

## 最先端プラズマバイオ技術

名古屋大学

堀 勝\*, 石川 健治,

田中 宏昌, 橋爪 博司

富山大学

近藤 隆

In this review article, a progress of emerging plasma medical science, which is a novel interdisciplinary field that combines studies on the plasma science with those on the medical science is introduced. The non-thermal atmospheric pressure plasma has been used for many medical treatments, such as for the cancer, the blood coagulation, and the wound healing. Understanding of the scientific principles governing the plasma medical science leads to the promotion of world innovations not only in the medical field but also in the agricultural one.

**Keywords:** plasma medicine, plasma agriculture, reactive oxygen species (ROS), plasma activated medium (PAM)

### 1 はじめに

近年、大気圧の下でガス温度の低い「非平衡大気圧プラズマ（低温大気圧プラズマ）」の生成が可能になり、医療や農業などバイオ応用の研究が世界的な潮流として急伸している。これまでに、多くの報告がなされているが、その中でも 2012 年に Iseki らが培養細胞にプラズマ照射した結果、纖維芽細胞が生存する中、卵巣がん細胞が選択的に死滅されることを発見した成果は、特筆すべき結果である<sup>1)</sup>。引き続き、2014 年に Tanaka らと Utsumi らは、プラズマを照射した細胞培養液が、がん細胞を正常細胞に対して選択死滅させることを発見し、その有効性を動物レベルでも実証した。このプラズマ照射した培養液はプラズマ活性溶液

(plasma activated medium: PAM) と呼ばれ<sup>2)</sup>、ヒトの葉物耐性卵巣がんをマウス皮下接種した箇所に PAM を投与することで腫瘍増殖の顕著な抑制効果<sup>3)</sup>のみならず、多様ながんにも同様の効果が得られ、PAM のがんの選択死滅に対する普遍的な有効性が示された。このようにプラズマの照射によって合成された PAM の抗腫瘍効果には、プラズマ照射により発生した液相の化学種の関与に起因しており、その全容解明に向けて世界中の科学者が取り組んでいる。

これまで、非平衡プラズマの応用は、主として真空中での薄膜堆積やエッチング、表面改質において、プラズマと固体材料との相互作用を基軸に展開されてきた。一方、バイオ応用の観点では、非平衡大気圧プラズマを用いることによって、プラズマの応用は、水や細胞といった液体や生体に対象が広がっている。ここ数年で、プラズマと液体や生体との相互作用を基にした新たな応用やその機構の解明に対して、国内外でプラズマ診断技術を活用した研究がなされ、プラズマが誘起する液相の活性種の挙動やその生体物質への作用についても理解が進んできた。ここでは、この分野の最近の成果を紹介する。

### 2 非平衡大気圧プラズマ

#### 2.1 プラズマ生成の原理

大気圧では、多数の粒子衝突周波数が増加し、衝突によって、ガス温度が上昇し、電子の温度と等しくなる、所謂「熱平衡プラズマ」になりやすい。熱平衡プラズマでは、ガス温度は、6000 K 程度まで上昇する。したがって、このガス温度を如何にして、電子の温度よりも低くして、非平衡状態を実現するかが、非平衡大気圧プラズマを生成する上で、大きな鍵となる。まず、プラズマの生成を考えれば、電離（電子とイオン対）反応の連続的な発生（電離増幅、avalanche）が、放電現象の源である (Fig. 1)<sup>4)</sup>。

States of the Art Plasma Bio-applications

Masaru Hori\*, Kenji ISHIKAWA, Hiromasa TANAKA and Hiroshi HASHIZUME (Nagoya University), Takashi KONDO (Toyama University),  
〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町  
TEL:052-789-4420, E-mail: hori@nuee.nagoya-u.ac.jp

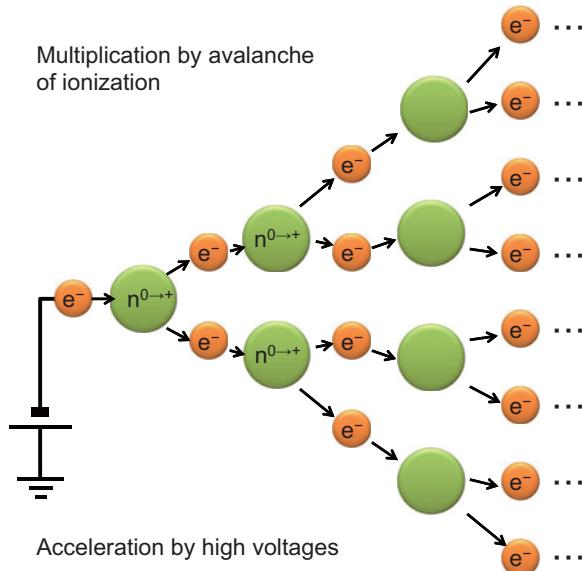


Figure 1. Multiplication of ionization (Avalanche) in application of high electric field<sup>4)</sup>. Reprinted with permission from Reviews of Modern Plasma Physics.

高電圧印加によって電子が加速され、電子 ( $e^-$ ) は電荷中性のガス  $n$  に衝突し、反応式で  $e^- + n \rightarrow n^+ + e^- + e^-$  となり、電子・イオン ( $n^+$ ) 対が生成される。ガスへの電子の衝突エネルギーには、ある閾値をもって電離反応は進行するが、他には励起や解離などの電子衝突反応も生じる (Fig. 2)<sup>4)</sup>。これはプラズマを生成するガス種を選べば、電子のエネルギーの分布に応じて、多種多様な反応活性種が生成される。電子・イオンの生成のみならず、反応活性な励起種・解離種 (便宜的にラジカルと総称することもある)、紫外線といった光が同時に生成されることになる。ただし、この生成プロセスにおいて、電離、励起、解離などの生成の確率を人為選択的に制御することは不可能である。しかし、圧力やパワーなどプラズマを制御するパラメーターによって、プラズマ中の電子のエネルギー分布を制御することで、電離、励起、解離による粒子の生成をある程度変化させることは可能である。これらの生成した粒子は、一般的には、高いエネルギー状態を有しているため、プラズマと接した表面で種々の化学反応を誘起し、非平衡の化学反応場を作り出すために、マクロな表面の温度は低いまま、イオン、光とラジカルなどの相互作用によって、局所的にホットな反応が進行することで、低温で様々な薄膜の合成や物質の加工を実現することができる。

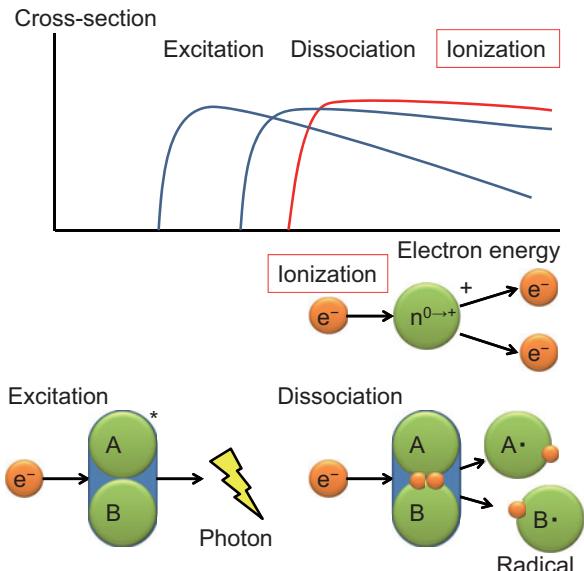


Figure 2. Electron collision processes with atoms and ions<sup>4)</sup>. Reprinted with permission from Reviews of Modern Plasma Physics.

