



解説

プラズマを用いた医療用滅菌器開発の現状

Current Trend of Medical Sterilization and Disinfection Methods Using Plasmas

板良 敷朝将¹⁾, 大城 盛作²⁾, 作道 章一³⁾, 林 信哉⁴⁾

ITARASHIKI Tomomasa¹⁾, OHSHIRO Seisaku²⁾, SAKUDO Akikazu³⁾ and HAYASHI Nobuya⁴⁾

¹⁾サラヤ株式会社 商品開発本部 商品開発部, ²⁾株式会社サクラクレパス PI 事業部,

³⁾琉球大学医学部保健学科生体代謝学分野, ⁴⁾九州大学大学院総合理工学研究院

(原稿受付: 2015年6月3日)

プラズマの医療・バイオ応用研究は、医療分野における治療、器材や施設の滅菌・殺菌など多岐にわたって広がっている。特に従来より研究が行われてきたプラズマ滅菌法は、現在実用化のための開発研究が行われている。本解説ではプラズマ滅菌法に残された課題である、滅菌処理の高速化、プラズマ滅菌工程の確認のためのプロセスインジケータの開発、病原性タンパク質への対応を取り上げ、プラズマ滅菌法実用化に向けた研究の現状を紹介する。

Keywords:

medical sterilization, microwave plasma, NO radical, plasma chemical indicator, radical detection, prion protein, plasma disinfection

1. はじめに

この十数年発展してきたプラズマの医療・バイオ応用研究は、医療分野では治療から医療器材や施設の滅菌・殺菌まで、基礎医学分野では動物細胞の変異抑制やがん細胞のアポトーシス誘導等の分子生物学と多岐にわたって研究開発が行われており、各分野の最前線まで到達しつつある。医療・バイオ応用の第0世代または第1世代と呼ばれるプラズマを用いた滅菌法は、近年国内外各所で研究開発が進み、いずれも所定の滅菌を達成しつつありようやく実用化が視野に入ってきた。一方で、実際の医療の現場にプラズマ滅菌法を導入するにあたっては、滅菌処理の高速化や病原性を有する非生物物質への対応、滅菌工程を確認するためのデバイスの開発が必須または重要な要求事項であり、これらの課題を解決しない限りはプラズマ滅菌法の実用化は不可能である。本解説では、これらの問題点を解決する最先端の技術について紹介する。まず滅菌処理時間の短縮が可能となる次世代のプラズマ滅菌器であるマイクロ波プラズマ滅菌器について解説する。また、非生物であるものの高い感染能と難分解性を持ち狂牛病の原因物質とされ注目されているプリオンタンパク質に対するプラズマ滅菌法の有効性について説明する。さらに、医療用滅菌器の運用に際して必須であるプラズマ滅菌プロセスを保証しエンドポイントを決定するためのプロセスインジケータを紹介する。

2. マイクロ波プラズマにより生成された NO ラジカルの滅菌効果

2.1 はじめに

これまで、酸化エチレンガス (ethylene oxide gas, EOG) や過酸化水素が残留すると、悪影響の生じるおそれがあることが報告されている。医療施設における滅菌処理は、低温下で、かつ環境に負担をかけることなく、高い安全性と低コストで実施することが望まれている[1]。これまでの報告の中には、酸素、アルゴン、ヘリウム、またはこれらの混合物を用いたプラズマ滅菌法に関するものもあるが、大気中の空気を用いたプラズマ滅菌に関する詳細な研究はされていない。また、マイクロ波プラズマによる、芽胞の不活性化の研究報告もあるが、真空チャンバー内の芽胞の減少に関する報告はない[2-10]。本研究では、空気プラズマで生成した酸素ラジカルにより滅菌を行い、また高い安全性を確保しつつ、環境負荷の低い装置開発を目的とした。この滅菌法は、低温であり、かつ従来の滅菌法(非耐熱性医療機器向けの、EOG滅菌法および過酸化水素ガス滅菌法)に代わり得るものである。また、化学薬品や滅菌ガスを使用しないため、低コストである。高圧蒸気滅菌法などと比較した場合においても、空気を用いたマイクロ波プラズマによる滅菌法は非常に優位である。プラズマ生成部においてマイクロ波エネルギーが吸収され、マイクロ波プラズマが生成される。このプラズマにより、大量の熱を発生させたり密度を高めたりすることなく、限られた領域において高エネルギーを生成することができる。また、低温下において、高エネルギーの活性種は滅菌に適している。本研究では、マイクロ波プラズマによる低温滅菌に最

適な条件を決定した。

2.2 実験手順

本実験のプラズマ源では、マイクロ波トーチプラズマを生成した(図1)。空中放電によって生じる、高密度のラジカルを得るためである。実験装置は、マイクロ波電源、導波管、アンテナおよびガラス管、真空チャンバー、および真空ポンプで構成されている。マイクロ波電源の周波数は2.45 GHzである。アンテナ内に内径5 mmのガラス管を設置した。このアンテナには、約6 cmのスリットを設けた(マイクロ波の半波長に相当)。導波管内に設置されたアンテナによってマイクロ波が吸収され、アンテナ内に設置されたガラス管内でプラズマは生成される。生成されたプラズマは、処理領域内に送られる。滅菌の評価には芽胞であるバイオロジカルインジケータ(BI)を使用する。BIは、トーチの開口端の3 cm下に設置した。使用した真空チャンバーの容量は約17.5 Lである。トーチの開口端からプラズマが放出し、その電子密度をラングミュアプローブ(直径1 mm, 長さ4 mmの円筒電極付き)で測定した。真空チャンバー内の圧力が数 Pa になるまで減圧し、その後、真空チャンバー内の圧力が数百 Pa になるまでプラズマ生成用ガスを流入し、芽胞に作用する。原子および高エネルギー電子との衝突によって生成されたラジカルとの化学反応により、芽胞は死滅する。また、高エネルギー電子による励起原子から放出された紫外線が、この芽胞のDNAを損傷する[11]。さらに、荷電粒子(電子、イオンなど)がこの芽胞に直接衝突し、これを死滅させる。以上のように、滅菌とは存在するすべての細菌を全滅させる方法である。菌の数を10分の1に減少させるのに要した時間をD値という。このD値を求めるうえで本実験に使用したBIは納豆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)である。またBIは、滅菌の有効性の評価に用いる。滅菌の評価に使用されるBIには、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス(*Geobacillus Stearothermophilus*) ATCC7953という耐熱性細菌胞子が含まれている。この方法は、滅菌後に細菌胞子を培養し、それが絶滅したかチェックするうえで標準的な方法である。

