# グリーンイノベーション研究拠点形成プロジェクト

平成27年度~令和元年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研 究	成	果	毂	告	書
-----	---	---	---	---	---

令和2年3月
 学校法人名 名城大学
 大学名 名城大学
 研究組織名 名城大学ナノカーボン研究センター
 研究代表者 平松 美根男

 (名城大学理工学研究科)

### 目 次

はしがき

研究プロジェクトに参加した主な研究者、博士研究員 ・・ 2 研究成果の概要 ・・ 4

研究成果の詳細

- 1. ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー
- 1-1 ナノカーボン材料を太陽電池に応用する技術の開発
- 1-1-1 ナノカーボン・酸化鉄ナノチューブ材料を太陽電池に応用する技術の開発

•• 11

1

• •

1-2 ナノカーボン材料を燃料電池に応用する技術の開発			
1-2-1 燃料電池に応用可能な単層カーボンナノチューブ作製技術の開	発		
	•	•	20
1-2-2 白金ナノ粒子担持ナノグラフェン燃料電池触媒層作製技術の開	発		
	•	•	24
1-2-3 白金ナノ粒子担持カーボンナノウォール電極作製技術の開発	•	•	28
1-2-4 酸化物ナノシートと機能性有機配位子の複合化技術の開発	•	•	32
1-3 ナノカーボン材料をバイオセンサや VOC ガス浄化に応用する技術	の厚	뤼発	
1-3-1-1 ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術の開発(その	) 1)		
	•	•	37
1-3-1-2 ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術の開発(その	) 2)	)	
	•	•	43
1-3-2 ナノカーボン材料を VOC ガス浄化に応用する技術の開発	•	•	47
1−3−3 ナノカーボン材料の安全性評価技術の開発	•	•	52
2 プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー			
2-1 環境センシング及び殺菌海化技術の開発			
2-1-1 プラズマ技術を用いた環境センシング技術の開発			59
2-1-2 ナノカーボン材料を用いた環境センシング技術の開発			63
			67
2-1-4-1 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その1)			71
2-1-4-2 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その?)			77
2-1-4-3 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その3)	•	•	83

2-2 バイオマス燃料用の植物の高効率生長や高効率分解・発酵技術の開発 2-2-1-1 プラズマ技術を用いた植物の高効率生長手法の開発(その1)

• • 89

2-2-1-2 プラズマ技術を用いた植物の高効率生長手法の開発(その2)

•• 93

2-2-2 バイオマス燃料用リグノセルロースの高効率分解技術の開発	•	•	ļ	97
2-2-3 バイオマス燃料用アミロースの高効率分解技術の開発	•	•	1(	02
2-2-4-1 バイオマス燃料用高効率発酵技術の開発(その1)	•	•	1(	06
2-2-4-2 バイオマス燃料用高効率発酵技術の開発(その2)	•	•	1	10
2-2-5-1 大気圧プラズマプロセス評価技術の開発(その1)	•	•	1	15
2-2-5-2 大気圧プラズマプロセス評価技術の開発(その 2)	•	•	12	22

総括

今後の展望

127128

#### はしがき

本研究プロジェクトは、名城大学で推進してきた 21 世紀 COE プログラム「ナノファクトリー」、総合研究所ナノカーボン研究センター、ならびに、東海広域知的クラスター事業等で遂行してきた独創的なナノカーボン材料技術と先進プラズマ技術の成果を、自然エネルギーを効率よく利用したり、環境を保全したりするための環境調和型の革新的なデバイスや技術(グリーンイノベーションテクノロジー)として発展させ、世界的な研究拠点を形成することを目的とする。この目的を実現するために「ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー」と「プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー」との2つの研究テーマを相乗効果が出るように遂行することで、環境調和型の革新的なデバイスや技術を開発し、現在地球規模での課題となっているクリーンで経済的なエネルギーシステムや健康長寿社会の実現に貢献することが本研究プロジェクトの社会的意義である。

平成27年度は、カーボン太陽電池、燃料電池、バイオ・メディカル・環境分析デバイス への応用を目指した各種ナノカーボン材料の試作実験、デバイス作製手法の検討及び プラズマによる酵母などの有益菌や植物の高効率成長促進、大腸菌などの高効率殺菌 手法、プラズマを用いた環境分析・浄化手法の検討を行った。平成28年度は上記ナノカ ーボン材料の基礎特性の評価、プラズマによる微生物等の成長促進効果と殺菌効果の 定量的評価、プラズマを用いた環境分析・浄化手法の基本特性の定量的評価を行った。 平成29年度にはナノカーボン材料の基礎特性の改良及び各種デバイスへの応用、プラ ズマと溶液と細胞との相互作用計測による微生物等の成長促進と殺菌手法、環境分析・ 浄化手法の改良、中間評価を行った。

平成 30 年度以降は、上記デバイスや技術のさらなる改良、総合評価、実用化のための知見及び技術の集約を行った。

研究プロジェクトに参加した主な研究者

研究者名	所属·職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
	田工営工力	プロジェクトの統括とナノ	ナノカーボン材料とプラズ
平松 美根男	生 上 子 <b>听 九</b> 刊 - <del>数</del> /型	カーボンプラットフォーム	マ技術を用いたグリーン
		の開発と応用	テクノロジーの開発
	ᅖᆕᆇᄪᄨ		ナノカーボン材料を用い
坂東 俊治	埋 L 字 研 究	ナノカーホン材料を用い	たグリーンテクノロジーの
	科・教授	太陽電池開発	開発
		ナノカーボン材料を用い	ナノカーボン材料を用い
丸山 隆浩	世上字研究	た燃料電池電極材料の	たグリーンテクノロジーの
	科・教授	開発	開発
		ナノカーボンと光触媒の	ナノカーボン材料を用い
大脇 健史	世上字研究	ハイブリッド材料による	たグリーンテクノロジーの
	科・教授	VOC ガス浄化	開発
	ᅖᅮᆇᅲᅭ	ᄷᆘᄴᇗ ᆥᄡ	ナノカーボン材料を用い
才田 隆広	埋 上 字 研 究	燃料電池用触媒あよびす	たグリーンテクノロジーの
	科▪准教技	ハイスの作衆・評価	開発
	ᅖᆕᆇᄪᄨ	バイオ燃料用植物・菌成	プラズマ技術とナノカーボ
伊藤 昌文	埋 L 字 研 究	長促進、ナノカーボンプラ	ン材料を用いたグリーン
	科・教授	ットホームの開発	テクノロジーの開発
	理工学研究	環境浄化及び環境分析	プラズマ技術を用いたグ
太田 頁之	科·教授	用プラズマと手法の開発	リーンテクノロジーの開発
4m + =	理工学研究	プラズマ装置の性能評価	プラズマ技術を用いたグ
竹田 主吾	科•准教授	支援	リーンテクノロジーの開発
	農学研究科・	バイオ燃料用植物・菌の	プラズマ技術を用いたグ
加滕	教授	成長評価	リーンテクノロジーの開発
	茶台和中も		ナノカーボン材料を用い
灘井 雅行	梁字研究科▪ 教授	カーホンテノ材料の女主	たグリーンテクノロジーの
			開発
小本 中关了	薬学研究科・	微生物を用いた環境浄化	プラズマ技術を用いたグ
小林 田夫丁	准教授	の評価	リーンテクノロジーの開発
村田 宮伊	薬学研究科・	プラズマ処理溶液の安全	プラズマ技術を用いたグ
11日 6116	准教授	性評価	リーンテクノロジーの開発
	農学研究科・	バイオ燃料製造促進の評	プラズマ技術を用いたグ
芯小 儿子	准教授	価	リーンテクノロジーの開発
	<b>田</b> 〒 尚 田 応	デバノス化 MEMS 共復の	ナノカーボン材料を用い
熊谷 慎也	_ 生 上 子 <b>切 九</b> 利 - <del>物</del> 垣		たグリーンテクノロジーの
	171 叙授	1戊百)	開発
	ᅖᅮᄚᄪᆇ	비국 다 / / 수 \ 雪 과 터 씨	ナノカーボン材料を用い
内田 儀一郎	理 L 子 研 究	リテリム1 / ノ電池材料	たグリーンテクノロジーの
	・ 科・教授	への心用検討	開発

飯島 澄男	理工学研究 科・終身教授	プロジェクト全体に関する 助言、指導	ナノカーボン材料とプラズ マ技術を用いたグリーン テクノロジーの開発
(共同研究機 関等) 橋本 剛	<ul><li>(株)名城ナノカ</li><li>ーボン・代表</li><li>取締役</li></ul>	カーボンナノ材料の品質・ 生産性向上支援	ナノカーボン材料を用い たグリーンテクノロジーの 開発
堀勝	名古屋大学 低温プラズマ 科学研究セ ンター・教授	プラズマ装置の性能評価 支援	プラズマ技術とナノカーボ ン材料を用いたグリーン テクノロジーの開発
石川 健治	名古屋大学 低温プラズマ 科学研究セ ンター・特任 教授	プラズマ活性溶液評価・ 表面反応解析支援	プラズマ技術とナノカーボ ン材料を用いたグリーン テクノロジーの開発

# プロジェクトで採用した博士研究員

呉 準席	理工学研究科・博士 研究員(H28.6.1- 30.3.31) 大阪市立大学・准教 授(H30.4~現在)	プラズマ源の開発 とプラズマ及びプロ セス評価法の開発	プラズマ技術を用いた グリーンテクノロジーの 開発
Vladislav Gamaleev	理工学研究科・博士 研究員(H30.6.1- R1.9.30) 名古屋大学低温プラ ズマ研究センター・博 士研究員(R1.10.1~ 現在)	ナノカーボンプロセ スの開発、プラズマ 源の開発と評価	ナノカーボン材料とプラ ズマ技術を用いたグリ ーンテクノロジーの開発

#### 研究成果の概要

平成27年度からの取り組みにおいて、118編の学術論文、7編の学術図書、952件の 国内・国際学会発表、8件の特許申請など多くの成果を挙げてきた。(様式2、13研究発 表の状況 参照) 例えば、①単層カーボンナノチューブを 300℃以下の低温で作製する 技術の実現、②白金担持ナノグラフェンおよび白金担持カーボンナノウォールを用いた 高耐久燃料電池触媒層の実現、③カーボンナノウォール用いた電気化学センサの実現、 ④カーボンナノウォールの構造制御技術の実現、⑤カーボンナノウォールによる微量有 機分子質量分析技術の実現、⑥セルロース分解促進技術の実現、⑦でんぷん分解酵素 アミラーゼ分泌促進技術の実現、⑧アルコール発酵酵母の成長促進技術の実現、⑨大 気圧ラジカル処理された活性水、培養液等の生体安全性等に対する評価技術の確立な どである。これらの成果により、研究者が 6 件受賞、大学院生らが計 33 件受賞し、研究 者が基調講演5件、キーノート講演13件、招待講演124件の合計142件の招待講演を 受けるなど、本グループの研究成果は国際的にも高く評価されている。また、本期間内に 研究代表者は第 11 回(2017 年度)応用物理学会フェロー表彰を受賞している。また、本 研究プロジェクト主催の国際ワークショップを1回、2 国間ワークショップを 10 回、グリーン イノベーションセミナーを6回開催し、グリーンイノベーション関連の学術分野の発展に寄 与する取組を行った。さらに、これらの成果を企業との共同研究に発展させ、新たな産業 形成に寄与すべく実用化に向けた取組も同時に進めている。本研究プログラムでは、1. 「ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー」と2.「プラズマ技術を用いたグリーンテ クノロジー」の2つの研究テーマを相乗効果が出るように、1-1 ナノカーボン・酸化鉄ナノ チューブ材料を太陽電池に応用する技術の開発、1-2 ナノカーボン材料を燃料電池に 応用する技術の開発、1-3 ナノカーボン材料をバイオセンサや VOC ガス浄化に応用す る技術の開発、2-1環境センシング及び殺菌浄化技術の開発、バイオマス燃料用の植物 の高効率生長や高効率分解・発酵技術の開発を遂行してきた。

具体的には、平成 27 年度からの取り組みを通じて、「ナノカーボン材料を用いたグリー ンテクノロジー」では以下のような成果を達成した。

以下に研究成果の詳細を上記研究の詳細を研究課題番号順に記載する。

# 1. ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー

#### 1-1 ナノカーボン材料を太陽電池に応用する技術の開発

#### 1-1-1 ナノカーボン・酸化鉄ナノチューブ材料を太陽電池に応用する技術の開発

グラフェンへの窒素ドープを行い、層あたりの電気伝導性を未ドープに比べ 75%減少 させることに成功した。これらの成果を基にメラミン蒸気圧制御による窒素ドープグラフ ェンのドーピングサイト制御技術、及び、超高圧ジェットミルと遠心分離を用いたナノ材 料の分散・単離技術を確立した。関連する成果は 7 件の論文として発表され、高い評 価を得ている。

グラフェンの透明電極応用における電気伝導性向上を目的として、窒素ドープ以外 にボロン原子のドープを試み、電気伝導性の変化を調べた。窒素ドープでは低濃度ド ープにより確かな電気伝導性の向上を確認したが、ボロンドープでは電気伝導性が向 上する場合と逆に劣化する場合が認められ、確実な制御方法の確立までには及ばな かったが、査読付き国際会議発表論文としてまとめた。酸化物ナノチューブ作製と二次 電池電極応用に向けて、酸化鉄ナノチューブ、酸化チタンナノチューブの純度向上、 及び新たに酸化バナジウムナノチューブの作製方法を確立した。これらのナノチューブ 材料を活物質として,正極に酸化鉄ナノチューブ、負極に酸化チタンナノチューブを用 いたナトリウムイオン電池フルセルの特性を調べ、出力電圧 1.3 V 容量 160mAh/g を 達成した。酸化バナジウムナノチューブは、酸化鉄ナノチューブよりも酸化電位が高い ことを確認しており、正極に用いることで特性が向上する可能性がある。さらに、電極添 加用導電材料として多層カーボンナノチューブの有効性も確認した。新たなナノカーボ ン材料として今まで単離できなかったC60分子内にGd原子を取り込んだGd@C60(CF)。 分子を他大学との共同研究で、単離された状態の磁気特性を調べ、その電子状態を 明らかにし、電極材料応用への可能性を追求した。(最終目標:太陽光変換効率 15% 以上のナノ材料開発には至らなかったが、ナトリウムイオン電池として適応可能な酸化 物ナノチューブ電極(放電容量 100mAh/g 以上)の開発に成功した。(\*1-1-1 に対応) (坂東)

#### 1-2 ナノカーボン材料を燃料電池に応用する技術の開発

#### 1-2-1 燃料電池に応用可能な単層カーボンナノチューブ作製技術の開発

化学気相成長(CVD)法により,燃料電池電極に応用可能な、高密度垂直配向した 単層カーボンナノチューブ作製技術を実現した。また、燃料電池電極に適した高比表 面積を有するグラフェンと単層カーボンナノチューブのハイブリッド構造体の作製に向 け、酸化グラフェン上への触媒ナノ粒子の高密度担持技術を開発し、露出触媒比表面 積 200 m²/gを達成した。これらの成果を基に 300℃程度の低温で単層カーボンナノチ ューブを作製する技術を確立した。以上の成果を元に、CoやIrを触媒粒子に用いて、 グラフェン上への単層カーボンナノチューブの作製を行い、燃料電池電極への応用を 見据えたナノカーボンハイブリッド構造体の作製に成功した。さらに、大きな比表面積 をもつポーラスカーボン上へも単層カーボンナノチューブの作製に成功した。関連する 成果は 25 件の論文、2 件の図書として発表され、1 件の招待講演を受けるなど高い評 価を得ている。(中間目標:グラフェン上への触媒担持特性の改良(露出触媒比表面積 が70 m²/g 以上)を達成したが、最終目標:電極比表面積:1000m²/g 以上は未達成) (\*1-2-1 に対応)(丸山)

#### 1-2-2 白金ナノ粒子担持ナノグラフェン燃料電池触媒層作製技術の開発

液中プラズマで作製したナノグラフェンのアモルファスカーボン成分除去方法や分 散方法等の改善により、白金ナノ粒子担持ナノグラフェンを利用した燃料電池触媒層 において 80 m<sup>2</sup>/g の白金表面積を達成し、液中プラズマを用いたナノグラフェンの製造 ならびに分散技術を確立した。さらに、この白金ナノ粒子担持ナノグラフェンの高電位 負荷サイクルテストを実施したところ、初期の白金の電気化学活性比表面積(ECSA)が 半減するまでのサイクル数は 14 万を達成(カーボンブラックの 7 倍)した。関連する成 果は 4 件の論文、1 件の図書として発表され、45 件の招待講演を受けるなど高い評価 を得ている。(最終目標:電極比表面積 1000m<sup>2</sup>/g 以上は未達成)(\*1-2-2 に対応)(平 松、竹田、堀)

#### 1-2-3 白金ナノ粒子担持カーボンナノウォール電極作製技術の開発

プラズマ CVD 法で作製したカーボンナノウォールに超臨界化学堆積法を用いて白 金ナノ粒子担持を施したカーボンナノウォール電極の高電位負荷サイクルテストを実施 したところ、測定開始から 2 万サイクルでは白金の電気化学活性比表面積(ECSA)の 減少が見られないことを確認、初期白金 ECSA が半減するまでのサイクル数は 14 万を 達成(カーボンブラックの 7 倍)した。これらの成果を基にカーボンナノウォール表面上 への白金ナノ粒子の高分散・高速形成技術を確立した。これらの成果は 3 件の論文と して発表され、15 件の招待講演、3 件の学生表彰を受けるなど、高い評価を得ている。 (中間目標:触媒耐久性を市販品の 1.5 倍以上を達成したが、最終目標:単セル発電 時の最大負荷電流密度:2 A /cm<sup>2</sup>は未達成)(\*1-2-3 に対応)(平松、竹田、堀、内田、 Gamaleev)

#### 1-2-4 酸化物ナノシートと機能性有機配位子の複合化技術の開発

有機配位子で表面修飾を行った酸化黒鉛ナノシートにおいて, アルカリ雰囲気下に て 0.9 V vs. RHE の酸素還元開始電位を得た。これらの成果を基に酸化物ナノシートと 機能性有機配位子の複合化技術を確立した。これらの成果は 2 件の論文として発表さ れ、6 件の招待講演を受けるなど高い評価を得ている。(中間目標:0.8 V vs.RHE 以 上の酸素還元開始電位は達成したが、最終目標:電極比表面積 1000m<sup>2</sup>/g 以上は未 達成)(\*1-2-4 に対応)(才田、丸山)

#### <u>1-3 ナノカーボン材料をバイオセンサや VOC ガス浄化に応用する技術の開発</u> 1-3-1 ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術の開発

カーボンナノウォールの構造制御技術を確立するとともに、電気化学・バイオセンサの電極として有用性を示した。一例として、白金ナノ粒子で修飾したカーボンナノウォール電極を用いた過酸化水素センサを試作し、検出限界800nM、1-1500µMの直線性領域を有することを確認した。これらの成果は13件の論文として発表され、21件の招

待講演を受けるなど高い評価を得ている。また、カーボンナノウォール表面のグルコー スオキシダーゼ修飾を実施し、カーボンナノウォールを用いたグルコースセンサの開発 に着手した。(最終目標:アミノ酸の検出感度 100nM 以下は未達成)(\*1-3-1 に対応) (平松、竹田、熊谷、Gamaleev)

#### 1-3-2 ナノカーボン材料を VOC ガス浄化に応用する技術の開発

ナノカーボン材料と光触媒を組み合わせると、光触媒単独による分解に比べ、トル エンガス分解効率を高めることができた(3 リットル 500ppm 濃度で、1 mW/cm<sup>2</sup>照射下に おいて光触媒単独の減少率は 40ppm/h、組み合わせでは 120ppm/h)。これらの成果 を基に可視光応答型光触媒と大気圧プラズマを組み合わせた VOC ガス分解装置を 開発した。これらの成果は 2 件の論文として発表され、1 件の招待講演を受けるなど高 い評価を得ている。 さらに、光触媒材料を複合化したり、大気圧プラズマを組み合わ せた VOC ガス分解装置によって VOC ガス分解機構を調べた。その結果、分解効率を 高め目標を達成した(上記条件で270ppm/h)。また、分解の相乗効果を明らかにし、特 許出願した。企業とも連携し、実用化に向けて活動中である。(最終目標:VOC ガスの 分解率 99.9%は未達成となったが、270ppm/h の分解効率を達成した。)(\*1-3-2 に対 応)(大脇)

#### 1-3-3 ナノカーボン材料の安全性評価法の開発

ナノカーボン(単層カーボンナノチューブ)は 14 種のシトクロム P450(CYP)分子種 において mRNA 発現量を 50%以上低下させること、その機序の一部に DNA のメチル 化が関与することを明らかにした。また、グルクロン酸転移酵素および硫酸転移酵素の 発現がわずかに低下すること、さらにグルクロン酸転移酵素活性を低下させることを明 らかにした。また、薬物の能動輸送に関わるトランスポーターの発現が変動する可能性 が示唆された。ナノカーボンの種類により薬物の吸着が異なることも明らかにした。これ らの研究成果は、論文(1件)、国際学会(2件)、国内学会(2件)において発表し、ナノ カーボンの生体安全性に関わる基礎的情報として評価を得ている。(\*1-3-3 に対応) (灘井)

#### また、「プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー」では以下のような成果を達成した。

#### 2. プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー

#### 2-1 環境センシング及び殺菌浄化技術の開発

#### <u>2-1-1 プラズマ技術を用いた環境センシング技術の開発</u>

気液プラズマを用いることで、標準液を用いることで最終目標の 0.1 mg/L の Cu の 検出に成功した。これらの成果を基に大気圧気液プラズマを用いた食品内微量元素 分析装置を開発した。さらに気液プラズマ源を用いた微粒子合成による重金属処理技 術を確立した。これらの成果は 2 件の招待講演、1 件の学生表彰を受けるなど高い評 価を得ている。(最終目標:Cu 0.1 mg/L は標準液で達成)(\*2-1-1 に対応)(太田、平 松、伊藤)

#### 2-1-2 ナノカーボン材料を用いた環境センシング技術の開発

ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術開発の成果を基に微量分析技術 として大気圧プラズマにより親水化処理されたカーボンナノウォールによる微量有機分 子質量分析技術を確立した。さらにカーボンプラットフォームを stripping 電極とした重 金属の高速析出技術を確立した。また大気圧プラズマ源によるカーボンナノウォール の表面機能化による細胞培養テンプレート等を開発した。これらに関連する成果は7件 の論文として発表され、32件の招待講演と3件の学生表彰を受けるなど高い評価を得 ている。(採択時の付された留意事項「2 つの研究テーマ間の協調性に留意」した成果) (\*2-1-2 に対応)(太田、平松、竹田)

#### 2-1-3 プラズマ技術を用いた難分解物質浄化技術の開発

水処理に適した液体滴下型大気圧プラズマ処理装置や液体蒸発型大気圧プラズ マ処理装置を開発しインジゴカルミン(難分解物質のモデル色素)を14分で100%分 解することに成功したが酢酸分解率99%は未達となった。(最終目標:酢酸分解率 99%以上は未達)(\*2-1-3 に対応)(太田)

#### 2-1-4 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発

脱イオン蒸留水に有機物を添加し、酸素ラジカル処理をすることで、pH を 5.8~8.6 の状態で大腸菌を滅菌することに成功した。これらの成果を基に環境中に存在する多 剤耐性菌高効率殺菌技術と殺菌特性を有する水耕栽培用有機肥料処理液を開発し、 1 件の特許として申請中である。(最終目標:pH を 5.8~8.6 の状態で滅菌を達成) 関 連する成果は 3 件の論文として発表され、7 件の招待講演、4 件の学生表彰を受ける など高い評価を得ている。また食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌毒素溶液を酸素ラ ジカル処理することで、毒素活性を低下させる可能性を見出し(低下率:RPLSA 法で 2 ~4 管)、関連する成果は 3 件の論文として発表された。(\*2-1-4 に対応)(伊藤、小 森、呉、Gamaleev)

## 2-2 バイオマス燃料用の植物の高効率生長や高効率分解・発酵技術の開発 2-2-1 プラズマ技術を用いた植物の高効率生長手法の開発

大気圧プラズマ源で処理したプラズマ活性水により植物の生長を約99%(約2倍に) 促進することに成功した。また大気圧プラズマ源で処理したプラズマ処理土壌により植 物の生長を50%促進することに成功した。プラズマに電界パルスの効果を加えることで 60%の成長促進に成功した。これらの成果は3件の論文として発表され、6件の招待 講演、高い評価を得ている。(最終目標:生長促進30%以上を達成)(\*2-2-1 に対 応)(太田、伊藤)

#### 2-2-2 バイオマス燃料用リグノセルロースの高効率分解技術の開発

大気圧酸素ラジカル源によるセルロースの前処理で100%のセルロース分解促進に成功した。また従来報告されているオゾン処理法の10倍以上の処理速度を得ることに

成功した。さらに、アルカリ前処理リグノセルロースに対して大気圧酸素ラジカル処理を することにより、副産物として生成するエタノール発酵阻害物質バニリンの毒性の低減 を可能にし、アルカリ処理稲わらを用いた実験で 500%のバイオエタノール生産促進に 成功した。これらの成果は 7 件の論文、1 件の図書として発表され、6 件の招待講演と 2 件の賞と6 件の学生表彰を受けるなど高い評価を得ている。またこれらの成果に基づ いたセルラーゼ分解用プラズマ源を開発し、6 件の特許として申請中である。(最終目 標:分解促進 30%以上を達成)(\*2-2-2 に対応)(加藤、志水、伊藤、呉、Gamaleev)

#### 2-2-3 バイオマス燃料用アミロースの高効率分解技術の開発

大気圧酸素ラジカル源による菌の処理で、でんぷん分解酵素アミラーゼ分泌を 40%促進することに成功した。これらに関する結果は6件の論文と2件の図書で発表 され、招待講演19件、1件の優秀論文賞、3件の学生表彰を受けるなど学術的にも高 い評価を得ている。(最終目標:分解促進30%以上を達成)(\*2-2-3 に対応)(伊藤、 呉、加藤、志水)

#### 2-2-4 バイオマス燃料用の植物の高効率発酵技術の開発

大気圧酸素・酸化窒素ラジカル源によりアルコール発酵酵母の成長を 20%促進す ることに成功した。一方、エタノール発酵阻害物質バニリン存在下では、酸素ラジカル 処理することで未処理に対して 300%の酵母成長にすることに成功した。これらの結果 は 2 件の論文 2 件の図書で発表され、19 件の招待講演を受けるなど学術的にも高い 評価を得ている。(最終目標:成長促進 30%以上達成)(\*2-2-4 に対応)(伊藤、呉、 加藤、志水)

#### 2-2-5 大気圧プラズマプロセス評価技術の開発

大気圧プラズマ中の気相中でのラジカル密度の計測法、液中の長寿命活性種密度の計測法、疑似皮膚試料を使った活性種の透過性測定法、殺傷シグナル伝達酵素の計測法などを組み合わせ、各種培養細胞の殺傷メカニズムを解明することで生体安全性等に対する評価技術を確立し、多くの論文で成果を公表した。これらの結果は37件の論文と2件の図書で発表され、35件の招待講演と13件の学生表彰を受けるなど高い評価を得ている。(大気圧プラズマ、活性水、活性培養液の生体安全性等に対する 評価報を確立)(\*2-2-5に対応)(伊藤、呉、村田、竹田、熊谷、石川、Gamaleev)

上記のように、約5年間で予定していた研究内容に加え、新たなるデバイス、プロセス技術や分析評価技術を実現し、2つの研究テーマ間の協調性に留意した成果も残してきた。

次に、上記項目番号順に詳細な内容を示す。

# 1. ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー 1-1 ナノカーボン材料を太陽電池に応用する技術の開発

# 1-1-1 ナノカーボン・酸化鉄ナノチューブ材料を

# 太陽電池に応用する技術の開発

- ナノチューブ状物質の太陽電池・二次電池用電極応用へ向けた基盤研究 -

#### 坂東俊治

#### 名城大学 理工学研究科

#### 1. はじめに

再生可能エネルギーにかかわる技術開発は、全世界的 に避けて通れない課題であり、研究者が専門分野にと らわれることなく学際領域横断的に情報交換、情報発 信を行っている.本研究では、太陽エネルギー利用お よび電気エネルギー貯蔵という観点に主眼を置き、ナ ノチューブ状物質を活物質とした有機太陽電池やナ トリウムイオン二次電池の電極用ナノ材料としての 性能評価を通じて、応用への可能性を追求した.ナノ 材料としては、希少元素をできるだけ用いないように する元素戦略を基本路線とした.以下に取り組んだ研 究課題を示し、各章でその成果を報告する.

まず, 導電材料となるグラフェンへの異種元素ドー プによる電気伝導性の向上を目指した研究に取り組 んだ[1,2]. その後,酸化鉄ナノチューブを可視光吸 収材料とした光電変換素子を作製し,可視光領域の分 光感度特性の評価を行った[3].電気エネルギー貯蔵 としては,地球上に豊富に存在する元素であるナトリ ウムを用いたナトリウムイオン二次電池に焦点を絞 り,正極材料として酸化鉄ナノチューブ[4],酸化バ ナジウムナノチューブ[5]を用いた半電池(ハーフセ ル)の評価,負極材料として酸化チタンナノチューブ [4]を用いたハーフセルの評価を行った.これらの結 果を報告する.

新たな技術の発展や学問領域の展開には,新奇物質 の発見,合成,抽出が起点となることが多い.例えば 18 世紀にはじまった産業革命においては蒸気機関の 開発が大きな役割を果たしている.また,近年におい ては固体素子による電力制御, つまりトランジスター の開発や関連領域の学問発展,青色発光素子による省 エネルギー化は高純度 GaN 結晶成長技術の確立が礎 となっている. 球形炭素クラスターであるフラーレン 分子は、その特異な構造と電子状態を生かし、活性酸 素(一重項酸素)クエンチャーとして注目されている. また,フラーレンケージに金属元素を内包した金属内 包フラーレンがある. Cs2 ケージの中に金属元素を取 り込んだ金属内包フラーレンの単離は行われている が、C60フラーレンに金属を内包した分子の合成・抽 出は、本研究以前までその成功例はなかった.新奇ナ ノ炭素材料開発と物性評価という点に立脚し、名古屋 大学の研究グループと共同で Gd@C60 (CF3) 3 分子の単離 精製を行い、名城大で磁気特性の評価を行った[6]. この結果も併せて報告する.

#### 2. 多層グラフェンの成長と異種元素ドープ

グラフェンは、Cu 基板上でのメタンの熱分解と炭 素原子の表面拡散を用いる気相堆積法により成長さ せた.異種元素としてBとNを選んだ.それぞれの元 素の供給源として、Bはフェニルボロン酸、Nはメラ ミンを用い、昇華してグラフェン成長炉にメタンガス とともに導入した.得られた試料を XPS により調べ, 異種元素ドーピングサイトの定量化を行った.図1は Bドープグラフェン,図2はNドープグラフェンのXPS スペクトルである.



図1 Bドープグラフェンの XPS スペクトル. グラフェン成長 温度は 950℃であり, 図中の B-120, B-140, B-160 の数 値はフェニルボロン酸の昇華温度を示す. B のドーピ ング量は, C1s と B1s の積分強度比から求めた.



図2 Nドープグラフェンの XPS スペクトル. 図中の記号 N-T1000, N-T950, N-T900 の数値はグラフェン成長温 度を示す.メラミンの昇華温度は 200℃である.

図1のB1s スペクトルより, ~191 と ~187 eV に ピークが存在することがわかる. ~191 eV のピーク は,原子欠陥を伴って炭素と置き換わったBドープを 示す.炭素ネットワーク中で,このような原子欠陥を 伴った B は空気中に出すと即座に酸素と反応し (edge-oxidized B), CB-O ボンドを形成する. ~187 eV のピークは、C と完全に置き換わったものであり (graphitic B), 空気中に出しても酸素と結合しない. このように XPS の結果から、B は2 種類のサイトにド ープされることがわかり、これらのドーピングサイト の制御が今後の課題である.

図2のNドープグラフェンでは、N1s スペクトルの ピーク分離により、4つのドーピングサイトが存在す ることがわかる.1つはCと完全に置き換わった graphiticNであり、残り3つは原子欠陥を伴ったド ーピングサイト(ピロール型,ピリジン型)および、 それらの一部が空気中で酸化した edge-oxidized N (CN-0)に分類される.XPS スペクトルのピーク分離 により算定したドーピングサイト別ドープ量とその 合計を表1および表2に示す.

表 1. ドーピングサイト別 B ドープ量

Sample code	Graphitic (at%)	CB-O (at%)	Total (at%)
B-120	1.1	10.2	11.3
B-140	0.6	4.8	5.4
B-160	1.0	11.0	12.0

表 2. ドーピングサイト別 N ドープ量

Sample code	Graphitic (at%)	CN-O (at%)	Pyrrolic (at%)	Pyridinic (at%)	Total (at%)
N-T1000	0.48	1.65	0	0.01	2.14
N-T950	0.38	1.07	0.02	0.15	1.62
N-T900	0.82	0.77	0.08	0.23	1.90

表1のBドープ量について、合計のドープ量に対す る graphitic B が占める割合を求めると、B-120、 B-140、B-160で、それぞれ ~10%、~11%、~8%と なり、B-160 試料では若干 graphitic B の割合が低 い.このことは、フェニルボロン酸の昇華温度を下げ、 B原子の供給割合を少なくしてBドープを行った方が、 原子欠陥が少ない B ドープグラフェンが成長するこ とを示唆する.

表2よりNドープについても同様に合計のNドープ

量に対する graphitic N が占める割合を求めると, N-T1000, N-T950, N-T900 で, それぞれ ~22 %, ~ 23 %, ~43 % となりグラフェン成長温度が低いほう が graphitic N の割合が高いことがわかる. さらに, メラミンの昇華温度は 200 ℃で固定しており, メタ ンの供給量もすべての試料で同じであるため, 合計の N ドープ量はほとんど試料に依存しないことになる. つまり, グラフェン成長温度を下げ Cu 基板表面での Cu 原子の拡散速度を遅くした方が, graphitic N の ドーピングが促進されることを示唆する.

図 3 は未ドープグラフェン, B ドープグラフェン (B-140), Nドープグラフェン (N-T1000)の表面抵抗 の温度依存性である. BやNをドープした方が未ドー プグラフェンよりも表面抵抗が低下することがわか る. 今後, ドーピングサイトを制御した試料を作製し, 表面抵抗のドーピングサイト依存性を調べる必要が ある.



 図3 表面抵抗の温度依存性. Gr (undope) は、未ドープ グラフェンである (B-140, N-T1000 は、表1,2 を参照). Gr\_ref は文献1より引用した.

# 3.酸化鉄ナノチューブの分光感度特性と光 電変換効率

酸化鉄のバンドギャップは~2.2 eV であり,波長 560 nm 程度の可視光領域の光により HOMO から LUMO への 電子励起が可能である.酸化鉄ナノチューブはゾルゲ ル法により作製した[7].作製した試料には界面活性 剤 F-127 が残存するため空気中での加熱処理により これ完全に燃焼させた.この熱処理には,格子ひずみ 除去のためのアニーリング効果も含まれる.加熱温度 は443,473,523,548,573 K であり,それぞれの試 料コードを NT443,NT473,NT523,NT548,NT573 と した.これらの試料をアセチルアセトン,Triton X-100を用いて水溶液中に分散させ,IT0 ガラス上に スピンコートした電極を作製し(図4参照),分光感 度特性を評価した.



図4 SEM および TEM 像. 左は ITO ガラス上にスピン コートした酸化鉄ナノチューブ (NT473)の SEM 像(右下挿入は TEM 像),右は TEM 像である.

図 5 は、NT573 試料の対極(CE)に対する印加電圧 V と光誘起電流 Iの照射光波長依存性である.この図よ り,波長 510 nm の光を照射したときに光誘起電流が 大きくなることがわかる.同様なデータを前述したす べての試料について測定し,照射波長ごとに単位時間 当たりのエネルギー密度で規格化することにより,光 電変換効率(IPCE)を求めた.それらの結果が,図6の 分光感度特性である.



図5 印加電圧 Vと光誘起電流 Iの照射光波長依存性. 測定は 573 K で熱処理した酸化鉄ナノチューブ NT573 を用いて行った.

図 6 に示す各試料の分光感度特性を比較すると, NT573 試料において波長 510 nm の光照射で最も高い 光電変換効率(IPCE)を示すが,波長 600 nm 以上で



図 6 熱処理温度の異なる酸化鉄ナノチューブ試料に 対する分光感度特性. 573 K で熱処理をした NT573 は波長 510 nm で最も高い光電変換効率 を示すが,波長 600 nm 以上の領域で IPCE が急 激に劣化している.

その効率が急激に劣化することがわかる. その他の試 料では分光感度特性の線形が変化することなく, 熱処 理温度の増加とともに IPCE が徐々に増加している. XRD を用いた分析により,酸化鉄ナノチューブは熱処 理温度 543 Kまではマグネタイト型の結晶構造を維持 するが,熱処理温度を 573 Kまで上げるとへマタイ ト型に変化することがわかった. このことが原因で, 長波長領域の光電変換効率が低下したのであろう. 長 波長領域の太陽光スペクトルを有効に利用するため には不具合な結果であり,NT543 試料が最良の特性を 示したことになる.

次に NT543 試料を用いてタンデム型有機太陽電池 (色素増感型)を作製し,その評価を行った.NT543 試料を光吸収材料とし,有機金属ハライドペロブスカ イト(CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbI<sub>3</sub>)(以下,有機ペロブスカイトと略) を含侵させた層を形成した.ホール輸送層としては P3HT (poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl))を用いた. 有機ペロブスカイトを NT543 層に含侵させるときに, γ-butyrolacton に溶かした有機ペロブスカイト溶 液を NT543 層に滴下したのち,0秒から 300 秒まで待 ってスピンさせ,含侵させる深さの制御を試みた.こ のようにして作製した有機太陽電池の分光感度特性 の含侵時間依存性を図7に示す.

図7より,光電変換効率は有機ペロブスカイト層の 含侵深さに強く依存しており,適切な深さで制御しな



図7 酸化鉄ナノチューブ(NT543)を用いた有機太陽 電池の分光感度特性. 図中に示した時間は,有機 ペロブスカイトの含侵時間である. 含侵時間 10 秒で最もよい光電変換効率を示すことがわかる.

ければならないことがわかる. 含侵した深さの定量化 が今後の課題として残るが,図7には図6に示される 波長540nm 付近の光電変換効率のピークはなく,より 短波長側で光電変換効率が高くなっている. いずれに しても,酸化鉄ナノチューブを用いて IPCE が10%程 度(可視光領域)で発電できることを示す結果が得ら れた.

# 金属酸化物ナノチューブを用いたナトリウムイオン二次電池用電極材料の開発

実験に用いた金属酸化物は,酸化鉄,酸化バナジウム,酸化チタンであり,それらをナノチューブ状にしている.酸化鉄ナノチューブ (Fe-ox-NT)は前章で説明したゾルゲル法で作製した.酸化バナジウムは五酸化バナジウム粉末を塩化テトラメチルアンモニウム,水酸化アンモニウムを加え,希硝酸でpHが2~5になるように調整し,120,140,160℃の3種類の温度で強攪拌しながら還流して作製した.これらの試料コードをNa-V-0120,Na-V-0140,Na-V-0160として表す.酸化チタンナノチューブ(Na-TiO<sub>2</sub>-NT)は、アナターゼ型二酸化チタン粉末を10Mの水酸化ナトリウム溶液中で強攪拌しながら160℃で還流して作製した. 得られたナノチューブ試料を活物質として用い,導

電材料として炭素粉末(もしくは多層カーボンナノチ

ューブ), テフロン粉末を加え圧縮成型して膜状にし たものを白金メッシュに貼り付け, 作用極(WE)とした. ハーフセルを組み上げるときの対極 (CE) は Pt 線を 用い, 電解質液として NaClO<sub>4</sub>を ethylene carbonate (EC)/ diethylene carbonate(DEC) = 1:1 に溶解した ものを用いた.

図8は、WEの活物質としてFe-ox-NTを用いたときのサイクリックボルタングラム(CV曲線)である.



図8 酸化鉄ナノチューブの CV 曲線

図8より, Ag/Ag+ 電位を基準にして -0.3 ~ -0.5 V に Fe(2+)→ Fe(3+) への酸化電位, -1.5 V 付近に Fe(3+)→ Fe(2+) への還元電位があることがわかる.



図 9 酸化バナジウムナノチューブの CV 曲線. 還流温度 120 で作製した Na-V-0 120 試料が最もよい再現性 (サイクル特性)を示した.

図9はWEの活物質として酸化バナジウムナノチュ ーブを用いた時のCV曲線である.Na-V-0120, Na-V-0 140, Na-V-0160ともに,同様な特性を示したが, Na-V-0120試料のサイクル特性が最も高かった. Fe-ox-NTと異なり,図9に示すようにVが4価から5 価へ酸化される過程も検出されており、より高い電位 で充電が可能であることを示している. V<sub>2</sub>0<sub>5</sub>粉末につ いても同様な測定を行ったが、図8の黒線で示される ように明瞭な酸化還元波が検出されず、二次電池の活 物質としての機能を果たさないことがわかる.

図10はWEの活物質として酸化チタンナノチューブ を用いた時の CV 曲線である.酸化鉄ナノチューブ, 酸化バナジウムナノチューブに比べ,低電位側に酸化 波と還元波が検出されており,二次電池の負極材料に



図 10 酸化チタンナノチューブの CV 曲線

適することがわかる.

これら3種類のNaイオン貯蔵・放出材料としての 活物質に対して充放電特性を調べるため、ガルバニッ クサイクルの測定を行った.図 11(a), (b), (c) はそ れぞれ, Fe-ox-NT (酸化鉄ナノチューブ), Na-V-0120 (酸化バナジウムナノチューブ), Na-TiO<sub>2</sub>-NT(酸化 チタンナノチューブ)を作用極(WE), Pt 線を対極(CE) としたハーフセルの充放電特性である. 電気容量は, 酸化バナジウムナノチューブ(Na-V-0 120) が一番大 きく ~165 mAh/g を示し, 酸化鉄ナノチューブ (Fe-ox-NT) が ~49 mAh/g, 酸化チタンナノチューブ (Na-TiO2-NT) が ~21 mAh/g である. 酸化バナジウ ムナノチューブで大きな値を示したのは、図9の CV 曲線で現れたように V の価数が 3 価から 5 価まで変 化したことに対応する.このことを考慮して図 11(b) の放電曲線の傾きに注目すると、横軸の電気容量が ~10 ~ 80 mAh/g の領域と ~80 ~ 150 mAh/g の領 域で、曲線の傾きが異なっていることがわかる.前者 の領域では V(5+)  $\rightarrow$  V(4+),後者では V(4+)  $\rightarrow$  V(3+)の価数変化に対応すると考えてよい.目標とする電気容量として 500 mAh/g 程度が一つの目安になるため、さらなる容量増加が必要である.

容量増加の試みとして、導電材料を炭素粉末から多



図 11 ハーフセルの充放電特性. (a), (b), (c) は活物 質として, それぞれ Fe-ox-NT, Na-V-0 120, Na-TiO<sub>2</sub>-NT を作用極に用いた. 電解質液は NaClO<sub>4</sub> / EC / DEC である. 電気容量は約 40 mAh/g (Fe-ox-NT), 165 mAh/g (Na-V-0 120), 21 mAh/g (Na-TiO<sub>2</sub>-NT) と求められる.

層カーボンナノチューブ (MWCNT) に変え, CV 特性に 差が出るかを調べた. その結果を図 12 に示す. 活物 質と導電材となる炭素材料の混合比は, Na-V-0 120 /



図 12 導電材として多層カーボンナノチューブを用いた場 合と炭素粉末を用いた場合の CV 特性. 多層カーボン ナノチューブを用いると,酸化還元波のピークが明 瞭に検出されるようになり,電流値も増加する.



図 13 Na-V-0 120 / MWCNT ハーフセルの充放電特性のサイ クル依存性. 上図は 100 回までのガルバニックサイク ル特性,下図は電気容量のサイクル数依存性を示す.

