論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	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
Title(English)	
著者(和文)	高松利寛
Author(English)	Toshihiro Takamatsu
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9523号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:沖野　晃俊,堀田　栄喜,河野　雅弘,松本　義久,赤塚　洋,伊藤　典彦
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9523号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

東京工業大学

博士論文

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

提出者

大学院総合理工学研究科 創造エネルギー専攻

学籍番号 11D55106

氏名 髙松 利寛

指導教員　　沖野 晃俊　准教授

平成 25 年 12 月

目次

第 3 章　ダメージフリーマルチガスプラズマジェットの基礎特性

第 4 章　各ガス種のプラズマによる表面処理

第 5 章　各ガス種のプラズマによる微生物の不活化効果

第 1 章

序論

1.1 はじめに

ハンドボールとはどんなスポーツかご存じであろうか。私は友人にハンドベースボールと間違われた苦い経験があるのだが，ハンドボールとはゴールキーパーが 1 人，コートプレイヤーが 6 人の 7 人で 2 組のチームがボールを相手のゴールに投げ入れて勝負を競う競技である。走・跳・投という運動における基本 3 要素が求められ，さらに激しくぶつかり合う格闘的な要素も含めた総合スポーツであり，それ故ダイナミックなシュートシーンやスピーディーな試合展開が魅力となっている。現在，ハンドボールは五輪競技にもなっており，ヨーロッパでは，サッカーに次ぐ人気を誇る国もある。しかし，日本ではまだマイナースポーツであり，知らない方も多いであろう。実際，日本のサッカーの競技人口は約 110 万人いるのに対し，ハンドボールの競技人口は未だ 20 万人に満たない。

そんな中，宮崎大輔選手の名前を耳にしたことがある方は多いのではないだろうか。2006 年のテレビ番組 スポーツマン No.1 決定戦で総合 No.1 獲得を果たし，メディアでも話題となった，甘いマスクと強靭な身体能力を兼ね備えたハンドボール選手である。彼は，垂直跳び 95 cm という驚異的な跳躍力を武器に，身長 172 cm と小柄でありながら，190 cm を超える相手ディフェンスの上から時速 120 km の強烈なシュートを放つ。考えても見て欲しい。重さ 450 g の球が時速 120 km で打ち出されるのである。プロのキーパーであっても指を骨折することがあると聞いたことがあるが，もし素人が触れれば骨折必至である。

だが，これほど強靭的な肉体を持つ宮崎選手でも怪我に悩まされた時期があり，やはりスポーツを行う際にはあらゆる場面で怪我のリスクがつきまとう。かく言う私も運動中に足を骨折しまい，運悪く手術が必要になってしまったことがある。その際，患部を 5 cm 程切開し，骨同士をボルトで固定したのだが，術後 1 週間は傷が疼き，傷が塞がった後も骨がつくまで全治 1 ヶ月という長い期間の活動が制限されてしまった。このと

きほどファイナルファンタジーに登場する回復アイテム ポーションやドラゴンクエストの回復呪文 ホイミの存在を願ったことはなかったであろう。プロのスポーツ選手でも怪我で手術する話をよく耳にするが，選手生命が有限である以上，治療期間が短いに超したことはない。しかし治療期間は自己治癒力に依存し，この治癒力を向上させる方法は民間療法の域を出ない。それどころか，しかるべき処置を行わなければ，取り返しのつかないことになるケースさえある。

例えば，切開手術の後に必要とされる処置は基本的に抗生物質を服用し，傷口に消毒薬を塗り，患部を清潔に保つことであるが，この処置を怠ると傷口から感染症を引き起こし，治療期間の遅延や合併症，最悪の場合死を招くことさえある。そのため，医療の現場では感染症に対して非常に敏感であり，このような事態を防ぐために，院内の衛生管理や手術器具の滅菌では厳しい規則が設けられ，細心の注意が払われている。また，手術の際には，石鹸や水などは全てフットペダルで操作し，決して汚い部分に手が触れないよう手洗いを行う。

この様子は，チームバチスタの栄光の著者として有名な海堂尊の作品ブラックペアン1988にも描かれている。「身体の中心に汚れを集め，患者に触れる指先だけはとことん清潔に。イソジンをまぶした剛毛で十回こすり上げるのが外科の清潔の標準だ。不潔さを寄せ集める身体の中心部に触れたらアウト。また一から清潔を重ね上げなければならない[1]」彼は現役の医者でもあるため，このように作中に出てくる医療シーンはリアルに描かれ，医療行為を行うことにおいて，殺菌及び防菌が非常に重要な位置付けにいることを物語っている。

現在，殺菌方法としては，高圧蒸気 (オートクレーブ) やエチレンオキサイドガス (EOG: Ethylene Oxide Gas)，電子線，ガンマ線，紫外線などが挙げられる。これらは各種適用できる材質等に制限がある。もちろん非常に強力な殺菌作用があることから，生体に対しても同様の効果を与えてしまい，人体に用いることはできない。そのため，生体の殺菌はしばしば消毒薬が用いられる。しかし，消毒薬は全般に発疹，そう痒などの過敏症状や粘膜や創傷部位への刺激，接触皮膚炎といった副作用を生じることがあり，希釈ミスや長時間の薬液残留が問題となるケースもある。

そこで，処理対象物に無負荷な大気圧プラズマを用いた殺菌技術が注目を集めている。このプラズマ源は構造によって柔軟に用途が使い分けられ，温度の制御や反応性活性種の種類，大面積の殺菌から局所的な殺菌まで自由自在である。また，プラズマにより発生した反応性の高いガスは，殺菌効果のみならず，数多くの生物的効果が見つかり，そ

の中には細胞の増殖能が増加する結果も報告されている。これらの効果を利用すれば，医療応用において，さらに幅広いプラズマの利用が見込める。

こういったことから近年“Plasma Medicine”と呼ばれる分野が新たに立ち上げられ，この高いポテンシャルを持ったプラズマのメカニズムの解明と実用化に向けて努力が成されている。

1.2 本研究の目的

現在，医療応用に向けて多くの大気圧プラズマ源が考案されており，その中でも粘膜組織の焼灼や内視鏡用の凝固装置として用いられるアルゴンプラズマ凝固法 (APC: Argon Plasma Coagulation) や過酸化水素を用いたプラズマ滅菌装置などは実用化に至っている。しかし，これらのプラズマ源は人体に対して大きく損傷を与えてしまうものであり，取り扱いには多くの制限があった。そこで近年では，対象物に熱損傷や放電損傷を与えない大気圧非熱平衡プラズマが注目されている。これはプラズマ中で生成された活性種が生物組織と相互作用することから，殺菌･滅菌，創傷治療，血液凝固，細胞のアポトーシスなどの効果をもたらす。また，残留毒性の無い短寿命な活性種を用いるため，生体へのダメージを最小限に抑えることができ，人体に長時間直接照射が可能である。このように生体応用に優れた特徴を持つため，主に歯科治療，皮膚科治療，創傷治療の分野に集中してその応用研究が進められている。

このプラズマの生成には，高周波やマイクロ波を用いたプラズマ源や誘電体バリヤ放電型，ジェット型など多くのプラズマ源が用いられている。しかしこれらのプラズマ源には生成出来るガス種に制限がある場合や，構造上処理対象物の形状が制約される場合がある。プラズマガスの活性種による化学的な相互作用が効果を及ぼしている以上，プラズマガスを自由に変更することでより良い効果得られる可能性は大いに考えられ，処理対象物に対しても形状に制限がない方が好ましい。

そこで，本研究ではこれらの問題を解決したマルチガスプラズマジェットを用いてバイオ関連材料や各種細菌，生体への照射実験を行い，その効果を詳細に調査した。

1.3 論文の構成

本論文の構成を以下に示す。

第 2 章「大気圧プラズマの医療分野への応用」では，大気圧プラズマの概要と生体への影響，医療応用に向けたプラズマ源，細菌の特徴及び既存の殺菌技術，プラズマ殺菌のメカニズム，細胞死と細胞の評価法について記述する。

第 3 章「マルチガスプラズマジェットの基礎特性」では，本研究のために開発したマルチガスプラズマジェットの装置の構成，温度制御の構成，電流・電圧波形，紫外線量，溶液に対する pH の変化について説明する。

第 4 章「各ガス種のプラズマによる表面処理」では，各ガス種のプラズマ処理による器材の表面親水化効果，細胞の接着性，銅酸化膜還元について報告する。

第 5 章「各ガス種のプラズマによる微生物の不活化効果」では，各ガス種のプラズマによる各細菌，真菌，ウイルスの不活化について報告する。

第 6 章「各ガス種のプラズマによる生体への影響」では，生体へのプラズマ照射の影響について，ガス種，照射距離，プラズマのガス温度の各条件を変化させたときの効果の違いと DNA に対する影響，さらには角膜に対するプラズマ照射の影響について報告する。

第 7 章「各ガス種のプラズマで生成される活性種」では，各測定法によるプラズマの放電部, アフターグロー部, 液中で生成される活性種の同定および定量について報告する。

第 8 章「結論」では，本論文で得られた結果をまとめ，ダメージフリーマルチガスプラズマジェットの医学分野への応用の有効性を示す。

参考文献

[1]　海堂尊，“ブラックペアン 1988”，講談社，(2007)

第 2 章

大気圧プラズマの医療分野への応用

2.1 はじめに

近年，医療や食品加工の現場において，衛生上の問題による人体への影響が多く取り上げられており，殺菌や滅菌の取り組みが改めて重要視されつつある。そのため殺菌・滅菌の対象は医療器具や飲料のみならず，衣服や，部屋の壁や床，人の身体まで広範囲に及ぶようになった。しかし従来からよく使われるオートクレーブやエチレンオキサイドガスを用いた滅菌法は，滅菌の信頼性が高い反面，低温処理の要請や環境面の問題に対応できない。そこで，現在これらに替わる殺菌・滅菌法の模索が行われており，その新たな技術の一つとして，毒性物質を用いず，低温殺菌・滅菌が可能な大気圧非平衡プラズマが期待されている。

また，殺菌・滅菌応用だけでなく，バイオマテリアルの分野や医学分野においても有益な効果が得られており，医療応用に向けたプラズマ源の開発が行われている。その一方で，プラズマによって生成された活性種が，処理対象物や生体組織内でどのような働きを持つかは明らかになっていない部分が多く，プラズマ処理効果のメカニズム解明や，生体への安全性の確保は十分に行われていない。そのため，プラズマの有益な処理効果を生体へと適用するならば，そのメカニズム解明と生体に対する安全性の調査は急務となっている。

2.2 大気圧プラズマ

大気圧プラズマは，アーク放電や誘導結合型プラズマに代表される熱平衡プラズマ(thermal equilibrium plasma)と，コロナ放電や誘電体バリア放電，大気圧プラズマジェットに代表される非熱平衡プラズマ(non-thermal plasma)に大別される[2]。この非熱平衡プラズマは非平衡プラズマとも呼ばれ，ここでは熱平衡プラズマと，非平衡プラズマについて記述する。

2.2.1 熱平衡プラズマ

プラズマは電子，正イオン中性原子を含む電離した気体である。これらの粒子は互いに衝突を繰り返しながら熱運動し，大気圧下においては，空間中に存在する中性粒子の拡散が非常に小さいため，同種および異種の粒子同士が衝突を繰り返し，電子温度(T_e)，イオン温度(T_i)，ガス温度(T_g)が等しい熱平衡の状態となり(T_e=T_i=T_g)，これを熱平衡プラズマ(熱プラズマ)と呼ぶ。

大気圧でプラズマを生成する方法は，大きく分けて電極放電と無電極放電の 2 種類がある[3]。電極放電は，電界によって電極から電子放出やイオン生成が行なわれ，放電がおこりにくい大気圧においても比較的容易にプラズマを安定生成することができる。グロー放電やアーク放電などの直流放電プラズマ(DCP: Direct Current Plasma)や，容量結合プラズマ(CCP: Capacitively Coupled Plasma)は代表的な電極放電として知られている。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。電極を同軸状に配置し，放電をプラズマガスで吹き出す形状にしたものはプラズマジェットと呼ばれる。電流路が集中するため，大気圧中で 10,000 ℃以上の熱プラズマを生成できるが電極が直接触れるためにプラズマ中に電極材料が混入し，予期せぬ二次生成物を発生する可能性がある。これに対し，誘導結合プラズマ(ICP: Inductively Coupled Plasma)，マイクロ波誘導プラズマ(MIP: Microwave Induced Plasma)が，代表的な無電極放電として知られている。ICP では，ガラス管などの周囲にコイルを巻いて高周波を印加すると，ガラス管内の電子が誘導電場によって加速され，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，電極材料を含んだ二次生成物を心配する必要がなく，電極の消耗がないため純度が求められる質量分析の励起源などに用いることができる。

2.2.2 非平衡プラズマ

前述のように熱平衡プラズマでは電子温度，イオン温度，ガス温度が等しくなるため，高温高密度のプラズマを生成できるが，医療分野に用いる場合，温度に敏感な対象物に対して照射することができない。一方非平衡プラズマは，電子，原子，イオン，分子それぞれが異なった運動状態にある。例えばグロー放電の場合，荷電粒子である電子とイオンは電界で加速されるため，高温になりやすい。イオンは原子や分子と衝突して温度が低くなるが，質量の小さい電子は原子や分子と衝突してもほとんどエネルギーを与え

ないため，高温状態が保たれる。このため，T_e ＞＞ T_i ＞ T_g となる。以上のように，非平衡プラズマは高い電子温度のためにプラズマ化学反応を促進することに適しており，低いガス温度のために処理対象物への熱的な損傷を低減できるため，“Non-Thermal Gas Plasma”とも呼ばれ，生体への応用が期待されている。熱平衡プラズマと非平衡プラズマそれぞれの特徴を，表 2-1 に示す[4]。非平衡プラズマの実現には，放電空間を小さくすること，ガスがプラズマと接触する時間を短くすること，プラズマがついている時間を短くすることが挙げられ，代表的なものとしては誘電体バリア放電やコロナ放電，大気圧プラズマジェットなどがある[5]。

誘電体バリア放電は，古くはエキシマランプやオゾンを生成する方法として使用されており，現在でも高濃度オゾン発生器やプラズマディスプレイの放電セルなどに使用されている。1 対の平行平板電極または同軸円筒電極の一方もしくは両方を誘電体で覆うため，直接プラズマに電極がさらされない放電方法である。放電電流が誘電体上の蓄積電荷によって制限される自己消弧放電であるため，アーク放電への移行を防ぐことができるなどのメリットがある。そのため，大気圧下で比較的大型のプラズマを生成することができるが，試料を誘電体として使用するため，プラスチックフィルムやガラスなどの絶縁体であり，かつ薄いものに使用範囲が限られている。

コロナ放電型プラズマ源は，電極間でフィラメント状のプラズマを生成し，プラズマをガス圧で吹き伸ばすことで試料の表面にプラズマを照射する。誘電体バリア放電型と異なり，プラズマを吹き出させる形式で処理が行えるため，試料の大きさに制限なく処理ができる。しかし，金属材料は直接プラズマに接触すると放電損傷を伴うため，こちらも誘電体バリア放電型と同様に試料は電気伝導性のないものに限られる。

大気圧プラズマジェットは内径数 mm のガラス管にヘリウムやアルゴンなどのガスを流し，外側に数 cm の間隔で配置した電極に数 kHz オーダーの低周波の電力を供給すると，ジェット状にプラズマが噴出する。プラズマガス流に沿ってプラズマが進展し，大気中でも拡散せずに数 cm 以上進展すること，温度が室温程度と低いことが特徴である。電源の配置や電力の供給方法を工夫することで，放電損傷がなく，仮に人体に触れても感電やまったく痛みを感じないプラズマジェットを生成することが可能である。

表 2-1 熱平衡プラズマと非平衡プラズマの主な特徴[7]

	LTE plasmas	Non-LTE plasmas
Current name	Thermal plasmas	Cold plasmas
Properties	$T_e = T_h$ High electron density: $10^{21}-10^{26}$ m^{-3} Inelastic collisions between electrons and heavy particles create the plasma reactive species whereas elastic collisions heat the heavy particles (the electrons energy is thus consumed)	$T_e \gg T_h$ Lower electron density: $<10^{19}$ m^{-3} Inelastic collisions between electrons and heavy particles induce the plasma chemistry. Heavy particles are slightly heated by a few elastic collisions (that is why the electrons energy remains very high)
Examples	Arc plasma (core) $T_e = T_h \approx 10{,}000$ K	Glow discharges $T_e \approx 10{,}000-100{,}000$ K $T_h \approx 300-1000$ K

2.3 大気圧プラズマによる表面処理

プラズマによる表面処理は，プラズマ中に存在する化学反応性の高い活性なラジカルや原子，イオン，分子，電子を固体表面と相互作用させて，固体表面の化学的・物理的性質を変える技術である。プラズマを用いた表面処理技術は，半導体製造プロセスや鉄鋼生成部品の表面硬化，ガラス表面の洗浄，高分子材料の接着性の改善など，幅広い産業で利用されている。しかし，産業分野で用いられているプラズマは真空設備を備えた低圧プラズマが大部分を占める。これはプラズマのガス温度や活性種生成の均一性が安定しているためであるが，活性種の密度や，処理ごとの真空引きが，律速や対象物の種類に制限をかけている。

そこで近年注目を集めている技術が，大気圧非平衡プラズマである。この技術によって低温で真空設備を必要としない大気圧プラズマが生成できるため，従来不可能であった大型の器材や液体などの様々な対象物に対して，高密度で高速なプラズマ処理を施すことができる。プラズマを用いた表面処理の一例には，親水化があり，現在，すでに産業界では半導体やフラットパネルディスプレイの製造過程で利用され始めている[6]。また，このプラズマ処理は産業のみならず，医療分野において生体親和性の高い高分子材料をはじめとした，医療機器材料の処理などにも利用可能な技術として注目を集めている。

2.4 プラズマによる生体への影響

医療の分野において，前節で述べた大気圧プラズマは利用形態に応じて，生体を誘電体もしくは電極として用いその近傍に接地した電極との間に放電させる直接放電式と，別の場所で生成したプラズマを流れと共に照射する非直接放電式に分類することができる。

直接放電式のプラズマ源では，生体に電流が流れるため安全性については十分に配慮する必要がある。図 2-1 に示すように人体が感じ始める電流の大きさは周波数に依存し，周波数を高くすることで，大きな電流を流しても患者が電流を感知しないようにすることができる[7]。例えば，手術で用いる電気メスでは数 kHz～数 MHz の周波数を利用している。すでに実用化されている直接放電式のプラズマ源では，電気メスと同様に安全性の確保を考慮している。この感知電流を超える電流を人体に流すと通電経路の筋肉のけいれんが激しくなり，神経が麻痺して，運動の自由がきかなくなる。

一方非直接放電式のプラズマ源では，これらの制約がないため，電流や周波数の適用範囲が広い。また，照射時間についても損傷の大きい直接放電式では数秒程度が限度であるのに対し，非直接放電式の方は数分程度の処理が可能である。

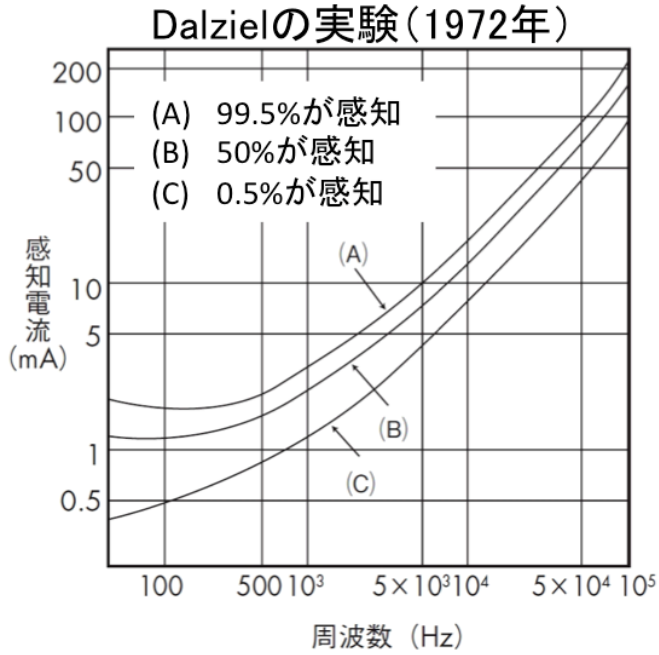


図 2-1　人体が感知する電流と周波数の関係[9]

2.5 医療応用に向けた大気圧低温プラズマ

2.2 節で述べたように，プラズマの生成過程によってプラズマの温度や密度，処理できる形状などが大きく異なる。そのため，様々な用途に合わせて，これらの特徴を活かしたプラズマ源が開発されている。ここでは，現在開発されている大気圧プラズマ源とその医療応用について記述する。

2.5.1 アルゴンプラズマ凝固装置

アルゴンプラズマ凝固法は内視鏡と組み合わせることで，消化管の止血，食道腫瘍に対する凝固手術，鼻アレルギーに対する治療などに利用され，現在では世界中に広く普及している。図 2-2 にプラズマ凝固法[8]の機構と原理を示す。

ガス流路にはアルゴンガスを流し，中心にあるワイヤー電極に高周波電圧を印加することで，ワイヤー電極先端と組織の間のアルゴンガス流路でプラズマが形成される。このとき，電極から組織に電流が流れるため，主にこのジュール熱により組織が凝固する。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，組織が凝固すると電流が流入する位置がまだ凝固していない組織に自動的に移動する。また，組織が複雑な形状であっても電流が回り込むため，均一な組織の凝固が可能であるといった特徴がある。他にも，非接触で行うため電極と組織の付着がないこと，広範囲を短時間で処置できること，出血点をガスで露出できるため止血が容易であること，凝固組織が浅層に留まること，炭化が少ないなどの長所がある。

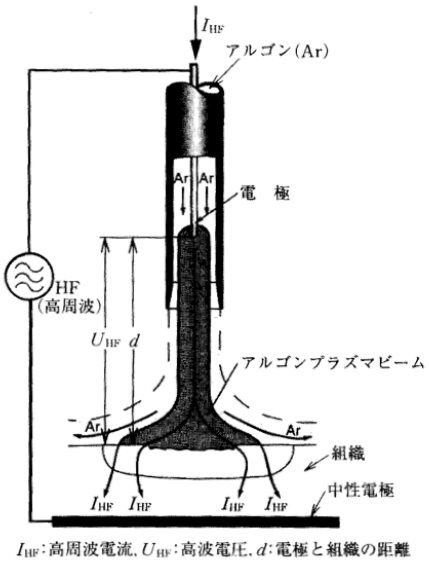


図 2-2 アルゴンプラズマ凝固装置の原理

2.5.2 プラズマ殺菌装置

日本で唯一市販されている医療用滅菌装置にステラッド®[9]がある。これは過酸化水素低温プラズマ滅菌法（HLPS: Hydrogen Peroxide Low Temperature Plasma sterilization）と呼ばれ，1994 年の厚生省の認可以来，医療施設を中心に急速に普及し，プラズマ滅菌の代名詞になりつつある。特徴としては，残留毒性が無く安全性が高い，低温低湿度で滅菌できる，滅菌工程が EOG に比べて短い，操作が簡単である，特殊な配管や使用法がなく電源のみで稼働する，などが挙げられる。ステラッド®の動作原理を図 2-3 に示す。

しかし，この HLPS は現在，プラズマではなく過酸化水素の拡散により滅菌が行われ，プラズマは過酸化水素を解毒する役割を持つとされている[10]。このため HLPS は，プラズマ滅菌ではなくガス滅菌に分類されるのが適当であると考えられる。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有し，微生物を死滅させること」と定義される[11]。これに従うと，医療用のプラズマ滅菌装置はまだ開発されていないことになる。

そこで近年シートタイプの誘電体バリア放電[12]，LF 電源を用いた大気圧プラズマジェット[13][14]などで菌に直接プラズマを照射する殺菌実験も研究されている。図 2-4 に LF プラズマジェットの構造を示す。ここで用いられるプラズマ源は，簡易に製作でき，

製作に必要なコストも低い。また，プロセスガス自体に毒性はなく低温にもかかわらず高い殺菌の効果を持ち，真空排気装置が不要であること，損傷なく連続的に処理が行えること，さらには生体へ直接照射可能であることなどの多くの利点があるため，Plasma Medicine 研究のスタンダードとなっている。

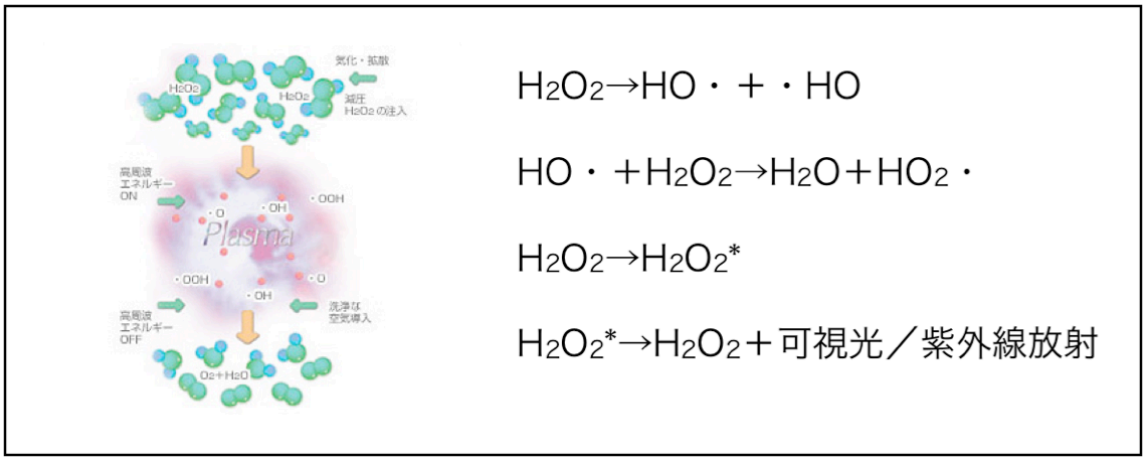


図 2-3 ステラッド®の動作原理

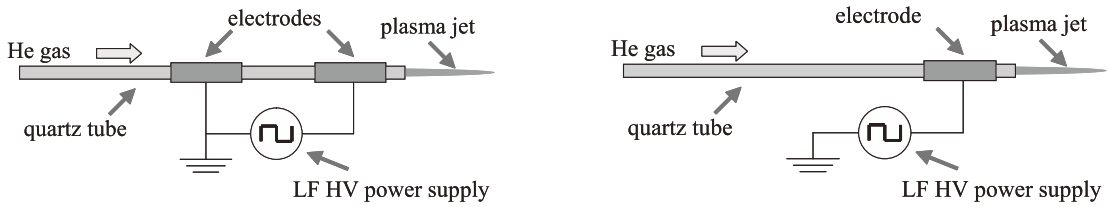


図 2-4 LF プラズマジェットの構造

2.5.3 低温プラズマによる難治性創傷の治療

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。そこで，近年プラズマによる創傷治療の研究が行われている。その例として，図 2-5 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。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 K 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[15]。

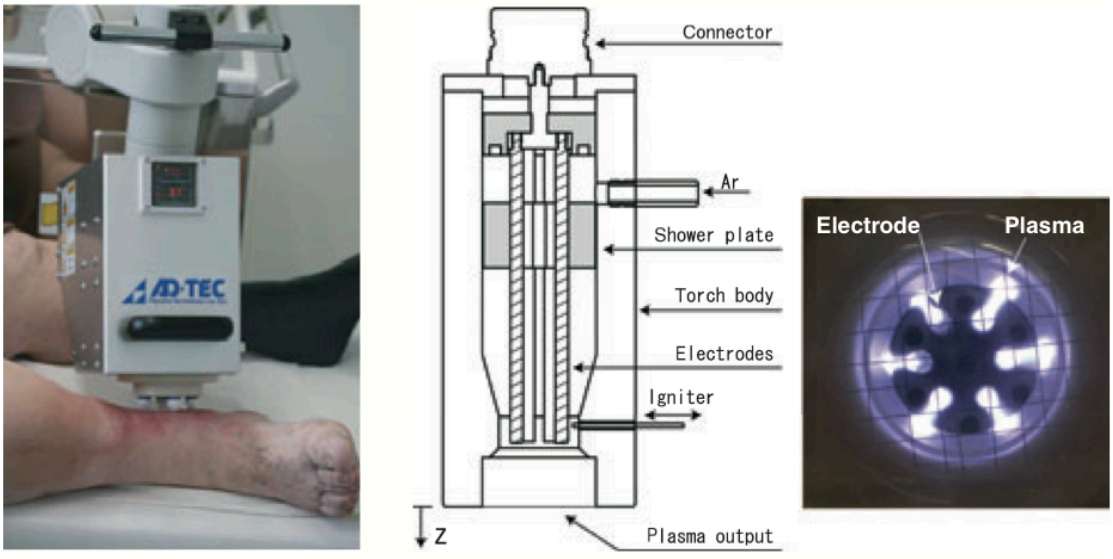


図 2-5 マイクロ波アルゴンプラズマ発生装置

2.5.4 低温プラズマ照射による血液凝固

低温プラズマ照射による血液凝固は熱的損傷がなく，外傷処置や外科処置，救急医療において有用な処置となり得るため，研究が進められている。現在，図 2-6 に示すような浮遊電極型誘電体バリア放電(FE-DBD)[16]では石英ガラスに被膜された銅の電極を空気中に保持し，500 Hz～1.5 kHz，数 kV～20 kV，1.5 μs 程度の双極性高電圧パルスを印加すると，プラズマは電極を被覆している石英ガラスと血液サンプルの間で発生する。このプラズマ源では 15 秒の照射で 500 μl の血液の凝固を促進する効果が得られており，これはプラズマが作り出す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[17]。

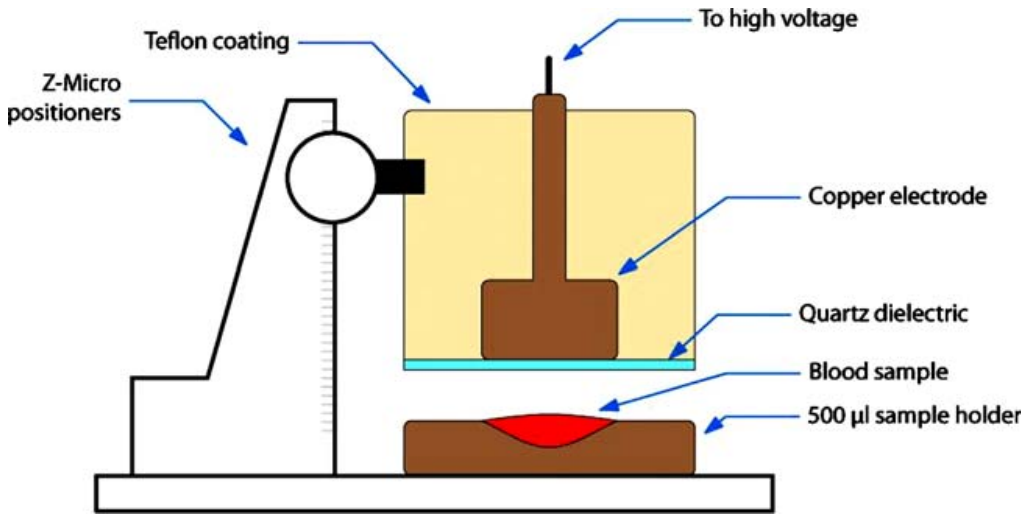


図 2-6 浮遊電極型誘電体バリア放電装置

2.5.5 低温プラズマ照射によるガン細胞の死滅

近年，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，プラズマがガン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ことが見出されてきた[18]。現在図 2-7 に示すような 60 Hz, 10 kV, 20 mA でアルゴンプラズマを生成しアフターグローの部分を細胞に照射して影響調査が行なわれている[19]。その結果，低温プラズマは正常細胞には低負荷で，ガン細胞に選択的にアポトーシスを引き起こすことが明らかにされた[20]。さらに腫瘍を移植したマウスに対してプラズマ照射する研究も行なわ

れており，FE-DBD を用いて腫瘍に対してプラズマ照射すると，図 2-8 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[21]。現在，これは活性酸素種(ROS)が寄与するものと考えられており，放射線や重粒子線などに次ぐガン治療として注目を集めている。

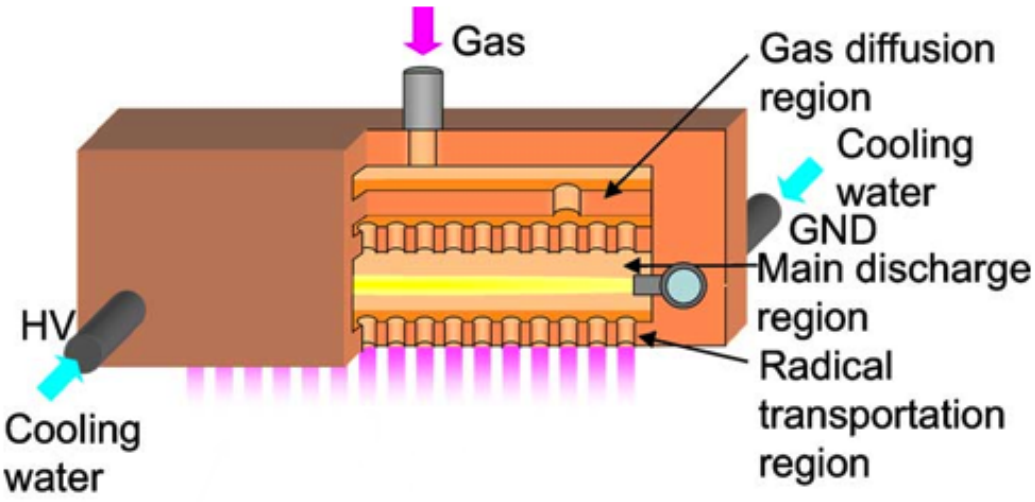


図 2-7 大気圧非平衡アルゴンプラズマ

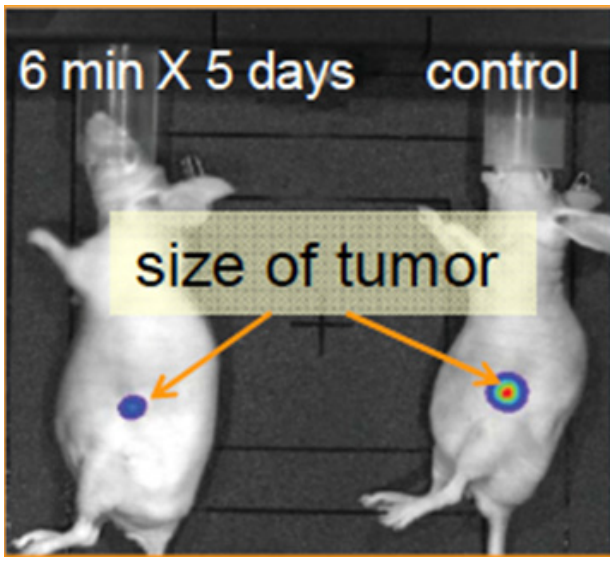


図 2-8 腫瘍を移植されたマウスに対するプラズマ照射効果

2.6 殺傷の対象となる細菌

微生物は，生物圏とされているほぼ全ての環境に存在しており，人体に欠かせないものから悪影響を及ぼすものまで様々である。悪影響を及ぼす菌は病院などの医療機関では，消毒という処置が施される。この消毒には一般に消毒薬が用いられるが，さまざまな細菌・真菌の種類に対して消毒薬の作用範囲が存在し，これを抗菌スペクトルと呼ぶ。そして図 2-9 に示されるように殺菌の対象となる菌種や対象物によってこれらの消毒薬は使い分けられている。例えば，低水準や中水準の消毒薬では人体の消毒によく用いられている。しかし，全ての有害な菌種に対して有効なわけではなく，芽胞形成菌のような耐性の高い細菌を対象とした場合，殺菌することはできない。一方で，芽胞形成菌を殺菌することが可能な高水準の消毒薬は，人体に有毒であるため，生体の消毒に用いることはできない。

このように消毒薬による殺菌では制限がある中，大気圧非平衡プラズマは細菌の種類に問わず，人体へ損傷を与えずに殺菌できる方法として期待されている。そこで，プラズマによる殺菌法を開発するにあたって，細菌の種類による特性の違いや，その取り扱い方を考慮することは非常に重要である。本節では，プラズマ殺菌を行う上で重要な細菌の特徴を述べる。

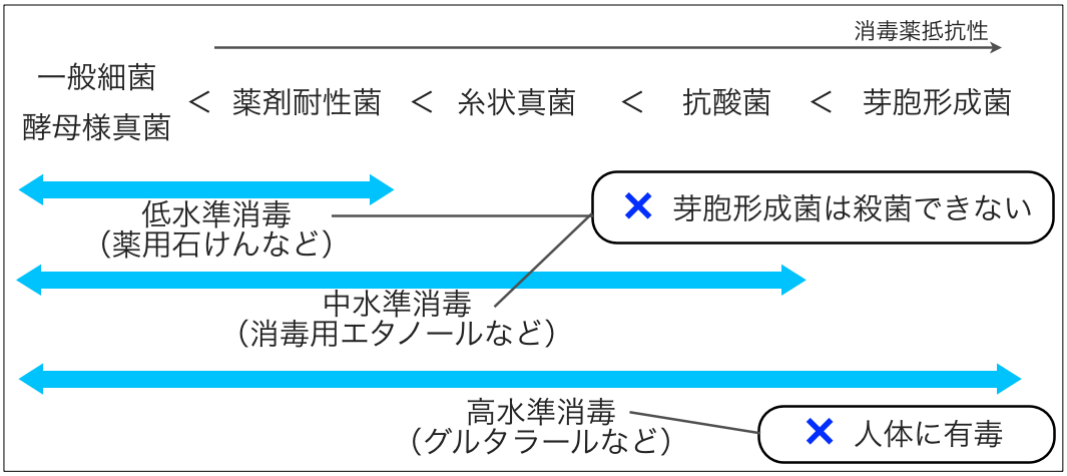


図 2-9 消毒薬による殺菌効果

2.6.1 グラム陽性菌とグラム陰性菌

細菌はグラム染色に対する反応に基づいて，グラム陽性菌とグラム陰性菌という２つの主要なグループに分けることができる。グラム染色すると，グラム陽性菌は紫色に，グラム陰性菌は赤色になる。グラム染色に対する反応がこのように異なるのは，グラム陽性菌の細胞とグラム陰性菌の細胞で，細胞壁の構造が異なるためである。図 2-10 にこれらの構造を示す。グラム陽性細胞は大部分が主に単一の分子からなる薄い細胞壁を持つが，グラム陰性細胞の細胞壁は多層構造を持ち，非常に複雑である。図 2-11 に示すようにこのグラム陰性細胞の外層はリポ多糖構造で形成され，この構造の特にリピド A がサルモネラ菌や，赤痢菌，大腸菌等に見られる毒性に由来している[22]。このため，ヒト病原細菌の多くはグラム陰性菌であるが，グラム陽性菌の中にも *Streptococcus* 属，*Staphylococcus* 属，*Corynebacterium* 属，*Listeria* 属，*Bacillus* 属，*Clostridium* 属の６つは典型的なヒト病原細菌である。

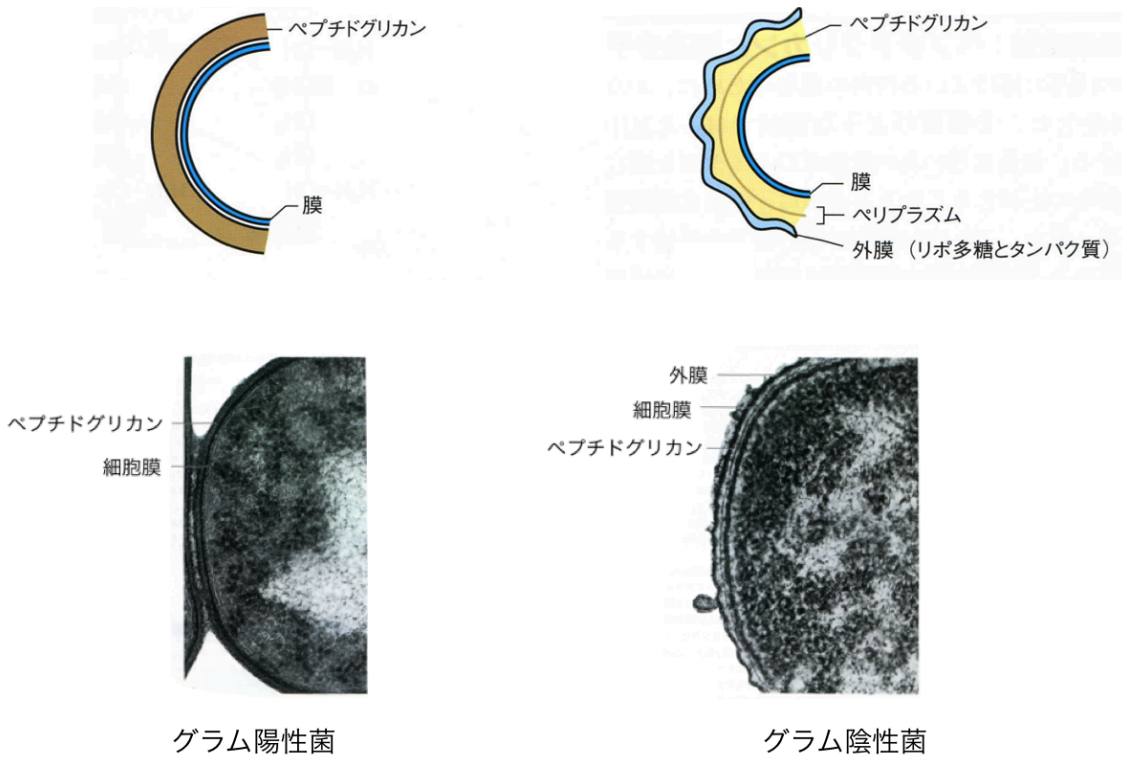


図 2-10 グラム陽性菌とグラム陰性菌の構造[25]

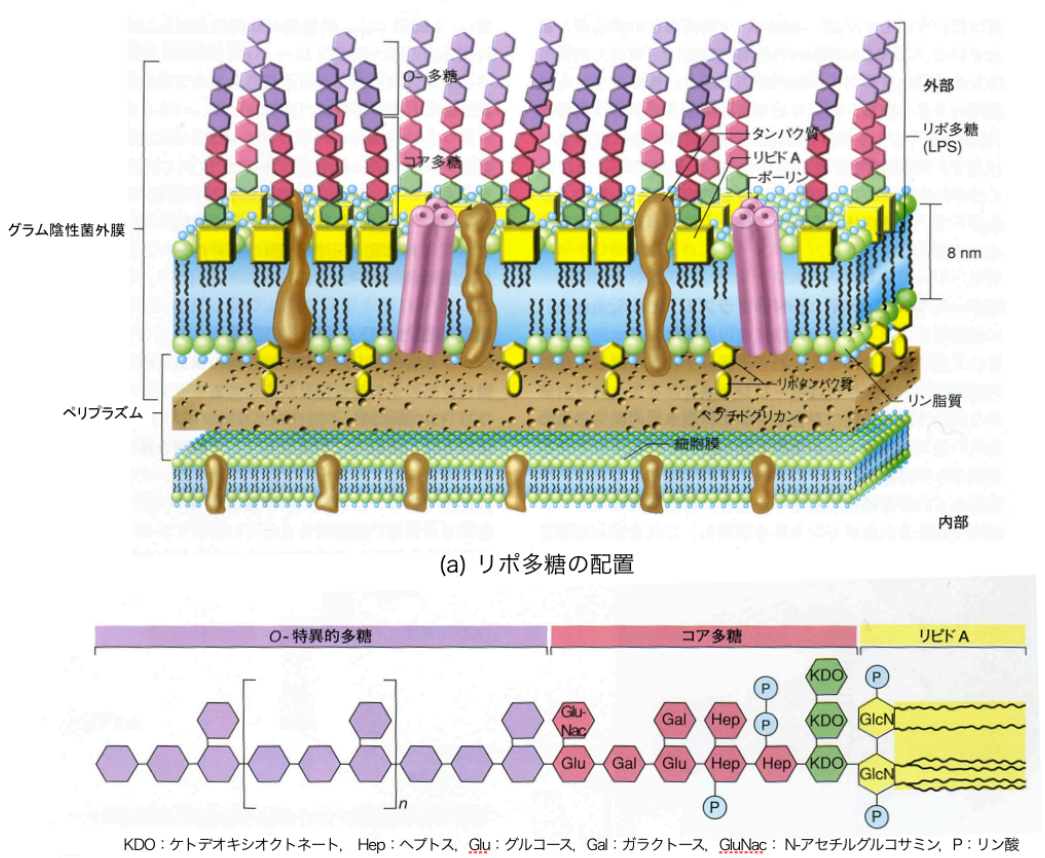


図 2-11 グラム陰性菌の外膜の構造[25]

2.6.2 真菌

真菌の分類は，形態的には有性器官の形質で分類されており，菌種によって酵母や，糸状菌などの形態を取る。酵母は *Candida* 属などが代表的であり，出芽型分生子と呼ばれる芽細胞を作る単細胞から成るコロニーを形成する。基本的には真核で単細胞性の微生物で，運動性はなく，細胞壁を持っていて，形態的には特徴の少ない円形か楕円形をしている。これらは出芽または分裂によって増え，それによって増殖した細胞が，互いに不完全にくっついて樹枝状を呈する場合もある。

糸状菌は *Aspergillus* 属などが代表的であり，菌糸とよばれるフィラメントを形成する。菌糸の幅は通常 1-10 μm で，各菌種によりほぼ一定の幅を持って伸びる。菌糸は先端部から枝分かれしながら成長し，網状，樹皮状ないし束状の集合体を形成する[23]。

酵母の消毒薬に対する感受性は一般細菌と同様で，低水準消毒薬でも十分効果が得ら

れるが，糸状菌は消毒薬に対して抵抗性があるため，消毒が必要な場合には中水準消毒薬以上のものが用いられる。

2.6.3 抗酸菌

抗酸菌の主要なものは *Mycobacterium* 属の細菌であり，アニリン色素に難色性で，媒染剤や加温によって一度染色されると酸アルコールに脱色されにくい。これらの細菌は，いずれも長い杆菌で運動性がなく，好気性であり，固形培地で集落形成に 7 日以上要する遅発育抗酸菌と 7 日以内である迅速育抗酸菌に分けられる[24]。細胞壁に多量の脂質を含有するため消毒薬抵抗性が強く，殺菌には中水準消毒薬以上のものが用いられる。

2.6.4 芽胞形成菌

芽胞形成菌は全てグラム陽性菌であり，内生胞子と呼ばれる特殊な構造体を細胞内に作る。内生胞子の形成は細胞が急激に分裂しているときには起こらず，生長に不可欠な栄養を使い尽くしたために生長が止まったときにだけ起こる。内生胞子の形成の過程を図 2-12 に示す。この内生胞子のみの状態では繁殖せず休眠状態であるが，また適切な条件下に置かれれば発芽する。この内生胞子は非常に高い耐熱性や，乾燥，放射能，酸，化学消毒などに対する耐性を持っているため，滅菌法を開発する上で *B. subtilis* や *B. cereus* などがしばしば指標菌として用いられる。

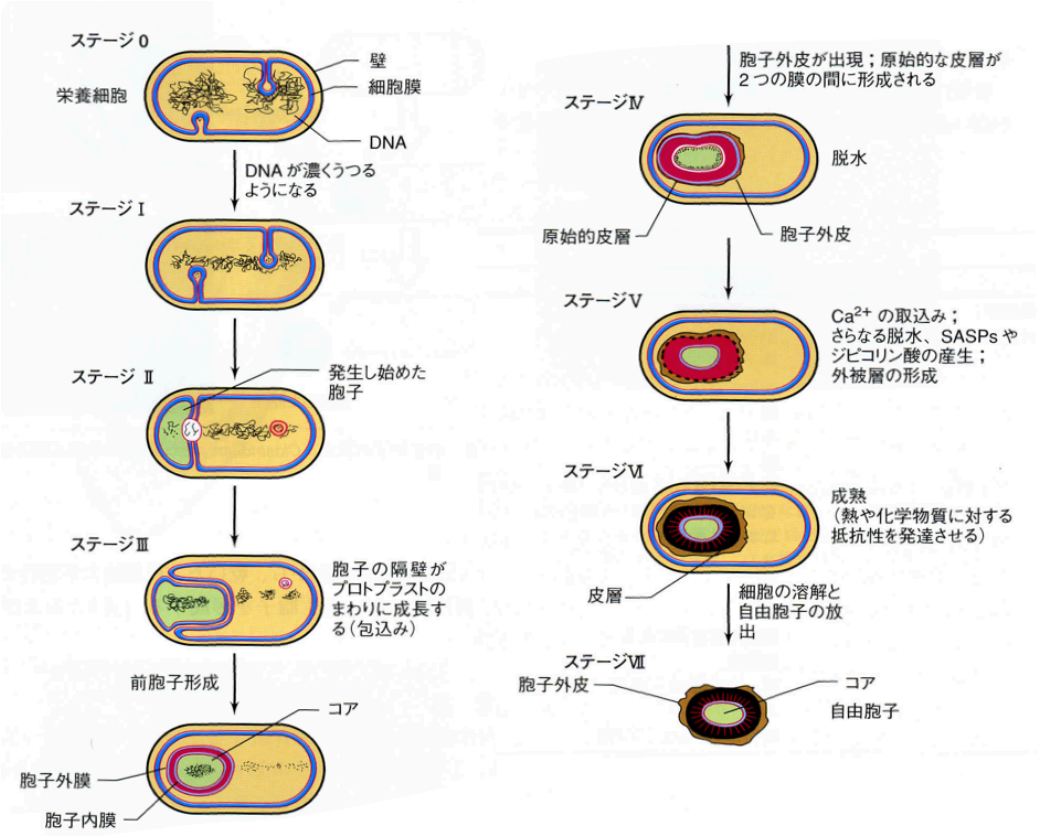


図 2-12 内生胞子形成の過程[25]

2.7 ウイルス

古細菌，真正細菌，真核生物の 3 つからなる生命体と違って，ウイルスは「非細胞体」である。つまり，ウイルスは細胞ではなく細胞からできているものでもない。多くのウイルスは核酸と数種類のタンパク質のみから構成されている。ウイルスは外界との相互輸送や代謝という細胞にとって基本的な機能をまったく行うことができない[25]。また，ウイルスは単独では増殖することができないが，動物細胞や植物細胞等の宿主内に侵入した後には，宿主の生合成機能を利用して増殖することができる。

ウイルスは，脂質を含むエンベロープと呼ばれる膜で包まれている場合と，エンベロープを持たない小型球形ウイルスに分類できる。例えば，エンベロープを持つウイルスには，インフルエンザウイルス，ヘルペスウイルス，ヒト免疫不全ウイルスがある。また，エンベロープを持たないウイルスの例として，アデノウイルス，コクサッキーウイルス，ネコカリシウイルスがある。消毒薬による不活性化を受けやすいか，抵抗性かの

違いは，このエンベロープを有しているかどうかにより異なる。エンベロープを有するウイルスはエタノールや有機溶媒，石けんなどで容易に脂質を破壊することができる。逆に，エンベロープを持たないウイルスは消毒剤の感受性が低く不活化されにくい。

2.8 殺菌

細菌の種類や生存数は周囲の環境により大きく異なるが，一般的に空気中には無数の細菌が存在し，人工的に作り出さない限りは細菌が存在しない状態を得ることは困難である。しかし食品や飲料，医療などの分野においては，人体に悪影響を及ぼす細菌が医療機器や食品を通じて直接体内に入る可能性があるため，扱う製品や環境について有害な菌の菌数コントロールが必須となる。人体にとって有害な細菌とその特徴を表 2-2 に示す。対象の菌数を減少させる操作として通常，殺菌処理が行われる。殺菌処理には種々の方法が存在するが，殺菌効果を有している以上，人体の細胞に対してもその効果が悪影響を与えてしまう可能性がある。処理の過程において実施者に危険が及んではならないため，殺菌処理を行う際には必ず取り決めを遵守し，特に有害な薬物等を使用する場合には，細心の注意を払う必要がある。

表 2-2 細菌性病原体の特徴

細菌	グラム染色	引き起こす病気	呼吸	芽胞の有無
Staphylococcus aureus	陽性	傷口感染，尿路感染症	通性嫌気性	無
Staphylococcus epidermidis	陽性	傷口感染，尿路感染症	通性嫌気性	無
Clostridium difficile	陽性	偽膜性大腸炎（PMC）	嫌気性	有
Bacillus cereus	陽性	歯周炎，傷口感染，食中毒	通性嫌気性	有
Pseudomonas aeruginosa	陰性	火傷患者，心臓マヒ，気道または尿路の感染症（特に免疫不全患者）	好気的（CFバイオフィルムでは嫌気性）	無
Escherichia coli	陰性	腸疾患，腹膜炎，乳腺炎，肺炎，敗血症	通性嫌気性	無
Klebsiella pneumoniae	陰性	傷，気道と尿路の感染症	通性嫌気性	無
Acinetobacter lwoffii	陰性	皮膚感染，傷口感染，胃炎，肺炎	通性嫌気性	無

2.8.1 殺菌と滅菌，消毒など

殺菌とは，単純に菌を殺すことであり，その対象や程度は含まない概念である。菌の一部だけでも殺すことができれば殺菌と言えるため，この言葉を用いた場合，厳密には有効性を保証することができない。

一方，医療現場など，菌による影響を排除し安全性を確保する必要のある場合，一般に滅菌の概念が用いられる。滅菌という言葉には明確な定義が与えられているため，殺菌効果の指標とすることができる。滅菌とは，「物質中の全ての微生物を殺滅または除去すること」を意味する言葉であるが，しかし厳密な意味で「細菌数がゼロである」ことを保証しているわけではない[26]。これは，菌の死滅過程は一般に確率的に取り扱われ，図 2-13 のような生残特性を示すが，生残する菌数は処理時間とともに指数関数的に減少するため，菌数が完全にゼロになることはないためである[27]。このため，無菌性保証水準（Sterility Assurance Level，10^{-n} で表される）を設定し，このレベルを達成した場合を滅菌と定義する。無菌性の保証としては現在，SAL=10^{-6} が国際的に採用されている。日本薬局方における最終滅菌法の概念や厚生省生衛発第 956 号，医療機器の滅菌バリデーション基準においても，同様の基準が採用されている[28]-[29]。ここで，微生物の 90%を死滅させ，生残率を 1/10 に低下させるために必要な時間（Decimal Reduction time）または 1/10 に低下させるために必要な線量（Decimal Reduction Dose）のことを D 値（Decimal Reduction Value）と定義する。多くの場合，初発菌数 10^6 個の指標菌の生残菌数を 10^{-6} 以下にする，すなわち D 値×12 の時間をかけて処理すること（オーバーキル法）により滅菌が達成されると考えることが一般的である。他の滅菌条件の設定としては，特定の滅菌法に対して強い抵抗性を示す指標菌の芽胞を担体に塗布乾燥したバイオロジカルインジケータ（BI）に含まれる，10^6 個の指標菌のすべてが死滅する時間の 2 倍の時間処理を行うハーフサイクル法，被滅菌物に存在する微生物の数と種類（バイオバーデン）を広範に調査し，得られた平均バイオバーデン数に 3 倍の標準偏差を加えたものを基に滅菌条件を設定するバイオバーデン法などがある。また，滅菌法として設定されているものには，高圧蒸気法・乾熱法などの加熱法，放射線法・高周波法などの照射法， EOG などを用いたガス法，滅菌用フィルターを用いて微生物を除去するろ過法などがある。

類似した概念に消毒があり，これは「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こと」であり，必ずしもすべての微生物を殺滅，除去するものではない」ことを意味している。他にも除菌とは，対象物や限られた空間に含まれる微生

物の数を減らし清浄度を高めることをいい，学術的な専門用語としてはあまり使われていないが，食品衛生法の省令では「ろ過等により，原水等に由来して当該食品中に存在し，かつ，発育し得る微生物を除去することをいう」と規定されている。また抗菌とは，菌を殺したり減少させるのではなく，菌の繁殖を防止するという意味であり，対象やその程度を含まない概念である。経済産業省の定義では，抗菌の対象は細菌のみである。なおプラスチックの抗菌については，日本工業規格では JIS Z 2801，国際規格では ISO 22196 としてその試験法が規定されている。このほか，菌は殺さないがその増殖を止めるという意味の静菌があり，これも対象やその程度を含まない概念である。

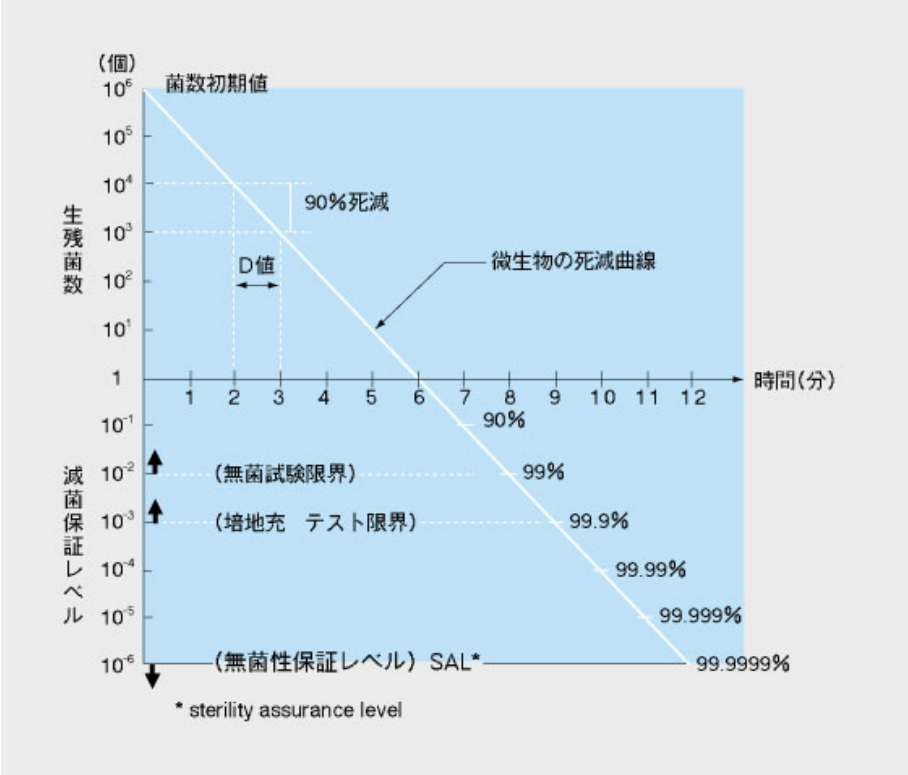


図 2-13 D 値を利用した滅菌様式（D=1 分の微生物の場合）

2.8.2 各種殺菌法

医療現場や医療関連製品に対して用いられている主な殺菌（滅菌）法として，火炎滅菌や乾熱滅菌，高圧蒸気滅菌，煮沸滅菌などの加熱による滅菌法，γ 線などの放射線，紫外線，高エネルギーの電子線を用いる照射滅菌法，EOG や過酸化水素ガスを用いるガス滅菌法，ろ過フィルターを用いるろ過滅菌法などがあり，対象物の材質や形状に合

わせて，適切な滅菌法が用いられる。表 2-3 に，各殺菌方法の特徴を示す。

オートクレーブを代表とする高圧蒸気滅菌法は，病院などの医療現場で広く利用されている。短時間で滅菌でき，有毒なガスなどは発生せず，滅菌コストが低いなどの利点があるが，高温高圧になるため，使用用途が制限される。

放射線法は，熱に弱いものに対しても適用でき，包装したままでも滅菌できる利点があるが，設備が極めて大型になるため，一般に滅菌コストが高くなる等の問題がある。さらに滅菌対象物の品質変化も考慮する必要があるため，デリケートな器具などには適さないといわれている。

EOG 滅菌は，低温での処理が可能であるため，プラスチックのような加熱ができないものの滅菌ができるが，爆発性をもつために通常二酸化炭素などで 10～30%に希釈して用いられる。また EOG 自身に残留毒性があるため，滅菌した製品の残留 EOG や他の二次生成有毒ガスの濃度をエアレーション等により安全なレベルまで下げる必要がある。このように，これまでの殺菌方法にはそれぞれ長所と短所が存在するため，これらの問題を解決する技術が医療機関などで求められている。こうした中で，2.5.2 節で述べたような利点を持つプラズマ殺菌法に注目が集まっている。

表 2-3 各種殺菌法の比較

殺菌方法 / 項目	高圧蒸気	電子線	ガンマ線	EOG	紫外線
装置設備	小～中型	大型	大型	小～大型	小～中型
使用用途	滅菌	滅菌	滅菌	滅菌	殺菌
材料の選択	耐熱・耐水性	耐放射線性	耐放射線性	幅広	幅広
温度	121℃	常温	常温	50～60℃	常温
処理時間	数時間	数十分	数時間	数時間	数分
後処理	乾燥	不要	不要	ガス抜き	不要
デメリット	樹脂材の使用不可	材料改質の問題	材料改質の問題	毒性ガスの問題 通気性包装が必要	表面のみの殺菌

2.9 プラズマによる殺菌メカニズム

プラズマによる殺菌の原理としては，プラズマが生成する活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)等のラジカルが化学的に細菌表面のエッチング，酸化作用を及ぼしているとする説が有力であるが，詳細については不明である。また，発光分光によって UV の発光が測定されることや，大腸菌の細胞液に含まれるカリウムの漏出濃度が，プラズマにより増大することから，プラズマ生成中に発せられた紫外線(UV)による DNA 損傷や，イオン等による物理的なスパッタリングも殺菌効果に影響していると考えられている。殺菌のメカニズムをまとめたものを図 2-14 に示す。

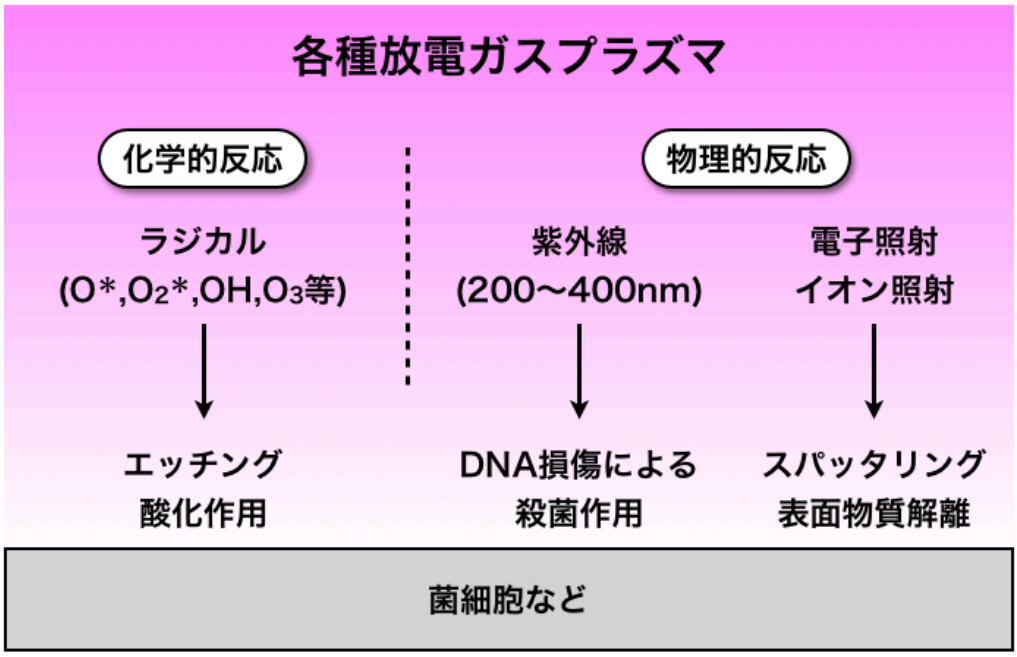


図 2-14 殺菌のメカニズム[30]

2.10 生体応用のための細胞の評価

細胞の生死を評価する場合，生から死への変化の解析は困難であるため，細胞の何らかの変化を指標として，その細胞の死を判定する必要がある。ここでは細胞死と一般的な細胞死判定法について述べる。

2.10.1　ネクローシスとアポトーシス

細胞死の過程はネクローシスとアポトーシスに大別されている。ネクローシスとは虚血，火傷，毒物など各種の病的要因により細胞膜のイオン勾配が維持できなくなった結果起こる，不慮の細胞死である。この細胞死の形態的変化は，細胞質，特にミトコンドリアに始まる。まず，この細胞内小器官がまず膨化し，細胞全体も徐々に膨らんでいく。エネルギー生産の場であるミトコンドリアが失われて ATP(アデノシン三リン酸)産生能が失われ，浸透圧制御能も失ってついには細胞溶解を起こす。このネクローシスでは細胞溶解が起こり，細胞内容物が流出し，周辺の生存細胞に炎症性の反応が起こる。

一方アポトーシスとは，動物細胞集団を制御するための，能動的な細胞死であり，細胞膜と核内の構造変化を伴う細胞サイズの縮小から始まるのが特徴である。核では DNA とタンパク質の複合体であるクロマチンの網状構造が消失し，凝縮する。その際，特に早期に核膜辺縁へ半月状に凝縮する。核濃縮が生じると共に，核の微細構造が失われ，核と細胞質が凝縮・縮小し，細胞全体のサイズの縮小が起こってくる。こうした変化に伴って細胞表面が膨らみを生じ，透明な液胞が現れ，多くの細胞では核や細胞に大小の突起が生じる。この突起はくびれてちぎれ，細胞が断片化し，膜に包まれた大小の球状の小胞(アポトーシス小体)になる。このアポトーシス小体は速やかに近接細胞に取り込まれ貪食除去され，ネクローシスとは異なり炎症が見られないのが特徴である。

アポトーシスが組織内に細胞で生じると，細胞が縮小した結果，隣接細胞との間に間隔ができ，この間隔の出現も組織像におけるアポトーシス検出の目安となっている。

2.10.2 分染法

分染法は色素に染まるか，染まらないかによって生死を判定する手法である。一般的にはトリパンブルーという青い色素や，各種の蛍光色素が判定に用いられている。生きている細胞の正常な細胞膜はこれらの色素を透過させないが，細胞が死に，膜の透過性が変化すると，色素が細胞内に入り込み染色される。この手法では，直接顕微鏡で観察し，細胞数をカウントするため細胞系や個人の熟練度の差によりデータの変動が出てしまう可能性があるが，非常に簡便で，同一の系では再現性も良いため多くの研究分野で用いられている。

2.10.3 酵素活性測定法

生きている細胞は代謝を活発に行うため, 死細胞に比べて酵素活性が高い。そのため, 酵素活性の低下を指標として細胞死が判定できる。一般的にはミトコンドリアの活性を指標とするMTT法[31]が細胞数測定によく用いられている。MTTとは分子式$C_{18}H_{16}BrN_5S$で示されるテトラゾリウム塩の一種で，MTT が細胞内に取り込まれると，ミトコンドリア中にある脱水素によってホルマザンに変化する。ホルマザンへの反応を図 2-15 に示す。このホルマザンは非水溶性の結晶で，これを有機溶媒で溶解させ，よく混ぜると均一の赤紫色の溶液となる。

呈色した試料の測定として一般的な測定法に吸光分光法がある。この方法を用いた吸光度測定において基本となるのは，式(2・1)で表されるランベルト–ベールの法則(Lambert-Beer's law)である[32]。

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon cl \qquad (2\cdot1)$$

ここで I_0 は濃度 c の試料の入った厚さ l の吸収層への入射光強度を示し，I は吸収層を透過した後の光強度である。ε は物質, 波長, 用いる媒体などによって決まる定数で, 吸光係数と呼ばれる。さらに c をモル濃度，l を cm 単位で表したとき，この値はモル吸光係数($mol^{-1}dm^3cm^{-1}$ あるいは $M^{-1}cm^{-1}$: molar absorptivity)と呼ばれる。また，I/I_0 を透過率($100\times I/I_0$, percent transmittance: $\%T$), さらに $\log(I/I_0)$ を吸光度(absorbance: A)という。試料のある波長における ε 値が既知であれば, 吸光度の値から試料濃度を決定できるため，定量分析に利用される。MTT 法では呈色した溶液を 570 nm における吸光度測定を行うことで生細胞数が測定できる。

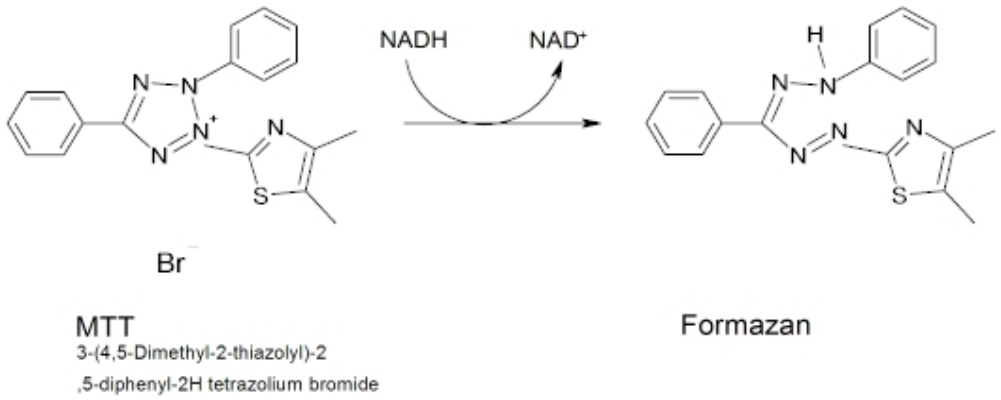


図 2-15 MTT 法の原理

2.8 まとめ

本章では，大気圧プラズマの分類や殺菌，医療応用について基礎的な概要を記述している。大気圧プラズマに関しては，大気圧プラズマの分類や産業応用の現状とプラズマが人体に及ぼす可能性のある電気的な影響について，感知電流と周波数の関係を示し，安全性の確保の方法を述べている。さらに，現在医療応用に向けて開発されているプラズマ源の特徴を整理している。

殺菌に関しては，細菌の構造，特徴について述べ，さらに殺菌の定義と類義語の意味について整理している。滅菌については，医療分野で運用されており，はっきりとした定義がなされているため，その概念や実施方法について記述し，殺菌の実施方法とその効果についての指標としている。また，各種の殺菌方法に触れてそれらの特徴を示し，プラズマ殺菌と対比させてその有用性について述べている。

生体応用に関しては，プラズマが細胞死を引き起こした場合，そのプロセスがネクローシスかアポトーシスかが重要となるため，これらの定義とその過程について整理している。また，プラズマによるダメージを評価するための一般的な判定法を記述している。

参考文献

[2] 水野彰, 朽久保文嘉, 内田諭, 小田昭紀, 高木浩一, 林信哉, 大気圧プラズマを学ぼう, *J. Plasma Fusion Res.*, **83**, 11, pp. 913– 919 (2007).

