

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：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24108003

研究課題名(和文)高度時空間制御による生体適合放電生成の基盤確立と革新的医療プラズマ源の創成

研究課題名(英文)Development of novel plasma sources for plasma medicine through advanced spatio-temporal control of atmospheric-pressure discharge

研究代表者

節原 裕一 (Setsuhara, Yuichi)

大阪大学・接合科学研究所・教授

研究者番号：80236108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 87,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、気相・液相での独自のプラズマ生成・制御技術を礎に、放電励起源の最適化と流体制御による高度時空間制御に気相活性粒子計測を加味した系統的な研究により、生体適合性と時空間制御性に優れた放電生成の基盤確立を通じて、革新的な医療用プラズマ源の開発に向けた研究を推進した。その結果、放電励起周波数依存性ならびに流体力学的特性の可視化を通じて蓄積した知見を基に、気相ならびに液相での活性種生成に及ぼす因子を系統的に明らかにすることにより、液相中における生成濃度比を従来に比べて桁違いに広範囲かつ自在に制御することに成功すると共に、高密度かつ長尺の医療用高周波プラズマ源を開発した。

研究成果の概要(英文)：The research project has been carried out for development of novel plasma sources for plasma medicine through advanced spatio-temporal control of atmospheric-pressure discharge. The results obtained in the present project have shown that the novel high-density plasma source has been developed via high-frequency discharge through optimization of source configuration based on systematic studies on spatio-temporal characteristics and frequency dependence of atmospheric-pressure plasmas.

研究分野：プラズマ理工学

キーワード：プラズマ医療 プラズマ生成・制御

1. 研究開始当初の背景

プラズマ中で生成する活性種ならびに光子は、約 0.1 eV から 1 keV までの非常に広いエネルギー領域での作用が可能であり、有機分子の結合解離エネルギー (1~10 電子ボルト程度) を考慮すると、放電の時空間構造を制御したプラズマ源により、分子修飾や解離制御に基づく革新的なプラズマ医療技術の開拓に資することが期待される。

本研究が対象としている大気圧ならびに液相での放電では、時間的にも空間的にも、放電電流の集中により不安定になりやすいため、非平衡プラズマ (気体温度が、電子温度よりも極めて低い、室温程度で生成されるプラズマ) の生成では、多くの場合、定常的な連続放電ではなく、間欠的な放電になりやすい。特に、誘電体バリアプラズマジェットでは、ガラス管 (管径: 数 mm) の外周に配置した電極に 10 kV 程度の高電圧を数 kHz の低周波で印加することで、噴出長さが数 cm 程度に及ぶジェット状のプラズマを生成可能であることから、これまでのプラズマ医療研究において世界的に広く用いられている。この大気圧プラズマジェットは、時間的に連続しているように見えるが、実は、電源周波数に同期して、弾丸状に飛び出した『電離波動』が伝搬する非定常な放電である。

一方、間欠的なプラズマ (ストリーマと同様の電離ヘッド) を生体に照射する状況について考えると、電離ヘッドの到達時であるか否かによって、表面での状況が激変する。すなわち、a) 照射される活性種 (イオン、ラジカル) は時間的に著しく変動し、b) 電離波動の到達時には 10 kV/cm を越える高電界が生体組織に印加され、さらに、高電界で加速されたイオン衝撃により、c) 反応促進と同時に解離による著しい分子損傷を生じ、分子損傷 (特に、DNA) に伴う副作用を生じることが懸念される。さらに、従来のプラズマ源では、照射される活性種 (イオン・ラジカル) のエネルギーならびにフラックスさらに電界強度は互いに依存しており、「粒子パラメータ」を独立に制御することは困難である。

このため、本研究では、放電励起源の最適化と流体制御による高度時空間制御 (阪大) に気相活性粒子計測 (東大) を加味した系統的な研究により、生体適合性と時空間制御性に優れた放電生成の基盤確立を通じて、医療用プラズマ源を開発する。

