

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23340176

研究課題名(和文) プラズマバイオプロセスのためのプラズマ液中反応場の構築と理解

研究課題名(英文) Understanding and construction of plasma induced reaction field in liquid for plasma bio processes

研究代表者

北野 勝久 (Kitano, Katsuhisa)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20379118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,800,000円、(間接経費) 2,340,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマによる生体への相互作用の反応素過程を探求するために、活性種と生体高分子の反応に関する研究を進めた。人体は濡れ環境であるので、溶液中に生成された活性種が重要であるため、液中に生成された活性種の測定をおこなった。アミノ酸、タンパク質、脂質に与える影響を分析すると共に、アルツハイマー病の原因となるアミロイド に関して不活化の研究を進めた。また細胞内酸化ストレスを評価するために、人工細胞として色素内包ミセルを合成し、低pH法による細胞内酸化ストレスの上昇を確認した。

研究成果の概要(英文)：For understanding the reaction processes of low temperature atmospheric pressure plasma to living organism, the research of the reaction between active species and biomacromolecule. As human body is wet condition and active species generated in liquid are important, measurements of active species in liquid were done. Effects of plasma to amino acid, protein, lipid were evaluated and amyloid beta protein, which cause Alzheimer disease. intracellular oxidation stresses were evaluated using dye included micelle. It was confirmed that increment of oxidative stress was increased with the reduced pH methods.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学

キーワード：プラズマ医療 大気圧低温プラズマ プラズマ誘起液中反応場 プラズマ処理水

1. 研究開始当初の背景

大気圧低温プラズマを生体へ照射することで、細菌の殺菌や医療行為を行う研究が注目されているが、その作用機序に関する研究はほとんど行われていなかった。申請者らは人体の消毒を目的として液中での殺菌に関する研究を進めていたが、低 pH 法と呼ばれる液中殺菌を効果的に行う技術を開発しており、液中のスーパーオキシドアニオンラジカルの酸解離平衡により生成されるヒドロペルオキシラジカルによる細胞内酸化外レスが重要であることを主張していた。人体は濡れ環境であるために、プラズマ医療を行う上では、液中に生成した活性種を評価し、それらが生体高分子と反応することで、細胞の生死、増殖活性などマクロな影響がであることを示唆する実験結果であり、このようなコンセプトに基づいて反応場を正しく理解することにより、殺菌のみならず医療応用への波及効果も高いと認識し、本申請内容の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大気圧低温プラズマによる液中反応場を用いたバイオプロセスを、反応素過程から探求する事である。プラズマバイオ研究は、バイオマテリアルなどの材料開発のみならず、人体へのプロセスであるプラズマ医療なども行われつつある。それらの多くは濡れ環境で行われ、従来のドライ環境下で固体に対して行われる減圧下のプラズマプロセスとは異なった視点で研究を進める必要がある。大気圧プラズマによるプロセス、特に液中でのプロセスに関しては、粒子種は運動量を持たないために、反応は物理的ではなく化学的となる。ミクロでは液中の生体高分子が化学作用を及ぼされた結果、種々のマクロな効果が現れる。本研究では、プラズマにより液中に誘起する活性種の生成過程を明らかにし、プラズマ誘起活性種と生体高分子との相互作用に関する研究を行う。プラズマバイオプロセスの反応素過程を物理学、化学、生化学的な面から統合的に研究を進める学際的な研究内容となる。

3. 研究の方法

大気圧低温プラズマによる液体へのプロセスをプラズマ誘起液中化学反応場ととらえ、液中に生成された化学種を各種方法により測定し作用因子となる化学種を同定した。また、溶液中に溶解させた生体高分子をプラズマ処理し、その変化を評価した。

安定したプラズマ溶液液中反応場を構築するために、雰囲気ガスを変更可能な気密容器からなる処理チャンバーを製作した。基本的にヘリウムプラズマを用いており、活性種の源となる酸素・窒素は雰囲気ガスもしくは元のプラズマ生成用ヘリウムガスに混合した。

溶液中に生成される活性種は、電子スピン

共鳴法(ESR)、KI 法、イオンクロマト法などにより測定を行った。特に ESR では、短寿命ラジカルを捕捉して長寿命なアダクトを生成して間接的に元のラジカルを計測するスピントラップ法を中心に用い、一部の活性種に関してはスピン酸化法により測定を行った。

