

# 福岡工業大学 学術機関リポジトリ

## Growth Characteristics of Budding Yeast using Atmospheric Pressure Plasma Irradiation : Dependence of Feed Gas

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北崎, 訓, 中山, 聖治 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11478/00001740">http://hdl.handle.net/11478/00001740</a>

# 大気圧プラズマを照射した出芽酵母の増殖特性 —原料ガス依存性—

北崎 訓 (工学部電気工学科)

中山 聖治\*) (大学院工学研究科電気工学専攻)

## Growth Characteristics of Budding Yeast using Atmospheric Pressure Plasma Irradiation : Dependence of Feed Gas

KITAZAKI Satoshi (Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering)

NAKAYAMA Seiji (Electrical Engineering, Graduate School of Engineering)

### Abstract

The atmospheric pressure plasmas were irradiated to budding yeast, a model organism, at different feed gas and irradiation times to elucidate the mechanism of cell proliferation by plasma irradiation. The optimal plasma irradiation conditions for the growth of budding yeast using plasmas were N<sub>2</sub> plasma irradiation. Hydrogen peroxide and nitric acid ions generated by plasma irradiation may play a key role in budding yeast growth.

**Keywords** : atmospheric pressure plasma, budding yeast , growth promotion

### 1. はじめに

大気圧プラズマは、ガス温度は室温程度と低いものの、電子温度が高い状態のプラズマである<sup>[1]</sup>。電子温度が高いことから化学反応性が高く、表面改質や排ガスの処理等への応用が研究されてきた。近年、細胞増殖の促進や植物の成長促進、品質向上等、医療分野や農業分野において大気圧プラズマを用いる研究が盛んに研究が進められている。特に医療分野での応用は世界中で研究されており、微生物の殺菌や、止血、細胞への遺伝子導入、がん細胞の不活化処理など、数多くの成果が確認されており、注目されている<sup>[2-6]</sup>。しかしながら、プラズマ照射における細胞の活性化メカニズムの解明については未だ不明な点が多い。プラズマ中には電子やイオン、中性状態の活性種が同時に存在することから、プラズマ中の何が、対象物のどこに作用し、所望の結果を得ているのか、特に実用化のためには、プラズマの性質と細胞内で生じる様々な代謝系等の生化学分野との関連付けが急務となっている。本研究では、プラズマ照射による細胞増殖促進メカニズムの解明を目的とし、モデル生物である出芽酵母に原料ガスおよび照射時間を変化させた大気圧プラズマ照射を行い、酵母の増殖に最適な照射条件の導出、また、培地の構成成分を分析し、酵母の増殖に最も効果的なプラズマ照射ガスについての検討を行った。

### 2. 実験装置および方法

本研究では、プラズマ源に大気圧プラズマジェット方式を用いた。内径 4 mm、外形 6 mm、長さ 80 mm である石英管内部にステンレスメッシュを挿入し、石英管外部に銅テ

ープを巻いた。ステンレスメッシュに高電圧を印加し、石英管内部に誘電体バリア放電を生成、原料ガスを通過させることでガスがプラズマ化し、さらにガス流でプラズマジェットを生成する構造となっている。印加電圧は約 14.5 kV<sub>pp</sub>、原料ガスは He, Ar, N<sub>2</sub>、ガス流量は 2 l/min、プラズマ源先端から液面までの距離は 15 mm、照射時間は 10 min, 20 min, 30 min とした。酵母は出芽酵母 (BY20118)、培地は YPD 培地 (Yeast Extract: 1%, Hipoly Pepton: 2%, Glucose: 2%) を用いた。

プラズマ照射が酵母の増殖を促進または抑制させる要因として、照射で溶液内に生成した活性種が直接酵母の増殖に影響を与える、または、照射により培地成分が変化し、変化した培地成分が酵母の増殖に影響を与える、の 2 つの可能性が考えられる。本研究では、出芽酵母を含んだ YPD 培地 (酵母懸濁液) にプラズマを照射し培養、また、YPD 培地にプラズマ照射後、出芽酵母を懸濁し培養、の 2 種類の照射実験を行った。いずれの照射においても、12 ウェルの細胞培養プレートに酵母懸濁液または YPD 培地を 3 ml ずつ滴下し、プラズマを照射した。

照射後の酵母の増殖傾向を確認するため、プレートリーダー (Thermo Scientific Multiskan FC) を用いて、吸光度を計測した。96 ウェルマイクロプレートに、YPD 培地と照射後の酵母の比率を 190:10、総量を 200  $\mu$ l に調整し、培養温度 37  $^{\circ}$ C とし、30 分おきに約 14 時間、波長 660 nm における吸光度を計測した。原料ガスを変化させたプラズマ照射が溶媒である純水に与える影響を確認するために、照射した溶液に生じる過酸化水素、亜硝酸イオン、硝酸イオン濃度を試験紙を用いて計測した。また、プラズマ照射が培地を構成するそれ

