

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：33919

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21110006

研究課題名(和文)プラズマと菌細胞マイクロ構造体との相互反応ダイナミクス

研究課題名(英文)Reactive dynamics between plasma and microorganism

研究代表者

伊藤 昌文(ITO, MASAFUMI)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：10232472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 59,200,000円、(間接経費) 17,760,000円

研究成果の概要(和文)：ラジカルと植物性菌細胞のナノ界面階層的反応ダイナミクスをモニタリングする新規システムを構築し、ナノ領域で顕在化するプラズマと細胞との相互反応が細胞階層構造に与えるダイナミクスを定量的に明らかにした。

主な成果を以下に示す。酸素ラジカル源による照射実験から、原子状酸素ラジカルと分子状酸素ラジカルの絶対密度と殺菌効率を定量的に評価した。階層的解析により、細胞壁のダメージはなく、細胞膜の機能を失活させて細胞内の酸化により殺菌されることを定量的に明らかにした。酸素原子ラジカルのドーズ量によって酵母細胞の増殖・抑制・殺菌を制御できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Reactive dynamics between plasma and microorganism was investigated by constructing a novel monitoring system for establishing the science of interaction among gas phase of plasma, surface reaction on microorganism, and life function of microorganism.

Main results are as follows. 1. There is no damage through radical exposure while oxygen species inhibit selective permittivity of membrane and destruct Quinone. 2. Quantitative measurement of ground-state atomic oxygen and excited-state molecular oxygen radicals and evaluation of efficiencies. 3. Cell proliferation and inactivation can be controlled by dose of atomic oxygen.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：プラズマ 殺菌 活性化 ラジカル カビ 酵母 蛍光 フラックス

1. 研究開始当初の背景

プラズマによる真菌の不活性化に関する論文は多く報告されているが、プラズマ中のどのような因子がどのように作用して不活性化されるか定量的な議論が全くされていなかった。さらにこのような殺菌因子が真菌とどのように階層的反応を起こすか、特に細胞膜などのナノ界面で顕在化するプラズマと細胞との相互作用反応が生体機能にどのように影響を与えるかについてもほとんど定量的に分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではラジカルと植物性菌細胞のナノ界面を含めた階層的反応ダイナミクスをモニタリングする新規システムを構築することで、ナノ領域で顕在化するプラズマと細胞との相互作用反応が細胞階層構造に与えるダイナミクスを分子レベルで明らかにすることを目的とした。また、“プラズマ誘導に起因する植物生体の時空間反応を解明する”という見地から、プラズマ誘起セル工学(プラズマポタニクセルテクノロジー)構築のための基盤研究を推進することも目指した。

3. 研究の方法

本研究ではラジカルと真菌のナノ界面階層的反応ダイナミクスをモニタリングする新規システムを構築し、ナノ領域で顕在化するプラズマと細胞との反応が細胞階層構造に与えるダイナミクスを分子レベルで明らかとした。

具体的には、

- 1) 非平衡大気圧ラジカル源から生成される反応性酸素種の定量化
- 2) 階層的反応ダイナミクスモニタリング手法の構築
- 3) ラジカルと菌の階層構造部位とのナノ界面時空間相互反応ダイナミクスの解析
- 4) 酸素ラジカルによる細胞増殖促進効果の検証

について研究・開発を進めた。

1) については殺菌に大きな影響を及ぼすO原子などの反応性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の効果に着目し大気圧酸素ラジカル源を開発し、中性酸素ラジカルの細胞への照射効果を検証した。真空紫外分光法を用いて基底状態酸素原子と励起状態酸素分子の密度測定を行い、定量化した。

2) についてはラジカルと真菌細胞の反応をその場観察できる共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて、ラジカルと細胞外部組織の反応を検証し、ラジカルと細胞の階層的反応ダイナミクスの解明を試みた。

3) については2)で構築した階層的反応ダイナミクスモニタリング手法により細胞膜の機能変化と内部の脂質の酸化の時間変化を観察し、その殺菌メカニズムを定量的に解明した。4) については酸素ラジカルのドーズ量と細胞周期に基づいて、酵母の細胞増殖促進効果について解析し、非常に狭い領域

