Heat and Ozone Resistance of Bacillus Spores Isolated from Laboratory Animals

Tian Mei PAN, Ying Xia LIU, Kouji SHIMODA, Kazuyoshi MAEJIMA, Takatoshi KUHARA*, Toru URANO**, Tomoaki ISHIHARA***, and Noriyuki KASAI****

Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, *Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173, **Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860, ***Hokkaido University, Institute of Immunological Science, Sapporo 060, and ****Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060, Japan

(Received 15 December 1989/Accepted 2 March 1990)

Heat resistance of free-spores of 78 *Bacillus* strains isolated from laboratory animals was examined. Spores of 41 out of 78 strains survived for 320 minutes at 70°C, 27 for 160 min. at 100°C, only one for 20 min. at 110°C by autoclaving, and none for 5 min. at 120°C. D-values at 100°C of 9 strains determined were between 5.03 and 30.06 min. Spores of 9 strains from stock cultures were exposed to ozone gas at various conditions. Ozone resistance of spores was closely dependent upon relative humidity. D-values of the spores tested by treatment with 200 ppm ozone at 60% RH were over 200 min., especially over 1,000 min. in 4 strains, indicating that exposure to ozone at a moderate humidity for 6 hours could not sterilize *Bacillus* spores. At 90% RH, however, treatment with 200 ppm ozone for 6 hr. might be effective for a routine sterilization in laboratory animal facilities.

実験動物由来 *Bacillus* 芽胞の熱およびオゾン抵抗性

潘 甜 美・柳 英 俠・下田 耕 治・前 島 一 淑・久 原 孝 俊*
浦 野 徹**・石 原 智 明***・笠 井 憲 雪****

慶応義塾大学医学部実験動物センター

*帝京大学医学部動物実験施設

**熊本大学医学部動物実験施設

***北海道大学免疫科学研究所免疫動物実験施設

****北海道大学医学部動物実験施設

一般に、実験動物施設の滅菌、消毒作業には、ヒトや家畜の衛生管理の場で用いられている殺菌あるいは不活化（以下殺菌）技術がほとんどそのまま用いられている。この殺菌技術は微生物学の原理に基づいて確立されたものであるから、基本的には、対象が実験動物であってもヒトや家畜であっても適用上の差異はない筈であるが、実験動物施設という特殊な場に適合する滅菌、消毒

操作を確立するため、文部省科学研究費による総合研究が昭和60年から3年間実施された。具体的には、実験動物由来の各種病原ウイルス、マイコプラズマ、細菌、真菌、寄生虫を対象としてさまざまな殺菌処理の効果が詳細に検討され、実用性及び消毒薬の毒性を考慮したうえ1つの標準的操作が提案された [5]。

この研究の一環として、実験動物から収集した好気性

*** : (現在) 酪農学園大学実験動物学教室

芽胞形成桿菌（以下 *Bacillus*）芽胞の熱抵抗性が検索され、その1部は柳らによって第34回日本実験動物学会総会（岡山，昭和62年）において口頭発表されたが、その後、実験動物施設の新しい滅菌，消毒手段としてオゾン燻蒸の有用性が注目され始めたので，上記 *Bacillus* 芽胞のオゾンガス抵抗性に関する検索に着手した。著者らの最終目的は，実験動物衛生管理のための1手段としてオゾン燻蒸法を加えることで，本論文は，そのための基礎ならびに応用研究の最初の報告である。

実験方法

〔供試菌株〕慶応義塾大学医学部実験動物センター，熊本大学医学部動物実験施設，北海道大学医学部動物実験施設および免疫科学研究所免疫動物実験施設で飼育中のマウス，ウサギ，イヌの糞便から分離した *Bacillus* 株を用いた。まず，マウス，ウサギあるいはイヌの新鮮糞便を採取し，100倍量（W/V）の滅菌リン酸塩緩衝生理食塩水（pH 7.0：以下 PBS）を加えて磨砕した。この糞便懸濁液の2ml ずつを径1cm の小試験管に入れ，恒

温水槽にて70℃20分処理後，その1白金耳をハートインフュージョン（以下 HI）カンテン平板に塗抹し，37℃ 2日間培養した。発育集落を採取し，HI カンテン平板上で37℃ 1日培養を繰返して純化し，HI カンテン斜面に塗抹して室温保存すると同時に，菌体の幅，芽胞の形状，空胞の有無を含む形態学ならびに各種性状（カタラーゼ，VP，尿素利用，タンパク分解，糖分解，食塩抵抗，硝酸塩還元等）について検査した [6]。最終的な供試菌株は，マウス由来24（慶大15，熊大9）株，ウサギ由来36（慶大20，熊大8，北大8）株，イヌ由来18（慶大7，熊大6，北大5）株の計78株で，このうちの37株が *Bacillus licheniformis*，25株が *B. subtilis*，4株が *B. cereus*，3株が *B. coagulans*，残る9株が同定不能であった。

