

二酸化塩素ガスによる種子クリーン化法の可能性評価※

荒川宏樹・高橋秀人

Evaluation of the Potential for Seed Cleaning Method using Chlorine Dioxide Gas

Hiroki Arakawa・Hideto Takahashi

従来、病原微生物に感染した種子の処理に用いられてきた乾熱処理や殺菌剤浸漬などの方法は、発芽率の低下などの悪影響を及ぼす可能性がある。そこで、これまで培ってきた医薬・医療分野向けの二酸化塩素ガスを用いた除染技術を基に、病原微生物に感染した種子に対する新規クリーン化方法を、微生物数の減少効果と発芽率によって評価した。本報告では、アブラナ科黒腐病の病原菌である *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* に感染した種子を用い、二酸化塩素ガスを利用した種子クリーン化法の適用可能性について評価した。その結果、微生物数の減少効果は、人工汚染種子に対して目標を達成した。さらに、二酸化塩素ガス暴露直後の発芽率に有意な低下は認められなかった。以上の結果から、二酸化塩素ガスを用いた種子クリーン化法は、病原微生物に感染した種子に対して適用できる可能性が示唆された。

1. はじめに

二酸化塩素は、微生物除染剤として高い殺菌消毒効果が一般的に認められており、欧米での水道水の殺菌消毒の実績や国内で食品添加物としてカット野菜やフルーツへの使用が認可されている^{1),2)}。これらの効果と安全性を鑑み、我々はバイオハザード対策用クラスIIキャビネット³⁾や医薬医療分野の無菌製剤（注射剤、点眼剤、眼軟膏剤）を研究・開発・製造する無菌エリアで使用する二酸化塩素ガス除染技術の確立を目指して研究を行っており⁴⁾⁻⁹⁾、実績を積み重ねてきた。

本稿では、これまで培ってきた除染技術を基に、農業分野へ応用することを目的として、種子に付着または感染した微生物の処理方法として二酸化塩素ガスを利用したクリーン化法を検討した結果を報告する^{10),11)}。

従来の微生物感染した汚染種子の処理方法には、乾熱処理や薬液浸漬処理がある。しかし、乾熱処理法は種子を72°Cで72時間高温環境にさらすため、種子へのダメージが大きく、発芽率が低下する問題があった。また、薬液浸漬処理法は種子を薬液浸漬した後に遠心乾燥と低温乾燥を行うため、発芽率低下に加えて作業工程の切り替えごとに種子を移動する手間がかかるといった課題があった。そこで、二酸化塩素ガスを用いた乾式での種子クリーン化法を試験評価し、前記課題解決の可能性を検討した。なお、クリーン化とは、ガス暴露装置を使って種子を乾式洗浄することを示し、薬液浸漬処理法や農薬処理法と区別するための表現である。

※ 令和7年度空気調和衛生工学会講演論文¹¹⁾を加筆修正したものである。

2. 二酸化塩素ガスによる種子クリーン化処理の概要

2.1 二酸化塩素ガスの主な物理的性質と許容濃度

二酸化塩素の主な物性と許容濃度を表1に示す。二酸化塩素は沸点が11°Cであり常温ではガス状態として存在する。米国の労働安全衛生局による許容暴露限界は0.1 ppmである。0.1 ppmの二酸化塩素ガスは、人の嗅覚で感知できるため、万が一処理中に僅かでもガス漏洩が発生したとしても、検知器など特別な分析機器を用いることなく臭気で危険を察知することが可能であり、実用に適している。

表1 二酸化塩素の主な物性と許容濃度

沸点	11 °C	
水溶解度	0.8 g/100mL (20°C)	
相対蒸気密度 (空気 = 1)	2.3	
爆発下限値	10 vol%	
許容暴露限界 (PEL)	0.1 ppm	
短時間暴露限界値 (STEL)	0.3 ppm	
安全性	ガスの色	数百 ppm 以上で目視確認可能 (赤色～黄色)
	臭い	安全濃度 0.1ppm (PEL)でも人の嗅覚で感知可能
菌数減少効果	酸化作用	