[3] 林泉, プラズマ工学, 朝倉書店, (1987).

[4] A. Schutze, J.Y. Jeong, S.E. Babayan, J. Park, G.S. Selwyn, R.F. Hicks, The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **26**, 6, pp.1685– 1693 (1998).

[5] 板谷良平, 非平衡大気圧プラズマ(NTAPP)の課題と展望, プラズマ・核融合学会誌, **79,** 10, pp. 1029– 1032 (2003).

[6] 柴田哲司, 山崎圭一, 田口典幸, 中園佳幸, 澤田康志, 大面積処理対応シャワー型常圧プラズマ表面改質装置, 松下電工技報, **54**, 2, pp. 67-71(2006)

[7] 大森豊明, 電磁気と生体, 日刊工業新聞社, (1987).

[8] 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, Endoscopic anti-reflux procedures, *GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY*, **55**, 7, pp.807- 810 (2002).

[9] S. Lerouge, M. Tabrizian, M.R. Wertheimer, R. Marchand and L'H. Yahia, Safety of plasma-based sterilization: surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes, *Bio-Medical Materials and Engineering*, **12**, pp. 3–13 (2002).

[10] 玉澤かほる, プラズマ滅菌の特徴と問題点および新しいプラズマ滅菌の将来展望, 防菌防黴誌, **32,** 1, pp. 13-30 (2004).

[11] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian and L'H. Yahia, Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, *Int. J. Pharmaceutics*, **226**, pp. 1-21 (2001).

[12] H. Eto, Y. Ono, A. Ogino, and M. Nagatsu, Low-temperature sterilization of wrapped materials using flexible sheet-type dielectric barrier discharge, *Appl. Phys. Lett.*, **93**, 221502 (2008).

[13] 北野勝久, 谷口和成, 酒井 道, 高木浩一, 浪平隆男, 服部邦彦, 大気圧プラズマを点けてみよう, *J. Plasma and Fusion Res.*, **84**, 1, (2008).

[14] 北野 勝久, 浜口 智志, 低周波大気圧マイクロプラズマジェット, 應用物理, **77,** 4, 383-389 (2008).

[15] G. Isbary, G. Morfill, H.U. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, J. Heinlin, S. Karrer, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, R. Monetti, J.L. Zimmermann, R. Pompl and W. Stolz, A first prospective randomized controlled trial to decreasebacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients, *British J.Dermatology*, **163**, pp. 78–82 (2010).

[16] 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. and Plasma Processing* **26**, 4, pp. 425-442 (2006).

[17] S. U. Kalghatgi, G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. N. Vasilets, A. F. Gutsol, A. Fridman, and G. Friedman, Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma, *IEEE Trans. on plasma sci.*, **35**, 5, pp. 1559-1566 (2007).

[18] 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, Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species, *Annals of Biomedical Eng.*, **39,** 2, pp. 674–687 (2011).

[19] 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**, 081503 (2008).

[20] 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**, 113702 (2012).

[21] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J. M. Pouvesle, A. L. Pape, ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma, *Int. J. Cancer*, **130**, pp. 2185–2194 (2012).

[22] 室伏きみ子, 関啓子, Brock 微生物学，オーム社 (2003).

[23] 矢口貴志, 真菌の分類と同定, モダンメディア, **55**, 8, pp. 205-216 (2009).

[24] 前田伸司，小林和夫, 抗酸菌の分類・命名の現状と将来像, 感染症学雑誌, 75, 6, pp.457-459 (2001).

[25] David Sadava, David M. Hillis, H. Craig Heller, May R. Berenbaum, Life 8th edition: The Science of Biology， Sinauer Associates, Inc. (2008)

[26] 永津雅章, プラズマを用いた低温殺菌・滅菌技術, プラズマ・核融 合学会第 21 回専門講習会, pp. 1-18 (2008).

[27] 小林寛伊，大久保憲，吉田製薬　文献執筆チーム，消毒薬テキスト第 3 版, (2008).

[28] 廃厚生省生衛発第 956 号，廃棄物処理法に基づく感染性廃棄物処理マニュアルの一部改正について，(1999).

[29] 厚生省医薬監第 1 号，滅菌バリデーション基準について，(1997).

[30] 永津雅章，高密度プラズマの医療分野への応用，精密工学会誌, **73**, 9, pp. 988-992 (2007).

[31] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunological Methods*, **65**, 1-2, pp.55-63, (1983).

[32] 梅沢善夫，本水昌二，渡会仁，寺前紀夫，機器分析実験，東京化学同人，(2002).

第 3 章

マルチガスプラズマジェットの基礎特性

3.1 はじめに

現在，大気圧プラズマは半導体プロセシング[33]や有害ガスや有害物質の分解[34],[35]，元素分析[36]など，幅広い産業分野で研究されている。そのため，RF や LF，パルス電源などを用いたジェット型の大気圧プラズマ源が多く開発されている。これらはプラズマ源の出口から伸びるプラズマのアフターグローを用いるため処理対象物の形状に制限が無く，放電損傷を与えないため，様々な材質に照射が可能である。しかし，これらのプラズマ源で生成できるプラズマのガス種は，比較的プラズマ化しやすいヘリウムやアルゴンに制限されることが多い。他の分子性ガスでプラズマを生成したい場合は，単パルス放電や変調した高周波を利用した空気や窒素専用のプラズマ源を用いる必要があり，応用先は限定的であった。

著者らは，処理対象物に放電損傷を与えず，かつ様々なガスで安定に大気圧プラズマを生成することができる，マルチガスプラズマジェットの開発に成功した。この新たなプラズマ源を用いることにより今まで行うことが難しかった，プラズマガス種を変化させたときの処理効果の検証を様々な対象物に対して行うことが可能となる。さらに，プラズマのガス温度を自由に制御できる，温度制御プラズマ装置の開発にも成功し，マルチガスプラズマジェットと組み合わせることで，自由なガス温度のプラズマで生体などの熱に弱い対象物に対しても処理効果を検証することができる。

この章では当研究室で開発したプラズマ源の基礎的な特性について理解するため，プラズマ源の構造や温度制御プラズマ装置の構成，プラズマ源の電源の電圧・電流波形やプラズマから発せられる紫外線量，プラズマ照射による溶液の pH 変化について調査したので報告する。

3.2 マルチガスプラズマジェット

当研究室で開発したマルチガスプラズマジェットの外観を図 3-1 に示す。このプラズマ源は全長 83 mm と小型で，操作性に優れている。内部構造を図 3-2 に示す。プラズマ源後方に，電力供給用の端子とガス供給用の部品が取り付けられており，そこから電力とガスをプラズマ源内部に供給する。印加電極はプラズマ源内部に組み込まれており, その印加電極とプラズマ源筐体である接地電極との間でプラズマを生成する。プラズマ源先端には，直径 1 mm の穴が空いており，そこから生成されたプラズマがガス流によって外部に噴き出す構造となっている。

このように筐体を接地し，高電圧を印加する電極を内部に配置したことで，外部に電界が漏れない構造になっており，処理対象物に放電損傷を与えない。また，高電圧側の電極に高周波やパルス電圧を印加する事でプラズマの高温化を防ぐため低温のプラズマによる処理が可能であり, 処理対象物に熱的損傷を与えることはない。さらに，このプラズマ源では，ヘリウム，アルゴン，酸素，ネオン，窒素，二酸化炭素，空気，またはそれらの混合ガスなど様々なガス種で安定に大気圧プラズマを生成することができる。図 3-3 に各種ガスを用いて生成したプラズマの写真を示す。従来のプラズマ源では，プラズマ化できるガスに制限があったが，このプラズマ源は分子性ガスを含む様々なガスでプラズマが生成できることから，処理対象物に対して反応性が高い最も効果的なガスを選択することが可能となる。

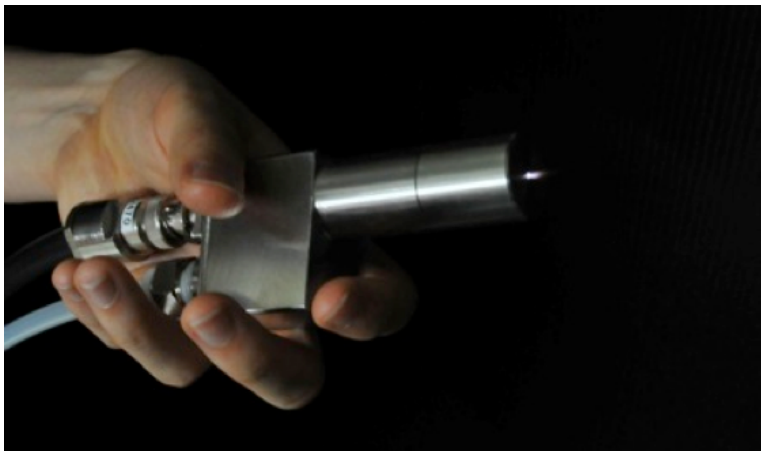


図 3-1 マルチガスプラズマジェット

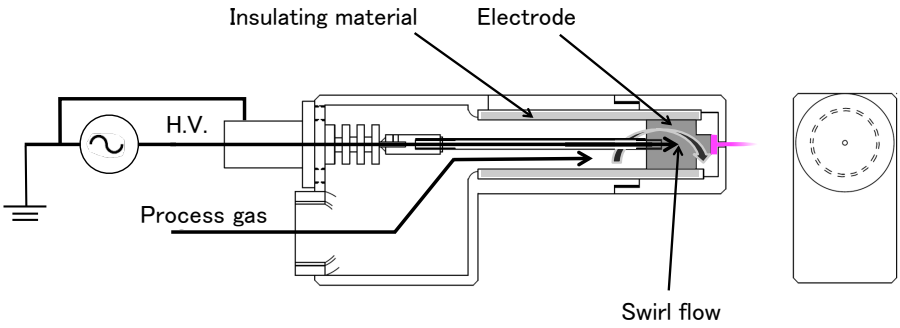


図 3-2 マルチガスプラズマジェットの内部構造

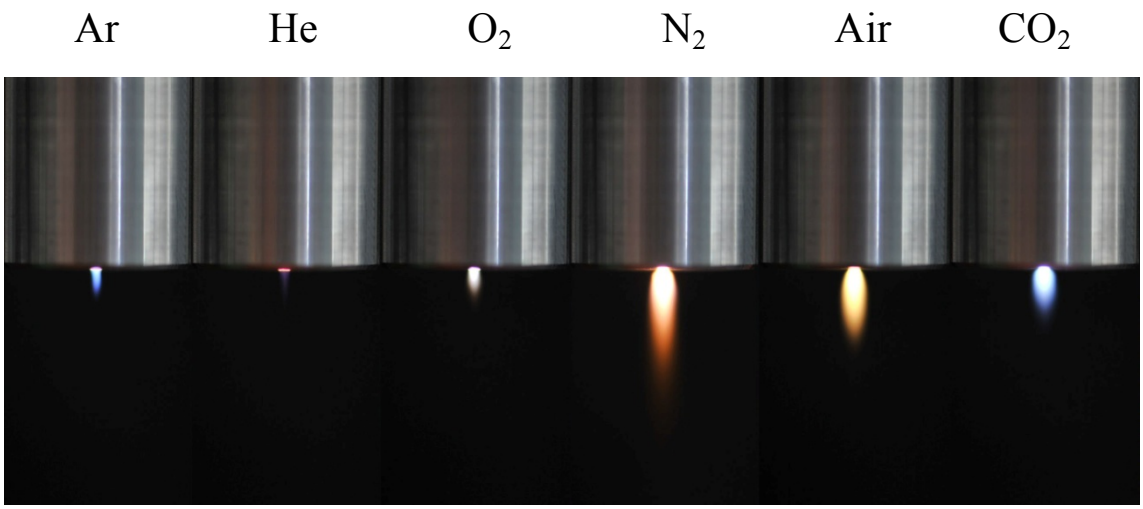


図 3-3 各種ガスで生成したプラズマ

3.3 温度制御プラズマ装置

大気圧非平衡プラズマは低温であるため，現在，様々な応用が期待されている。その中に，この大気圧非平衡プラズマを生体に直接照射し，生体上の殺菌効果[37]や細胞の増殖[38]を検証する研究が盛んに行なわれている。しかし従来のプラズマ源では低温といえども，プラズマの温度は必ず室温以上に上がり，生体などの温度に敏感な対象物に対しては入力電力を下げる操作や，対象物との距離を長くするような操作が行なわれていた。マルチガスプラズマジェットも同様に各ガス種でプラズマを生成すると表 3-1 に各ガス種のプラズマのガス温度を示されるように，ガス温度は室温以上になる[39]。

そこで，著者らは，プラズマのガス温度を自由に制御できる装置を開発した（特許

第 4611409 号)。図 3-4 に示されるように，ボンベから供給されたガスを，液体窒素を用いたガス冷却装置によって冷却したのち，ヒーターによって所望の温度に加熱してからプラズマを生成する。生成されたプラズマのガス温度をヒーターの入力電力にフィードバックすることで，零下の低温から 160℃程度の高温までプラズマのガス温度を所望の値に制御することができる[40]。水に対する零下のプラズマ照射の様子を図 3-5 に示す。このように 10 s プラズマ照射することで水が氷結する様子が見られた。そして，この装置とマルチガスプラズマジェットを組み合わせることによって様々なガス種のプラズマのガス温度を自由に制御し，プラズマの照射効果を調査することができる。

表 3-1 各ガス種のプラズマのガス温度

Distance [mm]	Temperature [ºC]						
	Ar	He	O_2	N_2	Air	CO_2	Ar/O_2 90-10
1	37.3	50.9	60.5	61.0	64.2	66.5	48.6
5	35.8	48.0	53.3	57.1	59.0	60.5	46.5
10	33.6	45.8	50.5	49.9	53.3	59.7	41.7

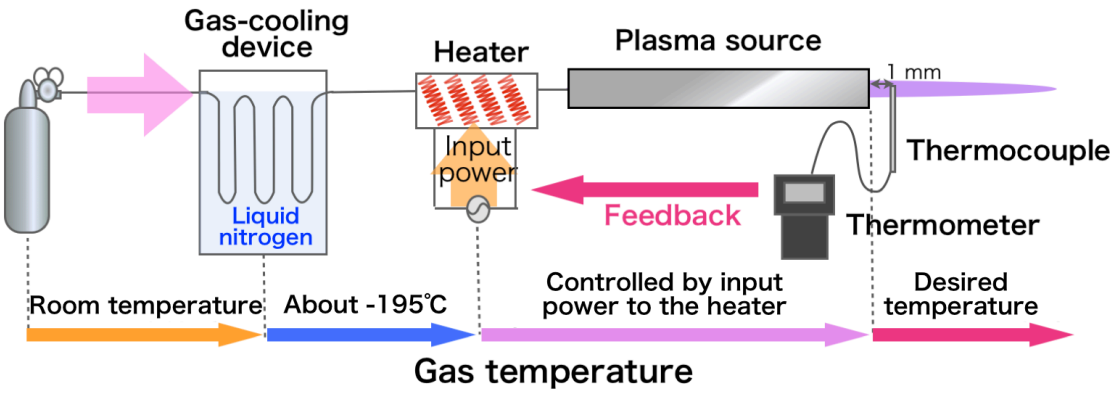


図 3-4 温度制御プラズマの機構

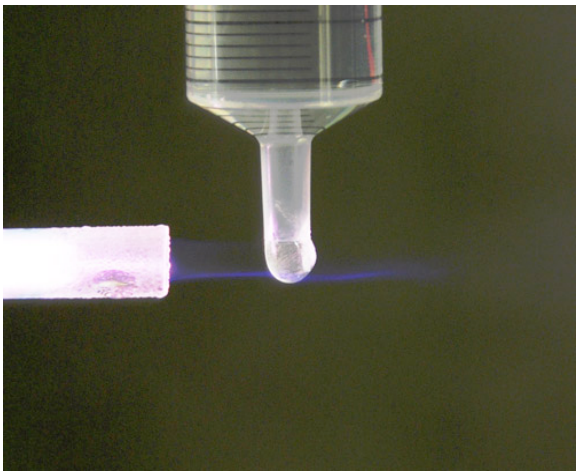


図 3-5 零下のプラズマ照射

3.4 プラズマ生成時の電圧，電流および電力

放電開始電圧は電源やガス種によって異なる。特にヘリウムやアルゴンなどの希ガスは放電開始電圧が低いことでよく知られている。これはヘリウムやアルゴンなどの励起準位には高エネルギーで寿命の長い準安定準位があるためである。表 3-2 に主要原子の準安定準位の特徴を示す[41]。

ヘリウムを例に取ると，まず準安定状態の寿命は 6×10^5 s と長い。そしてこの電離エネルギーは約 25 eV であるのに対し，準安定準位のエネルギーは約 20 eV である。したがって，電離衝突により直接電離させようとすれば，電子に 25 eV 以上の運動エネルギーを持たせなければならないが，累積電離ではその差の約 5 eV 以上の電子で電離に関与できる。また，準安定粒子同志の衝突ではそれらの内部エネルギーの和が 40 eV となり容易に電離に関与できる。

このような特徴から，プロセスガスにヘリウムやアルゴンを用いたプラズマ源の放電開始電圧は多く研究されているが，これに対比させた他の分子性ガスについての報告はほとんどない。そこで，本プラズマ源における種々のガスの放電開始電圧を調査することは，プラズマ源の特性を理解しプラズマを制御するために重要である。そこで，各ガス種でプラズマを生成したときの電圧及び電流，電力を調査した。

マルチガスプラズマジェットの電源には，50 Hz から RF まで様々な周波数の交流電源を用いることができる。その電源の一つとして，9 kV, 16 kHz の交流高電圧電源 [Plasma Power supply, Plasma Concept Tokyo Inc.]を用いて実験を行った。電圧及び電流の計測は高圧プローブと抵抗を用い，オシロスコープで測定した。図 3-6 に電圧，電

流計測のセットアップを示す。この方法を用いてアルゴン，ヘリウム，空気，窒素，酸素，二酸化炭素のプラズマの電圧及び電流波形を測定した。また，測定した電圧及び電流波形から単位時間あたりの電力を計算した。図 3-7 に無負荷時の電源電圧波形を示す。また，各ガス種のプラズマを生成したときの電圧及び電流波形と放電部の電圧，電流波形をそれぞれ図 3-8 から図 3-19 に示す。各ガス種をプラズマ源に添加し，交流電圧が印加され，絶縁破壊電圧に達したときに放電が開始してプラズマが生成される。ガス種によって，絶縁破壊電圧値が異なり，希ガスであるアルゴン，ヘリウムはそれぞれ約 1 kV，500 V であった。一方で分子性のガスである酸素，窒素，二酸化炭素は絶縁破壊電圧が約 5.5 kV で，窒素と酸素の混合気体である空気は約 6 kV であった。放電開始後は各ガス種のプラズマも電圧及び電流はアルゴンガスが波形の腹の部分で約 200 V，50 mA，それ以外のガス種は波形の腹の部分で約 500 V，50 mA であった。

また, 各ガス種のプラズマの単位時間あたりの電力を図 3-20 に示す。この結果から，アルゴンプラズマが 1.8 W 程度と低電力であったが，他のガス種のプラズマはヘリウムプラズマが 5.5 W，空気プラズマが 6.4 W，窒素プラズマが 5.1 W，酸素プラズマが 6.2 W，二酸化炭素が 7.7 W 程度であった。アルゴンと他のガス種で差が見られたのは放電電圧の違いによるものであると考えられる。

表 3-2 主要原子の準安定準位の特徴

原子	基底項 X	準安定準位 M	ポテンシャルエネルギー E_M [eV]	寿命 τ [s]
He	1^1S_0	2^3S_1 2^1S_0	19.82 20.61	6×10^{5} 2×10^{-2}
Ar	3^1S_0	4^3P_2 4^3P_0	11.55 11.72	>1.3 >1.3
N	$2^4S_{3/2}$	$2^2D_{5/2}$ $2^2D_{3/2}$ $2^2P_{3/2}$ $2^2P_{1/2}$	2.38 2.38 3.58 3.58	6.3×10^{4} 1.4×10^{5} 13 13
O	$2^3P_{2.1.0}$	2^1D_2 2^1S_0 3^5S_2	1.96 4.17 9.13	1.1×10^{2} 7.8×10^{-1} ?

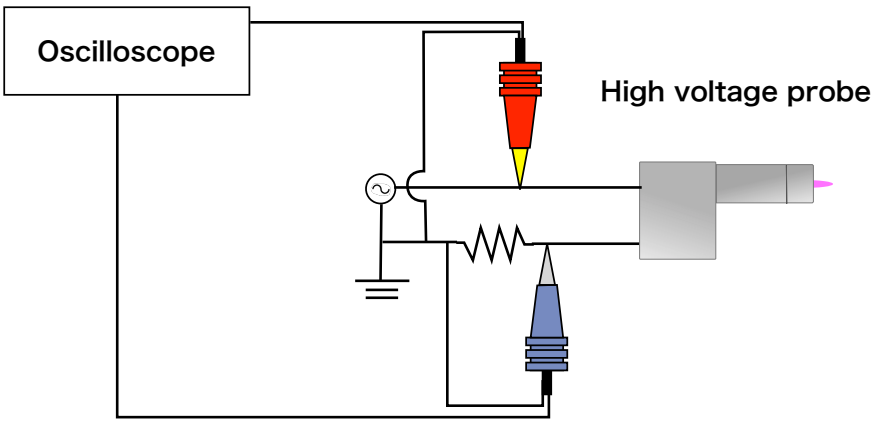


図 3-6 プラズマ生成時の電圧および電流測定

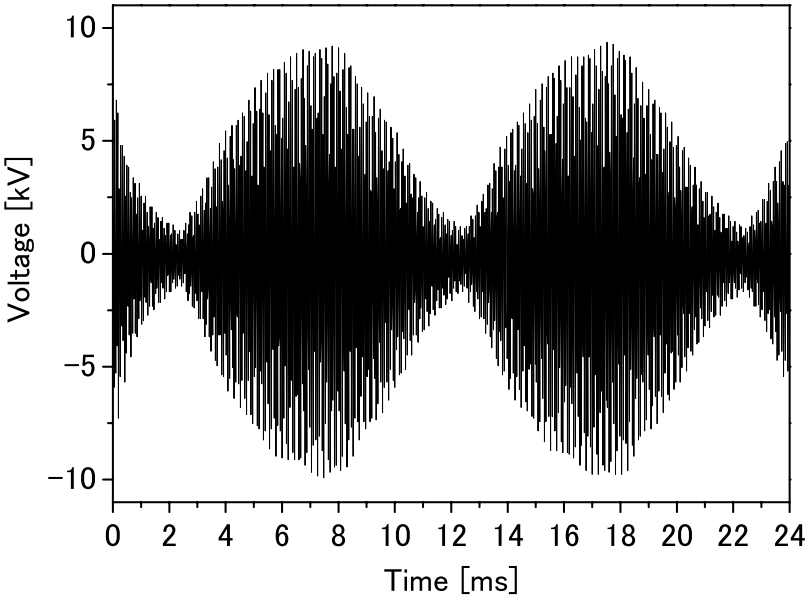


図 3-7 無負荷時の電圧波形

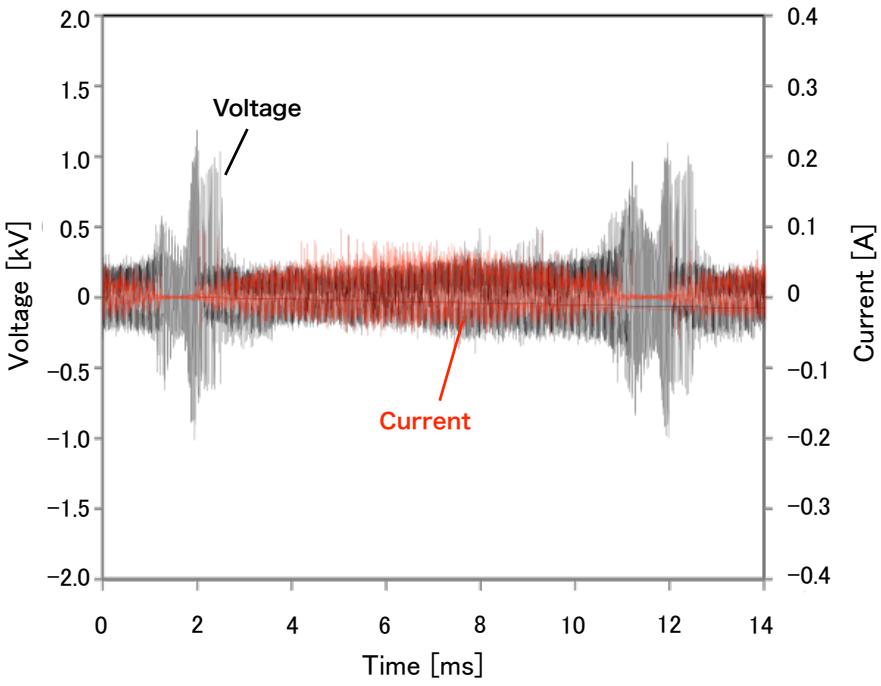


図 3-8 アルゴンプラズマ生成時の電圧及び電流波形

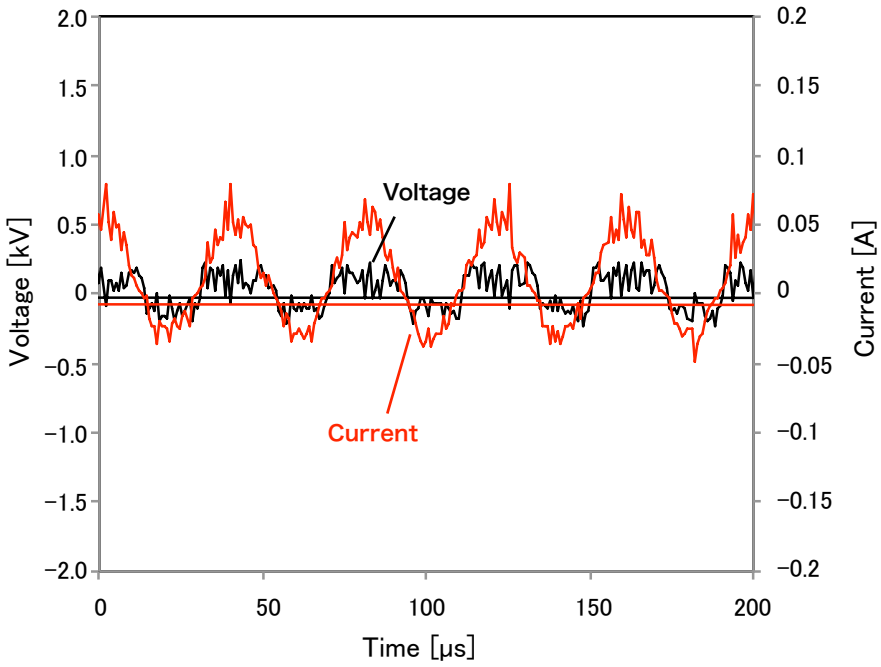


図 3-9 アルゴンプラズマの放電部の電圧及び電流波形

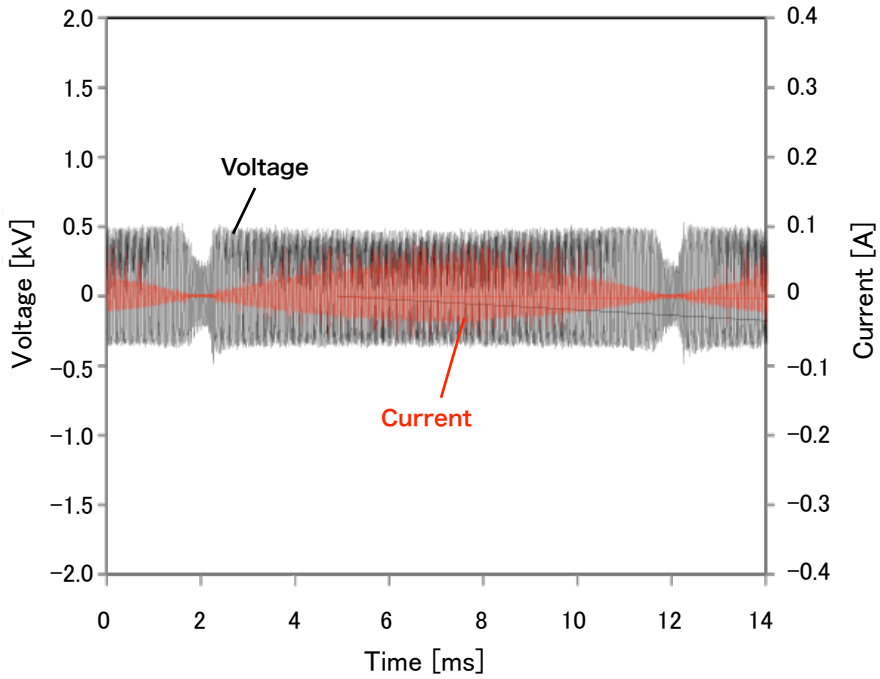


図 3-10 ヘリウムプラズマ生成時の電圧及び電流波形

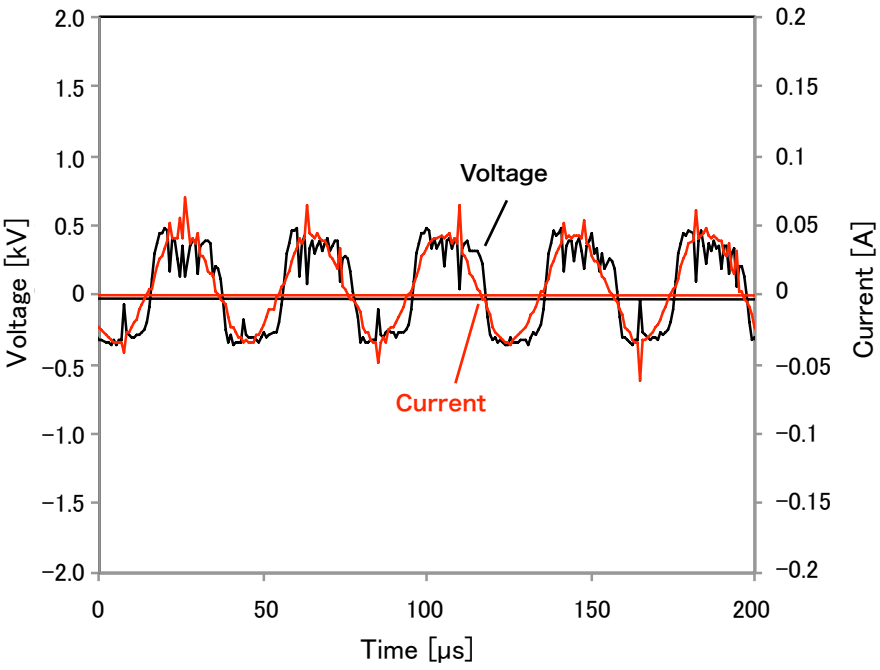


図 3-11 ヘリウムプラズマ放電部の電圧及び電流波形

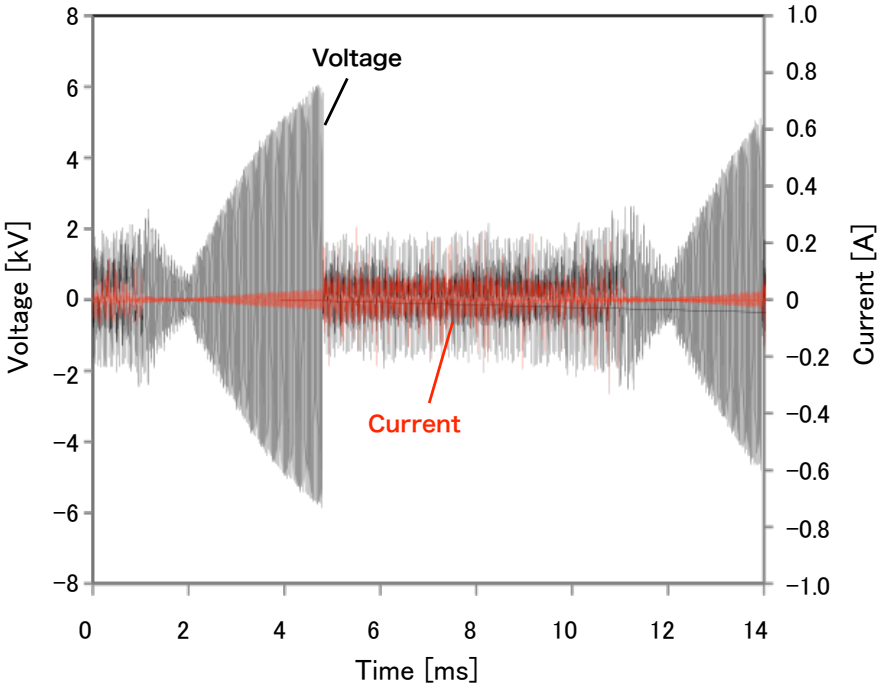


図 3-12 空気プラズマ生成時の電圧及び電流波形

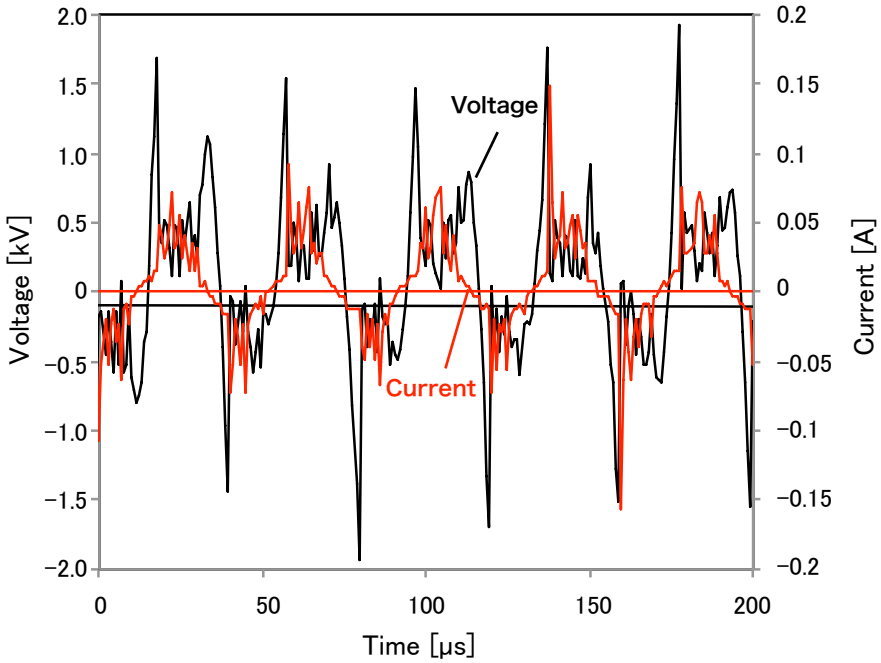


図 3-13 空気プラズマ放電部の電圧及び電流波形

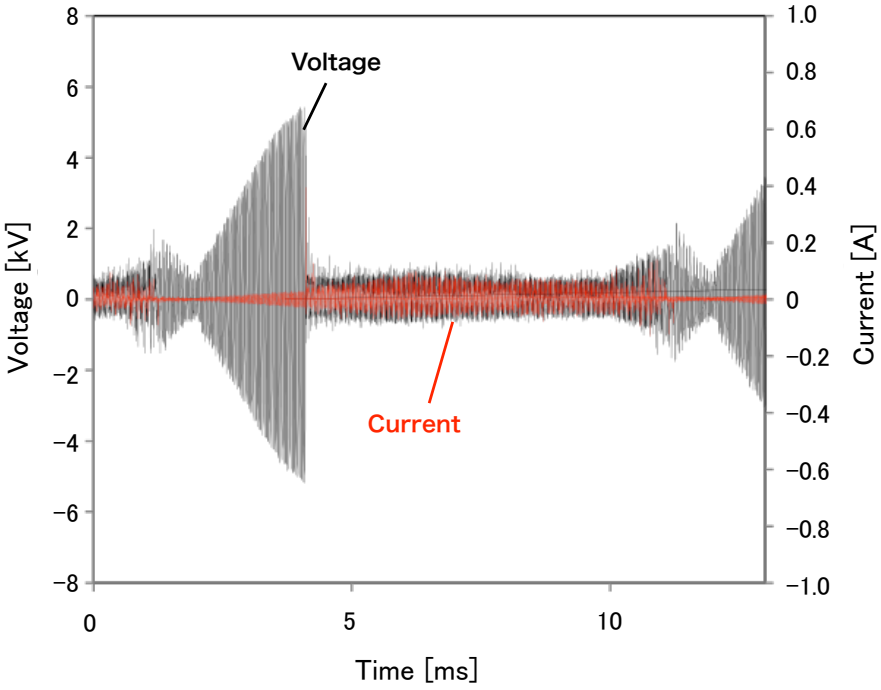


図 3-14 窒素プラズマ生成時の電圧及び電流波形

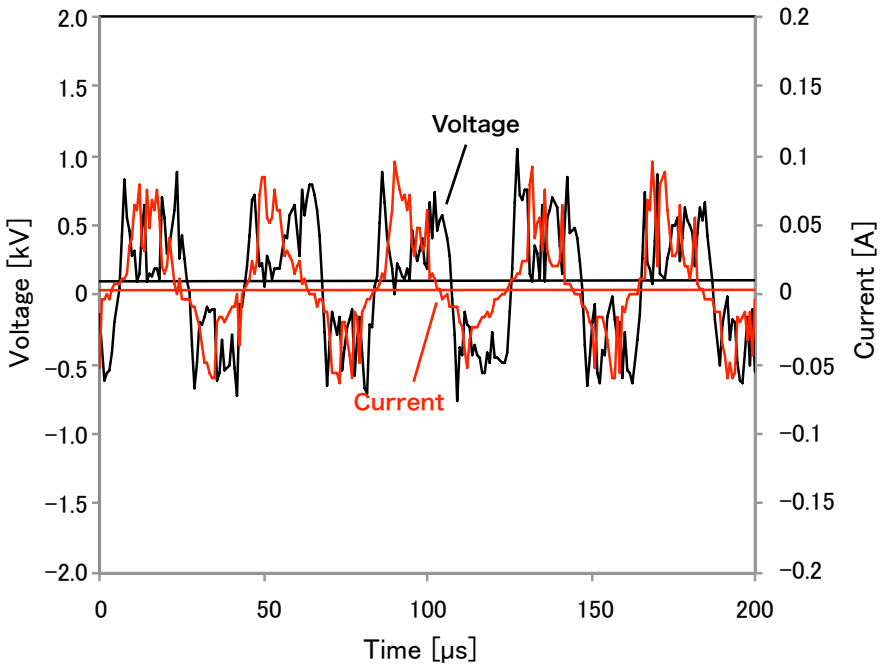


図 3-15 窒素プラズマの放電部の電圧及び電流波形

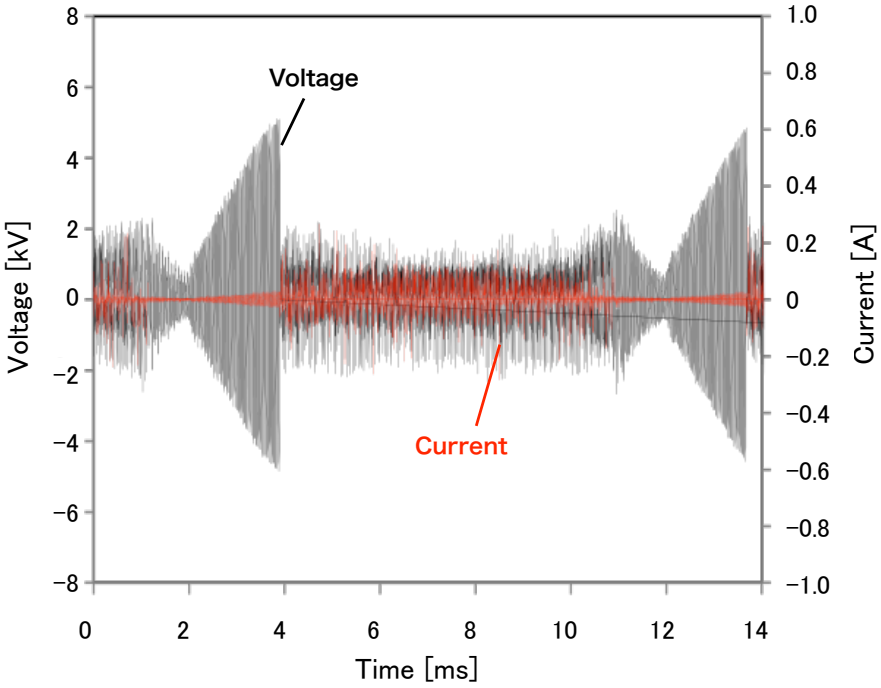


図 3-16 酸素プラズマ生成時の電圧及び電流波形

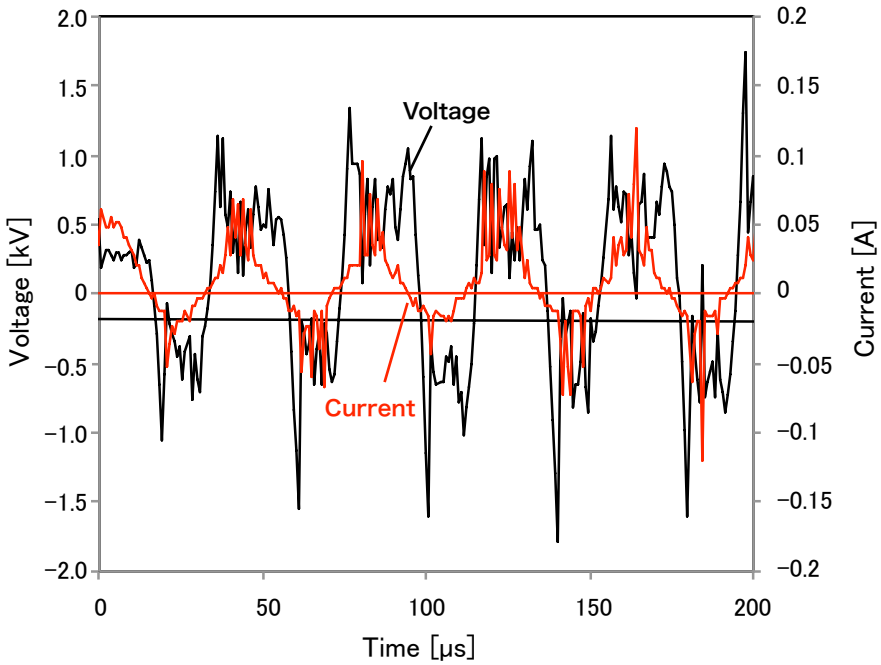


図 3-17 酸素プラズマの放電部の電圧及び電流波形

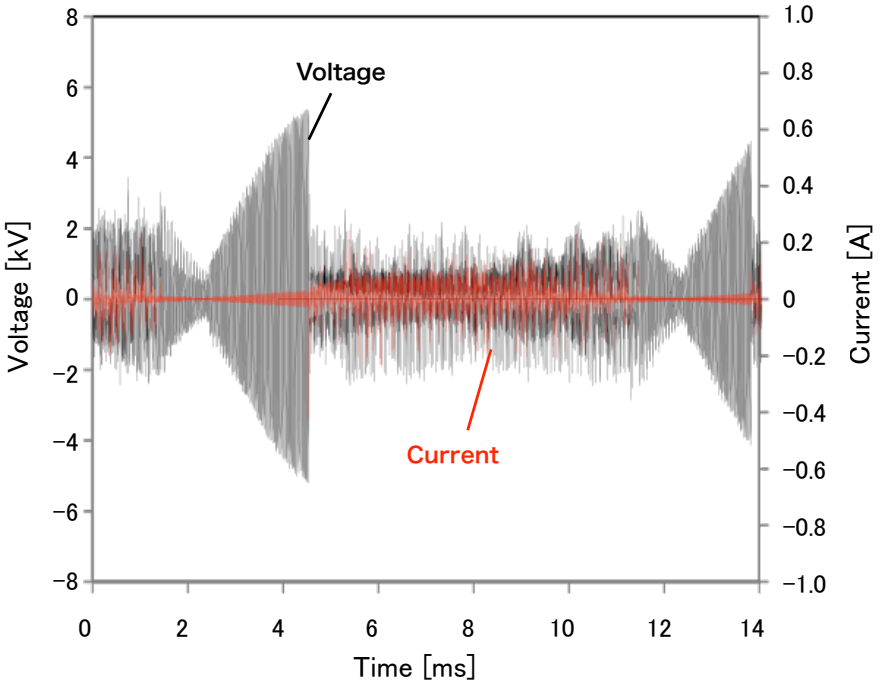


図 3-18 二酸化炭素プラズマ生成時の電圧及び電流波形

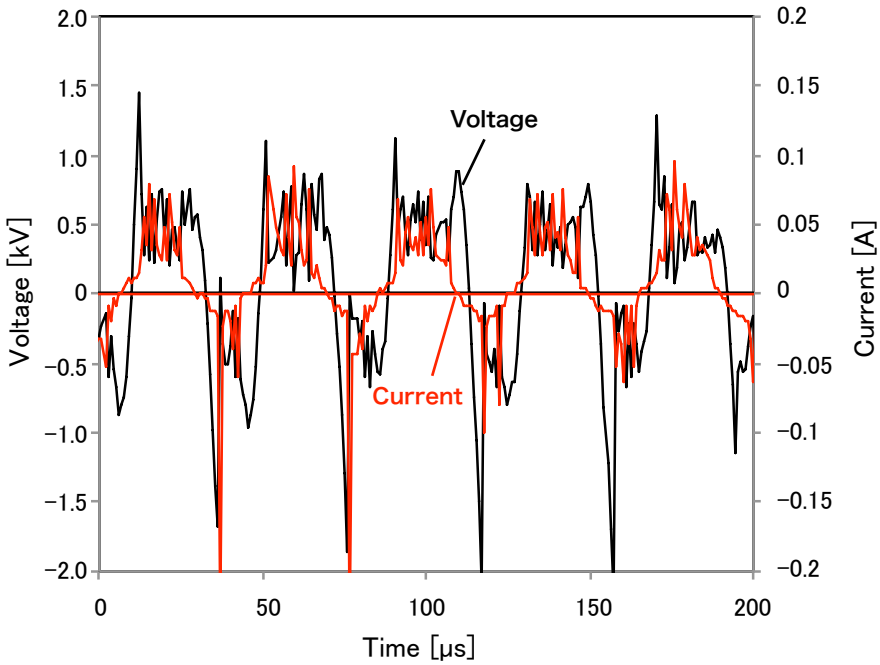


図 3-19 二酸化炭素プラズマの放電部の電圧及び電流波形

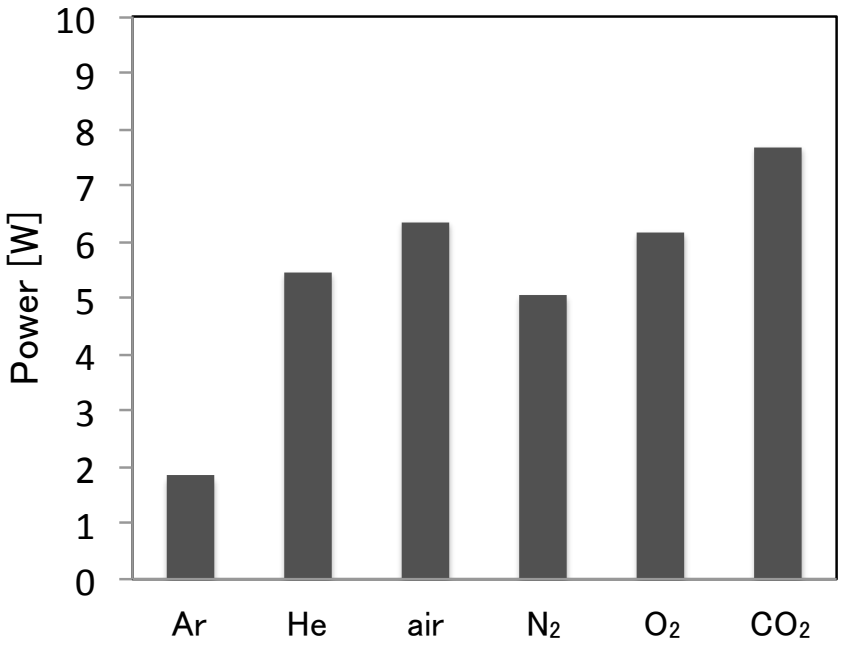


図 3-20 各ガス種のプラズマ生成時における電力

3.4 各ガス種のプラズマによる紫外線量

殺菌に寄与する因子の一つとして近紫外線が挙げられる。この近紫外線の感受性は紫外線の波長域によって異なり，主に UV-A(400-315 nm)，UV-B(315-280 nm)，UV-C(280-200 nm)の 3 つの帯域に分けられている。そして DNA の損傷に寄与するのは UV-C の帯域であり，水銀ランプからは 253.7 nm の波長が得られるため，紫外線殺菌灯として一般に用いられている。この紫外線の発光は大気圧プラズマの生成時にもプロセスガスや電極に由来する原子線，分子線，イオン線等の発光として得られる。そこで，各ガス種のプラズマから発せられる UV-C の紫外線量を測定した。

測定には紫外線積算光量計[C9536; 校正波長: 254 nm，浜松ホトニクス株式会社]を用い，各ガス種のプラズマをガス流量 1 L/min，プラズマ源出口から計測器までの距離を 3 mm で測定した。また，窒素のプラズマに関してはプラズマ源出口から計測器までの距離を 2-20 mm まで変化させて紫外線量を測定した。

図 3-21 に各ガス種のプラズマによる単位時間あたりの UV-C の紫外線量を示す。この結果から，酸素，ヘリウム，アルゴン，空気，二酸化炭素のプラズマの順に UV-C の紫外線量が多くなり，そして窒素プラズマの UV-C の発光が最も多い紫外線量を示

し，その量は 27.4 μW/cm^2 となった。これは寒天培地上の大腸菌殺菌を例にとると，90%殺菌するためには 3600 μJ/cm^2 が必要とされるので，窒素プラズマの場合，照射時間が 131 s 必要となる。滅菌まで処理するためには，99.9999%殺菌される時間の 2 倍にあたる 26 min 必要である。

図 3-22 に窒素プラズマによる紫外線量の照射距離依存性を示す。この結果からプラズマ源出口から距離が離れるにつれて紫外線量は指数関数的に減少することが確認された。そのためプラズマ源出口から 2 mm の位置では UV-C の紫外線量は 41.6 μW/cm^2 となった。このとき，90%の大腸菌殺菌に必要な照射時間は 87 s であり，滅菌処理には 17 min 必要とされる。このことから，プラズマから生成される紫外線量は細菌に対する影響が非常に軽微であると考えられる。

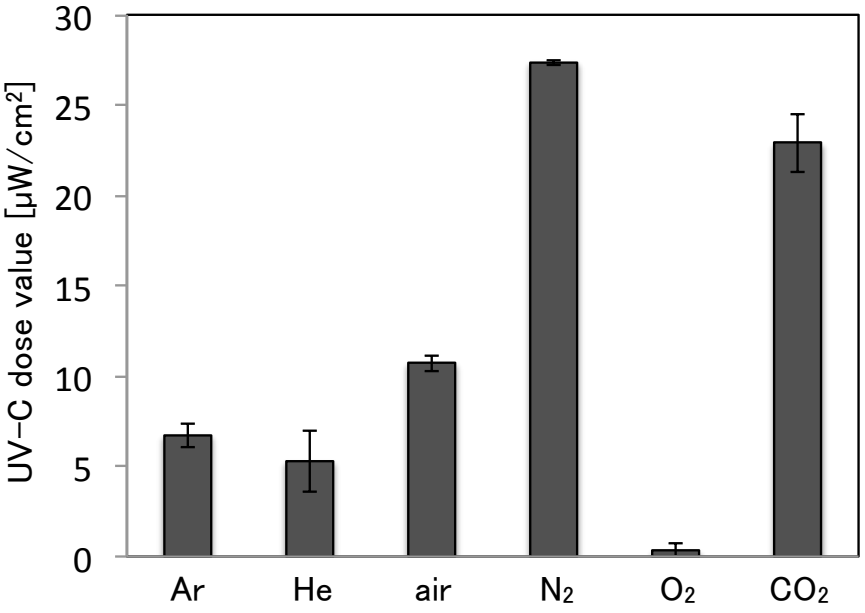


図 3-21 各ガス種のプラズマから発せられる UV-C の紫外線量

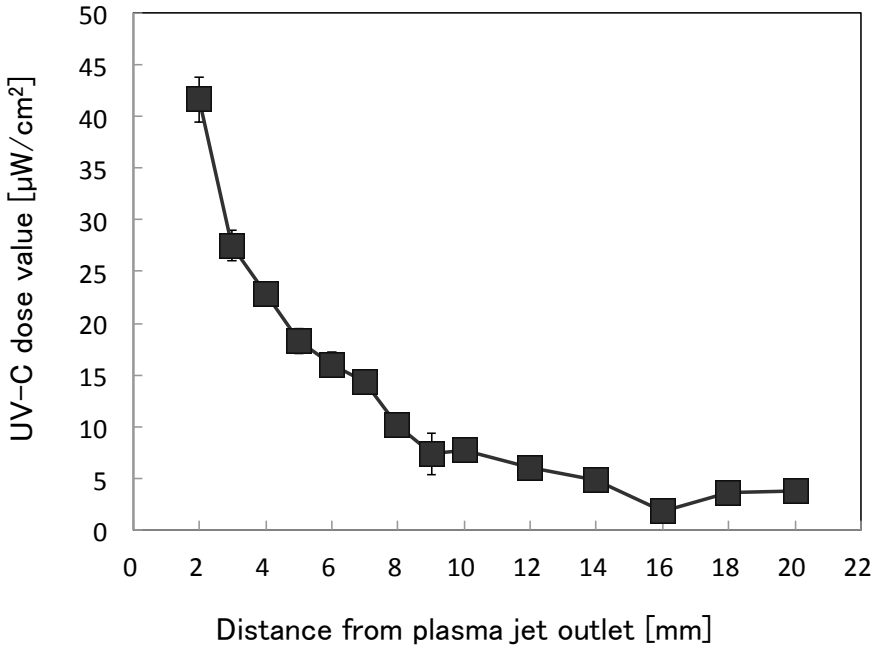


図 3-22 窒素プラズマから発せられる UV-C の紫外線量の距離依存性

3.5 各ガス種のプラズマによる液体の pH 変化の測定

生体内では安定した化学反応を起こすために外的な要因を受けても pH を一定に保つような緩衝能が存在する。このように pH は化学反応において重要な位置づけにあり，プラズマから生成される活性種の化学反応を調査する上で pH の変化は重要なパラメータとなる。現在, プラズマによって液中の pH が変化するという報告があり[42], 様々なガス種のプラズマによってその pH の変化の様子も異なると考えられる。そこで, 様々なガス種のプラズマを蒸留水や緩衝能を持った溶液に対して照射し，pH を測定した。

図 3-23 に示されるように 96 well プレートに 200 μL の蒸留水を分注し，プラズマ源を出口から液面まで 6 mm の位置に配置し, ガス流量 5 L/min で蒸留水に対して各ガス種のプラズマを 0-160 s 照射して pH を測定した。また，緩衝液であるリン酸緩衝液(PBS)と, 細胞培養に用いられる培養液である D-MEM に対しても同様の操作で空気プラズマを 0-600 s 照射して pH を測定した。このとき, pH の測定には pH 計[Orion DUAL STAR meter, Thermo scientific]を用いた。

図 3-24 に各ガス種のプラズマ照射による蒸留水の pH 変化を示す。蒸留水は空気中の二酸化炭素を取り込んでいるため，初期の pH が 5.3 となっている。この蒸留水に対して，二酸化炭素プラズマを照射したとき pH を下げ，160 s 照射でその値は pH4.3 となった。これは高濃度の二酸化炭素が吹き付けられることによって水中に取り込まれ，炭酸水素イオン濃度が上昇したためと考えられる。空気プラズマを照射したときは，今回のガス種の中で最も pH を下げ， 160 s 照射でその値は pH2.4 となった。これは気相中で一酸化窒素や二酸化窒素が生成され，水と反応し，亜硝酸もしくは硝酸となっているためであると考えられる。一方でアルゴン，窒素プラズマでは pH の上昇が見られた。これは水中の二酸化炭素がこれらのガスによって脱気されて本来の蒸留水の pH である 7.0 に近づいたためと考えられる。また酸素プラズマで pH が変化しなかったのは，二酸化炭素が脱気されながらも，過酸化水素の生成やオキソニウムイオンなどの酸性になる因子が酸素プラズマ照射によって生成されたためと考えられる。

PBS と D-MEM の溶液の pH について，PBS は大気中で pH7.5 に調製されており，D-MEM は CO_2 5%の環境下で pH7.5 を保つように炭酸水素ナトリウムの濃度が調製されているため，大気中における初期の pH は 9.0 となっている。そして，これらの溶液に対して，空気プラズマ照射による pH 変化を図 3-25 に示す。蒸留水と同様に空気プラズマの照射によって pH は下がる傾向にあった。しかし，その減少の度合いは小さく， 600 s の空気プラズマ照射で PBS は pH4.2 まで下がり，D-MEM は pH7.1 まで下がった。pH が下がりにくい要因として各溶液の緩衝能によるものと考えられる。

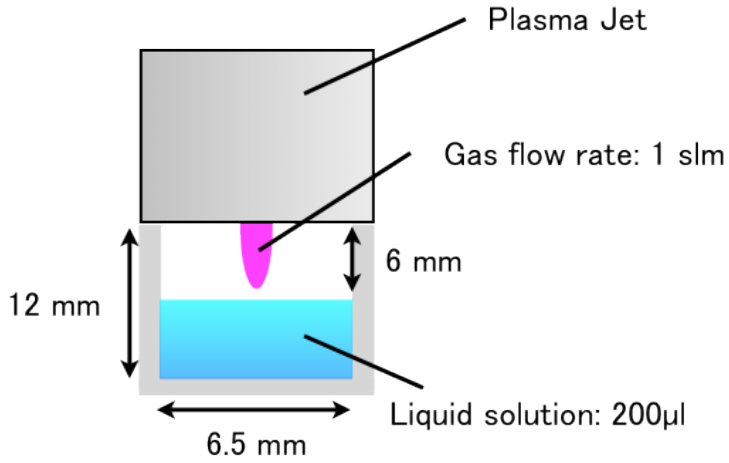


図 3-23 溶液に対するプラズマ照射

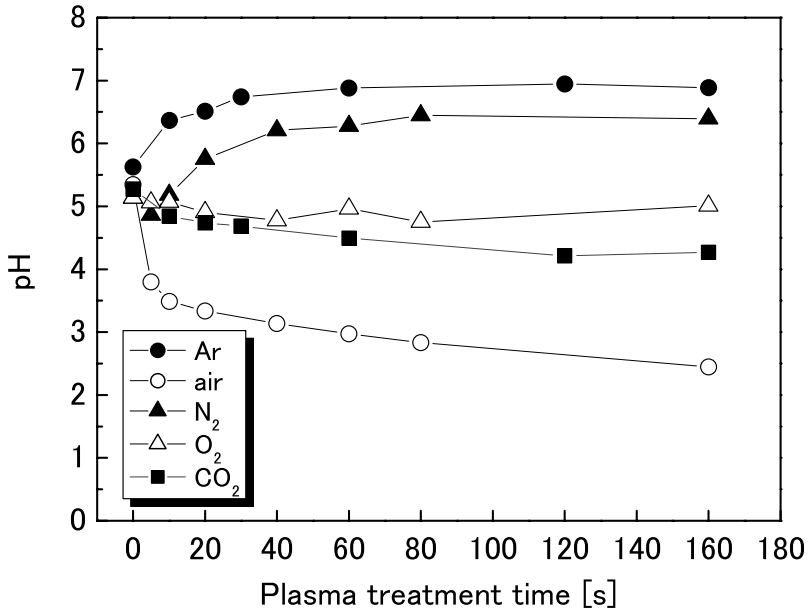


図 3-24 各ガス種のプラズマ照射による蒸留水の pH 変化

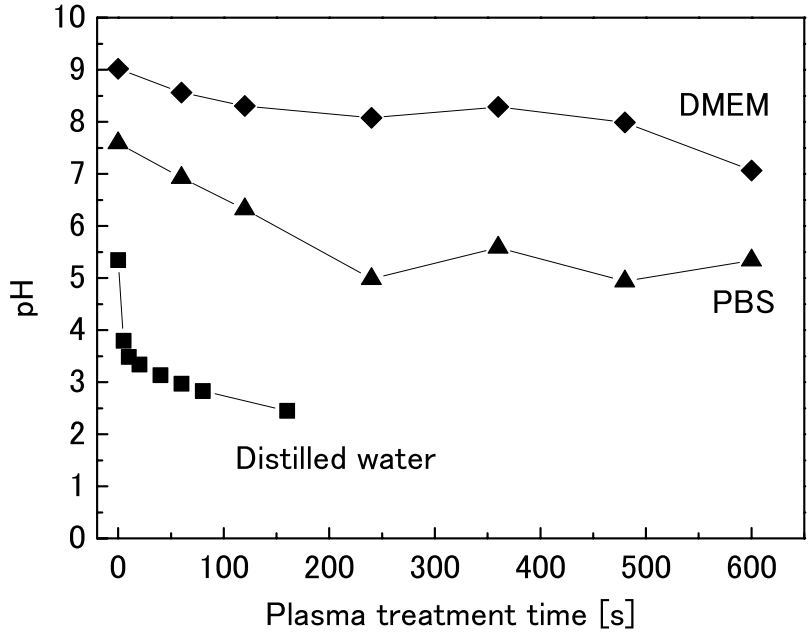


図 3-25 空気プラズマによる各種溶液の pH 変化

3.6 まとめ

本章では，様々なガス種をプラズマ化できるマルチガスプラズマジェットについてプラズマ源の構造，温度の制御法を示し，このプラズマ源を用いた電圧，電流及び電力測定，各ガス種のプラズマによる紫外線量，プラズマ照射による pH の変化といった基礎的な特性について調査した。

各ガス種のプラズマ生成時の電圧及び電流測定ではプロセスガスによって絶縁破壊電圧が異なり，アルゴンでは 1 kV，ヘリウムでは 500 V，そして，分子性ガスである窒素，酸素，二酸化炭素は 5.5 kV 程度であり，酸素と窒素の混合ガスである空気プラズマは 6 kV 程度であった。放電時の波形では，電流はどのプラズマも変わらず 30 μs のパルス幅で約 50 mA で，電圧はアルゴンが 200 V で他のガス種が 500 V であった。電力に関しては放電部での電圧の低かったアルゴンが 1.8 W 程度であり，他のガス種は 5-8 W 程度であった。

各ガス種のプラズマから発せられる UV-C の紫外線量は，窒素プラズマが最も紫外線量が多く，27.4 μW/cm^2 であった。この線量は通常の紫外線殺菌に用いられる紫外線量よりも大幅に小さく，微生物に対する影響は軽微であると結論づけた。

各ガス種のプラズマによる pH の変化では pH5.2 の蒸留水に対して空気プラズマが最も pH を下げ，160 s 照射でその値は pH2.4 となった。また，このプラズマは緩衝液である PBS や DMEM に対しても pH を下げ, 600 s の照射で PBS は pH4.2 まで下がり，D-MEM は pH7.1 まで下がることが明らかとなった。

[33] W. Kumagai, H. Miyahara, E. Hotta, A. Okino, Atmospheric line remote plasma source for surface treatment, *The Sixth Asian-European Int. Conf. on Plasma Surface Eng.*, **310**, P4007 (2007).

[34] T. Tamura, Y. Kaburaki, R. Sasaki, H. Miyahara, and A. Okino, Direct Decomposition of Anesthetic Gas Exhaust Using Atmospheric Pressure Multi-gas Inductively Coupled Plasma, *IEEE Trans. Actions. Plasma Sci.*, **39**, 8, pp.1684-1688 (2011).

[35] T. Watanabe, T. Tsuru, Water plasma generation under atmospheric pressure for HFC destruction, *Thin Solid Films*, **516**, pp.4391–4396 (2008).

[36] K. Shigeta, H. Traub, U. Panne, A. Okino, L. Rottmann and N. Jakubowski, Application of a micro droplet generator for an ICP-sector field mass spectrometer - Optimization and analytical characterization, *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, pp.646-656 (2013).

[37] G. Fridman, A. D. Brooks, M. Balasubramanian, A. Fridman, A. Gutsol, V. N. Vasilets, H. Ayan and G. Friedman, Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria, *Plasma Process. Polym.*, **4**, pp.370-375,(2007).

[38] 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, 1, pp. 20-24, (2011)

[39] 高松利寛, 大下貴也, 平位英之, 佐々木良太, 宮原秀一, 松本義久, 沖野晃俊. マルチガスプラズマによる殺菌および医療応用の検討, プラズマ/パルスパワー合同研究会, PST-11-112／PST-11-113, (2011).

[40] 大下貴也, 上原広大, 高松利寛, 川手彬嗣, 宮原秀一, 沖野晃俊, 温度制御ー酸素混合ヘリウムプラズマジェットを用いた大腸菌の殺菌, 電気学会プラズマ研究会, PST-13-009, (2013).

[41] J. S. Chang, R. M. Hobson, 市川幸美，金田輝男, 電離気体の原子・分子過程, 東京電機大学出版局, (1982).

[42] J. L. Brisset, B. Benstaali, D. Moussa, J. Fanmoe and E. Njoyim-Tamungang, Acidity control of plasma-chemical oxidation: applications to dye removal, urban waste abatement and microbial inactivation, *Plasma Sources Sci. Technol.*, **20**, 034021, (2011).