〔熱抵抗性試験〕保存菌株を HI カンテン斜面に移し，37℃ 1晩培養によって活性化させた後，それぞれを数本の HI カンテン斜面上に塗抹して37℃ 3日間培養した。その菌苔をかき取り，PBS に懸濁してよく攪拌し，滅菌濾紙（東洋 C 5：東洋製作所）で濾過し，4℃ に保存した。芽胞液は，必要に応じて70℃ 20分間加熱して栄養

Fig. 1. Diagram of ozonizing apparatus

Table 1. Heat resistance of bacillus spores (Qualitative test)

Unheated Control	70℃			100℃			110℃			120℃	
	80	160	320min.	40	80	160min.	5	10	20min.	5	10min.
78*	76	72	41	55	49	27	5	4	1	0	0

* : No. of strains showing positive culture after heat treatment

Table 2. D-values of bacillus spores at 70°C and 100°C treatment

No. of Strains	Heated at (°C)	D-value	Origin of Strains	Species
11	70	107.16*	Rabbit	<i>B. subtilis</i>
	100	8.21	Keio U.	
16	70	21.55	Rabbit	<i>B. subtilis</i>
	100	6.43	Keio U.	
22	70	∞**	Rabbit	<i>B. licheniformis</i>
	100	14.67	Keio U.	
43	70	86.73	Mouse	<i>B. licheniformis</i>
	100	30.06	Kumamoto U.	
52	70	82.44	Rabbit	<i>B. subtilis</i>
	100	13.47	Kumamoto U.	
58	70	187.37	Rabbit	<i>B. licheniformis</i>
	100	17.22	Kumamoto U.	
60	70	124.11	Dog	<i>B. licheniformis</i>
	100	5.03	Kumamoto U.	
67	70	118.65	Rabbit	<i>B. licheniformis</i>
	100	20.85	Hokkaido U.	
77	70	67.08	Dog	<i>B. licheniformis</i>
	100	11.65	Hokkaido U.	

* : 10% survival time in minute

*** * : >1,000**

Table 3. D-values of spores exposed to 200 ppm of ozone gas at various relative humidity

No. of strains	Relative humidity		
	60%	75%	90%
11	214.2*	285.6	52.8
16	∞^{**}	∞	42.0
22	∞	∞	55.2
43	352.8	100.2	64.8
52	∞	240.0	62.4
58	315.6	120.0	84.6
60	∞	461.4	61.8
67	750.0	285.6	52.8
77	375.0	85.2	33.6

* : 10% survival time in minute

* * : >1,000

Table 4. D-values of spores exposed to different concentration of ozone gas at 90% relative humidity

No. of strains	Ozone gas concentration		
	50ppm	100ppm	200ppm
11	124.8*	44.4	52.8
16	273.0	48.0	48.6
22	∞^{**}	157.8	54.6
43	88.2	58.2	64.8
52	∞	89.4	89.4
58	111.0	127.8	84.6
60	∞	124.8	71.4
67	666.6	93.6	51.0
77	71.4	45.0	49.8

* : 10% survival time in minute

*** * : >1,000**

型菌を殺し、HI 寒天平板を用いて「生きている」芽胞数を数え、ml 当たりの芽胞数を 10^5 ないし 10^6 個に調整した。芽胞液は径1cm の小試験管に1ml ずつ分注し、恒温水槽、沸騰水あるいはスピードオートクレーブ（トミー：S90N）によって加熱処理し、所定の処理後は試験管を流水中に漬けて急冷した。恒温水槽および沸騰水

中においては、試験管内の試料温度は30秒以内に所定温度に達したが、オートクレーブの場合は、温度計が室温から100℃に達するに15.10±0.42分、110℃には18.60±0.82分、120℃には23.70±0.67分を要した（平均±標準偏差）。また、オートクレーブ処理後、温度計が120℃ならびに110℃から99℃に下がるに要した時間は、15.10±

0.41分ならびに 9.2 ± 0.35 分であった。芽胞の生死に関する定性的な判定は、加熱処理した芽胞液にHI プイオン5mlを加え、37℃ 7日間培養後の発育の有無によった。生残した芽胞数は、常法どおり、各希釈段階2枚のHIカンテン平板を用いて算定した。

