

大気圧マイクロ波励起プラズマを用いた
癌細胞選択的抗腫瘍効果に関する研究

高橋 洋平

名古屋大学 工学研究科

2018

目次

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.1.1 非平衡大気圧プラズマ	1
1.1.2 大気圧プラズマによる効果	4
1.1.3 大気圧プラズマのバイオ・医療分野への応用	5
1.2 プラズマ癌治療	10
1.2.1 現在の癌治療法	10
1.2.2 癌細胞への大気圧プラズマの直接照射	12
1.2.3 大気圧プラズマの間接照射による癌治療	13
1.3 マイクロ波励起プラズマの間接照射による癌細胞死滅効果	14
1.3.1 癌治療を目的として研究されているプラズマ源	14
1.3.2 マイクロ波励起プラズマの特徴と期待される効果	14
1.4 本研究の目的	15
1.5 本論文の構成	15
参考文献	17
第2章 マイクロ波励起プラズマの生成と評価方法	22
2.1 プラズマ生成の基礎	22
2.2 マイクロ波励起プラズマの生成と装置構成	25
2.2.1 マイクロ波励起プラズマの生成	25
2.2.2 本研究で用いたマイクロ波励起プラズマの構成	27
2.3 60Hz 非平衡大気圧プラズマ	30
2.4 ジェット型パルスストリーマ放電	32

2.5	発光分光法.....	33
2.5.1	発光分光法の原理.....	33
2.5.2	H β のシュタルク拡がりを用いた電子密度の計測.....	33
2.6	N $_2$ 2nd Positive System の発光スペクトルを用いたガス温度計測.....	37
2.7	レーザー誘起蛍光法による OH ラジカル密度の計測.....	38
2.8	マイクロ波励起プラズマの細胞培養液への照射方法.....	42
2.9	細胞の継代培養と生存率測定.....	44
2.9.1	継代培養.....	44
2.9.2	細胞生存率.....	45
2.10	化学プローブを用いた比色計測.....	49
2.10.1	過酸化水素の定量.....	49
2.10.2	亜硝酸イオンの定量.....	50
2.11	電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance, ESR).....	52
2.12	液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS).....	54
2.13	核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).....	56
	参考文献.....	58
第 3 章 マイクロ波励起プラズマの診断.....		60
3.1	背景.....	60
3.2	発光分光法.....	60
3.2.1	実験方法.....	60
3.2.2	発光種の同定.....	62
3.2.3	マイクロ波励起プラズマの電子密度.....	68
3.2.4	マイクロ波励起プラズマのガス回転温度.....	69
3.3	レーザー誘起蛍光法 (Laser Induced Fluorescence, LIF).....	71

3.3.1	実験方法.....	71
3.3.2	OH ラジカルの絶対密度.....	74
3.3.3	LIF 法による OH ラジカルの LIF 強度分布.....	76
3.4	結論.....	78
	参考文献.....	80
第 4 章	マイクロ波励起プラズマを照射した培養液の細胞殺傷効果.....	82
4.1	背景.....	82
4.2	マイクロ波励起プラズマで作製したプラズマ活性培養液(PAM)による HeLa 細胞の生存率評価.....	83
4.2.1	マイクロ波励起プラズマ照射距離の HeLa 細胞生存率への影響.....	83
4.2.2	マイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマで作製した PAM による HeLa 細胞生存率の比較.....	86
4.3	マイクロ波励起プラズマで作製した PAM による 正常細胞の生存率への影響.....	88
4.4	結論.....	90
	参考文献.....	91
第 5 章	マイクロ波励起プラズマを照射した培養液中の活性種の定量.....	92
5.1	背景.....	92
5.2	ESR スピントラップ法による OH ラジカル生成量.....	93
5.3	過酸化水素(H ₂ O ₂)の生成.....	98
5.4	亜硝酸イオン(NO ₂ ⁻)の生成.....	99
5.5	PAM 中の H ₂ O ₂ と NO ₂ ⁻ の濃度と HeLa 細胞生存率の関係.....	101
5.6	H ₂ O ₂ と NO ₂ ⁻ の相乗効果と PAM の比較.....	104
5.7	結論.....	107

参考文献.....	109
第 6 章 マイクロ波励起プラズマ照射による培養液成分の変化.....	111
6.1 背景.....	111
6.2 実験方法.....	114
6.2.1 細胞培養液へのマイクロ波励起プラズマの照射.....	114
6.2.2 LC-MS/MS の測定方法および条件.....	115
6.2.3 ¹ H-NMR の試料調製法および測定方法・条件.....	116
6.3 実験結果および考察.....	117
6.3.1 LC-MS/MS	117
6.3.2 ¹ H-NMR	122
6.3.3 メチオニンの減少およびメチオニンスルホキンド増加の HeLa 細胞生存率への影響.....	130
6.4 マイクロ波励起プラズマ照射によるメチオニンの酸化	133
6.5 結論.....	135
参考文献.....	136
第 7 章 プラズマによる細胞生存率への系統的な考察.....	138
7.1 背景.....	138
7.2 ジェット型パルスストリーマ放電の気相診断.....	139
7.3 ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度およびガス回転温度.....	142
7.3.1 ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度.....	142
7.3.2 ジェット型パルスストリーマ放電のガス回転温度.....	143
7.4 ジェット型パルスストリーマ放電による PAM 中 H ₂ O ₂ と NO ₂ ⁻ 濃度.....	144
7.5 ジェット型パルスストリーマ放電の照射によって作製した PAM の HeLa 細胞生存率.....	146

7.6 結論.....	148
参考文献.....	150
第8章 結論.....	151
8.1 本研究のまとめと成果.....	151
8.2 将来展望.....	155
謝辞.....	157
研究業績.....	159

第 1 章

序論

1.1 研究の背景

1.1.1 非平衡大気圧プラズマ

近年、非平衡大気圧プラズマの研究が盛んに行われている。高価で有効面積が限られている真空チャンバーを必要とする低圧プラズマと比較すると、大気圧プラズマ処理は安価で簡便であり、熱処理による効果によって性能が向上するような用途、例えば微粒子合成^[1-4]や表面処理^[5-7]などへの応用開発が行われている。また、近年、大気圧下において電子温度が高いにも関わらず、ガス温度が低いという特徴を有する大気圧非平衡プラズマは殺菌^[8-10]や健康医療分野^[11-13]への応用も期待されており、研究が拡がりつつある。

非平衡大気圧プラズマの生成について記述する。^[14] 大気圧では、多数の粒子衝突周波数が増加し、衝突によってガス温度が上昇し、電子の温度と等しくなる「熱平衡プラズマ」になりやすい。熱平衡プラズマではガス温度は 6000K 程度まで上昇する。非平衡大気圧プラズマを生成するためには、このガス温度を電子の温度よりも低くして、非平衡状態を実現するかが大きな鍵となる。大気圧でガス温度が上昇するのは、プラズマ生成のために投入された電気エネルギーが効率的に消費されて、熱的緩和によって熱が発生するためである。大気圧では、粒子間の衝突が頻繁に生じ、その際に発生する熱的緩和によってガス温度が上昇する。発生した熱は系から空間的・時間的に緩和され消えていくので、プラズマ源を覆う周囲の壁や大気への空間的に熱を移動さ

せるプロセスとみなすことができる。一方、プラズマ中で電子衝突によって電子のエネルギーが運動量移行によって加熱され、ガス温度を上げると近似すれば、時間的加熱 \propto 電子質量 \div ガス質量 \div 電子密度に従うと見なせる。加熱されたガスは、衝突緩和時間で緩和されるつまり、時間的に冷却が進む。したがって、加熱と冷却の比を調節することによって非平衡大気圧プラズマを実現することができる。

ガス温度の上昇が起こらないように工夫した非平衡大気圧プラズマ源が多く開発されている(図 1.1)。大気圧下で熱平衡プラズマであるアークプラズマでは、電気エネルギーが過剰に入ってガス温度が上昇し、熱電子の効果によって熱プラズマとなるが、電力投入を短時間パルスとすることでガス温度の上昇を防ぎ、非平衡大気圧プラズマを実現することができる。また、ガス流によって冷却することも有効である。また、アーク移行を防ぐために、誘電体を電極の間に挟んで放電させると、誘電体に蓄積されたチャージによって、プラズマ生成のための電界が打ち消され、放電が停止する。この放電の生成と停止によってプラズマをパルスの的に発生させることができる(誘電体バリア放電)。このバリア放電では、大気圧 He 下で、パルスのな電圧印加を起こすことによつて、ガス温度が過度に上昇することを抑制し、ストリーマ放電を実現することができる。

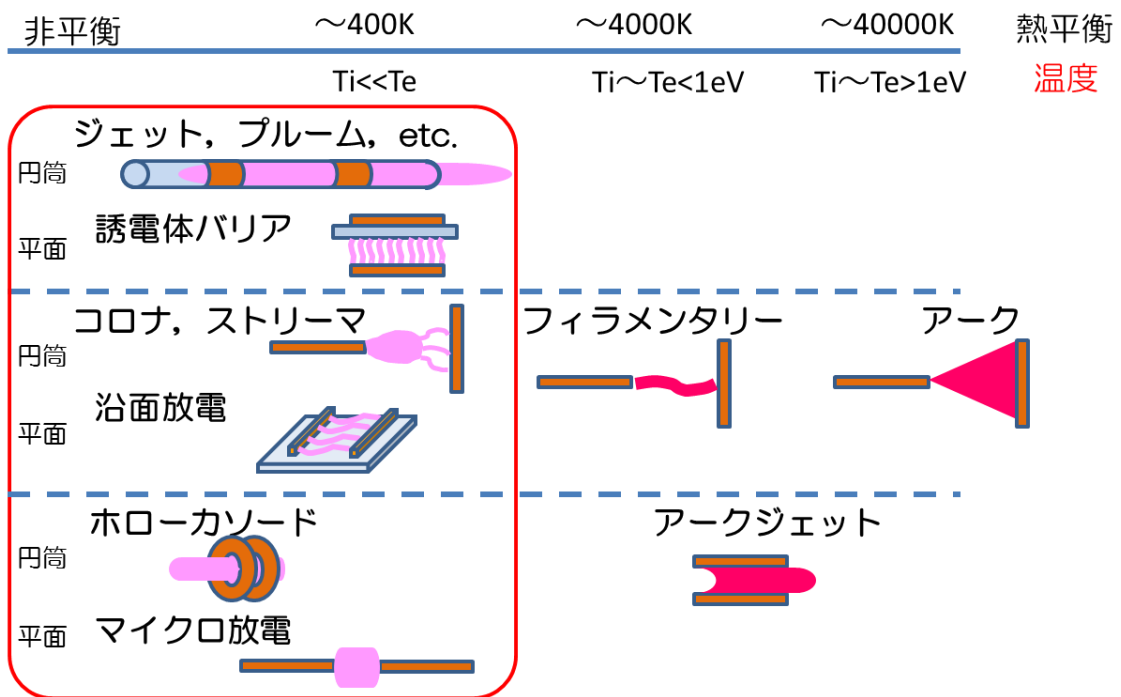


図 1.1 各種大気圧非平衡プラズマ源。^[14]

1.1.2 大気圧プラズマによる効果

大気圧プラズマによってさまざまな活性種が生成することが知られている。これは、電子密度が高いことに起因する。活性種の多くは、大量のガス流量やパルス電源を用いることによってもたらされる。さらに、分子や原子が解離する。また、励起と脱励起は、さまざまな波長の発光を生じる。とくに紫外/深紫外領域の波長の光はプラズマによる生成が得意な波長域であり、つまり高いエネルギーを有する光を放射している。電子のエネルギーによって原子や分子が励起、イオン化、解離などを引き起こし、活性種となる。

活性種にはオゾン (O_3)、過酸化水素 (H_2O_2)、窒化酸素 (NO_x) などがあり、プラズマによって生成する活性種の代表で、活性酸素窒素種 (Reactive Oxygen Nitrogen Species, RONS) でもある。これらは反応性が非常に高いため、表面処理や微粒子合成などへの応用が可能となる。

1.1.3 大気圧プラズマのバイオ・医療分野への応用

大気圧プラズマの応用分野はバイオ・医療への応用は特に盛んに行われている。大気圧プラズマのバイオ・医療分野への作用方法は、図 1.2 に示すように直接照射と間接照射の 2 つが挙げられる。直接照射は被照射エリアが明確であり、かつアクセスが容易な用途向けの場合に用いられる。逆に間接照射は被照射エリアが明確に特定できない場合や被照射物全体にその効果を及ぼしたいような用途に適している。

