

L-60

## フレッシュプラズマにおける酵母菌の殺菌 Sterilization of yeast fungus by Fresh Plasma

○浅川理絵<sup>1</sup>, 高橋秀幸<sup>1</sup>, 當麻誠仁<sup>2</sup>, 胡桃聡<sup>3</sup>, 鈴木薫<sup>3,4</sup>, 関啓介<sup>5</sup>, 中田智子<sup>5</sup>, 紙本篤<sup>5</sup>, 廣瀬英晴<sup>5</sup>, 升谷滋行<sup>5</sup>  
\*Rie Asakawa<sup>1</sup>, Hideyuki Takahashi<sup>1</sup>, Tomohito Taima<sup>2</sup>, Satoshi kurumi<sup>3</sup>, Kaoru Suzuki<sup>3,4</sup>  
keisuke Seki<sup>5</sup>, Tomoko Nakata<sup>5</sup>, Atushi Kamimoto<sup>5</sup>, Hideharu Hirose<sup>5</sup> and Shigeyuki Masutani<sup>5</sup>

Abstract: The fresh plasma generated by helium (He) gas can sterilize non-maleficence. In this study, the sterilization of yeast fungus by fresh plasma irradiation is investigated by raman spectroscopy and methylene blue stain measurement. The raman peak of living cells is disappeared after plasma irradiation for 15min and dead cells are stain by methylene blue. We report the yeast fungus is sterilized.

### 1. まえがき

近年, 医療分野において紫外光殺菌や $\mu$ 波殺菌が試みられている. しかしこれらは人体に影響があるため口腔内の殺菌に応用が出来ない. そこで我々はフレッシュプラズマによる殺菌に注目した. フレッシュプラズマを生成する際に形成される酸素ラジカルは, 細胞壁を破壊する作用<sup>[1]</sup>があるので, 殺菌が可能である. また誘電体バリア放電の原理<sup>[2]</sup>を用いてプラズマを発生させているため, 大きな電流が流れないのでガス温度を抑制することができ, 大気圧中でも直接手で触れることが可能である. プラズマガス種は化学的に安定しているヘリウムガスを媒体としているので人体に無害である. 真空容器・排気装置が不要なので, 装置も小型であり安価である.

本研究では, フレッシュプラズマを用いた酵母菌の滅菌・殺菌について報告する.

### 2. 実験方法

Fig.1 に実験装置の概略図を示す. 直径 5 mm の石英製のガラス管に 99.999 % のヘリウムガスを流入し, 石英管側面の電極に, 10 kV, 10 kHz の交流電圧を印加する. なお, 電極から石英製のガラス管までの距離は 30.0 mm, ヘリウムガスの流量を 3 l/min とした.

酵母菌 0.1 g に純水 9.9 g の水を加え, 酵母菌を 1 % に希釈する. この酵母菌をシャーレに移し, フレッシュプラズマを照射する. 試料はガラス管先端から 30.0mm 離れたところに置き, 0, 6, 15 min 間照射した. その後, 照射なしと照射ありの各試料をラマン顕微鏡 (レニショー system1000) を用いてラマンスペクトルを測定した. またメチレンブルーを用いて染色し, 光学顕微鏡にて生細胞と死細胞の観察をする.

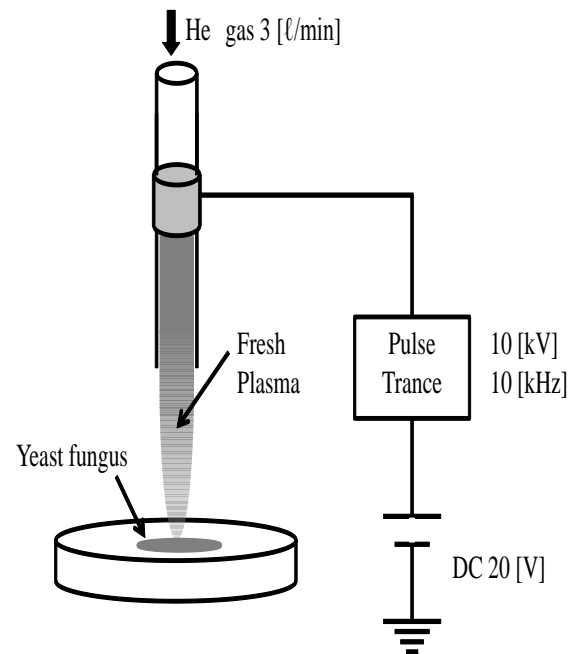


Fig.1 Fresh Plasma Generator

### 3. 実験結果と検討

Fig. 2 にフレッシュプラズマ照射なしと照射 15 min のラマンスペクトルを示す. ラマンスペクトルとはラマン散乱光と入射光の振動数の差に対する散乱強度の分布であり, 物質の構造に特有の値をとることから, 分子の構造や状態をしることが出来る<sup>[3]</sup>. 酵母菌のラマンスペクトルには, C=C 伸縮振動及びタンパク質, 生細胞の代謝活性, シトクロム類の C=C 伸縮振動, CH 変角振動の各ピークが現れる. 照射なしのラマンスペクトルは, 1600  $\text{cm}^{-1}$  付近に生細胞の代謝活性のピークがあるのに対し, 照射 15 min にはない. つまり照射 15 min で生細胞がなくなったことがわかる.

