

【研究報告】

オゾンガス発生装置による室内殺菌試験

山村隼志, 櫻井美栄

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.10, No.4, 2-6. (2003)

研究報告

オゾンガス発生装置による室内殺菌試験

石川島播磨重工業株式会社 山村隼志 櫻井美栄

要旨 オゾンガスによる殺菌効果がホルムアルデヒドガスと同等ならば、ホルムアルデヒドガスより速やかに無害な酸素に分解できるオゾンガスは、処理後の手間がかからず有効である。今回、発生量を強化したオゾンガス発生装置を用いて室内殺菌試験を行ったので、その結果について報告する。

キーワード：オゾンガス、室内殺菌、Biological Indicator

1. 目的

病室などの室内殺菌やクリーンルーム・実験動物施設などの滅菌にはホルムアルデヒド(ホルマリン)がよく使用されている。ホルムアルデヒドガスは十分な殺菌効果を持つが、取り扱いに際して十分な注意が必要である。一方、オゾンは、速やかに分解させ無害な酸素に戻すことができるため、特に処理後の手間がほとんどかからない。オゾンガスが、クリーンルームなどの殺菌・滅菌に使用されているホルムアルデヒドの代替として認められるためには、ホルムアルデヒドと同等の殺菌効果が求められる。そこで今回、病院や製薬、食品工場など、微生物による汚染を防止する必要がある場所の殺菌、もしくは必要に応じて滅菌も可能な装置開発を視野に自社製のオゾンガス発生装置を用いて室内殺菌試験を行った。その結果について報告する。

2. 方法

2.1 オゾンガス発生装置

オゾンガス発生装置(石川島播磨重工業(株)製、HZ-20型)を用いた。オゾンガス発生量は2 g/hrである。

2.2 Biological Indicator (BI)

表1に示す指標菌を用いてBIを作成した。約 10^3 cfu/mlの菌希釈液1 mlを取り、滅菌水10 mlで希釈しながら担体のフィルター上に、ろ過法で塗布した。塗布後、乾燥させ一次包装した。

表1 使用 Biological Indicator (BI) について

目標初菌数	約 10^3 cfu/担体
指標菌	<i>Bacillus atropheus</i> ATCC 9372 *1 芽胞名前変更 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980 *2 芽胞 <i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708 <i>Aspergillus niger</i> NBRC 9455 胞子 <i>Penicillium chrysogenum</i> NBRC 4640 胞子
担体	親水性ポリビニリデンジフロライド (PVDF) (ミリポア製 φ47 mm、孔径 0.22 μm)
一次包装	BI用タイベック包装紙(レーベン社製 表:タイベック、裏:ポリエチレン) 菌塗布面がタイベック側になるように入れヒートシールした

*1: *Bacillus subtilis* ATCC 9372から名称が変更。

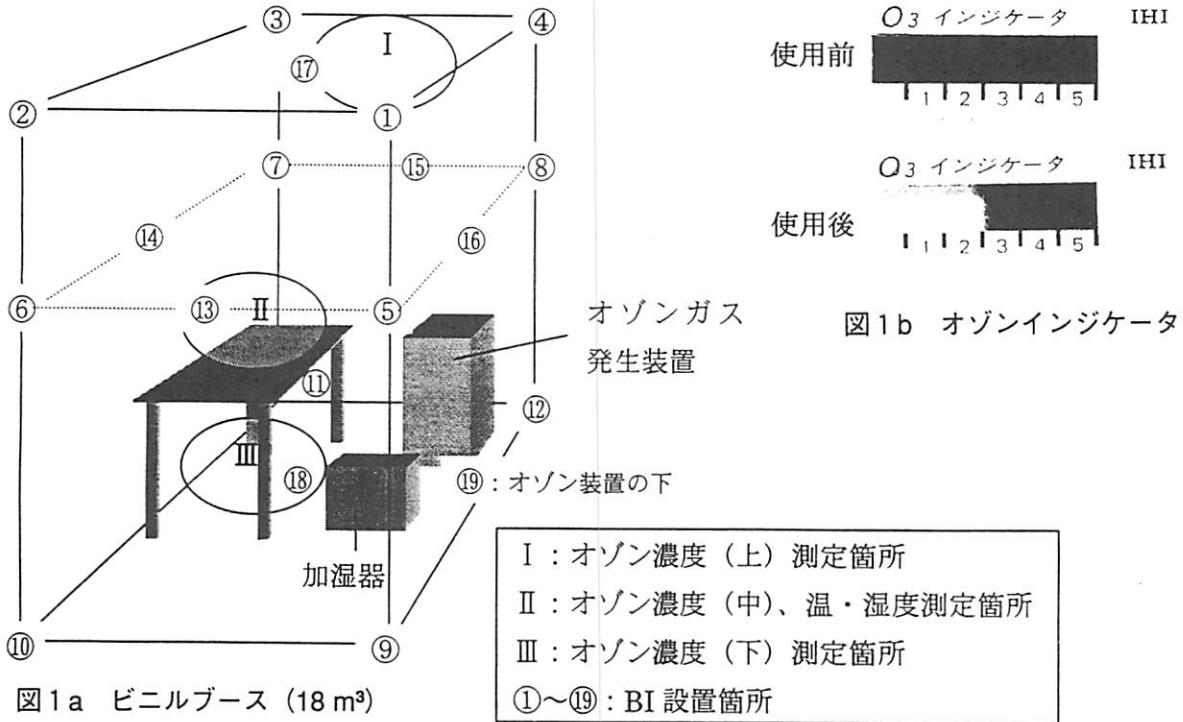
*2: *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980から名称が変更。

