

簡易滅菌法としてのマイクロ波照射応用の試み

岡山大学医学部細菌学教室（指導：金政泰弘教授）

安 部 益 文

（昭和56年8月5日受稿）

Key words：マイクロ波，殺菌効果，ウィルス不活化効果
滅菌法

要 約

マイクロ波は周波数300MHz～30GHzの電波であるが、このマイクロ波の電界に誘電物質をおくと、電波エネルギーは物質に吸収され熱エネルギーに変る。この高周波誘電加熱に立脚して開発された電子レンジが日常の簡易滅菌に如何なる有効性を示すかを検討した。供試微生物は *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis* の芽胞, *C. albicans*, Echo virus 及び Herpes simplex である。これらをガラス及びプラスチック哺乳瓶に定量的に附着させ電子レンジ(2450MHz 500W)で照射した。微生物の大低のものは5～6分、芽胞でも7分で完全死滅した。付着後乾燥状態にした場合はやや長時間を要したが、芽胞やウィルスでも12分では完全死滅した。

以上のことから、マイクロ波による滅菌はその局部内部加熱作用が微生物の滅菌に有効に働き、包装状態のまま短時間で行える上に、プラスチック、ゴムなどの容器は損傷されず極めて有用性の高いことが判明した。

緒 言

マイクロ波は周波数300MHz～30GHz（波長1m～1cm）の電波であり、一般にはレーダーや通信などに利用されている。しかし1945年頃、米国において、強ワットのマイクロ波で作られる電界に誘電物質をおくと、極めて短時間で加熱されることが発見され、1955年にはこの高周波誘電加熱を応用した電子レンジが商品化・販売されることになった¹⁾。本邦でも1959年頃から

高周波加熱の研究が急速に発展しはじめ、最近では電子レンジとして業務用のものから家庭用のものが普及するに及んだ。

そもそもマイクロ波は熱伝導に殆ど頼らない効率のよい内部加熱をもたらす特徴があり食品工業その他で加熱乾燥などに極めて有効であることが知られた。しかも急激な局部加熱性があるため、いろいろな分野で殺菌、殺虫効果が期待されていることも事実である。例えば、伝染性院内感染症の発生する恐れのある新生児病棟、ICU、重症病棟等における食器、器具類の殺菌処理は、可成り厳密に行なわれなければならないが、日常の業務の中でそれぞれの滅菌操作をすることは煩瑣である。電子レンジの殺菌効果は、勿論加熱による効果が主体であるが、プラスチック、ゴム製品などはエネルギー吸収率が低いので、それ自体は損傷を受けることが少なく、附着している菌の殺菌効果のみが発揮されしかも短時間に、包装状態のまま殺菌できる利点がある。特に新生児室などで調乳・哺乳器具等の消毒・殺菌には、毒性残存もなく好適であると考えられる。

マイクロ波の細菌に対する影響は、一部ではすでに古くから研究されているが、試験試料が水溶液中での試験であったり²⁻⁵⁾、スライドガラス上のものであったり⁶⁾、いわゆる実用品を用いて残存生菌量を定量測定したものは極めて少ない⁷⁾。

そこで本研究では、新生児病棟、ICU、重病患者病棟などで日常使用する食器、器機の実用例としてガラス瓶、プラスチック瓶等の内側に

付着している一般常在の真菌・細菌・ウイルスに対する電子レンジの殺菌効果を検らべ、医用簡易殺菌法として電子レンジを応用することの是非について検討した。

材料および方法

供試菌：教室保存の標準株で、次の菌種を馴化し使用した。Staphylococcus aureus 209 P, Bacillus subtilis PCI 219, Escherichia coli K12, Pseudomonas aeruginosa P13, Candida albicans YU 1200. ウイルスは、愛媛衛研より分与を受けた Echo virus 11型 Gregoryと Herpes simplex HF 株を供試した。