〔オゾンガス抵抗性試験のための芽胞浮遊液〕上記78株の中から選んだ9株を、オゾンガス抵抗性試験に用いた。これらの菌株の由来と菌種はTable 2に記してある。まず、保存菌株の微量を3mlのHIブロスを用いて2回、37℃ 24時間静置培養を繰返して活性を高めた後、その1mlを200mlのHIブロス(角瓶)3本に移して37℃ 72時間震盪培養した。つづいて、滅菌PBS (pH 7.0)を用いて4℃、3,000rpm、30分間の遠心洗浄を3回行い、最終的に2mlの菌浮遊液に濃縮した。これに70℃ 20分間の加熱処理を加えて栄養型菌を殺して芽胞型菌のみを残し、強く震盪したのち滅菌濾紙(東洋C5:東洋製作所)で濾過し、大きな芽胞塊をとり除いた。芽胞浮遊液の生菌数は、上記と同様にHIカンテン平板を用いて算定し、滅菌PBSにて0.02ml当たり約 10^6 個となるように希釈した。続いて、この希釈芽胞液を乾熱滅菌した抗生物質感受性試験ディスク用濾紙(径8mm:東洋製作所)に0.02mlずつ滴下して浸込ませ、滅菌したフィルタキャップ付きマウスケージ内で自然乾燥させた(以下芽胞試料)。この芽胞試料は密閉容器に入れて4℃で保存した(芽胞生菌数がこの条件で安定であることは確認済み)。

〔オゾンガス暴露〕芽胞試料は、オゾン発生装置(新菱冷熱特製 ELIOS-AR)のグローブボックス内で湿度60、75または90%、オゾン濃度50、100または200ppmの条件で1、2、4および6時間暴露した。温度は、すべて21~22℃の範囲にあった。オゾン暴露直前(0時間)およびオゾン暴露後、ただちにそれぞれの芽胞試料(濾紙)を10mlの滅菌PBSを入れた中試験管に入れ、ガラス棒を使って十分に磨砕した。この原液ならびにその10倍段階希釈液の各0.1mlを2枚のHIカンテン平板に滴下し、コンラージ棒で広げて37℃培養し、48時間後の集落数を数えた。なお、Fig. 1はオゾン発生装置の模式図で、オゾナイザによって発生させたオゾンガスは、コンプレッサからの空気と混合されて所定濃度に調整され、グローブボックス内に送られる。グローブボックスには、オゾン濃度を調節、記録するためのオゾンモニタ、オゾンレコーダならびに湿度を調整するための加湿器が連結されている。また、グローブボックス内の天井には、オゾン濃度を均一にするための攪拌用ファンが取付けられている。芽胞試料の出入れは、パスボックスを経

由する。

成 績

1. 熱抵抗性試験: Table 1は、78菌株の芽胞($10^5 \sim 10^6$ 個)について、70℃(恒温水槽)、100℃(沸騰水)、110℃および120℃(オートクレーブ)処理で生残した菌株数を示している。78菌株中76菌株が70℃ 80分の加熱に耐え、70℃ 320分でも41菌株が生残した。100℃の処理に対して49菌株が80分、27菌株が160分の加熱に抵抗した。また、110℃ 5分(オートクレーブ)処理に対して少なくとも5菌株が、20分処理でも1菌株が抵抗したが、120℃処理に耐えた芽胞はなかった。熱抵抗性と菌株の由来の間に関連性は認められなかった。

つぎに78菌株の中から無作為的に9菌株を選び出し、 10^5 ないし 10^6 個を浮遊させた1mlのPBSに70℃あるいは100℃で20、40、60、80分の加熱処理を施した。各処理条件において生残した芽胞数の減少直線(一次回帰曲線)から算出されたD値(10%生残時間)をTable 2に示した。例えば菌株22、43、58、67の芽胞は70℃処理にも100℃処理にも強く抵抗した。70℃処理においてもっとも耐熱性をもつ芽胞は菌株22で、D値は計算できないほど大きかった(100℃のD値は14.67分)。表では1,000分以上のD値を ∞ と表示した。菌株22のつぎに70℃処理に耐えた芽胞は菌株58でD値は187.37分であった(100℃のそれは17.22分)。一方、100℃処理に対してもっとも抵抗した芽胞は菌株43で、D値は30.06分であった(70℃のそれは86.73分)。このように、70℃処理と100℃処理におけるD値の間の強い関連を示す結果は得られなかった($r=0.2184$)。