C と Na-V-0 120 / MWCNT で同じである. MWCNT を導 電材として用いた方が酸化還元波も明瞭に検出され, 電流値も大きくなり, MWCNT を導電材料として用いる と特性が改善されることがわかる. Na-V-0 120 / MWCNT ハーフセルの充放電特性のサ イクル依存性を負過電流 190 mA/g (~1 C rate) で 調べた.図 13 上図に測定結果,下図に電気容量のサ イクル依存性を示す.サイクル回数が 10 回程度まで は,電気容量の増加がみられる.これは,作用電極内 での Na イオンの移動パス形成における過渡的な現象 であり,その後,緩やかに電気容量は減少していく. しかし,100 回の充放電を繰り返しても 120mAh/g 程 の容量を保っており,多層カーボンナノチューブの有 効性を示すものといえる.

正極に酸化鉄ナノチューブ,負極に酸化チタンナノ チューブを用いてフルセルを作製し,充放電特性を調 べた.図14は50回の充放電を繰り返し,その電気容 量の変化を記録したものである.1サイクルから5サ イクルの間で大きな電気容量の変化があったが,その 後の変化はあまりなく,安定した特性を示した.この ような容量の変化は電極表面での不活性層形成によ るものと考えられる.さらなる分析が必要であるが, ナトリウムイオン二次電池の電極用活物質として酸 化鉄ナノチューブと酸化チタンナノチューブが利用 可能であることを示す実験結果である.最後に図14 から求めた Fe-ox-NT / Na-TiO<sub>2</sub>-NT フルセルの電気 容量維持率を表3にまとめた.1サイクルから5サイ クルの間で,40%程度の電気容量の減少があり,そ



図 14 Fe-ox-NT / Na-TiO<sub>2</sub>-NT フルセルの充放電特性のサイク ル依存性. 図中の黒線で示した特性は 1 サイクル目のも のであり, 100 mAh/g 程度の電気容量を示すが, 2 サイク ル目で 60 mAh/g 程度まで容量低下するが, その後の変化 はこれほど大きくない.

の後 50 サイクル目では,5 サイクル目に比べて電気 容量が 15 % 程度大きくなっている.電極表面に形成 された不活性層の離脱によるものと考えられる.

表3 Fe-ox-NT / Na-TiO2-NT フルセルの電気容量維持率

サイクル数 (Cycle)	電気容量 (mAh/g)	電気容量維持率 (%)
1	77	
5	47	61
50	54	70

#### 5. Gd@C<sub>60</sub>(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>の磁気特性

フラーレン分子合成において,最も多く生成される のは C60 分子であり、単離精製されている. その他に は C<sub>70</sub>, C<sub>76</sub>, C<sub>82</sub> などの高次フラーレンの単離精製が行 われ, 試料として応用に向けた研究が展開されている. フラーレンケージの中に金属元素を取り込んだ金属 内包フラーレンは、C60 に取り込まれた分子の単離精 製には成功しておらず, Cs2 ケージに取り込まれた M@C82 分子の単離精製がほとんどである.なぜ C60 分子 に金属元素が取り込まれた M@C60分子が単離できない のかは、C60分子の発見以来大きな謎であった. その 理由として挙げられていたのは、M@C60 は反応性が高 く,空気中では即座に酸素などと反応してしまい,そ の構造が壊れてしまうからであるというものであっ た. したがって, 何らかの方法で化学反応性を抑えて しまえば M@C60の単離ができるものと考えられ、これ まで多くの試みがなされてきたが、本研究以前までそ の成功を見なかった. 今回, 共同研究を行っている名



図 15 Gd@C<sub>60</sub>(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>分子模型.赤色の原子がフラーレン ケージ内にある Gd 原子であり、3 つの CF<sub>3</sub>がフラ ーレンケージと結合している.

古屋大学のグループが CF<sub>3</sub> をフラーレンケージに付 加することにより Gd@C<sub>60</sub>(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>分子(図 15 参照)を単 離精製することに成功し,名城大でその磁気特性の解 明を行った.

図 16 に 273, 100, 20, 10, 4.2, 2 K で測定した磁 化曲線を示す.縦軸は飽和磁化の値で規格化し,横軸 は磁場を測定温度で割った値 (H/I)である.測定した すべての温度における磁化曲線は, J = 7/2 の Brillouin 関数でフィッティングすることができる. このことは金属内包フラーレンの価数が,  $Gd^{3+0}C_{82}^{3-}(CF_3)_3$ となっていることを表し,フラーレン ケージに移動した3つの電子は3つのCF<sub>3</sub>との結合に 使われていることを示している.したがって  $Gd@C_{82}(CF_3)_3$ 分子の磁気状態としてフラーレンケージ に内包された Gd 原子上にだけ J = 7/2のスピンが 生き残っていることを示している. Gd@C<sub>82</sub>分子では J= 6/2 に近い磁気状態になっており[8], これは Gd



図 16 Gd@C<sub>60</sub>(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>固体の磁化曲線. すべての磁化曲線は J= 7/2 のブリルアン関数でフィッティングできる.

上の *S*=7/2 スピンとフラーレンケージ上に残る *S*= 1/2 スピンが反強磁性的な相互作用をし、スピン量子 数が減少するためであると解釈されている.

本研究における成果は、大きな磁気モーメントを持 つ磁性分子が空気中で安定に存在しうることを示し、 分子磁性を用いる MRI 造影剤への応用が考えられる.

#### 6. まとめ

透明電極材料としてグラフェンに注目し, 異種元素 ドープ技術の開発を行った. BやNをドープすること により表面抵抗が低下することを示し,透明導電膜へ の異種元素ドープの有効性を示した.太陽電池の受光 材料として, 波長 560 nm 程度の可視光を吸収する酸 化鉄ナノチューブを用い、同波長領域の IPCE として 10 % 程度を実現したが, 目標とした 20 % には届か なかった. グリーンテクノロジーに関わるナノ材料開 発としては、二次電池電極材料への適応が可能かどう かを調べることも重要課題である. そこで資源が豊富 な Na イオンを用いた二次電池電極用材料としての性 能評価も行い、Na イオンの吸蔵・放出が可能である ことを示した.このことは各種金属酸化物ナノチュー ブがグリーンテクノロジーに関わる基盤材料として の高いポテンシャルを示唆するものである.また, C60 ケージに Gd イオンを内包した金属内包フラーレン誘 導体を単離し、J=7/2に相当する大きな磁気モーメ ントをもつことを示した.本テーマ自体はグリーンテ クノロジー材料とは直接結びつかないが、 今まで単離 されていない新奇ナノカーボン材料であり, MRI 造影 剤などの新たな研究領域への展開が期待できる.

#### 参考文献

- 1. S. Bandow, T. Yoshida, Appl. Phys. A **123** (12), 728-736 (2017).
- R. Furukawa, Y. Yamamoto, Y. Nabei, S. Bandow, MRS Advances 4 (3-4), 211-216 (2019).
- Y. Kosugi, T. Tomiyasu, S. Bandow, *MRS Advances* 1 (59), 3891-3896 (2016).
- 原田佳奈、「ナトリウムイオン電池電極用ナノ 材料の作製と性能評価」2019 年度・名城大学理 工学部応用化学科卒業論文.
- 5. 野口翔太,「Na 含有バナジウム酸化物の合成と Na イオン二次電池電極材料としての性能」2019 年度・名城大学理工学部応用化学科卒業論文.
- A. Nakagawa, M. Nishino, H. Niwa, K. Ishino, Z. Wang, H. Omachi, K. Furukawa, T. Yamaguchi, T. Kato, S. Bandow, J. Rio, C. Ewels, S. Aoyagi, H. Shinohara, *Nature Communs.* 9, 3073 (2018).
- Y. Kosugi, S. Bandow, J. Inorg. Organomet. Polym. 24 (6), 933–939 (2014).
- H. Funasaka, K. Sugiyama, K. Yamamoto, T. Takahashi, J. Phys. Chem. 99, 1826-1830 (1995).

1-2 ナノカーボン材料を燃料電池に応用する技術の開発

# 1-2-1 燃料電池に応用可能な単層カーボンナノチューブ

# 作製技術の開発

- 燃料電池電極用ナノカーボン材料の開発 -

丸山 隆浩<sup>1)</sup> Aliza Khaniya Sharama<sup>1)</sup> 岡田拓也<sup>1)</sup> 小澤顕成<sup>1)</sup> Kamal Prasad Shrama<sup>1)</sup> 才田 隆広<sup>1)</sup>

1) 名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

燃料電池は燃料を燃やさずに電気を直接取り出せ るため、理論的にも発電効率が高く、有害物の排出も 無く、騒音も少ない。そのため、自動車や定置用コー ジェネレーション、ポータブル電源などに利用されて いる。実用化が進んでいる固体高分子型燃料電池

(Proton Exchange membrane Fuel Cell: PEFC)では、 水素と酸素を燃料とし、燃料極(負極)において水素 の酸化反応が、空気極(正極)では酸素還元反応が進 行し、理論上1.23 Vの起電力が生じる。

PEFC では、水素酸化、酸素還元反応ともに、触媒 金属として過電圧の低い白金もしくは白金合金が使 用されている。一方、電極触媒担体は化学的に安定で 比表面積が大きく、電子伝導性が高く、さらにコスト が安いことが望まれる。そのため、現在流通している PEFC ではカーボンブラックが用いられている。しか し、PEFC をさらに小型化しコスト低減を図るために は高電流密度化が必要であり、そのためには酸素の供 給、生成水の排出、およびプロトン伝導の面でより優 れた電極が不可欠である。その材料として、炭素材料 の中でも高い比表面積をもつカーボンナノチューブ

(Carbon nanotube: CNT) とグラフェンはその有力な 候補である。特に、高密度で配向した単層カーボンナ ノチューブ (Single-walled carbon nanotube: SWCNT) とグラフェンを組み合わせることで、プロトンおよび 電子伝導性やガス拡散パスに優れた理想的な電極が 形成できる。

本研究では、燃料電池の電極材料として有望なグ ラフェンと SWCNT から成るナノカーボンハイブリッ ド構造体の作製に向け、SWCNT の作製技術の開発を行 った。特に、SWCNT の低温成長と細径 SWCNT の作製を 目指した。さらに、実際にグラフェン上への SWCNT 成 長を行い、ナノカーボンハイブリッド構造体の作製を 試みた。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 低温成長と細径 SWCNT の成長

本研究では、SWCNT 作製にガスソース型のコールド ウォール化学気相成長(CVD)装置を用いた(図 1) [1]。本装置は、我々が独自に開発したもので、ノズ ルを介して原料ガスを基板に供給するため、基板付近 のみ原料ガス圧力を高くすることができる。SWCNT 成 長中もターボ分子ポンプで装置内を排気しており、高 真空下のクリーンな状態で SWCNT 成長を行うことが できる。また、原料ガス圧力を高精度で制御すること が可能である。本実験では、低温成長用触媒として Rh と Co を、細径 SWCNT 作製用触媒としては Pt と Ir を用い、これらを SiO<sub>2</sub>/Si 基板上、もしくは、その上 に形成したアルミナ膜上に堆積し、エタノール蒸気を 原料ガスとして用い、SWCNT 成長を行なった。作製し た SWCNT は、ラマン分光、走査電子顕微鏡(SEM)、お よび透過電子顕微鏡(TEM)観察により評価を行った。



図1 高真空ガスソース型 CVD 装置の構造

#### 2.2 ナノカーボンハイブリッド構造体の作製

通常のコールドウォール型 CVD 装置を用いて、 SWCNT とグラフェンのナノカーボンハイブリッド構造 体の作製を行った。高配向性熱分解グラファイト (HOPG)からグラフェンを剥離し、SiO<sub>2</sub>/Si 基板上に 塗布したのち、触媒凝集抑制のための酸処理を行った。 その後、グラフェン上に Ir 触媒を堆積し、エタノー ル蒸気を原料に用いて SWCNT 成長を行なった。作製し た試料はラマン分光、および SEM により評価を行った。

#### 実験結果

#### 3.1 SWCNTの低温成長

図2(a)、(b)にRh触媒を用いて、エタノール圧力1 ×10<sup>-5</sup> Paで成長を行なった試料のラマンスペクトル を示す[1, 2]。(a)が低波数領域、(b)が高波数領域で ある。成長温度320℃で作製した試料のスペクトルに おいて、233 cm<sup>-1</sup>にRBM(Radial Breathing Mode)ピー クが存在し、また、1590 cm<sup>-1</sup>付近に現れるGバンドが G<sup>+</sup>とG<sup>-</sup>の2つに分裂して様子が観測された。これらの 結果から、Rh触媒からSWCNTが生成していることがわ かった。さらに、エタノール圧力は変化させず、成長 温度を270℃に下げて実験を行なったところ、Gバンド ピークの分裂は明瞭ではなかったが、RBMピークが同 じ波数に存在しており、270℃においてもSWCNTが成長 していることが確認できた。高真空ガスソース型CVD 装置を用いることで、エタノールの供給圧力を最適圧 力まで低減できたことが、300℃以下での低温成長の 実現につながったと考えられる。





さらに、ラマンスペクトル中のSWCNTのGバンドと500 cm<sup>-1</sup>に存在するSiのフォノンピークの強度比(G/Si比) をとり、成長温度に対してアレニウスプロットをとっ たものを図2(c)に示す。G/Si比は、SWCNT成長量の目 安となるため、図2(c)のフィッティング直線の傾き からSWCNT成長におけるRh触媒の活性化エネルギーを おおまかに見積もることができる。その結果、Rh触媒 の活性化エネルギーは、0.85 eVと非常に小さい値で あることがわかった。このような低い活性化エネルギ ーが、300℃以下でのSWCNTの低温成長につながったと 考えられる。

Rhは高価であるため、より安価な金属触媒を用いて 低温成長を実現することが望ましい。そこで、SWCNT 成長用触媒として一般に用いられるCoを触媒に用い てSWCNTの低温成長を行った[3]。図3(a)、(b)に、エ タノール蒸気を原料に用い、成長温度270~370℃にお いてCo触媒から成長したCNTのラマンスペクトルを示 す。Rh触媒のときと同様、低波数領域にRBMピークが、 また、高波数領域にGバンドが存在することから、 SWCNTが成長していることがわかる。すなわち、Co触 媒を用いて270℃という低温でSWCNTの成長に成功し た。RBMピークの波数から判断すると、Rh触媒に比べ ると、直径の太いSWCNTが生成していると思われる。 また、370℃と270℃で成長させたときのSWCNTのSEM 像を図3(c)、(d)に示す。成長温度370℃のときには、 数百nmの長さのSWCNTが蜘蛛の巣状に成長している様 子が観察された。一方、270℃ではSWCNTの生成密度は 非常に低く、長さも100 nm以下のものが多かった。ま た,生成密度はRh触媒を用いた場合と大差はなかった。 以上の結果から、RhとCoを触媒に用いることで270℃ の低温でSWCNTが成長できることが示された。なお、 本研究で実現した270℃は、SWCNTの成長温度として報 告されている中では最も低い温度である。



図 3 Co 触媒から生成した SWCNT のラマンスペクトルの(a) 低波数領域と(b) 高波数領域. (c) 370℃、(d) 270℃で作製した SWCNT の SEM 像.

#### 3.2 細径SWCNTの成長

燃料電池の電極触媒担体に炭素材料を用いる際、比 表面積が大きいことは重要な要素の一つである。開端 処理を行ったSWCNTは1000 m<sup>2</sup>/g以上の非常に大きな比 表面積をもつが、細径化することで、より比表面積を 高めることができる。一般に市販されているSWCNTに は直径が2~3 nm程度のものが多数含まれる。そこで 本実験では、直径1 nm程度以下の細径SWCNTの作製を 試みた。

まず、Ptを触媒に用いて、ガスソース型CVD法により、 SWCNT成長を行った[4]。成長温度を700℃とし、エタ ノール蒸気の圧力を最適化することで、直径1 nm程度 以下の細径のSWCNTの作製に成功した。図4にラマン分 光測定から見積もったPt触媒から生成したSWCNTの直 径分布を赤色で示す。直径の算出には、d [nm]=248/  $\omega_{\text{RBM}}$  [cm<sup>-1</sup>](d: SWCNT直径、 $\omega_{\text{RBM}}$ : RBMピークの波数) を用いた[5]。ラマン分光測定では、共鳴条件を満足 したSWCNTしか観測にかからないため、波長532、633、 785 nmの3つの励起光のレーザを用いて測定を行った。 また、比較のため、Co触媒を用いて同じ手法で作製し たSWCNTの直径分布を黒色で示す。励起波長により、 観測されるSWCNTの直径分布は異なるものの、Co触媒 の場合、直径が主に1~2 nm程度のSWCNTが分布してい る様子がわかる。これに対し、Pt触媒を用いて作製し たSWCNTの直径は主に0.6~1.1 nmの範囲に分布し、細 径のSWCNTが成長している。すなわち、細径SWCNTの作 製にPt触媒が有効であることが示された。



図4 ラマン分光測定により見積もったPtおよびCo 触媒から成長した SWCNT の直径分布. 使用したレー ザの励起波長は、それぞれ(a) 532、 (b) 633 およ び(c) 785 nm.

さらに、細径SWCNTの成長量を増やすため、Irを触媒 に用いたSWCNT成長を行った。Irは周期表上ではPtの 隣に位置するが、融点が2000℃以上と非常に高いため、 SWCNT成長中の触媒粒子の凝集が比較的少ないことが 期待できる。すなわち、小さい粒径の触媒粒子から細 径のSWCNTが成長することが期待できる。Pt触媒と同 様、高真空ガスソース型CVD装置を用いて実験を行っ たところ、エタノール圧力を最適化することで成長時 間60分、成長温度800℃において、図5のSEM像に示さ れるようにSWCNTが高密度で垂直配向して成長してい る様子が観察された。また、ラマン分光測定とTEM観 察から、Ir触媒から生成したSWCNTは主に直径1.2 nm 程度以下の細径のSWCNTであることがわかった[6]。



図5 Ir を触媒に用いて作製した垂直配向 SWCNT の SEM 像.

#### 3.3 グラフェン上へのSWCNTの直接成長

実際にグラフェン上へのSWCNT成長を試みた。HOPG から剥離したグラフェン上にIr触媒粒子を堆積し、コ ールドウォール型CVD装置を用いてSWCNT成長を試み た。作製条件は、成長温度800℃、エタノール圧力40 Pa、 成長時間は60分とした。図6(a)に試料表面のSEM像を 示す。グラフェンが数層重なったグラファイトフレー ク上に繊維状の物質が生成している様子が観察され た。この物質に対してラマン分光測定を行った。図 6(b)および(c)にこの試料のラマンスペクトルを示す。 それぞれ、532、671および785 nmの3波長のレーザで 励起し測定を行っている。グラフェンに由来する2600 ~2700 cm<sup>-1</sup>付近の2Dバンドに加え、低波数領域にRBM ピークが観測されたことから、グラファイトフレーク 上にSWCNTが成長していることがわかった。また、ラ マン分光測定からは、生成しているSWCNTの直径は主 に1.1 nm以下であり細径のSWCNTの成長が示唆された。



図 6 Ir を触媒に用いて作製したグラフェン (グ ラファイトフレーク)上に成長した SWCNT の(a) SEM 像と(a) 低波数領域と(b) 高波数領域のラマンス ペクトル.

#### 5. 結論

本研究では、燃料電池に応用可能な SWCNT 作製技術 の開発を行った。燃料電池の電極材として望まれる比 表面積の大きな炭素材料の開発のため、SWCNT とグラ フェンのハイブリッド構造体の作製に向けた SWCNT 成長技術の開発を行った。その結果、Rh および Co 触 媒を用いて 300℃以下での低温成長、Pt および Ir 触 媒を用いて細径 SWCNT の成長を実現した。さらに、Ir 触媒を用いることで、HOPG から剥離したグラフェン 上への SWCNT 成長に成功した。

#### 参考文献

- T. Maruyama, A. Kozawa, T. Saida, S. Naritsuka, and S. Iijima : Carbon 116 (2017) 128.
- [2] H. Kiribayashi, T. Fujii, A. Kozawa, S. Ogawa, T. Saida, S. Naritsuka, and T. Maruyama : J. Cryst. Growth 468 (2017) 114.
- [3] T. Okada, T. Saida, S. Naritsuka, and T. Maruyama : Mater. Today Commun. 19 (2019) 51.
- [4] T. Maruyama, H. Kondo, R. Ghosh, A. Kozawa, S. Naristsuka, Y. Iizumi, T. Okazaki, and S. Iijima : Carbon 96 (2016) 6.
- [5] A. Jorio, R. Saito, J. H. Hafner, C.M. Lieber, M. Hunter, T. McClure, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus : Phys. Rev. B 86 (2001) 1118.
- [6] T. Okada, T. Saida, S. Naritsuka, and T. Maruyama : MRS Advances 4 (2019) 225.

# 1-2-2 白金ナノ粒子担持ナノグラフェン燃料電池触媒層作製

平松 美根男<sup>1)</sup> 梶川 兼吾<sup>1)</sup> 竹田 圭吾<sup>1)</sup> Vladislav Gamaleev<sup>1,2)</sup>

1)名城大学 理工学研究科
 2)名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター

#### 1. 緒 言

液中プラズマは、水溶液やアルコール等の液体中に 高密度のエネルギーを与えてプラズマを発生させる 技術で、減圧プラズマと比較すると、装置構成が簡単 であるばかりでなく、高速反応が実現可能で、溶液反 応を活用した新規ナノ材料の合成や新しい処理・加工 技術の開発など種々の応用が進められている。このう ち、アルコールを原料とした液中プラズマでは、ナノ グラフェンの大量合成が可能であり、カーボンブラッ クに替わる燃料電池触媒層の安価な供給方法として 期待されている[1-4]。

従来の固体高分子形燃料電池では、触媒層として自 金粒子を担持したカーボンブラックが用いられてき た。容易に発電特性が得られる一方で、白金が凝集し やすく、耐久性に問題があった。電位サイクル試験で は、2万サイクル程度で白金触媒の電気化学的活性表 面積(electrochemically active surface area, ECSA) は初期値から半減するほどで、耐久性の改善、あるい は、カーボンブラックに替わる白金ナノ粒子の担体の 開発が強く望まれている。

本研究では、アルコールを原料とした液中プラズマ で合成したナノグラフェンに白金担持を施し、燃料電 池触媒層としての特性を評価した。液中プラズマで合 成したナノグラフェンのアモルファスカーボン成分 除去方法や分散方法等の改善により、耐久性が大幅に 改善されることを明らかにした[5]。 液中プラズマ装置の模式図を図1に示す。エタノー ルの入ったビーカの上部空気をアルゴンで置換し、ア ルゴン雰囲気中の上部電極とエタノール中の下部電 極間に交流高電圧を印加することでプラズマを生成 した。ナノグラフェンの合成は30分間行い、黒色にな ったエタノール溶液は吸引濾過を行った後、黒色物質 のみを回収した。図2は、液中プラズマ印加前後のエ タノールと、吸引濾過法を用いて黒色溶液を濾過し、 濾紙(孔径1 µm)上に回収した黒色物質の画像を示す。



図1 液中プラズマ装置の模式図[5]。



図 2 液中プラズマ印加前後のエタノールと、濾紙 (孔径 1 µm)上に回収した黒色物質の写真[5]。

#### 2. 実験方法

液中プラズマ法で合成したナノグラフェンは、後述 するようにアモルファスカーボン成分を含んでいる ため、80 ℃の 30% 過酸化水素水で処理することによ りアモルファスカーボン成分の除去を行った[6]。こ のナノグラフェンを水/エチレングリコール溶液に投 入し、超音波ホモジナイザーを用いて超音波照射を施 してナノグラフェン分散液とし、塩化白金酸(H<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>Pt) を原料として液相還元法によりナノグラフェン表面 に白金ナノ粒子の付着を行った。そして、白金担持ナ ノグラフェンと純水/2-プロパノール/アイオノマー を混合して触媒インクとした。

電気化学評価では、作用電極として回転電極を備え た3電極法を用い、触媒インクを回転電極に塗布して、 0.1Mの過塩素酸(HClO<sub>4</sub>)に浸して電気化学測定を行 った。走査速度 50 mV/s でサイクリックボンルタンメ トリ(CV)を測定し、白金触媒の電気化学的活性表面 積(electrochemically active surface area, ECSA) を求めた。白金触媒の耐久性の評価は、燃料電池実用 化推進協議会(FCCJ)の標準プロトコル「電位サイクル 試験」[7]に準拠し、走査:1.0-1.5 V, 2s/cycle の条 件で ECSA の特性変化を調べた。また、作製した触媒 インクを 2 枚のカーボンファイバペーパに塗布し、プ ロトン導電膜を挟んで 130 °C、7 MPa で熱圧着して膜 -電極接合体(MEA: Membrane Electrode Assembly) とし、燃料電池出力特性の評価を行った。

#### 3. 実験結果

図3は、過酸化水素処理前後のナノグラフェンのラ マンスペクトルを示している。1340 cm<sup>-1</sup>のDピーク、 1580 cm<sup>-1</sup>付近のGピーク、1610 cm<sup>-1</sup>のD'ショルダ ーピーク、2700 cm<sup>-1</sup>付近の2Dピークが観測され、典 型的なナノグラフェンのラマンスペクトルとなって いる。また、過酸化水素処理前のナノグラフェンのラ マンスペクトルに現れている1000-1700 cm<sup>-1</sup>の幅広い ピーク(縦線ハッチング部)はアモルファスカーボン 成分によるもので、処理後のラマンスペクトルには同 ビバックグラウンドのピークがほぼ無くなっている ことが分かる。さらにGバンドピークに着目すると、 過酸化水素処理前のラマンスペクトルのGピークの 半値幅約46 cm<sup>-1</sup>に対して、約30 cm<sup>-1</sup>まで狭くなって いることがわかる。液中プラズマで合成したナノグラ フェンはアモルファス成分を含んでいるが、過酸化水 素水処理によって、効果的にアモルファス成分が除去 され、結晶性も改善されていることが確認された。



図 3 過酸化水素処理前後のナノグラフェンのラ マンスペクトル[5]。



図 4 白金担持処理前(左)および担持処理後(右) のナノグラフェンの TEM 像[5]。

液中プラズマで合成したナノグラフェンは凝集し やすいため、白金担持処理前に十分分散させておく必 要があるが、過酸化水素水処理を施してアモルファス 成分を除去することによりナノグラフェンの親水性 が改善され、水溶媒への分散性が向上する。さらに純 水/エチレングリコール混合溶媒であれば、96 日以上 の長期間分散状態を保持できることを確認した。図4 に、白金担持前後のナノグラフェンの透過型電子顕微 鏡(TEM)像を示す。液中プラズマで合成されたナノグ ラフェンのサイズは 10-100 nm であり、塩化白金酸の 液相還元でナノグラフェン表面に形成される白金ナ ノ粒子のサイズは 2-5 nm であった。X 線回折スペク トルからも白金の回折ピークが得られ(データ非表 示)、そこから Scherrer の式を使って求めた白金粒 子のサイズも 3 nm 程度となり、TEM 観察と一致して いることが確認できた。

図5は、白金担持ナノグラフェンのサイクリックボ ンルタンメトリ(CV)曲線を示している。0.05-0.4V 付近に水素脱着ピークと 0.8 V 付近に酸化還元ピー クが観測できる典型的な CV 曲線を得た。この赤い領 域の面積を求め、白金担持ナノグラフェンの熱重量分 析により求めた白金の重量を使って得られた白金表 面積は 80 m<sup>2</sup>/g であった。



図 5 白金担持ナノグラフェンの CV プロファ イル[5]。



図6 ナノグラフェンとカーボンブラックにつ いて、白金担持後の電位サイクル試験中の ECSA の推移[5]。

図6は、液中プラズマを用いて合成したナノグラフ エンに自金担持を施した白金担持ナノグラフェンイ ンクにおける白金の ECSA の電位サイクル試験におけ る推移を表しており、測定開始初期の値で規格化して ある。比較のため、白金担持カーボンブラックの場合 の ECSA の推移も併せて示している。白金担体カーボ ンブラック場合、2万サイクル後には初期白金表面積 の約半分である51%まで減少した。一方、担体にナノ グラフェンを用いた触媒の場合、2万サイクル後でも 初期白金表面積の約80%であり、ECSA が半減するまで のサイクル数は14万で、カーボンブラックの場合の 7倍のサイクル数でより優れた耐久性を有しているこ とがわかる。



図 7 白金担持カーボンブラックと白金担持ナ ノグラフェンの電位サイクル試験前と 2 万サイ クルおよび 14 万サイクル後の SEM 像[5]。

図7は白金担持カーボンブラックと白金担持ナノグ ラフェンの電位サイクル試験前と2万サイクルおよ び14万サイクル後(ナノグラフェンのみ)のSEM像 を示している。白金担持カーボンブラックの電位サイ クル試験前後のSEM像を見ると、サイクル試験前の白 金粒径が2-3 nm だったのに対し、2万サイクル後の 白金粒径は4-6 nm まで凝集していた。一方、白金担 持ナノグラフェンの場合には、2万サイクル後の白金 粒径は4-6 nm、14万サイクルで4-6 nm まで凝集して いた。

次に、膜-電極接合体(MEA)を構築し、発電特性の評

価を行った。図8に白金担持ナノグラフェン触媒層を 採用した MEA の電流密度および電力密度を示す。最大 電流密度は240 mA/cm<sup>2</sup>、最大電力密度は52 mW/cm<sup>2</sup>と なった。これは一般的なカーボンブラック触媒層を使 った標準セル(東陽テクニカ EFC-05-02)の1/4程の 電流密度であった。今回作製した白金担持ナノグラフ ェンの白金担持量は30 wt%で、一般的な白金担持カ ーボンブラックの場合の白金担持量(20-50 wt%)と同 程度である。ところが、実際の燃料電池としてはカー ボンブラック触媒層の場合の1/4 程度の性能しか得 られていない。プロトン導電膜と触媒層との密着が悪 いなどと、三相界面が十分に確保できなかった可能性 があり、改善の余地がある。



図 8 白金担持ナノグラフェン触媒層を採用した MEA の電流密度および電力密度[5]。

#### 4. 結論

アルコールを原料とした液中プラズマを用いて合 成したナノグラフェンに対して、アモルファスカーボ ン成分除去方法や分散方法等の確立により、白金ナノ 粒子担持ナノグラフェンを利用した燃料電池触媒層 において 80 m<sup>2</sup>/g の白金表面積を達成し、液中プラズ マを用いたナノグラフェンの製造ならびに分散技術 を確立した。さらに、この白金ナノ粒子担持ナノグラ フェンの電位サイクル試験を実施したところ、初期の 白金の電気化学活性比表面積 (ECSA) が半減するまで のサイクル数は 14 万を達成 (カーボンブラックの 7 倍)した。ところが、燃料電池としての特性はまだま だ不十分で、三相界面の十分な確保など、周辺技術の 確立が求められる。

#### 参考文献

- T. Hagino, H. Kondo, K. Ishikawa, H. Kano, M. Sekine, M. Hori, Appl. Phys. Express 5, 035101 (2012).
- [2] A. Ando, K. Ishikawa, H. Kondo, T. Tsutsumi, K. Takeda, T. Ohta, M. Ito, M. Hiramatsu, M. Sekine, M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 57, 026201 (2018).
- [3] T. Amano, H. Kondo, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hiramatsu, M. Sekine, M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 57, 045101 (2018).
- [4] T. Amano, H. Kondo, K. Ishikawa, T. Tsutsumi, K. Takeda, M. Hiramatsu, M. Sekine, M. Hori, M. Appl. Phys. Express 11, 015102 (2018).
- [5] V. Gamaleev, K. Kajikawa, K. Takeda, M. Hiramatsu, MDPI C: J. Carbon Research, Special Issue "Plasma Processing for Carbon-based Materials", 4, 65 (2018).
- [6] Y. Feng, G. Zhou, G. Wang, M. Qu, Z. Yu, Chem. Phys. Lett. 375, 645 (2003).
- [7] 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)固体 高分子形燃料電池実用化推進技術開発基盤技術開 発:「セル評価解析の共通基盤技術」『セル評価解 析プロトコル』(2014-12),学校法人大同学園,学校法 人立命館,国立大学法人東京工業大学,一般財団 法人日本自動車研究所

# 1-2-3 白金ナノ粒子担持カーボンナノウォール電極作製

平松 美根男1) 竹田 圭吾1) 今井 駿2) 近藤 博基3) 石川 健治3) 堀 勝3)

1)名城大学 理工学研究科
 2)名古屋大学 大学院 工学研究科
 3)名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター

#### 1. 緒 言

カーボンナノウォール (carbon nanowall) は、シ リコンや金属基板に対してほぼ垂直に成長して自己 組織的に3次元迷路状壁構造を構築する多層グラフ ェンで、主としてメタンと水素の混合ガスを用いたプ ラズマ CVD 法による形成が報告されている[1]。 超高 アスペクト比(数 nm の厚さの多層グラフェンシート が数 10 µm の高さまで成長) やグラムあたり数 100 m<sup>2</sup> という大きな比表面積、ならびにグラファイトのもつ 導電性と化学的安定性が特徴で、電池やキャパシタ、 あるいは電気化学センサ・バイオセンサの「電極」と しての応用が期待されている[2]。カーボンナノウォ ールそのものを電荷の授受のための電極として用い る場合と、金属ナノ粒子や生体分子が主役で、これら を保持する基材(サポート材料、プラットフォーム) の役割を担う場合に大別される。実用化に向けては、 応用目的に合わせた構造の最適化や、金属ナノ粒子に よる表面修飾など機能化付加技術の確立が必要であ る。カーボンナノウォールの構造制御に関する最近の 成果については 1-3-1-1 において別途纏める。後者に ついては、例えば、白金 (Pt) ナノ粒子を担持したカ ーボンナノウォールは、過酸化水素等のセンシングや 固体高分子型燃料電池用電極としてカーボンブラッ クに替わるものとして期待されており、電気化学的評 価に焦点を絞り、有用性を明らかにする。

固体高分子型燃料電池用電極として Pt 担持を施し たカーボンブラックがしばしば用いられているが、Pt 粒子が凝集し易く、耐久性の改善が強く求められてい る。実用化に向け、高価な Pt を使わず安価な代替触 媒の探索と、利用する Pt をできるだけ減らし(効率 よく利用し)て、さらに耐久性を延ばす、という2つ のアプローチがある。カーボンナノウォールは単結晶 ではなく、数10 nmのグレインから構成されている[3]。 グレインの境界(grain boundary)は化学的に活性で あり、Pt等の金属ナノ粒子を分散させて固定し易く、 また耐久性も期待できる。本研究では、Pt ナノ粒子 担持を施したカーボンナノウォール電極にポイント を絞り、電位サイクル試験を実施して耐久性などの評 価を行った結果[4,5]について言及する。

#### 2. Pt 担持カーボンナノウォールの作製

CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>およびC<sub>2</sub>F<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>の2種類の原料を用いたラジカ ル注入プラズマCVD[6,7]によりカーボンナノウォー ルの作製を行った(図1)。C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>等のフロロカーボンガ スを炭素原料とした場合、大量の水素原子が必要とな るため、炭素源ラジカルと水素原子の供給が独立制御 可能なラジカル注入プラズマCVD法において容易に適 応可能である[1]。



図 1 カーボンナノウォールの製造に用いたラジ カル注入プラズマ CVD システムの模式図[7]。

カーボンナノウォール表面へのPtナノ粒子担持は、 超臨界流体有機金属化学堆積法[8]を用いて行った。 図2に超臨界流体有機金属化学堆積法の原理を示す。 ヘキサンで希釈した有機白金(CH<sub>3</sub>C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Ptを超臨 界CO2中に拡散させ、輸送された有機白金が120-170 ℃ に加熱された基板表面上で選択的に熱分解されてPt ナノ粒子を堆積させる手法で、カーボンナノウォール 膜や高密度カーボンナノチューブ膜など入り組んだ 構造体の奥深くまで1-2 nm程度のPtナノ粒子を高分 散で形成可能である[8]。本手法では、ナノドメイン 間の境界 (grain boundary) などの欠陥において核発 生が起こり易く、数10 nmのグレインから構成されて いるカーボンナノウォール表面への高密度・高分散Pt ナノ粒子の担持に適した手法であり、30分の堆積でカ ーボンナノウォール表面上に10<sup>12</sup> cm<sup>-2</sup>の密度のPtナノ 粒子の形成が可能である。



with high aspect ratio and narrow interspaces

図 2 超臨界流体有機金属化学堆積法の原理を表 す模式図。

#### 3. 評価方法

Pt担持カーボンナノウォール (Pt/CNW) の電気化学 評価は、可逆水素電極とPt電極をそれぞれ参照電極と カウンター電極に用い、作用電極として回転電極を備 えた3電極法により行った。Ti基板上に作製したカー ボンナノウォール表面にPtナノ粒子を担持させ、カー ボンナノウォール膜表面から1%ナフィヨン水溶液を 塗布して65℃で乾燥させた後、作用電極 (回転電極) に貼り付け、0.1 Mの過塩素酸(HC10<sub>4</sub>)に浸して電気 化学測定を行った。走査速度50 mV/sでサイクリック ボンルタンメトリ(CV)を測定し、Pt触媒の電気化学 的活性表面積(electrochemically active surface area, ECSA)を評価した。Pt触媒耐久性の評価は、燃 料電池実用化推進協議会(FCCJ)の標準プロトコル「電 位サイクル試験」[9]に準拠し、走査:1.0-1.5 V, 2s/cycleの条件でECSAの特性変化を調べた。

#### 4. 実験結果

電位サイクル試験を実施した際の0、8千、1万5千、 2万サイクルにおいて測定したCVプロファイルを図3 に示す。図の斜線領域の面積からECSAを求めた。



図 3 Pt 担持カーボンナノウォールの電位 サイクル試験中の CV プロファイル (0,8,000, 15,000, 20,000 サイクル) [4]。



図 4 Pt 担持カーボンナノウォールの電位 サイクル試験中の ECSA の推移[4]。

図4は、カーボンナノウォール表面に担持された Pt の ECSA の電位サイクル試験における推移を表してい る。開始から8千サイクルまでは ECSA は上昇し、そ の後、2万サイクルでは8千サイクルで得られた ESCA の最大値と比較して22%の減少に留まっている。カー ボンブラックに担持された Pt の ECSA が2万サイクル 程度で半減していること[10]と比較すれば、カーボン ナノウォール表面に担持された Pt は優れた耐久性を 有していることがわかる。

図5は、電位サイクル試験前と2万サイクル後にお けるPt 担持カーボンナノウォール表面の透過型電子 顕微鏡(TEM)像である[4]。超臨界流体有機金属化学 堆積法によって形成されたPtナノ粒子の平均サイズ は1.6±0.4 nm、密度は5×10<sup>12</sup> cm<sup>-2</sup>であったが、2 万回の電位サイクル試験後には、Ptナノ粒子の平均 サイズは1.8±0.7 nmとわずかに増大し、一方密度は 2×10<sup>12</sup> cm<sup>-2</sup>にまで減少した。また、Pt 担持カーボン ナノウォールのラマンスペクトルは、電位サイクル試 験前と2万サイクル後で変化は見られず、カーボンナ ノウォールそのものについては、電位サイクル試験に 対して優れた耐久性を有していることが分かる。



図5 電位サイクル試験前後のPt 担持カーボ ンナノウォールの TEM 像[4]。

 $C_2F_6/H_2$ の原料を用いて作製したカーボンナノウォ ールについて、同様に Pt ナノ粒子を担持し、電位サ イクル試験を実施して耐久性を評価した。図 6 は、  $C_2F_6/H_2$  原料を用いて作製したカーボンナノウォール 表面に担持された Pt の ECSA の電位サイクル試験にお ける推移を表している。比較のため、CH4/H<sub>2</sub>原料を用 いて作製したカーボンナノウォールの場合の ECSA の 変化も併せて示している。CH4/H<sub>2</sub>および  $C_2F_6/H_2$ の原料 で作製したカーボンナノウォールを、それぞれ、 CH4-CNWs および  $C_2F_6$ -CNWs と記し、サイクル試験開始 直後の最大値で規格化してある。CH4-CNWs に担持した Pt の ECSA は約 3 万サイクルで半減しているのに対し て、 $C_2F_6$ -CNWs の場合は ECSA が半減するまでのサイク ル数は 14 万(カーボンブラックの場合の 7 倍)となり、より 優れた耐久性を有していることがわかる[5]。



図 6  $CH_4/H_2$ および  $C_2F_6/H_2$ の原料で作製した カーボンナノウォールについて、Pt 担持後 の電位サイクル試験中の ECSA の推移[5]。

図7は、CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>および C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>の原料で作製したカー ボンナノウォールのラマンスペクトルを示しており、 2つのラマンスペクトルはGバンドピークで規格化し てある。C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>で作製されたカーボンナノウォールの ラマンスペクトルは、①Gバンドの半値幅が狭く、② Dバンドのピーク強度はより大きく半値幅は狭い、と いう特徴を有している[5]。つまり、C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>で作製さ れたカーボンナノウォールは、より小さなサイズのグ レインで構成されているものの、それぞれのグレイン のグラフェンとしての結晶性はより良好であること を示唆している。



図7 CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>および C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>の原料で作製した カーボンナノウォールのラマンスペクトル (Gバンドピーク強度で規格化)[5]。

以上のように、カーボンナノウォールは多くの結晶 粒界を有しているため、それがアンカーとなって Pt ナノ粒子を安定して高分散で担持し易く、また、カー ボンナノウォールそのものも耐久性に優れており、Pt 担持カーボンナノウォールが電極応用において有用 であることを明らかにした。

#### 4. 結論

CH4/H2 および C2F6/H2 を用いたラジカル注入プラズ マ CVD 法でカーボンナノウォールを作製し、超臨界流 体有機金属化学堆積法を用いて白金ナノ粒子担持を 施した。カーボンナノウォール表面上の白金触媒の耐 久性評価として、燃料電池実用化推進協議会(FCCJ) の標準プロトコルに準拠した電位サイクル試験を実 施し、白金触媒の電気化学的活性表面積(ECSA)を評 価した。CH4/H2系のカーボンナノウォール電極の場合、 測定開始から3万サイクルで白金のECSAが半減した が、C2F6/H2系の場合はECSAが半減するまでのサイク ル数は14万(カーボンブラックの場合の7倍)とな り、より優れた耐久性を有していることが示された。 カーボンナノウォールは数10 nmのグレインから構成 されており、結晶粒界(grain boundary)が良好なア ンカーとなって、白金ナノ粒子の高密度・高分散担持 に適した材料で、特に結晶性の改善により高耐久性の 担持材料となることが確認された。

#### 参考文献

- M. Hiramatsu, M. Hori, "Carbon Nanowalls: Synthesis and Emerging Applications", Springer Verlag, Wien (2010).
- [2] M. Hiramatsu, H. Kondo, M. Hori, "Graphene Nanowalls", in New Progress on Graphene Research, Jian Ru Gong, Ed., Ch.9, 234-260 (2013).
- [3] K. Kobayashi, M. Tanimura, H. Nakai, A. Yoshimura,
  H. Yoshimura, K. Kojima, M. Tachibana, J. Appl. Phys. 101, 094306 (2007).
- [4] S. Imai, H. Kondo, H. Cho, H. Kano, K. Ishikawa, M. Sekine, M. Hiramatsu, M. Ito, M. Hori, J. Phys. D: Appl. Phys. 50, 40LT01 (2017).
- S. Imai, H. Kondo, H. Cho, K. Ishikawa, T. Tsutsumi,
   M. Sekine, M. Hiramatsu, M. Hori, Appl. Phys. Express 12, 015001 (2019).
- [6] M. Hiramatsu M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 45, 5522 (2006).
- S. Kondo, M. Hori, K. Yamakawa, S. Den, H. Kano,
   M. Hiramatsu, J. Vac. Sci. Technol. **B26**, 1294 (2008).
- [8] T. Machino, W. Takeuchi, H. Kano, M. Hiramatsu, M. Hori, Appl. Phys. Express 2, 025001 (2009).
- [9] □新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO) 固体高分子形燃料電池実用化推進技術開発基盤 技術開発:「セル評価解析の共通基盤技術」『セ ル評価解析プロトコル』(2014-12),学校法人大同学 園,学校法人立命館,国立大学法人東京工業大 学,一般財団法人日本自動車研究所
- [10] V. Gamaleev, K. Kajikawa, K. Takeda, M. Hiramatsu, MDPI C: J. Carbon Research, Special Issue "Plasma Processing for Carbon-based Materials" 4, 65 (2018).

