

バイオロジカルクリーンルームを対象とした 過酸化水素による防虫対策

洞田 浩文^{*1}・大手山 亮^{*2}・益留 純^{*3}・川崎 康司^{*3}

Keywords : hydrogen peroxide, cleanroom, booklice, fungi

過酸化水素, クリーンルーム, チャタテムシ, 真菌

1. はじめに

従来、無菌製剤医薬品工場の無菌室の除染法としては、ホルムアルデヒド燻蒸が用いられることが多いが、その環境影響や作業毒性が指摘されている。最近では、代替技術として海外、国内共に過酸化水素による除染法が注目され研究開発が行われており¹⁾ 実際の案件への適用例も増加してきている。

一方、クリーンルームにおけるクレームとして、チャタテムシが原因となることがあり、無菌製剤医薬品工場における昆虫類の調査結果からもチャタテムシが多く出現していることが報告されている²⁾。

チャタテムシは外部から建築資材等に付着してクリーンルームを始め、建屋内へ持ち込まれると考えられるが、外部からの持込みの機会を皆無とすることは難しいと考えられる。よってチャタテムシの増殖しやすい環境を整えることが重要といえる。この考え方方に則り過酸化水素蒸気によるチャタテムシの制御が可能であれば、現在知られている過酸化水素蒸気によるクリーンルーム除染の副次的な効果としても期待できると考えた。

本研究では過酸化水素蒸気による除染において対象とされる細菌に加え、チャタテムシに対する殺虫性能評価を行うことで、過酸化水素蒸気除染の付加的効果の検証を行った。また、チャタテムシは真菌を餌として増殖しており、その餌となる真菌の量が個体数の動態に最も影響しているとされることから²⁾、過酸化水素の真菌に対する殺菌効果も合わせ実施した。

*1 技術センター 建築技術開発 建築生産技術開発室

*2 調達本部 第一調達部

*3 (株) エアレックス

2. チャタテムシに対する殺虫効果^{3) 4)}

2.1 試験概要

2.1.1 試験材料

試験には、チャタテムシの一種であるヒラタチャタテ (*Liposcelis bostrychophilus*, 川崎コロニー) を用い(写真-1), 内径 25mm (口径 20mm), 深さ 60mm のガラス製容器内に約 30 匹配置した。



写真-1 ヒラタチャタテ
Photo.1 *Liposcelis bostrychophilus*

2.1.2 試験方法

ガラス製容器に配置したヒラタチャタテを、クリーンルームを模擬した試験室内 5 箇所に設置した。なお、図-1 中の①から④は床上 200mm, ⑤は 1800mm の位置とした。試験は(株)エアレックス技術研究センター(愛知県東海市)にて実施した。

試験室中央に設置した室内除染用ガス発生装置 ((株)エアレックス製, SD-300GD-mini) により過酸化水素蒸気を発生させた。過酸化水素の供給条件を表-1 に示す。除染時間は 240 分間とし、その後 120 分程度室内空気を触媒に通して屋外排気とするエアレーションを実施した。これはクリーンルームの除染法としては標準的と言える条件である。

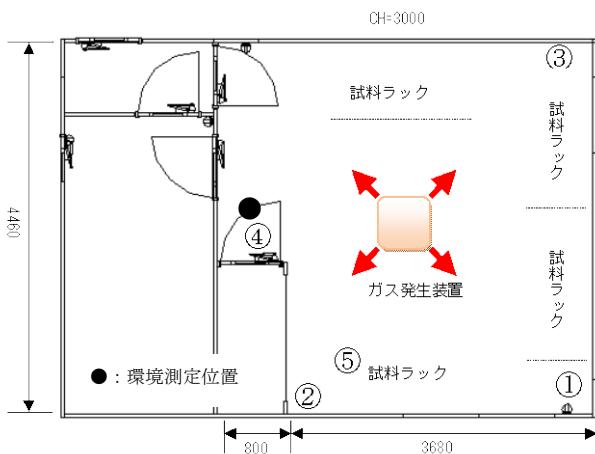


図-1 試験室概要および試験体設置場所
Fig.1 Outline of test room

表-1 過酸化水素供給条件

Table 1 Supply condition of hydrogen peroxide

投入量	480 g
滴下速度	2 g/分
投入時間	240 分

除染作業終了後、ガラス製容器から口径 70mm、深さ 45mm の樹脂製容器に移し、湿度を保つために水に浸した濾紙小片を入れて樹脂製の蓋を被せ、20~25°C の室内に保存して致死数を計測した。なお、過酸化水素蒸気に暴露させずに処理区と同様の運搬、保存条件下において対象区を設け、評価は補正致死率として算定した。

$$\text{補正致死率} = \frac{\text{暴露区致死率} - \text{対象区致死率}}{100 - \text{対象区致死率}} \times 100 \quad (1)$$