溶液中における生体高分子との反応を評価するために、溶液中にアミノ酸、タンパク質、脂質を入れておき、処理後に各種方法で変化を評価した。

4. 研究成果

溶液中の活性種診断から、プラズマ照射条件により活性種供給のスペクトルが異なっていることが明瞭になった。例えばプラズマと溶液が接触している系では、一重項酸素、ヒドロキシラジカルが多く供給されるが非接触にすることで、このような短寿命な活性種はほとんど供給されなくなった。それに対して比較的長寿命としてしらているスーパーオキシドは、プラズマと液面が接触・非接触の場合でも量は異なるものの観測された。オゾンに関しては接触・非接触にかかわらず供給されていた。

プラズマ源を新しく開発し活性種の選択的供給も試みた。特にヘリウムプラズマのアフターグローと酸素を混合することで、スーパーオキシドのみが水溶液中へ選択的に供給されることが分かった。一般的にプラズマによって生成される化学種はプラズマ中の自由電子による電子化学反応により生成されるが、本方式はヘリウムプラズマのアフターグローに含まれるメタステーブルヘリウム原子による励起だと考えられる。

プラズマを直接照射する方法のみならず、プラズマを照射した水を用いて活性種を供給する方法の開発も進めた。プラズマ処理水と呼んでいるが、低 pH 法により滅菌が十分できるほど高い殺菌力が得られることが判明しており、その活性は時間と共に失活するが、半減時間は温度に依存しており、温度を下げることで寿命が伸長することがわかった。この半減時間の温度依存はアレニウスの式と一致しており、一次反応による分解反応だと推測される。また、この殺菌力の活性は時間とともに減少していくのにもなって、スピントラップ法によって計測したスーパーオキシドも同じ半減時間で減衰していることがわかった。

アミノ酸に対する修飾反応を評価するために、プラズマ照射したアミノ酸溶液を質量分析装置や生化学的な方法により診断した。アミノ酸の種類により反応性が異なり、SH 基が優先して酸化されていくことなどがわかった。

生体中で重要な役割を果たしているタンパク質に関してもプラズマ照射を行った、酵素活性を評価したところ時間と共に減少していくことがわかった。酵素活性が 70% 失活

していても、質量分析による評価では質量が0.6%程度しか増加しておらず直接的な因果関係はないということがわかったために、円偏光二色性スペクトルにより立体構造を評価したところ 40%程度の構造変化が生じていることがわかった。これらのことから、タンパク質のアミノ酸残基のごく一部が酸化修飾されることにより、タンパク質の立体配位が変化し、酵素活性が低下したものと考えられる。従来の類似する研究では FTIR によりタンパク質の結合状態を評価する研究がほとんどであり、タンパク質の物理的な構造を評価しているのみであったが、酵素活性の低下はより早い段階で進行している。プラズマ医療での作用機序として、この酵素活性の低下は重要なはずであり、今後の研究展開が必要である。

細胞膜などを構成している脂質に対しても同様の評価を行った。TBA 法により脂質酸化を評価したところ、不飽和脂肪酸が一重項酸素により優先して酸化が進むことがわかった。

アルツハイマー病の原因とされるアミロイド に対してもプラズマ処理を行ったところ、細胞毒性は変わらなかったが、プロテアーゼ耐性が減少していることがわかり、酵素反応により分解できるように変化することがわかった。

低 pH 法は酸解離平衡により電氣的に中性になったラジカルが細胞膜内へ浸透しやすくなることにより高い殺菌力を発揮していると考えているが、細胞内酸化ストレスを人工細胞を用いて評価を行った。プラズマ照射条件を固定したまま、pH 条件を変えることで細胞外のヒドロペルオキシラジカル濃度の制御を行った。色素含有ミセルを用いて細胞内へ浸透した活性種を評価したところ、細胞外に存在するヒドロペルオキシラジカルの量に比例して脱色反応の速度が増加することが明らかになった。また各種細菌に対しての殺菌実験を行ったところ、同様に溶液中のヒドロペルオキシラジカルに比例した殺菌力が得られた。それぞれの実験結果で、反応因子となる活性種の濃度と、反応速度が比例していることから、反応速度論的に考えて因果関係があると認められる。これらの結果から、溶液中のヒドロペルオキシラジカルが低 pH 法に寄与していることが実験的に示されたと考えられ、これまでのモデルが正しかった事が分かった。

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 6 件)

1. "Chemical Modification of Amino Acids by Atmospheric-Pressure Cold Plasma in Aqueous Solution", Eisuke Takaia, Tsuyoshi Kitamura, Junpei Kuwabara,

