

環境循環型プラズマ滅菌処理装置の開発に関する研究

—大気圧プラズマ滅菌装置を用いた各種微生物の滅菌—

辻 政雄・木村英生・秋津哲也^{*1}・福島金平^{*2}・小駒益弘^{*3}

Development of Sterization Equipment using a Glow Discharge Plasma at Atmospheric Pressure

Masao TSUJI, Hidco KIMURA, Tetsuya AKITSU¹, Kinpei FUKUSHIMA², Masuhiro KOGOMA³

要 約

ヒトに安全で、環境にやさしい大気圧プラズマ滅菌装置を開発した。本装置は、安全なヘリウムと酸素ガスを使用して酸素ラジカルを発生させ、真空チャンバーが要らない大気圧下で滅菌するものである。また、可動式のため連続滅菌が可能な構造となっている。酸素ラジカルの発生量は、ヘリウムと酸素の混合比率で決定され、酸素/ヘリウムが0.06% (ヘリウム:1.5L/min, 酸素:1 mL/min) の時に最大となり、黄色ブドウ球菌を指標とした時に滅菌時間が最も短かった。本装置で、不織布包材で包装した各種微生物を滅菌したところ、*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* 及び *Candida albicans* は1分、*Staphylococcus aureus* は5分及び *Bacillus subtilis* と *Bacillus stearothermophilus* は20分で死滅していた。

Abstract

Antimicrobial effect of atmospheric pressure glow discharge plasma generator was studied. Electrodes of the generator had dimensions of 150×50×20mm in width, depth and height, respectively, and was constructed of aluminum block. The electrodes was insulated by dielectric material, quartz glass(230×115×3mm). The experimental conditions were the following. The discharge power was 670W, the frequency was 27.12MHz, the pulse duration was 10 μ sec, the gap distance was 3mm, and the gas was a mixture of helium(1.5L/min) and oxygen(1 mL/min).

Each microorganism at the level c.a.10⁶ CFU was put on glass plate (18×18×0.15mm) and dried, packed with nonwoven cloths made from polyethylene. When each microorganism was treated in the plasma generator, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Candida albicans* were sterilized in 1 min, *Staphylococcus aureus* was in 5 min, and *Bacillus atropheus* and *Bacillus stearothermophilus* were in 20 min, respectively.

1. 緒 言

滅菌とは対象物からすべての微生物を殺滅し無菌状態にすることである。その方法¹⁾には、高温蒸気滅菌、高温乾熱滅菌、ガス滅菌及び放射線滅菌が知られている。高温蒸気滅菌法は、2気圧、121℃で20分間処理する方法で、金属やガラスの滅菌、またレトルト食品の製造などに用いられている。しかし、湿熱に耐えられない材料には適さない欠点がある。高温乾熱滅菌法は、180℃で1時

間処理する方法で、ガラス、金属、針、粉末などの滅菌に用いられるが、耐熱性の低い材料には適さず、また長時間要する欠点がある。ガス滅菌は、エチレンオキシドガス (EOガス) が用いられ、低温で処理されるため、プラスチックやゴム、また複雑な器具や装置の滅菌に適している。しかし、このガスはヒトに対して毒性^{2) 3)}が強く、発ガン性があるとともに、環境中への排出が規制されている物質である。放射線滅菌は低温処理のため、熱に弱い材質に適応可能であるが、大型の装置が必要である。このように多くの滅菌方法があるが、それぞれ長所と短所があり、それぞれの材質に合わせて使用されている。

一方、新しい低温滅菌法の一つとして過酸化水素低温

*1 山梨大学医学工学総合研究部

*2 ヤマトラボテック(株)

*3 上智大学理工学部化学科

プラズマ滅菌法¹⁾がある。これは、1980年代に開発されたもので、過酸化水素と低温プラズマを用い、真空チャンパー内で減圧・バッチ方式で滅菌するものであり、日本では1994年に厚生省の許可を受けてから、EOガス滅菌の代替法として普及してきている。しかし、この滅菌法は過酸化水素を用いたガス滅菌の一種で、このガスにより微生物を滅菌させ、プラズマにより残存する過酸化水素の分解促進を図るもので、実質的にはプラズマ滅菌とは言えない。すなわち、プラズマ滅菌²⁾とは処理ガス自体に微生物不活化作用がなく、プラズマ化したときに初めて微生物不活化作用を有し、微生物を死滅させることであるからである。