\*) 現在 : 大崎電気工業株式会社

それぞれの成分 (Yeast Extract, Hipoly Pepton, Glucose)に与える影響を確認するために、培地構成成分の化学結合の変化をフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)を用いて分析した。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 酵母の増殖特性

原料ガスを He, Ar, N<sub>2</sub>, 照射時間を 10 min, 20 min, 30 min と変化させたプラズマを酵母懸濁液に照射し、その後培養した酵母の吸光度の時間変化を図 1 に示す。原料ガス He, N<sub>2</sub> の場合、全ての照射時間において酵母は増殖傾向であつ

た。照射時間 30 min の場合、最も吸光度の差が大きくなり、増殖抑制に働いた Ar とその他を比較した際、840 min で最も変化が生じ、He とは約 1.56 倍、N<sub>2</sub> とは約 1.76 倍、未照射とは約 1.46 倍の差が生じた。また、増殖速度は原料ガス He, N<sub>2</sub> では大きな差が確認できなかったが、Ar の場合、測定開始時から増殖に遅れが生じた。

原料ガスを He, Ar, N<sub>2</sub>, 照射時間を 10 min, 20 min, 30 min と変化させたプラズマを YPD 培地に照射し、その後酵母を懸濁して培養した酵母の吸光度の時間変化を図 2 に示す。酵母懸濁液にプラズマを照射したときと同様、原料ガス

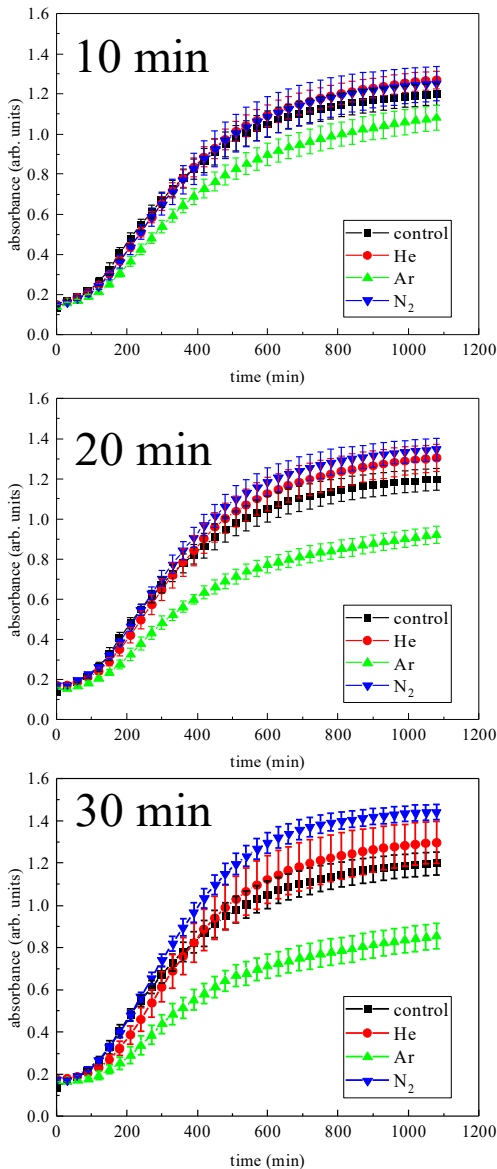


図 1 : 酵母懸濁液にプラズマを照射した場合における吸光度の時間変化 (原料ガスおよび照射時間依存性)  
Fig.1 Absorbance curve of budding yeast suspension after plasma irradiation to YPD medium and budding yeast (dependence of feed gas and irradiation time).

