

低温プラズマジェット照射による
細菌不活化機構に関する基礎研究

2013年1月

博士（工学）

中島 知子

豊橋技術科学大学

環境・生命 工学専攻	学籍番号	D085802	指導 教員	水野 彰
申請者 氏名	中島 知子			

論文要旨 (博士)

論文題目	低温プラズマジェット照射による細菌不活化機構に関する基礎研究
------	--------------------------------

(要旨 1,200字程度)

大気圧低温プラズマは、生体組織への直接処理による新規医療技術などの新たなプラズマ応用を可能とした。本研究では、プラズマ医療に貢献可能な知見を得ることを目的に、大腸菌 (*Escherichia coli*) のプラズマ感受性に関わる因子の分析、ならびにプラズマ処理と薬品の併用による細菌不活化効果の促進に取り組んだ。プラズマ源として、アルゴンあるいはヘリウムガスを流した管の開放部付近でバリア放電を発生させて生成した低温プラズマジェットを用いた。これらのガスは準安定状態の寿命が長くかつ高いため、管の外にジェット状に射出されることができ、空気中の酸素や水分を解離しラジカル類など反応性の高い化学種を生成する。これによる化学的活性と電磁界等により生体との相互作用が発生し、致命的、非致命的両方の様々な細胞応答が誘起される。本研究では低温プラズマジェット照射 (プラズマ処理) 時の細菌不活化効果の特性を調べ、特に (1) 鉄イオン添加による細菌不活化効果の増幅、(2) 被処理物に残留する細菌不活化効果、および (3) 細菌の生育条件の感受性への影響、について実験的検討を行った。その概要は以下の通りである。

(1) 反応場となる大腸菌浮遊液への第一鉄イオン源 (硫酸第一鉄) の添加が低温プラズマ処理による大腸菌不活化効果へ及ぼす影響を測定した。第一鉄イオンは、低温プラズマにより生成される過酸化水素を水酸化物イオンおよび、強力な酸化力を有するヒドロキシルラジカルに分解する。そのためこれの添加により酸化分解効果を増幅し、不活化効果の増大が可能と考えた。結果、不活化効果の増大が確認されたが、効果が最大となる硫酸第一鉄濃度は反応場への空気混入量等の処理条件により著しく変動した。

(2) プラズマ処理を受けた寒天培地および蒸留水が大腸菌不活化効果を有することを見いだした。この残留性の不活化効果はプラズマ処理により生成される代表的な化合物である過酸化水素および硝酸では再現されず、またプラズマ処理を停止してから数十分程度で消失した。このことから、残留性の不活化効果の要因としてオゾンが考えられる。

(3) 細菌の生育条件による低温プラズマ感受性への影響評価では、生育条件として増殖経過の時期 (培養時間)、あるいは生育温度 (培養温度) を変えた大腸菌を調製し、プラズマ感受性を比較した。結果、増殖状態の推移期 (増殖準備期から対数増殖期、および、対数増殖期から定常期) にプラズマ感受性が低下することが確認された。これらの内、対数増殖期から定常期への移行における感受性増大は、定常期初期に特異的に生じる細胞膜透過能の低下が関与している可能性が考えられる。また、生育温度による感受性への影響も確認された。19、28、37、40、および 43°C で培養した大腸菌を用いて培養温度の影響を評価した結果、至適生育温度の 37°C においてプラズマ感受性は最小となり、低温および高温はいずれも感受性を増大させた。他の研究にて、パルス電界感受性についても類似の傾向が確認されている。これより、本研究で観察された培養温度によるプラズマ感受性の変化においては、プラズマが供給する要素の内電界が重要な働きをしていた可能性が高いといえる。

year month day
2013 Feb. 25th

Environment and Life Engineering Department	ID	D085802
Name	Tomoko Nakajima	

Advisor	Akira Mizuno
---------	--------------

A b s t r a c t

Title	Basic research on bacterial inactivation effect of cold plasma jet
-------	--

(800 words)

Atmospheric cold plasma enabled novel plasma applications, such as new medical treatment by direct exposure to living tissue. In present study, with the aim of contribution to the novel plasma medical technology, investigations to factor of plasma sensitivity and a trial to enhancement of inactivation effect by combination use with a chemical were carried out, using *Escherichia coli* (*E. coli*) as bacterial samples. Cold plasma jets were used as plasma sources. They were generated by barrier discharge near the ends of the tubes which is injected helium or argon. Metastable states of molecules of these gases are long-lived and have high energy. Therefore it can be released to air and generates active radicals by dissociation of oxygen and water in air. The chemical activity and electromagnetic action interacts with living body, and induce various cell answers, both lethal and non-lethal. In present study, experimental investigation about (1) enhancement of inactivation by ferrous iron, (2) residual bacterial inactivation effect of subjects, and (3) effect on plasma sensitivity of bacteria by its growth condition, were carried out.

(1) Change on plasma sensitivity of *E. coli* caused by addition of ferrous iron (ferrous sulfate) was evaluated. Ferrous iron disproportionate hydrogen peroxide to hydroxide ion and hydroxyl radical with strong oxidation power. Hydrogen peroxide is a common product of plasma treatment. From these, enhancement of oxidation power, namely bacterial inactivation effect by addition of ferrous iron was expected. In result, it is observed that ferrous sulfate in appropriate concentration enhances bacterial inactivation. Though, the appropriate concentration varied greatly depending on condition, such as amount of air around reaction field.

(2) In investigation about residual effect, it is observed that both agar medium and distilled water immediately after plasma treatment have bacterial inactivation effect. The effect was not reproduced by comparable concentrations of hydrogen peroxide and nitric acid, which are typical products of plasma treatment. Ozone is considered as main factor of the effect according to its disappearance in several minutes to several hours.

(3) In effect on plasma sensitivity of bacteria by its growth condition, growth phase (time of cultivation) and growth temperature (temperature at cultivation) were evaluated separately. In evaluation of growth phase effect, plasma sensitivity of *E. coli* in various growth phases were measured. In result, decreases of sensitivity were observed around transitions between these growth phases. Among them, the decrease around the transition between exponential phase and stationary phase is highly considered to be caused by the specific decrease of cell membrane permeability around early stationary phase. In evaluation of growth temperature effect, *E. coli* was cultivated at 19, 28, 37, 40, and 43°C, and plasma sensitivity of them were compared. In result, *E. coli* cultivated in 37°C, optimum growth temperature, showed lowest sensitivity. Namely, both lower and higher growth temperature increased sensitivity. There is a paper which reports that sensitivity of *E. coli* to pulse electric field increased by both higher and lower growth temperature namely is similar to the trend in plasma sensitivity. Therefore, it can be considered that electric field has critical role in the plasma jet treatment, aside from reactive species.

論文目次

第 1 章 序論	4
1-1 背景	4
1-2 低温プラズマジェットおよび関連事項	4
1-2-1 プラズマ	4
1-2-2 放電	5
1-2-3 大気圧低温プラズマ	6
1-2-4 低温プラズマジェット	8
1-2-5 低温プラズマ殺菌	8
1-2-6 プラズマ医療	9
1-3 <i>Escherichia coli</i> および関連事項	11
1-3-1 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	11
1-3-2 微生物集団の増殖状態の推移	12
1-3-3 平板培養法による生菌数測定	14
1-3-4 メンブレンフィルタを用いた培養	15
1-4 その他	15
1-4-1 フェントン反応	15
1-5 本研究の概容	15
参考文献	17
第 2 章 低温プラズマジェットの生成および基礎特性の測定	21
2-1 はじめに	21
2-2 電源および測定部	21
2-3 cross-field 型プラズマジェット生成装置、生成条件および実験系	22
2-4 linear-field 型プラズマジェット	25
2-4-1 linear-field 型プラズマジェット生成装置、生成条件および実験系	25
2-4-2 各処理条件における被処理物への電源電圧測定	28
2-4-2-1 測定方法	28

2-4-2-2 測定結果	29
2-5 まとめ	34
参考文献.....	34
第3章 鉄イオン添加による細菌不活化効果の増幅	35
3-1 はじめに.....	35
3-2 実験概要.....	35
3-2-1 第一鉄イオン（硫酸第一鉄）添加方法.....	35
3-2-2 インジゴカルミン脱色反応を指標とした分解効果の確認	36
3-2-3 フェントン反応活性を持たない二価金属との比較	36
3-2-4 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌のプラズマ感受性.....	38
3-2-5 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌の過酸化水素感受性評価.....	38
3-2-6 PBS を液相とした場合のインジゴカルミン脱色効果.....	38
3-3 実験結果および考察	39
3-3-1 インジゴカルミン脱色反応を指標とした分解効果の確認	39
3-3-2 フェントン反応活性を持たない二価金属との比較	41
3-3-3 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌のプラズマ感受性.....	43
3-3-4 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌の過酸化水素感受性評価.....	45
3-3-5 PBS を液相とした場合のインジゴカルミン脱色効果.....	47
3-4 まとめ	48
参考文献.....	49
第4章 被処理物に残留する細菌不活化効果	50
4-1 はじめに.....	50
4-2 実験概要.....	50
4-2-1 寒天培地を被処理物とした実験	50
4-2-1-1 寒天培地を被処理物とした残留効果の測定	50
4-2-1-2 寒天培地に残留した効果による細菌不活化の確認.....	51
4-2-1-3 寒天培地に残留した細菌不活化効果の安定性の評価	52
4-2-2 蒸留水を被処理物とした実験	52
4-2-2-1 プラズマ処理された蒸留水の濃度別の細菌不活化効果の測定	52

4-2-2-2 過酸化水素・硝酸水との細菌不活化効果の比較	53
4-2-2-3 プラズマ処理水の 24 h 経過後における大腸菌不活化効果の評価	53
4-3 実験結果および考察	54
4-3-1 寒天培地を被処理物とした実験	54
4-3-1-1 寒天培地を被処理物とした残留効果の測定	54
4-3-1-2 寒天培地に残留した効果による細菌不活化の確認.....	55
4-3-1-3 寒天培地に残留した細菌不活化効果の安定性の評価.....	56
4-3-2 蒸留水を被処理物とした実験	58
4-4 まとめ	59
参考文献.....	60
第 5 章 細菌の生育条件によるプラズマ感受性への影響評価	61
5-1 はじめに.....	61
5-2 実験概要.....	62
5-2-1 増殖経過の時期による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価	62
5-2-2 生育温度の変更による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価	63
5-3 実験結果および考察	64
5-3-1 増殖経過の時期による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価	64
5-3-2 生育温度の変更による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価	66
5-4 まとめ	69
参考文献.....	70
第 6 章 総括	72
業績.....	74
謝辞.....	80

第 1 章 序論

1-1 背景

プラズマは、分子が解離し、原子が電離し、陽イオンと電子が自由に運動している状態である。従来、大気圧高温プラズマおよび低圧低温プラズマが様々な分野で応用されてきたが、近年これらに加え大気圧低温プラズマ^[1-1]が知られるようになってきている。大気圧低温プラズマは、その名が示す通り大気圧下で生成される低温プラズマで、生体を含む低圧に耐えない素材への非熱的プラズマ処理を可能にした。それらの内でも、生体組織への処理は新規性や、今日の医療・生体への関心の高さから注目を集め、身体組織表面の疾患治療などへの有用性が見いだされ、一部で製品化も開始している^[1-2-1-6]。大気圧低温プラズマは、電離により生じる荷電粒子および励起原子、またそれらと空気および被処理物中の成分との反応で生成される各種化学種、および電磁界の作用を、熱負荷や物理的ダメージを与えることなく供給する。微生物を含む細胞への処理では、物理的破壊による不活化や、特定の化学種の細胞内シグナルとしての作用により致命的・非致命的両方の様々な応答を誘起可能である。

本研究では、プラズマ医療技術を始めとするプラズマバイオプロセッシングに貢献できる知見を得ることを目的とし、低温プラズマジェット^[1-7-1-11]を用いた細菌のプラズマ感受性に関わる因子の分析、および細菌不活化効果の制御に取り組んだ。

1-2 低温プラズマジェットおよび関連事項

1-2-1 プラズマ

物質にはそれぞれ、固体、気体、液体の状態が存在し、これを物質の三態という。固体にエネルギーを加えると融解して液体になった後蒸発し、(低圧下では昇華して) 気体となる。一般に固体、液体、気体の順に分子間力が弱くなる。気体にさらにエネルギーを加えると、分子の電離による電子と陽イオンの生成により、物質は気体分子と正イオンと電子の混合物となる。このような荷電粒子群を含む粒子集団をプラズマと定義している。電離するときに正イオンと電子は必ず対で生じるので、一般にプラズマ中の正イオンの数と電子の数はほぼ等しく、全体として電氣的に中性の状態である。全体が電氣的に中性であ

るということも、プラズマの定義に含まれる場合がある。

気体分子に加え、これの電離によって生成される電子およびイオンを含有するプラズマは気体よりさらにエネルギーが高く、後述の非平衡状態にあるものを除いて数百～数千 K となる。このようなプラズマは熱プラズマ、または平衡プラズマと呼ばれ、高温を利用する溶接などに応用されている。未来のエネルギー源として期待される核融合炉も反応場は平衡プラズマとなるが、極めて高い温度となるそれを格納する技術の開発は大きな課題となっている。他方、数百 Pa 以下の低圧下においては摂氏数十～数百度からさらには室温程度の低温プラズマが生成されることが知られてきた。プラズマ中では、主に軽い電子が印加電位からエネルギーを受け取り、衝突によって重いイオンや中性粒子へエネルギーが伝達されるが、低圧下では分子間の衝突頻度が低いため、電場等による加速を最も受けやすい電子のみが高速、すなわち高温となりイオン温度やガス温度は高くない非平衡状態が成立する。

$$T_e \gg T_i \geq T_n$$

T_e : 電子温度、 T_i : イオン温度、 T_n : 中性子温度

非平衡状態プラズマは、低温プラズマとも呼ばれ電離を起こしていながら被照射物に熱負荷を与えない。低温下で高い化学反応性を供与可能であることから、エッチングや薄膜堆積といったプロセッシング等に利用されている。

1-2-2 放電

プラズマの人工的な生成、利用には、ほとんどの場合放電が用いられる。放電には電離が伴い、すなわちプラズマ生成を伴う。これより「プラズマ」と「放電」とは広い範囲で同義に用いられる。

多種多様な放電が生成されており、気体放電に限ってもグロー放電、アーク放電等、コロナ放電、火花放電などが知られている。媒質も気体に限らず、水溶液系をはじめとする液相中での放電や、固体もしくは液体と気体との界面に生成される沿面放電等も知られ、これらは液中プラズマ、固体表面、液面プラズマとして研究、応用されているが、以下最も基本的な気体放電について述べる。気中には平常より宇宙線等により低密度ながら電離

による電子が存在するがこれにより流れる電流は暗電流と呼ばれる極めて微弱なものであり、上述の放電の開始には電離による電子供給が必要である。電子供給機構は、さらに衝突電離作用、熱電離作用、および電界放出に分類される。衝突電離作用は電子が電界で加速されて気体分子や陽電極に衝突し、分子を解離し電子を放出させる作用であり、気体分子でのそれを α 作用、陽極表面でのそれを γ 作用と呼ぶ。熱電離作用および電界放出はそれぞれ電極の加熱、および電極近傍の強力な電界により電子が負極から直接放出される作用である。電極間の印加電圧の上昇にともない、針電極対平板電極等の不均一電界ではコロナ放電から火花放電へ、平等もしくはそれに近い電界ではグロー放電からアーク放電へと移行する。グロー放電とアーク放電はいずれも空間の均一な発光を伴うが、アーク放電では電流がグロー放電と比較して著しく大きくなり電圧は低下し、高温と強烈な発光を伴う。グロー放電とアーク放電では電子供給機構が異なりグロー放電では衝突電離、アーク放電では熱電子放出および電界放出が主である。グロー放電とコロナ放電は低温プラズマ、アーク放電は高温プラズマを生成する。

自然現象の中での放電としては稲妻が代表的である。これは雷雲と大地、もしくは雷雲と雷雲を結ぶ何 km にも及ぶ長大な火花放電である。また、衣服を脱ぐ時などに発生する静電気による微小な火花放電は最も身近な放電現象といえる。放電を利用する技術で身近なものとしては電灯が挙げられる。白熱電球および LED を除く電灯は、いずれも放電プラズマより放射される電磁照射を直接、もしくは蛍光物質で可視光線に変換し利用している。

1-2-3 大気圧低温プラズマ

近年、真空装置を必要としない大気圧低温プラズマに大きな注目が集まっており、放電機構と応用に関する研究が共に精力的に進められている。

低圧下では分子の平均自由行程が長いことから、広い条件にて電子温度に比べてガス温度やイオン温度が低い非熱平衡状態にある低温プラズマが生成されるが、圧力が上がると粒子間の衝突頻度が高まり電子から気体粒子へエネルギーが移動し、高温プラズマに移行しがちである。これより以前は、不平等電界によるコロナ放電を除く、グロー放電による一様な低温プラズマの生成には低圧が必要とされていた。(1-2-1 節)

しかし近年、電極間への誘電体の挿入、1.0 kHz 以上の高周波高電圧の使用、放電ガス

としてのヘリウムもしくはアルゴンの利用などを条件として、大気圧下で低温プラズマが生成されることが見出された^[1-1]。図 1-1 に線対円筒電極での誘電体バリア放電生成装置の構造の例を示す。誘電体は直流電流を流すことができないため、放電の発生には交流高電圧の印加が必要となり、印加電圧や雰囲気ガスに加え誘電体の比誘電率や誘電体の厚さも重要な条件となる。誘電体で被覆された電極による放電は誘電体バリア放電と呼ばれ、代表的な大気圧低温プラズマ生成技術である。大気圧低温プラズマは、肉眼での観察では一様だが、実際には短時間の放電の繰り返しからなっている。低压低温プラズマでは粒子間の衝突頻度の低さにより非熱平衡状態が維持されているのに対し、誘電体バリア放電による大気圧低温プラズマでは時間的に不均一な放電が行われることにより非平衡状態が実現されている。一般的に誘電体として用いられる材料には、ガラスや石英ガラス、窯業製品、薄いエナメルや重合体層などが挙げられる。ヘリウムのイオン化エネルギーは 24.5 eV と全ての気体の中で最も高いが、19.8 eV に長寿命の準安定状態が存在するため、連続した放電ではイオン化のためにたかだか 4 eV 程度のエネルギーしか必要としない。そのため、大気圧放電開始電界強度は全ての気体の中で最も低くなっている。それに加えて、高い熱拡散性もプラズマの高温化の抑制に役立っている。アルゴンはイオン化エネルギーが 15.8 eV で 11.8 eV に準安定状態を持ち、ヘリウムには劣るが同様の特性を持ち、安価であることから広く用いられている。

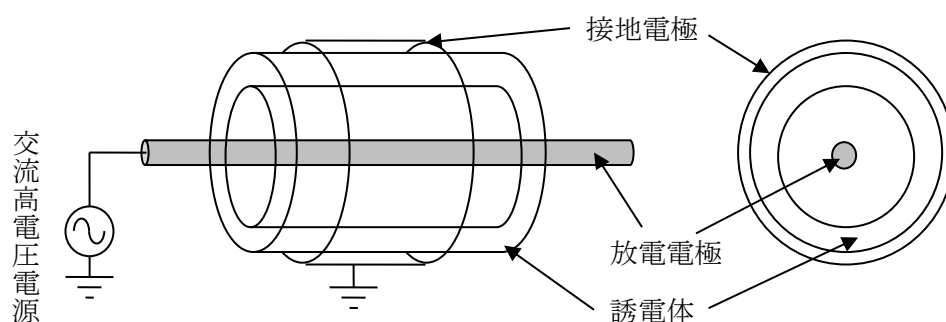


図 1-1 線対円筒電極での誘電体バリア放電生成装置の構造

1-2-4 低温プラズマジェット

低温プラズマジェット^[1-7-1-11]は、ガス流を用いて生成される、空気中に射出される炎状の大圧低温プラズマである。大気圧低温プラズマが知られる前から、アーク放電によって生成される高温の炎状プラズマである高温プラズマジェットが溶接等に用いられており、プラズマジェットという名称はそちらを意味することが一般的である。このため、室温付近のプラズマジェットは通常区別のため低温プラズマジェットと称される。

一般的な低温プラズマジェットは、内径数mm～数十mmの開放管内部に、アルゴンもしくはヘリウムを流し、開放端付近に高周波高電圧もしくはパルス高電圧を印加することにより、生成したグロー放電のガス流に沿った伸長により生成される。このような方法で生成された低温プラズマジェットをCCDカメラで観察すると、プラズマバレット、プラズマ塊などと名称される短い電離部がガス流にそって高速で射出されているのが観察される。また電極からのプラズマの伸長はガス流束、および電極により形成される電界に依存しガス流の方向とは関連が無いことが確認されている。これらのことより、このような低温プラズマジェットは媒質制限型の部分放電と考察されている^[1-7]。

他に放電部では高温のプラズマを生成し、高速のガス流により活性種を運搬・冷却するアフターグロープラズマ^[1-12]や、板状電極に開けられた内径数百 μm 以下の細孔に直流電圧を印加することで生成されるマイクロホローカソード放電^[1-13]も低温プラズマジェットを生成可能であるが、これは前段落で述べた現在主流の低温プラズマジェットとは機構を異にしている。ただ条件により、前述の媒質制限型放電による低温プラズマジェットでもガス流による化学種の運搬・冷却の考慮が必要となる。

低温プラズマジェットは、長く伸長する形状により操作性に優れることや、放電ガスとして不活性ガスを用いることや被処理物を電極としないことからより侵襲性が低いといった特徴より、各種大気圧低温プラズマ源の内でも生体組織処理への適合性が高い。

1-2-5 低温プラズマ殺菌

一部の医療器具など高温に耐えない素材の殺菌は、大気圧低温プラズマの最も期待される応用の一つである。競合する可能性のある殺菌技術との比較ではエチレンオキシドガス曝露に対し残留リスクで、紫外線照射には処理時間で、放射線照射には設備の規模で勝

るとされる。生体組織への非熱的処理によるプラズマ医療においても、殺菌は創傷治療など適合性が高いとされる用途で治療効果の中核をなす最も重要な作用である^[1-14~1-16]。

大気圧低温プラズマは、細菌を含む細胞に対しては荷電粒子、励起種、活性種（活性酸素種、活性窒素種）、電磁照射（紫外線）、電位などからなる複合ストレス源である。多くの研究報告は、活性種、特に活性酸素種による酸化がプラズマ殺菌において重要と結論付けている^[1-17~1-20]。しかし、実際に誘起される反応等、詳細に関しては未だ研究中である。低温プラズマに加え、細胞（細菌）側にも関与しうる要素が多数存在し、さらにそれらは互いに関連しているため機構は極めて複雑である^[1-19]。

1-2-6 プラズマ医療

プラズマを用いた医療技術は、今日の医療や生体への関心の高さやそれらとプラズマ科学の融合分野という新規性により注目を集めている^[1-2~1-6, 1-19~1-21]。