上智大学の小駒ら³⁾は、大気圧下でもヘリウムやアルゴンといった希ガスを用いて誘電体層を隔てた間欠放電を行えば安定的にプラズマが発生することが見いだした。そこで、今回この技術を基礎として、人体に安全なガスを用いたプラズマ滅菌装置を開発し、これを用いて各種の微生物の滅菌評価を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1 大気圧プラズマ滅菌装置

滅菌装置の外観を図1に示す。大きさは1300×700×940mmで、上面にプラズマ滅菌部(図2)、自動搬送装置(ストローク800mm、可変最大1mm/s~300mm/s)(図3)及び操作パネルが配置してある。図4は滅菌部の模式図及びそのシステム系を示す。高周波電源により最大1kW、工業用周波数(27.12MHz)の電力を供給し、ヘリウムを満たした放電空間にプラズマを生成する。電極は内部に冷却水チャネルを設けたアルミニウム製ブロック(サイズ:幅150、奥行き50、厚さ20mm)であり、20℃の冷却水によって一定温度に保たれている。上下の電極表面は絶縁体(誘電体)で覆われている。この材質は、透明石英ガラス(サイズ:幅230、奥行き115、厚さ3mm)である。誘電体は絶縁破壊によるアーク放電発生を防いでいる他、誘電体バリアー放電プラズマの非平衡励起に重要な役割を果たしている。石英ガラスの間の放電空間は、幅3mmである。放電空間の周囲は耐熱ガラス及びセラファンで囲まれ、電極間にはヘリウムガスと酸素の混合気体が電極間に導入されている。放電空間の背面にある、φ1mmの小穴10個を有するノズルよりヘリウム等のガスを空間内部に導入し、空間全面に設けた同様な小穴よりガスが排出される。導入ガス量は、マスフローコントローラーにより1mL~5L/minの間で制御されている。



図1 装置の全体図

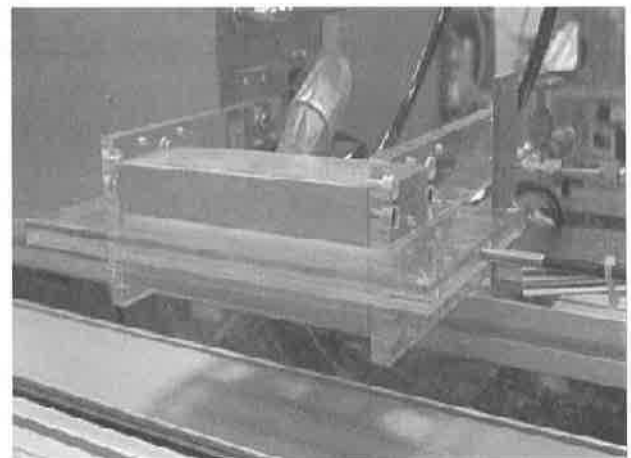


図2 プラズマ滅菌部位(プラズマ発光中)

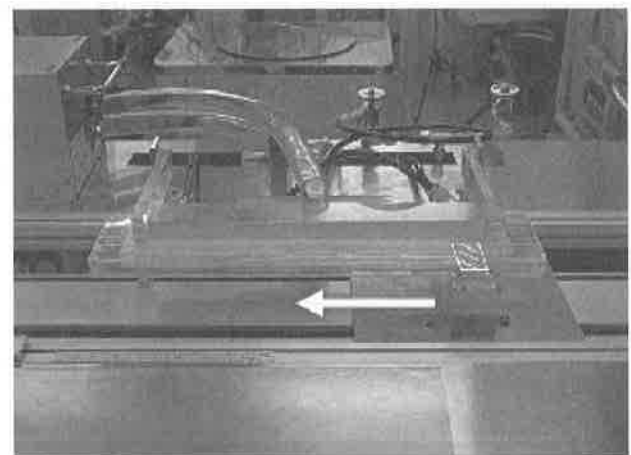


図3 被滅菌物の搬送状況(可動式)