2.2 種子クリーン化装置

本稿で使用した種子クリーン化装置の概要を図1に示す。温湿度計 (Vaisala 社製、HMT120) と循環ファンを設置した種子暴露チャンバ (300mm×300mm×300mm) に、二酸化塩素ガス濃度計 (CSI 社製、EMS)、二酸化塩素ガス発生器 (以下、発生器)、二酸化塩素ガス分解器 (以下、分解器) と加湿器を配管接続して構成した。種子暴露チャンバ内の環境は、温度は周囲成行き、湿度は加湿器空気と周囲の低湿度空気のポンプ供給で制御した。二酸化塩素ガスは、発生器内の反応容器に25%亜塩素酸ナトリウム溶液と9%塩酸溶液をポンプ供給・攪拌して発生させ、このガスを種子暴露チャンバ内濃度に応じてポンプ供給した。種子へのガス暴露が終了後、分解器用ポンプを運転しながら種子暴露チャンバに接続した発生器用と加湿器用のポンプも運転し、装置内の二酸化塩素ガスが安全濃度に到達したことを確認した後、種子を取り出した。

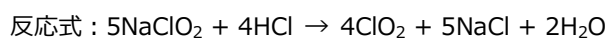
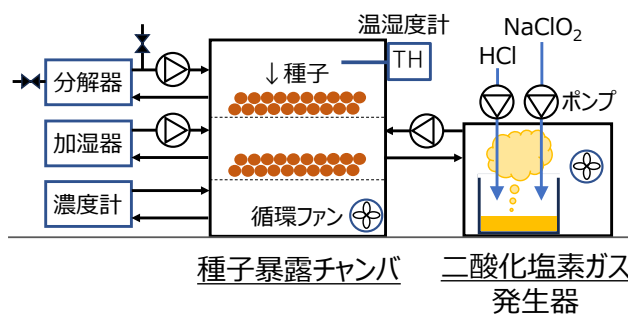


図1 種子クリーン化装置の概要

3. 二酸化塩素ガスによる種子クリーン化効果の評価

一般に、種子クリーン化効果は、クリーン化直後の菌数減少効果と発芽影響および貯蔵後の発芽影響などで評価される。また、二酸化塩素ガスを用いた種子クリーン化法は初めての取組みであり、暴露条件が不明である。そこで、まずは所定の病害菌で人工汚染させた種子を用い、二酸化塩素ガス暴露条件を変化させた時の菌数を測定することで、菌数減少効果の合格基準を満足する暴露条件を設定した。次に、設定した暴露条件で3種類の種子を二酸化塩素ガス処理し、暴露直後の菌数減少効果と発芽影響を測定することで、種子クリーン化効果の評価し、適用可能性を確認した。

3.1 二酸化塩素ガス暴露条件の設定

菌数減少効果はガス濃度とその暴露時間に強く依存し、一般的にガス濃度 (C) と暴露時間 (T) の積 (以下、CT 値) が同じであれば同一の菌数減少効果が得られることが知られており、菌数減少効果は CT 値で管理される。また、既往研究において、我々はバイオロジカルインジケータの指標菌である *Bacillus atrophaeus* を用いた二酸化塩素ガスの微生物除染効果に対する相対湿度依存性を確認した^{6),7)}。本節では、乾球温度、相対湿度、CT 値をパラメータとして、乾球温度と相対湿度を変化させた条件で菌数を1桁減少させるために必要な CT 値を測定比較し、二酸化塩素ガスによる病害菌汚染種子の菌数減少効果に対する相対湿度依存性について、さらに乾球温度の依存傾向について評価した。また、菌数1桁減少 CT 値の測定結果を基に、種子クリーン化の菌数減少効果の合格基準を満足させる CT 値を設定した。

3.1.1 方法

試験に用いる病害菌汚染種子について、アブラナ科黒腐病は、キャベツ、ハクサイ、カブ、ダイコン、ブロッコリーなど多くのアブラナ科野菜に感染する世界的に重要な病害細菌の一つである。また、キャベツは、消費量が多く、国民の生活に欠かせない野菜として農林水産省が指定している野菜 (指定野菜) の1つである。そこで、アブラナ科黒腐病菌を人工汚染させたキャベツ種子を用い、暴露チャンバ内に設置後、所定の温湿度条件で二酸化塩素ガスを供給し、所定の CT 値で暴露した。試験菌数は、生理食塩水 (Tween20 添加) 100mL を入れたフラスコを滅菌して冷めたものに 40g の試験種子を入れ、ロータリーシェーカー (室温、125rpm) で 2.5 時間振とう洗浄し、その洗浄液の原液、10 倍、100 倍希釈液を2つの選択培地に塗布してコロニー数を計数した。生存菌数は1試験区3反復の平均値より求めた。菌数減少効果は、二酸化塩素ガス暴露前後の生存菌数の対数値の差である菌数減少桁数で評価した。

- ・ 乾球温度：23～43℃
- ・ 相対湿度：46～81%
- ・ 試験種子：キャベツ
- ・ 試験菌：アブラナ科黒腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)
- ・ 培地：mFS 培地、mCS20ABN 培地
- ・ 培養条件：28℃、4～6 日