で増殖促進の効果があることが分かった。

4. 研究成果

(1) 非平衡大気圧ラジカル源の気相診断とミドリカビ胞子の主要な殺菌因子の解明

非平衡大気圧プラズマによるミドリカビ胞子の殺菌において、主要な殺菌因子を定量的に特定することを目的とした。大気圧プラズマジェットを用いた実験により、プラズマから生成される紫外(UV)光やオゾンによる殺菌への寄与は小さいことが分かっている[1,2]。そこで、酸化還元電位が大きい中性の活性酸素種のうち、基底状態の酸素原子 $O(^3P)$ と寿命の長い励起状態の一重項酸素分子 $O_2(^1)$ に着目した。中性酸素種を細胞に照射するために、超高密度非平衡大気圧Ar/ $O_2$ プラズマを用いた酸素ラジカル源を使用した。このラジカル源は、電極構造により、荷電粒子(電子、イオン)及びUV光を除去し、電気的に中性な活性酸素種のみが出射される。真空紫外吸収分光法(VUVAS)を用いて、酸素ラジカル源から生成される $O(^3P)$ 密度と $O_2(^1)$ 密度をそれぞれ測定し、殺菌効率と比較することにより、主要な殺菌因子の解明を行った。

図1に、超高密度非平衡大気圧Ar/ $O_2$ プラズマを用いた酸素ラジカル源とVUVAS光学系の模式図、図2にラジカル源のヘッド部の詳細図を示す。大気の状態が、照射される中性酸素種の組成や細胞の反応に影響することを避けるため、真空容器内にラジカル源を設置し、Arガスで置換して実験を行った。酸素ラジカル源には総流量5 L/minのArと酸素の混合ガスを流し、ラジカル射出口から距離10~20mmの位置に細胞を配置した。また、 $O(^3P_{j=0,1,2})$ 原子密度を、マイクロホローカソード光源( $3s^3S^0-2p^4P_2$ : 130.217 nm,  $3s^3S^0-2p^4P_1$ : 130.487 nm,  $3s^3S^0-2p^4P_0$ : 130.604 nm)を用いて測定した[3]。同様に、 $O_2(^1)$ 分子密度は重水素ランプ(128.5[nm] 134.0[nm])により測定した[4]。酸素の流量比、照射時間、照射距離を変化させて実験を行った。これらのミドリカビ胞子を、コロニーカウント法により殺菌評価を行った。

酸素流量比0.2%, 0.6%, 1.2%において、ラジカル照射後の生菌数の照射時間依存性を図3に示す。3分と5分の間でのD値は、酸素流量比0.2%では7.6 min, 0.6%では0.9 min, 1.2%では5.3 minとなり、酸素流量比0.6%において最も殺菌効率が高いことが示された。そこで、酸素流量比を0.6%とし、照射距離を10から20 mmまで変化させた。O密度、 $O_2$ 密度D値の照射距離依存性を図4に示す。照射距離を長くすると、O密度は減少したのに対し、 $O_2$ 密度は変化がなかった。また、オゾン( $O_3$ )密度は紫外吸収分光法により測定したが、検出限界以下の $2.5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ということがわかった。ラジカルの寿命は、Oが0.46 ms,  $O_2$ が数十ms以上と見積もられ、それぞれ短寿命、長寿命ラジカルであることが

明らかになった。D 値は照射距離 10 mm では 1.2 min, 15 mm では 7.9 min, 20 mm では 19.8 min となり, 照射距離を長くすると, 殺菌効率が小さくなることがわかった。生残曲線は Chick-Watson の法則に従い, 殺菌因子が一つであると考えると式(1)のように表される。

$$-\log\left(\frac{m}{N}\right) = kCT \quad \dots(1)$$

ここで,  $m$ : 照射後の生菌数,  $N$ : 初発菌数,  $k$ : 反応定数,  $C$ : 殺菌に寄与する因子の濃度(密度),  $T$ : 処理時間である。測定した数密度と D 値を用いて式(1)から殺菌効率を殺菌反応定数として式(2)を用いて評価した。

$$k \propto \frac{1}{C \cdot Dvalue} \quad \dots(2)$$

その結果,  $k_0 = 6.3 \times 10^{-17} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{O_2} = 6.0 \times 10^{-21} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{O_3} < 10^{-21} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  となり, ミドリカビ胞子の殺菌においては,  $O_2$  及び  $O_3$  は効果が小さく,  $O$  が殺菌因子として機能していることが定量的に示唆された。

