

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	マルチガス温度制御プラズマジェットの開発と医療および植物工学への応用
Title(English)	
著者(和文)	末永祐磨
Author(English)	Yuma Suenaga
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11819号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:沖野 晃俊,中村 健太郎,北本 仁孝,佐藤 千明,赤塚 洋,岩澤 篤郎, 伊藤 典彦
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11819号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

マルチガス温度制御プラズマジェットの開発と 医療および植物工学への応用

東京工業大学 工学院 電気電子系 ライフエンジニアリングコース

末永 祐磨

指導教員 沖野 晃俊 准教授

2022 年 2 月

目次

第 1 章	序論	1
1.1	はじめに	2
1.2	プラズマとは	3
1.3	プラズマの応用	4
1.4	本論文の目的	5
1.5	本論文の構成	6
第 2 章	従来の大気圧低温プラズマの生成とプラズマのガス温度制御	7
2.1	従来の大気圧低温プラズマの生成方法	8
2.1.1.	バリア放電プラズマ	8
2.1.2.	プラズマバレット	8
2.1.3.	コロナ放電	9
2.1.4.	グライディングアーク	10
2.2	新しい大気圧低温プラズマジェットの開発	10
2.2.1.	大気圧マルチガスプラズマジェット	10
2.2.2.	金属 3D プリンタで造形したプラズマジェット	11
2.3	大気圧低温プラズマのガス温度制御の要求	13
2.3.1.	極低温の大気圧低温プラズマの生成	14
2.3.2.	大気圧温度制御プラズマの開発	14
2.3.3.	様々なガス種でプラズマを生成できる温度制御プラズマ開発の課題点	15
2.4	まとめ	15
第 3 章	マルチガス温度制御プラズマジェットの開発と特性測定	17
3.1	はじめに	18
3.2	マルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御機構の原理	19
3.3	マルチガス温度制御プラズマジェットの試作	19
3.3.1.	試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの設計	19
3.3.2.	試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの製作	20
3.3.3.	試作版マルチガス温度制御プラズマジェットによるプラズマ生成	21
3.3.4.	試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能の評価	22
3.3.5.	試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの評価と改良点	24
3.4	改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの設計	25

3.5	数値流体解析を用いたマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能の評価	27
3.5.1.	本研究で用いた数値流体解析	27
3.5.2.	マルチガス温度制御プラズマジェットの数値流体解析の条件	27
3.5.3.	マルチガス温度制御プラズマジェットの解析結果	28
3.6	改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの製作	30
3.7	改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能	30
3.7.1.	試作版と改良したマルチガス温度制御プラズマジェットの性能比較	32
3.8	プラズマのガス種とガス温度が放電電圧, 電流に与える影響	34
3.9	プラズマのガス種とガス温度が生成される活性種に及ぼす影響	39
3.9.1.	各種活性種の測定方法	39
3.9.2.	プラズマのガス種, ガス温度と生成される活性種の関係	40
3.10	まとめ	42
第 4 章	マルチガス温度制御プラズマの殺菌への応用	43
4.1	殺菌対象とした微生物の特徴と培養, 定量方法	45
4.1.1.	細菌および真菌の特徴と培養方法	45
4.1.2.	微生物の生菌数の評価方法	46
4.2	大気圧低温プラズマによる殺菌手法	47
4.2.1.	殺菌および滅菌の定義	47
4.2.2.	プラズマを用いた滅菌装置	47
4.2.3.	大気圧低温プラズマによる殺菌	48
4.3	マルチガス温度制御プラズマの照射による液中殺菌	50
4.3.1.	プラズマのガス種, ガス温度が殺菌効果に及ぼす影響	50
4.3.2.	二酸化炭素プラズマの殺菌効果と生成された活性種の相関関係	52
4.3.3.	二酸化炭素プラズマにおける殺菌効果の殺菌因子	53
4.4	プラズマバブリングによる医療器具表面の付着菌の殺菌	54
4.4.1.	眼科分野で問題となる細菌および真菌に対するプラズマバブリングの殺菌効果	55
4.4.2.	超音波併用プラズマバブリングの概要	58
4.4.3.	ステンレス板上の付着菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果	58
4.4.4.	メジャリングプリズム上の付着菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果	60
4.4.5.	プラズマバブリングで処理した MP の蛍光観察	62
4.4.6.	まとめ	63
4.5	多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの殺菌	64
4.5.1.	多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要	64
4.5.2.	多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの殺菌効果	66
4.5.3.	プラズマのガス種とプラズマバブリングの殺菌効果の関係	67

4.5.4.	多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで水中に導入される活性種	68
4.5.5.	プラズマバブリングした水の pH の変化	73
4.5.6.	プラズマのガス温度がプラズマバブリング殺菌に及ぼす影響	75
4.5.7.	多孔質フィルタの長さが殺菌効果に与える影響	77
4.5.8.	菌懸濁液の水温がプラズマバブリングの殺菌効果に及ぼす影響	79
4.5.9.	プラズマバブリング殺菌による濁度の改善効果	81
4.5.10.	プラズマバブリングで処理した菌懸濁液の生体膜脂質成分の分析	83
4.6	紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌	88
4.6.1.	紫外線併用プラズマバブリングの概要	88
4.6.2.	紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌効果	89
4.6.3.	多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリング	91
4.6.4.	多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングの殺菌効果	92
4.6.5.	紫外線照射プラズマバブリングによる OH ラジカルの生成	93
4.7	Plasma Bubbled-up Water による殺菌	96
4.7.1.	二酸化炭素の PBW 生成時間の検討	96
4.7.2.	PBW 生成時の水温と殺菌効果の関係	97
4.7.3.	細菌の PBW への暴露時間と生菌数の関係	98
4.7.4.	PBW の保存温度と殺菌効果維持時間	99
4.8	間欠動作プラズマバブリングを用いた PBW の殺菌効果維持	101
4.8.1.	間欠動作プラズマバブリングのコンセプト	101
4.8.2.	間欠動作プラズマバブリング装置の開発	102
4.8.3.	間欠動作プラズマバブリングによる PBW の殺菌効果維持	102
4.9	まとめ	104
第 5 章	マルチガス温度制御プラズマの歯科分野への応用	107
5.1	歯科材料接着への大気圧低温プラズマの応用	108
5.1.1.	照射するプラズマのガス種がジルコニア-レジンセメント間の接着強度に与える影響	108
5.1.2.	原子間力顕微鏡によるプラズマ照射後のジルコニア表面の観察	111
5.1.3.	X 線光電子分光法によるプラズマ照射後のジルコニア表面の分析	114
5.1.4.	窒素および酸素プラズマ照射によるジルコニア表面の接着機序の考察	115
5.2	大気圧低温プラズマによる歯科ホワイトニングへの応用	116
5.2.1.	歯科ホワイトニングに向けたプラズマミストの生成	116
5.2.2.	プラズマミストによるヘマトポルフィリン染色紙の漂白実験	116
5.2.3.	プラズマミスト生成時の水分供給量とガス流量が漂白効果に与える影響	117
5.3	まとめ	120
第 6 章	マルチガス温度制御プラズマの植物工学への応用	121

目次

6.1	マルチガス温度制御プラズマを用いた植物細胞のゲノム編集ツールの開発	122
6.1.1.	植物細胞へのプラズマの照射条件の検討	122
6.1.2.	プラズマを用いたタバコ葉片への緑色蛍光タンパク質の導入実験	124
6.1.3.	CRISPR-Cas9 を用いたタバコのゲノム編集	128
6.2	水耕栽培における大気圧低温プラズマの応用	132
6.2.1.	プラズマ照射によるイチゴ萎黄病の原因菌の殺菌	132
6.2.2.	プラズマバブリングによる液肥中のイチゴ萎黄病の原因菌の殺菌	134
6.2.3.	プラズマバブリングが液肥成分へ及ぼす影響	135
6.3	まとめ	137
第 7 章	結論	139
謝辞		145
参考文献		153

第 1 章

序論

1.1 はじめに

プラズマはイオンや電子などの荷電粒子を含む気体である。このプラズマは気体に電界や熱、光などのエネルギーを与え、原子分子を解離、電離させることで得ることができ、固体や液体、気体に次ぐ第4の状態として知られている。このプラズマという言葉が使われ始めたのは1928年にまで遡る。名付けはIrving Langmuir(1881-1957)によって低気圧放電の発光現象を指す言葉としてプラズマを用いたことに始まり、ギリシャ語で神によって形づくられたものを意味する「 $\pi\lambda\alpha\sigma\mu\alpha$ 」が語源となっている。なぜ、Langmuirがプラズマと名付けたのかは明確に伝えてられていないが、“発光領域が放電管の形に応じ、その内部をほぼ埋め尽くすことから、この名称が用いられた”というのが定説である^[1]。Langmuirが意図したかは定かでは無いが、今ではプラズマは放電管だけでなく、宇宙空間全体を満たしており、宇宙を、生命を形作る上で重要な要素であることが明らかとなりつつある。

宇宙がプラズマで満たされている謎の探求がジェームズ・ウェッブ宇宙望遠鏡 (James Webb Space Telescope: JWST) で行われようとしている。JWSTは、日本時間2021年12月25日午後9時20分、アリアン5ロケットに搭載され、フランス領ギアナのギアナ宇宙センターから打ち上げられた史上最大の宇宙望遠鏡である。図1-1に示すJWSTは、18枚の六角形のミラーからなる6.5 mの主鏡を備えた赤外線望遠鏡で、宇宙初期の星や銀河の観測、形成過程にある星や銀河の観測、太陽系内外の惑星の調査が期待されている^[2]。このJWSTの最大のプロジェクトとして、初期宇宙の観測がある。このプロジェクトは、ビックバンから数億年間の暗黒時代を経て、最初に誕生した星であるファーストスターを135億年以上の過去に遡って観測する。ビックバンから数十万年の間、宇宙はプラズマ状態であり、光は自由電子によって散乱され霧がかかったような状態であった。これが冷えて、それぞれ別々に存在していた陽子、電子、中性子が再結合し、水素とヘリウムで構成される中性のガスへと変化していった。これによって、宇宙の霧が晴れたが、同時に宇宙空間はプラズマが存在しない、暗闇が支配する暗黒時代となった。しかし、宇宙の最初の星であるファーストスターが登場したことで、宇宙は再び電離され、無数の星が輝くプラズマで満たされた宇宙となった。このファーストスターを観測することで、宇宙がなぜ再び電離されたのか、現在の生命を形作るヘリウム、水素以外の原子はどこから来たのか、という宇宙の歴史の謎を解き明かすことにつながるかもしれないと期待されている。

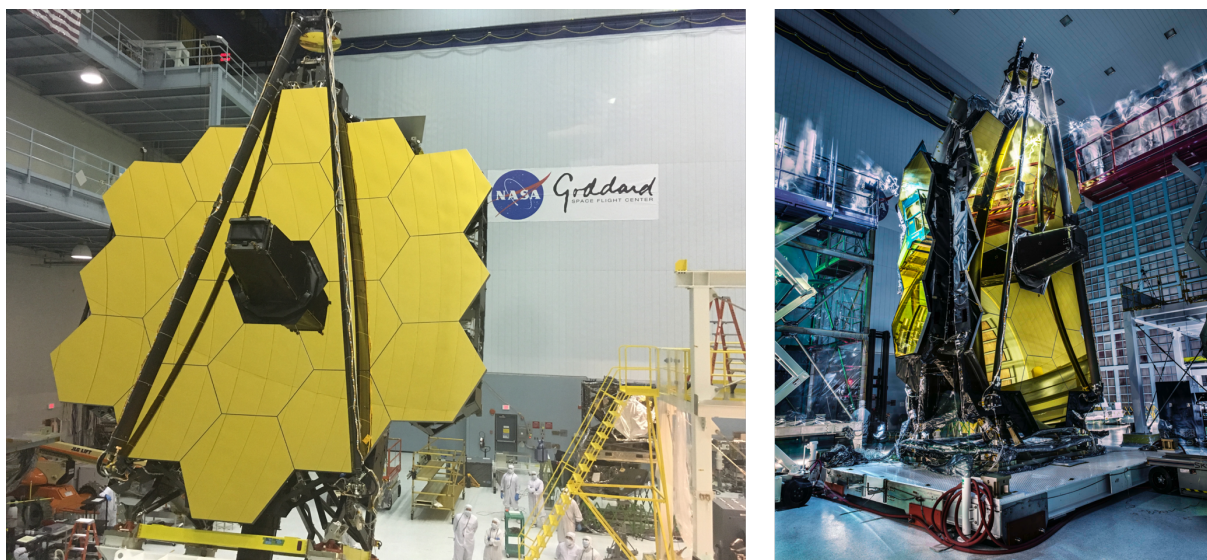


図 1-1 JWST の巨大な主鏡(左)と折りたたまれた状態の主鏡(右)^[3]

この様に宇宙の歴史はプラズマとともにあったと言っても過言ではない。また、地球の生命誕生にもプラズマは重要な働きをしている。生命誕生の黎明期である 23 億年や 7 億年前など、我々のいる天の川銀河と矮小銀河の衝突によって、大量の新星が誕生した。それらの新星のうち、特に大きな恒星はその後数千万年のうちに次々と超新星爆発をおこし、大量の宇宙線が地球へと降り注いだ。陽子や電子、ニュートリノを含む放射線の一種である宇宙線は大気を電離し、雲核を形成したことにより、地球は全球凍結などの激しい気象変動に見舞われた。これにより、生命は誕生と淘汰を繰り返し、新種の誕生など生命の進化を加速させた^[4]。

宇宙はプラズマで溢れているが、我々地球上の人類の目線で考えるとプラズマ状態のものは雷やオーロラなど限られた状況でしか存在しない。しかし、これらのプラズマの現象は古代から人々を惹きつけてきた。特に世界各地で観測される雷は、北欧神話の雷神トールやギリシャ神話のゼウスの王笏などの多くの神話が残っている。また、日本では雷の多い年は豊作になるということから、雷光を稲光や稲妻と読んでいる^[5]。この様に古来では、雷のようなプラズマ現象は神格化され、人々の畏怖の対象であった。しかし、人類は技術の発展によって、これらプラズマ現象を解明し、人工的に作り出すことに成功した。1700 年代、ベンジャミン・フランクリンによって雷の正体が放電現象であることが示され、その後の様々な放電工学の研究によって徐々にプラズマの性質が明らかにされていった。そして、現代では、核融合などに代表されるプラズマ物理学につながっていった。これらの研究を通して、人類はプラズマという現象を理解し、それを応用する術を身に着けてきた。現代ではプラズマは産業に様々な形で応用されている。プラズマから放出される光を用いた蛍光灯などの照明器具やプラズマの熱を利用するアーク溶接などの加工器具、プラズマ中の加速された電子、イオンを利用するエッチングや薄膜形成技術など、今やプラズマは私達の生活に欠かせないものとなっている。また放電工学やプラズマ物理学の進展によって、近年では大気圧下、室温と変わらないような低温でプラズマを生成する技術も開発され、医療や農業、産業分野での応用研究がより一層の盛り上がりを見せている。

1.2 プラズマとは

プラズマは、イオンと電子の荷電粒子を含み、全体としてこれらの電気的な中性が保たれている気体のことを指す。このプラズマを生成するには、プラズマ化させたい物質にエネルギーを与え電離させればよい。エネルギーを与える方法としては、レーザーや高速の電子の衝突、熱などの方法があるが、工業的にプラズマを利用する場合は主に放電が用いられる。放電でプラズマを生成する場合、10 Torr 程度以下の低気圧放電と 0.5 気圧以上の高気圧放電に大別される。

低気圧放電では、絶縁破壊電圧が低く、放電は数百 V 程度で開始する。放電が開始して過渡状態が落ち着くと陰極から放出された電子が電界で加速され、電極間の中性粒子を励起、電離するグロー放電が形成される。低気圧下では、中性粒子との衝突によってエネルギーを失う電子は極めて少ないため、電子の温度と、イオンや中性粒子の温度が異なる温度を持つ非平衡な状態となる。イオンや中性粒子は温度が低いため、低温プラズマとも呼ばれる。さらに放電電流を増加させていくと異常グロー放電を経て、アーク放電へと移行する。アーク放電では、放電電流は局所的に流れ、電極の加熱、蒸発を生じる。

一方、大気圧放電では、ストリーマの進展によって開始し、開始後すぐにアーク放電へと移行する。アーク放電では、加速された電子やイオンは周辺に存在する中性粒子に衝突を繰り返し、

電子やイオンと中性粒子の温度が等しい熱平衡状態となる。そのため、プラズマのガス温度は数千℃ほどの高温になり、別名、大気圧熱プラズマと呼ばれている。一方で、大気圧低温プラズマと呼ばれる、室温から 100℃程度のプラズマの生成方法も近年確立された。大気圧低温プラズマでは、電極構造やガス流、放電波形を工夫することで、アーク放電を長時間維持しないような工夫がなされている。このため、大気圧下であるにも関わらず、非平衡プラズマを生成することが可能となっている。

1.3 プラズマの応用

プラズマは物質の第4の状態として知られている様に、固体や液体、気体とは異なる物理的、化学的性質を示す。今日ではこのプラズマの性質を用いて、応用研究が行われている。

低気圧で生成されるグロー放電は、イオンや中性粒子の温度は低いものの電子の温度は数万℃と高く、盛んに電離や励起を行うことができる。そのため、物質表面の化学反応や性質の変化、形状変化などの効果を得ることができるため、薄膜形成やエッチングなどで応用されている。低気圧放電プラズマは、放電によって発光を生じるため、照明用の光源として応用されている。蛍光灯などは最たる例であり、アルゴンに微量の水銀が封入されており、励起された水銀から基底状態に戻る際に放出される紫外線を、蛍光灯内面に塗布されている蛍光物質で可視光へ変換している。他にも、低気圧ではないが、高圧水銀ランプや、高圧ナトリウムランプなどプラズマの発光は、照明器具として利用されている。

大気圧熱プラズマは、数千 K 以上の高温を得ることができ、主に熱源として広く応用されている。例えば、大気圧下でのアーク放電はその発生する熱を用いて、溶接や物質表面にセラミックなどの皮膜を作る溶射、フロンガスなど有害物質の分解など用いられる。また、ヘリウム中のグラファイト電極でアーク放電を行うと、新しい結晶構造の炭素原子であるフラーレン(C_{60})が得られることが発見されている。元素、同位体分析における原子発光分析法や質量分析法でも大気圧熱プラズマは用いられる。これらの分析法では、試料を気化、原子化、励起、イオン化する必要があるが、これに大気圧熱プラズマである 8000 K ~ 10000 K 程度の誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma: ICP) が利用されている^[6]。この分析分野で用いられる ICP では、内径 18 mm 程度の石英管とその外側に巻きつけられた誘導コイルから構成される。石英管内に 8~20 L/min ほどのアルゴンを流し、誘導コイルに高周波を印加することで、磁界によって、アルゴン中に渦電流を誘起し、プラズマが生成される。この ICP では、表面に電流密度が集中することで、ドーナツ上のプラズマとなる。これによって、試料は効率よく大気と分離され、気化、原子化、励起、イオン化が行われる。この様に分解や融解などの産業的な応用から、新構造の物質の創生、分析に至るまで、様々な分野に応用が進められている。

これまでに紹介した低気圧放電プラズマや大気圧熱プラズマは、気圧や温度など地球上とはかけ離れた環境でプラズマを生成し応用するものであった。そのため、その応用先としては、表面処理や材料加工など工業分野に偏っていた。しかし、近年、大気圧下で室温から数百℃程度のプラズマを安定生成することができる大気圧低温プラズマが近年開発された。このプラズマは、大気圧下であるため、真空チャンバーなどを必要とせず、人体に照射できるような温度のプラズマも実現可能であり、これまであまり応用が行われてこなかった医療や植物工学分野などへの分野で応用も検討されるようになった。これによって、植物や生体組織などの熱に弱い対象へのプラズマ照射が可能となり、植物細胞へのタンパク質導入^[7]や植物の成長促進^[8]、止血

[9],[10], 創傷治癒^[11], 殺菌^{[12],[13]}など医療、農業の分野での応用研究が盛んに行われている。これらの応用では、プラズマの生成に伴う電界や磁界、発光などによる物理的な作用もあるが、生体などへの応用においては、プラズマから生成される活性種が特に重要である。この活性種はプラズマ生成によって生じた励起状態や電離状態の粒子と、周囲に存在する窒素、酸素、二酸化炭素、水分などの様々な原子分子と化学反応することで生成される。特にプラズマの生命化学分野での応用で議論される活性種としては、スーパーオキシドラジカルや過酸化水素、OH ラジカル、一重項酸素、オゾン、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカル、一酸化窒素、二酸化窒素、ペルオキシナイトライトなどが挙げられる^[14]。例えば生体細胞への応用では、これらの活性種が、細胞膜の破壊や細胞機能の変化、DNA や RNA の破壊、アポトーシス^{[15],[16]}など様々な効果を及ぼすことが示唆されている。この様に活性種はプラズマの応用において様々な効果を与えるが、ナノ秒程度の極短寿命の活性種も存在する上、大気圧下での反応経路が無数に存在するため、原理解明を難しくしている原因でもある。

1.4 本論文の目的

近年、大気圧下で低温プラズマの安定生成が可能となり、医療や産業など様々な分野に応用されている。例えば、医療分野では殺菌^{[17],[18]}や止血^{[10],[13]}, 創傷治癒^[11], 産業分野では表面改質^[19]などに応用されている。これらの大気圧低温プラズマで処理効果を増大させるには、一般的には放電電力などにより単位体積に印加するエネルギーを増加させれば良い^[20]。しかし、この手法では同時にガス温度が上昇してしまい、低温という特性が失われてしまう。例えば、Ohkubo らは大気圧プラズマを用いて PTFE の接着を報告している^[21]。この研究では入力電力の増加により温度上昇したプラズマから高い接着効果と活性種生成が確認されている。しかし、生体のような熱に弱い物質に照射する場合には、温度の上昇が問題となる。この問題を解決するため、プラズマ生成前の He ガスを液体窒素で冷却することで、極低温から常温でのプラズマが生成可能な装置が開発された^{[22],[23]}。また、Oshita らはこの装置の発展させたプラズマジェットとして、大気圧温度制御プラズマ装置を開発した^[24]。この装置では、液体窒素で冷却した He ガスをヒーターの加熱によって任意の温度に制御した後、プラズマを生成することでプラズマガスの温度を-54℃～160℃の範囲で制御している。

また、大気圧低温プラズマの印加するエネルギーを増加させる以外で、処理効果を増大させる方法として、プラズマのガス種を変える方法がある。Takamatsu らは、アルゴンやヘリウムだけでなく、窒素や二酸化炭素、酸素などで大気圧低温プラズマを生成し、生成される活性種の種類や量が大きく変化することを報告している^[25]。また、ポリイミドフィルムの表面処理効果がプラズマのガス種に影響することを報告しており、二酸化炭素プラズマが最も処理効果が高いことを示している^[26]。このように大気圧低温プラズマの応用で対象に熱損傷を与えることなく、高い処理効果を得るためには、プラズマのガス温度を制御でき、かつ様々なガス種のプラズマが生成可能であることが求められる。

そこで、本研究では、様々なガス種のプラズマの安定生成とプラズマのガス温度制御の機能を両立させたマルチガス温度制御プラズマジェットの開発を行う。このプラズマジェットの作製には、近年のプラズマジェットの作製でも注目されている金属3D プリンター^{[27]–[29]}を用いることで、自由度の高いプラズマジェットの設計・製作が可能であることを示す。また、作製したマルチガス温度制御プラズマジェットを用いて、プラズマのガス種の選択性とプラズマのガス温度制御が殺菌や歯科材料接着、ゲノム編集などの応用に及ぼす影響を評価する。これらで得られた知見が

ら、大気圧低温プラズマのガス種の選択性およびガスの温度制御の機能の有用性を示し、大気圧低温プラズマの応用のさらなる発展と応用範囲の拡大に寄与する。

1.5 本論文の構成

本論文は7章で構成される。

2章「従来の大気圧低温プラズマの生成とプラズマのガス温度制御」では、大気圧低温プラズマの基本的な生成方法とその利用について述べる。また近年開発が進められている新しい機能を持った大気圧低温プラズマについて記述する。これらの大気圧低温プラズマでは、プラズマのガス温度を制御できることが求められていることを述べ、いくつかのプラズマのガス温度制御の手法を紹介する。

3章「マルチガス温度制御プラズマジェットの開発と特性測定」では、マルチガス温度制御プラズマジェットの設計と金属3Dプリンタによる製作について述べる。また製作したプラズマジェットの温度制御性能や活性種生成などの特性について述べる。

4章「マルチガス温度制御プラズマの殺菌への応用」では、マルチガス温度制御プラズマを用いた液中殺菌手法を開発し、プラズマのガス種やガス温度が殺菌効果に与える影響などの基礎特性を調べた結果について記述する。また目的に応じて超音波処理や間欠動作などの機能をマルチガス温度制御プラズマと組み合わせることで、より効果的にプラズマ応用が実現されることを示す。

5章「マルチガス温度制御プラズマの歯科分野への応用」では、マルチガス温度制御プラズマを歯科材料の接着と歯科ホワイトニングに応用した結果について記述する。

6章「マルチガス温度制御プラズマの植物工学への応用」では、マルチガス温度制御プラズマを、ゲノム編集ツールと水耕栽培へ応用した結果について記述する。

7章「結論」では、本研究でのマルチガス温度制御プラズマの開発と医療および植物工学への応用について総括し、今後の展望を述べる。

第 2 章

従来の大気圧低温プラズマの生成と プラズマのガス温度制御

2.1 従来の大気圧低温プラズマの生成方法

大気圧低温プラズマでは、ほとんどの原子や分子は室温に近い温度で存在しているが、1,000℃のイオン、10,000℃程度の電子や高い反応性を持ったラジカルなども存在している。つまり、中性粒子と電子、イオンなどとの温度が釣り合っていない非平衡状態であり、プラズマ状態であるにもかかわらず室温から数百℃程度の低温を実現している。この大気圧低温プラズマの生成では主に強い電界を印加することで生じる放電が用いられる。しかし、大気圧下で放電させると直ちに電流密度の高いアーク放電に移行するため、安定で均一なプラズマを生成する事は容易ではない。そのため、大気圧低温プラズマの生成では印加する電界やガス流、電極構造を工夫し、アーク放電に移行しない、またはアーク放電が長時間維持されない様に工夫されている。本節では、大気圧低温プラズマの基本的な生成方法について記述する。

2.1.1. バリア放電プラズマ

バリア放電プラズマの概要を図 2-1(a)に示す。一對の電極間にガラスなどの誘電体を配置し、電極間に交流の高電圧を印加することで図 2-1(b)に示すようなプラズマを生成できる。電極間に高電圧を印加すると放電空間に微細な放電が生じる。放電により移動した電荷は誘電体表面に蓄積され、やがて放電が発生しなくなる。電圧の極性を反転させることで、また放電が起こる。これを繰り返すことで、放電空間内に連続的なプラズマが生成される。電極間の距離は数 mm 程度であるため、処理対象物には制限があるが、大面積で均一にプラズマを生成することができるため、表面処理などに応用されている。

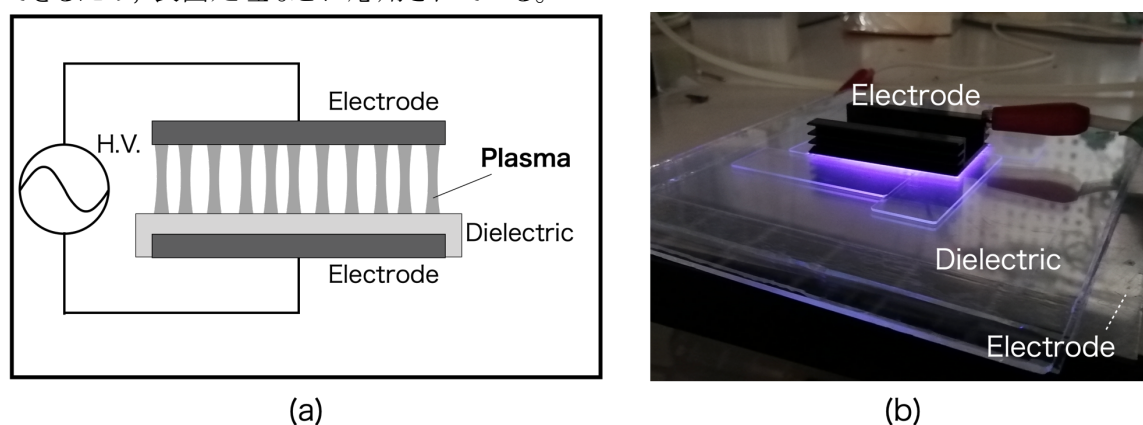


図 2-1 バリア放電プラズマ

(a): バリア放電プラズマ概要, (b): バリア放電の様子

2.1.2. プラズマバレット

バリア放電プラズマを発展させた生成方法にプラズマバレットがある。プラズマバレットの概要を図 2-2(a)に示す。内径数 mm の誘電体の円筒にヘリウムやアルゴンなどの希ガスを流し、誘電体外側に配置した電極間に交流の高電圧を印加することで円筒内にプラズマを生成する。生成されたプラズマは、プラズマガスによって円筒先端から押し出されるため、放電の生成領域から離れた場所の処理も可能である。生成されたプラズマを高速度カメラなどで観察すると、弾丸状の発光の移動が観察されるため、このプラズマの名前の由来となっている。図 2-2(b)は、プラズマガスの流量を変化させた際のプラズマの様子であり、ガス流量を増やすほどプラズマが伸

長している。簡単な構造で、処理対象物の制約も少なく、容易に大気圧低温プラズマの生成が可能なることから、医療や農業、表面処理まで様々な分野に応用されている。しかし、安定してプラズマを生成させることのできるガス種はヘリウムやアルゴンなどの希ガスに限られている。

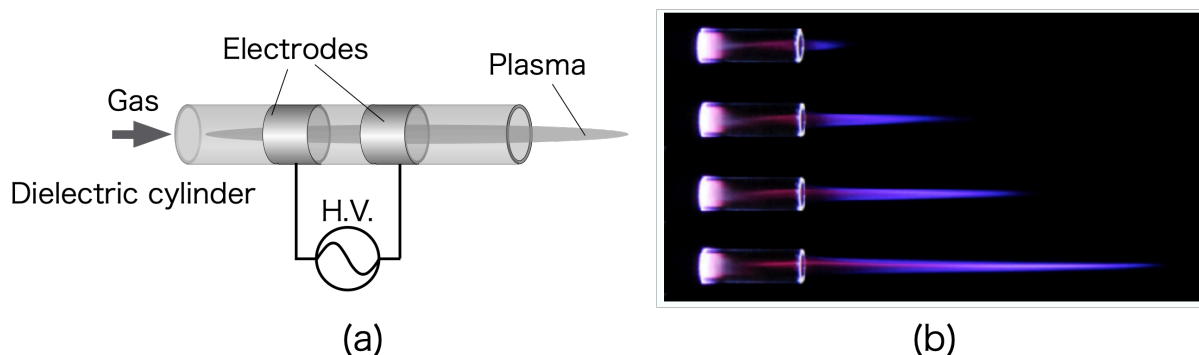


図 2-2 プラズマバレット

(a): プラズマバレットの概要, (b): ガス流量増加によるプラズマの伸長

2.1.3.コロナ放電

図 2-3(a)に示すように、平板電極に対向する針電針に高電圧を印加することで、通常よりも低い電圧で放電が開始する。このとき、針電極先端には、電界が集中しており、局所的なプラズマが生成されている。これをグローコロナと呼ぶ。さらに印加する電圧を上昇させると図 2-3(b)に示すようなストリーマコロナと呼ばれる無数の細い放電が観察される。これらはコロナ放電と呼ばれ、集塵機や除電器などに利用されている。

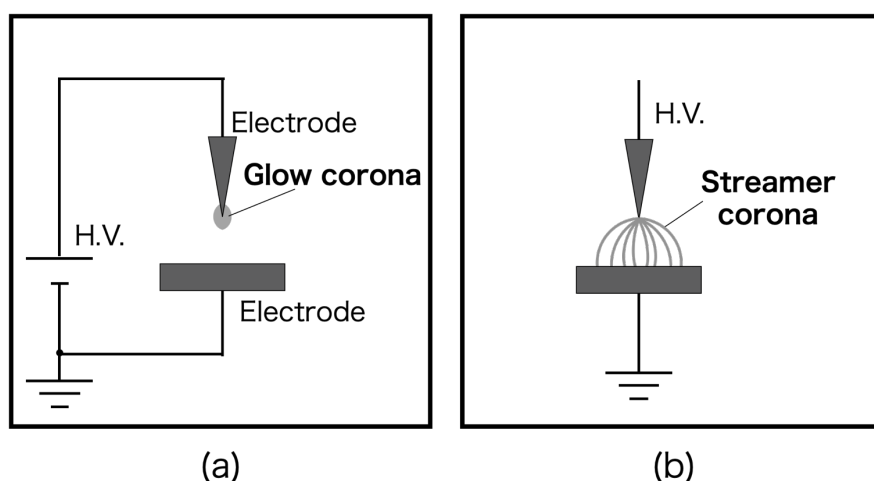


図 2-3 コロナ放電

(a): グローコロナ, (b): ストリーマコロナ

2.1.4. グライディングアーク

図 2-4 にグライディングアークの概要を示す。対向電極にパルス状の高電圧を印加することで、放電を生成する。この放電をガス流によって吹き流すと放電によって生成されたイオンや電子が移動し、放電箇所が下流側に移動する。グライディングアークの対向電極は下流に行くほど電極間距離が広がる形状であるため、ある程度まで下流に移動すると放電は再び上流側に移動する。放電が外部に露出するため、処理対象へ放電損傷を与える可能性があるため、注意が必要である。プラズマが様々なガス種で高密度のプラズマを生成することができ、表面処理などに応用されている。

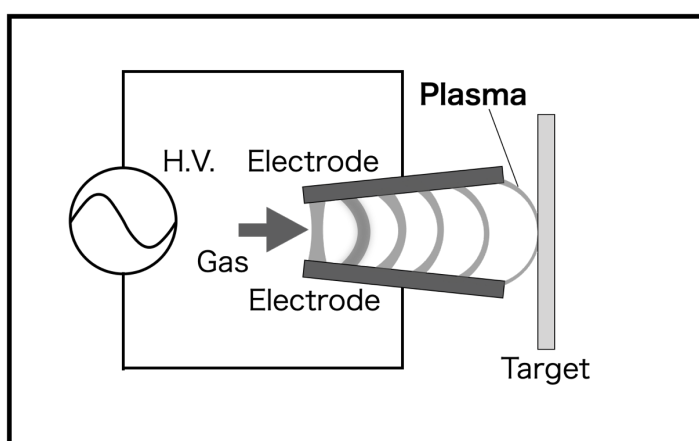


図 2-4 グライディングアークの概要

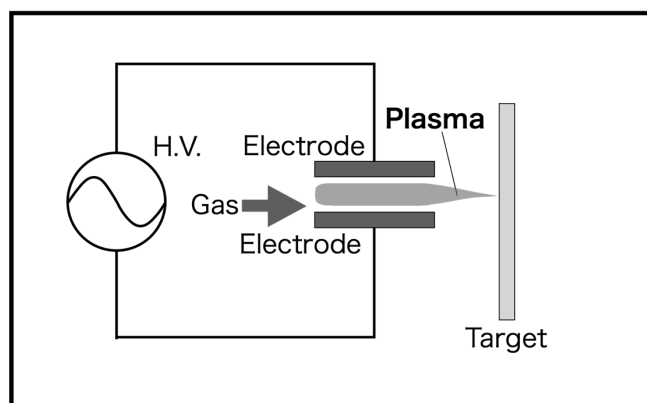
2.2 新しい大気圧低温プラズマジェットの開発

大気圧低温プラズマでは、2.1 で示したように様々な生成方法が検討され、応用に向けた研究が行われている。さらにこれらの研究が進み、新たな機能、構造をもったプラズマの生成方法の検討が行われている。また、近年 3D プリント技術が発達したことにより、これまで作製不可能であった、小型かつ複雑形状を持つプラズマジェットや、安価で使い捨て可能なプラズマジェットなど積極的に応用されている^{[27],[30]}。本節では、新たな機能、構造をもった大気圧低温プラズマジェットについて紹介する。

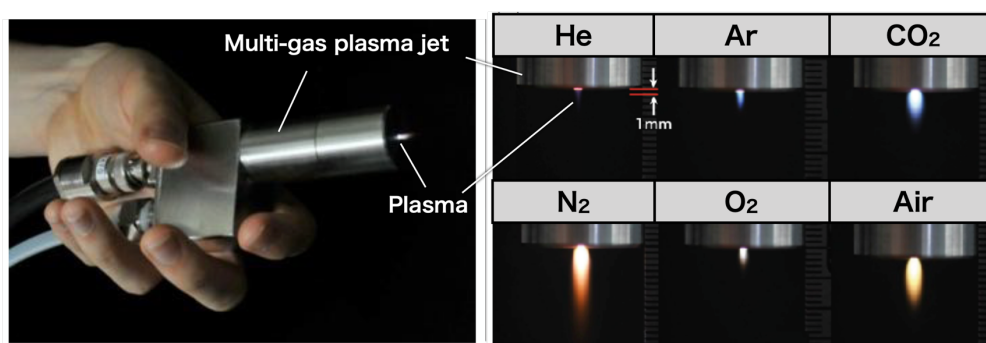
2.2.1. 大気圧マルチガスプラズマジェット

プラズマのガス種は、プラズマから生成される活性種の種類や量に大きく影響を及ぼすため、各種応用に合わせてガス種を変更できることが望ましい^[31]。しかし、従来のプラズマ生成では、大気圧低温プラズマの生成方法によって使用できるガス種に制限があった。また、様々なガス種でプラズマ生成が可能なグライディングアークでは、処理対象に放電損傷を与えてしまうため、応用先に制約があった。このため、大気圧下で様々なガス種のプラズマを安定して生成することのできる大気圧マルチガスプラズマジェットが開発された。大気圧マルチガスプラズマジェットの概要を図 2-5(a)に示す。また大気圧低温プラズマジェットの外観と各種プラズマ生成の様子を

図 2-5(b)に示す。この大気圧マルチガスプラズマジェットでは、アルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、二酸化炭素、空気、またはこれらの混合ガスなどのガスを、内部に配置された対向電極でプラズマ化して、ジェット外部へ照射する。そのため、放電が処理対象に触れることもなく、放電損傷なくプラズマ処理が可能である。



(a)



(b)

図 2-5 大気圧マルチガスプラズマジェット^[26]

(a):大気圧マルチガスプラズマの概要図,

(b): 大気圧低温プラズマジェットの外観と各種プラズマ生成の様子

2.2.2. 金属 3D プリンタで造形したプラズマジェット

従来のプラズマジェットでは、導電性があり、耐熱性も優れる金属が用いられており、これらのほとんどは機械加工や溶接によって製造されている。そのため、複雑または曲線形状のプラズマジェットを作る場合は工程が複雑になる、部品点数が多くなる、製造コストが高くなるなどの問題があった。

近年では、加工造形の手段として金属 3D プリンタが注目され、応用が検討されている。例えば、金属 3D プリンタで患者それぞれに最適化した形状の人工骨を造形し、手術での使用もなされている^[32]。また、ほぼ全ての部品を 3D プリンタによって製造したロケットエンジンなども開発されており^[33]、様々な分野での応用が進められている。大気圧低温プラズマの研究でも金属の 3D プリンタの利用が検討されている。Barillas らは、液体の前駆体を大気圧低温プラズマで重合し機能性薄膜を形成する研究で、前駆体を噴霧するミストチャンバー部分をステンレスの 3D

プリンタを用いて製作し、内部容積や形状を評価している^[28]。また、プラズマジェット本体でも3Dプリンタの応用が進められている。Takamatsu らは、図 2-6 に示すような直径 3.7 mm、長さ 60 mm のチタン製の小型の大気圧低温プラズマジェットを金属の 3D プリンタを用いて製作している^[29]。このプラズマジェットでは、安定したアルゴン、ヘリウム、窒素のプラズマの生成を確認している。加えて、このプラズマジェットを発展させたものとして、内視鏡下でプラズマを照射できるような直径 2.8 mm のチタン製プラズマジェットが金属の 3D プリンタで製造されている。このプラズマジェットでは生体豚を用いた実験において、止血効果が確認され^[30]、実用に足ることが確認されている。この様に、金属 3D プリンタの普及によって、小型かつ複雑形状の大気圧低温プラズマジェットの製作例が多数報告されており、より自由度の高いプラズマジェットの設計、製作が可能であることが示されている。

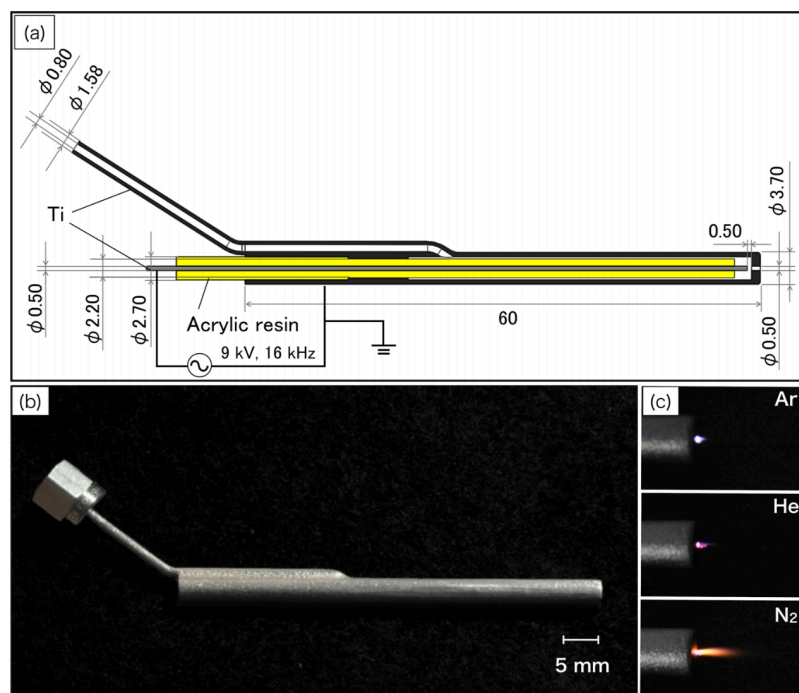


図 2-6 金属の 3D プリンタで製作された小型の大気圧低温プラズマジェット^[29]

(a): プラズマジェット断面図, (b): プラズマジェット外観,
(c):アルゴン、ヘリウム、窒素のプラズマ生成の様子

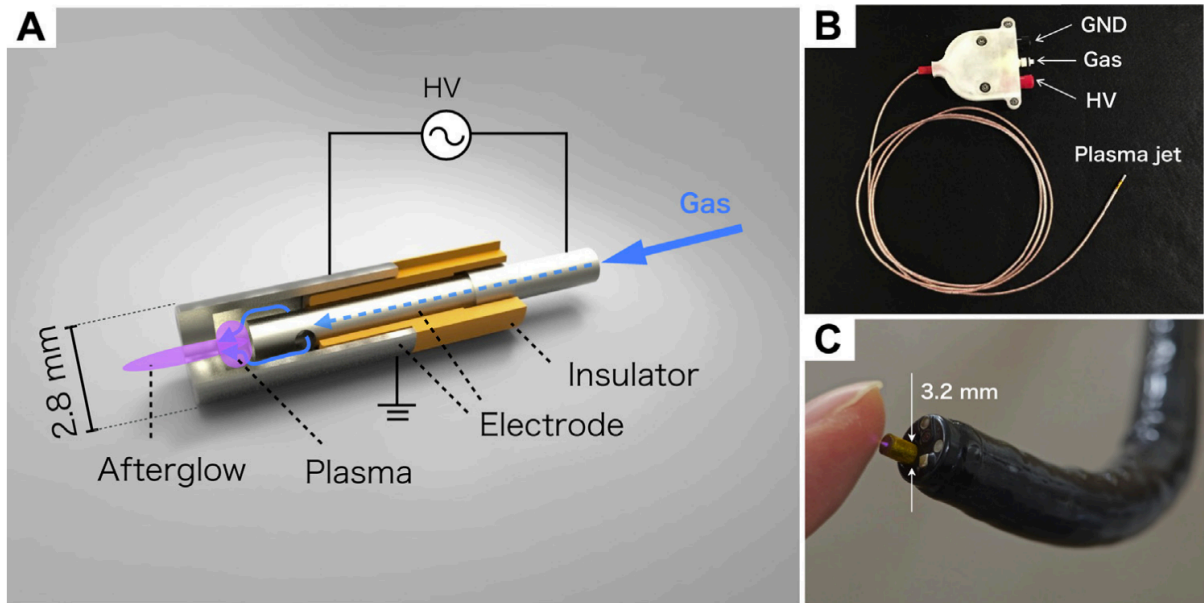


図 2-7 内視鏡下で用いることのできるプラズマジェット^[30]

2.3 大気圧低温プラズマのガス温度制御の要求

大気圧低温プラズマの生成では、室温のガスにエネルギーを印加してプラズマを生成するため、ガス温度が上昇してしまう。また、このプラズマのガス温度は、ガス流速やガスの種類、プラズマの照射距離、放電電力などによって大きく変化する。例えば、ガスの種類によりプラズマのガス温度は大きく変化する。Takamatsu らは、ガス種ごとにプラズマのガス温度を報告しており、プラズマ出口より1 mm の地点において、アルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、空気、二酸化炭素のプラズマのガス温度はそれぞれ 36.0, 41.5, 51.7, 50.1, 57.0, 53.9℃となることが報告されている^[26]。また、これらのプラズマのガス温度は放電電力を変えることで容易に変化する^[22]。そのため、これまで紹介した大気圧低温プラズマは、低温と言われるが、そのガス温度は室温から数百℃程度と大きく幅があった。

近年、大気圧低温プラズマの応用範囲拡大によって様々な対象へのプラズマの照射が検討されており、プラズマのガス温度は照射対象によっては重要な意味をもつ場合がある。例えば、生体や樹脂などの熱に弱い対象へのプラズマ照射では、プラズマのガス温度は室温や体温などに近いことが求められる。歯への応用では、歯髄の温度が 5.5℃上昇するだけでも、象牙芽細胞などへのダメージがあるため^[34]、可能な限り体温に近い状態で照射を行う必要がある。特に熱に弱い植物への応用では、場合によっては室温以下での照射も求められる^[7]。また、材料処理では、応用するときの材料の温度によって大きく物性が変わるものもある。半導体での低圧のプラズマによるエッチングでは、シリコンウェーハを 170 K で冷却しながら処理することで、深いトレンチ形成においてサイドエッチングを低減できるため、有効であることが示されている^[35]。また、基材の加熱と同時にプラズマ照射を行うことで処理効果が向上すること^[21]なども報告されている。

これまでの大気圧低温プラズマでは、このようなプラズマのガス温度の変更が必要となった場合、放電電力や照射距離、ガス流速を変えることで制御されていた。しかし、上記の手法は、プ

ラズマのガス温度を間接的に変化させるため、制御できる幅が小さいことに加え、原理的に室温以下のプラズマは生成できなかった。

これらのプラズマのガス温度制御の要求の高まりを受けて、プラズマのガス温度を直接制御する手法が研究されている。本節では、現在までに行われているプラズマのガス温度制御の研究について述べる。

2.3.1. 極低温の大気圧低温プラズマの生成

これまでの大気圧プラズマの応用研究では、主に数千 K 以上の大気圧熱プラズマと数百 K の大気圧低温プラズマが用いられていた。これに対して、Ishihara らは第三の温度領域のプラズマとして、極低温から室温までのクライオプラズマ (cryo-plasma) の生成について報告している^[23]。図 2-8 にクライオプラズマの概略図を示す。クライオプラズマは、石英ガラス管に He ガスを流し、中心のタングステン電極に $0.44 \sim 3.5 \text{ kV}_{p-p}$, 10 kHz の電圧を印加することで生成している。このとき、ガスは液体窒素によってプラズマ生成前に冷却され、その後にプラズマを生成することで、零下のプラズマ生成を実現している。24.4℃の大気下でクライオプラズマを生成するとガラス管から 3 mm 離れた地点では -42.4℃となる。また、周辺雰囲気温度や組成を制御することのできる専用のチャンバーを用いることで、-93.2℃まで低下させることを示している。

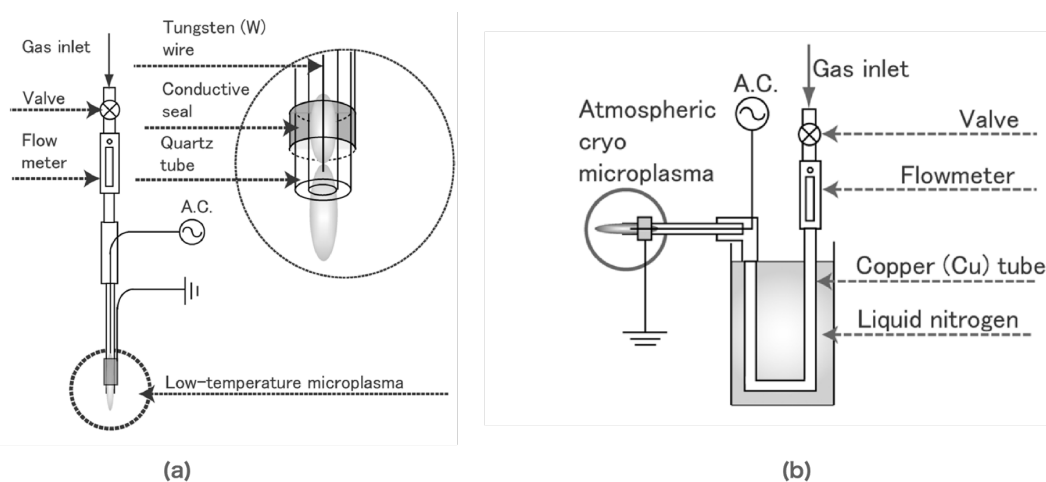


図 2-8 Ishihara らの開発したクライオプラズマ^[23]

(a): クライオプラズマのプラズマ生成部分の概略図, (b): クライオプラズマの概略図

2.3.2. 大気圧温度制御プラズマの開発

前項のクライオプラズマでは、大気圧下で氷点下のプラズマの生成に成功した。Oshita らはこのプラズマ装置を発展させて、零下から高温までプラズマのガス温度を制御することのできる大気圧温度制御プラズマを開発した^[24]。図 2-9 に示す大気圧温度制御プラズマは、ボンベから供給された室温のヘリウムを液体窒素によって冷却し、その後ヒーターで任意の温度まで加熱する。この温度の制御されたガスを用いてプラズマを生成する。プラズマのガス温度はヒーターにフィードバックされ、プラズマのガス温度を所望の値に制御する。このプラズマ装置では、ヒーターへの入力電力を変化させることで、プラズマのガス温度を -54 ~ 160℃まで 1℃単位で制御が可能なことを示した。またこのプラズマ装置を応用した研究では、プラズマのガス温度を上昇さ

せることで、一重項酸素や OH ラジカルの生成量を増加させ、プラズマ照射で得られる殺菌効果が向上することが述べられている^[36]。

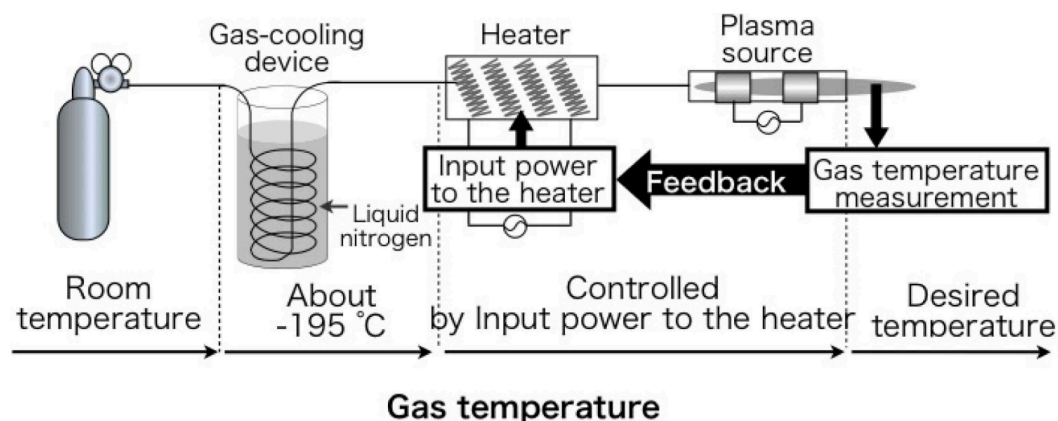


図 2-9 Oshita らの開発した大気圧温度制御プラズマ^[24]

2.3.3. 様々なガス種でプラズマを生成できる温度制御プラズマ開発の課題点

これまで示されている温度制御可能なプラズマジェットでは、極低温から 100℃を超えるような温度までプラズマのガス温度を制御できることが示された。しかし、プラズマガスとして用いられるのは、ヘリウムがほとんどで、アルゴンなどの他の希ガスはもちろん、分子性のガスは用いられていない。これは、これまでに検討されている温度制御の方式によるところが大きいと考えられる。これまでのプラズマの温度制御は、プラズマガスを-196℃の液体窒素を用いて一度低温まで冷却してからプラズマ化するため、液体窒素よりも沸点、融点の低いアルゴンや酸素、二酸化炭素でのプラズマ生成は原理的に難しいと考えられる。また、ヘリウムやアルゴン以外のガスではそもそも大気圧低温プラズマを安定して生成することが難しいという問題もある。

もう一つの課題点として、利便性が挙げられる。これまでの温度制御では液体窒素を用いるため、液体窒素を供給できる環境下でしか応用ができなかった。この点は応用先を制限してしまう可能性がある。

2.4 まとめ

この章では、これまでの大気圧低温プラズマの生成方法として、バリア放電、プラズマバレット、コロナ放電、グライディングアークを紹介した。これらの大気圧低温プラズマは、大面積でのプラズマ生成やリモート処理など、それぞれの特徴を生かした応用がされている。また、近年では、より応用先の用途に沿ったプラズマジェットの開発が行われており、様々なガス種でプラズマを生成可能なプラズマジェットや金属 3D プリンタを用いたプラズマジェットの開発がおこなわれていることを示した。これらの大気圧低温プラズマでは、プラズマのガス温度を変更できることが求められており、プラズマのガス温度を制御する手法の研究が行われている。プラズマのガス温度制御の例として、極低温プラズマと大気圧温度制御プラズマを紹介し、プラズマのガス温度制御の現状について述べた。

この様に、大気圧低温プラズマの生成について、電極の構造や放電を制御する手法の研究が進められた結果、新たな機能や構造をもつ大気圧低温プラズマの開発も容易となった。加え

て、加工技術の進歩によって、プラズマジェット的设计の自由度も上がっている。これによって、プラズマジェットの大きさや使用するガス、実現したい温度など、それぞれの分野での応用に適した特徴を持つプラズマジェットをカスタマイズして製作することも可能となってきた。

第 3 章

マルチガス温度制御プラズマジェット の開発と特性測定

3.1 はじめに

1 章において、大気圧低温プラズマの応用で対象に熱損傷を与えることなく、高い処理効果を得るためには、プラズマのガス温度を制御でき、かつ様々なガス種のプラズマが生成可能であることが必要であることを述べた。2 章では、これらの背景を踏まえた上で、様々なガス種でプラズマを生成可能なマルチガスプラズマジェットと、ヘリウムプラズマのガス温度を制御できる温度制御プラズマジェットを紹介した。これまでの温度制御方式で用いられる液体窒素での冷却が使用できるガス種の制限や利便性の低下を招いていることを指摘した。

本章では、He に加え、酸素や二酸化炭素などの様々なプラズマのガス温度制御が可能な機構を検討した。この温度制御機構では二酸化炭素や酸素ガスを冷却することによる液化や固化を防ぐため、液体窒素を用いた過度な冷却は避ける必要がある。そのため、開発した装置では先行研究とは異なり、プラズマ生成用ガスを温度制御したプラズマ生成装置筐体の内部で滞留させる機構を設けた。これによってプラズマ生成用ガスは筐体との間で熱交換され、プラズマ生成後のガス温度制御が実現される。また、温度制御範囲を広げるため、数値流体解析を用いたモデルの設計と解析を行った。この複雑形状のプラズマジェットを製作するため、金属の 3D プリンターを用いた。本章では、数値流体解析による装置設計と金属3D プリンタによる装置製作、製作したプラズマジェットの温度制御性能などの特性について述べる。

3.2 マルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御機構の原理

マルチガス温度制御プラズマジェットでは、温度を制御したガスでプラズマを生成することでプラズマのガス温度制御を行う。これを実現するために、プラズマ生成前のガス温度をプラズマジェットとの熱交換によって可変する機構を備えたマルチガス温度制御プラズマジェットを設計した。概念図を図 3-1 に示す。マルチガス温度制御プラズマジェットでは、温度制御流体 (Temperature-Control Fluid: TCF) を用いて、プラズマジェット管体を冷却、または加熱する。このプラズマジェットにプラズマガスを導入することで、プラズマジェット管体とガスとの間で熱交換を行い、プラズマ生成前のガス温度を制御する。つまり、温度制御されたガスを用いてプラズマを生成する事で、プラズマのガス温度制御を実現する。

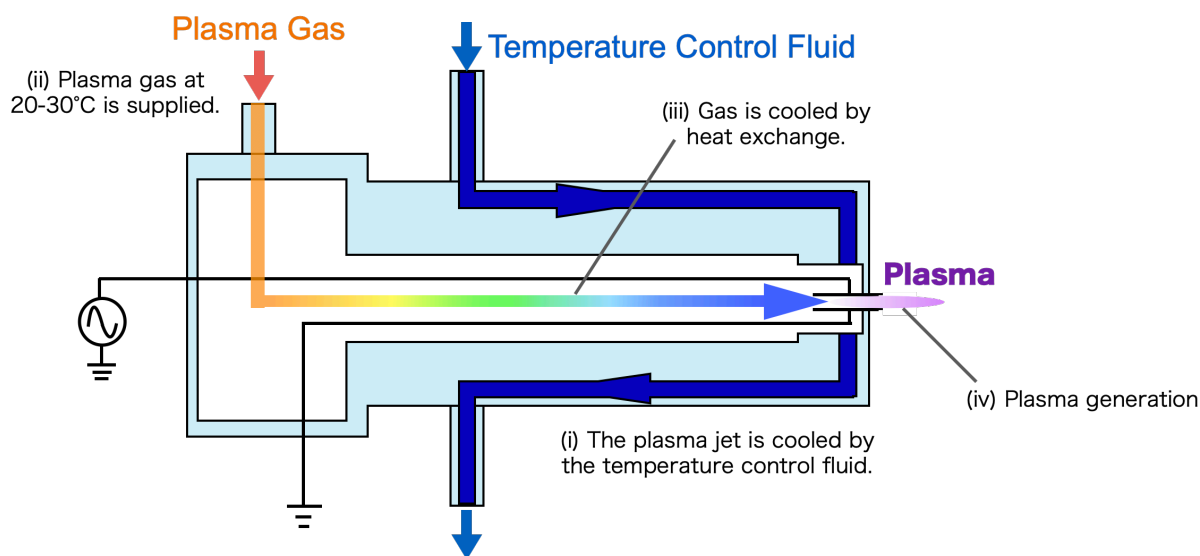


図 3-1 マルチガス温度制御プラズマジェットの概念図

3.3 マルチガス温度制御プラズマジェットの試作

3.3.1. 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの設計

3.2 で示した機構を評価するため、マルチガス温度制御プラズマジェットを試作した。設計したプラズマジェットを図 3-2 に示す。このプラズマジェットでは、2.2.1 で示したマルチガスプラズマジェットに温度制御機構を加えた形で設計している。TCF とプラズマジェット管体、プラズマジェット管体とプラズマガスでは、流路中で熱交換を行うため、熱交換に大きな影響を及ぼす流路の表面積をなるべく大きく確保する必要がある。そこで、プラズマジェット管体内部で TCF 流路は二往復させ、さらにガス流路は TCF 流路の外側に螺旋を描く様に配置した。これによって、プラズマジェット内の TCF 流路の表面積は 3243 mm^2 、ガス流路の表面積は 8122 mm^2 となった。また流路内を除いたプラズマジェット管体外側の表面積は 15652 mm^2 であり、体積は 75887 mm^3 となった。

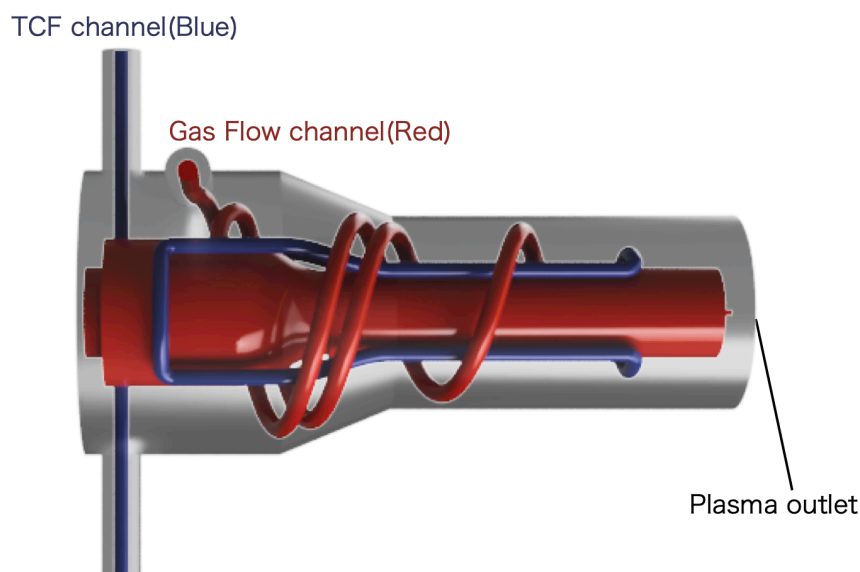


図 3-2 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの概要図

3.3.2. 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの製作

この装置は、筐体の内部に複雑な流路を持つため、一般的な機械加工での製作は難しい。そこでプラズマ筐体は金属の 3D プリント技術を用いて製作した。製作した試作版マルチガス温度制御プラズマジェットを図 3-3 に示す。3D プリント技術は造形技術の一つであり、低コストで自由度が高いため、プラズマジェットの製作においても導入が検討されている^{[27]–[29]}。また、近年では金属 3D プリンタで製作した直径 3 mm 程度の内視鏡用プラズマジェットなどが報告されている^[30]。今回のプラズマ筐体製作には金属粉末をレーザー焼結させる DMP (Direct Metal Printing) 方式の 3D プリンタ (Prox300, 3DSYSTEMS Inc., CA, USA) を用いた。プラズマジェット本体は、SOLIZE Corporation, Tokyo, Japan によって製作された。金属粉末には、アルミニウムシリコン合金 (AlSi12) を使用した。アルミニウムとアルミニウムシリコン合金の組成及び物性値を表 3-1 に示す。アルミニウムシリコン合金は耐食性および鋳造性に優れている。また、純アルミニウムと比較すると熱伝導率は低下するものの、引張強度などの機械的強度の面で優れている。アルミニウムシリコン合金の金属粉の粒度分布では、D10, D50, D90 がそれぞれ 9 μm , 20 μm , 36 μm であった。3D プリンタのパラメータは、1 層あたりの厚さが 40 μm で、造形物の標準公差は ± 0.3 mm であった。プラズマジェットは 3D プリンタで造形後、高い精度が必要なネジ部分や気密性が必要な箇所については、工作機械によって追加工した。プラズマ出口付近の部品と高電圧コネクタは、東京工業大学、オープンファシリティセンター、設計製作部門にて機械加工で製作した。製作したプラズマジェットの TCF 流路およびガス流路の状態を確認するため、水を流路中に流し、漏れやつまりが無いことを確認した。

表 3-1 アルミニウム及びアルミニウムシリコン合金の組成と物性値

	Al (A1050)	AlSi12 (ADC1)
composition	Al: Over 99.5%	Si: 11-13% Al: the rest
Tensile strength [N/mm ²]	78 ^[37]	290 ^[38]
Hardness [HRB]	20 ^[39]	38 ^[38]
Density [kg/m ³]	2.70 ^[40]	2.65 ^[38]
Specific heat [J/(kg · K)]	917 ^[37]	963 ^[38]
Thermal Conductivity [W/(m · K)]	225 ^[37]	121 ^[38]
Conductivity [%IACS]	59 ^[37]	31 ^[38]

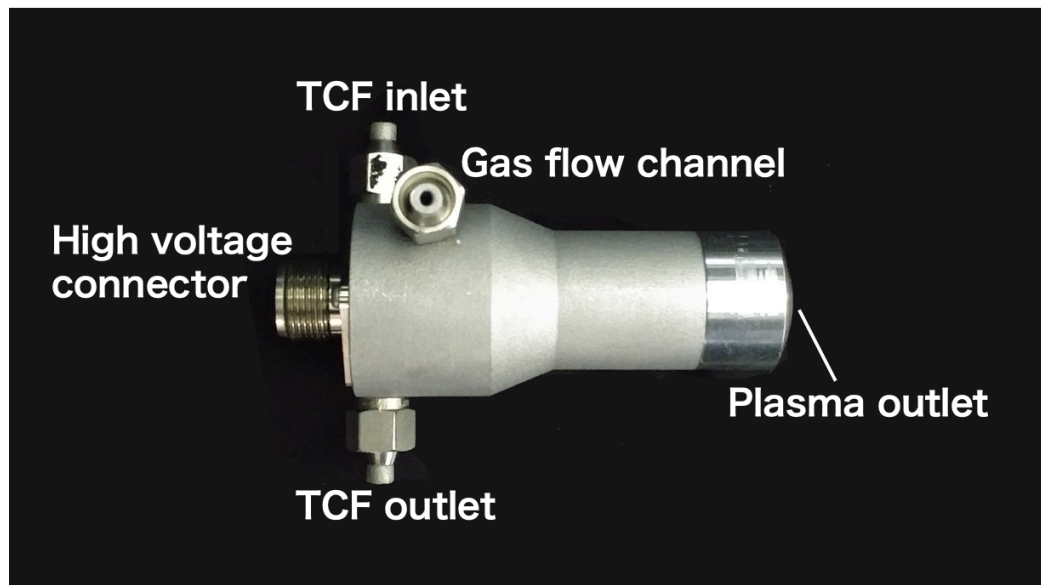


図 3-3 金属 3D プリンタで作製した試作版マルチガス温度制御プラズマジェット

3.3.3. 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットによるプラズマ生成

試作したマルチガス温度制御プラズマジェットを用いてヘリウム、アルゴン、窒素、二酸化炭素、酸素、空気のプラズマを生成した様子を図 3-4 に示す。各ガスを 3 L/min でプラズマジェットに供給し、高電圧コネクタに 9 kV、16 kHz の正弦波を印加することでプラズマを生成した。各ガスにおいて、安定したプラズマ生成が確認された。金属の 3D プリンターで造形した複数の流路をもつプラズマジェットでの安定したプラズマ生成が可能なことを示した。