直接照射による医療応用はプラズマによる止血技術や創傷治癒などが挙げられる。まず、止血技術は外科手術において重要な技術であり、滲み出るような出血に対して行われているのは、高周波電気凝固装置やアルゴンプラズマ凝固装置などが用いられている。これは、焼灼止血と呼ばれ、出血点に熱を加えて血管を焼くことによって止血がなされる。しかし、熱による組織の損傷によって術後には障害の原因になることが知られており、よりマイルドな止血方法が求められている。このマイルド止血のために開発が続けられているのが大気圧プラズマジェットを用いた方法であり、He ガスを用いた方が Ar ガスを用いた場合よりも、血液の凝固が促進されることが報告されている(図 1.3)。^[15] この効果は、大気圧プラズマから生成した活性種が血液中の凝固因子の反応を促進することによるものであると考えられている。

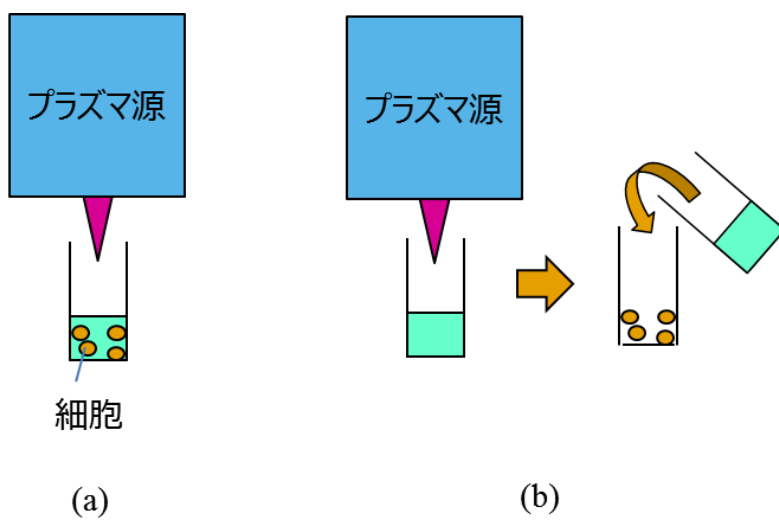


図 1.2 大気圧プラズマを作用させる方法。

(a) 直接照射 (b) 間接照射

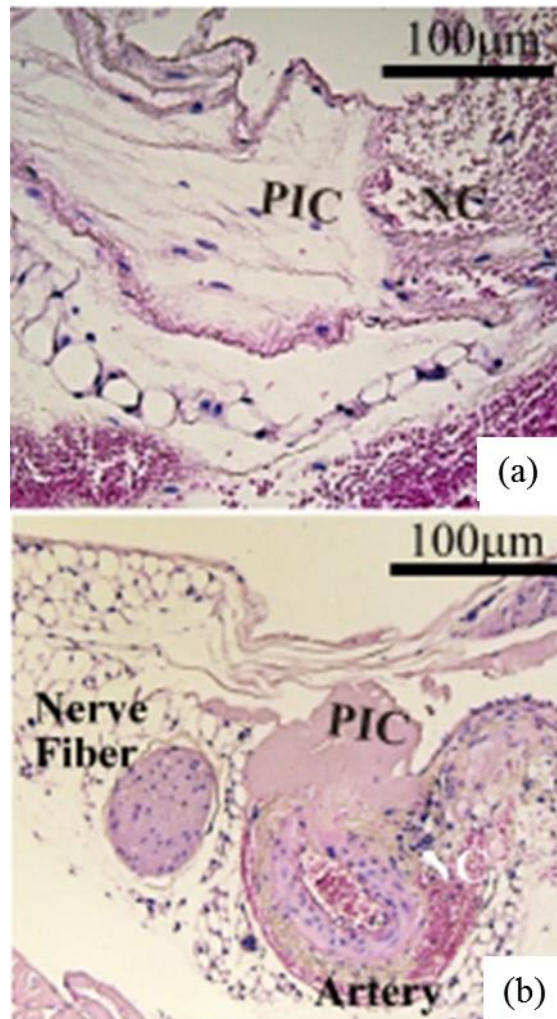


図 1.3 凝固血液の組織学的解析。^[16]

(PIC:大気圧プラズマによる凝固領域、NC:自然凝固領域)

(a)強拡大で観察したエオジン好性の線維性膜様構造物の組織像。

自然に凝固した領域(NC)では、赤血球の形態を確認できる。

(b)アルゴンを使用した際の PIC。

エオジン好性の無構造な凝固物を認める。

また、創傷治癒は、ドイツですでに実用化が進んでいる。マックスプランク研究所で開発された MicroPlaSter β®はマイクロ波電源を用いたプラズマトーチである(図 1.4)。6つの電極を備えており、プラズマから生成する活性種をガス流れによって患部まで運び、バクテリアなどの菌を死滅させることで感染を防ぎ、治癒効果を高めることができる(図 1.5)と報告している。^[17]



図 1.4 MicroPlaSter β®。^[17]

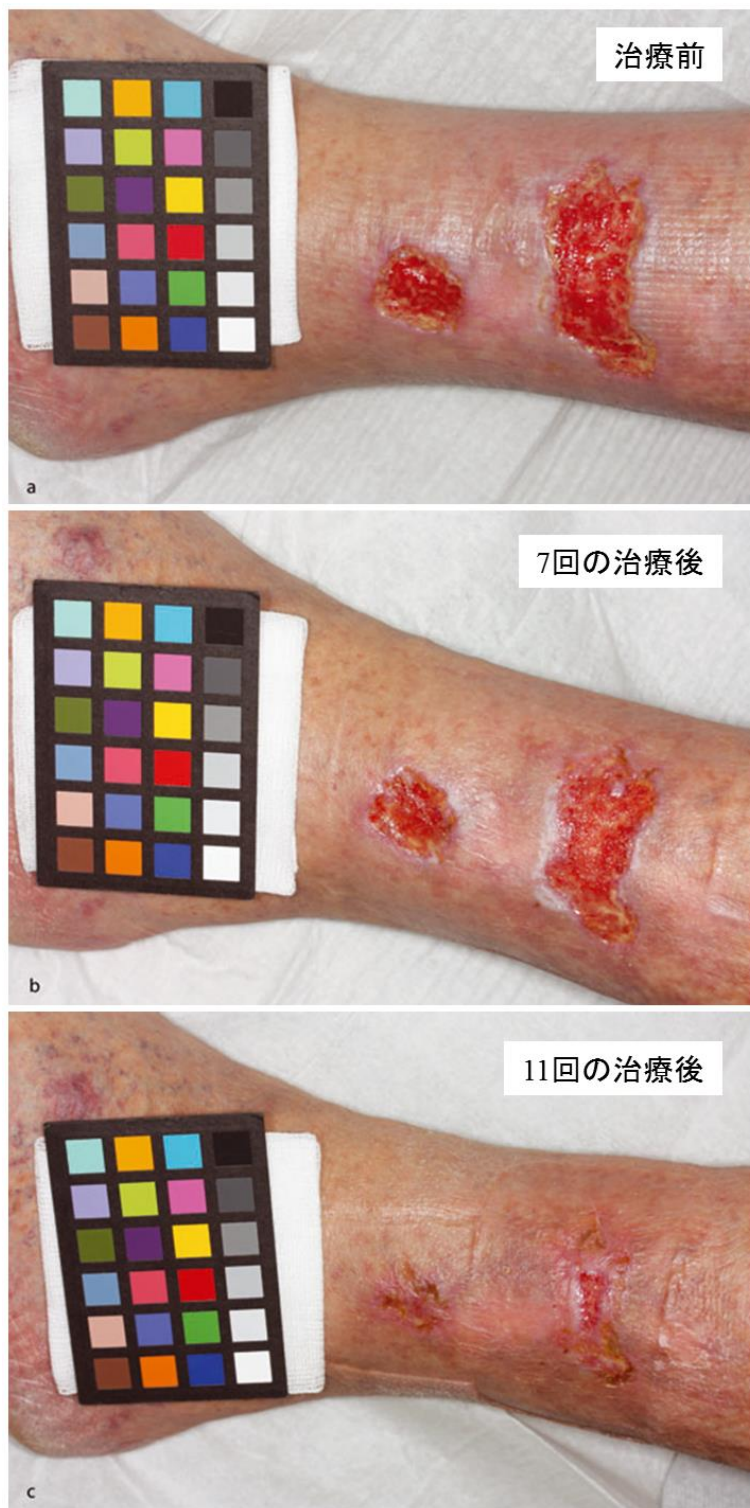


図 1.5 MicroPlaSter β^{\circledR} による創傷治癒効果。^[17]

1回の処置は2分間の照射を行った。

1.2 プラズマ癌治療

1.2.1 現在の癌治療法

現在の日本は高齢化社会を迎えており、医療への関心が高まっている。中でも疾患による死因に占める悪性新生物(癌)の割合は年々高まっており(図 1.6)、^[18] 癌治療への国民の期待も同時に高まっている。

癌の治療法には大きく分けて、手術(外科的治療)、抗癌剤などの薬物治療、放射線治療の3つが挙げられる。

外科的治療は、癌が存在する部位を直接臓器から取り除くことで根治を目指す治療法である。最も効果的な治療法であり、早期に発見された癌には非常に有効であり、3つの治療法の中では根治の可能性が最も高い。しかし、高齢者は手術によるリスクも考慮しなくてはならず、さらに転移性の癌であった場合は根治が難しくなる。また、切除部位が大きくなると、体の機能を失ってしまい生活の質(Quality of life, QOL)の低下を招いてしまうことも課題として挙げられる。^[19]

抗癌剤は、癌細胞のDNAを攻撃し、癌細胞を死滅させる薬物治療である。抗癌剤は全身をめぐりながら癌細胞を攻撃する。抗癌剤による癌細胞の縮小効果が癌細胞の増殖速度よりも早ければ効果的であると言え、手術で除去しきれなかった微小な癌細胞を消失させることができる。しかし、抗癌剤は正常細胞にも作用することから強烈的な副作用がしばしば見られる。また、癌細胞の性質により有用な抗癌剤は異なっており、適切な抗癌剤の選択が不可欠というリスクも挙げられる。

放射線治療は、局所的な癌細胞を死滅させるのに役立つが、過剰照射による副作用が考えられ、さらに1回に照射できる放射線量が制限されているため、何度も照射しなくてはならない。

このように、満足のいく万能な癌治療法は未だ存在しないのが現状であり、より効果的な癌治療法が求められている。または、治療目的別により効果的な方法が実現されなくてはならない。

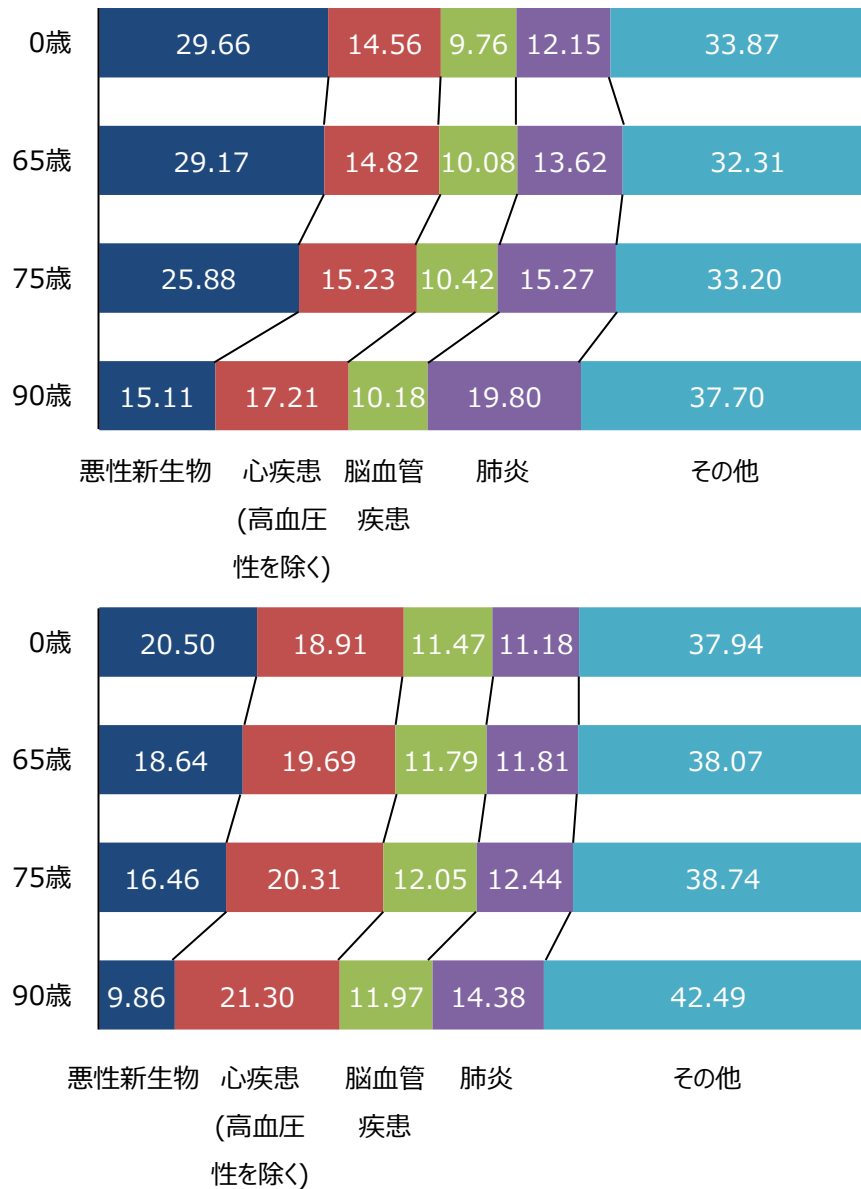


図 1.6 日本人の死因分析(2010年)。^[18]