2. 研究の目的

本研究では、気相・液相での独自のプラズマ生成・制御技術を礎に、放電励起源の最適化と流体制御による高度時空間制御 (阪大) に、気相活性粒子計測 (東大) を加味した系統的な研究により、生体適合性と時空間制御性に優れた放電生成の基盤確立を通じて、マイクロサイズ (カテーテル・腹腔鏡) から広範囲分散型 (皮膚、臓器への照射) にわたる革新的な医療用プラズマ源の開発を目的と

している。具体的に、以下の 4 項目を設定して研究を遂行した。[1] 生体高分子との相互作用解明、[2] 放電構造・活性種分布の時空間計測・評価、[3] 放電励起の高度時空間制御による生体適合放電生成の基盤確立、[4] 革新的医療プラズマ源の開発。

3. 研究の方法

(1) 高密度高周波プラズマジェットの開発

内径と外径がそれぞれ 4 mm と 6 mm の石英管の先端に接地電極、その後方に高周波印加電極を設置した新規電極構造を有する高周波プラズマジェットのプラズマ基礎特性を解析した。プラズマジェット長、放電電圧、発光分光の計測に加え、活性酸素ラジカルの 1 つである原子状酸素密度を真空紫外吸収分光法を用いて測定した。

(2) プラズマ活性細胞培養液中の ROS、RNS 精密制御とがん細胞殺傷効果の解明

プラズマ活性細胞培養液中の H_2O_2 と NO_2 の濃度を試薬添加による呈色反応を利用し評価した。 H_2O_2 に関しては Molecular Probe 社の試薬 A22188、 NO_2 に関しては DOJINDO 社の試薬 NK05 を用いた。がん細胞殺傷効果は、子宮類内膜腺がん細胞をプラズマ活性細胞培養液で 24 時間培養し、その後、細胞生存率を試薬添加による呈色反応を用いて評価した。

(3) プラズマ照射による細胞培養液成分変化の解明

プラズマ細胞培養液中のグルコース、アミノ酸、ビタミンの成分変化を、液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて評価した。

(4) 低周波プラズマジェットによる効率的活性種生成と空間分布制御

駆動電圧波形、駆動周波数、ガス流量、ガス流モードを実験パラメータに発光分光計測と放電消費電力計測を詳細に行った。また、ガス流をシュリーレン法により可視化し、そのモード遷移を解析した。ROS の空間分布を、KI-デンプン溶液 (KI:0.3%, デンプン 0.5%) にアガロース (0.5%) を添加したゼリー状試薬を用いて計測した。KI-デンプン試薬は、ROS との酸化反応により紫色に変色するため、ROS の生成量、ならびに空間分布を可視化できる。

(5) 電位直接計測によるプラズマジェット照射状態の評価

プラズマジェット前方に金属電極を設置し、プラズマジェット接触時の金属電極の電位変化を電圧プローブ (テクトロニクス社製 P5100A) で測定した。

(6) 放電構造・活性種分布の時空間計測・評価

プラズマ医療において重要である OH, O, NO, $O_2(a)$ の各活性種を、レーザー誘起蛍光法と発光分光法を用いて計測した。ストリーマ放電についてはシミュレーションを行い、活性種の生成機構に関する解析を行った。また、プラズマ照射対象となる溶液からの蒸散

水蒸気濃度を計測した。

(7) ナノ秒パルスストリーマ放電の開発とがん免疫治療への応用

ナノ秒パルスストリーマ放電を開発し、マウスに移植したメラノーマに照射した。マウスに2つ腫瘍を作り、片方の腫瘍にプラズマを照射するともう一方の腫瘍にも抗腫瘍効果が得られる現象の評価、腫瘍に対する免疫を獲得していることを確認するサイトカインの計測、また、長期的な免疫の獲得を確認する実験を行った。動物実験の他に、メラノーマ細胞を用いた細胞実験を行った。培養液中のメラノーマ細胞にプラズマを照射し、プラズマから供給された活性種の密度と細胞不活化率の相関を評価した。