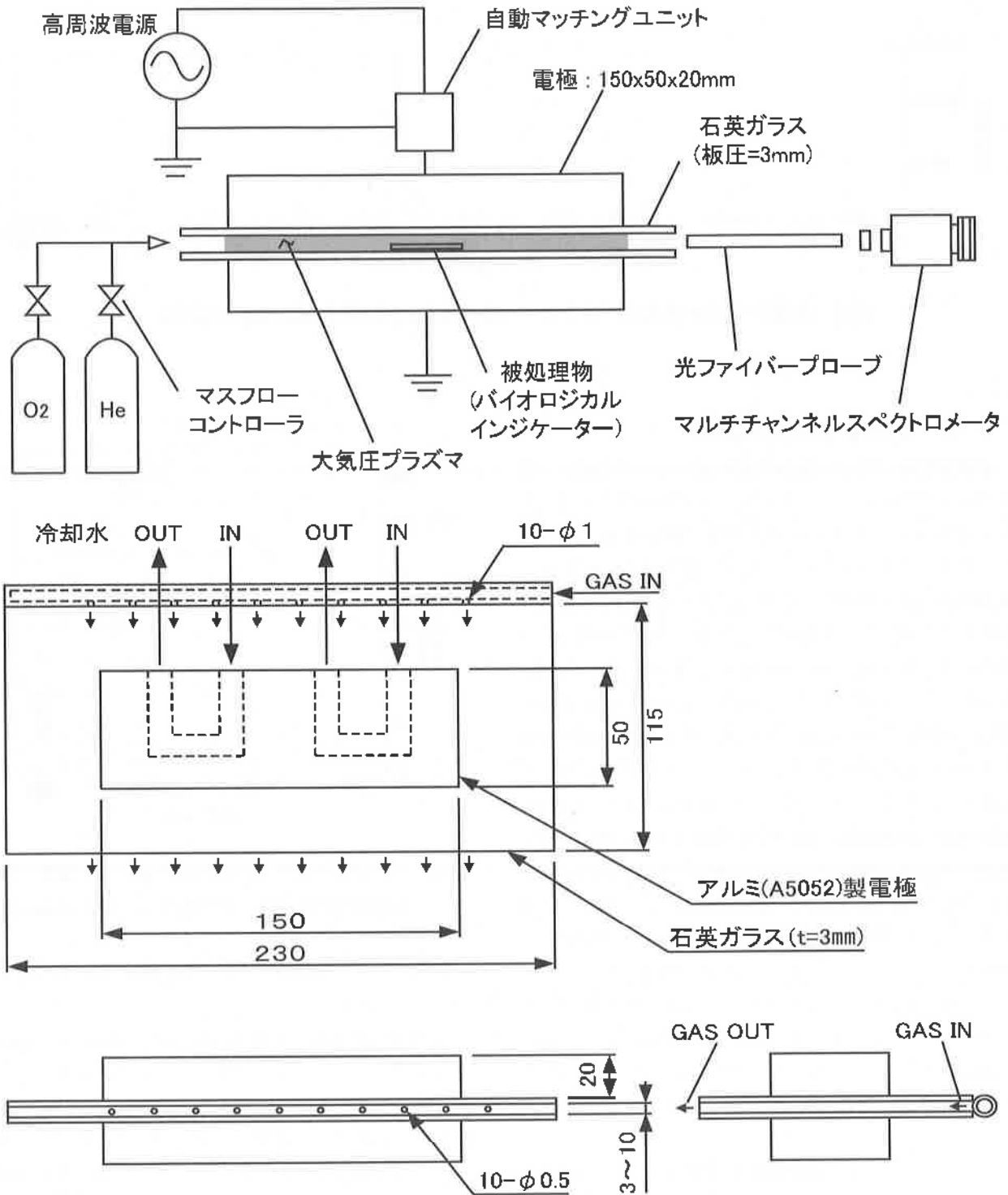


図4 プラズマ滅菌部位の模式図

2-2 プラズマ内の温度測定

大気圧プラズマ内の温度は、大気圧プラズマ中に安立計器の蛍光式光ファイバ温度計FL-2000のセンサーを直接挿入して測定した。この温度計は、蛍光緩和時間の計測という手法を採用している。光ファイバ先端に極薄の蛍光物質を接着し、これに光ファイバを通して閃光をあてると、蛍光輝度の減衰が温度に応じて大きく変化するという原理を利用した装置であり、電界や磁界の影

響を受けずに温度を測定することができる。

2-3 酸素ラジカル発光スペクトルの観測

酸素ラジカル発光スペクトルの観測には、TVC製マルチスペクトロメータMonoSpec18と、SBIG製CCDカメラシステムST-6V(焦点距離156mm)を用いた。プローブは石英ガラス間の大気圧プラズマの側方に設置した。なお、下記の図5に777nm付近に出現する酸素ラジカル発光スペクトルを示した。