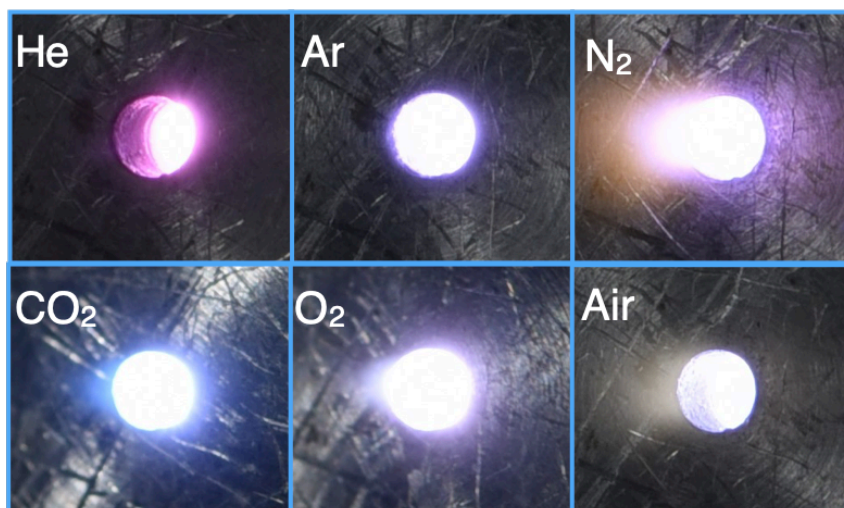


図 3-4 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットで生成した各種ガスのプラズマ

3.3.4. 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能の評価

試作版マルチガス温度制御プラズマジェットに TCF を供給し、温度制御性能を評価した。TCF は、 $-40\sim 0^{\circ}\text{C}$ までは 80w%エタノール、 $10\sim 95^{\circ}\text{C}$ では水を使用した。TCF は、 $-40\sim 0^{\circ}\text{C}$ では低温恒温水槽 (NCB-2410 型, EYELA, 東京理化器械株式会社), $10\sim 95^{\circ}\text{C}$ では恒温水槽 (NCB-1210B, 東京理化器械株式会社, Tokyo, Japan)によって供給した。筐体温度はプラズマジェットの中央部のテーパ部分に K 型熱電対を設置し、熱電対ロガー (RX-450K, アズワン株式会社, Osaka, Japan)を用いて測定した。測定時の気温と湿度はそれぞれ, 18.9°C , 21%であった。

TCF と筐体温度の関係を図 3-5 に示す。筐体温度は, TCF の温度変化とともに変化した。TCF 温度が筐体温度に影響を与えると仮定し単回帰分析を行うと, 決定係数は 0.9987 となった。このことから, TCF 温度を変化させることで筐体温度が線形に変化する事が示された。

筐体温度とガス温度, プラズマのガス温度の関係を図 3-6 に示す。筐体温度を $-10\sim 85^{\circ}\text{C}$ の範囲で変化させると, 二酸化炭素ガスでは $-14\sim 75^{\circ}\text{C}$, 窒素ガスは $-12\sim 67^{\circ}\text{C}$, アルゴンガスは $-10\sim 62^{\circ}\text{C}$, 酸素ガスは $-12\sim 67^{\circ}\text{C}$ で線形に変化した。筐体温度がガス温度に影響を与えると仮定し単回帰分析を行うと, 二酸化炭素, 窒素, アルゴン, 酸素の決定係数はそれぞれ, 0.9995, 0.9973, 0.9993, 0.9987 となった。このことから, 筐体温度を変化させることでガス温度が線形に変化する事が示された。プラズマを生成するとそれぞれのガス温度が上昇した。その結果, 筐体温度を $-10\sim 85^{\circ}\text{C}$ の範囲で変化させると, 二酸化炭素プラズマでは $-13\sim 87^{\circ}\text{C}$, 窒素プラズマでは $27\sim 86^{\circ}\text{C}$, アルゴンガスは $5\sim 82^{\circ}\text{C}$, 酸素ガスは $12\sim 95^{\circ}\text{C}$ で線形に変化した。

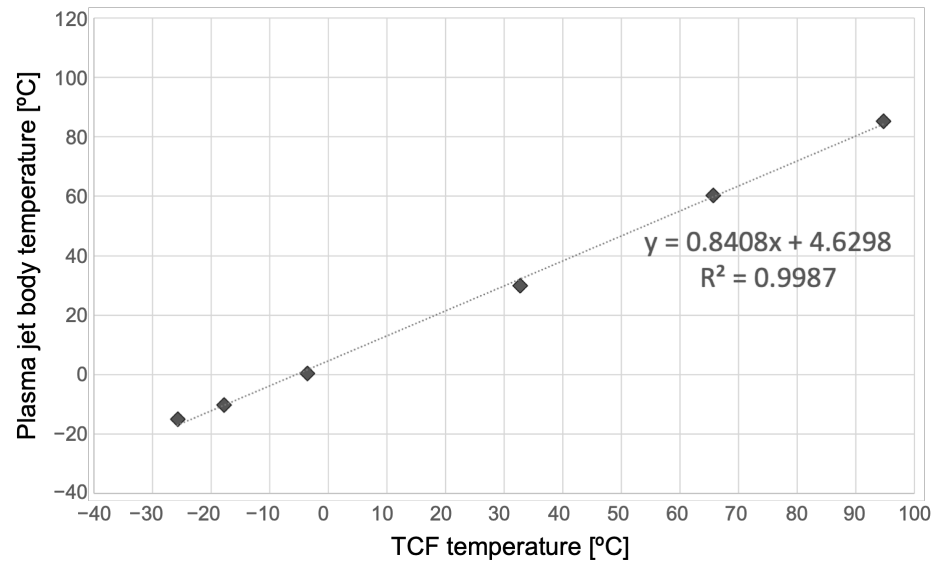


図 3-5 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの
TCF と筐体温度の関係

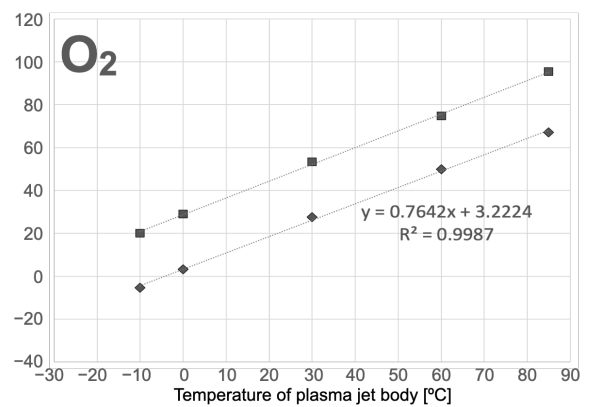
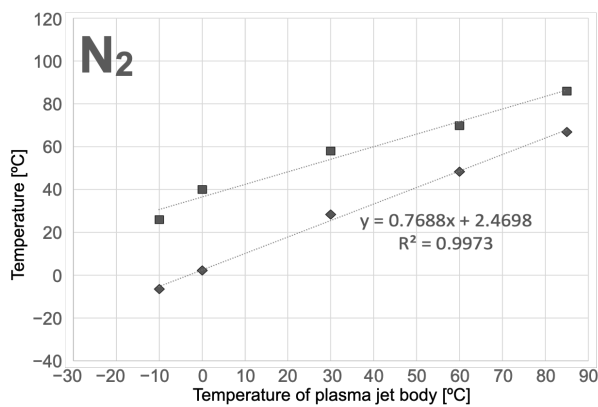
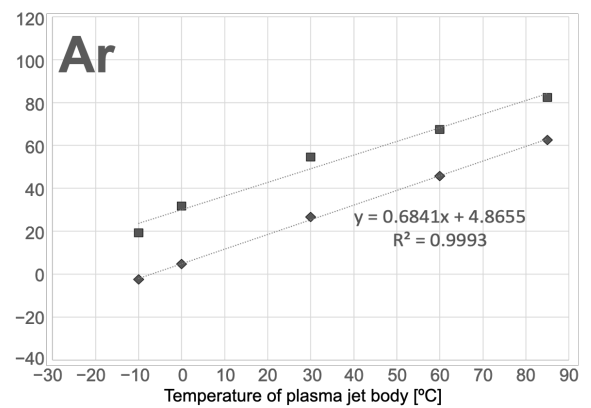
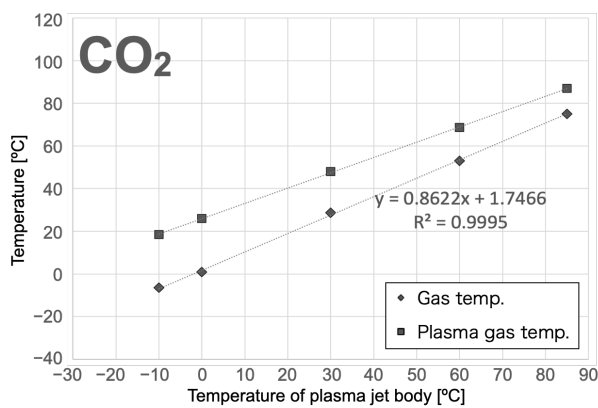


図 3-6 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの
筐体温度とガス温度, プラズマのガス温度の関係

3.3.5. 試作版マルチガス温度制御プラズマジェットの評価と改良点

試作したマルチガス温度制御プラズマジェットでは、TCF 温度を制御することで、筐体を介してプラズマ生成用のガスと熱交換を行い、ガス温度およびプラズマのガス温度を変化させることに成功した。プラズマの筐体を $-30\sim 85^{\circ}\text{C}$ まで変化させると、プラズマのガス温度制御範囲は、最低 5.1°C から最大 95°C となった。TCF、筐体温度、ガス温度、プラズマのガス温度はそれぞれ線形に変化したため、目標の温度とガス種を設定することで、温度制御は容易に行えると考えられる。

試作したマルチガス温度制御プラズマジェットでは温度制御面とおよび操作面で改善点が得られた。温度制御面の改善点として、温度追従性が挙げられる。試作したマルチガス温度制御プラズマジェットでは、TCF 温度を変更してから、プラズマジェットの筐体の温度変化には時間を要していた。これは、プラズマジェットの筐体に熱が蓄積するためであり、迅速な温度制御の実現には、筐体を可能な限り小さくし、熱容量を少なくすることが求められた。筐体温度は、TCF 温度に比例して変化し、その比例定数は 0.84 であった。また、ガス温度も筐体温度に比例して変化し、その比例定数は二酸化炭素で 0.8622、窒素で 0.7688、アルゴンで 0.6841、酸素で 0.764 であった。これらの比例定数は TCF 流路およびガス流路の表面積を増加させるなどの改良によって、より向上させられると考えられる。

操作面では、TCF の導入口と排出口、ガスの導入口がプラズマジェットのそれぞれ別々の方向に配置されており、使用時に配管が煩雑となる問題点があった。操作や処理を行う上では、ガスや TCF の配管が 1 方向にまとめて配置されることが望ましい。また、プラズマジェット内部のガス流路が複雑となったことにより、低温域ではガス中に含まれる水分が凍結しガス流路の閉塞される事象が確認された。ガス流路の閉塞をおこさないために、ガス流路ではなるべく流路の断面積を確保しつつ、熱交換が行われる表面積を維持することが求められた。

以上のマルチガス温度制御プラズマジェットの改良点をまとめると以下の事項が挙げられる。

- プラズマジェット筐体の体積縮小
- TCF 流路の表面積の増加
- ガス流路の断面積の増加と流路の表面積の維持もしくは増加
- TCF の導入口と排出口、およびガス導入口を 1 方向に配置

3.4 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェット的设计^[41]

3.3.5 で示された改良点をもとに、新たなマルチガス温度制御プラズマジェットを設計した。新設計した温度制御マルチガスプラズマジェットの概念図と断面構造を図 3-7、図 3-8 に示す。改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットでも基本的なコンセプトは同様であり、設計したプラズマジェット内には、従来手法のプラズマジェットと同様に温度制御流体流路とプラズマを生成するためのガスを流すガス流路の 2 つの流路を持っている。TCF に任意の温度に制御した流体を流す事によって、プラズマジェットの筐体を任意の温度に保つ。プラズマジェットに導入されたガスは、ガス流路内で熱交換を行いながら、ホット電極とグランド電極に到達する。プラズマは電極間放電で生成され、直径 1 mm の穴からプラズマジェット外に吹き出される。ガス流路および TCF の導入口、排出口はプラズマジェットの 1 つの面に集中して配置した。

プラズマジェット筐体は、TCF 流路およびガス流路の表面積を維持もしくは向上させつつ、筐体の体積が小さくなるように設計した。試作版と改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの体積とそれぞれの流路の表面積、プラズマジェット外側の表面積を表 3-2 に示す。TCF 流路は表面積を増加させるため、ガス流路を中心に螺旋状に設けられている。これによって、TCF 流路の表面積は 1.98 倍に増加した。ガス流路は試作版と異なり、流路断面面積が広くなるように設計したため、ガス流路の表面積は 0.61 倍となった。この少ない表面積の中で効率よく熱交換するため、ガス流路中でガスを旋回させることでガスの滞留時間を増加させる様に設計した。また、ガス流路と TCF 流路を密に配置しプラズマジェット筐体の体積を可能な限り小さく設計したため、体積とプラズマジェット筐体外側の表面積はそれぞれ、0.59 および 0.60 倍となった。

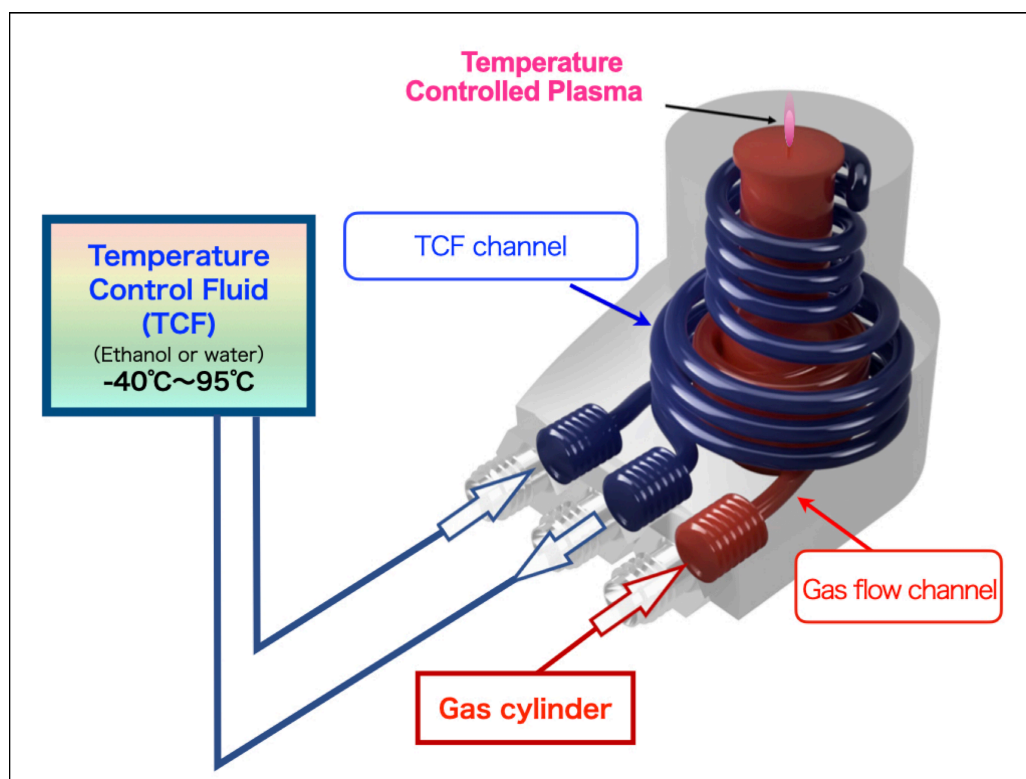


図 3-7 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの概念図

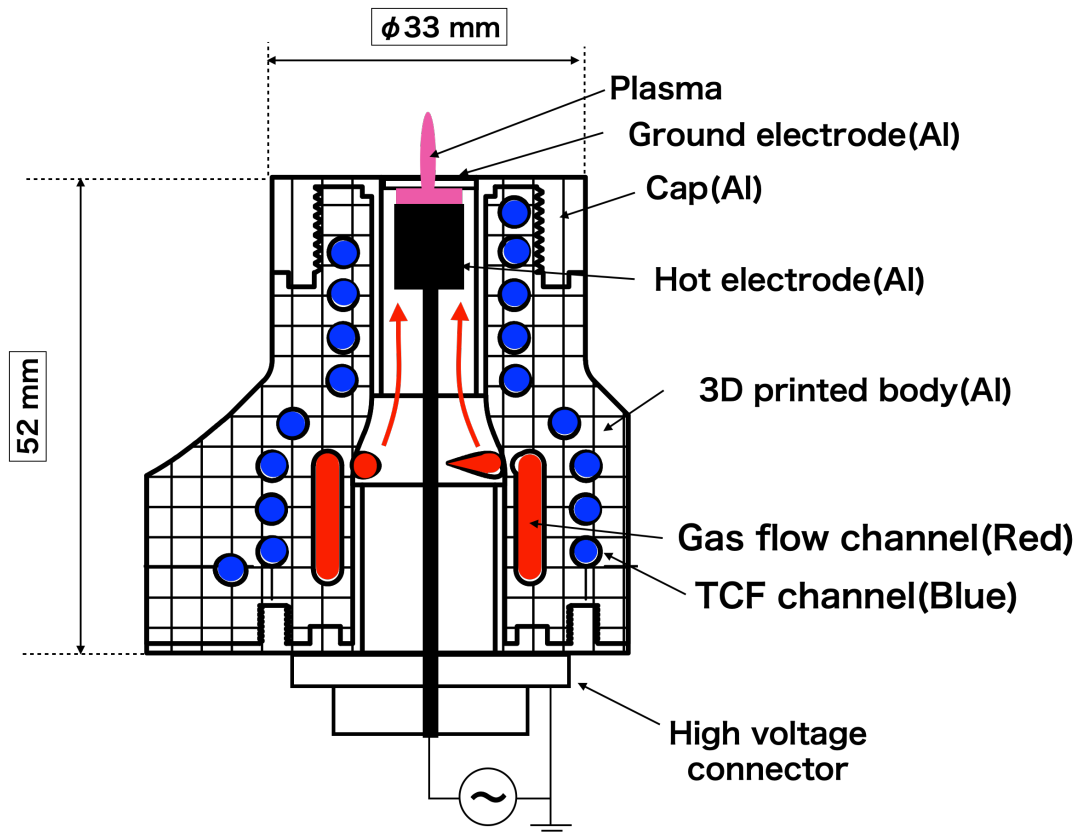


図 3-8 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの断面

表 3-2 試作版と改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの体積と表面積の比較

	Conventional plasma jet	Improved plasma jet	Rate of increase
Volume [mm ³]	75887	45139	0.59
Surface area of TCF channel [mm ²]	3243	6427	1.98
Surface area of gas flow channel [mm ²]	8122	4916	0.61
Surface area of the outside of plasma jet [mm ²]	15652	9353	0.60

3.5 数値流体解析を用いたマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能の評価

3.5.1. 本研究で用いた数値流体解析

数値流体解析 (Computational Fluid Dynamics: CFD) とは、流体の流れや熱の伝わり方、化学反応などの現象をコンピュータによるシミュレーションで再現し解析する手法である。車や航空機などの揚力、抗力の計算や内燃機関での燃焼、電気回路で発生した熱の冷却、気象学など様々な分野で応用されている。プラズマジェットの設計でも、流体力学や熱伝導を理解するために CFD 解析が行われている^[42]。熱伝導とガスの流れを解析するために、連続式、Navier-Stokes 式、エネルギー式を離散化して、有限要素法で計算した。非圧縮性流体で計算される方程式を以下に示す。

連続式:

$$\rho(\nabla \cdot \mathbf{U}) = 0 \quad \text{式(3-1)}$$

Navier-Stokes 式:

$$\rho \frac{\partial \mathbf{U}}{\partial t} + \rho(\nabla \cdot \mathbf{U})\mathbf{U} = \rho \mathbf{g} - \nabla P + \mu \nabla^2 \mathbf{U} \quad \text{式(3-2)}$$

エネルギー式:

$$\frac{\partial \rho C_p T}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho C_p T \mathbf{U}) = \nabla^2 k T \quad \text{式(3-3)}$$

これらの式の中で、 ρ は密度、 $\mathbf{U}$ は速度ベクトル、 $\mathbf{g}$ は重力加速度ベクトル、 P は圧力、 μ は粘度、 C_p は定圧比熱、 T は温度、 k は熱伝導率を示している。

3.5.2. マルチガス温度制御プラズマジェットの数値流体解析の条件

本研究では、プラズマジェットの流路を設計するために、数値流体解析ソフトウェアの Autodesk CFD (Autodesk Inc., CO, USA) を用いた。この装置では、プラズマジェット内でガスを循環させて外部に放出するため、必然的に流路中はレイノズル数が高くなることが予想される。そのため、本研究では、マルチガス温度制御プラズマジェット内外の流体流れを乱流として扱った。乱流を解析するための方程式を時間平均化している。この平均化によって発生したレイノルズ応力項は、乱流モデル $k-\epsilon$ を用いて近似した。なお、ナビエ・ストークス方程式の対流項の計算には、改良されたペトロフ・ガラーキン法を用いている。CFD に用いたモデルを図 3-9 に示す。このモデルでは計算を簡略化するため、CFD に大きな影響を及ぼさない部品のつなぎ目やネジ山などは省略した。また、外部への熱伝達や外部流体の気流についても解析するために、プラズマジェットを流体中に配置した。モデルのメッシュサイズは「自動」とし、パラメータはグローバル解像度:1.000, 局所ストレッチ:1.100, 最小点数/エッジ:2, 最長エッジのポイント数:10, アスペクト比のサーフェイス制限:20 とした。総ノード数は 236,971 (流体ノード:169,458, 固体ノード:67,513), 総要素数は 1,008,496 (流体要素:532,224, 固体要素:476,272) とした。低温側

($-30\sim 0^{\circ}\text{C}$)の解析では TCF として 80wt%のエタノールを使用し、TCF 流路に 0.5 L/min で供給した。高温側($10\sim 90^{\circ}\text{C}$)の解析では、TCF は水を使用し、TCF 流路に 0.5 L/min で供給した。プラズマジェットへの TCF の供給は周囲に断熱材を施したシリコンゴム製のチューブによって供給される。TCF の流路出口面は圧力を 0 Pa とし、温度制御流体の出口での圧力損失は無いものとした。プラズマ生成に用いるガスは 3 L/min, 24°C , 湿度 0%の窒素を選択した。アルミニウム製のプラズマジェットの周囲をエチレンプロピレンジエンゴム製の断熱材を厚さ 5 mm で配置した。断熱材の熱伝導率は、 $0.032\text{ W/m}\cdot\text{k}$ に設定した。ただし、プラズマ照射口が存在する面と上部面は実用上プラズマ処理の障害となるため、断熱材を配置していない。プラズマジェット外部の流体には、実際の使用環境に合わせた温度 24°C , 湿度 60%の窒素を用いて、この流体の全面は圧力損失の無いものとして、解析を行った。プラズマ生成前のガスおよび外部の流体に関しては、状態方程式に従って、密度、粘度などが変化するように設定した。

温度制御流体温度がプラズマ生成前のガスに与える影響を明らかにするため、温度制御流体を $-30\sim 90^{\circ}\text{C}$ で変化させて、その時の筐体温度とガス温度をそれぞれ測定した。この評価では、筐体温度はプラズマジェット筐体全体の平均温度とし、プラズマの照射口の 2 mm 地点での温度をガス温度とした。なお、今回使用した CFD では、プラズマ生成による影響は加味されていない。

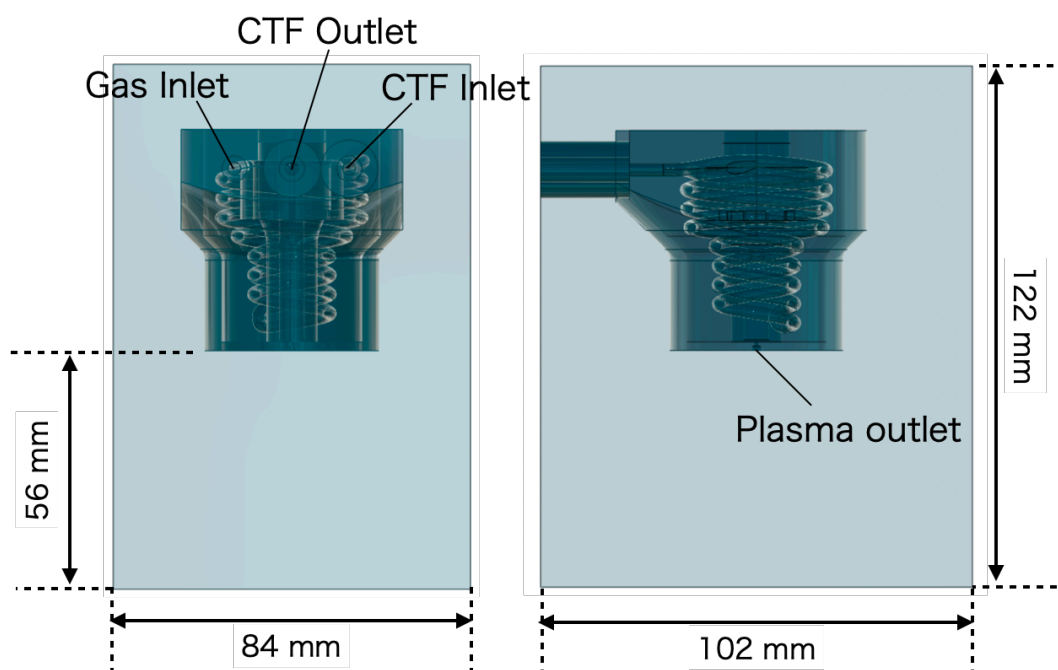


図 3-9 数値流体解析に用いたモデル

3.5.3. マルチガス温度制御プラズマジェットの解析結果

図 3-10(a)と(b)に TCF 流路に -30°C および 90°C の温度制御流体を流したときのマルチガス温度制御プラズマジェットの断面の温度分布を示す。TCF チャンネルに -30°C の TCF を流した際にはプラズマジェットの温度は、 -28.7°C まで低下した。プラズマジェットのプラズマ出口から 2 mm 地点でのガス温度は -26.0°C となった。TCF チャンネルに 90°C の TCF を流した場合、プラズマボディの温度は、 89.5°C となった。プラズマジェットのプラズマ出口から 2 mm 地点でのガス

温度は 82.9℃となった。それぞれの場合とも、プラズマ出口から吹き出したガスの温度は照射距離が延びるほど室温と近くなることが示された。図 3-11 に TCF 温度とプラズマ出口から 2 mm の距離でのガス温度の関係を示す。供給する TCF の温度の上昇に伴い、プラズマジェットの高体温度は線形に変化し、その比例定数は 0.9888 となった。TCF 温度が上昇するとともにガス温度も比例して上昇する傾向が示された。両方の結果において、装置周辺に気流が見られた。これは、温度による対流の影響であると考えられる。

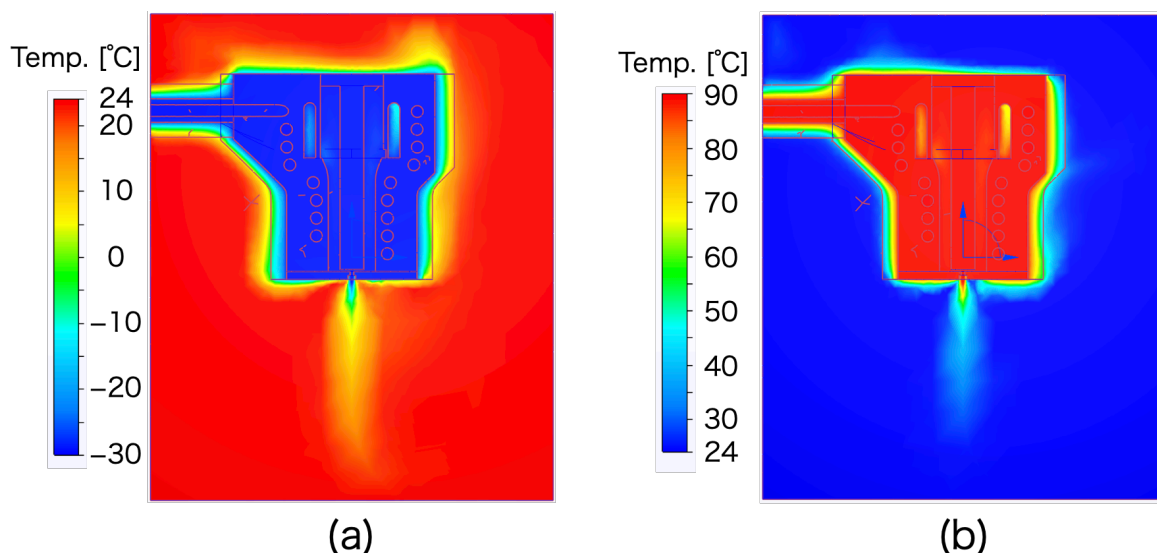


図 3-10 数値流体解析により計算された装置断面の温度分布
(a) : -30℃の温度制御流体を流した場合, (b) : 90℃の温度制御流体を流した場合

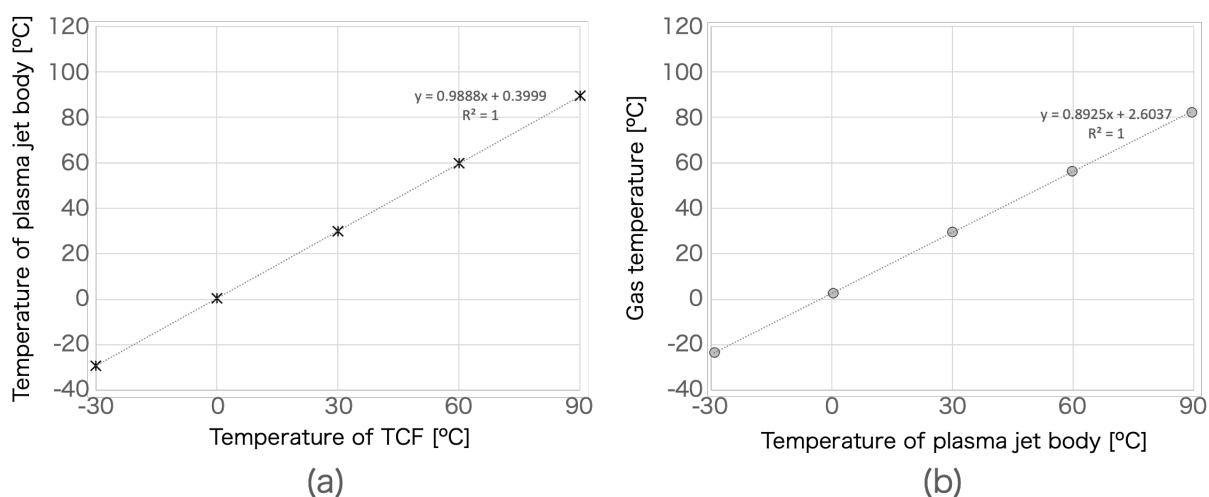


図 3-11 CFD 解析によって得られた TCF 温度とプラズマジェット高体温度, ガス温度の関係
(a) : TCF 温度とプラズマジェット高体温度の関係,
(b) : プラズマジェット高体温度とガス温度の関係

3.6 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの製作

改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの製作にも試作版と同様に金属の 3D プリント技術を用いた。製作したマルチガス温度制御プラズマジェットを図 3-12 に示す。試作版のプラズマジェット製作と同様に、金属粉末をレーザー焼結させる DMP 方式の 3D プリンタ (Prox300, 3D Systems Inc., CA, USA) を用い、SOLIZE Corporation, Tokyo, Japan によって製作された。金属粉末には、アルミニウムシリコン合金 (AlSi12) を使用した。アルミニウムシリコン合金の金属粉末の粒度分布では、D10, D50, D90 がそれぞれ $9\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$, $36\ \mu\text{m}$ であった。3D プリンタのパラメータは、1 層あたりの厚さが $40\ \mu\text{m}$ で、造形物の標準公差は $\pm 0.3\ \text{mm}$ であった。プラズマジェットは 3D プリンタで造形後、高い精度が必要なネジ部分や気密性が必要な箇所については、機械加工を行った。プラズマ出口付近の部品と高電圧コネクタは、東京工業大学、オープンファシリティセンター、設計製作部門にて機械加工で製作した。製作したプラズマジェットの TCF 流路およびガス流路の状態を確認するため、水を流路中に流し、漏れやつまりが無いことを確認した。

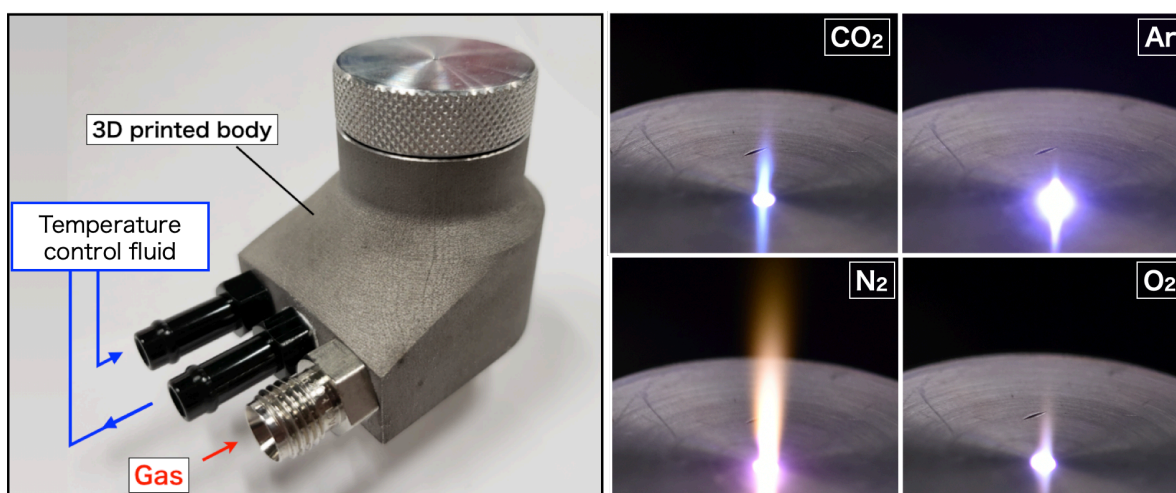


図 3-12 金属 3D プリンタで製作したマルチガス温度制御プラズマとプラズマ生成の様子

3.7 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能

改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能を評価した。TCF には試作版のマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能評価と同様に $-40\sim 0^{\circ}\text{C}$ では 80w% エタノール、 $10\sim 95^{\circ}\text{C}$ では水を使用した。TCF の供給は、 $-40\sim 0^{\circ}\text{C}$ では低温恒温水槽 (NCB-2410 型, EYELA, 東京理化工機株式会社), $10\sim 95^{\circ}\text{C}$ では恒温水槽 (NCB-1210B, 東京理化工機株式会社, Tokyo, Japan) によって供給した。プラズマジェット管体と装置導入前の温度制御流体温度の温度、プラズマ照射口から $2\ \text{mm}$ 地点のガス温度、プラズマガス温度をそれぞれ測定した。プラズマジェット管体温度はプラズマジェットの中央部のテーパ部付近に K 型熱電対を設置し、熱電対ロガー (RX-450K, アズワン株式会社, Osaka, Japan) を用いて測定した。測定時の気温と湿度はそれぞれ、 22.1°C , 58% であった。

図 3-13 に TCF 温度とプラズマジェットの管体温度の関係を示す。プラズマジェット管体の温度は、TCF 温度の上昇によって線形に増加し、その比例定数は 0.9627 となった。図 3-14 には、

プラズマ管体温度とガス温度、及びプラズマのガス温度の関係を示す。二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素のガス温度は、管体温度を-30℃から 90℃まで変化させることで、それぞれ-17～77、-18～74.5、-20～78、-21～78℃の範囲で変化した。また、二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素プラズマのガス温度は、それぞれ 29～108、3～85、28～108、17～106℃の範囲で変化した。管体温度がプラズマのガス温度に効果を与えると仮定し、単回帰分析を行った。それぞれの近似直線の決定係数を表 3-3 に示す。プラズマを生成しない場合は、すべてのガス種において、決定係数 R^2 値が 0.99 以上となった。プラズマのガス温度は、すべてのガス種において決定係数 R^2 値が 0.98 以上であった。近似直線に非常によく当てはまり、管体温度に対してガス温度とプラズマのガス温度は比例して変化することが明らかとなった。このことから、TCF 温度を制御することで間接的にプラズマのガス温度を制御することに成功した。プラズマのガス温度は、プラズマジェット温度が-10～20℃の間で近似直線から外れることがあった。これは、結露した水滴がプラズマ照射口付近に存在したためである。これらの水滴はプラズマのガス流に巻き込まれ、プラズマのガス温度の不安定さを引き起こしたと考えられる。

図 3-14 の窒素の結果には、3.5.3 において CFD 解析で得られた結果も併せてプロットした。実測した窒素のガス温度を CFD での温度制御性能と比較すると、最大で 5℃程度の差が見られ、CFD の結果と実測値が完全に一致することはなかった。この原因としては、プラズマジェット周辺の外気流れなどの外乱を CFD では加味していないためであると思われる。

すべてのガス種において、プラズマを生成すると、ガス温度上昇が確認された。プラズマジェット温度-30℃における二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素の温度上昇幅は、それぞれ 46, 22, 49, 37℃であった。管体温度 90℃における二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素の温度上昇幅は、それぞれ 31, 10, 31, 28℃であった。ガス温度が上昇するごとにプラズマ生成による温度上昇幅は小さくなった。このことから、より低温または高温のプラズマのガス温度を実現するには、温度制御流体の温度を大きく変化させることが必要である。改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットでは、管体温度を-30℃まで低下させることで、30℃以下の照射条件を実現することができ、植物など特に熱に弱い処理物に関しても照射が可能である。また、二酸化炭素および窒素のプラズマにおいて、最高 108℃のプラズマのガス温度を実現することができ、接着や殺菌などの処理効果の向上が期待される。

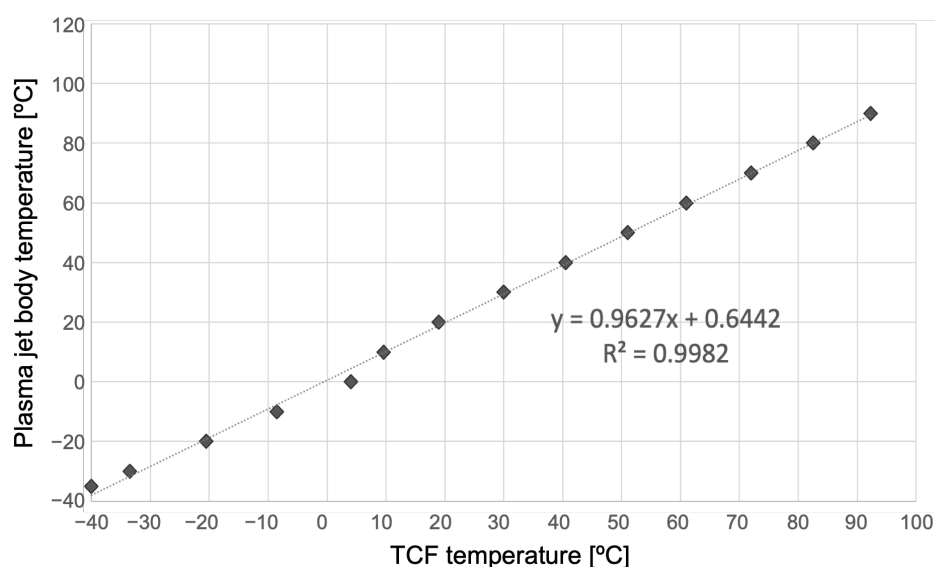


図 3-13 改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットの TCF と管体温度の関係

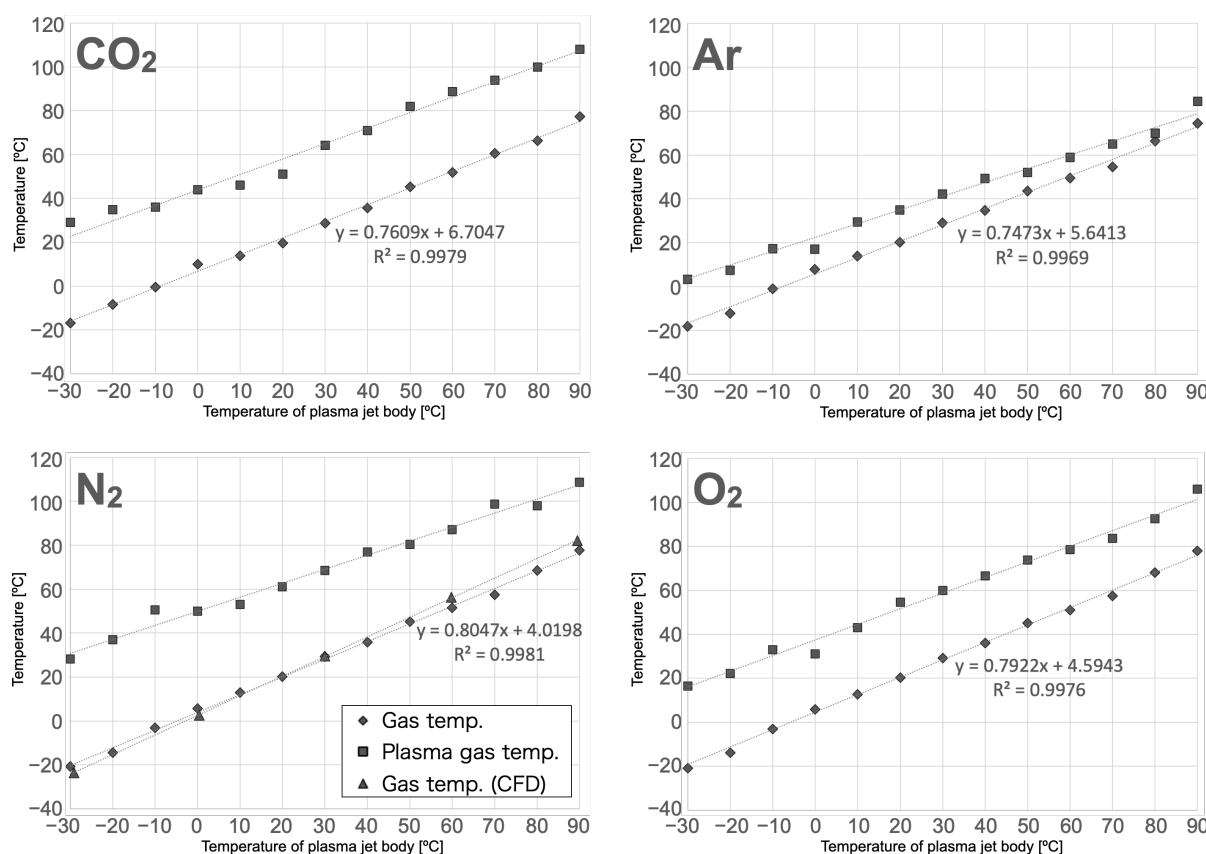


図 3-14 プラズマジェットの筐体温度に対する
TCF 温度、プラズマ生成前後のガス温度の関係

表 3-3 各ガス種のプラズマジェットの筐体温度とガス温度の決定係数

	CO ₂	Ar	N ₂	O ₂
Gas	0.9975	0.9967	0.9981	0.9996
Plasma	0.9828	0.9898	0.9861	0.9893

3.7.1. 試作版と改良したマルチガス温度制御プラズマジェットの性能比較

試作版と改良したマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御性能を比較した。表 3-4 に試作版および改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットにおける TCF とプラズマジェット筐体間、プラズマジェット筐体と各種ガス間における比例定数を示す。改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットでは、TCF 流路を改良したことによって比例定数は 0.9627 となり、試作版のプラズマジェットの 0.8408 と比較して向上した。これには、TCF 流路の表面積向上とプラズマジェット筐体の体積減少によるものであると考えられる。また、プラズマジェット筐体と二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素のガスとの比例定数は、それぞれ 0.7609, 0.8947, 0.7473, 0.7922 となり、二酸化炭素以外では試作版のプラズマジェットと比較して向上した。これには、TCF の熱が効率よく筐体に伝達した事とガスの滞留による交換がうまく寄与したと考えられる。

それぞれのマルチガス温度制御プラズマジェットに恒温槽で設定できる最低温度および最高温度の TCF を供給し、現状で実現できる最高の温度制御範囲を評価した。低温域では、低温恒温槽を用いて-40℃の 80wt%のエタノールを TCF として供給した。高温域では 95℃の水を

TCFとして供給した。プラズマ照射口から2 mm 地点のガス温度とプラズマのガス温度をそれぞれK型熱電対で測定した。図3-15に試作版と改良されたマルチガス温度制御プラズマジェット
のガスおよびプラズマ照射で得られた温度制御範囲を示す。試作版のマルチガス温度制御
プラズマジェットにおける二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素ガスのそれぞれの温度制御範囲は、
-14～75, -12～67, -9.9～63, -12～67℃であった。改良されたマルチガス温度制御プラズマジ
ェットでは、それぞれ-20～77, -20～78, -19～75, -20～78℃であった。プラズマのガス温度は、
試作版のマルチガス温度制御プラズマジェットで、それぞれ13～87, 27～86, 5～82, 12～95℃
であった。改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットでは、それぞれ15～108, 11～109,
6～85, 16～106℃であった。

それぞれガス温度およびプラズマのガス温度で試作版のプラズマジェットと比較して、改良版
では温度制御範囲の拡大が得られた。

表 3-4 試作版および改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットにおける
TCF とプラズマジェット筐体間, プラズマジェット筐体とガス間の温度の比例定数

proportional relation	Conventional plasma jet	Improved plasma jet
TCF and plasma jet body	0.8408	0.9627
Plasma jet body and	CO ₂ gas	0.8622
	N ₂ gas	0.7688
	Ar gas	0.6841
	O ₂ gas	0.7642
		0.7922

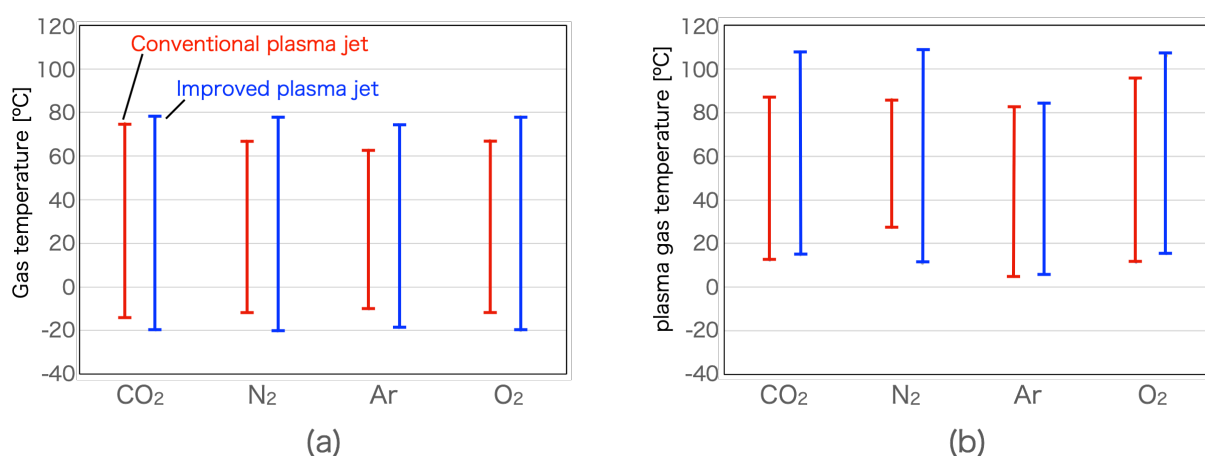


図 3-15 試作版と改良したマルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御範囲の比較
(a): ガス温度制御範囲, (b): プラズマのガス温度制御範囲

3.8 プラズマのガス種とガス温度が放電電圧、電流に与える影響

本研究で製作したマルチガス温度制御プラズマ装置について、放電時の電流と電圧の特性を調べた。電圧と電流の測定回路を図 3-16 に示す。測定では、オシロスコープ (DPO4104, TEKTRONIX, INC., USA) に電圧プローブ (HVP39pro, Pintek Electronics Co., Taiwan) と電流モニター (PEARSON CURRENT MONITOR MODEL 4100, PEARSON ELECTRONICS, INC., USA) を接続して、プラズマジェットに供給される電圧と電流を計測した。プラズマは 3 L/min の二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素を使用して生成し、筐体温度を $-30\sim 90^{\circ}\text{C}$ まで変化させて、それぞれの電流電圧波形を測定した。プラズマジェットの電極間は 0.5 mm に設定し、電極の素材はアルミニウムを用いた。また、使用した高電圧電源に関して、無負荷時の電圧波形を測定した。

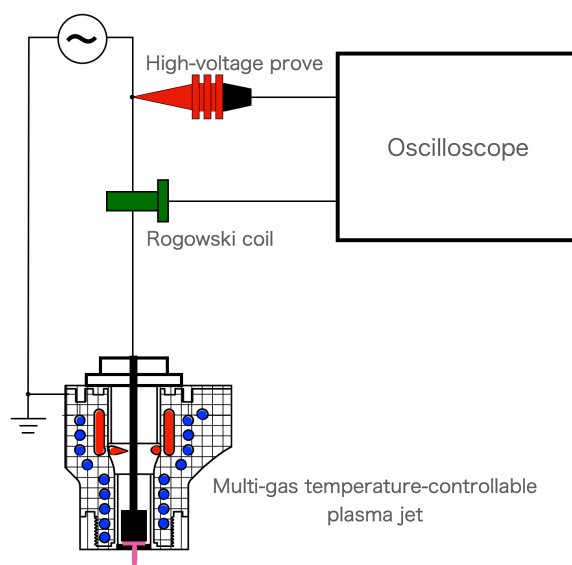


図 3-16 放電時の電圧および電流の測定回路

無負荷時のプラズマ電源の電圧波形を図 3-17 に示す。無負荷時では、ピーク電圧は 10 ms 周期で変化し、最大 15 kV_{pp} となった。また、電圧は約 28 kHz で脈動している。筐体温度 -30°C で二酸化炭素ガスでの放電時の電流電圧波形を図 3-18 に示す。電極間に印加される電圧が絶縁破壊電圧に達した地点で放電し、2A 程度の電流が流れる。それと同時に、電圧は瞬時に低下するため、この電流は持続して流れることは無い。このようなナノ秒オーダーのパルス放電を繰り返すことで、プラズマを生成している。プラズマのガス種およびガス温度に筐体温度が -30°C および 90°C において、二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素プラズマを生成した際の電流電圧波形を図 3-19～図 3-22 に示す。また図中の青色の波形が電圧、赤色の波形が電流を示している。二酸化炭素では、約 2 kV で放電がはじまり、約 8 ms 放電が持続した。また絶縁破壊の際には約 2 A の瞬時電流が確認された窒素プラズマでは、約 1.5 kV で放電が開始し、約 8.4 ms 放電が持続した。絶縁破壊の際には約 2 A の瞬時電流が確認された。アルゴンプラズマでは、0.5 kV で放電が開始し、約 9.2 ms 放電が持続した。絶縁破壊の際には約 1 A の瞬時電流が確認された。酸素プラズマでは約 1.5 kV で放電が開始し、約 8.1 ms 放電が持続した。絶縁破壊の際には約 2.5 A の瞬時電流が確認された。大気圧下における二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素の 0.5 mm の絶縁破壊電圧は 2.1, 1.85, 0.5, 1.9 kV であり、プラズマジェットの放電

開始電圧はおおよそ一致した。プラズマの筐体温度を変化させても放電電圧や放電電流波形に大きな変化は確認されなかった。

瞬時電圧と電流の積で求めた瞬時電力波形から台形公式を用いて、電力を求めた。それぞれの条件ごとに3回ずつ測定し、その平均値を求めた。筐体温度 -30°C では二酸化炭素、窒素、アルゴン、酸素プラズマの電力の平均値は、2.9, 3.0, 2.6, 3.0 Wとなった。筐体温度が 30°C ではそれぞれの電力の平均値は、2.0, 2.2, 1.8, 2.0 Wとなり、筐体温度 90°C では3.0, 2.4, 1.7, 2.4 Wとなった。二酸化炭素、窒素、酸素では、筐体温度が 30°C のときに電力が最低となった。アルゴンでは、筐体温度が上昇することによって、電力が低下し、 60°C で1.6 Wとなった。

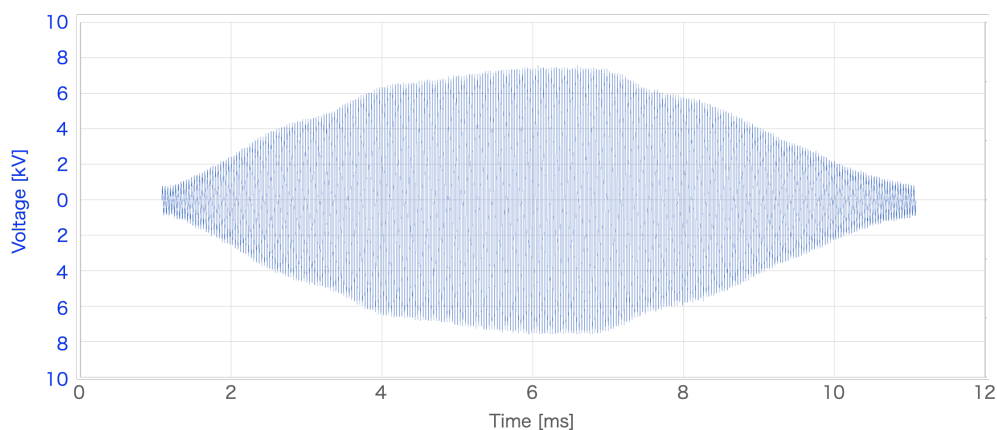


図 3-17 無負荷時のプラズマ電源の電圧波形

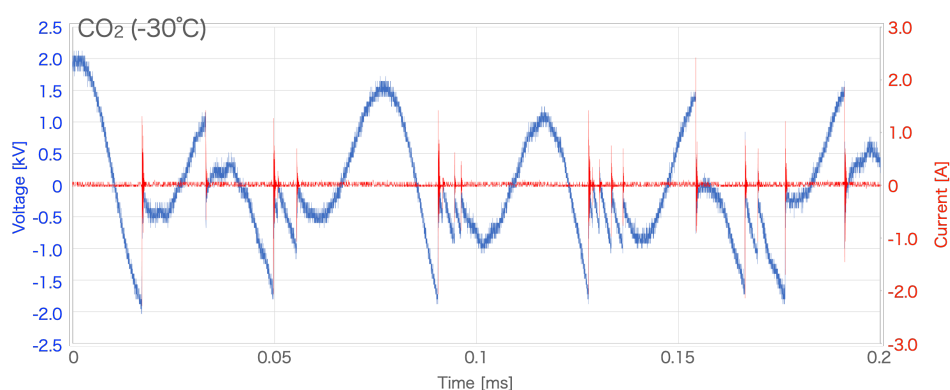


図 3-18 二酸化炭素プラズマにおける放電時の電圧電流波形

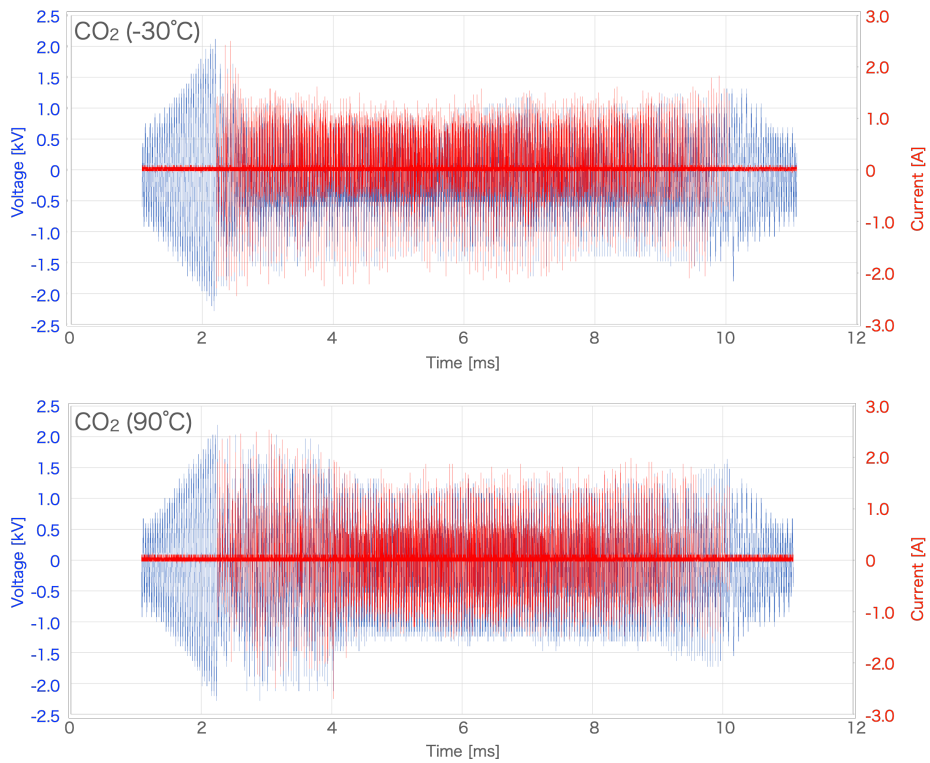


図 3-19 二酸化炭素プラズマの電圧・電流波形

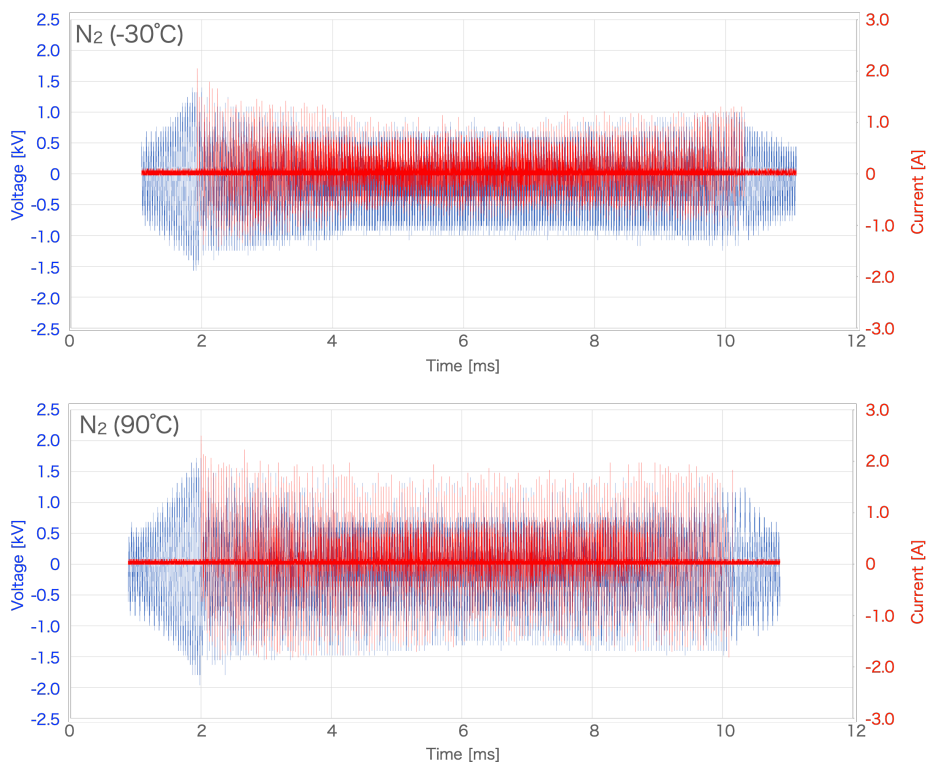


図 3-20 窒素プラズマの電圧・電流波形

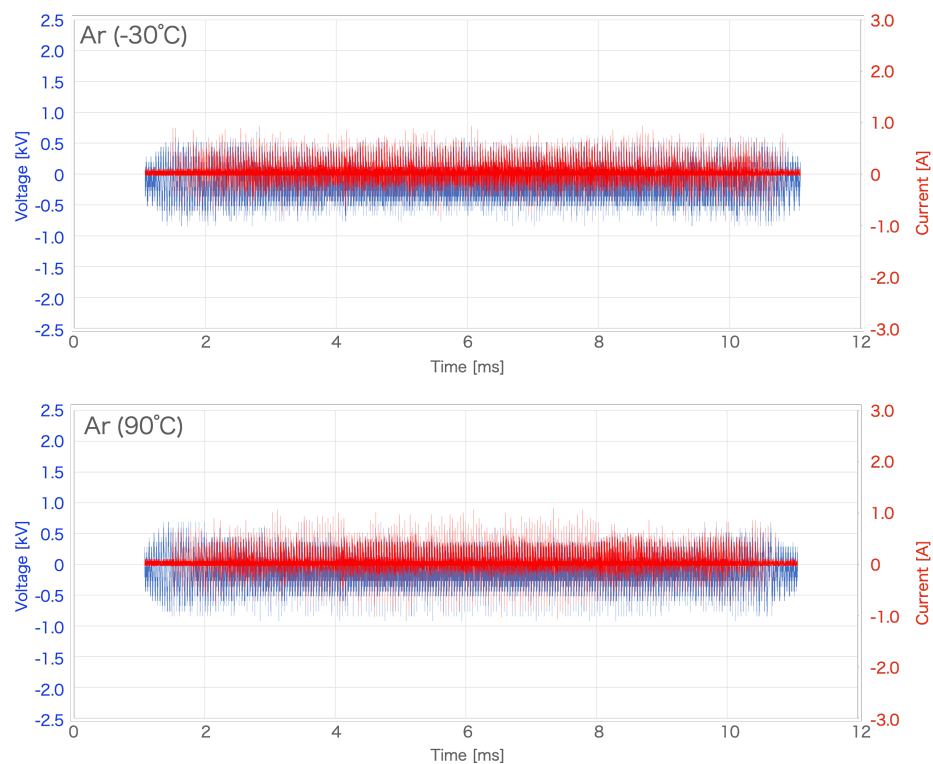


図 3-21 アルゴンプラズマの電圧・電流波形

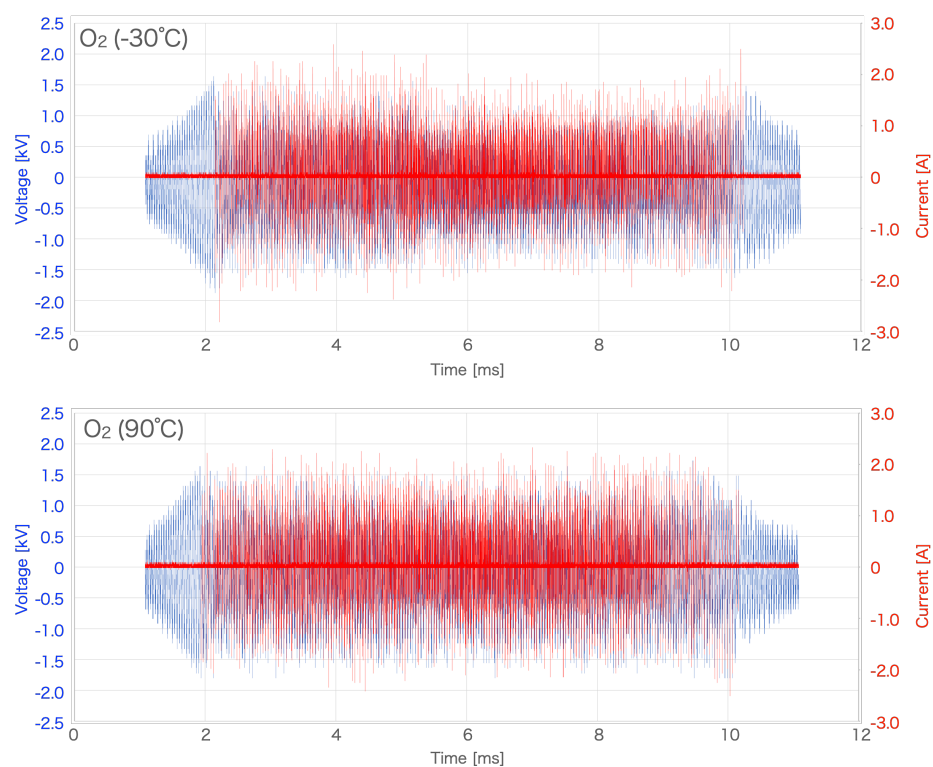


図 3-22 酸素プラズマの電圧・電流波形

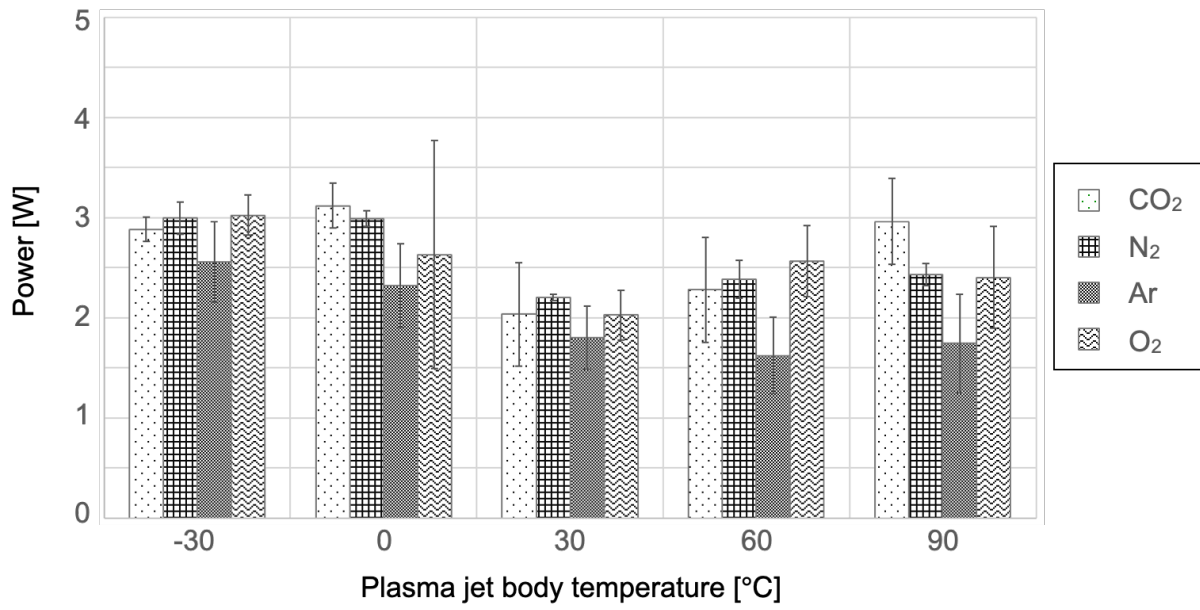


図 3-23 筐体温度を-30～90℃まで変化させたときの各ガス種のプラズマの放電電力

3.9 プラズマのガス種とガス温度が生成される活性種に及ぼす影響^[43]

プラズマのガス種やガス温度を変化させると、生成される活性種が変化することが明らかとなっている。例えば、Takamatsuらは、プラズマのガス種をアルゴン、ヘリウム、窒素、酸素、二酸化炭素など変化させることで一重項酸素やHラジカル、OHラジカルなどの生成量が変化することを報告している^[25]。またKawanoらは、ヘリウムに3%の酸素を添加したプラズマにおいて、プラズマのガス温度を10℃から80℃まで変化させ、一重項酸素やOHラジカルの生成量が増加することを報告している^[36]。本節では、開発したマルチガス温度制御プラズマジェットを用いて、プラズマのガス温度とガス種を変化させて、生成される活性種量を測定した。

3.9.1. 各種活性種の測定方法

本実験では、OHラジカル、一重項酸素、オゾン、過酸化水素を測定した。OHラジカルと一重項酸素の濃度は、電子スピン共鳴法(Electron Spin Resonance: ESR; JES-FA100, 日本電子株式会社, Tokyo, Japan)を用いて測定した。オゾンと過酸化水素の濃度は、ポケットオゾン計(DR300, Hach Company, CO, USA)と二重ビーム分光光度計(U-2900, Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan)による比色法によって測定した。プラズマ処理の概要を図3-24に示す。窒素、二酸化炭素、酸素、アルゴンのプラズマを3 L/minで使用した。各プラズマのガス温度は、プラズマ出口から2 mmの距離で30, 45, 60, 75, 90℃に制御した。その後、直径10.3 mmのウェルに200 µLずつ分注し、液面上16.5 mmの高さから15秒間処理した。