既存のプラズマを用いる医療技術として、アルゴンプラズマ凝固法が挙げられる。本技術では、アルゴンガスを流入させた管の中央に固定したワイヤに高電圧を印加し、大気圧プラズマを生成する器具を使用する。電極先端から治療部位へ伸長する大気圧プラズマを生成し、組織表面に局所的に電流を流しジュール熱による処理を行う。組織表面の焼灼による、手術時の止血、また鼻粘膜表面の一時的な除去によるアレルギー性鼻炎の緩和などに用いられており、医療保険も適用されている。非接触であること、また処理により乾燥した組織は高インピーダンスとなることより放電が自律的に未処理部分を走査することから、広範囲、複雑な形状の治療部位でも短時間で均一な処理が可能である。ただ、本技術では治療効果をもたらすのは電流によるジュール熱であり、プラズマは導体として用いられているのみである。他の実績のあるプラズマを用いた医療技術としては低温アブレーションが挙げられる。こちらも電極を用い組織表面を処理するもので、組織の切除やそれと同時に凝固が可能とある。概観は電気メスに近いが、より周辺組織への熱損傷を抑えた処置が可能で、扁桃腺摘出手術等に用いられ術中の痛みの軽減や経過の改善が報告されている。液中放電プラズマを用いており、局所的な高温、気泡の生成消失による機械的作用、および化学種による化学的作用が相乗的に働き組織が切断、凝固されるとされている^[1-21]。

こうした従来からのプラズマ医療に加え、プラズマプロセッシングの生体組織への適用と位置付けられる、化学種を主体とする作用を利用する低侵襲治療が現在注目を集めている。

う歯^[1-22]、慢性創傷^[1-23]、感染性皮膚疾患、等、組織表面の疾患の治療への利用が期待されている。細胞の物理化学的な破壊による不活化（殺菌）や、特定化学種（ex.一酸化窒素）の細胞内シグナルとしての働きによる活性化やアポトーシスなど細胞応答誘導により治癒効果が生じるとされている。特に慢性創傷の治療は、殺菌および細胞活性化の両作用や、非接触での処理という大気圧低温プラズマの特性が活かされた効果的かつ利便性の高い治療が可能とされ、一部で実用化が開始されている。糖尿病による慢性創傷への低温プラズマジェット照射による、創傷部の生菌数減少及び治癒の促進が報告されている^[1-23]。

1-3 *Escherichia coli* および関連事項

1-3-1 大腸菌 (*Escherichia coli*)

Escherichia coli (*E. coli*、大腸菌) はグラム陰性の桿菌、栄養要求性が低く至適生育温度での倍化時間が最少培地で約 40 min、富栄養培地で約 20 min と増殖が速く、また代謝活性が高いなどの特徴から、分子生物学におけるモデル細菌として最も広く用いられている。O157 株のような病原性株も存在するが、多くは無害であり温血動物の腸内微生物相の一般的な構成細菌である。通性嫌気性であるが、研究においては、多くの場合振とうにより増殖の速い好気条件で培養する。

プラスミド (小型の環状 DNA で、ゲノム DNA と独立して複製される) を有する大腸菌の概略図を図 1-2 に示す。長さ約 2 μm 、幅約 1 μm の桿状菌で、鞭毛を持ち、これを回転させることにより液中を泳動する。また表面全体に、線毛という短く細い毛状の器官を持ち、これにより他の細胞の表面等へ接着する。外被は、グラム陰性菌共通の特徴として細胞質を包む内膜、外膜と呼ばれる二層の脂質二重膜および、その間の多糖類の一種であるペプチドグリカンと、ペリプラズムと呼ばれるタンパク質の層からなる。ペプチドグリ

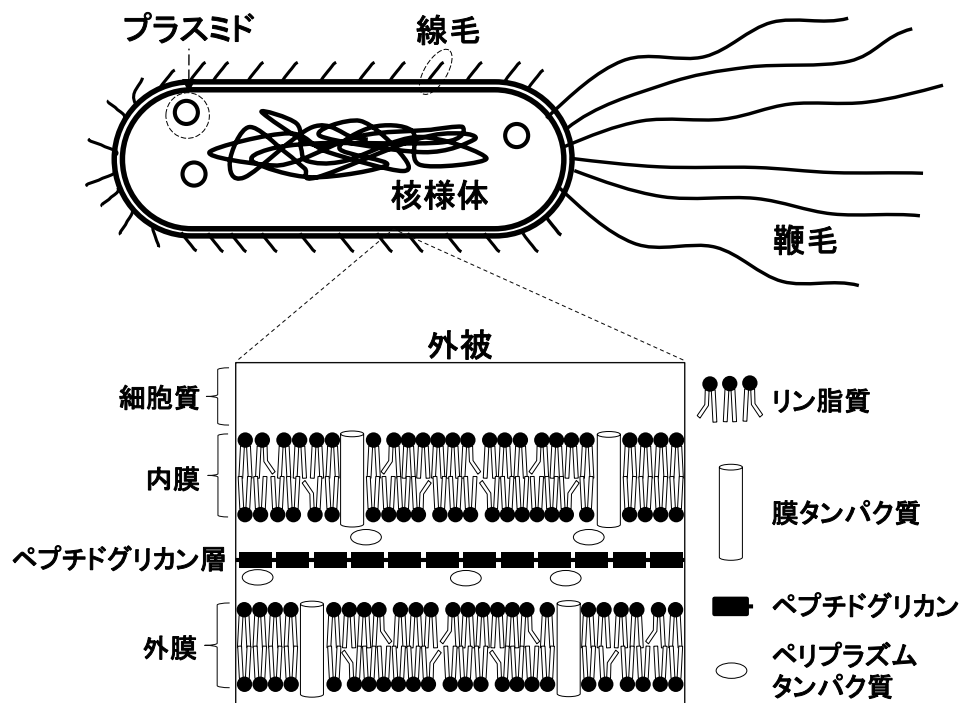


図 1-2 大腸菌 (プラスミド保有) 菌体構造の概要図

カン層は力学的な強度を有し細胞の棹型を形作り、浸透圧変化による破裂などからも保護している。分裂の際には、幅はそのまま長さを増し、中央に障壁を作り娘細胞に分裂する[1-24, 1-25]。

1-3-2 微生物集団の増殖状態の推移

閉鎖系で微生物を培養した際の生菌濃度は、一般に、培養開始から短時間は増殖を開始せず、その後指数関数的に増加して飽和濃度に達した後減少し、一定期間微減しつつ維持された後、急速に減少する、という推移を示す。これらの各段階は増殖準備期、対数増殖期、定常期、および死滅期と呼ばれる。増殖経過の推移は生菌濃度もしくは生菌濃度の対数表示を培養時間に対しプロットした増殖曲線から判別される。図 1-3 に典型的な増殖曲線と、増殖の各段階を示す。これらの各段階は、増殖経過の時期 (growth phase) と総称される。必要な場合には各増殖経過の時期をそれぞれ初期、中期、後期に区分する場合もある。この増殖経過の時期は微生物集団に対し適用される、個々の細胞の細胞齢とは異なる概念である[1-26, 1-27]。

増殖経過の推移は増殖による閉鎖系内の環境変化と、それへの細胞の適応からなる。増殖準備期は微生物が増殖準備を含め新たな環境への適応を進めている段階で、環境変化が少ない場合は短時間となる。対数増殖期では、微生物はその種および培養条件から決定される倍化時間ごとに分裂、倍化を続けている。増殖速度はその時点の生菌濃度に比例するため生菌濃度は指数関数的に増大し、生菌濃度を対数表示とするとこの時期の増殖曲線は直線となり、傾きの大きさの逆数から倍化時間が求められる。増殖が進むと、栄養素の枯渇、有害代謝産物の蓄積や過密により増加が抑制され、定常期へ移行する。定常期では、代謝が低下し、生菌濃度が飽和時に近いほぼ一定の濃度で長期間保たれる。これは、増殖

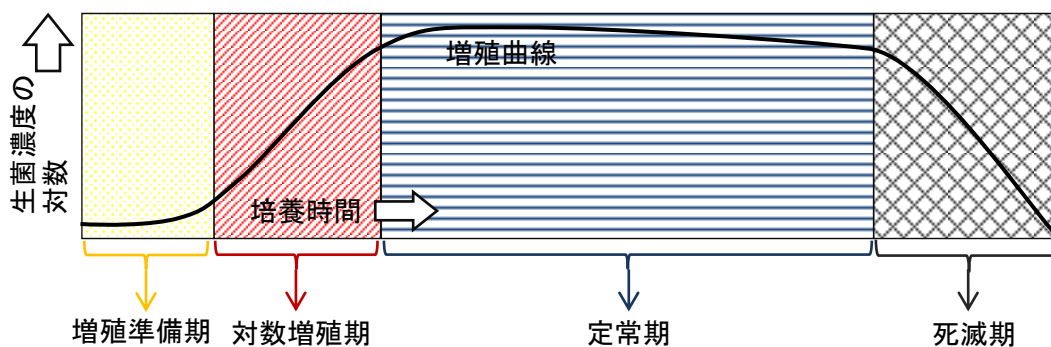


図 1-3 閉鎖系での微生物細胞集団生育における典型的な増殖曲線、および増殖の各時期

可能な環境の再来を待機する、生存戦略とされている。定常期の後、死滅期となりここでは指数関数的な死滅が起こる。死滅期は、貯蔵物質が消費しつくされたことなどにより引き起こされるとされる。従来定常期は細胞の増加数と死滅数の均衡した状態と考えられていたが、近年同一の細胞が長期にわたり代謝を低下させ生存していることや、増殖期の推移に伴う発現遺伝子群の変化が観測されていることから、定常期への移行は環境の好転の待機を目的とする高ストレス環境への統制された順応である、という解釈が成立しりつつある。細菌の増殖経過の推移に伴う発現遺伝子の変化は、主に σ 因子により制御されている。 σ 因子は細菌の種ごとに数種類が存在する遺伝子発現制御因子で、RNAポリメラーゼと結合しプロモーターへの結合と転写開始を媒介する。媒介可能なプロモーターは σ 因子の種類ごとに異なるため、細胞内の σ 因子の種類別の存在比が変わることにより、転写される遺伝子が増える。大腸菌においては σ^{70} 、 σ^{19} 、 σ^{24} 、 σ^{28} 、 σ^{32} 、 σ^{38} 、 σ^{54} の7種の σ 因子が知られており、対数増殖期では σ^{70} が、定常期では σ^{38} が支配的となる[1-28]。

1-3-3 平板培養法による生菌数測定

生菌数は衛生的品質や環境衛生管理上の指標とされており、様々な方法で評価される。その一つである平板培養法は最も広く用いられる生菌数評価法で、増殖可能な菌が生きた菌であるという前提のもと生菌数を最も正確に測定可能である。

図 1-4 に塗沫平板培養法による生菌数評価の概要図を示す。検体を希釈し固形培地を用いて培養すると、固形培地一枚辺りの生菌数が十分少なくなった段階で微生物の各細胞は各々独立したコロニーを形成する。コロニー数を計測することにより、希釈率から検体の生菌濃度を算出する。これより平板培養法により測定された生菌数の単位として CFU (Colony Forming Unit) が用いられる。希釈は通常 $1/10^n$ (n は 0 および自然数) の段階希釈とし、原則 30~300 個のコロニーの発育が認められた平板のコロニー数を用いる。コロニー数が少ないと誤差が大きくなり、多すぎると発育の抑制や労力の問題が生じるためこ

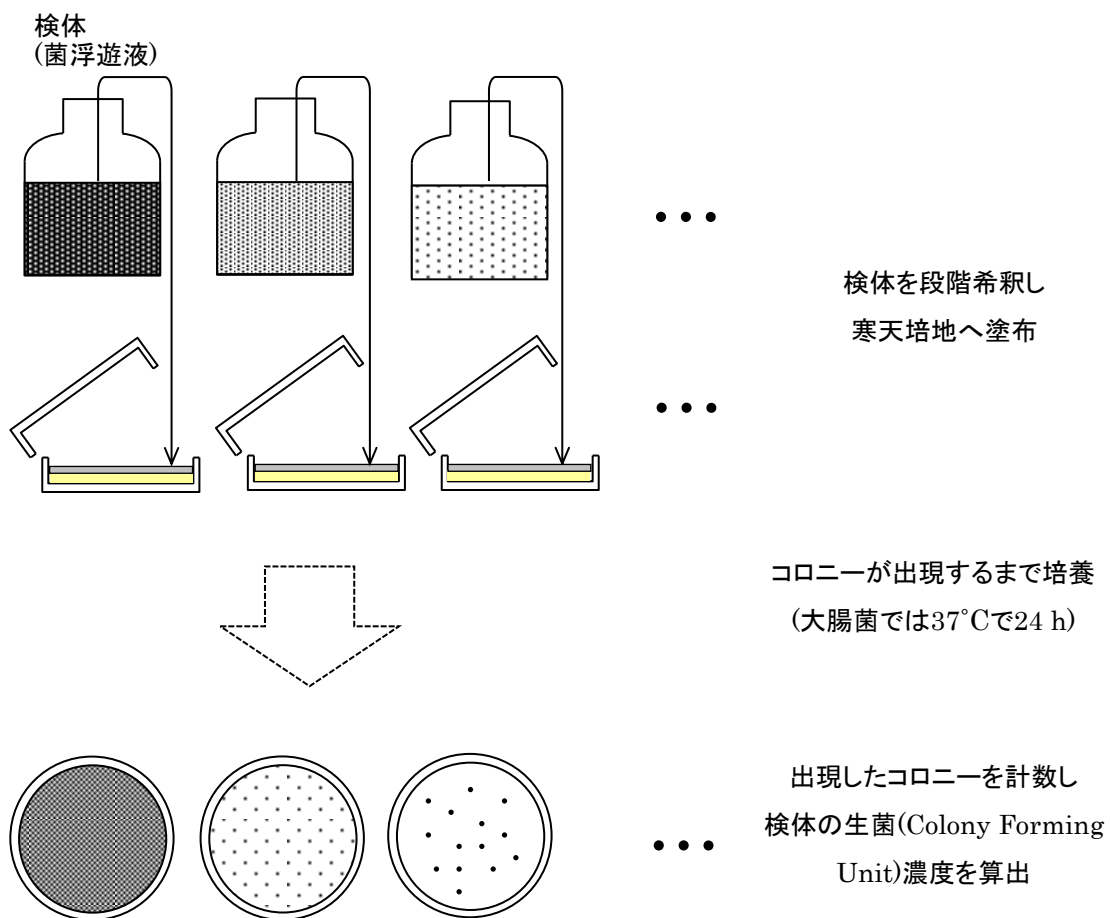


図 1-4 塗沫平板培養法による生菌数評価の概略

これらの個数を算出に用いる。高温に耐える芽胞等が測定対象の際には、植菌を固形表面への塗沫ではなく固化する前の液状の培地への混入で行う場合もある。両者を区別する場合、固形培地への塗付を用いる場合を塗沫平板培養法、混入を用いる場合を混積平板培養法と称する^[1-24]。

1-3-4 メンブレンフィルタを用いた培養

固形培地上で微生物を培養する際、直接塗布するのでなく特殊合成濾紙製のメンブレンフィルタ（フィルタ）を用いる場合もある。微細な孔を持つフィルタを用いて微生物の浮遊液を吸引もしくは加圧濾過し、これを固形培地に張り付けることで塗沫した場合と同等に培養が可能である。孔径数十 nm～数 μm のフィルタが市販されており、細菌の捕集、培養には孔径 0.45 μm のものが最も一般的である。試料の生菌濃度が低い際の濃縮や、微生物を固形培地から分離しての染色その他の処理が可能となる^[1-24]。

1-4 その他

1-4-1 フェントン反応

フェントン反応^[1-29]は、第一鉄イオンにより過酸化水素が分解され水酸化物イオンおよびヒドロキシルラジカルが生成される反応である。フェントン反応の反応式を（1）に示す。



また、二価鉄イオンは式（2）により一価鉄イオンに酸化される。



反応（2）は擬フェントン反応と呼ばれる。擬フェントン反応が十分な速度で起こる条件では、鉄イオンは繰り返し作用できる。フェントン反応は、反応溶液に低濃度の第一鉄イオン源および過酸化水素を添加するという簡便かつ経済的な処理で強い酸化力が得られることから、有機物を含む排水の処理等への応用が期待されている^[1-30]。

1-5 本研究の概容

低温プラズマジェット（プラズマジェット）および大腸菌を用い、大気圧低温プラズマによる水溶液系の殺菌へ応用可能な知見を得ることを目的とした実験に取り組んだ。本論

文は1章から6章までの構成となっている。

第1章では、放電現象を含むプラズマジェットに関する基礎的事項やプラズマ医療・殺菌、本研究で用いられた検体や関連事象、プラズマ医療の動向の概括など本研究の背景、また本研究全体の目的について述べた。

第2章では、使用したプラズマジェットの生成装置・実験系概要、および印加電圧をはじめとするプラズマジェット生成条件について記載する。またプラズマジェット生成時の電流測定結果とそれより算出された電力、およびプラズマジェット照射時、被処理物に印加される電圧の測定結果について報告する。

第3章では、プラズマジェットの殺菌効果の増幅や制御を目的とした、反応場に第一鉄イオンを添加しての大腸菌不活化実験について報告する。第一鉄イオンを添加しフェントン反応を誘起することで、プラズマ処理で生成された過酸化水素を酸化力の高いヒドロキシラジカルへ変換することによる酸化分解効果すなわち細菌不活化効果の増幅を試みた。反応場に第一鉄イオン源として硫酸第一鉄を添加し、プラズマジェット照射（プラズマ処理）後の感受性への影響を評価した。また、フェントン反応の誘起の確認を目的とし、プラズマ処理の代わりに過酸化水素を用いた場合や、指標としてインジゴカルミンの分解脱色を用いた場合との傾向の比較などを行った。

第4章では、被処理物に残留する大腸菌不活化効果の測定結果について報告する。大気圧低温プラズマ曝露によって水溶液系に生成される多様な化学種のうち、安定性の高いものはプラズマ処理を停止しても被処理物に残留すると考えられる。大腸菌不活化を指標として、この残留効果を評価した。寒天培地、および蒸留水にプラズマ処理を行い大腸菌を植菌して不活化効果を測定した。

第5章では、細菌の生育条件の変化によるプラズマ殺菌への影響についての知見を得ることを目的に、大腸菌の生育条件の変更によるプラズマ感受性への影響について評価を行った。生育条件として、増殖経過の推移および、生育温度について別個に評価した。増殖経過の推移による影響は、大腸菌を液体培地を用いて培養し、逐次採取してプラズマ感受性を測定することにより測定された。生育温度による影響は、様々な温度で培養された大腸菌のプラズマ感受性の影響を測定することにより評価された。

第6章では、本論文を総括している。

参考文献

- [1-1] S. Kanazawa, M. Kogoma, T. Moriwaki and S. Okazaki, "Stable glow plasma at atmospheric pressure," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 21, no. 5, pp. 838–841, 1988.
- [1-2] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman, "Applied plasma medicine," *Plasma Process and Polymers*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, 2008.
- [1-3] G. Morfill, M. G. Kong and J. L. Zimmermann, "Focus on plasma medicine," *New Journal of Physics*, vol. 11, 115011 (8 pp.), 2009.
- [1-4] M. G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. van Dijk and J. L. Zimmermann, "Plasma medicine: an introductory review," *New Journal of Physics*, vol. 11, 115012 (35 pp.), 2009.
- [1-5] J. Heinlin, G. Isbary, W. Stolz, G. Morfill, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, T. Nosenko, J.L. Zimmermann and S. Karrer, "Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 25, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [1-6] 勝木淳、矢野正彦、光武和典、諸富桂子、安部恵祐、矢野憲一、秋山秀典、「プロジェクトレビュープラズマ - バイオ融合科学への新展開 5 パルス高電界の生体作用と先端的医療応用」、『プラズマ・核融合学会誌』、第87巻10号、710–714頁、2011年。
- [1-7] 北野勝久、浜口智志、「低周波大気圧マイクロプラズマジェット」、『応用物理』、第77巻4号、0383–0389頁、2008年。
- [1-8] J. L. Walsh, F. Iza, N. B. Janson, V. J. Law and M. G. Kong, "Three distinct modes in a cold atmospheric pressure plasma jet," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 43, 075201 (14 pp.), 2010.
- [1-9] M. Laroussi and T. Akan, "Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, no. 9, pp. 777–788, 2007.

- [1–10] A. Shashurin, M. N. Shneider, A. Dogariu, R. B. Miles and M. Keidar, "Temporal behavior of cold atmospheric plasma jet," *Applied Physics Letter*, vol. 94, 231504(3 pp.), 2009.
- [1–11] M. Laroussi and X. Lu, "Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications," *Applied Physics Letters*, vol. 87, 113902 (3 pp.), 2005.
- [1–12] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmanson and P. Leprince, "Atmospheric pressure plasmas: A review," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 61, no. 1, pp. 2–30, 2006.
- [1–13] A. A. H. Mohamed, J. F. Kolb and K. H. Schoenbach, "Low temperature, atmospheric pressure, direct current microplasma jet operated in air, nitrogen and oxygen," *The European Physical Journal D*, vol. 60, no. 3, pp. 517–522, 2010.
- [1–14] M. Laroussi, "Non - thermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 30, no. 4, pp. 1409–1415, 2002.
- [1–15] M. Laroussi, "Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, no. 4, pp. 391–400, 2005.
- [1–16] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Schultz, A. Fridman and K. Harding, "Gas plasma: medical uses and developments in wound care," *Plasma Process and Polymers*, vol. 7, no. 3–4, pp. 194–211, 2010.
- [1–17] M. Laroussi and F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 233, no. 1–3, pp. 81–86, 2004.

- [1-18] Tetsuji Shimizu, Tetyana Nosenko, Gregor Eugen Morfill, Takehiko Sato, Hans-Ulrich Schmidt and Takuya Urayama, "Characterization of Low-Temperature Microwave Plasma Treatment With and Without UV Light for Disinfection," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 3-4, pp. 288-293, 2010.
- [1-19] H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Biological evaluation of DNA damage in bacteriophages inactivated by atmospheric pressure cold plasma," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 3-4, pp. 301-308, 2010.
- [1-20] H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Single-molecule measurement of strand breaks on large DNA induced by atmospheric pressure plasma jet," *Applied Physics Letters*, vol. 99, 191504 (3 pp.), 2011.
- [1-21] 崎山幸紀、「小特集 医療バイオ分野へのプラズマ応用 5. プラズマ治療・手術」、『プラズマ・核融合学会誌』、第83巻7号、613-617頁、2007年。
- [1-22] E. Stoffels, A. J. Flikweert, W. W. Stoffls and G.W. W. Kroesen, "Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio) materials," *Plasma Sources Science and Technology*, vol. 11, no. 4, pp. 383-388, 2002.
- [1-23] G. Isbary, G. Morfill, H.U. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, J. Heinlin, S. Karrer, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, R. Monetti, J.L. Zimmermann, R. Pompl and W. Stolz,"A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients, " *British Journal of Dermatology*, vol. 163, no. 1, pp. 78-82, 2010.
- [1-24] 扇元敬司、「バイオのための基礎微生物学」、講談社、16-20頁、2002年。
- [1-25] 多田宜文、渡辺雅保、「微生物学入門」、コロナ社、1998年。
- [1-26] 柳田友道、「微生物科学 2 成長・増殖・増殖阻害」、学会出版センター、1981年。

- [1-27] J. Monod, "The growth of bacterial cultures," *Annual Review of Microbiology*, vol. 3, pp. 371-394, 1949.
- [1-28] 吉川寛 (編集)、「ネオ生物学シリーズ 第3巻細菌」、共立出版、1996年。
- [1-29] H. J. H. Fenton, "LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron," *Journal of the Chemical Society*, vol. 65, pp. 899-910, 1894.
- [1-30] M. Panizza, and G. Cerisola, "Electro-Fenton degradation of synthetic dyes," *Water Research*, vol. 43, no. 2, pp. 334-339, 2009.

