



オオムギ種子発芽促進に効果を示すウルトラファインバブルの個数濃度*

Number Concentration of Ultrafine Bubble Being Effective in Promoting Barley Seed Germination

大下 誠一** 上條 雄樹*** ファム ティ クィン アン** 吉村 正俊**
OSHITA Seiichi KAMIJO Yuuki Pham Thi Quynh Anh YOSHIMURA Masatoshi

五月女 格** 亀谷 宏美† 藤田 俊弘*** リュウ シュ††
SOTOME Itaru KAMEYA Hiromi FUJITA Toshihiro LIU Shu

Abstract The test method for evaluating the promotion effect of Ultrafine Bubble (UFB) on barley seed germination was published as an ISO standard in July 2019. There should be a minimum number concentration of UFB that can provoke early seed germination, but it is still unclear. Hence, we conducted a germination examination by applying UFB water containing different number concentrations. The results showed that the promotion of germination is observed statistically with UFB water whose number concentration is in the range of 10 to the 8th power/ml. The difference in the number concentration of UFB was also supported by ESR analysis. After the application of ultrasonic sound of 43 kHz for 30 s, UFB water containing UFB of 6.03×10^8 particles/mL showed the larger signal intensity of reactive oxygen species which was composed more of hydroxyl radicals than that of 1.26×10^8 particles/mL. This fact indicated the difference in the number concentration of UFB without any effect of foreign matter included in UFB water.

Keywords: Ultrafine bubble, Number concentration, Barley seed, Germination promotion effect, ESR

1. 緒言

はじめに気泡の大きさを表す用語について記す。従来、直径が数~数十 μm 程度の気泡をマイクロバブル、サブミクロンオーダーの直径を持つ気泡をナノバブルと表記する例が、特に学術論文において多くみられた。一方、ISO（国際標準化機構）において、2017年6月に気泡の体積相当

に応じた用語が ISO 規格として発行された[1]。その中で、直径が $1\mu\text{m}$ 以上で $100\mu\text{m}$ 未満の気泡を microbubble、 $1\mu\text{m}$ 未満の気泡を ultrafine bubble、両者を総称して fine bubble という用語が定義された。これにより、特に産業界では ISO 規格に則った用語の使用が推奨されることになった。学術論文における用語は、著者により異なる

* 2019.12.16 受付

** 東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
TEL: (03)5841 8182 FAX: (03)5841 8182 E-mail: aoshita@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

*** IDEC(株)

† 農研機構・食品研究部門

†† School of Space and Environment, Beihang University, Beijing

が、従来の用語に加えて ISO 用語を用いる例が激増する様相を呈している。本稿では ISO 規格の用語を用いることを基本とし、文献の引用に際しては、混乱を招く恐れがある場合には、その文献で使われた用語と ISO 用語を併記した。

ファインバブルの物理化学的特性については従来より多くの知見が報告されてきたが[2-14]、生体への影響に関する報告は少ない。こうした状況もあり、筆者らはオオムギ種子を対象に UFB (ウルトラファインバブル) 水の発芽促進効果を検討してきた。DO (溶存酸素濃度) が同じでも UFB 水で発芽が促進されるメカニズムに関して、筆者らは、UFB 水における活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) の発生を実験的に認めた。そこで、UFB の個数濃度 (個/mL) の経時的な減少 (UFB の崩壊) により ROS ($\cdot\text{OH}$: ヒドロキシルラジカル) が発生し、これがシグナル伝達分子となって種子内の ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$: スーパーオキシドアニオンラジカル) の発生を誘発し、発芽を促進するという仮説を提示し、これを実験的に裏付けるデータを報告してきた[15-17]。これらの結果に基づき、ベトナム、タイ、インドネシア、ハワイなどでも実証試験と ISO への国際規格提案を行った結果、FB (ファインバブル) の応用技術のうち、最初に発行した規格の一つとして「オオムギ種子の発芽促進を評価する試験法」が国際規格として発行された[18]。

こうした発芽促進効果は UFB の個数濃度がおよそ $10^7\sim 10^8$ (個/mL) レベルにあるときに観察されているが、UFB が発芽促進に効果を発揮するための最小の UFB 個数濃度については報告が見当たらないので、検討した。

2. 実験方法および装置

2.1 種子と発芽試験

種子には、コムギ、トウモロコシ (メイズ)、コメに次いで世界で 4 番目に重要な穀物であるオオムギ種子 (コピンカタギ) を用いた。種子水分を約 13 % w. b. に調製した乾燥種子を 20 °C 前後の室内に静置し、11 ヶ月~45 ヶ月にわたって保存することにより、異なる保存期間における種子を採取して実験に供した。いずれの実験でも、粒が大きく、変色がない健全な種子 300 粒を選別し、これを任意に 2 つのグループに分け、一方を UFB 水試験区用 (UFB 区)、他方を蒸留水試験区用 (コ

ントロール区) とした。各グループを更に 50 粒ずつ 3 組に分け、プラスチック製ネットに入れた。それぞれの試験区の 50 粒 3 組ずつを UFB 水および蒸留水を入れたピーカーに浸漬した。水量は種子 1 粒につき 10 mL とし (各試験区とも 150 粒 /1.5L)、各水を 1 日 2 回交換した。恒温水槽を用いて水温を 25 °C 一定で暗条件とし、各測定時間に、各試験区の水で十分に湿らせたろ紙上に種子を 50 粒ずつ整列させ、発芽した種子数を記録した。

2.2 発芽の判定

種子の発芽は、吸水に始まり幼根が伸びて外皮 (種皮) を破ることと終わるとの記述がある[19]。しかし本稿では技術的な取扱いを念頭に置いて、ISO 規格 (ISO 18763:2016) に則り、幼根が 1 mm の長さには達した状態を発芽と判定した[20]。

