

## 高温シリコンオイル殺菌装置の殺菌効果

The Effectiveness of Newly Developed Hot Silicon Oil Sterilizer

安藤 正実

キーワード：高温シリコンオイル殺菌装置、HBVウイルス、大腸菌、加熱殺菌効果



(あんどう・まさみ)  
ICDフェロー  
歯学博士

### I. 序 文

高温シリコンオイル殺菌装置（仮称・以下「殺菌装置」と略す）の殺菌効果を試験する目的で、Staphylococcus aureus（黄色ブドウ球菌）209P株、Escherichia coli（大腸菌）SC2株を対象として殺菌力の試験を行った。これらの菌株は、化学療法剤の抗菌力試験を行う際に標準菌として一般に使用される株である。

歯科用医療器具の殺菌は、これらの一般細菌のほかにはHBVを対象とすることが必要であるが、HBVの定量が困難なため、これらの菌株で代用することにした。この場合、HBVの不活化には、98℃ 2分間で十分であるという報告（Kobayasi, H. et al., Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectant or heat. J. Clin. Microbiol. 20 : 214-216. 1984.）をふまえて、上記2種の細菌の熱抵抗性からHBVに対する効果を推論することとした。

### II. 材料と方法

#### 1. 菌株

Staphylococcus aureus 209P (JCI)

Escherichia coli JC-2

ともに東京大学医科学研究所微生物株保存施設から分与されたものである。

#### 2. 培地

液体培地としてはL broth（ペプトン10g、酵母エキス5g、ブドウ糖1g、食塩5g、全量1,000ml）を、固形培地（平板）としてはL brothに寒天（和光純薬・東京）を1.2%添加したものを、ともに121℃で15分間高圧滅菌したのち使用した。

#### 3. 培養法

液体培地は、恒温振盪培養器（タイテック・pergonal-10）を用いて、37℃で160回振盪培養した。平板は、37℃のフラン器で好氣的に培養した。

#### 4. 生菌数測定

菌液を滅菌生理食塩水で10倍系列希釈し、適当な希釈段階の0.1mlを平板2枚ずつに接種し、1夜培養して発育したコロニーの数から原液中の生菌数を算定した。

## 5. 殺菌力の検定

### 5-1 98℃処理による場合

高さ105mm、外径15mm、厚さ1.5mmの滅菌試験管に一夜培養菌液2.0mlをいれ、十分量の沸騰水中で軽く振り混ぜながら加温処理した。菌液を試験管に分注する時は試験管の上部（沸騰水中に入らない部分）に菌液が付着しないように注意し、加温後の菌液を採取するときにも、加温処理が不十分な内壁部分に付着しているかもしれない菌にピペットの先端が触れぬよう注意した。加温後直ちに氷で冷やした菌液を100  $\mu$ l ずつピペットでとって平板の表面に塗り広げ1~2日間培養し、発育したコロニーの数を数えた。またこれとは別に一定量の菌液を10倍量以上のフロスに接種して1~2日間振盪培養し、菌の発育の有無を調べた。

### 5-2 「殺菌装置」による場合

高圧滅菌したタービンに10  $\mu$ l の菌液を滴下し、クリーンベンチ内で40~60分乾燥したのち、別に高圧滅菌したハンドピース内に無菌的に収め、「殺菌装置」で所定の時間加熱処理した。処理済のタービンを無菌的に取り出し、直接法と同様に5mlのフロスの入った中試験管（18×180mm）に入れて一夜振盪培養し、菌

の発育を肉眼的に判定した。発育が見られなかった試験管はさらに一昼夜培養を続け、発育のないことを確認した。

## Ⅲ. 結 果

### 1. 98℃加熱処理の殺菌効果

#### 1-1 予備実験

S.aureus 209P, E.coli JC-2の一夜培養液2mlずつを試験管に分注し、沸騰水（98℃）の中で1、2、3、4、5分間加熱し、直ちに氷中に漬けて冷却し、菌液10  $\mu$ l を接種して無菌試験し、一方平板2枚ずつに100  $\mu$ l を塗抹・培養した。

#### 1-2 加熱処理後の回復期間

予備実験では、209Pを2分間加熱処理したのち、平板に塗抹培養するとコロニーが生じないのに、フロスに接種培養すると菌の発育が見られた。このことは、加熱後平板に塗抹することが細菌にとってストレスとなり、弱っている菌が発育できないのに対して、フロス中で37℃に戻すとある程度回復して生存可能な細胞ができるという可能性を示唆しているのかも知れない。そこで、加熱後、平板に塗抹する前に、フロス中でしばらく37℃に放置して、回復できる細胞を活性化してから平板に塗抹することとした。

S.aureus 209Pの一夜培養菌液2mlずつを6本の試験管に分注し、沸騰水（98℃）の中で1、2、3分間加熱し、直ちに氷中に付けて冷却後、37℃で30分保温

