

令和3年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「最先端プラズマ・紫外線照射技術を併用したガス中の
ヒドロキシルラジカル生成プロセスを活用した制菌システムの開発」

研究開発成果等報告書

2022年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 一般財団法人大阪科学技術センター

目次

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	6
1-3 成果概要	7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
第2章 本論	
2-1 研究開発実施内容	9
【1】殺菌効果を増強する・OH 生成法開発と条件最適化	9
【1-1】・OH 生成量増大のための紫外線照射法の最適化	9
【1-2】殺菌効果増強に寄与する・OH 生成量の最適化	12
【2】制菌システムの開発	15
【2-1】ラジカルの生成を最適化するための電極開発	15
【2-2】ガスフロー及びUV制御系開発	16
【2-3】動作プログラムの構築と制菌システムの開発	17
【3】制菌システムの性能評価と実証	20
【3-1】プラズマとUVを併用した殺菌効果の評価	20
【3-2】制菌システムの評価と実用条件における実証	22
2-2 研究開発成果の外部発表状況	25
最終章 全体総括	26
3-1 研究開発成果、アドバイザーによる講評及び複数年の研究開発成果	26
3-2 研究開発後の課題・事業化展開	26

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1)研究開発の背景

近年、カビや細菌あるいはウイルスに対する殺菌技術は我々の社会生活を支える基盤技術として広く認識され、その対象は食品、公衆衛生および医療分野だけでなく、我が国の製造業全般に拡大しつつある(図1-1)。これまで、殺菌しようとする対象の性状、規模および殺菌の水準に応じて、加熱法、オゾンあるいは殺菌試薬、紫外線照射および大気圧プラズマ(以下 APP)などが適宜応用されてきたが、既存の殺菌法では現代社会が求める多様な環境の維持と管理に対応できない現状が顕在化しつつある。さらに、食品産業のグローバル化を背景に、食品の製造と輸送過程に清浄度が維持された環境を適時かつ低コストで提供できる菌を制御する(以下、制菌)技術の開発とシステム構築が求められている。

このような状況を鑑み、ガス中におけるプラズマ・紫外線照射法を併用するヒドロキシルラジカル(以下、 $\cdot\text{OH}$)生成反応を新技術とする制菌システムの研究開発に着手している。本研究は、「コア技術」であるガス中に含まれる微量水分を分解する APP 生成技術に紫外線照射を併用して効果的に生成する $\cdot\text{OH}$ を活用する制菌技術である。この技術は、従来技術のように殺菌用の薬剤を使用しないクリーンな制菌技術である。また、新技術で活用する $\cdot\text{OH}$ は黒カビ(メラニン有する菌:メラニン生成菌)など種々の殺菌に耐性を持つ菌にも有効な制菌作用を有している。さらに、新技術は試薬を使用しないことから、システム開発における自由度が高く、食品製造工場、医療施設の空調設備、輸送システムから細胞培養など実験設備まで適切な制菌環境を提供できる可能性を有している。



図 1-1 社会を取り巻くカビ、菌、ウイルスとその問題

従来の殺菌手法の課題および新技術の特徴を下表 1-1 に示した。従来使用された加熱法や紫外線殺菌法、オゾン・殺菌試薬処理法は、それぞれ「連続的な使用による対象物へのダメージ」、「紫外線照射法は有効な手段であるが陰のできる対象物への利用が困難」あるいは「薬剤の残存による臭いや有毒性」などの問題が示唆された。また、それぞれの殺菌手法で対象や乾湿、温度条件など使用環境がそれぞれ異なっていることや、これらの手法に対して耐性を持つ菌(例、黒カビに代表される生体内でメラニンを生合成できるメラニン生成菌)が存在する。近年、多様な条件で共通的に使用できる可能性を持つ強力な殺菌手法として、大気圧プラズマ(APP)が注目されている。APP は「プラズマ」状態の励起分子種と総称する高活性化学反応種が発する紫外(200 nm)から可視領域(900 nm)の光を含んでいる。特に、紫外線領域の光は殺菌効果を示すことが期待されているが、プラズマ由来の光による直接的な効果は限定的であるとされる。また、殺菌効果は、対象物が濡れている時のみ発揮されるとされる。このような基礎的な知見の乏しさは、大気圧プラズマによる殺菌の応用が停滞している理由と考えられる。さらに、APP 装置自体の安定制御が困難なことから実用化に至っていない。

表 1-1 従来の殺菌技術と技術シーズ及び新技術(本事業)の比較

分類	従来技術			新技術シーズ	新技術(本事業)
	加熱	非加熱	近年注目	非加熱	非加熱
方法	加熱	紫外線 (UV)	オゾン (O ₃) 殺菌試薬	大気圧プラズマ	大気圧プラズマ + UV
殺菌源	熱	光	オゾン 殺菌試薬	プラズマ 光	・OH
対象物	水、ガラス、金属。料理済食品(レトルト)など加熱可能な物	水など劣化しないもの。金属、一部の樹脂	水、ガラス、金属など反応無き物	濡れている(研究段階)	水に浸かっている。表面が濡れているもの
メラニン生成菌の殺菌	△	×	×	△	◎
特徴	導入易	導入易	装置・薬品価格低	殺菌効果不安定	殺菌効果大 高安定性 多用途
問題点	対象限定的(生もの不可)	対象が限定的(劣化物不可)	臭いがきつい 残存の影響	水溶液が必要 基礎研究段階	試薬が必要 水溶液が必要

最終目標値
生成量 100 μM/分
テーマ[1][2]

最終目標値
温度変化1℃以下
プログラムによる装置制御
清浄度クラス C3達成・維持
テーマ[2][3]

最終目標値
1時間で一桁殺菌
テーマ[1][3]

テーマ[2][3]

以上の技術的問題を解決し、大気圧プラズマ装置を高度化、製品化するために、平成 28 年度戦略的基盤技術高度化支援事業(以下、サポイン事業)において[大気圧プラズマを基盤とする活性酸素ラジカル種を安定的に生成できる装置]を開発した。そして、該当装置で開発した技術をコア技術とした。

コア技術では、APP 内でガス中の微量の水分(数 ppm)から・OH が生成し、再結合反応により H₂O₂ が生成する。この H₂O₂ も殺菌作用を示す上に、ガス中に含まれるためどの様な隙間にも侵入する事が可能である。また、装置の特徴として、連続使用で 30 分以上、断続的使用で 14 日間の間で誤差±8%の安定性を実現した。そして、このコア技術に、京都工芸繊維大学(以下、工繊大)井沢准教授が開発した「APP を応用した活性酸素ラジカルによる殺菌」を技術シーズと融合する。そして、実用化にむけて、APP による直接的な殺菌効果および殺菌成分の生成と紫外線照射による光反応および化学的反應の併用により、試薬を使用せず強力な殺菌効果を有し、かつ多用途が可能な制菌システムを実現する。

(2) 研究目標

研究の背景に示した課題を解決するために、次の 3 課題、(1)装置開発のための基礎的研究「殺菌効果の増大」、(2)装置の開発「装置化」および(3)実証「殺菌効果の検証」に分割した(図 1-2)。

研究課題	研究テーマ
殺菌効果の増強	【1】 殺菌効果を増強する・OH生成法開発と条件最適化
装置化	【2】 制菌システムの開発
殺菌効果の検証	【3】 制菌システムの性能評価と実証

図 1-2 本事業の研究課題および研究テーマ

工繊大井沢准教授は、これまでに一般的な菌(非メラニン生成菌)に対する APP による殺菌処置は効果を発揮する一方で、メラニン生成菌に対しては十分な効果が得られないことを示した(2016, Itooka ら; 2018 Itooka ら)。そこで、APP 殺菌の効果を増強するために、二価鉄(Fe²⁺)試薬(FeSO₄あるいは FeCl₂)を用いた化学的反應を応用し、メラニン生成菌に対する殺菌効果を報告した(2019 Fukuda ら)。一方で、試薬の使用は実際の現場においては困難である。また、文献 3 ではハンドメイドの APP 装置を用いており、手法の最適化および実用化のための APP 装置が必要であった。

本事業では、新技術の実現に向けて図 1-2 に示した研究テーマをそれぞれ、【1】「殺菌効果を増強する・OH 生成法の開発と条件最適化」を京都工芸繊維大学、APP 装置および制菌装置のシステム構築のために【2】「制菌システムの開発」を誠南工業、殺菌技術および制菌システムを検証するためにテーマ【3】「制菌システムの性能評価と実証」を富山大学、京都工芸繊維大学および誠南工業が実施した。

