

小型アルゴンプラズマジェットによる殺菌効果の検証

柴原大輝*, 安田八郎*, 藤井直斗**, 栗田弘史*,
高島和則*, 水野 彰*¹

(2009年8月3日受付; 2009年11月10日受理)

Sterilization of *Escherichia coli* by Small Size Argon Plasma Jet

Daiki SHIBAHARA,* Hachiro YASUDA,* Naoto FUJII,** Hirofumi KURITA,*
Kazunori TAKASHIMA* and Akira MIZUNO*¹

(Received August, 3 2009; Accepted November, 10 2009)

Non-thermal atmospheric pressure plasmas have recently been applied in biomedical field. Plasma jet show a considerable promise for medical application where surfaces are exposed to plasma in a non-contact and site-specific manner at nearly the same temperature as the ambient gas. We have characterized a device of argon plasma jet of relatively small dimensions using smoke wire methods and optical emission spectrometry. Efficacy of decontamination by the plasma for the wet state of *Escherichia coli* cells was investigated with several culturing conditions such as surface of an agar plate, inside the soft agar layer and in the water solution. Denaturation of the proteins inside the cell was also demonstrated. These results suggest that reactive species are produced from these water and they kill the bacterial cells.

1. はじめに

近年, プラズマや放電を利用した新しい殺菌・医療技術の開発・実用化が検討されている. その中でも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盛んに進められている¹⁾. 大気圧プラズマの1つとして, プラズマジェットが挙げられる. プラズマジェットは被照射物に対して熱負荷をかけずに, 化学的に活性化ラジカルによるプラズマプロセスを行うことが可能である. 任意の対象物表面に非接触で曝露できることから, 身体表面の疾患治療や血液凝固の促進などの医療分野への応用研究が注目されている²⁾. また, プラズマジェットは局所的なプラズマプロセスを可能としているため虫歯治療³⁾や96穴プレートを用いた多検体並列処理への適用が期待されている⁴⁾.

本研究では, アルゴンガス(以下 Ar ガス)を媒体とする, 小型プラズマジェット発生装置を作製し, その特性理解のためスモークワイヤー法による Ar ガス流れの可視化, 分光器を用い

た発光分光計測を行った. また, 寒天培地表面および液中環境下における大腸菌の殺菌効果の検証およびタンパク質変性効果の検証を行った.

2. 実験装置および実験方法

図1に, 本実験の実験構成図を示す. Ar ガス流量は流量計にて 2.0 L/min に調整し, 小型プラズマジェット発生装置に流入させた. 電源にはパルス電源(電子制御国際 実験機 9号)を用い, 発光分光計測, 寒天培地表面における殺菌および GFP 蛍光減衰効果実験では印加電圧 6.4 kV_{0-p}, 周波数 4 kHz とし, 液中殺菌では印加電圧 5.0 kV_{0-p}, 周波数 4 kHz とした.

図2に小型プラズマジェット発生装置概略図を示す. 北野らの方法⁵⁾を参考にし, 接地電極を2本にする等の一部改変を加えた. 石英ガラス管(外径4 mm, 内径2 mm)の内部にアルミテープを貼り付け高電圧印加電極とした. また, その石英ガラス管に対して, 外壁にアルミテープを接地電極として設置した石英ガラス管2本を斜めに配置した. 石英ガラス管内部には Ar ガスが流入し, 装置先端からプラズマジェットが発生する構造となっている. 図3にプラズマジェット発生時における観察写真を示す.

2.1 スモークワイヤー法による Ar 流れの可視化

シャーレおよび96穴プレートにおいて, プラズマジェット発生装置より放たれるガス流の挙動を調べるためにスモークワイヤー法にて Ar 流れの可視化を行った.