2.3 モデル式と評価パラメータ

時間と共に種子が発芽する過程をモデル化するために、式 (1) に示す dose response (s-shaped) model を適用し、 T_{50} を求めた[21]。

$$G(t_i) = \frac{G_{max}}{1 + \exp\{B(\log(t_i) - \log(T_{50}))\}} \quad (1)$$

ここで、 \log は自然対数を表し、記号は末尾に示す通りである。

次に、UFB の効果を定量化する評価パラメータとして ISO 規格で定義された式 (2) の P 値を求め[18]、本稿では P 値を%に換算して示した。また、視認性を考慮して、それぞれの T_{50} と残差平方和を基にした 95% 信頼帯をも示した。

$$P = (T_{50, control} - T_{50, UFB}) / T_{50, control} \quad (2)$$

2.4 UFB 発生装置

UFB の発生には Ultrafine GALF FZ1N-10 bubble generator (IDEC 株) を用いた。供給電力は 1.5 kVA、水 (蒸留水) の循環流量は 16.6 L/min、供給される空気は 0.83 L/min である。蒸留水を 15 L 供給し、室内空気をフィルタ (エアフィルター KIC-T6, アズワン 株) を介して取り込み、10 分間稼働させて発生装置内を洗浄後、すべての UFB 水を排出した。続いて 15 L の蒸留水を用いて 10~60 分間稼働させ、空気 UFB を発生させた後に静置し、UFB の粒径や個数濃度が比較的安定する翌日から実験に供した。

なお、後述する 3.1 UFB 水の特性および 3.2 発

芽試験結果とモデル解析においては、実験の都度、目的とする UFB 個数濃度となるように UFB 発生装置の稼働時間を調整した。

2.5 UFB 計測装置

UFB の測定には、粒子解析装置ナノサイト LM10 (日本カンタム・デザイン株式会社) を使用した。レーザー光源は 635 nm, 40 mW の半導体レーザーである。同型機種でも、パラメータの設定が異なれば結果の再現性が損なわれる。本測定では解析ソフトウェア上で与えるパラメータを以下の通り一定とした。[Capture Window]: Screen Gain=2.1、Camera Level=max、[Process Window]: Detection threshold=6、[Measurement Window]: Number of captures=3、Capture duration 30s。なお、Capture duration はブラウン運動する粒子の録画時間であるが、予備実験として 30 s から 60 s まで 10 s 刻みで同一試料を測定した結果から、30 s の録画時間であれば微粒子解析結果に影響しないことを確認して設定した。

2.6 ESR (電子スピン共鳴) 分光器とラジカル

ESR (Electron Spin Resonance) 分光器は X バンド (9.8 GHz) の EMX-plus (ブルカーバイオスピン株式会社) を用いた。測定条件を、中心磁場 3521 G、測定磁場範囲 200 G、磁場変調幅 1 G およびマイクロ波強度 6 mW と設定し、室温にて測定した [22]。

UFB 水をシリンジ付きディスク扁平セル (60(L)×6.5(W)×0.3(T:ID) mm、有限会社 フラッシュポイント) で吸い上げ、セルを ESR キャビティ内にセットした後、速やかにアダクト信号を計測した。

スピントラップ剤には 50 mM の 5-(2,2-dimethyl-1, 3-propoxy cyclophoryl)-55-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO, MW=247.23) (合同会社 PRINC) を用いた。

UFB を崩壊させてラジカルを発生させるために、UFB 水を採取したディスク扁平セルの、セル部のみ、超音波洗浄器 (ASU-3D, 43 kHz, 80 W, アズワン株式会社) に 30 秒浸漬した。

なお、得られた ESR スペクトルから目的のシグナル強度を定量評価するために標準試料 (ESR 用スタンダード試料 (PFA-4/10) を用いた測定も行った。

2.7 その他の装置

上記に加えて以下に列挙する装置を使用した。

- (1) 蛍光式溶存酸素濃度 (DO) 計および pH 計 : Seven2Go Pro および TMSevenExcellence™ 卓上メータ (メトラー・トレド株式会社)
- (2) ゼータ電位 : ゼータ電位計 ZEECOM (株式会社マイクロテック・ニチオン)
- (3) 蒸留水 : 蒸留水製造装置 (ヤマト科学株式会社, Autostill WA-53) を用いた。

3. 実験結果

3.1 UFB 水の特性

UFB 発生装置を 60 分間運転した後、110 mL のガラス瓶 (スクリュー管瓶) 複数に UFB 水を採取後、ヘッドスペースが生じないように密封して 20°C の恒温室に静置し、約 1 ケ月に渡って UFB の特性を計測した。なお、個数濃度と粒径の測定では、ガラス瓶の上部、中央部および下部から約 5 mL の UFB 水をサンプル水として採取し、各サンプル水につき 3 回測定し、合計 9 個の測定値を得た。

3.1.1 運転時間と UFB 水の温度

UFB 発生装置に循環水の冷却機能がないため、運転時間と共に UFB 水の温度は漸増し、60 分運転後の UFB 水温度は、34.8°C (室温 17.7°C) および 41.6°C (室温 22.8°C) まで上昇した。一方、DO は、いずれも 12 mg/L 程度であり、大気圧下で同温度域の飽和溶存酸素濃度 8.4~9.3 mg/L に対して過飽和になっていた。したがって、40°C 超の水温であっても、DO の観点からは運転による水温上昇に問題は認められなかった。

3.1.2 個数濃度、粒子径、DO、pH およびゼータ電位

UFB 装置の運転時間と共に UFB 個数濃度やその他の特性が変化する。ここでは個数濃度が 10 の 8 乗レベルで個数濃度が近い値にある UFB 水の例を代表として 2 例取り上げ、各種の特性を示した。図中の記号 DW は蒸留水中に発生させた UFB を指し、() 内は発生させた日付を意味しており、Fig.1~Fig.5 まで共通である。

【UFB 個数濃度】

ヘッドスペースがない状態で密封保存した試料の UFB 個数濃度 2 例を Fig. 1 に示した。DW(2/20)は $1.1 \times 10^8 \sim 1.62 \times 10^8$ (個/mL)、DW(5/08)は $1.4 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8$ (個/mL) の範囲にあり、28 日間にわたって大きな変動はなく、UFB が安定して存在した。

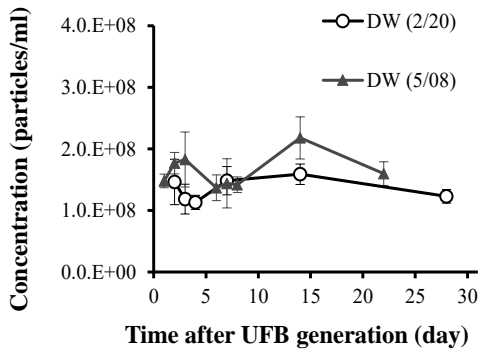


Fig. 1 UFB number concentration over storage Time.