(3) 研究目標に対する成果

以下の表 1-2 に本事業の最終目標および成果をまとめた。詳細は第2章で述べる。

表 1-2 本事業の最終目標および目標に対する成果

【番号】開発項目	最終目標	最終目標に対する成果
【1】殺菌効果を増強する・OH 生成法開発と条件最適化	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒドロキシルラジカルの生成積算量 100 μM/分 ・各ラジカル種生成量の誤差を平均値±10%以下 	<ul style="list-style-type: none"> ・OH ラジカルの生成量、最大 108μM/分を達成。 ・誤差: ±10%以下を達成。 <p>目標 100%達成</p> <p><追加検討項目> テーマ【3】で明らかとなった O₃ 経由 H₂O₂、NO₃⁻ についての研究</p>
【2】制菌システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・清浄度クラス C3 相当(100 CFU/m³)に制菌 ・菌検出・殺菌の適時制御 ・各ラジカル種生成量の誤差を平均値±10%以下 	<ul style="list-style-type: none"> ・動作感応型装置、自動制御型装置の開発。動作プログラムの開発。開発後耐久性、使用感の向上を実施。製品化に向けての検討。 ・清浄度クラス C3 相当(100 CFU/m³)に制菌・菌検出・殺菌の適時制御 ・各ラジカル種生成量の誤差を平均値±10%以下を達成 <p>目標 100%達成</p> <p><追加検討項目> 大型化装置開発。評価を実施。</p>
【3】制菌システムの性能評価と実証	<ul style="list-style-type: none"> ・落下菌 3.52 x 10⁵ CFU/m³、 ・空中浮遊菌 100 CFU/m³ を 3 日間維持 	<ul style="list-style-type: none"> ・動作感応型装置の性能(大腸菌および出芽酵母を 99%以上殺菌/1h) ・連続動作および処理後の殺菌性能を評価。 ・落下菌 3.52 x 10⁵ CFU/m³、 ・空中浮遊菌 100 CFU/m³ を 3 日間維持 <p>目標 100%達成</p>

1-2 研究体制

誠南工業は大気圧プラズマによるラジカル種の安定生成技術を有し、高度化した殺菌プロセスを装置化した制菌システムを制作する。

工織大田嶋教授は本研究で用いる活性酸素ラジカル種の生成や反応性に関する研究を推進する。工織大井沢准教授は本研究開発の技術シーズであるメラニン生成菌の殺菌に有効プラズマ殺菌技術を開発した。主に、ラジカル殺菌効果および制菌システムの評価を担当する。

富山大近藤特別研究教授は、医学部に所属している利点を生かし、再生医療も含め広い範囲で制菌システムの展開に向けて、テーマ 3 の殺菌効果の評価およびシステムの評価を行う。

川下ユーザーであるキノコ生産者大愛およびバイオ系装置販売会社ワケンビーテックからユーザーのニーズを収集して本事業を推進する。さらに、事業化に向けて大阪大から助言、提案を頂く。以上より、本事業終了後を見据えてスムーズに事業化するために、バイオ、医学、化学、装置開発の専門機関とバイオ周辺装置販売(ワケンビーテック)および食品製造(大愛)のアドバイザーを含む体制を構築した(図 1-3)。

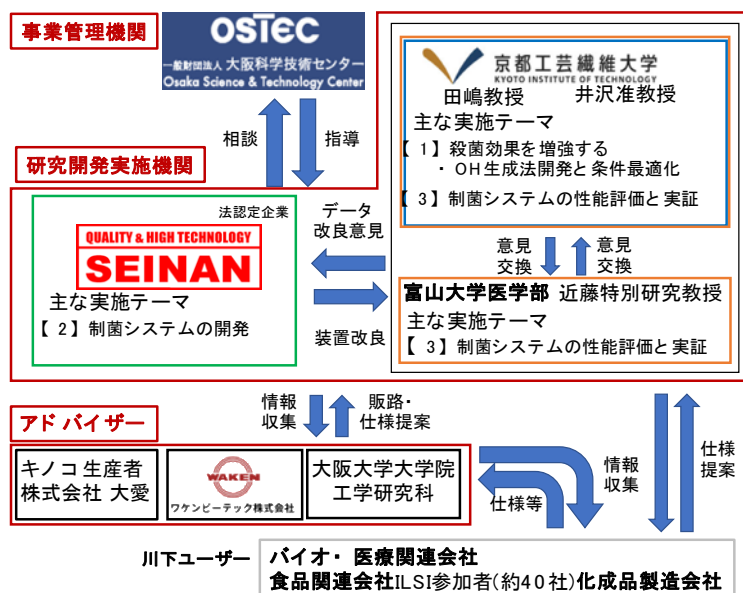


図 1-3 研究開発実施体制

1-3 成果概要

本事業の成果概要をサブテーマ毎にまとめた。

【1】殺菌効果を増強する・OH 生成法開発と条件最適化

【1-1】・OH 生成量増大のための紫外線照射方法の最適化

本事業では制菌システムに採用するプラズマの生成源であるノズル型、スリット型および融合型装置を開発した。そのプラズマ生成源に最適なガス流量、ガス中の水分含量を検討した。また、生成した・OH の再結合物質である過酸化水素を分解し、・OH を再度生成するための紫外線照射方法を検討した。その結果として、これまで紫外線による殺菌効果が低いとされる 308 nm を用いて・OH 生成量を増大できる事を確認した。さらに、装置で使用する LED-UV の波長を最適化し、プラズマ由来の過酸化水素(H₂O₂)を 308 nm の LED-UV 素子よりも分解に適していることが実験で明らかになった 280 nm 以下の LED-UV を採用した。また、LED-UV 光を効率的に照射できる LED-UV 素子の配置を検討した。プラズマを連続照射した水に LED-UV を照射することで 24 μM/分の・OH をスピントラッピング ESR 法で観測した。その結果、プラズマによる直接の・OH 生成量 84 μM/分と併せて 108 μM/分を生成した。

【1-2】殺菌効果の増強に寄与する・OH 生成量の最適化

最終目標である・OH の生成量(積算量)100 μM /分および各ラジカル種生成量のばらつきを平均値 $\pm 10\%$ を達成するために、プラズマ生成動作条件の最適化を実施した。その結果、ガス流中の水分量を検討したところ(詳細第 2 章)、プラズマのみによる・OH ラジカルの生成量はスリット型で最大 84 μM /分を達成した。上記の LED-UV による過酸化水素の分解で生成する・OH ラジカル量 24 μM /分とプラズマによる直接の・OH 生成量を併せて 108 μM /分を生成した。そして、スリット型プラズマ源の安定性を繰り返し評価したところ・OH 生成量のばらつき、誤差を $\pm 10\%$ に抑えた。

以上の結果から、・OH 生成量の積算値の目標値 100 μM /分および平均値の誤差を $\pm 10\%$ 以下を達成した。本テーマで検討したプラズマ源としてスリット型と同形の小型化電極をテーマ 2 で開発する装置に採用した。

【2】制菌システムの開発

【2-1】ラジカルの生成を最適化するための電極開発

本事業で開発した電極を用いて発生したヒドロキシルラジカル(・OH)の生成量を評価し、最大化するために、電極の構造として電極間距離、印加電圧を検討した。また、開発した電極が生成した・OH の二量化で発生した過酸化水素(H_2O_2)を LED-紫外線(UV)によって分解した・OH の定量を実施した。プラズマと UV を融合したスリット型電極は計 108 μM /分の・OH を生成できることを確認した。

【2-2】ガスフローおよび UV 制御系開発

ラジカルの生成を安定化するためにガスフロー制御系を開発し、ラジカルの生成量の増大および安定化するために UV 照射の制御系を開発した。ラジカル生成量はテーマ【1】および【2-1】で達成している事が確かめられ、その安定度(・OH 生成量の変動平均値) $\pm 10\%$ を達成できるガスフロー、UV 制御系を開発した。

【2-3】動作プログラムの構築と制菌システムの開発

落下菌を対象とする制菌システム、動作感応型制菌装置および 30L 空間をモデルとして殺菌・制菌する自動制御型制菌装置を開発した。動作感応型装置を対物センサーで動作させる動作のプログラムを開発し、制菌システムに搭載した。開発した装置の機能をテーマ【3】にて評価した

【3】制菌システムの性能評価と実証

【3-1】プラズマと UV を併用した殺菌効果の評価

テーマ【2】で開発し、テーマ【1】で性能を確認した装置を用いて評価を実施した。実験条件下において、落下菌を対象とした殺菌効果をプラズマ、UV および併用系で評価を行った。プラズマ単体でも 20 分(大腸菌)、60 分(出芽酵母)で 99.9 % 殺菌されたことを確認した。

【3-2】制菌システムの評価と実用条件における実証

寒天培地に播種した落下菌(黒カビ、真菌類、出芽酵母、大腸菌)を 3.52×10^6 CFU/m³ から 3.52×10^5 CFU/m³ 以下まで殺菌できた。また、落下菌 3.5 処理ボックス(30 L)内で SDC 寒天培地を使用し、空中浮遊菌をエアサンプラー法で検出を試みた。一般細菌に由来するコロニーは観測されなかった。以上の結果より、100 CFU/m³ 以下を維持される事を示した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