プラズマジェット発生装置先端部から 3 mm の位置にφ 0.1 mm のタングステン線を設置し, トレーサーには流動パ

キーワード: アルゴンプラズマジェット, プラズマ, スモークワイヤー法, 殺菌効果, 大腸菌

* 豊橋技術科学大学エコロジー工学系 (441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1)

Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology, 1-1, Hibiyaoka, Tenpaku-ku, Toyohashi 441-8580, Japan

** 象印マホービン株式会社 (530-8511 大阪府大阪市北区天満 1-20-5)

Zojirushi Coporation, 1-20-5 Temma, Kita-ku, Osaka 530-8511, Japan,

¹ mizuno@eco.tut.ac.jp

ラフィンを用いた。このとき、プラズマジェット発生装置のメインノズル両脇に配置した石英ガラス管は、メインノズルより放たれるガス流に影響を及ぼさないと考え取り外した。タングステン線への電圧印加用電源として直流電源を使用、印加電圧 12 V、電流 1.4 A として放電無し Ar ガス流れを可視化した。また、撮影には、高速度カメラ (PHOTORON FASTCAM-X1280PCI) を用いて毎秒 250 フレームで撮影を行った。

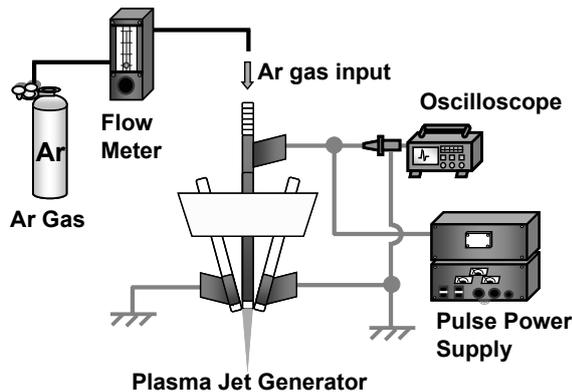


図 1 実験構成図

Fig. 1 Schematic of the experimental set-up.

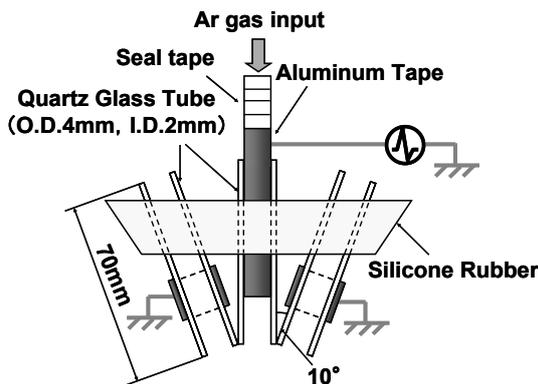


図 2 プラズマジェット発生装置概略図

Fig. 2 Schematic of the plasma jet generator.

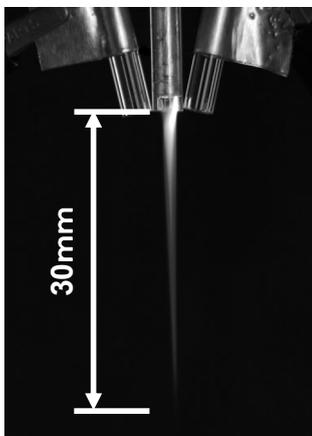


図 3 放電観察写真

Fig. 3 Photographs of the plasma jet.

2.2 発光分光計測

プラズマジェット発生装置先端部と分光計測用光ファイバーヘッド (USB4000P Ocean Optics) の間 20 mm の位置に 5 mm 厚の石英ガラスを設置し、照射下部から垂直に採光して発光分光計測を行った。

2.3 小型プラズマジェット殺菌効果の検証

本実験では、クラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) を産生する組み換え体大腸菌 (*E. coli* MV1184 pGLO) を殺菌検体とした。L(+)-アラビノースを含む培地で培養すると GFP の発現が誘導され、細胞内に GFP が蓄積する。プラズマジェットを曝露した場合におけるメンブレンフィルタ (ADVANTEC Cellulose Acetate, ポアサイズ 0.45 μm , ϕ 90 mm (以下フィルタ)) 上での範囲別殺菌効果の検証、大腸菌を Soft agar に混合させた場合における培地中深度別殺菌効果の検証、96 穴プレート内に菌液を滴下した場合における殺菌効果の検証を行った。それぞれ全 3 回の実験を行い、平均グラフを算出した。

