

パルス電子ビーム照射による滅菌 Sterilization using Pulsed Electron Beam Irradiation

渡邊 正人, 村越 貴成, 堀田 栄喜

Masato Watanabe, Takanari Murakoshi and Eiki Hotta

In this research, a low-energy secondary emission electron gun using wire ion plasma source was developed. The characteristics of secondary electron beam were investigated in order to achieve main objective, which is to realize the sterilization using pulsed electron beams. The electron dose per unit time was also observed by film-type dosimeter, and it was confirmed to increase at the higher repetition rate. The sterilization experiments were conducted using bacteria called *Bacillus pumilus* which is the biological indicator of radiation sterilization. It is found that the inactivation effect is intensified by increasing the repetition rate of the electron beam irradiation. Furthermore, morphological damage to the bacteria is observed by Field Emission-Scanning Electron Microscope. It is observed that the damage are caused by radial effects that it is attributed to electron beam irradiation.

Keyword: Electron Beam, Plasma, Pulsed Power Technology, Sterilization, *Bacillus pumilus*

1. はじめに

電子ビームは電子を収束・加速して得られる粒子ビームであり、物質に対する透過性および反応性をもつことから、表面処理、通信、溶接等幅広い分野で応用されている。これらに加えて、電子ビームの滅菌分野への応用が広く行われてきており、特に医療機器の滅菌技術として注目されている^[1-3]。

現在、医療機器の主な滅菌方法は、①火炎滅菌法、乾燥式滅菌法、オートクレーブを用いた高圧蒸気滅菌法、煮沸滅菌法などの加熱滅菌法、②エチレンオキシドガス (EOG) や過酸化水素を用いたガス滅菌法、③ろ過フィルタを用いたろ過滅菌法、④ガンマ線、紫外線、電子線などの照射滅菌法の 4 種類に分類できる^[4]。オートクレーブを用いた高圧蒸気滅菌法は、小型から中型で比較的 low コストであるが、高温で滅菌を行なうため、プラスチックのような樹脂材には使用できず、滅菌対象が金属やガラス材質に制限される。エチレンオキシドガス滅菌では、50~60℃の比較的低温で処理ができるが、滅菌に用いるガスは発がん性が指摘されている毒性ガスであり、また爆発性がある。さらに、ガス脱気のため 1~2 週間を必要とする場合がある。ガンマ線や電子線を用いる照射滅菌では、包装したまま滅菌できるメリットがあるが、設備が極めて大型で消費電力も高く、結果としてコストが非常に高くなる。また、照射により滅菌対象物を変質してしまうため樹脂材には適していない。このように、従来の滅菌方法は有用であるが問題点も多く、さらなる開発の進展が望まれている。

そこで本研究では、筆者らが開発したイオン衝撃二次電子銃 (Secondary Electron Emission Gun, 以下 SEEG) を用いて小型かつ低消費電力の滅菌装置の開発を目指す。SEEG は比較的コンパクトな形状ながら、高いエネルギーを持つ電子ビームを照射可能で、これまで窒素酸化物や揮発性有機化合物の分解処理への適応で成果を上げてきている^[5,6]。

これまでの研究で、SEEG は大気圧中の大腸菌に対して滅菌能力を持つことが確認されている^[7]。しかしながら、一般的に実用化されている低エネルギー電子線滅菌 (電子エネルギーが 300 keV 以下) に比して処理時間 (滅菌所要時間) が非常に長くなっていた。また、照射条件により滅菌結果にばらつきが生じるため、滅菌条件の適正化のためには滅菌要因の特定が急務の課題となっている。

よって、本論文では SEEG の殺菌能力の向上と殺菌要因の特定を目指し、SEEG の繰り返しパルス周波数を増加した時の電子ビーム分布と吸収線量の測定を行った。また、各種照射条件における滅菌実験と滅菌要因の特定を行った。

2. 二次電子銃と実験方法

図 1 に SEEG の構造を示す^[5]。SEEG はイオン衝突から得られる二次電子を利用したパルス電子ビーム源であり、その構造は大きく 3 つの領域に分けられる。イオンの発生源となるワイヤ・イオン・プラズマ源 (Wire Ion Plasma Source, 以下 WIPS)、二次電子放出と電子の加速