培養：S. aureus, E. coli および P. aeruginosa は普通ブイヨンに振盪培養し、中期対数増殖期に達した菌を実験に供した。B. subtilisは、芽胞状態での実験を目的として普通寒天培地に3日間の陳旧培養をおこなった菌苔を10mg/dlの濃度になるよう生理的食塩水に懸濁させ、60℃1時間保ち栄養型を殺して芽胞のみを得た。C. albicansは Sabouraud 培地に30℃2日間培養した菌苔を10mg/dlになるよう懸濁した。これらの菌懸濁液を生理的食塩水で菌数 $0.5 \sim 5 \times 10^5$ /mlになるよう適宜調整し以下の実験に供した。

ウイルスの培養は Eagle の MEM 培養液と、YLE 培養液の等量混合液（以下 YLM 液と略す）で HeLa 又は HES 細胞を3日間培養し、単層形成細胞に供試株を接種した。4~5日後、CPEが充分現われた時に培養液を回収し細胞成分を除いた上清をウイルス原液とした。この原液を YLM 液で10倍に希釈して以下の実験に供した。

汚染材料の作成：あらかじめ高圧滅菌したガラス製哺乳瓶またはガス滅菌したプラスチック製の哺乳瓶に、希釈菌液0.1mlを入れ壁に均一に付着させた。1本の瓶には $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個の菌が付着するよう調整した。これをそのまま照射した場合を「湿潤状態」とし、これをデシケーターに入れ減圧乾固して照射に供した場合を「乾燥状態」とした。ウイルスの場合も同様に、ウイルス原液を適宜希釈し、その0.1~0.2mlを壁面に付着させ、「湿潤状態」と「乾燥状態」を作成した。

電子レンジ照射：電子レンジは三菱電機製

RR-5000 (500W, 2450MHz, ターンテーブル付) を使用し、所定時間照射し、照射後ただちに容器のまま水冷し、以下の生菌数測定に供した。

生菌数の測定：照射後の哺乳瓶に滅菌生食10mlを入れ、瓶壁を洗滌し、生存菌が全て懸濁するよう強く振盪しこれを混釈培養して菌数計算をおこなった。

生存ウイルス数測定：照射後の哺乳瓶に YLM 液10mlを入れて、最初入れたウイルス液が均等懸濁するよう手動振盪した。この懸濁原液、その10倍および100倍希釈液の3系列を作り、その0.2ml宛をあらかじめシャーレで3日間培養した HeLa 細胞上 (Echo の場合) またはヒト胎児皮膚細胞上 (HVS の場合) に加え (各系列とも3枚ずつ) 37℃1時間の前培養により細胞に吸着させた。その後上清液を捨て PBS で洗浄し、第一次の Agar overlay 液 5ml を加えて炭酸ガス培養器中で37℃で培養した。4日目に第二次 Agar overlay 液 (Neutral red 加) を重層し Plaque の現われる翌日まで培養を続けた。誤差も少なく算定に便利な系列の PFU を求め平均値をもって生存ウイルス数とした。

実験結果の表示は、すべての菌について対照 (無照射例) を100%とし、照射後の生残率%で表わした。

走査電子顕微鏡による観察：B. subtilis および E. coli の懸濁液 (5×10^5 /ml) をポリリジンでコーティングしたカバーガラスに滴下し、湿潤状態で5分間の照射をおこない、グルタルアルデヒド固定、臨界点乾燥後金蒸着し、TSM-U3 型で加速電圧25KVで観察した。

結 果

ガラス瓶上湿潤状態菌に対する効果：グラム陽性菌の S. aureus, 陰性菌 E. coli および真菌である C. albicans の湿潤状態でガラス瓶に付着している場合の菌に対する電子レンジの殺菌効果を図1に示した。S. aureus と E. coli は照射時間に対して指数曲線的に生残率が減少し、いずれも5分間の照射で全ての菌が殺菌されれていた。C. albicans の場合はシグモイド的な経過をたどるが、3分間の照射で殆ど殺菌されていた。