なお、供試虫の準備および評価は、一般財団法人日本環境衛生センターに依頼した。

2.2 結果および考察

図-2 に過酸化水素濃度、温度、相対湿度の測定例として除染1回実施時の結果を示す。なお、過酸化水素濃度の測定は過酸化水素ガス濃度測定器（ドレーダル・セーフティ・ジャパン（株）製、ポリトロン 7000）により測定した。除染開始後、過酸化水素濃度は上昇し、除染時間 240 分のうちの 3/4 程度の時間で高濃度となっている。

表-2 に除染1回実施時、表-3 に除染連続2回実施時の試験結果を示す。表-2 より、通常の除染を想定した1回実施の場合では、補正致死率は 39.8% であった。事前に同様の過酸化水素濃度条件で実施したアイソレータでの予備試験結果が補正致死率 100% であったことか

ら、実際の室内では過酸化水素蒸気濃度やその凝縮挙動の分布にムラが生じた可能性も考えられた。しかし同時に設置したバイオロジカルインジゲータ BI (*Geobacillus stearothermophilus* ATCC12980, Apex 製) の結果は、予備試験、1 回実施いずれの場合も全数陰性となっており、ヒラタチャタテ死滅の挙動は BI のそれとは異なる可能性があると考えられた。

この結果を受けて除染回数を連続 2 回とする追加実験を行った。一般的に除染を複数回連続して実施するケースは少數ではあるが、ヒラタチャタテの致死率は表-3 に結果を示す通り、6 日後には 100% の補正致死率となった。この結果により除染条件を変更することでヒラタチャタテを死滅させられる可能性があることがわかった。

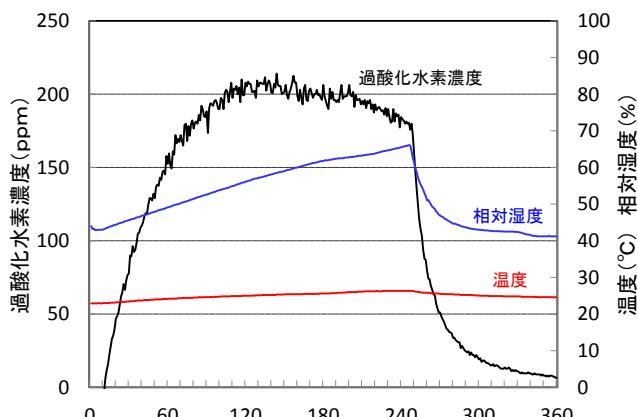


図-2 過酸化水素濃度、温度、相対湿度の経時変化例
Fig.2 Time course of environment

表-2 除染1回実施時の試験結果

Table 2 Examination results (one time)

試験区	配置場所	供試虫数	致死数			
			1日後	2日後	3日後	8日後
暴露区	①	33	0	1	2	6
	②	35	1	2	3	12
	③	32	0	0	0	16
	④	31	0	1	1	11
	⑤	23	4	4	4	19
	計	154	5	8	10	64
致死率 %			3.2	5.2	6.5	41.6
対象区	A	13	0	0	0	1
	B	27	0	0	0	1
	C	27	0	0	0	0
	計	67	0	0	0	2
	致死率 %		0	0	0	3.0
補正致死率 %			3.2	5.2	6.5	39.8

表-3 除染2回実施時の試験結果
Table 3 Examination results(two times)

試験区	配置場所	供試虫数	致死数			
			1日後	2日後	3日後	6日後
暴露区	①	30	6	19	25	30
	②	30	4	16	30	30
	③	30	15	25	30	30
	④	30	6	15	30	30
	⑤	30	4	15	30	30
	計	150	35	90	145	150
	致死率 %		23.3	60.0	96.7	100.0
対象区	A	30	1	1	8	8
	B	30	0	0	0	1
	C	30	0	0	0	0
	計	90	1	1	8	9
	致死率 %		1.1	1.1	8.9	10.0
補正致死率 %			22.5	59.6	96.3	100.0

3. 真菌類に対する殺菌効果^{4) 5)}

3.1 試験概要

3.1.1 試験材料

表-4 に供試真菌を示す。試験には、一般環境下で検出されることの多い、クロコウジカビ、クロカワカビおよびアオカビの3種類を用いた。写真-2から写真-4に供試真菌の培養時の様子と顕微鏡写真を示す。

1) 菌液の調整

PDA培地（ポテトデキストロース寒天培地、栄研化学（株）製）にて供試菌を25℃、7日間培養後、形成された胞子を1/10濃度に調整したGP培地（ブドウ糖ペプトン培地、日本製薬（株）製）に懸濁させ、胞子数が1mlあたり10⁶から10⁷となるように調整し、菌液とした。

2) 試料の調整

スライドグラス（26mm×76mm）に、菌液0.1ml滴下後、乾燥し、試料とした。なお、濡れた状態での効果確認を目的にPDA培地上に直接菌液を塗布した実験も行った。

3.1.2 試験方法

スライドグラス上に供試菌を調整した試料を、図-1に示すクリーンルームを模擬した試験室内5箇所に設置した。設置高さ等他の条件は殺虫効果の検討と同様とした。

除染作業終了後、試料を0.05%ポリソルベート80添

加リン酸緩衝生理食塩水20mlに入れ、振とうし、菌を抽出した。この抽出液の生菌数を測定し、試料あたりに換算した。なお、生菌数の測定方法は、PDA培地を用いた混釀平板培養法（25℃、7日間培養）とした。