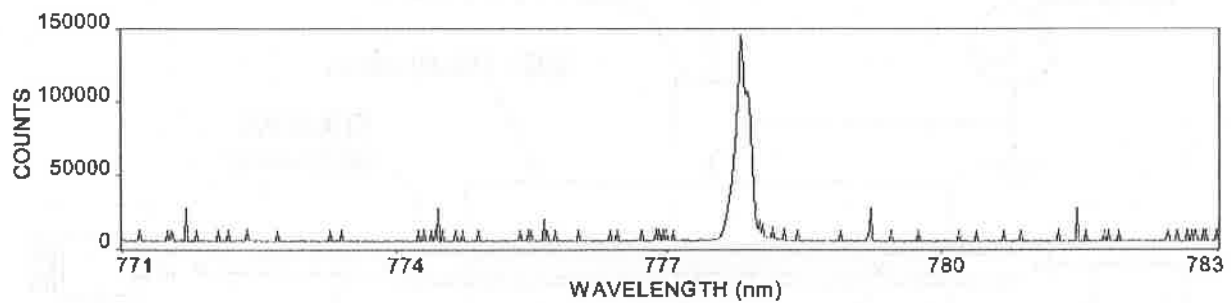


図5 酸素ラジカル発光スペクトル (He:1.5 L/min, O₂:1 mL/min の場合)

2-4 滅菌用微生物試料の調製

各種微生物に対する滅菌効果を調べるための試料を以下のように作製した。すなわち、各種微生物をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCD培地, ベクトン・ディッキンソン社製) で2回培養後、その0.01mLをSCD寒天培地に塗抹して培養し、さらにその1白金耳を蒸留水に懸濁して、約10⁶CFUとなるように乾熱滅菌したカバーガラス (18×18×0.15mm) に塗抹・乾燥させた。その後、このカバーガラスを滅菌パウチ (商品名Tyvek) (PET:0.06mmとPE不織布:0.15mmでそれぞれの側面が構成されている包装材料, 以下タイベック包材と記す) で密封した。選択した微生物は、*Escherichia coli* ATCC8739, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Candida albicans* ATCC10231及び芽胞菌の*Bacillus atrophaeus* ATCC9372, *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953の6種類を用いた。微生物の培養と無菌判定は、日本薬局法⁷⁾に準拠して行った。すなわち、プラズマ処理したカバーガラスをTyvek包材から取り出し、100mLの滅菌SCD培地 (三角フラスコ) に入れ、*B. stearothermophilus*は55~60℃、*C. albicans*は25℃、その他の微生物は30~35℃で、それぞれ7日間培養後、培地の濁度を見て無菌状態を判定した。

3. 結果及び考察

3-1 各種パルス照射・停止条件における出力と温度との関係

周波数27.12MHz、He:1.5L/min及び電極間距離3mmにおける各種パルス照射・停止条件下における出力とプラズマ温度との関係を図6に示した。その結果、いずれのパルス照射・停止条件においても出力が増加するに伴い、温度が上昇した。また、同じ出力下では、パルス照射時間が短いほど、また停止時間が長いほど、プラズマ温度は低下していた。なお、プラズマが電極間に安定的に発生する領域は、点線より上の部分であった。

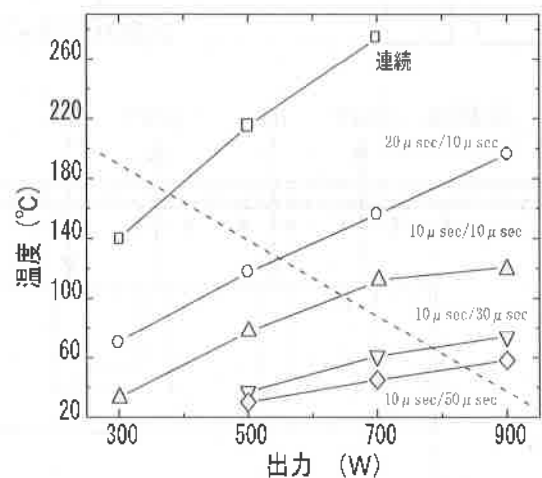


図6 各種パルス条件下での出力とプラズマ温度の関係 (電極間距離3mm, 27.12MHz, He:1.5L/min)

3-2 パルス照射・停止が同時間におけるプラズマ温度

周波数27.12MHz、出力670W、He:1.5L/min及び電極間距離3mmにおけるパルス照射・停止を同時間とした場合のプラズマ温度を図7に示した。その結果、パルス同時時間が15μsecまでは急激なプラズマ温度の上昇が見られたが、その後はパルス時間が増加しても顕著な温度上昇は見られなかった。なお、今回の微生物滅菌実験では、耐熱性の高い芽胞菌を短時間で滅菌することを目的として、パルス条件は10μsec照射、10μsec停止を採用した。この時のプラズマ内温度は図7から90℃であった。

