

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286071

研究課題名(和文) プラズマで生成された生体内フリーラジカルの実時間計測とプラズマ滅菌処理の研究

研究課題名(英文) Real-time in situ measurements of free radicals during Plasma sterilization

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ滅菌では理想的には薬品を不要とし、電力供給だけで医療行為を行える。しかしながら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、光などによる放電プラズマの作用は未解明であった。モデル生物としてミドリカビ胞子の生体フリーラジカル観察を行い、殺菌中の実時間その場検出し、そのフリーラジカル信号の同定を行った。さらに、プラズマと相互作用により代謝される生体物質の質量分析法による測定を行い、放電プラズマのイオン、ラジカル、光というような個々の作用とそれらの相乗効果について解明した。新たなプラズマ源を創成し、プラズマ滅菌の装置の要求仕様を示した。

研究成果の概要(英文)：The low-temperature plasma sterilization have advantages for applications. However, complexity of plasma processes arises from the involvement of a myriad of species including: electrons, ions, radicals, and photons. Such plasma components are needed to be measured and analyzed for fine-tuning the process. To determine the best practice for the sterilization, plasma diagnostics were conducted on clarifying the relationship between the control parameters and the plasma parameters. Penicillium digitatum spores, which causes green mold on citrus, are inactivated by contribution of extracellular reactive oxygen species (ROS). The stable free radical as semiquinone in the spores decreases during oxygen atom irradiation observed using real time in situ electron spin resonance (ESR). The plasma electrical discharge induce metabolic modification. Also, intracellular metabolites induce the inactivation of spores. These understanding provides the development of plasma sources.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：プラズマ滅菌 電子スピン共鳴

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が処理装置の最適化、処理速度向上、完全滅菌を実現する上で求められている。

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。すなわち、細胞内の過剰な酸化が壊死を引き起こす。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に世界に先駆けて成功してきた。その結果は、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 et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2, (2011) 1278）。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の実時間観察から、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り、プラズマ完全滅菌装置の完成を目指してきた。

2. 研究の目的

プラズマ殺菌されるモデル生物としてミドリカビ胞子の生体フリーラジカル観察を行い、世界に先駆けて胞子内の生体フリーラジカルの殺菌中の実時間その場検出してきた（K. Ishikawa et al., *Appl. Phys. Lett.* 101, (2012) 013704）。このラジカルの検出を基軸として、このカビ胞子のプラズマ不活性化挙動との関連を詳細に評価して、生体内フリーラジカルの及ぼすプラズマ滅菌・不活性化の機構解明を図ることを目的としている。減少する信号がプラズマによる滅菌処理が10分から20分と遅いことも示しており、イオン・ラジカル・光といった中から支配的な因子の究明が急務であった。そこで、生体内

フリーラジカルの実時間その場観察によるプラズマと生体の相互作用の解明を進め、ミドリカビ胞子のみならず、あらゆる生体材料を対象としたプラズマ-生体の相互作用の理論構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、申請者が世界に先駆けて開発した実時間その場電子スピン共鳴解析技術を用いて、プラズマと生体の相互作用の学際体系化に基づいた学問構築を目指してきている。モデル生物のフリーラジカル観察を行い、観察結果に基づきとそのプラズマ相互作用による挙動の詳細解析を行い、さらにメタボロミクス解析として質量分析測定を進めた。生化学反応におけるフリーラジカルの同定とその検証作業を行い、放電プラズマの化学種の個々の作用とそれらの相乗効果について、ラジカルの反応モデルを立てた。

平成26年度に実時間その場電子スピン共鳴装置に生体解析のための装置を取り付けた。生体のフリーラジカル検出、プラズマとの相互作用の解析をおこない、平成27~28年度にかけてプラズマ相互作用で発生する生体内代謝物の解析をおこなった。

胞子の不活性化機構の概略を考え、モデル生物として取り上げたミドリカビの生活環において、胞子の段階は厚い外皮に覆われており無呼吸で発芽がみられる。さらに、酸化性ストレスからの防御機構として、胞子内の還元性分子ラジカルが働き、酸化性ストレスのスカベンジャーとして生体バランスを保っている。しかし、放電プラズマで生成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、発芽できない状態となっていると推察される。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の解明を試みている。