なお、供試菌の準備および評価は、一般財団法人日本食品分析センターに依頼した。

表-4 供試真菌
Table 4 Fungi under test

菌名	学名	NBRC
クロコウジカビ	<i>Aspergillus niger</i>	105649
クロカワカビ	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6348
アオカビ	<i>Penicillium citrinum</i>	6352



写真-2 クロコウジカビ
Photo.2 *Aspergillus niger*



写真-3 クロカワカビ
Photo.3 *Cladosporium cladosporioides*



写真-4 アオカビ
Photo.4 *Penicillium citrinum*

3.2 結果および考察

表-5に除染前後の生菌数測定結果を示す。除染前の菌数がクロコウジカビで10⁴、クロカワカビ、アオカビで10⁶程度であったものが、除染の回数によらず検出されないレベルまで減少しており、1回の除染により真菌を死滅させられると考えられた。表-6の結果から

表-5 生菌数測定結果（スライドグラス上塗布）

Table 5 Examination results(on glass slide)

供試菌	場所	除染前	1回除染	2回除染
クロコウジカビ	①	5.5×10^4	<10	<10
	②	5.5×10^4	<10	<10
	③	5.5×10^4	<10	<10
	④	5.5×10^4	<10	<10
	⑤	5.5×10^4	<10	<10
	対象	5.5×10^4	3.3×10^4	1.7×10^4
クロカワカビ	①	1.4×10^6	<10	<10
	②	1.4×10^6	<10	<10
	③	1.4×10^6	<10	<10
	④	1.4×10^6	<10	<10
	⑤	1.4×10^6	<10	<10
	対象	1.4×10^6	1.2×10^6	3.2×10^5
アオカビ	①	1.8×10^6	<10	<10
	②	1.8×10^6	<10	<10
	③	1.8×10^6	<10	<10
	④	1.8×10^6	<10	<10
	⑤	1.8×10^6	<10	<10
	対象	1.8×10^6	2.1×10^6	1.5×10^6

<10：検出せず

表-6 生菌数測定結果（培地上塗布）

Table 6 Examination results(on culture media)

供試菌	場所	除染前	1回除染	2回除染
クロコウジカビ	①～⑤	30	<10	<10
	対象	30	29	30
クロカワカビ	①～⑤	68	<10	<10
	対象	68	55	63
アオカビ	①～⑤	79	<10	<10
	対象	79	78	72

<10：検出せず

も除染により菌は検出されず、濡れた状態に存在する菌に対しても効果があると考えられた。なお、同時に実施したバイオロジカルインジゲータの結果も、全数陰性であった。

以上のように過酸化水素蒸気により真菌を死滅させられる可能性が見出せたことより、真菌を餌とするチャタテムシに対しても効果的と考えられた。

4. まとめ

- 1) 過酸化水素蒸気による除染による副次的な効果を期待して、クリーンルームでクレームとなるチャタテムシに対する殺虫効果の検討を実施し、過酸化水素蒸気により致死出来る事を見出した。
- 2) 除染1回の条件では、チャタテムシの致死率は40%程度であったが、除染を連続2回実施することで致死率は100%となることがわかった。
- 3) 過酸化水素蒸気により真菌類を死滅させることができ可能であり、チャタテムシの餌の増殖を抑えすることが可能と考えられた。過酸化水素蒸気のチャタテムシに対する直接的な作用とあわせても効果的な方法と考えられた。

ただし、今回の除染では室内に露出している部分を対象としており、パーティション内部などの蒸気が届きにくい部位に対しては、建築的な対応等他の対策が必要であると考える。

参考文献

- 1) 松岡宏、富田美帆、岡崎貢、信田正義、杉浦彰彦、山本光夫：過酸化水素ミスト殺菌におけるミストの挙動とクリーンルーム殺菌時の条件検討、第24回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会予稿集、pp.69-71, 2006.
- 2) 谷壽一、伊藤壽康：無菌操作区域の昆虫類の生息状況とその発生原因、PDA Journal of GMP and Validation in Japan, Vol.8, No.1, pp.68-77, 2006.
- 3) 洞田浩文、大手山亮、益留純、川崎康司：過酸化水素蒸気による生物制御性の検討 その1 チャタテムシに対する殺虫効果、日本建築学会大会学術講演梗概集（関東）、pp.687-688, 2011.
- 4) 川崎康司、益留純、洞田浩文、大手山亮：製薬工場、無菌室での過酸化水素蒸気を用いた室内除染技術について、空気清浄、Vol.46, No.5, pp.37-43, 2012.
- 5) 洞田浩文、大手山亮、益留純、川崎康司：過酸化水素蒸気による生物制御性の検討 その2 真菌類に対する殺虫効果、日本建築学会大会学術講演梗概集（関東）、pp.689-690, 2011.