

エチレンオキサイドおよびプロピレン オキサイドによるガス滅菌試験

植 村 誠 次⁽¹⁾
山 家 義 人⁽²⁾

I 緒 言

エチレンオキサイドおよびプロピレンオキサイドは、その毒性のわりに殺菌力が強く、かつ、滅菌する対象物の物理的、化学的諸性質をいぢるしく変化させないので、特にアメリカにおいては古くから穀類、食料品、果物等の病害、虫害防除のための燻蒸剤として使用されており⁹⁾²³⁾、また、医学方面でも器物、衣類等の殺菌に用いられ^{11)~15)}、最近は土壤病原菌、あるいは土壤の滅菌剤としても注目されるに至つてきた。^{1~6)8)17)~21)24)}

筆者らも微生物学研究の立場から、主として微生物および寄主植物培養用の培地を対象として、これらの薬剤を用いて二、三の滅菌試験を行なつたので、その結果の一部を取りまとめて発表し、参考に供するしだいである。

本実験実施に際し、ご協力をいただいた土壤調査部西田富美子氏にお礼を申し上げる。

II 材料および実験方法

1. 使用滅菌剤およびその特性について

a) エチレンオキサイド (ethylene oxide; 1,2-epoxy-ethane, $(CH_2)_2O$): 比重 0.89, 沸点 $10.7^\circ C$]の無色腐蝕性の液体で、水と容易に化合してエチレングリコール (ethylene glycol) となる。ガス比重は 1.3, 空気と混合 (3~80%) すると引火性を帯びる。

なお、エチレンオキサイド 1 容に液体炭酸ガス 9 容を混じて生じた化合物は、カルボオキサイド (carboxide) といわれ、これは多少腐蝕性を有し、また刺激性もいぢるしい。しかし、浸透性が強く、かつ殺菌後比較的容易に残存ガスの毒性を除去できるので、食品、穀類、家具等の病虫害の燻蒸剤として広く用いられている。

エチレンオキサイドの毒性は、塩素ガス、亜硫酸ガスより弱く、クロロホルム、四塩化炭素より強く、アンモニアガスにはほぼ匹敵するものとされている。

1,000 ft^3 の穀類を燻蒸するのに 3 lb のエチレンオキサイド (あるいはこれに 27 lb のドライアイスを加えたもの) で十分とされている。

PHILLIPS^{13)~16)} によれば、エチレンオキサイドの殺菌機構は、本剤が単純な有機化合物および蛋白質をアルキル化する作用によるもので、すなわち、エチレンオキサイドの不安定な水素イオンが微生物の蛋白質と結合して、微生物の蛋白質を変性にして死に至らしめるものとしている。

b) プロピレンオキサイド (propylene oxide; 1,2-epoxypropane, C_3H_6O): 比重 0.86, 沸点 $34.5^\circ C$ の無色の液体で、 $20^\circ C$ ではほぼ 40% 水に溶解しプロピレングリコール (propylene glycol) となる。アルコール、エーテルと混和し、ガス比重は 1.9, 空気と混和 (2.1~21.5%) して引火性を帯びる。本剤は

(1) 土壤調査部土壤肥料科土壤微生物研究室長・農学博士 (2) 土壤調査部土壤肥料科土壤微生物研究室員

エチレンオキシドに比しいく分滅菌力が劣るが、種子の発芽を害する程度が前者より多少弱いとされている。糸状菌、酵母の滅菌には 1 l について 0.3 cc で足りるという。

以上の薬剤のうち、特にエチレンオキシドは、その蒸発点が高いので室温で使用するのに不便な場合が多いので、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、イソプロピルフォルマリン (isopropyl formate) を適当に混じて、蒸発点を 95° から 136°F の間に保つようにした混合薬剤もガス殺菌剤として用いられている⁷⁾。

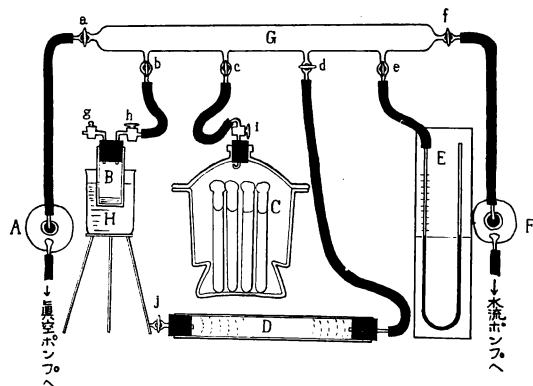
これらの薬剤は、本邦ではこれまであまり市販されていなかったので入手しがたく、かなり高価なものであつたが、最近石油工業界で非イオン界面活性剤の原料およびエチレングリコール等の生産のため工業的にかなりの量産が行なわれている¹⁰⁾。

実験に供した薬剤は、いずれも冷蔵庫 (0°C) 内の密栓したガラス瓶に貯蔵して、使用時に必要量だけ蒸発用ガラス容器に移して用いた。

2. 滅菌装置および滅菌方法

最初は予備的にかなり粗放な、間に合わせの装置で試験を実施したが、その後装置を改良して、次の減圧の場合と常圧の場合の2つの装置により滅菌試験を行なつた。

A. 減圧滅菌



第1図 減圧滅菌装置

Fig. 1 Apparatus A for the sterilization in reduced pressure.

