

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24654191

研究課題名(和文)実時間その場電子スピン共鳴分析によるプラズマの生体に及ぼす作用に関する研究

研究課題名(英文) Study of effect of atmospheric pressure plasma on biological specimen by using in situ real time electron spin resonance technique

研究代表者

石川 健治 (Ishikawa, Kenji)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60417384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の殺滅を目的とした放電プラズマ滅菌は、薬品不要で電源のみで稼働するために、いつでもどこでも生物学・農学的な作用を得られることから、有望な技術である。しかしながら、これまでも生体内での活性酸素の細胞壊死に与える影響は多く調べられてきているのであるが、生体外から故意の酸化作用による細胞寿命の決定機構は解明されていない。本研究では、この実時間その場ESR観察技術を進展させ、プラズマと生体との相互作用の一端が解明され、バイオプラズマ技術の実用化が促進されたと考える。プラズマ滅菌の生化学的な作用の解明に物理化学的観察手法から切り込む研究が今後も期待される。

研究成果の概要(英文)：Atmospheric pressure plasma sterilization of pathogens is now paid much attention for usefulness of no chemicals, electrical operations and so on. The plasma generates many kinds of reactive chemical species such as atomic oxygen, excited oxygen, hydroxyl radical, excited nitrogen, nitrous oxide, etc. However, interactions these species with biological specimens such as fungal spores, microorganisms etc. have not been clarified completely. In particular of intentional exposure of the reactive species to the biological specimen, the author has focused on understanding of free-radicals during plasma sterilization. Employing in situ real time electron spin resonance (ESR) technique, observation of free radical on the fungal spore of *Penicillium digitatum* has been succeeded. ESR signal decay is linked with inactivation of the spore, therefore the author found the close correlation of the free radical detected by ESR technique with biological response of inactivation on the fungal spores.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学

キーワード：プラズマ滅菌 電子スピン共鳴 フリーラジカル ミドリカビ胞子

1. 研究開始当初の背景

従来の滅菌法には過酸化水素といった薬品を用いるため、その保管・運搬などの必要があった。一方、プラズマ滅菌では理想的には薬品を不要とし、宇宙や戦場、交通の便がない場所でさえ太陽電池といった電力供給だけで医療器具の処理が可能で医療行為を行えるため画期的な技術として注目され、活発に研究が続けられている。しかしながらプラズマ滅菌の作用が放電プラズマにより生成する化学活性なイオン、ラジカル、光などによることは推察されているが、これらが個々にどのように生物学・農学的な作用を及ぼすのかについて未知な部分が多い。そのためプラズマの生体に及ぼす作用を解析することが求められている。

滅菌は微生物などの生体に死をもたらす行為であり、死に至る原因には細胞破壊（物理作用）や細胞膜酸化（化学作用）、壊死（生化学作用）などが挙げられる。特に、生化学作用である壊死は活性酸素といった生体内フリーラジカルが大きく関わっていると考えられている。すなわち、細胞内の過剰な酸化が壊死を引き起こしているという考えであるが、これらはポリマーの劣化や表面変性におけるラジカル発生と自動反応などと共通点がある。

研究代表者はプラズマとポリマーの相互作用を研究しており、ポリマー表面のプラズマ照射下で生じる化学反応の観察方法の開発に取り組み、電子スピン共鳴（ESR）法によるその場実時間でのラジカル観察を行った結果、フルオロポリマーの結合エネルギーの高いC-F結合からフッ素を引き抜く反応がプラズマ発光紫外線と水素原子ラジカルの相乗効果で促進されることを見出した（K. Ishikawa, J. Phys. Chem. Lett. 2, 1278 (2011)）。この実時間その場電子スピン共鳴法による生体内フリーラジカルの挙動観察から、プラズマと生体材料との相互作用を解析し、プラズマ滅菌の生化学作用の解明を図ってきた。

2. 研究の目的

細菌の殺滅を目的とした放電プラズマ滅菌は、薬品不要で電源のみで稼働するために、いつでもどこでも生物学・農学的な作用を得られることから、盛んに研究されつつある。このバイオプラズマ応用において、プラズマと生体との相互作用は未知であり、その解析が強く求められている。本研究ではこの要求に対し、プラズマ滅菌過程の生体内フリーラジカルの挙動の解析に着目し、プラズマ生成するイオン、ラジカル、光といった個々の反応種の滅菌作用の発現機構をその場で実時間に観察可能な方法により詳細解明することを目的とする。研究代表者は、実時間その場で表面生成するラジカル検出可能な電子スピン共鳴観察手法を確立しており、この解析を応用すればバイオプラズマ技術の実用