誠南工業株式会社 技術部

藪田勇氣

〒559-0011 大阪市住之江区北加賀屋 4-3-24

TEL : 06-6682-6788

FAX : 06-6682-6750

e-mail : yabuta@seinan-ind.co.jp

第2章 本論

2-1 研究開発実施内容

【1】殺菌効果を増強する・OH 生成法開発と条件最適化

【1-1】・OH 生成量増大のための紫外線照射法の最適化

i) 補助事業の具体的内容

ヒドロキシルラジカル(・OH)の生成量(積算量)について、100 μM/分を達成するために、本事業で新規に開発したノズル型、スリット型および融合型装置のプラズマ源を使用し、ガス中の水分含量およびガス流量、印加電圧などプラズマ生成条件を最適化した(テーマ【1-2】)。そして、プラズマで生成する過酸化水素(H₂O₂)を分解し、・OH 量を増大するための紫外線(UV)波長を検討した。本事業では短波長の 265 nm, 280 nm, 308 nm, 325 nm および 365 nm の波長を検討し、LED により 265 nm, 280 nm は十分な H₂O₂ 切断能力を有する事が明らかとなった。加えて、300 nm 以下の LED に比べて LED 素子のコストを抑える事が可能な 308 nm および 325 nm LED をテーマ 2 で開発する装置に応用するための方法と電源回路を検討した。

ii) 重点的に実施した事項

これまでの研究から、プラズマの元となるヘリウム(He)ガスに含まれる数 ppm 程度の水分に由来するヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$; "•"は不対電子、ラジカルを表す)あるいは水素原子(水素ラジカル; $\cdot\text{H}$)をラジカル検出試薬(DMPO)を使用したスピントラッピング法(図 2-1)を組合せた流通型電子スピン共鳴法(流通型 ESR 法)(図 2-2)を使用して定量的に評価を実施した。

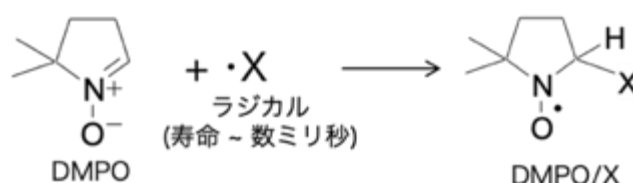


図 2-1 DMPO による短寿命ラジカルの捕捉反応

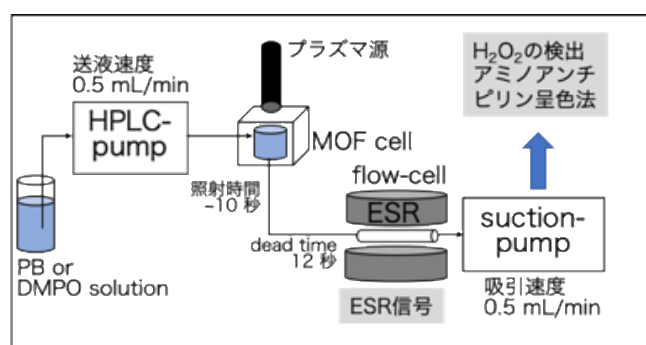


図 2-2 制菌装置の大気圧プラズマを評価するために用いた流通型 ESR 測定系

また、ラジカルの観測条件と同一条件で、 $\cdot\text{OH}$ が二量化して生成する過酸化水素(H_2O_2)をアミノアンチピリン呈色法で定量した。

LED-UV の波長 390 nm、365 nm、325 nm、308 nm、280nm および 265 nm の波長特性と過酸化水素水溶液を用いて H_2O_2 の分解能力について検討した。その結果、365 nm では光の強度を強くしても、 H_2O_2 を分解できないことが明らかとなり、325 nm 以短の波長が有効であることを確かめた。次に、大気圧プラズマで生成した過酸化水素を $\cdot\text{OH}$ の生成源として 325 nm 以短の LED-UV の評価を実施し、テーマ【2】における装置開発に応用した。

まず、325 nm 以下の紫外線は DMPO を光励起し、副反応によりブランク信号を示す。ラジカルの生成を
保証するために、 H_2O_2 未添加の条件で DMPO に強力な UV(実験用水銀灯)を照射し ESR 信号を記録した
(図 2-3-a)。得られた ESR スペクトルには微少な信号が見られた。次に過酸化水素水溶液 200 μM に対し
て、UV を照射すると 1:2:2:1 の 4 本線の信号が観測された。これはヒドロキシルラジカルの DMPO 付加体
(DMPO/OH)の信号と帰属した。信号の観測結果から前述のブランク信号に見られた微弱な信号は
DMPO/OH であると同定した。次に、同様の測定を LED-UV の波長を 325 nm とするとブランクの ESR 信号
と同程度の ESR 信号しか見られなかった(data not shown)。さらに LED-UV の波長を 308、280、265 nm に
変化すると、308 nm で信号強度が増加し、280 nm および 265 nm では水銀灯と同じ強度の ESR 信号が観
測された(図 2-3-c)。次に、過酸化水素濃度を 20 μM に下げ、同様の実験を行うと、265 nm および 280 nm
の LED-UV において図 2-3-c の 8 分の 1 の DMPO/OH 生成量となった(図 3-3-d)。一方で、20 μM 過酸化
水素では 325 nm ではほとんど DMPO/OH の信号が観測されなかった。

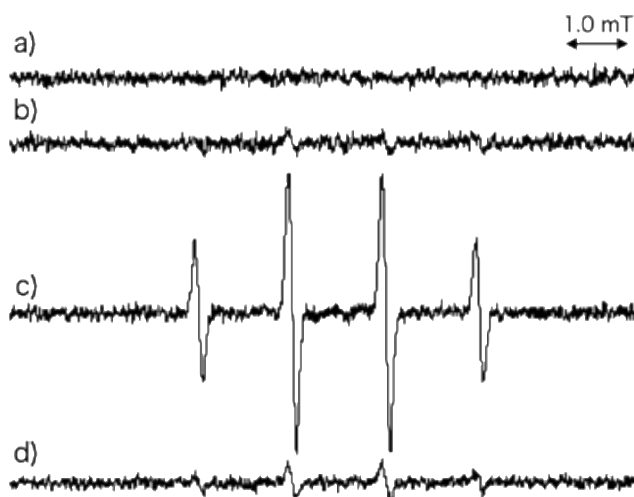


図 2-3 50 mM DMPO 混合溶液への紫外線照射で観測される ESR スペクトル a) blank b) UV
on, c)[H_2O_2] = 200 μM UV on, d) [H_2O_2] = 20 μM UV on

以上の結果から、大気圧プラズマで生成する過酸化水素 200 μM (照射時間 10 分以上)に対して、ラジカ
ル種を増大できる LED-UV の波長は 265 nm および 280 nm である事が示された。これまでに多くの研究機
関が検討した殺菌効果で示された、265 nm および 280 nm が有効であることを示しており、上記の ESR 観
測結果と一致することが明らかとなった。

一方で LED-UV の効率的な応用を検討するために、LED-UV の研究会に参加し、300 nm 以上の LED

の出力を向上させる有効性に関する知見を得た。そこで、上記で良好な結果が見られなかった LED-UV 308 nm について再検討し、電圧を昇圧し、光量の増加を検討した。

光量の検討には、まず、分光光度計を使用して評価を実施すると、仮説以上の光強度に増大した。そして、過酸化水素の分解で生成する・OH の生成量を評価した(図 2-4)。その結果、LED-UV の光強度は 17 倍に増強された。この LED-UV により、プラズマを連続照射した水中で 24 $\mu\text{M}/\text{分}$ の・OH が生成された。

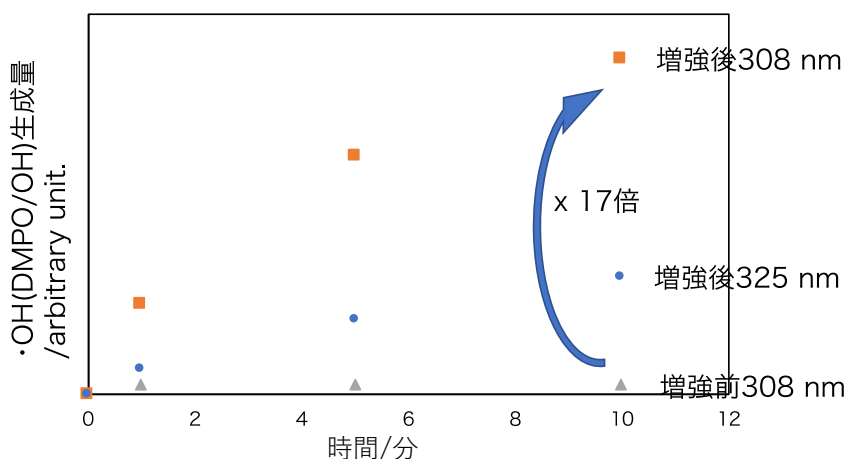


図 2-4 LED-UV 308 nm および 325 nm を DMPO/過酸化水素混合溶液に照射して観測される DMPO/OH 生成量の相対比の時間変化

【1-2】殺菌効果増強に寄与する・OH 生成量の最適化

i) 補助事業の具体的内容

・OH を生成量(積算量)100 $\mu\text{M}/\text{分}$ 生成し、そのばらつきを平均値 $\pm 10\%$ を達成するために、各制菌装置で採用したプラズマ源の使用条件を検討した。ラジカル種のばらつきおよび生成量については電子スピン共鳴(ESR)法を使用し、過酸化水素の生成量とばらつきについてはアミノアンチピリンの呈色を紫外可視吸収測定で評価した。

ii) 重点的に実施した事項

制菌装置に搭載するプラズマ源の最適化

本サブテーマでは・OH の生成量を本年度の 100 $\mu\text{M}/\text{分}$ とするために、テーマ 2 で開発したプラズマ源 3 種を比較検討した。また、・OH の生成量と共に過酸化水素の生成量を測定し、サブテーマ【1-2】と関連して・OH の生成量を最適化、最大化を試みた。