- A. 汚過瓶(真空ポンプと連結) : (Filtering flask connected with vacuum pump.)
- B. 蒸発器 (Vaporization vessel, heavy walled glass vessel, 5×10 cm)
- C. 滅菌用デシケーター (Sterilizing chamber, vacuum desiccator, 10 l)
- D. 汚過管 (Filtering tube stuffed with cotton, 4×30 cm)
- E. 水銀圧力計 (Mercury manometer)
- F. 汚過瓶(水流吸引器と連結) : (Filtering flask connected with a water aspirator pump.)
- G. 分岐ガラス管 (Glass tube with six stopcocks, 2×35 cm)
- H. 保温用ビーカー (Beaker filled with hot water 80°C)
- a-j. 活栓 (Stopcocks)

減圧による滅菌試験は ALLISON³⁾ の報告を参照して、第1図のような装置を用いた。

すなわち、a, b, c, d, e, f の6箇所の通路をもつた真空用ガラス分岐管 (G: 各通路に活栓付) を中心として、それぞれ耐圧ゴム管で、aは吸引瓶 (A) を経て真空ポンプに、bは蒸発用ガラス容器 (B: 厚さ 2 mm, 内径 5 cm, 高さ 8 cm, 上部は大型ゴム栓で密栓し、ゴム栓の中央部は、それぞれ外部に活栓を有するガラス管が内部に通じている) に、cは約 10 l 入りの減圧用デシケーター (C: 内径 25 cm, 高さ約 25 cm) に、dは汚過用ガラス管 (D: 厚さ 1.5 mm, 内径 3 cm, 長さ 50 cm のガラス管の内部に、比較的密に綿が封入してあり、両端は、中央にガラス管を通したゴム栓で封じてあり、外気と通ずる方のガラス管には活栓 j を有する) に、eは水銀圧力計 (E) に、fは吸引瓶 (F) を経て水流ポンプに通じている。

滅菌操作は以下の順序で実施した。

- 1) 滅菌試料は、いずれも綿栓した大型試験管 (内径 3.5 cm, 長さ 22 cm), あるいは

普通の小形試験管 (内径 1.5 cm, 長さ 16 cm) に入れて実験に供した。ただし土壌の一部は普通のシャーレの中に入れ、ふたをして行なつた。

まず、試料のはいつた試験管およびシャーレをデシケーター中に入れる。

2) 次に、それぞれの活栓を調節して、真空ポンプにより、デシケーター(C)、汙過器(D)および分岐管(G)内の圧力を、連結した圧力計(F)の指標が所定の圧力を示す点まで減圧し、直ちに a の活栓をとじる。本実験では、蒸発器を連結する際、減圧が 5 mm 程度もどるので、それを考慮に入れて、所定の減圧より、いくぶん強めに減圧した。また、この際漏出箇所がないかを気圧計で調査した。

3) 次に、事前に冷蔵庫内で冷却しておいた蒸発器(B)に、所定量の薬液 (従来の予備試験結果より一部液化する量も考慮して 10 l の容積に対しエチレンオキシドは 15 cc, プロピレンオキシドは 18 cc 使用) を入れてゴム栓をし、できるだけ速やかに、b と連絡した耐圧ゴム管と連結し、b の活栓と蒸発器の活栓(h)を開いて、薬液のガスが分岐管内に移行するようにする。

4) 次に薬液の気化を促すため、蒸発器の底部を、約 80°C の温湯を入れたビーカー(H)に浸す。ガスはいずれも引火しやすいので、バーナーによる加熱は行なわず、必要に応じ温湯を数回取り換えた。

5) 気圧計が常圧に戻つたら、b, e の活栓を閉じ、蒸発器を取り除き、残りの薬液は取り捨てる。

6) 以上のままで一定の時間放置することにより、分岐管、汙過管、デシケーターの内部は所定の滅菌操作を受けたこととなる。

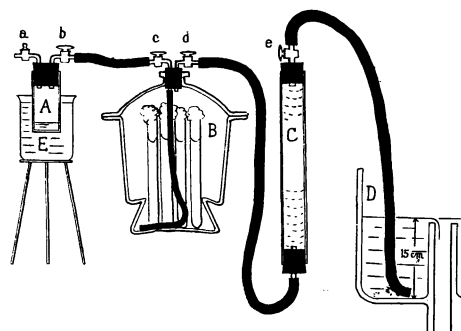
次に、f の活栓を開いて、水流ポンプで減圧して、内部のガスを除去した後、活栓を閉じ、汙過管(D)の活栓(j)を少し開いて、空気を導入する。以上の操作を数回 (5~6 回) 反復した後、f の活栓を閉じ、a の活栓を開いて、今度は真空ポンプによる同様なガスの排除 (約 50 mm, 減圧の程度は培地の種類により多少加減した) を数回実施する。

なお、滅菌試料の種類のいかんによつては、残存ガスがなかなか除去されないで、この場合は試料をそのまま封入したデシケーターを 30°C の恒温器に入れて、毎日、汙過管を通じて、真空ポンプによる残存ガスの除去を、排除ガスの臭気なくなるまで実施した。

B. 常圧滅菌

常圧による滅菌試験には第 2 図のような装置を用いた。

すなわち、熱湯に浸した蒸発器(A)から発生したガスは、デシケーター(B)の上部のゴム栓を貫く 2 つのガラス管の一方 (本管は内部でゴム管と連結し、デシケーターの底部に達する) からデシケーター中に入り、デシケーター中の空気および余分のガスは他の排気用ガラス管から汙過器(C)に



第 2 図 常圧滅菌装置

Fig. 2 Apparatus B for the sterilization in normal pressure.

