

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33924

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600130

研究課題名(和文) プラズマ オン チップ

研究課題名(英文) Plasma-on-Chip

研究代表者

熊谷 慎也 (Kumagai, Shinya)

豊田工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70333888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1細胞に対して低温大気圧プラズマを照射し、細胞の活性状態を制御することを目的としている。そこで、プラズマ技術とマイクロ電子機械システム(MEMS)技術を駆使して、1細胞へのプラズマ照射を実現するマイクロデバイスPlasma-on-Chipを作製した。このデバイスは、プラズマ活性種が細胞培養マイクロウェル底面に作られた貫通孔を通して、ウェル内の細胞に供給される構造になっている。生体試料としてChlorella細胞にプラズマを照射したところ、Chlorella細胞が発する蛍光の強度が減少した。プラズマ中の活性酸素種等が、Chlorella細胞の活性度に影響を与えたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our objective is to irradiate a single cell with an atmospheric pressure plasma for controlling biological activity of the single cell. Using technologies of plasma and microelectromechanical systems (MEMS), we have developed a microdevice which enabled plasma irradiation to a single cell. The microdevice was named as "Plasma-on-Chip". In the plasma irradiation, reactive species generated in the plasma were delivered to a single cell cultured in a microwell through through-holes fabricated in the microwell bottom. We used Chlorella cell for the biological experiments. The plasma irradiation decreased fluorescence from the Chlorella cells. It was considered that the reactive species degraded biological activity of the Chlorella cells.

研究分野：ナノバイオテクノロジー、プラズマ、MEMS

キーワード：プラズマ 細胞 MEMS

1. 研究開始当初の背景

放電研究の歴史は古いが、プラズマの高い物理・化学反応性が半導体微細加工等の用途に利用されるようになったのは、1980年代である。2000年代に入って低温大気圧プラズマが注目され、バイオ・医療分野への応用が始まった。プラズマ滅菌・殺菌、プラズマ医療である(文献①, ②, ③)。

プラズマは細胞の生体反応をトリガすることが可能な活性種を生成できるため、目的に応じて細菌数を減少させることから、真核細胞の活性化まで制御する。プラズマの照射範囲は、プラズマ装置のノズル径と、ノズルから放出されるプラズマ中の活性種が照射対象の表面に到達するまでの拡散によって決まる。

従来、プラズマ医療は皮膚疾患・外傷治療を目的とした、広い領域への処置であった。このような場合では、プラズマと組織の反応が議論の中心になっている。ここで、プラズマ医療のメカニズムを、より詳細に理解することを考えると、組織を構成する細胞1個のレベルで、プラズマに対する応答反応を調べていくことが必要である。この1細胞レベルでの応答反応の理解が、プラズマ医療の本質を明らかにすることに繋がり、細胞の生体反応を積極的に制御することに繋がるというが、これまで十分な研究が進められていなかった。

2. 研究の目的

皮膚疾患・外傷治療のように広い範囲を照射するには大きな問題ではないが、小さな領域への照射には技術的な課題があった。プラズマは、ガス状であるため、基本的には拡散によって広がる。照射領域を小さくして1細胞に対して局所的にプラズマを照射することができれば、プラズマと細胞との一対一の反応を追跡することができる。その結果、プラズマと1細胞の相互作用の理解に基づいて、プラズマのバイオ/医療応用の新たな学術領域を開拓できると考えた。

本研究では、マイクロ電子機械システム(MEMS)技術を駆使し、1細胞よりも小さな領域へのプラズマ照射を実現して細胞活性状態や分化を制御し、細胞1個のレベルからのバイオ/医療応用への道を切り拓くことを目指して、研究を実施した。

3. 研究の方法

1細胞へのプラズマ照射を実現するための課題は二つある。それは、「1. 細胞培養に欠かせない液相状態(培養液)と気相状態であるプラズマとを両立すること」、そして、「2. 1細胞よりも小さな領域にプラズマを照射する」、である。

培養液中を漂う細胞は、足場タンパク質を介して培養シャーレ底部の表面に吸着する。気相状態にあるプラズマを細胞に照射するためには、培養液を排出して細胞を大気中

露出させなければならないが、細胞は乾燥すると死滅する。これらの矛盾ともいえる課題をクリアするため、マイクロ流路デバイスで気相と液相の界面をつくり、その界面部近傍でプラズマを発生させることを考えた。このデバイス「プラズマ オン チップ」の概略を図1に示す。マイクロウェルの底面には、細胞よりも小さいスルーホール(貫通孔)が作られている。マイクロウェルに溶液が供給されると、液体の表面張力が働いて、気液界面が形成される。その結果、液体はスルーホール外部にリークしない。マイクロウェル底面の反対側には電極対を作製しておく。この電極間に電圧を印加することでプラズマを発生させ、スルーホール径で定義される、細胞よりも小さな領域にプラズマを照射させることができる。この状況下では、プラズマ活性種が、ほぼ距離ゼロで細胞に到達することになる。プラズマからの活性種が培養液分子との衝突によって失活することを大幅に低減できる。従って、プラズマが細胞に与える影響をより直接的に調べることができる。

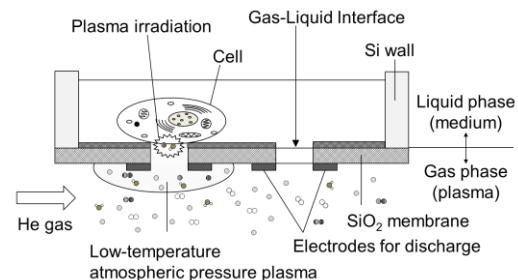


図1 「プラズマ オン チップ」デバイスの概念図。

4. 研究成果

マイクロ電子機械システム(MEMS)作製技術を駆使して、「プラズマ オン チップ」デバイスを作製した。図2に示すように、細胞培養用マイクロウェルの背面に、プラズマ生成用の電極構造を作製できている。

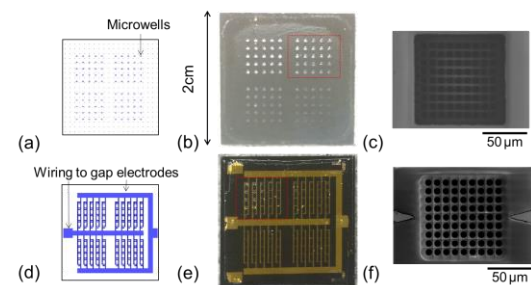


図2 作製した「プラズマ オン チップ」デバイス。(a, b) デバイスの模式図。(b, c, e, f) デバイスの写真。(a, b, c) マイクロウェル側からみた構造。(d, e, f) マイクロプラズマ源から見た構造。

作製したデバイスのマイクロウェルに純水を注ぎ、プラズマ発生試験を行ったところ、純水がウェルの外部にリークすることなく、プラズマを発生させることができた。

生体試料として、近年エネルギー材料として注目されている *Chlorella* 細胞を利用した。*Chlorella* 細胞はバイオマスエネルギー分野で期待されている。*Chlorella* 細胞を含む液体をマイクロウェルに注ぎ、ウェル背面でプラズマを発生させ、*Chlorella* 細胞に対してプラズマ照射処理を行った。プラズマ照射を行った *Chlorella* 細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、*Chlorella* 細胞からの放出される蛍光強度が減少した。

プラズマの中に生成される活性種を分析するために、発光分光を行った。その結果、酸化力のある O, OH ラジカルが存在していることが分かった。

Chlorella 細胞が放出する蛍光は、*Chlorella* 細胞の内部に存在するクロロフィルに由来している。プラズマの中に酸化力のある O, OH ラジカルが検出されたことから、これらのラジカルが *Chlorella* 細胞内部のクロロフィルを失活させて、その結果、蛍光強度が減少したと考えられる。

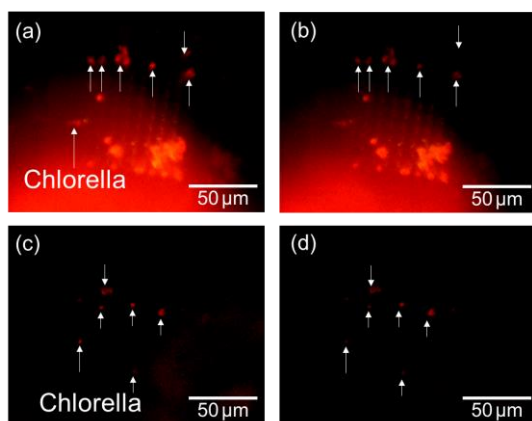


図 3 プラズマオンチップのマイクロウェルに保持された *Chlorella* 細胞の蛍光顕微鏡像。(a, b) プラズマ照射実験の *Chlorella* 細胞の像。(a) プラズマ照射前、(b) プラズマ照射後 (照射時間: 3 分)。(c, d) プラズマを照射しない場合の *Chlorella* 細胞の像。(c) マイクロウェルで保持した後の状態。(d) 照射時間に相当する時間インキュベーションした状態。

続いて、他の生体試料として、酵母を用いてプラズマ照射実験を行った。しかしながら、プラズマ照射後の酵母に対しては、外見上の変化は見られなかった。酵母の内部に何らかの影響を及ぼしている可能性はあるが、先の *Chlorella* 細胞の例と比較すると、酵母はプラズマ照射に対する耐性があるものと思われる。

本研究では、1 細胞にプラズマを照射するデバイス「プラズマ オン チップ」の開発と、生体試料に対するプラズマ照射を行った。本手法はプラズマと細胞の相互作用を直接的に理解するための情報を生み出すものと言える。今度の一層の発展が期待できる。

<引用文献>

- ① M. G. Kong et al., *New. J. Phys.* **11**, (2009) 115012.
- ② H. Tanaka et al., *IEEE Trans Plasma Sci.* **42**, (2014) 3760.
- ③ B. Gweon et al., *Appl. Phys. Lett.* **99**, (2011) 063701.

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 2 件)

- ① T. Okada, C.-Y. Chang, M. Kobayashi, T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai, “Plasma-on-chip device for stable irradiation of cells cultured in media with a low-temperature atmospheric pressure plasma”, *Arch. Biochem. Biophys.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.001> (8 pages). 査読有
- ② S. Kumagai, C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi, T. Shimizu, M. Sasaki, “Development of plasma-on-chip: Plasma treatment for individual cells cultured in media”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**, (2016) 01AF01 (7 pages). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① J-S. Oh, S. Kojima, A. Hatta, M. Sasaki, S. Kumagai, “Measurement of Reactive Species for the Development of Plasma-on-Chip”, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 21p-W331-13, 3 月 19 - 22 日, 東京工業大学 大岡山キャンパス (東京都・目黒区)
- ② J-S. Oh, S. Kojima, A. Hatta, M. Sasaki, S. Kumagai, “Plasma-on-Chip: Evidence of Reactive Species Through Through-Holes”, ISPlasma 2016/IC-PLANTS 2016, 10aB010, Mar. 6-10, Nagoya University. (Aichi-ken・Nagoya-shi)
- ③ C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi, T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai, “Plasma-on-chip device for analyzing interactions between plasma gas and individual cells”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), ANYL 726, Dec. 15-20 (2015), Honolulu, HI, USA.
- ④ C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi, T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai, “Irradiating Cells Cultured in Microwells with Low-Temperature

Atmospheric Pressure Plasma” , The
10th Asian-European International
Conference on Plasma Surface
Engineering (AEPSE2015), 24am-C[4],
20-14, Sep. (2015), Jeju, Korea.

- ⑤ C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi,
T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai,
“Plasma-on-Chip for Treatment of
Individual Cells Cultured in Medium” ,
第 76 回応用物理学会秋季学術講演会
13p-PB7-8, 9 月 13-16 日 (2015), 名古
屋国際会議場. (愛知県・名古屋市)
- ⑥ C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi,
T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai,
“Plasma-on-Chip for Controlling
Bioreaction of an Individual Cell” ,
ISPlasma2015/IC-PLANTS2015, A3-P-05,
26-31 Mar. (2015), Nagoya University.
(Aichi-ken・Nagoya-shi)
- ⑦ C.-Y. Chang, J.-H. Jeong, M. Kobayashi,
T. Shimizu, M. Sasaki, S. Kumagai,
“Plasma Treatment of Individual Cells
using Gas-Liquid Interface” , 第 62 回
応用物理学会 春季学術講演会,
12a-P10-8, 3 月 11-14 日 (2015) 東海大
学 湘南キャンパス. (神奈川県・平塚
市)

[その他]

ホームページ等

豊田工業大学研究者一覧

[http://ttiweb.toyota-ti.ac.jp/public/us
er.php](http://ttiweb.toyota-ti.ac.jp/public/user.php)

豊田工業大学 マイクロメカトロニクス研
究室ホームページ

[http://www.toyota-ti.ac.jp/mems/index.h
tm](http://www.toyota-ti.ac.jp/mems/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 熊谷 慎也

(KUMAGAI, Shinya)

豊田工業大学・工学部・准教授

研究者番号： 7 0 3 3 3 8 8 8

(2) 研究分担者 佐々木 実

(SASAKI, Minoru)

豊田工業大学・工学部・教授

研究者番号： 7 0 2 8 2 1 0 0

研究分担者 鄭 鍾炫

(JEONG, Jonghyon)

豊田工業大学・工学部・研究員

研究者番号： 9 0 7 2 8 1 1 4