

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K03604

研究課題名（和文）低温大気圧プラズマ照射溶液中の活性種制御

研究課題名（英文）Control of reactive species in solution treated by cold atmospheric plasma

研究代表者

清水 鉄司（Shimizu, Tetsuji）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：70803881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：医療分野において、低温大気圧プラズマの利用を加速するために、プラズマ照射された溶液中の活性種制御が重要である。生体細胞などが、一般に溶液中に存在しているためである。本研究では、気相中の活性種分布を投入電力により制御できる表面誘電体バリア放電を用い、またプラズマ空間中に微小液滴を導入することで、溶液中の活性種分布の制御を行うことができた。また、芽胞菌を用いて滅菌実験を行い、プラズマ照射溶液中のオゾンなどの活性種が殺菌に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において表面誘電体バリア放電を用いた溶液中の活性種分布の制御を達成することができた。これは、低温大気圧プラズマを用いた医療応用分野において、プラズマ照射による細胞応答メカニズム解明やプラズマ照射の最適化につながり、当該分野の発展に貢献している。また、プラズマ医療分野だけではなく、コロイド溶液を用いた化学反応プロセスを用いる物質合成分野における新たな制御技術の提案等も考えられ、新たな化学反応制御技術への展開につながる。

研究成果の概要（英文）：In the biomedical applications using cold atmospheric plasmas, it is important to control a profile of reactive species in plasma-treated solution. The biological reactions are discussed in terms of reactive species and the biological samples are often immersed in liquid. In this study, a method to control reactive species in liquid has been investigated using a surface dielectric barrier discharge plasma and micrometer-size droplets. The surface dielectric barrier discharge was used because the reactive species generated by this plasma source can be controlled by the plasma-input power. The reactive species in plasma-treated solution was measured by UV absorption spectroscopy.

It was observed that the reactive species in plasma-treated solution could be controlled by changing input power to plasma. Moreover, it was shown that the bactericidal property of the plasma-treated solution was related to the reactive oxygen species in the solution.

研究分野：プラズマ応用

キーワード：低温大気圧プラズマ プラズマ医療 プラズマ照射溶液 活性種 殺菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、大気圧低温プラズマを用いた医療分野への応用が研究されている。その中でも低温大気圧プラズマの生体への直接照射は、ほぼ室温でヒトの免疫システムと同様の活性種を供給することができる。その特徴から毒性が少ないことが予想され、さまざまな医療応用が活発に試みられており、慢性創傷消毒への展開は、その一例である。その一方、プラズマ照射により化学的に活性化された溶液を、細胞などに投与することが行われている。これは、プラズマの生体への間接照射であり、殺菌やがん細胞の選択的不活化(アポトーシスの誘導)などがすでに報告されている。この際、プラズマにより活性化された溶液中に存在する活性種の分布により、細菌や細胞の応答が変化する。

一般に被照射物は液体に覆われているため、プラズマを直接照射する際にも、目的に応じた細胞の応答を引き出すためには、プラズマ照射した溶液中に存在する活性種の分布を制御することが必要である。ところが、一つのプラズマ源からは、図1に示すように、多くの場合 Reactive Oxygen Species (ROS) と Reactive Nitrogen Species (RNS)のいずれかが選択的に生成されることが多く、ROS と RNS を任意の割合で生成することは困難であった。

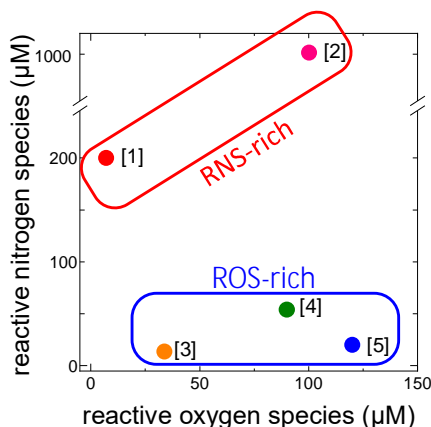


図1 各種プラズマ源による水中のROSとRNSの生成。

[1] Kurake et al., J. Phys. D, (2017). [2] Traylor et al., J. Phys. D, (2011). [3] Uchida et al., J. Appl. Phys. (2016). [4] Oh et al., JJAP (2018). [5] Dolezalova et al., Bioelectrochemistry (2015).