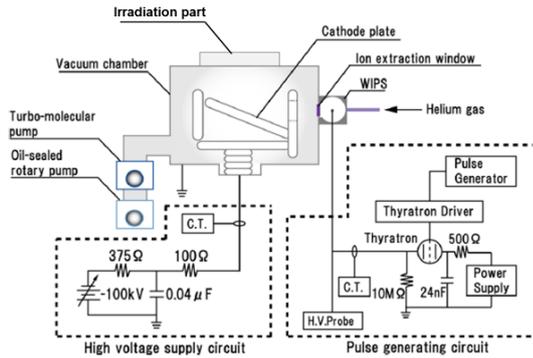


図1 イオン衝撃二次電子銃

を担う陰極板を備えた真空チャンバー、対象物の処理を行う電子ビーム照射部で構成される。WIPS はタングステン製の細線を陽極として使用し、これと同軸のステンレス製円筒を陰極としたプラズマ源である。SEEG ではこの WIPS が二次電子を得るためのイオン源として利用されている。内部にヘリウムガスを充填し、放電開始電圧よりも高いステップ電圧を印加することによりパルス放電を起こすことが可能である。真空チャンバー内には高電圧陰極板が設置されており、WIPS からイオンを引き出す。陰極板にイオンが衝突すると二次電子が発生するため、それを静電界で加速させて電子ビームを得る。また陰極板の周囲には、陰極板端部への電界集中を防ぐ目的でアルミニウム製の電界緩和プレートを設置している。SEEG の特徴として、①WIPS をパルス放電させることによってイオン電流密度の瞬時値を増大させ、パルス電子ビームのピーク出力を増大させることができること、②真空チャンバー内の陰極板はイオンビームの引き出しと電子ビームの加速という2つの役割を同時に果たすため、装置が比較的単純かつ小型であること、③WIPS の細線陽極の軸方向長さがビーム幅となるため、広範囲かつ均一なシート状の電子ビームを得ることが可能であることが上げられる。図2に真空チャンバー中のヘリウムイオンと電子ビームの軌道のイメージを示す。WIPS から発

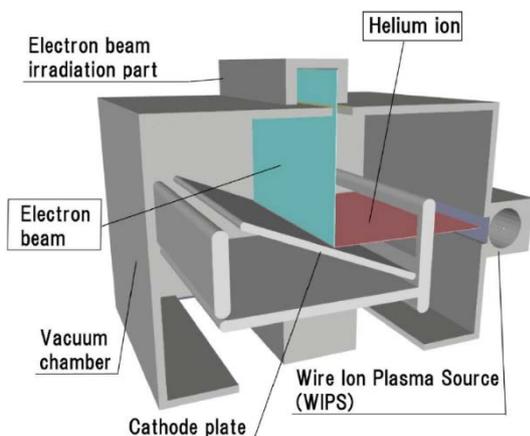


図2 イオンビームと電子ビームの軌道

生したシート状のヘリウムイオンが、陰極板に向かって進行し、傾斜した陰極板に衝突することで、イオンビームの進行方向から垂直な方向にシート状の二次電子が発生し陰極板電圧により加速される。

本装置では、大気圧中で電子ビームを照射するために、真空チャンバーと電子ビーム照射部の間に電子透過窓が設置されている。構造図を図3に示す。電子透過窓はアルミニウム製のハニカム支柱と高分子フィルムから構成される。ハニカム支柱はアルミニウム製で厚さ8 mm、セル幅3.5 mm となっている。また、本研究では高分子フィルムとして厚さ12 μm のポリエチレンテレフタレート (PET) 基材にシリカを蒸着したガスバリアフィルム (三菱ケミカル株式会社製、テックバリア VX) を用いた。本装置で、陰極板印加電圧を-100 kV とした場合、大気中で得られる電子ビームのエネルギーは64.3 keV となった。また、電子透過窓の直上には、大気圧処理チャンバーが設置されている。滅菌実験では、ここに処理対象とする菌を塗布したプレートを設置し、大気圧の環境下で電子ビームを照射して滅菌実験を行う。

