小特集

パルスパワー生成放電プラズマのバイオ技術への応用

3 . パルスパワーによるバクテリアの殺菌

勝 木 淳
(熊本大学工学部)

Bacteria Decontamination by Pulsed Power

KATSUKI Sunao

Department of Electrical and Computer Engineering, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

(Received 13 September 2002)

Abstract

In order to explore the effect of Pulsed Electric Fields (PEF) with pulses on the order of the charging time of bacterial membranes, we studied the effect of 45 ns pulses on the viability of bacillus subtilis in its vegetative state. A 30 Ω Blumlein generator with a low inductance spark gap switch delivers square wave voltage pulses of 45 ns duration to the electrodes in the bacterial treatment chamber. The rise time, which was varied from 2 ns ($f < 200$ MHz) to 20 ns ($f < 50$ MHz), determines the high frequency components in the Fourier spectrum of the pulse. Among pulses of different rise times, having the same total energy, those with the shortest rise time were found to kill bacteria more effectively. These results indicate that the high frequency components in the PEF deposit the electrical energy in the cell and affect intracellular structures.

Keywords:

sterilization, intracellular structure, frequency effect, ultra-short pulse electric field, Blumlein generator

3.1 はじめに

最近の食品や医薬品に対する安全性向上のために、現場での殺菌の徹底と技術の見直しが進んでいる。安全性に加えて、品質、省エネにつながるものが求められており、熱による食品のダメージを軽減する殺菌技術の開発や、非加熱殺菌技術との併用が試みられている。超高压殺菌、パルス電界殺菌、紫外線殺菌、放射線殺菌などがそれである[1]。また、高電圧パルス電源技術の進展から水中でのパルスストリーマ放電を利用する技術が、殺菌に限らず水中有害分子の処理のために利用されつつある[2-5]。この中で、パルス電界(PEF)殺菌法は、食品の風味や養分を損なうことなく比較的簡単な装置で殺菌処理できることから早くから注目されており、多くの研究

[6-12]がある。Sale と Hamilton の実験[6]をはじめとするこれまでの研究のほとんどは、時間幅が 500 ns 以上の PEF を用いており、この場合、菌の殺傷効果は細胞膜の絶縁破壊による不可逆的な穿孔現象であると考えられている[13]。PEF 殺菌を実用化するためには高効率化が重要である。また、外からの刺激に対して強い抵抗性を示す芽胞菌の殺菌が望まれるところであるが、芽胞菌に対する PEF の効果は弱く、十分な殺菌効果を得るためには、媒質の絶縁破壊に近い高電界と多くのエネルギーを要する[12]。このため PEF 法の殺菌対象は限られる。

筆者らは、細胞膜と細胞質の電気的特性の違いによって、電界の周波数が高いほど細胞内部の組織を刺激できる可能性がある[14,15]ことから、立ち上がりが高速な

author's e-mail: katsuki@eecs.kumamoto-u.ac.jp

幅 45 ns のパルス高電界を用いて、菌への周波数の影響を調べている。菌に対する新しい効果は芽胞菌に対する殺菌効果も期待できる。これまでの実験 [16] において、立ち上がりが高速、すなわち高い周波数成分を含む PEF を用いた場合、高い殺菌効果が得られることを示した。本稿では、従来の PEF 殺菌の考え方と効果について実験例を示しながら述べ、さらに、筆者らが取り組んでいるナノ秒 PEF を用いた新しい殺菌法の概念とその可能性について筆者らが行った実験結果を中心に述べる。

