

低圧酸素プラズマを用いたバイオフィルムの分解特性に関する研究

中村, 修也
九州大学大学院総合理工学府総合理工学専攻プラズマ・量子理工学メジャー

<https://hdl.handle.net/2324/7178684>

出版情報：九州大学, 2023, 修士, 修士
バージョン：
権利関係：



令和5年度

九州大学大学院 総合理工学府

総合理工学専攻

プラズマ・量子理工学メジャー

修士論文

論文名

低圧酸素プラズマを用いた

バイオフィルムの分解特性に関する研究

氏 名

中村修也

指導教員名

林信哉

目次

第1章 序論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究目的.....	4
1.3 論文構成.....	4
第2章 プラズマ滅菌法	5
2.1 滅菌とは.....	5
2.2 滅菌サンプル.....	6
2.2.1 バイオフィルム.....	6
2.2.2 細菌芽胞.....	8
2.3 プラズマ滅菌とは.....	11
2.3.1 プラズマ	11
2.3.2 プラズマ滅菌法.....	12
2.3.4 容量結合型プラズマ	14
第3章 実験装置および実験方法.....	16
3.1 低圧高周波酸素プラズマ装置.....	16
3.1.1 低圧高周波酸素プラズマ発生装置.....	16
3.1.2 酸素プラズマの生成方法.....	19
3.2 プラズマ中の生成活性種の特定	20
3.2.1 発光分光計測	20
3.3 酸素プラズマ滅菌の滅菌特性の調査.....	22
3.3.1 滅菌評価方法	22
3.3.2 滅菌サンプルの作製.....	28
3.3.3 空気プラズマおよび酸素プラズマ滅菌の照射時間特性調査.....	34
3.3.4 酸素プラズマ滅菌の投入電力特性調査.....	34
3.3.5 プラズマ照射時に生じる熱による滅菌への影響調査.....	35
3.3.6 酸素プラズマ滅菌の滅菌に要する最短処理時間の調査.....	36
3.4 滅菌処理による副生成物調査.....	37
第4章 実験結果および考察.....	38
4.1 発光分光計測による酸素プラズマ中の生成粒子種の特定	38

4.2 滅菌特性の調査	41
4.2.1 空気プラズマおよび酸素プラズマ滅菌の照射時間特性調査.....	41
4.2.2 酸素プラズマ滅菌の投入電力特性調査.....	42
4.2.3 プラズマ照射時に生じる熱による滅菌への影響調査.....	42
4.2.4 酸素プラズマ滅菌の滅菌に要する最短処理時間の調査.....	43
4.3 滅菌処理による副生成物調査	51
第5章 総括.....	54
謝辞.....	56
参考文献.....	57

第 1 章 序論

1.1 研究背景

宇宙開発の歴史は冷戦時代にその始まりを見る。1957 年にソビエト連邦による人類初の人工衛星「スプートニク 1 号」の成功した打ち上げは、米ソ間の宇宙開発競争、通称スペースレースの火付け役となった [1]。これに対抗する形で、アメリカは 1958 年に NASA を設立し、特に 1969 年のアポロ 11 号による月面着陸は顕著な成果として記憶されている。最近では、アポロ計画に続き、宇宙飛行士による月周回軌道の宇宙飛行および月面着陸を目的とした「アルテミス計画」が進行中である [2]。このような新たな探査においては、地球外生態系への微生物レベルでの汚染防止や、探査機に付着する未知の細菌の持ち込み防止といった滅菌処理が重要視されている。現状として、国際宇宙ステーション (ISS) 内に存在する細菌が乗組員の健康に影響を及ぼすことが懸念されている [3]。ISS 内は長期間にわたり船体が宇宙環境にさらされることから、船内の清掃には限界がある。その結果、環境真菌や常在真菌が宇宙環境で増殖し、乗組員への曝露リスクが高まっている [4]。特に、細菌の集合体であり表面が膜で覆われた構造を持つバイオフィームは、既存の滅菌技術では処理が難しいと言われている。このようなバイオフィームの問題は、食品分野や宇宙開発分野においても重要な課題となっている。

ISS 内でも特に細菌の増殖が懸念されている箇所の一つに、水循環システム (WPA) がある。WPA は、ISS 内で生成された廃水や乗組員の呼吸や汗から放出される船内の湿気を処理して飲料水に変換するシステムで、宇宙環境において限られた水資源を最大限に利用することを目的としている [5]。しかし、乗組員の生活から発生する廃水を処理するため微生物を含む有機物質が元々含まれていることや、複雑な水処理システム設備から細菌の増殖が懸念されている。そこで ISS では現在、水処理システムへの滅菌法として紫外線殺菌照射 (UVGI) 消毒が用いられている。この手法は、表面処理により薬剤を使用せずに迅速かつ効果的に微生物の不活化を促進することが可能だが、UV 光の浸透力には限りがあることから、表面が膜で覆われたバイオフィームの分解手法としては効果が薄い。

宇宙空間における宇宙機用の滅菌器に求められる特性として、有害なガスおよび薬剤残留物が無く、船内で貴重とされている水を不要とし、タンパク質などの有機物の滅菌も可能であることが挙げられる。そして特に「確実性」と「安全性」が求められている。しかしながら、現在医療分野を始めとする多くの分野で使用されている従来の滅菌法は、それぞれの問題により宇宙機用の滅菌法には適さない。以下に代表的な滅菌方法を述べる。

高圧蒸気(オートクレーブ)滅菌法

オートクレーブ滅菌に使用される滅菌材は、130℃前後の加圧飽和水蒸気である。この高温高圧蒸気が細菌を構成するタンパク質の凝固・分解を引き起こすことで細菌を滅菌させる。そのため、有毒な殺菌薬を使わないために残留性の心配がなく、かつ低コストで滅菌できる利点を持つ。一方で、熱を利用した滅菌法であるため、部材への熱変形が懸念される上に、宇宙空間での高圧環境を作り出すことは非常に危険を伴うので使用することが出来ない。

エチレンオキサイドガス (Ethylene Oxide Gas:EOG) 滅菌法

EOG 滅菌では EOG がアルキル化剤として滅菌に作用し、タンパク質分子の—COOH 基,—SH 基や核酸中の NH₂ 基をアルキル化し細菌を変性・不活化する。オートクレーブ滅菌法とは異なり低温処理が可能な滅菌法であるため、非耐熱器材や光学器材、精密器材のような高圧蒸気滅菌法を適用できない非耐熱性・非耐湿性の器材にも適用することが出来る。しかし、EOG は 毒性が強く発がん性がある薬剤でもあるため、除染作業者の被害対策や器材に残留した成分が宇宙空間を汚染してしまう問題も発生する。器材に薬剤を残留させないためにエアレーションという滅菌容器内の換気操作が処理工程に含まれるが、エアレーションが終了するまで最低でも 8～12 時間もの長時間を要し、エアレーション後も薬剤が残留したケースが報告されている [6]。

酸化性殺菌剤を用いた物理的処理

酸化性殺菌剤を用いた殺菌処理では、使用後は無機イオンになることからオゾン、過酸化水素、次亜塩素酸およびクロラミン若しくはブロマミン等の酸化系殺

菌剤が多く用いられてきた。中でも、ハロゲン系殺菌剤はその取扱いの簡易さから、水道のみならず、温泉、水泳プール等で繁用されている。これらのもつ塩素やヨウ素は、微生物のタンパク質や酵素のアミノ酸残基と反応し、タンパク質構造の変化に寄与する。これによりその生物学的機能が失われ、微生物の代謝活動が阻害される。さらに、ハロゲンは細胞内の核酸にも作用する。DNA や RNA の損傷が引き起こされ、細菌やウイルスの遺伝情報の複製や修復が不可能になる。このような機序により、ハロゲン系殺菌剤は広範囲の微生物に対して高い殺菌効果を発揮する。しかし、酸化性殺菌剤の残存は人体に様々な影響を及ぼす可能性が高い。これらの殺菌剤は、微生物を不活性化するために酸化反応を利用するが、適切に除去されないと皮膚や粘膜の刺激、呼吸器への影響、アレルギー反応を引き起こすことがある。特に長期間にわたる露出や高濃度での使用は、健康リスクを高める可能性がある [7]。これに加え、宇宙空間において貴重な資源である水を使用するため、宇宙空間での滅菌手法には適していない。

以上の各滅菌法の課題より、従来の滅菌法は宇宙空間での宇宙機内部の滅菌器として使用することは非常に困難である。そんな中近年、従来の滅菌法が抱える課題を克服し、さらに宇宙空間での恒常的な運用にも適している新たな滅菌法としてプラズマを用いた滅菌法が注目されている [8] [9]。プラズマ滅菌法は、原料ガスをプラズマ化することにより生成される活性酸素種を利用して細菌を死滅させる技術である。この方法は低温での滅菌が可能であり、活性酸素種の寿命が短いため、安全性が高いとされる。そのため、プラズマを生成し対象物に直接照射するポータブル装置であるプラズマジェットを用いたバイオフィーム処理に関する先行研究も既に存在する [10]。プラズマジェットによる滅菌方法は、簡易的で即時に利用できるという点から幅広い分野で応用されている。しかし、処理範囲が局所的であり均一な処理が難しいことや、操作者の技術依存性、照射部分が露出していることによる事故のリスクを持つという側面も持つ。そのため、滅菌効果の確実性と手法の安全性が求められる宇宙機内においてプラズマジェットを用いた手法は最適とは言えない [11]。

そこで、真空チャンバーを用いた低圧酸素プラズマ滅菌によるバイオフィームの分解を試みた。低圧酸素プラズマ滅菌器は、宇宙機用の滅菌器としての特性を

有し、酸素と電気のみで運用が可能であるため、資源が限られた宇宙空間において特に適していると考えられる。また、真空チャンバーを用いることにより対象物全体を一括して滅菌処理できるため、均一な滅菌が可能となる。さらに、密閉された環境での処理により操作者や周囲への安全性が高まり、処理における事故リスクが減少することから、滅菌の確実性と安全性は高いと言える。しかし、実用化の為にバイオフィルムを対象とした低圧酸素プラズマ滅菌の滅菌特性、さらに主要な滅菌因子となる活性種および、その活性種が最も多く生成される条件を調査する必要がある。

1.2 研究目的

本研究の目的は、ISS 内に常設される WPA に存在するバイオフィルムを対象に、低圧高周波酸素プラズマ滅菌器の有効性を検証することである。バイオフィルムは微生物のコロニーが表面に密着して形成される構造であり、その除去は特に困難である。このような環境で、低圧高周波酸素プラズマ滅菌器が効果的にバイオフィルムを除去できるかを調べるのが研究の焦点である。

そこで本研究は、バイオフィルムを形成させたプレート(ステンレス板, アルミニウム) に対して真空チャンバー内にて低圧高周波酸素プラズマ照射を行い、その滅菌特性(酸素プラズマ中で生成される活性種、滅菌性能の酸素ガス圧力依存性、滅菌に要する最短処理時間) および主要な滅菌因子を明らかにし、分解特性を調査することを目的に行った。

また、バイオフィルム制御の原理には、①バイオフィルム内の微生物を消滅させることと、②新たなバイオフィルムの形成を防ぐためにバイオフィルムの表面を覆うマトリックスの崩壊を促進することの両方が含まれることから、上記 2 点を目標に掲げた。

1.3 論文構成

第 1 章では本研究の研究背景について述べた。第 2 章では研究目的、第 3 章では本研究において用いた実験装置や酸素プラズマ照射方法および細胞活性化の評価法に関して述べた。第 4 章では実験結果および考察、第 5 章では総括を述べた。

第2章 プラズマ滅菌法

2.1 滅菌とは

滅菌（sterilization）とは、“病原性および非病原性を問わず、芽胞を含む全ての微生物を殺滅（芽胞をも死滅させることを含む）あるいは除去すること”を意味している [12]。滅菌は、消毒の意味する「害がないレベルにまで微生物数の数を減らしたり毒性を無くしたりすること」以上の厳しい基準である。[13]一般に菌の生残数は確率論的に取り扱われ、細菌は処理時間に対して指数関数的に減少することが知られている。

図 2.1 には、指標菌の残存曲線を示す。図に示すように、滅菌処理により微生物は処理時間に対し $1/10$ ずつ対数的に減少していくが、理論上は完全に 0 にはならない。医療現場では滅菌処理後の無菌保証水準(Sterility Assurance Level : SAL) として、微生物が残存する確率を 10^{-6} (6D) 以下と定めている。これは、滅菌処理後、被滅菌物に微生物の存在する確率が 100 万分の 1 以下となることであり、ほぼ 0 に等しいことを意味する [12]。被滅菌物に付着している菌数を $1/10$ に減少させるために必要な滅菌処理時間を D 値と呼び、滅菌処理前の器具に 10^6 個の微生物が存在した場合、SAL を達成するには 12D だけ時間が必要ということになる。

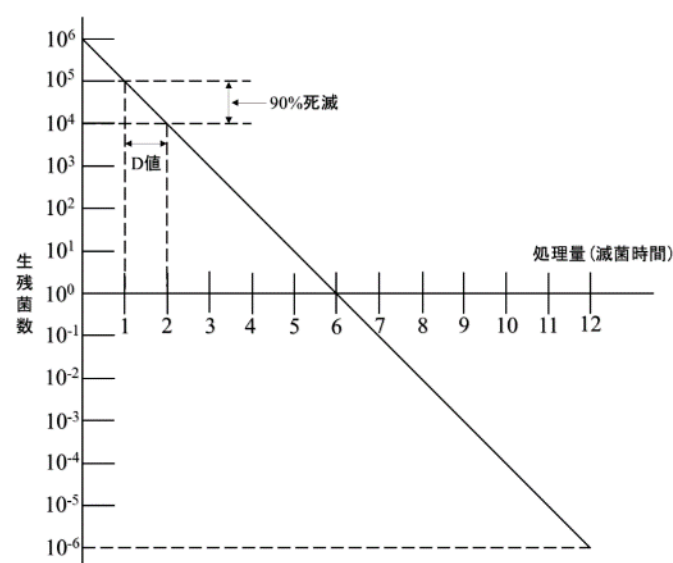


図 2.1 指標菌の残存曲線

2.2 滅菌サンプル

2.2.1 バイオフィルム

バイオフィルムは、物質表面に付着した微生物とそれらが生産するマトリックスで覆われた 3 次元構造体である。微生物や細菌を覆うマトリックスは主に多糖類、核酸、およびタンパク質から構成されており、細胞外多糖類が約 70 %、タンパク質が約 20 %、その他 10 %は脂質や核酸で占められている。[7]。バイオフィルムは固体表面と水が接している環境であれば、水圏を始め、土壌中、植物体、動物体など自然環境と人工環境を問わずに存在する。自然環境ではバイオフィルムは複数種類の微生物から構成されるミックスバイオフィルム(mixed biofilm)として存在している。それらは我々の生活とも深い関わりをもっており、身近な例として歯垢や台所の排水溝のヌメリなどが挙げられ、水道管や石油パイプライン、医療器具のカテーテル内にも存在が確認されている。

