原著

過酸化水素低温プラズマによる新しい滅菌法

古橋正吉* 上田伊佐雄*

New Sterilization Method by Hydrogen Peroxide Low Temperature Plasma

Masayoshi FURUHASHI and Isao UEDA

Surgical Center, School of Medicine,
Tokyo Medical and Dental University
1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Abstract

The new sterilization studied the performance of hydrogen peroxide(H_2O_2) low temperature plasma sterilizer (STERRAD®), developed in the United States. The sterilization process was as follows: Vacuum process, Injection of 50 % H_2O_2 (in a 1 ml ampule), Air diffusion process, Low temperature plasma process, and Recovery to atmospheric pressure, Completion of the process.

Following five bacteria were used for the sterilization test; *Bacillus subtilis globigii*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* (these bacilli used were spores), *Staph. aureus* and *Aspergillus niger*.

The results were as follows: When *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* (spore, on a filter paper chip) were put in a special purpose packaging materials (STERRAD®), which were further sealed by heating, they were killed by 50 minutes sterilization with the low temperature plasma of hydrogen peroxide.

Sterilization process of hydrogen peroxide low temperature plasma; Free radicals(hydroxy radical, hydrogen radical, superoxide and hydroperoxy radical) are very reactive and exhibit enough bacteriocidal activity within a short time. Microorganisms are possible killed by the attack of these active molecules.

The method using this equipment has merits that the sterilization can be performed at low temperature (25° to 30°C) and low moisture, and that the procedure is not dangerous, because no toxic compounds are secondarily produced during sterilization.

はじめに

過酸化水素 (H_2O_2) 低温プラズマを用い、その活性分子が微生物と反応して滅菌する新しい

概念の医療用具用滅菌装置がアメリカで開発された。低温、低湿下で滅菌でき、滅菌により毒性を示す二次生成物の産生もなく安全である。本装置を用い、滅菌効果の確認と高額医療機器に適用した場合の材質検討を行ったので研究成績を中心に報告する。

*東京医科歯科大学医学部附属病院手術部
(原稿受付：1991年10月21日)

図1 過酸化水素低温プラズマ滅菌装置
(上部は滅菌槽)

図2 過酸化水素液カセット
(アンプル10本収容)

1. 研究方法

1. 滅菌装置および操作

過酸化水素低温プラズマ滅菌装置(図1)は、滅菌槽(容積150ℓ)と扉、過酸化水素液(50%液, 1ml アンプル入り)カセット板とインジェクター, 真空ポンプ, 操作盤, 滅菌工程記録計等から構成されている。過酸化水素液はプラスチックアンプル10個がカセットに封入され1回の滅菌に1アンプルを使用する(図2)。

滅菌の手順は次の5工程をふんで行われる。

- (1) 真空工程(滅菌槽内を大気圧760 torr から0.2 torr 以下にする)。
- (2) 過酸化水素液(50%)注入工程(滅菌槽内に放出された H_2O_2 液が気化, 拡散する)。
- (3) 気化拡散工程(過酸化水素の拡散が続く。
(2)(3)の所要時間40分)。
- (4) 過酸化水素プラズマ工程(滅菌槽内圧力が0.5 torr のとき高周波放電を放射すると低温プラズマを生じる。この低温プラズマの活性化成分フリーラジカルは反応性に富み高エネルギーを有している。微生物はこの酸化作用によって死滅する。その後, 高エネルギーは不活化され最終分解物質, O_2 , H_2O を生成する)。
- (5) 最後に滅菌槽内を大気圧に復帰して全工程が完了する(図3)。

滅菌工程は自動運転され, 通常の全滅菌標準

図3 過酸化水素低温プラズマ滅菌の工程

所要時間は60分だが, 時間設定は可変である。

滅菌に用いる H_2O_2 の濃度は50%で, 液量は僅か1ml (比重 ≈ 1.0) である。滅菌槽容積は150ℓであるから, 滅菌時の H_2O_2 濃度は $3.33 \approx 3 \text{ mg/l}$ と算出される。