3 2 パルス高電界を用いた殺菌

3 2.1 細菌への電界の効果

細胞の構造は非常に複雑であるが、細胞への電界の効果を考慮する場合、細胞全体を覆う細胞膜の電気的特性が非常に重要な役割を持っており、多くの知られている高電界効果は、Fig. 1 に示されるように非常に簡単なモデルを使って説明される。細胞膜は、誘電層である細胞膜により覆われた導電性の細胞質と考えることができる。微生物細胞膜に印加される電圧（電界強度） V_c は細胞の形状により下の式により算出できる [7]。

$$V_c = 1.5aE_c \cos \theta \quad (1)$$

ただし、 a ：球形の細胞の半径、 E_c ：臨界電界強度、 θ ：電気力線方向と細胞の中心と細胞膜位置を結んだ線がなす角度、である。細胞膜に 1 V を超える電圧を与えたとき、細胞膜の不可逆的な変化が起こり始めることがわかっている。この 1 V の電圧は、 2×10^6 V/cm という非常に大きい電界強度を膜の中に発生する。

細胞膜は、Fig. 2(a) に示すように、リン脂質からなる二重構造である。膜にはある特定のイオンに対して能動的にはたらくポンプがあり、ナトリウムおよびカリウムイオンを排出あるいは取り込むことによって、細胞内のイオン濃度は一定に保たれている。細胞膜内外でのイオン濃度の違いから、細胞質は外部に対して常に負に帯電しており、そのため、外部電界がある場合は電気力線の上流側の膜へかかる電界のほうが下流側のそれよりも大きくなる [17]。細胞膜にある大きさの電界が印加されたとき、Fig. 2(b) のように膜に細孔ができ、内外の物質が自由に通過できるようになる。ただし、この細孔があまり大きくなければ細胞自身によって修復される。細胞膜に修復可能な細孔を意図的に生成する操作を細胞膜穿孔 (Electroporation) と呼び、疾患細胞への直接的な薬物投与 (Drag Delivery) や、細胞融合 (Electrofusion) など、医療およびバイオ技術に用いられている [13]。これに対

Fig. 1 Cross section and electrical equivalent circuit of bacteria in suspension.

Fig. 2 Schematic diagram of cell membrane.

して、さらに電界を大きくしたり、パルス幅を長くするなど、細孔にある大きさ以上の電気エネルギーを供給する場合は、自発的に修復不可能なほどの大きな穴となって細胞の内容物が外部へ流出し、その結果、細胞が壊死すると考えられている [13]。

3 2.2 パルス電界の殺菌特性

パルス電界 (PEF) を用いた殺菌に関する実験は数多く、様々な菌種に対して、様々なパラメータの電界が用

いられ、菌に対する効果が詳しく調べられている．その中で、Hulsheger[7]らはPEF処理を行った微生物の生存割合と、電界強度および処理時間との関係を次のように表した．

$$s = (t/t_c) - (E - E_c)/k \quad (2)$$

ただし、 s ：相対的生残率($0 < s < 1$)、 t ：処理時間、 t_c ：処理時間のしきい値、 E ：印加電界、 E_c ：印加電界のしきい値、 k ：微生物形状係数である．Fig. 3およびFig. 4はGrahlらによって行われた、スキムミルクの中に懸濁した大腸菌の電界殺菌の試験結果[8]である．縦軸はPEF処理しないサンプルに対する処理後の残存菌数の比である．Fig. 3は殺菌効果の電界強度依存性を示しており、殺菌効果が顕著になる電界強度のしきい値 E_c が存在し、 E_c 以上の電界では電界強度を大きくするほど指数関数的に菌数が減少していることがわかる．図中の n はPEFの印加回数であり、回数が多いほど菌数の残存率は小さい．Fig. 4は「パルス幅×電界印加回数」で定義される実処理時間 t に対する菌数の残存率を示す．この場合も、ある処理時間 t_c から菌数の急激な減少が始まっており、(2)式と同様の傾向である．