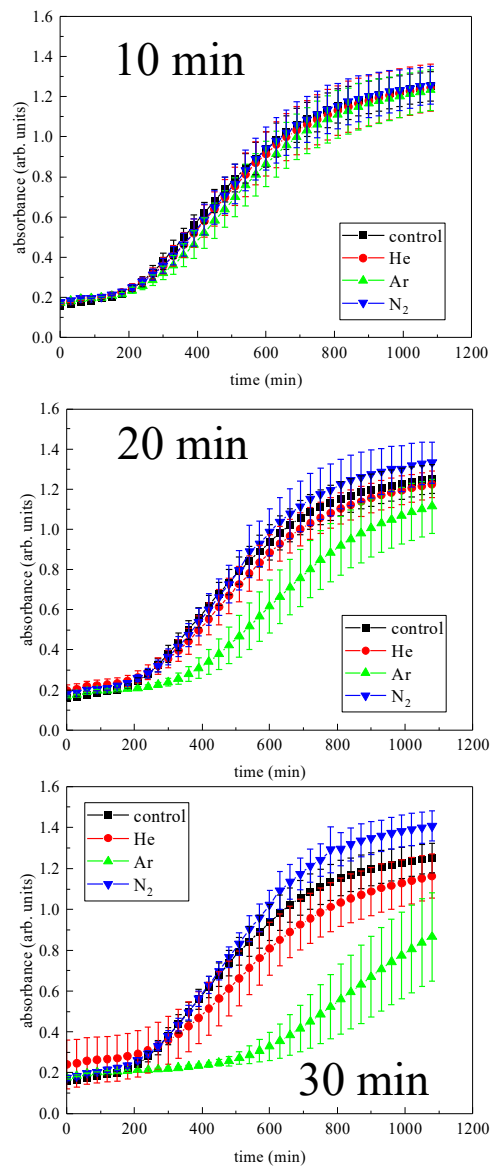


図 2 : YPD 培地にプラズマを照射し、その後酵母を懸濁した場合における吸光度時間変化 (原料ガスおよび照射時間依存性)  
Fig.2 Absorbance curve of budding yeast suspension after plasma irradiation to YPD medium (dependence of feed gas and irradiation time).

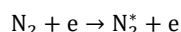
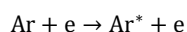
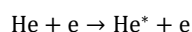
が He, N<sub>2</sub> のとき, 増殖の促進が確認でき, Ar のときは増殖の抑制が確認された. また, 照射時間が 30 min, 原料ガスが He, N<sub>2</sub> の場合, 増殖抑制に働いた Ar と比較すると, 培養開始 420 min で最も吸光度に差が現れ, N<sub>2</sub> とは約 1.8 倍, He とは約 1.6 倍, 未照射とは約 1.8 倍の差が生じた. また, Ar の場合, 測定開始時から増殖が遅れが生じた.

酵母懸濁液にプラズマを照射した場合と, YPD 培地にプラズマを照射し, その後酵母を懸濁し培養した場合とで比較すると, どちらの場合においても原料ガスが N<sub>2</sub> の時, 増殖が促進される傾向となっているが, 酵母懸濁液にプラズマを照射した方が酵母の増殖がより速い結果となった. プラズマ照射で溶液内に生成した活性種が直接酵母の増殖促進に強く影響を与えていると考えられる.

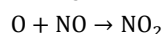
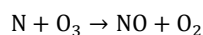
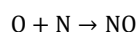
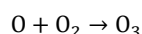
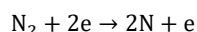
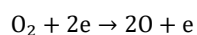
### 3.2 プラズマ照射で溶液内に生成される過酸化水素, 亜硝酸イオン, 硝酸イオン濃度計測

原料ガスを変えたプラズマ照射で生じる純水中の過酸化水素, 亜硝酸イオン, 硝酸イオン濃度の照射時間依存性を図 3 に示す. これらの物質は, 以下の反応を経て生成される<sup>[7]</sup>.

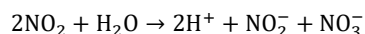
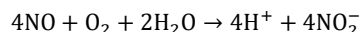
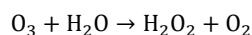
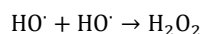
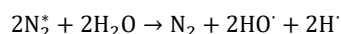
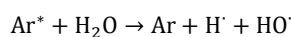
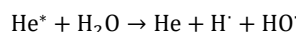
まず, それぞれの原料ガスにおいて, 放電領域内で下記の反応で準安定粒子 (反応式中「\*」で表記) が生成される.



次に, プラズマ照射時に周囲の空気を巻き込むことから, 大気中の酸素, 窒素に起因する反応が生じ, オゾン, 一酸化窒素, 二酸化窒素が生成される.



準安定粒子との反応で生成したオゾン, 一酸化窒素, 二酸化窒素が純水と反応, または, 準安定粒子が純水と反応し, 純水中に生成したラジカル (反応式中「·」で表記) が反応し, 最終的に過酸化水素, 亜硝酸イオン, 硝酸イオンが生成される.