1.2.2 癌細胞への大気圧プラズマの直接照射

2012年、井関らの名古屋大学のグループは癌細胞に大気圧プラズマを直接照射することによって卵巣癌細胞がアポトーシス死へと誘導されるのに対し、正常細胞である線維芽細胞は増殖に影響を受けないという選択的抗腫瘍効果を報告した。^[20] 図 1.7 に各細胞に対してプラズマ照射前後の顕微鏡像を示す。卵巣癌細胞は大気圧プラズマの照射によって球状に縮小して死滅するのに対して、線維芽細胞は影響を受けていない。これにより大気圧プラズマを用いた新しい癌治療法の開発への道を切り拓いた。癌細胞が死滅することだけでなく、正常細胞に影響を与えていないことは副作用が少ない治療法であると言え、非常に重要な因子である。

大気圧プラズマの直接照射による選択的抗腫瘍効果のメカニズムはいまだ解明されておらず、早期の解明が期待される。皮膚癌などの表面に露出している癌の治療には非常に有効である一方で、臓器で生成した腫瘍に対して直接プラズマを照射することは困難であり、開腹手術をしたとしても臓器が入り組んでいる箇所などへ大気圧プラズマ装置を用いてアクセスして照射することは非現実的であると言える。

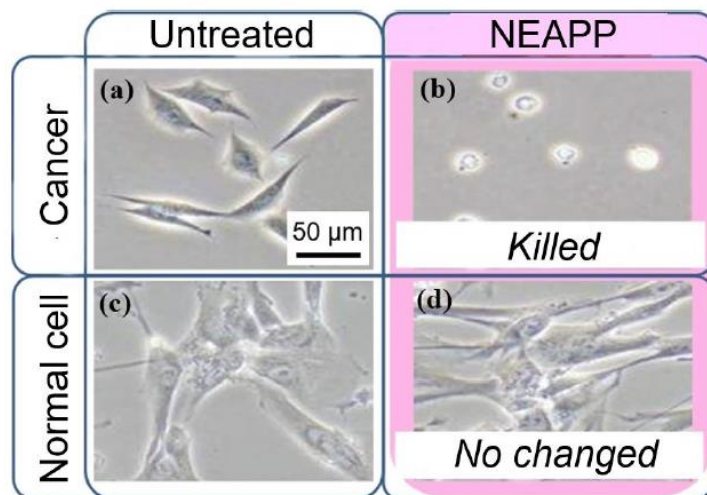


図 1.7 各細胞に大気圧プラズマを照射した 24 時間後の形状変化。^[20]

1.2.3 大気圧プラズマの間接照射による癌治療

直接照射に対して、間接照射つまり大気圧プラズマを照射した培養液を用いた選択的抗腫瘍効果が報告されている。^[21] 大気圧プラズマを照射した培養液はプラズマ活性化培養液(Plasma-Activated Medium, PAM)と呼ばれている(図 1.8)。^[22] 直接照射と同様に、神経膠芽腫細胞はアポトーシスへと誘導され、正常細胞のアストロサイト(中枢神経系に存在するグリア細胞の一つ)の細胞生存率は維持されていた。また、内海らはモデルマウスにヒト子宮頸癌細胞を移植し、PAMを皮下投与したところ、腫瘍の縮小が見られた。^[23] 以降、多くの細胞やプラズマ源によって、大気圧プラズマの間接照射による選択的抗腫瘍効果が報告されている。^[24-40]

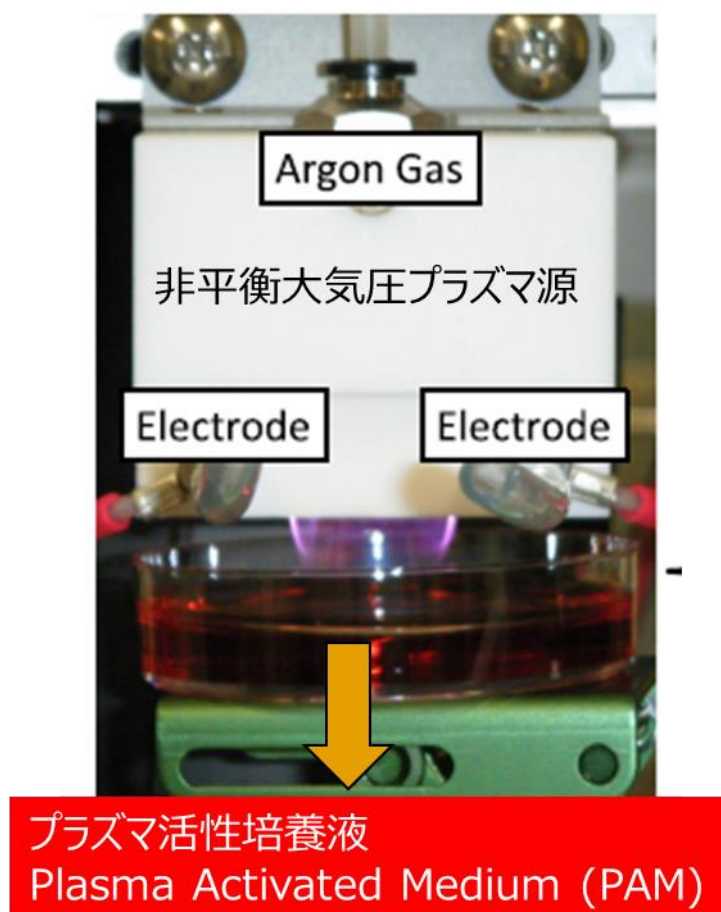


図 1.8 培養液への大気圧プラズマ照射による PAM の作製。^[22]

1.3 マイクロ波励起プラズマの間接照射による癌細胞死滅効果

1.3.1 癌治療を目的として研究されているプラズマ源

間接照射を用いた癌治療を行う場合、液体中に癌細胞を攻撃するための活性酸素窒素種を生成しなくてはならない。液中の活性酸素窒素種の生成はプラズマ源の電源、ガス種、ガス流量に依存して変化することが示唆される。さまざまなプラズマ源を液体に照射し、活性酸素窒素種を定量している報告がある^[41-50]が、ほとんどの報告は 10 Hz から 13.56 MHz (RF) の周期のパルスや正弦波の交流高圧電源を用いた報告であり、マイクロ波電源を使用したマイクロ波励起プラズマに関する報告はほとんどない。しかしながらマイクロ波励起プラズマには、連続的に放電が生成していること、被照射物に電界が掛からないなどの特長があり、本研究ではマイクロ波電源に着目した。

1.3.2 マイクロ波励起プラズマの特徴と期待される効果

マイクロ波励起プラズマは、電極を必要としない放電であるために、電極の消耗による被照射物への汚染を考慮する必要がなく、長時間の放電が可能となる。医療機器装置にとって、汚染物の影響は望ましくない。さらに、マイクロ波励起プラズマはほぼ連続的に放電させやすく、連続的な放電によって、単位時間あたりの電子や発光種の被照射物への総供給量は大きくできる。さらに、マイクロ波励起プラズマは被照射物に電界が掛からない。まだ明らかになっていないもののプラズマによる電界の影響が PAM 中の活性酸素窒素種の生成にどのような影響を与えているかについて考察できる。

1.4 本研究の目的

本研究では、マイクロ波励起プラズマ源に着目し、培養液への間接照射によって癌細胞や正常細胞にどのように作用するかを確認することを目的とした。マイクロ波励起プラズマはまだあまり研究されておらず、非常に興味深い。マイクロ波励起プラズマの特徴を理解することで、これまで未解明であった大気圧プラズマによる抗腫瘍効果のメカニズム解明に繋げることを本研究の目的とした。

1.5 本論文の構成

本論文は 8 章から構成されている。

本章では、まず非平衡大気圧プラズマの進展について、分類、応用先の観点から紹介し、大気圧プラズマの医療応用への期待が高まっていることを説明した。また、高齢化社会において新たな癌治療法がもたらす意義について述べた。最後に大気圧プラズマの照射による抗腫瘍効果が注目されており、プラズマ医療応用分野研究の現状を説明して、本研究の目的について述べた。

第 2 章では本研究で用いたマイクロ波励起プラズマの生成方法を説明する。さらに、本研究で行った気相中の活性種を把握するためのプラズマ計測の原理や方法について説明する。また、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM による癌細胞、正常細胞の生存率測定の方法を説明する。さらに、PAM 中に含まれる抗腫瘍成分を特定するために行った化学プローブによる比色計測や LC-MS/MS、NMR の原理、方法についても述べる。

第 3 章では、マイクロ波励起プラズマのプラズマ計測を行い、培養液内に生成する長寿命の活性種の生成に気相中に生成している活性酸素窒素種とどのような相関があるかを考察する。本研究ではマイクロ波励起プラズマによる発光種の同定、発光分布の把握、プラズマ密度、OH ラジカル濃度の計測に取り組んだ。

第 4 章では、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM による癌細胞と正常細胞の生存率評価結果を述べる。

第 5 章では、すでに癌細胞に対する抗腫瘍成分と報告されている H_2O_2 と NO_2^- の PAM 中における生成速度について述べる。多くの報告がされているパルス放電と比較しながらマイクロ波励起プラズマの特徴について考察する。

第 6 章では、 H_2O_2 と NO_2^- 以外の抗腫瘍成分を特定するために、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) 法とプロトン核磁気共鳴法 ($^1\text{H-NMR}$) を用いて、マイクロ波励起プラズマの照射によって細胞培養液に含まれるアミノ酸やビタミンがどのように変化しているかを解析し、変化している成分について癌細胞への影響を検討する。

第 7 章では、マイクロ波励起プラズマの特徴をより明確にするために、パルス放電のジェット型プラズマの気相診断、液相診断を行う。放電体積が同じ条件において、連続放電であるマイクロ波励起プラズマと比較することによって、マイクロ波励起プラズマの特徴を深く理解する。

最後に第 8 章では、本研究の成果を総括し、研究課題と将来展望について述べる。

参考文献

- [1] Y. Sawada, S. Ogawa and M. Kogoma, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **1995**, 28, 1661.
- [2] T. Nozaki, S. Yoshida, T. Karatsu and K. Okazaki, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2011**, 44 174007.
- [3] T. Hagino, H. Kondo, K. Ishikawa, H. Kano, M. Sekine and M. Hori, *Applied Physics Express*, **2012**, 5, 035101.
- [4] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, Y. Yamanishi and M. Hori, *Applied Physic Express*, **2016**, 9, 096201.
- [5] M. J. Shenton and G. C. Stevens, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2001**, 34, 2761.
- [6] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito and M. Hori, *Applied Physics Letters*, **2008**, 92, 081503.
- [7] H. T. Kim and O. C. Jeong, *Microelectronic Engineering*, **2011**, 88, 2281.
- [8] M. Laroussi, *Plasma Processes and Polymers*, **2005**, 2, 391.
- [9] K. Y. Lee, B. J. Park, D. H. Lee, I. S. Lee, S. O. Hyun, K. H. Chung and J. C. Park *Surface and Coatings Technology*, **2005**, 193, 35.
- [10] T. Sato, T. Miyahara, A. Doi, S. Ochiai, T. Urayama and T. Nakatani *Applied Physics Letters*, 2006, 89, 073902.
- [11] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Leqrain, J.M. Pouvesle and A.L. Pape, *International Journal of Cancer*, **2012**, 130, 2185.
- [12] N. Barekzi and M. Laroussi, *Plasma Processes and Polymer*, **2013**, 10, 1039.