第 4 章

各ガス種のプラズマによる表面処理

4.1 はじめに

材料は表面を介して他の物体や周辺の環境と相互作用するため，材料表面に対して新しい機能特性を付与する表面処理の行程は工学からバイオ研究と分野を問わずあらゆる場面で用いられる。しかし，その多くは化学的処理によるもの，もしくは低圧プラズマを用いるものがほとんどであった。化学的処理は洗浄や乾燥の行程が必要であるほか，環境汚染の問題が指摘されている。一方低圧プラズマを用いたものは，真空環境が必要なことからバッチ処理が必須で，かつ高密度なプラズマの生成が困難なため処理速度が見込めないことから,スループットの向上には限界がある。そこで近年，真空容器や排気設備が不要であり，高密度のプラズマによる連続処理が可能となる，大気圧プラズマが各種産業から注目を集めている。

今回用いるプラズマ源は，あらゆるガス種を大気圧下で安定にプラズマ化することができるため，選択的に有効な活性種を生成し，新たな機能を効率的に付与する処理を施すことが可能である。また，放電による損傷も無く，プラズマのガス温度も室温程度の低温であるため，あらゆる材質に対して処理することができる。そこで，本章ではこの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による様々な材料への表面処理効果を調査した。

4.2 大気圧プラズマによる親水化処理

表面処理の分野において，材料表面の塗装性や接着性を向上させるために，水をはじめとした溶液との親和性を高める親水化処理が有効な手段として用いられている。この親水化効果はプラズマ処理によって得られることが分かっており，様々な材料分野の研究に用いられている。プラズマ照射による親水化のメカニズムは材質によって異なり，例えば無機物材料の場合，表面の有機物をプラズマによって生成されたオゾンや酸素活性種などの化学的に高活性な因子によって脱離させ，処理表面を清浄し，

本来の親水性を取り戻す。一方，高分子材料の親水化では，前述の活性種によって表面の結合が切断され，官能基が形成される。この官能基には，親水性のカルボキシル基やカルボニル基などが含まれることから，材料の親水性を向上させることができ，接着剤や塗料との親和性を高めることができる[43]。また，プラズマのエッチングによる表面荒さなども親水性の向上に寄与していると考えられている[44]。現在，この親水化処理を産業分野で用いるためには，さらなる律速や持続性の向上が要求されており，本節ではマルチガスプラズマジェットを用いて，ガス種を変化させて高効率に親水化効果を及ぼすプラズマの条件について調査した。

4.2.1 各ガス種のプラズマによる親水化効果

前述したようにプラズマから生成される活性種により親水化効果を得ることができるため，マルチガスプラズマジェットのプロセスガス種を選択することで，親水性の向上に寄与する活性種を効率よく生成することが可能である。各材質に対する酸素プラズマによるぬれ性変化の様子を図 4-1 に示す。図 4-1 のように大気圧プラズマは半導体や金属，ガラスなどの無機材料からゴムや樹脂，生体などの有機材料といったあらゆる材料に対して親水化効果を及ぼすことができる。

そこで生体材料やバイオ研究等にもよく用いられる有機材料に焦点を当てて，今回薄さ 25 μm，初期接触角度 60º のポリイミドフィルム[TGK 280-18-16-13, DU PONT-TORAY CO., LTD]にプロセスガスの種類をアルゴン，ヘリウム，酸素，窒素，空気，二酸化炭素と変化させてマルチガスプラズマジェットを照射し，各親水化の効果を調査した。その際に，プラズマ源の出口から 3 mm の位置で処理対象物を搬送装置[GLM20, THK Co., LTD]を用いて 10 mm/sec から 1500 mm/sec の間で速度を変化させて移動させ，各ガス種のプラズマを照射した。そして，材料表面の親水化の程度は材料表面の表面張力，すなわち接触角によって表すことができるので[45]，接触角計（PG-X, MATSUBO Co.）で処理表面の接触角を測定した。実験のセットアップを図 4-2 に示す。さらに，プラズマ照射前後でポリイミドフィルム表面の結合状態がどのように変化しているかを調べるために，最も親水化効果の高かったガス種に関して，Attenuated Total Reflection (ATR) FT-IR[VIR-9500, JASCO Co.]を用いて，4000-600 cm^{-1} の範囲を測定した。このとき，処理したフィルムの反射スペクトルから処理前の反射スペクトルを差し引いた計算を行った。

照射後のポリイミドフィルムと水の接触角との関係を図 4-3 に示す。親水性が向上

した，すなわち速い搬送速度で大きく接触角が低下したガス種は二酸化炭素，窒素，酸素，ヘリウム，アルゴン，空気の順であった。特に，二酸化炭素に関しては，搬送速度が 1500 mm/sec において，接触角が初期値 60°から約 40°まで減少した。このように低圧プラズマの場合と同じく，二酸化炭素のプラズマで高い親水化効果を示した。そこで，この二酸化炭素プラズマの処理前後の変化について ATR FT-IR を用いて測定した。処理前のスペクトルおよびポリイミドの構造式を図 4-4(a)に，処理前後のスペクトルの差を図 4-4(b)に示す。この結果からスペクトル変化として，1500 cm^{-1} の 1,4-C_6H_4 の伸縮運動(stretching)，1378 cm^{-1} の CN の伸縮運動，1245 cm^{-1} の C-O-C の伸縮運動，815 cm^{-1} の 1,2,4,5-C_6-H_2 の vending[46]，723 cm^{-1} の C-H の縦ゆれ振動(wagging vibration)のスペクトル[47]がそれぞれ減少している。さらにカルボキシル基(COOH)と考えられる 1720 cm^{-1} のスペクトル[48]が増加している。このことから，二酸化炭素のプラズマからは酸素活性種や炭素活性種などが生成されているので，プラズマ処理を行うことで，スペクトルに減少が見られる振動の結合が切れ，その代わりに COOH などの親水基が形成された可能性が考えられる。

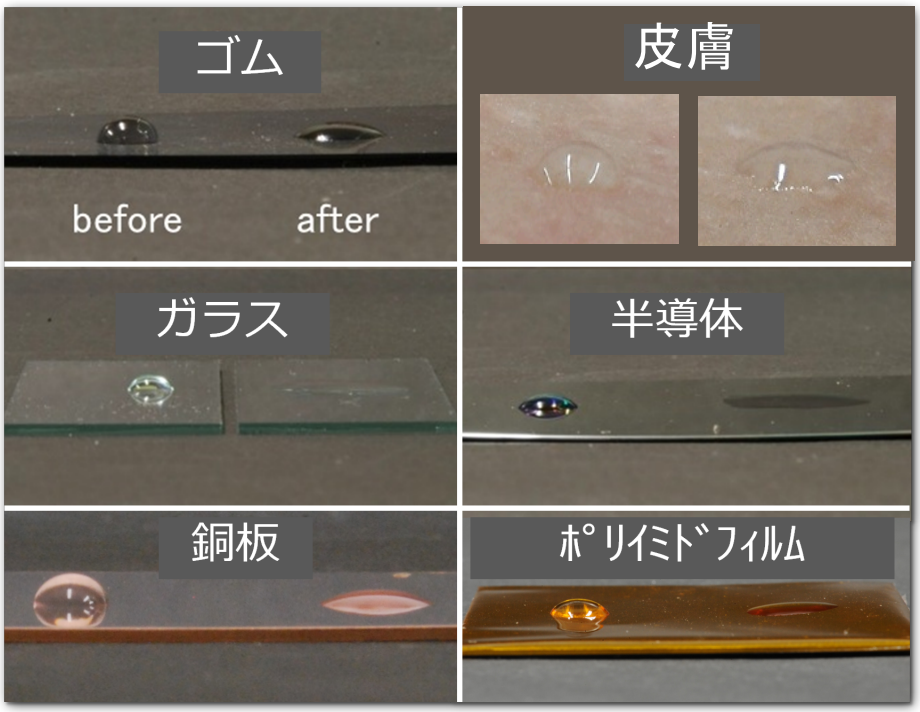


図 4-1 各材質に対するプラズマ処理のぬれ性変化

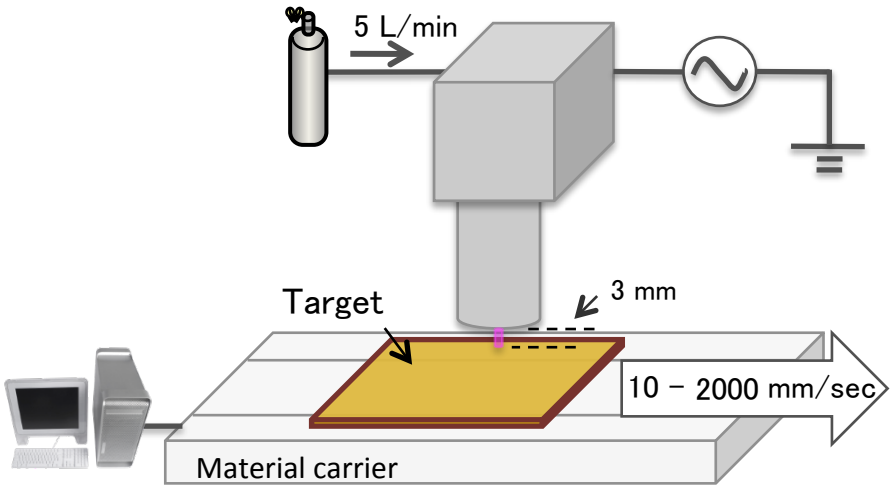


図 4-2 実験装置構成

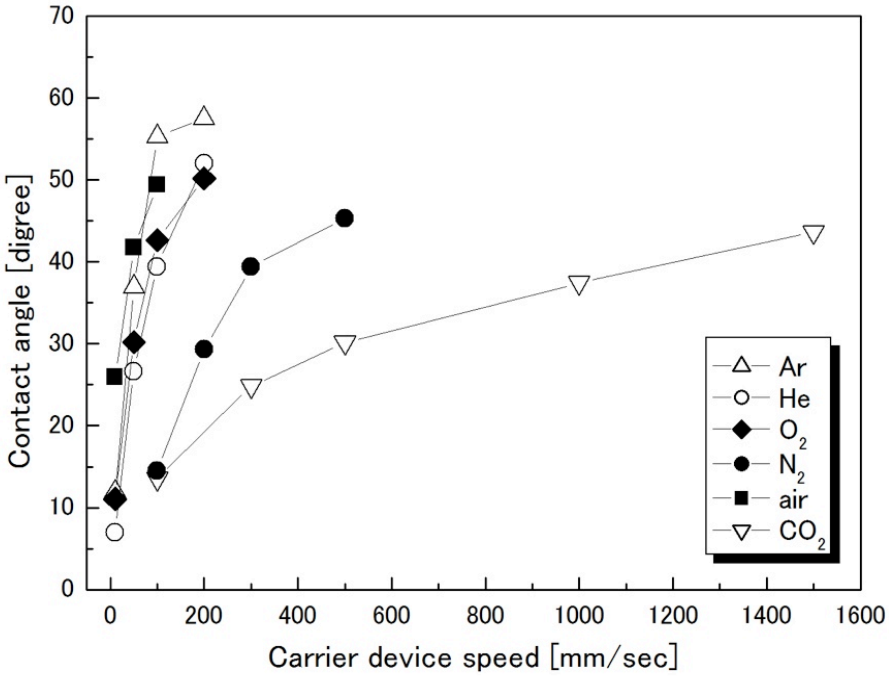


図 4-3 各ガス種のプラズマによる親水化効果

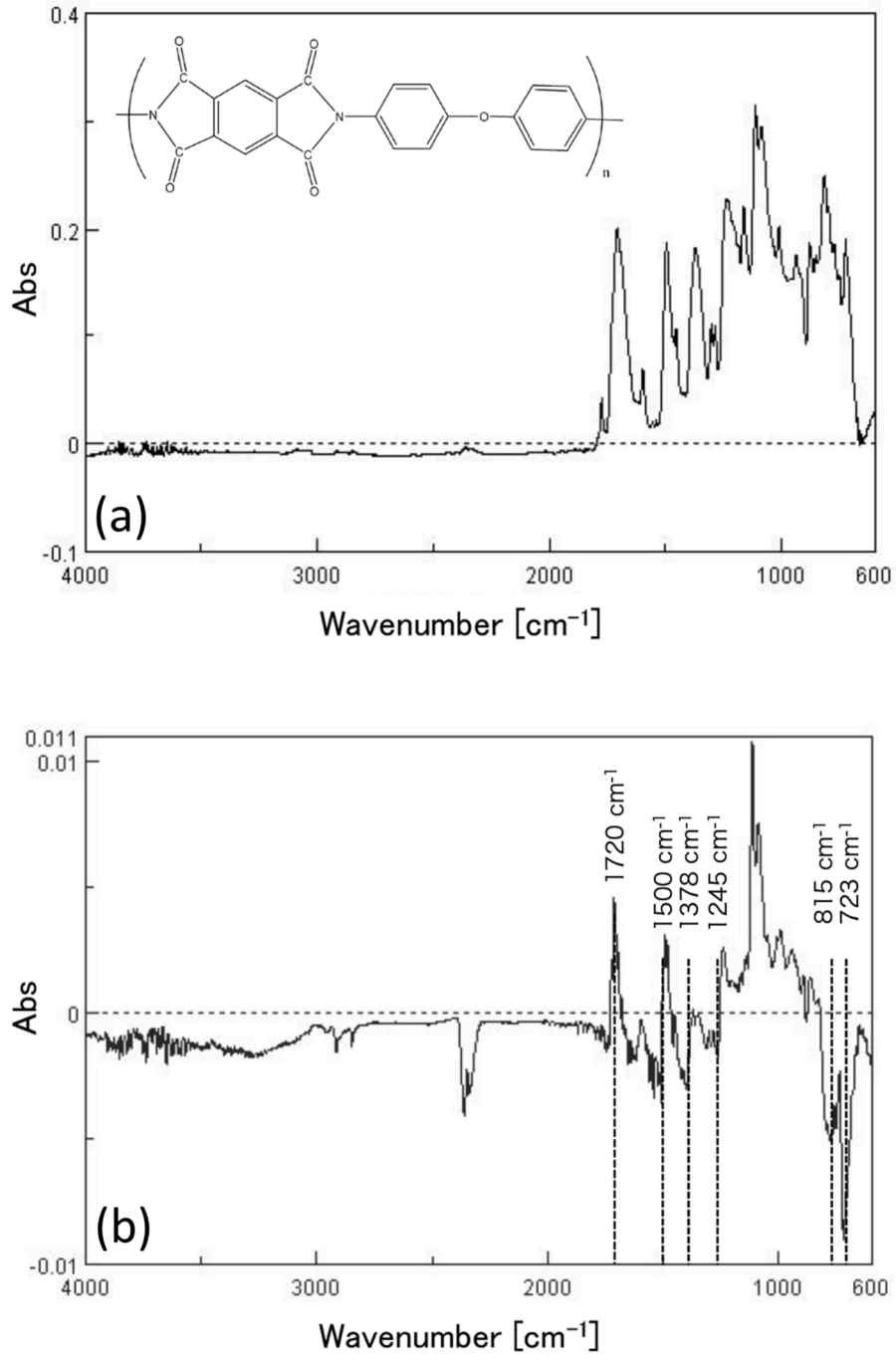


図 4-4 二酸化炭素プラズマの処理前後の ATR FT-IR スペクトル，(a) 未処理のポリイミドフィルム，(b)二酸化炭素プラズマ処理前後のスペクトルの差

4.2.2 混合ガスのプラズマによる親水化効果

100 mm/sec で搬送しているポリイミドフィルムに対して流量 5 slm のプラズマを照射し，接触角を測定した。このとき，プロセスガスは，アルゴン，ヘリウムに対して，酸素，窒素，二酸化炭素を 0-100%の比率で添加した混合ガスを用い，ガス種による親水化効果の変化を調査した。

図 4-5 にアルゴン及びヘリウムに対する酸素の添加率を変化させプラズマ照射したときのポリイミドフィルムの接触角を示す。アルゴンまたはヘリウム単体でプラズマを生成して処理を行ったときよりも酸素を添加した条件での接触角の減少が顕著であり，双方とも添加濃度が 10%前後で親水化効果の極大が存在することがわかる。これはそれぞれの混合濃度で活性酸素種が多く生成されたためと考えられる。

次にアルゴン及びヘリウムに対して窒素または二酸化炭素の添加率を変化させた混合ガスを用いてプラズマを生成し，ポリイミドフィルムの接触角を調査した。窒素添加の場合の接触角を図 4-6 に，二酸化炭素添加の場合の接触角を図 4-7 に示す。窒素を混合した場合には，アルゴン，ヘリウムのいずれも窒素の添加率が 1-5%と 100%のときに接触角が極小となり，高い親水効果を示した。特に，窒素 100%の方が高い親水化効果を示した。ヘリウムに二酸化炭素を混合した場合は混合率 10%で最も高い親水化効果を示したが，アルゴンに二酸化炭素を混合した場合は混合率 100%で高い親水効果を示した。アルゴンよりヘリウムに二酸化炭素を混合した方が高い親水化効果を示した理由は，ヘリウムの方が準安定状態の寿命が長く，ポテンシャルエネルギーも 2 倍程度高いため，準安定状態のヘリウムが対象物表面の衝突する確率や他の分子等に衝突して活性種を生成させる確率が高かくなったことが考えられる。

これらをまとめると，酸素や窒素をアルゴンまたはヘリウムに混合した際，1-10%の低濃度域に親水化効果のピークが存在した。しかし，ガスを混合すれば必ず親水化効果が向上するわけではなく，窒素をアルゴンまたはヘリウムに混合したときには，ガス単体の方が高いことが明らかになった。

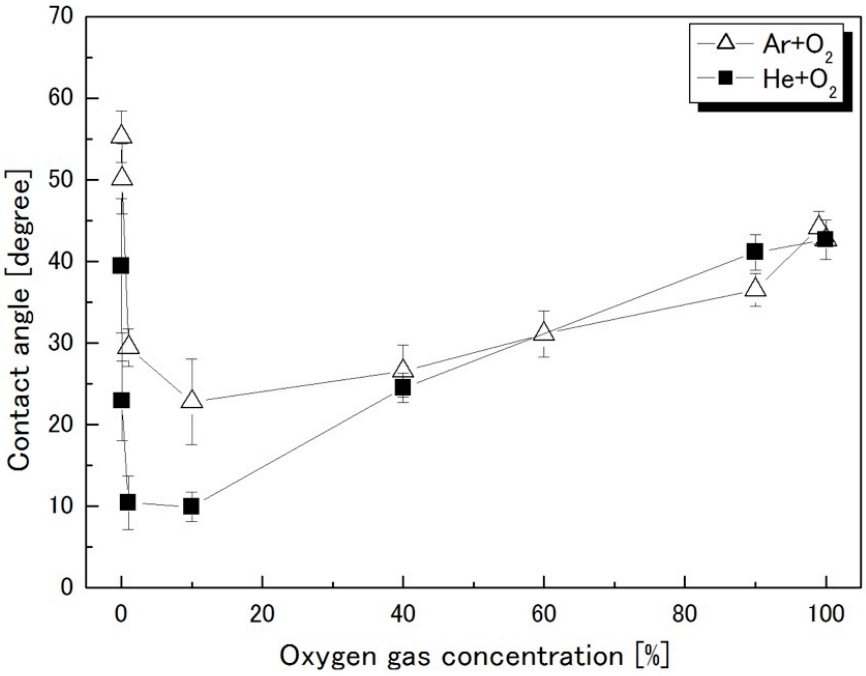


図 4-5 アルゴン酸素及びヘリウム酸素プラズマの親水化効果の混合率依存性

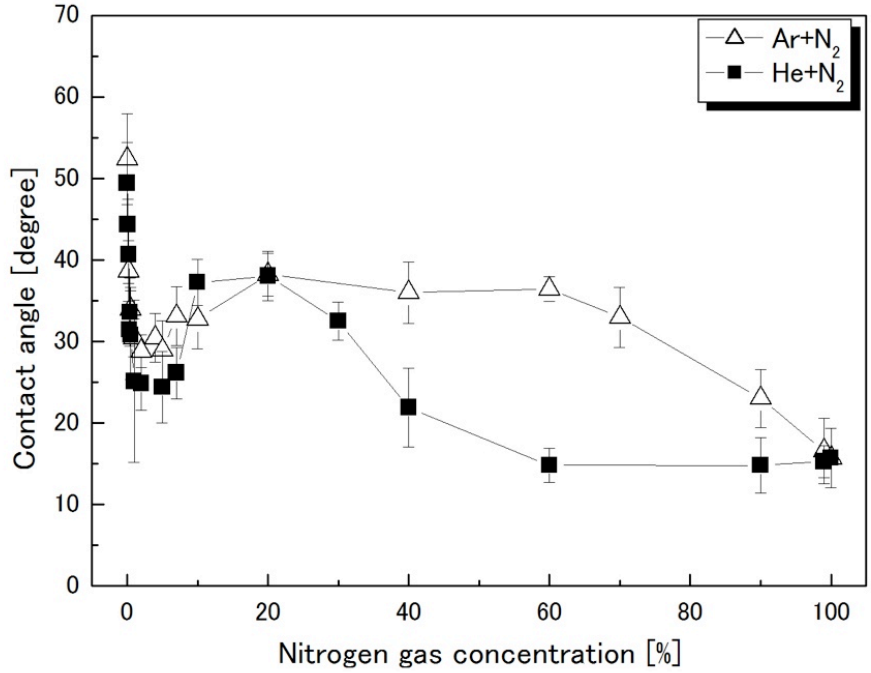


図 4-6 アルゴン窒素及びヘリウム窒素プラズマの親水化効果の混合率依存性

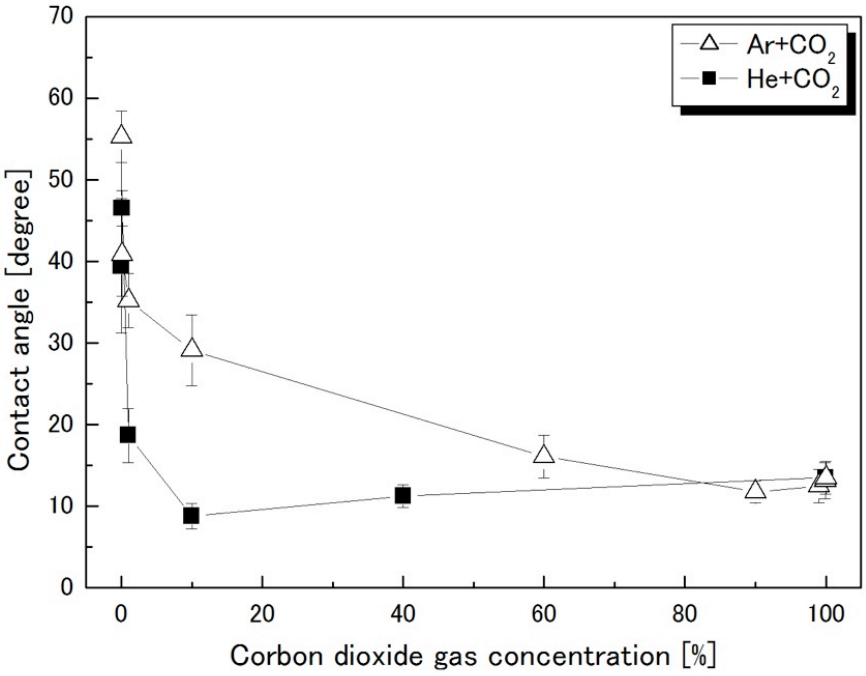


図 4-7 アルゴン二酸化炭素及びヘリウム二酸化炭素プラズマの親水化効果の混合率依存性

4.2.3 各ガス種のプラズマによる親水化効果の持続性

高分子の親水化の際には，プラズマ照射により表面に親水性の官能基を形成し，特異的に表面エネルギーが高い状態となる[49]。しかし，時間が経つにつれて，この官能基が高分子の内部に潜り込むため，系全体として安定化に向かい，表面エネルギーが低下する。これにより親水性が低下すると考えられている[50]。ここでは，ポリイミドフィルムを搬送速度が 50 mm/sec として各ガス種で生成したプラズマで処理したのち，大気開放下で保存して，時間経過による接触角の変化を測定した。

各ガス種におけるプラズマの親水化効果の経時変化について，32 日後までの様子を図 4-8 に示す。プラズマ照射直後の接触角は二酸化炭素がもっとも小さく，窒素，ヘリウム，酸素，アルゴン，空気の順で大きくなった。処理後 3 日までいずれのガス種も接触角の急激な上昇が見られた。しかし，その上昇の度合いはどのガス種も同様であり，時間経過と共に緩やかになった。そして，7 日以降接触角の上昇が止まり，特に二酸化炭素のプラズマで処理した試料の接触角が約 30°と他のガス種よりも低い状

態を維持した。これは二酸化炭素のプラズマによるエッチングの度合いが他のガス種と比べて大きかったことが原因として考えられる[34]。そしてこの親水化効果は 7 日以降から 32 日経過した時点でも接触角が変わらず持続していた。

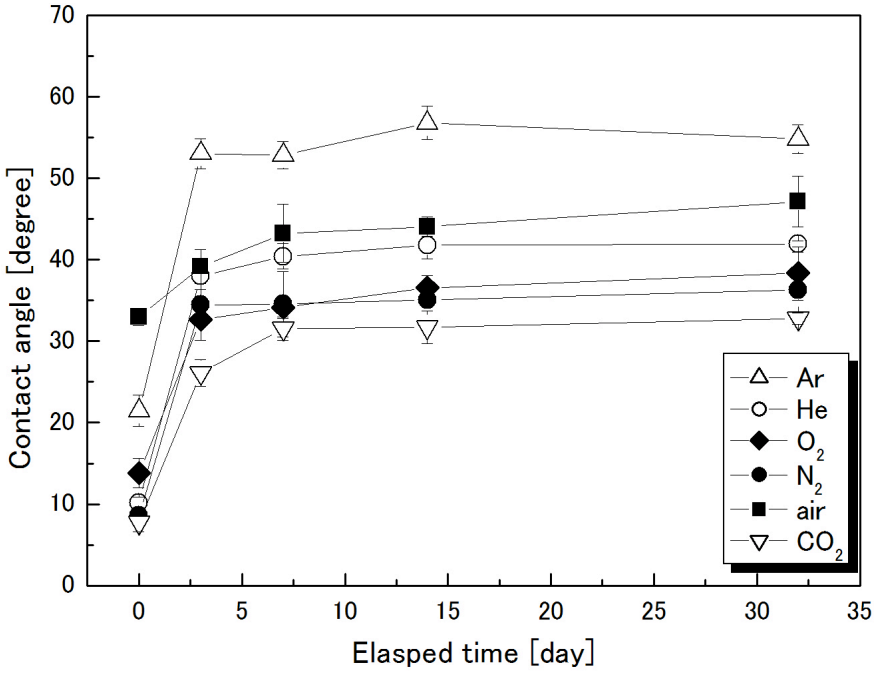


図 4-8 各ガス種のプラズマ処理後の親水化効果の経時変化

4.3 セルデスクに対する各ガス種のプラズマ処理

組織工学、再生医学において細胞培養に使用する基材、基質の役割は重要である。付着性の細胞のために，ポリマー表面をプラズマ処理されたもの、天然の細胞外基質であるコラーゲンや電荷を陽性にするためポリ-L-リジンでコーティングされたものがある。逆に浮遊性の細胞のために、各種処理やコーティングされたものもあり、細胞の培養形態に合わせた培養基材表面の工夫が多種多様にある。近年の幹細胞研究において細胞を取り囲む微小環境によって幹細胞の未分化の維持，分化誘導が制御されることが明らかになってきた。ES/iPS 細胞を始めとする幹細胞を用いた再生医療の臨床応用が目前となってきた。さらなる材料表面の選択性が求められるようなり，バイオマテリアルの分野で新たな材料開発や細胞と基材の界面解析が盛んに進められてい

る。プラズマ処理によって材料表面の組成や構造が変化させることが可能である。そこで本節では，様々なガス種のプラズマで細胞培養用器材であるセルデスク表面を処理し，セルデスク表面及びセルデスク上で培養した細胞の状態を調査した。

4.3.1 各ガス種のプラズマ処理によるセルデスク表面の状態

細胞培養器材にはポリマー表面が細胞付着処理された Non-coat および Collagen-coat されたセルデスク[LF-1， C-1，φ13.5mm，住友ベークライト株式会社]を使用した。Collagen-coat の器材は Non-coat の器材よりも細胞の付着性が高く，バイオ研究でよく用いられている。図 4-9 のように各種セルデスクに対して流量 5 L/min の窒素プラズマを照射距離 3 mm で中央に 60 s 照射し，親水化効果を測定した。さらに，4.3 節で親水化効果の高かった二酸化炭素及び窒素プラズマで処理された表面の状態を Atomic Force Microscope (AFM)[Bruker]を用いて形状観察した。

図 4-10 に各種セルデスクのぬれ性変化を示す。4.3 節と同様に窒素プラズマによって各種セルデスク表面に親水化効果が見られた。Non-coat のセルデスクでは接触角が 62.5ºから 32.2ºまで下がり，Collagen-coat のセルデスクでは接触角が 72.6ºから 10.2ºまで下がった。このことから各種セルデスクの表面に親水基が形成された，もしくは表面の微細な形状が変化されたと考えられる。そこで，AFM を用いたによるプラズマ処理前後の各種セルデスク表面の形状を図 4-11 から図 4-12 に示す。図 4-11 が示すように未処理の Non-coat セルデスク表面に繊維状の形状が見られた。そして，この表面に対して各ガス種のプラズマ処理を行なうと，どのガス種でもプラズマ処理前後で表面形状の変化が見られた。また，各ガス種間でも表面形状に差異が見られた。二酸化炭素のプラズマ処理では表面が粒状に変化し，未処理のセルデスクよりも輪郭がシャープな画像が取得された。一方窒素のプラズマ処理では表面が滑らかな形状が観測され，未処理のセルデスクよりも輪郭が不明瞭な画像が取得された。このことから，表面形状の変化に加えて極性も変化したことから AFM の針に対して影響を及ぼし，輪郭の分解能に寄与した可能性が考えられる。Collagen-coat のセルデスクに対する各ガス種のプラズマ処理後の表面形状を図 4-12 に示す。図 4-11 と同様の傾向が見られたが，プラズマ処理した Non-coat と Collagen-coat のセルデスクを比較すると表面の構造に違いが見られるため，プラズマ処理はコーティングのような同質になるような処理では

なく材料の特性に依存した特徴を示すと考えられる。

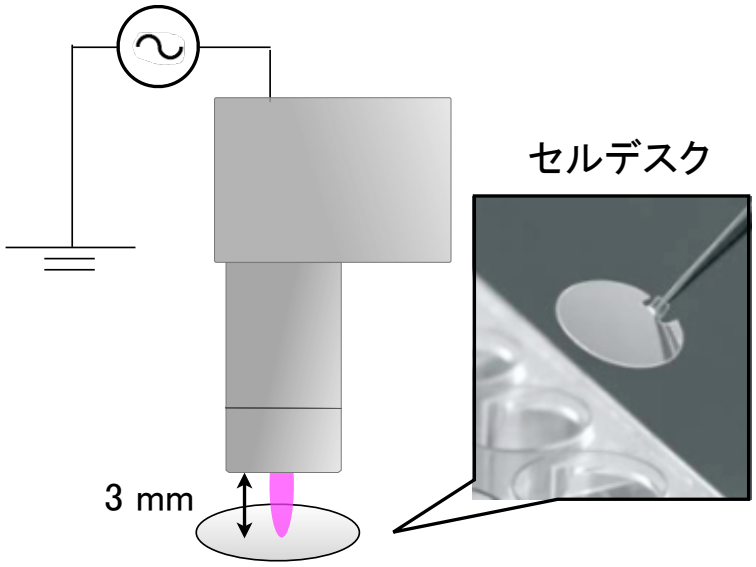


図 4-9 セルデスクのプラズマ処理

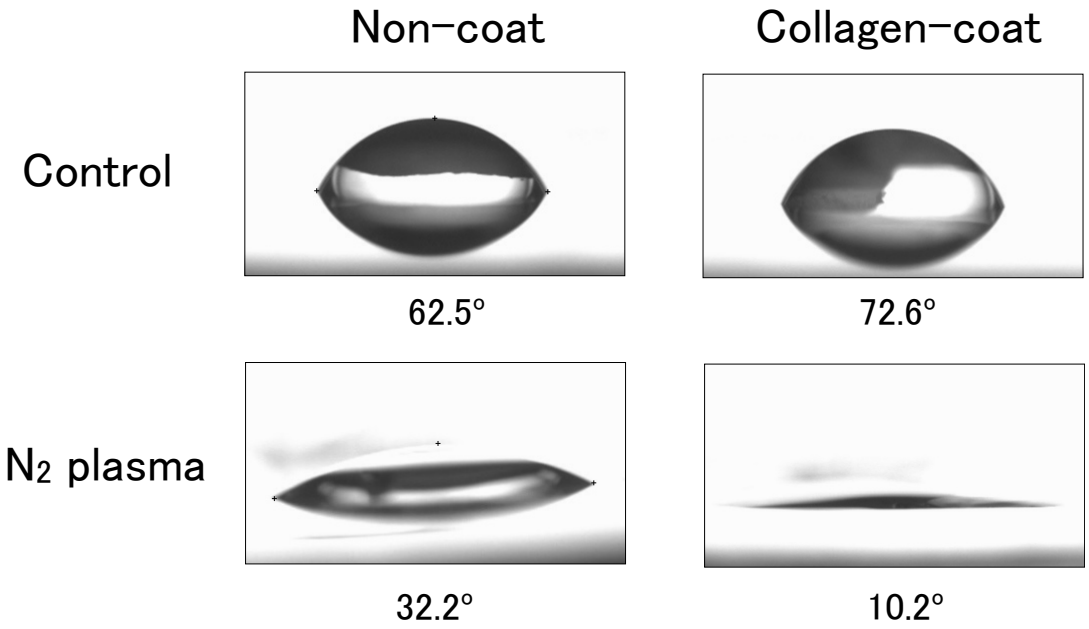


図 4-10 Non-coat および Collagen-coat のセルデスクに対する窒素プラズマの親水化効果

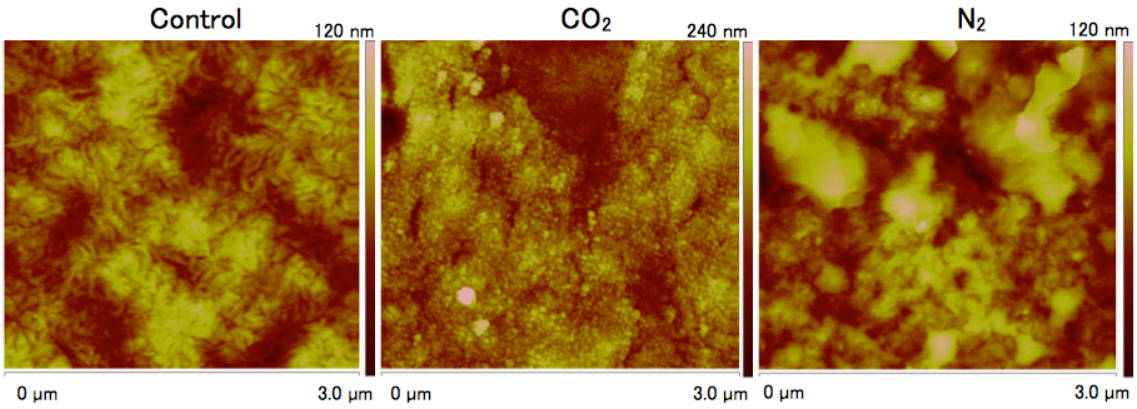


図 4-11 AFM による Non-coat のセルデスク表面の観察

(左図：未処理，中央：二酸化炭素プラズマ処理，右図：窒素プラズマ処理)

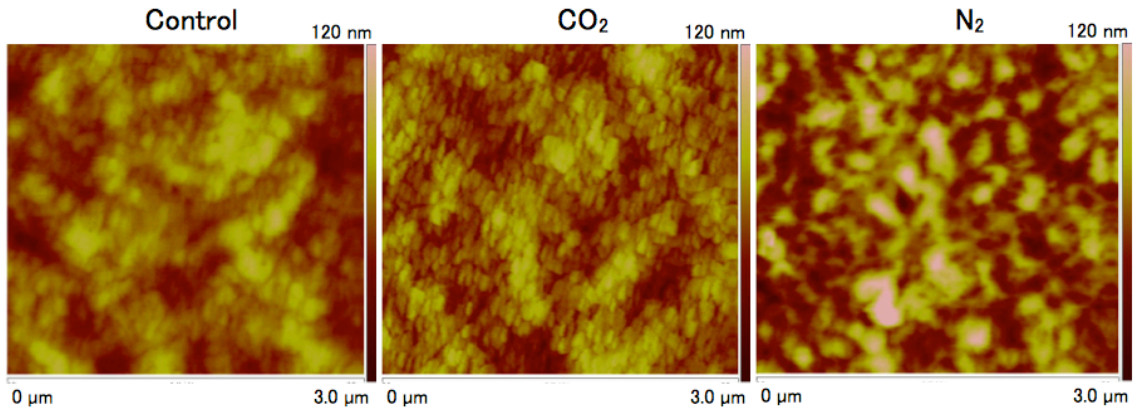


図 4-12 AFM による Collagen-coat のセルデスク表面の観察

(左図：未処理，中央：二酸化炭素プラズマ処理，右図：窒素プラズマ処理)

4.3.2 各ガス種のプラズマ処理によるセルデスクの細胞付着性

次にプラズマで処理した各種セルデスクを用いて細胞培養の性能を調査した。図 4-9 と同様に照射距離 3 mm で各種セルデスクの中央に流量 5 L/min で 60 s，アルゴン，空気，窒素，酸素，二酸化炭素の各ガスのプラズマを照射した。また，Non-coat のセルデスクの二酸化炭素プラズマ処理に関しては 5 min 照射した条件も用意した。プラズマ処理後，セルデスクを 24 ウェルプレート内に置き，DMEM(非働化 FBS 5%)の培養液で 3×10^5 cell/mL としたマウス繊維芽細胞の懸濁液を 500 μL ずつ分注した。その後，培養器(37ºC, CO_2 5%)で培養して 1 日，2 日後の細胞の様子を観察した。

各ガス種のプラズマを 60 秒間照射した Non-coat のセルデスクを用いた 1 日後，2 日後の細胞の様子を図 4-13 および図 4-14 に示す。どのガス種のプラズマも処理されたセルデスクの中央部では，未処理のセルデスクと比べて明らかに細胞の付着・増殖が少ない様子が見られた。また，空気，窒素，二酸化炭素のプラズマ処理では網目状に付着・増殖する様子が見られた。2 日後も同様な様子が見られたことから，プラズマ処理により細胞の付着性あるいは増殖性に変化を及ぼしたと考えられる。

次に，各ガス種のプラズマを 60 秒間照射した Collagen-coat のセルデスクを用いた 1 日後，2 日後の細胞の様子を図 4-15 および図 4-16 に示す。各ガス種のプラズマ処理から 1 日後では未処理のセルデスクと比べて明らかに細胞の付着と増殖が少ない様子が見られたが、Non-coat のセルデスクに比較して多数の細胞が見られた。窒素，酸素，二酸化炭素のプラズマ処理では Non-coat 同様、網目状に付着・増殖する様子が見られた。プラズマ処理から 2 日後には細胞が増殖し，酸素，二酸化炭素のプラズマ処理以外で様子の違いが見られなくなった。これは Collagen-coat のセルデスクと細胞との親和性が Non-coat に比べて高いためと考えられる。

二酸化炭素プラズマを 5 分間照射した Non-coat のセルデスク上で培養した 1 日後，2 日後の細胞の様子を図 4-17 に示す。60 s 照射のときよりもさらに付着・増殖した細胞が少ない様子が見られた。2 日後では付着した細胞は横に広がらず球状に増殖している様子が見られた。これはスフェロイド培養の状況と酷似している[51]。スフェロイドとは，細胞が多数凝集し中心部と外周部で分化段階が異なる細胞が協調する状態である。従来の単層培養に比べ未分化な細胞の機能を長期間維持することが可能であり，より生体に近い状態である。そのため，細胞センサーとしての働きが期待でき，創薬

の分野で注目を集めている。このスフェロイド培養方法は細胞の付着する界面の付着性を下げる処理や，表面積を小さくするようにアレイ状の凹凸を配置するなどの微細加工を施すことで平面培養されないよう制御している[52]。今回このようなスフェロイド状の細胞が形成されたのは図 4-11 のように二酸化炭素のプラズマによって材料表面が粒状になり，細胞が付着する界面の表面積が小さくなったためと考えられる。

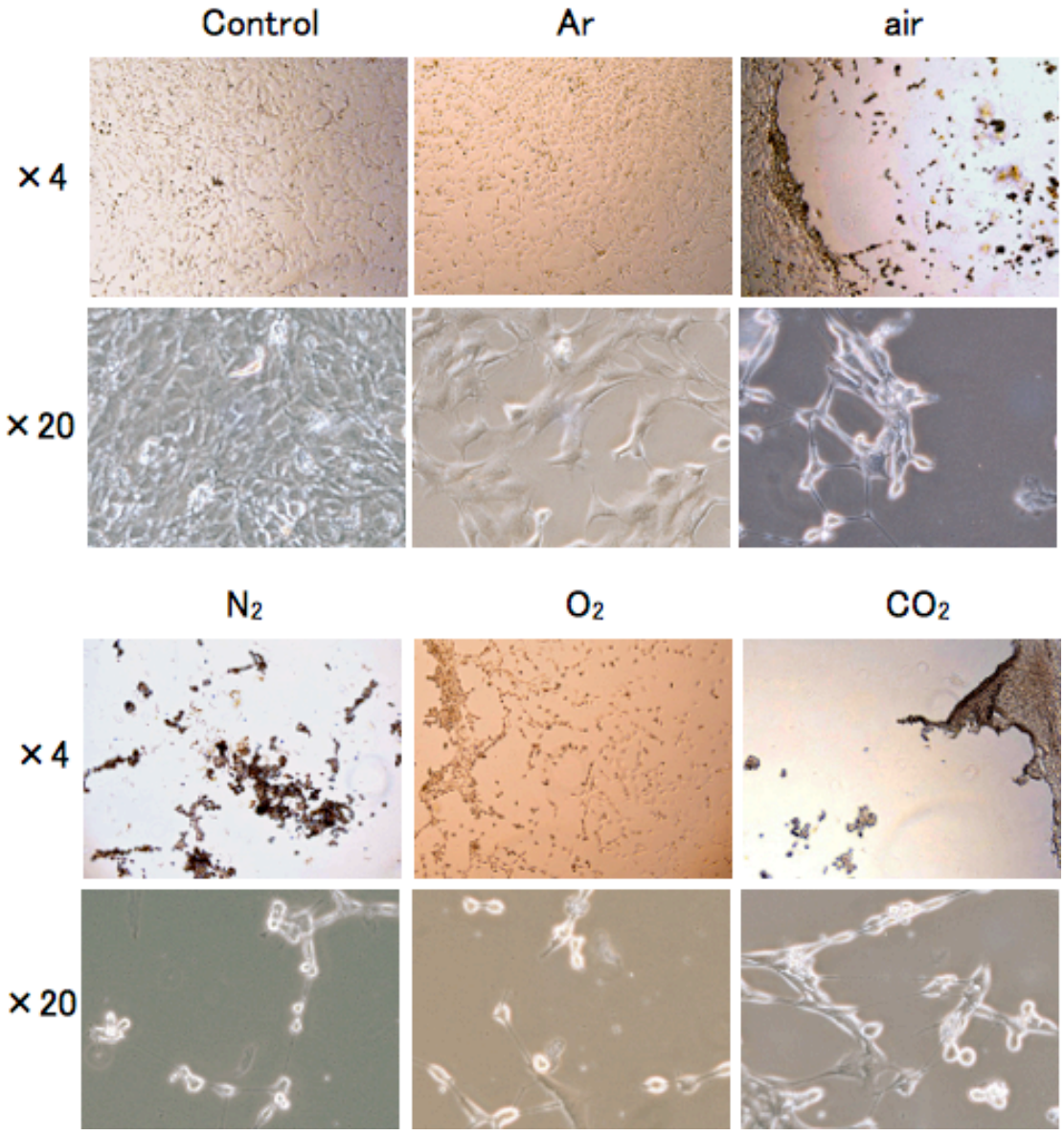


図 4-13 Non-coat のセルデスクに対して各ガス種のプラズマ処理した 1 日後の細胞付着の様子(顕微鏡倍率；4 倍，20 倍)

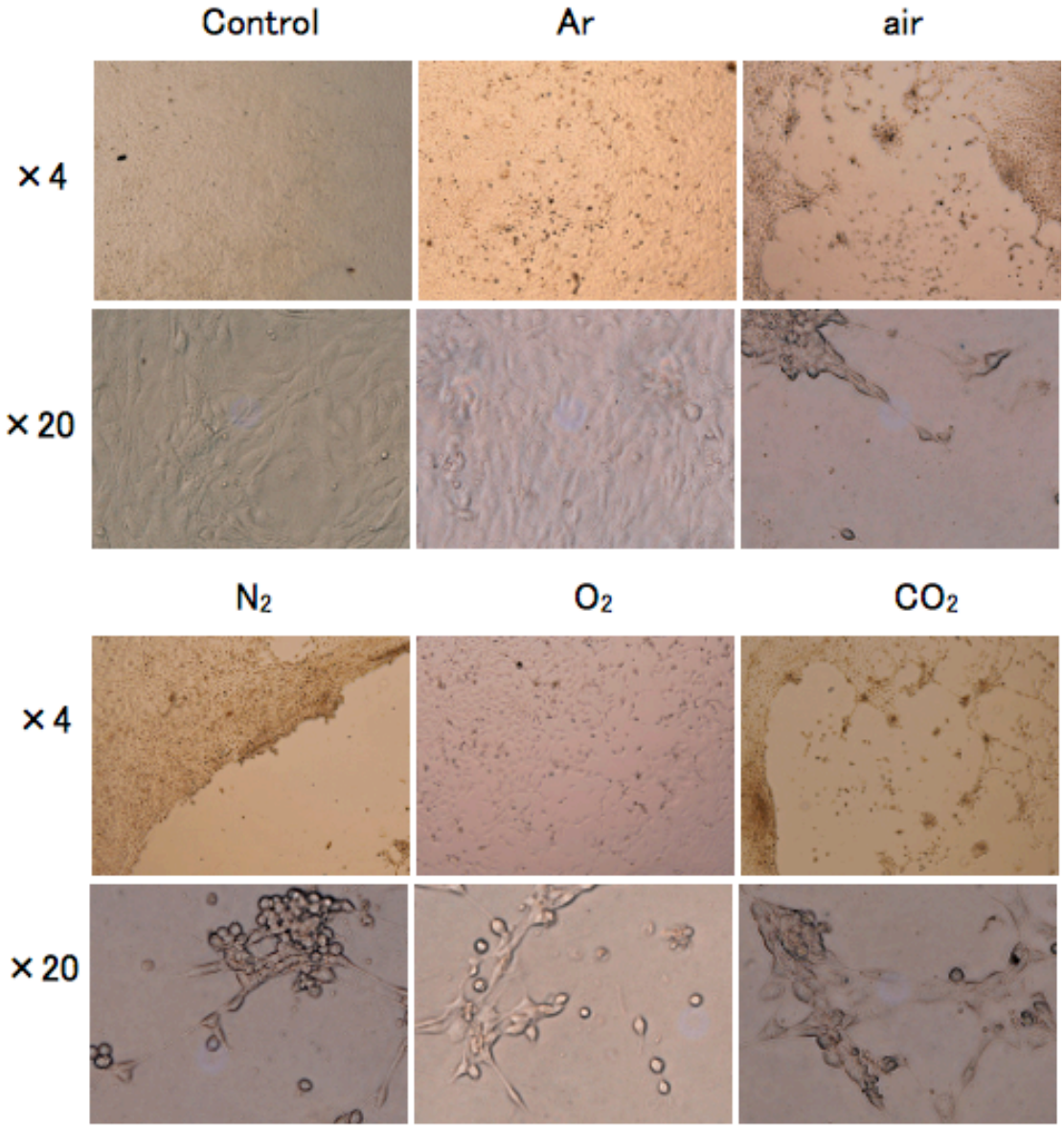


図 4-14 Non-coat のセルデスクに対して各ガス種のプラズマ処理した 2 日後の細胞付着の様子(顕微鏡倍率；4 倍，20 倍)

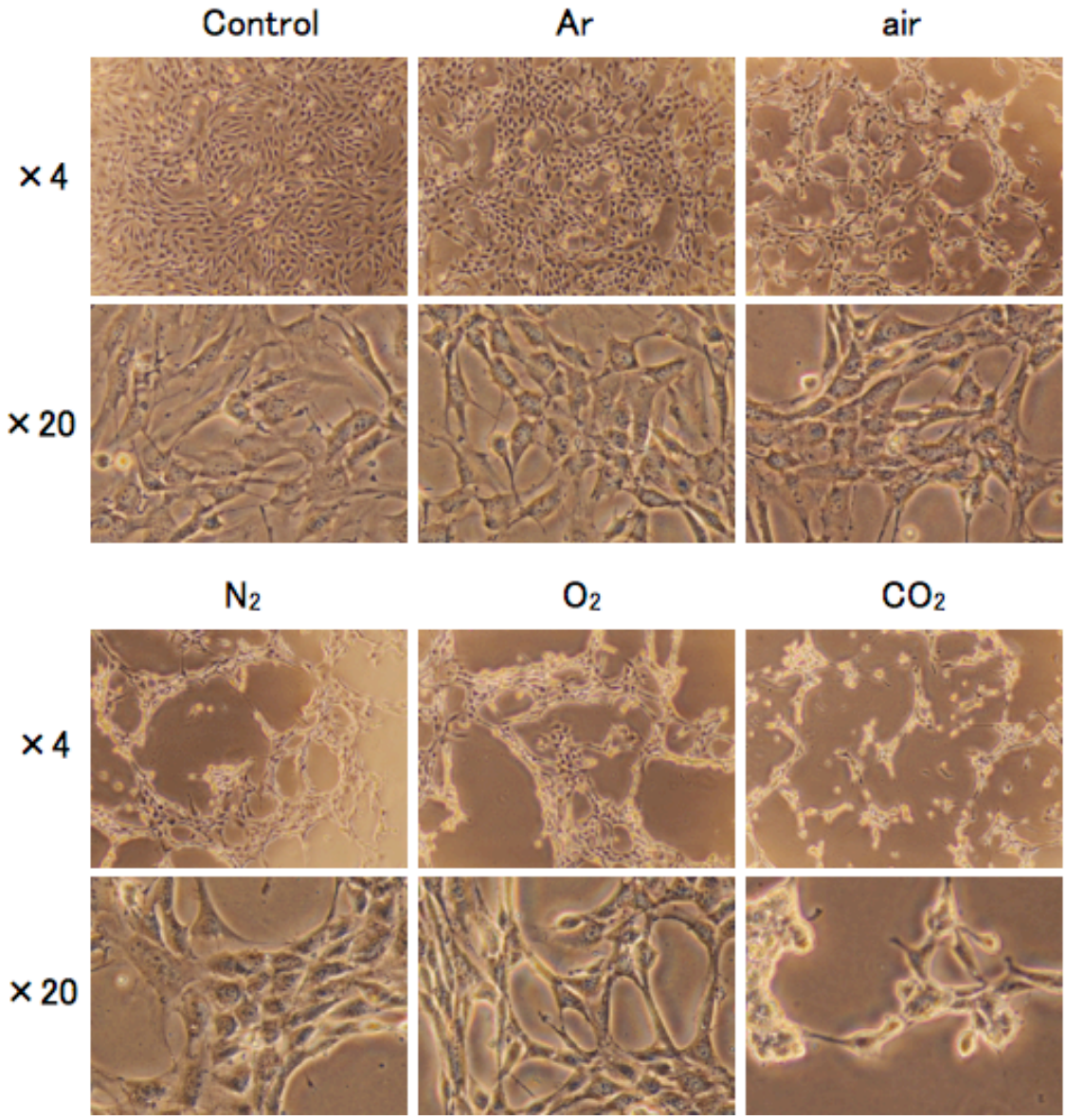


図 4-15　Collagen-coat のセルデスクに対して各ガス種のプラズマ処理した 1 日後の細胞付着の様子(顕微鏡倍率；4 倍，20 倍)

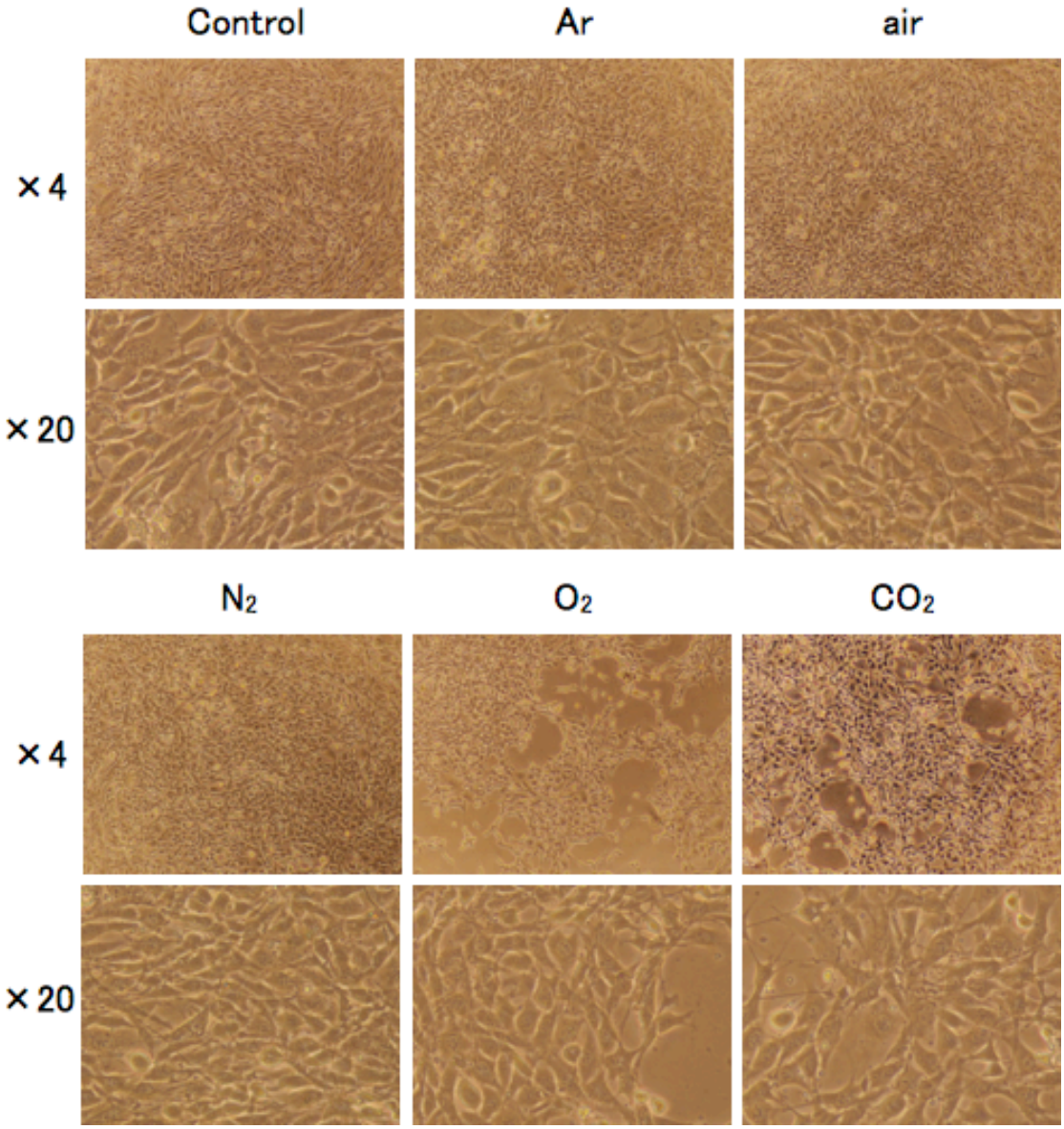


図 4-16　Collagen-coat のセルデスクに対して各ガス種のプラズマ処理した 2 日後の細胞付着の様子(顕微鏡倍率；4 倍，20 倍)

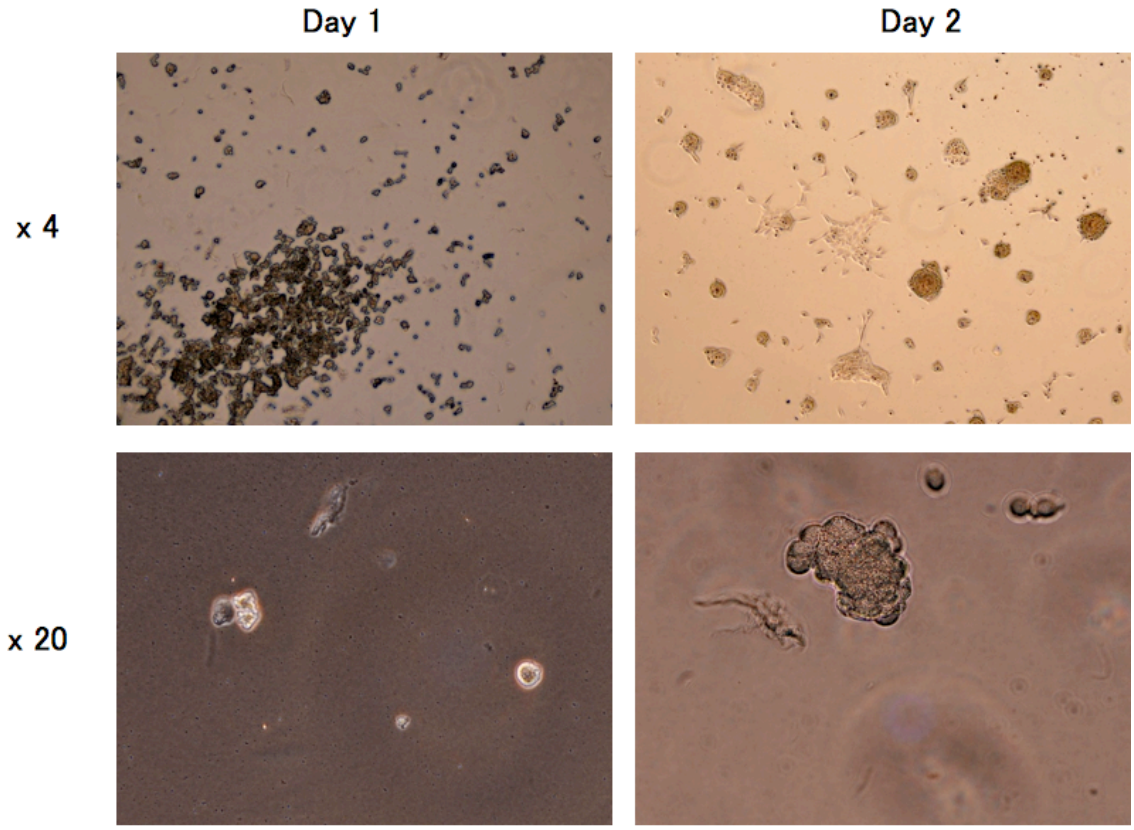


図 4-17 Non-coat のセルデスクに対して二酸化炭素プラズマを 5 分間照射し培養を行った 1 日後，２日後の細胞付着・増殖の様子(顕微鏡倍率；4 倍，20 倍)

4.4 マルチガスプラズマによる酸化膜還元処理

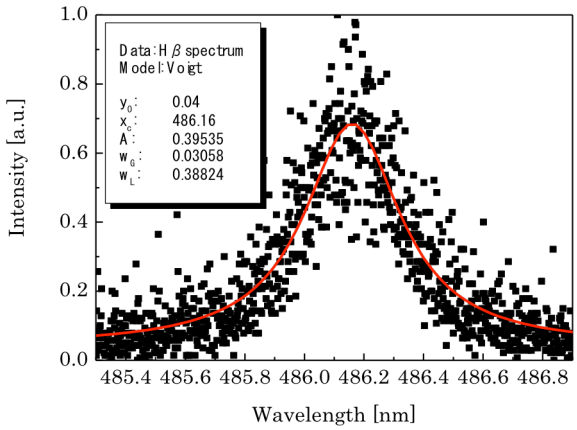
前節までの処理は活性種の中でも主に活性酸素種や活性窒素種を用いた酸化反応であった。マルチガスプラズマはこれらの酸化反応の他にも，水素ラジカルなどを用いた還元反応処理も施すことができる。この還元反応の評価に最も簡易的な方法として酸化膜の還元処理が挙げられる。そこで，今回銅酸化膜に対して，アルゴンに水素ガスを添加したプラズマの還元処理効果について調査した。

4.4.1 水素ガス添加プラズマの電子密度

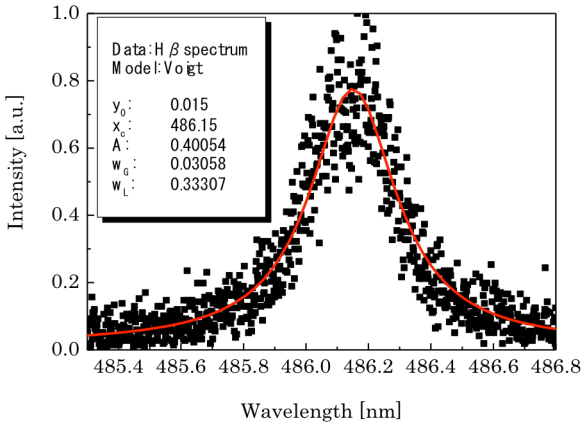
プラズマの密度の目安としてプラズマの電子密度が相関した値として見積もることができる。今回，水素混合アルゴンプラズマの水素混合濃度および入力電力依存性についてモノクロ分光器を用いて電子密度を調査した。ガス流量を 10 L/min とし，入力電力を 80-140 W と変化させて，水素添加濃度 1, 3, 5%のプラズマの発光について調査した。光ファイバーはプラズマ源から 30 mm の距離に固定して，発光分光によって得られた H_β 線(486.13 nm)のシュタルク広がり $\Delta\lambda_s$ を式(4.1)に代入し, 電子密度を算出した[53]。

$$n_e = 1.03\times10^{16}\left(\Delta\lambda_s\right)^{1.488} \quad \left[cm^{-3}\right] \quad (4.1)$$

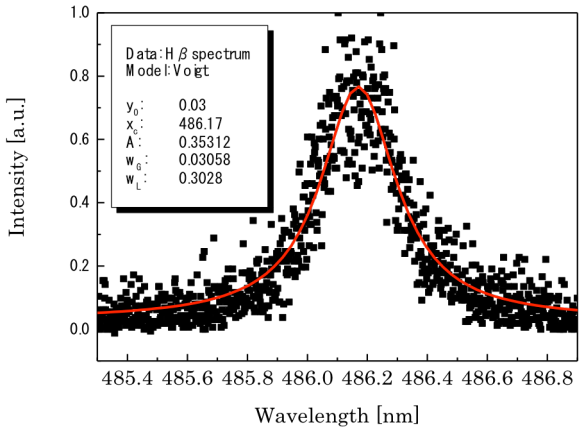
入力電力 100 W，水素混合濃度を 1 %から 5 %まで変化させ，得られたスペクトルとフォークト関数によるフィッティングを図 4-18 に示す。このように得られたシュタルク広がりを表 4-1 に示す。さらに，上記の方法により導出した，電子密度の水素混合濃度および入力電力依存性を図 4-19 に示す。この結果より，どの水素混合濃度でも入力電力を上げると増加の傾向にあり，水素混合濃度が 1 %，入力電力 140W のとき 2.7×10^{15} cm^{-3} と最大であった。一方, 水素混合濃度の増加とともに減少傾向がみられ，水素混合濃度が 5 %，入力電力 140W のとき 2.2×10^{15} cm^{-3} となった。



(a) 水素混合濃度: 1 %



(b) 水素混合濃度: 3 %



(c) 水素混合濃度: 5 %

図 4-18 各水素混合濃度のプラズマのフォークト関数による H_β 線のフィッティング

表 4-1 各水素混合濃度におけるシュタルク広がり

水素混合濃度	シュタルク広がりΔλs［nm］
1%	0.38
3%	0.33
5%	0.30

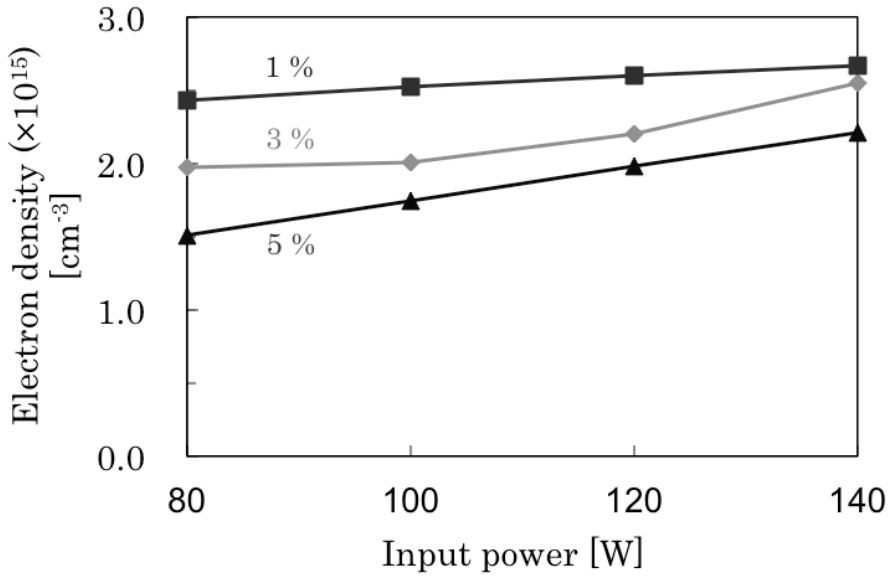


図 4-19 電子密度の水素混合濃度および入力電力依存性

4.4.2 水素ガス添加プラズマによる銅酸化膜の還元

還元効果の比較をする上で，自然酸化銅では厚さが約 10 nm と薄く，不十分であるため，銅板を 210℃，10 分間加熱処理し，350 nm 程度の酸化皮膜銅板を作成した。その試料を搬送装置の上に保持し，これに銅板との照射距離が 1 mm になるようプラズマ発生部を図 4-20 のように設置した。電源に水素添加プラズマ用の電源[株式会社プラズマコンセプト東京]を用い，水素混合濃度 3 %，入力電力 100 W の条件で生成した水素混合アルゴンプラズマを用いて，搬送速度 10 mm/s で酸化銅膜を処理した。酸化銅が還元されているか調べるために，X 線光電子分光装置(XPS)[PHI 5000 VersaProbe,

アルバック・ファイ株式会社]を用いて表面分析し，CuO のピーク(933,16 eV)の変化について調査した。さらに, XPS では Cu_2O のスペクトルと Cu のスペクトルが近いため，Cu_2O の変化を見ることが困難であることから，レーザー波長 532 nm のレーザーラマン顕微鏡[RAMAN-7，ナノフォトン社]を用いて，処理前後の Cu_2O ラマンスペクトル(215 cm^{-1})の変化を測定した。

処理前後における Cu 由来の XPS スペクトルの解析結果を図 4-21(a)，(b)に示す。プラズマ処理前後の試料において Cu の XPS スペクトルが 932.21 eV で検出された。未処理の試料ではこの他に, CuO の XPS スペクトルが 933.16 eV で検出され, Cu と CuO の割合は，それぞれ 84.9%と 15.1%であった。一方で，プラズマ処理した試料では，検出強度の 100%が Cu のスペクトルを示しており, CuO のスペクトルはみられなくなった。図 4-22 にプラズマ処理前後のラマンスペクトルを示す。プラズマ処理前では Cu_2O ラマンスペクトル(215 cm^{-1}) [54],[55]のピークが見られたが，処理後は見られなくなった。このことから酸化膜が還元されていることが確認された。XPS の結果も合わせて考えると，CuO, Cu_2O 双方とも減少していることが明らかになった。

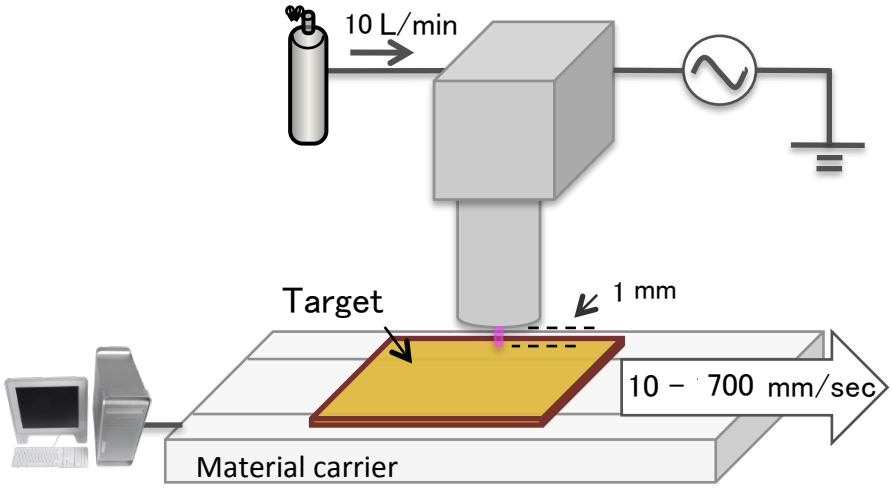


図 4-20 酸化膜除去のセットアップ

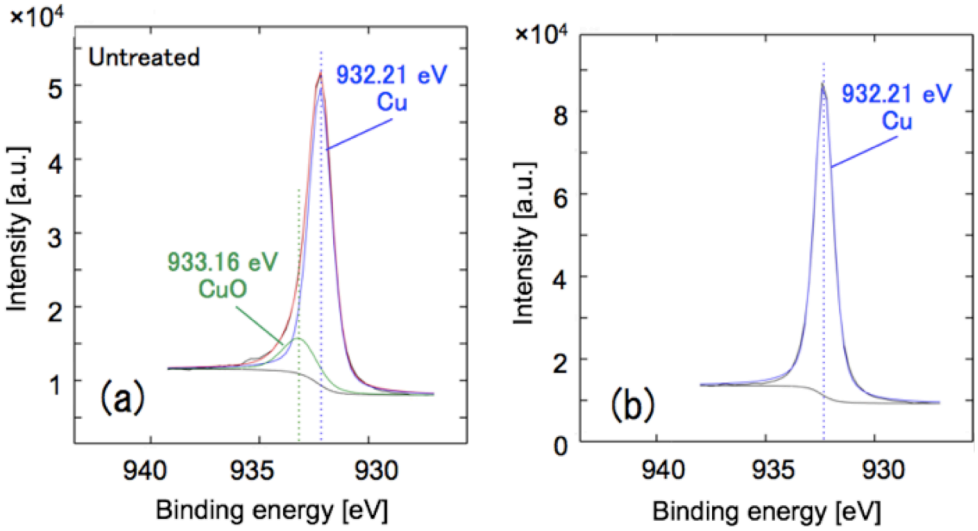


図 4-21 (a)プラズマ処理前の銅板表面の XPS のスペクトル.(b)プラズマ処理後の銅板表面の XPS のスペクトル(照射距離 1 mm，アルゴンガス 10 L/min，水素添加濃度 3%，入力電力 100 W，搬送速度 10 mm/s)

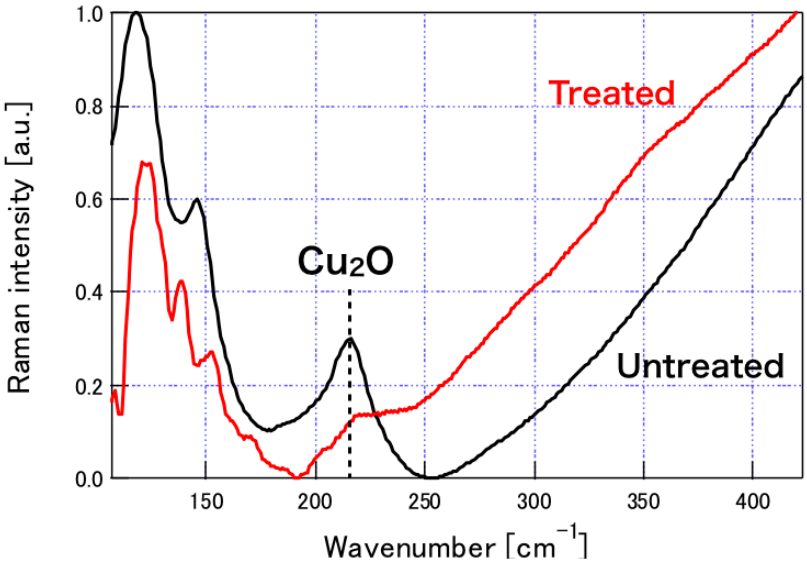


図 4-22 プラズマ処理前後での Cu_2O ラマンスペクトル変化(照射距離 1 mm，アルゴンガス 10 slm，水素添加濃度 3%，入力電力 100 W，搬送速度 10 mm/s)

4.4.3 水素ガス添加プラズマによる銅酸化膜の還元速度

銅板を搬送装置により移動させながら，水素混合濃度 1, 3, 5 %, 入力電力 100, 120, 140 W とプラズマ条件を変化させて生成させた, 水素混合アルゴンプラズマ照射した。銅酸化膜が還元除去されると，酸化銅の黒色から銅の茶色に変化するため，プラズマ処理が行われたところは目視により確認できる。この色の変化が目視で判断できなくなるまで，搬送速度を上昇させ，酸化膜還元が黙視で確認できる限界の搬送速度を各プラズマ生成条件間で比較した。

搬送速度を 200, 300, 400, 500, 700 mm/s として各入力電力における水素混合濃度を変化させたときの，酸化膜の還元が観測される限界の搬送速度を図 4-23 に示す。この結果から，水素を混合した場合，どのプラズマ条件でも搬送速度 200 mm/s 以下でプラズマ処理したときに酸化膜の還元がみられた。水素添加濃度および印加電力が高いほど効果が高く，水素混合濃度 5%, 入力電力 140 W のとき，700 mm/s の搬送速度で処理した場合でも表面の酸化膜還元が確認された。このときの銅酸化膜除去の様子を図 4-24 に示す。水素混合濃度の増加に伴って高い混合濃度で高速な酸化膜除去ができた。この理由は水素活性種の量が混合率の増加に伴って増えたためと考えられる[56]。

厚み方向の酸化膜の還元速度を定量的に調査するために, 図 4-23 において最も酸化膜還元効果の高かった，水素混合濃度 5 %, 入力電力 140 W の条件について，照射距離 1 mm, 搬送速度 300, 700 mm/s で還元処理を行い，処理前後の銅板断面を TEM(JEM-2010F, JEOL 株式会社)を用いて膜厚変化を測定した。

図 4-25(a)にプラズマ処理前の，図 4-25(b)に搬送速度 300 mm/s で処理後の銅酸化膜最表面の断面図を示す。銅酸化膜層より任意の 3 点選択し，その平均を膜厚として算出した。その算出結果を図に示す。図 4-26 に示されるように，プラズマ処理前は平均厚さが約 360 nm の酸化膜が確認されたが，搬送速度 300 mm/s で処理後は平均膜厚約 110 nm となり，250 nm 減少した。また，搬送速度 700 mm/s における処理後の平均膜厚は約 210 nm となり，150 nm 減少した。この搬送速度と膜厚の減少分より算出される深さ方向の酸化膜還元速度はそれぞれ 76 μm/s, 110 μm/s で，平均 93 μm/s となった。

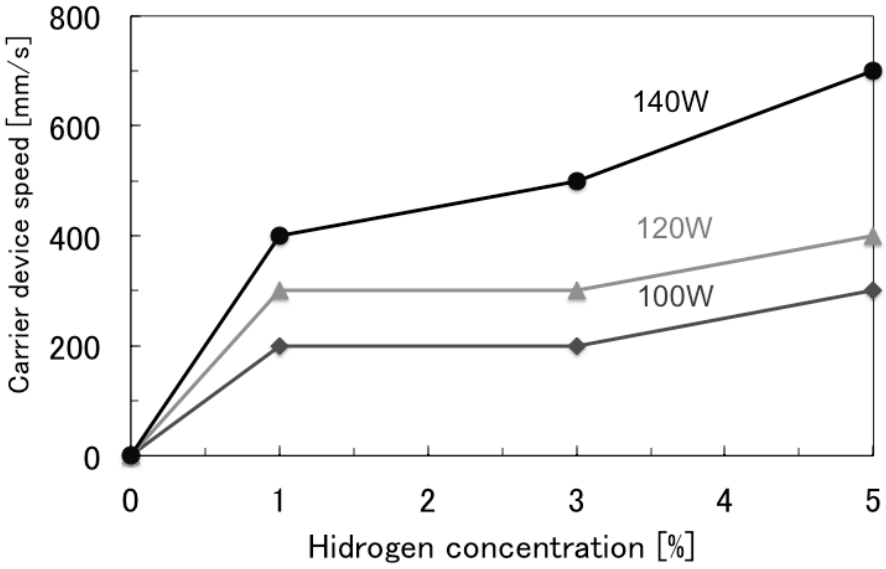


図 4-23 各プラズマ生成条件における酸化膜除去速度

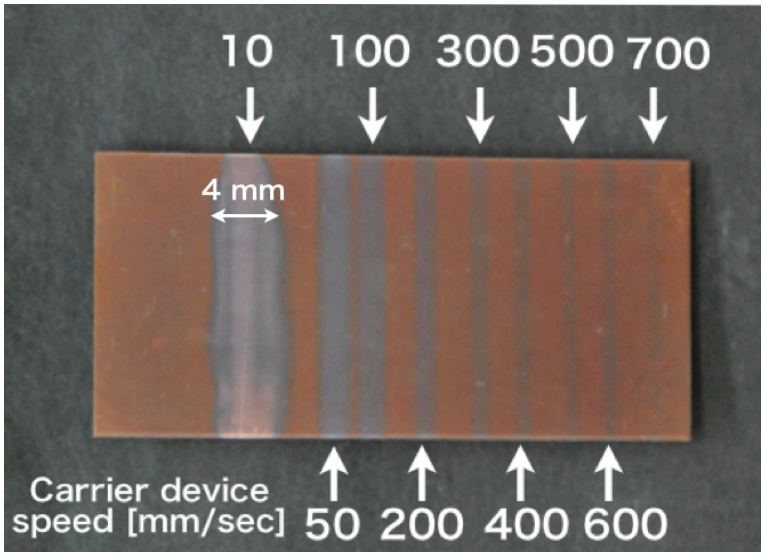


図 4-24.最適条件での酸化膜除去(照射距離 1 mm，アルゴンガス 10 L/min，水素添加濃度 5%，入力電力 140 W)

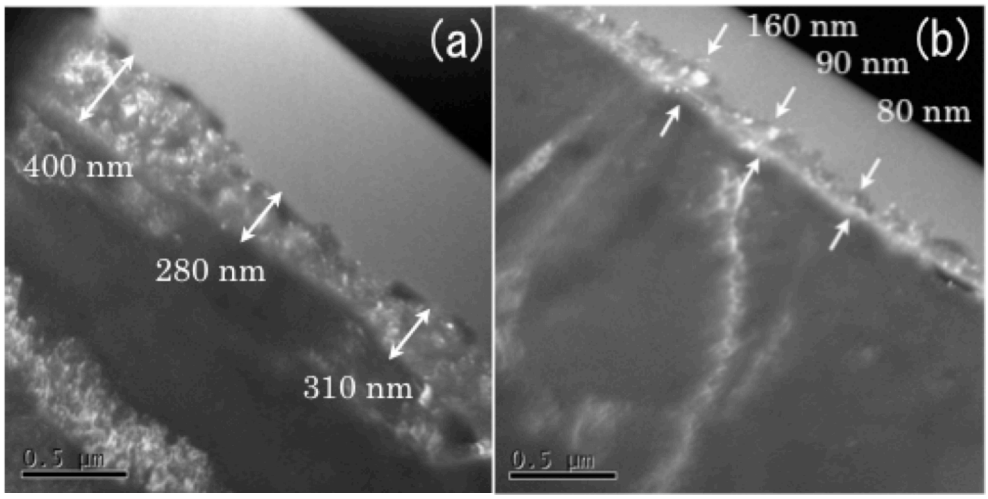


図 4-25. (a)プラズマ処理前の銅酸化膜層(b)搬送速度 300 mm/sec でプラズマ処理した後の銅酸化膜層

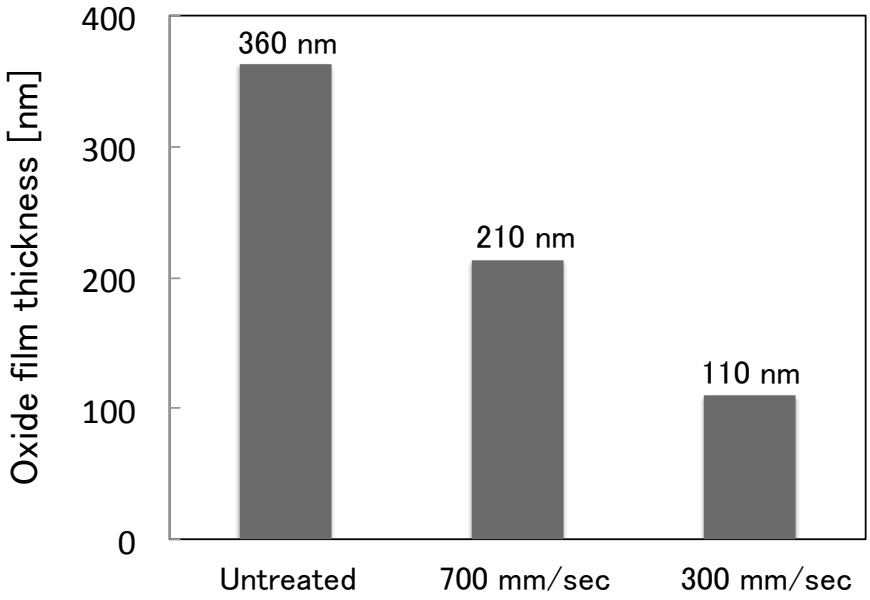


図 4-26 プラズマ処理前後での酸化膜厚変化

4.5 まとめ

本章では様々なガス種のプラズマによる各対象物に対する表面処理効果を調査した。まず，マルチガスプラズマによる表面親水化では無機材料から有機材料まであらゆる対象物を親水化することができた。なかでも，有機材料であるポリイミドフィルムに着目し，親水化効果を調査した。様々なガス種，混合率のプラズマで親水化効果を調べた結果，二酸化炭素プラズマ，10%酸素を混合したアルゴンやヘリウムプラズマが親水化効果高い親水化効果を示した。また，ATR 法によりポリイミドフィルムの表面分析した結果，カルボキシル基などの親水基のスペクトルの変化が確認されたため，親水化の要因としてプラズマによる表面の官能基の変化が示唆された。さらに，親水化効果の持続性を調査した結果, 処理後 3 日目まで接触角の急激な上昇が見られたが，処理後 7 日以降の接触角は安定し，親水化効果が持続することが明らかとなった。

ポリイミドフィルムの他に，細胞培養器材のセルデスクに対してプラズマを照射したところ親水化効果を示し，AFM による観察の結果，未処理の試料と比べて大きな形状の変化を確認した。プラズマ処理後のセルデスクにマウスの繊維芽細胞を培養したところ，細胞の接着性が低下し，スフェロイド状に細胞が変化した。これは器材表面の構造が変化したためと考えられる。

酸化膜に対するプラズマの還元処理では，水素混合アルゴンプラズマジェットを用いて，高温加熱処理によって作製した酸化銅板を還元処理することができた。XPS による表面分析では CuO (933.16 eV)のスペクトルの減少が確認され，さらに 3%水素混合アルゴンプラズマで処理した銅板表面では Cu_2O (215 cm^{-1})のラマンスペクトルの減少が確認された。還元処理の最適条件は，ガス流量 10 L/min, 水素混合濃度 5 %, 入力電力 140 W のときで，TEM によって銅板最表面の断面を観察した結果，酸化膜は 93 μm/s の速度で還元されることを明らかにした。

[43] J. Xie, D. Xin, H. Cao, C. Wang, Y. Zhao, L. Yao, F. Ji, Y. Qiu, Improving carbon fiber adhesion to polyimide with atmospheric pressure plasma treatment, *Surf. & Coat. Tech.*, **206**, pp. 191-201 (2011).