なお、滅菌の定義は「病原性および非病原性を問わず、芽胞を含む全ての微生物の殺滅」であるが、微生物学の分野では滅菌とは確率的なものであり、一般的にある細菌を殺滅しても最終的に菌数をゼロにすることはできない。そこで滅菌保証レベル (sterility assurance level : SAL) を設定し、このレベルを達成した時を滅菌としている。国際的には $SAL \leq 10^{-6}$ を満たすことで滅菌としている^[8]。また、D 値 (Decimal Reduction Value) と呼ばれる値も定義されている。D 値とは、殺菌処理を行い、細菌のコロニー数が1/10 以下になる吸収線量の値のことをいう。つまり、90% 殺菌するのに必要な線量である^[8]。

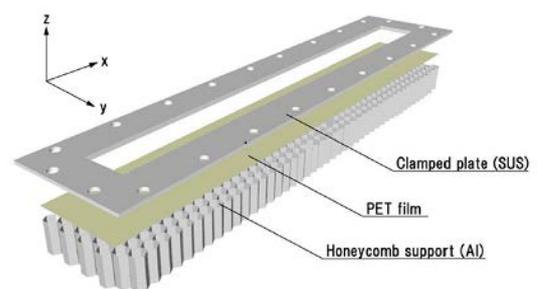


図3 電子透過窓の構造

3. 結果と考察

3.1 電子ビーム分布の測定

本実験では、他の線量計と比べて紫外線に対する感度が極めて小さく室内光で利用できる利便性、フィルムを任意の形に切断できる柔軟性から、吸収線量測定にガフクロミック (Gaf) 線量計 (ASHLAND 社, HD-V2) を使用した。まず 27 mm × 10 mm の大きさの Gaf 線量計を電子

