

ホルマリンガス殺菌・無毒化法の残留毒性の生物学的評価

平田統一¹⁾ 吉田 敬²⁾ 安田 準³⁾

¹⁾ 岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター御明神牧場、

²⁾ (株)アスカメディカル、³⁾ 岩手大学農学部附属動物病院

Biological Evaluation of Residual Toxicity of Formaldehyde Gas Sterilization and Neutralization Method

T-I. Hirata¹⁾, T. Yoshida²⁾, J. Yasuda³⁾

¹⁾ Omyojin Animal Farm, Field Science Cener, Faculty of Agriculture, Iwate University,

²⁾ Asuka Medical co.

³⁾ Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Agriculture, Iwate University

要 約 ホルマリンガス (FG) 殺菌・無毒化装置「Holl Steri」(アスカメディカル) の残留毒性を、従来法のエチレンオキサイドガス (EOG) 殺菌法のそれと比較して、生物学的に評価した。0.25ml ストローに6時間保存した精子生存率において、FG区は無殺菌の対照区に比べ6時間目で有意 ($p<0.01$) に生存率が減少した。しかし、FG区はEOG区に比べて有意 (2時間目: $p<0.01$ 、4時間目: $p<0.05$) に生存率が高かった。3日間の胚盤胞期牛胚培養において、FG区はガンマ線殺菌の対照区に比べ2日目で有意 ($p<0.01$) に生存率が減少し、2.5日目にはすべての胚が死滅した。しかし、EOG区に対しては、培養後1、2日目に、有意 ($p<0.01$) に生存率が高かった。10日間前後の牛卵子の体外成熟・受精・培養系において、FG区およびガンマ線殺菌の対照区の5細胞期以上への分割率と胚盤胞への発生率は、それぞれ60.0%と20.0%および65.0%と36.7%で、FG区でやや低かったものの有意差はなかった。一方、EOG区での胚発生はなかった。以上の結果から、FG殺菌・無毒化装置による殺菌では、無殺菌やガンマ線滅菌に比べ細胞毒性の残存がみられるが、従来広く用いられてきたEOG殺菌に比べ残留毒性は極めて少ないことが示された。

——キーワード: ホルマリンガス、殺菌、無毒化、残留毒性、生物学的評価

家畜臨床誌 27(2):51-55, 2004

ABSTRACT The residual toxicity of formaldehyde gas (FG) sterilization and neutralization equipment, "Holl Steri" (Asuka Medical), was evaluated biologically and compared with the conventional ethylene oxide gas (EOG) disinfectant process. The percentage of FG group motile spermatozoa, preserved in 0.25 ml straws for 6 hours, compared with the non-sterilized control group, decreased significantly ($p<0.01$) in the 6th hour. However, FG group had significantly higher survival rate than EOG group (2nd hour: $p<0.01$; 4th hour $p<0.05$). In bovine embryo culture

Received 14 September 2004 / Accepted 27 September 2004

*Correspondence to T-I. Hirata, Omyojin Animal Farm, Field Sciencce Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, 8-20-7, Omyojin, Shizukuishi, 020-0581, Japan (〒020-0581 岩手県岩手郡雫石町御明神8-20-7)

for three days, the embryo survival rate decreased significantly ($p<0.01$) in FG group compared with control group of gamma ray sterilization on the 2nd day, and, at 2.5 days, all embryos were nonviable. However, compared with EOG group, embryo survival rate in FG group was significantly ($p<0.01$) higher on the 1st and 2nd days. In the in vitro maturation, fertilization and culture system of bovine oocytes for about ten days, the division rates into five or more-celled embryos and the blastocyst generation rates in FG group and control group of gamma ray sterilization were 60.0, and 20.0%, and 65.0 and 36.7%, respectively. Although rates were a little lower in FG group, there was no significant difference between groups. On the other hand, there was no embryonic growth in EOG group. These results suggest there was slight residual cell toxicity with FG sterilization and neutralization equipment compared with non-sterilizing or gamma ray sterilization, however there was very little residual toxicity compared with the widely employed conventional EOG sterilization.