- A. 蒸発器 (Vaporization vessel, heavy walled glass vessel, 5×10 cm, contained with ethylen oxide 15 cc or propylene oxide 18 cc)
- B. 滅菌用デシケーター (Sterilizing chamber, vacuum desiccator, 10 l)
- C. 汙過管 (Filtering tube stuffed with cotton, 4×30 cm)
- D. 水槽 (流水を 15 cm の深さに保持する)
: Sink (filled with running tap water at the depth of 15 cm)
- E. 保温用ビーカー (Beaker filled with hot water 80°C)
- a~e. 活栓 (Stopcocks)

入り、最後にゴム管を通じ流し(D)の流水中に排除されるものである。なお、デシケーター内部に多少圧力が加わるように排気用ゴム管の末端は、Dに見られるように水面下 15 cm の所にくるようにした。

薬液の量は減圧の場合と同量を使用し、蒸発器内の薬液の気化が完了したら、デシケーターと蒸発器を通ずる活栓(b, c)および汙過器の活栓(e)を閉じ、所定の時間放置する。滅菌完了後は、水流ポンプと真空ポンプを用い、前の場合と同様、数回デシケーター中の残存ガスの排除を汙過管を通じて行なう。

なお、エチレンオキサイドは、比較的低温 (10.8°C) でも気化しやすく、室温も 20°C 内外を示していたので室内で滅菌操作を実施した。プロピレンオキサイドは蒸発温度が 34.5°C で、最初は室温 (20°C 内外) で実施したが、ガラス管等の通路の内側で、気化したガスのかかなりの量がふたたび液化する傾向が見受けられたので、後半の試験では、実験を 50°C に保持した大型定温器内で行なつた。なお、ガスは引火性があるので蒸発器の加熱には温湯 (80°C) を使用した。

III 滅菌試料の種類

最初は予備的に、種々なる試料について異なつた減圧および滅菌時間で、いろいろな滅菌試験を行なつたが、系統的試験としては、第 1 表記載の試料について、同表記載のごとき圧力および滅菌時間で試験を実施した。

シャーレに入れた土壌の場合を除いて、試料は前述のごとく試験管 (大型または小型) に入れ、綿栓してデシケーター中で滅菌した。

滅菌状態の検査は、土壌あるいは土壌水溶液の場合は、滅菌完了後、試料の一部 (なるべく中心部) を白金耳で、肉汁・ブドウ糖寒天および酵母水・ブドウ糖寒天培地に移植して、28°C で 3 週間培養の結果判定した。また、培養基または培養液の場合は、同様 28°C で 3 週間定温器内に放置後、培地に微生物発生の有無により判定した。なお、特に別記しないもののほかは、同一試料については 2 回の繰返しを行なつた。

滅菌試料の種類、調製法は以下のようである。

1. 土壌の滅菌試験

試料土壌には、林業試験場目黒苗畑の黒土 (表土)、赤土 (心土) および石英砂 (粒径約 1 mm, 前年度砂耕培養に使用し、そのまま屋外に放置したもの) を使用した。

(a) 上記各土壌を、それぞれ大型試験管に 50g, 小型試験管に 5g, シャーレに 5g 入れ、試験管は綿栓し、シャーレはふたをして試験に供した。供試土壌のうち黒土および赤土は採集直後でかなり湿つており、石英砂は気乾状態を呈していた (第 1 表参照)。

(b) また、これらの土壌が水溶液の状態でも滅菌されうるか否かを検するため、小型試験管中に水道水 10 cc を入れ、これに上記黒土、赤土をそれぞれ 2g 加えて十分振とうした後、綿栓して試験に供した (第 1 表参照)。

(c) このほか、土壌の滅菌と、残存ガスの毒性除去の程度を知るため、直径 9 cm (3 寸) の素焼鉢に黒土約 300g を入れ、日本紙で十分包装したもの 20 個を、大型デシケーター (径約 50cm, 高さ 50cm) に入れ、エチレンオキサイドを用いて A 法 (減圧 50 mm) で 24 時間滅菌を行なつた。

所定の滅菌完了後、数回水流ポンプおよび真空ポンプによる残存ガスの除去を行ない、大型デシケーターに入れたまま 30°C の定温器中に貯蔵し、1 日 1 回真空ポンプによるガスの除去 (50 mm) を行なつた。