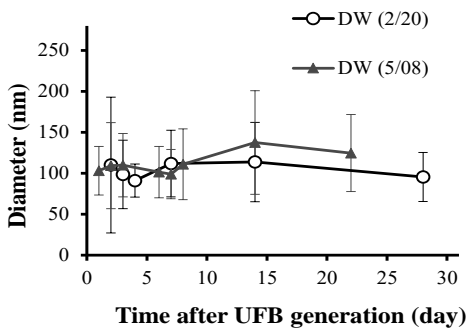


Fig. 2 Mean diameter of UFB over storage time.

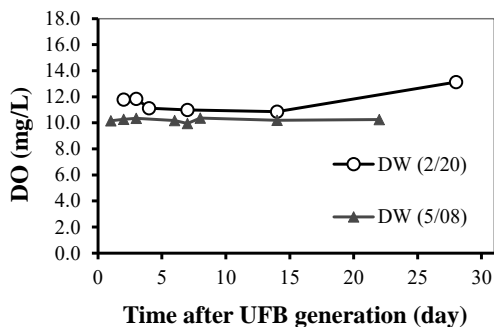


Fig. 3 DO of UFB water over storage time.

【粒径、DO、pH、ゼータ電位】

UFBの平均粒径（全粒子の平均直径）を Fig. 2 に示した。保存全期間に渡り平均粒径は、DW

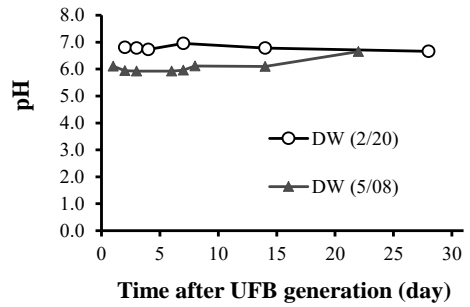


Fig. 4 pH of UFB water over storage time.

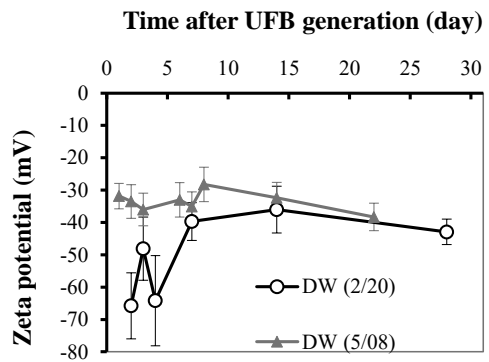


Fig. 5 Zeta-potential over storage time.

(2/20) では 98.9~137.4 nm、DW (5/08) では 91.1 ~111.8 nm の範囲にあり、安定していた。また、DO を Fig. 3、pH を Fig. 4、ゼータ電位を Fig. 5 に示した。ゼータ電位を除いて、いずれも、保存全期間にわたってほぼ安定した値となった。ゼータ電位 (Fig. 5) のみ、UFB 発生後 5 日間ほど変動が大きかった。Fig. 2 に見られる平均粒径の大きなバラツキが単に幾つもの異なる粒径の存在を反映したものでなく、UFB 発生後しばらくはバブルの合一や収縮が生じており、それがゼータ電位の計測を不安定にした可能性が考えられる。

3.2 発芽試験結果とモデル解析

3.2.1 高品質種子（短期保存）に現れる促進効果

UFB 水と Control 水に浸漬した場合の発芽率の経時変化と s-shaped モデルによるフィッティング結果を Fig. 6 に示した。UFB の個数濃度は 2.37×10^8 個/mL であった。記号□は UFB 水、○はコ

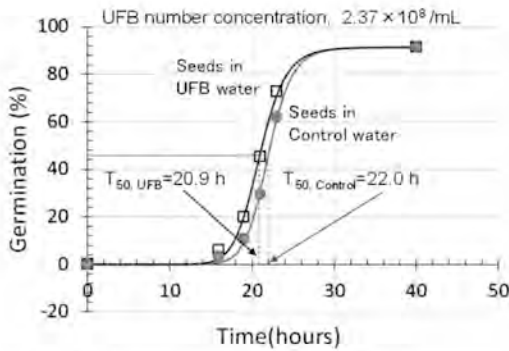


Fig. 6 Fitting curve of germination ratio over submerged time with T_{50} values of high quality seeds.

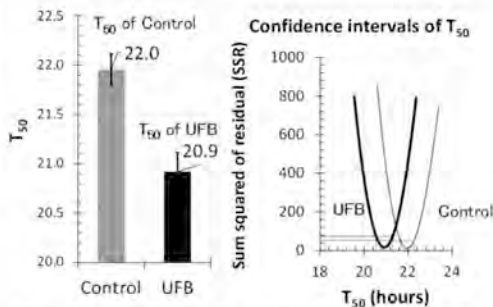


Fig. 7 Mean values and 95 % confidential intervals of T_{50} .

コントロール水に種子を浸漬した場合であり、1つの記号は、種子 50 粒を 1 組として発芽率を求めた時の、3 組の平均値を示す。UFB の個数濃度および T_{50} の値も合わせて Fig. 6 に示した。供試材料は 34 ヶ月保存後の種子である。最終発芽率は 95 % であり、所要時間は 40 時間であった。

この T_{50} の平均値と標準誤差を Fig. 7 (左図) に、残差平方和から求めた 95% 信頼帯を Fig. 7 (右図) に示した。図中の数値で明らかなように $T_{50, UFB} < T_{50, Control}$ であり、式(2)に示した評価パラメータ P は $P=5.0 \pm 1.1\%$ となって、UFB による種子の発芽促進効果が示された。ただし、この場合では 34 ヶ月保存後も種子の発芽に係る生理特性は良好に保たれているため、最終発芽率は UFB 区、コントロール区共にほぼ同じ 95 % であり、UFB 区において発芽速度が向上する効果のみが示された。