2.3.1 フィルタ表面における殺菌効果

減圧濾過法にて、約 3,000 cell の大腸菌をフィルタ上に捕集し、アンピシリンおよび L(+)-アラビノースが添加された LB 寒天培地上に設置した。設置されたフィルタ中央上部 20 mm の位置にプラズマジェット発生装置を設置し、プラズマジェットを曝露した。曝露時間は 0, 15, 45, 135, 405, 1,215 s とした。曝露後、37°C に設定されたインキュベーター内にて 24 時間培養後、生菌数の測定および観察を行った。フィルタを中心地点より半径 5 mm の同心円で区分し、中心領域を①、最外領域を⑤とする①-⑤の領域における生菌数の測定および単位面積当りの生菌数の算出を行った。

2.3.2 培地深度別殺菌効果

アラビノースを添加し 45°C にしておいた溶解 Soft agar 培地に約 10,000 CFU/mL となるよう大腸菌を混合させ、アンピシリンおよび L(+)-アラビノースが添加された LB 寒天培地上に厚さを 1-5 mm まで 1 mm ごとに変えて重層した。Soft agar 培地中央上部 20 mm の位置にプラズマジェット発生装置を設置し、プラズマジェットを曝露した。曝露時間は 0, 2, 4, 6 min とした。曝露後、37°C に設定されたインキュベーター内にて 24 時間培養後、Soft agar 中心地点より半径 1 mm の領域および半径 2.5 mm の領域において単位面積当りの生菌数の測定および観察を行った。

2.3.3 96 穴プレートを用いた液中殺菌効果

1.5×10^8 CFU/mL に調整した大腸菌を 96 穴プレートの 1 ウェル内に 70 μL (菌液深さは約 2 mm) および 150 μL (菌液深さは約 4 mm) 滴下し、液面上部 20 mm の位置にプラズマジェット発生装置先端を設置し、プラズマジェットを曝露した。曝露時間は 70 μL では 0, 2, 4, 6, 7, 8, 10 min とし、150 μL では 2-20 min までの 2 min 間隔とした。また、周囲への影響を調べるため

プラズマジェット照射に隣接する 1 ウェル内に同様の菌液を 70 μL および 150 μL 滴下した。曝露後、pH の測定、菌の回収および希釈を行い、コンラージ棒にて LB 寒天培地上に塗布した。塗布された培地を 37°C に設定されたインキュベーター内にて 24 時間培養後、生菌数の測定を行った。

2.4 フィルタ表面における GFP 蛍光減衰効果

減圧濾過法にて、約 1.0×10^9 cell の大腸菌をフィルタ上に捕集し、アンピシリンおよび L(+)-アラビノースが添加された LB 寒天培地上に設置した。設置されたフィルタ中央上部 20 mm の位置にプラズマジェット発生装置を設置し、プラズマジェットを曝露した。曝露時間は 5–20 min までの 5 min 間隔とした。曝露後、紫外線励起波長 254 nm を照射し観察を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 スモークワイヤー法による Ar 流れの可視化

スモークワイヤー法による放電無し Ar ガス流れの可視化を行った。図 4 に容器別の Ar ガス流れの様子を示す。

図 4(a) は 50 mm シャーレにおける Ar ガス流れである。プラズマジェット装置先端から放たれた Ar ガスがシャーレに衝突し、シャーレ底面全体に広がりを見せているのが分かる。また、図 4(b) は 96 穴プレートにおける Ar ガス流れである。プラズマジェット装置先端から放たれた Ar ガスが 1 ウェルにのみ流入しており隣接する穴にはほとんど流入しないことが分かった。

以上の結果から、シャーレおよび 96 穴プレートにおいて、プラズマジェットの有効範囲を推測することができた。

3.2 発光分光計測

分光器によるプラズマジェットの発光分光計測を行った。DNA の紫外線吸収による損傷として高い殺菌効果が認められている UV-C region は 200–280 nm においてスペクトルが観測される。また、活性酸素種のうち最も強力な酸化力をもつ、OH ラジカルが発生すると、309 nm 付近にスペクトルが観測される⁶⁾。図 5 に本実験で用いたプラズマジェットの発光スペクトルを示す。