2.3 ラジカルの生成

準安定性の窒素原子 $N(^2D)$ は、放電領域で生成される。窒素原子 $N(^2D)$ は寿命が長いので、その間にトーチからチャンバー内に送られる。トーチ開口端の7 mm下の位

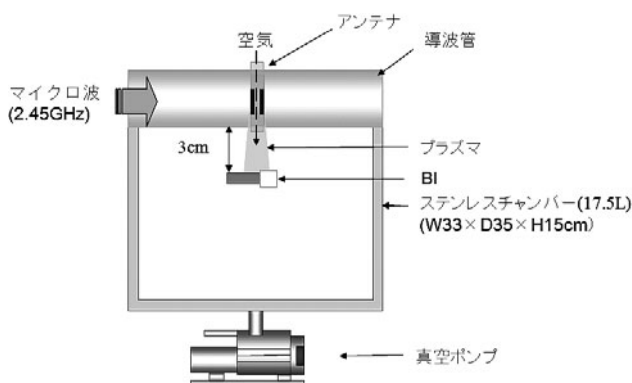


図1 マイクロ波トーチプラズマ装置概略図。

置における電子密度は、ラングミュア探針の検出限界の 10^5 cm^{-3} 未満である。この結果から、黄色い発光源は、準安定性の窒素原子 $N(^2D)$ と酸素原子との化合によってトーチの外側に生成されたNOラジカルであることがわかる。発光強度は滅菌能力に比例すると考えられるため、圧力とマイクロ波入力電力とを定めることにより、真空チャンバー内の発光スペクトルを測定した(図2)。発光スペクトルは400~800 nmの範囲で測定され、マイクロ波電力の上昇と共にピークも高くなっている。このピークは、空気と窒素プラズマとによるスペクトルのピークとはまったく異なる。マイクロ波電力を上げた場合、ピークの波長に変化はないが(図2)、ジュール加熱によってマイクロ波アンテナの温度が上昇する。各種の窒素酸化物を調べるうえで、 N_2 と O_2 との混合比を変えても(1:9~9:1)、スペクトルの形状が大きく変わることはない。このことから、前述のピークの広がり、各種の窒素酸化物の重ね合わせに起因するものではないことがわかる。また、マイクロ波電力が上昇しても、ピーク形状はほとんど変わらない。つまり、スペクトルの広がり、黒体放射によるものではなく、準安定的な圧力効果から生じるものと考えられる(この効果とは、比較的高圧の領域において隣接する粒子が動くことでエネルギーレベルが変化した結果として起こる、発光周波数の変化である)。その後、プラズマの温度が上昇する。したがって、測定されたスペクトルは、黒体放射から生じたものではない。ガラス管内のガスの発光スペクトルは、真空チャンバー内の下部領域と同様であった。したがって、真空チャンバー内のラジカルは、ガラス管内のプラズマ生成領域の近くで生成されたものである[12]。ラングミュアプローブの電極は、処理領域のうち高密度のエネルギー粒子が吹き出すガラス管の開口端の付近に設置した。ラングミュアプローブのI-V特性にイオン電流は観測されず、アンテナで生成された荷電粒子はガラス管内で消失し、ラジカルだけが処理領域に到達するものと考えられる。窒素と酸素の混合比を変えた場合、570 nmにおけるブロードピークの高さは、1:1の混合比で最大となる(図3)。したがって、プラズマからの黄色の発光は長寿命のNOラジカルによるものと考えられる。ラジカル検出用のケミカルインジケータ(ストリップタイプ)を用

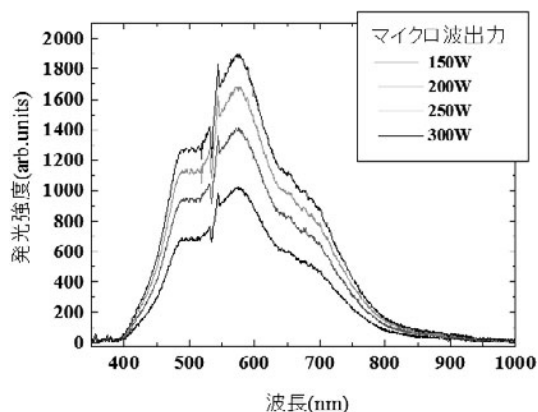


図2 マイクロ波電力変化と発光スペクトル。

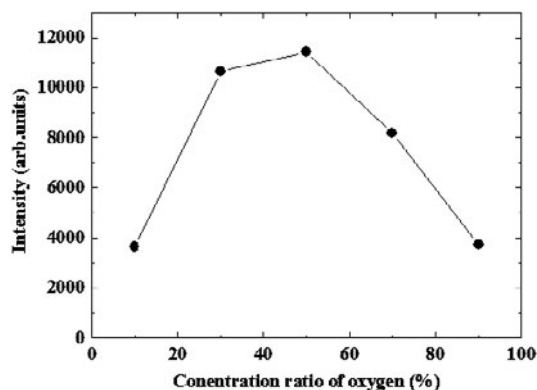


図3 マイクロ波プラズマの発光強度の酸素分圧依存性.

