

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13923

研究課題名(和文) 波形重畳高電圧パルス制御による菌類の分離・培養の一元化技術の創成

研究課題名(英文) Development of separation and cultivation of microorganism by using super-imposed pulsed-power devices

研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI, TORU)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90514018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧プラズマやパルスパワーを組み合わせることで細胞に対するストレスを制御することで、菌類への処理効果を検討し、有益な菌類を選択的に成長させ、弁別、回収できるプロセスを構築するための基盤的な知見を得るため、波形重畳型パルスパワー電源を開発し、菌類に与える影響を調査した。その結果、パルス列の数に応じて大腸菌が増殖する場合があります。化合物などの影響については小さいことが明らかとなった。これらのことから大気圧プラズマやパルスパワーを組み合わせることで菌類へ照射することで有益な菌類を選択的に成長させ、弁別、回収するための新たなプロセスを構築できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated effects of atmospheric pressure plasma generated by superimposed voltage waveform pulsed-power supply on treatment of Escherichia coli (E.coli). The growth rate of E.coli is evaluated with a measurement of optical density. The results show that the growth rate of E.coli with the irradiation of atmospheric pressure plasma without superimposed voltage waveform decreases. On the other hand, the growth rate of E.coli with the irradiation of atmospheric pressure plasma with superimposed voltage waveform is similar to the control condition. These results suggest that the irradiation of atmospheric pressure plasma with superimposed voltage waveform affects the growth rate of E.coli.

研究分野：パルスパワー工学

キーワード：パルスパワー放電 大気圧プラズマ 菌類 増殖率

1. 研究開始当初の背景

菌類などの微生物は、受けるストレスの種類や強度に対してそれぞれ異なる応答をとる。微生物のストレスには電気刺激・酸化・放射線などが挙げられ、過度のストレスはDNA・脂質・蛋白質を変質させ、重大な細胞機能障害を引き起こす。その一方で、軽度のストレスが与えられた場合には、細胞機能が活性化されることがある。細胞の分化・増殖の機能に参与するMAPキナーゼなどの生体物質が刺激を受けると、細胞は生体にとって防御的な応答をとり、積極的に細胞の分化・増殖を行うようになる。このため、細胞に対するストレスは微生物の活性化・不活性化の両面に作用すると考えられる。これらのストレスを与える手法として、近年、パルスパワー放電大気圧プラズマ照射を用いて細胞の不活化を促す方法がある。

パルスパワー放電は、パルスパワー装置の制御性を利用して、電氣的に細胞に刺激を与える方法である。その中でバーストパルスパワー放電では、細胞を形成している水や細胞膜の誘電応答関数に対応するバーストパルスを印加して、細胞内に分極を引き起こす。この結果、細胞に臨界電界値以上の電界を細胞に与えることで電気穿孔効果を得られ、細胞膜の透過率が上昇して細胞膜内外で物質の交換が可能となる。そのため、細胞内に物質を導入して不活化を誘導することができる。また、パルス放電を印加することで、キノコ等の増産の実績等もある。

一方、大気圧プラズマは、真空装置が不要であり、高密度な活性種を生成できること、簡便な放電装置によって容易に生成できることから、様々な細胞に対する照射効果が検討されている。大気圧プラズマの照射効果の主な作用としては、大気圧プラズマ生成時に発生する窒素酸化物やOHラジカル、オゾン等が細胞に作用することで、不活化を促すことが明らかとなっている。しかしながら、これらの化合物が細胞へどのように作用するか、またその経路については十分に明らかになっていない。上記の通り、大気圧プラズマやパルスパワー放電等を併用することにより菌類への不活化に対する効果は明らかになっているが、細胞のストレス応答と言う観点を検討することが必要である。

2. 研究の目的

大気圧プラズマやパルスパワーを組み合わせ細胞に対するストレスを制御することで、活性化あるいは不活性化の両面から新しい技術が構築できると考えられる。本稿は、細胞膜への化合物導入を行うため高周波電磁パルスを導入し、同時に発生する大気圧プラズマによるラジカル生成を併用することで、菌類への処理効果を明らかにすることが目的である。そのため、任意の電圧波形を形成できるパルスパワー電源を用いて生成した大気圧プラズマを照射したときの菌の処