図 5 は波長 200–850 nm での発光スペクトルである。その結果 UV-C region ではピークが観測されず、短波長域でスペクトルが観測できたのは UV-A region (315–400 nm) のみであった。この結果から、本実験で作製したプラズマジェットでは紫外線による殺菌効果は期待できないと考えられる。また、観測されたピークの波長は、それぞれ 381, 406, 697, 751, 764, 772 nm であった。波長データベース^{7, 8)}を引用し、これらの波長を特定した結果全ての波長においてアルゴンを観測することができたが、OH ラジカルなどのスペクトルを観測することはできなかった。このことから、OH ラジカルなどの活性種は培地上もしくは液中にプラズマジェットを照射した際に、それらに含まれる水分子から生成されるのではないかと考えられる。

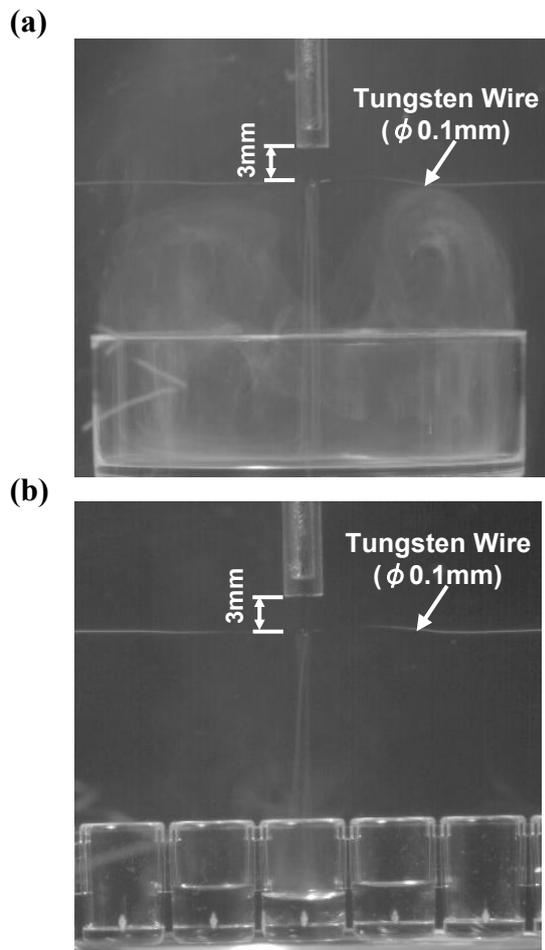


図 4 Ar ガス流れの可視化写真

(a) 50 mm シャーレ, (b) 96 穴プレート

Fig. 4 Visualization of the argon gas flow.

(a) 50 mm Petri dish, (b) 96-well plate.

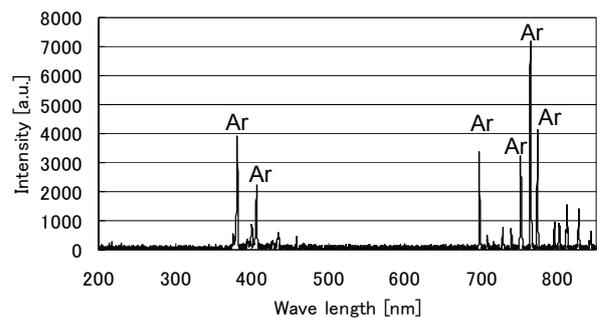


図 5 発光分光計測結果

Fig. 5 Emission Spectrum of the plasma jet.