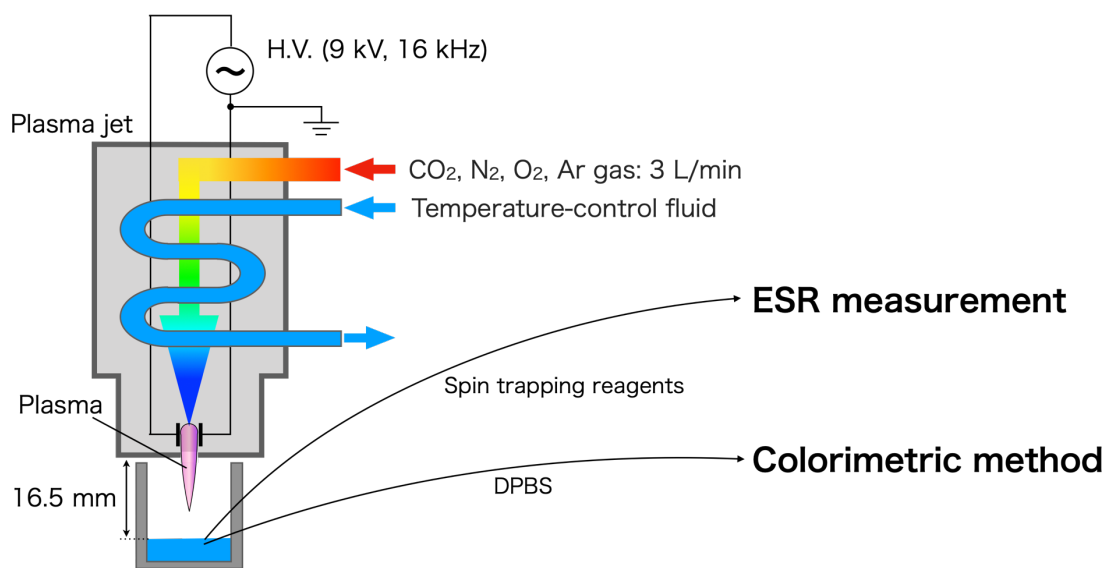


図 3-24 プラズマより生成される活性種の定量

OHラジカルと一重項酸素のスピントラップ試薬は、それぞれ5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)^[44]と2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC)^[45]を使用した。これらの試薬はダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline: DPBS)溶液に溶解した。DMPOとTPCの濃度はそれぞれ200 mMと75 mMに調製した。プラズマ処理された各スピントラップ試薬150 µLは30秒以内にESRで測定した。ESR測定は、マイクロ波周波数9.425 GHz、変調周波数100 kHz、掃引時間2分、磁場335.5 ± 5 mT、変調幅0.1 mTに設定した。

オゾンの測定には、オゾン試薬 (AccuVac® Mid-Range 0-0.75 mg/L, Hach Company, CO, USA)による比色法を使用した。プラズマ処理した 120 μL の DPBS を直ちにオゾン試薬と混合し、ポケットオゾン計でオゾン濃度を測定した。また、過酸化水素は、 Fe^{3+} とキシレノールオレンジの反応に基づく比色法を用いて測定した^[46]。 Fe^{3+} は Fe^{2+} と過酸化水素の反応により生成される生成物である。プラズマ処理した 120 μL の DPBS と 120 μL の比色試薬 (200 μM xylenol orange, 500 μM 硫酸アンモニウム鉄(II), 50 mM 硫酸, 200 mM ソルビトール)を混合した。40 分間混合した後、586 nm の吸光度を測定することにより、過酸化水素を定量化した。

3.9.2. プラズマのガス種, ガス温度と生成される活性種の関係

各ガス種について、プラズマのガス温度と生成される活性種の間関係を図 3-25 に示す。OH ラジカルの濃度は、窒素プラズマで約 130 μM 以上と最も高くなり、二酸化炭素とアルゴンプラズマでは 20~40 μM , 最も濃度が低いのは酸素プラズマで 10 μM 以下であった。窒素プラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 45°C に変化させると OH ラジカル濃度は 146 μM から 172 μM に増加し、45°C から 75°C では変化が少なく、75°C から 90°C に変化させると 131 μM に減少することが示された。二酸化炭素プラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 90°C に変化させると、濃度は 26 μM から 39 μM に増加した。アルゴンプラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 45°C に変化させると、濃度は 28 μM から 34 μM に増加した。プラズマガス温度が 45°C から 75°C に上昇しても濃度の変化はほとんどなく、プラズマガス温度が 75°C から 90°C に変化すると、濃度は 27 μM に減少した。酸素プラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 90°C に変化させると、濃度は 5.7 から 10 μM に増加した。

一重項酸素の濃度は、プラズマガス温度が 30°C のとき、酸素、二酸化炭素、窒素、アルゴンの順で高いことが示された。二酸化炭素ガスプラズマでは 45°C 以上で濃度の上昇が見られた。二酸化炭素プラズマ中の一重項酸素の濃度は、プラズマガス温度が 30°C から 45°C に変化することにつれて、77 μM から 459 μM に増加した。45°C から 60°C では、濃度の変化はほとんどなく、60°C から 90°C では、435 μM から 812 μM に上昇した。酸素プラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 90°C に変化させると、濃度は 96 μM から 208 μM に増加した。窒素プラズマでは、プラズマガス温度を 30°C から 90°C に変化させると、生成量は 56 μM から 115 μM に増加した。アルゴンプラズマの場合、生成量は、30°C から 75°C への温度変化で 16 μM から 24 μM に増加し、90°C では 13 μM に減少した。

オゾンの濃度は、酸素プラズマでは 30°C で 3.4 μM , 60°C で 2.0 μM の最小値になり、90°C まで温度が上がると 3.1 μM に増加した。アルゴンプラズマでは、30°C から 75°C の間で 3.0 μM から 2.3 μM へと緩やかに減少し、90°C では 2.6 μM まで上昇した。窒素プラズマでは、プラズマガス温度の影響を受けず、30~90°C で 2.0 ± 0.2 μM であった。二酸化炭素プラズマでは、30°C から 90°C への温度上昇によって、濃度は 2.0 から 1.2 μM へと緩やかに減少した。

過酸化水素の濃度は、二酸化炭素プラズマで最も高く、アルゴン、窒素プラズマでは同程度、酸素プラズマで最も低くなった。二酸化炭素プラズマでは、30°C から 60°C の間で 32 μM から 26 μM に減少し、60°C から 90°C に上昇すると 56 μM に増加した。窒素プラズマでは、30°C から 90°C の間で 21~27 μM の間でほぼ一定であったが、45°C でのみ 17 μM に減少した。アルゴンプラズマでは、プラズマガス温度の変化が濃度に与える影響は小さく、21~26 μM で一定であった。酸素プラズマでは、30°C から 90°C の間で、濃度は 6 μM から 19 μM まで緩やかに増加した。

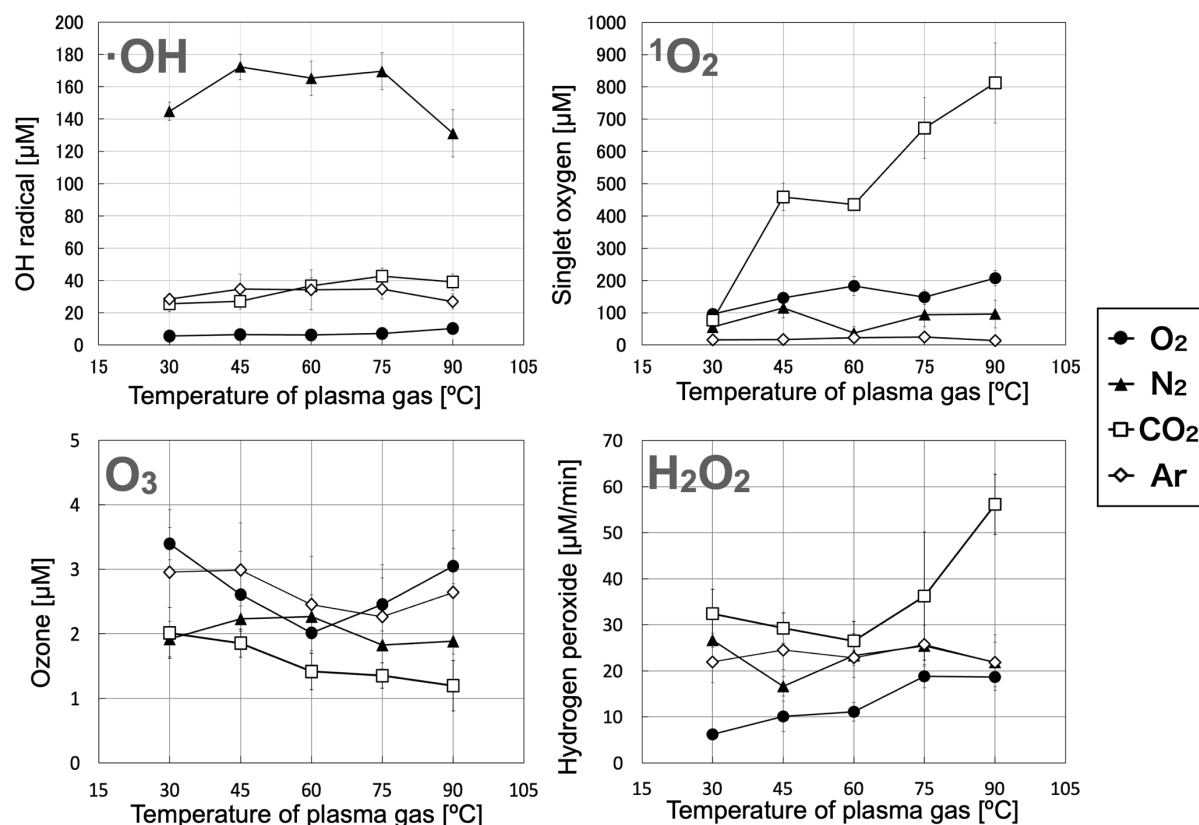


図 3-25 各ガス種におけるプラズマのガス温度と生成される活性種の関係

これらのことから、生成される活性種はプラズマのガス種とガス温度の変化に影響を受けることが明らかとなった。特に OH ラジカルは窒素プラズマから多く生成された。この理由としては酸素やアルゴンなどの準安定状態の原子分子よりも準安定窒素の寿命の長いことに由来していると考えられる。真空中の理想的な条件での窒素 $2^2D_{5/2}$ 、アルゴン 4^3P_2 、酸素 2^1D_2 の半減期はそれぞれ 6.1×10^4 秒^[47]、56 秒^[48]、 1.0×10^2 秒^[47]である。大気中で生成された窒素プラズマでは、分光測定により窒素原子の存在が確認されており^[26]、他の準安定状態の原子分子よりも寿命の長い準安定窒素が活性を保ったまま空気中の水や水滴と接触し、気液界面で OH ラジカルを生成したと考えられる^[49]。Takamatsu らの研究でも、窒素プラズマからは他のガス種よりも多くの OH ラジカルが生成されることを報告している^[25]。一重項酸素は、酸素プラズマよりも高温の二酸化炭素プラズマで多く生成された。これは、酸素プラズマでは、一重項酸素を生成する原子状酸素が、周囲に豊富に存在する三重項酸素と反応し、速やかにオゾンに変化するためと考えられる^[50]。

酸素プラズマと二酸化炭素プラズマでは、ガス温度の上昇に伴い、OH ラジカル、一重項酸素、過酸化水素の生成量が増加する傾向がみられた。これは、Kawano らによる酸素混合ヘリウムプラズマのガス温度上昇させた場合の活性種生成量の報告と同様であった^[36]。つまり、酸素元素を含むガス種では、温度上昇に伴い、OH ラジカル、一重項酸素、過酸化水素の活性種が増加すると考えられる。

3.10 まとめ

本研究では、任意に制御された温度で様々なガス種のプラズマを発生させることができるマルチガス温度制御プラズマジェットを開発した。試作したマルチガス温度制御プラズマジェットから、TCF およびガスの流路表面積を増加させ、プラズマジェット全体の体積をなるべく小さく設計することで、温度制御性能と温度追従性を改善できることが示唆された。この知見をもとに、マルチガス温度制御プラズマジェットを改良した。改良されたマルチガス温度制御プラズマジェットではガス流路の周囲に TCF 流路を螺旋状に配置して設計し、CFD 解析を用いて流路の検討を行った。設計したマルチガス温度制御プラズマジェットは金属 3D のプリンタを用いて製作した。製作したプラズマジェットを用いて、窒素、酸素、二酸化炭素、アルゴンのプラズマを安定して発生させることに成功した。金属 3D プリンタ技術を用いて、より自由度の高いプラズマジェットの設計・製作を実証し、医療、農業、材料加工などのプラズマ応用のための任意の形状のマルチガス温度制御プラズマジェットの応用可能性を示した。

プラズマのガス温度は、プラズマジェットの温度を -30°C から 90°C まで変化させることで、最小 3°C から最大 108°C の間でプラズマのガス温度を制御することに成功した。ガス温度は、プラズマ生成により上昇した。二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素のプラズマのそれぞれの温度上昇範囲は、プラズマジェット本体の温度が 20°C のとき、 31°C 、 15°C 、 41°C 、 34°C であった。プラズマのガス温度制御特性は、ガス種によって大きく異なっていた。しかし、全てのガス種において、プラズマ生成後のガス温度は TCF の温度に比例して変化するため、TCF 温度を制御することでプラズマガスの温度を容易に制御できる。マルチガス温度制御プラズマジェットでプラズマを生成する際の放電電力は、筐体温度 -30°C では二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素において、2.9, 2.6, 3.0, 3.0 W となった。筐体温度が 30°C ではそれぞれの放電電力は、2.0, 1.8, 2.2, 2.0 W となり、筐体温度 90°C では 3.0, 1.7, 2.4, 2.4 W となった。

プラズマによって生成される活性種はガス種によって大きく異なり、特に窒素プラズマでは OH ラジカルが大量に生成されることが明らかとなった。また、プラズマのガス温度の変化によっても、生成される活性種の濃度が変化した。特に二酸化炭素プラズマでは一重項酸素の生成量はプラズマのガス温度の上昇によって著しく増加し、ガス温度 90°C では 30°C の 8 倍以上の一重項酸素が生成された。

以上のことから、マルチガス温度制御プラズマジェットを用いることで、様々なガス種のプラズマのガス温度を制御し、被処理物にダメージを与えることなく、処理が可能であることが示された。また、殺菌や止血、表面処理などの活性種を利用した処理において、プラズマのガス種や温度を変えることで処理効果の向上が期待される。

第 4 章

マルチガス温度制御プラズマの 殺菌への応用

医療分野では、さまざまな患者が使用する機器を介して感染が拡大する。このような感染を避けるため、医療現場では、使い捨て可能な機器が使用されている。しかしながら、精度の高い機器を使い捨て可能な機器に置き換えることは困難であり、滅菌および消毒を行い再使用がなされている。これらの滅菌と消毒には、十分な殺菌効果に加えて、機器にダメージを与えることなく短時間で処理でき、処理後に患者に害を与えることのない方法が求められている。例えば、金属製の機器などは、オートクレーブなどで滅菌することが可能である。オートクレーブは高温高圧の蒸気を使用する殺菌手法のため残留毒性がなく人体に影響を与えないが、精度の高い機器では温度変化を繰り返すことは避けなければならない。現在これらの高精度の金属や樹脂製の医療機器では、ガス滅菌や高水準消毒薬による殺菌が行われている。ガス滅菌はオートクレーブと同等の殺菌能力を持つが、残留ガスの除去に多大な時間を要する^[51]。また高水準消毒薬を用いた消毒では、残留した化学物質が人体に大きなダメージを与える可能性があるため、すすぎなどで多くの時間を要する。消毒薬での処理の繰り返しも問題であり、接着剤の溶解や化学反応による劣化を引き起こす可能性がある。

近年では、新たな殺菌手法として大気圧低温プラズマが注目されている。大気圧低温プラズマを用いた殺菌の応用研究では様々な方式が考案されているが、多くは大気圧低温プラズマの直接照射による殺菌^[18]と、液体を介した間接的な殺菌方法^[52]に大別される。本研究では、マルチガス温度制御プラズマを用いた殺菌応用を進めるため、液体の殺菌や器具の殺菌など用途別に殺菌手法の開発を行った。本章では、開発したマルチガス温度制御プラズマによる殺菌手法について詳細を示し、プラズマのガス種やガス温度が殺菌効果に与える影響など基礎特性を調べた結果を記述する。

4.1 殺菌対象とした微生物の特徴と培養, 定量方法

微生物は生命が誕生してから長い歴史の過程で、様々な特徴を獲得し、分化してきた。我々の生活圏にも、様々な微生物が存在しており、細菌や真菌、ウイルスなどに分類される。本節では、この研究で使用した細菌や真菌の特徴や培養方法、生菌数の評価方法について述べる。

4.1.1. 細菌および真菌の特徴と培養方法

細菌は原核生物の一種であり、1 μm 程度の小さな生物である。細菌でも種類によって、大きさや形態、構造が大きく異なる。細菌は分裂によって世代交代を繰り返しており、一つの細菌が分裂し、2 つの細菌となる。大腸菌や黄色ぶどう球菌、緑膿菌などは約 30 分で分裂し、世代交代を行う。真菌は、真核生物の一種であり、カビや酵母、きのこなどが分類されている。通常数 μm の大きさがあるため、顕微鏡などで観察することができる。自然界に広く生息し、周辺の有機物、無機物を栄養源として増殖を行う。真菌は大きく分けて酵母様真菌と糸状菌に分類され、それぞれ細菌とは異なった形式で増殖を行う。酵母様真菌内でも、いくつかの増殖方法があるが一番多いのは出芽法であり、親酵母から出芽し、その芽が大きくなって、やがて1つの酵母となるものである。糸状菌は、世の中ではカビとして知られている。糸状菌の増殖は孢子から発芽して、菌糸を伸ばし、先端または側枝部でまた孢子を形成する。この孢子は空気中に飛散して、また発芽して増殖を繰り返す^[53]。

この研究で使用した細菌および真菌を表 4-1 に示す。*Staphylococcus aureus*(黄色ブドウ球菌)は、グラム陽性、通性嫌気性の細菌で、形状は球菌である。人間の皮膚など生活圏にも広く分布しており、健康な人に対する病原性は低いが免疫の弱っている人に対しては皮膚感染症や敗血症などを引き起こす。また、100℃に加熱しても失活しない毒素であるエンテロトキシンを産出し、食中毒の原因となることが知られている。*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)は、グラム陰性、偏性好気性の細菌で形状は桿菌である。日和見感染症の原因菌であり、尿路感染症や敗血症、皮膚感染症などを引き起こす。*Serratia marcescens*(霊菌)は、グラム陰性、通性嫌気性の細菌で小桿菌である。日和見感染症の原因菌で創傷感染や髄膜炎、敗血症など様々な感染症の原因菌と考えられている。*Escherichia coli*(大腸菌)は、グラム陰性、通性嫌気性の細菌で桿菌である。通常は無害な菌であるが、尿路や呼吸器など腸管以外に迷入してしまうと病原性を示し、化膿創や髄膜炎、膀胱炎などの原因菌となる。一部の血清型の大腸菌では、毒素を産出するため、食物などとともに摂取された場合は食中毒を引き起こす事がある。1996 年には給食に腸管出血性大腸菌が混入したことによって、集団食中毒も引き起こされており、患者は約 6000 人にも及んでいる。*Clostridium perfringens*(ウェルシュ菌)はグラム陽性、偏性嫌気性の細菌で大型の桿菌である。土壌や下水などの自然界に広く分布し、創傷感染した場合はガスと各種毒素を伴い組織を破壊するガス壊疽を起こす。またエンテロトキシンを産生するため食中毒の原因菌ともなりうる。また、*C. perfringens* は増殖に必要な栄養素が枯渇している場合芽胞を形成する細菌である。芽胞は細菌の休眠状態であり、物理的、化学的刺激に対して強い耐性を獲得している。*Fusarium solani* は糸状菌の一種であり、日和見感染症を引き起こす原因菌となる。*Candida albicans* は酵母様真菌、糸状菌両方の増殖形態を持つ真菌である。粘膜や皮膚、爪などで炎症を起こすカンジダ症の原因となる^[54]。

細菌および *C. albicans* に関しては、実験の前日に Luria-Bertani 寒天培地に継代し、36℃で一晩培養した。培養後の細菌は寒天培地上からコロニーのみを採取し、滅菌済みの純水に溶

かして、菌懸濁液を作製した。真菌である *F. solani* に関しては、実験の4-7日前にポテトデキストロースの斜面培地に継代した。胞子が生成されたことを確認してから、0.5%の界面活性剤(ポリソルベート 80)水溶液を加え、斜面培地上を白金耳で擦り、胞子を採取した。胞子液は、滅菌された金網で菌糸を除去し、遠心分離と純水への懸濁を2-3回繰り返すことで界面活性剤を除去した。

表 4-1 本研究で使用した細菌および真菌とその培養方法

	Microorganism	Strain	Ager plate	Incubation time, temperature
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	Luria-Bertani ager	Overnight, 36°C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	Luria-Bertani ager	Overnight, 36°C
	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC13880	Luria-Bertani ager	Overnight, 36°C
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Luria-Bertani ager	Overnight, 36°C
	<i>Clostridium perfringens</i>	NCTC8237	Columbia Agar with 5% Sheep Blood	Overnight, 36°C
Fungi	<i>Fusarium solani</i>	ATCC36031	Potato Dextrose agar	4-7 days, room temperature
	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	Luria-Bertani ager	Overnight, 36°C

4.1.2. 微生物の生菌数の評価方法

この研究で用いた生菌数の評価方法はコロニーカウントである。コロニーカウントでは、評価したい菌懸濁液の原液、もしくは段階希釈した後の菌懸濁液を寒天培地上に塗布し、培養する。すると、一つの細菌が指数関数的に増殖を繰り返し、図 4-1 に示すような目で確認できる程度の細菌の塊(コロニー)が形成される。適切な濃度に希釈した菌懸濁液を塗布しすることで、1つの細菌からコロニーを形成させることができ、このコロニー数をカウントし、希釈倍率と掛け合わせることで元の菌懸濁液の生菌数を推定する。形成されたコロニー数から生菌数を推定するため、単位は CFU (Colony Forming Unit) が用いられる。

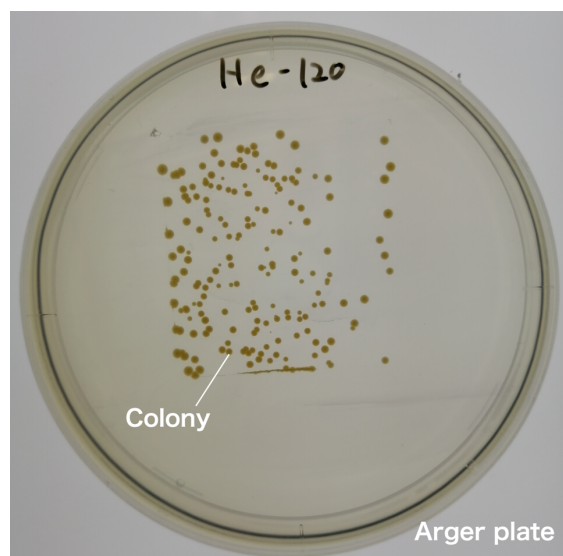


図 4-1 寒天培地上に形成されたコロニー

4.2 大気圧低温プラズマによる殺菌手法

4.2.1. 殺菌および滅菌の定義

微生物制御の分野では、殺菌や消毒、滅菌、抗菌などの言葉がよく聞かれる。例えば殺菌という言葉では微生物を殺すことを指すが、すべての微生物を死滅させることなのか、半減させるのか、殺菌という言葉に程度の概念は含まれていない。また、消毒という言葉は、病原性微生物が感染を起こさない程度までダメージを与えることを意味するが、明確な程度は示されていない。一方で、滅菌という言葉がある。滅菌とは、全ての微生物を殺す意味を持っており、殺菌、消毒とは明確な差がある^[55]。しかし、現実ですべての微生物が存在しないことを証明することは容易ではないため、無菌性保証レベル(sterility assurance level: SAL)というものが定められている。現在、SAL は国際的に 10^{-6} と設定されており、日本でも厚生労働省の「医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」の滅菌バリデーション基準などに明記されている^[56]。生菌数は殺菌処理を行った時間に対して、対数的に減少するため、滅菌する対象の初期生菌数と種類が把握できていれば、致死速度(一般的には、生菌数を 1/10 にするのに必要な時間: D 値)を用いて、ある処理時間での生菌数を計算することができる。例えば、D 値が 5 分の滅菌法を用いて、初期生菌数が 10^6 CFU の滅菌対象を処理した場合、各処理時間に対する生菌数は図 4-2 のように表される。

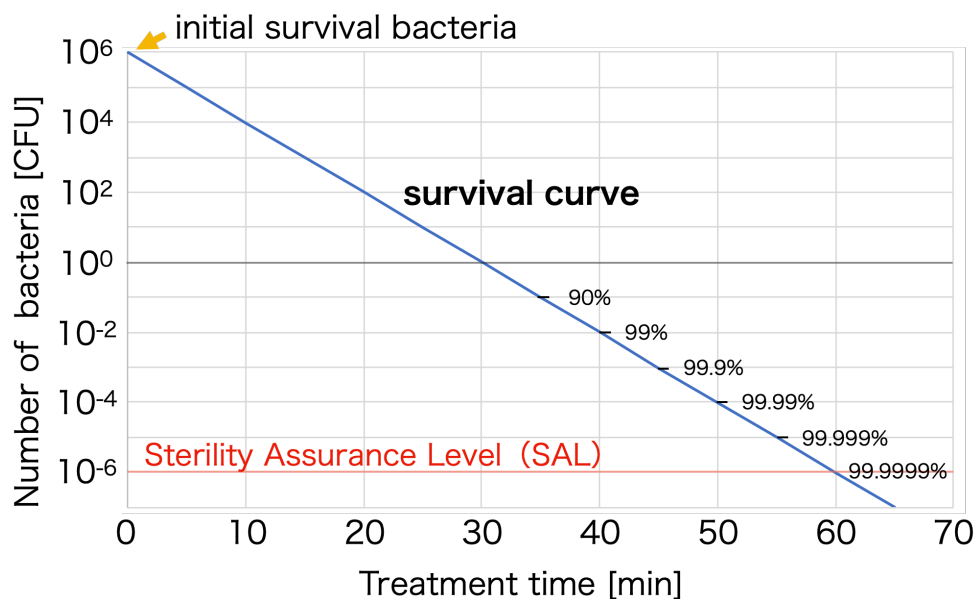


図 4-2 D 値が 5 分の滅菌法における生菌数の変化

4.2.2. プラズマを用いた滅菌装置

日本で現在市販されている医療用プラズマ滅菌装置としては、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社から発売されている STERRAD[®]が挙げられる^[57]。

この装置では、滅菌剤として過酸化水素を用いており、過酸化水素蒸気による殺菌と、過酸化水素プラズマによる殺菌を行っている。処理を行う場合、被滅菌物が入ったチャンバーを過酸化水素蒸気と過酸化水素プラズマ生成時に高真空状態下にする必要がある。そのため、真

空状態に耐えられる器具にのみしか適用させることはできない。しかし、最短で24分(ステラッド®100NX with ALLClear™ テクノロジー エクスプレスサイクルの場合)で滅菌が行えることや低温低湿で処理が行えること、過酸化水素も装置内で分解されるため給排気設備が必要ないことなどから、医療機関を中心に広く普及している。この装置でのプラズマの役割は、もちろん過酸化水素プラズマを生成し殺菌に寄与している部分もあるが、そのほとんどは過酸化水素ガスの分解であるとされている^[58]。

4.2.3. 大気圧低温プラズマによる殺菌

大気圧低温プラズマによる殺菌では、複雑な化学反応を経て、UVや荷電粒子、励起原子分子、活性種、熱、電磁場などの複数の殺菌因子が生成され、それらが単独または相乗的に殺菌効果を発揮する。これらを用いて、対象を殺菌するために、図4-3に示すような大気圧低温プラズマを直接殺菌対象に照射して、殺菌する手法が開発されている。図4-3(a)では、殺菌対象を電極間に挿入し、大気圧低温プラズマで直接処理する。プラズマが直接対象に触れるため、UVや荷電粒子、活性種、電場が殺菌効果に大きく寄与していると考えられる。図4-3(b)では、生成したプラズマをガス流によって吹き出して殺菌を行う。この場合、UVや荷電粒子に加え、外部気体を混合することで生成された活性種などが寄与している。

また、図4-4(a)のような大気圧低温プラズマを液体に照射することで、殺菌効果を得る手法も開発されている^[12]。プラズマを液体に照射し、液体中に活性種を導入することで、殺菌を行う。液体中に活性種が存在する間は殺菌効果が保持されているため、図4-4(b)のようにプラズマで処理した液体を殺菌対象に掛けて殺菌を行うことも可能である。

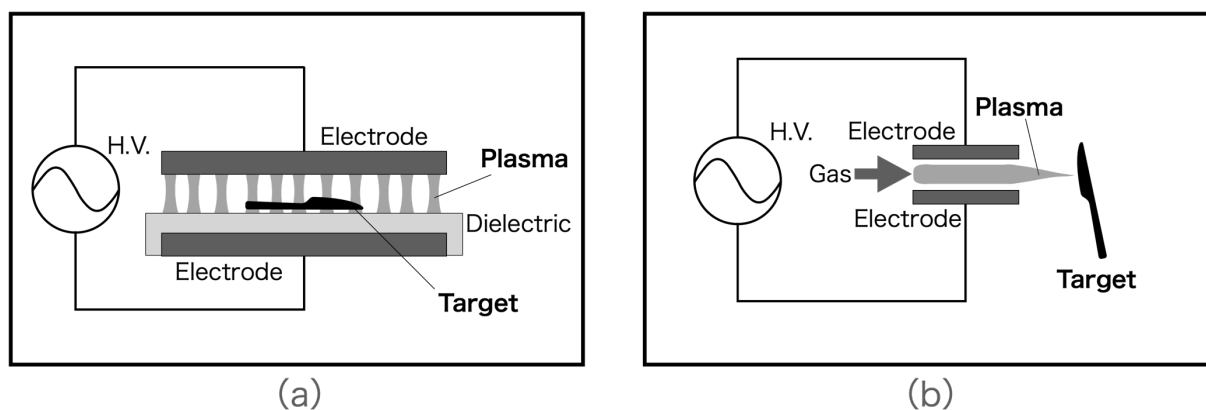


図 4-3 大気圧低温プラズマの直接照射による殺菌

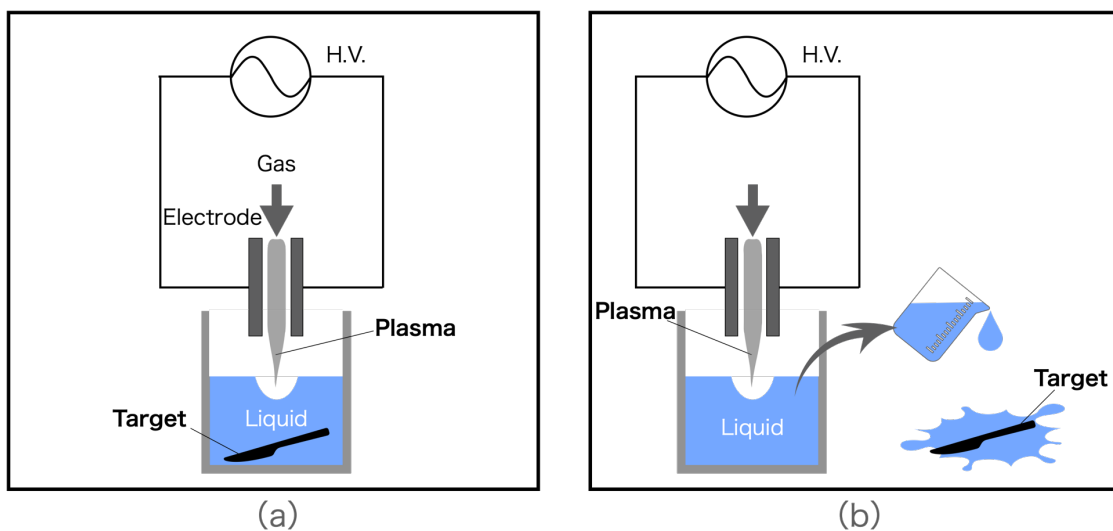


図 4-4 大気圧低温プラズマによる液体を介した殺菌

4.3 マルチガス温度制御プラズマの照射による液中殺菌^[43]

プラズマを用いた殺菌手法として、プラズマを水に照射して殺菌効果を得る手法が報告されている^[12]。これらの殺菌では、プラズマ照射によって液中に導入された活性種が殺菌因子と考えられる^[59]。マルチガス温度制御プラズマでは、3章で示した様にプラズマのガス種とガス温度を変化させることで、生成される活性種の種類や量が大きく変化するため^[43]、プラズマのガス種、ガス温度を変化させることで殺菌効果も大きく変化すると予想される。

この節では、液中殺菌においてプラズマのガス種とガス温度が殺菌効果に及ぼす影響を明らかにするため、マルチガス温度制御プラズマを用いて殺菌実験を行った。また、得られた殺菌効果と生成される活性種から殺菌因子について考察した。

4.3.1. プラズマのガス種、ガス温度が殺菌効果に及ぼす影響

液中殺菌においてプラズマのガス種とガス温度が殺菌効果に及ぼす影響を明らかにするため、ガス温度によって生成される活性種に顕著な差が見られた二酸化炭素と窒素のプラズマを用いて殺菌実験を行った。実験では、殺菌対象として細菌の *S. aureus* を用いた。菌懸濁液は、*S. aureus* を 10^8 CFU/mL になるように Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline に懸濁して作製した。プラズマガスには、3 L/min の二酸化炭素と窒素を用いた。プラズマのガス温度は、プラズマ出口から 2 mm の位置で、30, 45, 60, 75, 90°C に制御した。500 μ L の菌懸濁液を 24 ウェルプレート (MS-8024R, 住友ベークライト株式会社, 東京) に分注し、液面から 16.5 mm の位置からプラズマを照射した。その後、100 μ L の菌懸濁液を採取して段階希釈し、コロニーカウントにより生菌数を評価した。また、比較のために、90°C の二酸化炭素および窒素ガスで菌懸濁液を処理し、生菌数を評価した。この場合、恒温槽を用いた温度制御では、プラズマを発生させずに 90°C のガスを実現することができなかった。そこで、リボンヒーターを用いてマルチガス温度制御プラズマジェットを直接加熱し、ヒーターにかける電圧を調整することでガスを 90°C に制御し、照射した。

殺菌効果を定量的に評価するために、式(4-1)を用いて算出できる殺菌力 (Bactericidal Activity: BA) 値を用いた^[36]。

$$BA = \frac{\log_{10}(N1/N2)}{T2-T1} \quad \text{式(4-1)}$$

BA 値は、単位時間に殺菌された菌数の対数を示している。プラズマによる殺菌では、処理後、殺菌効果が得られるまで時間がかかることが示されている^[60]。本研究では、生菌数が初期値から 1 桁以上減少した時点から、菌数が検出限界以下に減少する直前までの範囲で BA 値を算出し、殺菌効果を評価した。ここで、 $T1$ は生菌数が初期値から 1 桁以上減少する直前の測定点での時間、 $T2$ は生菌数が検出限界以下になる直前の測定点での時間である。 $N1$, $N2$ はそれぞれ $T1$, $T2$ の時点での生菌数である。

結果を、図 4-5 に示す。図中の黒の実線が BA 値の算出に用いたデータであり、傾きが BA 値を表している。ガス温度が 30°C の場合、二酸化炭素プラズマは 60 秒で生菌数を 4 桁以上減少させる殺菌効果を示した。ガス温度が 45°C の場合、二酸化炭素プラズマは 60 秒で生菌数を 6 桁以上減少させる殺菌効果を示した。ガス温度が 60°C および 75°C の場合、二酸化炭素プラズマは 15 秒間で生菌数を 6 桁以上減少させる殺菌効果を示した。ガス温度が 90°C の場合、二

酸化炭素プラズマは10秒間で生菌数を6桁以上減少させる殺菌効果を示した。二酸化炭素のプラズマでは、ガス温度の上昇により殺菌効果が著しく向上した。90℃の二酸化炭素のガスを60秒間照射しても、生菌数の減少は1桁以下であった。窒素プラズマの60秒間照射による殺菌効果は、最大でも生菌数を1桁減少させる程度であり、二酸化炭素プラズマの殺菌効果と大きな差が見られた。プラズマガスの温度が30～75℃までは、ほとんど殺菌効果に違いが見られなかった。プラズマガスの温度が90℃の場合、60秒の処理で生菌数を1桁減少させる殺菌効果であった。また、90℃の窒素ガス処理の場合は、60秒の処理で生菌数はほとんど減少しなかった。

顕著な殺菌効果が確認された二酸化炭素プラズマでBA値を算出した。各温度におけるBA値を表4-2に示す。炭酸ガスプラズマ処理では、プラズマガス温度の上昇に伴い、BA値が増加した。プラズマのガス温度が90℃の場合、30℃の場合と比較してBA値は約7倍に増加した。

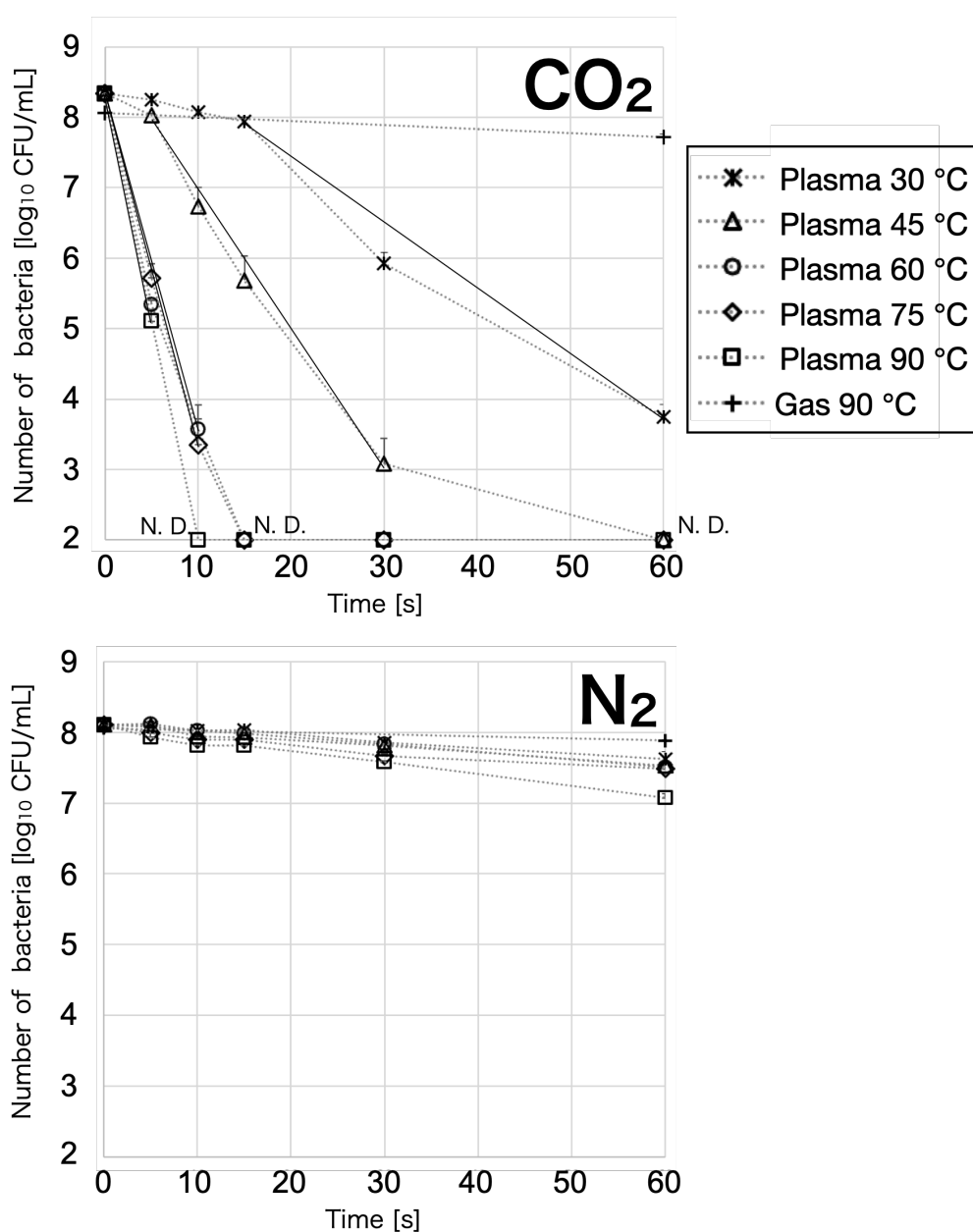


図 4-5 二酸化炭素および窒素プラズマのガス温度と殺菌効果の関係

表 4-2 プラズマガス温度と BA 値の関係

Plasma Temp. (°C)	30	45	60	75	90
BA value (min ⁻¹)	5.6	11.9	28.6	29.9	38.8

4.3.2. 二酸化炭素プラズマの殺菌効果と生成された活性種の相関関係

二酸化炭素プラズマの殺菌効果と生成された活性種の相関係数を算出した。図 4-6 に二酸化炭素プラズマの殺菌効果と生成される活性種の関係を示す。生成される活性種に関しては、3 章で定量した活性種量を 1 分間あたりの生成量に換算して使用した。殺菌効果と活性種の相関係数を表 4-3 に示す。OH ラジカルの生成量は殺菌効果と強い正の相関関係があり、相関係数(R)は 0.914 であった。一重項酸素の生成量は殺菌効果と強い正の相関があり、R は 0.885 であった。オゾンの発生量は殺菌効果と強い負の相関があり、R は-0.997 であった。過酸化水素の生成量は殺菌効果と正の相関があり、R は 0.623 であった。

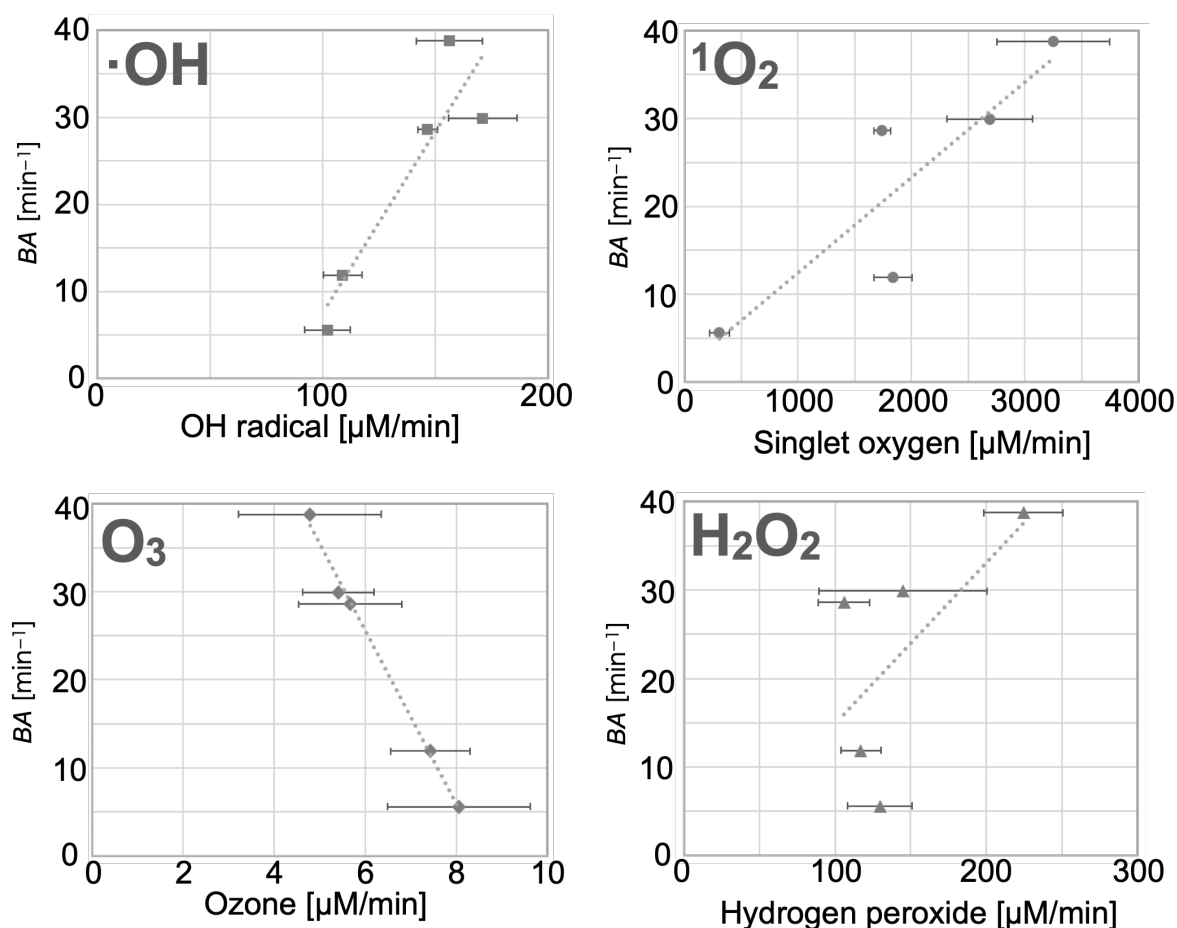


図 4-6 二酸化炭素プラズマの殺菌効果と生成される活性種の関係

表 4-3 二酸化炭素プラズマの BA 値と活性種の相関係数

	Correlation Coefficient Value, R			
	OH Radical	Singlet Oxygen	Ozone	Hydrogen Peroxide
BA value	0.914	0.885	-0.997	0.623

4.3.3. 二酸化炭素プラズマにおける殺菌効果の殺菌因子

4.3.1 に示すように、窒素プラズマと二酸化炭素プラズマでは、ガス種によって殺菌効果に大きな違いが見られた。窒素プラズマでは、最大でも 60 秒の処理で生菌数を 1 桁減少させる殺菌効果しか得られなかった。この結果は、窒素ガスの高い殺菌効果を確認した Takamatsu らの研究結果とは異なっていた^[61]。窒素プラズマ中の活性種の生成においては、酸素を含まないガスであるため、高い酸化力を持つ酸素系の活性種生成には空気との混合が重要である。そのため、ガス流量や処理距離などの処理条件の違いが大きく影響したと考えられる。一方、90℃の二酸化炭素プラズマでは、10 秒の処理で生菌数を 6 桁の減少させる高い殺菌効果が得られた。また、90℃の二酸化炭素ガスをを用いた処理では、60 秒処理しても生菌数の減少は 1 桁以下であった。これらのことから、二酸化炭素プラズマの殺菌効果向上がガス温度の上昇によるものではなく、プラズマで発生した活性種が寄与したものであることを示している。二酸化炭素プラズマでは、一重項酸素や OH ラジカルなどの活性種の生成量がプラズマガス温度の上昇に伴って大きく変化しており、これらの活性種が殺菌効果に寄与していることが示唆された。

二酸化炭素プラズマの殺菌効果は、オゾンと強い負の相関を示し、OH ラジカルおよび一重項酸素と強い正の相関を示した。オゾンは殺菌にも用いられ、Lezcano らは 0.94 mg/L (19.6 μM)のオゾンで *Escherichia coli* を 0.41 分で 90%殺菌することを報告している^[62]。今回の研究では、二酸化炭素プラズマ中のオゾンの最高濃度は 2.0 μM であり、高い殺菌効果を得るには不十分な濃度であった。また、殺菌効果に寄与する活性種が OH ラジカルであると仮定すると、多量の OH ラジカルが生成される窒素プラズマで殺菌効果が見られなかったことと矛盾が生じる。これらの結果から、二酸化炭素プラズマの殺菌における一重項酸素の寄与が示唆された。先行研究である Takamatsu らの研究では、ラジカルの消去剤を用いて二酸化炭素のプラズマの殺菌因子を調べており、一重項酸素が殺菌効果へ寄与していることが示唆されている^{[61],[63]}。二酸化炭素プラズマにおいてガス温度上昇により殺菌効果が向上したのは、プラズマで生成される一重項酸素の量が温度の上昇に伴い増加し、殺菌効果に寄与する一重項酸素が増加したためと考えられる。ただし、大気圧低温プラズマによる殺菌では、活性種や紫外線、荷電粒子などが微生物に複合的に作用することが報告されており^[64]、一重項酸素だけが殺菌効果に寄与しているとは考えにくく、他の殺菌因子についても検討が必要である。

4.4 プラズマバブリングによる医療器具表面の付着菌の殺菌^[65]

医療現場では機器、器具上に付着した細菌による感染を引き起こす可能性があるため、効果的な洗浄消毒処理が行われている。医療器具表面に付着した細菌(付着菌)は、患者由来の汚れなどを栄養源に増殖し、微生物の棲みかとも言えるバイオフィルムを形成することもある。バイオフィルムを形成すると洗浄消毒が困難になる。

これらの付着菌の殺菌への大気圧低温プラズマの応用も検討されており、付着菌やバイオフィルム中の細菌に対してプラズマの殺菌効果が有効であることが報告されている^{[12],[66],[67]}。しかし、付着菌はプラズマの殺菌に対しての耐性が向上しており、液中に浮遊している細菌に比べて長い処理時間を必要とすることが報告されている。したがって、プラズマによる付着菌の殺菌では、器具全体の均一な殺菌に加えて、より高い殺菌効果が求められる。

4.3のような液体へのプラズマ照射で殺菌効果を得る方法では、活性種がプラズマと液体との気液界面で生成、導入されていることが示唆されている^[49]。そのため、活性種の導入経路となるプラズマと液体との気液界面の面積を増加させ、活性種の導入量を増加させることができれば、殺菌効果の向上が期待される。そこで開発されたのがプラズマバブリングである。プラズマバブリングでは、図 4-7 のようにプラズマをバブルとして水中へ直接導入する。これによって、プラズマを液面に直接照射して殺菌を行う手法と比較して、プラズマガスと水との気液界面の面積が大きく上昇する。このプラズマバブリングによる殺菌効果は先行研究にて報告されており、酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングで高い殺菌効果が確認されている^[68]。本研究では、医療器具の付着菌にプラズマバブリングによる殺菌を適用した。また、付着菌を効率よく殺菌するため、付着菌の剥離効果を持つ超音波と殺菌効果を持つ大気圧低温プラズマを組み合わせた超音波併用プラズマバブリングを開発した。本節では、プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングの概要と付着菌に対する殺菌効果について述べる。

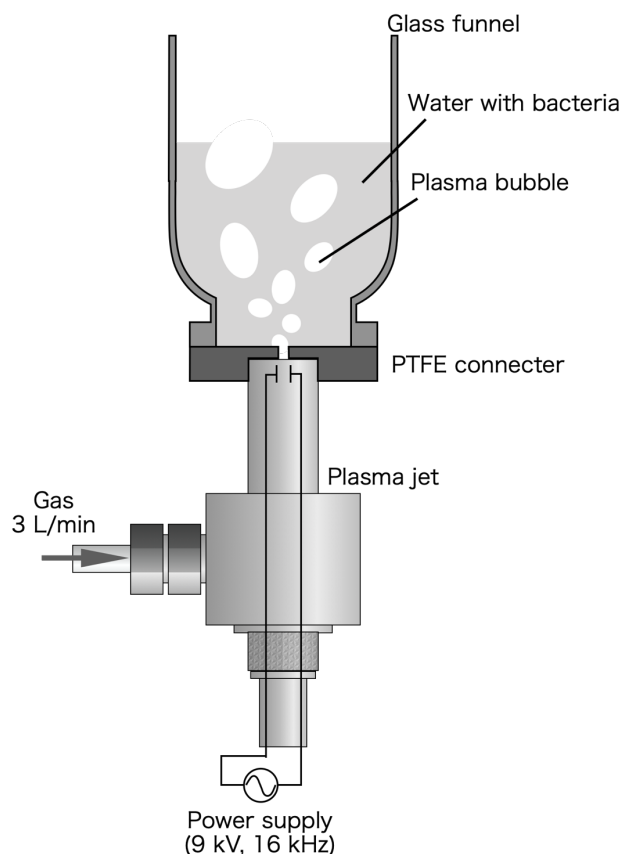


図 4-7 プラズマバブリングの概要

4.4.1.眼科分野で問題となる細菌および真菌に対するプラズマバブリングの殺菌効果

眼科分野で院内感染の原因となっている緑膿菌などの細菌・真菌に対するプラズマバブリングの殺菌効果を評価した。ISO 14729“Ophthalmic optics – Contact lens care products – Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses”で眼科光学製品やコンタクトレンズの衛生管理製品に対する微生物学的要求事項及び試験方法について定めている。この規格に記載のある *S. aureus* ATCC6538, *P. aeruginosa* ATCC9027, *C. albicans* ATCC10231, *S. marcescens* ATCC13880, *F. solani* ATCC36031 に対してプラズマバブリングの殺菌効果を評価した。これらの指標菌へのプラズマバブリングは図 4-7 に示す手法を用いた。プラズマジェットは、ポリテトラフルオロエチレン製のコネクターを介してガラス製ファンネルの底に接続した。3 L/min の二酸化炭素プラズマを生成し、ファンネルに入れた 200 mL の菌懸濁液をプラズマバブリングで処理した。この方法によりプラズマは、周囲の空気と直接混合することなく、液体中に導入される。その後任意の処理時間で、プラズマバブリングで処理した菌懸濁液を採取し、段階希釈した後、コロニーカウントによって生菌数を評価した。また、菌株によっては、ガスみのバブリングによっても殺菌効果が得られる場合があるため、ガスバブリングによる殺菌効果も確認した。

結果を図 4-8 に示す。細菌である *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* の初期生菌数は約 10^7 CFU/mL であった。酵母様真菌である *C. albicans* と糸状菌である *F. solani* の初期生菌数はそれぞれ約 10^5 CFU/mL, 10^4 CFU/mL であった。*S. aureus* については、3 分間のプラズ

マバブリングにより、生菌数が5桁減少した。*P. aeruginosa*では、5分間のプラズマバブリングで生菌数が5桁減少した。*S. marcescens*では、10分間のプラズマバブリングで生菌数が約5桁減少した。*C. albicans*と*F. solani*では、5分および15分のプラズマバブリングで生菌数がそれぞれ3および2桁の減少した。プラズマバブリングによる殺菌では、すべての指標菌は検出下限値以下まで減少した。

ガスバブリングによる殺菌効果は*P. aeruginosa*でのみ見られた。*P. aeruginosa*では、10分間のガスバブリングによって生菌数が約2桁減少した。その他の菌株では、10分間のガスバブリングでも生菌数の減少は1桁以下であり、ほとんど殺菌効果は確認されなかった。それぞれの菌株において、プラズマバブリングとガスバブリングの殺菌効果には大きな差があり、得られた殺菌効果はプラズマバブリングによるものと考えられる。

プラズマバブリングの殺菌効果は、ISO14729に記載されているすべての細菌および真菌の菌株に対して有効であった。*S. aureus*に対するプラズマバブリングの殺菌効果は、その生存曲線から*P. aeruginosa*と同等またはそれ以上であった。一方、*S. marcescens*と*F. solani*の生存曲線は*P. aeruginosa*よりも緩やかであり、プラズマバブリングは生菌数を減少させるのに長い時間を必要とした。このことから、プラズマバブリングに対する耐性は、微生物の種類によって大きく異なることが明らかとなった。菌株によって得られる殺菌効果が異なることは、他のプラズマ処理水を用いた殺菌の研究からも示唆されている^[67]。

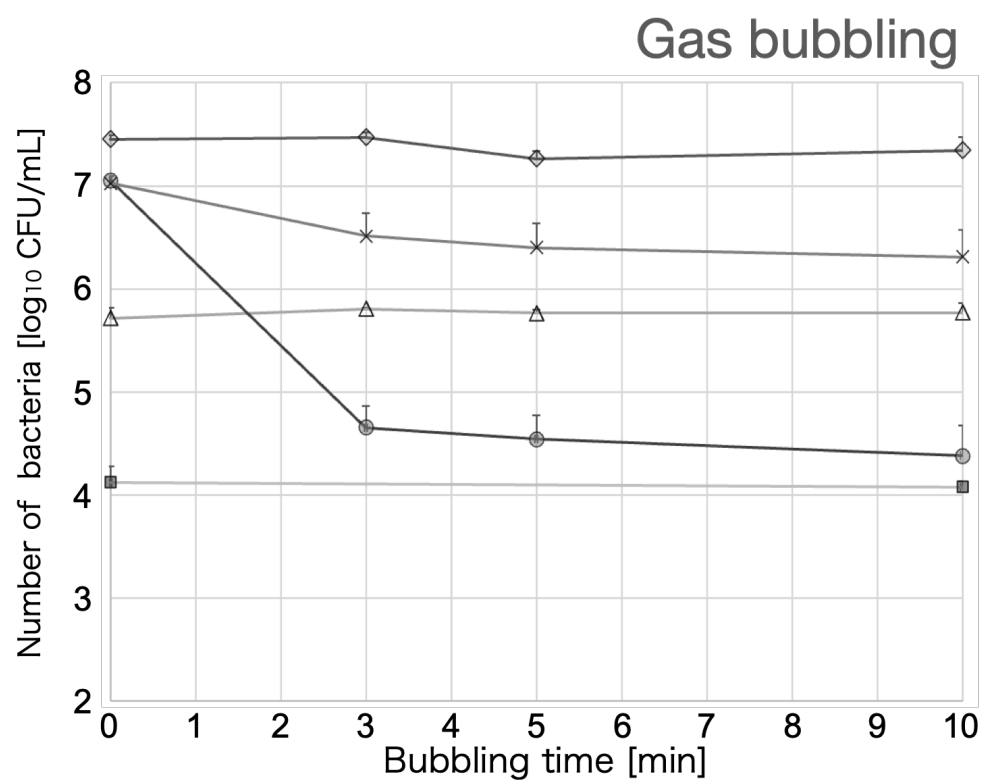
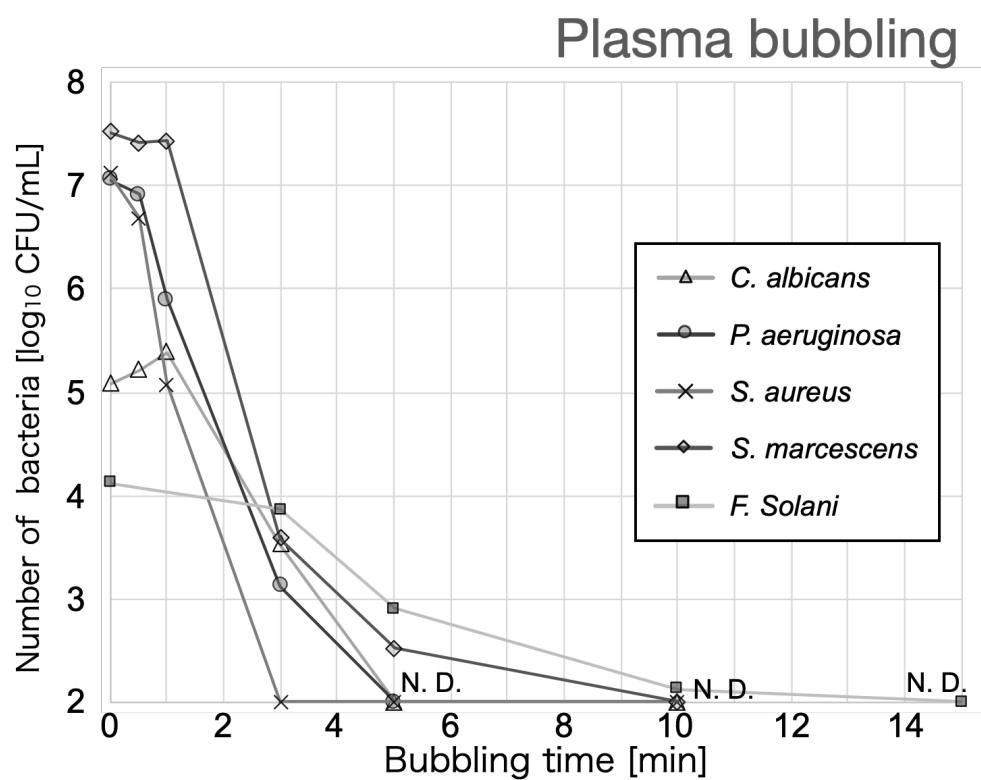


図 4-8 ISO14729 に示されている指標菌に対する殺菌効果

4.4.2. 超音波併用プラズマバブリングの概要

大気圧低温プラズマでは、浮遊菌に対して高い殺菌効果を持つが、付着している細菌に対しては殺菌に時間を要することが報告されている^[12]。そこで本研究では、医療機器表面に付着している細菌と真菌を超音波によって剥離し、浮遊菌にしてからプラズマバブリングで殺菌を行う超音波併用プラズマバブリングを開発した。図 4-9 に超音波併用プラズマバブリングの概要を示す。超音波併用プラズマバブリングでは、プラズマバブリングに加えて、外部から超音波を照射する。そのため、水と処理対象を入れたガラス容器を超音波水槽(60 W, 38 kHz, UK-1KS, 株式会社エスエヌディ, Nagano, Japan)に浸し、ガラス容器の上部にプラズマジェットを配置した。プラズマガスには 3 L/min の二酸化炭素を用いた。

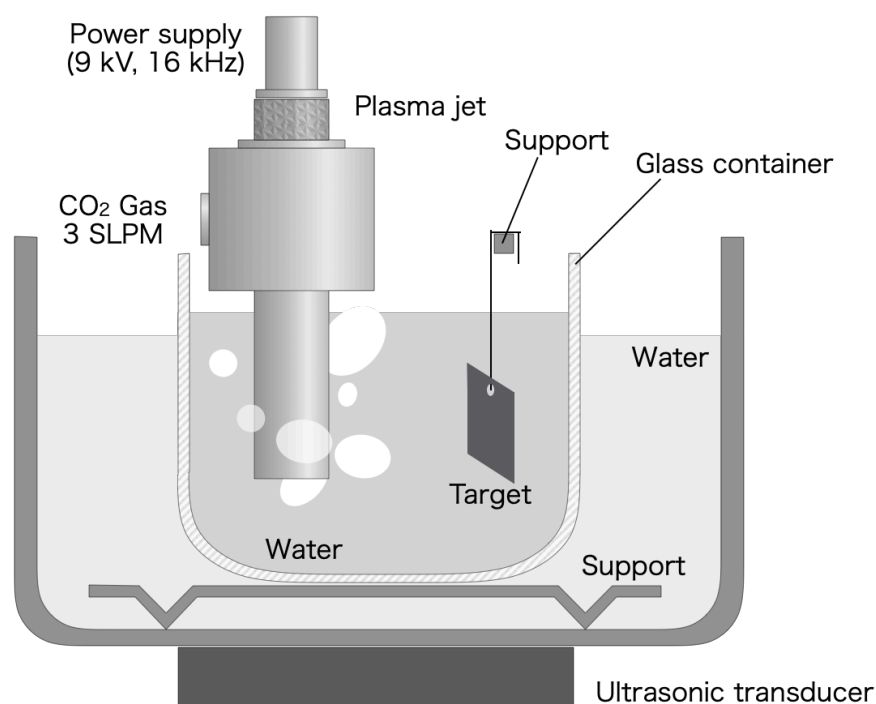


図 4-9 超音波併用プラズマバブリングの概要

4.4.3. ステンレス板上の付着菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果

本実験では、処理対象物として、医療分野で一般的に使用されているステンレス(SUS316L, 20 mm 角)を使用した。このステンレス板を、1 mL の約 10^9 CFU/mL の *P. aeruginosa* 懸濁液と 99 mL の Luria-Bertani 培地の混合液に 36°C で 18 時間浸漬して培養し、流水で表面を洗浄した。表面に *P. aeruginosa* が付着したステンレス板を 200 mL の精製水中に 4 枚懸架し、超音波、プラズマバブリング、超音波併用プラズマバブリングで処理した。1, 2, 3, 5 分後に処理水から 1 枚ずつステンレス板を取り上げた。取り出されたステンレス板は、片面を綿棒で拭き取ることで付着菌を回収した。この綿棒を精製水 1 mL に懸濁し、付着菌数をカウントした。また、ステンレス板の回収と同時に処理水を採取し、段階希釈して浮遊菌の生菌数を評価した。本実験における検出下限値は、浮遊菌は 100 CFU/mL、付着菌は 100 CFU であった。

付着菌に対する殺菌効果を図 4-10 に示す。細菌が付着したステンレス板を 5 分間のプラズマバブリングで処理すると付着菌は 3 桁減少した。ステンレス板から剥離した浮遊菌は、1 分間

のプラズマバブリングで約 10^4 CFU/mL が確認された。これらの浮遊菌は、3 分間のプラズマバブリングで検出下限値以下まで減少した。細菌が付着したステンレス板を 1 分間超音波で処理すると付着菌は 1 桁減少した。ステンレス板から剥離された浮遊菌は、1 分間の超音波処理で約 10^4 CFU/mL 以上が確認された。これらの浮遊菌は 5 分間の超音波処理でも減少しなかった。細菌が付着したステンレス板を 3 分間の超音波併用プラズマバブリングで処理すると付着菌は検出下限値以下まで減少した。ステンレス板から剥離した浮遊菌は、5 分間の超音波併用プラズマバブリングによって、検出下限値以下まで減少した。これらの結果から、付着菌の殺菌における超音波併用プラズマバブリングの有効性が確認された。

超音波のみの処理では浮遊菌の殺菌効果は確認されなかった。したがって、超音波併用プラズマバブリングによって付着菌への殺菌効果が向上したのは、付着菌が超音波によって剥離され、プラズマバブリングによって殺菌しやすい浮遊菌となったためであると推測される。Kamgang-Youbi らはステンレス板から剥離した細菌は、プラズマ処理水に対して付着菌と同程度の抵抗性を示すことを報告している^[12]。この抵抗力は遠心分離によって失われたことが示されており、浮遊菌に付着しているバイオフィルムの影響が示唆されている。一方でこの実験では、このような現象は観察されず、プラズマ処理の条件の差や超音波処理の強さが影響したと推測された。