いると色が変わることから、処理領域で生成された NO ラジカルは O (酸素) ラジカルよりも高いエネルギーを有することが分かる。この色が変わる速度は、酸素を用いた RF プラズマの場合よりもはるかに速い。それゆえ、マイクロ波放電によって生成された高密度の NO ラジカルは、滅菌における因子の一つである。

2.4 滅菌特性

滅菌に要する時間を明らかにするため、D 値を求めた。本実験に用いる BI (納豆菌) は自作した。菌数が 10^4 cfu/g の納豆菌をガラスメッシュフィルター上に載せたものである。この BI は、トーチの開口端の 3 cm 下に設置した。所定の時間だけこの BI にプラズマを照射した後、滅菌の性能を確認するために残った芽胞の数を測定した。この測定にはコロニーカウント法を用いた。また、再現性をチェックするため、同じ測定を 4 回繰り返した。以上による結果を図 4 に示す。芽胞数は、10 分間で 10 分の 1 に減少した。しかし、100 分の 1 に減少させるには 1 時間を要した。これは、芽胞同士が互いに重なり合っているため、ラジカルが達しにくかったためと推測される。これを確認するには、滅菌処理の後、芽胞の消滅状態を顕微鏡で観察するなど、更なる状態確認が必要である。

低温滅菌を実現するには、プラズマ生成の要素 (圧力、マイクロ波電力など) を制御する必要がある。圧力やマイクロ波電力が増加すると、滅菌対象の温度も上昇しやすくなる。滅菌対象物の温度を 60°C 以下に保つため、マイクロ波電力を 280 W に、チャンバー内の圧力を 60 Pa 以下に設定した。この条件下で生成されたプラズマは、チャンバー内全体を均一に広がる。チャンバー内の温度は、ストリップタイプのインジケータで測定した。本実験で用いた BI は、ジオパチルス・ステアロサーモフィルス ATCC7953 であり、菌数が 3×10^6 cfu/g 含まれている。この種の BI は、医療現場において滅菌の確認するために使用されている。この BI をトーチの開口端の 3 cm 下に設置した。実験後、BI を培養液に加え、培養液の色が変化しない場合は、滅菌に成功したことを意味する。滅菌実験結果を表 1 に示す。チャンバー内の温度 60°C 以下において、チャンバー内の圧力 60 Pa、マイクロ波電力 280 W の条件下では、BI が滅菌状態に達するのに 6 時間を要した。

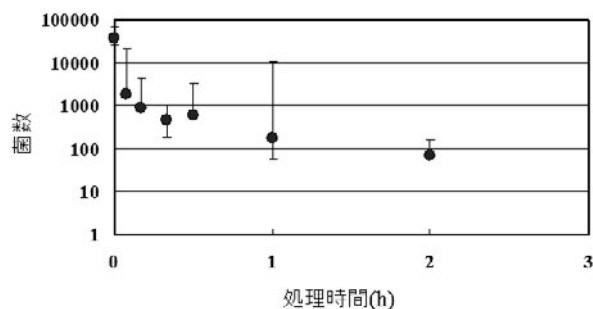


図4 生残菌数 (納豆菌芽胞) のプラズマ照射時間依存性.

表1 滅菌容器の容積と滅菌結果との関係。○印は滅菌成功を示す。

処理時間(分)	17.5 L	0.1 L
180	×	×
360	×	○
720	×	-

2.5 まとめ

本研究により、マイクロ波プラズマは滅菌 D 値が 10 分程度と高速滅菌に有効であることが明らかになった。一方で、重なり合った芽胞の処理や処理体積の大体積化に関しては、今後解決すべき課題である。マイクロ波プラズマは歯科医向けのような小型滅菌器として利用できることが考えられる。

3. 反応性プラズマ計測用ケミカルインジケータの開発

3.1 ケミカルインジケータ (Chemical Indicator, CI)

CI は、医療現場における医療器具類の再利用や医療器具製造の際に行われる滅菌工程において使用されるツールであり、滅菌器内の処理条件 (たとえば、時間、温度、飽和蒸気、湿度、EOG 濃度、蒸気過酸化水素濃度、吸収線量など) が規定値に達したことをモニタリングするために使用される。モニタリング結果は CI に設けられた検知部の色相変化や有色のインジケータバーの伸長などの形状変化によって示され、作業者が目視で容易に識別可能なように設計されている。

低温滅菌法として近年普及している過酸化水素ガスプラズマ滅菌用の CI に関しては、2013 年に作成された CI に関する JIS 規格 T 11140-1 では、過酸化水素ガス滅菌用 CI の一種として記載されており、検知すべき重要変数の項目をみても「適用可能な場合はプラズマ」として、副次的に記載されている。そのため現在市販されている過酸化水素ガスプラズマ滅菌用 CI は過酸化水素ガス滅菌用 CI と共用であり、例としてサクラクレパス社のネスコス[®]I・C カード ap, J&J 社フォーシユア[™] などがある。一方、市販されていないが、過酸化水素ガスプラズマ由来のラジカルを重要変数として検知可能な CI の開発例もある。

3.2 ラジカル検知用 CI の開発

過酸化水素ガスプラズマ滅菌器の滅菌プロセスは、減圧下過酸化水素水を注入、気化・拡散した後に再度減圧して高周波を印加することでプラズマ状態にしてサイクルが終了する。通常はこのサイクルを 2 回繰り返して滅菌が完了

する。開発品 CI は、過酸化水素蒸気では変色せず、プラズマ工程を経て初めて変色することを目標とした。

開発品 CI は基材にポリエチレンテレフタレートを使用し、検知部はラジカルと反応して変色する赤色アゾ系色素とラジカルに耐久性のある緑色色素を利用したものである[13]。赤色色素の反応性を図 5 に示す。赤色色素のアセトン溶液に過酸化水素水を添加しても吸光度に変化は見られない。また 254 nm の紫外線を照射しただけでも同様に変化は見られないが、過酸化水素水を添加して 254 nm の紫外線を照射し、ラジカル発生条件にした場合には吸光度が低下することがわかる。また、変色触媒を添加することで吸光度がさらに低下することから、触媒添加量によって変色性能をコントロール可能であることもわかる。

内容積 1 L のセパラブルフラスコを用いて、過酸化水素蒸気の暴露試験を行った結果、開発品 CI は J&J 製 STERRAD[®]50 の過酸化水素拡散濃度の 2 倍にあたる 72 μL/L (58%過酸化水素水使用) であっても全く変色しなかった。チャンパー容積 8.8 L の平行平板高周波プラズマ装置を用いて過酸化水素ガスプラズマ処理した際の開発品 CI の変色性を図 6 に示す[14]。図の縦軸は処理前後の変色色差 ΔE*ab であり、数字が大きいくほど処理前後の色相変化が大きいことを示している。この図から開発品 CI は使用する過酸化水素水の濃度が高いほど色相変化が小さいことがわかる。図は省略するが、流量・時間を一定として出力を変化させた時の過酸化水素水と水を用いたプラズマの発光分析を行い、778 nm にある OH・の発光強度を比較した結果、過酸化水素ガスプラズマのほうが OH・の発光強度が少ないことを確認した[14]。水の O-H 結合よりも、過

