

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600122

研究課題名(和文) 気液プラズマ照射下におけるバイオマテリアル形態変化のその場電子顕微鏡観察

研究課題名(英文) In-situ observation of bio materials under gas-liquid plasma exposure

研究代表者

近藤 博基 (KONDO, HIROKI)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50345930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧下または液中環境下においてプラズマ照射されたバイオマテリアルの構造的・化学的变化を、走査電子顕微鏡などによってその場観察する手法の確立に取り組んだ。ウェットSEMカプセル(SEM:走査電子顕微鏡)に導入可能で、大気圧下および液中でプラズマ生成可能な超小型マクロプラズマ源を構築し、プラズマ生成に必要なガス導入、プラズマ生成に伴うガス発生による内圧上昇の補正機構、液環流システムなどを検討した。また、「プラズマ活性化培養液(PAM)」を暴露下でのDNAの形態変化を液中原子間力顕微鏡などでも観察する一方、プラズマ照射による培養液中で発生する活性酸素種の計測などを行った。

研究成果の概要(英文)：In-situ observation techniques of morphological changes of biomaterials under plasma exposure were investigated in this study. For example, a catheter-type compact plasma source, which can be installed to "wet SEM capsule", was developed, and plasma discharge characteristics in atmosphere and liquid, and active species measurements were conducted. In addition, gas supply and pressure control system, and circulatory flow system of liquid were also studied. On the other hand, morphological changes of plasmid DNA under an exposure of plasma-activated medium (PAM) was observed by a high-speed scan in-liquid atomic force microscope. Active species in the PAM were also evaluated and measured.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：プラズマ バイオマテリアル その場観察 プラズマ活性化培養液

1. 研究開始当初の背景

大気圧下および液中でのプラズマ生成技術の発達により、近年、バイオ・医療分野へのプラズマ応用が急速に着目され、研究が活発化している。申請者らのグループにおいても、「大気圧プラズマ照射による卵巣がん細胞の選択的な死滅」(S. Iseki, et al., Appl. Phys. Lett. 100, 113702 (2012))など、「ミドリカビの滅菌における活性種とラジカルのシナジー効果」(S. Iseki, et al., Appl. Phys. Lett. 96, 153704 (2010))など、ユニークな成果や本質的なメカニズムの解明を報告してきた(図1)。2012年には、「プラズマ照射下でのリアルタイム電子スピン共鳴法(ESR)によって生体材料表面でのラジカル形成過程」(Appl. Phys. Lett. 101, 013704 (2012))を明らかにしている。またシステムバイオロジーを駆使して、プラズマ照射によって細胞内でどのようなシグナル伝達が生じ、様々な生体反応を誘起しているかを明らかにする試みも実施している。一方、このような化学的・生物学的な反応解析の一方で、細胞分子表面での物理的な構造変化を明らかにする試みは殆どなされていない。特にカビの胞子のような比較的大きな生体材料では、最表面の細胞壁の分解が、死滅過程において本質的かつ決定的な意味を持つことから、近年開発されたウェット SEM カプセル (SEM: 走査電子顕微鏡) を用いて、これを解明することを着想した。