3.1.2 結果と考察

各温湿度条件について、CT 値に対する菌数減少桁数を図 2 に示す。小さい CT 値で菌数減少桁数が大きいほど、つまりグラフの傾きが急なほど、菌数減少効果が高いことを示し、23℃×81%RH 条件の効果が高く、41℃×46%RH 条件の効果が低かった。本結果を基に、相対湿度と乾球温度に対する菌数1桁減少 CT 値を図 3、図 4 にまとめた。菌数1桁減少 CT 値が小さいほど、つまりグラフの下方にあるプロットほど菌数減少効果が高いことを示す。相対湿度は、高湿度ほど菌数減少効果が高い傾向であり、相対湿度依存性が認められた。ただし、相対湿度 70%と 80%では大きな差は見られなかった。一方、乾球温度は、低い方が菌数減少効果は高まる傾向を示した。次に、菌数減少効果の合格基準を、試験菌数 10⁵CFU/g が処理後に検出されなくなる時、つまり「菌数減少桁数>5.0」に設定した。目標とする菌数減少効果を達成できるのであれば、CT 値は小さい方がガス濃度を低く暴露時間を短くできるため運用上優位である。以上の結果から、実際の運用状況と安全率を考慮して、菌数減少効果の合格基準を満足する二酸化塩素ガス暴露条件を以下

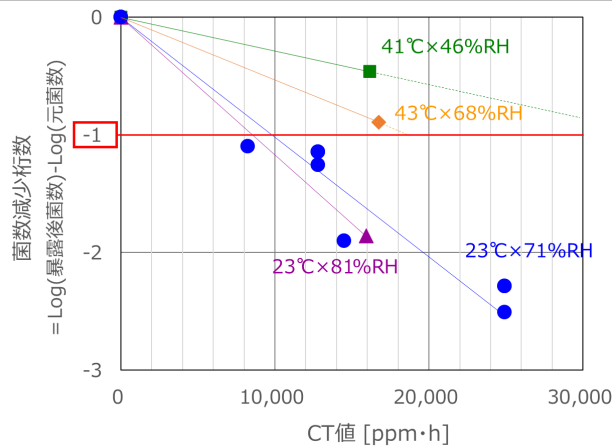


図2 各温湿度条件でのCT値に対する菌数減少桁数

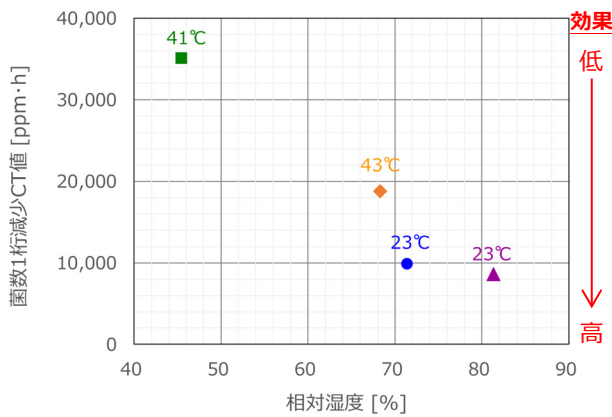


図3 相対湿度ごとの菌数1桁減少CT値

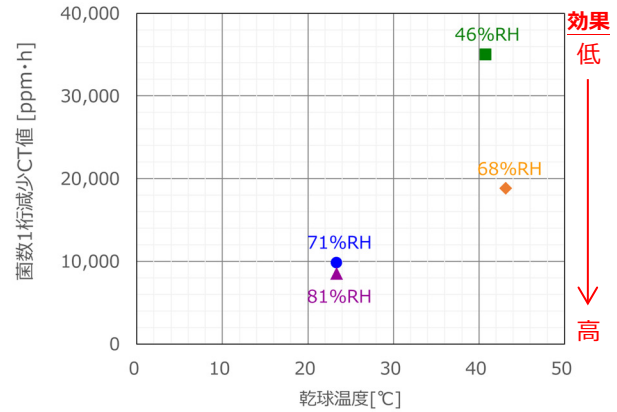


図4 乾球温度ごとの菌数1桁減少CT値

に設定した。

- ・ 乾球温度：23°C
- ・ 相対湿度：70 %
- ・ CT 値：66,500 ppm·h 以上

3.2 種子クリーン化効果の評価

種子クリーン化効果について、菌数減少効果は 3.1 節で設定した暴露条件で合格基準「菌数減少桁数> 5.0」を満足できるかで、発芽影響は病害菌に汚染されていない健全種子に二酸化塩素ガスを暴露した直後の発芽率で評価した。