第2章 低温プラズマジェットの生成および基礎特性の測定

2-1 はじめに

本章では、本研究で用いた二種類の低温プラズマジェット（プラズマジェット）の生成装置構造、プラズマジェット生成条件、実験系概要、また電流測定結果とそれと印加電圧より算出された電力について記述する。また、linear-field 型プラズマジェット（後述）照射時、被処理物に印加される電圧の測定結果について述べる。本研究では大別して二種類のプラズマジェット生成装置を用いた。文献^[2-1]にて提案された放電ガス流と電界の方向に基づく分類に基づき、各装置を cross-field 型、および linear-field 型と称する。

2-2 電源および測定部

電源として、高電圧パルス電源（株式会社電子制御国際、PPS-8000）により生成された最大値および周波数を調製したパルス高電圧を使用した。電源電圧および放電電流の波形を、オシロスコープ（Tektronix Inc., TDS2014）、高圧プローブ（Tektronix Inc., P6015A）、および電流プローブ（Pearson Electronics、Model 2877）を用いて測定した。接続については後述する。

2-3 cross-field 型プラズマジェット生成装置、生成条件および実験系

図 2-1 に、cross-field 型プラズマジェット生成装置の断面構造図を示す。本装置には(a)、(b)の二種類があるが、放電部を始めとする基本構造は同一であり、放電部下端から石英ガラス管開放端の距離および本部分の外壁の絶縁構造のみが異なる。装置(a)では、24 穴プレート処理においてアルゴンガスの装置周辺への逆流により、接地電極下端と高電圧電極先端とが石英ガラス管開放端および管外壁表面を介する火花放電によって導通しプラズマジェット生成が不可能となった。そのため放電部からガラス管開放端までの距離の伸長と外壁を被覆するシリコーンの厚みの増大により、絶縁を向上させた装置(b)を作成した。

放電部は、石英ガラス管（外径 7.0 mm、内径 5.0 mm）の管軸に固定されたステンレスワイヤ（株式会社ニラコ、SUS304 製直径 0.4 mm）、および管外周のステンレスメッシュ（東京スクリーン社、SUS304 製 30 mesh/inch 線径 0.3 mm）より構成される。ワイヤを電圧源に接続し、ステンレスメッシュを接地すると管軸から管壁方向へ放射状の電界が形成される。高電圧電極（ステンレスワイヤ）は、石英ガラス管外周の接地電極（ステンレスメッシュ）と対向し放電部となる 10.0 mm を残し外径 2.0 mm、外径 1.0 mm の細径ガラス管

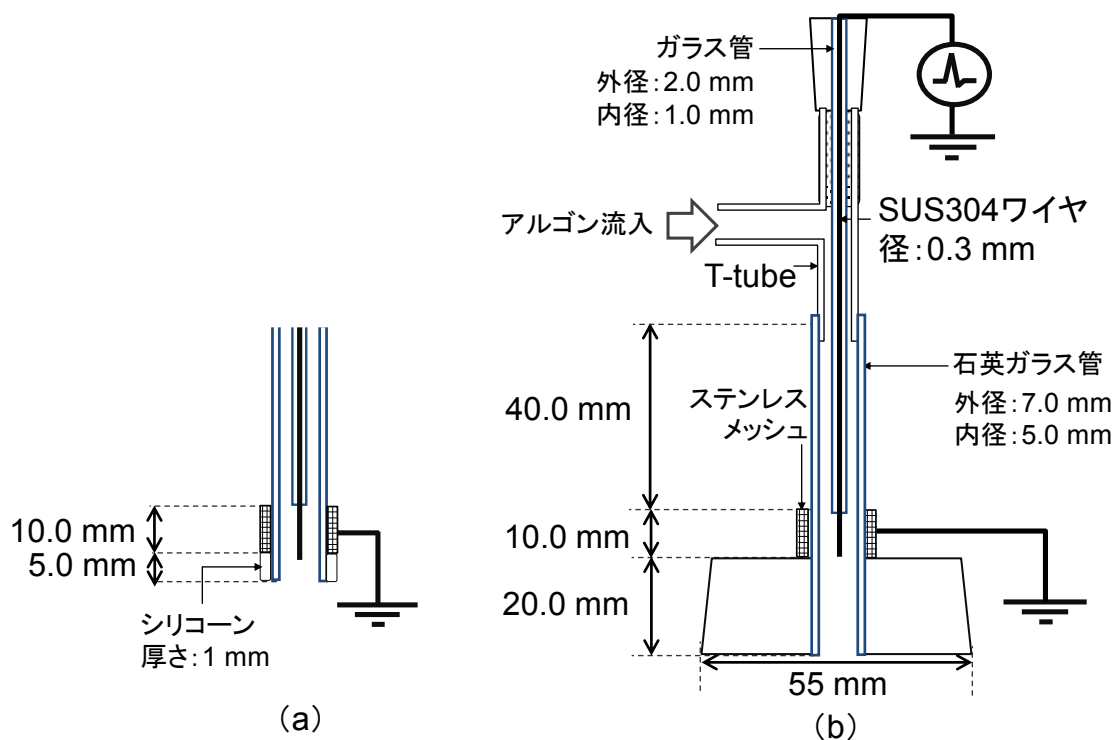


図 2-1 cross-field 型プラズマジェット生成装置

ラス管で被覆されている。交流高電圧を印加すると石英ガラス管の管壁を誘電体とする線対円筒電極型のバリア放電が発生し、大気圧低温プラズマが生成され、適切な放電ガスを流入させることにより伸長しプラズマジェットを生成する。cross-field という名称は、電界がガス流に対し直交することに基づいている。

図 2-2 に cross-field 型プラズマジェット生成装置での実験系およびプラズマジェット生成条件を示す。電源電圧および周波数は 12.0 kV_{0-P}、2.5 kHz に設定した。放電ガスとして、流量 2.0 l/min の工業用アルゴンを用いた。

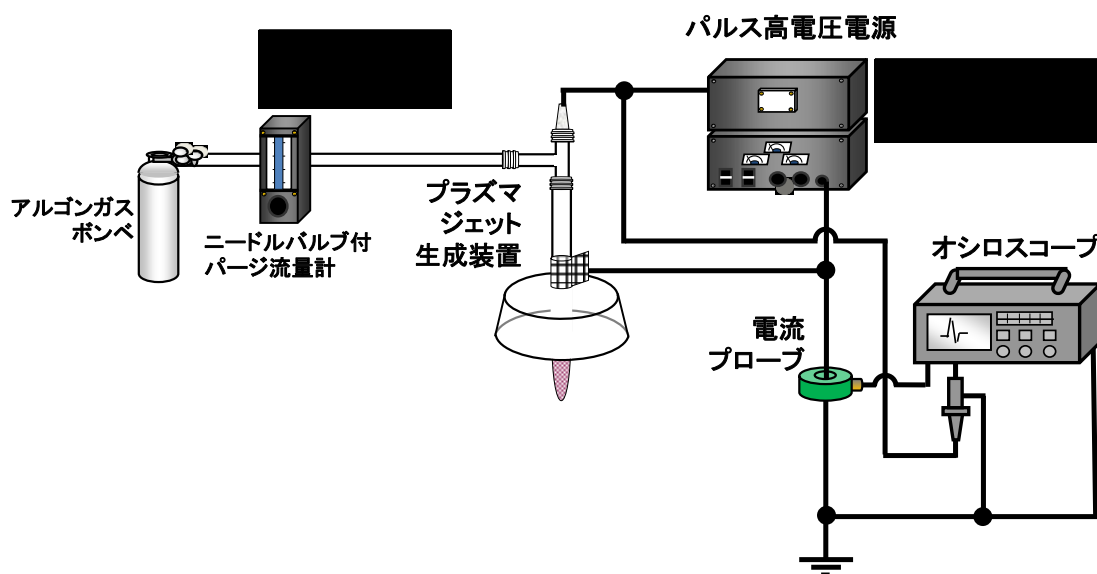


図 2-2 cross-field 型プラズマジェット実験系およびプラズマジェット生成条件

図 2-3 に、図 2-1 に示した条件でのプラズマジェット生成時における電源電圧および測定された電流の波形を示す。電流は、パルス電源接地部に電流プローブを装着して測定し、電流最大値は 0.37 A 、電力は 8 W となった。

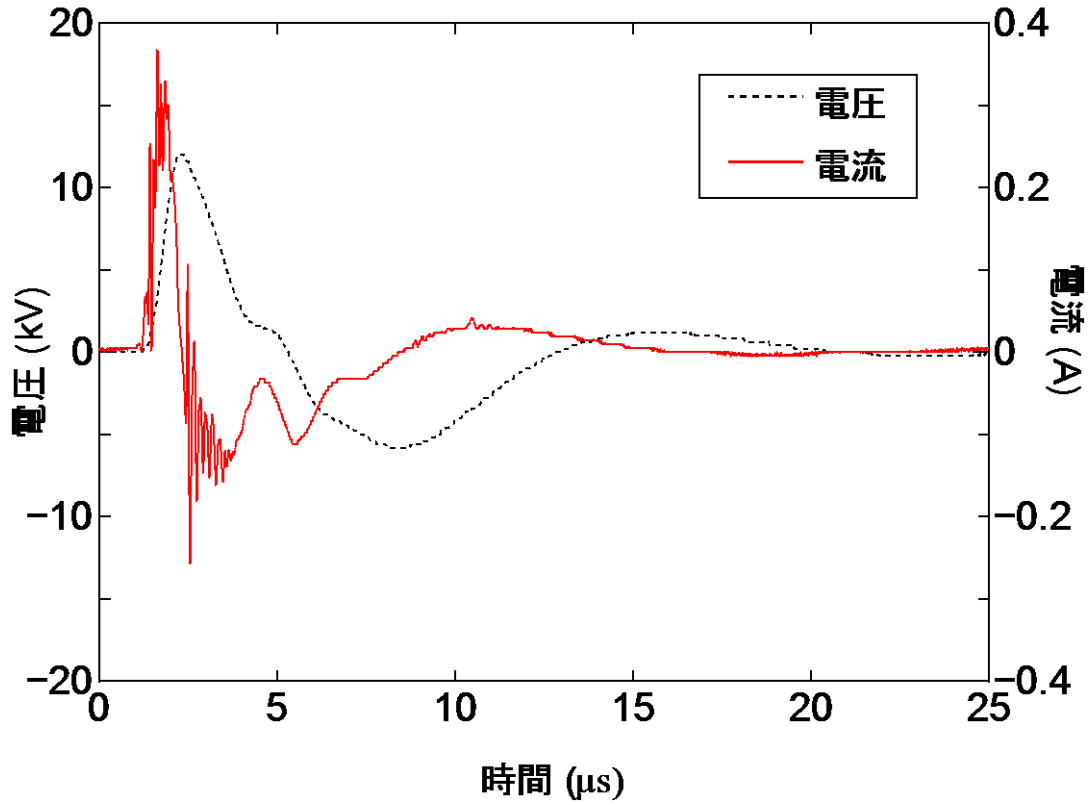


図 2-3 cross-field 型プラズマジェット印加電圧・電流波形

2-4 linear-field 型プラズマジェット

2-4-1 linear-field 型プラズマジェット生成装置、生成条件および実験系

図 2-4 に、linear-field 型プラズマジェット発生装置の断面構造図を示す。本装置の放電部は石英ガラス管（外径 7.0 mm、内径 5.0 mm）およびその外周のアルミニウムテープから構成される。アルミニウムテープを交流高電圧電極として放電を生成し、装置には接地電極を有しない。管の開放端から十分離れた大気もしくは被処理物が接地電位となり、電界とガス流は平行となるため、本方式は linear-field 型と名称される^[2-1]。

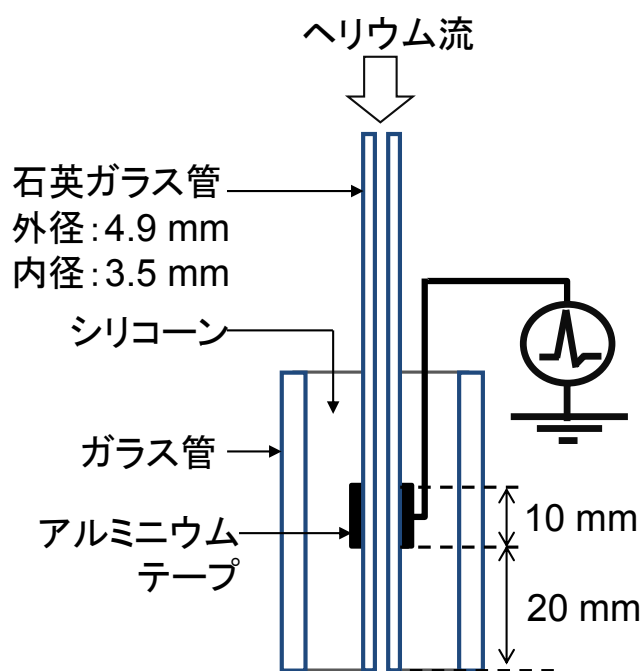


図 2-4 linear-field 型プラズマジェット生成装置

図 2-5 に本装置使用時の実験系及びプラズマジェット生成条件を示す。

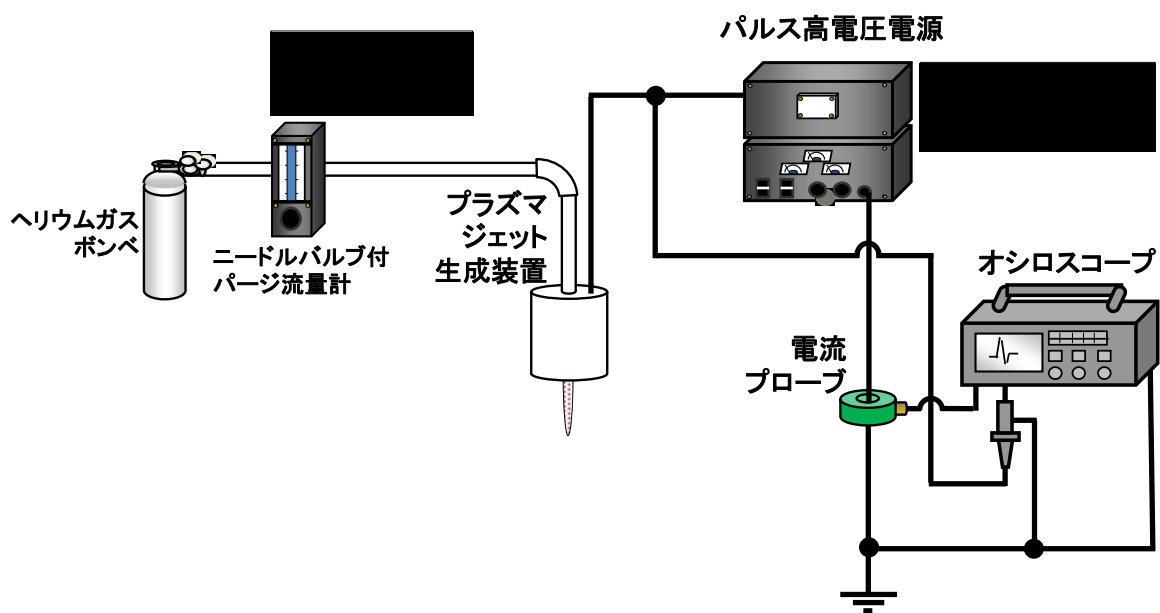


図 2-5 linear-field 型プラズマジェット実験系およびプラズマジェット生成条件

図 2-6 に、図 2-5 に示した条件でのプラズマジェット生成時における電源電圧および電流の波形を示す。電流は、パルス高電圧電源接地極に電流プローブを装着して測定した。電流最大値は 0.32 A、電力は 10 W となった。

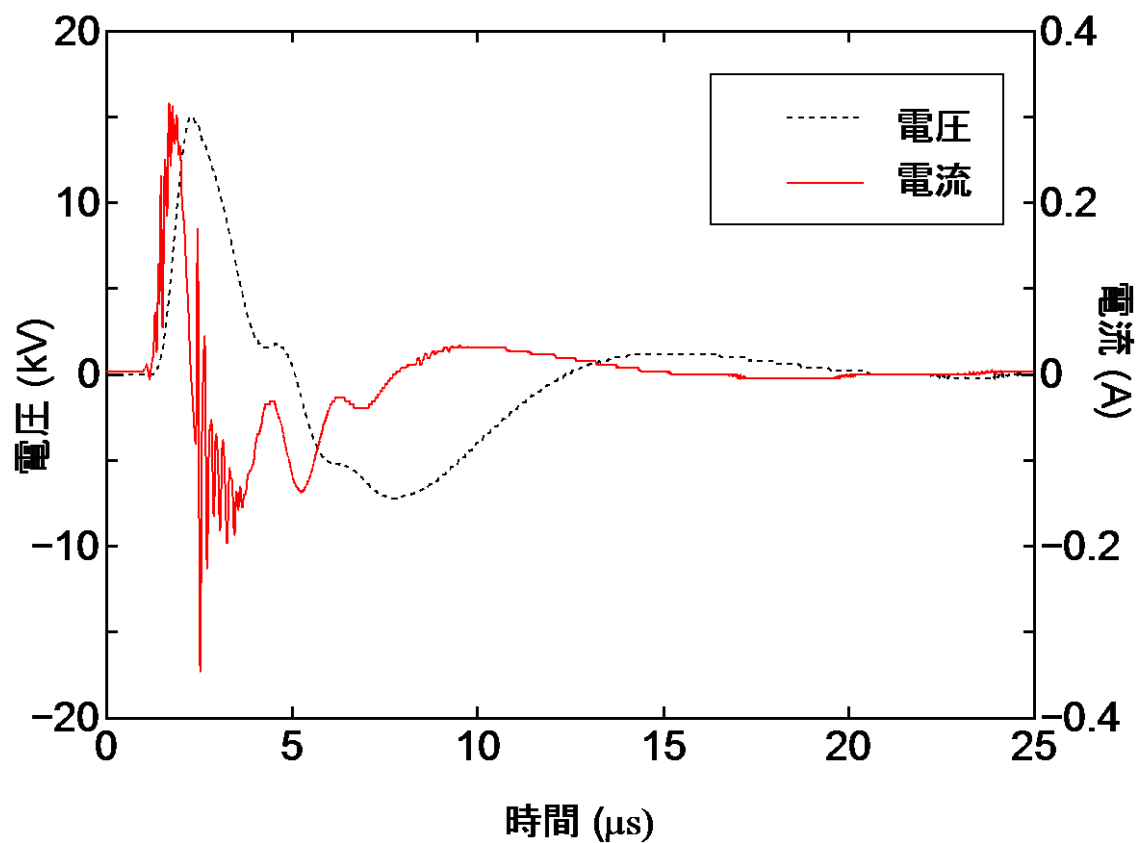


図 2-6 linear-field 型プラズマジェット印加電圧・電流波形

2-4-2 各処理条件における被処理物への電源電圧測定

2-4-2-1 測定方法

linear-field 型プラズマジェット処理で被処理物に印加される電位を測定した。測定系概要を図 2-7 に示す。24 穴細胞培養プレート (Becton, Dickinson and Company, BD Falcon™, 35-3047) の高さ 15 mm、底面積 2.0 cm² のウェル底面に孔を開け SUS316 製、直径 0.3 mm のワイヤの先端 4 mm をウェル内に挿入して直角に曲げ、ワイヤ先端部をウェル底上に接触させた状態でシリコン接着剤 (信越化学工業株式会社、KE-45T) で固定および穴を充填した。これによりウェル内液体へワイヤを電氣的に接続できるようにした。この 24 穴プレートをグラウンドに接続した直径 5 mm の孔を開けたアルミニウム板上へ設置し、ワイヤを孔へ通し浮動電極とし、高圧プローブおよびオシロスコープを接続し電位を測定した。被処理物としてリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline, PBS) を用いた。PBS 400 μl を 24 穴細胞培養プレート (Becton, Dickinson and Company, BD Falcon™, 35-3047) の高さ 15 mm、底面積 2.0 cm² のウェルに注入し、水面中央に linear-field 型プラズマジェットを照射した。高圧プローブの出力を被処理物への印加電位として測定した。処理条件は原則図 2-5 と同様とし、そこから電源電圧波形における最大値、電源周波数、放電ガス (ヘリウム) 流量、および被処理物への距離を変化

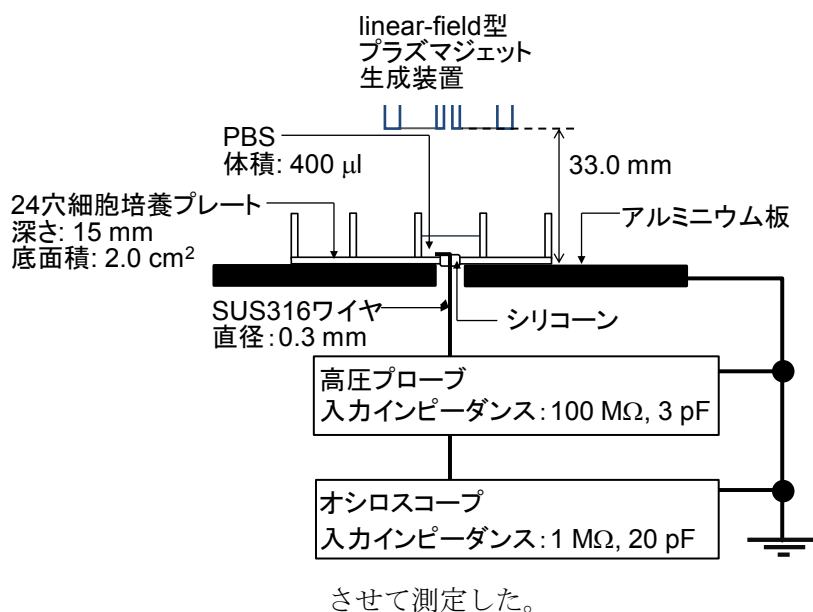


図 2-7 被処理物への印加電圧測定実験系

2-4-2-2 測定結果

図 2-8 に、電源電圧最大値を 5.0、10.0、15.0、および 20.0 kV_{0-P} に変化させプラズマ処理した際に被処理物に生じた電位（被処理物電位）の波形を示す。被処理物電位はおおむね電源電圧と同期したが、電源電圧に見られたアンダーシュート（図 2-6）が被処理物電位には見られなかった。最大値はそれぞれ 0.1、1.3、1.7、2.4 kV となり、電源電圧 10.0 kV_{0-P} 以上では、被処理物への印加電位はそれに比例する傾向を示した。ただ電源電圧 5.0 kV_{0-P} では被処理物電位は 0.1 kV_{0-P} と大幅に低下し、この関係から外れた。外観において、電源電圧 10.0 kV_{0-P} ではプラズマジェットが被処理物に到達していたのに対し 5.0 kV_{0-P} ではそれが見られなくっており、それと対応する結果となった。

