

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	マルチガス温度制御プラズマ装置の開発と医療分野への応用に関する基礎研究
Title(English)	
著者(和文)	川野浩明
Author(English)	Hiroaki Kawano
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10854号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:沖野 晃俊,岡村 哲至,奥野 喜裕,佐藤 千明,松本 義久,岩澤 篤郎
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10854号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

# 目次

第1章 序論.....	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 プラズマとは.....	2
1.3 大気圧プラズマ.....	3
1.3.1 大気圧熱プラズマ.....	4
1.3.2 大気圧低温プラズマ.....	5
1.4 本論文の目的.....	6
1.5 本論文の構成.....	7
第2章 大気圧低温プラズマの医療応用の現状.....	9
2.1 はじめに.....	9
2.2 大気圧低温プラズマによる殺菌技術.....	9
2.2.1 従来の殺菌法.....	9
2.2.2 プラズマを用いた滅菌装置.....	11
2.2.3 プラズマの直接照射による殺菌.....	12
2.2.4 プラズマ処理水による殺菌.....	13
2.3 がん治療への応用.....	14
2.4 止血への応用.....	15
2.4.1 大気圧熱プラズマによる止血.....	15
2.4.2 大気圧低温プラズマによる止血.....	16
2.5 創傷治療への応用.....	17
2.6 医療用プラズマ装置への要求.....	19
2.7 まとめ.....	19
第3章 プラズマのガス温度が殺菌効果に与える影響.....	20
3.1 はじめに.....	20
3.2 プラズマの温度.....	20

3.3	温度制御プラズマ装置.....	22
3.3.1	一般的なプラズマのガス温度の制御方法.....	22
3.3.2	温度制御プラズマ装置におけるプラズマガス温度の制御方法 <sup>[22]</sup> .....	22
3.3.3	本研究で用いた温度制御プラズマ装置.....	23
3.4	プラズマのパラメータのプラズマガス温度依存性.....	26
3.4.1	先行研究で調査された温度制御プラズマ装置の特性 <sup>[31]</sup> .....	26
3.4.2	本研究で調査した温度制御プラズマ装置の特性.....	32
3.5	プラズマのガス温度が殺菌効果に与える影響.....	34
3.5.1	先行研究で行われた殺菌効果へのガス温度の影響調査.....	35
3.5.2	液中の細菌に対する殺菌効果の定量評価方法.....	36
3.5.3	液中の細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性.....	37
3.5.4	プラズマの熱が殺菌効果に与える影響.....	41
3.5.5	ガス流速が殺菌効果に与える影響.....	43
3.6	プラズマガス温度が液中の活性種量に与える影響.....	45
3.6.1	液中の活性種の定量方法.....	47
3.6.2	液中の活性種量のプラズマガス温度依存性.....	55
3.7	活性種生成量と殺菌実験の結果の比較.....	56
3.8	活性種消去剤を用いた殺菌要因の調査.....	59
3.8.1	消去剤の活性種消去能の調査.....	60
3.8.2	活性種消去剤が殺菌効果に与える影響.....	62
3.9	まとめ.....	64
第4章	マルチガスプラズマバブリングによる液中殺菌.....	66
4.1	はじめに.....	66
4.2	マルチガスプラズマバブリング装置.....	66
4.2.1	マルチガスプラズマジェット.....	66
4.2.2	マルチガスプラズマジェットの基礎特性.....	68
4.2.3	マルチガスプラズマバブリング装置の構造.....	73
4.3	各種ガスプラズマバブリングによる殺菌効果.....	75
4.3.1	各種溶媒中の大腸菌に対する殺菌効果.....	76
4.3.2	塩化ナトリウムの濃度が殺菌効果に与える影響.....	78
4.3.3	精製水中の各種細菌に対する殺菌効果.....	79

4.3.4	プラズマの導入距離が殺菌効果に与える影響 .....	80
4.4	各種ガスのプラズマバブル水による殺菌効果 .....	82
4.5	各ガス種のプラズマによって液中に導入される活性種の調査.....	85
4.5.1	スピントラッピング法による活性種測定.....	85
4.5.2	吸光光度法による活性種測定 .....	87
4.6	標準試薬による殺菌効果.....	91
4.7	各ガス種のプラズマの殺菌要因の考察 .....	92
4.8	二酸化炭素プラズマの殺菌要因の調査 .....	92
4.8.1	バブリング時の二酸化炭素プラズマの発光スペクトル .....	93
4.8.2	初期菌数および接触時間が殺菌効果に与える影響 .....	94
4.8.3	殺菌効果に pH が与える影響 .....	97
4.8.4	二酸化炭素プラズマバブル水の静置時間と殺菌効果 .....	97
4.8.5	二酸化炭素プラズマバブル水の吸光スペクトル.....	98
4.9	まとめ.....	100
第 5 章	マルチガス温度制御プラズマ装置の開発と医療および生命科学分野への応用 .....	101
5.1	はじめに.....	101
5.2	マルチガス温度制御プラズマ装置の開発 .....	102
5.2.1	マルチガス温度制御プラズマ装置の設計および製作 .....	104
5.2.2	マルチガス温度制御プラズマ装置の基礎特性 .....	107
5.2.3	温度制御された各ガス種のプラズマによる殺菌効果 .....	111
5.3	超音波併用プラズマバブリングの眼科用器具への応用 .....	114
5.3.1	眼科分野における標準菌株に対するプラズマの殺菌効果 .....	115
5.3.2	付着菌に対するプラズマバブリングの殺菌効果.....	117
5.3.3	プラズマバブリングと超音波の併用による殺菌効果の検証.....	119
5.3.4	眼科用器具付着菌に対する殺菌効果.....	120
5.3.5	プラズマバブリングが眼科用器具に与える影響 .....	123
5.4	内視鏡的止血術用マルチガスプラズマジェットの開発 .....	125
5.4.1	血液凝固機構 <sup>[99]</sup> .....	126
5.4.2	血液凝固効果のガス種依存性.....	128
5.4.3	加熱用プラズマ装置を用いた血液凝固効果のガス温度依存性.....	129
5.4.4	内視鏡手術用マルチガスプラズマジェット設計および製作.....	130

5.4.5	内視鏡用プラズマジェットの基本特性 .....	131
5.4.6	内視鏡用プラズマジェットによる止血効果 .....	139
5.5	植物細胞中への高分子の導入 <sup>[112]</sup> .....	149
5.5.1	各ガス種のプラズマによるタンパク質の導入 .....	149
5.5.2	細胞内に導入されたタンパク質の定量解析 .....	151
5.5.3	異なる植物細胞および組織に対するタンパク質の導入 .....	153
5.5.4	タバコ葉の細胞への DNA の導入 .....	155
5.6	まとめ .....	156
第 6 章 結論 .....		159
6.1	総括 .....	159
6.2	今後の展望 .....	163
謝辞 .....		164
参考文献 .....		170

# 第1章

## 序論

### 1.1 はじめに

心頭滅却すれば火もまた涼し、という言葉がある。これは、大辞林によると、“1582年甲斐国の恵林寺が織田信長に焼き打ちされた際、住僧快川がこの偈を発して焼死したという話”に由来しており、“無念無想の境地にあれば、どんな苦痛も苦痛と感ぜない”という意味で発せられたとされる<sup>[1]</sup>。今では強い心持ちを持ってすれば何事も耐えたり、乗り越えたりできるという意味のことわざとして使われている。マラソンではこの言葉の意味を体感することができる。20 km を越える行程の場合、実力に見合ったペースをスタートからゴールまで維持できたときにベストタイムが出せる、という持論がある。しかし、マラソンにおいてはペースを維持する、ということが最も辛く、難しい。そのため、心を無にし、余計な事は考えず、ただ時間に気を配りながら走ることでペースを維持する。最終的にはどれだけ長い時間苦痛に耐え、心を無にしていられるか、というメンタルが試される。この苦行を乗り越え、ゴールに到達したときに大きな達成感が得られるのが、マラソンの醍醐味である。ただし、70 km のウルトラマラソンでは、もはやペース云々ではなく、時間内にゴールまで到達したいか否かの気力勝負であった。このように、心頭滅却すれば火もまた涼し、という言葉の意味は400年以上経った現代でも十分に伝わり、理解されるものである。

実際に、人は気力次第で病気にすら打ち勝つことができる。プラシーボ効果というものがあるが、これは医学分野でも認められている反応で、日本語では偽薬効果という。患者によく効く薬だと言ってブドウ糖の粉、すなわち本物の薬のような粉を与えると、症状が改善されたという結果が多数報告されている<sup>[2]</sup>。プラシーボ (Placebo) の語源はラテン語の “I shall please” という言葉であり、その真の意味は、患者を満足させる、または心理的効果を期待して与えられる活性を持たない物質とされる<sup>[3]</sup>。つまり人は、気持ち次第で病を克服できる能力を秘めている。

プラシーボ効果に似たもので、怪我をした際に傷口に唾を付けておく、という民間療法がある。これは傷口を唾液できれいにする、唾液には傷を治す効果がある、という発想から来ているものと思われるが、これらに関しては全くの誤りである。ヒトは細菌と共生することで健康を維持しており、ヒトの腸内には1.5 kgもの細菌が存在しているとされる<sup>[4]</sup>。ヒトの口腔内にも400種以上の細菌が存在する。これは、口腔内は水分が多く、栄養が豊富であり、細菌が育成されやすい環境にあるためである。傷口もこれと同様の環境である。このため、傷口に唾を付けることによって、土などの汚れは除去することができるが、多くの細菌を水分と栄養が豊富な傷口で育成することと

なり、最悪の場合は化膿する。

プラシーボ効果とは逆の効果で、悲嘆すると通常より白血球の数が減少するという結果がある<sup>[2]</sup>。この結果は、人の心理状態が身体の免疫機能に影響を与えることを示しており、治したい気持ちが強ければ傷口の細菌に対する免疫力が高くなる可能性はある。しかし、細菌の増えるスピードは凄まじく、化膿の原因となる緑膿菌に関しては、人肌のように温かく、栄養が豊富な状況であると1日で1000倍以上に増加する。さらに、唾を付ける程度の小さな傷口を治したいという気持ちを強く持ち続けることは容易ではない。したがって、傷口の消毒には、プラシーボ効果は期待できない。外来の細菌による化膿のリスクを抑えるため、傷口は殺菌してから絆創膏等で覆うことが望ましいが、傷口に適用でき、かつ薬剤耐性の高い細菌に有効な殺菌手法はない。そのため、きれいな流水でしっかりと汚れを落とし、滅菌されたガーゼや絆創膏等で細菌の侵入を防ぐほかない。

一般的に、様々な対象に適用でき、確実な殺菌手法としては、熱による殺菌法がある。家庭でも行える殺菌手法にはアルコール消毒などがあるが、これは十分な殺菌手法とは言えないため、たとえばピンセットやまな板などの耐熱性が高いものは火でよく炙ることや熱湯をかけることが推奨される。医療機関においては、圧力鍋のような容器に器具を入れ、高压高温の蒸気で滅菌を行う。しかし、たとえ心頭滅却して心では涼しく感じようとも、皮膚の細胞にとって火や熱湯の持つ熱量はとても耐えられるものではないため、傷口を炙る事とはできないし、熱湯や高压高温の蒸気にもさらす事もできない。このため、熱に弱い人肌にも適用でき、高い殺菌効果を示す殺菌手法の開発が望まれる。

近年では、生体に直接照射可能なプラズマによる薬剤耐性の高い細菌の殺菌や止血などの研究が世界各地で活発に行われている。さらには、プラズマによるがん細胞の選択的殺傷、創傷治療といった、にわかに信じがたいような結果も報告され、注目を集めている。

## 1.2 プラズマとは

プラズマをイメージしやすい例としては雷が挙げられる。雲の中の氷の粒などが摩擦により電離し、雲が静電気を帯び、雲の地表側には地表が正に帯電しているため負の電荷が引きつけられ、雲と地表との間の電圧が大気の絶縁破壊電圧以上になった際に雷が発生する。ひとたび絶縁破壊が起これば、秒という一瞬のうちに数千から数十万 A の電流が地上に向かって流れる。なお、人に 0.1 A の電流が流れると死に至るとされている<sup>[5]</sup>。

このようにプラズマには、炎のように我慢すれば一瞬触ることができるというものだけではなく、触れた瞬間に大火傷や感電する危険なものもある。しかし、プラズマをうまく制御することができれば、いつでも温かいお風呂を沸かしてくれる炎のように、我々の生活を豊かにしてくれる。気

付られないことが多いが、プラズマは私達の身の回りでも利用されており、私達の生活に欠かせない存在となっている。

自然界には雷の他にオーロラなど多くのプラズマが存在し、我々の身の回りでは蛍光灯やネオンサイン、プラズマディスプレイ、空気清浄、プラズマ溶接など、人工的なプラズマが広く利用されている。これらはプラズマが持つ発光性や反応性、高温などを応用した技術である。プラズマとは、固体、液体、気体に続く物質の第4の状態であり、一般的には気体を構成する分子または原子が電離した状態のことを指す<sup>[6], [7]</sup>。たとえば、水は 0°C以下では氷であるが、温度が高くなるにつれて水、水蒸気と状態が変化する。これらはそれぞれ固体、液体、気体状態と呼ばれ、いずれも水分子 (H<sub>2</sub>O) の状態として存在する。しかし、さらに高温になると水分子が解離しはじめ、H<sup>+</sup>、OH<sup>-</sup>などのイオンや電子を含む気体となる。この状態をプラズマ状態と呼ぶ。

プラズマ状態を実現するためには、原理的には、電界、光、熱、衝撃波などの、高いエネルギーを微小な空間に集中させればよいが、工業的には気体中に強い電界を印加し、絶縁破壊を生じさせる場合が多い。大気圧下では、絶縁破壊電圧が高く、プラズマ状態を得ることが難しいため、従来はガラスや金属の容器内を低気圧に保ち、その中でプラズマを発生させてきた。その代表例がプラズマプロセッシングやプラズマディスプレイ、放電ランプなどである。たとえば放電ランプの一種である蛍光灯では、管内の気圧を 1/500 atm 程度に下げ、管の両端に電圧を印加することでプラズマを発生させる。プラズマ中の励起原子が基底準位に戻るときに発する紫外光を、管内壁に塗布した蛍光物質で可視光線に変換し、照明光として利用する。また、プラズマは表面処理など産業にも広く使われている。この場合、容器内にプラズマ処理を施す対象物を入れ、減圧ポンプで容器内を低気圧にする。その後、プラズマを生成して表面を処理し、気圧を大気圧まで戻して、容器から取り出す、という工程が必要となる。いずれのプラズマも、容器内を低気圧にすることから、低気圧プラズマと呼ばれている。

### 1.3 大気圧プラズマ

低気圧プラズマに対し、今世紀初めごろから大気圧下で生成するプラズマが注目されている<sup>[8], [9]</sup>。大気圧プラズマは、気圧の調整に必要な真空容器や排気設備が不要なため、対象物にプラズマを照射するだけで処理が完了する。これにより、真空容器に入れることができない航空機などの大型建造物や、大気中での呼吸を必須とする生物へのプラズマ照射の道が一気に開けた。さらに、大気圧プラズマは大気圧下でプラズマを生成するため、高密度なプラズマを生成できる。大気圧プラズマは、原子と電子が持つ熱の平衡状態によって、大気圧熱プラズマと大気圧低温プラズマに大別される。本節では、それぞれの大気圧プラズマの特徴および代表的な生成方法を記述する。

### 1.3.1 大気圧熱プラズマ

プラズマは電子やイオン、中性粒子を含み、その一部または全体が電離した粒子の集団である。電界によって加速された電子やイオンが中性粒子に衝突し、エネルギーを与えることで中性粒子が電離してプラズマ状態となる。大気圧下においては、気相中に存在する中性粒子の数密度が高く、拡散が小さいため、これらの粒子同士の衝突が頻繁に繰り返される。それにより、プラズマ中の電子の温度と、中性粒子の温度、イオンの温度(ガス温度)が等しい熱平衡状態になったプラズマを熱プラズマ(熱平衡プラズマ)といい、そのガス温度は数千 K から数万 K になる。大気開放下で生成される熱プラズマはその生成部からジェット状に噴出され、周囲への熱放射を起こす。それにより、大気圧熱プラズマのプラズマジェットでは、プラズマの中心が最も温度が高く、その周りは徐々に温度が下がる温度分布となるため、プラズマ全体が等しい熱平衡とはみなされず、それぞれの領域において温度が等しい局所的熱平衡として取り扱われる。

熱プラズマの大きな特徴としては、電子やイオン、原子の全てが高温なことが挙げられる。さらに、大気圧下で生成した大気圧熱プラズマはエネルギー密度が高いため、熱源として使われることが多く、たとえばアーク溶接や廃棄物処理に用いられる<sup>[10], [11]</sup>。さらに、熱プラズマ中では多くのイオンやラジカルが生成されるため、化学反応性も高く、古くから薄膜や厚膜の合成が行われている。近年では、ナノ粒子やナノチューブなどの合成にも応用されている<sup>[12]-[14]</sup>。

大気圧熱プラズマの生成方法は電極放電と無電極放電の 2 種類に大別される。電極放電では、放電が起こりにくい大気圧下においても、高電圧または高周波電圧を電極間に印加することによって比較的容易にプラズマを安定に生成できる。アーク放電などの直流放電プラズマや容量結合プラズマが代表的な電極放電として知られている<sup>[15]</sup>。このうちアーク放電は、グロー放電の 1,000 倍程度の電流密度を持ち、外見上は火花や雷のような、明るく細い放電となる。しかし、電極放電はプラズマと電極が直接接触するため、プラズマ中に電極材料が混入して予期せぬ二次生成物の発生やデブリが後工程への悪影響を引き起こす可能性がある。一方、無電極放電はプラズマと電極が接触しないため、電極材料のデブリの心配はない。さらに、電極が劣化しにくいいため、メンテナンスフリーでの連続運転が可能である。代表的な無電極放電としては、誘導結合プラズマ (ICP: Inductively Coupled Plasma) やマイクロ波誘導プラズマが知られている<sup>[16]</sup>。ICP では、ガラス管などの誘電体の周囲にコイルを巻いて高周波電圧を印加すると、誘電体内の電子が誘導電場によって加速され、衝突を繰り返すことでプラズマが生成される。この場合、プラズマは電極や誘電体と接触しないため、原料ガス以外が混入していない極めて高純度のプラズマが生成でき、発光分析や質量分析など化学分析の分野で広く用いられている<sup>[17]</sup>。

### 1.3.2 大気圧低温プラズマ

ここ十数年のプラズマ生成技術の進歩に伴い、大気圧下で、室温～100℃程度の、従来のプラズマと比べて低温で安定したプラズマの生成が可能になった<sup>[18]</sup>。この低温のプラズマは大気圧低温プラズマと呼ばれる。大気圧低温プラズマでは、プラズマ中の電子の温度と、中性粒子の温度、イオンの温度(ガス温度)が異なる、非平衡状態になっている。このため、大気圧非平衡プラズマとも呼ばれる。

大気圧低温プラズマの代表的な生成方法には、誘電体バリア放電(DBD: Dielectric Barrier Discharge)がある。基本構造は図 1-1 に示すような平行平板型であり、誘電体で覆われた 2 枚の電極板の間に空間を作り、電極板間に交流の高電圧を印加する事で、誘電体の間に均一なプラズマが生成される。電極の間に誘電体が存在する事で、電極間での放電がアーク放電に移行できなくなるため、ナノ秒オーダーの極めて短い時間の放電が間欠的に発生する。放電時間が短くなる事で、軽い電子は加速されるが、重いイオンや気体分子は十分に加速されないため、ガス温度はあまり上昇しない。よって、電子のみが加速されることで、気体中の原子や分子が電離し、反応性の高いイオンや活性種が生成される。このため、DBD では、低温で高い反応性を持つプラズマを容易に生成できる。DBD プラズマ装置は、熱で分解してしまうオゾンの発生器や、熱に弱い材料の表面処理、殺菌処理などに広く応用されている<sup>[19]-[21]</sup>。

さらに、電極を同軸円筒に配置することでも DBD プラズマを生成できる。図 1-2 にガラス管の上に電極を配置するジェット型の DBD プラズマ装置の概念図を示す。これはジェット型の DBD プラズマ装置の一例であるが、一对の電極をガラスなどの誘電体の管の同軸円筒上に配置し、内部にヘリウムやアルゴンなど、プラズマを生成しやすいガスを流してプラズマを生成する<sup>[22]</sup>。たとえば、ガラス管に金属テープなどを巻く事で容易にプラズマ生成部を製作できる。この構造を持つプラズマ装置は、ジェット状にプラズマを照射できることからプラズマジェットと呼ばれる。また、そのジェット状のプラズマを高速度カメラで観測すると、弾丸状のプラズマが連続的に射出されている事からプラズマバレットとも呼ばれる<sup>[23]</sup>。プラズマジェットはその取扱いの簡便性から最も一般的な大気圧低温プラズマ装置となっている。

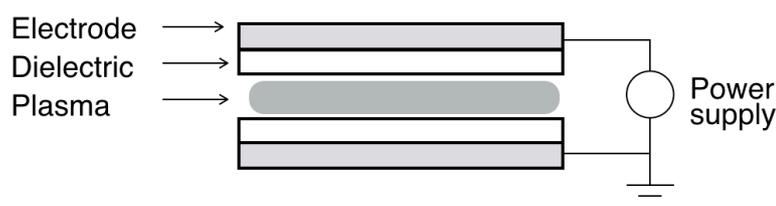


図 1-1 平行平板型 DBD プラズマ装置の構造

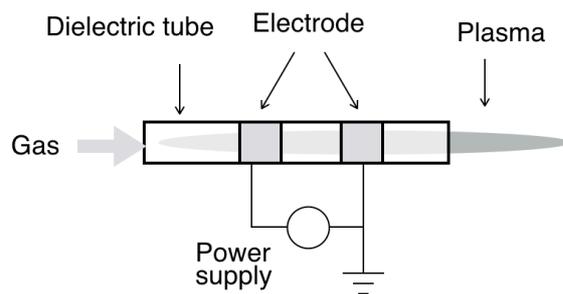


図 1-2 一般的な DBD プラズマジェットの構造

このように簡単に反応性が高く、低温のプラズマを生成できるようになったため、プラズマの反応性を活かした様々な応用研究が進められるようになってきた。たとえば、高分子材料などの熱に弱い物体の表面に低温のプラズマを照射すると、表面を親水化することができる。従来の親水化処理法では、薬剤で親水化処理をしたあとに乾燥させるという二つの工程が必要であったが、大気圧低温プラズマでは液体を使わずに親水化処理ができるため、工程を一つに減らすことができる。プラズマによる親水化効果は、プラズマ中に存在する活性酸素種等によって、表面に付着した目に見えない有機物などの汚れを化学的に分解および気化し、表面を原子レベルでクリーニングできることや、クリーニングされた表面にカルボキシル基などの親水基を付与する事などの効果による<sup>[24]</sup>。

## 1.4 本論文の目的

近年では、大気圧低温プラズマが細菌やウイルス、がん細胞に対して不活化効果を示す事や血液凝固効果がある事など、医療分野での利用が期待できる処理効果が明らかとなってきた。このため、生体のプラズマ処理を視野に入れた、大気圧低温プラズマの医療分野への応用に向けた研究が行われている<sup>[25]</sup>。これらの研究には、比較的低温のプラズマを生成する必要があるため、主に前述の DBD プラズマ装置が多く用いられている<sup>[26][27]</sup>。しかし、いずれのプラズマ装置も室温程度のガスに電圧を印加してプラズマを生成するため、必ず室温以上のプラズマとなり、高いものでは生体に熱損傷を与える温度となっている<sup>[28]</sup>。また、プラズマによる各種処理効果には、プラズマ中で生成される活性種が大きな影響を与えていると言われている<sup>[25]</sup>。なかでも酸素または窒素由来の活性酸素種や活性窒素種が高い反応性を持つため、これらの量や種類の制御が重要であるとされる<sup>[29]</sup>。生成される活性種の量や種類にはプラズマを生成するガス種が大きな影響を与える。しかし、プラズマの医療応用で使用される事が多い DBD プラズマ装置では使用できるガスに制限があった<sup>[30]</sup>。

当研究室の先行研究では、任意の温度にプラズマのガス温度を制御できる温度制御プラズマ

マ装置を開発した<sup>[22]</sup>。この装置により、プラズマのガス温度を上昇させることで殺菌効果が高くなること、放電電力を変えずにガス温度だけを変える事で、室温以下のプラズマでも高い殺菌効果を得られる事が明らかとなった<sup>[31]</sup>。この成果により、プラズマのガス温度を人肌に制御した場合や、さらに低くした場合でもプラズマによる効果を得られるため、実用性の高い装置である事が示された。さらに、安定した様々なガス種のプラズマを生成可能なマルチガスプラズマ装置を開発した<sup>[24]</sup>。この装置により、ガス種ごとに殺菌効果や表面改質効果が大きく異なる事が明らかとなり、ガス種を変える事の重要性が示された。

医療分野で実用可能なプラズマ装置の開発においては、プラズマのガス温度や生成される活性種が処理効果や安全性に与える影響を明らかにする必要がある。その検討を行うためには、ガス温度に関しては、プラズマのガス温度の変化に伴って処理効果がどの程度変わるのか、プラズマによる処理効果のガス温度依存性の定量的な評価が必要となる。そして、学術的にはプラズマのガス温度の変化が殺菌効果に影響を与える要因について明らかにする事が望まれる。活性種に関しては、ガス種を変えた際の殺菌効果にどの活性種が関与しているか明らかにならず、各ガス種のプラズマによって生成される活性種の定量的な調査が必要である。しかし、上記の温度制御プラズマでは、装置の構造上 DBD プラズマ装置を用いているためガス種に制限があり、マルチガスプラズマ装置も装置の構造上プラズマのガス温度の制御が困難であった。生体など熱に弱い対象を効率よくプラズマ処理するためには、プラズマのガス温度の制御が可能で、殺菌要因となる活性種を高密度に生成できるプラズマ装置が望ましい。

そこで本研究では、大気圧低温プラズマの医療分野への応用を目的として、プラズマのガス温度やガス種が処理効果に与える影響を、殺菌効果を指標として調べた。そして、プラズマのガス温度制御が可能かつガス種を変えることができるマルチガス温度制御プラズマ装置を開発し、大気圧低温プラズマの医療応用に向けた基礎研究を行った。

## 1.5 本論文の構成

本論文は6章で構成されている。

第2章「大気圧低温プラズマの医療応用の現状」では、従来の低温プラズマの医療応用研究を紹介し、プラズマによる処理効果や安全性を向上させるためには、ガス温度の制御とマルチガス化を両立できるプラズマ装置の開発が必要である事を述べる。

第3章「プラズマのガス温度が殺菌効果に与える影響」では、温度制御プラズマ装置の基礎特性を記述するとともに、液中の細菌に対する殺菌効果プラズマガス温度依存性を調べ、殺菌要因を調べた結果を記述する。

第4章「マルチガスプラズマバブリングによる液中殺菌」では、マルチガスプラズマバブリング

装置を用いて、各ガス種のプラズマの殺菌効果および殺菌要因を調べた結果を記述する。

第5章「マルチガス温度制御プラズマ装置の開発と医療および生命科学分野への応用」では、マルチガスプラズマバブリング装置を用いて、各ガス種のプラズマの殺菌効果および殺菌要因を調べた結果を記述する。また、眼科分野への応用として、眼科用の超音波併用プラズマバブリング装置の開発を行い、有効性を調べた結果を記述する。さらに、止血を目的とした、内視鏡に挿入可能な小型マルチガスプラズマ装置を開発し、血液凝固効果および止血効果を確認する事により、開発したプラズマ装置の有用性を評価した結果を記述する。最後に、マルチガス温度制御プラズマ装置による細胞中へのタンパク質の導入実験を行い、マルチガス温度制御プラズマ装置の生命科学分野への応用の可能性を調べた結果を記述する。

第6章「結論」では、本研究で得られた成果をまとめ、今後の展望について述べる。

## 第2章

# 大気圧低温プラズマの医療応用の現状

### 2.1 はじめに

大気圧プラズマの中でも、低温でプラズマを生成できるようになったのはここ二十年程の事であり、大気圧低温プラズマの医療応用に関する研究が活発になったのは十年程前からである。本章ではこれまでに報告されている大気圧低温プラズマの医療応用に向けた研究をいくつか紹介し、プラズマの医療応用に向けて求められるプラズマ装置について言及する。

### 2.2 大気圧低温プラズマによる殺菌技術

#### 2.2.1 従来の殺菌法

人のほぼすべての生活圏に細菌は存在しており、その住処は大気中や水中のみならず、人の体内にまで及ぶ。細菌の種類や数は環境に大きく左右されるが、通常人工的に作り出さない限り無菌状態は存在しない。医療分野においては、度々細菌が原因となる感染症が問題となり、細菌の存在は害とされる場面が多い。そのため、医療分野においては殺菌や滅菌への取り組みが日常的に行われており、その対象は手術器具から衣服、さらには人体と多岐に渡る。それらで用いられる手法は殺菌処理する対象や求められる殺菌の程度によって変わってくる。

細菌は自己増殖する事ができる最も小さな単細胞原核生物である。一言に細菌とは言っても様々な種類があり、その形状や外部ストレスからの耐性の違いによって一般細菌、酵母様真菌、糸状真菌、抗酸菌、芽胞形成菌に分類される。

どの程度細菌を不活化または除去する事で人に対して無害となるかの指標は、感染防止の取り組みにおいて重要となってくる。医療分野では無害化のレベルによって用語が使い分けられる。「殺菌」とは“菌を減らす事”という意味で、対象や程度を含まない概念とされる。そして、「消毒」は“対象物に存在している病原性のある微生物を無害なレベルまで減らす事であり、必ずしもすべての微生物を殺滅または除去するものではない”とされている。それに対して、「滅菌」は明確に区別されているが、厳密な意味で“細菌数がゼロである事”を保証するものではない。一般に細菌の死滅過程は確率的に取り扱われ、処理時間とともに生菌数が指数関数的に減少していく。これを対数的死滅則といい、生菌数をいつまでもゼロにする事はできない。したがって、医療分野では無菌性保証レベル（SAL: Sterility Assurance Level）を採用し、あるレベルに達

する処理を「滅菌」と定義している。

現在では、SALとして $10^{-6}$ が国際的に採択されており、厚生労働省が1999年に通知した「厚生省生衛発第956号」や医療機器学会が作成した「医療現場における滅菌保証のガイドライン2015」でも同様に $10^{-6}$ を採択している<sup>[32]</sup>。図2-1のように生菌数は桁という視点から見れば線形的に減少していく<sup>[33]</sup>。生菌数を1桁減少させるために必要な時間はD値（Decimal Reduction Value）と定義される。細菌は培養すると、分裂して増殖し、コロニーと呼ばれる集団を作り、目視で確認できるようになる。このため、菌数は一般的にコロニー形成単位（CFU: Colony Forming Unit）で表記される。SALの $10^{-6}$ では、一般的に初期菌数が $10^6$  CFUの芽胞形成菌に処理を施し、生菌数が $10^{-6}$ になるまでの時間、すなわちD値を12倍した値を滅菌されている事が保証できる処理時間としている<sup>[32]</sup>。

なお、「除菌」とは殺菌と意味が近く菌を不活化せずとも“菌を対象から取り除く事”を意味している。また、「抗菌」は表面をコーティングするなどして”菌が付着しにくくする事”を意味している。

感染症の原因となる細菌を滅菌するためには、煮沸や高圧蒸気法など熱による処理方法が用いられる。しかし、熱による滅菌法の適用が難しい生体や熱に弱い医療用器具を対象とする場合には、薬剤による消毒が行われる。薬剤は、殺菌作用を持つ成分によって有効な細菌の種類が異なり、図2-2に示すような抗菌スペクトルと呼ばれる消毒薬が有効な範囲が存在する。消毒に用いられる薬剤は、その抗菌スペクトルの範囲によって高水準消毒薬、中水準消毒薬、低水準消毒薬の三水準に分けられている。そして、消毒対象の材質や求められる消毒レベルに応じて使用する薬剤は使い分けられている。たとえば、手指の消毒に一般的に用いられている消毒用エタノールは中水準消毒薬であるため、抗酸菌までは不活化できるが、芽胞形成菌には効かない。さらに、これらの中で、生体に適用可能な薬剤に対する耐性を獲得した細菌は薬剤耐性菌と呼ばれる。薬剤耐性菌は、ペニシリンなどの抗菌薬に耐性を持つ多剤耐性緑膿菌などが知られ、世界保健機関において国際的脅威として扱われるほど問題視されている<sup>[34]</sup>。芽胞形成菌を不活化したい場合はグルタラールなどの高水準消毒薬が用いられるが、それらの高水準消毒薬は人体に対しても毒性を示すため、人体に適用する事ができない。

このように従来の滅菌手法にはそれぞれ一長一短があり、これらの問題点を克服した新しい滅菌手法が求められている。また、薬剤を用いた殺菌では、薬剤耐性菌ができる可能性があるため、耐性を持たせる事なく殺菌できる手法が求められる。その新しい滅菌手法の一つとして、近年、大気圧低温プラズマが注目を集めている。

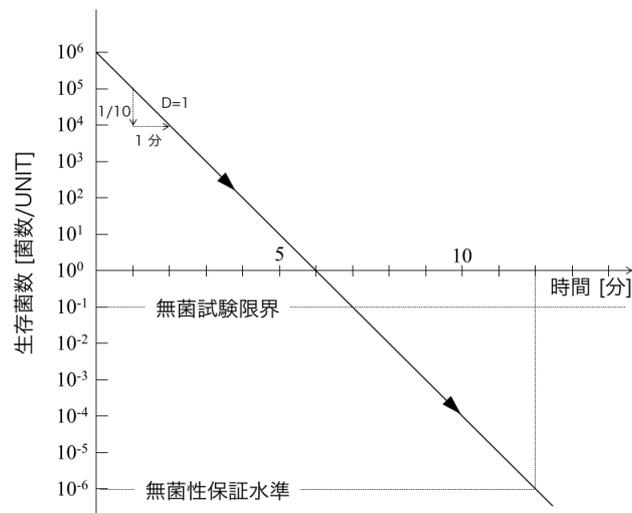


図 2-1 細菌の死滅曲線<sup>[33]</sup>

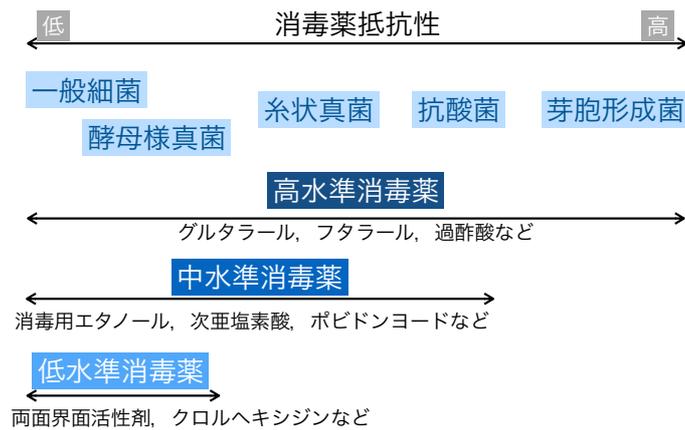


図 2-2 細菌の消毒薬抵抗性と消毒薬の水準

## 2.2.2 プラズマを用いた滅菌装置

日本で市販されている医療用滅菌装置にステラッド<sup>®</sup>がある<sup>[35]</sup>。これは高真空状態で過酸化水素を噴霧し、高周波やマイクロ波により過酸化水素プラズマを生成させて滅菌処理する。そのため、真空環境に耐えられる器具などにしか使用することができない。しかし、45°Cという低温で、かつ1時間ほどで滅菌処理できるのに加え、給排気などの設備が不要であることから、高圧蒸気法を適用できない器具の滅菌処理のために、急速に普及しつつある。ステラッドは日本初のプラズマ滅菌装置として取り上げられたが、現在ではこの装置の主な滅菌要因は過酸化水素ガスであるとされ、プラズマの役割は過酸化水素ガスの無毒化であるとされている。Moisan らに

よると、プラズマ滅菌とは「処理ガスそれ自体に微生物不活化作用がなく、プラズマ化したときに初めて微生物不活化作用を有し、微生物を死滅させる事」と定義されている<sup>[36]</sup>。この定義によると医療用のプラズマ滅菌装置はまだ開発されていない事になる。

### 2.2.3 プラズマの直接照射による殺菌

現在、大気圧低温プラズマの医療応用の研究の中でも、各種細菌の不活化に関する研究が最も広く行われている<sup>[37]-[39]</sup>。これらの研究によって、比較的殺菌が難しいとされる芽胞形成菌に対しても大気圧低温プラズマは殺菌効果を示し、耐性菌を作らない事が明らかとなっている<sup>[40]</sup>。これらの研究で用いられるプラズマ源の多くは1章で記述したDBDプラズマ装置であり、プラズマの医療応用のスタンダードとなっている。

Bruggemanらのグループでは、高周波 (RF: Radio Frequency) 電源駆動のDBDプラズマジェットを用いて、アルゴンプラズマによる液中の細菌に対する殺菌実験を行っている<sup>[38]</sup>。実験は図2-3のように、緑膿菌を懸濁した菌液の上方8mmの位置からプラズマを照射して殺菌効果を調査している。この実験から、プラズマの照射時間が長くなるほど殺菌効果が高くなり、1分間のプラズマ照射で液中の細菌をほとんど殺菌できる事を明らかにしている。この要因としてプラズマから発生される紫外線の影響を調査したが、液中の細菌に対しては、水による紫外線の吸光が支配的であり、紫外線の殺菌効果への関与は無視できるとしている。また、アルゴンの準励起状態の寿命は長いですが、プラズマジェットから射出された弾丸上の準励起状態のアルゴンは周辺空気と反応し、液面に到達する頃には多くが失活している事を示している。その他、電場やイオンおよびガス流による殺菌効果への直接的な関与はない事を同様に示している。主な殺菌要因としては、気相中で生成されたイオン等によって気液界面で生成される活性酸素種や活性窒素種が関与していると結論づけている。

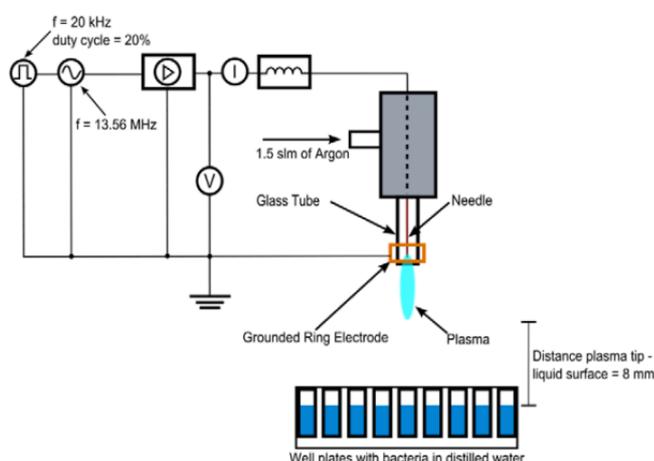


図 2-3 アルゴン DBD プラズマジェットによる液中の細菌に対する殺菌実験<sup>[38]</sup>

この研究では、アルゴンプラズマジェットを使用しているが、あくまでも殺菌に関与しているのは、空気と混合され、液面に到達した結果生成される活性酸素や活性窒素種である事を示している。さらに Reuter らのグループでは、プラズマ中に導入される水蒸気量がプラズマによって生成される活性酸素量に大きな影響を与える事を示している<sup>[41]</sup>。したがって、プラズマによる殺菌メカニズムを調べるためには、周辺空気がプラズマに与える影響をできるだけ排除し、生成される活性種をコントロールできる実験系である事が望ましいと考えられる。

## 2.2.4 プラズマ処理水による殺菌

多くの研究結果から、プラズマによる殺菌には、気液界面でのプラズマガスと水との反応が重要である事は間違いがないといえる<sup>[25], [42]-[44]</sup>。しかしながら、プラズマの中での複雑な反応に加えて、気液界面での反応、さらには液中での化学反応が加わるとその反応経路は無数に存在する<sup>[21], [45]</sup>。このため、プラズマによる殺菌メカニズムを特定するためには、まず細菌を不活化させる殺菌因子を特定し、そこから殺菌因子が生成されるプロセスを探る研究が多く行われている<sup>[46]</sup>。プラズマによる殺菌のプロセスは、液中に導入される殺菌因子、具体的には化学的な活性種が寄与しており、液中の細菌に対してプラズマは直接作用するわけでないと考えられている。液中に溶け込んだ活性種と細菌との反応により不活化されると考えると、プラズマ処理した水に殺菌効果を付与していると解釈ができる。近年では、プラズマ処理した液体全体をプラズマ処理水と呼び、医療や農業分野などで様々な応用研究が行われている<sup>[29], [47], [48]</sup>。

プラズマ処理水による殺菌効果の例を図 2-4 に示す<sup>[49]</sup>。この実験は、160  $\mu\text{L}$  のプラズマ処理した純水を一定時間静置したあと、20  $\mu\text{L}$  の大腸菌懸濁液と 200 mM に調製した 20  $\mu\text{L}$  のクエン酸ナトリウム緩衝液を混合し、プラズマ処理水による殺菌効果の寿命を調べている。プラズマ処理水の生成には、これまで記述した研究と同様に DBD プラズマジェットを使用している。ここで、クエン酸ナトリウム緩衝液を使用している理由としては、これまでの実験で pH が低くなるほど殺菌効果が高くなる事が明らかとなっているためである<sup>[43]</sup>。プラズマ処理直後から 4 分間は初期菌数が  $10^6$ - $10^7$  CFU/mL の大腸菌を検出下限値である 10 CFU/mL 以下にする高い殺菌効果を示している。その後、静置時間が長くなるほどプラズマ処理水による殺菌効果が低下し、10 分ほどでプラズマ処理水に殺菌効果がなくなる事が示されている。

このようにプラズマ処理水は、プラズマ処理直後は高い殺菌効果を持ち、時間の経過とともに殺菌効果が失われる事が示され、残留毒性なく高い殺菌効果を示す新しい殺菌手法として注目されている。現在では、殺菌剤としての利用対象が、医療機器や生体など医療分野のみならず、食品や水など農業や衛生管理の分野でも検討されている<sup>[29]</sup>。

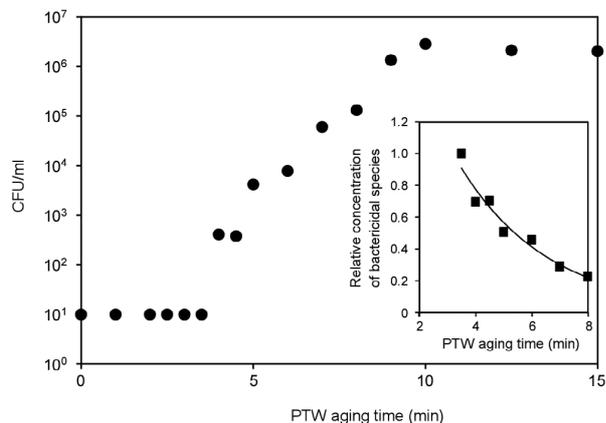


図 2-4 プラズマ処理水による大腸菌の不活化効果とその寿命<sup>[49]</sup>

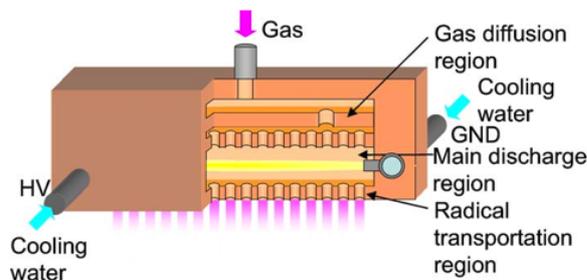


図 2-5 大気圧低温プラズマ装置の構造<sup>[50]</sup>

## 2.3 がん治療への応用

近年、大気圧低温プラズマを用いたがん治療法の有用性が相次いで発見され、プラズマががん細胞にプログラム細胞死として知られるアポトーシスを誘導する事が見出されてきた<sup>[51]</sup>。現在、図 2-5 に示す構造のプラズマ装置に 60 Hz, 10 kV, 20 mA の交流電圧を印加してアルゴンプラズマを生成し、そのアフターグローを細胞に照射する事で、がん細胞に対するプラズマ照射の影響が調べられている<sup>[50], [52]</sup>。その結果、大気圧低温プラズマによって正常細胞にダメージを与えずに、がん細胞に選択的にアポトーシスが誘発される事が明らかにされた。細胞にプラズマを照射する際に、がん細胞へ直接プラズマを照射しているのではなく、培養液を介してプラズマが作用している事から、アポトーシスの誘発には培養液中に導入される活性種が関与しているとした。

そのため、殺菌の研究と同様に、プラズマ処理した培養液 (PAM: Plasma Activated Water) を使ってがん細胞への影響が調べられている<sup>[53]</sup>。その中で、何も処理しない場合およびアルゴ

ンのみを照射した場合には、アポトーシスは確認されなかったが、アルゴンプラズマで作成した PAM ではアポトーシスが誘導される事が明らかにされた。このことから、プラズマによるがん細胞のアポトーシス誘発効果には、培養液中に導入される活性種が影響を与えている事が示された。さらに、PAM による効果の持続時間は 8 時間から 18 時間であるとされ、非常に長い寿命を持つ活性種の関与が示されている。現在は、培養液中の乳酸とプラズマによって液中に導入される活性酸素種の反応によって、化学種が生成されている事が明らかとなっている<sup>[54]</sup>。

別のグループではがん細胞による in vitro 試験だけではなく、腫瘍を移植したマウスに対してプラズマ照射する in vivo 試験も行なわれている<sup>[55]</sup>。この研究では、生体を接地し、生体と電極の間でプラズマを生成する浮遊電極型誘電体バリア放電 (FE-DBD : Free Electrodes - DBD) を用いて実験を行っている。腫瘍に対してプラズマ照射すると、図 2-6 に示すように、腫瘍の成長が抑制されるという研究成果が挙げられている。

## 2.4 止血への応用

### 2.4.1 大気圧熱プラズマによる止血

大気圧プラズマを用いた医療用機器の中で最も歴史が長く、広く普及している機器アルゴンプラズマ凝固装置がある。この装置はアルゴンプラズマ凝固法 (APC: Argon Plasma Coagulation) というアルゴンプラズマによるジュール熱で傷口を塞ぐ方式を用いている<sup>[56]</sup>。アルゴンプラズマ凝固装置は、外科手術や内視鏡を用いた手術の際の止血または腫瘍の除去に用いられる。

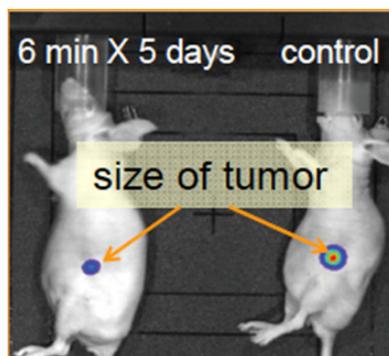


図 2-6 腫瘍を移植されたマウスに対するプラズマ照射の効果<sup>[55]</sup>

図 2-7 にアルゴンプラズマ凝固装置の構造を示す<sup>[57]</sup>。アルゴンプラズマ凝固法では、ガス管の中心にワイヤー電極を配置してアルゴンガスを流し、ワイヤー電極に高周波電圧を印加することで、ワイヤー電極の先端と処理対象とのアルゴンガス流路でプラズマが生成される。このとき、電極から処理対象に電流が流れるため、主にジュール熱により処理対象に含まれるタンパク質などの組織が凝固する。そして、電流は凝固していない低インピーダンスの組織に流れるため、電流が流入する位置はまだ凝固していない組織に自動的に移動する。これにより組織の形状が複雑であっても電流が回りこむため、均一な組織の凝固が可能である。さらに、非接触で処理が行える、広範囲を短時間で処理できる、出血点をガスで露出できるため止血が容易であるなど多くの利点がある。

## 2.4.2 大気圧低温プラズマによる止血

上記のアルゴンプラズマ凝固法は多くの利点がある一方で、処理対象付近の正常な組織も同時に死滅し、処置部が施術後に潰瘍化するという問題がある。また、プラズマを生成するガスにアルゴンを用いているため、むき出しになっている血管にアルゴンガスを吹き付けた場合、ガスが血管中に混入し、血栓を起こす可能性があるなどといった問題があった。ガス流を必要としない、または血栓起こしにくいガスを使用することで、大気圧低温プラズマによる血液凝固が可能になれば、熱損傷を与えずに即座に傷口を塞ぎ、かつ殺菌処理を施す事ができるため、外傷処理や外科処理、救急医療において有用な技術となり得る。

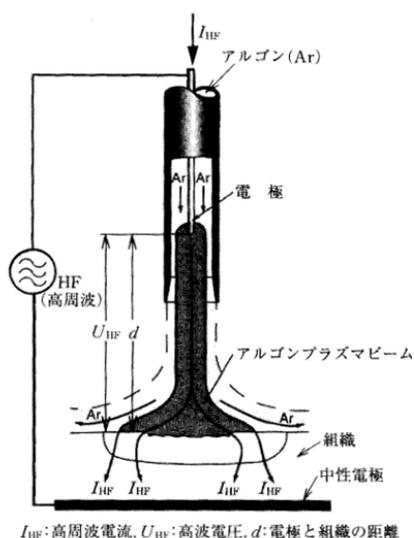


図 2-7 アルゴンプラズマ凝固装置の構図<sup>[57]</sup>

そのため、大気圧低温プラズマによる止血の研究が進められており、その一つとして Fridman らが行った研究がある<sup>[58]</sup>。この研究では、図 2-8 に示すように石英ガラスに被膜された銅の電極を空气中に保持し、0.5~1.5 kHz, 数 kV, 1.5  $\mu$ s 程度の双極性高電圧パルスを印加する事で、石英ガラスと血液サンプルの間でプラズマが発生させる FE-DBD をプラズマ源として用いている。この報告では、15 秒のプラズマ照射で 500  $\mu$ L の血液の凝固を促進する結果が得られており、これはプラズマによって生成される活性種が血液凝固のカスケードに寄与するためであるとされている。しかし、このプラズマ装置では、放電形態が DBD であるため、使うほどプラズマ装置から熱が発生し、熱による処置部へのダメージが懸念される。また、ガス流を伴わないため、出血点がわからない部分の止血が難しいなどの問題がある。

## 2.5 創傷治療への応用

皮膚病のうち難治性創傷は長期的な治療が必要であり、適切な治療法でなければ治癒はなかなか見込めない。その上、治療が長引くと感染症のリスクも高くなり命の危険性まで出てくるため、新たな治療法の開発が急務となっている。

このような中で、プラズマによる殺菌効果だけでなく、プラズマ照射によって傷の治りが早くなるという研究結果が報告された<sup>[59]</sup>。図 2-9 (a) に同じラットの背面に作成した火傷の様子を示す。実験では傷口に 1 日 1 回 90 秒のプラズマ照射を行い、傷の回復の様子を観察している。プラズマ装置には、ヘリウムの DBD プラズマジェットを使用しており、ヘリウムプラズマを照射した患部の様子とヘリウムガスを吹付けた患部の様子を比較している。この結果、図 2-9 (b) のように、右のガスのみを吹き付けた患部は、傷が半分程度しか塞がっていないのに対して、左のプラズマを照射した患部は、傷口のほとんどが塞がっている事が確認された。また、同様のプラズマをラットに吸引されると、血管拡張作用により血圧が低下する事が明らかとなった<sup>[60]</sup>。この事から、プラズマ照射によって、プラズマ処理部の血行が促進され、回復が早まったと考えられている。

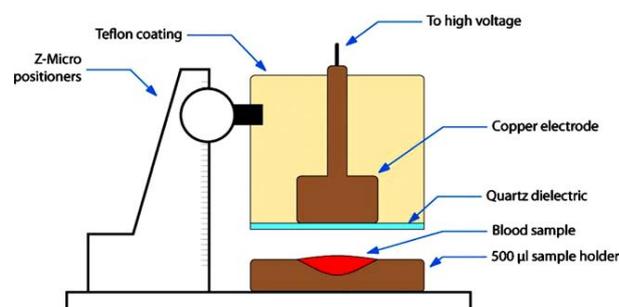


図 2-8 FE-DBD プラズマ装置による血液凝固実験の概念図<sup>[58]</sup>

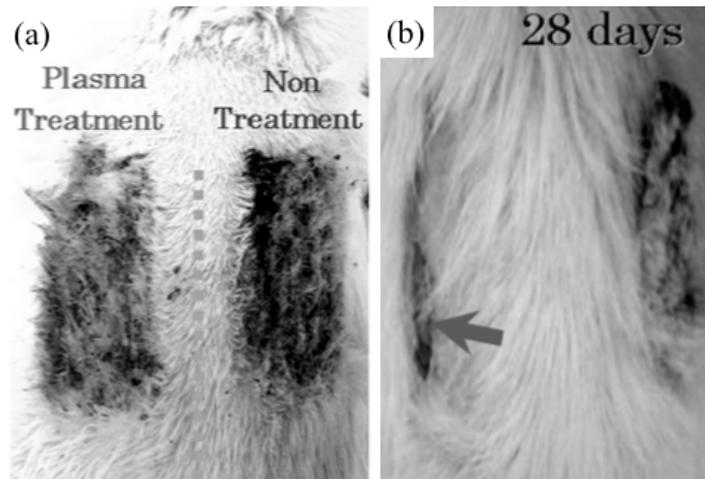


図 2-9 ラットの傷口に対するプラズマ照射の影響<sup>[59]</sup>

(a) プラズマ照射直後 (b) 28 日後

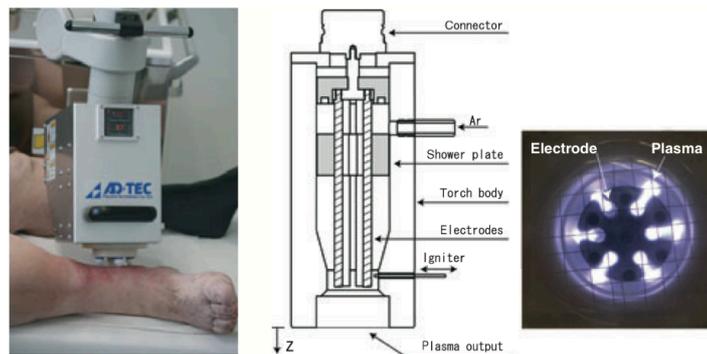


図 2-10 マイクロ波アルゴンプラズマ発生装置

(左) 装置外観 (中央) 装置の概念図 (右) プラズマ生成部<sup>[61]</sup>

この結果の実用化に向けた装置の例として、図 2-10 に示すようなマイクロ波アルゴンプラズマ発生装置が挙げられる<sup>[61]</sup>。このプラズマ源はアルミニウムのパイプ内に 6 つのステンレス棒を円周上に配置し、プラズマトーチにアルゴンガスを供給する。パイプとステンレス棒の間に 2.45 GHz, 85 W のマイクロ波を給電するとそれぞれのステンレス棒とパイプ間に放電が生じ、アルゴンガス流によって開口部へ押し流される。この生成したプラズマはトーチ出口では温度が 500 °C を超えるが、出口から 10 mm ほど距離を離すと室温程度まで温度が下がり、人体に照射が可能となる。

臨床実験では、処理回数と共に患部が治癒していく結果が得られており、これはプラズマが生成する紫外線や化学的活性種などによる殺菌作用の効果および NO ラジカルの創傷治癒促進効果によるものと考えられる。

## 2.6 医療用プラズマ装置への要求

上述の通り、大気圧低温プラズマの医療応用に向けた取り組みが活発に行われている。プラズマを医療分野で応用する際の利用方法は、対象へ直接プラズマを照射する、またはプラズマ処理した液体を使う、という 2 つに分けられる。前者については、金属製やポリプロピレン製など対象が熱に強ければ問題はないが、生体や薄膜など熱によってダメージを受ける対象の場合、プラズマのガス温度を任意の値に制御できる事が求められる。また、ただガス温度を下げるのではなく、プラズマによる処理効果を下げない事が望ましい。後者については、液中に導入される活性種の種類や量が重要となってくる。加えて、より効果的な活性種を多く導入するためだけでなく、不必要な活性種の導入による副作用のリスクを低減するために、プラズマ中に生成される活性種の選択性が求められる。活性種の選択性を得るためには、プラズマを生成する周辺空気の影響を除く他に、任意のガス種でプラズマを生成できる事が求められる。

現状では、どちらかの要求に応える事ができるプラズマ装置は存在するが、同時に 2 つの要求に応える事ができるプラズマ装置は存在しない。もし、マルチガス化かつ温度制御が可能なプラズマ装置が開発されれば、これまでプラズマの照射条件が制限されていた対象にも自由にプラズマ処理を施す事が可能になる。さらに、従来のプラズマ装置よりも迅速かつ効率よく目的の処理を行う事ができる。また、学術的には、これまで調べる事ができなかった、各ガス種のプラズマのガス温度のみが変わった場合に、処理効果に与える影響を調べる事が可能となる。

## 2.7 まとめ

本章では、現在までに行われたプラズマの医療応用の研究の中から、本研究に関わるものをいくつか記述した。これを受けて、プラズマの医療応用に向けて、プラズマの処理効果を落とす事なくプラズマのガス温度を制御できるプラズマ装置が求められる事、プラズマによる処理効果や安全性を高めるためには、マルチガス化が必要である事を記述した。そして 2 つの要求に同時に応えられるプラズマ装置の必要性を実用化および学術的な面から言及した。

## 第3章

# プラズマのガス温度が殺菌効果に与える影響

### 3.1 はじめに

室温程度から 100°C 以下の大気圧低温プラズマ装置が開発された事により、プラズマの医療応用に向けた研究が盛んに行われるようになった。これらの研究で用いられるプラズマ装置では、室温程度のガスに電力を入力してプラズマを生成するため、入力した電力に応じてプラズマの温度が上昇するため、プラズマの温度は必ず室温よりも高くなっていた。従来のプラズマ装置ではプラズマのガス温度の上昇を抑えるために、電流を制限する、放電時間を短くする、ガス流量を上げるなど、入力電力やガス流量を制御する方法が用いられていた<sup>[45], [58]</sup>。しかし、プラズマのガス温度と他のパラメータが同時に変化するため、ガス温度が処理効果に与える影響を他のパラメータと独立に調べる事はできなかった<sup>[28]</sup>。

そこで我々の研究室では、プラズマの生成条件とは独立にプラズマのガス温度を制御できる手法と装置を開発した<sup>[22]</sup>。この装置を用いる事で、今まで調査できなかったプラズマのガス温度がプラズマの処理効果に与える影響を調べる事が可能になった。

本章では、プラズマの温度について記述したのち、温度制御プラズマ装置の基礎特性を、先行研究で行われた殺菌実験の結果とともに記述する。そして、本研究で行った、プラズマのガス温度が液中細菌の殺菌効果に与える影響を調べた結果を示し、殺菌要因について考察する。

### 3.2 プラズマの温度

大気圧低温プラズマはプラズマ中の電子とイオン、原子の熱運動が異なる熱非平衡状態となっており、非平衡プラズマは次の 3 つの意味で「非平衡状態」となっている。1 つ目は電子速度分布関数がマクスウェル・ボルツマン分布ではないという意味で非平衡という表現が用いられている。2 つ目は原子の内部励起状態への分布がボルツマン分布に従わないという事を意味している。3 つ目は電子の平均運動エネルギーと気体原子の平均運動エネルギーが異なるという意味である。熱平衡プラズマは「温度」という状態量ですべての分布則を統一に表現できるのに対し、非平衡プラズマはそれができない。しかし、近似的に温度を定義できる場合があり、便宜的

に「温度」の概念を用いている。

非平衡プラズマにおける温度は次のように定義される。

#### 1. 電子温度

電子の運動エネルギーによって規定される温度。電子の速度分布がある温度  $T_e$  のマクスウェル・ボルツマン分布と同じになるとき、この  $T_e$  は電子温度と定義される。

#### 2. 回転温度

分子の回転の運動エネルギーによって規定される温度。分子の回転準位間の分布がボルツマン分布の時、その分布を与える温度を回転温度といい  $T_{rot}$  と表記される場合が多い。

#### 3. 励起温度

原子の各エネルギー準位に存在する割合を規定する温度。励起準位の原子密度分布が温度  $T_{ex}$  のボルツマン分布と等しいとき、 $T_{ex}$  を励起温度と定義する。しかし、非平衡プラズマでは一部の準位でしかボルツマン分布していない事が多い。したがって、温度測定の際にはその測定方法がどの領域でのボルツマン分布を前提にしたものか、注意する必要がある。

#### 4. 電離温度

電子密度が温度  $T_i$  の熱平衡状態の密度に等しいとき、 $T_i$  を電離温度と呼ぶ。

#### 5. 振動温度

分子の振動準位間の分布がボルツマン分布のとき、その分布を与える温度を振動温度と呼ぶ。

#### 6. ガス温度

原子やイオンなど重い粒子の並進運動エネルギーによって規定される温度。中性原子の速度分布が温度  $T_n$  のマクスウェル・ボルツマン分布を取るとき、この  $T_n$  を中性原子温度と呼ぶ。実験室で生成されるプラズマは電離度が低く、中性原子がプラズマの大部分を占めているため、この中性原子温度をガス温度と呼び  $T_g$  と表記される事がある。本論文でこれまでに論じたプラズマの温度はこのガス温度  $T_g$  を指す。

局所的熱平衡 (LTE) 状態のプラズマではこれらの温度は一致するが、大気圧低温プラズマは全体の内の一部が電離した弱電離プラズマであるため、LTE 状態ではなく、これらの温度は等しくならない。多くの場合は  $T_e > T_{ex} > T_g, T_{rot}$  となっている。そのため、大気圧低温プラズマの実用性を考えた場合はガス温度が重要となるが、温度の議論を行う場合にはその他の温度の測定が望まれる。

### 3.3 温度制御プラズマ装置

#### 3.3.1 一般的なプラズマのガス温度の制御方法

一般的な大気圧低温プラズマ装置の構成とその際のガス温度の推移を図 3-1 に示す。3.1 で述べたように、一般的な大気圧低温プラズマ装置はボンベから供給される室温程度のガスに電力を入力してプラズマを生成する。このため、生成されるプラズマのガス温度は必ず室温以上となっていた。生体などへ熱損傷を与えない温度にプラズマのガス温度を抑えたい場合はプラズマを生成する際の電力の制限やガス流速を上げるほかなかった。

このように、一般的な大気圧低温プラズマ装置においては、放電波形やガス流速等により、単位体積あたりのガスに入力されるエネルギーを変える事でプラズマのガス温度を制御しているため、プラズマのガス温度の変化に伴ってプラズマの密度も変化していた。

#### 3.3.2 温度制御プラズマ装置におけるプラズマガス温度の制御方法<sup>[22]</sup>

当研究室で開発した温度制御プラズマ装置の概略図を図 3-2 に示す（特許第 4611509）。この温度制御プラズマ装置はプラズマ源の前にガス温度制御部を設けて、プラズマ化する前のガスそのものの温度を制御する事で、プラズマのガス温度を制御する。ガスボンベから供給されるガスはガス冷却器で冷却されたのち、ヒーターによって加熱され、プラズマ化される。生成されたプラズマのガス温度を測定し、ヒーターへの入力電力を調整する事で、所望の温度のプラズマを生成する。このプラズマ装置の機構では、プラズマを生成する際の放電電力やガス流速を変える事なく、プラズマのガス温度を制御する。

