

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630104

研究課題名(和文) 周辺水蒸気を原料とした促進酸化反応によるバイオフィーム除去システム

研究課題名(英文) Bilfilm removal with advanced oxidation using atmospheric plasma in wet air

研究代表者

安岡 康一 (Yasuoka, Koichi)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：00272675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品や医薬品工場また医療現場では、菌の集合体であるバイオフィームによる壁・床・装置などの表面汚染が課題であり、安全で強力な殺菌方法が求められている。本研究ではプラズマを使ってヒドロキシラジカルを作り、その強力な酸化力で殺菌することを目的とした。大気圧プラズマに加湿空気を供給することでオゾンと過酸化水素を生成し、さらに両者の反応よりヒドロキシラジカルを生成した。さらにこの方式により緑膿菌バイオフィームの菌数を1000分の一以下に低下させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：A biofilm is a layer of microorganisms which forms on surfaces of wall, floor or inner surface of devices used in food or medical industries. Effective and safe methods of biofilm removal need to be developed. We proposed a plasma device that produces hydroxyl radicals which can penetrate into biofilm and kill bacteria. The device generated ozone and hydrogen peroxide by feeding wet air. These substances produced hydroxyl radicals on a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and 99.9% of bacteria were successfully killed.

研究分野：プラズマ工学

キーワード：バイオフィーム 促進酸化 ヒドロキシラジカル 過酸化水素 オゾン

1. 研究開始当初の背景

様々な滅菌薬や滅菌装置が開発されているが、それらへの耐性を備えた菌の発生が後を絶たない。このため多様な滅菌法が開発されているが、人体に有害な薬液を必要とせず、かつバッチ・連続処理のどちらにも対応できるプラズマ滅菌法が注目されている。

プラズマ滅菌研究は1990年代後半から開始され、減圧空気中の低気圧プラズマが先行して滅菌効果を実証された。ただし真空排気装置を必要としバッチ処理に限定される課題があるため、大気圧プラズマ方式の開発が進んだ。本研究の殺菌対象であるバイオフィームは種々の菌の集合体で強固な膜によって内部の菌を覆っている。大気圧プラズマ方式はバイオフィーム表面の殺菌には適すが内部の殺菌は困難だった。

2. 研究の目的

食品、医薬品工場、医療や介護現場の床面あるいは壁面には、菌が集合したバイオフィームが固着し環境悪化を招いている。バイオフィームは生物膜あるいは菌膜ともいわれ、固体表面に付着した微生物、または微生物が作る菌体外多糖などの生産物の集合体であり、成長の後期では強固となり容易には除去できない。このためこうした固体表面に固着したバイオフィーム内部の耐性菌類を完全滅菌して除去することが求められている。このために本研究では、ヒドロキシラジカルによって菌膜を破壊してバイオフィーム内部への進入路を作り、その後オゾンや過酸化水素によって殺菌をする2段階殺菌処理方法を提案し、その処理方法を大気圧プラズマで実現すること、実際にバイオフィームの殺菌を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

緑膿菌は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源課 NBRC (Biological Resource Center, NITE) より分譲された *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275 を用いた。

超純水 1 L に対してブイオン (栄研化学, E-MC35) を 18 g 溶かし液体培地とした。これを 5 mL 取り、平板培地の菌をエーゼで採って入れ、インキュベータにて 37 °C で 24 時間培養した。培養した液体培地を遠心分離機にかけて液体培地と緑膿菌を分離した。そして、緑膿菌を EPS 培養液に移し、菌懸濁液をシャーレに 15 mL 入れ、インキュベータにて 37 °C で 1 日から 5 日間培養した。培養に用いた EPS 培養液を捨て、生理食塩水で 2 回洗浄したものをバイオフィームとして実験に使用した。

殺菌用およびヒドロキシラジカル生成用試薬として、過酸化水素 (昭和化学, 35%) を超純水で希釈したものを使用した。濃度は 1%, 0.1%, 0.01% とした。また溶存オゾンによる殺菌の影響を除く目的でオゾン反応停

止剤であるチオ硫酸ナトリウム (和光薬品) を超純水で 0.1 mol/L まで希釈し使用した。

EPS 培養液 (Extracellular Polysaccharide growth medium) は超純水 1 L に対して、 K_2HPO_4 :3.0 g, KH_2PO_4 :0.1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.1 g, $(NH)_2SO_4$:0.1 g, $CaCl_2$:0.001 g, $FeSO_4$:0.001 g, $NaCl$:0.1 g, glucose:10.0 g を溶かした。さらにオートクレーブで滅菌するとき、glucose の変性を防ぐため、glucose 溶液とそれ以外の溶液に分けて滅菌処理した。その後ふたつの溶液を混合して EPS 培養液として使用した。