—Key Words : Formaldehyde gas, sterilization, neutralization, residual toxicity, biological evaluation

Jpn. J. Vet. Clinics 27(2):51-55, 2004

緒 言

家畜生産、とくに牛の繁殖において、近年、多排卵誘起・回収、経膈生体内卵子吸引・体外受精・培養、胚移植などの新規諸技術が盛んに利用されるようになってきている。これらの技術が安全に利用されるためには器具器材の殺菌操作が不可欠である〔7〕が、ポリエチレンやポリプロピレン、塩化ビニル製の器材など、高温に耐えられないものも多い。これら耐熱性の低い器材の殺菌には、一般にエチレンオキシドガス（EOG）が用いられてきた。EOGは、操作が容易で殺菌効果が優れているが、特定化学物質等第2類物質に指定されており、その殺菌操作に当たっては、特定化学物質等作業主任の有資格者が必要なほか、排気設備の設置や、従事者の健康診断、作業環境測定が義務付けられるなど、様々な制限がある〔9〕。また、残留毒性にも問題がある〔2, 7〕。さらに殺菌・浄化に要する時間が比較的長く、短期間に繰り返し使用する器材の殺菌に不向きな面もある〔4〕。一方、ホルマリンの低温蒸気殺菌法もまた熱不安定な器材の低温殺菌法として有用性や安全性が証明されてきた〔4, 5〕が、畜産分野での利用は限られてきた。ホルマリンは特定化学物質等第3類物質に指定されているが、EOGに比べて取り扱いが容易で規制が少ない。また、殺菌に要する時間がEOG殺菌に比べ短いことから、器具の予備を必要最小限に抑えることができ、コスト削減にもつながるなど、畜産現場で活用し得るものと期待できる。ホルマリンガス殺菌・無害化装置「Holl Steri」（アスカメディカル）は、ホルマリンガス（FG）を用いる殺菌装置で、ガスの浄化・中和が自動化され、より安

全で簡便に滅菌操作が実施できる。本装置を用いたFG殺菌法の殺菌効果について、武藤ら〔5〕は、動物で頻繁にみられる感染の原因菌に対し殺菌効果があり、生体への影響は少ないと報告している。本試験ではFG殺菌・無毒化法を畜産の現場で安全に用いるための基礎的知見を得るために、EOG殺菌法と比較しながら、牛精子や胚盤胞期牛胚の保存、牛卵子の体外培養系を用いて、短期間・中期間・長期間処理の残留毒性を生物学的手法で検討した。

材料と方法

実験1：短期間処理の残留毒性を6時間前後の凍結融解精液中の精子性状で評価した。塩化ビニル製の0.25mlストロー（富士平工業）を殺菌せず市販の状態（対照区）、あるいはFG殺菌（FG区）、EOG殺菌（EOG区）して用いた。すなわち、FG区ではストローをハイブリッドメッキンバック（HM-1302、ホギメディカル）に入れ、「Holl Steri 20」（アスカメディカル）のTBモード（加温50℃、殺菌240分、浄化210分、全工程7時間30分）で殺菌浄化後、空気中で約65時間放置して用いた。EOG区ではFG区と同様にメッキンバックに入れたストローをEOG滅菌器「Elpack」（イキ）を用いて、EOGを充填したラミスセラ（西本産業）中に6日間静置し、強制換気でガス置換後、空気中で約65時間放置して用いた。

凍結黒毛和種精液（Pクロ404、家畜改良事業団）は、38℃の温湯中で融解後、媒精液（IVF100、機能性ペプチド研究所）を用いて 3×10^6 sperm/mlに濃度調整して各区のストローに充填し、ヒートシールで密閉した。

38.5℃の炭酸ガス培養器（4020、朝日ライフサイエンス）内に静置して0、2、4、6時間後に精子の生存率と運動性を観察した。精子生存率は、hoechst 33342（Sigma）とPropidium Iodide（Sigma）を用いた蛍光2重染色法により確認した。精子運動性は、運動性を有している精子の割合と運動の強度を観察し、指数化した[8]。