まず、テーマ【2】で開発した制菌装置のプラズマ源の型式であるノズル型、スリット型および融合型をそれ

ぞれ使用し、ガス中の水分量を 3 ppm から 2100 ppm まで変えて、 $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ のスピニアダクトおよび過酸化水素の生成量を測定した。ノズル型を使用すると水分量 3 ppm において 40 $\mu\text{M}/\text{分}$ を達成した。一方で、水分量が 2100 ppm の時に安定性が非常に悪い(誤差 $\pm 100\%$ 以上)ことが明らかとなった。これは水分量が増大すると放電の効率が低下し、プラズマ自体が生成しないためであることが明らかとなった。ゆえに、ノズル型で $\cdot\text{OH}$ 生成量を増大する事は困難であると判断し、スリット型および融合型で検討を続けた。

$\cdot\text{OH}$ および過酸化水素(H_2O_2)生成量増大に関する検討

スリット型およびノズル型(詳細テーマ【2】)では測定結果が類似していたため、スリット型の結果を述べる。スリット型において、水分量を 3 ppm から 2100 ppm まで変えながら $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ の検出と定量を行った。

水分量 3 ppm の時、ガス流量を 1.5 slm、印加電圧を 12 kV(peak-peak)として図 2-2 の測定装置に DMPO を流通しながら、 $\cdot\text{OH}$ 生成量(DMPO/OH)を評価した。ESR スペクトルをシミュレーションして解析すると $\cdot\text{OH}$ 生成量は 64 $\mu\text{M}/\text{分}$ と見積もられた(図 2-5-a)。このとき、 $\cdot\text{H}$ は $\cdot\text{OH}$ とほぼ同程度の 70 $\mu\text{M}/\text{分}$ と定量した。次に水分量を 700 倍の 2100 ppm において同様の測定を行うと、 $\cdot\text{OH}$ 生成量は 84 $\mu\text{M}/\text{分}$ 、 $\cdot\text{H}$ 生成量は 81 $\mu\text{M}/\text{分}$ と定量した(図 2-5-b)。すなわち、スリット型プラズマ源では、水分量が 700 倍に増大してもラジカル種の生成量は頭打ちとなった。

頭打ちとなった結果から、短寿命かつ高反応性の $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ がそれぞれ反応して水(H_2O)、過酸化水素(H_2O_2)あるいは水素(H_2)に変化している可能性を仮定した。

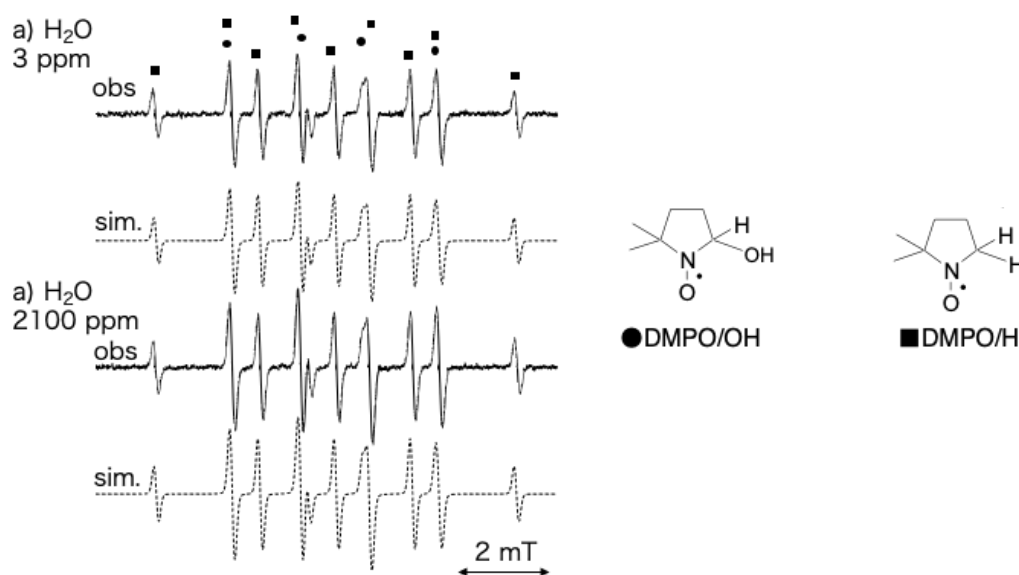


図 2-5 水分量の異なる大気圧プラズマ照射で観測された ESR 信号(実線 実測値、破線 シミュレーション); a) 3 ppm、 b) 2100 ppm、inset; DMPO/OH と DMPO/H の分子構造

そこで、過酸化水素の定量を、アミノアンチピリン法で定量した。すると生成した過酸化水素は 3 ppm の時に 35 μM 、2100 ppm の時に 75 μM となり、2 倍以上に増大した。本結果から、大気圧プラズマ中では $\cdot\text{OH}$ の生成量が増大しているが、プラズマ中で直ちに二量化反応し過酸化水素(H_2O_2)が生成すると推測した。

以上の結果から反応を詳細に検討するために、スリット型電極中のプラズマ光を蛍光分光測定(OES)で測定した(図 2-6)。水分量 3 ppm で加速された OES スペクトル(図 2-6-a)では、308 nm、388 nm、427 nm、656 nm、706 nm および 777 nm にピークが観測された。それぞれ $\cdot\text{OH}$ 、He、酸素原子(O^+)、水素原子($\cdot\text{H}$)、He、酸素原子(O)の励起状態であると帰属した。また、その他微弱なピークはいずれも He 由来のピークと帰属した。続けて、水分量を 21000 ppm まで変えながら OES スペクトルを記録した(図 2-6-b~g)。すると、各ピークは水分量の増大に応じて減少する傾向が見られた。特に、388 nm(He)、427 nm(O^+)、777 nm(O)は水分量が 2100 ppm から 4200 ppm で急激に減少した。一方で、残りのスペクトルは単調な減少が見られた。

OES ピークの変化と ESR およびアミノアンチピリン呈色法の結果をもとに、ヘリウムの励起状態(He プラズマ, He^*)の生成から、ラジカル種および過酸化水素の生成までを報文を参考に以下の反応式にまとめた(図 2-7)。

以上の反応から、不安定・短寿命中間体としてのラジカル種の生成と安定生成物としての過酸化水素(H_2O_2)が生成することが明らかとなった。すなわち、水分量の変化による ESR 測定結果と過酸化水素の呈

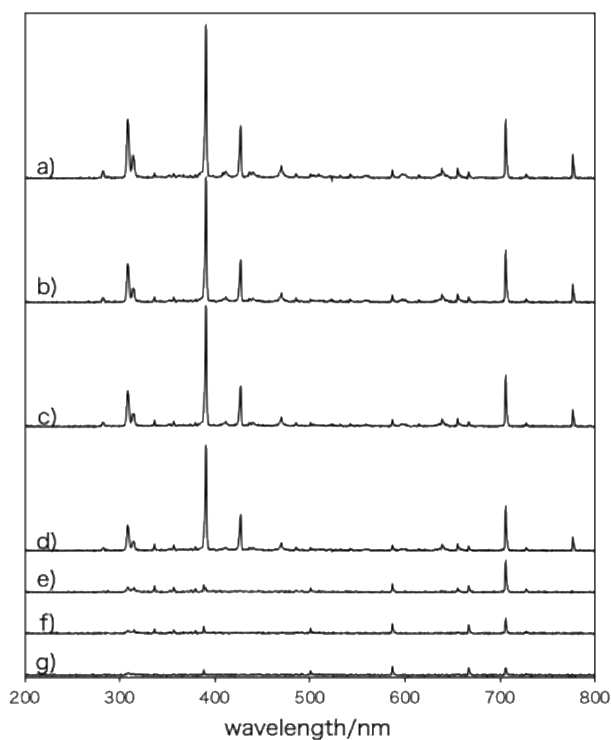


図 2-6 水分量の異なる大気圧プラズマの発光分光スペクトル; a) 3 ppm, b) 210 ppm, c) 1050 ppm, d) 2100 ppm, e) 4200 ppm, f) 10500 ppm, g) 20100 ppm.