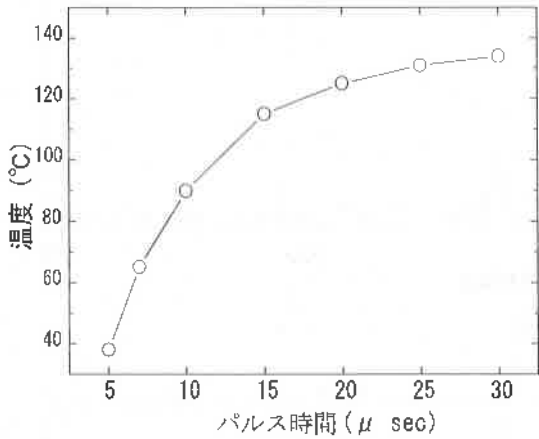


図7 パルス時間（照射及び停止が同時間）とプラズマ温度との関係

3-3 ヘリウムに対する酸素の混合率が酸素ラジカル発光強度に及ぼす影響

本大気圧プラズマ滅菌装置は、ヘリウムでプラズマを発生させ、この中に酸素を混入して酸素ラジカルを発生させるが、ヘリウムに対する酸素混合率が酸素ラジカル発光強度に及ぼす影響を図8に示した。その結果、酸素混合率が0.06% ($O_2/He=0.001/1.5(L/min)$) のところに最大強度が存在し、これ以下及びこれ以上の混合率では発光強度が低下していく傾向であった。なお、酸素混合率が1% ($O_2/He=0.015/1.5(L/min)$) ではオゾン臭が感じられた。

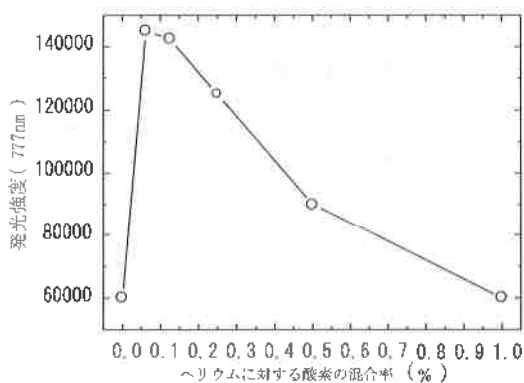


図8 ヘリウムに対する酸素混合率と発光強度（ヘリウム流量：1.5L/min）

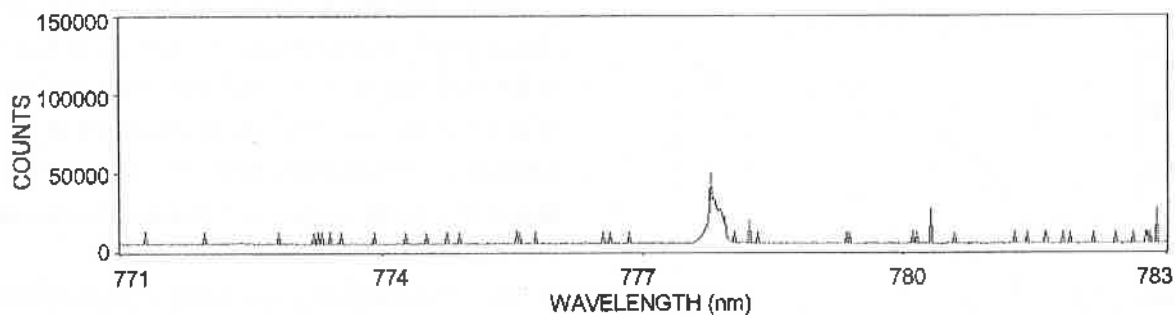
3-4 ヘリウムに対する酸素の混合率が黄色ブドウ球菌の滅菌に及ぼす影響

ヘリウムに対する酸素混合率が酸素ラジカルの発生量に影響を及ぼすことが認められた。そこで、酸素ラジカ

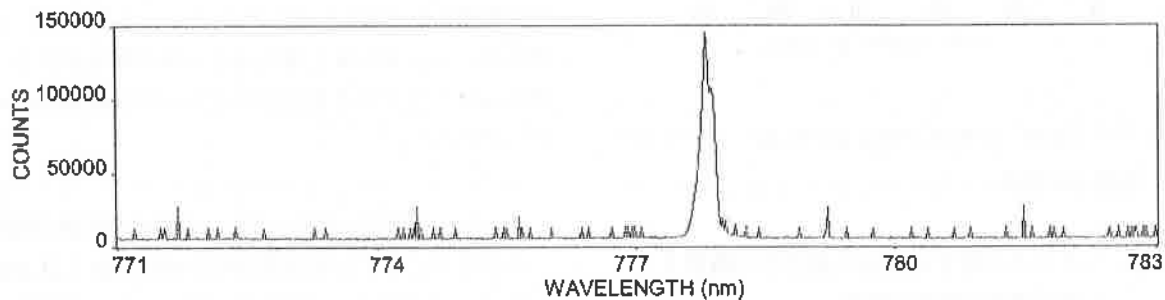
ル発生量と微生物滅菌の関係を明らかにするために、酸素混合率が0, 0.06及び0.25%の3条件で、黄色ブドウ球菌の滅菌評価を行った。それぞれの条件下における発光強度を図9に示したが、0.06%区が最も強く、次に0.25%区で、0%区が最も低かった。なお、0%区でも酸素ラジカルが発生するのは、空気中に含まれる酸素の影響と思われる。

