過酸化水素—低温プラズマ滅菌器内に生成する ラジカル数の概算法に関する研究

高 島 征 助* 新 太喜治*² 加見谷将人*²

Study for the Approximate Estimation of the Radicals Formed
from Hydrogenperoxide in the Sterilizer by Plasma Discharging
Technique at Low Temperature

Seisuke Takashima, Takiji Arata*²
and Masato Kamitani*²*

* Co-operative Research Center, Okayama University

*² Central Operating Division,
Department of Medicine, Okayama University

Abstract

An attempt to estimate the radicals numbers formed from hydrogenperoxide by plasma discharging technique in the apparatus (STERRAD 100, Johnson & Johnson Med. Co.) has been done using ascorbic acid (A. A) and diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) as radical indicator. Then, the radical numbers were reduced from the adsorbance difference at λ max. on the spectra (on A. A: ultraviolet, on DPPH: visible ray) between before and after sterilizing using the Loschmidt's number, respectively. In result, it was found that the radical numbers were similar to the molecule numbers of H_2O_2 fed into the sterilizer before sterilizing.

Moreover, it was guessed that $\cdot O$ radical mainly reacted on A. A and $\cdot OH$ radical mainly reacted on DPPH by the spectroscopic and gas chromatographic techniques.

1. 緒 言

過酸化水素のプラズマ放電によって発生するラジカルによる滅菌処理法は従来の酸化エチレン (EOG) のような残留毒性あるいは爆発の危険性もない。また、放射線滅菌法のような大掛かりな装置も必要ない。したがって、今後の汎用性のある滅菌法として注目されつつあり¹⁾、

本法の滅菌効果については古橋らの指標菌を使用しての詳細な報告がなされている²⁾。

しかし、最近の著者らの検討では医療用具の素材によって滅菌効果がことなることも認められている³⁾。この事実は本法を臨床現場で施行する際には重要な留意点である。さらに、その滅菌効果の根源となるラジカルの挙動についても滅菌機序を考察する上で明らかにされなければならない事項であるにもかかわらず、それが連鎖反応であり、定量的な取り扱い是不可能という観点からほとんど検討がなされていない。

* 岡山大学地域共同研究センター

*² 岡山大学医学部中央手術部

(原稿受付日：1995年8月23日)

(16) 医 器 学 Vol. 66, No. 1 (1996)

そこで著者らは特殊な装置あるいは試薬を使用することなく滅菌器内のラジカル量を推定する方法について検討した。さらに、簡単なシミュレーションによって過酸化水素から生成するラジカルと試薬との反応について若干の知見を得たので、これらの事柄について報告する。

2. 実験方法

i. 滅菌装置

過酸化水素—低温プラズマ滅菌器 (STER-RAD 100, Johnson & Johnson Medical 社製, 以下, J & J. Med. と略記)

ii. 試薬類

①過酸化水素水, 58%水溶液 (J. & J. Med. 社製, STERRAD 100 に使用), 35%過酸化水素水 (和光純薬(株)社製)

②インジケーター用試薬: アスコルビン酸 (A. A), ジフェニルピクリルヒドラジル (DP-PH)

iii. 滅菌器内のラジカル捕捉実験法

①インジケーターとする試薬を約 0.007~0.014 g 精秤して, 内容積, 14 ml のガラス製試験管に採取し, 開封したままで本装置専用の包装材にのせる。包装材をヒートシールして装置内に静置する。

②本装置の通常の運転条件にて75分間滅菌操作を行う。

③操作完了後, 試薬をただちに既知量のメタノールに溶解してその溶液の紫外・可視部吸収スペクトルを測定する。スペクトル測定に際しては予めそれぞれの既知量の試薬のメタノール溶液で検量線を作成しておく。

iv. 測定に使用した機器

紫外・可視分光光度計 (島津製作所(株)製 UV-160A 型)

測定波長領域:

紫外部吸収スペクトル: 200~400 nm

可視部吸収スペクトル: 400~800 nm

測定用セル: 石英製セル (光路長, 10 mm)

v. 紫外線照射による過酸化水素からのラジカルの生成法

図1に示すように2本の電子スピン共鳴スペクトル測定用試料管 (全長が 27 cm, 下部 10 cm

図1 Trapping method for radicals generated from hydrogenperoxide aq. solution by UV irradiation at room temperature

