

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26886009

研究課題名(和文)低温プラズマ中で生成される活性種の詳細調査とプラズマ医療実現に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Investigation of reactive species generated by low temperature plasma and fundamental research for plasma medicine

研究代表者

高松 利寛 (Takamatsu, Toshihiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10734949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：開発した温度制御可能なマルチガスプラズマを用いて、医療応用に向けた、活性種生成や殺菌効果、プラズマ装置の最適化、生体への影響を調査した。その結果、OHラジカルや一重項酸素の生成量が多い窒素、二酸化炭素のプラズマで高い殺菌効果が得られた。また、プラズマバブル水を発案し殺菌効果が確認された。さらに、3Dプリンタを用いて内視鏡に導入できるサイズのプラズマ装置の開発に成功した。そして、いずれのプラズマ装置で処理しても生体に対して毒性を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：Using developed temperature-controllable multi-gas plasma, generation of reactive species, bacterial inactivation, optimization of plasma source and effect on living body were investigated for medical application. As the results, it is found that nitrogen plasma and carbon dioxide plasma, which generate a large amount of OH radical and singlet oxygen, have high bacterial inactivation effect. We suggest plasma bubble water, and the bacterial inactivation effect was confirmed. Using 3D printer, we succeeded to develop new plasma source, which can be inserted in endoscope. And the treatments with these plasma sources were free from damage to living body.

研究分野：プラズマ科学

キーワード：大気圧低温プラズマ プラズマ医療 活性種 殺菌

1. 研究開始当初の背景

大気圧プラズマは真空容器や排気設備が不要であり、高密度で高い活性を持つ粒子を生成できる。処理効率や速度の飛躍的な向上に繋がることから、各種産業からの期待が高まっており、半導体プロセッシングや有害ガス分解、元素分析など、幅広い産業分野で研究されている。さらに近年、大気圧非平衡プラズマによって温度が室温から 100°C 程度の低温でアルゴンやヘリウム、空気のガス種でプラズマを生成できるようになり、熱に弱い生体等へのプラズマ照射が可能となった。このため、様々な生物学的な研究が進められ、これまでにプラズマによる殺菌効果や血液凝固、細胞の成長促進、がん細胞の選択的殺傷効果などが報告されている。プラズマによる殺菌は残留毒性なく低温で様々な菌を殺傷できるため、新たな殺菌技術として食品の殺菌や医療機器の滅菌の分野で注目されている。また、治療装置としての応用も検討されており、ドイツなどでは創部感染症の治療に向けた臨床研究が行われている。殺菌や治療効果は、プラズマで生成される活性酸素種が主たる因子であると考えられている。しかし、従来の装置ではプラズマのガス種やプラズマの温度に制限があるため、これらの詳細なメカニズムは未だに明確になっていないのが現状であった。

2. 研究の目的

我々は、世界で初めて様々なガス種でプラズマを大気圧下で安定に生成でき、かつ 1°C 以下で温度を制御できるマルチガスプラズマジェットを開発した。これまでに、プラズマの親水化効果に対してガス種を選択することの有効性が示されており、従来のプラズマ源では不可能な速度の殺菌処理や治療効果が実現できると考えられる。

本研究では我々が開発した温度制御可能なマルチガスプラズマジェットを用いて、殺菌メカニズムの解明や、慢性的創傷や創部感染症等の医療応用にプラズマが利用可能かどうかに対して、指針を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

マルチガスプラズマジェットは、図1のようにアルゴンやヘリウムの他に酸素、窒素、二酸化炭素、空気やそれらの混合ガスで直接プラズマを生成することができる。構造は相対する二極の電極を備え、電極間で放電を起こすことで、電力 10 W 程度のプラズマが生成される。電極間で生成されたプラズマは、ガス流量 1 L/min で直径 1 mm の出口から吹き出される構造となっている。

さらに、我々が開発した温度制御プラズマでは、放電前のガスをあらかじめ制御することで、プラズマの温度を制御する事が可能である。装置構成の一例を図2に示す。このシステムでは、ボンベから供給されたガスを液

体窒素などを用いたガス冷却装置によって冷却したのち、ヒーターによって適度に加熱してからプラズマを生成する。生成されたプラズマの温度をモニタリングしてプラズマ生成前のガス温度を制御する事でプラズマの温度を精密に制御できる(特許第 4611409 号)。試作した装置では、-90~150°C の範囲で、±1°C 以内の精度で温度制御された大気圧プラズマを供給することができた。

本研究ではこのマルチガスプラズマジェット及び温度制御システムを用い、様々なガス種で一定温度(25°C)の大気圧低温プラズマを生成し、(1)各ガス種のプラズマから生成される活性種及びその殺菌効果の調査、(2)医療応用に特化したプラズマ源の開発、(3)生体に対する大気圧低温プラズマの影響調査を行った。

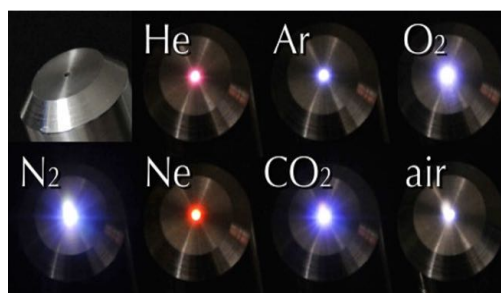


図1.マルチガスプラズマ

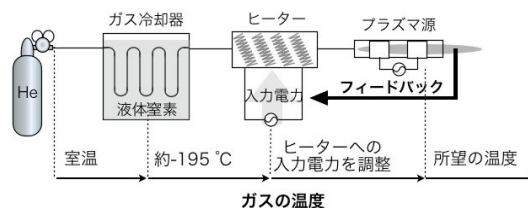


図2.プラズマのガス温度制御機構

4. 研究成果

(1)各ガス種のプラズマから生成される活性種及びその殺菌効果の調査

液中に導入される活性種のガス種による違いを調査するため、プラズマから生成される各種活性種の濃度を電子スピン共鳴法(ESR: Electron Spin Resonance)と吸光度法を用いて、殺菌に寄与している可能性が高いと考えられているヒドロキシルラジカル(HO·)、一重項酸素(¹O₂)、オゾン(O₃)、過酸化水素(H₂O₂)に注目し、測定を行った。その結果、図3に示されるように、ガス種によって生成される活性種の種類や量が大きく異なることが明らかとなった。

さらに、黄色ブドウ球菌の懸濁液に対して、殺菌効果のガス種依存性を調査したところ、図4に示されるように、二酸化炭素、窒素プラズマの殺菌効果が高く、120秒間プラズマを照射した結果菌数は6桁減少した。また、酸素プラズマを120秒照射した結果、3桁菌数が減少した。空気やアルゴンのプラズマ処

理では生存菌数は減少しなかった。この結果は図3と比較するとOHラジカルと一重項酸素の生成量と関連性が見られるため、殺菌に寄与する因子として結びつけられる。

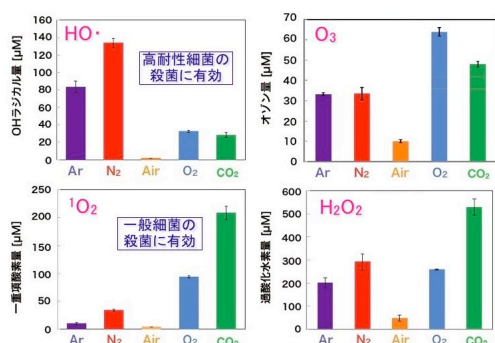


図3. マルチガスプラズマジェットによって生成される各種活性種量

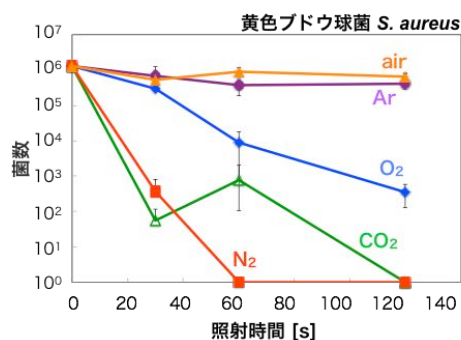


図4. マルチガスプラズマジェットによる殺菌効果

(2) 医療応用に特化したプラズマ源の開発

① プラズマバブル水

これまでの研究から、プラズマ中で生成される寿命の短い活性種が大気圧低温プラズマの主な殺菌要因であると考えられている。そのため近年では、プラズマを水面に照射することで活性種を水中に導入し、水自体に殺菌効果を持たせる「プラズマ処理水」の研究も行われている。しかし、従来の研究は上方から水面へプラズマ照射を行うため、プラズマと水との接触面積が水面に限られていた。そこで我々は、プラズマと水との接触面積を増やすため、図5に示すようにプラズマ化したガスを気泡として水中に直接導入する、プラズマバブリング法の着想に至った。この手法を用いることでプラズマと水との接触面積が大幅に増加し、また空気中の活性種の損失がないため、水中への活性種導入効率の向上が期待できる。またプラズマ源には様々なガス種で安定したプラズマを生成することができる。本研究では、いくつかのガス種を用いてプラズマバブリング法により処理した水である「プラズマバブル水(Plasma

Bubbled-up water : PBW)」を作製し、PBWと黄色ブドウ球菌の細菌懸濁液をそれぞれ混合し、混合溶液中の生存菌数を測定することで、各種ガスのPBWの殺菌効果を調査した。その結果、図6に示されるように、窒素プラズマではPBWで殺菌効果が見られなかったが、酸素プラズマを使用したPBWでは殺菌効果が見られ、生存菌数を6桁減少させる高い殺菌効果が確認された。



図5. プラズマバブリングの様子

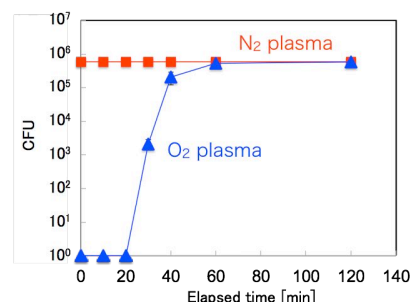


図6. PBWによる殺菌効果

② 3Dプリンタを用いたプラズマ装置開発

従来のプラズマ装置は金属やガラス、樹脂の機械加工によりプラズマ生成部を作成していたため、小型化や複数部品の一体化に制限があり、微小かつ実用的なプラズマ生成部を作成することは困難であった。例えば、内視鏡の鉗子口は内径3.7mm前後であるため、内視鏡下でプラズマを使用するためには、それよりも細かいプラズマ装置を作成する必要がある。これに対し我々は、世界に先駆けて金属の3Dプリンタを用いてプラズマ生成部を試作し、安定にプラズマを生成する事に成功した。図7(a)は3Dプリンタで造形されたプラズマ源、図7(b)は窒素のプラズマジェット、図7(c)は内視鏡の鉗子口にこのプラズマジェットを組み込んだ写真である。窒素プラズマの他にアルゴン、ヘリウムプラズマも生成することができる。また、生成されるプラズマは室温程度の低温であり、生体に熱損傷なく処理することができる。プラズマ生成部が非常に微小であることから、従来のプラズマ源では処理が困難であった複雑な構造を

持つ対象物に対しても表面処理が可能になった。また、内視鏡の鉗子孔の内径よりも小さく造形できるため、内視鏡下での生体殺菌や止血のための医療機器として応用が期待される。

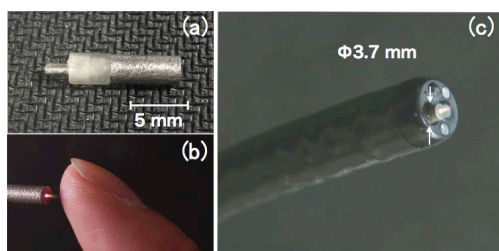


図 7. 3D プリンタで作成した大気圧低温プラズマ源

(3) 生体に対する大気圧低温プラズマの影響

生体に対するプラズマ照射の影響調査として、図 4 で殺菌効果の高かった窒素プラズマをブタの胃粘膜に対して 2 分間照射した。その結果、図 8 に示されるように、未処理と比較しても差はなく、組織障害は確認されなかった。そのため、生体へのプラズマ照射による殺菌処理が期待できる。

次に、PBW の生体に対する影響調査について、in vitro として、ヒト繊維芽細胞に対して PBW を接触させ、蛍光試薬でアポトーシスやネクロシスを引き起こすかどうか調査した。図 9 に PBS 処理によるヒト繊維芽細胞の蛍光観察像を図 10 に PBW 処理によるヒト繊維芽細胞の蛍光観察像を示す。双方とも処理時間が 1 min まではアポトーシスもネクロシスもほとんど見られなかった。しかし 5 min を超えると PBS の処理でもネクロシスの応答が確認され、10 min で双方の条件でほとんどの細胞がネクロシスを示した。そして、どの条件でもアポトーシスはほとんど見られなかった。

また、in vivo において、げっ歯類に対して PBW を経口投与したところ、急性毒性や粘膜障害は確認されなかった。これらのことから、大気圧低温プラズマ処理や PBW 処理は残留毒性や細胞障害が非常に軽微であることが明らかとなった。このことから、液体を介した効率的な生体の殺菌処理が期待できる。

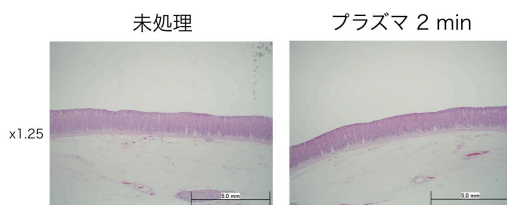


図 8. ブタの胃粘膜に対する大気圧低温プラズマ照射の影響

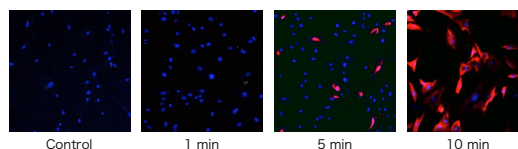


図 9. PBS 処理による繊維芽細胞への影響

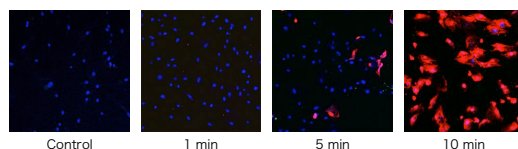


図 10. プラズマバブル水処理による

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 4 件)

1. T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, T. Azuma and A. Okino, Atmospheric nonequilibrium mini-plasma jet created by a 3D printer, AIP Advances, 5, 077184 (2015). 査読あり
2. T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, M. Hidekazu, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, M. Kohno, T. Azuma, A. Okino, Microbial Inactivation in the Liquid Phase Induced by Multigas Plasma Jet. PLoS ONE 10(7): e0132381 (2015). 査読あり
3. T. Oshita, H. Kawano, T. Takamatsu, H. Miyahara and A. Okino, Temperature Controllable Atmospheric Plasma Source, IEEE Trans on Plasma Sci, 43, 6, pp. 1987-1992 (2015). 査読あり
4. T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, H. Miyahara, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, T. Azuma, M. Kohno and A. Okino Investigation of reactive species using various gas plasmas. RSC Adv 75: 39901-39905. (2014) 査読あり

[学会発表] (計 27 件)

1. Development of atmospheric non-thermal mini-plasma jet created by a 3D printer, T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, T. Azuma and A. Okino, 第 25 回日本 MRS 年次大会, 2015 年 12 月 10 日 神奈川.
2. 小林智裕, 菅原修馬, 川野浩明, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東 健, 沖野晃俊. ガス種及びガス温度がプラズマバブル水中の活性種に与える影響, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 2015 年 9 月 13 日名古屋.

3. 堂山英之, 川野浩明, 小林智裕, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊. 各種ガスプラズマによる水中殺菌と細菌の電子顕微鏡観察, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 応用物理, 2015年9月13日名古屋.
4. 様々なガス種のプラズマによる殺菌効果と細菌の電子顕微鏡観察, 高松利寛, 佐々木洋太, 松村有里子, 岩澤篤郎, 宮原秀一, 河野雅弘, 東健, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第42回年次大会, 2015年9月1日大阪
5. ヘルスケア・医療分野への応用に向けた大気圧低温プラズマの開発, 高松利寛, 第1回先端錯体工学研究会ミニシンポジウム, 2015年7月27日 神奈川
6. Influence of plasma gas temperature on inactivation effect to various bacteria, H. Kawano, T. Oshita, T. Takamatsu, Y. Matsumura, H. Miyahara, A. Iwasawa, T. Azuma and A. Okino, ISPC22, Jul.7, 2015, Belgium.
7. 川野浩明, 渡辺洋輔, 佐々木洋太, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊. 各種ガスプラズマによる水中殺菌と ESR および吸光光度法による活性種測定, 平成 27 年度 日本分光学会 年次講演会, 2015 年 6 月 1 日東京.
8. 小林智裕, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 松原裕樹, 大島悟, 神谷哲, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊. 殺菌・洗浄を目的としたプラズマバブル水の活性種測定, 平成 27 年度 日本分光学会 年次講演会, 2015 年 6 月 1 日東京.
9. Measurement of sterilization ability and reactive species of various plasma bubbled-up water, Tomohiro Kobayashi, Yosuke Watanabe, Takaya Oshita, Toshihiro Takamatsu, Hiroki Matsubara, Satoru Oshima, Tetsu Kamiya, Yuriko Matsumura, hidekadzu miyahara, Atsuo Iwasawa, Takeshi Azuma, Akitoshi Okino. The 42th IEEE International Conference on Plasma Science, May 26, 2015, Turkey.
10. Investigation of Bacterial Inactivation by Various Gas Plasmas and Electron Microscopic Observation of Treated Bacteria, Toshihiro Takamatsu, Tomohiro Kobayashi, Hiroaki Kawano, Yota Sasaki, Yosuke Watanabe, Yuriko Matsumura, Hidekazu Miyahara, Atsuo Iwasawa, Takeshi Azuma and Akitoshi Okino, International Conference on Plasma Science, May 26, 2015, Turkey.
11. プラズマバブル水の活性種測定と細菌不活化効果の調査, 小林智裕, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 松原裕樹, 大島悟, 神谷哲, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 平成 26 年度 第 4 回 電気学会東京支部神奈川支部研究会, 2015 年 2 月 16 日 神奈川
12. マルチガスプラズマジェットを用いた殺菌効果に寄与する活性種の調査, 高松利寛, 佐々木洋太, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 松村有里子, 河野雅弘, 東健, 沖野晃俊, 第 24 回 日本 MRS 年次大会, 2014 年 12 月 11 日 神奈川.
13. Water sterilization and clarification by multi-gas plasma-bubbling, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 小林智裕, 松原裕樹, 大島悟, 神谷哲, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 第 24 回 日本 MRS 年次大会, 2014 年 12 月 10 日 神奈川.
14. 様々なガスを用いたプラズマバブル水の殺菌効果調査, 小林智裕, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 松原裕樹, 大島悟, 神谷哲, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 第 24 回 日本 MRS 年次大会, 2014 年 12 月 10 日 神奈川.
15. Influence of plasma gas species on bacterial inactivation and reactive species production by plasma-bubbling, Toshihiro Takamatsu, Yosuke Watanabe, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Masahiro Kohno, Akitoshi Okino, Asia-Pacific EPR/ESR Symposium, Nov. 14, 2014, Nara.
16. Investigation of Reactive Species Generated by Various Gas Plasmas using ESR Spin Trapping Method, Yuriko Matsumura, Toshihiro Takamatsu, Kodai Uehara, Yota Sasaki, Hidekazu Miyahara, Atsuo Iwasawa, Masahiro Kohno, Akitoshi Okino, Asia-Pacific EPR/ESR Symposium, Nov. 14, 2014, Nara.
17. Investigation of Sterilization Effect by Various Gas Plasmas and Electron Microscopic Observation of Bacteria, Yota Sasaki, Toshihiro Takamatsu, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Masahiro Kohno, Keiko Ikeda, Akitoshi Okino, 56th Annual Meeting of the APS Division of Plasma Physics, Oct. 28, 2014, USA.
18. 殺菌効果および活性種生成量のプラズマガス温度依存性の調査, 川野浩明, 大下貴也, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 電気学会プラズマ/パルスパワー/放電 合同研究会, 2014 年 10 月 25 日 大分.
19. Investigation of ROS Production Process using Multi-Gas Plasma, Toshihiro Takamatsu, Yota Sasaki, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Masahiro Kohno, Takeshi Azuma, Akitoshi Okino, THE 21ST