ガラス瓶とプラスチック瓶との差異：ガラスの

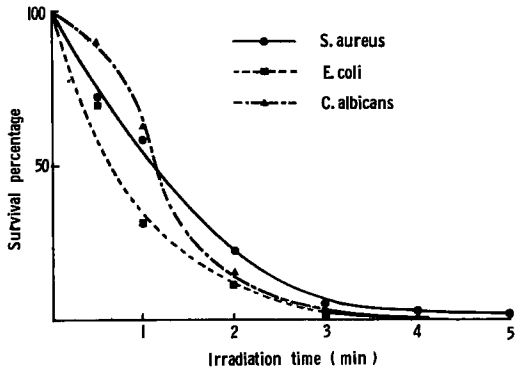


図1 マイクロ波によるガラス瓶内側付着菌の殺菌効果。
S. aureus, E. coli, C. albicans の各菌液 ($10^4 \sim 10^5$ /ml) を哺乳用ガラス瓶内壁に付着させ、30秒から5分間電子レンジ内でマイクロ波を照射し、その生残率を表わした。

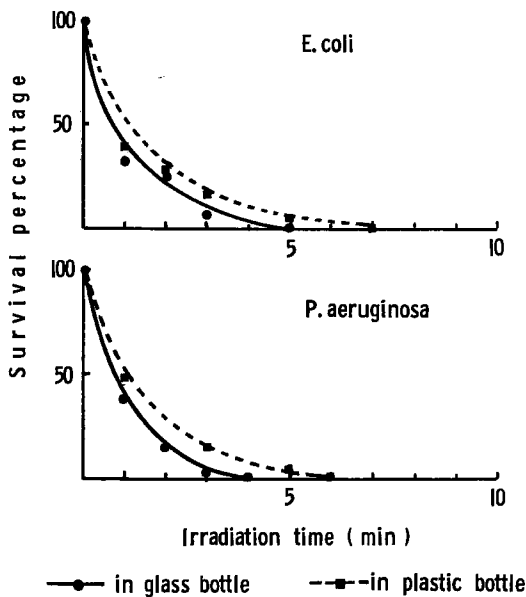


図2 ガラス瓶およびプラスチック瓶に付着した大腸菌および緑膿菌のマイクロ波による殺菌効果。
E. coli と P. aeruginosa をガラス瓶およびプラスチック瓶に付着させ、1～6分間照射し、その生残率を表わした。

方がプラスチックよりマイクロ波による吸熱量が大きいため、その差が殺菌効果に影響を与えるのではないかと思われ、E. coli と P. aeruginosa でその差異を検討した。図2にその結果を

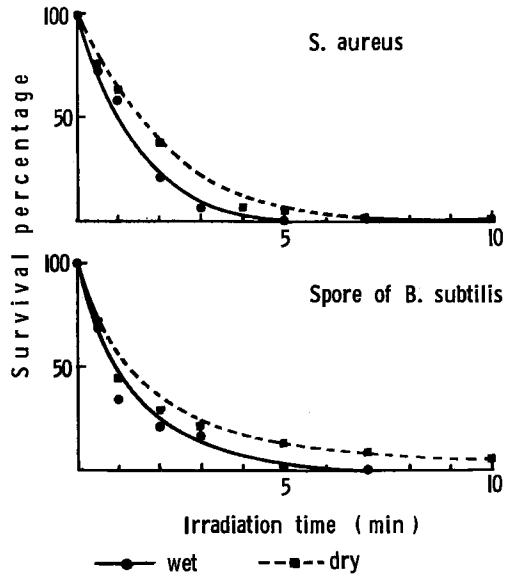


図3 プラスチック瓶に付着したブドウ球菌枯草菌のマイクロ波による殺菌効果。
哺乳瓶に菌液0.1ml ($10^3 \sim 10^4$ 個) を付着させたものを湿潤状態とし、それをデシケーター内で乾燥させたものを乾燥状態とした。照射は30秒～10分間おこない、その生残率で表わした。

示した、E. coli でも P. aeruginosa でも、又 S. aureus (図1と図3) においてもプラスチック瓶の方が完全殺菌に要する時間が1～2分長くかかった。