色反応の結果の妥当性が示された。

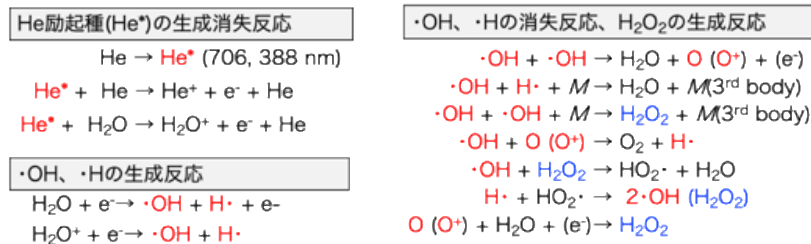


図 2-7 大気圧プラズマによって生成する活性種の生成消失機構

OES スペクトルで観測された酸素原子(O および O+)は、結合すると酸素分子(O₂)を生成する。このときに生成する酸素分子の電子状態は通常の三重項酸素(³O₂)または励起状態の一重項酸素(¹O₂)であると考えられる。一重項酸素は非常に高い酸化反応性を有する。反応速度を元に各活性酸素種の反応性を序列すると、**・OH > ¹O₂ >> H₂O₂**となる。

加えて、一重項酸素に由来する他の活性種の生成も推測でき、これまで、本事業で殺菌に効果のある活性種として検討してきた・OH と過酸化水素に加えられる。この結果から、本事業で開発した装置の今後の展開が期待できる。

以上のように、LED-UV による 24 μM/分の・OH とプラズマによる直接の・OH 生成量 84 μM/分と併せて 108 μM を 1 分間に生成した。目標数値であるヒドロキシルラジカル生成量 100 μM/分以上およびラジカル種の生成量誤差の平均 10 %以下が達成出来た。また、活性種の生成機序を合わせて検討できた。これらの結果について、学会と論文で発表し、本研究内容が化学系の学会で認められた。

【2】制菌システムの開発

【2-1】ラジカルの生成を最適化するための電極開発

i) 補助事業の具体的内容

新規に開発した電極を用いたラジカルの生成量の増大をテーマ【1】において検討を実施した。ラジカル量の増大時の装置に搭載したプラズマ電極の安定性およびガスの加熱状態を繰り返し計測した。また、異常加熱、異常放電についても連続動作下で検討した結果、加熱の異常と異常放電が発生した。この問題を改善した電極で、連続 200 時間以上問題無く動作していることを確認した。

ii) 重点的に実施した事項

ノズル型、スリット型、融合型電極(図 2-8)についてテーマ【1】で評価し、それぞれの電極による活性種の生

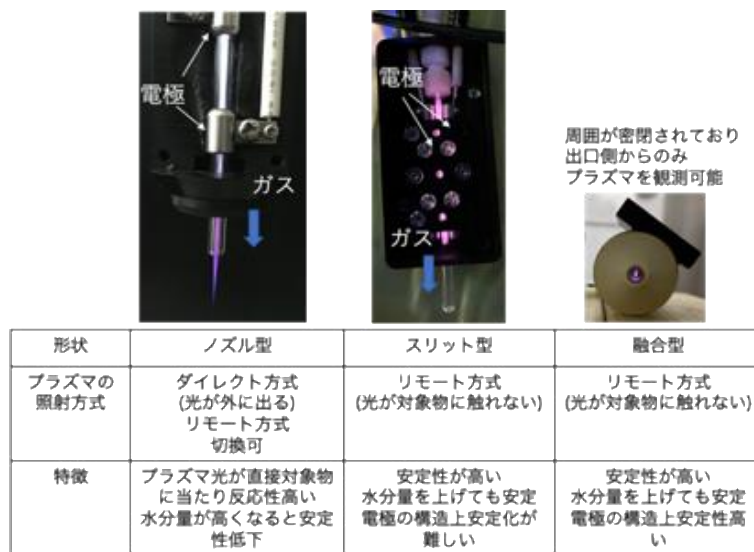


図 2-8 制菌システムの大気圧プラズマ生成部の名称と、プラズマ照射方式および特徴

成安定性を向上させるために電極周囲の密閉度を高めた。すると、電極金属部に接した空気・ガスの熱がこもり、周辺樹脂が溶融して変形し、異常放電、発煙が見られた。装置の安全性を向上するために、特に融合型電極の金属周辺部分を改良し、耐熱性が高い硬化型樹脂でガスが金属部分に触れない様に密封した。その結果、異常放電など問題は起こらないことを確認した。

【2-2】ガスフロー及び UV 制御系開発

i) 補助事業の具体的内容

ラジカルの生成量を安定化し、ガス温度を上昇させないためのガスフロー系を検討した。エアーポンプおよび窒素ガスの混合部が正常に動作し、温度制御出来ていることを確認した。UV の出力を向上させるための素子を組み込み、これまで・OH の生成量が 17 倍となる光量となることを確認した。

効率的な殺菌処理のための、プラズマ放出口を新規に開発した(図 2-9)。

ii) 重点的に実施した事項

サブテー【2-1】で示したように、ラジカル種の安定生成のために、ガスフローを安定化した。また、ラジカルの照射を最適化されるようにプラズマの放出口をシャワー型(図 2-9)に設計した。本シャワー型出口を動作感応型装置およびその小型化した物を自動制御型制菌装置に採用した(図 2-10)。

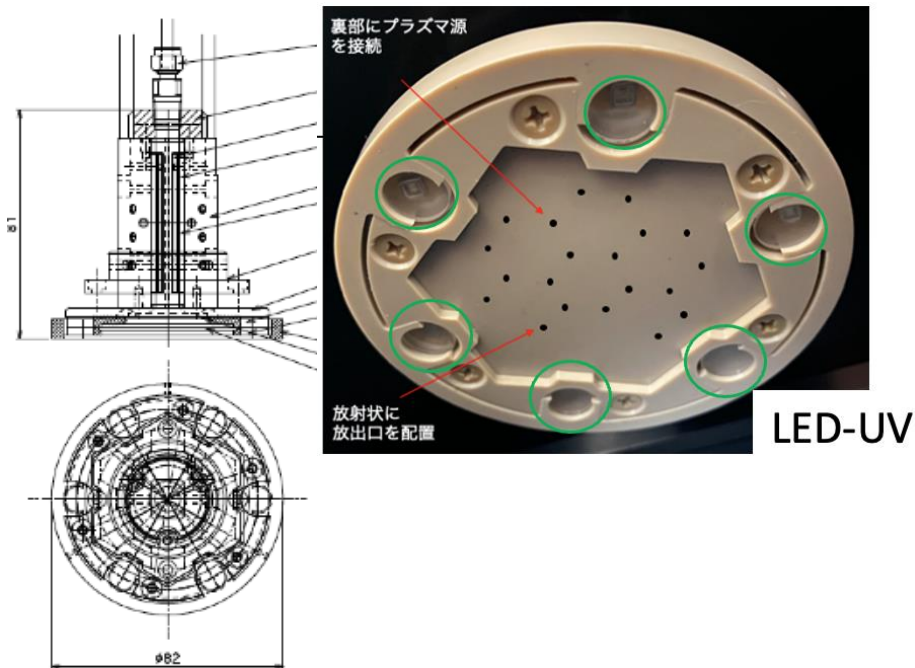


図 2-9 動作感応型装置のプラズマ放出口:左上、(プラズマ電極部側面設計図、左下シャワー型出口設計図、右シャワー形状出口緑丸はLED-UV。微細なシャワー形状出口部を黒点で示した。

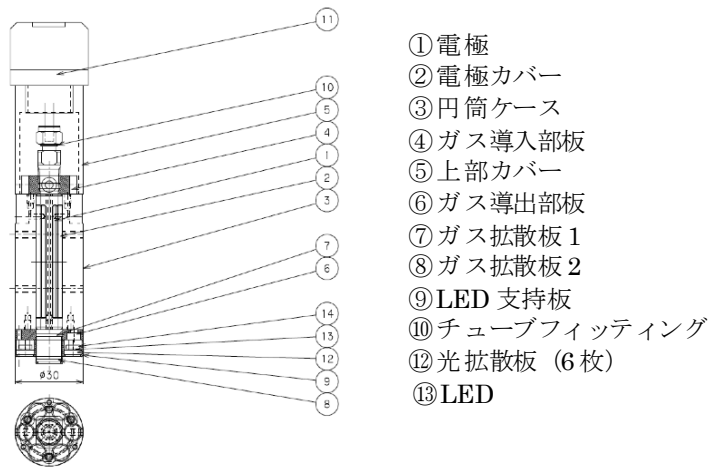


図 2-10 自動制御型制菌システムのプラズマ放出口の設計図(側面(上)および放出口(下))

開発直後にはシャワー型出口とプラズマ源の接続部の密閉性を高めた事で、熱がこもり異常放電、発火が起こった。それを改良した結果、ガスフロー、活性種の吹付の安定性を保ったままで異常放電が起こらない事を確認した。

【2-3】動作プログラムの構築と制菌システムの開発

i) 補助事業の具体的内容

落下菌を対象とする制菌システムとして、動作感応型制菌装置および 30L 空間を殺菌・制菌対象のモデルとする自動制御型制菌装置を開発した。動作感応型装置は実際に研究現場で使用し、得られた使い勝手や装置の安定動作を改善した。

ii) 重点的に実施した事項

動作感応型制菌装置の開発

本テーマでは、動作感応型制菌装置および自動制御型制菌装置を開発した。動作感応型制菌装置は、300 mm x 320 mm x 283 mm の筐体内に、プラズマ+UV 処理空間を有し、処理空間内に物体が入った事を内部のセンサーで感知して自動で殺菌処理が開始される。プラズマガスの照射分はサブテーマ(2-2)で開発したシャワー型を搭載し、シャワー型放出口に LED-UV を配置したことで、大気圧プラズマと UV を同時に処理できる仕様を有する。