バイオフィルムを構成する集合体付着生活形の細菌は、細胞周囲に細胞外多糖を有している。そのためバイオフィルムを構成する細菌は、同種の浮遊生活形の細菌と比較して環境変動の流動、干出、浸透、水質変化等に対する耐性が強い。また、栄養の乏しい天然環境に生育する天然バイオフィルムは、バイオフィルム内部に通水チャネル (water canal) を有していることがあり、その場合にはバイオフィルム内部での物質の透過と伝達是非常に早いといわれる。そのため、他の微生物とも相互影響を及ぼし合う共同的な生活空間となっている [14]。バイオフィルムの形成は自然環境において水や土壌の浄化などに大きな役割を果たしているが、その形成は様々な分野において熱交換率の低下、水供給率の低下、微生物腐食、そして微生物汚染等を引き起こす原因となっている。したがって、水の処理管理施設や食品、医薬品の製造ライン、プール水や温泉水の衛生管理、そして医療器具や病院の衛生管理などにおいてバイオフィルムの殺菌・除去が強く求められている [15]。病院等の医療関連施設で発生する感染性疾患の多くはバイオフィルムに起因すること、バイオフィルム形成による疾患なども報告されている。更には、バイオフィルムの形成により微生物の環境変化や薬剤・殺菌剤に対する抵抗性が増すことから、バイオフィルムの制御が重要な課題となっている。

・バイオフィーム形成過程

バイオフィーム形成過程にはいくつかの段階を踏むことが報告されている。

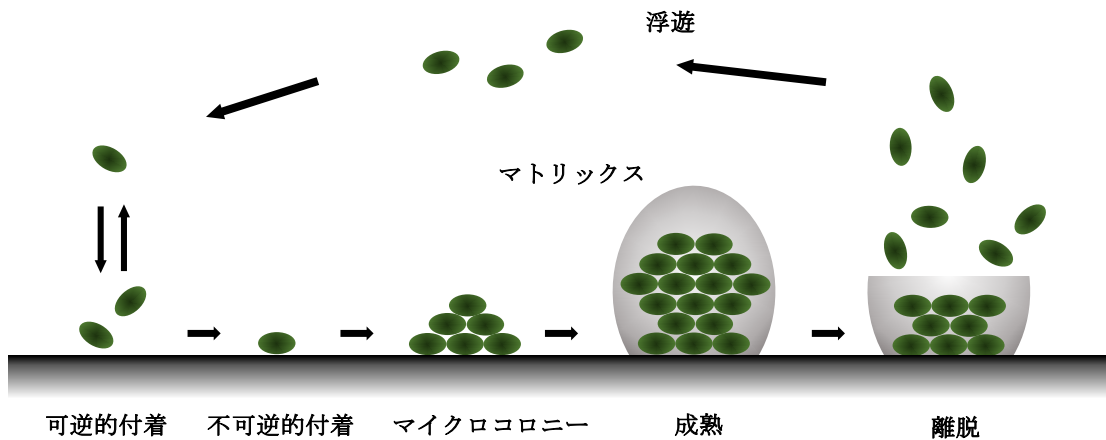


図 2.2 バイオフィームのライフサイクル

I. 浮遊状態の細胞が鞭毛や繊毛を用いた運動性により、固体表面に付着

バイオフィームのライフサイクルにおいて、付着段階は浮遊状態からバイオフィーム状態へと移行する分岐点である。付着に際して、菌体はまず鞭毛や線毛を介して物質表面に“緩く”付着する。この段階は可逆的付着状態と呼ばれ、浮遊状態と付着状態の中間の状態である。可逆的付着状態にある細胞のうちのいくらかは再び浮遊状態へと移行するが、一部の細胞はバイオフィーム形成の前段階である不可逆的付着状態へと移行する。

II. 物理化学的な力により可逆的に付着

富裕状態だった菌体は鞭毛により強固に付着する。付着に伴い細菌の形態や生理機能が変化し、細菌では細胞外多糖類の産生、鞭毛や繊毛運動が低下する。菌体外酵素や微生物間情報伝達物質の産生などが始まり、薬剤や低栄養などの環境からの攻撃に対する抵抗性が増加する。

III. 立体的なマイクロコロニーの形成

基質に付着した細菌は基質表面上で分裂し、細胞群やマイクロコロニーを形成。

IV. バイオフィームの成熟

成熟したバイオフィームは複数の層を持ち、水チャネルなどの複雑な構造を形成する。これらの構造は、バイオフィーム内の栄養分や廃棄物の流れを

助け、細胞間の物質交換を促進する。

V. 微生物細胞の離脱

バイオフィルムはある一定の成熟度に達すると、微生物細胞が離脱し始める。このプロセスは自然な生命サイクルの一環であり、離脱後は新たな表面への付着が行われ、上記プロセスを繰り返す。

2.2.2 細菌芽胞

細菌芽胞は、一部の細菌が極端な環境条件下で生存するために形成される耐久性の高い休眠形態の構造物である。芽胞は通常、栄養素が欠乏しているか、温度が非常に高いまたは低いなど、生存に適さない状況に直面したときに形成される。芽胞状態の細菌は厳しい環境下でも長期的に生存することができ、乾燥や 100℃ の熱、紫外線、アルコール、芽胞以外のすべての細菌・ウイルスに有効であるオルトフタルアルデヒドのような強力な殺菌剤にも強い抵抗性を示す [16]。芽胞は、細菌の DNA、リボソーム、酵素などの必要な生物学的要素を含んでおり、外部の過酷な条件からこれらを保護する。これにより、細菌は長期間にわたり生存し、条件が改善されると再び活動的な状態に戻るができる。芽胞を形成する菌は限られており、特に土壌中や極端な環境下で見られるバチルス属やクロストリジウム属の細菌が一般的である [17]。

細菌芽胞の形成過程は複数の段階を経て進行する。初期段階では、細胞内で DNA が複製され、細胞が不均等に分裂して芽胞と母細胞が形成される。続いて、芽胞は特殊な被膜によって覆われ、乾燥や熱、化学物質、放射線などに対する耐久性が増す。最終段階では、母細胞が崩壊することで耐久性の高い芽胞だけが残る [18]。

・芽胞の構造 [19][17]

細菌芽胞は、極端な環境条件に耐えられるように、コア・内膜・皮質・芽胞殻の 4 つの部位から構成されている。図 2.4 には細菌芽胞の構造図を示す。

① コア (Core)

コアは脂質で構成された細胞膜に覆われた部分であり、DNA や RNA、生命活動に必要なリボソーム、酵素、難溶性低分子タンパク質などが存在し、芽胞が発芽した後に栄養細胞へと成長する部分である。のコアの存在により、芽胞は過酷な環境条件下で長期間生存し、環境が再び生育に適した条件に戻った際に、細菌は活動的な状態に復帰することができる。特に注目すべきは、コア内には DNA を保護するために、カルシウムとピロリン酸塩が豊富に含まれている点である。これらの化合物は DNA に安定化作用をもたらし、外部のストレスから遺伝情報を守る役割を果たす。さらに、コアは低水分状態に保たれており (Geobacillus stearothermophilus では 54%)、これが細菌芽胞の耐熱性や耐乾燥性に寄与している。

② 内膜 (Inner Membrane)

内膜は、芽胞のコアを直接取り囲む重要な構造である。この内膜は、脂質二重層から成る典型的な細菌の細胞膜と同様の構造を持っているが、芽胞形成時には通常の細胞膜よりも不浸透性が高まる特徴がある。内膜の主な役割は、コアを物理的な損傷や有害物質から保護することであり、これによって芽胞は外部環境からの様々なストレスに耐えることができる。

③ 皮質 (Cortex)

コルテックスは、主にペプチドグリカンで構成されており芽胞殻と内膜に挟まれた部分に位置している。ペプチドグリカンとは、アミノ酸が $-\text{CONH}-$ (ペプチド結合) で繋がって作るペプチドとアルコール(C-OH)を多く含む炭水化物の一種である糖の直鎖が結合して作られる高分子化合物である。芽胞は熱や化学物質に対して高い耐性を示すが、これはコルテックスの厚く、密度の高い構造により持外部からの物理的な損傷や化学的な攻撃を効果的に遮断することができるからである。さらに、コルテックスによって内部の水分が保持され、芽胞が長期間にわたって過酷な環境条件に耐えることが可能になるため、細菌芽胞の休眠状態における安定性にも寄与している。

④ 芽胞殻 (Spore coat)

細胞殻は、約 90%がシステインやシスチンを豊富に含む硬質なケラチン様結晶性タンパク質から構成されている。この高いシステイン含量により、細胞殻は特に堅牢な構造を持ち、外部環境からの様々なストレスに対して優れた保護能力を発揮する。システインとシスチンは硫黄含有アミノ酸であり、これらが多システインことで、タンパク質間のジスルフィド結合が形成され、結晶性と硬質な特性が強化される。この細胞殻の化学組成により、芽胞は機械的な損傷、消化酵素の侵入、化学物質や紫外線などに対する耐性を高めることができる。

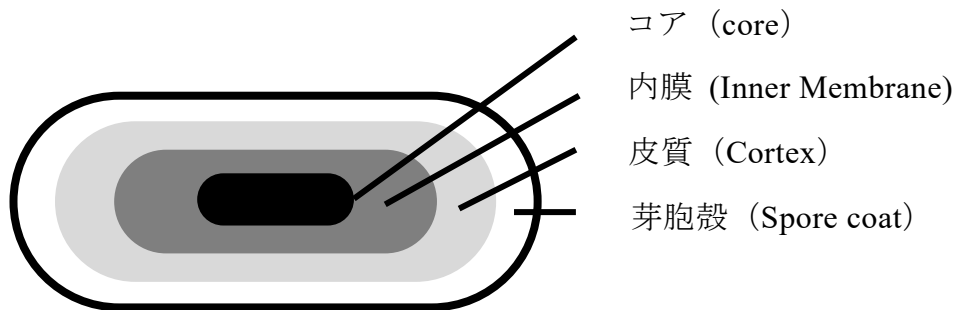


図 2.3 芽胞菌の構造

2.3 プラズマ滅菌とは

2.3.1 プラズマ

物質の状態には固体、液体、気体そしてプラズマの4種類の状態が存在する。物質の温度を上げていくと、固体から液体、気体へと状態が変化し、プラズマはこれら物質の3態に続く「物質の第4の状態」といわれる。気体の状態から温度をさらに上げるなどしてエネルギーを加えると、気体分子同士が激しく衝突することで電離が起こり、多数の正イオンと電子が発生して、それらが動き回っている状態となる。このような、イオンや電子などの荷電粒子と、原子や分子などの中性粒子からなる気体を「プラズマ」という。電離する際、正イオンと電子は必ず対で生じるためプラズマ中の正イオンの数と電子の数はほぼ等しく、全体としては電氣的に中性の状態にある。電場を加えることで電子を加速し中性粒子と衝突させると、粒子は電離し電子を放出する。さらに放出された電子は、他の粒子と衝突し電離させる。これを繰り返すことでプラズマが生成される [20]。

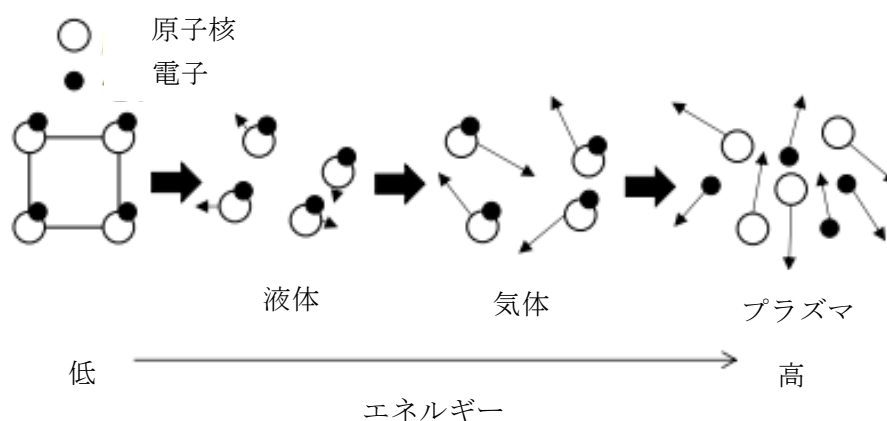


図 2.4 物質の三態とプラズマ

プラズマは、一般的な中性粒子からなる気体には見られない熱的、電磁氣的、化学的、光学的性質を持つことが知られている [21]。このような特質を活かして、プラズマ溶射、半導体のエッチング、蛍光灯といった様々な分野で用いている。近年では、プラズマ中で生成される活性種を利用した医療応用に関する研究が盛んに行われている。医療器材の滅菌分野では、低圧プラズマや大気圧低温プ

ラズマを用いた滅菌処理が効果的であることが報告されており、これにより菌の死滅が促進される。その他にも、がん治療 [22]やプリオンなどの難分解性タンパク質の分解・除去 [23]などへの応用が注目されている。

・熱平衡プラズマと非熱平衡プラズマ

気体放電を利用したプラズマは、熱平衡プラズマと非熱平衡プラズマに大別される。大気圧に近い高圧力で放電すると、イオン、電子、中性粒子間の衝突が激しいことから、これらの粒子間でエネルギー交換が頻繁に行われ、各粒子が同じ温度にある熱平衡状態となる。イオン、電子、中性子の温度がほぼ等しい熱平衡プラズマを熱プラズマという。

一方、数百 Pa 以下の低圧力プラズマはイオンと電子が異なるエネルギーを持っており、熱的に非平衡な状態となる。電子は他粒子との衝突面積が小さいため運動エネルギーを失いにくく、イオンや中性粒子よりもはるかに電子温度が高い状態となる。このようなプラズマを非熱平衡プラズマと呼ぶ。非熱平衡プラズマでは、高エネルギー電子が周囲の中性粒子を励起、解離することでラジカルを生成し、ラジカルを起点として高い反応性を様々な技術へと応用可能になる。

2.3.2 プラズマ滅菌法

プラズマ滅菌は、励起状態の分子や原子、さらには原料ガスから生成される活性粒子を利用した滅菌方法である。プラズマ中で生成されるこれらの粒子は、細菌に化学的・物理的影響を与えることで、殺菌効果を得る。この方法は、人体に害のない原料ガスを用いるため安全性が高く、高速かつ低温での滅菌処理が可能であることから盛んに研究が行われている。原料ガスには、空気、酸素、アルゴン、窒素、ヘリウムなどが使用される。これらのガスはプラズマ状態にすることで、微生物の細胞膜や DNA に損傷を与える活性粒子や励起粒子を生成する。プラズマ滅菌のメカニズムは、これらの粒子が細菌の構造に直接作用し、細胞の機能を破壊することにより滅菌を実現する [24]。

大気圧プラズマ滅菌

大気圧プラズマ滅菌では、主に RF 電源による誘電体バリア放電 (DBD: Dielectric Barrier Discharge) や DBD を用いたグロー放電、マイクロ波を用いたプラズマジェットによる滅菌の研究が行われている。大気圧環境下でプラズマを生成する場合、原料気体は放電部分でイオンや原子状態となる。原料ガスが希ガスであれば、放電源から数 cm 離れた所までプラズマ状態の気体粒子が届き、細菌の細胞壁や細胞膜を破壊して滅菌を行うことができる。希ガス以外の原料ガスでは、放電領域から離れると、励起状態や電離状態から元の原料気体成分に戻る気体粒子もいるが、励起状態や電離状態の気体粒子同士が結合して原料気体にはない電氣的に中性な活性気体を作る場合もある。酸素からはオゾン、窒素と酸素からは窒素系活性酸素種が作られ、これら中性活性気体が細菌を構成する有機物に化学的作用を与えて滅菌が行われる。