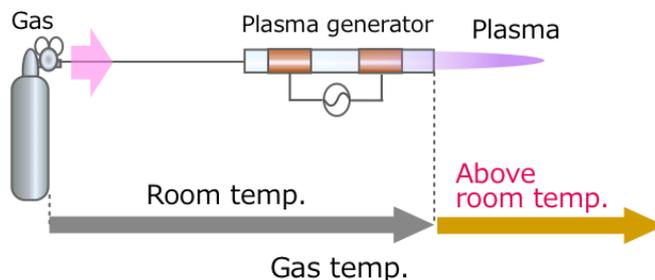


図 3-1 一般的な大気圧低温プラズマ装置の構成とガス温度の推移

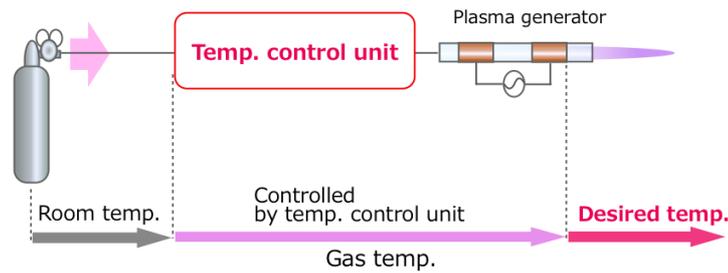


図 3-2 温度制御プラズマ装置の概略図

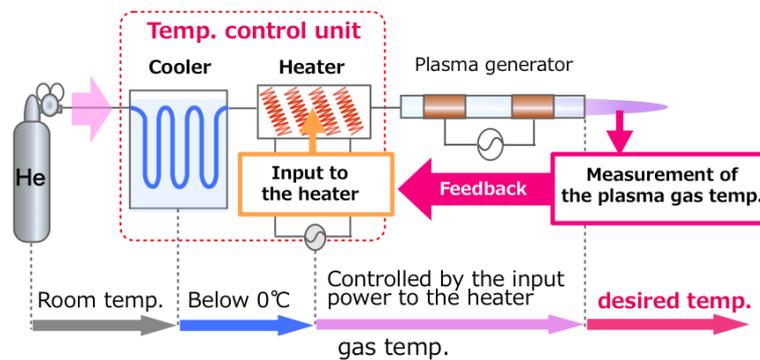


図 3-3 使用した温度制御プラズマ装置の構成

### 3.3.3 本研究で用いた温度制御プラズマ装置

本研究では、図 3-3 に示す構成の温度制御プラズマ装置を使用した。プラズマのガス温度を予め制御する温度制御機構は、ガス冷却部とガス加熱部によって構成される。ガス冷却部には液体窒素、加熱部には 15 Ω のニクロム線を用い、プラズマ源には DBD プラズマジェットを用いた。銅パイプを液体窒素に浸し、この銅パイプの中にヘリウムガスを流す事でポンベから室温程度で供給されるガスを一度零下に冷却する。その後、冷却されたガスはヒーターによって加熱され、プラズマ化される。ヒーターへの入力電力を調整する事で、所望のガス温度のヘリウムプラズマを生成する。

プラズマ生成部には、1.3.2 で紹介した DBD プラズマジェットを使用した。DBD を利用したプラズマジェットは大気圧低温プラズマ源の中でも比較的低温のプラズマの生成が可能で、温度を制御しない場合でも 40～50℃程度と手で触れる事の可能な温度のプラズマを生成できる。本研究で使用した DBD プラズマジェットの構成を図 3-4 に示す。本実験では、内径 3 mm、外径 5 mm 石英製のガラス管の周囲に 10 mm の幅のリング状銅電極を 10 mm 間隔で配置し、両電極間に交流高電圧を印加する事でプラズマを生成した。このプラズマ源は電極がガラスなどの誘

電体の外側に配置されているため、プラズマガスが比較的熱伝導率の低いガラス（熱伝導率  $\lambda = 1$  [W/(m·K)]）にしか触れず、直接金属（ $\lambda = 200 \sim 400$ ）に触れる場合と比較して外部への熱の拡散を抑える事ができる。

本研究で使用したヘリウムプラズマジェットの放電特性を調べるために、放電時の電流および電圧を測定した。電流値は図 3-5 に示すように、プラズマ源の下流側の電極に  $5 \text{ k}\Omega$  の抵抗を接続し、抵抗の両端にかかる電圧から算出した。シャント抵抗の抵抗値が比較的大きいが、これは、抵抗値が低いとプラズマ源の発するノイズとの S/N 比が大きくなり、電流値の正確な測定ができないためである。放電電圧はプラズマ源の上流側の電極と接地電位間の電圧と、シャント抵抗にかかる電圧の差から求めた。各電圧の測定にはオシロスコープ（TDS-680B, Sony/Tektronix Corporation, Tokyo, Japan）を用い、プラズマ源の上流側の電極と接地電位間の電圧の測定には高圧プローブ（HVP39pro, Pintek Electronics Co., Taiwan）を使用した。

まず、ピーク電圧が  $4 \text{ kV}$ 、周波数が  $16 \text{ kHz}$  の正弦波を印加すると、図 3-6 に示すように電圧の立ち上がり部分と立ち下がり部分に電流のパルスが観測された。これは 2.5.2 でも述べたように DBD の特有の電流波形である。

次に、ピーク電圧を  $9 \text{ kV}$  に増加させ、周波数  $16 \text{ kHz}$  の正弦波を印加すると、図 3-7 に示すように  $4 \text{ kV}$  を印加した場合と同様の電流パルスが観測された。本論文でプラズマの生成に使用した交流高電圧電源（PF-DFMJ02, Plasma Concept Tokyo, Tokyo, Japan）の開放時の電圧波形は、図 3-8 に示すように  $16 \text{ kHz}$  の周波数でピーク電圧が  $1 \text{ kV}$  から  $9 \text{ kV}$  の間で脈動しており、脈動の周波数は  $100 \text{ Hz}$  となっている。そのため、プラズマ生成時の電流パルスはピーク電圧によって時間的な変動がある。

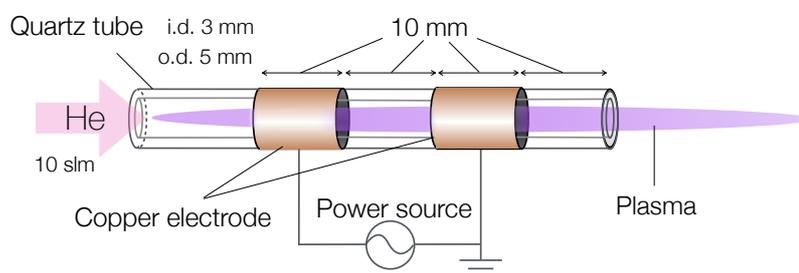


図 3-4 使用した DBD プラズマジェットの構成

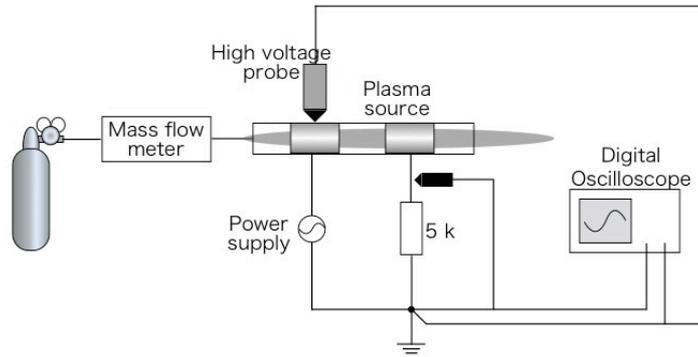


図 3-5 電流電圧測定の設定アップ

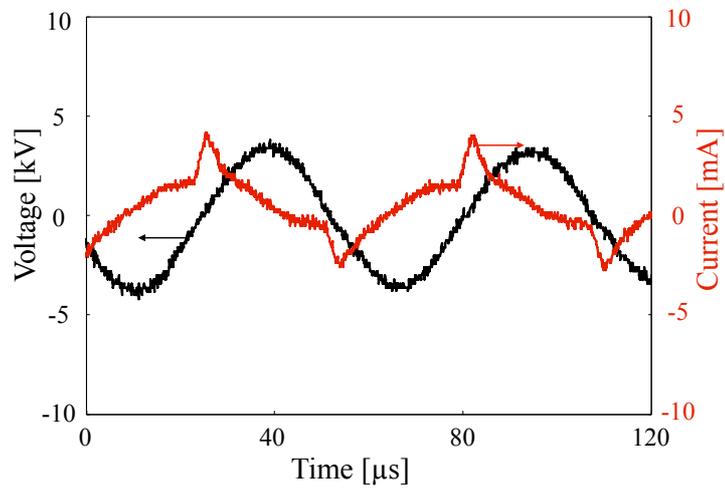


図 3-6 4 kV 印加時の電流電圧波形

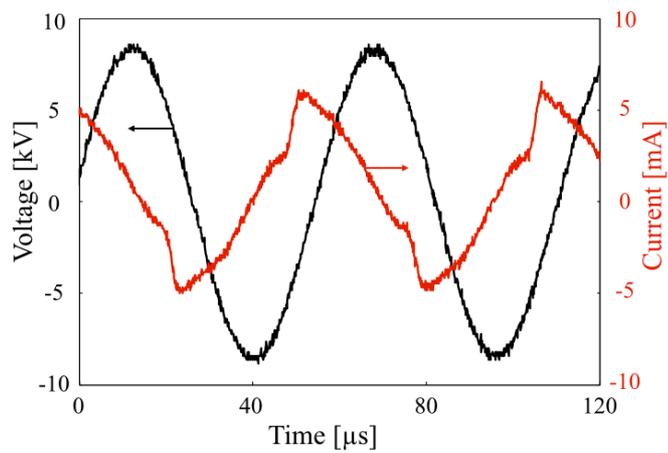


図 3-7 9 kV 印加時の電流電圧波形

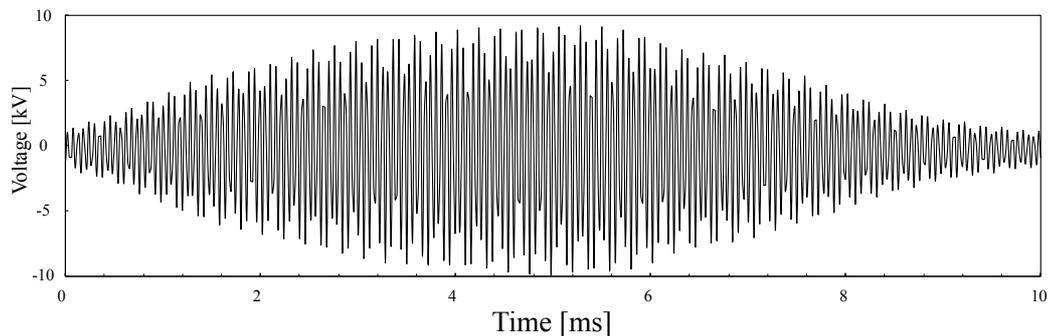


図 3-8 電源の開放電圧波形

### 3.4 プラズマのパラメータのプラズマガス温度依存性

プラズマの殺菌効果や血液凝固効果は使用するプラズマの状態によってその効果は大きく変化する事が予想される。このため、使用するプラズマ装置によって生成されるプラズマの状態を知る事は先行研究と比較する上で重要となる。本論文では、プラズマの状態を示すパラメータのうち、殺菌や血液凝固に影響を与えると考えられる、放電電力や、電子密度などのプラズマのガス温度依存性について記述する。本節では、まず先行研究で調査された結果を記述する。その後、本研究で調査した結果を記述する。

#### 3.4.1 先行研究で調査された温度制御プラズマ装置の特性<sup>[31]</sup>

##### ガス温度制御能

本研究において温度測定の対象となるプラズマは、細管内を流れ、出口の噴出口からジェット状に吹き出す流体であり、その流体の温度の測定にはいくつかの方法がある。まず、プラズマに限らず簡易的にガス温度を測定する方法として、熱電対などの接触式温度計を用いる方法がある。この方法では、温度センサと測定対象であるガスが直接接触するため、温度センサが測定対象に影響を与える事、センサと測定対象の間の熱の移動のしやすさに依存する測定誤差を十分に考慮する必要がある。一方、非接触の温度計測方法としてはプラズマの発光を利用した発光分光法や、レーザーを用いた蛍光分光法があるが、光学系を必要とするため簡便な測定とはいかず、また、温度の算出に計算が必要なため、リアルタイムな測定が困難である<sup>[28]</sup>。先行研究および本研究では、プラズマのガス温度と各種処理効果の関係を調べるにあたり、温度測定の簡便さを重視し、熱電対によるプラズマのガス温度の計測を行った。

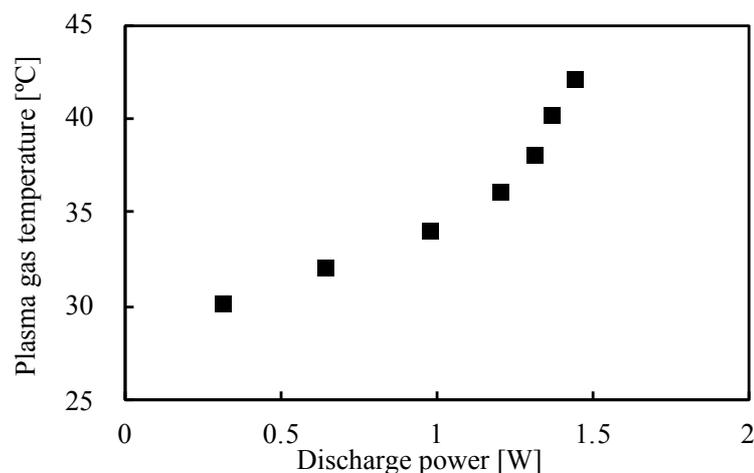


図 3-9 プラズマの放電電力とガス温度の関係

プラズマ中の分子の回転温度はガス温度と同等の値を示すため、正確なプラズマのガス温度は前述のように OH の回転温度などから測定される必要がある。先行研究では、温度制御プラズマ装置を用いた場合に、熱電対によってガス温度を測定した結果とプラズマ中の OH の回転温度を測定した結果を比較している。この結果、熱電対で測定した結果のほうが 6~23℃低くなり、誤差はあったものの、温度変化の傾向はほとんど変わらない事を明らかにしている<sup>[22]</sup>。先行研究および本研究では、温度の正確さよりも、温度計測の簡便さが重視されるため、熱電対による測定値をプラズマのガス温度とした。ガス温度の測定は、ステンレススチール (SUS316) 製のシースタイプの熱電対 (長さ 50 mm, 外径 1 mm) を用い、プラズマ源出口から 2 mm の位置で行っている。

本研究で用いる温度制御プラズマ装置の優位性を確認するため、プラズマの放電電力とガス温度の関係を調査した結果を記述する。放電電力はプラズマを維持できる下限である 0.4 W から、プラズマ生成部が壊れない上限の 1.5 W の間で変化させている。その結果、図 3-9 に示すように放電電力の上昇に伴い、非線形にプラズマのガス温度が上昇し、そのガス温度の範囲も 30℃から 42℃程度となっている。

次にプラズマの生成部の前にガス冷却部とヒーターを配置し、ヒーターへの入力電力を変える事でプラズマのガス温度を制御した結果を記述する。ヒーターへの入力電力とプラズマのガス温度の関係を図 3-10 に示す。ヒーターに電圧を印加せず、プラズマを生成していない状態では、出口のガス温度は-69.5℃となり、プラズマを生成した際の最低ガス温度は-54℃となった。ヒーターに電圧を印加すると、ヒーターへの入力電力に比例してプラズマガス温度は上昇し、入力電力が 60 W のとき、ガス温度は 160℃となった。プラズマ生成前後でのガス温度の変化は、図

3-11 に示すようにどの温度域でも約 14°C と大きな変化はなかった。このため、この温度制御プラズマ装置を用いる事によって、ヘリウムプラズマジェットの高温度を -54~160°C の範囲、 $\pm 1^\circ\text{C}$  の範囲で制御できるといえる。プラズマ生成部に使用している断熱材などの耐熱温度の限界により、プラズマの高温度の上限は 160°C となっている。そのため、ヒーターより出口側の材料が高温度に耐える事ができれば、原理的にはさらに高い温度のプラズマの生成が可能である。これらの結果から、従来のプラズマ装置と比較して温度制御プラズマ装置は、プラズマの放電電力を変える事なく、-54°C から 160°C 程度の範囲でプラズマの高温度を制御できる事が示されている。

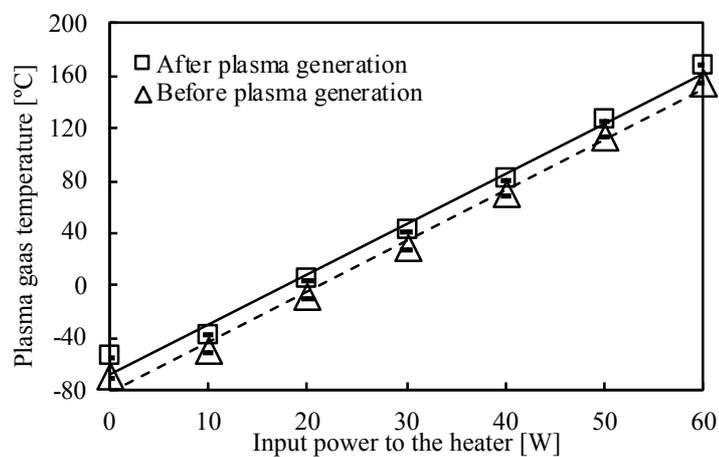


図 3-10 ヒーターへの入力電力とプラズマの高温度の関係

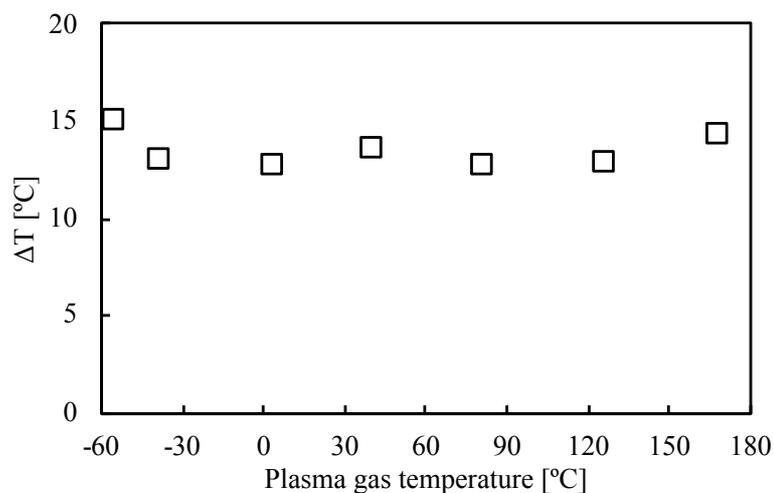


図 3-11 プラズマ生成前後の高温度の変化

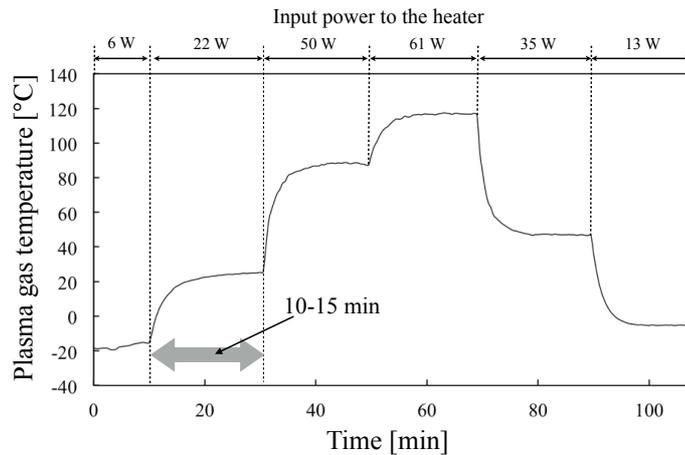


図 3-12 プラズマのガス温度制御時の時間応答

ヒーターへの入力電力を変化させた場合のプラズマのガス温度の応答を図 3-12 に示す。横軸は時間軸であり、各時間におけるヒーターへの入力電力はグラフの上部に記された値となっている。ヒーターへの入力電力が変化したあと、プラズマのガス温度はすぐに変化し始め、10～15 分程で安定した。本実験は、ヒーターへの入力電力を固定してプラズマのガス温度の測定を行っているため、プラズマのガス温度が安定するまでに時間を要する。しかし、温度を上げる場合は一気にヒーターへの入力電力を上げ、急速にガス温度を上昇させて目的のガス温度に近くなったらヒーターへの入力電力を落とす、というように測定したプラズマのガス温度をヒーターへの入力にフィードバックしてヒーターへの入力電力を制御する事で、より高速な温度制御が可能になると考えられる。

### 発光分光

プラズマのガス温度を 0, 60, 120°C に制御したヘリウムプラズマの可視光と赤外光の発光スペクトルを図 3-13 と図 3-14 に示す。可視光領域ではヘリウムの原子線が、赤外領域では酸素の原子線が観測された。いずれのガス温度でも各原子線は観測され、プラズマのガス温度の上昇に伴って、これらの原子線の発光強度が弱くなる事がわかった。この測定は、大気開放下で行われているため、酸素の原子線および、その他のスペクトルは、周辺空気中のガスやガスボンベ中の不純物由来のものであったと考えられる。

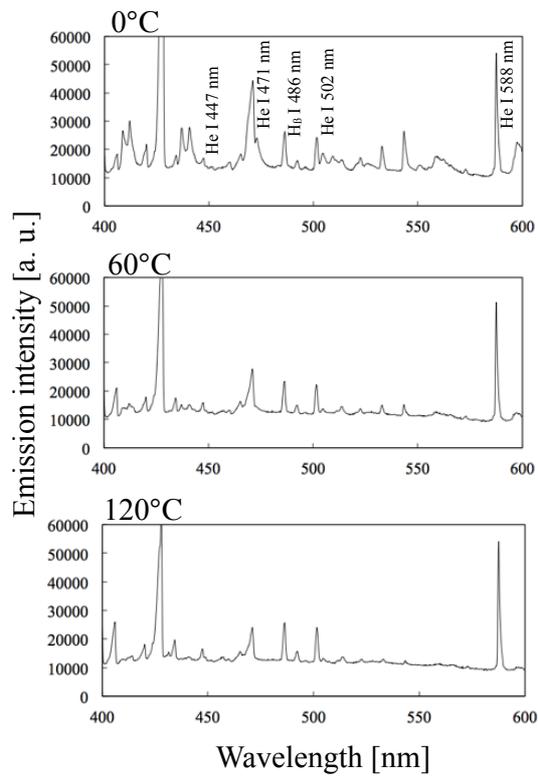


図 3-13 各プラズマのガス温度における可視光の発光スペクトル

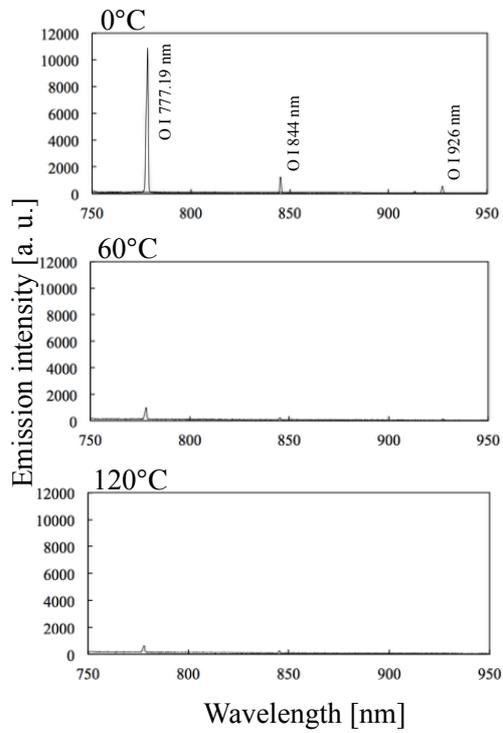


図 3-14 各プラズマのガス温度における赤外光の発光スペクトル

## 励起温度

プラズマの励起温度は高い励起状態の原子や分子の分布の広がりであるため、励起温度が高いほど励起エネルギーを持つ原子や分子が多く存在する。このため、励起温度はプラズマの反応性を示す指標となり、プラズマの処理効果に大きな影響を与えと考えられる。そこで先行研究では、温度制御した際の励起温度の変化を調べている。ヘリウムの励起温度は、447.15 nm と 501.57 nm のヘリウムの原子線を用い、2 線法により算出している。このとき使用したヘリウムの原子線の情報を表 3-1 に示す。ガス温度が 40°C のときのボルツマンプロットを図 3-15 に示す。このときのヘリウムの励起温度は 1,619°C であった。

プラズマのガス温度とヘリウムの励起温度の関係を図 3-16 に示す。同じ条件で 3 回ずつ発光を測定し、それぞれの測定結果から得られた平均値をプロットし、エラーバーは標準偏差を意味している。プラズマのガス温度を 0°C から 120°C まで増加させると、ヘリウムの励起温度は 1,200°C から 1,900°C まで上昇した。この結果から、生成されたプラズマの非平衡さが示され、励起温度はプラズマのガス温度の上昇以上に高くなっている。また、プラズマの放電電力によってプラズマのガス温度を変えた場合に生成されるヘリウムプラズマの励起温度を測定して比較した結果、温度制御プラズマ装置を用いてガス温度を制御した場合と同様に、プラズマのガス温度の上昇に伴ってヘリウムの励起温度が上昇している。このことから、プラズマのガス温度を上昇させる事でプラズマによる処理効果が高くなる可能性が示唆された。

表 3-1 励起温度の測定に使用したヘリウムの原子線

Wavelength $\lambda/\text{nm}$	Excitation energy $E_i/10^{-18}\text{J}$	Degeneracy g	A-factor $A_{ij}$
447.15	3.8029	15	0.314
501.57	3.6989	3	0.134

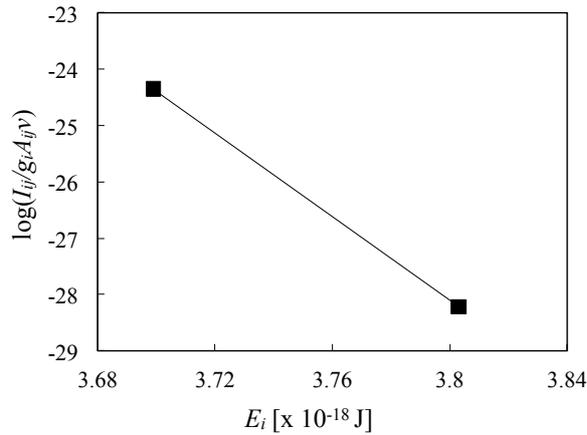


図 3-15 40°Cのプラズマにおけるヘリウムの原子線のボルツマンプロット

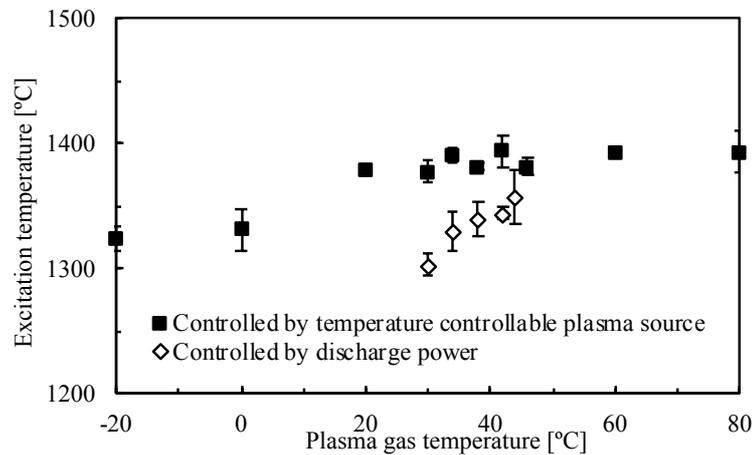


図 3-16 各ガス温度制御方式における励起温度の変化

### 3.4.2 本研究で調査した温度制御プラズマ装置の特性

#### 放電電力

温度制御プラズマ装置を用いる事によって、プラズマ生成部に入力する電力を変える事なく、プラズマのガス温度の制御が可能となった。しかし、ガス温度の変化に伴ってガスの密度や流速が変化するため、放電電力が変化する可能性がある。そこで、プラズマのガス温度を-20~80°Cに制御した際の放電電力を調査した。実験は3.4.1で行った電流電圧の測定実験と同じ実験系で行った。放電電力はプラズマにかかる電圧と回路に流れる電流の積から算出した。

プラズマのガス温度と放電電力の関係を図 3-17 に示す。測定は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。この結果からプラズマのガス温度の上昇に伴い、放電電力は減少している事がわかる。この要因としてはプラズマのガス温度の上昇に伴って電子密

度が低下している可能性が考えられる。電子密度については次項で記述する。

プラズマのガス温度を変化させると放電電力も変化したことから、プラズマの放電電力と独立にプラズマのガス温度の影響を調べる、という本研究の目的にそぐわない結果となった。しかし、従来のプラズマ源では、プラズマの放電電力とともにプラズマのガス温度が上昇しており、本研究で用いる温度制御プラズマ装置はその逆の傾向を示している。したがって、温度制御プラズマ装置で高温のプラズマを生成し、処理効果が高くなった場合は少なくとも放電電力の影響ではなくプラズマのガス温度が影響を与えている事を示唆できると考えられる。

### 電子密度

電子密度は、プラズマと処理対象物の反応頻度や各種の正イオンの生成量の指標となるため、温度とともに重要なプラズマのパラメータの一つである。電子密度の測定には、温度や平衡状態、気圧など、プラズマを生成する環境に応じた測定法が用いられている<sup>[62]-[64]</sup>。本研究では大気圧低温プラズマ中の電子密度の測定に用いられる、プラズマの発光のシュタルク広がりを用いた測定法を用いた<sup>[28]</sup>。本研究ではスペクトル線が重なっていない、水素の $\beta$ 線を用いて電子密度を求めた。3.4.1の発光分光の結果にあったように、ヘリウムプラズマでも、空気由来の水分やガスボンベ中に含まれる水分がプラズマに巻き込まれる事で $H_{\beta}$ 線が観測される。 $H_{\beta}$ 線はバルマー系列の $n = 4$ から $n = 2$ の間の遷移によって放射されるスペクトルで、中心波長は486.13 nmである。放電電力のガス温度依存性を調査した際と同様に、プラズマのガス温度は $-20^{\circ}\text{C}$ から $80^{\circ}\text{C}$ の間で制御した。

プラズマのガス温度と電子密度の関係を調べた結果を図 3-18 に示す。測定は $n = 3$ で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。 $-20^{\circ}\text{C}$ のときの電子密度は $3.4 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ であったが、プラズマのガス温度が高くなるにつれて、電子密度は低下し、 $80^{\circ}\text{C}$ のときは $2.4 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と $-20^{\circ}\text{C}$ のときと比較して約30%低下した。温度 $T_1$ における気体原子・分子の数密度 $n_{T_1}$ と温度 $T_2$ における気体原子・分子の数密度 $n_{T_2}$ の関係はボイル・シャルルの法則から次式で表される。

$$n_{T_2} = \frac{T_2}{T_1} n_{T_1} \quad \text{式 3-1}$$

ここで、 $T_1$ を253 K ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) とし、 $T_2$ を353 K ( $80^{\circ}\text{C}$ ) とすると、 $n_{T_2} = 0.72 n_{T_1}$ となる。このヘリウム原子の数密度の理論値と電子密度を比較すると、それぞれの値の変化に同様の傾向があることから、ヘリウム原子の数密度の変化が電子密度に影響を与えている可能性がある。そして、この電子密度の低下が、プラズマのガス温度の上昇に伴う、放電電力および発光強度の低下にも影響を与えていると考えられる。

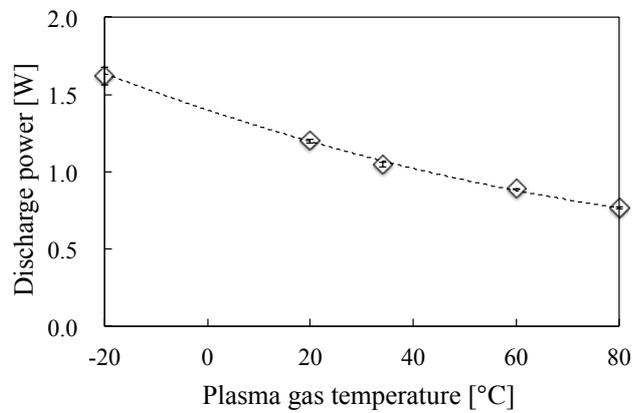


図 3-17 プラズマのガス温度と放電電力の関係

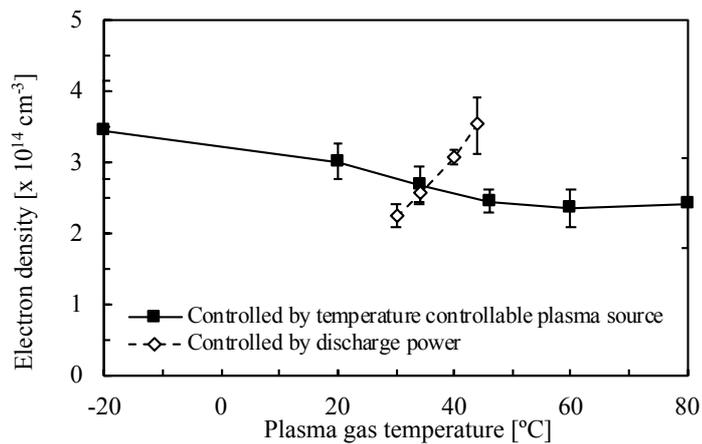


図 3-18 各ガス温度制御方式における電子密度の変化

### 3.5 プラズマのガス温度が殺菌効果に与える影響

現在、医療分野において殺菌対象となる細菌が生育する環境は、傷口や口腔内、体内など、比較的ウェットな環境である事も少なくない。そのため、液中の細菌の制御技術が重要となっており、2.2 で紹介したように様々な殺菌技術が用いられている中で、大気圧低温プラズマが新しい殺菌手法として注目されている。生体など熱に弱い対象へのプラズマの照射を考えた場合、対象に熱損傷を与えないために、プラズマのガス温度の制御が重要となる。しかし、前述の通り、一般的に用いられるプラズマ装置ではプラズマのガス温度のみを独立に制御する事ができなかった。さらに、プラズマのガス温度を精密に制御する事もできなかった。そのため、プラズマのガ

ス温度のみをパラメータとして殺菌効果を調査した報告はない。生体など熱に敏感な対象へのプラズマ照射を考えた場合、プラズマのガス温度が処理効果や生体へ与える影響の調査は必須である。

本節では、プラズマのガス温度が処理効果に与える影響の調査を目的として、温度制御プラズマ装置を用いて各種細菌に対する殺菌効果を評価した結果を記述する。

### 3.5.1 先行研究で行われた殺菌効果へのガス温度の影響調査

当研究室の先行研究では、開発した温度制御プラズマ装置を用いて、寒天培地上の細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性を調査している<sup>[31]</sup>。温度制御プラズマ装置については、次章で詳しく記述する。寒天培地に大腸菌を均一に塗布し、寒天培地の上方から温度制御した酸素とヘリウムの混合ガスのプラズマを照射した結果を図 3-19 に示す。図は寒天培地を上から観察したもので、黄色の箇所は大腸菌が生長し、コロニーを形成している。プラズマの照射時間を 1 分とした場合、25℃以上のプラズマで、直径が 15 mm ほどの阻止円が観察された。これはプラズマ装置の直下の細菌が殺菌されている事を表す。プラズマの照射時間を 3 分とした場合、全てのガス温度のプラズマ照射後に寒天培地全体で殺菌された領域が確認された。この結果から、プラズマのガス温度の上昇に伴って、殺菌効果が高くなる事、プラズマの照射時間が長い場合には、零下のプラズマでも殺菌が可能である事が示された。しかし、プラズマのガス温度が殺菌効果に影響を与える要因は明らかとなっていない。この要因としては、殺菌効果の定量評価や殺菌因子の定量が困難であった事が挙げられる。

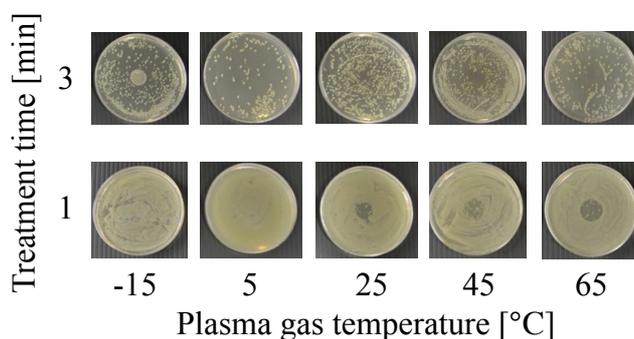


図 3-19 寒天培地上の大腸菌に対して各ガス温度のプラズマを照射した結果<sup>[31]</sup>

### 3.5.2 液中の細菌に対する殺菌効果の定量評価方法

本研究ではプラズマのガス温度が液中に存在する細菌に与える影響を定量的に調査するために、次の方法で殺菌実験を行った。図 3-20 に示すようにサンプルカップに入れた 200  $\mu\text{L}$  の菌液に対して、10~80  $^{\circ}\text{C}$  に制御したプラズマを照射した。指標菌には、一般細菌として大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922), 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853), 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923), 腸球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC29212) を用い、芽胞形成菌としてセレウス菌 (*Bacillus cereus* JCM2152) を用いた。ガスの体積は温度によって変化するため、ガス流量の制御にはマスフローメーターを使用し、単位を Standard Litter per Minute (SLM) とした。プラズマは温度制御プラズマ装置に酸素 3%とヘリウム 97%の混合気体を 10 SLM 流して生成し、液面上 5 mm の位置から照射した。酸素混合ヘリウムガスを用いた理由としては、先行研究でヘリウムガス単体よりも酸素を混合したほうが殺菌効果は高くなり、酸素を 3%添加する事によって数分で高い殺菌効果が得られる事が明らかとなっているため、実験の便宜上使用した<sup>[31]</sup>。溶媒の pH が変わる事で殺菌効果が高くなる事が報告されているため、プラズマのガス温度のみの影響を調べるためには pH の変動を抑えられる事が望ましい<sup>[43]</sup>。また、細菌に浸透圧によるストレスを与えないために溶媒の塩濃度を 0.9%に調整する必要がある。そこで、菌液の溶媒としてはダルベッコリン酸緩衝液(-) (DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(-)) を使用した。プラズマによる殺菌効果は、プラズマによって生成される活性酸素種の酸化ストレスであると考えられている<sup>[25]</sup>。液中に導入される活性種には液中での寿命が数マイクロ秒と短いものから数十分と長いものも存在し、活性種と細菌の反応(接触)時間が殺菌効果に影響を与える。活性種と細菌の反応時間を一定にする事で反応時間が殺菌効果へ与える影響を除く事ができる。本研究では、反応時間をプラズマによって液中に導入される活性種を失活させる事で制御した。活性種を失活させるために、プラズマ照射後の細菌懸濁液を室温で 20 分間静置させたのち LB 培地と 1:1 で混合した。このため、本章の殺菌実験における活性種と細菌の反応時間はすべて 20 分となっている。LB 培地と混合した細菌懸濁液を段階希釈して寒天培地上に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベータで 15~20 時間培養した。もし、細菌が 1 個生存していたら、その細菌が寒天培地上で分裂して増殖し、コロニーと呼ばれる集団を形成するため、目視での菌数カウントが可能になる。そこで本研究では、育成したコロニー数をカウントする事で殺菌効果を定量的に評価し、生菌数の単位をコロニー数で考える CFU (Colony Forming Unit) とした。細菌培養用の培地には LB 培地を使用した。また、今回の実験では、培地上に塗布した菌液の内、一般細菌に関しては、10 倍希釈した菌液の濃度が最も高く、その菌液を 10  $\mu\text{L}$  塗布したため、検出下限値は 200 CFU となった。なお、実験はすべて大気開放雰囲気下で行った。

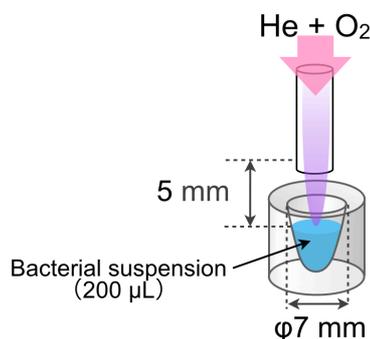


図 3-20 各ガス温度のプラズマによる殺菌実験における菌液へのプラズマの照射方法

### 3.5.3 液中の細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性

一般細菌および芽胞形成菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性を調べた結果を図 3-21 に示す。グラフは横軸がプラズマの照射時間、縦軸がプラズマ照射後の生菌数をログスケールで表しており、各温度のプラズマを照射した結果をプロットしている。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。標準偏差の値が平均値を上回った場合、負の範囲は表示していない。また、下部の破線は検出下限値を表しており、細菌の生存が確認されなかった、もしくは最も濃い菌液を塗布した培地上で 1 つコロニーが検出された場合に破線上にプロットしている。

初期菌数が約  $6.8 \times 10^7$  CFU の大腸菌に対して  $10^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した結果、プラズマの照射時間が長くなるほど生菌数が減少していき、2 分間照射する事で生菌数が約  $2.2 \times 10^4$  CFU となり、約 3 桁減少した。そして、プラズマのガス温度が高くなるにつれて、短い照射時間で生菌数が減少し、 $50^\circ\text{C}$  以上のプラズマを 20 秒間照射した場合には、コロニーは形成されず、生菌数は検出下限値である 200 CFU を下回った。

初期菌数が約  $9.2 \times 10^7$  CFU の緑膿菌に対して  $10^\circ\text{C}$  のプラズマを 2 分間照射した結果、生菌数は約  $4.9 \times 10^7$  CFU となり、生菌数は約半分になっていた。そして、 $20^\circ\text{C}$  のプラズマを 2 分間照射した場合、生菌数は約  $1.5 \times 10^7$  CFU となり  $10^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した場合のさらに半分になっていた。さらにプラズマのガス温度を上げていくと、生菌数の減少量が急激に増加し、 $30^\circ\text{C}$  のプラズマでは 2 分間のプラズマ照射で生菌数が約  $6.7 \times 10^4$  CFU となり、 $60^\circ\text{C}$  以上のプラズマでは 20 秒間の照射で生菌数が検出下限値を下回った。

初期菌数が約  $3.8 \times 10^7$  CFU の黄色ブドウ球菌に対して  $10^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した結果、生菌数は約  $8.1 \times 10^6$  CFU となり生菌数は約半分になっていた。 $20^\circ\text{C}$  のプラズマを 2 分間照射した場合には、生菌数が約  $2.5 \times 10^3$  CFU となり、4 桁以上減少していた。そして、プラズマのガス温度の上昇とともに短い照射時間で生菌数が減少し、大腸菌と同様に  $50^\circ\text{C}$  以上のプラズマで

は 20 秒間の照射で生菌数が検出下限値を下回った。

初期菌数が約  $7.1 \times 10^7$  CFU の腸球菌に対して  $10^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した結果、生菌数は約  $8.6 \times 10^6$  CFU となり、約 1 桁減少した。 $20^\circ\text{C}$  のプラズマを 2 分間照射した場合には生菌数が約  $2.4 \times 10^6$  CFU となり  $10^\circ\text{C}$  のプラズマの約 1/4 になっていた。さらにプラズマのガス温度を上げていくと、短い照射時間で生菌数が減少し、緑膿菌と同様に  $60^\circ\text{C}$  以上のプラズマでは 20 秒間の照射で生菌数が検出下限値を下回った。

初期菌数が約  $1.4 \times 10^7$  CFU のセレウス菌に対して  $10^\circ\text{C}$  および  $20^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した結果、生菌数は約  $3.6 \times 10^6$  CFU となりほぼ同じであった。 $30^\circ\text{C}$  から  $80^\circ\text{C}$  のプラズマを 2 分間照射した場合には生菌数が徐々に減少し、 $80^\circ\text{C}$  のプラズマでは 2 分間の照射で生菌数が約  $4.0 \times 10^2$  CFU となった。

これらの結果から、温度の変化に伴う殺菌効果の変化の程度は菌種によって異なったものの、いずれの菌種に対してもプラズマのガス温度の上昇に伴って殺菌効果が高くなる事を実証した。この事から、菌種によってプラズマによって生成される殺菌因子に対する耐性または殺菌因子の種類が異なっている可能性が考えられる。また、大腸菌と黄色ブドウ球菌に関しては、室温以下の  $10^\circ\text{C}$  や  $20^\circ\text{C}$  のプラズマを照射した場合においても 2 分間で生菌数を 4~5 桁減少させる高い殺菌効果が確認された事から、生体へ直接照射する際に熱損傷を与える事なく、高い殺菌効果が得られる可能性を示した。

プラズマの照射時間を  $t$  [min]、反応時間(接触時間)を  $t'$  [min] とした場合、生菌数の減少量は次の式で表す事ができる<sup>[49]</sup>。

$$\text{Log}_{10} \left( \frac{N_0}{N} \right) = kct' = kat't \quad \text{式 3-2}$$

ここで、 $N_0$  [CFU] は初期菌数、 $N$  [CFU] は  $t$  分間プラズマ照射後の生菌数、 $k$  [L/(mol·min)] は反応速度定数、 $c$  [mol/L] は殺菌因子濃度を表す。殺菌因子の寿命が長い場合、殺菌因子の濃度  $c$  は、単位時間あたりのプラズマ照射による殺菌因子の導入量  $a$  [mol/(L·min)] とプラズマ照射時間  $t$  の積で表される。 $t'$  はどの条件でも 20 分としており、同じガス温度のプラズマおよび細菌では、 $a$  および反応速度  $k$  は一定となる。そのため、 $kat'$  の値は殺菌対象とする菌種およびプラズマのガス温度によって異なってくると考えられる。そこで本研究では、各ガス温度のプラズマの殺菌能と液中への活性種の導入量を定量的に比較するために、 $kat'$  の値を殺菌能 (BA: Bactericidal Ability) として定義し、各菌種およびガス温度ごとに算出した。BA 値は単位時間あたりのプラズマ照射によって減少させる菌の桁数を表す。

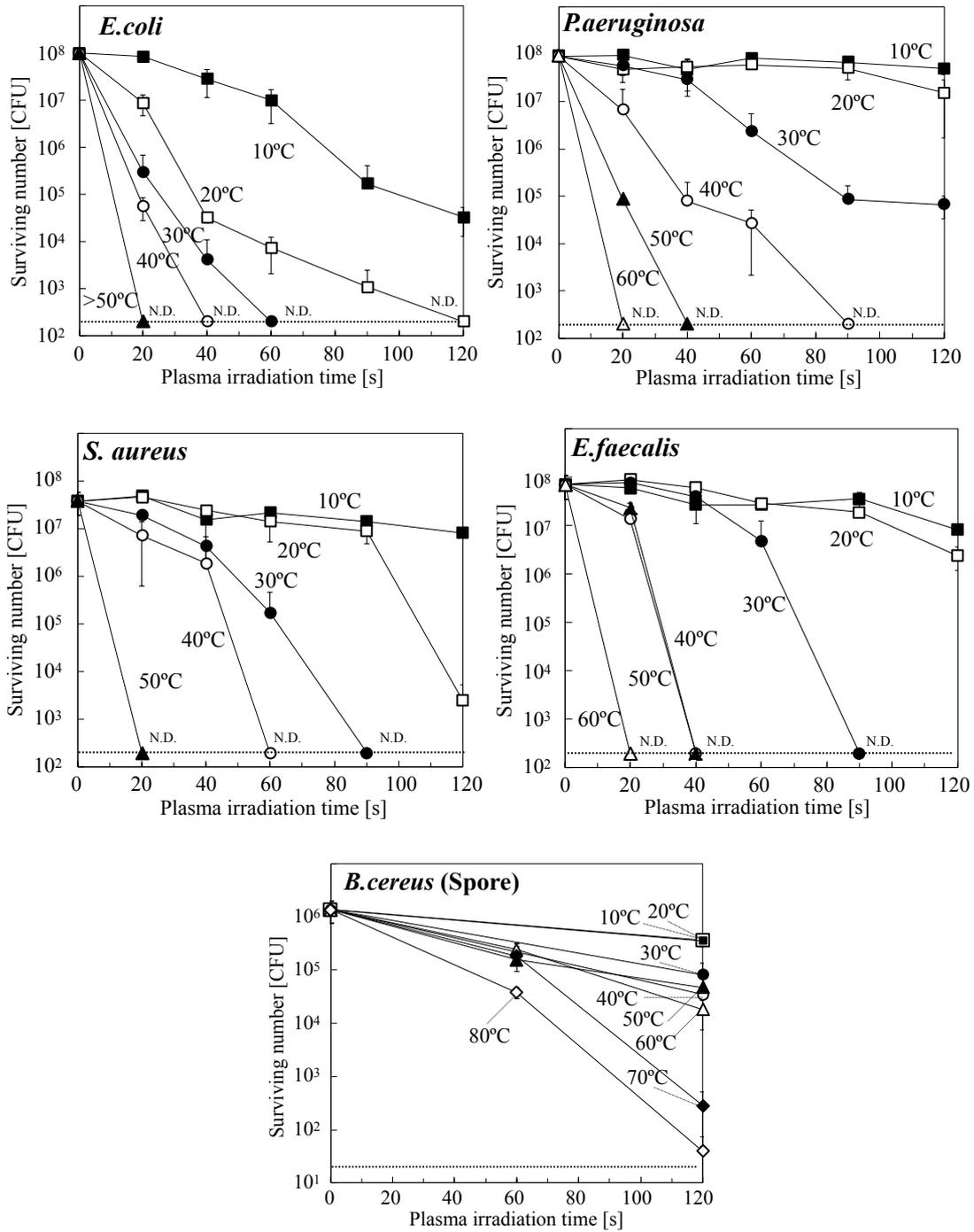


図 3-21 各種細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性

プラズマ照射によって細菌やがん細胞を不活化させるためには、一定時間以上のプラズマ照射が必要である事が報告されている<sup>[65]</sup>。そこで、プラズマの照射時間と生菌数のグラフにおいて、生菌数がしきい値以下となる点の一つ前の点から生残直線を作成し、その直線の傾きを  $BA$  値とした。本論文ではしきい値を初期菌数の 10 分の 1 とした。そのため、 $BA$  値は  $BA = \log(N_1/N_2)/(t_2-t_1)$  として計算した。このとき、 $N_1$ と  $N_2$ はそれぞれ、 $t_1$ および  $t_2$ 分間プラズマ照射後の生菌数である。2 分間照射後の生菌数と初期菌数に 1 オーダー以上の差がなかった場合は、 $BA_1 = 0$ とした。最短の照射時間である 1/3 分 (20 秒) 以内に検出下限値となった場合は、 $BA_2 = \log(N_0/200)/(1/3)$ とした。 $BA_1$ と  $BA_2$ に関しては各菌種の各ガス温度でそれぞれ 1 点ずつ使用し、他の点を除外した。 $BA_1$ に関しては検出下限値以下となった始めの点、 $BA_2$ に関しては  $BA_2$ の中で最も高い温度の点を使用した。

たとえば、*P.aeruginosa* に対する  $BA$  値は次のようになった。*P.aeruginosa* の初期菌数は  $9.2 \times 10^7$  CFU であるため、しきい値を  $9.2 \times 10^6$  CFU とした。図 3-22 の上の破線はしきい値を示し、実線は  $BA$  値を求めるために使用した 2 点を繋いでいる。10°Cと 20°Cのプラズマでは、2 分間のプラズマ照射で、生菌数がそれぞれ、 $4.9 \times 10^7$ ,  $2.3 \times 10^7$  CFU となっており、減少値は 1 桁未満となった。このため、これらの温度では、 $BA$  値は 0 となった。30°Cでは、1 分間のプラズマ照射で生菌数がしきい値以下となり、2 分間で  $6.7 \times 10^4$  CFU となった。そのため、 $BA$  値は  $\log(2.9 \times 10^7/6.7 \times 10^4) / (2 - 2/3) = 2.0 \text{ min}^{-1}$ となった。40°Cでは、1/3 分 (20 秒) 照射後の生菌数がしきい値以下となり、1.5 分間のプラズマ照射で検出下限値以下となった。そのため、 $BA$  値は  $\log(9.2 \times 10^7/200) / (1.5 - 0) = 3.8 \text{ min}^{-1}$ となった。60°C以上のプラズマでは生菌数が 1/3 分以内に検出下限値以下となったため、 $BA$  値は  $\log(9.2 \times 10^7/200)/(1/3) = 17 \text{ min}^{-1}$ 以上となった。

同様にして求めたそれぞれの菌種に対する各ガス温度のプラズマの  $BA$  値を図 3-24 に示す。*E.coli*, *P.aeruginosa*, *E.faecalis*, *S.aureus*, *B.cereus*に対する殺菌能は 10°Cのプラズマでは、それぞれ 2.4, 0, 1.3, 0, 0  $\text{min}^{-1}$ であった。これに対して、80°Cのプラズマではそれぞれ、 $>17$ ,  $>17$ ,  $>17$ ,  $>16$ , 3.0  $\text{min}^{-1}$ となり、それぞれの殺菌能は大きく向上した。これらの結果から、芽胞形成菌はプラズマに対する耐性がその他の細菌と比較して高く、その他の細菌の間では大きな違いがない事を明らかにした。また、いずれの菌種に対しても、プラズマのガス温度の上昇に伴って、殺菌能が高くなる事を定量的に示した。

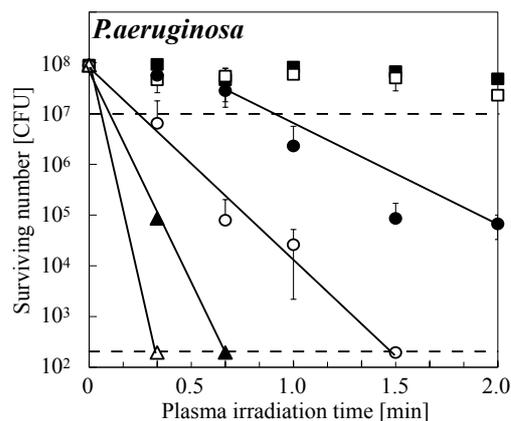


図 3-22 BA 値を算出する際のしきい値の設定

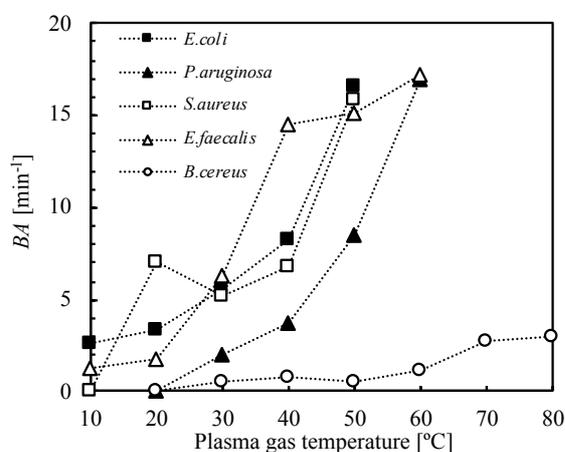


図 3-23 各種細菌に対する殺菌能とプラズマのガス温度の関係

### 3.5.4 プラズマの熱が殺菌効果に与える影響

プラズマのガス温度の上昇に伴う殺菌効果の向上には、プラズマの熱が細菌に直接作用し、殺菌効果に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、殺菌実験で使用したプラズマの最高温度である 80°C の酸素混合ヘリウムガスを殺菌実験と同様の条件下で各種菌液に対して 2 分間照射し、生菌数を調べた。その結果を図 3-24 に示す。グラフの縦軸は生菌数であり、下の破線は検出下限値を表している。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。いずれの菌種に 80°C のプラズマを照射した後の生菌数は検出下限値以下、またはその近くの値となっている。一方、80°C のガスを照射した後の生菌数はいずれの菌種においても生菌数は減少しなかった。さらに、各ガス温度のプラズマを照射した後の水温を測定した結果を図 3-25 に示す。グラフの破線はプラズマ照射前の水温を示す。10°C のプラズマ照射後の菌液の温度は、6.0°C であり、プラズマのガス温度の上昇に伴って水温は上昇した。しかし、80°C のプラズマでも、

照射後の菌液の温度は、照射前の 23.0℃からほとんど変わらず 22.9℃であった。このことから、プラズマのガス温度の上昇に伴う殺菌効果の向上に、プラズマの熱が直接的に関与していないと考えられる。

また、200  $\mu$ L の菌液に各ガス温度のプラズマ照射した後の液量の変化を図 3-26 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。このグラフから、ガス温度に比例して液量が気化し、液量が減少している事がわかる。そのため、80℃のガス吹付け後の生菌数が処理前よりもわずかに増加している原因には、ガスの吹き付けで菌数が減らないにも関わらず、ガス温度に応じて菌液の水分が気化するため、菌濃度が高くなる事が影響していると考えられる。

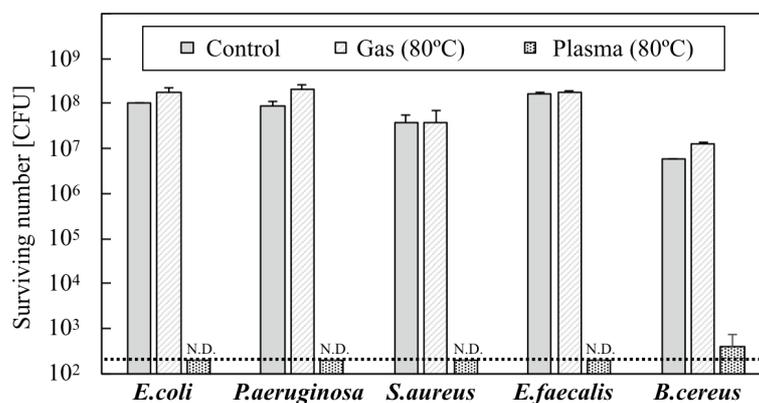


図 3-24 各種細菌へ 80℃のガスおよびプラズマ照射後の生菌数(照射時間 2 分)

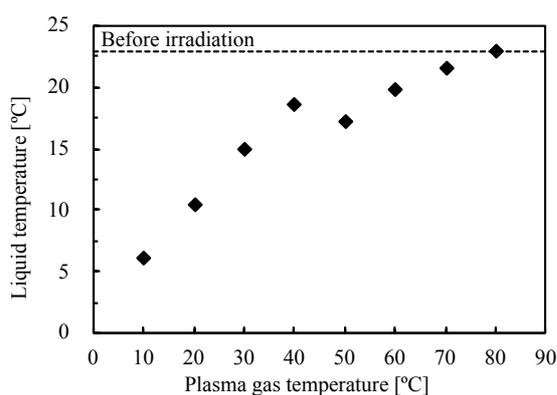


図 3-25 各ガス温度のプラズマを照射した後の液温

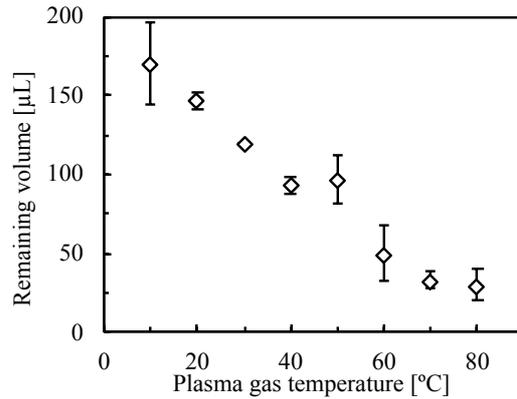


図 3-26 各ガス温度のプラズマを照射後の溶液の残量  
(初期液量 200 μL, 照射時間 2 分)

### 3.5.5 ガス流速が殺菌効果に与える影響

本研究で使用した温度制御プラズマ装置は、温度制御部の前にマスフローメーターを設置し、プラズマのガス温度を制御する前の流量を一定にしていた。温度制御部を通過する事でガスの体積がガス温度に応じて変化するのに対し、プラズマジェットの噴出口の口径は変わらないため、プラズマ生成部付近のガス流速が変化している。この事が殺菌効果に影響を与えている可能性が考えられるため、プラズマのガス温度は一定にし、ガス流量を変える事で模擬的にガス流速を変化させ、プラズマのガス流速が殺菌効果に与える影響を調べた。今回の実験では 0, 40, 80°C のときのガス流速で殺菌実験を行った。ガス温度とガス流速の関係は以下の手順で算出した。

プラズマジェットの噴出部は大気圧であり、気圧は大きく変わらないため、ボイル・シャルルの法則から温度  $T$  のときの気体の体積  $V$  を用いて次式で表される。

$$V = \frac{V_0}{T_0} T \quad \text{式 3-3}$$

このとき、 $T_0$  は 0°C の気体の温度であり、そのときの気体の体積を  $V_0$  としている。そして、ガス流速  $v$  はプラズマジェットの噴出口の面積を  $S$  とすると次式で求める事ができる。

$$v = \frac{V}{S} \quad \text{式 3-4}$$

プラズマジェットの口径は、プラズマジェット本体の温度によって変化するが、石英ガラスの熱膨張率は  $10^{-7}$  であり、3.5.2 の実験では温度差が最大で 70°C しかないため熱膨張は無視し、 $S$  を定数として扱う。式 3-5 と式 3-6 からガス流速とガス温度の関係は次式となる。

$$v = \frac{V_0}{ST_0} T \quad \text{式 3-5}$$

3.5.2 の殺菌実験では、ガス流速を 10 SLM に統一していた。そのため、 $V_0 = 10 \text{ L}$ 、 $S = 4.7 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ 、 $T_0 = 273.15 \text{ K}$  として、 $T = 40^\circ\text{C}$  (313 K) のときの流速  $v_{40}$  と  $T = 80^\circ\text{C}$  (353 K) のときのガス流速  $v_0$  を導出したところ、ガス流速は図 3-27 のように  $40^\circ\text{C}$  のときは 1.15 倍になり、 $80^\circ\text{C}$  のときは 1.29 倍になり、そのときの流速は 23.6, 27.1, 30.5 m/s となると算出した。そこで、温度制御部の前のガス流量をそれぞれ 10.0, 11.5, 12.9 SLM とする事で擬似的にガス流速を変化させて殺菌実験を行った。このときのプラズマのガス温度は  $40^\circ\text{C}$ 、照射時間を 1 分間とし、指標菌には大腸菌を用いた。

その結果を図 3-28 に示す。グラフの横軸はガス流速、縦軸が生菌数を表しており、破線は初期菌数を表している。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。ガス流量を 10, 11.5, 12.9 SLM としたプラズマを照射したあとの生菌数はそれぞれ約  $6.9 \times 10^4$ ,  $2.1 \times 10^4$ ,  $6.5 \times 10^3$  CFU となり、生菌数はガス流速の上昇に比例して減少した。この事から、プラズマのガス流速の変化によって、殺菌効果が増加する事を明らかにした。しかし、3.5.2 の殺菌実験において、 $10^\circ\text{C}$  と  $80^\circ\text{C}$  のプラズマを 20 秒間照射した場合には生菌数に 5 桁以上差が生じているが、ガス流速を変えた場合には約 1 桁しか差が生じなかった。この事から、ガス流速の変化がプラズマのガス温度の上昇に伴う殺菌効果の向上の主な要因ではなく、ガス流速が速くなる事でプラズマ中に生成される寿命を持つ殺菌因子が早く液面に到達し、殺菌効果が高くなったと考えられる。

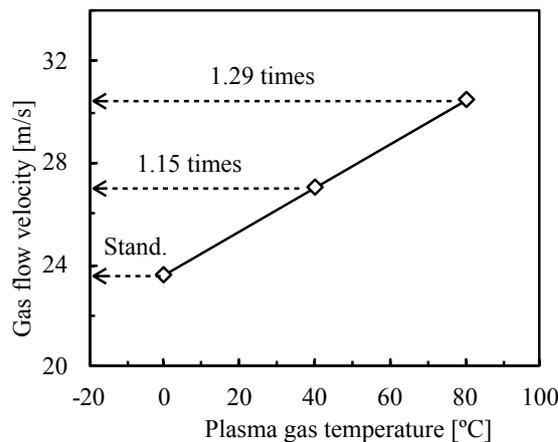


図 3-27 理論的に算出したプラズマのガス温度とガス流速の関係

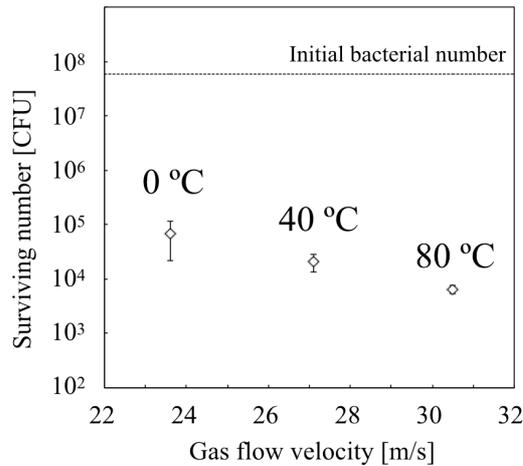


図 3-28 プラズマのガス流速が大腸菌に対する殺菌効果に与える影響

### 3.6 プラズマガス温度が液中の活性種量に与える影響

前節で行った殺菌実験により、プラズマのガス温度の上昇に伴って殺菌効果が向上し、その要因に短い寿命を持つ殺菌因子が寄与している可能性を示した。さらに、室温以下のプラズマにおいても高い殺菌効果が得られた事から、殺菌因子を明らかにし、室温程度の低温のプラズマで殺菌因子をより多くする事ができれば、生体など熱に弱い対象に熱損傷を与える事なく、高効率殺菌を実現できる可能性がある。