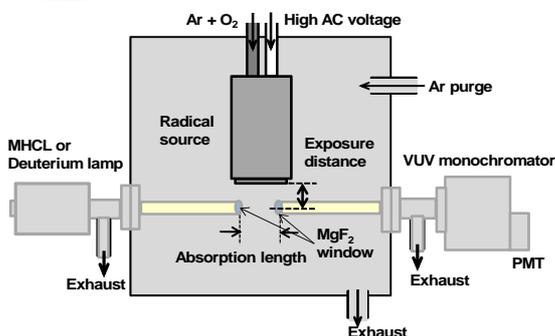


図1 ラジカル源と真空紫外光分光光学系

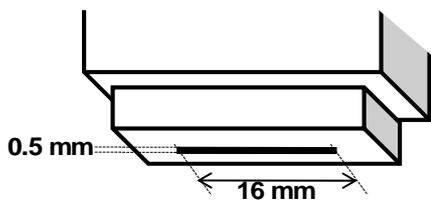


図2 ラジカル源のヘッド部

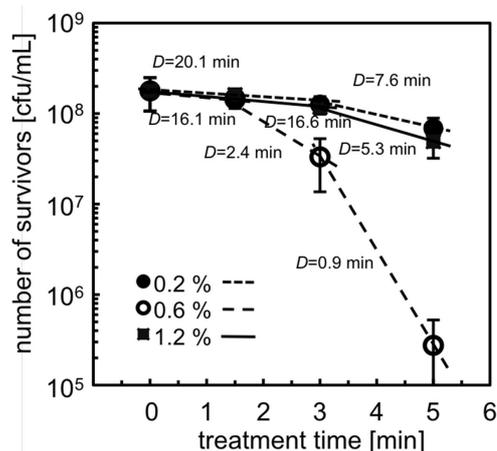


図3 生菌数の酸素流量比依存性

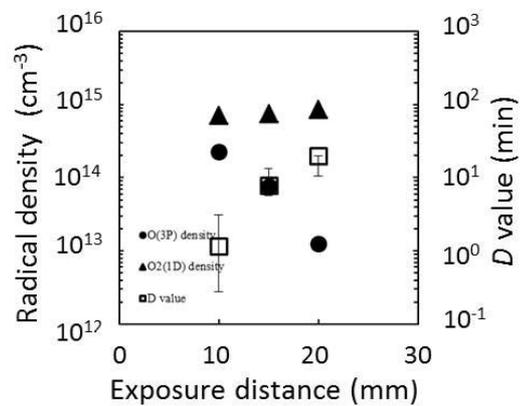


図4  $O(^3P_i)$ 密度,  $O_2(^1D)$ 密度, D 値の照射距離依存性

## (2) ラジカルと菌の階層的反応ダイナミクスのモニタリング装置の開発と解析

中性酸素種がミドリカビ胞子に照射されたとき, 細胞膜などの外側組織の酸化分解あるいは細胞の内部組織が酸化されて死に至ることが考えられる。そこで, ラジカルと菌の階層反応ダイナミクスのモニタリングと解析を目指した。具体的には, ミドリカビ胞子の外側組織の形状変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し, 内部組織を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。また, 時空間相互反応ダイナミクスを解析するため, ラジカルを照射しながらリアルタイムで蛍光観察することが可能なシステムを構築し, 酸素ラジカルのドーズ量に基づくミドリカビ胞子の殺菌過程における作用機序を明らかにすることを旨とした。