の部分は石英製細管) をシリコーン製 Y 字連結管で接続し, 一方に 50 μl の過酸化水素水 (18, 35, 58%) を注入し, もう一方に約 0.006~0.007 g 精秤した A. A あるいは DPPH をいれて, -80°C に冷却した状態でロータリーポ

ンプにて減圧する(約 1mmHg). 2 分間, 減圧処理を行った後, ガラス製コックを閉鎖して, 過酸化水素水を注入した試料管を 254nm の紫外線を照度, $6.5\text{mW}/\text{cm}^2$ にて10分間照射する. 照射後, 試料管中の A. A あるいは DPPH をメタノールに溶解して回収して, 上述した方法で, それらの紫外部あるいは可視部吸収スペクトルを測定する.

vi. 過酸化水素—低温プラズマ滅菌処理における DPPH の分解生成物の同定

滅菌器内でプラズマ処理した DPPH を 20ml のメタノールに溶解してガスクロマトグラフィーを行った. さらに, そのメタノール溶液を 100 倍に濃縮した試料についても同様にガスクロマトグラフィーを行った.

また, クロマトグラム上に出現したピークを同定するために, 次の 3 種類の試料を調製した.

- ①. 密栓付き石英製紫外吸収スペクトル測定用セル(光路長: 10mm) 中にて 1ml の DPPH-メタノール溶液 ($0.004\text{g}/10\text{ml}$) に 1ml の 58% 過酸化水素水を添加した.
- ②. ①の試料に $7.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の照度で 30 秒間, 紫外線照射を行った.
- ③. $30\mu\text{l}$ の 58% 過酸化水素水を $7.0\text{mW}/\text{cm}^2$

で 30 秒間, 紫外線照射した後, 1ml の DPPH-メタノール溶液を添加した.

①～③の試料溶液をそれぞれガスクロマトグラフィーを行った.

ガスクロマトグラフィー測定条件

ガスクロマトグラフ: 島津製作所製 GC-8A 型

カラム: 5% シリコンオイル OV17/テナックス GC (ガラスカラム, $1.0\text{mm}\phi \times 3\text{m}$)

カラム温度: 200°C , 注入口温度: 250°C

検出器: 水素炎イオン化検出器 (FID)

注入量: $0.5\sim 1.0\mu\text{l}$

3. 実験結果

i. 滅菌器内に生成したラジカルの個数の推定

滅菌器内に既知量の A. A あるいは DPPH をガラス管にいてプラズマ滅菌処理を行った際のメタノール溶液のスペクトルおよび, それらとほぼ同量の未処理の試料のスペクトルを図 2 に示す. それによると, A. A はラジカルと反応して吸光度が低下すると同時に極大吸収位置がやや長波長側にシフトすることが認められ

図 2 UV Spectra (ascorbic acid) and Visible ray spectra (DPPH) before and after hydrogen peroxide/plasma discharging sterilization

(18) 医器学 Vol. 66, No. 1 (1996)

図 3 Reactivity of ascorbic acid and DPPH on the radicals generated from hydrogenperoxide by UV irradiation

表 1 Calculated radical numbers based on Ascorbic acid and Diphenyl picryl hydrazyl on H_2O_2 plasma reaction in plasma sterilizer

Agent	Calcd. total radical numbers	Reference
H_2O_2	2.05×10^{22}	2 ml of 58% H_2O_2 aq. soln. fed into sterilizer
Ascorbic acid (A. A)	1.58×10^{23}	0.01360g fed into the glass tube
Diphenyl picryl hydrazyl (DPPH)	3.58×10^{22}	0.00796g fed into the glass tube

た。一方, DPPH では単に吸光度が低下しただけであった。次にそれぞれの検量線から, 極大吸収位置の吸光度の低下量はラジカルと反応して消費された分子数と見なし, ロシュミット数⁴⁾を用いて滅菌器内の全空間で消費された分子数を算出した。それらの計算結果を表 1 に示す。A. A では滅菌器に注入された過酸化水素の分子数よりも A. A の反応によって消費された分子数, すなわちラジカル量が約 7 倍程度高い値となったが, DPPH では 1.5 倍程度であった。

ii. 紫外線照射による過酸化水素からのラジ

カルの生成

過酸化水素から生成するラジカルがインジケータとして用いた A. A および DPPH と反応することについての一つのシミュレーションとして, 減圧下で過酸化水素への紫外線照射処理を行った。ここでは蒸留水 (過酸化水素濃度: 0 %), および 18, 35, 58 % 過酸化水素水を紫外線照射し, 生成したラジカルを A. A および DPPH にコンタクトさせ, それぞれのメタノール溶液の吸収スペクトルを測定した。そ