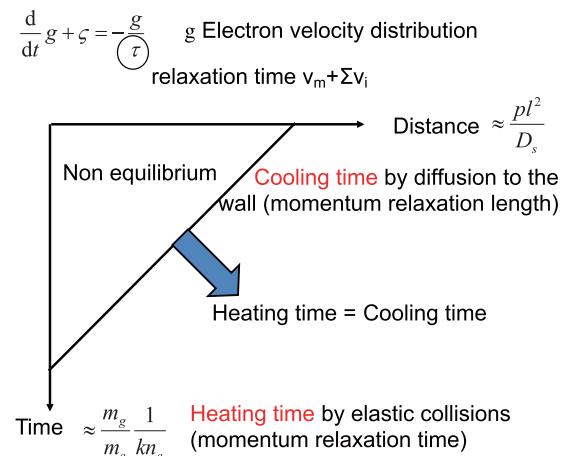


Figure 3. Equilibrium conditions on a balance between thermalization and relaxation of the electronic dynamics<sup>4)</sup>. Reprinted with permission from Reviews of Modern Plasma Physics.

現在では、プラズマ生成における非平衡状態を保つために、大気圧下においてガス温度を上げない技術が開発されている。大気圧でガス温度が上がる機構は、生成に投入された電気エネルギーが効率的に消費され、熱的緩和により熱を発生させることにある。大気

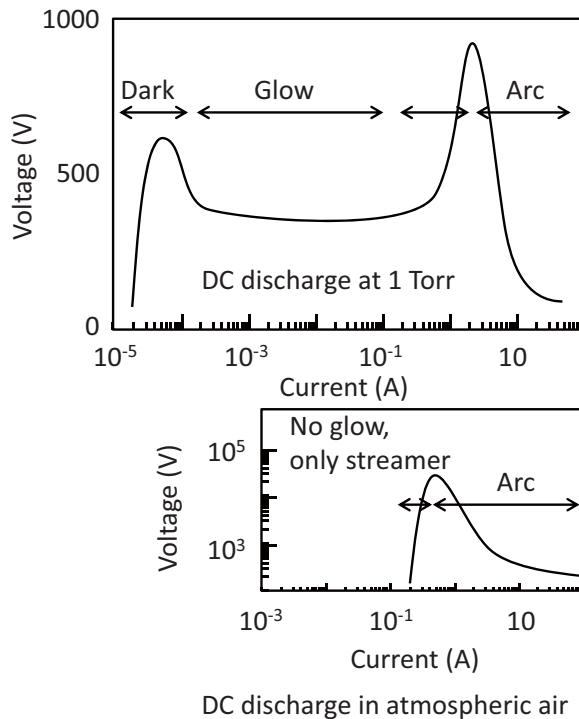


Figure 4. Transitions among the discharge modes appeared in current-voltage characteristics<sup>5)</sup>. Reprinted with permission from Reviews of Modern Plasma Physics.

圧といった高い圧力では、粒子間の衝突が頻繁に生じ、その際発生する熱的緩和によってガス温度が上昇する。発生した熱は、系から空間的・時間的に緩和され消えていくので、プラズマ源を覆う周囲の壁や大気へ空間的に熱を移動させる拡散のプロセス、つまり、空間的熱移動  $\propto$  圧力  $\div$  (拡散距離  $\times$  特性長の 2 乗) に従うと見なせる (Fig. 3)<sup>4)</sup>。一方、プラズマ中で電子衝突によって電子のエネルギーが運動量移行によって加熱され、ガス温度を上げると近似すれば、時間的加熱  $\propto$  ガス質量  $\div$  電子質量  $\div$  電子密度に従うと見なせる (Fig. 3)<sup>4)</sup>。一旦、加熱されたガスは、統計的に衝突緩和時間  $\tau$  でもって緩和すると仮定すれば、熱統計的に速度分布関数  $g$  の時間変化は、 $dg/dt + \xi = -g/\tau$  に従い、時間的に冷却が進む。ここで  $\xi$  は衝突項である。このような前提に立脚して、現象を洞察すれば、加熱と冷却の比が(空間的にも時間的にも)、ガス温度を決めるので、この比が調節されればガス温度が上がらない、すなわち、非平衡プラズマを大気圧下で実現することができる。

逆に、古くから大気圧放電で知られるアークプラズ

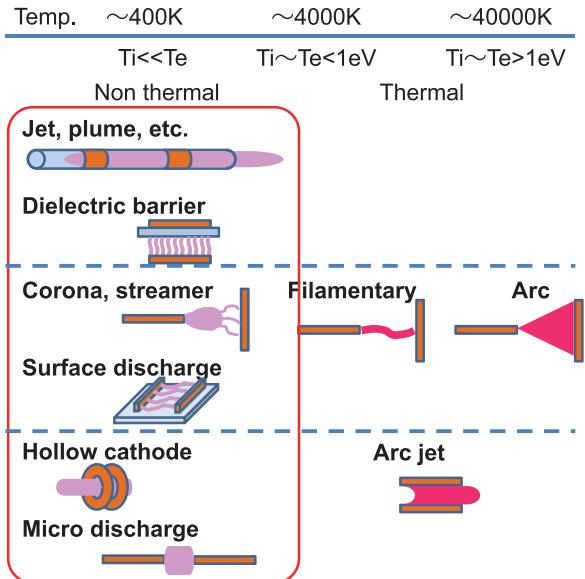


Figure 5. Various kinds of atmospheric pressure plasma sources<sup>4)</sup>. Reprinted with permission from Reviews of Modern Plasma Physics.

マでは、電気エネルギーが過剰に入ってガス温度を高くすることで熱電子の効果により熱プラズマとなる。教科書的な説明では、直流で放電させると、その電流 - 電圧の振る舞いから、下記のように、各モードに分類されている。ガス圧が低い場合には、順にタウンゼント放電からグロー放電、アーク放電に遷移していく、大気圧近くの高い圧力では、ストリーマ放電からアーク放電に、いきなり遷移する (Fig. 4)<sup>5)</sup>。ただし、このような過剰な電力投入も、例え短時間パルス放電(時間的)やガス流(空間的)冷却によって、非平衡大気圧プラズマを実現させることができる。他にも、このようなアーク移行を防ぐために、誘電体を電極の間に挟んで放電させると、誘電体に蓄積されたチャージによって、プラズマ生成のための電界が打ち消されるために、放電が停止する。この放電の生成と停止によって、プラズマをパルス的に発生させができる(バリア放電)。このバリア放電では、大気圧 He 下で、パルス的な電圧印加を起こすことによって、ガス温度が過度に上昇することを抑制し、ストリーマ放電を実現することができる。現在では、多くの種類のプラズマ源が開発されている (Fig. 5)<sup>4)</sup>。

プラズマは、電子やイオンの荷電粒子と中性ガスから構成されることから、それぞれ電子、イオンの温度とガスの温度、さらに電子、イオンの密度とガスの

密度について示される。通常、電子の密度によってプラズマ密度を特徴付けている。大気圧のガス密度が  $10^{19} \text{ cm}^{-3}$  程度であるが、% オーダーの  $10^{17} \text{ cm}^{-3}$  まで電離していれば、非常に高密度のプラズマとして定義される。うっすらと青白く見えるコロナ放電などでは  $10^{10} \text{ cm}^{-3}$  のレベルである。ここで、非平衡大気圧プラズマ源が実現しているプラズマは、その間に入るレベルである。大気圧ストリーマ放電は使いやすい反面、プラズマ密度は  $10^{13} \text{ cm}^{-3}$  程度であり、十分高いとは言えない。そこで、活性種の生成を高くするためにも、プラズマ密度を  $10^{15} \text{ cm}^{-3}$  位にまで高い状態にまで得ようとすれば、アーク放電になりやすく、同時にガス温度を高温にする。この克服には、回路的な電流制限やガス流の原理を活用して、ガス温度を下げることで、非平衡性が実現されている。上述のような原理により、現在では、非平衡大気圧プラズマを生成できる装置が多数発表され、プラズマを液体や生体に作用させる研究が急伸している。