4. 研究成果

研究代表者は、放電プラズマの作用により胞子の形態に損傷は認められないことを *ex situ* で観察し確認した。実際に、生体内のフリーラジカル信号の同定が必要であることから、カビ胞子の成分分析を試料の粉碎・超遠心分画により行い、高純度試薬を参照することで信号同定を行った。その結果、プラズマと相互作用により代謝される生体物質の観測し同定された。

生体内の代謝物質の観測と同定については、代謝物の質量分析法による測定をおこなった。引き続き種々多様なモデル生物に調査対象を拡張していき、プラズマとの相互作用の解明に及んだ。放電プラズマからイオン、ラジカル、光というような個々の反応種と作用やそれらの相乗効果について着目し、プラズマ照射により発現される代謝経路とその機構を解明することができた。すなわち、技術的には新たなプラズマ源を創成し、イオン

のみやラジカルのみ、また光照射だけといった装置の構築可能性を示した。

プラズマと相互作用前後での生体内フリーラジカルを含む物質系の総括的に集合として捉えて解析していき、プラズマ作用を受けた分子集合の挙動を解明することにより、生体反応を体系化してきた。さらに、構築している実験系ではプラズマからのイオン、ラジカル、光という個々の反応種を別々に、ないしそれらの相乗効果について照射影響をメタボロミクスの観測でき、より詳細に踏み込んだ解明に成功した。

その場実時間電子スピン共鳴手法のダイナミクス解析を軸に、その他の赤外分光や非線型分光技術などにより、プラズマと生体の相互作用のモデル構築を進め、新たなプラズマ滅菌装置の開発指針をえるに至った。

このように生体内フリーラジカルの検出と解析に基づいた理解は、フリーラジカル生成やプラズマ滅菌の機構解明にさらに発展し、生体内分子の反応生成（代謝）物の質量分析による分子構造解析に進んだ。バイオインフォマティクス技術の応用より相関関係にある分子集合が明らかにされ、プラズマ滅菌におけるメカニズム解明が新たな滅菌方法の開発が進んだ。

多種多様なモデル生物を調査対象に拡張してプラズマと生体との相互作用の解明を目指した。放電プラズマがイオン、ラジカル、光というような個々の反応種と作用やそれらの相乗効果について解析を進め、プラズマ照射により発現される代謝経路とその機構の解明をおこなった。新たなプラズマ源作成をはじめ、イオンのみやラジカルのみ、また光照射だけといった装置を構築し、完全滅菌を目指した。プラズマと相互作用前後での生体内フリーラジカルを含む物質系の総括的に集合として捉えて解析し、プラズマ作用を受けた分子集合の挙動を解明した。生体反応を体系化するため、構築している実験系ではプラズマからのイオン、ラジカル、光という個々の反応種の個別効果・相乗効果について質量分析をおこなった。メタボロミクス解析との対応関係で詳細に踏み込んだ機構解明が進められた。

生体のフリーラジカル検出と代謝物の網羅解析を進めることができた。

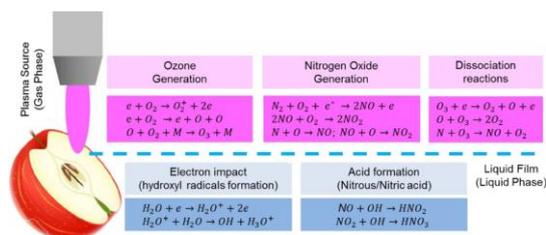


図 滅菌や酵素不活性化に関するプラズマと生体の相互作用の重要な反応

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 2 件)

[1] N. N. Misra, S. K. Pankaj, Annalisa Segat, Kenji Ishikawa, *Trend. Food Sci. Technol.* 55, 39-47 (2016) DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.001 査読有

[2] H. Hashizume, Takayuki Ohta, Keigo Takeda, Kenji Ishikawa, Masaru Hori, and Masafumi Ito, *Jpn. J. Appl. Phys.* 54, 01AG05 (2014) DOI: 10.7567/JJAP.54.01AG05 査読有