3.2.2 低品質種子(長期保存)に現れる促進効果

保存期間が 45 ヶ月の種子を用いた発芽試験結

果を Fig. 8 に示す。この図では UFB 区、コントロール区とも平均値ではなく、3 組の発芽率の実測値をプロットした。記号の意味は前項と同じである。ただし、Fig. 6 で平均値を示したのに対し、Fig. 8 では、パラツキの直感的な視認性を考慮して、各実験区 3 組の種子発芽率の生データを全てプロットした。ここで、UFB の個数濃度は 1.54×10^8 個/mL であった。また、最終発芽率に達するまで、高品質種子では 40 時間であったのに対し、119 時間を要した。Fig. 8 の左図は s-shaped モデルによるフィッティングの結果、右図は T_{50} の平均値と 95% 信頼帯である。前項と同じく、 $T_{50, UFB} < T_{50, Control}$ であり、評価パラメータ P は $P=46.6 \pm 2.2\%$ となって、高品質種子に比べて顕著な発芽促進効果が認められた。さらに特筆すべきは最終発芽率にも促進効果が現れた点である。すなわち、コントロール区で 62.0 % でしかなかった最終発芽率が UFB 区では 87.3 % まで向上した。

以上から、UFB の促進効果は、発芽速度の向上(高品質種子)のみならず最終発芽率の増大(低品質種子)をも伴うことが示された。

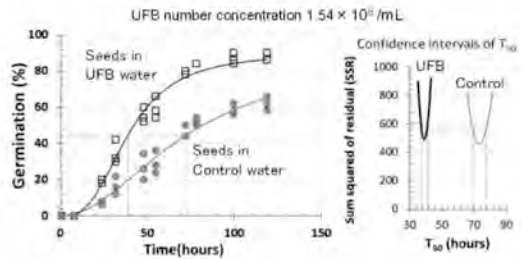


Fig. 8 Fitting curve of germination ratio over time and 95% confidential intervals of T_{50} of low quality seeds.

3.3 種子保存期間、UFB 個数濃度と発芽促進効果

前節で示したように、UFB の発芽促進効果は種子の品質により現れ方が異なる。一方、種子の品質は保存条件が一定であれば保存期間に依存して劣化する。そこで、UFB 個数濃度の順に、種子の保存期間、UFB 区とコントロール区の T_{50} の値と両者間の有意差 (5% の危険率で有意差有りの場合○、ない場合×)、および両区最終発芽率 G_{max} を Table 1 に示した。

T_{50} から判断して、保存 34 ヶ月と 38 ヶ月の間に、種子の品質劣化が生じる明瞭な転換点があることが分かる。

Table 1 Promotion effect on germination of Barley seeds with storage duration and UFB number concentration.

Number concentration (particles/mL)	Storage duration (month)	T _{50, control} (h)	T _{50, UFB} (h)	G _{max, Control} (%)	G _{max, UFB} (%)	Significant difference	P
1.06 × 10 ⁷	25	20.4	19.6	92.0	97.0	X	3.9
3.14 × 10 ⁷	26	20.7	18.9	95.0	92.0	○	8.7
3.46 × 10 ⁷	25	20.4	18.7	92.0	95.0	X	8.3
7.22 × 10 ⁷	11	14.6	13.0	92.0	94.0	○	11
2.37 × 10 ⁸ *	34	22.0	20.9	91.3	91.3	○	5.0
5.62 × 10 ⁸	34	22.0	20.7	91.3	93.3	○	5.9
1.54 × 10 ⁸ **	45	73.2	39.1	62.0	87.3	○	47
1.95 × 10 ⁸	44	102.8	49.7	49.3	82.7	○	52
2.27 × 10 ⁸	38	46.4	39.6	37.3	44.0	○	15
6.61 × 10 ⁸	38	77.6	37.9	37.3	76.7	○	51

Note: *Data of Fig.6 and Fig.7, **Data of Fig.8

発芽促進効果の観点からは、いずれの場合も T_{50, UFB} < T_{50, Control} であり UFB 区で発芽速度が向上した。しかし、第 1 行 (1.06 × 10⁷ 個/mL) においては、統計的有意差 (危険率 5%) が認められなかった。その理由は、UFB 個数濃度が低すぎて効果発現に至らなかったと考えられる。

一方、これよりも約 3 倍高い個数濃度で比較した結果が第 2 行 (3.14 × 10⁷ 個/mL) と第 3 行 (3.46 × 10⁷ 個/mL) である。両者は、ほぼ同等の個数濃度であったが、前者では T_{50, Control} と T_{50, UFB} に有意差があったのに対し、後者では有意差が認められなかった。従ってこのレベルの個数濃度では統計的に安定した発芽促進効果は望めないと判断された。

さらに、個数濃度を高めた場合、すなわち、7.22 × 10⁷ 個/mL ~ 6.61 × 10⁸ 個/mL の範囲では、種子の品質に関わらず、統計的有意差を持って発芽促進効果が認められた。この事実と、本研究で用いたナノサイト LM10 を始め、多くの微粒子計測装置による個数濃度が、不可避免的に水中の UFB と異物を合算した値でしかないことを考慮すると、発芽促進効果は、およそ 10⁸ 個/mL 以上において発揮されると推察された。

さらに、種子の品質が一定の場合に、UFB 個数濃度がどう発芽に影響するかを第 9 行と第 10 行から推察できる。コントロール区における両者の G_{max, Control} は共に 37.3% と極めて低く、発芽の生理活性に係る種子品質は同等であった。これに UFB 水を適用すると、個数濃度が 2.27 × 10⁸ 個/mL (第 9 行) の時に 44.0% にしか増大しなかった発

芽率が 6.61 × 10⁸ 個/mL (第 10 行) では 76.7% まで増大し、発芽促進効果に顕著な違いが見られた。すなわち、発芽率が低い種子に対しては、UFB 個数濃度が顕著な影響を与えることが示された。

3.4 ESR 法によるラジカルの検出と UFB 個数濃度

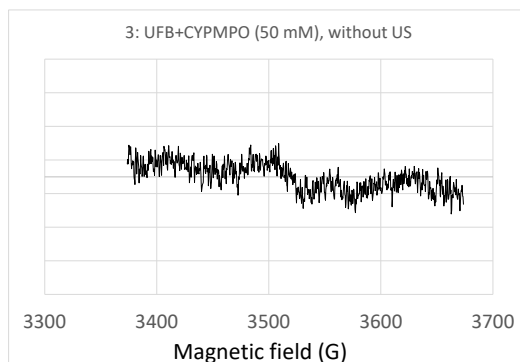


Fig. 9 ESR spectrum of UFB water containing CYPMPO without applying ultrasonic sound.