[44] R. M. Sanchis, O. Calvo, L. Sánchez, D. García, R. Balart, Enhancement of Wettability in Low Density Polyethylene Films Using Low Pressure Glow Discharge N_2 Plasma, *J. Polymer Sci.: Part B: Polymer Phys.*, **45**, pp. 2390-2399 (2007).

[45] 佐々木良太，新しい大気圧プラズマ源の開発と製造および環境技術への応用に関する基礎研究，東京工業大学博士論文 (2010).

[46] N. Inagaki, S. Tasaka and K. Hibi, Surface Modification of Kapton Film by Plasma Treatments, *J. Polymer science. Part A, Polymer chem.*, **30,** 7, pp. 1425-1431, (1992).

[47] J. Cho, K. H. Shin and J. Jang, Micropatterning of conducting polymer tracks on plasma treated flexible substrate using vapor phase polymerization-mediated inkjet printing, *Synthetic Metals*, **160**, pp. 1119-1125, (2010).

[48] N. Inagaki, S. Tasaka and K. Hibi, Improved adhesion between plasma-treated polyimide film and evaporated copper, *J. Adhesion Sci. and Technol.*, **8,** 4, pp. 395-410, (1994).

[49] Gonzalez II, M. D. Barankin, P. C. Guschl and R. F. Hicks, Remote Atmospheric-Pressure Plasma Activation of the Surfaces of Polyethylene Terephthalate and Polyethylene Naphthalate, *Langmuir*, **24**, 21, pp. 12636-12643 (2008).

[50] Y. I. Yun, K. S. Kim, S. J. Uhm, B. B. Khatua, K. Cho, J. K. Kim, C. E. Park, Aging behavior of oxygen plasma-treated polypropylene with different crystallinities, *J. Adhesion Sci. Technol.*, **18**, 11, pp. 1279-1291 (2004).

[51] R. Z. Lin and H. Y. Chang, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, Biotechnol. J., 3, pp. 1172–1184(2008)

[52] H. Otsuka, A. Hirano, Y. Nagasaki, T. Okano, Y. Horiike and K. Kataoka, Two-Dimensional Multiarray Formation of Hepatocyte Spheroids on a Microfabricated PEG-Brush Surface, *ChemBioChem*, **5**, pp. 850-855 (2004)

[53] Mohamed Moselhy, Isfried Petzenhauser, Klaus Frank and Karl H Schoenbach, Excimer emission from microhollow cathode argon discharges, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** pp. 2922–2927, (2003).

[54] M. Balkanski, M.A. Nusimovici and J. Reydellet, FIRST ORDER RAMAN SPECTRUM OF Cu_2O, *Solid State Communications*, **7**, pp. 815-818, (1969).

[55] G. Niaura, Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Observation of Two Kinds of Adsorbed OH^- Ions at Copper Electrode, *Electrochim. Acta*, **45**, pp. 3507-3519, (2000).

[56] H. Inui, K. Takeda, H. Kondo, K. Ishikawa, M. Sekine, H. Kano, N. Yoshida, and M. Hori, Measurement of Hydrogen Radical Density and Its Impact on Reduction of Copper Oxide in Atmospheric-Pressure Remote Plasma Using H_2 and Ar Mixture Gases, *Appl. Phys. Express*, **3**, 126101, (2010).

第 5 章

各ガス種のプラズマによる微生物の不活化効果

5.1 はじめに

近年，殺菌を目的とした多くの大気圧非熱平衡プラズマ源の開発が行われており，その中には，効果的な活性種を多く生み出すためにガス種を変更してプラズマを生成し，その殺菌効果を検証する動きがある[57]。しかし，前述したように多くのプラズマ源には変更できるガス種に制限があり，アルゴンやヘリウムなどの希ガスに酸素や窒素などを数%程度しか混合できなかった。そこで，プラズマ源の構造を変えることにより酸素 100%，窒素 100%でプラズマを生成できるようになったが，処理対象物がシート状ものに限られるなどの制約があった[58]。また，これらのガス以外で検証された報告は少なく，CO_2 を用いた低温プラズマ殺菌に関しては，アルゴンベースで数%程度の混合したプラズマ殺菌しか報告されていない[59]。

本章では，今まで検証されていなかったガス種に関して，マルチガスプラズマジェットを用いて殺菌効果を調査すると共に，これを殺菌分野へ応用するために効果的な殺菌条件の選定を行った。

5.2 各種条件におけるプラズマの殺菌効果

マルチガスプラズマジェットはガス種，ガス温度を自由に変化させてプラズマを生成することができる。プラズマからは光子，磁場，電子，イオン，紫外線，活性種，熱などが生成される。プラズマ殺菌のメカニズムとして，低温プラズマのアフターグローから放出される光子や磁場はエネルギーが大きくなく，電子，イオンは大気中ですぐに消滅してしまうので，活性種等による酸化ストレスや紫外線，熱による影響などが寄与すると考えられている。これは扱うプラズマの生成法等によって支配的な因子が変わる。そこで，各条件のプラズマからこれらの因子を調査するために，*Escherichia coli*（大腸菌）に対してプラズマのガス種やガス温度を変化させてマルチガスプラズマジェットの

殺菌効果を調査した。培地は簡易のスクリーニングとして EZ2C 寒天培地または Soybean-Casein Digest(SCD)寒天培地を用い，37 ℃のインキュベータ内で培養を行なった。

5.2.1 各ガス種のプラズマの殺菌効果

プラズマ殺菌の大きく寄与するとされる因子として，活性種が挙げられる。これはプラズマのプロセスガス種で活性種の種類や生成量が大きく異なる。そこで，プラズマの殺菌効果のガス種依存性について，単体ガス，または 2 種類のガスの組み合わせの中で，どのようなガス条件が高い殺菌効果を示すかを調査した。使用するガスの種類による殺菌効果について，ガス流量 5 L/min，照射距離 3 mm に固定して実験を行った。ガス種およびガスの組み合わせによる殺菌効果の違いは，寒天培地に一定量の指標菌を塗抹した寒天培地を用いることで，コロニーの形成具合から目視で殺菌効果を評価することができる。この方法では，菌数を正確に計測することはできないが，試験条件が多くても比較的容易に作業を進めることができる利点がある。殺菌実験の指標菌には *E.coli* を用いた。プラズマのプロセスガスとしてアルゴン，空気，窒素，酸素，二酸化炭素，アルゴン酸素混合ガスを用いて，直径 90 mm の EZ2C 寒天培地上に塗抹した *E.coli* の中心が処理されるようプラズマ源を設置させプラズマ照射した。プラズマ処理の様子を図 5-1 に示す。照射時間は 10-600 s とし，処理後はインキュベータにて 37 ℃で 24 時間培養後，菌繁殖状況を目視にて確認した。その結果を図 5-2 に示す。

赤褐色の部分は，殺菌されずに生存した菌が，コロニーを形成している部分が見やすくなるように染色されたエリアであり，白色の部分は，殺菌されたため菌の繁殖が見られないエリアである。この結果から，各種ガスのプラズマについて大腸菌に対する殺菌効果が確認され，アルゴン酸素混合プラズマの殺菌効果が高かった。特にアルゴンに対する酸素濃度が 10%のときに高い殺菌効果が得られた。この条件のときに活性酸素種が多く生成され，殺菌に寄与したためであると考えられる。また，どのガス種のプラズマも照射時間 10 秒から殺菌効果が確認でき，処理時間が長いほど広範囲が殺菌され，空気，窒素，酸素，二酸化炭素，アルゴン酸素混合ガスのプラズマのときには，600 s 照射によりシャーレ全体を殺菌できていることが確認された。

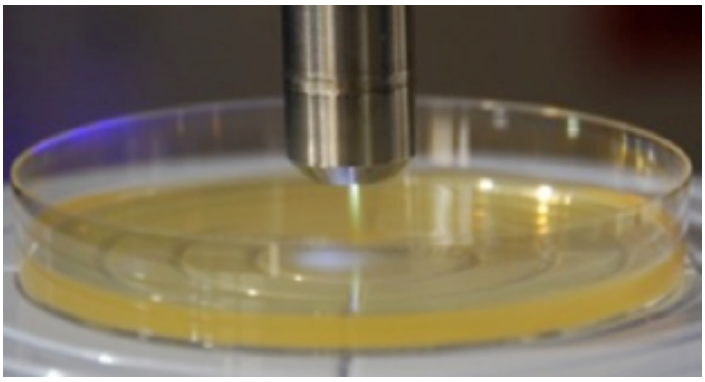


図 5-1 寒天培地上の指標菌へのプラズマ照射

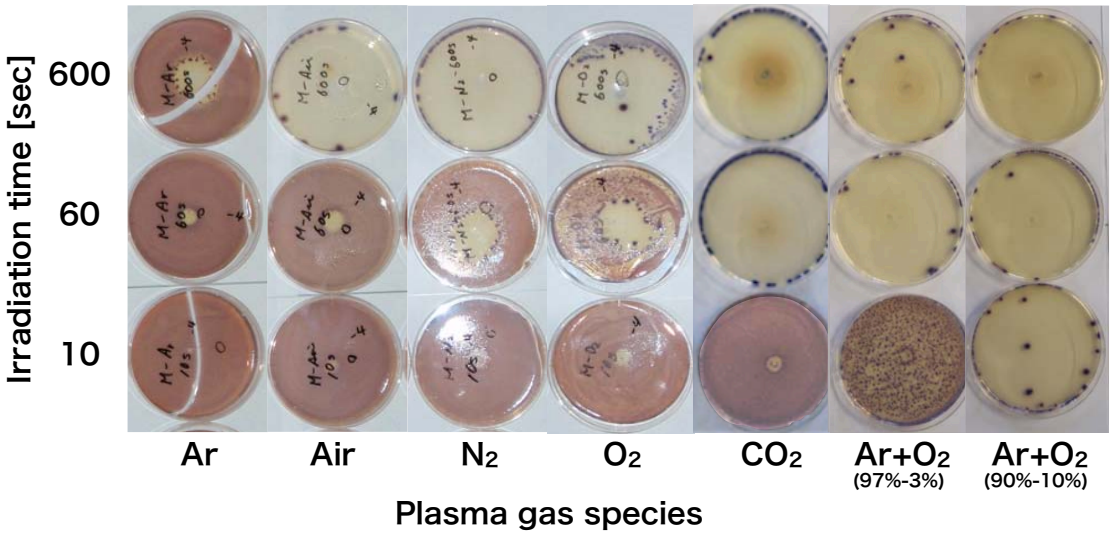


図 5-2 *E.coli* に対する各ガス種の効果

5.2.2 各ガス種のプラズマから発せられる紫外線による殺菌効果

プラズマ殺菌メカニズムの因子の一つとして考えられる紫外線について殺菌効果を調査するために，図 5-3 のように厚さ 1 mm の石英ガラスで紫外光だけを透過させて大腸菌に 60 s 照射した。照射距離は 3 mm とし，ガス種にアルゴン，窒素，酸素，二酸化炭素，アルゴン酸素混合ガス(Ar:O_2=90:10)を選択した。

プラズマ照射された場合，紫外線が照射された部分が図 5-4 のように殺菌される。各ガス種のプラズマから発せられる紫外線の影響を図 5-5 に示す。どのガス種のプラズマも紫外線によって殺菌効果が示された。しかしその範囲はどの条件も 3 mm 程度であり，

第 3 章で紫外線量の多かった窒素，二酸化炭素のプラズマでも他のガス種との差はほとんど見られなかった。また，前節の殺菌効果では 90 mm の殺菌範囲が示されたことから紫外線以外の因子が殺菌に支配的であると考えられる。

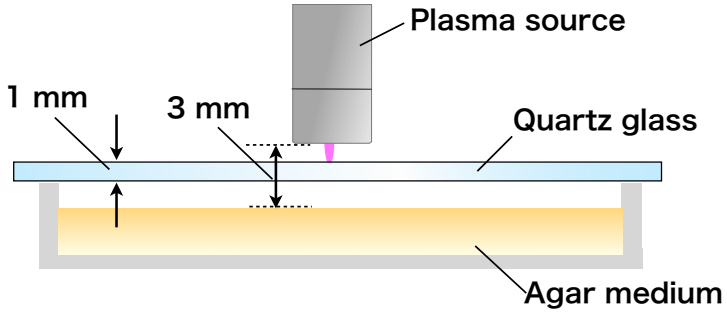


図 5-3 プラズマから発せられる紫外線による影響調査のセットアップ

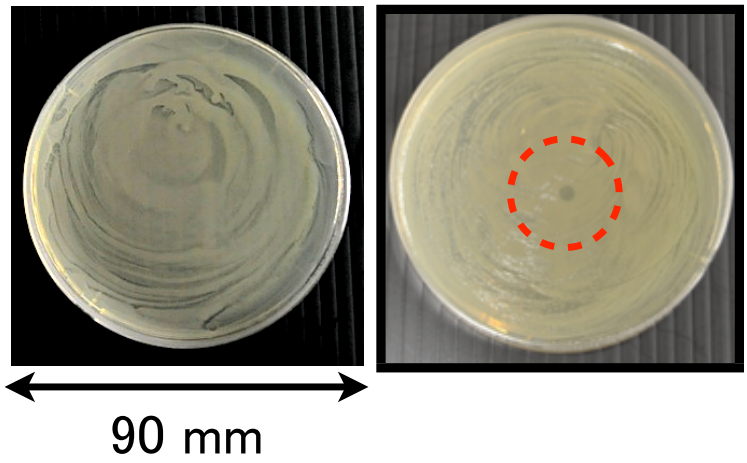


図 5-4 プラズマから発せられる紫外線による殺菌効果(左図:未処理の大腸菌，右図:アルゴンプラズマ照射の様子)

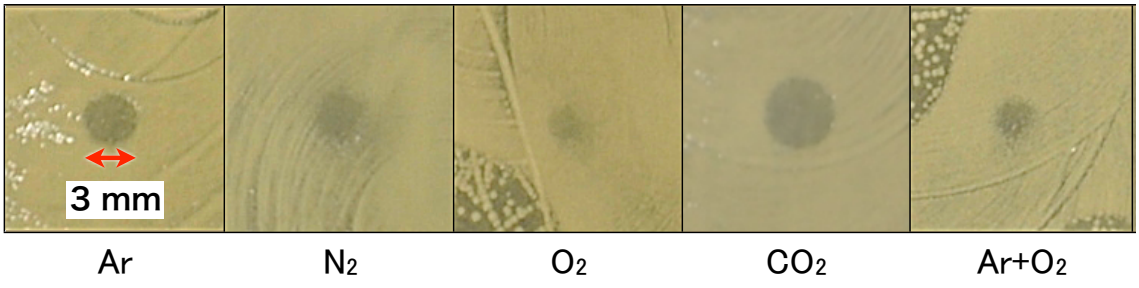


図 5-5 各ガス種のプラズマから発せられる紫外線による殺菌効果

5.2.3 各ガス種のプラズマのガス温度による殺菌効果への影響

プラズマ殺菌メカニズムのもう一つの因子の調査として，ガス温度による影響を前章で述べた温度制御プラズマを用いて殺菌効果を検証した。図 5-1 と同様にプラズマ源を固定し，プラズマのガス温度を 0，20，70ºC と変化させて，二酸化炭素，酸素，アルゴン酸素混合ガスでプラズマを生成し，60 s 照射して殺菌効果を調査した。

図 5-6 に各ガス種のプラズマ殺菌効果のガス温度依存性を示す。この図からどのガス種のプラズマも温度に依存せず殺菌効果が見られた。大腸菌の耐性温度は 70ºC であるので，プラズマのガス温度が 0ºC でも殺菌されたことから活性種が最も殺菌に寄与する因子であると結論づけた。

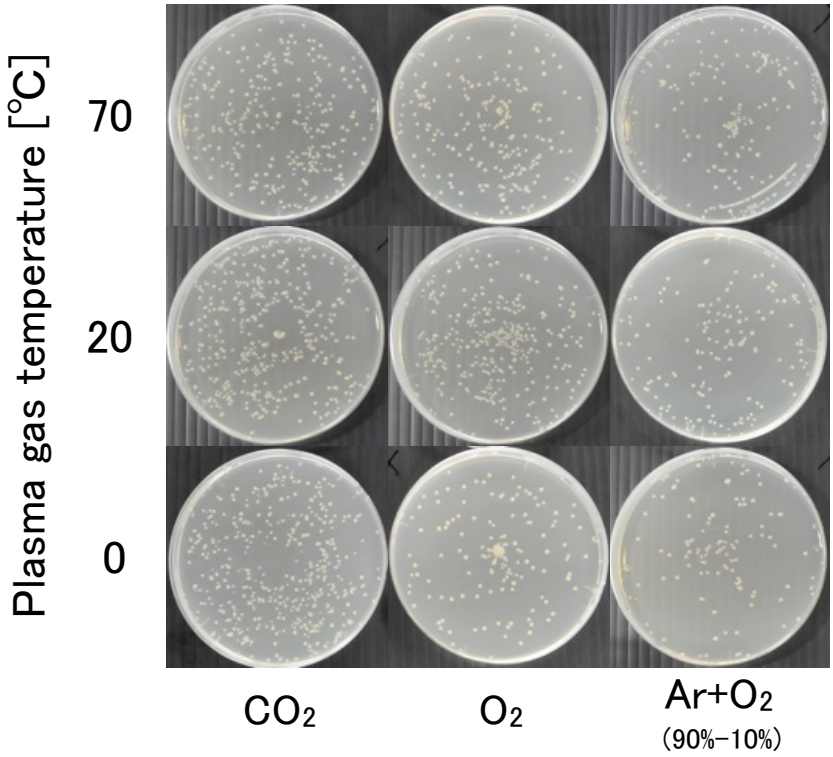


図 5-6 各ガス種のプラズマのガス温度による殺菌効果への影響

5.3 様々な菌種に対する寒天培地上での殺菌実験

前節ではプラズマによって寒天培地上の大腸菌が殺菌されたことが示された。そこで，次は耐性が異なるとされる各種菌種に対するプラズマの殺菌効果を調査した。調査した菌種として，一般細菌のグラム陽性菌である *Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌)，*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)，*Enterococcus faecalis*（腸球菌）グラム陰性菌の *E. coli* (大腸菌) ，*Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)，*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)，から真菌の *Candida albicans* (カンジダ菌)，抗酸菌の *Mycobacterium terrae* (マイコバクテリウム テラエ)，計 8 種類の菌種を用いてスクリーニングを行なった。

一般細菌は SCD 寒天培地，真菌はサブロー寒天培地，抗酸菌は Middlebrook7H10 寒天培地にそれぞれ塗布した。プラズマの照射口は図 5-7 に示されるようにシャーレ中央部上に培地表面から 6 mm の距離で固定した。直径 90 mm の寒天培地上の中央に各ガス種のプラズマを 60 s 照射して一般細菌は 37℃で 18 時間，真菌は室温で 18 時間，抗酸菌は 37℃で 6 日間培養した後に，コロニーの様子を観察した。

図 5-8 に各種細菌に対する各ガス種のプラズマの殺菌効果を示す。どのガス種のプラズマでも殺菌効果が見られ，特に二酸化炭素，空気，酸素のプラズマでは一般細菌，真菌，抗酸菌問わず，すべての細菌に対して寒天培地の中央部，及び一部の菌種に関しては全面が殺菌された。これらのガス種には酸素が共通の組成として含まれているので，活性酸素種が殺菌効果を及ぼしていると考えられる。

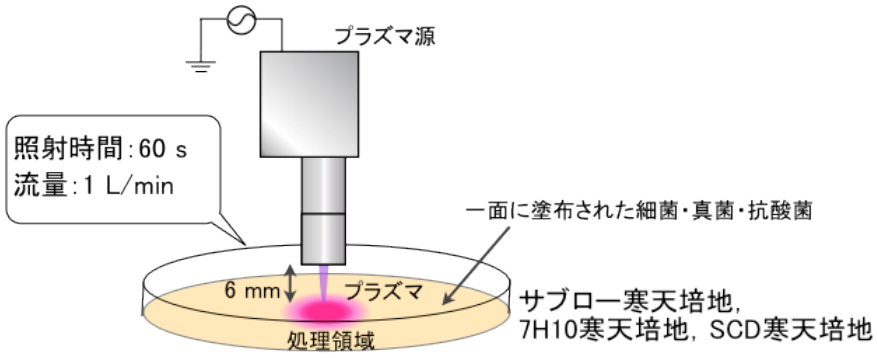


図 5-7 寒天培地上の細菌・真菌に対するプラズマの照射

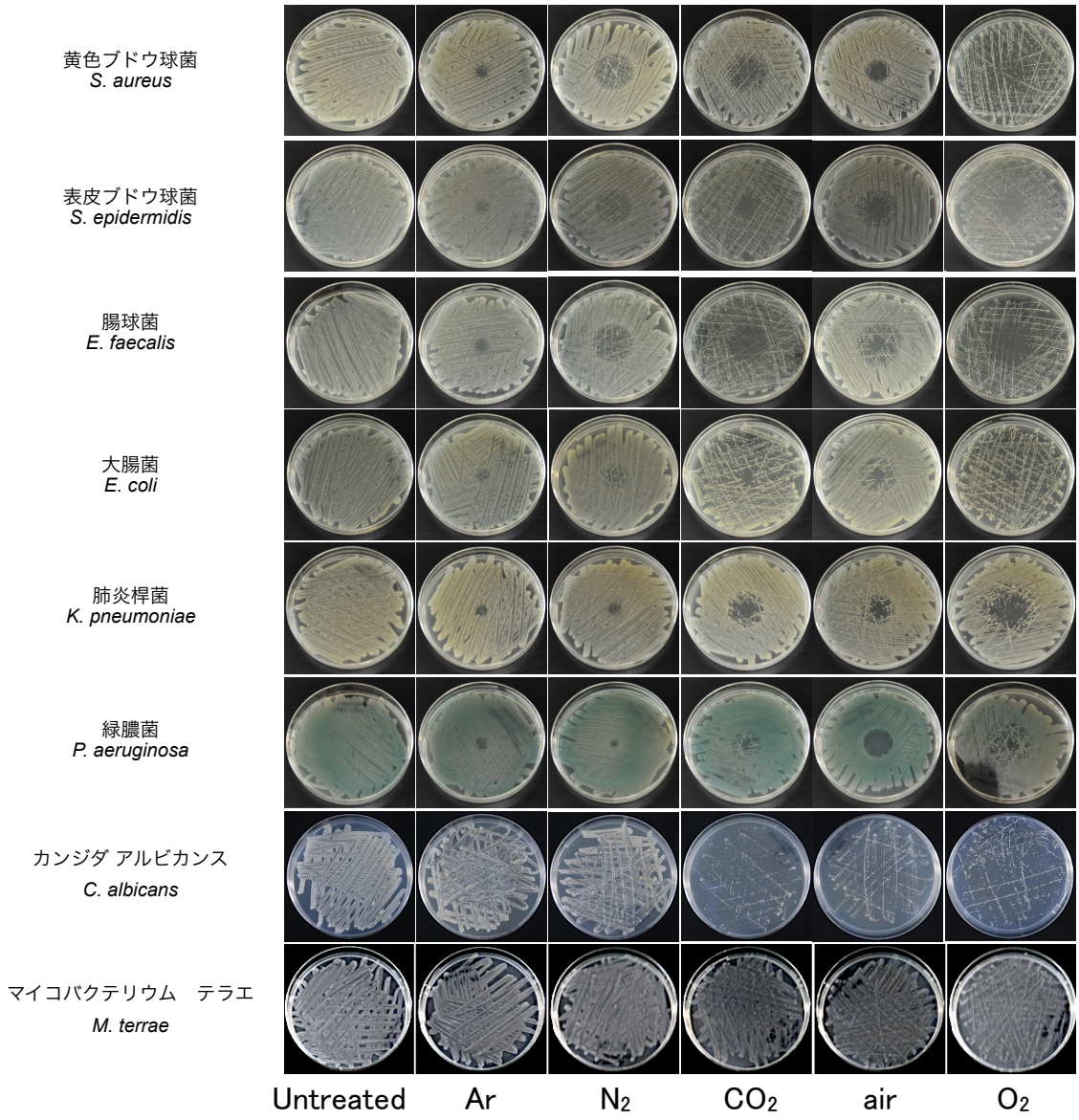


図 5-8 プラズマ照射前後の寒天培地上の細菌・真菌

5.4 様々なガス種のプラズマによる液中の細菌及び真菌に対する不活化効果

前節では各ガス種のプラズマの殺菌効果について定性的に調査した。しかし，寒天培地上の細菌に対してプラズマによって殺菌された面積がプラズマの殺菌力であるとは限らない。そこで，定量評価として液中に一定量菌数を含んだ懸濁液にプラズマを照射し，不活化した効果を殺菌効果として調査した。

5.4.1 一般細菌に対するプラズマの殺菌効果

第 3 章でプラズマによって pH が変動してしまうことが明らかとなっているので，条件が変動しないようリン酸緩衝液(PBS)を用いた。そして，PBS 200 µL に対して，一般細菌 *S. aureus* (黄色ブドウ球菌)，*P. aeruginosa* (緑膿菌)，*E. coli* (大腸菌)が 200 µL 中に 2–5×10^7 個となるように懸濁液を調整した。その懸濁液の水面からプラズマ源の照射口までの距離を 6 mm となるように，プラズマ源を図 5-9 のように設置し，流量は 1 L/min で各ガス種のプラズマを照射した。その後，プラズマを照射した懸濁液の 10 倍希釈系列を用意し，それぞれの希釈液を直径 90 mm の寒天培地上に滴下した。所定の時間培養後，各希釈液より形成したコロニーを計測した。

殺菌効果のガス種依存性を図 5-10 から図 5-12 に示す。*S. aureus* に対しては二酸化炭素，窒素プラズマの殺菌効果が最も高く，60 s プラズマを照射した結果，6 桁殺菌された。また，酸素プラズマを 120 s 照射した結果，3 桁殺菌された。一方，アルゴン，空気プラズマ照射後の菌数は初期菌数とほとんど変化しなかった。また， *P. aeruginosa* や *E. coli* に対しても，二酸化炭素，窒素プラズマの殺菌効果が高く，二酸化炭素のプラズマではどちらの菌種も 30 s で 6 桁殺菌された。また窒素のプラズマではどちらの菌種も 60 s で 6 桁殺菌された。したがって，これら 3 菌種に対して二酸化炭素，窒素プラズマが最も有効であることが分かった。窒素プラズマに関して，寒天培地上の細菌の殺菌面積が他のガス種と比べて低かったにも関わらず，液中での殺菌が高かった理由として，窒素プラズマが溶液と反応して殺菌効果の高い活性種を生成したか，または反応性が高く寿命が短い活性種で直下に高い殺菌効果を及ぼしていることが考えられる。

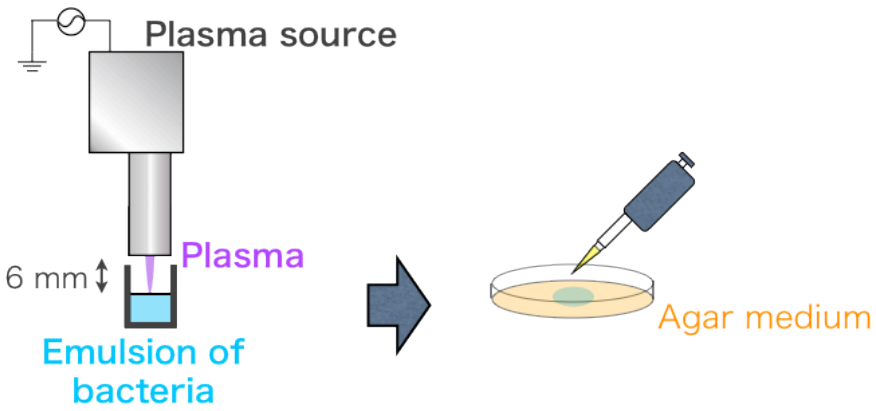


図 5-9 実験のセットアップ

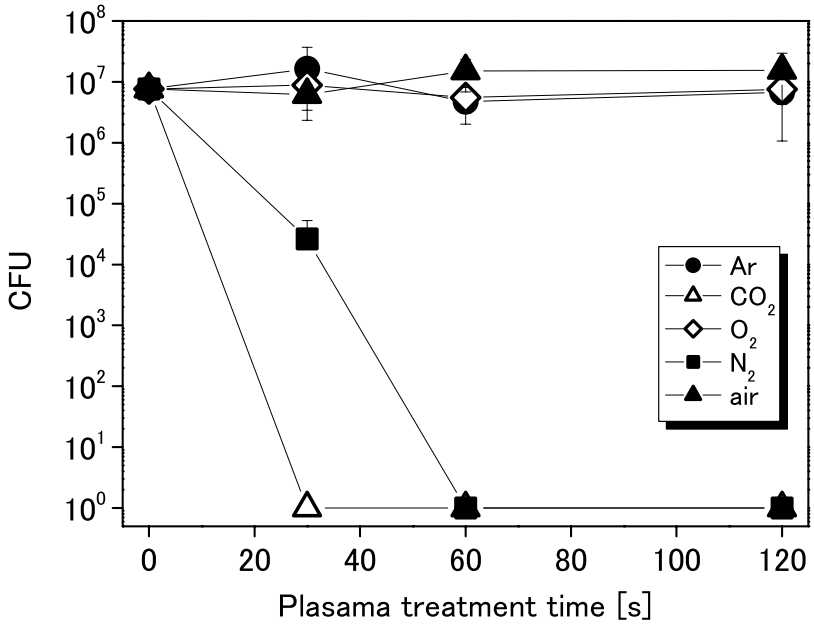


図 5-10 黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果

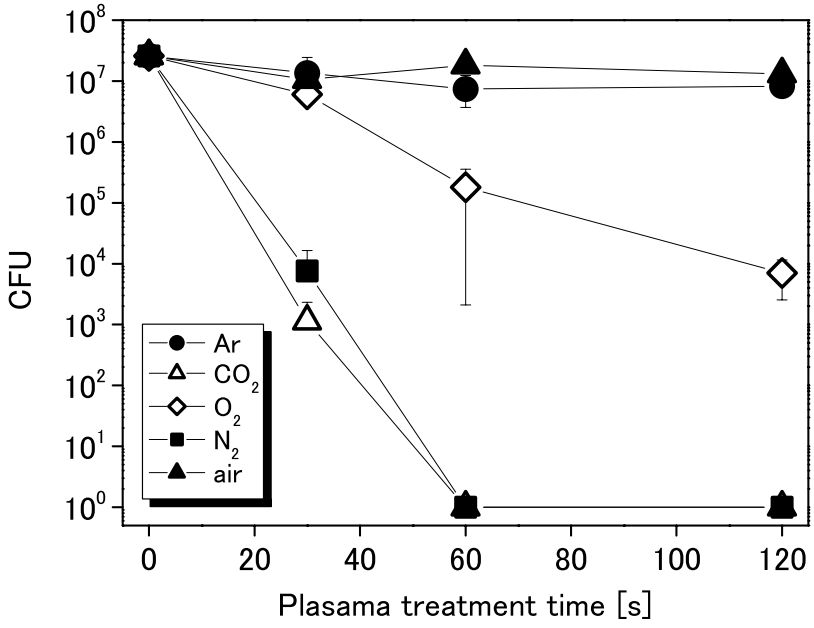


図 5-11 緑膿菌に対する殺菌効果

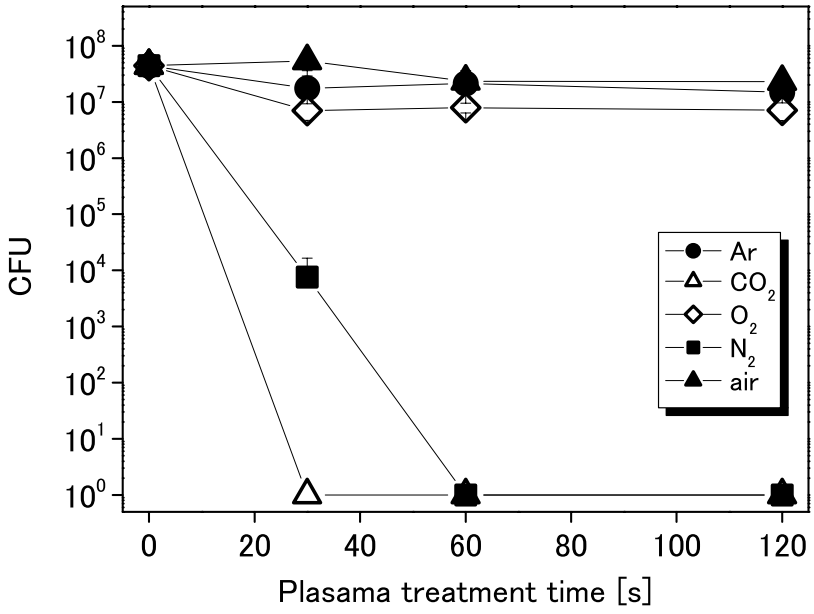


図 5-12 大腸菌に対する殺菌効果

5.4.2 耐性の高い細菌に対するプラズマの不活化効果

前節で明らかとなった殺菌効果の高い二酸化炭素，窒素プラズマを用いて，薬剤耐性菌や一般細菌よりも耐性の高い真菌，抗酸菌，芽胞菌，計 11 菌種に対する殺菌効果について定量評価を行った。使用した菌種を表 5-1 に示す。各細菌，真菌に対する殺菌効果を図 5-13 から図 5-23 に示す。

二酸化炭素プラズマでは，一般細菌（腸球菌）と薬剤耐性菌（MRSA）を 1 min 以内，酵母様真菌（カンジダ菌 2 種）を 5 min 以内で 6 桁の殺菌効果が得られた。また，糸状真菌（水虫菌 2 種）は 10 min 以内で 4 桁程度の殺菌効果が得られた。糸状真菌（黒カビ 2 種）は 10 min プラズマ照射しても殺菌効果が得られず，抗酸菌（*M. abscessus, M. terrae*）は 10 min で 2-3 桁程度の殺菌効果が得られた。芽胞形成菌（セレウス菌）に対しては 15 min プラズマ照射しても殺菌効果は得られなかった。

一方，窒素プラズマでは，一般細菌（腸球菌），薬剤耐性菌（MRSA），酵母様真菌（カンジダ菌 2 種）を 1 min 以内，糸状真菌（水虫菌 2 種）は 10 min 以内，糸状真菌（黒カビ 2 種）は 5 min 以内，抗酸菌（*M. abscessus, M. terrae*）はそれぞれ 1 min, 10 min 以内，芽胞形成菌（セレウス菌）に対しては 15 min 以内で 6 桁の殺菌効果が得られた。

以上の結果から，各プラズマ照射の条件で，細菌の耐性が高くなる程殺菌にかかる時間が長くなり，また，殺菌の様子も時間に比例して殺菌されるのではなく，しきい値が存在するような傾向が見られた。これは紫外線や放射線による殺菌にも見られる傾向であり，微生物の標的にヒットする確率から生残率が推定される，標的論[60]に沿った特徴であると考えられる。そして菌種によって減少の度合いが異なるのは，菌の殺菌耐性によって殺傷に必要なヒット数が異なるからであり，これは式(5･1)で示されるようなマルチヒットモデルと相関すると考えられる。

$$\frac{N}{N_0} = (1 - \mathrm{e}^{-k \cdot I \cdot t})^n \qquad (5\cdot1)$$

N: 照射後微生物数，N_0: 照射前微生物数，k: 不活化速度定数，I: 線量率，t: 照射時間，n: 致死ヒット数

ガス種による違いとしては二酸化炭素のプラズマでは耐性の高い黒カビ及び芽胞形成菌に対する殺菌効果は見られなかったが, 窒素プラズマはどの菌種も殺菌することができ，耐性の最も高いセレウス菌に対しても 15 分で 6 桁の殺菌効果が得られた。このことから窒素プラズマの方が二酸化炭素プラズマよりも殺菌効果が高いということが明らかとなり, 窒素プラズマで高い反応性を持った活性種が生成されている可能性がある。

表 5-1 プラズマ照射対象の細菌・真菌

分類	種	株	培地	培養時間, 温度
一般細菌 (グラム陽性菌)	*Enterococcus faecalis*（腸球菌）	ATCC29212	SCD 寒天培地	18 時間，37ºC
薬剤耐性菌	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）	臨床分離株	SCD 寒天培地	18 時間，37ºC
真菌(酵母様真菌)	*Candida albicans*（カンジダ菌）	NBRC1393	サブロー寒天培地	2 日，室温
真菌(酵母様真菌)	*Candida albicans*（カンジダ菌）	NBRC1594	サブロー寒天培地	2 日，室温
真菌(糸状菌)	*Trichophyton mentagrophytes*（水虫菌）	臨床分離株	サブロー寒天培地	4 日，室温
真菌(糸状菌)	*Trichophyton rubrum*（水虫菌）	臨床分離株	サブロー寒天培地	12 日，室温
真菌(糸状菌)	*Aspergillus niger*(黒カビ)	NBRC9455	サブロー寒天培地	2 日，37^{o}C
真菌(糸状菌)	*Aspergillus niger*(黒カビ)	NBRC105649	サブロー寒天培地	2 日，37^{o}C
抗酸菌	*Mycobacterium terrae*	JCM12143	Middlebrook7H10 寒天培地	8 日，37^{o}C
抗酸菌	*Mycobacterium abscessus*	ATCC19977	Middlebrook7H10 寒天培地	2 日，37^{o}C
芽胞形成菌	*Bacillus cereus*（セレウス菌）	BC772	SCD 寒天培地	1 日，37^{o}C

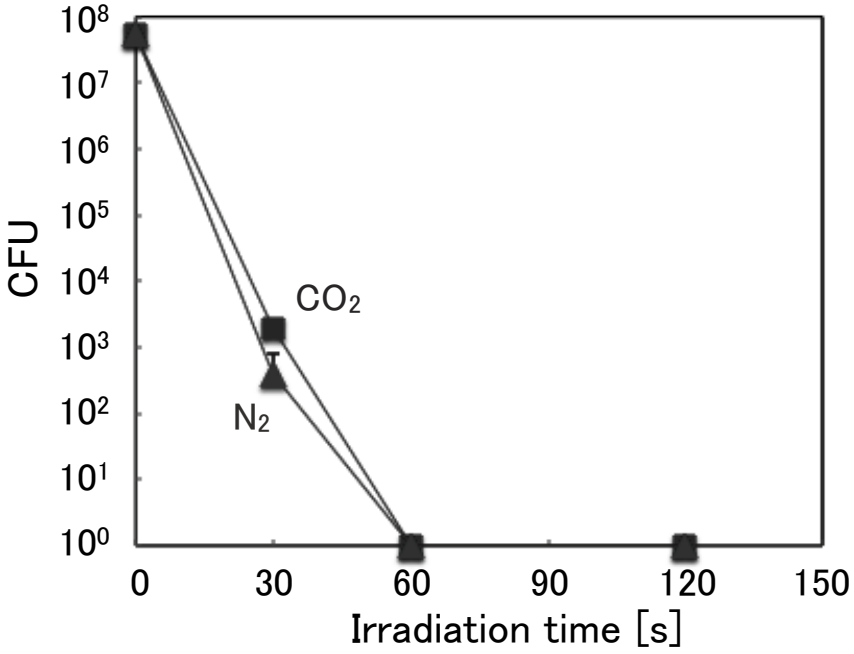


図 5-13 一般細菌(腸球菌)に対する殺菌効果

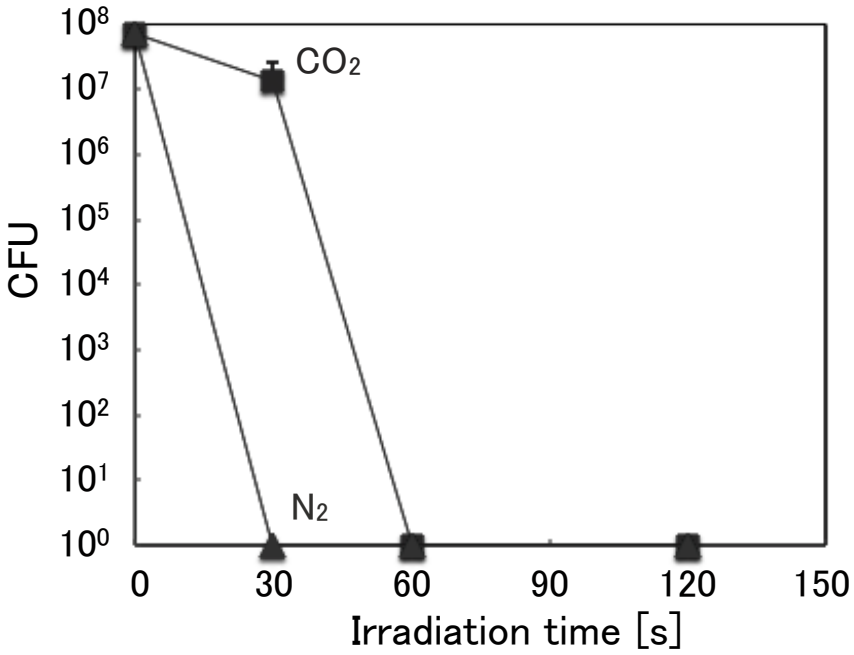


図 5-14 薬剤耐性菌(MRSA)に対する殺菌効果

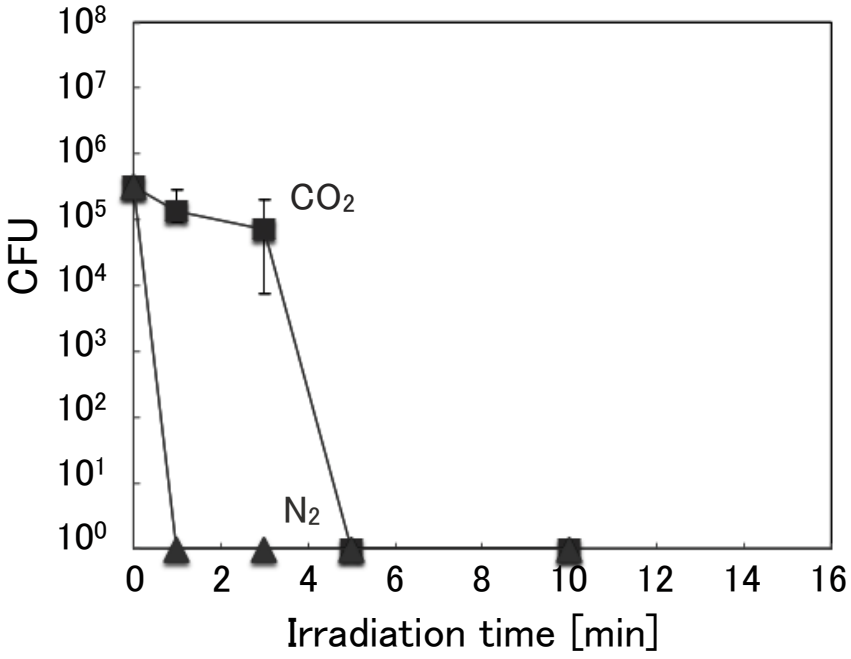


図 5-15 酵母様真菌(カンジダ菌 NBRC1393)に対する殺菌効果

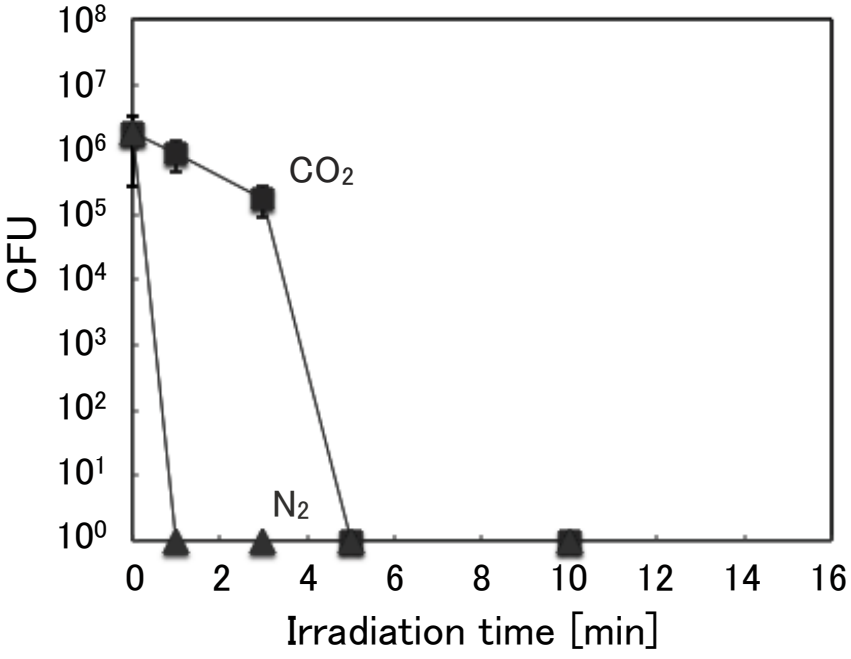


図 5-16 酵母様真菌(カンジダ菌 NBRC1594)に対する殺菌効果

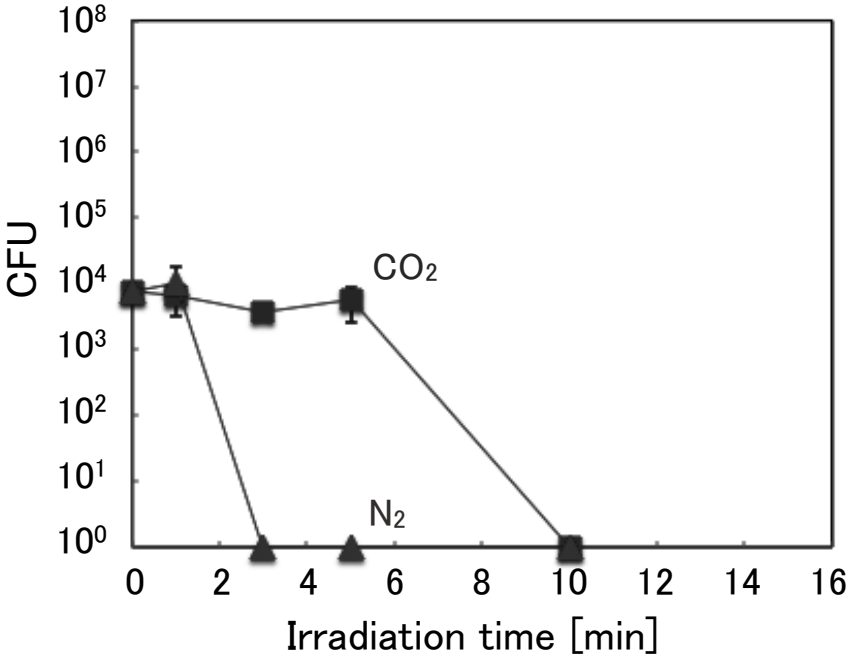


図 5-17 糸状真菌(水虫菌 *T. rubrum*)に対する殺菌効果

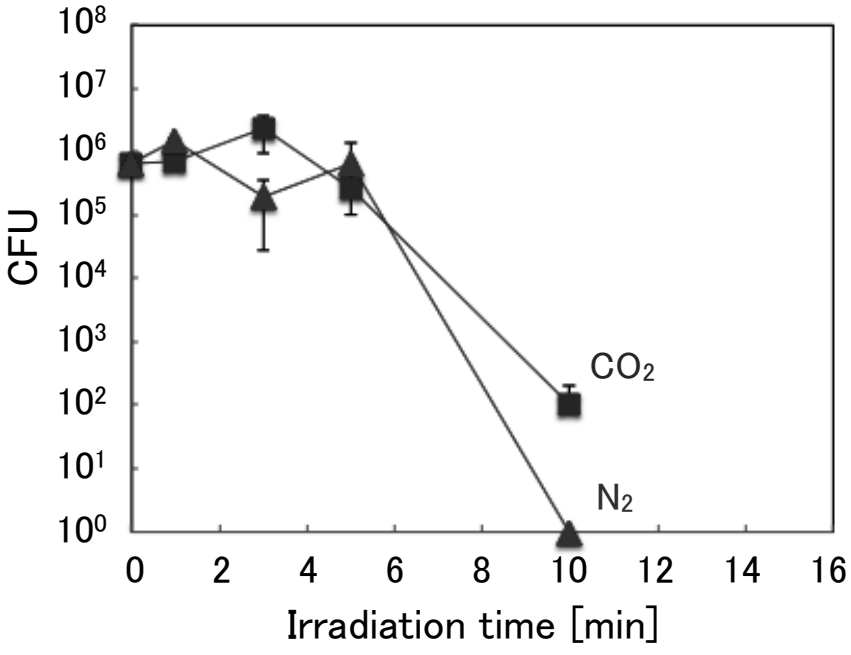


図 5-18 糸状真菌(水虫菌 *T. mentagrophytes*)に対する殺菌効果

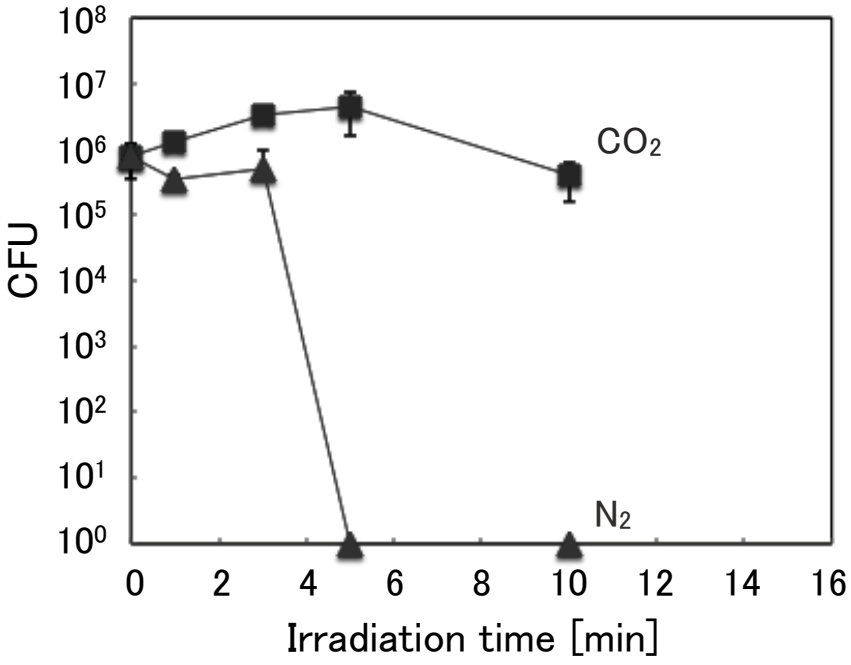


図 5-19 糸状真菌(黒カビ菌 NBRC9455)に対する殺菌効果

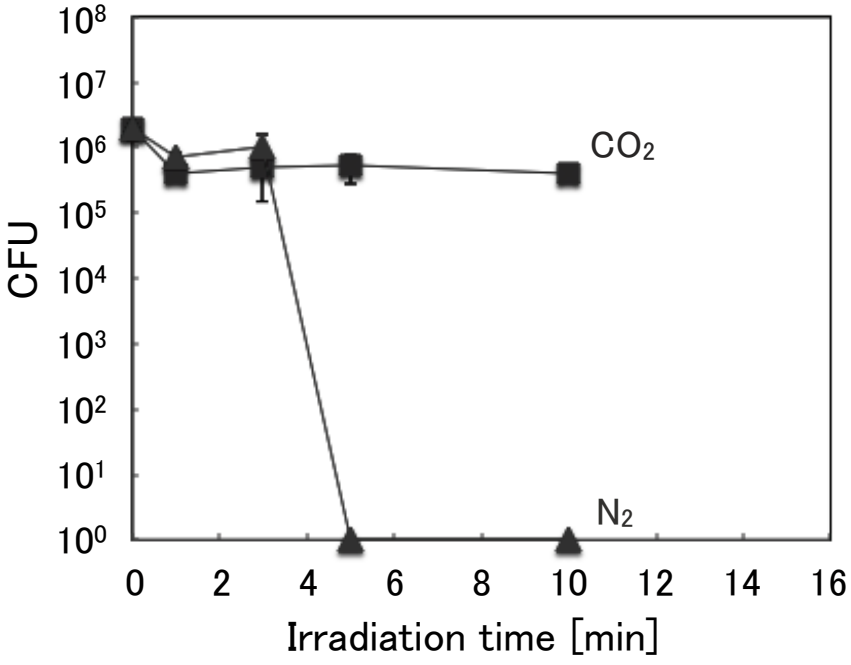


図 5-20 糸状真菌(黒カビ菌 NBRC105649)に対する殺菌効果

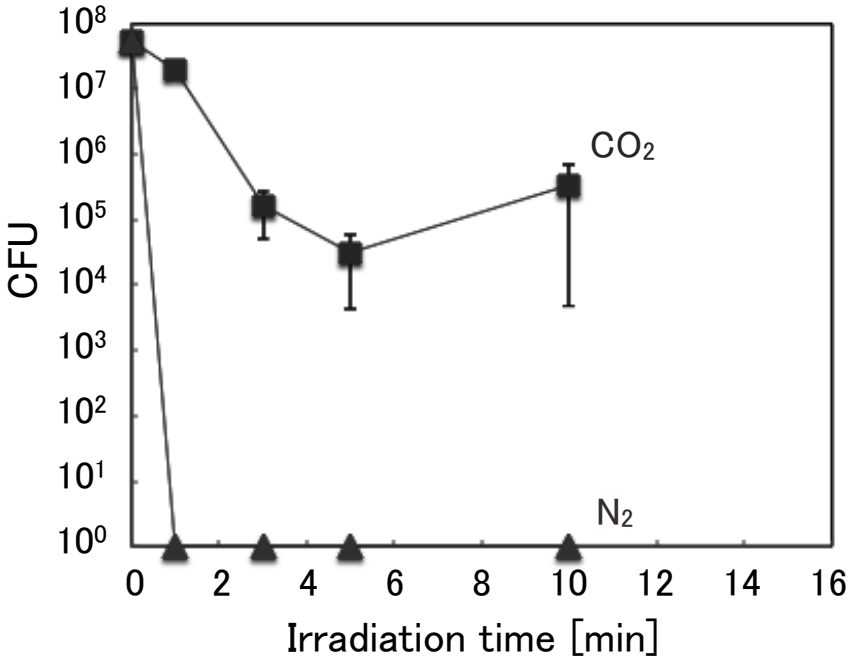


図 5-21 抗酸菌（*M. abscessus*）に対する殺菌効果

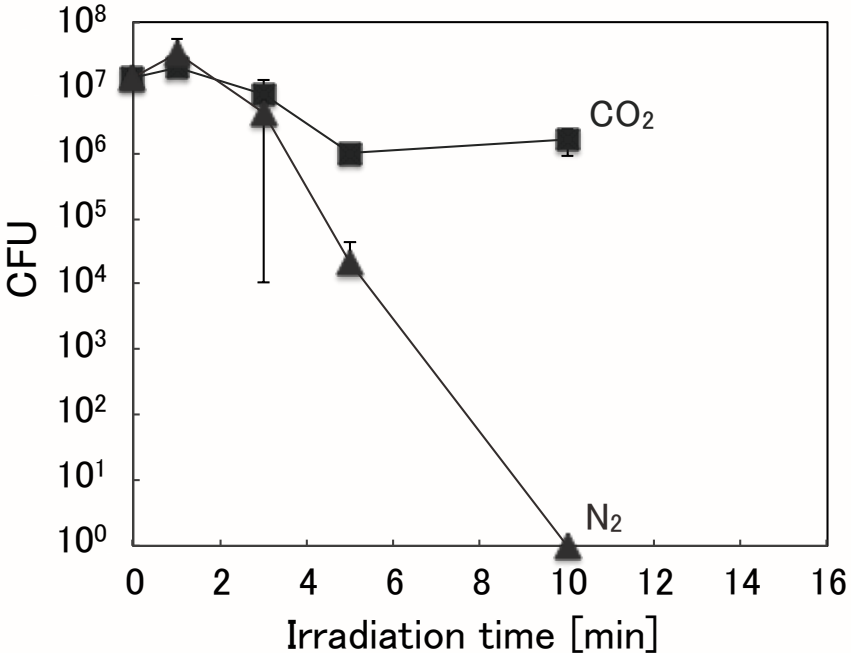


図 5-22 抗酸菌（*M. terrae*）に対する殺菌効果

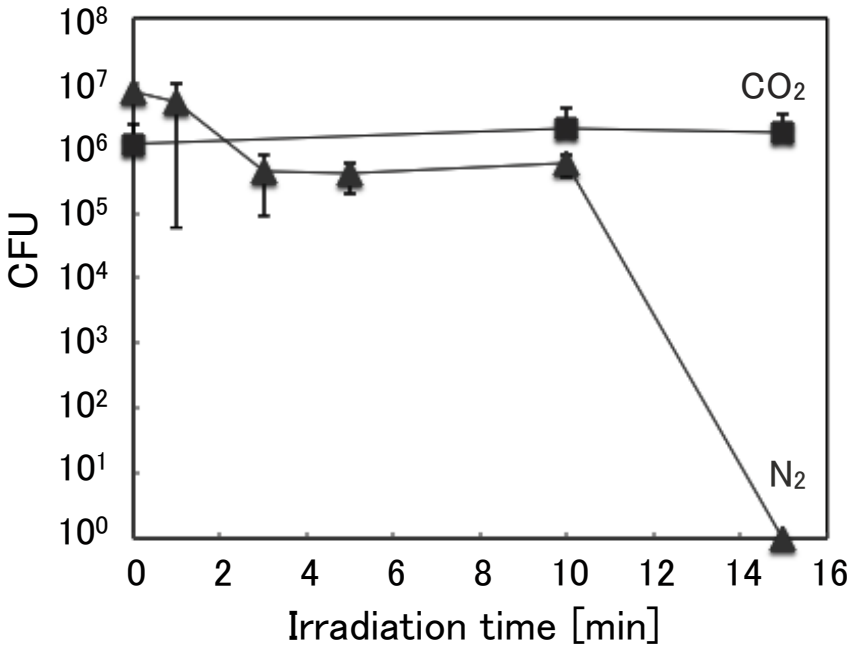


図 5-23 芽胞形成菌(セレウス菌)に対する殺菌効果

5.5 活性種消去剤を用いた殺菌効果への影響調査

前節で各菌種に対する殺菌される条件が明らかになった。そこで，溶液中に生成した活性種を消去剤で無効化して，殺菌効果の減少の度合いから，殺菌効果に寄与する活性種を調査した。まず，活性種の消去剤を混合した PBS(-) 200 μL 中に菌数が 2−5×10^6 個となるように懸濁液を調整した。このとき，一重項酸素消去剤としてアジ化ナトリウム(NaN_3)を用いた[61]。また，ヒドロキシラジカル消去剤として，ジメチルスルホキシド(DMSO)[Sigma Aldrich]10 mM[62], または生体内のヒドロキシラジカル消去剤に近い働きを示す還元型グルタチオン(GSH) [和光純薬工業]10 mM で調製した[63]。図 5-9 に示したように，プラズマの照射は前節と同様に行った。その後，プラズマを照射した懸濁液で 10 倍希釈系列を用意し，それぞれの希釈液を 10 μL ずつ直径 90 mm の寒天培地上に滴下した。所定の時間培養後，各希釈液より形成したコロニーを計測した。

黄色ブドウ球菌と緑膿菌の混濁液に対して，一重項酸素の消去剤 NaN_3 とヒドロキシラジカルの消去剤 DMSO を混合し，殺菌効果の高い窒素，二酸化炭素プラズマを 60 s

照射した結果を図 5-24，図 5-25 に示す。その結果，どちらの菌種に対しても窒素及び二酸化炭素プラズマのヒドロキシラジカルを消去することにより殺菌効果が減少することから，ヒドロキシラジカルが殺菌に寄与していると考えられる。また，二酸化炭素プラズマの一重項酸素を消去することにより殺菌効果が減少することから，一重項酸素も殺菌に寄与していることが考えられる。一方で窒素プラズマの一重項酸素を消去したときには緑膿菌に対して殺菌効果が減少したが，黄色ブドウ球菌に対しては寄与しなかった。これは腸球菌に対してヒドロキシラジカルが殺菌効果に支配的であり，窒素プラズマではヒドロキシラジカルが多く生成されたことが考えられる。