- [13] J. Schlegel, J. Koritzer, and V. Boxhammer, *Clinical Plasma Medicine*, **2013**, 1, 2.
- [14] 堀勝、石川健治、田中宏昌、橋爪博司、近藤隆, *放射線化学*, **2017**, 104, 3.
- [15] Y. Ikehara, H. Sakakita, N. Shimizu, S. Ikehara and H. Nakanishi, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **2013**, 26, 555.
- [16] 文部科学省新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」領域概要。
<http://plasmamed.nagoya-u.ac.jp/shingakujutsu/outlook/a02.html>
- [17] J. Heinlin, G. Morfill, M. Landthaler, W. Stolz, G. Isbary, J. L. Zimmermann, T. Shimizu and S. Karrer, *J Dtsch Dermatol Ges.*, **2010**, 8, 968.
- [18] 厚生労働省 HP。
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life10/04.html>
- [19] M. Kanada, Y. Takeuchi, T. Sakai, S. Namikawa, H. Yuasa and M. Kusagawa, *The Japanese Journal of Thoracic Diseases*. **1984**, 22, 468.
- [20] S. Iseki, K. Nakamura, M. Hayashi, H. Tanaka, H. Kondo, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori, *Appl. Phys. Lett.*, **2012**, 100, 113702.
- [21] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori, *Plasma Medicine*, **2011**, 1, 265.
- [22] H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, S. Maruyama, Y. Kodera, H. Terasaki, T. Adachi, M. Kato and M. Hori, *Physics of Plasmas*, **2015**, 22, 122004.
- [23] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano, M. Hori and F. Kikkawa, *PLoS ONE*, **2013**, 8, e81576.
- [24] K. Torii, S. Yamada, K. Nakamura, H. Tanaka, H. Kajiyama, K. Tanahashi, N. Iwata, M. Kanda, D. Kobayashi, C. Tanaka, T. Fujii, G. Nakayama, M. Koike, H. Sugimoto, S. Nomoto, A. Natsume, M. Fujiwara, M. Mizuno, M. Hori, H. Saya, and Y. Kodera, *Gastric Cancer*, **2015**, 18, 635.

- [25] F. Ye, H. Kaneko, Y. Nagasaka, R. Ijima, K. Nakamura, M. Nagaya, K. Takayama, H. Kajiyama, T. Senga, H. Tanaka, M. Mizuno, F. Kikkawa, M. Hori and H. Terasaka, *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 7705.
- [26] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. I. Kondo, and M. Hori, *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, 79, 28.
- [27] H. Hara, M. Taniguchi, M. Kobayashi, T. Kamiya and T. Adachi, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2015**, 584, 51.
- [28] T. Adachi, A. Kano, S. Nonomura, T. Kamiya and H. Hara, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2016**, 605, 120.
- [29] T. Adachi, S. Nonomura, M. Horiba, T. Hirayama, T. Kamiya, H. Nagasawa and H. Hara, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 20928.
- [30] M. Horiba, T. Kamiya, H. Hara and T. Adachi, *Sci Rep.*, **2017**, 7, 42208.
- [31] K. Nakamura, Y. Peng, F. Utsumi, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa and H. Kajiyama, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 6085.
- [32] Z. Chen, L. Lin, X. Cheng, E. Gjika and M. Keidar, *Plasma Processes and Polymers* **2016**, 13, 1151.
- [33] Z. Chen, H. Simonyan, X. Cheng, E. Gjika, L. Lin, J. Canady, J. H. Sherman, C. Young and M. Keidar, *Cancers* **2017**, 9, 61.
- [34] D. Yan, H. Cui, W. Zhu, N. Nourmohammadi, J. Milberg, L. G. Zhang, J. H. Sherman and M. Keidar, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 4479.
- [35] S. Mohades, N. Berekzi and M. Laroussi, *Plasma Processes and Polymers*, **2014**, 11, 1150.
- [36] S. Mohades, M. Laroussi, J. Sears, N. Berekzi and H. Razavi, *Physics of Plasmas*, **2015**, 22, 122001.

- [37] J. Duan, X. Lu and G. He, *J. Appl. Phys.*, **2017**, 121, 013302.
- [38] N. Kumar, J. H. Park, S. N. Jeon, B. S. Park, E. H. Choi and P. Attri, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2016**, 49, 11540.
- [39] Y. Liu, S. Tan, H. Zhang, X. Kond, L. Ding, J. Shen, Y. Lan, C. Cheng, T. Zhu and W. Xia, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 7980.
- [40] Y. F. Yue, S. Mohades, M. Laroussi and X. Lu, *IEEE Plasma Science*, **2016**, 44, 2754.
- [41] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno and M. Hori, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2016**, 605, 102.
- [42] H. Jablonowski and T. von Woedtke, *Clinical Plasma Medicine*, **2015**, 3, 42.
- [43] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova and M. Clupek, *Plasma Sources Sci. Technol.*, 2014, 23, 015019.
- [44] D. B. Graves, *Plasma Processes and Polymers*, **2014**, 11, 1120.
- [45] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Hashizume, K. Nakamura, H. Kajiyama, T. Kondo, F. Kikkawa, M. Mizuno and M. Hori, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2017**, 50, 155202.
- [46] G. Uchida, A. Nakajima, T. Ito, K. Takenaka, T. Kawasaki, K. Koga, M. Shiratani and Y. Setsuhara, *J. Appl. Phys.*, **2016**, 120, 203302.
- [47] T. Ito, G. Uchida, A. Nakajima, K. Takenaka and Y. Setsuhara, *Japanese Journal of Applied Physics*, **2017**, 56, 01AC06.
- [48] G. Uchida, K. Kawabata, T. Ito, K. Takenaka and Y. Setsuhara, *J. Appl. Phys.*, **2017**, 122, 033301.

- [49] P-M. Girard, A. Arbabian, F. Michel, G. Bayvukke, V. Puech, M. Dutreix and J. S. Sousa, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 29098.
- [50] G. Bauer and D. B. Graves, *Plasma Processes and Polymers*, **2016**, 13, 1157.

第 2 章

マイクロ波励起プラズマの生成と評価方法

本章では、プラズマ生成に関する基礎原理から、大気圧非平衡プラズマを安定に生成するための要件を述べる。さらに、本研究で用いたマイクロ波励起プラズマ、60Hz 大気圧プラズマおよびジェット型パルスストリーマ放電の生成方法について説明する。また、本研究で実施したプラズマ計測方法について記述する。さらに細胞生存率評価、過酸化水素、亜硝酸イオン定量のための比色計測方法、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) 法とプロトン核磁気共鳴法 ($^1\text{H-NMR}$) についても説明する。

2.1 プラズマ生成の基礎^[1]

プラズマの放電開始や特性を決定するのは、プラズマ中の電子である。電子と気体中の原子や分子 (以下、分子と総称する) の衝突によって引き起こされる諸現象が基礎過程として重要な要素となる。^[1] あるエネルギー ε を持った電子を考えると、それが単位体積中に 1 個存在する分子と衝突する確率が ε の関数としての衝突断面積で表すことができる。非弾性衝突によって中性分子は励起、解離および電離される。それぞれの起こりやすさは、電子のエネルギーに対する衝突断面積から、励起、解離、電離の順になる。電子のエネルギーによって励起では光エネルギーへ、解離ではラジカルの生成へと変換される。また電離ではイオン化による電子生成が起こり伝播するため、電離現象がプラズマの維持のために必要となる。プラズマ中で衝突による粒子のエネルギー損失係数 κ (弾性衝突で失うエネルギー) は大気圧では衝突頻度が大きいため、電子温度 (T_e)、イオン温度 (T_i)、ガス温度 (T_g) は $T_e \cong T_i \cong T_g$ と表される。例と

して熱平衡大気圧プラズマであるアーク放電 $T_e \cong T_i \cong T_g$ では、大気圧であるため粒子間の衝突が増え、電場からエネルギーを得た電子、イオンと中性粒子の熱交換の頻度が上がる。そのため、ガス温度(中性粒子)が上がり、熱電離により電子、イオンが生成される。これを防ぐためには、ガス温度の上昇を抑制する必要がある、大気圧においてアークへ移行することなくグロー放電を発生させる代表的な方法として、

- ① 特定のガスを用いる
- ② パルス電圧を利用してアーク移行前に放電を止めるために電力を間欠的に加える
- ③ 放電領域を小さくする(ホローカソード効果を利用する)
- ④ 電流の経路を集中させない

などが挙げられる。^[2]

①は、ガスの種類や構成によっては比較的容易にグロー放電を維持できる場合がある。代表的なガスが He で、低電界において高い電離レートを有すること、励起種によるペニング電離が期待できること、拡散係数が大きいことなどのため、アーク転移することなくグロー放電が維持される。^[3-5] 定常状態において、電子温度とガス温度の比は以下の式で与えられる。

$$T_g/T_e = \sigma v n (m/M) \left(\Lambda^2/D \right) \quad (2.1)$$

ここで、 σ は電子の衝突断面積、 v は電子の平均熱運動速度、 n は電子密度、 m は電子質量、 M は分子質量、 Λ は放電空間の寸法、 D は熱拡散係数である。非平衡状態を作るには、ガス流量を増やすことや D を大きくすることが有効である。マイクロ波励起プラズマで、連続放電にもかかわらず温度の非平衡状態が維持されるのは流通ガスによる冷却効果によるものである。

②は、ガス温度が高くなる前に放電を中断し、ガス温度が冷えた後放電を開始する方法である。アーク転移の予測は、アーク転移時に陰極近傍で発生する輝点が発生するまでにグロー放電の陰極降下(シース)部で消費されるエネルギーをシースの体積で割った値などから算出する。^[6] シース部の体積は、電極面積と式(2.2)で求まる正規グロー放電のシース長 l_c の積から求められる。

$$l_c = 0.23 \cdot p^{-1} \quad (2.2)$$

③は、陰極を平行平板あるいは U 字型あるいは円筒型とし、それらの内側にプラズマが現れるようにした方法である。陰極間隔を狭くするまたはガス圧を低下して二つのグローを合体させると、1)放電維持電圧が下がる、2)電流密度の増加、3)高エネルギー電子の増加などのホローカソード効果が生じる。放電領域の体積は以下のように説明される。

電子衝突によるガスの加熱時間を τ_e 、熱拡散によるガスの冷却時間を τ_D と表すと、 τ_e は、

$$\tau_e \cong (m/M)(1/\sigma v n_e) \quad (2.3)$$

τ_D は

$$\tau_D = l^2/D \quad (2.4)$$

と表される。ここで、 m は電子質量、 M は分子質量、 σ は断面積、 v は電子の平均熱運動速度、 n_e は電子密度、 l は代表寸法、 D は電子のガス中への自己拡散係数である。大気圧非平衡プラズマの生成条件では、 $\tau_e > \tau_D$ であることから l は 230 μm 以下となる。

④は誘電体バリア放電に代表させる方法である。電極に高電圧を印加すると、負電極から電子が放出される。電極近辺に初期電荷があると強い電界のために電荷は加速

され他の分子に衝突したときにその分子をイオン化する。電子放出反応であれば、電子は再度加速されて分子と衝突を繰り返す。特に電子や負イオンは正電極で増加しながら走っていき、これが初期ストリーマとなる。

ストリーマ放電が発生すると、誘電体表面は帯電し、放電空間の電界強度が弱められ、放電が停止するが現実には、誘電体の一部のみで帯電による放電停止が起こるため、系全体ではパルス状の放電が多数観測される。

2.2 マイクロ波励起プラズマの生成と装置構成

2.2.1 マイクロ波励起プラズマの生成^[1]

周波数 30 MHz から 300 MHz までの VHF 帯、300 MHz から 3 GHz までの UHF 帯の電磁波を励起源とするプラズマ装置では、一般に電磁波的なアンテナ結合によりエネルギーを供給することによりプラズマ生成を行っている。これらの電磁波を用いたプラズマ生成法の中でも、磁場を用いた電子サイクロロン共鳴 (ECR) を利用する方法と磁場を用いない表面波プラズマが用いられている。

無磁場でのマイクロ波放電は直径数 cm 以内の細長い円筒状プラズマに関する研究が多く行われている。図 2.1(a)に示すように、マイクロ波をプラズマに照射するランチャーあるいはアンテナの位置から、管軸方向に表面波が励起され、波が減衰して消滅するあたりまで細長くプラズマが伸びる。

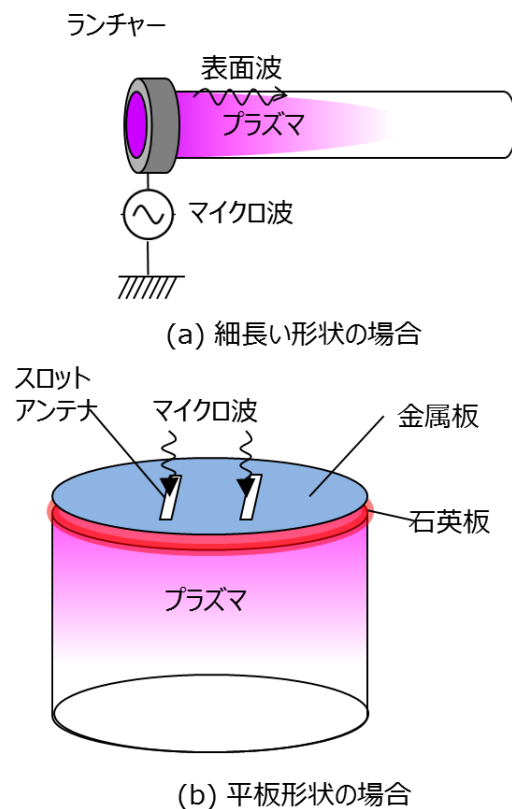


図 2.1 表面波プラズマの励起方法。^[1]

大気圧マイクロ波放電の例として、以下にマイクロ波プラズマトーチについて簡単に紹介する。カナダのモントリオール大学の Moison らのグループは図 2.2 のような厚さを薄くした導波管部分に円柱の石英パイプを挿入し、パイプ内部にガスを大気圧でフローさせて放電実験を行った。^[7] 大気圧において直径が 2 から 3 mm 程度の細長いプラズマの生成に成功している。マイクロ波を用いた大気圧プラズマジェットに関する初期の実験結果であり、その後プラズマトーチとしての応用に関する研究がおこなわれている。このタイプのトーチは SURFTRON とも呼ばれる。

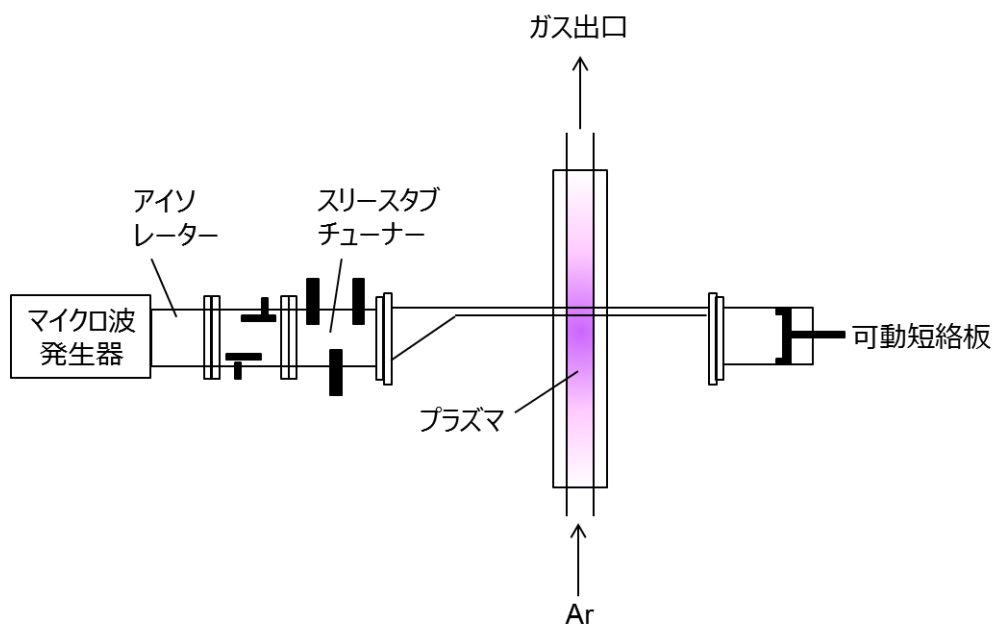
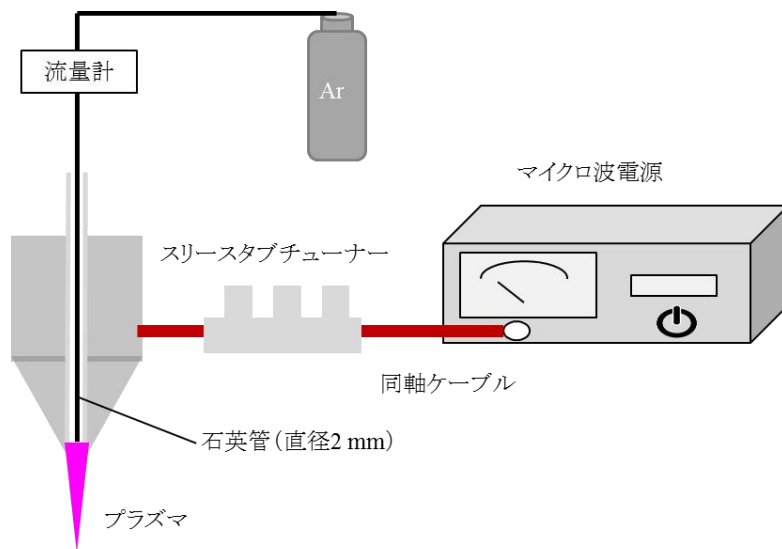


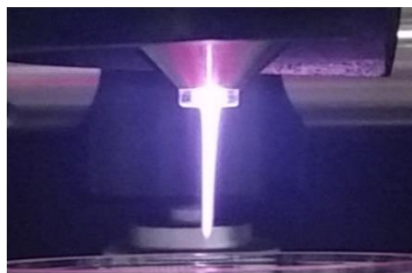
図 2.2 大気圧マイクロ波プラズマジェットの実験装置の概略。^[7]

2.2.2 本研究で用いたマイクロ波励起プラズマの構成

本研究に用いたマイクロ波励起プラズマ源の構成を図 2.3 に示す。流量計を用いて Ar(G1, 純度>99.99995 vol%)を 2 slm 流通させ、同軸ケーブルで 2.45 GHz のマイクロ波を供給する。出力は 50 W とした。同軸ケーブルとマイクロ波励起プラズマ源の間にスリースタブチューナー(アリオス株式会社製)を組み込み、反射電力が最小となるように調節した。図 2.4 にスリースタブチューナーを組み込んだ装置図とスリースタブチューナーによるプラズマの変化の写真を示す。スリースタブを組み込むことで、プラズマの伸びは最大約 7 mm から約 13 mm に伸長し、放電も安定した。ノズル直径は 2 mm である。



(a) マイクロ波励起プラズマ源の構成



(b) 生成したマイクロ波励起プラズマ

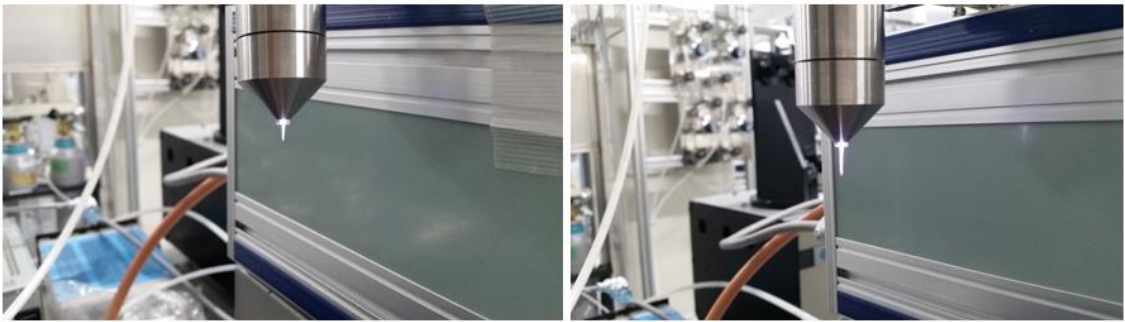
図 2.3 装置構成。

(a) マイクロ波励起プラズマ源の構成。

(b) 本装置構成で生成したマイクロ波励起プラズマの外観写真。



(a) スリースタブチューナーを組み込んだ様子



(b) スリースタブチューナーなし

(c) スリースタブチューナーあり

図 2.4 スリースタブチューナーを組み込んだ装置図とプラズマの変化。

(a) スリースタブチューナー。

(b) スリースタブチューナー組み込みなしのプラズマの伸び(約 7 mm)。

(c) スリースタブチューナー組み込み時のプラズマの伸び(約 13 mm)。

2.3 60Hz 非平衡大気圧プラズマ

マイクロ波励起プラズマの特性の比較対象として名古屋大学の堀研究室で開発された大気圧プラズマ源について記述する。図 2.5 に 60Hz 非平衡大気圧プラズマ源の概要図を示す。本プラズマ源は、電子密度およそ 10^{16} cm^{-3} という高密度のプラズマを生成することができる。^[8-11] Ar(G1) ガス流量は 2 slm であり、プラズマ源中のガス拡散領域で均一に分散される。電極はホロー構造を有しており、放電領域の電極間に 60Hz の交流電圧をネオントランス(レシップ社製 Alpha Neon M-5)で 7 kV_{0-p} に昇圧すると、この領域に非平衡大気圧プラズマを生成させることができる。生成したプラズマをガス流れによって、プラズマ出射部から放出する。

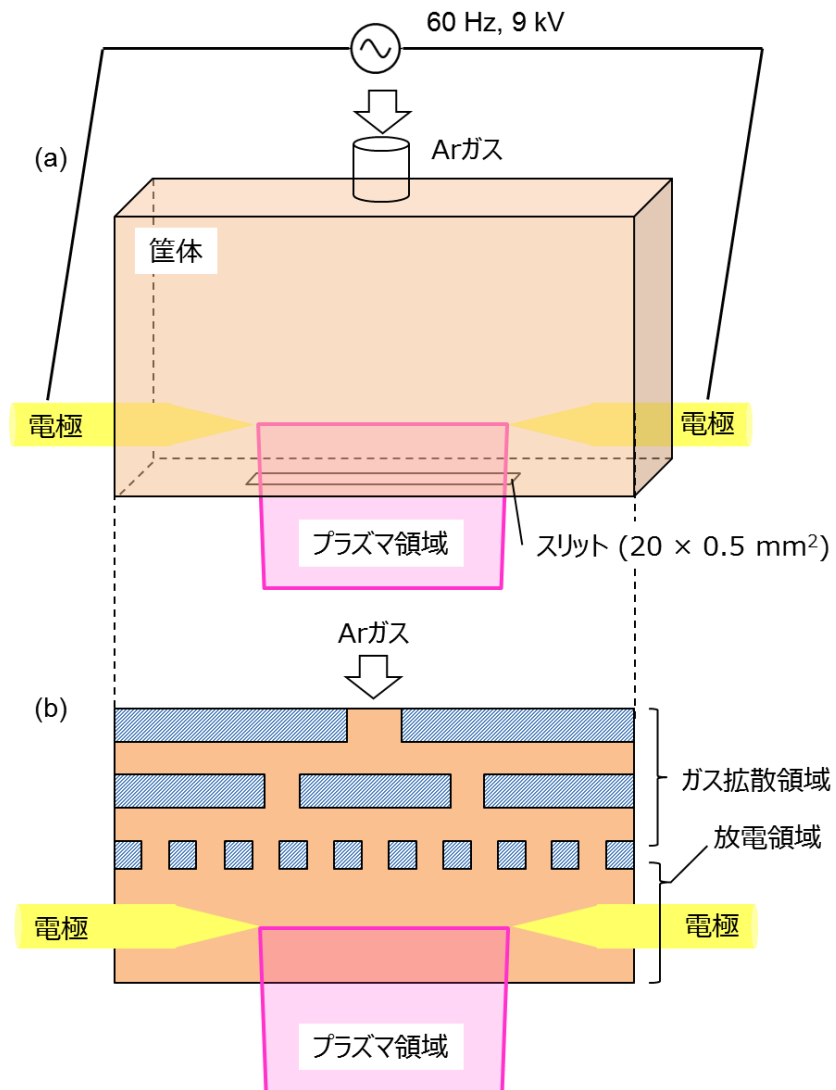


図 2.5 60Hz 非平衡大気圧プラズマ源。^[9]