2. 研究の目的

本研究の目的は、低温大気圧プラズマにより活性化する溶液中の活性種分布制御法の開発である。一般的なアプローチは、気相中に生成する活性種を変え、溶液中に溶け込む活性種を制御することである。そのために、気相中の活性種をコントロールできる表面誘電体バリア放電プラズマを用いる。それに加え、プラズマ照射する溶液の形状制御をおこなう。具体的には、微小液滴をプラズマ空間内に導入することである。液滴の導入で、プラズマと液体表面の接触面積が変わるため、プラズマ照射した溶液内のさらなる活性種分布制御につながることを期待される。

本研究では、表面誘電体バリア放電プラズマを用い、以下のことを主に明らかにする。

- 気相中の活性種を制御した際、および液滴を導入した際のプラズマ照射溶液内活性種分布
- プラズマ照射溶液の殺菌能

3. 研究の方法

図2に本研究で用いた実験の概要を示す。容量100mlの密閉容器内に表面誘電体バリア放電電極と液滴を生成するネビュライザを設置し純水を入れる。空気を作動ガスとして用いた表面誘電体バリア放電プラズマを用いると、投入電力に応じて生成する活性種が変わるのを利用して、溶液中の活性種分布制御を試みた。投入電力が小さい場合、オゾン濃度がプラズマオン時間中に単調に増加する。これは、プラズマ空間中において、ROSが支配的であることを意味している。それに対して、電力が大きくなると、オゾンは初期の時間のみに存在する。オゾンが消失したのちは、酸化窒素などのRNSが支配的になることを確認している。プラズマへ投入する電力を変化させることにより、気相中のROSとRNSのバランスを制御できる。

プラズマは、生成電極に周波数20kHzの高電圧を印加することにより生成した。電圧を7-8kV_{pp}まで変化させることにより、プラズマへの投入電力を0.8-1.9Wの間で制御することができた。プラズマ照射溶液の生成のために、密閉容器内でプラズマを2分間生成した。その後容器を1分間の間振盪し、液体と気体を十分に混合した。

気相中の活性種分布制御を確認するため、ROSであるオゾンを吸収紫外分光法を用いて測定した。水銀ランプからの波長254nmの吸収を測定することにより、気相中のオゾン濃度を見積もった。溶液中のオゾンやNO₃などの活性種濃度は紫外吸収分光法を用いて測定した。

また、液滴をプラズマ空間内に導入するため、容器底部にネビュライザを設置した。ネビュライザを用いることにより、直径10マイクロメートル程度の液滴を生成し、プラズマ空間内に導入

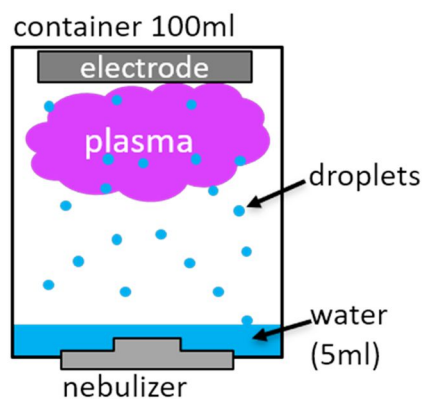


図2 実験装置概要。

した。

本研究で生成したプラズマ照射溶液の殺菌能を調べるため、*Geobacillus stearothermophilus* 芽胞菌 (ATCC 7953) (3M healthcare, Attest 1291) による評価を行った。本評価方法は、菌数として5桁低減を保証している。なお、プラズマ照射溶液と芽胞菌の接触時間は240 sとした。