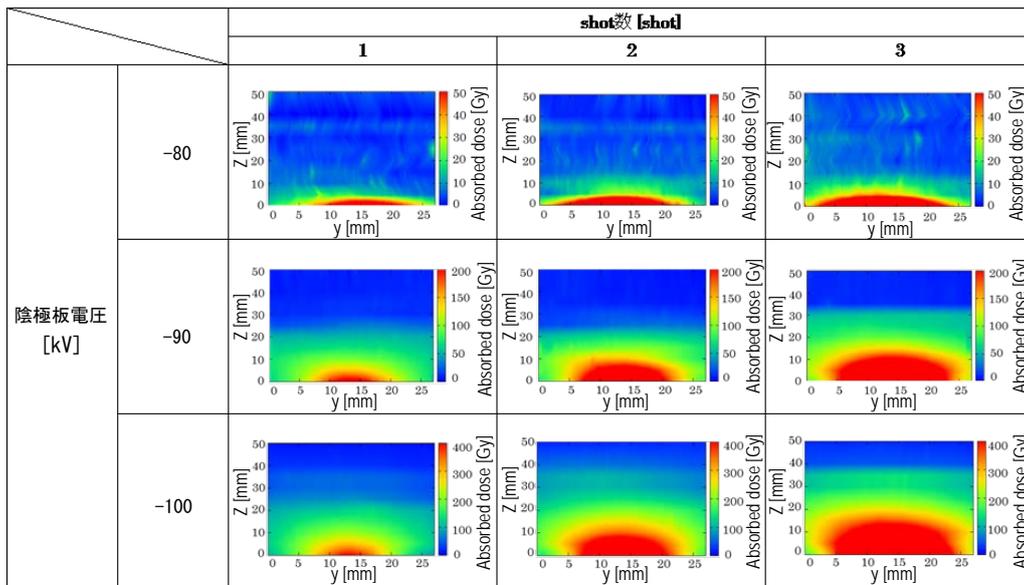


図4 陰極板電圧を変えた場合の電子ビーム強度の空間分布

透過窓の中心，および電子透過窓からビームの照射方向に 5 mm 間隔で 50 mm までの位置に設置して照射実験を行った．なお，ここで図 3 に示すように x, y および z 軸を定めると，電子ビーム幅方向である x 軸方向に対してはビームの分布変化がほとんど見られなかったため，今回は y および z 軸方向のパラメータのみを議論の対象とする．二次電子の加速電圧に相当する陰極板電圧 -80 kV, -90 kV および -100 kV で照射実験を行い，さらに各陰極板電圧について 1 shot, 2 shot および 3 shot とショット数を変化させた．照射間隔は 10 秒とし，各パラメータにおける照射実験は十分な時間を空けて行った．図 4 には各陰極板電圧において得られたビームプロファイルを示す．なお，ビームのエネルギーは吸収線量(単位 Gy)で示す．また表 1 には，各陰極板電圧時での電子ビーム照射による電子透過窓通過後の電子 1 個当たりのエネルギーと理論的に求めたビームの飛程をまとめたものを示す．

陰極板電圧が-80, -90, -100 kV と上がるにつれて，電

電圧が-80 kV 時は，ビーム進入方向の距離 z が約 10 mm 付近，陰極板電圧が-90 kV 時は，約 25 mm 付近，陰極板電圧が-100 kV 時は，約 40 mm 付近までビームエネルギー（緑色のカラーバー）が広がっていることが分かる．この結果と表 1 に示したビームの推定飛程距離を比較すると，陰極板電圧の増加に伴い理論値との飛程の差が大きくなっている．これは，ビームの発散効果によるものと考えられる．一般的にリボン状のビーム幅の増加率は，ビームの電流量に比例することが知られている^[10]．そのため加速電圧の増加により，1shot 当たりのビームの電流量が増加したことにより，ビームの発散効果の影響が大きくなったことが考えられる．このビーム発散効果の影響を考慮すると，十分に整合性がとれるデータであることが言える．これより，ビームの飛程は陰極板電圧，つまり加速電圧が一定であれば変化しないといえる．またショット数の増加による y 軸方向でのビーム分布の広が

表 1 各陰極板電圧での電子ビームのエネルギーと飛程

陰極板電圧	[kV]	-80	-90	-100
電子窓透過後の電子のエネルギー	[keV]	23.1	46.7	64.3
ビーム飛程	[mm]	6.99	28.0	49.4

子ビームの吸収線量ならびにビームの飛程が増加している．また，y 軸の中心付近のエネルギー分布の広がりより，ショット数の増加によりビームの累積電流の増加が確認できる．一方で，ビームの進入長はショット数の増加によって，ほとんど変化していないことが分かる．図 4 の各陰極板電圧でのビームプロファイルより，陰極板

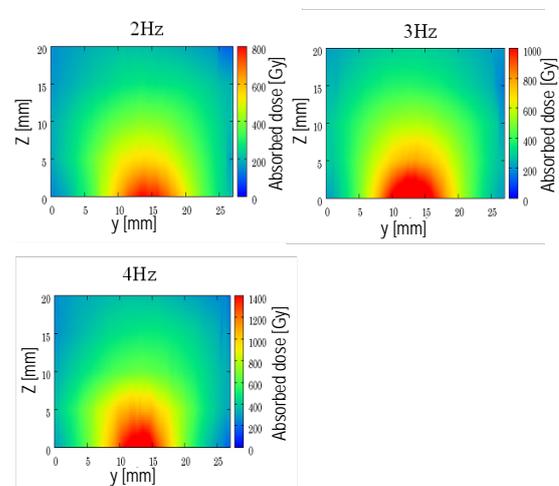


図5 繰り返しパルス周波数を変えた場合の電子ビーム強度の空間分布

りは、電子ビームの電流量の累積によることがいえる。これらのビーム特性は、異なる手法を用いて解析した研究報告^[11]ともよく一致している。

次に、繰り返しパルス周波数を増加させたときの電子ビームの空間分布を求めた。なお、SEEG の陰極板印加電圧は-100 kV とした。図 5 に繰り返しパルス周波数を変化させたときの電子ビームの空間分布の様子を示す。これより、繰り返しパルス周波数の増加に伴って、吸収線量は増加している。しかし、y 軸方向のビーム幅や z 方向へのビームの進入長は、各パルス周波数で一定であり、同様のビーム形状をしていることが確認できる。これは、ビームの飛程は電子の加速電圧によって決まるため、パルス照射によってビームの飛程は変化しないことが言える。また、繰り返しパルス照射によって、ビームの電流量は比例的に増加したためビームの形状の変化が見られなかったことが示唆される。