これらの滅菌鉢の土壌については、滅菌直後、1週間目、2週間目および3週間目に、土壌の滅菌状態を調査するとともに、鉢にオオバヤシヤブシの種子を播種して、その発芽および生育におよぼす土壌中の残存ガスの毒性の影響を観察した。

2. 培地の滅菌試験

肉汁・ブドウ糖および酵母水・ブドウ糖の寒天および液体培地に土壌を加えて、ガス滅菌が可能であるか否かを調査するとともに、一部の培養液については、エチレンオキシドによる培地 pH の変化、培地毒性の除去、高圧滅菌による培地 pH の変化との比較などの調査を行なった。

(d) 綿栓試験管内の酵母水・ブドウ糖寒天培地 (約 10 cc) を加熱熔融し、その凝固前 (約 40°C) に、黒土あるいは赤土を、それぞれ 2g 加えて、斜面にしたものを試験に供した。

(e) 酵母水・ブドウ糖培養液および肉汁・ブドウ糖培養液を、各 10 cc あて小形試験管に分注し、綿栓後滅菌に供した。

(f) 培養液の pH の変化に関する試験

試験管内に約 10 cc の、種々なる pH 段階の酵母水・ブドウ糖培養液あるいは寒天培地を入れたものについて、前述の装置を用いてエチレンオキシドによる滅菌試験を実施した。本方法による滅菌は、薬液量、減圧の程度、滅菌時間、処理温度、残存薬剤の除去方法のいかん等により、滅菌処理後の pH の変化にかなりの差異が認められたので、ここでは 1, 2 の実験結果の例を記載し、その傾向をうかがうことにとどめた。

なお、ガス滅菌と同時に、同じ材料について、従来の加圧滅菌を行ない、培地の pH の変化を、ガス滅菌の場合と比較した。また、ガス滅菌を行なった培地については、残存ガスを減圧あるいは加温によつて除去した後、培地に微生物を移植して、その発育状態から毒性除去の程度を判定した。

3. 種子の滅菌試験

(g) 綿栓した試験管中にモクマオウ (*Casuarina* sp.), オオバヤシヤブシ (*Alnus Sieboldiana*), ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*) の種子をそれぞれ 5g 入れたものを試料とした。滅菌完了後の種子の一部は、シャーレ中の酵母水・ブドウ糖寒天培地上で、25°C で 3 週間培養して、滅菌状態の検定ならびに発芽力を調査した。

以上 a~g の試料のうち、c, f を除いた滅菌試験に適用した減圧および滅菌時間は第 1 表に記載のようであつて、c, f, すなわち小鉢の土壌および pH に関する滅菌試験では、いずれもエチレンオキシドによる 50mm, 24 時間の滅菌を行なった。

IV 試験結果ならびに考察

1. 試料 a, b, d, e についての試験結果

滅菌試料 a, b, d, e の試験結果は、第 1 表記載のとおりである。滅菌試料にはいずれも同一試料について 2 回の繰返しを行ない、2 回とも滅菌された場合は滅菌完全(—), うち 1 個でも不完全な場合は滅菌不完全(+)として取り扱った。

すなわち以上の結果から判断して、このような種類および量の試料を、エチレンオキシドならびにプロピレンオキシドで滅菌する際は、24 時間内の滅菌処理の範囲内では、減圧程度を高くし、滅菌時間を長くするほど滅菌効果があがつている。

第1表 エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドによる気相滅菌試験結果

Table 1. Results of the vapour-phase sterilization with ethylene oxide and propylene oxide.

試料 Material		滅菌剤 Fumigant	圧力(温度) Pressure (temp.)	時間 Time (h)	エチレンオキシド Ethylene oxide									プロピレンオキシド Propylene oxide					
					Hg 10mm			Hg 50mm			Hg 760mm			Hg 10mm		Hg 50mm		Hg 10mm 50°C	760 mm 50°C
					0.5	6.0	24	0.5	6.0	24	0.5	6.0	24	0.5	24	0.5	24	24	24
a	黒土 Black soil	40g	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-		
	〃	5g	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-		
	赤土 Red soil	40g	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	〃	5g	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	石英砂 Quartz sand	40g	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	〃	5g	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-		
	黒土(シャーレ) *Black soil in a petridish	5g	+	+	-	+	+	-	+	+	-								
	赤土(シャーレ) *Red Soil in a petridish	5g	+	+	-	+	+	-	+	+	-								
	石英砂(シャーレ) *Quartz sand in a petridish	5g	+	-	-	+	-	-	+	+	-								
b	黒土 2g+水道水 10cc Black soil 2g+tap water 10cc		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
	赤土 2g+水道水 10cc Red soil 2g+tap water 10cc		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+		
d	黒土 2g+酵母水・ ブドウ糖寒天 10cc Black soil 2g+yeast- extract agar 10cc		+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-		
	赤土 2g+酵母水・ ブドウ糖寒天 10cc Red soil 2g+yeast- extract agar 10cc		+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
e	酵母水・ブドウ糖培養液 10cc Yeast-extract glucose solution 10cc		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	肉汁・ブドウ糖培養液 10cc Bouillon glucose solution 10cc		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
g	モクマオウ種子 Seed of <i>Casuarina</i> sp. 5g		+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	オオバヤシヤブシ種子 Seed of <i>Alnus</i> <i>Sieboldiana</i> 5g		+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		
	ニセアカシア種子 Seed of <i>Robinia</i> <i>pseudoacacia</i> 5g		+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-		

注：*印以外の試料は、綿栓試験管中に封入後滅菌；+印は滅菌不完全；—印は滅菌完全

Note: The materials except ones with * were placed in plugged test tubes and sterilized;

+ Not sterilized; — Sterilized.