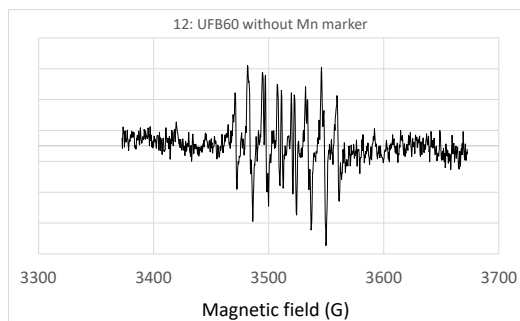


Fig. 10 ESR spectrum of UFB water containing CYPMPO after applying ultrasonic sound.

個数濃度が 7.22 × 10⁸ 個/mL の UFB 水に CYPMPO を加えた溶液の ESR スペクトルを Fig.9 に示した。縦軸 (Fig.9 ~ Fig. 12) は CYPMPO アダクトのシグナル強度の相対値である。ノイズが大きく、ラジカルの発生を示す特徴的なシグナルは認められなかった。これにより、CYPMPO を加えても UFB の崩壊は生じないと判断された。

Fig.10 は個数濃度 6.03 × 10⁸ 個/mL の UFB 水に CYPMPO を加えた溶液に超音波を照射した後に観測された ESR スペクトルであり、ラジカルの

発生が確認された。その形状から、大半はヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) で、少量のスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) が混在すると判断された。

次に、マンガンマーカと UFB 水を測定し、観測されるラジカルのシグナル強度 (矢印①) を矢印②のシグナル強度比として算出した。

これにより、異なる試料・条件であってもラジカル発生量すなわちシグナル強度を相対的に比較し定量化することができる。Fig. 10 のスペクトルを呈する UFB 水をマンガンマーカと共に測定して得たスペクトルを Fig. 11 に示す。図中の矢印① ($g=2.01$) がマンガンマーカの影響を受けずにシグナル強度が安定して観察できる $\cdot\text{OH}$ 由来のアダクトシグナルであり、矢印② ($g=1.93$) がマンガンマーカのシグナルを示す。両者のシグナル強度から、マンガンマーカのシグナル強度を 1 とすると $\cdot\text{OH}$ のシグナル強度は 0.79 であった。

一方、個数濃度が低い UFB 水 (1.26×10^8 個/mL) に超音波を照射した後、同様に ESR スペクトル

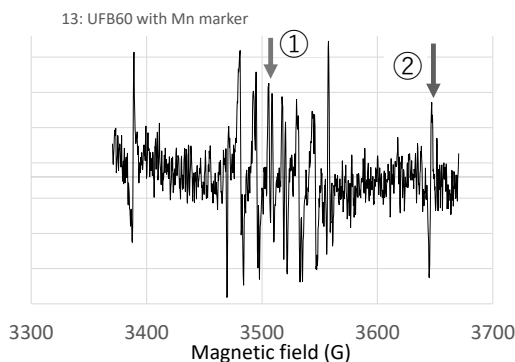


Fig. 11 ESR spectral of UFB water containing CYPMPO after applying ultrasonic sound with Mn marker.

を測定した。その結果を Fig. 12 に示す。このとき、前述と同じ方法でマンガンマーカの単位当たりのシグナル強度に対する $\cdot\text{OH}$ のシグナル強度は 0.68 となった。

以上の結果、UFB 個数濃度が高いほどラジカルの発生量が多いことが示された。このように、ラジカルの発生量と UFB 個数濃度の多寡とが対応する結果が得られたことから、現時点で多くの微粒子計測装置が異物と UFB を識別できない問題

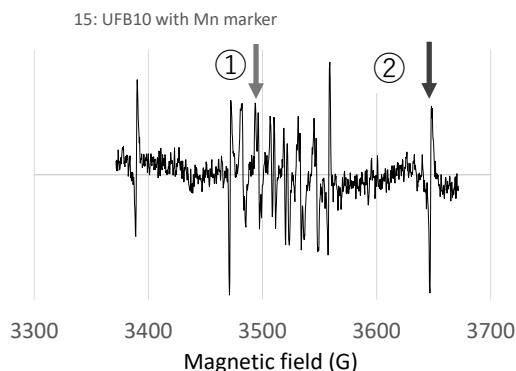


Fig. 12 ESR spectral of UFB water containing CYPMPO after applying ultrasonic sound with Mn marker.

を解決する方法の 1 つが示唆された。すなわち、超音波照射により、異物ではなく UFB のみの個数濃度を、ラジカル量を介して推定・評価できる可能性に光が当てられた。

さらに、UFB 発生翌日以降の UFB 水から、ESR 法により、ラジカルの発生が認められた。このことは、UFB が少なくとも数秒や数分という短時間でなく、日単位で長期にわたって存在することを支持するデータであると考えられる。

4. 考 察

4.1 発芽促進に係る UFB 個数濃度

ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$) がシグナル伝達系でセカンドメッセンジャーとして働き、これらが植物の成長や発育、ストレス応答など様々なプロセスを制御していることが知られている。Kranterらは内生の ROS に関する研究が進んでいるのに対し、外生の ROS が種子の発芽に果たす生理学的な重要性に関する知見が少ないことから、エンドウの種子を水に浸漬した発芽の初期段階では短時間に生成する H_2O_2 が発芽に重要な役割を果たしていることを示すと同時にその生成量は極めて少ないことを指摘した[23]。一方、Ishibashiらは人為的に外生の H_2O_2 を与えた結果、オオムギ種子の発芽が促進されることを報告した[24]。両報告の結果は一致しており、外生の ROS が種子発芽を促進することから、UFB 水による発芽促進に関する報告[15, 25, 26]が増加している理由の一端もここにあると思われる。