プラズマはその生成条件により、温度、密度など多様なパラメータを持つ。そのパラメータはプラズマによって生成されている殺菌因子に影響を与えると考えられる。たとえば、プラズマから発せられる紫外線は使用するガス種や放電電力によって波長や強度が異なり、電子やイオンの生成量に関しては放電方法で大きく変わってくる。図 3-29 に示すようにプラズマによる殺菌効果にはプラズマによって生成される物質の化学的な作用や、紫外線による DNA 損傷や電子やイオンの衝突によるエッチングなどの物理的な作用が影響を与えていると考えられている<sup>[66]</sup>。この中でも紫外線の影響に関しては多くの議論が成され、結果プラズマ殺菌の主な要因ではないとされている<sup>[67]</sup>。現在、プラズマ殺菌の殺菌因子としてはプラズマによって生成される活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) や活性窒素種 (RNS: Reactive Nitrogen Species) などの活性種が最も有力であるとされている。活性種は化学的に細菌に酸化ストレスを与え、細菌の不活化を引き起こしていると考えられている<sup>[30], [68]</sup>。

本実験では、ヘリウムと酸素の混合プラズマを用いている事から、活性種の中でも ROS が寄与していると考えられる。ROS は酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称で、

一般にヒドロキシルラジカル (HO·), 一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ), 過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), スーパーオキシドアニオンラジカル ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) の 4 種類とされる<sup>[37]</sup>。広義の活性酸素種として, オゾン ( $\text{O}_3$ ) と, RNS でもある一酸化窒素ラジカル ( $\text{NO}\cdot$ ) と二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) などがある。これらと似た表現でフリーラジカルと呼ばれる分類は, 不対電子を持つ原子や分子を指し, 上記のヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンラジカル, さらには原子状酸素 ( $\text{O}$ ) がこれに分類される。これらの活性種が細菌に与える酸化ストレスの強さは, それぞれの活性種が持つ酸化電位によって決まる。酸化電位は酸化還元電位とも呼ばれ, その物質が他の物質を酸化しやすいか還元しやすいかを定量的に表す尺度である。この値が正であれば酸化作用を示し, 負であれば還元作用を示す。代表的な ROS の酸化電位を表 3-2 に示す。この中ではヒドロキシルラジカルが最も高い酸化力を持つ。一重項酸素は基底状態の三重項酸素より高いエネルギーを有し, 他の物質と化学的に反応する場合と, 物理的に衝突する事でエネルギーを他の物質に渡す場合があるとされている。そのため, 一重項酸素に関しては酸化電位が定義されていない。

プラズマによる殺菌要因を明らかにするためには, プラズマによって生成される活性種と殺菌効果を定量的に比較する事が望ましい。プラズマによって生成される活性種の観測方法には, 発光分光法やレーザー誘起蛍光法などの非接触のものも存在するが, これらの観測方法では活性種量を定量する事ができない<sup>[69], [70]</sup>。活性種の定量方法には, 活性種を捕捉する試薬を含む溶液にプラズマを照射し, 液中の活性種濃度を測定する手法が多く存在する<sup>[71]-[73]</sup>。

本節では本研究で用いた液中に導入される活性種量の定量方法について記述したのち, 液中の活性種濃度のプラズマガス温度依存性を調査した結果を記述する。

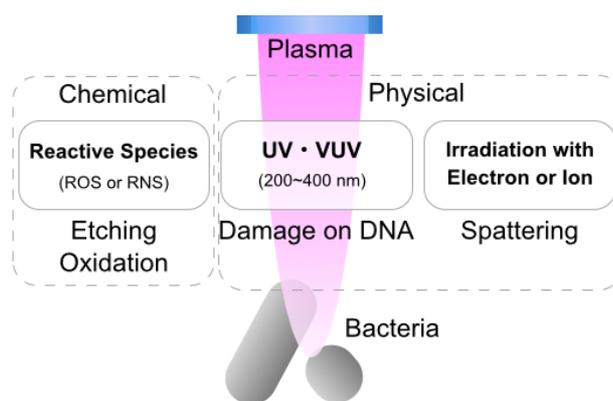


図 3-29 プラズマによる殺菌に関与する因子<sup>[66]</sup>

表 3-2 代表的な ROS の酸化電位

Reactive species	Oxidant potential [V]
HO·	2.80
O	2.42
O <sub>3</sub>	2.07
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.78
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1.70

### 3.6.1 液中の活性種の定量方法

本実験では酸化電位または有するエネルギーが比較的高く、殺菌に寄与している可能性が高い活性種である、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素、オゾンを選定対象とした。溶けている物質や環境にも依るが、ヒドロキシルラジカルと一重項酸素はどちらも反応性が高いため、それぞれ室温の液中における寿命はおおよそナノ秒オーダーとナノ秒～マイクロ秒オーダーであり、直接観測する事は難しい<sup>[74]</sup>。そこで本研究ではヒドロキシルラジカルと一重項酸素を電子スピン共鳴法 (ESR: Electron Spin Resonance) を用いて定量測定した。また、過酸化水素とオゾンに関しては吸光光度法を用いて定量測定した。

#### ESR を用いたスピントラッピング法

ESR は不対電子を有する原子や分子、いわゆるフリーラジカルをそれぞれのトラッピング剤でトラップし、その後の生成物に磁場をかけてゼーマン分裂させ、磁気共鳴させる事で固有のゼーマンエネルギーを波形情報として得る装置である<sup>[75]</sup>。つまり、非常に寿命の短いラジカルをトラッピング剤に一度トラップする事で寿命を延ばし、ラジカルとトラッピング剤の反応による生成物を検出する事で、間接的にラジカルの量を検出する。この手法をスピントラッピング法という。

ESR によってヒドロキシルラジカル、一重項酸素、水素ラジカル、一酸化窒素などの活性種の測定が可能である。本研究ではヒドロキシルラジカルのトラッピング剤に 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (DMPO)を用い、一重項酸素のトラッピング剤に 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC) を用いて測定した。それぞれの詳細な情報を表 3-3 に示す。

ヒドロキシルラジカルは図 3-30 に示すように DMPO と反応し、DMPO-OH を生成する<sup>[72]</sup>。一重項酸素は不対電子を持たないが、図 3-31 に示すように TPC を酸化させる事で不対電子を持つスピンアダクトを生成する<sup>[76]</sup>。

生成されたスピンアダクトはそれぞれ固有の磁場で共鳴する。TPC と DMPO から生成される

スピンドクトは 330.5～340.5 mT の磁場をかける事で固有の磁気共鳴スペクトルを観測する事ができる。図 3-32 に DMPO-OH の、図 3-33 に TPC の酸化物の磁気共鳴スペクトルの例を示す。DMPO-OH から観測される 4 本の固有のスペクトルの強度は左から順にほぼ 1 : 2 : 2 : 1 となり、ピーク値は DMPO-OH の濃度と比例する。また、ESR で得られるスペクトルはマイクロ波の微分系の吸収スペクトルを示しており、得られたスペクトルを 2 回積分した値がスピンドクト量を表す。TPC の酸化物の吸収スペクトルから求められるスピンドクト量は、液中の TPC の酸化物の濃度、つまり一重項酸素の濃度と比例する。

それぞれのラジカルを定量するためには濃度が既知である試料を用いて検量線を作成する必要がある。本研究ではその標準試料として 50 mM の 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-Oxyl (TEMPO) を用い、表 3-4 に示す条件で測定した。その際に得たスペクトルを図 3-34 に示す。ヒドロキシルラジカルの濃度はこのスペクトルの 333.7 mT 前後のピーク値を 50 mM として DMPO で得られたスペクトルの 333.3 mT 前後のピーク値と比を取る事で算出し、一重項酸素の濃度は TEMPO のスピンドクト量を 50 mM として TPC の酸化物のスピンドクト量と比を取る事で算出した。

表 3-3 実験に使用したスピントラッピング剤

試薬名	分子式, 分子量	製造会社
2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC) 99%	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O 168.24	SIGMA-ALDRICH
5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (DMPO) ≥99%	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO 113.16	(株) 同仁化学研究所

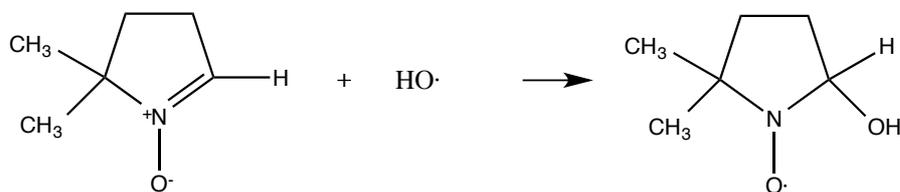


図 3-30 DMPO と HO· の反応による DMPO-OH の生成<sup>[75]</sup>

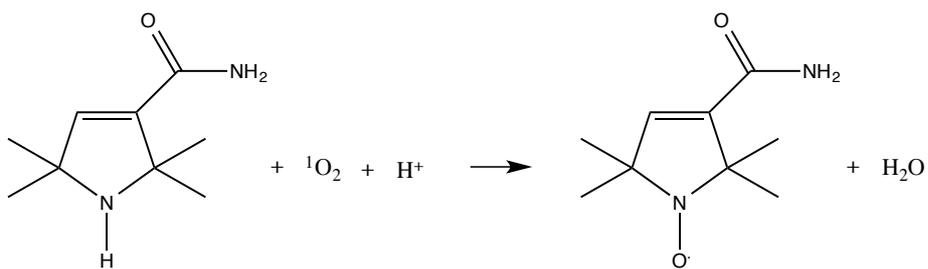


図 3-31 TPCと $^1\text{O}_2$ の反応によるTPC酸化物の生成<sup>[75]</sup>

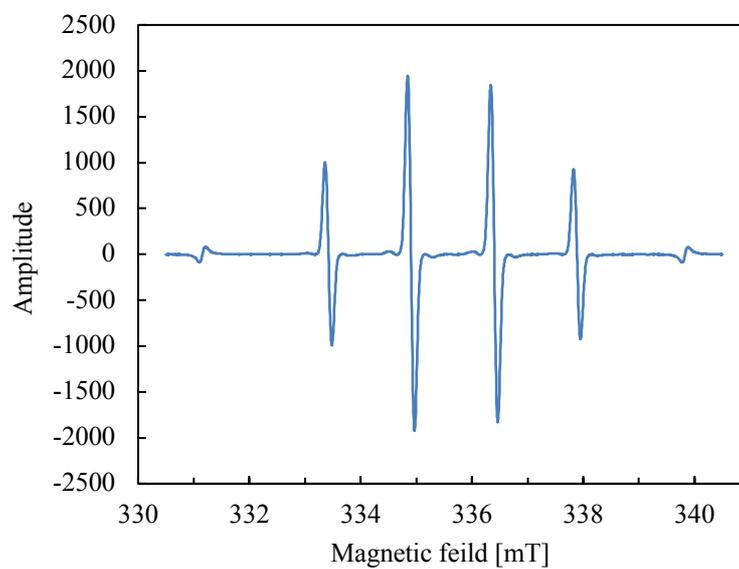


図 3-32 DMPO-OHの磁気共鳴スペクトル

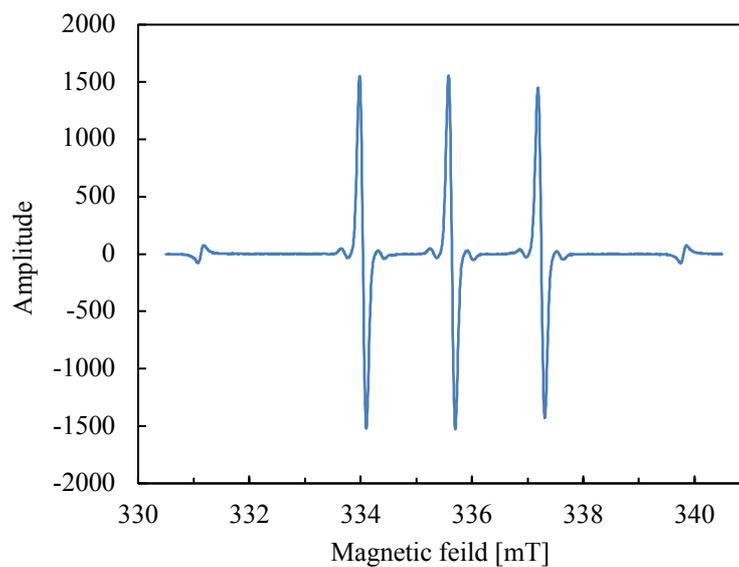


図 3-33 TPCのスピンアダクトの磁気共鳴スペクトル

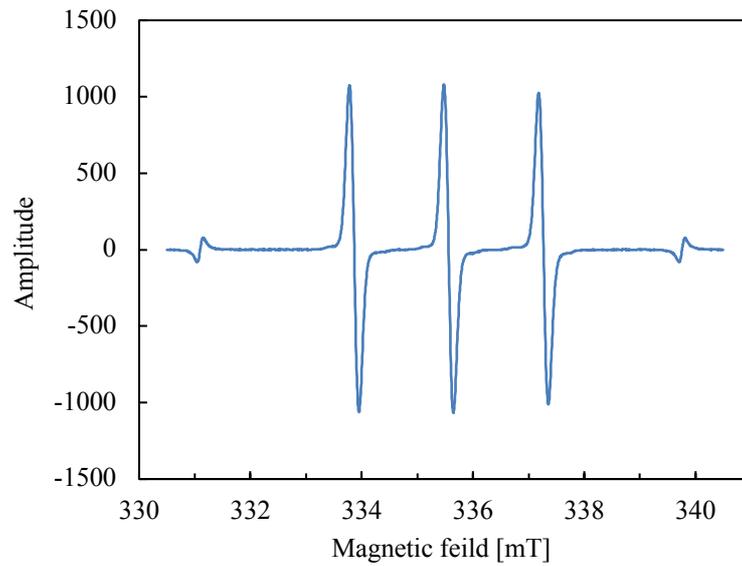


図 3-34 TEMPO の磁気共鳴スペクトル

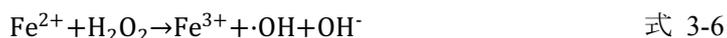
表 3-4 ESR の測定条件

	DMPO	TPC
Microwave frequency [GHz]	9.43	9.43
Power [mW]	1	1
Magnetic field [mT]	$335.5 \pm 5$	$335.5 \pm 5$
Sweep time [min]	2	2
Modulation frequency [kHz]	100	100
Modulation width [mT]	0.1	0.1
Time constant [sec]	0.1	0.1

## 吸光光度法

本研究では、プラズマ照射後の溶液中のオゾン (O<sub>3</sub>) と過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の量の定量に吸光光度法を用いた。吸光光度法では、固有の活性種と反応し、呈色または脱色する試薬の吸光度を測定し、その吸光度から活性種量を定量する事ができる。

液中の過酸化水素の濃度はフェントン反応を利用して定量測定される。フェントン反応とは過酸化水素と2価の鉄イオン Fe<sup>2+</sup>が反応する事で、Fe<sup>2+</sup>が酸化して3価の鉄イオン Fe<sup>3+</sup>となる反応の事であり、次の反応式で表される。



過酸化水素と Fe<sup>3+</sup> の濃度は比例関係にあり、すべての過酸化水素が Fe<sup>2+</sup> と反応すると仮定すると、Fe<sup>3+</sup> の生成量を調べる事で過酸化水素の濃度を間接的に調べる事ができる。そこで、過酸化水素の定量実験では、Fe<sup>3+</sup> と反応する事で呈色反応を起こすキシレノールオレンジ (XO, C<sub>31</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>13</sub>S) を溶媒に混ぜて吸光度を測定し、特定波長の吸光度の変化から液中の過酸化水素を定量した。次式に Fe<sup>3+</sup> とキシレノールオレンジの反応式を示す。



Fe<sup>3+</sup> と反応する前のキシレノールオレンジは 440 nm 付近の波長の光を吸収するが、Fe<sup>3+</sup> とキシレノールオレンジが結合した Fe<sup>3+</sup>-XO は 580 nm 付近の光を吸収する。そのため、Fe<sup>3+</sup> の生成量が多くなるほど、吸光波長のピークの分布は 440 nm 付近から 580 nm 付近へとシフトしていく。長さ *l* の媒質を透過した光の吸光度 *I* と Fe<sup>3+</sup>-XO の濃度 *c* の関係は次のランベルト・ベールの式で表される。

$$\log_{10}(I) = -\epsilon cl \quad \text{式 3-8}$$

このとき、 $\epsilon$  はモル吸光係数を表している。同じ実験系であれば  $\epsilon$  と *l* は変わらないため、Fe<sup>3+</sup>-XO の濃度 *c* に比例して  $\log_{10}(I)$  は高くなる。したがって、過酸化水素の濃度が高くなってフェントン反応が進むほど 580 nm 付近の吸光度も指数関数的に高くなっていく。

本研究における過酸化水素の定量測定には、表 3-5 に示す試薬を用いた<sup>[77]</sup>。定量測定するためには、既知の濃度の過酸化水素を用いてあらかじめ検量線を作成する必要がある。そこで、1~50  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水を作成し、試薬と混ぜあわせ、350~700 nm の波長の光でスキャンして吸光度を測定する事で検量線を作成した。吸光度の測定にはダブルビーム型の可視・紫外域吸光分光光度計 (U-2900, Hitachi High Technologies Co.) を用いた。その結果、図 3-35 に示すように過酸化水素の濃度が高くなるほど 440 nm 付近の吸光度が下がり、580 nm 付近の吸光度が高くなった。586 nm における吸光度が、図 3-36 のグラフに示すように 1~30  $\mu\text{M}$  の範囲で直線的になったため、これを検量線として使用した。

表 3-5 過酸化水素測定で用いた試薬

試薬名	分子式, 分子量	製造会社
3,3'-Bis[ <i>N,N</i> -bis(carboxymethyl)aminomethyl]- <i>o</i> -cresolsulfonphthalein, disodium salt (XO)	$C_{31}H_{30}N_2Na_2O_{13}S$ , 716.62	(株) 同仁化学研 究所
硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物, 99.5%	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ , 392.14	和光純薬工業 (株)
D(-)-ソルビトール	$C_6H_{14}O_6$ , 182.17, 293.34	和光純薬工業 (株)
0.5 M 硫酸	$H_2SO_4$ , 98.08	和光純薬工業 (株)
9 M 過酸化水素	$H_2O_2$ , 34.01	和光純薬工業 (株)

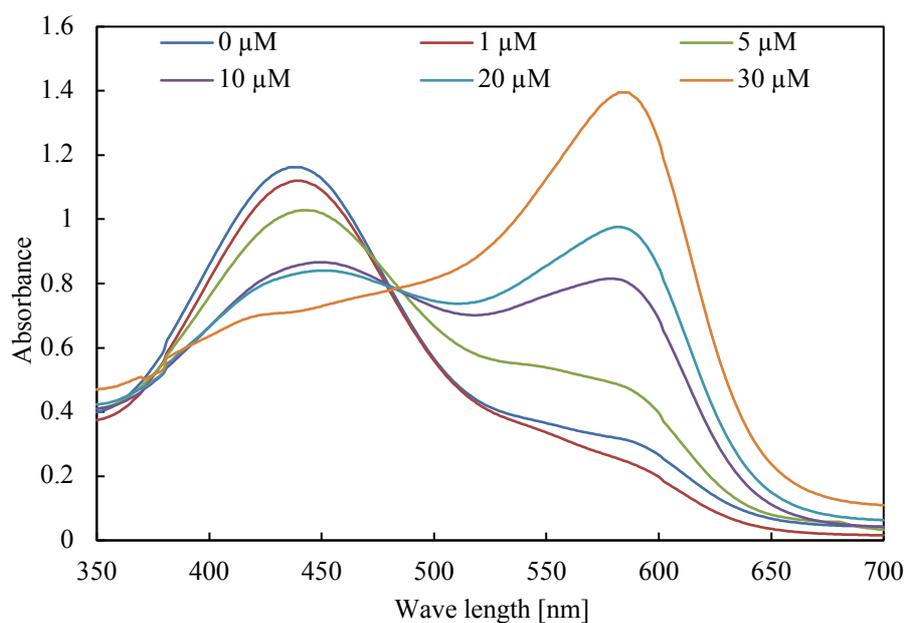


図 3-35 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の吸収スペクトル

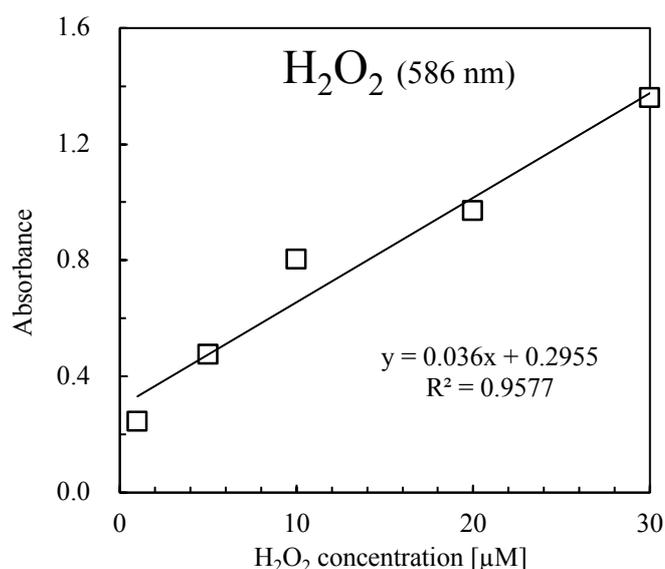
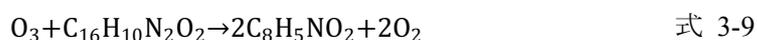


図 3-36 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の検量線

液中に溶けているオゾンの測定にはインディゴ (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を用いた手法が広く知られている。オゾンはインディゴを酸化させ、イサチン (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) を生成する。オゾンとインディゴの反応は次の反応式で表される。



インディゴが溶媒に溶けている場合には、その溶媒は 300 nm 付近と 600 nm 付近の波長の光を吸収するため青色である。そして、インディゴとオゾンが反応するとインディゴがイサチンに変化するが、イサチンは可視光に吸収波長を持たない。そのため、オゾン濃度が高くなり、反応が進むと溶媒は徐々に可視光を吸収しなくなり、すべてのインディゴが酸化されると無色透明となり、300 nm 付近と 600 nm 付近における吸光度はほぼ 0 になる。そのため、過酸化水素の定量と同様に特定の波長における吸光度の変化はオゾン濃度によって決まるため、吸光度の変化を測定する事で溶液中のオゾンの濃度の定量が可能になる。

本研究でのオゾンの定量にはオゾン測定用のインディゴ試薬 (オゾン試薬 MR, HACH1184, Colorado, US) を用いた。まず、オゾンの検量線を作成するために、オゾン濃度が既知のオゾンナイザーで酸素ガスからオゾンガスを生成し、精製水にバブリングさせ、その溶液をインディゴ試薬と混合させ、オゾン計 (HACH, Colorado, US) を用いてオゾン濃度を測定した。その後、その溶液を過酸化水素の定量測定のときに用いた吸光分光光度計で 450~700 nm の光の吸光度を測定した。その結果、図 3-37 に示すようにオゾン濃度が高くなるほど 600 nm 付近の吸光度が下がった。597 nm における吸光度が、図 3-38 のグラフに示すように 0~17 μM の範囲で直線的になったため、これを検量線として使用した。

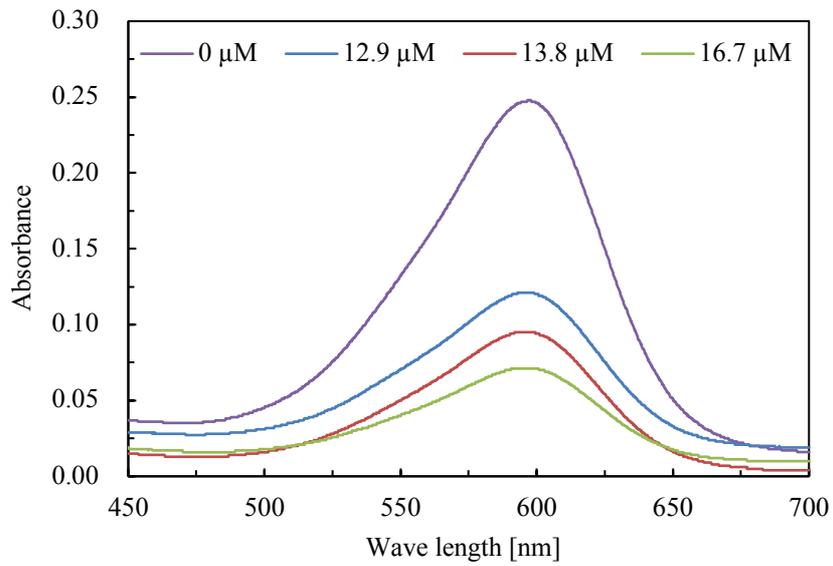


図 3-37 各濃度の O<sub>3</sub> 水と混合後のインディゴの吸収スペクトル

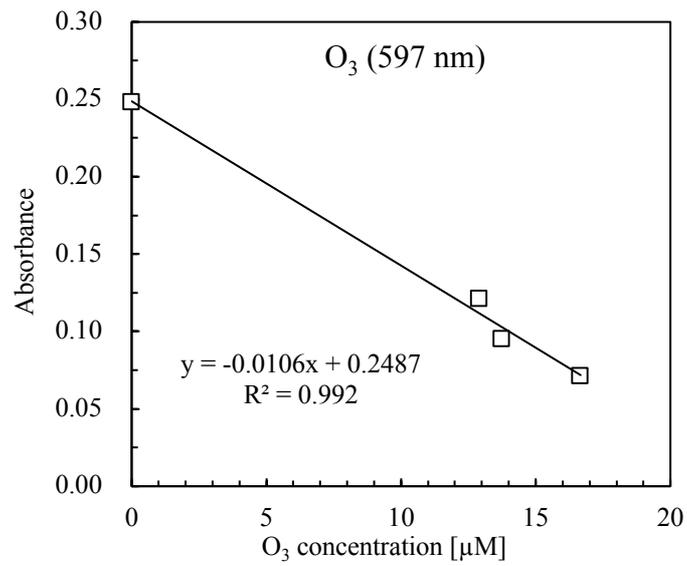


図 3-38 O<sub>3</sub> の検量線

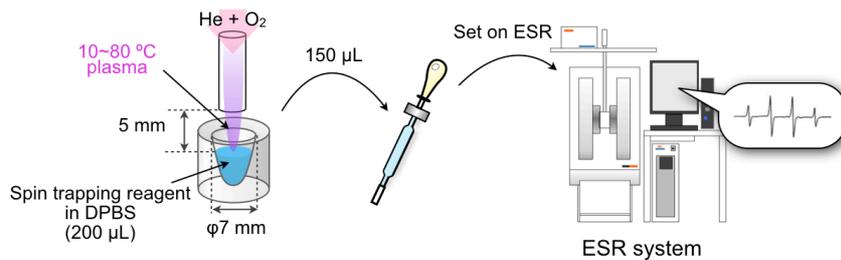


図 3-39 ESR による活性種測定実験の模式図

### 3.6.2 液中の活性種量のプラズマガス温度依存性

プラズマのガス温度が溶液中の活性種量に与える影響を調査するために、温度制御プラズマ装置を用いてプラズマのガス温度を 10~80°C に制御し、液中のヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素、オゾンを定量測定した。本節では、それぞれの活性種を測定するためのセットアップおよび測定結果を記述する。

ESR を用いた活性種測定では図 3-39 に示すように、直径 7 mm のすり鉢状の容器に各種ラッピング剤を溶解した 200  $\mu$ L の DPBS を入れ、液面から 5 mm の位置から 30 秒間プラズマを照射したのち、その溶液を ESR 装置にセットし、ESR スペクトルを得た。ヒドロキシルラジカルの測定では DPBS 中の DMPO の濃度が 200 mM に、一重項酸素の測定では TPC の濃度が 75 mM になるように調製した。

吸光光度法による活性種測定では、上記の ESR による測定と同様に、200  $\mu$ L の精製水に対して 30 秒間プラズマを照射したのち、各試薬を溶解した溶液と 100  $\mu$ L ずつ混合し、吸光分光計にかけて吸光度を測定した。オゾンの測定ではプラズマを照射した精製水とインディゴがすぐに反応し終わるため、混合させた直後に吸光分光計にかけて吸光度を測定した。過酸化水素の測定では過酸化水素と試薬の反応に時間がかかるため、プラズマを照射した精製水と試薬を混合してから 30 分間暗所で静置したのち、吸光度を測定した。

図 3-40 にプラズマのガス温度と液中の各活性種の濃度のグラフを示す。実験は  $n = 3 \sim 4$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。ヒドロキシルラジカルの濃度は、10°C のプラズマでは約 18  $\mu$ M であったが、80°C のプラズマでは約 71  $\mu$ M となり、プラズマのガス温度に比例して増加する事を明らかにした。一重項酸素の濃度は、10°C のプラズマでは約 10  $\mu$ M であり、40°C のプラズマでは約 40  $\mu$ M と、40°C のプラズマまではヒドロキシルラジカルと同様にプラズマのガス温度と比例して増加した。しかし、50°C 以上のプラズマではプラズマのガス温度の上昇に伴って急激に濃度が上昇し、80°C のプラズマでは約 270  $\mu$ M となった。過酸化水素の濃度は、10°C のプラズマでは約 12  $\mu$ M で、プラズマのガス温度の変化とともにわずかに変動しているが、80°C のプラズマでは約 19  $\mu$ M と大きな濃度の変化はみられなかった。オゾンの濃度は、10°C のプラズマでは約 0.18  $\mu$ M で、70°C のプラズマでは約 3.8  $\mu$ M と 70°C まではプラズマのガス温度の上昇に伴って上昇している事を確認した。しかし、80°C のプラズマでは約 1.8  $\mu$ M と 40°C のプラズマと近い濃度まで低くなった。これらの活性種測定の結果から、プラズマのガス温度が液中の活性種量に影響を与えており、プラズマのガス温度が高くなるにつれて液中の活性種量が多くなる傾向がある事を明らかにした。

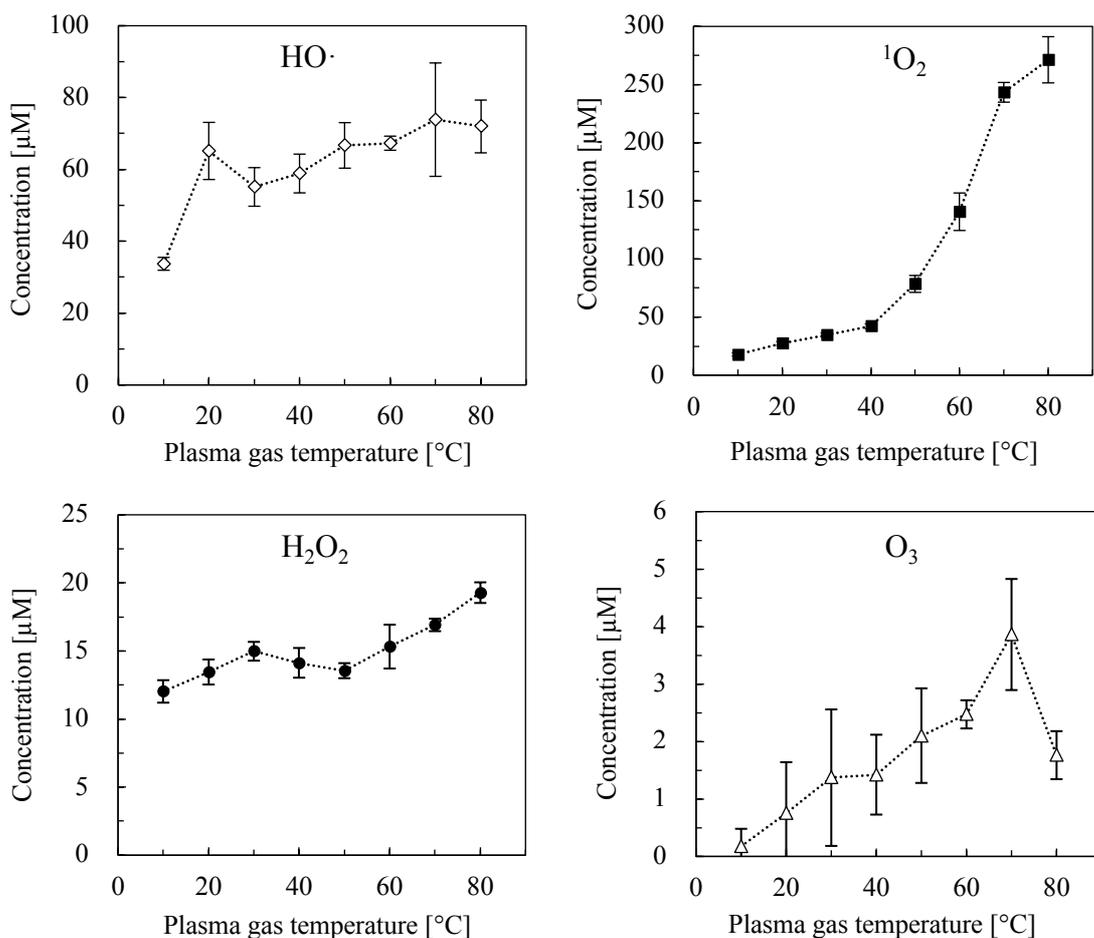


図 3-40 各種活性種濃度のプラズマガス温度依存性

### 3.7 活性種生成量と殺菌実験の結果の比較

プラズマによる殺菌要因が、液中に導入された活性種であると仮定すると、式 3-2 および式 3-3 から殺菌能の高さと活性種の導入量に相関があると考えられる。そこで、各ガス温度のプラズマの殺菌能と液中に導入される活性種量の相関係数を算出して、殺菌に参与している活性種の推定を行った。このときの活性種量は、3.6.2 の結果から算出した単位時間(1分)で液中に導入される活性種の本数とした。相関係数  $R$  は次式を用いて求めた。

$$R(X_i, Y_j) = \frac{\sum(x_{i,T} - \bar{x}_i)(y_{j,T} - \bar{y}_j)}{\sqrt{\sum(x_{i,T} - \bar{x}_i)^2 \sum(y_{j,T} - \bar{y}_j)^2}} \quad \text{式 3-10}$$

ここで、 $X_i$  は各種活性種  $i$  ( $\text{HO}\cdot$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) の導入量の集合で、 $Y_j$  は各種細菌  $j$  ( $E.coli$ ,  $P.aruhginosa$ ,  $S.aureus$ ,  $E. faecalis$ ,  $B.cereus$ ) に対する殺菌能の集合を表す。 $X_i \ni x_{i,T}$  は  $T$  °C のプラズマ照射後の活性種  $i$  の導入量、 $Y_j \ni y_{j,T}$  は  $T$  °C のプラズマ照射による細菌  $j$  に対する

殺菌能を表し、 $\bar{x}_i$ および $\bar{y}_j$ はそれぞれ  $X_i$ および  $Y_j$ の要素の平均値である。 $R$ は、-1 から 1 の間の値を取り、各プラズマのガス温度における殺菌能と活性種量の関係に正の相関があれば 1.00 に、無関係であれば 0 に、負の相関があれば-1 に近づく。

BA 値と活性種量の関係のグラフの例を図 3-41 に示す。白抜きが相関係数を求めるために使用した点、黒抜きは除外した点をプロットしている。図はそれぞれの温度のときの *P.aeruginosa* に対する BA 値と一重項酸素の導入量を示しており、この条件では相関係数の算出に 20~60°C までの点を使用した。このときの相関係数  $R$ は 1.00 となり、*P.aeruginosa* に対する殺菌能と一重項酸素量との間に非常に強い相関を確認した。

同様にして各菌種および活性種について求めた  $R$ の値を表 3-6 にまとめた。この結果、各菌種に対する殺菌能の変化と、一重項酸素の量の変化の間に  $R$ が 0.80~1.00 となる非常に強い相関を確認した。次いで、殺菌能の変化とオゾンの量の変化に  $R$ が 0.65~0.94 となる非常に強い相関を確認した。ヒドロキシルラジカルと過酸化水素はそれぞれ  $R$ が 0.43~0.83 と 0.32~0.94 となる強い相関を確認した。これらの結果から、今回測定した活性種の全てが殺菌に関与しているが、菌種によって有効な活性種が異なる可能性が考えられる。中でも一重項酸素とオゾンの相関係数がその他の活性種と比較して高い事から、一重項酸素とオゾンが各種細菌に対する殺菌能に影響を及ぼしている可能性が高い。

殺菌効果に一重項酸素の関与が推察されるが、液中での一重項酸素の寿命は数マイクロ秒と非常に短く、BA と  $a$  の関係式(式 3-3)の仮定との矛盾が生じている。このため、プラズマの温度変化に伴う殺菌効果の変化には寿命が長い殺菌因子が関与しており、一重項酸素はこの殺菌因子が生成される際の前駆体または副生成物である可能性がある。また、相関係数は擬似相関がある場合も高くなるため、殺菌要因を推定するための手がかりと考える必要がある。

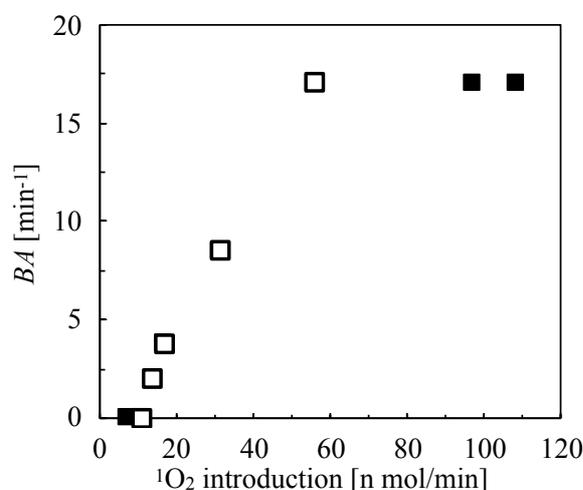


図 3-41 一重項酸素導入量と緑膿菌に対する殺菌能の関係 ( $R = 1.00$ )

表 3-6 プラズマのガス温度の変化に伴う殺菌能と活性種濃度の相関係数  $R$

	HO·	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>
<i>E. coli</i>	0.43	0.95	0.67	0.87
<i>P. aeruginosa</i>	0.58	1.00	0.53	0.94
<i>E. faecalis</i>	0.61	0.80	0.60	0.92
<i>S. aureus</i>	0.83	0.95	0.32	0.88
<i>B. cereus</i>	0.71	0.97	0.94	0.65

一重項酸素は、主に図 3-42 に示す反応過程により生成されていると考えられる。まずプラズマ中での電子の衝突により、ヘリウムは準励起状態となり(I)<sup>[78]</sup>, 酸素分子は一重項酸素となる(II)<sup>[45]</sup>, または原子化する(III)<sup>[79]</sup>。そして準励起状態となったヘリウムが酸素分子と衝突する事により、酸素分子は原子化する(IV)<sup>[80]</sup>。生成された酸素原子は酸素分子を酸化させて、オゾンが生成される(V)<sup>[44]</sup>。生成されたオゾンは熱によって分解し、酸素原子と一重項酸素が生成される(VI)<sup>[45]</sup>。一方で、酸素原子は酸素原子同士で結合し、一重項酸素が生成される(VII)<sup>[45]</sup>。

プラズマのガス温度の上昇に伴って、一重項酸素の濃度が高くなった要因としては、次の 2 点が考えられる。1 つはガス流速の増加である。ガス温度の上昇に伴い、ガスが膨張する事によって、ガスの吹き出し速度が早くなる。これにより、IV～VI の反応で生成された酸素原子などの短寿命の活性種が、消滅する前に水溶液に到達し、結果的に液中の一重項酸素の量が増加した可能性がある。2 つ目に熱によるオゾンの分解速度の促進である。プラズマのガス温度が 10℃と 60℃のプラズマを照射した時の液温はそれぞれ、6℃と 20℃であった。そのため、プラズマのガス温度および液温の上昇により VI のオゾンの分解過程が促進されたものと考えられる。また、オゾンの生成量は、プラズマのガス温度の上昇に伴って V の反応が促進されたと考えられる。しかし、オゾンの濃度は 70℃のときに最大で、80℃のときには低下している。

液温が活性種濃度に与える影響を調べるために、液温が異なる DPBS に対して 42℃のプラズマを 30 秒間照射して溶液中の一重項酸素の濃度を調査した。溶液の温度は、10, 25, 40, 60℃とした。その結果、図 3-43 に示すように、一重項酸素の濃度は 10℃と 25℃のプラズマでは約 40 μM であったが、40℃と 60℃にすると約 50 μM に増えた。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。この事から一重項酸素の濃度は液温の影響を受ける事を明らかにした。3.5.3 で測定したプラズマ照射後の水温の変化は、10～80℃のプラズマを用いた場合、10～23℃であったが、気液界面では温度が高くなっている可能性が考えられる。このため、プラズマのガス温度の上昇に伴って、気液界面での反応が促進され、殺菌能が高くなっている可能性が考えられる。

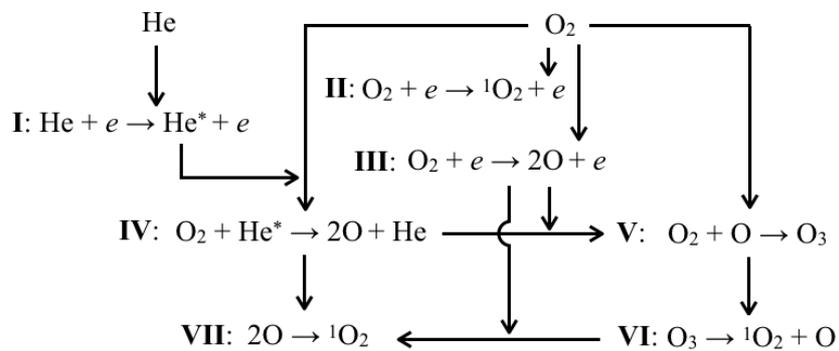


図 3-42  ${}^1\text{O}_2$  生成の反応経路

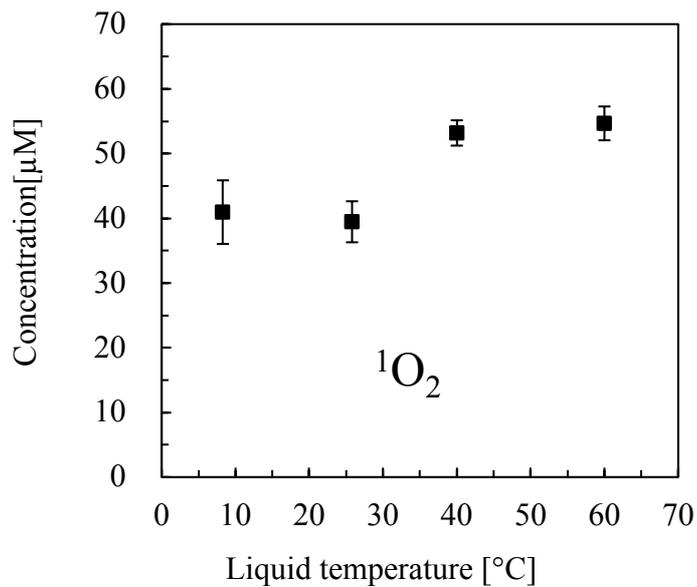


図 3-43  ${}^1\text{O}_2$  濃度の溶媒温度依存性

### 3.8 活性種消去剤を用いた殺菌要因の調査

特定の活性種を消去する消去剤を用いる事により、特定の活性種が殺菌効果に影響を与えているかどうか確かめる事が可能である。たとえば、Takamatsuらは、ヒドロキシルラジカルの消去剤である、dimethyl sulfoxide (DMSO) を菌液に添加して、窒素プラズマの殺菌効果が低下した事から、窒素プラズマによる殺菌効果にはヒドロキシルラジカルが影響を与える事を示し、Kitano

らは、スーパーオキシドアニオンラジカルの消去剤である superoxide dismutase (SOD) を用いて、スーパーオキシドアニオンラジカルが殺菌効果に影響を与えている事を示している<sup>[43], [81]</sup>。

そこで、本研究では、消去剤を用いて一重項酸素の影響を除いた場合の殺菌効果を調べた。そのために、消去剤の濃度と活性種消去能を調べた。検討によって得られた消去剤の条件を用いて殺菌実験を行い、一重項酸素が 3.5.2 の実験の条件で殺菌効果に与える影響を調べた。

### 3.8.1 消去剤の活性種消去能の調査

殺菌要因を調べるためには、特定の活性種を消去した場合に、殺菌効果がなくなる事が望ましい。そこで、一重項酸素とヒドロキシルラジカルの消去剤を用いて殺菌実験を行った。これらの消去剤は、その濃度に応じて消去される活性種の量は変わると考えられる。そこで、消去剤の濃度と各活性種の濃度の関係を調べた。

一重項酸素およびヒドロキシルラジカルの測定には、3.6 の実験と同様に TPC および DMPO をトラッピング剤として使用した。一重項酸素の消去剤にはアジ化ナトリウムと L-histidine を、ヒドロキシルラジカルの消去剤には DMSO を用いた。本研究では、3.6 の実験で、スーパーオキシドアニオンラジカルもトラップする事が可能な DMPO を使用したが、スーパーオキシドアニオンラジカルが検出されなかったため、スーパーオキシドアニオンラジカルの消去剤である SOD は使用していない。消去剤は消去する目的の活性種のトラッピング剤とともにそれぞれ DPBS 中に混合した。プラズマは 3.6 の実験と条件で生成し、200  $\mu$ L の各種試薬に 60°C のプラズマを照射した。

図 3-44 に、アジ化ナトリウムの濃度と一重項酸素の濃度の関係、図 3-45 に L-histidine の濃度と一重項酸素の濃度の関係を示す。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。アジ化ナトリウムの添加量を増やしても一重項酸素の濃度は減少しなかった。L-histidine は添加量を増やすと一重項酸素濃度は減少し、100 mM になると一重項酸素の濃度の減少は緩やかになった。これらの結果より、アジ化ナトリウムの一重項酸素の消去能は確認できず、L-histidine の濃度は 100 mM とするのが適当である事がわかった。

図 3-46 に、DMSO の濃度とヒドロキシルラジカルの濃度の関係を示す。DMSO 濃度を増加させるとヒドロキシルラジカル濃度は減少し、DMSO 濃度を 2000 mM としたときのヒドロキシルラジカル濃度は 5.1  $\mu$ M となった。このため、DMSO は 2000 mM とするのが適当であると考えられる。

これらの測定により、活性種の消去剤を用いた殺菌実験には L-histidine と DMSO が有効である事を確認した。

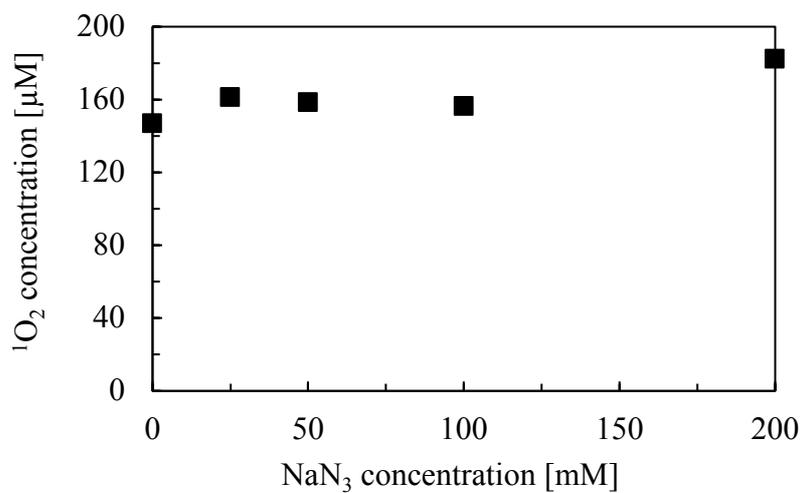


図 3-44 アジ化ナトリウムと一重項酸素の濃度の関係

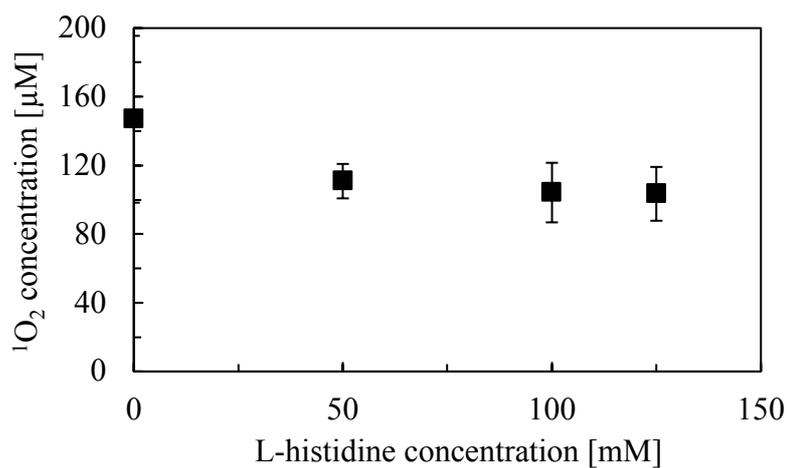


図 3-45 L-histidine と一重項酸素の濃度の関係

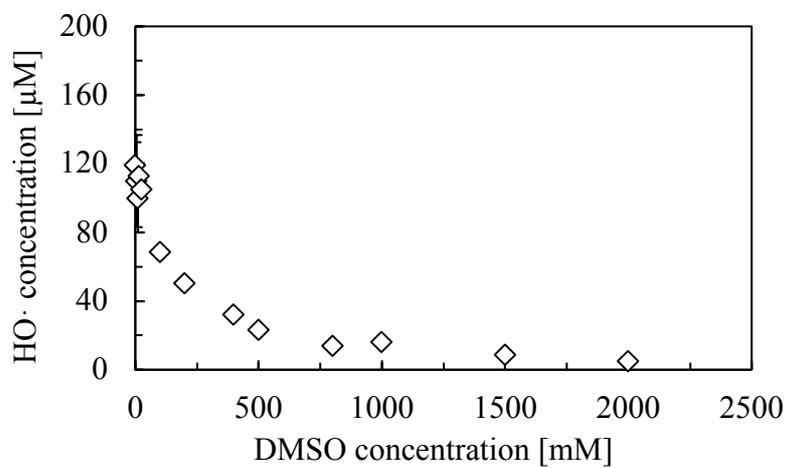


図 3-46 DMSO とヒドロキシルラジカルの濃度の関係

### 3.8.2 活性種消去剤が殺菌効果に与える影響

一重項酸素に対する消去剤には L-histidine を、ヒドロキシルラジカルの消去剤には DMSO を用いて、各活性種が殺菌効果に与える影響を調べた。殺菌実験は 3.5.3 と同様の条件で行い、菌液に各種消去剤を混合してプラズマを照射した。指標菌には大腸菌を用いた。消去剤の終濃度が、L-histidine は 100 mM、DMSO は 2000 mM となるように菌液に添加した。

DMSO の濃度は 2000 mM と文献の値を大きく上回る濃度となっている<sup>[82]</sup>。このため、まず、これらの消去剤が生菌数に与える影響を調べた。菌液と各種消去剤を混合したあとの生菌数を調べた結果を図 3-47 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。消去剤を添加していない菌液では、生菌数が、 $1.1 \times 10^9$  CFU となった。L-histidine および DMSO を添加した場合は、生菌数が  $4.5 \times 10^8$  CFU、 $4.7 \times 10^8$  CFU となった。このことから、今回使用する消去剤には高い殺菌効果がない事を確認した。

次に、各種消去剤の有無がプラズマによる殺菌効果に与える影響を調べた結果を、図 3-48 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、点は平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。消去剤を添加していない場合は、プラズマのガス温度を高くすると殺菌効果は高くなり、 $40^\circ\text{C}$  以上のプラズマで生菌数が検出下限値以下となった。L-histidine および DMSO を混合した菌液にプラズマを照射すると、プラズマガス温度を高くしても殺菌効果は示さなかった。このことから、今回使用した L-histidine と DMSO により、殺菌因子が失活する事を実証した。

DMSO によって殺菌効果がなくなったことから、ヒドロキシルラジカルが殺菌効果に関与している可能性が浮上した。しかし、ヒドロキシルラジカルの濃度上昇と、*E.coli* への殺菌能との相関係数は 0.43 とその他の活性種と比較して低かった。また、図 3-49 は酸素プラズマを水に照射した際に、液中に導入される活性種の生成である。たとえば、プラズマ中でオゾンが生成され、液中に導入される事で、水と反応して過酸化水素を生成する。このように、一つの活性種が液中に導入される事によってその他の活性種が生成される<sup>[30], [69]</sup>。このため、DMSO によって、一重項酸素やオゾンも消去されている、または各活性種の相互作用によって殺菌効果が引き起こされている可能性が考えられる。

そこで、今回使用した消去剤の活性種消去能の選択性を調べた。実験は 3.8.1 と同様に行った。それぞれの消去剤による、一重項酸素およびヒドロキシルラジカルの消去能を調べた結果を図 3-50 と図 3-51 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。一重項酸素およびヒドロキシルラジカルの濃度は、いずれの消去剤を添加した場合でも減少した。この結果から、いずれの消去剤も、一重項酸素とヒドロキシルラジカルを失活させている事を示した。このため、この実験によって一重項酸素が殺菌効果に直接関与している事を確認できなかった。消去剤を用いて、活性種が殺菌効果へ与える影響を調べるためには、より選択性の高い消去剤が開発される事が望まれる。

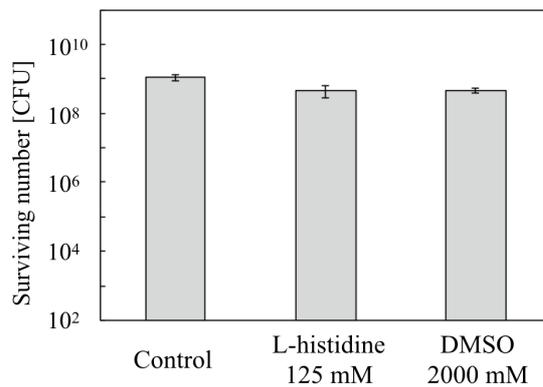


図 3-47 各種活性種消去剤添加後の大腸菌の生菌数

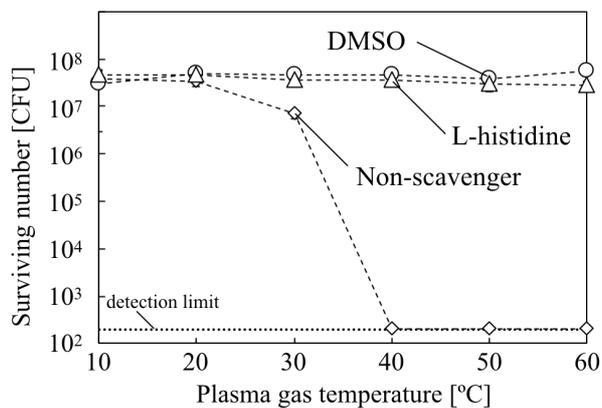


図 3-48 消去剤添加後の殺菌効果とプラズマの温度の関係

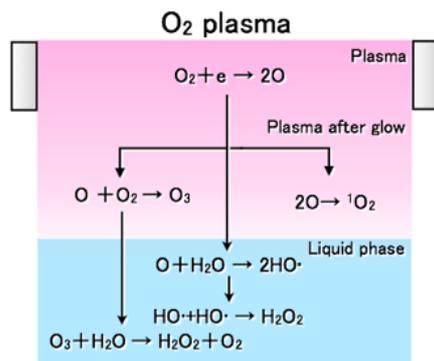


図 3-49 酸素プラズマによって液中に導入される活性種の生成過程

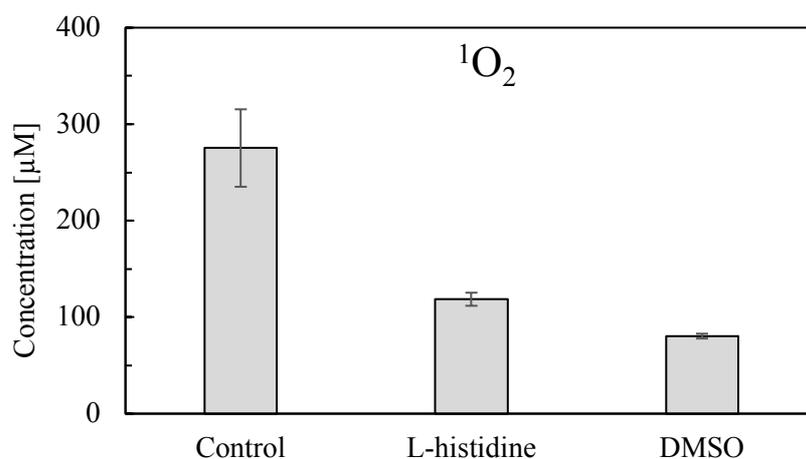


図 3-50 各消去剤の混合による一重項酸素濃度の低下

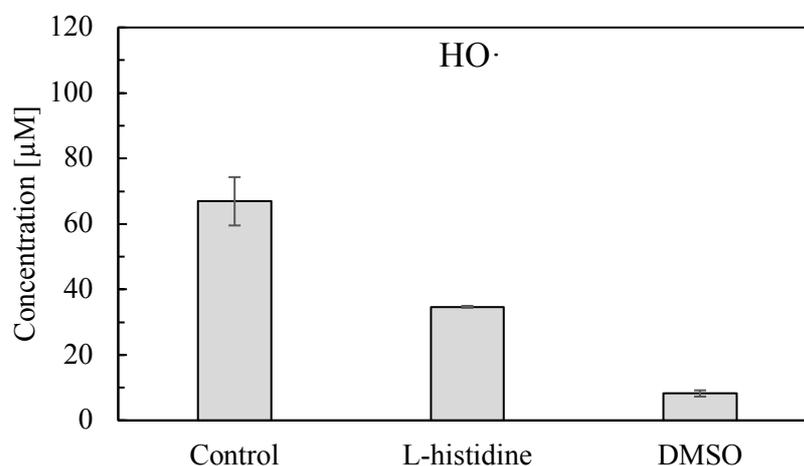


図 3-51 各消去剤添加によるヒドロキシルラジカル濃度の低下

### 3.9 まとめ

本章では、温度制御プラズマ装置の基礎特性について記述した後、殺菌効果のガス温度依存性を調べ、殺菌因子について考察した結果を記述した。

基礎特性についてはまず、従来研究で調査された温度制御プラズマ装置の温度制御能と、発光強度およびヘリウムの励起温度のガス温度依存性について記述した。この中で、プラズマガスとしてヘリウムを用いた場合には、プラズマのガス温度を $-54^{\circ}\text{C}$ から $160^{\circ}\text{C}$ の間で $\pm 1^{\circ}\text{C}$ という高い精度で制御できる事、プラズマのガス温度が高くなるにつれて、ヘリウムの発光強度は低下し、ヘリウムの励起温度は高くなる事を示した。

本研究では、温度制御プラズマ装置の基礎特性として、放電電力と電子密度のプラズマガス

温度依存性を調べた。その結果、プラズマの放電電力および電子密度はプラズマのガス温度の上昇に伴って低下する事を明らかにした。その要因を考察した結果、理論式と同様の傾向が得られた事から、プラズマのガス温度が気体中のヘリウムの数密度に影響を与えている可能性を示した。

液中の各種細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性を調べた結果、菌種によらずプラズマのガス温度が高くなるほど、殺菌効果が高くなる事を明らかにした。また、殺菌効果へのプラズマの熱の直接的な影響が小さい事を確認した。本研究では、プラズマの殺菌能の指標を「単位時間あたりのプラズマ照射によって減少する菌の桁数」と定義し、各ガス温度のプラズマの殺菌能を算出した。その結果、いずれの菌種に対しても、プラズマのガス温度が高くなるほど、殺菌能が指数関数的に高くなる事を明らかにした。

殺菌要因として、プラズマによって液中に導入される各種活性種量のプラズマガス温度依存性を ESR および吸光光度計を用いて測定した。ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、オゾン、過酸化水素の量を測定した結果、活性種の濃度はいずれも、プラズマのガス温度が高くなるほど高くなり、特に一重項酸素の濃度が指数関数的に高くなる事を明らかにした。この測定結果と殺菌能を比較して、プラズマのガス温度の変化に伴う、殺菌能の変化と、液中の活性種量の相関を調べた。その結果、殺菌能と、一重項酸素およびオゾンの導入量との間に、それぞれの相関係数が 0.95~1.00 および 0.65~0.94 となる強い相関がある事を明らかにした。この事から、一重項酸素とオゾンが各種細菌に対する殺菌能に影響を及ぼしている可能性が高い事を示した。

一重項酸素とヒドロキシルラジカルの消去剤を用いて殺菌実験を行い、それぞれの活性種の殺菌への関与を調べた結果、どちらの消去剤を使用した場合にも殺菌効果がなくなる事を確認した。また、各消去剤を添加した場合の液中に導入される一重項酸素とヒドロキシルラジカルを定量した結果、いずれの消去剤を用いた場合でも一重項酸素およびヒドロキシルラジカルの両方の濃度が低下した。このため、各活性種の相互作用によって殺菌効果が引き起こされている可能性が考えられ、一重項酸素が殺菌に直接関与している事を決定付ける事はできなかった。

これらの結果から、迅速な殺菌のためには、プラズマのガス温度を高くする必要がある事が示された。しかし、熱に弱い対象にプラズマを照射する場合には、プラズマのガス温度を照射対象に熱損傷を与えない温度以下にする事が求められる。また、プラズマのガス温度の変化に伴って、プラズマによって生成される活性種の量が変化した事から、殺菌だけでなく、止血や創傷治療などの処理効果にもプラズマのガス温度は大きな影響を与えられと考えられる。以上の事から、目的および照射対象に応じたプラズマのガス温度の設定が必要であると言え、本研究により、プラズマの医療応用におけるガス温度制御の重要性を示した。

## 第4章

# マルチガスプラズマバブリングによる 液中殺菌

### 4.1 はじめに

DBD プラズマジェットをはじめとする、従来の医療分野用プラズマでは、低温の大気圧プラズマを生成しやすい反面、ヘリウム (He) やアルゴン (Ar) などの特定のガスしか使用できないものが多かった<sup>[23], [41], [83]</sup>。こうした装置では、ヘリウムやアルゴンプラズマの高い励起能力によって空気中の窒素や酸素を活性化させる事で、殺菌効果を発揮している。このため、生成される活性種はプラズマガス自身と空気に依存したものの混合状態であり、殺菌に寄与している活性種およびその殺菌機序を調べる事は容易ではなかった。

我々の研究室で開発したマルチガスプラズマジェットは、ヘリウムやアルゴンなどの希ガスだけでなく、窒素 (N<sub>2</sub>)、酸素 (O<sub>2</sub>)、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>)、水素 (H<sub>2</sub>) などの分子性のガスや空気、さらにはこれらの混合したガスでも安定したプラズマを生成する事ができる。さらに、これまでの研究では、マルチガスプラズマジェットと、周辺空気から受ける影響を除くと同時に効率よく短時間で液体をプラズマ処理するプラズマバブリング方式を組み合わせる手法を提案した<sup>[31]</sup>。

本章ではまず、マルチガスプラズマジェットとプラズマバブリング手法を用いたマルチガスプラズマバブリング装置について説明する。そして、様々なガス種のプラズマによる殺菌効果およびそれらの殺菌要因を調べた結果について記述する。

### 4.2 マルチガスプラズマバブリング装置

#### 4.2.1 マルチガスプラズマジェット

図 4-1 にマルチガスプラズマジェットの外觀の写真を、図 4-2 にマルチガスプラズマジェットから射出される各ガス種のプラズマの写真を示す。ガスの種類を変えると、当然ながら生成される活性種が変わるため、プラズマの性質も大きく変化し、表面処理の効果や殺菌効果も変わる<sup>[24]</sup>。これにより、照射対象を酸化させたい場合には酸素を、窒化させたい場合には窒素を使用する事ができる。また、マルチガスプラズマジェットでは CF<sub>4</sub> などの通常は低圧のプラズマで 사용되는ガスも使用できるため、一つの装置で様々なガス種を利用できる長所は大きい。