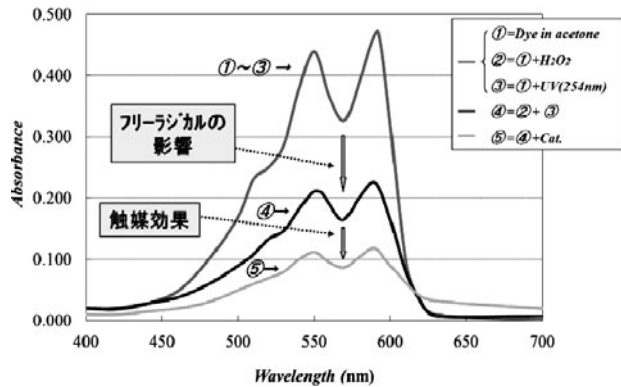


図 5 ラジカルによる色素の吸光度変化。

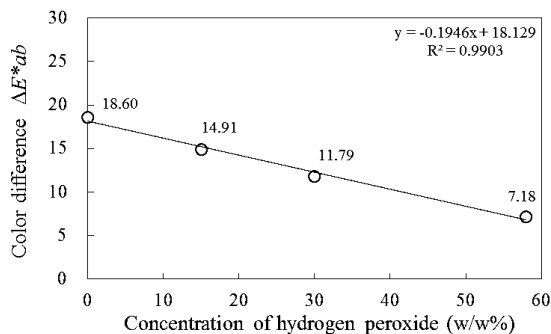


図 6 過酸化水素濃度と15分プラズマ処理した時の PCI の変色色差の関係。[14]から引用。

酸化水素の O-O 結合のほうが解離しにくいためであると考えられる。

3.3 ラジカル検知用 CI による滅菌工程の解析

開発品 CI のラジカル検知性能を利用して、過酸化水素ガスプラズマ滅菌工程におけるラジカルの寄与を検討した。過酸化水素蒸気および過酸化水素ガスプラズマ由来のラジカルの侵入具合をチューブの径と長さで調整可能なポリプロピレン製密閉容器 (図 7) 内に開発品 CI と BI を入れて STERRAD[®]50 で滅菌した。

チューブの径と長さを変化させた時の各 CI の色相変化と BI の死滅を調査した結果をまとめたものが図 8 である。BI 陰性で開発品 CI が変色している領域が図中の①の部分であり、この領域では過酸化水素ガスプラズマ由来のラジカルによる菌の殺滅が起こりうると考えられる。一方、BI 陰性であるが、開発品 CI が変色していない②の領域は、菌の死滅が過酸化水素蒸気の拡散状況のみに依存している領域であると考えられる。

3.4 滅菌以外のプラズマ処理への応用

前項の過酸化水素ガスプラズマ由来のラジカルを検知できる開発品 CI は、過酸化水素蒸気と水蒸気以外に酸素、窒素ガスプラズマでも変色することが確認されている。そこで、滅菌保証プログラムにおいて CI で行われている滅菌工程モニタリングと類似の工程管理手法を、半導体製造技術、高分子の表面改質などの分野で広く応用されている低温プラズマの診断に応用する試みがなされている[15, 16]。この反応性プラズマ計測用のケミカルインジケータをサクラクレバス社は Plasma Indicator[®]あるいは Plasma Chemical Indicator[®] (PCI) と名付け、実用化を進めている。

リモート式マイクロ波プラズマ装置を用いて、初期減圧 0.9 Torr、酸素ガス流量 1,000 sccm および 500 sccm、出力 1.0 kW および 0.5 kW、処理時間 1~10 分間でプラズマ処理した時のポリエチレン板のエッチング量 (重量減) と同時

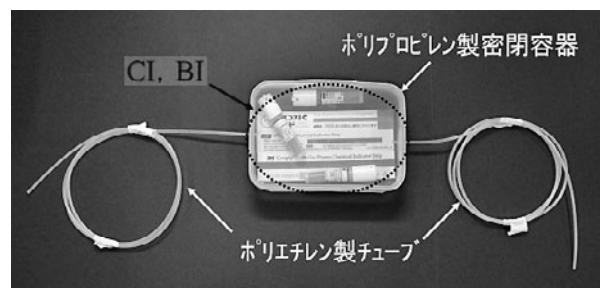


図 7 実験に使用した容器。

チューブ内径 (mm)	片側チューブ長さ(m)					
	0	0.25	0.5	1	2	3
0.5	BI: 陰性 ②	BI: 陽性				H ₂ O ₂ 蒸気による菌の死滅領域
1		H ₂ O ₂ ラジカルによる滅菌領域 ①			②	
3	H ₂ O ₂ ラジカルによる滅菌領域 ①		② 菌の死滅が、H ₂ O ₂ 蒸気に依存しているので、濃度バラッキにより結果が変動する。			
5						

図 8 ラジカル検知用 CI による滅菌工程の解析結果。

に処理した PCI の変色色差の相関性を図 9 に、ポリエチレン板に対する水の接触角測定結果と PCI の変色色差の相関性を図 10 に示す。図 9 から PCI の変色色差がエッチング量と相関関係にあることが確認できる。ポリエチレン板のエッチング量は、ラジカル濃度と処理時間の積算量を反映していると考えられることから、PCI の色相変化も主にプラズマ処理で被処理物に作用するラジカル濃度と処理時間の積算量に関する情報を反映していると考えられる。図 10 からは、PCI の変色色差がポリエチレン板に対する水の接触角とも相関関係にあることが確認できる。水の接触角は酸素プラズマ処理の表面改質効果によってポリエチレン板表面に導入された親水性官能基の量を反映していると考えられ、PCI の色相変化はこの表面改質効果を見積もることができるといえる。