図5に大気圧酸素ラジカル源照射後のミドリカビ胞子のSEM像を示す。Arと酸素の混合ガスの総流量を5 l/min, 酸素の流量比を0.6%, 照射距離10 mmとして, ラジカル照射時間を1.5 min, 3 min, 5 min, 7 minとした。照射距離10 mmにおけるO密度は  $2.3 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  であり, ガス流量が10 m/sであることより, 単位面積・単位時間あたりに照射されるOフラックスは  $2.3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  と求められる。このOフラックスと照射時間よりOドーズ量を算出した。図5から, 大気圧酸素ラジカル源照射によって, ミドリカビ胞子の形状変化がないことがわかる。また照射距離10 mmでのD値は1.2 minであることから, 3 min以上は十分殺菌されている照射時間であるが, 酸素ラジカル照射による形状変化がないことがわかる。

細胞内部の超微細構造の変化を観察するため, 酸素ラジカル照射を行ったミドリカビ胞子を, 厚さ80~90 nmの超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) により観察した。図6にミドリカビ胞子の切片のTEM像を示す。未照射の胞子においては, 核やミトコンドリアといった細胞内小器官などが観察された。  $2.1 \times 10^{19}$  や  $4.2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  程度のドーズ量を

処理した孢子においても上記の細胞内部の構造は比較的保たれていた。その一方で、 $7.0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$ 以上のドーズ量においては、酸素ラジカルにより内部の構造が酸化分解されていく過程が観察された。

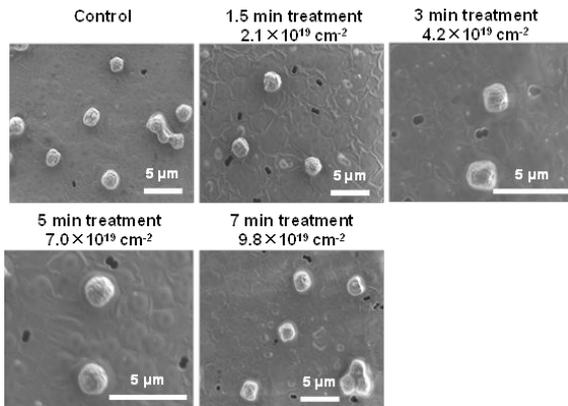


図5 大気圧酸素ラジカル源照射後のミドリカビ孢子の形状

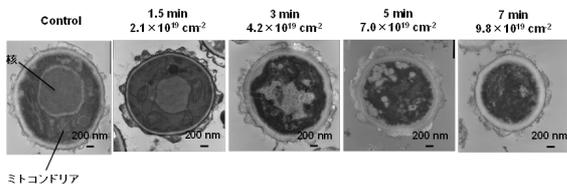


図6 酸素ラジカル照射によるミドリカビ孢子の内部構造の変化

(3) 共焦点レーザ蛍光顕微鏡を用いたミドリカビ孢子の酸化過程のリアルタイム解析  
 酸素ラジカルのドーズ量に基づいたミドリカビ孢子殺菌過程における作用機序を明らかとするため、図7のような、ラジカルを照射しながら蛍光解析が可能なリアルタイム観察システムを構築した。これにより、ミドリカビ孢子の酸化過程をリアルタイム解析することができる。2種類の蛍光色素を用いて解析を行った。1つは 1,1'-di-octadecyl-3,3',3''-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI)である。これは細胞膜などのリン脂質を染色する蛍光試薬で、細胞膜の機能を解析するために用いられる。酸素ラジカルドーズ量に対して、細胞膜機能が障害され、細胞内部に酸素ラジカルが流入する過程を解析した。もう1つの蛍光試薬として、リン脂質が酸化された際に生成される過酸化脂質を染色する蛍光試薬 diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP)を用いて、酸素ラジカルの酸化の度合いの変化を解析した。

図8に未照射および酸素ラジカル照射したミドリカビ孢子の DiI 蛍光像と透過像を、図9に未照射および酸素ラジカル照射したミドリカビ孢子の DPPP 蛍光像と透過像を示す。図8から、未照射の孢子においては細胞膜のみが染色されるが、酸素ラジカル照射した孢子においては細胞内部にも蛍光が観察され