低圧プラズマ滅菌

低圧プラズマ滅菌では、主に、高周波 (RF) 電源による容量結合プラズマ (CCP: Capacitively Coupled Plasma) や電子サイクロトロン共鳴生成プラズマ (ECR: Electron Cyclotron Resonance) が用いられ、原料気体はイオンや原子状態となって細菌を構成する有機物に化学的、物理的に作用を与えることで滅菌が行われる。殺菌因子であるイオンや原子、励起分子は電源からのエネルギー供給を止めると元の原料気体成分へと戻るため、殺菌因子は残留しない。仮に新たな活性気体成分が生成された場合でも圧力が数 Pa~数百 Pa であるため、気体存在量はとても少ない。そのためプラズマ内での粒子間の衝突が減少し、粒子はより多くのエネルギーを持つことができる。特に酸素のみを使用した低圧プラズマ滅菌では殺菌因子が酸素に戻るのみであることから、残留気体への心配や後処理を考慮する必要がないといった利点がある。これらより、低温処理が可能かつ人体や環境に無害、そして短時間での処理が可能なドライな滅菌法として低圧酸素プラズマ滅菌法が注目されている。以下に宇宙機内での滅菌プロセスにおいて酸素プラズマの使用が有益である理由を三点述べる。

一点目は、宇宙空間での運用コストの低さである。低圧高周波酸素プラズマ滅菌器は、酸素ガスを唯一の原料とし、空気中の酸素から生成することが可能であ

る。また、動力源には電気を使用し、太陽光パネルからの供給により運用することが可能である。このように、ランニングコストの面で優れており、資源が限られた宇宙空間での使用に適している。

二点目は、滅菌処理における安全性である。滅菌因子であるプラズマ中の活性酸素種はエネルギーの印加時のみ生成される。そのためエネルギーの印加がなくなるとすぐに消滅し、活性酸素種は即座に安定な酸素分子へと変化する。この過程で有毒なガスは発生しないため、化学薬品や放射線を使用する他の滅菌方法と比べて宇宙環境への汚染や乗組員への影響が非常に小さい。

三点目は、滅菌対象物に対する高い素材適合性である。酸素プラズマ中の活性酸素種を用いた滅菌処理は、滅菌対象物の表面に作用が限定されるため、素材の内部特性に影響を与えることが少ないとされている。宇宙機のように一度打ち上げるとメンテナンスが不可能になる場合にも、この滅菌方法は非常に適していると考えられている。

2.3.4 容量結合型プラズマ

本研究では、容量結合型プラズマ(Capacitively Coupled Plasma : CCP)を使用した。図 2.5 に示す容量結合型プラズマの典型的な回路図から確認できるように、この方式では高周波電源が高周波印加電極と接地電極の二枚の平行電極板に接続されている。高周波印加電極側には、整合器（マッチングボックス、M.B.）とブロッキングキャパシタ（CB）が配置されている。工業用途で一般的に使用される 13.56MHz の高周波電力をこの回路に印加することで、電極間に存在する初期電子が高周波電場によって加速される。この加速された電子がガス分子と衝突し、衝突電離作用により新たな電子とイオンを生成する。これらの新たな電子はさらに連鎖的な衝突電離を引き起こす α 作用により、プラズマが生成される。高周波印加電極には交流電源が印加されているため、電圧は周期的に正と負に切り替わる。正の半周期では、プラズマ中の電子が高周波印加電極側に加速され、その結果、高周波印加電極付近は負に帯電する。対照的に、負の半周期では、イオンは質量差による慣性が大きく、13.56MHz 高周波に追従できないため、高周波印加電極上の負電荷を完全に中和することができない。これにより、定常状態で

は高周波電極付近は負電位になる。これを自己バイアス電圧と呼ぶ [25] [26]。

図に示されたブロッキングコンデンサ (C_B) は、この自己バイアスによって発生する直流電流成分を遮断し、高周波電源を保護する役割を果たす。また、マッチングボックス (M.B.) は、内蔵された二つのキャパシタを用いて放電回路のインピーダンスを最適化し、電極に最大電力を供給する。容量結合型プラズマの典型的な放電条件は、ガス圧力 $10\sim1000\text{Pa}$ 、電極間距離 $1\sim5\text{cm}$ 、高周波電力 $20\sim200\text{W}$ であり、プラズマ密度は 10^{16}m^{-3} 程度と比較的低いが、大口径プラズマの生成が容易な特長を持つ [27] [28]。

本研究で用いたプラズマ滅菌装置では真空容器を接地電極として利用し、チャンバー容器内全体にプラズマを生成することが可能である。従って、船内滅菌工程において、複数の器具を同時に処理する必要がある状況に対応するのに適したプラズマ方式である。 [25]

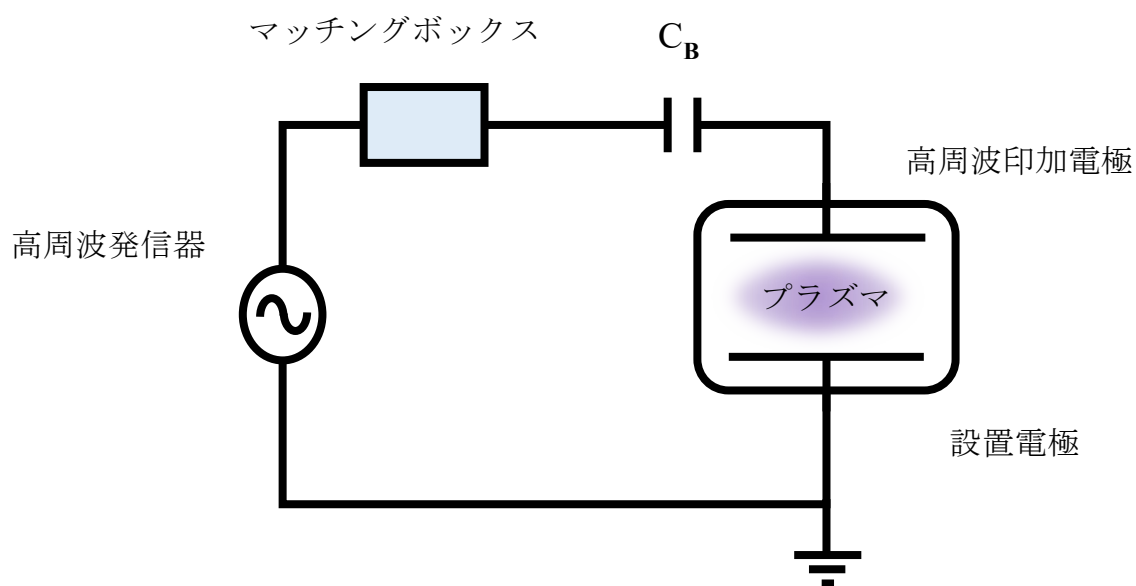


図 2.5 容量結合型プラズマ回路図

第 3 章 実験装置および実験方法

3.1 低圧高周波酸素プラズマ装置

本研究では、低圧の酸素雰囲気チャンバー内に容量結合型プラズマを生成し、発生する活性酸素を滅菌サンプルに照射することで、その滅菌特性を調査する。使用した実験装置および方法を下記に記述する。

3.1.1 低圧高周波酸素プラズマ発生装置

本研究で用いた高周波酸素プラズマ発生装置について説明する。

図 3.1 に本研究で使用した円筒形真空チャンバーの外観を示す。プラズマを低圧で生成するために、ステンレス製の円筒形真空チャンバーが採用された。真空チャンバーはステンレス 304 製であり、長さ 500 mm、内径 210 mm、内容積約 17 L となっている。この真空チャンバーの側面と蓋にはプラズマを観測するためのビューポートが設置されており、プラズマ生成用の高周波電源、真空排気用の真空ポンプ、圧力計測用の真空計、原料ガス導入および圧力調整用のカットバルブおよびニードルバルブ、プラズマ観測用のビューポートがそれぞれ接続されており、用途に応じて付け替える。

図 3.2 に高周波過酢酸ガスプラズマ発生装置の概略図、図 3.1.3 に真空チャンバー内部とその断面図を示す。図 3.1.3 に示すように、高周波印加電極は真空チャンバーの内壁に沿うようにチャンバーの軸方向に設置しており、チャンバー内に一様なプラズマを生成できる。また高周波印加電極は、プラズマによるスパッタリングを防ぐためにガラススリーブで覆われている。電極の下方にはサンプル設置のためのステージが設置されており、このステージの幅を変えることで電極からサンプルの距離を変更可能である。



図 3.1 真空チャンバー外観図

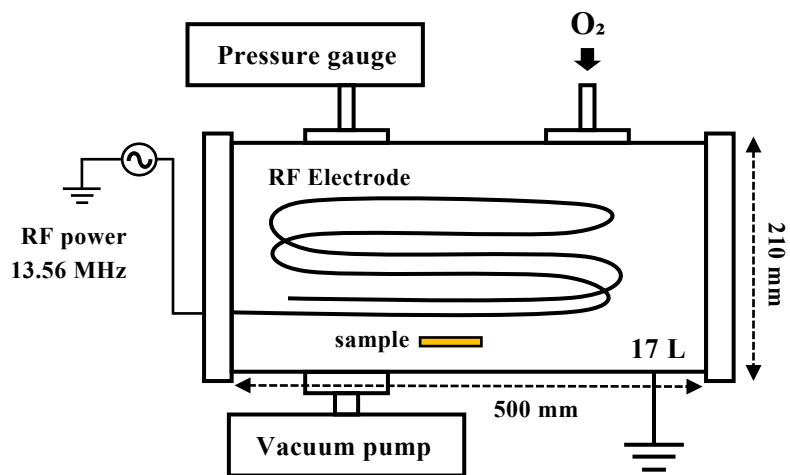


図 3.2 高周波酸素プラズマ発生装置の概略図

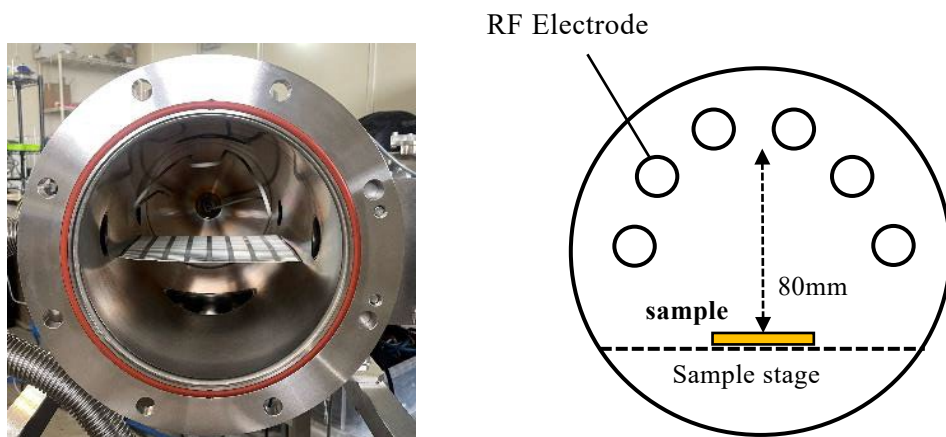


図 3.3 真空チャンバー内部 (左) と断面図 (右)

真空ポンプおよび真空計

図 3.4 および図 3.5 に本研究で使用した真空ポンプおよび真空計を示す。真空ポンプは、株式会社大阪真空機器製作所の真空ポンプ(GLD-051)を用いた。実行排気速度は 60 L/min である。真空計は佐藤真空株式会社製のピラニ真空計(PG-20B)を使用した。測定範囲は $1.4 \times 10^{-1} \sim 6.0 \times 10^3$ Pa である。



(左) 図 3.4 株式会社大阪真空機器製作所 VACUUM POMP

(右) 図 3.5 佐藤真空株式会社製ピラニ真空計 PG-20B

高周波電源およびマッチングボックス

図 3.6 に本研究で使用した株式会社サムウェイ製の高周波電源(T161-4613R80)およびマッチングボックス(T029-4613R80)を示す。この電源からの交流電圧の周波数は 13.56 MHz、最大電力は 80 W である。



図 3.6 高周波電源およびマッチングボックス

3.1.2 酸素プラズマの生成方法

下記に本実験での容量結合型プラズマの生成方法の手順を記載する。さらに、図 3.7 に酸素プラズマの発光の様子を示す。

- ① 真空ポンプを用いて真空チャンバー内を 5Pa 以下まで減圧する。
- ② カットバルブとニードルバルブを開き、真空チャンバー内に酸素ガスを真空チャンバー内の圧力が 300 Pa 以上になるまで導入する。
- ③ 真空チャンバー内を酸素ガスで十分に置換するため、①と②の操作を 3 回繰り返す。
- ④ ニードルバルブを操作して、チャンバー容器内の酸素ガス圧力を目的の圧力に調整し、高周波電源（13.56MHz）から高周波印加電極に高周波電力を供給し容量結合型プラズマを生成する。

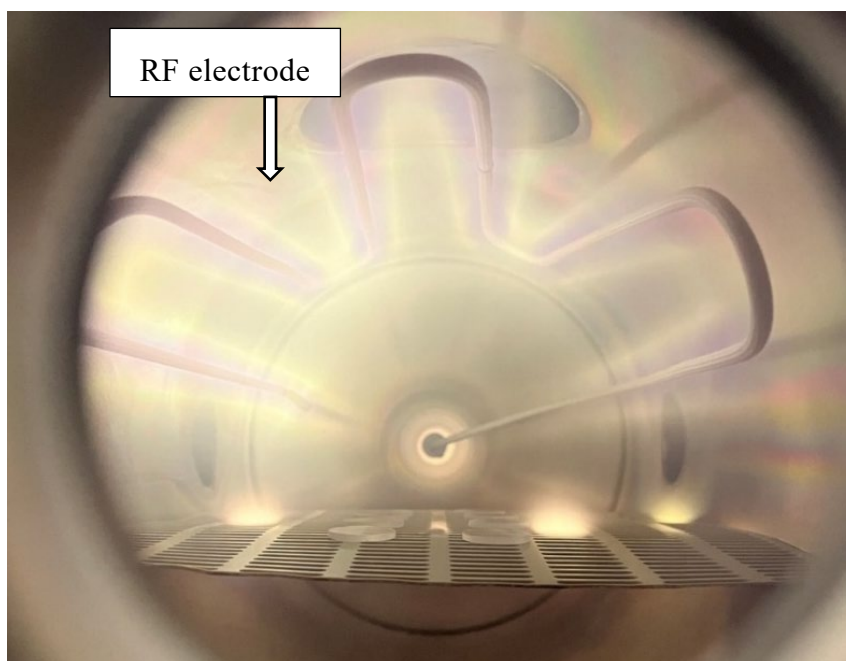


図 3.7 酸素プラズマの発光の様子

3.2 プラズマ中の生成活性種の特定

3.2.1 発光分光計測

酸素プラズマ中で生成される活性種を特定し、滅菌に寄与する粒子種を調べるために発光分光スペクトル計測をする。発光分光計測では、プラズマ中に生成された励起した粒子が、励起準位から低エネルギーの準位に遷移する際に放つ各粒子固有の波長の光を検出することで、プラズマ中で生成される粒子種を特定することができる。