プラスチック瓶内で湿および乾燥状態にある菌に対する効果：S. aureus と芽胞を形成し抵抗性の強い S. subtilis について、プラスチック瓶上で湿潤および乾燥状態における殺菌効果を検べた。図3にその結果を示した。S. aureus においては乾燥状態と湿潤状態では、乾燥状態の方が生存率が高く、完全殺菌に7～10分間の照射を要した。枯草菌の芽胞では湿潤状態では7分間の照射で、乾燥状態でも11～12分の照射では完全に殺菌効果があった。即ち芽胞を形成する菌は、湿潤状態に戻して照射する方がより効率的であるといえる。

プラスチック瓶内のウイルスに対する効果：RNA ウィルスでエンベロップを有しないエンテロウィルスの Echo virus と、DNA ウィルス

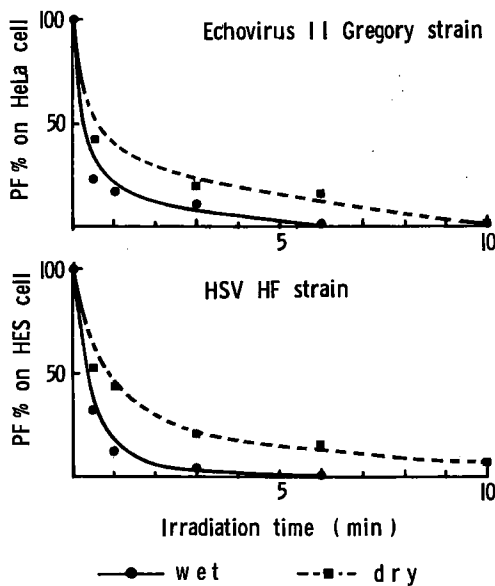


図4 プラスチック瓶内側に付着したウイルスのマイクロ波による不活化。ウイルス培養液の上清0.1mlをプラスチック瓶側に付着したもの(湿潤状態)とデシケーター中で乾燥したもの(乾燥状態)とをマイクロ波を30秒~10分間照射し、生残ウイルスのPFUを未照射の場合のPFUを100%として表わした。

でエンベロープを有する Herpes virus に対する照射効果をしらべた。図4にその結果を示した。湿潤状態では細菌・真菌と同じく5分の照射で完全に不活化効果があったが、乾燥状態のものは、芽胞よりも長時間を要した。ウイルスの場合も、いわゆる湿潤状態を保って照射に供する方がより強い殺菌効果を発揮することができる。

照射による細菌の損傷：B.subtilisとE.coliのマイクロ波照射による形態変化を走査電子顕微鏡で観察したものが、図5と6である。B.subtilis(図5)は照射によりその表層構造に大きな変化は認められないが、グラム陰性菌のE.coli(図6)では照射後に一部溶菌を認め、表層構造に損傷を与えていることがわかった。

考 察

マイクロ波による加熱の原理は、高周波電界

の周波数に従って物質を構成する電気的雙極子が激しく振動し、分子摩擦を起すことにより物質の温度が上昇する、この高周波電波エネルギーが誘電物質中で熱エネルギーに変換していくのが高周波誘電加熱である。

高周波加熱では被加熱物である誘電体自身が発熱体となるところに特徴があるが、この誘電体に吸収される熱に変わる電力量Pは次の式で表わされる^{1,7,8)}。

$$P = \frac{5}{9} f E^2 \epsilon_r \tan \delta \times 10^{-10} \text{ [W/m}^2\text{]}$$