しかし、エチレンオキシドの24時間の滅菌処理では、滅圧程度のいかんに関係なく、ほぼ同程度の良好な滅菌効果を示した。すなわち、10 mm, 50 mm, あるいは常圧の24時間処理で、黒土あるいは赤土2gを含んだ水溶液の試料の場合を除いては、いずれの試料も滅菌された。

したがって、このような種類および量の試料を、エチレンオキシドのガスで滅菌する場合は、室温が20°C以上であれば、特に滅圧操作を施さなくとも、大部分のものを滅菌することができるものと考えられる。

なお、本試験の対象としては取り扱わなかつたが、特に試料が液状を呈するものは、その液層の厚さによつて滅菌の程度に差異を生じ、たとえばeの試料、すなわち、培養液50ccを、液層の高さが7cmになる大型試験管に入れた場合は、常圧、24時間の処理で滅菌できたが、液層が20cmになる小型試験管に入れた場合は10 mm, 24時間の処理でも滅菌が不十分であつた。

プロピレンオキシドの場合は、室温(20°C)で実施したものは、気化したガスが液化しやすかつたため、エチレンオキシドに比べてかなり滅菌力が劣つており、10 mm, 24時間の滅菌操作でも黒土および黒土を含んだ水道水ならびに寒天培地の滅菌には不十分であつた。しかし、50°Cで行なつた場合は、きわめて強力な滅菌効果を示し、10 mm, 24時間の殺菌処理では、エチレンオキシドの10 mm, 24時間処理でも滅菌不完全であつた上述の試料を完全に滅菌した。

普通プロピレンオキシドはエチレンオキシドに比べ、いくぶん滅菌力が劣るとされているが50°Cでの滅菌力は、20°Cのエチレンオキシドの滅菌力よりすぐれた結果が得られた。

また、これらの薬剤は、一般に湿つた試料より乾燥した試料に対して滅菌力が強く、また、残存毒性の除去も容易であるとされているが、本試験の結果では、毒性の残存、あるいは除去の問題は別として、水溶性の、あるいは寒天状の試料でも、ある程度の量は滅菌しうることが明らかにされた。

2. 試料 c についての滅菌効果

本試験はエチレンオキシドによる滅菌土壌の残存ガスの毒性の除去を目的としたものである。すなわち、20個の日本紙で十分包装した直径3寸の素焼鉢に入れた土壌(黒土)300gは、50 mm 24時間の滅菌処理によりいずれも完全に滅菌することができた。なお、滅菌処理後数回水流吸引器および真空ポンプでガスの排除を行ない、5個あて次の4区分を設けて、オオバヤシヤブシ種子の播種を行なつた。

i) 直ちにオオバヤシヤブシ種子を播種して、温室で培養、発芽、生育状態を調査した。まだ土壌は、エチレンオキシドのかんりのガス臭を放つており、種子の発芽は全然認められなかつた。

ii) デシケーター中に鉢を入れたまま、30°Cの定温器に1週間入れ、毎日1回無菌的にデシケーターを50 mmに滅圧、残存ガスの排除を行なつた後、オオバヤシヤブシの種子を播種した。ガスの臭気はわずかに感じられ、土壌もいくぶん乾燥しているので、適当に殺菌水を灌水した後播種した。各鉢とも3~5本の発芽種子が見受けられたが、生育はきわめて不良であつた。

iii) 同上の処理を2週間続けた後、オオバヤシヤブシの種子を播種した。ほとんどガスの臭気は感じられない。土壌は相当乾燥しているので、十分殺菌水を灌水した後播種した。種子は発芽も生育もかなり良好であるが、iv)の場合より劣つていた。

iv) 同上の処理を3週間続けた後、オオバヤシヤブシの種子を播種した。残存ガスの臭気は消失し、土壌は著しく乾燥し、粉状を呈していたので十分殺菌水を灌水した。種子の発芽状態も、生育も無処理の場合とほとんど差異は認められなかつた。

以上の結果から考察するに、エチレンオキサイドで土壌を滅菌した場合、もちろん土壌の量、土性等によつてかなり異なるものと思われるが、その残存毒性を除去するためには、かなり長期間、定温器 (30°C 内外) 内に保持しながら、ガス排除を行なうことが必要と思われる。また、本試験の対象からは除外したが、プロピレンオキサイドについても予備的に同様の残存毒性の除去試験 (50°C, 50 mm で実施) を実施したが、この場合は 50°C の定温器に保持したためか、エチレンオキサイドの場合より比較的早く残存毒性の除去ができるように思われた。