滅菌中は特に加温, 加湿を必要としない。

滅菌を開始すると滅菌槽内温度は $33^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 程度に上昇する。

2. 供試菌調製と滅菌効果試験

滅菌効果の確認試験は次の供試菌を用いた。*Bacillus subtilis globigii* (ATCC No. 9372), *B. stearothermophilus* (ATCC No. 12980, 7953), *B. licheniformis* (ATCC No. 14580)

(20) 医器学 Vol. 62, No. 1 (1992)

以上いずれも spore (芽胞) および *Staph. aureus* (ATCC No. 6538), *Aspergillus niger* (ATCC No. 16404) の 5 種を選択した。

供試菌懸濁液調製は、芽胞形成菌の場合、各菌株を寒天培地で $33 \sim 35^{\circ}\text{C}$ (*B. stearothermophilus* $56 \sim 60^{\circ}\text{C}$) で 7 ~ 14 日間培養し、次いで芽胞形成を確認後、滅菌生食水とガラスビーズを用い培地表面から菌塊を剝離し、試験管に集めた。これを 70°C 20 分間加熱して栄養細胞を除去後、滅菌生食水で 2 回、滅菌蒸留水で 2 回遠心洗浄を行った。得られた沈殿物を少量の滅菌蒸留水に懸濁し、芽胞懸濁液とした。このほか、Proof® (AMSCO 製, Lot # PI 102 D) 濾紙片も検討に加えた。

非芽胞形成菌および真菌懸濁液の調製は、*Staph. aureus* の場合は標準寒天培地で $32 \sim 35^{\circ}\text{C}$, 2 日間, *As. niger* はポテトデキストロース寒天培地を用い, 23°C , 5 ~ 7 日間培養した。发育した菌塊を白金耳でかきとり、滅菌蒸留水に懸濁して菌液とした。

供試菌懸濁液を濾紙片に $100 \mu\text{l}$ 接種しクリーンベンチ内で一晚風乾した。また歯科治療用スチールバー先端部にも菌液 $10 \mu\text{l}$ 接種して同様に一晚風乾した。接種菌量は濾紙片共に $10^4 \sim 10^8$ の範囲とした。

滅菌効果の確認試験は、上述の濾紙片およびスチールバーをそれぞれ専用包装材料 (STERRAD*) に入れてヒートシールして過酸化水素低温プラズマ滅菌した。滅菌後、トリプトソイブイオン培地 (BBL) に中和剤 (Ascorbic acid: 3%) を添加したものを用い $32 \sim 35^{\circ}\text{C}$ (*B. stearothermophilus* $56 \sim 60^{\circ}\text{C}$) で 7 日間培養し細菌発育の有無を観察した。

さらに、過酸化水素低温プラズマが医療用チューブ内にも有効に作用し滅菌できるか否かを検討するため、フィルターホルダー (47 mm 径, ポリカーボネート製) と両端にポリエチレンチューブ (2 mm 径, 4 mm 径, 長さ, 50 cm, 1 m, 1.5 m, 2 m) をつなぎフィルターホルダー内に供試菌濾紙片を挿入して滅菌した。滅菌後、供試菌濾紙片を無菌的にとり出して上述の方法で細菌培養した。

図 4 90% 死滅率曲線

II. 研究 成績

1. 滅菌効果の確認

B. subtilis (spore, 10^6 , 濾紙片), *B. stearothermophilus* (spore, 10^4 , 濾紙片) を専用包装材料 (STERRAD*) に入れヒートシールした場合、滅菌時間 50 分で死滅した ($N=100$). *B. licheniformis* (spore, 10^6 , 濾紙片) は、上記包装材料に入れた場合滅菌時間 20 分で死滅した ($N=25$).