実装部品やプリント配線板のクリーニング処理に用いられることの多い酸素プラズマの検知に特化して感度調整した PCI と g 線レジストを塗布したシリコンウエハ片を同時処理した時の、レジストエッチング量（干渉式膜厚計による測定）と PCI の色相変化の相関性を図 11 に示す。プラズ

マ処理は、酸素ガス流量 10 sccm および 20 sccm, RF 出力 75 W, 圧力 10 Pa, 処理時間 3 ~ 10 分間の条件で、平行平板高周波プラズマ処理装置を用いて行った。図より、エッチング量と変色色差 ΔE^*_{ab} が直線関係にあることがわかる。すなわち、このような検量線を作成しておけば、インジケータの色差測定からプラズマ処理によるエッチング量を容易に精度よく見積もることが可能となる。

3.5 無機色材を用いた PCI

以上は過酸化水素ガスプラズマ滅菌用に開発された CI の改良品であり、アゾ系色素、すなわち有機色素を用いたラジカル検知用インジケータの改良品であった。しかし、エレクトロニクス業界で利用されているプラズマ処理においては、低放出ガス、高温プロセスおよび高プラズマ密度への対応が必須であり、これらの要求には有機色素では対応が困難であった。そこで、ラジカルを検知可能な無機色材が開発された [17, 18]。この無機色材は酸素、四フッ化炭素などのフルオロカーボン、六フッ化硫黄、水素ガスのプラズマなどラジカルを生成するものだけでなく、アルゴンガスプラズマのようにイオンが主体のプラズマに暴露しても色相が変化する。

平行平板高周波プラズマ処理装置の円盤電極上に中心から周辺にかけて 5 箇所は無機色材を用いたインジケータを設置し、その位置に対応した空間の電子密度をラングミュアプローブで測定した結果を図 12 に示す。プラズマ処理は

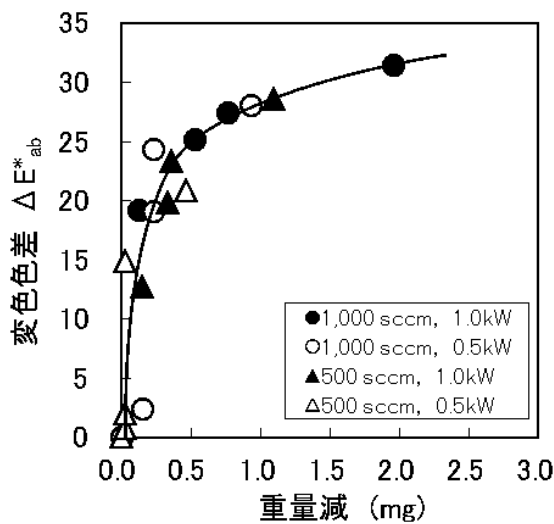


図 9 ポリエチレン板のエッチング量と PCI 変色色差の関係。

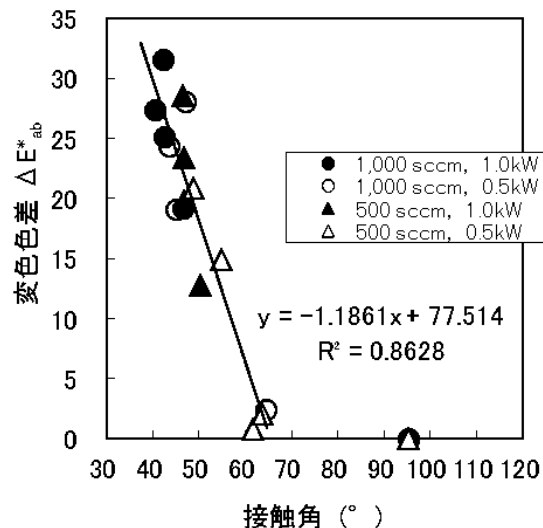


図 10 ポリエチレン板に対する水の接触角と PCI 変色色差の関係。

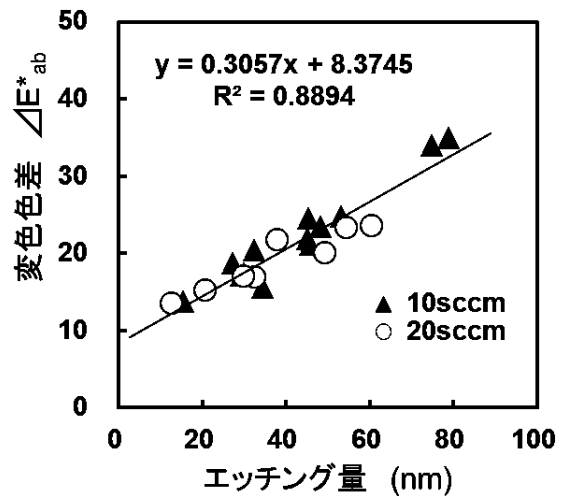


図 11 g 線レジストのエッチング量と PCI 変色色差の関係。

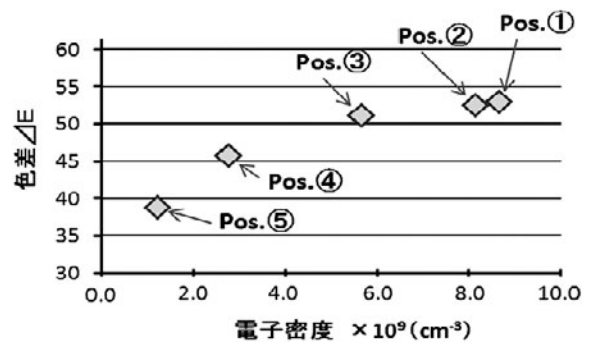


図 12 アルゴンプラズマの電子密度と無機色材 PCI の変色色差の関係。Pos. ①は中心、Pos. ⑤は周縁部。

アルゴンガス流量 160 sccm, 圧力 5.0 Pa, RF 出力 60 W, 処理時間 60 分間で行った。図より, 電子密度と無機色材の变色色差 ΔE^*_{ab} に相関性があるのがわかる。