なお、全般を通じ、定温器の温度を高くするほど、低温の場合より早く毒性の除去ができるようである。

3. 試料 f についての試験結果

開始時 pH 2.5 から 10.5 までは 10 段階に調製した酵母水・ブドウ糖液体培地 (約 10 cc 入り) を、小型試験管に分注綿栓し、エチレンオキサイドで 50 mm, 24 時間処理で滅菌した場合と、同上試料を高圧釜 (15lb, 120.6°C で加圧停止) で滅菌した場合の、各 pH 区の pH 値の変化は第 2 表のようである。ただし、前者は水流ポンプおよび真空ポンプで数回ガス排除を行なつた直後のものを、後者は釜から取り出して室温に冷却したものを、ガラス電極 pH メーターで測定したものである。

すなわち、本例では、pH の変化からのみ見れば、加圧滅菌に比べてアルカリ側においていちじるしく好ましい結果を示している。しかしながら、エチレンオキサイドでは、ガス排除を行なわない滅菌直後の場合は、いずれの pH 区も、アルカリ側に移行した結果が得られており、特にその移行は、滅菌操作のいちじるしいほど、また培地酸性の pH の強い区ほど、いちじるしい値が見受けられた。なお、寒天培地の場合でも同様の傾向が見受けられたが、この場合は、加圧滅菌では液状に変化する pH 8.5 以上でも、培地の外観上の変化はほとんど見受けられなかつた。しかし、エチレンオキサイドで滅菌された培地の化学組成の変化については、今後検討を要する問題と思われる。

つぎに、エチレンオキサイドで滅菌された培地に、微生物を發育させるためには、どの程度の残存ガスの除去を必要とするかを知るために、上述の方法によりエチレンオキサイドで滅菌した試験管の培地 (酵

第 2 表 エチレンオキサイドおよび高圧滅菌による肉汁・ブドウ糖培養液の pH の変化

Table 2. Changes of the pH values of east-extract glucose solution sterilized by ethylene oxide and autoclave.

開始時 pH Initial pH	2.5	3.1	4.6	4.8	6.2	7.5	8.3	8.7	9.7	10.5
種類 Kind										
エチレンオキサイド* Ethylene oxide	3.2	3.7	4.8	5.0	6.3	7.4	8.2	8.5	9.3	9.3
高 圧 釜* Autoclave	2.3	3.3	4.6	4.8	5.9	6.8	7.1	7.4	7.5	7.4

注(Notes):

* 試料は、50 mm, 20°C で 24 時間滅菌後、真空ポンプで数回ガス排除を行なつた後 pH 値を調査した。

The samples were sterilized in 50 mm of Hg pressure at 20°C for 24 hours and the pH values of them were measured after the removing the ethylene oxide gass from them by a vacuum pump several times.

** 試料は 15 ポンドで滅菌、冷却後 pH 値を調査した。

The samples were strilized in 15lb and the pH values of them were measured after letting them cool.

母水・ブドウ糖寒天および液体培地 pH 7.0)を、50°C の定温器に入れ、毎日 50 mm に減圧して、3 回真空ポンプでガス排除を行ない、糸状菌 *Aspergillus niger*, 放射状菌 *Actinomyces alni*, 根瘤菌 *Rhizobium leguminosarium* を接種して、その発育状態を調査した。その結果糸状菌、放射状菌では、滅菌処理後 1 週間目以降のものに移植した場合、そのかなりの発育が見られ、根瘤菌では、2 週間目以降のものにはじめて発育が見受けられた。

以上の結果から見ると、少量の寒天あるいは液体培地は、エチレンオキシドガスの滅菌処理により、pH およびその組成をいちじるしく変化させることなく、容易に滅菌できるものと考えられるが、土壌の場合と同様、残存ガスの毒性の除去が容易でないで、この解決が今後に残された問題とみなされた。

4. 試料 g (種子) の滅菌試験結果

モクマオウ、オオバヤシヤブシ、ニセアカシア種子の滅菌試験結果は第 1 表記載のとおりで、すなわちエチレンオキシドでは、20°C の常圧 24 時間の処理で、プロピレンオキシドでは 50°C で常圧 24 時間の処理で完全に滅菌され、減圧で処理すれば多少処理時間を短縮することがうかがわれた。

しかしながら、両薬剤を通じ、滅菌完全と思われた処理後の種子の発芽試験結果では、モクマオウ、オオバヤシヤブシはいずれも発芽能力は消失し、硬粒種子のニセアカシアのみわずかに発芽するものが見受けられ、発芽力を害せずに種子の表面を滅菌することは、特殊の硬粒種子を除いては不可能と思われた。

また、このほか発芽後 2 カ月の、これらの樹種の稚苗について滅菌試験を行なつたが、この場合は常圧 30 分間程度の処理でも、いずれの苗も枯死した。これらの薬剤は生物に対して、その体内の蛋白質と化合して、その生活機能を破壊するものとみなされており、したがって、稚苗の生体を損傷することなく、外部の微生物を死滅させることは、種子の場合より一層困難と思われた。