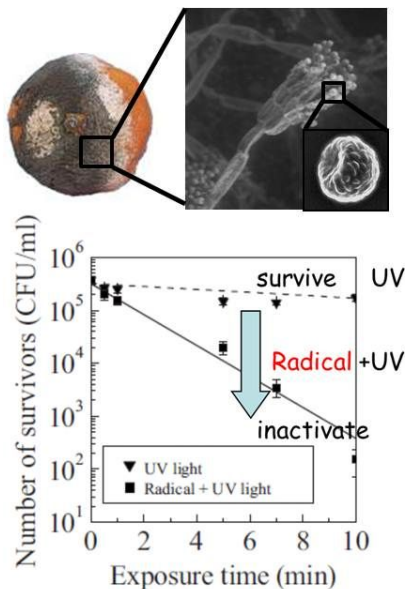


図1 大気圧プラズマ照射によるミドリカビの滅菌効果

2. 研究の目的

本研究の目的は、大気圧下または液中環境下において、プラズマ照射されたバイオマテリアルの構造的・化学的变化をリアルタイムで、電子顕微鏡などによってその場観察する

手法の確立である。具体的には例えば、ウェット SEM カプセル内に大気圧下および液中でも放電可能な超小型マイクロプラズマ源を導入し、プラズマ照射下で細胞や胞子が死滅に至るまでの構造変化、表面の化学組成変化をリアルタイムその場観察し、そのメカニズムの解明に取り組んだ。また同プラズマ源について、真空紫外吸収分光などを駆使してラジカルなどの活性種の絶対密度を測定し、プラズマとバイオマテリアルとの表面反応に関する定量的解析を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、大気圧下または液中環境下において、プラズマ照射されたバイオマテリアルの構造的・化学的变化をリアルタイムで、走査電子顕微鏡などによってその場観察する手法の確立に取り組んだ。それを中心として、具体的には以下の項目を検討した。すなわち、1) ウェット SEM カプセルに導入し、大気圧下および液中でプラズマ生成可能な超小型マイクロプラズマ源の構築、2) プラズマ照射下ならびにプラズマ活性化溶液の暴露下における生体材料のリアルタイムその場観察、3) 同プラズマ源で生成されるラジカルなど活性種の定量分析、4) プラズマ照射下リアルタイム ESR 装置による生体材料表面の固体ラジカル計測、である。これらによって、プラズマ照射が生体材料で生じる反応過程を、気相から表面反応に至るまでの系全体で定量的に明らかにし、生体材料表面における反応速度論の構築を目指した。

4. 研究成果

計画初年度では、ウェット SEM カプセルに導入可能で、大気圧下および液中でプラズマ生成可能な超小型マイクロプラズマ源を構築した。また、脆弱なメンブレンを電子線窓として有するウェット SEM カプセルの密閉構造を考慮し、プラズマ生成に必要なガス導入、プラズマ生成に伴うガス発生による内圧の上昇を補正し、内圧を一定に保つための排気用のノズル、圧力モニタ、環流システムを検討した。具体的には、ウェット SEM カプセル内における気相・液相の圧力等の制御システムの最適化検討を進めると同時に、同カプセルの導入を想定しているセミインレンスタイプ SEM における二次電子検出ディテクタの選択、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) の計測条件などの検討を進めた。一方、観察環境に関しては、我々がプラズマ医療研究において見出した「プラズマ活性化培養液 (PAM)」を暴露下での観察を検討内容に加えた。PAM の暴露は、各種のがん細胞に対する選択的死滅効果が確認されている上、プラズマの直接照射に比べ、より医療、農業、漁業の現場での導入に適していることから、その場観察による更なるメカニズムの解明が期待されている。本研究で開発している環流システムを用いることにより、PAM 暴露が生体

試料に与える効果をリアルタイムに観察することが出来る。第1段階の評価として、PAMの暴露が、DNA試料などに与える効果を、液中原子間力顕微鏡などで検証した。図2は、2 μ lのプラスミドDNA溶液(10mM MgCl₂)をマイカ上に滴下した後、マイカ上の溶液をPAMに置換した。10分静置した後、AFMを用いて観察を行った。PAM暴露後において、暴露前には見られなかった切断されたDNAが観察された。一方、切断されていないDNAも同時に観察されており、PAMの作用時間の違いが確認された。さらに、PAMの濃度に対する依存性や、暴露時間に対する依存性なども明らかにした。