3.6 今後の展開

CI は滅菌保証プログラムの重要な一要素であり, ラジカルを検知可能な CI である PCI の開発によりその工程管理手法をエレクトロニクス分野へ拡張する事が可能となった。ロジック回路, 各種方式のメモリー素子およびこれらを集積した LSI, CCD などの光学素子, LED などの発光素子, 電力制御用パワー半導体などの各種デバイスを製造する半導体製造前工程で用いられるプラズマ処理に対しては, ラジカルを検知可能な無機色材を用いたラベル型及びウエハ型の PCI が開発中である。

ワイヤーボンディングなどの回路接続と封止プロセスなどの後工程, 実装回路部品の表面処理, そしてこれらをプリント配線板に組み立てるプロセスで用いられるプラズマ処理においては無機色素タイプと有機色素タイプ PCI の選択肢があり, 後者についてはサクラクレパス社が販売を開始している (PLAZMARK[®] No.1)。エレクトロニクスに限らず幅広い分野において多用されている低温プラズマ処理効果を色相変化で簡便に確認するツールとして, 反応性プラズマの計測用インジケータの普及が期待される。

4. プリオン病対策としてのプラズマ技術

4.1 はじめに

近年, 滅菌技術としてのプラズマが注目されている。滅菌により達成される無菌保証レベル (SAL, Sterility assurance level) の定義には細菌芽胞が 10^{-6} 個以下になっていることとなされているように, 細菌芽胞への殺菌効果で, 処理技術の優劣が比較されている。しかし, プリオンと呼ばれる病原体は, 細菌芽胞よりも一般的な処理に対して抵抗性が高いとされており, 滅菌が達成されていても, プリオンは不活化できているとは限らない。本項では, プリオンとはどのような病原体で, プラズマ滅菌の技術開発においてどのような重要性をもつのかについて議論したい。

4.2 プリオンとは

プリオンはプリオン病と呼ばれる人獣共通の神経変性疾患を引き起こす病原体である。プリオン病は感染の他にも, 遺伝が原因で起こることがある。ヒトの場合は, 全体のプリオン病の 85~90% が原因不明の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD, sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease) であり, 100 万人に 1 人の割合で発生している。この sCJD のプリオンも含め, 全てのプリオン由来のプリオンは感染性を持つが, 遺伝性のものはやや感染性は低いことが知られている。感染が原因でプリオン病となった場合は医原性 CJD (iCJD, iatrogenic CJD) と呼ばれている。動物のプリオン病もあり, その代表例が狂牛病の名称で有名な牛の BSE (Bovine spongiform encephalopathy, 牛海綿状脳症) である。

1987 年に BSE (Bovine spongiform encephalopathy) の初めての報告がなされた [19]。1996 年には BSE 由来のヒトのプリオン病である変異型 CJD (vCJD, variant CJD) が報

告された [20]。vCJD は BSE 牛の肉を食べたことが原因と考えられており, 輸血による感染の可能性も指摘されている。現在のところ (2014 年 10 月現在), vCJD は全世界で 229 例, 日本では 1 例発生が報告されている [21]。この日本での患者は 1980 年から 1996 年の間に 24 日間英国に滞在しており, その際に感染したものと考えられている。最近, 英国人の虫垂を測定すると, 約 2000 人に 1 人という高い確率でプリオンが検出されたとの報告がなされた [22]。これを英国の人口比で換算すると約 3 万人もの未発症 vCJD がいると予測される。一般に vCJD 患者は, その他の CJD 患者に比べて若い (死亡時の年齢; vCJD: 28 歳; その他の CJD: 68 歳) とされている。しかし, パプアニューギニアの原住民フォア族において死者の脳を食べる習慣により発生したプリオン病 (クールー病) の場合, 40 年以上も後に発症した例も見られており, BSE 発生のピークの 1992 年から 20 年以上経過し BSE の発生もほとんど見られなくなった現在も楽観できない。推移を慎重に観察し, 適切な対策をたてる必要がある。

4.3 現行のプリオン不活化法

プリオン対策として欠かすことのできないのは, 病原因子 (プリオン) の不活化処理 (無害化) による二次感染防止である。特に, プリオン病のリスクの高い患者 (家族性プリオン病に関連するプリオン蛋白質遺伝子変異を持つ方や, プリオン病様の症状を示したり, 硬膜移植歴や下垂体ホルモン摂取歴のある方) 脳神経外科開頭手術, 整形外科脊髄手術, 眼科手術を行う時である。プリオンは, 一般的な滅菌操作では感染性を完全には失わない。例えば, 121°C, 20 分の高圧蒸気滅菌, 紫外線照射, γ 線照射, アルコール処理 (70% エタノール処理など) はプリオン不活化効果はない。これは, プリオン病原体は蛋白質を主要構成成分にもつ物質であり, 細菌やウイルスなどの核酸を遺伝子にもつものではないためである。このようなプリオン病原体の不活化困難性に加えて, プリオン病には生前診断法がなく治療法がないなどの問題を抱えている。したがって, プリオン汚染の可能性のある器具の使用時においては, 適切な処理を行うことが必要である。具体的には, ギ酸などの特定の酸や NaOH などの強アルカリおよび強い界面活性剤である SDS (Sodium dodecyl sulfate) で一定時間処理することや通常よりも高温 (134°C 以上) での高圧蒸気滅菌が必要となる (表 2)。

我が国で作成された「プリオン病感染予防ガイドライン 2008 年度版」では, 科学データに裏付けられた CJD プリオンの不活化方法として以下の方法が挙げられている [25]。①適切な洗剤による十分な洗浄 + SDS 処理 (3% SDS, 3~5 分処理), ②アルカリ洗剤ウォッシャー・ディスイنفクター処理 (80°C~93°C・3~10 分間の熱水による洗浄) + 真空脱気プリバキューム式高圧蒸気滅菌 134°C, 8~10 分, ③適切な洗剤による十分な洗浄 + 真空脱気プリバキューム式高圧蒸気滅菌 134°C, 18 分, ④アルカリ洗剤洗浄 (洗剤濃度や洗浄温度などの条件はメーカー指示に従う) + 過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌の 4 つである。

医療器具の中には, 熱に弱いものが多い。そのような内

表2 プリオンの不活化に有効な処理[23, 24].