4. 研究成果

(1) 高密度高周波プラズマジェットの開発

次世代型医療用プラズマ源として、長尺高密度プラズマジェットの開発に成功した。放電駆動周波数を従来型の kHz オーダーから、MHz オーダーへと増大させることにより、駆動電圧を 6 kV から 1 kV 以下へと格段に低減させた。また、新規電極構造を考案することにより、プラズマジェットの長尺化を実現した。具体的には高周波印加電極幅を拓げることにより、プラズマジェット長は伸長し、接地電極幅を狭めることにより、さらにプラズマジェット長は大きく増大した。この新規電極構造を採用することにより、40 mm 程度まで伸縮自在の長尺プラズマジェットの生成に成功した。プラズマの評価として、原子状酸素密度を真空紫外吸収分光法で計測した。図 1 に示すように従来型の低周波プラズマジェットの 10^{12} cm^{-3} の密度に対し、 10^{14} cm^{-3} と 2 桁高い超高密度を達成した。開発したプラズマ源を用いることにより、3 桁のオーダーで活性ラジカル密度を制御可能であることが明らかになった。

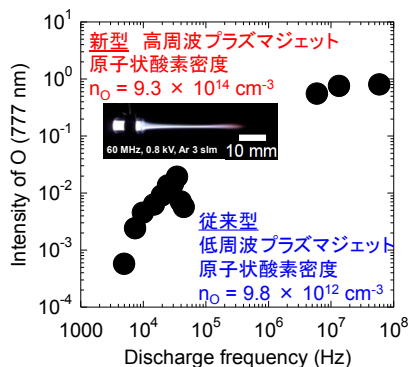


図 1：高周波プラズマジェットの特性。従来型の低周波プラズマジェットの 10^{12} cm^{-3} の密度に対し、 10^{14} cm^{-3} と 2 桁高い超高密度を達成した。

(2) プラズマ活性細胞培養液中の ROS、RNS 精密制御とがん細胞殺傷効果の解明

低周波 (LF) プラズマジェットと高周波 (HF) プラズマジェットを用いて、プラズマ活

性細胞培養液中の H_2O_2 と NO_2 の広範囲制御に成功した。図 2 に示すように、低周波プラズマジェットの溶液への直接照射においては、 H_2O_2 濃度が NO_2 濃度に比べ高くなった。一方、新規に開発した高密度高周波プラズマジェットの溶液への非接触照射においては、 NO_2 濃度が H_2O_2 濃度より高くなった。このように、プラズマ源、プラズマ照射方法を適切に選択することにより、溶液中の ROS、RNS 濃度比を連続的かつ広範囲に制御可能であることが明らかになった。また、細胞応答に関する医工連携研究を本領域内で精力的に推進し、プラズマ活性細胞培養液中の活性種濃度比を従来に比べて格段に広範囲に制御した条件におけるがん細胞殺傷効果を明らかにした。

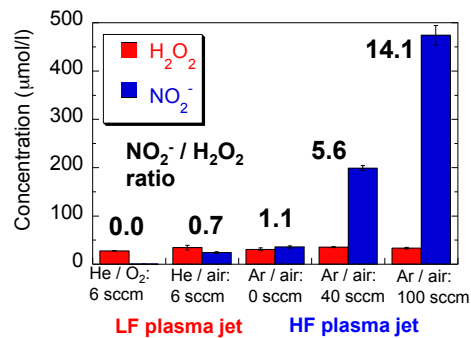


図 2：プラズマ活性細胞培養液中の H_2O_2 、 NO_2 濃度。プラズマ源、プラズマ照射方法により、 H_2O_2 、 NO_2 濃度比の広範囲制御に成功した。

(3) プラズマ照射による細胞培養液成分変化の解明

プラズマ照射細胞培養液の成分変化に関して、プラズマ照射により、アミノ酸の特にメチオニン濃度が大きく低下することを明らかにした。図 3 に各種アミノ酸の濃度変化を示す。プラズマ照射により、メチオニンとトリプトファン濃度が特異的に大きく減少し、また、メチオニンの酸化物であるメチオニンスルフォキシド成分が大量に観測された。また、プラズマ照射方法によってもアミノ酸の分解の様子が大きく異なることが明らかになった。