3.3 小型プラズマジェットの殺菌効果

3.3.1 フィルタ表面における殺菌効果

菌を捕集したフィルタ上にプラズマジェットを曝露した場合における殺菌効果の検証を行った。図 6 にプラズマジェット曝露時間 0, 135, 1,215 s の観察写真、図 7 に単位面積当たりの範囲別生存曲線を示す。

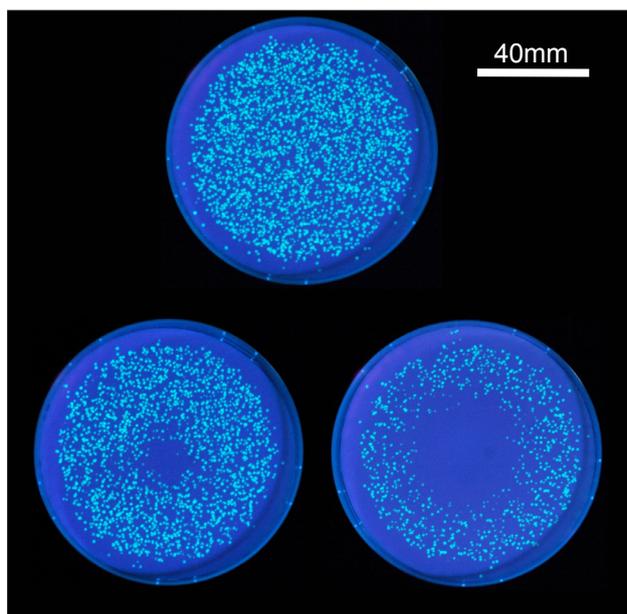


図6 フィルタ上範囲別殺菌観察写真
 上：コントロール，左：放電時間 135 s，右：1,215 s.
 Fig. 6 Photographs of Petri dishes showing the effects of the plasma jet on *E. coli* cells.
 Top Petri dish is control, bottom Petri dishes were treated for 135 s (left) and 1,215 s (right).

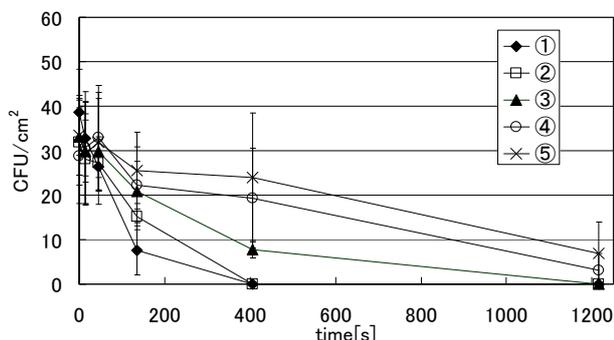


図7 フィルタ上範囲別生存曲線
 Fig. 7 Survival curves of *E. coli* according to the range on membrane filter which exposed the plasma jet.

図 6, 7 より, プラズマジェットの曝露時間経過に伴い, 曝露部分を中心とし, 放射状に殺菌が伸展することが分かった. また, 殺菌効果は曝露部分に近づくにつれ上昇し, 曝露部分(中心領域①)の領域においては, 放電曝露開始 405 s にて 100%の殺菌率となった.

プラズマジェットにおける殺菌のメカニズムとして, 曝露部中心における荷電粒子の菌体への衝突による物理的破壊および培地上の水分を吸収したフィルタへ, プラズマジェットを曝露することによって生成した活性種による化学的破壊が行われていると考えられる. また, Ar ガスがフィルタ表面に衝突し, フィルタ表面全体に広がりを見せていることから, Ar ガ

スの流れに伴い, 曝露が培地上全体に広がり活性種を生成すると考えられる. 更に液層で生成された活性種が拡散することにより殺菌効果を放射状に伸展させていると考えられる.

3.3.2 培地深度別殺菌効果

上層寒天培地中に固定された菌へのプラズマジェットの影響を調べた. Soft agar 培地に混合し重層させた培地上にプラズマジェットを曝露した場合における殺菌効果の検証を行った. 図 8 にプラズマジェット曝露時間 6 min での Soft agar 培地厚さ 1, 3, 5 mm の観察写真, 図 9 に Soft agar 培地厚さ別単位面積当たりにおける生存曲線を示す.

図 8 の結果から, Soft agar 培地の厚さに関らず曝露部を中心として殺菌効果が確認された.