表1 原液の生菌数

table. 1 Number of live bacteria of the bross

	希釈	コロニー (平均)	生菌数/ml	$\times 10 \mu$ l
209P	$10^{-6}$	65/56 (61)	$6.1 \times 10^8$	$6.1 \times 10^6$
JC-2	$10^{-6}$	484/406	$4.4 \times 10^9$	$4.4 \times 10^7$

表2 98℃加熱と生存菌の有無（フロス10  $\mu$ l）

table. 2 After heating 98℃ survivor bacteria (bross 10  $\mu$ l)

	0	1	2	3	4	5
209P	+	+	-	-	-	-
JC-2	+	-	-	-	-	-

+ : 発育あり - : 発育なし

表3 98℃加熱と生存菌数 (ofu/ml)

table. 3 Number of survivor bacteria after heating 98℃

	0分	1分	2分	3分
209P	$6.1 \times 10^8$	< 5	< 5	< 5
JC-2	$4.4 \times 10^9$	< 5	< 5	< 5
		4分	5分	
209P		< 5	< 5	
JC-2		< 5	< 5	

表4 原液の生菌数

table. 4 Number of live bacteria of the bross

	希釈	コロニー (平均)	生菌数/ml	$\times 10 \mu$ l
209P	$10^{-6}$	64/115 (85)	$8.5 \times 10^8$	$8.5 \times 10^6$

表5 98℃加熱と生存菌の有無

table. 5 After heating 98℃ survivor bacteria

	0分	1分	2分	3分
209P	+	-	-	-

(フロス10  $\mu$ l  $\times$  2)

表6 98℃加熱と生存菌数 (cfu/ml)

table. 6 Number of survivor bacteria after heating 98℃

	0分	1分	2分	3分
209P	$8.5 \times 10^8$	0.5*	<0.5	<0.5

\*平板20枚中（菌液2ml）にコロニー1個

表7 原液の生菌数

table. 7 Number of live bacteria of the bross

	希釈	コロニー (平均)	生菌数/ml	×100 μl
209P	10 <sup>-6</sup>	94/56 (75)	7.5×10 <sup>8</sup>	7.5×10 <sup>7</sup>

表8 加熱時間と生存菌の有無

table. 8 Heating time and survivor bacteria

	0分	1分	2分
209P	+	-	-

(ブロス100 μl)

表9 加熱時間と生存菌数 (cfu/ml)

table. 9 Number of survivor bacteria and heating time

	0分	1分	2分
209P	7.5×10 <sup>8</sup>	2.0*	<0.5

\*平板20枚中 (菌液 2ml) にコロニー 4個。

し、そのうちから10 μl をLブロス 5 ml中に入れて無菌試験し、平板20枚に100 μl ずつ (合計 2 ml) を塗抹して培養した。

即ち、209Pは、98℃・1分間の加熱処理でおよそ 5.8×10<sup>-10</sup> (0.5/8.5×10<sup>8</sup>) に、2分間ではそれ以下に菌数が減少したことになる。予備実験で1分間処理後に見られた発育は、試験管上部の菌の混入によるものであろう。

1-3. 少量菌液の加熱処理

加熱と冷却をより短時間で行うために、2) では1本の試験管に5 ml ずつ分注していた菌液をここでは2 ml ずつ4本に分け、ブロス培養試験も100 μl をLブロス50ml中に接種した。

平板培養試験は、平板20枚に100 μl ずつ (合計 2 ml) を塗抹培養した。

即ち、7.5×10<sup>8</sup>/mlの菌液の生菌数は、98℃ 1分の加熱で2.7×10<sup>-9</sup> (2.0/7.5×10<sup>8</sup>) に、2分間加熱ではそれ以下に減少した。

以上の実験結果から、S.aureus 209Pは、98℃ 1分間の加熱で生菌数がおおよそ10<sup>-8</sup>程度になることが分った。細菌の殺菌理論に従えば、次の1分間でさらに菌数が10<sup>-9</sup> (最終的には10<sup>-18</sup>) に減少することが期待されるから、S.aureus 209Pは98℃ 2分間で完全に殺菌されると結論できる。そこで、この株を「殺菌装置」によるHBVの不活化を調べるための指標とすることとした。

2. 「殺菌装置」の殺菌効果

2-1 予備実験

S.aureus 209P, E.coli JC-2の一夜培養液10 μl をタービンに滴下・乾燥し、1、2、3分間殺菌処理してからタービンを無菌試験した。「殺菌装置」の温度は115℃を上下していた。

2-2 130℃処理の殺菌効果

S.aureus 209P, E.coli JC-2の一夜培養液10 μl をタービンに滴下・乾燥し、「殺菌装置」を用いて130℃で1、2、3分間処理してからタービンを無菌試験した。(生菌数)

