

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24246034

研究課題名(和文) 生体界面プラズマ流の極限時空間制御による標的遺伝子群発現誘導機構

研究課題名(英文) Induction mechanism of targeted gene expression by controlling spatiotemporally plasma flow at biological interface

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高速高圧電源の開発、高時空間分解能を有する可視化システムの構築、高精度プラズマ特性同期計測システムの構築により、自己保存プラズマ流の生成制御および観察法の開発・製作に成功した。自己保存プラズマ流は、電圧印加後数百ナノ秒後に電極先端に微細な気泡群を構成し、突起状気泡の先端から秒速2 km程度でパルス状の放電電流と同期して断続的に進展を開始することを明らかにした。

遺伝子群発現誘導については、弱いプラズマ刺激に対し、プラズマ刺激の主要因となる過酸化水素と異なる代謝、免疫、再生などの機能を有する遺伝子群が発現することを網羅的遺伝子解析により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The development of the formation and controlling method of the self-preserving plasma flow were accomplished by development of the high-speed high-voltage power supply, visualization system which had a very high spatiotemporal resolution and high accurate synchronous measurement system of the plasma characteristics. It has been shown that the self-preserving plasma flow makes a microscopic bubble cluster at the tip of the electrode several hundred nanoseconds after the voltage was applied, then starts propagation intermittently with a speed of about 2 kilometers per second from the tip of the protrusion of the bubbles synchronously with the pulsed discharge current.

As for the induction of gene cluster expression, it has been shown by the comprehensive gene analysis that the gene cluster with functions of metabolism, immunity, regeneration, etc. expressed by weak plasma stimuli, which was different from hydrogen peroxide which was a main cause of the plasma stimuli.

研究分野：流体工学

キーワード：バイオ流体力学 自己保存プラズマ流 極微小時空間解析 細胞応答 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

プラズマは高温から低温まで幅広い生成法があるが、近年体温程度のプラズマの流れを利用した医療応用が進められている。例えば、新型インフルエンザや抗生物質耐性菌、食中毒などの感染リスク低減に向けたプラズマ滅菌・消毒技術は、国民の健康を脅かす重大な社会問題を解決する手段として大いに期待されている。滅菌・消毒から発展したプラズマ治療の研究は、臨床試験や動物実験に至る報告もあるが、プラズマ流が生体を治療する機構はほとんど未解明であり、「プラズマ医療」の発展にはプラズマ流と生体の相互作用に関する学理の構築が不可欠な状況である。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者らが発見した自己保存プラズマ流の生成を極微小時間空間で制御し、細胞にイオン・化学的活性種を極短時間で輸送することで化学的刺激を細胞に与え、標的遺伝子群の発現を誘導すると共にこの機構を解明することを目的とする。これにより、細胞活性化治療やアポトーシス誘導治療などの革新的なプラズマ治療法の開発への展望が開け、次世代の医療基盤技術として黎明期にある「プラズマ医療」の学術的基盤構築ならびにわが国の国際科学・産業競争力の向上に大きく寄与できると確信している。

### 3. 研究の方法

本研究では、生体界面に自己保存プラズマ流を生成し、極微小時間空間において制御することで、標的とする遺伝子群発現を誘導することを目的とする。研究は、(1)自己保存プラズマ流の生成制御、(2)イオン・化学的活性種の刺激の生成輸送解析、(3)遺伝子群の発現解析、(4)細胞膜輸送の解析と網羅的遺伝子解析、(5)標的遺伝子群発現誘導機構を行う。

### 4. 研究成果

本研究は、自己保存プラズマ流の極微小時間空間制御により、細胞の標的遺伝子群の発現を誘導する手法の開発を目的とした。

自己保存プラズマ流については、100 ns で電圧を 20 kV 以上印加できる電源の開発、発生したプラズマ現象のナノ秒時間分解能かつ 100  $\mu\text{m}$  程度の視野角の可視化システムの構築、1 ナノ秒以下の同期計測された放電電流や発光強度と可視化写真との時間差の精度の達成により、自己保存プラズマ流を担う水中ストリーマ放電の開始・進展機構を詳細に明らかにした。その過程は、電極に電圧を印加すると、電極先端に微細気泡が生成され気泡群を構成し、数百ナノ秒後には気泡群は数十  $\mu\text{m}$  スケールまで成長し、部分的に突起形状を形成する。この気泡群内部には電荷が集積され、10 MV/cm 程度以上の電界強度に達すると突