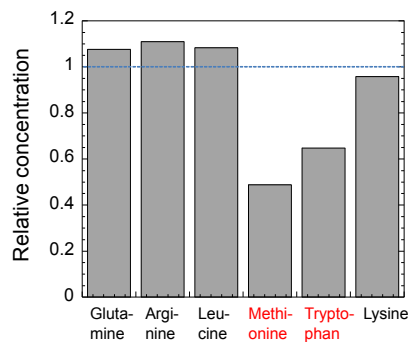


図 3：プラズマ照射後のアミノ酸の濃度変化。特にメチオニンとトリプトファン濃度が大きく減少することが明らかになった。

プラズマの接触状態（接触、非接触）を比較したところ、代表的な ROS である H_2O_2 濃度は同量にもかかわらず、プラズマ直接接触において、質量数の小さいアミノ酸のフラグメント成分が大量に観測された。本研究により、プラズマ照射細胞培養液中におけるアミノ酸分解と酸化物生成が明らかになった。

(4) 低周波プラズマジェットによる効率的活性種生成と空間分布制御

低周波プラズマジェットの駆動電圧波形、駆動周波数、ガス流量、ガス流モードにより、効率的活性種生成と空間分布制御に成功した。駆動電圧波形に関して、ナノ秒オーダーの立ち上がり時間とパルス幅を有する波形を採用することにより、O 原子からの発光効率（O 原子生成効率）が大きく向上した。駆動周波数によっても O 原子発光強度は大きく変化し、1 パルス当たりの発光強度は 5 kHz 程度で最大になることが明らかになった。ガス流量に関して、ガス流量の増大により、プラズマジェット長は増大するが、O 原子発光強度は逆に減少する傾向が明らかになった。さらに、ガス流速がある速度以上になると層流から乱流へとモードが遷移し、活性種の空間分布が大きく変化することを見いだした。図 4 にゼリー状の KI-デンプン試薬を用いて測定した ROS 空間分布を示す。KI-デンプン試薬は、ROS と反応し紫色に変色する。層流状態のプラズマジェットにおいては、中心部に強い変色が見られ、局所的に ROS が供給されている様子が明らかになった。一方、乱流状態のプラズマジェットにおいては、全体に薄い変色がみられ、広範囲に均一に ROS が供給される様子が明らかになった。本研究において、低周波プラズマジェットを用いた効率的活性種生成とその空間分布制御に成功した。

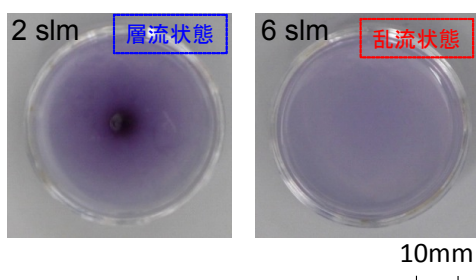


図 4:ゼリー状 KI-デンプン試薬を用いた ROS 空間分布計測。プラズマジェットの層流状態と乱流状態で、ROS 空間分布が大きく異なることを明らかにし、ROS の空間分布制御に成功した。

(5) 電位直接計測によるプラズマジェット照射状態の評価

大気圧プラズマジェットについて、電気的な直接測定により、電離波動としての伝搬挙動と共に固体表面あるいは液体表面への照射状態を直接的に評価可能であることを示

し、プラズマ照射状態（接触、非接触）に関する定量評価指標として有用であることを提案した。図 5(a)にプラズマジェットの印加電圧波形と放電電流波形を、図 5(b)にプラズマジェットが金属電極に接触した時の電圧波形を示す。照射距離が 20 mm と近い場合、プラズマ接触と同時に電圧は 1 kV 程度まで大きく増大した。この電圧ピーク値は、照射距離とともに指数関数的に低下し、プラズマ非接触時には、ほぼ 0 となった。この電圧信号は、電離波動の電界強度の減衰過程を示唆しており、これにより固体表面あるいは液体表面への照射状態（接触、非接触）を定量的に評価可能であることを示した。