腸球菌と薬剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の混濁液に対して，一重項酸素の消去剤 NaN_3 とヒドロキシラジカルの消去剤 GSH を混合し，窒素，二酸化炭素プラズマを 60 s 照射した結果を，図 5-26，図 5-27 に示す。その結果，どちらの菌種に対しても窒素及び二酸化炭素プラズマの一重項酸素，ヒドロキシラジカルを消去することにより殺菌効果が減少することから，一重項酸素及びヒドロキシラジカルが殺菌に寄与していると考えられる。

カンジダ菌(NBRC1393)の混濁液に対して，一重項酸素の消去剤 NaN_3 とヒドロキシラジカルの消去剤 GSH を混合し，窒素，二酸化炭素プラズマを 5 min 照射した結果を，図 5-28 に示す。その結果，窒素及び二酸化炭素プラズマのヒドロキシラジカルを消去することにより殺菌効果が減少した。しかし，一重項酸素を消去したときには二酸化炭素の殺菌効果は減少したが，窒素プラズマは殺菌効果が減少しなかった。このことから図 5-25 の腸球菌の結果と同様に，カンジダ菌に対してヒドロキシラジカルが殺菌効果に支配的であり，窒素プラズマではヒドロキシラジカルが多く生成されたことが考えられる。

抗酸菌(*M.abscessus*)に対して，一重項酸素の消去剤 NaN_3 とヒドロキシラジカルの消去剤 GSH を混合し，窒素プラズマを 10 min 照射した結果を図 5-29 に示す。その結果，ヒドロキシラジカルを消去することにより殺菌効果が減少した。しかし，一重項酸素を消去したときには窒素プラズマは殺菌効果が減少しなかった。

以上の結果と図 5-21 の結果もふまえると，ヒドロキシラジカルは一重項酸素よりも酸化力が高いこと，二酸化炭素で殺菌効果が低かったことから，一部の一般細菌及び耐性の高い菌種であるカンジダ菌や抗酸菌に対して一重項酸素の影響は薄く，ヒドロキシラジカルが殺菌効果に支配的であったと考えられる。

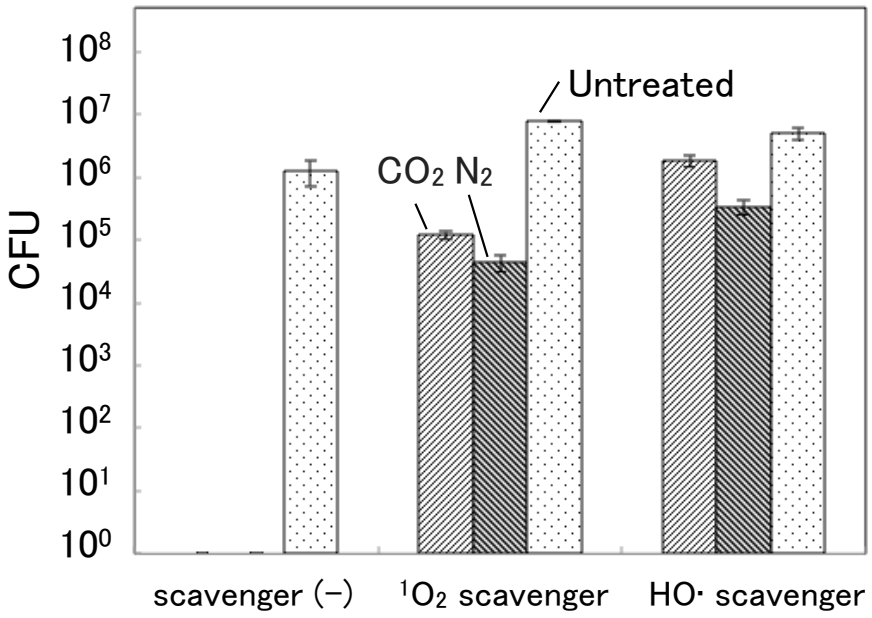


図 5-24 活性種消去剤を混合した場合の一般細菌(黄色ブドウ球菌)に対する殺菌効果

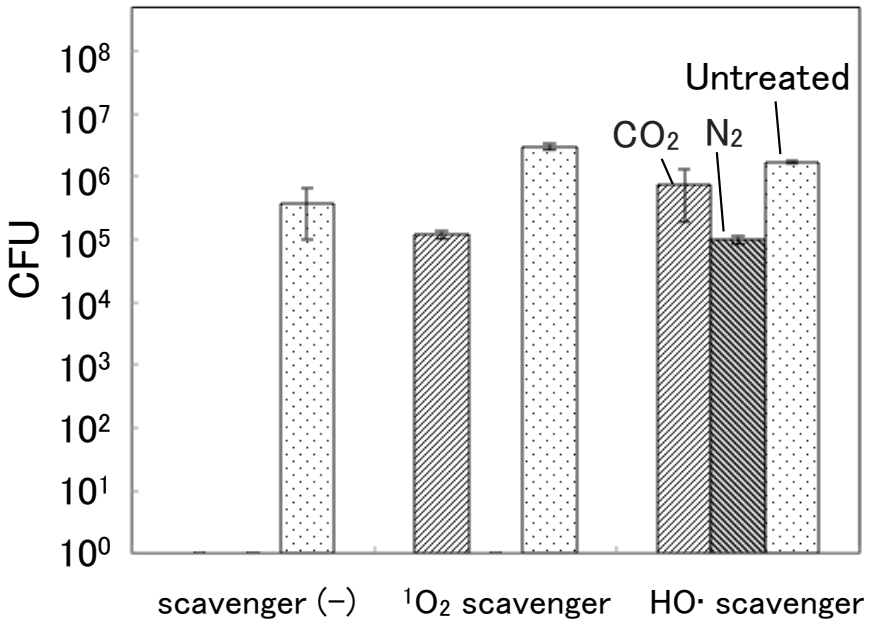


図 5-25 活性種消去剤を混合した場合の一般細菌(緑膿菌)に対する殺菌効果

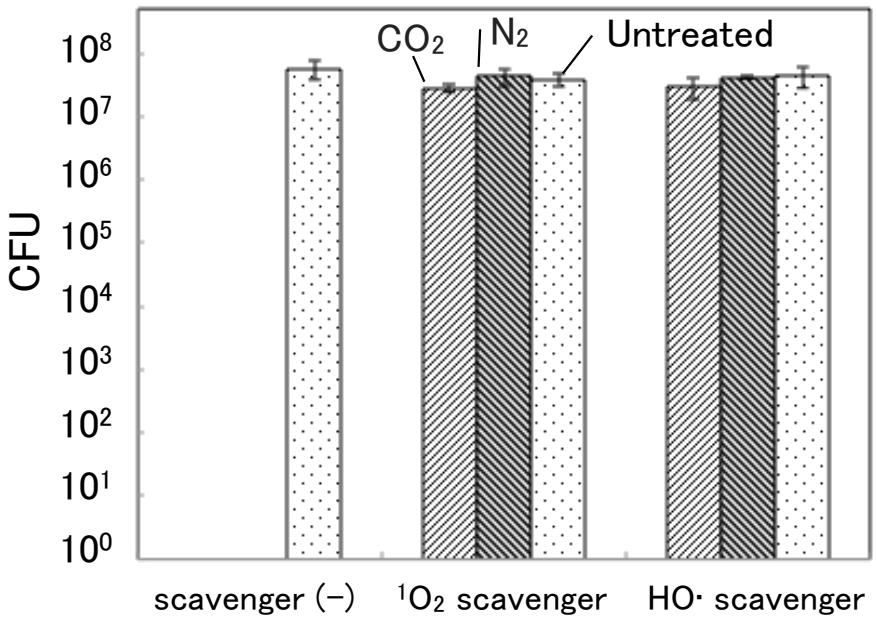


図 5-26 活性種消去剤を混合した場合の一般細菌(腸球菌)に対する殺菌効果

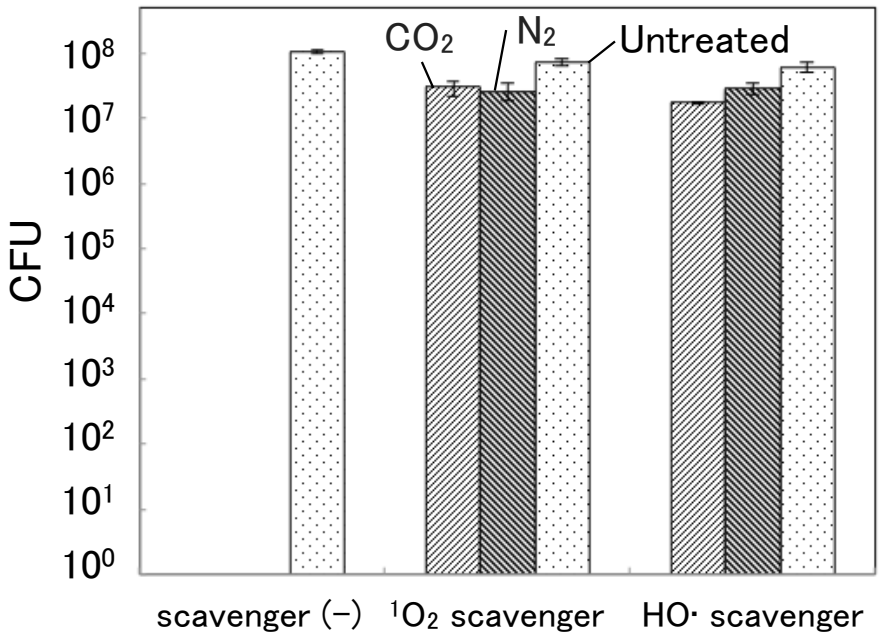


図 5-27 活性種消去剤を混合した場合の薬剤耐性菌(MRSA)に対する殺菌効果

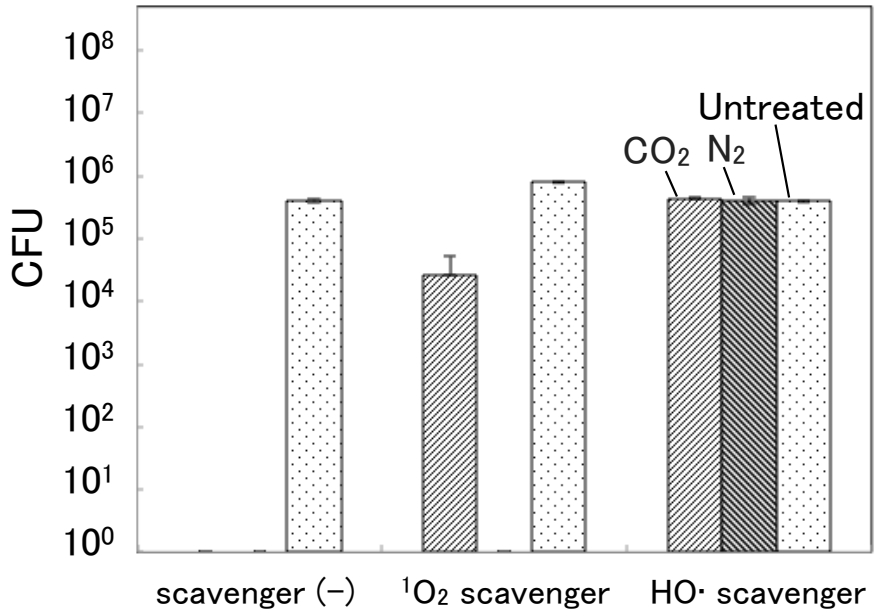


図 5-28 活性種消去剤を混合した場合の酵母様真菌(カンジダ菌)に対する殺菌効果

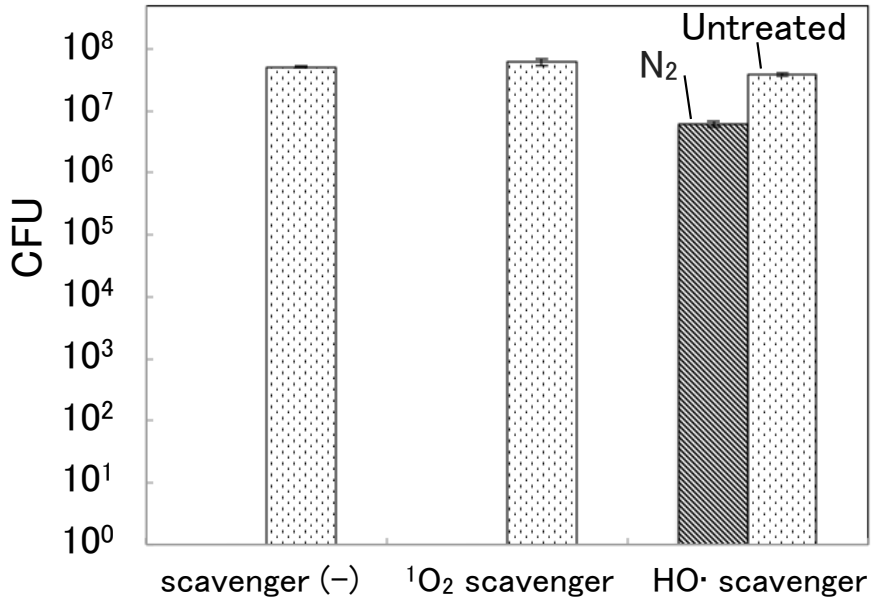


図 5-29 活性種消去剤を混合した場合の抗酸菌(M. abscessus)に対する殺菌効果

5.6 走査型顕微鏡を用いた各ガス種の殺菌効果の観察

前節までで活性種が殺菌効果に寄与することが確認された。この活性種が殺菌に寄与する過程として，細胞壁の破壊，酵素の失活，タンパク質の変性，DNA 損傷などが考えられる。そして，細胞壁の破壊に関しては画像による観察が可能であり，今回，電界放射型走査型電子顕微鏡[FE-SEM S4700，日立製作所]を用いて黄色ブドウ球菌に対する二酸化炭素及び窒素のプラズマによる殺菌効果を観察した。

未照射の黄色ブドウ球菌を，図 5-30 に示す。この菌に対して，図 5-9 と同様の手順で各ガス種のプラズマを 10 秒，120 秒照射した。その結果を図 5-31，図 5-32 に示す。二酸化炭素プラズマ照射後の黄色ブドウ球菌は，10 秒，120 秒の照射共に，図 5-31 のように菌自体の形状に変化は見られなかった。しかし，120 秒の照射では，菌同士の間の接着部分で損傷があるように見られた。このことから菌の表面で障害を起こし，繁殖に影響を与えた可能性が考えられる。また，ヒドロキシラジカルよりも一重項酸素は菌の深部まで透過する可能性があるため，二酸化炭素プラズマは菌体内部で障害を起こしている可能性も考えられる。

窒素プラズマ照射後の黄色ブドウ球菌では，図 5-32 のように 10 秒の照射で細胞壁に穴があき，内容物と予想される物質が多数観測された。また，120 秒の照射では，菌同士の間が粘体のようになっていることが観測された。これはプラズマによって破壊された菌体の内容物が形状のまだ確認できる菌の上に乗っているものと考えられる。さらに観察した視野上では，未処理と二酸化炭素プラズマ処理において，カバーバラス上の菌数に大きな違いが見られなかったが，10 秒の窒素プラズマ照射では菌数が減少しており，120 秒の窒素プラズマ照射後では顕著に減少していた。

これらの結果から，活性種によって殺菌機序に違いがあることが示唆され，窒素プラズマ処理では最も酸化電位の高いヒドロキシラジカルによって菌の細胞壁を破壊したことが殺菌の主たる要因である可能性が示された。一方，二酸化炭素プラズマによる殺菌効果は今回の結果からは確実なことは言えず，今後の検証として透過型顕微鏡等を用いて細胞内も観察する必要がある。

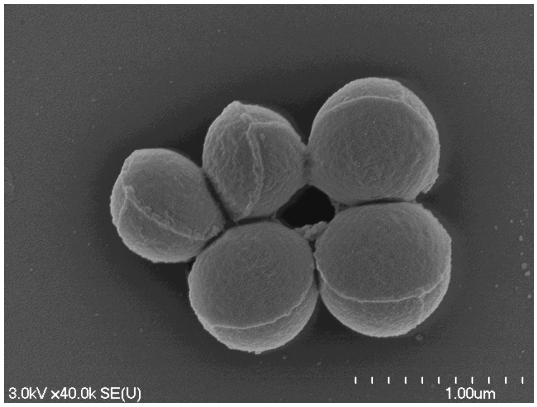


図 5-30 プラズマ未照射の黄色ブドウ球菌

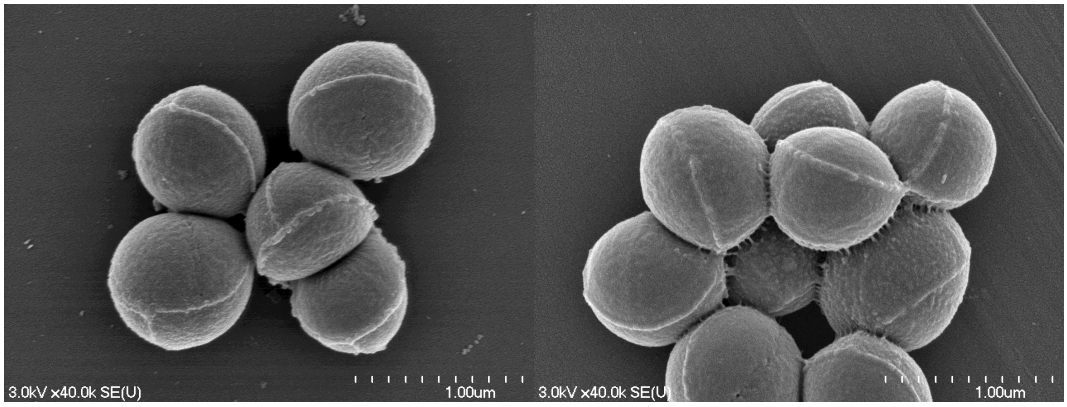


図 5-31 二酸化炭素プラズマ照射した黄色ブドウ球菌(左:10 秒, 右:120 秒)

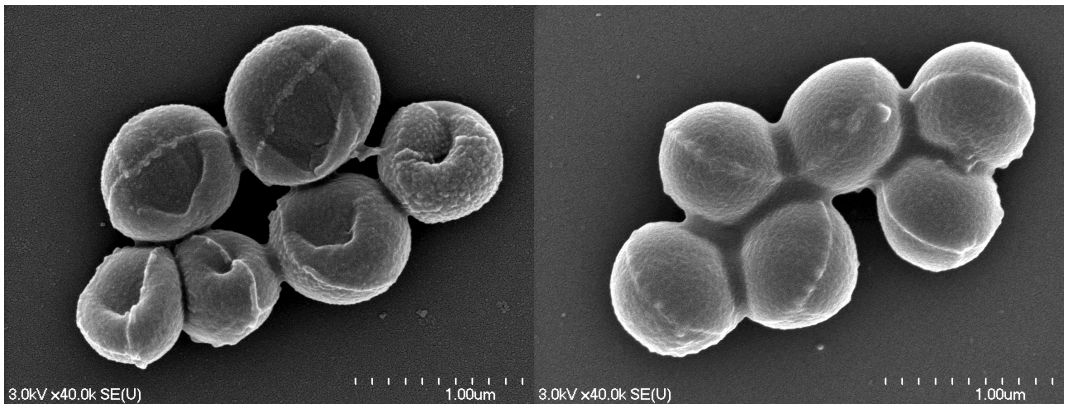


図 5-32 窒素プラズマ照射した黄色ブドウ球菌(左:10 秒, 右:120 秒)

5.7 様々なガス種のプラズマによる液中のウイルスに対する不活化効果

ウイルスは細菌や真菌とは生物学的な機能が全く異なるため，ウイルスについて不活化を調査する必要がある。本節では，ネコカリシウイルス，コクサッキーウイルス，アデノウイルスの 3 種のウイルスの不活化効果を調べた。

まず，リン酸緩衝液 PBS(-)200 μL 中にウイルスの懸濁液を調製した。図 5-9 に示したように，プラズマの照射方法は前節と同様に行った。図 5-33 に実験のセットアップを示し，表 5-2 に照射対象のウイルス種を示す。ガス種に殺菌効果の高かった二酸化炭素，窒素を選択し，プラズマを照射後の懸濁液で 10 倍希釈系列を用意し，10 μL を感受性細胞が培養してある 96 well plate に接種した。最後に，倒立顕微鏡下で細胞変性効果(CPE)を観察し，感染価($TCID_{50}$)を求めた。$TCID_{50}$ とは培養細胞の 50%を感染させるために必要なウイルス濃度である。

二酸化炭素及び窒素プラズマによるネコカリシウイルス，コクサッキーウイルス，アデノウイルスの不活化効果の時間依存性を図 5-34 から図 5-36 に示す。ネコカリシウイルスは，窒素プラズマを 3 min 照射もしくは二酸化炭素プラズマを 5 min 照射することで 6 桁不活化された。コクサッキーウイルスに関しては窒素プラズマを 10 min 照射することで 6 桁不活化され，二酸化炭素のプラズマ照射では 10 min 照射で 2 桁程度不活化された。一方アデノウイルスには，窒素プラズマを 10 min 照射しても 1 桁程度の不活化効果しか得られなかったが，二酸化炭素プラズマを 10 min 照射すると 6 桁の不活化効果が得られた。ネコカリシウイルス及びコクサッキーウイルスは前節の殺菌効果と同様の傾向を示したことから，ヒドロキシラジカルが寄与していると考えられ，アデノウイルスに関しては，また異なった機序が関与していると考えられる。

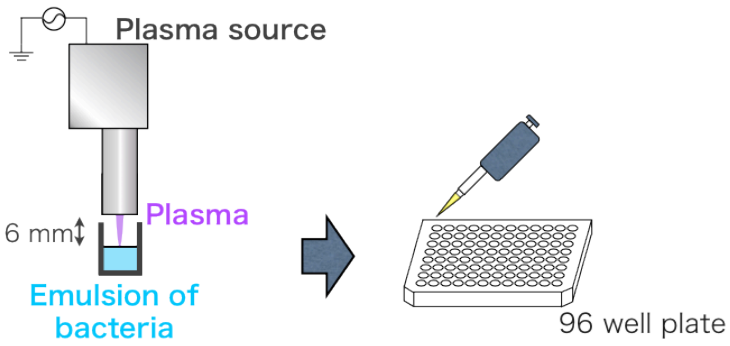


図 5-33 実験のセットアップ

表 5-2 プラズマ照射対象のウイルス

種	株	感受性細胞	培養時間，温度
エンテロウイルス	コクサッキー A 群 7 型	Vero 細胞 アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来	5 日，37℃
アデノウイルス	3 型	A549 細胞(JCRB0076) ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞	11 日，37℃
ネコカリシウイルス	F9	CRFK 細胞(JCRB9035) ネコ腎細胞由来	5 日，37℃

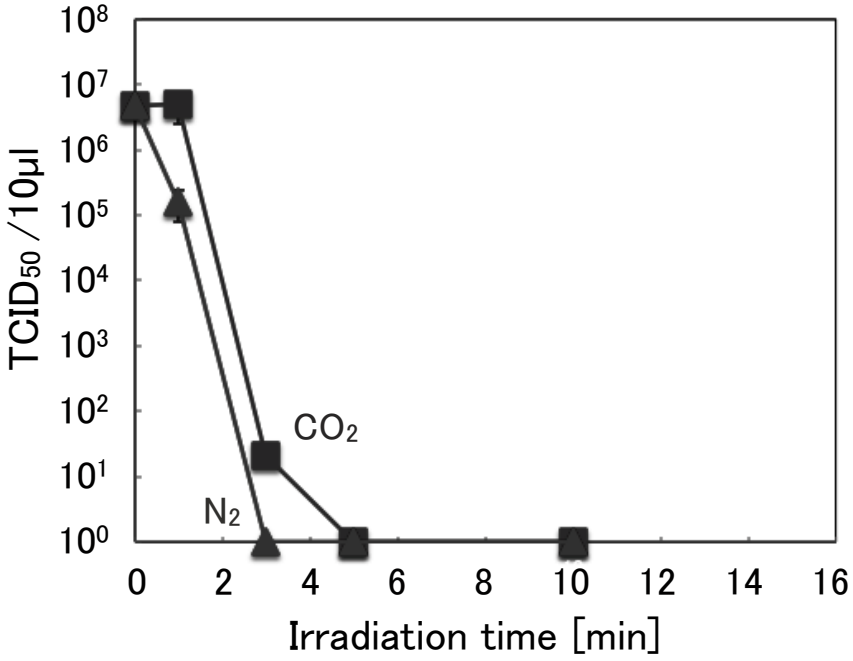


図 5-34 ネコカリシウイルスに対する不活化効果

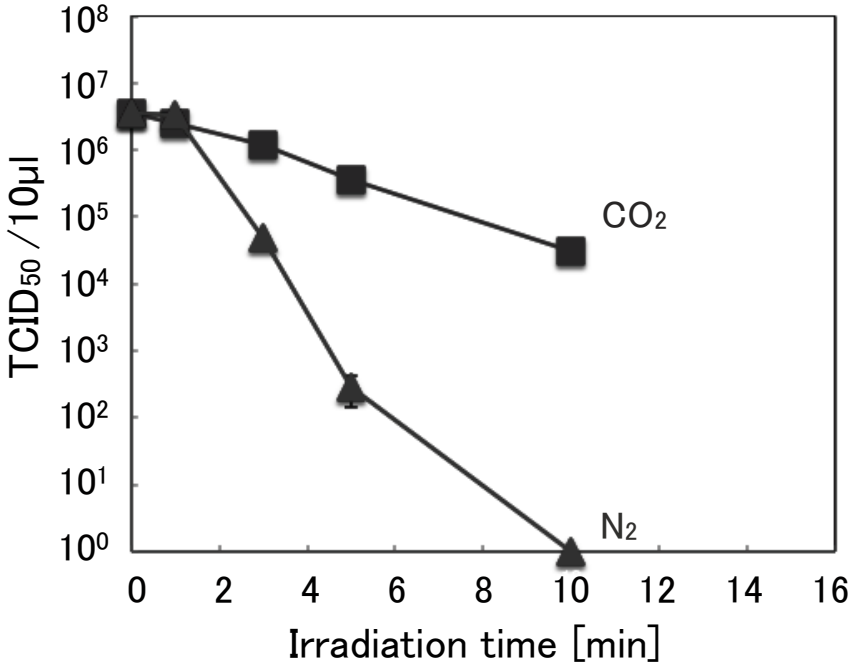


図 5-35 コクサッキーウイルスに対する不活化効果

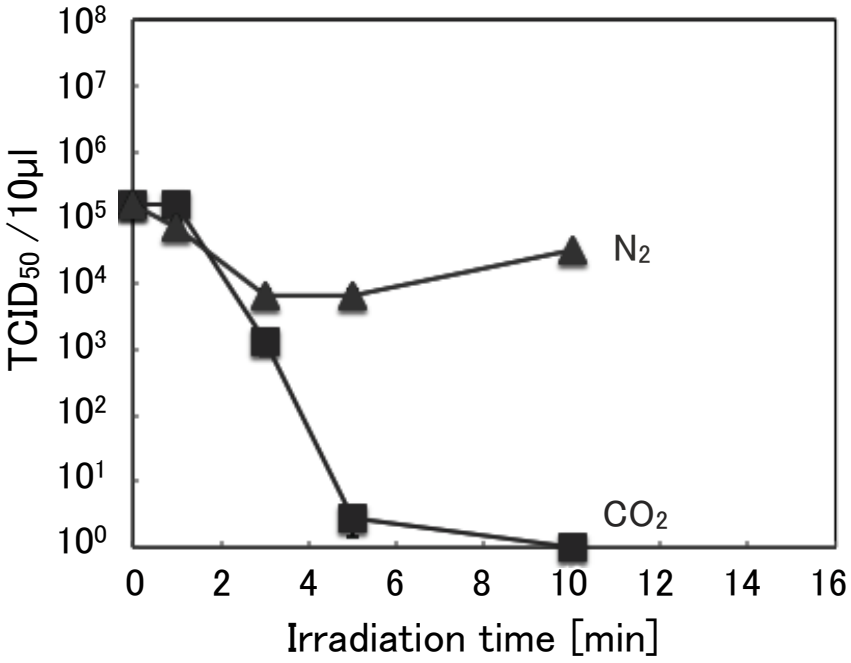


図 5-36 アデノウイルスに対する不活化効果

5.8 乾燥条件下での殺菌効果の定量評価

前節までの殺菌では，寒天培地や PBS 溶液の液界面との相互作用が関与し，水分子と反応してヒドロキシラジカルが生成され，その活性種が殺菌に寄与していると考えられた。そこで次に，液体のない乾燥条件下でのプラズマの殺菌効果を調査するために，芽胞が載せられた試料に対する殺菌効果を定量評価した。

5.8.1 各ガス種のプラズマによる殺菌効果

実験には芽胞形成菌である *Bacillus subtilis*（枯草菌）を 1.0×10^5 個載せたメンブランフィルタのインジケータを使用した。このメンブランフィルタのインジケータは直径約 10 mm に *B. subtilis* の菌液を濾過させて作成した。このインジケータに対して，各ガス種のプラズマを直接照射し，その後，滅菌水で洗い出し，その菌の懸濁液を寒天培地上で定量評価することにより殺菌効果を導出した。

プラズマガスにアルゴン，空気，窒素，酸素，二酸化炭素，アルゴン二酸化炭素混合ガス(9:1)を用いて，*B. subtilis* に対する殺菌効果を調査した。照射距離は 10 mm として，ガス流量を 5 L/min，照射時間を 0-5 min でプラズマ照射した。図 5-37 に *B. subtilis* 対す

る各ガス種のプラズマの殺菌効果を示す。その結果，アルゴンのプラズマ以外，どのガス種のプラズマも殺菌効果が確認された。単体のガスの場合，その殺菌効果は 5 min で 2-3 桁程度であり，時間に比例して殺菌効果が見られた。そして，アルゴンに二酸化炭素を 10%混合したガスのプラズマでは 5 min で 5 桁の殺菌効果が得られた。これは高エネルギーで寿命の長い準安定状態のアルゴンが二酸化炭素の励起及び原子化の効率を上げている可能性が考えられる。

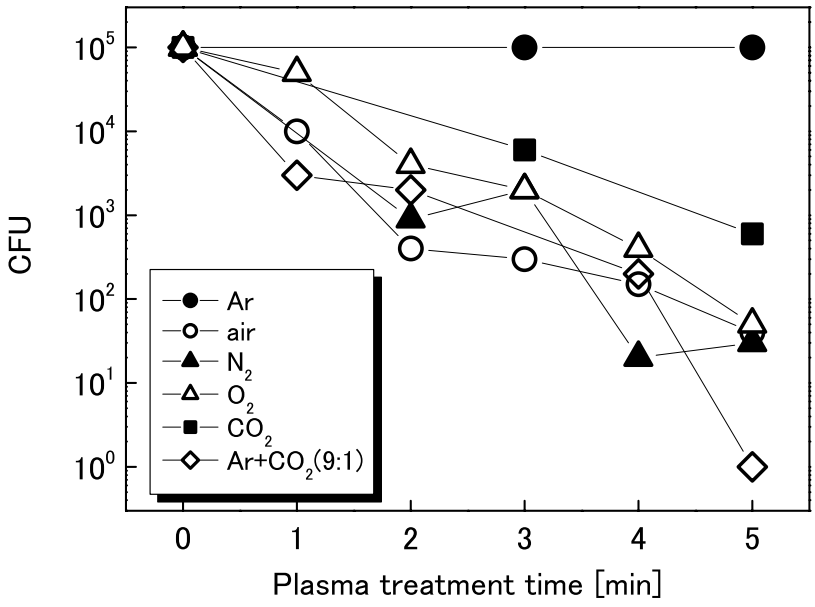


図 5-37 *B.subtilis* に対する各ガス種のプラズマ殺菌効果

5.8.2 混合ガス濃度と殺菌効果の関係

前節までの結果より，混合ガスに高い殺菌効果が見られた。そこで，アルゴン二酸化炭素混合プラズマについて，流量は変えずに混合ガスの濃度のみを変えて，*B. subtilis* に対して 3 min プラズマ処理を行い，殺菌効果の高い条件について調査した。

図 5-38 に各ガス混合比のプラズマによる殺菌効果を示す。混合比によって殺菌される度合いが異なり，アルゴンに対する二酸化炭素の混合比が 20%のときに殺菌効果が最大となった。そのため，この混合比のときに，殺菌に寄与する活性種が効率よく生成されていると考えられる。

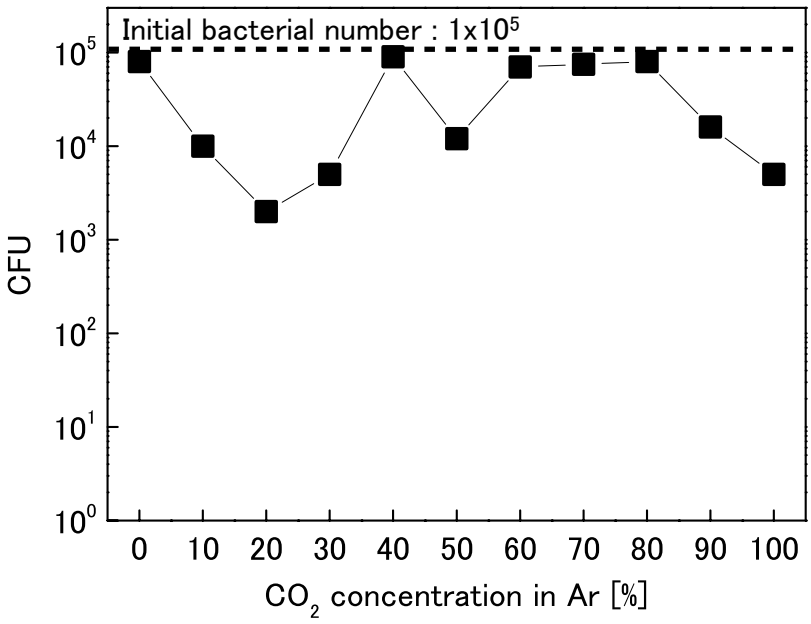


図 5-38 *B. subtilis* の殺菌に対するアルゴン二酸化炭素プラズマの混合比依存性

5.8.3 ガス流量変化による殺菌特性

次に殺菌において最適な条件を探すために, ガス流量による殺菌効果の依存性を調査するために，*B. subtilis* に対して照射距離 10 mm と固定し，アルゴン二酸化炭素混合ガス(9:1)のプラズマを照射時間 3 min でガス流量を流量 2.5 L/min から 12.5 L/min と変化させて殺菌効果を測定した。

ガス流量による殺菌特性を図 5-39 に示す。これにより 2.5 L/min と 12.5 L/min の照射で 2 桁程度の殺菌効果，その間の流量範囲では 1 桁以下の殺菌効果となり，流量の低い領域と高い領域に殺菌効果が高くなる結果となった。これは流量が低い領域ではプラズマ源出口での滞在時間が長くなり，プラズマの密度が高くなるためであると考えられ，流量が高い領域では生成されたプラズマが速いガス流に乗せられて，ラジカルの寿命までに殺菌対象に届くためであると考えられる。

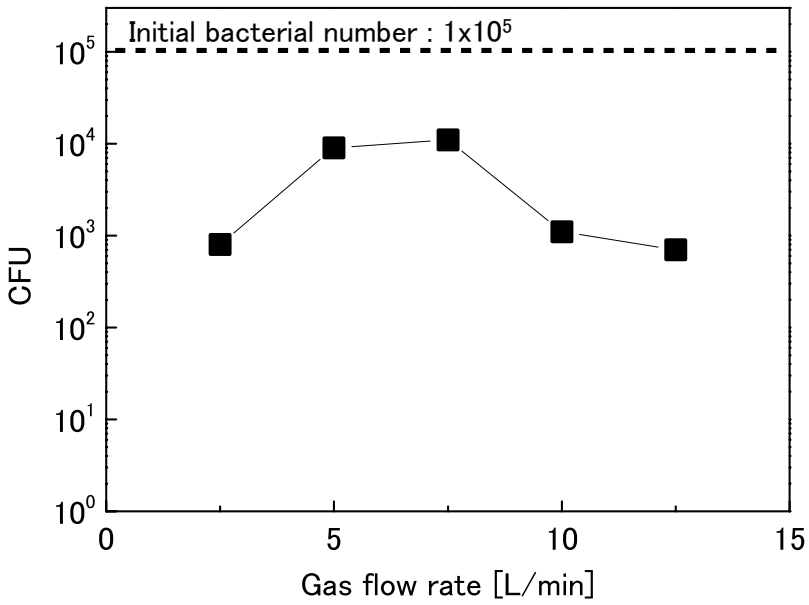
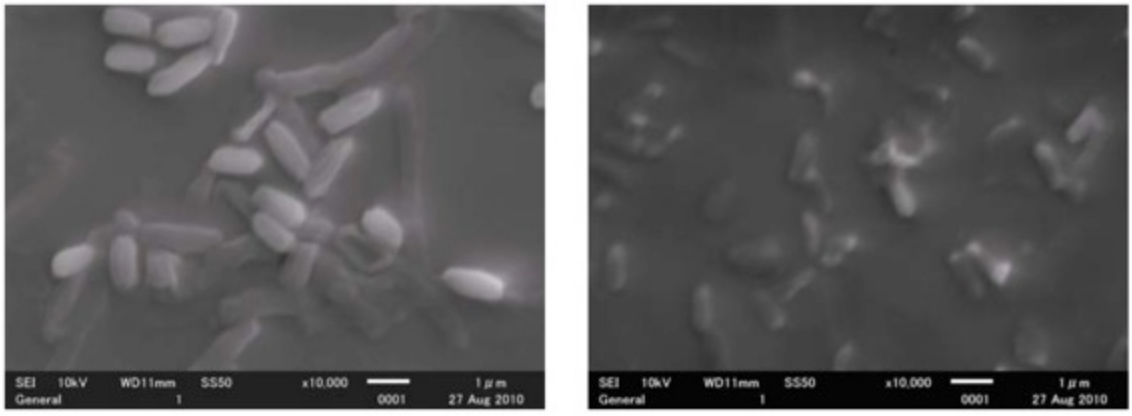


図 5-39 殺菌のガス流量依存性

5.8.4 走査型電子顕微鏡を用いた乾燥条件下の殺菌効果の観察

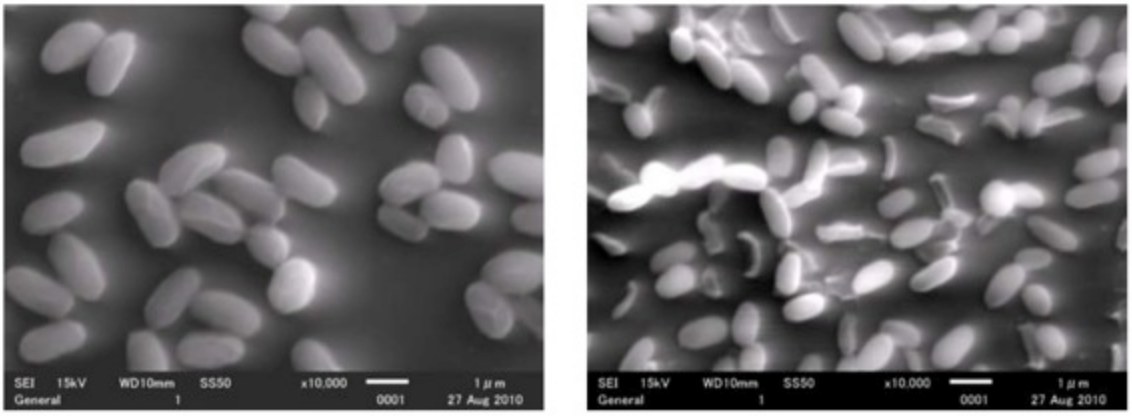
乾燥条件下で, プラズマ照射により各菌種に対して物理的に作用しているかを調べるため，プラズマ処理前後の細菌の様子について走査型電子顕微鏡 [JEOL，JSM-6510A] を用いて観察した。*B. subtilis* 芽胞，*Geobacillus stearothermophilus* 芽胞， *A. niger* 胞子に対し，前節と同様の条件でアルゴン二酸化炭素混合ガス（10%）プラズマを 5 min 照射し，電子顕微鏡により表面物理形状変化の有無を観察した。各指標菌のプラズマ処理前後の電子顕微鏡観察結果を図 5-40 から図 5-42 に示す。これらの菌種において，プラズマ処理後，各菌で形状の変化が確認された。

詳しく観察すると，*B. subtilis* 芽胞は処理前後で，芽胞の崩壊が確認され，*G. stearothermophilus* 芽胞に関しては内容物が外に漏れ，菌の縮小が観測された。また，*A. niger* 胞子では胞子の周りのトゲのような部分が無くなっていた。これらはプラズマから生成された酸素原子や一重項酸素, オゾンなどの活性酸素種によるエッチングによるものであると考えられる。



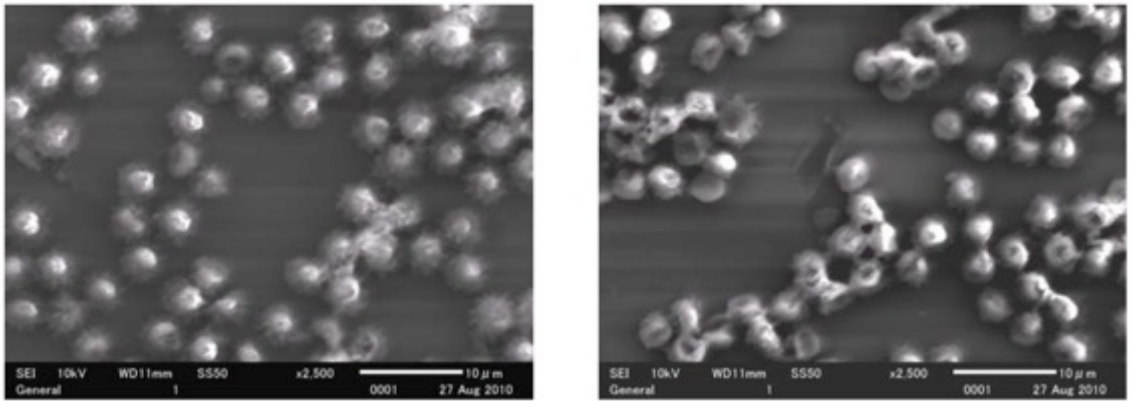
Before irradiation　　After irradiation

図 5-40 プラズマ処理前後の *B. subtilis* (枯草菌)芽胞の SEM 画像



Before irradiation　　After irradiation

図 5-41 プラズマ処理前後の *G. stearothermophilus* 芽胞の SEM 画像



Before irradiation　　After irradiation

図 5-42 プラズマ処理前後の *A. niger*（黒カビ）胞子の SEM 画像

5.9　各ガス種のプラズマによる毒素の分解

細菌が産生する物質で，動物に対して病原性を示すものに，内毒素(endotoxin)と外毒素(exotoxin)がある。内毒素とは，細菌が破壊または溶解したときに出現してくる毒素であり，外毒素とは，細菌が菌体外に産生･放出する毒素である。内毒素は敗血症を引き起こす大腸菌や緑膿菌などが生成する菌として有名であり，外毒素はボツリヌス毒素，コレラ毒素を分泌するボツリヌス菌やコレラ菌などが有名である。このような細菌から生成される毒素は殺菌処理を施しても残存する場合があり，その量が許容量を超えてしまえば人体に対して影響が現れる。こういった毒素に対する処理の方法として，薬剤の投与による解毒や加熱処理による毒素の構造破壊が一般的である。しかし，耐熱が高い毒素や，熱に弱い対象物に対しては加熱処理が行なうことができない。また，解毒できる薬剤がない毒素も存在するので毒素の種類によって処理法に制約を受ける。現在，大気圧プラズマによって有機結合を持った有害物質を分解できることが明らかになっており[64]，著者らは低温で処理できる方法として大気圧プラズマが利用可能であると考えた。

今回，毒の分解処理に対して耐性の高いテトロドトキシン(TTX)を用いた。TTX はフグの毒として有名であり，高い毒性を持つことから，ヒトの経口摂取の場合 1-2 mg 程度で死に至る。塩基性または強酸性の環境下で分解されるが，拮抗薬や特異療法などによる解毒法が見つかっておらず，また，熱に安定で300℃以上に熱しても分解されない。この TTX がプラズマによって分解出来れば，TTX の無毒化が実現でき，また他の有毒物質も分解できることが期待される。本研究では TTX 溶液に対して様々なガス種のプラズマを照射し，その溶液のマススペクトルを分析した。

試料として図 5-43 のような構造を持つ TTX(細胞生物学用，和光純薬工業)を超純水で 10 ppm に調製し，マイクロチューブに 1 mL 添加した。流量を 2 L/min として空気，二酸化炭素，アルゴン，酸素，窒素でプラズマを生成し，図 5-44 のように照射距離を 15 mm として TTX の溶液に 5 min 照射した。その後，試料を 1/10 に希釈し，LC-ESI-TOF-MS(micrOTOF Ⅱ, BRUKER Co.)を用いて表 1 のような測定条件でマススペクトルの分析を行った。さらに，酸素，窒素のプラズマに関しては，照射時間を 1-10 min と変化させて，定量測定を行った。

図 5-45 に 1 ppm の未処理の TTX 溶液の質量スペクトルを示す。図 5-45 のように TTX はプロトン付加分子$[M+H]^+$（m/z=320.1088）が観測されやすいため，この質量数の強度で各プラズマガス種の処理効果を比較した。各ガス種のプラズマ照射による TTX のス

ペクトル強度を図 5-46 に示す。各ガスのプラズマによって TTX のスペクトル強度が異なった。空気プラズマでは減少せず，窒素プラズマが最も TTX の信号強度を減少させた。他のガス種では二酸化炭素，アルゴン，酸素の順で TTX の強度が減少した。各ガス種のプラズマではプロセスガス由来の原子線が確認されることや，ヒドロキシラジカル，一重項酸素が生成されることから，これらの活性力の高い活性種が TTX の強度の減少に寄与したと考えられる。特に，ヒドロキシラジカルは有機化合物を分解する活性種として有力視されており，ヒドロキシラジカルを多く生成できる窒素，酸素プラズマ照射が TTX のマススペクトルを減少させること，逆にヒドロキシラジカルの生成量の少ない空気プラズマの照射で TTX のマススペクトルが減少しないことからヒドロキシラジカルが TTX の分解に最も寄与する要因として考えられる。

次に酸素及び窒素プラズマの照射時間による TTX のスペクトルの推移を調査した。その結果，図 5-47 のように窒素プラズマ 10 min の照射で TTX の濃度は 0.10 ppm となり 1/100 の濃度の減少が確認された。図 5-48，図 5-49 に酸素及び窒素プラズマにおける各照射時間の質量スペクトルをそれぞれ示す。その結果，各ガス種のプラズマ照射によって TTX のスペクトル以外の質量数も観測された。m/z=318.1 や 336.1 などのスペクトルが現れたことから，プラズマ照射によって TTX が分解や酸化したことが考えられる。しかし，これらのスペクトルも照射時間を長くすることで減少した。このことから分解された物質も長時間のプラズマ照射により，さらに分解されたと考えられる。

以上の結果から TTX 以外の有機結合を持つ毒素に対してもガス種を選択することによってプラズマによる毒素分解を実現できる可能性が示された。

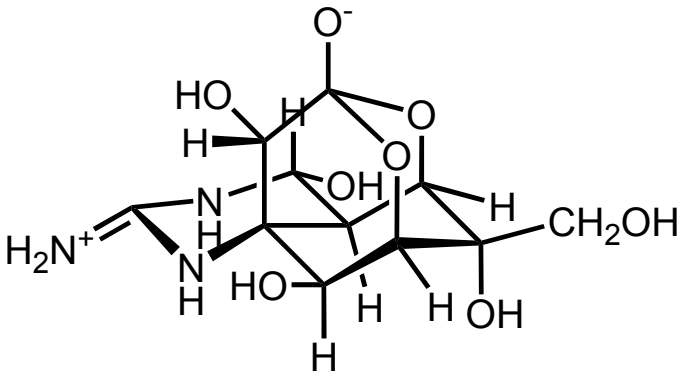


図 5-43 Tetrodotoxin (TTX)

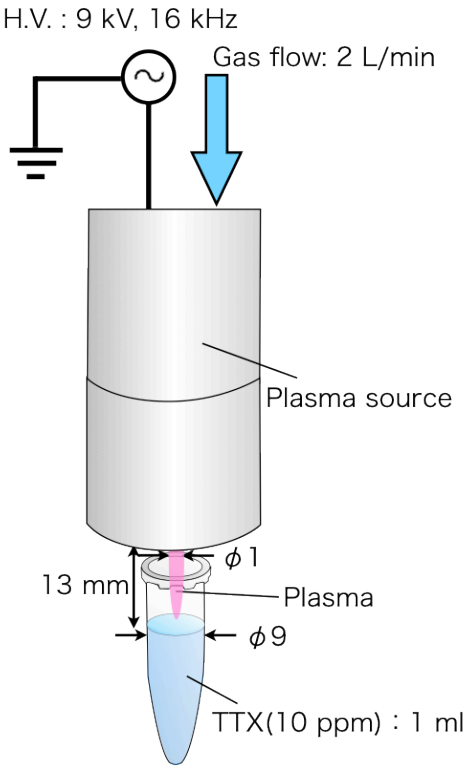


図 5-44 TTX 溶液に対するプラズマ照射

表 5-3 Condition of ESI-TOF-MS

Scan range : m/z 50−700
Ion polarity : Positive
Set capillary : 4500 V
Set end plate offset : −500 V
Set nebulizer : 1.8 Bar
Set dry gas : 10 L/min
Set divert valve : waste
Flow rate : 0.2 ml/min
Mobile phase : 50% acetonitrile
Injection volume : 30 μl

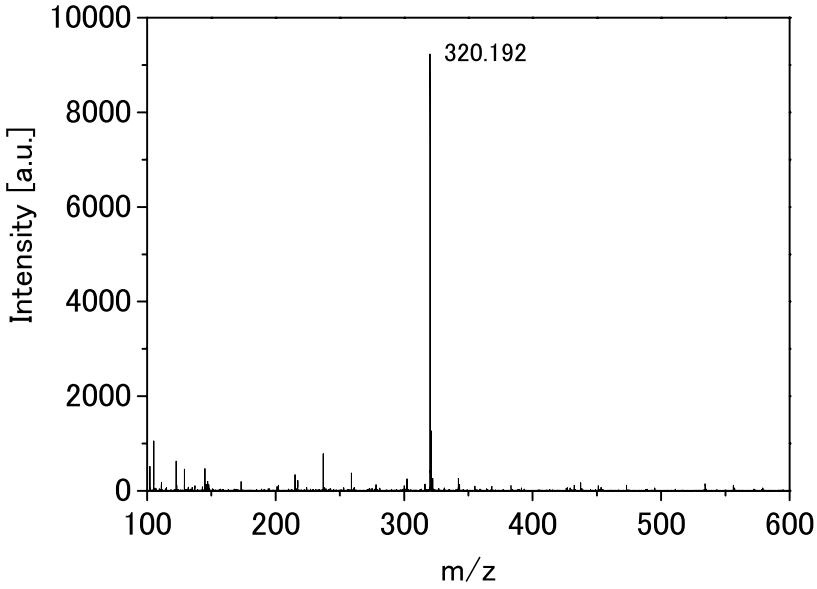


図 5-45 TTX 1 ppm の質量スペクトル

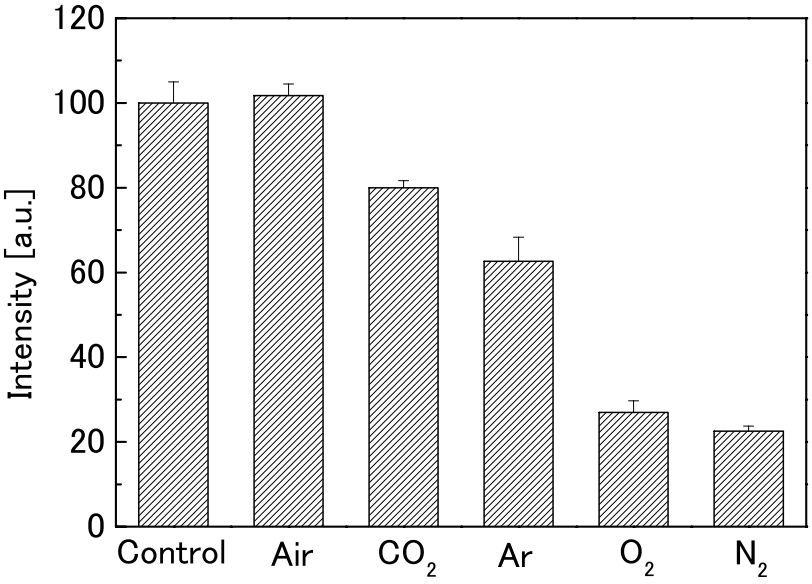


図 5-46 照射時間 5 min の各ガス種のプラズマ照射による TTX のスペクトル強度

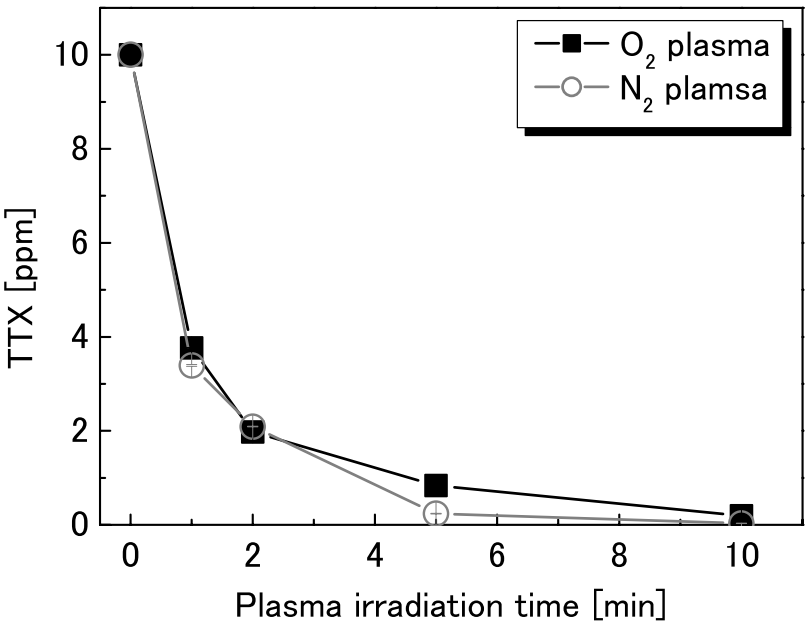


図 5-47 酸素及び窒素プラズマ照射による TTX の濃度

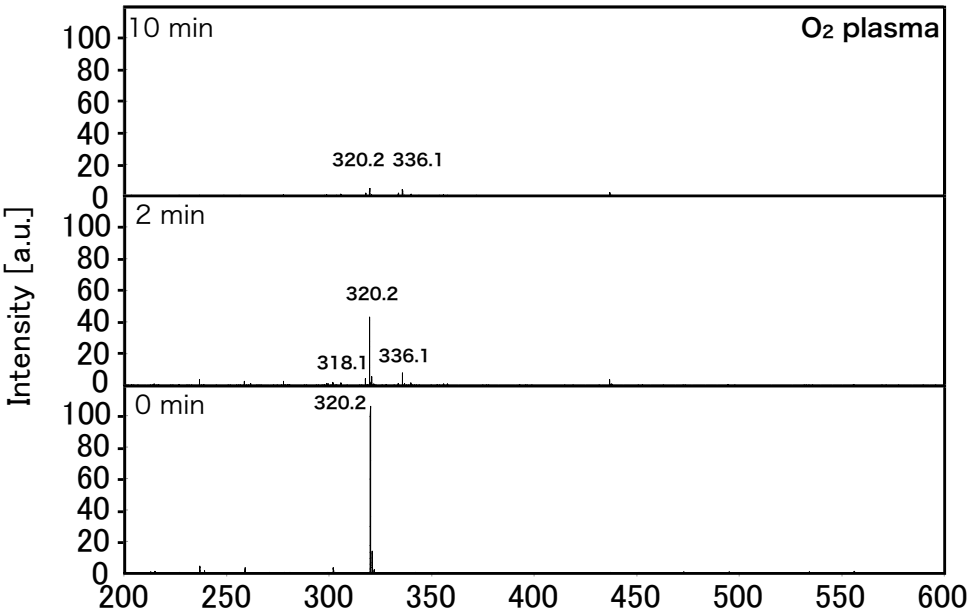


図 5-48 酸素プラズマ照射前後の質量スペクトル

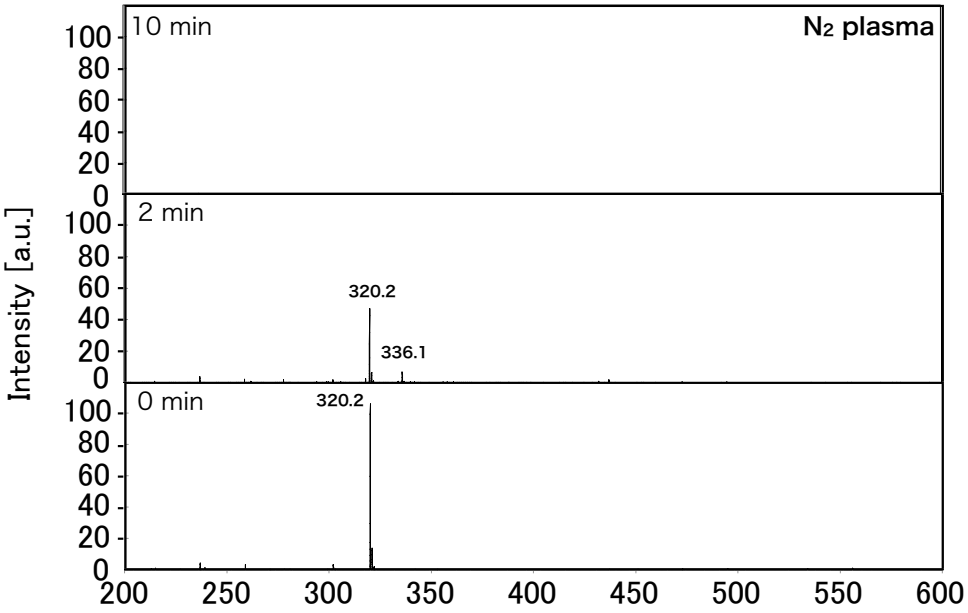


図 5-49 窒素プラズマ照射前後の質量スペクトル

5.10 まとめ

本章では，マルチガスプラズマジェットを用いて様々な条件で殺菌効果を検証した。その結果，各ガス種のプラズマにおいて大腸菌に対する殺菌効果が認められ，アルゴンに酸素を混合したプラズマで高い殺菌効果が得られた。プラズマによる活性種，紫外線，温度による影響を調査したところ，プラズマによる殺菌効果は活性種が支配的であることが明らかとなった。また，その活性種は耐性の高い菌種に対しても殺菌効果を示した。

この殺菌効果を定量評価するために菌数が既知の懸濁液に対してプラズマ照射効果を検証したところ，窒素及び二酸化炭素のプラズマで高い殺菌効果が得られた。さらに，様々な細菌に対する殺菌効果は，耐性の高い菌種になるにつれて，二酸化炭素のプラズマで殺菌効果が見られなくなり，一方で窒素プラズマでは最も耐性の高い芽胞形成菌に対しても殺菌効果が得られた。これらのガス種のプラズマが殺菌効果を示すメカニズムを調査するために，活性種の消去剤を混合して，本来の殺菌効果と比較した。その結果，一重項酸素とヒドロキシラジカルの消去剤によって活性種の影響が消去され，一部の細菌に対する影響は，一重項酸素及びヒドロキシラジカルが双方とも寄与しているということが明らかになった。一方で，耐性の高い菌種では一重項酸素による殺菌効果よりも，ヒドロキシラジカルの方が殺菌効果に支配的である可能性が示唆された。走査型電子顕微鏡による観察では二酸化炭素のプラズマでは大きな変化は見られなかったが，窒素プラズマ照射では細胞壁の破壊が観測された。さらに，各種ウイルスに対する照射効果も検証した結果，殺菌効果のみならずウイルスの不活化効果も見られた。

さらに，芽胞形成菌を用いて乾燥条件下でプラズマによる殺菌効果を調査した。その結果，アルゴンプラズマ以外，どのガス種のプラズマでも殺菌が確認された。特に，アルゴンに二酸化炭素を添加したプラズマで高い殺菌効果が得られ，アルゴンに対する二酸化炭素の混合比が 20%のときに最大の殺菌効果が見られた。また， *B.subtilis*（枯草菌），*G.stearothermophilus*，*A.niger*（黒カビ）の芽胞形成菌，真菌について，走査型電子顕微鏡を用いてプラズマ処理前後を観察したところ，乾燥条件下でも菌の形状が変化していることが確認された。

そして，毒素に対するプラズマ処理では，テトロドトキシン(TTX)に対して各ガス種のプラズマを照射し，分解の度合いを調査した。その結果酸素，窒素プラズマによって高効率な TTX の分解が確認され 10 min で 1/100 まで濃度が減少した。このことから，マルチガスプラズマを用いてガス種を変更することによって，あらゆる場面の微生物の不活化及び毒素の分解できることが明らかとなった。

[57] 秋津哲也，平山けい子，大川博司，清水尚博，今西雄一郎，プラズマ発生ガスの相違による滅菌効果の違い，*Bokin Bobai*, **38**, 9, pp. 597-608, (2010).

[58] 永津政章，Tyvek 包装された芽胞菌の低温プラズマ滅菌技術, *Bokin Bobai*, **38**, 10, pp. 687−692, (2010).

[59] A. S. Chiper, W. Chen, O. Mejlholm, P. Dalgaard and E. Stamate, Atmospheric pressure plasma produced inside a closed package by a dielectric barrier discharge in Ar/CO_2 for bacterial inactivation of biological samples, *Plasma Sources Sci. Technol.* **20,** 025008, (2011).

[60] B. F. Severin, M. T. Suidan and R. S. Engelbrecht, Kinetic modeling of UV disinfection of water *Wat. Res.*, **17**, 11, pp. 1669-1678, (1983).

[61] 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).

[62] R. B. Fox, Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea., *J Clin Invest*., **74**, 4, pp. 1456–1464 (1984)

[63] R. Franco, M. I. Panayiotidis and J. A. Cidlowski, Glutathione Depletion is Necessary for Apoptosis in Lymphoid Cells Independent of Reactive Oxygen Species Formation, *J. Bio. Chem.*, **282**, 42, pp.30452–30465, (2007).

[64] T. Kuroki, K. Yoshida, H. Watanabe, M. Okubo and T. Yamamoto, Decomposition of trace phenol in solution using gas-liquid interface discharge, *Japan. J. Appl. Phys.*, **45**, pp. 4296-4300 (2006).