る。すなわち、酸素ラジカル照射により細胞膜の機能が障害され、細胞内部に酸素ラジカルおよび DiI 色素が流入することが示された。図9から、酸素ラジカル照射した孢子のみ蛍光が観察される。すなわち、酸素ラジカル照射により細胞内に過酸化脂質が蓄積することが示された。図10に全孢子数と細胞内部に DiI 染色の蛍光が観察された孢子数から導き出した DiI 細胞内染色率の酸素ラジカルドーズ量依存性を示す。細胞内染色率は、ドーズ量  $2.1 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  で 83%、 $4.2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  で最大値 87% をとり、 $7.0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  以上のドーズ量で 50~60% まで減少した。これは過剰なドーズ量の酸素ラジカルにより、色素とリン脂質との結合部分が損傷したためと考えられる。本結果から、酸素ラジカル  $2.1 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  のドーズ量により、殆どの孢子の細胞膜機能が障害されることが示された。図11にミドリカビ孢子の酸化度合いと生菌数の酸素ラジカルドーズ量依存性を示す。孢子の酸化の度合いは、DPPP 染色された孢子の蛍光強度を数値化することにより算出した。孢子の酸化度合いは  $2.1 \times 10^{19}$  から  $9.8 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  まで増加し、その後飽和した。また、このドーズ量の間には生菌数が急激に減少し、殆どの孢子が殺菌された。この結果から、孢子の酸化度合いと不活化とが相関すること、すなわち孢子の酸化度合いの上昇が、不活化に影響することが示唆された。

以上の結果から、 $2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$  以下の低ドーズ量において、孢子の形態を変化させることなく細胞膜機能を障害する。続いて  $2 \times 10^{19}$  から  $1 \times 10^{20} \text{ cm}^{-2}$  の中程度のドーズ量においては孢子内部の細胞小器官も酸化され、この酸化の度合いの上昇とともに孢子は不活化する。さらに高ドーズ量の処理により細胞内部の構造は完全に崩壊する。