図 4-1 マルチガスジェットの外觀<sup>[84]</sup>

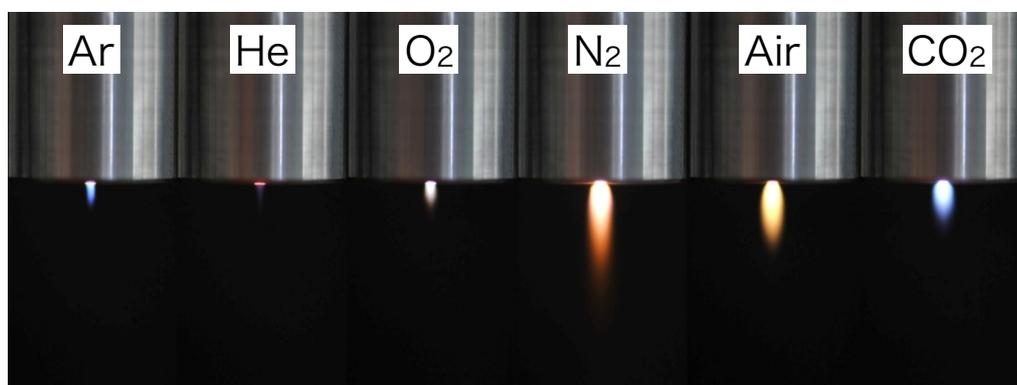


図 4-2 各ガス種のプラズマのアフターグロー<sup>[84]</sup>

図 4-3 にマルチガスプラズマジェットの構造を示す。この装置は、プラズマヘッド部の内部に配置された一対の電極間に 16 kHz, 9 kV の交流電圧を印加する事で、安定した大気圧プラズマを生成する。接地された筐体の直径 1 mm 程度の穴からプラズマが吹き出すため、金属や生体を近づけても放電損傷を与える事がない。このため、金属や半導体だけでなく、繊維、紙、プラスチックなど様々な物質に大気圧プラズマを安全に照射する事ができる。たとえば図 4-4 は高松氏が様々な材料に酸素プラズマを照射する前後の親水性の変化を確かめた結果である<sup>[84]</sup>。親水性が高いほど、滴下した水が材料になじみ、水と材料との接触面積が大きくなる。有機や無機に関係なく、プラズマ照射後の材料は損傷を受ける事なく、高い親水性を得ている。これは、プラズマによって生成される活性種が、材料表面に付着した有機物を酸化・気化させる事によるクリーニング効果や、表面に水酸基などの親水性の官能基を付与していることが起因しているとされている<sup>[24]</sup>。

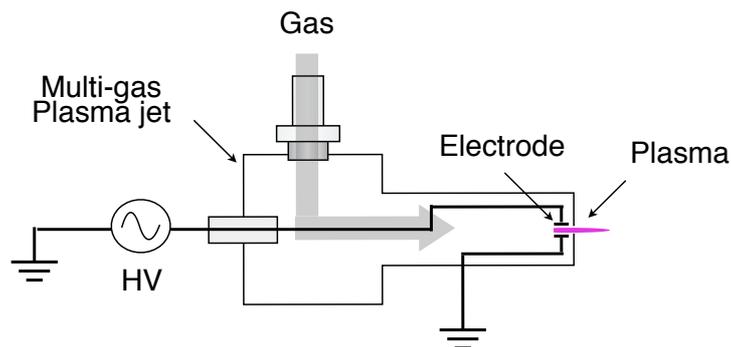


図 4-3 マルチガスプラズマジェットの構造

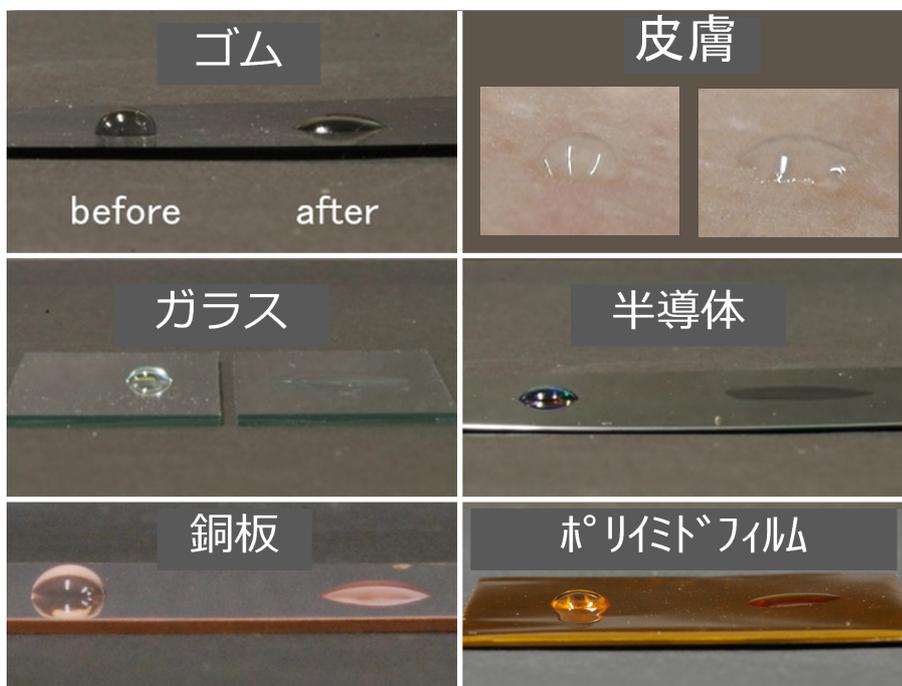


図 4-4 酸素プラズマによるポリイミドフィルムの親水化<sup>[84]</sup>

#### 4.2.2 マルチガスプラズマジェットの基礎特性

ここでは、マルチガスプラズマジェットを本研究で使用するにあたり、プラズマの放電電力などの基礎特性は処理効果に大きな影響を与えると考えられる。そこでまず、従来研究で調査された、ガス温度の測定結果とマルチガスプラズマジェットにおけるガス温度の制御方法について記述する。そして、本研究で調査した電圧や電流、放電電力の測定結果について記述する。

### プラズマのガス温度測定<sup>[31], [84]</sup>

高松氏が調査したアルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマのガス温度の測定結果を表 4-1 に示す。このときのプラズマのガス温度は、マルチガスプラズマジェット先端から1, 3, 5 mm の位置にステンレス製シースタイプの K 熱電対を垂直に固定し、測定されている。また、プラズマは各ガス種のボンベから供給された 5 SLM のガスに電力を入力して生成している。アルゴンプラズマのガス温度は 1 mm の位置でも 37.3°C と生体に近い温度であるが、その他のプラズマのガス温度は 60.5~66.5°C となり、生体に対しては高温となっている。距離を離すにつれてガス温度は低下するが、10 mm の位置でも 50.5~59.7°C と生体に対しては高温のままであった。生体に対して直接照射することを考えた場合、10 mm 離して照射しても熱損傷を与える可能性がある。さらに、距離を離すほど、プラズマ中で生成された活性種は失活し、処理効果が低下する。プラズマの温度制御は、前章で記述した温度制御機構をマルチガスプラズマジェットに適用する事ができれば、容易にガス温度を制御できると考えられる。しかし、マルチガスプラズマジェットに前章で使用した温度制御システムを適用するにはいくつかの問題があった。これについては次章で詳しく記述する。

先行研究では、高温側または低温側にガス温度を変えることができる温度制御機構を持たせた 2 種類のマルチガスプラズマジェットを開発した。高温側にガス温度を振るために加熱機構を持たせたプラズマジェットでは、図 4-5 に示すように先端部に巻かれたニクロム線に電流を流し、先端部を加熱する。このヒーターへの入力電力を制御する事により、プラズマのガス温度を表 4-1 のガス温度から 200°C 程度の範囲で精密に制御する事に成功している。

低温側にガス温度を振るために、図 4-6 のように冷却機構を持たせたマルチガスプラズマジェットでは、プラズマの熱が発生する先端部の周囲に冷却ガスを流す事によって、プラズマのガス温度を低下させる。先行研究では、冷却ガスに液体窒素を用いて冷却したヘリウムを用いる事で、プラズマのガス温度を 20°C 程度まで低下させる事に成功している。

表 4-1 各ガス種のプラズマのガス温度<sup>[84]</sup>

Distance [mm]	Gas temperature [°C]				
	Ar	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Air
1	37.3	60.5	61.0	66.5	64.2
5	35.8	53.3	57.1	60.5	59.0
10	33.6	50.5	49.9	59.7	53.3

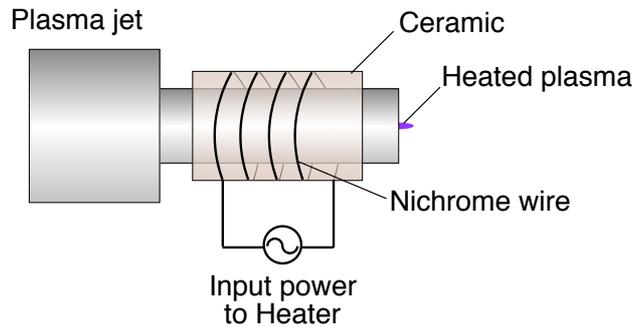


図 4-5 加熱機構を持つマルチガスプラズマジェット<sup>[31]</sup>

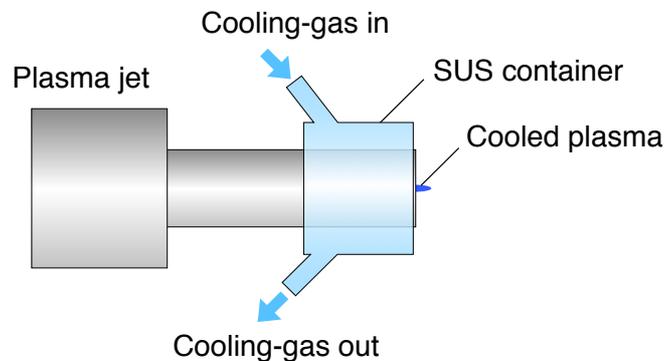


図 4-6 冷却機構を持つマルチガスプラズマジェット<sup>[31]</sup>

### 電圧電流測定

本研究で用いるマルチガスプラズマジェットの電流および電圧特性を調べた。測定には、高電圧プローブ (HVP39pro, Pintek Electronics Co., Taiwan) および電流プローブ (TCP303, TCPA300, Tektronix Co., US) を使用し、これらを図 4-7 に示すように接続し、オシロスコープ (TDS-680B, Tektronix Co., US) を用いてそれぞれの波形を観測した。プラズマは、3 SLM のアルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気 (窒素 80% + 酸素 20%) を用いて生成した。

各ガス種のプラズマを生成する際の電圧および電流の波形を図 4-8 から図 4-12 に示す。それぞれの図において、青が電圧、赤が電流の波形であり、電圧値は左縦軸に、電流値は右縦軸に示している。マルチガスプラズマジェットの電源は、終端開放時は 3 章で使用した電源と同じ電圧波形となるため、10 ms 周期で脈動している。いずれのガス種でも、電極間に印加される電圧が絶縁破壊電圧に達した際に放電が発生して電流が流れ、それと同時に電圧が一気に低下している。また、電圧の低下に伴い、電流値も低下している。これにより、瞬時的にナノ秒オー

ダーのパルス放電が発生している。絶縁破壊電圧はガス種によって異なり、アルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気それぞれ 1.0, 3.8, 3.7, 4.2, 3.8 kV であり、絶縁破壊時に発生する電流はそれぞれ、1.3, 5.1, 5.3, 5.6, 4.0 A であった。アルゴンは比較的放電しやすいため、1.0 kV という比較的低い電圧で放電し、放電を起こしにくいとされる二酸化炭素は 4.2 kV と最も高い絶縁破壊電圧となった。この絶縁破壊電圧が高いほど、絶縁破壊時に大きな電流が発生するため、絶縁破壊電圧に応じた電流値となっていると考えられる。

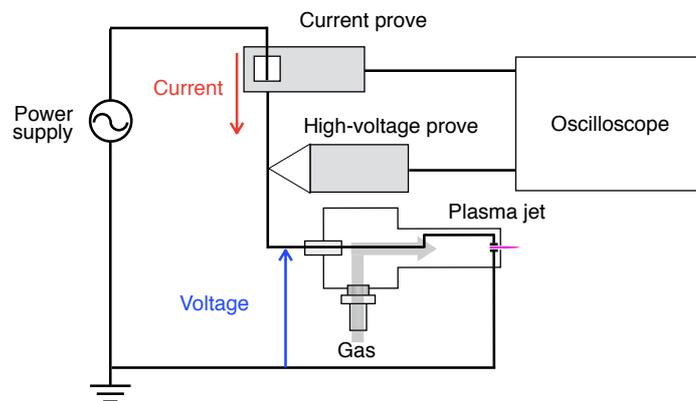


図 4-7 電流および電圧測定のセットアップ

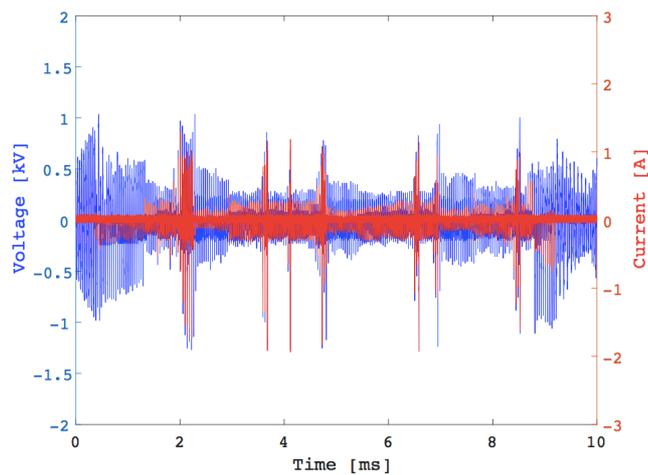


図 4-8 アルゴンプラズマの電流および電圧波形

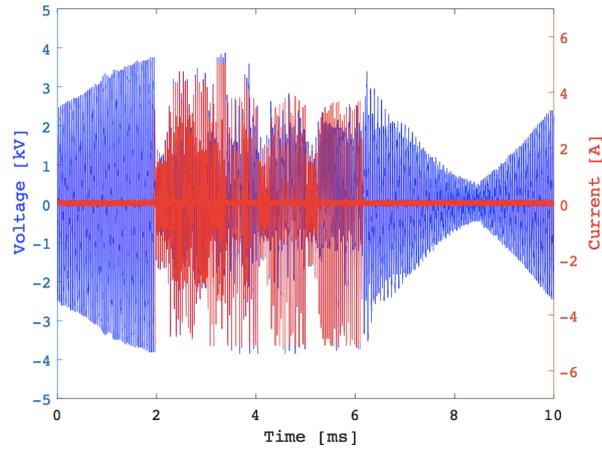


図 4-9 酸素プラズマの電流および電圧波形

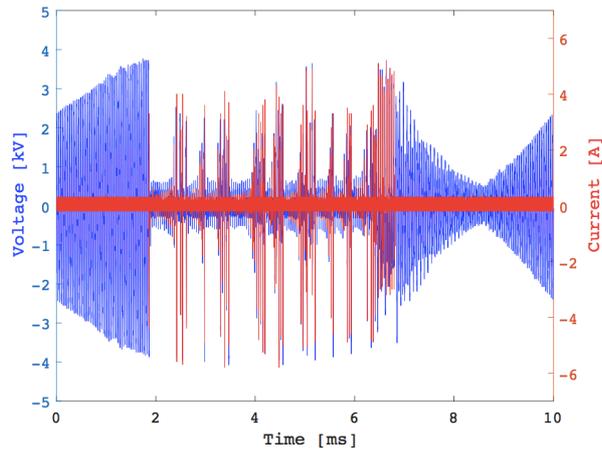


図 4-10 窒素プラズマの電流および電圧波形

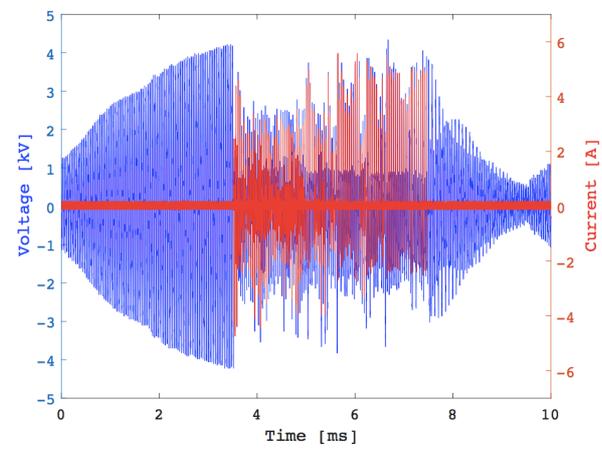


図 4-11 二酸化炭素プラズマの電流および電圧波形

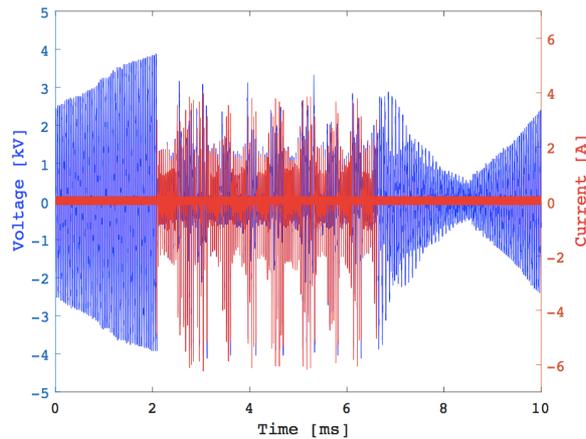


図 4-12 空気プラズマの電流および電圧波形

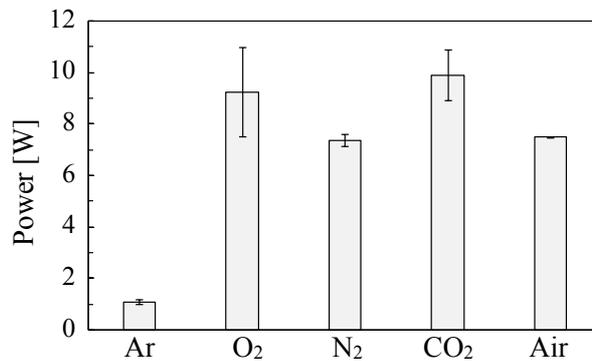


図 4-13 各ガス種のプラズマの生成時の電力

### 放電電力

測定した電圧電流波形の積から各ガス種のプラズマを生成した際の電力を求めた。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。その結果、図 4-13 のように、アルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマ生成時の放電電力はそれぞれ、1.1, 9.2, 7.3, 9.8, 7.4 W となった。絶縁破壊電圧が大きくなるほど、瞬時的であれ大きな電流が発生する。このため、放電電力の違いには絶縁破壊電圧の違いが大きな影響を与えていると考えられる。

### 4.2.3 マルチガスプラズマバブリング装置の構造

本実験で使用したマルチガスプラズマバブリング装置の概略図を図 4-14 に示す。バブリングする液体を入れたガラス容器の下に、マルチガスプラズマジェット固定して、容器の下部からプラズマガスを導入し、プラズマを気泡として導入する。これにより、プラズマガスと液体との接触面

積が増加し、液中にプラズマ中で生成された活性種が導入しやすくなる<sup>[31]</sup>。

容器には図 4-15 に示す濾過フィルタ用のガラスファンネルを使用した。この容器は下部の直径が上部の直径よりも小さくなっているため、この容器を用いる事で下部から導入したバブルが浮上する際に壁面側で水が対流し、液体の均等なプラズマ処理が期待できる。プラズマジェットとファンネルの接続部には、図 4-16 のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のシートを使用した。この PTFE シートにはプラズマジエットの先端部と同じ 20 mm の直径で、深さ 7.5 mm のくぼみがあり、その中心部に  $\phi 2.0$  mm の穴が空いている。この穴を通して、プラズマジエットから射出されたプラズマのアフターグローが液中に導入されるため、プラズマと周辺空気が反応する事はない。この PTFE のシートとファンネルの間に厚さ 0.5 mm のシリコンシートを挟み、クランプで固定した。

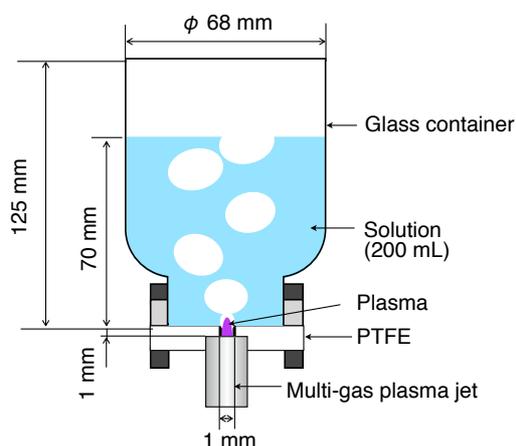


図 4-14 本実験で使用したマルチガスプラズマバブリング装置の概略図

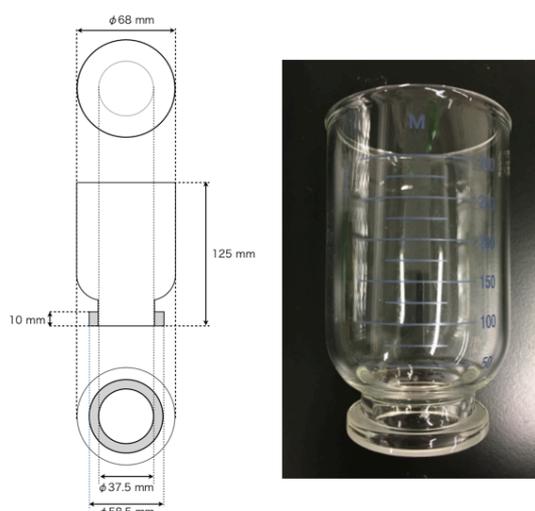


図 4-15 ガラス製ファンネルの寸法と実物の写真

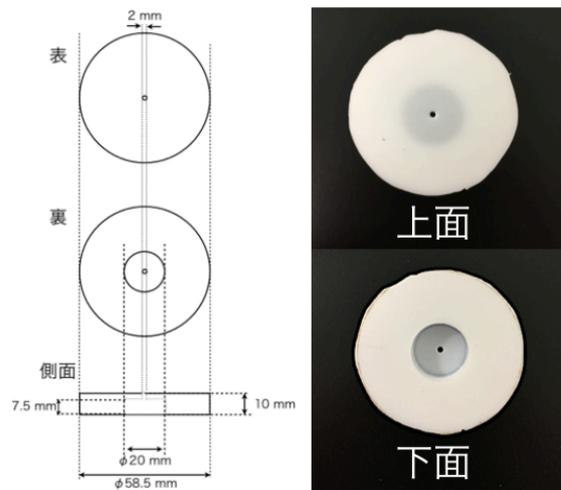


図 4-16 PTFE 製接合部の寸法と実物の写真

### 4.3 各種ガスプラズマバブリングによる殺菌効果

これまで記述したように、プラズマによる殺菌因子はプラズマ中で生成される活性種であると考えられる。生成される活性種はプラズマを生成するガス種に大きく依存する。また、従来のプラズマ殺菌の研究ではアルゴンやヘリウムなどのプラズマが用いられているが、殺菌には空気中または液中の窒素が重要であるとされている<sup>[38], [49]</sup>。しかし、それら自体のガスやさらには空気中に多く存在する二酸化炭素の影響について調べている論文はまだ少ない。Takamatsu らにより、大気開放下でプラズマを生成するガス種を変える事で殺菌効果が大きく変わり、特に窒素と二酸化炭素が高い殺菌効果を示す事が明らかとなっている<sup>[82]</sup>。しかし、これらの殺菌のメカニズムは未だ明らかとなっていない。メカニズムを明らかにするためには、周辺空気のように、不安定で殺菌に大きな影響を与える要因を除外する事は必須である。このため、プラズマを生成するガス種が殺菌効果に与える影響を、周辺空気の影響を除いた状況で調べる意義は大きい。

本節ではプラズマバブリング方式を用いて、プラズマのガス種が殺菌効果に与える影響を調べた。殺菌効果を調べるためには、プラズマ以外が細菌に与えるストレスを軽減するために、pH や塩化ナトリウム濃度を調査する事が望ましい。このため、pH が 7.0 程度の中性で、塩化ナトリウム濃度がヒトの体内に近い 0.9% に調整された PBS などが多く用いられる。しかし、液中の成分が殺菌効果に影響を与える可能性がある。また、細菌は菌種によって、構造や感受性などが大きく異なり、同じ菌種でも菌株によっても感受性や毒性が大きく異なる。そこでまず、溶媒による殺菌効果の違いを調べ、その後菌株による殺菌効果の違いを調べた。

### 4.3.1 各種溶媒中の大腸菌に対する殺菌効果

図 4-17 に実験のセットアップを示す。生理食塩水または精製水中に菌数が約  $10^6$  CFU/ml となるように調整した 200 mL の細菌懸濁液をプラズマバブリング装置の容器に入れ、3 L/min のガス流量で生成したプラズマで 5 分間バブリングした。その後、各時間で採取した菌液を寒天培地に塗布し、37°C で 18 時間培養した。培養後に形成されるコロニーをカウントする事でそれぞれの溶媒中の大腸菌 (*E.coli* ATCC25922) に対する殺菌効果を評価した。今回の実験系では検出下限値は 100 CFU/mL であった。プラズマガスにはアルゴン (Ar)、窒素 ( $N_2$ )、酸素 ( $O_2$ )、二酸化炭素 ( $CO_2$ )、模擬空気 (Air:  $N_2$  80% +  $O_2$  20%) を使用した。

実験は  $n = 3$  で行い、いずれのグラフもプロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数表記であるため、標準偏差値が平均値を上回った場合は、負の範囲のエラーバーは表記していない。各ガス種のプラズマを用いて生理食塩水中の大腸菌に対する殺菌実験を行った結果を図 4-18 に示す。酸素、窒素、二酸化炭素プラズマを用いた場合に、1 分以内に生菌数を 4 桁以上減少させる高い殺菌効果を確認した。なかでも酸素プラズマが最も殺菌効果が高く、10 秒以内に検出下限値以下となった。空気プラズマでは 5 分間のプラズマ処理で生菌数が 2 桁減少したが、酸素、二酸化炭素、窒素のプラズマと比較して殺菌効果が低くなった。一方、アルゴンプラズマを用いた場合は生菌数が減少せず、殺菌効果がない事を確認した。

精製水中の大腸菌に対する殺菌実験を行った結果を図 4-19 に示す。酸素と二酸化炭素プラズマを用いた場合に、1 分以内に生菌数を 4 桁以上減少させる高い殺菌効果を確認した。酸素プラズマは生理食塩水のとくと同様に最も殺菌効果が高く、20 秒以内に検出下限値以下となった。空気プラズマは 5 分間のプラズマ処理で生菌数が検出下限値以下となり、生理食塩水を用いた場合よりも殺菌効果が高くなった。一方、窒素とアルゴンプラズマを用いた場合は生菌数が減少せず、殺菌効果がない事を確認した。

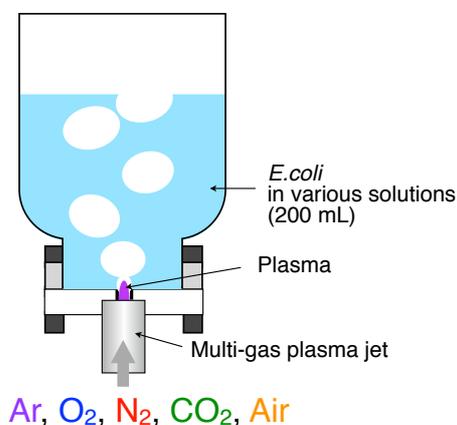


図 4-17 マルチガスプラズマバブリングを用いた殺菌実験のセットアップ

この結果から、プラズマ装置が異なる事から一概には言えないが、従来のアルゴンガスを用いる殺菌の研究では、アルゴンと溶液との反応で活性種が生成されて殺菌効果を引き起こしているのではなく、空気中の分子を巻き込む事で殺菌効果の高い活性種を生成している可能性が高い事を示した。さらに、窒素プラズマでは、溶媒に精製水を用いた場合は殺菌効果がなかったが、生理食塩水を用いた場合は高い殺菌効果が得られた。この事から、窒素プラズマによる殺菌効果には、液中の塩化ナトリウムが関与している可能性がある。一方で、空気プラズマについては、生理食塩水では殺菌効果がなかったが、精製水では殺菌効果が確認された事から、塩化ナトリウムによって殺菌効果が阻害されている可能性がある。

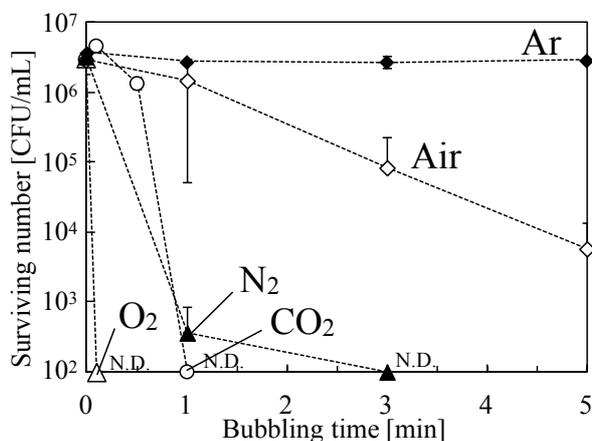


図 4-18 生理食塩水中の大腸菌に対する各種ガスのプラズマの殺菌効果

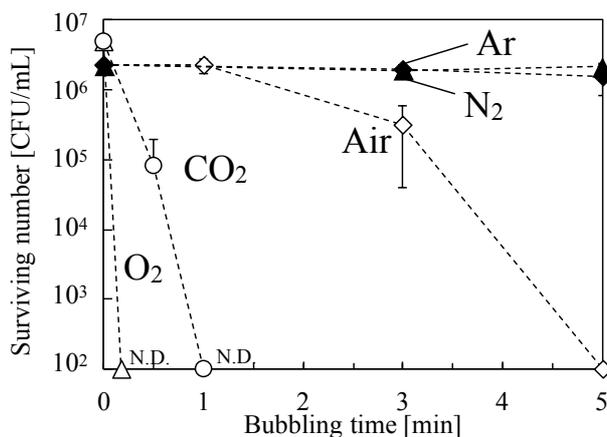


図 4-19 精製水中の大腸菌に対する各種ガスのプラズマの殺菌効果

### 4.3.2 塩化ナトリウムの濃度が殺菌効果に与える影響

前述の結果から、窒素および空気プラズマによる殺菌効果には、塩化ナトリウムが影響を与える可能性が示された。そこで、菌液中の塩化ナトリウム濃度を変化させて、それぞれの殺菌効果を調べた。殺菌実験には塩化ナトリウム濃度が 0, 0.9, 0.09, 0.009%の溶液を使用した。その他の実験条件は 4.3.1 の実験と同様にした。実験は各実験条件を  $n = 3$  で行い、いずれのグラフも、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を示している。生菌数は対数表記であるため、標準偏差値が平均値を上回った場合は、負の範囲のエラーバーは表記していない。

窒素プラズマによる殺菌実験の結果を図 4-20 に示す。窒素プラズマでは、塩化ナトリウム濃度が 0 および 0.009%のときは生菌数の減少は確認されず、塩化ナトリウム濃度が高くなるほど、短い時間で生菌数が大きく減少し、塩化ナトリウム濃度が 0.9%の時は 30 秒以内に検出下限値以下に減少した。このことから、窒素プラズマでは塩化ナトリウム濃度が高くなるほど殺菌効果が高くなる事を示した。

空気プラズマによる殺菌実験の結果を図 4-21 に示す。空気プラズマでは、塩化ナトリウム濃度が 0%のときは、5 分間のプラズマバブリング処理で 1 桁減少した。一方、塩化ナトリウムを 0.009%以上添加した場合には生菌数が減少しない事を確認した。このことから、空気プラズマでは液中の塩化ナトリウム濃度が 0.009%以上になると殺菌効果がなくなる事を示した。

4.3.1 および 4.3.2 の実験の結果から、液中の塩化ナトリウムが殺菌効果に影響を与える事が明らかとなった。各ガス種のプラズマによる殺菌要因を特定するためには、この影響を除く必要がある。そのため、今後の実験では特別な理由がない限り、精製水を使って殺菌効果および殺菌要因を調べた。

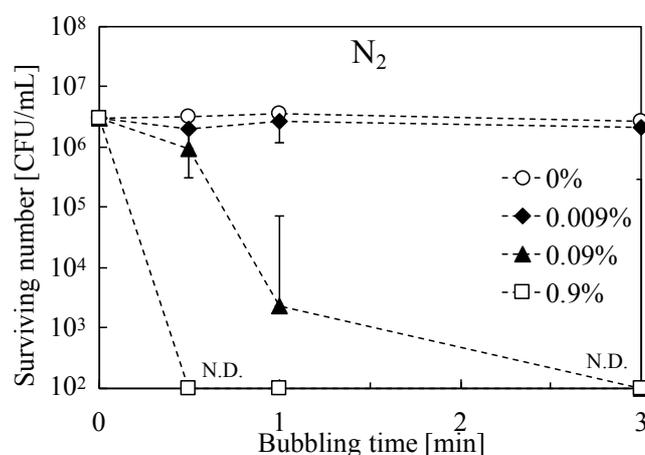


図 4-20 窒素プラズマの殺菌効果と NaCl 濃度の関係

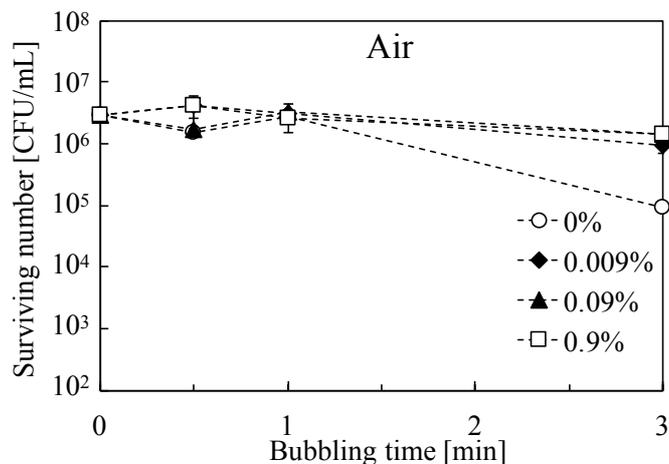


図 4-21 空気プラズマの殺菌効果と NaCl 濃度の関係

#### 4.3.3 精製水中の各種細菌に対する殺菌効果

様々な菌種に対する殺菌効果を検証するために、まず、皮膚病や眼病の原因となる一般細菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の標準菌株 (ATCC25923) に対する殺菌効果を調べた。殺菌実験は 4.3.1 の精製水を用いた実験と同様に行い、バブリング時間を 1 分とした。実験は各実験条件を  $n=3$  で行い、いずれのグラフも、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を示している。その結果、図 4-22 のように酸素プラズマでは、10 秒以内に生菌数が 3 桁以上減少し、40 秒以内に検出下限値となった。二酸化炭素プラズマでは、バブリング時間が長くなるにつれて生菌数が減少し、1 分間で生菌数が 3 桁以上減少した。一方、その他のアルゴン、窒素、空気のプラズマでは殺菌効果がない事を確認した。

次に大腸菌と黄色ブドウ球菌のどちらに対しても高い殺菌効果を示した酸素と二酸化炭素プラズマを用いて、膿や眼病の原因となる一般細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の標準菌株 (ATCC 9027) に対する殺菌効果を調べた。その結果、図 4-23 のように、二酸化炭素プラズマでは、10 秒以内に生菌数が 4 桁以上減少し、40 秒以内に検出下限値以下となった。また、酸素プラズマでは、10 秒以内に生菌数が 3 桁以上減少し、20 秒以内に検出下限値以下となった。

これらの結果から、酸素プラズマおよび二酸化炭素プラズマは菌種によって程度の違いはあるものの、いずれの菌種に対しても高い殺菌効果を示す事を明らかにした。

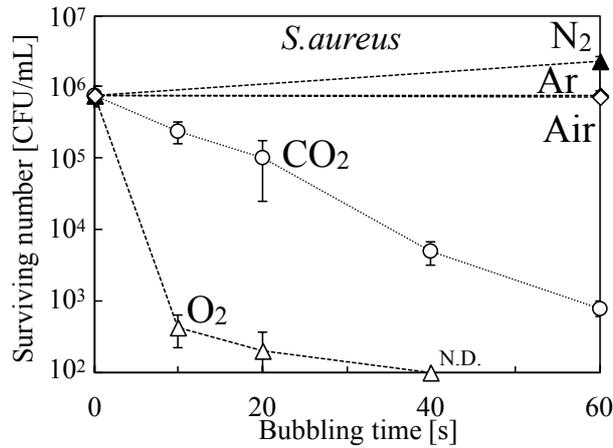


図 4-22 精製水中の黄色ブドウ球菌に対する各種ガスのプラズマの殺菌効果

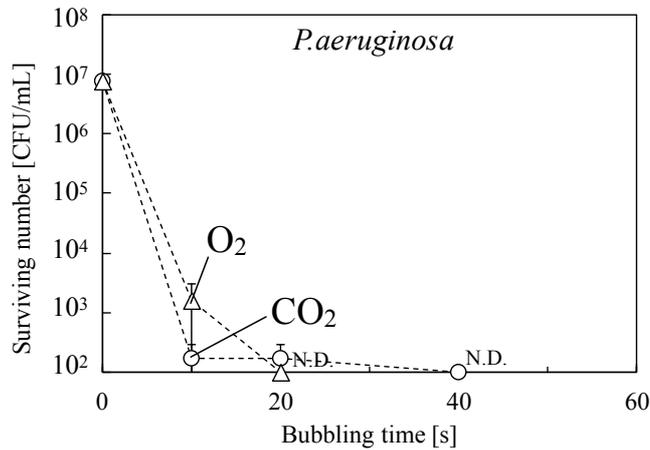


図 4-23 精製水中の緑膿菌に対する酸素と二酸化炭素のプラズマの殺菌効果

#### 4.3.4 プラズマの導入距離が殺菌効果に与える影響

プラズマ中の殺菌因子としてはプラズマによって生成される活性種である可能性が高い。活性種は酸化力が高いほど反応性が高く、ナノからマイクロ秒で失活するほど寿命が短い<sup>[85]</sup>。このため、プラズマを生成してから、液中に導入するまでの距離を設ける事で、プラズマ中で生成された短寿命の活性種の影響を除く事ができると考えられる。

そこで、図 4-24 のようにプラズマジェットの先端部とファンネルの間に、ガラス管を挿入し、プラズマを生成してから液中に導入するまでの距離を長くして殺菌実験を行った。実験には、これまでの殺菌実験で殺菌効果を示した酸素、窒素、二酸化炭素、空気プラズマを用い、ガス流量は同じく 3 SLM とした。ガラス管の長さは 56 mm でガラス管の体積とガス流量からガスの通過時間を計算した結果、およそ 8.5 ミリ秒でガラス管内を通過する。このため、ナノ～マイクロ秒オー

ダーの短寿命の活性種の影響は除くことができる。たとえば、一重項酸素は、電子配置によって  $^1\Sigma g^+$  と  $^1\Delta g$  の 2 つの状態をとり、前者は気相中でも非常に寿命が短い、後者は比較的長く、気相中での寿命は  $10^{-3}$  秒ほどである<sup>[86]</sup>。また、ヒドロキシルラジカルは、約 0.1 秒で 1 オーダー減少するとされている<sup>[87]</sup>。そこで、気相中で短寿命の活性種が殺菌効果に与える影響を調べるために、大腸菌を生理食塩水中に懸濁して、5 分間バブリングを行った。

実験の結果を図 4-25 に示す。実験は  $n=3$  で行い、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数表記であるため、標準偏差値が平均値を上回った場合は、負の範囲のエラーバーは表記していない。酸素プラズマでは、30 秒以内に生菌数が検出下限値以下となった。二酸化炭素プラズマでは、1 分間で生菌数が 2 桁以上減少し、3 分以内に検出下限値以下となった。窒素と空気プラズマは殺菌効果を示さなかった。

酸素および二酸化炭素プラズマに関しては、直接導入した場合と比較して、殺菌効果の大きな違いはなかった。このため、酸素と二酸化炭素プラズマ中の主な殺菌因子は気相中では長寿命である、または、気相中で長寿命の物質が液中に導入される事で、殺菌因子を生成している可能性が考えられる。一方、窒素プラズマは、塩化ナトリウム濃度が 0.9%であったにも関わらず、殺菌効果が確認されなかった。このため、窒素プラズマによって液中に導入される殺菌因子は、気相中で短寿命な物質と塩化ナトリウムの反応によって生成されていると考えられる。空気プラズマは、塩化ナトリウムが存在しているため、距離を離しても殺菌効果を確認できなかったと考えられる。

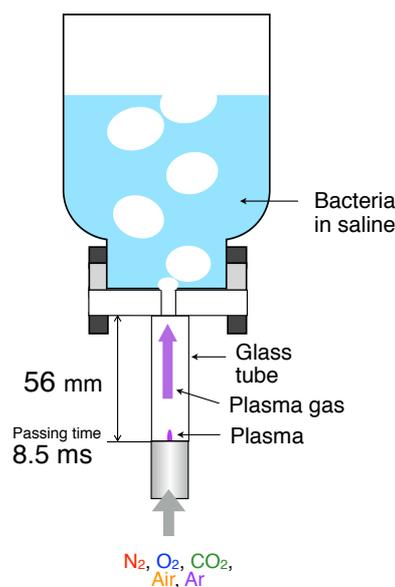


図 4-24 プラズマの導入距離が殺菌効果に与える影響の調査方法

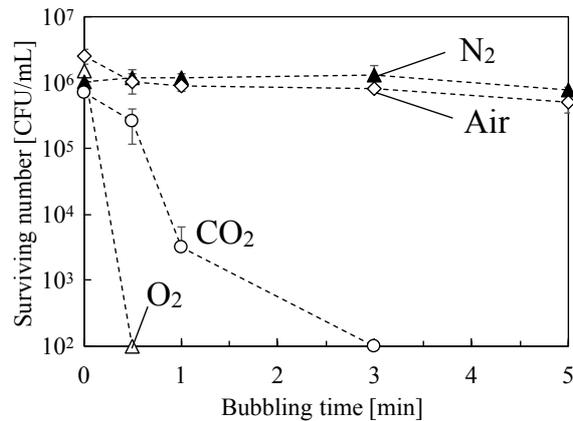


図 4-25 生理食塩水中の大腸菌に対する殺菌効果と導入距離

#### 4.4 各種ガスのプラズマバブル水による殺菌効果

これまでのプラズマバブリングによる殺菌実験では、バブリングする溶液中に細菌を懸濁してプラズマバブリングする、ダイレクトプラズマバブリングを行っていた。ダイレクトプラズマバブリングでは、細菌は、溶液の全体に分布しており、対流による攪拌効果があったとしても、プラズマの気泡が直接細菌に作用して殺菌しているのはごくわずかで、ほとんどが水を介して殺菌因子が細菌に作用する事で殺菌されていると考えられる。このため、プラズマによる液中殺菌やがん細胞の不活化の研究において、水の重要性が注目されており、プラズマ照射によって水に溶けた殺菌因子は条件によって異なる寿命を持つといわれている<sup>[88], [89]</sup>。プラズマ処理する事によって、何かしらの機能を付与された水はプラズマ処理水と呼ばれ、殺菌をはじめとして様々な基礎から応用まで幅広い研究が行われている<sup>[29], [43]</sup>。

プラズマ処理水は主に、プラズマを液体の上方から照射することで生成される。この手法を用いる事によって簡便にプラズマ処理水を作製できるが、プラズマと水の接触面積が小さい、プラズマが周辺空気の影響を受ける、などの問題がある。これらの問題はプラズマバブリング方式を用いることによって解決できる。また、プラズマバブル水による殺菌実験により、各ガス種のプラズマによって生成された殺菌因子のうち、液中における寿命が短いものを除いた殺菌効果の検証が可能となる。そこで本研究では、プラズマバブリング方式を用いて生成したプラズマ処理水を特にプラズマバブル水 (PBW: Plasma Bubbled-up Water) と呼び、プラズマバブル水による殺菌効果を調べた。

殺菌効果は、図 4-26 に示すように、990  $\mu$ L のプラズマバブル水と 10  $\mu$ L の大腸菌の菌液を混合し、その溶液中の生菌数からそれぞれのプラズマバブル水の殺菌効果を評価した。プラズ

マバブル水はプラズマバブリングを開始して5分経過したときに、ピペットで採取し、ポリプロピレン製のエッペンチューブ内の菌液と混合した。採取してから菌液と混合するまでの時間は4~5秒であった。混合後、プラズマバブル水と菌液が十分に反応するように室温で1時間以上静置したのち、段階希釈を行った。プラズマバブル水は、生理食塩水を3 SLM のアルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマでバブリングすることで作製した。菌液は大腸菌 (ATCC 25922) の初期菌数が  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL のものを使用した。また、このときの検出下限値は 100 CFU/mL であった。

生理食塩水を用いて生成した各ガス種のプラズマバブル水による殺菌実験の結果を図 4-27 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。窒素、酸素、二酸化炭素のプラズマを用いてプラズマバブル水を作製した場合に、生菌数が検出下限値以下になる高い殺菌効果を示した。また、空気のプラズマを用いた場合に生菌数が 1 桁減少する殺菌効果を確認した。一方、アルゴンプラズマを用いた場合は殺菌効果で確認できなかった。生菌数が検出下限値以下となった、窒素、酸素、二酸化炭素のプラズマは、ダイレクトプラズマバブリングでも殺菌効果が検出下限値以下となっていた。このことから、これらのプラズマバブル水中には高い殺菌効果を液中で数秒以上保つ比較的生命長な殺菌因子が存在している事を示した。空気プラズマはダイレクトプラズマバブリングでは殺菌効果を示さなかったにも関わらず、プラズマバブル水とした場合に殺菌効果を示した。この要因については明らかとなっていないが、生理食塩水を空気プラズマでバブリングする事で、長寿命の殺菌因子が導入される事を示した。

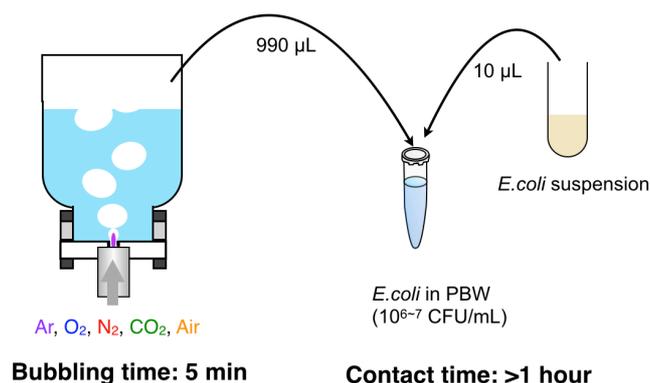


図 4-26 プラズマバブル水による殺菌実験

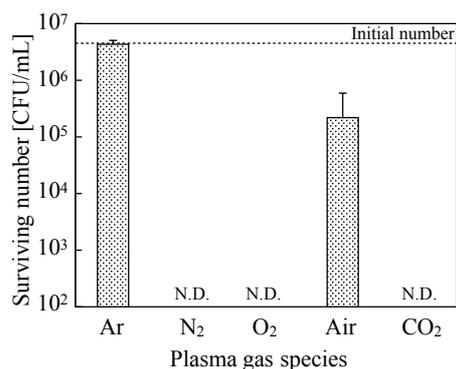


図 4-27 生理食塩水を用いた各ガス種のプラズマバブル水による大腸菌の殺菌効果

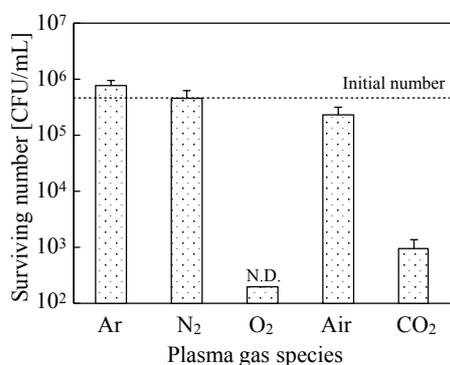


図 4-28 精製水を用いた各ガス種のプラズマバブル水による大腸菌の殺菌効果

次に、溶媒に精製水を使用して、同様の実験を行った。予備実験により、細菌の培養液である LB 培地とプラズマバブル水を混合する事で、プラズマバブル水の殺菌能がなくなる事が確認できたため、この実験では、プラズマバブル水と菌液の接触時間をコントロールするために、プラズマバブル水と菌液を混合してから 1 時間後に、培養液と 1:1 で混合した。このため、このときの検出下限値は 200 CFU/mL となった。また、このときの初期菌数は  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL であった。

精製水を用いて作製した各ガス種のプラズマバブル水による殺菌実験の結果を図 4-28 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。酸素プラズマを用いた場合は生菌数が検出下限値以下となる、高い殺菌効果を確認した。二酸化炭素プラズマの場合は、生菌数を 2 桁減少させる殺菌効果を示し、アルゴン、窒素、空気のプラズマでは生菌数の大きな変化は確認されなかった。この結果から、プラズマバブル水の溶媒に精製水を用いた場合でも、酸素と二酸化炭素のプラズマバブル水が殺菌効果を示し、数秒以上の寿命を持つ殺菌因子が存在する可能性を示した。また、生理食塩水を用いた場合よりも、窒素と二酸化炭素のプラズマバブル水による殺菌効果が低下していることから、それぞれのプラズマによって液中に導入される物質と塩化ナトリウムの反応によって殺菌因子が生成されている可能性がある。

## 4.5 各ガス種のプラズマによって液中に導入される活性種の調査

殺菌実験の結果から、プラズマのガス種によって異なる寿命の殺菌因子または殺菌に関与する物質が存在する可能性が示された。そこでそれらの物質を特定するために 3 章と同様に、各ガス種のプラズマによって液中に導入される活性種を、ESR を用いたスピントラッピング法と吸光度法を用いて測定した。

### 4.5.1 スピントラッピング法による活性種測定

各ガス種のプラズマによって液中に導入される短寿命な活性種を測定するために、ESR を用いたスピントラッピング法によってヒドロキシルラジカルと一重項酸素を測定した。測定法に関しては 3.6 と同様である。ヒドロキシルラジカルの測定には DMPO を、一重項酸素の測定には TPC を使用する必要があるが、いずれの試薬も高価であるため、これまでの殺菌実験のように 200 mL という大容量の液体ではなく、できるだけ少量の液体に対するバブリングをすることが望ましかった。そのため、図 4-29 のように液量を 50 mL とし、3 SLM のアルゴン、酸素、窒素、空気、二酸化炭素プラズマで 30 秒間バブリングして活性種を測定した。試薬はそれぞれ生理食塩水に懸濁し、DMPO と TPC の濃度はそれぞれ 100 mM と 75 mM とした。

測定した結果を図 4-30 と図 4-31 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。ヒドロキシルラジカル濃度は窒素とアルゴン、二酸化炭素プラズマでそれぞれ 2.6, 0.6, 0.3  $\mu\text{M}$  となり、その他のガス種では検出されなかった。一重項酸素濃度は、酸素プラズマで最も高く、95  $\mu\text{M}$  となり、次いで二酸化炭素、空気、窒素プラズマで 12, 11, 0.6  $\mu\text{M}$  となり、アルゴンプラズマでは検出されなかった。窒素とアルゴン、二酸化炭素プラズマでヒドロキシルラジカルが検出された要因としては、励起したアルゴン原子や窒素原子、炭素原子が水分子と衝突し、水分子の結合を切断することでヒドロキシルラジカルを生成していると考えられる。

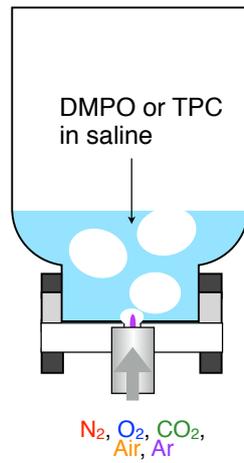


図 4-29 スピントラッピング法による活性種測定実験

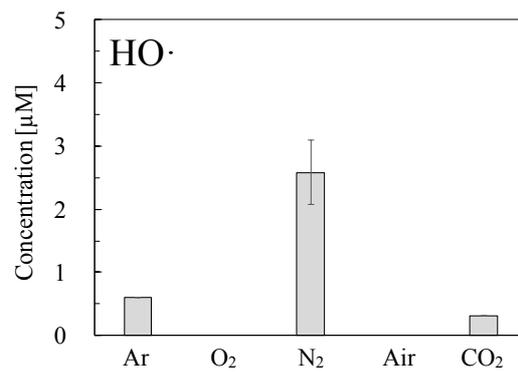


図 4-30 各ガス種のプラズマによって液中に導入される HO ラジカル濃度

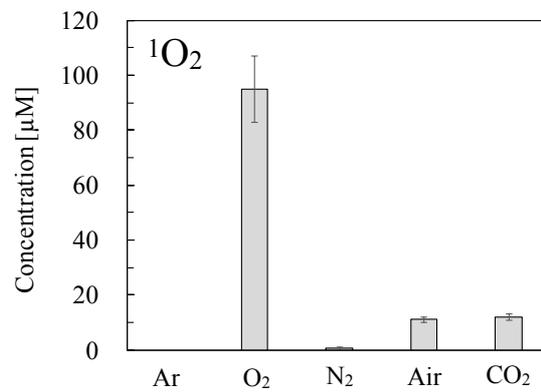


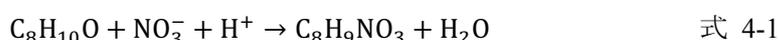
図 4-31 各ガス種のプラズマによって液中に導入される一重項酸素濃度

## 4.5.2 吸光光度法による活性種測定

吸光光度法を用いた活性種測定は、図 4-32 のように 200 mL の精製水を 30 秒間バブリングし、その後呈色試薬と混ぜ合わせることで吸光度の変化を測定し、活性種濃度を定量した。測定対象は、オゾン、過酸化水素、亜硝酸イオン、硝酸イオン、次亜塩素酸とした。測定にはダブルビーム型の可視・紫外域吸光分光光度計 (U-2900, Hitachi High Technologies Co.) を用いた。

オゾンと過酸化水素はインディゴ試薬と、XO 溶液を用いて測定を行った。これらの試薬の調整および検量線に関しては 3.6 と同様である。

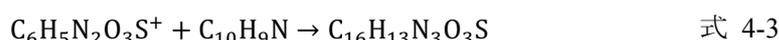
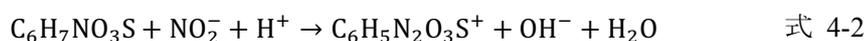
硝酸イオンは NANOCOLOR Standard Test Nitrate (硝酸イオン・硝酸態窒素 測定用 スタンダードテスト (DEV 法)) キットを用いて測定した。このキットでは次式示す、試料中の硝酸イオンと試薬中の 2,6-ジメチルフェノール ( $C_8H_{10}O$ ) の反応を利用する。



この反応は酸性溶液中で起こり、特定の吸収波長を持つ 4-ニトロ-2,6-ジメチルフェノール ( $C_8H_9NO_3$ ) が生成される。4-ニトロ-2,6-ジメチルフェノールの濃度に依存した吸光度の変化から硝酸イオン濃度を定量する。

硝酸イオン濃度の測定は次の手順で行った。まず、亜硝酸による干渉を防ぐため、100  $\mu$ L の試料に 63  $\mu$ L のアミド硫酸を加えた。その後、この溶液に 100  $\mu$ L の R2 試薬 (2,6-ジメチルフェノール<0.5%, 2-プロパノール 45%) 混合し、最後に 800  $\mu$ L の R1 試薬 (硫酸 52%, o-リン酸 39%) を加えた。反応が終わり、色が落ち着くまで静置したあとに、石英ガラスセルに移し、分光光度計で 340 nm の吸光度を測定した。図 4-33 および図 4-34 のように、プラズマバブル水中の活性種を測定する前に各濃度の硝酸を試料として使用し、硝酸イオン濃度と吸光度の関係をグラフにして検量線を作成した。

亜硝酸イオンは NANOCOLOR Standard Test Nitrite (硝酸イオン・硝酸態窒素 測定用 スタンダードテスト (スルファニル酸法)) キットを用いて測定した。このキットでは次式示す、試料中の亜硝酸イオンと試薬中のスルファニル酸 ( $C_6H_7NO_3S$ ) と 1-ナフチルアミン ( $C_{10}H_9N$ ) の反応を利用する。



酸性溶液中でスルファニル酸はジアゾ化され、生成されたジアゾ塩は 1-ナフチルアミンと結合し、赤色染料 ( $C_{16}H_{13}N_3O_3S$ ) を生成する。この赤色染料の濃度変化による吸光度から亜硝酸イオン濃度を定量する。

亜硝酸イオン濃度の測定は次の手順を行った。まず、800  $\mu$ L の試料に 80  $\mu$ L の R1 試薬 (硫酸<1%, 酢酸 24%) と 80  $\mu$ L の R2 試薬 (1-ナフチルアミン<0.1%, 酢酸 28%) を混合した。反応が終わり、色が落ち着くまで静置したあとに、石英ガラスセルに移し、分光光度計で 520 nm の吸光

度を測定した。硝酸イオン濃度と同様に、図 4-35 および図 4-36 のように亜硝酸イオン濃度と吸光度の関係をグラフにして検量線とした。

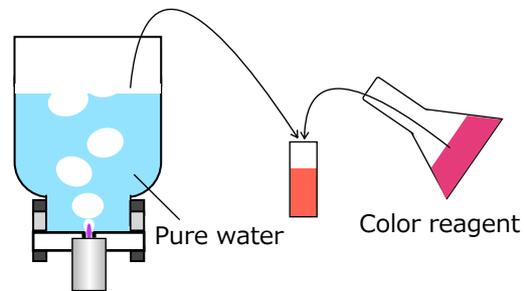


図 4-32 吸光光度法による活性種測定実験

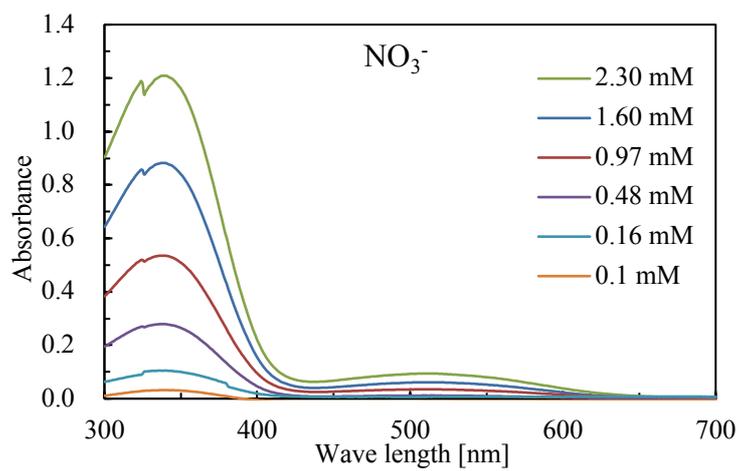


図 4-33 硝酸イオン濃度に依存した 4-ニトロ-2,6-ジメチルフェノールの吸収スペクトル

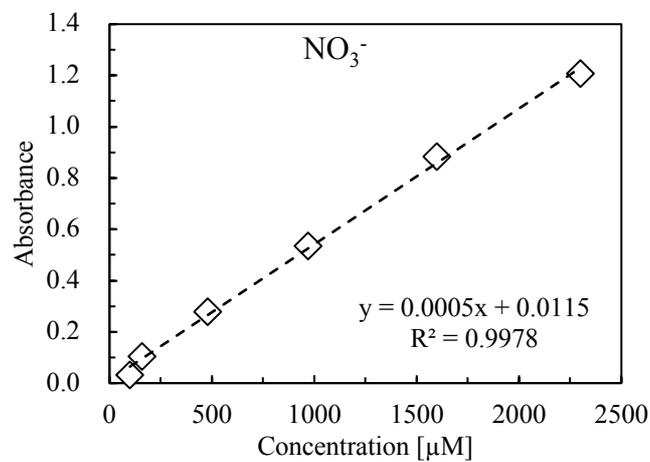


図 4-34 硝酸イオン濃度の検量線

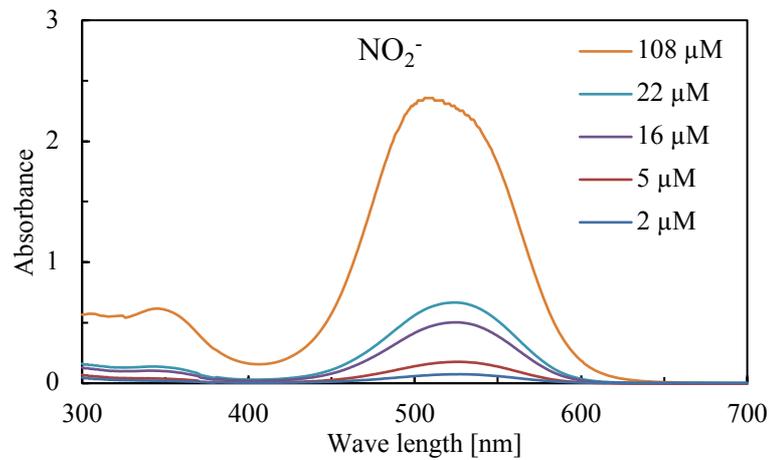


図 4-35 亜硝酸イオン濃度に依存した赤色染料の吸収スペクトル

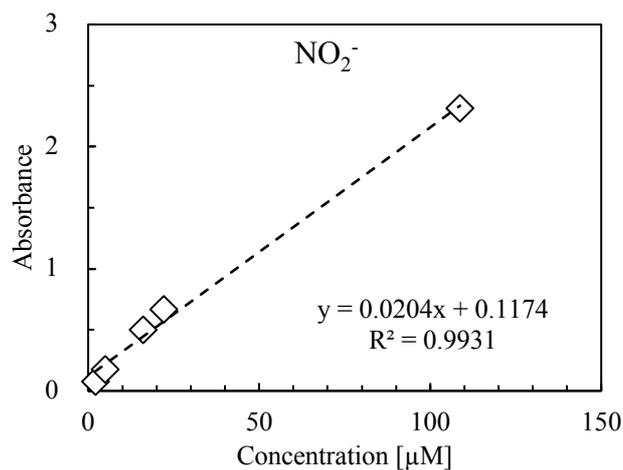


図 4-36 亜硝酸イオン濃度の検量線

実験は  $n=3$  で行い、いずれのグラフもエラーバーは標準偏差を意味する。各ガス種のプラズマバブル水中のオゾンの測定結果を図 4-37 に示す。酸素プラズマを用いた場合に  $15.2 \mu\text{M}$  と最も高い濃度でオゾンを検出した。そして、空気プラズマでは  $0.4 \mu\text{M}$  のオゾンを検出した。一方、精製水を用いたプラズマバブル水で殺菌効果を示さなかったアルゴンおよび窒素プラズマのみならず、殺菌効果を示した二酸化炭素プラズマでも、オゾンが検出されなかった。図 4-38 のようにすべてのプラズマバブル水中で過酸化水素を検出した。酸素プラズマを用いた場合に  $20.2 \mu\text{M}$  と最も高い濃度となり、空気、窒素、二酸化炭素、アルゴンプラズマでは、 $9.3, 4.0, 2.6, 1.0, 0.4 \mu\text{M}$  の過酸化水素を検出した。硝酸イオンは図 4-39 のように空気プラズマバブル水からのみ検出され、 $82.5 \mu\text{M}$  となった。亜硝酸イオンは図 4-40 のように空気および窒素プラズマバブル水から検出され、それぞれ  $74.2 \mu\text{M}$  と  $4.2 \mu\text{M}$  となった。