3.2.1 方法

菌数減少効果は、アブラナ科黒腐病菌に $10^5 \sim 10^6$ CFU/g で人工汚染または自然汚染された 3 種類の種子（キャベツ人工汚染種子、ブロッコリー人工汚染種子、コールラビ自然汚染種子）を、図1の種子クリーン化装置および3.1節の設定条件にて二酸化塩素ガスを暴露し、暴露前後の菌数減少桁数を測定評価した。

発芽率は、健全種子を 3.1 節の設定条件で二酸化塩素ガス暴露した後、蒸留水で湿らしたろ紙上に種子を 100 粒ずつ 2 ケース（合計 200 粒）播種し、7 日間 20~30°C の変温環境で管理した後、正常発芽数と異常発芽数を計数した。発芽率の合格基準は、二酸化塩素ガス未暴露の健全種子の正常発芽率と比較して 95% 信頼区間内に収まる範囲に設定した。

3.2.2 結果と考察

菌数減少効果の測定結果を図5に、二酸化塩素ガス暴露前後の試験菌培養の様子を写真1に示す。二酸化塩素ガス暴露後の試験菌について、人工汚染したキャベツ種子とブロッコリー種子の場合は検出されずに検出限界以下で合格基準を満足したが、自然汚染されたコールラビ種子は試験菌が 1,087 CFU/g 検出され、菌数減少桁数は 2.5 であり合格基準を満足できなかった。人工汚染種子の場合、試験菌は種子表面近傍でほぼ均一に存在する状態で二酸化塩素ガスにさらされるため、設定 CT 値で目標通りの菌数減少効果が得られた。一方、自然汚染種子の場合、試験菌は種子表面以外の部位や菌数の濃淡の差が大きな状態で存在したため、合格基準を満足できなかったと考える。

発芽率の測定結果を図6に示す。今回試験した3種類の健全なアブラナ科種子は、二酸化塩素ガス暴露直後（貯蔵期間なし）の測定では発芽率の低下は認められず、合格基準を満足した。

4. まとめ

医薬医療分野の除染方法として研究開発してきた二酸化塩素ガス除染技術の農業分野への応用として、アブラナ科黒腐病に対する種子クリーン化効果を評価し、以下の知見を得た。

- ①二酸化塩素ガスによるアブラナ科黒腐病の菌数減少効果は、相対湿度が高いほど、また乾球温度が低いほど、高まる傾向を示した。

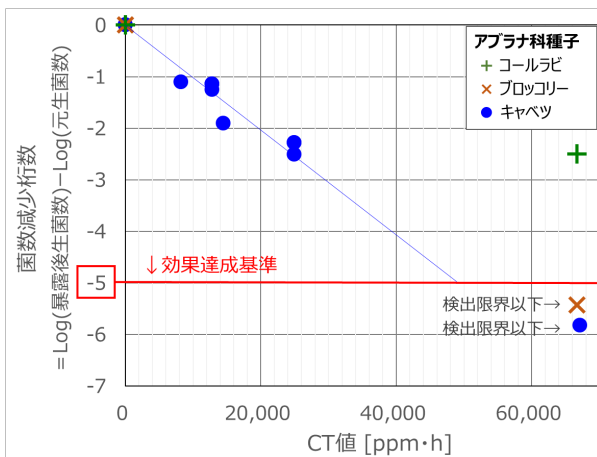


図5 菌数減少効果の測定結果

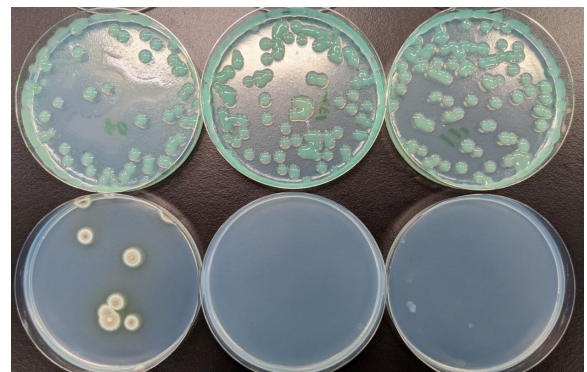


写真1 アブラナ科黒腐病菌の培地培養の一例
(ブロッコリー種子、n=3)