図7 リアルタイム蛍光観察システム

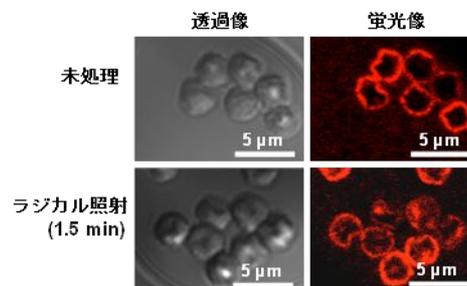


図8 DiI 蛍光像

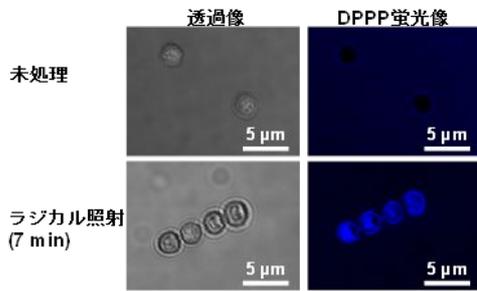


図9 DPPP 蛍光像

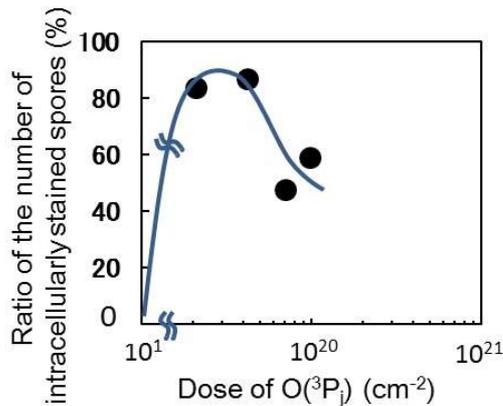


図10 DiI 細胞内染色

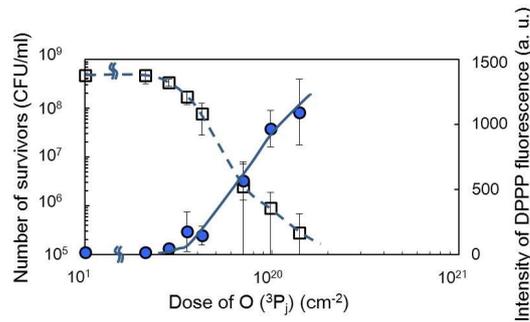


図11 酸化度合いと生菌数

(4) 酸素ラジカル照射量による出芽酵母の増殖促進および抑制効果の制御

細胞は、化学物質や栄養分、熱、放射線など様の刺激の量や強度に応じて生体は様々な応答する。そこで、非平衡大気圧ラジカル源から照射される中性な酸素ラジカルの細胞の活性化に対する効果について、真核生物のモデルとして代表的な出芽酵母を用いて検討した。菌株は *Saccharomyces cerevisiae* W303a を用いた。図12に、未照射と酸素ラジカルを30 s および5 min 照射した酵母細胞において、24, 48, 72 時間後の細胞数の計測結果を示す。未照射の細胞は培養時間とともに増殖した。30 s 照射した細胞は48 時間後において未照射の細胞よりも1.2 倍多く、酸素ラジカル照射により増殖が促進されたことが示された。一方、5 min 照射した細胞では劇的に増殖が抑制された。酸素ラジカル照射のドーズ量によって細胞増殖促進・抑制と様々な効果をもたらすことが示唆された。ここでのドーズ量は(3)までとは異なり、溶

液への照射であるため、全照射量を溶液の堆積 3 ml で割った単位体積当たりのドーズ量 ( $\text{cm}^{-3}$ ) とした。未照射の細胞に対してどの程度増殖が促進または抑制されたかを検討した結果を、図13に示す。照射距離関わらず、およそ  $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$  近傍のドーズ量においては10-20%程度の増殖促進効果を示し、 $3.0 \times 10^{17} \sim 1.0 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$  においては20-30%程度の増殖抑制効果を示した。さらにドーズ量を増やすと50%以上の細胞が殺菌された。以上の結果から、 $\text{O}(^3\text{P}_j)$  が殺菌因子だけでなく、そのドーズ量を制御することで成長促進因子としても作用することが示唆された。

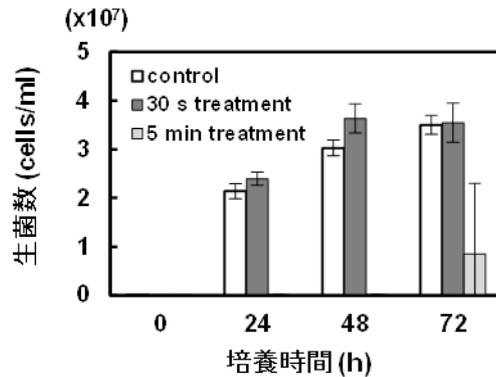


図12 酸素ラジカル照射による細胞数の変化

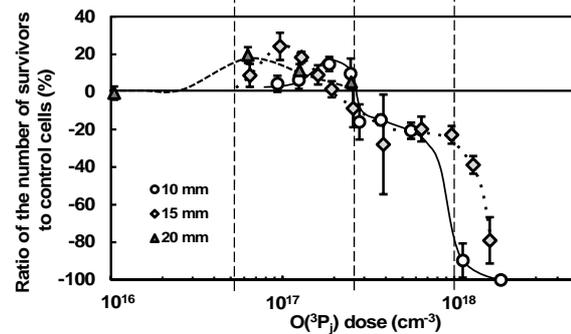


図13 細胞数の  $\text{O}(^3\text{P}_j)$  ドーズ量依存性

参考文献

- [1] Illuminating Engineering society, IES lighting handbook, 2nd ed. :the standard lighting guide ( Illuminating Engineering society, New York, 1952).
- [2] S. Iseki, T. Ohta, A. Aomatsu, M. Ito, H. Kano, Y. Higashijima, M. Hori, Appl. Phys. Lett., 96 153704 (2010).
- [3] H. Nagai, M. Hiramatsu, M. Hori, and T. Goto, Review of Scientific Instruments, 74, 3453 (2003)
- [4] G. Gousset, P. Panafieu, M. Touzeau, and M. Vialle, Plasma Chem., Plasma Process. 7, 409 (1987).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Oxidation mechanism of *Penicillium digitatum* spores through neutral oxygen radicals, Japanese Journal of Applied Physics 53, 010209 (2014). 査読有