# 1-2-4 酸化物ナノシートと機能性有機配位子の複合化技術の開発

- ビピリジンからなる鉄キレート錯体と酸化黒鉛ナノシートの複合化-

才田 隆広1)

丸山 隆浩4)

1) 名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

固体高分子形燃料電池(PEFC)は、環境低負荷な次世 代電源の1つとして注目されており、既に定置用や車 載用電源として市販化されている。しかし現状では、 PEFC の普及は限定的である。PEFC の広範な普及を 妨げている大きな要因として、その高い販売価格が挙 げられる。PEFC が高価格となる一因として、貴金属 である白金を電極触媒として使用している点が挙げ られる。そこで、PEFC の低コスト化を推進すべく、 非白金系触媒の開発が盛んに行われている。なかでも 比較的に製造コストも低く触媒活性も高い炭素系材 料からなる非白金触媒は、M/N/C 触媒と称され注目を 集めている。

M/N/C 触媒の歴史は古く、1964 年に Jasinski らがコ バルトフタロシアニンのアルカリ電解質中での酸素 還元反応 (ORR) に対する触媒活性の発見に遡る。[1] その後に、鉄やコバルト等を中心金属とした大環状金 属錯体 (ポルフィリン、フタロシアニン系) などの ORR 用の M/N/C 触媒について広く研究された。[2,3] その結果、Fe-N4 や Co-N4 などの金属中心構造を持つ 環状化合物を炭素源と混合し、不活性ガス雰囲気下で 熱分解することで、高い ORR 活性と安定性がえられ ることが知られるようになった。加えて、このような 金属含有大環状分子は、グラフェンまたは他の炭素材 料と複合化させることで ORR 活性が更に向上するこ とが知られている。また M/N/C 触媒の活性サイトは、 Fe-N 部分であることが示唆され、原子状の鉄である ことが観察された。[4,5] 他方、ドープされた窒素の 存在が ORR 活性向上に寄与し、ピリジン型窒素が最 も高い活性を有することも報告されている。[6]

端的に M/N/C 触媒の ORR に対する活性サイトを述 べると、ピリジン型にドープされた窒素原子に配位し た原子状の鉄やコバルトである。前述にもあるが、 M/N/C 触媒で用いる大環状金属錯体として鉄フタロ シアニンが一般的である。しかし、フタロシアニンや ポルフィリン自体には、ピリジン環ではなく炭素原子 が1つ少ないピロールにて構成されている。このため、 炭素源との還元焼成を行い、鉄原子を内包したままピ リジン型の窒素サイトを形成する必要がある。鉄が粒 子化してしまうと ORR 活性が落ちるだけでなく、 PEFC 全体の耐久性を下げることが知られている。し たがって、M/N/C 触媒を合成する上では、精密な焼成 条件検討が必要となる。

目線を PEFC 用触媒から有機化合物に移すと、ピリ ジン型に窒素が導入された六員環をからなる化合物 は多数存在する。代表的な化合物として、2 つのピリ ジン環からなるビピリジンがある。このビピリジンは、 鉄イオンとキレート錯体を形成することが出来る。こ のため、既存のポルフィリンやフタロシアニンよりも、 鉄原子とピリジン型窒素の数を制御しやすいと予想 される。また、既存の合成手法では、ピリジン型以外 のサイトにも窒素原子が導入されてしまうが、ビピリ ジンを用いることで選択的にピリジン型窒素サイト を形成できると予想される。そこで本研究では、ピリ ジン型窒素を持つ 2,2'-ビピリジン-6,6'-ジオール (bpy)を用いて窒素種の制御を試み、窒素のドープ

32

量の違いによる酸素還元能を評価した。また、鉄配位 bpyの基材となる炭素材料として高比表面積な酸化黒 鉛ナノシート(GOns)を用いた。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 酸化黒鉛ナノシート(GOns)の合成手順

酸化黒鉛はハマーズ法に準じて合成した。黒鉛 1.0 g を硫酸ナトリウム 0.5 g と混合し、0°C に冷やした濃 硫酸(18 mol L) 23 mL を加えた。過マンガン酸カリウ ム 3.0 g を温度上昇防止のために冷却しながら少しず つ加え、ガラス棒で2時間撹拌を行った。撹拌終了後、 4 日間室内で静置し反応させた。その後、ホットスタ ーラーで加熱しながら 46 mL の超純水を加え、100°C で 15 分間加熱し、140 mL の超純水と過酸化水素(30 mass%)10 mL を加え反応を終了させた。最後に、その 反応溶液を吸引濾過しながら 5 mass%の塩酸 500 mL で洗浄し、室温で十分に乾燥させ、酸化黒鉛を得た。 合成した酸化黒鉛 100 mg を三角フラスコに加え、そ こに超純水 100 mL を加え超音波処理を 30 分間行った。 その後、10 日間浸とうすることで、酸化黒鉛ナノシ ート (GOns) コロイド溶液を得た。

#### 2.2 ビビリジン鉄錯体と GOns の複合化

スクリュー管に IPA を入れ、2,2'-ビピリジン-6,6'-ジオールと塩化鉄 4 水和物が、モル比で bpy:Fe=1:1 になるように加え、30 分間超音波処理を行った。得 られたビピリジン鉄錯体と GOns コロイド溶液を混合 し、30 分間超音波処理を行った。得られた溶液を 80°C のガラス板上に滴下し、完全に乾燥させた。乾燥した 粉体を 3%水素流通下 800°C で所定の時間 (30 秒もし くは1分間) にて焼成を行った。

#### 2.3 物性および ORR 活性評価

合成した触媒の物性をXRD、XPSを用いて確認した。 ORR 活性評価は、参照極として Ag/AgCl 電極、対極 としてカーボンファイバーからなる三極式セルを用 いた電気化学測定より算出した。また、電気化学測定 は、回転電極法にて実施している。ORR 開始電位は、 回転数 400 rpm における ORR 電流 (*i*ORR) から算出し 評価した。具体的には、*i*ORR 電流 (*i*ORR) から算出し 評価した。具体的には、*i*ORR を O<sub>2</sub> 飽和時の電流値か ら Ar 飽和時の電流値を差し引いた値とし、*i*ORR の流 れ始めを ORR 開始電位 (*E*ORR) とした。また 0.5V vs.RHE における Kouteck-Levich プロット (K-L プロ ット) から質量活性を算出した。なお電気化学測定は 60°C の 0.1 M HCIO4 中で全て行った。

#### 3. 実験結果

焼成前後における結晶構造の変化を XRD にて確認 した。その結果、未還元の試料において 10°および 20° 付近に 2,2'-ビビリジン-6,6'-ジオールに起因するピー クが観察された。しかし、この回折ピークは還元する ことにより消滅したことから 2,2'-ビピリジン-6,6'-ジ オールが分解されたと考えられる。また、還元処理後



図1 bpyFe/GO 複合体の XRD パターン。(a) 未還元、(b) 800℃で 30 秒の還元処理、 (c) 800℃で 30 秒の還元処理。
には 25°にピークが出現した。これは還元グラフェン (rGO) に起因するピークと考えられる。

GOns から rGO への還元は、XPS における C 1s ピ ークからも確認できる(図2参照)。還元前は、GOns 由来の官能基やビピリジン由来の sp<sup>3</sup>炭素が多く確認 されたが、還元処理後には sp<sup>2</sup>炭素が支配的となって いた。このため電子伝導性の観点から考えると、還元 処理時間は 30 秒で十分である可能性がある。



図 2 bpyFe/GO 複合体の XPS における C 1s ピ ーク。

他方、窒素原子は、完全にピリジン型だけに制御す ることは出来なかった(図3参照)。しかし、ピロー ル型や酸化型に起因するピークは極めて少なく、本研 究にて合成した複合体触媒は、bpyと鉄の混合比に依 らずピリジン型窒素が支配的であると言える。一方で、 Fe の量が XPS の検出限界以下であったため、Fe の電 子状態を観察することは出来なかった。ただし、XRF から鉄原子の存在を全ての試料から確認している。こ のため、鉄は、rGO上に高分散に原子状またはイオン 状にて存在していると推測される。



ープボルタモグラム(LSV)を図4に示す。この時の回

転数は、400 rpm-2200 rpm の範囲で変化させている。 400 rpm 時における LSV から Eorr を算出すると、1.04 V であった。この値は、電流値は極微小であるが白金 と同定の Eorr である。このため、鉄とビピリジンを 複合化させた触媒は、本質的に高い活性を有している 可能性が示唆された。一方で、各回転数における 0.55 V での電流値から K-L プロットを作成し、量的な ORR 活性を算出すると 0.236 A g<sup>-1</sup> であった。この値は、白 金に遠く及ばず、鉄ポルフィリン系の M/N/C 触媒よ りも低い値となった。

続いて、1 分間 800℃にて還元処理を行った試料の LSV を図 5 に示す。



#### E / V vs. RHE

図4 800℃1分で還元した bpyFe/GO 複合体触 媒の LSV。

30 sにて還元処理を行った試料とは異なり、0.8 V 付近から明らかな還元電流が観察された。E<sub>ORR</sub>を算 出すると 0.94 V であり、還元時間が延びると E<sub>ORR</sub> が約 0.1 V 低下した。この時の 0.55 V における ORR 活性を K-L プロットより算出すると、0.587 A g<sup>-1</sup>で あった。還元処理時間を倍にすることで、0.55 V に おける質量活性も 2 倍近くまで向上する結果となっ た。現段階では、還元処理時間の増加により、鉄ビ ピリジン錯体が rGO 内に埋め込まれたと推測してい るが、詳細は不明である。ただし、還元処理時間を 1 分以上とすると活性が低下することも確認してい る。また、bpy:Fe のモル比を変化させ、鉄に配位す るビピリジンの数を増やすと ORR 活性が低下する ころも確認している。このため、活性サイトである 鉄原子もしくは鉄イオンの軌道を空けておく必要も 示唆された。

#### 4. 結論

ピリジン型窒素をもつビピリジン鉄錯体と酸化黒 鉛ナノシートの複合体を合成し、酸素還元能を評価し た。また bpy:Fe のモル比を変えることにより鉄に対 する窒素の量が活性に与える影響を調査した。

XPSのN1sスペクトルからピリジン型窒素が支配 的であることが確認された。電気化学測定の結果、鉄 に対する窒素の量が少ない bpy:Fe=1:1 が最も活性が 高くなった。鉄に配位した窒素の量が多くなるにつれ、 酸素が吸着できるサイトが少なくなっていくために 活性が低くなったと考えられる。

#### 参考文献

- [1] R. Jasinski, *Nature*, **201**, 1212-1213 (1964).
- [2] 尾崎純一, 今城靖雄, 炭素, 265, 204-212(2014).
- [3] G. Liu, X. Li, J.-W. Lee, B. N. Popov, *Catal. Sci. Technol.*, 1, 207-217 (2011).
- [4] H. T. Chung, D. A. Cullen, D. Higgins, B. T. Sneed, E.
   F. Holby, K. L. More, P. Zelenay, *Science*, **357**, 479-484 (2017).
- [5] L. Li, S. Shen, G. Wei, X. Li, K. Yang, Q. Feng, J. Zhang, ACS Appl. Mater. Interfaces, 11, 14126-12135 (2019).
- [6] D. Guo, R. Shibuya, C. Akiba, S. Saji, T. Kondo, J. Nakamura, *Science*, **351**, 361-365 (2016).

1-3 ナノカーボン材料をバイオセンサや VOC ガス浄化に

応用する技術の開発

# 1-3-1-1 ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術の

## 開発 (その1)

平松 美根男 1) 竹田 圭吾 1) 東松 真和 2) 近藤 博基 2) 堀 勝 2)

1)名城大学 理工学研究科
 2)名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター

#### 1. 緒 言

シリコンや種々の金属基板上にほぼ垂直に成長し、 相互に支え合って自己組織的に3次元迷路状壁構造 となる多層グラフェンは、カーボンナノウォール (carbon nanowall) やグラフェンナノウォール (graphene nanowall)、カーボンナノフレーク (carbon nanoflake) と呼ばれ、主としてメタンと水 素の混合ガスを用いたプラズマ CVD 法による形成が 報告されている[1]。超高アスペクト比(数 nm の厚さ の多層グラフェンシートが数 10 µm の高さまで成長) やグラムあたり数 100 m<sup>2</sup> という大きな比表面積、な らびにグラファイトのもつ導電性が特徴で、スーパー キャパシタならびに新規電池の電極や細胞培養の基 材のほか、金属触媒ナノ粒子や酵素等による表面修飾 と組み合わせて、電気化学・バイオセンサ電極等への 応用、即ち、プラットフォームとしての新規応用が期 待されている[2]。実用化に向けては、応用目的に合 わせた構造の最適化や、ナノ粒子や酵素を用いた表面 の修飾技術・コンフォーマルコーティング・シート間 への埋め込みといった機能化付加技術の確立が必要 である。

本研究では、誘導結合型プラズマ CVD 法を用いたカ ーボンナノウォールの形成[3]において、プラズマ中 のラジカルやイオンの制御、基板の前処理(金属ナノ 粒子の付与)など種々の方法で壁間隔や結晶性などの 構造制御手法について検討を行った。さらに、カーボ ンナノウォール表面を白金ナノ粒子で表面修飾し、過 酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)センサ電極に応用してその性能を評価した[4,5]。

#### 2. カーボンナノウォールの構造制御

CH₄/A の混合ガスを用いた誘導結合型プラズマ CVD[3]により、700 ℃程度に加熱されたSiまたはSiO2 基板上にカーボンナノウォールの作製を行った。圧力 15-20 mTorrのもとで、ガスの流量比を変化させるほ か、基板に正バイアスを印加して、基板に到達するイ オンのエネルギーやフラックスがカーボンナノウォ ールの核発生や成長に与える影響について系統的に 調べるとともに、Tiナノ粒子を付着させたSiO2 基板 を用いて、金属触媒による核発生促進とそれを利用し た構造制御についても検討を行った。

CH<sub>4</sub>とArの流量比を変えて1時間成長を行ったカー ボンナノウォールの電子顕微鏡(SEM)像を図1(a)と (b)に示す。典型的なカーボンナノウォールの作製条 件(a: Ar/CH<sub>4</sub>=1)の場合と比べて、Arの流量が多い 場合(b: Ar/CH<sub>4</sub>=14)には、壁間隔が狭く、さらに個々 のシートには枝分かれが多く確認される。Arの流量 を多くして基板を叩くArイオンのフラックスを増加 させることにより核発生が促進されて密度が増加す る(壁と壁の間隔が狭くなる)が、定常成長時のカー ボンナノウォール表面へのイオン衝撃は2次核発生 を誘起し、枝分かれの原因となることが分かる。一方 図1(c)では、(a)と同じプラズマ条件下でTiナノ粒 子を付着させた基板を用いており、結晶性は維持され たままカーボンナノウォールの壁間隔だけが狭くなっていることが分かる。



図1 カーボンナノウォール膜(1時間成長)の表面 および断面 SEM 像。(a) 典型的な成長条件(Ar/CH<sub>4</sub>=1)、 (b) Ar 高流量(Ar/CH<sub>4</sub>=14)、(c) Ti/SiO<sub>2</sub> 基板上に形成 (Ar/CH<sub>4</sub>=1)。



図2 カーボンナノウォール膜のラマンスペクトル。 基板バイアス無し(SiO<sub>2</sub> 基板)、基板バイアスあり (SiO<sub>2</sub>基板)、基板バイアスあり(Ti/SiO<sub>2</sub>基板)。

カーボンナノウォールのラマンスペクトルを図2に 示す。「without bias」と記されたものが典型的なカ ーボンナノウォールのラマンスペクトルで、グラファ イトに起因するGバンド、欠陥やグレインサイズの小 ささに起因するDバンド、グラフェンエッジに起因す るD'バンドが観察される。カーボンナノウォールは 1枚の単結晶ではなく、結晶性は悪くないものの小さ なグレインで構成されているため[4]、ラマンスペク トルは平面状グラフェンのそれとは異なり、Gバンド ピークと同程度がそれ以上の強度となるシャープで 鋭いDバンドピークとD'バンドの肩ピークで特徴付 けられる。一方、基板に正バイアス(+50 V)を印加 してイオン衝撃を抑えた場合、カーボンナノウォール は形成されなかった。Si や SiO<sub>2</sub>基板を用いた場合、 立ったグラフェンの核発生に先んじて 10-30 nm 程度 の非晶質カーボン層が形成されるが、イオン衝撃のア シストが無いと炭素源前駆体の基板表面への付着係 数が小さくなるため非晶質カーボン層が形成されず、 結果カーボンナノウォールの成長に至らない[3]。Ti ナノ粒子を付着させた基板を用いた場合(Ti/SiO<sub>2</sub>基 板)には、基板に正バイアスを印加してイオン衝撃の アシストを抑えているにもかかわらず、カーボンナノ ウォールの形成が確認できる。



図 3 Ti/Si0<sub>2</sub> 基板を用いてカーボンナノウォール を形成した場合の核発生時の SEM 像(2分)、および 核発生メカニズムの模式図。

図1(c)及び図2の結果は、Ti ナノ粒子を基板に付 着させた場合、グラフェンの核発生のメカニズムが Si や Si02基板上とは異なることを示唆している。図 3 は、Ti/Si02基板を用いてカーボンナノウォールを 形成した場合の成長開始2分後のSEM像、および核発 生メカニズムの模式図を示している。Ti/Si02基板を 用いた場合、カーボンナノウォールと基板界面に非晶 質カーボン層が形成されず、直接ナノグラフェンが Ti ナノ粒子から核発生している。しかもまず水平方 向に成長し、その後上方に向きを変えてカーボンナノ ウォールの成長へと繋がっている。Ti は Si と反応し てシリサイドを作りやすく、基板加熱によって埋もれ てしまうが、表面部分はグラフェン形成の触媒能力を 有していることが示唆される。

水平なグラフェンは、Ni や Cu 基板を用いて熱 CVD で形成することができるが、プラズマ CVD の場合、基 板へのイオン衝撃の影響で、Ni や Cu 基板上にもカー ボンナノウォールが成長してしまう。しかし、基板に 正バイアスを印加してリモートプラズマの構造とし てイオン衝撃による核発生を抑止することで、Ni や Cu の触媒効果により水平なグラフェンを得ることも 可能である。図 4 は、Ni 基板上に本研究と同じ誘導 結合型プラズマ CVD を用いて 30 秒間成長させた生成 物のラマンスペクトルで、リモートプラズマ構造を採 用することにより水平なグラフェンも得られること を示している。



図4 誘導結合型プラズマを用いてNi上に30秒形成 したグラフェンのラマンスペクトル。上:通常モー ドで作製したカーボンナノウォール、下:リモート プラズマモードで作製した水平な多層グラフェン。

プラズマ中の炭素源前駆体と水素原子の比はカー ボンナノウォールの構造や結晶性、成長速度に影響を 及ぼす。水素原子の割合が増えると結晶性は向上し壁 間隔は拡がるが成長速度は小さくなる[5]。炭素源前 駆体と水素原子の比は、励起方法や圧力に依存すると ともに、利用ガスの混合比を変化させることで制御可 能であるが、制御可能な壁間隔の領域は大きくない。 カーボンナノウォールの壁間隔を小さくするのは イオン衝撃や金属ナノ粒子を用いた核発生の制御に より可能であるが、拡げることは容易ではない。カー ボンナノウォールを細胞培養の基材に用いる提案[6] が成されたものの、細胞のサイズに比べてカーボンナ ノウォールの壁間隔が小さいため、壁間隔を拡げる技 術の確立が望まれる。図5はカーボンナノウォール形 成後の後処理によって 10-50 倍程度に広い壁間隔を 得た例である。過酸化水素水(90°C)浸すことにより、 基板とカーボンナノウォールの界面に存在するアモ ルファスカーボン選択的に除去され、カーボンナノウ ォールも一緒に剥離したものと考えられる。一方、Ti を付与した Si 基板上に形成したカーボンナノウォー ルの場合、アモルファスカーボン界面層が存在しない ため、同じ溶液処理を行っても変化は見られなかった。



図 5 過酸化水素水処理前後のカーボンナノウォー ルの SEM 像。

# カーボンナノウォール表面の白金ナノ粒 子修飾

カーボンナノウォールは単結晶ではなく、数 10 nm のグレインから構成されている[4]。グレインの境界 (grain boundary)は化学的に活性であり、金属ナノ粒 子や生体分子を固定しやすいため幅広く表面修飾が 可能である。カーボンナノウォールはこれらの担持材 料(プラットフォーム)として電気化学・バイオへの 幅広い応用が期待できる。白金は水素化、脱水素、酸 化等の反応に活性を示し、種々の電気化学応用が提案 されている。燃料電池電極や電気化学センサ電極とし て応用するためには、白金の使用量を減らしながらも 大きな反応面積が得られるよう、ナノメートルサイズ の粒子として高分散させた状態でカーボンナノウォ ール表面に付着させる必要がある。白金ナノ粒子によ るカーボンナノウォールの表面修飾は、塩化白金酸の 液相還元[7]や超臨界二酸化炭素を利用した化学堆積 [8]が有効である。

塩化白金酸(H<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>Pt)を原料として液相還元法によ りカーボンナノウォール表面に白金ナノ粒子の付着 を行った。図6は白金ナノ粒子でカーボンナノウォー ル表面を修飾する前後での表面のSEM像である。5-10 nm の粒径の白金ナノ粒子が分散されて形成されてい ることが分かる。超臨界二酸化炭素を利用した化学堆 積法[8]で得られるPtナノ粒子の平均サイズ1-2 nm と比較して若干大きいが、簡便で実用的な手法である ことが実証された。



 $2H_2CI_6Pt\Box$  NaBH<sub>4</sub> + 11NaOH  $\rightarrow$  2Pt $\Box$  12NaCl + B(OH)<sub>3</sub> + 8H<sub>2</sub>O

図 6 塩化白金酸を原料として液相還元法により白 金ナノ粒子修飾を施したカーボンナノウォール表面 の SEM 像: (a)処理前、(b)修飾処理後。



図 7 カーボンファイバ上に形成した Pt ナノ粒子修 飾処理後カーボンナノウォールの SEM 像(左)、対 応する領域の C および Pt の EDX マッピング[7]。

#### 4. 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)センサへの応用

カーボンナノウォールの電気化学応用に関して、カ ーボンファイバペーパ上にカーボンナノウォールを 成長させて表面積を増大させ、さらに表面を白金ナノ 粒子で修飾して過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)センサ用電極とした [7]。図7左はカーボンファイバ上に形成したPtナノ 粒子修飾処理後のカーボンナノウォール/カーボンフ ァイバの SEM 像である(カーボンファイバの断面)。 同右は、対応する領域のCおよびPtのエネルギー分 散型X線分析(Energy dispersive X-ray spectroscopy、 EDX) 元素マッピングの結果を示している。カーボン ナノウォールの先端から根元までPt が高分散で形成 されている。またこれらの白金ナノ粒子が酸化されて いないことは、X線光電子分光(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)分析により確認された[7]。



図 8 Pt-CNW/CFP 電極を用いた典型的なサイクリ ックボルタモグラム (240 µ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1M PBS (pH = 7.4)) [7]。

3 電極法を用いて電気化学評価を行うとともに、リ ン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 0.1 M) 中に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を滴下し、 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の検出能力の評価を行った。図8は、白金ナノ粒 子で修飾されたカーボンナノウォール/カーボンファ イバ電極 (Pt-CNW/CFP 電極)を3 電極法の作用電極に 用い、0.1 M PBS (リン酸緩衝生理食塩水, phosphatebuffered saline) (pH=7.4) 中に 240 µM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を滴下 して得られた典型的なサイクリックボルタモグラム を示している[7]。-2から-1V付近で還元のピークが 見られる。次に、この Pt-CNW/CFP 電極を用い、-1 V にポテンシャルを固定して 100 秒ごとに一定量の過 酸化水素水を滴下して電流を測定するアンペロメト リーを行った。図9に示すように、10 μMから1.5 mM の広い領域に亘って良好な線形性が得られている[7]。



図 9 Pt-CNW/CFP 電極を用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度と電流の校正曲線[7]。



-0.1 V におけるピーク電流の推移を表し[9]。

前述の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> センサ用電極を CV 測定に繰り返し使用 した場合の反応の変化や電極の劣化について検討を 行った。図 10 は、240 µM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む PBS において Pt-CNW/CFP 電極を用いて 3000 回サイクル CV 測定を 行い、ポテンシャル-0.1 V におけるピーク電流の推 移を表している[9]。1000 サイクル毎に液を新しいも のに取り替えている。1000 サイクル毎の推移では、 サイクル数の増加に伴ってピーク電流の減少が見ら れるが、これは主として Pt 表面での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解反応 によって液中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が減少したことによること に加え、液を取り替えた直後のピーク電流は十分に回 復しないことから、Pt ナノ粒子の凝集やカーボンナ ノウォールからの離脱など電極の劣化も徐々に起こ っていると考えられる。3000 サイクル後の SEM 観察 やラマン測定の結果から推定される電極の劣化の模 式図を図 11 に示す[9]。ポテンシャルの印加により Pt 表面での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の化学反応で OH が生成され、これが グラフェンの先端方向からエッチングを引き起こす と考えられる。これによってカーボンナノウォールの 先端エッジから Pt の凝集が進むと考えられる。



図 11 H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>検出の分解によって生成される 2 次生成 物との反応による Pt-CNW/CFP 電極の劣化のメカニズ ムを表す模式図[9]。

#### 4. 結論

グラファイトの持つ導電性、化学的安定性、および 広い比表面積を有するカーボンナノウォールは、触媒 や生体分子の担持材料として優位な構造を有してお り、エネルギー・電気化学・バイオ応用に向けたプラ ットフォームとして幅広い応用が期待される。カーボ ンナノウォールの構造制御技術を確立するとともに、 電気化学・バイオセンサの電極として有用性を示した。 一例として、白金ナノ粒子で修飾したカーボンナノウ ォール電極を用いた過酸化水素センサを試作し、検出 限界 800 nM、1-1500 µMの直線性領域を有することを 確認した。一方、白金表面でのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の化学反応により 生成されるOH<sup>-</sup>等の2次生成物によりカーボンナノウォ ールがエッチングされ、Pt ナノ粒子の凝集など白金 ナノ粒子で修飾したカーボンナノウォール電極の劣 化のメカニズムについても議論した。

グルタミン酸は脳の機能のみならず、脳神経疾患に も関与する重要な神経伝達物質であり、脳の機能や脳 神経疾患の治療法を探るために、脳内のグルタミン酸 の動態観察が必要とされる。グルタミン酸の検出方法 として、酸化酵素と組み合わせて電気化学反応をモニ タする方法が提案されている。L-グルタミン酸オキシ ダーゼはグルタミン酸の酸化酵素であり、グルタミン 酸は酸化反応を誘起されて過酸化水素が生成される ため、過酸化水素を検出することにより間接的にグル タミン酸を検出することが可能である[10]。本研究で 開発を行っている過酸化水素センサは、高感度グルタ ミン酸センサの開発の一環として取り組んでいるも のであり、今後は L-グルタミン酸オキシダーゼの固 定と組み合わせて、速やかにグルタミン酸センサへの 適用可能性を実証していく。さらに、同様の原理は、 グルコースセンサへも適用可能であり、グルコースオ キシダーゼと組み合わせて、グルコースセンサへの適 用についても検討を開始した。

#### 参考文献

- M. Hiramatsu, M. Hori, "Carbon Nanowalls: Synthesis and Emerging Applications", Springer Verlag, Wien (2010).
- [2] M. Hiramatsu, H. Kondo, M. Hori, "Graphene Nanowalls", in New Progress on Graphene Research, Jian Ru Gong, Ed., Ch.9, 234-260 (2013).
- [3] M. Hiramatsu, Y. Nihashi, H. Kondo, M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys., 52, 01AK05 (2013).
- [4] K. Kobayashi, M. Tanimura, H. Nakai, A. Yoshimura,
  H. Yoshimura, K. Kojima, M. Tachibana, J. Appl. Phys., **101**, 094306 (2007).

- [5] H. Cho, H. Kondo, K. Ishikawa, M. Sekine, M. Hiramatsu, M. Hori, Carbon, 68, 380 (2014).
- [6] H. Watanabe, H. Kondo, Y. Okamoto, M. Hiramatsu,
   M. Sekine, Y. Baba, M, Hori, Appl. Phys. Lett. 105, 244105 (2014).
- M. Tomatsu, M. Hiramatsu, J.S. Foord, H. Kondo, K. Ishikawa, M. Sekine, K. Takeda, M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys., 56, 06HF03 (2017).
- [8] M. Hiramatsu, T. Machino, K. Mase, M. Hori, H. Kano, J. Nanosci. Nanotechnol., 10, 4023 (2010).
- [9] M. Tomatsu, M. Hiramatsu, H. Kondo, K. Ishikawa, T.i Tsutsumi, M. Sekine, M. Hori, C (Journal of Carbon Research) 2019 (MDPI), 5, 7 (2019).
- [10] J. Hu, S. Wisetsuwannaphum, J. S. Foord, Faraday Discuss. **172**, 457 (2014).

## 1-3-1-2 ナノカーボン材料をバイオセンサに応用する技術の開発

## (その2)

- 生体超分子を用いて合成された触媒ナノ粒子を利用したカーボンナノウォール の合成促進 -

熊谷慎也1) 竹田圭吾1) 平松美根男1)

1) 名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

ナノカーボン材料は、優れた電気的、機械的、化 学的性質を発揮することから、ナノテクノロジー研究 において欠かせない材料となっている。ナノカーボン 材料の例としては、カーボンナノチューブ、グラフェ ン、カーボンナノウォール等がある。例えば、カーボ ンナノウォールは燃料電池における電極材料として 用いられており、カーボンナノウォールに触媒ナノ粒 子を付着させることで、電池性能が向上することが報 告されている。

ナノカーボン材料は様々な手法で合成することが できる。化学気相堆積法、アーク放電、レーザーアブ レーション等の手法が用いられる。ナノカーボン材料 の合成効率を向上させるために、触媒材料が用いられ てきた。触媒はナノカーボン材料の成長核の生成を促 進することから、ナノカーボン材料の成長の起点を決 定しうるともいえる。従って、触媒をナノスケールで パターニングできれば、ナノカーボン材料をナノスケ ールで選択的に成長させることが可能になる。しかし ながら、触媒材料のナノパターンを従来のトップダウ ン的な加工手法を用いて作製するのは、容易ではなか った。

上記のトップダウン加工手法の一方で、原子・分 子をナノスケールで積みあげて構造を作り上げるボ トムアップ的な手法がある。近年、バイオミネラリゼ

ーション能を持つかご状タンパク質を用いたナノ粒 子の合成が報告されている。このかご状タンパク質の 中で有望なものが、アポフェリチンである(図1)。ア ポフェリチンは直径 12 nm の球殻状のタンパク質超 分子であり、内部に 6 nm のキャビティ (空洞)を持 つ。我々ヒトの血液の中にもこのアポフェリチンは存 在しており、内部のキャビティに鉄を貯蔵することで 血中の鉄分濃度を保つ役割を果たしている。このキャ ビティをナノ粒子合成のテンプレートとして用いる ことで、均一な大きさを持つナノ粒子を作製すること が報告されている[1]。これまでにアポフェリチンを用 いて様々な材料のナノ粒子が合成されており、その触 媒能を利用した材料合成や[2]、その電気特性を利用し た電子デバイス応用などが報告されている。本研究で は、このかご状タンパク質アポフェリチンで合成した 触媒ナノ粒子を用いて、カーボンナノウォールの生成 を試みたので報告する。



図 1 かご状タンパク質フェリチンの模式図。ナノ 粒子を内包するアポフェリチンをフェリチンと呼 ぶ。



図2シリコン基板上に吸着した Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 触媒ナノ粒子の合成

本研究では、アポフェリチンを用いて合成した Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子を使用した[3]。走査電子顕微鏡 (SEM) による観察像を図2に示す。かご状タンパク質部分は SEM では画像化されないため、内包された Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナ ノ粒子が白い輝点として観察される。

#### 2.2 シリコン基板上への触媒ナノ粒子の高密度吸着

基板として、熱酸化膜を有するシリコン基板を用い た。このシリコン基板の表面を、非熱平衡大気圧プラ ズマジェットを照射してクリーニングし、シリコン基 板表面の親水化を行った。

親水化処理後のシリコン基板に対して、Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ 粒子を内包するアポフェリチンの吸着を行った。熱酸 化膜を有するシリコン基板を液体中に入れると、表面 での解離反応の結果、基板表面はマイナスに帯電する。 一方、アポフェリチンの表面も中性 pH 付近ではマイ ナスに帯電する。これらのマイナスの表面電荷同士に よる静電的な反発によって、アポフェリチンのシリコ ン基板上への吸着は妨げられることになる。そこで、 アポフェリチンを確実に吸着させるために、静電的な 反発の抑制を行った。

液体中には様々な荷電粒子が存在し、電荷を持つ 表面が存在すると、それとは反対の電荷を持った荷電 粒子(対イオン)が集積し、表面電荷に起因する静電 ポテンシャルが遮蔽される。この静電遮蔽距離(Debye 長)は、液体中のイオン強度の関数になっており、次 式で表される。

$$\lambda = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r kT}{2e^2 l}} \tag{1}$$

ここで、*e*<sub>0</sub>は真空の誘電率、*e*<sub>r</sub>は比誘電率、*k*はボルツ マン定数、*T*は絶対温度、*e*は電荷素量、*I*は溶液のイ オン強度である。液体中での静電的な反発を抑制する には、この Debye 長を短くするとよい。そこで、 MES/Tris バッファを用いて、Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子を内包す るアポフェリチンを含む溶液のイオン強度を 100 mM に調節した。この条件のもとでは、Debye 長が約 1 nm となり、静電的な反発を大きく抑制できる[4,5] 。こ のアポフェリチンを含む溶液を表面親水化処理を行 なったシリコン基板上に滴下し、アポフェリチンを吸 着させた。その後、リンス、スピンドライを行った。 そして、アポフェリチンを吸着させた基板を SEM で 観察した。

## 2.3 プラズマ励起化学気相堆積法によるカーボンナノウ オールの合成

プラズマ励起化学気相堆積法 (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition: PECVD)を用いて、カーボン ナノウォールの合成を行った[6]。Co3O4 触媒ナノ粒子を 内包するアポフェリチンを吸着させた基板と、吸着させて いない基板を同じ真空チャンバの中に設置した。真空排 気を行い、基板を 600 °Cにまで加熱した。カーボンナノウ オールを生成させるため、CH4 および Ar ガスをそれぞれ 22.5 sccm、25 sccm のレートで導入し、プラズマ生成アン テナに RF 電力 500 W を加え、誘導結合プラズマを 30 s 間生成させた。



図3 シリコン基板上へのフェリチン吸着。(a) バッファ無し、(b) バッファ有り。

#### 3. 実験結果

#### 3.1 シリコン基板上への触媒ナノ粒子の吸着

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ粒子を内包するフェリチンの吸着時にお ける静電遮蔽距離の効果を評価した。結果を図3に示 す。SEM 観察ではタンパク質部分は観測されないた め、内包された Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ粒子のみが白い輝点として 観測される。バッファを用いて静電的な反発を抑制し たことで、フェリチンの吸着量が著しく向上している ことが分かる。フェリチンの吸着密度を評価したとこ ろ、図4に示すように、平均して4-5×10<sup>10</sup>個/cm<sup>3</sup> であった。

シリコン基板上への触媒ナノ粒子の吸着量をさら に増加させるため、フェリチンの複数回吸着を試みた。 一般的にタンパク部分は乾燥することで変質するた め、シリコン基板上に吸着したフェリチンが持つ負の



図4 シリコン基板上へのフェリチン吸着密度。



図 5 シリコン基板上へのフェリチン吸着。(a)吸着 1 回目、(b)吸着 2 回目、(c)吸着 3 回目。

電荷に起因する静電的な反発を抑制できるためである[5]。吸着回数を増やすごとに、図5に示すように吸着量が増加した。フェリチンの吸着プロセスを3回繰り返したところ、図6に示すように、吸着密度は最大で2×10<sup>11</sup>個/*cm*<sup>3</sup>に達した。

3.2 生体超分子由来 Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒子を用いたカー ボンナノウォールの合成

フェリチンの複数吸着を行って Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒



図 6 吸着回数に対するシリコン基板上へのフェ リチン吸着密度。

子の吸着量を増加させたシリコン基板を用いて、カー ボンナノウォールの合成を試みた。結果を図7に示す。

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒子を吸着させた基板で、カーボン ナノウォールが確認された。その大きさは 50-70 nm で ある。一方、Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒子を吸着させていない 基板では、カーボンナノウォールは観察されなかった。 文献 6 によると、触媒を用いない場合、カーボンナノ ウォールの初期成長核が形成されるのに 5 分かかる と報告されている。触媒ナノ粒子を用いることで、カ ーボンナノウォールの成長速度がおよそ 6 倍まで増 加したといえる。

#### 5. 結論

触媒ナノ粒子を用いることで、カーボンナノウォ ールの成長速度を促進することができた。触媒ナノ粒 子を基板上でパターニングすることで、基板上の狙っ た位置でカーボンナノウォールを成長させることが 可能になる。ナノカーボン材料を用いたバイオセンシ ングなどを作製する上で有効な技術である。

#### 謝辞

かご状タンパク質アポフェリチンは、大阪大学 山下一郎特任教授から提供いただいた。ここに感謝を 申し上げる。



図7 プラズマ励起化学気相堆積後のSEM 観察像。 (a) Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒子あり、(b) Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 触媒ナノ粒 子なし。

#### 参考文献

- I. Yamashita, K. Iwahori, S. Kumagai, Biochim. Biophys. Acta **1800**, (2010) pp.846-857.
- [2] S. Kumagai, T. Ono, S. Yoshii, A. Kadotani, R. Tsukamoto, K. Nioshio, M. Okuda, I. Yamashita, Appl. Phys. Exp. 3, (2010) 015101 (3 pages).
- [3] R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka, I. Yamashita, Bull. Chem. Soc. Jpn. 78, (2005) pp. 2075–2081.
- [4] K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, I. Fujiwara, K. Nishio, M. Okuda, N. Matsukawa, I. Yamashita, Jpn. J. Appl. Phys. 45, (2006) pp. 4259-4264.
- [5] K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, A. Miura, Y. Uraoka,
   T. Fuyuki, I. Yamashita, Jpn. J. Appl. Phys. 45, (2006)
   pp. 7549-7553.
- [6] M. Hiramatsu, Y. Nihashi, H. Kondo, M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 52, (2013) 01AK05 (6 pages).