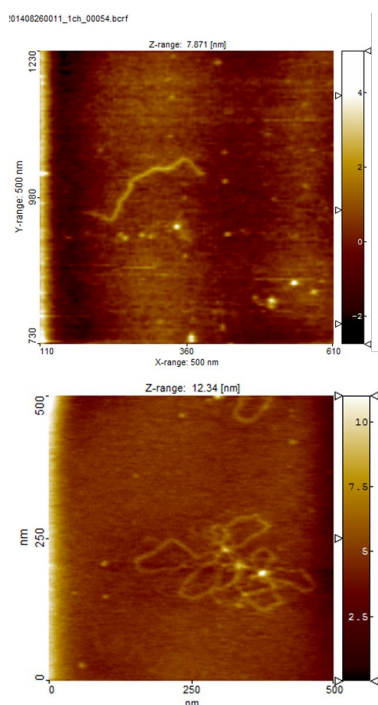


図2 プラズマ活性化培養液(PAM)を暴露したプラスミドDNAの高速AFM像

一方、観察対象の一つであるミドリカビの胞子の胞子に関して、これまでに既に取得しているプラズマ照射に伴う死滅速度や電子スピン共鳴(ESR)信号などの変化を更に解明するために、同プラズマ源から生成されるラジカルなど活性種の密度や空間分布、プラズマ源から放出されるガス流の時空間計測を進めた。具体的にはシュリーレンシステムを用いたガス流れの時空間計測によって、大気の巻き込み状況などを明らかにした。また、プラズマを照射した培養液中における、がん細胞の選択的死滅のメカニズムを明らかにするために、培養液中に生じるフリーラジカルの計測を行った。スピントラップ剤を使用したESR計測によって、プラズマ照射による培養液中でのヒドロキシルラジカルラジカルの生成と、照射後の減衰過程、過酸化水素(H₂O₂)の生成が明らかとなった。他方、プ

ラズマ照射した培養液を用いた細胞培養実験の結果では、必ずしもH₂O₂濃度と細胞生存率に関連が無い場合が確認され、H₂O₂以外の抗腫瘍成分の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Hitoshi Watanabe, Hiroki Kondo, Yukihiro Okamoto, Mineo Hiramatsu, Makoto Sekine, Yoshinobu Baba, and Masaru Hori, Carbon nanowall scaffold to control culturing of cervical cancer cells, Appl. Phys. Lett. 105, p.244105, 2014, DOI: 10.1063/1.4902054

[学会発表](計 14件)

安藤睦, 小島和晃, 竹田圭吾, 近藤博基, 石川健治, 関根誠, 太田貴之, 伊藤昌文, 平松美根男, 加納浩之, 堀勝, AC 励起アルコール液中プラズマにおけるナノグラフェン合成機構の解析, 19p-F3-7, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2014年3月17日-20日

小島和晃, 安藤睦, 竹田圭吾, 石川健治, 太田貴之, 伊藤昌文, 堀勝, コヒーレントアンチストークスラマン散乱分光法を用いたナノグラフェン合成液中プラズマの診断, 17p-F2-10, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2014年3月17日-20日

倉家尚之, 田中宏昌, 石川健治, 中村香江, 梶山広明, 吉川史隆, 近藤隆, 水野正明, 竹田圭吾, 近藤博基, 関根誠, 堀勝, 大気圧プラズマ照射培養液の電子スピン共鳴(ESR)による解析, 19p-F2-3, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2014年3月17日-20日

坂倉峻亮, 石川健治, 田中宏昌, 橋爪博司, 太田貴之, 伊藤昌文, 竹田圭吾, 近藤博基, 関根誠, 堀勝, プラズマ照射した食肉血液成分の電子スピン共鳴解析(口頭), 19p-F2-7, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2014年3月17日-20日

近藤博基, 堀勝(招待講演), プラズマ誘起ナノプロセスの進展と放射光実験への期待, SESSION 3. (2014年9月21日 15:20-15:55), 東京大学物性研究所 平成26年度前期短期研究会 「真空紫