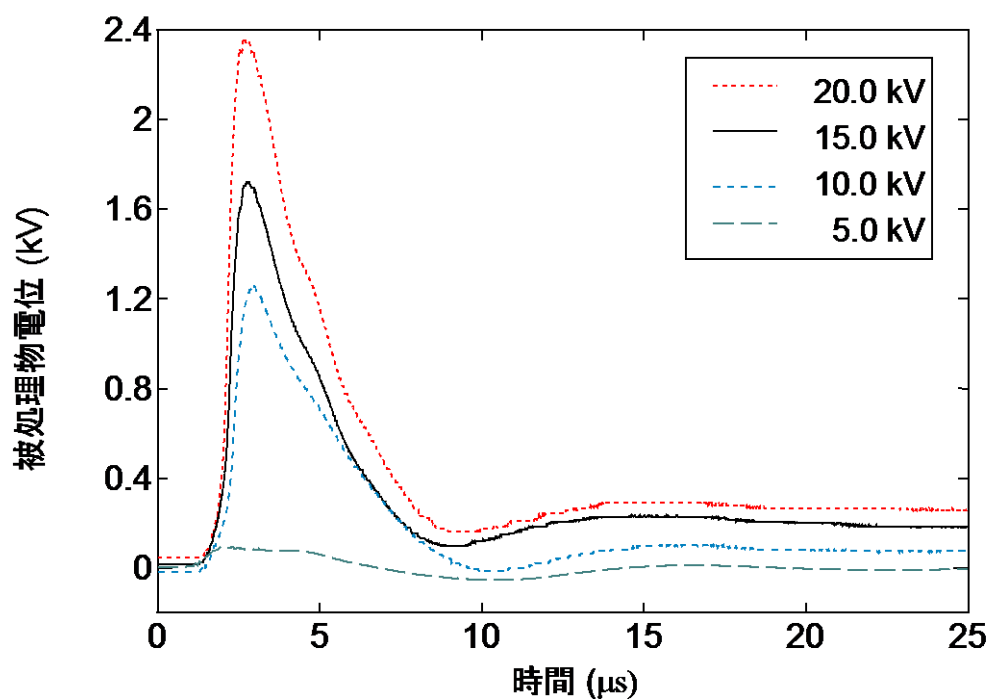


図 2-8 電源電圧最大値の変化に伴う被処理物への印加電位波形の変化

図 2-9 に、電源周波数を 0.5、1.0、2.0、3.0 kHz に変化させた場合の被処理物への印加電位の波形を示す。被処理物電位は電源周波数の増大に伴い減少し、3.8、2.3、1.8、1.7 kV_{0-P} となった。波形は、電源電圧を変化させた際と同様アンダーシュートが見られないものとなった。

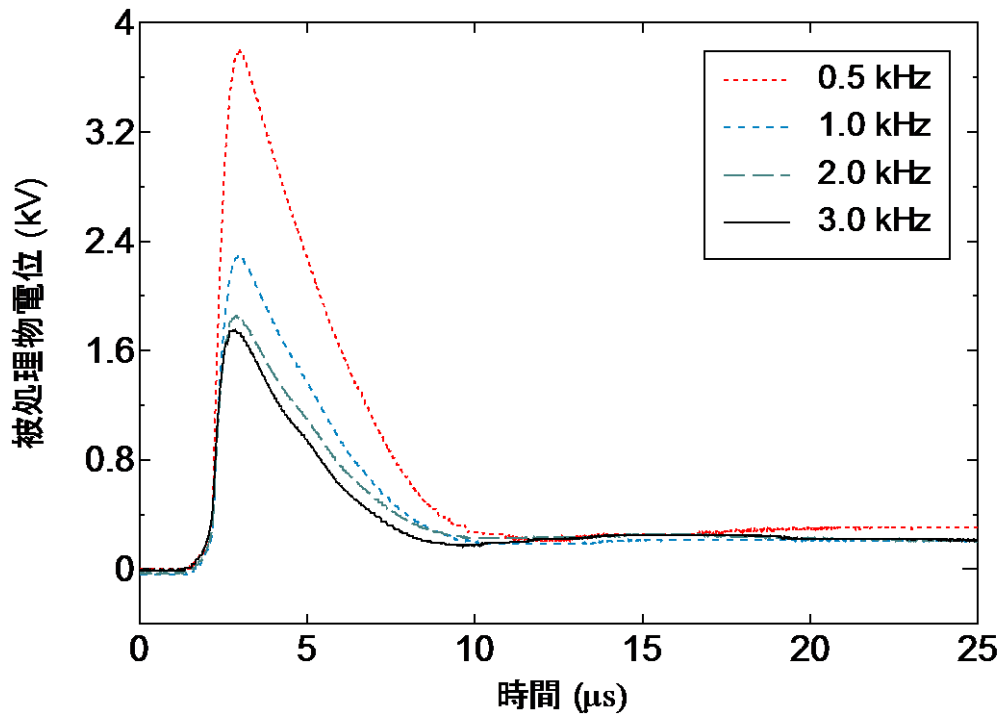


図 2-9 電源周波数別の被処理物への印加電圧波形の変化

図 2-10 にヘリウム流量を 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、および 20.0 l/min に変化させた場合の被処理物電位の波形を示す。被処理物電位はそれぞれ 0.8、1.5、6.0、7.8、8.5、8.7、および 8.7 kV_{0-P} となり、流量増大による被処理物への印加電位の増大が確認されたがこの影響は流量 8.0 l/min 付近において飽和した。一般的な低温プラズマジェットは媒質制限型の放電である（1 章 1-2-4 節）ことより、本実験条件においてこの流量以上では被処理物に到達するヘリウム流束の径が飽和したと考えられる。本実験では、流量が大きな領域で被処理物電位にアンダーシュートが生じた。

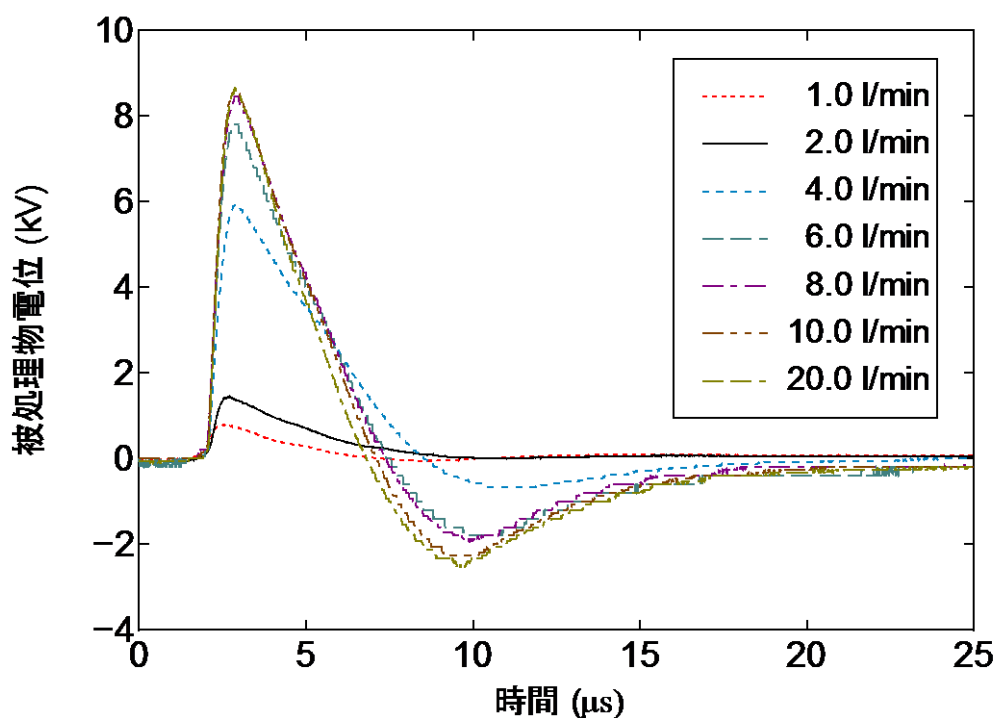


図 2-10 ヘリウム流量ごとの被処理物への印加電圧波形の変化

図 2-11 にプラズマジェット生成装置先端から PBS 水面（被処理物）への距離を 23.0、33.0、53.0、73.0 mm に変化させた場合の被処理物への印加電位の波形を示す。は印加電位における最大値はそれぞれ 8.0、1.2、0.6、0.5 kV となり、距離 23.0 mm での著しい増大が観察された。

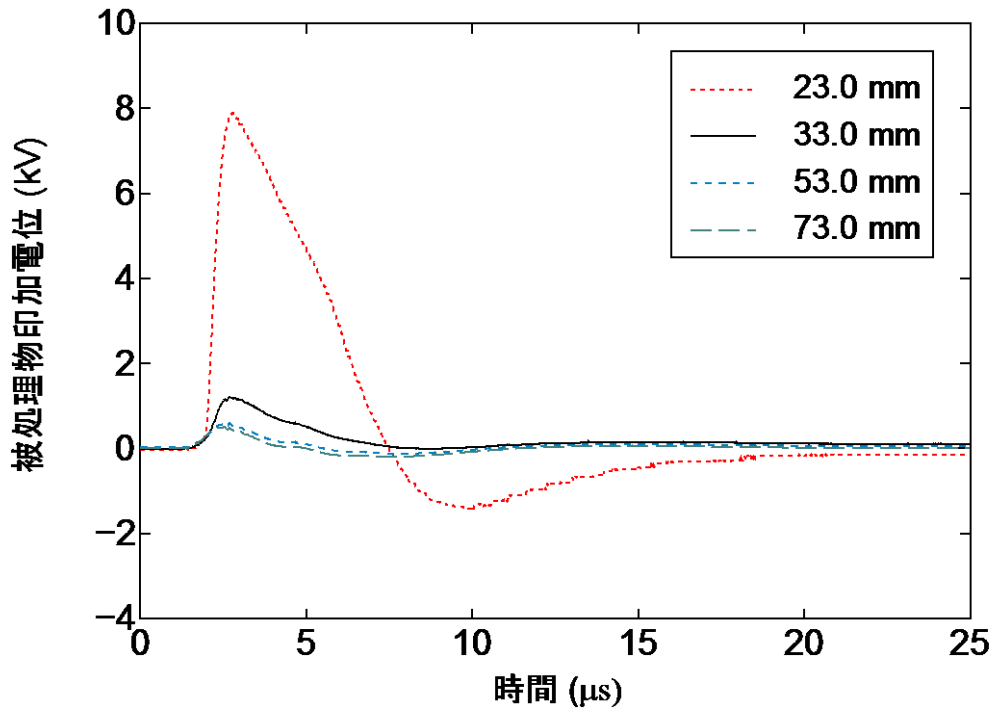


図 2-11 被処理物への距離（プラズマジェット生成装置先端から PBS 水面）ごとの被処理物への印加電圧波形の変化

図 2-12 には距離 33.0 mm 以上における結果のみを示す。これらの距離でも距離の縮小に伴う印加電圧の増大が見られた。

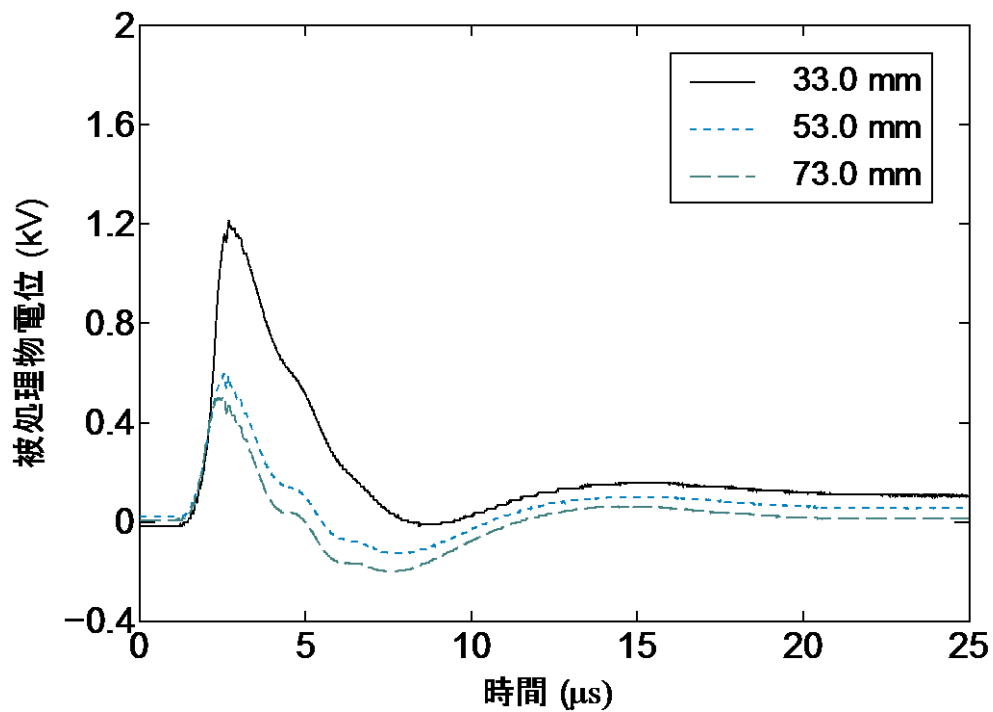


図 2-12 被処理物への距離ごとの被処理物への印加電圧波形の変化 (33.0 mm 以上のみ)

2-5 まとめ

本章では、cross-field 型、linear-field 型の両プラズマジェット生成装置の構造と動作条件について記述し、両プラズマジェットの電気的特性として生成時の電流波形と電力、また linear-field 型プラズマジェットによる被処理物への印加電位を測定した。結果、以下の知見が得られた。

- 電力は、cross-field 型で 8 W、linear-field 型で 10 W と算出された。
- プラズマジェットの被処理物には、電源電圧とおおむね同調する電位が生じた。
電源電圧 15.0 kV_{0-p}、3.0kHz、放電ガス流量 2.0 l/min、被処理物への距離 33.0 mm での linear-field 型装置によるプラズマ処理で、被処理物電位は 1.5~1.7 kV_{0-p}であった。
- 電源電圧最大値、放電ガス流量の増大は被処理物電位を増大させた。
- 電源周波数、被処理物への距離の増大は被処理物電位を減少させた。

参考文献

- [2-1] J. L. Walsh, M. G. Kong, J. L. Zimmermann and S. Karrer, "Contrasting characteristics of linear-field and cross-field atmospheric plasma jets," *Applied Physics Letters*, vol. 93, 111501 (3 pp.), 2008.

第3章 鉄イオン添加による細菌不活化効果の増幅

3-1 はじめに

プラズマ処理による細菌不活化効率を高めることができれば、これを用いた応用での安全性および利便性の向上が可能である。本実験では、フェントン反応（1章 1-4-1 節）の誘発による大気圧低温プラズマの細菌不活化効果の増幅を試みた。殺菌検体としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁した大腸菌を用いた。PBS は、浸透圧が調製され pH 緩衝能を有するより生体環境へ近い液相として選択した。また、大腸菌不活化は化学反応の他に多くの生物学的反応の関与する極めて複雑な反応であることから、より酸化分解効果との相関が高いと考えられるインジゴカルミンを検体とし、本物質の分解による脱色を指標とする実験も行った。インジゴカルミン分解実験においてのみ、蒸留水を液相（溶媒）とした際の効果も評価された。原則、硫酸第一鉄濃度を変化させ、効果との関係性を評価した。

過酸化水素とヒドロキシルラジカルは、いずれも水溶液系への大気圧低温プラズマ処理で生成される活性酸素種である。過酸化水素は活性酸素種の中では反応性が低く、被照射物に残留しやすい。他方ヒドロキシルラジカルは活性酸素種の中で最大の酸化力を持つ。プラズマ処理による細菌不活化の主要因は酸化的破壊である可能性が高いことから、ヒドロキシルラジカルは本効果の重要な因子とされている。これらのことより、プラズマ処理時にフェントン反応を誘起できれば、生成される過酸化水素のヒドロキシルラジカルへの変換によりプラズマのエネルギーの酸化分解効果への変換効率が向上し、細菌不活化効果が増幅されると考えた。化合物との相乗作用の利用は、効率の改善に加えプラズマ生成条件の調節のみでは困難な効果の領域的な制御（ex. 創傷部分での殺菌効果の増幅）に繋がる。

3-2 実験概要

3-2-1 第一鉄イオン（硫酸第一鉄）添加方法

第一鉄イオン源として硫酸第一鉄を用いた。硫酸第一鉄を濃度 100 mM にて蒸留水に溶解し、pH 調製のため水酸化ナトリウム 10 N を加えた。この溶液を蒸留水にて終濃度の 100 倍濃度に希釈後、後述の大腸菌浮遊液もしくはインジゴカルミン溶液へ 1/100 体積滴

下した。溶液中の第一鉄イオンは第二鉄イオンに酸化されやすく濃度が不安定であるため、この硫酸第一鉄水溶液は実験ごとに調製した。

3-2-2 インジゴカルミン脱色反応を指標とした分解効果の確認

大腸菌不活化に先立ち、有機染料のインジゴカルミンの脱色を指標とするより単純な系で硫酸第一鉄添加による分解効果への影響を確認した。インジゴカルミンを濃度 400 mg/l にて蒸留水に溶解した。この溶液 400 μ l を 24 穴細胞培養プレート (BD Falcon™、Becton、Dickinson and Company; 35-3047) の深さ 15 mm、底面積 2.0 cm² のウェルに分注し前節の方法にて終濃度 1.0、0.1、0.01、0.001、および 0.0001 mM の硫酸第一鉄を添加した。これをグラウンドに接続したアルミニウム板上に設置し”プラズマ処理群”ではプラズマ生成装置先端と大腸菌浮遊液水面とを 33.0 mm として水面中央へ linear-field 型プラズマジェット (2 章 2-4-1 節) を照射 (プラズマ処理) した。5 min 一方、対照の”プラズマ非処理群”では、プラズマ処理と同様の状態で生成装置に電圧を印加せず、2.0 l/min のヘリウム流を大腸菌浮遊液水面に照射した。両群とも処理後に溶液を 20 倍希釈後 OD₅₉₅ を測定し、値の減少をインジゴカルミン分解として評価した。

3-2-3 フェントン反応活性を持たない二価金属との比較

大腸菌のプラズマ感受性への硫酸第一鉄添加による影響を確認した。蒸留水による大腸菌浮遊液では硫酸第一鉄のみで桁数減少に至る強力な不活化効果を示し、プラズマ処理との相乗効果の評価は困難であった (data not shown)。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 内では硫酸第一鉄添加のみによる強力な毒性は生じなかったため、これを液相とした場合についてのみ検討した。PBS は、浸透圧及び緩衝能の面より、本実験が目的とする処理対象である生体組織表面により近い水溶液系である。

大腸菌 ATCC13706 株 (大腸菌) を LB 寒天培地上にて画線培養し、単離コロニーを Lennox LB 培地 (LB 培地) 20 ml に溶解して 37°C にて一晩前培養した。前培養後の大腸菌浮遊液 0.5 ml を 1L フラスコ内の余熱した LB 培地 100 ml へ植菌 (生菌濃度 10⁷ CFU/ml) して 37°C にて 120rpm の振とうを加えながら培養した。培養液の OD₅₉₅ を適宜測定し対数増殖期 (OD₅₉₅ = 0.4~0.8) にて採取し氷上 (4°C) への 5 min の静置による増殖停止後、冷却遠心 (2600×g, 4°C, 10 min) にて大腸菌を沈殿として回収し生菌濃度 5 × 10⁶ CFU/ml にて PBS へ懸濁した。懸濁時の生菌濃度は、回収時における培養液の OD₅₉₅

および、予め測定した培養液の OD_{595} と生菌濃度の関係より調整された。この大腸菌浮遊液を用いて、終濃度 1.0 mM の硫酸第一鉄、および硫酸マグネシウム添加による大腸菌のプラズマ感受性への影響を評価した。硫酸マグネシウムは、フェントン反応活性を持たない二価金属イオンの硫酸塩であり、鉄イオンに特異な影響を確認するための対照として選択した。硫酸マグネシウムは pH を降下させなかったため、これには水酸化ナトリウムは添加しなかった。

各大腸菌浮遊液 100 μ l を 24 × 60 × 0.15 mm のガラス板（松浪ガラス工業株式会社、NEO micro cover glass No. 1）に滴下し、グラウンドに接続したアルミニウム板上設置して液滴中央に linear-field 型プラズマジェット（2章 2-4-1 節）を 5 min 照射し、生菌濃度の変化を測定した。浮遊液およびガラス板は、グラウンドに接続したアルミニウム板上に設置した。アルミニウム板表面とプラズマジェット生成装置先端から 40 mm とした。プラズマ処理による水分の蒸発で浮遊液が濃縮されるため、照射前後にガラス板ごと重量の減少を測定し、減少分を蒸発分として滅菌水を添加し補正した。生菌濃度の測定には塗沫平板培養法を用いた。

3-2-4 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌のプラズマ感受性

前節と同様に調整した大腸菌浮遊液 400 μ l を 24 穴細胞培養プレート (3-2-2 節) のウェルに分注し、終濃度 1.0、0.1、0.01、0.001、および 0.0001 mM の硫酸第一鉄を添加して (3-2-1 節) linear-field 型プラズマジェット (2 章 2-4-1 節) を照射した。水面とプラズマジェット生成装置先端との距離を 33.0 mm とし、グラウンドに接続したアルミニウム板上にて水面中央にプラズマジェットを照射した。対照群には、同様の条件でプラズマジェット生成装置に電圧を印加せず、2.0 l/min のヘリウムガス流を照射した。両群を、“プラズマ処理群”および“プラズマ非処理群”と称する。生菌濃度の測定には塗抹平板培養法を用いた。

3-2-5 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌の過酸化水素感受性評価

プラズマ処理の代わりに、これによって生成される濃度の過酸化水素添加を用いた場合の、硫酸第一鉄による大腸菌感受性への影響を評価した。これにより、プラズマで生成された過酸化水素がフェントン反応により高い酸化力を持つヒドロキシルラジカルに変換され分解効果が増大する、という意図した反応の確認を試みた。過酸化水素は、半定量試験紙 (MACHEREY-NAGEL、QUANTOFIX® Peroxide 100) により測定された。前節と同様の条件で PBS 400 μ l へのプラズマ処理を行い、終了後ただちに測定した。

測定された過酸化水素濃度への曝露による大腸菌不活化実験を行った。大腸菌浮遊液 (3-2-3 節) 400 μ l を 24 穴細胞培養プレートウェルに分注して終濃度 1.0、0.1、0.01、0.001、および 0.0001 mM の硫酸第一鉄を添加し (3-2-1 節)、測定された濃度の過酸化水素を滴下し、5 min 静置した。対照では、各濃度の硫酸第一鉄のみを添加した。両処理を、“過酸化水素”+および“過酸化水素-”と称する。生菌濃度の測定には塗抹平板培養法を用いた。

