

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14208

研究課題名(和文) プラズマ殺菌の原理解明に向けた活性種の殺菌力の計測

研究課題名(英文) Measurement of bactericidal effects by reactive species for sterilization using plasma

研究代表者

小野 亮 (Ono, Ryo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90323443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放電プラズマを用いた医療や水処理におけるプラズマ殺菌では、プラズマで生成されるOHなどの活性種が殺菌を起こしていると考えられている。しかし、OHのような短寿命活性種による殺菌効果を直接計測した例はまだない。本研究では、申請者が開発した、真空紫外光の光解離反応で特定の活性種を選択的に生成し菌に照射する手法を用いて、寒天培地上の枯草菌および大腸菌に対するOHラジカル、オゾン、H₂O₂の殺菌効果を定量的に測定した。そして、各活性種の殺菌効果や菌種による殺菌効果を比較した。さらに本手法で生成される活性種密度を計測し、本手法で活性種密度を計算するシミュレーションの精度の検証も行った。

研究成果の概要(英文)：In the sterilization using discharge plasma including plasma medicine and water treatment, reactive species such as OH radicals are considered to cause the sterilization. However, the bactericidal effects by those short-lived reactive species including OH radicals have not been directly measured. In this study, we quantitatively measured the bactericidal effects by OH radicals, ozone, and H₂O₂ on *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* using the method we have developed, which selectively produces specific types of reactive species using photolysis by vacuum ultraviolet light. Then, we compared the bactericidal effects by OH, ozone, and H₂O₂, and the bactericidal effects on the two types of bacteria. In addition, we measured the densities of reactive species produced by this method to verify the reliability of the simulation which calculates the densities of reactive species of this method.

研究分野：プラズマ応用工学

キーワード：sterilization discharge plasma reactive species vacuum ultraviolet photolysis plasma medicine

1. 研究開始当初の背景

放電プラズマに殺菌効果があることが、古くから知られている。例えばプラズマで水中の殺菌を行う水処理など、プラズマの殺菌効果を利用した応用研究が広く行われている。近年盛んに研究されているプラズマ医療でも、その中の創傷治療においては、プラズマによる殺菌が重要な要素となっている。このように、プラズマによる殺菌は応用面での研究が盛んに進められている。しかし一方で、プラズマの何が殺菌効果を発揮しているのか、原理解明が遅れているのが現状である。プラズマ医療による創傷治療は、海外ですでにヒトを対象とした臨床試験が始まっているが、その実用化には、プラズマ殺菌の原理解明が重要である。

プラズマ殺菌では、プラズマで生成される OH ラジカル、O ラジカル、オゾン、 H_2O_2 などの活性種に殺菌作用があると考えられている。オゾンや H_2O_2 など、比較的安定な化学種による殺菌効果の計測はある程度研究が進んでいるが、OH ラジカルや O ラジカルなど、寿命が 1 ms 以下と短い活性種の殺菌効果は測定するのが容易ではなく、研究はあまり進んでいないのが現状である。

このような短寿命活性種による殺菌効果を測定するには、その活性種のみを選択的に生成して菌に照射する必要がある。あるいは、その活性種の密度のみを変化させて照射する実験を行い、殺菌効果との相関を調べる必要がある。しかし、プラズマ中には数 10~100 種類以上もの活性種が存在するため、例えば OH ラジカルだけを生成する、あるいは OH ラジカルの密度だけを選択的に変化させることは困難である。以上の理由から、短寿命活性種の殺菌効果を分離して測定する手法は、必要とされながらも実現していないのが現状であった。

本研究では、このような短寿命活性種の殺菌効果を測定する手法として申請者が開発した、VUV (vacuum ultraviolet: 真空紫外光) 法を用いた研究を行う。VUV 法は、活性種をプラズマで生成するのではなく、真空紫外光による光解離反応で生成する手法である。電子衝突反応を主体とし、反応経路が極めて複雑なプラズマに比べて、VUV 法はシンプルな光解離反応を用いるため、生成される活性種密度をシミュレーションで比較的容易に計算できる。また、生成される活性種の種類が 10 種類以下と少ないため、特定の活性種の効果を分離して測定することができる特徴を有する (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では、(1) VUV 法を用いた活性種の殺菌効果の計測および、(2) VUV 法の精度向上を目指した VUV 法のシミュレーションの検証を行う。