なおオゾナイザ (エコデザイン, ED-0G-R5) に酸素を供給してオゾン化酸素を作り、これを超純水にバブリングすることで、1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L のオゾン水を生成し、殺菌実験に使用した。

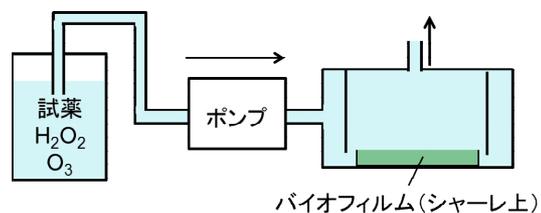


図1 バイオフィーム殺菌装置構成

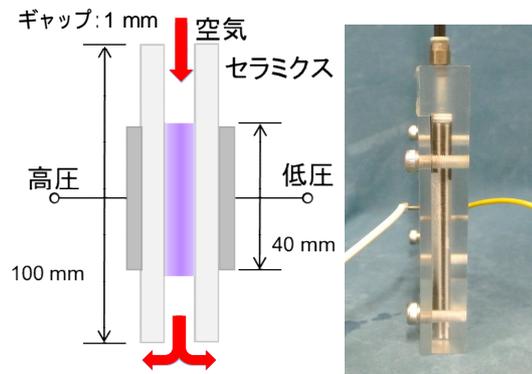


図2 大気圧プラズマリアクタの図と写真

図1に過酸化水素水、オゾン水によるバイオフィーム殺菌を行う構成図を示す。容器に過酸化水素水とオゾン水を入れ、可変速送液ポンプ (Master flex, 7554-90) とポンプヘッド (Master flex, 7518-00) によりシャーレを入れた容器に供給し、溶液の流量を 200 mL/min または 400 mL/min に制御した。図2に大気圧空気プラズマリアクタの写真と構造図を示す。リアクタは両面バリア放電の構造をとり、金属電極はアルミ板 (50 mm × 50 mm × 0.3 mm) で、絶縁体にアルミナ (100 mm × 100 mm × 1 mm) を使用した。ギャップ長調節にフッ素ゴムを用いた。

プラズマ発生用の電圧は、ファンクション・ジェネレータ (Tektronix, AFG320) で発生した正弦波交流電圧を増幅器 (エヌエフ回路設計ブロック, HVA4321) で 6 kV から 10

kV に昇圧して使用した。電圧は、増幅器の出力に高耐圧プローブ (Tektronix, P6015A) で測定し、電荷測定用コンデンサ 4 nF に印加される電圧をプローブ (TEXAS, TX3125) で測定した。コンデンサに蓄積する電荷は電気容量 4 nF とコンデンサに印加する電圧の積で求めた。

プラズマ発生用の乾燥空気としては純度 G3 の 10 L 空気ポンプを用いた乾燥空気、レギュレータ、マスフローコントローラ (HORIBA, SEC-400MK3) を介してガス流量を調整してリアクタに供給した。また加湿空気は大気空気をポンプで超音波噴霧器に 2.9 L/min で送り、ミストを加えることで加湿空気としてリアクタに供給した。また気相中のオゾンはオゾン濃度計 (荏原実業, EG-600) で、過酸化水素はパックテスト試薬 (共立理化学研究所, WAK-H2O2 と WAK-H2O2(C)) と分光高度計 (日本分光, V-630) により測定した。さらにバイオフィーム中の菌数は、シャーレ中に 10 mL の生理食塩水を入れ、超音波洗浄器で 60 秒処理した後、平板培地に塗抹して培養し、コロニー数を測定して求めた。

4. 研究成果

図 3 に菌懸濁液を入れたシャーレを 1 日から 5 日間培養したときのシャーレ中に付着した菌数の変化を示す。1 日で菌数が飽和していることから、殺菌実験は 3 日間培養したバイオフィームを使用した。

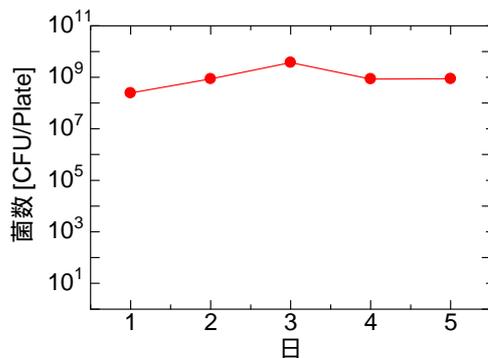


図 3 バイオフィームの菌数変化.