3.2 滅菌実験

滅菌実験には電子ビーム照射の対象菌として *Bacillus pumilus* を使用した。*Bacillus pumilus* は芽胞形成菌の一種

であり、放射線滅菌の指標菌である。芽胞形成菌の特徴として、分裂増殖が困難な環境になると芽胞と呼ばれる特殊な構造を形成する。芽胞は熱や乾燥、消毒薬に強い抵抗性を示し、放射線に対しても強い耐性をもつ。実験では、*Bacillus pumilus* を寒天培地上に形成されるコロニー数を示すコロニー形成単位 CFU (Colony Forming Unit) が 10^4 CFU となるように塗布し、電子ビームを照射した^[12]。各繰り返しパルス周波数で電子ビームを 2 kGy 刻み

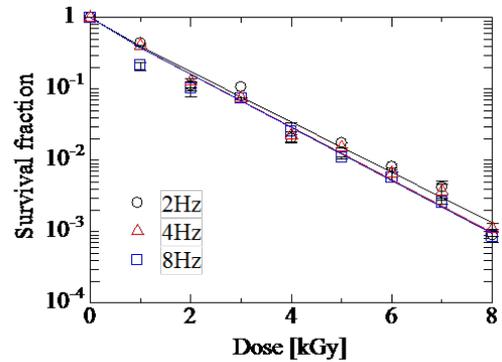


図 7 吸収線量の変化に対する *Bacillus pumilus* の生存曲線

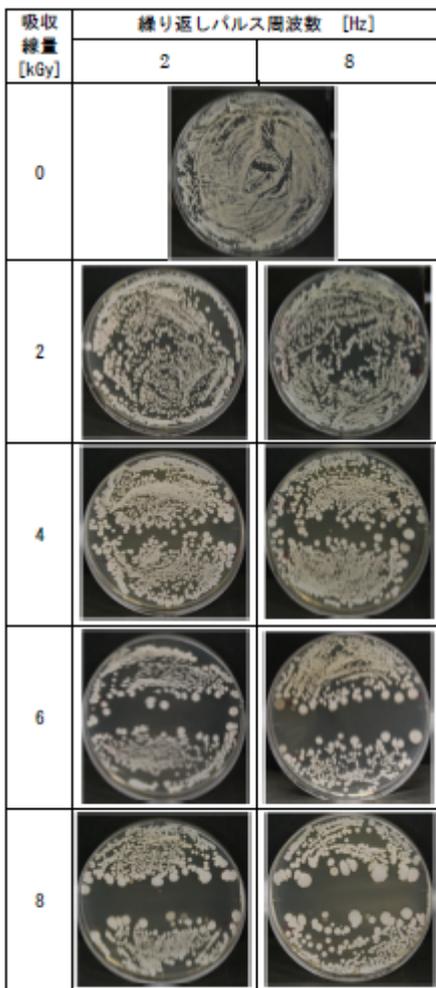


図 6 各繰り返しパルス周波数における *Bacillus pumilus* 観測写真

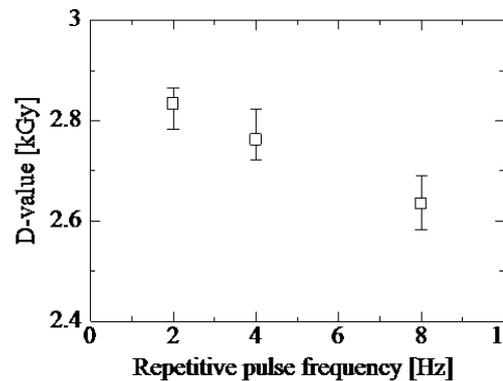


図 8 各繰り返しパルス周波数での D 値の比較

で照射し、8 kGy まで照射した。繰り返しパルス周波数 2 Hz と 8 Hz 時におけるそれぞれの吸収線量の時のコロニー数の変化の観測写真を図 6 に示す。図 6 から各照射線量と繰り返しパルス周波数の時の生存コロニー数を計測し、各繰り返しパルス周波数の吸収線量の変化に対するコロニー生存率の変化をまとめたものを図 7 に、各繰り返しパルス周波数の変化に対する D 値の比較を図 8 に示す。