プラズマ中の粒子（原子や分子、活性種）は、プラズマによってエネルギーを受け取り励起状態になる。励起状態とは、粒子内の電子がエネルギーの低い安定な軌道から高い軌道に遷移した状態を指す。容量結合プラズマでは、電極とチャンバー間の電位差により加速された電子が気体粒子に衝突し、原子や分子にエネルギーを与える。粒子の励起状態の寿命は短く遷移した電子はすぐに元の安定した軌道に戻るが、その際に放出される光は粒子種に固有の波長を持つ。発光分光測定により検出された光のピーク波長から、粒子の種類を特定する。

計測方法

プラズマからの発光を分光計測し、容量結合型の低圧空気プラズマによって生成される活性気体の成分特定を行った。図 3.8 および図 3.9 に本実験で使用したオーシャンインサイト社（旧 オーシャンオプティクス社）製マルチチャンネルファイバー分光器 Flame-S と光ファイバーを示す。分光器の測定可能な波長範囲は 200~850 nm である。光ファイバーは石英ガラスを用いており、両端が FC コネクターとなっているものを使用した。図 3.10 に示すように、光ファイバーを接続できる端子と酸化ケイ素ガラスの窓を合わせたフランジ窓をチャンバー正面のポートに取り付け、このフランジに計測器と接続されている光ファイバーを固定した。

まず、自然光や暗電流などの外部の影響を除外するためにプラズマを生成していない状態でバックグラウンド測定を行い、次いでプラズマを生成して、以下の条件で発光分光スペクトルを測定した。

表 3.1 高周波酸素プラズマの発光分光計測の計測条件

原料ガス	酸素
ガス圧力	20～100 Pa
高周波電力	60 W
測定波長	200～800 nm
露光時間	1000 ms
積算回数	10 回



図 3.8 分光器



図 3.9 光ファイバー



図 3.10 発光計測位置

3.3 酸素プラズマ滅菌の滅菌特性の調査

3.3.1 滅菌評価方法

バイオロジカルインジケーター (BI)

バイオロジカルインジケーター(以下、「BI」とする)は、滅菌プロセスが適切に行われたかどうかを確認するために使用されるツールであり、滅菌効果を判断するために最も信頼性の高い試験方法である。滅菌処理後は、指標菌に応じて適切な温度で培養を行い、滅菌の可否を判定する。

本研究では、ISS 内において医療現場レベルでの滅菌処理を施すことで惑星免疫システムを確立することを最終目標と掲げているため BI を滅菌指標に採用した。BI には主に紙片型、培地一体型の 2 種類がある。紙片型は細菌芽胞を含む懸濁液を濾紙片に塗布し、乾燥させたものである。培養する際には芽胞紙片をあらかじめ準備した培養液に無菌的に移し替える操作が必要であり、設備や無菌操作技法が必要となる。一方、培地一体型は芽胞の塗布された紙片とガラスアンプルに封入された培養液をプラスチック容器に含んだ構造をしている。培養液が一体となっているため、培養液の準備や培養の際の無菌操作が不要である。

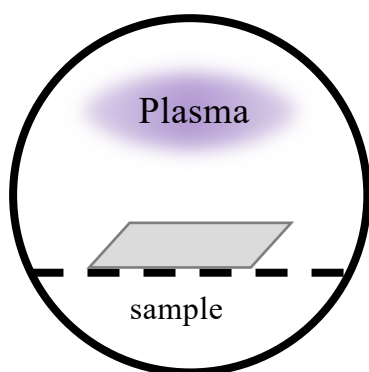
本研究では、pH 指示薬によって検出する培地一体型の BI を使用した。液体培地中に pH インジケーターが入っており、滅菌の可否に応じて培地の色に変色する。図 3.11 に使用した BI (MesaLabs 社製, TSB 培地) を示す。表 3.2 には、培養条件を示す。また図 3.13 には、滅菌結果の判別法を示す。図 3.12 に示すように、培養後に培養液の色が紫色から変色しない場合は滅菌成功となり、黄色に変色した場合は滅菌失敗となる。

表 3.2 BI における各サンプルの培養条件

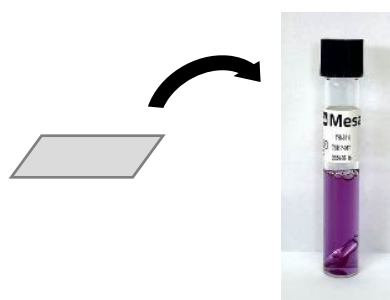
サンプル	培養時間 [h]	培養温度 [°C]
芽胞菌	24	58
バイオフィルム	48	36



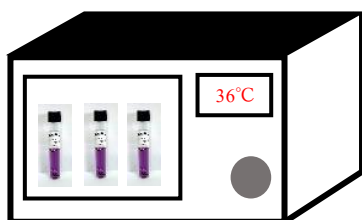
図 3.11 培地一体型バイオロジカルインジケーター



① 滅菌処理



② サンプルを BI 内に投入



③ 培養 (24 h)



成功



失敗

④ 滅菌結果の判別

図 3.12 滅菌結果の判別法

クリスタルバイオレット染色法 [29]

クリスタルバイオレットは、トリフェニルメタン色素の一種で、一般に pH 指示薬や染色液として利用されている。その化学式は $C_{25}H_{30}ClN_3$ で、固体状態では金属光沢を有し、深緑色を呈している。この色素は、pH 指示薬や染色液として広く用いられており、微生物培養検査での発育阻止剤や褥瘡治療、内視鏡検査時の色素散布にも利用されることがある。また、バイオフィルムの量を定量的に評価する際に用いられる手法である。

染色の原理

クリスタルバイオレット染色法は、主にグラム染色において用いられ、染色法の原理はグラム陽性菌とグラム陰性菌の細胞壁の違いに基づいている。各細胞壁は糖（アセチルグルコサミン）と酸（N-アセチルムラミン酸）からなる網状のポリマーであるペプチドグリカン層を有する。

グラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層を持ち、エタノールによる色素洗浄が困難であるため、クリスタルバイオレットが染色層に留まり、紫色に染まる。一方、グラム陰性菌は薄いペプチドグリカン層を有し、エタノール処理によって染色が容易に洗い流される。その後、フクシンやサフラニンのような赤色色素で染色され、ピンク色に見える。

評価手順

① サンプルの準備

ステンレス板上に作成したバイオフィルムを丸底プレートに移す。

② クリスタルバイオレット溶液の調製

本研究では、株式会社バイオメディカルサイエンス製の 1%クリスタルバイオレット溶液を用いた。この溶液を蒸留水で希釈し、最終濃度が 0.1%のクリスタルバイオレット溶液を調製した。希釈は、溶液の均一性を保証するために慎重に行った。

③ サンプルへの染色

準備された 0.1%クリスタルバイオレット溶液を、サンプル上に 200 μ L 滴

下し、20 分間静置して染色を行った。この染色時間は、十分な染色強度を確保するために選定された。

④ 洗浄と乾燥

染色後、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）を用いて余分な染色液を洗い流し、サンプルを洗浄した。その後、ステンレス板上のサンプルを空気乾燥させた。この乾燥プロセスは、サンプルの物理的な損傷を最小限に抑えつつ、余分な水分を効果的に除去するために重要である。

⑤ エタノール処理

乾燥後、サンプル上に 500 μ L の 99%エタノールを滴下し、15 分間放置した。この処理は、染色された部分を顕著に浮かび上がらせ、観察を容易にすることを目的に行った。

⑥ 評価

クリスタルバイオレットが溶解出した 500 μ L の 99%エタノールから 20 μ L を取り出し、96 ウェルプレートに移して図 3.13 に示す Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (thermo fisher scientific 社製) で 595 nm の光学濃度を測定した。この波長は、クリスタルバイオレットの吸光ピークに対応しており、各サンプルは最低でも 3 回は測定し、平均値を求めた。

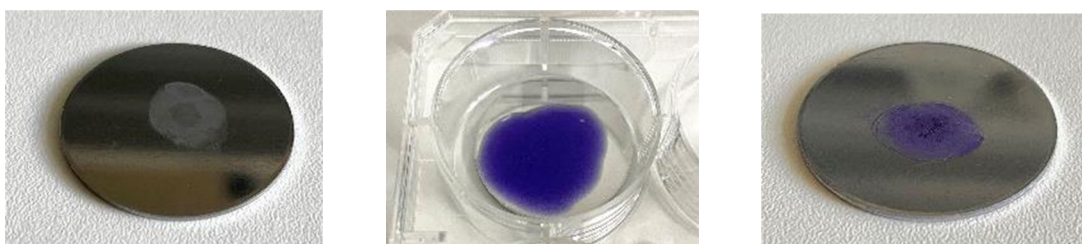


図 3.13 クリスタルバイオレット染色法による染色の様子
(左：BF サンプル、中央：染色液滴下直後、右：染色後)

プレートカウント法による生菌数測定

評価手順

- ① ステンレスプレート上に形成されたバイオフィルムを、滅菌済みの綿棒で拭き取る。
- ② はさみを火炎滅菌処理し、そのはさみで綿棒の先端を切断した。次に、この切断した綿棒の先端を 10 ml のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に入れ、3 分間ボルテックス混合した。
- ③ 攪拌後の溶液を希釈し、寒天培地上に滴下した。その後、温度一定で 24 時間培養し、寒天培地上に生成したコロニー数を計測した。

表 3.3 本研究におけるプレートカウント法の評価条件

	枯草菌 BF	好熱菌芽胞 BF
寒天培地	トリプトソーヤ寒天培地	標準菌寒天培地
培養温度 [°C]	45	58
培養時間 [h]	24	24

フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) [30]

プラズマ照射によるバイオフィルム内に存在する有機物の化学構造の変化を赤外分光法によって調査した。赤外分光法について以下に述べる。

赤外分光法とは、物質に赤外光を照射し、透過または反射した光を測定することで、試料の構造解析や定量を行う分析手法である。分子を構成する原子は、原子間結合の種類によって固有の振動を有し、分子に波長を連続的に変化させた赤外線照射すると、原子間結合に固有の振動エネルギーに対応した波長の赤外線が吸収され、分子構造に応じた特有のスペクトルが得られる。未知試料の赤外線吸収スペクトルと既知の赤外線吸収スペクトルを比較することで、未知試料中に含まれる分子の種類や構造を調べる手法を赤外線吸収法という。本研究で使用した FTIR は日本分光社製の FT/IR-4600 である。

測定方法

FTIR には測定対象によって様々な測定方法があるが、本実験で行ったのは、フッ化カルシウム板を用いた透過法である。調べたい試料（気体や固体粉末）に入射方向に進む赤外線を一度だけ透過させ、吸収された波数のスペクトルから測定試料の成分や組成を分析する方法である。本実験では、窓材に水溶液をのせる操作や窓材を再使用するための洗浄で水とアルコールの使用があること、滅菌処理で酸性気体にさらすことから、水、アルコールに不溶で酸に強いフッ化カルシウム結晶を窓材に採用した。



図 3.14 フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) の外観図

3.3.2 滅菌サンプルの作製

好熱性の芽胞菌である *Geobacillus stearothermophilus* およびバイオフィルムの滅菌サンプルを作成する。先行研究より、*Geobacillus stearothermophilus* は活性酸素種を用いたプラズマ滅菌において不活化が難しいことが確認されており、難分解性であるバイオフィルムとの比較対象として適していると考え、採用した。

滅菌サンプルの作成過程において、滅菌対象物が他の菌に汚染されるコンタミネーションを防止するため、図 3.15 に示す防塵システムがとれたクリーンベンチ (MCV-B131S, PHC) 内を使用して行った。

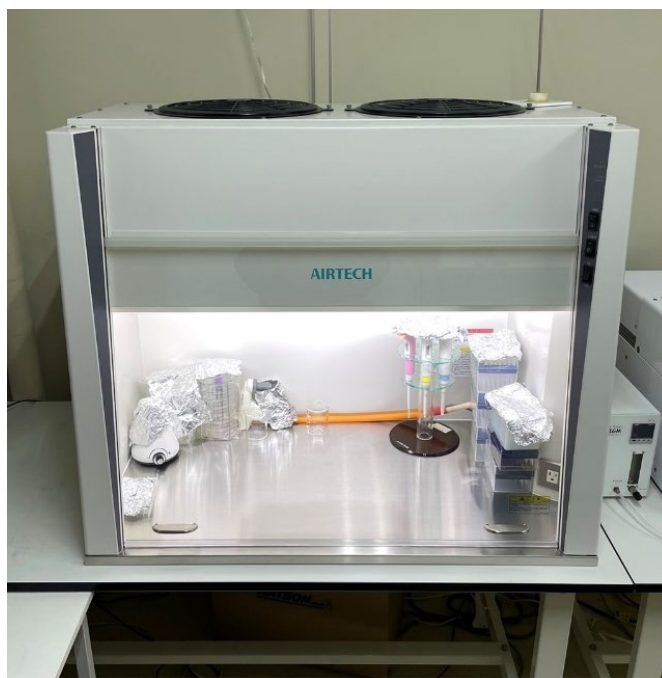


図 3.15 クリーンベンチ (MCV-B131S, PHC)

・芽胞菌サンプル

Geobacillus stearothermophilus

Geobacillus stearothermophilus は活性酸素種を用いたプラズマ滅菌において不活化が難しく、酸素プラズマ滅菌は処理温度が 60～70℃まで到達することや過酷な宇宙空間でも活動できる可能性が高いことから、本研究におけるバイオフィ

ルムとの比較対象指標菌とした。以下にサンプルの作成方法を述べる。

- ① 10 μL あたりの菌数が 2.0×10^6 個の芽胞懸濁液 (MERCK 社、ゲオバチルス ステアロサーモフィルス芽胞懸濁液) から 20 μL を、マイクロピペットを用いて計量し、専用の容器に液体をすべて排出する。
- ② 専用容器に、マイクロピペット用いて 980 μL の蒸留水をすべて排出し、芽胞懸濁液と混合する。
- ③ 作成した混合溶液から、マイクロピペットを用いて 10 μL をアルミニウム (10 $\times$ 10 mm) 上に滴下する。この時、アルミニウム表面に塗布される菌数は 4.0×10^4 個の菌が存在している。
- ④ 混合液を表面に滴下したアルミニウムを、インキュベータの中に設置し 48 時間放置することで、混合液の水分をすべて揮発させ、芽胞形成菌がアルミニウム表面に塗布された状態にする。サンプルを図 3.17 に示す。
- ⑤ 完成したサンプルの 1 つを BI の中に入れ、24 時間の培養後、培養液が黄色になったことを確認 (細菌が表面に付着しているかの確認) する。
- ⑥ 完成したサンプルの 1 つを滅菌バッグに入れた状態で、真空チャンバー内に設置し、排気を行う。チャンバー内圧力は 5Pa まで減圧した状態で 6 時間サンプルを放置した。その後、サンプルを BI の中に入れ、24 時間の培養後、培養液が黄色になったことを確認 (低圧環境下で、バイオフィルム上の細菌がはがれていないかの確認) する。
- ⑦ ⑤、⑥の確認が終了したのちに、滅菌処理実験を行う。