乾燥空気および加湿空気をバリア放電に通して、オゾンと過酸化水素を生成した。放電電力を計算するために $V-Q$ リサージュ波形を用いた。リサージュ波形で囲まれた面積が放電 1 周期あたりの放電電力量であり、この電力量に周波数をかけたものが放電電力となる。

図 4 に乾燥空気をリアクタにガス流量 500 mL/min で通してバリア放電の周波数を 1.5 kHz にしたときのリサージュ波形を示す。電圧は 8 kV である。図 5 は乾燥空気をリアクタに通したときのガス流量に対するオゾン濃度を示す。ガス温度の上昇とともにオゾン濃度が低下するので、オゾン濃度が平衡状態になったときの値をオゾン濃度として測定

した。投入電力の増加とともにオゾン濃度は増加した。しかし、電圧 6 kV、周波数 1.5 kHz のとき、ガス流量が 200 mL/min 以下でオゾン濃度が放電時間とともに急激に減少した。

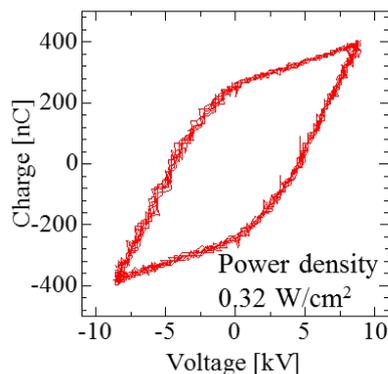


図 4 乾燥空気での $V-Q$ リサージュ図形

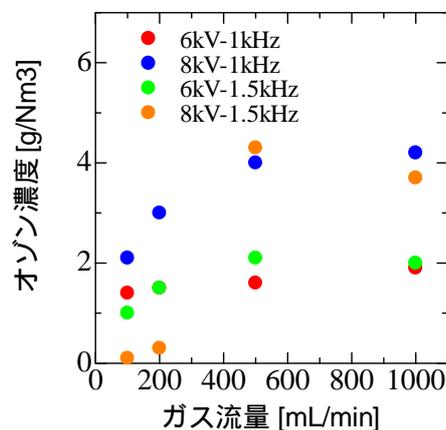


図 5 オゾン濃度とガス流量

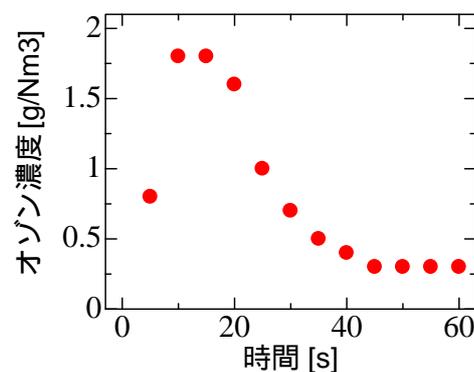


図 6 オゾン濃度の時間変化

図 6 に乾燥空気使用時のオゾン濃度の時間変化を示す。このとき投入電圧 8kV、周波数 1 kHz、ガス流量 200 mL/min であり、電力密度は 0.19 W/cm² であった。ガス投入直後からオゾン濃度が上昇し、最大 1.8 g/Nm³ となったが、20 秒経過時からオゾン濃度が減少した。この原因はバリア放電によってガス温度

が上昇したため、オゾンの損失反応が進んだからである。リアクタには電極を冷却する機構を取り入れることで、ガス温度の上昇を押さえることはできる。しかし、装置の小型化が必要なため、ガス温度の上昇を抑えられる投入電力およびガス流量を選択する必要がある。

図7にミストを含んだ加湿空気をリアクタに通してバリア放電の周波数を1.5 kHzにしたときのリサージュ波形を示す。印加電圧6 kVからバリア放電が生じることを確認した。図4の乾燥空気と比較すると、電力密度が2倍から3倍程度増加した。セラミックに水が付着したために、誘電率が増加し、セラミックに蓄積する電荷量が増加したためである。加湿空気をリアクタに通して、過酸化水素の生成量を測定するために、リアクタの下部にシャーレを設置した。シャーレには超純水を10 mL 入れ、リアクタ出口から放出するガスが超純水に接触するようにした。

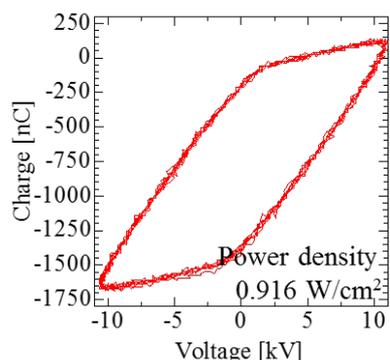


図7 加湿空気でのV-Qリサージュ図形

図8に加湿空気をリアクタに通して、シャーレ中の超純水で捕集した過酸化水素濃度を示す。また、周波数1.5 kHz、印加電圧8 kVのとき、リアクタ出口のオゾン濃度を測定すると5 ppmとなり、オゾンも生成していた。