最近の研究では(2)式の変数 E_c と k は t の関数として扱うべきという見地に基いた解析が行われている．

3.2.3 短パルス化による高効率化

細胞への周波数の影響を見るために、Fig. 1の簡単な細胞モデルを等価的な電気回路で表すこととする(Fig. 5[14, 15, 18])．細胞質は抵抗率100 cm程度の導電性の良い抵抗体(R_c)として、細胞膜はその抵抗が細胞質に比べて十分に大きい良質の絶縁膜としてみなすことができる．細胞膜の単位面積あたりの静電容量 C_m は 10^{-6} F/cm²程度である． R_s および C_s は懸濁液の抵抗および静電容量である．また、細胞膜で外界の様々なイオンに対してはたらくポンプは、コンダクタンス G_i ($i = 1, 2, \dots$)をもつ電圧源 V_i として扱う．Fig. 5の等価回路はPEFの印加以後の細胞膜および細胞内部への電界分布の経時変化を与える．電界が印加されたとき、導電体である細胞質において電界が緩和される時間 τ_1 は、細胞の抵抗率 ρ_c と誘電率 ϵ_c を用いて

$$\tau_1 = \epsilon_c \rho_c \quad (3)$$

で表される．比誘電率80、抵抗率100 Ωcmの媒質では τ_1 は0.7 nsである．電圧パルスが細胞に印加される時、誘電体膜である細胞膜が充電される時間 τ_2 は

Fig. 3 Dependence of the fraction of surviving cells of *E. coli* suspended in UHT-milk (1.5 % fat content) on the electrical field strength [8].

Fig. 4 Dependence of the fraction of surviving cells of *E. coli* suspended in UHT-milk (1.5 % fat content) on the treatment time of PEF treatment [8].

Fig. 5 Cross section and electrical equivalent circuit of bacteria in suspension [14].

$$\tau_2 = \left(\frac{\rho_s}{2} + \rho_c \right) C_m a \quad (4)$$

で表される．ここで、 ρ_s ：懸濁液の抵抗率、 a ：細胞の直径である．(4)式は細菌の形状が球の場合であり、球で

ない場合は補正が必要である．直径 $1\ \mu\text{m}$ 程度の細菌を $1\ \text{k}\Omega\text{cm}$ の溶液に懸濁した場合， τ_2 は $30\ \text{ns}$ 程度となる．

膜が絶縁破壊によって損傷し始める電圧を V_{cr} とすると，膜を V_{cr} に充電するために外部から与えるべき電界の強度 E_{cr} は次のように表される．

$$E_{\text{cr}} = \frac{V_{\text{cr}}}{fa[1 - \exp(-\tau/\tau_2)]} \quad (5)$$

ここで， τ は印加電界のパルス幅， f は細胞の形に依存する係数である．したがって，膜に損傷を与えるために必要な電気エネルギー W は

$$W = \frac{E_{\text{cr}}^2 \tau}{\rho_s} = \frac{K\tau}{[1 - \exp(-\tau/\tau_2)]^2} \quad (6)$$

となる．ここで， K は定数である．Fig. 6 に， $\rho_s = 1.9\ \text{k}\Omega\text{cm}$ の溶液に懸濁した大腸菌 (*E. coli*) に対して，損傷を与えるための電界強度 E_{cr} ，および電気エネルギー需要 W の電界パルス幅 τ への依存性を示す．図中の点は Schoenbach 等による実験結果 [18] である．(4) 式から大腸菌の場合の充電時間は $60\ \text{ns}$ 程度と推定され，エネルギー需要 W は，細胞膜の充電時間 τ_c に対して少し長いパルス幅の電界を与えたときに最小となる．エネルギー需要の計算曲線において W が最小となるパルス幅より短い場合は，細胞膜の充電時間に対して電界のパルス幅が短く，短いほど細胞膜に V_{cr} を印加するために大きい外部電界が必要であることを示す．実験で用いられている時間幅 $60\ \text{ns}$ のパルスではエネルギーに対する左上がりの傾向は見られないが，上に述べた理論を確かめるためには実験データの補充が必要である．

3.3 サブ 100 ns パルス高電界の効果

Fig. 6 は細胞の殺傷機構が細胞膜の損傷に起因することを前提として計算されたものである．確かに $100\ \text{ns}$ 程度以上の幅の PEF であれば，印加電圧は抵抗率の大きい細胞膜にかかり，導電性の細胞質では電界はほとんど発生しない．しかしながら，パルス幅を非常に短くして，PEF の周波数成分を非常に高くすれば，電界は細胞内部へと侵入し，細胞内部の構造に影響する可能性がある．全節までの議論では，パルス幅を等価的に周波数の逆数とみなしていたが，厳密には，周波数は電圧波形に依存する．筆者らは電圧波形の立ち上がりを制御することによって，波形に含まれる周波数成分を変化して，細菌に対する電界の周波数の影響を調べた [15]．立ち上がりを変化してもパルス幅および波高値の変化は小さいので，

Fig. 6 Electric field and energy density required to reduce the *E. coli* population by one order of magnitude as a function of the pulse duration [18].

