

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 22日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21246032

研究課題名（和文） 生体反応プラズマ流生成輸送制御による細胞活性化の促進抑制機構

研究課題名（英文） Mechanism of activation and inactivation of cell viability by generation and transport control of biological reactive plasma flow

研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO TAKEHIKO)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：10302225

研究成果の概要（和文）：

生体反応プラズマ流の化学輸送機構について、放電時に形成される高温気流が水面上に広がり水中に流れが誘導され化学輸送を担うことを実験・数値解析から明らかにした。また、ラジカルから変化した安定化学種の中で、過酸化水素が HeLa 細胞の不活化作用を有することを、形態変化、カタラーゼによる細胞毒性の消滅、遺伝子発現解析などから明らかにした。さらに、細胞膜のエネルギー輸送は輸送方向と細胞膜分子種に依存することを示した。

研究成果の概要（英文）：

The chemical species of the biological reactive plasma flow was mainly transported by the generation of the expanding high temperature gas flow on the water surface and induced water flow due to the gas flow. Hydrogen peroxide among the stable chemical species generated by the plasma flow was identified as an important inactivation factor of the HeLa cell viability by the morphological variation process, the effect of catalase, the gene expression analysis, and so on. The energy transport in the cell membrane was affected by the transport directions and molecular types.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：バイオフィ体力学

1. 研究開始当初の背景

新型インフルエンザ感染爆発や院内感染、食中毒などによる健康を脅かす社会問題の解決が重要な課題となっていた。また、iPS細胞の発見による再生医療の著しい発展などが期待されていた。これらの課題を解決し、飛躍的に発展させるため、細胞の成長を促

進・抑制させる、安全かつ簡便に取り扱える新しい手法の開発が必要であった。

一方、世界では、プラズマによる皮膚治療や低温で血液を凝固させる方法などの報告があり、プラズマを利用した生体への応用が大いに期待されていた。しかしながら、プラズマがどのような作用を生体に与えるのか

については、ほとんど未解明の状況であった。

2. 研究の目的

本研究は、生体反応プラズマ流を細胞に照射することで、それによる細胞死および細胞増殖の発現機構を解明し、その因子を特定する。これにより、流体工学を基盤にしたプラズマ、化学、電気、バイオ・医療を融合する、革新的なプラズマ滅菌やプラズマ細胞増殖法を開発し、次世代のプラズマ医療基盤技術の創成とその学理の構築を目指す。

3. 研究の方法

研究体制は、研究統括、プラズマ流解析、生体反応解析（佐藤：代表者、横山：研究支援者）、細胞膜エネルギー輸送解明（小原：分担）、細胞活性促進抑制機構検証（城倉：分担）、生体反応機構検証（宮原：分担）である。

研究は、①生体反応プラズマ流の生成装置の新規計・製作、②生体反応プラズマ流の診断・制御と生成輸送機構の解明、③細胞のアポトーシスとネクローシス発現機構の解明、④細胞の死滅・回復・増殖発現条件の抽出と活性化による細胞増殖促進の検証、⑤細胞膜中のエネルギー伝達機構の解明の各項目について行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①気液プラズマ流の熱流動場・反応場解析

図1に電圧印加時の電極間のシュリーレン写真を示す。電極先端から水面へ移動する三日月型の濃淡領域が観察された。この濃淡は約 100 μs 毎に発生しており、放電の発生を示す電流パルスが現れる間隔に等しい。また、電流パルスの半値幅が 20 ns 程度でありストリーマの生成時間は十分に短いと考えられることから、放電によって熱せられた中性ガスの流れだと考えられる。この流れは、電界

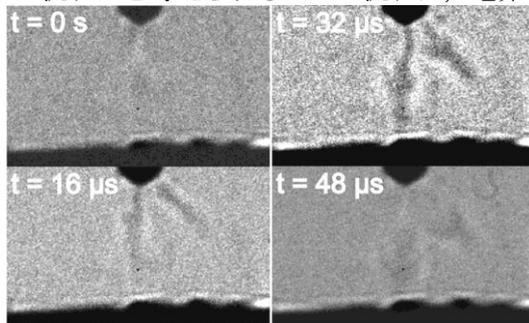


Fig. 1 Sequential images of the pulse discharge visualized by the schlieren method.