3-2-6 PBS を液相とした場合のインジゴカルミン脱色効果

3-2-2 節のインジゴカルミン分解脱色を指標とする硫酸第一鉄添加のによる影響評価を、溶媒を蒸留水から PBS に変更して行った。濃度 400 mg/l のインジゴカルミン PBS 溶液 400 μ l を 24 穴細胞培養プレートウェルに分注し、終濃度 1.0、0.1、0.01、0.001、および 0.0001 mM の硫酸第一鉄を添加し (3-2-1 節)、プラズマ処理および対照のヘリウムガス流処理を行った。両群を、“プラズマ処理群”および“プラズマ非処理群”と称する。インジ

ゴカルミンの脱色分解は PBS で 20 倍希釈後 OD₅₉₅ を測定することにより評価した。

3-3 実験結果および考察

3-3-1 インジゴカルミン脱色反応を指標とした分解効果の確認

結果を図 3-1 に示す。"プラズマ処理群"および"プラズマ非処理群"は、測定された OD₅₉₅ の値を"0 mM 硫酸第一鉄添加・プラズマ非処理群"の OD₅₉₅ の値により正規化し、パーセント表示している。"正規化プラズマ処理群"は、"プラズマ処理群"の値を"プラズマ

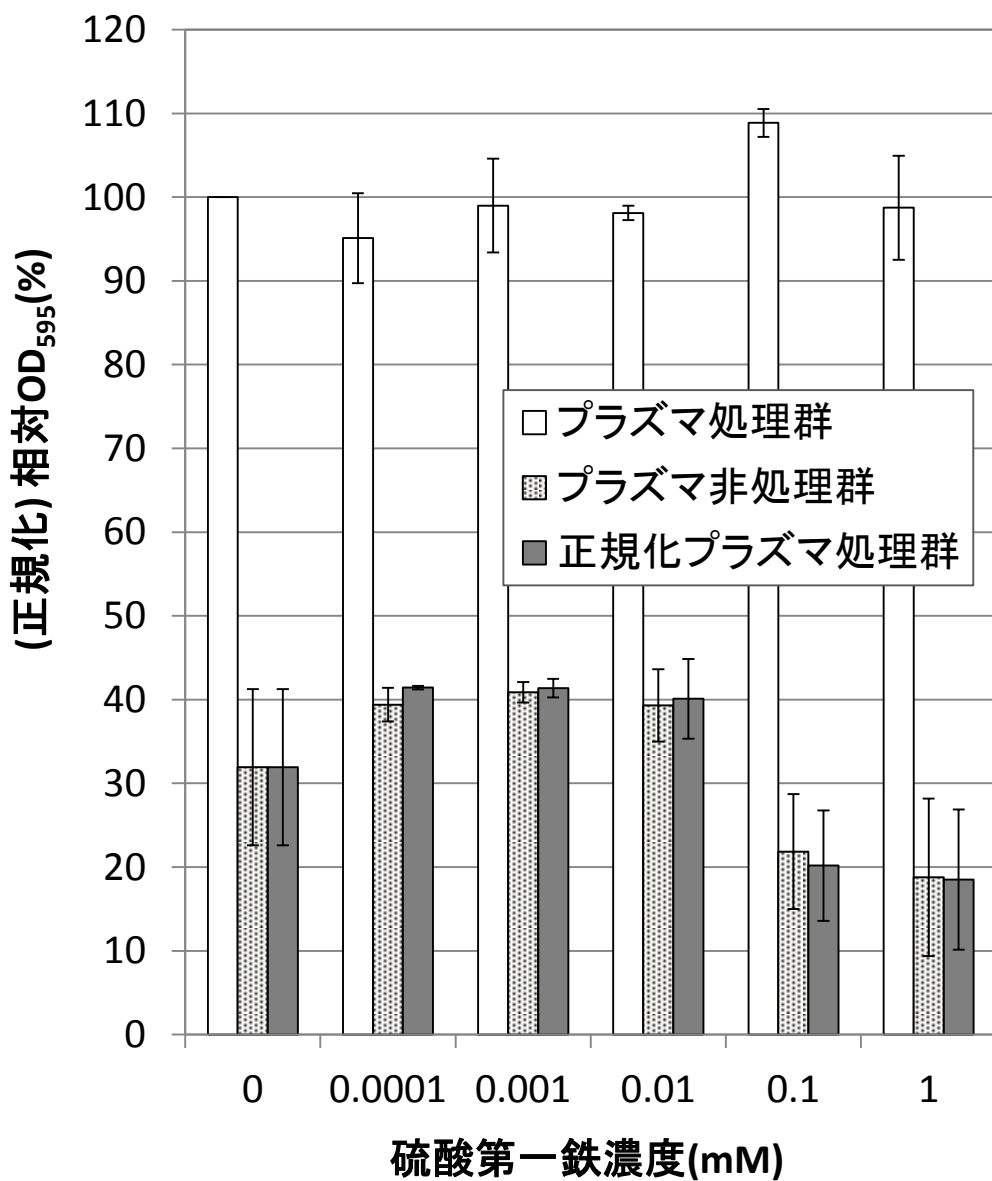


図 3-1 各濃度の硫酸第一鉄添加下における"プラズマ非処理群"および"プラズマ処理群"によるインジゴカルミン水溶液の OD₅₉₅ の変化

非処理群”の値で正規化した値のパーセント表示で、その硫酸第一鉄添加濃度における”プラズマ非処理群”からの変化を示す。2 回の実験の平均および母集団標準偏差を表示している。”0 mM 硫酸第一鉄添加・正規化プラズマ処理群”の正規化相対 OD₅₉₅ 値は 32%であったのに対し濃度”0.1 mM 硫酸第一鉄添加・正規化プラズマ処理群”、”1.0 mM 硫酸第一鉄ではそれぞれ 20%、19%に低下し、硫酸第一鉄添加による分解脱色が確認された。ただ、硫酸第一鉄添加濃度 0.01、0.001、0.0001 mM では”正規化プラズマ処理群”の値は 40、41、41%となり効果がむしろ抑制された。これらの傾向より、本実験条件においてインジゴカルミン分解脱色の硫酸第一鉄添加による促進は、添加濃度 0.01 mM 以上 0.1 mM 以下で出現および飽和したと考えられる。これより、十分な濃度の硫酸第一鉄はプラズマ処理による酸化効果を増幅することが示された。

3-3-2 フェントン反応活性を持たない二価金属との比較

結果を図 3-2 に示す。各大腸菌浮遊液における”プラズマ処理群”および”プラズマ非処理群”での生菌濃度を、”添加無し・プラズマ非処理群”における生菌濃度により正規化し、生存率としてパーセント表示している。”正規化プラズマ処理群”は、各大腸菌浮遊液の”プラズマ処理群”の値を”プラズマ非処理群”の値で正規化し、正規化生存率としてパーセント表示しており、その大腸菌浮遊液におけるプラズマ処理後の生存率を示す。”プラズマ処理群”

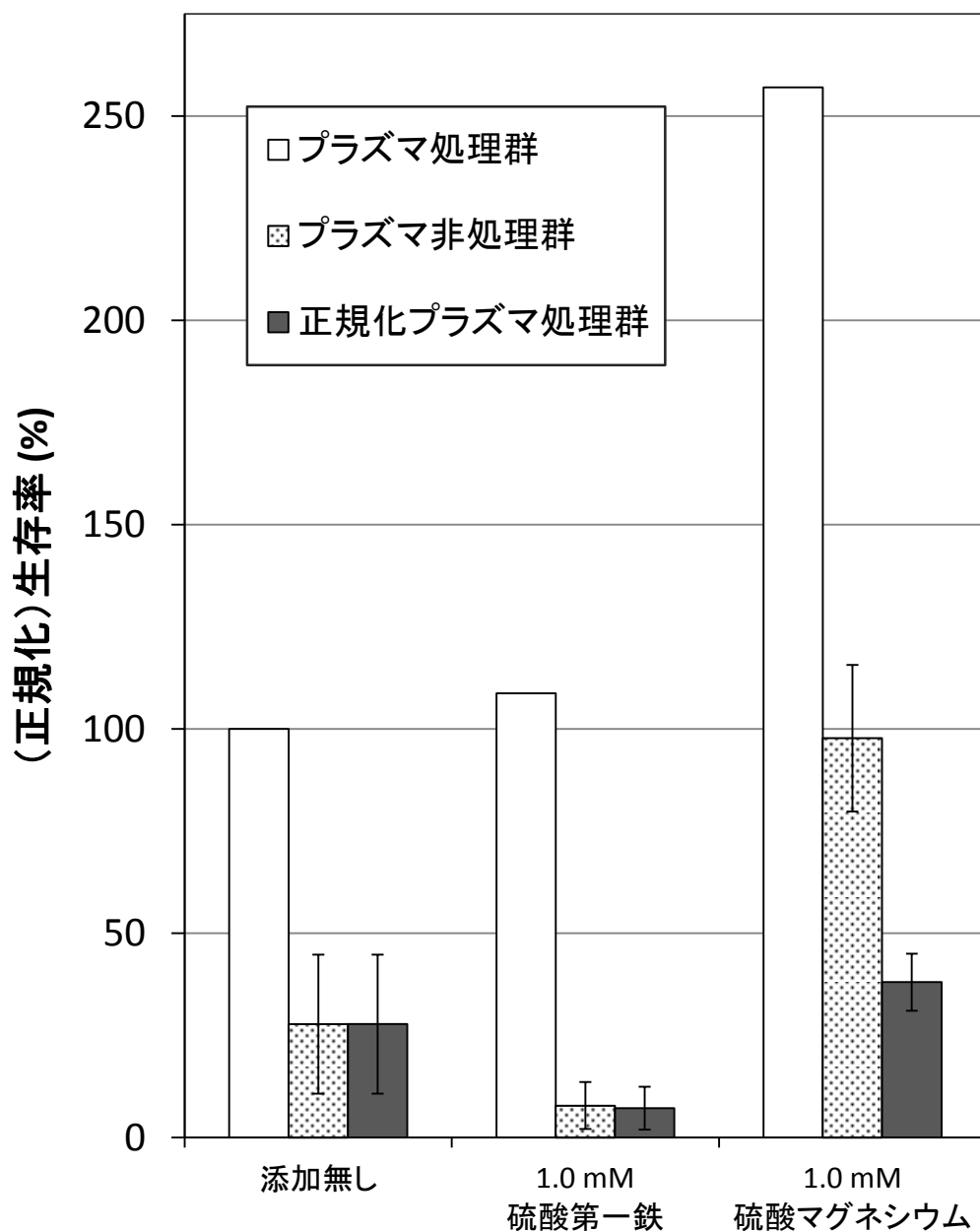


図 3-2 1.0 mM 硫酸第一鉄および硫酸マグネシウム添加による *E. coli* のプラズマ感受性への影響

および”正規化プラズマ処理群”については独立して行われた 2 回のプラズマ処理実験から得られた結果の平均および母集団標準偏差を示している。

”正規化プラズマ処理群”の値は“添加無し”、”1.0 mM 硫酸第一鉄”、および”1.0 mM 硫酸マグネシウム”においてそれぞれ 28%、7%、38%となった。”1.0 mM 硫酸第一鉄”で“添加無し”より生存率が低くなり、硫酸第一鉄添加による大腸菌のプラズマ感受性の増幅を確認することができた。また硫酸マグネシウムでは増幅は起こらなかったことから、この効果は鉄イオンに特有と考えられる。

3-3-3 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌のプラズマ感受性

結果を図 3-3 に示す。“プラズマ処理群”および“プラズマ非処理群”での生菌濃度は、“0 mM 硫酸第一鉄添加・プラズマ非処理群”での生菌濃度により正規化し、パーセント表示している。“正規化プラズマ処理群”は、“プラズマ処理群”を“プラズマ非処理群”の値で正規化した値のパーセント表示で、その硫酸第一鉄添加濃度における“プラズマ非処理群”からの変化を示す。3回の培養および処理結果の平均および母集団標準偏差を示す。

本実験では、大腸菌のプラズマ感受性は硫酸第一鉄濃度 0.001 mM において増幅が見られた。正規化生存率は、“0 mM 硫酸第一鉄添加・正規化プラズマ処理群”の 46%か

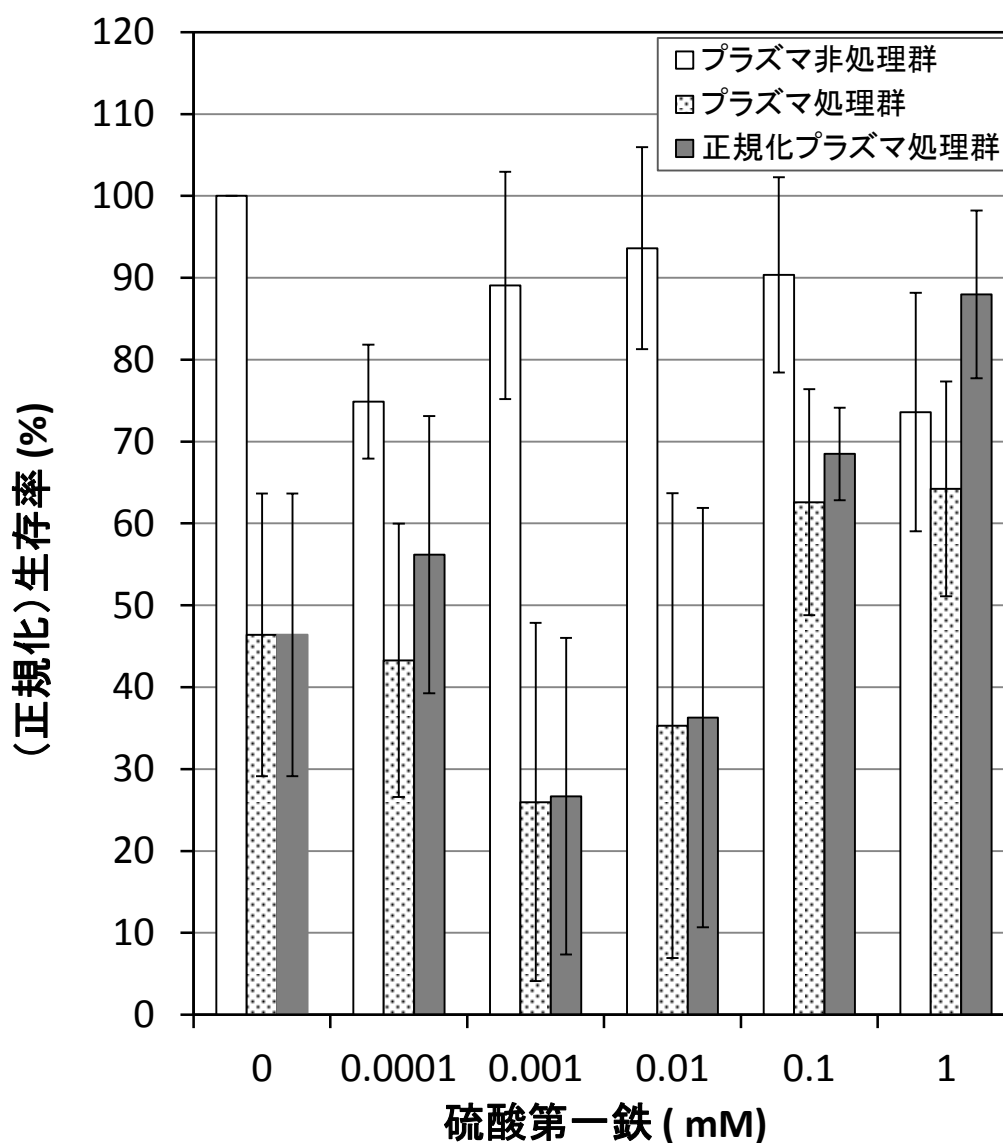


図 3-3 各濃度の硫酸第一鉄添加下での処理“プラズマ非処理群”および“プラズマ処理群”における大腸菌生存率

ら”0.001 mM 硫酸第一鉄添加・正規化プラズマ処理群”では 26%に低下した。前節の硫酸マグネシウム添加との比較では濃度硫酸第一鉄 1.0 mM により大腸菌のプラズマ感受性が増幅されたにも関わらず、本実験ではむしろ効果が抑制され”1.0 mM 硫酸第一鉄添加・正規化プラズマ処理群”では正規化生存率は 88%に増加した。

前節の実験では、プラズマ処理時大腸菌浮遊液 100 μ l をガラス板に滴下したのに対し、本実験では大腸菌浮遊液 400 μ l を 24 穴細胞培養プレートの円筒形のウェル（底面積 2.0 cm^2 、深さ 15 mm）に分注した。これによるプラズマ処理時における大腸菌浮遊液の比表面積、水面付近の外気混入量、印加電位等の変化が、同じ濃度の硫酸第一鉄の添加による影響を全く異なるものにしたと考えられる。プラズマ生成に直接関与しない、副次的と見なしていたパラメータが処理結果に大きな影響を及ぼす結果となった。大腸菌のプラズマ感受性を増大させる硫酸第一鉄添加濃度は、処理条件により著しく変化することが示唆された。

3-3-4 各硫酸第一鉄添加濃度下での大腸菌の過酸化水素感受性評価

プラズマ処理された PBS の過酸化水素濃度は<15 ppm となったため、終濃度 0.44 mM (15 ppm) の過酸化水素を添加した。結果を図 3-4 に示す。実験 3 回の平均値と標準偏

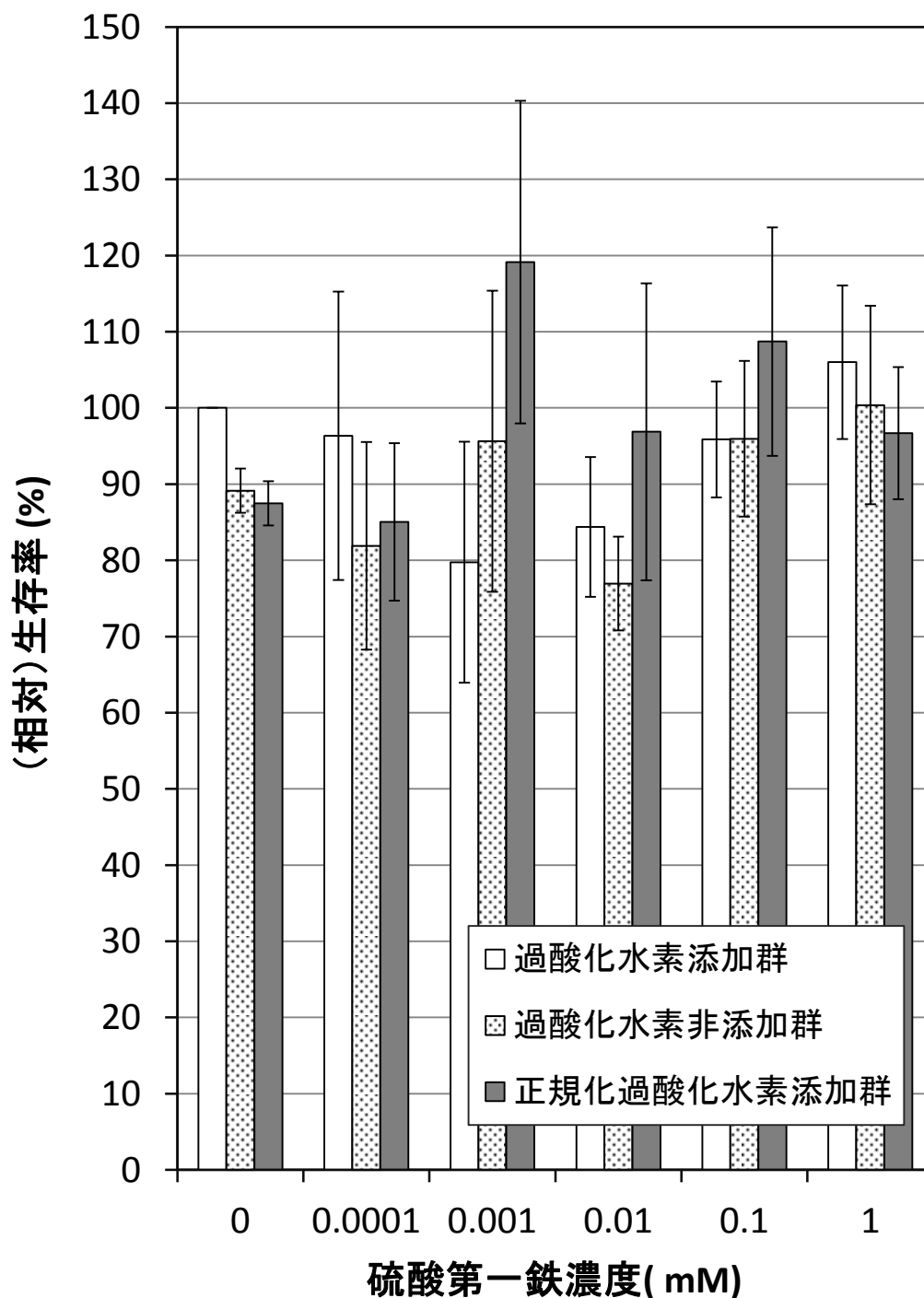


図 3-4 各濃度の硫酸第一鉄添加下における処理”過酸化水素添加群”および”過酸化水素非添加群”における大腸菌生存率

差を示している。”過酸化水素添加群”および”過酸化水素非添加群”は生菌濃度を、”0 mM 硫酸第一鉄添加・過酸化水素非添加群”の生菌濃度で正規化し、生存率としてパーセント表示している。”正規化過酸化水素添加群”は、各硫酸第一鉄濃度における”過酸化水素添加群”の値を”過酸化水素非添加群”の値で正規化し、正規化生存率としてパーセント表示している。

前節のプラズマ処理での傾向は再現されなかった。プラズマ処理では硫酸第一鉄濃度 0.001 mM で感受性の増大が生じたが、過酸化水素添加では若干ながら、逆に増殖が促された。低濃度の過酸化水素は細胞内シグナルとして働き、増殖を促進するという報告があり^[3-1]、これに類する作用がこの濃度の硫酸第一鉄により促進された可能性がある。前節で観察された硫酸第一鉄による大腸菌のプラズマ感受性の増大は、単純な過酸化水素のヒドロキシルラジカルへの変換による酸化力増大によるとは考えにくいということが示された。

3-3-5 PBS を液相とした場合のインジゴカルミン脱色効果

プラズマ処理の結果を図 3-5 に示す。各処理における相対 OD₅₉₅ の処理は 3-3-1 節と同等である。実験 2 回の平均値と標準偏差を示している。溶媒が蒸留水であった 3-3-1 節の実験では硫酸第一鉄濃度 0.1 mM および 1.0 mM にて分解脱色効果の増幅が見られたのに対し、溶媒が PBS に変更された本実験ではこの添加濃度における分解脱色効果の増幅は生じなかった。また、“0.001 mM 硫酸第一鉄添加・プラズマ非処理群”において分解効果が生じ、相対 OD₅₉₅ は 86% となった。