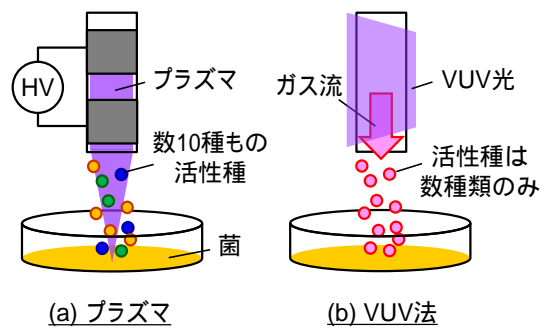


図1 プラズマと VUV 法の比較

(1) 活性種の殺菌効果の計測

殺菌効果の計測では、プラズマ殺菌でも特に重要と考えられている OH ラジカルを短寿命活性種の代表として取り上げ、OH ラジカルの複数種の菌に対する殺菌効果の測定を行う。さらに、比較的殺菌効果の研究が進んでいるオゾンおよび H_2O_2 の殺菌効果も VUV 法で測定し、OH ラジカルによる殺菌効果との比較を行う。このように、短寿命活性種による殺菌効果を直接測定した研究はこれまでに例がなく、本研究により OH ラジカルによる殺菌効果が初めて定量的に明らかになる。これまでプラズマの分野では、OH ラジカルに強い殺菌効果があると漠然と想像されてきたが、これを定量的に評価する意義は大きい。また、本手法で O_3 や H_2O_2 など複数の活性種の殺菌効果を定量的に比較できることを示し、活性種の殺菌効果を調べる上で有用なツールであることを実証する。

(2) シミュレーションの検証

VUV 法のシミュレーションの検証では、VUV 法で生成された活性種密度を計測し、シミュレーションで計算された活性種密度と比較する。VUV 法では、活性種の密度をシミュレーションで計算するため、VUV 法による殺菌効果検証の精度を向上させるには、シミュレーションの精度向上が不可欠である。

3. 研究の方法

最初に VUV 法の原理および実験装置について説明し、次に具体的な実験方法について述べる。VUV 法の原理を図 2 に示す。石英管に加湿したアルゴンあるいはヘリウムガスを流し、そこに Xe_2 エキシマランプで波長 172 nm の VUV 光を照射する。 H_2O 分子は 172 nm における光解離断面積が大きいので、VUV 光を照射すると一部が $H + OH$ に光解離する。この H と OH がさらに化学反応を繰り返し、 HO_2 、 H_2O_2 などの活性種も生成され、これら活性種の混合ガスが空气中に置かれた菌に照射される。

VUV 法の光解離反応と化学反応は容易にシミュレーションでき、また本手法は石英管内の一次元層流流れを用いるため、極めて簡単な一次元シミュレーションで活性種密度を計算できる。シミュレーションを併用しな

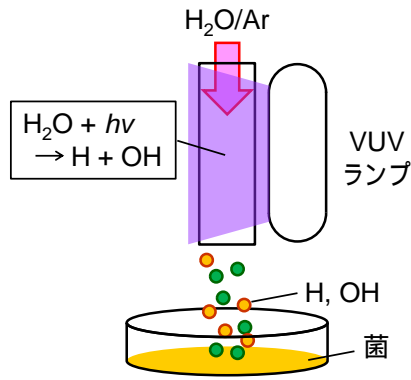


図2 VUV法の原理

から実験条件を変化させると、殺菌効果を測定したい活性種、例えばOHラジカルの密度だけを選択的に変化させて菌に照射することができる。このときの殺菌率と活性種密度の関係を調べることで、活性種の殺菌力を定量的に測定することができる。

石英管に流すガスをAr/H₂OからAr/O₂に置き換えると、O₂分子が光解離してO, O₃, O₂(a), O₂(b)など、O₂由来の活性種を生成し、菌に照射することもできる。本研究では、この2種類のガスを用いた実験を行う。