## 2.2 プラズマと液体の相互作用

プラズマバイオ技術の対象は複雑な系であり、プラズマから細胞・組織・生体で生じる複雑な現象を系統的に理解することが必要である。プラズマは、電子に加え、イオン、ラジカル、光を対象に供与し、対象の表面に多様な反応場を及ぼす (Fig. 6)<sup>6)</sup>。生体への照

射を考える場合、水の存在が無視できない。プラズマが誘起する化学的な作用は、水を含む液体への作用と見なすことができる。さらに、細胞や組織、器官への影響には、物理的な電流や電(磁)界の作用も考慮しなければならない。液体といえども、細胞培養液には浸透圧や pH 調整のための塩が入っていて、電気伝導性も用いる培養液の特性に応じて大きく変化する。さらに、エネルギー源としての糖や物質源としてのアミノ酸や脂肪酸などを含んでいる。血液ともなれば、血漿成分にタンパクや赤血球、白血球、血小板が含まれている。創傷では、血液の周りに上皮組織が共存することがあり、細胞接着の細胞外マトリクスなどが表面を構成し、それらとの相互作用の上でプラズマが存在する系を理解しなければならない。プラズマ照射自体は、ポリマーのような有機物固体の表面にプラズマを照射しているに過ぎないが、その作用を考えるには、個々の系を精密に計測し、その相互作用を理解して、総合的に体系化することが必要であり、膨大な研究成果の蓄積が必要になっている (Fig. 7)。

この解明には、下記のアプローチが必要である。液相活性種の解析結果には

- (i) プラズマ源の相違
- (ii) 培養液では有機物、無機イオンなど、液体の化学組成

に依存するため、これらの動態を診断して、時々刻々の分析結果の取得が、機構の解明に必要である。例えば、プラズマ照射した純水 (plasma treated water: PTW) については、精力的に分析がなされてきた。2010年に Ikawa らと 2012 年に Tani らが、プラズマ照射した純水中にスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) の生成を報告した<sup>7)</sup>。2011 年に Shimizu らは PTW 液中に、 $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_3$  の生成を見出し<sup>8)</sup>, Sato らは細胞培養液にプラズマを照射して、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成を報告した<sup>9)</sup>。ここで、興味深い点は、電離放射線を照射した水中においても、 $\text{H}^{\cdot}$ ,  $\text{NO}^{\cdot}$ ,  $\text{O}^{\cdot\cdot}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$  などのラジカルが生成されることが明らかになっており、放射線化学で得られた知見との類似がみられる<sup>10)</sup>。

液相生成する活性酸素種 (ROS) は、Fricke 法や KI 法などの簡易手法によって、その挙動が可視化することが可能であるが、その化学組成はわからない。電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法で、液相ラジカルを捕捉して、その活性種の種類の特定や密度、その動態を調べることができる。

プラズマ照射によって発生する ROS には、 $\text{H}_2\text{O}_2$  があり、その生成経路として、気相で生成した  $\text{OH}^{\cdot}$  や

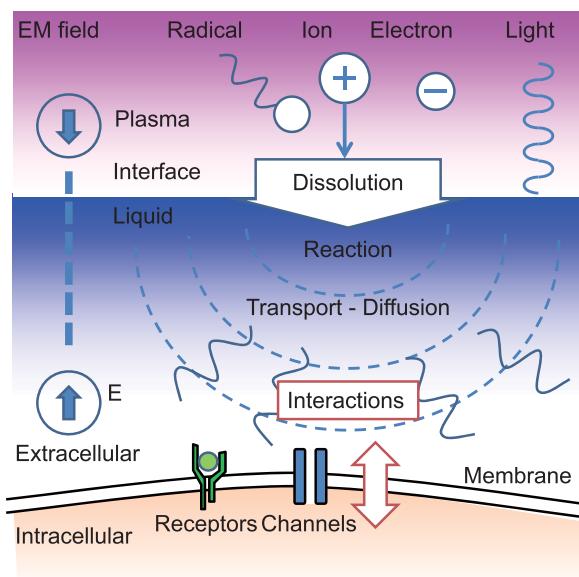


Figure 6. Interactions between non thermal plasma and biological matter<sup>6)</sup>.

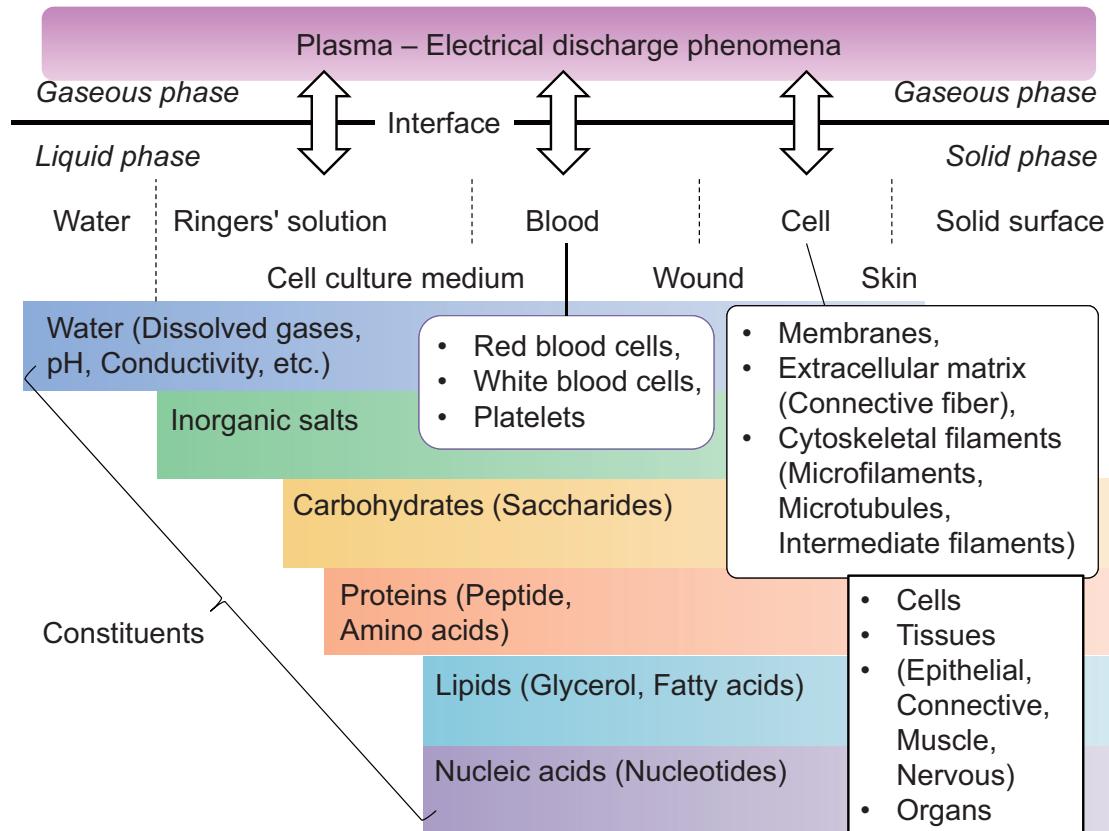


Figure 7. Schematic overview of plasma-liquid interactions.