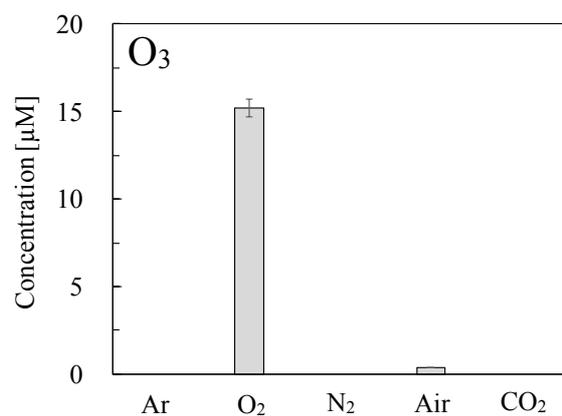


図 4-37 各ガス種のプラズマによって液中に導入されるオゾン濃度

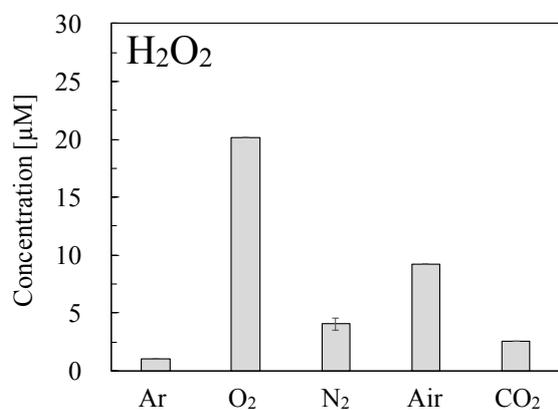


図 4-38 各ガス種のプラズマによって液中に導入される過酸化水素濃度

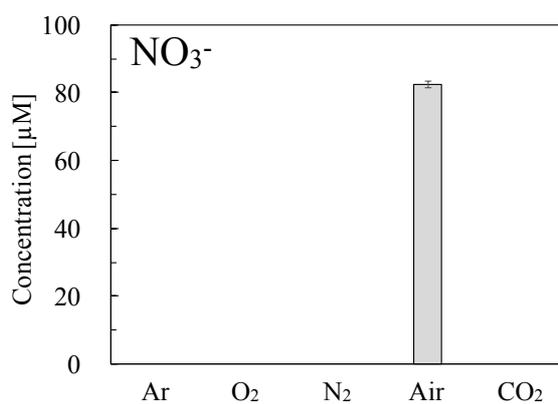


図 4-39 各ガス種のプラズマによって液中に導入される硝酸イオン濃度

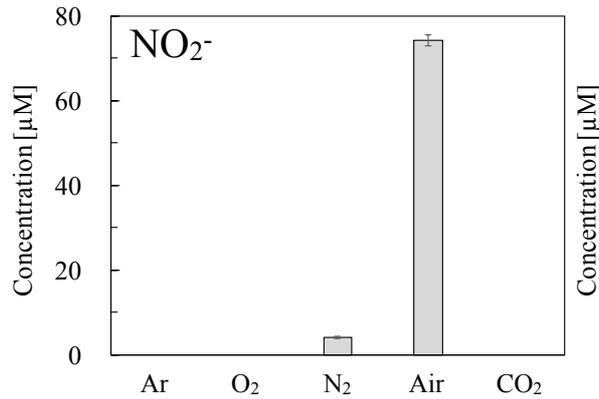


図 4-40 各ガス種のプラズマによって液中に導入される亜硝酸イオン濃度

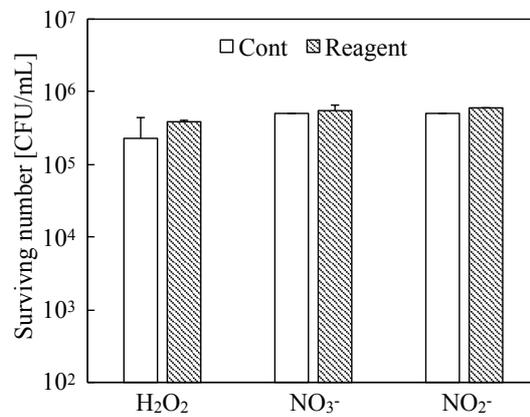


図 4-41 各種標準試薬による大腸菌に対する殺菌効果

## 4.6 標準試薬による殺菌効果

酸素プラズマで 20  $\mu\text{M}$  の過酸化水素が、空気プラズマで 82.5  $\mu\text{M}$  の硝酸イオンと 74.2  $\mu\text{M}$  の亜硝酸イオンが検出された。これらによる殺菌効果をそれぞれの標準試薬を用いて調べた。プラズマバブル水による殺菌実験と同様に、990  $\mu\text{L}$  の標準試薬と 10  $\mu\text{L}$  の大腸菌の菌液を混合して、生菌数を調べた。試薬には、30  $\mu\text{M}$  に調製した過酸化水素水溶液と 86  $\mu\text{M}$  に調製した硝酸イオン水溶液、70  $\mu\text{M}$  に調製した亜硝酸イオン水溶液を使用した。

実験の結果を図 4-41 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、エラーバーは標準偏差を意味する。いずれの試薬を混合した場合でも、生菌数は初期菌数と変わらなかった。このことから、プラズマバブル水中に導入される濃度の過酸化水素、亜硝酸イオン、硝酸イオンには殺菌効果がない事を確認した。

## 4.7 各ガス種のプラズマの殺菌要因の考察

空気プラズマを用いてプラズマバブル水を作製した際に、最も高い濃度の亜硝酸イオンや硝酸イオンが多く検出されたが、前節の実験から、空気プラズマバブリングによって液中に導入される濃度の亜硝酸イオンや硝酸イオンには殺菌効果がない事を示した。このため空気プラズマの殺菌因子は、これらのイオンが生成される過程で生成されるものまたは、これらの組み合わせによって生成されるものであると考えられる。

酸素プラズマは、プラズマバブル水による殺菌効果が高かったため比較的長寿命な殺菌因子が液中に導入されていると考えられる。しかし、比較的長寿命かつ酸素プラズマによって液中に導入されていた約 20  $\mu\text{M}$  の過酸化水素には殺菌効果がなかった。6.25  $\mu\text{M}$  (0.3 ppm) のオゾン水では大腸菌を 0.6 分で 3 桁以上殺菌できるという報告があり<sup>[90]</sup>、本研究の酸素プラズマバブル水の実験では、オゾン濃度は 15  $\mu\text{M}$  の濃度で 3 桁以上の殺菌効果を確認している。これらことから、酸素プラズマバブル水による殺菌効果にはオゾンが殺菌要因である可能性が高い。

窒素プラズマは 4.3.1 のダイレクトプラズマバブリングによる殺菌実験において、精製水に対してバブリングした際には殺菌効果がなく、0.9%の塩化ナトリウムを含む生理食塩水に対してバブリングした際に高い殺菌効果を示した。さらに、4.3.2の実験では塩化ナトリウム濃度が高くなるほど殺菌効果が高くなり、4.4の実験では生理食塩水を窒素プラズマバブリングした水でも高い殺菌効果を示した。このことから、窒素プラズマは液中に塩化ナトリウムが含まれる場合に高い殺菌効果を示す事を明らかにした。4.5.1の活性種測定においては、ヒドロキシルラジカルの濃度は、窒素プラズマで最も高くなった。そのため、生理食塩水を窒素プラズマバブリングした場合は、次の反応が起きている可能性が考えられる。



次亜塩素酸は漂白剤や殺菌剤として広く一般的に使用されている成分である。この次亜塩素酸が液中で生成される事によって殺菌効果が発現している可能性がある。このため、塩化カリウムを添加したプラズマバブル水による殺菌効果を確認する、または生理食塩水から生成した窒素プラズマバブル水中から次亜塩素酸を検出できれば、窒素プラズマによる殺菌要因を特定できる可能性が高い。

## 4.8 二酸化炭素プラズマの殺菌要因の調査

これまでのダイレクトプラズマバブリングおよび長距離プラズマバブリング、プラズマバブル水による殺菌実験で二酸化炭素プラズマによる高い殺菌効果を確認した。活性種測定によって、二酸化炭素プラズマによって液中に導入されている活性種の中で、その他のガス種と比較して

濃度が高かった一重項酸素が殺菌に関与している可能性があった。しかし、二酸化炭素プラズマバブル水が殺菌効果を示したことから、液中における殺菌因子の寿命は数秒以上である事が示された。液中における一重項酸素の寿命はマイクロ秒程度であるため、一重項酸素によって殺菌されている可能性は極めて低い。長寿命な活性種としては過酸化水素やオゾンがあるが、過酸化水素の濃度は殺菌効果のなかった窒素プラズマよりも低く、オゾンに関しては検出されなかった。このため、二酸化炭素プラズマによる殺菌因子は未だ不明である。

二酸化炭素プラズマにはその他のガス種と比較して、コストが低いというメリットがある。たとえば医療用プラズマ装置で使われることが多いヘリウムやアルゴンのガスは、7 m<sup>3</sup> のガスボンベで考えるとそれぞれ 2 万円前後、8 千円前後ほどかかる。また、窒素や酸素は同体積量で 3 千円前後である。これらに対して二酸化炭素は約 2 倍の体積量で 3 千円前後となっている。このため、価格は今回調査した中で最も安い。また、同程度に安く、高い殺菌効果を示した酸素ガスは大量のオゾンガスが発生するうえに、支燃性のガスであるため火災を起こす危険を伴うが、二酸化炭素は不活性ガスであるためそのリスクは比較的小さい。さらに、二酸化炭素は加圧することにより常温でも液体化するため、ガスとして存在するよりも体積あたりのモル量が多くなり、小さいサイズのボンベで済む。また、病院などには既に導入されているケースが多く、新しいガスを導入する必要がなく手続きが簡素に済む。このように、二酸化炭素はその他のガス種と比較して多くのメリットを持つ。

二酸化炭素プラズマを殺菌など医療応用するためには、その殺菌機構や安全性を明らかにする必要がある。しかし、これまでの実験では、その殺菌の特性や生成される活性種の詳細は明らかとならなかった。このため、本節では二酸化炭素プラズマによる液中殺菌の特徴や生成される物質をさらに調べた結果について記述する。

#### 4.8.1 バブリング時の二酸化炭素プラズマの発光スペクトル

二酸化炭素プラズマによる発光から、生成される活性種を予測するために、バブリングしている際の発光分光測定を行った。図 4-42 のように、ガラスファンネルの中に、アクリルの円筒の中に固定した光ファイバを入れ、発光部から 30 mm の位置で厚さ 1 mm の石英ガラス越しに測定した。このとき光軸はプラズマジェットの中心部に合わせた。測定した発光はマルチチャンネル分光器に取り込み、波長ごとの強度のスペクトルを測定した。200～900 nm の測定には Ocean Optics HR4000 を 900～1700 nm の測定には Ocean Optics NIRQuest512 を使用した。バブリング条件は殺菌実験と同様に、液量は 200 mL とし、二酸化炭素のガス流量は 3 SLM とした。

測定した結果を図 4-43 に示す。いずれの波長領域の発光からも、酸素および炭素の原子線を確認した。1587 nm にある発光線は 777.4 nm の酸素の原子線の倍数であると考えられるため、O I 777.4 と記入している。この結果から、バブリング時の二酸化炭素プラズマ中では、二酸

化炭素ガスが原子化するところまで解離していること、水由来の発光スペクトルが発生していない事を確認した。

#### 4.8.2 初期菌数および接触時間が殺菌効果に与える影響

プラズマバブル水による殺菌効果は、プラズマバブリングによって液中に導入された殺菌因子が細菌に作用する事によって引き起こされている。プラズマバブル水として使用する際は、プラズマバブリングする場所とプラズマバブル水を使用する場所が異なるため、液中に存在する殺菌因子の量は有限である。プラズマバブル水中の殺菌因子の濃度  $c$  は mol/L という濃度で定義でき、何らかの殺菌因子を持つ薬剤として考えることができる。薬剤中の殺菌因子の濃度  $c_0$  と薬剤と細菌の接触時間  $t$  によって変わり、初期菌数を  $N_0$ 、 $t$  分後の生菌数を  $N_t$  とすると、薬剤による殺菌能は次の式で表される。

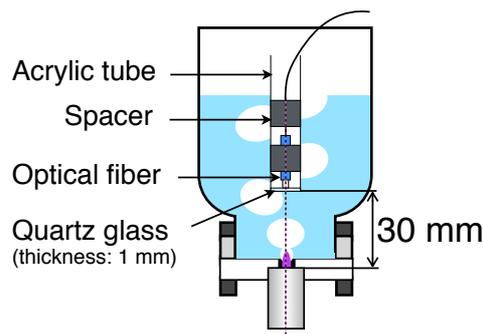


図 4-42 バブリング時の発光分光測定の実験系

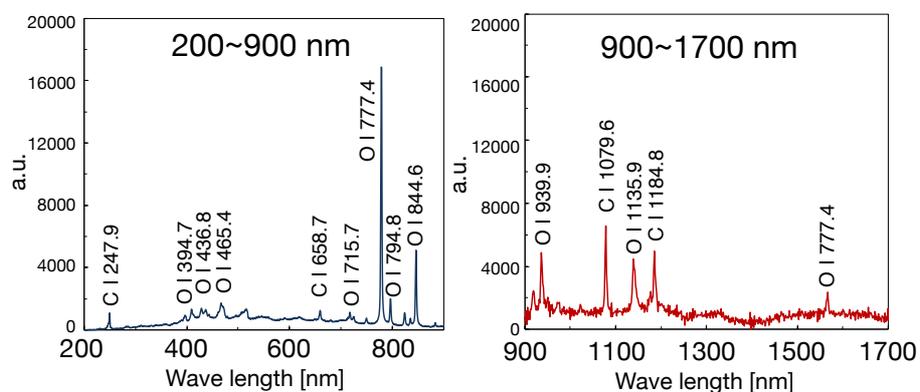


図 4-43 バブリング中の二酸化炭素プラズマの発光スペクトル

$$\text{Log}\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -kc_s t \quad \text{式 4-5}$$

ここで、 $k$ は反応速度定数であり、温度によって変化する。つまり、定温条件下では  $c_s$  または  $t$  に比例して、生菌数の桁数は直線的に減少していく。本研究では全て、室温の下で実験を行ったため、 $k$  は一定である。プラズマバブル水による殺菌効果は、殺菌因子の寿命が長く、細菌の濃度  $c_b$  が  $c_s$  を大きく下回る場合、すなわち  $c_b \ll c_s$  である場合は、 $t$  の影響のみ考慮すればいいと考えられ、細菌の減少量と接触時間の関係から、CO<sub>2</sub> プラズマバブル水中の殺菌因子が持つ殺菌能を明らかにする事ができる。しかし、 $c_b \gg c_s$  となった場合は殺菌因子が高い殺菌能を有していても、殺菌効果を確認する事ができなくなる。したがって、初期菌数は殺菌効果に大きな影響を与える。そこで、プラズマバブル水と細菌の接触時間およびプラズマバブル水と初期菌数が殺菌効果に与える影響を調べた。

図 4-44 に示すように、990  $\mu\text{L}$  のプラズマバブル水と 10  $\mu\text{L}$  の大腸菌の菌液を混合したあと、0 から 240 分間静置した。その後 LB 培地と 1:1 で混合することでプラズマバブル水と大腸菌の接触時間をコントロールして殺菌効果を評価した。プラズマバブル水は 4.4 と同様にプラズマバブリングを開始して 5 分経過したときに、ピペットで採取し、予めポリプロピレン製のエッペンチューブ内に入れた菌液と混合した。また、プラズマバブル水は、精製水を 3 SLM の二酸化炭素のプラズマでバブリングすることで作製し、pH による影響を調べるために、ガスのみをバブリングしたガスバブル水による影響も同時に調査した。菌液はプラズマバブル水と菌液を混合後の大腸菌 (ATCC 25922) の初期菌数が  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CFU/mL のものを使用した。また、このときの検出下限値は 200 CFU/mL であった。

室温 (23.8°C) の精製水を 5 分間二酸化炭素ガスまたは二酸化炭素プラズマでバブリングした後の pH は 4.1 であった。二酸化炭素プラズマバブル水による殺菌実験の結果を図 4-45 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。初期菌数が  $5.3 \times 10^6$  CFU/mL のときは、接触時間の増加とともに、生菌数がログスケールで直線的に減少し、60 分で 1 桁、240 分で 2 桁減少した。一方、初期菌数が  $5.3 \times 10^5$  CFU/mL の場合は接触時間が 1 分で生菌数が  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL まで減少し、30 分以内に検出下限値以下となった。初期菌数が  $5.3 \times 10^4$  CFU/mL 以下の場合には、プラズマバブル水を混合して 1 分以内に生菌数は検出下限値以下となった。また、ガスバブル水では、初期菌数が  $5.3 \times 10^4$  CFU/mL 以上の場合には生菌数は減少し、 $5.3 \times 10^3$  CFU/mL 以下の場合には 240 分接触させても生菌数は減少しなかった。

これらの結果から、二酸化炭素プラズマバブル水は初期菌数が  $10^5$  CFU/mL オーダー以下の場合高い殺菌効果を示す一方で、初期菌数が  $10^6$  CFU/mL 以上になると、細菌の数に対して殺菌因子の濃度が不足し、特異的な高い殺菌効果を確認できなかつたと考えられる。また、

初期菌数が  $10^5$  CFU/mL 以下の場合、二酸化炭素プラズマバブル水中の殺菌因子は即座に細菌と反応し、殺菌効果を引き起こしている事が明らかとなり、非常に反応性の高い殺菌因子が存在している事を示した。一方で、ガスバブル水でも生菌数の減少が確認された事から、二酸化炭素の融解による pH の低下が殺菌効果に影響を与えていると考えられる。

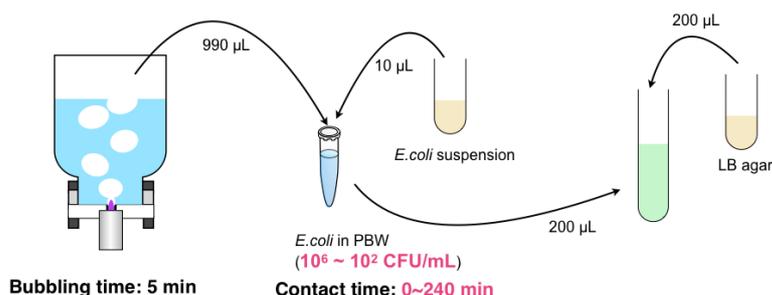


図 4-44 初期菌数および接触時間と殺菌効果の関係の調査方法

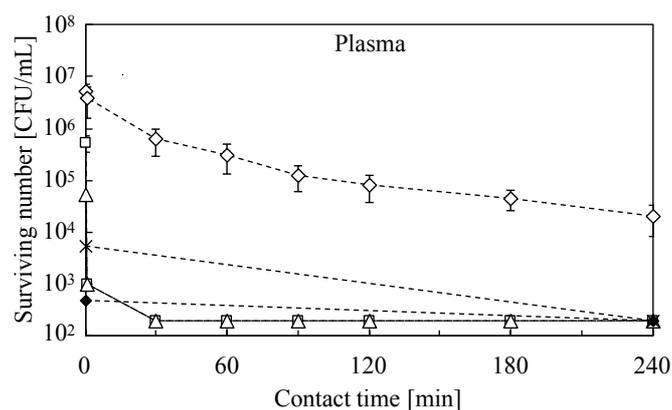


図 4-45 大腸菌の初期菌数が  $\text{CO}_2$  プラズマバブル水の殺菌効果に与える影響

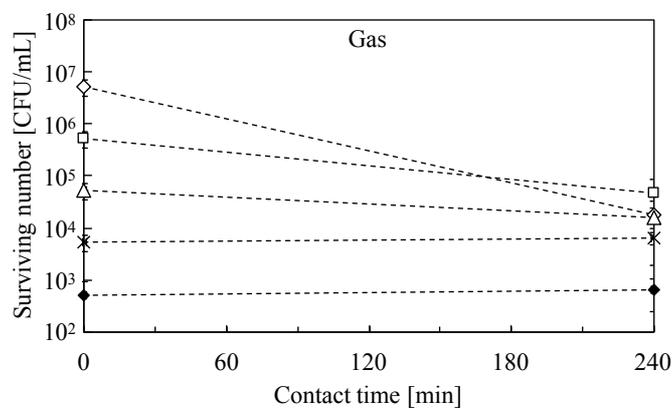


図 4-46 大腸菌の初期菌数が  $\text{CO}_2$  ガスバブル水の殺菌効果に与える影響

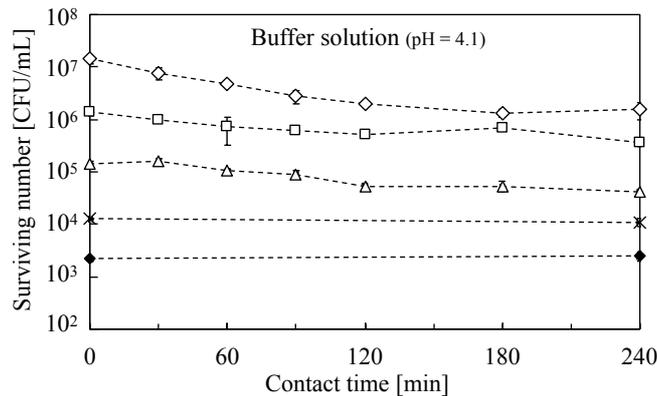


図 4-47 クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液の pH と殺菌効果の関係

#### 4.8.3 殺菌効果に pH が与える影響

ガスバブル水でも殺菌効果があったことから二酸化炭素プラズマによる殺菌効果には pH も関与していると考えられる。そこで、二酸化炭素プラズマでバブリングした後の水の pH は 4.1 であったため、pH が 4.1 のクエン酸緩衝液を用いて 4.8.2 と同様の手順で殺菌実験を行った。クエン酸緩衝液は、クエン酸水和物とクエン酸三ナトリウムを用いてクエン酸濃度が 20 mM となるように調製した。このときの初期菌数は  $1.4 \times 10^7$  CFU/mL であった。

実験の結果を図 4-47 に示す。実験は  $n=3$  で行い、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。初期菌数が  $10^5$  CFU/mL 以上では、生菌数がログスケールで直線的に減少し、 $10^4$  CFU/mL 以下になると減少しなかった。この結果と、二酸化炭素ガスバブリングの結果がほとんど同じ傾向を示していることから、二酸化炭素が溶ける事によって pH が低下し、生菌数が減少する事を示した。

#### 4.8.4 二酸化炭素プラズマバブル水の静置時間と殺菌効果

二酸化炭素プラズマによってバブリングした精製水を一度別のガラスビーカーに移し、一定時間静置した後、菌液と混合する事で、二酸化炭素プラズマバブル水中の殺菌因子の液中での寿命を調べた。バブリング時間は 5 分とし、バブリング後は室温で静置した。接触時間は 60 分とした。初期菌数は  $4.0 \times 10^5$  CFU/mL で、その他の条件は 4.8.2 の実験と同様に行った。

殺菌実験の結果を図 4-49 に示す。グラフは横軸が静置時間、縦軸は混合後の生菌数を表している。実験は  $n=3$  で行い、プロットは平均値を、エラーバーは標準偏差を意味する。0 分のものはビーカーに移す前に菌液と混合し、採取してから混合するまで、4~5 秒程度かかった。静置時間が長くなるほど生菌数は増加し、10 分後には  $1.3 \times 10^5$  CFU/mL となり、20 分静置後には生菌数は初期菌数と同等の  $4.2 \times 10^5$  CFU/mL となった。この結果から、二酸化炭素プラズマ

マバブル水中の殺菌因子の寿命は10分程度である事を明らかにした。殺菌因子が液中の反応が進むことによって失活しているとすると、化学反応であるため反応速度は温度に依存する。そのため、温度をパラメータとして、二酸化炭素プラズマバブル水の殺菌能の変化を追う事で、殺菌因子を推定する、反応速度論を用いた活性種の推定が可能であると考えられる<sup>[49]</sup>。

#### 4.8.5 二酸化炭素プラズマバブル水の吸光スペクトル

活性種は反応性が高く、寿命が短いと考えられるため、4.5.2 では活性種を試薬と反応させることによる呈色または脱色反応によって安定かつ特異的な吸光波長を持つ物質を生成して定量を行った。しかし、液中の活性種によっては、例えば硝酸イオンなどは試薬と反応させずとも特別な吸光スペクトルを示す<sup>[73]</sup>。そこで殺菌要因の特定が困難であった二酸化炭素プラズマバブル水の吸光スペクトルを測定した。測定には4.5.2と同様に測定にはダブルビーム型の可視・紫外域吸光分光光度計 (U-2900, Hitachi High Technologies Co.) を用い、測定波長範囲は200 nmから700 nmとした。二酸化炭素プラズマバブル水は、これまでの実験と同様に精製水を5分間プラズマバブリングする事によって作製した。

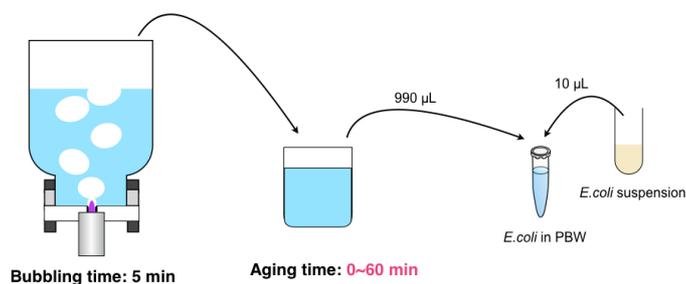


図 4-48 静置時間と殺菌効果の関係の調査方法

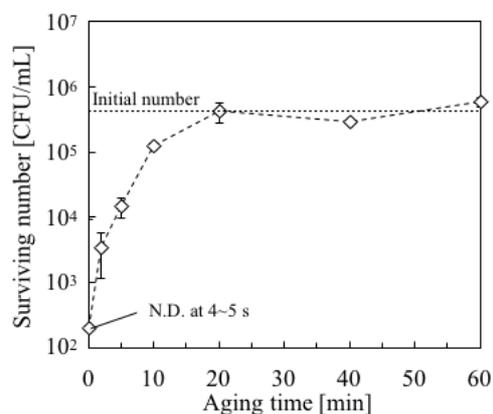


図 4-49 二酸化炭素プラズマバブル水の静置時間と殺菌効果の関係

オゾン濃度が 0.1 ppm の酸素プラズマバブル水の吸光スペクトルを観測した場合、図 4-50 の青線のように 262 nm 付近にオゾン特有のピークが検出された。一方、二酸化炭素プラズマバブル水の場合は、測定した波長域ではピークは検出されなかった。この結果から、二酸化炭素プラズマバブル水中にはオゾンが存在していても極めて低濃度であること、紫外可視領域に吸光スペクトルを持つ物質が存在しない事を明らかにした。

二酸化炭素プラズマバブル水中の殺菌因子を検出できなかった要因としては、殺菌因子の高い反応性から、測定するまでに液中に導入された殺菌因子の大部分が失活している可能性がある。低濃度で反応速度が早く、高い殺菌効果を示す強力な殺菌因子が存在していると仮定した場合、次の手法によって検出できる可能性がある。1 つ目は反応速度を落とす方法である。式 4-5 の反応速度定数  $k$  は温度によって影響を受けるため、低温下でプラズマバブリングをすることにより殺菌因子の失活を防ぐ事ができる可能性がある。2 つ目は、より高い濃度の殺菌因子を液中に導入する方法である。4.3.4 の長距離バブリングでも二酸化炭素プラズマは高い殺菌効果を示したことから、二酸化炭素プラズマによって生成される気相中では寿命が長い物質  $X_1$  が生成されている。 $X_1$  は液中では寿命が短いことから、殺菌因子  $X_2$  は水と  $X_1$  の反応、つまり気液界面で生成されている可能性がある。このため、プラズマバブルの気泡の大きさを小さくする事により、より高濃度の殺菌因子を液中に導入できると考えられる。

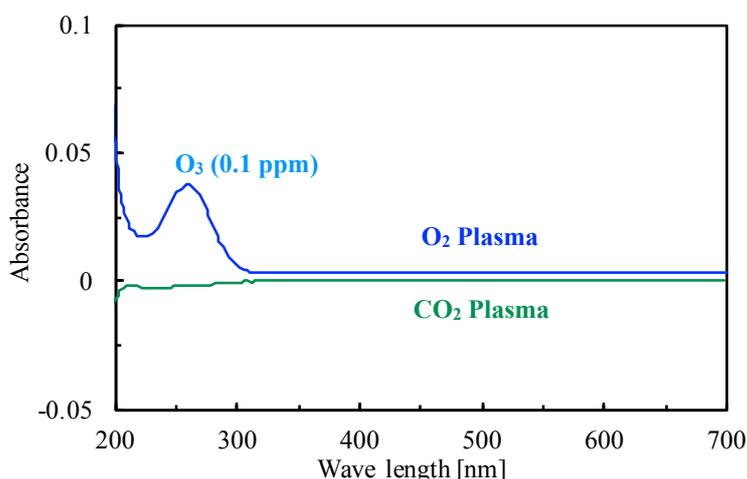


図 4-50 酸素および二酸化炭素プラズマバブリングした精製水の吸光スペクトル

## 4.9 まとめ

本章では様々なガス種のプラズマを生成できるマルチガスプラズマジェットを用いてプラズマバブリングする事によって、各ガス種のプラズマの殺菌効果および殺菌要因を調べた。その結果、窒素、酸素、二酸化炭素、空気のプラズマが大腸菌に対して高い殺菌効果を示し、その中でも高い殺菌効果を示した酸素と二酸化炭素のプラズマは大腸菌のみならず、黄色ブドウ球菌や緑膿菌などその他の一般細菌に対しても高い殺菌効果を示す事を明らかにした。各ガス種のプラズマによって液中に導入される活性種を測定した結果、液中にガス種によって導入される活性種の種類や量が大きく異なる事を明らかにした。

窒素プラズマでは、液中に塩化ナトリウムが存在する場合に高い殺菌効果を示し、ヒドロキシルラジカルが多く液中に導入されている事から、液中で次亜塩素酸を生成している可能性がある事を示した。酸素プラズマに関しては、主にオゾンが殺菌に関与している事を示した。空気プラズマでは、多くの硝酸イオンと亜硝酸イオンが液中に導入されている事、硝酸イオンと亜硝酸イオンには殺菌効果がない事を明らかにし、それらのイオンの生成過程で殺菌因子が生成されている可能性を示唆した。二酸化炭素プラズマでは、10分程度の寿命を持つ高い殺菌効果を示す殺菌因子の存在を明らかにした。しかし、殺菌因子を特定する事ができなかった。二酸化炭素プラズマの有用性や安全性を評価するために、今後詳細に殺菌因子を調べる必要がある。

## 第5章

# マルチガス温度制御プラズマ装置の開発と 医療および生命科学分野への応用

### 5.1 はじめに

生体への直接照射も視野に入れた殺菌や創傷治療、止血などプラズマの医療応用の研究および新しい医療機器として大気圧低温プラズマ装置の開発が盛んに行われている。このようなプラズマ装置には照射対象に放電や熱による損傷を与える事なく、高いプラズマ処理の効果が得られる事が望まれる。プラズマによる熱損傷を与えずにプラズマによる処理効果を維持するためには、プラズマの放電電力と独立にプラズマのガス温度を抑える必要がある。3章では、プラズマのガス温度が高いほどプラズマの殺菌能が高くなる事を示した。これらの事から、医療用のプラズマ装置には処理対象に応じて適切な温度にプラズマのガス温度を制御する事が望まれる。また、4章では、プラズマのガス種を変える事で、生成される活性種の種類や量が異なり、殺菌処理においては二酸化炭素プラズマが有用である事を示した。

先行研究では、ブタの角膜に二酸化炭素プラズマ照射する際に、プラズマの冷却の有無がブタの角膜に与える影響を調べている<sup>[84]</sup>。図 5-1 の図は各処理後のブタの角膜を HE 染色し、顕微鏡観察したときの病理画像である。左の図はブタの角膜に二酸化炭素のガスを 1 分間吹き付けたあとの病理画像で、ガスのみを照射後の様子は未処理の様子と比べて変化はなかった。冷却なしで 45°C の二酸化炭素プラズマを同じ時間照射した場合は、図 5-1 の中央の図のように角膜の表層が剥離した。一方、20°C に冷却した二酸化炭素プラズマを照射した場合は、図 5-1 の右の図のように角膜に剥離はみられず、ガスのみを照射した結果と大差がなかった。このように先行研究により、温度制御をしていないプラズマの熱がブタの角膜へのダメージに大きな影響を与えている事が明らかとなっている。

以上の結果から、さらなるプラズマの医療応用の可能性を探るためには、マルチガス化が可能な温度制御プラズマ装置が必要であるといえる。そこで、本研究では、マルチガス温度制御プラズマ装置を開発した。

本章では、まず本研究で開発したマルチガス温度制御プラズマ装置の設計や基礎特性とともに、温度制御した各ガス種のプラズマによる殺菌能の変化を調べた結果を記述する。さらに、大気圧低温プラズマ装置の医療技術への応用として、殺菌が困難である基材に付着した細菌を迅速に

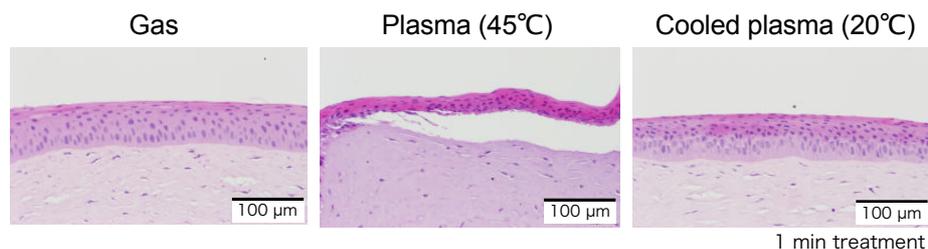


図 5-1 二酸化炭素プラズマ照射後のブタの角膜の病理画像<sup>[84]</sup>

殺菌する超音波併用プラズマバブリング装置と、内視鏡的止血術用プラズマ装置を開発し、それらの有用性を調べた結果を記述する。最後にマルチガス温度制御プラズマ装置の生命科学分野への応用として、植物細胞中へタンパク質および DNA (Deoxyribonucleic acid) といった高分子の導入を行った結果を記述する。

## 5.2 マルチガス温度制御プラズマ装置の開発

これまでの温度制御プラズマ装置では、プラズマ生成部の直前に加熱用のヒータを取り付け易い事、液体窒素で $-150^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷却したヘリウムを用いる事から、プラズマの生成部に DBD プラズマジェットを使用していた。このため、温度制御プラズマ装置をマルチガス化するには、プラズマの生成部の DBD プラズマジェットで様々なガス種のプラズマを生成する事で実現できる。

通常の DBD プラズマジェットでは、図 1-1 のようにリング状の電極をガラス管などの誘電体の外側に配置し、ガラス管内で DBD を発生させて、プラズマジェットを生成する。このため、ヘリウムやアルゴンのように比較的安定してプラズマを生成しやすいガス種であれば、ガラス管内で均一な密度のプラズマが生成できる。また、熱伝導率が低いガラスを用いる事によって、管内のガス温度の制御が金属と比較して容易となる。しかし、窒素や酸素、二酸化炭素などはその絶縁破壊電圧の高さや準励起状態の寿命の短さなどから、DBD を発生させるためには、高電圧または高周波の電圧を印加する必要がある。高電圧を印加する事によってプラズマを発生させる場合には、絶縁破壊を起こした一部に電流が集中しやすく、一部 DBD ガラス管内でプラズマを均一に維持する事が困難である。高周波電圧を印加する場合は、入力される電力密度が高くなるため、プラズマのガス温度が上昇し、低温のプラズマの生成が困難となる。

先行研究では図 5-2 のように電極を螺旋状に配置する事で、マルチガス DBD プラズマジェットの開発に成功している<sup>[31]</sup>。このプラズマ装置をプラズマ生成部に使用する事によって、温度制御プラズマ装置のマルチガス化が可能となる。しかし、このプラズマ装置では、DBD という放

電方法から、電子密度が  $10^{13} \text{ cm}^{-3}$  オーダーと低く、処理効果の低さに問題があった。

そこで、先行研究では、電子密度が  $10^{14} \sim 10^{15} \text{ cm}^{-3}$  のプラズマジェットを生成可能なマルチガスプラズマジェットの温度制御を行っている<sup>[31]</sup>。高温の温度制御は、図 4-5 のように、ヒータをプラズマジェットの先端部に設置する事によって成功している。これは、ヒータによってプラズマジェットの管体を加熱し、加熱された管体を介してプラズマを生成する直前のガス温度を上昇させる。また、低温側は、加熱の場合と同様に、図 4-6 のように冷却用のガスや液体をプラズマジェットの先端部に流し、プラズマジェットの管体を介してプラズマ生成前のガス温度を低下させる。これによって室温以下のプラズマの生成に成功している。図 4-6 の冷却機構は、プラズマジェットの先端部に巻きつけた銅パイプ内に、液体窒素を用いて冷却したヘリウムガスを流す構造であった。この構造では、ヘリウムガスの熱容量がプラズマジェットの管体よりも小さいため、ヘリウムガスの温度を制御してもプラズマのガス温度が追従せず、ガス温度を任意の値に制御する事は困難であった。

生体へのプラズマ照射を考えるとプラズマのガス温度を下げ過ぎた場合、細胞が凍結してしまうため、適切な温度に制御する必要がある。このため、3 章の温度制御機構をマルチガスジェットに適用する事が望ましいが、マルチガスジェットの管体が金属製であるため、プラズマ生成用のガスの温度を予め制御していても外気との熱交換によってプラズマ生成部での温度が安定しなかった。

本節では本研究で開発したマルチガス温度制御プラズマ装置のコンセプトや設計、基礎特性を記述する。そして、開発したプラズマ装置を用いて殺菌実験を行った結果を記述する。

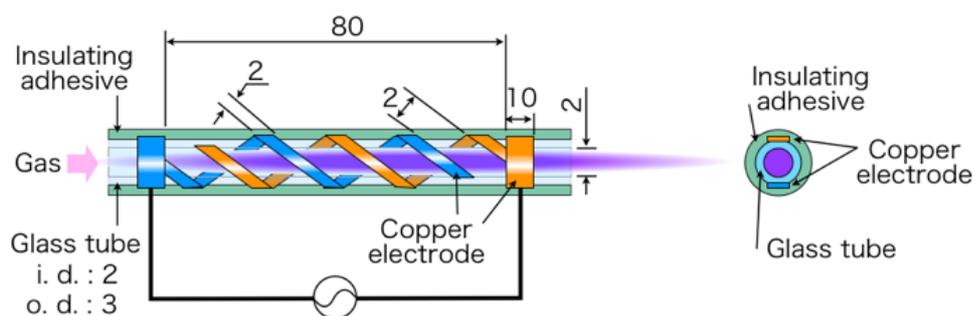


図 5-2 螺旋電極式マルチガス DBD プラズマ装置の構造<sup>[31]</sup>

### 5.2.1 マルチガス温度制御プラズマ装置の設計および製作

従来のマルチガスプラズマジェットでは、図 5-3 のように、ガスボンベから供給された室温程度のガスに電圧を印加して、プラズマを生成し、ガス流によってプラズマを外部に押し出す構造となっている。このため、プラズマのガス温度は必ず室温以上となっていた。また、筐体はステンレス製で外気の熱の影響を受けやすい構造となっていた。

そこで本研究では、図 5-4 のように、プラズマジェットの筐体の壁の内部に流路を設け、そこに温度制御した流体を流す事によって、プラズマの温度を制御する。プラズマ装置は、ガスの導入口や電力を供給するコネクタがある本体部と、筐体内に流路を持つ温度制御部に分けて設計した。これにより、温度制御部の仕様変更が容易になるとともに、温度制御部と本体部の熱的結合を弱くできる。

温度制御部および本体部は 3D-CAD を用いて設計した。温度制御部は図 5-5 のように、長さ 110 mm、外径 20 mm、内径 11 mm の円筒状で、ガス導入口周りにフランジ構造を持ち、本体部にネジ止めされる。筐体の温度を制御する温度制御流体は、フランジ付近に設けられた導入口から供給され、長さ方向に 2 往復する直径が 2mm の流路の中を通ったのち、温度制御流体の導入口の反対側から排出される。本体部は図 5-6 のように、40 x 40 x 50 mm、壁の厚さ 7 mm の中空の箱にガス導入用の継手、電力供給用のコネクタ、温度制御部を接続できる穴を持った構造とした。

温度制御部を製作するためには、プラズマジェットの筐体の壁の中に流路を設ける必要があるが、従来の切削や溶接といった加工方法では製作が困難であった。そこで本研究では、金属製の 3D プリンタを用いて温度制御部を製作した。本体部は簡単な構造であるため、東京工業大学 技術部 すずかけ台設計工作部門のご協力のもと、切削により製作した。図 5-7 に製作したマルチガス温度制御プラズマ装置の写真を示す。温度制御部はチタン合金、本体部は SUS を用いて製作した。製作したプラズマ装置に、ヘリウム、アルゴン、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のガスを用いて点灯確認を行った結果、図 5-8 のようにすべてのガス種で安定してプラズマが生成される事を確認した。

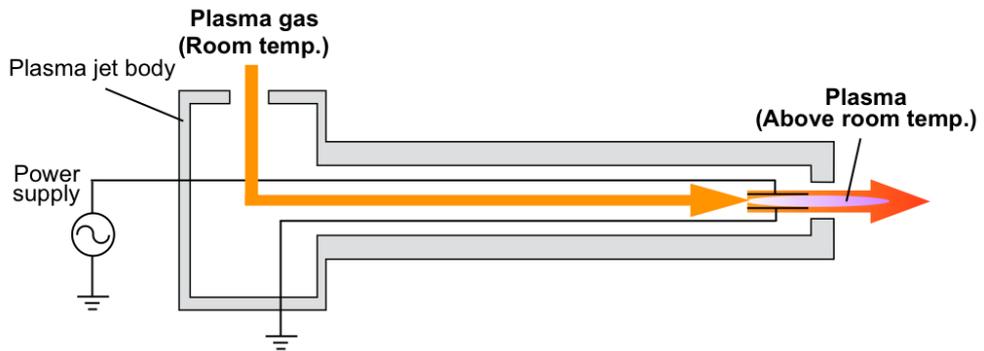


図 5-3 従来のマルチガスプラズマ装置の構造とガス温度変化

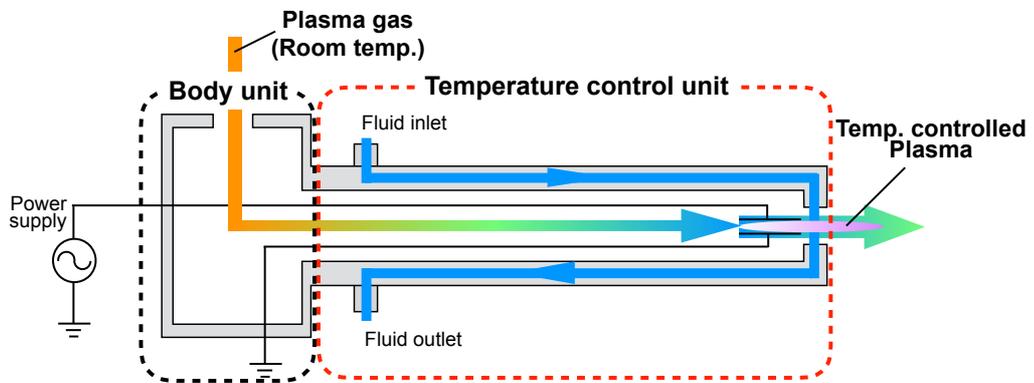


図 5-4 マルチガス温度制御プラズマ装置のコンセプト

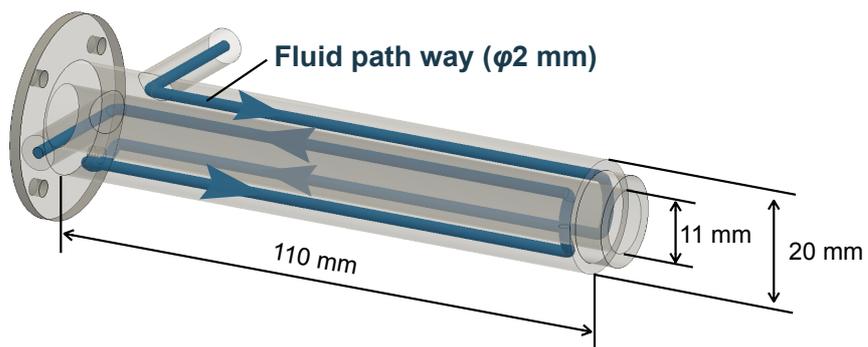


図 5-5 壁の内部に流路を設けた温度制御部の 3D-CAD 図

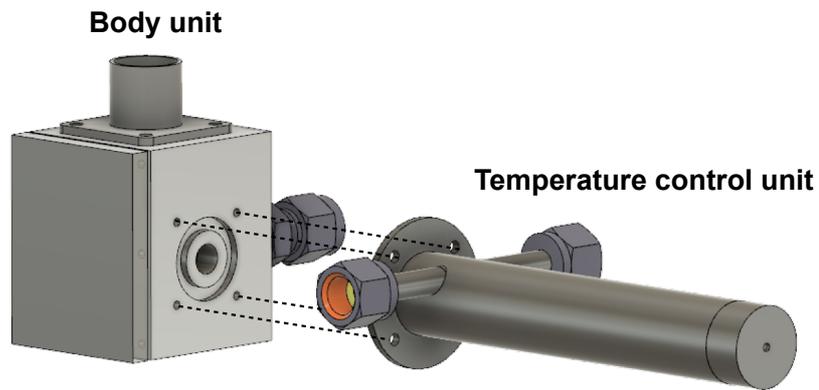


図 5-6 温度制御部と本体の 3D-CAD 図

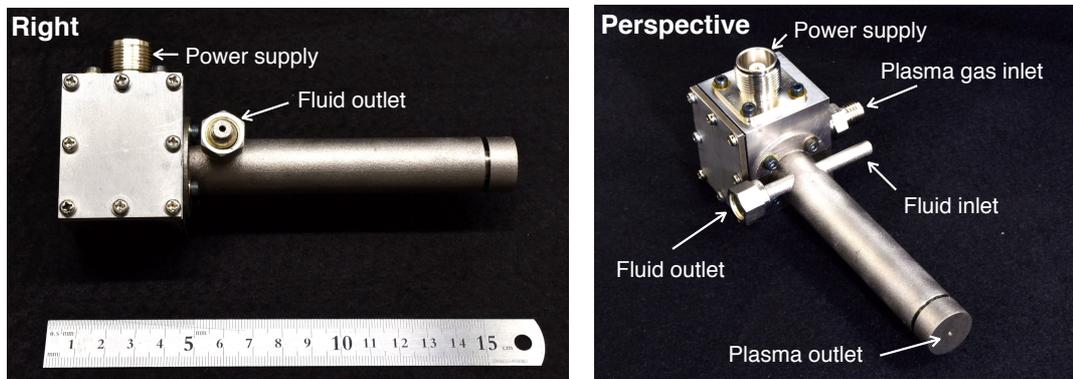


図 5-7 製作したマルチガス温度制御プラズマ装置の外観

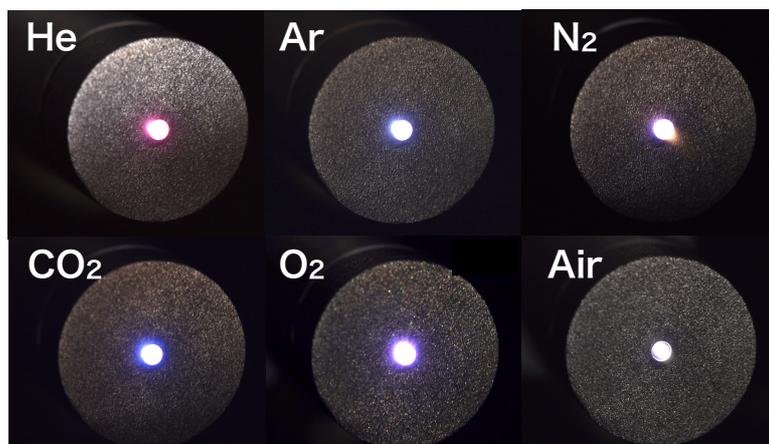


図 5-8 各ガス種のプラズマを生成している時の様子

## 5.2.2 マルチガス温度制御プラズマ装置の基礎特性

### ガス温度制御能

開発したマルチガス温度制御プラズマ装置のガス温度制御能を調査した。図 5-9 に実験のセットアップを示す。温度制御流体には、チラーで冷却したエチレングリコールを使用し、 $-20^{\circ}\text{C}$  から  $20^{\circ}\text{C}$  の間で  $10^{\circ}\text{C}$  刻みで制御した。本体は金属製であるため、本体部および温度制御部のまわりに断熱材を巻き、外気の熱の影響を低減した状態で実験を行った。これまでのガス温度測定実験と同様に、プラズマ装置の射出口から  $2\text{ mm}$  の位置に、熱電対を垂直に設置してプラズマのガス温度を測定した。プラズマは、 $2\text{ SLM}$  のアルゴン、窒素、酸素、二酸化炭素のガスに交流電源 (DFMJ-02, プラズマコンセプト東京) を用いて電圧を印加して生成した。

図 5-10 に各ガス種のプラズマの生成前後のガス温度を示す。横軸は温度制御流体の温度  $T_f$ 、縦軸はそれぞれのガス温度  $T_g$  となっている。いずれのガス種もプラズマ生成前のガス温度は、 $T_f = 20^{\circ}\text{C}$  の場合は  $22^{\circ}\text{C}$  前後で、温度制御流体の温度を下げるほどガス温度が低くなり、 $T_f = -20^{\circ}\text{C}$  の場合は  $T_g = 0\sim 3^{\circ}\text{C}$  となった。このことから、プラズマ生成前の温度は、ガス種によらずほとんど同じで、温度制御流体の温度に比例して低下する事を確認した。プラズマを生成した場合は、 $T_f = 20^{\circ}\text{C}$  のとき、アルゴンは  $35^{\circ}\text{C}$ 、窒素は  $56^{\circ}\text{C}$ 、酸素は  $57^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素は  $63^{\circ}\text{C}$  となり、ガス種によって大きく異なった。しかし、 $T_f$  を下げるほどいずれのガス種のプラズマの温度も低下し、 $T_f = -20^{\circ}\text{C}$  のとき、アルゴンは  $15^{\circ}\text{C}$ 、窒素は  $31^{\circ}\text{C}$ 、酸素は  $35^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素は  $43^{\circ}\text{C}$  となり、 $T_f$  に比例してガス温度が変化した。各  $T_f$  のときのプラズマ生成前後の温度差は、それぞれ、アルゴンは  $11\sim 13^{\circ}\text{C}$ 、窒素は  $31\sim 34^{\circ}\text{C}$ 、酸素は  $33\sim 38^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素は  $41\sim 43^{\circ}\text{C}$  となった。これらの結果から、プラズマ生成前後の温度差はガス種によって異なるが、 $T_f$  に対する  $T_g$  の変化の割合は、ガス種によらず同程度である事が明らかとなった。このため、ガス種ごとのプラズマの生成前後の温度を考慮して温度制御流体の温度を制御する事で、任意の温度のプラズマを生成できる事を示した。

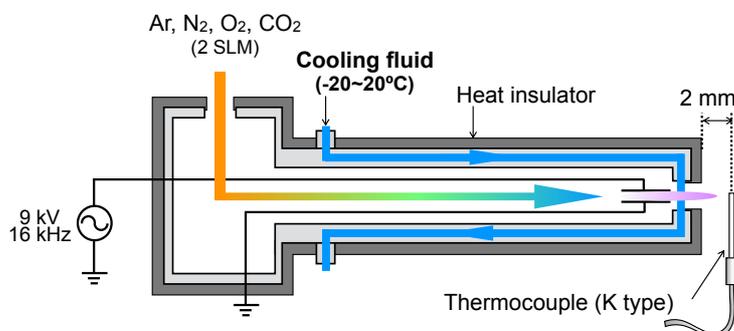


図 5-9 ガス温度制御実験のセットアップ

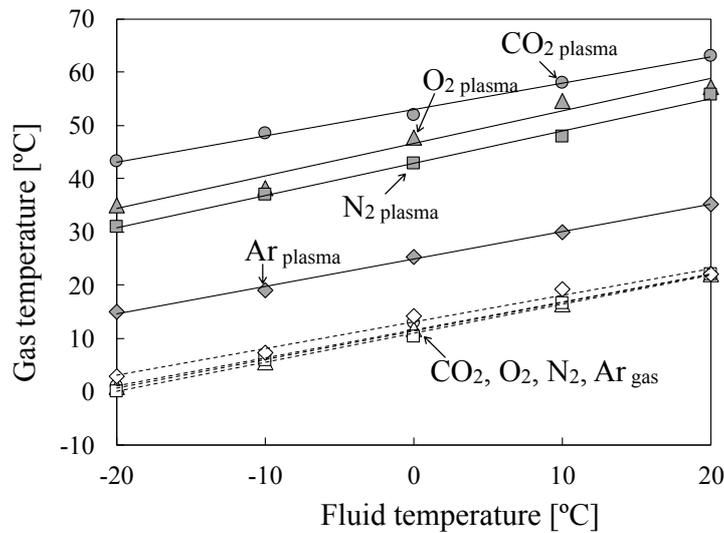


図 5-10 ガス温度と温度制御流体温度の関係

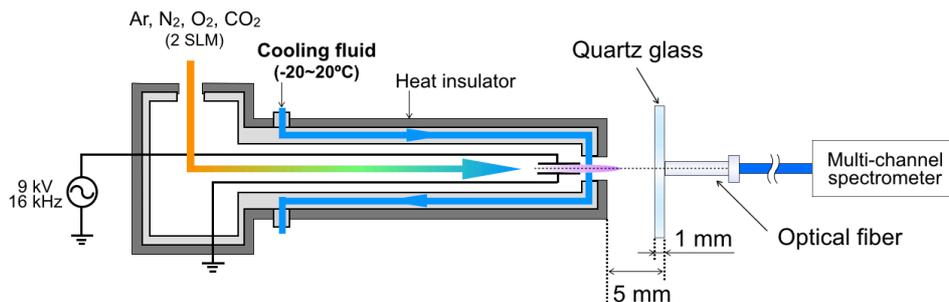


図 5-11 分光実験のセットアップ

### 発光分光

プラズマのガス温度が各ガス種のプラズマの発光スペクトルへ与える影響を調べた。発光の測定は図 5-11 のように、プラズマの光軸上に光ファイバを設置し、プラズマと光ファイバの間に厚さ 1 mm の石英ガラスの板を挿入して行った。光ファイバは、プラズマの射出口から 5 mm の位置に固定した。温度制御流体にはチラーで $-20^{\circ}\text{C}$ および  $20^{\circ}\text{C}$ に温度制御したエチレングリコールを用いた。上記のガス温度制御能を調査した場合と同様に、プラズマは、2 SLM のアルゴン、窒素、酸素、二酸化炭素のガスを用いて生成した。分光器には、200~1100 nm の範囲を測定可能なマルチチャンネル分光器 (Ocean Optics Maya2000 PRO) を用いた。冷却温度を変化させる事で、プラズマのガス温度を変化させたときの発光強度の比較を行うため、積算時間はそれぞれのガス種で変更し、アルゴンは 6 ms、ヘリウムは 1 s、酸素は 9 ms、窒素は 120 ms、空気は 100 ms、二酸化炭素は 120 ms とした。また、スペクトルにばらつきがあるため、それぞれ 10 回の平均を求めた。

図 5-12 から図 5-15 にそれぞれの発光スペクトルを示す。 $T_1 = 20^\circ\text{C}$ のときのスペクトルは赤い線で、 $T_1 = -20^\circ\text{C}$ のときのスペクトルは青い線でプロットし、それぞれのときの  $T_g$  をグラフの左上に表記している。いずれのガス種でもガス中の原子由来の原子線が観測され、それぞれのスペクトルはプラズマのガス温度とともに発光強度が増加した。3.4.1 に記述したヘリウムプラズマを温度制御した際の発光スペクトルの変化の測定実験では、ガス温度の上昇に伴ってヘリウムの発光スペクトルが弱くなっており、逆の結果となった。この要因は明らかとなっていない。この結果から、3 章と同様に、プラズマのガス温度の変化に伴ってプラズマの処理効果が異なる可能性が示唆された。

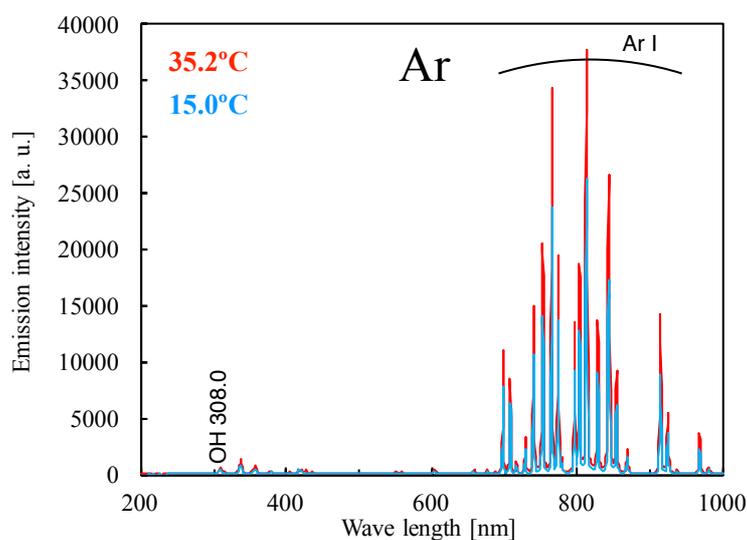


図 5-12 アルゴンプラズマの発光スペクトル

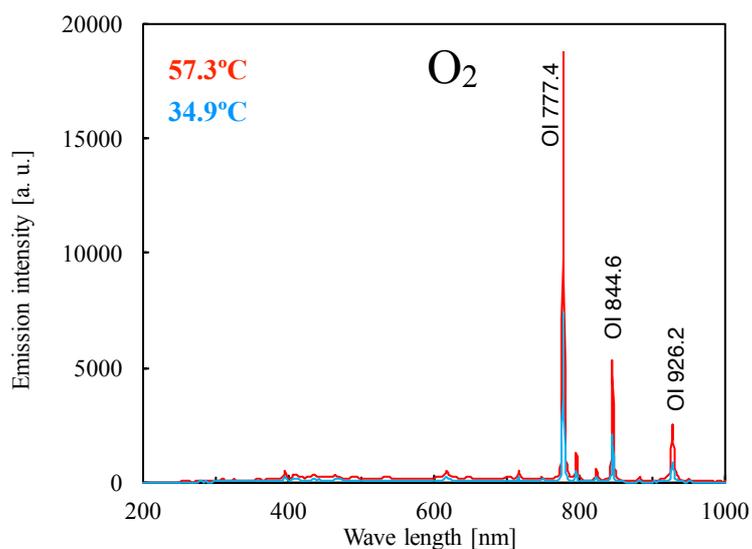


図 5-13 酸素プラズマの発光スペクトル

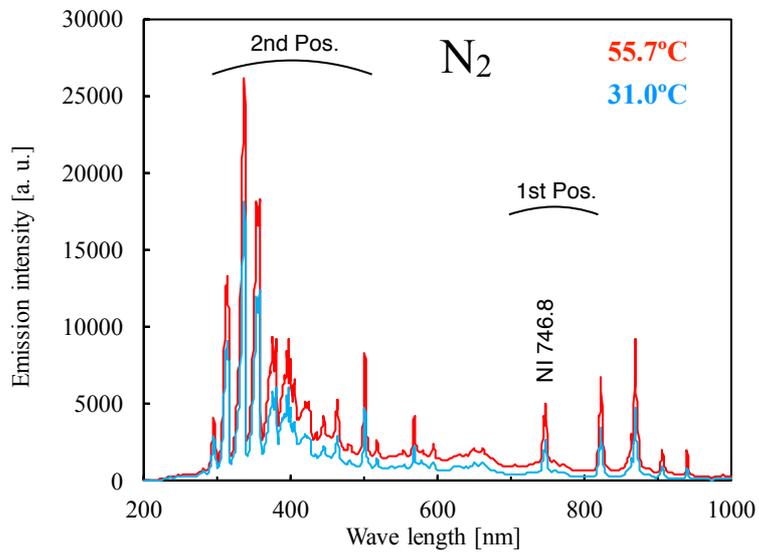


図 5-14 窒素プラズマの発光スペクトル

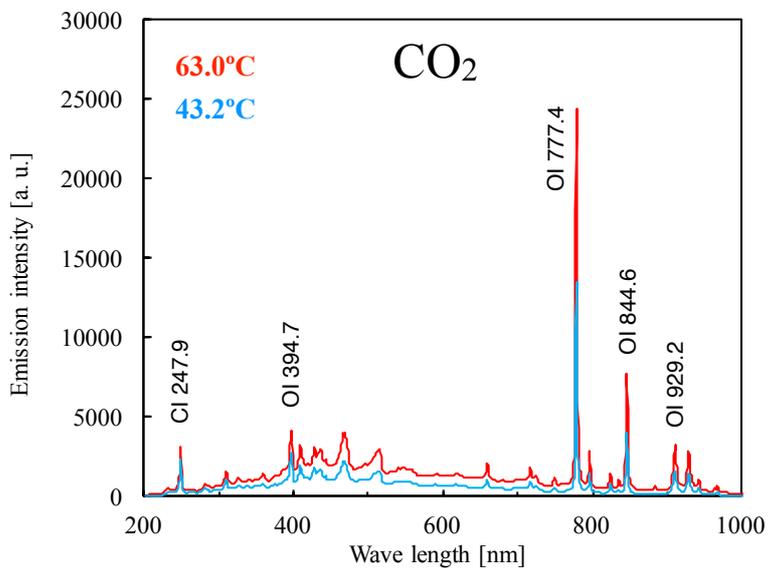


図 5-15 二酸化炭素プラズマの発光スペクトル

### 5.2.3 温度制御された各ガス種のプラズマによる殺菌効果

3章の温度制御プラズマ装置では、酸素を添加したヘリウムプラズマの殺菌効果のガス温度依存性を調べた。その結果、プラズマのガス温度の上昇に伴って、殺菌能が高くなる事が明らかとなった。本章では、ガス種を変えた場合に、殺菌効果のガス温度依存性がどのように変化するか調べた。

マルチガス温度制御プラズマジェットの温度制御流体用流路に、 $-20\sim 20^{\circ}\text{C}$ に制御したエチレングリコールを流し、プラズマガス温度の制御を行った。指標菌には、一般細菌である大腸菌 (*E.coli* ATCC25922) を用い、DPBS 中に懸濁し、菌液を作製した。プラズマガスには、4章で高い殺菌効果を確認した酸素、窒素、二酸化炭素を使用し、ガス流量を2 SLMとした。サンプルカップに入れた 200  $\mu\text{L}$  の菌液に、大気開放下で液面から 6 mm の位置よりプラズマを照射した。プラズマ照射後の菌液は、段階希釈後、LB 寒天培地上に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで 15~20 時間培養した。培養後に形成されたコロニー数から生菌数および殺菌能を評価した。このときの初期菌数は酸素プラズマについては  $5.8 \times 10^7$  CFU、窒素および二酸化炭素プラズマについては  $1.9 \times 10^8$  CFU であった。

図 5-16 から図 5-18 に温度制御した各ガス種のプラズマによる殺菌実験の結果を示す。実験は  $n = 3$  で行い、それぞれのグラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数となっているため、標準偏差値が平均値を上回った場合、負の範囲のエラーバーは表示していない。横軸はプラズマの照射時間、縦軸はプラズマ照射後の生菌数となっている。図中の破線は検出下限値を表しており、このときの検出下限値は 200 CFU であった。 $T_1 = -20, 0, 20^{\circ}\text{C}$ としたとき、 $T_g$ はそれぞれ、酸素プラズマは 42, 51,  $60^{\circ}\text{C}$ 、窒素プラズマは 38, 48,  $58^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素プラズマは 40, 50,  $62^{\circ}\text{C}$ となった。温度制御流体の温度に関わらず、いずれのガスのプラズマでも照射時間を長くすると生菌数は減少した。酸素プラズマは、 $T_1 = -20^{\circ}\text{C}$ のとき 120 秒間のプラズマ照射後の生菌数は  $2.6 \times 10^4$  CFU であったが、プラズマのガス温度が高くなるほど短い照射時間で生菌数が減少し、 $T_1 = 20^{\circ}\text{C}$ のとき、60 秒のプラズマ照射で生菌数は検出下限値以下となった。二酸化炭素プラズマはいずれのガス温度のときも、60 秒の照射で生菌数が検出下限以下となる高い殺菌効果が確認された。一方、窒素プラズマでは  $T_1 = -20^{\circ}\text{C}$ のとき、120 秒間照射したあとの生菌数が  $3.9 \times 10^5$  CFU であったが、プラズマのガス温度が高くなるほど、120 秒照射後の生菌数は増え、 $T_1 = 20^{\circ}\text{C}$ のときの生菌数は  $2.1 \times 10^6$  CFU となった。

それぞれのガス種における殺菌能のプラズマガス温度依存性を定量的に調べるために、上記の結果および式 3-5 を用いて、殺菌能を算出した。酸素および二酸化炭素プラズマの殺菌能の計算には、プラズマを 40 秒間照射後の生菌数を、窒素プラズマには 120 秒間照射後の生菌数の値を用いた。図 5-19 に各ガス種プラズマの大腸菌に対する殺菌能のガス温度依存性を示す。横軸はガス温度、縦軸はプラズマの殺菌能を表す。酸素プラズマでは、プラズマのガス温度

が高くなるほど、殺菌能が指数関数的に高くなる事を明らかにした。この結果は酸素を添加したヘリウムプラズマの結果と同様の傾向を示している事から、プラズマによって液中に導入されるROSの濃度が変化している事が予想される。一方、二酸化炭素および窒素プラズマでは、プラズマのガス温度の上昇に伴って、殺菌能が低くなる事を明らかにした。プラズマのガス温度が高くなるほど、液中への気体の溶解度が低下する事から、液中へ導入されるプラズマ中で生成された殺菌因子の量が低下している事が影響を与えていると考えられる。

以上の結果より、プラズマのガス温度の変化に伴って、プラズマによる殺菌能が変わり、その変化はガス種によって異なる事を明らかにした。今回は各ガス種のプラズマによる殺菌効果のプラズマガス温度依存性を調べているためこのような結果になったと考えられ、親水化効果など処理効果の指標によっては違う傾向を示す可能性がある。

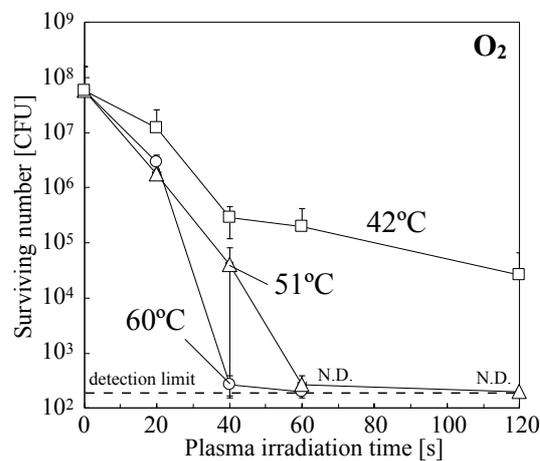


図 5-16 酸素プラズマの殺菌効果のプラズマガス温度依存性

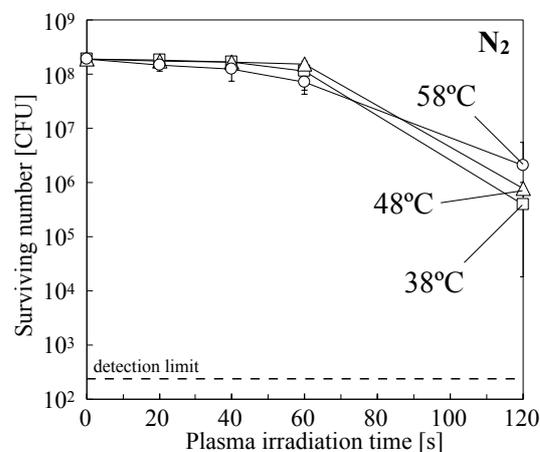


図 5-17 窒素プラズマの殺菌効果のプラズマガス温度依存性

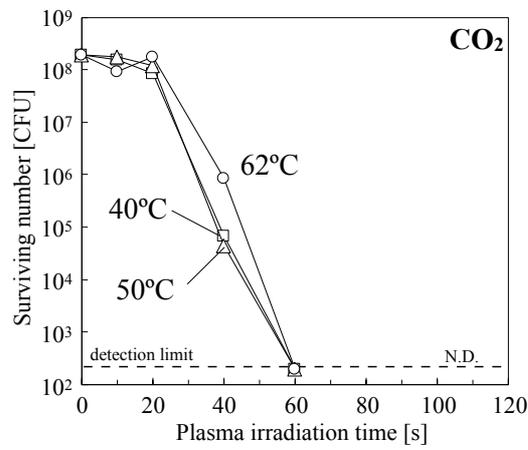


図 5-18 二酸化炭素プラズマの殺菌効果のプラズマガス温度依存性

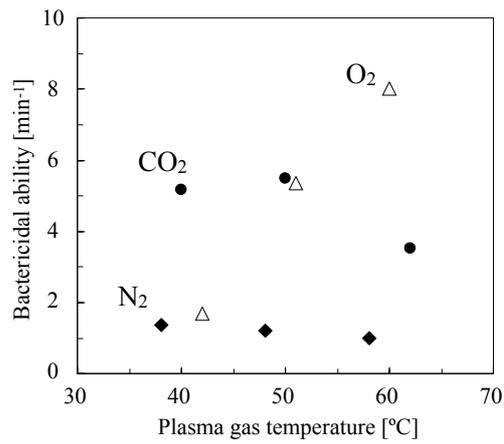


図 5-19 各ガス種のプラズマの殺菌能のプラズマガス温度依存性

### 5.3 超音波併用プラズマバブリングの眼科用器具への応用

眼科分野では、緑内障の診断のために眼圧の測定が行われている<sup>[91]</sup>。緑内障にかかると、眼球内の房水と呼ばれる眼球内に栄養を供給するための溶液が排出されずに眼圧が高くなる。眼圧が基準値よりも高くなると視神経を圧迫し、痛みが生じる。失明の原因の多くが緑内障であり、緑内障の早期発見および早期治療のためには正確に眼圧を測定する必要がある。

眼圧の測定に使われる眼圧測定器には非接触式と接触式がある。非接触式の場合は、患者の目に一定の圧力の風を吹き付け、このときに生じる眼球のくぼみの形状から眼圧を計測する。このため、測定器具と患部が触れず、機器の汚染レベルが接触式に比べて大幅に低減される。しかし、非接触式には眼圧の測定精度が低いというデメリットがある。接触式の場合は、まず測定する前に患者に点眼麻酔を施し、その後蛍光試薬を用いて角膜や結膜を染色する。そして、図 5-20 に示す先端が平らなメジャリングプリズム(アプラネーションチップ)を眼圧計の先端に装着し、プリズム部分を患者の目に押し当てる。眼球は球体で、アプラネーションチップのプリズム部分は平らであるため、目にかかる圧力によって眼球とプリズムが接する面積が変わる。この面積を測定者はプリズムを介して観察し、面積が基準値になった時に目にかかる圧力を眼圧とする。その基準の面積がわかりやすいように、アプラネーションチップのプリズムの構造が工夫されている。接触式の特長としては、高い精度で眼圧の測定が可能である事が挙げられる。しかしながら、患部と測定機器が接触するため、患者の角膜上に存在するタンパク質等の汚れや細菌やウイルスなどの微生物が器具に付着する。このため、接触式の測定器は使用することに確実な洗浄および消毒が必要となる。

このように非接触式の方が院内感染のリスクも低く、メンテナンスが容易なため、運用面から考えると大きな利点があるといえる。現在、健康診断など多くの患者の診断をする場合には、非接触式が多く使用されている。しかし、緑内障の早期発見には高い測定精度が求められるため、測定前に前処理が必要かつ高い消毒レベルが求められるにも関わらず接触式は多く使用されている。このため、より簡便に高い洗浄および消毒効果を示す手法が求められている。

現行のアプラネーションチップの洗浄方法としては、0.05%次亜塩素酸ナトリウム、2/3.5%グルタルアルデヒド、0.2~0.5%グルコン酸クロルヘキシジン、3%過酸化水素が用いられている。しかし、それぞれ、後洗浄が必要、十分な殺菌力がない、アプラネーションチップに損傷を与える、など問題がある<sup>[92]</sup>。これらの薬剤を繰り返し使う事によってアプラネーションチップの接着部が膨張し、亀裂が生じる。この亀裂に細菌やウイルス等が混入した場合、洗浄はより困難になる。このため、後洗浄の必要がなく、かつアプラネーションチップに損傷を与えない新しい殺菌手法が求められている。

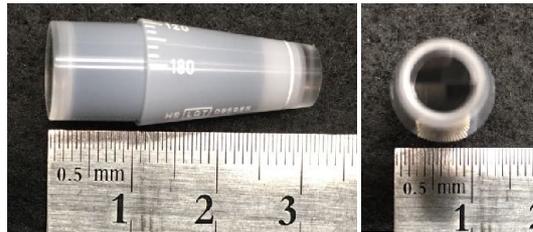


図 5-20 アプラネーションノメーター用メジャリングプリズム(ゴールドマン)

本研究では、プラズマバブリングによるアプラネーションチップの洗浄および消毒を目的として超音波併用プラズマバブリング法を提案した。本節では、プラズマバブリングの付着菌に対する殺菌効果を検証した後、アプラネーションチップに付着した細菌に対する殺菌効果およびアプラネーションチップへの影響を評価した。

### 5.3.1 眼科分野における標準菌株に対するプラズマの殺菌効果

眼科分野では主に緑膿菌、黄色ブドウ球菌などの細菌やアcantアメーバ、アデノウイルスなどの微生物が消毒の対象となっている<sup>[93]</sup>。眼科分野で最も一般的な医療機器のコンタクトレンズのための洗浄液には、これらの微生物に対する不活化効果を調べる必要があり、詳しい実験手順や対象菌株は ISO14729 に明記されている。4.3.3 ではこの ISO 規格に記載されている一般細菌である緑膿菌 (*P.aeruginosa* ATCC9027) と黄色ブドウ球菌 (*S.aureus* ATCC25923) に対する殺菌効果を調査し、酸素と二酸化炭素プラズマがこれらの細菌に対して有効である事を明らかにしている。本章ではさらに、別菌株の黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538) と真菌であるカンジダ菌 (*Candida albicans* ATCC10231) とセラチア菌 (*Serratia marcescens* ATCC13880) に対するプラズマバブリングの殺菌効果を調査した。

殺菌実験は 4.3.3 と同様に行い、200 mL の精製水中に各種細菌を懸濁し、プラズマバブリングによって殺菌効果を調査した。プラズマガスには 3 SLM の酸素と二酸化炭素を使用し、5 分間プラズマバブリングを行った。

それぞれの細菌に対する殺菌効果を図 5-21 から図 5-23 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、それぞれのグラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数となっているため、標準偏差値が平均値を上回った場合、負の範囲のエラーバーは表示していない。いずれの菌種に対しても、酸素プラズマが 1 分または 30 秒以内に生菌数を検出下限値以下まで減少させる高い殺菌効果を示した。また、二酸化炭素プラズマは黄色ブドウ球菌とカンジダ菌の生菌数を 3 分以内に検出下限値以下にし、セラチア菌の生菌数は 5 分で  $2.7 \times 10^2$  CFU まで減少させる高い殺菌効果を示した。これらの結果から、酸素および二酸化炭素プラズマは、一般細菌だけでなく真菌に対しても高い殺菌効果を示す事を示した。

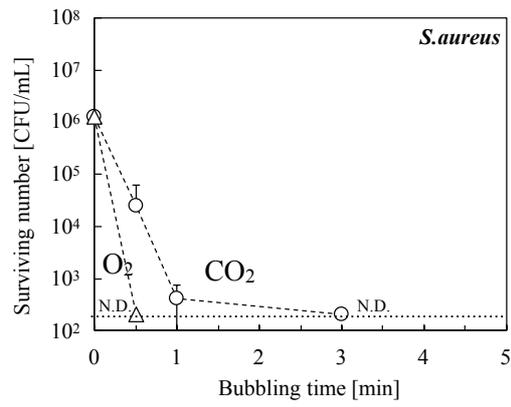


図 5-21 黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果

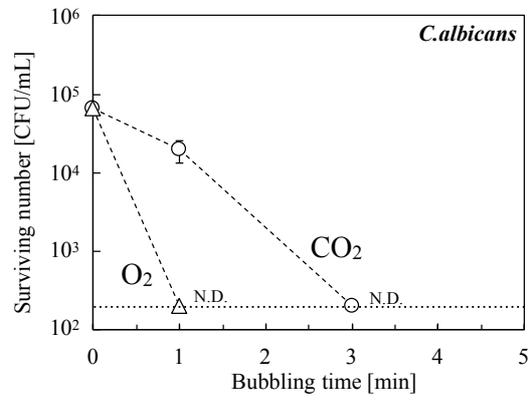


図 5-22 カンジダ菌に対する殺菌効果

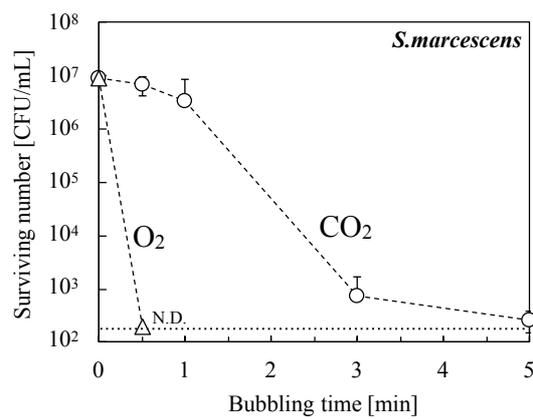


図 5-23 セレチア菌に対する殺菌効果

### 5.3.2 付着菌に対するプラズマバブリングの殺菌効果

これまでの殺菌実験では、液中に懸濁した細菌(浮遊菌)を殺菌対象としていた。浮遊菌に対する殺菌効果は、汚染水の洗浄および消毒や、殺菌効果の基礎特性調査としては有効である。しかし、医療機器をはじめとして、殺菌対象の多くが基材に付着している付着菌である。細菌は付着菌になると塊となって付着するだけでなく、菌種によってはバイオフィームと呼ばれる多糖体を形成するため、一般的に浮遊菌よりも殺菌が困難となる<sup>[94]</sup>。そこでまず、板材に細菌を付着させてプラズマバブリングによる殺菌効果を評価した。

図 5-24 のように、細菌を付着させた 20 x 20 x 1.5 mm の SUS 板 (SUS 316L) をファンネルの上部からワイヤーで吊架し、3 SLM の酸素または二酸化炭素プラズマによるバブリング処理を行った。バブリング処理後、SUS 板に付着した細菌を滅菌綿棒で回収し、滅菌綿棒に付着した細菌を 1 mL の精製水中に懸濁し、生菌数をカウントする事で、付着菌に対する殺菌効果を評価した。このときの検出下限値は 100 CFU であった。付着菌のサンプルは、緑膿菌 ATCC9027 または黄色ブドウ球菌 ATCC6538 を懸濁した培養液の中に SUS 板を浸し、15 時間培養して作製した。実験は  $n=3$  で行い、それぞれのグラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数となっているため、標準偏差値が平均値を上回った場合、負の範囲のエラーバーは表示していない。

図 5-25 に SUS 板に付着させた緑膿菌に対する殺菌効果を調べた結果を示す。グラフの横軸はバブリング時間、縦軸は滅菌綿棒で回収した付着菌の生菌数である。付着菌の初期菌数は  $2.0 \times 10^5$  CFU であり、3 分間の二酸化炭素プラズマバブリング処理により、生菌数は  $2.5 \times 10^2$  CFU まで減少したが、5 分後の生菌数は  $2.8 \times 10^2$  CFU となり、3 分と 5 分で差がなかった。酸素プラズマを用いた場合は、3 分間のプラズマバブリングで生菌数は  $3.0 \times 10^3$  CFU まで減少し、5 分後には  $1.1 \times 10^3$  CFU となった。これらの結果から緑膿菌に対しては、二酸化炭素プラズマの方が高い殺菌効果を示す事を明らかにした。これは、緑膿菌は pH の変化に弱く、二酸化炭素プラズマバブリング前の pH は 5.5 程度であるが、バブリング後の pH は 4.0 となり酸性となっている事からプラズマ中の殺菌因子と pH の相乗効果で緑膿菌を殺菌していると考えられる。

図 5-26 に SUS 板に付着させた黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果を調べた結果を示す。初期菌数は  $1.2 \times 10^5$  CFU であり、1 分間の酸素プラズマバブリング処理で  $6.7 \times 10^2$  CFU となり、生菌数が 2 桁以上減少した。しかし、3 分後は  $2.3 \times 10^2$  CFU であり、5 分後に検出下限値以下となった。二酸化炭素プラズマを用いた場合は、3 分まではプラズマのバブリング時間にほぼ比例して生菌数の桁数は減少し、3 分で  $2.6 \times 10^3$  CFU となったが、5 分で  $1.5 \times 10^3$  CFU と菌数の減少量が低下した。

以上の結果から、プラズマバブリング処理が付着菌に対しても有効である事を示した。しかし、いずれの菌種に対しても、バブリング開始から 1~3 分後には、酸素または二酸化炭素プラズマ

で付着菌の生菌数が検出下限値近くまで減少したものの、その後はバブリング時間に対して生菌数が減少する速度が低下した。この原因としては、SUS 板表面における細菌の堆積が考えられる。SUS 板の表面では細菌が塊となって付着しており、プラズマバブリングによって塊の外側に存在する多くの細菌は不活化されたものの、内部に存在する細菌は外側の細菌の死骸によりプラズマバブル、または液中の活性種からの影響を受けにくくなっている可能性がある。

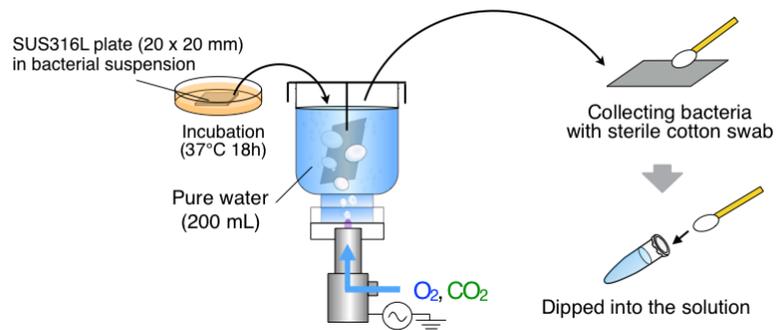


図 5-24 付着菌に対する殺菌実験のセットアップ

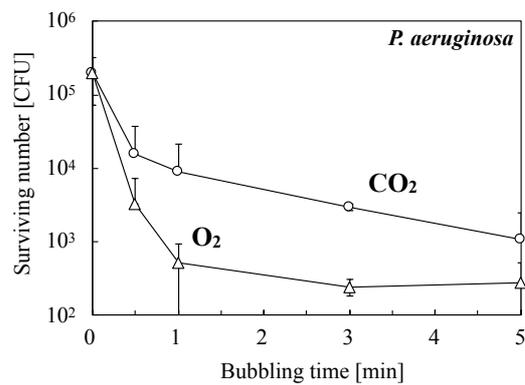


図 5-25 SUS 板に付着させた緑膿菌に対する殺菌効果

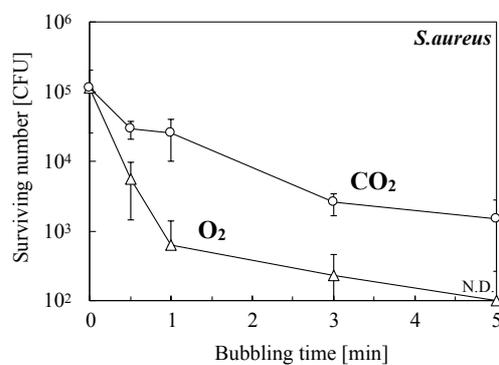


図 5-26 SUS 板に付着させた黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果

### 5.3.3 プラズマバブリングと超音波の併用による殺菌効果の検証

上記の結果から、SUS 板の表面に付着菌が堆積しており、上層の細菌が、下層の細菌とプラズマの接触を阻害している可能性が示された。プラズマバブリングは浮遊菌に対して高い殺菌効果を示すことから、基材に付着した細菌を剥離できれば、迅速に不活化できる。そこで本研究では、剥離効果の高い超音波 (Ultra-Sonic Wave: USW) とプラズマバブリングを併用する事で付着菌の殺菌を行った。

図 5-27 に超音波併用プラズマバブリング実験のセットアップを示す。装置の構造上、SUS を浸したガラス容器の上部からマルチガスプラズマジェットを液中に挿入した。ガラス容器を超音波発生装置に入れた水道水に浸した。超音波は卓上型超音波発生装置 (株式会社 エスエヌディ, UK-1KS, 周波数:38 kHz, 出力:60 W) を使用して発生させた。プラズマガスには 3 SLM の二酸化炭素を用いた。指標菌には緑膿菌を使用し、付着サンプルの作製および生菌数の評価は 5.3.2 と同様に行った。超音波によって剥離された細菌に対する殺菌効果を調べるため、浮遊菌の生菌数も同時に調べた。

付着菌に対する殺菌実験の結果を図 5-28 (a)に、浮遊菌に対する結果を図 5-28 (b)に示す。実験は  $n=3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。生菌数は対数となっているため、標準偏差値が平均値を上回った場合、負の範囲のエラーバーは表示していない。超音波のみの場合は、3 分間の超音波処理で付着菌数が初期菌数の  $2.7 \times 10^5$  CFU から  $2.0 \times 10^3$  CFU まで減少したが、その後の超音波処理では付着菌数は減少しなかった。これに対して、プラズマバブリングの場合は付着菌数が 5 分以内に検出下限値以下となり、超音波併用プラズマバブリングの場合は、1 分以内に付着菌数が検出下限値以下となった。浮遊菌に対する殺菌効果は、超音波処理を行った場合には、処理開始後 1 分から  $2.1 \times 10^4$  CFU/mL 程度となり、その後大きな変化はなかった。それに対してプラズマバブリングと超音波併用プラズマバブリングの場合は、3 分以内に検出下限値以下にまで減少した。

以上の結果を見ると、超音波処理によって菌数が減ったように見える。しかし、今回の実験は 200 mL の精製水中で行っており、菌濃度でなく溶液全体の数にすると  $4.2 \times 10^6$  CFU となる。このとき、初期菌数が  $2.7 \times 10^5$  CFU の SUS 板を 1 度に 4 枚入れて殺菌実験を行っているため、全体の生菌数は大きく変化していない。一方で、超音波併用プラズマバブリングの場合は、付着菌数が 1 分以内に検出下限値以下に減少し、浮遊菌数も 3 分以内に検出下限値以下にまで減少している。また、プラズマバブリングと超音波併用プラズマバブリングを比べると、浮遊菌に対する殺菌効果は大きく変わらないが、付着菌に対する殺菌効果が 5 倍以上向上する事が明らかとなった。以上の結果から、付着菌を殺菌する際には超音波とプラズマの併用が効果的である事を示した。

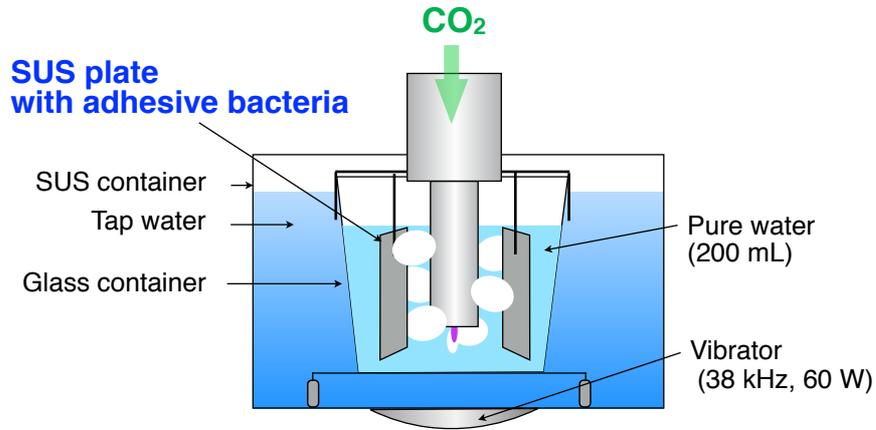


図 5-27 超音波併用プラズマバブリング実験のセットアップ

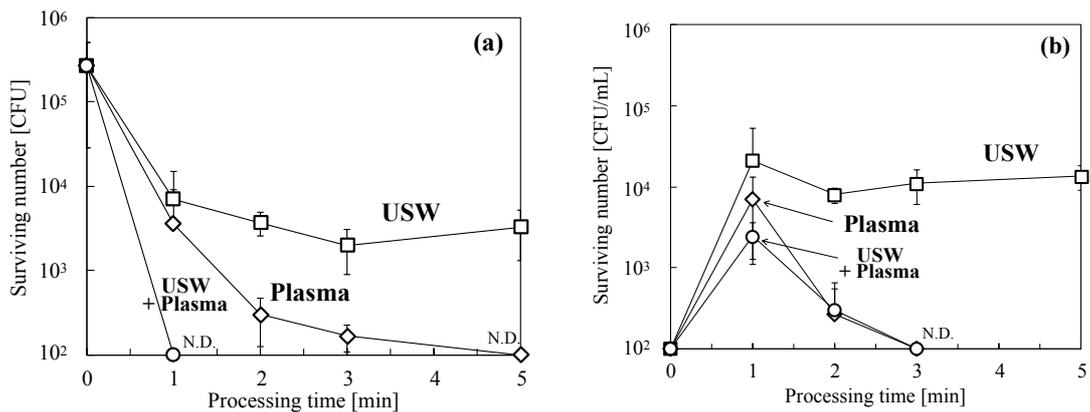


図 5-28 超音波併用による緑膿菌に対する殺菌効果

(a) 付着菌 (b) SUS 板から剥離された浮遊菌

### 5.3.4 眼科用器具付着菌に対する殺菌効果

医療現場でアブレーションチップを使って測定する場合は、眼球の上に存在する細菌にアブレーションチップを押し当てる。アブレーションチップが汚染されるのは主にこの瞬間であり、測定後に先端部のプリズムの周囲に細菌等が付着する事が予想される。そこで、実際の測定での付着を模擬して図 5-20 のアブレーションチップ(ゴールドマン社アブレーショントノメーター用)に付着した細菌に対する殺菌効果を調べた。

実験には 5.3.3 の実験と同様の超音波併用プラズマバブリング装置を使用した。図 5-29 のように、眼球に見立てた寒天培地上に、初期菌数を 10<sup>9</sup> CFU/mL に調製した緑膿菌

ATCC9027 または黄色ブドウ球菌 ATCC6538 の菌液を 100  $\mu$ L 滴下し、その上からアプラネーションチップを 3 秒間押し当てて汚染サンプルを作成した。サンプルを精製水ですすいだのち、200 mL の精製水が入った容器の中にワイヤーを用いて吊架し、各処理を 5 分間行った。処理は、ガスバブリング、超音波、プラズマバブリング、ガスバブリングと超音波の併用、プラズマバブリングと超音波の併用の 5 条件とした。実用を考えた場合、サンプルに付着している細菌だけでなく、液中の細菌も殺菌できる事が好ましい。このため、5.3.3 の実験と同様に、付着菌と浮遊菌の生菌数を調べた。付着菌は、各種処理後のアプラネーションチップのプリズム部分を、LB 寒天培地に擦りつけたのち寒天培地を培養し、形成されたコロニー数から生菌数を調べた。浮遊菌は、各種処理後の精製水を 0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターを用いて濾過し、ろ過後のフィルターを LB 寒天培地に貼り付けたまま培養し、形成されたコロニー数から生菌数を調べた。付着菌および浮遊菌はいずれも生菌数が 300 CFU 以上となると、コロニー同士が重なり、正確なカウントができなかったため、300 CFU を超えた場合は生菌数を 300 CFU 以上とした。

図 5-30 に緑膿菌が付着したアプラネーションチップに対する殺菌実験の結果を示す。ガス、超音波、プラズマ、超音波とガスの併用、超音波とプラズマの併用ではそれぞれ付着菌の生菌数は、133, 8, 169, 100, 0 CFU となり、浮遊菌は >300, >300, 2, >300, 11 CFU となった。付着菌に対しては、超音波または超音波とプラズマの併用が有効であった。浮遊菌に対しては、プラズマまたはプラズマと超音波の併用が高い殺菌効果を示した。この結果から、超音波は付着菌を剥離する高い殺菌効果を示す一方で、殺菌効果がない事を示した。また、プラズマは付着菌の状態では殺菌効果が確認されなかったが、浮遊菌に対しては高い殺菌効果を示す事を確認した。これらの結果から、プラズマと超音波の併用により、付着菌および浮遊菌の両方に高い殺菌効果を示す事を明らかにした。

図 5-31 に黄色ブドウ球菌が付着したアプラネーションチップに対する殺菌実験の結果を示す。ガス、超音波、プラズマ、ガスと超音波の併用、プラズマと超音波の併用ではそれぞれ付着菌の生菌数は、>300, 235, 238, 1, 0 CFU となり、浮遊菌は >300, >300, 11, >300, 21 CFU となった。付着菌に対しては、緑膿菌の場合と異なり、ガスと超音波の併用またはプラズマと超音波の併用が有効であった。浮遊菌に対しては、緑膿菌の場合と同様に、プラズマまたはプラズマと超音波の併用が高い殺菌効果を示した。これらの結果から、黄色ブドウ球菌に対しても緑膿菌の場合と同様の傾向がある事を確認した。

以上の結果から、アプラネーションチップに付着した緑膿菌および黄色ブドウ球菌に対するプラズマと超音波の併用の有効性を確認した。

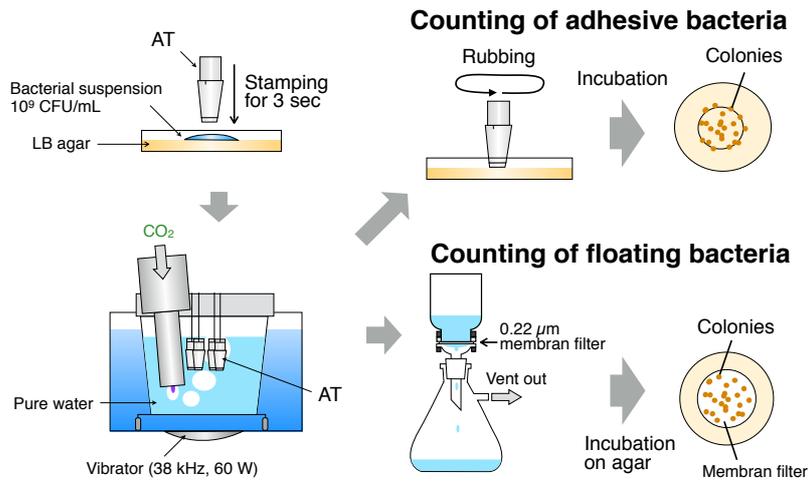


図 5-29 アプラネーションチップ(AT)付着菌および浮遊菌に対する殺菌効果の評価手順

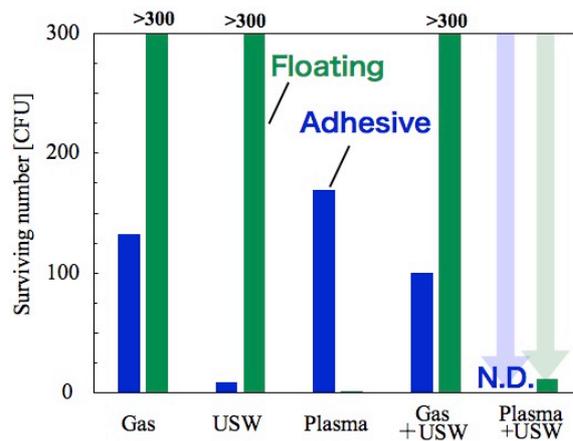


図 5-30 AT に付着した緑膿菌に対する殺菌効果

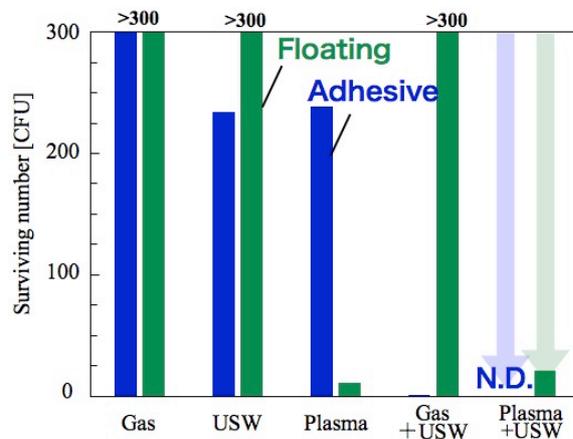


図 5-31 AT に付着した黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果

### 5.3.5 プラズマバブリングが眼科用器具に与える影響

これまでの結果から、超音波とプラズマの併用が眼科用器具であるアブレーションチップの消毒に有効である事を確認した。しかし、その高い殺菌効果から現行の次亜塩素酸ナトリウム等と同様にアブレーションチップに損傷を与える可能性が考えられる。アブレーションチップに損傷があった場合、傷の溝に微生物が入り込み、消毒が困難となる。そこで、蛍光試薬によってアブレーションチップを染色する事でプラズマ処理後の損傷の有無を確認した。

約 11 時間プラズマバブリングおよび超音波併用プラズマバブリング処理したアブレーションチップを 10 分間、1 mM のフルオレセイン (ウラニン, 東京化成工業) 溶液に浸し、精製水ですすいだ後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。ウラニンの極大吸収波長は 489~493 nm, 蛍光波長は 521 nm であるため、GFP (Green Fluorescent Protein) 用の光源およびフィルターを用いた。ネガティブコントロールには、傷がついたアブレーションチップを使用した。

図 5-32 (a)にネガティブコントロール, 図 5-32 (b)にプラズマ処理後のアブレーションチップを観察したときの画像を示す。どちらも左側にプリズムがあり、ライン状に光っている部分は元々白く印字されている部分である。ネガティブコントロールでは、表面の汚れや目に見えない浅さで長さが 500  $\mu\text{m}$  ほどの切り傷に蛍光試薬が入り、発光している事を確認した。一方、プラズマ処理後のサンプルでは、傷が確認されなかった。これらの事から、約 11 時間前後のプラズマバブリング処理ではアブレーションチップに損傷を与えない事を示した。

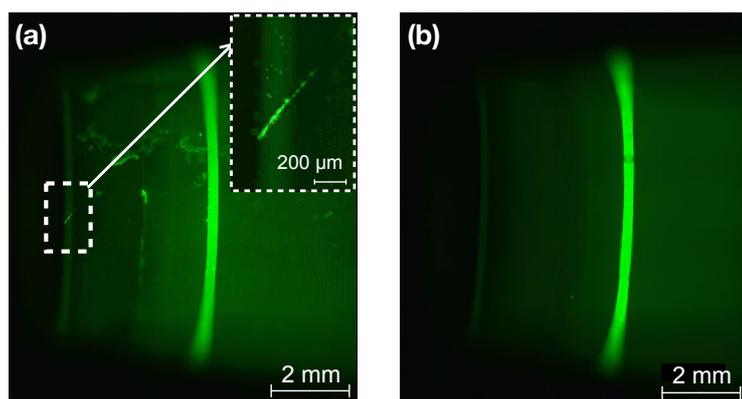


図 5-32 蛍光染色によるアブレーションチップの損傷の確認  
(a) ネガティブコントロール (b) プラズマ処理後(約 11 時間)

通常の薬剤でアプラネーションチップの洗浄および消毒を行うためには、まず流水で予備洗浄を行い、乾燥させたのち薬剤に30分から60分程度浸し、さらに5分から15分程度流水ですぐ必要がある。このため、多くの手間を要すると同時に、薬剤に浸す時間が長いことから接着剤が膨張し、亀裂が生じる事がある。本研究で行った、超音波併用プラズマバブリング処理を用いる事により、5分以内の処理でアプラネーションチップに付着している細菌および液中の細菌に高い殺菌効果が得られた。この事から、接着剤の膨張によって亀裂が生じるリスクは低くなると考えられる。さらに、二酸化炭素プラズマによる殺菌の場合は10分程度で殺菌能が失活するため、残留毒性が低いと考えられる。

以上の結果から、超音波の併用二酸化炭素プラズマバブリング装置が、後洗浄が不要な高い殺菌効果を持つ殺菌装置となりえる可能性を示した。今後はさらにウイルス等の微生物に対するプラズマの有効性を検討するとともに、残留毒性の調査や実用化に向けた装置の開発が望まれる。

## 5.4 内視鏡的止血術用マルチガスプラズマジェットの開発

現在、手術下での止血方法として、アルゴンプラズマ凝固法（APC）などの熱凝固法やクリップなどを用いた機械的圧迫法が用いられている。熱凝固法は、出血部を焼灼して簡易に止血効果を得るものであるが、その反面、組織への熱損傷を引き起こすため、患者への負担も大きくなる。機械的圧迫法は侵襲性の少ない方法であるが、出血点が定まらない湧出性出血の止血や血管が脆弱であった場合の止血に対して使用する事が困難である。さらに、腹腔鏡や内視鏡下の手術の場合、機械的圧迫法では止血操作に高度な技術を要する上に、クリップなどの止血用器具が視野の妨げとなる事がある。そのような状況で、2006年頃から、2章で記述した大気圧低温プラズマにより血液凝固が促進されるという研究成果が報告されて、手術の際の止血治療への利用に向けて研究されるようになった<sup>[58], [61]</sup>。これは血液に対してヘリウムや空気の低温プラズマを直接照射する事で化学的に凝固を促進させる方法であるため、従来の高温なアルゴンプラズマや高周波による熱凝固と異なり組織の熱損傷がない<sup>[95]-[97]</sup>。さらに、機械的圧迫法の使用が困難な、出血点が不明な場合の止血も期待できる。

大気圧低温プラズマを用いた消化管出血に対する止血効果の調査として、Nomuraらは、ブタの胃粘膜および肝臓に対する *in vivo* の止血実験を行った<sup>[98]</sup>。その結果、APCなどの照射対象に電流が流れるプラズマとは違い、照射対象に電流が流れないアフターグローを照射するプラズマは組織に大きな損傷を与えない事を実証し、特に生体吸収性の良い二酸化炭素の大気圧低温プラズマが内視鏡治療において有用である可能性を示唆した。しかし、上記の研究で使用したプラズマ源の形状は最大直径φ20 mmの円筒形であるため、内視鏡下で使用するためには小型化する必要がある。消化器系の内視鏡手術に使用される大腸内視鏡の鉗子口の直径は約φ3.7 mm、上部消化管内視鏡の鉗子口の直径は約φ3.2 mmであるため、この直径以下にする必要がある。現在内視鏡に導入できるプラズマ源がWeltmannらにより報告されているが<sup>[26]</sup>、アルゴンやヘリウム以外のガス(特に二酸化炭素)でプラズマを生成する事は困難である。また、院内感染を防ぐためには安価に製作でき、使い捨てが可能な事が望ましい。しかし、これらの要件を満たすプラズマ源を切削や溶接で製作する事は困難である。

本節では、まず本研究で行った従来のマルチガスプラズマジェットによる血液凝固効果のガス種およびガス温度依存性の調査結果を記述する。そして3Dプリンタを用いて開発した、使い捨てが可能な内視鏡用のプラズマ源の設計およびその基礎特性を評価した結果について記述する。加えて、そのプラズマ源を用いて、ヒトの血液に対する凝固実験の *in-vitro* 試験およびブタの胃粘膜や大腸での出血に対する止血実験の *in vivo* 試験を実施して止血能力を検証した結果から、開発した止血用プラズマ装置の有効性について論じる。

### 5.4.1 血液凝固機構<sup>[9]</sup>

表 5-1 に血液凝固因子を、図 5-33 に血液凝固の機序を示す。血管が損傷すると、損傷部に血小板が集まり、凝集塊(血小板血栓)を作り、損傷部を塞ぐ一次止血が始まる。そして、図 5-33 に示す機構から血中のプロトロンビン(第 II 因子)が活性化してトロンビンに変わり、血中のフィブリノゲン(第 I 因子)をフィブリンモノマーに変える。フィブリンモノマーが損傷部を塞いでいる血小板を覆い固め、二次止血が行われる。

血液凝固が始まるきっかけには外因系と、内因系の 2 つがあるとされており、血液凝固が起こるきっかけは異なる。図 5-33 の右上の反応は外因系の場合であり、血管が損傷すると、通常は血液が触れる事のない血管の外側に存在する組織液が血液と混合される。この組織液中の組織因子である組織トロンボプラスチンがプロコンバーチン(第 VII 因子)と複合体を作る事によって、プロコンバーチンが活性化されて血液凝固が始まる。本来、血液中にない物質によって血液凝固が始まる事から外因系と呼ばれる。図 5-33 の左上の内因系の場合は、血液を注射器等で採取し、組織因子と混合されないようにしても、ガラス製の試験管に入れると凝固が始まる。血液中の接触因子と呼ばれる蛋白が、異物に吸着する事で PTA(第 XI 因子)を活性化していると考えられている。外来の物質がなくても、血液中に存在する物質によって血液凝固が始まると考えられる事から、内因系と呼ばれる。きっかけは異なるものの、いずれの凝固系においても、トロンビンが生成され、血液凝固が行われる。

このように、ヒトの血液は採取するだけで、血液凝固が始まるため、プラズマによる止血効果を確認する事が難しい。そのため本研究では、抗凝固剤を用いて自然に血液が固まらない状況下でプラズマによる血液凝固実験および止血実験を行った。血液凝固実験で使用したクエン酸は、血液凝固因子の 1 つであるカルシウムイオン(第 IV 因子)をキレートする事で、次のカスケードへの進展を阻害する。たとえば、プロトロンビンがトロンビン変わる反応ではカルシウムイオンが必要となるが、カルシウムイオンがキレートされる事で、トロンビンの生成量が減少し、血液凝固する量が減少する。また、動脈硬化などの薬として使われるワーファリンは、ビタミン K の働きを阻害する事で、血液凝固因子とカルシウムイオンが必要な反応を阻害する。止血実験ではブタにワーファリンを投与する事で、出血モデルを作成している。

表 5-1 血液凝固因子

Factor	Name
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Thromboplastin
IV	Calcium ion
V	Proaccelerin
VI	none
VII	Proconvertin
VIII	Antihemophilic Factor
IX	Christmas factor
X	Stuart-Power factor
XI	Plasma thromboplastin antecedent
XII	Hageman factor
XIII	Fibrin stabilizing factor

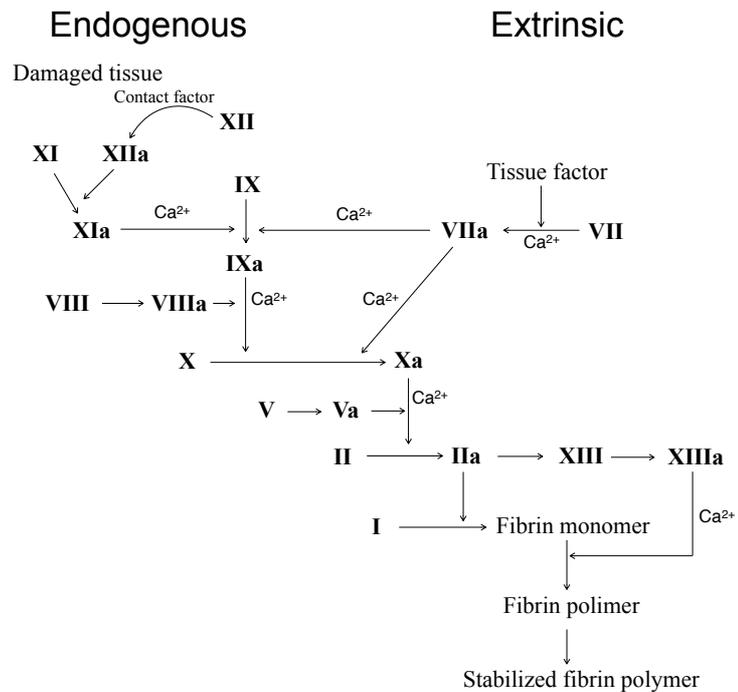


图 5-33 血液凝固機序

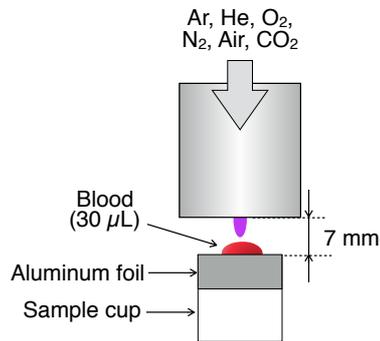


図 5-34 マルチガスジェットによるヒトの血液に対する血液凝固実験のセットアップ

#### 5.4.2 血液凝固効果のガス種依存性

先行研究により、プラズマ中に生成される活性種によって血液凝固効果が促進しているとされている<sup>[61]</sup>。4章の結果から、プラズマのガス種を変える事で、生成される活性種の量や種類が大きく異なる事を明らかにした。そこで本研究では、ヒトの血液にマルチガスプラズマジェットを用いて各ガス種のプラズマを照射したときの変化を観察し、各ガス種のプラズマによる血液凝固効果を評価した。

血液は健常人ボランティアより採血した。健常人ボランティアは成人で血液疾患の既往がなく、最近の服薬がない者とした。採取した血液は放置しておくため、採取後すぐに 3.2%クエン酸入り真空管 (VENOJECT II, VP-CA053K, テルモ社) に入れて抗凝固剤と混合した。本研究におけるヒトの血液を用いた実験は、神戸大学の倫理委員会から承認を受けて行われた (No. 160110)。抗凝固剤を含む 30  $\mu$ L の血液を図 5-34 のようにサンプルカップに被せたアルミホイルの上に滴下し、上方からプラズマを照射した。プラズマの射出口と血液との距離を 7 mm とし、プラズマは 5 SLM のアルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、模擬空気 (窒素 80%, 酸素 20%)、二酸化炭素に電圧を印加して生成した。プラズマ照射を開始してから血液表面全体が肉眼的に凝固するまでの時間を血液凝固時間とした。

各ガス種のプラズマによる血液凝固時間を図 5-35 に示す。実験は  $n=3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。アルゴンプラズマでは血液凝固するまで約 45 秒かかった。その他のガス種のプラズマによる血液凝固時間は、ヘリウムでは 15 秒、酸素では 23 秒、窒素と空気では 21 秒、二酸化炭素では 18 秒となり、大きな差はなかった。これらの結果から、アルゴンプラズマは他のガス種と比較して血液凝固作用が低い、その他のガス種には大きな差がない事を明らかにした。

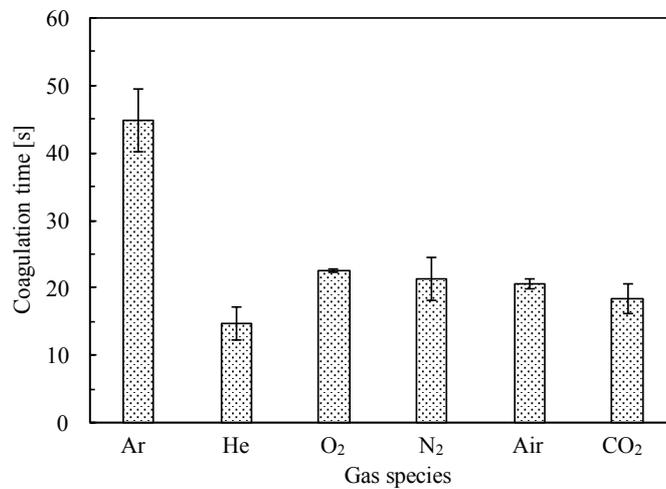


図 5-35 プラズマのガス種と血液凝固時間の関係

### 5.4.3 加熱用プラズマ装置を用いた血液凝固効果のガス温度依存性

本研究の 3 章によって、プラズマのガス温度が高くなるほど活性種の生成量が多くなる可能性を示した。そこで 3 章の殺菌実験で使用した温度制御プラズマジェットを用いて、プラズマのガス温度が血液凝固効果に与える影響を調べた。実験のセットアップは 5.4.2 と同様に抗凝固剤を含む 30  $\mu\text{L}$  のヒトの血液に対して 7 mm の距離からプラズマを照射し、血液表面の全体が固まるまでの時間を凝固時間とした。プラズマガスには 10 SLM のヘリウムを使用し、プラズマのガス温度は $-10^{\circ}\text{C}$ から $70^{\circ}\text{C}$ の間で $10^{\circ}\text{C}$ 刻みに制御した。

実験の結果を図 5-36 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。 $-10^{\circ}\text{C}$ と $0^{\circ}\text{C}$ のプラズマを照射した場合は、血液が凍結し、血液凝固時間を測る事はできなかった。 $10^{\circ}\text{C}$ のプラズマでは 9.5 秒で凝固し、プラズマのガス温度を高くするほど凝固時間は短くなり、 $70^{\circ}\text{C}$ のプラズマでは 6.5 秒で凝固した。この結果から、プラズマのガス温度が高くなるほど血液凝固時間が短くなる事を示した。この要因としては殺菌実験と同様に血液中への活性種導入量が増え、血液凝固因子に影響を与えている可能性が考えられる<sup>[98]</sup>。

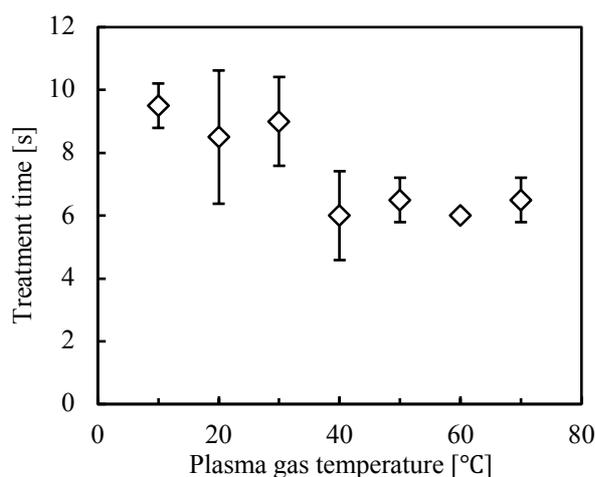


図 5-36 プラズマガス温度と血液凝固時間の関係

#### 5.4.4 内視鏡手術用マルチガスプラズマジェット設計および製作

上記の実験の結果から、プラズマのガス種とガス温度を変える事によって、迅速に血液を凝固させ、止血できる可能性を示した。このため、プラズマのガス種および温度を変えられるプラズマ装置を内視鏡下で使用できる事が望まれる。

そこで、本研究では、上部消化管内視鏡の鉗子口の直径が $\phi 3.2$  mm であるため、プラズマジェットの直径がそれ以下になるように、3D-CAD を用いてプラズマ源を設計した。図 5-37 (a) に直径 2.8 mm のプラズマ源の 3D-CAD 図を示す。このプラズマ源は高電圧を印加する内部電極、ガス供給部、絶縁部、プラズマ噴出口を持つ筐体によって構成されている。筐体および内部電極は 3D プリンタ (M280, Electro Optical Systems Inc.) を用いてチタンで造形し、絶縁部には内径 1.5 mm, 外径 2.5 mm, 長さ 8 mm のアルミナのパイプを使用した。筐体は接地され、内部電極に高電圧を印加する事で先端部で電極放電が起こり、プラズマが生成される。そして生成されたプラズマはガス流によって直径 0.7 mm の噴出口からプラズマ源の外部へと吹き出される。このため、処理対象物に対してはプラズマのアフターグローを照射する事となり、対象物に放電損傷を与えずにプラズマを照射する事が可能である。内部電極の先端部と噴出口との距離を電極間距離とみなし、その距離を 0.5 mm とし、噴出口を有す筐体の板厚は 1 mm とした。

図 5-37 (b) に各パーツを用いて組み立てたプラズマ装置の全体図を示す。開発したプラズマ源では内視鏡の鉗子口に導入できるよう、配線およびガス管の全長を 2 m とした。高電圧側のワイヤーはガス管の内部に、接地側のワイヤーはガス管の外にそれぞれ設置した。内視鏡鉗子口に導入した様子を図 5-37 (c) に示す。ガスおよび電力はそれぞれ終端に接続された端子から供給される。

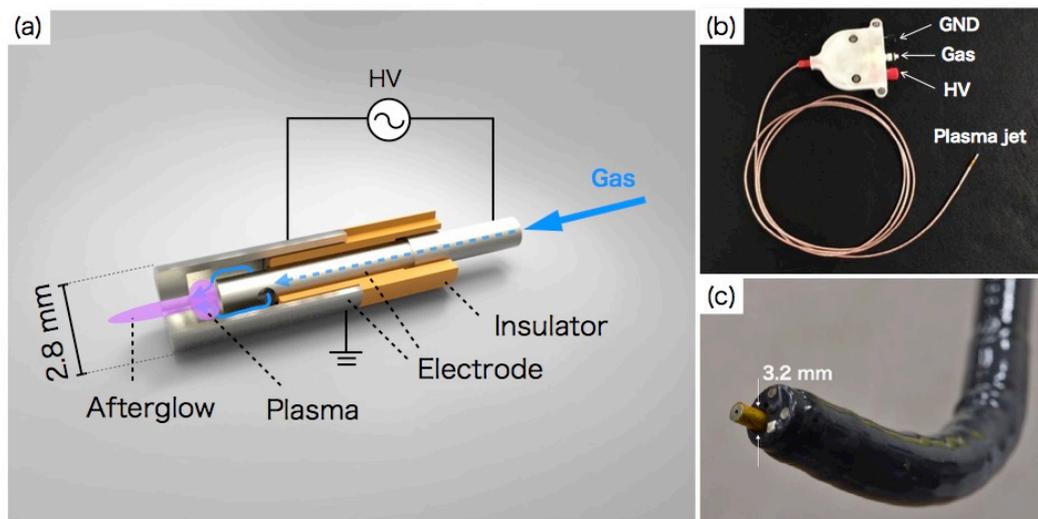


図 5-37 内視鏡用プラズマジェットの外観図

(a) 3D-CAD 図 (b) 製作したプラズマ装置の全体写真 (c) 内視鏡に挿入している様子

#### 5.4.5 内視鏡用プラズマジェットの基礎特性

##### 発光分光・電子密度

開発したプラズマ源の基礎特性として、まずプラズマによって生成、励起された原子や分子等の発光をマルチチャンネル分光器 (Maya2000pro[200–1100 nm], Ocean Optics, Inc.) と光学分解能が 0.027 nm で 500 mm の焦点距離を持つ Czerny–Turner 型のモノクロメーター (入射スリット幅 10  $\mu\text{m}$ ) を用いて観測した。電源には、本来は出力電圧が 9 kV と固定されているマルチガスプラズマジェット用電源 (DFMJ01, Plasma Concept Tokyo) を、出力電圧が可変となるように改造したものを使用した。プラズマは、1 SLM のアルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、空気、二酸化炭素を用いて生成した。プラズマの発光は軸方向から、光ファイバをプラズマ源の出口に対向して配置し、ファイバとプラズマ源出口の間に 1 mm の石英ガラス板を挟み、距離 3 mm の位置で測定した。この石英ガラス管は光ファイバを直接プラズマに曝さないように保護するためのものである。そして、プラズマの重要なパラメータの一つである電子密度を水素の  $H_{\beta}$  線 (486.13 nm) の発光スペクトルの広がりから算出した<sup>[28], [64]</sup>。

プラズマの点灯確認を行った結果、内視鏡の鉗子口に開発したプラズマ装置を挿入した状態でヘリウム、アルゴン、空気、酸素、窒素、二酸化炭素など様々なガス種でプラズマを生成する事に成功した。それぞれのプラズマが生成されている時の写真を図 5-38 に示す。窒素プラズマでは 3 mm ほどのアフターグロープラズマを目視で確認できた。各ガス種のプラズマの発光スペクトルを図 5-39 に示す。アルゴンやヘリウムの単原子ガスや、窒素や酸素の単原子分子のガスでは、プラズマ生成ガス由来の原子線やイオン線、分子線発光スペクトルが観測された。空

気

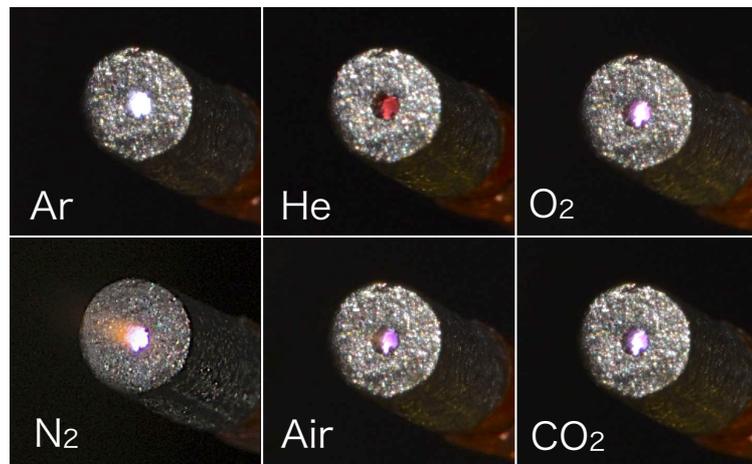


図 5-38 内視鏡用プラズマジェットによる各ガス種のプラズマの生成

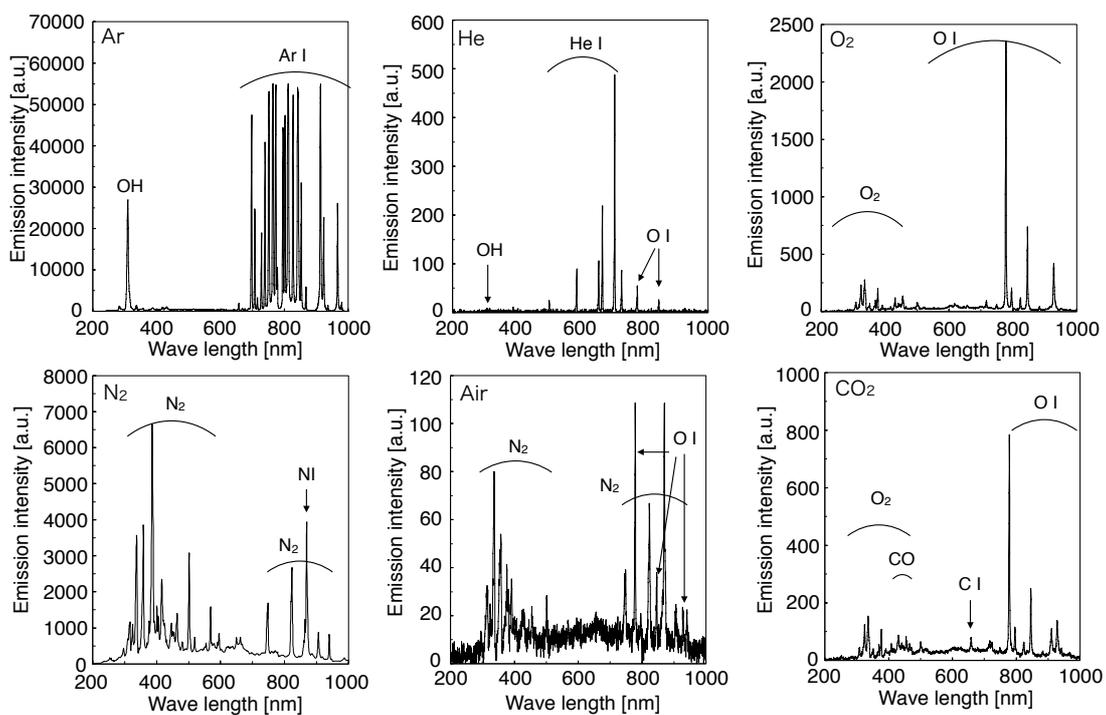


図 5-39 内視鏡用プラズマジェットで生成した各ガス種のプラズマの発光スペクトル

プラズマの発光は弱く、S/N 比が高くなった。アルゴンやヘリウムプラズマでは OH や酸素の発光スペクトルも観測されているが、これらはアルゴンとヘリウムの準励起状態の寿命が長いから、周辺空気中の水蒸気や酸素由来の発光が観測されていると考えられる<sup>[98], [100]</sup>。

電子密度は、 $H_{\beta}$  線が観測できたアルゴンとヘリウムでのみ測定ができ、それぞれの電子密度

は  $5.9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  と  $2.8 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  であった。Chen らによるヘリウム DBD プラズマジェットでは  $9.9 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}$  が報告されており<sup>[101]</sup>、開発したプラズマジェットと同様の電極間放電方式であるプラズマジェットにおいてヘリウムでは  $1.7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 、アルゴンでは  $2.0 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  <sup>[102]</sup>、さらに熱プラズマである Ar-ICP では約  $5.1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ <sup>[103]</sup>となっている事から、開発したプラズマジェットは比較的高密度なプラズマの生成が可能である事を示した。Iwai らのプラズマジェットと比較して高密度になった事には、開発したプラズマジェットの方が放電部の面積が小さく、エネルギー密度が高くなった事が影響を与えていると考えられる。

### ガス温度

発光分光測定と同じ条件でプラズマを生成し、プラズマのガス温度を、プラズマ噴出口から 1 mm の位置にプラズマ源と熱電対が垂直となるように熱電対を固定して測定した。測定には K 熱電対を使用し、ガス種はアルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、空気、二酸化炭素を用いた。

プラズマのガス温度はアルゴン、二酸化炭素、酸素、窒素、空気、ヘリウムの順で高くなり、それぞれ 37, 39, 41, 50, 53, 73°C であった。この事から、ヘリウムプラズマを生体に照射する場合は、照射時間を短くする、温度上昇を抑制する、照射距離を遠くする、などの方法で温度を調整する必要がある事が示唆された。

そこで、二酸化炭素のプラズマを生成する時のガス流量および印加電圧がプラズマのガス温度に与える影響を調べた。ガス流量は 1.0, 1.5, 2.0 SLM とし、入力電圧は 1.75~6 kV の間で変化させた。測定した結果を図 5-40 に示す。下の破線は 1.0 SLM の二酸化炭素のガス温度で、21.0°C であった。ガス流量が 2.0 SLM、入力電圧が 1.75 kV のとき、プラズマのガス温度は 34.6°C となった。ガス流量が少なくなるほど温度は高くなり、ガス流量が 1.0 SLM のときは、42.6°C となった。入力電圧を上げるに連れてプラズマのガス温度は高くなり、ガス流量が 1.0 SLM、入力電圧が 6 kV のときにプラズマのガス温度は 233°C となり最も高くなった。ガス流量とガス温度の関係は入力電圧によらず同様の傾向を示した。ガス流量および入力電圧が変わる事で、単位体積あたりのガスに入力されるエネルギー量に変化し、プラズマのガス温度が変化したと考えられる。またこの事から、プラズマの処理効果の変化を伴う可能性があるが、ガス温度制御機構の搭載が困難な内視鏡下でも、入力電圧を変える事によって任意の温度にプラズマのガス温度を変えられる事を示した。

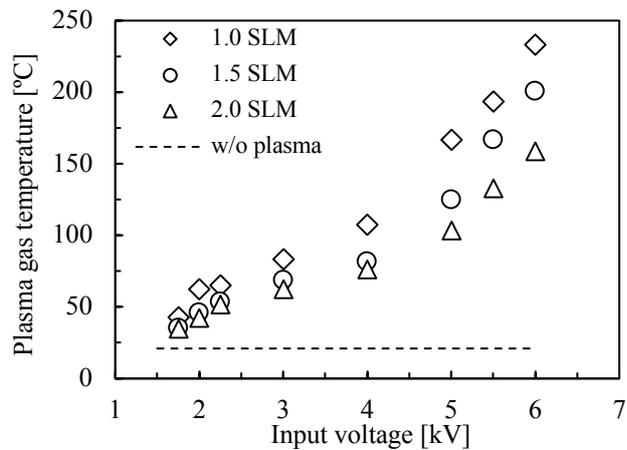


図 5-40 二酸化炭素プラズマ生成時の入力電圧とガス温度の関係

### 放電電圧電流

各ガス種のプラズマを生成した際の、放電電圧および電流を測定し、ガス種ごとの放電電力の違いを調べた。図 5-41 に実験のセットアップを示す。マルチガスプラズマジェットの電力測定実験と同様に、プラズマジェットの筐体が接地されているため、内部の高電圧電極にかかる電圧を高耐圧プローブ（HVP-39pro, PINTEK）を用いて測定し、回路に流れる電流をカレントプローブ（HVP-39pro, PINTEK）を用いて測定した。プラズマは 1.0 SLM のアルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、二酸化炭素を用いて生成し、入力電圧は 2.25 kV とした。電力は一周期分の電圧および電流波形から算出した。