- INTERNATIONAL SPACC SYMPOSIUM, Oct. 1, 2014, Tokyo.
20. 各種ガスのプラズマを導入した水による一般細菌の殺菌効果検証, 小林智裕, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会, 2014 年 9 月 25 日 東京.
 21. 各種ガスプラズマ照射で生成される液中活性酸素種の ESR 測定, 佐々木洋太, 高松利寛, 上原広大, 大下貴也, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 松村有里子, 東健, 河野雅弘, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会, 2014 年 9 月 25 日 東京.
 22. プラズマガス温度が殺菌効果および活性種生成量に与える影響, 川野浩明, 大下貴也, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会, 2014 年 9 月 25 日 東京.
 23. プラズマバブリングによる活性酸素種の水中導入と各種細菌の不活化, 渡辺洋輔, 大下貴也, 高松利寛, 松村有里子, 宮原秀一, 岩澤篤郎, 東健, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会, 2014 年 9 月 25 日 東京.
 24. 様々なガス種の低温プラズマによる殺菌及び毒素の分解効果の検証, 高松利寛, 上原広大, 佐々木洋太, 松村有里子, 岩澤篤郎, 宮原秀一, 河野雅弘, 東健, 沖野晃俊, 日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会, 2014 年 9 月 24 日 東京.
 25. Bacterial Inactivation using Ultrafine Bubble Water Produced by Atmospheric Multi-gas Plasma, Takaya Oshita, Yosuke Watanabe, Toshihiro Takamatsu, Masakazu Kashiwa, Hidekazu Miyahara, Toshihiro Fujita, Akitoshi Okino, Particulate System Analysis Sep. 16, 2014, UK.
 26. Investigation of Bacterial Inactivation by Reactive Species using Various Gas Plasmas, Toshihiro Takamatsu, Kodai Uehara, Yota Sasaki, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Takeshi Azuma, Masahiro Kohno, Akitoshi Okino, 5th Euro-Asian Pulsed Power Conference, Sep. 10, 2014, Kumamoto.
 27. Influence of Plasma Gas Temperature on Sterilizing Effect and Active-Species Generation, Hiroaki Kawano, Takaya Oshita, Toshihiro Takamatsu, Yuriko Matsumura, Hidekazu Miyahara, Atsuo Iwasawa, Takeshi Azuma, Akitoshi Okino, 5th Euro-Asian Pulsed Power Conference, Sep. 9, 2014, Kumamoto.

[図書] (計 1 件)

1. T. Takamatsu, H. Miyahara, T. Azuma and A. Okino, Gas Plasma Sterilization in Microbiology: Theory, Applications, Pitfalls and New Perspectives (Chapter 6 Current Progress in Advanced Research into Tetrodotoxin Inactivation by Gas Plasmas, pp51-58), Caister Academic Press (2016). SBN: 978-1-910190-25-8

[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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
<http://www2.es.titech.ac.jp/okino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松利寛 (Takamatsu Toshihiro)
神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野・学術研究員
研究者番号 : 10734949

(2) 研究協力者

東健 (Azuma Takeshi)
神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野・教授
研究者番号 : 60221040

沖野 晃俊 (Okino Akitoshi)
東京工業大学未来産業技術研究所・准教授
研究者番号 : 60262276

伊藤 典彦 (Ito Norihiko)
鳥取大学農学部附属動物医療センター・准教授
研究者番号 : 80264654