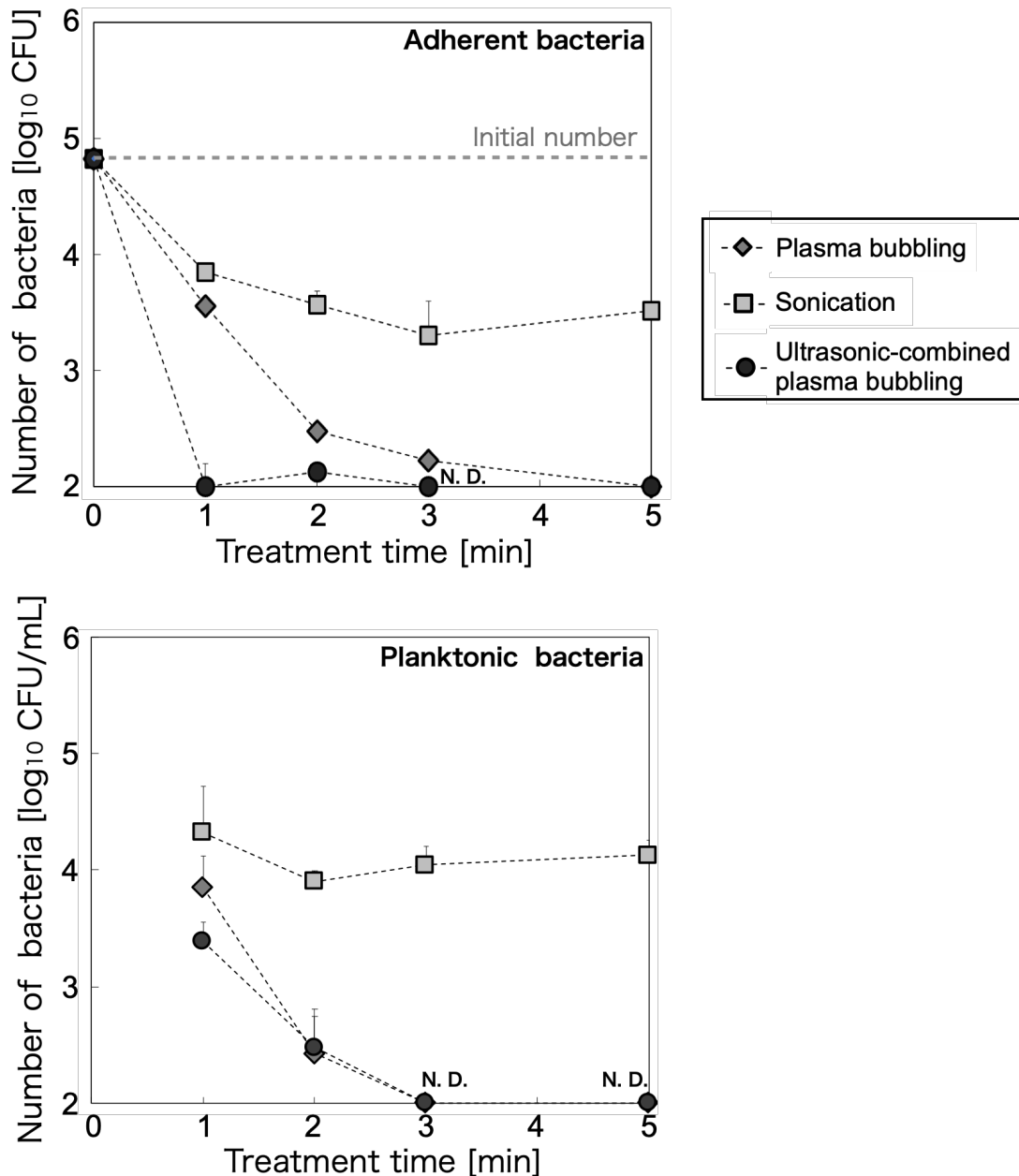


図 4-10 超音波併用プラズマバブリングによる付着菌の殺菌効果

4.4.4. メジャリングプリズム上の付着菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果

眼科分野で院内感染の媒介となる可能性が高い機器として、接触型眼圧計が挙げられる。緑内障などの診断では高精度の眼圧測定が求められ、信頼性が高いゴールドマン眼圧計がよく用いられる。この接触型眼圧計では患者の目にメジャリングプリズム (Measuring Prism: MP, Haag-Streit AG, ケーニッツ, スイス) を押し当てて測定を行い、使用後の MP は繰り返し使用するために滅菌、消毒する必要がある。MP はメタクリル樹脂のプリズムなど複数の部品から構成されるため、オートクレーブのような高温蒸気による滅菌は用いることができない。また、消毒においても使用する消毒薬に制限がある。MP の殺菌ではグルコン酸クロルヘキシジン、次亜塩素酸ナトリウム、グルタルアルデヒド、過酸化水素が指定されており、アルコールやアルコール含有液

の使用は禁止されている。しかし、アメリカ、ロサンゼルスで行われた調査では 68%の病院で 70%イソプロパノール溶液による消毒が行われており、多くの病院で適切な滅菌・消毒法が行われていないのが現状である^[69]。したがって、新たな滅菌・消毒法の開発が強く望まれている。今回の実験では、MP に付着した細菌に対して、超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果を評価した。

実験では、約 10^9 CFU/mL の *P. aeruginosa* 懸濁液を寒天培地に滴下し、MP の先端を 3 秒間押し付けた。その後 MP 先端を流水で洗浄し、200 mL の精製水が入ったガラス容器に MP を 1 つ懸架した。未処理、超音波処理、プラズマバブリング処理、超音波併用プラズマバブリング処理を 10 分間行った。各処理は 5 回ずつ行われ、それぞれで付着菌と浮遊菌を評価した。付着菌は、MP の先端を寒天培地に擦り付け、36℃で 18 時間培養して生菌数を評価した。浮遊菌は、各処理後の精製水を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ過後のフィルターを寒天培地に貼り付け、36℃で 18 時間培養して生菌数を評価した。付着菌と浮遊菌は目視で評価を行い、500 CFU を最大の検出可能なコロニー数とした。

MP 上の付着菌に対する殺菌効果を表 4-4 に示す。未処理の MP では、すべての MP で 500 CFU 以上の浮遊菌が見られた。また、2 つの MP で 500 CFU 以上、1 つの MP で 400~500 CFU、1 つの MP で 300~400 CFU、1 つの MP で 200~300 CFU の付着菌が見られた。超音波処理を行った MP では、すべての MP で 500 CFU 以上の浮遊菌が見られた。また、2 つの MP で 500 CFU 以上、1 つの MP で 200~300 CFU、2 つの MP で 1~100 CFU の付着菌が見られた。プラズマバブリング処理した MP では、1 つの MP で 400~500 CFU、3 つの MP で 1~100 CFU、1 つの MP で 0 CFU の浮遊菌が見られた。また、3 つの MP で 500 CFU 以上、2 つの MP で 1~100 CFU の付着菌が見られた。超音波併用プラズマバブリング処理した MP では、2 つの MP で 1~100CFU、3 つの MP で 0 CFU であった。付着菌は全ての MP で見られなかった。

プラズマバブリングと超音波併用プラズマバブリングは、付着菌に対する高い殺菌効果が明らかとなったが、殺菌効果の不安定性も示された。この不安定性は汚染物質や処理対象物の形状、水温など、プラズマの殺菌効果に影響を与える条件に起因している可能性があり、より確実な殺菌効果を得るためには処理時間を長くする必要がある。

表 4-4 MP 上の付着菌に対するプラズマバブリングと超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果

MP	Non-treatment		Sonication		Plasma bubbling		Ultrasonic-combined plasma bubbling	
	Adherent bacteria [CFU]	Planktonic bacteria [CFU]	Adherent bacteria [CFU]	Planktonic bacteria [CFU]	Adherent bacteria [CFU]	Planktonic bacteria [CFU]	Adherent bacteria [CFU]	Planktonic bacteria [CFU]
1	>500	>500	>500	>500	48	424	0	1
2	391	>500	4	>500	>500	6	0	0
3	282	>500	>500	>500	>500	5	0	21
4	>500	>500	30	>500	45	0	0	0
5	405	>500	288	>500	>500	6	0	0

4.4.5. プラズマバブリングで処理した MP の蛍光観察

プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングの処理による MP へのダメージの有無を調べるため、MP の蛍光観察を行った。蛍光試薬として、フルオレセインナトリウム(東京化成工業, 東京, 日本)を用いた。プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングで約 11 時間処理した MP を観察した。蛍光試薬として 10 mM のフルオレセインナトリウム水溶液を用い、MP を 10 分間水溶液に浸漬させた。フルオレセインナトリウムは 489~493 nm の光で最大吸収を示し、521 nm の蛍光を発するため、蛍光顕微鏡の緑色蛍光タンパク質の観察モードで観察した。比較のため、新品の MP と傷ついた MP も観察した。

図 4-11(a)は MP の外観を示す。図 4-11(b), (c), (d)はそれぞれ、新品と傷ついた MP, およびプラズマバブリングと超音波併用プラズマバブリングで合計 11 時間処理した MP を示す。図 4-11(b)に示す新品の MP では、表面全体に付着した蛍光試薬のわずかな蛍光が観察された。一方で、図 4-11(c)の傷ついた MP では、表面全体に付着した蛍光試薬のわずかな蛍光と強い線状の蛍光が観察された。この線状の蛍光は、MP の傷に蛍光試薬が染み込み込んだため、強い蛍光が発せられている。図 4(d)のプラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングで処理した MP では、表面全体に付着した蛍光試薬がわずかに蛍光を発しているのが観察され、新品の MP の蛍光の様子は変わらなかった。これらのことから、プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングは MP にダメージなく殺菌処理を行えることが示された。

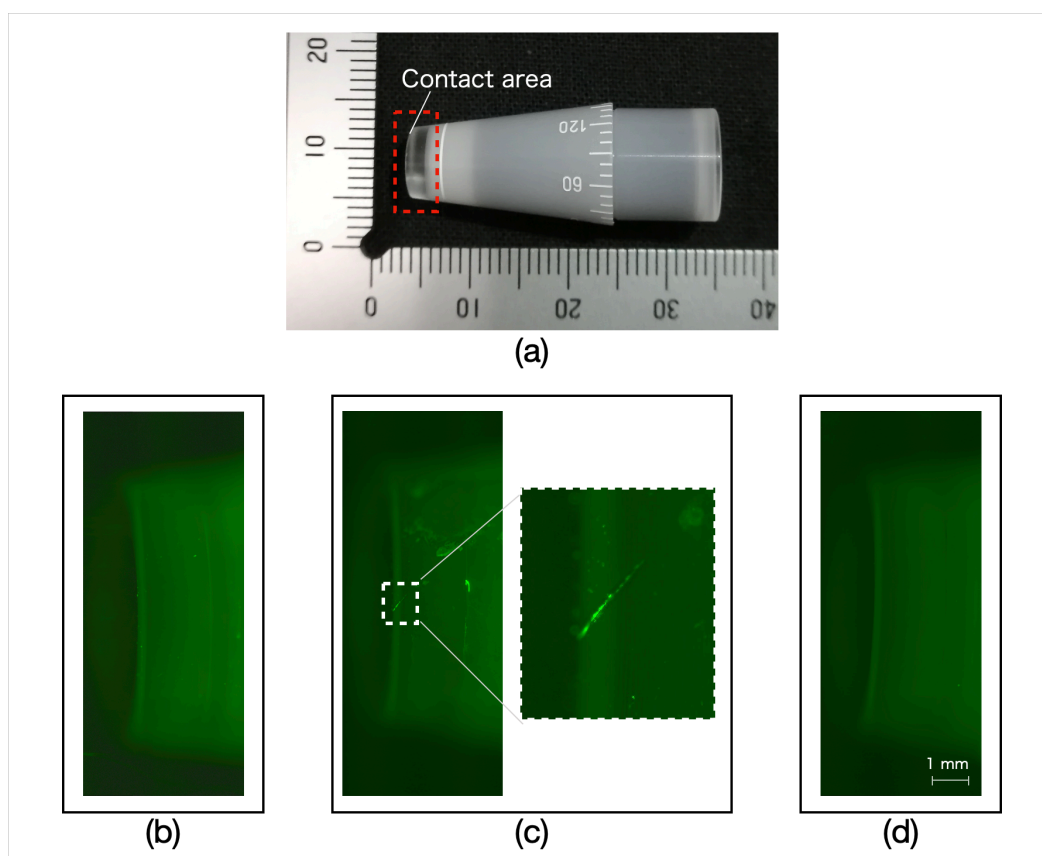


図 4-11 MP の蛍光観察

(a): MP の外観, (b): 新品の MP, (c): 傷がついた MP,
(d) プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングで 11 時間処理した MP

4.4.6. まとめ

本節では、プラズマバブリングによる付着菌の殺菌を試みた。また付着菌を効率よく殺菌するため、付着菌の剥離効果を持つ超音波と殺菌効果を持つプラズマバブリングを組み合わせた超音波併用プラズマバブリングを開発した。眼科分野で問題となる *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. marcescens*, *F. solani* に対するプラズマバブリングの殺菌効果を確認した。ステンレス板上に付着した約 10^5 CFU の *P. aeruginosa* は、5 分間のプラズマバブリングによって検出下限値以下となった。超音波併用プラズマバブリングでステンレス板上の付着菌を処理すると3分間で検出下限値以下となった。

超音波併用プラズマバブリングを医療器具の MP の殺菌に応用した。*P. aeruginosa* が付着した MP に対して10分間の超音波併用プラズマバブリングを行うことで、MP 上の付着菌を全て殺菌することに成功した。蛍光試薬を用いて、プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングを11時間行った MP を観察したが、傷や破損は見られなかった。これらのことから、付着菌の殺菌において、プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングの有効性を確認した。

4.5 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングによる殺菌

4.4 ではプラズマと液体との気液界面の面積を増加させ、殺菌効果の向上を図ったプラズマバブリングについて記述した。本研究では、さらにプラズマと液体との気液界面の面積を増加させ殺菌効果を向上させる目的で、多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングを考案した。本節では、多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要と殺菌効果、特性を調べた結果を記述する。

4.5.1 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要を図 4-12 に示す。プラズマジェットで生成されたプラズマは、図 4-13 に示す多孔質フィルタを通して、液中に直接導入される。多孔質フィルタは、セラミフィルタ(円筒ガス噴射管 A 型, AS ONE Corporation, Osaka, Japan)であり、 $\phi 10 \times 180$ mm のガラス管の先に、 $\phi 20 \times 20$ mm の円筒形状のフィルタがついている。フィルタは、表面にガラス被覆した Al_2O_3 主体の特殊骨材を合わせたものであり、耐腐食性に優れたものとなっている。

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングと従来手法のプラズマバブリングで簡易的に気液界面の面積を計算すると以下の様になる。バブルは完全な球ではないが、計算の簡略化のため、完全な球体と仮定し、二酸化炭素ガスは標準状態として扱った。バブル半径を r とすると、バブル1つあたりの体積 V は、式(4-2)のように表せる。

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad \text{式(4-2)}$$

次に、1分あたりに生成されるバブルの数 x は、1分あたりに流入するガス体積を z とすると式(4-3)のように表せる。

$$x = \frac{z}{V} \quad \text{式(4-3)}$$

1分あたりの気液界面の面積 S は、式(4-4)のように表すことができる。

$$S = 4x\pi r^2 \quad \text{式(4-4)}$$

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングと従来手法のプラズマバブリングそれぞれのバブリングの様子を撮影し、写真からバブル半径を測定した。それぞれの条件で 200 mL の精製水を 3 L/min の二酸化炭素ガスでバブリングすると図 4-14 の様になる。従来手法では、バブルの直径が約 21 mm であり、気液界面の面積が 0.86 m^2 であった。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリング手法では、バブルの直径が約 3.0 mm であり、気液界面の面積は 6.0 m^2 であった。多孔質フィルタを用いるプラズマバブリングでは、多孔質フィルタを用いない場合と比較して、約 7 倍の気液界面の面積が得られた。

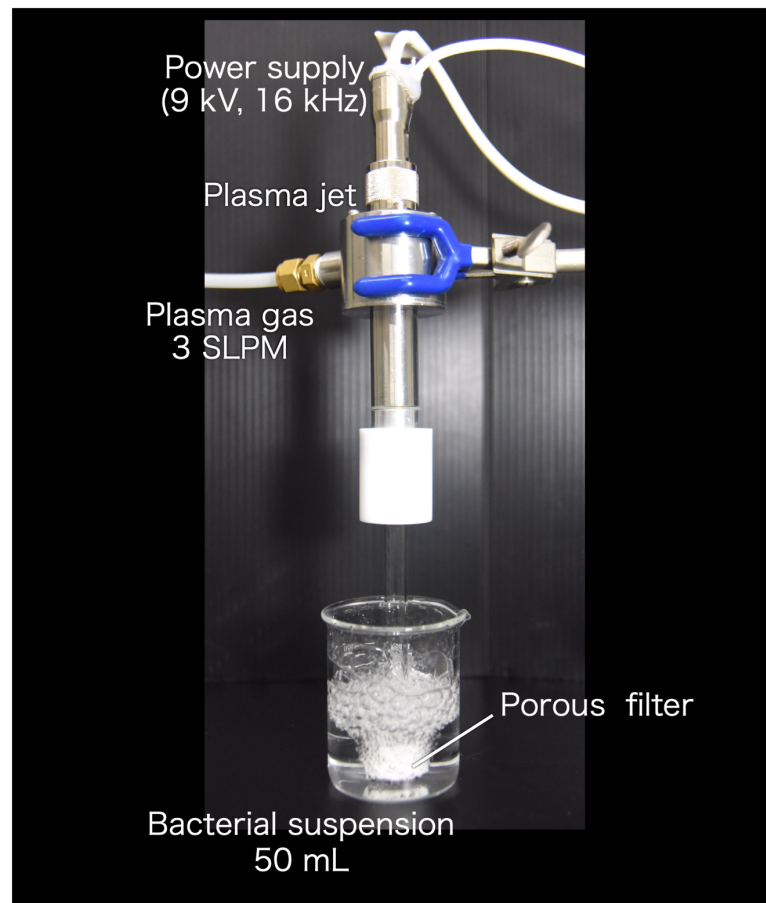
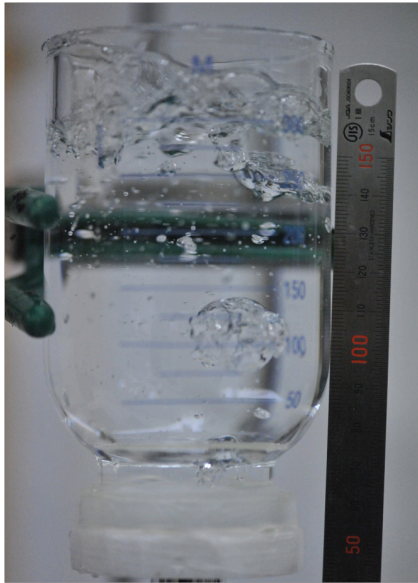


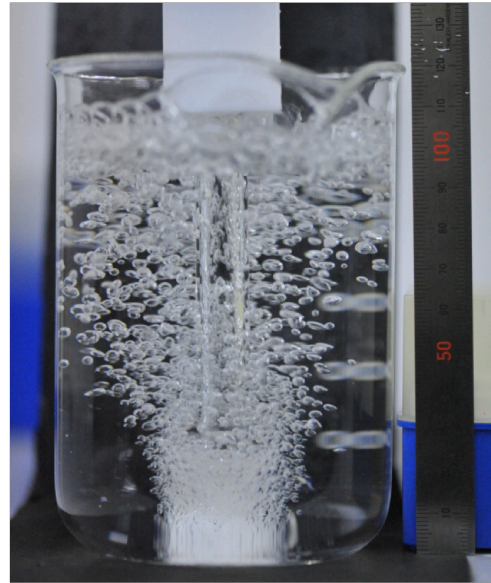
図 4-12 プラズマバブリングの概要



図 4-13 プラズマバブリングで使用した多孔質フィルタ



Conventional plasma bubbling



Plasma bubbling with porous filter

図 4-14 従来のプラズマバブリングと多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの様子

4.5.2. 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの殺菌効果

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの殺菌効果を確認するため、従来手法であるプラズマバブリングとの殺菌効果の比較を行った。図 4-15 に実験に用いたプラズマバブリングと多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要を示す。200 mL の *F. solani* の菌懸濁液は 3 L/min の二酸化炭素で生成したプラズマによって、2 つの方法で処理された。その後、コロニーカウントで、生菌数を評価した。また、二酸化炭素ガスのバブリングでの殺菌効果も同様の方法で評価した。

結果を図 4-16 に示す。初期菌数約 10^4 CFU/mL の *F. solani* を、二酸化炭素ガスで 20 分間バブリングしても生菌数は変化しなかった。プラズマバブリングでは 15 分間の処理で、生菌数を 2 桁減少させる殺菌効果を示した。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでは 2 分間の処理で生菌数を 2 桁減少させる殺菌効果を示した。これらの結果から、多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでは、従来のプラズマバブリングと比較して殺菌効果が大幅に向上していることが示された。またプラズマバブリングによって *F. solani* の生菌数を 2 桁減少させるのに要した時間は 2/15 に短縮された。

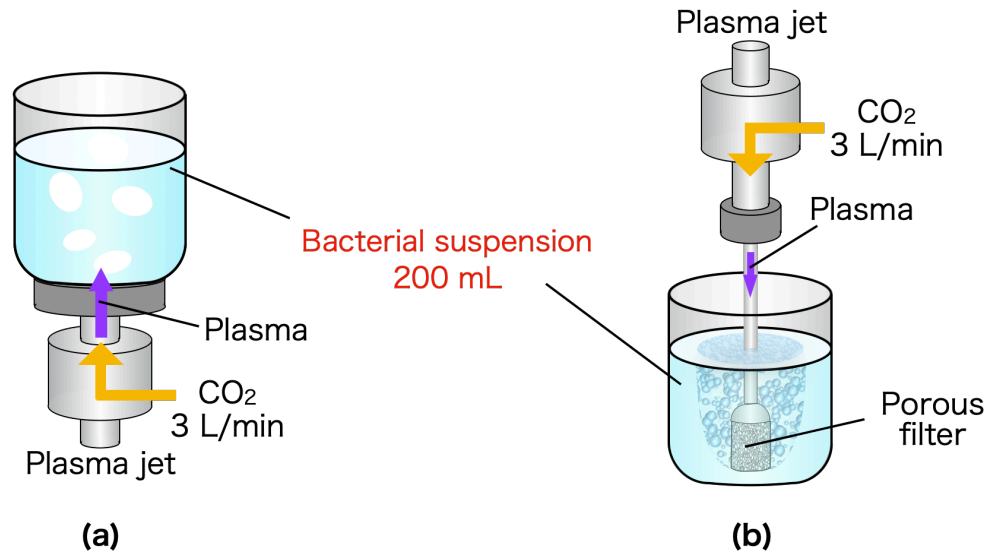


図 4-15 プラズマバブリングと多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの概要
(a)プラズマバブリング, (b)多孔質フィルタを用いたプラズマバブリング

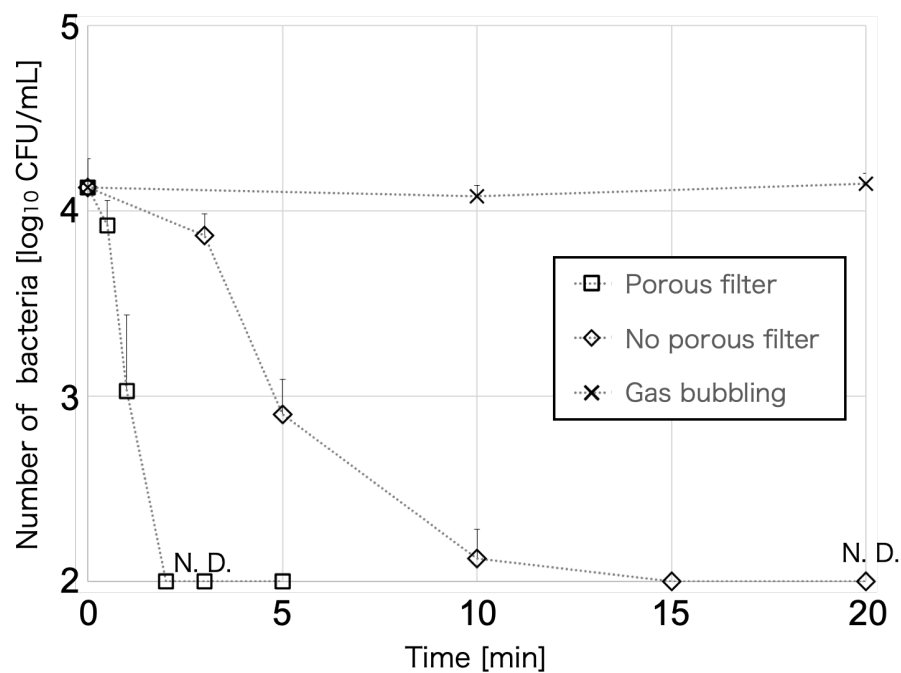


図 4-16 プラズマバブリングと多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングの殺菌効果

4.5.3. プラズマのガス種とプラズマバブリングの殺菌効果の関係

各ガス種によるプラズマバブリングの殺菌効果を調べた。プラズマバブリングの殺菌実験のセットアップを図 4-17 に示す。初期菌数が約 10^8 CFU/mL の大腸菌懸濁液を 3 L/min のアルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、ヘリウムのプラズマバブリングで処理し、コロニーカウントにて生菌数を評価した。結果を図 4-18 に示す。アルゴン、ヘリウム、窒素のプラズマバブリングでは 5 分間の処理で殺菌効果は確認されなかった。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、処理開始

30 秒経過時から生菌数の大きな減少が確認され、5 分間の処理で生菌数が 6 桁減少した。酸素プラズマでは、処理時間 0.5 分で生菌数が 6 桁以上低下する殺菌効果を示した。

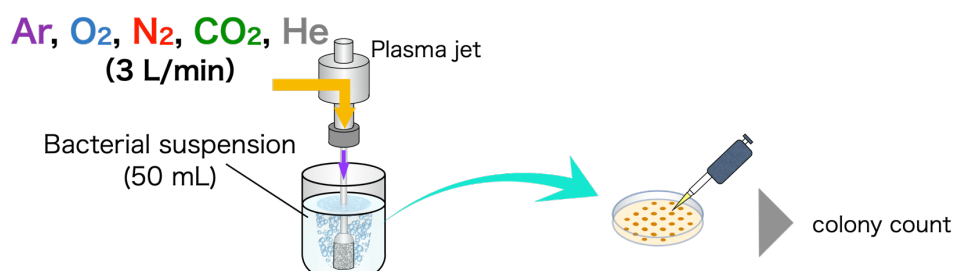


図 4-17 各ガス種によるプラズマバブリングの殺菌実験

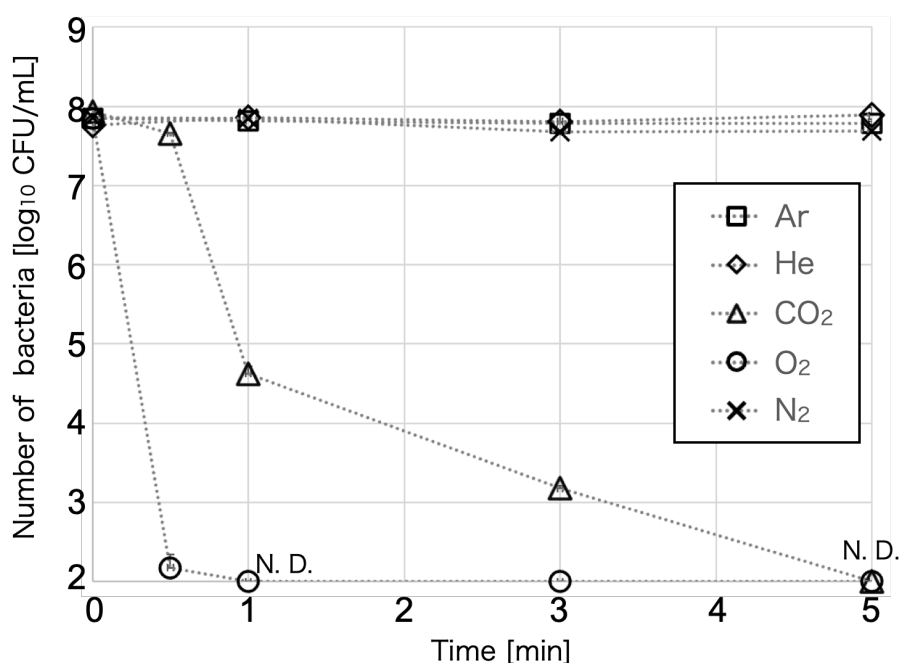


図 4-18 プラズマのガス種とプラズマバブリングの殺菌効果の関係

4.5.4. 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで水中に導入される活性種

プラズマバブリングでは、水中に導入された活性種が殺菌効果に寄与していると考えられる。本項では、多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで液中に導入される活性種の測定を行った。測定対象とした活性種は OH ラジカル、一重項酸素、オゾン、過酸化水素である。電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance: ESR; Magnetech MS5000, ブルカー・ジャパン株式会社, Tokyo) を用いて測定した。オゾンと過酸化水素の濃度は、ポケットオゾン計 (DR300, Hach Company, CO, USA) と分光光度計 (UV-2600, 島津製作所, Kyoto, Japan) による比色法によって測定した。OH ラジカル、スーパーオキシドラジカルのスピントラップ試薬は、それぞれ 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)^[44], 5-(2, 2-Dimethyl-1, 3-Propoxycyclophosphoryl)-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide (CYPMPO) を用いた。一重項酸素のスピントラップ試薬には、

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC)^[45]を使用した。これらの試薬は超純水に溶解した。DMPO と CYPMPO, TPC の終濃度はそれぞれ 200 mM, 5 mM, 75 mM となるように調製した。オゾンの測定では、オゾン試薬アンプル(AccuVac® Mid-Range 0-0.75 mg/L, Hach Company, CO, USA)による比色法を使用した。10 mL の超純水でアンプルの試薬を溶解した。酸素のプラズマバブリングではオゾンが生成される事が先行研究で示されているため、酸素のプラズマバブリングした超純水を用いて、オゾンの検量線を作成した。酸素のプラズマバブリングで生成したオゾン水 500 μ L とオゾン試薬 500 μ L を混合して、597 nm の吸光度を分光光度計で測定した。また同時に、ポケットオゾン計 (DR300, Hach Company, CO, USA) でオゾンの量を測定した。混合後の試薬の 597 nm 付近の吸光度を図 4-19 に、作成した検量線を図 4-20 に示す。混合後の試薬の 597 nm の吸光度は、溶存オゾン量が 0 から 0.8 mg/L までの間で線形に変化したことから、オゾンの測定ではこの検量線を用いて定量を行った。

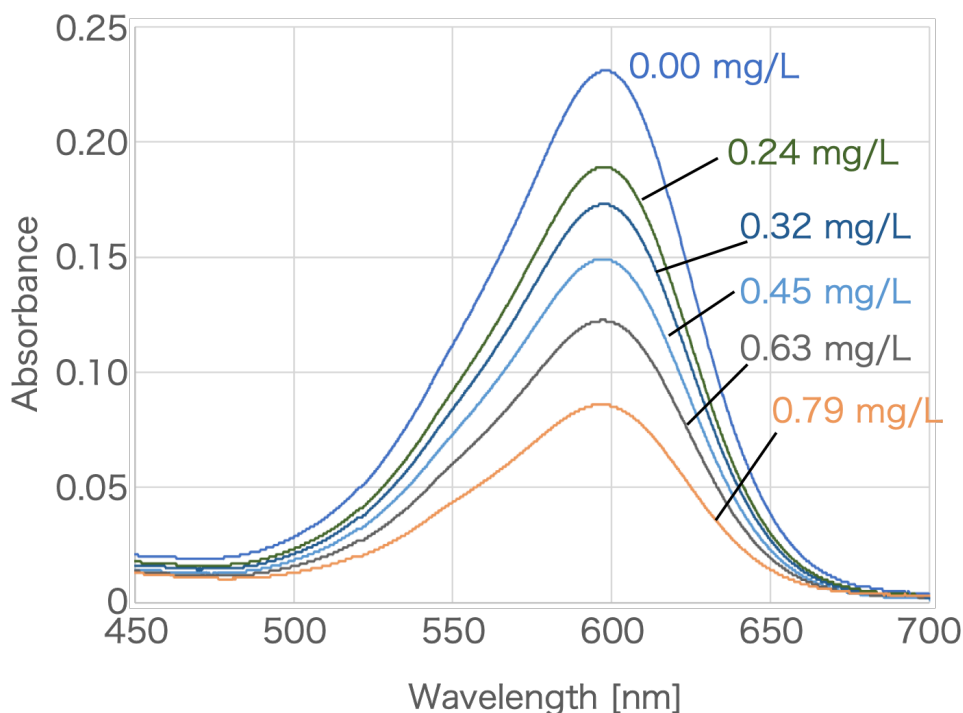


図 4-19 溶存オゾンの量と吸光度の変化

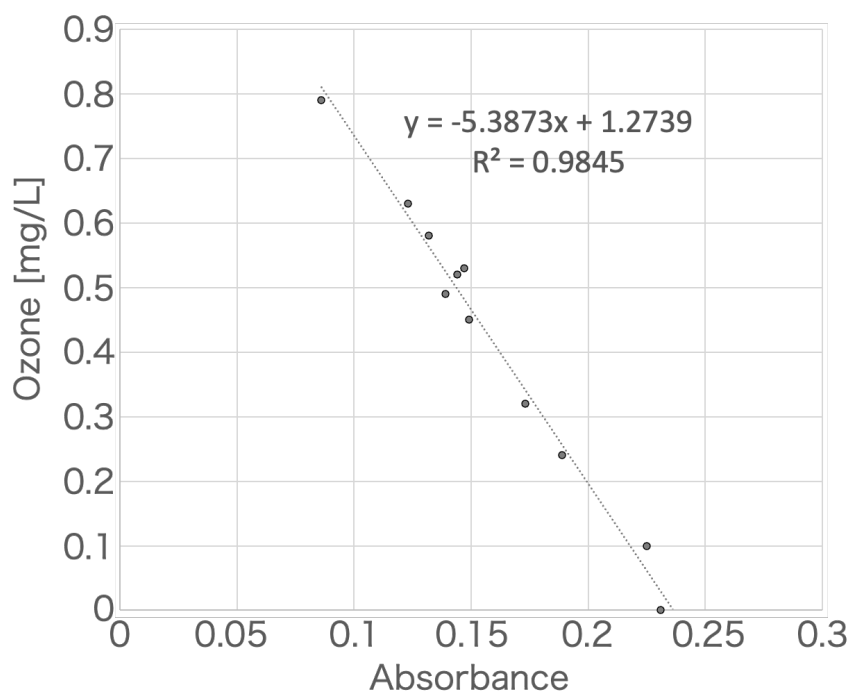


図 4-20 溶存オゾンの量と 597 nm の吸光度から作成した検量線

過酸化水素は、 Fe^{3+} とキシレノールオレンジの反応に基づく比色法を用いて測定した^[46]。過酸化水素 1 μM 、5 μM 、10 μM を含む超純水と比色試薬 (200 μM xylenol orange, 500 μM 硫酸アンモニウム鉄(II), 50 mM 硫酸, 200 mM ソルビトール) を混合し、検量線を作成した。図 4-21 に示すように過酸化水素量が増加すると、586 nm の吸光度が増加する。586 nm の吸光度を用いて、図 4-22 に示す検量線を作成した。混合後の試薬の 586 nm の吸光度は、過酸化水素量が 0 から 10 μM までの間で線形に変化したことから、過酸化水素の測定ではこの検量線を用いて定量を行った。

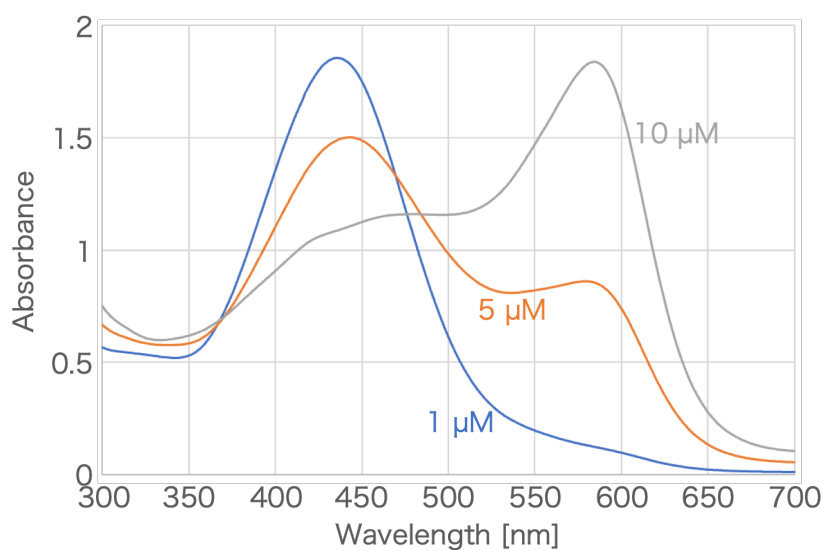


図 4-21 過酸化水素量と吸光度の変化

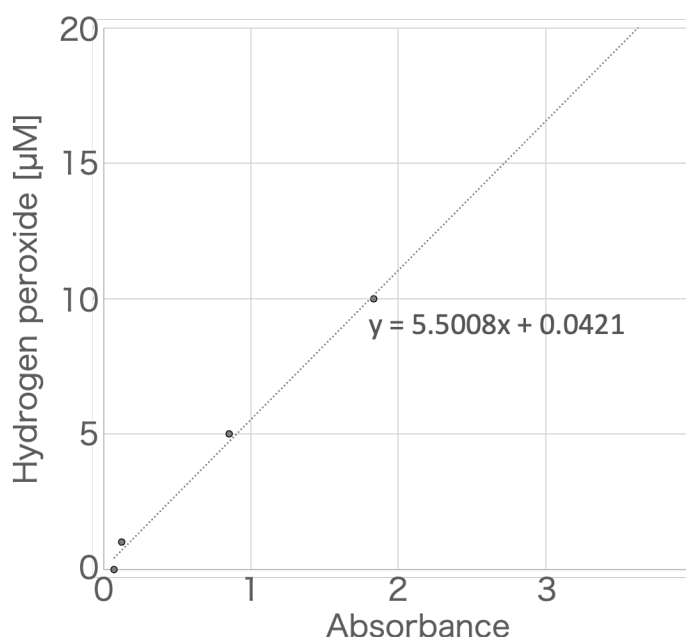


図 4-22 過酸化水素量と 586 nm の吸光度から作成した検量線

プラズマバブリングには、3 L/min で生成した酸素、二酸化炭素、アルゴン、窒素を用いた。約 8℃の超純水 50 mL を多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで 2 分間処理した。処理後直ちに DMPO、TPC、CYPMPO 試薬液 50 μL とプラズマバブリングで処理した水 50 μL を混合した。オゾンの測定では、オゾン試薬 500 μL とプラズマバブリングで処理した水 500 μL を混合した。過酸化水素の測定では、比色試薬 200 μL とプラズマバブリングで処理した水 200 μL を混合した。DMPO と OH ラジカルとの反応で生成されるスピニアダクトは寿命が短いため、混合後の DMPO 試薬は 30 秒以内に ESR で測定した。その後 TPC と CYPMPO の ESR 測定を行った。ESR での測定条件は全て、マイクロ波周波数 9.421 GHz、変調周波数 100 kHz、掃引時間 30 秒、磁場 329.50～341.00 mT に設定した。得られた ESR スペクトルの 333.051～337.95 mT のスピニアダクトの面積から活性種を定量した。オゾンは、分光光度計で 597 nm の吸収を測定することで定量した。過酸化水素については、混合後 40 分以上の反応時間をおき、測定を行った。

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで液中に導入されたオゾンと過酸化水素量を図 4-23 に示す。オゾンは酸素プラズマバブリングで高い濃度で検出され、19.9 μM(0.95 mg/L)であった。これはオゾン試薬の測定範囲である 0.75 mg/L を超える値であり、試薬との反応が飽和している可能性がある。よって、実際にはより高濃度でオゾンが溶解していた可能性がある。二酸化炭素では、0.48 μM のオゾンが検出された。アルゴン、窒素では、オゾンはほとんど検出されなかった。過酸化水素は、酸素プラズマバブリングにおいて、2.88 μM が検出された。二酸化炭素、アルゴン、窒素では、約 0.9 μM の過酸化水素が検出された。ESR での測定では、DMPO および CYPMPO を用いた測定では、全ての条件でスピニアダクトが検出されなかった。TPC においては、スピニアダクトが検出された。酸素のプラズマバブリングにおいて、他のガス種と比較して多い一重項酸素が見られた。しかし、測定レンジが小さく、バックグラウンドノイズの影響が大きいため、有意な差であるか明らかにできなかった。

これらのことから、酸素の多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでは、多量に生成され、殺菌剤としても用いられているオゾンが殺菌に寄与していることが示唆された。二酸化炭素の多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでも、 $0.48\text{ }\mu\text{M}$ のオゾンが検出された。しかし、このオゾンの量は殺菌に対しては、不十分であると考えられる。オゾンを用いた殺菌として、Lezcano らは 0.94 mg/L ($19.6\text{ }\mu\text{M}$) のオゾンで *E. coli* を 0.41 分で 90% 殺菌することを報告している^[62]。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、4.5.3 で示す様に 5 分間で *E. coli* を 6 桁低下 (99.9999% 殺菌) させる殺菌効果を持っており、Lezcano らが示している 20 分の 1 程度のオゾン濃度では、殺菌効果を説明することはできない。

プラズマバブリングで検出された過酸化水素濃度が殺菌効果を持つものであるか調べるため、4.4.1 で示した菌株に対する過酸化水素の殺菌効果を調べた。各種菌株の菌懸濁液と過酸化水素を混合して終濃度が $2.6\text{ }\mu\text{M}$ となるように調整し、その状態で 5 分および 15 分静置した。結果を図 4-25 に示す。全ての菌株において $2.6\text{ }\mu\text{M}$ の過酸化水素で 15 分処理した場合でも、生菌数の低下は 1 桁程度も確認されなかった。このことから、酸素および二酸化炭素の殺菌効果に過酸化水素はほとんど寄与していないと考えられる。

一重項酸素に関しても、二酸化炭素のプラズマバブリングでは殺菌効果を持たないアルゴンや窒素以下の検出量であり、殺菌因子であるとは考えられない。OH ラジカルやスーパーオキシドラジカルについても、全てのプラズマバブリングにおいてスピンアダクトが得られていない。

以上のことより、多孔質フィルタを用いた二酸化炭素プラズマバブリングにおける殺菌因子は明らかにすることができなかったが、オゾンや過酸化水素、OH ラジカル、スーパーオキシドラジカル、一重項酸素が殺菌効果に寄与している可能性は低いと考えられる。

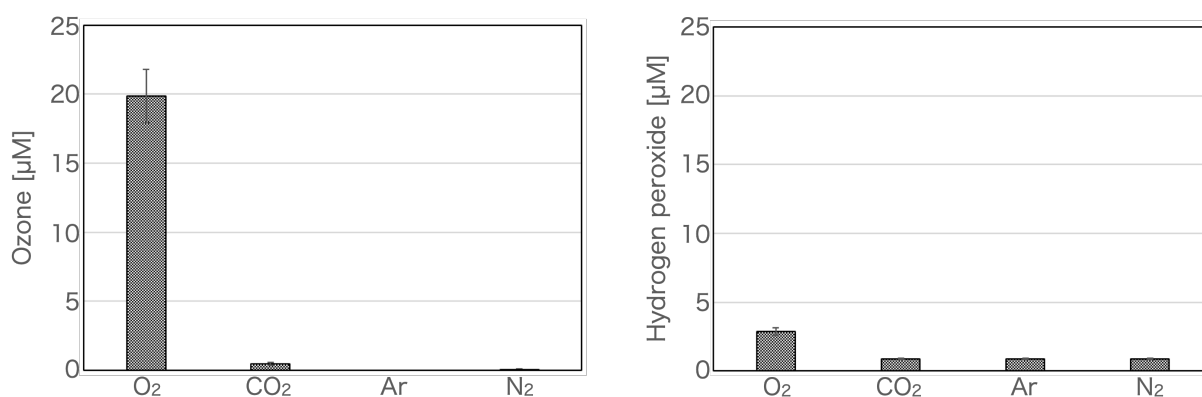


図 4-23 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで液中導入されたオゾンと過酸化水素

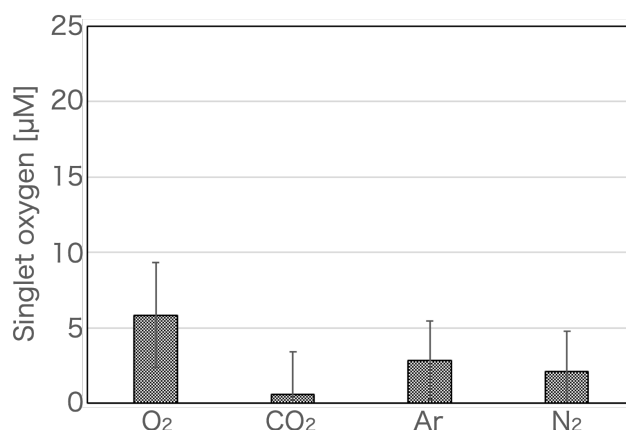


図 4-24 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで液中導入された一重項酸素

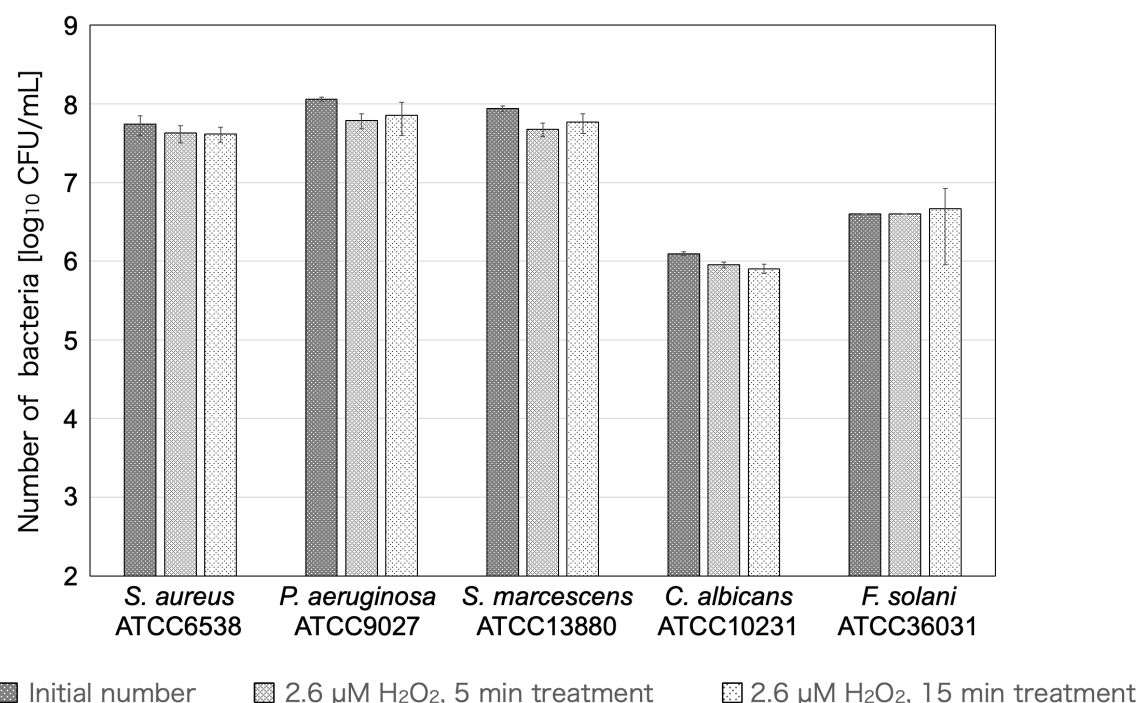


図 4-25 各種菌株に対する 2.6 μM の過酸化水素の殺菌効果

4.5.5. プラズマバブリングした水の pH の変化

pH は、プラズマを用いた殺菌効果に影響を与えることが報告されており^[70]、プラズマバブリングの殺菌効果においても影響を与える可能性がある。特に二酸化炭素のプラズマバブリングでは、液中に二酸化炭素が溶解することで pH が低下すると予想される。そこで、本項ではプラズマバブリングした水の pH を測定した。3 L/min の酸素および二酸化炭素で生成したプラズマで精製水をバブリングし、pH の時間変化を測定した。プラズマバブリングは従来手法と多孔質フィルタを用いた手法の両方で行い、それぞれ、200 mL および 50 mL の精製水を処理した。pH は、pH メーター (D-51, HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan) と pH 電極 (9615S-10D, HORIBA, Ltd., Kyoto,

Japan)を用いて測定した。プラズマバブリングした水の pH の変化を図 4-26 に示す。未処理の水では、pH は 5.72 であった。酸素のプラズマバブリングによって、徐々に pH は上昇し 5 分間の処理で 6.12 となった。酸素のガスバブリングにおいても、pH は徐々に上昇し、5 分間の処理で 6.32 となった。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、pH は開始 10 秒で大きく下降し、3 分間の処理で 3.95 となった。二酸化炭素のガスバブリングでは、プラズマバブリングの pH の変化とほぼ同様に变化した。

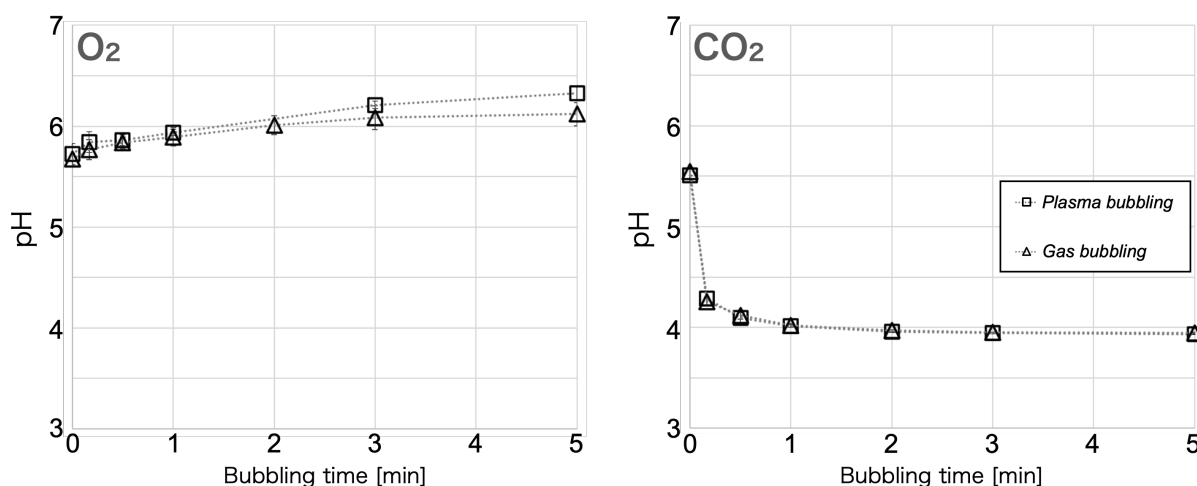


図 4-26 プラズマバブリングで処理した水の pH の変化

多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで処理した水の pH の変化を図 4-27 に示す。未処理の水の pH は 5.45 であった。酸素のプラズマバブリングでは、60 秒の処理で 6.02 となった。その後、pH はほとんど変化せず、一定であった。酸素のガスバブリングでは、pH は 60 秒の処理で 6.02 となり、5 分では、5.64 となった。二酸化炭素のプラズマバブリングで処理した水の pH は、処理開始 30 秒で 3.95 となり、それ以降 pH はほとんど変化せず、一定であった。二酸化炭素のガスバブリングでも pH は同様に变化した。

今回の測定では、二酸化炭素のプラズマバブリングによって、pH は最終的に 4 程度まで低下することが示された。また、プラズマの有無によって pH の変化に明確な差は確認されなかった。このことから、ガスバブリングとプラズマバブリングの殺菌効果の差は pH によるものではないと考えられる。

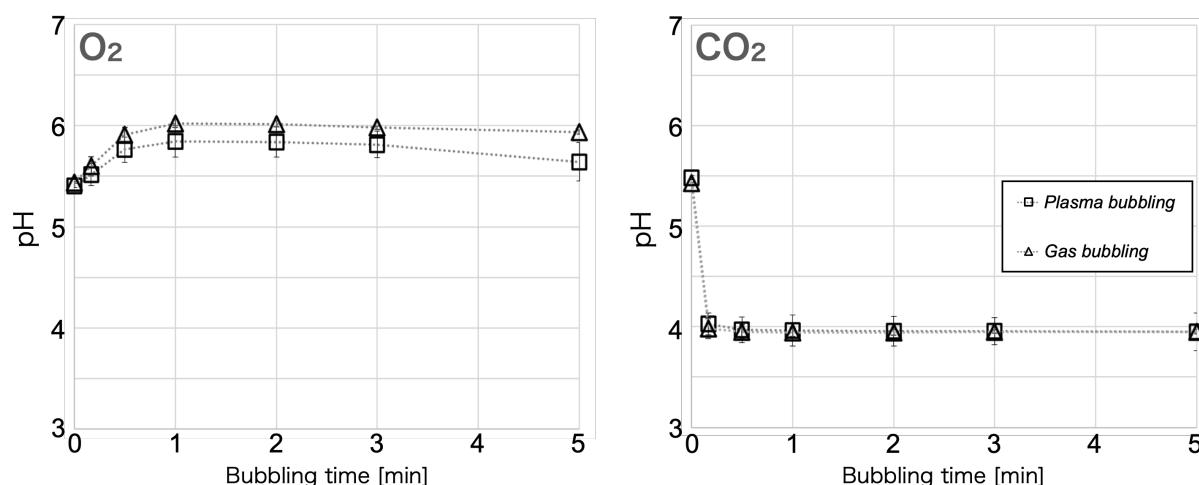


図 4-27 多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングで処理した水の pH の変化

4.5.6. プラズマのガス温度がプラズマバブリング殺菌に及ぼす影響

プラズマ中で生成される活性種の種類や量は、プラズマガスの種類や温度などのプラズマ生成条件によって変化する。このため、プラズマバブリングにおける殺菌効果も、これらの条件に影響を受けると考えられる。本研究では、プラズマガス温度とガス種がプラズマバブリングの殺菌効果に与える影響について調べた。

実験の概要を図 4-28 に示す。初期菌数が約 10^8 CFU/mL の大腸菌懸濁液を 3 L/min の二酸化炭素、酸素プラズマでバブリングした。それぞれのプラズマのガス温度は 30°C、60°C、90°C に制御された。大腸菌懸濁液はプラズマバブリングで温度が変化しない様に、10°C 以下に保持した。バブリングにはガラス製の全長 110 mm (ガラス管 90 mm, フィルタ部 20 mm) の多孔質フィルタを用いた。処理時間 90 秒までは懸濁液を 100 μ L 採取し、100 μ L の LB 培地と混合したのち段階希釈を行い、コロニーカウントにより生菌数を評価した。処理時間 120 秒以降は懸濁液を 1 mL 採取して直接寒天培地上に塗布し、コロニーカウントにより生菌数を評価した。

結果を図 4-29 に示す。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、全ての条件において 300 秒の処理で生菌数を 7 桁以上減少させる殺菌効果が確認された。処理時間が 180 秒以下の場合、プラズマガスの温度が 90°C のプラズマバブリングでは、30°C 及び 60°C の場合に比べて殺菌効果が低下した。特に、30 秒の処理ではプラズマガスの温度が 30°C および 60°C の条件では生菌数を約 2 桁減少させる殺菌効果であるのに対して、90°C の場合、生菌数はほとんど減少しなかった。活性種の生成量は温度とともに増加する傾向が見られているため、この殺菌効果の低下の原因は、プラズマガス温度が高いことで殺菌因子となる活性種の寿命が短くなり、110 mm の導入経路中で失活していると考えられる。一方で酸素のプラズマバブリングでは、全ての条件において 30 秒の処理で生菌数を 7 桁以上減少させる殺菌効果が確認された。一方で、酸素のプラズマバブリングでは、全ての条件において 30 秒の処理で生菌数を 7 桁以上減少させる殺菌効果が確認された。処理時間 15 秒では、プラズマガスの温度が 30°C および 90°C の条件で

は生菌数を約4桁減少させる殺菌効果であるのに対して、60℃の条件では生菌数を約5桁減少させる殺菌効果を有していた。

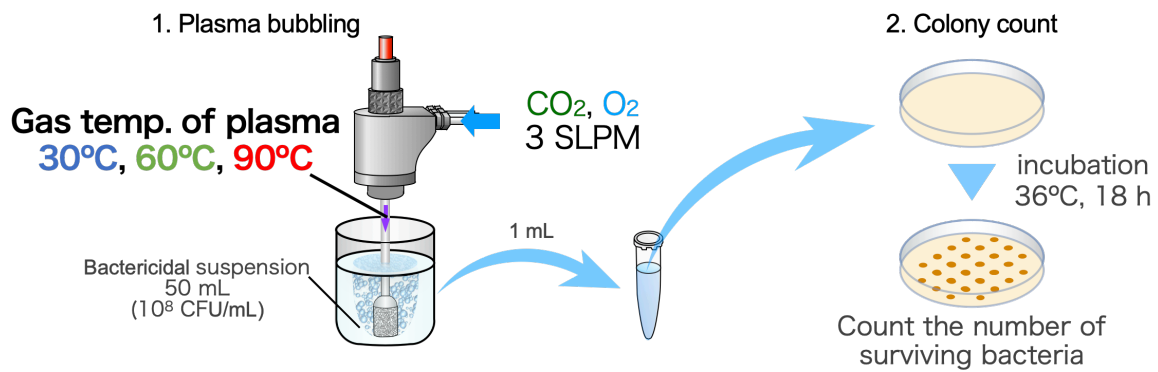


図 4-28 プラズマのガス温度を変化させたプラズマバブリングによる殺菌実験

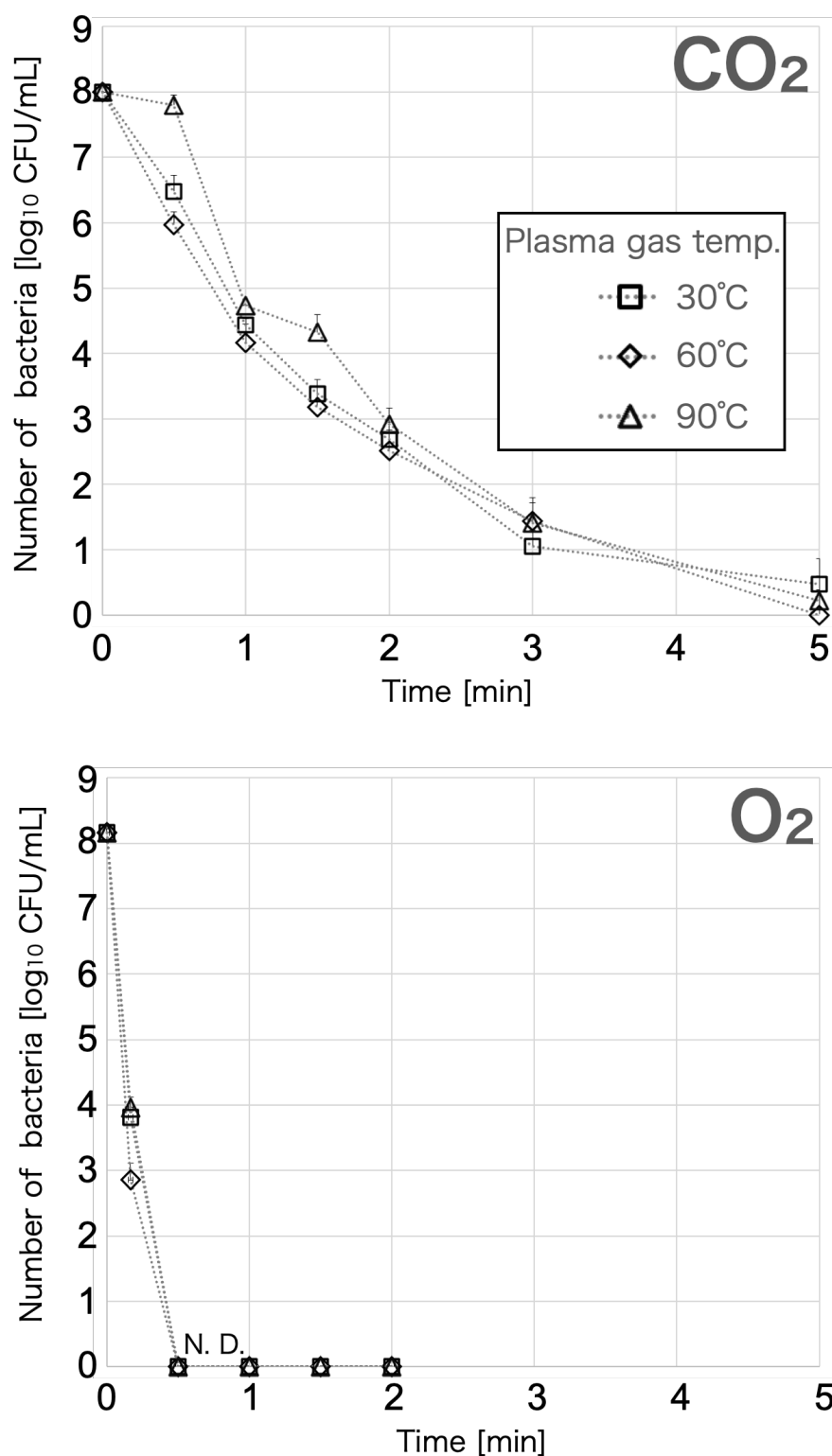


図 4-29 プラズマのガス温度がプラズマバブリングの殺菌効果に与える影響

4.5.7. 多孔質フィルタの長さが殺菌効果に与える影響

4.5.6 のプラズマバブリングにおいて、プラズマのガス温度を上昇させることによって、プラズマを液中に導入するまでの経路中で活性種が失活することが示唆された。そのため、プラズマの

生成から液中に活性種が導入されるまでの時間を延長すると、活性種が途中で失活し、殺菌効果が低下することが予想される。本研究では、導入経路の長さを変え、プラズマの生成から液中への導入時間と殺菌効果の関係を調べた。

図4-30に示すようにプラズマバブリング殺菌の導入経路の長さを5, 9, 13 cmと変化させ、殺菌効果を評価した。流量から計算されたそれぞれの導入経路におけるプラズマの生成から液中への導入時間は44, 79, 115 msである。 10^{7-8} CFU/mLの*E.coli*懸濁液50 mLを酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングで処理し、任意の処理時間経過ごとに採取した。採取した菌懸濁液は、コロニーカウントで生菌数を測定した。

結果を図4-31に示す。二酸化炭素のプラズマバブリングにおいて、導入経路5 cmおよび9 cmでは90秒の処理で生菌数を5桁以上減少させる殺菌効果を示した。一方で導入経路13 cmでは180秒の処理で生菌数を5桁低下させる殺菌効果を示した。導入経路が13 cm以上では殺菌効果が低下することが示された。これらのことから、115 ms以下で失活するような、短寿命の活性種が殺菌効果に寄与していることが示唆された。酸素のプラズマバブリングでは、15秒の処理で生菌数を検出下限値以下まで低下させるような高い殺菌効果が全ての条件で確認された。この高い殺菌効果により、多孔質フィルタの長さによる酸素プラズマバブリングの殺菌効果への影響は調べることができなかった。

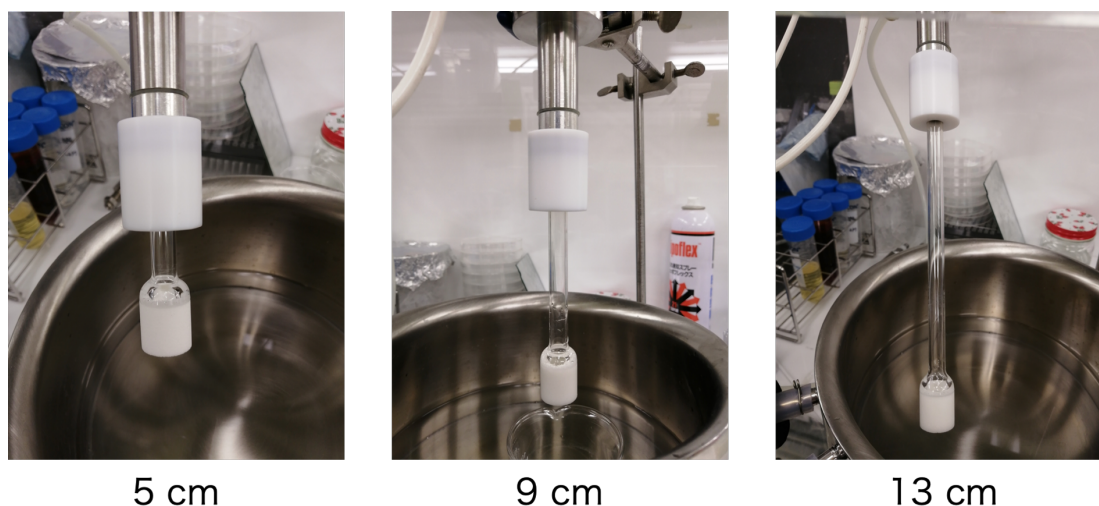


図4-30 各導入経路の長さの多孔質フィルタ

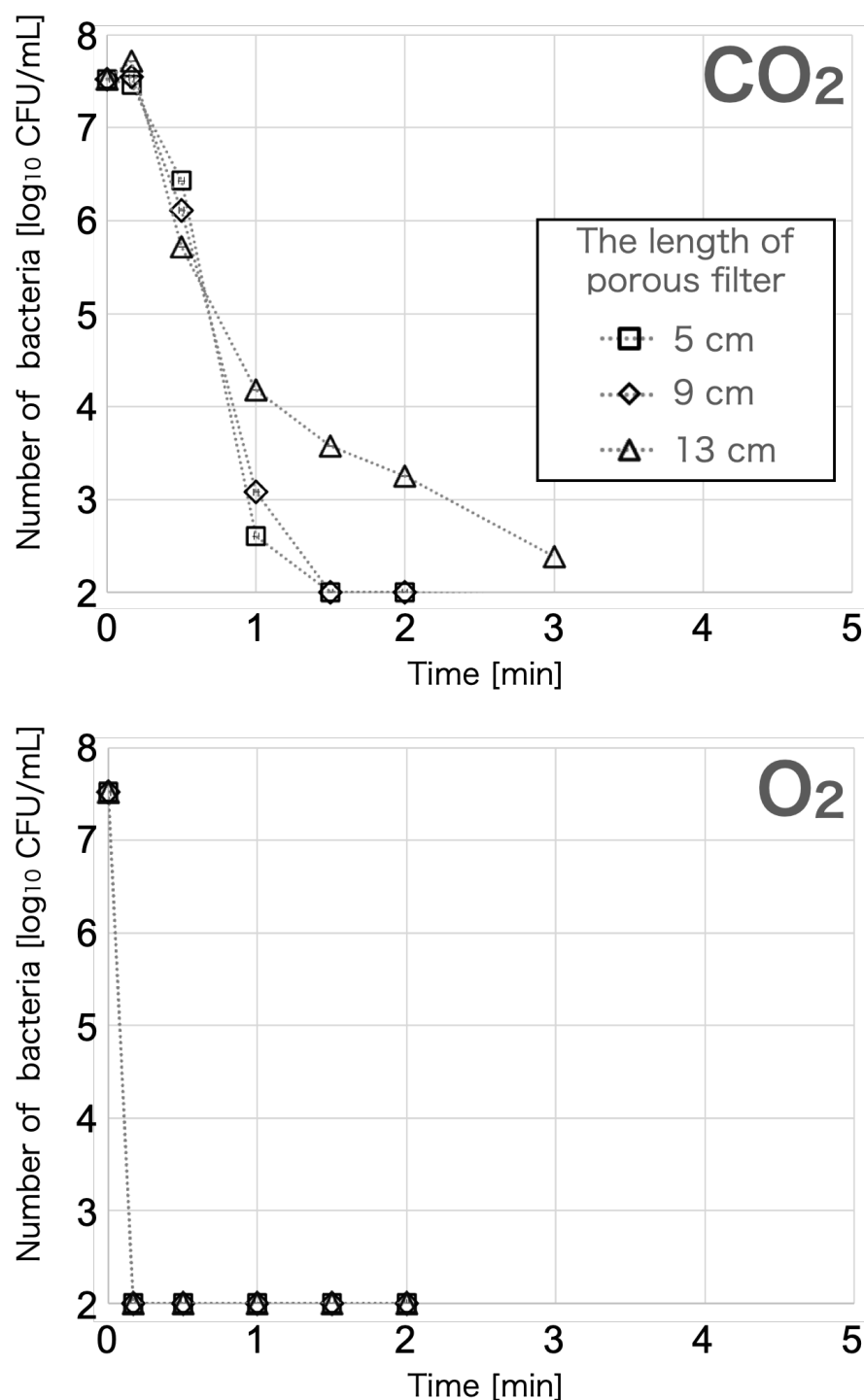


図 4-31 多孔質フィルタの長さでプラズマバブリングの殺菌効果の関係

4.5.8. 菌懸濁液の水温がプラズマバブリングの殺菌効果に及ぼす影響

菌懸濁液の水温はプラズマバブリングによって導入された活性種の寿命に関係するため、殺菌効果に影響を与えられとされる。そこで菌懸濁液の水温を変化させてプラズマバブリングの殺菌効果を評価した。実験のセットアップを図 4-32 に示す。実験では、殺菌対象として *E. coli* の菌数が約 10^8 CFU/mL となるように調整した菌懸濁液 50 mL を用いた。菌懸濁液の温度は