1 : 日大理工・学部・電気 2 : 日大理工・院 (前) 3 : 日大理工・教員・電気  
4 : 材料創造・先端材料センター 5 : 日本大学歯学部・教員

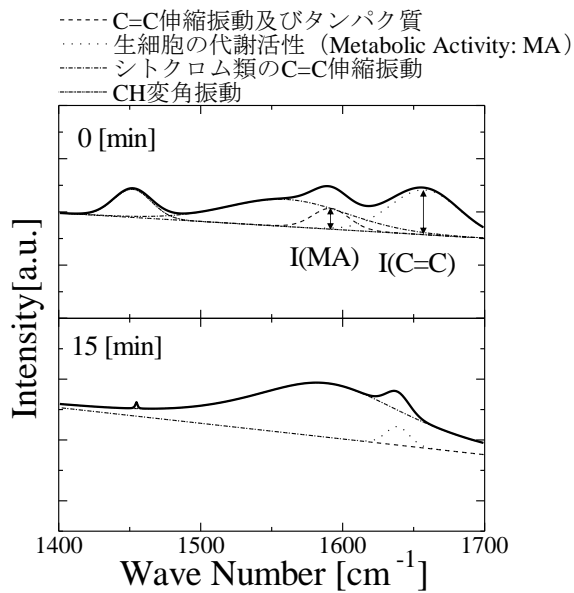


Fig. 2 Raman Spectra

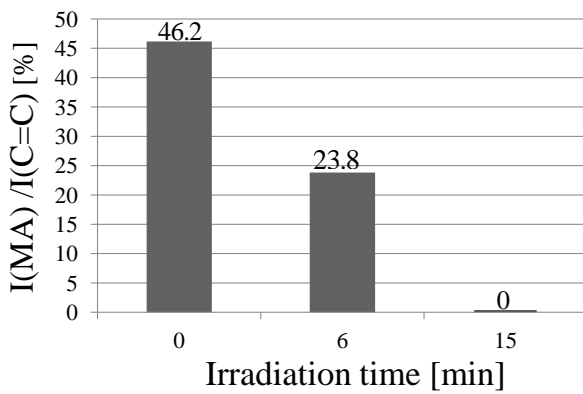
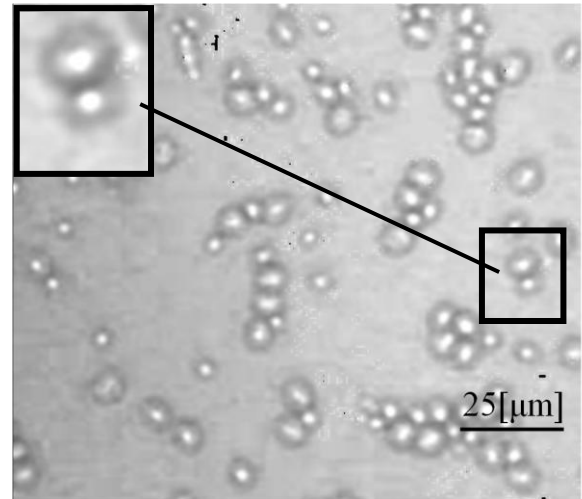


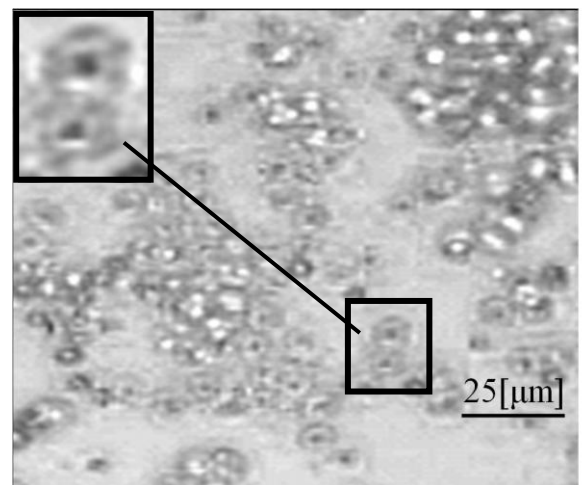
Fig. 3 Peak ration

Fig. 3 に C=C 伸縮振動及びタンパク質と生細胞の代謝活性のピーク比と照射時間の関係を示す. Fig.3 より, 照射 0 min では 46.2 %, 6 min では 23.8 %, そして 15 min では 0 % となり, ほぼ比例しながら酵母の生細胞が死細胞になっていくことがわかる.

Fig. 4 に照射なしと照射 15 min の各試料をメチレンブルーを用いて染色し, 光学顕微鏡で観察した画像を示す. メチレンブルーは酸化還元色素であり, 生細胞はメチレンブルーを還元脱色して染色されないが, 死細胞は還元力を失って青色に染色する. これにより, 酵母の生細胞と死細胞の区別をすることが可能である<sup>[3]</sup>. 照射なしでは染色していないのに対し, 照射 15 min では染色していることがわかる. 以上より, 照射 15 min では死細胞が確認された.



(a) Non fresh plasma irradiation



(b) Fresh plasma irradiation (15 [min])

Fig. 4 Optical microscope image of yeast fungus

#### 4. まとめ

フレッシュプラズマを酵母菌に照射することで酵母の生細胞が死細胞になった. これより殺菌作用が確認された. また 15 min 照射することで, 生細胞がすべて死細胞になり, 酵母菌の殺菌が確認された. すなわち照射時間が長いほど殺菌力が高いことが判明した.

#### 5. 参考文献

- [1] 「放電・プラズマを応用した殺菌・滅菌」 渡辺 隆行(東京工業大学原子炉工学研究所)
- [2] 電気学会放電ハンドブック出版委員会「放電ハンドブック 上巻」, p.420, オーム社
- [3] 「水中プラズマが拓く新しい無機・有機・バイオプロセス」 秋山 秀典(熊本大学)
- [4] 「Methylene blue 染色法による酵母の死細胞測定の再検討」 金丸 毅・藤原 耕三