第 6 章

各ガス種のプラズマによる生体への影響

6.1 はじめに

大気圧非熱平衡プラズマは入力電力やプラズマ源の構成，照射時間，プロセスガスなど様々なパラメータを制御することで殺菌や細胞の増殖，細胞の分離，アポトーシス，そしてネクローシスを含むあらゆる結果を引き起こすことができる[65]。そのためこのプラズマ源を治療分野に応用し，プラズマを人体へ直接照射することで創傷治療や歯科治療を行う試みがなされている[66][67]。しかしプラズマが生体に及ぼす影響は未だ解明されておらず，実用化を図るためにはその治療のメカニズムを検証する必要がある。本章では生体対するプラズマの影響調査として，各種細胞及び角膜を用い，プラズマ照射したときの活性力の変化や DNA の二本鎖切断の有無の調査や病理像の観察を行なった。

6.2 HeLa 細胞に対する各ガス種のプラズマの影響

HeLa(ヒーラ)細胞とは，ヒト子宮頸がん由来のがん細胞のことである。この細胞はHenrietta Lacksの子宮頸部から採取され，この名の頭文字から取って命名されている[68]。ヒト由来の最初の細胞株ということもあり，in vitroでの細胞を用いる試験や研究に幅広く用いられている。本説ではこのHeLa細胞を用い，細胞に対するプラズマの照射効果を調査した。培地はD-MEM/Ham's F12混合培地(ナカライテスク株式会社)に，ウシ胎仔血清10%(Hyclone Co.), ペニシリン100 units/ml及びストレプトマイシン0.5%(ナカライテスク株式会社)を添加したものを用い，5%CO_2存在下，湿潤状態37℃で培養を行なった。

6.2.1 分染法を用いたプラズマ照射効果の調査

前節で観察した細胞に対して，これらを定量的に評価する方法として2.10.2でも述べた分染法が挙げられる。そこで分染法として一般的なトリパンブルー溶液を用いた細胞数評価を行った。まず，HeLa細胞を約5×10^5 cell/mLになるようD-MEM(Ham's F12，CBS 10%，ペニシリン-ストレプトマイシン0.5%)で調製し，24 wellプレートに細胞懸濁液を500 μL分注し，図6-1のようにプラズマ源を設置して，クリーンベンチ内でプラズマ照射実験を行った。照射時間を10-60 sとし，一度培養液を取り除き，12 mmの距離でHeLa細胞に対して，ガス流量5 L/minでアルゴン，二酸化炭素のガスのみの照射とプラズマ照射をそれぞれ行なった。照射後，培養液を新しく500 μL入れて2日間インキュベーターで培養した。その後トリプシン溶液で容器の底面に張り付いた細胞を剥離し，0.5%-トリパンブルー染色液(ナカライテスク株式会社)で染色して細胞数をカウントした。図6-2に示されるように，白く丸い細胞が生細胞であり，紫色に染色され，形が不定形な細胞が死細胞である。

アルゴン及び二酸化炭素のガスのみとプラズマの照射による生細胞数の変化について図6-3，図6-4に示す。アルゴンのガス及びプラズマの影響では図6-3のようにガスのみとプラズマ照射で同様の推移を示し，生存率が低下した。このことから生存率の低下はガス流の乾燥による影響であることが考えられる。一方，二酸化炭素のガスのみとプラズマの照射では，図6-4のようにプラズマを30 s照射すると生細胞数が急激に低下することからプラズマによる影響を受けていることが考えられる。特に細胞の温度が42ºC以上になるとタンパク質の変成を起こすため，熱による影響も細胞の生存率低下の可能性として挙げられる。

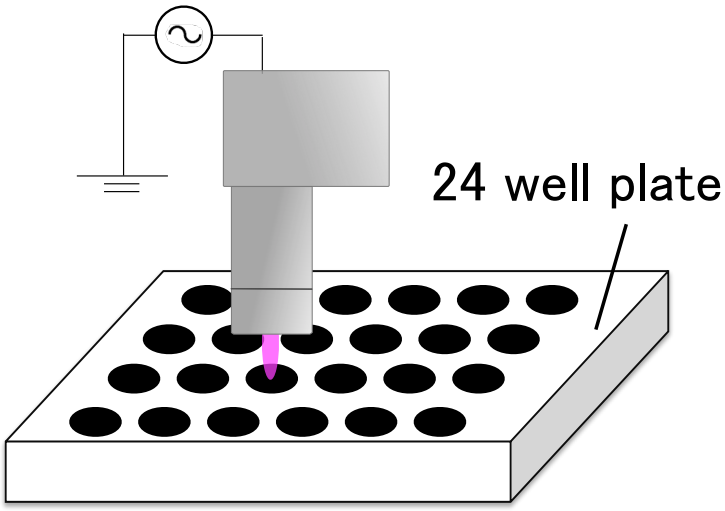


図 6-1 プラズマ源のセットアップ

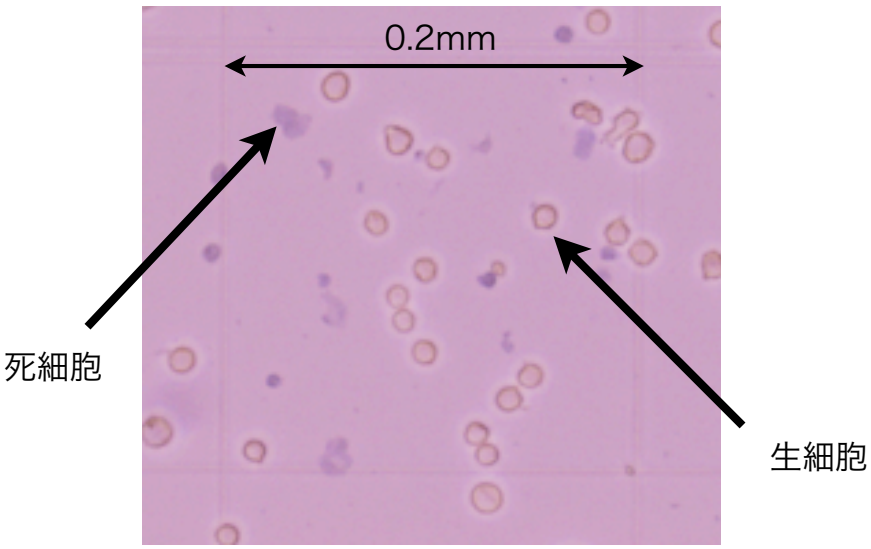


図 6-2 染色した HeLa 細胞の様子

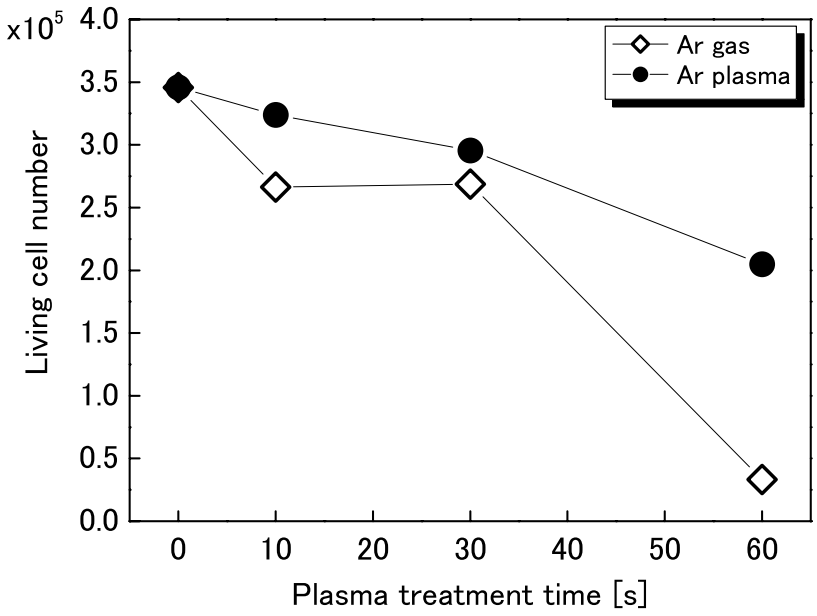


図 6-3 アルゴンガス及びプラズマ照射後の生細胞数

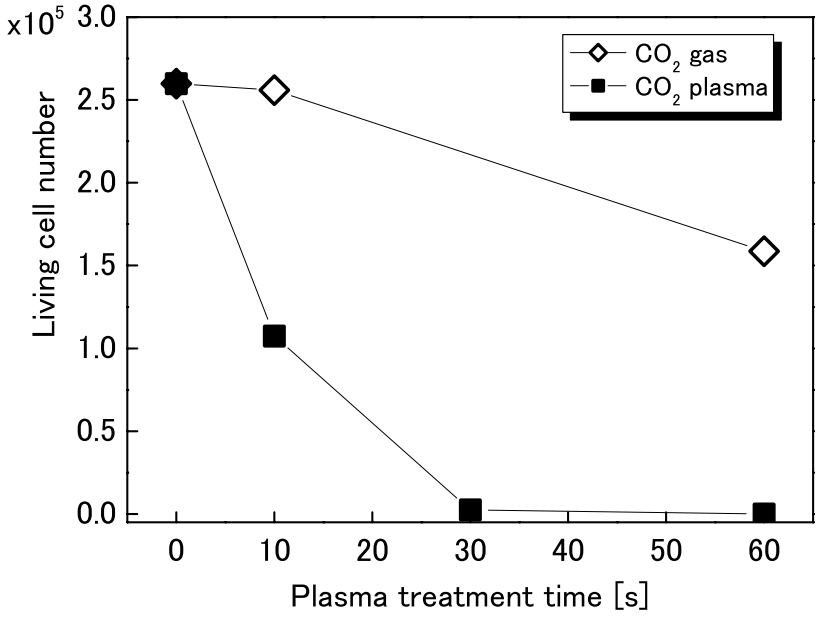


図 6-4 二酸化炭素ガス及びプラズマ照射後の生細胞数

6.2.2 酵素活性測定法を用いた各ガス種のプラズマ照射効果の調査

前節で用いた分染法は，個人の手技によって結果が左右され，また，手順と測定に時間が多くかかる。そこで別の評価方法として，酵素活性測定法が挙げられる。この方法は 2.10.3 でも述べたように，吸光度測定により機械的に評価ができるため，測定が簡易である。今回はこの測定法としてよく用いられる，MTT 法で細胞評価を行った。

照射から測定までの手順を図 6-5 に示す。まず 24 well の容器に 500 μL の培養液を前節と同様に入れて HeLa 細胞を培養した。照射前に培養液を取り除き，ガス種をアルゴン，空気，窒素，酸素，二酸化炭素として，照射時間を 0-60 s，照射距離 12 mm，ガス流量 5 L/min でガスのみ及びプラズマの照射を行った。そして照射後，培養液を 0.5 ml 入れ直し，2 日間インキュベーター内で培養した。培養後，MTT 試薬(ナカライテスク株式会社)を 50 μl 添加し，インキュベーター内で 4 時間呈色反応を行った。その後さらに可溶化溶液(イソプロピルアルコール)を加え，呈色反応したホルマザンを溶かして，その溶液を波長 570 nm で吸光度測定した。そして，細胞の活力と生存数は比例関係にあるので，ここで得られた値を生存率とした。

各ガス種のガスのみ及びプラズマによる HeLa 細胞の生存率の変化を図 6-6 から図 6-10 に示す。図 6-6 のように，アルゴンガスのみの処理でも生存率が約 80%となり，乾燥の影響を受けていると考えられる。また，アルゴンプラズマを照射したとき，細胞の生存率は約 60%となり，前節と同様の傾向を示した。空気，窒素のガスでは，図 6-7，図 6-8 に示されるように，ガスのみの処理ではアルゴンガスと同様の生存率の低下を示した。一方でプラズマ照射の条件では空気プラズマの場合 10 s で，窒素プラズマの場合 40 s で急激な生存率の低下が見られた。

そして，酸素，二酸化炭素のガス種に関しては図 6-9，図 6-10 に示されるように，酸素ガスの場合ガスのみの照射においても急激な生存率の低下が見られ，プラズマ照射との比較ができなかった。二酸化炭素の場合，ガスのみの照射でもアルゴンや窒素，空気よりも生存率の低下がみられ，プラズマを照射すると 10 s で急激な生存率の低下が見られた。これらのガスのみで大きな生存率の低下が見られたのはガスの特性もしくは著しい pH の変化による影響の可能性が考えられる。また，アルゴン以外どのガス種のプラズマ照射でも急激な生存率の低下が見られた。これはプラズマによる活性種や熱による影響が考えられる。

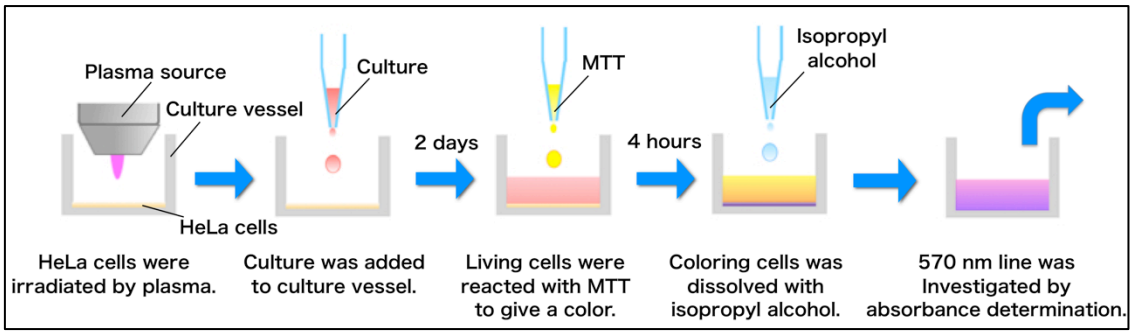


図 6-5 実験手順のフローチャート

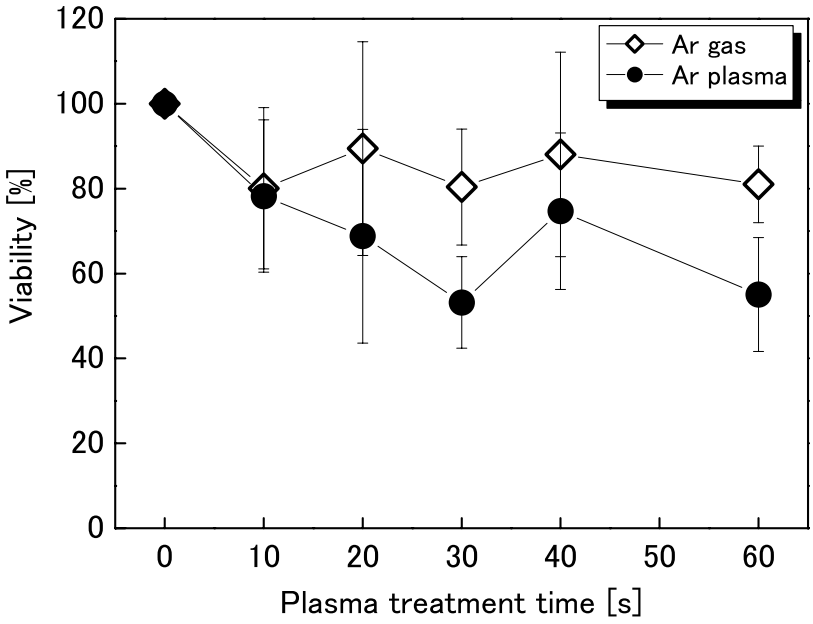


図 6-6 アルゴンガス及びプラズマによる HeLa 細胞の生存率の変化

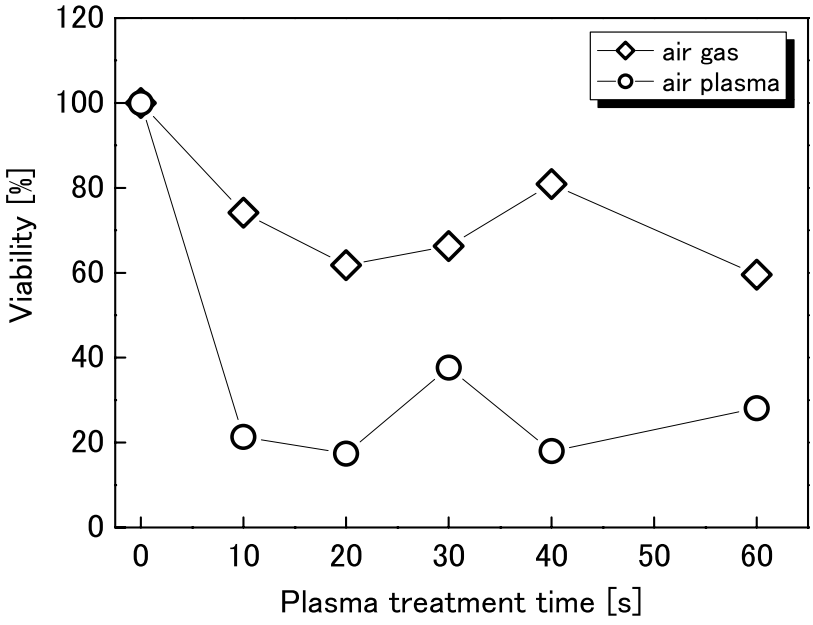


図 6-7 空気ガス及びプラズマによる HeLa 細胞の活性力の変化

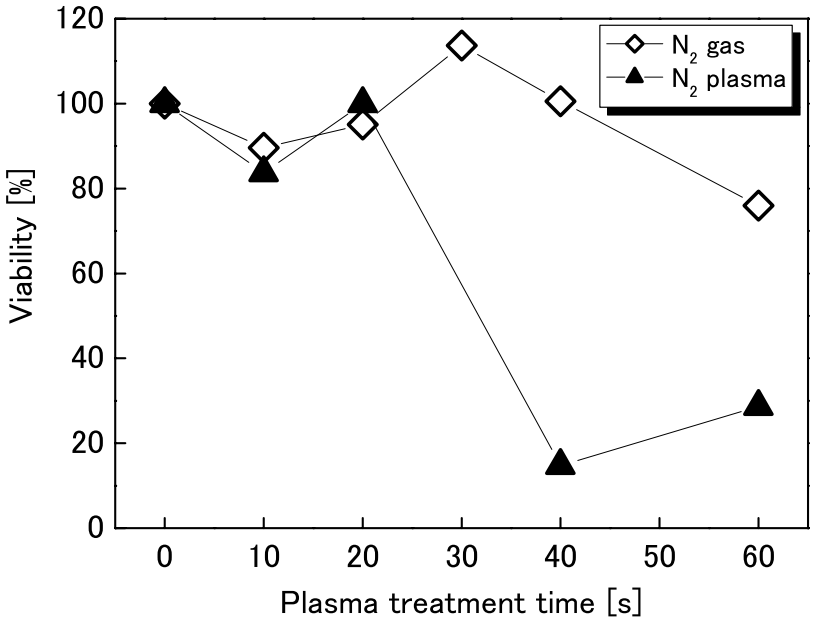


図 6-8 窒素ガス及びプラズマによる HeLa 細胞の生存率の変化

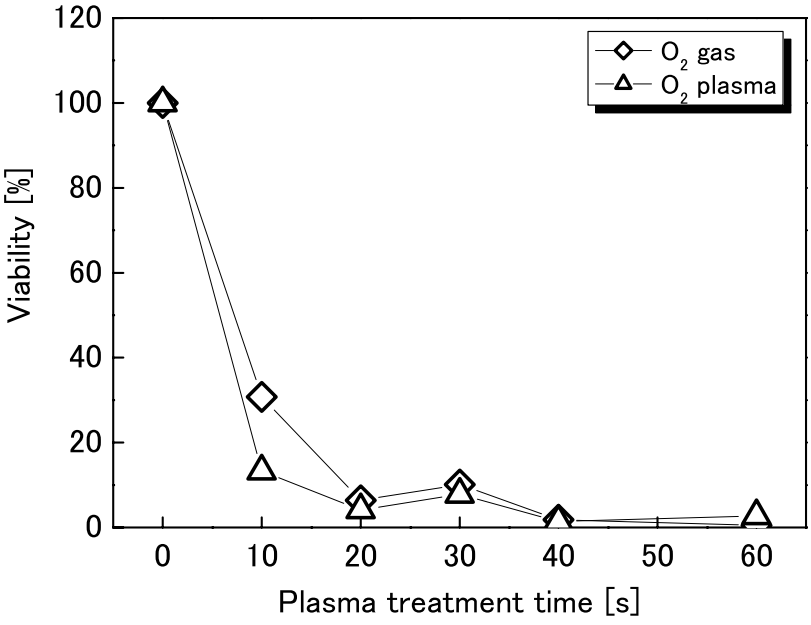


図 6-9 酸素ガス及びプラズマによる HeLa 細胞の生存率の変化

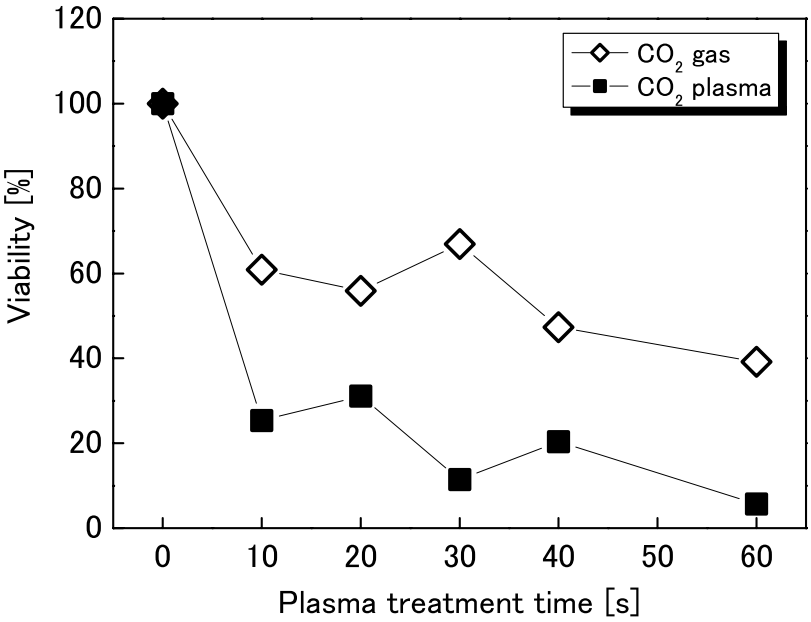


図 6-10 二酸化炭素ガス及びプラズマによる HeLa 細胞の生存率の変化

6.2.3 照射距離による生体への影響の変化

前項までの結果から，熱による影響や乾燥による影響などが示唆された。そこでそれらの影響を緩和するため，照射距離を 12，30，50 mm と変化させ，細胞に対する効果を調査した。照射距離 30，50 mm のとき図 6-11 に示すように外気を遮断した。このときガス種は二酸化炭素，窒素，アルゴン酸素混合ガス，アルゴン二酸化炭素混合ガスを選び，照射時間を 0-60 s，ガス流量 5 L/min で前節同様に照射実験を行い，生存率を調査した。

それらの結果を図 6-12 から図 6-15 にそれぞれ示す。各ガス種の条件で 30，50 mm と距離を離した際のプラズマ照射では生存率の減少が緩和された。これは，3.3 でも明らかになったように，照射距離が近い位置ではプラズマのガス温度が 42ºC を超えたためプラズマ照射による細胞の生存率低下が見られたが，今回 30 mm 以上離したことによって温度による影響を失くすことができたと考えられる。また，5.1 節では 90 mm のシャーレ全面に殺菌効果を及ぼしたことから，対象物との距離を 50 mm としてもプラズマから生成される活性種の効果は寄与すると考えられる。そのため，この細菌と細胞の影響の感受性に違いが見られるのは細胞のスケールが 10 倍程度異なるため，細胞膜の厚さや抗酸化物質の総量などが比例して大きいことが考えられる。

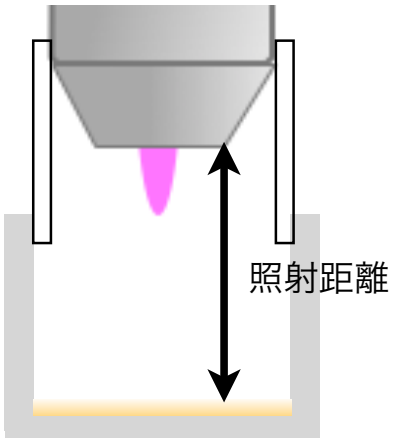


図 6-11 照射距離変化時の照射方法

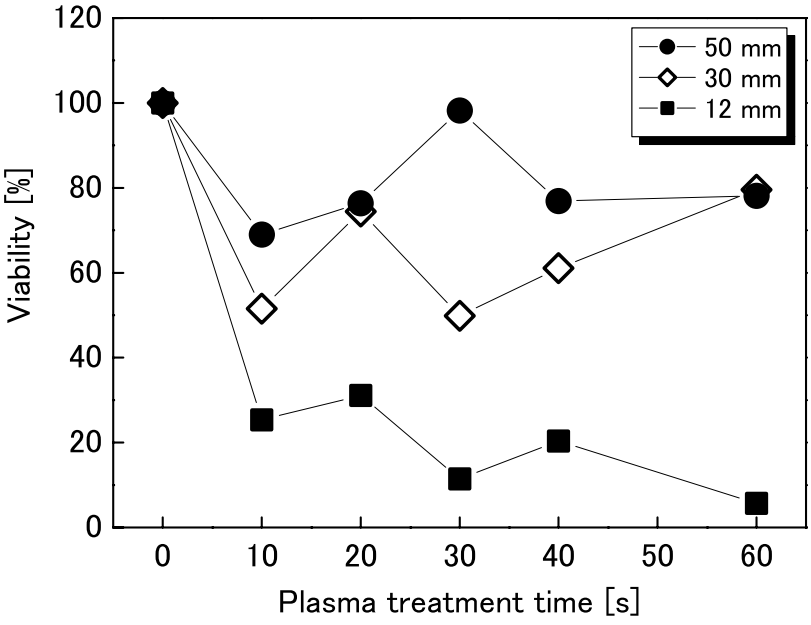


図 6-12 照射距離と CO_2 プラズマによる生存率の関係

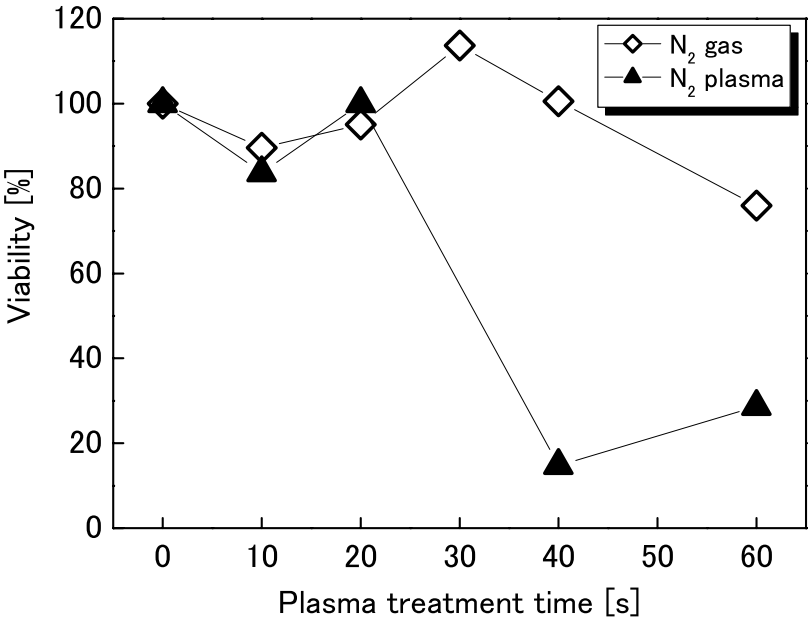


図 6-13 照射距離と N_2 プラズマによる生存率の関係

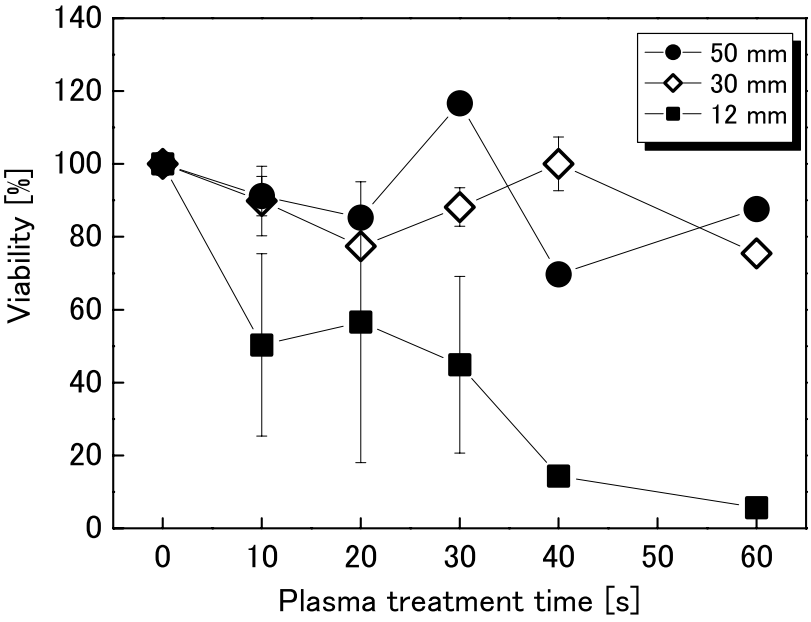


図 6-14 照射距離と $Ar+O_2$ プラズマによる生存率の関係

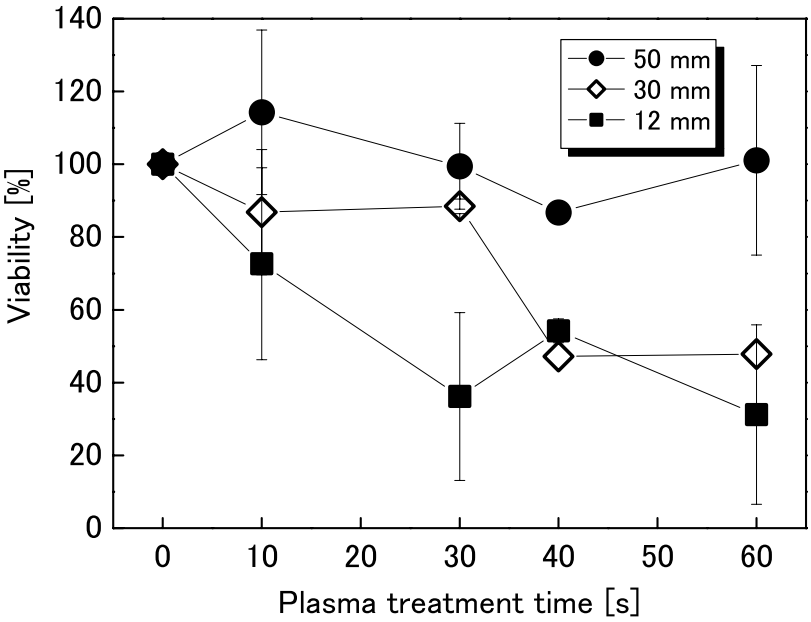


図 6-15 照射距離と $Ar+CO_2$ プラズマによる生存率の関係

6.2.4 温度制御プラズマによる細胞への影響

前項の照射方法で，対象物までの距離を長くすることで生存率の低下が緩和されることが明らかになった。しかし，対象物までの距離が長くなれば寿命の短い活性種は指数関数的に減少してしまうので，効果的な処理が要求される場合はこの操作は好ましくない。そこで，3.3 節で述べた温度制御プラズマの機構を用いることにより，ガス温度を 20ºC に制御したプラズマと 60ºC に制御したプラズマを生成することができる。今回，細胞に対するプラズマのガス温度依存性を調査した。まず，乾燥による影響を緩和するためにガス流量を 1 L/min とし，96 well のプレートに細胞を 3×10^5 cell/mL 含んだ懸濁液を 100 μL ずつ分注し，細胞がプレートに張り付いてから，一度培養液を取り除いた。その後，そのまま何も分注しない条件と，新しい培地を入れ直した条件を用意した。それらの試料に対して，ガス種はアルゴン酸素 (9:1)，アルゴン二酸化炭素(9:1)の混合ガスを用いてプラズマガス温度を 20ºC 及び 60ºC で制御して，照射時間 0-60 s，照射距離 12 mm でプラズマ照射した。照射後，新しい培地を入れ直した条件はそのまま培養し，何も分注しなかった条件は再度培養液を加え，各条件とも図 6-5 と同様の手順で MTT 法を用いた。

図 6-16 に図 6-17 に培地除去後何も分注せずに各温度のアルゴン酸素 (9:1)及びアルゴン二酸化炭素(9:1)の混合ガスプラズマ照射した HeLa 細胞の生存率を示す。どちらのガス種のプラズマの条件でもガス温度を 60ºC に制御したとき，細胞の生存率が減少した。一方，プラズマのガス温度を 20ºC に制御したとき，照射時間が 60 s まで細胞の生存率は下がらなかった。このことから，前節までの細胞の生存率低下は温度及び乾燥による影響であることが明らかになった。

しかし，プラズマの活性種が細胞に対して影響がないとは限らず，図 6-18，図 6-19 に示されるように，培養液を介したプラズマ照射では双方のガス種ともガスの温度によらず，細胞の生存率が低下した。これはプラズマと液界面で活性種が生成され，細胞に対して影響を及ぼしたと考えられる。

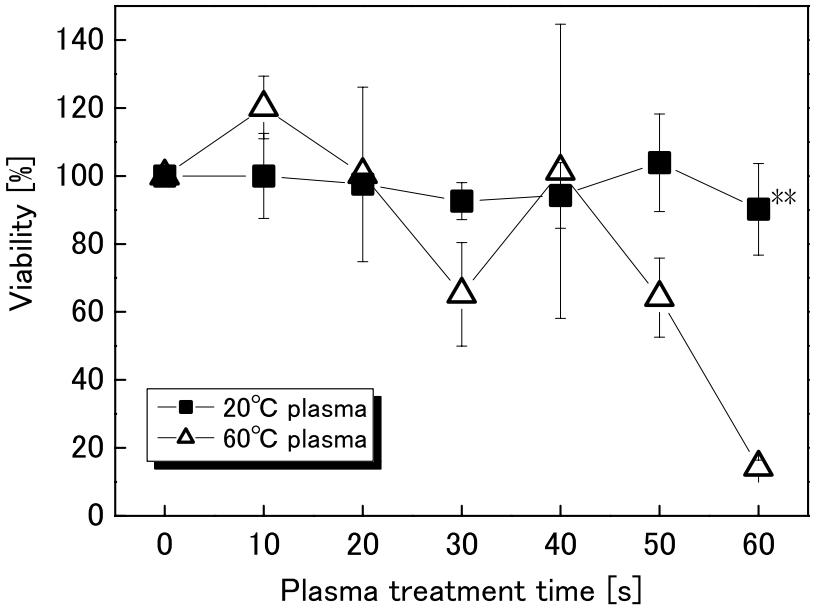


図 6-16 アルゴン酸素混合(9:1)プラズマ照射による生存率の温度依存性

(**は温度による有意性 $P < 0.01$)

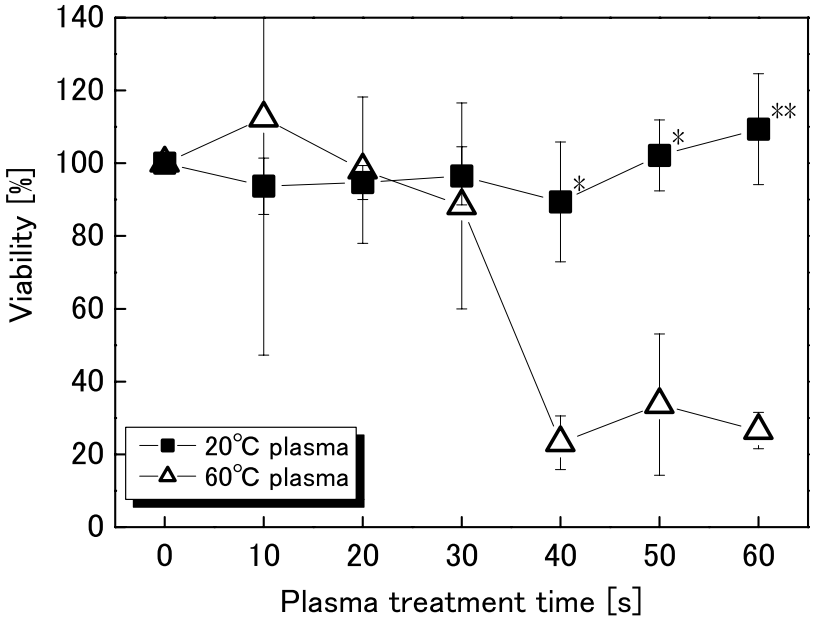


図 6-17 アルゴン二酸化炭素混合(9:1)プラズマ照射による生存率の温度依存性

(**は温度による有意性 $P < 0.01$, *が $P < 0.05$)

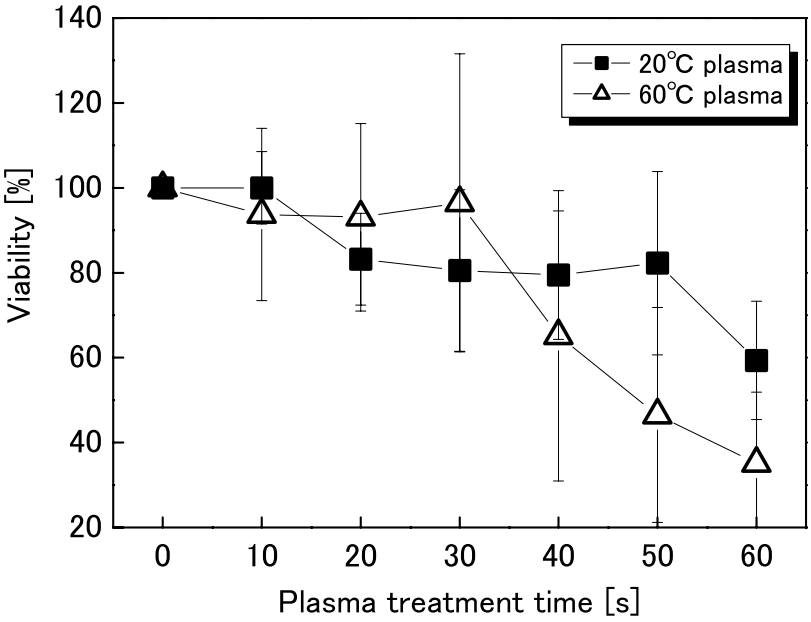


図 6-18 培養液中の HeLa 細胞に対するアルゴン酸素混合(9:1)プラズマ照射による生存率の温度依存性

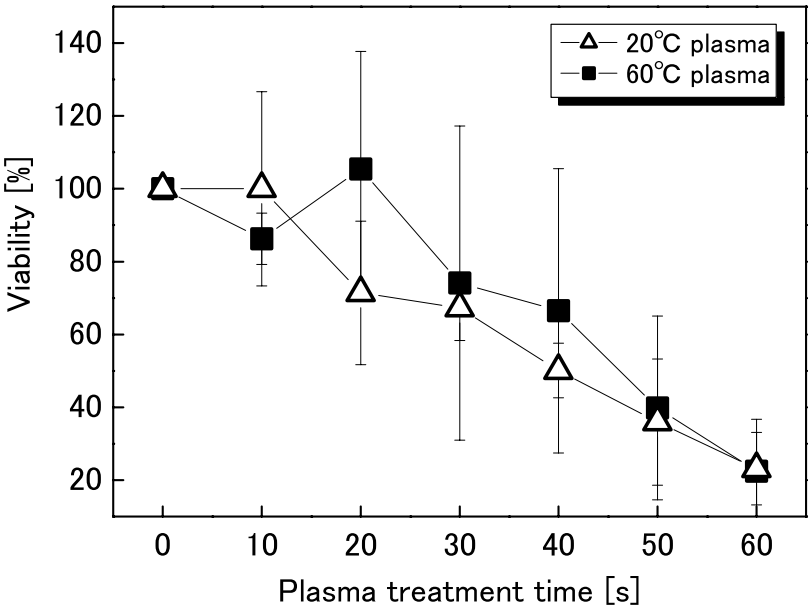


図 6-19 培養液中の HeLa 細胞に対するアルゴン二酸化炭素混合(9:1)プラズマ照射による生存率の温度依存性

6.2.5 ラジカル消去剤によるプラズマ照射効果の変化

前項で培養液を介すとプラズマによって生存率が低下するということが明らかになった。そこで，この原因を調査するために，ヒドロキシラジカルの捕捉剤であるDMSO(ナカライテスク株式会社)を用いて活性種の影響を調査した。

まず，DMSO を 0-120mM となるように培養液に添加して，アルゴン二酸化炭素混合(9:1)のプラズマを培養液中の HeLa 細胞に対してガス流量 1 L/min，照射距離 12 mm，照射時間 60 s で照射し，照射後そのまま培養して図 6-5 と同様の手順で生存率を調査した。プラズマ照射後，MTT 法により生存率を測定した。

図 6-20 にプラズマを照射したときのヒドロキシラジカル消去による生存率の変化を示す。DMSO の濃度が 60 mM 以上になるとプラズマ照射による生存率の低下が軽減され，120 mM のときにプラズマ照射による影響の大部分が消失した。このことから，HeLa 細胞に対するプラズマ照射の影響は，プラズマによって液中内に生成されたヒドロキシラジカルが要因となる可能性が示された。

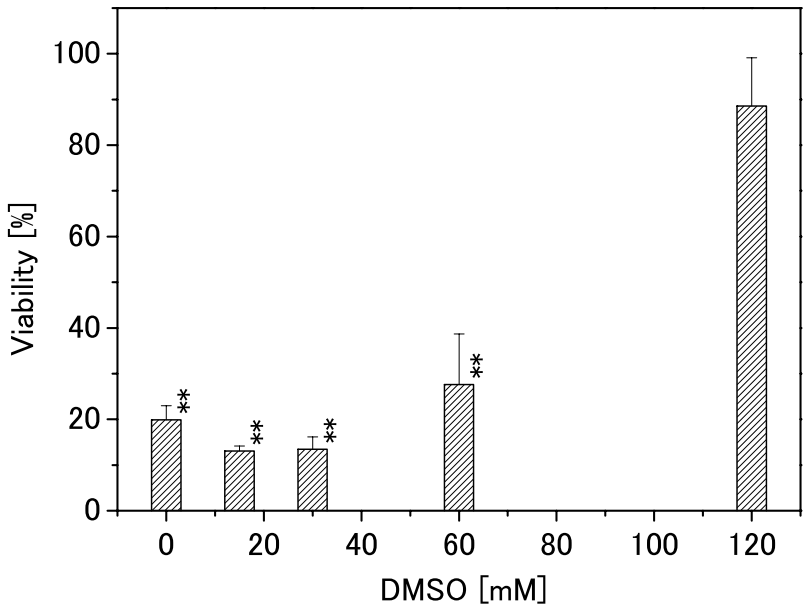


図 6-20 DMSO のヒドロキシラジカル消去による効果

(**はコントロールとの有意性 $P < 0.01$)

6.3 正常細胞に対するプラズマの影響

前節までは HeLa 細胞というがん細胞を用いて細胞に対する影響を調査した。しかし，生体への影響は組織の部位によっても異なり，同じ部位であってもがん細胞と正常細胞では外的な刺激に対して感受性が異なる場合もある。そこで，次に正常細胞であるマウスの繊維芽細胞に対する各ガス種のプラズマの影響を調査した。培養は D-MEM 培地 (Life Technologies)に，ウシ胎仔血清 5%(Life Technologies)，ペニシリン 100 units/ml 及びストレプトマイシン 0.5%(Life Technologies)を添加したものを用い，5%CO_2 存在下，湿潤状態 37℃で培養を行なった。

96 well のプレートに細胞を 3×10^5 cell/mL 含んだ懸濁液を 100 μL ずつ分注し，細胞がプレートに張り付いてから，一度培養液を取り除いた。その後，そのまま何も分注しない条件と，PBS を 100 μL 分注し直した条件について準備した。何も分注しない条件ではプラズマのガス温度を 20ºC 及び 60ºC で制御して，繊維芽細胞に対して二酸化炭素，窒素のプラズマを照射した。一方 PBS を 100 μL 分注し直した条件についてはプラズマガス温度を 20ºC で制御した二酸化炭素，窒素のプラズマを繊維芽細胞に対して照射時間 0-120 s，ガス流量を 1 L/min，照射距離 12 mm で照射した。照射後，PBS を分注し直した条件では PBS を取り除き，何も分注しない条件と共に図 6-5 に示される手順と同様の操作を行い，MTT 法で評価した。

図 6-21，図 6-22 に培地除去後何も分注せずに各温度の二酸化炭素及び窒素プラズマ照射した繊維芽細胞の生存率を示す。前節の HeLa 細胞に対するプラズマ照射効果と同様に温度が高いプラズマ照射では熱による影響を受け，各条件とも 60ºC のプラズマでは 30 s で急激に細胞の生存率が下がった。一方，20ºC のプラズマでは 60 s 照射しても，生存率の減少は見られなかった。しかし二酸化炭素の場合，120 s プラズマ照射すると生存率の減少が見られた。これは照射時間が長いと乾燥やプラズマの活性種による影響を受けるためと考えられる。

次に，図 6-23 に培地除去後 PBS を分注し 20ºC の二酸化炭素及び窒素プラズマ照射した繊維芽細胞の生存率を示す。その結果，二酸化炭素プラズマは 120 s 照射しても細胞に対して影響が見られなかったが，窒素プラズマに関しては何も分注せずにプラズマ照射したときよりも細胞の生存率が低下した。このことから，窒素プラズマは液界面と反応から活性種を生成し，細胞に対して影響を与えたと考えられる。

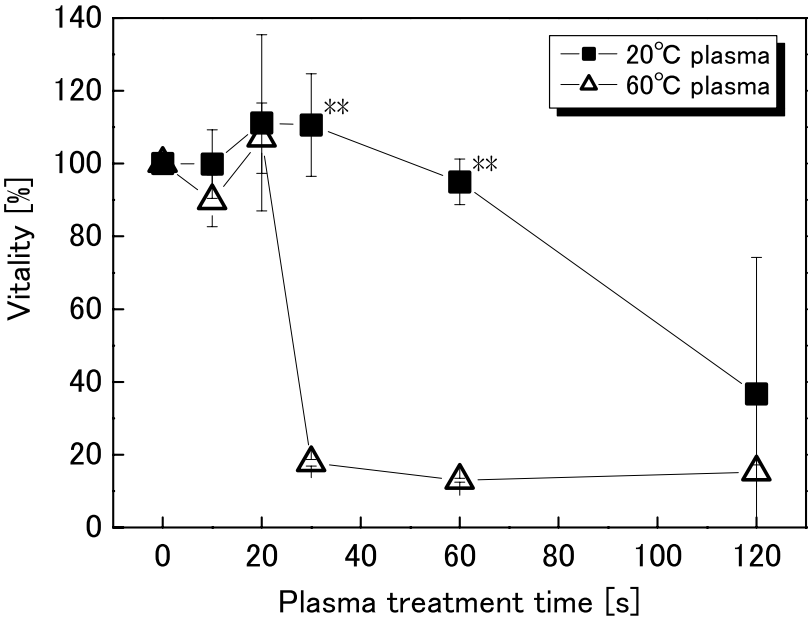


図 6-21 マウス繊維芽細胞に対する二酸化炭素プラズマ照射の影響

(**は温度による優位性 $P < 0.01$，*が $P < 0.05$)

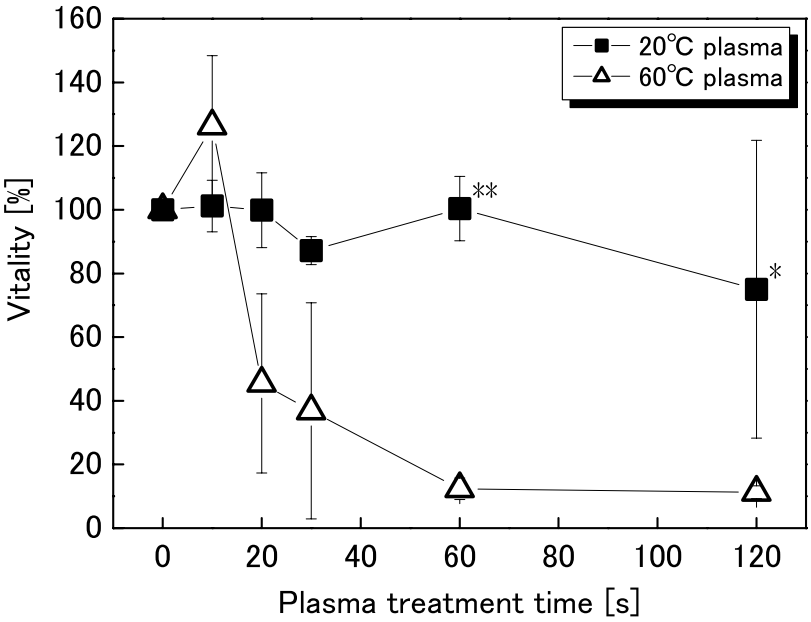


図 6-22 マウス繊維芽細胞に対する窒素プラズマ照射の影響

(**は温度による優位性 $P < 0.01$，*が $P < 0.05$)

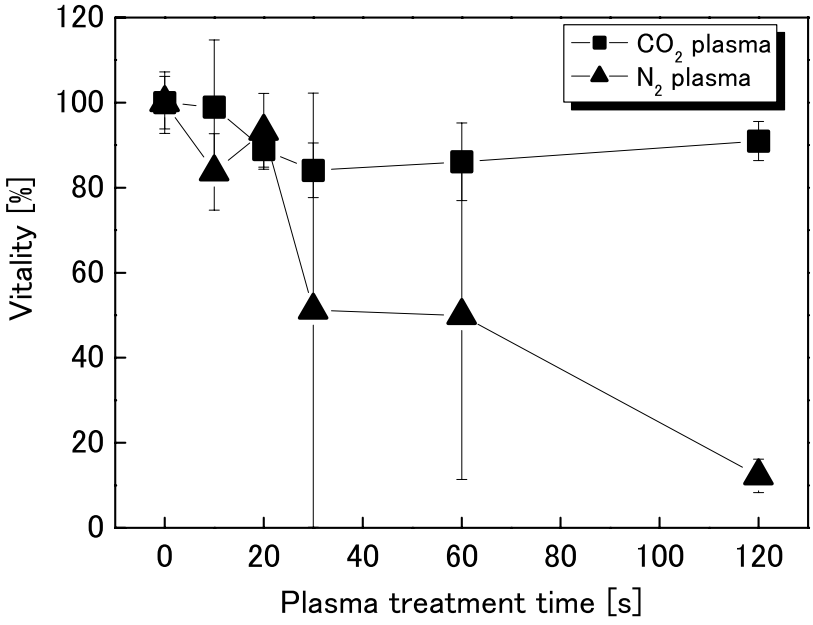


図 6-23 PBS 中のマウス繊維芽細胞に対するプラズマ照射の影響

6.4 DNA に対するプラズマの影響

細胞内で生じる様々な DNA 損傷の中で最も変異を起こすものとして DNA の二本鎖切断(Double-Strand Break)があげられる。そのため，プラズマ照射により，細胞に対して二本鎖切断が起こっているか調査する必要がある。そこで, 免疫染色法を用いて DNA に対するプラズマの影響を調査した。

二本鎖切断は電離放射線のような外的因子あるいは内性的に生じた活性酸素種（ROS）によって起こり，減数分裂と V(D)J 組換えの中間体としても生じる。二本鎖切断が哺乳類の細胞で起こると H2AX の Ser139 が数秒以内にすばやくリン酸化され，その結果，DNA 損傷部位における γ-H2AX(リン酸化された H2AX)が生じる。そこで，この部位を標識とする一次抗体とこの一次抗体を標識とする二次抗体の蛍光色素を用いる免疫染色法で観測することができる。

細胞の懸濁液を作成し，その溶液をカバーガラスの中央に 80 μL ずつ滴下し，細胞を付着させた。付着後 D-MEM を取り除き，D-PBS で一度洗い，再び D-PBS を加えた。この試料に対して図 6-24 に示されるように，プラズマガス温度 20ºC，照射距離 6 mm，ガス流量 1 L/min の窒素プラズマを，照射時間を 60 s, 120 s で照射した。その後，D-PBS

を取り除き，D-MEM を加えて 30 分 CO_2 インキュベーターに入れた。

このプラズマ処理された細胞中の DNA の二本鎖切断の存在を観察するため，γ-H2AX の抗体および Alexa Fluor 488 を用いて免疫染色した。図 6-25 及び図 6-26 に未処理の HeLa 細胞の実像及び蛍光の様子を示す。図 6-25 のように分布した細胞を蛍光顕微鏡で観察すると DNA の二本鎖切断された部分で点状の蛍光が見られる。未処理の細胞では二本鎖切断を示す蛍光は図 6-26 のように 1 つの細胞あたりに 1 個以下であった。一方，窒素プラズマを 120 s 照射した HeLa 細胞では，図 6-27 に示されるように分布したところを蛍光顕微鏡で観察すると，図 6-28 のように DNA の二本鎖切断された部分で蛍光が見られた。そして，DNA の二本鎖切断として優位であると判断される蛍光の点を数えると DNA の二本鎖切断された数が測定できる。DNA の二本鎖切断数は図 6-29 図 6-29 のように放射線の線量と比例関係にあり[69]，DNA の二本鎖切断の測定数から放射線との相関性を見出すことができる。そこで，照射時間 0，30，60 s の窒素プラズマによる DNA の二本鎖切断数を図 6-30 に示す。この結果から，プラズマの照射時間と DNA の二本鎖切断の数には相関性があり，120 s で一つの細胞で 39 個程度 DNA の二本鎖切断が確認された。図 6-29 ではヒト胎児肺細胞である MRC-5 細胞を用いているが，おおよその目安として関連づけることができる。そのため，窒素プラズマの照射による切断数から図 6-29 と比較すると，約 16 mGy/s に相当することが明らかとなった。

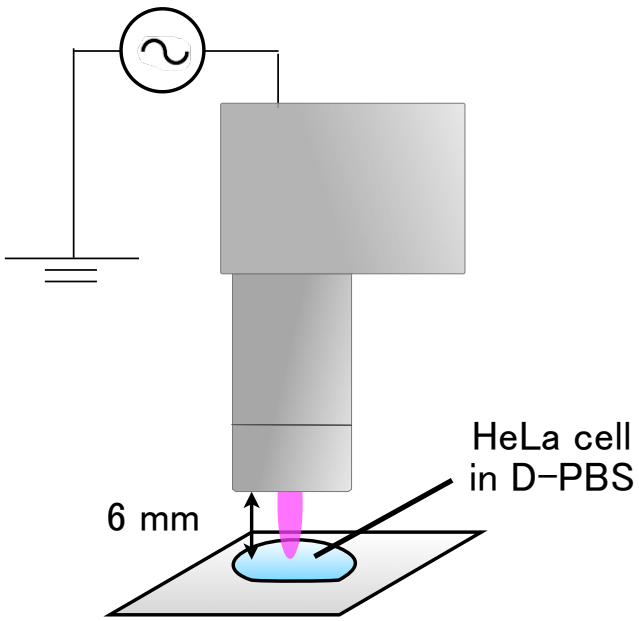


図 6-24 HeLa 細胞への照射

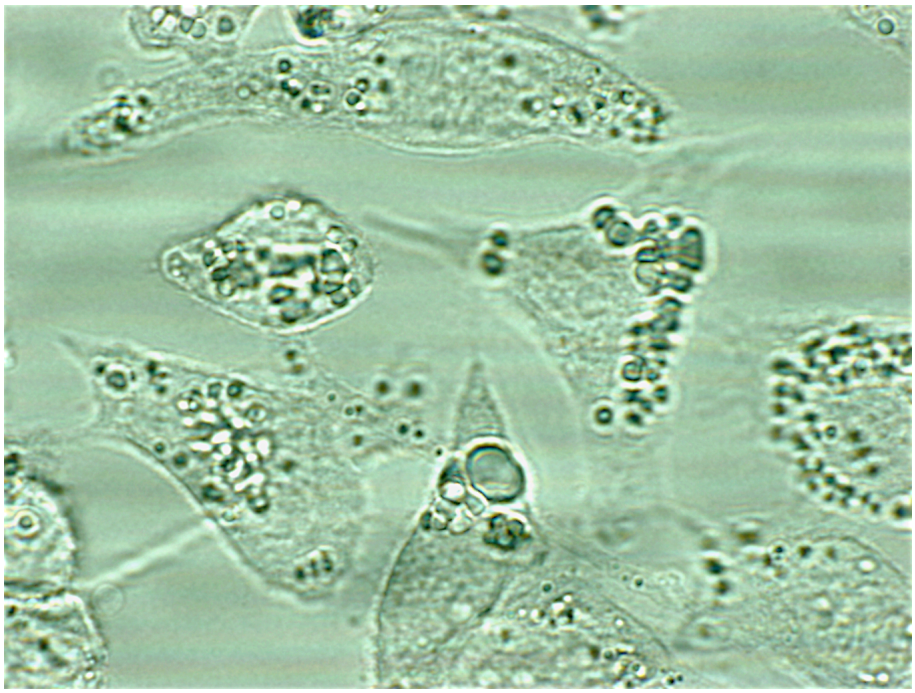


図 6-25 未処理の HeLa 細胞の位相差顕微鏡観察像

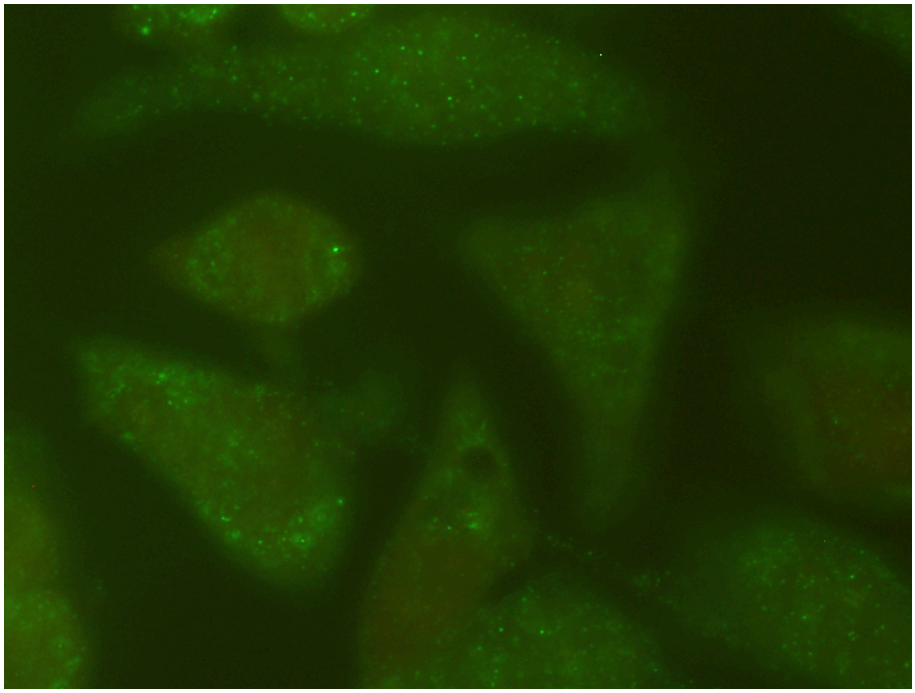


図 6-26 未処理の HeLa 細胞における γ-H2AX 免疫蛍光染色像

(図 6-25 と同じ視野を観察した。)

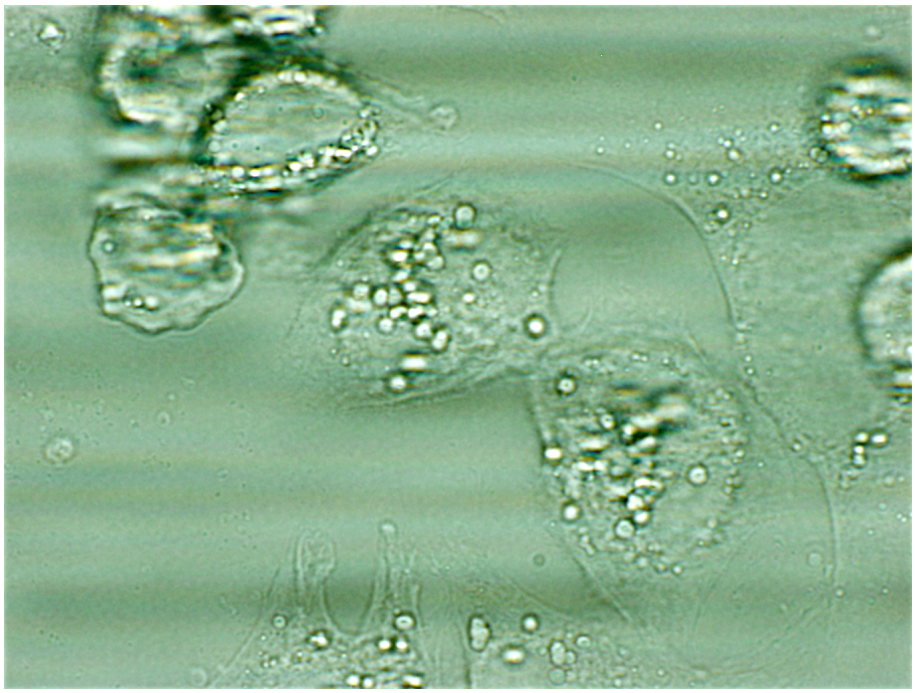


図 6-27 窒素プラズマ処理した HeLa 細胞の位相差顕微鏡観察像

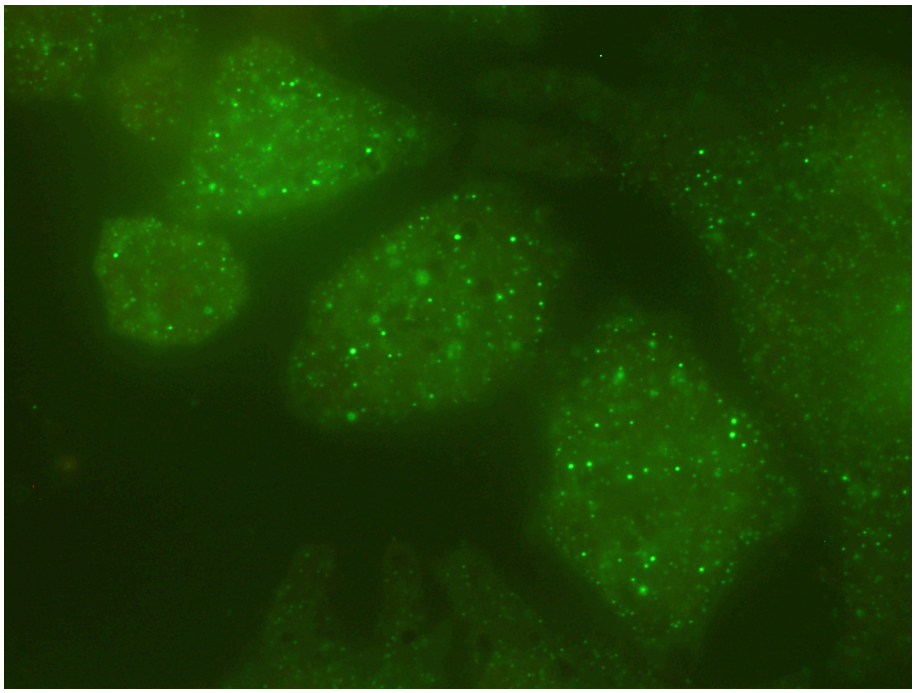


図 6-28 窒素プラズマ処理した HeLa 細胞における γ-H2AX 免疫蛍光染色像

(図 6-27 と同じ視野を観察した。)

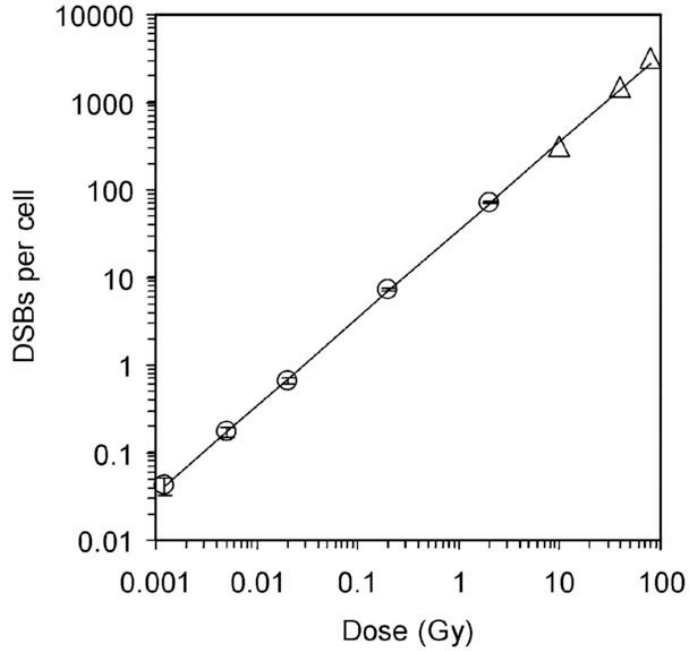


図 6-29 X 線照射による MRC-5 細胞の DNA の二本鎖切断[69]

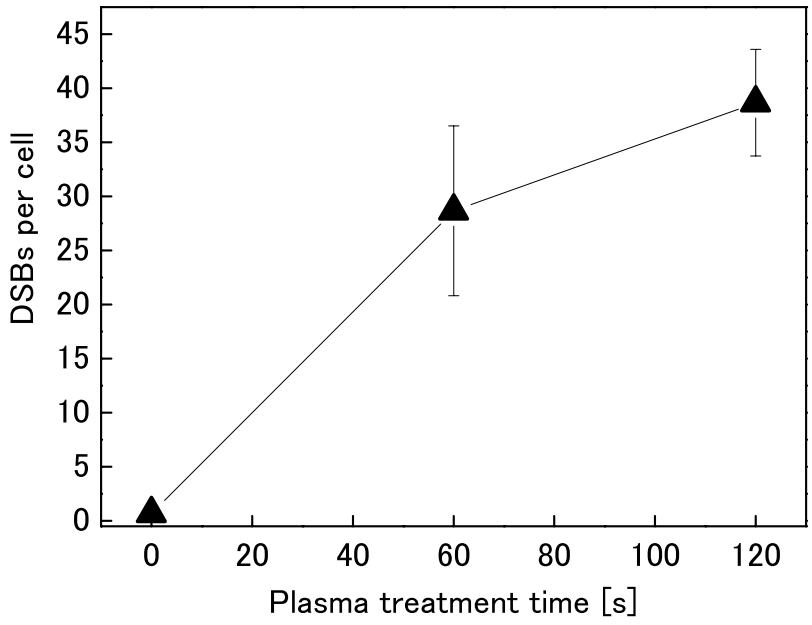


図 6-30 窒素プラズマ処理した HeLa 細胞の DNA の二本鎖切断数

6.5 角膜上皮に対するプラズマ照射の影響

現在，化粧品や薬品などの生体に対する影響を評価する手法として，角膜上皮に対する刺激性を調査する，眼粘膜刺激性試験法(ドレイズ試験) [70]が用いられている。また，角膜は刺激に対して比較的弱い組織でありながら，摘出された後しばらくは細胞の壊死が起こらないため，採取した角膜でも生体組織に対する影響調査することができる[71]。そこで，今回プラズマの生体組織に対する影響の調査として，角膜上皮に対してプラズマを照射して影響を調査した。角膜は食用として市販されている豚の眼球から採取した。角膜は豚の眼球から直径 5 mm で 4 片切り出すことができ，図 6-31 のようにシリコンシートに埋め込んで表層のみを処理できるように用意した。二酸化炭素，窒素をガス種に選択し，ガス流量を 1 L/min，照射距離を 6 mm で，ガスのみ，温度制御無しのプラズマ，温度制御したプラズマの条件で角膜試料に対して 1，5 min の照射を行った。また，温度制御する場合，プラズマのガス温度は 20ºC に制御した。そしてプラズマ照射後，マイルドホルム 20N(和光純薬株式会社)で固定して，HE 染色を施し，試料断面の病理像の角膜上皮細胞，特に基底部（角膜固有層と接する部分）の状態及び細胞の配列に着眼して観察した。

図 6-32，図 6-33 に角膜に対する各ガス種のプラズマ照射の影響を示す。照射時間 1, 5 min 共に温度制御なしの窒素及び二酸化炭素のプラズマを照射すると角膜上皮が剥離する様子や，縮んで滑らかな表面の形状が維持できなくなった様子が観察され，明らかに損傷を受けている病理像が見られた。一方で，温度制御した窒素及び二酸化炭素のプラズマ照射では，基底側の細胞の大きさと整然とした配列がみられ，照射時間 1 min では熱の影響は受けないことが明らかになった。しかし，5 min の照射ではどの条件も基底側の細胞も含め全体的に細胞が小さく収縮し，細胞の核も凝縮あるいは変形が見られ，ガスのみの条件からも観察されることから乾燥による影響と考えられる。したがって，温度制御したプラズマから生成される活性種による，角膜上皮に対する影響は病理学的な図からは観察されなかったと結論づけられる。このことから，生体に対する影響がある場合は細胞内である可能性が考えられる。しかし活性種の寿命は非常に短く，影響を及ぼした場合も極表層であると考えられる。

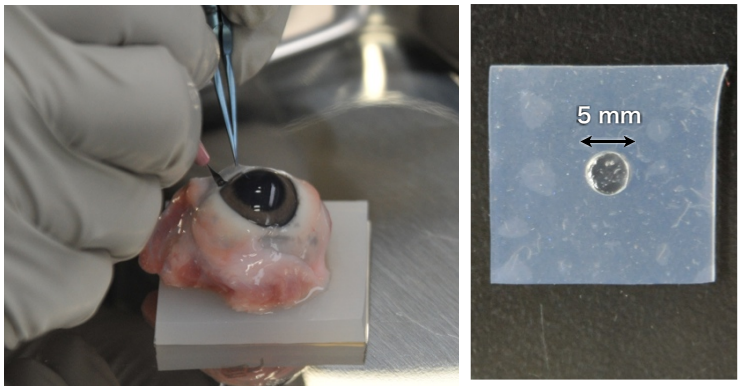


図 6-31 豚の角膜

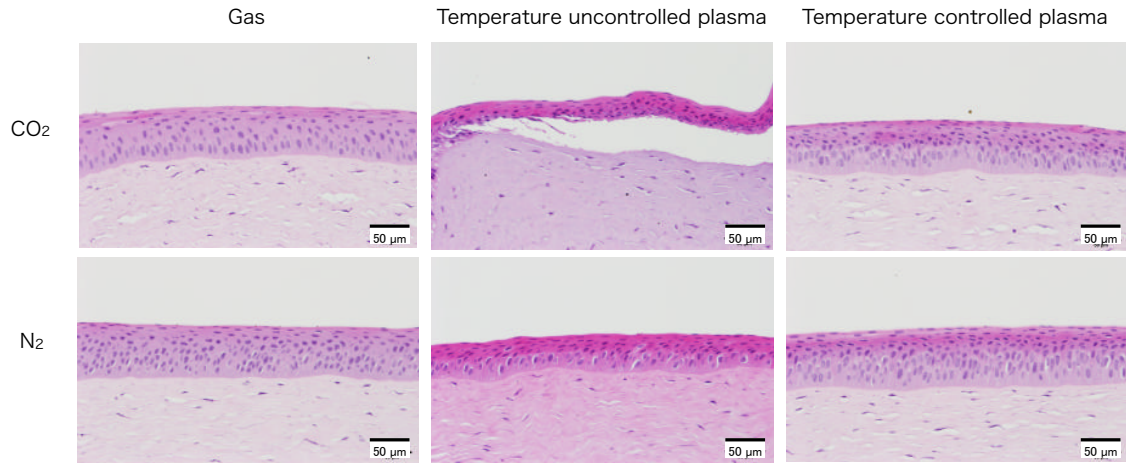


図 6-32 角膜に対する二酸化炭素及び窒素の各条件 1 min 照射の病理像(左：ガス照射，中：温度制御無しのプラズマ照射，右：温度制御プラズマ照射)

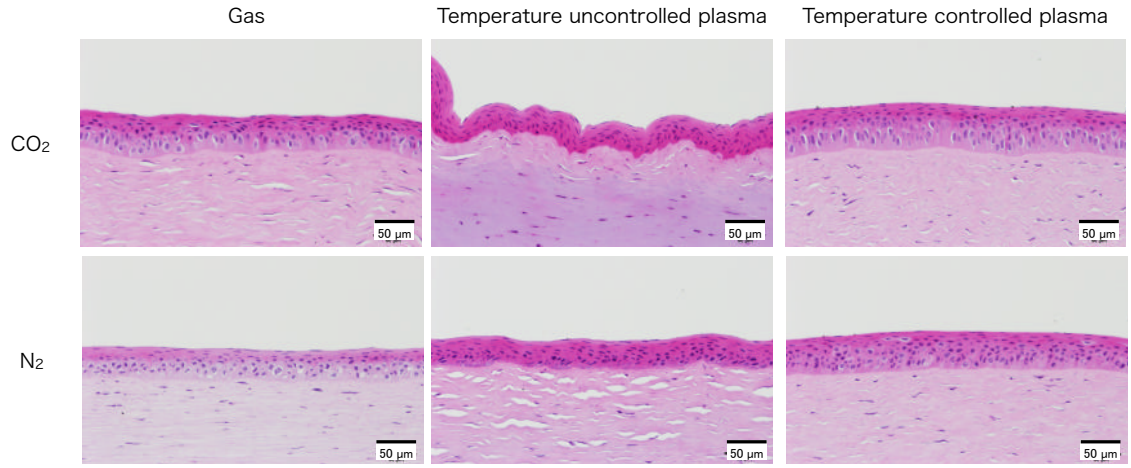


図 6-33 角膜に対する二酸化炭素及び窒素の各条件 5 min 照射の病理像(左：ガス照射，中：温度制御無しのプラズマ照射，右：温度制御プラズマ照射)

6.6 まとめ

本章では, マルチガスプラズマジェットを用いて医療応用に向けた生体への影響を調査するために，各細胞や角膜に対して各ガス種のプラズマ照射を行なった。

HeLa 細胞に対するプラズマ照射では，どのガス種もプラズマ照射によって生存率の低下が見られた。しかし, 照射距離を変化させると，どのガス種のプラズマも，12，30，50 mm と対象物との照射距離が長くなるほどプラズマ照射による生存率の低下が軽減された。これはプラズマガス温度が低下したためと考えられる。5 章では距離を遠ざけても殺菌効果が確認されているため, 照射距離を制御することで生体への影響を無くし, 殺菌だけの効果を及ぼすことができる可能性があることが明らかとなった。また，温度制御したプラズマの照射効果に関して，培地の無いドライな条件では，温度を 20ºC に制御した各ガス種のプラズマで HeLa 細胞の生存率の低下が見られなかった。一方で培養液を介したプラズマの照射方法では温度によらず細胞の生存率の低下が認められた。これはプラズマによって液界面と反応し，液中に活性種を生成したためと考えられる。そこで，ヒドロキシラジカルを消去する捕捉剤である DMSO を用いて液中のヒドロキシラジカルを捕捉し，プラズマ照射効果の影響を調査したところ，DMSO を添加することで細胞の生存率の低下が軽減された。このことから，プラズマによって液界面でヒドロキシラジカルが生成され，この効果の要因となっている可能性が考えられる。

マウスの繊維芽細胞に対するプラズマ照射効果は Hela 細胞のプラズマ照射のときと同様に培地の無い条件では温度を 20ºC に制御した各ガス種のプラズマで生存率の低下は見られなかった。しかし，窒素プラズマの照射は PBS を介して細胞の生存率を低下させた。この照射効果もプラズマ照射により，PBS の液中でも活性種が生成されたと考えられる。

窒素プラズマの HeLa 細胞に対する DNA の二本鎖切断について，免疫染色法を用いて調査したところ，DNA の二本鎖切断が観測され，その二本鎖切断の数から 16 mGy/s に相当することが明らかとなった。

また, 角膜に対する各ガス種のプラズマ照射の影響に関して病理像を観察したところ, 温度制御した場合, 各ガス種ともプラズマによる角膜の熱損傷及び活性種による変性は見られなかった。このことから，プラズマの影響は細胞内か極表層の反応である可能性が考えられる。

[65] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Schultz, A. Fridman, and K. Harding, Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care, *Plasma Processes Polymers*, **7**, 194–211, (2010).

[66] E. Stoffels, "Tissue Processing" with Atmospheric Plasmas., *Plasma Phys.*, **47**, 1-2, pp. 40-48, (2007).

[67] H. W. Lee, G. J. Kim, J. M. Kim, J. K. Park, J. K. Lee, and G. C. Kim, Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma, *J. Endod*, **35**, 587 (2009).

[68] Rebecca Skloot, The Immortal Life of Henrietta Lacks, Random House, (2010).

[69] K. Rothkamm and M. Löbrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses, *Proceedings of the National Academy of Sci.*, **100**, 9, pp. 5057–5062 (2002).

[70] C. Holden, Much work but slow going on alternatives to Draize test, *Science*, **242,** 4876, pp. 185-186, (1988).

[71] S. Saika, O. Yamanaka, Y. Okada, T. Miyamoto , A. Kitano , K. C. Flanders, Y. Ohnishi, Y. Nakajima , W. W. Kao and K. Ikeda, Effect of overexpression of pparγ on the healing process of corneal alkali burn in mice, *J. of Physiology - Cell Physiology*, **293**, C75-C86 (2007).