起状気泡の先端から秒速 2 km 程度の 1 次ストリーマの進展が開始する。また、印加電圧が大きい場合は、電界強度が 30 MV/cm 程度まで上昇してから秒速 20 km 程度の 2 次ストリーマが進展する。このように、1 次ストリーマ進展には電界の閾値が存在し、またその電界強度の大きさに 1 次と 2 次の異なるストリーマが発生することを明らかにした。また、1 次ストリーマは、一定以上の電界が印加されていると進展が断続的に進展し、2 次ストリーマと似た形状のフィラメント形状を形成することを明らかにした。一方、2 次ストリーマ進展時に連続成分を有する放電電流が流れることを明らかにした。以上の成果により、超純水中に直径 10  $\mu\text{m}$  以下のプラズマ径で、1  $\mu\text{s}$  以下の極短時間で消滅する微細水中プラズマ流の生成法を開発に成功した。また、水中プラズマ流発生に伴う気泡生成消滅と水素生成に強い相関があることや酸化還元電位が変化することを明らかにし、自己保存プラズマ流の化学輸送機構の解明に大きく貢献した。

遺伝子群発現誘導については、短時間(40 s)のプラズマ照射により、プラズマ照射が過酸化水素と異なる遺伝子応答が発現することを網羅的遺伝子解析により明らかにした。1.5 倍以上の遺伝子発現強度の上昇を示した遺伝子プロンプが 457 と同等の刺激の過酸化水素暴露における 224 プロンプよりも大きく増加することを明らかにし、プラズマ特有の遺伝子発現効果があることを示した。網羅的遺伝子解析の再現性を検証するために RT-PCR により抗酸化酵素の CAT と SOD1 について遺伝子発現を定量分析し再現性を確認した。これにより、細胞のアポトーシス発現においては別経路の可能性が示された。遺伝子オントロジーによる解析から、代謝、免疫、再生などの機能を有する遺伝子群が発現し、プラズマ特有の細胞応答が発現することを明らかにした。これらの成果は、細胞制御法の開発に向けた重要な知見である。

### 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. 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎, 佐藤岳彦  
水中正ストリーマの進展開始電圧に及ぼす放電パラメータの影響  
静電気学会誌, Vol.39, No.1, (2015), pp.21-26, 査読有。  
URL:  
<http://www.iesj.org/html/journal/articles/papers/39/39-1-21.pdf>
2. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya,

- Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Initiation process and propagation mechanism of positive streamer discharge in water  
Journal of Applied Physics, Vol.116, Issue 21, (2014), pp. 213301/1-213301/12, 査読有.  
DOI: 10.1063/1.4902862
3. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya, Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Highly Temporal Visualization of Generation Process of Underwater Secondary Streamer from Developed Primary Streamer  
IEEE Transactions on Plasma Science, Vol.42, Issue 10: Part 1, (2014), pp. 2398-2399, 査読有.  
DOI: 10.1109/TPS.2014.2325937
  4. Mayo Yokoyama, Kohei Johkura and Takehiko Sato  
Gene expression responses of HeLa cells to chemical species generated by an atmospheric plasma flow  
Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.450, Issue 4, (2014), pp. 1266-1271, 査読有.  
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.06.116
  5. Takashi Miyahara, Masanobu Oizumi, Tatsuyuki Nakatani and Takehiko Sato  
Effect of voltage polarity on oxidation-reduction potential by plasma in water  
AIP Advances, Vol.4, Issue 4, (2014), pp. 047115/1-047115/10, 査読有.  
DOI: 10.1063/1.4871475
  6. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya, Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Fast propagation of an underwater secondary streamer by the appearance of a continuous component in the discharge current  
Europhysics Letters, Vol.113, No.1, (2014), pp.15003/1-15003/5, 査読有.  
DOI: 10.1209/0295-5075/105/15003
  7. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya and Takehiko Sato  
Spatiotemporal analysis of propagation mechanism of positive primary streamer in water  
Journal of Applied Physics, Vol.113, Issue 11, (2013), pp.113304/1-113304/7, 査読有.  
DOI: 10.1063/1.4795765
  8. Takehiko Sato, Marc Tinguely, Masanobu Oizumi and Mohamed Farhat  
Evidence for hydrogen generation in laser- or spark-induced cavitation bubbles  
Applied Physics Letters, Vol.102, Issue 7, (2013), pp.074105/1-074105/4, 査読有.  
DOI: 10.1063/1.4793193
- [学会発表](計42件)
1. 佐藤佑介, 佐藤岳彦, 吉野大輔  
培養液中プラズマ照射に対する細胞応答  
日本機械学会東北支部第50期総会・講演会講演論文集, pp.101-102, (2015-3-13), 東北大学大学院工学研究科.
  2. 佐藤岳彦, 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎  
水中ストリーマ放電の開始・進展機構  
静電気学会「放電プラズマによる水処理研究委員会」キックオフ講演会, (2015-3-6), 東京大学.(招待講演)
  3. 佐藤岳彦, 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎  
大気圧水中放電の形成機構とバイオ応用  
東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会 仙台“プラズマフォーラム”, (2015-2-20), 東北大学大学院工学研究科.(招待講演)
  4. Takehiko Sato  
Plasma Sterilization Methods at Atmospheric Pressure  
1st Taiwan-Japan Workshop on Plasma Life Science and Technology, (2014-12-20), National Chiao Tung University (国立交通大学), Hsinchu, Taiwan.(招待講演)
  5. 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎, 佐藤岳彦  
水中二次ストリーマのナノ秒時間分解画像と同期放電電流  
第24回日本MRS年次大会, (2014-12-11), 横浜情報文化センター.
  6. 岡崎和貴, 佐藤岳彦, 吉野大輔  
細胞照射用低温プラズマ流生成法の開発  
第24回環境工学総合シンポジウム2014講演論文集, pp.99-100, (2014-11-18), つくば国際会議場.
  7. 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎, 佐藤岳彦  
ストリークカメラを用いた水中ストリーマの高時間分解解析  
日本機械学会第92期流体工学部門講演会, (2014-10-26), 富山大学.
  8. Yusuke Sato, Tomoki Nakajima, Takehiko Sato and Daisuke Yoshino  
Plasma Characteristics of Discharge in a Culture Medium  
Proceedings of the 11th International Conference on Flow Dynamics