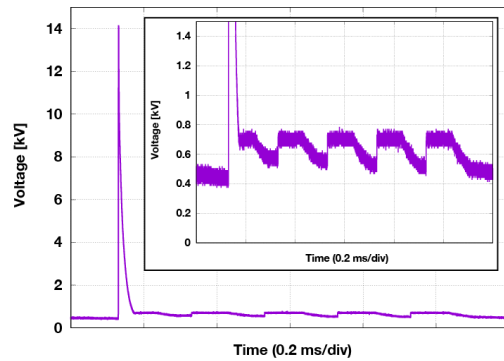


図1 電圧波形重畳型パルスパワー電源により発生した典型的な電圧波形

理効果と電圧波形との関係を評価し、菌類への処理効果を検討し、本手法により有益な菌類を選択的に成長させ、弁別、回収できるプロセスを構築するための基盤的な知見を得ることが目的である。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、電圧波形重畳型パルスパワー電源を開発し、それによって発生した大気圧プラズマを照射することで、その影響を検討した。

電圧波形重畳型パルスパワー電源は、高電圧MOS-FETを用いた半導体マルクス回路により出力を得ており、高電圧パルスと低電圧パルスを発生させるユニットと制御ユニットから構成されている。

高電圧パルスユニットは、1つの基板で3.3 kVの出力が得られ、それを6段直列に構成することで、最大20 kV、200 nsのパルス電圧が得られる。また、低電圧パルスユニットは最大6 kV、1 msのパルス電圧が得られる。低電圧パルスユニットの波形制御にはパワーMOS-FETにファンクションジェネレータの信号を投入することで動作させ、任意のタイミングでスイッチングを行っている。高電圧パルスユニットの出力と低電圧パルスユニットの出力を組み合わせることで、任意の波形重畳パルスを形成することができる。

図1に典型的な電圧波形重畳型パルスパワー電源の出力波形を示す。まずはじめに、14 kV-200 nsのパルス電圧を投入し、その後、800 V-0.5 msの低電圧パルスを発生させる。このときの低電圧パルスは、ファンクション

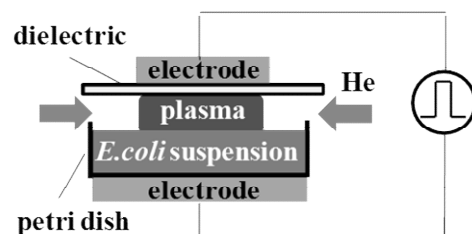


図2 誘電体バリア放電型大気圧プラズマ照射装置の装置構成図

ジェネレータにより切り出している。このような波形を利用することで、初期に短パルス高電圧を印加することで大気圧プラズマを発生させ、その後続くパルス列によって生成された大気圧プラズマの維持と電気穿孔効果が誘導できると考えられる。このため、本実験では、短パルス電圧のみの場合の照射効果と短パルス電圧に重畳電圧を加えた場合の照射効果を比較することで、その影響を検討した。

図 2 は誘電体バリア放電型大気圧プラズマ照射装置の装置構成図を示す。本実験装置は電圧波形重畳型パルス電源、電極、誘電体、シャーレ、作動ガスから構成される。上部電極、下部電極にはそれぞれ 30 mm×30 mm×20 mm、60 mm×25 mm のアルミニウム製電極を、誘電体には 200 mm×100 mm×1 mm のアルミナ製の誘電体を使用した。また、照射時に用いたシャーレはポリスチレン製で 57 mm×h 16 mm である。

誘電体と大腸菌懸濁液の間には He ガスを 5 L/min で導入し、そこへ高電圧を印加することで大気圧プラズマを発生させる。対象とする菌には、大量培養・長期保存が可能であり、取り扱いが比較的簡単である大腸菌を用いた。大腸菌には K-12 株 (NBRC 3301, 独立行政法人製品評価技術基盤機構) を使用した。また、大腸菌の培養液には LB 培地 (Bacto-tryptone 10 g/L, Bacto-yeast-extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) を使用した。大腸菌の培養液に大腸菌をいれて大腸菌懸濁液を調整した。このため、大腸菌懸濁液にプラズマが照射される構造になっており、誘電体と大腸菌懸濁液の間は約 12 mm とし、懸濁液の深さは 7mm となっている。