次に、具体的な実験について説明する。

(1) 活性種の殺菌効果の計測

寒天培地上に培養した菌に、VUV法で生成した活性種を照射して殺菌する。複数種の菌に対する活性種の効果を比較するため、以下の2種類の菌を用いる。

- ・ 枯草菌 *Bacillus atrophaeus*: ATCC 9372
- ・ 大腸菌 *Escherichia coli*: NBRC 3301

石英管に流すガスの組成、ガス流量、およびVUV光照射領域から菌までの距離を様々な条件に変化させることで、OHラジカル、H₂O₂、オゾンそれぞれの効果を分離して測定する。そして、これら活性種の殺菌効果を定量的に評価し、比較する。

(2) シミュレーションの検証

本VUV法では、OH, H, HO₂, H₂O₂, O, O(¹D), O₂(a), O₂(b), O₃の9種類の活性種が生成される。また、副生成物としてO₂とH₂も生成される。本研究では、この中からOH, O₃, H₂O₂, O₂(a), O₂(b)の密度を測定し、シミュレーションの結果と比較検証する。

OHの密度はレーザー誘起蛍光法(LIF: laser-induced fluorescence)で測定する。波長282nmの波長可変色素レーザーでOHのA-X(v' = 1, v'' = 0)バンドのQ₁(4)ブランチを励起し、励起OHから生じる蛍光を測定する。

O₃の密度は紫外線吸収法で測定する。長さ10cmの石英セルにO₃を含むガスを流し、そ

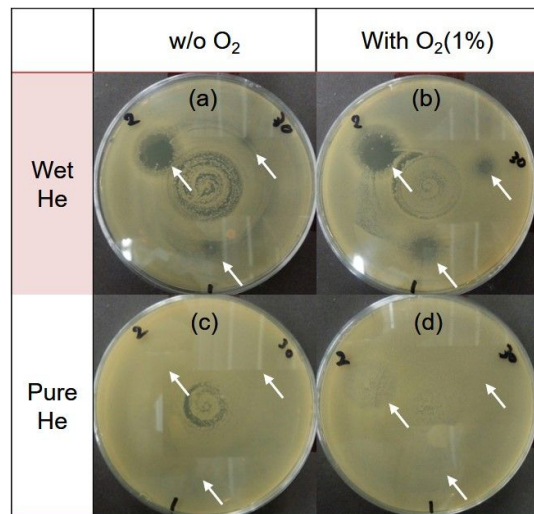


図3 枯草菌の殺菌実験の結果。論文(R. Ono et al., Journal of Physics D: Applied Physics, 49, 305401, 2016)より引用。

こに低圧水銀ランプの253.7nmのUV光を照射してO₃による吸収率を測定する。その吸収率からO₃密度を測定する。

O₂(a)の密度は発光分光計(OES: optical emission spectroscopy)で測定する。O₂(a)は準安定励起準位のためほとんど発光を生じないが、ごくわずかに基底準位への遷移a → Xで1.27μmの発光を生じる。この極めて微弱な赤外光を、フォトンカウンティング法で測定する。

H₂O₂およびO₂密度は、市販の測定器で測定する。いずれもppmオーダーの密度を測定することができる。

4. 研究成果

(1) 活性種の殺菌効果の計測

枯草菌の殺菌実験を行った結果の一例を図3に示す。この実験では、He、加湿He、He/O₂、加湿He/O₂の4種類のガスを用いた。各ガスについて、菌への照射時間を30秒、1分、2分の3通りで行った。最初にHeと加湿Heを比較すると、加湿Heでのみ殺菌が起きている。H₂O由来のOH, H, H₂O₂, HO₂のいずれかが殺菌していることを示している。一方、He/O₂では殺菌が起きていないため、O₂由来の活性種O, O(¹D), O₂(a), O₂(b), O₃の殺菌は観測されていないことが分かる。次に加湿Heと加湿He/O₂を比較すると、どちらも同程度の殺菌が生じている。シミュレーションで活性種密度を計算すると、この両方で活性種密度がほぼ等しいのはOHとH₂O₂のみである。加湿HeにO₂を加えると、HとO₂が反応してHO₂が生成されるため、HとHO₂密度は大きく変化する。これより、図3の殺菌を生じているのはOHかH₂O₂となる。この他に、