Aspergillus niger (conidium: 分生孢子, 10^6 , 濾紙片) は、専用包装材料に入れた場合は最低 10 分で死滅した ($N=25$). *Staph. aureus* (10^7 , スチールバー塗布) は、上記包装材料に入れた場合最低 6 分で死滅した ($N=100$). 専用包装材料は外層がメルトブラウン・ポリプロピレン製, 中間層はポリエチレン・酢酸ビニル重合体フィルム製, 内層は EVA とナイロン製の三層からなる。

2. 90% 死滅率 (Decimal reduction value :

D 値) 測定

B. subtilis (spore, 濾紙片) および *Staph. aureus* (スチールバー塗布) の所定菌量を用い測定した。この結果, H_2O_2 濃度 3 mg/l 35°C の滅菌条件下で包装材料に入れず直接プラズマに曝露した場合 *B. subtilis* (spore) の D 値は

2～2.5 (分) であった。しかし、*B. subtilis* (spore) 濾紙片に 10% 馬血清を加え乾燥し包装材料に入れて上述の滅菌条件下での D 値は 7.5 (分) を示した (図 4)。

3. 過酸化水素低温プラズマ透過試験

フィルターホルダー内部に *B. subtilis* (spore, 10^6) *B. stearothermophilus* (spore, 10^4) の濾紙片を入れた場合は滅菌時間 50 分ですべて死滅した ($N=25$)。しかし、フィルターホルダーの一端に 50 cm 長、内径 2 mm のチューブ (ポリエチレン) を接続して滅菌した場合に上記供試菌は 50 分では死滅しなかった。そこで、過酸化水素液 (10% 濃度) を注射器にとり、上記チューブの端に接続して滅菌槽に入れて 50 分間滅菌した。この結果、上記 2 菌種はいずれも死滅した。注射器内の過酸化水素液は完全に消失していた。この手段を用いることで内視鏡の付属細管やカテーテル等の内腔を滅菌することができることが明らかとなった。

4. 内視鏡、ソナー探触子の滅菌試験

試験対象は、ファイバースコープ内視鏡 (町田製作所) 2 種と電子リニア接触子 (アロカ株式会社) 4 種である。後者は手術室で利用され、業者は 40°C 以上の加熱、滅加圧の繰返しは機械破損の原因となり、特にコネクター部分にガスや薬液が入らないよう要望している。

内視鏡と電子リニア探触子に対し過酸化水素低温プラズマ滅菌 (30°C, 50 分曝露, 1 日 1 回) を 100 日間継続実施した。滅菌終了後外観、作動状況等を調べた。電子リニア探触子は、総合感度、空気中画像、水中感度インピーダンス特性、患者漏れ電流等の性能確認を滅菌 10 回実施するたびに実施した。

この結果、電子リニア探触子 4 機種のうち経食道探触子は滅菌実施 10 回後に先端彎曲部分被覆 (合成ゴム) に肉眼で「たるみ」が認められた。40 回後には挿入管の彎曲部被覆 (ポリウレタン製) に肉眼で剝離と亀裂が生じたが機能上は何ら異常はなかった。他の 3 種の探触子には外観、性能、電気安全上の異常は認めなかった (図 5)。

内視鏡は、滅菌後外観、性能上の異常は全く認めなかった。

表 1 過酸化水素低温プラズマ滅菌の滅菌効果

仕 様	菌 種	陽性数/ 検体数	判 定
濾紙片等 (自家製)	<i>Staph. aureus</i> (10^6) (ATCC. 6538)	0/100	陰 性
	<i>Asperg. niger</i> (10^7) (ATCC. 9372)	0/100	陰 性
ブルーFR	<i>B. subtilis</i> (spore, 10^6)	0/100	
	<i>B. stearothermophilus</i> (spore, 10^4)	0/100	陰 性

註: 滅菌条件 H_2O_2 濃度 3 mg/L, 30°C, 50 分滅菌。

図 5 過酸化水素低温プラズマ滅菌後の電子リニア探触子 (上) と内視鏡 (下) 先端部

内視鏡、ソナー探触子の滅菌に際し、上述した供試菌の濾紙片、スチールバー塗布したものを包装材料に入れて滅菌し、滅菌効果を検討した。

この結果、供試菌 (spore, 10^6 , 濾紙片) はすべて死滅した。一方、歯科用スチールバーに塗布風乾した *Staph. aureus* (10^6) は、50 分曝露で死滅した (表 1)。しかし、同菌の 10^6 は 50 分では死滅しなかった。