実験2：中間処理の残留毒性を3日間前後の牛胚培養で評価した。ポリスチレン製で表面を1型コラーゲンで被覆している培養シャーレ（リプロC1、機能性ペプチド研究所）を市販の状態で（ガンマ線殺菌、対照区）、あるいはFG殺菌、EOG殺菌して供試した。すなわち、FG区ではシャーレをハイブリッドメッキンバックに入れ、TBモードで殺菌無毒化後、空気中で約42時間放置して用いた。EOG区ではEOGを充填した滅菌バック中に4日間静置し、強制換気でガス置換後、空気中で約24時間放置して用いた。牛胚は、機能性ペプチド研究所の方法[11]を用い、と畜場卵巣由来の未成熟卵子を黒毛和種精液（Pクロ404、家畜改良事業団）で体外成熟・受精・培養して体外で生産（IVP: in vitro production）した。胚日齢7から8日の胚盤胞期胚で品質ランクとしてgood以上を供試した。ガラス化凍結・融解後、1から2時間の回復培養を行って、各試験区に胚品質のばらつきが最小になるように各区シャーレに分配し、38.5℃のマルチガス培養器（APM-30D、アステック）内に静置して、5%CO₂、5%O₂、90%空気条件で、0、1、2、2.5、3日後に牛胚の生存率と孵化率を観察した。

実験3：長期間処理の残留毒性を10日間前後の牛卵子体外受精・培養法で評価した。FG区、EOG区ともに、実験2で準備した培養シャーレに培養液を満たしてマルチガス培養器中で9日間放置した後、培養液を全量交換してして実験に用いた。実験2と同様にIVPを行い、体外受精日を0日として2日目の5細胞期以上への分割率、および7-10日目の胚盤胞への発生率を観察した。

成績

実験1：精子生存率において、滅菌処理していない対照区が試験期間を通し最も高い値を示した。FG区では対照区に比べ、2時間目、4時間目で有意差を認めなかったものの、6時間目で有意（ $p<0.01$ ）に生存率が減少した。また、EOG区では対照区に比べ、培養後2時間目以降有意（ $p<0.01$ ）に生存率が減少した。一方、FG区とEOG区を比較すると、FG区では2時間目（ $p<0.01$ ）および4時間目（ $p<0.05$ ）に精子生存率が有意に高かつ

た（図1）。精子運動性については、各区で大きな違いはみられなかったが、FG区で他の2区よりも運動性に及ぼす障害の程度がやや大きかった（図2）。

実験2：牛胚生存率において、ガンマ線滅菌した対照区が試験期間を通し最も高い値を示した。FG区では対照区に比べ、1日目では有意差を認めなかったものの、2日目では有意（ $p<0.01$ ）に生存率が減少し、2.5日目にはすべての胚が死滅した。また、EOG区では培養後1日目にすべての胚が死滅した。一方、FG区とEOG区を比較すると、FG区では培養後1と2日目に、有意（ $p<0.01$ ）に生存率が高かった（図3）。牛胚孵化率において、対照区に対しFG区は2日目以降有意（ $p<0.01$ ）に低率であった（図4）。

実験3：体外受精日を0日として2日目の5細胞期以上への分割率、および7-10日目の胚盤胞への発生率を指標としたところ、ガンマ線滅菌した対照区が、分割率65.0%、胚盤胞率36.7%で最も高い値を示した。これに対しFG区では、それぞれ60.0%、20.0%で、やや低かつ