一方、オオムギ種子の発芽時に NADPH オキシ

ダーゼにより合成された ROS が胚におけるジベレリン生合成を促進し、デンプン貯蔵細胞における α -アミラーゼを誘導するとの報告がある[27]。そこで、別途測定した α -アミラーゼ活性を Fig. 13 に示した。UFB 水に浸漬した種子の α -アミラーゼ活性がコントロール水よりも高いことが明瞭であり、UFB に起因した外生の ROS が内生の ROS 合成に寄与していることが推察された。

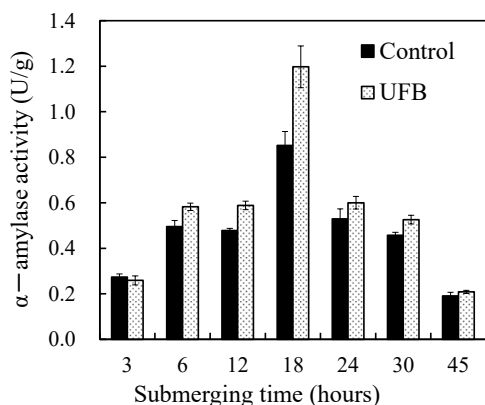


Fig. 13 α -amylase activity of seeds submerged in UFB and Control water.

Table 1 に示したように UFB 水の発芽促進効果が発揮されるためには、ある値以上の個数濃度が要求される。一方、UFB 自体を光学的には視認できないため、多くの装置がレーザー光を照射し、その散乱光を検出して、各々の装置に特有の方法で結果を求めることが多く、かつ、検出された情報の解析方法も装置によって異なる。このため、種々の論文で個数濃度が報告されていても、その濃度が実態をどこまで表現しているかは常に問題となっている。

そこで、本報告はナノサイト LM10 (計測ソフトウェア: NTA3.1 Build3.1.46) による個数濃度を使ったが、共著者が有するナノサイト NS500 (レーザー光源 405 nm、70 mW、計測ソフトウェア: NTA3.0 0068) を用いて、事前に比較測定を行った。装置に入力するパラメータは録画時間を 60 s とする以外は 2.5 節に記したと同等にし、2.4 節に記したバブル発生装置を 10 分、20 分および 60 分稼働させて異なる個数濃度の UFB 水を発生させ、ヘッドスペースを排除してガラス瓶に封入し、

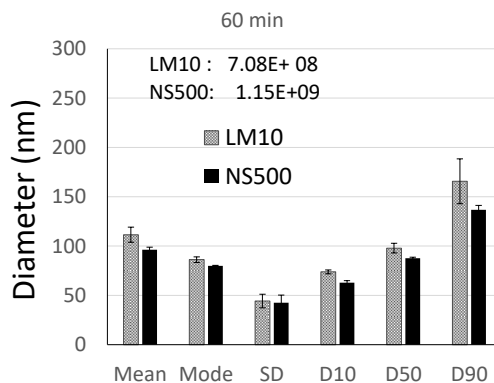


Fig. 14 Comparison of UFB diameter measured by both NanoSight LM10 and NanoSight NS500.

翌日の同時刻に 2 つのナノサイトで個数濃度や粒径を測定した。Fig. 14 に 60 分稼働させた場合の UFB 粒子径測定結果を 1 例として示した。計測性能は NS500 の方が高いにも関わらず、バブル粒子径には大差が見られなかった。一方、個数濃度は NS500 の方が 1.6 倍ほど多い値であった。計測装置の性能向上と共に、現象をよりの確に捉える方向に進んでおり、想定された結果となった。同一の製造会社で同一の計測器シリーズを用いて、このような違いが生じるのであるから、異なる製造会社の装置を用いた場合には、得られた結果に対して一層の注意が必要である。

以上の結果から、発芽促進効果を発揮する最小の個数濃度を判定する場合にも慎重にならざるを得ない。Table 1 において、UFB 水の発芽促進効果が認められる最小値は 7.22×10^7 個/mL であるが、これを 1.6 倍すると 1.15×10^8 個/mL になる。3.3 節で「発芽促進効果は、およそ 10^8 個/mL 以上において発揮される」としたのは、不可避の異物の影響も含めて、ここに記した計測装置に起因した理由による。

4.2 超音波照射によるラジカル発生量と UFB 個数濃度

静置した UFB 水から OH ラジカルが発生する可能性は低いとする数値シミュレーションが報告されている[28]。しかし、オオムギ種子では静置した UFB 水に浸漬するのみで外部からのエネルギーを与えることなく、Table 1 に示した発芽促進が認められた。また、蛍光試薬 APF を用いた

実験でもラジカル発生を観察している[16]。この不一致の理由については、今後の検討課題である。

一方、Fig. 9 に示したように ESR 法ではラジカルの信号は検出されなかった。この理由は、細胞の生育などに寄与するラジカル濃度が極めて低い[29]ことにあると考えられる。すなわち、UFB の一部が崩壊し微量のラジカルが生成されたが、本実験で用いた ESR 装置の感度では検出できなかった可能性が推察される。

こうした推論の上で、UFB の個数濃度と発生するラジカル濃度に対応があるかを超音波で UFB を崩壊させて検討した。

超音波の照射によりマイクロバブルが崩壊する時に・OH が生成することが知られており、45 kHz の超音波照射により・OH が生成されるが 28 kHz および 100 kHz では生成が抑制されるという報告がある。しかしながら、なぜ 45 kHz の超音波のみが・OH 生成に効果的であるのかは解明されていない[30, 31]。

一方、筆者らは、対象が UFB であっても超音波のエネルギーを効果的に UFB に伝える方法を検討し、Fig. 15 にしめすように ESR 用のディスプレイセル中の UFB 水に少量の空気を取り込むことにより、43 kHz, 80 W の超音波洗浄器を用いて UFB を崩壊（ラジカルの生成）させ得ることを実験的に確かめた。その結果が Fig. 10~Fig. 12 である。この方法により崩壊する UFB 数は UFB

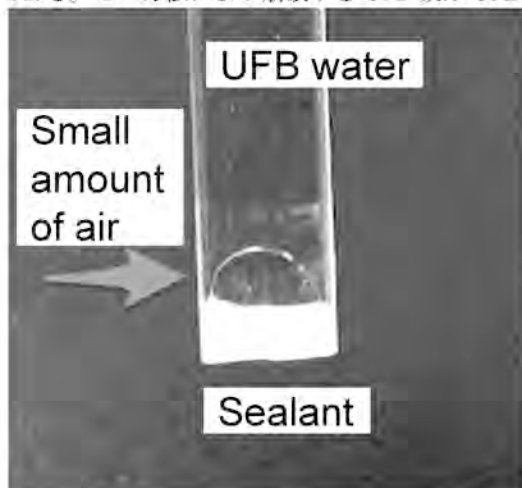


Fig. 15 Disposable flat cell for ESR measurement containing a small amount of air.