各繰り返しパルス周波数で電子ビーム照射を行った結果、図 7 の生残曲線より、吸収線量を増加させるにつれコロニー数が減少していることが確認できる。また図 8 より、繰り返しパルス周波数の増加に伴い、D 値が減少していることが分かる。各繰り返しパルス周波数での D 値は、2 Hz 時は 2.83 kGy、4 Hz 時は 2.70 kGy、8 Hz 時は

2.63 kGy であった。この D 値は、実験の環境、例えば、培地の成分などによって変化するものであるが、一般的に *Bacillus pumilus* の D 値は、約 1.4~2.3 kGy との報告がある^[13]。今回の実験では、電子ビーム照射前後に培地表面を十分に乾燥させ、培養したためこれらの研究より少し高い D 値となったことが考えられる。また、殺菌効果は単位時間当たりの線量率に依存しないという報告^[14]があるが、本結果より繰り返しパルス周波数を増加させるに伴って D 値は減少している。一般的な定義では無菌性保証水準(SAL) $\leq 10^{-6}$ となる時に滅菌となるので、滅菌に必要な吸収線量は D 値を 12 倍して、繰り返しパルス周波数が 2 Hz のときは約 34.0 kGy、8 Hz のときは約 31.6 kGy である。この結果より、各繰り返しパルス周波数での滅菌所要時間を求め比較すると、2 Hz 時は約 1 分 34 秒であるのに対し、8 Hz 時は約 22 秒であり、滅菌時間を 1 分以上短縮することが出来たことになる。以上の結果より、SEEG の繰り返しパルス周波数を増加させると殺菌効果は向上し、滅菌時間の大幅な短縮が可能となることが分かった。

3.3 FE-SEM による菌の観察

電子ビームの照射が菌に与える物理的影響を明らかにするために、電界放射型走査電子顕微鏡(日立ハイテクノロジー社製, S-5500)を用いて、電子ビーム照射前後の菌の観察を行った。図 9(a)に電子ビーム未照射の試料の様子を、図 9(b)に電子ビーム照射後の試料の様子を示す。これより、菌に電子ビームを照射することにより、菌表面に穴があげられていることが確認できる。この要因として、SEEG の電子ビーム照射によって芽胞内の水分子が放射線分解され、ラジカルを生成することによって、DNA 鎖だけでなく細胞にも物理的な損傷を与えたことによるものと考えられる^[15]。図 9(b)では電子ビーム照射によって、芽胞殻だけでなく菌内部が深くえぐられている様子からコアの部分にも損傷を与えていることが確認できる。これにより、芽胞は完全に不活性化されており、SEEG のような低エネルギー電子加速器での照射であっても、菌に対する吸収線量を確保することが出来れば、十分な殺菌能力を持つことが可能となる。なお、全ての菌に同様な外的損傷が見られなかったのは、ラジカルが生成される位置、すなわち電子ビームの当たり方のばらつきで、損傷の程度が異なったためであると推測される。

次に、ラジカルの影響をさらに調査するために、電子ビーム照射前の細胞にラジカル捕捉剤を添加して実験を行った。ラジカル捕捉剤とは、特定のラジカル反応を防止ならびに阻止することを目的とした化学物質で、本実験では特に殺・滅菌に効果を及ぼすとされている OH ラジカルを捕捉するために、グリセリン 1.5%とペプトン 2%を添加した^[16]。図 10(a)はラジカル捕捉剤を加えた菌に、図 10(b)はラジカル捕捉剤を添加していない菌に、それぞれ繰り返しパルス周波数 8 Hz で 20 kGy の電子ビームを照射した結果である。ラジカル捕捉剤を添加しない場合は図 9(b)と同様に、菌表面に穴が形成されている