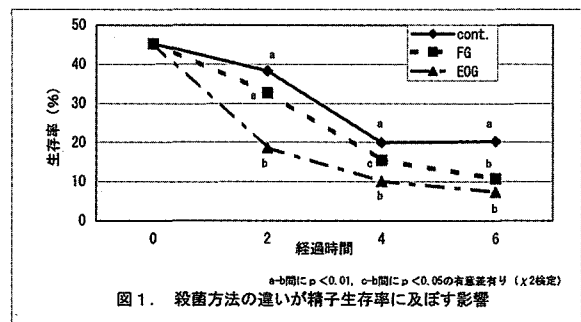


図1. 殺菌方法の違いが精子生存率に及ぼす影響

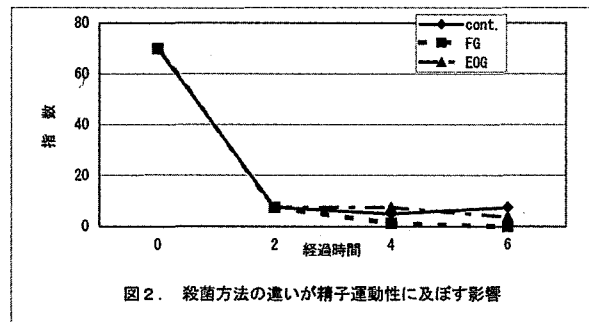


図2. 殺菌方法の違いが精子運動性に及ぼす影響

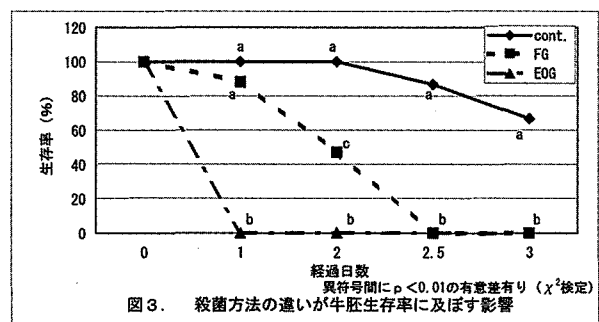


図3. 殺菌方法の違いが牛胚生存率に及ぼす影響

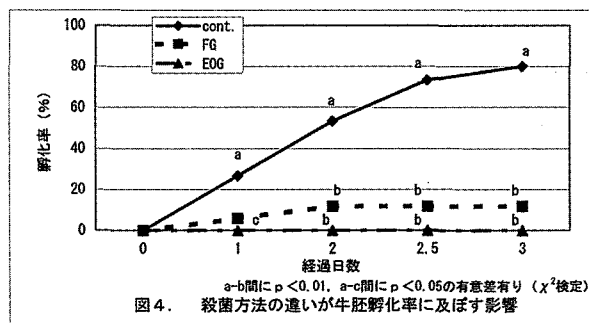


図4. 殺菌方法の違いが牛胚孵化率に及ぼす影響

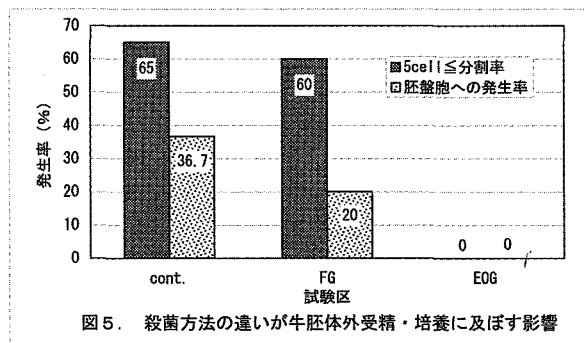


図5. 殺菌方法の違いが牛胚体外受精・培養に及ぼす影響

たものの有意差はなかった。一方、EOG区では、胚発生を認めなかった(図5)。

考 察

胚の体外培養や移植など家畜生産における近年の新規諸技術は、家畜の生産と育種効率を大幅に向上させる技術として応用されてきている。しかしながら、人工授精に比べ体外で生産された牛胚由来産子の妊娠期間は延長し、生時体重が増え、生後死亡率や難産発生率が増える[10]などの課題もあり、さらなる技術の改善が求められている。これら新規諸技術に使用される器材は、生体を感染症から守り、胚培養を成功裏に実施するために殺菌されなければならない。一般に耐熱性の低い機材の殺菌にはEOGが用いられているが、EOGには強い細胞毒性があり[2, 7]、胚の生存性や活力に悪影響を及ぼし、結果として胚移植後の受胎率や産子の正常性を傷害する可能性がある。そこで本試験では、一般的に用いられているEOG殺菌とホルマリンガス殺菌・無害化装置によるFG殺菌の残留毒性を生物学的に比較検討した。