上段:元種子洗浄液_100倍希釈

下段:CT 値 66,500ppm·h 暴露種子洗浄液_原液

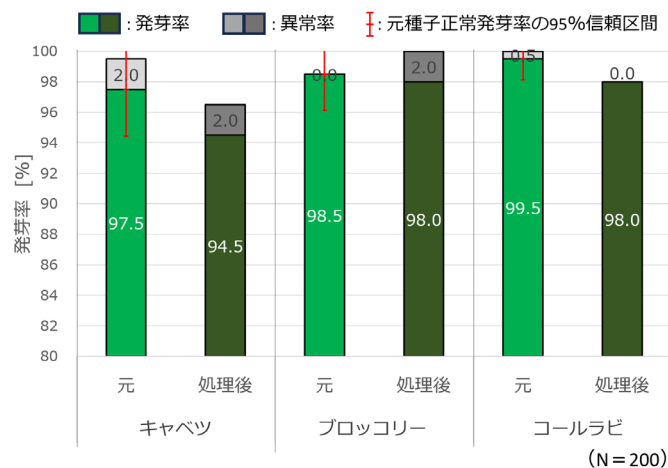


図6 発芽率の測定結果

②アブラナ科黒腐病の菌数減少に必要な温湿度およびCT値の条件を設定し、人工汚染種子を用いた試験にて菌数減少効果の合格基準を満足した。

③自然汚染された種子の場合、②条件での菌数減少効果は不十分であった。そのため、詳細な生菌の存在部位や汚染状況を把握して、効果を高める必要がある。

④今回試験したキャベツ、ブロッコリー、コールラビの健全種子の場合、二酸化塩素ガス暴露直後（貯蔵期間なし）の発芽率の合格基準を満足した。

二酸化塩素ガスによるクリーン化効果は極めて高く、従来の微生物に感染した汚染種子処理方法の代替として適用できる可能性が示唆された。

今後も二酸化塩素ガスによる種子クリーン化法の確立を目指し、自然汚染種子での条件設定、貯蔵後の発芽影響や他の種子病害菌に対するクリーン化効果について評価を行い、データを蓄積するとともに、クリーン化技術の拡充につなげていく予定である。

謝 辞

種子や病害菌に関する情報、ご助言、試験種子のご提供および菌培養や発芽などの測定評価についてご協力いただきましたタキイ種苗株式会社の草野様、青野様、塩見様および関係部署の皆さまに深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) 府食第 673 号，食品健康影響評価の結果通知について，平成 20 年 6 月 19 日
- 2) 公財 日本食品化学研究振興財団，各添加物の使用基準および保存基準
- 3) JIS K 3800 バイオハザード対策用クラスⅡキャビネット，付属書 B（除染）（2021）
- 4) 佐藤克己，阪田総一郎：二酸化塩素ガスによる殺菌消毒システムの開発，第 31 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，167-168（2014）
- 5) 荒川宏樹，高橋秀人：二酸化塩素ガスを用いた微生物除染特性，空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集，125-128（2017）
- 6) 荒川宏樹，高橋秀人：二酸化塩素ガスを用いた微生物除染特性の把握その 2，第 35 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，201-204（2018）
- 7) 荒川宏樹，高橋秀人：二酸化塩素ガスを用いた微生物除染特性の把握その 3，第 36 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，173-176（2019）
- 8) 荒川宏樹，高橋秀人，朴民亀，田中萌，岩堀伸哉，坂井利：二酸化塩素ガスを用いた安全キャビネット除染方法の評価，第 41 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，143-146（2019）
- 9) 荒川宏樹，高橋秀人：二酸化塩素ガス除染について，空気清浄，79-87（2022）
- 10) 青野昌彦，荒川宏樹，高橋秀人，草野新太郎，塩見寛：二酸化塩素ガスによる種子クリーン化の可能性”，日本植物病理学会報，91(3)，191（2025）
- 11) 荒川宏樹，高橋秀人：二酸化塩素ガスによる種子クリーン化法の可能性評価，その 1，空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集，117-120（2025）

ABSTRACT

The conventional methods used to treat seeds infected with pathogenic microbes, such as dry heat treatment and biocide dipping, can have certain detrimental effects, including reduced germination rates. Therefore, based on the decontamination technology we have developed using chlorine dioxide gas for the pharmaceutical and medical fields, we evaluate the novel cleaning method for seeds infected with pathogenic microbe using the effectiveness of reducing the number of microorganisms and the stability of the germination rate. In this report, we evaluated the potential of seed cleaning method using chlorine dioxide gas on seeds infected with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causative agent of black rot in Brassicaceae crops. The results confirmed that the reduction in the number of microorganisms achieved using the assessed method satisfied the designated target for artificially contaminated seeds. Moreover, we observed no significant reduction in the germination rate immediately after exposure to chlorine dioxide gas. These findings provide evidence for the potential utility of chlorine dioxide decontamination as an effective method for cleaning seeds.