f：周波数〔H〕

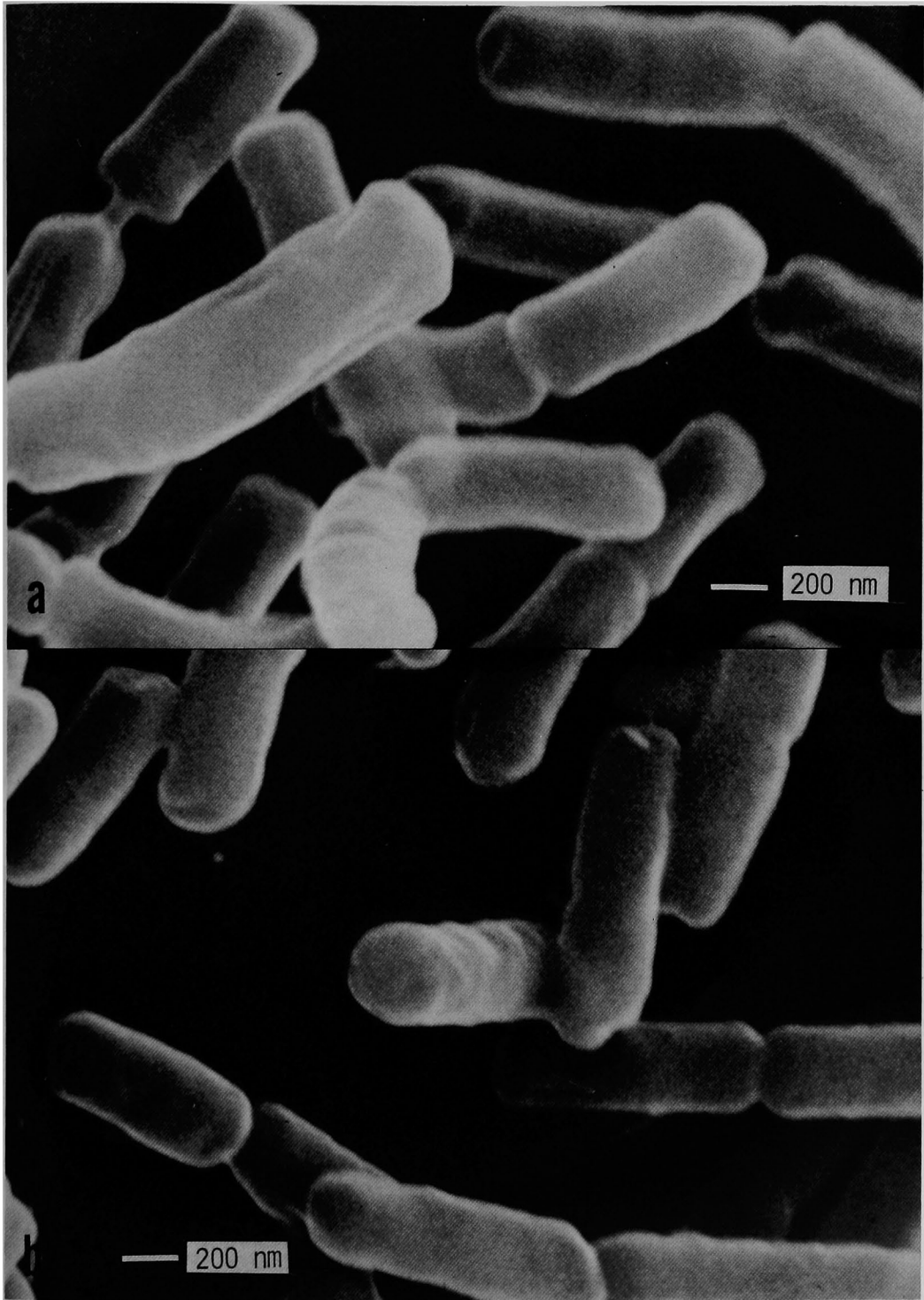
E：加えられる電界の強さ (v/m)

ϵ_r ：被照射物の比誘電率

$\tan \delta$ ：被照射物の誘電損失角

周波数fは通信以外の目的で使用する場合は国際的に規制されており、日本の電波法では2450 MHzを使用するよう定められている。電界の強さは機種により一定であるとすれば熱エネルギーに変換されて誘電物質に吸収される電力量は比誘電率と誘電損失角の積(loss factorと呼ばれる)に比例する。ちなみに一般的な物質の2450 MHzにおける比誘電率と誘電損失角を図7に示した⁷⁾。loss factorは水14.0、ガラス(普通~硬質)0.12~0.04、ゴム約0.02、プラスチック0.01~0.002、シリコン約0.001となり、水は極めて高く他のものは極端に小さい値を示す。ちなみに哺乳瓶に80mlの水(起始25℃)を入れて照射実験を行った所、1.5分照射で50℃±4℃に上昇した。したがって水又は水分を大量に含むものは選択加熱効率が極めてよい。湿潤状態の細菌は80%の水分を含むのでloss factorは極めて水に近いと考えてよい。たとえ菌が乾燥状態であっても結合水を菌体内に含んでいるので菌体を選択加熱されるランナウエイ(局部加熱)現象が認められるはずである。