その結果、凍結融解精液を指標にした短期間残留毒性については、FG区はEOG区に対して有意に生存率が高かったこと、牛胚盤胞を指標にした中期間残留毒性については、培養後1、2日目の胚生存率が有意に高かったこと、牛未成熟卵子のIVPを指標とした長期間残留毒性については、EOG区では全く胚が発生せず著しい細胞毒性を示したのに対し、FG区は対照区の発生率と有意差がなかったことなどから、FG殺菌はEOG殺菌に比べ

細胞毒性の残存はごくわずかであり、牛生殖細胞などを取り扱う場で利用できることが実証された。また、5細胞期以上への分割率および胚盤胞への発生率ともに、FG殺菌区の成績に影響を及ぼさなかったことから、滅菌した培養皿を9日間38.5℃のインキュベータで保持し、かつ、使用直前に培養液を交換して牛胚の体外培養を開始する実験系では残留毒性は少ないものと考えられた。このことからシャーレへのFG吸着は強固なものではなく、培養液中に溶け出す程度のものであったと予想された。このようなFGとEOGにおける残留毒性の相違は、ガスそのものの毒性の相違やストロー、シャーレへの吸着の程度に関連するほか、FG殺菌装置自体に自動の無毒化工程を含んでいる優位性によると考えられた。装置自体に無毒化工程を含むことは効率のうえからも有利である。Kanemitsuら[4]は、EOG殺菌には少なくとも24時間必要であるのに対し、低温ホルマリンガス殺菌では3から7時間を要するに過ぎず、内視鏡などの日々使用される医療用器具の殺菌に有用であると述べている。一方、Nakataら[6]は、硬質容器中にポリ塩化ビニルを入れEOG滅菌した結果、毒性を除くには17時間以上の通気が必要であったと述べている。さらにHolyoakら[1]は、牛の体外培養系において、EOG殺菌後の培養シャーレを12日間通気しても毒性を除くことはできなかったことを示している。本試験で用いたFG殺菌・無害化装置ではTBモードにおける浄化を含めた全工程で7時間30分、通常の器具殺菌モードで全工程2時間30分であったのに対し、EOG殺菌において毒性を残さないようなガスの拡散を待つためには42時間放置でも不十分[実験3]であったことから、FG滅菌はEOG殺菌に比べ頻回使用される器材を短時間で効率的に処理でき、かつ予備の器具を保つ必要性が減ることから低コストに結びつく殺菌方法であるといえる。EOG殺菌した培養シャーレを用いて牛胚のIVPを行っても卵割を含め胚発生を全く認めず、Holyoakら[1]の報告と同様であった。彼らはEOGはおそらく卵母細胞に対するより精子に対する毒性が強く、その結果体外受精に失敗することが卵割しない原因だろうと考察している。

今後畜産新技術分野でFG滅菌法を活用するうえでさらに検討すべき事項も示された。精子運動性において、有意差はなかったものの観察上はFG区の運動性が最も低かった。このような現象はFG殺菌に普遍的なことなのか、それとも特殊な要因によるものか検討する余地がある。今回用いた精液の活性が比較的低く、保存後2時間でいずれの区も急激に運動性が減少したことから、相

違がみえにくく観察結果に影響した可能性があるので、異なる種雄牛の凍結融解精子を供試して観察することが必要かもしれない。また、ガンマ線殺菌などの対照区に比べればFG殺菌にも残留毒性があることが示されたので、より安全にFG殺菌を活用するためにはさらに残留毒性を減らす工夫が必要である。今回の試験では、TBモード（加温50℃、殺菌240分、浄化210分、全工程7時間30分）で殺菌浄化を行ったが、通常の器具殺菌モード（加温50℃、殺菌60分、浄化90分、全工程2時間30分）で殺菌浄化すればさらに残留毒性は少なくなると期待される。また、通気時間や通気方法などFGの浄化行程を検討することで、十分な殺菌と安全がともに得られる殺菌法となり得る。