次に日本薬局方の家兎を用い、発熱性物質試験を実施した。芽胞濾紙片および歯科用カーボンランダムポイントに供試菌を塗布した試料を用い実験したが、滅菌後はいずれも陰性を示した。

5. 本滅菌法の適用

過酸化水素低温プラズマ滅菌法は耐熱性がなく、高い湿度をきらい医療用器具に広く適用できる。たとえば、ポリ塩化ビニール、テフロン、シリコン、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート等の高分子化合物および金属製、

図6 過酸化水素低温プラズマ滅菌による供試菌（枯草菌芽胞）の形態変化（電顕所見 ×8,000）

表2 過酸化水素水の物理的性質

H ₂ O ₂ (Wt %)	35	50
活性酸素量 (%)	16.5	23.5
比重 (20/4°C)	1.13	1.20
粘度 [cPs] 20°C	1.11	1.17
H ₂ O ₂ 分圧 (mmHg, 30°C)	0.36	0.74
分圧 (mmHg, 30°C)	23	18
沸点 [°C]	107	111
融点 [°C]	-32.8	-50

ガラス製の医療用具が挙げられる。ただし、リネン、綿布等の衣類、布類、ガーゼ等で十分な乾燥状態にない場合は、過酸化水素低温プラズマの作用を阻害する可能性がある。これらは蒸気滅菌が適用できるので特に問題とはならない。

III. 滅菌の機序

過酸化水素液 (H₂O₂) の殺菌作用は古くから知られており、分解で生じた発生機の酸素の強力な酸化作用により微生物が死滅すると考えられている。表2に過酸化水素水の物理的性質を要約した。

過酸化水素低温プラズマ滅菌法では H₂O₂ 50 % 液を僅かに 1 ml を用い、滅菌槽内において高周波（特定周波数レベル）を放射してプラズマを発生させる。H₂O₂ の活性分子は分子 H-O-O-H から電子が奪われているか、あるいは高

い電子エネルギー状態にある。

イオン化密度の高い部分で生成するフリーラジカルは、ヒドロキシルラジカル (·OH) 水素ラジカル (·H) スーパーオキシド (·O₂⁻) ヒドロペルオキシラジカル (·OH₂) などが生成される。これらは短時間で十分な活性を示し反応性が高い。微生物はこれら活性分子の攻撃によって死滅すると考えられる。

フリーラジカルは再結合して次の反応物を生じる。

イオン化を伴う類似の滅菌機序を示すものに放射線（ガンマ線）照射滅菌法がある。高エネルギー照射は共有結合の開裂を容易に起こしてラジカルを生成する。ガンマ線照射によって発生する微生物損傷は少なくとも一部はフリーラジカルを経由して進行するものと考えられている。

次に供試菌のうち *B. subtilis* (spore) を塗布した濾紙片を用い、H₂O₂ プラズマ滅菌の前

後で芽胞細胞にどのような形態変化がみられるか走査電顕 (SEM) による観察を行った。図 6 は滅菌前と滅菌後の芽胞の形態の変化を示した。

B. subtilis の spore は外層の外孢子殻と数層の内層とに分けられる。滅菌後において一部の孢子に明らかな変形像が認められた。これが外孢子殻だけの変形であるのかあるいは内層を含めた構造変化なのかは不明である。

IV. 考察と結論

過酸化水素 (H_2O_2) 低温プラズマ滅菌法が最近米国において開発された。本法はこれまでの概念にはない新原理にもとづくもので、滅菌後に毒性のある残留物や二次生成物生成がない。耐熱性がない医療用具や湿度をきらう高額医療機器、光学機器に適用がある。

過酸化水素低温プラズマ滅菌法は次の 5 段階の滅菌工程により行われる。

真空工程→ H_2O_2 (50% 濃度 1 ml アンブル入り) 注入→気体拡散工程→低温プラズマ工程→大気圧復帰・完了

滅菌所要時間は上記全工程で標準的には 60 分である。滅菌は自動運転され、滅菌時間の変更も随時可能である。

過酸化水素液は古くから消毒剤として知られているが、過酸化水素を大気圧下で加熱沸騰させガス状として殺菌に利用する方法を報告したのは Scatchard (1952 年) である¹⁾。