本実験では、いわゆる環境常在菌として芽胞を有する枯草菌、日和見感染ないし院内感染の原因菌としてブドウ球菌、大腸菌および緑膿菌、小児感染をおこし易いエコーウイルスおよびヘルペスウイルスに対する殺菌、不活化効果を検べた。その結果、湿潤状態にある場合の方が、短時間の照射で効果があらわれ、乾燥状態はや



B.subtilis

図5 マイクロ波を照射した枯草菌.
a. 照射前 b. 照射後

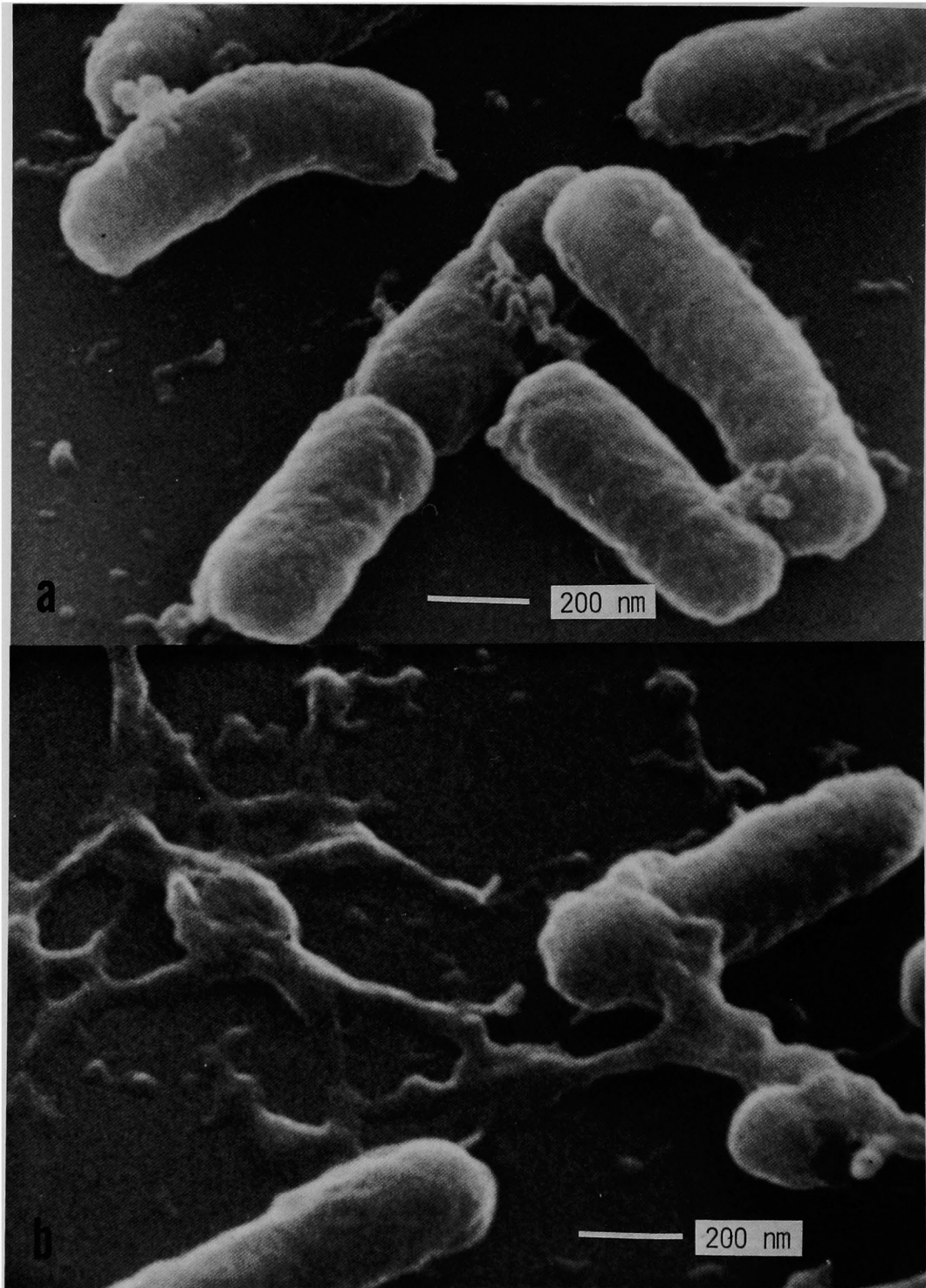
**E. coli**

図6 マイクロ波を照射した大腸菌。
a. 照射前 b. 照射後

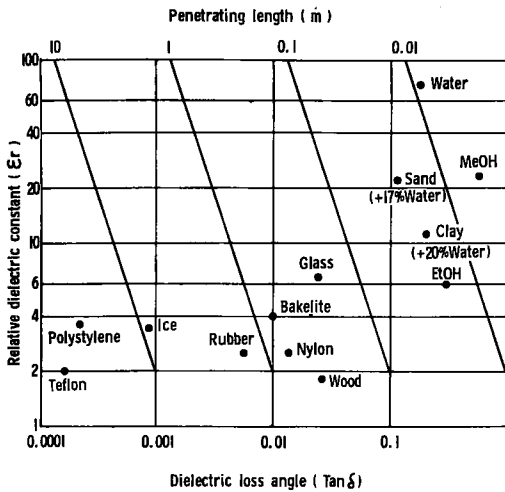


図7 2450MHzにおける各種物質の比誘電率及び誘導損失角。
なお図中には電力半減深度をも示した。

や長時間の照射を要した。したがって熱抵抗性も大で含水量も微少である芽胞や、構造上含水量の少いウイルスの乾燥系は10分ないし12分の照射を必要とした。なお本実験に供した哺乳瓶のガラス及びプラスチック材料は、製品によりその loss factor に差異があるが、原材料を検討した結果ガラス哺乳瓶は約0.1、プラスチック哺乳瓶は約0.005である。ガラス瓶は3分間の照射で素手で持つには困難な程加熱されるが、くり返し照射しても損傷は認められなかった。プラスチック瓶は5分程度では全く加熱は感じられず、10分間の照射でも高い加熱は認められず、くり返し照射でも瓶の損傷は認められなかった。

