

低周波プラズマ照射による酵母菌の殺菌効果

The bactericidal effect of the yeast fungus by a low frequency wave plasma exposure

○西沼慶太¹, 高橋秀幸¹, 胡桃聡³, 鈴木薫³, 廣瀬秀晴⁴, 升谷滋行⁴KeitaNishinuma¹, HideyukiTakahashi², SatoshiKurumi³, KaoruSuzuki³, HideharuHirose⁴, ShigeyukiMasutani⁴

Abstract: Our research is harmless to a human body, uses the low frequency wave plasma which touches directly, and investigates the bactericidal effect of the bacillus of periodontitis, and a yeast fungus. However, since the diameter of a periodontal pocket is narrow, irradiation of plasma is difficult for it. Therefore, needle plasma needs to be generated. When needle plasma was compared with ordinary low frequency wave plasma this time, it was investigated whether there would be any difference of a bactericidal effect. The measuring method used for the investigation is four of thermography method, plasma spectroscopy measurement, methylene blue stain method, and Raman-scattering-spectroscopy.

1. 諸言

低周波プラズマとは、プラズマのガス温度を抑制し、電子温度が高く大気圧中で発生させることができる非平衡大気圧プラズマの一種である。人体に直接照射が可能なことや、大気圧中でプラズマ処理が行える利便性と、ラジカルが多量に発生していることから、滅菌・殺菌技術といった様々な応用研究がされている。

過去の研究結果から低周波プラズマによる酵母菌殺菌が確認できたが、通常の石英管ノズル（直径:4mm）では口腔内の歯周ポケットへの直接照射が困難なため、本研究ではニードルノズル（約 400 μ m）を使用したニードルプラズマを生成し、通常のプラズマとの酵母菌殺菌評価及び温度特性、プラズマ分光の比較を行った。

2. 実験方法

図 1 に低周波マイクロプラズマジェット発生装置の概略図を示す。

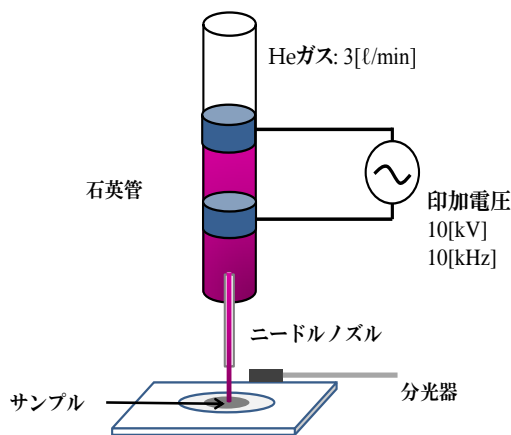


図 1 低周波ニードルプラズマ装置図

石英管（内径 0.4 mm）に He ガス（3 l/min）を流入させ、石英管側面より交流電圧を印加する。石英管から

電極までの距離は 30.0 mm とする。低周波プラズマを酵母菌に照射し、滅菌・殺菌を行う。ドライイースト 0.1 g を蒸留水 9.9 g に希釈して 30 分間攪拌させて発酵させたものをサンプルとした。サンプルを一つ穴スライドガラス（東新理興, T8-R003）にピペットで 0.3 ml 垂らし、石英管噴射口から 30.0 mm の距離に設置する。実験条件として印加電圧を 10 kHz, 10 kV, プラズマ照射時間を 0 ~ 10[s] とした。各条件で照射した酵母菌の滅菌評価として酸化還元色素を利用したメチレンブルー染色観察、顕微ラマン分光法（RENISHAW, system1000）で評価する。

またサーモグラフィ（NEC avio: GX-100）による温度特性評価、CCD 分光器（StellarNet: EPP2000）によるプラズマ分光評価から、通常プラズマとの比較を行った。

3. 実験結果と検討

3-1: 温度特性評価

サーモグラフィ（NEC avio: GX-100）で照射しているサンプルを撮影し、通常プラズマとニードルプラズマの温度を比較した。照射されている中心点を 0 点とし、そこから -20 ~ 20 [mm] 離れた温度を測定したところ、図 2 のような結果になった。

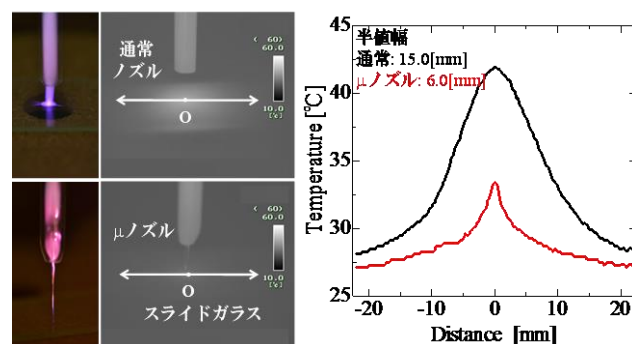


図 2. サーモグラフィによる温度特性比較図

通常ノズルの 0 点温度が 43.2℃に比べ、ニードルノズルは 33.4℃まで抑えることができ、温度の広がりや意味する半値幅は 15.0[mm]から 6.0[mm]まで下がったことから、より人体に負担なく、長時間の照射が望める。