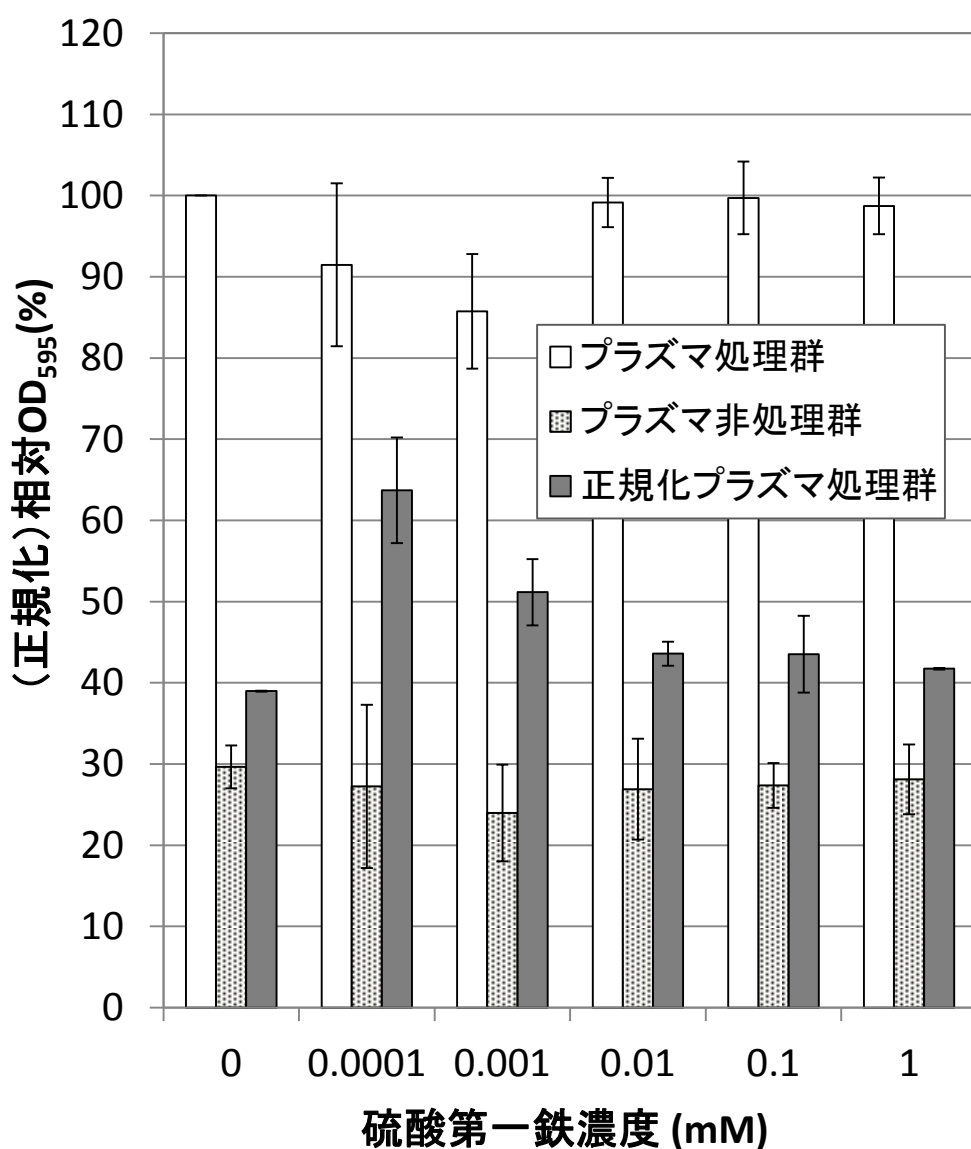


図 3-5 各濃度の硫酸第一鉄添加下における処理”プラズマ非処理群”および“プラズマ非処理群”によるインジゴカルミン PBS 溶液の OD₅₉₅ の変化

3-4 まとめ

フェントン反応誘起による細菌不活化（酸化分解）効果の増幅を目的として、反応場となる菌浮遊液の液相（及びインジゴカルミン溶媒）へ第一鉄イオン（硫酸第一鉄）を添加し、プラズマ処理による大腸菌不活化及びインジゴカルミン分解脱色実験を行った。結果、以下のような知見が得られた。

- PBS 内での大腸菌のプラズマ感受性に対する硫酸第一鉄添加による影響より、一定濃度の硫酸第一鉄によりプラズマ感受性の増幅が可能であることが示された。
- 増幅が生じる硫酸第一鉄濃度はプラズマ処理における液量及び容器形状により著しく変化した。処理によって生成された化学種の残留効率、蒸発に伴う濃縮、大腸菌浮遊液液面付近での外気混入量の減少、また印加電位の変化がこうした変化の要因と考えられる。今後更なる検討が必要である。
- インジゴカルミン分解効果が微弱な条件でも大腸菌不活化が生じ、大腸菌不活化には分解効果以外の要素も関与したことが示された。
- フェントン反応誘起の確認を目的として、プラズマ処理により PBS に生成され残留した濃度の過酸化水素を添加した場合（大腸菌の過酸化水素感受性）における硫酸第一鉄添加の影響を測定した。結果プラズマ処理と比較して効果が明らかに低下したことに加え、各濃度の硫酸第一鉄併用による効果への影響も再現されなかった。これよりプラズマ処理にて過酸化水素以外の化学種が主要な役割を果たしていることが確認された。
- 蒸留水が液相の際、硫酸第一鉄のみで強力な大腸菌不活化効果を示したが、この効果は PBS 内ではほぼ消失した。液相の蒸留水から PBS への変更も誘起される反応に大きな違いが生じさせたといえる。

参考文献

- [3-1] K. N. Schmidt, P. Amstad, P. Cerutti and P. A. Baeuerle, "The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B," *Chemistry & Biology*, vol. 2, no. 1, pp. 13-22, 1995.

第4章 被処理物に残留する細菌不活化効果

4-1 はじめに

プラズマ処理により、被処理物に残留する細菌不活化効果を評価した。プラズマ処理では多種多様な化学種が生成され、その一部は被処理物内部へ混入する。それらの内、安定で寿命の長いものはプラズマが消滅してからも残留する。水溶液系への処理における、窒素酸化物溶解による硝酸生成による pH 低下は広く知られており、細菌不活化効果にも影響を与えているとされる^[4-1]。他に、酸素と水からの過酸化水素生成も知られる。このようなプラズマ処理を停止後残存する化学種は意図しない作用に繋がる可能性があるため、安全性の観点から検討が必要と考えたがそうした報告は存在しなかったため、測定を試みた。またこのことに加え、プラズマ生成部と処理部が分離しているというプラズマジェットの特性（リモートプラズマ^[4-2]、また *indirect*^[4-3]などと名称される方式で、これが大気圧低温プラズマ源の中でもより侵襲性が低いという特徴につながっている）より、プラズマ生成と処理を時間的に分離した処理への着想を得た。

生体組織処理を想定し、水溶液系を被処理物とした場合について検討を行った。水溶液系として寒天培地、及び蒸留水を用いた実験を行った。予めプラズマ処理された LB 寒天培地、および蒸留水に大腸菌を接触させ、コロニー出現範囲および生菌濃度の変化等を測定した。

4-2 実験概要

4-2-1 寒天培地を被処理物とした実験

大腸菌をメンブレンフィルタ上に固定（1章 1-3-4）し、フィルタ置き換えによる植え替えにより、培地に残留した大腸菌不活化効果の観察等を行った。

4-2-1-1 寒天培地を被処理物とした残留効果の測定

大腸菌として、プラスミド pGLO 保有 DH5 α F^r株を用いた。本菌は pGLO によるアンピシリン耐性および L(+)アラビノース存在下での緑色蛍光タンパク質 (GFP) 生成能を有する。大腸菌は Lennox LB 培地（アンピシリンナトリウム 0.1 μ g/ml および L(+)アラビノース 5 mg/ml 添加）を用いて定常期まで培養後、フリーズストックとし、実験時に氷上で

解凍して用いた。大腸菌浮遊液をフィルターホルダー（ADVANTEC、KG-90）を用いて減圧濾過し、直径 90.0 mm、孔径 0.45 μm のセルロースアセテート製メンブレンフィルタ（ADVANTEC、C045A090C、以降フィルタ）上の直径 80 mm の円形の領域に固定した。（フィルタ上大腸菌）生菌数は、 3×10^4 CFU/sample とした。フィルタに固定した大腸菌を固形培地に張り付けることで直接塗布した場合と同様に培養可能である。固形培地として、直径 90 mm のペトリ皿に作成した Lennox LB 寒天培地（アンピシリンナトリウム 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および L(+)アラビノース 5 mg/ml 添加、以降寒天培地）を用いた。コンタミネーション防止および GFP 生成遺伝子発現のため、寒天培地には 0.1 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンナトリウムおよび 5 mg/ml の L(+)アラビノースを添加した。フィルタ上大腸菌を寒天培地に張り付けた状態で、cross-field 型プラズマジェット（2 章 2-3 節生成装置(b)、以降プラズマ）を中央へ照射（プラズマ処理）した。処理時間は、30 sec および 2 min とした。フィルタ上大腸菌の置き換えにより、下記 4 種類の処理を行った。処理名では大腸菌を *E*、寒天培地を *M* と略し、それぞれへのプラズマ処理の有無を+と-で示している。

E M+：寒天培地にフィルタに固定した大腸菌を張り付けてプラズマ処理し、そのまま培養した。大腸菌と寒天培地両方がプラズマ処理を受ける。

E M+：寒天培地にフィルタ上に固定した大腸菌を張り付けてプラズマ処理し、処理後直ちに大腸菌をフィルタごと未処理のものに交換し、培養した。大腸菌は直接プラズマ処理を受けず、寒天培地に残留した効果の影響のみを受ける。

E M-：寒天培地にフィルタ上に固定した大腸菌を張り付けてプラズマ処理し、処理後直ちに寒天培地を未処理のものに交換した。大腸菌は直接プラズマ処理を受け、寒天培地に残留した効果は除かれる。

E M+d：寒天培地にプラズマ処理し、処理後直ちにフィルタ上大腸菌を植菌した。”*E* M+”ではフィルタを介したプラズマ処理寒天培地プラズマ処理される。

各処理後、37°C のインキュベータにて 24 h 培養し、コロニー出現より大腸菌への影響範囲を観察した。培養結果の撮影には、波長 365 nm の紫外線照射下での GFP の蛍光を利用した。

4-2-1-2 寒天培地に残留した効果による細菌不活化の確認

空隙が出現した要因として大腸菌不活化のみではなく栄養分の破壊等による増殖阻害を

要因とするコロニー形成遅延が考えられるため、長期間の培養により判定を行った。前節と同様の条件にて寒天培地に 5 min のプラズマ処理を行い、フィルタ上大腸菌を植菌し (“*E*-M+d”)、37°C にて通常通りの 24 h 培養してコロニー出現を観察・撮影後、さらに 120 h、合計 144 h (6 日間) 培養し、コロニー出現範囲を比較した。効果が静菌的なものであれば、合計 144 h の培養では栄養分および生育阻害因子の拡散により 24 h の培養後に空隙だった部分にもコロニーが出現する。

4-2-1-3 寒天培地に残留した細菌不活化効果の安定性の評価

プラズマ処理停止からの時間経過に伴う、寒天培地への残留効果の変化を観察した。寒天培地に 5 min のプラズマ処理を行い、0、1、6、24 h 経過後にフィルタを植菌し (前節の “*E*-M+d”)、37°C にて 24 h 培養しコロニー出現範囲を比較した。

4-2-2 蒸留水を被処理物とした実験

大腸菌不活化効果の定量的な測定および要因の推定を目的とし、被処理物を蒸留水とする実験を行った。効果の要因の推定として、一般的にプラズマ処理によって被処理物に生成される化合物である、過酸化水素生成および硝酸との細菌不活化効果の比較を行った。また、プラズマ処理後 24 h 経過した場合の効果も評価した。

4-2-2-1 プラズマ処理された蒸留水の濃度別の細菌不活化効果の測定

検体として大腸菌 MV1184 株を用いた。本菌を LB 寒天培地にて定常期まで培養後、フリーズストックとしたものを氷上で解凍して使用した。

24 ウェル細胞培養プレート (BD Falcon™, Becton, Dickinson and Company; 35-3047) の深さ 15 mm、底面積 2.0 cm² のウェルに蒸留水 2.0 ml を分注し、水面中央へ装置(a)による cross-field 型プラズマジェット (2 章 2-3 節生成装置(a)、以降プラズマ) を 30 min 照射 (プラズマ処理) した。プラズマ生成装置下端と水面間の距離は 20 mm とした。以降、プラズマ処理された蒸留水をプラズマ処理水と呼ぶ。処理後ただちにプラズマ処理水を希釈し、大腸菌を添加した。希釈には未処理の蒸留水を用い体積濃度で 20、40、60、80% のプラズマ処理水を調製した。未処理の蒸留水と希釈無しのプラズマ処理水未処理の蒸留水と希釈無しのプラズマ処理水を 0% および 100% として加え、5 段階の濃度とした。

解凍後の大腸菌 (生菌濃度 10⁹ CFU/ml) の 1/9 体積をこれと混合し、生菌濃度 10⁸ CFU/ml、プラズマ処理水濃度 0、18、36、54、72、および 90% とした。25°C にて 1 h 保

管し反応させた後、塗沫平板培養法にて生菌濃度を測定した。各プラズマ処理水濃度で処理を行った後の生菌濃度をプラズマ処理水濃度 0%、すなわち未処理の蒸留水と反応させた場合の生菌濃度を基準にて正規化し、相対生菌濃度を算出した。

4-2-2-2 過酸化水素・硝酸水との細菌不活化効果の比較

水溶液系へのプラズマ処理で生成される代表的な化合物として過酸化水素および硝酸が挙げられる。プラズマ処理水の細菌不活化効果への両者の関与について評価を行った。プラズマ処理水の過酸化水素濃度は半定量試験紙（MACHERY-NAGEL、QUANTOFIX® Peroxide 1000）で測定した。硝酸は、pH を測定し、pH 降下がすべて硝酸により生じていると仮定しこれに合わせて添加した。プラズマ処理水の pH は pH メーター（BECKMAN 株式会社、本体: Φ360 pH/Temp/mV METER 電極: 511275-AB）により測定された。調製した過酸化水素・硝酸水を 100%のプラズマ処理水と同等に扱い、終濃度 0、18、36、54、72、90%にて大腸菌を曝露し、生菌濃度を測定した。生菌濃度は蒸留水（0%）の生菌濃度により正規化し、相対生菌濃度としプラズマ処理水と比較した。

4-2-2-3 プラズマ処理水の 24 h 経過後における大腸菌不活化効果の評価

プラズマ処理水の殺菌効果に、プラズマ処理停止からの経過時間に伴う大きな不安定性が見られたため、短寿命の不活化効果を除いた、安定性の高い長寿命の不活化効果の評価した。プラズマ処理停止から 24 h 経過したプラズマ処理水に大腸菌を添加し、プラズマ処理後ただちに添加を行った場合（4-2-2-1 節）と同様に相対生菌濃度を算出した。

4-3 実験結果および考察

4-3-1 寒天培地を被処理物とした実験

4-3-1-1 寒天培地を被処理物とした残留効果の測定

図 4-1 に結果を示す。出現コロニーは GFP を含有するため、紫外線照射により緑色に蛍光する。”*E+* *M+*”は、通常のプロズマ処理での大腸菌不活化効果を示している。フィルタ中央に細菌不活化によりコロニーの見られない領域が出現し、処理時間に伴い同心円状に拡大している。

空白は大腸菌が直接曝露されない検体”*E-* *M+*”および”*E-* *M+d*”にも出現し、寒天培地への効果の残留が観察された。”*E-* *M+d*”での細菌不活化効果は”*E-* *M+*”を若干上回り、フィルタによる遮断が除かれたことによる影響が確認された。”*E-* *M-*”の効果は”*E+* *M+*”と同等で、寒天培地への残留効果を除いても細菌不活化効果に違いは生じなかった。

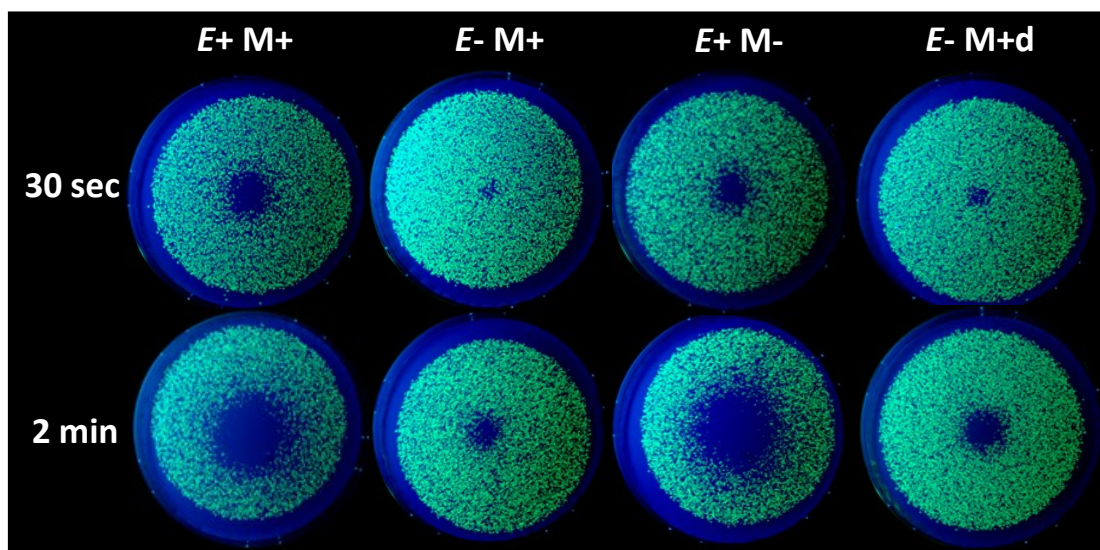


図 4-1 プラズマ処理時間 30 sec、2 min における寒天培地への残留効果

4-3-1-2 寒天培地に残留した効果による細菌不活化の確認

結果を図 4-2 に示す。コロニーの出現範囲に変化は見られず、プラズマ処理された寒天培地には細菌不活化効果が生じていることが確認された。

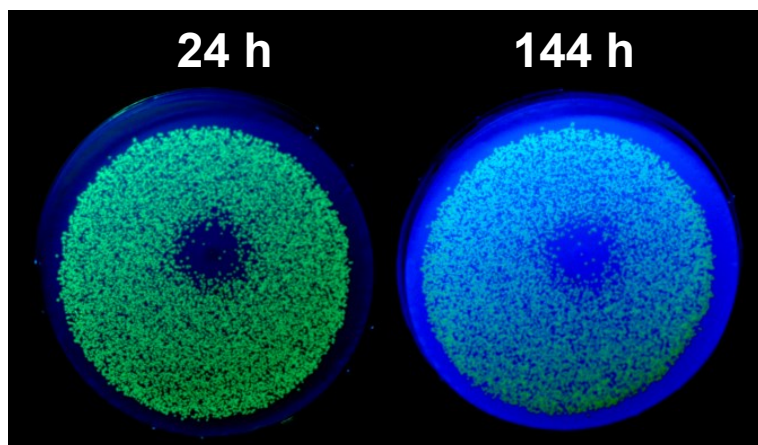


図 4-2 "E- M+d" (照射時間 5 min) で処理された検体の長期培養結果 (左 : 24 h、右 : 144 h)

4-3-1-3 寒天培地に残留した細菌不活化効果の安定性の評価

結果を図 4-3 に示す。プラズマ処理 1 h では、細菌不活化される領域に変化は見られなかった。6 h では、不活化効果の範囲が拡大した。これは寒天培地内で不活化効果を持つ成分が拡散したためと考えられる。経過時間が 24 h になると、細菌不活化効果は消失した。本結果は再現性があり、寒天培地表面に残留した細菌不活化効果は数時間にわたり安定であることが確認された。紫外線や電磁界等はプラズマ生成停止と共に消失するため、残留効果の要因は化合物を含む安定性の高い化学種と考えられる。プラズマ処理による細菌不活化では、ヒドロキシルラジカルを初めとする特に反応性の高い化学種が重要と考えられている。しかし、そのような化学種は極めて短寿命であり、電磁照射（紫外線）及び電磁界と同様プラズマ生成停止共に消失すると考えられる。

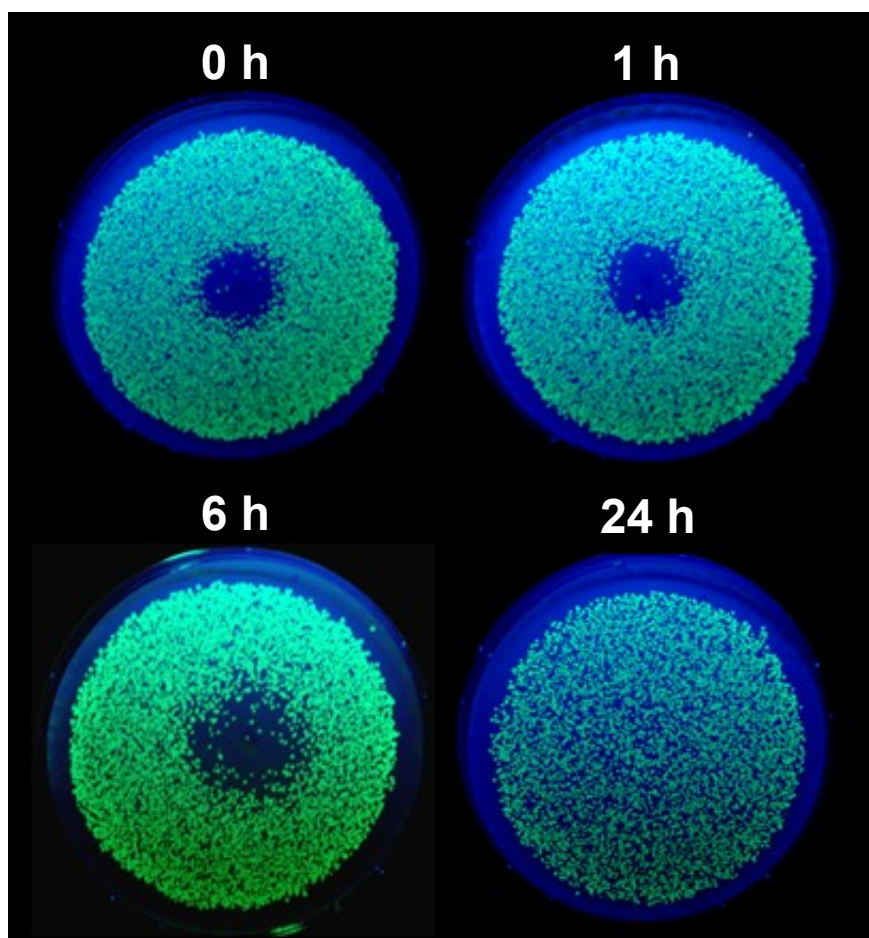


図 4-3 プラズマ処理停止から大腸菌添加までの経過時間に伴う細菌不活化効果が生じる領域の変化

窒素、酸素、水より生成される長寿命な化学種としては、硝酸、過酸化水素、亜硝酸、オゾン、スーパーオキシドアニオンラジカル等が挙げられる。これらのうち、スーパーオキシドアニオンはラジカルとしては長寿命とされるが水溶液中での寿命は 10^{-8} sec 程度であり^[4-5]、残留効果の要因と考えるには短寿命である。短寿命な化合物としては亜硝酸およびオゾンが挙げられる。亜硝酸は毒性のある化合物として知られるが大腸菌不活化効果は今回生成されうる濃度より高濃度でも生じないため、これも主要因になりえない^[4-6]。オゾンは水溶液中極めて強力な殺菌効果をもつが、pH 7.6 の水中で半減期 40 min^[4-7]というプラズマ処理水の短寿命の効果に近い寿命をもち、また極めて強力な細菌不活化効果を示す。また硝酸については pH 低下による他の化学種との相乗効果が知られている^[4-1]。のよる他の化学種への影響による作用も知られる。また、本実験で用いた寒天培地 (Lennox LB 培地) は 5% の塩化ナトリウムを含有するため、塩素及び次亜塩素酸も生成された可能性がある。極めて強力な細菌強酸性水による殺菌において重要な化合物である。強酸性水は食塩水の電気分解により生成され、極めて強力な殺菌効果を持つ^[4-4]。他の寒天培地の質はアガロース、ペプチド、アミノ酸、ビタミン類、無機イオンに大別できるが、これらは先に挙げた化学種と競合的に反応するためプラズマ処理による細菌不活化には抑制的に働くと考えられる。