4. 研究成果

気相中の活性種分布を確認するため、図3に示すようにプラズマ空間内のオゾン濃度を測定した。プラズマへの投入電力が小さい間は、オゾン濃度が単調に増加していくが、電力が高くなるとオゾンが初期にのみ存在し、その後消失することが確認できた。これは、プラズマ生成の際の外部パラメータである投入電力で、気相中の活性種分布の制御していることを意味している。

図4にプラズマ照射溶液の紫外吸収スペクトルの一例を示す。この吸収スペクトルは、プラズマ投入電力0.8 Wの際のプラズマ照射溶液から測定したものである。このスペクトルから、本研究で溶液中に生成する主な活性種は、オゾンとNO₃であることがわかった。

プラズマへの投入電力を変化させたときのプラズマ照射溶液中のオゾン濃度、NO₃濃度及びpHを図5(a)にまとめた。プラズマへの投入電力を0.8から1.9 Wまで変化させることにより、気相中の活性種の変化に応じて、溶液中においてもROSが主となる活性種分布からRNSが主となる分布まで制御できることがわかった。

さらに、ネビュライザを用いて液滴を導入した際の結果を図5(b)に示す。本研究で用いた実験パラメータの範囲では、液滴の導入による活性種分布の変化はほとんどないことがわかった。本研究で測定した活性種は長寿命のものであり、短寿命の活性種は変化している可能性があるため、電子スピン共鳴装置 (ESR) などを用いて検討していく必要があると考えられる。

表1に本研究で生成したプラズマ照射溶液の滅菌結果を示す。表中の-は滅菌の完了、+は未完了(5桁以上の殺菌が達成できていないこと)を示している。ここでは、それぞれの電力パラメータで5サンプルに対してテストを行い、サンプルごとの滅菌結果を示している。サンプルの判定は判定器(3M Attest 290/290G Autoreader, 3M)により行った。本研究においては、プラズマ投入電力が小さい時に生成したプラズマ照射溶液が、高い殺菌能を保持していることが示された。これは、オゾンなどのROSが殺菌に有効であることを示唆している。この傾向は、液滴の有無にかかわらず同じであった。殺菌に関する短寿命活性種の検討を今後行っていく必要がある。

本研究で達成した、プラズマに照射溶液中の活性種分布制御は、低温大気圧プラズマ照射による細胞応答の制御とその分子機構の解明につながるものと考えている。これは、プラズマによる

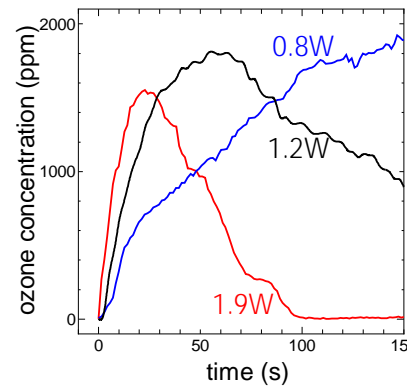


図3 気相中のオゾン濃度。

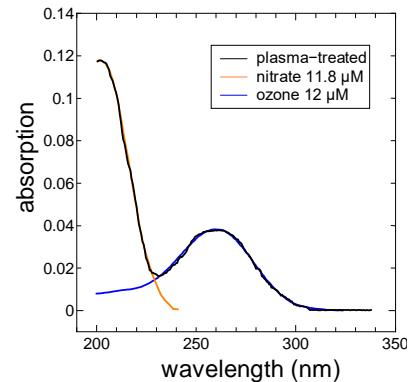


図4 プラズマ照射溶液の吸収スペクトル (プラズマ投入電力 0.8 W)