# 1-3-2 ナノカーボン材料を VOC ガス浄化に応用する技術の開発

大脇健史1),飯干智哉1)

1) 名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

室内や車室内空間等の浄化または快適性の創出が 強く求められている。特に気体の有害物質として揮発 性有機化合物(volatile Organic Compounds, VOC) の除去が重要である。その除去方法としては、吸着剤 を使用する方法 [1,2]、また、光触媒[3,4]またはプ ラズマ等[5,6]を利用し分解除去する方法がある。吸 着材は、初期には優れた除去性能を示すものの、その 性能は徐々に低下してくる特性を有している。

一方、光触媒はふんだんに存在する太陽光または室 内光を利用し、VOC等の有機分子を酸化分解できる特 徴があり、生活部材や建築材に実用化されている。光 が酸化チタン等の光触媒に照射されると電子・正孔が 生成し、それらが還元力および酸化力を発現し、表面 に吸着した VOCを分解する。しかしながら、空気中に 存在する VOC は ppm 以下の低濃度であり、吸着剤ほど の捕集能力はなく、通常の環境では分解には時間を要 してしまう。また、プラズマによる分解除去では、プ ラズマによって生成した酸化活性種が直接 VOC を分 解し、脱臭装置に応用されている。しかし、分解力を 高めるためプラズマパワーを大きくすると、同時に有 害なオゾン等が生成してしまう点もある。

そこで、本研究では、高速に VOC ガスを分解するこ とを目指し、以下の手順で研究を進めた。最初に、吸 着材としてのナノカーボン材料および光触媒を組み 合わせたハイブリッド材料を作製し、ナノカーボン材 料による VOC の捕集濃縮と光触媒分解による除去能 の評価を実施した。続いて、VOC ガスをダイナミック に分解するため、光触媒にプラズマを組み合わせた場 合の除去効果を評価した。

#### 2. 実験方法

# 2.1 ナノカーボン材料・光触媒ハイブリッド材料作製および VOC 除去性能評価

ナノカーボン材料である活性炭(AC、活性炭素、 関東化学)またはカーボンナノチューブ(CNT、eDIPS INK、名城ナノカーボン)[7,8]を酸化チタン粉末 (ST-01、石原産業)と固形重量比で1:1にて、重 量がトータル1wt%になるように純水に混ぜ、分散、 攪拌した。その後固形分が0.1gになるようにシャー レにいれ、乾燥後、150℃にて熱処理し均一な薄膜 を得た。評価用のVOCガスとして、アセトアルデヒド (AA)およびトルエン(T)を使用した。除去性能を 評価するため、5Lテドラバッグを用い、上記の作製 した試料と共に、乾燥空気を導入し、それぞれ500ppm になるように濃度調整した。暗所にて24時間放置し、

その後 360nm の紫外光を 1 mW/cm<sup>2</sup>の強度で照射しな がら、AA または T の濃度変化をガスクロマトグラフ または検知管によって調べた。

#### 2.2 大気圧プラズマ複合化による VOC 除去性能評価

VOC ガス浄化をダイナミックに進めるため、光触媒 ハイブリッド材料と大気圧プラズマを組み合わせ、 VOC 除去性能を評価した。光触媒には酸化チタン粉末 (ST-01)をTiメッシュに担持し光触媒フィルタを作 製した。プラズマには DC 型を採用し、図1に示すよ うな評価装置を構築した。図1に示すように、40Lプ ロピレン容器内に、ファン、プラズマ電極、光触媒フ ィルタと構成し、発生したプラズマがファンによって



図1 光触媒及びプラズマによる VOC 分解評価装置

光触媒に届くように構成した。光条件としては UV 光 を 3mW/cm<sup>2</sup>の光強度で容器の外からガラス窓を通して 光触媒フィルタに照射した。プラズマ条件として-7.0 kV、 0.3 mA で放電させた。容器内を乾燥空気で置換 した後、40ppm になるように AA を注入した。AA 除去 性能は、VOC モニターによって逐次濃度測定すること によって評価した。同時に、オゾン濃度測定器(エム ケーサイエンティフィック、GT-903)および排ガス分 析計(ホダカ、HT-1300Z)によってオゾン濃度、NOx 濃度も測定した。

#### 3. 実験結果

### 3.1 ナノカーボン材料・光触媒ハイブリッド材料に よるVOC除去効果

ナノカーボン材料・光触媒ハイブリッド材料によ るアセトアルデヒドおよびトルエンの除去性能につ いて調べた結果をそれぞれ図2、3に示す。図2より、2 種類のハイブリッド材料ともにアセトアルデヒドガ スを一定量吸着するものの限界があり、光照射によっ て、急速に分解除去できることが分かった。特にAC・ 光触媒ハイブリッド材料は、CNT・光触媒ハイブリッ ド材料に比べ、約20倍分解速度は速いことが分かった。 また、図3より、AC・光触媒ハイブリッド材料は、ト ルエン吸着および分解に優れ、除去能が高いことが分 かった[9]。一方、CNT・光触媒ハイブリッド材料は吸 着・分解に劣った。今回使用したナノカーボン材料の 比表面積は、約1000m<sup>2</sup>/gであり、物理吸着能は高いこ とが予想されるが、それ以外にVOCガスの極性が影響 していることが確認できた。つまり、ナノカーボン材 料は非極性であるので、疎水性分子除去には有効であ ることが言える。しかしながら、CNTの吸着性は悪か った。これは、分子の大きさに対して、CNTの内径が 小さいためであると推察される[10]。



図2 ハイブリッド材料のアセトアルデヒド吸着・分 解特性



図3 ハイブリッド材料のトルエンの吸着・分解特性 また、CNT・光触媒ハイブリッド材料は、光照射下で の分解性もAC・光触媒ハイブリッド材料より低かった。 これは、AC・光触媒ハイブリッド材料は粉末混合で 分散性よく混合されていたのに対し、CNT・光触媒ハ イブリッド材料では、CNTが繊維上であるため、光触 媒上に混合された状態で、光吸収も阻害されたと推察 られる。

#### 3.2 大気圧プラズマ複合化によるVOC除去効果

ナノカーボン材料・光触媒ハイブリッド材料より さらに高速でVOC除去を行うために、大気圧プラズマ を光触媒に組み合わせ、VOC除去効果を調べた。図4 には、光触媒および大気圧プラズマの組み合わせ、ま たそれぞれ単独で働かせたときの容器内のAAガスの 濃度変化を示す。



#### 図4 光触媒およびプラズマ分解に伴うアセトアルデ ヒドガス濃度変化

図4より、光触媒および大気圧プラズマを同時に働 かせたときの分解速度が、光触媒または大気圧DCプラ ズマそれぞれ単独での分解速度の和より向上してい ることがわかった。この濃度変化率を式に示すと、

 $[AA] = [AA_0] e^{-kt}$ 

となり、ここで、[AA]は、アセトアルデヒド濃度、[AA  $_0$ ]はアセトアルデヒド初期濃度、 $_k$ は反応速度定数で ある。光触媒および大気圧プラズマによる分解の $_k$ は、 それぞれ0.041、0.020であり、その組み合わせ作動時 での $_k$ 値は0.12となり、明らかに相乗的に分解速度が 向上していることが分かった。

これまでにも、光触媒をプラズマ電極表面に固定 化したり、プラズマ放電部の中に光触媒を配置し、プ ラズマから発生する紫外光を利用する方法によって VOC分解が加速することが報告されている[11,12]。こ れらはプラズマによるオゾン等酸化活性種の生成と その活性種によるVOC酸化分解[13]およびプラズマに よって発生した紫外光照射下での光触媒による酸化 分解を合わせた分解効果として説明されている。一方、 本研究では、プラズマ放電部と光触媒を分離すること によって、上記で説明したように、それぞれの分解効 果を超える相乗効果が得られている。

### 3.3 光触媒および大気圧プラズマ複合化による相乗 的VOC除去効果の機構

3.2では、光触媒および大気圧プラズマを同時に作 動させたときの相乗的にアセトアルデヒドガスの分 解が速くなることを示した。その相乗効果の機構を調 べるため、大気圧プラズマ作動時に加え、光触媒およ び大気圧プラズマ同時作動時における、プラズマによ って発生するオゾンおよびNO<sub>x</sub>ガスの濃度を測定した。 図5および図6に、プラズマ作動時間に伴うオゾンおよ びNO<sub>x</sub>ガス濃度の変化を示す。





図6 プラズマ作動時間に伴うNOxガス濃度の変化 図5より、プラズマ作動時ではオゾン濃度は時間と

共に増加していき、数十ppmにまで達しているのに対し、光触媒にUVを照射した場合まったくオゾンは発生

しないことが分かる。これらの結果に対し、同時作動 時には、オゾン濃度は大幅に低く抑えられていること が分かる。また、図6からもわかるように、NOxの発生 においても、プラズマ作動時では時間と共に濃度は増 加していき、同時作動時には、NOx濃度は大幅に低く 抑えられている。Maciucaらの研究では[12]では、プ ラズマに光触媒を組み合わせると、オゾン濃度は減少 しているもの、プラズマ作動だけの条件に比べ半分程 度である。一方、本研究では、プラズマ発生部と光触 媒を分離したことにより、プラズマによって発生した 活性種であるオゾンおよびNOxの分解が光触媒表面に おいて促進したと推察される。その活性種の反応につ いて、まずプラズマにより、以下の反応が生じ、様々 な活性種が生成する[13, 14]。

 $0_2 + e^- \rightarrow 20 + e^-$ 

$$0_2 + 0 + M \rightarrow 0_3 + M$$
 (M:雰囲気ガス)

- $N_2 + e^- \rightarrow 2N + e^-$
- $N + O_2 \rightarrow NO + O$
- $NO + O + M \rightarrow NO_2 + M$
- $NO+O_3 \rightarrow NO_2+O_2$

プラズマのみ作動の時、上記の反応が進み、その中で 比較的寿命の長いオゾンおよびNOx(NO, NO<sub>2</sub>)の濃度が 増加していくと考えられる。プラズマ作動に加え、UV 光を光触媒に照射し光触媒機能も同時に働かせたと きは、さらに以下のような反応が光触媒表面で生じて いると考えられる。

光触媒反応として[4]、

 $(TiO_2) + h\nu \rightarrow h^+ + e^-$ 

- $e^- + 0_2 \rightarrow \cdot 0_2^-$
- $h^+ + H_2 0 \rightarrow \cdot 0H + H^+$
- オゾンおよび光触媒活性種との反応として[15,16]、
  - $\bullet 0_2^- + 0_3 \rightarrow 0_2 + \bullet 0_3^-$
  - $\bullet 0_3^- + H_2 0 \rightarrow \bullet 0H + 0H^- + 0_2$
  - $0_3 + \cdot 0H \rightarrow 0_2 + \cdot 00H$

NO<sub>x</sub>および光触媒活性種との反応として[17]、

 $NO + \cdot O_2^- \rightarrow NO_2^- + O$ 

#### $NO_2 + \cdot O_2^- \rightarrow NO_3^- + O$

このように、プラズマによって生成した活性種に加え、 比較的寿命の長いオゾンおよびNOx系の活性種から、 活性が高く寿命が短い・00H、・0が光触媒表面で生成 され、これらの活性種によってアセトアルデヒドガス の分解が加速されていると考えられる。

#### 5. 結論

本研究では、VOC 浄化を行うため、ナノカーボンお よび光触媒を組み合わせたハイブリッド材料を作製 し、VOC 除去能力を調べた。さらに、光触媒に大気圧 プラズマを組み合わせ、ダイナミックな VOC 浄化能力 を調べた。ナノカーボン材料・光触媒ハイブリッド材 料では、VOC ガスの極性により浄化特性に差異が生じ、 アセトアルデヒドガスに対してはナノカーボンの種 類によらず浄化できるのに対し、トルエンガスに対し ては活性炭・光触媒ハイブリッド材料では優れた浄化 能を有しているのに対し、カーボンナノチューブ・光 触媒ハイブリッド材料では浄化能は劣っていること が分かった。また、大気圧プラズマに光触媒を組み合 わせ、ファンによってプラズマによって生成した活性 種が光触媒に届く構成にした浄化システムでは、プラ ズマおよび光触媒によるアセトアルデヒドの分解が 相乗的に促進されることが分かった。その相乗的 VOC 除去効果の機構として、光触媒上でのオゾン及び NOx ガスのより活性が高い活性種への変換であると考察 された。

#### 参考文献

- X. Zhang, B. Gao, A. E. Creamer, C. Cao, and Y. Li, Journal of Hazardous Materials, 338, 102-123(2017).
- [2] X. S. Zhao, Q. Ma, and G. Q. Lu, Energy & Fuels, 12, 1051-1054(1998).
- [3] K. Hashimoto, H. Irie, and A. Fujishima, Jpn. J. Appl. Phys. 44, 8269-8285(2018).
- [4] Y. Nosaka and A. Nosaka, "Introduction to Photocatalysis", Royal Soc. Chem. (2016).
- [5] B.M. Penetrante and S.E. Schultheis, Non-thermal plasma Techniques for Pollution Control, NATO ASI

Series 34, Springer-Verlag (1993).

- [6] 水野彰, J. Plasma Fusion Res. 89, 145-151 (2013).
- [7] X. Zhao, M. Wang, M. Ohkohchi, and Y. Ando, Jpn. J. Appl. Phys. 35, 4451-4456 (1996).
- [8] J. Zhu, M. Yudasaka, M. Zhang, and S. Iijima, J. Phys. Chem. B 20, 108, 11317-11320 (2004).
- [9] R. Leary and A. Westwood, Carbon, 49, 741-772 (2011).
- [10] X. Zhao, Y.Liu, S. Inoue, T. Suzuki, R.O. Jones, and Y. Ando, Phys. Rev. Lett. 92, 125502 (2004).
- [11] K. Sekiguchi, A. Sanada, and K. Sakamoto, Catalysis Communication, 4, 247-252 (2003).
- [12] A. Maciuca, C.B. Dupeyrat, and T.M. Tatibouet, Applied Catalysis B: Environmental, 125, 432-438 (2012).
- [13] 小野亮、J. Plasma Fusion Res. 87, 302-312 (2011).
- [14] Ø. Skreiberg, P. Kilpinen, and P. Glarborg, Combust. Flame, 136, 501-518 (2004).
- [15] K. P. Yu, and G. W. Lee, Appl. Catal. B: Environmental, 75, 29-38 (2007).
- [16] T. Batakliev, V. Georgiev, M. Anachkov, S. Rakovsky, G E. Zaikov, Interdiscip Toxicol. 7, 47–59 (1998).
- [17] J. Lasek, Y. H. Yu, and J. C.S. Wu, J. Photochem. Photobiol. C, 14, 29-52 (2013).

## 1-3-3 ナノカーボン材料の安全性評価技術の開発

#### ーナノカーボン材料を薬物輸送体としての生体利用に資する安全性研究ー

灘井 雅行<sup>1)</sup> 朝居 祐貴<sup>1)</sup> 加藤 美紀<sup>1)</sup>

1) 名城大学 薬学研究科

#### 1. 緒 言

カーボンナノチューブ (CNT) はダイヤモンドやフ ラーレンなどと同様に炭素同素体のひとつであり、 1991 年に飯島によって発見された新規のナノカーボ ンである[1]。CNT は、生体透過性に優れた近赤外線を 吸収することで、発熱し、アポトーシスを誘導するた め、この性質を利用して抗腫瘍効果が期待されている [2]。また、CNT は広い表面積を有し、薬物や抗体等を 結合させることが可能であるため、標的部位への薬物 輸送担体としても有用とされている[3]。

これまでに、生体内に投与された単層カーボンナノ チューブ (SWCNT) はエンドサイトーシスなどで細胞 内に取り込まれ、肺、肝臓、脾臓に分布することが明 らかになっている[4,5]。しかし、SWCNT は化学的に安 定で難分解性であるために、環境および人体への蓄積 が懸念されている。従って、SWCNT を生体内投与した 場合の安全性や生体機能に及ぼす影響を明らかにす る必要がある。

体内に投与された薬物は、主に肝臓で薬物代謝酵素 により化学構造が変換される。この過程を代謝と呼ぶ が、代謝は主にシトクロムP450(CYP)が担う第I相 薬物代謝反応と、ウリジンニリン酸-グルクロン酸転 移酵素(UGT)、硫酸転移酵素などが担う第II相薬物代 謝反応があり、これらの薬物代謝酵素は薬物などの生 体外異物の代謝を担うだけでなく、ステロイドホルモ ンや胆汁酸などの生体内物質の代謝にも関与する。 CYP や UGT は、薬物に極性基を導入することで、薬物 の体外への排泄を促進する。また、これらの薬物代謝 酵素は外来異物などにより機能(酵素活性)が阻害さ れることや、発現が誘導されることが知られている。 薬物代謝酵素の誘導は、転写が亢進することで mRNA 発現量が増え、タンパク質量が増加し、薬物代謝酵素 活性が上昇すると考えられている。一方、併用薬物に よる薬物代謝酵素活性の阻害は、臨床において散見さ れる。薬物代謝酵素の阻害や誘導は、投与した薬物の 血中濃度を変動させ、さらには治療効果の変化や、副 作用発現を惹起する可能性がある。加えて、薬物代謝 酵素だけでなく、生体内での薬物の輸送に関わる薬物 トランスポーターの発現量の増加や減少も、生体内で の薬物のクリアランスを変化させ、薬効及び副作用発 現に影響を及ぼす可能性がある。

ー方、ナノカーボンを薬物輸送担体として用いるた めには、薬物の吸着および放出をコントロールするこ とが重要である。これまでにシプロフロキサシンなど の芳香環を有する薬物は、疎水性相互作用や共有結合 中の $\pi$ 電子と CNT の $\pi$ 電子との間に生じる $\pi$ - $\pi$ スタ ッキングにより CNT に吸着すること、また、CNT の種 類、溶液の pH などの条件を変化させた場合、シプロ フロキサシンの吸着量が異なることが報告されてい る[6,7]。

そこで本検討では、ナノカーボンを薬物輸送担体と して臨床応用するために、ナノカーボンが生体機能に 及ぼす影響について、以下の4点を明らかにすること を目的に検討した。

- 1. 薬物代謝代謝酵素の発現に及ぼす影響
- 2. 薬物代謝酵素活性に及ぼす影響
- 3. 薬物トランスポーターの発現に及ぼす影響
- 4. 薬物とナノカーボンの吸着挙動

なお、ナノカーボンとしてカーボンブラック、サッ カーボール状分子であるフラーレン-C<sub>60</sub>およびラグビ ーボール状分子であるフラーレン-C<sub>70、</sub>多層カーボン ナノチューブ (MWCNT) も併せて検討した。



図1. ナノカーボンの構造

表1. ナノカーボンの物理化学的特性

ナノカーホ゛ン	直径	長さ	純度	金属触媒残量
	(nm)	(µm)	(%)	(atom.%)
FH-P-SWCNT	0.88-	5-10	>90.0	2.32±1.13
SO-SWCNT	1. 42 1. 27– 1. 42	1-5	>90. 0	(サイ) 1. 03±0. 22 (ニッケル) 0. 26±0. 06 (イットリウム)
EC1.5-P- SWCNT	1.00- 2.00	5-10	>99. 9	NA
MWCNT	6-13	2.5-20	>98	<20,000 ppm
カーホ゛ンフ゛ラック	>50	—	>99. 0	NA
フラーレン-C <sub>60</sub>	0.71		>99. 9	NA
フラーレン-C <sub>70</sub>	0.80		>99.0	NA
			*#	

NA, not available. \*製品データシートより

#### 2. 実験方法

#### 2.1 ナノカーボンの分散方法

FH-P-SWCNT および SO-SWCNT は、名城ナノカーボン (Aichi, Japan)から購入した。これらの SWCNT は鉄 (FH-P-SWCNT)またはニッケルとイットリウム (SO-SWCNT)を触媒としてアーク放電方法よって合成され ている。カーボンブラック、フラーレン- $C_{60}$ およびフ ラーレン- $C_{70}$ 、MWCNT は、シグマアルドリッチ (St. Louis, MPO, USA)から購入した。 超音波ホモジナイザー (VC-505, Sonics and Materials, Newtown, CT, USA)を使用してSWCNTを 1% カルボキシメチルセルロース (CMC) あるいは細胞 培養液に分散したが、最大分散濃度は1.0 mg/mL であ った。従って、全てのナノカーボンは、1.0 mg/mL 溶 液を調製して、実験に供した。

#### 2.2 SWCNTによる薬物代謝酵素の発現変動

本検討は、名城大学動物実験委員会の承認のもと、 実施した。ラット肝細胞は常法に従い作製した。ヒト 肝細胞 (Inducible-Qualified Human Cryohepatocytes, Lot No. 303, Donor No. HFC 476, 白人, 52歳, 女性, 非喫煙)はBD Biosciences (Franklin lakes, NJ, USA)から購入した。12ウェル プレートに播種した肝細胞に100 µg/mL SO-SWCNT分 散液を24時間曝露した。その後、肝細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)のプロトコー ルに従ってtotal RNAを抽出し、RT<sup>2</sup> First Strand Kit (QIAGEN) を用いてcDNAを合成した。96 well RT<sup>2</sup> Profiler PCR array System (Human Drug Metabolism : Phase I EnzymesもしくはPhase Ⅱ Enzymes, QIAGEN) を用い、リアルタイムPCRを行った。 内在性コントロールには5つのハウスキーピング遺伝 子から、Ct値の変動の小さい遺伝子を自動選択した。

#### 2.3 ナノカーボンによる CYP 酵素活性の変動

酵素源として用いた50人のドナーからプールされ たヒト肝ミクロソームは、コーニング (Corning, NY, USA) から購入した。酵素反応は以下のように行った。 最終濃度が、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)、 0.1 mg/mL ヒト肝ミクロソームタンパク質、0.1 mg/mL ナノカーボン、NADPH生成系 (最終濃度:2.8 mM  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、 10 mM 塩化マグネシウム、50 mM グルコース-6-リン 酸、10 U グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) に なるよう反応溶液を調製した。基質を添加し、37℃で インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを加 えることで反応を終結した。その後、4℃、21,000 g で10分間遠心分離し、上清をシリンジフィルターに通 した。得られた溶液中の代謝物を液体クロマトグラフ ィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS)もしくは高速 液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて定量した。

LC-MS/MSは、LCとしてProminence (島津製作所, Kyoto, Japan) を、MS/MSとしてAPI4000 (SCIEX, Framingham, MA, USA) を使用した。なお、分析カラ ムはInertsil ODS-3 (3  $\mu$ m, 2.1×100 mmあるいは 2.1×50 mm, GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いた。 試料のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法で 行い、多重反応モニタリングで検出した。HPLCでは、 分析カラムとしてCosmosil 5C18-MS-II (5  $\mu$ m, 4.6 ×150 mm, ナカライテスク, Kyoto, Japan) を使用 した。

コントロールには分散溶媒である1% CMCを用い、最 終濃度が0.1%になるように加えた。なお、0.1% CMCは CYP酵素活性に影響を及ぼさないことを確認した。ま た、反応液中の有機溶媒の濃度は0.1%以下になるよう に実験を行った。

なお、用いた基質と代謝物は以下の通りである。

基質	最終濃度	代謝物	
	(µM)		
フェナセチン	50	アセトアミノフェン	
クマリン	50	7-水酸化クマリン	
ブプロピオン	30	水酸化ブプロピオン	
ハ゜クリタキセル	20	6α-水酸化パクリタキセル	
トルフ゛タミト゛	100	4-水酸化トルブタミド	
S-メフェニトイン	20	4'-水酸化メフェニトイン	
デ゛キストロメトルファン	5	デ゛キストロルファン	
ミタ゛ソ゛ラム	5	1'-水酸化ミダゾラム	
テストステロン	50	6β-水酸化テストステロン	

表 2. CYP 酵素反応における基質と代謝物

#### 2.4 ナノカーボンによる UGT 酵素活性の変動

酵素源として用いた50人のドナーからプールされ たヒト肝ミクロソームは、コーニングから購入した。 酵素反応は基本的には次のように行った。最終濃度が、 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)、5 mM 塩化マグネ シウム、25 µg/mL アラメチシン、0.01-0.1 mg/mL ヒ ト肝ミクロソームタンパク質、0.1 mg/mL ナノカーボ ン、3 mM ウリジン-5'-ジホスホグルクロン酸になる よう反応溶液を調製した。基質を添加し、37℃でイン キュベートした後、3分間煮沸あるいは60% 過塩素酸 を添加することで反応を終結した。その後、4℃、 21,000 gで10分間遠心分離し、上清をシリンジフィル ターに通した。得られた溶液中の代謝物をLC-MS/MSを 用いて定量した。

コントロールには分散溶媒である1% CMCを用い、最 終濃度が0.1%になるように加えた。なお、0.1% CMCは UGT酵素活性に影響を及ぼさないことを確認した。ま た、反応液中の有機溶媒の濃度は1%以下になるように 実験を行った。

表 3. UGT 酵素反応における基質と代謝物

基質	最終濃度	代謝物	
	(µM)		
β ーエストラシ゛オール	5	β -エストラシ゛オール 3ーク゛ルクロン	
		酸抱合体	
セロトニン	100	セロトニングルクロン酸抱合体	
フ゜ロホ゜フォール	5	プロポフォールグルクロン酸抱合	
		体	

#### 2.5 SWCNTによる薬物トランスポーターの発現変動

ヒト大腸癌由来Caco-2細胞を10 mm ディッシュに 播種し、100 µg/mL SWCNT分散液(EC1.5-P-SWCNTまた はSO-SWCNT)を72時間曝露した。その後、2.2に準じて 細胞からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。96 well RT<sup>2</sup> Profiler PCR array System (Human Drug Transporter)を用い、リアルタイムPCRを行った。

#### 2.6 ナノカーボンと薬物の吸着

抗菌薬をpH が異なる0.1 mg/mL ナノカーボン分散 液中に溶解し、室温で1時間振とうした後、遠心分離 し、上清中の薬物濃度をHPLCにて測定した。なお、コ ントロールとして、CNTの分散に用いた0.01%CMC溶液 を用いた。CNT 1 gに対する薬物の吸着量はCNT分散液 中およびCMC溶液中の薬物濃度から算出し、Langmuir の吸着等温式を用いて解析することにより飽和吸着 量およびLangmuir係数を算出した。

#### 3. 実験結果

#### 3.1 SWCNTによる薬物代謝酵素の発現変動

SWCNT 曝露によるラット肝第 I 相薬物代謝酵素の変 動を、PCR アレイを用いて網羅的に解析した (図 2)。 その結果、CYP やアルデヒド脱水素酵素などの発現が 減少したことが明らかとなった。CYP には数多くの分 子種が存在し、薬物の代謝に関わっているが、それら の多くは SWCNT 曝露により発現が減少することが示 された。

また、ヒト肝細胞を用いて検討を行った結果(図3)、 ラット肝細胞と同様に CYP やフラビン含有モノオキ シゲナーゼの発現低下が認めれた。加えて、アルコー ル脱水素酵素の遺伝子発現も低下した。ヒト肝細胞で は、CYP 分子種の中でも CYP1A1 や CYP1A2 の発現低下 が顕著であった。



図 2. SWCNT によるラット肝第 I 相薬物代謝酵素の発現 変動

一方で、SWCNTの曝露により遺伝子発現の有意な増加が認められたものは、ラット肝細胞では3遺伝子、

ヒト肝細胞では1遺伝子のみであった。

次に、SWCNT 曝露によるラット肝第Ⅱ相薬物代謝酵素の変動を、PCR アレイを用いて網羅的に解析した(図 4)。







Log<sub>2</sub> (Fold change of SWCNT/Control)

図4.SWCNT によるラット肝第II 相薬物代謝酵素の発現 変動

その結果、UGTや硫酸転移酵素の一部の発現が低下す る傾向が認められたが、コントロールと比較して1/2 以下に有意に減少したものは認められなかった。また、 1遺伝子のみが2倍以上に有意に増加した。従って、第 Ⅱ相薬物代謝酵素は第Ⅰ相薬物代謝酵素と比較し、 SWCNT曝露による影響が小さいことが示された。

#### 3.2 ナノカーボンによるCYP酵素活性の変動

ナノカーボンによる各CYP分子種の残存酵素活性を 図5に示した。CYP1A2の指標活性であるフェナセチン 0-脱エチル化酵素活性、CYP2A6の指標活性であるクマ リン7-水酸化酵素活性は、コントロールと比較してナ ノカーボンによる変動は認められなかった。CYP2B6の 指標活性であるブプロピオン水酸化酵素活性、CYP2C8 の指標活性であるパクリタキセル6α-水酸化酵素活 性は、ナノカーボン存在下においても、80%以上の残 存活性を維持した。CYP2C9の指標活性であるトルブタ ミド4-水酸化酵素活性、CYP2C19の指標活性であるS-メフェニトイン4'-水酸化酵素活性は、コントロール と比較してナノカーボンによる変動は認められなか った。CYP2D6の指標活性であるデキストロメトルファ ン0-脱メチル化酵素活性は、SO-SWCNTにより残存活性 が60%に減少した。CYP3A4およびCYP3A5の指標活性で あるミダゾラム1'-水酸化酵素活性は、SO-SWCNTによ り55%に有意に減少した。さらに、CYP3A4およびCYP3A5 の他の指標活性として用いたテストステロン6β-水 酸化酵素活性は、SO-SWCNTにより残存活性が75%に減 少した。

FH-P-SWCNT、カーボンブラック、フラーレン-C<sub>60</sub>お よびフラーレン-C<sub>70</sub>は、本研究で検討した全ての酵素 活性に対し、影響を及ぼさなかった。

#### 3.3 ナノカーボンによるUGT酵素活性の変動

ヒト肝ミクロソームを酵素源とした場合、主として UGT1A1 により触媒されるβ-エストラジオール 3-グ ルクロン酸抱合活性は、FH-P-SWCNT と EC1.5-P-SWCNT により減少したが、主として UGT1A9 により触媒され るプロポフォールグルクロン酸抱合活性は増加した ことから、SWCNT が肝 UGT 酵素活性に及ぼす影響はUGT 分子種により異なると考えられた。また、UGT1A6 によ り触媒されるセロトニングルクロン酸抱合活性は、 EC1. 5-P-SWCNT により減少した。カーボンブラックや フラーレン-C<sub>60</sub> やフラーレン-C<sub>70</sub> を用いて同様に検討 したところ、SWCNT とは異なる挙動を示したため、ナ ノカーボンの種類により UGT 酵素活性に与える影響 が異なることが示された。



**図 5. ナノカーボンによる CYP 酵素活性の変動** CYP3A4/5 (M)はミダゾラム 1'-水酸化酵素活性、 CYP3A4/5 (T)はテストステロン 6 β-水酸化酵素活性の 結果を示す。

#### 3.4 SWCNTによる薬物トランスポーターの発現変動

EC1.5-P-SWCNT、SO-SWCNTの曝露により、大きな発現 変動が認められた薬物トランスポーターはほとんど なかった。従って、SWCNTは薬物トランスポーターよ りも薬物代謝酵素に対して影響を与えることが示さ れた。

#### 3.5 ナノカーボンと薬物の吸着

抗菌薬について、異なる pH 条件下での SWCNT ある いは MWCNT への吸着挙動について検討したところ、 SWCNT と MWCNT への吸着率に差異が認められる薬物が 存在すること、また、吸着は pH の影響を受ける場合 があることが明らかとなった。

#### 4. 結論

SO-SWCNT は CYP1A2 をはじめとする第 I 相薬物代謝 酵素の発現に影響を与えると考えられるため、SO-SWCNT を薬物輸送担体として臨床応用する際には、第 I 相薬物代謝酵素の発現変動に注意する必要がある ことが示唆された。一方で、SO-SWCNT は CYP2D6 や CYP3A4/5 酵素活性を弱いながらも阻害することが明 らかになったため、影響を評価する際に、薬物代謝酵 素の発現量だけでなく、酵素活性についても注意する 必要がある。しかし、酵素活性の阻害作用は FH-P-SWCNT では認められなかったため、同じ SWCNT でも物 理化学的性質が異なると及ぼす影響は異なることが 明らかになった。さらに、他のナノカーボンでは酵素 活性の阻害作用は認められなかったため、ナノカーボ ンにより生体に与える影響は異なることが示された。 一方で、SWCNT により第Ⅱ相薬物代謝酵素の発現は大 きく変動しなかったが、酵素活性を阻害あるいは亢進 したため、薬物代謝酵素の違いによっても影響が異な ると明らかになった。また、SWCNT に関しては薬物代 謝酵素への影響があると考えられるが、薬物トランス ポーターに対してそれほど大きな影響を及ぼさない と示唆された。また、薬物の CNT への吸着は、CNT の 種類や溶液の pH の変化により変動するため、ナノカ ーボンの種類の選択や生体内での pH が吸着量をコン トロールする上で重要な要因であることが明らかと なった。

しかし、ナノカーボンを薬物輸送担体としてを生体

内に投与した際の、肝臓などの臓器における曝露濃度 は不明であり、本研究に用いたナノカーボン濃度はド ラッグデリバリーシステムにおける薬物輸送担体と してに使用する想定濃度と比較すると非常に高濃度 であることが予想される。今後は実際に生体に投与さ れうるナノカーボン濃度の決定を含め、使用される濃 度付近におけるヒト *in vitro* あるいは *in vivo*での 更なる検討が望まれる。

(これらの成果は現在投稿中もしくは投稿準備中の雑誌 論文の内容の一部に対応する。)

#### 参考文献

- [1] S. Iijima. Nature. 354, 56-58 (1991).
- [2] N. W. Kam, M. O'Connell, J. A. Wisdom, H. Dai. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.102, 11600-11605 (2005).
- [3] Z. Liu, A. C. Fan, K. Rakhra, S. Sherlock, A. Goodwin, X. Chen, Q. Yang, D. W. Felsher, H. Dai. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48, 7668-7672 (2009).
- [4] J. V. Veetil, K. Ye. Biotechnol. Prog. 25, 709-721 (2009).
- [5] S. Yang, W. Guo, Y. Lin, X. Deng, H. Wang, H. Sun, Y. Liu, X. Wang, M. Chen, Y. Huang, Y. Sun. J. Phys. Chem. 111, 17761-17764 (2007).
- [6] M. C. Ncibi, M. Sillanpaa M, J. Hazard. Mater. 298, 102-110 (2015).
- [7] H. Li, D. Zhang, X. Han, B. Xing. Chemosphere. 95, 150-155 (2014).

# 2. プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー

2-1 環境センシング及び殺菌浄化技術の開発

# 2-1-1 プラズマ技術を用いた環境センシング技術の開発

太田 貴之 伊藤 昌文

名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

物質はすべて元素からできているので、構成する元 素の種類と量を決定することはきわめて重要であり、 安心・安全な社会を実現するために、環境センシング 技術の向上は近年ますます重要になっている。例えば、 鉱山や工場からの排水、電子機器等の廃棄物に含まれ る金属が土壌や河川、地下水に溶出することにより環 境が汚染される可能性がある。また、金属元素は人体 に対してアレルギー性・催奇性・発癌性を示すものが 多く、土壌に溶出した金属元素を吸収した農作物の摂 取や金属元素を含んだ飲料水の摂取により人体にも 悪影響を及ぼす危険性がある。このような現状から汚 染源の早期発見と汚染物質の特定が必要不可欠であ る。また食品・農業分野では、農作物の高付加価値化 や輸入農産物の差別化などが注目されており、高品質 で栄養価の高い農作物の需要が高まっている。高品質 で高栄養価、かつ大量生産を行うために欠かせないの が肥料の存在である。肥料は作物が生育していく上で 必要な元素(ミネラル)を補うことができ、作物の生 育には必要不可欠なものである。しかし、この肥料の 散布量を見極めるのが難しく、過剰もしくは不足な量 であると成長段階で葉や茎が変色・変形などといった 障害が生じ、正常に育たない恐れがある。この問題を 解決するために、肥料中の成分分析を迅速に行い定量 することが必要となる。

現在の元素の分析法として原子吸光分析法や ICP 発光分光分析法などが挙げられる。これらの装置は大 型で測定試料の前処理が必要などの欠点があり、これ も現地で迅速な測定には向いていない。これらの欠点 を解決するためには小型であり、現地で迅速な元素の 含有量がわかる装置が求められる。

非平衡大気圧プラズマは、大気圧下で生成可能であ るため減圧機構が不要であり、比較的温度上昇が低い ため冷却機構も不要である。これらのことから装置の 小型化が期待できる。また、高い電子密度を得られ、 試料の原子化及び発光効率が向上するため、試料の前 処理を簡略できる可能性がある。これらの利点から現 場での簡易分析が可能になると考えられる。

本研究の目的は、非平衡大気圧プラズマを用いた元 素装置の開発を目指し、銅(Cu)の標準溶液を用いた検 出感度の検討と、様々な分野に応用することを念頭に 種々の試料の分析を試みた。

#### 2. 実験方法

図1及び2に非平衡大気圧プラズマを用いた元素分 析装置の概略図と写真を示す。本装置はプラズマ源と 試料を保持する電極から成り、プラズマ源は電極とガ ス導入管で構成されている。ガス導入管からArガスを 流し、プラズマ源と下電極間に9kVの交流電圧を印加 すると空気の絶縁破壊が起こり放電する。このとき、 試料はプラズマにより原子化される。同時に、その一 部がプラズマのエネルギーにより励起状態になった 後、基底状態に戻るときに発光する。発光波長は試料 に含まれる元素に固有であるため、この発光スペクト ルを測定することで含有元素の同定と定量が実現さ れる。試料元素の発光をレンズで集光し、光ファイバ から分光器に導入した。

#### 3. 実験結果

過剰摂取すると嘔吐や下痢を引き起こす危険性の ある Cu の標準試料溶液をサンプルとして、検出感度 の検討を行った。図 3 に、濃度 0.1[ppm]に調整した Cu の標準試料溶液の発光スペクトルを示す。波長 324.8 [nm]と 327.5[nm]に Cu の発光スペクトルが得ら れ、濃度 0.1[ppm]の分析が可能であることが確認され た。図4に波長324.7[nm]のCu発光強度のCu標準試 料溶液の濃度依存性を示す。Cu 濃度にともなって Cu 発光強度が増加することがわかる。発光強度は原子数 密度と比例関係があるため、濃度が大きくなるとプラ ズマ中の Cu 原子の数が増えたためであると考えられ る。Cu 発光強度と濃度の関係から検量線を作成し、 傾き 6.08[a.u. /ppm]と標準偏差 11.82[a.u.]から統計的 な相関係数は0.975、検出限界は5.8 [ppm]となった。 検出限界は傾きを大きくすること, データのばらつき を示す標準偏差を小さくすることで改善できる。

様々な分野に応用することを念頭に種々の試料の 分析を試みた。農作物の高付加価値化や不足しがちな 栄養素を補いたいというニーズから、スーパーマーケ ットなどの現場で迅速に元素分析を行い、ミネラル成 分のパッケージ表示を行いたいというニーズがある ため、高い栄養分を含有するトマトを試料として検討 した。図5から7のように、トマトに含有されるMg、 Ca、Kの発光スペクトルが、それぞれ 284.4[nm]、 422.6[nm]、766.7[nm]の発光波長において得られた。 原子吸光装置で定量を行ったところ、それぞれの含有 量は110[ppm]、60[ppm]、2280[ppm]であり、本装置に より実トマトサンプルを対象とする分析が可能であ ることを示した。

近年、気温や湿度など作物が成長していく環境を人 工的に整え、季節や天候に左右されない生産法として 植物工場が注目されている。植物工場において、安定 した供給、収量改善、高品質な作物作りを達成するた めには、植物工場で用いられる液体肥料成分のモニタ リングが重要となる。

図 8 に植物工場を想定した大気圧プラズマを用いた 元素分析装置の写真を示す。試料供給ポンプにより液 体肥料を流路に供給し、流れている液体肥料に対して 大気圧プラズマ照射を行い、元素分析を行った。測定 試料として株式会社ハイポネックスジャパンの「ハイ ポネックス原液」を用いた。ハイポネックス原液は、 薄めて使うタイプの液体肥料であり、濃度調整が可能 である。主な成分は、窒素 6%、リン酸 10%、カリウ ム 5%である。本実験では、肥料の三大要素の1つで あり、根や茎を強くし耐病性を高める、開花や結実を 促進させるカリウム(K)と、作物中の酵素活性化や光 合成の効率化など作物の生育を助ける働きをするナ トリウム(Na)に注目した。

図9と10のように、液体肥料に含有される Na と K の発光スペクトルが、それぞれ 588.9 [nm]と 766.7[nm] の発光波長において得られた。また、標準試料溶液を 用いて評価した Na と K の相関係数はそれぞれ 0.991 及び 0.985 と 1 に近い値となり、検量線の直線性や濃 度と発光強度の相関性が強いことを確認することが できた。検出限界は、それぞれ 6.4[ppm]及び 5.4[ppm] となり、植物工場を想定した液体肥料の環境モニタリ ングに十分であることが明らかになった。

#### 4. 結論

本研究では、環境・食品・農業等の分野で要求され ている作業現場で簡易・迅速に元素が可能な装置の開 発を目指した。装置の小型化や試料の原子化及び発光 効率の向上が期待できる非平衡大気圧プラズマに着 目した。

銅(Cu)の標準溶液を用いて評価した結果、濃度 0.1[ppm]に検出が可能であった。検出限界は、どの元 素でも概ね数[ppm]オーダーが実現できることが明ら かになった。

本装置の応用を想定して、トマトや液体肥料の直接 分析を行い、応用可能であることを示した。各応用や

60

試料に適切な試料保持方法やプラズマの照射条件な どを確立することで、測定精度や検出感度を向上させ ることができる。



元素分析装置の概略図







図2 非平衡大気圧プラズマを用いた元素分析装置の写

真

Cu標準試料溶液の濃度依存性



図5 トマトの発光スペクトル(Mg)







図7 トマトの発光スペクトル(K)



図8 植物工場を想定した元素分析装置の写真



図9 液体肥料の発光スペクトル(Na)



図10 液体肥料の発光スペクトル(K)

# 2-1-2 ナノカーボン材料を用いた環境センシング技術の開発

太田 貴之 伊藤 寛納 平松 美根男

名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

近年、医療や農業の分野で非平衡大気圧プラズマを 用いた応用研究(プラズマによる止血や植物の成長促 進等)が盛んに行われている。そこで、生体分子(ア ミノ酸やタンパク質等)の反応を解明することが重要 になっている。生体分子の分析手法である質量分析法

(MS)は、生体組織中の複数の生体分子を一度に同 定でき、プロテオーム解析 (タンパク質の機能や構造 を解析する研究)に必須のツールである。質量分析法 では測定対象分子を脱離/イオン化する必要があるが、 生体試料に対してはイオン化過程におけるダメージ を抑える必要があるため、ソフトイオン化という手法 が用いられる。代表的なソフトイオン化法には、マト リックス支援(MA)レーザー脱離/イオン化(LDI) 質量分析法が挙げられる。Fig. 1(a)に MALDI-MS の概 略図を示す。MALDI-MS は試料を有機溶媒(マトリ ックス)に混合することで、LDIを促進することがで きる。タンパク質等の高分子 (m/z<10,000) 領域まで 測定できるが、有機マトリックス自身による信号が低 質量領域で観測され(m/z<700)、これらの信号がアミ ノ酸(m/z<250)などの信号と重なり解析が困難にな るという問題があった。

そこで、本研究では表面支援(SA) レーザー脱離/ イオン化質量分析法に着目した。Fig. 1(b)に SALDI-MSの概略図を示す。SALDI-MSは、表面支援 材料を用いることによって試料のLDIを促進させる ソフトイオン化手法であり、適用する表面支援材料の 種類や構造によってマススペクトルや測定感度に影 響を与える。これまでに報告された SALDI-MSの研 究では、表面支援材料として白金ナノ粒子[1]や白金ナ ノフラワー[2]等の無機ナノ材料が主に用いられてい る。また、LDI-MS ヘカーボン材料を適用した研究で は、カーボンナノチューブ[3]等が用いられている。こ れらの材料を用いた場合には、表面支援材料のフラグ メントが現れること、試料の信号に金属イオンが付加

([M+Na]<sup>+</sup>、[M+K]<sup>+</sup>)されて検出されることなどの問 題点があり、プロトン付加イオン([M+H]<sup>+</sup>)として の検出や支援材料のフラグメントを抑制する必要が ある。

そこで、SALDI-MS の新規表面支援材料としてカー ボンナノ材料であるカーボンナノウォール (CNWs) を検討した。CNWs は、数層のグラフェンが基板に対 して垂直に立つ構造を持ち、照射レーザーの電場の局 在化により試料のイオン化を促進することが期待で きる。また、NWs は 266[nm]近傍に極大吸収波長を持 ち、レーザーエネルギーを吸収した CNWs から放出 される電子により試料のイオン化を促進することが 期待できる

本研究では、CNWs 基板を表面支援材料として用いた SALDI-MS の開発を目指した。また、CNWs の親水 化処理による検出感度向上を試みた。

#### 2. 実験方法

Fig. 2にSALDI-TOF-MSシステムの概略図を示す。 LDI用パルスレーザーとしてNd: YAGレーザー(波 長:266nm、周波数:30Hz、パルス幅:2ms)を用い た。レーザーエネルギーはNeutral Density(ND)フィ ルタを用いて調整した。チャンバー内に試料基板を設 置し、レーザー照射により基板上の試料を脱離/イオ ン化させた。イオン引込み部により印加された負電圧 によりイオンは飛行時間(TOF)チャンバーに引込ま れる。マイクロチャンネルプレート(MCP)でイオン を検出し、その信号をオシロスコープで観測した。 TOFチャンバーにリフレクトロンを設置することに より飛行時間の高分解能測定を可能にした。

Fig. 3にシリコン基板上に成膜したCNWsのSEM像 を示す。CNWsは誘導結合型プラズマを用いたplasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) 法により 合成した。実験条件はRF電力:550W、Ar/CH4ガス: 20/50sccm、圧力:23mTorr、成膜温度:720℃、成長 時間1時間[4]であり、高さは約1.5μmであった。

Fig. 4に試料作製の手順を示す。アミノ酸を超純 水に溶解し、溶液の濃度を50mMに調整し、SiとCNWs 基板上に塗布し大気圧下で乾燥させて使用した。試料 にはアミノ酸のアルギニン、チロシン、グリシンを用 いた。

#### 3. 実験結果

Fig. 5 にアルギニン (Arg) のマススペクトルを示す。 CNWs 基板を用いた場合、約 175m/z の位置に[アルギ ニン+H]<sup>+</sup>として検出できた[5]。112 及び 115m/z の位 置に検出された信号は、アルギニンを塗布しない場合 には検出されていないことからアルギニンのフラグ メントであると考えられる[6]。アルギニンを塗布しな い CNW 基板で、CNWs を構成するグラフェンの炭素

(Cn) 由来の信号が 12m/z 間隔で観測された。Si 基板 を表面支援材料として用いた場合、アルギニンの信号 は観測されなかった。以上の結果より、CNWs を表面 支援材料に用いることによって質量分析測定ができ ることを示した。

チロシン (Tyr) 及びグリシン (Gly) のマススペ クトルをそれぞれ Fig. 6、 7 に示す。182 m/z 及び 76m/z の位置に、それぞれチロシンとグリシンのフラ グメントが観測された[7]。 Fig. 8 に親水処理した CNWs 基板を用いた試料作製 の手順を示す。CNWs の親水処理は大気圧プラズマに より行った。照射条件は、印加電圧:6kV、Ar ガス: 1.5sccm、照射時間:30ms、照射距離:5mm とした。 基板上にアルギニン水溶液を塗布し、SALDI-MS 測定 を行った。

Fig.9に親水処理した CNWs 基板を用いたアルギニ ンのマススペクトルを示す。縦軸は Si (=28m/z) の信 号強度で規格化した。Table 1に信号強度と S/N 比に ついてまとめた。レーザーエネルギー0.60mJ において 親水処理の有無を比較すると、親水処理によって信号 強度が約5倍程度増大した。親水処理有りにおいてレ ーザーエネルギーを変化させると、0.13mJ (S/N 比 10.1) で信号強度が最も高くなったがノイズも大きく なった。0.23mJ では高い S/N 比 17.8 が得られたこと から、分析に適切なレーザーエネルギーを調整する必 要があることが分かった。また、親水処理ありの基板 を用いた場合、158m/z の位置にアルギニンのフラグ メントも観測され、測定感度が向上されることを示し た。親水処理の効果として OH 基の表面修飾が考えら れる。Fig. 10 にプロトン付加イオン生成の概略図を示 す。試料を基板に滴下すると、試料は CNWs 基板表 面の OH 基と結合する。LDI によってこの OH 基から H+が供給されてプロトン付加イオンは生成される。 プラズマ照射により親水処理を行うことで、CNWs 基 板表面に OH 基が多量に付着し、これにより、アルギ ニンのプロトン付加イオンの生成量が増大し[8]、測定 感度が向上したと考えられる。

#### 4. 結論

本研究では、CNWs を表面支援材料に適用した SALDI-MS 装置により生体分子の測定と測定感度向 上を行った。得られた知見は以下のようである。 (1) CNWs を表面支援材料に用いた SALDI-MS により アミノ酸の質量分析測定が可能であることが示され た。

64

(2)本手法では、得られた信号は金属付加イオンではな くプロトン付加イオンとして検出された。
(3) CNWs に親水処理を施すことでアルギニンの信号 強度が向上した。これは、アルギニンに付加するプロ トンの量が増大したことが考えられる。

#### 参考文献

- [1] T. Yonezawa et al., Anal. Sci., 25, 339-346 (2009).
- [2] H. Kawasaki et al., J. Phys. Chem., 111, 16278-16283 (2007).
- [3] S. Xu et al., Anal. Chem., 75, 6191-6195 (2003).
- [4] H. Watanabe et al., J. Appl. Phys., 51, 01AJ071-01AJ074 (2012).
- [5] R. J. Beuhler et al., J. Am. Chem. Soc., 12, 3990-3999 (1974).
- [6] M. W. Forbes et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 18, 1959-1966 (2007).
- [7] J. Zhao et al., Int. J. Mass Spectrom. 255, 265-278 (2006).
- [8] T. Yao et al., Int. J. Mass Spectrom., 291, 145–151 (2010).