VUV ランプ照射領域から菌までの距離を延ばして、寿命の短い OH を枯渇させて H₂O₂ のみを照射した実験では、殺菌はまったく生じなかった。以上より、図 3 の殺菌は OH ラジカルによるものであると結論できる。

図 3 の実験条件における OH 密度は、シミュレーションおよび LIF 計測で求めることができる。両者の方法で OH 密度を求めると、その差は高々 20% 程度で良い一致を示した。この OH 密度と殺菌率を比較すると、OH 密度 (cm⁻³) × 照射時間 (s) の積を指標として 10¹³ s/cm³ のオーダーで OH を照射したときに、視認できる程度の殺菌が生じることが分かった。本実験により、短寿命活性種による殺菌効果の定量的な計測に初めて成功し、その成果は Journal of Physics D: Applied Physics に掲載された。

同様に O₃ と H₂O₂ による殺菌効果も測定し、OH による殺菌効果と比較した。その結果、OH には O₃ の少なくとも 20 倍以上、H₂O₂ の数 10 ~ 100 倍以上の殺菌効果があることが分かった。

同様の実験を、枯草菌の他に大腸菌に対しても行った。その結果、OH に関しては、枯草菌と大腸菌でほぼ同程度の殺菌効果が得られた。

(2) シミュレーションの検証

OH ラジカルの密度については先に述べたように、加湿 He を用いた場合において、20% 程度の誤差で LIF 測定結果とシミュレーション結果が一致した。H₂O₂ 密度も、加湿 Ar において、こちらも 20% 程度の誤差で一致した。O₃ は Ar/O₂ および加湿 Ar/O₂ において、10% 程度の誤差で一致した。以上 3 つの活性種においては、このようにシミュレーションは計測結果を良い精度で再現することができた。

O₂(a) 密度については、シミュレーション結果が測定結果よりも 3 ~ 5 倍程度小さくなった。この誤差の原因の一つは、OES 計測の密度較正の誤差に起因する。しかし本研究では時間の制約から、密度較正の誤差を検証するところまではいかなかった。この他、シミュレーションの誤差要因を解明するために、O₂(a) の反応と関連の深い O₂(b) の OES 計測も行うことが検討された。しかしこちらも時間の制約から、実施には至らなかった。

加湿 He10 を用いると、ppm オーダーの微量の O₂ が生成される。また、最初から ppm オーダーの O₂ を混ぜておくと、活性種との反応で O₂ が減少する。後者の現象について O₂ の計測を行ったところ、O₂ の減少を予想していたが、反対に O₂ がわずかに増加する傾向がみられた。本研究では、この不一致の原因を究明するために多くの時間をとられたが、結局原因は不明のままであった。VUV 法の今後の課題である。

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 5 件)

Y. Inoue and R. Ono, Measurement of singlet delta oxygen in an atmospheric-pressure helium-oxygen plasma jet, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 50, No. 21, 2016, 214001

DOI:10.1088/1361-6463/aa6c53

R. Ono, K. Yonetamari, Y. Tokumitsu, S. Yonemori, H. Yasuda, and A. Mizuno, Inactivation of Bacillus atrophaeus by OH radicals, 査読有, Vol. 49, No. 30, 2016, 305401

DOI:10.1088/0022-3727/40/30/305401

[学会発表](計 38 件)

R. Ono, A. Iwase, and H. Ishizaki, Supply of reactive species onto liquid surface produced using vacuum ultraviolet photolysis and measurement of their effects on liquid treatment, The 10th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing, 2017 (招待講演)(国際学会)

M. Kawanobe, A. Iwase, and R. Ono, Measurement of density and sterilization effect of specific reactive species with the aid of vacuum ultraviolet photolysis, International Conference on Plasma Medical Science Innovation 2017, 2017 (国際学会)

岩瀬 篤郎, 小野 亮, 真空紫外光を用いた OH の殺菌効果の検証と定量化, 2017 年度静電気学会春期講演会, 2017

M. Kawanobe, K. Yonetamari, Y. Shirakawa, and R. Ono, Measurement of the medical effect of specific reactive species with the aid of vacuum ultraviolet photolysis, 21st International Conference on Gas Discharges and Their Applications, 2016 (国際学会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 亮 (ONO, Ryo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 9 0 3 2 3 4 4 3