照射時間 30 min における過酸化水素濃度は, 原料ガスが He, N<sub>2</sub> の場合, 5 mg/l であったが, Ar の場合, 100 mg/l と急激に濃度が上昇した. 過酸化水素で酵母を処理すると, 酵母の細胞周期に寄与しているカルシウムイオン濃度が増加すると言われている<sup>[8]</sup>. 原料ガス He, N<sub>2</sub> の場合における過

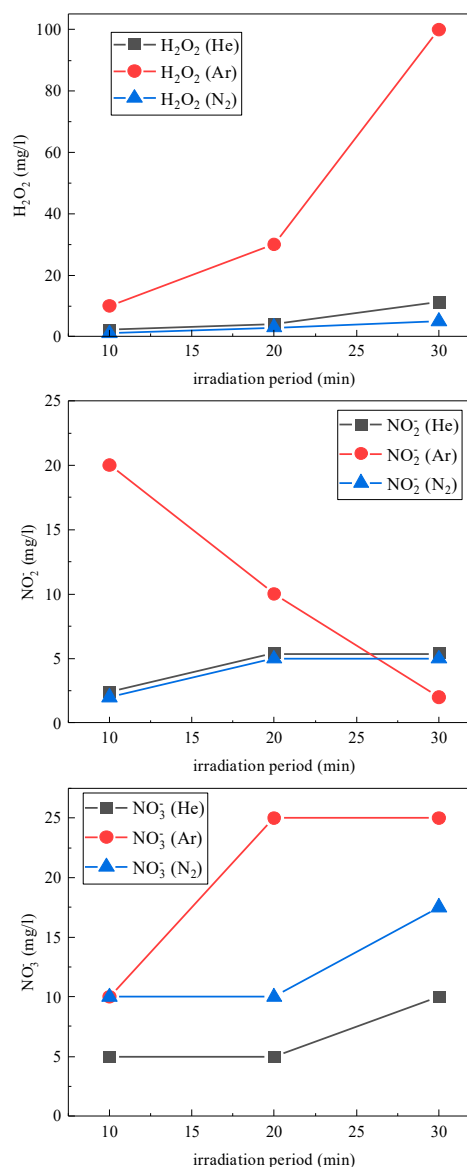


図 3 : プラズマ照射で純水中に生じる過酸化水素 (上), 亜硝酸イオン (中), 硝酸イオン (下) 濃度の原料ガスおよび照射時間依存性

Fig.3 Dependence of hydrogen peroxide (upper), nitrite ion (middle), and nitrate ion (lower) concentrations produced by plasma irradiation by changing feed gas and irradiation time.

酸化水素濃度は, 酵母のカルシウムイオン濃度を適度に増加させ, その結果増殖の促進につながったと考えられる. 一方, Ar の場合は過酸化水素が過剰となり, 酵母の増殖を抑制したと考えられる. 亜硝酸イオン濃度は, 最も増殖傾向に差が出た照射時間 30 min において原料ガスに関係なく, 最大 5 mg/l 程度であることから, 酵母の増殖の促進, 抑制には直接寄与していないと考えられる.

硝酸イオン濃度は, 原料ガスによる濃度の違いが出ていることから, 酵母の増殖に影響を与えている可能性が高い. 詳細な分析は現在行えていないが, プラズマ照射で直接, ま

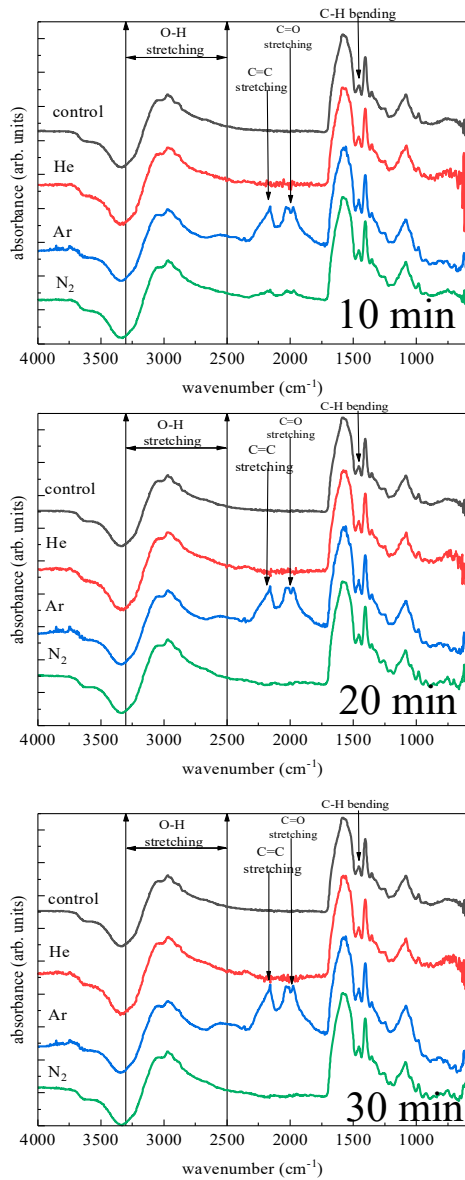


図4：プラズマ照射後のHipoly pepton溶液FTIRスペクトル（原料ガスおよび照射時間依存性）

Fig.4 FTIR spectrum of Hipoly pepton solution after plasma irradiation (dependence of feed gas and irradiation time).