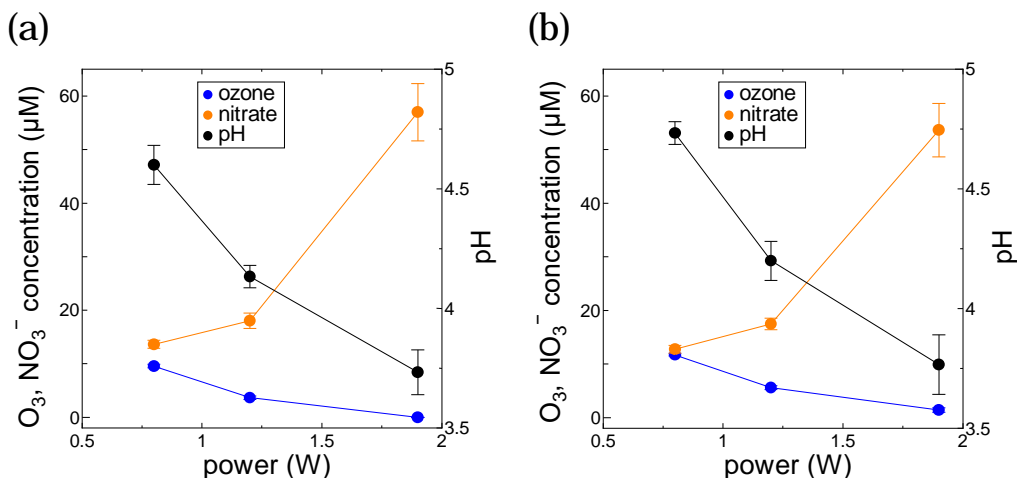


図5 プラズマ照射溶液中の活性種分布と pH。(a)プラズマ空間中に液滴を導入していない場合。(b)液滴を導入した場合。

細胞応答の最適化などを図るうえで重要である。また、溶液中の活性種を広範囲に制御できることから、コロイド溶液を用いた化学反応プロセスを用いる物質合成分野への波及も考えられる。

表 1 プラズマ照射溶液を用いた滅菌結果。

input power (W)	without droplets	with droplets
0.8	-----	-----
1.2	--++++	---++
1.9	+++++	+++++

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Tetsuji	4. 巻 59
2. 論文標題 Wound treatment by low-temperature atmospheric plasmas and issues in plasma engineering for plasma medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 120501 ~ 120501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abc3a0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Iwase, Y. Kamaji, S. Y. Kang, K. Koga, N. Kuboi, M. Nakamura, N. Negishii, T. Nozaki, S. Nunomura, D. Ogawa, M. Omura, T. Shimizu, K. Shinoda, Y. Sonoda, H. Suzuki, K. Takahashi, T. Tsutsumi, K. Yoshikawa, T. Ishijima, K. Ishikawa	4. 巻 58
2. 論文標題 Progress and perspectives in dry processes for emerging multidisciplinary applications: how can we improve our use of dry processes?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SE0803 ~ SE0803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/1347-4065/ab163a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mueller Meike, Shimizu Tetsuji, Binder Sylvia, Rettberg Petra, Zimmermann Julia L., Morfill Gregor E., Thomas Hubertus	4. 巻 8
2. 論文標題 Plasma afterglow circulation apparatus for decontamination of spacecraft equipment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 105013 ~ 105013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5040303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Tetsuji Shimizu
2. 発表標題 Distribution of Long-Lifetime Reactive Species in Water Produced by Surface Dielectric Barrier Discharge Plasma
3. 学会等名 30th Annual Meeting of MRS-J (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuji Shimizu
2. 発表標題 Long-Lifetime Reactive Species in Water Treated by Surface Dielectric Barrier Discharge Plasma
3. 学会等名 11th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology (APSPT-11) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuji Shimizu
2. 発表標題 Stimulation of cells by cold atmospheric plasma for wound treatment
3. 学会等名 31th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hubertus M. Thomas, Meike Mueller, Julia Zimmermann, Gregor Morfill, Petra Rettberg, Markus H. Thoma, Tetsuji Shimizu
2. 発表標題 Cold Atmospheric Plasma Device for Decontamination of Space Equipment
3. 学会等名 2018 MRS Fall Meeting & Exhibit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水 鉄司
2. 発表標題 低温大気圧プラズマ照射溶液中の活性種分布
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------