図 9(a)は半径 1 mm 領域での生存曲線である. Soft agar 培地厚さ 5 mm において, 曝露時間 6 min にて 92%の殺菌率となった. また, Fig. 9(b)は半径 2.5 mm 領域での生存曲線である. Soft agar 培地厚さ 5 mm において, 曝露時間 6 min にて 89%の殺菌率であった.

これらの結果より, Soft agar 培地の厚さを増やしても曝露部中心においてはほぼ同様の殺菌効果が得られたことから, プラズマジェットの殺菌能力は浸透性を持つことが確認された. その殺菌要因としてはプラズマジェットを培地表面に曝露した際に生成される活性種が培地内に浸透することによるものであると考えられる.

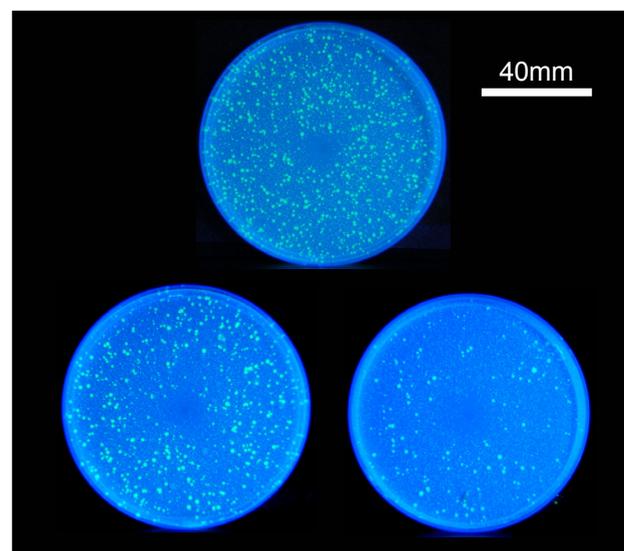


図8 培地厚さ別殺菌観察写真(放電時間：6 min)
 上：厚さ 1 mm，左：3 mm，右：5 mm.
 Fig. 8 Photographs of Petri dishes showing the effects of the plasma jet on *E. coli* cells.
 Top agar medium of Petri dish is 1 mm in thickness, bottom agar medium of Petri dishes are 3 mm in thickness (left) and 5 mm in thickness (right).

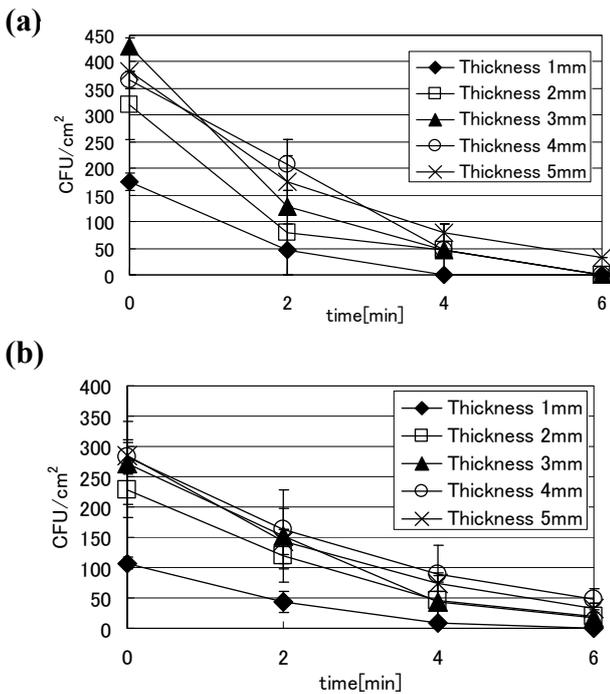


図9 培地厚さ別生存曲線

(a) 半径 1 mm 領域, (b) 半径 2.5 mm 領域.

Fig. 9 Survival curves of *E. coli* according to the thickness of the agar medium which exposed the plasma jet.

(a) 1 mm in radius area, (b) 2.5 mm in radius area.