Satoshi Ikawa, Shunsuke Yoshizawa, Kentaro Shiraki, Hideya Kawasaki, Ryuichi Arakawa, and Katsuhisa Kitano, Journal of Physics D: Applied Physics (2014).(accepted)

2. "Degeneration of amyloid-s fibrils caused by exposure to low-temperature atmospheric-pressure plasma in aqueous solution", Eisuke Takai, Gai Ohashi, Tomonori Yoshida, Karin Margareta Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Katsuhisa Kitano and Kentaro Shiraki, Appl. Phys. Lett. 104, 023701 (2014).
3. "Molecular mechanism of plasma sterilization in solution with the reduced pH method :importance of permeation of H₂O₂ radicals into the cell membrane", Eisuke Takai, Satoshi Ikawa, Katsuhisa Kitano, Junpei Kuwabara, Kentaro Shiraki, Journal of Physics D: Applied Physics, 46, 295402, (2013).
4. "Free radicals induced in aqueous solution by non-contact atmospheric-pressure cold plasma", A. Tani, Y. Ono, S. Fukui, S. Ikawa, K. Kitano, Appl. Phys. Lett. 100, 254103 (2012).
5. "Extracellular matrix patterning for cell alignment by atmospheric pressure plasma jets", A. Ando, T. Asano, A. Sayed, R. Tero, K. Kitano, T. Urisu, S. Hamaguchi, Jpn. J. Appl. Phys. 51, 036201 (2012).
6. "Protein Inactivation by Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution", Eisuke Takai, Katsuhisa Kitano, Junpei Kuwabara, Kentaro Shiraki, Plasma Processes and Polymers 9, 77-82 (2012).

[学会発表](計 10 件)

1. "Cryopreservation of the plasma treated water for disinfection treatment in dental and surgical therapies based on the reduced pH method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Tomoko Ohshima, Hiromitsu Yamazaki, Emi Usui, Yasuko Momoi, International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS), Osaka University, Feb. 26-28, (2014). (invited)
2. "Strong bactericidal activity of the plasma treated water for medical application based on the reduced pH

- method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Tomoko Ohshima, 8th International Conference on Reactive Plasmas 31st Symposium on Plasma Processing, Fukuoka, Feb. 3-7, (2014).
3. "Toward medical applications of atmospheric pressure plasmas with room temperature ~ Physics, Chemistry, Biochemistry, Molecular biology, Medicine ~", K. Kitano, 2013 Japan-Taiwan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2013), (2013). (Plenary)
 4. "Freezing preservation of the plasma treated water for disinfection treatment in dental and surgical therapies based on the reduced pH method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Hiromitsu Yamazaki, Tomoko Ohshima, Kazuhiro Kaneko, Masaaki Ito, Takeshi Kuwata, Atsushi Yagishita, 21st International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 21), August 4-9, Cairns Convention Centre, Queensland, Australia, (2013).
 5. "Plasma treated water with the reduced pH method for effective disinfection in dental and surgical treatment", K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Ohshima, E. Usui, Y. Momoi, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A. Yagishita, The 12th Asia Pacific Physics Conference of AAPPS (APPC-12), Makuhari, Chiba, July 14-19, (2013).
 6. "Plasma photonics", K. Kitano, Fundamentals and Applications of Nanophotonics, Photovoltaics and Bio-photonics", Morocco Optics and Photonics Center, MAScIR, Rabat, Morocco, March 7-8, (2013).
 7. "Innovative disinfection for dental and surgical therapies combined with the plasma treated water and the reduced pH method", K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Ohshima, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A. Yagishita, 4th International Conference on Plasma Medicine, (Orleans, France), June 17-21, (2012).
 8. "The reduced pH method with indirect plasma for safe and effective disinfection in dentistry and surgery", K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Ohshima, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A.

Yagishita, The 39th IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), (Edinburgh, UK), July 8-12, (2012).

9. "Toward Medical Applications of Atmospheric Pressure Plasmas ~ Physics, Chemistry, Biochemistry, Molecular biology, Medicine~", K.Kitano, IUMRS-ICEM2012, Yokohama, (2012/9/27).
10. 'Innovative plasma disinfection of bacteria in water by the reduced pH method combined with free radicals supplied by non-contact atmospheric plasma', Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Tomoko Ohshima, Hiroyasu Yamaguchi, Hiromitsu Yamazaki, Ryuichi Arakawa, Tsuyoshi Kitamura, Naofumi Ohnishi, The 20th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC-20), Philadelphia, USA, July 24-29, (2011).