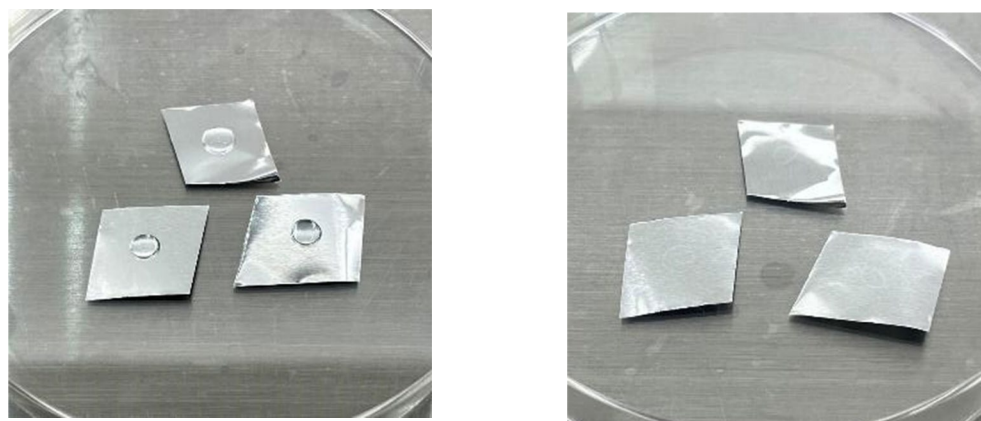


図 3.16 アルミニウム上に芽胞菌を塗布する様子
(左：塗布直後, 右：24 時間乾燥後)

・バイオフィルムサンプル

自然界に多く存在するバイオフィルムは、主に *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、*Bacillus subtilis* (枯草菌) の3つの細菌から形成される。緑膿菌および黄色ブドウ球菌は、病原菌における生物学的安全性の観点から取扱い可能な施設が限定されているため、本研究では枯草菌および好熱菌を照射対象とした。枯草菌には、乾燥や熱に対する環境耐性が高く、サンプルの採集が容易である納豆菌 (*Bacillus subtilis* var *natto*) を用いた。

以下にサンプルの作成方法を述べる。

I. バイオフィルム (*Bacillus subtilis* var *natto*)

- ① 市販の納豆 (タカノフーズ株式会社) からランダムに 20 粒を選び出し、これを 20 mL の蒸留水が入った専用の容器に移した。この過程では、可能な限り同じ大きさの納豆粒を選ぶことに注意した。
- ② 均一な懸濁液が得られるまで、①の混合液を攪拌機にて 3 分間攪拌させた。
- ③ マイクロピペットを使用し、攪拌後の専用容器から 20 μ L の混合液を精密に取り出し、別の容器に移した。続いて、この混合液に 1980 μ L の蒸留水を加え、全体量が 2000 μ L となるように調整し、100 倍の希釈を行った。この操作は、上記の好熱菌サンプルと同様の菌数に調整するために行い、 4.0×10^7 CFU/ml に菌数を調整した。菌数のカウントには血球計算盤 (ビルケルチュルク (Burker-Turk) 計算盤) を使用し、計算盤上に存在する細菌数をニコン製の倒立顕微鏡 (Eclipse Ti2) で観察しながら計測した。
- ④ ③で作成した混合液を再度 3 分間攪拌させた。
- ⑤ 攪拌後、希釈した混合溶液から 10 μ L を取り出し、プレート上に滴下する。滴下するプレートは実験用途に応じて、ステンレスプレート (ϕ 30 mm)、アルミニウム (10 $\times$ 10 mm)、CaF₂ 板 (ϕ 20 mm) に使い分けた。CaF₂ 板は FTIR による赤外分光法で使用し、CaF₂ 上に均一にサンプルを塗布する必要があったため、CaF₂ 板の表面に対して空気を原料とした容量結合プラズマ処理を施した。これにより CaF₂ 板表面に窒化膜を形成させ、面上の凹凸を無く

し、かつ親水性を持たせた。この操作により、塗布した混合液を CaF₂ 板上に均一に広げ、板面上からこぼれることを防ぐことができる。また、測定方法において CaF₂ 上全体に溶液を塗布する必要性から CaF₂ 上には 100 μ L の溶液を滴下した。

- ⑥ 混合溶液を表面に滴下したサンプルを、インキュベータ内に設置し 48 時間、36 $^{\circ}$ C の条件で静置培養を行う。このとき、混合溶液が乾燥しないようにサンプルを容器で密閉する。
- ⑦ 静置培養後、サンプル上に滴下したバイオフィーム部分を 200 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (株式会社エルメックス, ST-25 PBS) で 3 回すすぎ、浮遊細胞および緩く付着した細菌、残存している水滴を除去する。
- ⑧ すすいだサンプルを風乾し、バイオフィームがステンレス板およびアルミニウム表面に塗布された状態にする。
- ⑨ ステンレス板上に完成したバイオフィームに対してクリスタルバイオレット染色を行い染色反応を観察することでバイオフィームがサンプル表面に形成されているかを確認する。また、芽胞菌と同様に完成したサンプルの 1 つを BI の中に入れ、24 時間培養後に培養液が黄色に変色することを確認することで、サンプル上の菌の生死状態を確認する。
- ⑩ 完成したサンプルの 1 つを真空チャンバー内に設置し、排気を行う。チャンバー内圧力は 5Pa まで減圧した状態で 6 時間サンプルを放置した。その後、サンプルを BI の中に入れ、24 時間の培養後、培養液が黄色になったことを確認 (低圧環境下で、バイオフィーム上の細菌がはがれていないかの確認) する。
- ⑪ ⑨、⑩の確認が終了したのちに、滅菌処理実験を行う。



図 3.17 サンプル混合液滴下後の様子
(左：CaF₂ 板、中央：ステンレスプレート：右：アルミニウム)



図 3.18 培養後のバイオフィルムの様子
(左：CaF₂ 板、中央：ステンレスプレート：右：アルミニウム)

II. バイオフィルム (*Geobacillus stearothermophilus*)

- ① 市販の納豆をかき混ぜることで、ポリガンマグルタミン酸を採取した。このプロセスは、納豆の粘り気成分を抽出するための手順である。ポリガンマグルタミン酸は、納豆の特徴的なネバネバ質を構成しており、納豆菌による発酵過程で形成される。
- ② ポリガンマグルタミン酸から納豆菌を滅菌するために、オートクレーブを使用した。滅菌処理後、トリプトソーヤ寒天培地上に該当サンプルを滴下し、24 時間静置した。その後、滅菌が適切に行われたかを確認した。
- ③ ステンレス板上に作成しておいた芽胞菌サンプル上に滅菌処理したポリガンマグルタミン酸を滴下し、インキュベータ内にて 48 時間静置培養した。
- ④ 前述 I の⑨以降と同様の処理を行った。

⑤ 形成の確認

バイオフィルムは、主にクリスタルバイオレット染色法による染色で形成が確認されている。クリスタルバイオレット染色法は、細菌細菌の細胞壁にあるペプチドグリカン層に効果的に結合することで知られているが、バイオフィルムを構成する多糖類、タンパク質、核酸、表面を覆うマトリックスの染色にも寄与する。そこで本研究では以下の手法によってバイオフィルムの形成の確認を行った。

クリスタルバイオレット染色法による染色検査

クリスタルバイオレットによる染色を行った結果、染色が確認できた。しかし、納豆菌を攪拌させた混合液をプレート上に滴下し作製したバイオフィルムを形成していないサンプルでも微小な染色は確認された。そこで、このサンプルの染色に対して吸光マイクロプレートリーダーを用いて光学濃度を計測したところ、バイオフィルムサンプルでは 0.038~0.04、バイオフィルムを形成していないサンプルでは 0.017~0.019 という結果となった。この結果から、バイオフィルムサンプルでは菌類だけでなくバイオフィルムを構成する多糖類、タンパク質、核酸、表面を覆うマトリックスも染色されているためと考え、バイオフィルムの形成を示唆した。

視覚的検査

48 時間静置培養したバイオフィルムを確認したところ、プレート表面に白濁した膜の形成が確認できた。



培養直後のバイオフィルムサンプル

以上の手法から、プレート上におけるバイオフィルムの形成を示唆した。

3.3.3 空気プラズマおよび酸素プラズマ滅菌の照射時間特性調査

BI を用いて、空気プラズマ滅菌をおよび酸素プラズマ滅菌における照射時間特性を調査した。バイオフィルムサンプルを真空チャンバー内の中央部、高周波印加電極から 80 mm 離れた位置に設置し、空気プラズマおよび酸素プラズマを照射して BI による滅菌処理を行った。真空チャンバー内のガス圧力は 20 Pa、投入電力は 60 W 一定とし、プラズマの照射時間を変化させた。プラズマ照射による滅菌処理後、サンプルを BI 内に投入しインキュベータ内にて 36 °C、24 時間の条件下で培養処理を行った。

【実験条件】

ガス種	: 空気、酸素
圧力	: 60 Pa
投入電力	: 60 W
照射時間	: 30, 60, 90, 120, 150, 180 min

3.3.4 酸素プラズマ滅菌の投入電力特性調査

BI を用いて、酸素プラズマ滅菌における投入電力特性を調査した。真空チャンバー内のガス圧力は 20 Pa、投入電力は 60 W 一定とし、投入電力を変化させた。その後、照射時間特性調査と同様の処理を行った。

【実験条件】

ガス種	: 酸素
圧力	: 60 Pa
投入電力	: 20 W, 40W, 60 W, 80 W
照射時間	: 30, 60, 90, 120 min

3.3.5 プラズマ照射時に生じる熱による滅菌への影響調査

宇宙機内の滅菌プロセスでは、多様な物質が対象となるが、70℃以上の温度では耐熱性の低いプラスチックなどが劣化する恐れがある。そのため、まず①温度データロガー(株式会社 KN ラボラトリーズ製)を使用して、各投入電力における滅菌チャンバー内の最高温度を測定した。加えて、滅菌因子の一つとしてプラズマ照射時に生じる熱による死滅が考えられることから、②バイオフィルムサンプルに対して熱処理を行い、本プラズマ滅菌装置により生じる熱が滅菌に及ぼす影響を調査した。作成したバイオフィルムサンプルをインキュベータの中に設置して熱処理を行った。インキュベータ内の設定温度は、①の結果より 70℃一定、処理時間は2時間とし BI を用いて評価を行った。

【実験条件①】

ガス種	: 酸素
圧力	: 20 Pa
投入電力	: 20, 40, 60, 80 W
照射時間	: 5 h

【実験条件②】

設定温度	: 70℃
照射時間	: 2 h

温度データロガー

温度データロガーは、サンプルと同時に真空チャンバー内に設置することで、プラズマ照射時のサンプル設置地点の温度の経時変化を測定することが可能である。図 3.19 に、本研究で使用した株式会社 KN ラボラトリーズ製の温度データロガー (サーモクロン G タイプおよび読み取り機) を示す。測定可能温度範囲は-40 ~+80 °Cである。サーモクロンに計測条件を設定し、温度測定場所に設置する。測定終了後、読み取り機を用いることで測定データを回収できる。 [31]

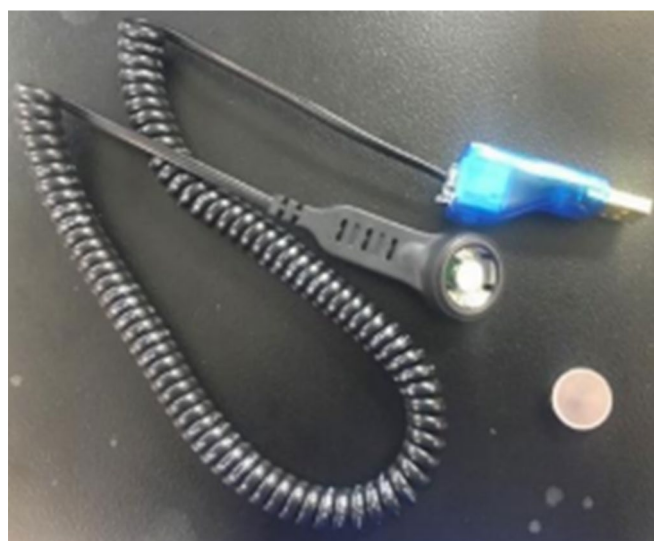


図 3.19 サーモクロン G タイプと読み取り機

3.3.6 酸素プラズマ滅菌の滅菌に要する最短処理時間の調査

BI により、酸素プラズマ滅菌の滅菌に必要な最短処理時間を調査した。投入電力を 60 W 一定とし、プラズマの照射時間および真空チャンバー内圧力を変化させ、BI およびクリスタルバイオレット染色法を用いて評価を行った。また、得られた圧力最適パラメータにおいてプレートカウント法を用いて評価を行った。

【実験条件】

圧力	: 20, 40, 60, 80, 100 Pa
投入電力	: 60 W
照射時間	: 30, 60, 90, 120 min

3.4 滅菌処理による副生成物調査

バイオフィルムへの酸素プラズマ照射によりタンパク質変性が生じ、酸化物などの物質が生成されている可能性を考慮し、各照射時間における副生成物調査を行った。酸素プラズマ滅菌における副生成物の調査として、CaF₂上に形成したバイオフィルムの化学構造の変化をフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)を用いて評価した。

【実験条件】

圧力	: 20 Pa
投入電力	: 60 W
ガス種	: 酸素
照射時間	: 10～90 min

第4章 実験結果および考察

4.1 発光分光計測による酸素プラズマ中の生成粒子種の特

図 4.1 に、酸素プラズマの発光分光スペクトルを示す。このときの酸素プラズマの生成条件は RF 電力 60 W、チャンバー内ガス圧力 60 Pa である。主に、一重項酸素分子 (wavelength = 762 nm : $^1Z_g^+ \rightarrow ^3Z_g^-$)、五重項酸素原子 (wavelength = 777 nm : $^5P \rightarrow ^5S$) が観測された。また、310nm に OH ラジカルの発光も確認された。原料ガスには含まれない OH ラジカルが観測される理由は、プラズマの生成時間が経過するにつれて OH ラジカルの発光ピークが減少することから、真空チャンバー内壁に付着した水分子の電離によるものだと考えられる。また、400~700nm の範囲で酸素イオン (O_2^+ , O^+) も観測された。これらの酸素イオンは寿命が短く、高周波電極付近で活性を失うと考えられる。一方で、一重項酸素分子や五重項酸素原子は中性粒子であり、チャンバー内を広範囲に拡散する特性を持つ。これらの粒子は、活性酸素粒子種として知られ、高い反応性も持つ。酸化力の強さは、OH ラジカル、五重項酸素原子、一重項酸素分子の順になるが、寿命の長さに関してはこの順序とは逆の関係が見られる。