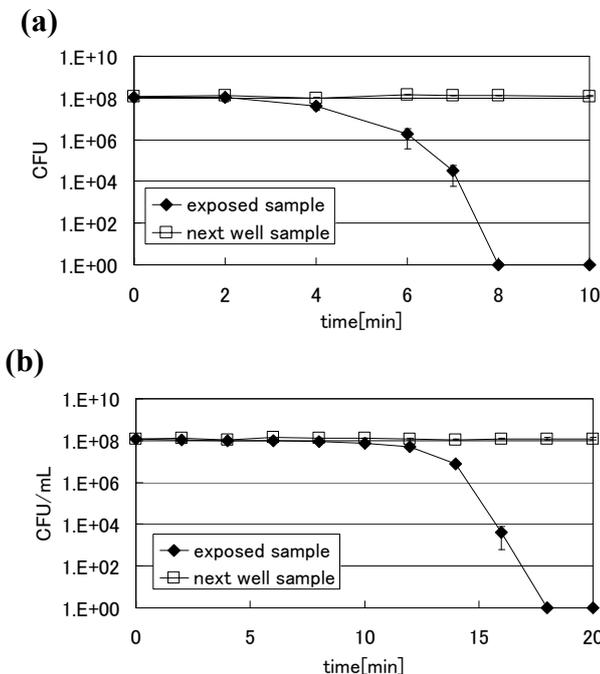


図10 96穴プレート1ウェル内生存曲線

(a) 菌液 70 µL, (b) 菌液 150 µL.

Fig. 10 Survival curves of *E. coli* in one hole of 96-well plate which exposed the plasma jet.

(a) 70 µL sample, (b) 150 µL sample.

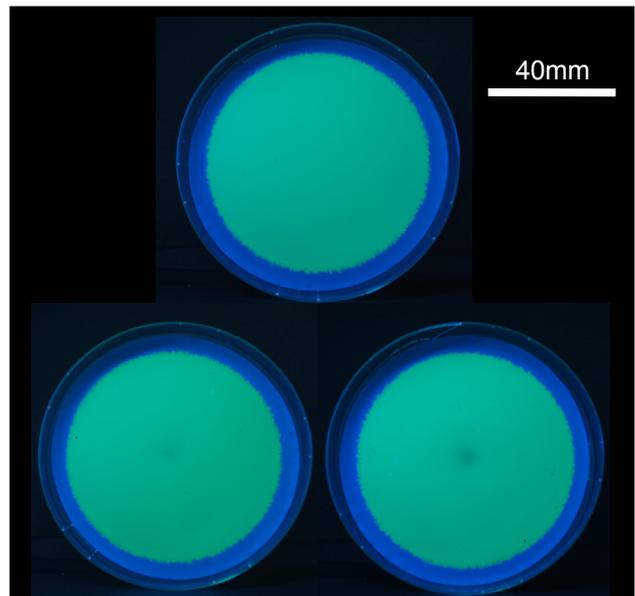


図11 フィルタ上 GFP 蛍光減衰観察写真

上: コントロール, 左: 放電時間 10 min, 右: 20 min.

Fig. 11 Photographs of Petri dishes showing the effects of the plasma jet on GFP.

Top Petri dishes are controls, bottom Petri dishes were treated for 10 min (left) and 20 min (right).

3.3.3 96穴プレートを用いた液中殺菌結果

プラズマジェット曝露後の 1 ウェル内の菌液および、隣接する 1 ウェル内の菌液を回収し、生菌数の測定を行った。図 10 に菌液 volume 別の生存曲線を示す。

図 10(a)は菌液 70 µL での 1 ウェル内生存曲線である。1 ウェル内において 8 min の曝露にて 4 桁の殺菌を確認した。殺菌要因としては、液中での活性種の生成による化学的破壊が考えられる。pH 測定の結果は放電時間 8 min 以降 pH 5 以下となっていた。また、隣の 1 ウェル内では 10 min においても生菌数に変化はみられなかった。

図 10(b)は菌液 150 µL での 1 ウェル内生存曲線である。菌液 volume を増やした場合、16 min の曝露にて 4 桁の殺菌を確認した。また、pH 測定の結果は 16 min 以降 pH 5 以下となっていた。