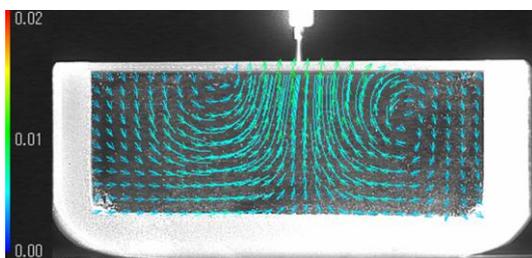


Fig. 2 Typical velocity vector field in the water measured by PIV method. Particles are polymethylmethacrylate 5 μm in diameter.

によって駆動されたイオンが中性粒子に衝突し、イオン-中性粒子の間で運動量交換が行われたために誘起されたと考えられる。この時、気流の速度は約 15 m/s である。

図2に電圧印加時の水中の速度ベクトル分布を示す。放電が発生すると、水と放電との接触点を起点として水中に流れが誘起される。流動する領域は、放電開始直後は接触点近傍のみであるが、放電時間の経過とともに次第に壁面方向へとひろがっていき、放電開始から約5秒後にはガラスセル内の全域にわたって渦状の流れが形成された。流速については、壁面近傍では数 mm/s であったのに対し、水面近傍では最大で 3 cm/s 程度となった。これは、水面上に誘起された気流が水面上で広がるときに水と運動量交換を行うためであり、数値解析でも検証された。

②プラズマ流による細胞不活化機構

図3に通常培地（コントロール）、プラズマ処理培地、過酸化水素添加培地に暴露した時の、異なる暴露時間に対する細胞数の変化を示す。細胞数の変化は吸光度で示した。暴露時間は 10, 30, 60, 120 min とした。コントロールでは、吸光度は概ね一定であるのに対し、プラズマ処理培地と過酸化水素添加培地では、暴露時間が長くなると共に減少し、120 min では細胞は死滅することが明らかになった。また、プラズマ処理培地と過酸化水素培地では、概ね同じ傾向を示すことが示さ

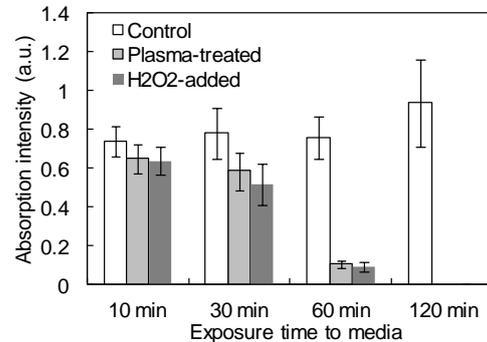


Fig. 3 Cell survival rate shown by the absorption intensity versus exposure time to media of the regular (control), plasma-treated and H_2O_2 -added.

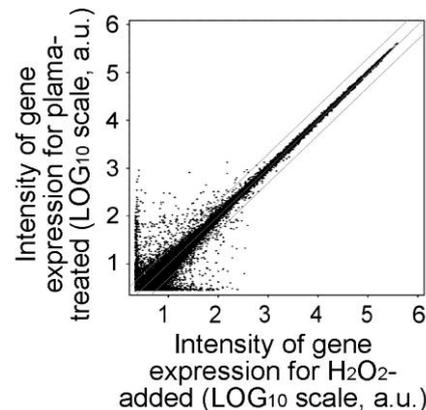


Fig. 4 Scatter plot of the intensities corresponding to each gene under plasma-treated case versus H_2O_2 -added case. The values in both vertical and horizontal axes are a common logarithm (Log_{10}).

れた。しかし、過酸化水素分解酵素であるカタラーゼを添加した場合、コントロールとプラズマ処理培地、過酸化水素添加培地の条件間で、ほとんど違いは得られなかった。また、形態観察より、コントロールでは、細胞は活発に移動や分裂を行うが、プラズマ照射培地や過酸化水素添加培地に暴露した細胞は、移動や分裂を行わず、3時間後には収縮を始め、5時間後には細胞膜の水泡様変化 (blebbing) が出現し、最終的に細胞質が水泡内に漏出し円形の水泡を形成する。細胞の不活性化は処理培地暴露直後から観察されると同時に、プラズマと過酸化水素では同じ過程を経て細胞死に至る。