以上の実験を含めて、これまでにエチレンオキシド、プロピレンオキシドを用いて行なつた種々なる滅菌試験の結果から、大体以下のことが結論ならびに考察された。

(1) エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドのガスは、減圧状態ではもちろん、常圧状態でも、比較的高度の滅菌力を持ち、土壌 (5~50g), 寒天培地 (10 cc), 液体培地 (10 cc), 種子等の試料は常圧、24 時間の処理で容易に滅菌することが可能である。

(2) エチレンオキシドは沸点が低いので、滅菌は室内 (20°C) でも容易に実施しうるが、プロピレンオキシドの場合は、完全を期するためには 50°C 内外の定温器内で行なうことが望ましい。

液の使用量は、両薬剤を通じ 10l の容積については 15~18 cc 程度で十分と思われる。

(3) これらの薬剤は、単に滅菌剤としての立場から見れば、材料の物理的、化学的組成にいちじるしい変化を与えることのない、かつ滅菌力の強い、常圧でも手軽に使用できるガス滅菌剤として、土壌の保存用、微生物の標本調製、器物、衣類等の消毒等に広く使用できるものと考えられる。

しかしながら、材料のいかん (特に含水量の多い場合) によつては、残存ガスの毒性除去が比較的困難であること、また生体の外部滅菌 (種子、稚苗等) では、外部滅菌と同時に生体自身を死滅させるので、これらの滅菌については、今後の検討を要するものと思われる。

V 摘 要

エチレンオキシド、プロピレンオキシドを用い、デシケーター中で土壌その他二、三の試料について滅菌試験を実施し、以下の結果が得られた。

1. 室温 20°C 内外でのエチレンオキシドによる滅菌試験では、減圧ではもちろん、常圧処理 24 時間の滅菌操作により、次の試料は完全に滅菌することができた。

- a) 関東ロームの表土（黒土）あるいは心土（赤土）：5~50g
石英砂（風乾，径 2 mm）：5~50g
- b) 黒土あるいは赤土 2g を含んだ酵母水・ブドウ糖寒天培地：10 cc
- c) 酵母水・ブドウ糖あるいは肉汁・ブドウ糖培養液：10 cc
- d) モクマオウ，オオバヤシヤブシ，あるいはニセアカシア種子：5g

ただし、滅菌後の種子は、ニセアカシアの種子の一部のみに発芽が見受けられた。

2. プロピレンオキシドは、室温 20°C では、エチレンオキシドより滅菌力が弱い結果を示したが 50°C の定温器内での、50 mm，24 時間の処理では、エチレンオキシドでは滅菌できなかった黒土あるいは赤土 2g を含んだ水道水 10 cc を滅菌した。

3. 小鉢に入れた黒土 300g は、エチレンオキシド 50 mm，24 時間処理（20°C）で滅菌されたが、土壌中の残存ガスの除去には、30°C の定温器内に保存して、毎日 1 回 50 mm までガス排除を行なつて、3 週間を要した。

4. pH 2.5~10.5 間を 10 段階に区分した酵母水・ブドウ糖培養液（10 cc）を、エチレンオキシドで 20°C，50 mm，24 時間の滅菌処理を行ない、水流ポンプおよび真空ポンプを用いて 50 mm 内外で残存ガスの排除を行なつて、直ちにそれらの pH 値を調査したが、各段階の pH は、両極端のものを除いては滅菌前のものといちじるしい差異を認められなかつた。しかし、培養液の毒性除去には、50°C の定温器内に保存して、毎日 1 回 50 mm までガス排除を行なつて 1 週間以上を要した。

文 献

- 1) ALDRICH, D. G. and MARTIN, J. P. : Effect of fumigation on some chemical properties of soil. *Soil Sci.*, 73, (1952) p. 149~159.
- 2) ALLISON, L. E. : Effect of microorganisms on permeability of soil under prolonged submergence. *Soil Sci.*, 63, (1947) p. 439~450.
- 3) ALLISON, L. E. : Vapor-phase sterilization of soil with ethylene oxide. *Soil Sci.*, 72, (1951) p. 341~352.
- 4) CLARK, F. E. : The use of ethylene oxide for soil sterilization. *Trans. 4th Int. Cong. Soil Sci.*, 1, (1950) p. 204. (cited from 22)
- 5) CLARK, F. E. : Changes induced in soil by ethylene oxide sterilization. *Soil Sci.*, 70, (1950) p. 345~349.
- 6) DALTON, F. H. and HURWITZ, C. : Effect of volatile disinfectants on survival of microflora in soil. *Soil Sci.*, 66, (1948) p. 233~238.
- 7) DE ONG, E. R. : Chemistry and uses of pesticides. 2nd ed. New York, (1956)
- 8) FORSBERG, J. L. : A new method of evaluating fungicides. *Phytopath.*, 42, (1949) p. 693~694.
- 9) HALL, L. A. : Ethylene oxide process reduces spoilage organisms. *Food Packer*, 32 (1951) p. 26~28. (cited from 17)
- 10) 化学と工業：エチレン・オキシッドの生産計画，11月号（1958）p. 719.
- 11) KAYE, S. : The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. III, The effect of ethylene oxide