2. オゾン抵抗性試験: 保存78菌株より9菌株を選び、それぞれ 10^6 個の芽胞を浸込ませて自然乾燥させた濾紙(芽胞試料)を200ppm(198~220ppm)のオゾンに60、120および240分暴露した。湿度は60、75、90%の3段階(温度はいずれも21~22℃)に設定した。生残した芽胞数の減少曲線(一次回帰曲線)より算出されたD値(10%生残時間)をTable 3に示した。検出限界は試料あたり100個である。

その結果、湿度60%の条件においては、200ppmオゾンに対する抵抗性をもっとも低い芽胞(菌株11)でも、90%を死滅させるのに200分以上を必要とした。菌株16、22、52、60のD値は1,000分を越えた(∞ と表示)。湿度75%の条件においても、菌株77の芽胞を除いては、90%を死滅させるのに100分以上の暴露を必要とした。しかし、湿度を90%に上げると、すべての芽胞は85分以内にその90%が死滅した。なお、100℃加熱処理によるD値

と湿度90%, 200ppm オゾン処理によるD値の相関係数は $r = 0.3640$ で, 相関は有意でなかった。

同じ9菌株を用い, 湿度90%(89~92%), 50, 100および200 ppm の条件でのD値を測定した。その結果はTable 4に示したように, 菌株43, 77を除く芽胞は, 50 ppm のオゾン暴露の場合, 90%を死滅させるために100分以上の処置を必要とした。100ppmにおけるD値も, 3菌株が100分以上を示した。200ppmのD値は, 湿度条件を変えた前の実験(Table 3)のそれとよく一致していた。

Table 4に示した測定値から計算された湿度90%, オゾン濃度200ppm 処置における一次回帰式は, 以下のとおりである。なお, y は, オゾン暴露 x 時間後の生残芽胞数(対数値)である。

菌株11: $y = 4.91 - 1.14x$ 菌株16: $y = 5.79 - 1.24x$
 菌株22: $y = 5.55 - 1.10x$ 菌株43: $y = 4.31 - 0.93x$
 菌株52: $y = 5.09 - 0.67x$ 菌株58: $y = 4.93 - 0.71x$
 菌株60: $y = 5.27 - 0.84x$ 菌株67: $y = 5.51 - 1.18x$
 菌株77: $y = 5.29 - 1.21x$

考 察

Bacillus 芽胞の耐熱性は, 芽胞を形成しない通常の病原細菌やウイルス等のそれらよりはるかに大きく, これらの芽胞を確実に殺滅できる加熱処理を行えば, 実験動物の病原体はすべて殺菌できると考えられる。ところで, 実験動物施設に常在している細菌芽胞の熱抵抗性を測定した実験資料は, 実験動物に対する病原体であるTyzzler菌についての報告[1, 2]を除いて見当たらない。今回の検討は, まず, わが国の3大学4実験動物施設より*Bacillus*株を収集するところから始めた。好気性菌のみを対象とし, 嫌気性菌を対象としなかった理由は, 扱いが簡単であること, 嫌気性菌が特別に高い抵抗性をもっているとは考えられないことの2点による。

収集した78菌株中41菌株が70℃320分, 27菌株が100℃160分, 5菌株が110℃5分にそれぞれ抵抗したが, 120℃処理に耐えた芽胞はなかった。70℃におけるD値は一般に極めて大きく, 殺菌手段を考える際の実際的な意味はない。100℃処理におけるD値は, 5.03(菌株60)から30.06分(菌株43)の間にあった。この値は, *B. stearothermophilus*を除く通常の好気性および嫌気性桿菌の芽胞のD値と著しくかけ離れたものではないといえる[3, 4]。実験動物の病原体であるTyzzler菌の芽胞の熱抵抗性は, 試験方法の違いがあって直接的な比較は難しいが, 通常の芽胞よりも弱い。したがって, 医学や獣医

学領域で通常行われている加熱殺菌処理で, 実験動物の衛生管理に支障はないと思われる。なお, 熱抵抗性と菌株の由来の間に関連性は認められない。

オゾン暴露実験によると, 湿度を90%に設定しないと芽胞に対する殺菌効果は実際上認められないこと, そして湿度90%においても, 100℃加熱に匹敵するD値を得るためには200ppmのオゾン暴露が必要なことは明らかである。高い湿度がオゾンの殺菌効果を高める理由については明確でないが, おそらく, 殺菌機序の本質である発生期酸素の形成に水の存在が必須なためである。また, 加熱処理によるD値とオゾン処理によるD値の間に強い関連は認められなかった。これは, 2つの操作における殺菌の機序が異なっているためであろう。

