上記の 3 条件でオートクレーブ処置した NMF 飼料を 12 匹（2 匹ずつ 6 台のアイソレータに収容）の無菌マウスに与えたが，無菌状態を 3 カ月以上維持できたので，菌が生残している可能性はまずないとみてよい。

これらの成績は，固型飼料が 115°C 30 分，120°C 20 分あるいは 125°C 15 分のオートクレーブ処置で滅菌できること，飼料の滅菌可否の検討には，H I ブイヨン 37°C 14 日の好氣的培養試験でおおよそ判断はできることを示す。

飼料由来 *Bacillus* の耐熱性：まず，NMF 飼料と FI 飼料 1 g あたりの好気性菌の生菌数 ($M. \pm S. D., N=20$) を H I 寒天でしらべたところ， $103.0 \pm 0.5, 103.1 \pm 0.3$ で，その大部が *Bacillus*，残りは *Micrococcus*，酵母，グラム陰性桿菌であった。嫌気性培養による菌数は，いずれも好気性菌の 1/10 以下であった。この飼料を砕き PBS に懸濁させ 100°C 10 分加熱すると，H I ブイヨンを用いた好気性培養で菌が検出される NMF 飼料は 6/20 コ，FI 飼料は 7/20 コにすぎず，100°C 20 分加熱すると全例陰性となった。

つぎに，30 株の *Bacillus* をこれらの飼料から無作為的に採取し，H I 寒天で 37°C 3 日培養し芽胞を形成させた。PBS 1 ml あたり 10^3 ないし 10^7 コの芽胞浮遊液をつくり，外径 10mm の小試に 0.5ml ずつ分注し，100°C のふっとう水中につけ 10 分おきにとりだし，その全容を H I ブイヨンに移し 37°C 14 日培養をおこなった。その結果，7/30 株は 100°C 10 分の加熱に耐えられなかったが，10/30 株は 30 分以上，とくに 4 株は 120 分の加熱に耐えた。しかし，この 4 株ならびにアイソレータの菌汚染事故に由来する保存 *Bacillus* 25 株の芽胞について，110，115，120°C で各 10 分のオートクレーブ処置を加えたところ，すべて 110°C 10 分の加熱に抵抗できなかった。

これらの成績は，*Bacillus* ないしその芽胞の浮遊液を用いた加熱処置に関するデータと実際に飼料をオートクレーブ処置した場合の成績にはくい違いがあることを

Table 3. Vitamin B₁ and B₂ contents in the autoclaved diets.

Pellets	Series of examination	Autoclaving	V. B ₁		V. B ₂	
			mg %	Retention %	mg %	Retention %
NMF	I	115°C for 30 min.	0.84	43.5	1.28	93.4
		120 20	0.60	31.1	1.31	95.6
		125 15	0.58	30.1	1.24	90.5
		untreated	1.93	—	1.37	—
CMF	I	115°C for 30 min.	1.25	44.2	2.80	93.3
		120 20	0.98	34.6	2.83	94.3
		125 15	0.94	33.2	2.77	92.3
		untreated	2.83	—	3.00	—
NMF	II	115°C for 30 min.	0.84	32.7	1.66	104.4
		120 20	0.75	29.2	1.51	95.0
		125 15	0.52	20.2	1.51	95.0
		untreated	2.57	—	1.59	—
FI	II	115°C for 30 min.	1.04	49.8	0.73	84.9
		120 20	0.93	44.5	0.65	75.6
		125 15	0.70	33.5	0.70	81.4
		untreated	2.09	—	0.86	—

Fig. 1 Food intake and body weight increase in conventional DDD mice given the autoclaved diet

Fig. 2 Temperature and pressure in autoclave

Fig. 3 Temperature of drinking water after reaching at 120°C in the autoclave

示唆している。つまり、飼料の滅菌条件については、飼料を実際にオートクレーブで処置して検討すべきであろう。

飼料ビタミンの破損と摂取量：飼料滅菌のためのオートクレーブ処置として、115°C 30分、120°C 20分あるいは125°C 15分という条件が設定できたと前述したが、飼料成分の破損状況がこの3種の条件のあいだで異なっているかもしれない。そこで、検索の対象としてビタミンB₁とビタミンB₂をとりあげ、NMF 飼料、CMF 飼料およびFI 飼料を上述の3条件でオートクレーブ処置したのち、定量を日本科学飼料協会に依頼した。Table 3に示すように、ビタミンB₁の破損は処置温度が低いほどすくない傾向にあったが、その差はとくに大きくはなかった。また、ビタミンB₂の破損はわずかであった。

ついで、滅菌飼料の摂取量について検討した。Fig. 1は、120°C 30分オートクレーブ処置 NMF 飼料を12週間にわたり与えたふつうのDDD マウスにおける摂取量ならびに体重の推移であるが、♂♀とも無処置群とのあい