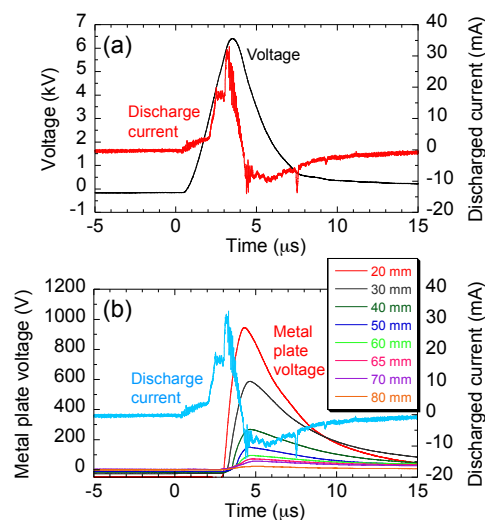


図 5: (a)プラズマジェット印加電圧波形と放電電流波形。(b)プラズマジェット前面に設置した金属電極の電圧波形。電圧波形から照射状態が評価可能であることを見いだした。

(6) 放電構造・活性種分布の時空間計測・評価

ヘリウムプラズマジェットの計測では、OH, O, NO の密度、二次元分布、およびマイクロ秒オーダーの時間変化をレーザー誘起蛍光法で測定した。また、 $\text{O}_2(a)$ 密度を赤外発光分光計測で測定した。図 6 に測定例を示す。プラズマジェットは、ヘリウムガスを流す石英管ノズルからプラズマジェットが吹き出すと同時に、石英管内部でも強いプラズマが発生する。OH の計測では、OH がジェット部ではなく、石英管内部のプラズマで生成されることを明らかにした。また OH は、ヘリウムガスに含まれる 10 ppm 程度の不純物 H_2O が、1%程度解離して生成されていることを示した。この結果から、プラズマジェットを実際に病院で使用する際に、ヘリウムの不純物濃度制御が重要であることを示した。一方、ジェット部に混入する周辺空気も H_2O を含むため、これが OH の生成源となることを当初予想していたが、予想に反してここではほとんど OH が生成されないことを示した。一方、O 原子は、ジェット部に混入する周辺空気の O_2 から生成されることを計測で明ら

かにし、プラズマジェットと空気がよく混ざった付近で O 密度が高くなることを示した。なお、微量の O₂ を He に混ぜた He/O₂ プラズマの O₂(a)計測でも、石英管内のプラズマが重要であることを示した。

ストリーマの活性種計測では、レーザー誘起蛍光法で OH, O, NO 密度を計測した。シミュレーションで、これら活性種の生成機構を詳細に分析し、これらが主に二次ストリーマで生成されることを明らかにした。一方で、プラズマ医療などの表面処理では、特に OH や O などの短寿命活性種について、照射表面から 0.1 mm 程度の近傍で生成された活性種のみが表面に到達することを示し、この近傍での活性種密度が特に重要であることを示した。プラズマ医療では、乾燥ガスを吹き付けながらプラズマを発生させることが多いが、照射対象から蒸散する水蒸気が表面近傍に薄い層を作り、極めて湿度の高い層を形成して、結果的に OH など H₂O 由来の活性種が多く生成されることを示した。

培養液中のメラノーマ細胞にストリーマを照射した実験では、OH, O, NO の中で、OH のみが細胞不活化率と相関を持つことを明らかにし、OH が細胞不活化に寄与している可能性を示した。

真空紫外光の光解離反応による活性種生成法の開発では、微量の H₂O あるいは O₂ を混ぜたヘリウムを石英管に流し、そこに波長 172 nm の Xe₂エキシマランプ光を照射して、H₂O や O₂ を光解離する手法を開発した。この手法では OH, HO₂, H, O, O₃, H₂O₂, O₂(a) の各活性種を生成することができ、それらの密度は本研究で開発したシミュレーションで求めることができる。また、H₂O や O₂ 濃度や照度、ガス流量を制御することで、各活性種の密度を個別に制御することができる。シミュレーションの妥当性は、OH および O₃ 密度の計測値と比較することで確認した。本手法を用いて、寒天培地上の枯草菌を殺菌する実験を行い、0.1 ppm の OH を 30 秒間菌に照射すると、目に見える殺菌を生じることが分かった。このように、OH のような短寿

