

## 針状大気圧低温プラズマ照射によるイースト菌の不活性化

## Inactivation of Yeast Cells by Low-Temperature Needle-Plasma Irradiation at Atmospheric Pressure

○胡桃 聡<sup>1</sup>, 高橋 秀幸<sup>2</sup>, 鈴木 薫<sup>1</sup>Satoshi Kurumi<sup>1</sup>, \*Hideyuki Takahashi<sup>2</sup>, Kaoru Suzuki<sup>1</sup>

Abstract: In this study, we report on the biocidal activity technique by low-temperature needle helium plasma irradiation at atmospheric-pressure using borosilicate capillary nozzle to apply for the oral surgery. The diameter of needle plasma was less than 50  $\mu\text{m}$ , and temperature of plasma-irradiated area was less than body temperature. Needle plasma showed emission due to OH and O radicals, which were inactivation source to yeast cells. Methylene blue stain showed yeast cells were inactivated by needle plasma irradiation.

## 1. はじめに

大気圧低温プラズマは電子温度が高いがガス温度が低いいため、直接触れることができるプラズマ<sup>[1]</sup>として有名であり、そのプラズマ照射による応用例として有機物の分解、ガス分析用のソースや殺菌効果など勢力的に研究がなされている<sup>[2]</sup>。これまで大気圧プラズマ照射によって殺菌効果が確認されていることから<sup>[3]</sup>、我々も口腔外科分野への応用を目指しているが、歯周ポケットや歯間などの 100  $\mu\text{m}$  以下の微細構造部位へこのプラズマを直接照射することが難しい。また大気圧低温プラズマは紫外線を発光することから、口内保護のためにその光量を減少させることが望ましい。そこで我々はプラズマ噴射ノズルに用いられる通常の石英管の先端をキャピラリー状に加工することで針状の大気圧低温プラズマを発生させて、これを微細部へ直接照射可能にした。また先端をキャピラリーに刷ることでプラズマの放出量が減少し、その結果放出される紫外光の減少が期待される。殺菌対象はイースト菌 (*S. cerevisiae*) を用いた。この菌は温度や pH 値に対する耐性が強く<sup>[4]</sup>、取扱も歯周病菌に比べて用意であることから口腔外科応用に向けた初期実験に適している。本稿はキャピラリー状に加工したノズルから放出される針状の低温大気圧プラズマの温度や発光特性および殺菌効果について報告する。

## 2. 実験方法

図 1 に大気圧低温プラズマの発生装置図とキャピラリーノズルから放出された針状プラズマの写真を示す。本実験では 2 種類のプラズマノズルを用いた。一つは通常の石英ノズル (内径: 4 mm) で、他方はキャピラリーノズルである。キャピラリーノズルの加工法について、まず内径 4 mm の石英管の片側を熱プロセスによって鋭利にする (内径: 1 mm)。そこにボロシリケートキャピラリー (内径: 50  $\mu\text{m}$ ) を石英管の鋭利部へ挿入したヘリウムガスを石英管へ流入する。流量は通常の石英ノズルは 3 l/min、キャピラリーノズルは 100 ml/min である。電極を石英部に取り付けてパルス電圧 (電圧:  $\pm 10$  kV, 周波数: 10 kHz) を印加する。印可した際にバリア放電によってプラズマが発生し、ノズルから噴出される。図 1 の写真に示す通りキャピラリーノズルから針状の大気圧プラズマが放出されていることが確認できる。プラズマの紫外光から可視光領域の発光スペクトルを CCD 分光器 (StellarNet 社製, EPP2000) によって測定した。イースト菌 (Nippan 社製, dry yeast) 1 g に対して純水 9.9 ml を攪拌した溶液をガラス基板状に垂らし、そこに針状大気圧プラズマを照射する。プラズマの噴射圧によって溶液が蒸発されないようにノズル-基板間距離は 10 mm とした。針状大気圧プラズマによるイースト菌の殺菌効果について、メチレンブルー (MB: Wako 社製, ck886) 染色法<sup>[5]</sup>によって検証した。