第 7 章

各ガス種のプラズマで生成される活性種

7.1 はじめに

プラズマの化学反応を用いた応用研究は古くから行われているが，このメカニズムは非常に複雑と考えられ，その解明のために今日多くの検討が行われている。現在そのメカニズムに深く関わるとされるものに，原子状酸素(O)やヒドロキシラジカル(HO･)，一重項酸素($^1O_2$)，スーパーオキシド(･O_2^-)，ヒドロペルオキシラジカル(HOO･)，オゾン(O_3)，過酸化水素(H_2O_2)などの活性酸素種や原子状窒素(N)や一酸化窒素(NO)，ペルオキシナイトライト(ONOO-)などの活性窒素種が挙げられ，ヘリウム，アルゴンなどのガス種を用いてプラズマを生成した場合には空気中の窒素や酸素などを巻き込み，起因する活性種を生じるとされている。

本研究で用いるプラズマ源は様々なガス種でプラズマが生成でき，これらの活性種を直接または効率よく生成できるガス種や混合比率を調査することができる。そこで本章では各分光法を用いて気相，液相での各種生成条件下におけるプラズマジェットの活性種の同定および生成量について調査した。

7.2 プラズマ生成に伴い引き起こされる活性種の化学反応

大気圧プラズマはプロセスガスの種類や大気，対象物を介して様々な化学反応を引き起こし，活性種を生成する。その活性種は図 7-1 に示すようにプラズマ生成部，プラズマアフターグロー部，対象物界面の主に３つのパートで化学的な相互作用を引き起こし生成される。プラズマ生成部では，プロセスガスと電子衝突等により分子の原子化やそれらの電離が起こる。プラズマアフターグロー部では生成された原子や励起種同士または大気との相互作用によって，様々な活性酸素種や活性窒素種が生成される。そして，

対象物界面の反応として水を例にとると，生成された活性種と水との反応でヒドロキシラジカルなどの水酸基を含む活性種が生成される。今回，対象物界面を水との相互作用として，様々なガス種のプラズマ生成に伴い引き起こされる各活性種の化学反応を表7-1 に示す。これらの活性種が現在，表面処理や殺菌などの要因になっていると考えられている。

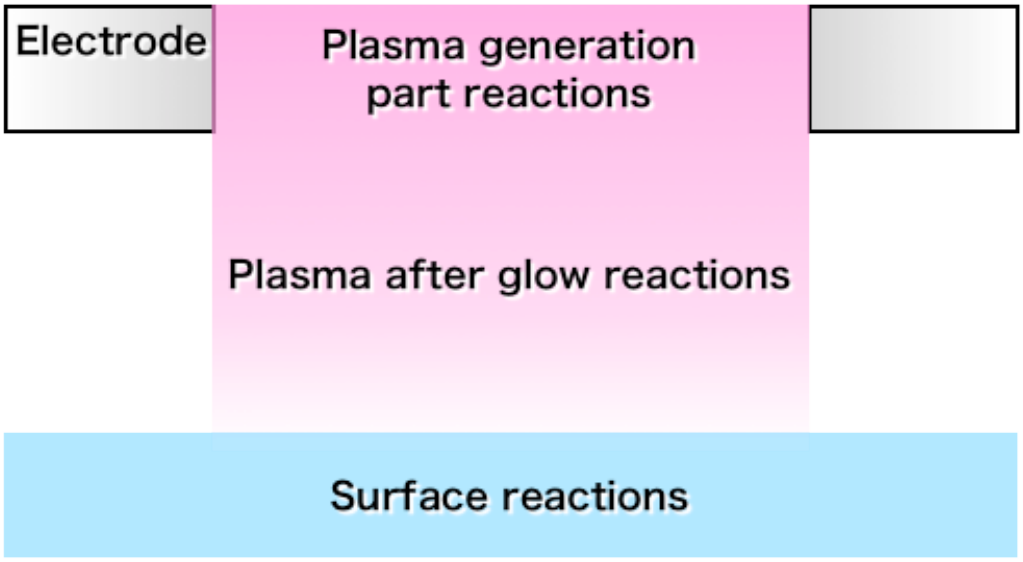


図 7-1 各活性種が生成されるエリア

表 7-1 各条件下での活性種の反応

Electron impact reactions		
$Ar + e \rightarrow Ar^* + e$	(7･1)	[72]
$He + e \rightarrow He^* + e$	(7･2)	[73]
$O_2 + e \rightarrow 2O + e$	(7･3)	[74]
$N_2 + e \rightarrow 2N + e$	(7･4)	[75]
$CO_2 + e \rightarrow CO + O + e$	(7･5)	[76]
$CO + e \rightarrow C + O + e$	(7･6)	[77]
$H_2O + e \rightarrow H\cdot + HO\cdot + e$	(7･7)	[78]
Active species reactions		
$Ar^* + O_2 \rightarrow Ar + 2O$	(7･8)	[79]
$He^* + O_2 \rightarrow He + 2O$	(7･9)	[78]
$Ar^* + N_2 \rightarrow Ar + 2N$	(7･10)	[80]
$He^* + N_2 \rightarrow He + 2N$	(7･11)	[81]
$N + O \rightarrow NO$	(7･12)	[82]
$N + O_3 \rightarrow NO + O_2$	(7･13)	
$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$	(7･14)	
$NO + O \rightarrow NO_2$	(7･15)	[82]
$O + O_2 \rightarrow O_3$	(7･16)	
$2O \rightarrow {}^1O_2$	(7･17)	[83]
$2HO\cdot \rightarrow H_2O_2$	(7･18)	[78]
Liquid phase reactions		
$Ar^* + H_2O \rightarrow Ar + H\cdot + HO\cdot$	(7･19)	[68]
$He^* + H_2O \rightarrow He + H\cdot + HO\cdot$	(7･20)	[84]
$2N + 2H_2O \rightarrow N_2 + 2H\cdot + 2HO\cdot$	(7･21)	[82]
$O + H_2O \rightarrow H_2O_2$	(7･22)	
$O + H_2O \rightarrow 2HO\cdot$	(7･23)	[78]
$O_3 + H_2O \rightarrow H_2O_2 + O_2$	(7･24)	[78]
$4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4NO_2^-$	(7･25)	
$2NO_2 + H_2O \rightarrow 2H^+ + NO_2^- + NO_3^-$	(7･26)	

7.3 各ガス種のプラズマの発光分光測定

プラズマからは様々な機構により非常に広い波長範囲にわたって光が放出される。その中でも可視光からは，原子，分子，低電離イオンなどの情報を得ることができる[85]。そして，このプラズマの分光分析を用いて，プラズマから生成される様々な活性種を同定する研究が数多く行なわれてきた。プラズマの反応によって生成される活性種を式(7･1)から(7･6)に示す。これらに示される各原子に対応したスペクトルがプラズマ生成部を発光分光測定によって観測される。今回プラズマによって生成された原子線や分子線等の発光を分光器[Maya 2000 Pro (200-1100 nm), Ocean Optics, Inc.]を用いて調査した。図 7-2 に分光実験のセットアップを示す。このとき光ファイバをプラズマ源の出口に対向して配置し，ファイバのコアにプラズマが照射されないように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，ガス流量 1 L/min，距離 6 mm の位置で測定した。図 7-3 から図 7-8 にアルゴン，ヘリウム，空気，窒素，酸素，二酸化炭素のガスで生成したプラズマの発光スペクトルをそれぞれ示す。この結果から単原子ガスであるアルゴンやヘリウムのプラズマからは式(7･1)及び(7･2)の反応時に発せられるアルゴンのイオン線が観測され，窒素，酸素の単原子分子のガスのプラズマからは，式(7･3)，(7･4)の反応でプロセスガスに由来する原子の原子線発光スペクトルが見られた。そして，空気のガス組成は主に窒素が約 80%，酸素が約 20%であるため，これらの原子線の発光が見られた。さらに二酸化炭素の分子組成は炭素と酸素であるため，式(7･5)，(7･6)の反応によって炭素および酸素の原子線の発光が見られた。しかし，どのガス種のプラズマも電極材料やプロセスガス以外に由来する発光は見られなかった。アルゴン，ヘリウム，窒素，空気プラズマにおいて OH の発光線が見られるのは式(7･19)から(7･23)に示されるように空気中の水蒸気に由来するものと考えられる。また，ヘリウムプラズマで酸素原子の発光線が見られるのは(7･9)に示されるように空気中の酸素に由来するものと考えられる。しかし，酸素及び二酸化炭素で OH の発光線がみられないことから式(7･23)の反応は式(7･19)及び(7･21)と比べて少ないものと考えられる。

アルゴンに少量の酸素を添加すると酸素ラジカル量が増加するという報告がされている[86]。これは式(7･3)の他に式(7･8)に示されるような寿命が長く，エネルギーも高い準安定状態のアルゴンが寄与しているためと考えられている。しかし，従来のプラズマ源ではアルゴンに対して酸素の混合濃度は数%程度が限界であった。マルチガスプラズマジェットはあらゆる濃度でプラズマを生成することができる。そこで，酸素の原子線のスペクトルである 777.4，844.6，926.2 nm の発光強度に関して，ガス流量 5 L/min で

アルゴンに対する酸素濃度の関係を 0-100%の範囲で測定した。

図 7-9 に各波長の酸素原子線強度に関する酸素混合アルゴンプラズマの混合比依存性を示す。どの発光線もアルゴンに対する酸素濃度が 15%で最大の発光強度となった。このことから，発光強度の最大の濃度で酸素原子の生成量が最大になると考えられる。

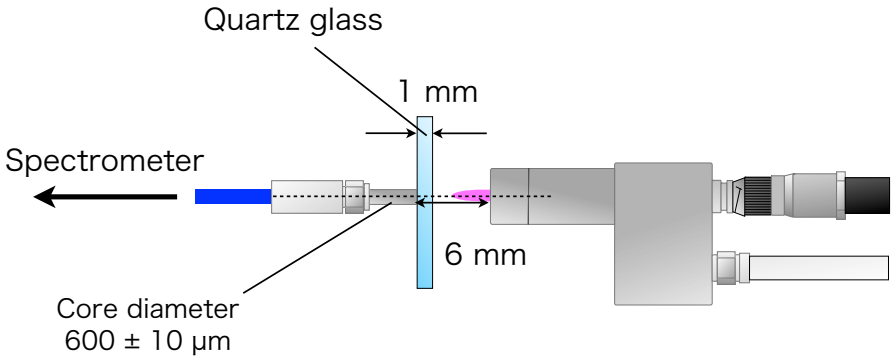


図 7-2 発光分光のセットアップ

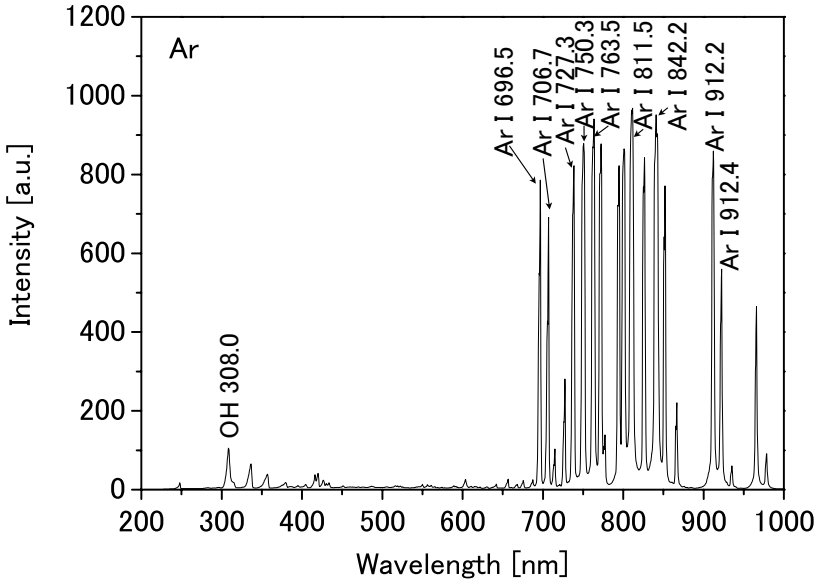


図 7-3 アルゴンプラズマの発光スペクトル

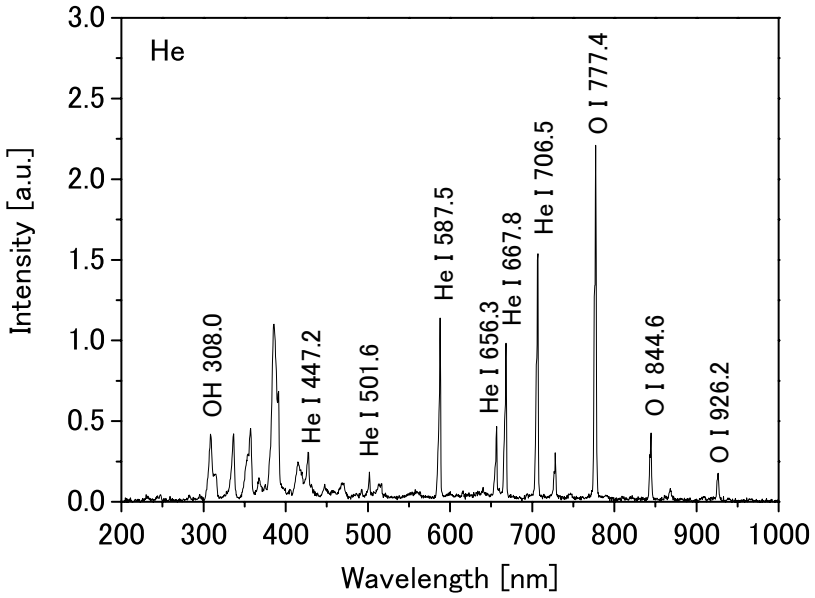


図 7-4 ヘリウムプラズマの発光スペクトル

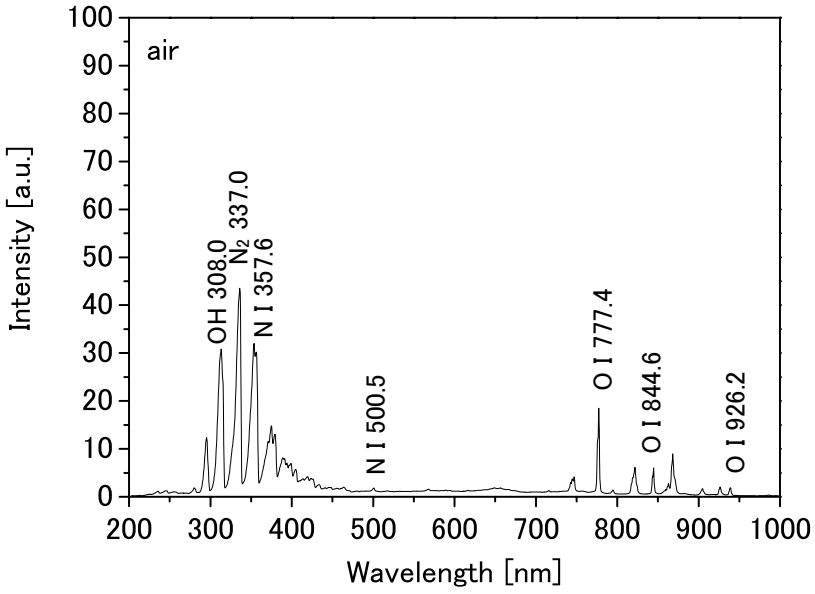


図 7-5 空気プラズマの発光スペクトル

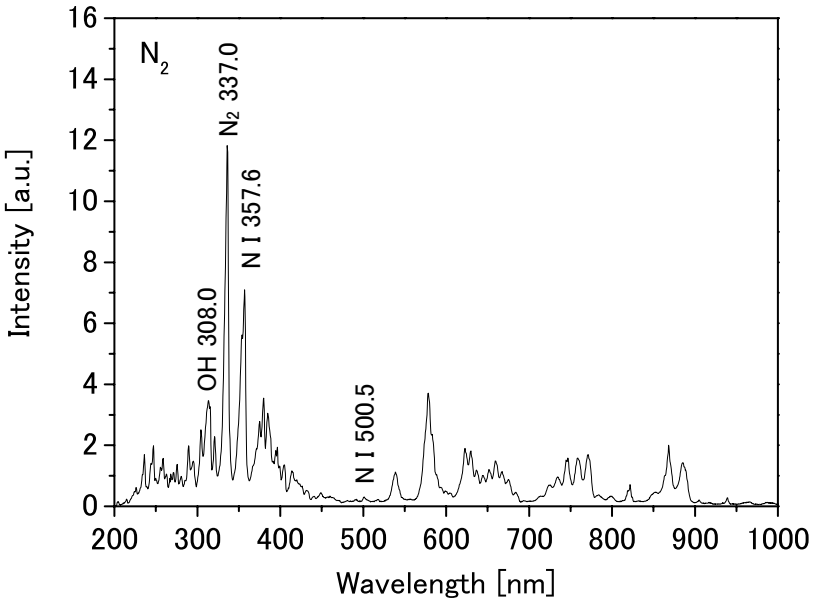


図 7-6 窒素プラズマの発光スペクトル

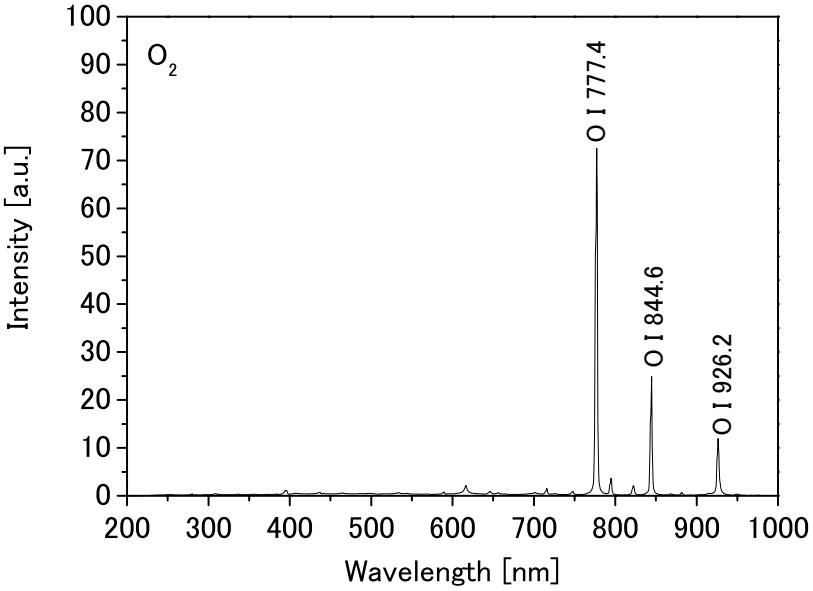


図 7-7 酸素プラズマの発光スペクトル

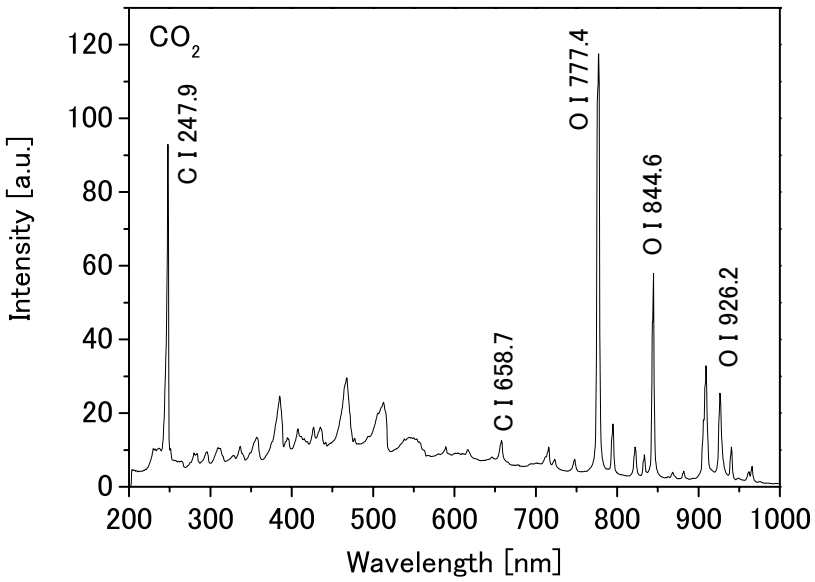


図 7-8 二酸化炭素プラズマの発光スペクトル

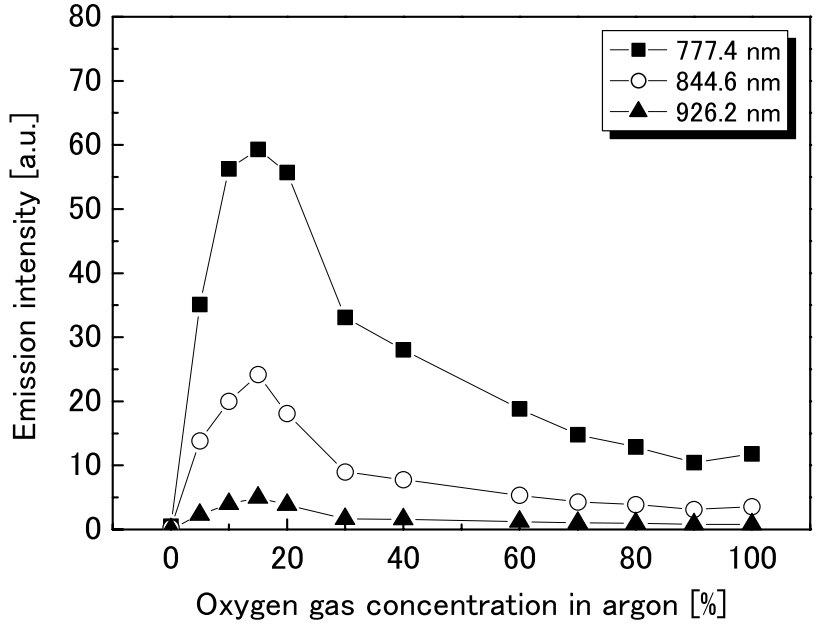


図 7-9 酸素原子線強度に関する酸素混合アルゴンプラズマの混合比依存性

7.4 北川式検知管を用いた各活性種の濃度測定

プラズマ生成に伴い発生する活性種は，しばしば処理対象物や生体に対して影響を及ぼす可能性がある。例えば，空気プラズマによって生成される二酸化窒素は大量吸引することで人体に対して有害な作用をもたらす。一方，二酸化窒素の他に多く生成される一酸化窒素に関しては，皮膚の治癒を促すなどの生物学的効果がある[87]。そのため，プラズマによって発生した活性種の生成量を知ることは重要である。そこで，本節ではプラズマによって発生する特定の活性種と化学反応し，染色される物質を用いてガス濃度を測定した。測定する活性種の測定範囲と測定原理を表 7-2 に示す。これらの測定原理を用い，北川式真空法ガス採取器[KOMYO RIKAGAKU KOGYO K.K.]で 100 mL 採取して測定を行った。実験のセットアップは図 7-10 に示されるように，外気をチューブで遮断し，内部で各ガス種のプラズマを生成し，5 L/min のガス流によって押し出されるガス試料を出口から 5 mm の位置で吸引して採取した。窒素と酸素を組成とするガスで生成するプラズマは式(7･12)から(7･15)に示されるように気相中で一酸化窒素，二酸化窒素が生成される。まず，窒素と酸素の比率を変えてプラズマを生成し，一酸化窒素および二酸化窒素の濃度を測定した。その結果を図 7-11，図 7-12 に示す。これらの結果から，窒素と酸素の比が 50：50 のとき一酸化窒素および二酸化窒素の濃度が最大となり，それぞれ 150，360 ppm であった。また，酸素濃度 10%以下および 80%以上では一酸化窒素は検出できなかった。これは式(7･3)及び(7･4)の反応で窒素原子と酸素原子が生成され，窒素と酸素の比が 50：50 のときに式(7･12)から(7･15)の反応が効率的に起きたことが考えられる。

酸素をプロセスガスとするプラズマには式(7･16)に示される反応のようにオゾンが生成される。そこで，酸素とアルゴンの比率を変えてプラズマを生成し，オゾンの濃度を測定した。その結果を図 7-13 に示す。酸素の比率が 30%～40%の間でオゾンの濃度が最大となり，その生成量は 470 ppm であった。これは式(7･8)の反応がオゾンの生成を促進したと考えられる。

表 7-2 各活性種の測定範囲と測定原理

活性種	測定範囲 [ppm]	測定原理
NO_2	20-1000	白色のオルトトリジンと二酸化窒素を反応させ黄橙色のニトロソオルトトリジンを生成する。
NO	10-300	酸化剤で二酸化窒素にし，この二酸化窒素を白い顆粒の3,3’-ジメチルナフチジンと反応させて黄橙色のニトロソ化合物を生成する。
O_3	50-500	紺色のインディゴがオゾンに酸化されて黄色のイサチンを生成する。

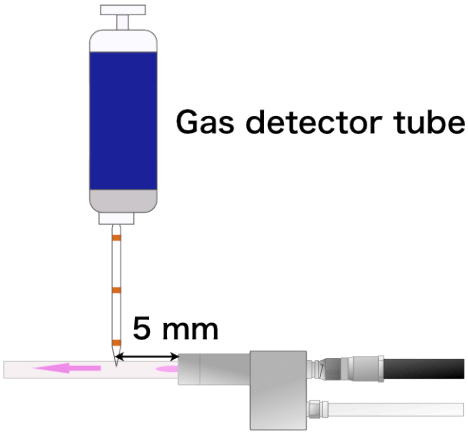


図 7-10 ガス濃度測定のセットアップ

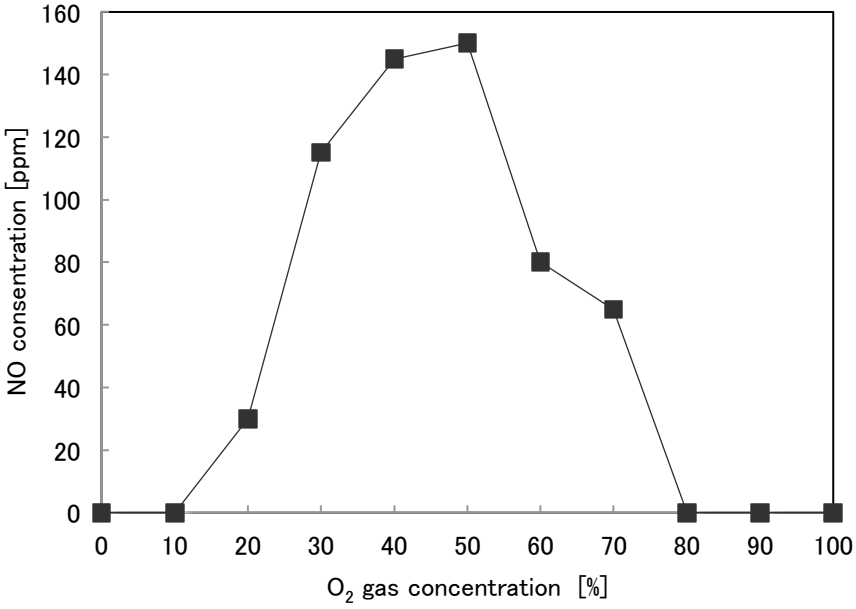


図 7-11 プラズマ生成時における N_2 と O_2 の比と NO の濃度の関係

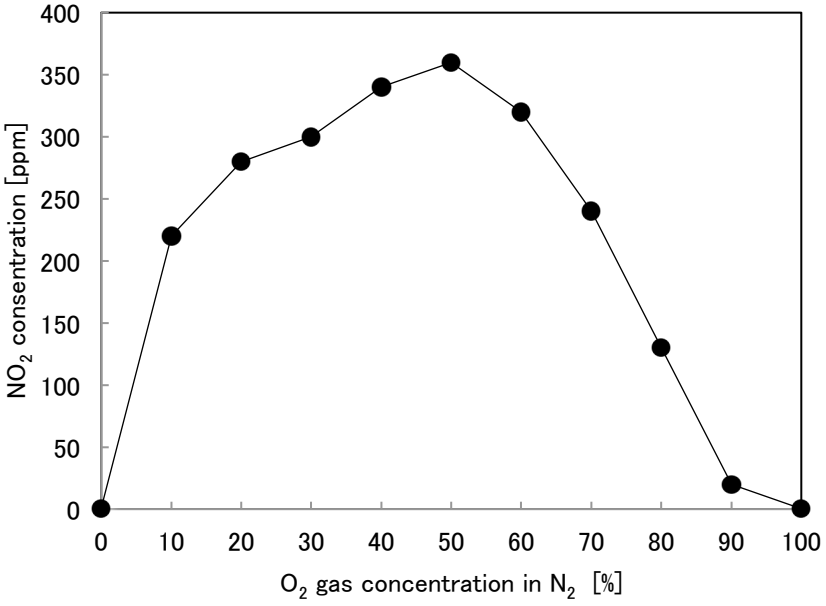


図 7-12 プラズマ生成時における N_2 と O_2 の比と NO_2 の濃度の関係

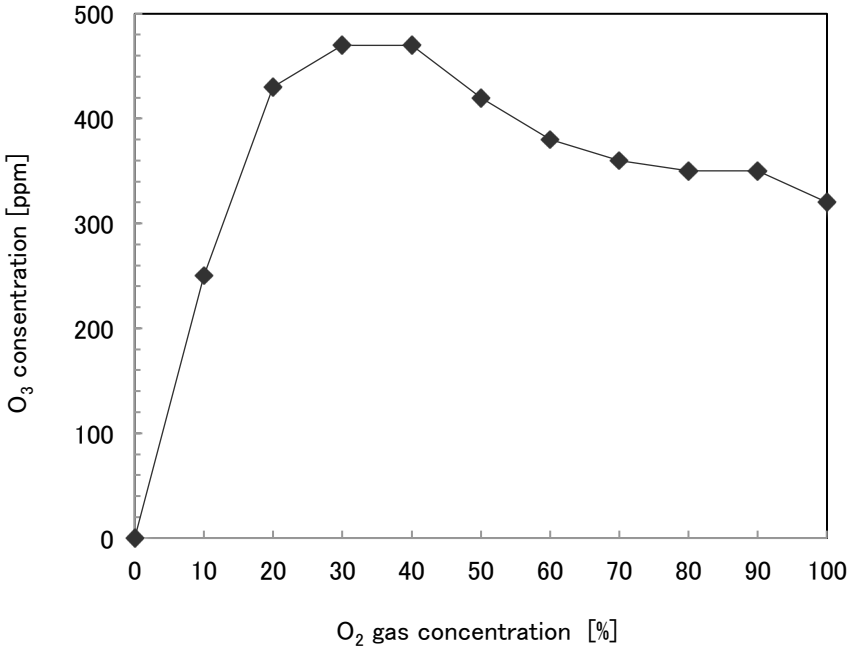


図 7-13 プラズマ生成時における Ar と O_2 の比と O_3 の濃度の関係

7.5 真空紫外吸光法を用いた酸素原子密度の測定

各種原子や分子は固有の波長の光を吸収する性質を持つ。そのため，真空紫外光や可視光，赤外光，マイクロ波などを吸光分光することにより各種気体の同定及び定量が可能である。そこで，今回，真空紫外光の吸光分光により，プラズマから生成される気相中の酸素原子[$O(^3P_j)$]の密度を測定した。実験には図 7-14 に示すような真空紫外吸光分光装置[32]を用いた。図 7-15 に示されるようにセラミック管の上端から 1 mm の位置にプラズマ源の出口を設置した。対になるセラミック(ϕ10 mm)の管は吸光分光の発光と受光の役割を果たしており，図 7-15 の左側のセラミック管から真空紫外光(VUV)が光路長 12 mm の気相を通り，右側のセラミック管を抜けて分光器[ARC VM-502]に受光される。その際，酸素原子の輝線 131.4 nm を吸光波長とし，図 7-16 に示される酸素原子の吸光度と密度の関係から酸素原子量が導出できる。今回光源は直流で出力し，さらに光源の安定性やノイズの関係から受光した信号は平均回数を 64 回とした。プラズマのガス流量は 5 L/min と固定し，アルゴンと酸素の比率を変えてプラズマ生成時の酸素原子の吸光度を測定した。

アルゴンに対する酸素濃度と酸素原子の密度との関係を図 7-17 に示す。その結果，

アルゴン単体では酸素原子の生成は確認されず，酸素単体では 5.5×10^{15} cm^{-3} の密度の酸素原子が生成された。また，アルゴンに対する酸素濃度が 15%のとき酸素原子の生成量が最大となりその密度は 1.6×10^{16} cm^{-3} であった。これは図 7-9 のアルゴンに対する酸素濃度とプラズマの発光強度の関係と相関している。

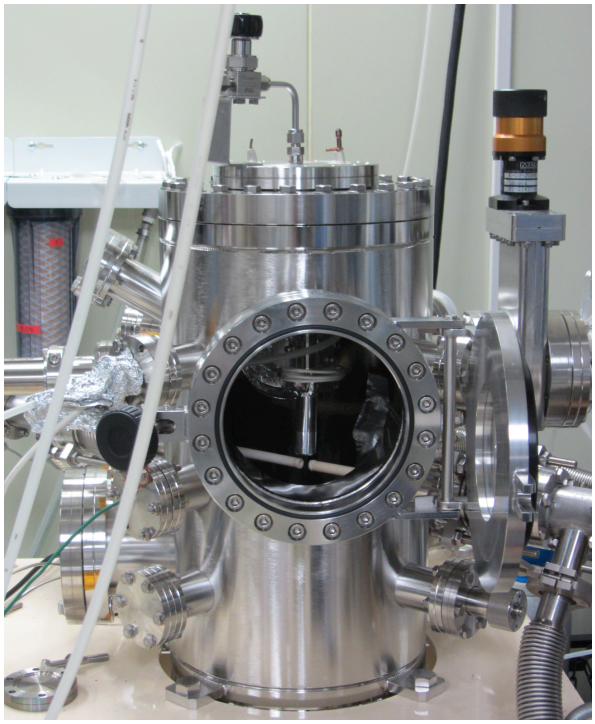


図 7-14 真空紫外吸光分光装置

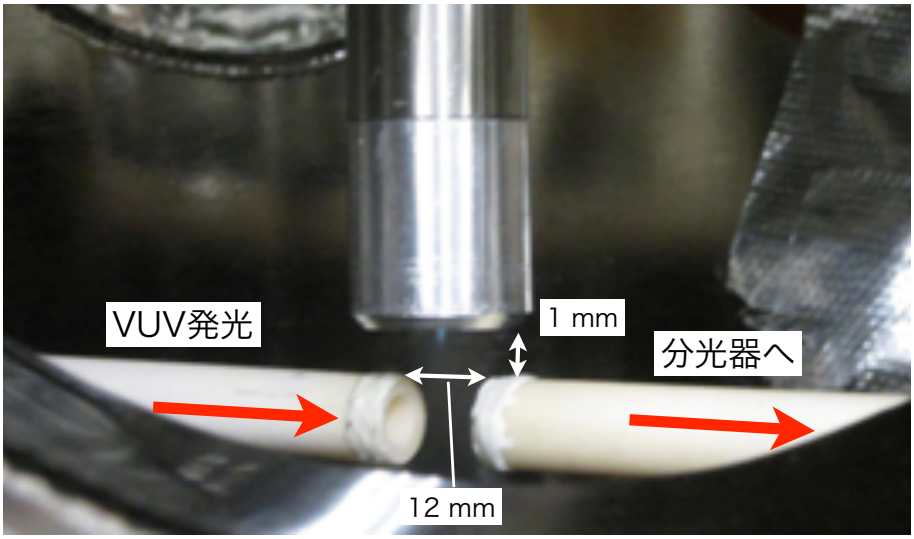


図 7-15 プラズマ源設置の様子

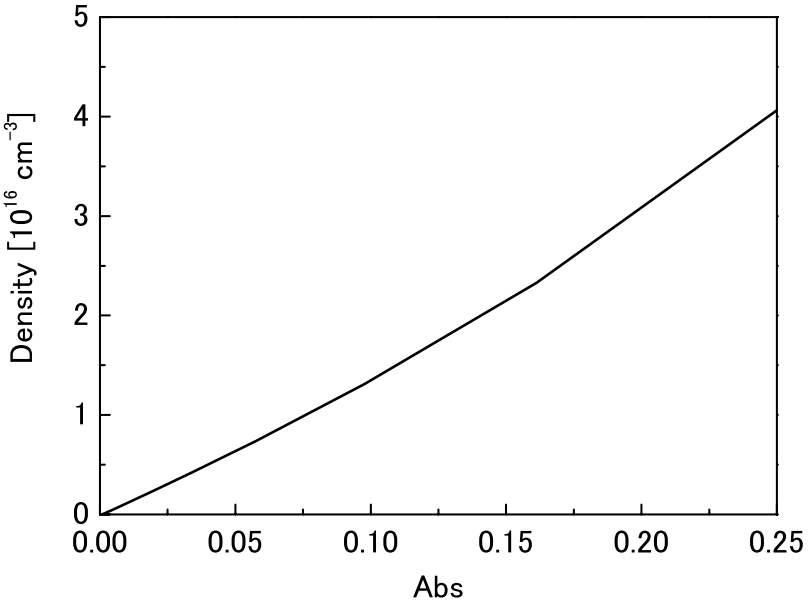


図 7-16 酸素原子の吸光度と密度の関係

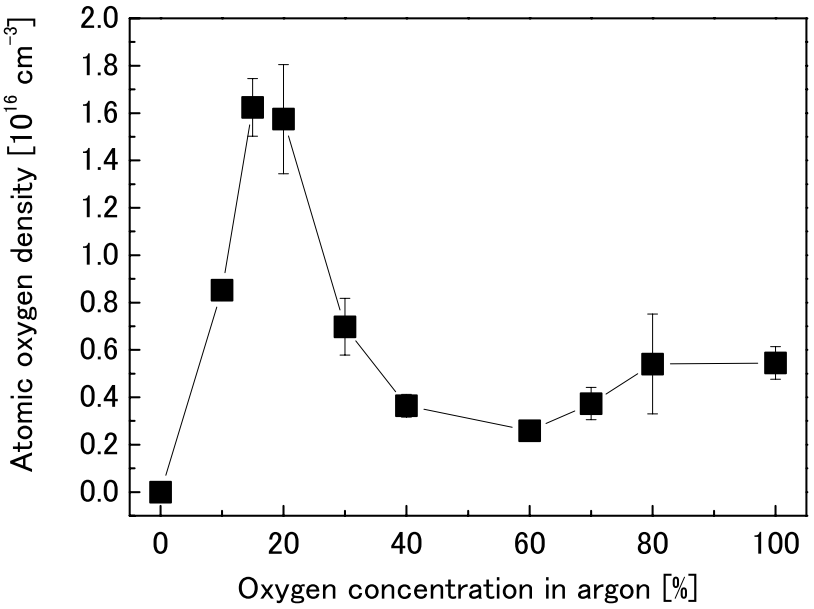


図 7-17 酸素原子生成の酸素濃度依存性

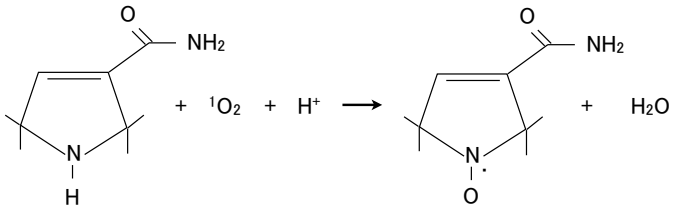
7.6 電子スピン共鳴法による液中の活性種測定

生体や微生物には水分が含まれており，生体応用においてプラズマによって液相中に生成される活性種を調査することは重要である。この液相中の活性種を調査する方法として電子スピン共鳴法(ESR)が挙げられる。ESR は不対電子を有する分子や原子いわゆるフリーラジカルを磁場でゼーマン分裂させ，磁気共鳴させることで固有のゼーマンエネルギーを情報として得る装置である[88]。特定の活性種は固有の捕捉剤を含む溶液と反応し ESR で測定できることが確認されている。そこで，様々なプラズマガス種について液中の各活性種の定量測定を行った。

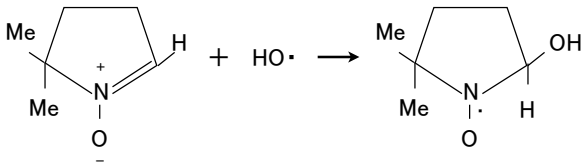
7.6.1 捕捉剤の濃度

現在知られている捕捉できる活性種として，一重項酸素($^1O_2$)やヒドロキシラジカル(HO･)，水素ラジカル(H･)，一酸化窒素(NO)が挙げられる。これらの活性種は式(7･13)や(7･19)から(7･23)，(7･17) に示されるようにプラズマから生成されると考えられる。そして，これらの活性種を正確に定量するためには，完全に捕捉できる捕捉剤の濃度を選択する必要がある。そこで，各捕捉剤が活性種を完全に捕捉する濃度を調査した。今回，一重項酸素に 2,2,5,5-テトラメチル-3-ピロリン-3-カルボキサミド(TPC)，ヒドロキシラジカル，水素ラジカルに 5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO)，一酸化窒素に N-メチル-D-グルコサミンジチオカーバメート鉄(MGD-Fe)を捕捉剤として用いた。

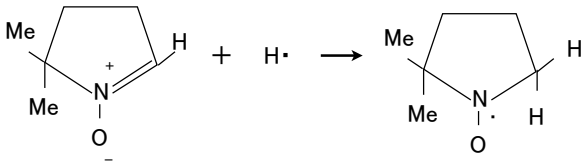
化学反応として一重項酸素は TPC と式(7･27)のように反応する。また，DMPO はヒドロキシラジカル，水素ラジカルと反応し，式(7･28)及び(7･29)のように DMPO-OH，DMPO-H などを生成する。そして，MGD-Fe 錯体は一酸化窒素と反応し，式(7･30)のように MGD-Fe-NO を生成する。



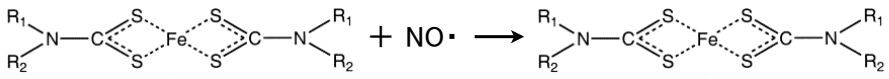
(7･27)



(7･28)



(7･29)



(7･30)

これらの活性種を捕捉した反応物は固有の磁場で共振する。TPC, DMPO の反応物は 335.5±5 mT の間の磁場で，MGD-Fe 錯体の反応物は，330±5 mT の間の磁場でゼーマン分裂して固有のスペクトルが観測でき，濃度が既知のスペクトルの 2 回積分と未知試料のスペクトルの 2 回積分の値からスピン量が導出できる。各種 ESR の設定条件を表 7-3 に示す。

まず，測定に使用する捕捉剤の濃度を決定するために図 7-18 のように 200μL の溶液に対して流量 1 L/min でプラズマを照射距離 6 mm で 30 秒間照射し，各濃度でスピン量を調査した。このときガス種として，TPC に酸素プラズマ，DMPO に窒素プラズマ，MGD-Fe に空気プラズマをそれぞれ用いた。そしてその結果を安定のラジカル剤である 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル(TEMPO)を用いて校正を行い，導出された値を生成量とした。

各濃度の TPC 溶液に対して酸素プラズマを照射した。一重項酸素アダクトのスペクトルは図 7-19 のように見られ，固有の 3 本のスペクトルから一重項酸素量が導出される。一重項酸素量と TPC の濃度依存性を図 7-20 に示す。TPC の濃度が 50 mM 以上に高くなるとスペクトルの増加が緩くなったため，今回 75 mM が一重項酸素の大部分を捕捉した値として測定に用いる濃度とした。さらに，TPC は一重項酸素以外からも酸化される可能性があるため，一重項酸素の消去剤であるアジ化ナトリウム(NaN_3)を各濃度

混合した 75mM の TPC 溶液に対して酸素プラズマを照射した。その結果，図 7-21 に示されるように 5〜100 mM の間で一重項酸素量の減少が緩やかになった。このことから一重項酸素が完全に消去された点として，測定に使用するアジ化ナトリウムの濃度を 100 mM とした。

次に各濃度の DMPO 溶液に対して窒素プラズマを照射した。ヒドロキシラジカルのアダクトのスペクトルは図 7-22 のように見られ，固有の 4 本のスペクトルからヒドロキシラジカル量が導出される。また，図 7-22 では水素ラジカルのスペクトルも観測され，固有の 9 本のスペクトルから水素ラジカル量も導出できる。ヒドロキシラジカルと DMPO の濃度依存性を図 7-23 に示す。DMPO の濃度が 200 mM 以上になるとヒドロキシラジカル量の増加が緩やかになったため，今回 200 mM を測定に用いる濃度とした。

各濃度の MGD-Fe 錯体溶液に対して空気プラズマを照射した。一酸化窒素のアダクトのスペクトルは図 7-34 のように見られ，固有の 3 本のスペクトルから一酸化窒素量が導出される。一酸化窒素と MGD-Fe 錯体の濃度依存性を図 7-25 に示す。MGD-Fe 錯体の濃度は 40 mM 以上濃度を濃くしても一酸化窒素の増加は止まらなかった。そのため，空気プラズマによる一酸化窒素の生成は図 7-25 から 30μM 以上であることが明らかになった。この試薬は，高濃度で多量に作成することが困難であるので，今回他のガス種のプラズマと比較する際には 8 mM を測定に用いる濃度とした。

表 7-3 ESR 測定の設定条件

	TPC	DMPO	MGD-Fe
Micro wave Fq [GHz]	9.43	9.43	9.43
Power [mW]	1	1	8
Magnetic Field [mT]	335.5±5	335.5±5	330±5
Sweep time [min]	2	2	2
MOD Fq [kHz]	100	100	100
MOD width [mT]	0.1	0.1	0.7
Amplitude	50	25	500
Time constant [s]	0.1	0.1	0.3

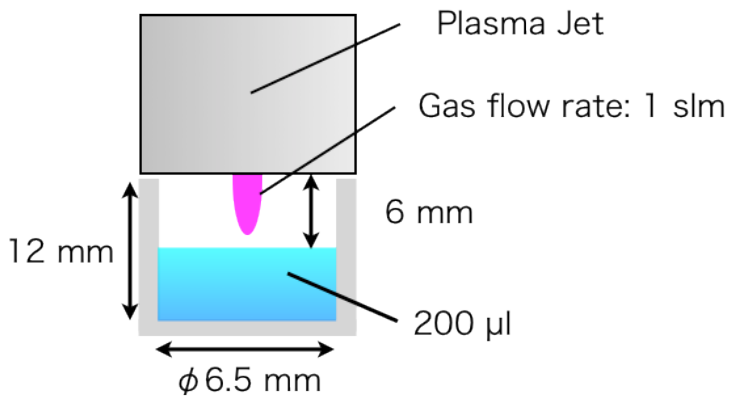


図 7-18 プラズマ照射方法

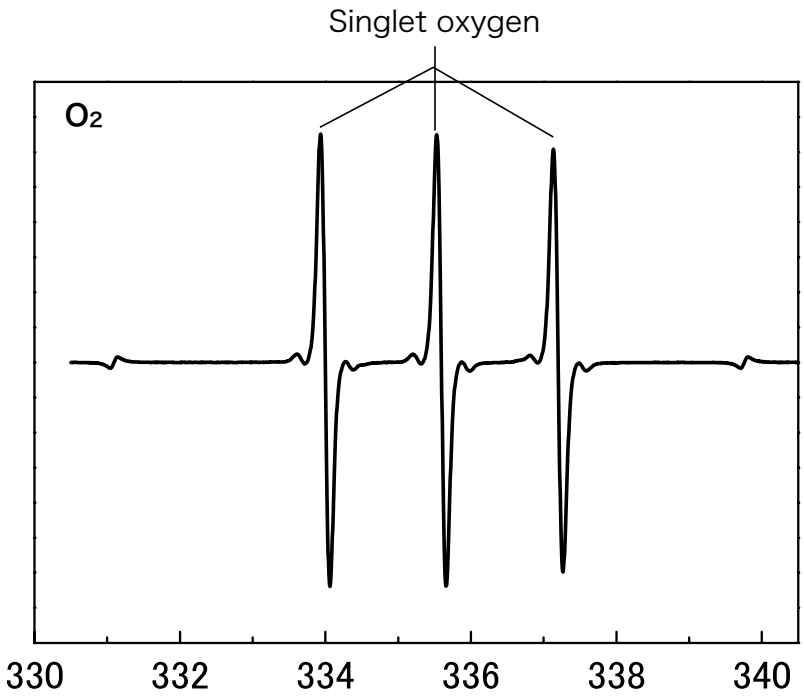


図 7-19 一重項酸素生成時の ESR スペクトル

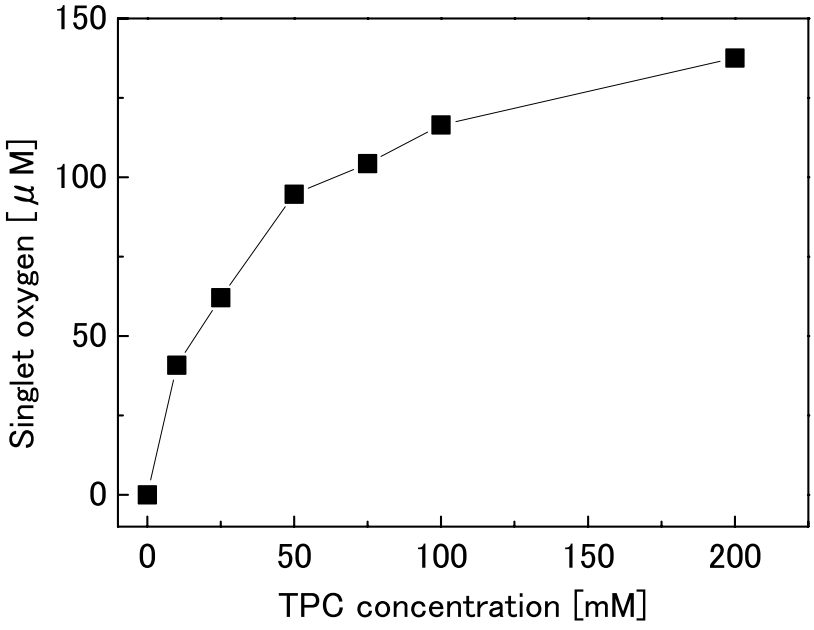


図 7-20 酸素プラズマにおける ESR スペクトルの TPC 濃度依存性

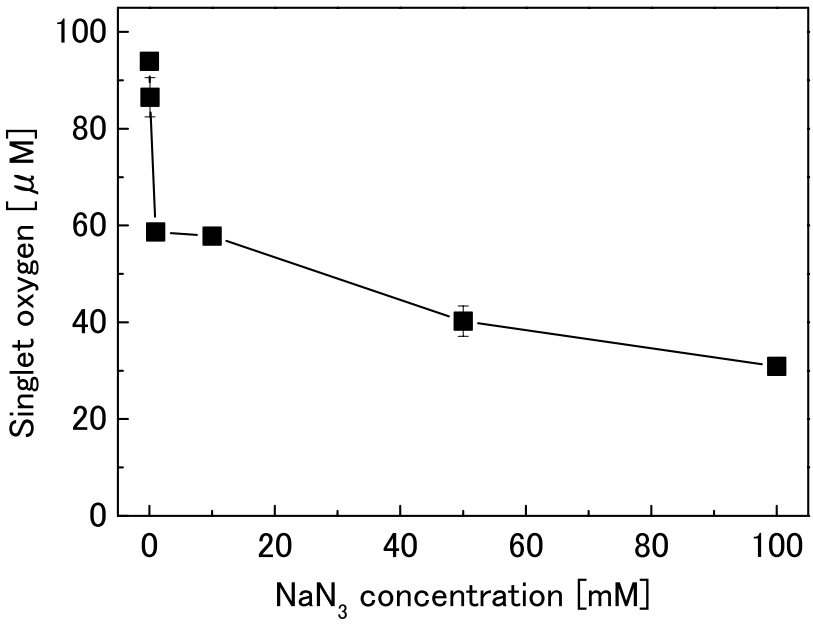


図 7-21 NaN_3 による酸素プラズマの一重項酸素量の減少

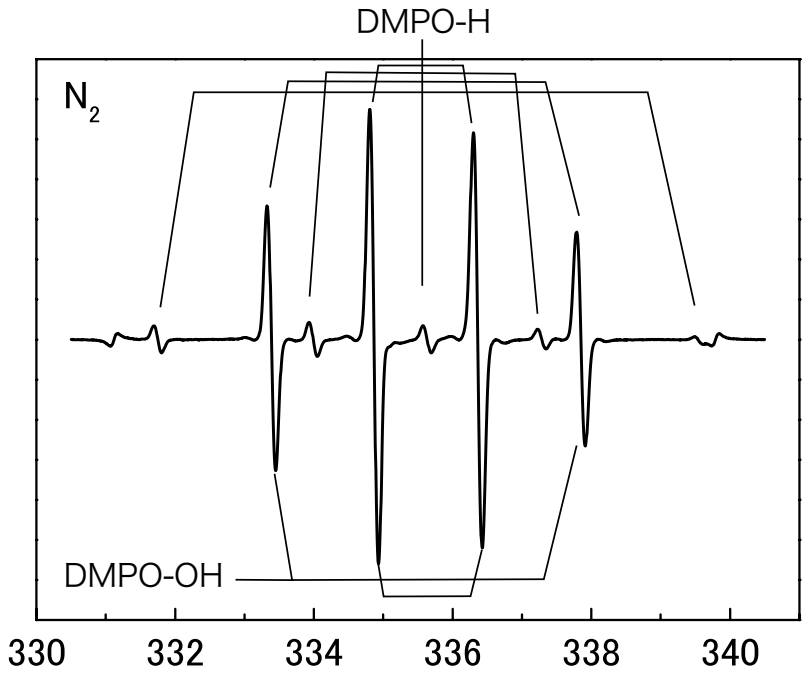


図 7-22 窒素プラズマ照射時の DMPO の ESR

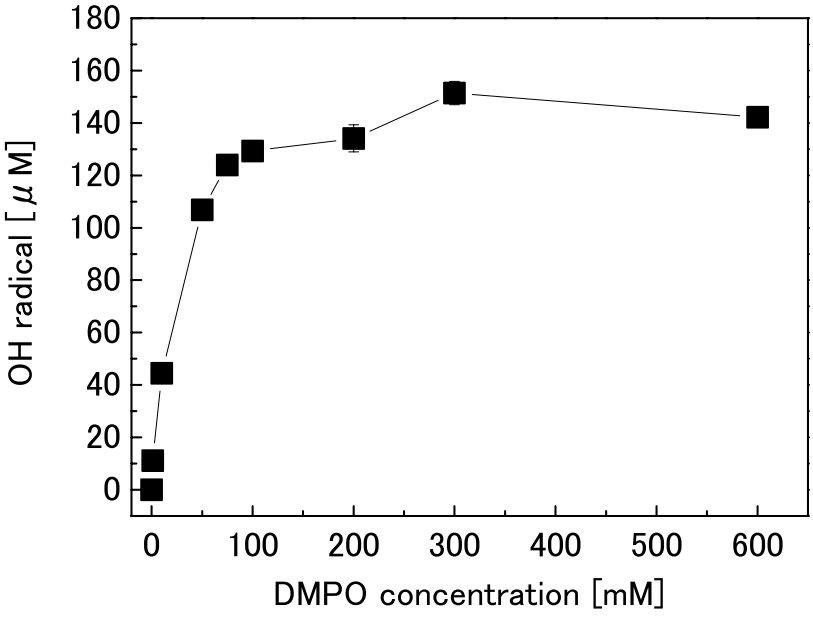


図 7-23 窒素プラズマにおける ESR スペクトルの DMPO 濃度依存性

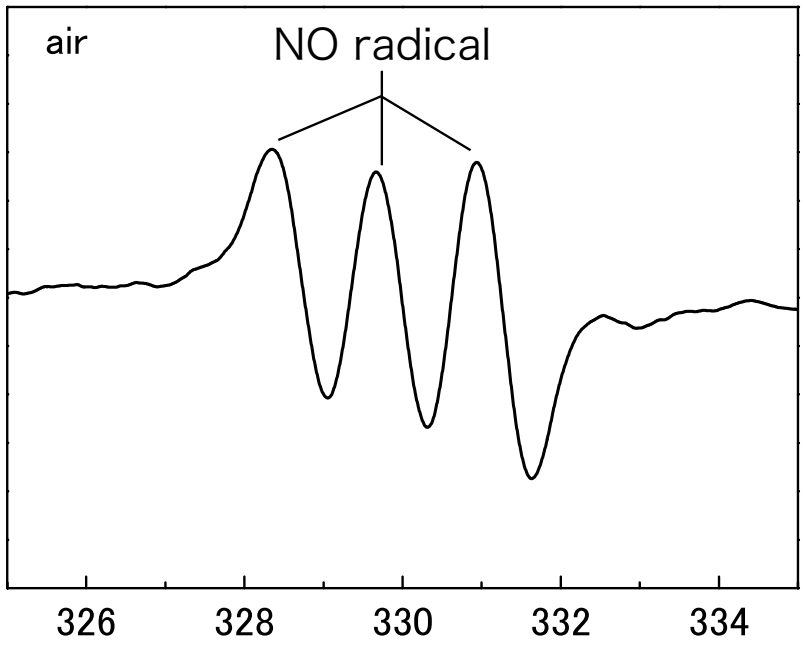


図 7-24 空気プラズマ照射時の MGD-Fe 錯体の ESR

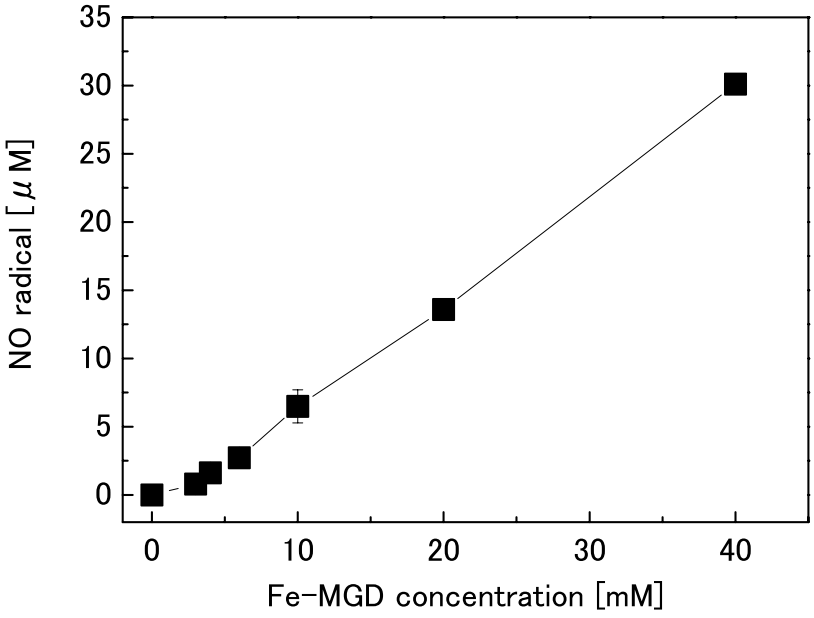


図 7-25 空気プラズマにおける ESR スペクトルの Fe-MGD 濃度依存性

7.6.2 各ガス種のプラズマによる活性種の生成量

プラズマガス種によって生成される活性種は異なると考えられる。そこで, アルゴン, ヘリウム，空気，窒素，酸素，二酸化炭素のプラズマに関して各活性種量を調査した。また TPC の測定においては, 各ガス種のプラズマを TPC 75 mM のみの溶液, TPC 75 mM とアジ化ナトリウム 100 mM 混合の溶液に対して図 7-18 と同様の操作で照射して一重項酸素量を比較した。DMPO を用いた測定では，上記に加えてアルゴンに水蒸気添加(H_2O)のプラズマに関しても ESR のスペクトルを調査した。

各ガス種のプラズマから生成される一重項酸素量を図 7-26 に示す。この結果から，二酸化炭素による一重項酸素量が最大となり，TPC のみの溶液で 210 μM，TPC とアジ化ナトリウムの溶液で 120 μM であった。この差から 92 μM が実際の一重項酸素量と考えられる。酸素のプラズマは TPC のみの溶液で得られたシグナルに対してアジ化ナトリウムで一重項酸素が消去された割合が高く，TPC のみの溶液で 94 μM，TPC とアジ化ナトリウムの溶液で 31 μM であり，その差は 63 μM であった。一方アルゴン，空気，窒素は TPC 溶液に照射することよってスピンが観測されたが，アジ化ナトリウムによって消去されたスピン量は少なく，他の活性種の寄与によるものと考えられる。このことから，式(7･17)のようにプラズマによる一重項酸素の生成は酸素原子生成が重要な要素であると考えられる。一方で, 空気プラズマで一重項酸素の生成量が少なかったのは, 気相中で式(7･12)，(7･15)の反応が起こり，液中の酸素原子量が減少したためであると考えられる。

ヒドロキシラジカルおよび水素ラジカルを定量した結果を図 7-27，図 7-28 に示す。ガス種によって生成される活性種およびそれらの量は大きく異なり, ヒドロキシラジカルはアルゴンに水蒸気を添加したプラズマで最も多く 210 μM 生成された。これは，プラズマ生成部で直接式(7･7)の反応を起こし，効率よくヒドロキシラジカルが生成されたためと考えられる。また，単体のガスでは窒素プラズマから多く生成され，その生成量は 130 μM であった。そしてアルゴン，ヘリウム，酸素，二酸化炭素のプラズマはそれぞれ 84，68，32，28 μM となった。これは式(7･19)から(7･23)の反応を液界面で起こし，ヒドロキシラジカルが生成されたと考えられる。また，窒素プラズマでヒドロキシラジカルの生成量が多いのは窒素プラズマで生成される窒素原子や準安定状態の窒素の寿命が長いためであると考えられる[89]。

水素ラジカル量に関して，アルゴン，ヘリウム，窒素のプラズマによる生成量はそれぞれ 14，10，11 μM となった。これは式(7･19)から(7･21)の反応の過程で生成されると

考えられる。また，空気プラズマではこれらのラジカルが観測されなかったが，ESR のスペクトルに微量な DMPOX のスペクトルが確認された。空気プラズマの ESR スペクトルを図 7-29 に示す。これは空気プラズマから，ヒドロキシラジカルや水素ラジカル，スーパーオキシド以外の高い酸化力を持った活性種が生成されていることが考えられる。

各ガス種プラズマによって生成される一酸化窒素の生成量を図 7-29 に示す。ガス種によって生成される一酸化窒素の量は異なり，空気プラズマで最も多く 1.6 μM 生成され，Ar，He プラズマはそれぞれ 0.50，0.22 μM となった。そして N_2，O_2，CO_2 プラズマでは一酸化窒素は観測されなかった。空気プラズマは式(7･3)，(7･4)の反応から式(7･12) の反応によって生成され，アルゴン，ヘリウムのプラズマでは空気中の酸素を介した式(7･9)，(7･8)の他に空気中の窒素を介した式(7･10)，(7･11)の反応を通って式(7･12)の反応で一酸化窒素を生成されたと考えられる。一方，酸素，窒素，二酸化炭素のプラズマでは，一酸化窒素の対となる窒素，または酸素の原子を空気中から生成することができなかったため，一酸化窒素が生成されなかったと考えられる。

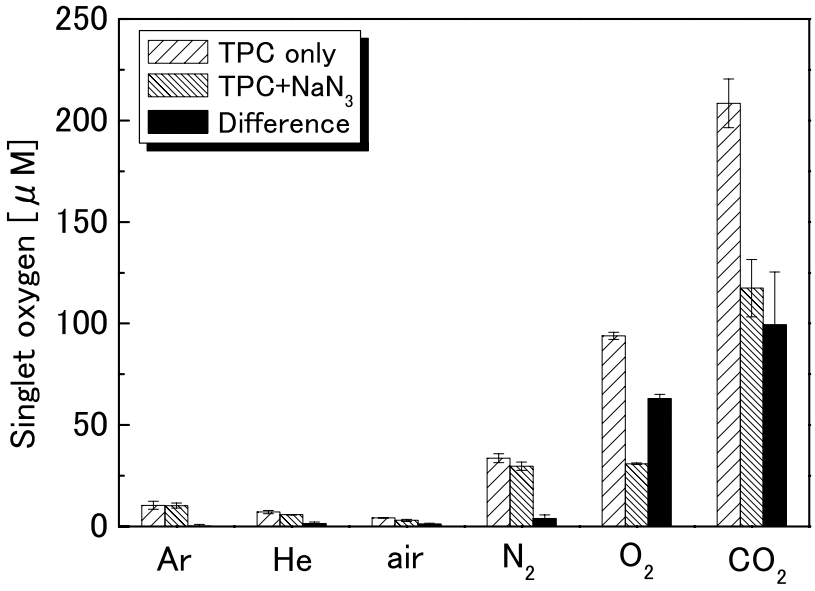


図 7-26 各ガス種のプラズマによる一重項酸素の生成量

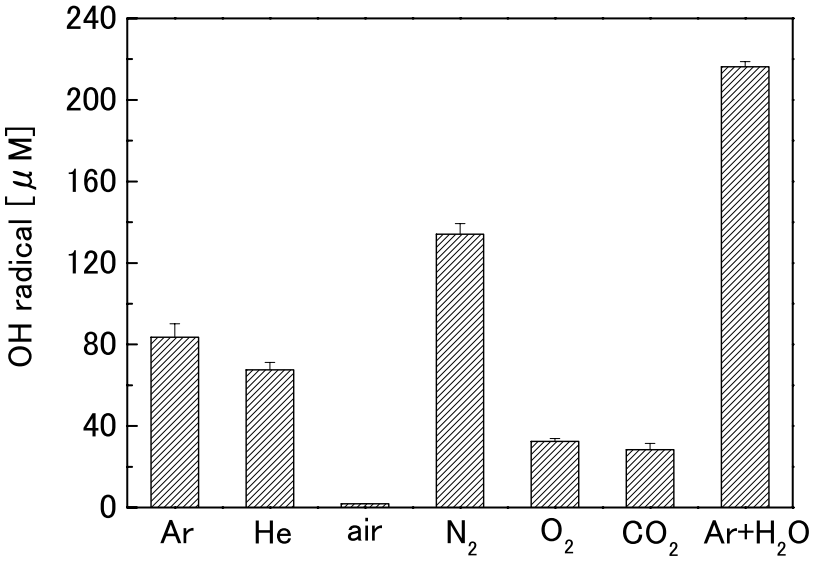


図 7-27 各ガス種による OH ラジカルの生成量

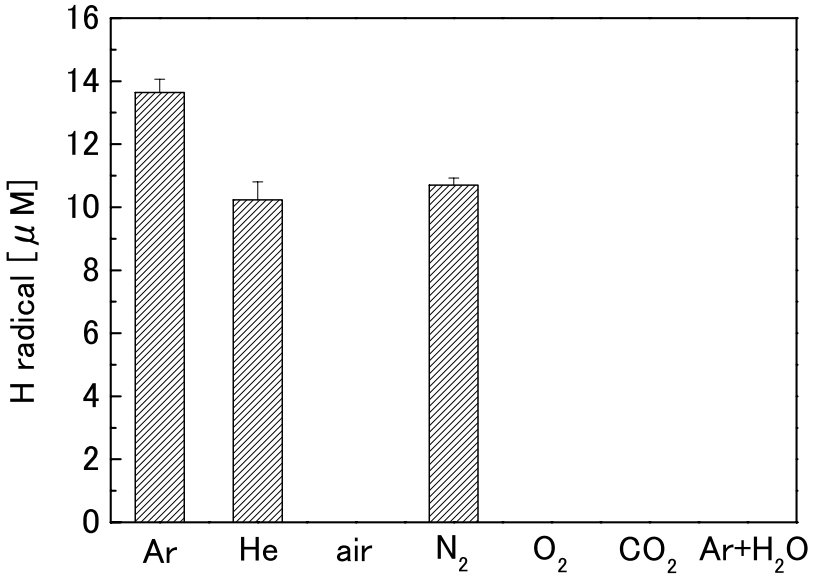


図 7-28 各ガス種による H ラジカルの生成量

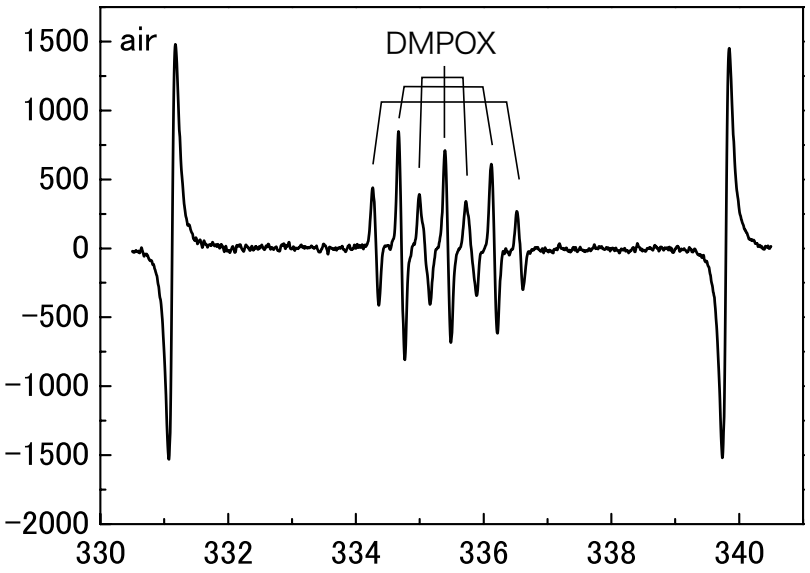


図 7-29 空気プラズマ照射時の DMPO の ESR

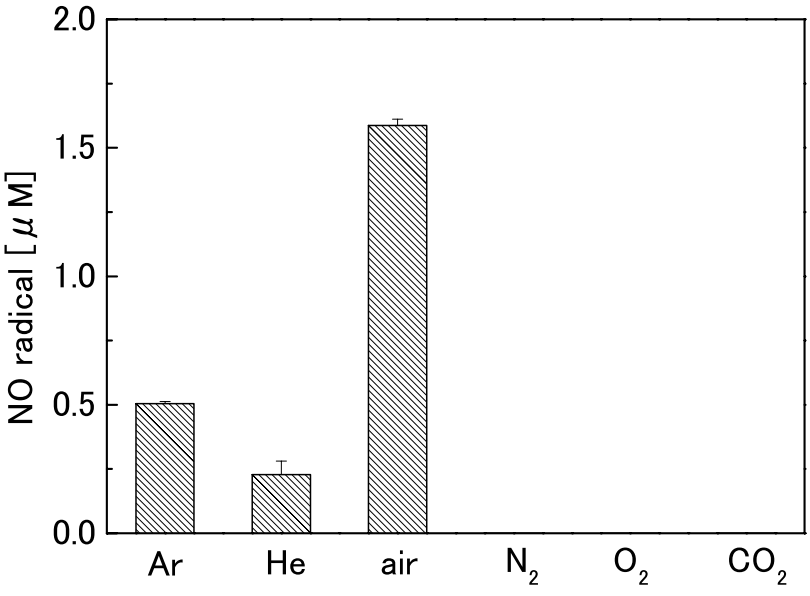


図 7-30 各ガス種による NO ラジカルの生成量

7.6.3 混合ガスのプラズマによる活性種量

活性種の生成量は複数のガスを混合することによって変化し，特に 7.4 節で明らかになったように，活性酸素種は酸素にアルゴンを混合する事で増加する。そこで，一重項酸素およびヒドロキシラジカルの生成量をアルゴンと酸素の混合プラズマで混合比を変化させて図 7-18 と同様の操作で調査した。さらに，酸素と窒素の混合プラズマについて各混合比で一酸化窒素量も調査した。