常温(26℃)及び低温(2℃)に調節された。3 L/min 二酸化炭素プラズマを用いて、プラズマバブリングを行った。その後、コロニーカウントによって、生菌数を評価した。

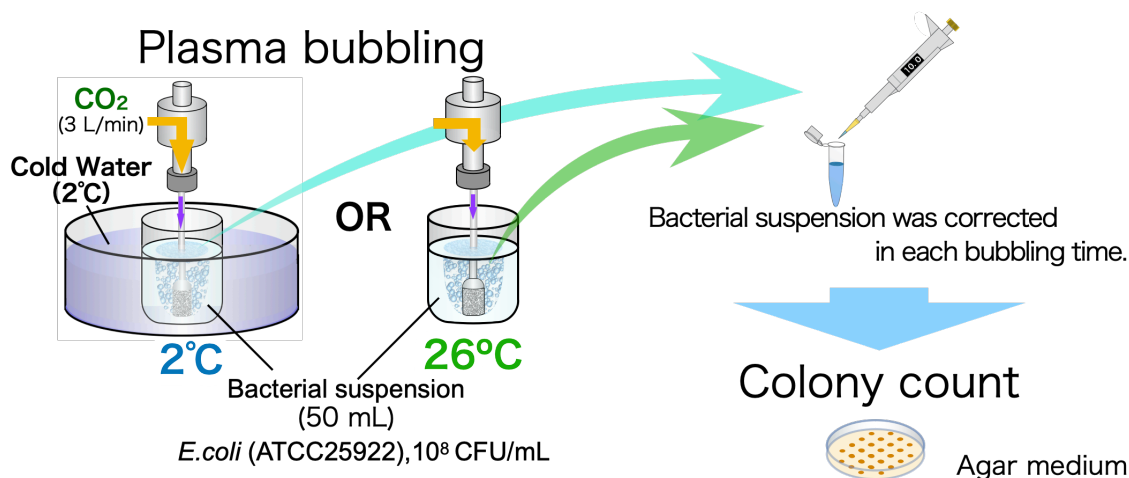


図 4-32 2℃および 26℃の菌懸濁液を用いたプラズマバブリングの殺菌実験

図 4-33 に結果を示す。殺菌効果については、菌数を1/10 にするのに要する時間である D 値で評価した。低温の菌懸濁液のプラズマバブリングでは、プラズマバブリング開始後 30 秒間は高い殺菌効果は確認されなかった。プラズマバブリング開始後 30～60 秒では、D 値は 8.3 秒を示し、高い殺菌効果を有していた。その後、バブリング時間が 60～180 秒までの結果では、D 値は 62 秒となった。常温の菌懸濁液のプラズマバブリングでは、低温の際と同様で、プラズマバブリング開始後 30 秒間は高い殺菌効果は確認されなかった。プラズマバブリングを開始後 30～60 秒では、D 値は 16 秒であった。その後、バブリング時間が 60～180 秒までの結果では、D 値は 58 秒であった。殺菌対象を低温にすることで、バブリング時間が 30～60 秒で得られる殺菌効果を高めることができた。また、バブリング時間が 60～180 秒では菌懸濁液の温度が変化しても、D 値はほとんど変わらないことが示された。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでは、バブリング時間が 30～60 秒の場合と 60～180 秒の場合では、D 値が大きく異なるため、複数の殺菌因子が殺菌に寄与している可能性が示された。

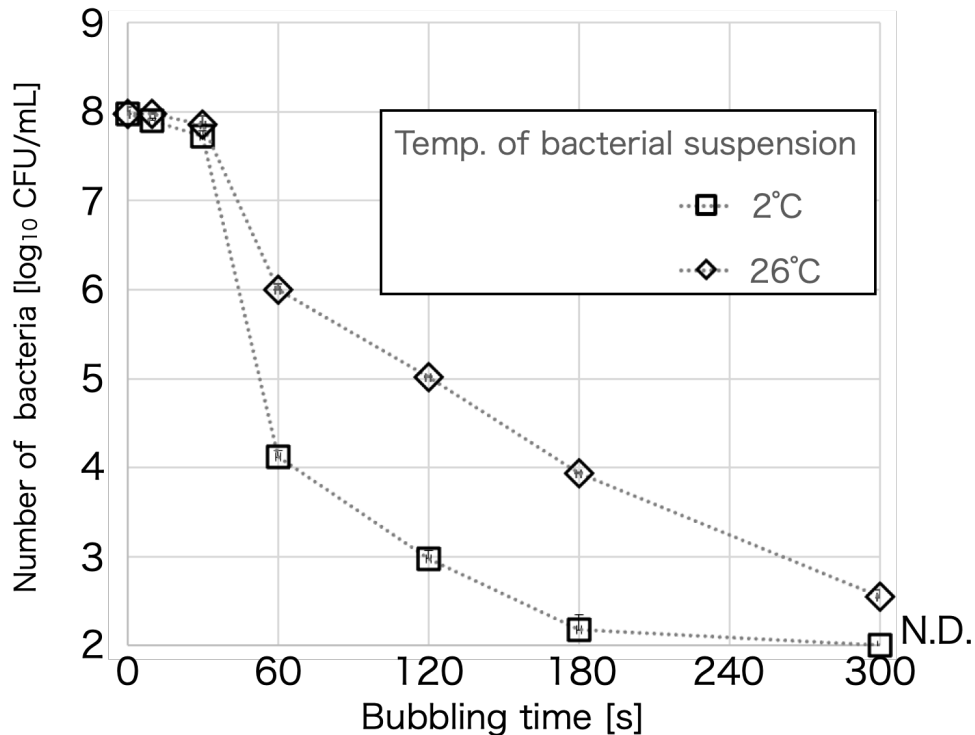


図 4-33 菌懸濁液の水温とプラズマバブリングの殺菌効果の関係

4.5.9. プラズマバブリング殺菌による濁度の改善効果

二酸化炭素でプラズマバブリング殺菌を行うと、図 4-34 の様に菌懸濁液の濁度が改善する現象が見られた。濁度が変化する現象は、加熱殺菌や菌懸濁液の溶媒の状態が変化したときに見られることが報告されている^[71]。これは、菌体の損傷や浸透圧による膨張など細菌の形状が変化したことに由来している。このため、濁度変化は細菌の状態を知る手がかりとなる。そこで本項では、殺菌後の菌懸濁液について濁度の測定を行った。測定の概要を図 4-35 に示す。殺菌対象として、約 10^8 CFU/mL の *E. coli* 懸濁液を用いた。50 mL の菌懸濁液を酸素と二酸化炭素のプラズマバブリングで処理し、処理時間 1, 3, 5, 10 分時に 5 mL 採取した。濁度は比色計(mini photo 518R, タイテック株式会社, Saitama, Japan)を用いて、660 nm の光学濁度を測定することで評価した。また、各処理時間における生菌数もコロニーカウント法で定量した。

結果を図 4-36 に示す。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、3 分の処理で生菌数が検出下限値以下まで低下した。菌懸濁液の光学濁度は未処理において 0.118 であった。二酸化炭素のプラズマバブリングを行うと1分で 0.136 まで上昇し、処理 3 分以降では光学濁度の低下が見られた。最終的に二酸化炭素のプラズマバブリング 10 分後では光学濁度は 0.016 となった。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、光学濁度の大幅な低下が見られたが殺菌効果が見られたタイミングと差があった。このことから、二酸化炭素のプラズマバブリングで死滅した細菌は、処理を継続することで細胞膜が破壊され、細胞質が溶出している可能性が示唆された。

酸素のプラズマバブリングでは、1 分の処理で生菌数が検出下限値以下まで低下した。菌懸濁液の光学濁度は酸素のプラズマバブリング開始から1分で 0.131 まで上昇し、その後緩やかに低下した。最終的に酸素のプラズマバブリング 10 分後では 0.117 となり、未処理の菌懸濁液

とほとんど同程度の光学濁度であった。酸素のプラズマバブリングで死滅した細菌は、処理後も菌体の形状が維持されていることが示唆された。

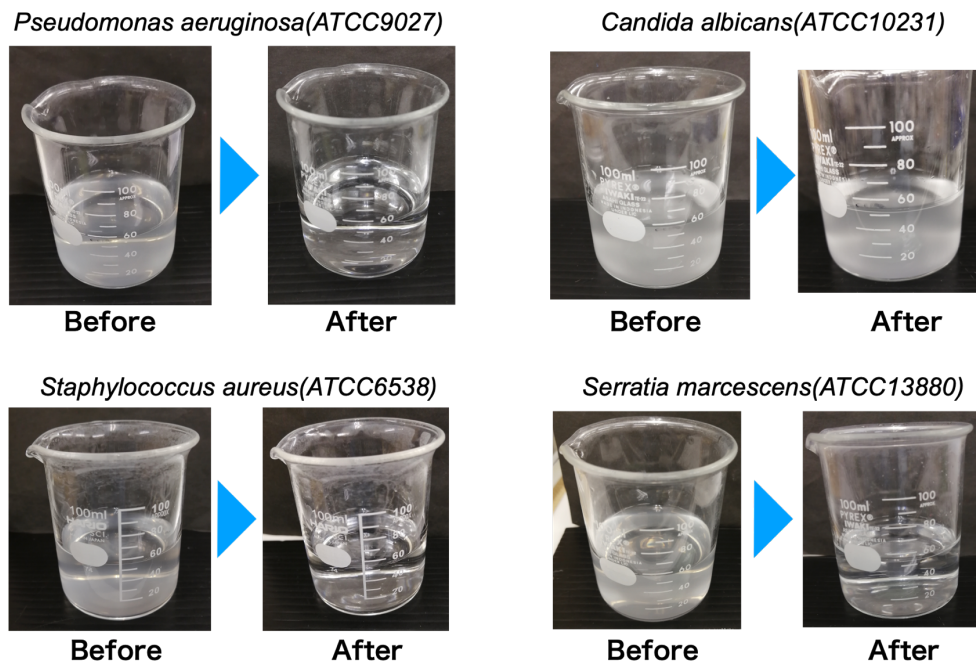


図 4-34 二酸化炭素プラズマバブリングの濁度改善効果

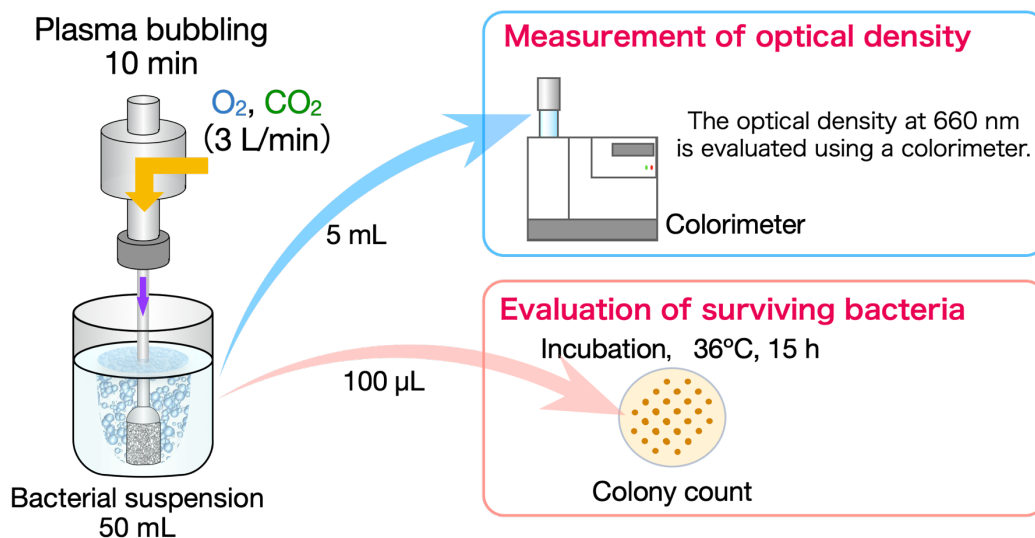


図 4-35 菌懸濁液の濁度測定実験の概要

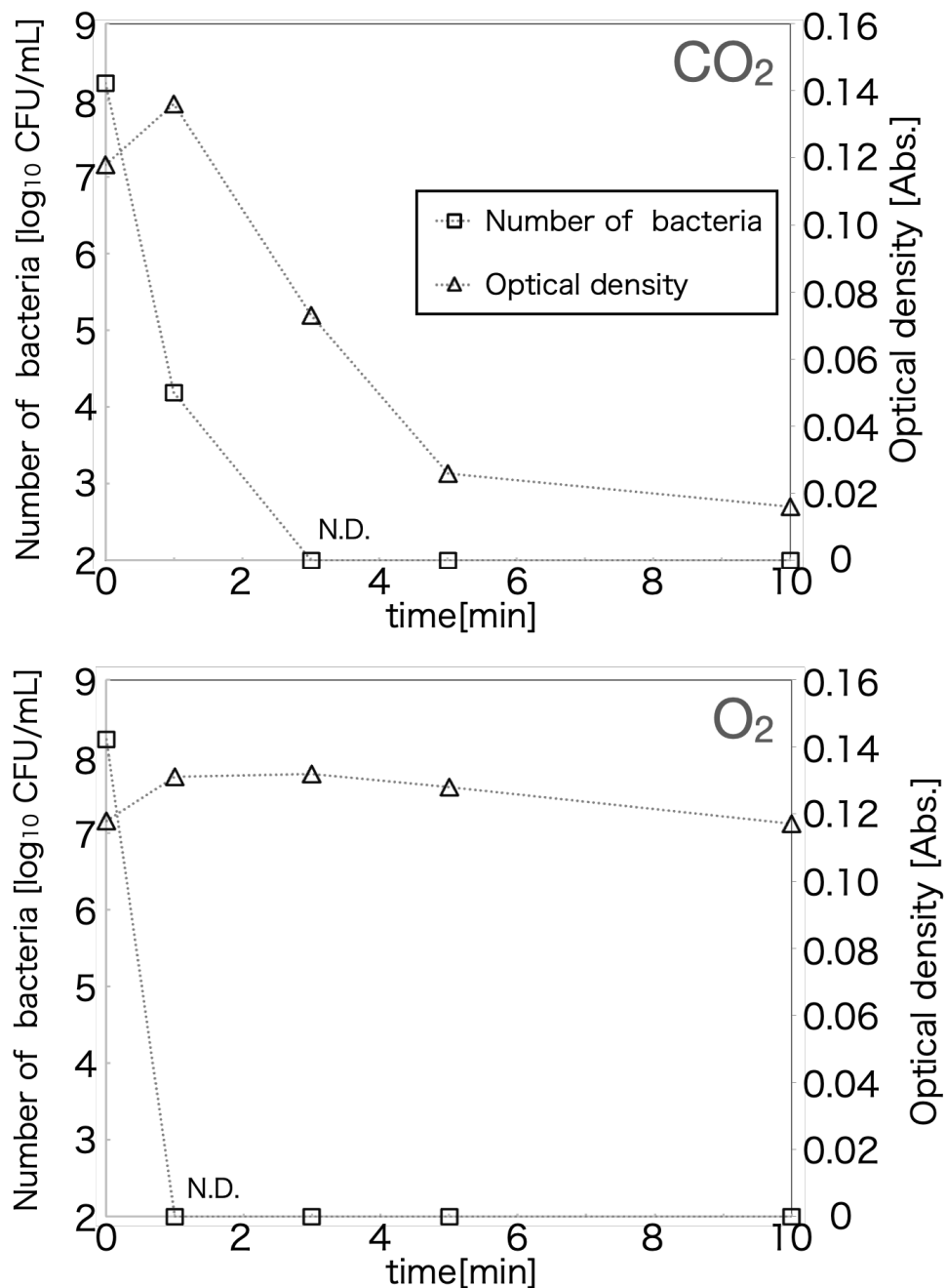


図 4-36 プラズマバブリングの殺菌効果と菌懸濁液の光学濁度の関係

4.5.10. プラズマバブリングで処理した菌懸濁液の生体膜脂質成分の分析

4.5.9 の中でプラズマバブリングによって細菌の細胞膜へダメージが示唆された。本項では、殺菌後の菌懸濁液の生体脂質成分を分析することで、プラズマバブリングが細菌及ぼす影響を調べた。

大腸菌の細胞膜は、図 4-37 に示す様に脂質膜が 2 重に存在する脂質二重層という構造になっている。大腸菌において、一つの脂質膜はエタノールアミンとリン酸、グリセロールと脂肪酸で構成されている。脂肪酸は、炭素鎖に 2 重結合をもつ不飽和脂肪酸と炭素鎖に 2 重結合をもたない飽和脂肪酸に分かれており、生体膜はこの不飽和脂肪酸によって、流動性を保っている。

この実験では、脂肪膜の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸について、ガスクロマトグラフィーによる分析を行った。実験と分析の概要を図 4-38 に示す。はじめに酸素と二酸化炭素のプラズマバブリングによって、50 mL の大腸菌懸濁液を 10 分間処理した。処理後の菌懸濁液は全量を乾燥凍結し、Bligh & Dyer 法による脂質抽出を行い^[72]、最終的に 1 mL のクロロホルム、メタノール混合液(2:1, v/v)に溶解させた。この溶液 50 μ L にメタノールを加え、脂肪酸との触媒反応によって、脂肪酸メチルエステルにするメチルエステル誘導体化を行った。これにより、分析の際の揮発性を高めることができる。脂肪酸メチルエステルは水素炎イオン化検出器のガスクロマトグラフィー(5890II GC-FID, Agilent, CA, USA)を用いた。カラムには HR-Thermon-3000B (0.25 mm i.d. $\times$ 25 m, 信和化工株式会社, Kyoto, Japan)を用いて、注入量を 1 μ L, スプリット比を 20:1 とした。検出器では水素 40 mL/min, 空気 450 mL/min, メークアップガスとして 20 mL/min の窒素を用いた^[73]。

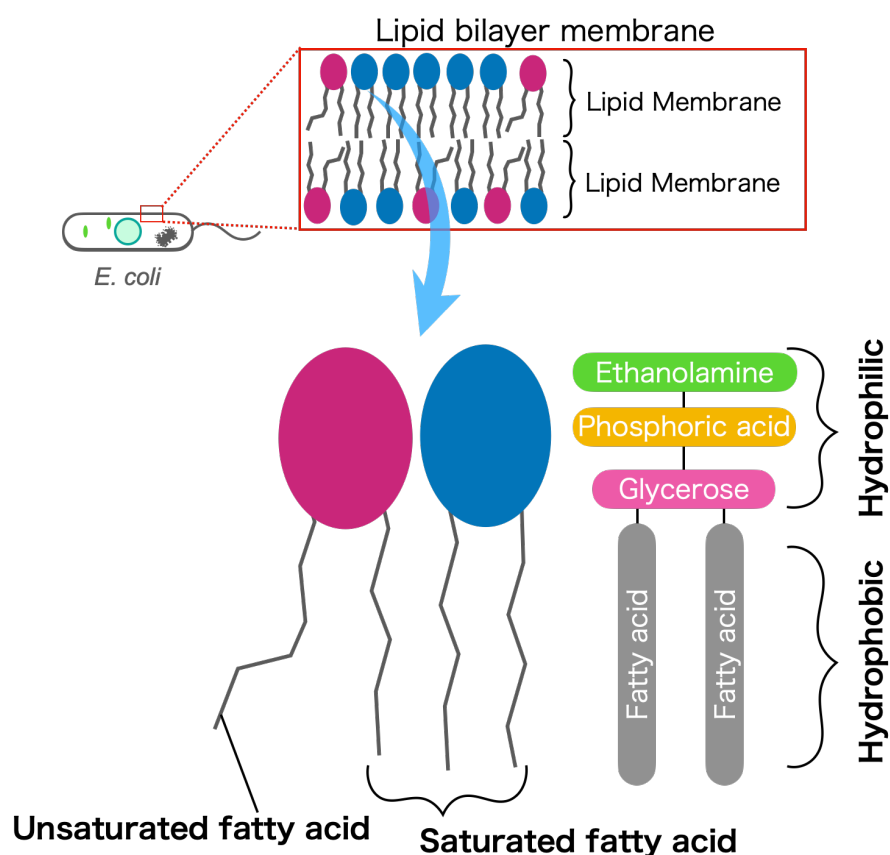


図 4-37 大腸菌の細胞膜構造と脂質膜

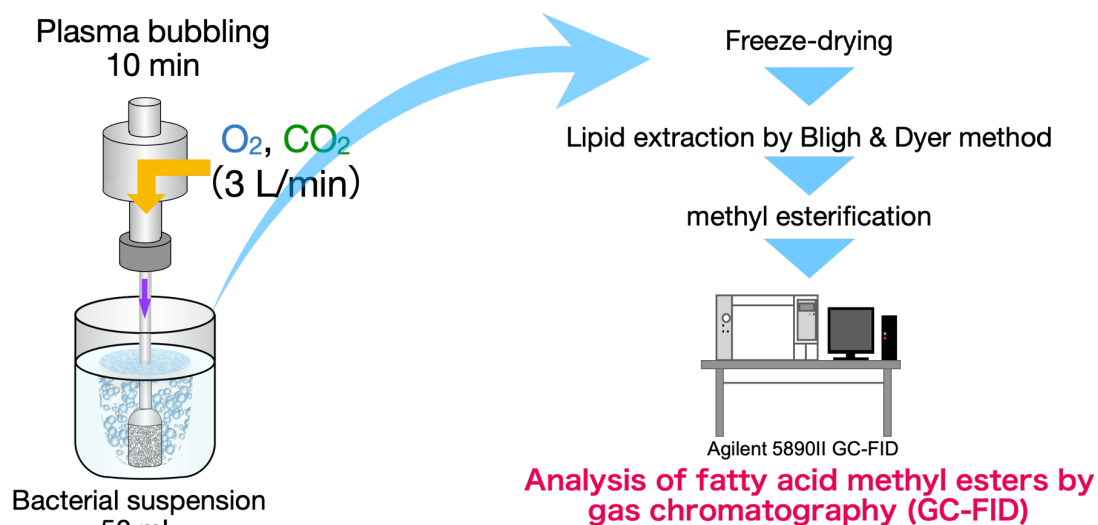


図 4-38 ガスクロマトグラフィーによる生体膜脂質成分の分析

結果を図 4-39 に示す。未処理の菌懸濁液では、炭素数が 14～18 の飽和脂肪酸が確認された。また、炭素数が 16 で二重結合を 1 つ持つ不飽和脂肪酸、炭素数が 18 で二重結合を 1 つ持つ不飽和脂肪酸がそれぞれ確認された。C19:0 は内部標準のピークである。これらの検出された飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を表 4-5 に示す。二酸化炭素のプラズマバブリングを行うと、炭素数が 14-18 までの飽和脂肪酸については検出されたが、C16:1 や C18:1 などの不飽和脂肪酸は検出されなかった。また酸素のプラズマバブリングにおいても、炭素数が 14-18 までの飽和脂肪酸は検出されたが、不飽和脂肪酸については検出されなかった。

これらのことから、二酸化炭素および酸素のプラズマバブリングでは、細菌の細胞膜の不飽和脂肪酸が酸化などによって破壊されたと考えられる。不飽和脂肪酸では、二重結合付近の C-H 結合が酸化されやすいため、活性種などによって積極的に酸化されたものと考えられる^[74]。これらのことから、プラズマバブリングが細胞膜の不飽和脂肪酸を破壊し、細胞膜の流動性が失われ、細菌の膜機能に障害を及ぼしたことが示唆された。ただし、10 分の酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングでは生菌数はいないものと予想されるため、殺菌された後に不飽和脂肪酸を破壊がおきた可能性もある。よって、今回の実験の結果から不飽和脂肪酸の破壊が殺菌メカニズムに寄与していることを証明することはできない。

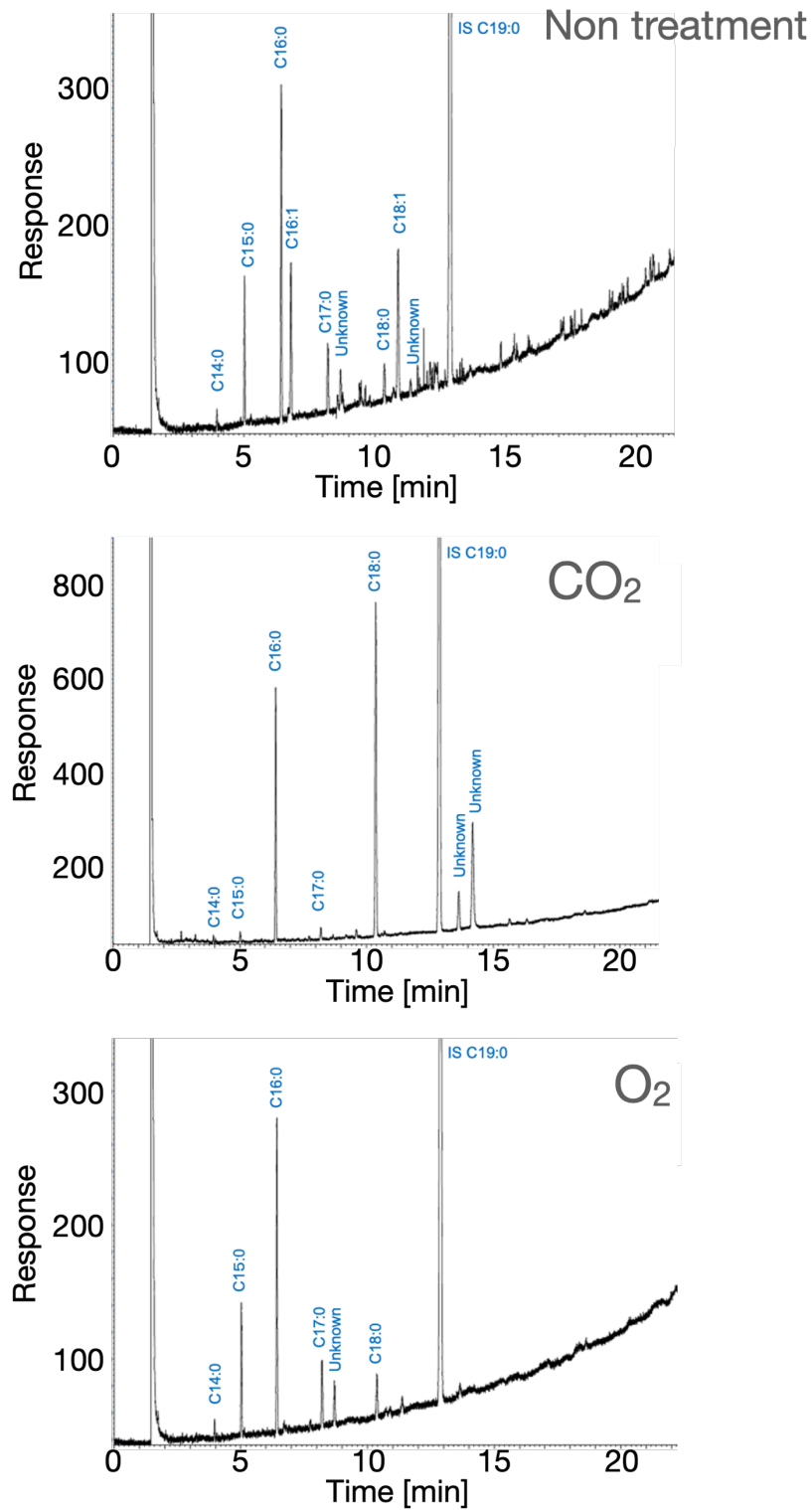
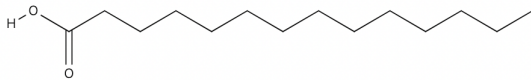
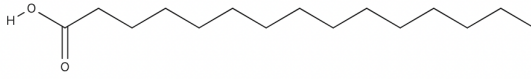
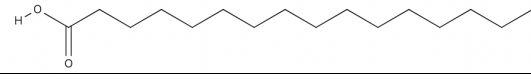
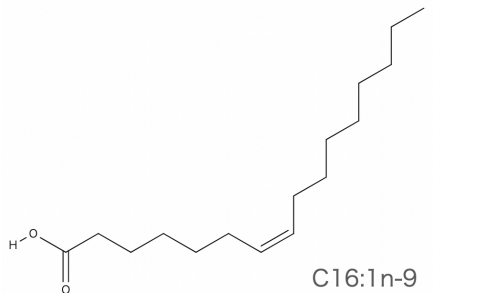
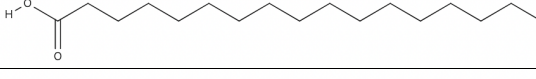
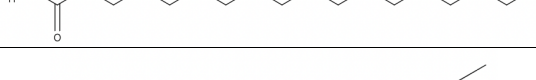
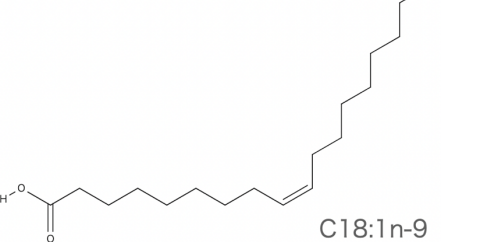


図 4-39 プラズマバブリング後の菌懸濁液の生体脂質成分

表 4-5 大腸菌懸濁液から観察された脂肪酸一覧

Abbreviation	Carbon number	Number of double bonds	Structural formula
C14:0	14	0	
C15:0	15	0	
C16:0	16	0	
C16:1	16	1	
C17:0	17	0	
C18:0	18	0	
C18:1	18	1	

* The structural formulas were drawn in MolView(<https://molview.org/>).

4.6 紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌

紫外線(Ultra violet: UV)は殺菌手法として使用されており、その歴史は1901年にドイツのハーマン・ストレーベルにより殺菌効果が確認された時点にまで遡る。そこから現在に至るまで、UVは低コストで手軽に殺菌できる方法として、食品・飲料分野、医療分野などで使用されている。近年はUVのLEDなども開発されており、コロナ禍も相まって注目されている。

UVはX線と可視光域の間の100~400 nmの波長域の電磁波のことを指す。このUVは国際照明委員会によって、UV-A、UV-B、UV-Cに分類されており、それぞれ315~400 nm, 280~315 nm, 100~280 nmの波長域のUVのことを指し、殺菌ではこの中のUV-Cを用いている。UV-Cが微生物に照射されると、微生物のDNA、RNAが光化学変化によって破壊され、増殖能力を失う。紫外線の殺菌効果は、微生物の種類によって、大きく異なる。例えば培地上の大腸菌を99.9%殺菌するのに必要な紫外線照射量は 5.4 mJ/cm^2 とされているのに対して、緑膿菌では 16.5 mJ/cm^2 と3倍以上の照射量が必要となる^[75]。いずれにせよ紫外線において高い殺菌効果を得るには、十分な照射量を確保する必要がある。しかし、液中の菌数が増加する、あるいは夾雑物が存在するなどの濁った環境において液中殺菌を行う場合、UVが十分に照射されずに殺菌効果が低下してしまう問題点があった。

そこで本研究では、4.5.9で示した様に濁度の改善効果と殺菌効果をもつプラズマバブリングとUVによる殺菌とを組み合わせることで殺菌効果の向上を図った。また、プラズマバブリングで導入される活性種と紫外線を組み合わせることで、より酸化力の高い活性種の生成も期待される。例えば、水中の溶存オゾンに紫外線を照射することでOHラジカルを生成し、オキシエチレンやトリハロメタン前駆体の分解など効果的であること^{[76],[77]}が示されている。この様に、紫外線とプラズマバブリングの相乗効果による殺菌効果の上昇も期待される。本節では、紫外線併用プラズマバブリングの開発とその殺菌効果、および活性種生成に及ぼす影響を示す。

4.6.1 紫外線併用プラズマバブリングの概要

図4-40に紫外線併用プラズマバブリングの概念図と実際の処理装置を示す。ステンレス容器内の水は上部から280 nmの紫外線が照射され、同時に下部からプラズマバブリングによって処理される。紫外線は照度 0.71 mW/cm^2 で波長が280 nmとなるように照射した。プラズマは、3 L/minのガスに9 kV, 16 kHzの高電圧を印加することで生成した。また、照射装置全体は外部へ紫外線の漏洩が無いように遮光ケースで覆った。

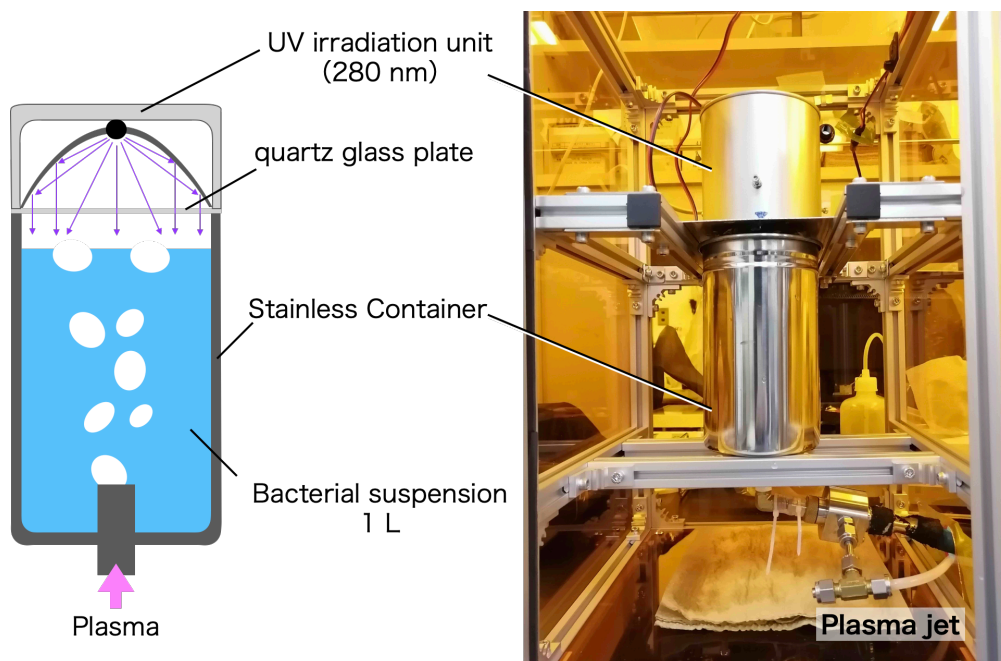


図 4-40 紫外線併用プラズマバブリングの概念図と実際の処理装置

4.6.2. 紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌効果

紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌効果を評価した。 10^{7-8} CFU/mL の *P. aeruginosa* 懸濁液 1 L に対して、紫外線照射、酸素プラズマバブリング、紫外線併用酸素プラズマバブリング、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングの処理を行い、各処理時間の生菌数をコロニーカウント法によって評価した。生菌数の評価では、段階希釈後にコロニーカウントを行う方法に加え、1 mL の菌懸濁液をそのまま寒天培地上に塗布することで、1 mL 中の生菌数をすべて評価した。

結果を図 4-41 に示す。紫外線照射では 90 秒の処理で生菌数を 7 桁以上低下させる殺菌効果を示した。しかし、120 秒においても、1 CFU/mL の生菌数が確認された。これは紫外線のみの処理では菌懸濁液の攪拌が無いため、紫外線が直接照射されない装置の影となるところでは殺菌効果が低くなってしまう。これにより菌懸濁液全体に均一な殺菌効果が得られず、120 秒でも生菌数が残存してしまったと考えられる。酸素プラズマバブリングでも 90 秒間の処理によって、生菌数を 7 桁以上低下させる殺菌効果を示した。紫外線併用酸素プラズマバブリングでは、60 秒間の処理で生菌数を 7 桁以上低下させる殺菌効果を示した。90 秒以降の処理では、生菌数は確認されなかった。紫外線と酸素プラズマバブリングの併用によって、それぞれの処理のみの場合と比較して、高い殺菌効果が得られた。空気プラズマバブリングでは、20 秒の処理で生菌数がわずかに低下した。しかし、20 秒以降では生菌数の変化がなかったことから、*P. aeruginosa* に対して空気プラズマバブリングはほとんど殺菌効果が得られない事が明らかとなった。紫外線併用空気プラズマバブリングでは、120 秒の処理で生菌数を 7 桁以上低下させる殺菌効果を示し、殺菌効果は紫外線のみの場合よりも低下した。これは、殺菌効果をほとんど持たない空気のプラズマバブリングによって、紫外線が乱反射したため、紫外線による殺菌効果が得られにくくなったと考えられる。

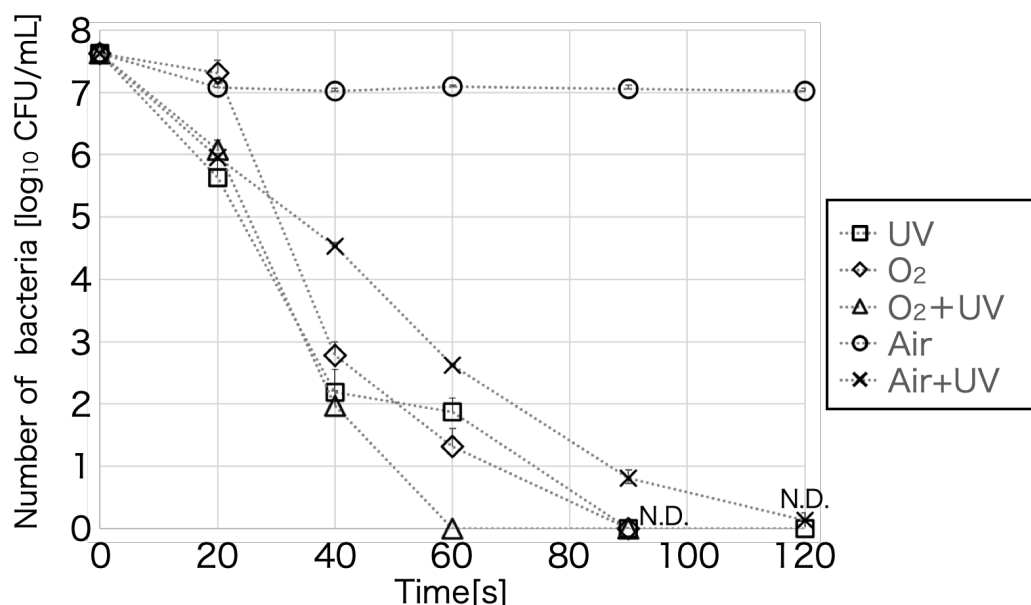


図 4-41 *P. aeruginosa* に対する紫外線併用プラズマバブリングの殺菌効果

同様の手法を用いて、芽胞形成菌である *C. perfringens* に対して殺菌効果を確認した。ヒツジ血液寒天培地上に *C. perfringens* を塗布し、嫌気条件で 18 時間培養した。芽胞の形成状態を確認するため、ウィルツ芽胞染色キット (No.4249-1, Muto pure chemicals co., LTD., Tokyo, Japan) を用いて、芽胞染色を行った。この方法で芽胞を形成した細菌を染色すると、芽胞は緑色、菌体は赤色に染色される。実験で使用した菌懸濁液から採取された *C. perfringens* を染色し顕微鏡観察を行った結果を図 4-42 に示す。実験で使用した菌懸濁液では、赤色の菌体のみが確認され、芽胞形成を示す緑色は確認されなかった。このことから、実験で使用する細菌では、芽胞は形成していないと考えられる。*P. aeruginosa* と同様に紫外線照射、酸素プラズマバブリング、紫外線併用酸素プラズマバブリング、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングの処理を行い、各処理時間の生菌数をコロニーカウント法によって評価した。

結果を図 4-43 に示す。紫外線照射では、120 秒の処理で生菌数を 5 桁以上低下させる殺菌効果を示した。酸素プラズマバブリングでは、120 秒間の処理によって生菌数を 3 桁低下させる殺菌効果を示した。紫外線併用酸素プラズマバブリングでは、120 秒間の処理で生菌数を約 6 桁低下させる殺菌効果を示した。空気プラズマバブリングでは、120 秒間処理しても、生菌数の低下はほとんど確認されなかった。紫外線併用空気プラズマバブリングでは、120 秒の処理で生菌数を 5 桁低下させる殺菌効果を示した。紫外線及びプラズマバブリングを用いた殺菌において、芽胞形成菌である *C. perfringens* に対しても殺菌効果が確認された。また、*P. aeruginosa* の結果と同様に紫外線併用酸素プラズマバブリングで最も高い殺菌効果が確認され、空気プラズマバブリングでは殺菌効果が得られないことが示された。

プラズマバブリングと紫外線を併用して処理することで、*P. aeruginosa* 及び *C. perfringens* に対して殺菌効果が向上することが示された。また、紫外線のみでの処理では装置の影などで不均一な処理になってしまうが、プラズマバブリングと組み合わせることで液体を攪拌し、液体全体で高い殺菌効果を得られる可能性が示された。これらのことから、液中殺菌において紫外線併用プラズマバブリングは有用であると考えられる。

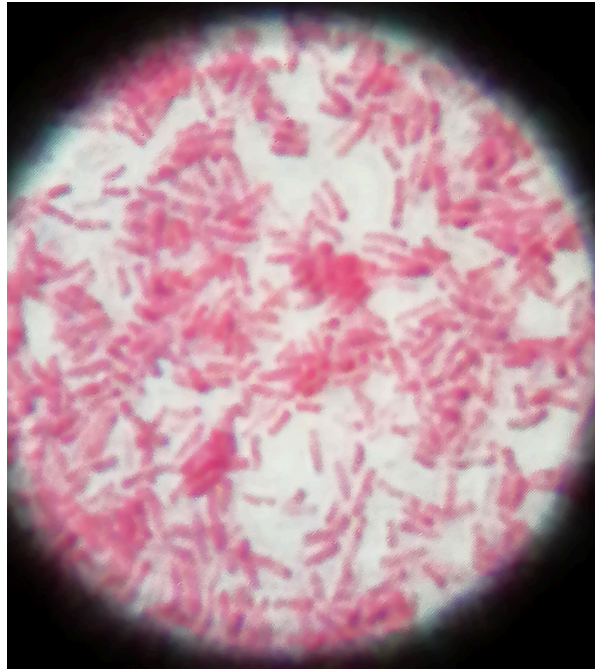


図 4-42 ウィルツの芽胞染色を行った *C. perfringens* の顕微鏡観察像

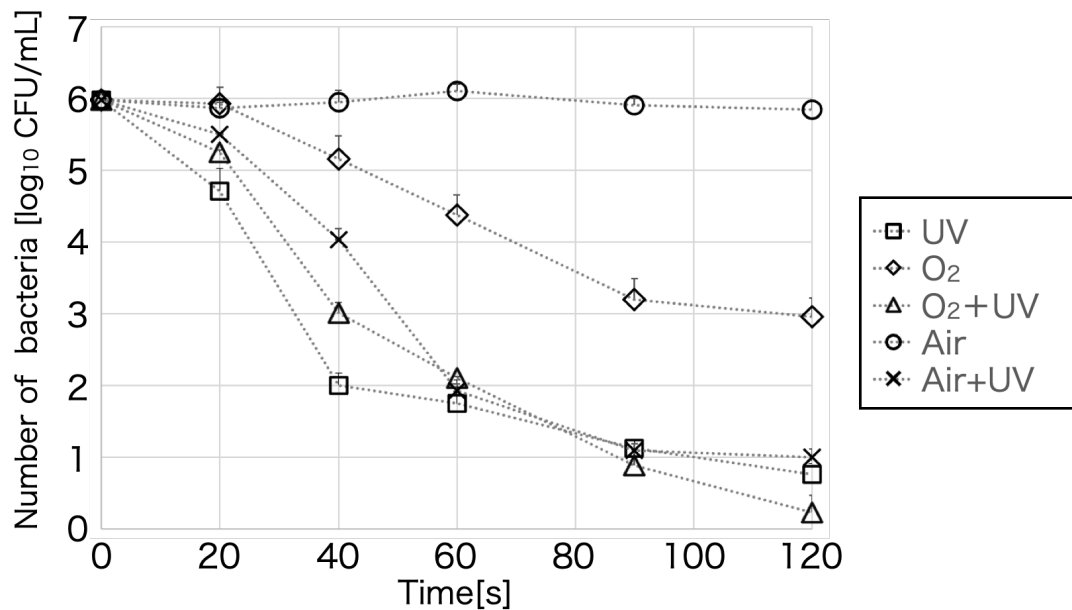


図 4-43 *C. perfringens* に対する紫外線併用プラズマバブリングの殺菌効果

4.6.3. 多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリング

4.5 で示した様に、プラズマバブリングでは多孔質フィルタなどを用いて、プラズマと液体との気液界面の面積を増加させることで殺菌効果が向上する。したがって、紫外線併用プラズマバブリングに多孔質フィルタを用いることで、より短時間で高い殺菌効果を得られると考えられる。そこで、4.6.1 の手法と多孔質フィルタを組み合わせた手法を検討した。開発した多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングの概要と実際の装置を図 4-44 に示す。この手法では、石英ビーカーの上部にプラズマジェットを配置し、多孔質フィルタを用いてプラズマバブリン

グを行うことができる。また、プラズマバブリングと同時に下部に配置された紫外線照射ユニットから 280 nm の紫外線照射が可能である。照射装置全体は外部へ UV の漏洩が無いように遮光ケースで覆った。

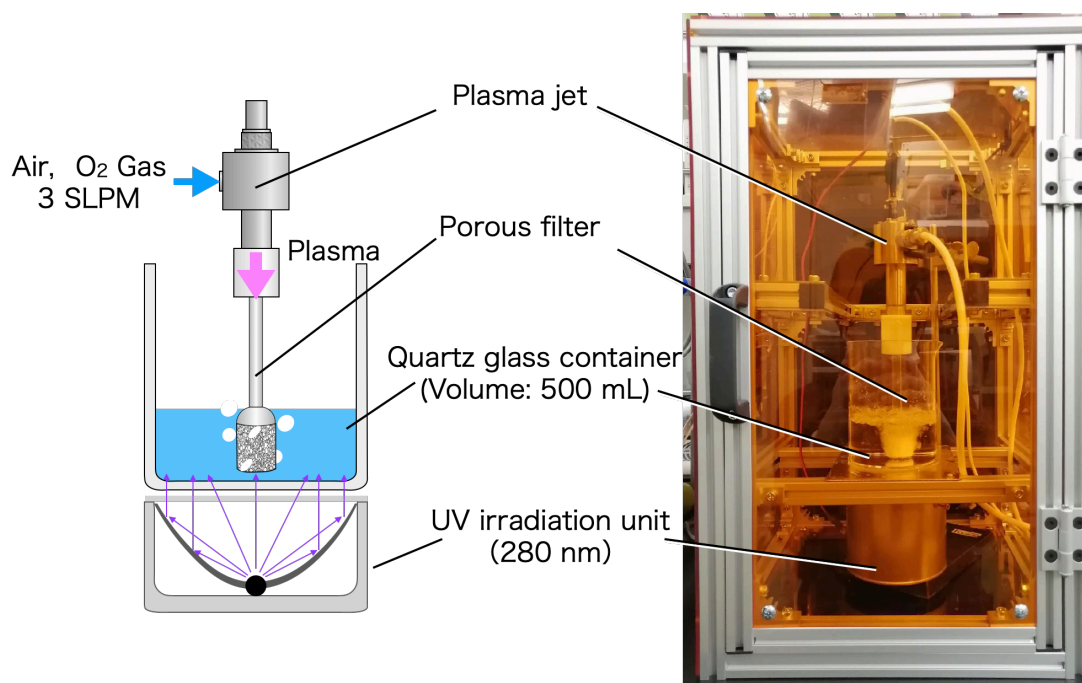


図 4-44 多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングの概念図と実際の処理装置

4.6.4. 多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングの殺菌効果

多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングによる殺菌効果を評価した。 10^{7-8} CFU/mL の *P. aeruginosa* 懸濁液 200 mL に対して、紫外線照射、酸素プラズマバブリング、紫外線併用酸素プラズマバブリング、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングの処理を行い、各処理時間の生菌数をコロニーカウント法によって評価した。コロニーカウントでは、段階希釈後にコロニーカウントを行う方法に加え、1 mL の菌懸濁液をそのまま寒天培地上に塗布することで、1 mL 中の生菌数をすべて評価した。

結果を図 4-45 に示す。紫外線照射では 40 秒の処理で生菌数を 7 桁低下させる殺菌効果を示した。酸素プラズマバブリングでも同様に、40 秒間の処理で生菌数を 7 桁低下させる殺菌効果を示した。紫外線併用酸素プラズマバブリングでは、20 秒間の処理で生菌数を約 7 桁以上低下させる殺菌効果を示し、20 秒以降の処理では生菌数は全く検出されなかった。空気プラズマバブリングでは、60 秒間処理しても、生菌数の低下は確認されなかった。紫外線併用空気プラズマバブリングでは、60 秒の処理で生菌数を 6 桁以上低下させる殺菌効果を示した。多孔質フィルタを使用し、紫外線併用プラズマバブリングを行うことで、 10^{7-8} CFU/mL の *P. aeruginosa* を 20 秒以内に完全に殺菌することに成功した。これらのことから、多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングでは、多孔質フィルタを用いない場合に比べ、より高い殺菌効果が得られる可能性が示された。

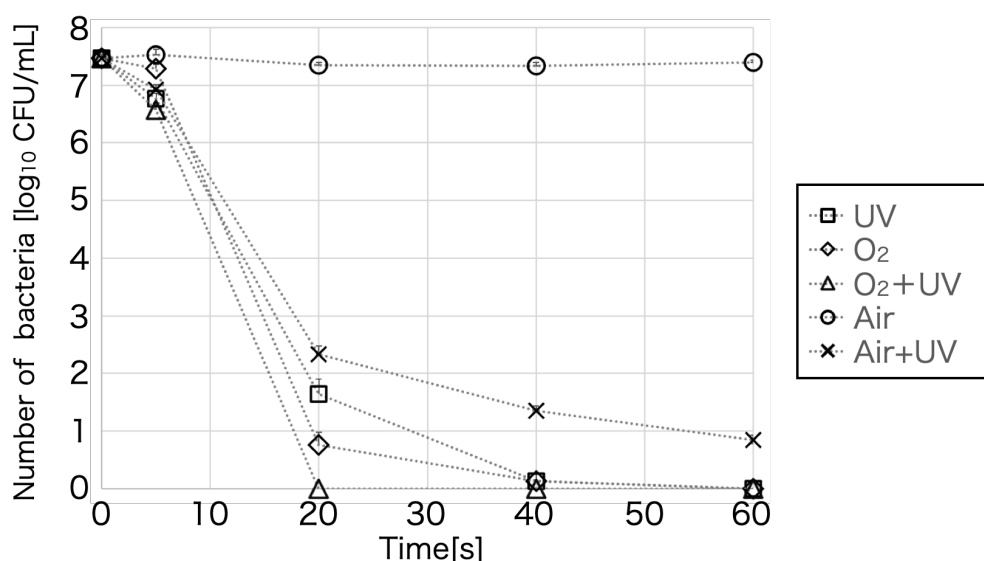


図 4-45 *P. aeruginosa* に対する多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングの殺菌効果

4.6.5. 紫外線照射プラズマバブリングによる OH ラジカルの生成

紫外線併用プラズマバブリングにおいて、高い殺菌効果が得られた機序として、それぞれの殺菌効果が重畳されたこと以外に、殺菌効果をもつ活性種の生成量が増加した可能性が考えられる。そこで本項では、多孔質フィルタを用いた紫外線併用プラズマバブリングについて、OH ラジカルの生成量を評価した。OH ラジカルは、テレフタル酸 2 ナトリウム(NaTA)を添加した水を紫外線照射、酸素プラズマバブリング、紫外線併用酸素プラズマバブリング、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングによって処理し、処理後の蛍光強度から定量した^[78]。図 4-46 に示す様に NaTA は OH ラジカルと水酸反応によって、2-ヒドロキシルテレフタル酸(2-HTA)を生成する。この 2-HTA は、310 nm の励起光を照射すると 425 nm の蛍光を発する。図 4-47 に示す様に、2-HTA 濃度の向上によって、425 nm 付近の蛍光強度が増加する。よって、425 nm の蛍光を測定することで、液中の OH ラジカル量を定量することが可能である。まず、2-HTA 試薬を用いて、検量線を作成した。作成した検量線を図 4-48 に示す。425 nm の蛍光強度は 2-HTA 濃度とともに、線形に増加した。2 mM の NaTA 水溶液 200 mL を紫外線照射、酸素プラズマバブリング、紫外線併用酸素プラズマバブリング、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングで処理し、処理時間ごとに 2 mL 採取した。その後、蛍光分光器 (RF-5300pc, 島津製作所, Kyoto, Japan) で 315 nm の励起光を照射し、425 nm の蛍光強度を計測した。計測された蛍光強度から検量線を用いて生成された 2-HTA を定量した。

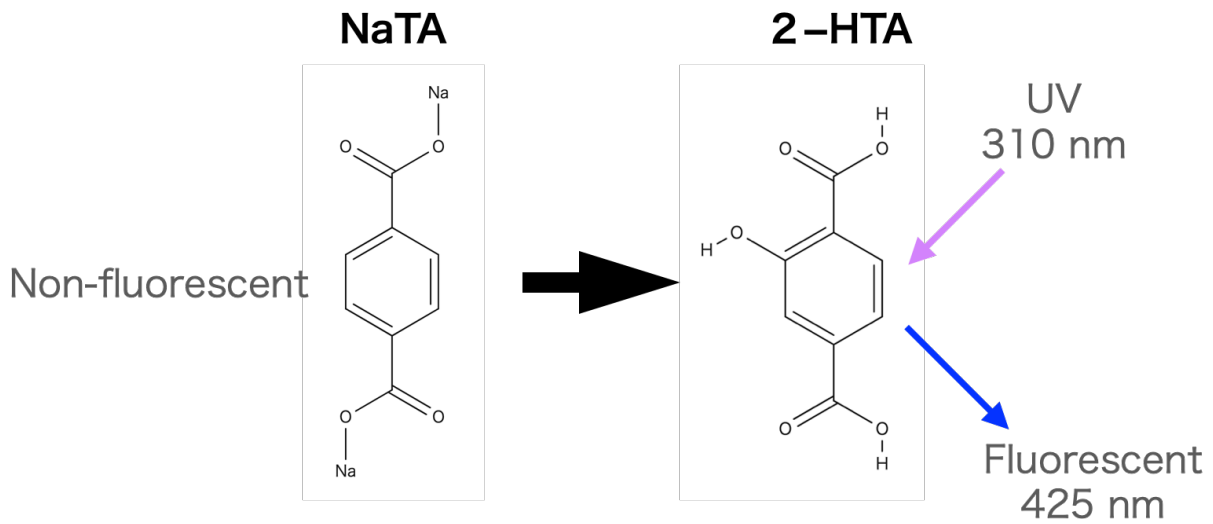


図 4-46 OH ラジカルによるテレフタル酸 2 ナトリウムの水酸化

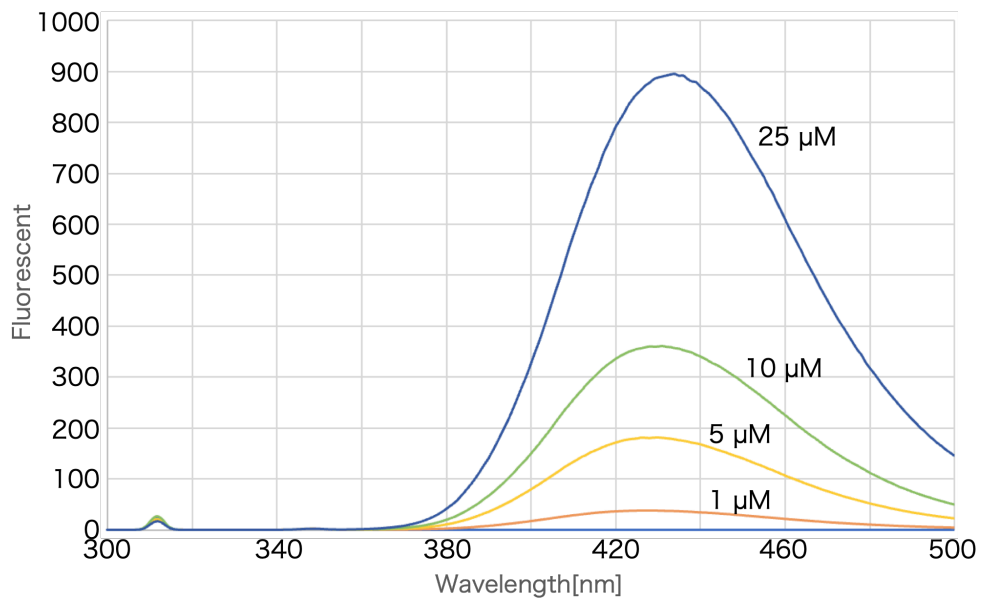


図 4-47 2-HTA 濃度と蛍光強度の関係

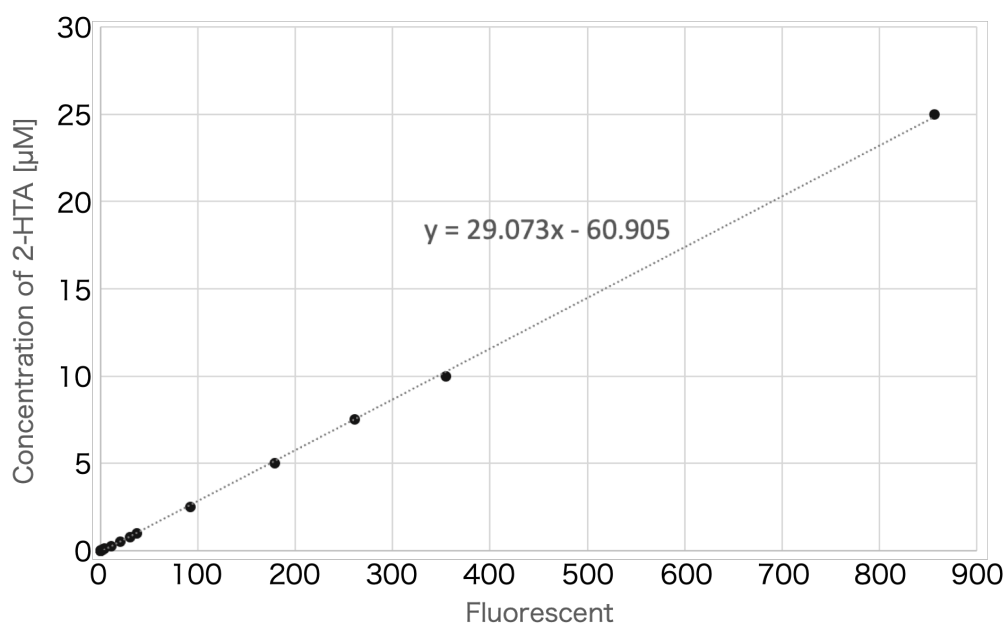


図 4-48 2-HTA 濃度と蛍光強度から作成した検量線

結果を図 4-49 に示す。紫外線、空気プラズマバブリング、紫外線併用空気プラズマバブリングの処理では、OH ラジカルの生成は確認されなかった。酸素プラズマバブリングでは、処理時間とともに 2-HTA の生成量が向上し、120 秒の処理で約 18 μM の 2-HTA が検出された。紫外線併用酸素プラズマバブリングでも、処理時間とともに 2-HTA の生成量が向上し、120 秒の処理で約 20 μM の 2-HTA が検出された。酸素のプラズマバブリングと比較して、紫外線併用プラズマバブリングでは、OH ラジカルの生成が増加する傾向が示された。これらのことから、紫外線とプラズマバブリングの殺菌効果がただ重畳されたのではなく、それぞれが相乗的に効果を及ぼした可能性が示唆された。

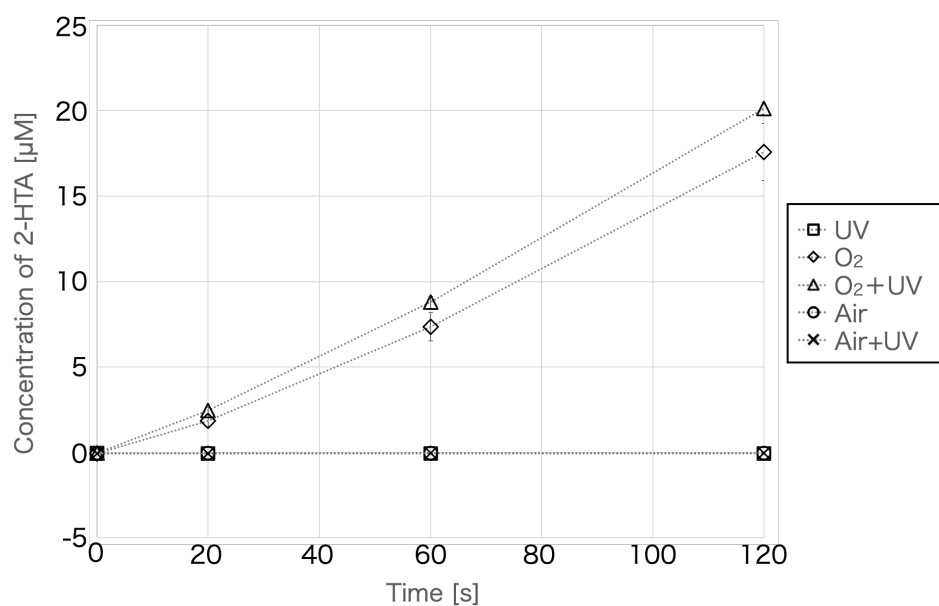


図 4-49 それぞれの処理による 2-HTA の生成量の変化

4.7 Plasma Bubbled-up Water による殺菌

プラズマ処理した液体には活性種などが残留し、一定時間殺菌効果を保つことが報告されている^[70]。よってプラズマバブリングした水に関しても、しばらくの間活性種が残留し、殺菌効果を示すと考えられる。本節では、二酸化炭素のプラズマバブリングによって殺菌効果を持つ水 (Plasma Bubbled-up Water: PBW) を生成し、その特性などを調べた結果を記述する。

4.7.1. 二酸化炭素の PBW 生成時間の検討

二酸化炭素の PBW の生成時間について検討した。図 4-50 に PBW の生成と殺菌実験の概要について示す。PBW は、50 mL の精製水を 3 L/min の二酸化炭素のプラズマでバブリングすることで生成した。このときの精製水は 20℃ に保たれている。その後 PBW 990 μ L と 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL, 10^9 CFU/mL の菌懸濁液 10 μ L をそれぞれ混合した。10 分間静置した後、コロニーカウントによって評価した。

結果を図 4-51 に示す。 10^7 CFU/mL の菌懸濁液と PBW を混合すると生菌数はわずかに低下した。ガスバブリングした精製水と混合した場合は、生菌数の低下は確認されなかった。 10^6 CFU/mL の菌懸濁液と生成時間 5 分の PBW を混合すると生菌数が約 2 桁低下した。ガスバブリングした精製水と混合した場合は、わずかに生菌数が低下した。 10^5 CFU/mL の菌懸濁液と生成時間 5 分の PBW を混合すると生菌数が 2 桁以上低下した。また生成時間 2 分以上では PBW の殺菌効果はほとんど向上しなかった。ガスバブリングした精製水と混合した場合は、わずかに生菌数が低下した。

初期生菌数の差で PBW の殺菌効果に差が見られた。これは PBW 中には限られた量の殺菌因子しか存在せず、一定数の細菌のみしか殺菌する効果を持たないためであると考えられる。初期生菌数が多い場合、殺菌は行われているものの、全体の生菌数に対して殺菌された菌数は微量であるため、結果に反映されなかったものと考えられる。逆に全体の生菌数が少ない場合では、PBW で殺菌された菌数が結果に反映されていると考えられる。また、生成時間が 2 分以上の PBW で殺菌効果がほとんど向上しなかったのは、水中に溶存できる活性種量に限りがあるためだと考えられ、PBW の生成では水中への活性種の導入と活性種の失活のバランスがとれた時点で殺菌効果が飽和する。よって、PBW の殺菌効果を向上させるためには、活性種の導入速度を向上させる、活性種が失活しにくい環境を作ることが重要である。

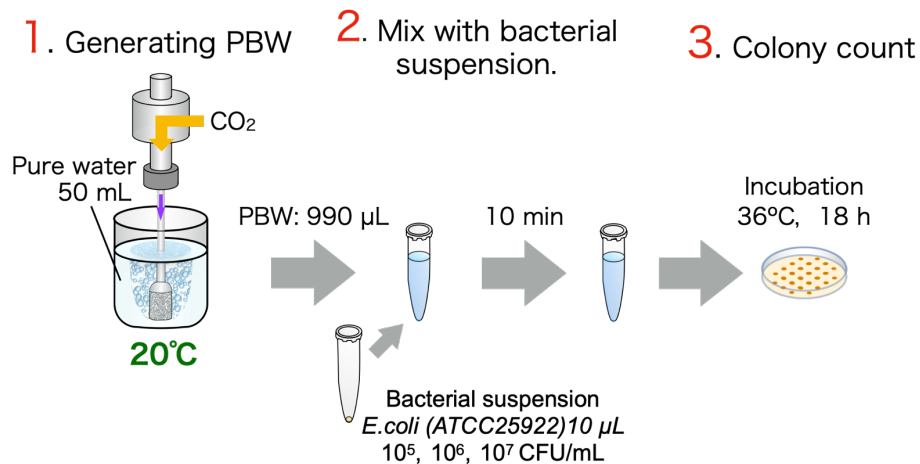


図 4-50 PBW の生成と殺菌実験の概要

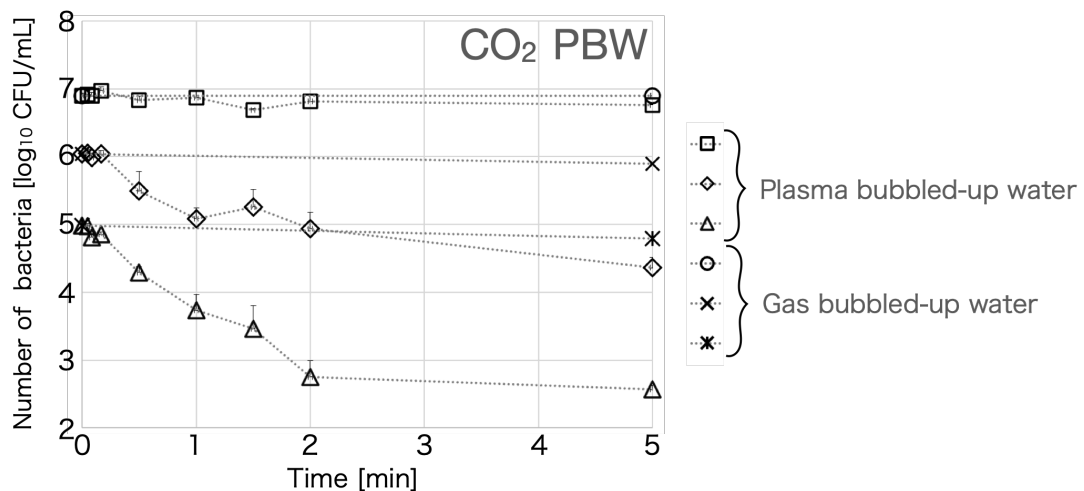


図 4-51 二酸化炭素の PBW の生成時間と殺菌効果

4.7.2. PBW 生成時の水温と殺菌効果の関係

活性種の失活を防ぐ方法として、水温を下げる事が挙げられる。化学反応にける反応速度と温度、活性化エネルギーの関係式であるアレニウスの式を式(4-5)に示す。

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad \text{式(4-5)}$$

k は反応速度定数, A は頻度因子, E_a は活性化エネルギー, R は気体定数, T は絶対温度を示す。この様に絶対温度が上昇すると反応速度は指数関数的に増加することが示されている。