- and related compounds upon bacterial aerosols. *Am. Jour. Hyg.*, 50, (1949) p. 289~295.
- 12) KAYE, S. : Use of ethylene oxide for the sterilization of hospital equipment. *Jour. Lab. and Clin. Med.*, 35, (1950) p. 823~828. (cited form 2)
 - 13) KAYE, S. and PHILLIPS, C. R. : The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. IV. The effect of moisture. *Amer. Jour. Hyg.*, 50, (1949) p. 295~306.
 - 14) PHILLIPS, C. R. : Sterilizing action of ethylene oxide. II. Sterilization of contaminated objects with ethylene oxide and related compounds: time, concentration and temperature relationships. *Amer. Jour. Hyg.*, 50, (1949) p. 280~288.
 - 15) PHILLIPS, C. R. and KAYE, S. : The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. I. Review. *Amer. Jour. Hyg.*, 50, (1949) p. 270~279.
 - 16) PHILLIPS, C. R. and WARSHOWSKY, B. : *Ann. Rev. of Microbiol.*, 12, (1958) p. 525~550.
 - 17) RIDDLE, K. B. and PRICKETT, P. S. : Studies on dry soil sterilization. *Jour. Bact.*, 43, (1942) p. 117. (Abstract)
 - 18) ROBERTS, J. L. et al. : Preliminary studies on soil sterilization with ethylene oxide. *Jour. Bact.*, 45, (1943) p. 40. (Abstract)
 - 19) ROSE, R. E. and BAILEY, R. W. : Ethylene oxide for soil sterilization. *Nature (Lond.)*, 169, (1952) p. 716.
 - 20) SAMPSON R. E. and LUDWIG, R. A. : Laboratory studies on the evaluation and activity of antifungal fumigants. *Can. Jour. Bot.*, 34, (1956) p. 37~43.
 - 21) VAN, BAVEI, C. H. M. : Soil aggregate stability as affected by sterilization with ethylene oxide and heat. (cited from *Soil and Fertilizer* : 2, (1950) p. 395)
 - 22) WARCUP, J. H. : Chemical and biological aspects of soil sterilization. *Soil and Fertilizer*, 20, (1957) p. 1~5.
 - 23) WHELTON, R. et al. : Control of microbiological food spoilage by fumigation with epioxides. *Food Indus.*, 18, (1946) p. 23~25.
 - 24) ZENTMEYER, G. A. and KENDRICH, J. B. : Fungicidal action of volatile soil fumigants. *Phytopath.*, 39, (1949) p. 864.

Some Experiments of Vapour-phase Sterilization with Ethylene Oxide and Propylene Oxide.

Seiji UEMURA and Yoshito YAMBE

(Résumé)

(1) As shown in Table 1, the different materials such as soils, agar media, liquid media, seeds etc, were used for the vapour-phase sterilization tests in different conditions with ethylene oxide and propylene oxide by the apparatus A in reduced pressure and B in normal pressure (cf. Fig. 1, 2).

In this experiment, ethylene oxide was used at 15 cc and propylene oxide at 18 cc per 10 l in a sterilizing chamber (a vacuum desicator).

In the results, most of the materials were sterilized completely by the treatments of ethylene oxide gas at normal pressure for 24 hours at 20°C or of propylene oxide gas at normal pressure for 24 hours at 50°C, but the soil solutions (10 cc tap water including 2g of soil) were sterilized by only propylene oxide treatment in 10 mm of Hg pressure for 24 hours at 50°C.

Sterilized seeds of *Casuarina*, *Alnus* spp. lost their germinating power, but some of the seeds of *Robinia* sp. still reserved their vital force.

(2) In a large vacuum desiccator, twenty pots (8×9 cm) each of which contained 300g of soil (fresh loamy soil) were fumigated with ethylene oxide gas in 50 mm of Hg pressure at 20°C by the apparatus B. All the soils of pots were sterilized completely, but it took about three weeks of incubation to remove the remaining toxic gas from the soil of pot at 30°C in a thermostat, though the elimination of remaining gas from the soil was carried out once per day for the incubation period by a vacuum pump in 50 mm of Hg pressure.

(3) As shown in Table 2, the liquid media (Yeast-extract glucose solution 10 cc) having ten different pH values in plugged test tubes were sterilized with ethylene oxide by the apparatus A (in 100 mm of Hg pressure, at 20°C for 24 hours), and with autoclave treatment (127°C, 15lb). In the case of ethylene oxide treatment, the remaining toxic gas was eliminated several times with a water aspirator and a vacuum pump in 50 mm of Hg pressure. The change of pH value of each medium sterilized with ethylene oxide and autoclave treatments is as shown in Table 2.

Generally speaking, the changes of pH values in the medium are smaller in the ethylene oxide treatment than in the autoclave treatment. Especially in strong alkali side, the former treatment is remarkably superior to the latter one.

But in the case of ethylene oxide treatment, if they were sterilized with stronger treatment (in lower pressure, for a longer period, and at higher temperature), the pH values of them covered into more alkaliside. It takes more than one week of incubation at 50°C in a thermostat to remove the remaining toxic gases from these sterilized liquid media for allowing the growth of microbes in them, though the elimination of gas in 50 mm of Hg pressure is carried out on them once per day.