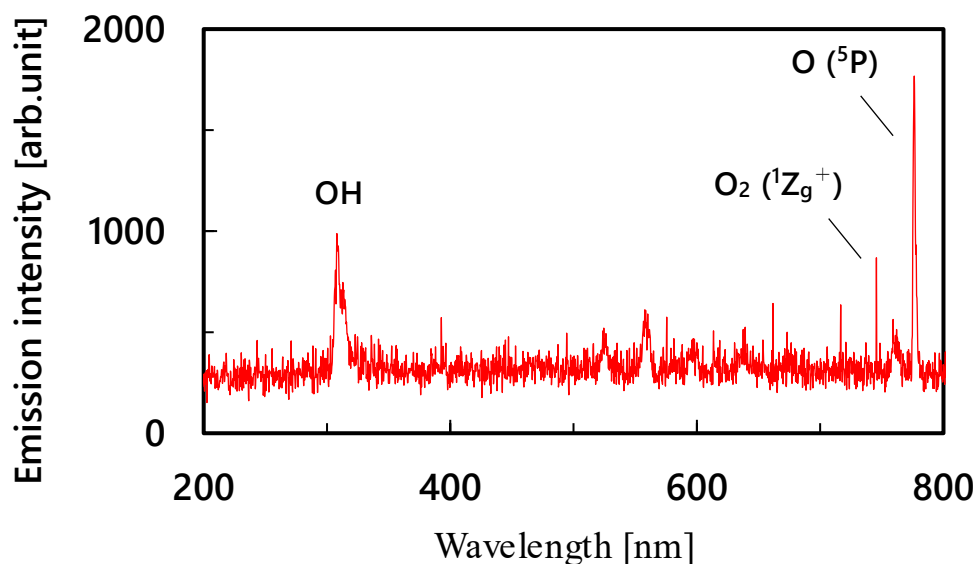


図 4.1 酸素プラズマ発光分光スペクトル

次に高周波電力を 60W に固定し、圧力を変化させることで活性種の発光強度の圧力依存性を調査した。圧力条件は 20 Pa～100 Pa まで変化させ、発光スペクトルの変化を計測した。

図 4.2 には、一重項酸素分子 (762 nm)、五重項酸素原子 (777 nm)、OH ラジカル (309 nm) の発光強度の圧力変化を示す。図 4.3 および図 4.4、図 4.5 には、それぞれ五重項酸素原子 (wavelength=777 nm : $5P \rightarrow 5S$) と OH ラジカル、一重項酸素分子の発光強度の酸素ガス圧力依存性を示す。図 4.3～4.5 において、投入電力が高いほど各粒子の発光強度が高くなることが確認できた。これは投入電力が高くなるにつれプラズマ中の電子に供給されるエネルギーが増加し、粒子と衝突した際に励起状態が容易になるからだと考えられる。また、五重項酸素原子および OH ラジカルの発光強度は圧力の低下とともに上昇し、一重項酸素分子の発光強度は圧力が 60Pa のとき発光強度が最大となった。五重項酸素原子および OH ラジカルの生成に必要なエネルギーは 5.1eV 以上であるのに対し、一重項酸素分子の生成に必要なエネルギーは 1.6eV である。このエネルギー差により、異なる圧力条件下での発光強度の様子に違いが生じる。

チャンバー内の圧力が低下すると、粒子数の減少により高圧力状態と比較して粒子間の衝突が減少し、電子の平均自由行程が長くなる。その結果、電子の平均運動エネルギーが増加し、これに伴い五重項酸素原子および OH ラジカルの生成に必要なエネルギーを超えるエネルギーを持つ電子が増加する。これにより、五重項酸素原子および OH ラジカルの生成が増加すると考えられる。

チャンバー内の圧力が増加すると、粒子同士の衝突が増え、結果としてプラズマ中の粒子の運動エネルギーが低下する。このエネルギーの低下により、60 Pa 近傍では酸素分子の解離が減少し、励起酸素分子である一重項酸素分子が生成されやすくなると考えられる。圧力をさらに高めるとプラズマ中の粒子の衝突が増加によりエネルギーの分散と損失が生じ、粒子が十分なエネルギーを受け取れず酸素分子を励起するのに十分なエネルギーを保つことができなくなる。これによりプラズマの全体的な発光が小さくなり観測される発光強度も小さくなったと考えられる。

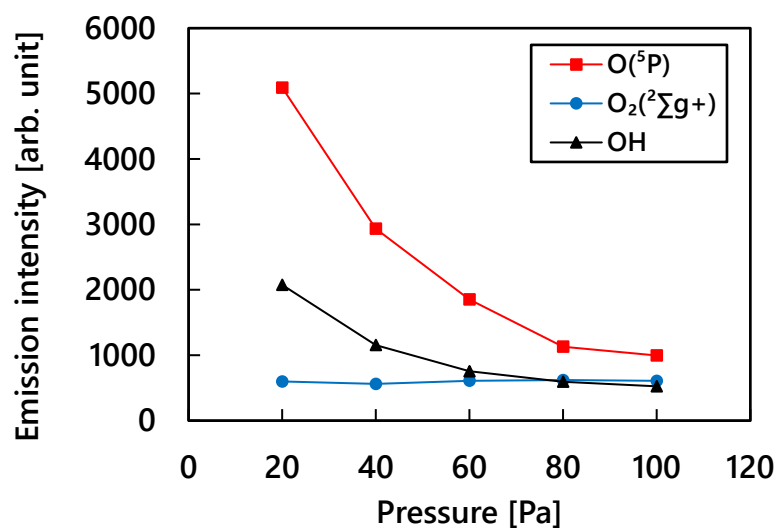


図 4.2 酸素プラズマ中の活性種の圧力変化

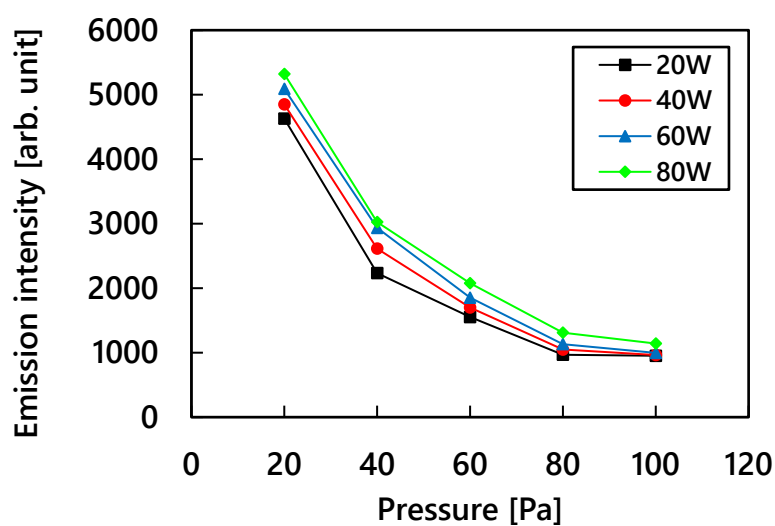


図 4.3 OH ラジカル (309 nm) の発光強度の酸素ガス圧力依存性

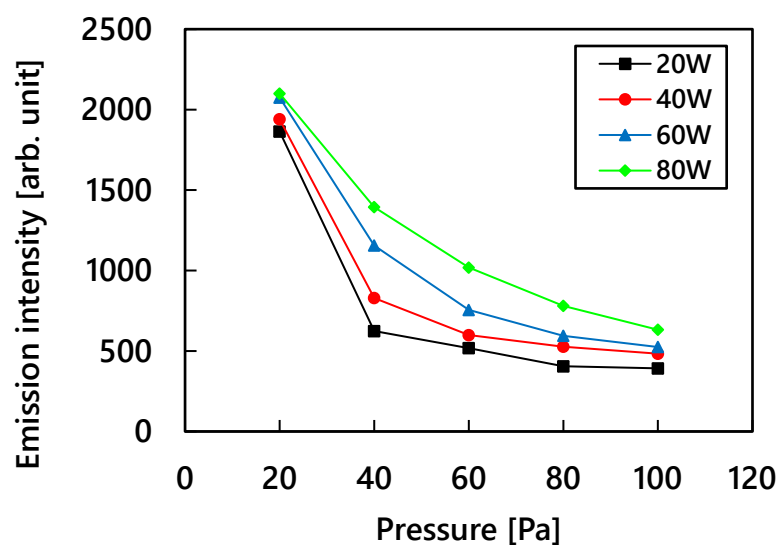


図 4.4 五重項酸素原子 (777 nm) の発光強度の酸素ガス圧力依存性

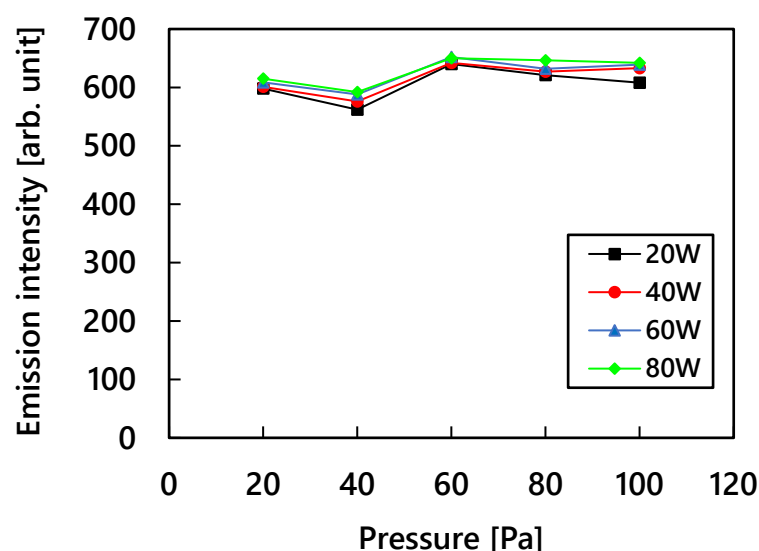


図 4.5 一重項酸素分子 (762 nm) の発光強度の酸素ガス圧力依存性

4.2 滅菌特性の調査

4.2.1 空気プラズマおよび酸素プラズマ滅菌の照射時間特性調査

表 4.1 には、酸素ガスおよび空気プラズマ照射による照射時間特性の BI 滅菌結果を示す。プラズマの照射条件は、投入電力 60 W、圧力を 60 Pa とした。

表 4.1 より、空気プラズマ照射による BI 試験では、210 分で滅菌に成功し、酸素プラズマでは 120 分で滅菌に成功した。このことから、空気プラズマに比べ酸素プラズマの方が滅菌成功率は高いことが分かった。滅菌要因としては、プラズマ中で生成された活性酸素種による酸化反応が考えられる。酸素プラズマは酸素分子から直接生成されるため、空気プラズマと比べ活性酸素種をより多く生成する。酸素プラズマ中で生成される酸素活性種は空気プラズマ中で生成される NO_2 、 H_2O_2 等の滅菌因子に比べ非常に酸化力が強く化学反応を起こしやすいため、酸素プラズマの方がより滅菌成功率が高い結果になったと考えられる。

表 4.1 酸素ガスおよび空気プラズマ照射による BI 滅菌結果の時間特性

BI 滅菌結果	照射時間 [min]						
	30	60	90	120	150	180	210
空気プラズマ	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3
酸素プラズマ	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3

4.2.2 酸素プラズマ滅菌の投入電力特性調査

酸素プラズマ滅菌における投入電力特性を調査した。表 4.1 の結果より雰囲気ガスを酸素、圧力を 60 Pa とし、RF 電力および照射時間を変化させた。表 4.2 には、酸素プラズマ照射において投入電力特性および照射時間を変化させた場合の BI の滅菌結果を示す。

表 4.2 より、80 W の条件下において最短 60 分で滅菌に成功し、滅菌成功率は RF 電力および照射時間の増加とともに向上したことが確認できた。これは RF 電力が高いほどプラズマ中の電子数は増加し衝突回数も増えることにより、生成される酸素活性種の量も増加するからだと考えられる。そのため、RF 電力と照射時間の増加に伴い滅菌成功率が向上したと考えられる。

表 4.2 酸素プラズマ照射による BI 滅菌結果の投入電力特性

BI 滅菌結果		照射時間 [min]				
		30	60	90	120	150
電力 [W]	20	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3
	40	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	60	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	80	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3

4.2.3 プラズマ照射時に生じる熱による滅菌への影響調査

滅菌因子の一つとして、プラズマ照射時に生じる熱による死滅が考えられる。そのため、BI に対して熱処理を行い、本プラズマ滅菌装置により生じた熱の滅菌への影響を調査した。表 4.3 には、酸素プラズマを 5 時間照射した場合における BI 設置地点の最大到達温度を示す。プラズマ照射開始時の BI 設置地点における初期温度はいずれも 20 °C 前後である。

表 4.3 より、BI 設置地点の到達温度は投入電力とともに上昇し、80 W の条件下において 75 °C まで到達した。しかし、処理温度が 70 °C 以上になると、耐熱性の低いプラスチック等の滅菌対象物の劣化が懸念されるため、最大到達温度

70℃以下における最大投入電力である 60 W を最適投入電力とした。

次に、滅菌因子の一つとしてプラズマ照射時に生じる熱による死滅が考えられることから、設定温度を 70℃として処理時間を変化させながらインキュベータによる熱処理を行った。表 4.4 にインキュベータによる熱処理の BI 滅菌結果を示す。

表 4.4 より、各処理時間において滅菌処理に失敗した。これは指標菌であるバイオフィルムの表面を覆う、マトリックスと呼ばれる粘着性物質が起因していると考えられる。マトリックスは水分を保持する機能を有し、約 90 %が水分で構成されている。通常、細菌は水分が不足すると熱ストレスに弱くなるが、マトリックスによって適切な水分環境が維持されるため、熱に対する耐性が高まったためだと考えられる。

表 4.3 酸素プラズマ照射後の滅菌対象物付近の到達温度

投入電力[W]	20	40	60	80
処理温度 [℃]	55	62	65	75

表 4.4 インキュベータを用いた熱処理試験における BI 滅菌結果

処理時間 [min]	30	60	90	120	150	180
滅菌結果	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

4.2.4 酸素プラズマ滅菌の滅菌に要する最短処理時間の調査

バイオロジカルインジケーター (BI)

酸素プラズマ滅菌に要する最短処理時間の調査として、圧力特性試験を行った。プラズマの照射条件は 4.2.1～4.2.2 の実験結果より、雰囲気ガスを酸素、投入電力を 60 W 一定として圧力および照射時間を変化させた。表 4.5 および表 4.6 には、酸素プラズマをバイオフィルムと好熱菌サンプルに照射した際の BI による滅菌結果を示す。表中の数値(n/m)は左側の数値(n)が滅菌成功本数、右側の数値(m)が滅菌試行本数である。図 4.6 には、酸素プラズマを照射した際の各圧力条

件における BI の滅菌成功本数 (バイオフィルムサンプル) と五重項酸素原子の発光強度の相関を示す。図中の棒グラフが BI の滅菌結果、折れ線グラフが五重項酸素原子の吸光度を示している。