水の量と取り込んだ空気の体積に影響されると考えられるが、その調整は出来なかった。Fig. 11 と Fig. 12 に示した・OH のシグナル強度が正確に UFB 個数濃度の比と対応しなかった理由はここにあると考えている。ただし、本稿では、ナノサイトでレーザー散乱光を放つ微粒子のブラウン運動から計測された個数濃度の違いを、別の視点、すなわち UFB の崩壊で生成するラジカルのシグナル強度の違いとして確認することが出来た。

4.3 UFB の長期滞留

コロイドサイズの空気バブルは滞留時間が非常に短く、半径 10~100 nm のバブルの滞留時間は 1~100 μ s に過ぎないという報告がなされた[32]前後から一部で UFB の長期存在に疑問が呈されるようになった。さらに、2007 年に Nature 誌にナノバブル（ウルトラファインバブル：UFB）の存在を否定する記事が掲載されるに至って[33]しばらくは UFB の存在を疑問視する声が続いたが、近年の FB（ファインバブル）技術の広がりと呼応した FB 研究者の増加により、UFB の存在を問う議論は減少の一途にある。しかし、2018 年に Alheshibri and Craig により UFB の長期滞留に疑問を呈する論文が発表された。すなわち、バブル発生器で生成された UFB の表面に surface-active な異物が吸着する。一方、UFB は短時間に消滅するが、表面の異物は凝集して長期に滞留する。これが UFB であると誤認識されているという説である[34]。

一方、筆者らは UFB を生成してから日単位の長時間を経た後に超音波を照射し、ラジカルの発生を認めた。水中に UFB がなく凝集した異物のみが残っていると仮定すると、超音波による UFB の崩壊に伴う高温高圧場の生成はなく、水の熱分解も生じないため、ラジカルの発生も期待されない。長期滞留という UFB の特性については、更なる議論が必要であると考えられる。

5. 結論

種々の個数濃度の UFB 水を生成し、収穫後の保存期間に応じて異なる品質を呈するオオムギ種子の発芽実験を行った結果、UFB が発芽促進効果を発揮するためには 10^8 個/mL レベルの個数濃度が必要であることが示された。また、UFB 水に超音波を照射して生成したラジカル量を定量的

に比較した結果、UFB 個数濃度と発生するラジカル量には対応関係が認められた。さらに、ラジカルの発生が実験的に確認された結果から、UFB が長期に存在することが明らかになった。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会の科研費・基盤研究 (B: 18H02302) および経産省の省エネルギー等に関する国際標準の獲得・普及促進事業委託費 (省エネルギー等国際標準開発 (国際標準分野)) (ファインバブル技術応用に関する国際標準化・普及基盤構築: H29 年度-H31 年度) の支援を得て行われたことを記し、感謝の意を表する。

またデータの解釈等については、北海道大学准教授の内田努氏、京都大学名誉教授の芹澤昭示氏、東京大学教授の原田慈久氏らとの不断の議論によるところが大きい。ここに記して謝意を表する。

Nomenclature

$G(t_i)$: observed germination ratio for each Inspection	[-]
G_{\max}	: maximum germination ratio	[-]
$G_{\max, \text{UFB}}$: maximum germination ratio of UFB Section	[-]
$G_{\max, \text{control}}$: maximum germination ratio of Control Section	[-]
T_{50}	: time when the inferred germination ratio is 50 % of G_{\max}	[h]
t_i	: time for each inspection; it is recommended to use $t_{0.1}$ for the time zero instead of t_0 in order to avoid the calculation of $\log 0$ for the smooth data analysis	[h]
B	: slope at the time T_{50}	[1/h]

参考文献

[1] Fine Bubble Technology — General Principles for Usage and Measurement of Fine Bubbles — Part 1: Terminology, ISO 20480-1 (2017), (<https://www.iso.org/standard/68187.html?brows e=tc>, October 23, 2019).

[2] Serizawa, A., Basics of Micro/Nano Bubbles (in Japanese), Journal of the JIME, Vol. 46(6), 861-866 (2011).

[3] Ohnari, H., Micro Bubble, The Japan Society of Mechanical Engineers, Vol. 108(1042), 694-695 (2005).

[4] Takahashi, M., Kawamura, T., Yamamoto, Y., Ohnari, H., Himuro, S. and Shakutsui, H., Effect of Shrinking Microbubble on Gas Hydrate

Formation, The Journal of Physical Chemistry B, Vol. 107(10), 2171-2173 (2003).

[5] Goto, Y., Serizawa, A., Eguchi, T., Tanaka, H. and Izumi, M., Oil Separation from Oil Polluted Soil by Micro Bubble Injection and Separation Mechanisms, Japanese Journal of Multiphase Flow, Vol. 20(1), 39-49 (2006).

[6] Terasaka, K. and Shinpo, Y., Separation of Fine Particles Suspended in Water Using Microbubble Flotation, Japanese Journal of Multiphase Flow, Vol., 21(1), 77-83 (2007).

[7] Li, P. and Tsuge, H., Water Treatment by Induced Air Flotation Using Microbubbles, Journal of Chemical Engineering of Japan Vol. 39(8), 896-903 (2006).

[8] Matsuo, K., Maeda, K., Ohnari, H., Tsunami, Y. and Ohnari, H., Water Purification of a Dam Lake Using Micro Bubble Technology, Progress in Multiphase Flow Research, Vol. 1, 279-286 (2006).