K. Takeda, M. Kato, F. Jia, K. Ishikawa, H. Kano, M. Sekine, and M. Hori, Effect of gas flow on transport of O (<sup>3</sup>P<sub>j</sub>) atoms produced in ac power excited non-equilibrium atmospheric-pressure O<sub>2</sub>/Ar plasma jet, J. Phys. D: Appl. Phys. 46, 464006 (2013). 査読有

H. Hashizume, T. Ohta, J. Fengdong, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Inactivation effects of neutral reactive-oxygen species on *Penicillium digitatum* spores using non-equilibrium atmospheric-pressure oxygen radical source, Applied Physics Letters, 103, 153708 (2013). 査読有

H. Hashizume, T. Ohta, T. Mori, S. Iseki, M. Hori, M. Ito, Inactivation Process of *Penicillium digitatum* Spores Treated with Non-equilibrium Atmospheric Pressure Plasma, Japanese Journal of Applied Physics 52, 056202 (2013). 査読有

K. Ishikawa, H. Mizuno, H. Tanaka, K. Tamiya, H. Hashizume, T. Ohta, M. Ito, S. Iseki, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, and M. Hori, Real-time in situ electron spin resonance measurements on fungal spores of *Penicillium digitatum* during exposure of oxygen plasmas, APPLIED PHYSICS LETTERS 101, 013704 (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 246 件)

(Invited)T. OHTA, H. Hashizume, M. Ito, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, Control of cellular activities by oxygen radical treatment, 3B-WS-04, 8th International Conference on Reactive Plasmas /31st Symposium on Plasma Joint International Workshop between Frontier science of interactions between plasmas and nano-interfaces and Plasma medical innovation, Fukuoka, Japan, Feb. 4-7, 2014

(Invited) M. Ito, Plasma microbiology using density-controlled atmospheric-pressure oxygen-radical source, The 3rd International Symposium for Plasma Biosciences (ISPB2013)/2013 International Forum on Functional Materials (IFFM2013), Invited-B05, Korea, June. 27-29, 2013

(Invited) M. Ito, T. Ohta, and K. Takeda, Plasma Agriculture Based on Quantitative Monitoring of Reactions between Fungal Cells and Atmospheric-pressure Plasmas, WW-2.7, 2012 MRS Spring Meeting & Exhibition, USA, Apr. 9-13, 2012.

(招待講演) 太田貴之, 橋爪博司, 伊藤昌文, 竹田圭吾, 石川健治, 堀 勝, ポストハーベストにおける鮮度保持を目指したプラズマ殺菌技術の開発, SV11-5, プラズマ・核融合学会 第 30 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日

〔図書〕(計 1 件)

T. Ohta, M. Ito, M. Hori, 3.5 節 Disinfection of Fungi by Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma (分担). Sterilization and Disinfection by Plasma: Sterilization Mechanisms, Biological and Medical Applications (Editors: Akikazu Sakudo, Hideharu Shintani), Nova Science Publishers, Inc., NY, USA, ISBN: 978-1-61668-782-3

〔産業財産権〕

出願状況 (計 10 件)

名称: 滅菌表示装置および滅菌装置および青果物表皮の殺菌方法

発明者: 伊藤昌文, 太田貴之, 橋爪 博司, 堀 勝, 石川健治,

権利者: 名古屋大学, 名城大学

種類: 出願

番号: 特願 2012-037940

出願年月日: 2012.2.23

国内外の別: 国内

取得状況 (計 3 件)

名称: 干渉測定装置および測定方法

発明者: 堀 勝, 伊藤昌文, 東島康裕, 太田貴之

権利者: 名古屋大学, 名城大学, NUシステム

種類: 登録, 番号: 5397817 号

取得年月日: 2014 年 11 月 1 日

国内外の別: 国内

〔その他〕ホームページ

<http://www.meijo-u.ac.jp/labo/ito/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 昌文 (Ito Masafumi)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号: 10232472

(2) 研究分担者

太田 貴之 (Ohta Takayuki)

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号: 10379612

(3) 連携研究者

竹田圭吾 (Takeda Keigo)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号: 00377863