〔図書〕(計5件)

1. 北野勝久, 井川聡, 谷篤史, 大島朋子: 「プラズマジェットを用いた殺菌メカニズムと消毒応用」, 静電気学会誌, 37, 3, 112-116, (2013)
2. 北野勝久, 谷篤史, 井川聡, 大島朋子: 「プラズマプロセスの新展開 医療応用の可能性」, クリーンテクノロジー, 日本工業出版, 2月号, (2013)
3. 北野勝久: 「冷たいプラズマを用いた液中誘起化学反応のバイオ応用 ~重合から殺菌まで~」, 化学と教育, 60巻9号, p380, (2012)
4. 北野勝久, 井川聡, 谷篤史: 「プラズマ医療のための大気圧低温プラズマを用いた液体の効果的殺菌技術」, 大気圧プラズマの技術とプロセス開発, シーエムシー出版, 第V編 医療・バイオ応用, 第2章, (2011).
5. 北野勝久, 井川聡, 谷篤史: 「プラズマ消毒治療のための液中殺菌技術とその物理化学モデル」, 化学工学, 化学工学会, Vol.75, No.6, (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計6件)

名称: 「殺菌用液体の生成方法および装置」
 発明者: 北野勝久, 井川聡, 中島陽一
 権利者: 大阪大学、大阪府立産業技術総合研究所
 種類: 日本国出願
 番号: 特願 2013-109827
 出願年月日: 2013/5/24
 国内外の別: 国内

名称: 「殺菌処理方法、殺菌用製剤、殺菌用

結氷体およびその生成方法および装置、並びに殺菌用液体の生成方法」
発明者：北野勝久、井川聡
権利者：大阪大学、大阪府立産業技術総合研究所
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2013/002877
出願年月日：2013/4/26
国内外の別：国外

名称：「活性種照射装置、活性種照射方法及び活性種被照射物作製方法」
発明者：北野勝久、谷篤史
権利者：大阪大学
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2013/50465
出願年月日：2013/1/11
国内外の別：国外

名称：「殺菌処理方法および殺菌用結氷体の生成方法および装置、並びに殺菌用液体の生成方法」
発明者：北野勝久、井川聡
権利者：大阪大学、大阪府立産業技術総合研究所
種類：日本国出願
番号：特願 2012-103800
出願年月日：2012/4/27
国内外の別：国内

名称：「Method and apparatus for supplying liquid with ions, sterilization method and apparatus」
発明者：北野勝久
権利者：大阪大学
種類：米国出願
番号：US13/404,691
出願年月日：
国内外の別：国外

名称：「活性種照射装置、活性種照射方法及び活性種被照射物作製方法」
発明者：北野勝久、谷篤史
権利者：大阪大学
種類：日本国出願
番号：特願 2012-005358
出願年月日：2012/1/13
国内外の別：国内

取得状況（計 4 件）

名称：「Method and device for supplying ions to liquid, and method and device for sterilizing」
発明者：北野勝久
権利者：大阪大学
種類：中国登録
番号：ZL201080038961.1
取得年月日：2014/3/21
国内外の別：国外

名称：「液体にイオンを供給する方法および装置並びに殺菌方法および装置」
発明者：北野勝久
権利者：大阪大学
種類：日本国登録
番号：特許第 5,305,274 号
取得年月日：2013/7/5
国内外の別：国内

名称：「Method and apparatus for supplying liquid with ions, sterilization method and apparatus」
発明者：北野勝久
権利者：大阪大学
種類：米国登録
番号：US8,383,038
取得年月日：2013/2/26
国内外の別：国外

名称：「Plasma producing apparatus and method of plasma production」
発明者：北野勝久、浜口智志、青木裕紀
権利者：大阪大学
種類：米国登録
番号：US8232729
取得年月日：2012/7/31
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.plasmabio.com/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
北野 勝久 (Kitano Katsuhisa)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：20379118

(2) 研究分担者
(なし)

(3) 連携研究者
谷 篤史 (Tani Atsushi)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10335333

井川 聡 (Ikawa Satoshi)
大阪府立産業技術総合研究所・主任研究員
研究者番号：80393297

荒川 隆一 (Arakawa Ryuichi)
関西大学・工学部・教授
研究者番号：00127177

白木 健太郎 (Shiraki Kentaro)
筑波大学・数理物質科学研究科・准教授
研究者番号：90334797