- (ICFD2014), pp.536-537, (2014-10-9), 仙台国際センター.
9. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya, Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Propagation Processes of Primary and Secondary Streamers by Pulsed Discharge in Water  
Proceedings of the 14th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2014), pp.126-127, (2014-10-9), 仙台国際センター.
  10. Tetsuji Shimizu, Masashi Hara, Gregor E. Morfill, Daisuke Yoshino and Takehiko Sato  
Generation and Transport of Chemical Species in Low-Temperature Atmospheric Plasma for Sanitization Device  
Proceedings of the 14th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2014), pp.96-97, (2014-10-9), 仙台国際センター.
  11. Kazuki Okazaki, Takehiko Sato and Daisuke Yoshino  
Effects of a Cold Plasma Flow on HeLa Cells Viability  
Proceedings of the 11th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2014), pp.454-455, (2014-10-8), 仙台国際センター.
  12. 清水鉄司, 岸本直也, 吉野大輔, 原将志, Gregor E. Morfill, 佐藤岳彦  
空気 - 水プラズマによるガス流駆動への水の導電率の影響  
日本機械学会 2014 年度年次大会, (2014-9-10), 東京電機大学.
  13. 佐藤佑介, 佐藤岳彦, 吉野大輔  
細胞培養液中放電のプラズマ特性  
静電気学会講演論文集 2014, pp.85-88, (2014-9-8), 広島国際大学.
  14. 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 金子俊郎, 佐藤岳彦  
水中正ストリーマの進展開始電圧に及ぼす放電パラメータの影響  
静電気学会講演論文集 2014, pp.45-50, (2014-9-8), 広島国際大学.
  15. 佐藤佑介, 佐藤岳彦, 吉野大輔  
細胞培養液中におけるプラズマ生成法の開発と HeLa 細胞への照射  
日本機械学会東北支部第 50 期秋季講演会講演論文集, pp.51-52, (2014-9-5), 東北学院大学工学部.
  16. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya, Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Role of continuous discharge current for secondary streamer in water  
International Symposium on Electrohydrodynamics (ISEHD2014) - Book of Abstracts, p.71, (2014-6-24), ザ・ビーチタワー沖縄.
  17. Tetsuji Shimizu, Naoya Kishimoto, Masashi Hara, Daisuke Yoshino, Gregor E. Morfill and Takehiko Sato  
Gas Flow Formation by Plasma Discharge on Water Surface  
International Symposium on Electrohydrodynamics (ISEHD2014) - Book of Abstracts, p.27, (2014-6-23), ザ・ビーチタワー沖縄.
  18. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマによる病原性微生物殺滅法と医療応用  
大気圧プラズマによる環境対策に関する特別講演会 - 健康社会・環境改善のための最先端プラズマ技術 -, (2014-6-6), 日本機械学会(東京).(招待講演)
  19. Daiki Masui, Daisuke Yoshino, Seiji Kanazawa, Toshiro Kaneko and Takehiko Sato  
Generation of micro plasma in water for biomedical applications  
5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) Abstract Book, p.30, (2014-5-22), 奈良県新公会堂.
  20. 佐藤岳彦  
プラズマ利用による殺菌反応  
平成 26 年電気学会全国大会シンポジウム S1「大気圧プラズマの反応シミュレーションの進歩」, (2014-3-19), 愛媛大学.(招待講演)
  21. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマ流の生成機構 ~ 水中ストリーマの進展ならびに針 - 水面プラズマによるガス流誘起 ~  
2014 年度第一回静電気学会研究会資料集, pp.65-79, (2014-3-6), 東京工業大学.(招待講演)
  22. Takehiko Sato, Tetsuji Shimizu, Naoya Kishimoto and Gregor E. Morfill  
Driving mechanism of plasma-induced gas flow between needle electrode and water surface  
8th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology (APSPT-8) Program, p.117, (2013-12-22), National Chiao Tung University (国立交通大学), Hsinchu, Taiwan.
  23. Takehiko Sato, Marc Tinguely, Masanobu Oizumi and Mohamed Farhat  
On Hydrogen Generation by the Collapse of Cavitation Bubbles  
Proceedings of the 13th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2013), pp.146-147, (2013-11-26), 仙台国際センター.
  24. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa,

- Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya and Takehiko Sato  
Visualized Propagation Process of Positive Primary Streamers in Water  
Proceedings of the 13th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2013), pp.110-111, (2013-11-26), 仙台国際センター.
25. Tetsuji Shimizu, Gregor E. Morfill, Naoya Kishimoto, Masashi Hara, Daisuke Yoshino and Takehiko Sato  
Flow Formation in Atmospheric Plasma Discharge between Pin Electrode and Water Surface  
Proceedings of the 13th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2013), pp.70-71, (2013-11-26), 仙台国際センター.
26. Masashi Hara, Daisuke Yoshino, Tetsuji Shimizu and Takehiko Sato  
Characteristics of Chemical Species Generated by a Gas-Liquid Plasma Flow Using a Wire Electrode  
Proceedings of the 10th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2013), pp.642-643, (2013-11-25), 仙台国際センター.
27. Takehiko Sato  
Plasma sterilization at low temperature and the transport mechanism of chemical species  
Seminar in National University of Singapore, (2013-11-11), National University of Singapore, Singapore. (招待講演)
28. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマによる病原性微生物殺滅法と医療応用  
静電気学会 - エアロゾル学会合同シンポジウム 大気汚染物質の除去に関する特別講演会, (2013-10-21), 大阪府立大学. (招待講演)
29. 藤田英理, 金澤誠司, 金子俊郎, 大谷清伸, 小宮敦樹, 佐藤岳彦  
水中1次ストリーマの高時空間分解能計測  
高速イメージングとフォトニクスに関する総合シンポジウム 2013, (2013-10-17), ホテルサンルート室蘭.
30. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya and Takehiko Sato  
Role of pulsed repetitive current for positive primary streamers in water  
21st International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC21), (2013-8-9), Cairns Convention Centre, Cairns, Australia.
31. Takehiko Sato, Mayo Yokoyama and Kohei Johkura  
Gene ontology analysis for HeLa cells exposed to a plasma- or H2O2-treated culture medium  
21st International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC21), (2013-8-6), Cairns Convention Centre, Cairns, Australia.
32. 藤田英理, 佐藤岳彦, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹  
水中放電におけるストリーマチャンネル生成過程の可視化  
第41回可視化情報シンポジウム講演論文集, pp.223-224, (2013-7-17), 工学院大学.
33. 原将志, 吉野大輔, 佐藤岳彦  
ワイヤ電極を用いた気液プラズマ流の化学種生成特性  
第23回環境工学総合シンポジウム 2013講演論文集, pp.252-253, (2013-7-12), 東京海洋大学.
34. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマ流への暴露による細胞応答  
第1回 日本機械学会部門協議会「高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会(P-SCC12)」特別講演会, (2013-7-5), 東京大学生産技術研究所. (招待講演)
35. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマによる病原性微生物殺滅法と医療応用  
大気圧プラズマによる環境対策に関する特別講演会 - 健康社会・環境改善のための最先端プラズマ技術 -, (2013-5-8), 日本機械学会(東京). (招待講演)
36. 藤田英理, 佐藤岳彦, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹  
水中プラズマのストリーマ進展過程  
電気学会 プラズマ・パルスパワー合同研究会講演論文集(電気学会研究会資料)pp.21-24, (2012-12-11), 東京大学.
37. Takehiko Sato, Masayuki Ishida, Kazuhiro Nakamura, Tomoki Nakajima and Daisuke Yoshino  
Development of plasma sterilization device using atmospheric air  
Book of Abstracts - II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2012), p.68, (2012-11-21), University of Lisbon, Lisbon, Portugal.
38. 佐藤岳彦  
大気圧プラズマ流の照射による HeLa 細胞の生体応答  
第28回九州・山口プラズマ研究会, (2012.11.11), 由布院倶楽部(大分県由布市). (招待講演)
39. Mayo Yokoyama, Takehiko Sato and Kohei Johkura  
Comprehensive Gene Expression

Analysis of HeLa Cells in Response to Plasma Stimuli  
Proceedings of the 9th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2012), pp.748-749, (2012.9.20), ホテルメトロポリタン仙台.(招待講演)

40. Takehiko Sato, Mayo Yokoyama and Kohei Johkura

Gene Expression Analysis Using a Microarray for Hela Cells Exposed to a Plasma Flow  
9th International Bioelectrics Symposium (BIOELECTRICS 2012), (2012-9-7), KKR ホテル熊本.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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

城倉 浩平 (JOHKURA, Kohei)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号：30303473

小原 拓 (OHARA, Taku)  
東北大学・流体科学研究所・教授  
研究者番号：40211833

金澤 誠司 (KANAZAWA, Seiji)  
大分大学・工学部・教授  
研究者番号：70224574

宮原 高志 (MIYAHARA, Takashi)  
静岡大学・工学研究科・教授  
研究者番号：70239432

(3)連携研究者

小宮 敦樹 (KOMIYA, Atsuki)  
東北大学・流体科学研究所・准教授  
研究者番号：60371142

大谷 清伸 (OHTANI, Kiyonobu)  
東北大学・流体科学研究所・助教  
研究者番号：80536748

吉野 大輔 (YOSHINO, Daisuke)  
東北大学・流体科学研究所・助教  
研究者番号：80624816