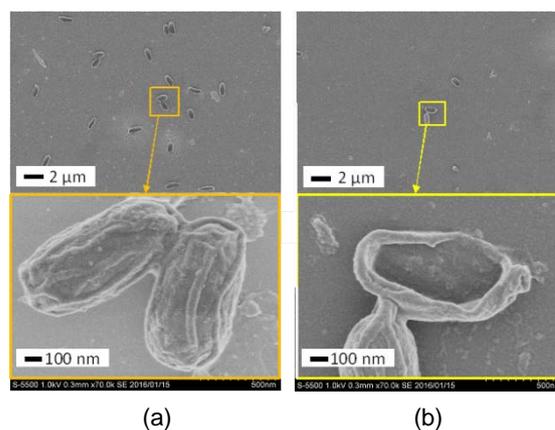


図 9 電子ビーム照射の有無による菌の違い

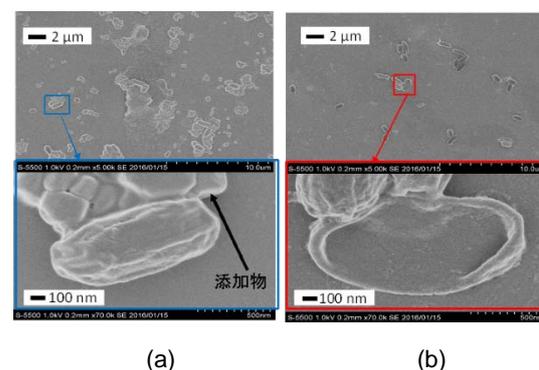


図 10 ラジカル捕捉剤の有無による電子ビーム照射後の菌の違い

のに対し、ラジカル捕捉剤を添加した場合は電子ビーム照射による菌表面の外的損傷が見られなかった。この結果は、電子ビームによる直接作用のみでは細胞膜は損傷を受けず、物理的な損傷を受けるのは放射線分解により発生するラジカルによってであることを示している。本実験結果と同様に、放射線に耐性を持つ菌に対する放射線の直接作用では、細胞膜の傷害は全く起こらないことが過去に報告されている^[17]。

以上の結果より、SEEG による電子ビーム照射によって芽胞のコアに損傷を与え、菌を不活性化していることを確認できた。また、電子ビーム照射による外的損傷は、放射線分解により発生するラジカルの影響であることが示された。

4. まとめ

イオン衝撃二次電子銃を用いて発生した電子ビームのビーム特性を計測した。また、この電子ビームを用いて、芽胞形成菌の一種である *Bacillus pumilus* の滅菌を行った。得られた結果を要約すると、

- ・ガフクロミック線量計による電子ビームの空間強度分布を計測し、電子ビームの加速電圧および繰り返しパルス数を変えた場合のビームプロファイルと飛程を明らかにした。
- ・SEEG の繰り返しパルス周波数を増加させると殺菌

効果は向上し、滅菌時間の大幅な短縮が可能となることを示した。本実験では、繰り返しパルス周波数を 2Hz から 8Hz に増やすと滅菌時間は約 1/4 に短縮された。

- ・電子顕微鏡を用いた観察により、電子ビーム照射により菌表面が物理的な損傷を受け、これが菌を死滅に導くこと、また、滅菌にはラジカルの存在が大きく関与しているところを明らかにした

本研究の手法による滅菌処理法が確立され、SEEG が小型の汎用滅菌処理装置として実用化されることになれば、現在非常に大規模な滅菌システムを使用している医療機関や企業等に導入することで、滅菌プロセスの高効率化、低コスト化が図られ、社会的にも大きな貢献が期待できる。