更にシリコンゴム製の乳首にも照射を試みたが変形、変質は認められなかった。ガラスとプラスチック瓶で比較した実験で、本来なら電力吸収の少ないプラスチック瓶の方が滅菌効果が良いと考えられるが、結果は逆であった。容器の loss factor に比べて菌体の loss factor は極端に高いので、菌体に対する局部加熱性は充分

であろうが、これに加えてガラス瓶の場合は瓶加熱の伝導熱効果が加わったものと考えられる。

マイクロ波の殺菌効果は、食品^{7),8),11)}や化粧品¹²⁾の添加物¹³⁾、臨床検査室のガラス器の乾燥を兼ねた殺菌⁶⁾などに応用された例がある。しかし大量のスープやミルク等に照射し殺菌を試みた例があるが⁴⁾、普通の加熱滅菌と同様長時間を要し特殊有効性は認められていない。すなわちマイクロ波に、加熱効果以外の高周波による特殊効果があれば特殊有効性が現れるであろうが多くの検討がなされているにもかかわらず、今のところ発熱効果以外の効力は確実には認められていないのが現状である^{2),4),9),10)}。

以上のことから結論すると電子レンジによる殺菌消毒は、器具の損傷を極力避けることが出来、しかも短時間で行える有効な方法と言える。マイクロ波は選択的に菌体又は孢子に吸収されるというランナウェイ現象がすぐれた熱効率をもたらし、しかもいかに包装していても選択加熱が可能である。したがって哺乳瓶を洗浄後、乳首やカバーを着装して乾燥もすることなく(むしろ湿潤状態の方がよい)照射を行って、そのまゝの状態で冷所にでも保存しておけば、用いのにぞんで使用することができる利点がある。