そこで本研究では、PBW 生成時の水温を低下させることで殺菌効果の向上を図った。PBW は、50 mL の精製水を 3 L/min の二酸化炭素のプラズマでバブリングすることで生成した。このときの精製水は 2°C および 25°C に保たれている。その後任意の生成時間経過後に 990 µL の PBW を採取し、10 µL の 10⁸ CFU/mL の *E. coli* 懸濁液と混合した。混合液は 10 分間静置し、段階希釈後コロニーカウントによって評価した。

結果を図 4-52 に示す。生成時間 10 秒までは 2℃および 25℃の PBW の殺菌効果は同程度であった。生成時間が 0.5 分以降になると、2℃の PBW では 25℃の PBW と比較して高い殺菌効果を示した。2℃の PBW では、生成時間 2 分時に最大の殺菌効果が得られた。一方、25℃で生成した PBW では生成時間 10 秒以降殺菌効果は変化しなかった。これらのことから、低い水温で PBW 生成することで、高い殺菌効果が得られることが明らかとなった。PBW の生成では水中への活性種の導入と活性種の失活のバランスがとれた時点で殺菌効果が飽和することが予想されるため、水温の低下によって活性種の失活が抑えられる。その結果、殺菌で用いることのできる殺菌因子が増加し、PBW 中の殺菌効果が増加したと考えられる。

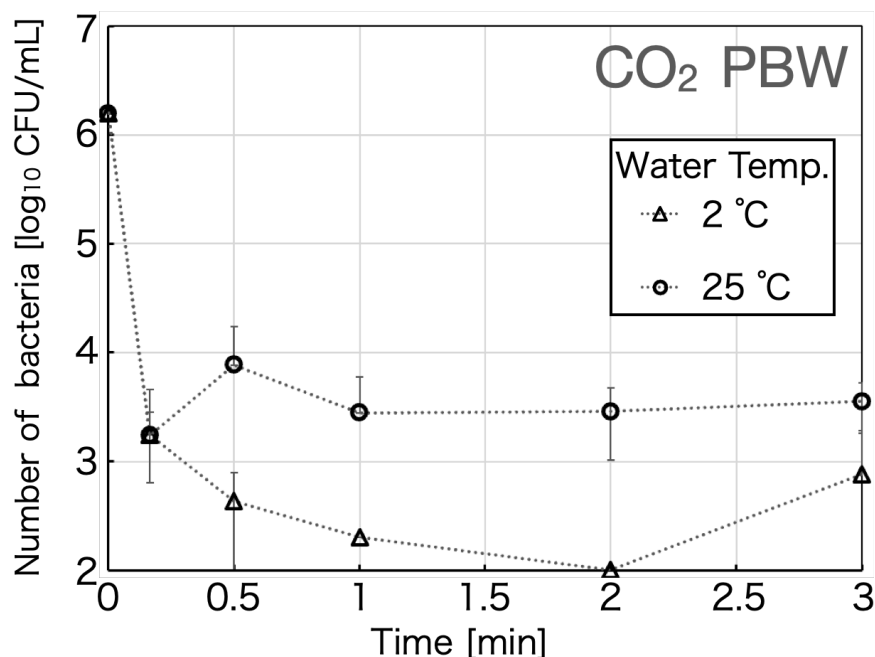


図 4-52 PBW の生成時の水温と殺菌効果の関係

4.7.3. 細菌の PBW への暴露時間と生菌数の関係

PBW と菌懸濁を混合したあと、生菌数がどのように変化するかを調べた。2℃の 50 mL の精製水を 3 L/min の二酸化炭素プラズマでバブリングし、PBW を生成した。生成した PBW を 990 μ L 採取し、直ちに 10^8 CFU/mL の *E. coli* 懸濁液 10 μ L と混合して、3℃および 22℃で静置した。各暴露時間における生菌数をコロニーカウントで評価した。またガスでバブリングした精製水でも同様に菌液と混合して、22℃で静置し、各暴露時間における生菌数とコロニーカウントで評価した。

結果を図 4-53 に示す。PBW と菌懸濁液の混合液では、生菌数は暴露時間が 2 分経過するまでに 2 桁減少し、特に PBW と菌懸濁液の接触後 30 秒間の間で生菌数は大きく減少する。暴露時間が 2 分以降は緩やかに生菌数が減少し、この減少速度はガスバブリングした水との混合液と同等であった。これらの結果から、PBW の殺菌効果は菌懸濁液と混合後直ちに現れ、暴露時間が 2 分時までに殺菌が完了すると考えられる。暴露時間が 2 分以降も生菌数が減少した理由として、4.5.5 に示した様に、二酸化炭素で生成した PBW の pH が低下しているため、生菌数が低下した可能性が考えられる。

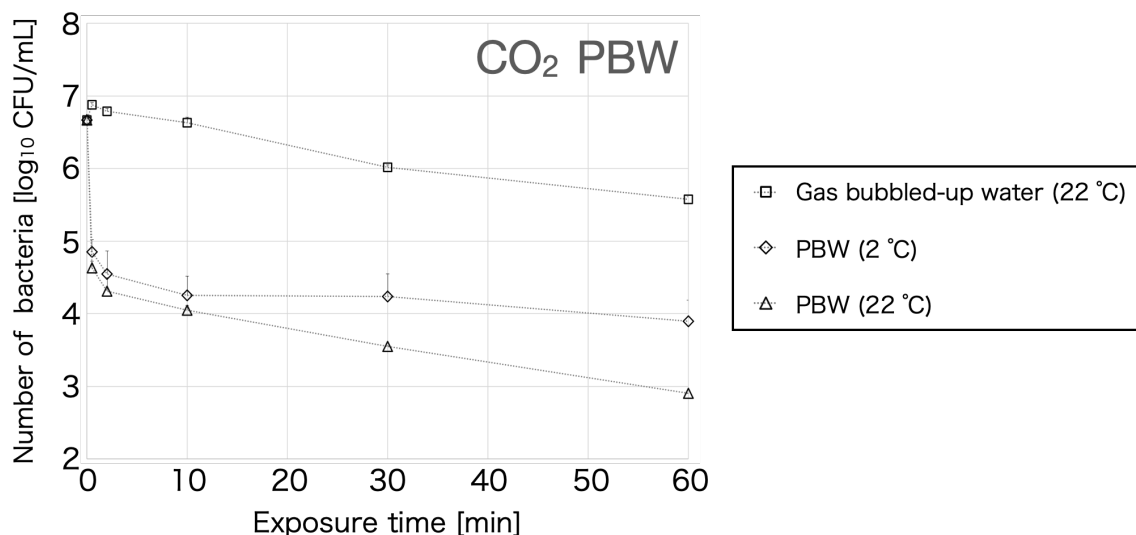


図 4-53 細菌の PBW への暴露時間と生菌数の関係

4.7.4. PBW の保存温度と殺菌効果維持時間

PBW では、精製水中に溶存する活性種などの殺菌因子によって、殺菌効果が得られていると考えられる。よって、PBW 生成から時間が経過すると殺菌因子が失活していき、殺菌効果が弱まっていくことが示唆される。本項では、2℃、23℃、40℃で保存した PBW について、殺菌効果の時間変化を調べた。

図 4-54 に実験の概要を示す。およそ 2℃で冷却された 50 mL の精製水を 3 L/min の二酸化炭素プラズマで 2 分間バブリングすることで PBW を生成した。その後、2℃、23℃、40℃で PBW を保存した。任意の保存時間で 990 μL の PBW を採取し、10μL の 10^8 CFU/mL の *E. coli* 懸濁液と混合した。混合後は 23℃で 1 時間静置した後、コロニーカウントで生菌数を評価した。

結果を図 4-55 に示す。生成直後の PBW には 10^6 CFU/mL の生菌数を 4 桁低下させるような高い殺菌効果が確認された。その後各温度で PBW を保存すると 40℃で保存した場合では、40 分で、23℃で保存した場合は 60 分で殺菌効果が完全に失われることが示された。一方で、2℃で保存した PBW では 180 分間保存しても殺菌効果が保持されていることが明らかとなった。それぞれの殺菌効果について、1 分間あたりに減少した生菌数の桁数 (D 値の逆数) で評価し、殺菌効果の半減期を求めると表 4-6 のようになる。PBW を 2℃、23℃、40℃で保存すると殺菌効果の半減期はそれぞれ 170 分、4.4 分、3.2 分となることが示された。

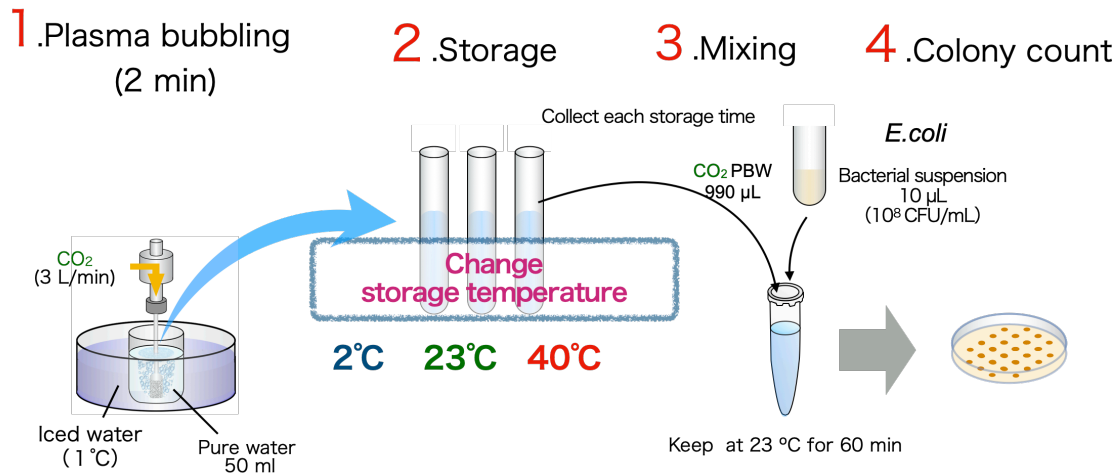


図 4-54 PBW の保存実験の概要

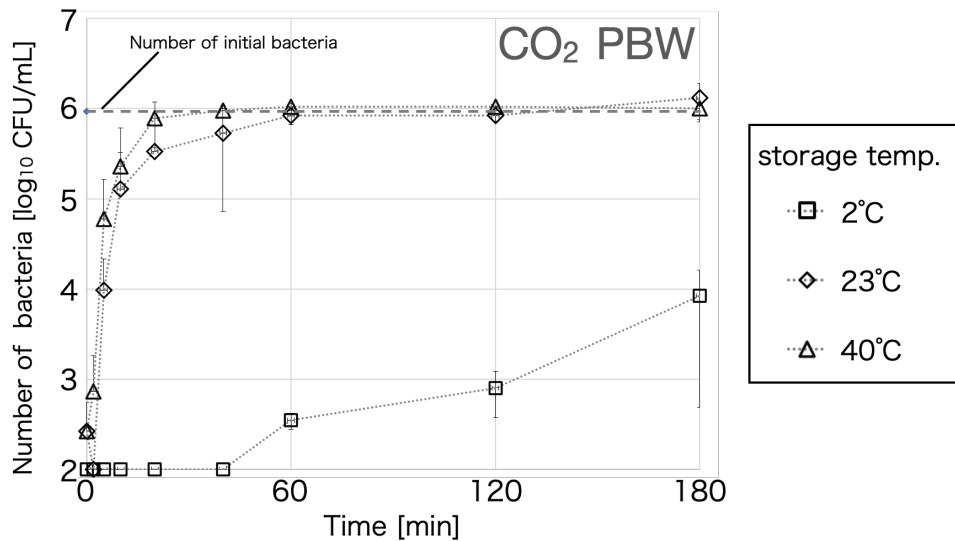


図 4-55 PBW の保存温度と殺菌効果の時間変化

表 4-6 二酸化炭素 PBW の殺菌効果の半減期

	Storage temperature of PBW		
	2 °C	23 °C	40 °C
Half-lifetime	170 min	4.4 min	3.2 min

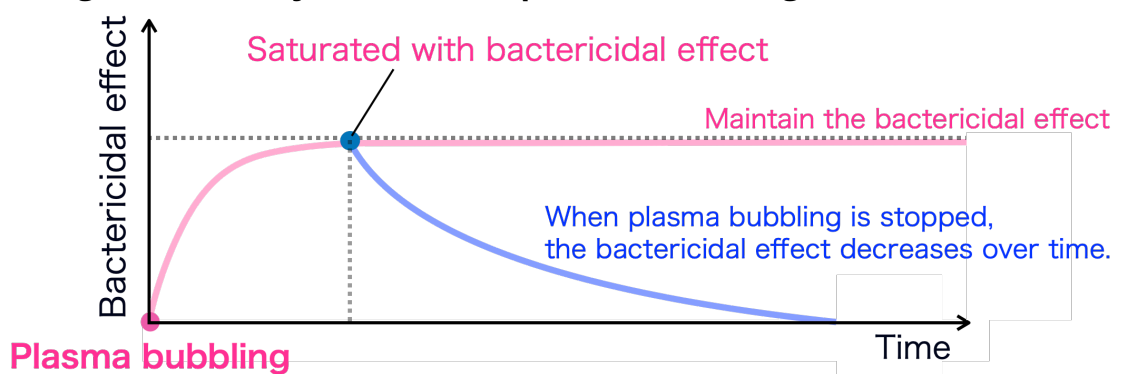
4.8 間欠動作プラズマバブリングを用いた PBW の殺菌効果維持

4.6において、PBWの殺菌効果とその特性について述べた。また、4.7.4ではPBWを生成し、プラズマバブリングを停止すると、時間経過によって殺菌効果が失われていくことを示した。したがって、PBWの殺菌効果を保つためには、プラズマバブリングを続ける必要がある。しかし、連続したプラズマバブリングは、プラズマガスや電力の消費量が増大するのに加え、プラズマジェットが高温になる、放電電極の消耗など装置面にも悪影響を及ぼす。本節では、これらを解決する手段として、間欠的にプラズマバブリングを繰り返すことで PBW の殺菌効果を維持する間欠動作プラズマバブリングについて述べる。

4.8.1. 間欠動作プラズマバブリングのコンセプト

連続と間欠動作のプラズマバブリングのコンセプトを図 4-56 に示す。連続のプラズマバブリングでは、PBWの殺菌効果が飽和した後も続けてプラズマを導入するため、殺菌効果が維持される。もし、プラズマバブリングを停止すると PBW の殺菌効果は徐々に低下していき、最終的に水に戻ってしまうと考えられる。間欠動作のプラズマバブリングでは、PBWの殺菌効果が飽和した後にプラズマバブリングの停止とプラズマバブリングを繰り返すことで、殺菌効果を高いレベルで維持するものである。

PBW generation by continuous plasma bubbling



PBW generation by interval plasma bubbling

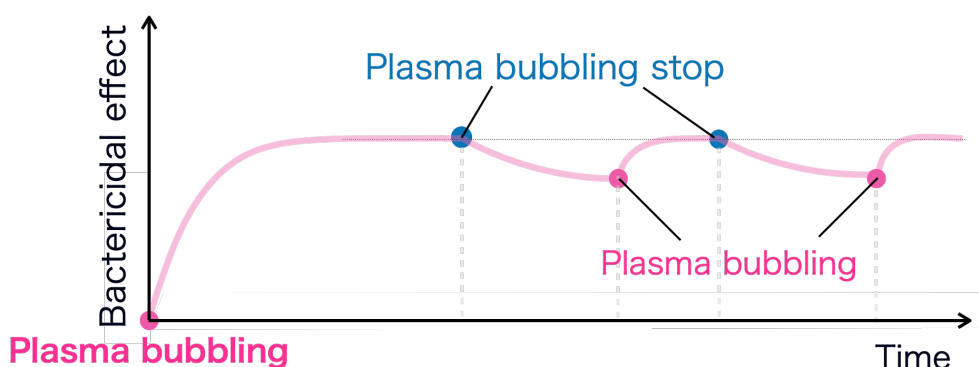


図 4-56 連続動作と間欠動作プラズマバブリングのコンセプト

4.8.2. 間欠動作プラズマバブリング装置の開発

間欠動作プラズマバブリングを実現するためには、設定された時間でプラズマジェットへの高電圧とプラズマジェットへのガスの供給を制御する必要がある。そのため、本研究では新たにプラズマバブリング装置と高電圧電源、装置支持台を製作した。図 4-57 に製作したプラズマバブリング装置の概要を示す。高電圧電源では、商用電源から 9 kV, 16 kHz(無負荷時)の交流高電圧を生成する。加えて、ガスと生成した高電圧をインターバルや時限動作で供給することが可能である。装置支持台では、安定したプラズマバブリングを実現する。プラズマバブリング装置では、様々なガス種による安定したプラズマの生成と多孔質フィルタによるプラズマバブリングを実現した。

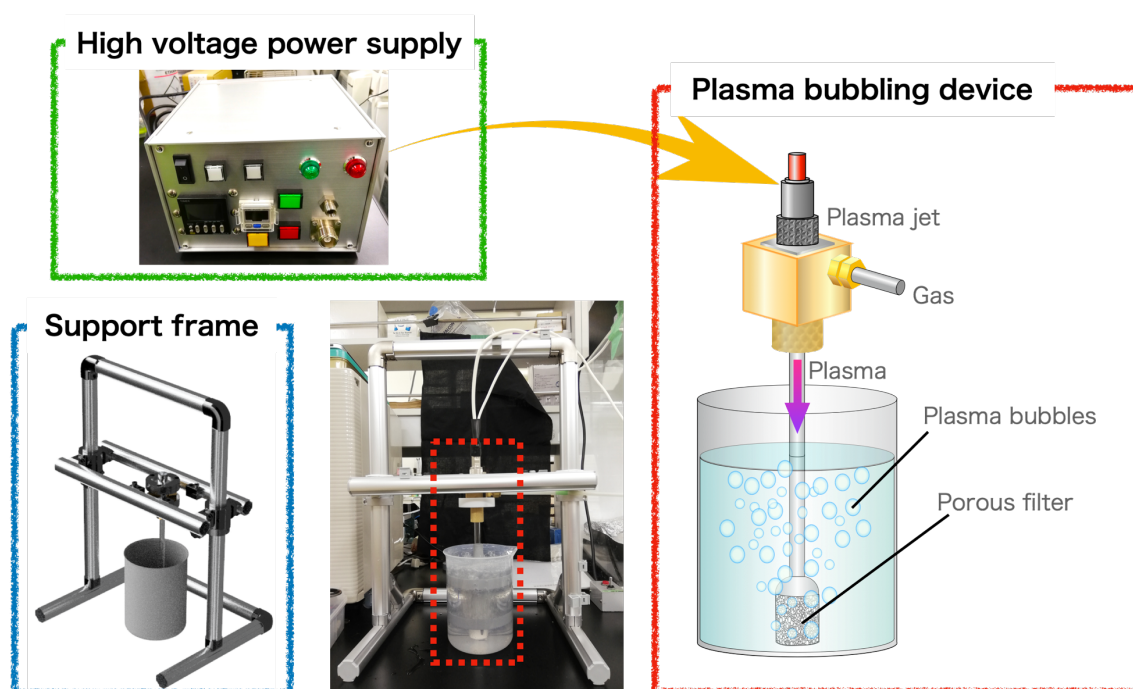


図 4-57 間欠動作のプラズマバブリング装置

4.8.3. 間欠動作プラズマバブリングによる PBW の殺菌効果維持

間欠動作プラズマバブリングによる PBW の殺菌効果維持の条件について、検討した。4.7.1 における PBW の生成時間と殺菌効果について述べた結果より、バブリング時間 10 秒程度でも PBW では殺菌効果が得られている。よって、短時間のプラズマバブリングによっても殺菌効果が付与できると考えた。また、4.7.4 では PBW の殺菌効果維持時間について調べ、常温(23℃)において保存時間 2 分までは殺菌効果の低下が確認されなかった。これらのことから、この実験では、プラズマ導入と停止の周期を 1 分間とし、プラズマバブリングの Duty 比を変化させて、殺菌効果を比較した。

図 4-58 に間欠動作プラズマバブリングによる殺菌実験の概要を示す。20℃の精製水 50 mL を 3 L/min の二酸化炭素プラズマで 2 分間バブリングすることで PBW を生成した。その後間欠動作プラズマバブリングに切り替え、殺菌効果を維持した。間欠動作のプラズマバブリング条件は、1 周期を 1 分とし、Duty 比が 25, 50, 75%となるようにプラズマバブリング時間とプラズマの停止時間を設定した。任意の保存時間で 990 μ L の PBW を採取し、10 μ L の 10^{6-7} CFU/mL の

E. coli 懸濁液と混合した。混合後は 10 分間静置した後、コロニーカウントで生菌数を評価した。また、比較のため、プラズマバブリングを行わなかった PBW (Duty 比 0%) の殺菌効果の維持時間についても評価した。

結果を図 4-59 に示す。PBW 生成直後では、生菌数を 2 桁以上低下させる殺菌効果を示した。Duty 比 0% の結果では、保存時間 2 分以降では殺菌効果の低下が確認され、保存時間が 7 分以降では殺菌効果がほとんど得られなくなった。一方で Duty 比 25, 50, 75% の結果では、保存時間 20 分においても生菌数を 2 桁以上低下させる殺菌効果を維持していた。これらのことから、間欠動作のプラズマバブリングを行うことで、PBW の殺菌効果が維持されることが示された。また、Duty 比 25% (プラズマ導入 15 秒、プラズマ停止 45 秒) の間欠動作のプラズマバブリングでも十分な殺菌効果の維持が見られたことから、さらに Duty 比を低くできる可能性が示された。

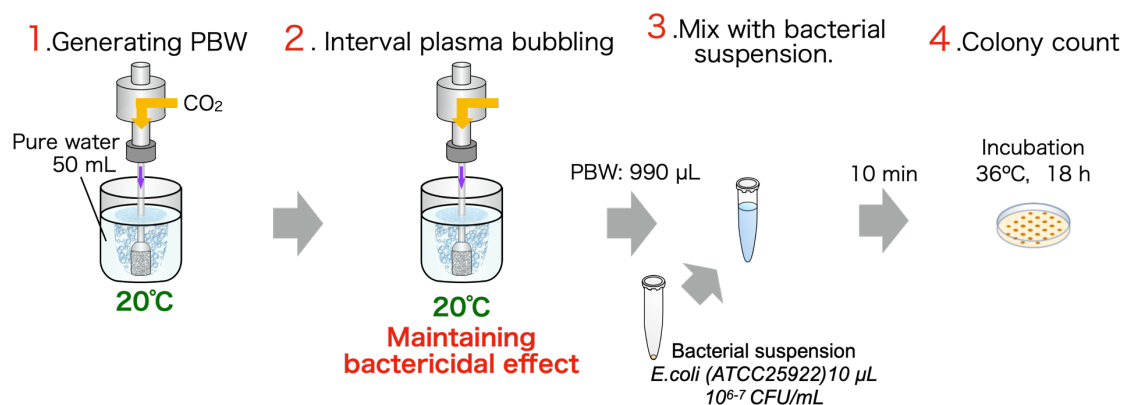


図 4-58 間欠動作プラズマバブリングによる PBW の殺菌効果維持実験

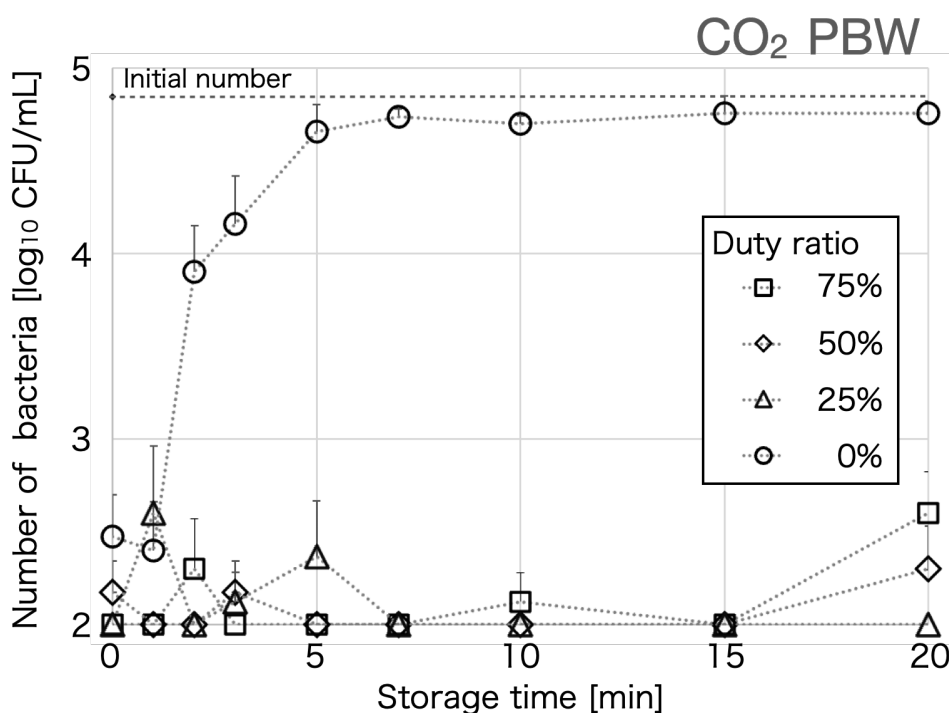


図 4-59 間欠動作プラズマバブリングによる PBW の殺菌効果維持

4.9 まとめ

本章ではマルチガス温度制御プラズマの殺菌への応用を行った。プラズマを直接菌懸濁液に照射する方法では、二酸化炭素のプラズマから高い殺菌効果が得られた。二酸化炭素のプラズマでは、プラズマのガス温度を上昇させると殺菌効果も向上した。最も高い殺菌効果が得られた 90℃ の二酸化炭素プラズマでは、初期菌数 10^8 CFU/mL の *S. aureus* を 10 秒間の照射で検出下限値以下まで低下させる殺菌効果が得られた。90℃ の二酸化炭素プラズマの照射では、30℃ のときの殺菌効果の約 7 倍の殺菌効果が得られた。二酸化炭素のプラズマ照射では、温度上昇によって生成量が大きく変化する一重項酸素が殺菌効果に寄与したと考察された。

プラズマバブリングでは、眼科分野で問題となる *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. marcescens*, *F. solani* の全ての菌株に対して殺菌効果が得られた。付着菌殺菌のために超音波併用プラズマバブリングを開発し、ステンレス板上および医療器具上の *P. aeruginosa* に対する高い殺菌効果を確認した。11 時間のプラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングで処理した医療器具では損傷が確認されなかった。超音波併用プラズマバブリングを用いることで医療器具に損傷を与えずに表面の付着菌を殺菌可能なことを示した。

プラズマバブリングの殺菌効果向上を図るため、多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングを開発した。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングによって、従来手法と比較して気液界面面積を約 7 倍に向上させた。*F. solani* の殺菌では、多孔質フィルタを用いた二酸化炭素のプラズマバブリングによって、生菌数を 2 桁減少させるまでの時間が従来手法の 2/15 に短縮された。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングでは、二酸化炭素の他に酸素で高い殺菌効果が得られた。他にも多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングについて特性を調べると、殺菌効果は多孔質フィルタの長さや処理時の水温、プラズマのガス温度に影響されることが示された。また、酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングで処理した菌懸濁液では、大腸菌の細胞膜の不飽和脂肪酸が酸化されたことが示された。酸素のプラズマバブリングでは、多量のオゾンが生成されたことから、このオゾンが殺菌に寄与していることが示された。二酸化炭素のプラズマバブリングでは、殺菌効果に寄与するようなオゾンや過酸化水素、OH ラジカル、スーパーオキシドラジカル、一重項酸素は検出されなかった。

酸素プラズマバブリングと紫外線照射を組み合わせた紫外線併用酸素プラズマバブリングでは、*P. aeruginosa* 及び *C. perfringens* に対して、高い殺菌効果が得られた。紫外線のための殺菌では照射の影となるようなところで殺菌効果が得られない問題があったが、プラズマバブリングと併用することで液中を攪拌しながら殺菌が可能となり、均一で高い殺菌効果が得られた。また、多孔質フィルタを用いることで、より高い殺菌効果が得られる可能性が示された。紫外線併用プラズマバブリングでは高い酸化力を持つ OH ラジカルの生成量が増加したことから、酸素プラズマバブリングと紫外線の殺菌効果が重畳するだけでなく、相乗的に殺菌効果に寄与した可能性が示唆された。

二酸化炭素のプラズマバブリングによって殺菌効果を付与した水 (PBW) は、 10^5 CFU/mL の *E. coli* を 2 桁以上低下させる殺菌効果を示した。PBW では、生成時に低温の水を用いることで殺菌効果が向上した。また、PBW 生成から時間が経過することで殺菌効果が失われていくことが明らかとなり、常温の 23℃ では殺菌効果の半減期は 4.4 分となった。しかし、PBW は低温で保存することで、殺菌効果を長時間維持することが可能であり、2℃ で保存すると殺菌効果の半減期は 170 分に延長された。

PBW の殺菌効果をより長時間維持する手法として、間欠動作プラズマバブリングが考案された。プラズマバブリングと停止を繰り返し行うことにより、ガスおよびエネルギーの消費を抑えつつ PBW の殺菌効果を保つことが可能である。常温保存の PBW において、1 分間うち 15 秒間動作する間欠動作プラズマバブリングを繰り返すことで、20 分以上殺菌効果を維持することに成功した。

本章では、マルチガス温度制御プラズマを用いて様々なセットアップでの液中殺菌を実現した。加えて、超音波や間欠動作、紫外線など、プラズマと他の機能を組み合わせることで、より効果的な処理が行えることを示した。殺菌の機序は一部を明らかにすることができたが、プラズマによる殺菌では複数の因子が複雑に関与していることが示唆されている^[79]。よって、それぞれの応用において活性種や特性測定などを網羅的に行い、殺菌因子を明らかにすることが求められる。また、医療分野の殺菌では信頼性が重要となるため、さらに実証試験を重ねていく必要がある。

第 5 章

マルチガス温度制御プラズマの 歯科分野への応用

5.1 歯科材料接着への大気圧低温プラズマの応用^[80]

歯科分野において、接着は歯科材料の研究やレジンセメント、ボンディング剤の開発などによって応用範囲が拡大しており、う蝕の治療や外傷で失った歯質の回復などで用いられている。歯科分野では、エナメル質への接着、象牙質やセメント質への接着、歯科修復材料への接着など様々な対象との接着が行われており、これらの接着では用いられる接着剤が異なる。また、それぞれに適した前処理や術式が行われている。本節では支台歯への歯冠の接着について、大気圧低温プラズマの応用を行った。

う蝕や外傷により失われた歯の治療では、失われた歯質を人工の材料で作られた歯冠によって機能的、審美的に回復させる臨床術式が行われている。この際に支台歯はこの歯冠を長期間に渡って支えるための土台にあたる部分である。支台歯と歯冠を十分に接着することは、二次う蝕や歯冠の脱落を防ぐことにつながる^[81]。今回は歯冠の材料として、優れた強度と高い生体親和性など、歯科用途に適した特性を有しているジルコニアを用いた^[82]。歯科用レジンセメントによってジルコニア歯冠を適切に接着させるためには、支台歯表面とジルコニア歯冠の内面を適切に処理することが重要である。一般的に用いられている方法はサンドブラストとプライマーの塗布である。ジルコニア歯冠の表面をアルミナ粒子によるサンドブラストを行うことで、表面の洗浄、不純物の除去、表面粗さの増大などの効果を得ることができる^[83]。加えて、リン酸エステル系モノマーを含むプライマーを塗布することで、ジルコニア表面の改質を行うことで接着性向上を図る^[84]。しかし、歯科用椅子の近くでサンドブラストを行う場合、粉体の飛散による環境汚染が問題となる。

近年、歯科分野での表面処理手法として、大気圧低温プラズマが注目されている。ジルコニアの接着についても大気圧低温プラズマの処理が検討されており、例えば He で生成した大気圧低温プラズマをジルコニアに照射することで、ジルコニアとレジンセメントの接着強度が向上することが報告されている^[85]。空気中で大気圧低温プラズマを生成すると、プラズマに大気中の水分が巻き込まれることによって、OH ラジカルが生成される^[25]。ジルコニアの処理でも、生成された OH ラジカルにより表面の有機物汚れが除去され、ジルコニアとレジンセメントとの接着強度の向上に寄与している可能性がある。

本研究では、ジルコニア-レジンセメント間の接着強度の向上を目的として、接着前のジルコニアに大気圧低温プラズマの照射を行った。本節では、様々なガス種のプラズマで処理したジルコニアの接着強度と表面の構造、化学組成、結合状態を分析した結果について記述する。

5.1.1. 照射するプラズマのガス種がジルコニア-レジンセメント間の接着強度に与える影響

ジルコニア試料は、3 mol% イットリア安定化ジルコニア (Aadvia Zirconia Disc EI, GC, Tokyo, Japan) のディスクから切片 (15 mm × 15 mm × 3 mm) を切り出し、ダイヤモンド研磨シート (POLYMOND, Suzuko syoji, Kanagawa, Japan) で研磨したものを使用した。ジルコニア試料へのプラズマ照射の様子を図 5-1 に示す。プラズマのガス種は、3 L/min の窒素、二酸化炭素、酸素、アルゴン、空気を使用し、生成したプラズマをジルコニア試料の上方 3 mm から 3 秒および 10 秒間照射した。サンドブラスト処理は、ジルコニア試料から 5 mm 離れた位置で 50 μm のアルミナ粒子を 0.3 MPa の圧力で射出し、5 秒間処理した。なお、リン酸エステル系モノマーを含むプライマーの塗布は、プラズマ照射のみの効果を明らかにするために行っていない。

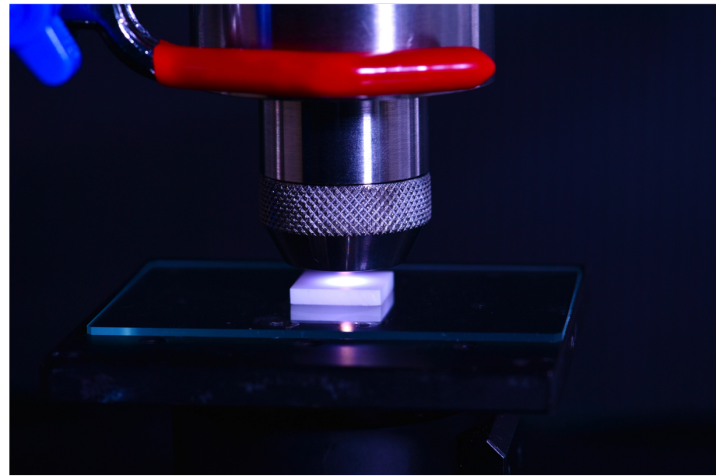
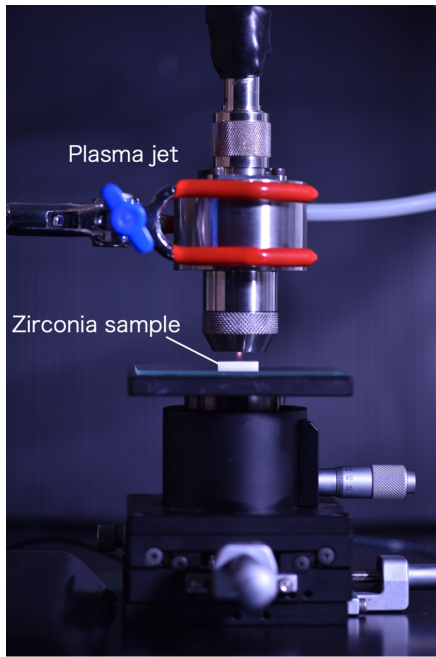


図 5-1 ジルコニア試料への大気圧低温プラズマの照射の様子

図 5-2 にジルコニア試料の接着試験の概要を示す。ジルコニア表面処理後，直ちにジルコニア試料を歯科用接着性レジンセメント(G-CEM LinkForce, GC, Tokyo, Japan)を用いて，直径 6 mm，高さ 15 mm のステンレスロッド(SUS303, ステンレス商事, Tokyo, Japan)に接着した。接着面積は直径 3 mm の円とし，定荷重装置で 10 N の静荷重をかけながら，歯科用 LED 光照射器(G-Light Prima II Plus, GC, Tokyo, Japan)を用いて 10 秒間光照射を行い，レジンセメントを硬化させた。完全に硬化する前にはみ出した余分なレジンセメントは除去した。未処理およびサンドブラスト処理した試料も同様の方法で接着した。その後， $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水中に 24 時間浸漬し，接着強度を測定した。接着強度は，万能試験機(Autograph AG-I 20kNT, 島津製作所, Kyoto, Japan)を用いて，クロスヘッドスピード 1.0 mm/min で引張試験を行い，接着強度を測定した。試験中に記録された最大荷重を接着強度の算出に使用した。

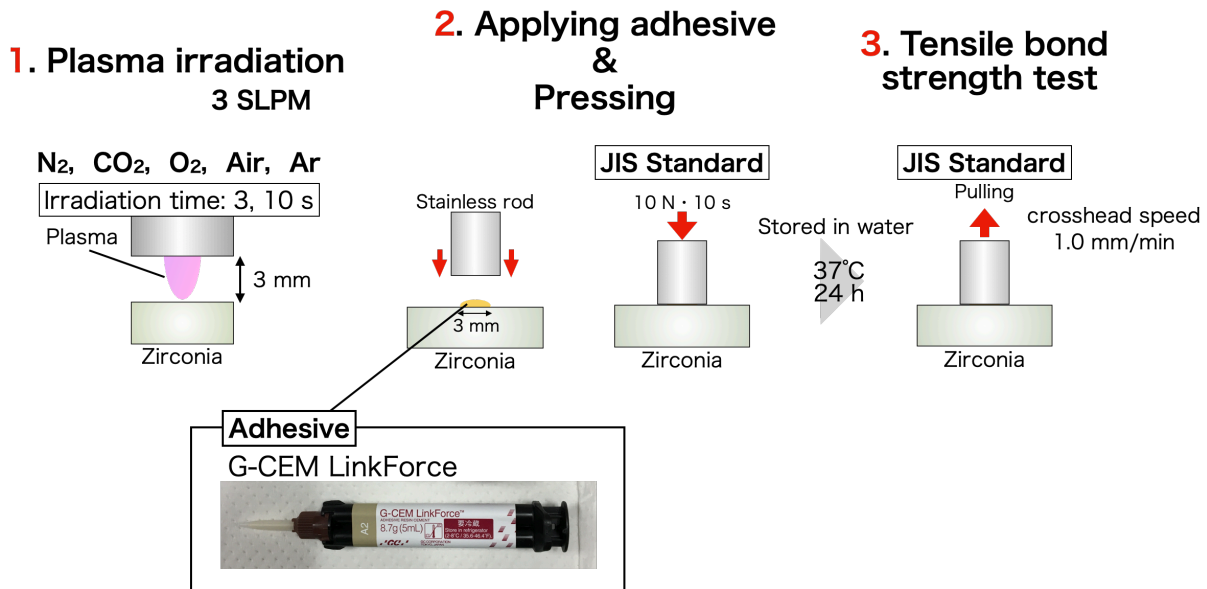


図 5-2 ジルコニア-レジンセメントの接着試験の概要

引張試験後のジルコニアとステンレスロッド界面を図 5-3 に示す。すべての試験片において、ジルコニアとレジンセメントの界面での破壊が確認された。ジルコニア-レジンセメントの接着強度を図 5-4 に示す。未処理でのジルコニア-レジンセメントの接着強度は 9.8 MPa となった。未処理と比較して、サンドブラスト処理では接着強度は増加し、接着強度の平均値は 18.5 MPa となった。プラズマ処理では、未処理の試料に比べ接着強度の向上が見られたが、プラズマのガス種によって効果は大きく異なった。特に窒素とアルゴンは未処理と比べて接着強度が大きく増加し、それぞれの接着強度は 18.5, 17.2 MPa であった。窒素の 10 秒間の処理では、サンドブラスト処理と同等の高い接着強度が示された。一方で酸素では、照射時間を 3 秒から 10 秒に延長させると接着強度が低下し、未処理と変わらない接着強度となった。

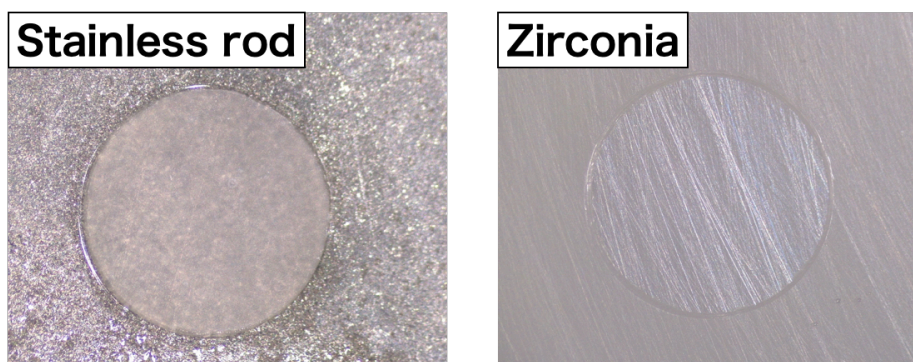


図 5-3 引張試験後のジルコニアとステンレスロッド界面

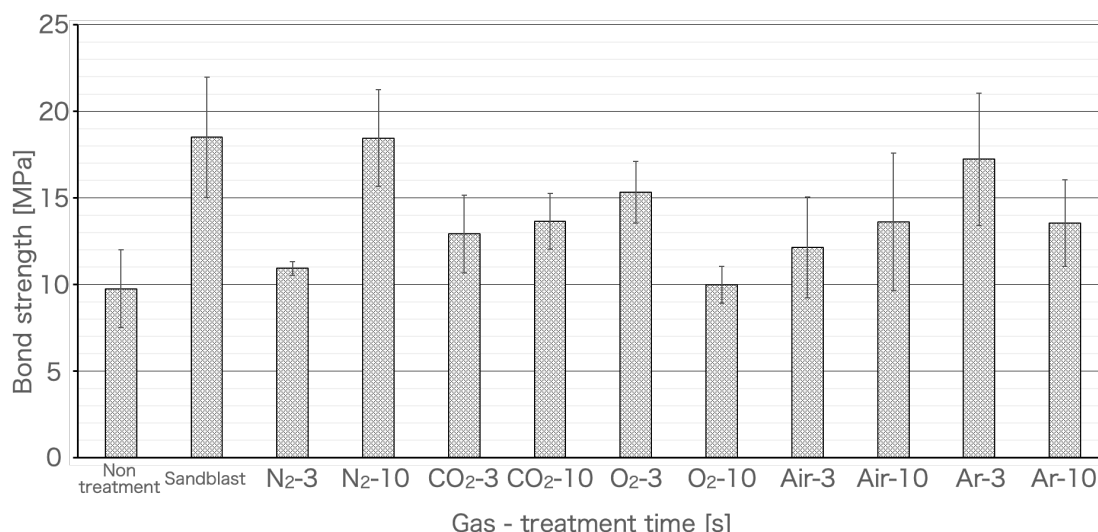


図 5-4 各プラズマ処理における接着強度

5.1.2. 原子間力顕微鏡によるプラズマ照射後のジルコニア表面の観察

プラズマ処理を行ったジルコニア試料について、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) による表面の観察を行った。AFM (NanoScopeV, Bruker Japan K.K., Tokyo, Japan) を用いて、各ガス種のプラズマ照射処理後のジルコニア表面構造を観察した。AFM では SiO₂ プローブ (EconoTESP-Au, $k = 40 \text{ N/m}$) を用い、タッピングモード 100–400 kHz, スキャンサイズは $1 \mu\text{m}$ 角と 100 nm 角で行った。

$1 \mu\text{m}$ 角でジルコニア表面構造を観察した結果を図 5-5 に示す。未処理の表面では、高さ 40 nm 以上の凹凸が確認された。サンドブラスト処理した表面では、高さ 400 nm 以上の凹凸が確認され、表面粗さが増加していることが確認された。各種プラズマの処理では、高さ 40–80 nm の凹凸が確認されたが、未処理と大きな差は観察されなかった。100 nm 角でジルコニア表面構造を観察した結果を図 5-6 に示す。未処理では高さ 20 nm 程度の凹凸が確認された。サンドブラスト処理した表面では、高さ 20 nm 程度の凹凸が確認された。プラズマ処理では、全ての処理で線上の溝が確認された。特に窒素と二酸化炭素では深さ 1–2 nm の溝が見られた。このような現象が見られた理由としては、以下のことが考察された。第一に実際の表面構造を表しており、プラズマ照射によってジルコニア表面の形状が変化した。第二に表面に修飾された活性のある官能基と探針との間に電気的な引力が働いた。第三に、プラズマによりジルコニア表面がエッチングされたとは考えにくいいため、この線状の溝はアーティファクトである可能性がある。

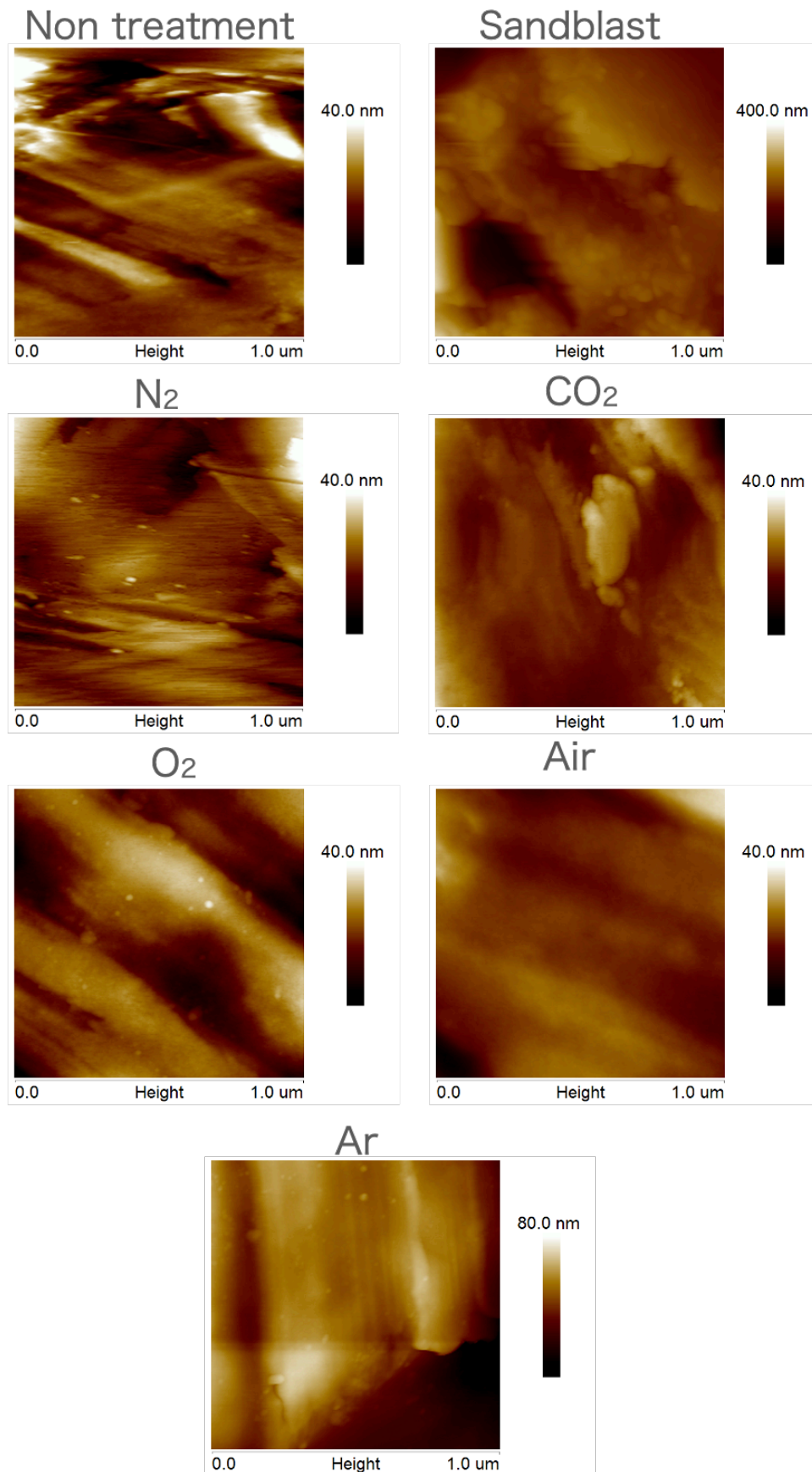


図 5-5 AFM によるジルコニア表面構造の観察(1 μm 角)

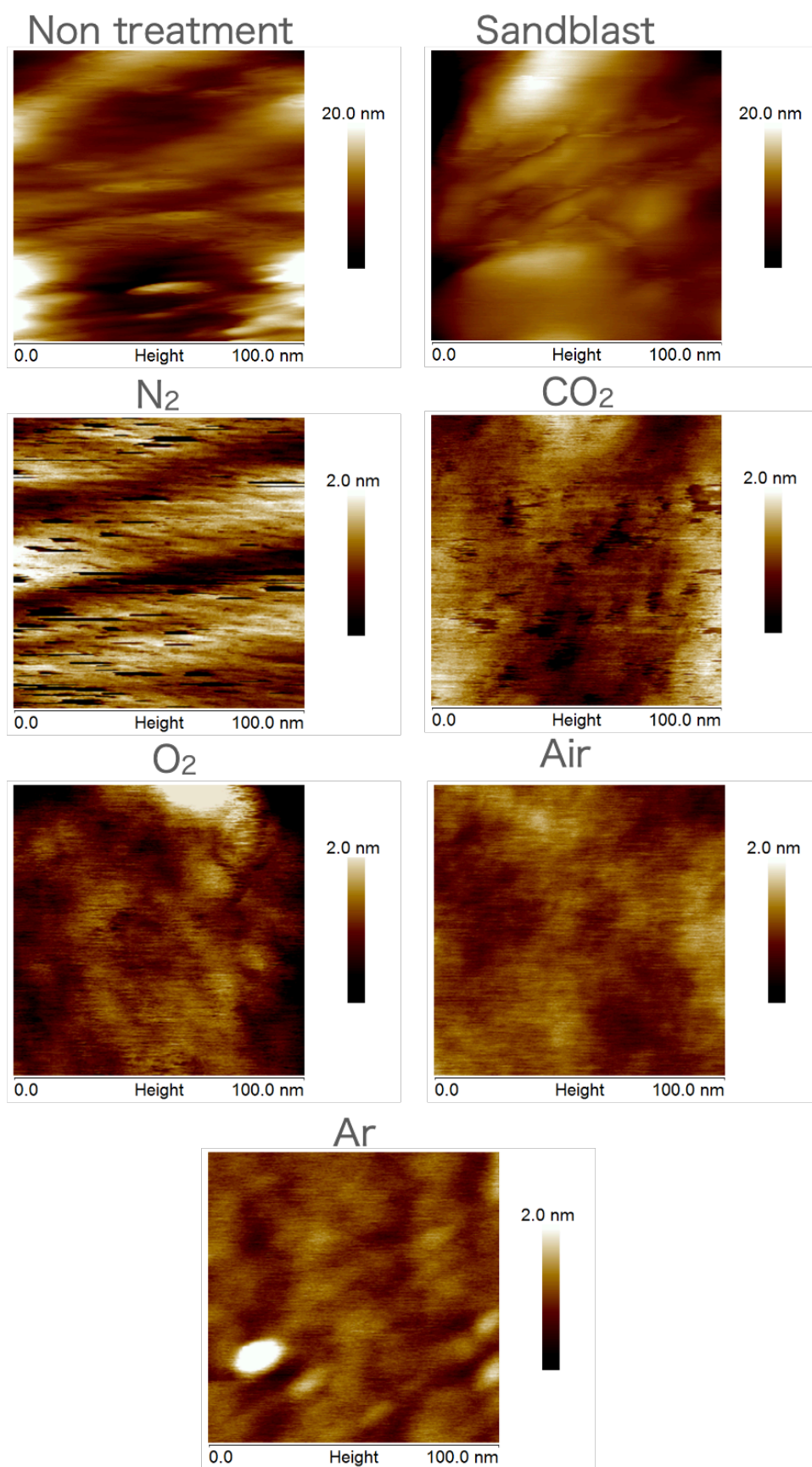


図 5-6 AFM によるジルコニア表面構造の観察(100 nm 角)

5.1.3. X線光電子分光法によるプラズマ照射後のジルコニア表面の分析

X線光電子分光法(X-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS)では、表面の化学組成や結合状態などを明らかにすることができる。ジルコニアは、高い接着強度を示した窒素プラズマ、ほとんど接着強度の向上が見られなかった酸素プラズマによって10秒間処理された。その後、XPS(ESCA 1700R, ULVAC-PHI, Kanagawa, Japan)を用いてジルコニア表面の結合エネルギーを分析した。X線源はAl-K α 線(1486.7 eV, 300 W)を用いた。また、比較のため、未処理のジルコニア試料も同様に分析した。

図5-7に各プラズマで処理したジルコニア表面の結合エネルギーのスペクトルを示す。また、図5-8には、顕著な変化が見られたC1sとO1sのスペクトルを示す。窒素および酸素のプラズマで処理するとC1sのスペクトルのC-C、C-Hピークが大きく減少した。最もC-C、C-Hピークが小さい条件は窒素プラズマで、次に酸素プラズマ、最もピークが大きい条件は未処理であった。O1sスペクトルでは、窒素と酸素プラズマ処理後では、表面塩基性を示すZr-O₂のピーク強度と、表面酸性を示すZr-OHのピーク強度で違いが見られ、窒素プラズマではZr-O₂のピーク強度が高く、酸素プラズマではZr-OHのピーク強度が高くなった。

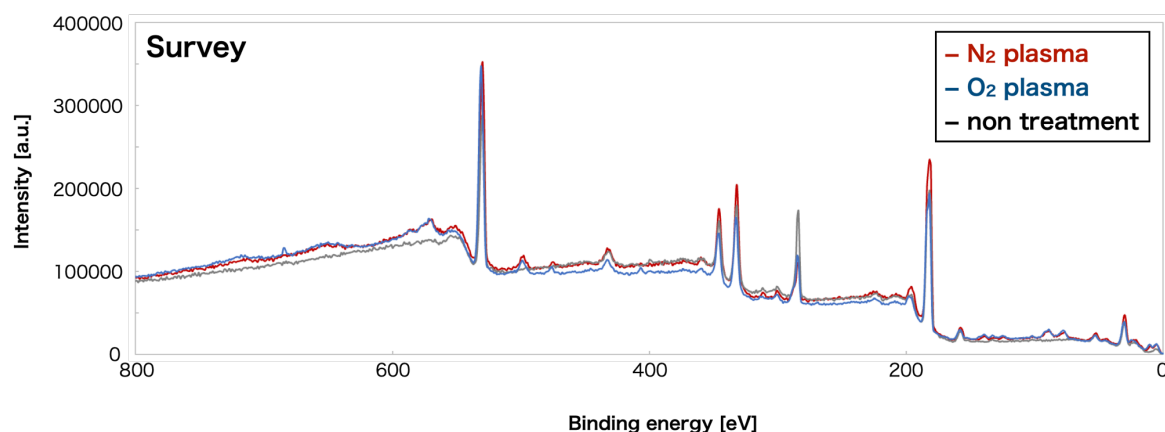


図5-7 XPSによる窒素および酸素プラズマ処理後のジルコニア表面の分析(Survey)

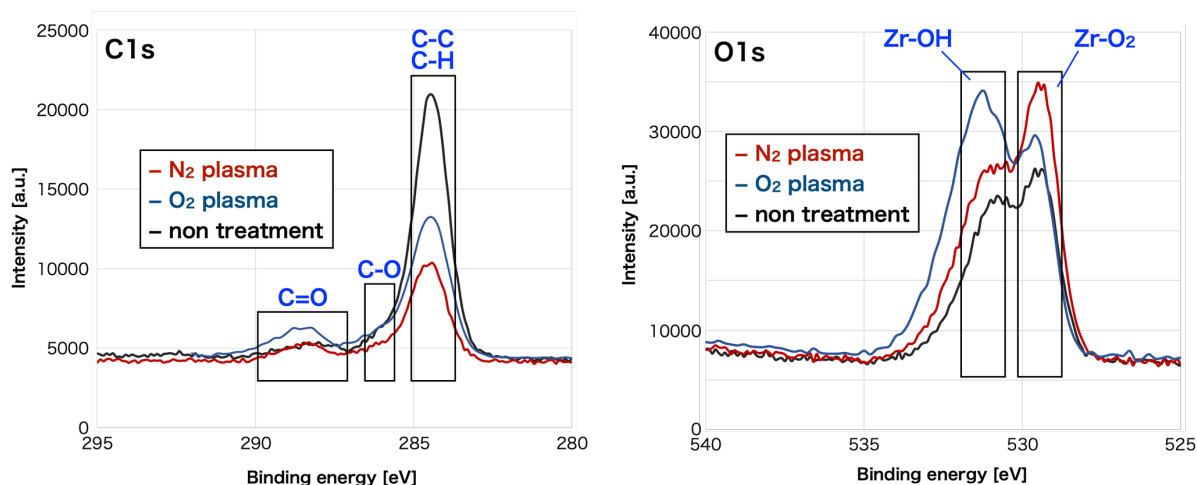


図5-8 XPSによる窒素および酸素プラズマ処理後のジルコニア表面の分析(C1s, O1s)

5.1.4.窒素および酸素プラズマ照射によるジルコニア表面の接着機序の考察

プラズマ照射では、3章の活性種測定においても OH ラジカルなどの高い酸化力をもつ活性種が生成されることが示されている。高い酸化力を持つ OH ラジカルは、高い速度定数 ($10^6 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で有機汚染物質を酸化する^[86]。今回のジルコニアの表面分析でも窒素および酸素プラズマ照射により C-C, C-H のピークが減少しており、プラズマによって生成された OH ラジカルなどがジルコニア表面の有機汚れを除去したと考えられる。窒素プラズマでは、酸素プラズマ照射よりも C-C, C-H のピークが小さかったが、これは窒素プラズマでは他のガスと比較して高い OH ラジカルが生成されることに由来すると考えられる。

酸素プラズマ照射では、ジルコニアとレジンセメントの化学結合に重要な役割を果たす Zr-OH の割合が増加したが^[87]、この実験では接着強度は向上しなかった。Liu らも、酸素プラズマで処理したジルコニア表面では歯冠表層などに用いられるベニアポーセレンとの接着強度が低く、酸素プラズマを照射していない表面よりも材料界面に多くの空隙が存在することが示されている^[88]。このことから、酸素プラズマの照射はレジンセメントの空隙率を増加させ、接着強度を弱める可能性がある。また、レジンセメント自体の接着強度を弱めた可能性も示唆される。レジンセメントではプライマーを塗布しレジンセメントによる硬化を行うと、メタクリル酸中でフリーラジカルを介した重合が行われ、レジンセメントの機械的性質の向上することが報告されている^[89]。酸素はこのレジンセメントのフリーラジカルを介した重合を阻害することが報告されている^[90]。したがって、この実験で酸素プラズマ照射によって、ジルコニア表面の微小構造に酸素が入り込み、この酸素が接着強度を低下させたことが示唆された。

5.2 大気圧低温プラズマによる歯科ホワイトニングへの応用

歯並びをきれいにし、歯を白くする、などの審美歯科治療の考えは近年一般に広まってきている。中でも、自身の歯の色に関して悩みを持つ人は多い^[91]。歯への着色は、エナメル質に喫煙やコーヒー、お茶など摂取によってタールやニコチン、タンニンなどの着色物質が歯の表面に定着することで生じる。現在、歯を白くするホワイトニングの処置では、歯質表面を洗浄した後、過酸化水素を含む薬剤を歯に塗布して行われる。薬剤に含まれる過酸化水素は分解されOHラジカルが生じ、歯質に定着している着色物質を分解、無色化する^[92]。しかし、この処置は高濃度の過酸化水素による歯茎へのやけどや知覚過敏の原因となるなどの問題点があった。

近年大気圧低温プラズマの生成が可能になり、医療分野への応用も盛んに行われている。大気圧低温プラズマを用いた歯科審美性への応用も行われており、ホワイトニングへの応用研究が報告されている^{[93],[94]}。開発したマルチガス温度制御プラズマジェットでも、OHラジカルや一重項酸素などの高い酸化力をもつ活性種を生成することができ、新しい歯科ホワイトニング手法として期待されている。この節では歯科ホワイトニング応用へ向けた大気圧低温プラズマの応用について述べる。

5.2.1. 歯科ホワイトニングに向けたプラズマミストの生成

歯科ホワイトニング応用に向けて開発したプラズマミストの生成について図 5-9 に示す。歯科ホワイトニング応用へ向けた大気圧低温プラズマとして、最も高いOHラジカル濃度が得られた窒素のプラズマを選定した。また、より高いOHラジカルを得るため、プラズマガスへの水の添加を検討した。プラズマガスに水蒸気を混合する手法によって、OHラジカルの生成量を増加することが知られており、例えば Nikiforov らは水蒸気を含む Ar ガスで大気圧低温プラズマを生成することでOHラジカルが増加することを報告している^[95]。この節では、生成した窒素プラズマに水を混合させ、水滴と同時にプラズマを照射するプラズマミストを歯科ホワイトニング応用に用いた。

5.2.2. プラズマミストによるヘマトポルフィリン染色紙の漂白実験

プラズマミストの生成条件を検討するため、ヘマトポルフィリン染色紙を用いて漂白実験を行った。ヘマトポルフィリン染色紙は光沢紙をヘマトポルフィリン溶液に5分間浸漬させ、その後自然乾燥させて作製した。窒素で生成したプラズマを水と混合して、プラズマミストを生成し、ヘマトポルフィリン染色紙へ照射した。プラズマミストの生成条件として、水分の供給量を0.0, 0.05, 0.10 mL/min、窒素のガス流量を1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0 L/minとした。プラズマミストの照射は、距離5 mmから3分間処理し、全ての条件をN=5で行った。

プラズマ処理前後の試料は歯科用分光測色計を用いて測定し、L*a*b*表色系による色差 ΔE と白色度差 ΔW を用いて比較した。それぞれの計算式を以下に示す。

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_0^*)^2 + (a_1^* - a_0^*)^2 + (b_1^* - b_0^*)^2} \quad \text{式(5-1)}$$

$$W_0 = 100 - \sqrt{(100 - L_0^*)^2 + a_0^{*2} + b_0^{*2}} \quad \text{式(5-2)}$$

$$W_1 = 100 - \sqrt{(100 - L_1^*)^2 + a_1^{*2} + b_1^{*2}} \quad \text{式(5-3)}$$

$$\Delta W = W_1 - W_0$$

式(5-4)

L_1^* , a_1^* , b_1^* はプラズマ処理後の試料の測色値, L_0^* , a_0^* , b_0^* はプラズマ処理前の試料の測色値を示している。 W_1 , W_0 はそれぞれプラズマ処理後と処理前の白色度を示している。 ΔE と ΔW の値が大きくなるほど、プラズマ照射前後で色差と白色度が異なることを示している。実験では、試料ごとに個体差があるため、全ての試料で処理前後の測色を行った。また、各処理条件でプラズマのガス温度を K 型熱電対で測定した。実際の応用で痛みや違和感なく処理するためには、40℃以下での処理が望まれる。

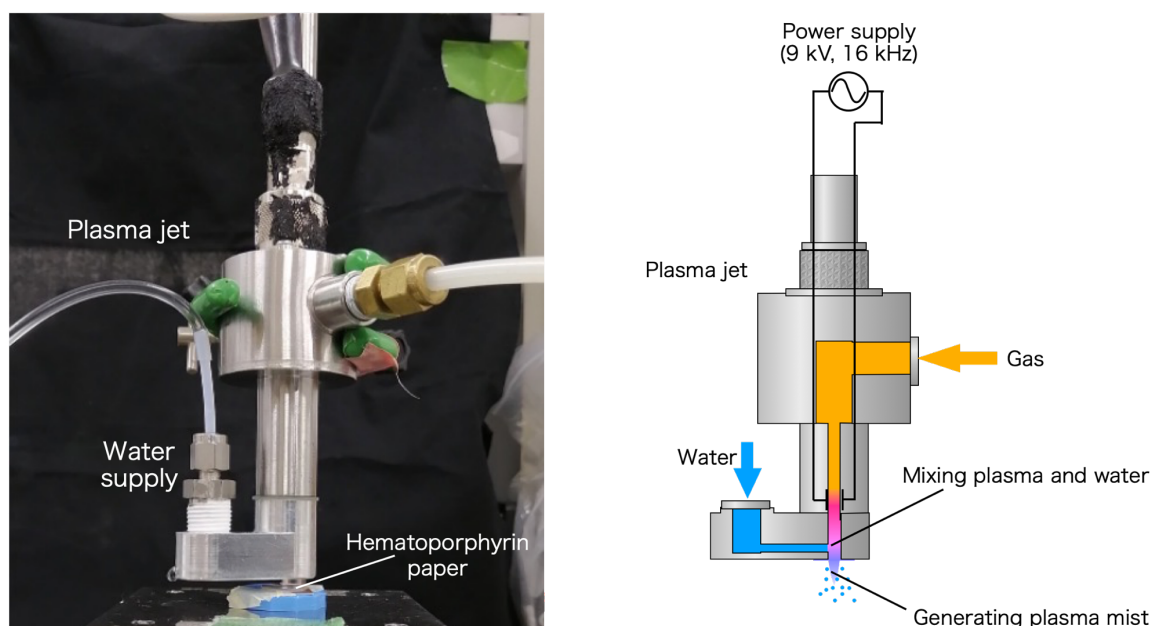


図 5-9 歯科ホワイトニング应用に向けて開発したプラズマミスト

5.2.3. プラズマミスト生成時の水分供給量とガス流量が漂白効果に与える影響

各条件の色差と白色度差をまとめた結果を図 5-10 に示す。プラズマミストの照射では、水分供給量が少ないほど漂白効果が高いことが示唆された。またガス流量を増加させても漂白効果が低下することが確認された。また、プラズマのガス流量、水分供給量とガス温度の関係を表 5-1 示す。プラズマのガス温度は、水分供給量が少ないほど上昇する傾向が示された。また、ガス流量を低下させるとプラズマのガス温度は上昇した。プラズマミストで処理後のヘマトポルフィン染色紙の写真を図 5-11 に示す。試料の写真をみると、照射の中心から離れるほど漂白効果の低下が見られた。水分供給量 0.05 L/min, 0.10 L/min の結果では、漂白効果が得られた面積が小さくなった。これは、試料に水が付着し、プラズマミストの照射が阻害されたためであると考えられる。

全ての処理条件の中で、水分供給量 0 mL/min, ガス流量 1 L/min で最も高い漂白効果が得られた。処理された試料の写真をみると、水分を添加したときと比較して広い面積で漂白効果が得られた。しかし、この条件ではプラズマ照射位置でのガス温度が 96℃であり、実際の人体への照射には適さない。プラズマのガス温度が 40℃以下の結果で比較すると、水分供給量 0.05 mL/min, ガス流量 3 L/min のプラズマミストと水分供給量 0.10 mL/min, ガス流量 2 L/min のプラズマミストが最も効果が高かった。

プラズマに水分を供給し生成したプラズマミストから漂白効果が確認された。また、ガス温度40℃以下の照射で漂白効果が確認され、プラズマミストによる歯科ホワイトニングへの実用可能性が示された。しかし、今回の実験では水の添加による漂白効果の向上は見られなかった。プラズマミストでは、プラズマへの水の混合の方法や添加する水の量をより詳細に検討することが望まれる。