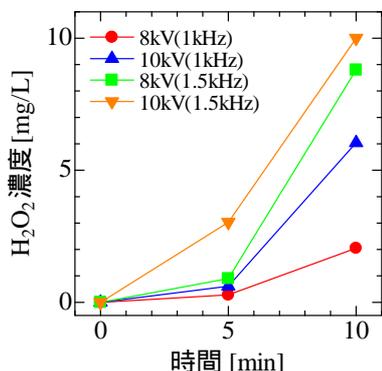


図8 過酸化水素濃度の時間変化

放電開始から5分までの過酸化水素生成量の傾きよりも、5分から10分後での過酸化水

素生成量の傾きが大きい結果となった。放電開始後から5分までの間にシャーレ中の超純水に過酸化水素が溶け込む反応経路を阻害する要因があると考えられる。この原因はわかっていないが、今後解明できると反応開始直後から過酸化水素を水に溶け込ませる方法が開発できると考えられる。

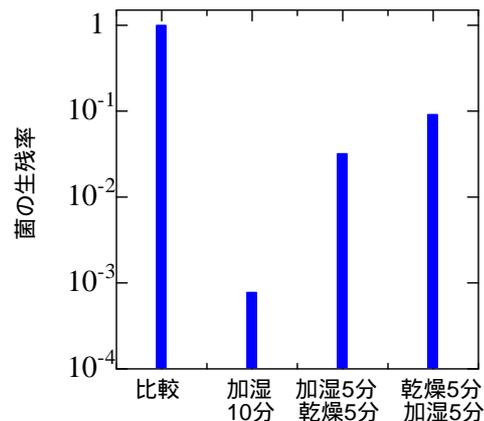


図9 菌の生残率とプラズマ条件

促進酸化処理に必要なOHラジカルはオゾンと過酸化水素がモル比1対1で反応する。ただし確認のため実施した過酸化水素試薬とオゾン供給による促進酸化処理では、オゾン濃度が高くなるほど菌の生残率が低下した。一方プラズマリアクタの場合でオゾンと過酸化水素の生成量を比較した結果、過酸化水素の生成量の方が少ないことが分かった。このため過酸化水素濃度が最も高くなるプラズマ条件として、周波数1.5 kHz、印加電圧10 kVを選定した。なお周波数を1.5 kHzとすると、投入電力が高い場合にオゾン生成量が減少するため、印加電圧は8 kV、ガス流量は500 mL/minとした。

図9は10分間のプラズマ処理について、プラズマリアクタに供給する空気の加湿条件、および処理条件を変化して測定した、バイオフィーム殺菌時の菌の生残率を示す。左の棒はプラズマ処理しない場合の比較値である。左から、加湿空気を10分間供給しながらプラズマ処理した場合、加湿空気5分後に乾燥空気を5分供給した場合、乾燥空気5分後に加湿空気を5分供給した結果を示す。過酸化水素試薬で事前検討した結果では、加湿空気から乾燥空気に切り替えた場合に生残率が低下したがプラズマ処理の場合は逆の結果となった。また左から2番目の加湿空気のみで殺菌すると、菌数は3桁以上減少することが分かった。この場合に生残率が顕著に減少する理由は、量が確保しにくい過酸化水素生成時間が2倍あること、またその場合でもオゾンが数ppm発生しているため、促進酸化処理が効果的に行われた結果と考えられる。

以上、バリア放電を有するプラズマリアクタに供給する大気圧空気の乾燥・加湿条件を

変化させて、プラズマにより生成する過酸化水素とオゾン量を変化させ、両者の反応によって発生するヒドロキシラジカルによる促進酸化処理を実現し、実際にバイオフィルムの殺菌を行った。この結果常に大気圧空気を加湿した条件が最も効果的にバイオフィルムの殺菌が行え、菌数の減少量は最大で3-logとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

菅沼亮太, 安岡康二, 「ミスト空気放電によるバイオフィルム殺菌」, 第38回静電気学会全国大会, pp. 157-158, 9aC-5, 2014年9月9日(広島国際大学呉キャンパス, 広島)

菅沼亮太, 安岡康二, 「空気プラズマを用いた促進酸化法によるバイオフィルム除去」, 日本防菌防黴学会第41回年次大会, p. 49, 24Ap06, 2014年9月24日(品川区立総合区民会館きゅりあん, 東京)

R. Suganuma, K. Yasuoka, "Inactivation of Biofilms by Air Plasma Containing Water", 67th Annual Gaseous Electronics Conference, MW1.00066, November 5, 2014, (Marriott city center, Raleigh, North Carolina, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安岡 康一 (YASUOKA, Koichi)
東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 00272675

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: