

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24340143

研究課題名(和文) コンビナトリアル細胞活性解析を用いた細胞超活性プラズマの創成

研究課題名(英文) Study on novel plasma activation of cells using combinatorial analysis of cell activity

研究代表者

古閑 一憲 (Koga, Kazunori)

九州大学・システム情報科学研究科(研究院・准教授)

研究者番号：90315127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ生体応用の新世代研究対象である生体細胞を対象として、プラズマ照射による細胞増殖加速のメカニズムを解明して、複数回のプラズマ照射による細胞増殖加速を実現する「細胞超活性プラズマプロセス」を創成することを目的とし以下の成果を得た。(1) コンビナトリアル細胞活性解析法を開発しプラズマバイオ応用研究で適用可能であることをしめした。(2) プラズマ-細胞相互作用による細胞増殖活性メカニズムについて、プラズマ照射による酸化ストレス応答が重要なプロセスであることを示した。(3) 細胞超活性プラズマの創成につながる、多世代に亘るプラズマ照射において照射効果の蓄積・リセットが起こることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To realize novel processing plasmas for enhancing cell activity, we have developed a combinatorial analysis of cell activity using a scalable dielectric barrier discharge device. Using the device, we have obtain following results. (1) We have confirmed the developed analysis can be employed to study plasma processes for bio applications. (2) Oxidative stress response due to plasma irradiation is one of the most important factor for the cell activation. (3) We have evaluated multi-generation effects of plasma growth enhancement to plants. The result suggests that the effects can accumulate or reset through generation, leading to plasma process for enhancing cell activity.

研究分野：プラズマ理工学

キーワード：大気圧非平衡プラズマ バイオテクノロジー 細胞活性 コンビナトリアル解析 プラズマ農業 マイクロアレイ解析

1. 研究開始当初の背景

プラズマの生体応用は、現在その応用範囲を広げつつ世界的に急速なスピードで研究されている。従来のプラズマの生体応用は、医療器具への薄膜堆積にはじまり、プラズマを用いた菌の破壊、そしてプラズマ照射による治療などが行われている。最近では、プラズマ照射による治療についてのモデリングなども行われ、理解が進んでいる。我々は、大気圧プラズマを酵母に照射した後、培養し38時間後の酵母数を比較したところ、照射しない酵母に対して、プラズマ照射を行った酵母の数は2倍程度多くなるという結果を得た。申請者は、プラズマの細胞増殖加速機構を明らかにすれば、プラズマを用いた細胞活性制御というプラズマ生体応用の新しい潮流を作り出すことができると考えた。また、このプラズマによる細胞活性制御を細胞の増殖加速に展開して、かつ、プラズマを複数回照射することで指数関数的な細胞増殖加速を実現する『細胞超活性プラズマプロセス』を創成できると着想し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、プラズマ生体応用の新世代研究対象である生体細胞を対象として、我々が見出した、プラズマ照射による細胞増殖加速のメカニズムを解明して、複数回のプラズマ照射による指数関数的な細胞増殖加速を実現する「細胞超活性プラズマプロセス」を創成することを目的とする。本研究で申請者が新しく創成する『細胞超活性プラズマ』とは、複数回のプラズマ照射により、細胞活性化を重畳して細胞増殖を加速度的に早めることである。これを実現するために、(1) コンビナトリアル細胞活性解析法の開発、(2) プラズマ-細胞相互作用による細胞増殖活性メカニズムの解明、(3) 細胞超活性プラズマの創成について研究遂行する。

3. 研究の方法

実験では、図1に示すスケラブル誘電体バリア放電(DBD)装置を用いた。DBD放電電

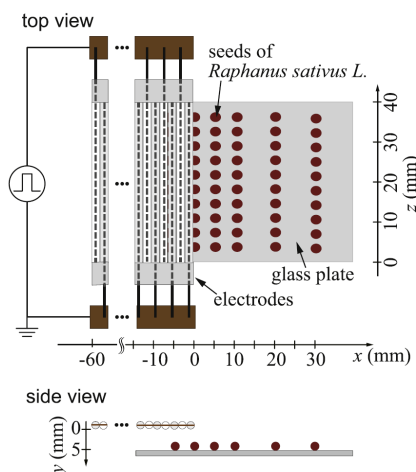


図1. スケラブル DBD 装置。

極は、外径2mmのセラミック管で覆われた直径1mm、長さ60mmのステンレス棒20本を交互に0.2mm間隔で水平に配置した構造を持つ。誘電体バリア放電は、電極間に10kHzの交流高電圧を印加して、空気中で生成した。放電電圧と電流はそれぞれ9.2kVと0.2Aであり、リサージュ波形から求めた放電電力密度は1.49 W/cm<sup>2</sup>であった。

プラズマで発生した活性酸素窒素種(RONS)の濃度はガス検知管を用いて計測した。オゾン濃度は、加えて重水素ランプを用いた吸収分光計測を用いて計測した。

コンビナトリアルプラズマ照射では、図1のように乾燥種子を電極棒に平行に並べたものを電極下および電極領域外に配置した。

4. 研究成果

研究項目(1) コンビナトリアル細胞活性解析法の開発

カイワレの種子を対象に空气中放電下のコンビナトリアル解析を行った。種子にプラズマを照射後、暗室下にて栽培し、カイワレの成長促進効果の時間推移を評価したところ、種子への1回の空気プラズマの照射により、成長促進効果が1週間程度維持することを明らかにした(図2)。プラズマ照射による1週間程度の成長促進効果について、オゾンなどの比較的長寿命活性種濃度の空間分布を計測し、成長促進効果と長寿命活性種との直接的な相関が弱いことを明らかにした(図3)。これらの結果は、開発したコンビナトリアル解析法を用いることで初めて精度よく得られた結果であり、コンビナトリアル解析法が、プラズマの生体応用に適用可能であることを示している。

研究項目(2) プラズマ-細胞相互作用による細胞増殖活性メカニズムの解明

カイワレの種子へのプラズマ照射時に、水を加えた場合の成長促進効果を評価した。水量を一定にして、水面から種子までの深さを変えてプラズマを照射したところ、種子が水

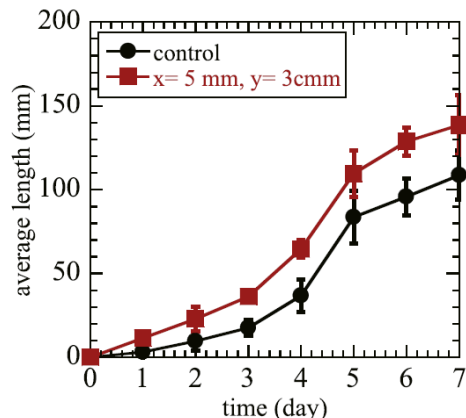


図2. カイワレの成長曲線。種子への3分間のプラズマ照射にも関わらず、その後の成長促進効果が1週間程度続くことを明らかにした。

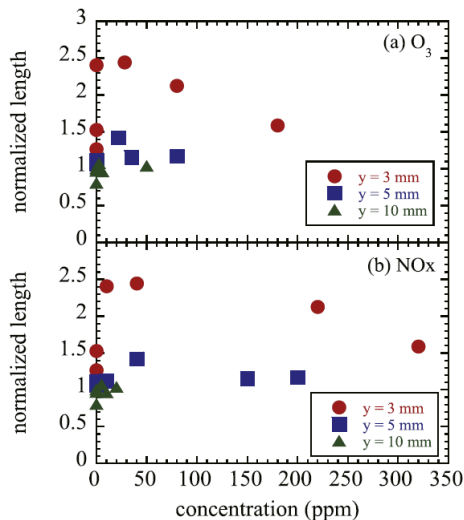


図3 . RONS 濃度を横軸とした、カイワレの規格化長さ。カイワレの長さをプラズマ未照射条件のカイワレ長さで規格化している。

面に近いほど、種子に直接プラズマを照射した場合に近い成長促進効果がえられた。この水深依存性と図3の結果から、プラズマで発生した短寿命の活性種による直接的な成長促進効果は見られないこと、また、プラズマ照射により、植物内ホルモンの分泌が変化して成長促進につながったことを示唆する結果を得た。

次に、ガス置換により、単一のガスを用いたプラズマ照射により、窒素雰囲気でも成長促進するが、酸素雰囲気や空気雰囲気が最も成長促進すること、アルゴンでは成長促進効果が見られない事を明らかにした。この結果は酸素系活性種が成長促進に重要な働きをしている事を示唆する結果である。

プラズマ照射効果の分子生物学的検討を行うため、プラズマ照射したシロイヌナズナの種を栽培し、発芽した状態のサンプルをマイクロアレイ解析した。この結果よりプラズマによる短時間の酸化ストレスに対する応答により細胞増殖を活性化している事を示す結果を得た。

またヨウ素デンブリン反応を利用してプラズマの酸化作用を定量化することに成功した。この結果を活用して、更なるメカニズムの解明を進めることができる。

### 研究項目(3)細胞超活性プラズマの創成

多世代に亘るシロイヌナズナへのプラズマ照射実験を行った。世代間でのプラズマ照射効果の蓄積(加速)やリセットが起こる事を明らかにした。第1世代の種子にプラズマを照射した後、この種子を種の収穫まで栽培する。収穫した第2世代の種子に再びプラズマを照射して、栽培、種を収穫。再び収穫した第3世代の種子にプラズマを照射して栽培することを繰り返した。プラズマ照射したシロイヌナズナの成長曲線を照射なしの場合と共に図4に示す。1-3代の全世代の種子に

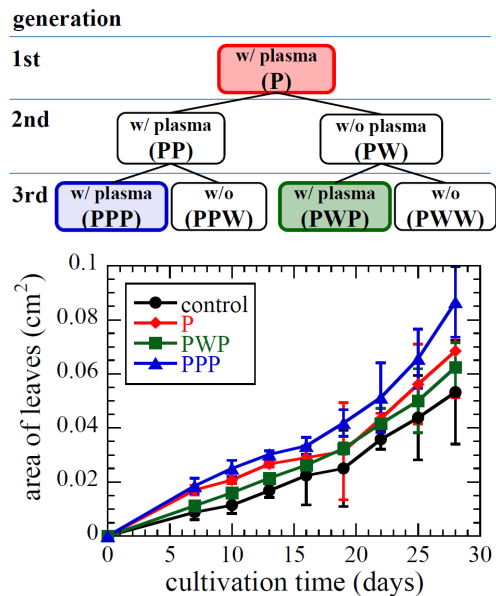


図4 .シロイヌナズナの種子への多世代に亘るプラズマ照射による成長促進効果の蓄積とリセット。1-3代の全世代の種子にプラズマ照射すると(図中の PPP)成長促進度が最も高い(蓄積)。1代目と3代目に照射し2代目に照射しない場合(PWP)、1代目に照射した場合(P)と同程度の成長促進を示す。

プラズマ照射した場合(図中の PPP)成長促進度が最も高く、プラズマ照射効果が蓄積しプラズマ照射による成長促進の加速が起きていることを示唆する。また1代目と3代目に照射し2代目に照射しない場合(PWP)、1代目に照射した場合(P)と同程度の成長促進を示す。この結果は細胞超活性の特性を示しており、超活性プラズマの創成に係わる重要な成果である。

### 予想以上の成果

プラズマ照射により、葉内グルコース量の増加を確認した。結果を図5に示す。この結果は、プラズマ照射による作物の糖分増加

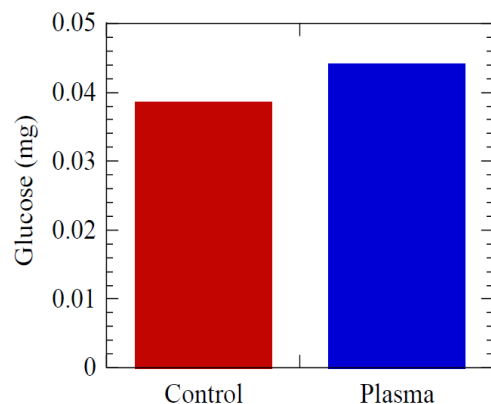


図5 . 葉中グルコース(糖の一種)量の比較。プラズマ照射種子の場合、葉中グルコース量が増加。

の可能性を示唆しており、食料問題やバイオ燃料などのエネルギー問題に貢献出来る可能性を示している。

また、シロイヌナズナの種子へプラズマ照射したのち、植物インキュベータで栽培後に種を収穫したところ、収穫時期で 10%短縮、収穫量が 50%増加することを明らかにした(図6)。この結果は、プラズマ照射による促成栽培と収穫量増加の可能とする細胞超活性プラズマとして食料問題やバイオ燃料などのエネルギー問題に貢献出来る可能性を示している。この成果については、米国電気学会、米国真空学会、ドイツ物理学会、応用物理学会のニュースとして取り上げられている。



図6 .プラズマ照射した種子を栽培して種子を収穫した場合(写真右) プラズマ照射しない場合(写真左)に比べて収穫量が約50%増加した。

## 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22件)

(1) S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Rapid Growth of Radish Sprouts Using Low Pressure O<sub>2</sub> Radio Frequency Plasma Irradiation, Materials Research Society Symposium Proceedings 2012 MRS Spring Meeting, 1469, 2012, ww02-08-1-6

(2) S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Effects of Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma Irradiation on Yeast Growth, Materials Research Society Symposium Proceedings 2012 MRS Spring Meeting, 1469, 2012, ww06-08-1 - 6

(3) Y. Akiyoshi, N. Hayashi, S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, Influence of Atmospheric Pressure Torch Plasma Irradiation on Plant Growth, Materials Research Society Symposium Proceedings 2012 MRS Spring Meeting, 1469, 2012, ww06-10-1 - 6

(4) A. Tanaka, M. Hirata, M. Shiratani, K. Koga, Y. Kiyohara, Subacute pulmonary

toxicity of copper indium gallium diselenide following intratracheal instillations into the lungs of rats, Journal of Occupational Health, 54, 2012, 187 - 195

(5) S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Growth Control of Dry Yeast Using Scalable Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma Irradiation, Japanese Journal of Applied Physics, 51, 2012, 11PJ02-1 - 5

(6) S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N. Hayashi, M. Shiratani, Plasma induced long-term growth enhancement of Raphanus sativus L. using combinatorial atmospheric air dielectric barrier discharge plasmas, Curr. Appl. Phys., 14, 2014, in press

(7) T. Sarinont, K. Koga, S. Kitazaki, G. Uchida, N. Hayashi, M. Shiratani, Effects of Atmospheric Air Plasma Irradiation on pH of Water, JPS Conf. Proc., 1, in press

(8) T. Kawasaki, K. Kawano, H. Mizoguchi, Y. Yano, K. Yamashita, M. Sakai, G. Uchida, K. Koga, M. Shiratani, Visualization of oxidizing substances generated by atmospheric pressure non-thermal plasma jet with water, Proceedings of 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing, 2014, 4P-PM-S09-P25

(9) T. Amano, T. Sarinont, S. Kitazaki, N. Hayashi, K. Koga, M. Shiratani, Long term growth of radish sprouts after atmospheric pressure DBD plasma irradiation to seeds, Proceedings of 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing, , 2014, 5P-PM-S12-P33

(10) T. Sarinont, K. Koga, S. Kitazaki, M. Shiratani, N. Hayashi, Effects of growth enhancement by plasma irradiation to seeds in water, Proceedings of 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing, , 2014, 5P-PM-S12-P32

(11) K. Koga, T. Sarinont, S. Kitazaki, N. Hayashi, M. Shiratani, Multi-generation evaluation of plasma growth enhancement to arabidopsis thaliana, Proceedings of 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing, , 2014, 6C-PM-A4

(12) T. Sarinont, T. Amano, S. Kitazaki, K. Koga, G. Uchida, M. Shiratani and N. Hayashi, Growth enhancement effects of radish sprouts: atmospheric pressure plasma irradiation vs. heat shock, J. Phys. : Conf. Series, 518, 2014, 12017

(13) S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N.

Hayashi, M. Shiratani, Plasma induced long-term growth enhancement of *Raphanus sativus* L. using combinatorial atmospheric air dielectric barrier discharge plasmas, *Curr. Appl. Phys.*, 14, 2014, S149-S153

(14) M. Shiratani, T. Sarinont, T. Amano, N. Hayashi, K. Koga, Plant Growth Response to Atmospheric Air Plasma Treatments of Seeds of 5 Plant Species, *MRS Advances*, 2016, 1-5

(15) K. Koga, T. Sarinont, T. Amano, H. Seo, N. Itagaki, N. Hayashi, M. Shiratani, Simple method of improving harvest by nonthermal air plasma irradiation of seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.), *Appl. Phys. Express*, 9, 2016, 16201

(16) P. Attri, T. Sarinont, M. Kim, T. Amano, K. Koga, A. E. Cho, E. Choi, M. Shiratani, Influence of ionic liquid and ionic salt on protein against the reactive species generated using dielectric barrier discharge plasma, *Scientific Reports*, 5, 2015, 17781

(17) G. Uchida, A. Nakajima, K. Takenaka, K. Koga, M. Shiratani, Y. Setsuhara, Gas flow rate dependence of the discharge characteristics of a plasma jet impinging onto the liquid surface, *IEEE Trans. Plasma Science*, 43, 2015, 4081-4087

(18) T. Sarinont, T. Amano, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Multigeneration Effects of Plasma Irradiation to Seeds of *Arabidopsis Thaliana* and *Zinnia* on Their Growth, *MRS Proceedings*, 1723, 2015

(19) T. Sarinont, T. Amano, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Effects of Atmospheric Air Plasma Irradiation to Seeds of Radish Sprouts on Chlorophyll and Carotenoids Concentrations in their Leaves, *MRS Proceedings*, 1723, 2015

(20) K. Koga, T. Sarinont, T. Amano, H. Seo, N. Itagaki, Y. Nakatsu, A. Tanaka, M. Shiratani, Simple Evaluation Method of Atmospheric Plasma Irradiation Dose using pH of Water, *Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP*, 60, 2015, LW1.143

(21) Y. Setsuhara, G. Uchida, A. Nakajima, K. Takenaka, K. Koga, M. Shiratani, Discharge characteristics and hydrodynamics behaviors of atmospheric plasma jets produced in various gas flow patterns, *Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP*, 60, 2015, LW1.58

(22) G. Uchida, A. Nakajima, T. Kawasaki, K. Koga, K. Takenaka, M. Shiratani, Y. Setsuhara, Gas flow rate dependence of the production of reactive oxygen species in liquid by a plasma-jet irradiation, *Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP*, 60, 2015,

TF1.2

〔学会発表〕(計 75 件)  
以下招待講演のみ記載。

(1) M. Shiratani, S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, G. Uchida, and N. Hayashi, Combinatorial Approach to Plasma Biosciences, 2013 International Forum on Functional Materials (IFFM2013) (招待講演), 2013 年 06 月 27 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Korea