化を大きく進展させることを研究目的としている。

3. 研究の方法

研究代表者がフルオロポリマーの水素ガスの放電プラズマ下で実時間その場電子スピン共鳴（ESR）法で観察した表面生成するラジカルの検出結果である。フルオロポリマーではC-Fの結合エネルギーが約5eV以上であり、真空紫外（VUV）光の作用で化学結合切断されダングリングボンド、すなわち表面生成するラジカルの発生が検出される。同時に放電生成した水素原子は単独では結合切断に作用はしないけれども、切断されたフッ素をHF形成により引き抜き促進作用をもつことを見出した。このようにポリマーを対象とするプラズマとの相互作用の解析技術は確立されている。

プラズマ滅菌において、ミドリカビをモデルとして殺菌対象とした場合に、現在考えている孢子の不活性化機構の概略図（図1）である。

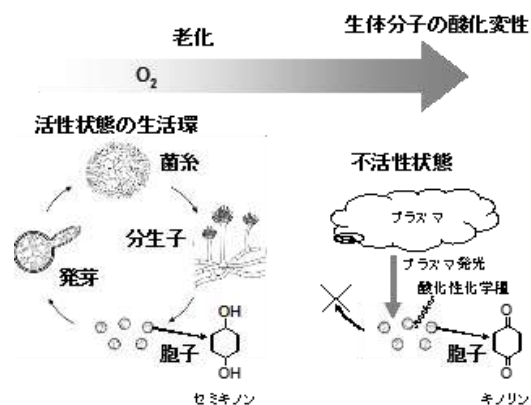


図1 ミドリカビ孢子のプラズマ不活性化モデル

ミドリカビの生活環において孢子の段階は厚い外皮に覆われており無呼吸で発芽をすると考えられている。いわばエネルギー代謝から見ると還元性分子ラジカルを孢子内に有し、酸化性ストレスからの防御機構が働いている。しかし、放電プラズマで制される酸化性化学種の暴露やプラズマ発光の過剰な供給の影響は、抗酸化機能を破壊して、もはや呼吸などのエネルギー供給なしに生殖できない状態となっていると推察している。このような生体分子の酸化変性・プラズマ不活性化の詳細な機構解明を行おうとしている。

研究代表者は、放電プラズマの作用により孢子の形態に損傷は認められないことを *ex situ* で観察し確認しているが、実時間その場ラジカル観察中の形態確認が不可欠であると考えた。そこで、生体ラジカル解析用の雰囲気制御されるチャンバー構成の解析装置をもちいて、プラズマ相互作用解析を進めてきた。

4. 研究成果

生体解析用その場実時間電子スピン共鳴装置によるプラズマとの相互作用について解析をおこなった結果、ミドリカビ胞子のフリーラジカルの電子スピン共鳴法による観察結果である。(図2a)

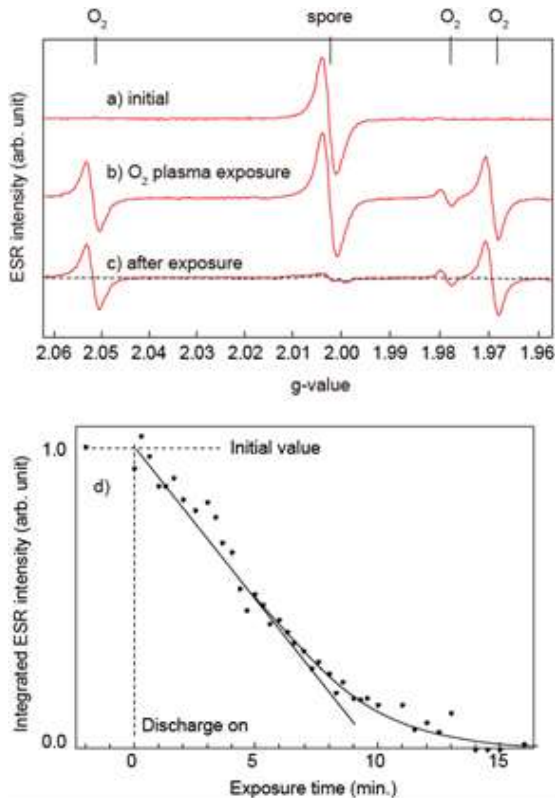


図2 ミドリカビ胞子の生体フリーラジカル信号(上, sporeで示す信号)と酸素プラズマによる信号消失の観察結果

図2下は酸素プラズマを照射しているその場観察結果であり、数分の照射により胞子からの信号が消失する。信号は、ユビキノンなど還元性ラジカルが検出されている。これらは酸化性ストレス防御機構ないしエネルギー代謝機構で重要な役割を担う分子であり、これらがプラズマ酸化することで、その後の胞子の発芽を不活性化していると考えている。