図 4 Reactivity of ascorbic acid and DPPH on the radicals generated from hydrogenperoxide by UV irradiation

これらの測定結果を図3および図4に示す。それによると A. A の吸光度は58%過酸化水素水の場合に変化するのみであり, DPPH の場合には蒸留水を照射した場合でも吸光度がわずかに低下することが認められたが, 過酸化水素の濃度を上昇させても, 吸光度が大幅に低下することとはなかった。

iii. 過酸化水素—プラズマ滅菌処理による DPPH の分解生成物の同定

滅菌器内でプラズマ処理した DPPH のメタノール溶液と未処理の試料溶液をガスクロマトグラフィーにて比較した。処理後の試料のクロマトグラムには溶媒のピークの後のテーリング部分にわずかに膨らみが認められた。この試料溶液を約100倍に濃縮すると, 2個の微小ピークが確認された(図5)。これらのピークを同定するために, 密栓付き石英製紫外吸収スペクトル測定用セル内で3種類の実験を行った(図6)。

実験①ではメタノールのピークのテーリング部分に微小ピークが出現した。実験②では, このピークは減少した。実験③では, このピークはより鮮明になった。

図5 Gas chromatograms of DPPH-MeOH solutions

4. 考 察

i. 過酸化水素のプラズマ放電による生成ラジカルについて

過酸化水素のプラズマ放電によるラジカルの

GC conditions

Apparatus: Shimadzu Model GC-8A

Column: 5% Silicone oil OV 17/Tenax GC
1.0m×3mmφ

Column temp.: 200°C, Injection temp.: 250°C

Detector: FID, Injection volume: 0.5~1.0 μl

① Added 10 μl of 58% H₂O₂ aq. soln. to 1 ml of DPPH-MeOH soln.

② UV irradiation at 7.0 mW/cm² for 30 secs. on ① soln.

③ UV irradiation at 7.0 mW/cm² for 30 secs. on 30 μl of 58% H₂O₂ aq. soln. and added 1 ml of DPPH-MeOH soln.

図6 Identification of the reaction products of DPPH/H₂O₂ by gas chromatography

生成機構が次のように考えられている⁵⁾。

これらのうち, とくに $\cdot\text{O-O-H}$, $\cdot\text{O-H}$ ラジカルは強い殺菌力を示すことが知られている。しかし, 上記の反応様式は定性的概念であり, 滅菌器内に生成するそれぞれのラジカル濃度はもとより, 全ラジカル濃度を直接測定することは極めて困難であると考えられる。一方, 放射線

(20) 医器学 Vol. 66, No. 1 (1996)

滅菌における照射量，酸化エチレン滅菌におけるガス濃度の効果と同様に，プラズマ滅菌の作用機構を詳細に検討するためには，滅菌器内のラジカル濃度に関する知見は重要である。

そこで著者らは特殊な装置や薬剤を使用することなく，通常の実験条件で滅菌器内に生成するラジカル濃度の概数を検出する方法について検討した。

まず，測定に先立ち，幾つかの仮定を設定した。

すなわち，

- ①生成した全てのラジカルはインジケーターとして用いた試薬に対して同等の反応性を有する。
 - ②生成した全てのラジカルは同等の寿命を有する。
 - ③インジケーターが静置されているガラス製試験管内に拡散してきたラジカルは完全にそのインジケーターと反応する。
 - ④生成したラジカルは滅菌器内に均一に分布している。
- などである。

しかし，現実には生成した全てのラジカルに対して同等の反応性を有する試薬は有り得ず，ガラス製試験管内に拡散したラジカルがそこにチャージされた試薬と完全に反応するという保証もない。さらに生成したラジカルが滅菌器内に均一に分布しているとは考え難いが，このような仮定を設定しなければ議論が困難である。

ii. インジケーターの選択

インジケーターの選択に当たっては，滅菌器内で使用することから，無毒性であることを最重要条件とした。また，減圧下，45°C という実験条件からして低沸点物質は蒸発するおそれがあることからアスコルビン酸 (A. A, ビタミン C) を選択した。A. A は生体内のラジカル捕捉剤として既に詳細な検討がなされており⁶⁾，本研究においてもそれらの知見は有効である。また，2,2-ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) は分子内に安定なラジカルを有し，一般的にラジカル反応を電子スピン共鳴スペクトル法 (ESR) で検討する際の指標物質である⁷⁾。本研究では過酸化水素から生成したラジカルと DPPH がどのように反応するのか，ESR での