マイクロ波の殺菌効果は、器材の熱損傷は最少限にとどめ、完全殺菌効果のあることが明らかになり、日常の医用簡易滅菌法に供することができることを示した。

謝 辞

本研究の遂行に終始御指導いただいた金政泰弘教授に深く謝意を表します。また本実験の直接指導をいただいた細菌学教室の諸先生、ウイルス学教室上羽 修先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は第32回中四国細菌学会で報告し、研究には厚生省の研究補助を受けた。

文 献

1. Okress, E.C.: *Microwave Power Engineering*. Vol. II Academic Press N.Y., pp84-95, 1968.
2. Goldblith, S.A. and Wang, D.I.C.: Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* 15, 1371-1375, 1967.
3. Lechowich, R.V., Beuchat, L.R., Fox, K.I. and Webster, F.H.: Procedure for evaluating the effects of 2450-megahertz microwave upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.* 17, 106-110, 1969.
4. Culkin, K.A. and Fung, D.Y.C.: Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. *J. Milk Food Technol.* 38, 8-15, 1975.
5. 笹田助三郎, 中村光慶, 若林 勝: 超短波電磁界の諸細菌に及ぼす影響に就て. 電気学会雑誌, 56, 94-97, 1936.
6. Latimer, J.M. and Matsen, J.M.: Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in clinical microbiology laboratory. *J. Clinical Microbiol.* 6, 340-342, 1977.
7. 小倉浩一, 戸石登志彦, 中田慶明: マイクロ波加熱による食品の殺菌. 防菌防黴 4, 21-28, 1976.
8. 竹内幹雄, 鈴木年康: 食品工業とマイクロ波加熱. 食品と科学 5, 122-126, 1970.
9. Olsen, C.M., Drake, C.L. and Bunch, S.L.: Some biological effects of microwave energy. *J. Microwave power* 1, 45-56, 1966.
10. Szmigielski, S., Kobus, M., Janiak, M. and Rytko, J.: Effect of microwave radiation on cells treated with membraneinjuring substances. *Exp. Path. Bd.* 13s, 296-301, 1977.
11. O'Meara, J.P., Tinga, W.R., Wadsworth, C.K. and Farkas, D.F.: Food sterilization in a microwave pressure retort. *J. Microwave Power* 11, 213-214, 1976.
12. Jasnow, S.B. and Smith, J.L.: Microwave Sanitization of color additives used in cosmetics: Feasibility Study. *Appl. Microbiol.* 30, 205-211, 1975.
13. Mothiron, J.C., Vialard-Goudou, A. and Maupas, P.H.: Use of an industrial prototype machine for drying and sterilizing pharmaceutical ampoules by microwave at 2.45 GHz. *J. Microwave Power* 11, 200-201, 1976.
14. 大竹公平, 山田俊一, 羽田英夫: 中枢薬理におけるマイクロウェーブ照射法の理論と応用. ソフトサイエンス社, 東京, pp.2-11, 1981.

Application of microwave radiation as a handy method of sterilization

Masufumi ABE

Department of Microbiology, Okayama University Medical School,

Okayama Japan

(Director: Prof. Y. Kanemasa)

The effect of microwave radiation (2450 MHz) on fungi, bacteria and viruses was examined to determine its applicability as a handy method of sterilization. Fungi (*C. albicans*) and bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. subtilis*) stuck on the inside of a glass or plastic milk bottle were sterilized within 5 minutes of radiation regardless of whether the bacteria were dry or wet. Spores of *B. subtilis* and virus (ECHO virus and Herpes virus) were inactivated within 10 min without affecting the plastic or glass bottle. Wet condition rendered the micro-organisms more susceptible than dry conditions. The results indicate that the microwave oven may be suitable for sterilization of things such as feeding bottles or trays in infant rooms of hospitals.