大腸菌懸濁液の菌濃度は濁度測定 (Optical Density : O.D.) により評価し、生菌数はコロニーカウント法により評価を行った。

4. 研究成果

プラズマを生成するための印加電圧波形には、(1) 最大値 14 kV, パルス周波数 800 pulse/s の高電圧パルス電圧と (2) 最大値 14 kV, パルス周波数 800 pulse/s の高電圧パルス電圧に加えてピーク電圧 0.8kV, パルス幅 0.05ms のパルス電圧を 5 パルス重畳したものを使用した。これらの印加電圧波形により生成した大気圧プラズマを大腸菌懸濁液に照射し、大腸菌の倍加時間への影響を評価した。プラズマの照射時間を 30 分間、実験の試行回数を 6 回とした。

図 3 は、未処理の大腸菌とプラズマ照射後の大腸菌の増殖特性を比較した結果である。なお、図中の横軸はプラズマ照射直後を 0 h としたときの大腸菌の培養時間を示している。また、縦軸はプラズマ照射直後の大腸菌数を 1 と規格化したときの数を示している。そのため、図 3 の傾きは大腸菌の比増殖速度を表わしている。図 3 より、高電圧パルスのみを印加してプラズマを照射した場合、未処

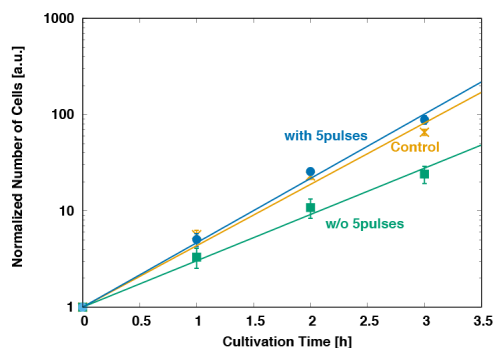


図 3 未処理の大腸菌とプラズマ照射後の大腸菌の増殖特性

理時の大腸菌と比較して大腸菌の比増殖速度が減少していることがわかる。また、このときプラズマの照射有無に対して大腸菌の増殖率に有意な差があることを確認するため、両側 T 検定により判断した。その結果、有意水準 5% でその差は有意であることが示された。一方、高電圧パルスに加えて 5 パルスの重畳電圧を用いた場合には、未処理時の大腸菌と比較して大腸菌の比増殖速度が増加していることがわかる。また、高電圧パルスのみを印加した場合と、重畳型圧を用いたそれぞれの場合で大腸菌の増殖率の差が有意な差であるかを両側 T 検定により判断した。その結果、その差は有意水準 5% で有意差であることが示された。

次に、大腸菌の増殖率から倍加時間を見積り、プラズマ照射による影響を評価した。Fig. 6 にプラズマ照射時の 3 時間培養後の大腸菌の増殖率 (=3 時間培養後の菌体数 / 初期菌体数) を示している。図 4 より、プラズマを照射しない場合の大腸菌の増殖率の平均値は約 65 倍程度となった。この結果より、(1) 式と (3) 式を用いて倍加時間を算出すると、30 分となることがわかる。一般的に大腸菌の増殖率の倍加時間は培養環境にも依存するが同条件の倍加時間は 20~30 分であり、プ

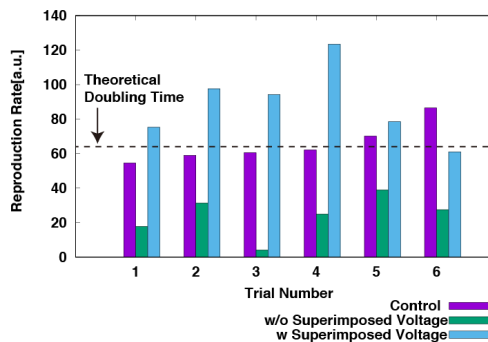


図 4 プラズマ照射時の 3 時間培養後の大腸菌の増殖率 (=3 時間培養後の菌体数 / 初期菌体数)