図4にプラズマ処理培地と過酸化水素添加培地に対する遺伝子発現強度のスクエアープロットを示す。これは、網羅的遺伝子発現解析 (Whole Human Genome Microarray Kit, Agilent Technologies) により得られた結果をまとめたものである。この解析は、一度にヒト遺伝子の発現応答を得ることが可能であり、異なる条件の細胞群を比較することで遺伝子発現の全体的な変化を把握することが可能である。図4の結果より、プラズマ処理培地と過酸化水素添加培地への暴露に対する細胞の遺伝子発現応答は、発現強度が高い領域で、全ての遺伝子発現が対角線上に位置していることから、一致していることが示された。

③細胞膜エネルギー輸送機構

細胞膜内のエネルギー輸送について数値解析により、細胞膜を構成する分子内と分子間のエネルギー輸送の比率がエネルギー輸送方向や分子種により影響を受けることが明らかになった。

(2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

本研究成果は、プラズマ医療において重要なプラズマ-水-生体のシステムにおいて、気相中で生成された化学種がどのように生体に輸送されるのかについて、世界で初めて明らかにした。また、水中においては生成されたラジカルは極めて短い時間で安定化学種に変化するため安定化学種による影響を明らかにする必要があるが、安定化学種の中でも過酸化水素がプラズマの刺激因子と同じ役割を担っていることを世界で初めて明らかにした。これらの成果は、プラズマ医療学理構築の一翼を担う重要な成果である。

(3) 今後の展望

今後は、本研究を基盤とし、プラズマ医療の実用化を見据え、プラズマの特徴を生かした生体への刺激の与え方を新たに開発するとともに、遺伝子群発現の検証による細胞応答誘導法の開発を目指し、プラズマ医療の学

理構築に向けた研究を促進する。

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8件)

1. Tetsuji Shimizu, Yutaka Iwafuchi, Gregor E. Morfill and Takehiko Sato
Formation of thermal flow fields and chemical transport in air and water by atmospheric plasma
New Journal of Physics, Vol. 13, No. 5, (2011), pp. 053025/1-053025/10, 査読有.
2. Tetsuji Shimizu, Yutaka Iwafuchi, Gregor E. Morfill and Takehiko Sato
Transport mechanism of chemical species in a pin-water atmospheric discharge driven by negative voltage
Journal of Photopolymer Science and Technology, Vol. 24, No. 4, (2011), pp. 421-427, 査読有.
3. Takehiko Sato, Mayo Yokoyama and Kohei Johkura
A key inactivation factor of HeLa cell viability by a plasma flow
Journal of Physics D: Applied Physics, Vol. 44, No. 37, (2011), pp. 372001/1-372001/5, 査読有.
4. 佐藤岳彦
プラズマ医療と流体力学
日本機械学会流体力学部門ニューズレター「流れ」, 特集テーマ: 医療と流体力学, (2011), 査読無. (解説)
5. Tetsuji Shimizu, Tetyana Nosenko, Gregor E. Morfill, Takehiko Sato, Hans-Ulrich Schmidt and Takuya Urayama
Characterization of Low-Temperature Microwave Plasma Treatment With and Without UV Light for Disinfection
Plasma Processes and Polymers, Vol. 7, Nos. 3-4, (2010), pp. 288-293 (Special Issue on Plasma Medicine). 査読有
6. Takehiko Sato, Shiroh Ochiai and Takuya Urayama
Generation and Transport Mechanisms of Chemical Species by a Post-Discharge Flow for Inactivation of Bacteria
New Journal of Physics, Vol. 11, No. 11, (2009), pp. 115018-1 - 115018-12 (Special Issue on Plasma Medicine). 査読有
7. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流による滅菌技術の開

発
クリーンテクノロジー, 第19巻, 8号,
(2009), 41-45頁, 査読無. (解説)

8. 佐藤岳彦
プラズマ滅菌
静電気学会誌, 第33巻, 4号, (2009),
137-141頁, 査読無. (解説)

[学会発表] (計35件)