Fig. 1 Schematic diagram of (a) MALDI (b) SALDI.



Fig. 2 Schematic diagram of SALDI-TOF-MS system.

(a) (b)

Fig. 3 SEM image of CNWs

(a) top view (b) cross section a view.



Fig. 4 Sample preparation.



Fig. 5 Mass spectra of arginine.



Fig. 6 Mass spectra of Tyrosine.



Fig. 7 Mass spectra of Glycine.



Fig. 8 Sample preparation with hydrophilic treatment.



Fig. 9 Mass spectra of Arginine with or without hydrophilic

Table 1 Normalized signal intensity of arginine and signal-to-noise (S/N) ratios.

Hydrophilic treatment Laser energy (mJ)		Normalized intensity of arginine	S / N ratio
Without	0.60	0.18	9.0
With	0.60	0.87	6.7
With	0.23	1.60	17.8
With	0.13	2.80	10.1



Fig. 10 Production Mechanism of protonated ions.

# 2-1-3 プラズマ技術を用いた難分解物質浄化技術の開発

太田 貴之 大澤 郁実 木野 裕也 名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

近年、湖沼を水道水源とする場所では湖沼に流れ込 んだ工業廃水などに含まれる難分解性有機物の存在 が懸念されている。現在、浄水処理場での汚染水に溶 存する有機物の分解には、塩素やオゾンが用いられて いることがほとんどであるが、難分解性有機物は塩素 やオゾンの酸化力によって分解除去することは極め て難しく、また発がん性を指摘されるトリハロメタン などの有害物質を生成してしまう可能性がある。そこ で、難分解性有機物を分解することができる強い酸化 力を有すOHラジカルやOラジカルなどの活性酸素を 用いた新しい水処理法が注目されている。活性酸素を 用いた促進酸化法のうち、間接方式はオゾンや過酸化 水素、紫外線などを併用することで活性酸素を生成し て水処理を行う。一方、大気圧プラズマを水に直接照 射することで活性酸素を生成する直接方式は、活性酸 素を生成するための化学種を個々に生成する必要が ないため、ランニングコストの面で長けた方式である。 低温で扱うことができる大気圧プラズマを用いた難 分解性有機物の分解に関するいくつかの研究が報告 されている。水中に O2や Ar などのガスを注入して生 成される気泡内でプラズマを発生させる水中気泡内 プラズマや[1]、電界を集中させやすく低電圧でプラズ マを生成することが可能な針電極を使ったものであ り[2]、プラズマ生成範囲や酸化分解反応領域が狭く分 解効率が低いといった問題がある。

本研究では、これらの問題を解決するために、広範 囲にわたってプラズマを生成することができ、十分な 処理範囲を確保できる誘電体バリア放電を用いた水 処理装置の構築を行い、難分解性有機物のモデル物質 となる酢酸の分解率向上を目指した。

#### 2. 実験方法

図1に本研究で構築した液体滴下型誘電体バリア 放電装置の概略図及び実際の写真を示す。ポンプより 流量約250[L/h]でくみ上げられた処理液体は、上部の リアクタに連結している漏斗へ流し込まれる。リアク タ内を通過した液体は下部に取り付けられた容器を 通り、再びポンプが備え付けられた容器へ戻る。リア クタ内に発生させた誘電体バリア放電部を、液体が滴 下されるように流れ落ち、分解される仕組みになって いる。図2のようにリアクタ部は、ガラス管にステン レス管を挿入し、内部電極とした。この電極に直径 5[mm]の穴を開けることで、ガラス管内にガスを流し 込む構造となっている。また、ガラス管の外側には外 部電極として銅網を巻き付けた。内部電極側を接地し、 外部電極側に周波数60[Hz]の交流高電圧を印可した。 図3に放電の様子を示す。

#### 3. 実験結果

濃度10[mg/L]の100[mL]インジゴカルミン水溶液を 分解処理した様子を図 4 に示す。空気ガス流量を 2[L/min]、印可電圧を18[kV]とした。写真からわかる ように、14 分間の処理によりインジゴカルミン水溶 液は無色透明に変化し、分解ができたことがわかる。

図 5 に示すプラズマ処理前後の可視吸光スペクト ルから脱色率を評価した。インジゴカルミンの最大吸 光波長である 610[nm]における吸光度を用いた。図 6 にプラズマ照射による脱色率の時間変化を示す。脱色 率は、脱色率=(初期吸光度-処理後吸光度)/初期吸光 度[%]として求めた。プラズマ処理時間を増加させる と脱色率は大きくなり、処理時間 14[min]でインジゴ カルミン水溶液の脱色率が 100[%]、すなわち完全に 脱色された。プラズマ照射によって水中で生成された 活性種の酸化力により、インジゴカルミンの有機結合 が分解され脱色したと考えられる。

次に難分解性有機物の分解を試みた。難分解性有機 物のモデル物質には濃度 50000[ppm]の酢酸を使用し た。 図7にプラズマ処理なしの酢酸水溶液の赤外 (IR)吸収スペクトルを示す。循環回数ごとに IR スペク トルを測定した。図から酢酸(CH3COOH)に起因する C-C (1014cm<sup>-1</sup>)、C-O (1277cm<sup>-1</sup>)、C=O (1709cm<sup>-1</sup>)が見 られた。循環回数を増やすと IR スペクトル強度が減 少した。これは、酢酸を蒸発させるための加熱によ る気化や循環パイプなどに付着したために減少した と考えられる。図8にプラズマ処理ありの酢酸水溶液 の赤外(IR)吸収スペクトルを示す。図7と比較すると、 IR スペクトル強度の減少量が大きく、この差分がプ ラズマによって分解された量であることがわかる。図 9 に、C-C、C-O、C=O 各結合のプラズマによる分解 率の処理回数依存性を示す。これらの結果から、3回 循環させることで約50%分解できることがわかった。 処理回数を更に増やすことで、分解率が向上すること が示唆された。また、酢酸が難分解性有機物である原 因である結合力の高い C-C 結合も、通常のオゾンや塩 素処理では分解できないが、プラズマ処理により分解 できることを明らかにした。これは酸化力と持つ OH ラジカルがプラズマにより生成されたことが起因す ると考えられる。表1に酢酸とOH ラジカルの反応式 を示す。酢酸と OH ラジカルが反応すると水や二酸化 炭素以外にもギ酸やショウ酸などの副生成物も発生 するため、プラズマ処理によって 1050[cm<sup>-1</sup>]近くでピ ークが見られた。これらの結果より、プラズマと水が 反応することで発生したOHラジカルや酸素原子など の活性酸素が酢酸を分解したと考えられる。

#### 4. 結論

大気圧プラズマ技術を用いて、湖沼に流れ込んだ工 業廃水などに含まれる難分解性有機物浄化技術の開 発を行った。具体的には、処理効率を向上させるため に誘電体バリア放電を基にした様々な処理装置を開 発した。モデル物質の一つであるインジゴカルミン水 溶液は、14 分間の処理で完全分解できることを示し た。また、通常のオゾンや塩素処理では分解できない 結合力の高い C-C 結合をもつ難分解性有機物の難分 解性有機物のモデル物質として、酢酸の分解を試みた。 その結果、プラズマによって OH ラジカルが生成でき たことにより、C-C 結合を分解できることと、3 回の 循環処理で酢酸を約 50%分解できることを示した。処 理回数を更に増やすことで、分解率が向上できる。

#### 参考文献

 [1] 佐藤圭輔、安岡康一、石井彰三、IEEJ Trans. FM、 128(2008)401.

[2] 飯島崇文、東芝レビュー、61(2006)40.



図1 液体滴下型誘電体バリア放電装置の全体図



(a) 概略図

(b) 実際の写真

図2 液体滴下型誘電体バリア放電装置のリアクタ部



図3 液体滴下型誘電体バリア放電の様子



14 分





図5 インジゴカルミン水溶液の

吸収スペクトルの時間変化



図6 脱色率の処理時間依存性



図7 酢酸の IR スペクトル (プラズマ処理なし)



図8 酢酸の IR スペクトル (プラズマ処理あり)


図9 各結合の分解率の処理回数依存性

(1)	CH <sub>3</sub> COOH + $\cdot$ OH
	$\rightarrow$ ·CH2COOH + H2O
(2)	CH <sub>3</sub> COOH + •OH
	$\rightarrow$ CH <sub>3</sub> COO· + H <sub>2</sub> O
(3)	CH3COO•
	$\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + ·CH <sub>3</sub>
(4)	O2CH2COOH+ O2CH2COOH
	$\rightarrow$ OHCCOOH + OHCH2COOH
(5)	$H_{2}O_{2} + 2HOCH_{2}COOH + O_{2}$
	$\rightarrow$ H2O2 + 2OHCCOOH + 2H2O
(6)	H2O2 + HOCCOOH
	$\rightarrow$ HCOOH + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O
(7)	$H_{2}O_{2} + 2HOCCOOH + O_{2}$
	→H2O2 +2HOOCCOOH

表1 酢酸とOH ラジカルの化学反応

# 2-1-4-1 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その1)

- 酸素ラジカル活性水中の高効率殺菌メカニズムの解明 -

伊藤 昌文<sup>1)</sup>、岩田 直幸<sup>1)</sup>、太田 貴之<sup>1)</sup>、呉 準席<sup>1,2)</sup>、石川 健治<sup>3)</sup>、堀 勝<sup>3)</sup> 1)名城大学 理工学研究科、2)大阪市立大学 工学研究科、3)名古屋大学 低温プラズマ研究センター

#### 1. 緒 言

プラズマ殺菌は数あるプラズマプロセスの中でも 盛んに研究されている分野の一つである。プラズマ殺 菌は、プラズマのエネルギーによって大気や導入ガス から生成された活性種(ラジカル)が直接 細菌やカビ と反応して不活性化させる場合と、その活性種が液相 に侵入して新たな化学種となり液中の菌を不活性化 する場合の2つに大別できる。特に液中殺菌はプラズ マによって生成されるヒドロキシルラジカル(OH•)や 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)などの活性酸素種(ROS: Reactive Oxvgen Species)と一酸化窒素 (NO.) や亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)などの活性窒素種(RNS: Reactive Nitrogen Species)が有害菌に対して殺菌効 果示すことが報告されている。[1,2] これらの強力な 化学活性種を生成できる水へのプラズマ活性化処理 は水耕栽培、植物工場、水質浄化設備等、医療器具洗 浄、歯科治療などへの応用が期待され、盛んに研究さ れている。

しかしながら、これまでの研究でプラズマ活性水 による殺菌メカニズムを調査した例は少なく、プラズ マ活性水の安全な利用のため、その解明が急務となっ ている。特に、気相におけるプラズマ中の各因子(中 性ラジカル、陽イオン、電子など)の個々寄与を調査 した例はなく、プラズマ中のどの因子がプラズマ活性 水の殺菌効果生成に重要であるのかは報告されてい ない。

そこで、大気圧下においてプラズマから中性ラジカ ルのみを取り出し照射できる非平衡大気圧ラジカル 源を用いて、ラジカル活性水を調整した。そして、ラ ジカル活性水の殺菌効果を評価すると共に、同活性水 中に生成された活性酸素窒素種の濃度を深紫外吸収 分光法で調査することでその殺菌メカニズムを解明 することで高効率な殺菌手法の開発を目指した。

具体的には、ラジカル源を用いた液中細菌への殺菌 効果の評価、ラジカル照射前後のpH変動、ラジカル 活性水中に含まれる各種活性酸素窒素種の濃度調査、 高純度ガスの使用時やガス配管パージによる液中活 性種の濃度や殺菌効果の変動、ラジカル活性水を用い た殺菌における三重項酸素原子(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)の重要性の検討、 ESR法によるラジカル活性水中のフリーラジカルの検 出などを行い、メカニズムの検討を行った。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 非平衡大気圧ラジカル源

本研究では、生成したプラズマからその中に存在す る中性ラジカルだけをサンプルへ照射するために、非 平衡大気圧ラジカル源(Tough Plasma FPA10, Fuji MFG Co., Ltd.)を用いた。[3-7] 本装置は図1に示すよ うに3段構造になっており、第1段(Discharge part) で不活性であるアルゴンとラジカル生成のための酸 素ガスを供給し、放電によりプラズマ化する。第2段 (Intermediate part)では、接地電極によりプラズマ 中の正イオンと電子を除去し、第2段と第3段(Nozzle Part)の間で経路を曲げることで紫外線・可視光等を 除去する。以上の構造により、この装置はプラズマ中 から酸素ラジカルのみ取り出し、殺菌等における中性 ラジカルの寄与を評価することを可能とする。

供給する酸素ガス流量比  $0_2/(Ar+0_2)=0.6\%$ のとき、照 射されるラジカルの密度は最大である  $10^{13}\sim 10^{14}$  cm<sup>-3</sup> になることが先行研究より検証されている。[8-10]



図1 非平衡大気圧ラジカル源の構造

#### 2.2 中性ラジカル照射による大腸菌の液中殺菌

殺菌実験を行う前準備として前培養を行い大腸菌 のサンプルを作成した。

前培養の手順は、振とう培養チューブに液体培地 NB (Nutrient Broth) 3 ml を入れ、そこに冷凍保存 しておいた大腸菌懸濁液を室温に戻したものから 10 μl 入れた後、振とう培養機内で 30 °C・250 rpm の条 件で 17 時間、液体培養を行った。

また、大腸菌を培養するために $\Phi$ 90 mm のシャーレ に NA 培地 (Nutrient Agar : NA) を作成した。前培養 で培養した大腸菌を 5000×g, 3 min の条件で遠心分離 を行い、大腸菌(約 3×10<sup>9</sup> 個/ml)を集菌した。集菌 後、培養液を捨て、超純水 3 ml に大腸菌を懸濁し直 し、大腸菌懸濁液の原液を作成した。超純水は、 Millipore Direct-Q 3UV システムによって水道水を UV 滅菌・脱イオンすることで得られたもので、25 °C で 18.2 MΩ·cm の抵抗率を示した。原液を超純水で 30 倍希釈したもの(大腸菌約 1×10<sup>8</sup> 個/ml)を大腸菌懸濁 液とした。0.3 ml の大腸菌懸濁液と 2.7 ml の超純水 を  $\Phi$  38 mm シャーレに入れたものを照射サンプル(大 腸菌約 1×10<sup>7</sup> 個/ml)とし、酸素ラジカルを照射した。 中性ラジカルの照射条件は、アルゴン(Ar)と酸素 (0<sub>2</sub>)の混合ガスの総流量を 5 slm とし、流量比 0<sub>2</sub>/(Ar+0<sub>2</sub>)を 0.6%とした。ラジカル出射部からの照 射距離 10 mmの位置にサンプルを設置し、照射時間は 1、3、5、7、10 min とした。このとき、大気の 影響を抑えるためにプラスチックカバーをつけ、Ar でカバーの中を満たした状態でサンプルに酸素ラジ カルを照射した。また、サンプル全体に酸素ラジカル が照射されるようにステージを用いて、スピードは4 mm/s、走査距離は 15 mm として走査した。

中性ラジカル照射後、照射サンプルを適当な倍率 まで希釈(10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup>倍)し、希釈を行った大腸菌懸濁液 100 µ1 を NA 培地に塗布した。大腸菌を塗布した NA 培地を培養棚で 30 ℃、24 時間培養してコロニーカウ ント法により殺菌効果を評価した。

## 2.3 深紫外吸収分光法による液相中の活性種濃度の 測定

液中の大腸菌に対するラジカル照射による殺菌メ カニズムを解明するため、酸素ラジカル活性化によっ て液中に生成される各種活性酸素窒素種の濃度を深 紫外吸収分光法とフィッティングプログラムによっ て求めた。

まず、 $\Phi$ 38 mmシャーレに超純水を3 ml入れ、照射 サンプルとした。

酸素ラジカルの照射条件は、アルゴン(Ar)と酸素 (0<sub>2</sub>)の混合ガスの総流量を5 slmとし、流量比 0<sub>2</sub>/(Ar+0<sub>2</sub>)を0.6%とした。ラジカル出射部からの照射 距離10 mmの位置にサンプルを設置し、照射時間は1、 3、5、7、10 minとした。

酸素ラジカル照射後に、3 mlのサンプルを石英キ ユベット(S10-SQ-10, GL-Science)に入れ、ダブルビ ーム式UV-Vis-NIR分光光度計(SolidSpec-3700DUV)を 用いて紫外吸収スペクトルを測定した。測定では、 150-400 nmの波長範囲を、波長分解能:0.2 nm、スキ ャン速度:120nm/min(中速)の条件で測定した。 本測定中、サンプル側のキュベットには測定対象 を入れ、参照側のキュベットには何もいれず、空気に 対するサンプルの紫外透過率を測定した。サンプルの 紫外透過率T'と超純水の紫外透過率Tを次式のランベ ルトベールの法則で吸光度Aへ変換する。

A = -Log(T/T')

最後に、波長190<sup>~</sup>340nmの領域の紫外スペクトルか ら、フィッティングプログラムを用いてH<sub>2</sub>0<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>のスペクトルへとdeconvolutionし、各活性酸素窒 素種の濃度を求めた。[11, 12]

#### 3. 実験結果

## 3.1 超純水中大腸菌への中性ラジカル照射による殺 菌効果

図3に超純水中での中性ラジカル照射時間による大 腸菌の生菌数を示す。酸素ラジカル照射時間と共に生 菌数は減少し、照射時間7分で生菌数は検出限界まで 殺菌された。よって、中性ラジカル照射により超純水 中で大腸菌は殺菌されることが明らかになった。

# 3.2 深紫外吸収分光法による液相中の活性種濃度の 測定結果

図4(a)に、中性ラジカル照射によって作成されたラ ジカル活性水の紫外吸光度と、(b)に、その deconvolution によって算出されたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃 度の照射時間依存性を示す。ラジカル活性水の紫外吸 光度は酸素ラジカル照射時間の増加に伴って、増加し ていった。また、活性種濃度も、照射時間の増加に伴 って、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度は増加していった。しかし、 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度は照射時間5minの点で最大値を迎え、その後、 照射時間の増加と伴って減少した。この現象は、酸素 ラジカルの照射によってラジカル活性水中に、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と 反応する物質濃度が増加し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>がNO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと変性した ことに起因すると思われる。

この結果で興味深いことは、本研究ではArと0<sub>2</sub>ガス のみをラジカル源に導入したにも関わらず、活性窒素 種(N0<sub>2</sub><sup>-</sup>とN0<sub>3</sub><sup>-</sup>)もラジカル活性水中から検出されたこ とである。







図4 ラジカル処理水の(a)紫外吸光度と(b)その内部の活性酸素窒素種濃度の照射時間依存性

3.3 中性ラジカル活性化による超純水のpH変動の結 果

3.2で報告したように、中性ラジカル照射によって作 成されたラジカル活性水中からはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>といった 酸が検出された。ArとO<sub>2</sub>のみを導入したラジカル源か ら、これらの活性窒素種が検出されることは不可解で あるため、実際に中性ラジカル照射によって、ラジカ ル活性水のpHが変動するか調査した。

図5に、中性ラジカル照射によって作成されたラジカ ル活性水のpH変動を示す。ラジカル活性水のpHは、中 性ラジカル照射時間の増加に伴って、低下し、10 min のラジカル照射によってpH:3.58まで減少した。この ことから、中性ラジカル照射によって、ラジカル活性 水中に酸が生成されていることが裏付けられた。

また、照射時間の増加に伴ってpHがより低下してい ることから、図3に示した中性ラジカル照射による大 腸菌殺菌にpHが関与していることが示唆された。

## 3.4 中性ラジカル殺菌への導る酸素ガス流量比依存 性の結果

図6に、ラジカル源へ導入する酸素ガス流量比  $0_2/(Ar+0_2)を変更した場合の、酸素ラジカル照射によ$  $る大腸菌の生菌数変動を示す。<math>0_2/(Ar+0_2) = 0$ %では、 大腸菌生菌数が最も多く、 $0_2/(Ar+0_2)$ が増加するほど、 大腸菌生菌数は減少した。従って、 $0_2/(Ar+0_2)$ が増加 するほど、酸素ラジカル照射による殺菌効果も強まっ たということになる。しかし、この結果は、 $0_2/(Ar+0_2)$ が0.6の時にピークに達する $0({}^{3}P_{j})$ 密度の振る舞い [6,7]と相関しないため、 $0({}^{3}P_{j})$ が酸素ラジカル照射に よる大腸菌殺菌において、直接の殺菌因子ではないこ とを示している。

# 3.5 ESR法によるラジカル活性水中のフリーラジカル の検出

図7に、CYPMPOを溶解した超純水への酸素ラジカル 照射による、ESR解析の結果を示す。明らかに、CYPMPO のOH・AdductとHOO・Adductが検出されている。 [13,14] このことから、超純水への酸素ラジカル照 射によってOH・とHOO・が超純水中に生成、あるいは、 輸送されることが示唆された。



図5 中性ラジカル照射時間に対するラジカル活性水のpH変動



図6 0/(Ar+0)に対する酸素ラジカル照射時の大腸菌生菌数

## 3.6 SODを用いた酸素ラジカル活性水の殺菌効果の変 動結果

図8に、HOO・を選択的に失活する酵素として知られる スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を溶解した超 純水へ大腸菌を懸濁し、さらに酸素ラジカル照射を行 ったときの、大腸菌生菌数を示す。照射時間が増加す るにつれ、SODを溶解した場合と、ControlであるBSA

74

を溶解した場合とで、大腸菌生菌数の差が大きくなる ことが確認された。常にSOD添加の場合が、BSA添加の 場合と比較して大腸菌生菌数が多いことから、SODに よってHOO・が消去され、殺菌効果が低下したことが 示唆された。これらの結果から、大腸菌を懸濁した超 純水への酸素ラジカル照射による殺菌では、HOO・が 殺菌因子の一つである可能性が高いことが示唆され た。

3.7 SODを用いたHOO・Adductシグナルの消失

図9に、SODとCYPMPOを溶解した超純水へ酸素ラジカル 照射を行ったときの、ESRシグナルを示す。SODの添加 によって、図7で確認されたCYPMPOのOH・Adductと HOO・Adductのうち、HOO・Adductのシグナルのみがほ ぼ消失していることが分かる。一方、Controlである BSAとCYPMPOを溶解した超純水への酸素ラジカル照射 では、OH・AdductとHOO・Adduct検出された。このこ とから、本実験での、超純水へのSOD添加によって、 HOO・が選択的に失活されていることが検証された。 よって、酸素ラジカル照射による大腸菌殺菌に、HOO・ が関与している可能性がより高くなった。



図7 CYPMPOを用いた場合の、ラジカル活性水のESRシグナ ル



# 4. 中性ラジカル照射による液中殺菌メカニ ズムの検討

3 の実験結果で述べたように、液中大腸菌の中性ラ ジカル殺菌では、HOO・が殺菌因子である可能性が非 常に高い。そして、HOO・の生成には、ラジカル活性 水から検出された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>などの、長寿命活性 種が関与している可能性が高い。

まず、H2O2の生成だが、配管の汚染によってラジカ

ル源へ供給された供給された水分子(H<sub>2</sub>0)が OH・ へ解 離させ、その OH・が再結合し、生成された可能性が 高い。

 $H_2O + e^- \rightarrow H^+ + OH \cdot + e^-$ 

 $0H \cdot + 0H \cdot \rightarrow H_2 O_2$ 

次に NO<sub>2</sub>つ生成は、ガス配管に混入した大気(N<sub>2</sub>)が、 ラジカル源内のプラズマによって N・原子へ解離され 生成された可能性が高い。以下に、N<sub>2</sub>が NO<sub>2</sub>に変化す るまでの経路を示す。

- $N_2 + e^- \rightarrow 2N \cdot$
- $N \cdot + 0_2 \rightarrow NO \cdot + 0 \cdot$

 $2N0 \cdot + 0_2 \rightarrow 2N0_2 \cdot$ 

 $NO \cdot + NO_2 \cdot + H_2O \rightarrow 2H^+ + 2NO_2^-$ 

なお、3の実験結果で確認された NO<sub>3</sub>では、下記の NO<sub>2</sub>での変性又は0・か0<sub>3</sub>による酸化によって生成された可能性が高い。

 $2H^+ + 2NO_2^- + NO_3 \cdot \rightarrow 2HNO_3 + NO_2 \cdot$ 

そして、生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup>が反応することで過 酸化亜硝酸(ONOOH)となり、ONOOH がもう一度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と 反応することで過硝酸(O<sub>2</sub>NOOH)となる。O<sub>2</sub>NOOH は酸化 解離定数(pKa)=5.9を持ち、それ以下の pH では HOO・ と NO<sub>2</sub>・となる。[49, 50]

 $\mathrm{H^{+}}~+~\mathrm{NO_{2}^{-}}~+~\mathrm{H_{2}O_{2}}~\longrightarrow~\mathrm{ONOOH}~+~\mathrm{H_{2}O}$ 

 $0NOOH + H_2O_2 \rightarrow O_2NOOH + H_2O$ 

 $O_2NOOH \leftrightarrow HOO \cdot + NO_2 \cdot (pKa=5.9)$ 

実験結果の(3)で示した中性ラジカル処理による超 純水の pH 変動によると、照射時間 1 min の時点で、 既に pH が 5.0 付近まで低下しているため、常識によ って 0\_N00H から H00・が生成され、大腸菌を殺菌して いる可能性があることが分かった。

#### 5. 結論

本研究では、電気的に中性なラジカルを照射した超 純水における殺菌効果の評価とその殺菌メカニズム の解明を行った。特に、スカベンジ酵素と電子スピン 共鳴法(ESR 法)を用いることで、ラジカル活性水中に 生成される短寿命活性種を特定し、その中でもヒドロ ペルオキシルラジカル(HOO・)がラジカル処理水中の 殺菌因子の1つであることを検証した。また、ラジカ ル活性水中に生成された各種長寿命活性種を深紫外 吸収分光法で定性・定量的に解析することにより、プ ラズマ源に接続された配管中の汚染物質が生成され るプラズマとその処理対象に与える影響を調査した。 最後に、それらの結果から中性ラジカルによる大腸菌 の不活性化メカニズムの考察を行った。その結果、酸 素ラジカル処理でも、配管内またはボンベ内の汚染物 質としての N<sub>2</sub>により 0<sub>2</sub>NOOH が生成され、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の生成 により pH が低下することから HOO・が生成され、大 腸菌を殺菌している可能性があることが分かった。

#### 参考文献

- S. Ikawa, K. Kitano, and S. Hmaguchi : Plasma Processes Polym., 7 (2010) 33.
- [2] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, and K. Kitano : J. Phys. D: Appl. Phys., 49 (2016) 425401.
- [3] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito, and M. Hori, Appl. Phys. Lett. 92, 081503 (2008).
- [4] M. Iwasaki, Y. Matsudaira, K. Takeda, M. Ito, E. Miyamoto, T. Yara, T. Uehara, M. Hori, J. Appl. Phys. 103, 023303 (2008).
- [5] M. Iwasaki, H. Inui, H. Kano, M. Ito, Y. Suzuki, D. Sutou, K. Nakada, and M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 47, 3625 (2008).
- [6] H. Hashizume, T. Ohta, J. Fengdong, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Appl. Phys. Lett. 103, 153708 (2013).
- [7] H. Hashizume, T. Ohta, T. Mori, S. Isei, M. Hori, M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 52, 056202 (2013).
- [8] H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 53, 010209 (2014).
- [9] H. Hashizume, T. Ohta, M. Hori, M. Ito, Appl. Phys. Lett. 107, 093701 (2015).
- [10] T. Kobayashi, N. Iwata, J.-S. Oh, H. Hahizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, J. Phys. D Appl. Phys. 50, 155208 (2017).
- [11] J.-S. Oh, E. J. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Furuta, R. D. Short, A. Hatta, J. Photopolym. Sci. Tec. 28, 439-444 (2015).
- [12] J.-S. Oh, E. J. Szili, K. Ogawa, R. D. Short, M. Ito, H. Furuta, A. Hatta, Jpn. J. Appl. Phys. 57, 0102B9 (2018).
- [13] A. Tani, Y. Ono, S. Fukui, S. Ikawa, K. Kitano, Appl. Phys. Lett. 100, 254103 (2012).
- [14] A. Tani, S. Fukui, S. Ikawa, K. Kitano, Jpn. J. Appl. Phys. 54, 01AF01 (2015).

# 2-1-4-2 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その2)

 ラジカル及びプラズマ処理水によるバイオフィルム形成緑膿菌の殺菌効果、および 黄色ブドウ球菌が産生する毒素に対する不活化作用 –

伊藤 昌文<sup>1)</sup>、小森 由美子<sup>2)</sup>、長瀬 智之<sup>1)</sup>、Vladislav Gamaleev<sup>1,3)</sup>

1)名城大学 理工学部 電気電子工学科
 2)名城大学 薬学部 薬学科
 3)名古屋大学 低温プラズマ研究センター

#### 1. 緒 言

近年、複数の薬剤に耐性を示す細菌(多剤耐性菌) による感染症が問題になっている。中でも環境常在菌 である緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)は耐性化し やすく、免疫力が低下した人に対して病原性を示す日 和見病原体であり、緑膿菌による院内感染症は非常に 問題視されている。多剤耐性緑膿菌に対しては、各種 抗菌薬が無効な場合が多く、さらにバイオフィルム形 成により消毒剤に対しても抵抗性を示すため、感染症 対策は非常に困難である。またバイオフィルムは金属 材料に対して微生物腐食を引き起こす原因となるた め、工業用配管の材質劣化も問題となっている。[1]

本研究では、プラズマ中に含まれる電気的に中性な 活性種(ラジカル)を選択的に照射できる2-1-4-1項 で記載した非平衡大気圧ラジカル源、または新たに開 発した特別なガスを必要とせず周りの空気で高密度 なラジカルを発生させることのできる環境大気グロ ープラズマ源を用い、それぞれの装置で処理した滅菌 水の浮遊緑膿菌またはバイオフィルム形成緑膿菌に 対する殺菌効果の効果を検証した。

またヒトの皮膚などに常在する黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)が産生する各種エンテロ トキシンは、食中毒や毒素性ショック症候群(Toxic shock syndrome, TSS)の原因となり、世界各国で食 品の製造・加工や衛生用品の製造現場での毒素汚染が 大規模な事故を引き起こしている。[2-4] ブドウ球菌 のエンテロトキシンは耐熱性で、通常の調理などによる 加熱では容易に失活せず、各種タンパク分解酵素に対 しても抵抗性を示すため、一旦食品・製品が汚染され ると不活化や除去は困難である。[5]本研究では、 2-1-4-1項で記載した非平衡大気圧ラジカル源を用い、 標準エンテロトキシン溶液に酸素ラジカルを照射し た場合の不活化効果を検証した。

#### 2. 対 象

本研究ではグラム陰性好気性桿菌の一種で、主に院 内感染の起因菌として知られている緑膿菌を殺菌対 象として用いた。本菌は環境中に広く存在し、土壌や 水中などに見られる環境菌である。本実験では、ATCC 27853株 (BSL 2)を使用した。

緑膿菌は約1~2 µmの大きさで、発育温度は4~42℃、 発育pHは5.6~9.3の範囲となっている。至適温度は 37℃前後、至適pHは7.0付近である。一本の鞭毛をも ち運動性がある。青緑色のピオシアニンと蛍光色のピ オベルジンという色素を産生するため、感染部位の膿 が青緑色となるのが特徴である。本菌は元来、弱毒菌 であるため健常者では感染症を起しにくいが、基礎疾 患があるなどの原因で抵抗性が低い人や、熱傷などの 皮膚障害を受けている人では日和見感染を引き起こ す。そのため病院内での感染が問題視されている。ま た多くの抗生物質に対して自然耐性を示すため、化学 療法が困難な場合がある。バイオフィルム形成能も非 常に高く、一般に緑膿菌感染症治療に使用される主要 抗菌薬3種に耐性を示す多剤耐性緑膿菌

(Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP)の増加が報告されている。[6, 7]

細菌には、それが持つ基本的な性質のために薬剤に 対して抵抗性を持つもの(自然耐性)がある。しかし、 本来効果があるはずの薬剤でも使用を繰り返すうち に耐性を獲得するようになる。薬剤耐性は主に、プラ スミドを介して遺伝的に伝播することが多く、これに より耐性を獲得した菌がさらに別の薬剤の耐性を持 つ多剤耐性菌へと変異していくと、薬剤投与による化 学療法が困難となり、感染拡大や症状の重篤化へつな がる可能性がある。耐性化するメカニズムとしては、 (1)薬剤を分解、不活性化する酵素の産生、(2)薬剤結 合標的分子の構造変化、(3)バイオフィルムの形成、 (4)薬剤排出機構の亢進、などが挙げられる。

細菌の中には、自身に不利な環境下において、バイ オフィルムと呼ばれる構造物を形成するものがある。 同一菌群でも菌株により形成の条件やバイオフィル ムの主成分は様々であるが、抗菌薬や消毒薬に抵抗性 を示し、物理的なバリア機能により血清成分や免疫細 胞の侵入を防ぐ役割を持つ。バイオフィルム内の菌密 度は、懸濁状態の菌と比較しても非常に高いため、病 原性を持つ菌は日和見感染等を起こす可能性がある。 医療機器表面や、身近なものではシンクなどの湿潤な 環境で発生する可能性があり、人体内でバイオフィル ムを形成することもある。[8]

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や粘膜常在菌であり、 皮膚の化膿性疾患の原因となるほか、肺炎や心内膜炎 などの重篤な感染症を起すこともある。様々な毒素を 産生することが知られているが、日常的には食中毒や 毒素性ショック症候群を引き起こすエンテロトキシ ン(staphylococcal enterotoxins, SEs)とその類縁 毒素(Toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)が問 題となることが多い。[9]SEsが産生された食品を喫 食すると、約3時間後に激しい嘔気・嘔吐、腹痛、下 痢を伴う急激な急性胃腸炎症状を起こす。摂取した毒素量などの違いにより症状には個人差があるが、まれ に重症化する場合もある。一般には予後は良好で、死 亡例はほとんどなく、通常1日か2日間で回復する。

エンテロトキシン (SEs) は分子量27,000前後の単 純蛋白質で、多様なバリエーションが存在し、抗原性 の違いから現在A~L型 (SEA~SEL) までが報告されて いるが、日本における食中毒事件では、SEAに関連す るものが最も多い。[10] 食中毒発症に必要な量は、 SEBでは25~50 µg と考えられていたが、加工乳など の事件では200 ng以下のSEAで発症していることも報 告されている。

#### 3. 実験方法

#### 3.1 環境大気グロープラズマ源[11]

図1に本実験で用いた環境大気グロープラズマ源 の概略図を示す。図に示す回路によりグローモードの 時最大約2.5 kV、2.5 mAの正の高電圧パルスを針電極 に印加することにより、液体表面間の大気中でグロー プラズマを発生させ、脱イオン化滅菌水 (DDW)を処 理した。



図1 環境大気グロープラズマ源

## 3.2 実験手順(バイオフィルム形成緑膿菌に対する殺 菌効果)

緑膿菌を懸濁したTSB培地(Trypto Soy Broth)に 金属板(SUS304)を37℃で24h浸漬することにより、 金属板上でバイオフィルムを形成させた。金属板上に 形成しているバイオフィルムだけを回収するため、金 属板をTSB培地から取り出し、生理食塩水で2度洗浄し ている。金属板に付着しているバイオフィルムは粘性 が高く、納豆の糸が引くようにバイオフィルムもねば ついて糸を引くような状態になる。この糸を引いた部 分を完全に取り除いたsample 1と、そのまま残した sample 2 を実験に用いた。滅菌水に2-1-4-1項の2.1 に記載したラジカル源を用いて酸素ラジカルまたは 酸化窒素ラジカルを10分間照射し、照射液3.0mlにバ イオフィルムが形成した金属板浸し、任意の時間時間 振とうあるいは超音波振動を印加した。振とうしたサ ンプルにおいては、振とう後に超音波振動により金属 板に残った細菌を剥離させた。懸濁液を希釈系列で 10<sup>4</sup>倍まで希釈し、各希釈液を固形培地に塗抹し37℃ で 24 h 培養した。培養後、コロニーカウント法によ り殺菌効果を評価した。

#### 3.3 実験手順(黄色ブドウ球菌毒素の不活化効果)

市販のSEA, SEB, SEC, SED, TSST-1, EXT-A, EXT-B の7種の毒素を使用した。標準毒素を注射用水で16倍 希釈し、酸素ラジカルを5~20分間照射後、図2に示す ような原理に基づく逆受け身ラテックス凝集法を利 用したエンテロトキシン検査キット(SET-RPLA<sup>TM</sup>、 TST-RPLA<sup>TM</sup>、EXT-RPLA<sup>TM</sup>、デンカ生研製)を使用して 活性を測定した。[12]



図2 逆受け身ラテックス凝集法による黄色ブドウ 球菌毒素の測定

#### 4 実験結果

4.1 ラジカル処理滅菌水によるバイオフィルム形成 細菌(sample 1)の不活性化

図3 にバイオフィルム形成細菌(sample 1)に対する 酸素・酸化窒素ラジカル処理滅菌水の殺菌効果を示す。 図からわかる通り、バイオフィルム形成細菌(sample  に対してはかなり殺菌効果が弱くなっていること がわかる。このことから、バイオフィルムは抗菌薬や 防腐剤に対して耐性を持つだけでなく、ラジカルがバ イオフィルム内部に侵入することも防ぐことが示唆 される。



図3 バイオフィルム形成細菌(sample1) に対する 酸素・酸化窒素ラジカル処理滅菌水の殺菌効果

### 4.2 超音波振動印加ラジカル処理滅菌水によるバイ オフィルム形成細菌 (sample 1)の不活性化

4.1 の実験結果からバイオフィルム形成細菌に対 してラジカル処理水では効果的な殺菌が出来ないこ とがわかったため、殺菌効果向上を目的として超音波 振動の印加を試みた。図4 にバイオフィルム形成細菌 (sample 1)に対する超音波振動印加酸素・酸化窒素ラ ジカル処理滅菌水の殺菌効果を示す。超音波振動を印 加することで酸素・酸化窒素ラジカル処理滅菌水の殺

ル処理滅菌水の場合は120分の処理時間でバイオフ ィルム形成細菌(sample1)を滅菌基準まで減少させ ることができた。これは超音波振動によりバイオフィ ルムが破壊され、漏出した細菌細胞が液中活性種に直 接接触することで殺菌されたためと推測される。

菌効果は向上し、特に超音波振動印加酸化窒素ラジカ



- 図4 バイオフィルム形成細菌(sample 1)に対する 超音波振動印加酸素・酸化窒素ラジカル処理滅 菌水の殺菌効果
- 4.3 酸化窒素ラジカル処理滅菌水によるバイオフィ

#### ルム形成 (sample 2) の不活性化

図5にバイオフィルム形成細菌(sample 2)に対する 超音波振動印加酸化窒素ラジカル処理滅菌水の殺菌 効果を示す。前項では2時間の処理でバイオフィルム 形成細菌(sample 1)が滅菌基準まで達したのに対し、 バイオフィルム形成細菌(sample 2)に対してはほと んど殺菌効果を示さないことがわかった。この結果か ら、バイオフィルム量が多いほど殺菌は困難になると 考えられる。



図5 バイオフィルム形成細菌 (sample 2) に対する 酸化窒素ラジカル処理滅菌水、超音波振動印加 酸化窒素ラジカル処理滅菌水の殺菌効果

## 4.4 超音波振動印加環境大気グロープラズマ処理滅 菌水の殺菌効果のバイオフィルム量依存性

図6 にバイオフィルム形成細菌 (sample 1、sample 2) に対する超音波振動印加した環境大気グロープラ ズマ処理DDWの殺菌効果、図7 にそれぞれのサンプル のバイオフィルムのみを染色したクリスタルバイオ レットの吸光度を示す。この吸光度は形成されたバイ オフィルム量に相当する。同じ培養条件で、殺菌実験 に用いるバイオフィルムとバイオフィルム定量に用 いるバイオフィルムの2つを用意し、初期バイオフィ ルム量による殺菌速度の違いを検討した。サンプルは それぞれ3つずつ(sample 1: a~c、sample 2: A~C) 用意した。まずバイオフィルム形成細菌を環境大気グ ロープラズマ処理DDWに浸漬して180分間の超音波振 動を印加することで、ほとんどのサンプルが滅菌基準 に達したことから、環境大気グロープラズマ処理DDW の方がより殺菌効果が強いことが示唆された。殺菌効 果にばらつきがあるが、図6と図7を比較すると、バイ オフィルム量が多いほど殺菌速度が遅くなっている ことがわかる。



図6 超音波振動印加環境大気グロープラズマ処理滅 菌水の殺菌効果



#### 4.5 紫外吸収分光法による液中活性種計測

酸化窒素ラジカル処理滅菌水と環境大気グロープ ラズマ処理滅菌水の吸収ピークを図8に示す。200 nm 付近で希釈なしの酸化窒素ラジカル処理水より50倍 希釈のアークプラズマ処理水の方が高い吸光度を示



#### 図8 酸化窒素ラジカル処理滅菌水と環境大気グロー プラズマ処理滅菌水の吸収スペクトル

しており、酸化窒素ラジカル処理水に比べて120~130 倍の濃度の活性種が生成されていることが分かった。

## 4.6 エンテロトキシンに対する酸素ラジカル照射の 影響

標準エンテロトキシン(SEA~SED)、TSST-1、表 皮剥脱毒素(EXT-A、B)の7種の毒素に酸素ラジカル を5、10、20分間照射後、逆受け身ラテックス凝集反 応で各毒素溶液が何倍希釈まで反応を示すか測定し た。コントロールとして、同じ時間アルゴンガスのみ を照射した場合と、毒素溶液を100℃で加熱した場合 の活性を比較した。図9に示すように、SEA、SEB、SED、 TSST-1、EXT-Bに対しては、酸素ラジカル照射は加熱 処理とほぼ同等またはそれ以上に毒素不活化作用を 示した。特にTSST-1に対しては、5分間の酸素ラジ カル照射で活性が急激に低下していた。SEC、EXT-A に対しても酸素ラジカル照射は時間依存的な作用を 示したが、加熱処理と比較するとその効果は弱かった。



#### 図9 黄色ブドウ球菌毒素に対する酸素ラジカル 照射時間と毒素活性の変化

#### 5. 結論

本研究では、殺菌が困難なバイオフィルム形成細菌 に対する殺菌のメカニズムを解明するために、クリス タルバイオレット染色法によるバイオフィルムの定 量、また紫外吸収分光法によるラジカル処理滅菌水、 環境大気グロープラズマ処理滅菌水中の活性種計測 を行った。これらの結果から、バイオフィルムが形成 された SUS304 に超音波振動を印加することで、バイ オフィルムのほとんどを剥離できることがわかった。 しかしながら SUS304 上に形成するバイオフィルムの 量にはばらつきがあり、バイオフィルム量が多いほど 殺菌速度は遅くなり、殺菌速度はバイオフィルム量に 依存することが分かった。

また、紫外吸収分光法による液中活性種計測の結果 から、同じ時間で処理した酸化窒素ラジカル処理滅菌 水に比べて環境大気グロープラズマで処理した滅菌 水の方が、液中活性種濃度が2桁以上高いことが分か った。さらに、環境大気グロープラズマは消費電力も 半分程度でAr や02ガスなどの特別なガスを必要とし ないことから、コスト面からも効果的な殺菌手法であ ることが分かった。

通常の加熱処理などでは不活化されにくいとされ る黄色ブドウ球菌エンテロトキシン群(SEs)に対し、 酸素ラジカル照射は100℃加熱処理と同等、もしくは それ以上の効果を示す可能性が示唆された。今回酸素 ラジカル照射をした液中に、どのような活性種が存在 し、それがどのような機序でSEsに作用したのかは、 今後検討すべき課題である。しかし食品や衛生用品の 製造過程で使用される設備や機器などで、高温加熱処 理などが困難なものに対するエンテロトキシン汚染 防止のためには、簡便で安価、また残留毒性のない手 法を開発する必要があり、ラジカルの種類や照射条件 を変更して、さらに検討を行う必要があると考える。

#### 参考文献

- [1] 臨床と微生物, Vol.45 No.1 (2018).
- [2] 五十嵐英夫,日本食品微生物学会雑誌, 20, 51-62(2003).
- [3] 食品安全委員会,ファクトシート,平成 23 年 11 月 24 日 (2011).
- [4] Jacques-Antoine Hennekinne, Marie-Laure De Buyser, Sylviane Dragacci, FEMS Microbiology Reviews, 36, 815–836 (2012).
- [5] 重茂克彦, 食品衛生, 51, 81-91 (2005).
- [6] 小栗豊子編,臨床微生物検査ハンドブック第4版,pp. 303-304, 三輪書店 (2008).
- [7] 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業,公開情報 2018 年1月~12 月 年報 (2018).
- [8] Christoph A. Fux, Paul Stoodley, Lauanne Hall-Stoodley, J William Costerton, Expert Review of Antiinfective Therapy, 1, 667-683 (2003).
- [9] Martin M. Dinges, Paul M. Orwin, Patrick M. Schlievert, Clinical Microbiology Reviews, 13, 16-34 (2000).
- [10] 国立感染症研究所,<u>https://www.niid.go.jp/niid/</u> ja/kansennohanashi/511-aureus.html.
- [11] Vladislav Gamaleev, Naoyuki Iwata, Masaru Hori, Mineo Hiramatsu, Masafumi Ito, Applied Science, 9, 3505 (2019).
- [12] 五十嵐英夫, イーズ, 22, 栄研化学 (2001).