(a) 外観 (b) 内部構造(断面図)

2.4 ジェット型パルスストリーマ放電

本研究に用いたジェット型パルスストリーマ放電のプラズマジェットは、マイクロホロー放電と誘電体バリア放電によるものである。これはグロー放電とアーク放電の中間的領域、特に 0.1~10 Torr 前後の圧力領域、1~10 A/cm² 前後の維持電流領域でのプラズマである。この領域では電子温度(T_e)は 0.1~1 eV 程度、ガス温度(T_g)は 0.5 eV 以下となる $T_e/T_g = 1\sim 10$ と記述され、 $T_e/T_g = 50\sim 100$ の低圧プラズマ、 $T_e/T_g = 1$ の熱プラズマ領域とは異なるプラズマ環境にある。

本研究に用いたジェット型パルスストリーマ放電のプラズマ源の構成を図 2.6 に示す。内部電極の先端はホロー形状になっており、内部電極と外部電極の間に 60 Hz の高電圧 (9 kV) を印加することで、プラズマジェットを生成することができる。

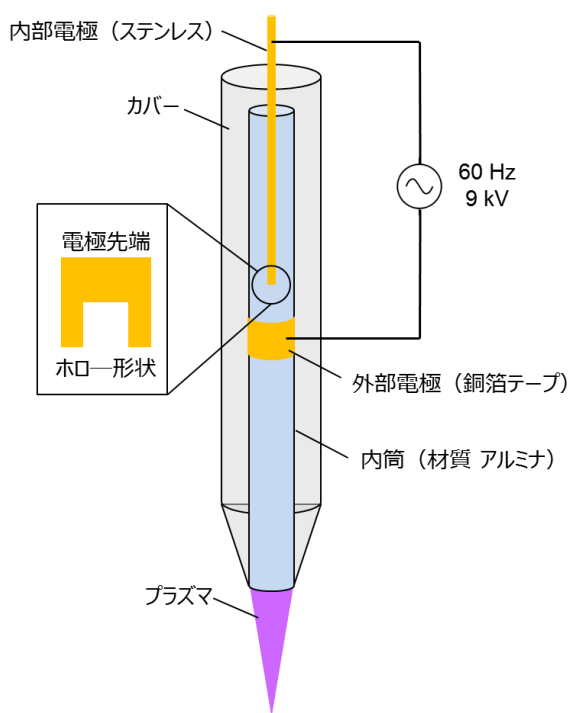


図 2.6 ジェット型パルスストリーマ放電。

2.5 発光分光法 (Optical Emission Spectroscopy : OES)

2.5.1 発光分光法の原理

発光分光法はプラズマ計測で最も一般的で広く用いられている。プラズマ領域内部では、電子、中性粒子、電子、イオンなどの粒子が衝突を繰り返している。衝突前後の運動エネルギーに着目すると、非弾性衝突で衝突種の運動エネルギーに転化しなかったエネルギーは衝突した粒子の内部エネルギーとなる。このエネルギー利得によって衝突した粒子は、励起、解離、電離等のプロセスを生じ、励起準位に励起される。励起粒子からは光子が放出され、光学遷移により下準位へと脱励起する。このとき、励起準位と下位準位のエネルギー差と等しいエネルギーを持つ光子を放出する。光子のエネルギーを波長として分光器で観測することで、発光種を同定することが可能となる。

2.5.2 H_{β} のシュタルク拡がりを用いた電子密度の計測

プラズマの電子密度を発光分光法から計測する場合には、486.13 nm の H_{β} スペクトル (量子数 4 の電子軌道から量子数 2 の電子軌道に電子が遷移したときに放出された光子のエネルギーの差) を解析する手法を用いた。このスペクトルは電場に非常に強く影響を受け、電子密度の変化量に対して、線幅が大きく変化するため、電子密度の計測に適している。^[12,13] H_{β} スペクトルは Gaussian 関数と Lorentzian 関数に大別され、Gaussian 関数はドップラー拡がり装置拡がり、Lorentzian 関数は自然拡がり、共鳴拡がり、van der Waals 拡がりシュタルク拡がりから成る。Gaussian 関数と Lorentzian 関数は畳み込むことで Voigt 関数として表される。 H_{β} スペクトルは Voigt 関数で表すことができる。^[11] Voigt 関数 $V(\lambda)$ の近似式を次に示す。

$$V(\lambda) = (1 - \eta)G(\lambda) + \eta L(\lambda) \quad (2.5)$$

λ は波長、 $G(\lambda)$ は Gaussian 関数、 $L(\lambda)$ は Lorentzian 関数を示し、 η は Gaussian と Lorentzian の線幅への寄与率である。一般的には $\eta = 0.5$ が用いられる。

ドップラー拡がり $\Delta\lambda_{Doppler}$ は、共鳴角振動のドップラー効果によって生じ、対象の原子・分子の温度に依存する。ガウス型プロファイルをもつドップラー拡がりは、以下の式で表される。

$$\Delta\lambda_{Doppler} = \exp \left[- \left\{ 2\sqrt{\ln 2} \frac{(v-v_0)}{\Delta v_D} \right\}^2 \right] \quad (2.6)$$

また、

$$\Delta v_D = \frac{2v_0}{c} \sqrt{\frac{2RT \ln 2}{M}} \quad (2.7)$$

ここで、 $\Delta\lambda_{Doppler}$ はドップラー拡がりの半値全幅、 v_0 は中心波長、 c は光速、 R はガス定数、 T はガス温度、 M は質量を示す。

装置拡がり($\Delta\lambda_{Instrument}$)は、計測に用いる分光器の仕様で決定される。較正用の光源としては低圧水銀ランプを用い、水銀線のスペクトル幅を装置拡がりとすることが一般的である。435.83 nm 及び 546.07 nm の発光スペクトルと装置関数をガウス関数と仮定し、486.13 nm を中心波長とした計算結果と照合すると、求められた装置拡がりの半値全幅は 26 pm であった。

ガウス拡がり $\Delta\lambda_G$ は次式で表すことができる。^[14-17]

$$\Delta\lambda_G = \sqrt{\Delta\lambda_{Instrument}^2 + \Delta\lambda_{Doppler}^2} \quad (2.8)$$

自然拡がり、励起原子の寿命時間内に自然放出によって下準位へ脱励起されることで生じる。これは一般的に極めて小さいため無視できる。

共鳴拡がり、2つの水素原子のような同種の粒子の衝突による拡がりである。共鳴拡がり $\Delta\lambda_R$ は次式で与えられる。^[18]

$$\Delta\lambda_R \cong \frac{3e^2}{16\pi\epsilon_0 m_e c^2} \lambda_{ul}^2 \lambda_{lg} f_{gl} N_g \sqrt{g_g/g_l} \quad (2.9)$$

ここで、 e は素電荷、 m_e は荷電粒子の質量、 ϵ_0 は真空中誘電率、 f_{gl} は上準位と下準位間の遷移における許容振動子強度、 g_g 、 g_l は統計重率、 N_g は上準位の密度、 λ_{ul} と λ_{lg} はそれぞれ、上準位と下準位、下準位と基底準位間遷移の中心波長である。大気圧下では、共鳴拡がりの影響は極めて小さいとされており、計算から除外してもよいとされている。^[19]

van der Waals 拡がり、中性粒子間の van der Waals 力によるものである。van der Waals 拡がり $\Delta\lambda_{vw}$ は次式で与えられる。

$$\Delta\lambda_{vw} \approx 4.09 \times 10^{-13} \lambda_0^2 (aR^2)^{2/5} \left(\frac{T_g}{\mu}\right)^{3/10} n \quad (2.10)$$

ここで、 λ_0 は発光波長、 a は中性粒子の平均分極率、 R は発光原子の半径、 T_g はガス温度、 μ は発光粒子と衝突対象の換算質量、 n はガス密度である。

シュタルク拡がり、発光粒子が電界の影響でエネルギー準位が分裂するシュタルク効果によって引き起こされるものである。これによりスペクトルの分裂現象が起こる。プラズマ中では電荷が釣り合っており、正と負の電荷は同量存在するため、これらの荷

電粒子によってスペクトルの拡がりが生じる。言い換えると電荷によってスペクトル拡がり
 が変化するため、シュタルク拡がりを抽出することによってプラズマ密度を決定できる。
 シュタルク拡がり $\Delta\lambda_{\text{Stark}}$ とプラズマ密度の関係は次式で表される。

$$n_e = C(n_e, T_e)(\Delta\lambda_{\text{Stark}})^{3/2} \quad (2.11)$$

ここで、 $C(n_e, T_e)$ は電子密度 n_e と電子温度 T_e を関数としてわずかに変化する係数である。
 表 1 に $C(n_e, T_e)$ を示す。

表 2.1 シュタルク拡がりの半値全幅から電子密度を決定する際の係数。

		$C(n_e, T_e)[10^{16} \text{ nm}^{-3/2} \text{ cm}^{-3}]^{[19]}$				
Line	T_e (K)	電子密度 n_e (cm^{-3})				
		10^{14}	10^{15}	10^{16}	10^{17}	10^{18}
H_β	5000	1.21	1.16	1.09		
	10000	1.20	1.13	1.04	0.942	
	20000	1.18	1.12	1.02	0.958	
	40000	1.19	1.11	1.04	0.908	

大気圧下でのマイクロ波励起プラズマの電子温度は 5000 K 以下、電子密度は 10^{15} cm^{-3} として $C(n_e, T_e)$ は 1.16×10^{16} に固定して計算した。

実験では、計測された H_β スペクトルの半値全幅から Gauss 関数の拡がりを差し引き、得られたスペクトルから、 $\Delta\lambda_G$ を差し引き、さらに、 $\Delta\lambda_{vw}$ 、 $\Delta\lambda_R$ を差し引くことによって $\Delta\lambda_{\text{Stark}}$ を求めた。

2.6 N_2 2nd Positive System の発光スペクトルを用いたガス温度計測

N_2 分子の回転温度は、 N_2 の電子遷移による発光スペクトル ($C^2\Pi_u - B^3\Pi_g$) を用いて計算することができる。電子遷移は、ある電子準位内の様々な振動準位における回転準位から、その他の電子準位における回転準位や振動準位へと遷移することで起きる。 N_2 分子の発光スペクトルの一つに 2nd Positive System と呼ばれ、たくさんの回転準位と振動準位をとることが可能な $C^3\Pi_u$ 準位から $B^3\Pi_g$ 準位へと電子遷移する遷移スペクトルがある。 $C^3\Pi_u$ と $B^3\Pi_g$ 準位における回転準位に存在する電子がボルツマン分布していると仮定することで、ある振動回転準位に分配された発光スペクトルが回転温度に依存する。そのため、 N_2 分子の回転温度は、理論値から計算される計算スペクトルと実測スペクトルを比較することにより求めることができる。

本研究では、波長 380.4 nm に観測される N_2 の発光スペクトルを計測した。上準位である $C^2\Pi_u$ の振動量子数 0、下準位である $B^3\Pi_g$ の振動量子数 2 の振動バンドを用いた。まず、 $C^3\Pi_u$ と $B^3\Pi_g$ 準位のエネルギー準位を算出し、選択則によってそれぞれの分岐における遷移波長を求める。その後、それぞれの遷移について Hönl-London 因子

とボルツマン分布を加味して線強度を計算する。^[20] 求めた線強度からスペクトル波形を決定する。その際、線スペクトル幅と回転温度の関数を使用する。最後にスペクトル幅と回転温度から最小二乗法で計算スペクトルを描画し、計測したスペクトルとフィッティングした。

2.7 レーザー誘起蛍光法による OH ラジカル密度の計測^[21]

レーザー誘起蛍光法(Laser-induced fluorescence, LIF)は測定対象となる粒子を励起準位に励起するために必要な波長のレーザーを照射し、励起準位からの脱励起光(蛍光)を検出して粒子密度を算出する方法である。蛍光強度は基底準位の分布密度に比例することを利用するため、励起状態に励起された粒子の密度を算出することができる。

本実験で用いる OH のエネルギー準位を図 2.7 に示す。283 nm 付近の波長を励起光として用い、基底状態 $X^2\Pi(v=0)$ から励起状態 $A^2\Sigma(v=1)$ に励起する。観測される蛍光は 315 nm 付近の $A^2\Sigma(v'=1) \rightarrow X^2\Pi(v''=1)$ の緩和と、 $A^2\Sigma(v'=1) \rightarrow A^2\Sigma(v''=0)$ への振動緩和(Vibrational Energy Transfer, VET)した後に生じる 309 nm 付近の $A^2\Sigma(v'=0) \rightarrow X^2\Pi(v''=0)$ である。大気圧では、VET の影響が大きいため、2 つのスペクトルを考慮した計算モデルを確立する必要がある。