$\text{O}^{\bullet\bullet}$  が液面に到達して,  $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{O}^{\bullet\bullet} + \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  などの反応が挙げられる。また真空紫外光 (VUV,  $h\nu$ ) で  $\text{H}_2\text{O}$  の解離,  $\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}^\bullet$  が知られている。液相で  $\text{H}_2\text{O}$  が解離して  $\cdot\text{OH}$  が生成すれば、再結合により  $\text{H}_2\text{O}_2$  は必ず生成する。また、生成した  $\text{H}_2\text{O}_2$  は VUV の発光で解離される。Ar や He の希ガスを流してプラズマを生成する場合、VUV の発光が大気によって吸収される効果が小さいことから、これらの光は、溶液に照射されるため、溶液の光解離の影響を明らかにすることが必要である。このようなプラズマからの発光の影響については  $\text{MgF}_2$  ガラス (波長 > 115 nm 透過) を培養液の上に被せることによって、プラズマからの荷電粒子やラジカルを遮断し、透過した光のみを溶液に照射させて、 $\cdot\text{OH}$  や  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{NO}$  の生成を分析することで、その影響が解析されている (Fig. 8)<sup>11)</sup>。また、ジェット型のプラズマを用い、プラズマ源から吹き出した発光部を液相から離した場合と接触した場合を比較することによって、その影響について調べられて

いる。 $\text{H}_2\text{O}$  に VUV 照射した場合に、化学トレーサーとして溶液の中に導入した、5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) のアダクト、DMPO-OH と DMPO-H の発生が ESR シグナルとして観測され、光解離による溶液での反応を検出することができる。一連の実験において、プラズマ照射した際、DMPO-OH が支配的に見られ、DMPO-H が少ないことは特徴的な現象である。また、 $\text{MgF}_2$  透過窓の有無でプラズマ光の影響を評価すると、DMPO-OH の生成に大差は認められない。しかしながら、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成量を比較すると、プラズマ照射された場合にのみ、多く検出される。少なくとも、 $\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}^\bullet$  の光解離を生じた  $\cdot\text{OH}$  が再結合反応  $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  による生成は支配的でなく、プラズマあるいはプラズマ中で生成された活性種が、溶液中で反応して合成された、酸素原子など化学種が輸送され液面反応で  $\text{H}_2\text{O}_2$  が生成することが支配的である (Fig. 8)<sup>11)</sup>。現在では、 $\cdot\text{OH}$  の再結合以外の  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成反応が支配的であり、他の活性種の挙動も含めた総合的な理解が必要になっている。

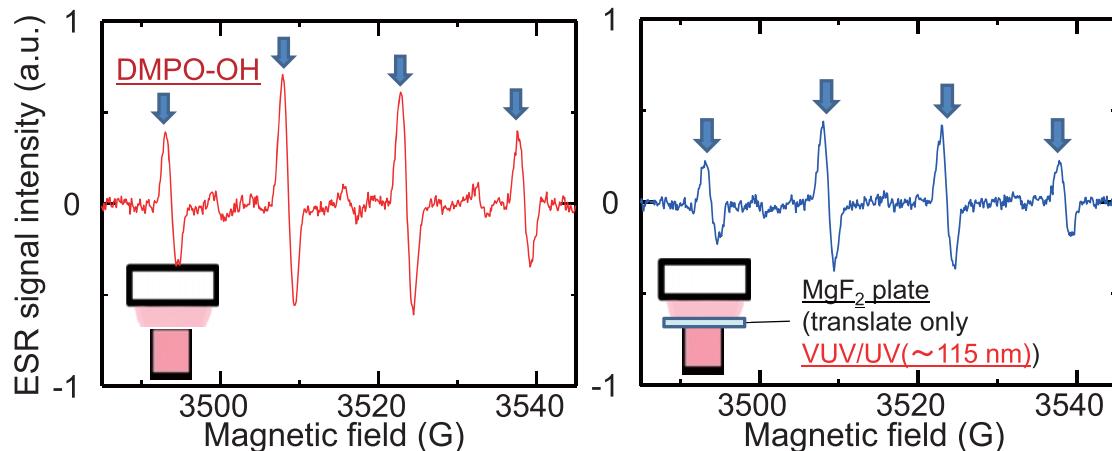


Figure 8. ESR spectra of DMPO-adducts in the water after plasma irradiation with or without VUV lights<sup>11)</sup>. IOP publishing. Reproduced with permission. All right reserved.

すなわち、プラズマ照射によって  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する機構には、 $\text{O}^{\bullet\bullet}$  原子の共存下では  $\cdot\text{OH} + \text{O}^{\bullet\bullet} \rightarrow \text{HO}_2\cdot + \text{O}_2$  から、 $\text{HO}_2\cdot + \text{H}^{\bullet} \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$  や  $\text{HO}_2\cdot + \text{O}^{\bullet\bullet} \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$  の反応が  $\cdot\text{OH}$  を生成する<sup>11,12)</sup>。 $\cdot\text{OH}$  再結合生成や光照射よりも、液面で  $\text{O}^{\bullet\bullet} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ 、や、励起状態の  $\text{O}^{\bullet\bullet}$  が関係して  $\text{O}(\text{I}\text{D}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  の反応経路が優先する。これらの一連の反応は、気相活性種の組成に依存し、プラズマ源からの距離依存性も踏まえ、プラズマ照射中の ROS の生成機構は判断されるべきである。リン酸緩衝液 (PB) とリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) へのプラズマ照射の効果では、酸素原子を主とするラジカルのみの照射結果で、 $\text{H}_2\text{O}_2$  量は  $\text{Cl}^-$  の存在で減少する。pH 緩衝下では、非常に早い反応で  $\cdot\text{OH}$  が  $\text{Cl}^- + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{HOCl}$  の生成経路を経て、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ClO}^-$  を生成する<sup>12)</sup>。 $\text{NaClO} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{OCl}^-$  は同様の効果を得られそうであるが、 $\text{HOCl}$  の生成効果にプラズマの特異性が見られる。すなわち、塩の酸解離の対イオンの存在や寿命の短い励起状態にある化学種の効果を考慮することが必要である。

プラズマの気相中では、希ガスの電離によるプラズマ解析から  $\cdot\text{NO}$  が検出される<sup>13)</sup>。 $\cdot\text{NO}$  の気相中生成は、Zeldovich 反応で知られる  $\text{N}_2 + \text{O}^{\bullet\bullet} \rightarrow \cdot\text{NO} + \text{N}^{\bullet}$  や  $\text{N}^{\bullet} + \text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{NO} + \text{O}^{\bullet\bullet}$  が主な反応経路であり、ガス温度が約 1000 K 以下では、前者の反応による  $\cdot\text{NO}$  生成は支配的である。その後、 $\cdot\text{NO} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{HNO}_2$  が生成され、液相の  $\text{NO}_2^-$  は  $\text{HNO}_2$  の溶液中解離により生成される。一方  $\cdot\text{NO}$  の水への溶解は非常に低いので、直接気相中から溶解して液中反応することは考え難く、気相と液相の境界は明確ではないが気液界面近傍

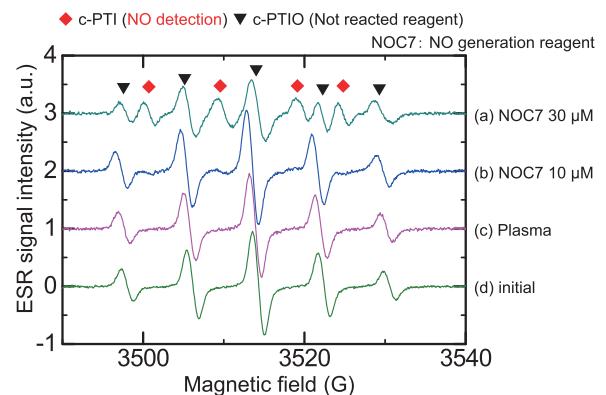


Figure 9. ESR spectra of C-PTIO and NO trapped C-PTI in the plasma irradiated cell-culture media (DMEM)<sup>11)</sup>. IOP publishing. Reproduced with permission. All right reserved.