# 2-1-4-3 プラズマ技術を用いた高効率殺菌手法の開発(その3)

- 水耕栽培に適した pH 中性領域での高効率殺菌手法の実現 -

伊藤 昌文<sup>1)</sup>、太田 貴之<sup>1)</sup>、呉 準席<sup>1,2)</sup>、石川 健治<sup>3)</sup>、堀 勝<sup>3)</sup>

1)名城大学 理工学研究科
 2)大阪市立大学 工学研究科
 3)名古屋大学 低温プラズマ研究センター

#### 1. 緒 言

2-1-4-1、2-1-4-2に記載したように、プラズマによ ってプラズマ活性水中に生成されるヒドロペルオキ シルラジカル(HOO・)が、その殺菌因子である可能性が 高いことが分かってきた。 しかしながら、このフリ ーラジカルは存在している溶液の pH が<4.8 でなけれ ば、プロトン(H<sup>+</sup>)とスーパーオキシドアニオンラジカ ル(0<sup>2</sup>-・)という形に解離してしまう。[1]また、多く の植物生長の適切な pH 値は 5.5~6.5[2]であり、プ ラズマ活性水を用いた殺菌方法は、水耕栽培などの植 物が存在する環境には適していない。

そこで我々は、植物生長を阻害しない pH が 5.5~ 6.5の環境においても、効果的に雑菌を殺菌できる新 しいプラズマ液中殺菌技術の開発に取り組んだ。その 結果、ベンゼン環を有する有機化合物を電気的に中性 な酸素系ラジカルで処理することによって、上記 pH 領域でも殺菌効果を生成することを見出した。[3]

本研究では、ベンゼンを有する化合物であり、有機 肥料の成分の1つであるL-フェニルアラニン(L-Phe) をラジカル源で処理し、大腸菌を殺菌対象とした。

#### 2. 実験方法

## 2.1 本研究で用いた各種アミノ酸とリン酸の化学的 構造

本研究では、有機肥料の成分であるアミノ酸をプラ ズマ処理することによって、殺菌効果を付加すること を目標としている。そもそも、アミノ酸とは、広義に はアミノ基とカルボキシル基の両官能基を持つ有機 化合物の総称である。また、狭義にはタンパク質を構 成する 22 種類のα-アミノ酸を指す。従って、α-ア ミノ酸は、人間をはじめとするあらゆる生物の体を構 成する基であり、生命活動と深い関わりを持つとされ ている。[7,8]

以下に、本研究でプラズマ処理の対象となる各種ア ミノ酸とその溶媒となったリン酸緩衝液の化学的構 造を示す。



図1 本研究で用いた各種アミノ酸とリン酸の化学的 構造一覧

# 2.2 活性化 L-フェニルアラニン溶液を用いた大腸菌の殺菌実験

殺菌実験を行う前準備として前培養を行い大腸菌 のサンプルを作成した。

前培養の手順は、振とう培養チューブに液体培地NB (Nutrient Broth) 3 ml を入れ、そこに冷凍保存し ておいた大腸菌懸濁液を室温に戻したものから 10 µl 入れた後、振とう培養機内で 30℃・250 rpm の条件で 17 時間、液体培養を行った。

また、大腸菌を培養するためにΦ90 mm のシャーレに NA 培地 (Nutrient Agar: NA) を作成した。

以下に、ラジカル活性L-フェニルアラニンを用いた 殺菌実験の手順を示す。前培養で培養した大腸菌を 5000×g, 3 min の条件で遠心分離を行い、大腸菌(約 3×10<sup>9</sup> 個/ml)を集菌した。集菌後、培養液を捨て、 リン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3)3 ml に大腸菌を懸濁 し直し、大腸菌懸濁液の原液を作成する。原液をリン 酸緩衝液で30 倍希釈したもの(大腸菌約 1×10<sup>8</sup> 個/ml)を大腸菌懸濁液とした。

酸素ラジカルの照射条件は、アルゴン(Ar)と酸素 ( $0_2$ )の混合ガスの総流量を 5 slm とし、流量比  $0_2/(Ar+0_2)$ を 0.6%とした。ラジカル出射部からの照 射距離 10 mmの位置にサンプルを設置し、照射時間は 0~15 min とした。このとき、大気の影響を抑えるた めにプラスチックカバーをつけ、Ar でカバーの中を 満たした状態でサンプルに酸素ラジカルを照射した。 サンプルは、L-フェニルアラニン(80 mmol/1)が溶解 されたリン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3)の3 ml を $\Phi$ 38 mm シャーレに入れたものを照射サンプルとし、酸素ラジ カルを照射した。

照射後、大腸菌濃度が  $1\times 10^7$  個/ml となるように、 照射サンプルの一部と置換し、30℃・250 rpm の条件 でしばらく振とう培養した。その後、適当な倍率まで 希釈( $10^1 \sim 10^4$ 倍)し、希釈を行った大腸菌懸濁液 100  $\mu$ l を NA 培地に塗布した。大腸菌を塗布した NA 培地 を培養棚で 30 ℃、24 時間培養してコロニーカウン ト法により殺菌効果を評価した。

## 2.3 他の芳香族アミノ酸をラジカル活性した場合の殺菌 活性

ラジカル活性フェニルアラニンの殺菌活性がラジ カルとフェニルアラニン間の相互作用から得られる 特異的な現象であるかを照査するために、他の芳香族 アミノ酸(トリプトファンとチロシン)をラジカル源 で処理した場合の殺菌活性を評価する。

 以下に、ラジカル活性フェニルアラニンを用いた殺 菌実験の手順を示す。前培養で培養した大腸菌を 5000
 ×g, 3 min の条件で遠心分離を行い、大腸菌(約 3
 ×109 個/ml)を集菌する。集菌後、培養液を捨て、 リン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3) 3 ml に大腸菌を懸濁 し直し、大腸菌懸濁液の原液を作成する。原液をリン 酸緩衝液で 30 倍希釈したもの(大腸菌約 1×108 個 /ml)を大腸菌懸濁液とする。

酸素ラジカルの照射条件は、アルゴン (Ar)と酸素 (02)の混合ガスの総流量を 5 slm とし、流量比 02/(Ar+02)を 0.6%とする。ラジカル出射部からの照 射距離 10 mm の位置にサンプルを設置し、照射時間は 0<sup>15</sup> min とする。このとき、大気の影響を抑えるた めにプラスチックカバーをつけ、Ar でカバーの中を 満たした状態でサンプルに酸素ラジカルを照射する。 サンプルは、L-トリプトファン(50 mmol/l)かL-チロ シン(2 mmol/l)が溶解されたリン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3)の 3 ml を  $\Phi$  38 mm シャーレに入れたものを照 射サンプルとし、酸素ラジカルを照射する。

照射後、大腸菌濃度が 1×107 個/ml となるように、照 射サンプルの一部と置換し、30 ℃・250 rpm の条件で しばらく振とう培養する。その後、適当な倍率まで希 釈(101<sup>~</sup>104倍)し、希釈を行った大腸菌懸濁液 100 µl を NA 培地に塗布する。大腸菌を塗布した NA 培地を培 養棚で 30 ℃、24 時間培養してコロニーカウント法に より殺菌効果を評価する。

## 2.4 活性化した非芳香族化合物溶液/リン酸緩衝液の殺 菌実験

電気的中性ラジカルと芳香族化合物間の相互作用 で、中性 pH 領域における殺菌効果生成が得られるこ とを検証するために、ベンゼン環構造を持たない L-アラニン溶液、並びに、4.2.5項まで各アミノ酸の溶 媒として使用したリン酸緩衝液をラジカル源で処理 し、その殺菌効果を評価する。

以下に、殺菌実験の手順を示す。前培養で培養した 大腸菌を 5000×g, 3 min の条件で遠心分離を行い、 大腸菌(約 3×109 個/ml)を集菌する。集菌後、培 養液を捨て、リン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3) 3 ml に 大腸菌を懸濁し直し、大腸菌懸濁液の原液を作成する。

84

原液をリン酸緩衝液で30倍希釈したもの(大腸菌約1×108個/ml)を大腸菌懸濁液とする。

酸素ラジカルの照射条件は、アルゴン (Ar)と酸素 (02)の混合ガスの総流量を 5 slm とし、流量比 02/(Ar+02)を 0.6%とする。ラジカル出射部からの照 射距離 10 mm の位置にサンプルを設置し、照射時間は 0<sup>~</sup>15 min とする。このとき、大気の影響を抑えるた めにプラスチックカバーをつけ、Ar でカバーの中を 満たした状態でサンプルに酸素ラジカルを照射する。 サンプルは、L-アラニン(80 mmol/1)が溶解されてリ ン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3)か、有機物が溶解されて いないリン酸緩衝液(200 mM, pH 6.3)の3 ml を $\Phi$ 38 mm シャーレに入れたものを照射サンプルとし、酸素ラジ カルを照射する。

大腸菌濃度が 1×107 個/ml となるように、希釈サン プルの一部と置換し、30 ℃・250 rpm の条件でしばら く振とう培養する。その後、適当な倍率まで希釈 (101<sup>~</sup>104 倍)し、希釈を行った大腸菌懸濁液 100 µl を NA 培地に塗布する。大腸菌を塗布した NA 培地を培 養棚で 30 ℃、24 時間培養してコロニーカウント法に より殺菌効果を評価する。

#### 3. 実験結果

3.1 活性化L-フェニルアラニン溶液を用いた大腸菌の殺菌結果

図2に、ラジカル活性フェニルアラニン溶液に懸濁さ れてからの、大腸菌生菌数の変動を示す。なお、図2 上部の凡例は、それぞれラジカルによるフェニルアラ ニンの処理時間を示す。まず、ラジカル処理時間が0 minの溶液中では、懸濁から240時間経過しても、大腸 菌生菌数が全く減少しなかった。それに対して、ラジ カル源によって5、10、15 min処理されたフェニルア ラニン溶液中では、振とう培養時間の増加に伴って、 大腸菌生菌数が劇的に減少した。



図2 ラジカル活性フェニルアラニン溶液の殺菌効果

特に、ラジカル源によって15 min処理されたフェニル アラニン溶液の殺菌効果は、大腸菌懸濁から24時間以 内に生菌数が検出限界に達するほど強いものであっ た。また、ラジカル照射時間が5、10、15 minと長く なるにつれて、大腸菌生菌数の減少速度が上昇してい ることからも、電気的に中性なラジカルとフェニルア ラニンと反応し、殺菌活性を有した物質が新たに生成 されていることを示唆している。

## 3.2 他の芳香族アミノ酸をラジカル活性した場合の 殺菌結果

図3に、L-フェニルアラニンとは異なる物質である L-トリプトファンやL-チロシンをラジカル処理した 場合の殺菌実験の結果を示す。

ラジカル活性L-トリプトファンとL-チロシンの両 者で、殺菌活性が確認された。

また、L-フェニルアラニン(80 mmol/l)をラジカル 源で活性化した場合より、L-トリプトファン(50 mmol/l)を活性化した場合の殺菌活性が明らかに強力 である。このことから、L-フェニルアラニンよりL-トリプトファンの方が、ラジカル源から供給される電 気的中性な活性種との反応速度が高く、殺菌因子の生 成確率が高いことが示唆された。



図3 ラジカル活性エートリプトファンとチロシンの殺菌効果

## 3.3 活性化した非芳香族化合物溶液/リン酸緩衝液の 殺菌結果

図4に、L-フェニルアラニンとは異なりベンゼン環構造を 持たない非芳香族アミノ酸であるL-アラニンや、有機物を 一切含有しないリン酸緩衝液をラジカル処理した場合の 殺菌実験の結果を示す。

ラジカル活性 L-アラニンとリン酸緩衝液からは、殺菌活性が確認されなかった。

この結果より、ラジカル源から供給された電気的に中性 な活性種と L-フェニルアラニン等が持つベンゼン環構造 が相互作用を起こし、中性 pH における殺菌活性を持った 新たな物質が生成されることが検証された。

さらに、ラジカル処理されたリン酸緩衝液から殺菌効果 が確認されないことから、これまでに水溶液の大気圧プラ ズマ処理によってその生成が報告され、かつ、プラズマ活 性水による殺菌への寄与も報告されてきた過酸化水素 (H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>)、亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)[8-10]と いった比較的長寿命な活性種も、本殺菌に寄与していて いないことが判明した。



#### 4. 結論

本研究では、作物の生長を阻害せず溶液中の雑菌を殺 菌することを目的に、中性 pH 領域において殺菌できる手 法の開発した。その結果、多くの植物生長の適切な pH 値 は 5.5~6.5 領域においてプラズマ液中殺菌を実現する ためには、電気的中性なラジカルと芳香族化合物間の相 互作用が重要であることが判明した。特に、L-フェニルア ラニンを、電気的中性なラジカルで処理することによって、 最終目標になっていた中性 pH 領域での大腸菌の 6 桁殺 菌に成功した。また、ベンゼン環を有さない L-アラニンや リン酸緩衝液のみをラジカル処理した場合には殺菌効果 が確認されなかったことから、中性ラジカルと L-フェニル アラニンが液相中で反応し、殺菌活性を持つ物質 X が生 成されたことが伺える。

本技術による、殺菌メカニズムの解明のためには、ラジ カル処理によって L-フェニルアラニン溶液中に生成され た化学種の分析を行うことが必須である。今後は、溶液中 成分の分析によって、ラジカル処理フェニルアラニンによ ってもたらされる現象のメカニズム解明に取り組むとともに、 本技術の実用性や安全性を評価していく予定である。 (これらの成果は様式2の雑誌論文93の内容の一部に対応する。本稿は原著論文ではなく、研究成果を解説した報告書である。)

#### 参考文献

- S. S. Korshunov, J. A. Imlay, Mol. Microbiol., 43, (2002) 95.
- [2] N. SHARMA, S. ACHARYA, K. KUMAR, N. SINGH, O.P. CHAURASIA : J. SOIL WATER CONSERV., 17 (2018) 364.
- [3] N. Iwata, V. Gamaleev, H. Hashizume, J.-S Oh, T. Ohta,
  K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito : Plasma Process. Polym. 16 (2019) 1900023.
- [4] H. Hashizume, T. Ohta, T. Mori, S. Isei, M. Hori, M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 52, 056202 (2013).
- [5] H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 53, 010209 (2014).
- [6] H. Hashizume, T. Ohta, M. Hori, M. Ito, Appl. Phys. Lett. 107, 093701 (2015).
- [7] W. Sakami, H. Harrington, "Amino acid metabolism", Annu. Rev. Biochem. 32, 355-398 (1963).
- [8] S. Azad, "Amino acids: Its types and uses", Int. J. Clin. Diagn. Pathol. 1, 13-16 (2018).
- [9] M. J. Traylor, M. J. Pavlovich, S. Karim, P. Hait, Y. Sakiyama, D. S. Clark, and D. B. Graves : J. Phys. D. Appl. Phys., 44 (2011) 472001.
- [10] K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel, Ch. Wilke, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann, and Th. von Woedtke : Plasma Processes Polym., 8 (2011) 904.
- [11] N. Iwata, V. Gamaleev, J-S. Oh, T. Ohta, M. Hori, M. Ito : Plasma Process Polym. 16 (2019) e1900055.

2-2 バイオマス燃料用の植物の高効率生長や高効率分解・

発酵技術の開発

# 2-2-1-1 プラズマ技術を用いた植物の高効率生長手法の開発(その1)

- 植物生長と殺菌が同時達成可能なプラズマ照射液肥の開発 -

伊藤 昌文1)、岩田 直幸1)、太田 貴之1)、呉 準席1.2)、石川 健治3)、堀 勝3)

1)名城大学 理工学部 電気電子工学科
 2)現、大阪市立大学 工学研究科
 3)名古屋大学 低温プラズマ研究センター

#### 1. 緒 言

近年、非平衡大気圧プラズマの生体応用において、 様々な有益な効果が報告され注目が集まっている。例 としては、がんの選択的不活性化[1-4]や創傷治癒 [5,6]といった医療応用や、作物生長促進[7,8]<sup>)</sup>や有 害菌の殺菌[9,10]などの農業応用など多岐に渡る。そ の中でも、非常に強い殺菌効果を持つプラズマ活性水 は最も注目されているトピックの1つである。 近年 の報告によると、プラズマによってプラズマ活性水中 に生成されるヒドロペルオキシルラジカル(H00•)が、 その殺菌因子であるとされている。[11,12] しかし ながら、このフリーラジカルは存在している溶液の pH が<4.8 でなければ、プロトン(H<sup>+</sup>)とスーパーオキ シドアニオンラジカル(02-)という形に解離してしま う。[13] また、多くの植物生長の適切な pH 値は 5.5 ~6.5[14]であり、プラズマ活性水を用いた殺菌方法 は、水耕栽培などの植物が存在する環境には適してい ない。

そこで我々は、2-1-4-3項に記載したように植物生 長を阻害しない pHが5.5~6.5の環境においても、効 果的に雑菌を殺菌できる新しいプラズマ液中殺菌技 術の開発に取り組んだ。その結果、ベンゼン環を有す る有機化合物を電気的に中性な酸素系ラジカルで処 理することによって、上記 pH 領域でも殺菌効果を生 成することを見出した。

本研究では、同溶液によってカイワレ大根等の植 物生長が促進されるかを検証した。 本研究では、ベンゼンを有する化合物であり、有機 肥料の成分の1つであるL-フェニルアラニン(L-Phe) をラジカル源で処理し、カイワレ大根を生長促進対象 とした。

#### 2. 実験方法

不織布(M-3II, BEMCOT)3枚を 6 90 mmの新円状に切 り出し、それらに30 mlの超純水を含ませた。その不 織布を φ 90 mmの滅菌ディッシュに入れ、カイワレ大 根の発芽場とした。カイワレ大根の種子20個を上記発 芽場の上に置き、人工気象器(BIOTRON, NK system) を用いて、温度・湿度を22 ℃・60 %として、48時間 かけて培養した。その後、大腸菌殺菌時と同じ条件を 用いて、80 mmol/1のL-Pheを溶解させたリン酸緩衝液 を、ラジカル源を用いて10分間処理した。ラジカル処 理の条件は2-1-4-3項の実験と同じである。ラジカル 処理完了後、ラジカル活性フェニルアラニン溶液の30 mlを20本のカイワレ大根に与え、人工気象器(BIOTRON, NK system)を用いて、温度・湿度を22 ℃・60 %とし て、48時間かけて再度培養した。最後に、カイワレ大 根20本の茎長と乾燥重量を測定・平均化し、比較する ことで、ラジカル活性フェニルアラニン溶液によるカ イワレ大根への生長促進効果を評価した。

#### 3. 実験結果

図1にL-Phe 含有リン酸緩衝液(コントロール)、それ をラジカル処理して活性化された L-Phe 含有リン酸緩衝 液の原液、それをリン酸緩衝液で1.5倍希釈、2倍希釈、 3 倍希釈、4 倍希釈した溶液によって生長させたカイワレ 大根の一例を写真を示す。

写真から明らかなように、原液でもコントロールより良く 成長しており、4倍希釈まですると生長率が落ちるが、1.5 倍希釈で大きく生長が促進していることが分かる。

これらのカイワレ大根の茎長と乾燥重量を測定し、それらをグラフにしたものが図2と図3である。

図2にラジカル活性L-Phe 溶液によって生長したカイ ワレ大根の茎長(左縦軸)と、ラジカル未処理L-Phe 溶液 によって生長したカイワレ大根の茎長に対する、処理溶 液によって生長したカイワレ大根の茎長比(右縦軸)を示 す。

ラジカル未処理の L-Phe 溶液中では、カイワレの平均 茎長は約 18 mm であるのに対し、ラジカル源で 10 min 処 理した L-Phe の溶液中では、カイワレ大根の生長は約 25mm(約 1.4 倍)まで上昇した。さらに、ラジカル源で 10 min 処理した L-Phe 溶液を、リン酸緩衝液 (pH6.3)を用い て、1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍に希釈し、カイワレ大根に与え たところ、その生長は最大で約 36mm(約 2 倍)にまで促進 された。

図3に、希釈ではなく、ラジカル処理時間を変更したときの、L-フェニルアラニン溶液によるカイワレ大根の生長促進実験の結果を示す。

ラジカル処理時間を7、5、3、2.5minとした場合でも、カイワレ大根の生長は促進された。

さらに、ラジカル処理時間 7、5、3、2.5 min は、4.3.13 項に示した 10 min ラジカル処理 L-フェニルアラニン溶液 のそれぞれ 1.5、2、3、4 倍希釈に対応しており、各照射 時間と希釈倍率における生長促進度合いは、互いに近し いものとなった。

これらの結果より、殺菌効果だけでなく、植物生長促進 効果も、中性ラジカルとL-フェニルアラニン間の相互作用 によってもたらされることが示唆された。

これらの結果より、ラジカル処理された芳香族化合物は、 中性pHにおいて殺菌効果を有するだけではなく、植物の

#### 生長を促進することが示唆された。



図 1 にラジカル活性 L-Phe 溶液によって生長したカイワ レ大根の写真



図2 ラジカル活性フェニルアラニン溶液による カイワレ大根の生長促進度



図3 ラジカル処理時間を変更したL-フェニルアラニ ンの生長促進効果

また、ラジカル源によって10min処理されたL-Phe 溶液 を、リン酸緩衝液(pH6.3)によって1.5倍と2倍に希釈し、 大腸菌を懸濁して場合の、大腸菌生菌数の変動を図2に 示す。殺菌速度が減速しているものの、希釈後も幾分か の殺菌活性は残存していることが分かる。



#### 4. 結論

本研究によって、有機肥料の成分である L-フェニルアラ ニンを、電気的中性なラジカルで処理することによって、 ラジカル処理 L-フェニルアラニンは、植物生長促進効果 として、未処理のものと比較して 99%(約2倍)の生長促 進効果を示し、最終目標としていた 30%促進を大幅に更 新する結果を示した。

また、2-4-1-3項で記載したように、ベンゼン環構造を持 つ有機物の電気的中性ラジカル処理によって、、2-1-4 項での最終目標になっていた中性 pH 領域での大腸菌の 6 桁殺菌に成功した。

これらの結果から、従来のプラズマ活性水を用いた殺菌 では不可能とされた中性 pH 環境下で殺菌と生長促進が 同時に達成できる可能性があることを示しており、水耕栽 培等の農業現場における新しい殺菌法となりうる。

しかしながら、図5に示すように中性ラジカルとL-フェニ ルアラニンが液相中で反応し、植物の生長促進能を持つ 物質 X'と殺菌活性を持つ物質 X が生成されたと考えら れるが、これらの物質を特定することができなかった。

今後はこれらの物質を特定し、さらに高効率な手法の実 現を目指す予定である。

(これらの成果は様式2の雑誌論文93の内容の一部に対応する。本稿は原著論文ではなく、研究成果を解説した報告書である。)



#### 参考文献

- G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V.
   N. Vasilets, A. Fridman : Plasma Process. Polym., 5 (2008) 503.
- [2] S. Iseki, K. Nakamura, M. Hayashi, H. Tanaka, H.

Kondo, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, and M. Hori : Appl. Phys. Lett., 100 (2012) 113702.

- [3] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kajiyama, F. Utsumi, F. Kikkawa, M. Hori : Sci Rep 2016, 6, 36282.
- [4] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, S. Toyokuni, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Hori, Plasma 1 (2018) 150.
- [5] S. Kalghatgi, G. Friedman, A. Fridman, A. M. Clyne : Ann Biomed Eng, 38 (2010) 748.
- [6] S. Kalghatgi, G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. N. Vasilets, A. F. Gutsol, A. Fridman, G. Friedman : IEEE T PLASMA SCI., 35 (2007) 1558.
- [7] S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, and Nobuya Hayashi : Jpn. J. App. Phys., 51 (2012) 01AE01.
- [8] S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N. Hayashi and M. Shiratani : Curr. Appl. Phys., 14 (2014) S149.
- [9] K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel, Ch. Wilke, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann, and Th. von Woedtke : Plasma Processes Polym., 8 (2011) 904.
- [10] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek : Plasma Sources Sci. Technol., 23 (2014) 015019.
- [11] S. Ikawa, K. Kitano, and S. Hmaguchi : Plasma Processes Polym., 7 (2010) 33.
- [12] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, and K. Kitano : J. Phys. D: Appl. Phys., 49 (2016) 425401.
- [13] S. S. Korshunov, J. A. Imlay, Mol. Microbiol., 43, (2002) 95.
- [14] N. SHARMA, S. ACHARYA, K. KUMAR, N. SINGH, O.P. CHAURASIA : J. SOIL WATER CONSERV., 17 (2018) 364.

# 2-2-1-2 プラズマ技術を用いた植物の高効率生長手法の開発(その2)

- 大気圧プラズマとパルスパワーを併用した生長促進 -

太田 貴之、伊藤 昌文

名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

近年、日本は先進国の中でも食料自給率が低いこと が問題となっており、その原因は野菜の生産量と農業 就業人口の減少にある。食料自給率の減少を改善する ためには、一人あたりの作物生産量を改善することが 求められている。

作物生産量を改善するために多くの手法が研究開 発されている。プラズマによって生成された活性酸素 及び窒素種(Reactive Oxygen and Nitrogen Species ;RONS)が、植物の生長促進に寄与すると報告 されている[1]-[2]。また、パルス電界を印加すること で、担子菌(きのこ類)の発芽や収量改善、被子植物で ある単子葉植物網ユリ目のグラジオラス(Gladiolus)の 発芽や生育速度改善、トマトやインゲン、レタスを用 いた実験など多様な植物でその生長促進効果につい て報告されている[3]-[6]。これらの刺激による生長促 進効果は異なると考えられ、異なる刺激を同時に与え ることで相乗効果により生長促進効果を向上させる 可能性がある。

本研究では、作物に対して RONS 照射とパルス電界 印加の同時刺激により生長促進効果の向上を目指した。

#### 2. 実験方法

図1に示す大気圧プラズマとパルス電界同時刺激 装置を構築した。図2に示す大気圧プラズマ源の詳細 を示す。上部から酸素(0.03[slm])とアルゴン(4.97[slm]) の混合ガス5[slm]を流入させた。プラズマ源内部は多 孔構造となっており、ガスを拡散させることでガス流れを均一にしている。また、本プラズマ源は60Hz、8kVの交流電源により電極間に放電を起こし、下部のスリットから長さ5mm程度のプラズマ発光部が流出する。 パルス電界印加部の詳細を図3に示す。MPC3000S

(末松電子製作所)を用いて電極間距離100[mm]の アルミ電極間にパルス電界を発生させた。

実験は、カイワレの種子20個に同時刺激を行った。 また、照射の際カイワレの種子に均等にプラズマを照 射するため、ステージによるスキャンを行った。ステ ージ速度は2mm/sとし、スキャン1往復で4sとした。さ らに、プラズマ出射部からカイワレの種子までの距離 を10mmとなるように調整し、大気下でプラズマ照射 を行った。

カイワレの種子の栽培には人工気象器を用い、温 度22℃、湿度60%の一定条件に保った。図4に示すよ うに、栽培一日目はφ90mmのシャーレ内に脱脂綿を敷 き30[ml]の水道水を投与し、カイワレを播種した。3 ~5日目では茎の湾曲を防ぐために栽培キットを用い た。栽培5日目で全てのサンプルの茎の長さを測定し た。生長促進効果を評価するために、未照射のカイワ レに対する照射後のカイワレの生長変化率を以下の 式により求めた。

#### 生長変化率=(d<sub>B</sub>-d<sub>A</sub>)/d<sub>A</sub>×100[%]

ここでdAは未照射のサンプルの茎の長さ、dBは照射後のサンプルの茎の長さである。

#### 3. 実験結果

図5に、パルス電界0.4[kV/cm]と大気圧プラズマを 3分間同時照射行った条件における、栽培5日目のカ イワレの写真をしめす。左は control の写真であり、 パルス電界と大気圧プラズマを同時照射することに より生長促進効果が得られていることがわかる。

実験は大気圧プラズマ照射時間を1~5[min]、パルス 電界印加電界強度を0.4~0.8[kV/cm]と変化させた。図 6に大気圧プラズマ照射のみ、図7にパルス電界印可 のみ、図8に大気圧プラズマ照射パルス電界印可の同 時照射を行ったときのカイワレの生長変化率を示す。

図 6 の大気圧プラズマ照射のみのときには、照射時 間の増加とともに生長変化率が増加し、照射時間 3[min]の時に未照射に対し 41[%]の生長促進効果が得 られた。さらに照射時間を 4[min]以上に増加させると、 生長変化率は減少し、5[min]照射の時に生長変化はほ とんど見られなかった。RONS が過剰に照射されたた めに生長抑制されたためであると考えられる。

図 7 のパルス電界印可のみのときには、同様の傾向 が得られ、電界強度の増加とともに生長変化率も増加 し、0.8[kV/cm]の時に未照射に対し 56[%]の生長促進 効果が得られた。1.0[kV/cm]では、生長変化率が減少 した。パルス電界が大きすぎたために生長抑制された と考えられる。

図 8 のように、大気圧プラズマ照射パルス電界印可 の同時照射を行うと、印加電界強度 0.4[kV/cm]におい て、同時照射時間 3[min]の時、未照射に対し 62[%]の 生長促進効果が得られた。大気圧プラズマ照射のみ及 びパルス電界印可のみを比較すると、弱い印加電界強 度で高い生長促進効果が得られ、同時刺激による効果 が確認できた。また、印加電界強度 0.8[kV/cm] では、 大気圧プラズマ照射時間が長くなる、すなわち同時刺 激が強くなる条件で生長促進効果が見られた。今後、 このメカニズムを解明する必要がある。

図9及び10に、それぞれ電界強度0.4[kV/cm]及び 0.8[kV/cm]におけるカイワレの発芽率の大気圧プラズ マ照射時間依存性を示す。ほとんどの条件で、栽培日 数3日で発芽率が100%となった。また、電界強度が 大きい方が発芽促進される傾向が確認された。

レタス葉にパルス電界を印加した結果、光合成から 生成される化学エネルギー(植物中の無機栄養物を他 の有機化合物に変化させる性質をもつ)の増加が確認 されており[3]、これはプラズマの活性酸素種(ROS)に よる酸化ストレスや活性窒素種(RNS)による施肥効果 とは異なる生長促進のメカニズムであるため、相乗効 果が働いていることが示唆された。今後、詳細なメカ ニズムを解明する必要がある。

#### 4. 結論

大気圧プラズマとパルス電界の同時照射装置を構築し、カイワレの種子に大気圧プラズマ照射とパルス 電界印可の同時刺激することで生長促進の向上を目 指した。

どの刺激手法でも、刺激の増加とともに生長変化率 が増加し、生長促進効果が得られた。さらに刺激を強 くすると、生長変化率は減少した。

大気圧プラズマ照射のみ及びパルス電界印可のみ を比較すると、弱い印加電界強度で高い生長促進効果 が得られ、同時刺激による効果が確認できた。パルス 電界印加とプラズマの ROS や RNS による効果は異な る生長促進のメカニズムであり、相乗効果が働いてい ることが示唆された。

プラズマやパルス電界における気相中の化学反応プ ロセスや各刺激による作用機序が明らかになってい ないため、今後解明していく必要がある。

#### 参考文献

- [1] 北崎 訓、林 信哉、信学技報 113(2013)71.
- [2] S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi: Jpn. J. Appl. Phys., 51 (2012) 01AE01.
- [3] 王斗艶、光木文秋、電気学会誌 136(2016) 802.
- [4] 高木浩一、電気学会誌 130(2010) 963.
- [5] 犬塚涼介、猪原哲、山部長兵衛、電気学会研究会

資料、46 (2008)57.

[6] C.Eing, S.Bonnet, M.Pacher, H. Puchta, and W.Frey, IEEE Trans. Dielect. Elect. Insulation, 16 (2009) 1322.



図1 大気圧プラズマとパルス電界同時刺激装置の概 略図



図4 カイワレの栽培方法



図 5 栽培 5 日目のカイワレ (control: 左、 0.4[kV/cm],3min 同時照射:右)





図2 大気圧プラズマ部の概略図



図3 パルス電界印加部の概略図



図7 生長促進効果 (パルス電界印可)



図10 発芽率(電界強度 0.8[kV/cm])



図8 生長促進効果(大気圧プラズマ照射とパルス電 界印可の同時刺激)



図 9 発芽率(電界強度 0.4[kV/cm])

# 2-2-2 バイオマス燃料用リグノセルロースの

## 高効率分解技術の開発

- 酸素ラジカルによる前処理がセルロースの分解を格段に促進する -

加藤 雅士<sup>1)</sup>、志水 元亨<sup>1)</sup>、酒井 杏匠<sup>1)</sup>、呉 凖席<sup>2,3)</sup>、 伊藤 昌文<sup>2)</sup>

1)名城大学 農学研究科
 2)名城大学 理工学研究科
 3)大阪市立大学 工学研究科

#### 1. 緒 言

セルロースは天然で最も豊富なバイオマスである。 グルコース単位がβ-1,4 結合で直鎖状につながった 構造を有し、バイオ燃料、繊維、製紙などの各産業に おいて主要な原料物質である。セルロース分解酵素は、 例えば植物バイオマスからバイオ燃料を製造するよ うなバイオリファイナリー産業において非常に重要 である[1]。 セルロースの完全分解にはいろいろな 基質特異性を有する複数のセルロース分解酵素が相 乗的に作用することが重要である。

白色不朽菌 Phanerochaete chrysosporium はリグノ セルロースを完全分解できる生物であり、エンドグル カナーゼ、セロビオハイドロラーゼおよび β-グルカナー ゼなどのセルロース分解酵素を分泌する [2]。 加えて、 銅依存性の多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO) を分泌生 産し、セルロースの分解を促進する [3]。 LPMO のセ ルロース分解の促進作用は第二世代のバイオ燃料生 産の鍵を握ると考えられている。LPMO とセロビオー スデヒドロゲナーゼの組み合わせによりセルロース 鎖の開裂が起こり、新たに生じたセルロース鎖の末端 にセルロース分解酵素がアクセスしやすくなり、結果 として 2 から 8 倍の分解活性の向上が見られること が明らかとなっている [4]。

リグノセルロースからのバイオエタノール生産に は3つのステップが存在する。 (1)リグノセルロース構造を破壊するための前処理の工程、(2)セルロースやヘミセルロースなどの多糖から酵母等のエタノール発酵をする微生物が資化できる糖類への酵素分解の工程、(3)酵母等による糖からエタノールへの発酵生産の工程である。

現在までに、多くの生物学的、化学的、物理的な前 処理方法が開発されている。生物学的前処理では、褐 色不朽菌、白色不朽菌などの菌類をセルロース、ヘミ セルロース、リグニンの分解に用いるが、分解速度は 一般に遅い。アルカリ処理などの化学的前処理法は広 範に研究され、頑強なリグノセルロース構造を破壊す るのに効果的であることは分かっているものの、環境 に悪影響を及ぼす。さらに、使用する化学物質に耐性 の装置を必要としたり、中和の作業が必要であったり、 コスト面での問題をはらんでいる。最近、オゾン分解 を利用した方法が研究され、オゾンによる酸化の過程 が酵素分解を促進することが示された [5]。 しかし ながら、オゾンは原子状態の酸素より酸化力が弱く、 処理時間に数時間を要し、処理速度が遅いことが問題 となっている。

堀らはこれまでに、非平衡大気圧プラズマ技術を基 盤として、市販のプラズマ発生装置と酸素アルゴン混 合ガスを用いた酸素ラジカル発生装置を開発してい る[6,7]。 この酸素ラジカル発生装置は酸化の作 用による微生物の殺菌に効果的であることが証明さ れており[8,9]、前述の酵素糖化のための前処理に有 効であることが期待された。

酸素ラジカル発生装置の前処理法への利用にはい くつかの利点がある。1)オンサイトでのラジカル生 成が可能であることから、化学薬品の供給や貯蔵の必 要がないこと、2)常温、常圧での反応が可能なこと、 3)高密度の酸素ラジカルによる迅速な反応が可能な こと、4)化学的前処理より環境負荷が小さく、廃液 も生じないことが挙げられる。

本研究では、白色不朽菌 P. chrysosporiumの培養 上清を酵素剤として用い、カルボキシメチルセルロー ス (CMC) および天然のリグノセルロースとしての麦 わらの分解に対する、酸素ラジカルによる前処理の効 果を詳細に調べることを目的とした。

#### 2. 実験方法

## 2.1 P. chrysosporium が生産する細胞外タンパク質 の解析

*P. chrysosporium* (ATCC 34541; ATCC, Manassas, VA, USA) は 1.0% 結晶星セルロースを含む Kirk 液体培地 [1.2 g/L ammonium tartrate, 0.05 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.20 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1  $\mu$  g/L thiamine, and 1 mL/L trace mineral solution (pH 4.5)] を用いて 37°C にて培養した。細胞外タンパク質を 2 次元電気 泳動で分離後、 MALDI-TOF/TOF-MS にて解析をした [10]。

#### 2.2 酸素ラジカルによる前処理

2-1-4-1項で示した非平衡大気圧ラジカル源を用いてラジカル照射を行った。ガス総流量を4.97
standard litter per minute (slm)とし、酸素の混合ガス流量比は酸素原子密度が最大となる0.6%とした。照射距離は10 mmとした。CMC (60 mg)、MCC (60 mg)あるいは麦わら(60 mg)を3 mLの蒸留水に懸濁し、20分間ラジカル照射を行った。

#### 2.3 酵素活性測定

酵素(培養上清、CBHI あるいは CBHII) および基質 (CMC、MCC、あるいは麦わら)を 0.5 mL の 50 mM 酢 酸緩衝液 (pH 4.5)中で 37℃にて反応し、反応終了 後、Nanosep centrifugal device (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)で分画、Flow-through 画 分を 100°C、30分間煮沸処理した。反応液中の還元 糖量は dinitrosalicylic acid (DNS)法にて測定した。 標準曲線はグルコース溶液を用いて作成し、セルラー ゼの1ユニットは1分間に1 $\mu$  molの還元糖(グルコ ース当量)を生ずる酵素量と定義した。

CMC および麦わらから生ずる可溶性の反応物は還元 糖 HPLC 解析システム(島津製作所)にて解析した[10]。

#### 3. 実験結果

## 3.1 セルラーゼ活性の経時変化と培養上清中の分泌 タンパク質の同定

結晶性セルロースを含む培地で培養した白色不朽 菌 *P. chrysosporium*の培養上清のセルラーぜ活性の 経時変化を調べたところ、7日後に最高値(9.82 U/mL) となった。図1に細胞外タンパク質の2次元電気泳動 のプロファイルを示した。



図1.2次元電気泳動による培養上清タンパク質の解 析結果と同定されたタンパク質(右表)

培養上清タンパク質に由来する 32 のスポットが検 出され、そのうち 15 種類のタンパク質が同定された。 結晶性セルロースを含む培地中で同定されたタンパ ク質は3つのクラスに分類された。1) セルロース分 解に関与する酵素 (spot 3-8,11-13)、2) キシラ ン分解に関与する酵素 (spot 1, 2, 9,10)、

 その他のタンパク質(spot 14,15)(図1右表)である。 検出されたタンパク質のうち主要なセルロース 分解酵素はGH7 family に属するCBHI(図1; spot 5, 6,11)と GH6 family に属するCBHII(図1; spot 12) であった。

## 3.2 培養上清を用いたCMC分解に対する酸素ラジカル 前処理の影響

結晶性セルロースを含む培地で7日間生育させた *P. chrysosporium*の培養上清を酵素溶液として用い、 CMC 分解による還元糖の生成に対する酸素ラジカル前 処理の影響を調べた。酸素ラジカルによる前処理を行 った場合、未処理の場合と比べて還元糖の生産量は顕 著に増加した。酵素反応 60 分後の時点では未処理な らびに対照実験(酸素ガス処理)に比べて約2倍の還 元糖が生成していた(図2)。



図 2. 培養上清を用いた CMC 分解による還元糖生産に 対する酸素ラジカル前処理の影響。対照実験としての 酸素ガス処理(左パネル)と酸素ラジカル処理(右パ ネル)。 各パネルとも実線が処理区、破線が未処理 区を示す。

さらに、分解産物を還元糖 HPLC にて解析したところ、 反応時間 60 分の時点で 1.5 mM のセロビオースが検 出された(Data not shown)。生産量に関しては対照 実験の 2.0 倍であった。結晶性セルロースを用いて同 様の実験を行ったところ、同様の結果が得られている (Data not shown)。

CBHIとCBHIIによるCMCの酵素分解に対する酸素 ラジカル処理の還元糖生成への影響を同様に評価し たところ、培養上清を用いた場合と同様の反応生成物 が得られた(図 3). CBHIの場合は酸素ラジカル照射 により1.7倍、CBHIIの場合は1.6倍の促進効果が



図 3. CBHI と CBHII による CMC の酵素分解に対する酸 素ラジカル処理の還元糖生成への影響。CBHI (左パネ ル)、CBHII (右パネル)を使用。

以上、酸素ラジカル処理がセルロース鎖の開裂を引 き起こし、還元末端および非還元末端の数が増えるこ とにより、還元末端に作用するセルラーゼと非還元末 端に作用するセルラーゼの両方の反応を促進するこ とが示唆された。さらに、ラジカル処理をした CMC の CBHI と CBHII による還元糖生成の促進効果が培養上 清を用いた場合(図 2)よりも低いことは、培養上清中 に存在する還元末端および非還元末端から作用する セルラーゼ(CBHI および CBHII) やエンド型のセルラ ーゼ、LPMO などの他の酵素との相乗効果が起こって いることを示唆している。

## 3.3 天然のリグノセルロースとしての麦わらの酵素 分解に対する酸素ラジカル前処理の影響

酸素ラジカル処理および酸素ガス処理(対照実験) をした麦わらのセルロース、ヘミセルロース、リグニ ン量を定量したところ、酸素ラジカル処理をした麦わ らと対照実験の麦わらの組成に違いがないことが明 らかとなった(Data not shown)。この結果は、酸素 ラジカル処理は麦わら中の分子の分解はするものの、 単糖、オリゴ糖や水溶性の低分子芳香化合物などには 分解しないことがわかる。麦わらに対するプラズマ照 射がリグニンの脱重合が起こるとの報告がされてい る[11]. リグニンの分解産物がセルロース分解酵素 に影響を及ぼすので、阻害物質を除去するために、麦 わらのプラズマ照射前処理後に水による洗浄のステ ップが重要である [11]。本研究では、先行研究に倣 い、酸素ラジカル処理をした麦わらは水で洗浄して酵 素阻害物質を除去しているが[11]、洗浄画分を凍結乾 燥して、トリメチルシラン化した後に、ガスクロマト グラフィー質量分析機(GC-MS)で分析したところ、 糖やリグニンの分解物は検出されなかった (Data not shown)。以上の結果は、非平衡常圧プラズマ技術を 用いた酸素ラジカル処理は低分子量のリグニン分解 物を生成しないことを意味している。先行研究では、 本実験(20分)より長い時間(最長7時間)の処理 を行なっていたために、阻害物質が生成されたのかも しれない。

酸素ラジカル前処理した麦わらを、洗浄、非洗浄の 条件に分け、48時間の酵素処理した後に、還元糖分 析をした。その結果、洗浄、非洗浄の条件ともに、ほ ぼ同じ還元糖量であることがわかった。

この結果に基づき、麦わらの酵素分解に対する酸素ラ ジカルの影響を非洗浄の条件で調べることとした。

P. chrysosporium 培養上清を用いた1、6、12、24、
48、および72時間の反応では、酸素ラジカル前処理
により、それぞれ、1.4倍,1.4倍,1.4倍,1.5倍,
1.8倍,および1.8倍の還元糖量となった(図4)。



図 4. 麦わらの酵素分解に対する酸素ラジカル前処理 の影響

可溶性の生成物を還元糖 HPLC にて分析すると、4.7 mM のセロビオースが検出された(図 5)。



図 5. 酸素ラジカル前処理の麦わらの酵素分解産物の 解析。実線が処理、破線が未処理を示す。

植物バイオマスの酵素反応の前処理において、化学 的な処理に比べての酸素ラジカル処理の利点は、化学 薬品や有機溶媒を使用する代わりに気体を用いるこ とで、濾過や精製、化学薬品の回収、廃液の処理をす る必要がないことである。酸素ラジカル処理はまた、 薬品を使用しないため、さらにコストが抑えられる。 再生エネルギーを用いてプラズマを発生させ、酸素ラ ジカルの生成プロセスに利用することができれば、よ り魅力的である。従来の前処理法に比べ、酸素ラジカ ル処理法は現在はまだほとんど普及していないが、バ イオマスの酸素ラジカル前処理法の持続可能性を十 分に検証することは、非常に重要である。

また、産業利用の観点から、酵素生産のコストを低 く抑えることも重要である。一般に、酵素精製のステ ップは時間がかかり、酵素生産のコストの約8割を占 めているといわれている[12]。*P. chrysosporiumの* 培養液から得られる上清は、還元末端に作用するセル ラーゼと、非還元末端に作用するセルラーゼ(CBHIお よび CBHII)の両方を主たる酵素として含んでいるの で、この培養上清を直接利用することにより、酵素精 製のプロセスを省くことができるので、大きく酵素利 用のコストも下げることができる。

#### 4. 結論

本研究では、CMC と麦わらの酵素分解に対する酸素 ラジカル前処理の効果について詳細な解析を行った。 酸素ラジカル処理は 白色不朽菌 *P. chrysosporium*の 培養上清に存在する還元末端側から作用するセルラ ーゼと非還元末端から作用するセルラーゼとの両方 によるセルロースの分解を促進することが明らかと なった。CMC ならびに麦わらを酸素ラジカル処理後に 酵素処理をした場合の反応生成物の量は、対照実験の 結果と比べて、CMC では 2.0 倍、麦わらでは 1.8 倍の となった。以上、リグノセルロースの酸素ラジカル処 理は、酵素分解の前処理法として植物バイオマスの有 効利用に関して顕著な貢献をすることが期待される。

(本研究で得られた成果は、既に原著論文[参考文献 13]にて出版された。本稿は原著論文ではなく、研究 成果を解説した報告書である。)

#### 参考文献

- Sims RE, Mabee W, Saddler JN, Taylor M. Bioresour Technol. 2010;101:1570-80.
- [2] Fushinobu S. Nat Chem Biol. 2014; 10: 88-9.
- [3] Hemsworth GR, Johnston EM, Davies GJ, Walton PH. Trends Biotechnol. 2015; 33: 747-61.
- [4] Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 7007-15.
- [5] Shi F, Xiang H, Li Y. Bioresour Technol. 2014; 179: 444-51.
- [6] Inui H, Takeda K, Kondo H, Ishikawa K, Sekine M, Kano H, Yoshida N, Hori M. *Appl Phys Express*. 2010; 3: 126101.
- [7] Iwasaki M, Matsudaira Y, Takeda K, Ito M, Miyamoto E, Yara T, Uehara T, Hori M. *J Appl Phys* 2008; 103: 023303.
- [8] Hashizume H, Ohta T, Fengdong J, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Ito M. *Appl Phys Lett.* 2013; 103: 153708.
- [9] Kobayashi T, Iwata N, Oh JS, Hahizume H, Ohta T, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Ito M. i 2017; 50: 155208.
- [10] Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugiyama Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M. *J Biol Chem.* 2015; 290: 27914-27.