つぎに上記の各条件において黄色ブドウ球菌を経時的に殺菌した結果を表1に示したが、0.06%区が最も早く3分で死滅し、次に0.25%区の4分、0%区では4分でも死滅していなかった。すなわち、これらのことから、酸素ラジカル発生量と滅菌速度に相関関係があることが認められ、ラジカル発生量が大きいほど滅菌効果の高いことがわかる。

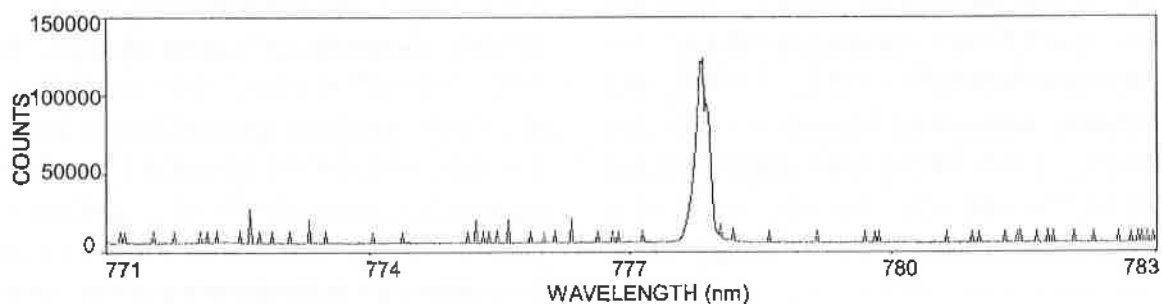
3-5 不織布包材で包装した各種非芽胞菌の滅菌評価
ヘリウムに対する酸素混合率0.06% ($He\ 1.5L/min$ 、 $O_2\ 1ml/min$) の条件で、不織布包材で包装した各種微生物を滅菌した結果を表2に示した。対照として電極内が90℃となることから、90℃の加熱処理区も設定した。その結果、*Escherichia coli*と*Candida albicans*は、加熱処理(90℃)1分では生残するが、プラズマ処理では1分で死滅していた。*Salmonella enteritidis*は加熱5分でも生残していたが、プラズマでは1分で死滅していた。さらに*Staphylococcus aureus*は耐熱性が強く、加熱15分でも死滅しないが、プラズマ処理では5分で死滅していた。このように菌種により死滅時間は異なるものの、プラズマ処理の方が、加熱処理よりも滅菌時間が短かった。



(A) 0%



(B) 0.06%



(C) 0.25%

図9 ヘリウムに対する酸素混合率と酸素ラジカル発生強度の関係

表1 *Staphylococcus aureus* の滅菌に及ぼすヘリウムに対する酸素混合率の影響

He に対する O ₂ 混合率 (%)	He 流量 (L/min)	O ₂ 流量 (ml/min)	処理時間 (分)			
			1	2	3	4
(A) 0	1.5	0	+	+	+	+
(B) 0.06	1.5	1	+	+	-	-
(C) 0.25	1.5	3.8	+	+	+	-

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし、

** 実験条件：出力 670W、高周波数 27.12MHz、電極間距離 3mm、パルス；駆動 10 μ sec、停止 10 μ sec
電極内温度 90 $^{\circ}$ C

***：カバーガラスに *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (1.3 \times 10⁸CFU) を塗抹・乾燥させたものを処理した。

表2 不織布包材で包装した各種微生物の滅菌評価

菌種 (菌数)	プラズマ処理 (min)					加熱処理 (90°C) (min)				
	1	3	5	10	15	1	3	5	10	15
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739 (1.6×10^7)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (3.5×10^7)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 (4.7×10^7)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> ATCC10231 (5.1×10^6)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし、