以上の結果からプラズマジェットを液中に曝露することで、生成された活性種により殺菌が行われたと考えられる。しかし、菌液 volume を増やすことで深さが増し殺菌効果は弱くなると考えられる。また、菌液の pH が低下していることから、溶存 NO_x が増加していると考えられる。菌液 70 µL でのプラズマジェット曝露において、直接曝露を行った 1 ウェル内では殺菌効果が得られ、隣の 1 ウェル内では殺菌効果が得られなかったことおよびプラズマジェットでの 96 穴プレートにおいて、Ar ガスが 1 ウェルにのみ流入しており隣接する穴にはほとんど流入しないことから、周囲のウェルに影響を与えること

なく、殺菌評価を行えることが示唆された。

3.4 フィルタ表面における GFP 蛍光減衰結果

我々は、誘電体バリア放電による殺菌において、菌体内 GFP (緑色蛍光物質) の変性と菌の死滅との間に密接な相関が見られることを示した⁹⁾。

そこで、GFP 産生菌を捕集したフィルタ上にプラズマジェットを曝露した場合における GFP 蛍光の減衰効果の検証を行った。図 11 にプラズマジェット曝露時間 0, 10, 20 min の観察写真を示す。

図 11 の結果から、プラズマジェット曝露部分において時間経過に伴い GFP 蛍光の減衰が生じていることがわかった。この主な要因として、プラズマジェット曝露により生成された活性種が菌に含まれるタンパク質を酸化および変性させていると考えられる。

4. まとめ

小型プラズマジェットにより、Ar ガス流れの可視化、発光分光計測、フィルタ上範囲別殺菌、培地厚さ別殺菌、96 穴プレート 1 ウェル内液中殺菌、フィルタ上 GFP 蛍光減衰実験を行った。これらの結果より、以下のことが示唆された。

- (1) 発光分光測定結果より、本実験で作製したプラズマジェットでは紫外線による殺菌効果は期待できない。
- (2) プラズマジェットは空気中においては OH ラジカルなどの活性種をほとんど生成していない。しかしプラズマジェットを培地上および液中に照射させた際には活性種を生成すると考えられる。
- (3) 範囲別殺菌効果は中心部が最も強く、Ar ガスの流れに

伴い曝露が広がり放射状に殺菌効果が伸展していく。

- (4) 厚さ別殺菌効果において、プラズマジェットの曝露部中心では荷電粒子や活性種が浸透性を持つと考えられる。
- (5) 液中および培地中において、液層で発生した活性種や硝酸イオン等が拡散していると考えられる。
- (6) 小型プラズマジェットでの 96 穴プレートにおいて隣接する穴に影響を与えることなく、1 つのウェル内のみを殺菌できる。
- (7) プラズマジェットはタンパク質の変性にも影響を与える要素を持っていることが示された。

参考文献

- 1) M. Laroussi: Plasma Process. Polym., **2** (2005) 391
- 2) G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman: Plasma Process. Polym., **5** (2008) 503
- 3) B. Liu, D. Drake and E. Stoffels: IEEE Trans. Plasma Sci., **34** (2006)1317
- 4) M. Laroussi, C. Tendero, X. Lu, S. Alla, W.L.Hynes: Plasma Process. Polym., **3** (2006) 470
- 5) 北野勝久, 浜口智志, 青木裕紀: プラズマ生成装置およびプラズマ生成方法, 国際公開番号 WO2008/072390 A1
- 6) 佐藤圭輔, 安岡康一, 石井彰三: IEEJ Trans. FM, **128**, 6 (2008) 401
- 7) G.R. Harrison: "M.I.T. Wavelength Tables", p.xxii-xxxiv, MIT Press, Cambridge (1969)
- 8) R.K. Winge, V.A. Fassel, V.J. Peterson and M.A. Floyd: "Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, An Atlas of Spectral, information", p.28, Elsevier Science Publication, Maryland Heights (1985)
- 9) H. Yasuda, M. Hashimoto, Md. M. Rahman K. Takashima and A. Mizuno: Plasma Process. Polym., **5** (2008) 615