それぞれのガス種のプラズマを生成した際の放電電圧および電流波形を図 5-43 から図 5-46 に示す。グラフは青い線が電圧波形で、左の縦軸の値が電圧値となり、赤い線が電流波形で、右の縦軸が電流値となっている。比較的安定してプラズマを生成しやすいアルゴンとヘリウムのプラズマは、最大の電流値は 1.5～2.5 A であり、一周期が 20 ms であるのに対して電流が流れる時間は合計で 5 ms 以下であった。それに対して、その他の分子性のガスは、常に絶縁破壊を繰り返すような波形となり、瞬時的に 6～8 A の大電流が流れている事を確認した。

これらの波形から算出した各ガス種のプラズマを生成した際の放電電力を図 5-47 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。アルゴンとヘリウムのプラズマ生成時の放電電力はそれぞれ、1.2 と 1.1 W となりほぼ同じ値を示した。酸素、窒素、二酸化炭素のプラズマ生成時の電力はそれぞれ、3.6, 2.6, 3.8 W となり、二酸化炭素プラズマを生成した場合に最も高い放電電力となった。これは、二酸化炭素プラズマの高い絶縁破壊電圧が影響していると考えられる。

二酸化炭素プラズマにおいては、入力電圧を変化させた際の放電電力を測定した。ガス流量

は 1.0 SLM のままで、入力電力を 1.75, 2.25, 3.00, 4.00 kV と変化させた。測定した入力電力と放電電圧の関係を図 5-48 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。入力電圧を 1.75 kV とした時の放電電力は 0.8 W であり、最大の 4.00 kV とした時の放電電力は 6.8 W となった。入力電圧は約 2.3 倍なのに対して放電電力が約 8.7 倍となった要因としては、1.75 kV という入力電圧はプラズマを維持できるギリギリの電圧であるため、プラズマの点灯時間が短くなっている事が考えられる。安定してプラズマが生成される最低の電圧は 2.25 kV であり、この時の放電電力は 3.8 W であった。これに対する 4.00 kV とした時の入力電圧および放電電力はどちらも約 1.8 倍となっている。これらの結果から、安定してプラズマを生成できる条件であれば、放電電力は電圧にほぼ比例する事を明らかにした。これは、入力電圧が高くなるほど瞬時的には大電流が発生するが、大電流が流れると入力電圧を落とすという電源の特性が影響した結果、トータルの通電時間が短くなり、結果として入力電圧と放電電力が比例した事が要因となっていると考えられる。

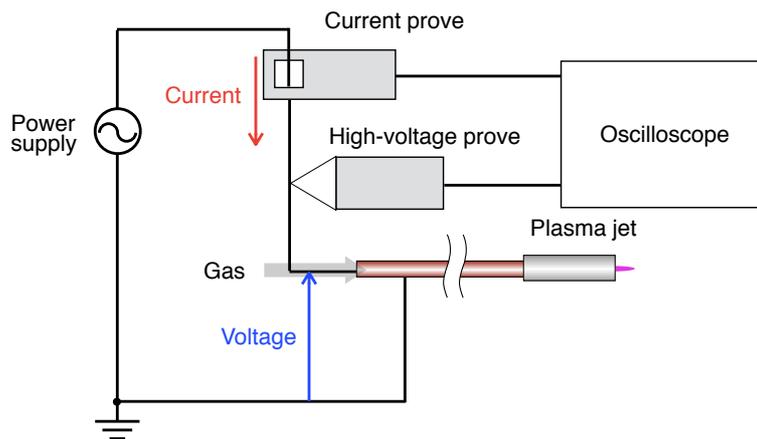


図 5-41 内視鏡用プラズマジェットの放電電圧電流測定実験のセットアップ

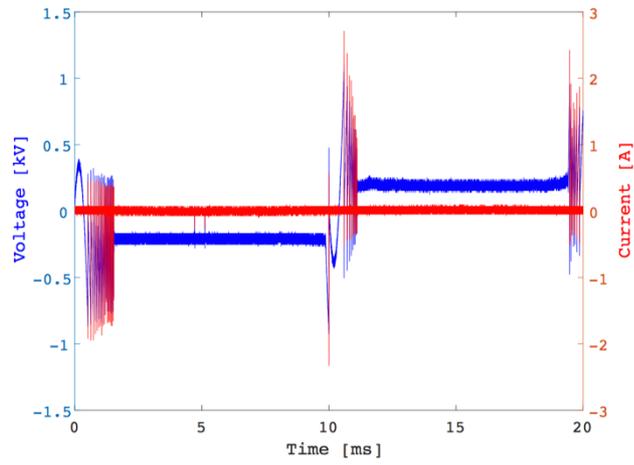


図 5-42 アルゴンプラズマ生成時の電流電圧波形

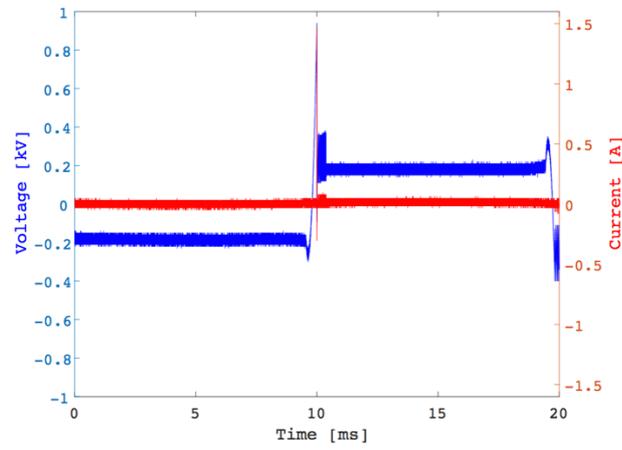


図 5-43 ヘリウムプラズマ生成時の電流電圧波形

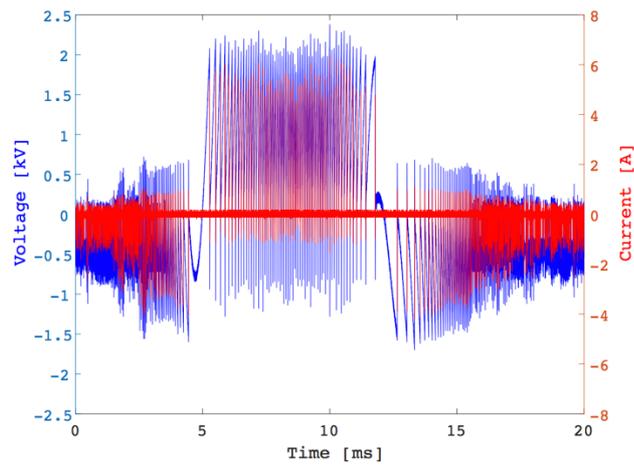


図 5-44 窒素プラズマ生成時の電流電圧波形

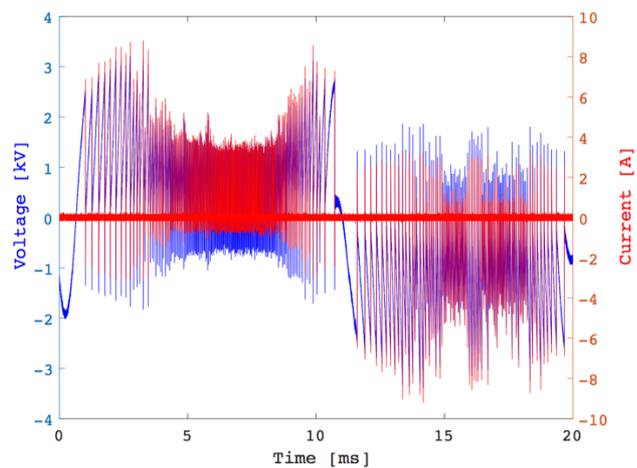


図 5-45 酸素プラズマ生成時の電流電圧波形

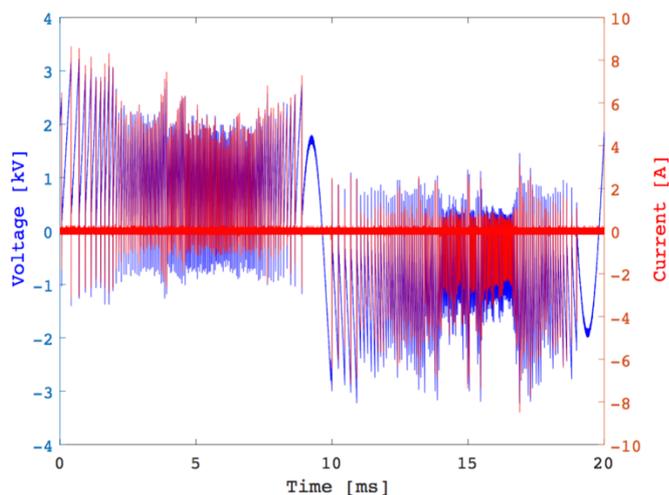


図 5-46 二酸化炭素プラズマ生成時の電流電圧波形

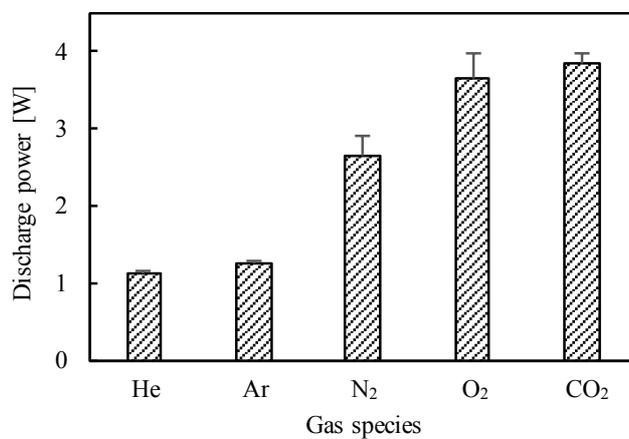


図 5-47 各ガス種のプラズマ生成時の放電電力(入力電圧: 2.25 kV, ガス流量: 1.0 SLM)

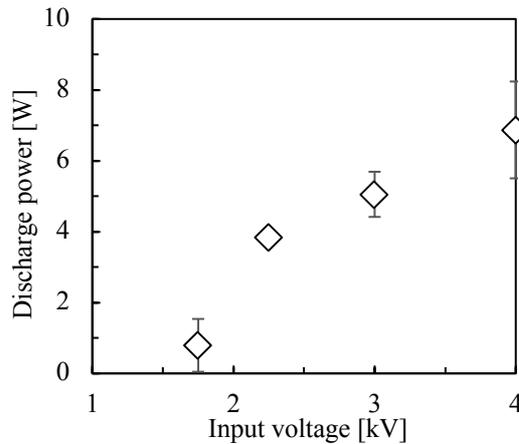


図 5-48 二酸化炭素プラズマ生成時の印加電圧と放電電力の関係

### 活性種測定

プラズマが様々な処理効果を示す主な要因は、プラズマ中に生成されるイオンや活性酸素種であると考えられている<sup>[58], [96]</sup>。プラズマ中で生成される活性種は寿命が短いものも多く、直接定量する事が困難である。中でもプラズマによって生成されるヒドロキシルラジカルは殺菌や表面改質などにおける重要な要因であると考えられ、血液凝固効果にも影響を与える重要な要因となりえる<sup>[61], [104]</sup>。そこで本研究では、各ガス種のプラズマ中に生成される活性種の指標としてヒドロキシルラジカル測定した。測定はヒドロキシルラジカルとスピントラップ剤と反応させて安定なスピニアダクトを生成し、電子スピン共鳴法を用いて行った。ヒドロキシルラジカルスピントラップ剤には 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を用いた。DMPO の濃度が 200 mM となるように調製した 200  $\mu$ L の DPBS に、液面から 7 mm の位置から各ガス種のプラズマを 30 秒間照射した。プラズマは分光実験と同様の条件で生成した。

ESR を用いて液中のヒドロキシルラジカル濃度を測定した結果を図 5-49 に示す。実験は  $n = 3$  で行い、グラフ中のエラーバーは標準偏差を意味する。ヒドロキシルラジカル濃度は空気、二酸化炭素、アルゴン、酸素、窒素、ヘリウムプラズマの順で高くなり、それぞれ 2, 4, 6, 14, 32, 33  $\mu$ M であった。各ガス種のプラズマでヒドロキシルラジカル生成が確認された要因には、空気中または液中の水と、プラズマまたは生成された活性種が反応している可能性が考えられる<sup>[30]</sup>。ヒドロキシルラジカル濃度が高かったヘリウムと窒素プラズマは、準励起状態の寿命が長いいため、大気中の水分のみならず気液界面でもヒドロキシルラジカルを生成していると考えられる<sup>[38], [105]</sup>。

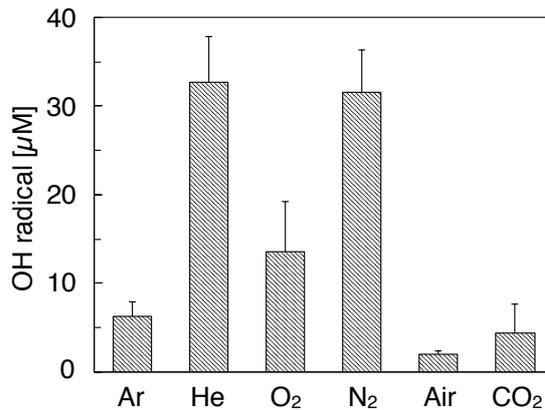


図 5-49 内視鏡用プラズマジェットによって液中に導入された HO ラジカル

#### 5.4.6 内視鏡用プラズマジェットによる止血効果

##### *in vitro*

開発したプラズマ源による血液凝固効果を調べるために、ヒトの血に対してプラズマを照射し、凝固するまでの時間を測定した。5.4.2 と同様に血液は健常人ボランティアより採取し、すぐに 3.2%クエン酸入り真空管 (VENOJECT II, VP-CA053K, テルモ社) に入れて抗凝固剤と混合した。図 5-50 に血液凝固実験の手順を示す。アルミホイルの上に厚さ 0.4 mm の不織布 (BEMCOTTM CLEAN WIPE-P, Asahi KASEI, Japan) を貼り付け、不織布に血液を 0.4 μL 滴下した。プラズマジェットは不織布とプラズマの射出口の間の距離が 3 mm となる距離に設置した。プラズマ照射直後に、血液を滴下した不織布に血液凝固検査用の不織布を当て、シリコンゴムで 3 秒間スタンプした。そして、検査用の不織布に付着した血液量を 0~6 として 0.5 刻みの 15 段階で評価した。不織布に血液が全く付着しない条件を '0' とし、プラズマを照射せずに 60 秒間静置し、その後スタンプしたときに不織布に付着する血液量を '6' とした。各スコアのときの血液量を図 5-51 に示す。プラズマは、上記の活性種測定実験と同じ条件で生成し、照射時間は 2, 4, 6, 8, 10 秒とした。このときの室温は 24.8°C、湿度は 18%であった。スコアが安定した条件は  $n=4$  とし、スコアが安定しない条件は  $n=5$  とし、平均値を各条件のスコアとした。

図 5-52 に各ガス種のプラズマを用いてヒトの血液の凝固実験を行った結果を示す。それぞれのグラフのエラーバーは標準誤差を意味する。ヘリウムプラズマを用いた場合に、8 秒間の照射でスコアが 0 となり、凝固するまでの時間が最も短くなった。次いで、アルゴンと窒素が 10 秒間の照射でスコアが 0 となった。酸素、空気、二酸化炭素を用いた場合は、4 つうち 3 つが 10 秒間の照射でスコア 0, 1 つが 10 秒間の照射で 0.5 となった。これらの結果から、ヘリウムプラズマの凝固時間がその他のガス種と比べてやや早く、その他のガス種の血液凝固速度には差が

ほとんどない事が示唆された。ガス種によって血液凝固効果が異なった要因としては、ヘリウムプラズマのガス温度が73℃なのに対して、その他のプラズマのガス温度は37～54℃である事から、ヘリウムプラズマでは熱によって血液凝固が促進された可能性が考えられる。

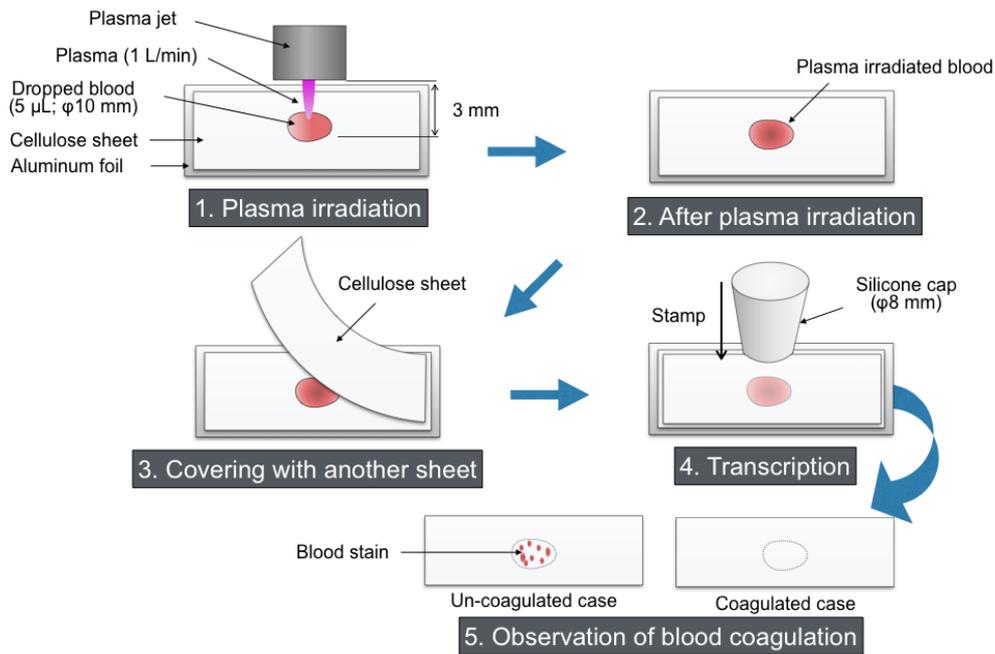


図 5-50 血液凝固効果の評価手順

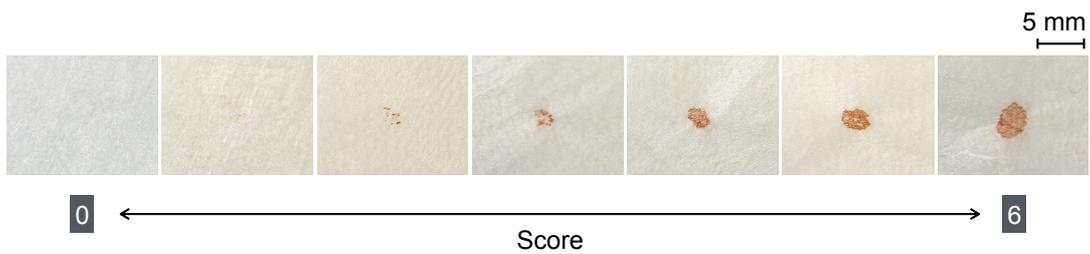


図 5-51 血液凝固効果の評価におけるスコアリング

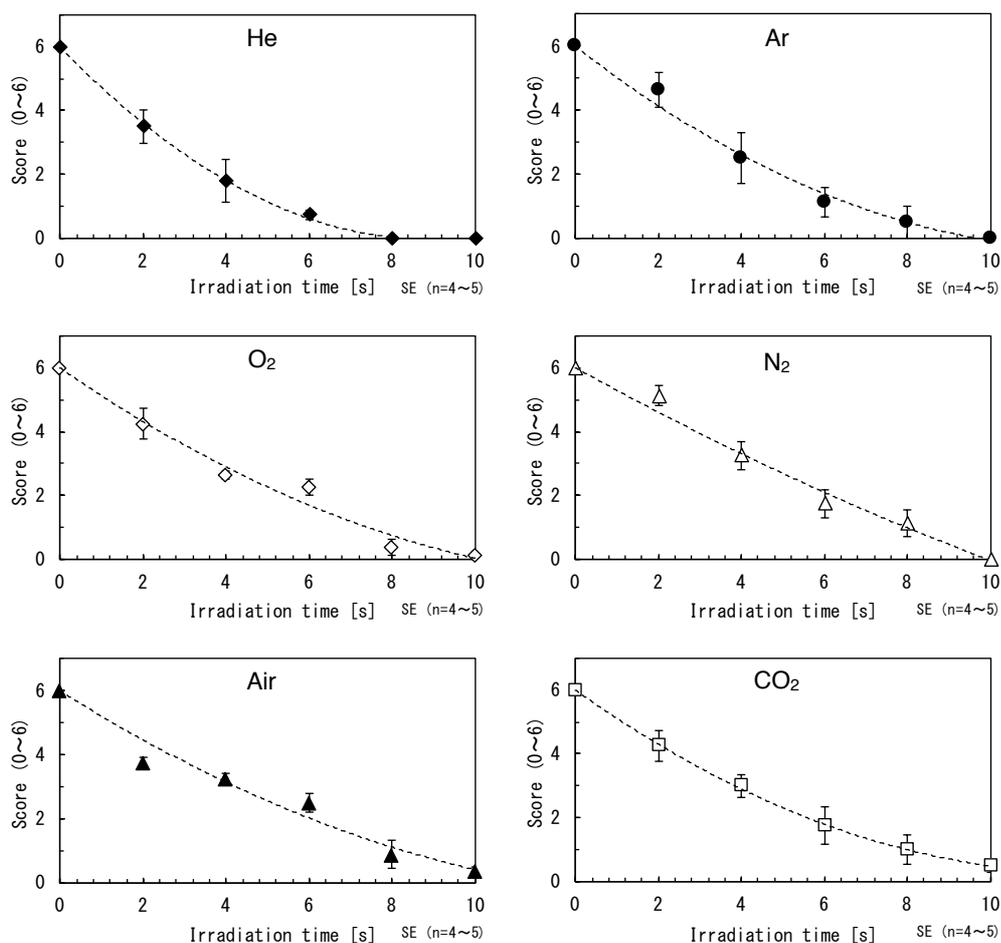


図 5-52 各ガス種のプラズマによる血液凝固にかかる時間

### *in vivo* (開腹)

プラズマ源の止血効果を調べるために、開腹した生きたブタの胃の出血部にプラズマを照射し、止血されるまでの様子を観察した。出血部は、内視鏡治療を想定して、生検鉗子を用いて 3 mm x 8 mm 程度の傷を作って出血させ、傷口の血液を拭き取ったあとも出血する患部を使用した。プラズマは図 5-53 に示すように、出血部の上部約 3~4 mm の位置で動かしつつ、傷口が止血されるまで照射した。プラズマガスには従来の血液凝固実験で用いられる事の多いヘリウムと、窒素と比較して 160 倍程度生体吸収性がよく<sup>[106]-[108]</sup>、血管に入り込んでも血栓となりにくいと考えられる二酸化炭素を使用した<sup>[109], [110]</sup>。また、プラズマ照射後の組織へのダメージを調べるために、照射後の組織を採取し、in situ アポトーシス検出キット(MK500、宝バイオ社)を用いて免疫染色を行った。このキットを用いる事で、TUNEL アッセイを行い、断片化したクロマチン DNAを検出する事ができる。操作は、製造業者の推奨プロトコルに従って行った。観察した病理組織では、断片化されたクロマチン DNA をジアミノベンジジンで茶色に染色し、正常細胞をメチ

ルグリーンで緑色に染色した。

今回の実験では大人のメスの LDW 系の生体豚を用いた。すべての実験に際し、Ketamine (10 mg/kg) (ケタラール筋注用 500 mg: 第一三共プロファーマ(株)製) および Xylazine (2 mg/kg) (セラクター 2%注射液: バイエルメディカル(株)製), 硫酸アトロピン (0.5 mg/head) (アトロピン硫酸塩注 0.5 mg「タナベ」: 田辺三菱製薬(株)製) を前投薬として筋肉内投与した。麻酔導入のために、マスクを用いて麻酔薬を高濃度 (Isoflurane (エスカイン: メルク薬品(株)製) 5%濃度, 酸素流量 3 L/min) で吸入させ、顎筋が弛緩し気管チューブが挿入し易くなるまで吸入を続けた。その後、気管チューブを挿入し麻酔配管を差し替えた後、麻酔薬を 1~3%濃度で維持した。術中は麻酔器 (Fancy80 Ma, 木村医療機器(株)製) につなぎ、Isoflurane (2~3%) と酸素投与で維持を行った。耳介静脈より乳酸リンゲル液 (ラクテック注, (株)大塚製薬工場製) の点滴を 60 ml/h で行った。今回の手術の最後に深麻酔下に大動脈を切開し、放血させ動脈酸素飽和度が「0」になるのを確認して安楽死とした。全ての処理と手順は IVTeC Japan の動物実験委員会によって承認されている (承認番号: IVT15-05)。

図 5-54 (A I) と (B I) の円はブタの胃粘膜層に作製した出血部を示す。図は胃粘膜を生検鉗子で傷つけて出血を確認後、血液を一度拭き取ったあとの状態である。患部は放置しておくとも血液が湧出していた。図 5-54 (A II) と (B II) は患部にヘリウムおよび二酸化炭素プラズマを照射しているときの写真である。ヘリウムおよび二酸化炭素プラズマを照射すると、血液の表面が凝固し、血液塊が形成された。ヘリウムプラズマを用いた場合、二酸化炭素プラズマよりも早く血液の表面が凝固して血液塊が形成された。しかし、ヘリウムプラズマによって形成された血液塊の内部にある傷口付近の血液は凝固しなかったため、図 5-54 (A III) のように血圧由来の内側からの圧力によって血液塊が決壊し、完全な止血には至らなかった。一方、二酸化炭素プラズマの場合はヘリウムプラズマよりも血液凝固する速度は遅かったものの、ガス流により上部の血液が傷口から遠ざけられ、傷口付近の血液を集中的に凝固させる事ができた。その結果、図 5-54 (B III) のように、二酸化炭素プラズマ照射後は傷口付近に薄い血液塊が形成され、50 秒ほどで完全に止血できた。二酸化炭素のガスのみを当てた場合は、ガス流で上部の血液を傷口から遠ざける事はできたが、血液凝固はできず、止血には至らなかった。

図 5-55(A I) と (B I) に生検前の胃粘膜の病理画像を示す。胃は粘膜層、粘膜筋板、粘膜下層、固有筋層の順で積層した構造となっている。図 5-55 (A II), (B II), (A III), (B III) に生検鉗子により出血させ、ヘリウムまたは二酸化炭素プラズマを照射した後の胃粘膜の病理画像を示す。出血をさせる際に、粘膜下層の上部まで生検されており、傷口近辺では粘膜層がほとんど残っていなかった。プラズマ照射部は血塊が生じ、粘膜下層や一部残った粘膜筋板への熱損傷は見られなかった。これらの結果から、大気圧低温プラズマは従来の APC のように血管や正常組織を破壊して出血を止める方法とは異なり、出血してきた血液を凝固させる事によって止血

していると考えられる。よってヘリウムおよび二酸化炭素のプラズマのどちらも非侵襲な止血手法であるといえる。

以上の止血実験の結果から止血用には傷口を露呈させる事ができ、かつ低温で血液凝固能を有す二酸化炭素の方がヘリウムよりも適している可能性が示唆された。さらに、照射時間が長くなるほど血管内にガスが混入するリスクは高くなるが、二酸化炭素ガスは血液中に溶解するため、もし血管内に混入しても血栓の原因となるリスクはヘリウムよりも低い。二酸化炭素ガスは現在、臨床でも消化器内視鏡検査および治療時の送気や腹腔鏡手術時の気腹など広く使用されている事から、新しいガスポンペを導入する必要もなく、医療現場への導入のハードルは比較的低い。以上の事から止血用プラズマ装置のガスに二酸化炭素を用いる事には大きなメリットがあるといえる。

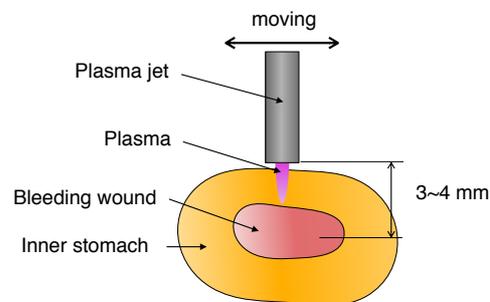


図 5-53 ブタの胃粘膜上出血に対する止血実験のセットアップ

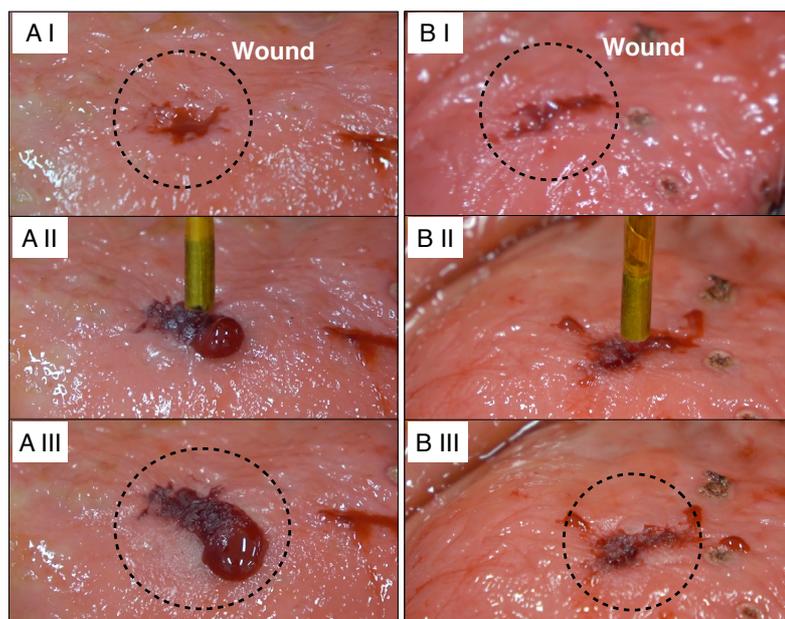


図 5-54 プラズマ照射実験の様子 A: ヘリウムプラズマ, B: 二酸化炭素プラズマ  
(A I), (B I) プラズマ照射前, (A II), (B II) プラズマ照射中(A III), (B III) プラズマ照射後

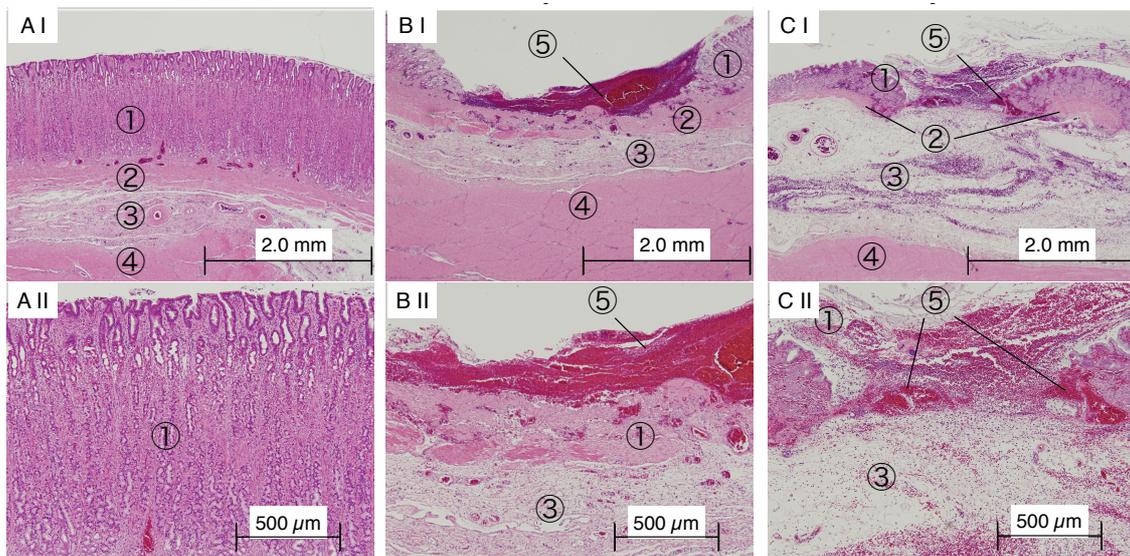


図 5-55 プラズマ照射後の胃粘膜組織の HE 染色画像

(A I), (B I), (C I) x 4, (A II), (B II), (C II) x 10

A: コントロール, B: ヘリウムプラズマ, C: 二酸化炭素プラズマ

① 粘膜層, ② 粘膜筋板, ③ 粘膜下層, ④ 固有筋層, ⑤ 血液塊

### *in vivo* (内視鏡下)

上記の実験では、開腹したブタの胃粘膜に対してプラズマを照射して、止血実験を行い、二酸化炭素プラズマの有効性を確認した。しかし、開腹した状態と、開腹していない状態では、プラズマの周辺雰囲気異なる事の止血効果への影響が考えられる。そこで次に、生きたブタの消化器内に内視鏡を挿入し、止血実験を行った。内視鏡下でも開腹時と同様に、生検鉗子を用いて胃粘膜上出血部を作り、止血実験を行った。プラズマは、CO<sub>2</sub>プラズマ (2.25 kV, 1.8 W, 50°C) と CO<sub>2</sub>プラズマ (4.00 kV, 6.8 W, 90°C) の 2 条件で処理し、プラズマの放電電力の違いによる止血効果への影響を調べた。また、従来法と比較するために、APC (40 W)、クリップ、99.5%エタノール、トロンビンによる止血処理も行った。クリップは血管を結紮して止血するため、操作に高度な技術が必要であるが止血効果は非常に高いとされる。今回の実験では止血に 2 つのクリップを使用した。エタノールは強力な脱水固定作用により血管が収縮させるとともに、血管内に血栓を形成して止血する。止血処理後は開腹し、ホルマリンで組織固定を行い、HE 染色を施して止血部の顕微鏡観察を行った。また、深部まで損傷を与えていた場合、胃に潰瘍が生じる。そこで、各処理による止血部の潰瘍化の有無を確認するため、同じ条件で各処理を違うブタに施し、5 日間の経過観察を行った。

今回の実験では大人のメスの LDW 系の生体豚を用いた。すべての実験に際し、Ketamine (10 mg/kg) (ケタラール筋注用 500 mg: 第一三共プロファーマ(株)製) および Xylazine (2 mg/kg) (セラクター 2%注射液: バイエルメディカル(株)製), 硫酸アトロピン (0.5 mg/head) (アトロピン硫酸塩注 0.5 mg「タナベ」: 田辺三菱製薬(株)製) を前投薬として筋肉内投与した。麻酔導入のために、マスクを用いて麻酔薬を高濃度 (Isoflurane (エスカイン: メルク薬品(株)製) 5%濃度, 酸素流量 3 L/min) で吸入させ、顎筋が弛緩し気管チューブが挿入し易くなるまで吸入を続けた。その後、気管チューブを挿入し麻酔配管を差し替えた後、麻酔薬を 1~3%濃度で維持した。術中は麻酔器 (Fancy80 Ma, 木村医療機器(株)製) につなぎ、Isoflurane (2~3%) と酸素投与で維持を行った。耳介静脈より乳酸リンゲル液 (ラクテック注, (株)大塚製薬工場製) の点滴を 60 ml/h で行った。今回の手術の最後に深麻酔下に大動脈を切開し、放血させ動脈酸素飽和度が「0」になるのを確認して安楽死とした。全ての処理と手順は IVTeC Japan の動物実験委員会によって承認されている (承認番号: IVT15-05)。

実験の様子および、処理後の傷口の状態、処理後の組織の HE 染色画像を図 5-56 に示す。また、処理後 5 日間の経過観察の様子を図 5-57 に示す。

CO<sub>2</sub> プラズマ (2.25 kV, 1.8 W, 50°C) を用いた場合、90 秒ほどのプラズマ照射で出血部に血塊が生じて止血された。また、止血後数度の送水を行ったが再出血は認められなかった。処理後の組織の顕微鏡観察からは、処理部や粘膜下層への熱損傷は見られなかった。経過観察も 5 日後には潰瘍化は見られず、正常に修復している様子を確認した。

CO<sub>2</sub> プラズマ (4.00 kV, 6.8 W, 90°C) を用いた場合、処理部が熱により少し炭化したが、30 秒ほどで止血された。処理後の組織の顕微鏡観察ではプラズマ照射部は熱変性が生じ、粘膜筋板まで熱損傷が見られたが、粘膜下層の熱変性はなかった。これは APC による処理後と似た様子であった。しかし、5 日後の経過観察では潰瘍化は見られず、正常に修復していた。

APC を用いた場合、0.5 秒程度の処理を数回行う事によって止血され、処理された部分は炭化が見られた。顕微鏡観察では APC 照射部は熱変性が生じ、粘膜筋板まで熱損傷が見られたが、粘膜下層への熱変性まではなかった。しかし、5 日後の経過観察では潰瘍化が見られた。

クリップを用いた場合はその施術の困難さから止血まで 4 分ほど時間を要した。顕微鏡観察では粘膜下層の組織の乱れもなく、5 日後の経過観察ではほとんど修復していた。

エタノールを用いた場合は、0.2 ml のエタノールを出血部付近に注入する事で止血できた。処理直後の組織の顕微鏡観察では大きな損傷は見られなかったが、経過観察では処理した次の日は若干の潰瘍化が見られ、5 日後には処理部全体に潰瘍が見られた。

トロンビン処理した部分は流血部分も徐々に血塊になり、2 分後には止血できた。顕微鏡観察でも損傷は見られず、5 日後の経過観察ではほとんど修復していた。良好な止血効果を確認したが、流血部分が処置視野を悪くし、流血を流すために送水してしまうとトロンビンと血塊が流れ

てしまい、再出血の可能性がある。このためトロンビンは基本的に術中では使用されない。

このように、従来の止血手法では、難易度、潰瘍の有無、再出血の可能性の全てをカバーできない事を示した。一方、開発した内視鏡用プラズマジェットで CO<sub>2</sub> プラズマでは、出力を上げる事によって 30 秒以内に止血が可能で、処理後も潰瘍が生じない事を実証した。以上の結果から、内視鏡的止血術における大気圧低温プラズマによる止血の優位性を示した。

プラズマによって血液凝固が起こるメカニズムは、血液凝固機構のいずれかのカスケードにプラズマ中の活性種が影響を与えていると考えられる。今回使用した抗血液凝固剤であるクエン酸はカルシウムイオンをキレートする。このため、第 II 因子のプロトロンビンが、トロンビンになる反応が止められていると考えられる。プラズマ照射によって血液凝固が起こっている事から、この反応以降の反応が進んでいるものと考えられる。具体的には、プロトロンビンがトロンビンになるためには、プロトロンビンがカルシウムイオンと活性化第 X 因子と反応し、酵素活性によりプロトロンビンの構造の中の Arg320-Ile321 間で切断される必要がある。このため、プラズマによって化学的に血液凝固を起こす事ができる可能性はきわめて低い。Miyamoto らは、ヘリウム DBD プラズマジェットを用いて血液凝固させ、凝固後の血液塊を顕微鏡で観察しており、その際に赤血球が凝集している事を報告している<sup>[111]</sup>。この凝集の割合が高い事から、この論文ではフィブリンによる血液凝固よりも、赤血球の凝集による血液凝固が支配であると結論づけている。血液凝固効果がガス種によって大きく変わらなかった事から、本研究でも同様に赤血球の凝集による血液凝固である可能性が高い。今後は、プラズマ照射によって生成された血液塊を観察または、成分分析する事によって、血液凝固メカニズムを明らかにする必要があると考えられる。

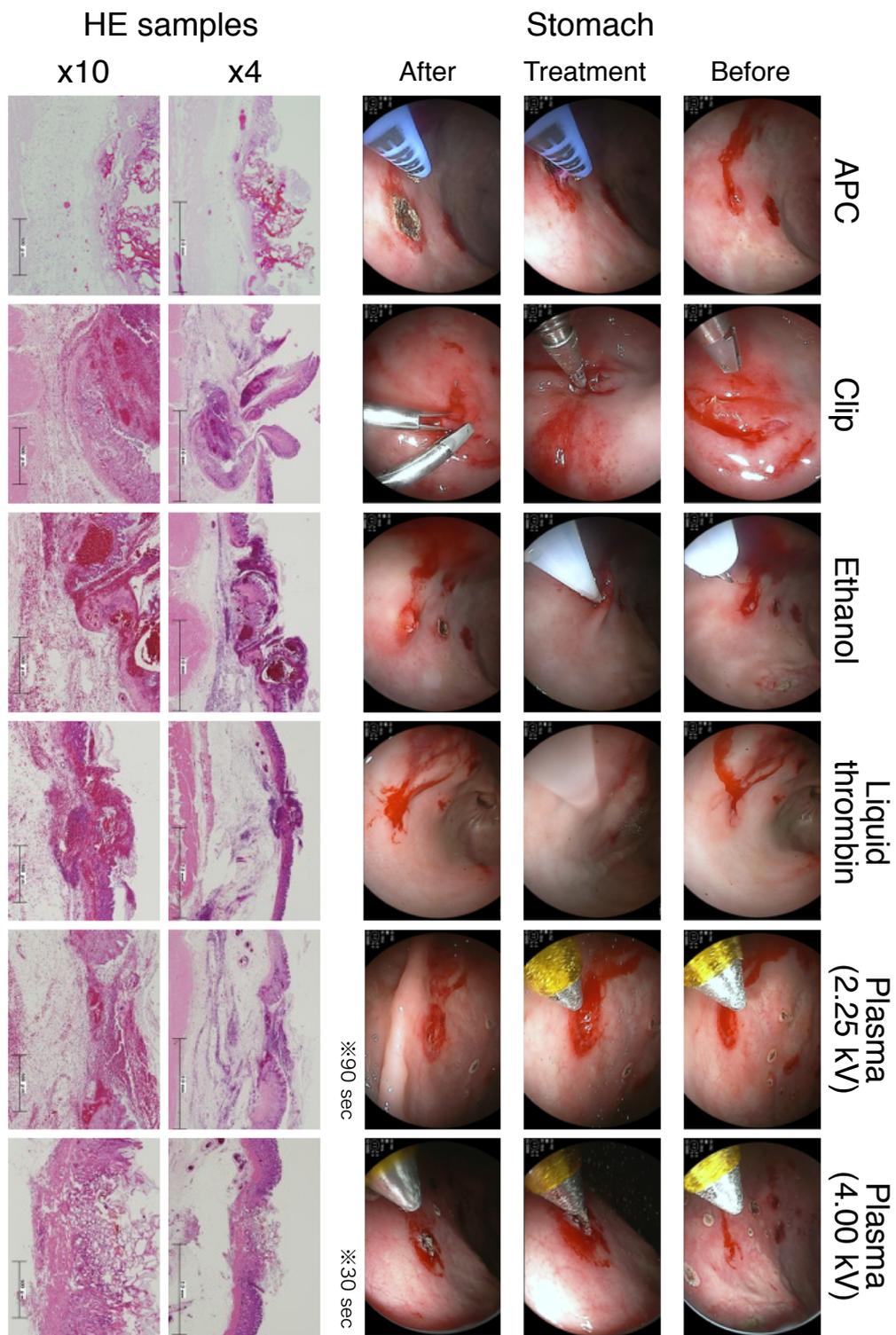


図 5-56 上部内視鏡下での止血処理および顕微鏡像



図 5-57 上部内視鏡下での胃に対する止血処理後の経過観察

## 5.5 植物細胞中への高分子の導入<sup>[112]</sup>

現在、動物細胞にタンパク質や DNA などの高分子の導入技術は多く開発されている<sup>[113], [114]</sup>。DNA を組み換える場合には、違う個体の同士の交配や、外来遺伝子を細胞内に直接導入する手法などが用いられている<sup>[115]</sup>。しかし、これらの手法では、外来遺伝子が持つ別の機能も DNA に組み込まれる可能性がある。そのため、近年ではタンパク質を細胞内に導入する事で、細胞に機能を付与する技術が注目されている。遺伝子操作とは異なり、導入したタンパク質は細胞内で分解されるため次世代に遺伝する事はない。

動物細胞はタンパク質や DNA の導入技術が多く確立されているため、動物細胞へのタンパク質導入用のキットも多く販売されている。しかし、植物細胞の場合は、角膜(クチクラ)層や細胞壁の構造によって、タンパク質の導入が阻害されるため、動物細胞よりもタンパク質の導入は困難となる。これまでに、膜透過ペプチドと開花を促進する分子量の小さなタンパク質が入った溶液に根を浸す事によって、細胞内にタンパク質を導入する技術などが開発されている<sup>[116]</sup>。しかし、膜透過ペプチドを利用する技術は、対象の組織や品種に制限がある。植物細胞は動物細胞に比べて、扱い易く、植物細胞へ簡単に生体高分子を導入する事ができれば、細胞壁を持たない動物細胞への応用も可能となり、がん細胞の選択的殺傷などの利用も考えられる。

これまでに大気圧プラズマを用いて動物の細胞内に高分子の薬剤を導入する研究結果が報告されており、この効果にはプラズマによって生成されるヒドロキシルラジカルが関与していると考えられている<sup>[117]</sup>。一方で、植物は上述の通り、クチクラ層などの構造を有するため、前処理なしの高分子の導入は困難である。また、植物のみならず細胞は温度が適温から高くても低くても損傷を受けるため、プラズマを照射するためには精密な温度制御が求められる。そこで本研究では、開発したマルチガス温度制御プラズマ装置を用いて、植物細胞へのタンパク質および DNA の導入実験を行った。

### 5.5.1 各ガス種のプラズマによるタンパク質の導入

図 5-58 に実験のセットアップを示す。植物から切り出した 20 x 20 mm の葉片に 20°C 程度に冷却したプラズマを 30 秒間照射し、その後緑色蛍光タンパク質を含む PBS にプラズマを照射した葉片を 1 日浸した。蛍光タンパク質には、sGFP (Superfolder green fluorescence protein) とアデニル酸シクラーゼ (CyaA) を融合させたタンパク質 (His-sGFP-CyaA) を使用した。5 SLM の二酸化炭素、酸素、アルゴン、アルゴン+水素、窒素、模擬空気に高周波電源 (DFMJ-02, プラズマコンセプト東京社) を用いて電圧を印加する事でプラズマを生成した。葉片とプラズマの射出口の距離は 5 mm とした。蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-300, オリンパス社) を使用した。

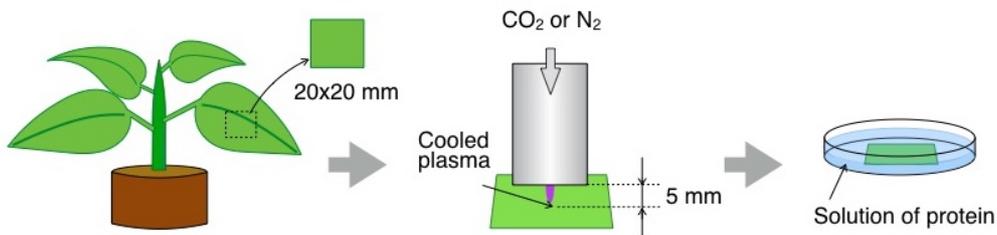


図 5-58 タンパク質導入実験のセットアップ

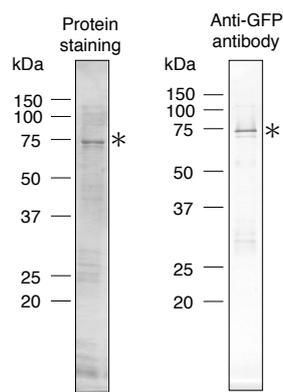


図 5-59 電気泳動による His-sGFP-CyaA の純度チェック

(左) タンパク染色 (右) 抗 GFP 抗体

His-sGFP-CyaA の分子量を電気泳動によって調べた。この結果図 5-59 に示すように、分子量は約 75,000 であった。

ナス科の植物モデルであるタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の葉にプラズマを照射して、タンパク質を含む溶液に浸した葉片の GFP 蛍光および自家蛍光を蛍光顕微鏡で観察したときの写真を図 5-60 に示す。自家蛍光は、植物の持つ葉緑体によって発せられる蛍光で、GFP 観察の際にバックグラウンドノイズとなるため、個別に観察をした。二酸化炭素、酸素、アルゴン+水素、窒素プラズマ照射後の葉片から sGFP 由来の蛍光が観察されたことから、タンパク質が導入されている事を確認した。一方、酸素と窒素の混合ガスである模擬空気ではタンパク質の導入は確認されなかった。また、アルゴンプラズマ照射後の葉片からも sGFP 由来の蛍光が確認されたが、蛍光の輪郭がはっきりしていないことから、細胞の外にタンパク質が付着していると考えられる。これらの結果から、従来の前処理や膜透過ペプチドなしに、切り出した葉片への二酸化炭素または酸素、アルゴン+水素、窒素のプラズマ照射と、高分子タンパク質を含む溶液に葉片を浸すという簡単な手順により、細胞内に導入できる事を示した。

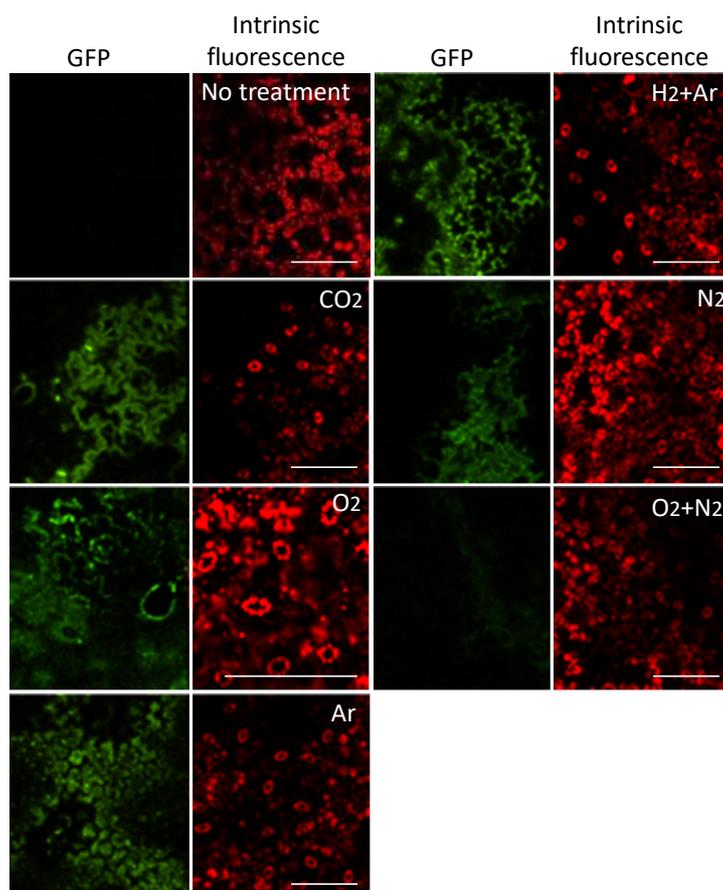


図 5-60 各ガス種のプラズマ照射後の GFP および葉緑体の自家蛍光観察

## 5.5.2 細胞内に導入されたタンパク質の定量解析

5.5.1 と同様の実験系で二酸化炭素、酸素、アルゴン+水素、窒素の 4 種類のプラズマを照射し、タバコ葉の細胞内に導入されるタンパク質量を定量的に調べた。本研究では蛋白シウ His-sGFP-CyaA を用いているが、この内の CyaA タンパク質はそのままでは活性を示さない。CyaA タンパク質は細胞内に取り込まれると触媒となり、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) から環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) への変換をする酵素として機能する。そのため、プラズマを照射したあと、His-sGFP-CyaA を含む溶液に浸し、葉片に含まれる cAMP 量を測定することで、細胞内に導入されたタンパク質を定量する事が可能となる。cAMP 量は測定キット (Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System Product booklet RPN2255, GE Healthcare Life Sciences) を用いて算出した。この実験ではプラズマの照射時間を、5, 10, 20, 40 秒とし、コントロールは、未処理かつタンパク質を PBS 中に入れないもの、未処理かつタンパク質を PBS 中に入れたもの、プラズマ照射してタンパク質を PBS 中に入れないもの 3 条件とした。

各種処理後のタバコ葉片に含まれる cAMP 量のグラフを図 5-61 に示す。二酸化炭素と窒素のプラズマでは、いずれの照射時間でもコントロールと比較して cAMP 量が増加した。酸素とアルゴン+水素のプラズマでは、20 秒と 30 秒のプラズマ照射によって cAMP 量が増加したが、10 秒以下のプラズマ照射では増加しなかった。これらの結果から、二酸化炭素と窒素のプラズマが短い照射時間で多くの cAMP を導入できている事がわかり、処理速度およびランニングコストの面でその他のガス種よりも優位性がある事を示した。

さらに、二酸化炭素と窒素のプラズマ照射から 6 日後の葉の様子を図 5-62 に示す。照射時間が 5 秒以下のときは、未処理の場合と見た目に差はなく、葉にダメージは確認されなかった。一方、照射時間が 10 秒以上となると、照射部が変色する損傷を確認した。また、温度制御をしない場合は、2 秒間のプラズマ照射でも損傷を与えるうえに、タンパク質が導入されなかった。

以上の結果から、冷却した二酸化炭素と窒素のプラズマを 2~5 秒間照射する事によって、タバコ葉に損傷を与えずに細胞内にタンパク質を導入できる事を示した。

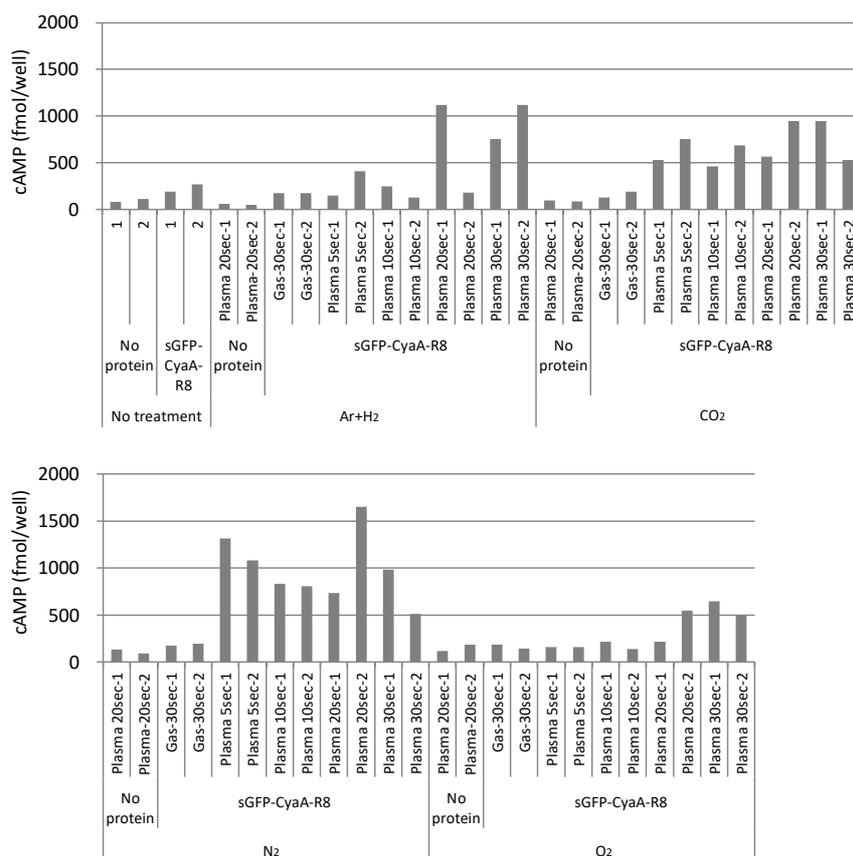


図 5-61 各種条件下における cAMP 導入量の比較

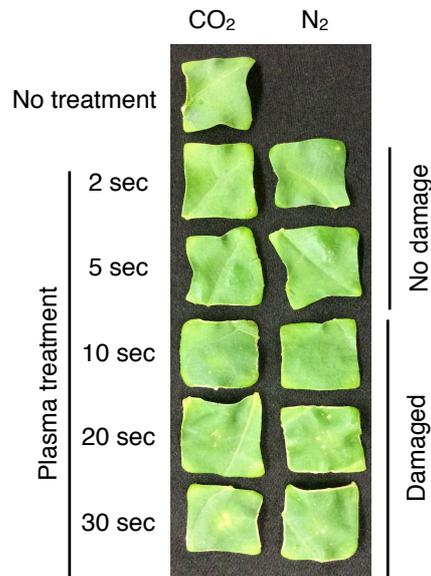


図 5-62 プラズマ照射から 6 日後の葉片の様子

### 5.5.3 異なる植物細胞および組織に対するタンパク質の導入

従来のタンパク質導入法では、対象とする植物の種類や組織に制限があった。そこで、タバコ以外の植物および組織を用いて、二酸化炭素および窒素プラズマ照射によるタンパク質の導入実験を 5.5.1 と同様に行った。サンプルにはシロイヌナズナの葉とイネの根を用いた。プラズマの照射時間はそれぞれ 2 秒とした。コントロールとして、それぞれのガスのみを 2 秒間照射した。

各処理を行った蛍光観察した際の写真を図 5-63 および図 5-64 に示す。双子葉植物のシロイヌナズナの葉および単子葉植物のイネの根の両方で、二酸化炭素および窒素のプラズマを照射したサンプルから sGFP 由来の蛍光を観察した。また、イネの根には葉緑体がないことから自家蛍光がない事、ガスのみでは GFP の蛍光が発せられていない事を確認した。これらの結果から、植物の分類および組織を問わず、本手法を用いる事でタンパク質を細胞内に導入できる事を示した。

以上の結果から、本研究で開発した植物細胞への高分子タンパク質の導入法は、特別な前処理なしに利用でき、植物の品種や組織を限定しない。そのため、実験室で使える細胞内へのタンパク質の導入法という基礎技術に留まらず、農業分野では現場での利用もできる実用性が高い技術であると考えられる。本手法によって、アレルギー物質を作らない作物の開発や、開花時期の制御など広い応用範囲が期待できる。以上のことから、温度制御したプラズマのバイオ技術への応用の可能性を示した。

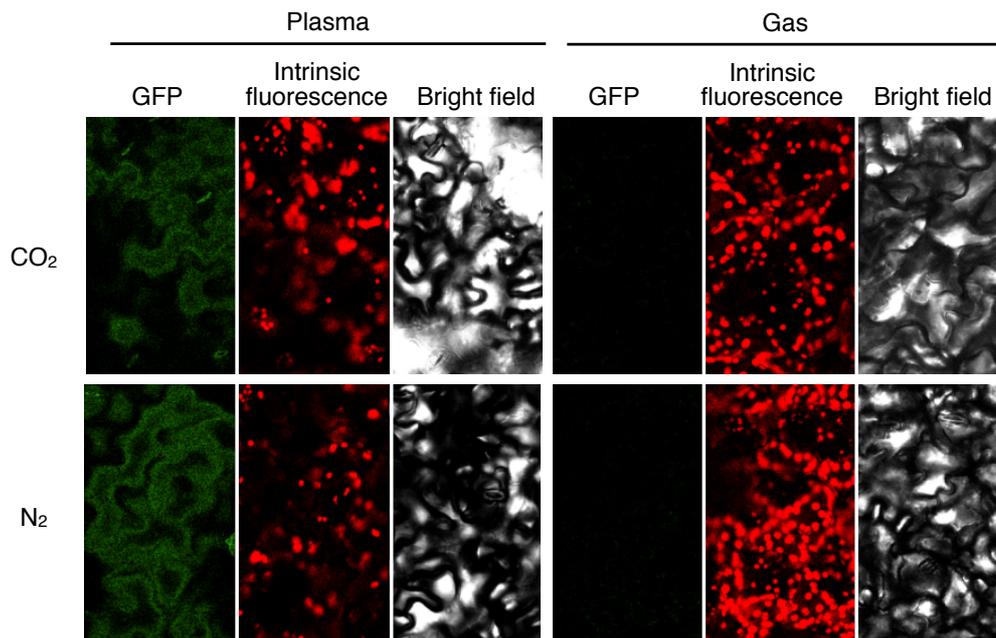


図 5-63 二酸化炭素および窒素プラズマ照射によるシロイヌナズナ葉の細胞へのタンパク質導入

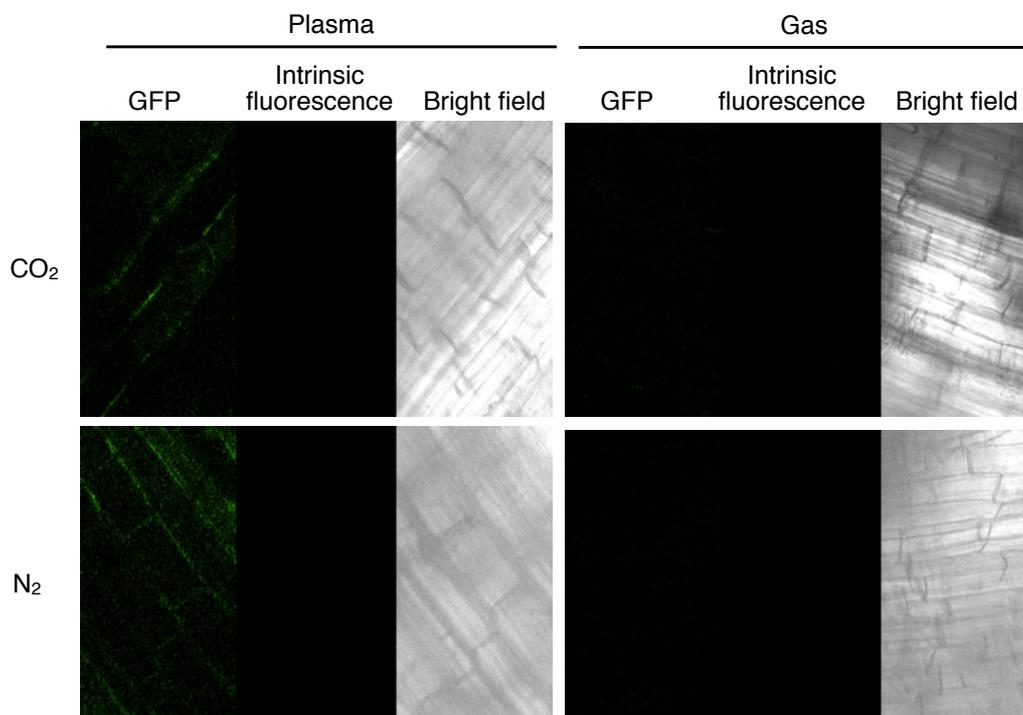


図 5-64 二酸化炭素および窒素プラズマ照射によるイネ根の細胞へのタンパク質導入

#### 5.5.4 タバコ葉の細胞への DNA の導入

タバコ葉の細胞に対してタンパク質を導入できる事を明らかにしたが、DNA を導入する事ができれば、高精度な遺伝子組み換え等にも応用可能になる。そこで、タバコ葉片に温度制御した二酸化炭素のプラズマを照射したあとにプラスミドを含む PBS に葉片を 2 日間浸し、DNA の導入実験を行った。実験には pUGW2 ベクターに GFP 遺伝子を組み込んだ、分子量が約 4,100,000 の pUGW2-sGFP を使用した<sup>[118]</sup>。細胞中に pUGW2-sGFP が取り込まれ、細胞内で転写され、翻訳される事で GFP の蛍光観察が可能になる。

プラズマ照射後に観察を行った結果を図 5-65 に示す。GFP 蛍光が二酸化炭素プラズマで処理された細胞の内部で観察でき、pUGW2-sGFP をタバコ葉の細胞への導入できる事を実証した。二酸化炭素ガスで処理した細胞では、有意な GFP 蛍光は検出されなかったため、プラズマ照射によって、分子量が約 4,100,000 と大きな DNA も植物の細胞中に導入可能な事を示した。これらの結果から、プラズマ照射によって、遺伝子組み換えやゲノム編集など生命科学分野へ幅広い応用が期待される。