1. Takehiko Sato
Flow formation and chemical species transport in a pin-water surface atmospheric plasma
Book of Abstracts of the 8th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing, abstract no. 005, (2012-1-16), 東大寺総合文化センター.
2. 佐藤岳彦
プラズマ処理培地への暴露における HeLa 細胞不活性化因子
日本機械学会第 24 回バイオエンジニアリング部門講演会, (2012-1-7), 大阪大学.
3. 佐藤岳彦
プラズマ流と生体の相互作用解明に向けた流体工学的取組
日本機械学会環境工学部門第 2 回第 3 技術委員会, (2011-12-22), 日本機械学会. (招待講演)
4. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流による生体への干渉機構—プラズマ医療への展開—
第 1 回流体科学におけるバイオ・医療に関する講演会, (2011-12-21), 東北大学流体科学研究所. (招待講演)
5. Takehiko Sato
Plasma Induced Flow and Chemical Transport in a Plasma-Water System
Abstracts CD of the 21st Academic Symposium of MRS-Japan 2011, abstract no. A-08, (2011-12-19), 横浜市開港記念会館.
6. 佐藤岳彦
流体力学的視点からみたプラズマ医療
プラズマ核融合学会専門委員会「プラズマ科学の医療応用」第 2 回会合, (2011-12-16), 産業技術総合研究所臨海副都心センター.
7. 佐藤岳彦
プラズマ処理培地への暴露による細胞不活性化における過酸化水素の役割
プラズマコンファレンス 2011 (PLASMA2011), (2011-11-22), 石川県立音楽堂.
8. Takehiko Sato
Effect of Chemical Species Generated by a Plasma Flow on Inactivation of

HeLa Cell Viability
Proceedings of the 8th International Conference on Flow Dynamics, pp. 690-691, (2011-11-11), Hotel Metropolitan Sendai (Invited).

9. Takehiko Sato
Observation of Bubble Formation and Collapse Process by Generating a Plasma
Proceedings of the 11th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration, pp. 66-67, (2011-11-10), Hotel Metropolitan Sendai.
10. Takehiko Sato
Effect of Neighboring Solid Wall on Generation of Residual Microbubbles after Collapse of Laser-Induced Bubble
Proceedings of the 11th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration, pp. 64-65, (2011-11-10), Hotel Metropolitan Sendai.
11. Naoya Kishimoto
Analysis of Plasma Flow at Gas-Liquid Interface for Biological Interaction
Proceedings of the 11th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration, pp. 68-69, (2011-11-10), Hotel Metropolitan Sendai.
12. 佐藤岳彦
プラズマ照射培地による細胞不活性化
第 35 回静電気学会全国大会, (2011-9-13), 東京理科大学.
13. Takehiko Sato
Inactivation process of HeLa cell by exposure to a plasma-treated medium
Proceedings of the 20th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC-20), Paper No. 287, (2011-7-25), Philadelphia, USA.
14. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流の気液中における熱流動解析
第 21 回環境工学総合シンポジウム 2011, (2011-7-1), 産業技術総合研究所臨海副都心センター.
15. 石田将之, 佐藤岳彦
大気放電による滅菌法の開発
第 21 回環境工学総合シンポジウム 2011, (2011-6-30), 産業技術総合研究所臨海副都心センター.

16. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流の化学種生成輸送機構と滅菌特性
学術振興会「プラズマ照射による医療用品の滅菌, エンドトキシンならびにプリオン不活化法と応用」に関する研究開発専門委員会, 平成 23 年度第 4 回合同委員会, (2011-6-27), 千里ライフサイエンスセンター. (招待講演)
17. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流の気中・液中における化学輸送機構
第 28 回国際フォトポリマーコンファレンス, (2011-6-23), 千葉大学. (招待講演)
18. 佐藤岳彦
水面上に形成するプラズマ流による気液中の化学輸送機構
第 23 回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム, (2011-5-18), 愛知県産業労働センター.
19. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流のバイオ・医療応用
バイオエレクトロクスシンポジウム 2011, (2011-3-10), 熊本大学.
20. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流の生成化学種による細胞への影響
日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, No. 10-74, pp. 495-496, (2011-1-9), 熊本大学.
21. Takehiko Sato
Plasma Sterilization by Generation and Transport of Reactive Chemical Species
Abstracts CD of the 20th Academic Symposium of MRS-Japan 2010, abstract no. A-1, (2010-12-20), 横浜市開港記念会館.
22. Takehiko Sato
Mechanism for Inactivation of Bacteria by Transport of Chemical Species in a Plasma Flow at Atmospheric Pressure
The 1st International Workshop on Bio Device and Medical Applications, (2010-11-27), Tokyo City University.
23. Takashi Miyahara
Water Quality Change Induced by Plasma Formation in Water
Proceedings of the 10th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI2010), pp. 88-89, (2010-11-2), Sendai International Center.
24. Takehiko Sato
Development of Next-Generation Plasma Autoclave
Proceedings of the 10th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI2010), pp. 90-91, (2010-11-2), Sendai International Center.
25. Takehiko Sato
Residual Microbubbles after Collapse of Discharge-Induced or Laser-Induced Bubbles in Water
Proceedings of the 10th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI2010), pp. 120-121, (2010-11-2), Sendai International Center.
26. Takehiko Sato
Observation of Streamer and Bubble Generation by Plasma
Proceedings of the 10th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI2010), pp. 150-151, (2010-11-2), Sendai International Center.
27. Tetsuji Shimizu Yutaka Iwafuchi, Gregor E. Morfill and Takehiko Sato
Analysis of Plasma Flow at Gas-Liquid Interface for Biological Interaction
Proceedings of the 10th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI2010), pp. 92-93, (2010-11-2), Sendai International Center.
28. 佐藤岳彦
大気圧水蒸気プラズマ流の化学種生成過程と滅菌機構
日本機械学会第 88 期流体工学部門講演会講演論文集, pp. 595-596, (2010-10-31), 山形大学.
29. Takehiko Sato
Effect of Culture Medium Exposed to a PlasmaFlow on Activity of HeLa Cells
Book of Abstracts of 3rd International Conference on Plasma Medicine (ICPM 3), p. 29, (2010-9-20), Greifswald, Germany.
30. 佐藤岳彦, 横山茉代, 城倉浩平
大気圧プラズマ流のHeLa細胞への影響
第34回静電気学会全国大会講演論文集, pp. 151-152, (2010-9-15), 鳥取大学.
31. 佐藤岳彦
大気圧プラズマ流による機能性化学種

の生成輸送機構と滅菌機構
日本機械学会2010年度年次大会講演資料
集, Vol.9, No.10-1, pp.149-150,
(2010-9-7), 名古屋工業大学.

32. 佐藤岳彦
水中の放電現象による水質への影響
日本機械学会第20回環境工学総合シン
ポジウム2010講演論文集, No.10-15,
pp.197-198, (2010-6-28), パシフィコ
横浜.
33. Takehiko Sato
Generation of a Plasma Flow in Pure
Steam and Its Sterilization
Efficacy
プラズマ生成・電離過程に関わる突発性
と構造形成研究会, (2010-3-15), 京都
大学.
34. Takehiko Sato
Mechanism of Radical Generation and
Sterilization by a Plasma Flow at
Atmospheric Pressure
Proceedings of the 9th Int. Symp. on
Advanced Fluid Information and
Transdisciplinary Fluid Integration
(AFI/TFI2009), pp.60-61, (2009-11-5),
Hotel Metropolitan Sendai.
35. Tetsuji Shimizu
Analysis of Reactive Species in a
Plasma Flow for Medical Treatment
Proceedings of the 9th Int. Symp. on
Advanced Fluid Information and
Transdisciplinary Fluid Integration
(AFI/TFI2009), pp.66-67, (2009-11-5),
Hotel Metropolitan Sendai.

[図書] (計3件)

1. 崎山幸紀, 佐藤岳彦 (分担), 沖野晃俊
(監修)
(株)シーエムシー出版
大気圧プラズマの技術とプロセス開発,
(2011), pp.41-46.
2. 佐藤岳彦 (分担), 沖幸夫, 上野和夫 (監
修)
日本溶射協会
溶射工学便覧, (2010), pp.8-36.
3. 佐藤岳彦 (分担), 日本学術振興会プラ
ズマ材料科学第153委員会編
(株)オーム社
大気圧プラズマ 基礎と応用, (2009),
pp.254-260, 371-376, 395-396.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO TAKEHIKO)
東北大学・流体科学研究所・教授
研究者番号: 10302225

(2) 研究分担者

小原 拓 (OHARA TAKU)
東北大学・流体科学研究所・教授
研究者番号: 40211833
城倉 浩平 (JOHKURA KOHEI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 30303473
宮原 高志 (MIYAHARA TAKASHI)
静岡大学・工学部・教授
研究者番号: 70239432

(3) 連携研究者

なし