外・軟 X 線放射光物性研究のパラダイムシフトに向けて」, 東京大学物性研究所 6 階 大講義室, 2014 年 9 月 20 日-21 日

石川健治, 田中宏昌, 橋爪博司, 竹田圭吾, 近藤博基, 関根誠, 堀勝(招待講演), プラズマ誘起バイオマテリアルの表面反応とプラズマ医療への展開, 18p-A1-8 (2014 年 9 月 18 日), 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学札幌キャンパス, 2014 年 9 月 17 日-20 日

Hiroki Kondo, Tomoaki Amano, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Masaru Hori, Masafumi Ito, and Mineo Hiramatsu, Synthesis and electrocatalytic properties of Pt nanoparticles-supported nanographene synthesized employing in-liquid plasma, International Conference on Microelectronics and Plasma Technology 2014 (ICMAP 2014), MP-ECS-TuA-5 (July 8, 2014), Gunsan, Korea, July 8-11, 2014.

Jerome JOLIBOIS, Jagath KULARATNE, Kenji ISHIKAWA, Mineo HIRAMATSU, Makoto SEKINE, Masaru HORI, Effect of Carrier Gas on Graphene Synthesized from in-Liquid Plasma, International Union of Materials Research Societies - The 15th International Conference in Asia (IUMRS-ICA2014), D2-O26-009 (August 26, 2014), Fukuoka University, Fukuoka, August 24-30, 2014.

Hiroki Kondo, Tomoki Amano, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Masaru Hori, Mineo Hiramatsu, Controlled synthesis and electrocatalytic characteristics of Pt nanoparticles-supported nanographene synthesized by in-liquid plasma, 67th Annual Gaseous Electronics Conference, FT3 3 (November 6, 2014), Raleigh, North Carolina, USA, November 2-7, 2014.

A. Ando, K. Takeda, H. Kondo, K. Ishikawa, M. Sekine T. Ohta, M. Ito, M. Hiramatsu, H. Kano, M. Hori, Spectroscopic analysis of gas-liquid plasma for nanographene synthesis, 6th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, 06aD03O, Meijo Univ., Aichi, Japan, Mar. 2-6, 2014

安藤睦, 竹田圭吾, 近藤博基, 石川健治, 関根誠, 太田貴之, 伊藤昌文, 平松美根男, 加納浩之, 堀勝, ナノグラフェン合成中の液中プラズマの分光診断, 19a-C2-5, 平成 25 年秋季第 74 回応用物理学会学術講演会, 同志社大学京田辺キャンパス, 2013 年 9 月 16-20 日

安藤睦, 竹田圭吾, 近藤博基, 石川健治, 関根誠, 太田貴之, 伊藤昌文, 平松美根男, 加納浩之, 堀勝, ナノグラフェン合成のための気-液プラズマの分光計測, PST-13-127, 電気学会プラズマ研究会, 名城大学名駅サテライト, 愛知県, 2013 年 11 月 21-23 日

安藤睦, 竹田圭吾, 近藤博基, 石川健治, 関根誠, 太田貴之, 伊藤昌文, 平松美根男, 加納浩之, 堀勝, ナノグラフェン合成液中プラズマの分光学的診断, P-O10-003, 第 23 回日本 MRS 年次大会, 横浜市開港記念会館, 神奈川県, 2013 年 12 月 9-11 日

石川健治, 近藤博基, 竹田圭吾, 関根誠, 堀勝, アルコール液中プラズマによるグラフェン合成 / Synthesis of graphene Using Alcohol In-Liquid Plasma, P-O9-004, 第 23 回日本 MRS 年次大会, 横浜市開港記念会館, 神奈川県, 2013 年 12 月 9-11 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://horilab.nuee.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 博基 (KONDO, Hiroki)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 50345930

(2) 連携研究者

伊藤 昌文 (ITO, Masafumi)
名城大学・理工学部・教授
研究者番号: 10232472

竹田 圭吾 (TAKEDA, Keigo)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00377863

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