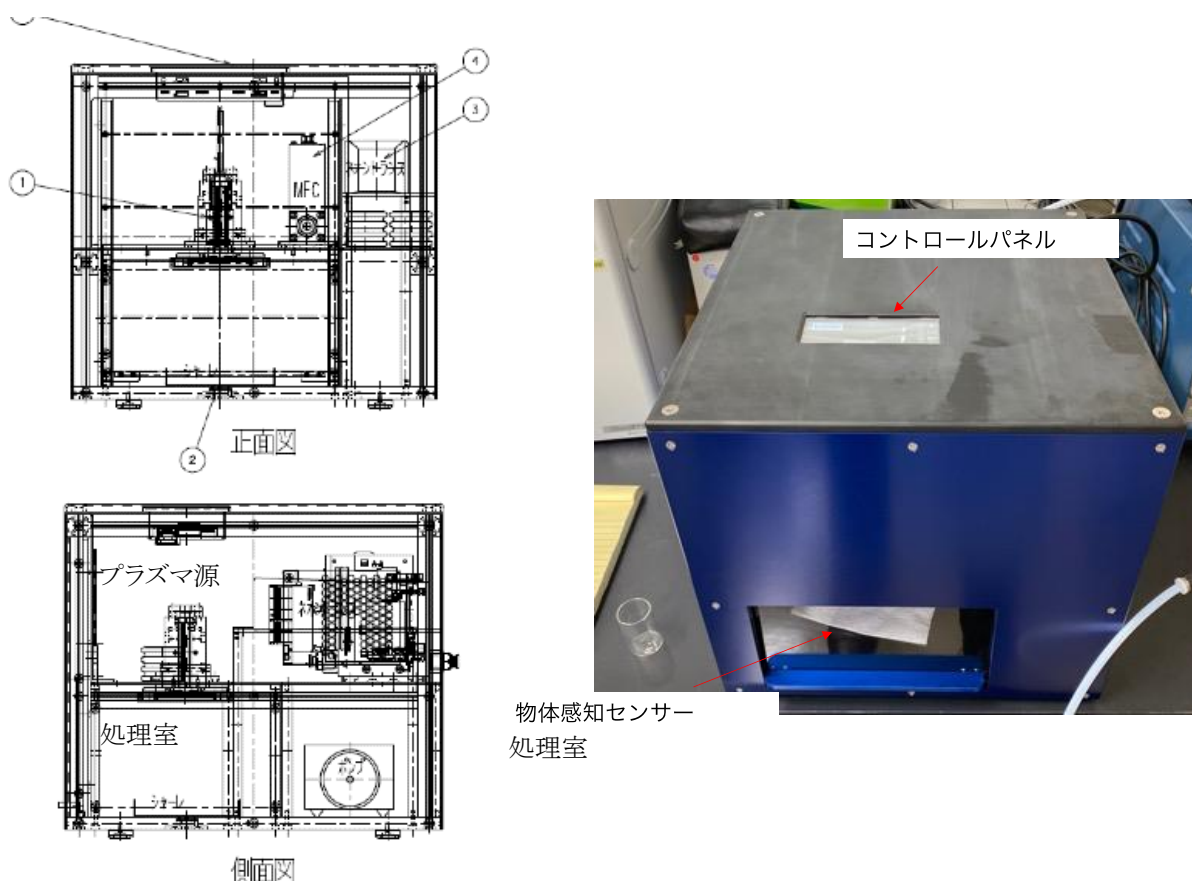


図 2-11 動作感応型装置の設計図(左:正面図、右:側面)と実物写真(下)

図 2-11 を実験室において実際に評価し、装置のサイズ、使い勝手、装置の動作安定性を改善し、図 2-12 に示した装置に改良した。筐体、処理室の位置、処理中の視認性を向上するためのカラーパネルをデザインし、内部の密閉性を向上したことで装置の使い勝手が大幅に向上した。



待機・ガス安定中 プラズマ処理中 プラズマ+UV処理中 UV処理中

図 2-12 改良後の動作感応型装置。動作中の装置

自動制御型制菌装置の開発

動作感応型制菌装置の開発で得た知見を活かし、自動制御型制菌装置を開発した。プラズマおよび LED-UV 照射部の構造は動作感応型制菌装置で開発したシャワー型/UV 同時処理型を小型化(図 2-10)して採用した(図 2-13)。

開発した装置をテーマ【1】で評価をした。プラズマから放出されるガスの温度は室温+1 度未満で、最終数値目標である 30 L 空間内の温度変化は 0 °Cであった。また、ラジカル生成量の変動について、テーマ【1】で評価したとおり、±10 %以下であった。

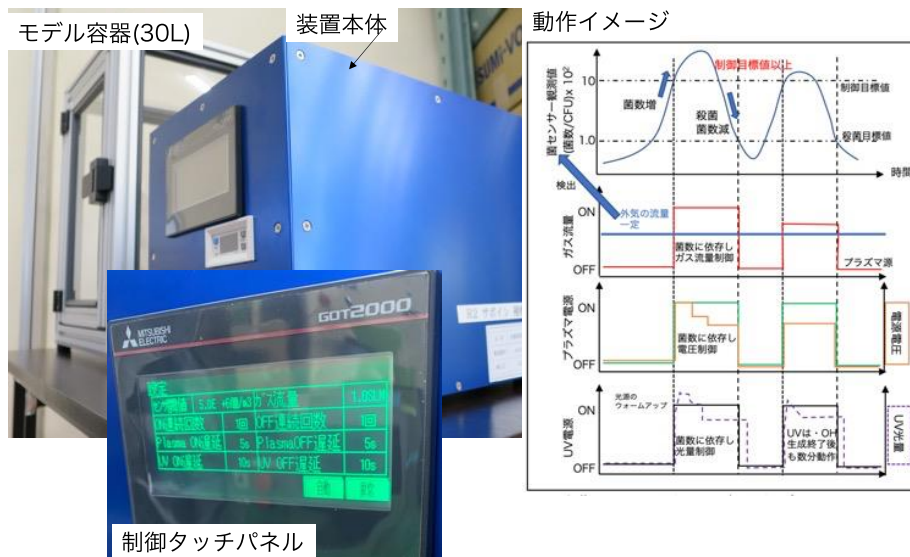


図 2-13 自動制御型制菌装置と動作イメージ

本事業では、再生医療やクリーンルーム内で使用される培養器、パスボックスを想定した 30 L 内の制菌を検討してきた。その過程において、クリーンベンチや大型保存室の中の制菌が可能となる大型化について相談を持ちかけられた。そこで、電極部およびガスのコントロール部の大型化を試みた(図 2-14 左)。開発した大型電極を自動制御型制菌装置(図 2-13) に接続して活性種の生成量、動作時の温度変化等を検討した。大型化した装置ではガス、装置の温度上昇が顕著に見られたため水冷機構を追加した。その結果、温度上昇を抑えても活性種の生成量を低減しない条件(18 kV、水冷有)に最適化できた(図 2-14 右)。

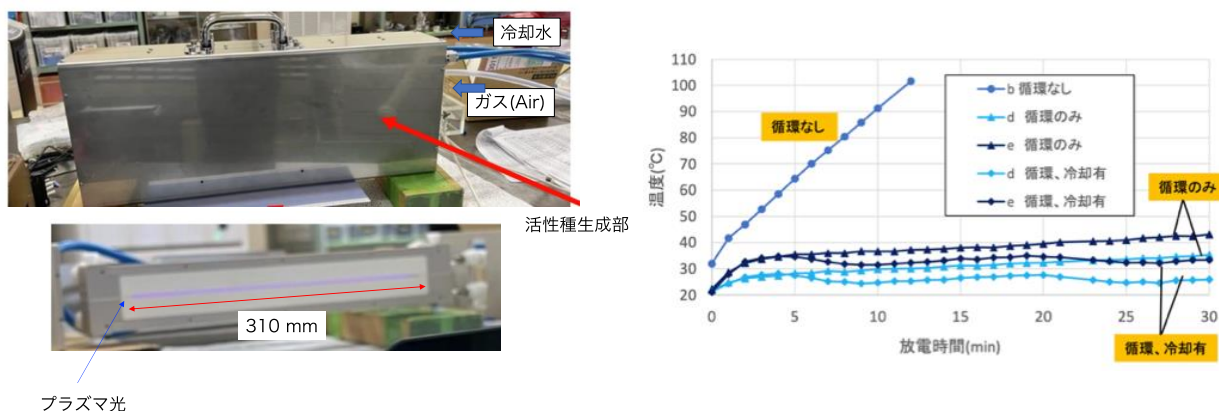


図 2-14 自動制御型制菌装置用大型電極(左)と動作時の温度変化(右)

【3】制菌システムの性能評価と実証

【3-1】プラズマと UV を併用した殺菌効果の評価

i) 補助事業の具体的内容

本事業では、制菌の評価法を開発してから、落下菌を対象とした殺菌効果をプラズマ、UV および併用系において評価を実施した。テーマ【3-2】の評価実施回数を増やすために、E. Coli および S. Cerevisiae を用いた。さらに、殺菌の効果を評価する方法として条件として固相(寒天培地)および(液相)液体培地の表面および内部の殺菌効果について検討した。

ii) 重点的に実施した事項

本事業期間では新型コロナウイルスの影響で、大学施設等における研究活動が自粛および縮小を余儀なくされたため、サブテーマ【3-1】の進め方について、当初の予定を変更した評価方法の検討を行った。

(i) 昨年度メラニン生成菌に対しての評価を行い従来の大気圧プラズマを用いた殺菌手法と比較して殺菌

効果が高い結果を得た。この結果について文献等で検討した内容について、本事業で開発した装置では新たな高活性種($^1\text{O}_2$)の存在の可能性についてサブテーマ【1-2】で述べた。

(ii)メラニン生成菌は培養し、安定して実験に使用できるまでに 10 日間は必要であり、実験数が制限される状況下では使いにくい。1~2 日で培養できる大腸菌を使用して実験数を増やした方が良いのではという提案から、大腸菌(*E.coli*)および出芽酵母(*S.cerevisiae*)を用いてテーマ【3】に関する実験を推進した。