通常のXバンドESRではエネルギー分解能が低いため、複数の信号の重畳や超微細相互作用などの詳細が解析できないために、Qバンド(1.2T 33GHz帯)でESR測定をおこなった。Qバンド測定で得られた信号は図3に示す。信号は少なくとも二種のラジカルに帰属できるものが重畳していることがわかった。一つはセミキノン様の信号で有り、g値にして2.004付近の高い側に位置する。もう一方は過酸化ラジカル信号でg値にして2.003付近を中心にして見られる。初期には大気中にあることから胞子由来に過酸化ラジカルも存在しているが、酸素プラズマを処理するとセミキノン様の信号が消失し、過酸化ラジカルの信号が支配的に残存することで信号

形状が変わっていることがわかる。

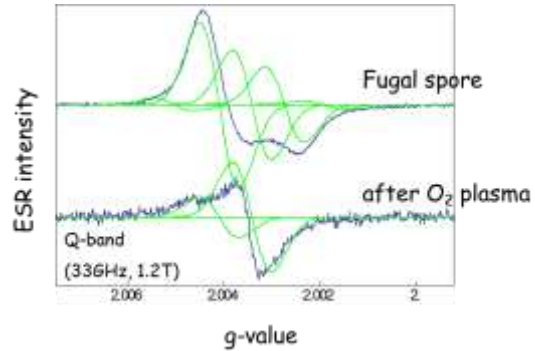


図3 QバンドESRスペクトル

これまでにも生体内での活性酸素の細胞壊死に与える影響は多く調べられてきているのであるが、生体外から故意の酸化作用による細胞寿命の決定機構は解明されていない。本研究では、この実時間その場ESR観察技術を進展させ、プラズマと生体との相互作用の一端が解明され、バイオプラズマ技術の実用化が促進されたと考える。細胞の寿命決定メカニズムについて新たな学説など、プラズマ滅菌の生化学的・物理化学的作用の解明に物理化学的観察手法から切り込む研究が今後とも期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Hiroshi Hashizume, Takayuki Ohta, Keigo Takeda, Kenji Ishikawa, Masaru Hori, Masafumi Ito, "Oxidation mechanism of *Penicillium digitatum* spores through neutral oxygen radicals", *Jpn. J. Appl. Phys.* 53, (2014) 010209. DOI: 10.7567/JJAP.53.010209

② Hiroshi Hashizume, Takayuki Ohta, Jia Fengdong, Keigo Takeda, Kenji Ishikawa, Masaru Hori, and Masafumi Ito, "Inactivation effects of neutral reactive-oxygen species on *Penicillium digitatum* spores using non-equilibrium atmospheric-pressure oxygen radical source", *Appl. Phys. Lett.* 103 (15), (2013) 153708. DOI: 10.1063/1.4824892

③ Kenji Ishikawa, et al., "Real-time In Situ Electron Spin Resonance Measurements on Fungal Spores of *Penicillium digitatum* during Exposure of Oxygen Plasmas", *Appl. Phys. Lett.* 101 (1), (2012) 013704. DOI: 10.1063/1.4733387

[学会発表] (計7件)

① Kenji Ishikawa, et al., "Electron spin resonance analyses of plasma-biological material interactions in atmospheric pressure plasmas"

International workshop on control of fluctuation of plasma processes - Joint International Workshop between "Frontier science of interactions between plasmas and nano-interfaces" and "Plasma medical innovation" (Feb. 2014), 3B-WS-07 福岡

② Kenji Ishikawa, et al., "In-situ ESR measurements for plasma materials interactions", The 9th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE), (Aug. 2013) 23-1 韓国

③ Kenji Ishikawa, et al., "Electron spin resonance study of plasma-biological surface interaction for food hygiene" The 5th International Symposium on Advanced Plasma Science and its applications for nitrides and nanomaterials (ISPlasma), (Mar. 2013), P3025A 名古屋

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：滅菌表示装置および滅菌装置および青
果物表皮の殺菌方法

発明者：石川健治、堀勝、伊藤昌文、太田貴
之、橋爪博司

権利者：名古屋大学、名城大学

種類：特許

番号：出願 2012-037940

出願年月日：2012年2月23日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.plasma.engg.nagoya-u.ac.jp/ishikawa/index.php/Home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 健治 (ISHIKAWA KENJI)

名古屋大学・大学院工学研究科・特任教授

研究者番号：60417384