[11] Schultz-Jensen N, Kádár Z, Thomsen AB, Bindslev H,

Leipold F. Appl Biochem Biotechnol. 2011; 165: 1010-23.

- [12] Hearn MT, Acosta D. J Mol Recognit. 2001; 14: 323-69.
- [13] Sakai K, Kojiya S, Kamijo J, Tanaka Y, Tanaka K, Maebayashi M, Oh JS, Ito M, Hori M, Shimizu M, Kato M. *Biotechnol Biofuels*. 2017; 10: 290. doi:10.1186/s13068-017-0979-6.

## 2-2-3 バイオマス燃料用アミロースの高効率分解技術の開発

- 大気圧ラジカル処理コウジカビによるアミラーゼ産生促進 -

伊藤 昌文1) 、田中 優太1) 、後藤 拓也1)、加藤 雅士2)、志水 元亨2)

1)名城大学 理工学研究科
 2)名城大学 農学研究科

#### 1. 緒 言

近年、化石燃料の採掘限界が懸念されており、化石 燃料に代わり再生可能エネルギーを利用した循環型 社会の形成が注目を集めている。我々は、再生可能エ ネルギーの中でも、特にバイオマスを利用したエタノ ール生成に注目した。バイオエタノールの製造過程は バイオマスを単糖や二糖まで分解する糖化と、糖を酵 母に吸収させエタノールを生成する発酵がある。糖化 過程には強酸等を用いた方法と酵素を用いた方法が あり、後者は環境への負荷が小さいことが利点である。 しかしながら、バイオマスの糖化処理に用いられる酵 素の生産性が低く、バイオエタノールの生産コストを 増加させる一つの要因となっている。

非平衡大気圧プラズマは低温であるため生体試料 や生体組織に直接照射することが可能である。 [1.2.3] 近年、医療分野や農業分野において盛んに応 用研究がなされている。 [4.5]

 一般的に外部からの物理的及び化学的なストレス が与えられると、細胞は活性化または不活性化される。
 また、プラズマ中の活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)や活性窒素種(Reactive Nitrogen Species; RNS)が細胞の活性化、不活性化に関与していることが報告されつつある。[6.7.8]

我々はプラズマ中に生成される電気的に中性な酸素ラジカルによるミドリカビ胞子の殺菌効果につい て検証した結果、基底状態の酸素原子 0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)が殺菌因 子であることを報告した。[9.10]また出芽酵母に対 して 0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)照射量に応じて増殖が促進されることも 報告してきた。[11]

本研究では、プラズマ中に生成されるラジカルのう ち、電気的に中性な酸素ラジカルに着目し、実験対象 にアミロース分解酵素であるアミラーゼを産生する ニホンコウジカビ胞子を対象として、酸素ラジカルに よるカビの成長促進効果と酵素活性化を検証し、酵素 の生産性の向上に向けた研究に取り組んだ。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 デンプン分解量測定

寒天培地上に成長しているコウジカビから胞子 10 mg を電子天秤にて正確に測り取る。マイクロチュー ブにカビ胞子 10 mg と滅菌処理された超純水を用いて 1 %に調整した界面活性剤 Tween20 (Wako 製, Poly oxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate) 溶液を 1 mL 加えたのち、10 倍希釈したものを胞子懸濁液 (10<sup>7</sup>CFU/mL 相当) とする。 $\phi$ 35mm のディッシュシャ ーレに胞子懸濁液 1  $\mu$ Lを合計 25 箇所に滴下し、乾 燥させたものを照射サンプルとした。

2-1-4-1 項で示した非平衡大気圧ラジカル源を用い てラジカル照射を行った。ガス総流量を 5 standard litter per minute (slm)とし、酸素の混合ガス流量 比は酸素原子密度が最大となる 0.6%とした。照射距 離は 10 mm とした。また、サンプル全体に照射するた め 4 mm/s の速度で 16 mm の範囲を前後にスキャン操 作し、サンプル全体に照射できるようにした。大気の

102

影響をできるだけなくすために、照射口からサンプル までの空間をプラスチックカバーで覆いアルゴンガ スでパージした後、酸素ラジカル照射を行った。照射 時間は15,30,45 sとした。

照射されたサンプルは 300  $\mu$ L の Tween20 溶液にて 掻き取られた。回収されたサンプルは、Czapek-Dox 液体培地中で 28 °C、100 rpm で振盪培養された。培 養後、吸引濾過器を用いて菌体と上澄み液に分離した。 コウジカビによって酵素分泌された上澄み液 200  $\mu$ L を 0.5 %のデンプン水溶液 200  $\mu$ L と 250 mM のリン酸 緩衝液 100  $\mu$ L の混合液に加え 1 時間反応させた。反 応後、酵素反応液 100  $\mu$ L とヨウ素溶液 20  $\mu$ L をよ く混ぜ、96 well プレートに 100  $\mu$ L ずつ移し、プレ ートリーダーにて 620 nm の波長で吸光度を測定した。 吸光度とデンプン量の検量線を図 1 に示す。この検量 線を用いてアミラーゼ酵素によって分解されたデン プン量を定量化した。



#### 2.2 α-アミラーゼ活性測定

2.1 で得られた上澄み液をバッファー置換用ゲル 濾過カラム(PD10)を用いて培地成分を 50 mM, pH 5.8 のリン酸緩衝液に置換した。置換後の酵素液を遠心濃 縮チューブ(Vivaspin)に添加し、遠心分離機を用い 温度 4  $^{\circ}$ ,回転速度 3000 rpm で遠心操作を行い 40 倍 (10 ml→250 µl)まで濃縮した。濃縮した酵素液を  $\alpha$ -アミラーゼ測定キット(キッコーマンバイオケミファ 社製)を用いて $\alpha$ -アミラーゼの活性を測定した。 キットのマニュアルに従い、プラスチック試験管 に合成基質 N3-G5-CNP の溶液 500 µ1 とキット付属の 酵素溶液 500 µ1 を加え、撹拌した混合液を 37℃で約 5 分間予備加温した。混合液に 40 倍濃縮酵素液(測 定試料)を 100 µ1 を加え 37 ℃で 10 分間反応させた。 反応停止液 2 m1 を加え撹拌後、キュベットに反応液 を 800 µ1 播種し、分光光度計を用いて波長 400 nm の吸光度を測定した。測定値を式(3.1)に代入し $\alpha$ -アミラーゼの活性を算出した。[12]。

<α-アミラーゼ活性算出方法>

α-アミラーゼ活性(U / mL)

= (Es1 – Eb1) × 0.179 (1) ただし、Es1:測定試料の吸光度、Eb1:ブランクの吸光 度である。

#### 2.3 糖化力分別定量測定

本実験では糖化力分別定量測定キット(キッコーマ ンバイオケミファ社製)を用いてグルコアミラーゼ・ α-グルコシダーゼの活性を測定した。。

プラスチック試験管に G2-β-PNP 基質溶液 500 µL と $\beta$ -グルコダーゼ酵素液 500 µLを加え撹拌した混合 液を 37℃で 5 分間予備加温した。混合液に 2.2 より 得られた 40 倍に濃縮したコウジカビ抽出液を 100 µ1 を加え 37 ℃で 10 分間反応させた。反応停止液 2 m1 を加え撹拌後、キュベットに反応液を 800 µ1 播種し、 分光光度計を用いて波長 400 nm の吸光度を測定した。 測定値を式(2)に代入し酵素液の糖化力を算出した。

プラスチック試験管に PNPG 基質溶液 2 mL を加え 37℃で5分間予備加温した。混合液に5.5.2項より得 られた40倍濃縮したコウジカビ抽出液を100µl を加 え37℃で10分間反応させた。反応停止液2ml を加 え撹拌後、キュベットに反応液を800µl 播種し、分 光光度計を用いて波長400 nm の吸光度を測定した。 測定値を式(3),(4)に代入し酵素液に含まれるグルコ アミラーゼ・ $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を算出した。 [13,14,15]

103

#### 3. 実験結果

#### 3.1 デンプン分解促進効果

図2に酸素ラジカル照射時間によるデンプン分解量 測定結果を示す。照射時間15 sにおいて最大値を示し、 未照射に比べて約1.4倍分解量が向上した。その後、 照射時間が増加するにつれてデンプン分解量は減少 傾向にあることが示された。

#### 3.2 α-アミラーゼ活性測定

図3に酸素ラジカル照射時間によるα-アミラーゼ活 性測定結果を示す。照射時間15 sにおいて最大値を示 し、未照射に比べて約1.4倍活性が向上した。その後、 照射時間が増加するにつれてα-アミラーゼ活性は減 少傾向にあることが示された。



#### 図2 デンプン分解量―ラジカル照射時間依存性



図3 α-アミラーゼ活性―ラジカル照射時間依存性

#### 3.3 糖化力分別定量測定

図4に示すグルコアミラーゼ活性測定結果では、照射時間15 sにおいて最大値を示し、未照射に比べて約 1.2倍活性が向上した。

一方で、図5に示すα-グルコシダーゼ活性測定結果 では、照射時間15 sにおいて最大値を示し、未照射に 比べて約1.1倍活性が向上した。

照射時間30 s以降のラジカル照射はそれぞれの酵素 活性が減少傾向にあることが示唆された。



図4 グルコアミラーゼ活性―照射時間依存性



図5 α-グルコシダーゼ活性---照射時間依存性

#### 4. 活性化効果の検討

本研究では酸素ラジカル照射においてコウジカビ胞 子の活性化効果を検討した。具体的には、酸素ラジカ ル照射されたコウジカビ胞子を液体培養することで 得られる酵素分泌液の活性への影響を調査した。

アミラーゼ活性によるデンプン分解量では、酸素ラ

ジカル照射時間 15 s において未照射の 1.4 倍となり 活性の向上が確認された。また、コウジカビが分泌す る 3 種類のデンプン分解酵素群(α-アミラーゼ、グ ルコアミラーゼ、α-グルコシダーゼ)はどれも照射 時間 15 s で最大となり、それぞれ未照射より 1.4 倍, 1.2 倍, 1.1 倍の活性の向上が確認された。α-アミラ ーゼは不規則にデンプンの糖鎖を切断することがで きるため、デンプンの分解に対する寄与率が大きいが、 グルコースへの変換については、その他の酵素も相乗 的に作用しうることから、酸素ラジカル照射がデンプ ンからグルコースへの変換反応を効率的に促進しう ることが示唆された。

#### 5.結論

本研究では、酸素ラジカルに着目し、本研究では、 酸素ラジカルをニホンコウジカビ胞子に照射し、デン プン分解量への影響を検証した。さらに、測定キット を用いてコウジカビより産生されるデンプン分解酵 素群(α-アミラーゼ・グルコアミラーゼ・α-グルコ シダーゼ)それぞれの活性化を検証した。

その結果、酸素ラジカル照射によるコウジカビの酵素活性化効果の検証を行った。その結果、照射時間 15 s でデンプン分解量は 1.4 倍まで増加し、最終目標である分解促進 30%以上を達成した。

さらに、コウジカビが分泌する各アミラーゼの活性 化を検証した結果、α-アミラーゼ活性は 1.4 倍、グ ルコアミラーゼ活性は 1.2 倍、α-グルコシダーゼ活 性は 1.1 倍まで増加し酸素ラジカル照射による酵素 活性化効果が明らかとなり、デンプン分解促進効果は 主にα-アミラーゼ活性の向上の効果であることが分 かった。

#### 参考文献

- S. Iseki, H. Hashizume, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, T. Ohta, M. Ito, and M. Hori, Appl. Phys. Express 4, 116201 (2011).
- [2] 高木 浩一, J. HTSJ, Vol. 51, No. 216 (2012).

- [3] K. Ishikawa, H. Mizuno, H. Tanaka, K. Tamiya, H. Hashizume, T. Ohta, M. Ito, S. Iseki, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, and M. Hori, Appl. Phys. Lett. 101 (2012).
- [4] Min Ho Kang, Anchalee Pengkit, Kihong Choi, Seong Sil Jeon, Hyo Won Choi, Dong Bum Shin, Eun Ha Choi, Han Sup Uhm, Gyungsoon Park, DOI:10.1371 / journal. pone. 0139263 (2015).
- [5] N. Hayashi, Y. Yagyu, A. Yonesu, M. Shiratani, Jpn. J. Appl. Phys. 53, 05FR03 (2014).
- [6] V Raballand, J Benedikt, J Wunderlich and A von Keudell1, J. Phys. D: Appl. Phys. 41, 115207(2008).
- [7] A. Tani, Y. Ono, S. Fukui, S. Ikawa, and K. Kitano, Appl. Phys. Lett. 100, 254103 (2012).
- [8] E. Takai, S. Ikawa, K. Kitano, J. Kuwabara and K. Shiraki, J. Phys. D: Appl. Phys. 46, 295402 (2013).
- [9] H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, and M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 53, 010209 (2014).
- [10] H. Hashizume, T. Ohta, T. Mori, S. Iseki M. Hori, and M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 52, 056202(2013).
- [11] H. Hashizume, T. Ohta, M. Hori, and M. Ito, Appl. Phys. Lett. 107, 093701 (2015).
- [12] 白兼孝雄,「日本醸造協会誌」 91,889-894 (1996).
- [13] 今井泰彦「日本醸造協会誌」 91,51-57 (1996).
- [14] 今井泰彦「日本醸造協会誌」 92, 296-302 (1997).
- [15] 今井泰彦 「日本醸造協会誌」 90,823-827 (1995).
## 2-2-4-1 バイオマス燃料用高効率発酵技術の開発(その1)

- 大気圧ラジカル処理によるアルコール発酵酵母の増殖促進 -

伊藤 昌文1)、橋爪 博司2)、小林 潤1)、岡地 正嗣1)、加藤 雅士3)、志水 元亨3)、堀 勝2)

# 1)名城大学 理工学研究科 2)名古屋大学 低温プラズマ研究センター 3)名城大学 農学研究科

#### 1. 緒 言

近年では医療分野、農業分野や水産分野においてプ ラズマの応用が期待され、盛んに研究され始めている。 医療分野においては、プラズマによる止血、血管新生、 臓器癒着防止、細胞増殖等、様々な「治療効果」が期 待され始めている。[1] 農業分野においても微生物の 殺菌、植物の生産性の向上、農作物の鮮度保持にプラ ズマの応用が期待されている。[2, 3, 4]一般的に、 外部からの物理的または化学的ストレスが与えられ ることにより細胞の活性化または不活性化などの反 応が起きるとされている。[5] そのため、プラズマに より発生するイオンやラジカル等の反応活性種が生 体に作用することで上記のような効果の発現が期待 されている。プラズマ中に生成される因子の中でも特 に効果が高いとされるのが活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS) や活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species, RNS) である。活性酸素は細胞に 対して酸化ストレスを与えるが、この酸化ストレスを 過度に与えると脂質、タンパク質や DNA など生体分子 レベルで障害を与える。一方、軽度の酸化ストレスを 与えた場合には、細胞増殖や生体にとっての防御反応 を誘導すると考えられている。[6] 気相中では、これ らの活性種は細胞に直接作用するが、液相では気液界 面での反応が起点となり活性種は異なる活性種に変 化して微生物に作用する。また、液体に含まれる物質 によって活性種との反応が異なるため、生成される物

質によって細胞に対する影響も異なると考えられる。 [7] しかしながら、プラズマから生成される活性種が 液体との相互作用により生成される活性種がどのよ うな過程を経て、細胞に影響しているかは未だ解明さ れていない。効果の効率向上や、効果を最適に制御す るためにはもちろん、技術の安全性確保の観点からも このメカニズムの解明はプラズマの医療、農業分野へ の実用化に必要不可欠な喫緊の課題となっている。

本研究では、これらのメカニズム解明に向けて、プ ラズマ中に生成されるラジカルのうち、電気的中性な 酸素ラジカルに着目して真核細胞のモデル細胞でも ある出芽酵母細胞を対象として、増殖促進効果、不活 性化効果の作用機序の解明に向けた研究に取り組み、 増殖促進効果を最大限に引き出す検討をした。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 照射距離依存性評価実験

初めに、 $\Phi$ 90 mm のシャーレに Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) 寒天培地上に植菌しておいた 出芽酵母のコロニーを取り出し、振とう培養チューブ に YPD 液体培地 3 ml に入れた。その後、振とう培養 機で 30℃、250 rpm で 18 時間培養(前培養)を行った。 18 時間液体培養後、培養された酵母懸濁液を遠心分 離器(5000×g、25℃、 5 min)で集菌した。集菌後、 培養液を捨て Phosphate Buffered Saline (PBS(-))で 細胞濃度 1×10<sup>7</sup> cell/ml に調整するよう懸濁して酵 母懸濁液を作成した。そこから、PBS(-)で10倍希釈 したものをФ15 mm のシャーレに3 ml 入れて酸素ラ ジカル照射した。2-1-4-1 に示したラジカル源を用い て酸素ラジカルを照射した。ラジカル源にはアルゴン (Ar)と酸素 (0<sub>2</sub>)の混合ガスの総流量を5 slm とし、 流量比 0<sub>2</sub>/(Ar+0<sub>2</sub>)を 0.6%として供給した。この条件は 基底状態の酸素原子が最も多く生成される条件であ る。[8] ラジカル出射部から試料液面までの距離(照 射距離)をは10、15、20mmとし、照射時間は照射距 離10 mm のときは10、20、30、40、50 sとし、照射 距離15 mmのときは、30,60,90,120 sとし、照射 距離 20 mm のときは、30, 180, 360 s とした。この とき、照射部にカバーを取り付け、サンプルと照射部 をAr でパージすることにより大気の影響を少なくし た状態でサンプルに酸素ラジカルを照射した。また, サンプル全体に酸素ラジカルが照射されるようにス テージを用いて、スピードは4mm/sとして走査した。 照射後、遠心分離器を用いて、25℃、5000×gの条件 で10分間遠心分離を3回実施[(5000×g、25℃、10 min)×3と表記]して酵母を集菌し、PBS(-)で再懸濁 した。その後、セルカウント法による細胞数を計測し、 計測結果をもとに 1×10<sup>3</sup> cell/ml に調整して YPD 液 体培地に入れ、72時間まで浸とう培養機で培養した。 その後、24 時間ごとにセルカウントを行い、増殖効 果を評価した。

#### 2.2 照射溶液依存性評価実験

前培養は 2.1 と同様の方法で培養し、酵母懸濁液 を遠心分離器(5000×g、25℃、 5 min)で集菌した。 集菌後、培養液を捨て①PBS(-)、②YPD、③水道水の 脱イオンとオートクレーブ滅菌処理(121℃、0.12 Pa 20 min)により作成した Deionized Distilled Water (DDW)で細胞濃度 1×10<sup>7</sup> cell/ml に調整して酵母懸濁 液を作成した。各溶液で 10 倍希釈したものをΦ15 mm のシャーレに 3ml 入れた。その後、ラジカル源に設置 し、液面から照射部までの距離を 10 mm と固定して照 射時間を15、30、45、60、180、300 秒として、酸素 ラジカル照射を行った。照射後、溶液①、②、③にお いては増殖効果を検証するために、24 時間ごとにセ ルカウントを行った。また、全ての溶液において不活 性化効果を検証するために、照射後のサンプルを遠心 分離器(5000×g、25℃、10 min)×3 で酵母を集菌し、 PBS(-)で照射時の細胞濃度になるよう再懸濁した。そ の後、酵母懸濁液を希釈(10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup>)行い、懸濁液100  $\mu$ 1 を YPD 寒天培地上に塗布した。寒天培地を培養棚で 30℃、48 時間培養してコロニーカウント法により不 活性化効果を評価した。

#### 3. 実験結果

#### 3.1 培養時間に対する酵母数の変化

図1に30秒と5分間、酸素ラジカルを照射したときの 酵母細胞と未照射の場合の培養時間に対する細胞数 の変化を示す。これから30秒照射の酵母の増殖率が未 照射のものに比べて細胞数が多く、30秒照射の場合は 48時間、未照射の場合は72時間でほぼ増殖限界まで細 胞数が増えることが分かった。5分照射は増殖が抑制 され、培養時間72時間でも細胞数は10<sup>7</sup>個以下であっ た。培養時間48時間後が増殖率の差が大きくでること から、この後の実験は培養時間を48時間として行った。



図1 酵母細胞の培養時間に対する細胞数の変化

3.2 照射距離に対する酵母増殖率の変化

図2に照射距離10,15,20 mmにおけるラジカル照射 時間に対する酵母細胞の48時間後の増殖率を示す。増 殖率はラジカル未照射の酵母の48時間インキュベー ト後の細胞数をコントロールとして、それに対するラ ジカル照射酵母の48時間インキュベート後の細胞数 の比を表す。

全ての照射距離において増殖促進しており、照射距 離10 mmでは30 s照射で約15%、照射距離15 mmでは45 s 照射では約25%、照射距離20 mmでは約20%の増殖率を 示した。照射距離が長くなるにつれて増殖促進に必要 なラジカル照射時間が長くなることがわかる。また、 照射距離が短いほど増殖促進から増殖抑制にかかる 時間が早いことが明らかとなった。



The numbers of survivors were counted after culturing for 48h





図3 0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>) 照射量に対する細胞増殖率の変化

図3に図2の実験結果の横軸を下記の手順で基底状

態の酸素原子(0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>))照射量としたグラフを示す。 酵母が入ったPBS溶液単位体積当たりへの基底状態酸 素原子照射量は以下の式から算出した。

 0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)照射量/サンプル体積(個/cm<sup>3</sup>) =真空紫外吸収 分光法で測定した0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)密度×ガス流速(cm/s)×出 射口面積(cm<sup>2</sup>)×照射時間(s)÷サンプル体積(cm<sup>3</sup>)
 図3から6×10<sup>16</sup>~2×10<sup>17</sup> cm<sup>-3</sup>では増殖、3×10<sup>17</sup>~1×
 10<sup>18</sup> cm<sup>-3</sup> では抑制、1×10<sup>18</sup> cm<sup>-3</sup>以上の照射量では不 活性化が起こっていることが分かる。

以上の結果から、0(<sup>3</sup>P<sub>j</sub>)照射量を制御することで、 細胞増殖を制御できる可能性を見出すことができた。 また、この結果からPBS中の酵母細胞に酸素原子を照 射することで約25%の増殖促進を得ることに成功し た。

## 3.3 PBS、YPD、DDW溶液の違いによる増殖促進・不活 性化効果の変化

図4に48時間後の各溶液の照射時間に対する増殖促 進の結果を示す。YPD(酵母用液体培地)とDDW(脱イオ ン滅菌水)へのラジカル照射ではPBSと比較すると、ラ ジカル照射による増殖促進効果は小さいことが明ら かとなった。不活性化効果も増殖効果と同様にラジカ ル照射5 minまでYPDとDDWに懸濁された酵母では増殖 効果が確認されなかった。(Data not shown)



図4 各溶液のラジカル照射時間に対する増殖率

同様な実験を酸化窒素(Nox)ラジカルについても行い、Noxの照射によっても同様に増殖効果が得られる

ことが分かった。また、酸素ラジカル照射時とは異な り、DDW 中の酵母に NO ラジカルを照射することで酵 母が増殖することが分かった。(Data not shown)しか しながら、増殖率は約 25%と酸素ラジカルと同程度で あることが確認された。

#### 4. 結論

本研究では、プラズマから生成される電気的に中性 な酸素ラジカルと酸化窒素ラジカルに注目し、それら による出芽酵母細胞の増殖促進または不活性化効果 の検証を行った。これらの結果からの(P<sub>j</sub>)の密度と増 殖効果に相関があり、主にの(P<sub>j</sub>)が増殖効果に寄与し ていることが示唆された。また、溶液の種類により増 殖および不活性化効果が異なり、PBS に懸濁された出 芽酵母のみに酸素ラジカルの効果が顕著にみられる ことが分かった。さらに酸化窒素ラジカル照射におい は PBS 以外に、脱イオン滅菌水 (DDW) でも約 25%程 度の増殖促進が確認された。これらのことからラジカ ルと溶液の種類により、異なる活性種が液中に生成さ れ、それが増殖促進に寄与していることが推測できる が、活性種の特定には至っていない。

酸素ラジカルまたは酸化窒素ラジカル単独の効果で はプロジェクトで目標としていた 30%以上の増殖率の 促進は、PBS, YPD、DDW 中では困難であることが分か った。

(これらの成果は様式2の雑誌論文3の内容の一部に対応し、既に原著論文[参考文献9]にて出版された、本稿は原著論文ではなく、研究成果を解説した報告書である。)

#### 参考文献

- 浜口 智志," プラズマ医療におけるプラズマ生体 相互作用", J. Plasma Fusion Res. Vol.87, No.10 695-703 (2011).
- [2] 高木 浩一, "プラズマの農業利用", J. Plasma Fusion Res. Vol.90, No.9 531-533 (2011).
- [3] 高木 浩一, 内野 敏剛, 内田 諭, 小田 昭紀, 佐藤 岳彦, 勝木 淳, "プラズマによる農業応用の基礎", J. Plasma Fusion Res. Vol.90, No.9 534-540 (2014).
- [4] 清水 一男, 内田 諭, 佐藤 岳彦, 大嶋 孝之, 南谷

靖史,太田 貴之, "プラズマによる農作物の鮮度 保持・加工", J. Plasma Fusion Res. Vol.90, No.10 587-594 (2014) [6] H. Hashizume, T. Ohta, J. Fengdong, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Appl. Phys. Lett. 103, 153708 (2013).

- [5] 勝木 淳, 矢野 正彦, 光武 和典, 諸冨 桂子, 安部 恵祐, 矢野 憲一, 秋山 秀典, J. Plasma Fusion Res. Vol.87, No.10 710-714 (2011).
- [6] 榮長 裕晴, 吉原 栄治, 松尾 禎之, 淀井 淳司,
   "酸化ストレスとレドックス制御", 生物試料分析.
   Vol. 32, No4 (2009).
- [7] Y. Ryu, Y. kim, J. Lee, G. Shim, H. Uhm, G. Park and E. Choi, "Effect of Bachground Fluid on the Efficiency of Inactivating Yeast with Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma", PLOS one, Vol 3,6 e66231 (2013).
- [8] S. Iseki, H. Hashizume, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, T. Ohta, M. Ito., and Masaru Hori, "Inactivation of Penicillium digitatum Spores by a High-Density Ground-State Atomic Oxygen-Radical Source Employing an Atmospheric-Pressure Plasma", Appl. Phys. Express. 4, 116201 (2011).
- [9] Hiroshi Hashizume, Takayuki Ohta, Masaru Hori, and Masafumi Ito, "Growth control of Saccharomyces cerevisiae through dose of oxygen atoms" Applied Physics Letters Vol. 107, 093701 (2015).

## 2-2-4-2 バイオマス燃料用高効率発酵技術の開発(その2)

-酸素ラジカル照射が植物バイオマス由来の発酵阻害物質を低減し、 酵母によるエタノール生産を顕著に促進する-

加藤 雅士<sup>1)</sup>、志水 元亨<sup>1)</sup>、伊藤 奨<sup>1)</sup>、酒井 杏匠<sup>1)</sup>、伊藤 昌文<sup>2)</sup>

# 1)名城大学 農学研究科 2)名城大学 理工学研究科

#### 1. 緒 言

リグノセルロースを液体燃料や他の化学製品に変換 することは持続可能なエネルギーの獲得と環境保全 に重要である[1]。リグノセルロースは主に、セルロ ース、ヘミセルロース、リグニンからなる。セルロー スとヘミセルロースは酵素分解により、発酵可能な糖 に変換できるが、リグニンはリグノセルロース性バイ オマスの糖化にとってマイナスの働きをしている [2]。リグニンは高分子のフェノール化合物であるが、 3 つの単位(ヒドロキシフェニル核(H)、グアイアシ ル核(G)、シリンギル核(S))から構成されており、 ランダムにアリルエステル結合、エステル結合、炭素 結合でつながっている[3]。

リグノセルロースからバイオエタノール生産を行う には、一般に3つの工程がある: 1) リグノセルロ ース構造を壊すための前処理工程、2) セルロースや ヘミセルロースなどの多糖の酵素分解による発酵可 能な糖への変換工程、3) 糖からエタノールへの発酵 工程である[4]。前処理は、酵素がセルロースにアク セスし易くすることを目的として、バイオマスの化学 的、物理的性質を変えるために必要な操作である [5]。 種々の生物学的、化学的、物理的な前処理法が開発さ れてきている [6]。

バニリンは一般に、草本、軟木、硬木を問わずリグノ セルロースから発酵可能な糖を生産する工程での副 産物である。リグノセルロースの加水分解時における バニリンの濃度は、バイオマスの種類や処理方法によ り大きく変わることが知られている。バニリンは濃度 依存的に酵母の生育を抑え、発酵を抑制するため、エ タノール発酵の阻害物質となりうる。このため、バニ リンの毒性がバイオエタノール生産のコスト低減の 足かせとなっている[7]。

陰イオン交換樹脂処理、活性炭処理、硫酸処理、ラッ カーゼ処理など、リグニン由来のフェノール化合物の 無毒化には種々の方法が検討されているが、これらの 方法では長い処理時間を必要としたり、廃液を生じて 環境に負荷をかけたりしている。さらに、これらの方 法では、アルカリや酸に耐性の装置、中和の工程、化 学物質の回収、廃液処理などを必要とするため、リグ ノセルロースを含むバイオマスからの効率の良いエ タノール生産のための環境負荷の低いバニリンの除 去法の開発が緊急の課題である。

2-1-4-1 項で述べたように、当研究グループでは、非 平衡大気圧プラズマ技術を用いた酸素ラジカル発生 装置の開発に成功している。2-2-2 項で述べたように、 我々はセルロースおよび麦わらへの酸素ラジカル照 射が、白色不朽菌 Phanerochaete chrysosporium 由来 のセルロース分解酵素による糖化反応の前処理とし て非常に有効であることを示した [8]。

本研究では、酵母によるエタノール生産の阻害物質 であるバニリンに対する酸素ラジカル照射の影響を 詳細に調べることを目的とした。さらに、稲わらのア ルカリ前処理により生ずるリグニン由来のフェノー ル物質に対しても酸素ラジカルの影響を調べること とした。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬および実験材料

バニリン、バニリン酸、3.4-ジヒドロキシ-5-メトキ シベンズアルデヒドは和光純薬(大阪)から、2-メト キシヒドロキノンは東京化学工業(東京)から、プロ トカテク酸はシグマアルドリッチ(セントルイス、米 国)から、プロトカテクアルデヒドはナカライテスク (京都)から購入し、酵母の生育阻害剤として使用し た。*Aspergillus niger*由来のセルラーゼ(比活性 29,500 unit/g 主として *endo*- $\beta$ -1,4-glucanase と  $\beta$ -1,4-glucosidase を含む。)は東京化学工業より入 手した。 稲わらは名城大学附属農場(春日井、愛知) で収穫したものを使用した。稲わらは45℃で3時間 乾燥後、ミルで直径約1mmに粉砕した。蒸留水で洗浄 後、45℃で24時間乾燥し実験に使用した。

#### 2.2 酸素ラジカルによる前処理

2-1-4-1 項で示した非平衡大気圧ラジカル源を用いてラジカル 照射を行った。ガス総流量を4.97
standard litter per minute (slm)とし、少量の酸素(30 sccm)含むアルゴンガスを使用した。照射距離は10 mmとした。バニリン(1.0 mM, 2.5 mM, and 5.0 mM)は0.25% アセトニトリル(3.0 mL)に溶解し、酸素ラジカル発生装置により酸素ラジカルを照射した。

#### 2.3 酵母菌株、生育、エタノール生産

酵母 Saccharomyces cerevisiae S288c は独立行政 法人製品評価技術基盤機構より入手し、1.0 mM, 2.5 mM, and 5.0 mM バニリンを含む YPD 培地 (10 g/L 酵母エキス、 20 g/L ペプトン、 20 g/L グルコー ス) にて、28°C、100 rpm にて振盪培養した。 細胞 の増殖は 600 nm の吸光度にてモニターした。培養上 清中のエタノールはエタノール測定キット (メガザ イム インターナショナル, アイルランド) にて測 定した。

### 2.4 アルカリによる前処理と稲わらへの酸素ラジカ ル照射

アルカリ処理の前に、稲わらは直径約1mmの粒子と なるようにミルで粉砕した。蒸留水で洗浄し、45°C 24 時間の乾燥後、20gの稲わらを1N NaOH 溶液400 mLに懸濁した。懸濁液を37°C、24時間、100 rpm に て振盪しながら保温し、さらに120°C、60分間オ ートクレーブ処理をした。6 N HC1で中和した後、GC-MSの定量解析のための内部標準として50 μM のグリ シンを添加した。酸素ラジカルを同様に照射し、実験 に用いた。

#### 3. 実験結果

#### 3.1 バニリンへの酸素ラジカル照射

酸素ラジカル照射がバニリンに与える影響を高速 液体クロマトグラフィー(HPLC) とGC-MS で解析した。 酸素ラジカル照射によるバニリンの経時変化を調べ たところ、処理時間が増加するにつれ、バニリンの量 が減少した (Data not shown)。バニリン (5.0 mM) は 0.96 mM まで減少し、代わりにバニリン酸 (0.20 mM)、プロトカテクアルデヒド(0.14 mM)、プロトカテ ク酸 (0.01 mM)、メトキシヒドロキノン(0.03 mM)、 3,4-ジヒドロキシ-5-メトキシベンズアルデヒド (0.14 mM)、およびトリヒドロキシ-5-メトキシベンゼ ンが検出された。また、物質の同定はされていないが、 芳香族化合物の 2 量体と思われる物質が同定された (Data not shown)。

以前の研究より非平衡大気圧プラズマから生じる 活性種がTyr、Phe、Trp、Cys、Met、Pro、His、Lys、 Arg、Gln、Glu、Val、LeuおよびIleなどのアミノ酸 に対し、酸化やヒドロキシル化を引き起こし、分子量 に変化させることが示されている。特に、窒素や硫黄 を含む化合物や芳香族化合物のように電子豊富な化 合物はいろいろな活性種によって選択的に修飾され る [9]。さらに、Tyr、 Phe、 Trp、His の芳香環は非 平衡大気圧プラズマ照射によりヒドロキシル化され ることが報告されている。Asandulesa ら(2013) は ベンジルアルコール、ベンズアルデヒド、塩化ベンジ ルの芳香環が非平衡大気圧プラズマ照射により脂肪 族化合物に変換されることを示している [10]。酸素 ラジカルによるバニリンの変換や芳香環の開裂の正 確な機構については十分に解明されていないが、酸素 ラジカル処理により生じたラジカルがリグニン由来 のフェノール化合物と反応して、環開裂を促進するよ うなラジカル種を生成することが考えられた。これら の結果は、バニリンの酸化、一酸素添加、脱メトキシ 化、脱カルボニル化、2量体化、芳香環開裂が、酸素 ラジカル照射により引き起こされていることを示し ている。

## 3.2 酵母の生育、エタノール生産に対する酸素ラジ カル処理の影響

バニリン溶液に対する酸素ラジカル照射の酵母生育 に対する効果を調べるために、我々は酸素ラジカル照 射、非照射の条件で、最大5 mM バニリンを含む YPD 培地で、酵母 *S. cerevisiae* S288c の生育実験を行 なった。 図1はバニリン濃度を変えた酵母の生育曲 線を示したものである。バニリンが存在しない場合に 比べ、1.0 mM、2.5 mM および 5.0 mM のバニリンが 存在すると、それぞれ 8%、35% および 80%の生育阻 害が観察されたが、 酸素ラジカル照射により、それ ぞれ 105%、104% および 83% の生育となった。

バニリン酸、プロトカテク酸、プロトカテクアルデヒ ド、メトキシヒドロキノン、3,4-ジヒドロキシ-5-メ トキシベンズアルデヒド、シュウ酸などのバニリン の分解産物についても生育阻害効果を調べたところ、 バニリンが他のどの分解産物よりも阻害効果を有し ていた (Data not shown)。



反対に、酸素ラジカルによって生じた分解産物は、 酵母に対する毒性がより低いことを示している。さら に、バニリンを分解した際にできる分解産物は、シュ ウ酸をのぞいてバニリンよりも低い濃度になってい た (Data not shown)。

バニリン非存在下での 16 時間後の培養上清のエタ ノール濃度は 10.4 g/L であったが、1.0 mM、2.5 mM、 および 5.0 mMのバニリン存在下では、それぞれ 20%、 66%、および 88% のエタノール生産の阻害が起こって いた(図 2)。一方、酸素ラジカル照射をすることによ り、1.0 mM、2.5 mM および 5.0 mM バニリン存在で も、バニリン非存在下の 100%、92% および 83% のエ タノール生産となっていた.