検討も想定してインジケーターとして使用した。これら2種類の試薬の化学構造式を下に示す。

その他，塩化第1鉄 (FeCl₂ 薄緑色) もインジケーターとして検討した。この試薬は滅菌処理後，赤褐色となり，Fe²⁺ → Fe³⁺ になることを示しているが，薄緑色 → 赤褐色へ色調が変化すると検量線の作成が困難であることから検討を中止した。

iii. 生成したラジカルの概算法について

図2に示されるように，A. A および DPPH と滅菌器内でプラズマ処理によって，ほぼ同量の未処理の試料のスペクトルと比較して極大吸収波長位置の吸光度がかなり低下することが認められる。しかし，これらの吸光度の差からはそれぞれの試薬の直接のラジカルとの反応量しか算出出来ない。そこで上述した仮定③によって，それらの試薬の反応量は試薬を静置したガラス製試験管 (内容積: 14ml) 内に拡散したラジカル量に対応するとした。さらに仮定④によって，14ml のガラス製試験管に存在したラジカル量と同一の割合で滅菌器内の 100l の全空間に拡散しているものとして，プラズマ放電によって滅菌器内に生成した全ラジカル量を概算した (表1)。

iv. A. A および DPPH とラジカルの反応

図2で認められるように，A. A および DPPH はラジカルと反応して極大吸収位置の吸光度が低下するが，各々如何なる構造変化を来しているのであろうか。この問題を明らかにすることは，プラズマ放電によって滅菌器内に生成したラジカルの構造を知る上からも重要である。

A. A の紫外吸収スペクトルについては上述したように，ラジカルと反応して極大吸収波長位置がやや長波長側にシフトすることが認められる。A. A のラジカル捕捉反応は主に・Oラジカルが関与する次頁の反応であり，本来，2個存在する C=O 基が3個になり，分子構造内

の共役結合性は向上して長波長側にシフトするのであろう⁹⁾。上述した過酸化水素からのラジカル生成機構では・O ラジカルの生成は主経路としては示されていないが、A. A の反応量から推定して、多量の・O ラジカルが生成しているものと考えられる。

次に DPPH のラジカル反応性について考察する。

DPPH ではラジカルとの反応によって新しい吸収は出現せず、スペクトルの吸光度だけが全領域で低下しただけである。

そこで、DPPH のラジカル反応性について解析するために簡単なシミュレーションを行った(図1)。

すなわち、減圧下でプラズマ放電の代わりに過酸化水素に波長 254nm の紫外線を照射することによってラジカルを発生させ、そのラジカルを DPPH と反応させるという方法である。紫外線照射の利点が 254nm の単色光のエネルギーは 113 Kcal/mol (4.9 eV) であり、化合物の結合エネルギーと比較するのに好都合である⁹⁾。過酸化水素では O-O および O-H 結合エネルギーはそれぞれ、33.2, 110.6 Kcal/mol であり¹⁰⁾、紫外線照射によって O-O 結合は容易に切断されて・OH ラジカルが生成されることが予想される。

18, 35, 58%の過酸化水素水を用いて紫外線照射した際の DPPH 極大吸収位置の吸光度の低下の挙動は図4に示される如くであるが、過酸化水素の濃度が増大しても、その吸光度はそれ程顕著には低下しなかった。それは過酸化水素の濃度が増大するにしたがって、その溶液粘度も増大することから、生成したラジカルの拡散が抑制されることも原因の一つであろう。しかし、対照試験として行った蒸留水の場合でも、その吸光度は僅かではあるが低下しており、DPPH は・OH ラジカルに対して鋭敏な反応性を有すると考えられる。一方、A. A は 58%過酸化水素水の場合のみ吸光度が低下し、

・OH ラジカルとは反応し難いものと考えられる。

さらに、DPPH とラジカルの反応による DPPH の構造変化を解析するために、幾つかの実験を行った。

まず、通常のプラズマ滅菌処理した DPPH をメタノールに溶解してガスクロマトグラフィーを行った。プラズマ処理前の DPPH メタノール溶液のクロマトグラムと比較すると、処理後の試料溶液では溶媒のピークの後のテーリング部分に僅かに膨らみが認められた。この試料溶液を約 100 倍に濃縮すると、2 個の微小ピークが存在することが確認された(図5)。この微小ピークを種々の試薬のメタノール溶液で同定した結果、前者がフェノール、後者がアニリンの可能性が高い。このようにガスクロマトグラフィーによって DPPH の反応生成物中にフェノールが検出されたことから、ピクリン酸の存在も予想して、シリコーン OV-17 のカラムの使用上限温度 (300°C) で測定したが、ピクリン酸は検出されなかった。