[学会発表] (計 24 件)

[1] K. Ishikawa, E-MRS and MRS-J Joint symposium (2014, 12/10-12, Yokohama)

[2] K. Ishikawa, IUMRS-ICA symposium (2014, 8/26-31, Fukuoka)

[3] K. Ishikawa, ESCAMPIG, (2014, 7/15-19, Greifswald, Germany)

[4] H. Hashizume, K. Ishikawa, et al., DMPM (2014, 5/23-24, Nara)

[5] H. Hashizume, K. Ishikawa, et al., International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) (2014, 5/17-23, Nara)

[6] T. Towatari, K. Ishikawa, et al., International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) (2014, 5/17-23, Nara)

[7] K. Ishikawa, H. Tanaka, et al., International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) (2014, 5/17-23, Nara)

[8] H. Hashizume, H. Tanaka, K. Ishikawa, et al., 67th annual meeting on the Society for Free Radical Research (SFRRRI) (2014, 5/24-25, Kyoto Teresa)

[9] 石川健治, 田中宏昌, ほか 68 回酸化ストレス学会 (2015, 6/11-12, 鹿児島)

[10] C-T. Liu, K. Ishikawa, et al., 76 回応用物理学会 (2015, 9/13-17, 名古屋)

[11] K. Ishikawa, et al. American Vacuum Society (AVS) (2015, 10/18-23, San Jose, USA)

[12] K. Ishikawa, et al., 25th Material Society of Japan (MRS-J) (2015, 12/8-11, Yokohama)

[13] 石川健治, 26 回プラズマエレクトロニクス講習会 (2015, 12/20, 東京)

[14] C-T. Liu, K. Ishikawa, et al., ISPlasma, (2016, 3/4-10, Nagoya)

[15] K. Ishikawa, H. Tanaka, et al., IPS (2016, 6/26-29, Inuyama)

[16] K. Ishikawa, H. Tanaka, et al., IVC20 (2016, 8/21-26, Busan, Korea)

[17] 石川健治, 田中宏昌, ほか 69 回酸化ストレス学会 (2016, 8/30-31, 仙台)

[18] K. Ishikawa, H. Tanaka, et al., ICPM6 (2016, 9/4-9, Bratislava, Slovakia)

[19] K. Ishikawa, H. Tanaka, et al., 6th NU-SKKU Joint symposium (2016, 11/24-25, Suwon, Korea)

[20] 石川健治, 33 回プラズマ・核融合学会 (2016, 11/24-25, 仙台)

[21] 石川健治, 17 回プラズマ医療サイエンスの扉 (2016, 12/16, 名古屋)

[22] K. Ishikawa, 26th Material Society of Japan (MRS-J) (2016, 12/19-22, Yokohama)

[23] K. Ishikawa, Intern. Workshop on advanced plasma application on bio- and nanomaterials (2017, 1/27, Nagoya)

[24] 石川健治, プラズマエレクトロニクスの新展開 (2017, 3/29, 東京)

〔図書〕 (計 2 件)

[1] K. Ishikawa, "Plasma diagnostics", in "Non-thermal plasma for food processing", (Elsevier, 2016) ISBN: 9780128013656

[2] T. Ohta, "Plasma agriculture", in "Non-thermal plasma for food processing", (Elsevier, 2016) ISBN: 9780128013656

〔産業財産権〕

○取得状況 (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, 伊藤昌文, 太田貴之, 橋爪博司, 堀勝

権利者: 名古屋大学

種類: 特許登録

番号: 6,010,839 号

取得年月日: 2016 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

研究者紹介 Ishikawa ホームページ 名古屋大学プラズマナノ工学研究センター

<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

(2) 連携研究者

太田 貴之 (OHTA, Takayuki)

名城大学・理工学部・准教授
研究者番号: 10379612

田中 宏昌 (TANAKA, Hiromasa)

名古屋大学・大学院工学研究科・特任講師
研究者番号: 00508129