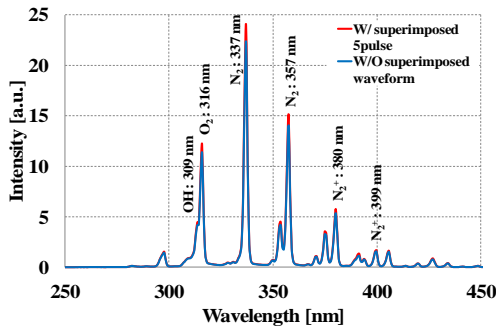


図 6 高電圧パルス印加プラズマ照射時，5pulses 重畳型プラズマ照射時の発光スペクトルの変化

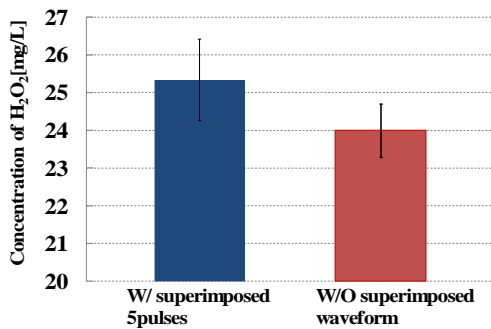
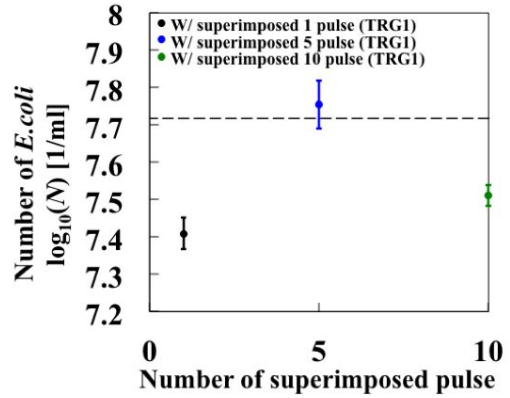


図 7 無重畳プラズマ照射時，5pulses 重畳型プラズマ照射時の過酸化水素濃度

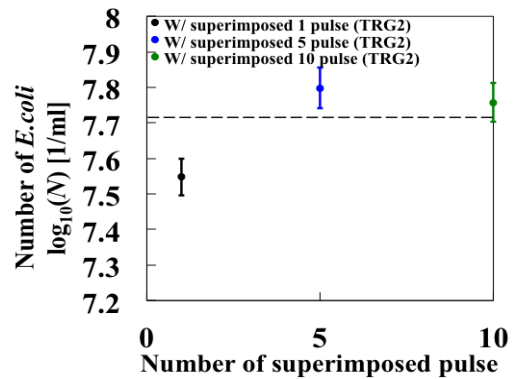
プラズマ未照射の大腸菌の比増殖速度は概ね一致している。一方，高電圧パルスのみを印加してプラズマを照射した場合，大腸菌の増殖率の平均値は約 25 倍程度となった。この増殖率の平均値から大腸菌の倍加時間を算出すると約 40 分となった。この結果から，高電圧パルスのみを印加してプラズマを照射した場合には大腸菌の増殖率が抑制されることがわかる。高電圧パルスに 5 パルスの重畳電圧を印加してプラズマを照射した場合，大腸菌の増殖率の平均値は約 88 倍となった。この増殖率から大腸菌の倍加時間を算出すると約 27 分となった。

これらの結果から，高電圧パルスのみを印加して発生したプラズマを照射した場合，未照射の条件に比べて倍加時間が低下し，菌体数が減っていることから大腸菌の増殖が阻害されることが明らかとなった。一方，高電圧パルスに加えて 5 パルスの重畳電圧を用いた場合には，高電圧パルスのみを用いた場合に比べて大腸菌の処理効果が変化し，大腸菌が未照射に比べて増加していることが明らかとなった。

図 6 に高電圧パルス印加プラズマ照射時，5pulses 重畳型プラズマ照射時の発光スペクトルの変化を示す。この結果より，高電圧パルス印加と 5 パルス重畳電圧印加した場合のプラズマの発光スペクトルには，窒素分子からの発光が主に見られたが，スペクトル強度には大きな違いが見られなかった。このため，発生したプラズマには大きな違いがないものと考えられる。