10<sup>-6</sup>希釈: 209P 60/68 (64) →6.4×10<sup>6</sup>/10 μl

JC-2 79/73 (76) →7.6×10<sup>6</sup>/10 μl

結論: 209Pは130℃ 1分間の加熱では十分ではなく、2分間ではじめて10<sup>-6</sup>以下に減少することが推測された。JC-2は1分間以内に10<sup>-6</sup>以下になった。

2-3 140℃処理の殺菌効果

S.aureus 209Pの一夜培養菌液10 μl をタービンに滴下・乾燥し、140℃で1、2、3、4分間殺菌処理してからタービンを無菌試験した。

結論: 209Pは、140℃ 1分間の加熱処理によって生菌数が1.3×10<sup>-7</sup> (1/7.5×10<sup>8</sup>) に減少した。

表10 115℃処理の殺菌効果

table. 10 The effectiveness of sterilizer at 115℃

試験菌株	殺菌時間と細菌の発育			
	0分	1分	2分	3分
209P	++	+	±	-
JC-2	+++	-	-	-

表11 加熱時間と生存菌の有無

table. 11 Heating time and survivor bacteria

菌株	0分	1分	2分	3分
209P	3+	1+	-	-
JC-2	3+	-	-	-

(タービン各1個ずつ)

表12 加熱時間と生存菌の有無

table. 12 Heating time and survivor bacteria

菌株	0	1	2	3	4
209P	1月1日	0/2*	0/2	0/3	0/2

\*0/2は2個のタービンを調べて0個に発育が見られたことを意味する。

生菌数は1-3の実験と同じく7.5×10<sup>6</sup>/10 μl

#### IV. 結論と考察

1 - 2、1 - 3の結果を総合すると、S.aureus 209Pは、98℃ 1分の加熱でおおよそ菌数が $10^{-9}$ に減少し、2分間では $10^{-16}$ 以下になると推測される。これは通常のfull growthの培養液109mlすなわち100万リッター中の菌が1コに、1リッター中の菌が $10^{-6}$ コに減少することを意味する。したがって、S.aureus 209P株については、98℃の加熱処理では、1分間では完全に感染力を奪ったとは言えないにしても、2分間では十分に殺菌したといえる。これは、HBVを不活化するために98℃ 2分間の加熱処理を推奨するKobayashiらの実験結果とほぼ相似の結果である。よって、S.aureus

209P株を加熱処理によるHBV不活化のモデルとして採用し、高温シリコンオイル殺菌装置の効果判定に用いることができると結論した。

2 - 2、2 - 3の結果から、高温シリコンオイル殺菌装置でタービンを処理すると、130℃では2分間、140℃では1分間で $10^{-6}$ 以下の菌数になる。したがって、 $10^{-6}$ の安全率をみて、130℃では4分間、140℃では2分間処理を行えば十分であると結論できる。ここではデータを示さなかったが、この条件ではBacillus subtilis（枯草菌）の芽胞を短時間で不活化することはできなかったのも、「滅菌器」と呼ぶことはできないが、S.aureus、おそらくはHBVをも十分な安全率で不活化できる「殺菌器」であるといえる。

---

#### ●抄録● 高温シリコンオイル殺菌装置の殺菌効果 ／安藤 正実

エアータービンハンドピースを介する院内感染を防止するため、加熱媒体としてシリコンオイルあるいは流動パラフィンを用いるエアータービン専用の殺菌装置を開発し、Staphylococcus aureus（黄色ブドウ球菌）とEscherichia coli（大腸菌）を被験菌として殺菌効果を検討した。その結果、130～140℃、2～4分間の加熱処理によってハンドピース内の細菌を効果的に殺菌できることが明らかになった。これによってS.aureusと同程度の耐熱性を持つとされるB型肝炎ウイルスに対しても、同等の処理で十分な不活化効果があることが示唆された。

キーワード：高温シリコンオイル殺菌装置、HBVウイルス、大腸菌、加熱殺菌効果

## The Effectiveness of Newly Developed Hot Silicon Oil Sterilizer

Masami ANDO, D.D.Sc., F.I.C.D.

We have developed the newly hot silicon oil sterilizer dedicated for the air turbine with heating medium of silicon oil or liquid paraffin in order to prevent in-hospital infection via the air turbine handpieces.

The investigation of its effectiveness on sterilization, against test sample of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* has revealed that heating by the newly developed hot silicon oil sterilizer with temperatures from 130°C to 140°C for 2 minutes to 4 minutes effectively functions to sterilize bacteria inside the handpieces.

It indicates that the same procedures would adequately inactivating effects on HBV, is known as same level of heat resistance as *S. aureus*.

**Key words** : Hot Silicon Oil, *Escherichia Coli* HBV, Disinfection Oil Temperature Hot Oil Sterilizer