M. luteus は、プラスチック製の滅菌シャーレ(φ50 mm)にφ47 mmのろ紙を敷き滅菌水約1 mlを含ませ、その上にBIの菌塗布面を上にした状態で保管した。燻蒸試験当日に乾燥させて一次包装した。シャーレは蓋の周りにビニルテープを巻いて室温(約26℃)で保管した。

2.3 オゾンガス燻蒸試験

18 m³のビニルブース(図1 a)を製作し、その中にBIを設置し試験を行った。ビニルブース内の19箇所(①

～⑱)にBIをタイベック紙側がガスに曝されるように貼り付けた。その後、ブースに目張りをし、加湿器で相対湿度が約85%となるように加湿を行った。相対湿度が約85%に達した時点で加湿器を停止させ、オゾンガス発生装置の運転を開始した。装置は15時間(事前に行った予備試験の結果、オゾンガス発生時間は15時間以上必要であった)オゾンガスを発生させた後、分解工程に移るプログラム運転を行った。オゾンガス濃度はブース内の上、中、下部の3箇所を、荏原実業(株)製オゾンモニタEG2001でモニタリングした(図2、3、4)。また、石川島芝浦機械(株)製オゾンインジケータ(図1b)を用いてブースの隅々まで均一にオゾンガスが拡散しているかを確認した。



2.4 ホルムアルデヒドガス燻蒸試験

電化式カトウ消毒器E-Bを使用：2時間で水蒸気を発生させると同時に、メタノールを加熱し、白金の触媒に接触させることでホルムアルデヒドガスを発生させた。そのままさらに2時間燻蒸を続け、アンモニアで50分間中和を行った。ホルムアルデヒドの濃度はガステックの検知管(測定範囲8～6400 ppm)を用いて、ビニルブースの上部、中部、下部の3ヶ所の濃度を燻蒸開始から1時間ごとに測定した(表3)。オゾンガスの場合と同様、相対湿度を測定した。

2.5 BIの培養方法

燻蒸試験後、BIを取り出し寒天培地上で2日間培養した(表2)。それぞれ至適培養温度で培養後、フィルター上のコロニー数をカウントした。

表2 使用した培地と培養温度

	<i>B. atrophaeus</i>	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>
培地	SCD 培地			GP 培地	
培養温度	35℃	55℃	30℃	25℃	25℃

3. 結果

B. atrophaeus のBIを用いた予備試験において、初菌数が約 10^3 cfu の *B. atrophaeus* を完全に死滅させる条件を求めた。オゾンによる殺菌、滅菌には湿度が影響するため、初菌数約 10^3 cfu の *B. atrophaeus* を死滅させるのに相対湿度約80%となるようにブース内を加湿したのち、オゾンガス燻蒸を15時間以上行うことが必要であることが分かった。

3.1 オゾンガス燻蒸試験

15時間の燻蒸でオゾンガスは最大で140~160 ppmまで達し、CT値(濃度Cと時間Tの積)は92,800 ppm・min~108,800 ppm・minになった。この間、ブース内の相対湿度は80%以上に保たれていた。この条件では、*B. atrophaeus*、*M. luteus*、*A. niger*、*P. chrysogenum*は、図2~4に示す3回の試験において全ての箇所のBIは生菌数が0であった(表4)。しかし、*G. stearothermophilus*はほとんどの箇所で生き残っていた(表5)。