不活化処理	代表的な文献
NaO CL (20000 ppm, 20℃, 1時間)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
NaOH (1 N, 20℃, 1時間)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
水に浸漬して高圧蒸気滅菌 (134℃, 18分)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
アルカリ洗剤 (1.6%, 43℃, 30分)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
フェノール系消毒剤 (5%, 20℃, 30分)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100℃, 10分	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
7 M 塩酸グアニジン, 室温, 2時間	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
3 M グアニジンチオシアネート, 室温, 2時間	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
3 M トリクロロ酢酸, 室温, 2時間	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
60%, ギ酸, 室温, 2時間	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
50%フェノール, 室温, 2時間	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
酵素洗剤 (0.8%, %, 43℃, 5分) + 過酸化水素ガスプラズマ滅菌 (1.5 mg/L, 25℃, 3時間)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
過酸化水素ガス (2 mg/L, 30℃, 3 サイクル)	G. Fichet <i>et al.</i> , Lancet 364, 521 (2004).
高周波ガスプラズマ	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
過酸化水素ガスプラズマ (Sterrad NX)	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
クロリン	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
銅 (0.5 mmol/L) + 過酸化水素 (100 mmol/L)	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
メタ過ヨウ素酸ナトリウム (0.01 M)	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
四級アンモニウム	J. Tateishi <i>et al.</i> , Microbiol. Immunol. 35, 163 (1991).
過酢酸 (1500 ppm, 20分; 0.2%, 1時間)	C. Vadrot and J.C. Darbord, J. Hosp. Infect., 64, 143 (2006); W.A. Rutala and D.J. Weber, Inf. Cont. Hosp. Epidemiol., 31, 107 (2010).

* 水に浸漬しないで高圧蒸気滅菌 (134℃, 18分) では不活化不十分 (乾燥させてしまうと, 不活化が困難になる)。

* 酵素洗剤 (0.8%, 43℃, 5分) + オートクレープ (121℃, 20分), 酵素洗剤 (0.8%, 43℃, 5分) のみ, 過酢酸 (0.25%, 55℃, 12分), 過酸化水素ガス (1.5 mg/L, 25℃, 3時間), 酵素洗剤 (0.8%, 43℃, 5分) + 過酸化水素ガス (1.5 mg/L, 25℃, 3時間) は不活化不十分。

視鏡などの器具に対しては, 上記ガイドライン④にあるように過酸化水素ガスプラズマ滅菌を組み合わせることが奨励されている。

4.4 プラズマをプリオン不活化法として開発する際に必要と思われること

ガスプラズマを用いた病原体の不活化研究のほとんどは過酸化水素ガスプラズマ滅菌装置を用いたものである。現在, ガスプラズマ滅菌装置として販売されているのは STERRAD® (Johnson & Johnson 株式会社) のみである。この装置を用いた研究では, プリオン[26]の他にも, HIV[27], A 型肝炎ウイルス[27], respiratory syncytial virus (RSV)[27], ワクチニアウイルス[25], Herpes simplex virus (HSV)[25], ポリオウイルス[27], アヒル B 型肝炎ウイルス[28], 細菌芽胞[29-31]などの不活化が報告されている。しかしながら, STERRAD®の滅菌メカニズムは過酸化水素ガスによるものが主で, ガスプラズマによるものでないと考えられている。この装置において, ガスプラズマは, 反応後に残った過酸化水素ガスを分解する目的に使われている。これに対して, 酸素, 窒素, 希ガス (アルゴンやヘリウム) などの気体自体は不活化効果を持たないもののガスプラズマを用いて病原体の不活化に成功した研究が報告されている (表3)。これらはガスプラズマによる不活化効果と考えられる。一方, プリオンの不活化に成功した論文は報告されていないが, 最近著者らは窒素ガスプラズマによりプリオンの不活化に成功している (未発表)。今後, ガス種, 圧力, 電力量, ガスプラズマ発生方式などを変化させ, 病原体の効率的な不活化条件を解

析するとともに, 病原体の不活化がどのようなメカニズムで起きているのかを明らかにしていく必要がある。そのためには, 発生している不活化因子を調べ, 処理後の病原体の構成成分の変化を生化学解析するなど, 異分野融合の研究推進が求められる。これらを通じて, 他の滅菌技術にないメリットがより明確になり, ガスプラズマ滅菌装置の実用化は達成されるものと期待される。

5. おわりに

現代医学の支えている滅菌技術は150年以上の研究開発の歴史があるが, その中でもプラズマ滅菌法は医療現場では革新的な方法として捉えられている。滅菌時間の短縮, 病原性非生物物質の不活化, 滅菌工程確認用デバイス開発に関しては, 既存の滅菌法においても継続的に研究開発が行われている。本解説で見たように, プラズマ滅菌法においてもこれらの課題が解決されつつあり, 製品化に向け一歩ずつ近づいている。近い将来, プラズマの医療応用のさきがけとしてプラズマ滅菌法が実用化されると期待される。

表3 病原体の抵抗性とプラズマによる不活化.