食品の腐敗防止の目的で過酸化水素の殺芽胞作用を研究した Toledo (1972 年) は、過酸化水素液を常温下で短時間接触させると死滅効果が得られ、これを無菌的パッケージングシステムに応用した例を報告している²⁾。

Fortson と Wardle (1979 年) らは冷ガス滅菌法のプロセス研究で、滅菌槽内を真空にして過酸化水素を注入した。 H_2O_2 濃度は 75 mg/l 以下 (80°C 以下) で滅菌効果が得られたと述べている³⁾。

Wang と Toledo (1986 年) らは、各種温度下での空気中で飽和状態にした H_2O_2 気体 (air saturated with hydrogen peroxide vapor: ASHP) の槽内にポリエチレン、ガラス、ステンレス鋼板にそれぞれ *B. subtilis* 芽

胞を塗布した試料をいれて、その死滅率を測定した。この結果、20°C から 60°C までの死滅率はほぼ直線的であった。温度上下させたが 60°C と 70°C の間の死滅曲線はゆるやかとなった。なお、90% 死滅率 (D 値) は 20°C は 2.96、30°C は 1.89、40°C は 0.81⁴⁾であったと報告した⁴⁾。

以上の研究報告は過酸化水素低温プラズマ滅菌ではなく、過酸化水素液の噴霧粒子を用いて殺菌作用を研究したものである。したがって低温プラズマ滅菌法とは原理的にも異なっている。低温プラズマ滅菌法の場合の D 値は Addy ら (1989 年) が研究し報告した⁵⁾。

Addy らは枯草菌 (*B. subtilis*) 芽胞を用い 99.999% 死滅率 (6D) は 5 であると報告した。

われわれの研究では、*B. subtilis globigii* (芽胞濾紙片) を専用包材にいれ、 H_2O_2 濃度 3 mg/l、35°C の条件下で D 値は 2~2.5 であった。しかし、濾紙片に馬血清を加え含浸後風乾した後、専用包材で包んで滅菌した場合の D 値は同条件下で 7.5 であった。

次に、低温プラズマが細いチューブの内部に浸透するか否かを検討した。内視鏡等の細管に低温プラズマを浸透させる目的で、チューブ等の端に過酸化水素液 (3%, 0.5 ml) をシリンジに入れて滅菌を実施すると、滅菌実施中に H_2O_2 液は完全に消費され、チューブ内に挿入した上述の細菌芽胞 (濾紙片, 10^6) はすべて死滅したことを確認した。

本滅菌法に使用できる包装材料は専用包装材料のほかに、Tyvek* (ポリプロピレン合成紙)、Mylar* (テリレンまたはダクロン繊維製品) も利用可能である。

文 献

- 1) Scatchard, G., Kavanaugh, G. M., and Tichnor, L. B.: Vapor-liquid equilibrium. viii. Hydrogen peroxide water mixture. J. Am. Chem. Soc. 74: 3715-21, 1952.
- 2) Toledo R. T., Escher, F. F., and Ayres, J. C.: Sporicidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage microorganisms.

(24) 医器学 Vol. 62, No. 1 (1992)

- Appl. Microbiol 26: 592-597, 1973.
- 3) Fortson, R. J. and Wardle, M. D.: Cold gas sterilization process. U. S. Patent 4, 169, 124, 1979.
 - 4) Wang, J. and Toledo, R. T.: Inactivation of microorganisms on polyethylene exposed to hydrogen peroxide vapors in air at various temperatures. In "Current Technologies in flexible packaging" ed. M. L. Troedel, p. 37, ASTMSTP 912, Am. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, PA., 1986.
 - 5) Addy, T.: Low temperature Plasma: A new development in instrument sterilization technology. International Kilmer memorial conference on the sterilization of medical products, Moscow, U. S. S.R., Sept. 11-15, 1989.