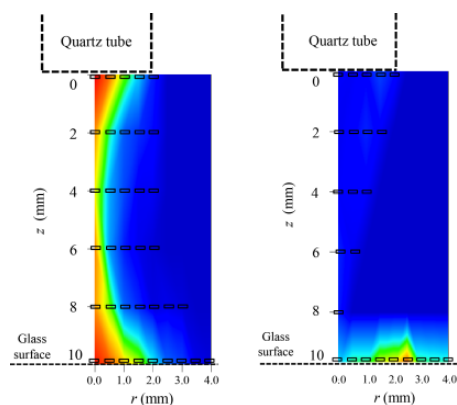


図 6: プラズマジェットをガラス板に照射したときの(左)OHおよび(右)O 密度分布測。

命活性種のバイオ医療効果が定量的に調べられた例はなく、本研究でその手法を新しく提案し、その実証実験にも成功した。

(7) ナノ秒パルスストリーマ放電の開発とがん免疫治療への応用

マウスの両脚にメラノーマを作成し、右脚の腫瘍のみストリーマ放電を 1 日 10 分間、5 日間続けて照射し、左脚の腫瘍にも抗腫瘍効果がでることを確認した。4 セットの実験を行い、プラズマ照射群と未照射群のマウスについて、腫瘍の成長速度を比較した (図 7)。その結果、プラズマ照射群も腫瘍は成長するものの、未照射群に比べて成長速度が遅いことが観測された。これは、腫瘍にプラズマを照射することで、全身性の抗腫瘍効果が得られたことを示している。

プラズマ照射したマウスがメラノーマに対する免疫を獲得していることを確認するため、マウスの脾臓をメラノーマ細胞と共生培養し、サイトカインの産出量を測定した。その結果、プラズマ照射群のサイトカイン産出量は、未照射群に比べて 10 倍以上であり、メラノーマに対する免疫を獲得していることを確認した。

次に、長期的な免疫効果を確認する実験を行った。腫瘍にプラズマ照射してマウスが免疫を獲得した後、腫瘍を一度切除して、2 週間後に別の場所に再度腫瘍を作成した。この再移植した腫瘍に対する抗腫瘍効果を調べた結果、プラズマ照射群では再移植した腫瘍の体積は少しずつ大きくなったものの、すべて緩慢な成長速度を示した。一方未照射群は、すべての個体において通常通りの成長速度を示した。この結果から、プラズマ照射したマウスが、照射開始から 1 カ月以上にわたって免疫の効果を維持していることを確認した。

メラノーマ細胞を用いた細胞実験では、プラズマ作動ガスの流量および O₂ 濃度を変化させて実験を行い、細胞の不活化率を測定した。OH, O, NO 密度を培養液面上 0.1mm の範囲で測定し、これら活性種の培養液に対するフラックスも測定した。その結果、O と NO は細胞不活化率と相関を示さなかったものの、OH は強い相関を示し、OH が細胞不活化に寄与している可能性を示した。

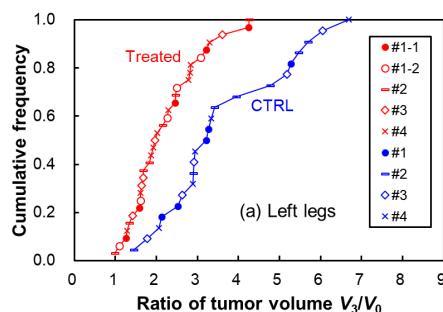


図 7: 右脚の腫瘍にプラズマ照射したときの、照射開始から 3 日後の左足の腫瘍の体積 (照射開始日の体積で規格化) の累積度数分布。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 55 件)