(1)重畳電圧 2.8kV



(2)重畳電圧 5kV

図 8 重畳パルス数及び重畳電圧値に対する菌体数の依存性

次に，培養液の変化を評価するため，pH 計 (HORIBA, D-51) を用いて，プラズマ照射後の pH 値を測定した。大腸菌懸濁液の容量は 15 mL，プラズマ照射時間は 30 分間とし，大腸菌に照射した場合と同じ条件とした。その結果，未照射時の pH は 6.62，無重畳プラズマ照射時の pH は 6.56，5pulses 重畳型プラズマ照射時の pH は 6.47 となった。このため，プラズマの照射時間に対して pH は変化するものの，大腸菌は，比較的酸性に耐性を有していることから，これらの影響は極めて小さいものであると考えられる。

また，殺菌に寄与する OH ラジカルの生成量が電圧重畳の有無に依存するかどうかを調べた。OH ラジカルから生成される過酸化水素濃度を計測するため，デジタルパックテスト (株式会社共立理化学研究所, DPM-H202C) を用いて，大腸菌懸濁液へプラズマ照射した時の過酸化水素濃度を測定した。このときの実験条件も大腸菌に照射した場合と同じ条件とした。図 7 は無重畳プラズマ照射時，5pulses 重畳型プラズマ照射時の過酸化水素濃度を測定した結果を示している。図 7 より，無重畳プラズマ照射時の過酸化水素濃度の平均値は 24 mg/L，5pulses 重畳型プラズマ照射時では 25 mg/L となった。プラズマ照射

によって生成される過酸化水素の濃度はパルス電圧の重畳に関係なくほぼ同程度となった。

これらのことから、培養液の性質に対しては電圧波形の重畳の有無について差異がないことが明らかとなった。また、プラズマを発生させずに電圧波形を重畳したパルスを印加した場合でも大腸菌の増殖率に変化が確認されなかった。このため、大腸菌の増殖率が変化した要因は特定に至っていないが、発生した大気圧プラズマと波形重畳電圧の相補的な影響により大腸菌の増殖率に変化を与えたものと考えられる。

最後に電圧値の影響と重畳パルス数の影響を評価した。図8は重畳パルス数及び重畳電圧値に対する菌体数の依存性を示したものである。その結果、重畳パルス数を変化させることで菌の増殖に対して影響を与えていることが確認できる。また、電圧値によっても菌数に違いが現れていることから、これらの影響を異なる菌に対する影響を引き続き検討することで、波形重畳型パルスパワー放電法を用いた大気圧プラズマ照射法を用いて、有益な菌類を選択的に成長させ、弁別、回収できるプロセスを構築できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) 佐々木 徹, 樋田 了, 伊藤 諒, 近藤 裕樹, 高橋 一匡, 菊池 崇志, 原田 信弘, 大沼 清, 「波形重畳型パルスパワー装置生成誘電体バリア放電による大腸菌の増殖率の検討」, 電気学会論文誌 A, **137**, pp.328-333 (2017)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 佐々木 徹, 樋田 了, 伊藤 諒, 近藤 裕樹, 高橋 一匡, 菊池 崇志, 原田 信弘, 大沼 清, 「電圧波形重畳型パルスパワー電源を用いて生成した大気圧プラズマ照射による大腸菌の処理効果の検討」, 電気学会 A 部門大会, 18-E-p1-4 (2015.9) 金沢大学角間キャンパス
- (2) 伊藤 諒, Bhudit Wipasvong, 大沼 清, 高橋 一匡, 佐々木 徹, 菊池 崇志, 原田 信弘, 「波形重畳型パルスパワー電源を利用した大気圧プラズマによる大腸菌の増殖率と重畳波形の関係」, 第 33 回プラズマ・核融合学会年会, 30aP07, (2016.11) 東北大学青葉山キャンパス
- (3) 伊藤 諒, Wipasvong Bhudit, 大沼 清, 高橋 一匡, 佐々木 徹, 菊池 崇志, 原田 信弘, 「大気圧プラズマ照射中の電圧制御による大腸菌の増殖速度の変化」, 電気学会全国大会, 1-125 (2017.3) 富山大学

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://mhdlab.nagaokaut.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI, Toru)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90514018

(2) 研究分担者

大沼 清 (OHNUMA, Kiyoshi)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50396834