表 4.5 より、圧力 20 Pa 条件下では照射時間 60 分で 3 本中 3 本の滅菌に成功し、圧力 40 Pa 条件下では照射時間 90 分で 3 本中 3 本の滅菌に成功した。この結果から、圧力が低下するほど滅菌成功率が向上することが確認できた。これは、真空容器内の圧力が減少した際に、容器内の粒子数が減少し粒子間の衝突が少なくなるため、圧力が高い場合と比較して電子の平均自由行程が長くなることが要因と考えられる。これにより、電子の平均運動エネルギーが上昇し、酸素原子の生成に必要な 5.1eV の解離エネルギーを超える電子が増加するため、低圧下では酸素原子が効率良く生成される。一方、圧力が増加すると粒子間の衝突が増加し、プラズマ中の粒子の運動エネルギーが低下する。結果として、酸素原子の生成に必要な解離エネルギーを持つ電子の数が減少し、酸素原子の生成量も低下する。これらの結果から、低圧条件下で酸素原子の生成量が増え、滅菌効率が向上すると考えられる。また、図 4.6 に示すように本結果と五重項酸素原子の発光強度の圧力依存性の傾向が類似していることから、五重項酸素原子がバイオフィルム滅菌の主要因子であると推察される。

表 4.5 BI 試験結果の圧力および照射時間依存性 (バイオフィルムサンプル)

BI 滅菌結果		照射時間 [min]				
		30	60	90	120	150
圧力 [Pa]	20	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	40	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	60	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	80	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3

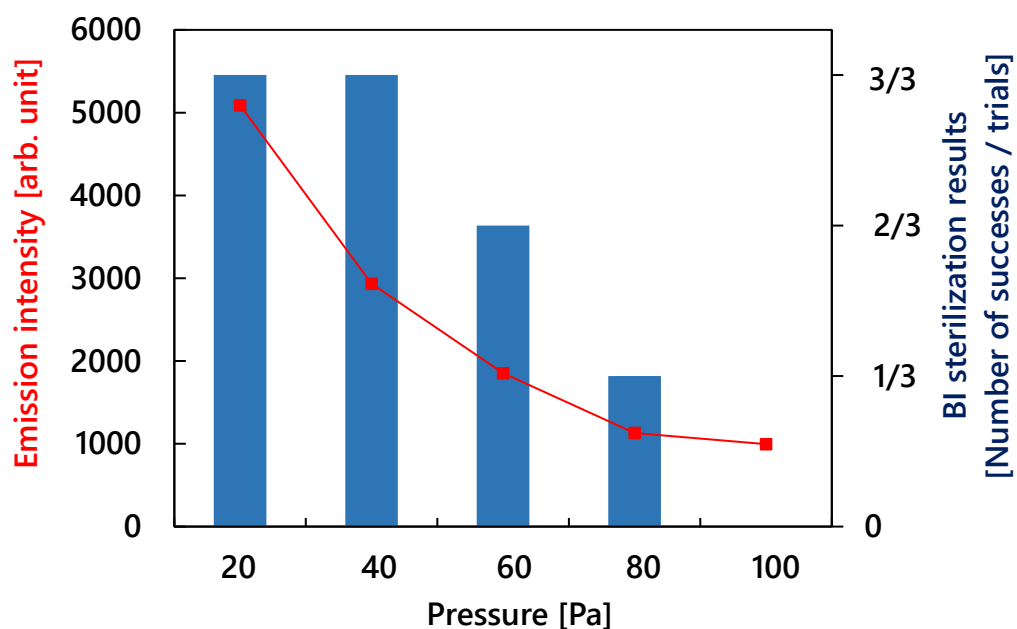


図 4.6 滅菌結果と五重項酸素原子の発光強度増加率の圧力依存性

クリスタルバイオレット染色法

BIの結果より、バイオフィルムの分解において圧力依存性が示唆されたことから、酸素プラズマ照射におけるバイオフィルムの圧力依存性を調査した。また、プラズマ照射によりバイオフィルムの物理的量に差異が生じる可能性があると考えた。そこで、これらの仮説を検証するために時間変化および圧力変化におけるバイオフィルムの定量評価を行うことを目的とし、クリスタルバイオレット染色を実施した。図4.7には、各圧力条件における吸光度を示す。

図4.7より、各圧力条件における照射時間に対する吸光度の変化は確認されなかった。この結果から、酸素プラズマ照射によるバイオフィルムの定量的な変化は、ほとんどなかったと考えられる。クリスタルバイオレット染色法は、細胞のペプチドグリカン層を染色することで細胞量を評価するが、生きている細胞と死んでいる細胞を区別する能力はない。よってバイオフィルム内で細胞が死滅しても、死滅した細胞がそのまま残りバイオマスとして測定されるため、実際の生存細胞数と測定値に差異が出る可能性がある。そこで、この差異を明らかにするために、プレートカウント法を使用して照射時間による生菌数の変化を調査した。

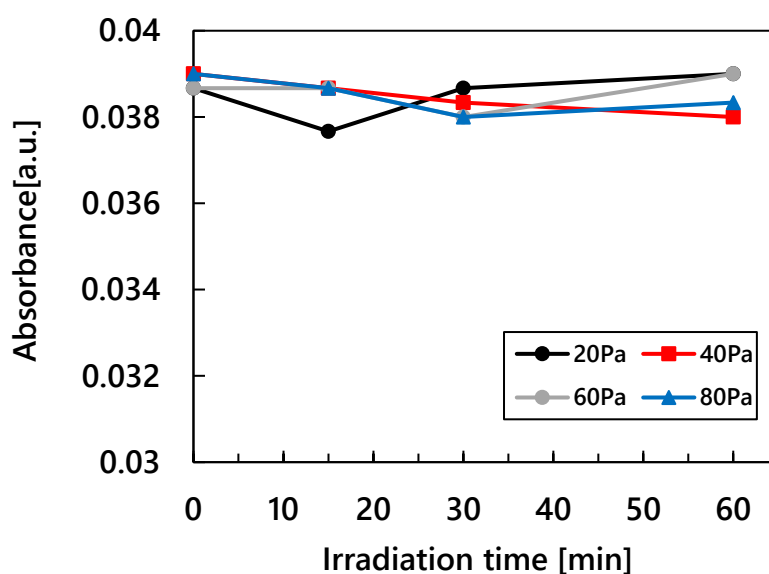


図 4.7 各圧力条件における吸光度の照射時間依存性

プレートカウント法による生菌数測定

I. *Bacillus subtilis* var natto

酸素プラズマ照射によるコロニー数の変化を正確に評価し、バイオフィルムの分解効果を定量的に測定するためにプレートカウント法による生菌数測定を行った。雰囲気ガスを酸素、投入電力を 60 W、圧力を 20 Pa 一定として照射時間を変化させた。図 4.8 には照射時間における生菌数変化を示す。

図 4.8 より、10 分間の照射で菌数は 10^6 CFU/mL から 10^4 CFU/mL まで急速に減少し、その後 D 値の減少は緩やかに遅くなることが確認できた。また、60 分の照射以降は菌数の減少が確認できなかった。この結果から、残存曲線における生菌数は三段階での減少が生じていると推察できる。

第一段階では、プラズマ中の酸素活性種によるバイオフィルム表面を覆うマトリックス及びへの酸化反応が考えられる。これより、多糖類およびタンパク質から構成されるマトリックスの分解が生じ、生成された酸素活性種はバイオフィルム内部に容易に浸透可能であるため、内部に存在する納豆菌へのアプローチが可能となる。その結果、細菌の急速な減少に繋がったと推察できる。

第二段階における残存曲線の減少ペースの鈍化は、バイオフィルム内に耐性菌の存在と酸素活性種が十分に浸透できなかったことが主に影響していると考えられる。この耐性菌には、納豆菌の芽胞化が示唆される。芽胞化は、細菌がストレス環境に遭遇した際に代謝活動を停止し、厚い外壁を形成する過程である。芽胞は非常に耐久性が高く、極端な環境条件下でも生存することができる細菌の生存形態を指す。バイオフィルム内での芽胞化が第二段階の耐性機構として機能すると仮定した場合、プラズマ照射初期の高い滅菌効果は芽胞を形成していない活動細菌に対しては効果的であるが、時間が経過すると芽胞化した細菌が生残するため生菌数の減少率が低下したと考えられる。しかし、照射後 60 分まで生菌数が緩やかに減少していることから、プラズマ照射が芽胞にもある程度の滅菌効果を持つことが示唆される。また、芽胞や活動細菌を覆う物質が酸素活性種の浸透を阻止している可能性も考えられる。この物質には分解されたマトリックスや死滅した細菌が当てはまる。クリスタルバイオレット染色法の結果より、プラズマを照射した前後でバイオフィルム全体量の変化がなかったことから、照射による死滅後も細菌は死骸として存在していることが示唆される。これら細菌の死骸など

により、酸素活性種が十分に浸透できずに生存曲線の減少率は鈍化したと考えられる。

第三段階において生菌数の変移が確認できなかった要因に関しては、バイオフィルム表面を覆うマトリックスが完全に破壊され、酸素活性種がマトリックス内部に存在する大半の細菌に到達したからだと考えられる。

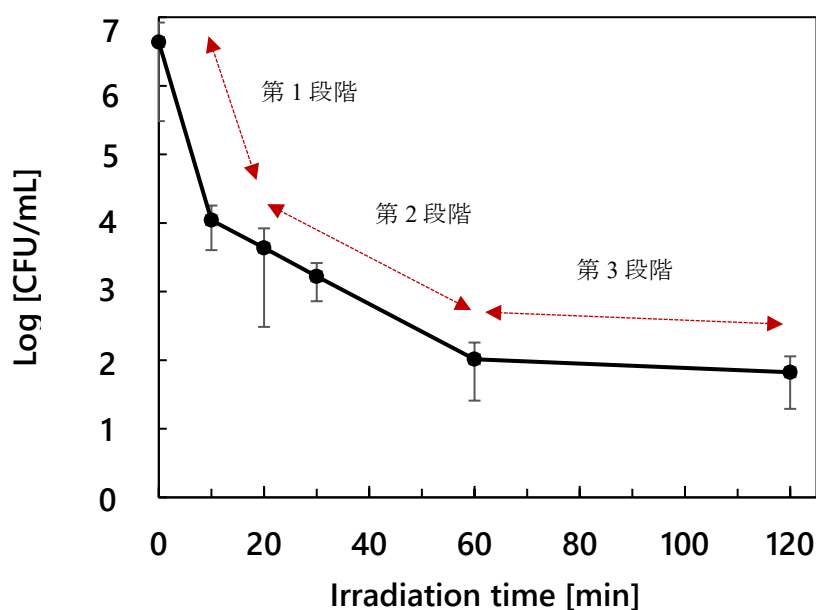


図 4.8 生菌数の照射時間変化 (*Bacillus subtilis* var *natto* Biofilm)

II. *Geobacillus stearothermophilus*

以下の二点の目的から、芽胞および芽胞上にバイオフィルムを形成したサンプルに酸素プラズマを照射した場合における生菌数測定試験を行った。

- ① *Bacillus subtilis* var *natto* バイオフィルムへの照射試験において、納豆菌が芽胞を形成し耐性を持つことが推察された。そこで、酸素プラズマを照射することで、酸素活性種が芽胞菌数に与える影響を評価するために行った。
- ② *Bacillus subtilis* var *natto* バイオフィルムへの照射試験において、長時間処理を施しても菌数は 10^2 CFU/mL から減少しなかった。この要因の一つとして、芽胞菌の形成が推察された。そこで、バイオフィルムを形成した芽胞菌と形成していない芽胞菌に長時間プラズマ照射を行い、それぞれの残存菌数を比較することで菌が一定数残存する要因の解明を図った。

雰囲気ガスを酸素、投入電力を 60 W、圧力を 20 Pa 一定として照射時間を変化させた。図 4.9 には、照射時間における生菌数の変化を示す。

図 4.9 より、両サンプルにおいて 30 分間の照射で大幅な芽胞菌の不活化が確認できた。しかし、照射 20 分時点での好熱菌芽胞の生菌数が納豆菌と同じ減少率に到達している点は、プラズマ照射の効果だけでは説明がつかない。これは照射による高周波のエネルギーがマトリックスを構成するタンパク質や多糖類に吸収された際に生じる熱による影響も考えられる。酸素プラズマ照射が芽胞菌の滅菌に対しても非常に効果的であることも示唆されたが、熱による分解も考慮しなければならない。また 30 分照射以降は、*Bacillus subtilis* var *natto* サンプルと同様に残存曲線の減少率が鈍化した。これは、前述した二段階での生菌数の減少に対する考察と同じ要因が考えられる。さらに、グラフよりバイオフィルムを形成した芽胞菌サンプルは、形成していない芽胞菌サンプルと比較して全体的に生菌数が多いことが確認できた。この要因は、バイオフィルムによる保護効果である。バイオフィルム内の細菌は、外部からの侵入に対してバイオフィルムの表面を覆い保護層の役割を担うマトリックスによって物理的に保護される。内部では、フィルム内に豊富に存在する細胞外多糖類 (EPS) により侵入異物の拡散を遅らせ、細菌への到達濃度を低減させる。このようにバイオフィルム内部の細菌は外部から保護されていることから、バイオフィルムを形成していない芽胞菌と比較して残存菌数が多いと考えられる。さらに、長時間の照射後には両サンプルにおける残存菌数がほぼ等しくなることが確認できた。これは、長時間照射によりバイオフィルムが分解され、大半の酸素活性種が内部に存在する細菌まで到達した可能性があることを示唆している。このことから、バイオフィルムの分解によって生成された物質 (マトリックスの破片等) が存菌数に大きな影響を与える可能性は少ないと推察した。

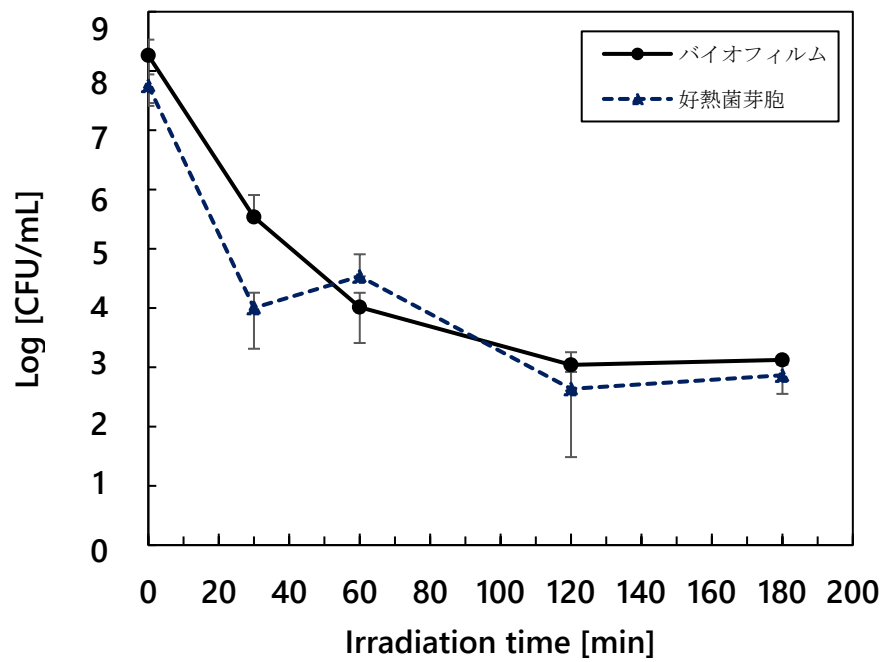


図 4.9 生菌数の照射時間変化 (*Geobacillus stearothermophilus* Biofilm)