図 2.7 のエネルギー準位図において、 $X^2\Pi(v=0)$ 、 $A^2\Sigma(v=0)$ 、 $A^2\Sigma(v=1)$ の密度を n 、 N_0 、 N_1 とすると、レート方程式は以下のようなになる。

$$\frac{dn}{dt} = -BIn + A_0N_0 + BIN_1 \quad (2.12)$$

$$\frac{dN_0}{dt} = Q_VN_1 - \Gamma_0N_0 \quad (2.13)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = BIn - \Gamma_1N_1 \quad (2.14)$$

BはアインシュタインのB係数、Iは励起レーザー強度、 Q_V はVET確率、 $\Gamma_0 \equiv A_0 + Q$ および $\Gamma_1 \equiv A_1 + Q + Q_V + BI$ である。また、添字0は $A^2\Sigma(v=0)$ 、添字1は $A^2\Sigma(v=1)$ に関するものであることを表す。式(2.11)で A_0N_0 、 $BI N_1$ の項は小さいために無視できる。さらに大気圧では、励起によって減少した $n(t)$ は回転エネルギー転移(Rotational Energy Transfer, RET)によって補填されると考え、 $n(t) = n_0$ で一定であるとする。このとき、レート方程式は、

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} n \\ N_0 \\ N_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\Gamma_0 & Q_V \\ BI & 0 & -\Gamma_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} n \\ N_0 \\ N_1 \end{pmatrix} \quad (2.15)$$

これを初期条件 $n(t=0)=n_0$ 、 $N_0(t=0)=N_1(t=0)=0$ で解くと、

$$n(t) = n_0 \quad (2.16)$$

$$N_0(t) = n_0 Q_V BI \left[\frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left(\frac{e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1} - \frac{e^{-\Gamma_0 t}}{\Gamma_0} \right) + \frac{1}{\Gamma_1 \Gamma_0} \right] \quad (2.17)$$

$$N_1(t) = n_0 BI \frac{1 - e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1} \quad (2.18)$$

が得られる。ここで、レーザーパルスの時間幅を τL とすると、 $\Gamma_1 \tau L, \Gamma_0 \tau L > 5$ より、 $e^{-\Gamma_1 \tau L}, e^{-\Gamma_0 \tau L} \approx 0$ とすると、式(2.17)の右辺第一項及び第二項は第三項に比べて無視できると考えられ、式(2.17)は

$$\int_0^{\tau} N_0(t) dt \cong \int_0^{\tau} \frac{n_0 Q_V B I}{\Gamma_1 \Gamma_0} dt = \frac{n_0 Q_V B I \tau}{\Gamma_1 \Gamma_0} \quad (2.19)$$

と書ける。同様に考えると、式(2.18)の右辺第二項は無視することができ、

$$\int_0^{\tau} N_1(t) dt \cong \int_0^{\tau} \frac{n_0 B I}{\Gamma_1} dt = \frac{n_0 B I \tau}{\Gamma_1} \quad (2.20)$$

これより、観測する蛍光は

$$\begin{aligned} I_{LIF} &= C_f V_0 \int_0^{\tau L} (A_0 N_0(t) h\nu_0 + A_1 N_1(t) h\nu_1) dt \\ &\cong C_f V_0 n_0 B I \tau L \left(\frac{A_0 Q_V}{\Gamma_1 \Gamma_0} h\nu_0 + \frac{A_1}{\Gamma_1} h\nu_1 \right) \end{aligned} \quad (2.21)$$

となる。 C_f は蛍光収率、 V_0 は測定領域の体積、 ν_0, ν_1 はそれぞれ

$A^2\Sigma(v'=0) \rightarrow X^2\Pi(v''=0)$ 及び $A^2\Sigma(v'=1) \rightarrow X^2\Pi(v''=1)$ 遷移の周波数である。

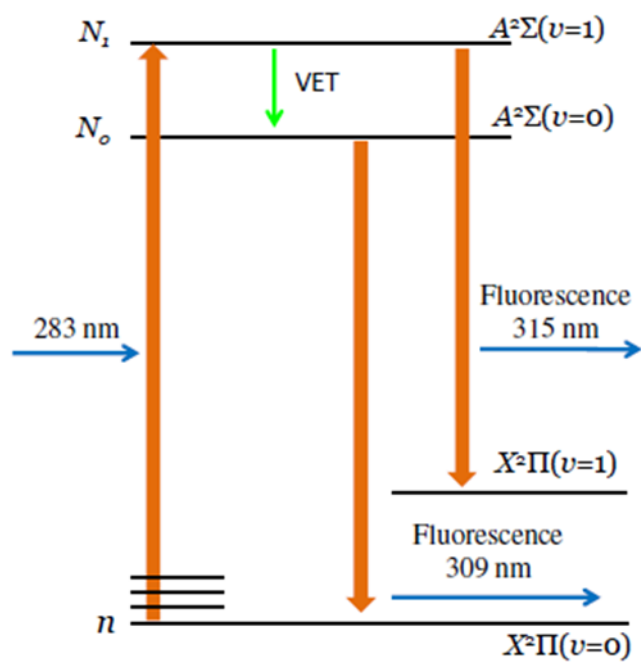
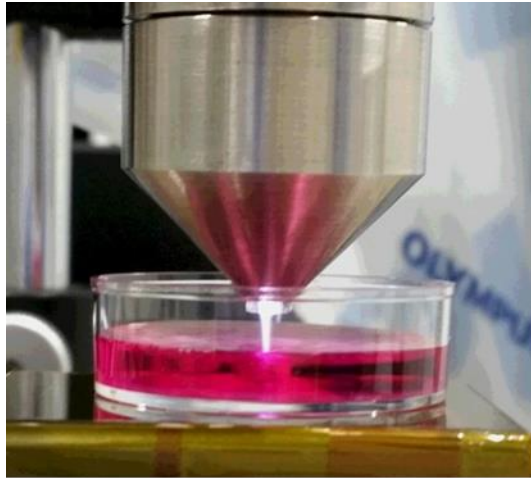


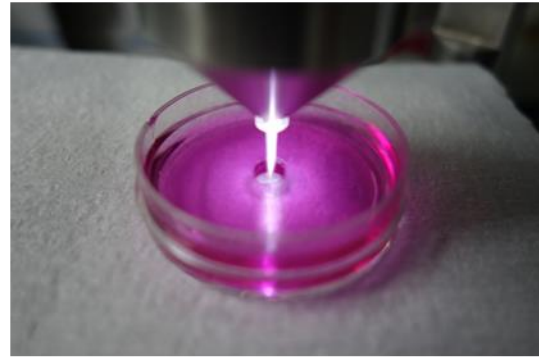
図 2.7 本研究で用いた OH ラジカルのエネルギー準位図。^[22]

2.8 マイクロ波励起プラズマの細胞培養液への照射方法

細胞培養液には Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。DMEM は 4°C に設定された冷蔵庫に保管している。マイクロ波励起プラズマの照射に用いる前におよそ 30 分程度クリーンベンチ内に置き、液温を常温にした。35 mm ディッシュに 3 mL の DMEM (D5796, Sigma-Aldrich) を入れ、図 2.8 (a) に示すようにマイクロ波励起プラズマ源の下に置いて、マイクロ波励起プラズマを照射した。照射時間は 30 秒から 180 秒の範囲で所望の実験条件になるように変化させた。マイクロ波励起プラズマ源のプラズマ出射口と DMEM 液面の距離は例えばラボジャッキを用いて決定した。本論文では、5 mm から 20 mm とした。Ar 流量は 2 slm、投入電力は 50 W で一定とした。生成するマイクロ波励起プラズマの条件を一定にするための指標として、スリースタブチューナーを用いたときの反射電力が 1 以下かつプラズマの伸びが 13 mm となることとした。プラズマが出射する直径 2 mm の石英ガラス端から Ar が流れる時のガス圧力によって、DMEM 液面は図 2.8 (b) に示すように凹形状を形成し、プラズマは DMEM に接触していない。



(a)



(b)

図 2.8 (a)マイクロ波励起プラズマ照射時の様子(照射距離 5 mm)。
(b)マイクロ波励起プラズマ照射時の液面の様子。

マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM は、必要に応じて DMEM によって希釈した。希釈前の PAM と同量の DMEM を添加した試料を 2 倍希釈とし、これを繰り返して 256 倍まで希釈した PAM を実験に用いた。

2.9 細胞の継代培養と生存率測定

2.9.1 継代培養

本研究ではヒト子宮頸部癌細胞 (HeLa) 細胞 (名古屋大学先端医療・臨床研究支援センター) とヒト乳腺上皮 (MCF10A) 細胞 (名古屋大学先端医療・臨床研究支援センター) を継代培養して実験に用いた。

本研究で細胞培養のために用いた試薬を以下に記す。

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (D5796, Sigma-Aldrich)
- ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (10437-028, Thermo Fisher)
- ペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin, P/S) (15140-148, Thermo Fisher)
- トリプシン-EDTA 溶液 (Trypsin-EDTA solution) (T3924, Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (14190-144, Thermo Fisher)

DMEM に 10% の FBS と 1% の P/S を添加して培養液 (DMEM++) として用いた。

継代作業について、60 mm ディッシュを用いた場合を例に説明する。継代作業するディッシュから古い DMEM++ を吸い取った後、DPBS 1 mL を添加し、細胞を洗浄した。DPBS を取り除いた後、0.5 mL のトリプシン-EDTA 溶液をピペットで 1 滴ずつ滴下し、均一になるようにディッシュ全体を振とうし、37°C、CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター内に 5 分間置いた。ディッシュを取り出し、細胞がディッシュ底面から剥離していることを確認した後、ディッシュを叩いて細胞同士の凝集を解いた。約 4.5 mL の DMEM++ で剥離した細胞を回収し、遠沈管に入れて遠心分離機 (A2800, KUBOTA) を用いて 1,000 rpm, 5 分間の遠心分離を行った。上澄みの DMEM++ とトリプシン-EDTA 溶液の混合溶液を回収し、新たに DMEM++ を添加した。その後、所望の細胞

播種数になるように DMEM++ に細胞懸濁液を添加して 60 mm ディッシュに播種し、インキュベーター内で培養を行った。

生細胞数の計測にはトリパンブルー溶液 (invitrogen) を用いた。本研究では、confluence 80% 以上、生細胞確率 90% の細胞を用いた。

2.9.2 細胞生存率

本研究では、細胞生存率の評価に CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3580, Promega Corp) を用いた。この試薬キットに含まれている 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) の発光を計測することで、生存率を評価した。MTS は、培地中に添加した MTS テトラゾリウムが生細胞中の電子キャリアー PES (phenazine ethosulfate) を介して、テトラゾリウム塩 (MTS; [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]) に還元されることで生成するホルマザン色素の発光 (490 nm) を検出した。生細胞が多いほど、吸光度が高くなるため、生細胞の生存率を定量することができる。本研究では、マイクロプレートリーダー (POWERSCAN HT, DS Pharma Biomedical) を用いて 490nm の吸光度で測定し、コントロール試薬との吸光度の比を算出することで細胞生存率を示した。生細胞が多いほど、吸光

度が高くなるため、生細胞の生存率を定量することができる。図 2.9 に MTS 試薬と還元反応物であるホルマザン色素の構造式を示す。

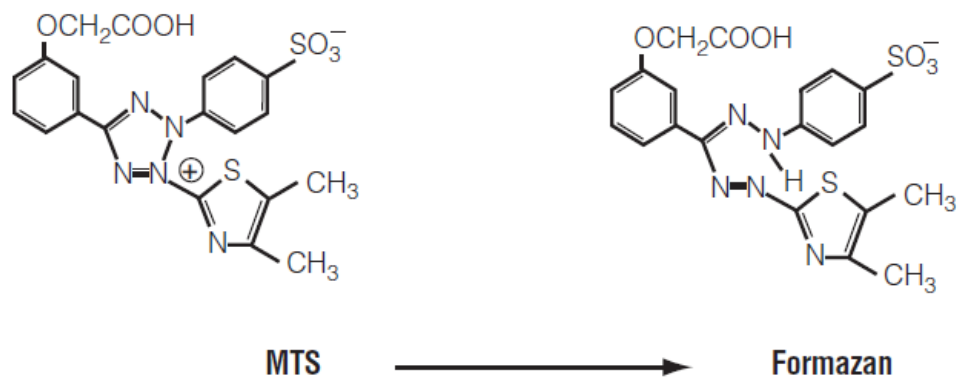


図 2.9 MTS テトラゾリウム塩の構造とその Formazan 生成物。^[23]