(2) N. Hayashi, S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, Y. Yagyu, A. Yonesu, Antioxidative Activity of Plant and Regulation of Plant Growth Induced by Oxygen Radicals (Invited), 2013 JSAP-MRS Joint Symposia (招待講演), 2013 年 09 月 16 日, Doshisha University, Japan

(3) 古閑一憲, プラズマ技術およびその応用可能性について, 平成 25 年度次世代テクノロジーセミナー(招待講演), 2014 年 01 月 30 日, リファレンス駅東ビル, 福岡

(4) K. Koga, T. Sarinont, S. Kitazaki, N. Hayashi, M. Shiratani, Multi-generation evaluation of plasma growth enhancement to *arabidopsis thaliana*, 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing(招待講演), 2014 年 02 月 06 日, Fukuoka International Congress Center

(5) 古閑一憲, コンビナトリアル細胞活性解析を用いた細胞超活性プラズマの創成, 第 8 回レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術専門委員会(招待講演), 2014 年 03 月 14 日, 沖縄科学技術大学院大学

(6) M. Shiratani, T. Sarinont, T. Amano, K. Koga, S. Kitazaki, and N. Hayashi, Enhancement of food energy efficiency using plasmas, 5th International Conference on Plasma Medicine(招待講演), 2014 年 05 月 19 日, Nara Prefectural New Public Hall, Nara

(7) M. Shiratani and K. Koga, Plasma agriculture: what plasma can do for agriculture, 19th Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics & 6th Workshop for NU-SKKU Joint Institute for Plasma-Nano Materials(招待講演), 2014 年 07 月 07 日, NFRI Plasma Technology Research Center, Gunsan

(8) 古閑一憲, 大気圧機能性プラズマにおけるクロススケール結合, 日本物理学会第 71 回年次大会(招待講演), 2016 年 03 月 20 日, 東北学院大学泉キャンパス

(9) M. Shiratani, T. Sarinont, T. Amano, N. Hayashi, K. Koga, Plasma Assisted Agriculture (Invited), 2015 MRS Fall Meeting(招待講演)(国際学会), 2015 年 12 月 04 日, Hynes Convention Center, Boston

(10) M. Shiratani and K. Koga, Plasma

assisted enhancement of agricultural yield (Invited), 25th International TOKI Conference (ITC-25)(招待講演)(国際学会), 2015年11月03日, Ceratopia Toki, Gifu

〔図書〕(計0件)

〔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  
プラズマ工学研究室  
<http://plasma.ed.kyushu-u.ac.jp/index.html>

研究成果について、以下のメディアで掲載された。

2015年10月12日  
米国真空学会ニュース 掲載  
<http://www.newswise.com/articles/view/641211/>

2015年11月30日  
IEEE Spectrum 掲載  
<http://spectrum.ieee.org/tech-talk/energy/environment/a-blast-of-plasma-makes-plants-grow-faster#.VI0A186Uilg.email>

2015年12月22日  
ドイツ物理学会ニュース  
pro-physik.de 掲載  
[http://www.pro-physik.de/details/vipnews/8708311/Plasma\\_kann\\_Pflanzenwachstum\\_beschleunigen.html](http://www.pro-physik.de/details/vipnews/8708311/Plasma_kann_Pflanzenwachstum_beschleunigen.html)

2016年4月25日  
応用物理学会  
JSAP Bulletin 掲載  
[http://jsap-bulletin.jsap.or.jp/research\\_highlights/hide-3](http://jsap-bulletin.jsap.or.jp/research_highlights/hide-3)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古閑 一憲 (KOGA, Kazunori)  
九州大学・大学院システム情報科学研究  
院・准教授  
研究者番号：90315127

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

林 信哉 (HAYASHI, Nobuya)  
九州大学・大学院総合理工学研究院・准教  
授  
研究者番号：40295019

中野 道彦 (NAKANO, Michihiko)  
九州大学・大学院システム情報科学研究  
院・准教授  
研究者番号：00447856