まず、LED-UV と大気圧プラズマの併用を検討した。大腸菌を含む溶液に、プラズマのみの照射を 1 分した。また、LED-UV(308 nm)を使用して、UV を 1 分照射した。さらに、プラズマ照射 1 分後に UV を 1 分照射した後の大腸菌の生存率を比較実験した。図 2-15 に示す様に、プラズマ 1 分照射 UV(308 nm)と UV1 分照射(UV308)照射を比べると、プラズマ照射の方が、殺菌効果が高い(大腸菌生存率の低下)結果が得られた。さらにプラズマ後に UV を照射すると(plasma+UV308)、それぞれを別々で処理した結果の総和よりも殺菌効果が高い結果が得られた。これは、プラズマによるラジカルを含めた活性種の直接暴露による殺菌に加えて、プラズマ照射で生成して培養液中に溶け込んだ過酸化水素を紫外線が分解する事で殺菌効果が増大したと考えられる。しかし、308 nm では殺菌効果(大腸菌生存率)が最大で 60 %にとどまった。

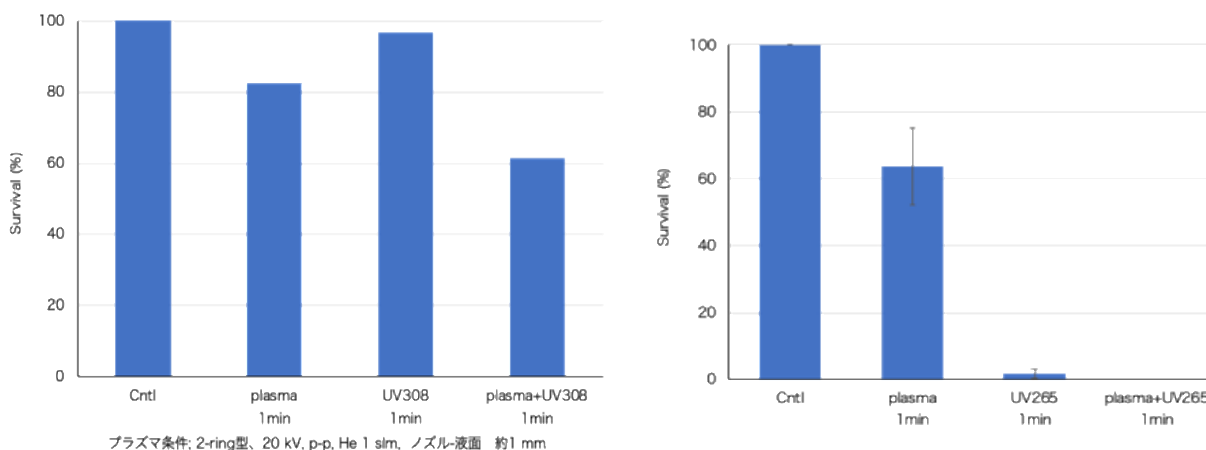


図 2-15 大腸菌への大気圧プラズマ照射および LED-UV 308 (nm) (左)と 265 nm(右) 照射処理生存率の関係

そこで、LED-UV の波長を 265 nm として、同様の評価方法を実施した(図 2-15)。すると、LED-UV(265 nm)のみで 98 %の殺菌効果が得られたことに加えて、プラズマを併用(plasma+UV265)すると測定下限以下 0.1 %の菌の残存率となった。この結果は、サブテーマ(1-1)で評価した紫外線による過酸化水素の分解で生成するヒドロキシルラジカルの濃度の大小関係に相当していると考えられる。同様の測定を 280 nm においても、265 nm に酷似した結果となった。

以上のように、紫外線の併用による殺菌効果が増大する結果が得られ、そのメカニズムは、大気圧プラズ

マによる過酸化水素蓄積とUVによるヒドロキシルラジカルの生成に由来している可能性が示唆された。これらの知見をもとに開発した装置を使用し、紫外線と大気圧プラズマの同時照射に関する検討はサブテーマ【3-2】で実施する。

【3-2】制菌システムの評価と実用条件における実証

i) 補助事業の具体的内容

テーマ 2 で開発した動作感応型制菌装置を使用して、殺菌効果の評価を実施した。また、動作時の装置の動作不良が発生した点について検討し、装置の完成度を高めるために連続的に週 20～30 時間使用し動作を確認した(図 2-16)。

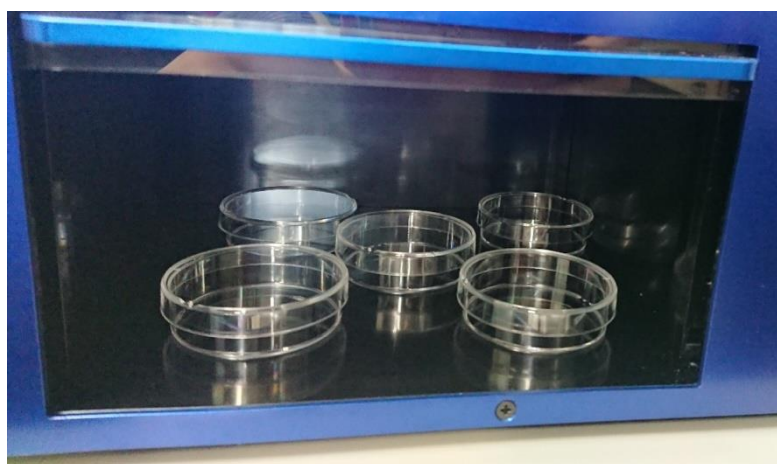


図 2-16 動作感応型制菌装置にセットした微生物(カビ、菌)サンプル

ii) 重点的に実施した事項

テーマ 2 で開発した動作感応型制菌装置を用いて紫外線照射と大気圧プラズマの同時処理による殺菌効率の評価を実施した。装置内部に大腸菌および出芽酵母を播種した寒天培地を配置して殺菌処理を実施した。

固相上の落下菌の殺菌

大腸菌および出芽酵母を播種した寒天培地を落下菌のモデルとして作成し、動作感応型制菌装置を用いて殺菌を評価した(図 2-17)。いずれも、処理時間 10 分で 99.9%以上の殺菌効果が確認された。

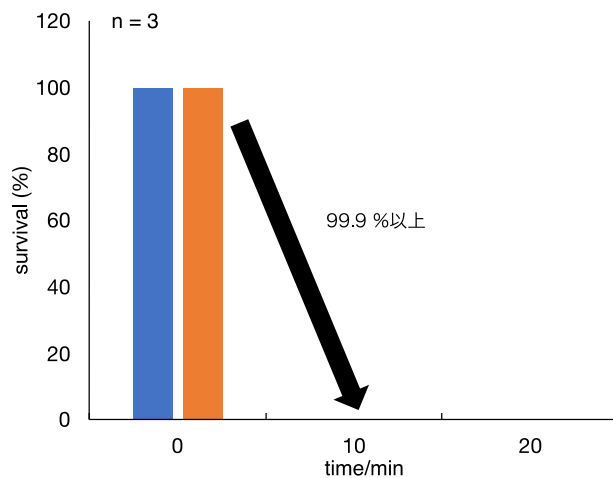


図 2-17 動作感応型制菌装置で殺菌処理を行った固相上の大腸菌(青)および出芽酵母(橙)

液相に分散した落下菌モデルの殺菌処理

次に、溶液中に大腸菌および出芽酵母を播種し動作感応型制菌装置で殺菌を行った。すると、時間に相関して殺菌が進み、20 分で 99.9 %の効果が見られた(図 2-18)。処理対象を発芽酵母に変えて同様の殺菌処理を実施した。すると、20 分まで緩やかに減少し、その後 60 分までに急激な減少がみられた。その結果 60 分で 99.9 %の死滅が確認された。

すなわち、微生物(菌)の種類によって殺菌効果は 3 倍の差が見られる事が明らかとなった。メラニン生成菌は出芽細胞と同様の傾向が予測される。メラニン生成菌の殺菌評価は来年度に掛けて評価を実施する。