Fig. 7 Voltage waveforms delivered to the treatment chamber with a matching resistor. WV2 and WV1 are obtained by using Blumlein generator with and without the $100\ \text{nH}$ inductor, respectively.

菌に与えるエネルギーをほぼ一定に保つことができる．

Fig. 7 に菌に印加した立ち上がりの異なる 2 種類の電圧波形を示す．電圧はインピーダンス $30\ \Omega$ のブルームライン線路および低インダクタンス放電スイッチによって電極間隔 $2.2\ \text{mm}$ の平行平板電極に供給される．Fig. 7 に示す 2 つの電圧波形 WV1 および WV2 の立ち上がり時間は，それぞれ $2\ \text{ns}$ および $25\ \text{ns}$ であり，パルス幅はいずれも $45\ \text{ns}$ である．両者の電圧の最大値は等しいが，付加に供給するエネルギーは WV1 の方が約 4 % 大きい．Fig. 8 は 2 つの電圧波形のフーリエスペクトルである．2 つの波形 WV1 および WV2 の遮断周波数は，それぞれ $200\ \text{MHz}$ および $60\ \text{MHz}$ である．Fig. 9 に，Fig. 7 に示す 2 種類の電圧で枯草菌を処理したときの結果を示す．処理は枯草菌を含んだ溶液（菌液）を連続的に一定

Fig. 8 Frequency spectra of the voltage waveforms in Fig. 7.

Fig. 9 Normalized number of surviving bacteria subjected to pulsed electric fields for different voltage waveforms as a function of the number of pulses.

速度で電極間の処理容器(0.25 ml)に流し込む方式で、菌液が電極間を通過する際に適当な数のPEFを受ける。菌液は電極間を1回通過するのみである。実験では、180から1,200 Ωcm の間で数種類の抵抗率の懸濁液を用いた。処理中の温度上昇は菌液の抵抗率 ρ_s に依存するが、最もエネルギーが注入される $\rho_s = 180 \text{ cm}$ の菌液の場合でも高々5である。

図から、2種類の導電性媒体とも、立ち上がりが高速なWV1で処理した場合に殺菌効果が大いことがわかる。また、立ち上がりの効果は菌液の抵抗率が小さいほど顕著である。細胞質における電界の緩和時間は1 ns弱であり、WV1で処理した場合には僅かながら細胞質内に電界が存在できる。また、WV1を印加した場合、充電時に細胞質に流れる最大電流はWV2に比べて約4倍大きい。立ち上がりの速いパルス(WV1)によって殺菌効果が上昇したのは、高周波成分による残存電界、ある

いは細胞内部への供給電力が増加したことに起因している可能性がある。しかしながら、細胞膜への影響も否定できない。 $\rho_s = 180 \text{ cm}$ の菌液中では細胞膜の充電時間は5 ns程度であり、電界の印加時間に比べて十分に短い。したがって、立ち上がりの速いWV1を印加した方が、細胞膜に最大電圧が印加されている時間が長いので細胞膜が電界から受けるエネルギーも大きく、細胞膜が損傷する可能性は大きい。