** 出力 670W, 高周波数 27.12MHz, 電極間距離 3mm, パルス; 駆動 10 μ sec, 停止 10 μ sec.

3-6 不織布包材で包装した *Bacillus atrophaeus* の菌数別の滅菌評価

芽胞菌である *Bacillus atrophaeus* の菌数別の滅菌評価を表3に示した。その結果、プラズマ処理により約 10^7 CFUでは20分でも生残していたが、約 10^5 CFUでは20分及び $10^4 \sim 10$ CFUでは5分で滅菌されていた。すなわち、菌数が少なくなるほど滅菌時間が短縮されることがわかる。なお、90°Cの加熱処理では、20分処理してもいずれの菌数の試験区でも死滅していなかった。

3-7 不織布包材で包装した *Bacillus stearothermophilus* の菌数別の滅菌評価

芽胞菌である *Bacillus stearothermophilus* の菌数別の滅菌評価を表4に示した。その結果、プラズマ処理により約 10^5 CFUでは20分及び $10^4 \sim 10$ CFUでは5分で滅菌されていた。すなわち、*Bacillus atrophaeus*と同様に、菌数が少なくなるほど滅菌時間が短縮されることがわかる。なお、この菌においても90°Cの加熱処理では、20分でもいずれの菌数の試験区も死滅していなかった。

表3 不織布包材で包装した *B. atrophaeus* ATCC9372 の菌数別の滅菌評価

<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC9372 の菌数 (CFU)		処理時間 (分)			
		5	10	20	20(90°C)
1)	1.1×10^7	+	+	+	+
2)	5.4×10^5	+	+	-	+
3)	2.7×10^4	-	-	-	+
4)	1.4×10^3	-	-	-	+
5)	6.8×10	-	-	-	+

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし、

** 出力 670W, 高周波数 27.12MHz, 電極間距離 3mm, パルス; 駆動 10 μ sec, 停止 10 μ sec

*** O₂/He:0.06% (He 1.5L/min, O₂ 1ml/min)

表4 不織布包材で包装した *B. stearothermophilus* ATCC7953 の菌数別の滅菌評価

<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 の菌数(CFU)		処理時間 (分)			
		5	10	20	20(90°C)
1)	6.6×10^5	+	+	-	+
2)	3.3×10^4	-	-	-	+
3)	1.6×10^3	-	-	-	+
4)	8.2×10	-	-	-	+

* +; 菌増殖 -; 菌増殖なし、

** 出力 670W, 高周波数 27.12MHz, 電極間距離 3mm, パルス; 駆動 10 μ sec, 停止 10 μ sec

*** O₂/He:0.06% (He 1.5L/min, O₂ 1ml/min)

4. 考 察

医療、包装、食品及び厨房などの領域・現場において、滅菌や殺菌は非常に重要な技術である。その方法には、乾熱、湿熱（オートクレーブ）、エチレンオキシドガス、紫外線及び放射線による滅菌・殺菌¹⁾²⁾やアルコール、アルデヒド、次亜塩素酸ナトリウムなど各種薬剤による殺菌、消毒³⁾がある。通常、これらの手法を組み合わせ、微生物を死滅させる操作を施しているが、新たな滅菌・殺菌技術が要望されている。その新技術の一つとしてプラズマ技術が注目されている。プラズマ⁴⁾とは、第4の物質状態とよばれ、正と負の荷電粒子と中性粒子が混在し、全体的にはほぼ中性の集団であるが、このプラズマ内でヒトに安全なガスを励起し、これによって微生物の滅菌・殺菌を行うものである。現在、プラズマ滅菌技術は、多くの研究^{5)~10)}が行われ、プラズマ励起周波数では高周波（13.56MHz）やマイクロ波（2.45GHz）、反応圧力では減圧や大気圧、反応性ガスでは水素、ヘリウム、アルゴン、酸素、窒素などを用いての検討が行われている段階で、実用化には至っていない。

今回われわれは、ヒトに安全で、環境に放出しても安全なヘリウムと酸素ガスを使用して、酸素ラジカルによって微生物を滅菌・殺菌させる大気圧プラズマ滅菌装置を開発した。しかも本装置は、通常のプラズマ装置では、減圧下で行うことが多いために真空チャンバーが必要であるが、大気圧下で行うことから真空設備が不要で、さらに連続的に滅菌が可能な構造となっている。