で、むしろ  $\text{HNO}_2$  や  $\text{HNO}_3$  を形成して、液相に溶解すると考えられる。 $\text{HNO}_3$  の解離定数は  $\text{p}K_a = 1.4$  であり、 $\text{HNO}_2$  は  $\text{p}K_a = 3.38$  であるため、pH が中性では  $\text{NO}_2^-$  が主に存在し、培養液中では  $\text{NO}_3^-$  が少ないことがある。

培養液中の  $\cdot\text{NO}$  を、2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-loxyl 3-oxide (C-PTIO) によりトラップし、生成した C-PTI を観察することで検出できる (Fig. 9)。意図的に 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (NOC7 :  $\cdot\text{NO}$  発生剤の 1 種) を添加して  $\cdot\text{NO}$  を 30  $\mu\text{M}$  発生させた場合

には C-PTI が確認できるが、プラズマを照射した培地から  $\cdot\text{NO}$  は C-PTI の検出以下である (Fig. 9)<sup>11)</sup>。そのため、液相に  $\cdot\text{NO}$  単体はほとんど存在しないことがわかる。

これらのプラズマ照射細胞培養培地の観測結果から、プラズマ照射で液相に生成する活性種の中でも  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{NO}_2^-$  が重要であると考えている<sup>14)</sup>。  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{NO}_2^-$  は、pH 依存で平衡がずれることにより  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  の比も変わっていく。ただし、緩衝されている培地では、 $\text{NO}^\bullet$  と  $\text{O}_2^\bullet-$  と  $\text{ONOO}^-$  が平衡し、 $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}=\text{NOOH} + \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}=\text{NOOH} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{NO}_2$  を保っている。

これらの生成パスにおいて、光解離の  $\cdot\text{OH}$  の再結合で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する経路は無視でき、以下の気相中で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成して溶解する経路と、 $\text{O}^\bullet-$  原子から  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する経路が支配的である (Fig. 10)<sup>11)</sup>。培地には、無機イオンをはじめ、单糖 (グルコース), pH 緩衝剤 (重曹), アミノ酸, ビタミン等の 30 種以上の化合物が含まれていて、 $\cdot\text{OH}$  はこれら化合物と反応していると考えられる<sup>11)</sup>。

さらに、プラズマ発光部を照射させた場合には、荷電粒子や励起粒子が影響し、多量の  $\cdot\text{OH}$  を生成する。アルコールは  $\cdot\text{OH}$  の消去剤でもあるが、ROS の二次反応として生成するアルキルラジカルの発生、 $\text{R-OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O}$  によるメチルラジカルの発生などが観察できる<sup>15)</sup>。R をアルキルとした場合、鎖長によりメチレンラジカル ( $\cdot\text{CH}_2$ ) やメチンラジカル ( $\cdot\text{CH}$ ) が重畠して検出され、その解析から異なる比率で発生していることがわかる。これより、プラズマ活

性培養液中の反応機構を明らかにするためには、まず、液相に  $\cdot\text{OH}$  の生成が反応の起点として作用し、 $\cdot\text{OH}$  がプラズマのもたらす多様な非平衡化学反応を時間発展的に体系化させていくことが必要である。

### 3 プラズマ医療

#### 3.1 マイルドプラズマ止血

プラズマを活用した血液凝固技術は、その応用に向けて精力的に研究されている。現在、外科手術の現場では高周波凝固装置が使われる。アルゴンプラズマ凝固装置とも呼ばれ、アーク放電により高温プラズマを生成し、組織の焼灼で、毛細血管を含む間質ごと加熱する。漏出性出血は止血される。この止血方法では深部筋層まで影響は及ばないが、組織表面に炭化した熱傷層を形成し、器官組織は壊死し、炎症反応が引き起こされている。組織面の付着、癒着をもって治癒する。このような組織癒着は、痛みを伴い、二度目以降の手術で癒着剥離をしなければ患部に到達することができず、大きな問題を引き起こしている。

一方、低温プラズマを用いた場合 (マイルドプラズマとも呼ばれる) でも止血効果が見いだされた (Fig. 11)<sup>16)</sup>。組織表面の温度は、ほぼ体温であり、加熱の効果はない。当初は、プラズマによる血液凝固促進として自然凝固系で活性化する  $\text{Ca}^{2+}$  の発生や  $\cdot\text{NO}$  の効果が考えられていた。現在では、Ikehara らによって血漿ほかタンパク成分 (アルブミンなど) が、プラズマの照射部に液状血液表面に凝集して凝固した膜を形成しながら止血する機構が提唱され、止血機構として有力視

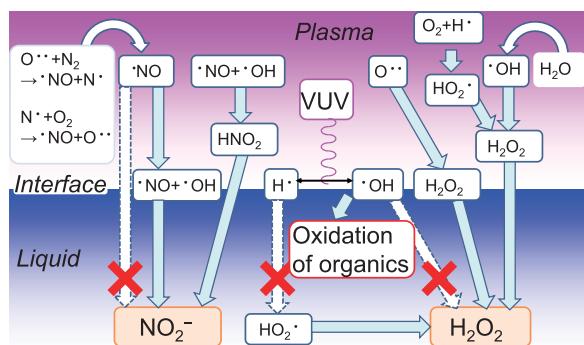


Figure 10. Dominant pathways of chemical reactions with respect to  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2^-$ <sup>11)</sup>. IOP publishing. Reproduced with permission. All right reserved.

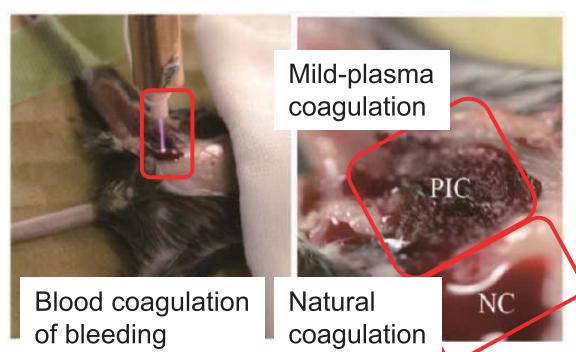


Figure 11. Blood coagulation examples using the mild plasma instrument. Reprinted with permission from Journal of Photopolymer Science and Technology<sup>16)</sup>.

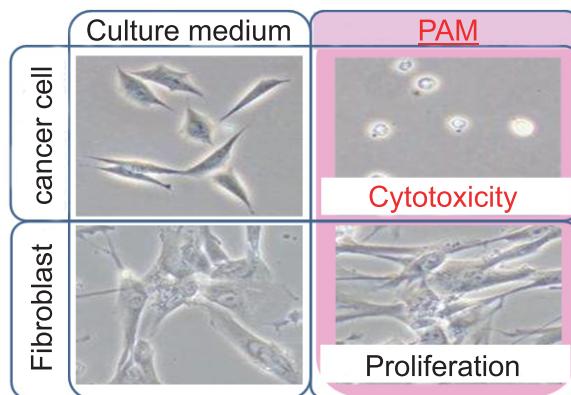


Figure 12. Selective killing of ovarian cancer cells against normal fibroblast cells<sup>1)</sup>. Reprinted from Appl. Phys. Lett., 100 (2012) 113702, with the permission of AIP Publishing.