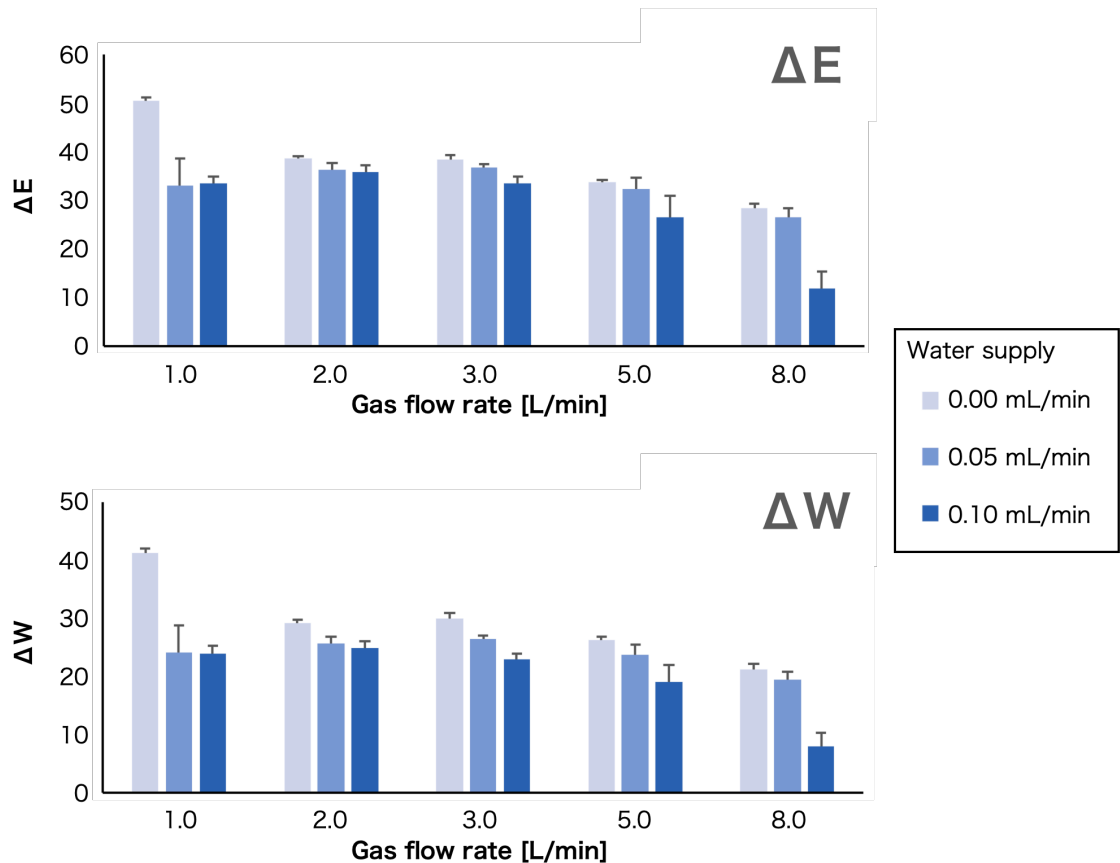


図 5-10 プラズマミスト照射前後の色差と白色度差

表 5-1 水分供給量, ガス流量とプラズマのガス温度の関係

		Gas flow rate (L/min)				
		1.0	2.0	3.0	5.0	8.0
Water supply (mL/min)	0.00	96℃	46℃	41℃	36℃	33℃
	0.05	46℃	41℃	36℃	33℃	32℃
	0.10	39℃	37℃	32℃	28℃	32℃

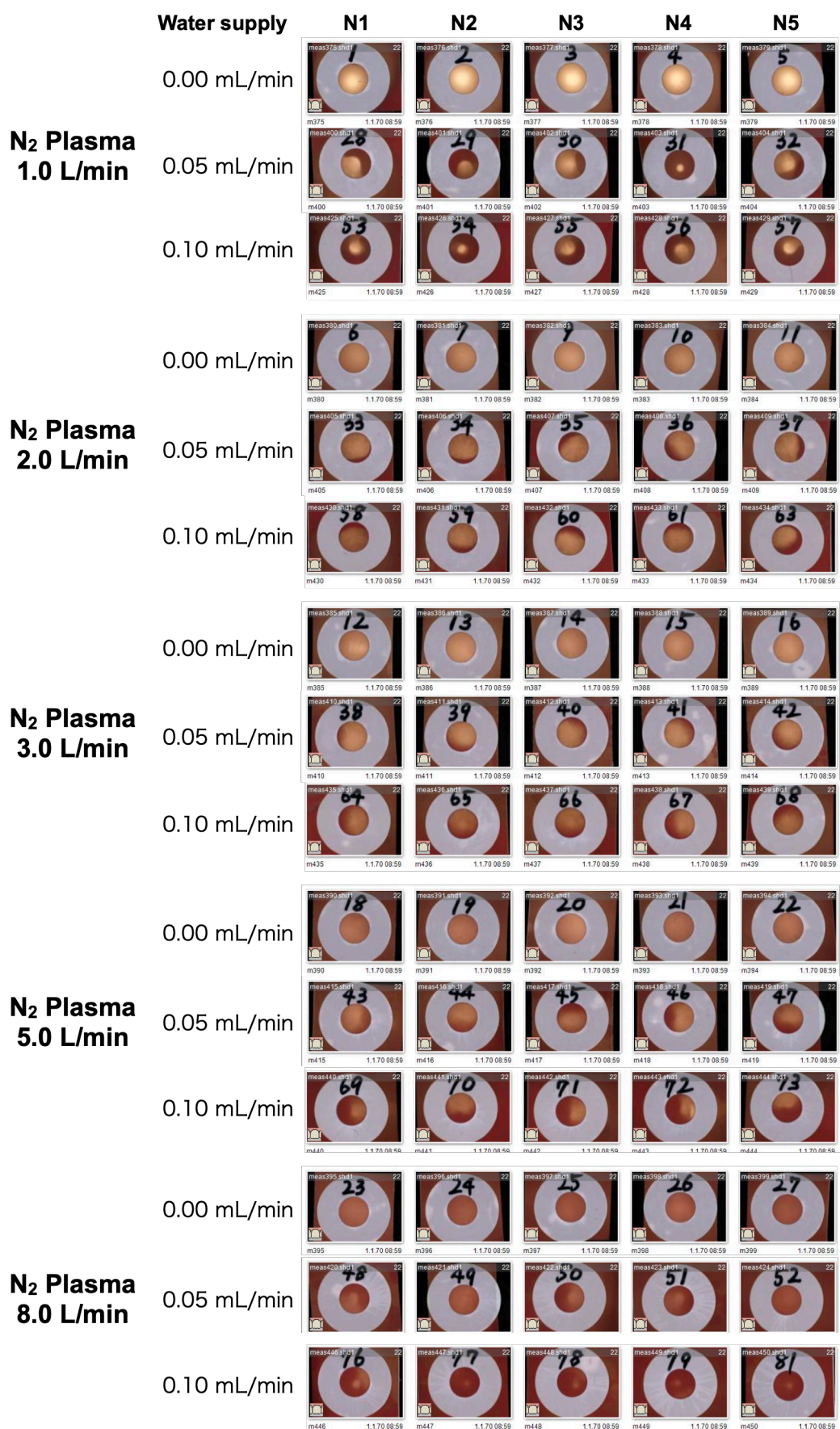


図 5-11 各条件のプラズマミストで処理したヘマトポルフィリン染色紙の写真

5.3 まとめ

本章では、大気圧低温プラズマを用いた応用として、歯科材料の接着と歯科ホワイトニングへの応用について記述した。大気圧低温プラズマを用いた歯科材料の接着ではジルコニアの接着の前処理として、大気圧低温プラズマ照射の有効性を実証した。窒素プラズマの10秒の処理したジルコニア試料では18.5 MPaのジルコニア-レジンセメント間の接着強度を得ることができ、未処理と比較して約1.9倍の接着強度となった。この接着強度は従来のジルコニアの接着の前処理で用いられているサンドブラストと同等の接着強度であった。ジルコニア試料に窒素プラズマを照射すると、表面のC-C, C-H結合の割合が減少したことから、ジルコニアに付着した有機物汚れが除去され、高い接着強度が実現されたと考えられる。一方で、酸素プラズマの10秒の処理では、表面の有機物汚れが除去され、ジルコニアとレジンセメントの化学結合に重要な役割を果たすZr-OHの結合の割合が増加したにも関わらず、接着強度の向上が見られなかった。レジンセメントの前処理に酸素プラズマ照射を用いる研究では、接着剤内での重合の阻害や接着界面の空隙の増加などが報告されている。ジルコニア-レジンセメント間の接着においても、これらの現象が接着強度の向上を阻害したと考えられる。ガス種や照射条件などを適切に選択したプラズマ処理を応用することで、将来的にはサンドブラスト処理に代わるチェアサイドで使用可能な前処理装置を構築できる可能性がある。

歯科ホワイトニングへの応用では、水分供給量0.05 mL/minかつ窒素ガス流量3 L/min、または水分供給量0.10 mL/minかつ窒素ガス流量2 L/minの条件で生成したプラズマミストから40℃以下で最も高い漂白効果が得られることを明らかにした。大気圧低温プラズマを用いたホワイトニング処理によって、高濃度の過酸化水素薬剤を用いない安全性の高い歯科ホワイトニング手法としての確立が期待される。今後プラズマミストを実用するためには、より詳細なプラズマミストの生成条件検討が必要であることが示唆された。また、将来的にプラズマのガス温度制御と組み合わせることで患者への負担の少ない手法が望まれる。

本章を通して、マルチガス温度制御プラズマの様々なガス種のプラズマ生成が歯科分野応用に対して有効であることが示された。今後はプラズマのガス温度制御も踏まえた照射条件の検討が期待される。将来的には *In vivo* での実験も含めた継続的な研究が望まれる。

第 6 章

マルチガス温度制御プラズマの 植物工学への応用

6.1 マルチガス温度制御プラズマを用いた植物細胞のゲノム編集ツールの開発

ゲノム編集は、ZFN (zinc-finger nuclease) や TALEN (transcription activator-like effector nuclease), CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated protein 9) などのゲノム編集酵素を用いて特定の DNA 配列を切断し、修復システムを利用してゲノム DNA に変異を導入するものである。この方法を用いれば、対象の生物のゲノム DNA に外来遺伝子を組み込まずに変異が導入可能であり、外来遺伝子がゲノム DNA に組み込まれる遺伝子組換えとは大きく異なる。特に 2015 年に Science 誌の breakthrough of the year に選出され^[96], 2020 年にはノーベル化学賞を受賞した CRISPR-Cas9^[97]は、標的配列に容易に変異を導入できる技術として、医薬品開発や遺伝子治療、農林水産などの分野で注目を集めている。

例えば、農作物での応用ではゲノム編集の登場によって品種改良が大きく変わろうとしている。これまでの農作物の品種改良では、優れた性質を持つ作物同士を掛け合わせることを何世代もの間繰り返す方法や偶発的な突然変異を利用する方法が取られており、長い時間と多くの労力がかかるものであった。さらに、遺伝子組換えで作出した最終産物には外来遺伝子が含まれているので、市場に出すためには外来遺伝子を除去し、無いことの証明をする必要があり、さらに世代の長い植物などでは外来遺伝子の除去が困難であるといった問題もある。しかし、ゲノム編集の登場によってこれらの品種改良の工程を短縮し、効率的に目的の性質を持つ外来遺伝子の含まない農作物を作り出すことが可能となった。CRISPR-Cas9 を用いた植物のゲノム編集は、シロイヌナズナやタバコなどのモデル植物はもちろんのこと、イネ、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、リンゴ、ソルガム、トマトなど様々な作物で利用できることが示され^{[98],[99]}, 応用研究が進められている。

ゲノム編集では、Cas9/sgRNA などのゲノム編集酵素を細胞内に導入する必要がある。動物細胞ではトランスフェクションなどを用いて容易にゲノム編集酵素を導入することができるが、植物には、クチクラ層や細胞壁といった構造が存在しているため、酵素の形では細胞に導入が困難であった。そのため、多くの場合は遺伝子組換えを利用して植物細胞に CRISPR-Cas9 遺伝子を導入した後、除去する手法が用いられていた。これらのことから、遺伝子組換えを用いないゲノム編集酵素導入ツールが求められていた。

近年、大気圧低温プラズマが開発され、低温でのプラズマ照射が可能となったことから、生体細胞への応用も進んでいる。これらの研究の中で、植物細胞へのタンパク質導入にプラズマ照射が応用できることが示されている^[7]。本研究では、植物細胞へのゲノム編集酵素の導入を目的として、ナス科植物のモデルであるタバコのゲノム編集にマルチガス温度制御プラズマを用いた。本節では、マルチガス温度制御プラズマの照射条件の検討と CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集実験について記述する。

6.1.1. 植物細胞へのプラズマの照射条件の検討

植物へプラズマを照射する場合、最も問題となるのはガス温度であると考えられる。そのため、植物に対してダメージなくプラズマを照射できる温度を検討するため、ガス温度を変化させたプラズマをタバコ葉片に照射し、葉の状態を観察した。

実験では、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の葉片にガス温度を制御したプラズマを照射した。照射の様子を図 6-1 に示す。プラズマジェット先端の流路に液体窒素で冷却した

ヘリウムガスを循環することでプラズマジェットを冷却し、間接的にプラズマのガス温度を冷却する。プラズマガスには従来研究で高いタンパク質導入効果が見られた窒素と二酸化炭素^{[7],[68]}を用いて、ガス流量は 5 L/min とした。ムラシゲスクーグ寒天培地上に配置されたタバコ葉片に対して、冷却したプラズマを 5 mm 上方より 5 または 10 秒間照射した。また照射時の温度を測定するため、同じ条件で生成したプラズマのガス温度を熱電対で測定した。プラズマで処理された葉片は別のムラシゲスクーグ寒天培地に移され、25℃、明暗サイクル(Light: Dark)を 16:8 時間に設定した植物用グロースチャンバーで培養した。

ガスを冷却せずにプラズマを生成すると二酸化炭素と窒素プラズマのガス温度はそれぞれ 35, 31℃となった。冷却を行うとプラズマのガス温度は、それぞれ 23, 19℃となった。プラズマを照射したタバコ葉片の様子を図 6-2 に示す。照射時間 5 秒の結果では、プラズマ照射直後では処理前と比較して、違いは観察されなかった。冷却していないプラズマを照射して 5 日目の葉の表側の観察では、未処理と比較して変化は見られなかった。一方で葉の裏側(気孔の多い側)では、窒素のプラズマ照射において、軽度の損傷が確認された。冷却したプラズマでは、照射後 5 日目の葉の表側および裏側で、損傷は確認されなかった。照射時間 10 秒の結果では、プラズマ照射直後では処理前と比較して、違いは観察されなかった。冷却していないプラズマを照射すると 5 日目で葉の表側に黄色の斑点と葉の色抜けが観察された。また葉の裏側では、円形の損傷が確認された。一方で冷却したプラズマでは、照射後 5 日目の葉の表側において未処理との違いは見られなかった。葉の裏側では、二酸化炭素と窒素の両方で軽度の損傷が見られた。

これらのことから、タバコ葉片へのプラズマの照射条件としては、冷却したプラズマを用いて、処理時間は 5 秒以内が良いと考えられる。

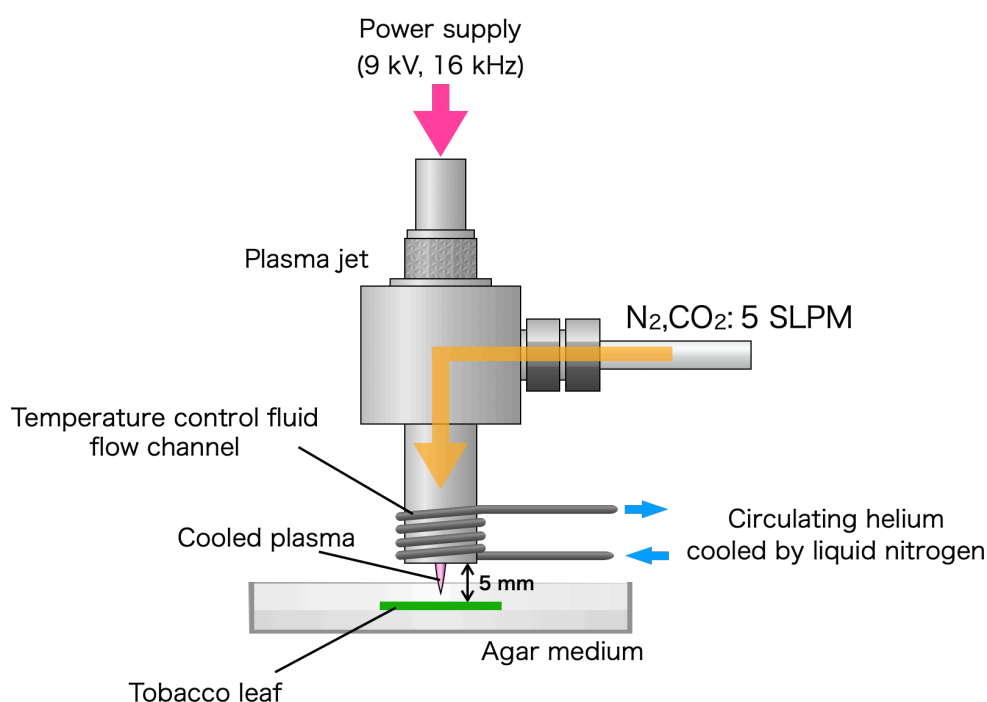


図 6-1 タバコ葉片への低温プラズマの照射の様子

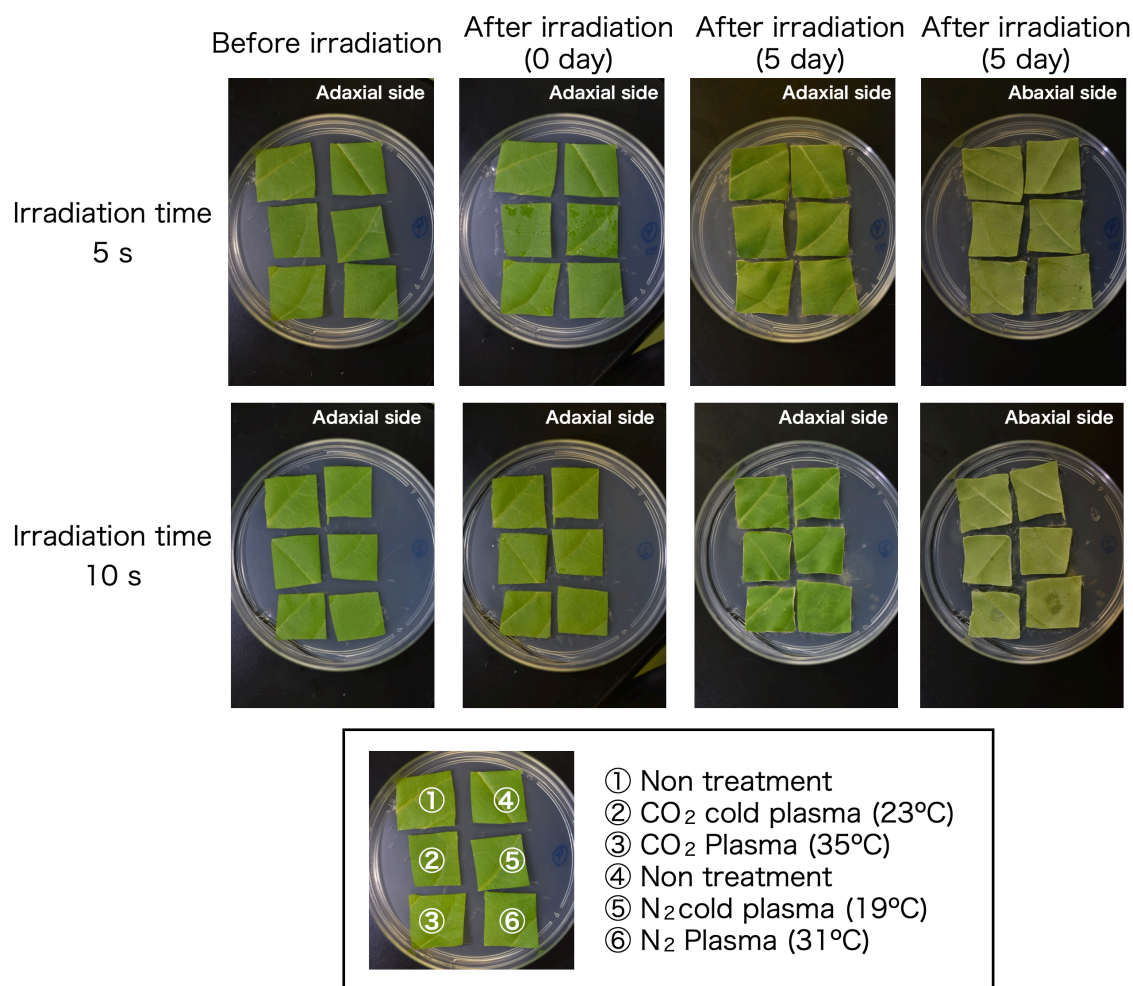


図 6-2 プラズマを照射したタバコ葉片の観察

6.1.2. プラズマを用いたタバコ葉片への緑色蛍光タンパク質の導入実験

ゲノム編集酵素の導入におけるプラズマの照射条件を検討するため、プラズマ照射によるタバコ葉片への緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) の導入実験を行った。タバコは、25°C、明暗サイクル(Light: Dark)を 16:8 時間に設定した生育室で栽培した。GFP には、His-sGFP-CyaA (histidine-tagged superfolder green fluorescence protein fused to adenylate cyclase) を用いた。ムラシゲスクーグ寒天培地上に配置した 2 cm 角のタバコ葉片の上方から二酸化炭素と窒素のプラズマを 2 または 5 秒間照射した。また同様の照射条件でプラズマのガス温度を測定した。照射後のタバコ葉片は照射した面を直ちに 50 µg/mL の His-sGFP-CyaA を含む PBS (phosphate-buffered saline) に浸し、25°Cで一晩静置した。その後、共焦点顕微鏡による明視野、葉緑体の自家蛍光、GFP 蛍光の観察を行った。

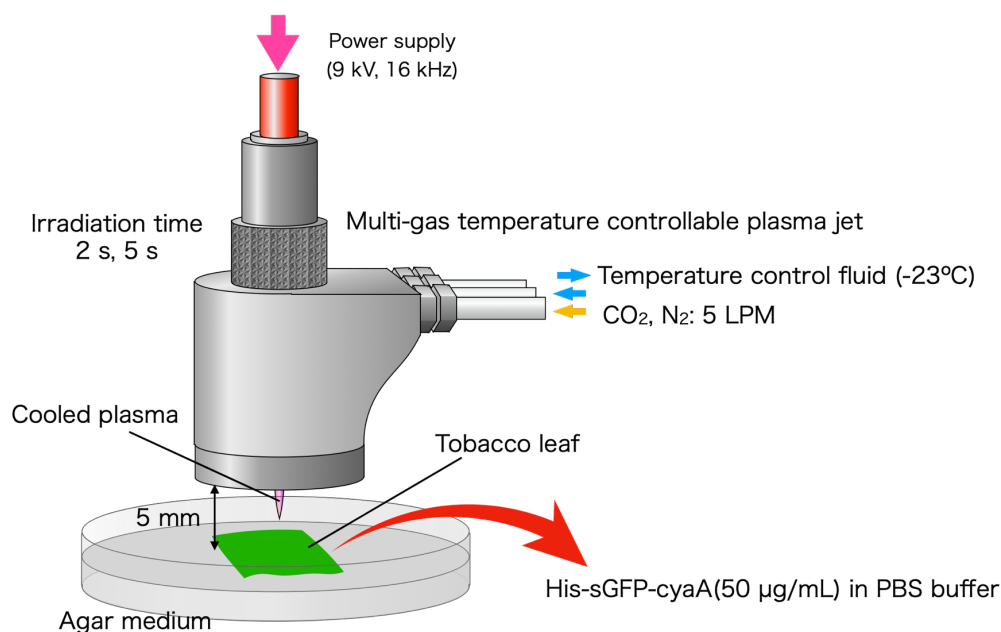


図 6-3 タバコ葉片への緑色蛍光タンパク質の導入実験

二酸化炭素と窒素プラズマのガス温度を図 6-4 に示す。プラズマは Time=0 で生成し、Time=15 で生成を停止した。ガスもプラズマ生成と同じタイミングで供給している。二酸化炭素ではプラズマを生成する前では約 19°Cであった。プラズマを生成すると 5 秒で約 24°C, 15 秒では 25°Cとなった。プラズマ生成を停止すると 5 秒でプラズマ生成前の温度以下となった。窒素プラズマでは、プラズマを生成する前では約 18.5°Cであった。プラズマを生成すると 5 秒で約 22.5°C, 15 秒では 25.5°Cとなった。プラズマ生成を止めると 5 秒でプラズマ生成前の温度以下となった。

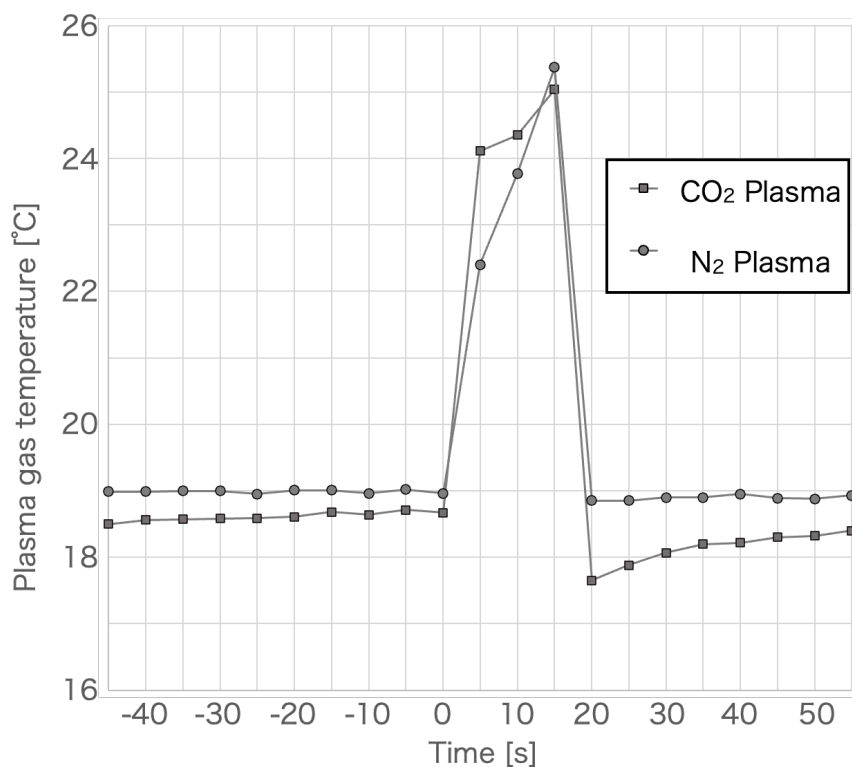


図 6-4 二酸化炭素および窒素プラズマのガス温度

窒素プラズマを用いて GFP の導入を行ったタバコ葉片を図 6-5 に示す。明視野像では、窒素ガスの照射とプラズマの照射では大きな差は見られず、表皮細胞も形を保っていた。窒素のガスを照射した場合では僅かな緑色の蛍光が観察されたが、これは葉緑体の蛍光像と一致していたので自家蛍光と考えられる。窒素のプラズマを照射した場合には GFP の強い蛍光像が見られた。この蛍光は葉緑体の蛍光とは一致しておらず、導入された GFP の蛍光であると考えられる。窒素プラズマでは、葉の細胞にダメージを与えることなく、2 秒および 5 秒の窒素プラズマ照射で GFP の導入が可能なが示された。なお、2 秒の窒素プラズマの照射した際の葉緑体の自家蛍光, GFP 像は、保存時の操作ミスにより白黒画像となってしまったが、蛍光は問題なく確認することができる。

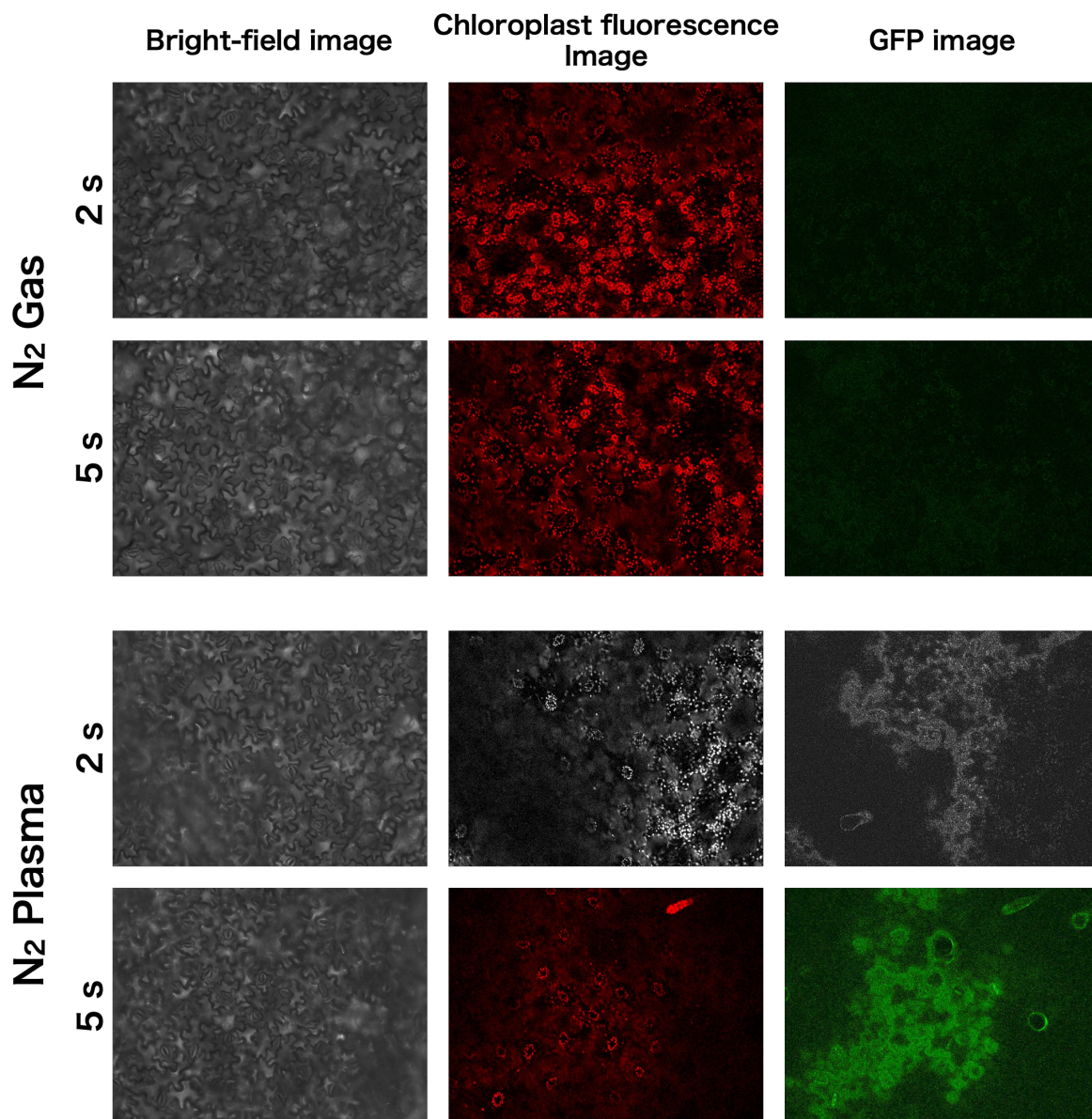


図 6-5 窒素プラズマを用いたタバコ葉片への GFP の導入

二酸化炭素プラズマを用いて GFP の導入を行ったタバコ葉片を図 6-6 に示す。明視野像では、二酸化炭素ガスとプラズマの照射で大きな差が見られた。二酸化炭素ガスの照射では表皮細胞は形を保っていた。しかし、二酸化炭素のプラズマを照射では、表皮細胞同士の境目がはっきりせず、葉の細胞へのダメージが見られた。二酸化炭素のガスを照射した場合は僅かな GFP 蛍光が観察されたが、葉緑体と一致していたので自家蛍光と考えられる。二酸化炭素プラズマを照射した場合には GFP の強い蛍光が見られた。この蛍光のうち葉緑体の蛍光像とは一致しなかった部分が導入された GFP の蛍光であると考えられる。二酸化炭素プラズマの照射では、葉の細胞にダメージを与えているものの 2 秒および 5 秒の照射で GFP の蛍光が示された。細胞がダメージを受けているところでも GFP の蛍光が見られたが、これに関しては生きた細胞内に導入された GFP であるか、壊れた細胞に拡散によって導入された GFP なのかは明らかでない。

窒素プラズマ照射による細胞内への GFP の導入の機序は、クラスリンによるエンドサイトーシスが寄与していると考えられる。クラスリン阻害剤によってプラズマの GFP 導入が抑制される結果が得られており、窒素プラズマを照射された植物細胞ではクラスリンによるエンドサイトーシスによって、GFP が細胞膜内へ輸送されたと考えられる^[100]。

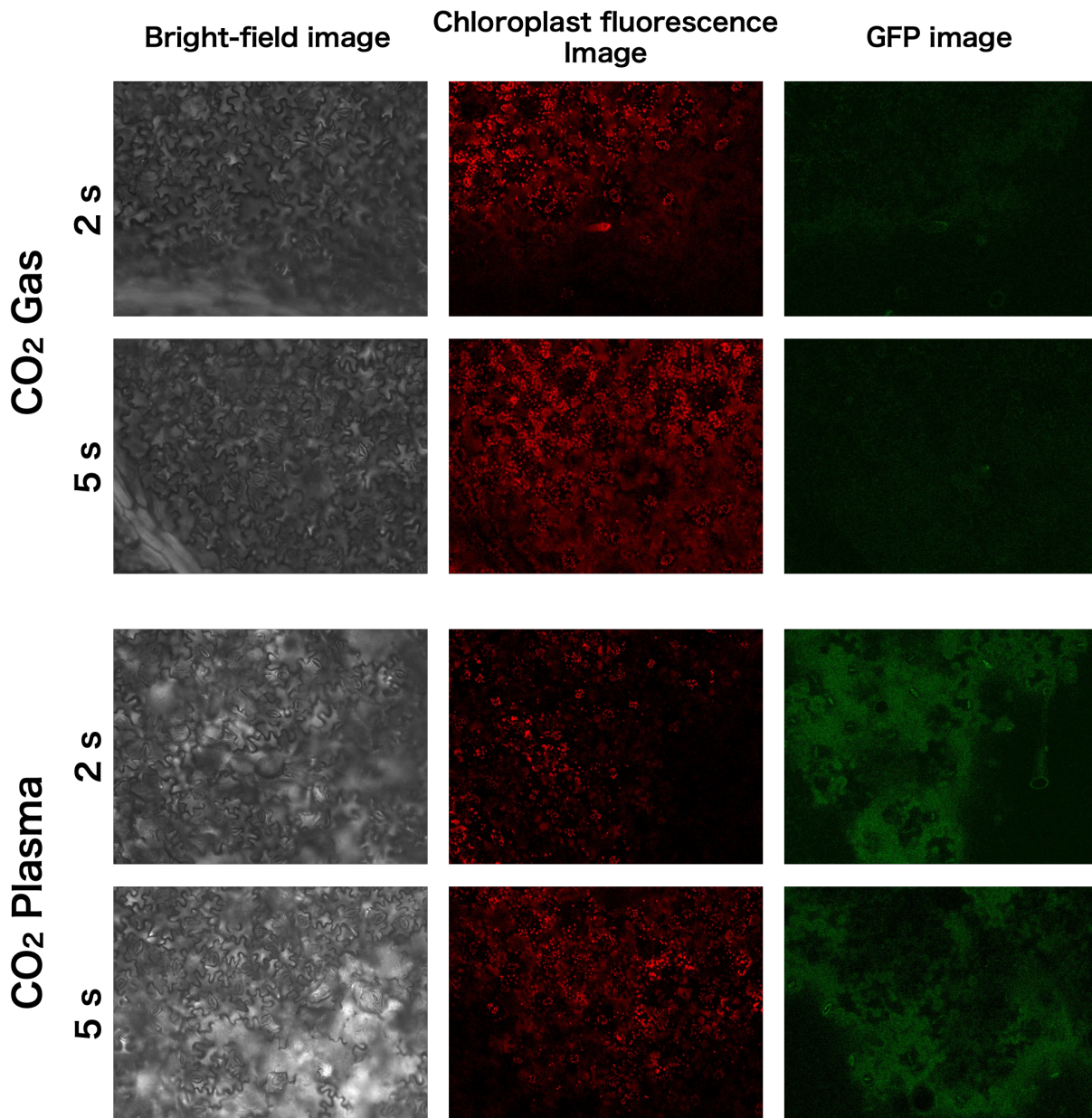


図 6-6 二酸化炭素プラズマを用いたタバコ葉片への緑色蛍光タンパク質の導入

6.1.3. CRISPR-Cas9 を用いたタバコのゲノム編集^[101]

ゲノム編集ツールとしてプラズマ照射の有効性を実証するため、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集実験を行った。CRISPR-Cas9 は、DNA の二本鎖切断を行う Cas9 タンパク質と特定の配列を認識する sgRNA から構成される。Cas9 タンパク質は 3 塩基の PAM (protospacer adjacent motif) 配列を認識して、その 3, 4 塩基上流で DNA の二本鎖を切断する^[102]。sgRNA は PAM 配列の上流 20 塩基に相補する配列を含むように設計することで Cas9 をゲノム上の標的配列に誘導する。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の手順としては、編集したい標的遺伝子の PAM 配列を決定し、その上流の相補配列を含むように sgRNA を作製する。Cas9 が核移行シグナルを有しているので、sgRNA と Cas9 タンパク質を融合させた Cas9/sgRNA を植物細胞内に導入す

ることで Cas9/sgrNA が核内に移行し、標的配列の PAM 配列上流で DNA の二本鎖の切断が行われる。

この実験では、sGFP (superfolder green fluorescence protein) -waxyTALEN-HPT (hygromycin phosphotransferase) レポーター遺伝子が入った遺伝子組換えタバコのゲノム編集を行った。sgRNA は waxy TALEN 領域を標的として設計した。もし、ゲノム編集されたならば図 6-7 に示す waxy TALEN 配列内の PAM 配列の 3 もしくは 4 塩基上流で二本鎖が切断され、変異が導入される。1/3 の確率によって下流のストップコドンとフレームがずれて翻訳されなくなり、ハイグロマイシン耐性遺伝子が活性化される。なお、sGFP と waxy TALEN, HPT 配列を、カナマイシン耐性遺伝子を有する pBI121 ベクターに組み込んだ pBI121-sGFP-waxyTALEN-HPT ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いてタバコに導入することでレポーター遺伝子をタバコ葉に導入した。導入された葉をカナマイシン含有培地で培養すると、遺伝子導入された細胞からカルスが形成され、さらに培養して形質転換タバコを作出した。実験には得られた種子を播種して生育した次世代のタバコ葉を用いた。

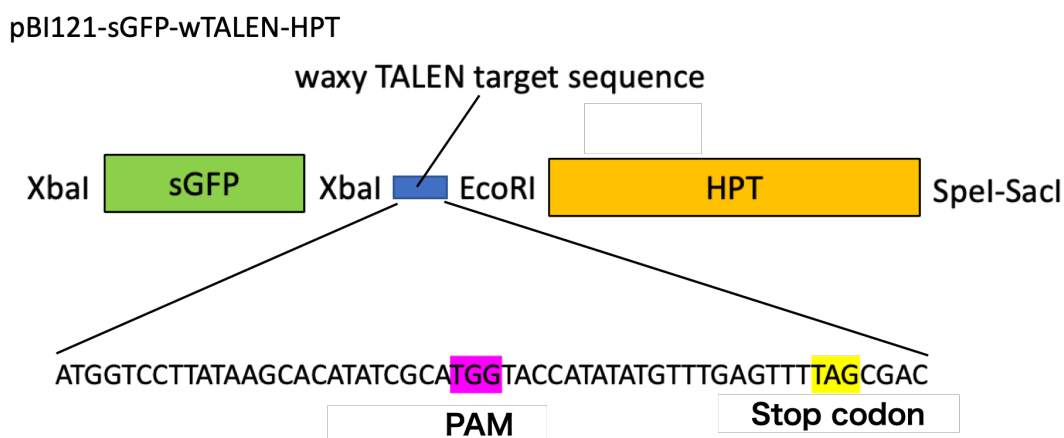


図 6-7 pBI121-sGFP-waxyTALEN-HPT ベクター

sgRNA の調整のために、Guide-it scaffold Template(5'-GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTA-3') と GFP-wx-Guide it(5'-TGCGGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTTATAAGCACATATCGCAGTTTTAGAGCT-3')を用いて DNA 断片を作成した。この断片を鋳型にして、ScriptMAX[®] Thermo T7 Transcription kit (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan)を用いて sgRNA を調整した。Cas9 と sgRNA を 5:1 になるように混合し、NEBuffer3 中で 30 分間、4℃でインキュベートすることで、Cas9/sgrNA を作成した。

プラズマ照射とその後のゲノム編集細胞の選別過程を図 5-5 に示す。この実験では 6.1.2 と同様の手法で窒素プラズマをタバコ葉片に 2 秒間照射した。処理された葉片は、照射後すぐに Cas9/sgrNA と 10 mM MgCl₂ を含む 400 μL の PBS に浸漬し、室温で一晩静置した。葉片をカルス形成培地 (1 倍の Murashige and Skoog, 1 倍の Murashige and Skoog vitamin [0.1 μg/mL チアミン塩酸塩, 0.5 μg/mL ピリドキシン塩酸塩, 0.5 μg/mL ニコチンアミド, 2 μg/mL グリシン, 100 μg/mL myo-イノシトール], 0.1 μg/mL α-ナフタレン酢酸, 1 μg/mL 6-ベンジルアミノプリン, 30 g/L スクロース, 8.5g/L 寒天)に移植し、28℃で 2 日間培養した。その後 1 つの葉片を四等分し、50 μg/mL ハイグロマイシンを含むカルス形成培地に移植し、28℃で静置した。この葉片

は、1 週間ごとに新しい 50 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン含有カルス形成培地に移し、カルス形成させた。なお、ゲノム編集細胞はハイグロマイシン耐性を有するので、ハイグロマイシン含有培地で増殖することからゲノム編集細胞のみを選別できる。

選別されたタバコの細胞から DNA を抽出し、PAM 配列付近が合成される様に設計した sGFP-441F と HPT3 のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction PCR) によって増幅した。その後シーケンサーによって DNA 配列を確認した。

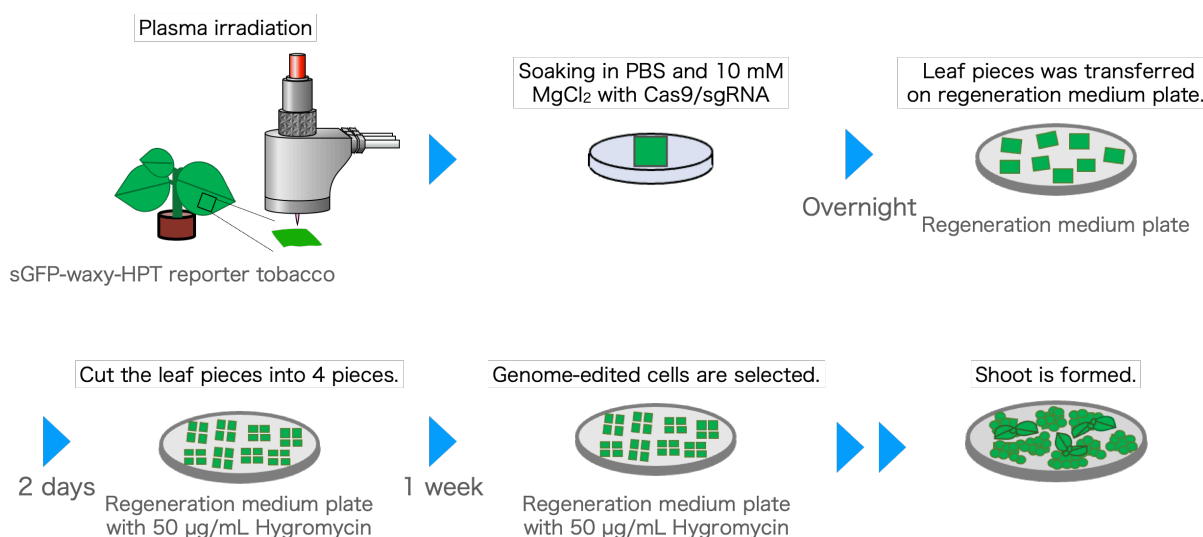


図 6-8 プラズマ照射からのゲノム編集細胞の選別まで過程

ゲノム編集細胞の選別の結果を図 6-9 に示す。選別後の写真では、窒素のプラズマを 2 秒間照射し、Cas9/sgRNA 溶液に浸漬させた葉片の一部において、ハイグロマイシン耐性をもつカルスを形成させることに成功した。この最も大きいカルス部分の一部を採取し、配列をシーケンスした。図 6-10 に PAM 配列付近のゲノム配列を示す。上の配列はゲノム編集されたと思われるタバコ細胞の配列で、下の配列は元の waxyTALEN 配列である。もしゲノム編集が理想通りに行われていれば、下の配列で示す PAM 配列の 3 もしくは 4 塩基上流の位置で二本鎖切断が起こり、変異挿入あるいは塩基置換が起こる。上の配列では、PAM 配列の 1 塩基上流で 4 塩基欠損を生じ、その下流にあるストップコドンが無視され、さらに下流のハイグロマイシン耐性遺伝子が発現したと考えられる。よって、今回の実験を通して、タバコの葉に窒素のプラズマを照射して Cas9/sgRNA 溶液に浸漬するという簡便な手法によって、植物細胞内に Cas9/sgRNA が導入され、ゲノム編集が行えることが明らかとなった。

窒素プラズマ照射によるゲノム編集酵素の導入の機序は直接調べられていないが、GFP の導入と同様にクラスリンによるエンドサイトーシスの寄与が予想される^[100]。今回のゲノム編集では、理想的な二本鎖切断位置から 2 塩基のズレが生じたが、これが偶発的なものであるのか、プラズマ照射など環境によるものであるのかは不明であり、今後も実証実験を重ねていく必要がある。

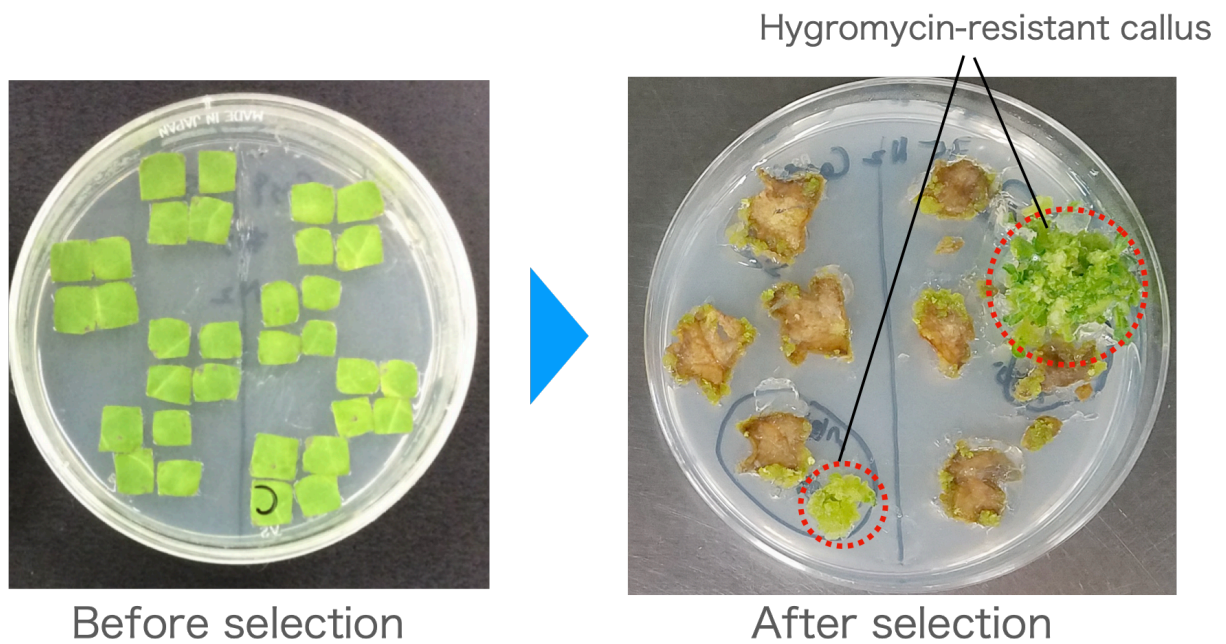


図 6-9 ハイグロマイシンによるタバコ細胞の選別

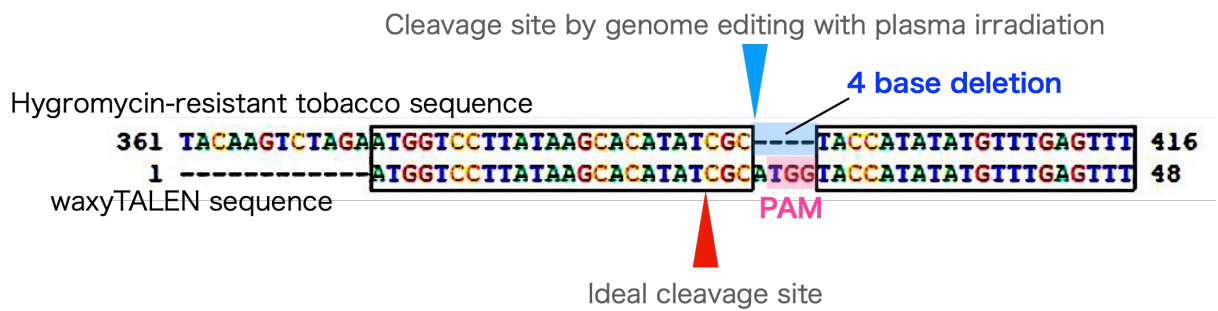


図 6-10 ハイグロマイシン耐性を獲得したタバコ細胞の waxyTALEN 配列付近のゲノム配列

6.2 水耕栽培における大気圧低温プラズマの応用

水耕栽培とは、土を用いずに植物が必要とする栄養素を含んだ水(液肥)を用いて植物を生育する手法であり、気候によらず安定した食料供給の方法として注目されている^[103]。水耕栽培では多くの場合、植物工場など水耕栽培のシステム内で液肥を循環させて使用する方法が取られる。これにより植物の状態の維持管理が容易になり、周辺の汚染を最小限にとどめることができる。しかし、欠点も存在し、特に循環する液肥で微生物汚染などを引き起こしてしまうと、そのシステムの全体の植物に影響が発生する^[104]。そのため、液肥を循環する水耕栽培では、何よりもシステム中を清潔に保つことが重要である。

近年大気圧低温プラズマは植物の栽培においても応用が検討されており、植物の成長促進^[8]や発芽促進^[105]などの様々な有益な効果が示されている。水耕栽培においても、液肥をプラズマで処理することで病原性微生物の殺菌も報告されている^{[106],[107]}。この研究では、イチゴの水耕栽培へのプラズマの応用を行った。イチゴは収益性の高い作物であり、日本国内の農業生産において重要な作物である。このイチゴの栽培では、萎黄病、炭疽病、灰カビ病などのイチゴの苗を枯死させる疫病により大きな被害を受けている。これらの疫病は感染後一定期間の病徴が表れず、外見での判断も困難であるため、疫病の発生が連鎖し被害が拡大する^[108]。そのため、拡大防止のための予防が重要となる。本節ではプラズマによるイチゴ疫病の原因菌の殺菌と液肥循環システムへの応用、液肥成分への影響を調べた結果を述べる。

6.2.1 プラズマ照射によるイチゴ萎黄病の原因菌の殺菌

はじめに、根や茎などにプラズマを直接照射して殺菌を行うことを想定した実験を行った。今回の実験ではイチゴ萎黄病の原因菌である糸状菌 *Fusarium oxysporum* NBRC 31982 を用いた。*F. oxysporum* は、ポテトデキストロース斜面培地に継代し、室温(22℃前後)で1週間以上培養した。孢子液は斜面培地に5%の界面活性剤(ポリソルベート80)を含む純水を2 mL 分注し、白金耳にてカビの孢子を回収することで作製した。孢子液 100 μ L をポテトデキストロース寒天培地上の全体に塗布した。図 6-11 に示すように 3 L/min の酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマを 6 mm 上方から 300 秒照射した。また比較のため、ガス照射の効果も比較した。照射後の寒天培地は室温で2日間培養し、その後写真を撮影した。

結果を図 6-12 に示す。未処理の寒天培地では寒天培地全体で *F. oxysporum* の増殖が確認された。それぞれのガス種のガスを照射した場合も同じく寒天培地全面で *F. oxysporum* の増殖が確認された。プラズマ照射では、寒天培地中央付近に *F. oxysporum* が増殖していない円形のエリア(阻止円)が確認され、全てのガス種のプラズマ照射で殺菌効果を確認した。また、この阻止円は二酸化炭素、酸素、窒素および空気の順に大きく、二酸化炭素の照射で最も広いエリアで殺菌効果が確認された。窒素のプラズマ照射では、阻止円が片側に大きく偏っていた。これは照射時にプラズマジェットが傾くことなどにより、プラズマのガス流に差ができたためだと考えられる。

これらのことから、イチゴ萎黄病の原因菌である *F. oxysporum* に大気圧低温プラズマを直接照射することで殺菌効果が得られることが示された。

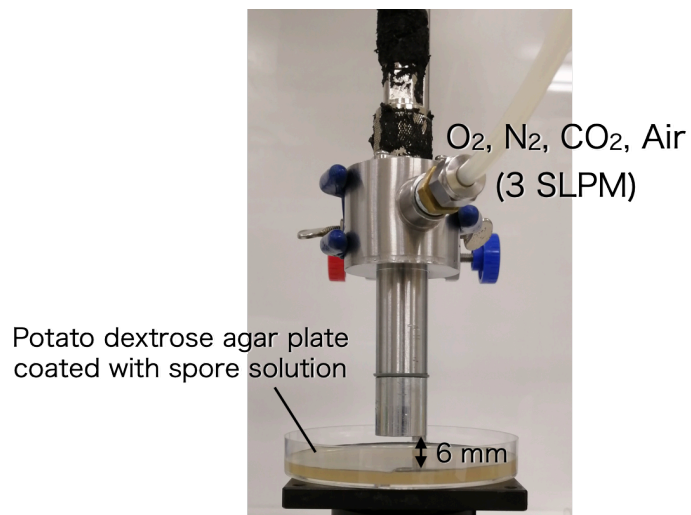


図 6-11 *F. oxysporum* の孢子液を塗布した寒天培地へのプラズマ照射

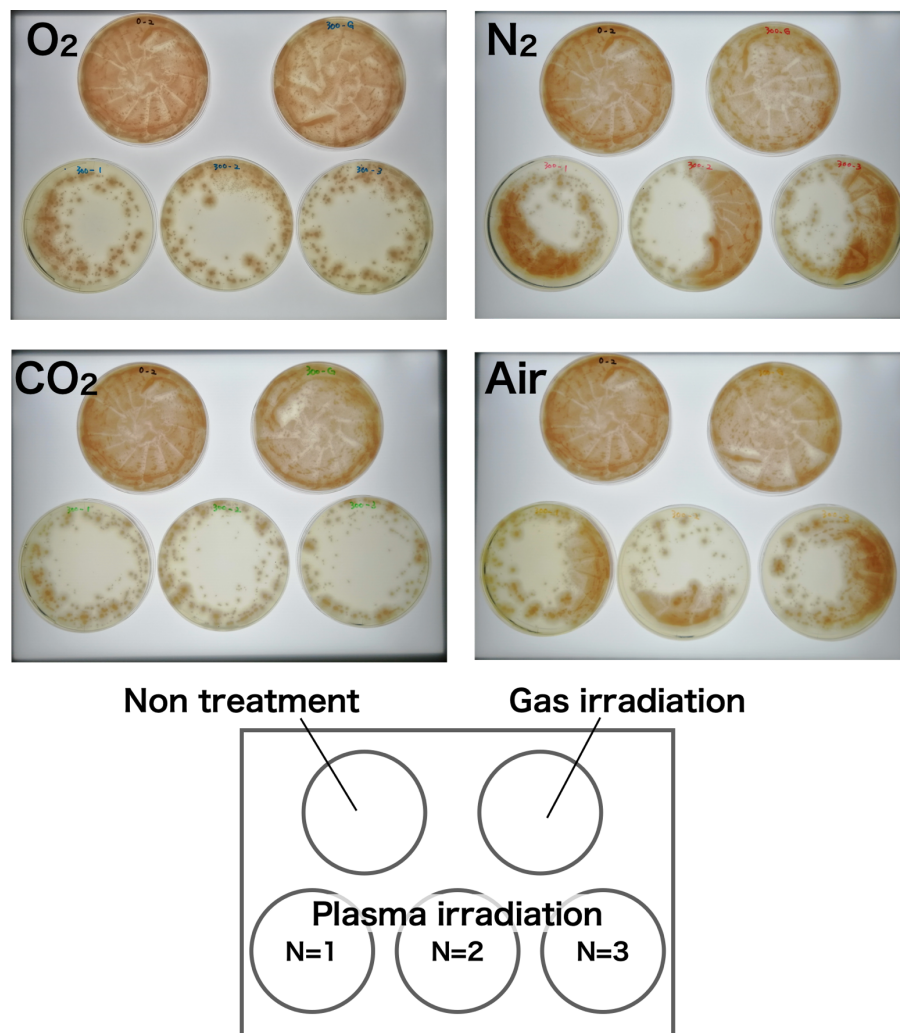


図 6-12 プラズマ照射による寒天培地上の *F. oxysporum* の殺菌

6.2.2. プラズマバブリングによる液肥中のイチゴ萎黄病の原因菌の殺菌

液肥中のイチゴ萎黄病の原因菌の殺菌を想定して、プラズマバブリングによる殺菌実験を行った。今回の実験ではイチゴ萎黄病の原因菌である糸状菌 *Fusarium oxysporum* NBRC 31982 を用いた。*F. oxysporum* は、ポテトデキストロース斜面培地に継代し、室温 (22℃ 前後) で1週間以上培養した。胞子は斜面培地に 0.5% の界面活性剤 (ポリソルベート 80) を含む精製水を 2 mL 分注し、白金耳にてカビの胞子を回収して作製した。得られた胞子液は遠心分離と精製水による洗浄を 2 回繰り返すことで界面活性剤を除去した。プラズマバブリングでは実用時を考えて Air プラズマを選択した。水および 800 倍希釈の液肥 (ワンタンクシリーズ, アグリワークス株式会社) と胞子液を混合し、それぞれ菌懸濁液を作製した。空気は、コンプレッサーから供給し、乾燥機を通した後に用いた。50 mL の菌懸濁液を 3 L/min の空気のプラズマバブリングで処理し、処理時間ごとに胞子液を採取した。その後段階希釈を行いコロニーカウントで生菌数を評価した。また、比較のためガスバブリングの殺菌効果も評価した。

結果を図 6-13 に示す。菌懸濁液の溶媒が水の場合、ガスバブリングでは、わずかに生菌数が低下したが、10 分の処理でも生菌数は1桁も減少しなかった。プラズマバブリングで処理をすると 2 分間で生菌数を約 1 桁減少させ、その後処理時間 10 分時まで生菌数を検出下限値以下まで低下させる殺菌効果を示した。菌懸濁液の溶媒が液肥の場合では、ガスバブリングでは、徐々に生菌数が低下したが、10 分の処理でも生菌数は1桁も減少しなかった。プラズマバブリングによって10分間処理した場合、ガスバブリングによる生菌数の変化と優位な差が見られなかった。

よって空気のプラズマバブリングでは、菌懸濁液の溶媒が水の場合でのみ殺菌効果が得られた。溶媒が液肥の場合で殺菌効果が得られなかった理由としては、プラズマバブリングによって導入された活性種の失活が考えられる。導入された活性種は高い反応性を持っているため、液肥のような夾雑物がある環境下では夾雑物と反応して失活してしまい、活性種が殺菌効果に寄与しなかった可能性がある。

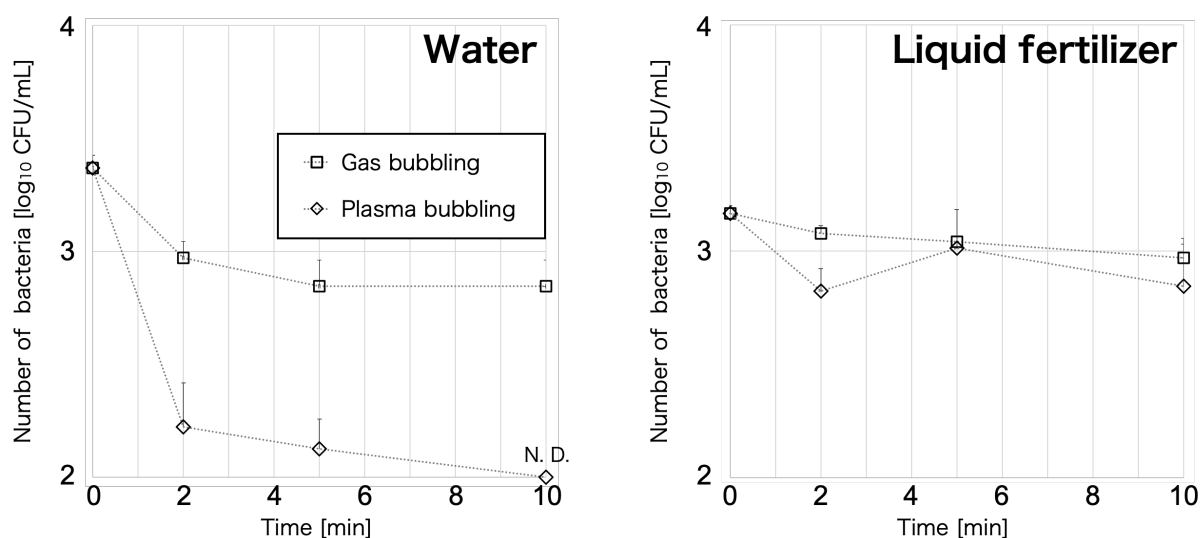


図 6-13 水中および液肥中の *F. oxysporum* に対するプラズマバブリングの殺菌効果

6.2.3. プラズマバブリングが液肥成分へ及ぼす影響

液肥中でプラズマバブリングを行うと殺菌効果が見られなくなることが明らかとなった。これは活性種が液肥の成分と反応したためと考えられた。したがって、プラズマバブリングを行うことで液肥の成分が変化する可能性がある。そこで本研究では、イオンクロマトグラフィーを用いて、プラズマバブリング前後の液肥の成分分析を行った。

超純水で 800 倍に希釈した液肥 (ワンタンクシリーズ, アグリワークス株式会社) 50 mL を酸素, 窒素, 二酸化炭素, 空気のプラズマバブリングで処理した。処理した液肥は処理時間 10, 20, 30 分時に 1 mL 採取され, メンブレンフィルターにてろ過後, イオンクロマトグラフィーによってイオン種を定量した。定量したアニオンは塩化物イオン Cl^- , 亜硝酸イオン NO_2^- , 硝酸イオン NO_3^- , リン酸イオン PO_4^{3-} , 硫酸イオン SO_4^{2-} で, カチオンはアンモニアイオン NH_4^+ , カリウムイオン K^+ , カルシウムイオン Ca^{2+} , マグネシウムイオン Mg^{2+} , ナトリウムイオン Na^+ であり, 植物が利用する主なイオン種を測定した。イオンクロマトグラフィーは電気伝導度検出器 (CDD-10AVP CONDUCTIVITY DETECTOR, 株式会社 島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて, 測定を行った。アニオンの測定での展開溶媒は, 四ホウ酸ナトリウム十水和物 1.5 mM, ホウ酸 5.8 mM, グルコン酸カリウム 1.5 mM, グリセリン 0.5 vol%, 1-ブタノール 3 vol%, アセトニトリル 4 vol% を含む超純水で, カラムには TSKgel IC-Anion-PW_{XL} PEEK (東ソー株式会社, Tokyo, Japan) を用いた。カラムオープン温度は 35°C に設定し, 流量は 1.2 mL/min, インジェクション量は 100 μL とした。カチオンの測定での展開溶媒は, 硝酸 2 mM を含む超純水を用いた。カラムには TSKgel IC-Cation-I/II HR (東ソー株式会社, Tokyo, Japan) を用いた。カラムオープン温度は 40°C に設定し, 流量は 0.8 mL/min, インジェクション量は 3 μL とした。

結果を図 6-14 に示す。未処理の液肥からは, 主に硝酸イオンが 148 ppm, リン酸イオン 28 ppm, カリウムイオン 44 ppm, カルシウムイオン 21 ppm, ナトリウムイオン 13 ppm が検出された。酸素のプラズマバブリングでは, 処理時間の延長に伴って, NO_3^- の量がわずかに増加し, 30 分処理した時点で 158 ppm となった。窒素, 二酸化炭素のプラズマバブリングでも同様の現象が確認され, 処理時間延長に伴って, NO_3^- の量がわずかに増加し, 30 分処理した時点でそれぞれ, 152, 156 ppm となった。空気のプラズマバブリングでは, NO_3^- の量が大きく増加し, 30 分処理した時点で 242 ppm となった。また, 10 分間のプラズマバブリングによって, 29 ppm の亜硝酸イオンが検出され, この亜硝酸イオンは処理時間を延長してもほとんど変化しなかった。

これらのことから, プラズマバブリングで液肥を処理するとは硝酸イオンや亜硝酸イオンなどの硝酸態窒素が増加する傾向が示された。窒素, リン, カリウムは肥料の三大要素とも呼ばれ植物にとって, 重要な元素である^[109]。Nam らは, イチゴの水耕栽培における窒素, リン, カリウム, カルシウムの栄養素量が収量と炭疽病の発生に与える影響を調べている。この中で, 0 から 30 mM まで窒素量を 5 mM ずつ増加させ収量を調べており, 最も収量が多かったのは 30 mM (硝酸イオンで 1860 ppm) となったことが報告されている^[110]。プラズマバブリングでは最も硝酸イオンが得られた結果でも 242 ppm であり, イチゴの生育上問題がない濃度変化であると考えられる。加えて, 濃度が 30 mM までは収量は増加傾向であることが報告されていることから, イチゴの収量増加が期待される。一方で炭疽病への罹患率は窒素量上昇することが報告されている^[110]。プラズマバブリングとの併用によって, 生育されるイチゴにどのような影響を与えるのか, 収量, 疫病の発病率なども含め, 詳細に検討する必要がある。