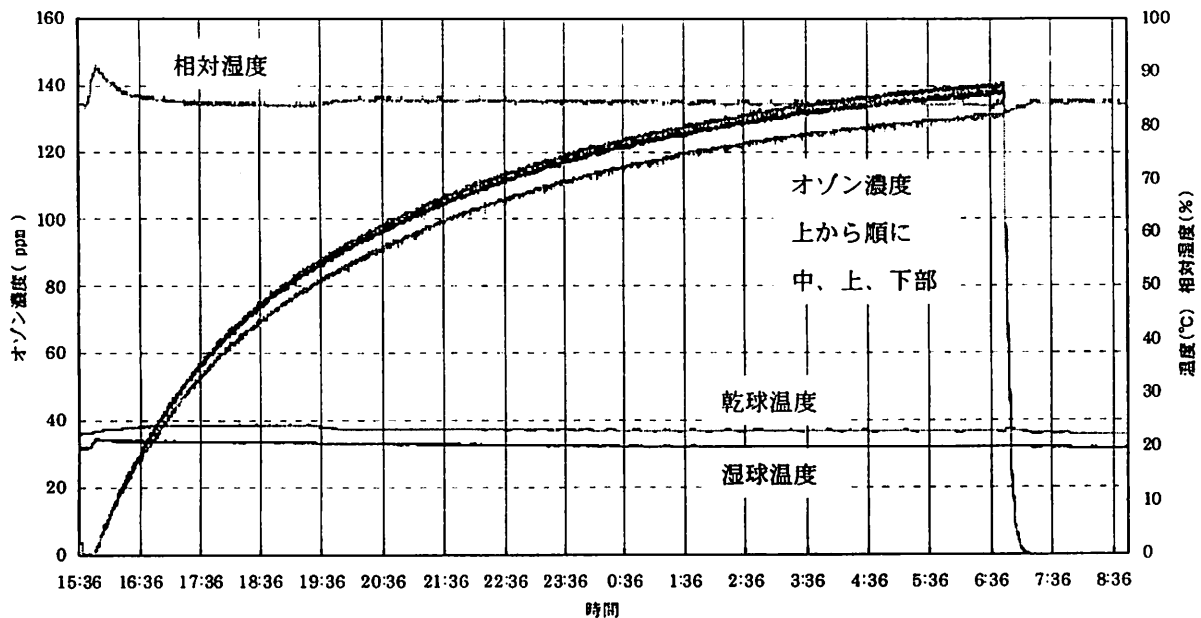


図2 オゾンガス濃度の変化(試験1回目)

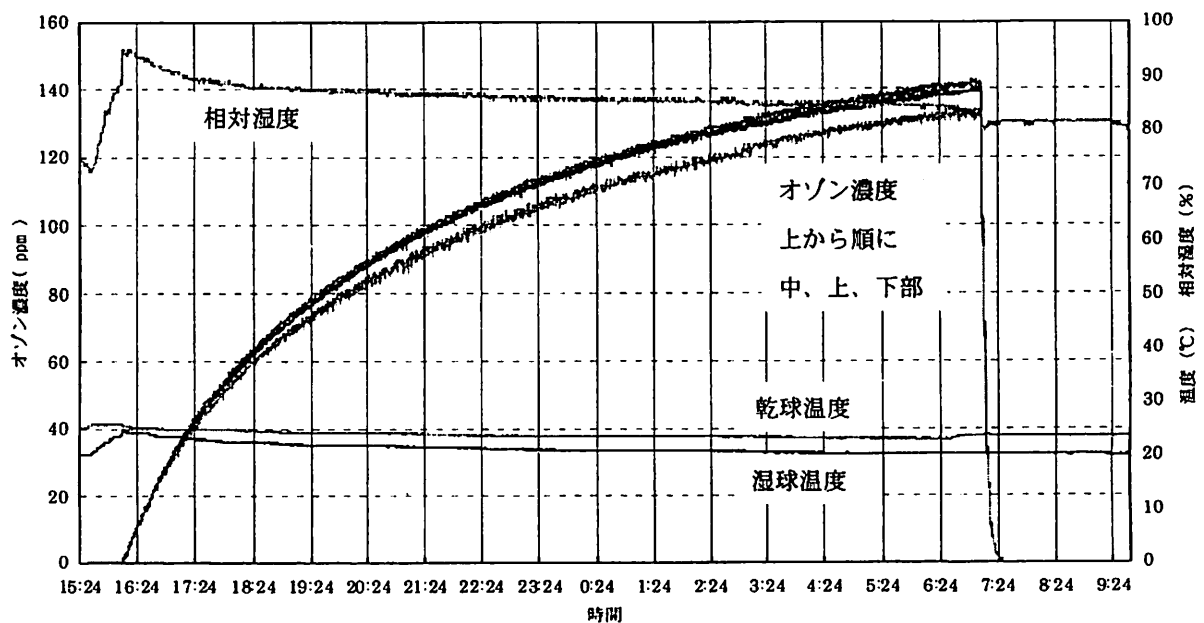


図3 オゾンガス濃度の変化(試験2回目)