本試験では毒性の発現時期に違いが見られた。すなわち実験1の精子生存率では、保存後4時間に対照区との間に有意差が見られたのに対し、実験2の胚の中期間培養では培養後2日に有意差が見られた。先に述べたように、毒性の残留には殺菌処置後の通気時間や通気方法が影響する。加えて、FGの残留の程度は、器材の形状や材質によって異なり、天然ゴムが残留が最も高く、次いで塩化ビニル、ポリウレタン、次いで明らかな差をもってポリプロピレン、ポリエチレンの順であったことが報告されている[3]。こと、用いたストローは外径が2mm前後の筒状で塩化ビニル製、シャーレは平状でコラーゲンで被覆されたポリスチレン製など形状と材質が異なることなどから、毒性が示される時期の違いはストローとシャーレの形状や原材料の違いに起因するものと考えられた。残留毒性と器材の形状、素材との関連についてさらに検討する必要がある。

FG殺菌・無害化装置「Holl Steri」が動物で頻繁にみられる感染症の原因菌に対し十分な殺菌効果があることは既に報告されている[5]。本試験の結果から、FG殺菌が、多排卵誘起・回収、経膈生体内卵子吸引・体外受精・培養、胚移植などの畜産関連新規諸技術で用いる生殖細胞を短期間扱う器材の殺菌において、従来のEOG殺菌よりも安全で作業時間が短時間で済み、法規制上の取り扱いも容易な[9]、畜産現場で活用できる装置であることが示された。

引用文献

1. Holyoak, GR., Wang, S., Liu Y. and Bunch, TD. (1996). Toxic effects of ethylene oxide residues on bovine embryos in vitro. *Toxicology*. 108 : 33-38.
2. The Japan Society for Occupational Health (2000).

Recommendation of occupational exposure limits. *J Occup Health*. 42 : 213-228.

3. 加見谷将人, 福島伸明, 田中清司, 小野民子, 磯崎博司 (2003). ホルムアルデヒドガスの殺菌効果ならびに残留の検討. *医器学* 73 : 657-658.
4. Kanemitsu, K., Kunishima, H., Imasaka, T., Ishikawa, S., Harigae, H., Yamato, S., Hirayama, Y. and Kaku, M. (2003). Evaluation of a low-temperature steam and formaldehyde sterilizer. *J. Hosp Infect*. 55 : 47-52.
5. 武藤 恵, 蘇 延根, 杉井俊二, 青木美香, 片本 宏, 嶋田照雅, 伊藤喜久治, 遠矢幸信, 高野 剛, 大橋文人 (2003). 動物病院でのホルマリンガス殺菌の有効性を評価. 日本獣医公衆衛生学会 (近畿) 講演要旨集 pp88.
6. Nakata, S., Umeshita, K., Ueyama, H., Takashina, M., Noguchi, S., Murata, A. and Ochi, T. (2000). Aeration time following ethylene oxide sterilization for reusable rigid sterilization containers: concentration of gaseous ethylene oxide in containers. *Biomed Instrum Technol*. 34 : 121-124.
7. 日本家畜人工授精師協会 (1996). 家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編). pp203-205. 日本家畜人工授精師協会, 東京.
8. 丹羽太左衛門, 門司恭典, 橋爪 力, 塩谷康生 (1998). 家畜の人工授精と受精卵移植. pp61-65, 創文, 東京.
9. 特定化学物質等障害予防規則. 昭和47年09月30日制定. 労働省令第39号.
10. van Wageningen-de Leeuw, AM., Aerts, BJ. and den Daas, JH. (1998). Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos : a field study. *Theriogenology*. 49 : 883-894.
11. Yamashita, S., Satoh, T. and Hoshi, H. (1996). Bovine blastocyst formation from IVM/TVF produced zygotes in serum and serum free medium. *Theriogenology* 45 : 197.