本研究とは別に, 浦野らは芽胞を形成しない通常の細菌の8菌株を用いてオゾン抵抗性について検討し(第36回日本実験動物学会総会), 実験動物の病原細菌の多くは100ppm 60分あるいは200ppm 30分の処置によって殺菌可能と結論されている。伊藤らによれば, 一般細菌に比べてTyzzler菌芽胞のオゾン抵抗性は大きい, 通常の*Bacillus*芽胞よりはオゾン感受性で, 濃度100ppm, 湿度90%, 1時間の暴露で明らかに活性の低下が認められ, 2時間の暴露で1万分の1に低下すると推察された(第36回日本実験動物学会)。

また佐藤らの検討によれば, 4種類の実験動物由来ウイルス(センダイウイルス, マウス脳脊髄炎ウイルス, マウス肝炎ウイルス, レオ3型ウイルス)に対して, (1)乾燥状態のウイルス材料のオゾン不活化には80%以上の湿度を必要とし, (2)液体に浮遊させたウイルス材料では, 供試4種類のウイルス中で物理学的処理および化学的処理にもっとも抵抗性が高いと考えられるレオ3型ウイルスでも, オゾン濃度300ppm, 4時間の暴露で10,000 PFU以上のウイルス不活化効果があるが, (3)ウイルス浮遊液の性質によっては不活化効果は阻害されるという(第36回日本実験動物学会)。

これまで, 実験動物施設内部の消毒には, 国内外を通じて一般的にはホルムアルデヒドガスを用いた燻蒸殺菌(不活化)が行われているが, ホルムアルデヒドの効果には疑問が残っており, また, ヒトや動物に対して有毒であるばかりでなく, 強い腐食性, 刺激性のために作業上にも問題がある[4]。通常ホルマリン消毒では, 1m³あたり約6,000 ppmのホルムアルデヒドガスを発生させているので, 濃度比でみればオゾンはきわめて有効であり, オゾン燻蒸殺菌操作における腐食性, 刺激性は相対的に著しく低く, 実験動物施設の衛生管理手段としてきわめて有利であると思われる。今後, より幅広い

検討が望まれる。

要 約

実験動物由来の *Bacillus* 菌78株の芽胞について熱抵抗性を検索した。その結果、41株の芽胞は70℃ 320分、27株が100℃ 160分以上抵抗したが、110℃オートクレーブ20分処理にはわずか1株が抵抗し、120℃ 5分では1株も抵抗できなかった。これら78株中の9株の100℃処置におけるD値（生菌数を10分の1に減少させるに必要な時間）は5.03～30.06分の間にあった。続いて、この9株についてオゾンガス抵抗性を検索したところ、湿度によって殺菌効果が著しく異なり、湿度60%、オゾン濃度200ppmの条件でのD値は200分を越え、とくに4株は1,000分を越し、6時間処理においても完全な殺菌は困難であった。しかし湿度90%の場合は、200ppmのオゾンに6時間暴露させれば実験動物施設における日常的な殺菌は可能と思われた。

本研究の1部は、文部省科学研究費補助金(総合研究A)「実験動物施設における滅菌消毒作業マニュアルの作成」(課題番

号: 6030408)によって行われた。また、オゾンガス暴露実験は、新菱冷熱株式会社の協力の下に、同社製オゾン燻蒸装置ELIOS-ARを用いて行った。関係者各位に深く感謝する。

文 献

- [1] Ganaway, J. R. (1980). Effect of heat and selected chemical disinfectants upon infectivity of spores of *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease). *Lab. Anim. Sci.*, **30**, 192-196.
- [2] Itoh, T., Ebukuro, M., and Kagiya, N. (1987). Inactivation of *Bacillus piliformis* spores by heat and certain chemical disinfectants. *Exp. Anim.*, **36**, 239-244.
- [3] 米虫節夫(1974). 熱滅菌法の基礎. 滅菌・消毒法第1集. 綿貫 吉・実側佐太郎・榊原欣作編. 文光堂. 東京.
- [4] 前島一淑・松本恒弥・高垣善男・加藤英一(1980). 実験動物衛生管理のための消毒と滅菌・ソフトサイエンス社. 東京.
- [5] 前島一淑・浦野 徹・佐藤 浩・八神健一(編)(1988). 実験動物施設における滅菌・消毒作業マニュアル. ソフトサイエンス社. 東京.
- [6] Sneath, P. H. A. (1986). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2*. Williams & Wilkins. Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.