だに差はみられなかったといえる。この知見は、飼料滅菌の条件は、むしろオートクレーブ作業のしやすさに重点をおいて決めればよいことを示している。そしてわれわれは、120°C 20分のオートクレーブ処置を、無菌動物用飼料の滅菌のための日常作業と決めた。

飲水の滅菌：水は比熱が大きいため、飼料の場合にくらべて水のオートクレーブ滅菌には、長時間の加熱が必要となる。滅菌缶内の温度の推移を、缶内に挿入したサーミスタ温度計によってしらべると、Fig. 2-a のようになった。参考までに、内筒温度ならびに圧力をあわせ示したが、滅菌缶内の温度は、内筒の温度とほぼ平行して上昇した。さて、飲水を滅菌缶に納め、120°C 20分オートクレーブ処置を加えて飲水温度の推移を記録したのがFig. 2-b であるが、滅菌缶内の水温の上昇はきわめてゆるやかであった。内筒温度が120°Cに達したときようやく30°C 前後、滅菌行程が終了したときでも70°Cにすぎなかった。このことは、飼料滅菌と同じ方法によっては飲水の滅菌ができないことを示している。事実、当

初センターでは飲水を120°C 30分という条件でオートクレーブ処置したが、これを与えていた無菌マウスの菌汚染率は65%（アイソレータあたり）をこえていた。なお、センターにオートクレーブが設置される以前は、器材の滅菌に培地室のオートクレーブを利用していたが、その時期の菌汚染率は3%以下であった。それは、培地室のオートクレーブの蒸気の導入はきわめてゆるやかで、120°Cに到達するのに60分以上を要し、滅菌缶内の水温と内筒温度がほぼ平行していたためと思われる。すなわち、センターに設置されたオートクレーブでは、蒸気の導入が急速すぎるといえる。

そこで、サーミスタ温度計とタイマーを連動させ、飲水の温度が120°Cに達してから15分オートクレーブ処置ができるように改造した。ところが、温度によって圧力が制御される機構のため、始動後約40分で内筒蒸気圧は約2 kg/cm²、温度は130°C前後まで上昇してしまった。そして、水温が120°Cに達するのに約90分を要し、タイマー作動と同時に蒸気弁が閉じ、内筒の温度と圧力は120°C、1.2 kg/cm²前後まで下降した。この方法は、水の滅菌のために完全なものではあるが、一時的に圧力と温度が高くなり、オートクレーブや滅菌缶を傷つけ、さらに1回ごとに温度計を滅菌缶内の飲水中に挿入しなければならないため、望ましいものではない。

ところで、飼料にふくまれる *Bacillus* の耐熱性を検討したとき、PBSに浮遊させた芽胞は110°C 10分の加熱に抵抗できなかった。また熱によって破壊されやすい成分をふくむ培地の滅菌には、110°C 10分処置がしばしば用いられる。そこで飲水も確実に110°C 10分加熱すれば滅菌できるかもしれないと考えた。さらに、温度計の飲水への挿入およびタイマーとの連動は繁雑であるから、

できるならば省略したい。そこで、反復して種々のオートクレーブ処置を試みた。Fig. 3は、内筒温度を120°Cに設定したときの滅菌缶内の水温の上昇曲線を示しているが、滅菌時間を90分と設定すれば、飲水は110°C以上で10分加熱される。この条件で滅菌した飲水を8台のアイソレータ（無菌マウスは計30匹以上収容）に2カ月供給したがマウスは無菌状態で維持された。なお、飲水のオートクレーブ処置に関する検討には、サーミスタ温度計を特別に装着しなくとも、留点温度計を用いて、一定時間ごとにオートクレーブを止めて反復検索すればよい。

床敷きその他の器材の滅菌：無菌動物飼育のためには、飼料と飲水のほかに床敷き、ケージ、フィルターなどが、オートクレーブ滅菌されることが多い。床敷き（おがくず）について、飼料と同様120°C 20分のオートクレーブ処置を加え、その木片を100コずつHIブイヨンならびに potato dextrose broth に投じ、37°Cならびに室温で14日間培養してみたが、いずれも陰性であった。その他の器材についての培養試験は試みてないが、これらがとくに滅菌されたいとする理由はみあたらない。実際に水以外の器材をすべて120°C 20分処置して無菌マウスに与えてみたが、いささかの支障もきたさなかった。

なお、オートクレーブには圧力と温度についての自動記録装置がついていたが、その精度はあまりよいものではない。むしろ加熱状態を示す“タイムカード”，ないし“タイムテープ”のほうが信頼できそうである。われわれは、各種のタイムカード・タイムテープを比較検討したが、製品あるいは lot のあいだの差はわずかであったことを附記しておく。