3.2 ホルムアルデヒドガス燻蒸試験

ホルムアルデヒドガスで燻蒸を始めて4時間、ホルムアルデヒドガス濃度は3カ所とも200~500 ppmの濃度を保っていた。4時間経つとアンモニアによる中和で、ブース内のホルムアルデヒドガス濃度は0 ppmとなった(表3)。培養の結果BIは、*G. stearothermophilus*以外は全て生菌数が0であった。*G. stearothermophilus*のBIは全て、菌が全面に生えコロニー数をカウントできなかった(表4)。

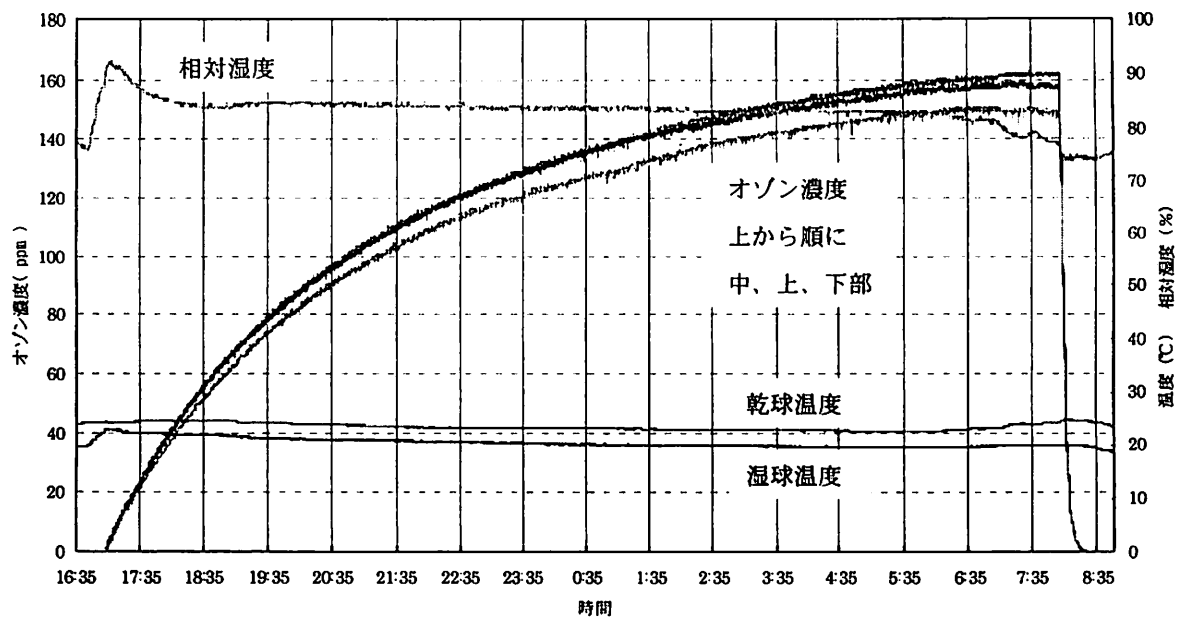


図4 オゾンガス濃度の変化 (試験3回目)

表3 ホルムアルデヒドガス濃度

濃度測定箇所	燻蒸を始めてからの経過時間			
	1時間後	2時間後	3時間後	4時間後
上部	200~500 ppm	200~500 ppm	200~500 ppm	0 ppm
中部	200~500 ppm	200~500 ppm	200~500 ppm	0 ppm
下部	200~500 ppm	200~500 ppm	200 ppm	0 ppm

3回の試験とも同様の濃度分布となった。

表4 ガス燻蒸処理後のBI培養結果 (試験は3回行った)