たは、溶液中に存在する硝酸から生成される一酸化窒素NOが酵母の増殖促進に寄与している可能性を考えている。NOは酵母内部の様々なストレス応答に寄与していることから、今後は試薬等を用いて酵母内部の分析を行う<sup>9,10)</sup>。

### 3.3 プラズマ照射培地のFTIR分析

YPD培地を構成する成分の1つであるHipoly pepton溶液に原料ガスをHe, Ar, N<sub>2</sub>, 照射時間を10 min, 20 min, 30 minと変化させ、プラズマを照射した後の溶液のFTIR分析結果を図4に示す。主な吸収ピークとして、1600 cm<sup>-1</sup>付近までにCH<sub>3</sub>変角振動(メチル基)やC-H変角振動(アルカン)、2000

cm<sup>-1</sup>付近にC=O伸縮(カルボニル基)、2160 cm<sup>-1</sup>付近にC≡C伸縮振動(アルキン)、2500 cm<sup>-1</sup>から3300 cm<sup>-1</sup>付近にO-H伸縮振動(カルボン酸)の吸収ピークが確認された。原料ガスArのみ、C=O伸縮(カルボニル基)、C≡C伸縮振動(アルキン)の吸収ピークを確認することができたが、その他の原料ガスに関してはピークを確認することができなかった。原料ガスArの場合、これらの付加反応によって培地の組成が変化し、酵母の増殖が抑制されたと考えられる。一方HeとN<sub>2</sub>(20 min以降)に関しては、アルキンやカルボニル基の反応が現れなかったことから、プラズマ照射によって生成した活性種が酵母の増殖に直接影響を与えたと考えられる。

## 4. まとめ

本研究では、プラズマ照射による細胞増殖促進メカニズムの解明を目的とし、モデル生物である出芽酵母に原料ガスおよび照射時間を変化させた大気圧プラズマ照射を行い、酵母の増殖に最適な照射条件の導出、また、培地の構成成分を分析し、酵母の増殖に最も効果的なプラズマ照射ガスについての検討を行った。得られた結果を以下に示す。

- (1) 原料ガスがHe, N<sub>2</sub>の場合、酵母の増殖は促進され、Arでは増殖は抑制される。また、プラズマを酵母に直接照射した方が培地のみならずプラズマを照射した時より、増殖の促進、抑制の効果は大きくなる。
- (2) プラズマ照射で溶液中に過酸化水素、亜硝酸イオン、硝酸イオンが生成される。原料ガスがHe, N<sub>2</sub>の場合は酵母の増殖に適した濃度の過酸化水素が生成されるが、Arの場合は高濃度となり、増殖が抑制される。
- (3) 原料ガスがArの場合、培地成分が変化し酵母の増殖が抑制される。

## 謝辞

本研究は、科研費リトライ支援制度により行われました。ここに謝意を表します。

## 文 献

1. 日本学術振興会プラズマ材料科学第153委員会編：大気圧プラズマ—基礎と応用—、オーム社、2009年
2. 田中宏昌、堀勝：ファルマシア、51(11)(2015)p.1053.
3. Tough Plasma:【プラズマ効果事例】医療用カテーテルへの適用、(閲覧日2022/06/30)
4. 金子俊郎、佐々木渉太、本田竜介、佐藤岳彦、神崎展：表面と真空、61(3)(2018)p.143.
5. 田中宏昌、堀勝：J. Plasma Fusion Res. 97(3)(2021)p.119.
6. 榊田創、池原譲：J. Plasma Fusion Res. 4(12)(2019)p.173.
7. T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, H. Miyahara, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, T. Azuma, M. Kohno, A. Okino: RSC Adv., 4(75)(2014)p.39901.
8. C. V. Popa, I. Dumitru, L. L. Ruta, A. F. Danet, I. C. Farcasanu: FEBS J, 277(19)(2010)p.4027.
9. 那須野亮、吉川雄樹、高木博史：化学と生物、55(9)(2017)p.617.
10. 西村明、高崎友里恵、高木博史：生化学、93(2)(2021)p.203.