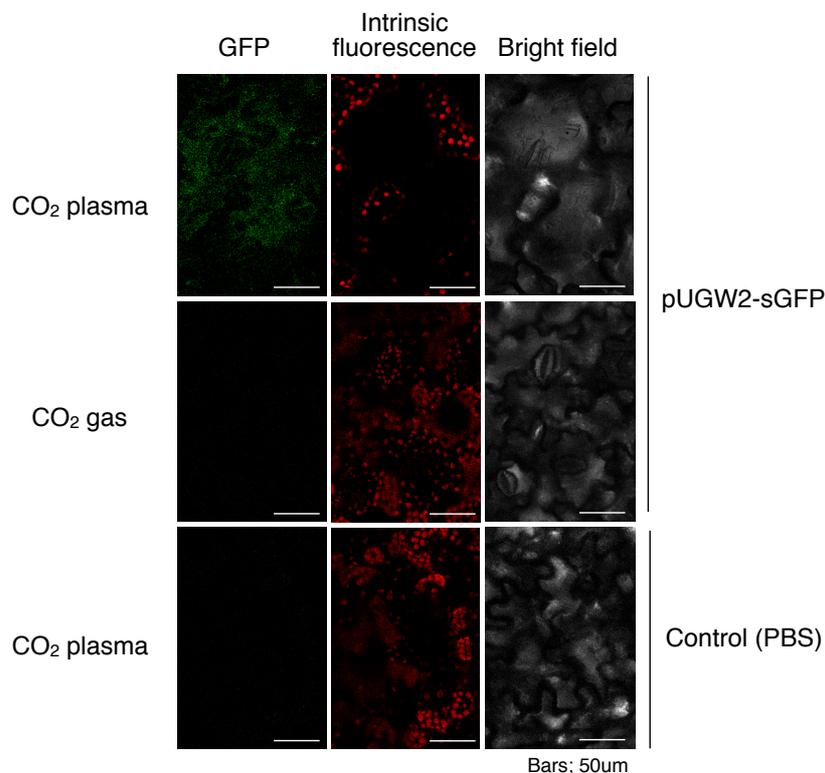


図 5-65 タバコ葉細胞への DNA の導入

## 5.6 まとめ

本章では、まず本研究で開発したマルチガス温度制御プラズマ装置の設計や基礎特性について記述した。マルチガス温度制御プラズマ装置は、温度制御流体の流路をプラズマ装置の管体の壁の中に持つため、金属の 3D プリンタを用いて作製した。温度制御流体と各ガス種のプラズマのガス温度の関係を調べた結果、ガス種ごとにプラズマの生成後の温度は異なったが、ガス種によらずプラズマのガス温度は温度制御流体の温度に比例する事を明らかにした。このことから、開発した温度制御プラズマ装置を用いる事で、様々なガス種のプラズマのガス温度を任意の温度に制御できる事を示した。開発した温度制御プラズマ装置を用いて、酸素と窒素、二酸化炭素のプラズマの殺菌能のプラズマガス温度依存性を調べた。その結果、酸素プラズマの殺菌能はガス温度の上昇に伴って高くなる事、窒素と二酸化炭素のプラズマは低くなる事を明らかにした。これらの結果からガス種によってガス温度特性が異なる事を示した。

大気圧低温プラズマ装置の眼科分野への応用にむけて、本研究で提案した超音波併用プラズマバブリングの有効性を確認し、眼科用器具に付着した細菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果を調べた。まず、SUS 板に付着した緑膿菌または黄色ブドウ球菌に対する、酸素または二酸化炭素のプラズマバブリングの殺菌効果を調べた結果、5 分間のプラズマバブリングでは検出下限値以下まで殺菌できない事が明らかとなった。このため、菌の凝塊やバイオフィルムの形成によって殺菌が困難となる付着菌を、超音波によって浮遊菌にする超音波併用プラズマバブリングによる殺菌効果を調べた。その結果、二酸化炭素プラズマで付着菌数を 1 分以内に検出下限値以下にする高い殺菌効果が得られた。また、その時の浮遊菌は 5 分以内に検出下限値以下となり、超音波併用プラズマバブリングが付着菌および浮遊菌のいずれにも有効である事を実証した。眼科分野において繰り返し利用されるアブラネーションチップに付着した緑膿菌および黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果を調べた。その結果、SUS 板の場合と同様に、超音波併用プラズマバブリングで、付着菌および浮遊菌に対する高い殺菌効果を確認した。また、蛍光試薬を用いて約 11 時間プラズマ処理したアブラネーションチップの損傷を調べた結果、アブラネーションチップに損傷がない事を確認した。以上の結果から、本研究で提案した超音波併用プラズマバブリングが医療機器の殺菌に有効である事を実証した。

大気圧低温プラズマの消化器内科分野への応用に向けて、プラズマによる血液凝固効果のガス種およびガス温度の影響を調べ、内視鏡的止血術用のマルチガスプラズマ装置を開発した。マルチガスプラズマ装置を用いて、アルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマによる血液凝固効果を調べた結果、アルゴンプラズマが最も血液凝固効果が低く、その他のガス種間では大きな差はなかった。温度制御プラズマ装置を用いて、 $-10^{\circ}\text{C}$  から  $70^{\circ}\text{C}$  のプラズマによる血液凝固効果を調べた結果、 $-10$  および  $0^{\circ}\text{C}$  のプラズマでは血液が凍結したが、 $10^{\circ}\text{C}$  以

上のプラズマではプラズマのガス温度の上昇に伴って、血液凝固効果が高くなる事を明らかにした。金属の 3D プリンタを用いて内視鏡に挿入可能な直径 2.0 mm のプラズマジェットを製作し、基礎特性を調べた結果、開発したプラズマ装置では、電子密度が  $10^{14} \text{ cm}^{-3}$  オーダーの比較的高密度なプラズマが生成されている事を確認した。開発したプラズマ装置による血液凝固効果を調べた結果、ヘリウムプラズマがその他のガス種よりも高い血液凝固効果を示した。生きたブタを用いて、開腹下で胃粘膜上の出血部に対する止血効果を調べた結果、ヘリウムプラズマでは血液凝固時間が短かったが、血液表面しか凝固できずに完全に止血する事ができなかった。それに対して二酸化炭素プラズマでは、余分な血液をガス流で飛ばすことが可能なため、傷口の周囲の血液のみを凝固でき、完全な止血ができた。上部内視鏡を用いて生きたブタの胃の中で止血実験を行った。従来の熱プラズマによる凝固法では高度な技術が必要であり、約  $3,000^{\circ}\text{C}$  の熱で凝固するため処理後に潰瘍を起こしていたが、出力を上げた二酸化炭素プラズマでは 30 秒ほどで止血でき、処理から 5 日後の経過観察の際にも潰瘍が生じなかった。以上の結果から、開発した内視鏡的止血術用のマルチガスプラズマジェットの有効性を確認した。また、高い止血効果と生体吸収性および安価で、不活性ガスである事から、内視鏡用のプラズマガスには二酸化炭素が適している事を示した。

大気圧低温プラズマの生命科学分野への応用にむけた基礎研究として、植物細胞に対してプラズマを照射する事によるタンパク質の導入実験を行った。まず、植物に熱損傷を与えない  $20^{\circ}\text{C}$  程度に温度制御した各ガス種のプラズマを用いて、タバコ葉片に対するタンパク質の導入実験を行った。その結果、酸素、二酸化炭素、アルゴン+ヘリウム、窒素のプラズマによって、細胞中へ分子量が約 75,000 のタンパク質が導入されている事を確認した。これらのガス種のプラズマ照射によって細胞中に導入されるタンパク質を定量した結果、二酸化炭素と窒素のプラズマでは 2 秒以上のプラズマ照射で、細胞中にタンパク質を有意に導入できる事を示した。また、プラズマを照射してから 6 日後のタバコ葉片の様子を観察した結果、5 秒以下のプラズマ照射では葉片に損傷はない事を確認した。一方、温度制御しないプラズマでは、葉片に損傷が確認され、タンパク質の導入ができない事を示した。その他の品種および組織に対する本手法の有効性を確認するために、シロイヌナズナの葉とイネの根に対するタンパク質導入実験を行った。その結果、従来法では、タンパク質を導入できる品種や組織が限られていたが、本手法では、植物の品種や組織を問わず、高分子タンパク質を導入できる事を実証した。さらに、同様の実験条件で分子量が約 4,100,000 の DNA の導入実験を行った結果、タバコ葉の細胞に DNA を導入できる事を明らかにした。これらの結果から、低温に温度制御した二酸化炭素および窒素のプラズマを用いる事で、特別な前処理なしに、高分子を細胞中に導入できる事を示し、生命科学分野においてゲノム編集や遺伝子組み換えの技術として幅広い応用が期待できる。

以上の結果から、本研究で開発したマルチガス温度制御プラズマ装置の有用性が確認された。上記の研究は、応用に向けた基礎研究であり、この中で使用したマルチガス温度制御プラズマ装置などは、まだ1つのユニットとして組み上げられていないため、装置を扱うためには多くの知見を必要とする。そのため、医療用プラズマ装置の実用化に向けては、特別な知識なしに使用可能なプラズマ装置が開発される事が望まれる。また、本手法では明らかにする事ができなかった、プラズマのガス温度と殺菌能の関係がガス種によって異なる事、プラズマによる血液凝固および細胞中へのタンパク質やDNAが導入できるメカニズムについてはさらに調べる必要がある。

## 第6章 結論

### 6.1 総括

本論文では、プラズマのガス温度を任意の値に制御でき、かつ様々なガス種でプラズマを生成できるマルチガス温度制御プラズマ装置を開発し、医療分野を中心とする各種応用に向けた研究を行った。2章では、従来の低温プラズマの医療応用研究を紹介し、プラズマによる処理効果や安全性を向上させるためには、ガス温度の制御とマルチガス化を両立できるプラズマ装置の開発が必要である事を述べた。第3章以降の各章で得られた結果を以下にまとめる。

第3章では、温度制御プラズマ装置の基礎特性を記述するとともに、液中の細菌に対する殺菌効果プラズマガス温度依存性を調べ、殺菌要因を調べた結果を記述した。

基礎特性についてはまず、従来研究で調査された温度制御プラズマ装置の温度制御能と、発光強度およびヘリウムの励起温度のガス温度依存性について記述した。この中で、プラズマガスとしてヘリウムを用いた場合には、プラズマのガス温度を $-54^{\circ}\text{C}$ から $160^{\circ}\text{C}$ の間で $\pm 1^{\circ}\text{C}$ という高い精度で制御できる事、プラズマのガス温度が高くなるにつれて、ヘリウムの発光強度は低下し、ヘリウムの励起温度は高くなる事を示した。

本研究では、温度制御プラズマ装置の基礎特性として、放電電力と電子密度のプラズマガス温度依存性を調べた。その結果、プラズマの放電電力および電子密度はガス温度の上昇に伴って低下する事を明らかにした。その要因を考察した結果、理論式と同様の傾向が得られた事から、プラズマのガス温度が気体中のヘリウムの数密度に影響を与えている可能性を示した。

液中の各種細菌に対する殺菌効果のプラズマガス温度依存性を調べた結果、菌種によらずプラズマのガス温度が高くなるほど、殺菌効果が高くなる事を明らかにした。また、殺菌効果へのプラズマの熱の直接的な影響が小さい事を確認した。本研究では、プラズマの殺菌能の指標を「単位時間あたりのプラズマ照射によって減少する菌の桁数」と定義し、各ガス温度のプラズマの殺菌能を算出した。その結果、いずれの菌種に対しても、プラズマのガス温度が高くなるほど、殺菌能が指数関数的に高くなる事を明らかにした。

殺菌要因として、プラズマによって液中に導入される各種活性種量のプラズマガス温度依存性を ESR および吸光光度計を用いて測定した。ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、オゾン、過酸化水素の量を測定した結果、活性種の濃度はいずれも、プラズマのガス温度が高くなるほど高くなり、特に一重項酸素の濃度が指数関数的に高くなる事を明らかにした。この測定結果と殺菌能を比較して、プラズマのガス温度の変化に伴う、殺菌能の変化と、液中の活性種量の相関

を調べた。その結果、殺菌能と、一重項酸素およびオゾンの導入量との間に、それぞれの相関係数が 0.80～1.00 および 0.65～0.94 となる強い相関がある事を明らかにした。このことから、一重項酸素とオゾンが各種細菌に対する殺菌能に影響を及ぼしている可能性が高い事を示した。

一重項酸素とヒドロキシルラジカルの消去剤を用いて殺菌実験を行い、それぞれの活性種の殺菌への関与を調べた結果、どちらの消去剤を使用した場合にも殺菌効果がなくなる事を確認した。また、各消去剤を添加した場合の液中に導入される一重項酸素とヒドロキシルラジカルを定量した結果、いずれの消去剤を用いた場合でも、一重項酸素およびヒドロキシルラジカルの両方の濃度が低下した。このため、各活性種の相互作用によって殺菌効果が引き起こされている可能性が考えられ、一重項酸素が殺菌に直接関与している事を決定付ける事はできなかった。

これらの結果から、迅速な殺菌のためには、プラズマのガス温度を高くする必要がある事が示されたが、熱に弱い対象にプラズマを照射する場合には、プラズマのガス温度を照射対象に熱損傷を与えない温度以下にする事が求められる。また、プラズマのガス温度の変化に伴って、プラズマによって生成される活性種の量が変化した事から、殺菌だけでなく、止血や創傷治療などの処理効果にもプラズマのガス温度は大きな影響を与えると考えられる。以上のことから、目的および照射対象に応じたプラズマのガス温度の設定が必要であると言え、本研究により、プラズマの医療応用におけるガス温度制御の重要性を示した。

第 4 章では、本章ではマルチガスプラズマジェットおよびプラズマバブリング装置を用いて、各ガス種のプラズマの殺菌効果および殺菌要因を調べた結果について記述した。

窒素、酸素、二酸化炭素、空気のプラズマが大腸菌に対して高い殺菌効果を示し、その中でも高い殺菌効果を示した酸素と二酸化炭素のプラズマは大腸菌のみならず、黄色ブドウ球菌や緑膿菌などその他の一般細菌に対しても高い殺菌効果を示す事を明らかにした。各ガス種のプラズマによって液中に導入される活性種を測定した結果、液中にガス種によって導入される活性種の種類や量が大きく異なる事を明らかにした。

窒素プラズマでは、液中に塩化ナトリウムが存在する場合に高い殺菌効果を示し、ヒドロキシルラジカルが多く液中に導入されている事から、液中で次亜塩素酸を生成している可能性がある事を示した。酸素プラズマに関しては、主にオゾンが殺菌に関与している事を示した。空気プラズマでは、多くの硝酸イオンと亜硝酸イオンが液中に導入されている事、硝酸イオンと亜硝酸イオンには殺菌効果がない事を明らかにし、それらのイオンの生成過程で殺菌因子が生成されている可能性を示唆した。二酸化炭素プラズマでは、10 分程度の寿命を持つ高い殺菌効果を示す殺菌因子の存在を明らかにした。しかし、殺菌因子を特定する事ができなかった。二酸化炭素プラズマの有用性や安全性を評価するために、今後詳細に殺菌因子を調べる必要があると結論づけた。

第 5 章では、まず本研究で開発したマルチガス温度制御プラズマ装置の設計や基礎特性について記述した。マルチガス温度制御プラズマ装置は、温度制御流体の流路をプラズマ装置の筐体の壁の中に持つため、金属の 3D プリンタを用いて作製した。温度制御流体と各ガス種のプラズマのガス温度の関係を調べた結果、ガス種ごとにプラズマの生成後の温度は異なったが、ガス種によらずプラズマのガス温度は温度制御流体の温度に比例する事を明らかにした。このことから、開発した温度制御プラズマ装置を用いる事で、様々なガス種のプラズマのガス温度を任意の温度に制御できる事を示した。開発した温度制御プラズマ装置を用いて、酸素と窒素、二酸化炭素のプラズマの殺菌能のプラズマガス温度依存性を調べた。その結果、酸素プラズマの殺菌能はガス温度の上昇に伴って高くなる事、窒素と二酸化炭素のプラズマは低くなる事を明らかにした。これらの結果からガス種によってガス温度特性が異なる事を示した。

大気圧低温プラズマ装置の眼科分野への応用にむけて、本研究で提案した超音波併用プラズマバブリングの有効性を確認し、眼科用器具に付着した細菌に対する超音波併用プラズマバブリングの殺菌効果を調べた。まず、SUS 板に付着した緑膿菌または黄色ブドウ球菌に対する、酸素または二酸化炭素のプラズマバブリングの殺菌効果を調べた結果、5 分間のプラズマバブリングでは検出下限値以下まで殺菌できない事が明らかとなった。このため、菌の凝塊やバイオフィルムの形成によって殺菌が困難となる付着菌を、超音波によって浮遊菌にする超音波併用プラズマバブリングによる殺菌効果を調べた。その結果、二酸化炭素プラズマで付着菌数を 1 分以内に検出下限値以下にする高い殺菌効果が得られた。また、その時の浮遊菌は 5 分以内に検出下限値以下となり、超音波併用プラズマバブリングが付着菌および浮遊菌のいずれにも有効である事を実証した。眼科分野において繰り返し利用されるアプラネーションチップに付着した緑膿菌および黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果を調べた。その結果、SUS 板の場合と同様に、超音波併用プラズマバブリングで、付着菌および浮遊菌に対する高い殺菌効果を確認した。また、蛍光試薬を用いて約 11 時間プラズマ処理したアプラネーションチップの損傷を調べた結果、アプラネーションチップに損傷がない事を確認した。以上の結果から、本研究で提案した超音波併用プラズマバブリングが医療機器の殺菌に有効である事を実証した。

大気圧低温プラズマの消化器内科分野への応用に向けて、プラズマによる血液凝固効果のガス種およびガス温度の影響を調べ、内視鏡的止血術用のマルチガスプラズマ装置を開発した。マルチガスプラズマ装置を用いて、アルゴン、ヘリウム、酸素、窒素、二酸化炭素、空気のプラズマによる血液凝固効果を調べた結果、アルゴンプラズマが最も血液凝固効果が低く、その他のガス種間では大きな差はなかった。温度制御プラズマ装置を用いて、 $-10^{\circ}\text{C}$  から  $70^{\circ}\text{C}$  のプラズマによる血液凝固効果を調べた結果、 $-10$  および  $0^{\circ}\text{C}$  のプラズマでは血液が凍結したが、 $10^{\circ}\text{C}$  以上のプラズマではプラズマのガス温度の上昇に伴って、血液凝固効果が高くなる事を明らかにした。金属の 3D プリンタを用いて内視鏡に挿入可能な直径 2.0 mm のプラズマジェットを製作

し、基礎特性を調べた結果、開発したプラズマ装置では、電子密度が  $10^{14} \text{ cm}^{-3}$  オーダーの比較的高密度なプラズマが生成されている事を確認した。開発したプラズマ装置による血液凝固効果を調べた結果、ヘリウムプラズマがその他のガス種よりも高い血液凝固効果を示した。生きたブタを用いて、開腹下で胃粘膜上の出血部に対する止血効果を調べた結果、ヘリウムプラズマでは血液凝固時間が短かったが、血液表面しか凝固できずに完全に止血する事ができなかった。それに対して二酸化炭素プラズマでは、余分な血液をガス流で飛ばすことが可能なため、傷口の周囲の血液のみを凝固でき、完全な止血ができた。上部内視鏡を用いて生きたブタの胃の中で止血実験を行った。従来の熱プラズマによる凝固法では高度な技術が必要であり、約  $3,000^{\circ}\text{C}$  の熱で凝固するため処理後に潰瘍を起こしていたが、出力を上げた二酸化炭素プラズマでは 30 秒ほどで止血でき、処理から 5 日後の経過観察の際にも潰瘍が生じなかった。以上の結果から、開発した内視鏡的止血術用のマルチガスプラズマジェットの有効性を確認した。また、高い止血効果と生体吸収性および安価で、不活性ガスである事から、内視鏡用のプラズマガスには二酸化炭素が適している事を示した。

大気圧低温プラズマの生命科学分野への応用にむけた基礎研究として、植物細胞に対してプラズマを照射する事によるタンパク質の導入実験を行った。まず、植物に熱損傷を与えない  $20^{\circ}\text{C}$  程度に温度制御した各ガス種のプラズマを用いて、タバコ葉片に対するタンパク質の導入実験を行った。その結果、酸素、二酸化炭素、アルゴン+ヘリウム、窒素のプラズマによって、細胞中へ分子量が約 75,000 のタンパク質が導入されている事を確認した。これらのガス種のプラズマ照射によって細胞中に導入されるタンパク質を定量した結果、二酸化炭素と窒素のプラズマでは 2 秒以上のプラズマ照射で、細胞中にタンパク質を有意に導入できる事を示した。また、プラズマを照射してから 6 日後のタバコ葉片の様子を観察した結果、5 秒以下のプラズマ照射では葉片に損傷はない事を確認した。一方、温度制御しないプラズマでは、葉片に損傷が確認され、タンパク質の導入ができない事を示した。その他の品種および組織に対する本手法の有効性を確認するために、シロイヌナズナの葉とイネの根に対するタンパク質導入実験を行った。その結果、従来法では、タンパク質を導入できる品種や組織が限られていたが、本手法では、植物の品種や組織を問わず、高分子タンパク質を導入できる事を実証した。さらに、同様の実験条件で分子量が約 4,100,000 の DNA の導入実験を行った結果、タバコ葉の細胞に DNA を導入できる事を明らかにした。これらの結果から、低温に温度制御した二酸化炭素および窒素のプラズマを用いる事で、特別な前処理なしに、高分子を細胞中に導入できる事を示し、生命科学分野においてゲノム編集や遺伝子組み換えの技術として幅広い応用が期待できる。

以上の結果から、大気圧低温プラズマの医療分野等への応用においては、プラズマガス種の選択およびプラズマガス温度の制御が重要であり、殺菌や止血等の各種の応用では、処理効果および生体等への影響を考慮してそれぞれを選択や制御する必要があると結論づけた。

## 6.2 今後の展望

第3章ではプラズマのガス温度を制御する事によって、プラズマによる殺菌能を変えられる事を示した。この要因として液中に導入される活性種の量が変化する事が影響している可能性が示されたが、殺菌効果に影響を与える因子は特定に至っていない。活性種の測定実験で、本研究で測定した全ての活性種がプラズマのガス温度とともに増加していたことから、殺菌効果とともに副作用のリスクも高まっている可能性が考えられる。したがって今後は、プラズマによる殺菌因子を特定するとともに、皮膚の細胞シートや動物実験などで、プラズマのガス温度と生体皮膚に与える影響を調べる必要がある。

4章の結果から、二酸化炭素プラズマによる殺菌への応用の可能性が示された。二酸化炭素プラズマは他のガス種にはないメリットが多くあり、実用性が高いガス種のプラズマである。しかしながら、その効果は直接殺菌した場合は非常に高いが、プラズマバブル水としての殺菌効果は、酸素プラズマバブル水と比較して低かった。酸素プラズマは高い殺菌効果を示す一方で、支燃性ガスである事、生成されるオゾンが刺激臭を放つ事、など医療現場に導入する際に懸念されるデメリットがある。そのため、二酸化炭素プラズマによる殺菌因子を明らかにし、二酸化炭素プラズマバブル水による殺菌効果を向上させる事ができれば、現行のオゾン水や次亜塩素酸水等の殺菌水に置き換わる可能性が期待できる。

本論文で行われた研究は、応用に向けた基礎研究であり、この中で使用したマルチガス温度制御プラズマ装置などは、まだ1つのユニットとして組み上げられていないため、装置を扱うためには多くの知見を必要とする。そのため、医療用プラズマ装置の実用化に向けては、特別な知識なしに使用可能なプラズマ装置が開発される事が望まれる。また、本手法では明らかにする事ができなかった、プラズマのガス温度と殺菌能の関係がガス種によって異なる事、プラズマによる血液凝固および細胞中へのタンパク質やDNAが導入できるメカニズムについてはさらに調べる必要がある。

このように本研究で得られた大気圧低温プラズマのガス温度およびガス種に関する知見は、医療分野に限らず、生命科学など幅広い分野への応用が期待できる。

## 謝辞

本研究は東京工業大学大学院総合理工学研究科創造エネルギー専攻沖野研究室において行われたものです。研究の遂行にあたり、数多くの方々にご指導、ご協力をいただき、ここに博士論文として完成させることができました。末尾となりましたが、ご協力いただいた皆様に、この場を借りて御礼申し上げます。

まず、本研究を進めるにあたり、多大なるご指導およびご助言を頂きました科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 准教授 沖野晃俊先生に心より感謝申し上げます。入学して間もない頃より、国内外の学会だけでなく、私が興味を持ったセミナーにも快く参加させていただいたことで、非常に多くの貴重な経験ができました。実験に関しましても、何でもやらせていただけたお陰で、一時期を除き存分に行うことができました。学会や書類の締切前には日本語、英語問わず文章の書き方が拙い私に、丁寧かつ的確なご指導していただきました。沖野先生をはじめとした共著者の皆様のお陰で、入学当初よりは文章を書く力が上達し、ここに本論文を完成させることができました。ここに深く感謝いたします。

科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 特任准教授、株式会社プラズマコンセプト東京代表取締役社長 宮原秀一先生に心より感謝申し上げます。研究の遂行だけでなく、仕事の進め方や物事の考え方など様々なことを優しく、厳しくご指導していただきました。宮原先生の確かな知識に裏付けされた奇抜な発想から刺激を受け、自分の視野の狭さや頭の固さに気が付かされることも多々ありました。また、後半は宮原先生の本気を拝見でき、非常に多くの貴重な経験ができました。ここに深く感謝いたします。

元 神戸大学大学院医学研究科 教授 故 東健先生に心より感謝申し上げます。内視鏡に関する研究は東先生のご協力なしには成し得ませんでした。東先生の厳しいご意見から医療機器製作のハードルの高さを認知するとともに、大きなやり甲斐を感じることができました。ここに深く感謝いたします。

学位審査にあたり、本学工学院 教授 岡村哲至先生、同学院 教授 奥野喜裕先生、同大学科学技術創成研究院 准教授 松本義久先生、同研究院 佐藤千明先生には審査員を御担当いただき、たくさんのご助言をいただきましたお陰で本論文を完成させることができました。ここに深く感謝いたします。

鳥取大学 農学部動物医療センター 准教授 伊藤典彦先生に心より感謝申し上げます。伊藤先生のご指導とご協力のお陰で、獣医学分野の知見を得ることができ、本論文の作成に関わる実験のみならず、多くの貴重な経験ができました。伊藤先生の研究への想いは誰よりも熱く、プロフェッ

シヨナルの方々と研究をすることの楽しさに気付くことができました。ここに深く感謝いたします。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 教授 岩澤篤郎先生に心より感謝申し上げます。本論文の執筆に欠かせない殺菌実験は、岩澤先生の丁寧なご指導やご協力なしでは決して遂行することができませんでした。また、本論文の審査員もご担当いただき、ご助言をくださりました。ここに深く感謝いたします。

神戸芸術工科大学 教授 大田先生に心より感謝申し上げます。3D プリンタによる各種装置の製作にご助力頂きました。大田先生のご講演では、芸術工学という分野に関する知見を得ることができました。ここに深く感謝いたします。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 講師 松村有里子先生に心より感謝申し上げます。活性種の測定実験をはじめとして、実験の考察から論文の添削まで、幅広くご指導していただきました。本論文の大部分は岩澤先生と松村先生のお力添えのお陰で作成することができたと思っています。ここに深く感謝いたします。

株式会社藤製作所 社長 藤澤信幸氏に心より感謝申し上げます。仲西さんとともに、プラズマ装置の製作および多くの面でご支援いただきました。お二人の厳しくも温かいご意見のお陰で、製品化を強く意識して研究をすることができました。ここに深く感謝いたします。

神戸大学大学院医学研究科学術研究員 兼 沖野研究室研究員の高松利寛博士に深く感謝いたします。入学当初より、プラズマ医療に関する知識や実験の進め方などたくさんのご指導していただきました。晴れ舞台の直前にもかかわらず、全力でサポートしてくださる高松さんの姿勢を、今後もずっと見習いたいと思います。沖野研究室のオブザーバーとして助けてくださる高松さんの存在は大変心強かったです。いつかこの御恩をお返しさせてください。ここに深く感謝いたします。

神戸大学大学院医学研究科 野村雄大先生、黒澤学先生、迫智也先生に深く感謝いたします。動物実験の際には長時間に渡る施術をしていただきました。皆様のご協力なしには、動物実験をすることができませんでした。ここに深く感謝いたします。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 主席研究官 光原一郎博士に深く感謝いたします。光原さん自ら運転して遠方までの実験装置の運搬や実験のサポートをしていただきました。柳川さんとの掛け合いを聞いていると、とても和やかな気持ちで実験をすることができました。心より感謝いたします。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 特別研究員 柳川由紀博士に深く感謝いたします。いつもわざわざ遠方までお供を携えて来ていただきました。冬の寒い日にはみんなでどうにか元気つけた結果得られたと思うと感慨深いものがあります。柳川さんのお陰で植物細胞という分野に触れることができ、まだまだ初歩的ではありますが、普通にしていたら決して身に付かない分野の知見を得ることができました。そして、ドジョウのかわいらしさにも気付くことができました。心より感謝いたします。

本学 技術部 すずかけ台設計工作部門 山本典彦氏に深く感謝いたします。山本さんの高い工作技術と熱心なご協力のお陰で、本研究に欠かせないプラズマ装置の製作や実験装置の改良を行うことができました。また、難しい工作依頼をした際には、突き放すことなく、すずかけ台設計工作部門の皆様が積極的に助言をくださったお陰で成し得た実験も少なくありません。心より感謝いたします。

沖野研究室秘書の大関杏子さんに深く感謝いたします。入学当初は発注や旅費申請など大変お世話になりました。プラ研の担当に変わられてからは、直接関わるのが少なくなりましたが、仕事ができる人というのはどういう人なのか学ばせていただきました。また、お手伝いした際の感謝(報酬)の重要性も学ばせていただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室秘書の村上奈津子さんに深く感謝いたします。昨年度からの 2 年間、非常に多くの頼み事をしてしまいましたが、何時も快く引き受けてくださるお陰でとても円滑に研究を進めることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室元秘書の河合富美さんに深く感謝いたします。プラ研の担当ということで直接関わる機会はありませんでしたが、プリンターと闘ったときなど、たまにお話できて楽しかったです。本当にありがとうございました。

沖野研究室元秘書の上井陽子さんに深く感謝いたします。発注や出張申請でたくさんのご迷惑をおかけしましたが、嫌な顔ひとつせず、対応してくださりました。上井さんのお陰で円滑な研究生生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の大下貴也博士(現在、積水化学工業株式会社)に深く感謝いたします。鋼のメンタルとロジカルかつスピーディーな行動によって完璧に業務をこなす大下さんには、入学より 1 年間、研究の計画の立て方や進め方、発表の仕方など多くのことをご指導していただきました。ご卒業後も実験や学会、プライベートで関わる機会が多く、その度に実力の差を痛感し、禪を締めなおすことができました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生の渡辺洋輔氏(現在、日機装株式会社)に深く感謝いたします。毎日のように実験をしているにも関わらず、書類などの作成を遅らせることもなく、さらにはバイトもする渡辺さんの要領の良さをいつも見習っていました。休日には草野球に誘ってくださるなどプライベートでもお世話になりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の佐々木洋太氏(現在、ユニカミノルタ株式会社)に深く感謝いたします。どんなときでも親身になって相談に乗ってくださる佐々木さんのおかげで、多くの実験に関する疑問点を解決することができました。その姿はご卒業後も変わらず、就職活動ではお世話になりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の宇都宮嘉孝氏(現在、スズキ株式会社)に深く感謝いたします。研究では直接関わることはありませんでしたが、テニスや卓球などで宇都宮さんと真剣に打ち合った日々は

いい思い出です。また、宇都宮さんはお酒に造詣が深くたくさんの美味しいお酒を教えていただきました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の石原由紀子女史(現在、関西電力株式会社)に深く感謝いたします。石原さんのきっちり仕事をこなす姿を尊敬していました。石原さんのポスターやプレゼンは内容が多いにもかかわらず、理解しやすく、自分の発表をするうえでとても参考になりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の掛川賢博士(現在、株式会社日立ハイテクサイエンス)に深く感謝いたします。研究では発光分光測定の仕事だけでなく、工場長の異名を持つ掛川さんには多くの工作に関するご指導もしていただきました。また、進学・修了関連についてたくさんの相談に乗っていただきました。掛川さんが残してくださった資料のお陰でスムーズに修了の書類を作成することができました。また、頂いたテニスラケットがいいのかテニスも上達しました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の井上裕貴氏(現在、イーグル工業株式会社)に深く感謝いたします。学会発表にむけた発表練習の際には夜遅くまでご指導していただきありがとうございました。また、先日は秋の京都観光にもお供いただきありがとうございました。とてもいいオバショットが撮れました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の小林智裕氏(現在、住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。小林くんの常識破りな発想にはいつも驚かされるとともに、自分の固定概念に気づかせてもらえました。小林くんの仕事内容が私の研究内容に近いこともあり、情報やアドバイスを頂けたことは本論文の一助となっています。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の鎗柄直人氏(現在、住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。業界知識に長け、進路相談にも親身になって乗っていただきました。また、コツコツと研究を進め、着実に結果を出したり、雨に打たれないように徹底したりするなど一度決めたことを貫き通す姿にいつも刺激を受けていました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の堂山英之氏(現在、住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。温度制御に関わる実験では多くのご協力をしていただきました。いろいろとありましたが、堂山くんの力無しには、本論文の核であるマルチガス温度制御プラズマ装置は完成してなかったと思います。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の菅原修馬氏(現在、日立建機株式会社)に深く感謝いたします。普段は重要な書類の提出を忘れていたりする菅原くんでしたが、研究に対する誠実さには感心するとともに、実験を手伝ってもらう際には大きな助力となりました。本当にありがとうございました。

沖野研究室卒業生の細田駿介氏(現在、川崎重工業株式会社)に深く感謝いたします。研究で直接関わることはありませんでしたが、高い意識やコツコツと実験をする姿には刺激を受けていました。細田くんが掃除したあとの実験室はとても快適で、いいデータが取れた気がします。本当にあ

りがとうございました。

沖野研究室卒業生の阿部哲也氏(現在, 東工大 安岡・竹内研究室)に深く感謝いたします。研究で直接関わることはありませんでしたが, 何気ない会話している際にところどころみせる”こだわり”にはよく衝撃を受けていました。私は何もしないと色白なので, 阿部くんの日焼け方法を春に実践してみたいとは思いますが, たぶんしません。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士 3 年の相田真里女史に深く感謝いたします。研究内容は全く違ったものの, 研究に必要な多くのことを学ばせてもらいました。新しい研究内容でも臆せず, 熱心に実験に取り組む姿勢や行動力にはいつも感化されていました。また, 授業課題や文章作成, 業務連絡などの事務作業も持ち前の集中力で一気に終わらせる姿勢は今後も見習っていきたいと思います。本当にありがとうございました。

沖野研究室博士 3 年の三宅智子女史に深く感謝いたします。沖野研にはいない生物系の出身ということで様々な助言を頂きました。特に細胞に関しては何度聞いてもなかなか頭に入らず, お手数をおかけしました。三宅さんからの丁寧なアドバイスのお陰で, 最近ようやく細胞に関する知識を取り込むことができるようになり, 本論文にも記述することができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士 2 年の小笠原大介氏に深く感謝いたします。当研究室には稀な化学屋さんとのこともあり, 本論文に欠かせない反応式に関する助言を頂きました。また, 後輩の面倒見がとてよく, 私から教えることが少なくなり, その分他の作業に取り組むことができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士 2 年の林悠太氏に深く感謝いたします。はじめは控えめであまり頼りない印象がありましたが, 今となっては自分の意見ははっきりといい, 実験も計画からセットアップまでしっかりとバックグラウンドを理解して行ってくれる印象があります。電力測定に関しては右に出るものはおらず, みんなへの指導を安心して任せることができました。本論文の執筆に関しても, 林くんに見てもらったお陰で, ブラッシュアップできました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士 2 年の細田順平氏に深く感謝いたします。とても真面目で, 実験が好きな順平くんのお陰で, 常にケースいっばいに寒天培地があり, 実験をスムーズに行うことができました。また, はじめはとて実験を一人でさせられませんでした, 最近では一人でも安定した結果を出せるようになってくれました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士 1 年の岡本悠生氏に深く感謝いたします。直接研究で関わることはありませんでしたが, 研究室生活にかかせない食料調達を行っていただきました。景気が良いのか今年は回転が異常に早く, バリエティに富んだ品揃えのおかげで, 快適に研究生生活を送れました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士 1 年の河野聡史氏に深く感謝いたします。河野くんには同じ実験室を使うからと

いう大義名分の下、かなり多くの雑務をこなしてもらいました。頼んだらやってくれる河野くんに甘えてしまったことを反省するとともにここに深く感謝いたします。

沖野研究室修士 1 年の末永祐磨氏に深く感謝いたします。とても堅実に研究を進める末永くんのお陰で、すでに自分の手元を離れて実験が進んでいます。本論文を執筆する際には、非常に多くの助力をいただき、執筆に専念することができました。また、息抜きのテニスも上達してきました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室学部 4 年の馬場美岬女史に深く感謝いたします。とても真面目に情報を取り込み、研究を進めてくれたおかげで、本論文にかかせないデータを得ることができました。また、全力で自分のしたいことを追い求める姿には、とても刺激を受けました。本当にありがとうございました。

沖野研究室学部 4 年の守屋翔平氏に深く感謝いたします。ためいきと文句を吐きながらも、異常なデザイン力と身体が付いてこられないほどのバイタリティを発揮してくれたおかげで、極太短小どんぐりだけでなく、多くの実験装置の製作や改良をすることができました。本当にありがとうございました。

最後に、様々な面で支えてくださいました友人をはじめ、先生方や先輩方、後輩たち、そして何より家族に厚く御礼申し上げます。

2018 年 3 月

川野 浩明

## 参考文献

- [1] 大辞林, “心頭滅却すれば火もまた涼し”, 6th ed., 三省堂 (1989).
- [2] 鍋谷欣市, “がんと免疫とこころ”, *W'waves*, 4, pp. 15–17 (1998).
- [3] S. NAKANO, “Clinical evaluation : Points of problems on placebo.”, *Rinsho yakuri/Japanese J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 26, pp. 611–615 (1995).
- [4] 伊藤泰雅, “口腔衛生と口腔内細菌”, *耳鼻咽喉科展望*, 45, pp. 226–234 (2002).
- [5] I. E. Commission, “国際電気標準会議 技術報告書(IEC60479-1)” (2005).
- [6] 大江一行, “プラズマエレクトロニクス”, オーム社 (2000).
- [7] 飯島徹穂, 近藤信一, “はじめてのプラズマ技術”, 工業調査会 (2011).
- [8] 北野勝久, 谷口和成, 酒井道, 高木浩一, 浪平隆男, 服部邦彦, “4.大気圧プラズマを点けてみよう”, *J. Plasma Fusion Res.*, 84, pp. 19–28 (2008).
- [9] T. NOZAKI and K. OKAZAKI, “Application of Atmospheric-Pressure Glow Plasma: Advanced Carbon-Based Materials Processing in Atmospheric-Pressure Glow Discharge”, *J. Plasma Fusion Res.*, 79, pp. 1016–1021 (2003).
- [10] 松下宗生, 片岡時彦, 池田倫正, 遠藤 茂, “プラズマ・アークハイブリッド溶接技術の開発”, *溶接学会論文集*, 30, pp. 77–85 (2012).
- [11] 東康夫, 鈴木富雄, 清水由章, 山田基夫, “都市ごみ焼却灰のプラズマ熔融特性”, *廃棄物学会論文集*, 7, pp. 193–201 (1996).
- [12] M. KOGOMA, “Advanced technology for surface treatment and CVD coating with atmospheric pressure plasma”, *J. Surf. Finish. Soc. Japan*, 58, pp. 779–784 (2007).
- [13] H. MURAKAMI, H. NAGAI, T. IROKAWA, T. YOSHIDA and K. AKASHI, “Super High Rate Thermal Plasma CVD of Ceramics”, *J. Ceram. Soc. Japan*, 97, pp. 49–55 (1989).
- [14] N. Kodama, Y. Tanaka, K. Kita, Y. Ishisaka, Y. Uesugi, T. Ishijima, S. Sueyasu and K. Nakamura, “Spatiotemporal distribution of thermal plasma temperature and precursor formation in a torch during TiO<sub>2</sub> nanopowder synthesis”, *Plasma Sources Sci. Technol.*, 26, p. 75008 (2017).
- [15] B. R. Locke and C. Republic, “Electrohydraulic Discharge and Nonthermal Plasma for Water Treatment”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, pp. 882–905 (2006).
- [16] H. Yabuta, H. Miyahara, M. Watanabe, E. Hotta and A. Okino, “Design and evaluation of dual inlet ICP torch for low gas consumption”, *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, pp. 1090–1095 (2002).
- [17] Y. Kaburaki, A. Nomura, Y. Ishihara, T. Iwai, H. Miyahara and A. Okino, “Development of Injection Gas Heating System for Introducing Large Droplets to Inductively Coupled Plasma”,

- Anal. Sci.*, 29, pp. 1147–1151 (2013).
- [18] S. Okazaki, M. Kogoma, M. Uehara and Y. Kimura, “Appearance of stable glow discharge in air, argon, oxygen and nitrogen at atmospheric pressure using a 50 Hz source”, *J Phys D Appl Phys*, 26, pp. 889–892 (1993).
- [19] 清水雅樹, 佐藤徹, 加藤昭二, 向川政治, 高木浩一, 藤原 民也, “誘電体バリア放電方式オゾナイザの電極形状による高効率化”, *電気学会論文誌 A, 基礎・材料・共通部門誌*, 125, pp. 501–507 (2005).
- [20] G. Borcia, C. a Anderson and N. M. D. Brown, “Dielectric barrier discharge for surface treatment: application to selected polymers in film and fibre form”, *Plasma Sources Sci. Technol.*, 12, pp. 335–344 (2003).
- [21] K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel, C. Wilke, R. Brandenburg, K. D. Weltmann and T. Von Woedtke, “Estimation of possible mechanisms of escherichia coli inactivation by plasma treated sodium chloride solution”, *Plasma Process. Polym.*, 8, pp. 904–913 (2011).
- [22] T. Oshita, H. Kawano, T. Takamatsu, H. Miyahara and A. Okino, “Temperature Controllable Atmospheric Plasma Source”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 43, pp. 1987–1992 (2015).
- [23] J. Shi, F. Zhong, J. Zhang, D. W. Liu and M. G. Kong, “A hypersonic plasma bullet train traveling in an atmospheric dielectric-barrier discharge jet”, *Phys. Plasmas*, 15, p. 13504 (2008).
- [24] T. Takamatsu, H. Hirai, R. Sasaki, H. Miyahara and A. Okino, “Surface hydrophilization of polyimide films using atmospheric damage-free multigas plasma jet source”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 41, pp. 119–125 (2013).
- [25] D. B. Graves, “The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 45, p. 263001 (2012).
- [26] T. Von Woedtke, H. R. Metelmann and K. D. Weltmann, “Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma”, *Contrib. to Plasma Phys.*, 54, pp. 104–117 (2014).
- [27] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman, “Applied plasma medicine”, *Plasma Process. Polym.*, 5, pp. 503–533 (2008).
- [28] S. Hofmann, A. F. H. van Gessel, T. Verreycken and P. Bruggeman, “Power dissipation, gas temperatures and electron densities of cold atmospheric pressure helium and argon RF plasma jets”, *Plasma Sources Sci. Technol.*, 20, p. 65010 (2011).
- [29] D. P. Park, K. Davis, S. Gilani, C.-A. Alonzo, D. Dobrynin, G. Friedman, A. Fridman, A. Rabinovich and G. Fridman, “Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium

- plasma increase plant growth rate and nutritional yield”, *Curr. Appl. Phys.*, 13, pp. S19–S29 (2013).
- [30] 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.*, 4, pp. 39901–39905 (2014).
- [31] 大下貴也, “温度制御プラズマ装置の開発と殺菌および表面処理への応用に関する研究”, 学位論文 (東京工業大学) (2015).
- [32] 一般社団法人日本医療機器学会, “医療現場における滅菌保証のガイドライン 2015” (2015).
- [33] 水野彰, 朽久保文嘉, 内田諭, 小田昭紀, 高木浩一, 林信哉, “大気圧プラズマを点けてみよう: 2. 大気圧プラズマを学ぼう”, *プラズマ・核融合学会誌*, 83, pp. 913–919 (2007).
- [34] 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議, “薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020” (2016).
- [35] J. Okpara-Hofmann, M. Knoll, M. Dürr, B. Schmitt and M. Borneff-Lipp, “Comparison of low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization for endoscopes using various Sterrad™ models”, *J. Hosp. Infect.*, 59, pp. 280–285 (2005).
- [36] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian and L. Yahia, “Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms”, *Int. J. Pharm.*, 226, pp. 1–21 (2001).
- [37] N. O’Connor, O. Cahill, S. Daniels, S. Galvin and H. Humphreys, “Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections?”, *J. Hosp. Infect.*, 88, pp. 59–65 (2014).
- [38] C. a J. van Gils, S. Hofmann, B. K. H. L. Boekema, R. Brandenburg and P. J. Bruggeman, “Mechanisms of bacterial inactivation in the liquid phase induced by a remote RF cold atmospheric pressure plasma jet”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 46, p. 175203 (2013).
- [39] A. Von Keudell, P. Awakowicz, J. Benedikt, V. Raballand, A. Yanguas-Gil, J. Opretzka, C. Flötgen, R. Reuter, L. Byelykh, H. Halfmann, K. Stapelmann, B. Denis, J. Wunderlich, P. Muranyi *et al.*, “Inactivation of bacteria and biomolecules by low-pressure plasma discharges”, *Plasma Process. Polym.*, 7, pp. 327–352 (2010).
- [40] G. Daeschlein, T. von Woedtke, E. Kindel, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann and M. Jünger, “Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment”, *Plasma Process. Polym.*, 7, pp. 224–230 (2010).
- [41] J. Winter, K. Wende, K. Masur, S. Iseni, M. Dünnbier, M. U. Hammer, H. Tresp, K.-D.

- Weltmann and S. Reuter, “Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 46, p. 295401 (2013).
- [42] C. Chen, D. Liu, A. Yang, H.-L. Chen and M. G. Kong, “Aqueous Reactive Oxygen Species Induced by He + O<sub>2</sub> Plasmas: Chemistry Pathways and Dosage Control Approaches”, *Plasma Chem. Plasma Process.*, pp. 1–17 (2017).
- [43] S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi, “Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application”, *Plasma Process. Polym.*, 7, pp. 33–42 (2010).
- [44] M. Laroussi and F. Leipold, “Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure”, *Int. J. Mass Spectrom.*, 233, pp. 81–86 (2004).
- [45] A. A. Ionin, I. V Kochetov, A. P. Napartovich and N. N. Yuryshev, “Physics and engineering of singlet delta oxygen production in low-temperature plasma”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 40, pp. R25–R61 (2007).
- [46] K. Ishiyama, K. Nakamura, H. Ikai, T. Kanno, M. Kohno, K. Sasaki and Y. Niwano, “Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents”, *PLoS One*, 7, pp. 1–5 (2012).
- [47] M. Naitali, G. Kamgang-Youbi, J.-M. Herry, M.-N. Bellon-Fontaine and J.-L. Brisset, “Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, pp. 7662–7664 (2010).
- [48] S. Mohades, M. Laroussi, J. Sears, N. Barekzi and H. Razavi, “Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells”, *Phys. Plasmas*, 22, p. 122001 (2015).
- [49] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima and K. Kitano, “Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 49, p. 425401 (2016).
- [50] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito and M. Hori, “Nonequilibrium atmospheric pressure plasma with ultrahigh electron density and high performance for glass surface cleaning”, *Appl. Phys. Lett.*, 92, p. 81503 (2008).
- [51] R. Sensenig, S. Kalghatgi, E. Cerchar, G. Fridman, A. Shereshevsky, B. Torabi, K. P. Arjunan, E. Podolsky, A. Fridman, G. Friedman, J. Azizkhan-Clifford and A. D. Brooks, “RETRACTED ARTICLE: Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species”, *Ann. Biomed. Eng.*, 39, pp. 674–687 (2011).
- [52] S. Iseki, K. Nakamura, M. Hayashi, H. Tanaka, H. Kondo, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa

- and M. Hori, “Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma”, *Appl. Phys. Lett.*, 100, p. 113702 (2012).
- [53] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori, “Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase”, *Plasma Med.*, 1, pp. 265–277 (2011).
- [54] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kajiyama, F. Utsumi, F. Kikkawa and M. Hori, “Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer’s solution for anti-tumor effects”, *Sci. Rep.*, 6, p. 36282 (2016).
- [55] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J.-M. Pouvesle and A. Le Pape, “ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma”, *Int. J. Cancer*, 130, pp. 2185–2194 (2012).
- [56] D. Friedrichs, J. Gilbert and J. Sartor, “New bipolar and hybrid Argon Plasma Coagulation technologies enable improved electrosurgical results” in *2013 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)2013*, 55, pp. 386–389.
- [57] G. G. Ginsberg, A. N. Barkun, J. J. Bosco, J. S. Burdick, G. A. Isenberg, N. L. Nakao, B. T. Petersen, W. B. Silverman, A. Slivka and P. B. Kelsey, “The argon plasma coagulator February 2002”, *Gastrointest. Endosc.*, 55, pp. 807–810 (2002).
- [58] G. Fridman, M. Peddinghaus, H. Ayan, A. Fridman, M. Balasubramanian, A. Gutsol, A. Brooks and G. Friedman, “Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air”, *Plasma Chem. Plasma Process.*, 26, pp. 425–442 (2006).
- [59] 筒井千尋, 平田孝道, 小町俊文, 岸本拓巳, 森晃, 秋谷昌宏, 山本俊昭, 田口亮, “マイクロスポット大気圧プラズマ源による細胞および生体組織の活性化”, *静電気学会誌*, 35, pp. 20–24 (2011).
- [60] C. Tsutsui, M. Lee, G. Takahashi, S. Murata, T. Hirata, T. Kanai and A. Mori, “Treatment of cardiac disease by inhalation of atmospheric pressure plasma”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, p. 60309 (2014).
- [61] S. Kalghatgi, G. Fridman, G. Nagaraj, M. Cooper, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. Vasilets, A. Gutsol, A. Fridman and G. Friedman, “Mechanism of blood coagulation by non-thermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge”, *PPPS-2007 - Pulsed Power Plasma Sci. 2007*, 2, pp. 1058–1063 (2007).
- [62] C. Yubero, M. D. Calzada and M. C. Garcia, “Using the Stark Broadening of the  $H_{\alpha}$ ,  $H_{\beta}$  and  $H_{\gamma}$  Lines for the Measurement of Electron Density and Temperature in a Plasma at Atmospheric Pressure”, *J. Phys. Soc. Japan*, 74, pp. 2249–2254 (2005).

- [63] J. Gou, Y. Xian and X. Lu, “Low-temperature, high-density plasmas in long micro-tubes”, *Phys. Plasmas*, 23, p. 53508 (2016).
- [64] M. Moselhy, I. Petzenhauser, K. Frank and K. H. Schoenbach, “Excimer emission from microhollow cathode argon discharges”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 36, p. 2922 (2003).
- [65] M. H. Lee, B. J. Park, S. C. Jin, D. Kim, L. Han, J. Kim, S. O. Hyun, K. H. Chung and J. C. Park, “Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure”, *New J. Phys.*, 11, p. 115022 (2009).
- [66] 永津雅章, “高密度プラズマの医療分野への応用(<特集>高密度プラズマとその応用技術の最前線)”, *精密工学会誌*, 73, pp. 988–992 (2007).
- [67] X. Deng, J. Shi and M. Kong, “Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 34, pp. 1310–1316 (2006).
- [68] X. Lu, T. Ye, Y. Cao, Z. Sun, Q. Xiong, Z. Tang, Z. Xiong, J. Hu, Z. Jiang and Y. Pan, “The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria”, *J. Appl. Phys.*, 104, pp. 1–5 (2008).
- [69] V. V. Kovačević, B. P. Dojčinović, M. Jović, G. M. Roglič, B. M. Obradović and M. M. Kuraica, “Measurement of reactive species generated by dielectric barrier discharge in direct contact with water in different atmospheres”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 50, p. 155205 (2017).
- [70] R. Ono and T. Oda, “Measurement of hydroxyl radicals in pulsed corona discharge”, *J. Electrostat.*, 55, pp. 333–342 (2002).
- [71] K. Nakamura, T. Kanno, H. Ikai, E. Sato, T. Mokudai, Y. Niwano, T. Ozawa and M. Kohno, “Reevaluation of Quantitative ESR Spin Trapping Analysis of Hydroxyl Radical by Applying Sonolysis of Water as a Model System”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 83, pp. 1037–1046 (2010).
- [72] M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta and T. Yoshikawa, “Spin-Trapping Studies on the Reaction of Iron Complexes with Peroxides and the Effects of Water-Soluble Antioxidants”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, pp. 1447–1453 (1991).
- [73] J. Oh, E. J. Szili, N. Gaur, S. Hong, H. Furuta, R. D. Short and A. Hatta, “In-situ UV Absorption Spectroscopy for Monitoring Transport of Plasma Reactive Species through Agarose as Surrogate for Tissue”, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 28, pp. 439–444 (2015).
- [74] A. Yamatake, J. Fletcher, K. Yasuoka and S. Ishii, “Water treatment by fast oxygen radical flow with dc-driven microhollow cathode discharge”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 34, pp. 1375–1381 (2006).
- [75] 河野雅弘, 吉川敏一, 小沢俊彦, “生命科学者のための電子スピン共鳴入門”, 講談社 (2011).

- [76] Y. Matsumura, A. Iwasawa, T. Kobayashi, T. Kamachi, T. Ozawa and M. Kohno, “Detection of High-frequency Ultrasound-induced Singlet Oxygen by the ESR Spin-trapping Method”, *Chem. Lett.*, 42, pp. 1291–1293 (2013).
- [77] H. Ikai, K. Nakamura, T. Kanno, M. Shirato, L. Meirelles, K. Sasaki and Y. Niwano, “Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.”, *Biocontrol Sci.*, 18, pp. 137–141 (2013).
- [78] E. Karakas, M. Koklu and M. Laroussi, “Correlation between helium mole fraction and plasma bullet propagation in low temperature plasma jets”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 43, p. 155202 (2010).
- [79] W. Bian, X. Song, D. Liu, J. Zhang and X. Chen, “Actions of nitrogen plasma in the 4-chlorophenol degradation by pulsed high-voltage discharge with bubbling gas”, *Chem. Eng. J.*, 219, pp. 385–394 (2013).
- [80] D. X. Liu, M. Z. Rong, X. H. Wang, F. Iza, M. G. Kong and P. Bruggeman, “Main species and physicochemical processes in cold atmospheric-pressure He + O<sub>2</sub> Plasmas”, *Plasma Process. Polym.*, 7, pp. 846–865 (2010).
- [81] T. Takamatsu, A. Kawate, K. Uehara, T. Oshita, H. Miyahara, D. Dobrynin, G. Fridman and A. Fridman, “Bacterial Inactivation in Liquids Using Multi- Gas Plasmas”, *Plasma Med.*, 2, pp. 237–247 (2012).
- [82] T. Takamatsu, K. Uehara, Y. Sasaki, M. Hidekazu, Y. Matsumura, A. Iwasawa, N. Ito, M. Kohno, T. Azuma and A. Okino, “Microbial inactivation in the liquid phase induced by multigas plasma jet”, *PLoS One*, 10, p. e0132381 (2015).
- [83] S. Fathollah, S. Mirpour, P. Mansouri, A. R. Dehpour, M. Ghoranneviss, N. Rahimi, Z. Safaie Naraghi, R. Chalangari and K. M. Chalangari, “Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats.”, *Sci. Rep.*, 6, p. 19144 (2016).
- [84] 高松利寛, “微生物の不活化および生体作用に対するプラズマガス種の影響に関する研究”, 学位論文 (東京工業大学) (2014).
- [85] M. A. J. Rodgers and P. T. Snowden, “Lifetime of oxygen in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements”, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, pp. 5541–5543 (1982).
- [86] R. M. Badger, A. C. Wright and R. F. Whitlock, “Absolute Intensities of the Discrete and Continuous Absorption Bands of Oxygen Gas at 1.26 and 1.065  $\mu$  and the Radiative Lifetime of the 1  $\Delta$  g State of Oxygen”, *J. Chem. Phys.*, 43, pp. 4345–4350 (1965).
- [87] T. A. Kovacs and W. H. Brune, “Total OH loss rate measurement”, *J. Atmos. Chem.*, 39, pp. 105–122 (2001).
- [88] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano,

- M. Hori and F. Kikkawa, “Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo”, *PLoS One*, 8, p. e81476 (2013).
- [89] A. Tani, Y. Ono, S. Fukui, S. Ikawa and K. Kitano, “Free radicals induced in aqueous solution by non-contact atmospheric-pressure cold plasma”, *Appl. Phys. Lett.*, 100, p. 254103 (2012).
- [90] M. D. Sobsey, “Inactivation of Health Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes”, *Water Sci. Technol.*, 2, pp. 179–195 (1989).
- [91] 稲邊富實代, 高谷典秀, 場集田寿, 丹沢正也, 小菅友子, 福地久和, 堀口実, 高谷純司, 高谷雅史, “正常眼圧緑内障早期発見を目的としたFrequency Doubling Technology視野計の予防医療導入の検討”, *人間ドック (Ningen Dock)*, 24, pp. 681–688 (2009).
- [92] A. K. Junk, P. P. Chen, S. C. Lin, K. Nouri-Mahdavi, S. Radhakrishnan, K. Singh and T. C. Chen, “Disinfection of Tonometers”, *Ophthalmology*, 124, pp. 1867–1875 (2017).
- [93] R. A. Rosenthal, S. V. W. Sutton and B. A. Schleich, “Review of standard for evaluating the effectiveness of contact lens disinfectants.”, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 56, pp. 37–50 (2002).
- [94] Q. Wei and L. Z. Ma, “Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, pp. 20983–21005 (2013).
- [95] S. Ikehara, H. Sakakita, K. Ishikawa, Y. Akimoto, T. Yamaguchi, M. Yamagishi, J. Kim, M. Ueda, J. I. Ikeda, H. Nakanishi, N. Shimizu, M. Hori and Y. Ikehara, “Plasma Blood Coagulation Without Involving the Activation of Platelets and Coagulation Factors”, *Plasma Process. Polym.*, 12, pp. 1348–1353 (2015).
- [96] C. Y. Chen, H. W. Fan, S. P. Kuo, J. Chang, T. Pedersen, T. J. Mills and C. C. Huang, “Blood clotting by low-temperature air plasma”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 37, pp. 993–999 (2009).
- [97] M. Hoffmann, A. Ulrich, J. K. Habermann, R. Bouchard, T. Laubert, H.-P. Bruch, T. Keck and E. Schloericke, “Cold-Plasma Coagulation on the Surface of the Small Bowel Is Safe in Pigs”, *Surg. Innov.*, 23, pp. 7–13 (2016).
- [98] Y. Nomura, T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, T. Azuma and A. Okino, “Investigation of blood coagulation effect of non-thermal multi-gas plasma jet on in vitro and in vivo for endoscopic use”, *J. Surg. Res.*, 219, pp. 302–309 (2017).
- [99] 齋藤英彦, “図解 血栓・止血・血管学-血栓症制圧のために-”, 中外医学社 (2005).
- [100] P. Bruggeman and C. Leys, “Non-thermal plasmas in and in contact with liquids”, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 42, p. 53001 (2009).
- [101] G. C. Y. Chan, J. T. Shelley, J. S. Wiley, C. Engelhard, A. U. Jackson, R. G. Cooks and G. M. Hieftje, “Elucidation of reaction mechanisms responsible for afterglow and reagent-ion formation

- in the low-temperature plasma probe ambient ionization source”, *Anal. Chem.*, 83, pp. 3675–3686 (2011).
- [102] T. Iwai, A. Albert, K. Okumura and H. Miyahara, “Fundamental properties of a non-destructive atmospheric-pressure plasma jet in argon or desorption / ionization source for high-resolution”, *J. Anal. At. Spectrom.*, 29, pp. 464–470 (2014).
- [103] T. Iwai, K. Kakegawa, K. Okumura, M. Kanamori-Kataoka, H. Miyahara, Y. Seto and A. Okino, “Fundamental properties of a touchable high-power pulsed microplasma jet and its application as a desorption/ionization source for ambient mass spectrometry”, *J. Mass Spectrom.*, 49, pp. 522–528 (2014).
- [104] T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, T. Azuma and A. Okino, “Atmospheric nonequilibrium mini-plasma jet created by a 3D printer”, *AIP Adv.*, 5, p. 77184 (2015).
- [105] K. Oehmigen, M. Hähnel, R. Brandenburg, C. Wilke, K. D. Weltmann and T. Von Woedtke, “The role of acidification for antimicrobial activity of atmospheric pressure plasma in liquids”, *Plasma Process. Polym.*, 7, pp. 250–257 (2010).
- [106] G. W. Stevenson, J. A. Wilson, J. Wilkinson, G. Norman and R. L. Goodacre, “Pain following colonoscopy: elimination with carbon dioxide”, *Gastrointest. Endosc.*, 38, pp. 564–567 (1992).
- [107] H. A. Saltzman and H. O. Sieker, “INTESTINAL RESPONSE TO CHANGING GASEOUS ENVIRONMENTS: NORMOBARIC AND HYPERBARIC OBSERVATIONS”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 150, pp. 31–39 (1968).
- [108] A. M. J. Hussein, C. I. Bartram and C. B. Williams, “Carbon dioxide insufflation for more comfortable colonoscopy”, *Gastrointest. Endosc.*, 30, pp. 68–70 (1984).
- [109] W. R. Webb, L. H. Harrison, F. R. Helmcke, A. Camino-Lopez, N. A. Munfakh, H. A. Heck and P. V. Moulder, “Carbon dioxide field flooding minimizes residual intracardiac air after open heart operations”, *Ann. Thorac. Surg.*, 64, pp. 1489–1491 (1997).
- [110] K. L. Skidmore, C. Jones and C. DeWet, “Flooding the surgical field with carbon dioxide during open heart surgery improves segmental wall motion”, *J. Extra. Corpor. Technol.*, 38, pp. 123–127 (2006).
- [111] K. Miyamoto, S. Ikehara, H. Takei, Y. Akimoto, H. Sakakita, K. Ishikawa, M. Ueda, J. Ikeda, M. Yamagishi, J. Kim, T. Yamaguchi, H. Nakanishi, T. Shimizu, N. Shimizu *et al.*, “Red blood cell coagulation induced by low-temperature plasma treatment”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 605, pp. 95–101 (2016).
- [112] Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino and I. Mitsuhashi, “Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet”, *PLoS One*, 12, p. e0171942

- (2017).
- [113] J. Jia, Y. Jin, T. Bian, D. Wu, L. Yang, N. Terada, W. Wu and S. Jin, “Bacterial Delivery of TALEN Proteins for Human Genome Editing”, *PLoS One*, 9, p. e91547 (2014).
  - [114] L. Hasadsri, J. Kreuter, H. Hattori, T. Iwasaki and J. M. George, “Functional Protein Delivery into Neurons Using Polymeric Nanoparticles”, *J. Biol. Chem.*, 284, pp. 6972–6981 (2009).
  - [115] Y. Kondo, K. Fushikida, T. Fujieda, K. Sakai, K. Miyata, F. Kato and M. Kato, “Efficient delivery of antibody into living cells using a novel HVJ envelope vector system”, *J. Immunol. Methods*, 332, pp. 10–17 (2008).
  - [116] H. Tsuji, K. Shimamoto, K. Taoka and H. Washida, “Method for introducing florigen”, 2013–53043, 2013.
  - [117] S. Sasaki, Y. Hokari, A. Kumada, M. Kanzaki and T. Kaneko, “Direct plasma stimuli including electrostimulation and OH radical induce transient increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and uptake of a middle-size membrane-impermeable molecule”, *Plasma Process. Polym.*, p. 1700077 (2017).
  - [118] T. Nakagawa, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo and T. Kimura, “Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation”, *J. Biosci. Bioeng.*, 104, pp. 34–41 (2007).