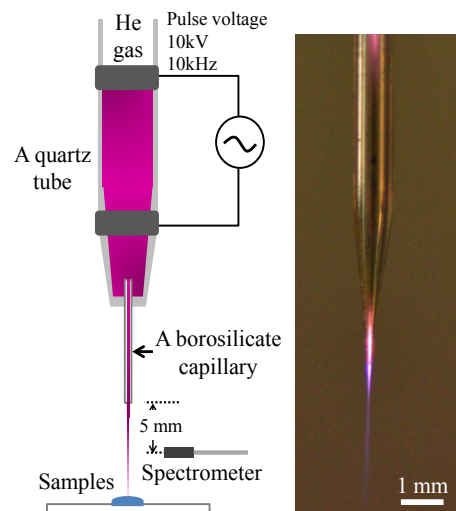


Figure 1. Experimental apparatus of needle plasma

1 : 日大理工・教員・電気, 2 : 日大理工・院 (前)・電気

### 3. 実験結果と考察

通常の石英ノズルおよびキャピラリーノズルから噴出した大気圧プラズマの発光スペクトルを図2に示す。石英ノズル、キャピラリーノズル共に同様の発光スペクトルを示した。300 から 450 nm の強度の高い発光は  $N_2$  または  $N_2^+$  起因の発光である。また He 起因の発光が 500 から 750 nm の領域に観測された。309 nm と 777 nm に発光が見られる。これらは O 及び OH のラジカル発光で、大気圧プラズマ中にこれらのラジカルが混在していることを示唆している。殺菌するためには O または OH ラジカルが必要であることから、発生させた大気圧プラズマは殺菌能力を有していると考えられる。

図3に MB 染色法で評価されたイースト菌の写真を示す。MB はイースト菌から生成される酵素によってロイコ MB に変化する。MB とロイコ MB の色はそれぞれ青色または透明色である。それゆえ透明色なイースト菌は生菌で、青色に染色されたイースト菌は死菌または不活性状態を意味している。プラズマ照射前のイースト菌は生菌だが、針状大気圧プラズマ照射 5 分後にはほとんどのイースト菌が青色に染色された。そこで我々は 300 のイースト菌について、その色が青または透明色か判別して染色率を導出した。針状大気圧プラズマの照射時間とイースト菌の染色率グラフを図3に示す。染色率は時間に対して減少し、照射後 5 分後に 20 % の染色率一定になった。これは、針状プラズマの殺菌効果が 80 % 程度であることを意味している。口腔内には 700 以上の種類の菌が存在しており<sup>[6]</sup>そのすべてを殺菌することは困難なため、80 % のイースト菌の殺菌能力は歯周病を予防する上で十分な能力を有していると考えられる。

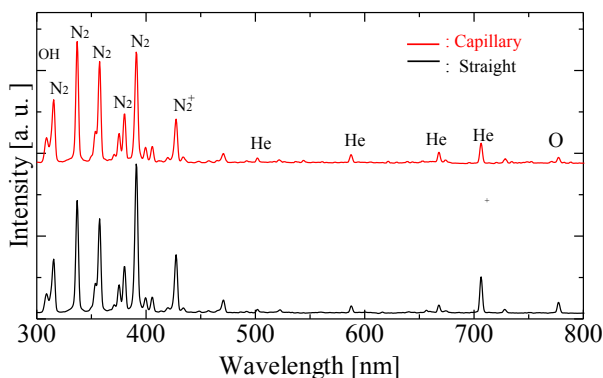


Figure 2. Emission spectra of ejected plasma plums

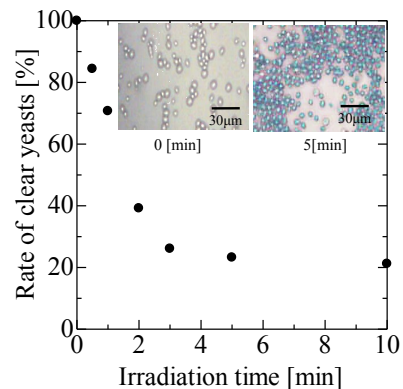


Figure 3. Relationship between plasma irradiation time and rate of clear (not dyed blue) yeasts

### 4. まとめ

我々は口腔外科応用のため針状の低温大気圧プラズマによるイースト菌の殺菌効果について検証した。針状の大気圧プラズマはキャピラリー状のノズル（内径: 50  $\mu\text{m}$ ）に加工製作した。キャピラリーノズルから放出される針状の大気圧プラズマは O 及び OH ラジカルの発光（309 nm および 777 nm）が確認された。MB 染色法により、イースト菌の殺菌効果を評価した結果、この針状プラズマによってイースト菌の死菌または不活性化が確認できた。また殺菌効果は 5 分で 80 % 一定となった。

### 参考文献

- [1] XinPei. Lu, ZhongHe. Jiang, Qing. Xiong, ZhiYuan. Tang, XiWei. Hu, and Yuan. Pan, Appl Phys Lett., **92** (2008) 081502.
- [2] M. Teschke, J. Kedzierski, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec, and J. Engemann, IEEE T Plasma Sci., **33** (2005) 310.
- [3] S. Ikawa, K Kitano and S. Hamaguchi, Plasma Process. Polym., **7** (2010) 33
- [4] H. J. Phaff, M. W. Miller and E. M. Mrak: *The life of yeasts* (Harvard University Press, 1978) 2nd ed., Chap. 4 and 7.
- [5] M. Sami, M. Ikeda and S. Yabuuchi, J. Ferment. Bioeng., **78** (1994) 212.
- [6] Kolenbrander, P. E., and J. London, J. Bacteriol., **175** (1993) 3247.