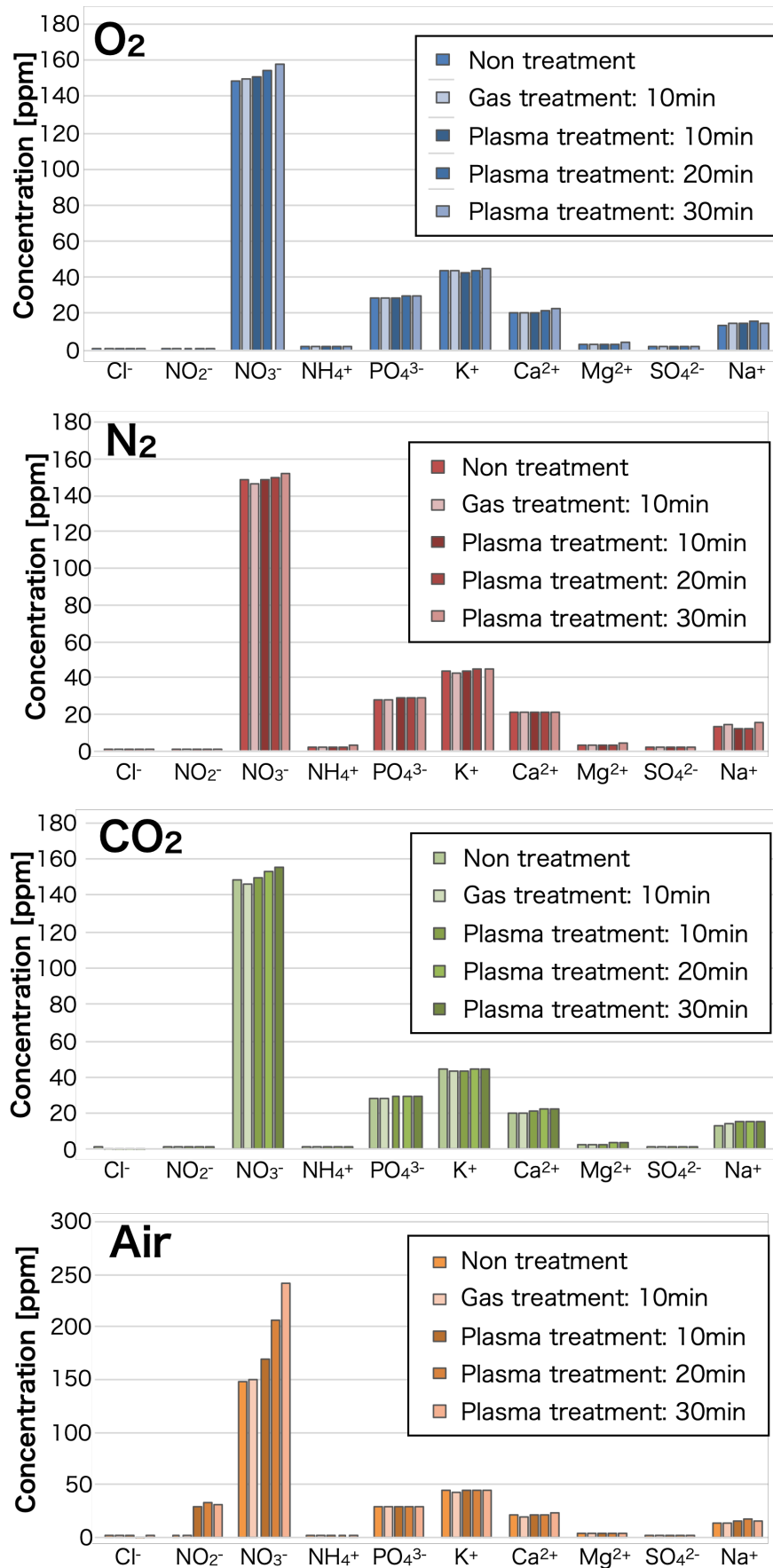


図 6-14 プラズマバブリングによる液肥中のイオン量変化

6.3 まとめ

本章では、マルチガス温度制御プラズマの植物工学への応用として、プラズマを用いたゲノム編集ツールの開発と水耕栽培へのプラズマバブリングの応用を行った。マルチガス温度制御プラズマを用いたゲノム編集ツールの開発では、窒素および二酸化炭素プラズマの照射によるタバコのゲノム編集を行った。窒素のプラズマのガス温度を 20℃前後に保つことでタバコ葉にダメージを与えずに照射できることを示した。しかし、温度を制御した窒素プラズマであっても、5 秒以上照射するとタバコ葉にダメージを与えてしまうことが示された。これらのことから、タバコ葉への応用では、20℃前後に制御したプラズマで 5 秒以内のプラズマ照射が適していることを明らかにした。20℃前後に制御した 2 および 5 秒のプラズマ照射によって、GFP の植物細胞内への導入を確認した。タバコのゲノム編集では、2 秒間の窒素プラズマ照射後に Cas9/sgRNA 溶液に浸すという簡便な操作により、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現に成功した。ハイグロマイシン耐性遺伝子を発現したタバコのカルス細胞を採取し、ゲノム配列を読み取ると PAM 配列の 1 塩基上流で 4 塩基欠損となった。これらのことから窒素プラズマを 2 秒間照射し Cas9/sgRNA 溶液に浸すという簡便な操作でゲノム編集が行えることが示された。これらの GFP や Cas9/sgRNA の導入では、クラスリンによるエンドサイトーシスが寄与していることが示された。

プラズマの水耕栽培への応用では、二酸化炭素、酸素、窒素、空気のプラズマを直接照射することによって、イチゴ萎黄病の原因菌である *F. oxysporum* の殺菌に成功した。また、水中に浮遊する *F. oxysporum* の胞子は、空気のプラズマバブリングを用いることで 2 分間の処理で生菌数を 1 桁減少させる殺菌効果を得た。しかし、液肥中の胞子に対する殺菌効果は確認されず、液肥中の成分との反応で活性種が失活している可能性が示された。プラズマバブリングによって液肥中では、硝酸態窒素の増加が見られ、成長促進などの効果が期待される。

これらの研究では、植物工学での応用におけるマルチガス温度制御プラズマの有用性を示した。ゲノム編集では、プラズマを照射することで植物細胞内にゲノム編集酵素を導入し、ゲノム編集が実現されたが、最適なプラズマの照射条件やその導入効率、利用可能な植物種など、まだまだ不明な点が多い。今後は様々な植物種でのゲノム編集も含め、実証実験を重ねていく必要がある。また、操作手順をマニュアル化し、誰でも扱うことのできる一つのシステムとして、プラズマを用いたゲノム編集ツールの設計開発を行う必要がある。プラズマの水耕栽培への応用では、今回対象としたイチゴ萎黄病以外の灰カビ病や炭疽病などの原因菌に対する殺菌効果を明らかにしていく必要がある。加えて、液肥中で殺菌効果を得るために、ガス種や処理方法の検討を進めていく必要がある。そして最も重要であるのが、実際にイチゴを用いた実証実験を行い、収量や疫病への罹患率などを調査していく必要がある。

第 7 章

結論

本論文では、様々なガス種のプラズマのガス温度を制御できるマルチガス温度制御プラズマジェットを開発し、その特性を調べた。また開発したマルチガス温度制御プラズマジェットを医療、農業分野に応用した。1章では、現在行われているプラズマを用いた応用を紹介し、大気圧下で様々なガス種でプラズマを安定して生成でき、そのガス温度を制御することのできるマルチガス温度制御プラズマが必要とされていることを示した。2章では、従来の大気圧低温プラズマの生成方法を解説し、近年開発されている新たな機能、構造をもった大気圧低温プラズマジェットについても紹介した。また、近年高まっているプラズマのガス温度制御への期待から開発されたプラズマのガス温度制御機構を紹介し、これらの先行技術のマルチガス化への課題点を示した。

3章では、マルチガス温度制御プラズマジェットの設計と金属3Dプリンタによる装置製作、製作したプラズマジェットの温度制御性能や活性種生成などの特性測定について記述した。従来の温度制御プラズマでは、ヘリウムプラズマの零下から100℃以上のガス温度の制御を実現していた。この温度制御の仕組みとしては、プラズマを生成する前のガス温度を変化させる事で、プラズマ生成後のガス温度を制御していた。ここから着想を得て、様々なガス種のプラズマを安定生成でき、そのプラズマのガス温度を制御できるマルチガス温度制御プラズマジェットの開発を行った。考案したマルチガス温度制御プラズマジェットでは、様々なガス種でプラズマを生成することのできるマルチガスプラズマジェットにプラズマ生成前のガス温度を変化させる温度制御機構を組み込んだ構造となっている。温度制御機構では、ヘリウムのみならず、酸素やアルゴン、窒素など分子性のガスにも対応できるように液体窒素を用いた過度な冷却は行わず、任意の温度に調整した温度制御流体(TCF)を用いることとした。このTCFとガスを、プラズマジェットの筐体を介して熱交換することで、プラズマのガス温度制御機構を実現した。この機構の動作を確認するため、プラズマジェットの筐体内部にTCFとガスの2つの流路を持つ試作版マルチガス温度制御プラズマジェットを金属3Dプリンタを用いて作製した。試作版マルチガス温度制御プラズマジェットでは、TCF温度を変化させることで、様々なガス種のプラズマのガス温度が制御可能なことを示した。加えて、流路構造や操作上の改良点が得られた。これらの改良点を踏まえ、数値流体解析等を用いてマルチガス温度制御プラズマジェットを完成させた。マルチガス温度制御プラズマジェットを用いて、窒素、酸素、二酸化炭素、アルゴンのプラズマを安定して生成させることに成功した。マルチガス温度制御プラズマジェットの筐体温度を-30℃から90℃まで変化させることで、二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素のガス温度はそれぞれ-17~77、-18~74.5、-20~78、-21~78℃の範囲で線形に変化した。プラズマのガス温度はそれぞれ29~108、3~85、28~108、17~106℃の範囲で線形に変化した。ガス温度はプラズマ生成により上昇し、二酸化炭素、アルゴン、窒素、酸素のプラズマの温度上昇幅は、プラズマジェットの温度が20℃のときで、31℃、15℃、41℃、34℃であった。全てのガス種において、プラズマのガス温度はTCFの温度に比例して変化するため、TCF温度を制御することでプラズマのガス温度を容易に制御できる。

プラズマによって生成される活性種はガス種によって大きく異なり、特に窒素プラズマでは130 μM を超えるOHラジカルが生成された。また、プラズマのガス温度の変化によっても、生成される活性種の濃度が変化した。特に二酸化炭素プラズマでは一重項酸素の生成量がプラズマのガス温度上昇によって著しく増加し、ガス温度90℃では30℃の8倍以上の一重項酸素が生成した。

開発したマルチガス温度制御プラズマジェットでは、様々なガス種のプラズマを安定生成し、そのガス温度を制御することに成功した。最低 3℃から最高 108℃までのプラズマのガス温度を実現したことから、植物や生体細胞など特に熱に弱いような対象へも応用が可能となった。プラズマのガス種やガス温度によって、生成される活性種の種類や量は大きく変化する。これは、活性種が寄与していると考えられる殺菌や止血、表面処理などの処理において、プラズマのガス種や温度を変えることで処理効果に変化することを示している。

4 章では、マルチガス温度制御プラズマの液中殺菌手法を開発し、プラズマのガス種やガス温度が殺菌効果に与える影響などの基礎特性について記述した。3 章で示したようにプラズマのガス種やガス温度を変化させることで、生成される活性種の種類や量が変化することから、殺菌効果もプラズマのガス種およびガス温度に影響を受けると考えられる。ガス種およびガス温度が殺菌効果に与える影響を調べるため、菌懸濁液にプラズマを直接照射し殺菌効果を調べた。ガス種として窒素と二酸化炭素を用いて、プラズマのガス温度を 30～90℃まで変化させると、二酸化炭素プラズマ照射でのみ高い殺菌効果が得られた。また、二酸化炭素のプラズマではプラズマのガス温度を上昇させると殺菌効果も向上し、最も高い殺菌効果が得られた 90℃の二酸化炭素プラズマでは、初期菌数 10^8 CFU/mL の *S. aureus* を 10 秒間の照射で検出下限値以下まで低下させる殺菌効果が得られた。一方で、窒素プラズマではガス温度の上昇による殺菌効果の大きな変化は確認されなかった。この様に、プラズマのガス種およびガス温度を変化させることで処理効果に大きな影響を与えることが示され、プラズマの殺菌応用においてマルチガス温度制御プラズマジェットの有用性が示された。二酸化炭素のプラズマ照射による殺菌では、殺菌効果の向上と相関関係が見られた一重項酸素が殺菌効果に寄与したと考察された。ただし、大気圧低温プラズマによる殺菌では、活性種や紫外線、荷電粒子などが微生物に複合的に作用することが予想され、他の殺菌因子についても検討が必要であると結論づけた。

プラズマを液面に直接照射して殺菌効果を得る手法では、活性種の導入、生成経路であるプラズマと水の気液界面の面積が重要であり、この面積を拡大することがより高い殺菌効果の実現につながる。そこで、プラズマを水中にバブルとして導入することで気液界面の面積を拡大したプラズマバブリングを殺菌に用いることを検討した。眼科分野で問題となる *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. marcescens*, *F. solani* の菌懸濁液を二酸化炭素のプラズマバブリングで処理することで、全ての菌株に対して殺菌効果が得られた。加えて医療器具などに付着し、プラズマによる殺菌にも耐性を示す付着菌を効率よく殺菌するため、剥離効果を持つ超音波と殺菌効果をもつプラズマバブリングを組み合わせた超音波併用プラズマバブリングを開発した。この手法を用いることで、従来のプラズマバブリングと比較してステンレス板上および医療器具上の *P. aeruginosa* に対する高い殺菌効果が得られた。11 時間のプラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリングで処理した医療器具では損傷が確認されなかった。超音波併用プラズマバブリングを用いることで医療器具に損傷を与えずに表面の付着菌に対して高い殺菌効果を得ることに成功した。

プラズマバブリングの殺菌効果をより向上させるため、多孔質フィルタを用いることでプラズマと水との気液界面の面積をより増大させたプラズマバブリングを開発した。多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングによって、従来までのプラズマバブリングと比較して約 7 倍の気液界面の面積を実現した。*F. solani* の殺菌では、多孔質フィルタを用いた二酸化炭素のプラズマバブリングによって、生菌数を 2 桁減少させるまでの時間が従来手法の 2/15 に短縮された。多孔質

フィルタを用いたプラズマバブリングでは、二酸化炭素の他に酸素で高い殺菌効果が得られた。また、二酸化炭素のプラズマバブリングにおいて、プラズマのガス温度が上昇すると殺菌効果が低下することが示された。他にも多孔質フィルタを用いたプラズマバブリングについて特性を調べると、殺菌効果は多孔質フィルタの長さや処理時の水温に影響されることが示された。酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングで処理した大腸菌では、細胞膜の不飽和脂肪酸が破壊され、膜機能に障害を及ぼしたことが示唆された。

酸素プラズマバブリングと紫外線照射を組み合わせた紫外線併用酸素プラズマバブリングでは、酸素プラズマバブリングのみ、及び紫外線のみと比較して高い殺菌効果が得られた。この紫外線併用プラズマバブリングでは活性種生成や液中の殺菌効果の均一性などの比較から、酸素プラズマバブリングと紫外線の殺菌効果が重畳するだけでなく、相乗的に殺菌効果に寄与し、殺菌効果が向上した可能性が示唆された。

プラズマバブリングを用いたもう一つの殺菌方法として、二酸化炭素のプラズマバブリングで殺菌効果を付与した水(PBW)を開発した。PBWは、プラズマバブリングで直接殺菌処理を行う方法と比較して、持ち運びなどの利便性に優れた殺菌方法となっている。二酸化炭素で生成したPBWは約 10^5 CFU/mL の *E. coli* を2桁以上低下させる殺菌効果を示した。PBWでは、生成時に低温の水を用いることで殺菌効果が向上した。また、PBW生成から時間が経過することで殺菌効果が失われていくことが明らかとなり、23℃で保存すると殺菌効果の半減期は4.4分となった。このことから、PBWは殺菌効果が残留しない殺菌剤として期待される。このPBWの殺菌効果の維持時間は温度によって大きく変化し、低温で保存することで殺菌効果を長時間維持することが可能であった。例えば、2℃で保存すると殺菌効果の半減期は170分に延長された。

このPBWの殺菌効果をより長時間維持する手法として、間欠動作プラズマバブリングが考案された。プラズマバブリングと停止を繰り返し行うことにより、ガスや電力の消費量を抑えつつPBWの殺菌効果を長時間保つことが可能である。常温保存のPBWにおいて、1分間のうち15秒間動作する間欠動作プラズマバブリングを繰り返すことで常温において、20分以上殺菌効果を維持することに成功した。

これらの酸素および二酸化炭素のプラズマバブリングの殺菌因子の全容は明らかとなっていない。しかし、本研究で得られた結果から、殺菌因子を予想することができた。酸素のプラズマバブリングによる殺菌では、プラズマバブリング処理した水から多量のオゾンが検出されたことから、このオゾンが殺菌効果に寄与していることが考察された。一方で二酸化炭素では、オゾンや過酸化水素、OHラジカル、スーパーオキシドラジカル、一重項酸素は、殺菌効果を持つような濃度で検出されなかった。二酸化炭素プラズマバブリングの殺菌効果は水温に影響されること、二酸化炭素のPBWでは時間経過とともに殺菌効果が失われること、液中に導入されるまでの経路中で殺菌因子が失活することなどから、化学反応性をもつ活性種であることは予想される。二酸化炭素プラズマバブリングの殺菌因子を明らかにするためには、本研究で測定されなかった活性種量と殺菌効果の関係を網羅的に調べていく必要がある。

マルチガス温度制御プラズマでは、プラズマのガス種およびガス温度を制御することでより高い液中殺菌の効果を得ることが可能であった。加えて、プラズマのガス種およびガス温度を変化させたときの殺菌効果と生成される活性種の関係から、殺菌因子の検討が可能なことを示した。これらのことから、マルチガス温度制御プラズマジェットは、処理効果の向上と機序解明において、有用性を持つことが示された。このマルチガス温度制御プラズマジェットは超音波や間欠動

作など、目的に応じてプラズマと他の機能を組み合わせることで、より効果的な殺菌が行えることを示した。今後は、それぞれ応用先で問題となる細菌、真菌、ウイルスを対象とした殺菌、不活化効果の検討をすすめ、より実用に近い形で殺菌装置を構築していく必要がある。

5 章では、マルチガス温度制御プラズマを歯科材料の接着と歯科ホワイトニングに応用した結果について記述した。

マルチガス温度制御プラズマの歯科材料の接着への応用では、ジルコニア-レジンセメント間の接着強度向上を目的として、接着前のジルコニアへプラズマ照射を行った。特に、10 秒の窒素プラズマ照射を行うことで、18.5 MPa のジルコニア-レジンセメント間の接着強度を得ることができ、未処理と比較して約 1.9 倍の接着強度となった。この接着強度は従来のジルコニアの接着の前処理で用いられているサンドブラストと同等の接着強度であり、歯科接着において十分な接着強度が得られた。ジルコニア試料に窒素プラズマを照射すると、表面の C-C, C-H 結合の割合が減少したことから、ジルコニアに付着した有機物汚れが除去され、高い接着強度が実現されたと考えられる。一方で、10 秒の酸素プラズマ照射では、表面の有機物汚れが除去され、Zr-OH の割合が増加したにも関わらず、接着強度の向上が見られなかった。酸素プラズマでは、レジンセメント内での重合の阻害や接着界面の空隙の増加などが報告されており、これらの現象が接着強度の向上を阻害した可能性がある。

歯科ホワイトニングへの応用では、生成した窒素プラズマに水を混合させ、水滴と同時にプラズマを照射するプラズマミストを開発し、歯科ホワイトニングに用いた。水分供給量 0.05 mL/min かつ窒素ガス流量 3 L/min、または水分供給量 0.10 mL/min かつ窒素ガス流量 2 L/min の条件で生成したプラズマミストでは、40℃以下で最も高い漂白効果が得られた。

これらの結果から、マルチガス温度制御プラズマの様々なガス種のプラズマ生成が歯科分野応用に対して有用であることが示された。今後は、プラズマのガス種選択だけでなく、プラズマのガス温度制御を実施することで、より高い処理効果かつ、患者への負担の少ないガス温度での応用が望まれる。

6 章では、マルチガス温度制御プラズマの植物工学への応用として、プラズマを用いたゲノム編集ツールの開発と水耕栽培へのプラズマバブリングの応用を行った。

マルチガス温度制御プラズマを用いたゲノム編集ツールの開発では、窒素および二酸化炭素プラズマの照射によりタバコのゲノム編集を試みた。タバコ葉への窒素および二酸化炭素プラズマの照射条件検討では、20℃前後に制御した窒素プラズマの 5 秒以内の照射が適していることを明らかにした。20℃前後に制御した 2 および 5 秒の窒素プラズマ照射によって、GFP の植物細胞内への導入を確認した。タバコのゲノム編集では、2 秒間の窒素プラズマ照射後に Cas9/sgRNA 溶液に浸すという簡便な操作により、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現に成功した。ハイグロマイシン耐性遺伝子を発現したタバコのカルス細胞を採取し、ゲノム配列を読み取ると PAM 配列の 1 塩基上流で 4 塩基欠損となった。これらのことから窒素プラズマを 2 秒間照射し Cas9/sgRNA 溶液に浸すという簡便な操作でゲノム編集が行えることが示された。また、これらの GFP や Cas9/sgRNA の導入では、クラスリンによるエンドサイトーシスが寄与していることが示された。

プラズマの水耕栽培への応用では、二酸化炭素、酸素、窒素、空気のプラズマを直接照射することによって、イチゴ萎黄病の原因菌である *F. oxysporum* の殺菌に成功した。また、水中に

浮遊する *F. oxysporum* の胞子は、2 分間の空気のプラズマバブリングによって生菌数が1桁減少する殺菌効果を得た。しかし、液肥中の胞子に対する殺菌効果は確認されず、液肥の成分との反応で活性種が失活している可能性が示された。プラズマバブリングした液肥を分析すると、硝酸態窒素の増加が見られたが、この増加量はイチゴの栽培上問題となる濃度ではなかった。また、硝酸態窒素の増加により、プラズマバブリングでは成長促進などの効果が得られる可能性を示した。

これらの結果から、植物工学での応用におけるマルチガス温度制御プラズマの有用性を示した。今後実用化するために様々な種類、または様々な形態の植物でのゲノム編集を行い、実証実験を重ねていく必要がある。またゲノム編集では、理想的な二重鎖切断位置から 2 塩基のズレが生じたが、これが偶発的なものであるのか、プラズマ照射など環境によるものであるのかは不明であった。今後、様々な植物を対象にしてサンプル数を増やしていくことで、マルチガス温度制御プラズマを用いたゲノム編集ツールの特性を明らかにする必要がある。

プラズマの水耕栽培への応用では、今回対象としたイチゴ萎黄病以外の灰カビ病や炭疽病などの原因菌に対する殺菌効果を明らかにしていく必要がある。そして最も重要であるのが、実際にイチゴを用いた実証実験を行い、収量や疫病への罹患率などを調査していく必要がある。

本研究で開発されたマルチガス温度制御プラズマジェットでは、様々なガス種での安定したプラズマ生成とプラズマのガス温度制御を実現した。これにより植物などの特に熱に弱い処理物への大気圧低温プラズマの応用が可能となった。医療分野と植物工学への応用では、プラズマのガス種の選択とガス温度制御が殺菌やゲノム編集などの処理効果向上と機序解明に重要であることを示した。また、目的に応じて超音波処理や間欠動作などの機能をマルチガス温度制御プラズマと組み合わせることで、より効果的にプラズマ応用が実現されることを示した。

マルチガス温度制御プラズマジェットの開発などの本研究で得られた知見、成果は、これまでの医療、農業、工業分野でのプラズマ応用に対して新たな視点を与えることができる。プラズマのガス種に加えてプラズマのガス温度を制御するツールを提供することは、これまでのプラズマ応用において新たな発見をもたらすだけではない。熱などの問題から応用が検討もされていなかった分野に対しても、新たな応用可能性を示すものである。将来的に、このマルチガス温度制御プラズマジェットの開発と医療分野と植物工学への応用研究が、プラズマの様々な分野での応用の発展に寄与することを期待する。

謝辭

本研究は、東京工業大学 工学院 電気電子系 沖野研究室で行われたものです。研究遂行にあたり、多くの方々にご指導、ご協力いただきまして、ここに博士論文として完成させることができました。ご協力いただきました皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多大なるご指導、ご助言を頂きました東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 准教授 沖野晃俊先生に心より感謝申し上げます。沖野研究室では国内外での学会発表などの普段の研究活動から、著書出版や特許出願など、普通の学生ではあまり体験できないようなことまで、本当にたくさんのことを経験させていただきました。このような経験を積むことができたのも、沖野先生が陰ながら研究資金の調達や研究室の運営を行ってくださるお陰であると思います。また博士課程となり研究室を支える側となって、人を教え導くことの難しさ、チームとして研究室を運営することの難しさを知ることができました。これまで多くの優秀な先輩方を育て、研究室を運営されてきた沖野先生を尊敬致しております。沖野先生を通して様々な方と交流を持つことができ、大学院での充実した5年間を過ごすことができましたのも、沖野先生のご支援、ご鞭撻の賜物であると感じております。ここに深く感謝いたします。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 教授 岩澤篤郎先生に心より感謝申し上げます。大学院入学まで全く殺菌や微生物と関わりのなかった私に、微生物実験を指南いただきました。また、多くの微生物実験において、微生物の調達や実験の前準備、片付けのサポートをしていただきました。岩澤先生のご助力がなければ、ここまで研究を進めることはできなかったと思います。ここに深く感謝いたします。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 准教授 松村有里子先生に心より感謝申し上げます。私が研究で躓いていると、いつも的確な助言をくださいました。また、研究生活において、松村先生の明るく前向きな姿勢に何度も助けられました。ここに本研究をまとめることができましたのも、松村先生のご助言と励ましあつてのことです。ここに深く感謝いたします。

東京理科大学 生命医科学研究所 助教、国立がん研究センター 特任研究員 高松利寛先生に心より感謝申し上げます。高松先生は沖野研究室出身ということで一番身近な先生であり、目標とする研究者でもありました。忙しいスケジュールの中、遅くまで実験や研究活動を支えていただきました。高松先生の献身的なサポートは、本研究を遂行する上で必要不可欠でした。ここに深く感謝いたします。

鳥取大学 農学部 准教授 伊藤典彦先生に心より感謝申し上げます。論文執筆や実用実験において、伊藤先生の医学的な視点、使用者側の目線に立ったご助言は論文を完成させる上で必要不可欠でした。また、私が研究や論文執筆で躓いていると、いつも叱咤激励の言葉をくださりモチベーションを上げることができました。伊藤先生の情熱に答えようと、ここまで研究を遂行することができたと思います。ここに深く感謝いたします。

東京薬科大学 生命科学部 助教 青木元秀先生に深く感謝申し上げます。本論文においては、脂肪酸の分析で多大なるご支援をいただきました。本当に様々な経験と知識をお持ちの先生で、脂肪酸の分析だけでなく研究の様々な面でご助言をいただきました。また、青木先生との趣味の電子工作の話は、身近に共通の趣味を持つ人がいなかった私にとって、とても楽しい時間でした。ここに深く感謝いたします。

東京大学大学院 理学系研究科 特任研究員、株式会社プラズマコンセプト東京 代表取締役社長 宮原秀一先生に感謝申し上げます。同じ研究室に所属した期間は1年と短い間では

ありましたが、研究面だけでなく、進路や研究室運営でも非常に気にかけていただいたことを覚えております。宮原先生にお教え頂いた、研究の根本である論理的に話を組み立てる術は今でも私の中に刻まれており、研究遂行の上で役立っております。ここに深く感謝いたします。

千葉大学大学院 園芸学研究院 植物細胞工学研究室 柳川由紀先生に深く感謝申し上げます。本論文では植物のゲノム編集において多大なるご支援をいただき、植物のことや遺伝子、ゲノム編集のことなど、実践を通して学ばせていただきました。また農研機構での長期インターンシップでは研究面のみならず、受け入れ体制を整えてくださり、充実した研究生活を送ることができました。また、本論文の植物のゲノム編集の節について、丁寧に修正、コメントしていただき、本論文の完成度を高めることができました。ここに深く感謝いたします。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 主席研究官 光原一郎博士に深く感謝申し上げます。本論文では植物のゲノム編集において多大なるご支援をいただきました。また、農研機構での長期インターンシップでは、お忙しい中受け入れ体制を整えてくださり、充実した研究生活が送れるようにサポートしていただきました。植物へのプラズマの応用研究において、機材、植物体の手配や遺伝子組み換え体の取り扱い方法をご教授いただくなど多数のご助力を賜りました。ここに深く感謝いたします。

東北大学大学院歯学研究科 口腔システム補綴学分野、東北大学病院 歯科部門 咬合回復科(歯科インプラントセンター兼任) 講師 依田信裕先生に感謝申し上げます。依田先生とは直接お会いする機会はありませんでしたが、本論文では歯科接着へのプラズマ応用において試料の用意や分析、考察で多大なるご支援をいただきました。ここに深く感謝いたします。

明海大学 保健医療学部 口腔保健学科 教授 金子潤先生に感謝申し上げます。本論文では歯科ホワイトニングへのプラズマ応用において試料の用意や分析、考察で多大なるご支援をいただきました。ここに深く感謝いたします。

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター 研究員 岩井貴弘先生に感謝申し上げます。プラズマを用いた分析でわからないこと、不明なことがあったときには親身になって、ご助言をくださいました。また、SPRING-8の見学では岩井さまが受け入れ体制を整えてくださったおかげで、貴重な経験をすることができました。ここに深く感謝いたします。

神戸大学大学院 農学研究科 資源生命科学専攻 教授 宇野雄一先生に感謝申し上げます。本論文では水耕栽培でのプラズマ応用において多大なるご支援をいただきました。また、実際に水耕栽培の現場を見る機会をいただけたことは、研究遂行の上で大変参考になりました。ここに深く感謝いたします。

東京工業大学 技術部 すずかけ台設計工作部門 技術専門員 山本徳彦氏に感謝申し上げます。本論文ではプラズマジェット作製で多大なるご協力を頂きました。山本さまから、マルチガス温度制御プラズマジェットなど様々なプラズマジェットについて、技術的、構造的な意見をいただけたことは、より良いプラズマジェット製作につながりました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室 秘書の村上奈津子さんに深く感謝いたします。研究室をいつも陰ながら支えていただきました。私が研究に専念することができましたのも、全て村上さんの献身的なサポートあってのことです。手続きなどの研究の事務的なことだけでなく、日常的なことにも親身になって相談に乗っていただき、安心して大学院生活を送ることができました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室 秘書の大関杏子さんに感謝いたします。研究室にきた際に毎日気さくに話してくださるため、研究室も明るい雰囲気になったと思います。また、プラ研の運営では、やり方や流

れなど、細かくお教えいただけたため、問題なく運営を遂行することができました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の相田真里博士(現在, 国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構)に感謝いたします。相田さんの在籍中は、話すと楽しい先輩で大学院生活に早く馴染めたのも相田さんの存在は大きかったです。また卒業後も研究や進路のことなど相談に乗っていただき、大変お世話になりました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の川野浩明博士(現在, 富士フイルム株式会社)に感謝いたします。本論文では付着菌の殺菌へのプラズマの応用において多大なるご支援をいただきました。また、私の直属の先輩である川野さんは私の大学院生活における目標そのものでした。私が 5 年間目標を見失わずに研究を続け、今回本論文を完成させることができましたのも川野さんへの憧れが大きかったと思います。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の三宅智子博士(元タカラベルモント株式会社)に感謝いたします。三宅さんは、研究や就活、論文のことなどいつも私を気にかけてくださいました。また、定期的に相談に乗っていただいたおかげもあり、なんとか本論文を仕上げることができました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の小笠原大介氏(現在, 株式会社クレハ)に感謝いたします。小笠原さんの研究での行動力と能力を見習おうと、私は努力することができました。また、高専の先輩ということで、気軽に色々と相談にのっていただき、大変お世話になりました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の林悠太氏(現在, オリパス株式会社)に感謝いたします。入学して間もない私に気さくに話しかけてくださったおかげで、大学院生活に早く馴染めたと思います。共通の卓球という趣味で競い合ったことは大学院生活を飾る思い出の一つとなっています。また卒業後も研究や就活の息抜きに付き合ってくださいだったおかげで、ここまで研究を続けてこれたと思っています。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の細田順平氏(現在, 株式会社メイテック)に感謝いたします。細田さんは、よく実験の愚痴を聞いていただいたり、手伝って頂いたりと大変お世話になりました。また、ストイックに研究に望む姿勢はとても輝いて見えました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の馬場美岬氏(現在, 日本マイクロソフト株式会社)に感謝いたします。いつもアクティブに行動し続ける馬場ちゃんのお土産話を聞くのが楽しみでした。私も 5 年間の大学院生活を通してたくさんの思い出や経験をすることができたので次会うときには、これまでのお土産話の御返しができるかもしれません。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の河野聡史氏(現在, 富士フイルムビジネスイノベーション株式会社)に感謝いたします。河野くんには定期的に電話や飲み会で研究や就活の愚痴を聞いてもらい、影で支えていただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の岡本悠生氏(現在, 日本たばこ産業株式会社)に感謝いたします。いつも、同期に笑いを提供してくれていて、一緒に研究した大学院生活はとても楽しく過ごせました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の阿部優凜氏(現在, アクセンチュア株式会社)に感謝いたします。本論文の作成において、歯科接着へのプラズマ応用で多大なるご協力を頂きました。また、研究のガス抜きによく私を連れ出してくれたおかげで、楽しく研究生生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の高木拓希氏(現在, 楽天モバイル株式会社)に感謝いたします。高木くんには研究室生活で必要不可欠な食料調達を行っていただきました。飲み物をいつも安く買うことができるのは, 高木くんが仕入れて運んでくれるからにほかありません。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の守屋翔平氏(現在, テルモ株式会社)に深く感謝いたします。本論文の作成において, マルチガス温度制御プラズマジェット作製で多大なるご協力を頂きました。守屋くんは後輩でしたが, 同じ時期に入った仲間として, 研究で, スポーツで, 趣味の中で切磋琢磨し合うことのできるかけがえのない友人でした。また彼の論理的で緻密な論文の組み立ては, 読んでいて大変参考になりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の吉田真優子氏(現在, ソニーセミコンダクタソリューションズ株式会社)に感謝いたします。吉田さんは, プラズマの電源開発等で, 電気回路や電子部品について意見を聞ける数少ない存在で, いろいろな質問に答えてくださいました。また, お酒を飲むと普段聞けない話が聞けるので, 飲みに行くといつも楽しい時間を過ごせました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の山崎翔矢氏に感謝いたします。山崎くんは 4 年生にもかかわらず 1 人で黙々と研究を進めていけるため, 1 つのテーマをしっかりと任せることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の飯島勇介氏(現在, 帝人株式会社)に感謝いたします。本論文の作成において, ゲノム編集へのプラズマの応用で多大なるご協力を頂きました。飯島くんは, いざというときに頼りになるので色々な場面で助けていただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の吉田真己氏(現在, 楽天グループ株式会社)に感謝いたします。プラズマの分析の研究テーマは最初から苦難の連続でしたが, 無事乗り越えてこれたのは真己ちゃんの真面目に研究に取り組む姿勢あつてのことだと思います。真己ちゃんのおかげでこれまでの先輩方が築いてきた研究成果が無駄とならずに, 現在までつながっていると思います。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の中井一輝氏(現在, ソニーセミコンダクタソリューションズ株式会社)に感謝いたします。中井くんは, 入学当初から企業との共同研究を担当することとなり, 最初のうちは少し不安でしたが, それはすぐに杞憂に変わりました。途中からは持ち前の飲み込みの速さとタフさで, 安心して共同研究を任せることができました。私が自身の研究に専念することができたのは, 中井くんがしっかり共同研究を引き継いでくれたからです。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士課程 2 年の太田高志氏に感謝いたします。太田さんにはプラズマを用いた分析について後輩たちをまとめていただきました。それまで私一人に集中していた分, 指導も十分にできていなかったところ補っていただき, 安心して任せることができました。最後の研究の追い込みの時期に自身の研究に集中できたのは太田さんのご協力あつてのことだと思います。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士課程 2 年の山崎顕一氏に感謝いたします。持ち前の社交性の広さで研究の輪を広げていく山崎さんはいつも頼りになり, 研究だけでなく, 何かと相談に乗っていただきました。山崎さんのようなカッコいい社会人になれるようにこれからも努力していきたいと思います。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士課程 1 年の劉智志氏に感謝いたします。一緒に研究していたのは 1 年間だけでしたが, 社会人ではない博士の学生ということで, 様々な実験に付き合ってくださいました。

真面目な劉さんのおかげで、共同研究が私の元から円滑に引き継がれ、安心して任せることができています。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士課程 1 年の徐茂氏に感謝いたします。忙しい中、ミーティングに参加されたり、空いた土日も実験をしたりと、徐さんの研究に対する積極性を見る度に、私も頑張らないという気持ちになりました。実験や研究活動後、よくご飯にお誘いいただき、研究生活の良い気分転換になりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年の石川雄大氏に感謝いたします。石川くんには研究の面ではもちろんのこと、私生活でも私を支えていただきました。博士 3 年生になってからは、平日だけでなく土日も研究や趣味に付き合ってもらい、毎日楽しく生活することができました。また、いつも私の知らない新鮮な体験を与えてくれる石川くんには教わったことはたくさんあります。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年の野口剛氏に感謝いたします。野口くんはいつも黙々と研究に取り組み、いざというときにとても頼りになる後輩でした。そんな野口くんには研究や学生生活の様々な面でサポートいただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年の森結登氏に感謝いたします。森くんには、中井くんの後輩としてガス分解へのプラズマ応用を担当してもらい、安心して共同研究を任せることができました。また、研究室では、よく世間話に付き合ってもらい、研究生活の重要な息抜きとなりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年の柳井優作氏に感謝いたします。ゴムの接着へのプラズマの応用では、積極的に実験を進めてくれる柳井くんのおかげで、たくさんの成果を得ることができました。また、柳井くんはとてもノリがよく、一緒に過ごした大学院生活はとても楽しいものとなりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 1 年の相澤駿輝氏に感謝いたします。本論文の作成において、マルチガス温度制御プラズマジェット作製で多大なるご協力を頂きました。相澤くんとは辛い実験と一緒に乗り越えた戦友であり、本論文の執筆にあたり欠かせない存在でした。また、年末年始や就活などで忙しい時期にも関わらず、合間を縫って、本論文の添削をしてくださいました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 1 年の大澤泰樹氏に感謝いたします。いつも気の利く大澤くんは、修士の学生とは思えないくらいテキパキと仕事をこなしてくださいました。おかげで私は自身の研究に専念することができました。また、研究室のたくさんのことを引き継いでもらったおかげで、安心して研究室運営を任せることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 1 年の清水祐哉氏に感謝いたします。いつも私が研究に疲れた時間帯に登校してくる清水くんと会話することは、良い息抜きになっていました。また、清水くんには研究生活に必須である、素敵なお菓子をたくさんいただき、研究をサポートしていただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程 1 年の吉田大輝氏に感謝いたします。企業や外部研究機関の様々な方と連絡を取りつつ、自身の研究を進めていく姿を見ていると、これからも安心して研究を任せられると思います。また、チョコやカップラーメン、飲み物など食料調達を一手に引き受けてくれたおかげで、毎日快適な研究生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室学士課程 4 年の日原弘喜氏に感謝いたします。あまり研究で関わることはありませんでしたが、いつも黙々ととにかくに取り組む姿を見て、私も頑張らないという気持ちになりました。

した。また、たまにボードゲームに付き合っていた事は、良い研究の息抜きになりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室学士課程 4 年の山内素明氏に感謝いたします。平日だけでなく、土日も含めていつも徐さんと一緒に研究をこなしており、安心してプラズマ誘起流の研究を任せることができました。また、自身の研究とはあまり関わりのない実験にも積極的に参加し、私の研究の一部を引き継いでくださいました。本当にありがとうございました。

最後に、様々な面で支えてくださいました友人をはじめ、先生方や先輩方、後輩たち、そして何より長い学生生活を心身面、経済面で支えてくれた家族に厚く御礼申し上げます。

2022 年 2 月

末永 祐磨

参考文献

- [1]. 林泉, 高電圧プラズマ工学 (丸善株式会社, 東京, 1996) p. 10
- [2]. N. A. and S. Administration, James Webb Space Telescope Science, https://www.nasa.gov/mission_pages/webb/science/index.html, (accessed 6 January 2022).
- [3]. N. A. and S. Administration, NASA Image and Video Library, <https://images.nasa.gov/>, (accessed 6 January 2022).
- [4]. 地球生命研究東京工業大学, 動画「全地球史アトラス」の全編を公開(冥王代生命学プロジェクト), http://old.elsi.jp/ja/news/information/2019/06/20190614_atlas.html, (accessed 1 February 2022).
- [5]. 遠藤食品株式会社, 雷と稲妻の語源, https://www.endo-foods.co.jp/mamechisiki/seasons_mame_kaminari.htm, (accessed 6 January 2022).
- [6]. G. P. Russ, J. M. Bazan, "Isotopic ratio measurements with an inductively coupled plasma source mass spectrometer", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **42**, 1, 49-62 (1987). [DOI:[https://doi.org/10.1016/0584-8547\(87\)80049-6](https://doi.org/10.1016/0584-8547(87)80049-6)]
- [7]. Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuhashi, "Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet", *PLoS ONE*, **12**, 2, e0171942 (2017). [DOI:10.1371/journal.pone.0171942]
- [8]. S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N. Hayashi, M. Shiratani, "Plasma induced long-term growth enhancement of *Raphanus sativus* L. using combinatorial atmospheric air dielectric barrier discharge plasmas", *Current Applied Physics*, **14**, S149-S153 (2014). [DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cap.2013.11.056>]
- [9]. M. Kurosawa, T. Takamatsu, H. Kawano, Y. Hayashi, H. Miyahara, S. Ota, A. Okino, M. Yoshida, "Endoscopic Hemostasis in Porcine Gastrointestinal Tract Using CO₂ Low-Temperature Plasma Jet", *Journal of Surgical Research*, **234**, 334-342 (2018). [DOI:10.1016/j.jss.2018.09.068]
- [10]. Y. Nomura, T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, A. Okino, Y. Masaru, A. Takeshi, "Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo", *Journal of Surgical Research*, **219**, 302-309 (2017). [DOI:10.1016/j.jss.2017.06.055]
- [11]. A. Shimatani, H. Toyoda, K. Orita, Y. Hirakawa, K. Aoki, J. Oh, T. Shirafuji, H. Nakamura, "In vivo study on the healing of bone defect treated with non-thermal atmospheric pressure gas discharge plasma", *PLoS ONE*, **16**, 10, 1-15 (2021). [DOI:10.1371/journal.pone.0255861]
- [12]. G. Kamgang-Youbi, J. M. Herry, J. L. Brisset, M. N. Bellon-Fontaine, A. Doubla, M. Naïtali, "Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/ detached state: Case of *Hafnia alvei* inactivation by Plasma Activated Water", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 3, 449-457 (2008). [DOI:10.1007/s00253-008-1641-9]
- [13]. G. Fridman, M. Peddinghaus, H. Ayan, A. Fridman, M. Balasubramanian, A. Gutsol, A. Brooks, G. Friedman, "Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air", *Plasma Chem Plasma Process*, (2006). [DOI:10.1007/s11090-006-9024-4]
- [14]. M. Domonkos, P. Ticha, J. Trejbal, P. Demo, "Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology in Medicine, Agriculture and Food Industry", *applied sciences*, **11**, 11, 4809 (2021). [DOI:10.3390/app11114809]
- [15]. V. Scholtz, J. Pazlarova, H. Souskova, J. Khun, J. Julak, "Nonthermal plasma – A tool for decontamination and disinfection", *Biotechnology Advances*, **33**, 6, Part 2, 1108-1119 (2015). [DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>]
- [16]. K.-D. Weltmann, T. von Woedtke, "Plasma medicine—current state of research and medical application", *Plasma Physics and Controlled Fusion*, **59**, 1, 14031 (2016).

[DOI:10.1088/0741-3335/59/1/014031]

- [17]. J. Pan, Y. L. Li, C. M. Liu, Y. Tian, S. Yu, K. L. Wang, J. Zhang, J. Fang, "Investigation of Cold Atmospheric Plasma-Activated Water for the Dental Unit Waterline System Contamination and Safety Evaluation in Vitro", *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, **37**, 4, 1091-1103 (2017). [DOI:10.1007/s11090-017-9811-0]
- [18]. T. Maisch, T. Shimizu, Y. F. Li, J. Heinlin, S. Karrer, G. Morfill, J. L. Zimmermann, "Decolonisation of MRSA, S. aureus and E. coli by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro", *PLoS ONE*, **7**, 4, 1-9 (2012). [DOI:10.1371/journal.pone.0034610]
- [19]. L. . Černáková, D. Kováčik, A. Zahoranová, M. Černák, M. Mazúr, "Surface Modification of Polypropylene Non-Woven Fabrics by Atmospheric-Pressure Plasma Activation Followed by Acrylic Acid Grafting", *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, **25**, 4, 427-437 (2005). [DOI:10.1007/s11090-004-3137-4]
- [20]. A. Van Deynse, P. Cools, C. Leys, N. De Geyter, R. Morent, "Surface activation of polyethylene with an argon atmospheric pressure plasma jet: Influence of applied power and flow rate", *Applied Surface Science*, **328**, 269-278 (2015). [DOI:10.1016/j.apsusc.2014.12.075]
- [21]. Y. Ohkubo, K. Ishihara, M. Shibahara, A. Nagatani, K. Honda, K. Endo, K. Yamamura, "Drastic Improvement in Adhesion Property of Polytetrafluoroethylene (PTFE) via Heat-Assisted Plasma Treatment Using a Heater", *Scientific Reports*, **7**, 9476, 1-9 (2017). [DOI:10.1038/s41598-017-09901-y]
- [22]. S. Yoshimura, M. Aramaki, Y. Otsubo, A. Yamashita, K. Koga, "Controlling feeding gas temperature of plasma jet with Peltier device for experiments with fission yeast", *Japanese Journal of Applied Physics*, **58**, SEEG03 (2019). [DOI:https://doi.org/10.7567/1347-4065/ab1473]
- [23]. D. Ishihara, Y. Noma, S. Stauss, M. Sai, T. Tomai, K. Terashima, "Development of a dielectric barrier discharge (DBD) cryo-microplasma :", *Plasma Sources Science and Technology Development*, **17**, 035008, 1-7 (2008). [DOI:10.1088/0963-0252/17/3/035008]
- [24]. T. Oshita, H. Kawano, T. Takamatsu, H. Miyahara, A. Okino, "Temperature Controllable Atmospheric Plasma Source", *IEEE Transactions on Plasma Science*, **43**, 6, 1987-1992 (2015). [DOI:10.1109/TPS.2015.2428696]
- [25]. T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, H. Miyahara, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, T. Azuma, M. Kohno, A. Okino, "Investigation of reactive species using various gas plasmas", *RSC Advances*, **4**, 75, 39901-39905 (2014). [DOI:10.1039/c4ra05936k]
- [26]. T. Takamatsu, H. Hirai, R. Sasaki, H. Miyahara, A. Okino, "Surface Hydrophilization of Polyimide Films Using Atmospheric Damage-Free Multigas Plasma Jet Source", *IEEE Transactions on Plasma Science*, **41**, 1, 119-125 (2013). [DOI:10.1109/TPS.2012.2227459]
- [27]. S. Martínez-Jarquín, A. Moreno-Pedraza, H. Guillén-Alonso, R. Winkler, "Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe", *Anal. Chem.*, **88**, 6976-6980 (2016). [DOI:10.1021/acs.analchem.6b01019]
- [28]. L. Barillas, E. Makhneva, S. An, K. Fricke, "Functional Thin Films Synthesized from Liquid Precursors by Combining Mist Chambers and Atmospheric-Pressure Plasma Polymerization", *coatings*, **11**, 1336 (2021). [DOI:https://doi.org/10.3390/coatings11111336 Academic]
- [29]. T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, T. Azuma, A. Okino, "Atmospheric nonequilibrium mini-plasma jet created by a 3D printer", *AIP Advances*, **5**, 077184 (2015). [DOI:10.1063/1.4928034]

- [30]. M. Kurosawa, T. Takamatsu, H. Kawano, Y. Hayashi, H. Miyahara, S. Ota, A. Okino, M. Yoshida, "Endoscopic Hemostasis in Porcine Gastrointestinal Tract Using CO₂ Low-Temperature Plasma Jet", *Journal of Surgical Research*, **234**, 334-342 (2019). [DOI:10.1016/j.jss.2018.09.068]
- [31]. T. Takamatsu, A. Kawate, T. Oshita, H. Miyahara, "Investigation of Reactive Species in Various Gas Plasmas Treated Liquid and Sterilization Effects", *Ispc 21*, , JANUARY, 4-7 (2014).
- [32]. JX金属株式会社, Alloyed社が金属3Dプリンターを用いた足首用インプラントの設計・造形に成功, https://www.nmm.jx-group.co.jp/newsrelease/2021/20211013_01.html, (accessed 1 January 2022).
- [33]. D. Sher, Jeff Bezos presents new Blue Moon lunar lander with "almost entirely 3D printed" BE-7 engine, <https://www.3dprintingmedia.network/relativity-mu-space-satellite-3d-printed-terran-1/>, (accessed 1 January 2022).
- [34]. L. Zach, G. Cohen, "Pulp response to externally applied heat", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, **19**, 4, 515-530 (1965). [DOI:[https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90015-0)]
- [35]. S. Aachboun, P. Ranson, C. Hilbert, M. Boufnichel, "Cryogenic etching of deep narrow trenches in silicon", *Journal of Vacuum Science & Technology A*, **18**, 4, 1848-1852 (2000). [DOI:10.1116/1.582434]
- [36]. H. Kawano, T. Takamatsu, Y. Matsumura, H. Miyahara, A. Iwasawa, A. Okino, "Influence of gas temperature in atmospheric non-equilibrium plasma on bactericidal effect", *Biocontrol Science*, **23**, 4, 167-175 (2018). [DOI:10.4265/bio.23.167]
- [37]. L. Nikkeikin Aluminium Core Technology Company, アルミニウムの基礎データ, <https://group.nikkeikin.co.jp/act/technology/basic.html>, (accessed 9 December 2021).
- [38]. 一般社団法人日本ダイカスト協会, ダイカスト用合金 アルミニウム合金ダイカスト, http://www.diecasting.or.jp/diecast/pdf/book/pdf_set023-0.pdf, (accessed 9 December 2021).
- [39]. L. Kabuku Co., A1050 (純アルミニウム), <https://www.kabuku.io/guide/metal/aluminum/a1050/>, (accessed 9 December 2021).
- [40]. メタルスーパー株式会社 山本テクノ, 材料の性質, <https://metal-super.com/?cat=27>, (accessed 9 December 2021).
- [41]. Y. Suenaga, T. Takamatsu, T. Aizawa, S. Moriya, Y. Matsumura, A. Iwasawa, A. Okino, "Plasma gas temperature control performance of metal 3D-printed multi-gas temperature-controllable plasma jet", *Applied Sciences (Switzerland)*, **11**, 24, 11686 (2021). [DOI:10.3390/app112411686]
- [42]. I. Onyshchenko, N. De Geyter, R. Morent, "Improvement of the plasma treatment effect on PET with a newly designed atmospheric pressure plasma jet", *Plasma Process Polym.*, **14**, e1600200 (2017). [DOI:10.1002/ppap.201600200]
- [43]. Y. Suenaga, T. Takamatsu, T. Aizawa, S. Moriya, Y. Matsumura, A. Iwasawa, A. Okino, "Influence of Controlling Plasma Gas Species and Temperature on Reactive Species and Bactericidal Effect of the Plasma", *applied sciences*, **11**, 24, 11674 (2021). [DOI:<https://doi.org/10.3390/app112411674>]
- [44]. M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta, T. Yoshikawa, "Spin-Trapping Studies on the Reaction of Iron Complexes with Peroxides and the Effects of Water-Soluble Antioxidants.", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **64**, 5, 1447-1453 (1991). [DOI:10.1246/bcsj.64.1447]
- [45]. Y. Matsumura, A. Iwasawa, T. Kobayashi, T. Kamachi, T. Ozawa, M. Kohno, "Detection of

- High-frequency Ultrasound-induced Singlet Oxygen by the ESR Spin-trapping Method", *Chemistry Letters*, **42**, 1291-1293 (2013). [DOI:10.1246/cl.130618]
- [46]. H. Ikai, K. Nakamura, T. Kanno, M. Shirato, L. Meirelles, K. Sasaki, Y. Niwano, "Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the photolysis of H₂O₂.", *Biocontrol science*, **18**, 3, 137-141 (2013). [DOI:10.4265/bio.18.137]
- [47]. B. M. Smirnov, *Physics of Atoms and Ions* (Springer, New York, NY, USA, 2003) p. 148
- [48]. N. E. Small-Warren, L.-Y. C. Chiu, "Lifetime of the metastable 3P₂ anti 3P₀ states of rare-gas atoms", *PHYSICAL REVIEW A*, **11**, 6, 1777-1783 (1975).
- [49]. J. T. Herron, D. S. Green, "Chemical Kinetics Database and Predictive Schemes for Nonthermal Humid Air Plasma Chemistry . Part II . Neutral Species Reactions", *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, **21**, 3, 459-481 (2001).
- [50]. M. Laroussi, F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure", *International Journal of Mass Spectrometry*, **233**, 1-3, 81-86 (2004). [DOI:10.1016/j.ijms.2003.11.016]
- [51]. H. Shintani, "Ethylene Oxide Gas Sterilization of Medical Devices.", *Biocontrol science*, **22**, 1, 1-16 (2017). [DOI:10.4265/bio.22.1]
- [52]. K.-Y. Lee, B. J. Park, D. H. Lee, I.-S. Lee, S. O. Hyun, K.-H. Chung, J.-C. Park, "Sterilization of *Escherichia coli* and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure", *Surface and Coatings Technology*, **193**, 1-3 SPEC. ISS., 35-38 (2005). [DOI:10.1016/j.surfcoat.2004.07.034]
- [53]. 坂上 吉一, 抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与, 加工技術と評価 (株式会社 技術情報協会, 2021) pp. 3
- [54]. 阿部千代治ら, 標準微生物学 (株式会社 医学書院, 東京, 2009).
- [55]. 城武 昇一, 抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与, 加工技術と評価 (株式会社 技術情報協会, 2021) p. 194
- [56]. 厚生労働省, 滅菌バリデーション基準の改正について, https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc2459&dataType=1&pageNo=1, (accessed 16 December 2021).
- [57]. J. Okpara-Hofmann, M. Knoll, M. Dürr, B. Schmitt, M. Borneff-Lipp, "Comparison of low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization for endoscopes using various Sterrad™ models", *Journal of Hospital Infection*, **59**, 4, 280-285 (2005). [DOI:10.1016/j.jhin.2004.10.002]
- [58]. 雅章永津, 大気圧低温プラズマの技術とプロセス開発, ed. 沖野晃俊 (株式会社シーエムシー出版, 2011) p. 230
- [59]. R. Zhou, R. Zhou, P. Wang, Y. Xian, A. Mai-Prochnow, X. Lu, P. J. Cullen, K. (Ken) Ostrikov, K. Bazaka, "Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications", *Journal of Physics D: Applied Physics*, **53**, 30, 303001 (2020). [DOI:10.1088/1361-6463/ab81cf]
- [60]. M. H. Lee, B. J. Park, S. C. Jin, D. Kim, I. Han, J. Kim, S. O. Hyun, K.-H. Chung, J.-C. Park, "Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure", *New Journal of Physics*, **11**, 115022 (2009). [DOI:10.1088/1367-2630/11/11/115022]
- [61]. T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, M. Hidekazu, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, M. Kohno, T. Azuma, A. Okino, "Microbial inactivation in the liquid phase induced by multigas plasma jet", *PLoS ONE*, **10**, 7 (2015). [DOI:10.1371/journal.pone.0132381]

- [62]. I. Lezcano, R. P. Rey, C. Baluja, E. Sánchez, "Ozone Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhimurium* in Water.", *Ozone: Science & Engineering*, **12**, 293-300 (1999). [DOI:10.1080/01919519908547242]
- [63]. T. Takamatsu, H. Kawano, Y. Sasaki, K. Uehara, H. Miyahara, Y. Matsumura, A. Iwasawa, T. Azuma, A. Okino, "Imaging of the *Staphylococcus aureus* Inactivation Process Induced by a Multigas Plasma Jet", *Current Microbiology*, **73**, 6, 766-772 (2016). [DOI:10.1007/s00284-016-1125-6]
- [64]. J. Guo, K. Huang, J. Wang, "Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review", *Food Control*, **50**, 482-490 (2015). [DOI:10.1016/j.foodcont.2014.09.037]
- [65]. Y. Suenaga, H. Kawano, T. Takamatsu, Y. Matsumura, N. Ito, A. Iwasawa, A. Okino, "Ultrasonic-Combined Plasma Bubbling for Adherent Bacteria Disinfection on Medical Equipment", *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, (2022). [DOI:10.1007/s11090-022-10241-7]
- [66]. J. C. Joaquin, C. Kwan, N. Abramzon, K. Vandervoort, G. Brelles-Mariño, "Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?", *Microbiology*, **155**, 3, 724-732 (2009). [DOI:10.1099/mic.0.021501-0]
- [67]. C. Smet, M. Govaert, A. Kyrylenko, M. Easdani, J. L. Walsh, J. F. Van Impe, "Inactivation of single strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* planktonic cells biofilms with plasma activated liquids", *Frontiers in Microbiology*, **10**, JULY, 1-15 (2019). [DOI:10.3389/fmicb.2019.01539]
- [68]. 川野浩明, マルチガス温度制御プラズマ装置の開発と医療分野への応用に関する基礎研究 (東京工業大学総合理工学研究科創造エネルギー専攻 博士論文, 2018).
- [69]. P. Fernandes, K. OYong, D. Terashita, "Understanding Infection Prevention Practices in Optometry Clinics", *Optometry and Vision Science*, **97**, 1, 24-27 (2020). [DOI:10.1097/OPX.0000000000001464]
- [70]. S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, K. Kitano, "Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water", *Journal of Physics D: Applied Physics*, **49**, 42, 425401 (2016). [DOI:10.1088/0022-3727/49/42/425401]
- [71]. J. Mager, M. Kuczynski, G. Schatzberg, Y. AVI-DOR, "Turbidity Changes in Bacterial Suspensions in relation to Osmotic Pressure", *Israeli Institute for Biological Research*, **14**, 69-75 (1956).
- [72]. T. Okuno, T. Yokomizo, *Bioactive Lipid Mediators* (Springer, Tokyo2, 2015) pp. 331
- [73]. M. Aoki, N. Sato, "Fatty Acid Content and Composition of Triacylglycerols of *Chlorella kessleri*", *Bio-protocol*, **8**, 1 (2018). [DOI:10.21769/BioProtoc.2676]
- [74]. 棚橋伸仁, あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センターニュース 2020 年 6 月号 (あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センター, 2020)
- [75]. 木下忍, 抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与, 加工技術と評価 (株式会社 技術情報協会, 2021) pp. 414
- [76]. 成治諸岡, 克己草壁, 喜義池水, 康夫加藤, "紫外線照射を伴うオゾンによる水中のポリ(オキシエチレン)の分解速度", *化学工学論文集*, **14**, 3, 427-430 (1988). [DOI:10.1252/kakoronbunshu.14.427]
- [77]. W. H. Glaze, G. R. Peyton, S. Lin, R. Y. Huang, J. L. Burleson, "Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. II. Natural trihalomethane precursors", *Environmental Science & Technology*, **16**, 8, 454-458 (1982). [DOI:10.1021/es00102a005]

- [78]. H. Juretic, M. Montalbo-Lomboy, J. Van Leeuwen, W. J. Cooper, D. Grewell, "Hydroxyl radical formation in batch and continuous flow ultrasonic systems", *Ultrasonics Sonochemistry*, **22**, 600-606 (2015). [DOI:10.1016/j.ultsonch.2014.07.003]
- [79]. R. J. W. Lambert, M. D. Johnston, E.-A. Simons, "A kinetic study of the effect of hydrogen peroxide and peracetic acid against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using the Bioscreen disinfection method", *Journal of Applied Microbiology*, **87**, 782-786 (1999).
- [80]. N. Yoda, Y. Abe, Y. Suenaga, Y. Matsudate, T. Hoshino, T. Sugano, K. Nakamura, A. Okino, K. Sasaki, "Resin Cement-Zirconia Bond Strengthening by Exposure to Low-Temperature Atmospheric Pressure Multi-Gas Plasma", *Materials*, **15**, 2, 631 (2022). [DOI:10.3390/ma15020631]
- [81]. 安田登, 二階堂徹, 秋元尚武, 遠山佳之, *接着治療失敗回避のためのポイント45 (クインテッセンス出版株式会社, tokyo, 2010)* pp. 158
- [82]. I. Denry, J. R. Kelly, "State of the art of zirconia for dental applications", *dental materials*, **24**, 299-307 (2007). [DOI:10.1016/j.dental.2007.05.007]
- [83]. M. Okada, H. Taketa, Y. Torii, M. Irie, T. Matsumoto, "Optimal sandblasting conditions for conventional-type yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals", *Dental Materials*, **35**, 169-175 (2019). [DOI:10.1016/j.dental.2018.11.009]
- [84]. 安田登, 二階堂徹, 秋元尚武, 遠山佳之, *接着治療失敗回避のためのポイント45 (クインテッセンス出版株式会社, tokyo, 2010)* pp. 178
- [85]. Y. Ito, T. Okawa, T. Fukumoto, A. Tsurumi, M. Tatsuta, T. Fujii, J. Tanaka, M. Tanaka, "Influence of Atmospheric Pressure Low-Temperature Plasma Treatment on the Shear Bond Strength Between Zirconia and Resin Cement", *Journal of Prosthodontic Research*, **60**, 4, 289-293 (2016). [DOI:https://doi.org/10.1016/j.jpor.2016.02.001]
- [86]. M. Cheng, G. Zeng, D. Huang, C. Lai, P. Xu, C. Zhang, Y. Liu, "Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds : A review", *Chemical Engineering Journal*, **284**, 582-598 (2016). [DOI:10.1016/j.cej.2015.09.001]
- [87]. N. Nagaoka, K. Yoshihara, V. P. Feitosa, Y. Tamada, M. Irie, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek, S. Hayakawa, "Chemical interaction mechanism of 10-MDP Chemical interaction mechanism of 10-MDP with zirconia", *Nature Publishing Group*, **7**, 45563 (2017). [DOI:10.1038/srep45563]
- [88]. Y. Liu, J. Hsieh, Y. Chen, L. Kang, C.-S. Hwangb, S.-F. Chuang, "Promoting porcelain - zirconia bonding using different atmospheric pressure gas plasmas", *Dental Materials*, **34**, 1188-1198 (2018). [DOI:10.1016/j.dental.2018.05.004]
- [89]. A. Ozaki, S. Shishido, K. Nakamura, A. Harada, Y. Katsuda, T. Kanno, H. Egusa, "Impact of adhesive primer and light-curing on polymerization kinetics of self-adhesive resin cement in association with free radical reaction", *European Journal of Oral Sciences*, , 1-12 (2021). [DOI:https://doi.org/10.1111/eos.12828]
- [90]. M. A. Gauthier, I. Stangel, T. H. Ellis, X. X. Zhu, "Oxygen Inhibition in Dental Resins", *Journal of Dental Research*, **84**, 8, 725-729 (2005). [DOI:https://doi.org/10.1177/154405910508400808]
- [91]. 中尾眞, 第1回調査「お口の健康に対する意識・要望を聞く」2004年実施, <https://www.gcdental.co.jp/kokumin/pdf/no1.pdf>, (accessed 27 December 2021).
- [92]. 千田彰, 田上順次, 近藤隆一, 中川孝男, 赤羽正治, ホワイトニング材の現状とこれから, <https://www.gcdental.co.jp/clinicalconv/pdf/no136.pdf>, (accessed 27 December 2021).
- [93]. H. Choi, K.-N. Kim, E.-M. You, E.-H. Choi, Y.-H. Kim, K.-M. Kim, "Tooth Whitening

- Effects by Atmospheric Pressure Cold Plasmas with Different Gases”, Japanese Journal of Applied Physics, **52**, 11NF02 (2013). [DOI:https://doi.org/10.7567/JJAP.52.11NF02]
- [94]. H. W. Lee, G. J. Kim, J. M. Kim, J. K. Park, J. K. Lee, G. C. Kim, “Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma”, Journal of Endodontics, **35**, 4, 587-591 (2009). [DOI:https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.01.008.]
- [95]. A. Y. Nikiforov, A. Sarani, C. Leys, “The influence of water vapor content on electrical and spectral properties of an atmospheric pressure plasma jet”, Plasma Sources Science and Technology, **20**, 1, 15014 (2011). [DOI:10.1088/0963-0252/20/1/015014]
- [96]. J. Travis, “Making the cut”, Science, **350**, 6267, 1456-1457 (2015). [DOI:10.1126/science.350.6267.1456]
- [97]. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”, Science, **337**, 6096, 816-821 (2012). [DOI:10.1126/science.1225829]
- [98]. Y. Osakabe, K. Osakabe, “Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants”, Plant and Cell Physiology, **56**, 3, 389-400 (2014). [DOI:10.1093/pcp/pcu170]
- [99]. K. Belhaj, A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, N. J. Patron, V. Nekrasov, “Editing plant genomes with CRISPR/Cas9”, Current Opinion in Biotechnology, **32**, 76-84 (2015). [DOI:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.007]
- [100]. Y. Yanagawa, Y. Suenaga, Y. Iijima, A. Okino, I. Mitsuhara, “Temperature-controlled atmospheric-pressure plasma treatment induces protein uptake via clathrin-mediated endocytosis in tobacco cells”, Plant Biotechnology, **39**, 2, 179-183 (2022). [DOI:https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.0105a]
- [101]. Y. Yanagawa, Y. Suenaga, Y. Iijima, M. Endo, N. Sanada, E. Katoh, S. Toki, A. Okino, I. Mitsuhara, “Genome editing by introduction of Cas9/sgRNA into plant cells using temperature-controlled atmospheric pressure plasma”, PLOS ONE, **18**, 2, 1-15 (2023). [DOI:10.1371/journal.pone.0281767]
- [102]. 佐久間哲史, 中出翔太, *All Aboutゲノム編集*, eds. 真下知士 and 山本卓 (株式会社羊土社, 2016) pp. 18
- [103]. N. Sharma, S. Acharya, K. Kumar, N. P. Singh, O. P. Chaurasia, “Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview”, Journal of Soil and Water Conservation, **17**, 364-371 (2018).
- [104]. J. Postma, *Recent Developments in Management of Plant Diseases*, eds. U. Gisi, I. Chet and M. L. Gullino (Springer Netherlands, 2009) pp. 133
- [105]. K. Koga, S. Thapanut, T. Amano, H. Seo, N. Itagaki, N. Hayashi, M. Shiratani, “Simple method of improving harvest by nonthermal air plasma irradiation of seeds {of Arabidopsis thaliana(L.)}”, Applied Physics Express, **9**, 1, 16201 (2015). [DOI:10.7567/apex.9.016201]
- [106]. T. Okumura, Y. Saito, K. Takano, K. Takahashi, K. Takaki, N. Satta, T. Fujio, “Inactivation of Bacteria using Discharge Plasma under Liquid Fertilizer in a Hydroponic Culture System”, Plasma Medicine, **6**, 3-4, 247-254 (2016). [DOI:10.1615/PlasmaMed.2016018683]
- [107]. K. Takahashi, Y. Saito, R. Oikawa, T. Okumura, K. Takaki, T. Fujio, “Development of automatically controlled corona plasma system for inactivation of pathogen in hydroponic cultivation medium of tomato”, Journal of Electrostatics, **91**, 61-69 (2018). [DOI:https://doi.org/10.1016/j.elstat.2017.12.006]
- [108]. 鈴木健, *イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル* (千葉県農林総合研究センター, 2012).
- [109]. 園芸の基本 まずは知りたい園芸知識, <https://www.sc->

engei.co.jp/gardeningbeginner/basics/005-003.html, (accessed 4 January 2022).

- [110]. M. H. Nam, S. K. Jeong, Y. S. Lee, J. M. Choi, H. G. Kim, "Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose", *Plant Pathology*, **55**, 2, 246-249 (2006). [DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01322.x>]