一重項酸素とヒドロキシラジカル生成量のアルゴン酸素混合比依存性について図 7-31，図 7-32 に示す。一重項酸素の生成のピークは酸素濃度が 30%と 90%のときに２つあり，また，その最大値は 30%のときに 180 μM となった。これは式(7･8)の反応で酸素原子の生成が促進されたためと考えられる。しかし，生成のピークが２つあったことから，他の生成過程も存在する可能性がある。ヒドロキシラジカルの生成量は，アルゴンに対して酸素が 3%のとき最大となり，その量は 98 μM となった。これは式(7･19)の反応に加えて，式(7･8)の反応が 3%程度の酸素濃度の条件で酸素原子が多く生成され，式(7･23)の反応からヒドロキシラジカルの生成量の増加に繋がったものと考えられる。

次に窒素と酸素の混合したプラズマについて，各濃度で一酸化窒素を調査した結果を図 7-33 に示す。その結果，窒素に対して酸素が 50%のとき，一酸化窒素量は最大となり，その量は 11 μM となった。これは図 7-11 と同様に，気相中で一酸化窒素が最も効率よく生成され，液中の MGD-Fe と反応したと考えられる。

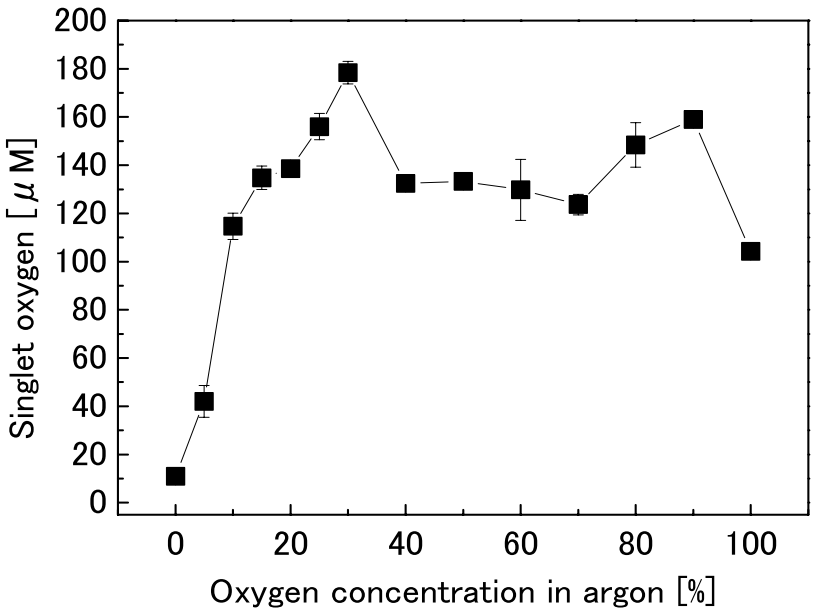


図 7-31 各 Ar/O_2 混合プラズマの一重項酸素量

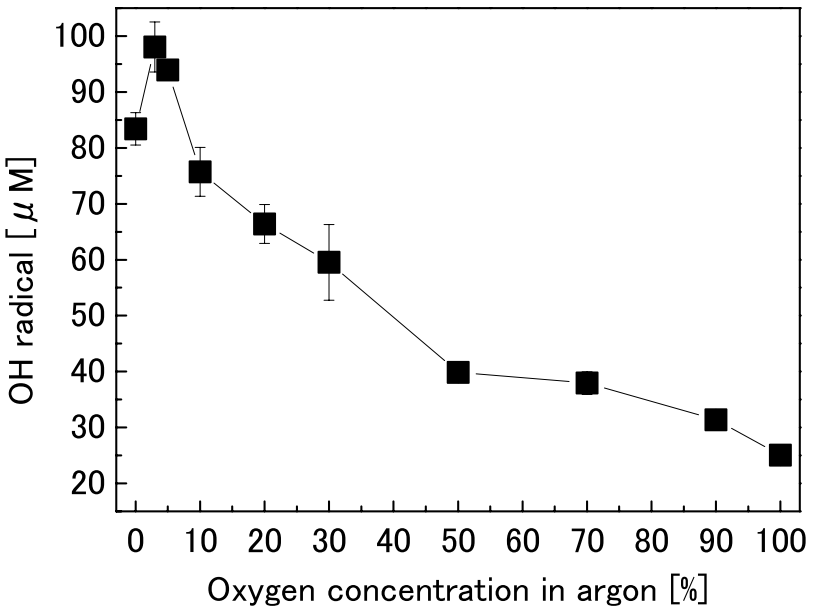


図 7-32 各 Ar/O_2 混合プラズマの OH ラジカル量

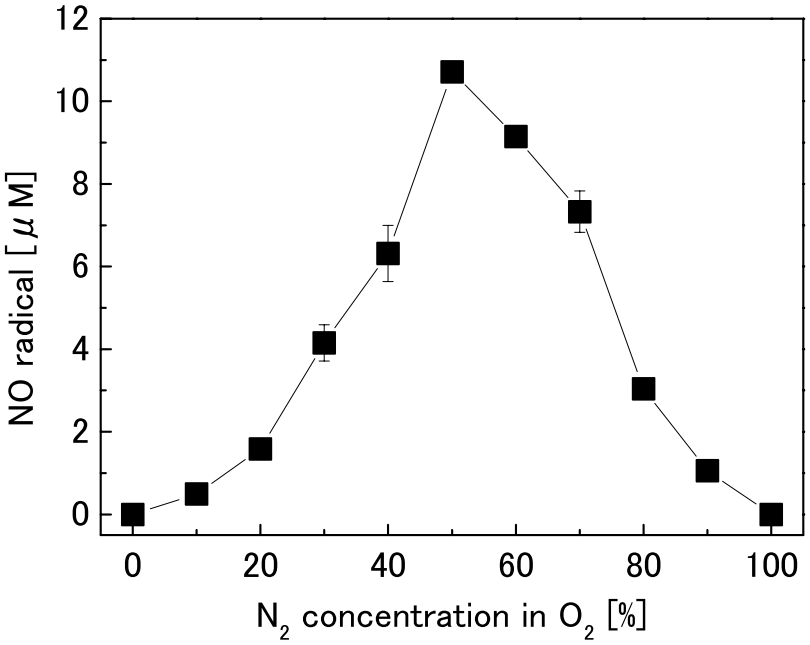


図 7-33 各 N_2/O_2 混合プラズマの NO ラジカル量

7.7 吸光分光法による液中の活性種測定

溶液中の活性種量の簡易な定量測定法として 6.3 節に用いた吸光分光法がある。これは固有の活性種と反応し，呈色もしくは脱色する試料の吸光度を測定し，定量することができる。プラズマから生成される活性種のうち，この方法で測定できるものとして，過酸化水素(H_2O_2) ，オゾン(O_3) ，硝酸イオン(NO_3^-) ，亜硝酸イオン(NO_2^-)が挙げられる。これらの活性種は式(7･16)，(7･18)，(7･22)，(7･25)，(7･26)に示されるような反応によって生成される。これらの測定原理を表 7-4 に示す。今回表 7-4 に挙げられる試薬を用いて各ガス種のプラズマによって生成される各種活性種量を調査した。吸光分光測定にはダブルビーム型の可視-紫外域吸光分光度計[U-2010, Hitachi High-Technologies Co.]を用いた。過酸化水素の測定の際には硫酸チタニル($TiOSO_4$)[Sigma Aldrich]を超純水で 10mM に調製して，濃度が既知の過酸化水素[和光純薬]を用いて検量線を作成した。また，オゾン測定においてはオゾン測定キット[HACH]を用い，検量線は既に校正してあるオゾン計[HACH]と比較し作成した。硝酸イオンの測定は Nitrate Test Kit[HACH]を用い，スルファミン酸[Sigma Aldrich]で亜硝酸イオンの干渉を取り除き，硝酸ナトリウム($NaNO_3$) [HACH]で検量線を作成した。亜硝酸イオンの測定は Nitrite Test Kit[HACH]を用い，亜硝酸ナトリウム($NaNO_2$) [HACH]で検量線を作成した。そして，図 7-18 のよ

うに流量 1 L/min の各ガス種のプラズマを照射距離 6 mm で各試料に 30 秒間，インディゴ染料の場合は測定範囲を超えるので 15 秒間 200 µl の溶液に対して照射し，各活性種の生成量を調査した。

吸光度法により測定した過酸化水素，オゾン，硝酸イオン，亜硝酸イオンの生成量を図 7-35 から図 7-37 に示す。過酸化水素の生成量は図 7-35 に示されるように二酸化炭素プラズマで最も多く 528 µM 生成され，アルゴン，ヘリウム，空気，窒素，酸素プラズマはそれぞれ 200，0，48，290，260 µM となった。これは式(7･6)の反応を通って式(7･17)の反応を起こすことから，一重項酸素を多く生成される二酸化炭素のプラズマは酸素原子が多く生成されると考えられるため，式(7･22)の反応によって過酸化水素も多く生成されると考えられる。一方，図 7-35 のようにオゾンは酸素プラズマで最も多く 64 µM 生成され，アルゴン，ヘリウム，空気，窒素，二酸化炭素のプラズマはそれぞれ 33，6.9，9.9，33，48 µM となった。これは酸素が多く存在する酸素プラズマ中で酸素原子が生成されることによって式(7･14)の反応でオゾンが多く生成されたと考えられる。

硝酸イオン，亜硝酸イオンの生成は図 7-36 及び図 7-37 のように空気のプラズマでのみ生成され，その生成量はそれぞれ 1.1，0.85 mM となった。これは式(7･25)，(7･26)の反応によって生成されるため，図 7-12 及び図 7-11 で示されたように，NO，NO_2 が生成される空気プラズマによってのみ生成されると考えられる。

表 7-4 各活性種の測定原理

活性種	測定原理
H_2O_2	硫酸チタニル($TiOSO_4$)と反応してペルオキソチタン酸を生成し 405 nm に吸光スペクトルを持つ。
O_3	インディゴ染料($C_{16}H_{10}N_2O_2$)と反応して脱色し，310 nm の吸光スペクトルが減少する。
NO_3^-	酸性溶液中で 2,6-ジメチルフェノールと反応し，4-ニトロ-2,6-ジメチルフェノールを生成して 370 nm に吸光スペクトルを持つ。
NO_2^-	第一級芳香族アミンと反応し，ジアゾニウム塩を生成して 515 nm に吸光スペクトルを持つ。

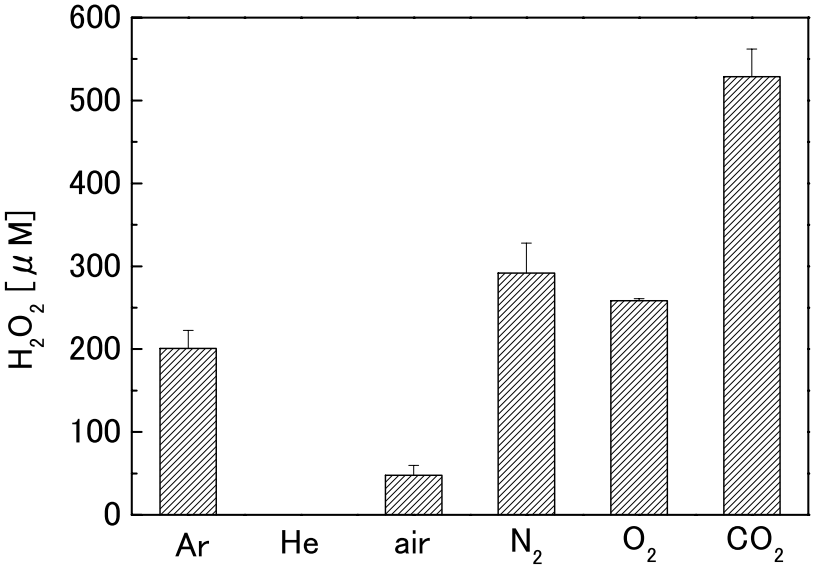


図 7-34 各種プラズマガスにおける液中の過酸化水素濃度

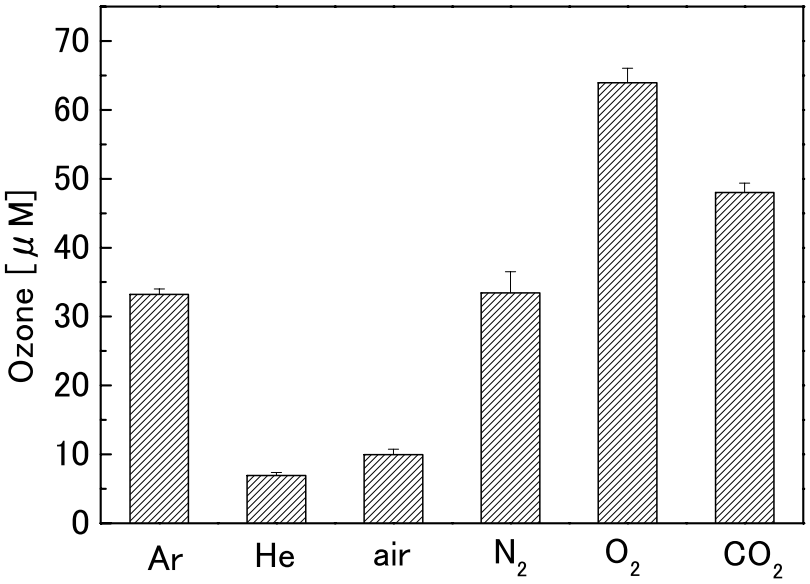


図 7-35 各種プラズマガスにおける液中のオゾン濃度

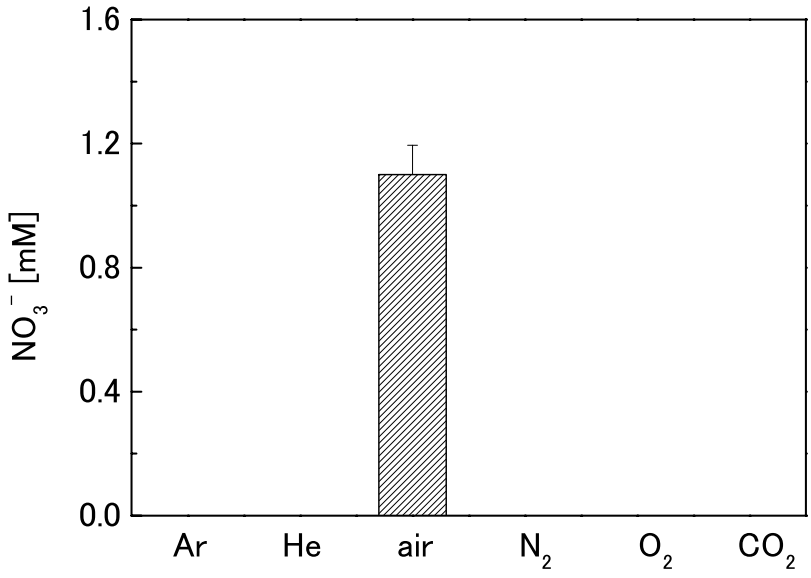


図 7-36 各種プラズマガスにおける液中の硝酸イオン濃度

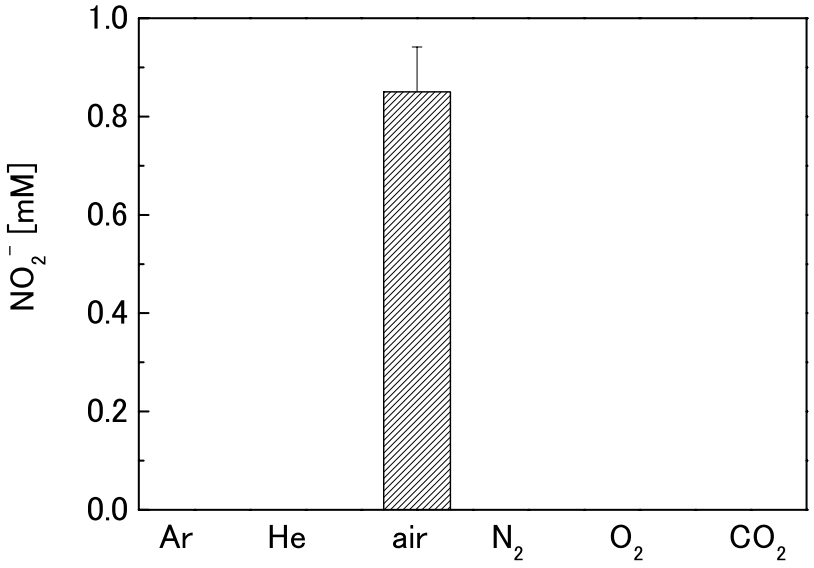


図 7-37 各種プラズマガスにおける液中の亜硝酸イオン濃度

7.8 蛍光試薬を用いた活性種の深さ方向の影響

活性種は非常に寿命が短く，細胞内において例えばヒドロキシラジカルは 8 ns 程度，一重項酸素は 4 μs 程度，そして過酸化水素は 4 ms 程度で消失する[90]。そのため，生体等に対する深さ方向の影響は極表層であるとされているが，測定法が確立していないため，どの程度深度があるかは未調査であった。そこで，著者らは活性種と反応すると蛍光波長を持つ試薬を，動物由来であるゼラチンに混合して固めることで生体組織に近いモデルの活性種プローブとして利用できると考えた。

今回，蛍光試薬に過酸化水素のプローブである Amplex® Red Reagent [Molecular Probes, Inc.]を用いた。この試薬は過酸化水素と反応すると 530 nm 付近の励起光によって 590 nm の蛍光を発する物質となる[91]。この試薬とペルオキシターゼがそれぞれ 100 μM および 0.1 U/mL になるよう PBS で溶かしたゼラチンで調製し，高さ 12 mm，φ6.5 mm のキュベットに 200 μL 分注した。そして 535 nm の LED をキュベット上方から照射することで蛍光を視覚的に観測することができる。図 7-38 に示されるように，未処理の H_2O_2 のプローブでは 535 nm の発光で蛍光しない。そこで，この過酸化水素のプローブに対

して紫外線を 15 分間照射した図と 3%H_2O_2 を 30 µL 滴下した図を図 7-39 に示す。紫外線を 15 分間照射した過酸化水素のプローブでは上方から濃淡の勾配が見られた。一方 3%過酸化水素を 30 µl 滴下した場合は反応した深度に境界が見られた。これは紫外線が透過した部分まで過酸化水素を生成したためと考えられ，3%過酸化水素を 30 µl 滴下した場合は過酸化水素が浸透した深さで境界が見られたものと考えられる。このように，過酸化水素と反応した部分に蛍光が見られるため，この過酸化水素のプローブを用いて各ガス種のプラズマを照射した時の過酸化水素が浸透する深度を調査した。

図 7-18 のようにプラズマ源を設置し，過酸化水素のプローブに対してアルゴン，空気，窒素，酸素，二酸化炭素のプラズマをそれぞれ 2 分間照射して測定した。そのときの様子を図 7-40 に示す。どのガス種のプラズマにおいても，1-3 mm の間の表層で蛍光が確認された。また図 7-40 で観測された過酸化水素が反応した深さをプラズマの影響する深度として図 7-41 に示す。酸素プラズマによる過酸化水素の反応した深度が最も深く，2.8 mm であった。しかし，図 7-34 で最も過酸化水素の生成量が多かった，二酸化炭素のプラズマによる過酸化水素の反応した深度は 1.4 mm であったため，濃度との相関はほとんどないものと考えられる。

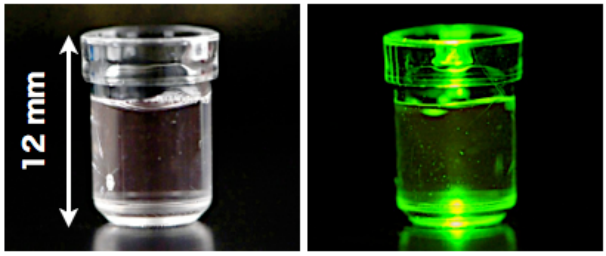


図 7-38 未処理の過酸化水素のプローブ(左図：蛍光灯下，右図：535 nm の LED 下)

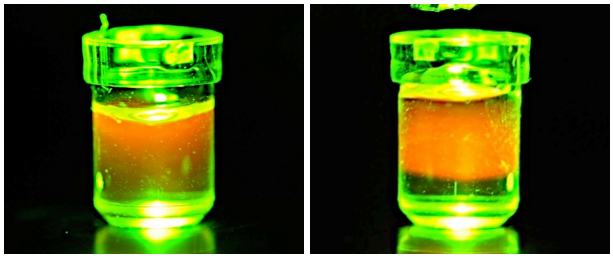


図 7-39 各条件における過酸化水素のプローブの蛍光(左図：紫外線 15 分照射，右図：3%過酸化水素 30 µl 滴下)

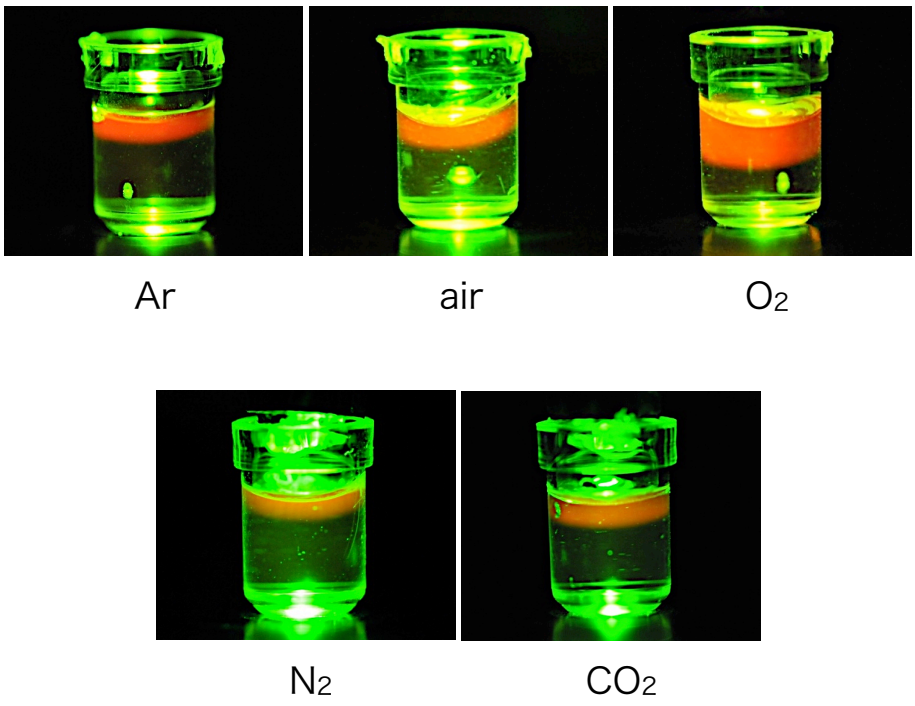


図 7-40 各ガス種のプラズマによる過酸化水素のプローブの蛍光

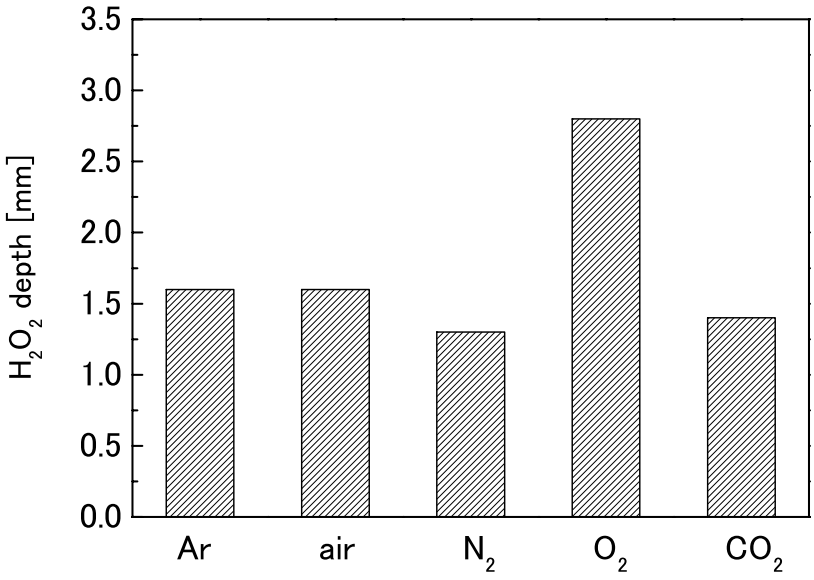


図 7-41 各ガス種のプラズマによって過酸化水素が反応する深度

7.9 生命の起源となる有機物生成機構解明への展開

生命の起源(Origin of life)は，地球上で生命の最初の誕生および生物が無性物質から発生した過程のことである。かつて地球上に生命が誕生するまでは，地球上には有機物は存在しなかったはずで，「最初に生じたのは無機栄養微生物だったはずである」と考えられていた時代があった。だが，最初の生命発生以前に有機物が蓄積していたはずだ，と考える人たちが出てきた。化学進化説は，「無機物から有機物が蓄積され，有機物の反応によって生命が誕生した」とする仮説であり，現在の自然科学ではもっとも広く受け入れられているものである。

化学進化説を最初に唱えたのはソ連の科学者オパーリンである。有機物の生成，蓄積を説明する実験や説としては，ユーリーとミラーによる実験に始まり，バーナルらによる表面代謝説や彗星からもたらされたとする説などがある。オパーリンの唱えた「化学進化説」ではその第一段階として「窒素誘導体の形成」が行なわれるという仮説がたてられていた。それを実験的に検証したのが 1953 年，シカゴ大学ハロルド・ユーリーの研究室に属していたスタンリー・ミラーの行なった「ユーリー・ミラーの実験」である[92]。これは，図 7-42 のように当時，原始地球の大気組成と考えられていたメタン，水素，アンモニアを無菌化したガラスチューブに入れ，水を熱した水蒸気でそれらのガスをガラスチューブ内で循環させ，水蒸気とガスが混合している部分で火花放電(60 kV)を行う。この処理を 1 週間続けることによってガラスチューブ内の水中でアミノ酸が生じるといった実験である。この 1 週間の間にはアルデヒド(CHO)や青酸(HCN)などが発生し，これらの分子が結合してアミノ酸の生成に寄与したと考えられている。ユーリー・ミラーの実験の応用として，放電や加熱以外にも紫外線や放射線などの様々なエネルギー源が試験され，その多くの実験が有機物の合成に肯定的な結果を示している。

しかし，ユーリー・ミラーの実験で用いられていた大気組成は当時考えられたものであり，現在はアポロ計画によって持ち帰られた月の石の解析結果から，地球誕生初期には隕石などの衝突熱によって地表はマグマの海とも言える状態にあり，原始大気組成は二酸化炭素，窒素，水蒸気と言った現在の火山ガスに近い酸化的なガスに満たされていたという説が有力になった。すなわち，還元的環境を前提としたユーリー・ミラーの実験は地球における有機物の誕生を直接そのまま再現したものとは言えないこととなっ

た。さらに，空気の組成として水素を無くし，メタンの代わりに二酸化炭素，アンモニアの代わりに窒素，そして水蒸気という組成にすると同様の実験では有機物が全く作れないという結果となった。このように二酸化炭素と窒素，水蒸気が大気の主成分を構成しているという説が有力であるため，現時点ではミラー型の化学進化説は可能性が低いとされている。しかし，これらの実験は高温の飽和水蒸気という特殊な条件下の実験であり，さらに気相中での反応を主として考えられている。そのため，低温下での液相と放電によって生成された活性種との反応が検証されていない。今回，低温プラズマを用いることにより，上記の検証が可能であり，また，前節までの結果から，二酸化炭素や酸素，窒素，水蒸気の低温プラズマと液体との様々な反応が見られている。そこで，これらの反応からアンモニアやメタン，水素が生成されれば，化学進化説の新たな問題を提起できるものと考えられる。

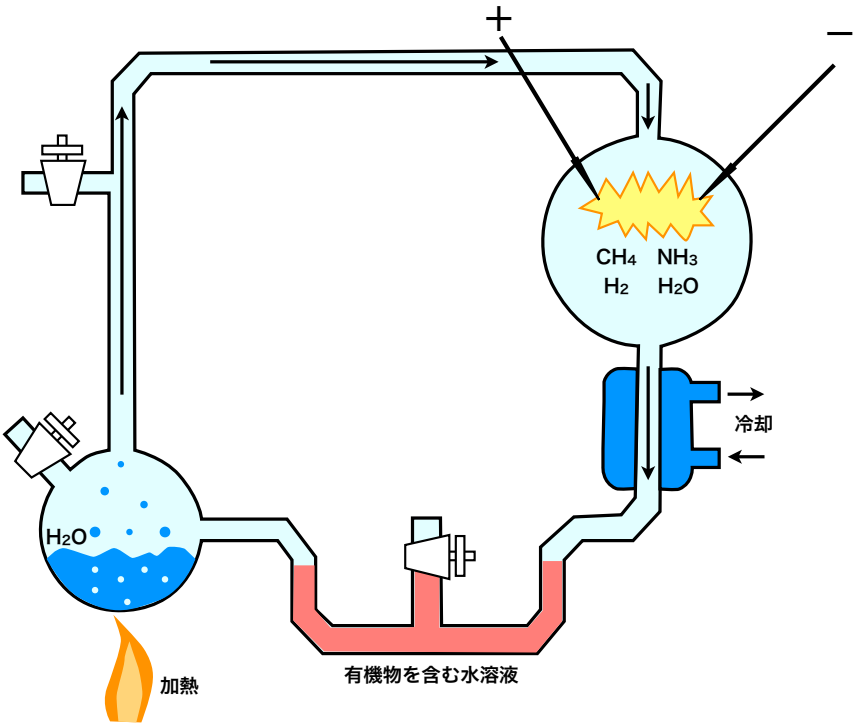


図 7-42 ユーリー・ミラーの実験の概念図

まず前節までの測定の結果，表 7-1 に示されるように，有機化合物の生成に必要な反応中間体となる窒素原子，酸素原子，炭素原子，一重項酸素，水素ラジカル，ヒドロキシルラジカル，一酸化窒素，二酸化窒素，オゾン，一酸化炭素，などの生成が確認されている。これらの化学種はアンモニアやメタン，青酸などの有機化合物を生成させる前駆体であり，有機物であるアミノ酸の生成を示唆している。

アンモニアに関しては 7.7 節で用いた吸光度法により測定することができる。水中にアンモニアが溶解しアンモニウムイオンとなると，ニトロプルシド塩の触媒の存在下で，次亜塩素酸イオン及びフェネートイオンと反応してインドフェノールブルーを形成し，図 7-43 に示されるように 690 nm の波長に吸光スペクトルを持つ。今回，濃度が既知のアンモニア(30%，和光純薬株式会社)を用い，アンモニア測定キット[TNT830, HACH]で検量線を作成して，10 分間窒素プラズマ処理を行なった精製水のアンモニア濃度を測定した。その結果，図 7-44 に示されるように，アンモニアが 0.62 ppm 生成されていることが明らかとなった。これは式(7･4)および(7･21)によって式(7･31)の反応を裏付ける結果となった。

同様に式(7･32)や式(7･6)から式(7･33)の反応へと導かれる可能性があり，これらの反応から水素やメタンの生成が確認されれば，ミラー型の化学進化説を支持する結果となり得る。

$$\mathrm{N} + 3\mathrm{H}\cdot \rightarrow \mathrm{NH_3} \qquad (7\cdot31)$$

$$2\mathrm{H}\cdot \rightarrow \mathrm{H_2} \qquad (7\cdot32)$$

$$\mathrm{C} + 4\mathrm{H}\cdot \rightarrow \mathrm{CH_4} \qquad (7\cdot33)$$

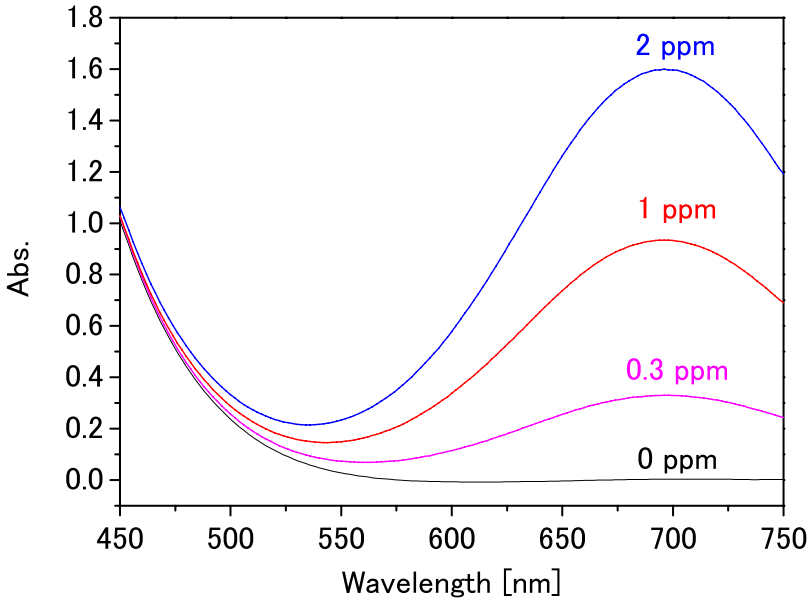


図 7-43 アンモニア測定キットによる吸光度測定

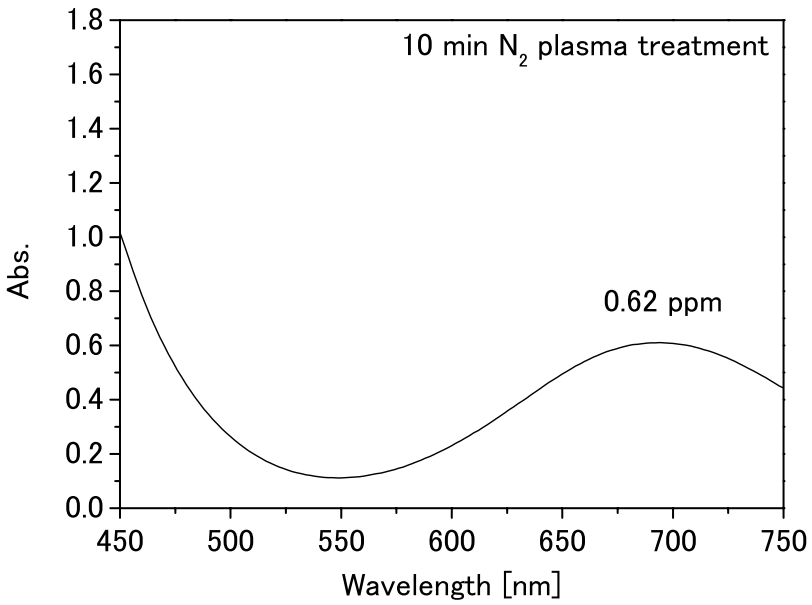


図 7-44 10 分間の窒素プラズマ処理によるアンモニアの生成

7.10 まとめ

本章ではプラズマによって生成される活性種を分光法を用いて気相中，液相中で同定及び定量測定を行なった。発光分光測定からはプラズマによるプロセスガスに由来するガス種の原子化が観測された。検知管を用いた実験では酸素及び窒素を組成に含むプラズマによって一酸化窒素，二酸化窒素が生成され，混合比が 50：50 のとき生成量はそれぞれ 150 ppm, 360 ppm となった。また，酸素を組成に含むプラズマではオゾンが生成され，アルゴンに対する酸素の混合率が 30%～40%の間でオゾン濃度が最大となり，その生成量は 470 ppm であった。紫外吸光法を用いた実験では，酸素原子の密度が測ることができ，アルゴンに対する酸素の混合率が 15%のとき 1.6×10^{16} cm^{-3} の密度で最大となった。液中で生成または捕捉された活性種は ESR を用いて測定することができ，一重項酸素，ヒドロキシラジカル，一酸化窒素が各ガス種のプラズマによって生成された。ガス種によって生成量が異なり，一重項酸素は二酸化炭素のプラズマによって最も多く生成され，その生成量は 92 μM であった。ヒドロキシラジカルについては窒素プラズマが単体のガスでは生成量が多く，その生成量は 130 μM であった。一酸化窒素の生成は窒素と空気を組成に持つプラズマで生成され，その生成量は 30 μM 以上であることが確認された。吸光分光法を用いた液中の活性種測定では過酸化水素，オゾン，硝酸イオン，亜硝酸イオンを測定することができ，最も多く生成したガス種として，過酸化水素は二酸化炭素プラズマで 528 μM 生成され，オゾンは酸素プラズマによって 64 μM 生成され，そして硝酸イオン，亜硝酸イオンは空気プラズマによってそれぞれ 1.1, 0.85 mM 生成された。また，水に対して 10 分間の窒素プラズマ照射によりアンモニアの生成も確認された。活性種の深さ方向に対する影響として，過酸化水素のプローブである蛍光試薬をゼラチンで固めた試料にプラズマ照射した結果，どのガス種のプラズマでも反応した深さは 1～3 mm 程度であった。以上の結果をまとめると各ガス種のプラズマで生成される活性種が異なり，図 7- 45 に示されるような生成過程を辿ると結論づけた。このように活性種をガス種によって選択的に生成することができるので，プラズマによる表面処理や殺菌メカニズムの解明，さらには生命の起源の解明へと展開できると考えられる。

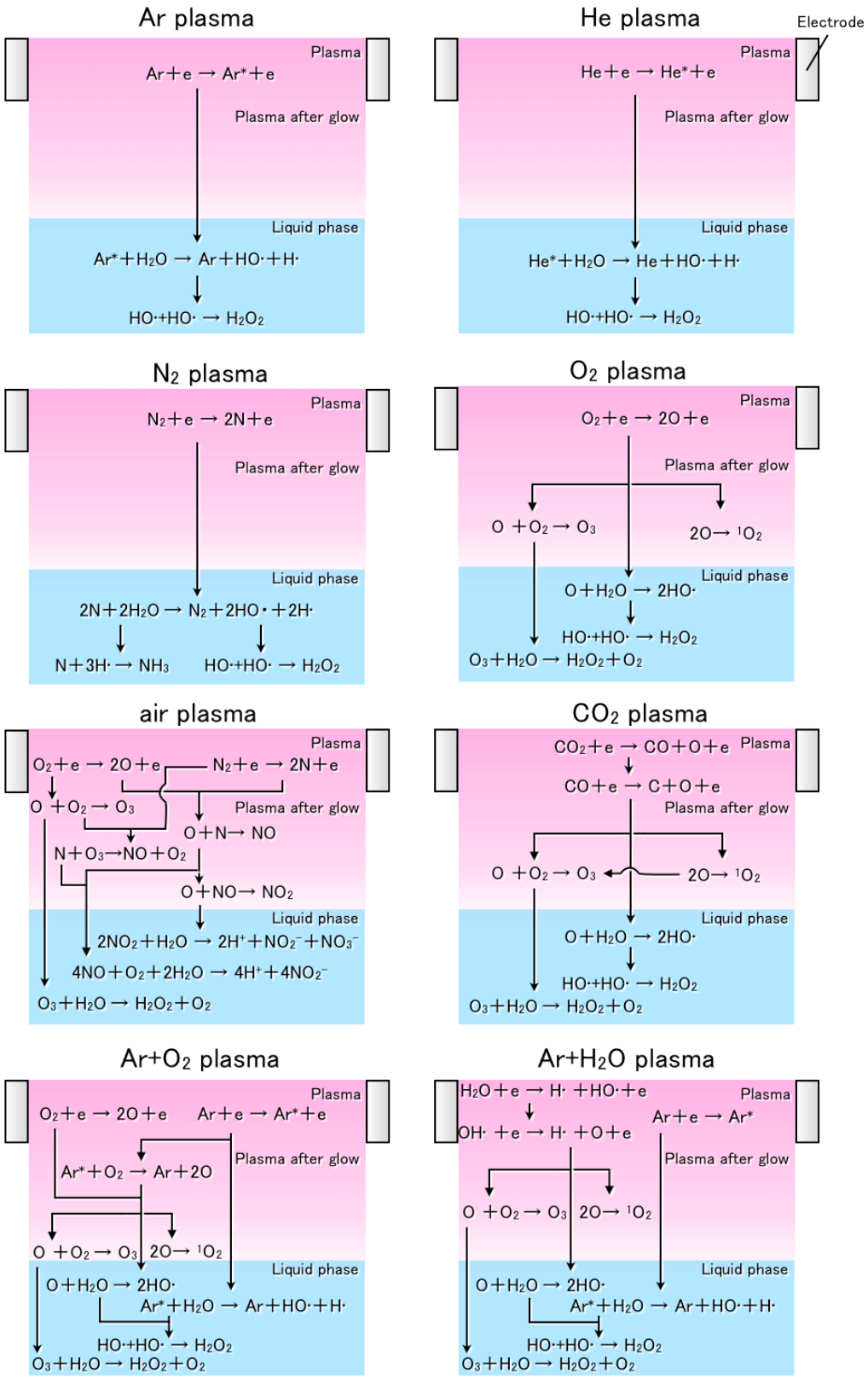


図 7- 45 各活性種の生成過程

[72] R. S. Mason, P. D. Miller, and I. P. Mortimer, Anomalous loss of ionization in argon-hydrogen plasma studied by fast flow glow discharge mass spectrometry, *Phys. Rev. E*, **55**(6); pp. 7462-7472 (1997)

[73] E. Karakas, M. Koklu and M. Laroussi, Correlation between helium mole fraction and plasma bullet propagation in low temperature plasma jets, *J. Phys. D*, **43**, 155202 (2010)

[74] S. Kongmany, H. Matsuura, M. Furuta, S. Okuda, K. Imamura and Y. Maeda, Plasma application for detoxification of Jatropha phorbol esters J. of Phys., **441,** 012006 (2013)

[75] V. Sharma, K. Hosoi, T. Mori and S. Kuroda, Electrical and Optical Characterization of Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet and the Effects of N_2 Gas on Argon Plasma Discharge, *Appl. Mechanics and Materials*, **268-270**; pp. 522-528 (2013)

[76] M. Li, G. H. Xu, Y. L. Tian, L. Chen and H F. Fu, Carbon Dioxide Reforming of Methane Using DC Corona Discharge Plasma Reaction, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 1687-1693, (2004).

[77] H. D. Hagstrum, Ionization by Electron Impact in CO, N_2, NO, and O_2, *Rev. Mod. Phys.*, **23**, pp. 185-203 (1951)

[78] 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_2 Plasmas, *Plasma Proc. Polym.*, **7**, pp. 846-865 (2010).

[79] K. Takechi and M. A. Lieberman, Effect of Ar addition to an O_2 plasma in an inductively coupled, traveling wave driven, large area plasma source: O_2/Ar mixture plasma modeling and photoresist etching, *J. Appl. Phys.*, **90**, pp. 3205-3211, (2001).

[80] M. Moravej, X. Yang, M. Barankin, J. Penelon, S. E. Babayan and R. F. Hicks, Properties of an atmospheric pressure radio-frequency argon and nitrogen plasma, *Plasma Sources Sci. Technol.*, **15** (2); pp. 204-210 (2006).

[81] J. M. Pouvesle, A. Bouchoule, and J. Stevefelt, Modeling of the charge transfer afterglow excited by intense electrical discharges in high pressure helium nitrogen mixtures, *J. Chem. Phys.*, **77**, 2, pp. 817-825 (1982).

[82] J. T. Herron and D. S. Green, Chemical Kinetics Database and Predictive Schemes for Nonthermal Humid Air Plasma Chemistry. Part II. Neutral Species Reactions, *Plasma Chem. and Plasma Proc.*, **21** (3); pp. 459-481, (2001).

[83] 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**, R25–R61 (2007).

[84] D. X. Liu, P. Bruggeman, F. Iza, M. Z. Rong and M. G. Kong, Global model of low-temperature atmospheric-pressure He + H_2O plasmas, *Plasma Sources Sci. Technol.*, **19**, 025018, (2010).

[85] N. Bibinov, N. Knake, H. Bahre, P. Awakowicz and V. S. Gathen, Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure μ-jet plasma source," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **44**, 345204 (2011)

[86] S. Iseki, H. Hashizume, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, T. Ohta, M. Ito, and M. Hori, Inactivation of Penicillium digitatum Spores by a High-Density Ground-State Atomic Oxygen-Radical Source Employing an Atmospheric-Pressure Plasma, Appl. Phys. Express, **4**, 116201 (2011)

[87] A. B. Shekhter, V. A. Serezhenkov, T. G. Rudenko, A. V. Pekshev, A. F. Vanin, Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds, Nitric Oxide, **12**, pp. 210-219 (2005)

[88] 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)

[89] 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**(1); pp. 119-125 (2013)

[90] R. W. Redmond and I. E. Kochevar Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen, *Photochem. and Photobio.*, **82**, pp. 1178-1186 (2006)

[91] A. Zhu ,R. Romero, H. R. Petty, Amplex UltraRed enhances the sensitivity of fluorimetric pyruvate detection, Analytical Biochemistry 403, pp. 123-125 (2010)

[92] S. L. Miler, A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions, *Science*, **117**, pp. 528-529, (1953).

第 8 章

結論

8.1　総括

本研究では, 様々なガスでプラズマを生成することができるマルチガスプラズマジェットを用いて, 様々なガス種のプラズマによる表面処理効果や各種細菌に対する不活化効果, 生体に対する照射効果及びプラズマから生成される活性種に関して詳細に調査した。以下に，第 3 章以降の各章で得られた主な成果をまとめる。

第 3 章「マルチガスプラズマジェットの基礎特性」では，様々なガス種をプラズマ化できるマルチガスプラズマジェットについて，プラズマ源の構造，導入した温度制御機構を示し，プラズマ源の基礎的な特性について記述した。このプラズマ源を用いて様々なガス種のプラズマを生成し，電圧，電流及び電力測定，紫外線量の測定，プラズマ照射による pH の変化の調査を行った。

第 4 章「各ガス種のプラズマによる表面処理」では，様々なガス種のプラズマによる各対象物に対する表面処理効果について述べた。まず，マルチガスプラズマによる表面親水化では無機材料から有機材料まであらゆる対象物を親水化することができた。なかでも，有機材料であるポリイミドフィルムに着目し，親水化効果を調査した。様々なガス種，混合率のプラズマで親水化効果を調べた結果，二酸化炭素プラズマ，10%酸素を混合したアルゴンやヘリウムプラズマが親水化効果高い親水化効果を示した。また，ATR 法によりポリイミドフィルムの表面分析した結果，カルボキシル基などの親水基のスペクトルの変化が確認されたため, 親水化の要因としてプラズマによる表面の官能基の変化が示唆された。さらに，親水化効果の持続性を調査した結果，処理後 3 日目まで接触角の急激な上昇が見られたが，処理後 7 日以降の接触角は安定し，親水化効果が持続することを明らかにした。ポリイミドフィルムの他に，細胞培養器材のセルデスクに対してプラズマを照射したところ親水化効果を示し，AFM による観察の結果，未処理の試料と比べて大きな形状の変化を確認した。プラズマ処理後のセルデスクにマウスの繊維芽細胞を培養したところ，細胞の接着性が低下し，スフェロイド状に細胞が変化した。これは器材表面の構造が変化したためと考えられる。

酸化膜に対するプラズマの還元処理では，水素混合アルゴンプラズマジェットを用いて，高温加熱処理によって作製した酸化銅板を還元処理することができた。XPS による表面分析では CuO (933.16 eV)のスペクトルの減少が確認され，さらに 3%水素混合アルゴンプラズマで処理した銅板表面では Cu_2O (215 cm^{-1})のラマンスペクトルの減少が確認された。還元処理の最適条件は，ガス流量 10 L/min，水素混合濃度 5 %，入力電力 140 W のときで，TEM によって銅板最表面の断面を観察した結果，酸化膜は 93 μm/s の速度で還元されることを明らかにした。これらの結果からバイオマテリアル等の材料分野で大気圧プラズマによる表面処理応用の可能性が示された。

第 5 章「各ガス種のプラズマによる微生物の不活化効果」では，マルチガスプラズマジェットを用いて，各種条件による大腸菌の殺菌，様々な細菌やウイルスの不活化，毒素の分解について述べた。まず，様々なガス種のプラズマで寒天培地上の大腸菌の殺菌効果を調査した結果，各ガス種のプラズマにおいて殺菌効果が認められ，アルゴンに酸素を混合したプラズマで高い殺菌効果が得られた。これらの殺菌効果のメカニズム解明を目的として，プラズマによる紫外線，温度による影響を調査したところ，プラズマによる殺菌効果の主要因でないことが明らかとなった。また，寒天培地上の様々な細菌や真菌に対する殺菌効果を定性的に調査したところ，菌種によって殺菌される範囲や処理時間が異なった。この殺菌効果を定量評価するために，様々な細菌，真菌の懸濁液に対してプラズマを照射し，液中殺菌を行った結果，窒素及び二酸化炭素のプラズマが高い殺菌効果を示した。さらに，様々な細菌に対して殺菌効果を調査したところ，耐性の高い菌種になるにつれて，二酸化炭素のプラズマで殺菌効果が見られなくなり，一方で窒素プラズマでは最も耐性の高い芽胞形成菌に対しても殺菌効果が得られた。これらのガス種のプラズマが殺菌効果を示すメカニズムを調査するために，活性種の消去剤を混合して，本来の殺菌効果と比較した。その結果，一重項酸素とヒドロキシラジカルの消去剤によって活性種の影響が消去され，一部の細菌に対する影響は，一重項酸素及びヒドロキシラジカルが双方とも寄与しているということが明らかになった。一方で，耐性の高い菌種では一重項酸素による殺菌効果よりも，ヒドロキシラジカルの方が殺菌効果に支配的であるということが明らかになった。この二酸化炭素と窒素プラズマで各種ウイルスの混濁液を処理した結果，ウイルスの不活化効果を示した。

さらに，芽胞形成菌を用いて乾燥条件下でプラズマによる殺菌効果を調査した。その結果，アルゴンプラズマ以外，どのガス種のプラズマでも殺菌が確認された。特に，アルゴンに二酸化炭素を添加したプラズマで高い殺菌効果が得られ，アルゴンに対する二

酸化炭素の混合比が 20%のときに最大の殺菌効果が見られた。また，乾燥条件下で *B.subtilis*（枯草菌），*G.stearothermophilus*，*A.niger*（黒カビ）の芽胞形成菌，真菌について，走査型電子顕微鏡を用いてプラズマ処理前後を観察したところ，菌の形状が変化していることが確認された。

そして，毒素に対するプラズマ処理では，テトロドトキシン(TTX)に対して各ガス種のプラズマを照射し，分解の度合いを調査した。その結果酸素，窒素プラズマによって高効率な TTX の分解が確認され 10 min で 1/100 まで濃度が減少した。

以上の結果から，マルチガスプラズマを用いてガス種を変更することによって，あらゆる場面で全ての種類の微生物の不活化及び毒素の分解ができ，バイオハザード等の除染や医療機器の滅菌等に応用できる可能性を示した。

第 6 章「各ガス種のプラズマによる生体への影響」では，子宮頸がん由来の HeLa 細胞，マウスの繊維芽細胞，角膜に対して，各ガス種のプラズマを照射し，プラズマが生体へ与える影響について述べた。 まず，HeLa 細胞に対するプラズマ照射では，どのガス種もプラズマ照射によって生存率の低下が見られた。しかし，照射距離を変化させると，どのガス種のプラズマも，12，30，50 mm と対象物との照射距離が長くなるほどプラズマ照射による生存率の低下が軽減された。これはプラズマガス温度が低下したためと考えられる。5 章では距離を遠ざけても殺菌効果が確認されているため，照射距離を制御することで生体への影響を無くし，殺菌だけの効果を及ぼすことができる可能性があることが明らかとなった。

温度制御したプラズマの照射効果に関して，培地の無いドライな条件では，温度を 20ºC に制御した各ガス種のプラズマで HeLa 細胞の生存率の低下が見られなかった。一方で培養液を介したプラズマの照射方法では温度によらず細胞の生存率の低下が認められた。これはプラズマによって液界面と反応し，液中に活性種を生成したためと考えられる。そこで，ヒドロキシラジカルを消去する捕捉剤である DMSO を用いて液中のヒドロキシラジカルを捕捉し，プラズマ照射効果の影響を調査したところ，DMSO を添加することで細胞の生存率の低下が軽減された。このことから，プラズマによって液界面でヒドロキシラジカルが生成され，この効果の要因となっていると結論づけた。

マウスの繊維芽細胞に対するプラズマ照射効果は HeLa 細胞のプラズマ照射のときと同様に培地の無い条件では温度を 20ºC に制御した各ガス種のプラズマで生存率の低下は見られなかった。しかし，窒素プラズマの照射は PBS を介して細胞の生存率を低下させた。この照射効果もプラズマ照射により，PBS の液中でも活性種が生成されたと考えられる。

窒素プラズマの HeLa 細胞に対する DNA の二本鎖切断について，免疫染色法を用いて調査したところ，DNA の二本鎖切断が観測され，その二本鎖切断の数から 16 mGy/s に相当することが明らかとなった。また，角膜に対する温度制御した各ガス種のプラズマ照射の影響に関して病理像を観察したところ，各ガス種ともプラズマによる角膜の損傷は見られなかった。このことから，プラズマの影響は細胞内か極表層の反応であると結論づけた。

以上の結果から，DNA の損傷も考慮しながら許容照射量を明らかにすれば，生体へ照射も可能であることが示された。

第 7 章「各ガス種のプラズマで生成される活性種」では，プラズマによって生成される気相中，液相中の各活性種を分光法により同定及び定量測定を行なった。発光分光測定からはプラズマによるプロセスガスに由来するガス種の原子化が観測された。検知管を用いた実験では酸素及び窒素を組成に含むプラズマによって一酸化窒素，二酸化窒素が生成され，混合比が 50 : 50 のとき生成量が最大となった。また，酸素を組成に含むプラズマではオゾンが生成され，アルゴンに対する酸素の混合率が 30%～40%の間でオゾン濃度が最大となり，その生成量は 470 ppm であった。紫外吸光法を用いた実験では，酸素原子の密度が測ることができ，アルゴンに対する酸素の混合率が 15%のとき 1.6×10^{16} cm^{-3} の密度で最大となった。液中で生成または捕捉された活性種は ESR を用いて測定することができ，一重項酸素，ヒドロキシラジカル，一酸化窒素が各ガス種のプラズマによって生成された。ガス種によって生成量が異なり，一重項酸素では二酸化炭素のプラズマが最も多く生成され，その生成量は 92 μM であった。ヒドロキシラジカルでは窒素プラズマが単体のガスでは生成量が多く，その生成量は 130 μM であった。一酸化窒素の生成は窒素と空気を組成に持つプラズマで生成され，その生成量は 30 μM 以上であることが確認された。吸光分光法を用いた液中の活性種測定では過酸化水素，オゾン，硝酸イオン，亜硝酸イオンを測定することができ，最も多く生成したガス種として，過酸化水素は二酸化炭素プラズマで 528 μM 生成され，オゾンは酸素プラズマによって 64 μM 生成され，そして硝酸イオン，亜硝酸イオンは空気プラズマによってそれぞれ 1.1，0.85 mM 生成された。さらに，10 分間の窒素プラズマ照射によりアンモニアの生成も確認された。このように活性種をガス種によって選択的に生成することができるので，プラズマによる表面処理や殺菌メカニズムの解明，さらには生命の起源の解明へと展開できると考えられる。

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。末尾になりましたが，みなさまに御礼を申し上げさせていただきます。

常に適切なご指導とご鞭撻を賜りました同専攻准教授　沖野晃俊先生に心より感謝申し上げます。修士で入学してから，実験で行き詰まったときなど，有益なアドバイスを数多くして頂いたほか，文章の修正等に昼夜休日を問わず多くの時間を割いて頂きました。本当にありがとうございました。沖野先生のもとで過ごした4年間は人生で最も濃い学生生活で，国内や国際学会における発表，さらには留学の機会も頂けたことで，たくさんのことを経験し，学び，大きく成長できたと実感しております。これまでに学び得た知識，知恵を今後社会に還元できるよう努めていきたいと思っております。

本論文を作成するにあたり，細胞関連実験の研究をご指導頂き，また審査教員として数多くの貴重なご助言をくださいました同専攻准教授　松本義久先生に心より感謝申し上げます。お忙しい中，研究室で長時間にわたって数々の実験をご指導頂いたり，示唆に富んだ有益なご助言を数多く頂きました。プラズマの細胞に対する影響をここまで調べられたのは先生のおかげです。ありがとうございました。

本論文の審査教員として数多くの貴重なご助言をくださいました同専攻教授　堀田栄喜先生に心より感謝申し上げます。お茶会などを開いて頂き，おいしいお土産と堀田研究室の皆様と共に，大変楽しい時間を過ごすことができました。また，自研究室で殺菌実験を立ち上げる際，ご相談に乗って頂きありがとうございました。おかげさまで多様な殺菌実験を行なえるようになりました。

プラズマの活性種測定において多大なご助力を頂き，また本論文の審査教員として数多くの貴重なご助言をくださいました生物プロセス専攻特任教授　河野雅弘先生に心より感謝申し上げます。先生から教えて頂いた ESR のノウハウは，今まで不可能であったプラズマの特性調査において大きなブレイクスルーになりました。また，実験結果についてのディスカッションでは数多くのご助言を頂き，大変勉強になりました。

本論文の審査教員として数多くの貴重なご助言をくださいました鳥取大学農学部附属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。獣医学的見地から様々な生物学の知識を教えて頂き，大変勉強になりました。また，お忙しい中実験以外に関しても相談に乗ってくださったり，お食事に誘ってくださったりと，いろいろ面倒を見て頂きありがとうござい

ました。これからも医学的知識を吸収して，医工を担う人材として社会に貢献できるよう精進していきたいと思っています。

本論文執筆にあたり，同専攻准教授 赤塚洋先生に審査員を担当して頂き，有益かつ的確なご助言を頂きましたことに厚くお礼申し上げます。

細菌，ウイルスの実験において多大なご助力を頂いた，生物プロセス専攻特任准教授 岩澤篤郎先生に心より感謝申し上げます。毎週のように実験に付き添って頂き，多種多様な細菌，ウイルスの取り扱いを教えて頂きました。おかげさまで，自研究室だけでは確実に得られなかったであろう，微生物学における数多くの知見を得ることができました。

生物プロセス専攻特任講師 松村有里子先生に心より感謝申し上げます。ESR 測定において数々のご指導を承り，また，豊富な化学的知識から ESR 以外にも数多くの活性種測定をご助力頂きました。

複合創造領域の支援のもと，私は 2012 年 7 月にドイツのマックスプランク宇宙物理学研究所，2013 年 1 月から 3 月までアメリカの Drexel University へ研修に行かせて頂きました。この場を借りて複合創造領域の先生およびスタッフの方にお礼申し上げます。

一ヶ月間の研修を受け入れてくださった Max-Plank 地球外物理学研究所 Satoshi Shimizu 博士に心より感謝申し上げます。研究所内の様々な場所を案内してくださっただけでなく，唯一プラズマを用いた臨床応用を行なっている病院も紹介してくださり，治療現場を見学することができました。

三ヶ月間の留学を受け入れてくださった Drexel University の Alexander Fridman 教授および主な研究指導をして頂いた Gregory Fridman 博士に心より感謝申し上げます。アメリカでの研究生活は刺激的な毎日で数多くの高額な装置を扱わせて頂きました。また，週一回のディスカッションでは数多くのご助言を頂き，大変勉強になりました。

名古屋大学電子情報システム専攻特任教授 石川健治先生に心より感謝申し上げます。先生のご助力により，気相中のラジカルについて測定することができました。ありがとうございます。

バイオ研究基盤支援総合センター 関禎子さんに心より感謝申し上げます。AFM測定において大変勉強になりました。また，シンポジウムにおいても沖野研究室の研究を紹介して頂きありがとうございました。

同専攻特任助教 宮原秀一先生に心より感謝申し上げます。宮原さんの実験手法および考え方は大胆ですがどれも本質をつかんでいて，どんなに困難な実験でも宮原さんに相談すれば解決できると思わせるほど凄かったです。そして，いつか真似できるようになりたいと思っています。また，プライベートでは，おいしいものをごちそうして頂いたり，研究室のみんなでお家にお邪魔させて頂いたり，大変お世話になりました。

沖野研究室卒業生 佐々木良太博士に心から感謝申し上げます。佐々木さんの発表や話し方には説得力があり，大変頼もしい先輩で，いつも相談に乗って頂いたり，学会の要旨やポスターなども見て頂いたりと大変お世話になりました。また，私が直属の後輩だったということも

あり，様々な実験に関わらせて頂き，何もわからなかった私にわかりやすく研究のいろはをたくさん教えてくださいました。今，私が自信を持って後輩に実験のアドバイスができるのも全て佐々木さんのおかげだと思います。

沖野研究室卒業生(現在，産業技術総合研究所所属) 重田香織博士に心から感謝申し上げます。余裕を持って優雅に実験をなさる姿を見て，重田さんを手本にして実験をしたいと常々思っていました。卒業後も，プライベートでは飲みに連れて行って頂いたり，楽しいお話をたくさん聞かせて頂いたりと，挙げればきりがないほどお世話になりました。

沖野研究室卒業生（現在，Agilent Technologies, Inc. 所属）永田洋一博士に心から感謝申し上げます。永田さんとは席が隣同士ということもあって，研究に行き詰まった際に，たくさん質問を投げかけてしまいました。しかし，何でもご存知の永田さんは，他分野でもしっかりと答えが返ってきて，大変勉強になりました。また，卒業後も，お食事に誘って頂いたり，いろいろと興味深い話を聞かせて頂いたりと大変お世話になりました。

沖野研究室博士課程 3 年 岩井貴弘氏に心から感謝申し上げます。入学は岩井さんの方が1年先輩でしたが，同年度に卒業する博士課程の学生として力を合わせて研究室を盛り上げてこられたことが大変誇らしく思います。また，プラズマに関して多大な知識を持っておられるため，教科書を開いてもわからなかったことは岩井さんに教えて頂き，私の研究生活において大変お世話になりました。

沖野研究室修士課程修了（現在 三菱電機株式会社所属）平位英之氏に心より感謝申し上げます。いつも夜遅くまで研究室に残り，実験に対して誠実に取り組む平井さんを見て，大変感銘を受けました。また私の実験と深くかかわり合いがあり，何度も深夜まで実験につき合わせてしまいました。ですが，あのころの経験があるからこそ本論文を完成させることができたと思います。

沖野研究室修士課程修了（現在，日本テキサス・インスツルメンツ株式会社所属）田村利幸氏に心より感謝申し上げます。スマートに仕事をこなし，発表練習の際も危なげなくこなす田村さんの姿を見て，大変優秀な先輩だと感じました。あまり研究ではご一緒することはありませんでしたが，そんな中でも絶えず気にかけて頂き，大変助かりました。

沖野研究室修士課程修了（現在，株式会社日立製作所所属）高橋勇一郎氏に心より感謝申し上げます。高橋さんは独特な雰囲気を醸し出しながらも，研究に関しては自分で決めたことを貫き通す姿勢はとても格好良く見えました。また，博士論文発表会の準備で皆忙しかった時期に分光器の使い方を教えて頂き，ありがとうございました。

沖野研究室博士課程 3 年 鏑木結貴女史に心から感謝いたします。鏑木さんはいつも元気がよく，研究室の雰囲気を良くしてくださる方です。学会の費用などの事務的な雑用も一手に引き受けてくださり，研究室生活を円滑に過ごす事ができました。ありがとうございます。

沖野研究室卒業生(現在，株式会社ブリジストン所属)根岸祐多氏に心から感謝いたします。根岸君は，書類の締め切りなど大事な情報を教えてくださいました。重要事項を忘れがちな私は大変助かりました。また，買い出しや外食などにも車で連れて行って頂き，味気ない学食の

毎日に，至福のひとときを与えて下さいました。

沖野研究室卒業生(現在，パナソニック株式会社所属)柴田萌女史に心から感謝いたします。柴田さんはしっかりと自分を持っておられ，議論になった際には積極的に意見を出して下さりました。また，留学経験があることから英語が堪能で，国際会議の要旨提出の際には非常にお世話になりました。英語が不得意な私に夜遅くまで親身に手伝って頂きました。ありがとうございました。

沖野研究室博士課程 2 年 大下貴也氏に心から感謝いたします。大下君が後輩の面倒を見てくれたり，陰ながら研究室を支えてくれたおかげで，いろいろなシンポジウムや学会の参加，様々な研究室との共同研究など大立ち回りすることができました。かなり自分勝手に動いていましたが，大下君が来年度もいるので，医療応用班を安心して任せられると思っています。

沖野研究室卒業生(現在，横河電気株式会社所属)鈴木雄太氏に心から感謝いたします。鈴木君は入学してからすぐに国際会議に出るなど，将来有望な人材だと思いました。また，隣の席だったため，いろいろ質問してしまったり，邪魔をしてしまったりしたことも多々あったと思います。その他分光計測や先輩の実験の対応などいろいろありがとうございました。

沖野研究室卒業生(現在，株式会社サイバーエイジェント所属)高妻智一氏に心から感謝いたします。学会に行く度に数々の業績を挙げ，研究室に貢献する高妻君がとても頼もしく見えました。そんな頼りになる後輩に研究室の雑用など数多く押し付けてしまいましたが，滞り無く遂行してくれて助かりました。

沖野研究室卒業生 鍋野幸大氏に心から感謝いたします。面白おかしい造語の数々で研究室を楽しませてくれました。また，アルバイト先での飲み会はとても楽しかったです。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 上原広大氏に心から感謝いたします。上原君とは毎週のように，一緒に早朝から次の日の朝まで実験を行なっている気がします。実験内容も活性種測定から細菌，ウイルス，細胞に対する影響調査まであらゆる分野に携わってくれて，大量の実験結果が得られました。これは上原君の研究に対する飽くなき好奇心とまじめに取り組む姿勢の賜物だと思います。本当にありがとうございました。社会に出てもきっと重宝されると思いますので，就職先でも攻めの姿勢で，若くして周りから一目置かれる存在になっていることを期待しています。

沖野研究室修士課程 2 年 川手彬嗣氏に心から感謝いたします。入学してから数多くの殺菌実験を手伝って頂きました。それにもかかわらず，研究の傍ら TABIPPO の幹部までこなす姿に感心しています。近いうちに必ず世界一周を達成してきて欲しいと思っています。

沖野研究室修士課程 2 年 奥村健祐氏に心から感謝いたします。奥村君とは電子部品を買いに秋葉原まで一緒に行ったり，趣味も合っていたので研究の息抜きに映画を見に行ったり，といろいろお世話になりました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 尾崎健氏に心から感謝いたします。同じ分野を研究する先輩が

いない中，企業との共同研究をしっかりこなす姿を見て感心していました。尾崎君はお調子者なところもありましたが，飲み会のときには率先して盛り上げて頂き，大変楽しかったです。

沖野研究室修士課程 2 年　野村亮仁氏に心から感謝いたします。野村君は率先してドロップレット分析の分野を進めて，数多くの業績を挙げる姿に感心していました。席が隣ということもあって様々な情報交換も行うことができ，他分野の知識も得られる貴重な時間となりました。

沖野研究室修士課程 1 年　佐々木洋太氏に心から感謝いたします。佐々木君には入学早々から毎度，いろいろな実験補助をして頂きました。早いうちにこれだけ経験が積める事もそうそうないので，来年度どれだけ成長しているかと考えると，とても楽しみです。

沖野研究室修士課程 1 年　渡辺洋輔氏に心から感謝いたします。渡辺君も入学早々から実験の補助をして頂きました。教えたことの飲み込みが早く，企業との共同研究ではすぐにそつなくこなせるようになり，非常に手のかからない後輩で大変助かりました。

沖野研究室修士課程 1 年　掛川賢氏に心から感謝いたします。入学してからすぐに博士課程に進学することを決意し，研究に没頭する掛川君を隣の席から見て，凄い学生が入ってきたなと思いました。それと同時に自分も頑張らなければという気持ちにもなりました。

沖野研究室修士課程 1 年　宇都宮嘉孝氏に心から感謝いたします。掛川君と同様に，宇都宮君の夜遅くまで実験に勤しむ姿を見て，自分も頑張らなければという気持ちになりました。また，バイクの後ろに乗せてもらい，晩ご飯を食べに行ったりといろいろお世話になりました。

沖野研究室修士課程 1 年　石原由紀子女史に心から感謝いたします。入学早々からドロップレット分析のエネルギッシュな先輩達に振り落とされないよう頑張る石原さんを陰ながら応援していました。また，細胞関連の実験では物品などいろいろ調べてくださり大変助かりました。

沖野研究室秘書　井筒優子さんに心より感謝申し上げます。いつも書類を丁寧にチェックして頂き，また，おいしいお菓子を頂き，ありがとうございました。

堀田・藤井・肖研究室秘書　岡真美恵さんに心より感謝申し上げます。資料室の整理やお茶の準備など，研究生活をサポートして頂きありがとうございました。

創造エネルギー専攻事務　平山洋子さんに心より感謝申し上げます。RA の書類を提出する際，毎回丁寧にチェックして頂きありがとうございました。おかげでなんとか滞りなく書類を提出することができました。

文末となりましたが，幼いころから現在まで私の長い学生時代をさまざまな面から支えてくださいました，祖母，父，母に深く感謝いたします。

また，研究生活を支えてくださいましたすべての方々に，厚く御礼申しあげます。4 年間大変お世話になりました。

2013 年 12 月

髙松　利寛