病原体の分類	病原体名	代表的なプラズマによる不活化効果を示す学術論文報告
プリオン	CJD, BSE, Scrapie	
細菌芽胞	<i>Geobacillus, Clostridium</i>	H. Shintani <i>et al.</i> , <i>Biocontrol Sci.</i> 12,131 (2007); N. Hayashi <i>et al.</i> , <i>Jpn. J. Appl. Phys.</i> 45, 8358 (2006).
原虫オーシスト	<i>Cryptosporidium</i>	J. Hayes <i>et al.</i> , <i>J. Microbiol. Methods.</i> 94, 325 (2013).
蠕虫卵	<i>Ascaris, Enterobius</i>	
マイコバクテリア	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
小型ノンエンベロープウイルス	Poliovirus, Parvovirus	
原虫シスト	<i>Giardia, Acanthamoeba</i>	
真菌胞子	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	H. Hashizume <i>et al.</i> , <i>Jpn. J. Appl. Phys.</i> 52, 056202 (2013); C. Pignata <i>et al.</i> , <i>J. Appl. Microbiol.</i> 116, 1137(2014).
グラム陰性細菌	<i>Pseudomonas, Escherichia</i>	A. Svetlana <i>et al.</i> , <i>J. Med. Microbiol.</i> 60, 75 (2011).
真菌栄養細胞	<i>Aspergillus, Candida</i>	P. Brun <i>et al.</i> , <i>PLoS One</i> 7, e33245 (2012).
蠕虫および原虫の栄養細胞	<i>Ascaris, Cryptosporidium</i>	J. Hayes <i>et al.</i> , <i>J. Microbiol. Methods</i> 94, 325 (2013).
大型ノンエンベロープウイルス	Adenovirus, Rotavirus	J. Zimmermann <i>et al.</i> , <i>J. Phys. D Appl. Phys.</i> 44, 505201 (2011).
グラム陽性細菌	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus</i>	K. Kawamura <i>et al.</i> , <i>Microbiol. Immunol.</i> 56, 431 (2012).
エンベロープウイルス	HIV, HBV, HSV	P. Brun <i>et al.</i> , <i>PLoS One</i> 7, e33245 (2012).

* 一般に抵抗性が高いとされているものほど、上の位置に記載している。

* 過酸化水素ガスプラズマ装置の報告は過酸化水素による不活化効果のものであるため、含めていない。

* 空欄は報告のないもの。

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease; BSE: Bovine spongiform encephalopathy; HIV: Human immunodeficiency virus; HBV: Hepatitis B virus; HSV: Herpes simplex virus

参考文献

- [1] J. Moreira *et al.*, *Appl. Surface Science*, **235**, 151-155 (2004).
- [2] N. Hayashi *et al.*, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 1302-1303 (2008).
- [3] K. Yoshino *et al.*, *Vacuum* **93**, 84 (2013).
- [4] H. Liu, J. Chen: *Applied Surface Science*, **254**, 1815-1821 (2008).
- [5] A. Bol'shakov *et al.*, *AIAA Journal* **42**, 823-832 (2004).
- [6] M. Nagatsu *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 211502 (2005).
- [7] M.K. Singh *et al.*, *New J. Phys.* **11**, 115027 (2009).
- [8] K. Stapelmann *et al.*, *J. Phys. D Appl. Phys.* **41**, 192005 (2008).
- [9] F. Rossi *et al.*, *New J. Phys.* **11**, 115017 (2009).
- [10] N. Hayashi *et al.*, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **39**, 2976 (2011).
- [11] M. Nagatsu *et al.*, *Appl. Phys.* **86**, 211502 (2005).
- [12] Y. Zhao *et al.*, *Appl. Phys.* **98**, 191501 (2011).
- [13] 山口範博ら: *医機学* **74**, 49 (2004).
- [14] S. Ohshiro *et al.*, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **26**, 533 (2013).
- [15] 大城盛作ら: 2012年度色材研究発表会講演要旨集, 20 A08.
- [16] 大城盛作ら: JIEP 関西ワークショップ2014要旨 No.8.
- [17] 山川 裕ら: 第75回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集, 08-084.
- [18] 菱川敬太ら: 第75回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集, 08-085.
- [19] G.A. Wells *et al.*, *Vet. Rec.* **121**, 419 (1987).
- [20] R.G. Will *et al.*, *Lancet* **347**, 921 (1996).
- [21] vCJD, Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Current Data (June 2014), <http://www.cjd.ed.ac.uk> (2014).
- [22] S. Brandner and Public Health England Press Office, <http://www.bmj.com/press-releases/2013/10/14/researchers-estimate-one-2000-people-uk-carry-variant-cjd-proteins> (2013).
- [23] 作道章一: *防菌防黴* **38**, 149 (2010).
- [24] 作道章一: *防菌防黴* **42**, 677 (2014).
- [25] 水澤英洋, 黒岩義之: 「プリオン病感染予防ガイドライン2008年度版 (厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業)」プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班, http://prion.umin.jp/guideline/cjd_2008all.pdf (2008)
- [26] G. Fichet *et al.*, *Lancet* **364**, 521 (2004).
- [27] C. Roberts and P. Antonoplos, *Am. J. Infect. Control* **26**, 94 (1998).
- [28] K. Vickery *et al.*, *J. Hosp. Infect.* **41**, 317 (1999).
- [29] S. Roth *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* **108**, 521 (2010).
- [30] Y.F. Hong *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 33 (2009).
- [31] J. Okpara-Hofmann *et al.*, *J. Hosp. Infect.* **59**, 280 (2005).



いたらしきともまさ
板良敷朝将

サラヤ株式会社商品開発本部ユニット長。1976年沖縄生まれ。

2013年より九州大学大学院総合理工学府博士課程に社会人ドクターとして在学。

主な専門は、動脈硬化測定、プラズマを用いた滅菌などの機器の研究・開発。最近ではプラズマの新たな利用方法を模索しています。



おおしろ せい さく
大城 盛作

(株)サクラクレパスPI (Plasma Indicator) 事業部課長。1972年大阪生まれ。近畿大学大学院工学研究科応用科学専攻1995年修了、金属表面処理メーカー・医薬品製造プラントメーカー勤務の後、近畿大学分子工学研究所を経て2003年(株)サクラクレパス入社、2015年より現職。可逆熱変色材料・インジケータ開発に従事、現在プラズマインジケータの企画・技術営業を担当。趣味は読書 (80年代SF)。



さく どう あき かず
作道 章一

琉球大学・医学部・准教授。2004年東京大学大学院にて博士(農学)を取得。大阪大学微生物病研究所特任研究員、助手、助教を経て、2009年より現職。主な研究分野は、

ウイルスやプリオン病原体の不活化法の開発、感染メカニズムと病原性発現機構の解明。最近では医学系学会よりも応用物理学系学会への参加が多くなっている。



はやし のぶ や
林 信哉

九州大学大学院総合理工学研究院・准教授、プラズマの新規応用に関する研究に従事(医療応用、農業応用、バイオ応用等)。加えて基礎実験も少々始めました。プラズマを巧く応用する鍵はプラズマの基礎知識量であることを痛感させられる日々です。