菌液の抵抗率への依存性について考える。別の実験から、菌液の抵抗率が小さい方がPEF印加1回あたりの殺菌効果が大いことがわかっている。ただし、エネルギー効率は小さい。(4)式からわかるように、細胞膜の充電時に細胞質に流れる電流は菌液の抵抗率に逆比例するので、電圧波形が同じであっても菌液の抵抗が小さいほど大きい電流が流れる。 $\rho_s = 180 \text{ cm}$ 、印加パルス数12.5のとき、測定した菌液の温度上昇は高々5であった。注入エネルギーから計算される温度上昇は1パルスあたり4であり、熱の収支が合わない。これは、測定された温度が時間的に平均化された値であることと、菌液で発生した熱がブルームライン線路を成す銅板を介して散逸するためである。菌液の瞬間的な温度上昇が微生物に与える影響は現在のところわかっていないが、解析上注意を要する点である。

殺菌のエネルギー効率についてマイクロ秒PEFと比較すべきであるが、ほかに1 μs 以下のPEFで枯草菌を処理した実験例がない。参考として、枯草菌と同じバチルス属のセレウス菌を時間幅500 nsのPEFで処理した実験[11]と比較してみる。実験[11]($\rho_s = 3,000 \text{ cm}$)では、菌数を1桁減少させるのに約40 J/mlエネルギーを要している。45 nsのPEFを用いた本実験では、条件が実験[11]に最も近い $\rho_s = 1,200 \text{ cm}$ の場合で1桁の菌数減少に要したエネルギーは約8 J/mlと、500 ns PEFの5分の1程度である。

3.4 まとめ

本稿では、電界殺菌の考え方と最近の極短PEFを用いた殺菌試験結果を中心に述べた。立ち上がりの速いパルス電界を用いると、エネルギーが細胞膜ではなく細胞内部へと注入されるので、これまでのマイクロ秒パルス電界とは違った殺菌効果が期待できる。特に、芽胞菌への応用が期待される。筆者らのこれまでの研究では、立ち上がりの速いパルス電界を用いた場合の殺菌効果改善の要因が、細胞膜ではなく細胞内部への作用であることを証明するには至っていない。立ち上がりの作用を解明す

るためには、数 ns 程度の極短パルス電界を用いた追実験と、さらに、微生物のミクロ的な解析が必要である。

参考文献

- [1] 一色賢司, 松田敏生: 食品の非加熱殺菌ハンドブック(サイエンスフォーラム, 2001).
- [2] M. Sato *et al.*, Int. Chem. Eng. 30, 695 (1990).
- [3] A. Mizuno *et al.*, IEEE Trans. Ind. Appl. 24, 387 (1988).
- [4] A. Abou-Ghazala, S. Katsuki *et al.*, to appear in IEEE Trans. Plasma Sci. (2002).
- [5] B. Sun, M. Sato *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. 32, 1908 (1999).
- [6] A.J.H. Sale and W.A. Hamilton, Biochem. Biophys. Acta. 148, 781 (1967).
- [7] H. Hulsheger *et al.*, Radiat. Environ. Biophys. 22, 149 (1983).
- [8] T. Grahl and H. Mearkl, Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 148 (1996).
- [9] B. Qin, Q. Zhang, G. Barbosa-Canovas *et al.*, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. 1, 6 (1994).
- [10] Q. Zhang, G.V. Barbosa-Canovas *et al.*, J. Food Eng. 25, 261 (1995).
- [11] S.J. MacGregor, O. Farish *et al.*, IEEE Trans. Plasma Sci. 28, 144 (2000).
- [12] S. Katsuki, T. Majima *et al.*, IEEE Trans. Plasma Sci. 28, 155 (2000).
- [13] U. Zimmermann, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105 (1986).
- [14] K.H. Schoenbach *et al.*, Bioelectromagnetics 22, 440 (2001).
- [15] K.H. Schoenbach, S. Katsuki *et al.*, IEEE Trans. Plasma Sci. 30, 293 (2002).
- [16] S. Katsuki, K.H. Schoenbach *et al.*, Proc. Power Modulator Conf., Hollywood, 2002, W2B.
- [17] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipurski, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell, (Ed.), Molecular Cell Biology, 4th Edition (Freeman, 1999) p.578.
- [18] K.H. Schoenbach, F.E. Peterkin *et al.*, IEEE Trans. Plasma Sci. 25, 284 (1997).