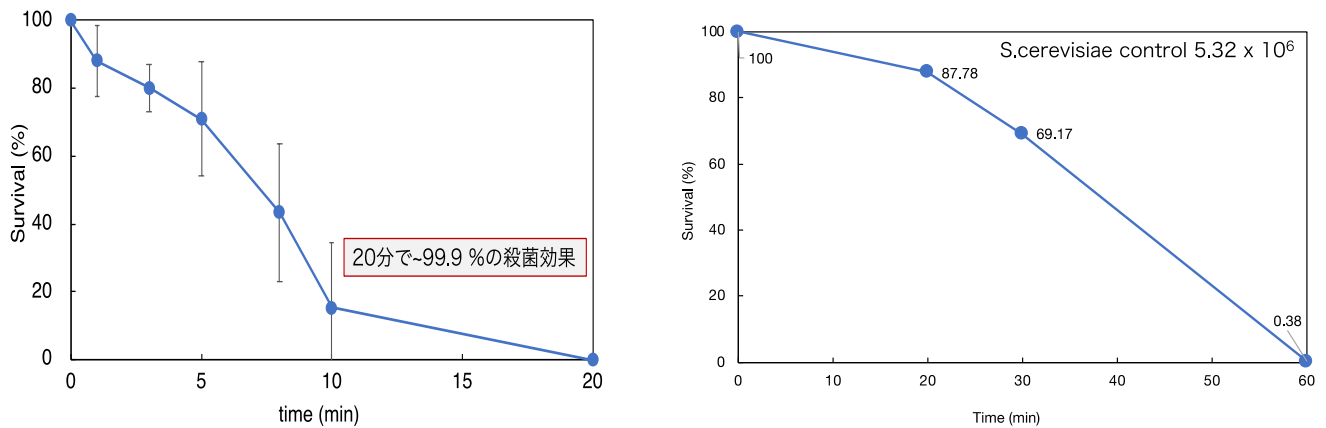


図 2-18 動作感応型制菌装置による液相中の大腸菌(左)および出芽酵母(右)の殺菌

装置のばらつきについての評価

殺菌処理を実施する際には、一度の処理で5枚のシャーレを使用する。これに関してばらつきがあるかを検討した。大腸菌および出芽酵母を用いて評価した(図 2-19)。

大腸菌に対して20分処理を行うと、図 2-18 のように5つのシャーレともに99%以上殺菌されるためばらつきを評価することはできなかった(図 2-19 左図)。一方で、出芽酵母に対して同様の処理を行うと、図 2-18 右図のように、処理庫内右奥の殺菌効果が高く、処理庫内左側の効果が低い結果がえられた。長時間の処理を行う事で処理庫内全体が99%殺菌されるため、現時点で短時間のばらつきの解消については保留した。

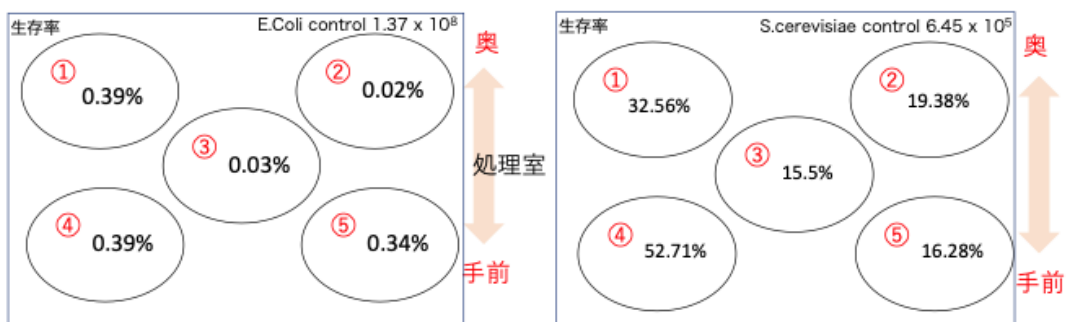


図 2-19 動作感応型制菌装置による液相中の大腸菌(左)および出芽酵母(右)の殺菌:20分における5つのシャーレの殺菌効率

自動制御型制菌装置の評価

自動制御型制菌装置を制菌処理対象のモデルボックス(30 L)に取り付けた。自動制御型制菌装置およびモデルボックスは人の出入りが自由な実験室内に設置した(図 2-20)。モデルボックス内には寒天培地を設置した。自動制御型制菌装置の動作を開始した。装置の自動制御条件は、装置動作開始閾値 浮遊粒子個数(浮遊菌) 1.0×10^2 、プラズマ生成開始後 UV 開始までの時間 1 分、制菌終了後プラズマ停止から UV 停止までの時間 3 分とした。プラズマ停止後に UV 照射を続けるのはプラズマ由来の活性種を UV によって分解し、ボックス内を無害にするための処理方法である。

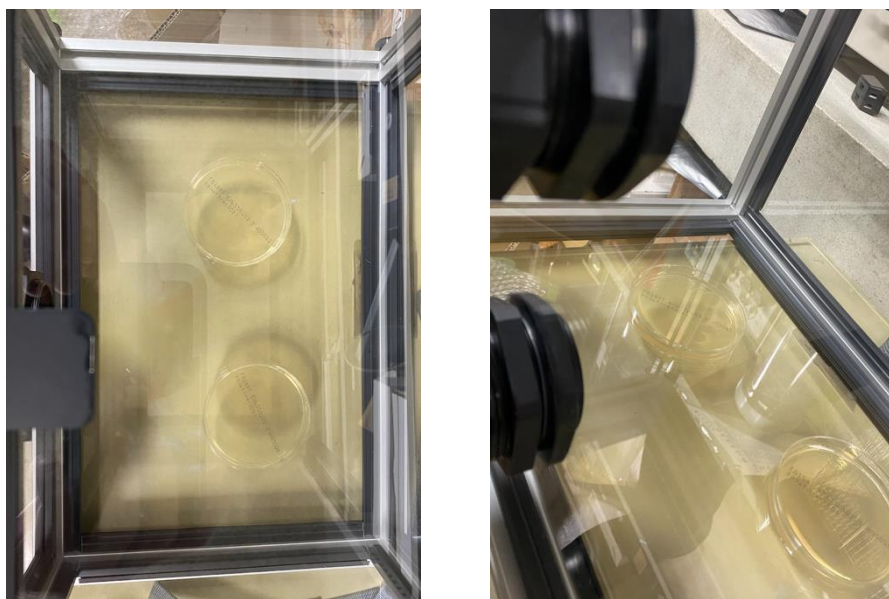


図 2-20 自動制御型制菌装置によるモデルボックス内の評価

このような手法で連続 3 日間動作を行い評価を実施した。3 日間動作後に培養しても、寒天培地上にコロニーは観測されなかった。このように 3 日間は清浄度が維持されたと評価した。

2-2 研究開発成果の外部発表状況

・論文発表

(1) Y. Sakurai, N. Yamamoto, Y. Yabuta, K. Kanaori, K. Taima, Chem. Lett., 2021, 50, 1628-1631

・学会発表

(1) 流通型スピントラッピング ESR 法による大気圧プラズマ由来活性種の反応機構解析 2021 年 3 月日本化学会第 101 春季年会 Web 開催、○櫻井康博・山本直子・藪田勇氣・亀井龍一郎・三宅祐輔・金折 賢

二・田嶋邦彦

(2)流通型 ESR 法による大気圧プラズマのキャラクタリゼーション

第 24 回 ESR フォーラム研究会 ○櫻井康博, 藪田勇氣, 山本直子, 金折賢二, 田嶋邦彦

(3) 日本農芸化学会 2021 年度大会 2022 年 3 月 福田志津, 櫻井康博, 井沢真吾

(4) 流通型 ESR 法によるヘリウム大気圧プラズマ由来ラジカルの生成消失機構解析,

日本化学会 第 102 春季年会 2022 年 3 月 櫻井康博, 山本直子, 藪田勇氣, 金折賢二, 田嶋邦彦

・その他外部発表

(1)化学工業「大気圧プラズマ-新たなステージへ-」第 73 巻第一号 近藤隆

(2)化学工業「大気圧プラズマ-新たなステージへ-」第 73 巻第一号 櫻井康博, 田嶋邦彦

最終章 全体総括

3-1 研究開発成果、アドバイザーによる講評及び複数年の研究開発成果

本事業で開発した制菌装置(動作感応型および自動制御型)の殺菌、制菌機能性の高さについては実験、実証の結果において高いことが示せた。その結果についてアドバイザーから研究開発推進委員会や打合せ等で性能の高さについて高い評価が得られた。一方で、近年コロナ禍に関連して、殺菌などに関連する家電(空気清浄機、空調など)や日用品(噴霧型殺菌溶液)が巷にあふれており、一般的な家電や機器、サービスなどの商品の価格からすると本事業で開発した装置が高価である、との指摘も頂いている。しかし、本事業では再生医療用を念頭とした装置開発を進め、バイオ系研究者や施設を対象としているため、一般的な装置の価格や性能に比べて一段階高い装置を開発した。現在、このような販路を念頭に置いてマーケティングを進めている。

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

2020 年には新型コロナウイルス(COVID-2019)の流行に関連して殺菌・消毒関連市場に注目が集まった。これまでもインフルエンザなどの感染性ウイルスの流行で季節、時期的な市場の拡大も見られたが、今回の世界的な流行と感染症への注目から今後は持続的な市場の拡大が期待できる。その対象として、食品製造や医療、バイオ分野だけでなく、レクリエーション施設などの公衆衛生、クレンリネス・サニテーション分野においても、制菌、殺菌機器、処理法は注目されると見られる。

本事業で、開発する制菌システムが対象としている空間は 30 L と小型であるが、研究成果から、空気から

作り出す過酸化水素および紫外線を用いてさらに広い空間への応用の可能性が見いだされた。そのためのプラズマ源およびガス供給部の大型化まで本事業内で展開できたことは大きな成果であるといえる。制菌の評価について、今回の事業機関内で実施してきた。今後の展開に向けては、公的な認証機関で実施することで商品の付加価値を高められると考えられる。

本事業で開発した制菌装置の販売価格は百数十万円から数百万円を想定している。推進委員会などで2022年現在市販されている類似の装置との機能と価格について、「高額ではないか」との意見をいただいた。しかし、これまでに無い機能を維持するための価格として現在の設定価格が必要である。そのためのマーケティングについて中小企業基盤整備機構様の支援を受けながら現在、プロジェクトチームを社内に立ち上げて販売促進を実施している。