参考文献

- [1] J. H. Bly: "Sterilization of medical devices with electron beam vscobalt 60", *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 33, No. 2, pp. 179-180 (1989).
- [2] H-J. Kim, J-S. Ham, J-W. Lee, K. Kim, S-D. Ha, C. Jo: "Effects of Gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into sliced and pizza cheeses", *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 79, No. 6, pp. 731-734 (2010).
- [3] 渡辺隆行:「放電・プラズマを応用した殺菌・滅菌」, プラズマ・核融合学会誌, Vol. 75, No. 6, pp.651-658 (1999).
- [4] 永津雅章:「医療バイオ分野へのプラズマ応用 3. プラズマ滅菌」, プラズマ・核融合学会誌, Vol. 83, No. 7, pp.601-606 (2007).
- [5] P. R. Charise, M. Ishikawa, M. Watanabe, A.Okino, K.-C. Ko, E. Hotta: "Side-Extraction-Type Secondary Emission Electron Gun Using Wire Ion Plasma Source", *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.40, No.2B, pp.1118-1121 (2001).
- [6] P. R. Chalise, Y. Wang, K. A. Mustafa, M. Watanabe, Y. Hayashi, A. Okino, E. Hotta: "NOx Treatment Using Low-Energy Secondary Emission Electron Gun", *IEEE Transactions on Plasma Science*, Vol.32, No.3, pp.1392-1399 (2004).
- [7] P. R. Chalise, M. S. Rahman, H. Ghomi, Y. Hayashi, M. Watanabe, A. Okino, T. Ano, M. Shoda, E. Hotta: "Bacterial Inactivation Using Low-Energy Pulsed-Electron Beam", *IEEE Transactions on Plasma Science*, Vol.32, No.4, pp.1532-1539 (2004).
- [8] ヤン・ハユス:「医療現場の清浄と滅菌」, 中山書店, 東京, pp. 81-83 (2012).
- [9] H. Cember, T. E. Johnson: "Introduction to Health Physics", McGraw-Hill Companies Inc. (2009).
- [10] 石井順三:「荷電粒子ビーム工学」, コロナ社, 東京, pp. 36-37 (2001).
- [11] 深町明日菜:「低エネルギー二次電子銃を用いた VOC の高効率分解」東京工業大学修士学位論文, pp.33-40 (2007).
- [12] 村越貴成, 渡邊正人, 堀田栄喜:「イオン衝撃二次電子銃による芽胞形成菌の不活性化実験」, 平成 27 年電気学会全国大会講演論文集, p.123 (2015).
- [13] H. N. Prince: "D-Values of Bacillus pumilus Spores on Irradiated Devices (Inoculated Product)", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 36, No. 2, pp. 392-393 (1978).
- [14] A. Tallentire, A. Miller, J. Helt-Hansen: "A comparison of the microbial effectiveness of gamma rays and high and low energy electron radiation", *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 79, Issue 6, pp. 701-704 (2010).
- [15] S. E. Fiester, S. I. Helfinstine, J. C. Redfearn, R. M. Uribe, C. J. Woolverton: "Electron Beam Irradiation Dose Dependently Damages the Bacillus Spore Coat and Spore Membrane", *International Journal of Microbiology*, Vol. 2012, Article ID 579593, pp. 1-9 (2012).
- [16] 伊藤均:「大腸菌及び関連細菌の放射線感受性に及ぼすフリーラジカルと培養基の影響」, 食品照射, Vol. 35, No. 1-2, pp. 1-6 (2000).
- [17] D. L. Popham, S. Sengupta, P. Setlow: "Heat, Hydrogen Peroxide, and UV Resistance of Bacillus subtilis Spores with Increased Core Water Content and with or without Major DNA-Binding Proteins", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 10, pp. 3633-3638 (1995).

(原稿受付 2017/11/27, 受理 2018/03/28)

*渡邊正人, 博士 (工学)

職業能力開発総合大学校, 能力開発院, 〒187-0035 東京都小平市小川西町 2-32-1

Masato Watanabe, Faculty of Human Resources Development, Polytechnic University of Japan, 2-32-1 Ogawa-Nishi-Machi, Kodaira, Tokyo 187-0035.

Email: m-watanabe@uitech.ac.jp

*村越貴成

新日鐵住金株式会社, 名古屋製鐵所, 〒476-8686 愛知県東海市東海町 5-3

Takanari Murakoshi, NIPPON STEEL & SUMITOMO METAL CORPORATION, 5-3 Tokai-cho, Tokai, Aichi 476-8686.

Email: murakoshi.g7p.takanari@jp.nssmc.com

*堀田栄喜, 工学博士

東京工業大学, 科学技術創成研究院, 〒226-8502 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

Eiki Hotta, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502.

Email: ehotta@es.titech.ac.jp