ピクリン酸は B. P.: 225°C/50 mmHg という高沸点物質であり¹¹⁾、ガスクロマトグラフィーでは検出不能であり、高速液体クロマトグラフィーなど他の分析法によらなければならないであろう。

さらに、DPPH と過酸化水素のラジカル反応によるフェノールとアニリンの生成機構についての確認反応を行った。

密栓付き石英製紫外外部吸収スペクトル測定用セルを用いて DPPH メタノール溶液/過酸化水素+紫外線照射の反応系で3種類の反応を行い、フェノールが生成することを確認したがアニリンのピークは出現しなかった(図6)。紫外線照射では、そのエネルギーと O-H 結合のエネルギーが接近しており、・H ラジカルの生成が困難であることからアニリンは生成し難いものと考えられる。

ここで得られた知見を基に DPPH と過酸化

図 7 Reaction mechanism of DPPH and radicals from generated from H_2O_2

水素とのラジカル反応機構は次のように考えられる (図 7)。

5. 結 語

過酸化水素—低温プラズマ滅菌法における滅菌器内に生成するラジカルの個数をインジケータにアスコルビン酸 (A. A) および 2,2-ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) を用いて処理前・後のそれぞれのメタノール溶液の紫外部あるいは可視部吸収スペクトルの極大吸収位置の吸光度の差に基づく方法によって概算した。その際、とくに、試薬を静置したガラス製試験管内に拡散して来たラジカルは試薬と完全に反応すること、生成したラジカルは滅菌器内に均一に分布していることなどの仮定を設定して解析した。その結果、A. A では滅菌開始前に添加した過酸化水素の分子数よりもやや高値であったが、DPPH ではほぼ類似の値が得られた。

また、得られたスペクトルの形状、およびシミュレーション、さらには反応生成物の解析によって、A. A は主に $\cdot\text{O}$ ラジカルと、DPPH は $\cdot\text{OH}$ ラジカルと反応することが判明した。

プラズマ放電による過酸化水素からのラジカル生成反応は放射線化学と同様に連鎖反応であり、ラジカルの構造および個数を正確に測定することは不可能であるが、本法によってラジカルの個数を概算することは可能である。

今後は、生成する全ラジカルに対して、さらに高感度で定量性のあるインジケータとなる試薬の探索が必要である。

(本論文の 1 部は第 70 回日本医科器械学会大会で報告した)。

引 用 文 献

- 1) Jacobs, P.: A New Technology for Instrument Sterilization., Johnson & Johnson Medical Inc., Arlington TX, 1993.
- 2) 古橋正吉, 上田伊佐雄: 過酸化水素低温プラズマによる新しい滅菌法, 医器学, 1992, 62 : 18-24.
- 3) 新 太喜治, 加見谷将人, 平井義人, 高島征助: 低温プラズマ滅菌システムの評価, 医器学, 1995, 第 70 回日本医科器械学会大会予稿集, 53 ページ.
- 4) Glasstone, S.: Elements of Physical Chemistry, 7th printings, Maruzen. 1954, p. 14.
- 5) Addy, T.: Low Temperature Plasma: A new development in instrument sterilization technology., International Kilmer Memorial Conference on the sterilization on medical products, Moscow, U. S. S. R., Sept., 1989, 11-15.
- 6) 皆川信子, 島崎弘幸: 抗酸化剤, 最新医学からのアプローチ 4, フリーラジカル, 体内動態と生体障害機序, メジカルビュー, 1992, 156-162.
- 7) 日本化学会編 実験化学講座 続 13 電子スピン共鳴吸収, 丸善, 1967, 272-273.
- 8) 奥村重雄, 赤堀四郎: 解説有機化学, 465 ページ, 共立出版, 1956.
- 9) 古海 浩: 紫外線殺菌の環境浄化への応用, 医用衛生紫外線研究会誌, 1995, 14 : 21-32.
- 10) 化学便覧 改定 4 版, 基礎編 II, 日本化学会編, 丸善, 1993, 302.
- 11) 化学便覧 改定 4 版, 基礎編 I, 日本化学会編, 丸善, 1993, 363.