[9] Shakouchi, T., Matsumoto, T., Nishio, M., Tsujimoto, K. and Ando, T., Flow and Aeration Characteristics of Micro Bubble Jet Flow, Progress in Multiphase Flow Research II, JSMF 33-38 (2007).

[10] Li, P., Takahashi, M. and Chiba, K., Degradation of Phenol by the Collapse of Microbubbles. Chemosphere Vol. 75, 1371-1375 (2009).

[11] Tsuge, H., Li, P., Shimatani, N., Shimamura, Y., Nakata, H. and Ohira, M., Fundamental Study on Disinfection Effect of Microbubbles. KAGAKU KOGAKU RONBUNSHU, The Society of Chemical Engineers, Japan, Vol. 35(5), 548-552 (2009).

[12] Ushikubo, F. Y., Furukawa, T., Nakagawa, R., Enari, M., Makino, Y., Kawagoe, Y., Shiina, T. and Oshita, S., Evidence of the Existence and the Stability of Nano-Bubbles in Water, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 361, 31-37 (2010).

[13] Uchida, T., Oshita, S., Ohmori, M., Tsuno, T., Soejima, K., Shinozaki, S., Take, Y. and Mitsuda, K., Transmission Electron Microscopic Observations of Nanobubbles and their Capture of Impurities in Wastewater, Nanoscale Research Letters, 6: 295 (2011) (<http://www.nanoscalereslett.com/content/6/1/296>).

[14] Uchida, T., Liu, S., Enari, M., Oshita, S., Yamazaki, K. and Gohara, K., Effect of NaCl on Lifetime of Micro- and Nanobubbles, Nanomaterials, Vol. 6, 31 (2016) (doi: 10.3390/nano6020031).

[15] Liu, S., Kawagoe, Y., Makino, Y. and Oshita, S., Effects of Nanobubbles on the Physicochemical Properties of Water: The Basis for Peculiar Properties of Water Containing Nanobubbles, Chemical Engineering Science, Vol. 93, 250-256 (2013).

[16] Liu, S., Oshita, S., Kawabata, S., Makino, Y. and Yoshimoyo, T., Identification of ROS Produced

- by Nanobubbles and their Positive and Negative Effects on Vegetable Seed Germination, *Langmuir*, Vol. 32, 11295-11302 (2016).
- [17] Liu, S., Oshita, S., Makino, Y., Wang, Q., Kawagoe, Y. and Uchida, T., Oxidative Capacity of Nanobubbles and its Effect on Seed Germination, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, Vol. 4, 1347-1353 (2016).
- [18] Fine Bubble Technology-Agricultural Applications - Part 2: Test Method for Evaluating the Promotion of the Germination of Barley Seeds, ISO 23016-2 (<https://www.iso.org/standard/75196.html?browse=tc>, November 17, 2019).
- [19] Bewley, J.D., Seed Germination and Dormancy, *The Plant Cell*, Vol. 9 (7), 1055-1066, (1997).
- [20] Soil quality - Determination of the Toxic Effects of Pollutants on Germination and Early Growth of Higher Plants, ISO 18763 (2016) (<https://www.iso.org/standard/63317.html> November 17, 2019).
- [21] Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D., Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* Vol. 10 (12), e0146021 (2015).
- [22] Kameya, H., Shoji, T., Otagiri, Y., Obata, A., Trivittayasil, V. and Tsuta, M., Evaluation of the Reactive Oxygen Species Scavenging Abilities of Tomato Juice Using ESR Spin Trapping Method, *Journal of the Japanese Society of Diet*, Vol. 27(4): 267-272 (2017).
- [23] Kranner, I., Roach, T., Beckett, R. P., Whitaker, C. and Minibayeva, F. V., Extracellular Production of Reactive Oxygen Species during Seed Germination and Early Seedling Growth in *Pisum Sativum*, *Journal of Plant Physiology*, Vol. 167, 805-811 (2010).
- [24] Ishibashi, Y., Tawaratsumida, T., Zheng, S-H., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M., NADPH Oxidases Act as Key Enzyme on Germination and Seedling Growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Production Science*, Vol. 13(1), 45-52 (2010).
- [25] Ahmed, A. K. A., Shi, X., Hua, L., Manzueta, L., Qing, W., Marhaba, T. and Zhang, W., Influences of Air, Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide Nanobubbles on Seed Germination and Plant Growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 66(20), 5117-5124 (2018).
- [26] Minagawa, H., Fujiwara, K., Kurimoto, R., Yasuda, T., Harada, E. and Hata, N., Effects of Microbubbles on Germination and Growth of Spinach, *Journal of JSEM*, Vol. 16 (1), 77-83 (2016).
- [27] Ishibashi, Y., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Kai, K., Yuasa, T., Hanada, A., Yamaguchi, S. and Iwaya-Inoue, M., A Role for Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidases in the Embryo and Aleurone Cells in Barley Seed Germination, *PLoS One*, Vol.10(11): e0143173 (2015).
- [28] Kyuichi, Y., Ultrafine Bubbles, *Journal of the Acoustical Society of Japan*, Vol.73(7), 424-431 (2017).
- [29] Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L. and Davies, J. A., Free Radical Biology and Medicine: it's a Gas, Man!, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Vol. 291: R491-R511 (2006).
- [30] Masuda, N., Naruyama, A., Eguchi, T., Hirakawa, T. and Murakami, Y., Influence of Microbubbles on Free Radical Generation by Ultrasound in Aqueous Solution: Dependence of Ultrasound Frequency, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 119, 12887-12893 (2015).
- [31] Murakami, Y., Chemistry of Microbubbles (in Japanese), *JATAFF Journal*, Vol. 4(2), 37-42 (2016).
- [32] Ljunggren, S. and Eriksson, J. C., The lifetime of a Colloid-Sized Gas Bubble in Water and the Cause of the Hydrophobic Attraction, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 129-130, 151-155 (1997).
- [33] Research highlights, Physics: No nanobubbles, *Nature*, Vol. 445 (7124), 11 January (2007).
- [34] Alheshibri, M. and Craig, V. S. J., Differentiating between Nanoparticles and Nanobubbles by Evaluation of the Compressibility and Density of Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C*, Vol.122, 21998-22007 (2018).