されている<sup>17,18)</sup>。この止血機構では、膜の形成で気中酸素との接触も遮断され、酸素由来に活性化する自然凝固系誘導の炎症反応が低減し、血液溶出した創傷部位の消炎が進むため、瘢痕を残さず、組織癒着も防がれる。

### 3.2 プラズマがん治療

低温プラズマを、細胞培養するシャーレに直接照射した場合、死滅してしまう領域と死滅しない領域があることが知られていた。接着細胞でありながら、浮遊してしまうことで死滅に至ることから、プラズマによって細胞外マトリクスが破壊することが原因と考えられていた。一方、死滅した細胞がアポトーシスで死滅しているという実験結果も報告されていた (Fig. 12)<sup>1)</sup>。プラズマの細胞死への影響を調べて行く上で、細胞を導入していない培養液のみにプラズマを照射し、その培養液を細胞に与えた場合でも、がん細胞に選択性の死滅効果が発現することが、名古屋大学より報告された。この効果は、照射後 8 時間程度放置した培養溶液でも発現するが、それ以上、放置した培養液では、効果の発現が観察されないという結果が示された。すなわち、プラズマ照射した培養液の抗腫瘍効果が持続し、8 時間以上経つと自然と抗腫瘍効果が無力化することが明らかになった<sup>2)</sup>。

さらに、名古屋大学では、プラズマ照射した液体を PAM と名付けて、ヒト卵巣がん (NOS2) を播種したマウスに皮下注射で 28 日間の間欠投与をおこない、腫瘍量の経時変化を調べた (Fig. 13)<sup>3)</sup>。その結果、プラ

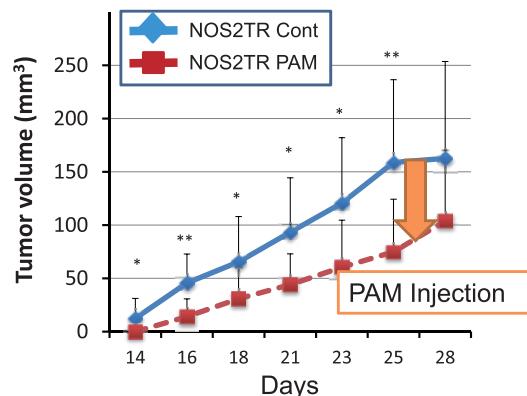
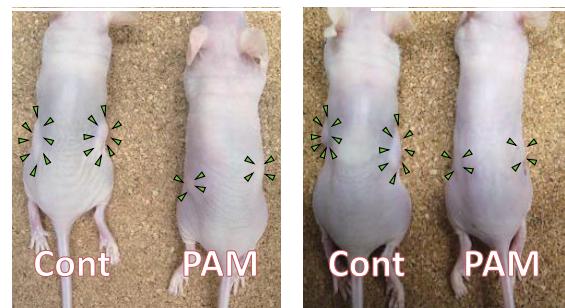


Figure 13. Inhibition of tumor growth by the subcutaneous injection of PAM in mice of xenograft model with parental (NOS2) or chemoresistant cells (NOS2TR)<sup>3)</sup>.

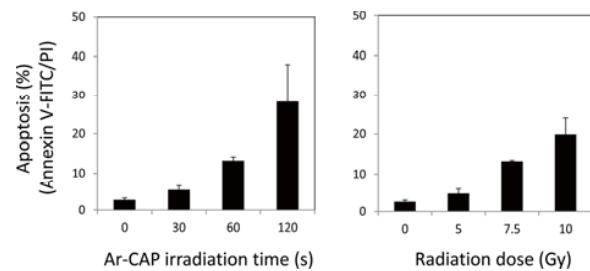


Figure 14. Apoptotic cell death induction after the plasma irradiation compared with the X-ray radiation<sup>15)</sup>.

ズマ照射しない液体投与群に対して有意に腫瘍容積が小さくなっていた。また、細胞株には抗がん剤投与後に耐性を獲得した細胞 (NOS2TR) にも同様の効果があることが示された (Fig. 13)<sup>3)</sup>。このことは、卵巣がんの外科手術摘出後に投与される抗がん剤の耐性株にも効く可能性を示しており、再発・転移の防止に効果をもつ意味で注目に値する。今後、PAM は、がん細胞

へ特異的に作用するので腹腔内への注射などによる臨床適用される可能性も高い。

一般に、プラズマ照射した溶液には、同一生物効果比較で放射線の約 200 倍とも換算される ROS が発生している (Fig. 14)<sup>15)</sup>。これらの結果から、プラズマ照射は、生体組織へのフリーラジカル生成を人為的に制御して、酸化ストレスを細胞に与えられる新たな技術となりうることを示唆している。

4 プラズマ農業

#### 4.1 腐敗菌や酵素のプラズマ不活性化

青果物の鮮度維持を向上するために、青果物に発生するカビの不活性化が挙げられる。ミドリカビがプラズマで生成した酸素原子の照射で不活性化することが報告されている<sup>19)</sup>。ミドリカビは学名 *Penicillium digitatum* と呼ばれ、温州ミカンに播種し繁殖して腐敗をおこす。この不活性化の作用機序として、カビの胞子に対して、物理的に膜の破壊を起こすのか、化学的に細胞膜などが酸化により障害を受けるのか、生体

内の細胞内に致命的な影響を与えるのかが考えられるが、十二分に解明がなされていなかった。プラズマから生成した酸素原子のみを照射して不活性化した胞子の細胞には、胞子壁に物理的な損傷が見られずに細胞内オルガネラが酸化的崩壊していることが顕微鏡で観察された<sup>20)</sup>。この酸化過程は、胞子内部に存在するフ

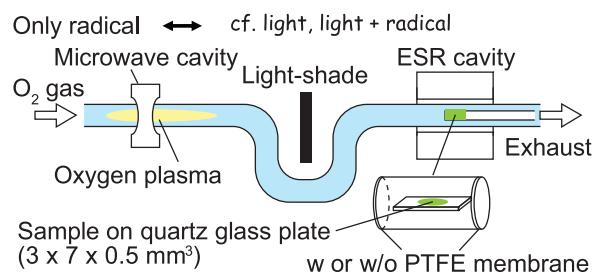


Figure 15. Setup of *in situ* electron spin resonance (ESR) at real time<sup>21</sup>). Reprinted from Appl. Phys. Lett., 101 (2012) 013704, with the permission of AIP Publishing.