4-3-2 蒸留水を被処理物とした実験

図 4-4 に各終濃度のプラズマ処理水、硝酸・過酸化水素水および 24 h 経過プラズマ処理水への曝露後の大腸菌の相対生菌濃度を示す。蒸留水へのプラズマ処理では、プラズマ処理後、蒸発により水量は 1.5 ml に減少し、これに伴い水面は 5 mm 低下したが再調整は行わなかった。プラズマ処理水の過酸化水素濃度は半定量試験紙による測定の結果 50-150 ppm、pH は 3.2 であったため、これに従い過酸化水素・硝酸水の過酸化水素濃度は 4.4 mM (150 ppm)、硝酸濃度は 0.7 mM (pH 3.2) とした。実験は 3 回行い、平均および母集団標準偏差を算出した。

プラズマ処理水への曝露では相対生菌濃度は著しく減少し、プラズマ処理水終濃度 72% で相対生菌濃度は検出限界の 10^{-6} を下回った。しかし、この強力な不活化効果は不安定で、数分から数十分程度で不活化効果は大幅に下落した。

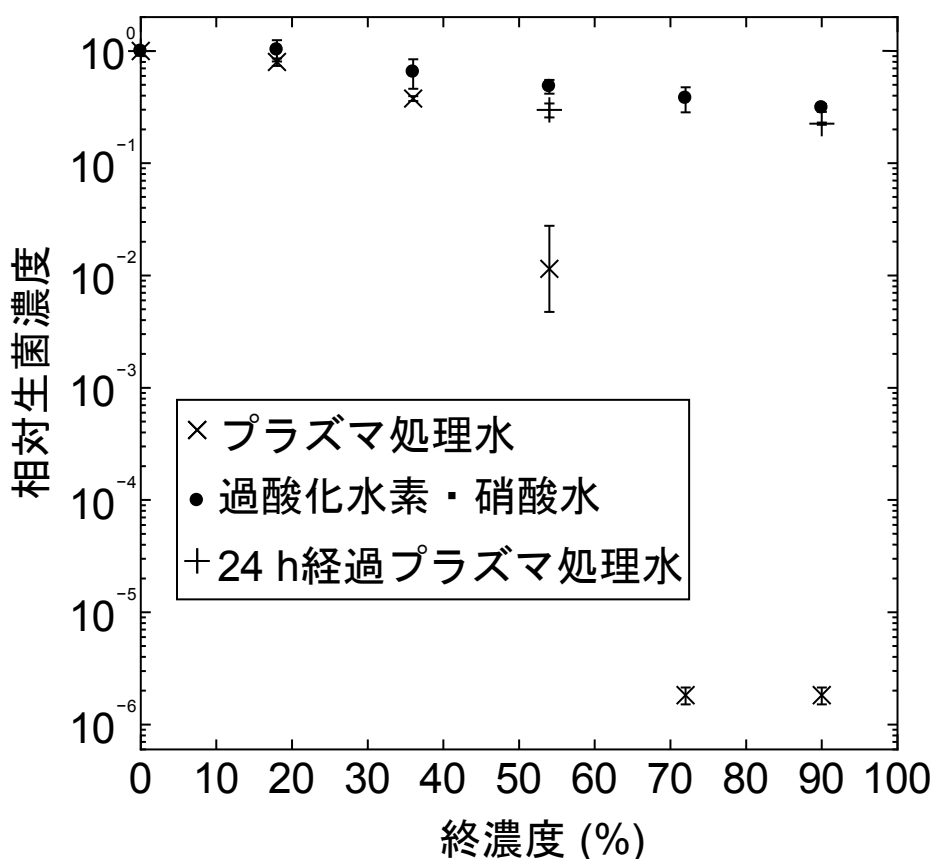


図 4-4 プラズマ処理水、過酸化水素・硝酸水 (100%にて過酸化水素 4.4 mM、硝酸 0.7 mM、pH3.2)、および 24 h 経過後プラズマ処理水の大腸菌不活化効果

過酸化水素・硝酸水では終濃度 90%においても生菌濃度の1桁をこえる下落には至らなかった。過酸化水素、硝酸両者の単独の不活化効果も測定したが、いずれも過酸化水素・硝酸水溶液の不活化効果を下回った（data not shown）。24 h 経過後のプラズマ処理水では、終濃度 90%においても生菌濃度の桁数の減少は生じず、過酸化水素・硝酸水と同程度となった。24 h 経過後のプラズマ処理水の殺菌効果は、概ねこれらの化合物によると考えられる。プラズマ処理水の生成についても不安定性がみられ、プラズマ処理停止直後に大腸菌を植菌したにも関わらず強力な不活化効果が生成されず、24 h 経過後と同様の特性となる場合があった。このような結果は図 4-4 に示す結果からは除外している。蒸留水の調製直後にはこの現象は発生しなかったことから、プラズマ処理水の生成効率に著しい影響を与える未定義の条件が蒸留水に存在すると考えられる。

過酸化水素および硝酸、また被処理物が蒸留水であったことより塩素・過塩素酸も候補から除外されるため、オゾンがプラズマ処理水の強力な細菌不活化効果の主要因と考えることができる。オゾンは気層中で生成された後蒸留水へ溶解すると考えられるため、プラズマ処理水生成における不安定性の要因として、気相でのオゾンのへの生成効率、生成されたオゾンの蒸留水への溶解効率の両面が考えられる。

4-4 まとめ

プラズマ処理で被処理物に生成され、処理後残留する大腸菌不活化効果を評価した。被処理物として寒天培地および蒸留水を用いた実験を行い、以下の知見を得た。

- プラズマ処理により被処理物（寒天培地、蒸留水）に大腸菌不活化効果が生成された。
- 蒸留水を用いた実験で、終濃度 72%で大腸菌が滅菌（相対生菌濃度が 10^{-6} 以下に減少）される強力な細菌不活化効果が観察された。
- 過酸化水素および硝酸水溶液はこの強力な不活化効果を再現しなかった。
- 強力な不活化効果は数十分程度で消失し、消失後の効果は過酸化水素・硝酸水溶液で再現される程度であった。
- 強力な不活化効果の主要因はその消失に要する時間よりオゾンであった可能性が高い。

今後の展望として、残留する効果を利用する間接的なプラズマ処理や、プラズマ処理の効果を化合物添加により再現可能なものとそれ以外とに分離することによるプラズマ処理の特異性や優位性の検討に繋がると考えている。

参考文献

- [4-1] S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi, "Effects of pH on bacterial Inactivation in aqueous solutions due to Low-Temperature atmospheric pressure plasma application," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 1, pp. 33–42, 2010.
- [4-2] 北野勝久、谷口和成、酒井道、高木浩一、浪平隆男、服部邦彦、「大気圧プラズマを点けてみよう」、『プラズマ・核融合学会誌』、第 84 巻 1 号、19–28 頁、2008 年。
- [4-3] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman, "Applied plasma medicine," *Plasma Process and Polymers*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, 2008.
- [4-4] 松尾晶樹、「電解水の基礎と利用技術」、技報堂出版、2000 年。
- [4-5] 菅野龍也、櫻木宏親、吉田政幸、「スーパーオキシドの化学」、『有機合成化学』、第 37 巻 4 号、335–345 頁、1979 年。
- [4-6] K. A. Schouten, B. Weiss, "Endonuclease V protects *Escherichia coli* against specific mutations caused by nitrous acid," *Mutation Research/DNA Repair*, vol. 435, no. 3, pp. 245–254, 1999.
- [4-7] 増田閃一、「新しいオゾン技術とバイオテクノロジー」、『電気学会誌』、第 108 巻 12 号、1173–1176 頁、1988 年。

第5章 細菌の生育条件によるプラズマ感受性への影響評価

5-1 はじめに

大腸菌の生育条件による低温プラズマジェット照射（プラズマ処理）への感受性（プラズマ感受性）への影響を測定した。微生物のプラズマ感受性に関する報告は数多いが、それらのほとんどはプラズマ生成およびプラズマ処理における条件とプラズマ感受性との関係を対象としており、生物的条件とプラズマ感受性の関連については、異なる種の微生物に対する効果の比較にほぼ限られている。実用においては様々な状態の微生物の不活化が求められるため、微生物の生理的条件によるプラズマ感受性への影響に関する知見は有用と考えられる。また、生理的条件の変化に伴う菌の性状変化とプラズマ感受性との関係は、大気圧低温プラズマ殺菌の機構への洞察における手がかりともなることも期待できる。

生育条件として、増殖経過の推移（1章 1-3-2節）および、生育温度を評価した。殺菌技術の評価を含む研究においては、増殖経過の推移の特定の時期に回収された微生物が用いられる。増殖経過の推移は、原理的には自身の増殖で引き起こされた環境変化によるストレスへの応答・適応である。細胞がストレスにさらされると、代謝バランスが崩れ修復および適応が必要な状態になり、甚だしい場合には細胞死が引き起こされる。そのため、多種多様な制御因子と遺伝子群によりストレスからの防御、生じた障害からの回復、および適応を行う。すなわちストレスに曝露され生存した細胞は、ストレス感受性を含む性質が変化する。細胞性状、薬剤等へのストレス感受性の増殖経過の推移に伴う変化が報告されている^[5-1-5-3]。本研究では、プラズマ感受性に対する増殖経過の推移による影響を評価した。

生育温度についての評価では、19、28、37、40、および 43°C で培養した大腸菌にプラズマ処理を行い、感受性を比較した。高温もしくは低温での生育も微生物にとってはストレスであり、その性質に影響を与える。大腸菌の至適生育温度は 37°C である。また菌株などにより差異があるがおおむね 10°C 以下あるいは 40°C 以上で増殖を停止し、50°C を上回ると死に始めるとされる。大腸菌を用いた他のストレス感受性に関する研究より、至適生育温度の 37°C より高温もしくは低温での生育により過酸化水素やパルス電界などへのストレス感受性、また酵素活性や細胞膜組成等の性状、および発現遺伝子の

変化が報告されている^[5-4, 5-5]。また、大腸菌生育可能域程度の範囲における加熱及び冷却は、生体組織処理との併用が可能であると考えられる。また、プラズマ処理と異なる種類のストレスとして熱処理を用いた同等の不活化実験を行い、生育温度と感受性の関連における傾向をプラズマ処理のそれと比較した。

5-2 実験概要

5-2-1 増殖経過の時期による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価

大腸菌 ATCC13706 株（大腸菌）を用いた。本株を LB 寒天培地にて画線培養し単離コロニーを得た。コロニー1 個を釣菌し、Lennox LB 培地（LB 培地）20 ml に植菌して 37°C で一晩振とう培養し定常期とし、これを前培養液として用いた。LB 培地 100 ml を 1L フラスコに分注して 37°C に予熱し、これに前培養液 0.5 ml を植菌（生菌濃度 10⁷ CFU/ml）植菌し 37°C、120 rpm の振とう下にて培養した。以降、植菌時刻を基準として 1 h ごとに培養液の一部を採取し、生菌濃度およびプラズマ感受性を測定した。10 h の培養により、10 時点での測定を行った。採取した培養液は増殖を停止させるため氷上で 5 min 冷却した後、生菌濃度推定のため OD₅₉₅ を測定した。次に冷却遠心（2600×g, 4°C, 10 min）により大腸菌を沈殿とし、上澄を廃棄してリン酸緩衝生理食塩水（PBS）へ再懸濁した。再懸濁後の生菌濃度は OD₅₉₅ 値および事前の生菌濃度測定結果からの推定により、全ての培養時間にて約 5 × 10⁶ CFU/ml に調整された。この大腸菌浮遊液 100 μl を 24 × 60 × 0.15 mm のガラス板（松浪ガラス工業株式会社、NEO micro cover glass No. 1）上に滴下し、液滴中央に linear-field 型低温プラズマジェット（2 章 2-4-1 節）を照射した。大腸菌浮遊液およびガラス板はグラウンドに接続されたアルミニウムプレート上に設置した、プラズマジェット生成装置先端とアルミニウム板表面の距離を 40 mm に調整した。蒸発による濃縮を補正するため、処理前後にガラス板および大腸菌浮遊液重量を測定し、減少分を水分蒸発量とみなして等量の蒸留水を添加した。プラズマ処理前後に塗沫平板培養法を用いて生菌濃度を測定し、これによりプラズマ感受性を測定した。また、PBS への再懸濁時の希釈率および処理前の生菌濃度より各培養時間における培養液の生菌濃度を測定した。これより増殖経過の時期を推定し、プラズマ感受性との関連を検討した。

5-2-2 生育温度の変更による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価

大腸菌を至適生育温度の 37°C および、より低温の 19°C、28°C、高温の 40°C、43°C で培養し、プラズマ感受性の変化を評価した。また、プラズマ処理の代わりに熱処理 (55°C) を用いて同様の実験を行い傾向を比較した。

大腸菌前培養液は前節と同様に調製した。LB 培地 100 ml を 1L フラスコに分注し、19°C、28°C、37°C、40°C および 43°C のいずれかに予熱後、前培養液 0.5 ml を植菌し、約 120 rpm にて振とう培養した。培養液の一部を採取し、氷上で 5 min 冷却して増殖を停止させた後冷却遠心 (2600×g, 4°C, 5 min) により菌を沈殿させ等量の PBS に再懸濁した。再度冷却遠心 (2600×g, 4°C, 5 min) と PBS への懸濁を行い、生菌濃度 10^6 CFU/ml にて PBS に懸濁しこれを検体とした。熱処理用には生菌濃度が 2×10^7 CFU/ml の浮遊液を調製した。

プラズマ処理には linear-field 型低温プラズマジェット (2 章 2-4-1 節) を用いた。大腸菌浮遊液 400 μ l を細胞培養用 24 ウェルプレートのウェルに分注してグラウンドに接続されたアルミニウム板上に設置し、プラズマ生成装置先端と大腸菌浮遊液水面の距離を 33.0 mm に調整して水面中央へ 5 min 照射した。また、対照としてプラズマ生成装置からのヘリウムガス流 (2.0 l/min) へ曝露する処理も行い、生存率算出にはこれを基準とした。さらにプラズマ処理、ヘリウムガス流曝露の両処理における水分蒸発量より、これによる濃縮を考慮し実験結果を補正した。水分蒸発量は、処理後の重量減少より測定した。熱処理では、PBS 380 μ l を 1.6 ml マイクロチューブに分注しアルミニウム製ヒートブロックにて 55°C に加熱し、生菌濃度 2×10^7 CFU/ml の大腸菌浮遊液 20 μ l を添加して生菌濃度 10^6 CFU/ml とし、5 min この温度に曝露した。生存率は、氷上 (4°C) で保管した大腸菌浮遊液の生菌濃度を 100% として算出した。生菌濃度の測定には塗抹平板培養法を用いた。

5-3 実験結果および考察

5-3-1 増殖経過の時期による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価

結果を図 5-1 に示す。3 回の培養および処理を行いそれらの平均と母集団標準偏差を示している。生菌濃度は培養開始後 5 時間目まで指数的に増大した。これより本実験により観察された増殖経過の時期には増殖準備期から対数増殖期、定常期初期が含まれるといえる。ただ増殖準備期を示す推移は観察されなかった。本実験条件では、増殖準備期は 1 時間未満であったと考えられる。

生存率は、対数増殖期初期に相当する培養時間 1 時間目に 100% と最大値を示した。その後培養時間に伴い急速に下落し、対数増殖期中期に相当する 4 時間目で最低の 5% とな

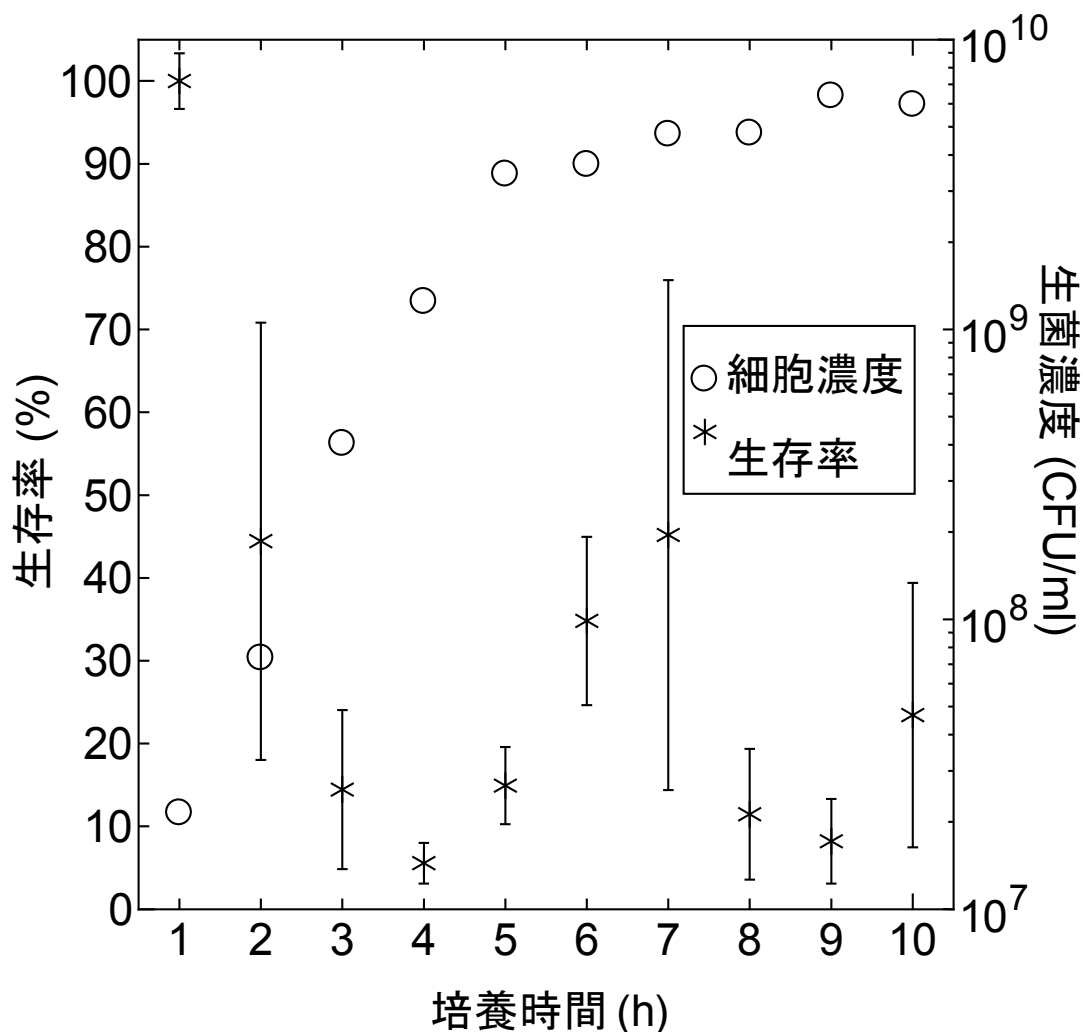


図 5-1 培養時間に伴うプラズマ処理後生存率および生菌濃度

った後再度上昇し、定常期極初期である 6、7 時間目にそれぞれ 35%および 45%となり、9、8 時間目では 11%および 8%に低下し 10 h で 23%に増大した。培養 6、7 時間目における感受性低下は、細胞膜におけるシクロプロパン脂肪酸 (CFA) 含有率の増大が要因である可能性が高い。CFA は炭素鎖内に炭素原子三個から成る環状構造 (シクロプロパン構造) を持つ脂肪酸で、大腸菌の細胞膜脂肪酸鎖にも含有される。CFA は、*cfa* 遺伝子の発現により細胞膜内の不飽和脂肪酸鎖の二重結合部分にアルキル基が付加され生成される。不飽和脂肪酸鎖の CFA への変換は脂質二重層膜の二次元的な流動性を低下させ、細胞膜の外部分子からの防御能を増大させる^[5-6, 5-7]。これにより低 pH や凍結融解、薬剤等への感受性が低下する。大腸菌の *cfa* 欠損株におけるストレス感受性増大が報告されている。^[5-3, 5-8]*cfa* 遺伝子は、定常期への移行を担う遺伝子発現制御因子 σ^{38} (1 章 1-3-2 節) の制御下にあり、対数増殖期末期から定常期初期において細胞膜の CFA 含有率はピークを示す。これによる、対数増殖期末期から定常期極初期における大腸菌のストレス感受性低下が報告されている。

10 時間目での感受性低下の要因は、定常期中期への移行開始と考えられる。定常期中期では、大腸菌は細胞壁の肥大、細胞質の縮小等などにより異常環境への耐性を高めている^[5-9]。本実験条件では、10 時間目で定常期初期から定常期中期への移行が始まったと考えられる。

5-3-2 生育温度の変更による大腸菌のプラズマ感受性への影響評価

各生育温度における、プラズマおよび熱処理後の大腸菌生存率を図 5-2 に示す。3 回の培養とプラズマおよび熱処理を行い、結果の平均および母集団標準偏差を示している。

至適生育温度から外れた生育温度は、低温、高温のいずれも大腸菌のプラズマ感受性を増大させた。プラズマ処理後の生存率は、培養温度が至適生育温度の 37°C であった場合における 89%に対し、より低温の 19、28°C にて 57、76%、高温の 40、43°C において 50、37%と、至適する生育温度からの推移に伴い低下した。他方熱処理では 19、28、37、40、および 43°C での生存率はそれぞれ 30、19、2、13、および 18%と、プラズマ処理と逆に至適生育温度から外れた生育温度により感受性が減少するという結果となった。高温条件