3-2.CCD 分光器によるプラズマ分光測定

殺菌効果があるとされている O ラジカル及び OH ラジカルが、CCD 分光器(StellarNet: EPP2000)による分光測定から検出できるかを行った。図 3 上部がニードルプラズマ、下部が通常プラズマのプラズマ分光測定を表している。

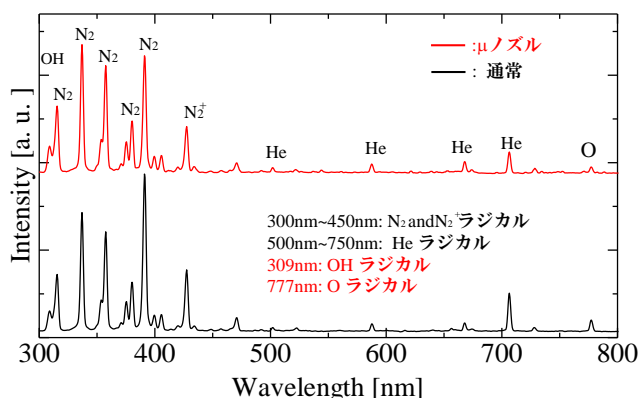


図 3. CCD 分光器によるプラズマ分光測定

ニードルプラズマからも通常ノズル同様の OH ラジカルの波長(309nm)及び O ラジカルの波長(777nm)が検出できたため、殺菌効果に影響はないと考えられる。

3-3. メチレンブルー染色法による殺菌評価

図 4 に光学顕微鏡によるメチレンブルー染色した酵母菌の観察結果及び生存率グラフを示す。

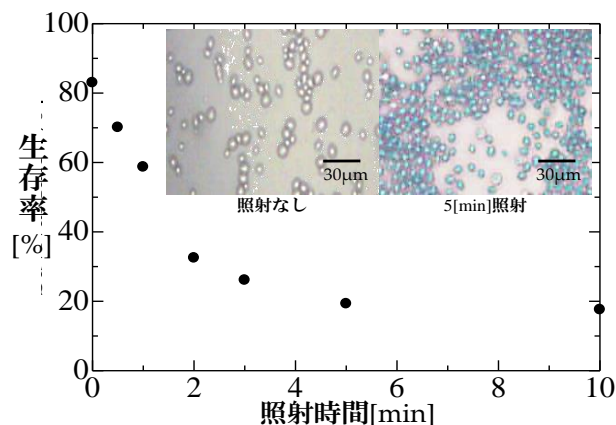


図 4.酵母菌染色画像及び生存率グラフ

低周波プラズマ (10 [kV], 5[min]) 照射によって酵母菌内部の青色の染色が確認される。メチレンブルーは酸化還元作用があり、酵母菌の酸化還元酵素の作用によ

って、青色 (メチレンブルー) が酸化型で死菌、無色が還元型で生菌となる。酸化還元酵素の作用で青色に染色された酵母菌が確認できた。またグラフから 3[min]の照射で約 80%の酵母菌の殺菌が確認できた。

3-4. ラマン分光法による殺菌評価

図 5 に顕微ラマン分光法で測定した酵母菌のスペクトルを示す。

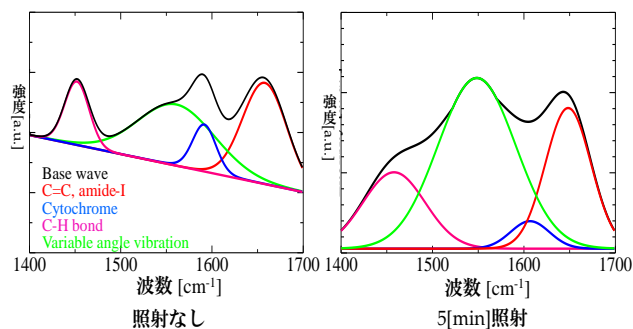


図 5 ラマン分光法による測定結果

1660 cm^{-1} 付近に C=C 伸縮振動及びタンパク質、1600 cm^{-1} 付近に生細胞の代謝活性、1550 cm^{-1} 付近にシトクロム類の C=C 伸縮振動、1450 cm^{-1} 付近に CH 変角振動のピークがそれぞれ認められる。プラズマ照射前と照射後のグラフを比較すると生細胞の代謝活性のピークが減少している。これより酵母菌の生細胞としての機能の低下や死菌となっていることが確認できる。

4.まとめ

通常ノズルと比べ、ガス流量及び温度を下げることから、コスト削減や長時間照射が期待できる。また二つの殺菌評価方法から通常プラズマと変わらない殺菌効果が望める。

今後の展望として、歯周病菌を殺菌対象物とした、殺菌評価を検討している。

5.参考文献

- [1] 當麻誠仁・胡桃聡・鈴木薫・関啓介・中田智子・紙本篤・廣瀬英晴・升谷滋行：「低周波プラズマジェットによる微生物の滅菌・殺菌能力」, 平成 24 年 電気学会全国大会講演論文集 p.232, (2012)
- [2] 北野勝久・浜口智志：「低周波大気圧マイクロプラズマジェットの放電メカニズム」, 電気学会プラズマ研究会資料 PST-09, 1-10, pp.49-54, (2009)
- [3] 北野勝久・谷口和成・坂井道・高木浩一・浪平隆男・服部邦彦：「大気圧プラズマを点けてみよう」, プラズマ・核融合学会誌 Vol.84, No.1, pp.19-28, (2008)