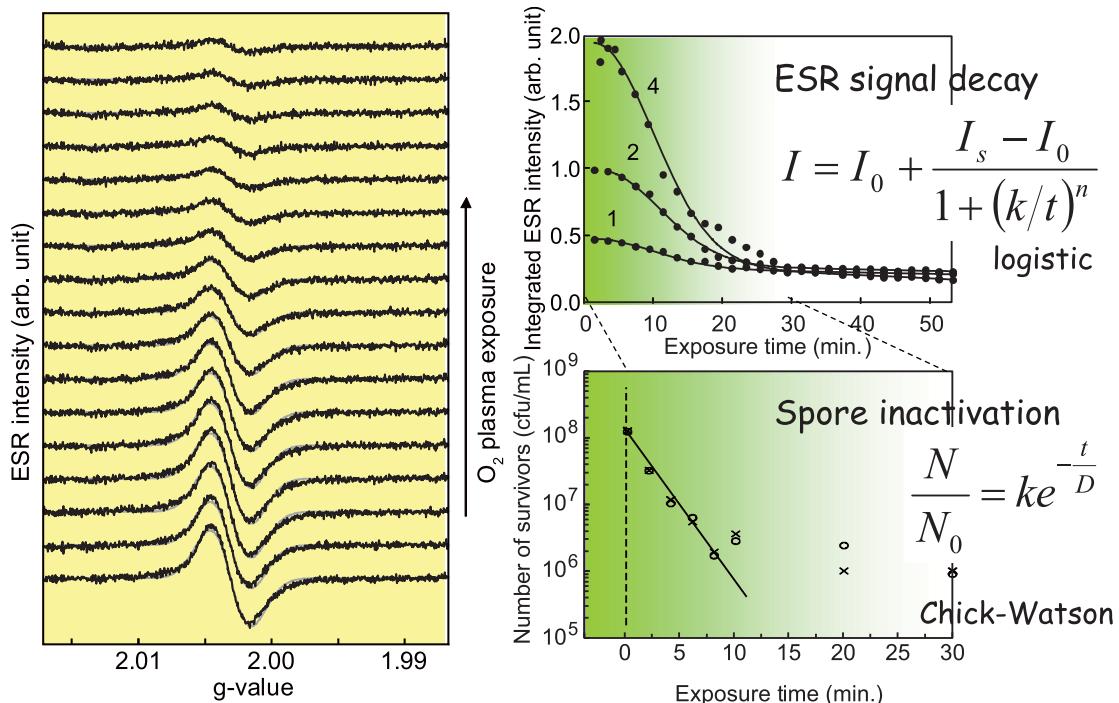


Figure 16. (Left) A series of ESR spectra of *Penicillium digitatum* spores during oxygen plasma discharges. (Right) A dependence of ESR intensities (top) and spore inactivation (bottom) on the irradiation time<sup>21</sup>. Reprinted from Appl. Phys. Lett., 101 (2012) 013704, with the permission of AIP Publishing.

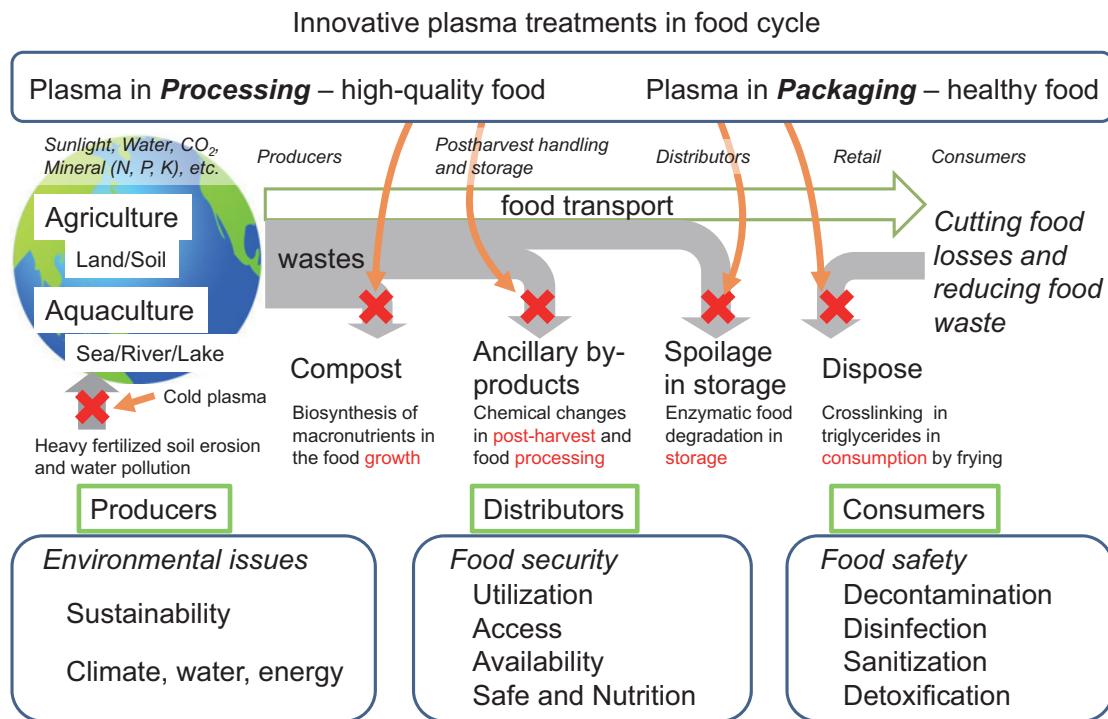


Figure 17. Innovative plasma application targets in the human food cycle, from farmers to customers, for cutting food losses and reducing food waste<sup>23)</sup>.

リーラジカルの挙動と関係がある。プラズマ照射下のミドリカビをその場観察可能なESR法（リアルタイムESR法）によって調べた（Fig. 15）<sup>21)</sup>。胞子は、休眠状態で濃い緑色を呈しており、発芽能力を有している。この胞子から、セミキノン様のラジカル信号（Q<sup>•</sup>）が検出された（Fig. 16 left）<sup>21)</sup>。キノンは電子伝達系を担う分子であり、酸化状態の分子の還元に有用である。

次に、胞子に対してプラズマで生成した酸素原子（O(<sup>3</sup>P)）を照射していくと、Q<sup>•</sup>信号は次第に弱くなり、過酸化ラジカル信号だけが残るように変化した。元のQ<sup>•</sup>信号の低下は、胞子の不活性化と関連している（Fig. 16 right）<sup>21)</sup>。つまり、休眠状態の胞子は、酸化ストレス抗力としてQ<sup>•</sup>の消去能による防御機構が作動している。プラズマから発生した酸素原子により、胞子細胞には酸化ストレスが過剰に及ぼされ、胞子壁を通して、細胞内分子に化学的な損傷が生じたと考えられている。

他にも、プラズマの発する紫外線がDNA傷害を与えて、不活性化する機構など、青果物の鮮度維持について多くの報告がある。しかしながら、もしDNA傷害がある場合には、それをヒトが摂取して、安全が確保される否かは今のところ分かっていない。そのため

めにも、殺菌の作用機序については解明が望まれる。

市場で売られる野菜、果物などはビニール袋に入れられているが、この袋に外部から電界を与え、袋の内部にプラズマを発生させることで、殺菌処理を施す方法も開発されてきている<sup>22)</sup>。薬剤に頼らない殺菌方法であることから魅力的である。食物の腐敗の原因は、微生物が汚染して毒素となる場合もあれば、自然と変敗が進んでいく場合もある。また、うまく酵素が働きタンパク質がアミノ酸に分解されれば「熟成」ともなり得る。プラズマの制御によって、このような生物が有する機能を制御、あるいは強化することができれば、プラズマの食品への新たなイノベーションをもたらすことが期待できる（Fig. 17）<sup>23)</sup>。

#### 4.2 成長促進

プラズマの農業応用については、静電気の利用にまで遡ると、18世紀には低木に電流を流して生長・開花や電極上に種子を置き発芽・生育の促進がみられたとの報告がある<sup>24)</sup>。最近では岩手大学・Takakiらが、主として電界を生物に応用することで興味深い成果を多く報告している。例えば、電気処理によって、担子菌（きのこなど）で子実体形成の促進、また種子や