はじめに本装置を用いて、出力670W、周波数27.12MHz、パルス条件10 μ sec照射で10 μ sec停止、電極間距離3mmに設定して、酸素ラジカル発生量を、ヘリウムと酸素の混合比率から検討したところ、酸素/ヘリウムの比率が0.06%、すなわちヘリウム：1.5L/min、酸素：1 mL/minの時に最大となった。そこで、酸素ラジカル発生量と微生物滅菌速度について、黄色ブドウ球菌を指標に検討したところ、酸素ラジカル発生量が最大の時に、滅菌時間が最も短いという結果が得られた。すなわち、微生物の滅菌速度には酸素ラジカル発生量が深く関与していることがわかった。

また、本装置で、酸素ラジカル発生量が最大である酸素/ヘリウムが0.06%の条件で、不織布包材で包装した各種微生物を滅菌したところ、*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* 及び *Candida albicans*, は1分、*Staphylococcus aureus*は5分及び*Bacillus subtilis*と*Bacillus stearothermophilus*は20分で死滅していた。すなわち、包装した状態でも短時間に滅菌できることがわかった。

今回開発した大気圧プラズマ滅菌装置は、電極幅が3mmのため、被滅菌物がプラスチック、布、紙などの薄膜が限られるが、使用した電源の周波数、出力、パルス条件

などを替えることで、温度を上げることなく、電極幅を広げられる可能性がある。また、プラズマ技術¹¹⁾は、素材の表面改質や高分子への接着力の供与などに利用される可能性があり、本装置が連続的に処理できる点は大きな優位性を持つものと思われる。

5. 結 言

ヒトに安全で、環境にやさしい大気圧プラズマ滅菌装置を開発し、各種微生物の滅菌評価を行った。

- 1) 本装置は、安全なヘリウムと酸素ガスを使用して酸素ラジカルを発生させ、真空チャンバーが要らない大気圧下で滅菌するものである。また、可動式のため連続滅菌が可能な構造となっている。
- 2) 酸素ラジカルの発生量は、ヘリウムと酸素の混合比率で決定され、酸素/ヘリウムが0.06%（ヘリウム：1.5L/min、酸素：1 mL/min）の時に最大となり、黄色ブドウ球菌を指標とした時に滅菌時間が最も短かった。
- 3) 本装置で、不織布包材で包装した各種微生物を滅菌したところ、*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* 及び *Candida albicans*, は1分、*Staphylococcus aureus*は5分及び*Bacillus subtilis*と*Bacillus stearothermophilus*は20分で死滅していた。

本研究は、文部科学省の独創的革新技术開発研究提案公募制度事業の一環として実施した。

文 献

- 1) 矢野郁也, 内山竹彦, 熊沢義雄編：病原微生物学, 東京化学同人, p51 (2002)
- 2) 新太喜治, 永井勲, 大久保憲, 三宅寿美著：改訂三版 滅菌・消毒ハンドブック, メディカ出版, p20 (2002)
- 3) 佐々木次雄, 中村晃忠, 三瀬勝利編著：滅菌法及び微生物殺滅法, 日本規格協会, p215 (1998)
- 4) 玉澤かほる：防菌防黴, 32, 13 (2004)
- 5) 小駒益弘：プラズマ・核融合学会誌, 79 (10), 1000 (2003)
- 6) S. Kanazawa, M. Kogoma, T. Moriwaki and S. Okazaki：Proc. Japan Symp. Plasma Chemistry, 3, 1839, Tokyo(1987)
- 7) 第14改正日本薬局方解説書 1, 廣川書店, pB-628 (2001)
- 8) 都築正和監修：殺菌・消毒マニュアル, 医歯薬出版, p6 (1999)
- 9) 玉澤かほる, 塚田甲, 堀内博：日歯保誌, 39 (2), 482 (1996)

- 10) M. Laroussi:IEEE Transacation on Plasma Science, 24 (3) ,1188 (1996)
- 11) T. C. Montie, K. K-Wintetenberg and J. R. Roth:IEEE Transacation on Plasma Science, 28 (1) ,41 (2000)
- 12) M. Laroussi, I. Alexeff and W. L. Kang:IEEE Transacation on Plasma Science, 28 (1) ,184 (2000)
- 13) D. Purevdorj, N. Igura, M. Shimoda, O. Ariyada and I. Hayakawa:Acta Biotechnol. ,21 , 333 (2001)
- 14) N. Philip, B. Saoudi, M. C. Crevier, M. Moisan, J. Barbeau and J. Pelletier:IEEE Transacation on Plasma Science ,30 (4) ,1429 (2002)
- 15) D. Purevdorj, N. Igura, O. Ariyada and I. Hayakawa:Letter in Applied Microbiology ,37 , 31 (2003)
- 16) S. Villeger, S. Cousty, A. Ricard and M. Sixou:J. Phys. D: Appl. Phys , 36 , L60 (2003)