バニリン 5.0 mM の条件では、酸素ラジカル照射に より非照射条件の7倍のエタノール濃度になってい た。これらの結果は酸素ラジカル照射がバニリンの酵 母に対する毒性を低減し、バニリン非存在下の 80% のエタノール収率までに回復させることができるこ とを示唆していた。

# 3.3 アルカリ前処理で生じるリグニン由来のフェノール化合物対する酸素ラジカル処理の影響

我々はアルカリで前処理した稲わら懸濁液の酵母 生育とエタノール生産に対する酸素ラジカル処理の 影響を調べた。アルカリで前処理した稲わらについて、 酸素ラジカル処理、未処理の条件で、総固形物の中の セルロース、ヘミセルロース、リグニン、灰分の組成 を決定した。アルカリ処理後による稲わらバイオマス の重量損失は31.1%であった。酸素ラジカル処理をし ていないアルカリ前処理稲わらの固形分のうち、セル ロースが65.4%、ヘミセルロースが18.2%、リグニンが 5.5%、であった。酸素ラジカル処理では、アルカリ前 処理した稲わらの組成は変化しなかった(Data not shown)。我々は酸素ラジカル処理によりアルカリ前処 理稲わら懸濁液中のバニリンの変換を行った後、HPLC とGC-MSで分析を行った(図3左パネル)。



図3. アルカリ前処理を行なった稲わらに対する酸 素ラジカル処理の影響

アルカリ処理した稲わらからの可溶性画分には、バニ リン(3.32 mM), バニリン酸(0.13 mM), p-クマル酸 (2.11 mM), t-フェルラ酸(0.69 mM), シュウ酸 (1.13 mM), 乳酸(0.50 mM), フルフラール(0.02 mM), and ヒドロキシメチルフルフラール(0.01 mM) が含まれていた。これらの結果は、酸素ラジカル処理 なしでもアルカリ処理だけで、稲わら中のリグニンが バニリン(7.5%), バニリン酸(0.3%), p-クマル酸 (5.2%), and t-フェルラ酸(2.0%)に変化することを 意味している。酸素ラジカル処理をすることにより、 バニリンの濃度は0.69 mM までに低下した(図3左パ ネル)。さらに、p-クマル酸も酵母の生育阻害剤であ るが [11]、酸素ラジカル処理により、0.31 mM まで に低下した。

2.5 mMの濃度のp-クマル酸,シュウ酸,乳酸およ び フルフラールの条件での酵母の生育は、同濃度の バニリンの条件での生育に比べ、それぞれ、1.59、1.61、 1.62および1.60倍生育が良いことが分かった(Data not shown)。これらの結果は、アルカリ前処理稲わ らの酸素ラジカル処理によるバニリンの変換が酵母 の生育とエタノール生産を促進することを意味して いる。

次に、酵母によるエタノール発酵の促進を評価する ため、酸素ラジカル処理と未処理の条件のアルカリ前 処理済みの稲わらの懸濁液を A. niger 由来のセルラ ーゼで処理し、エタノール発酵に用いる糖を生産した。 アルカリ処理した稲わら懸濁液を酸素ラジカル処理 したものを、酵素により加水分解したのち、還元糖 HPLC で解析したところ、グルコース、セロビオース、 セロトリオース、キシロースなどの還元糖の量は、酸 化ラジカル処理にかかわらずほぼ同じであった (Data not shown)。

我々の以前の研究では、酸素ラジカル処理によるセ ルロース骨格の β-1,4-グルコシド結合の切断による セルロースの断片化が CBH によるセルロース分解を 促進することを報告した[8]。*A. niger* は主としてエ ンド-β-1,4-グルカナーゼとグルコシダーゼを分泌 し、CBH は少量しか生産しない。そのため、酸素ラジ カル処理が還元糖生産に影響しなかったと考えられ る。

次に、酸素ラジカル照射(20分)した懸濁液での酵 母の生育を調べたところ、48時間後、酸化ラジカル照 射をした懸濁液では、未照射の懸濁液に比べて、5.8 倍の生育を示すことが分かった(図3中央パネル)。 エタノール生産に関しては、未処理懸濁液に比べ、酸 素ラジカル処理をした懸濁液では5.2倍になってい た(図3右パネル)。 これまでに、多くの生物学的、化学的、物理的な前処 理法が開発されている。経済的な理由から、酵素糖化 や発酵に用いるリグノセルロースを調製するために、 アルカリ加水分解が使われているが [12]、その工程 の中で、バニリンが酵母にとって毒性のある副産物と して生成している [13]。リグノセルロース性バイオ マスからのバイオエタノールの工業生産において、酵 母細胞は通常バニリンにさらされている。我々の知見 によれば、化学的処理と酸素ラジカル処理を組み合わ せて行うことにより、酵母細胞によるエタノール生産 が大きく改善されるであろう。非平衡大気圧プラズマ 技術を応用した酸素ラジカルを使用する処理法は、植 物バイオマスをエタノールに変換するのに非常に有 望な技術となることが期待される。

#### 4. 結論

本研究では、バニリン分子に対する酸素ラジカル処 理の効果を解析した。この処理により、バニリンが別 の誘導体に変換され、結果としてエタノール発酵時に おける酵母に対するバニリンの毒性が軽減されるこ とが明らかとなった。アルカリによって前処理したリ グノセルロース性バイオマスを酸素ラジカル処理す ることは、バニリンを各種誘導体に変換し、酵母の生 育阻害を抑えることを示した。酸素ラジカル未照射の リグノセルロース性バイオマスに比べ約5倍のエタ ノール生産促進効果があることが分かった。これによ り、バニリン溶液中では酸素ラジカル処理によりプロ ジェクトで目標としていた 30%の生産促進を大きく 上回る 500%の生産促進を達成することができた。こ れらの発見は、植物バイオマスの酸素ラジカル処理が、 バイオエタノール生産プロセスのさらなる進歩に大 きく貢献することを確信させてくれるものである。

(本研究で得られた成果は、様式2の雑誌論文115の 一部に対応し、既に原著論文[参考文献14]にて出版 された。本稿は原著論文ではなく、研究成果を解説し た報告書である。)

#### 参考文献

- Luo L, van der Voet E, Huppes G. Bioresour Technol. 2010;101:5023-5032.
- [2] Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY. Curr Opin Biotechnol. 2014;27:38-45.
- [3] Anterola AM, Lewis NG. Phytochemistry. 2002;61:221-294.
- [4] Chen H, Qui W. Biotechnol Adv. 2010;31:556-562.
- [5] Singh S, Cheng G, Sathitsuksanoh N, Wu D, Varanasi P, George A, Balan V, Gao X, Kumar R, Dale BE, Wyman CE, Simmons BA. Front Energ Res. 2015;2:62.
- [6] Wen P, Zhang T, Wang J, Lian Z, Zhang J. Biotechnol Biofuels. 2019;12:1-10.
- [7] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Bioresour Technol. 2000;74:17-24.
- [8] Sakai K, Kojiya S, Kamijo J, Tanaka Y, Tanaka K, Maebayashi M, Oh JS, Ito M, Hori M, Shimizu M, Kato M. Biotechnol Biofuels. 2017;10:1-10.
- [9] Takai E, Kitamura T, Kuwabara J, Ikawa S, Yoshizawa S, Shiraki K, Kawasaki H, Arakawa R, Kitano K. J Phys D: Appl Phys. 2014;47:285403.
- [10] Asandulesa M, Topala I, Pohoata V, Legrand YM, Dobromir M, Totolin M, Dumitrascu N. Plasma Process Polym. 2013;10:469-480.
- [11] Baranowski JD, Davidson PM, Nagel CW, Branen AL. J Food Sci. 1980;45:592-594.
- [12] Caspeta L, Castillo T, Nielsen J. Front Bioeng Biotechnol. 2015;3:1-15.
- [13] Du B, Sharma LN, Becker C, Chen SF, Mowery RA, van Walsum GP, Chambliss CK. Biotechnol Bioeng. 2010;107:430-440.
- [14] Ito S, Sakai K, Gamaleev V, Ito M, Hori M, Kato M, Shimizu M. Biotechnol Biofuels. 2020 ;13:18. doi:10.1186/s13068-020-1655-9.

## 2-2-5-1 大気圧プラズマプロセス評価技術の開発(その1)

- 深紫外吸収分光光度計により計測されたラジカル処理水中の長寿命活性種密度と 殺菌効果の関係-

伊藤 昌文1)、岩田 直幸1)、呉 準席1.2)、石川 健治3)、堀 勝3)

1)名城大学 理工学研究科
 2)大阪市立大学工学研究科
 3)名古屋大学 低温プラズマ研究センター

### 1. 緒 言

プラズマ液中殺菌は数あるプラズマプロセスの中 でも盛んに研究されている分野の1つである。プラズ マ殺菌はプラズマのエネルギーによって大気から生 成された活性種(ラジカル)が直接 細菌やカビと反応 して不活性化させる場合と、その活性種が液相に侵入 して新たな化学種となり液中の菌を不活性化する場 合の2つに大別できる。特に液中殺菌はプラズマによ って生成されるヒドロキシルラジカル(OH·)や過酸化 水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)などの活性酸素種(ROS: Reactive Oxygen Species)と一酸化窒素(NO·)や亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝 酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)などの活性窒素種(RNS: Reactive Nitrogen Species)が有害菌に対して殺菌効果示すこ とが報告されている。特に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は上記活 性種の中で比較的長時間存在できることが報告され ており、かつ、プラズマ処理水による殺菌[1-2]や植 物成長促進[3]に深く関与していることが報告されて いる。

しかしながら、これまでの研究でプラズマ処理後の 長寿命活性種の濃度や殺菌効果の経時変化を定量的 に測定した例は少なく、処理からの経時変化で殺菌効 果がどのように低下するのか定かではない。

さらに、プラズマ処理によって水中に生成される化 学種はプラズマ中の酸素・窒素活性種(RONS)が主な要 因だと考えられているが、実際にプラズマから中性活 性種のみを抽出して水へ照射し、プラズマ処理水とラ ジカル処理水の類似を調査した例はない。 そこで、本研究では大気圧下においてプラズマから 中性ラジカルのみを取り出し照射できる非平衡大気 圧ラジカル源(2-1-4-1 参照)[4-5]を用いて、ラジカ ル処理水中を作成した。その後、ラジカル処理水が持 つ殺菌効果と長寿命 RONS 濃度、pH の最大 30 日間に 及ぶ経時変化を深紫外吸収分光法とコロニーフォー ミングユニット、pH メータを用いて測定する。加え て、プラズマ中の中性ラジカルがプラズマ処理水作成 にどの程度寄与するのか定量的に調査する。

#### 2. 実験方法

# 2.1 RONS 吸収スペクトルデータベースの作成と deconvolutionの詳細手順

本研究では、非平衡大気圧ラジカル源を用いて超純 水を処理し、溶液中に生成された各種長寿命活性酸素 窒素種(RONS)の同定と定量を行う。そのための手法と して、深紫外吸収分光法とスペクトル deconvolution を用いる。そのために、ラジカル(プラズマ)処理によ って処理溶液中に生成される各種長寿命 RONS の深紫 外波長領域における吸収スペクトルとその濃度依存 性を調査した。測定条件としては、3 ml のサンプル を石英キュベット(S10-SQ-10, GL-Science)に入れ、 ダブルビーム式 UV-Vis-NIR 分光光度計 (SolidSpec-3700DUV)を用いて深紫外吸収スペクトル を測定した。測定では、150-400 nm の波長範囲を、 波長分解能:0.2 nm、スキャン速度:120nm/min(中速) の条件で測定した。物質の吸収スペクトルとその強さ (吸光度)は物質の濃度と強く関係するため、ラジカル 処理された溶液中のある RONS スペクトルを測定する ことでその濃度を推定することが可能である。

プラズマ処理水に生成される主な長寿命 RONS とし ては、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が挙げられる。そこで、水道水 を UV 滅菌・脱イオン化することで得られた超純水 (18.2 MΩ·cm at 25 °C)を用いて、これら3つの RONS の標準試薬を適当な濃度まで希釈し、ダブルビーム式 UV-Vis-NIR分光光度計(SolidSpec-3700DUV)を用いて 深紫外領域におけるその吸収スペクトルを測定した。 上記方法にて、様々な濃度における各種 RONS の深紫 外吸収スペクトルを取得し、スペクトル形状と濃度依 存性をデータベース化した。例として、図 1(A)に、 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>深の紫外吸収スペクトルの濃度依存性を示す。

そして、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含むプラズマ(ラジカル) 処理水の深紫外吸収スペクトルはこれら長寿命活性 種スペクトルの足し合わせとなる。作成した3種類の RONS の吸収スペクトルデータベースを基に、ラジカ ル処理水の吸収スペクトルを成す最適な各H202、NO2-、 N03<sup>-</sup>スペクトル(濃度)の組み合わせを予測 (deconvolution) することで、ラジカル処理によって 処理溶液に生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度を推定す る。[6] 加えて、過去の研究より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> のみのスペクトルの足し合わせでは、ラジカル処理水 のスペクトルとの(特に、波長 210nm 以下における) 形状的不一致が確認される。(図1(B)の赤点線を参照) これは、元々超純水中に溶存しこの波長領域で吸収を 示す酸素分子(02aq)がプラズマ処理によって脱気する ことで生じる。つまり、ラジカル処理水のスペクトル と3種類のRONSの足し合わせスペクトル間の誤差か らプラズマ処理によって脱気されたO2agの濃度を推定 することができる。[7]

本研究では、上記の深紫外吸収分光法と deconvolutionを用いて、ラジカル処理によって溶液 中に生成された各長寿命活性種の同定と定量を行う。





#### 2.2 非平衡大気圧ラジカル源

本実験で使用するラジカル源の詳細な構造や動作 原理は、2-1-4-1や2-1-4-3に示された通りである。 本研究では、プラズマ中で生成され生物の生育に 様々な影響を与えるとされる一酸化窒素(NO)ラジカ ル[8-9]の影響に注目し、様々な実験を行った。その ため、ラジカル源に供給する窒素ガス流量比は、ラジ カル源から照射される NO ラジカル密度が最大となる N<sub>2</sub>/(N<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>)=40%とした。[10]

#### 2.3 ラジカル処理水の作成手順

中性ラジカル照射の条件としては、まず処理サンプ ルである 100ml の超純水をガラス製ビーカーに入れ、 同ビーカーの上辺をラジカル源(2-1-4-1参照)の照射 ロを設置した。この時の照射距離は 21mm であった。 ガス条件は、アルゴン (Ar)、酸素 (0<sub>2</sub>)、窒素 (N<sub>2</sub>) の混合ガスの総流量を 2 slm、流量比 N<sub>2</sub>/(N<sub>2</sub>+0<sub>2</sub>)を 40 % とし、照射時間を 10min とした。このとき、ラジカル 源から照射されるラジカルが大気に流出することを 防ぐために、ラジカル源の照射口とサンプル入りビー カーの間にガラス製カバーを取り付けた。上記、100ml のラジカル処理水の作製を 6 度繰り返し、合計 600ml のサンプルを作成した。

中性ラジカル照射後、ラジカル処理水を 20m1 ずつ ガラス製バイアル瓶に入れ、作製したラジカル処理水 は 24℃の温度下で 0、1、3、5、7、14、21、30 日間 に渡って保管された。この 0<sup>~</sup>30 日間 保管されたラジ カル処理水を用いて、殺菌効果、各種長寿命 RONS 濃 度測定、pH 測定を行った。(詳細は次節に記す。)

#### 2.4 処理水の殺菌効果、RONS 濃度、pH の経時変化

殺菌実験を行う前準備として前培養を行い大腸菌 のサンプルを作成した。

前培養の手順は、振とう培養チューブに液体培地NB (Nutrient Broth) 3 ml を入れ、そこに冷凍保存し ておいた大腸菌懸濁液を室温に戻したものから 10  $\mu$ l 入れた後、振とう培養機内で 30  $\mathbb{C}$ ・250 rpm の条件 で 17 時間、液体培養を行った。また、大腸菌を培養 するために $\Phi$ 90 mm のシャーレに NA 培地 (Nutrient Agar : NA)を作成した。前培養で培養した大腸菌を 5000×g, 3 min の条件で遠心分離を行い、大腸菌(約 3×10<sup>9</sup> 個/ml)を集菌した。集菌後、培養液を捨て、 超純水 3 ml に大腸菌を懸濁し直し、大腸菌懸濁液の 原液を作成した。。原液を超純水で 30 倍希釈したもの (大腸菌約1×10<sup>8</sup>個/ml)を大腸菌懸濁液とした。

保管したラジカル処理水が持つ殺菌効果の経時変 化を評価するために、各保管日における処理サンプル の 2.7ml とあらかじめ作成しておいた大腸菌懸濁液 の 0.3ml を混合し、30 ℃・250rpm の条件で 24 時間 振 とう培養を行った。その後、培養サンプルを適当な倍 率まで希釈(10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup>倍)し、希釈を行った大腸菌懸濁 液 100  $\mu$ l を NA 培地に塗布した。大腸菌を塗布した NA 培地を 30 ℃ の条件で、24 時間培養してコロニー カウント法により殺菌効果を評価した。

次に、ラジカル処理水中の RONS 濃度の経時変化を 測定するために、各日数保管されたラジカル処理水中 の各種活性酸素窒素種(RONS)の濃度を深紫外吸収分 光法とフィッティングプログラムによって求めた。

まず、測ガラス製バイアル瓶中で各日数保管された 3mlのラジカル処理水とした。0<sup>~30</sup>日間の保管後に、3 mlのサンプルを石英キュベット(S10-SQ-10, GL-Science)に入れ、ダブルビーム式UV-Vis-NIR分光 光度計(SolidSpec-3700DUV)を用いて紫外吸収スペク トルを測定した。測定では、150-400 nmの波長範囲を、 波長分解能:0.2 nm、スキャン速度:120nm/min(中速) の条件で測定した。本測定中、サンプル側のキュベッ トには測定対象を入れ、参照側のキュベットには何も いれず、空気に対するサンプルの紫外透過率を測定し た。サンプルの紫外透過率T'と超純水の紫外透過率T を次式のランベルトベールの法則で吸光度Aへ変換す る。

A = -Log(T/T') (1) 最後に、波長190<sup>~</sup>340nmの領域の紫外スペクトルから、 フィッティングプログラムを用いてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、 O<sub>2aq</sub>のスペクトルへとdeconvolutionし、各RONSの濃度 を求めた。[7]

加えて、各保管日におけるラジカル処理水のpH値の 測定には、pHメータ(S220 SevenCompactTM pH/Ion, METTLER TOLEDO)を用いた。

117

#### 3. 実験結果

#### 3.1 ラジカル処理水の殺菌効果の経時変化

図2に0~30日間保管したラジカル処理水が持つ殺菌 効果の経時変化を示す。まず、保管0日目の殺菌効果 は24時間の大腸菌培養によって10<sup>7</sup>個/m1もの大腸菌 を死滅させ、検出限界に到達させるほど強力なもので あることが分かる。さらに、その後の7日間における 保管でも、ラジカル処理水が持つ殺菌効果はほとんど 変化しなかった。次に、保管14日目で、24時間のラジ カル処理水を用いた大腸菌培養によって、その生菌数 が検出限界に到達しなかったことが分かる。これは、 ラジカル処理から14日ほどで殺菌効果が低下し始め ることを示唆している。しかしながら、その後の保管 では、ラジカル処理水の殺菌効果に劇的な変化は確認 されなかった。つまり、ラジカル処理水の殺菌効果は、 作成から30日ほど経過しても大きく変化しないほど 安定なものであることが示唆された。



図2 ラジカル処理水の殺菌効果の経時変化

## 3.2 深紫外吸収分光法による液相中の活性種濃度の 測定結果

図3(a)に、中性ラジカル照射によって作成されたラ ジカル活性水の紫外吸収スペクトルを示す。超純水へ のラジカル処理によって、処理溶液からはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N0<sub>3</sub><sup>-</sup>が生成され、さらに元々超純水に含まれていた溶 存酸素0<sub>2aq</sub>も残存していることが判明した。これらの 活性種は、従来のプラズマ処理水でもその生成が報告 されている。[11]これらの実験データは、プラズマ処 理水における長寿命活性酸素窒素種の生成にプラズ マ中の中性ラジカルが関与していることを示唆して おり、かつ、プラズマとプラズマ中のラジカルだけで 処理した場合の超純水の組成が酷似していることを 意味している。



図3 ラジカル処理水の紫外吸収スペクトル

次に、図4(a)に30日間に及ぶラジカル処理水中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2aq</sub>濃度,また、(b)にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の経時変化 を示す。結果として、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2aq</sub>濃度、また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度の増減傾向は非常に強い相関関係にあり、互いの 生成と消滅に密接に関係していることが示唆された。 例えば、図4(a)に示されたように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度が減少し ている保管期間7<sup>-</sup>14日目においてO<sub>2aq</sub>濃度は対照的に 増加し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度が増加している保管期間14<sup>-</sup>30日目に おいてO<sub>2aq</sub>濃度は対照的に減少している。これらの挙 動は0<sup>-</sup>30日目の期間において、ラジカル処理水中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2aq</sub>が自身の分解によって相方を生成していた ことを示唆している。また、このH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2aq</sub>濃度間の相 関関係は0<sup>-</sup>30日の全期間で確認されたわけではない ため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2aq</sub>以外にもこれらの濃度変化に影響した 活性種の存在が示唆されるが、現在までにその種の特 定には至っていない。同じように、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度が減少し ている保管期間0<sup>~</sup>7日目や14<sup>~</sup>30日目においてとNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃 度は対照的に増加し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度が対照的に増加してい る。(図4の(b))





さらに、図5に30日間に及ぶラジカル処理水のpH値の変動を示す。超純水へのラジカル処理によって、超純水のpH(未処理時は6.3)が4.0付近まで低下するこ

とが判明した。すなわち、2-1-4-1の実験結果と同様 に、ラジカル処理にってもたらされる溶液pHの低下が、 ラジカル処理水中の殺菌効果生成に関与しているこ とが示唆された。さらに、ラジカル処理から最大30 日間保管した場合でも、そのpH値は4.0でほぼ一定で あったため、各活性酸素窒素種の30日間に及ぶ濃度変 化に、ラジカル処理によって処理溶液にもたらされる pH 変動は無関係であることが示唆された。



図5 ラジカル処理水のpH値の経時変化

### 4. ラジカル処理水の経時変化に関する考察

図4に示されたように、深紫外吸収分光法を用いて ラジカル処理水中の組成を分析した結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、O<sub>2aq</sub>が検出された。さらに、図4の(A)と(B)より、 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と O<sub>2aq</sub>濃度、また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の経時変化に は強い相関関係が確認された。ラジカル処理によるこ れら活性種の生成経路と、活性種濃度間の相関関係を 明らかにするために各活性種の反応式を以下考察す る。

まず、ラジカル源に供給された Ar がガスのプラズ マ化のために印加される高電圧によって準安定状態 に励起され、その準安定アルゴン(Ar\*)が照射対象で ある超純水(H<sub>2</sub>0)を解離しヒドロキシルラジカル(OH·) を生成することが考えられる。その OH·同士の反応に

119

よって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成に至った可能性が高い。そして、30 日間の経時変化によって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度は O<sub>2aq</sub>濃度に対し て対照的に変化している。この結果より、ラジカル処 理からの 30 日の間、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と O<sub>2aq</sub>はある反応によって互 いに生成と消滅を繰り返していたことが示唆された。 しかしながら、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と O<sub>2aq</sub>間の反応に関しては、これ までに詳細な研究がほとんど行われておらず、どのよ うな化学種と反応することでH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と O<sub>2aq</sub>が互いを生成 していたのかは不明である。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応物 をX、O<sub>2aq</sub>との反応物をX 'とし、これら活性種間の相 関を式(4)として考察する。

$Ar^* + H_2O \rightarrow OH + H + Ar$	(2)
$20H \cdot \rightarrow H_2 O_2$	(3)
$H_2O_2 + X \leftrightarrow O_{2aq} + X'$	(4)

次に、N02<sup>-</sup>と N03<sup>-</sup>の生成だが、これらの活性窒素種 は一酸化窒素(N0) ラジカルとその酸化反応によって 生成されることが報告されている[12]。そのため、ラ ジカル源から供給された N0 ラジカルが N02<sup>-</sup>と N03<sup>-</sup>の 生成源である可能性が極めて高い。[式(5-6)]

 $2N0 \cdot + 0_2 \rightarrow 2N0_2 \cdot \tag{5}$ 

 $2NO_2 \cdot + H_2 O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+$  (6)

さらに、保管 0<sup>~</sup>7 日目までの期間では、NO<sub>2</sub>-濃度が 減少する一方で、NO<sub>3</sub>-濃度は対照的な増加を見せた。 従って、上記の 7 日間では、以下の式(7-9)によって NO<sub>2</sub>-が徐々に NO<sub>3</sub>-に変化していったことが示唆された

 $2H^{+} + 2NO_{2}^{-} \rightarrow NO \cdot + NO_{2} \cdot + H_{2}O \qquad (7)$  $2NO \cdot + O_{2aq} \rightarrow 2NO_{2} \cdot \qquad (8)$ 

 $4NO_2 \cdot + O_{2aq} + 2H_2O \rightarrow 4NO_3^- + 4H^+$  (9)

しかしながら、保管 7<sup>~</sup>14 日目までの期間では、N0<sub>2</sub><sup>-</sup> と N0<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の増減傾向が変化した。上記の保管期間で は、N0<sub>2</sub><sup>-</sup>は増加し、N0<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度はほぼ変化せず一定であ った。これは、保管 7<sup>~</sup>14 日目では N0<sub>2</sub><sup>-</sup>のみが生成さ れる反応がラジカル処理水中で生じたことを示唆し ている。その一例として、式(10-11)が挙げられる。

 $N0 \cdot + 0H \cdot \rightarrow H^{+} + N0_{2}^{-}$ (10)  $N0 \cdot + N0_{2} \cdot + H_{2}0 \rightarrow 2H^{+} + 2N0_{2}^{-}$ (11) さらに、保管 14<sup>~</sup>30 日目では NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の対照 的な増減が確認され、さらに、その相関関係は保管 0<sup>~</sup>7 日目のものよりさらに強く見受けられる。これは、 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>が直接 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>に変性する式(12)のような反応が上記 保管期間において生じたことを示唆している。

2H<sup>+</sup> + 2N0<sub>2</sub><sup>-</sup> + 0<sub>2aq</sub>  $\rightarrow$  2H<sup>+</sup> + 2N0<sub>3</sub><sup>-</sup> (12) 最後に、殺菌因子に関する考察を行う。本研究のラ ジカル処理水でも N0<sub>2</sub><sup>-</sup>や H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>が検出され、かつこれら の活性種は 30 日間の保管後でも劇的な濃度減少を示 さなかったことから、N0<sub>2</sub><sup>-</sup>や H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>が式(13-15)によって 過硝酸 (0<sub>2</sub>NO0H) やそれに後続するヒドロペルオキシ ルラジカル (HOO・)を生成し、大腸菌を殺菌していた 可能性がある。さらに、2-1-4-1 でも示したように、 ヒドロペルオキシルラジカル (HOO・)の生成には、 pH<4.8 の環境が必要であるが、ラジカル源を用いて 100ml の超純水を 10min 間 処理するとその pH が 4 付 近まで低下することが確認されたため、今回の殺菌因 子が HOO・である可能性は極めて高い。

$H^+ + NO_2^- + H_2O_2$	$\rightarrow$ 0N00H + H <sub>2</sub> 0	(13)
$0\text{NOOH} \ + \ \text{H}_2\text{O}_2 \ \longrightarrow \ $	$O_2NOOH + H_2O$	(14)
$0_2 NOOH \leftrightarrow HOO \cdot$	+ NO <sub>2</sub> · (pKa=5.9)	(15)

上記したラジカル処理水中における各活性種の生成 経路とそれら濃度の経時変化に関する反応式を図 6 にまとめる。



#### 図6 ラジカル処理水中における各活性種の生成経路

とそれら濃度の経時変化

120

#### 5. 結論

本研究では、電気的に中性なラジカルを照射した超 純水における殺菌効果と含有される長寿命活性酸素 窒素種濃度の経時変化を観察した。その結果、殺菌効 果はラジカル処理水作製から 30 日後でも 107 個/ml の大腸菌をほぼ全滅させるほど強力かつ安定なもの であることが判明した。さらに、深紫外吸収分光法を 用いて今回のラジカル処理水を分析したところ、H2O2、 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、O<sub>2ag</sub> が検出された。さらに、これらの地 長寿命活性種はラジカル処理水作製から30日の間に おいて、互いに生成と消滅を繰り返していた痕跡が確 認された。この長寿命活性種間の反応によってラジカ ル処理から 30 日後でも、各活性種の濃度は大きく変 化せず、これが殺菌効果の安定性を向上させていると 考えられる。最後に、プラズマ処理水でもその生成が 報告される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、O<sub>2ag</sub>等の活性種がラジカ ル処理水からも検出されたことより、プラズマ中のラ ジカルがプラズマ処理水中の活性種生成において極 めて重要な因子であることが、本研究で判明した。 (これらの成果は様式2の雑誌論文94の内容の一部に対 応する。本稿は原著論文ではなく、研究成果を解説し た報告書である。)

#### 参考文献

- [1] S. Ikawa, K. Kitano, and S. Hmaguchi : Plasma Processes Polym., 7 (2010) 33.
- [2] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, and K. Kitano : J. Phys. D: Appl. Phys., 49 (2016) 425401.
- [3] S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N. Hayashi and M. Shiratani, Curr. Appl. Phys. 2014, 14, S149-S153
- [4] M. Iwasaki, H. Inui, H. Kano, M. Ito, Y. Suzuki, D. Sutou, K. Nakada, and M. Hori, Jpn. J. Appl. Phys. 47, 3625 (2008).
- [5] H. Hashizume, T. Ohta, J. Fengdong, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, Appl. Phys. Lett. 103, 153708 (2013). [8] A. Villalobo, FEBS J. 273, 2329-44 (2006).
- [6] J.-S. Oh, E. J. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Furuta, R. D. Short, A. Hatta, J. Photopolym. Sci. Tec. 28, 439-444 (2015).
- [7] J.-S. Oh, E. J. Szili, K. Ogawa, R. D. Short, M. Ito, H. Furuta, A. Hatta, Jpn. J. Appl. Phys. 57, 0102B9

(2018).

- [8] A. Villalobo, FEBS J. 273, 2329-44 (2006).
- [9] M. Du, MM. Islam, L. Lin, Y. Ohmura, Y. Moriyama, S. Fujimura, Biochem. Mol. Biol. Int. 41, 625-31 (1997).
- [10] N. Iwata, V. Gamaleev, J.-S. Oh, T. Ohta, M. Hori, M. Ito, Plasma Process. Polym. 16, e1900055 (2019).
- [11] P. J. Bruggeman, *et al.*, Plasma Sources Sci. Technol. 25, 053002 (2016).

# 2-2-5-2 大気圧プラズマプロセス評価技術の開発(その2)

- メラノーマ細胞と正常皮膚細胞を用いたラジカル活性溶液の安全性評価 -

伊藤 昌文<sup>1)</sup>、村田 富保<sup>2)</sup>、小川 和馬<sup>1)</sup>

1)名城大学 理工学研究科
 2)名城大学 薬学研究科

#### 1. 緒 言

大気圧プラズマによる病原性微生物の殺菌効果や がん細胞などに対する死滅効果、止血効果などはプラ ズマから生成される因子の中でも活性酸素種(ROS) や活性窒素種(RNS)などの効果が高いとされている。 具体的には<sup>1</sup>0<sub>2</sub>(励起状態の酸素分子)、30(基底状態 の酸素原子)0<sub>3</sub>(オゾン)、0H(ヒドロキシルラジカ ル)、0<sup>2-</sup>(スーパーオキシド)、H00(ヒドロペルオキ シラジカル)、N0(一酸化窒素)、N0<sub>2</sub>(二酸化窒素) 等の粒子種による殺菌作用が高いとされている[1]。

本研究室では、柑橘類に繁殖するミドリカビ病の一 種であるミドリカビ (Penicillium digitatum) 胞子 の不活化に関して非平衡大気圧プラズマを用いて行 ってきた。またプラズマ中においては電子、イオン、 ラジカル、紫外線など様々な因子を含んでおり殺菌因 子を特定することが難しい。そこで、電気的に中性な ラジカルのみを選択的に照射することができる非平 衡大気圧酸素ラジカル源を用いた殺菌実験を行った [2,3]。その結果、酸素ラジカルの中でも特に基底状 態の酸素原子 0(3Pj)が不活化に大きく寄与している ことが明らかとなった[4]。さらに、酸素ラジカル照 射によって分解が困難とされるセルロースの分解促 進についても報告されている[5]。また、酸素ラジカ ルを照射した培養液を用いて皮膚がん細胞であるメ ラノーマ細胞を処理すると、酸化ストレスに基づくア ポトーシスが誘導されることが明らかになっている。 しかし、窒素系ラジカルを培養液に照射した例はなく、 がん細胞に対する効果も未知である。

本研究では、ラジカル源に供給ガスとして窒素を加 えて培養液に対してラジカル照射を行い、調製した RAMにおける窒素系ラジカルの影響を検証した。メラ ノーマ細胞と正常細胞に対するラジカル活性溶液 (RAM)の細胞死誘導メカニズムの解明を目指し、メ ラノーマ細胞に対する RAM の抗細胞増殖効果を調べ、 正常皮膚細胞に対する RAM の影響との違いを明らか とし、正常細胞に対する RAM の安全性についても評価 した。

#### 2. 実験方法

マウスメラノーマ由来の B16F10 細胞は、10%ウシ胎 児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)を用いて、37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培 養した。また、継代培養については、細胞密度が 70% になり次第、0.2%トリプシン-EDTA 液を用いて細胞 の継代を行った。

図1に示すように、2-1-4-1に記載したラジカル源 に供給ガス(Ar ガスのみ、Ar/ 05混合ガス、Ar/02/N2 混合ガス)を導入しプラズマを発生させ、出射口から 電気的に中性なラジカルを選択的に照射した。なお、 生成されたラジカルが大気中の粒子と反応すること を防ぐために、照射サンプルにプラスチックカバーを 取り付けた。出射口とサンプルの液面までの距離を照 射距離とした。出射口よりサンプルの表面積が大きい サンプルには、均等にラジカルを照射するために、サ ンプルを設置したステージを4 mm/s で走査した。そ して、無血清の DMEM にラジカル照射を行い、照射後 に終濃度が 10%となるように FBS を添加したものを RAM とした。



#### 図1 ラジカル活性培養液調整実験系

次に、図2に示すように、96ウェルプレートに細胞 を播種し、37℃で6時間インキュベートした。その後、 上記の方法で調製したRAM(120µ1/well)をウェル中の DMEMと置換し、細胞を一定時間処理した。処理後、ウ ェルから一定量のRAMを取り除いて、MTS 試薬 (Celltiter 96 Aqueous One Solution reagent; Promega社)の濃度が20%になるようにFBS含有DMEMを 加え、37℃で1時間インキュベートした。その後、生 成した色素性ホルマザン産物の490 nmにおける吸光 度をマルチプレートリーダにより測定した。なお、MTS は生細胞の中でホルマザンに還元される試薬で、ホル マザン産物の490 nmにおける吸光度は、生細胞数に比 例する。



図2 ラジカル活性培養液による細胞生存率測定手順 3. 実験結果

3.1 窒素系ラジカル添加によるメラノーマ細胞の生

#### 存率への影響

#### 3.1.1 NOラジカル密度依存性

供給する酸素ガスと窒素ガスの割合を変化させる ことで窒素ガス流量比N<sub>2</sub>/(N<sub>2</sub>+0<sub>2</sub>)=35%において、NOラ ジカル密度が最も高くなることが先行研究から明ら かとなっている[6]。表1に示す照射条件を用いて、 NOラジカル密度とメラノーマ細胞の細胞死の相関性 を検証した。図3に測定結果を示す。N<sub>2</sub>/(N<sub>2</sub>+0<sub>2</sub>)=35%で NOラジカル密度が最も高いのに対してRAMで24時間処 理したメラノーマ細胞の細胞生存率はN<sub>2</sub>/(N<sub>2</sub>+0<sub>2</sub>)=90% で最も低くなった。これらの結果から、NOラジカル密 度のみには依存しないが、N<sub>2</sub>ガスを多く供給するほど、 RMNの生存活性抑制効果が強くなることが明らかとな った。

#### 表1 NOラジカル照射条件

Irradiation condition		
Ar/(O <sub>2</sub> +N <sub>2</sub> )[slm]	4 / 1	
N <sub>2</sub> gas flow rate ratio [%]	$\frac{N_2}{O_2 + N_2} = 10,35,70,90$	
Irradiation time[min]	9	
Irradiation distance[mm]	10	





#### 3.1.2 窒素ガス流量比依存性

上記のように、N2ガスを多く供給して調製したRAMほ

どメラノーマ細胞の細胞生存率を低下させた。そこで、 ガス総流量を5s1m、02ガス流量比0.6%と固定し、N2ガ スの供給量に応じてArガスの供給量を減らし、表2に 示す条件でラジカル照射を行った。図4に細胞生存率 の測定結果を示す。RAMで12時間処理すると、窒素ガ ス流量比N2/(Ar+02+N2)が高いほど細胞生存率は低く なった。これらの結果から、酸素ラジカルのみを照射 した場合に比べて、酸素ラジカルと窒素系ラジカルの 両方を照射した場合には、相乗効果によって著しい細 胞生存活性の低下が起こることが示唆された。そこで、 以降の実験では、N2/(Ar+02+N2)=70%でRAMを調製し、 実験を実施した。

Irradiation condition		
Ar/O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> [slm]	(4.97- <b>x</b> ) / 0.03 / <b>x</b>	
O <sub>2</sub> gas flow rate ratio [%]	$\frac{O_2}{Ar + O_2 + N_2} = 0.6$	
N <sub>2</sub> gas flow rate ratio [%]	$\frac{N_2}{Ar + O_2 + N_2} = 0, 10, 30, 50, 70$	
Irradiation time[min]	6	
Irradiation distance[mm]	10	





図4 窒素ガスの供給量と細胞生存率の関係 3.2 RAMによる細胞死誘導の検証

3.2.1 RAMによるがん細胞選択的な細胞生存抑制効果

RAMががん細胞特異的に細胞生存活性を低下させる か否かを検証するため、正常皮膚細胞NHDF-AdをRAM で12時間処理した。図5に測定結果を示す。Ar/02混合 ガスで調製したRAMの原液及びAr/02/N2混合ガスで調 製したRAMの2倍希釈液は、正常細胞の生存活性に影響 を及ぼさず、メラノーマ細胞のみに対してのみ生存活 性を低下させた。これらの結果から、RAMはがん特異 的に細胞死を誘導することができることが明らかに なった。



図5 希釈したRAMで処理したメラノーマ細胞(B16F10) と正常皮膚細胞(NHDF-Ad)の細胞生存率

## 3.2.2 RAM調製時のラジカル照射時間に依存したメ ラノーマ細胞の生存活性の低下

Ar ガスのみ、Ar/0<sub>2</sub>混合ガスあるいは Ar/0<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>混合 ガスを導入し、一定時間ラジカルを照射して 3 種類の RAM を調製した。これらの RAM についてラジカル照射 時間に対するメラノーマ細胞の生存活性の変化を調 査した。図 6 にラジカル照射時間に対する各種 RAM に よる細胞生存率を示す。Ar ガスのみで調製した RAM では照射時間に関わらずメラノーマ細胞の生存率は 変化しなかった。一方で、Ar/0<sub>2</sub> 混合ガスまたは Ar/0<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>混合ガスで調製した RAM では、照射時間が長 いほど細胞生存率は低くなり、Ar/0<sub>2</sub> 混合ガスで調製 した場合に比べて Ar/0<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 混合ガスで調製した場合 の方が細胞生存率の低下がさらに大きくなった。これ らの結果から、RAM の調製時におけるラジカル照射時 間に依存して、RAM がメラノーマ細胞の生存率を低下



図 6 ラジカル照射時間を変化させ調製した RAM によ る細胞生存率

## 3.2.3 メラノーマ細胞に対する RMA の細胞生存低下作 用の経時変化

メラノーマ細胞に対する RAM の経時的な細胞生存低 下作用を検証した。図 7 に測定結果を示す。Ar ガス のみで調製した RAM ではインキュベーション時間に 関わらずメラノーマ細胞の生存率は変化しなかった。 一方で、Ar/02 混合ガスまたは Ar/02/N2 混合ガスで調 製した RAM ではインキュベーション時間が長いほど 細胞生存率は低くなり、Ar/02 混合ガスで調製した場 合に比べて Ar/02/N2 混合ガスで調製した場合の方が 細胞生存活性の低下がさらに大きくなった。これらの 結果から、メラノーマ細胞に対して RAM が経時的に細 胞生存率を低下させることが判明した。



図 6 RAM で処理したメラノーマ細胞の経時的な細胞生存率

#### 5. 結論

本研究では、Ar/O2 混合ガスで調製した RAM と Ar/0<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>混合ガスで調製した RAM を用いて、B16F10 メ ラノーマ細胞の生存活性に対する影響を比較し、窒素 系ラジカルの細胞死への影響を検証した。まず、ラジ カル照射において 02ガスと N2ガスの流量比を変化さ せて NO ラジカル密度と細胞生存率との相関性を検証 した結果、細胞生存率はNO ラジカル密度に依存せず、 N2 ガスを多く供給した条件でも低くなった。そこで、 より多くの N<sub>2</sub> ガスを供給するため、ガス総流量(5 slm) と 02 ガス流量比 (02/(Ar+02)=0.6%) を固定し、 Ar ガスに比べて N<sub>2</sub>ガスの流量比を上げると、N<sub>2</sub>ガス 流量比(N<sub>2</sub>/(Ar+O<sub>2</sub>+N<sub>2</sub>))に依存してメラノーマ細胞の 生存率が低下することが判明した。これらの結果から、 窒素系ラジカルと酸素ラジカルが相乗的にメラノー マ細胞に対して細胞死を誘導することが示唆された。 また、RAM の正常皮膚細胞に対する影響を検証するこ とで、メラノーマ細胞に対して高い殺傷能力を持つ酸 素ラジカル活性培養液は、正常細胞を全く殺傷される ことなく、酸化窒素ラジカル活性培養液でも2倍希釈 することで正常皮膚細胞への影響は極めて小さく、安 全性が高いことが判明した。

抗がん剤を用いたがん治療では、正常細胞に対する 毒性によって副作用が現れるため、薬剤の容量を決定 する際に、正常細胞には影響を及ぼさずに、抗がん作 用が発揮できる容量が用いられる。本研究において、 皮膚がんの一種であるメラノーマ細胞に対して、酸素 ラジカル活性溶液及び酸化窒素ラジカル活性溶液の 作用時間や希釈率を調整することで、正常皮膚細胞に は影響を及ぼさずに、メラノーマ細胞を選択的に死滅 させることに成功したことから、プラズマ活性溶液は 人体への安全性を考慮してがん治療に応用できる有 用な抗がん治療液になりうることが考えられた。

#### 参考文献

[1] K. Ishikawa, H. Mizuno, H. Tanaka, K. Tamiya, H.

Hashizume, T. Ohta, M. Ito, S. Iseki, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, and M. Hori, Appl. Phys. Lett. 101 (2012).

- [2] H. Hashizume, T. Ohta, Jia Fengdong, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, and M. Ito, Appl. Phys. Lett. 103, 153708 (2013).
- [3] S. Iseki, T. Ohta, A. Aomatsu, M. Ito, H. Kano, Y. Higashijima, and M. Hori, Appl. Phys. Lett. 96, 153704 (2010).
- [4] H. Hashizume, T. Ohta, T. Mori, S. Iseki M. Hori, and M. Ito, Jpn. J. Appl. Phys. 52, 056202(2013).
- [5] K. Sakai, S. Kojiya, J. Kamijo, Y. Tanaka, K. Tanaka, M. Maebayashi, J-S. Oh, M. Ito, M. Hori, M. Shimizu and M. Kato, Biotechnol Biofuels 10:290 (2017).
- [6] 岡地正嗣, "酸化窒素ラジカル照射による出芽酵母細胞の増殖効果に関する研究" 平成 29 年度修 士学位論文 (2018).

### 総括

本研究プログラムでは、1.「ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー」 と2.「プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー」の2つの研究テーマを相乗 効果が出るように、

1-1 ナノカーボン・酸化鉄ナノチューブ材料を太陽電池に応用する技術の開発、

1-2 ナノカーボン材料を燃料電池に応用する技術の開発、

1-3 ナノカーボン材料をバイオセンサや VOC ガス浄化に応用する技術の開発、

- 2-1 環境センシング及び殺菌浄化技術の開発、
- 2-2 バイオマス燃料用の植物の高効率生長や高効率分解・発酵技術の開発、 を遂行してきた。

本報告書ではこれらの成果の一部を項目別に詳細に内容を記載した。

上記に記載した「ナノカーボン材料を用いたグリーンテクノロジー」の研究成果 のうち特に優れた研究成果としては、

- 1-① 単層カーボンナノチューブを 300℃以下の低温で作製する技術を開発した (\*1-2-1 に対応)、
- 1-②白金担持ナノグラフェンおよび白金担持カーボンナノウォールを用いた高耐 久燃料電池触媒層を実現した(\*1-2-2&1-2-3 に対応)、
- 1-③カーボンナノウォール用いた電気化学センサを実現した(\*1-3-1&\*2-1-2 に 対応)
- ことなどが挙げられる。

また「プラズマ技術を用いたグリーンテクノロジー」の研究成果のうち特に優れた研究成果としては、

- 2-①大気圧プラズマ源で処理したプラズマ活性アミノ酸水溶液により植物の生長 を約 100%促進すると同時に大腸菌を滅菌(6 桁以上の殺菌)する技術の実 現に成功した(\*2-1-4 と\*2-2-1 に対応)、
- 2-②従来技術の10倍以上のセルロース分解促進技術を実現した(\*2-2-2に対応)、 2-③アルコール発酵阻害物質存在下で従来技術の4倍以上の酵母成長促進技術、

6倍以上の酵母発酵技術を実現した(\*2-2-4に対応)、

2-④大気圧ラジカル処理された活性水、培養液等の生体安全性等に対する評価技術の確立した(\*2-2-5 に対応)

ことなどが挙げられる。

上記のように、本研究プロジェクトでは当初の予定していた最終目標を達成した 成果も得られたテーマも多数あり、当初の予定以上の成果を挙げることができた。

#### 今後の展望

本研究拠点では、16名の学内研究者と4名(内1名平成29年度退職)の学外研究 者の強い連携によって強力な研究基盤の構築がほぼ実現したと考えられる。また、 本プロジェクトにより、多数のシーズを産み出すことができ、今後はこれらの技術 を日本の技術として実用化していくことと、さらに新しいシーズの創出をしていく ことが極めて重要である。

以上のことから、今後の研究方針としては、引き続き研究シーズを産み出す取り 組みを継続することに加え、民間企業との共同研究を複数個実施し、最終的にシー ズを実用化するような取り組みを強化していく予定である。

その中でもシーズとして大きく期待されるのは、①ナノカーボン材料を燃料電池、 二次電池、キャパシタ等の電極や電気化学・バイオセンサの電極、ならびに細胞培 養の基材として用いるプラットフォームとしての応用と、②大気圧プラズマによる 微生物の活性化制御技術を活用したバイオマス燃料製造プロセスへの応用である。

これらの基盤技術は新しい環境調和型の革新的なデバイスやプロセスの創製に極 めて有効であると考えられ、今後は本プロジェクトメンバーを中心に、新たなるデ バイスやプロセスの創製だけではく、実用化に向けての検討を進めていく。具体的 には、2020 年度より名城大学次世代エネルギーマテリアルイノベーションセンタ ーと名城大学プラズマバイオ応用センターの設立に向けて既に始動しており、これ らセンターを中心に次世代の環境調和型の革新的なデバイスやプロセスの開発に 取り掛かる予定である。