液肥、培地の雑菌不活性化に効果的な結果が得られている<sup>25)</sup>。プラズマが、植物の生長を促進するという多くの報告がなされる状況で、その機構は未解明のままである。プラズマ農業を推進する上で、プラズマが誘起する植物等への機構の解明が重要な課題となっている。

プラズマから生体には、主として、酸化ストレスで刺激が与えられる。既に、放射線医学においては、低線量での生物応答に対してホルミシスという言葉がある。薬物投与に対しても用量に対する生体反応は薬理作用と致死作用を有し、いずれもロジスティックやシグモイド曲線となる。低用量では無作用であり、抗体が抗原に反応すれば、薬効が得られる。抗原への効果が間接的に作用する場合には薬理作用にも限界が見られる。同様に、酸化ストレスを用量として見た時に、低い場合には細胞が順応するので、生長促進という形で顕れる可能性がある。しかしながら、この点に関しては科学的な根拠を積み上げが必要である。

プラズマの医療や農業への応用は、古くから信頼性の乏しい報告があったが、この10年間で爆発的に研究論文が急伸し、新たな科学領域を創成するところまでの基盤が構築されようとしている。本分野は、プラズマ、物理、化学、医学、農水産学、薬学などとの融合分野であるとともに、放射線化学との対比を進めることで、両分野のさらなる発展と融合に繋がることが期待されている。本稿では、紙面の都合上、応用分野を全て網羅して紹介することはできなかつたが、魚類や土壤の改良など、様々な分野で興味深い報告がなされている。

## 5 まとめ

プラズマの農業や医療への最新の応用とその現象への科学的な解明へのアプローチについて研究成果を紹介した。特に、プラズマ医療の成果については、文部科学省新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」(平成24年から28年度)において、組織的に研究が遂行され、我が国が、本分野で世界を先導するまでに至っている。また、多様な分野の研究者が、研究を推進できるプラズマ科学プラットフォームが構築されている。今後は、プラズマが誘起する生体との相互作用の解明とその体系化を進めることにより、プラズマ生命科学という学術領域が構築されることを期待している。

## 〈謝 辞〉

本原稿をまとめるにあたり、文部科学省新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」、名城大学プラズマバイオ科学研究所センター、名古屋大学工学研究科および医学系研究科のメンバーならびに多数の関係者の方々に感謝の意を表します。本研究の一部は、文部科学省科学研究費新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」の助成を受けたものです。

## 〈参考文献〉

- 1) S. Iseki, K. Nakamura, M. Hayashi, H. Tanaka, H. Kondo, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, M. Hori, *Appl. Phys. Lett.*, 100 (2012) 113702.
- 2) H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, M. Hori, *Plasma Med.*, 3 (2011) 265.
- 3) F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano, M. Hori, F. Kikkawa, *PLoS ONE*, 6 (2014) e81576.
- 4) H. Tanaka, K. Ishikawa, M. Mizuno, S. Toyokuni, H. Kajiyama, F. Kikkawa, H.-R. Metelmann, M. Hori, *Rev. Mod. Plasma Phys.*, 1 (2017) 3.
- 5) A. Schultz, J. Y. Jeong, S. E. Babayan, J. Park, G. S. Selwyn, R. F. Hicks, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 26 (1998) 1685.
- 6) K. Ishikawa, T. Kondo, K. Takeda, J.-S. Oh, H. Tanaka, H. Hashizume, H. Kondo, T. Ohta, M. Ito, M. Sekine, M. Hori, *J. Plasma Fusion Res.*, 93 (2016) 246.
- 7) S. Ikawa, K. Kitano, S. Hamaguchi, *Plasma Process Polym.*, 7 (2010) 33.
- 8) T. Shimizu, Y. Iwafuchi, G. E. Morfill, T. Sato, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 24 (2011) 421.
- 9) T. Sato, M. Yokoyama, K. Johkura, *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 44 (2011) 372001.
- 10) NIST solution database  
(<http://kinetics.nist.gov/solution/>  
last accessed on Sep. 8, 2017).
- 11) N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, M. Hori, *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 50 (2017) 155202.
- 12) T. Kobayashi, N. Iwata, J.-S. Oh, H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 50 (2017) 155208.

- 13) K. Takeda, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine, M. Hori, *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 50 (2017) 195202.
- 14) N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, M. Hori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 605 (2016) 102.
- 15) H. Uchiyama, Q.-L. Zhao, M. A. Hassan, G. Andocs, N. Nojima, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, T. Kondo, *PLoS One*, 10 (2015) e136956.
- 16) Y. Ikehara, H. Sakakita, N. Shimizu, S. Ikehara, H. Nakanishi, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 26 (2013) 555.
- 17) K. Miyamoto, S. Ikehara, H. Takei, Y. Akimoto, H. Sakakita, K. Ishikawa, M. Ueda, J. Ikeda, M. Yamagishi, J. Kim, T. Yamaguchi, H. Nakanishi, N. Shimizu, M. Hori, Y. Ikehara, *Arch. Biochem. Biophys.*, 605 (2016) 95.
- 18) S. Ikehara, H. Sakakita, K. Ishikawa, Y. Akimoto, T. Yamaguchi, M. Yamagishi, J. Kim, M. Ueda, J. Ikeda, H. Nakanishi, N. Shimizu, M. Hori, Y. Ikehara, *Plasma Process. Polym.*, 12 (2015) 1348.
- 19) S. Iseki, H. Hashizume, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, T. Ohta, M. Ito, M. Hori, *Appl. Phys. Express*, 4 (2011) 116201.
- 20) H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, M. Ito, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 54 (2015) 01AG05
- 21) K. Ishikawa, H. Moriyama, H. Tanaka, K. Tamiya, H. Hashizume, T. Ohta, M. Ito, S. Iseki, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, M. Hori, *Appl. Phys. Lett.*, 101 (2012) 013704.
- 22) N. Misra, B. K. Tiwari, K. S. M. S. Raghavarao, P. J. Cullen, *Food Eng. Rev.*, 3 (2011) 159.
- 23) M. Hori B. A. Niemira, “8. Plasma agriculture and innovative food cycles”, in *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 50 (2017) 323001.
- 24) T. Shigemitsu, *J. Plasma Fusion Res.*, 75, 659 (1999).
- 25) K. Takaki, N. Yamazaki, S. Mukaigawa, T. Fujiwara, H. Kofujita, K. Takahasi, M. Narimatsu, K. Nagame, *J. Plasma Fusion Res.*, 8 (2009) 556.

### 〈著者略歴〉

堀 勝：昭和 61 年 3 月 名古屋大学大学院工学研究科博士課程後期課程電子工学専攻修了，工学博士（名古屋大学）。昭和 61 年 4 月（株）東芝総合研究所超 LSI 研究所。平成 4 年 4 月 名古屋大学 助手（工学部），平成 6 年 4 月 名古屋大学 講師（工学部）。平成 8 年 7 月 名古屋大学 助教授（工学部）。平成 9 年 8 月–12 月 英国ケンブリッジ大学キャベンディッシュ研究所客員研究員。平成 16 年 4 月–名古屋大学 教授（工学研究科）。平成 21 年 4 月–平成 25 年 3 月 名古屋大学大学院工学研究科附属プラズマナノ工学研究センター長。平成 23 年 11 月–NU-SKKU 先進プラズマナノ材料研究所長（韓国）。平成 25 年 8 月–名古屋大学プラズマ医療科学国際イノベーションセンター長。平成 26 年 4 月–名古屋大学未来社会創造機構教授。