- ① K. Mizuno, K. Yonetamari, Y. Shirakawa, T. Akiyama, R. Ono, Anti-Tumor Immune Response Induced by Nanosecond Pulsed Streamer Discharge in Mice, *Journal of Physics D: Applied Physics* 50 (2017), 12LT01. (査読有)
DOI:10.1088/1361-6463/aa5dbb
- ② Y. Setsuhara, Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 601 (2016), pp. 3-10. (査読有)
DOI:10.1016/j.abb.2016.04.009
- ③ G. Uchida, A. Nakajima, T. Ito, K. Takenaka, T. Kawasaki, K. Koga, M. Shiratani, Y. Setsuhara, Effects of nonthermal plasma jet irradiation on the selective production of H₂O₂ and NO₂⁻ in liquid water, *Journal of Applied Physics* 120 (2016), pp. 203302-1 - 203302-9. (査読有)
DOI:10.1063/1.4968568
- ④ G. Uchida, K. Takenaka, Y. Setsuhara, Effects of discharge voltage waveform on the discharge characteristics in a helium atmospheric plasma jet, *Journal of Applied Physics* 117 (2015), pp. 153301-1 - 153301-6. (査読有)
DOI:10.1063/1.4918546
- ⑤ I. Yagi, Y. Shirakawa, K. Hirakata, T. Akiyama, S. Yonemori, K. Mizuno, R. Ono, T. Oda, Measurement of OH, O, and NO Densities and Their Correlations with Mouse Melanoma Cell Death Rate Treated by a Nanosecond Pulsed Streamer Discharge, *Journal of Physics D: Applied Physics* 48 (2015), 424006. (査読有)
DOI: 10.1088/0022-3727/48/42/424006

〔学会発表〕(計 218 件)

- ① Y. Setsuhara, G. Uchida, T. Ito, J. Ikeda, Y. Mino, K. Takenaka, Characterization of atmospheric-pressure plasma jets and interaction with liquid for control of reactive species in plasma-activated aqueous solutions, *International Conference on Plasma Medical Science Innovation*, 2/27~28, Nagoya, Japan (2017). (招待講演)
- ② R. Ono, Measurement of reactive species in atmospheric pressure plasmas, 2016 Plasma Processing Science Gordon Research Conference, 7/24~29, New Hampshire, USA (2016). (招待講演)
- ③ R. Ono, Measurement of reactive

species for plasma medicine, 68th Annual Gaseous Electronics Conference / 9th International Conference on Reactive Plasmas, 10/12~16, Hawaii, USA (2015). (招待講演)

- ④ Y. Setsuhara, G. Uchida, K. Kawabata, A. Miyazaki, K. Takenaka, Discharge Characteristics and Interaction with Soft Materials in Vacuum, Air and Liquid, 5/18~24, Garmisch-Partenkirchen, Germany, (2014). (招待講演)
- ⑤ Y. Setsuhara, Characterization of Atmospheric-Pressure Discharge and its Interaction with Soft Materials as a Basis for Plasma Medicine, *International conference on Surface Engineering (ICSE2013)*, 11/18~21, Busan, Korea (2013). (招待講演)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：プラズマ発生装置及びこれを用いたプラズマ生成方法

発明者：節原裕一、内田儀一郎、竹中弘祐

権利者：大阪大学

出願番号：特願 2017-68320

出願年月日：平成 29 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

節原 裕一 (SETSUHARA, Yuichi)

大阪大学・接合科学研究所・教授

研究者番号：80236108

(2) 研究分担者

小野 亮 (ONO, Ryo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90323443

小田 哲治 (ODA, Tetsuji)

東京大学・名誉教授

研究者番号：90107532

(平成 25 年度より連携研究者)

(3) 連携研究者

竹中 弘祐 (TAKENAKA, Kosuke)

大阪大学・接合科学研究所・助教

研究者番号：60432423

内田 儀一郎 (UCHIDA, Giichiro)

大阪大学・接合科学研究所・准教授

研究者番号：90422435

阿部 浩也 (ABE Hiroya)

大阪大学・接合科学研究所・准教授

研究者番号：50346136

(平成 27 年度まで連携研究者)