4.3 滅菌処理による副生成物調査

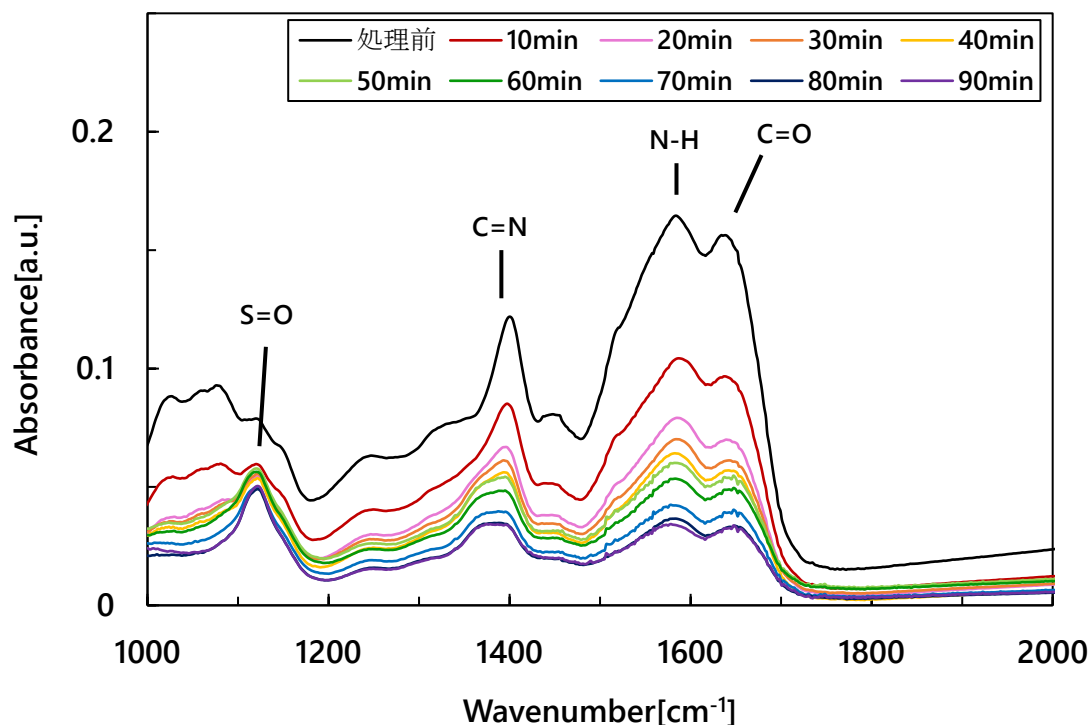


図 4.10 FTIR スペクトルの照射時間特性

バイオフィルムへの酸素プラズマ照射によりタンパク質変性が生じ、酸化物などの物質が生成されている可能性を考慮し、各照射時間における副生成物調査を行った。図 4.10 には、酸素プラズマ由来の活性気体による処理を受けた納豆起因バイオフィルムの各照射時間における FTIR スペクトルを示す。

・各ピークの減少

図 4.10 より、プラズマ照射後において照射前のスペクトルで見られた C-N 変角振動 (1400 cm⁻¹)、N-H 変角振動 (1560 cm⁻¹)、C=O 伸縮振動 (1650 cm⁻¹) のピークが減少していることから、酸素活性種によってペプチド結合が分解された可能性が高いと推測できる。タンパク質はペプチド結合を主鎖として形成していることから、タンパク質の分解も考えられる。

ペプチド結合が分解された要因として、酸素プラズマ中に生成された酸素活性種による酸化反応が挙げられる。生成された酸素活性種は非常に高い酸化能力を

持つため、ペプチド結合を形成するアミノ酸の主鎖や側鎖の水素原子と反応しやすい。これにより水素原子の移動反応が生じ、ペプチド結合の分解が進行したと考えられる。以下に水素移動反応について述べる。

I. 酸素活性種との反応

酸素活性種がアミノ酸側鎖や主鎖の水素原子と反応し、ペプチド結合を形成するアミノ酸の中心にある $C\alpha$ (アルファ炭素) に結合した水素を引き抜く。

II. ラジカルの生成

水素移動反応によって水素を引き抜かれた $C\alpha$ がラジカル化する。ラジカルは不対電子を持つため非常に反応性が高く、周囲の分子との反応を促進する。

III. 結合の開裂

ラジカルとの反応により、ペプチド主鎖の $C\alpha$ と隣接する C-N 結合間の電子密度が減少し、結合の不安定化を引き起こす。

IV. ペプチドの断片化

不安定化は最終的にペプチド結合の開裂を促進し、タンパク質の一次構造の連続性が破壊される。結合が開裂すると、ペプチドはより小さな断片に分解されることになり、これによりタンパク質の構造的および機能的特性が失われる。[32] [33]

・副生成物の可能性

酸素プラズマ由来の活性気体による処理を受けた納豆起因バイオフィルムの各照射時間における FTIR スペクトルを示す。図より、酸素プラズマの照射時間が長いほど各ピークの減少が顕著に確認できた。ピークの減少に関する考察は 4.3 の”バイオフィルムへの処理結果”に記載した考察と同様である。副生成物の可能性に関しては、波長 1150 cm^{-1} 付近で新たなピークが確認できたことから、酸素プラズマ照射による新たな化合物の生成が考えられる。

1150 cm^{-1} 付近のピークは、①スルホキシドの $S=O$ 伸縮振動が通常赤外スペクトルにおいて $1000\sim1300\text{ cm}^{-1}$ の範囲で観測されること、②タンパク質内のジスルフィド結合 (SS 結合) が酸化されてスルホキシドが形成される可能性があることから、スルホキシド ($S=O$) が考えられる。スルホキシドは、有機硫黄化合物の一種で2つの炭素原子がスルフィニル基 $-S(=O)-$ に結合している一群の化合物で

ある。1150 cm^{-1} 付近のピークがスルホキシドの S=O 伸縮振動に起因する場合、バイオフィルムに含まれるタンパク質の SS 結合が酸素活性種により分解され、チオール基に還元し、その際に硫黄化合物が生成されたと考えられる。タンパク質の三次元構造は、SS 結合によって大きく安定化されており、これらの結合の酸化はタンパク質の構造的な整合性に影響を与える。スルホキシドの形成により、バイオフィルムの EPS を構成するタンパク質のペプチド鎖同士を硬く繋ぐ SS 結合が断片化され、タンパク質構造の機能低減が生じたと考えられる。よって、酸素プラズマ照射においてバイオフィルム表面を覆うマトリックスの分解が示唆された。これが、4.2.4 節における好熱菌芽胞及びバイオフィルムサンプルへの照射試験結果より考察されたマトリックスの分解の起因であると考えられる。このことから、本研究の目標の一つであるマトリックスの破壊に成功したといえる。

第5章 総括

本研究では、低圧酸素プラズマ発生装置を用いて、バイオフィルムの酸素プラズマ滅菌における最適滅菌条件および主要な滅菌因子の調査を行うことで宇宙機内滅菌機としての酸素ガスプラズマ滅菌の可能性を調査した。

その結果、以下の結論が得られた。

1. 低圧酸素プラズマ滅菌の最適照射条件および主要滅菌因子

発光分光計測により、過酢酸ガスプラズマ中では活性酸素種である五重項酸素原子の生成が確認でき、真空チャンバー内の酸素ガス圧力の低下に従い五重項酸素原子の生成量が増加することが分かった。

プレート表面に形成したバイオフィルムに対して酸素プラズマを照射し、BIを用いた滅菌評価を行った結果、空気プラズマ照射に比べ酸素プラズマ照射の方が滅菌効果は大きいことが分かった。また圧力 20 Pa において最も滅菌成功率が高くなることが確認できた。これは、五重項酸素原子の滅菌対象物への到達量および BI による滅菌結果の圧力依存性の傾向が類似していることから、酸素ガスプラズマ滅菌の主要な滅菌因子は五重項酸素原子だと考えられる。以上より、ISS 内における酸素ガスプラズマ滅菌の最適条件は、雰囲気ガス：酸素、圧力：20 Pa、投入電力：60 W であった。

2. 最適条件での生菌数評価

得られた最適条件にて生菌数評価を行った結果、納豆菌及び好熱菌芽胞起因のそれぞれバイオフィルムにおいて細菌の不活化を確認することができた。

3. 滅菌処理による副生成物調査

90 分間の酸素プラズマ照射によって、 1150 cm^{-1} 付近にスルホキシドの生成が確認できた。有機硫黄化合物であるスルホキシドが生成されていることから、バイオフィルム内に存在するタンパク質のペプチド鎖同士を硬く繋ぐジスフィルド結合が断片化され、タンパク質構造の機能低減が生じた。これによりマトリックスを構成するタンパク質を硬く繋ぐペプチド鎖に隙間が生

じ、バイオフィルム内部に存在する細菌への酸素活性種のアプローチが実現したと考えられる。

以上の報告より、本研究で掲げた目的及び目標を達成することができた。そして本研究により、バイオフィルムに対する酸素プラズマ滅菌の滅菌特性・滅菌因子、そして分解特性を明らかにすることができた。酸素プラズマ滅菌は、従来の滅菌法よりも短時間での滅菌が可能である。また、電気と酸素ガスのみでの運用が可能であるため、物資の限られた宇宙空間においても非常に適性が高い。更に、滅菌処理後において乗組員の方々の健全性に影響を及ぼす物質の残存も確認できなかった。

本研究では宇宙空間に存在するバイオフィルムを対象として行ったが、バイオフィルムは医療分野などでも存在が懸念されている。今後、バイオフィルムのDNA分解における解析やSEMを用いた構造変化を明らかにすることで、他分野に渡る酸素プラズマ滅菌器の滅菌器としての実現を期待する。

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、様々な助言をいただいた指導教員の九州大学大学院総合理工学府 林信哉 教授に深く感謝を申し上げます。並びに九州大学大学院 農学研究院の敬久教授および博士後期課程 林云志さんには、バイオフィルム作成に関する有益な助言を頂きました。深くお礼申し上げます。また研究生活を支え、充実させてくださった同研究室の先輩方や同輩、後輩達に深くお礼申し上げます。

最後になりましたが、これまで温かく見守り、時には力を貸してくださった家族や友人に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

参考文献

- [1] 渡邊浩崇, “宇宙の研究開発利用の歴史、日本はいかに取り組んできたか,” 大阪大学出版会, 2022.
- [2] 渡部純一, 「分からない」が「面白い」に宇宙が凄い, エクシア出版, 2022.
- [3] NASA, “Monitoring Microorganisms,” 2024.
- [4] 佐. 杉. 山. 榎村浩一, “有人宇宙環境における真菌と健康に対するインパクト,” 宇宙医学連携研究会, 2011.
- [5] NASA, “International Space Station Water Balance Operations,” 2017.
- [6] 永津雅章, “プラズマ滅菌,” 医療バイオ分野へのプラズマ応用, 2007.
- [7] 立川眞理子, “立川眞理子『バイオフィルムと酸化性殺菌剤,’ *The Pharmaceutical Society of Japan*, 2006.
- [8] T. Watanabe, “プラズマ核融合雑誌,” 第 巻 75, pp. 651-658, 1999.
- [9] M. Nagatsu, “プラズマ核融合雑誌,” 第 巻 83, pp. 601-606, 2007.
- [10] S. O. N. H. Padrig B.Flynn, “Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges,” *Plasma Biotechnology*, pp. 577-638, 2018.
- [11] VERRIX, “New Report Highlights Importance of Sterility Assurance for Planetary Protection and Prevention of Hospital-Acquired Infections,” *Bio Space*, 2018.
- [12] 小林寛伊, 大久保憲, 尾家重治, “消毒と滅菌のガイドライン,” へるす出版, 2004.
- [13] ICHG 研究会, “国際標準の感染予防対策 滅菌・消毒・洗浄ハンドブック,” 医歯薬出版株式会社
- [14] 稲葉知大、清川達則、尾花望, 集団微生物学のすすめ, 2014.
- [15] T. Sutherland I. W., The biofilm matrix, 2001.
- [16] 池田玲子, 薬科微生物学 第 4 版, 丸善株式会社, 2003.
- [17] P. Setlow, “Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals.,” *Journal of Applied Microbiology*, 第 巻 101, 第 3, pp. 514-525, 2006.
- [18] A. Driks, “Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat.,” *Trends in Microbiology*, pp. 251-254, 2002.
- [19] A. Driks, “*Bacillus subtilis* Spore Coat,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 1-20., 1999.
- [20] 高橋秀一, プラズマ理工学入門, 森北出版株式会社, 1997.
- [21] 山崎耕造, プラズマの本, 日刊工業新聞社, 2006.
- [22] N. H. A. Y. T. Itarashiki, “Transactions of the Materials Research,” *Society of Japan*, 第 巻 41, 第 2, pp. 179-182, 2016.
- [23] R. K. a. Y. Y. : J. J. o. A. P. N. Hayashi, *Japanese Journal of Applied Physics*, 第 巻 52, pp. 52, 11NF03, 2013.

- [24] 永津雅章, “J. Plasma Fusion Res,” p. 10, 2007.
- [25] 菅井秀郎, プラズマエレクトロニクス, オーム社, 2002.
- [26] 電気学会放電ハンドブック出版委員会, “放電ハンドブック 上巻, 1998.
- [27] Y.Okamoto, *Journal of the Vacuum Society of Japan*, 第 巻 59, pp. 161-170, 2016.
- [28] 山村学・村山精一, プラズマの分光計測, 学会出版センター, 1995.
- [29] J. A. Davies, “Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain,” *Journal of bacteriology*, pp. 837-845, 1983.
- [30] 日本分光, FTIR の基礎 (1) 赤外分光の原理, <https://www.jasco.co.jp/jpn/technique/internet-seminar/ftir/ftir1.html>.
- [31] K. ラボラトリーズ, ボタン型温度データロガー.
- [32] 宮澤慶、高山光男, “MALDI-MSD におけるペプチドからの複数水素の脱離とラジカル誘導分解,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn*, 2021.
- [33] 高山光男, “分子間水素引き抜き反応によるペプチドのラジカル分解機構,” 横浜市立大学, 2018.
- [34] R. K. L. t. B. G. A. a. C. G. Anna Hauswirth, “Spectroscopic Investigation of the Impact of Cold Plasma Treatment at Atmospheric Pressure on Sucrose and Glucose,” *MDPI*, 2022.
- [35] 戸田和子、井崎やゑ子、糸川崇之, *食衛誌* 第 巻 6, p. 14, 1973.
- [36] 河合睦文, 生活衛生, 1978.