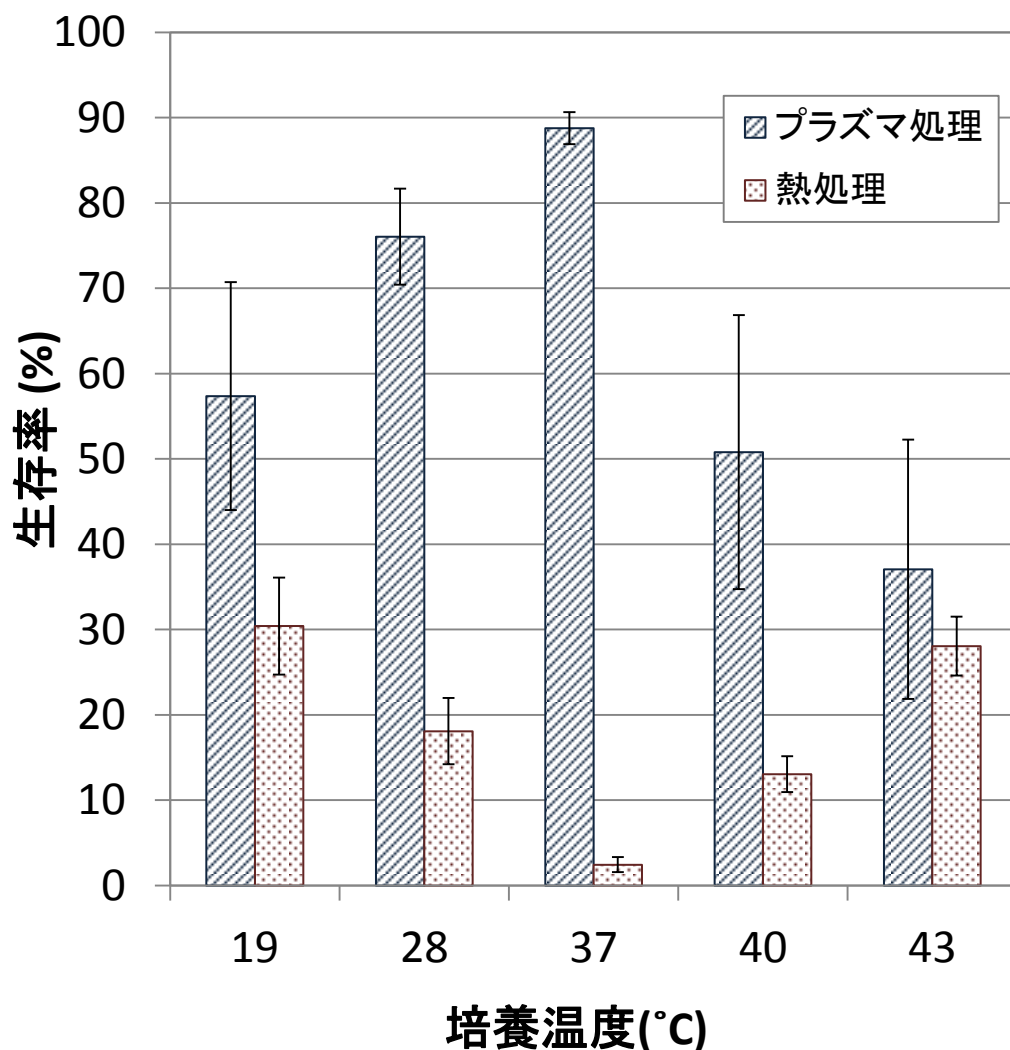


図 5-2 生育温度別のプラズマ処理および熱処理後の生存率

では至適生育温度との温度差が 3°C および 6°C と、-9°C および-18°C の低温条件より小さかったが、プラズマ処理および熱処理の感受性への影響では両条件で同程度となり、高温での生育の影響は特に大きいことが示された。本結果より、プラズマ感受性評価に至適生育温度を用いて培養された細菌を用いることは妥当であることが示された。また、細菌の倍化時間以上の保温もしくは保冷後のプラズマ処理により、プラズマ処理による細菌不活化効果を増幅可能と考えられる。

ただ、このような傾向の具体的な要因を挙げることは困難である。環境温度が至適生育温度を外れると代謝バランスが崩れ、回復および適応のための細胞応答が起こり、これにより細胞の性質は変化するが、このような細胞応答自体も完全に解明されていない。以下、大腸菌について報告のある生育温度による細胞性状変化と、それと今回得られたプラズマ感受性の変化の関連についての考察を述べる。まず、細胞一般の温度変化への応答としては、各種熱ショック、および低温ショックタンパク質生成が広く知られており、大腸菌も例外ではない。ただ、それらのほとんどは温度ショックから数十分から数時間後に最大となり、その後は減少する。本実験では各温度下で数時間の培養が行われているため、これらの温度ショックタンパク質が観察された感受性変化の重要な要因とは考えにくい。高温もしくは低温条件での数時間から数十時間の生育によりもたらされる大腸菌性状の変化としては細胞膜脂肪酸鎖の飽和度、抗酸化酵素の活性、細胞内グルタチオン量とその酸化度が報告されている。

前節で細胞膜内脂肪酸鎖と細胞膜透過性の関連について記述したが、生育温度もまた細胞膜の脂肪酸鎖の組成を変化させる。大腸菌を含む細胞が低温で生育すると、細胞膜脂肪酸鎖における不飽和脂肪酸鎖の含有率が增大する。逆に、高温での培養では飽和脂肪酸鎖の含有率が増加する^[5-1-5-2]。不飽和脂肪酸鎖含有率の増大は脂質二重層膜の流動性、すなわち透過性を増大させ、飽和脂肪酸鎖含有率はその逆に作用する。外部の有害分子からの防御という点では不飽和脂肪酸鎖の含有率を低下により細胞膜の透過性を低下させることが有利だが、細胞膜の働き全体を包括すると適切な流動性のある状態が生存に最も有利である。この生育温度による細胞膜脂肪酸鎖組成の変化は、細胞膜の流動性を最適に保つための細胞応答とされている。ただ、今回の結果における生存率の傾向至適生育温度に対し対称となったため、本現象単独では要因になりえない。本現象は、生育温度の低温域への

推移におけるプラズマ感受性増大の要因の一つとは考えられるが、高温での生育での傾向とは相反する。高温で生育した大腸菌においては、細胞膜の防御能がおそらく増大したにも関わらずそれを打消しプラズマ感受性を増大させた要因が存在したこととなる。

細胞内グルタチオン量およびその酸化率も、大腸菌の低温および高温下での生育による変化が報告されている^[5-10, 5-11]。グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、真核、原核両細胞における最も重要な細胞内チオールである。還元型グルタチオンもしくは酸化型グルタチオンとして存在する。酸化還元系の一つとして、活性酸素種からの防御を含む様々な生理活性を有し細胞の酸化還元状態を決定する主要な因子の一つである。活性酸素種からの防御においては還元型グルタチオンが酸化型グルタチオンに酸化されることで除去剤として働く。多くの細胞において、特にストレスを負荷していない場合にはグルタチオン（還元型グルタチオン+酸化型グルタチオン）のうち酸化型グルタチオンは数%以下で、至適する温度付近で培養された対数増殖期の大腸菌においては、還元型グルタチオン/酸化型グルタチオンの値は 500 程度と報告されている^[5-10, 5-11]。また好気培養された大腸菌におけるグルタチオン総量は 30 $\mu\text{g/ml}$ と報告されており、^[5-12]これは細胞内チオール類としては高濃度である。細胞にストレスが負荷されると、グルタチオンは酸化され還元型グルタチオン/酸化型グルタチオンの値は増大する。大腸菌細胞内グルタチオン量は、低温での培養で減少し高温での培養で増大すると報告されており、これはグルタチオン系による酸化ストレスからの防御機構が低温で不活発に、高温で活発となっていることを示している。このため、前述の細胞膜の変化と同様、高温での感受性増大と矛盾し単独で本実験で観察された傾向の要因とはなりえない。ただ、酸化型グルタチオン量については、至適生育温度付近で最少になり、生育温度が低温、高温の両方へ推移するに従い増大すると報告されている。低温での生育ではグルタチオン量が減少するが、還元型グルタチオン/酸化型グルタチオンの値は著しく減少し、高温での生育ではグルタチオン量が増大するが還元型グルタチオン/酸化型グルタチオンの値の増大は僅かであるため、酸化型グルタチオンについてこの傾向が成立する^[5-10, 5-11]。仮に、酸化型グルタチオンがプラズマとの相乗作用により生存に悪影響を与えるとすれば、今回の生育温度によるプラズマ感受性への影響の主要因となりうる。しかし、存在量が数～数十 $\mu\text{g/ml}$ 程度かつ毒性等は知られていない成分によるそのような作用があるとは考えにくい。

以上より、報告されている生育温度による大腸菌性状の変化の多くは、低温培養での感受性増大の要因とは考えられるが高温での生育による感受性増大を説明することはできない。これより、高温で生育した大腸菌のプラズマ感受性を大幅に増大させるなんらかの未知の要因が存在することが示唆されたといえる。

パルス電界殺菌に関する研究より、低温での生育も高温での生育も大腸菌の感受性を増大させるという、今回のプラズマ処理と同様の傾向が報告されている^[5-13]。パルス電界殺菌は電界による印加されると細胞膜への穿孔^[5-26]を利用する殺菌技術である。しかし、パルス電界殺菌との傾向の類似より、プラズマ処理により印加される電界（2章 2-4-2 節）により報告における実験にて生じたものと同様の機構が本実験でも生じ、これによって低温および高温で生育した大腸菌の感受性が増大した可能性を考えることができる。しかし、この仮定に基づくとしても、高温における感受性増大の要因については今後調査が必要である。

5-4 まとめ

大腸菌の生育条件によるプラズマ感受性への影響が評価された。生育条件として、増殖経過の推移および、生育温度が別個に評価された。

増殖経過の推移によるプラズマ感受性への影響評価では、対数増殖期初期から定常期初期までの大腸菌のプラズマ感受性が評価され、以下に示す結果が得られた。

- 増殖経過の推移は細菌のプラズマ感受性に影響を与えた。
- 他研究より報告されている、細胞膜におけるクロプロパン脂肪酸含有率増大による対数増殖期末期～定常期初期におけるストレス感受性低下がプラズマ処理についても確認された。
- 対数増殖期中期にはプラズマ感受性が低下したことから、この時期の細菌を用いた実験によるプラズマ感受性（殺菌効果）の測定値を他の増殖経過の時期やそれに類似する状態（増殖飽和時等）の細菌の不活化に関する判断に適用する場合は留意が必要と考えられる。

生育温度による影響評価では、大腸菌の至適生育温度である 37°C および低温条件として 19、28°C、高温条件として 40、43°C にて、対数増殖期中期まで培養された大腸菌が用

いられた。その結果、以下に示す結論が得られた。

- 生育温度の変更は細菌のプラズマ感受性に影響を与えた。
- 生育温度の至適生育温度からの推移はプラズマ感受性を増大させた。
- 至適生育温度で生育した細菌による研究より報告されたプラズマ感受性（殺菌効果）に関する結果は、より高温もしくは低温で生育した細菌の不活化に問題なく適用可能である。
- 熱処理とは生育温度による影響は対照的で、両者の作用機構の違いが明確に示された。
- 加温・冷却とプラズマ処理の併用により不活化効果を増幅できる可能性がある。

参考文献

- [5-1] J. E. Cronan Jr., "Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 95, no. 6, pp. 2054–2061, 1968.
- [5-2] C. W. M. Haest, J. de Gier and L. L. M. van Deenen, "Changes in the chemical and the barrier properties of the membrane lipids of *E. coli* by variation of the temperature of growth," *Chemistry and physics*, vol. 3, pp. 413–417, 1969.
- [5-3] Y. Chang and J. E. Cronan, "Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*," *Molecular Microbiology*, vol. 33, no. 2, pp. 249–259, 1999.
- [5-4] G. V. Smirnova, N. G. Muzyka and O. N. Oktyabrskii, "Enhanced resistance to peroxide stress in *Escherichia coli* grown outside their niche temperatures," *Journal of Thermal Biology*, vol. 32, no. 6, pp. 321–327, 2007.
- [5-5] G. V. Smirnova, O. N. Zakirova and O. N. Oktyabrskii, "The role of antioxidant systems in the cold stress response of *Escherichia coli*," *Microbiology*, vol. 70, no. 1, pp. 45–50, 2001.

- [5-6] M. Sinensky, "Homeoviscous Adaptation—A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 71, no. 2, pp. 522–525, 1974.
- [5-7] H. D. Warren and B. Y. Milton, "Correlation of Hyperthermic Sensitivity and Membrane Microviscosity in *E. Coli* K1060," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 39, no. 3, pp. 265–271, 1981.
- [5-8] Y. Chang, J. Eichel and J. E. Cronan Jr, "Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase ss due to RpoH-dependent proteolysis," *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 15, pp. 4288–4294, 2000.
- [5-9] 吉川寛（編集）、「ネオ生物学シリーズ 第3巻細菌」、共立出版、1996。
- [5-10] G. V. Smirnova and O. N. Oktyabrsky, "Glutathione in bacteria," *Biochemistry*, vol. 70, no. 11, pp. 1199–1211, 2005.
- [5-11] G. V. Smirnova, N. Muzyka and O. Oktyabrsky, "Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells," *Microbiological Research*, vol. 167, no. 3, pp. 166–172, 2012.
- [5-12] R. C. Fahey, W. C. Brown, W. B. Adams and M. B. Worsham, "Occurrence of glutathione in bacteria," *Journal of Bacteriology*, vol. 133, no. 3, pp. 1126–1129, 1978.
- [5-13] T. Ohshima, K. Okuyama and M. Sato, "Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*," *Journal of Electrostatics*, vol. 55, no. 3–4, pp. 227–235, Jul. 2002.
- [5-14] W. J. Dower, "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation," *Nucleic Acids Research*, vol. 16, no. 13, pp. 6127–6145, 1988.

第 6 章 総括

本研究では、大気圧低温プラズマによる細菌不活化効果の制御および解析に取り組んだ。プラズマ源として低温プラズマジェット（プラズマ）、殺菌検体として *Escherichia coli*（大腸菌）を用いた。細菌不活化効果の解析として、被処理物への細菌不活化効果の残留（第 4 章）、および細菌の増殖経過の推移や生育温度によるプラズマ感受性への影響（第 5 章）について評価した。また不活化効果の制御として、フェントン反応誘起による酸化効果増大を意図して、反応溶液への硫酸第一鉄添加による影響を評価した（第 3 章）。また、低温プラズマジェットの電気的特性に関する測定結果についても報告した（第 2 章）。

第 2 章での電気的特性測定結果より、本論文での実験で用いられた低温プラズマジェットの電力は、cross-field 型で 8 W、linear-field 型で 10 W と算出された。またプラズマ処理により、被処理物には数 kV_{0-P} の電源電圧と同調する電位が印加された。電源電圧最大値の増大、電源電圧周波数の減少、放電ガス（ヘリウム）流量の増大、被処理物への距離の短縮による被処理物への印加電位の増大が確認された。プラズマ処理の目的・条件によっては電位による影響も考慮する必要があるといえる。

第 3 章では、大腸菌浮遊液への硫酸第一鉄添加によりプラズマ感受性の増幅が可能であることが示された。しかし、効果が最大となる硫酸第一鉄濃度はプラズマ処理の際の浮遊液の量及び容器形状により著しく変化した。液面付近での外気混入量の減少、また印加電位の変化がこうした変化の要因と考えられる。

第 4 章では、プラズマ処理された寒天培地、および蒸留水（プラズマ処理水）への接触による大腸菌不活化が観測され、プラズマ処理による被処理物への細菌不活化効果の残留が見いだされた。過酸化水素・硝酸水溶液は、プラズマ処理水の大腸菌不活化効果を再現しなかった。またプラズマ処理水の効果はプラズマ処理停止から 24 h でほぼ消失し、過酸化水素・硝酸水溶液と同等程度となった。消失に要する時間より、オゾンがこの強力で不安定な細菌不活化効果の主要因である可能性が高いため、今後オゾン水による効果の再現を試みる必要がある。

第 5 章では、増殖経過の推移、および生育温度の両方が大腸菌のプラズマ感受性に影響を及ぼすことが見いだされた。増殖経過の推移による影響評価では、対数増殖期中期には

感受性が増大したが、増殖準備期、対数増殖期末期から定常期には感受性が減少することが観測された。対数増殖期中期の細菌を用いて得られたプラズマ感受性に関する結果の実生育温度の影響評価では、至適温度から外れた生育温度は低温、高温のいずれも大腸菌のプラズマ感受性を高めることが示された。

以上より、殺菌を目的とするプラズマ処理において処理部位の温度が高温もしくは低温となっている場合も、既存の至適生育温度での培養により調製された殺菌検体を用いたプラズマ感受性評価の結果は問題なく参考にできるといえる。また、治療部位の保温もしくは保冷との併用による、プラズマによる殺菌効果の増幅が可能である可能性が見いだされた。

業績

査読付き論文

- [1] T. Nakajima, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Generation of Bactericidal Factors in the Liquid Phase and Approach to New Gene Transfer Technology by Low Temperature Plasma Jet Treatment," *International Journal of Plasma Environmental Science & Technology*, vol.5, pp. 42–49, 2011.
- [2] H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, J. I. B. Wilson and S. Cunningham, "Single-molecule measurement of strand breaks on large DNA induced by atmospheric pressure plasma jet," *Applied Physics Letters*, vol. 99, 191504 (3 pp.), 2011.
- [3] S. Cunningham, T. Nakajima, H. Kurita, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Analysis of Non-Thermal Plasma-Treated Water using Single molecule measurement of Large DNA Damage," *International Journal of Plasma Environmental Science & Technology*, vol.6, pp. 54–58, 2012.

国際会議発表（発表者を下線で示す）

- [1] T. Nakajima, Y. Tanakan, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Bacterial inactivation and approach to new gene transfer technology using plasma torch treatment," The seventh International Symposium on Non-Thermal Plasma Technology, Canada (St. Johns), Jul. 2010.

- [2] S. Cunningham, J. Wilson, T. Nakajima, H. Kurita, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Analysis of plasma-treated water using single molecule measurement of DNA damage," 2nd ISNPEDADM-2011 New electrical technologies for environment, New Caledonia (Noumea), Nov. 2011.

- [3] A. Antoniu, H. Kurita, T. Nakajima and A. Mizuno, "Safety Evaluation of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Liquid Treatment," The 2012 Electrostatics Joint Conference, Canada (Ontario), Jun. 2012.

- [4] S. Cunningham, T. Nakajima, H. Uda, H. Kurita, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Single Molecule Measurement of Large DNA Induced Damage of Non-Thermal Plasma-Treated Water," 39th IEEE International Conference on Plasma Science, UK (Scotland), Jul. 2012.

- [5] H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Evaluation of DNA Damage Induced by Atmospheric Non-thermal Plasma," The 9th International Bioelectrics Symposium, Japan (Kumamoto), Sep. 2012.

- [6] T. Nakajima, H. Yasuda, H. Kurita, A. Antoniu, K. Takashima and A. Mizuno, "Enhancement of plasma inactivation and degradation by ferrous iron supplementation," International Symposium on Plasma Science and Technology for Environmental Applications, China (Hangzhou), Sep. 2012.
- [7] H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Single-molecule DNA Damage Analysis for Evaluation of Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma Exposure," 11th Asia Pacific Conference on Plasma Science and Technology and 25th Symposium on Plasma Science for Materials, Japan (Kyoto) , Oct. 2012.
- [8] T. Nakajima, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Enhancement of Plasma Bacterial Inactivation by Ferrous Iron Supplementation," The 2012 IEEE Industry Applications Society Annual Meeting, International Electrostatic Assembly, USA (Las Vegas), Oct. 2012.
- [9] T. Nakajima, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Investigation of Bacterial Inactivation Effect by Cold Plasma Jet," 1st Korea-Japan Working Group Meeting for Plasma Applications, Korea (Jeju), Nov. 2012.
- [10] T. Nakajima, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Examination of Bacterial Inactivation by Cold Plasma Jet," 30th Symposium on Plasma Processing, Japan (Shizuoka), Jan. 2013.

- [11] H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Quantitative evaluation of intensity of radical reaction by plasma exposure using the DNA combing method," 5th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, Japan (Nagoya), Jan. 2013.
- [12] T. Nakajima, H. Kurita, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno, "Effect of bacterial growth phase and cultivation temperature on *Escherichia coli* inactivation by atmospheric pressure plasma", The 6th International Conference on Plasma-Nanotechnology & Science, Japan (Gifu), Feb. 2013.

国内学会発表（発表者を下線で示す）

- [1] 藤井直斗、中島知子、安田八郎、高島和則、水野彰、「Ar/Ar+H₂O プラズマジェットを用いた大腸菌殺菌」、『第 32 回静電気学会全国大会』、大分（大分大学）、2008 年 9 月。
- [2] 安田八郎、三浦卓也、橋本麻衣、藤井直斗、中島知子、栗田弘史、高島和則、水野彰、「複合的ストレス源である大気圧放電プラズマの照射による細菌・ファージ不活化のメカニズムおよび大腸菌形質転換への応用」、『第 31 回日本分子生物学会年会／第 81 回日本生化学会大会合同大会』、兵庫県（神戸ポートアイランド）、2008 年 12 月。
- [3] 中島知子、藤井直斗、安田八郎、高島和則、水野彰、「プラズマトーチを用いた殺菌及び遺伝子導入技術」、『第 10 回静電気学会春期講演会』、東京（東京大学）、2009 年 3 月。
※増田賞、静電気学会春期講演会優秀賞、静電気学会春期講演会エクセレントプレゼンテーション賞受賞
- [4] 中島知子、安田八郎、栗田弘史、高島和則、水野彰、「プラズマトーチを用いた大腸菌への遺伝子導入」、『第 33 回静電気学会春期講演会』、東京（東京大学）、2009 年 9 月。
- [5] 中島知子、安田八郎、栗田弘史、高島和則、水野彰、「プラズマトーチを用いた殺菌および遺伝子導入技術」、『第 11 回静電気学会春期講演会』、東京（東京大学）、2010 年 3 月。

- [6] 栗田弘史、中島知子、安田八郎、高島和則、水野彰、「大気圧低温プラズマジェットによる長鎖 DNA 切断の 1 分子解析」、『第 35 回静電気学会全国大会』、東京（東京大学）、2011 年 9 月。
- [7] 中島知子、栗田弘史、安田八郎、高島和則、水野彰、「低温プラズマジェット照射による不活化効果に対する大腸菌増殖期の影響」、『第 13 回静電気学会春期講演会』、東京（東京大学）、2012 年 3 月。

謝辞

修士入学より 5 年間の長きに渡り、多くの方々のお世話になり研究を進めることができました。この場を借りて心よりお礼申し上げます。

水野彰教授には、終始適切なお指導と温かい励ましを賜りました。

主査として、論文や発表に関し貴重なお指導、ご助言をいただいた浴俊彦教授に深く謝意を表します。

高島和則准教授には研究および論文におけるお指導ご鞭撻に加え、日頃より様々なご高配を賜りました。

栗田弘史助教には、いつも大変熱心なお指導、また貴重な議論を頂きました。

安田八郎助手には入学当初より、実験研究の進め方等細部に渡りご教示頂きました。

林君をはじめ、研究室の皆様には大変お世話になり、また多くの事を学ばせて頂きました。

最後に陰ながら見守ってくれた家族に感謝いたします。