試験菌	初菌数 (cfu/担体)	生菌数 (cfu)		
		オゾン燻蒸後	ホルムアルデヒド燻蒸後	コントロール
<i>B. atrophaeus</i>	2.7×10^3	3回とも全箇所 0	3回とも全箇所 0	3回とも +++
<i>G. stearothermophilus</i>	2.3×10^3	表-5 参照	3回とも全箇所 +++	3回とも +++
<i>M. luteus</i>	1.8×10^3	3回とも全箇所 0	3回とも全箇所 0	3回とも +++
<i>A. niger</i>	1.1×10^3	3回とも全箇所 0	3回とも全箇所 0	3回とも +++
<i>P. chrysogenum</i>	3.2×10^3	3回とも全箇所 0	3回とも全箇所 0	3回とも +++

+++ : 菌が BI 全体に広がりコロニー数をカウントできなかったもの

表5 オゾンガス燻蒸した *G. stearothermophilus* の BI 培養結果

BI 設置箇所		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
生菌数 (cfu)	1回目	125	64	83	79	108	57	56	154	151	29
	2回目	101	+++	+++	0	3	110	27	2	0	10
	3回目	+++	+++	+++	3	43	+++	119	17	59	179
BI 設置箇所		⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	P.C.
生菌数 (cfu)	1回目	67	+++	173	11	116	116	+++	194	+++	+++
	2回目	0	1	19	38	0	16	189	+++	142	+++
	3回目	102	208	+++	+++	36	125	+++	377	+++	+++

+++ : 菌が BI 全体に広がりコロニー数をカウントできなかったもの

4. 考察

オゾンガスおよびホルムアルデヒドガスについてビニルブースを用いた室内殺菌試験を行った。試験の結果、空中浮遊菌などとして検出される *B. atrophaeus*、*M. luteus*、*A. niger*、*P. chrysogenum* について、約 10^3 cfu 程度の菌数に対して十分な殺菌効果が得られた。このことから、室(今回は 18 m^3 のビニルブースである)殺菌においてオゾンガスを用いても、ホルムアルデヒドと同等の殺菌効果が得られることが考えられる。通常の条件ではバイオバーデンとして *G. stearothermophilus* は検出されないが、*B. atrophaeus* は検出されることがある。しかし、*B. atrophaeus* が存在したとしても 10 cfu/m^3 以下程度である。本来滅菌を目的とするならばオゾンガス滅菌の場合の指標菌は *G. stearothermophilus* であるが、先に示したバイオバーデンの観点からオゾンガス燻蒸では *B. atrophaeus* 芽胞を指標菌として用いた場合、菌数を3桁減少させれば十分であることが考えられる。

また、今回の殺菌試験に使用したホルムアルデヒドガス燻蒸装置と比較した場合、オゾンガス燻蒸において *G. stearothermophilus* も生残菌数が0になる場合が認められた。オゾンガス殺菌では、温度と湿度が高いほど殺菌効果が上がることが分かっている。*G. stearothermophilus* については今回行ったオゾンガス殺菌試験では、試験3回目のオゾンガス濃度は最高で約 160 ppm に達しているが(図4)、1回目、2回目のBI培養結果に比べて、カウントできないほど生き残ったBIが多かった(表5)。相対湿度の微妙な差によって殺菌効果にばらつきがでたものと考えられる。このことから室内の温度、湿度等の条件を可能な限り最適に調節することができれば、*G. stearothermophilus* に対する殺菌効果を向上させることができることが考えられる。

今回のオゾンガスによる殺菌は、処理を終えた後のオゾン残留濃度を30分程で労働環境基準値の 0.1 ppm 以下にすることが可能であった。殺菌終了時以降の安全性についても、無害な酸素に分解するオゾンは安全で手間がかからず有効であると言える。

5. まとめ

オゾンガスとホルムアルデヒドガスによる室内殺菌試験を行い、殺菌効果を比較した。その結果、オゾンガスで菌数が約 10^3 cfu の *M. luteus* のような栄養型細菌のみならず、*A. niger*、*P. chrysogenum* などのカビ孢子、さらには *B. atrophaeus* のような *Bacillus* 属芽胞も死滅させることができた。バイオバーデンの観点から *B. atrophaeus* 芽胞を指標菌として3桁減少させることができたので、室内の殺菌効果としては十分ではないかと考えられる。*Bacillus* 属芽胞の中でオゾンガスに対して最も抵抗性の強い *G. stearothermophilus* については、今回の条件では完全に死滅させることはできなかった。しかし、室内の温度や湿度を調節し最適な条件にできれば、菌数が約 10^3 cfu の *G. stearothermophilus* 芽胞を死滅させ得る可能性も示唆された。