細胞生存率評価の実験手順の詳細を以下に示す。

【96 ウェルプレートへの細胞播種】

1. 継代手順と同様にして細胞懸濁液を得た。
2. 上記の細胞懸濁液 10 μL とトリパンブルー 10 μL を混合し、血球計算盤を用いて生細胞数を数え、細胞懸濁液中の生細胞濃度を計算した。
3. 所望の生細胞濃度になるように、DMEM と細胞懸濁液を混合し、8 連ピペットを用いて 96 ウェルプレートに細胞を播種した。本研究では、1,000 個/ウェル、5,000 個/ウェル、10,000 個/ウェル等の密度で細胞を播種した。1 ウェルに入れる細胞懸濁液の量は 200 μL である。
4. クリーンベンチ内で 30 分程度静置した後、37°C の CO_2 インキュベーターに入れ、約 24 時間培養した。

【PAM の作製】

1. PAM の作製には、血清を含んでいない DMEM を用いた。冷蔵庫から取り出し、室温に戻すためにクリーンベンチ内に静置した。
2. 培養液を 35 mL ディッシュに DMEM を 3 mL 入れ、培養液にプラズマを照射した。
3. インキュベーターから 96 ウェルプレートを取り出し、8 連ピペットを用いて培養液と PAM を入れ替えた。加えた PAM の量は 200 μL である。
4. 37°C の CO_2 インキュベーターに入れる。約 24 時間培養した。

【MTS アッセイ】

1. MTS 試薬 0.96 mL と DMEM 9.6 mL をリザーバー内で混合してアルミホイルで遮光した。

2. 2 日目に培養したインキュベーターから 96 ウェルプレートを取り出し、PAM と MTS 試薬+DMEM(100 μ L)を入れ替えた。
3. 30 分～60 分間、37°Cの CO₂インキュベーター内で培養した。時間は細胞数や PAM の条件によって最適な時間を選択した。

2.10 化学プローブを用いた比色計測

2.10.1 過酸化水素(H_2O_2)の定量

H_2O_2 の定量には、Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen) を用いた。Amplex® Red 試薬は無色の基質であり、horseradish peroxidase(HRP)を触媒として過酸化水素(H_2O_2)と 1:1 の化学量で反応して Resorfin を生成する(図 2.10)。レゾルフィンには、540 nm に強い吸収を持つが、Amplex Red®試薬は同波長に吸収を持たないため、吸光度は反応した H_2O_2 の量を示す。

Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit には、Amplex Red 試薬、dimethyl sulfoxide(DMSO), 0.25 mol/L のリン酸緩衝液(PBS), HRP, および 2 mmol/L の H_2O_2 標準液が含まれている。 H_2O_2 標準液を 0.25 mol/L の PBS で 20, 10, 5 $\mu\text{mol/L}$ に希釈し、0 $\mu\text{mol/L}$ と合わせて検量線を作製した。試料は検量線の濃度範囲に入るように PBS で希釈して測定し、濃度算出後に希釈した倍率を考慮して示した。測定は triplicate で行った。また、DMEM の吸収を考慮するために、プラズマを照射していない DMEM を試料の希釈倍率と同様に希釈し、その吸光度を background として差し引いた。

生成したレゾルフィンの 560nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、検量線を用いて定量した。

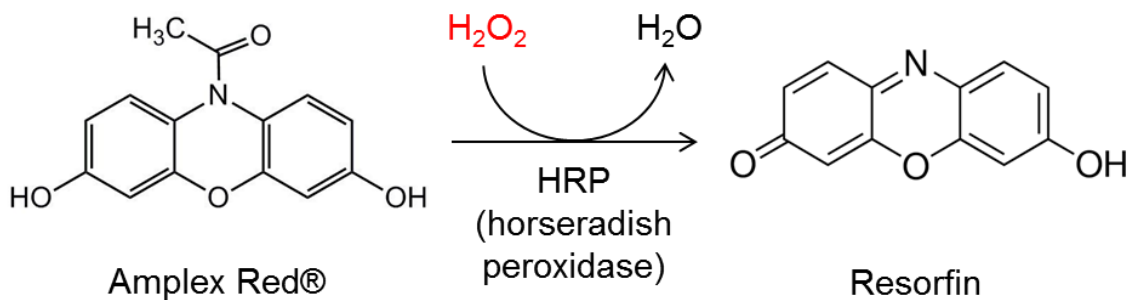


図 2.10 HRP を触媒とした Amplex Red® と H₂O₂ の反応。^[24]

2.10.2 亜硝酸イオンの定量

NO₂⁻の定量には、Oxiselect™ Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Assay Kit を用いた。この試薬は試料中の Nitrate (NO₃⁻) を Nitrate Reductase (硝酸還元酵素) で Nitrite (NO₂⁻) に還元後、Griess 試薬で検出する方法である。Oxiselect™ Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Assay Kit には、sulfanilamide, 触媒となる N-(1-naphthyl)ethylene diamine 溶液および溶媒が含まれている。sulfanilamide のアミノ基が NO₂⁻によってアゾ基に置換され、さらに N-(1-naphthyl)ethylene diamine が触媒となって 540nm に吸光ピークを示すアゾ化合物が生成する(図 2.11)。540 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して、NO₂⁻の定量を行った。なお、標準溶液を 8.75, 35, 140 μmol/L に希釈して検量線を用いて定量した。試料は検量線の濃度範囲に入るように純水で希釈して測定し、濃度算出後に希釈した倍率を考慮して示した。測定は 3 試料を同時に行った。また、DMEM の吸収を考慮するために、プラズマを照射していない DMEM を試料の希釈倍率と同様に希釈し、その吸光度を background として差し引いた。

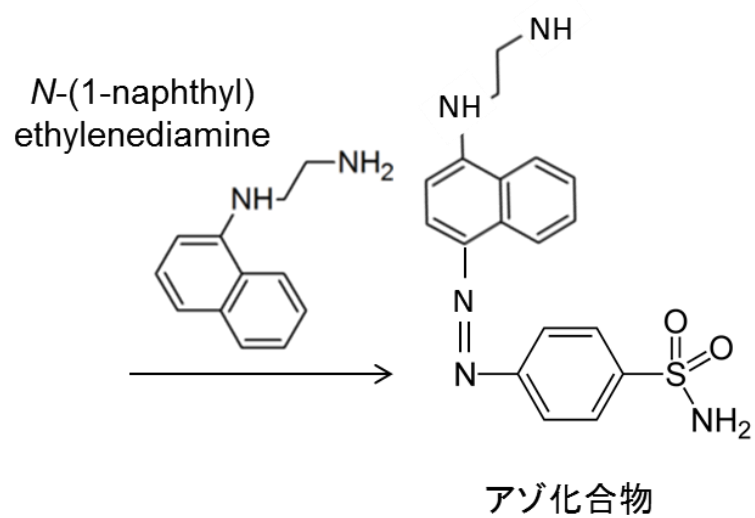
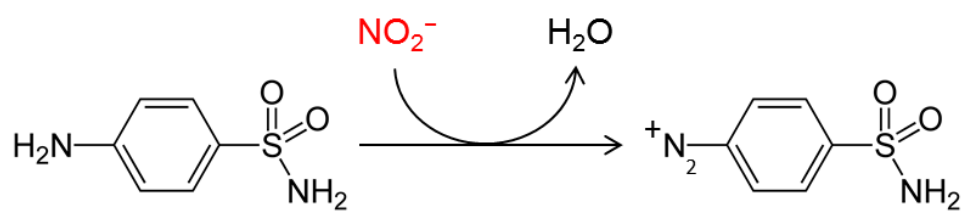


図 2.11 Sulfanilamide と NO_2^- の反応による定量。^[25]

2.11 電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance, ESR)

PAM 中に生成する OH ラジカルを定量するために、ESR 測定を行った。

ESR は、試料中の不対電子を検出できることができる。不対電子を有する物質は常磁性と呼ばれ、スピンを有する。1つの分子軌道に格納される2つの電子はパウリの排他原理にしたがって、スピンの向きが逆向きに配置される。電子スピンは磁場中では磁場に対して平行または反平行に配向する。ゼーマン効果によって、磁場中においては平行に配向したスピンは不安定化するが、反平行に配向したスピンは安定化する。2つのスピンのエネルギー差は、磁場の強度に比例し、そのエネルギー差 (ΔE) がマイクロ波のエネルギーと一致した時に、電子スピンはマイクロ波を吸収して、上準位に励起されるため、ESR シグナルが観測される。共鳴条件は次式で表される。

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B H \quad (2.22)$$

μ_B はボーア磁子であり、 $9.274 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$ 、 H は磁場強度 (mT)、 h はプランク定数、 ν は共鳴周波数 (Hz) を示す。 g 値は不対電子の持つ電子スピンの環境によって決まる固有値であり、式 (2.22) を用いて共鳴周波数と磁場から g 値を得ることができる。

OH ラジカルの液相での寿命は数十 μ 秒と言われており液相中で速やかに反応してしまいうため、OH ラジカルの定量のためにスピントラップ法を用いた。OH ラジカルのスピントラップ剤は 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) が良く用いられる。図 2.12 に DMPO の構造と $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{H}$ との反応によるスピニアダクトの構造を示す。

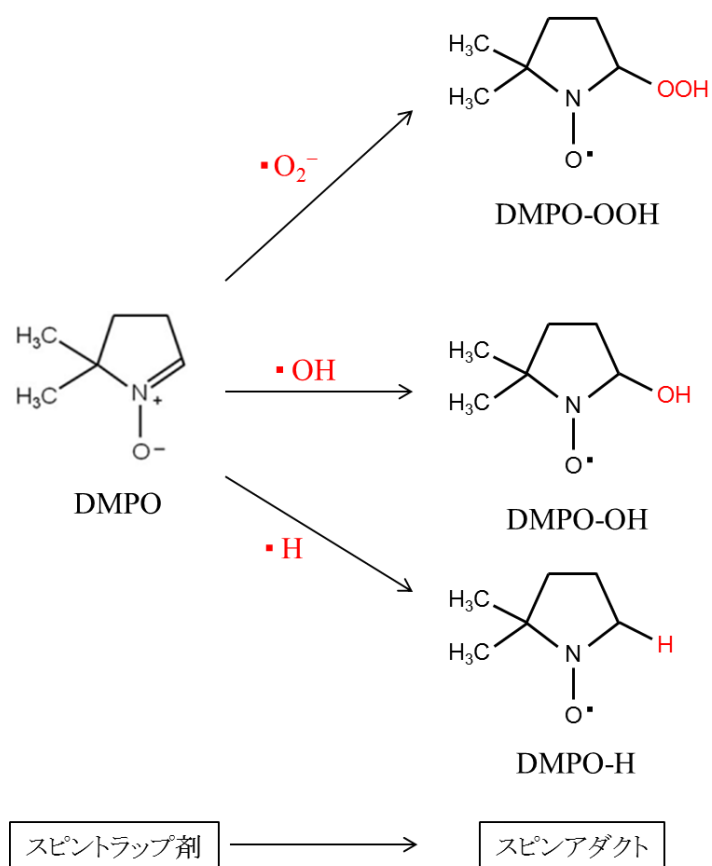


図 2.12 DMPO とラジカルの反応によるスピニアダクトの構造。

ESR 測定には、標準 X バンド (9 GHz) 分光器である EMX plus (Bruker Biospin 社製) とマイクロ波共振器 (ER4119HS-W1, Bruker Biospin) を用いた。

3 mL の DMEM に対して、5 μL の DMPO を添加し、マイクロ波励起プラズマを所定時間照射した。照射後の試料 32 μL を石英ガラス管に入れて測定した。プラズマ照射直後から測定開始までの時間は 30 秒に固定した。

2.12 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS)

LC-MS/MS は高速液体クロマトグラフ (HPLC) とタンデム型トリプル四重極質量分析計 (MS/MS) を組み合わせた分析法であり、試料を HPLC で分離した後 MS/MS 分析を行う。HPLC は、液体の移動相をポンプなどによって加圧してカラムを透過させる際、試料に含まれる物質が固定相と相互作用しながら移動相と共に移動するときの速度の差を利用して分離する装置である (図 2.13)。

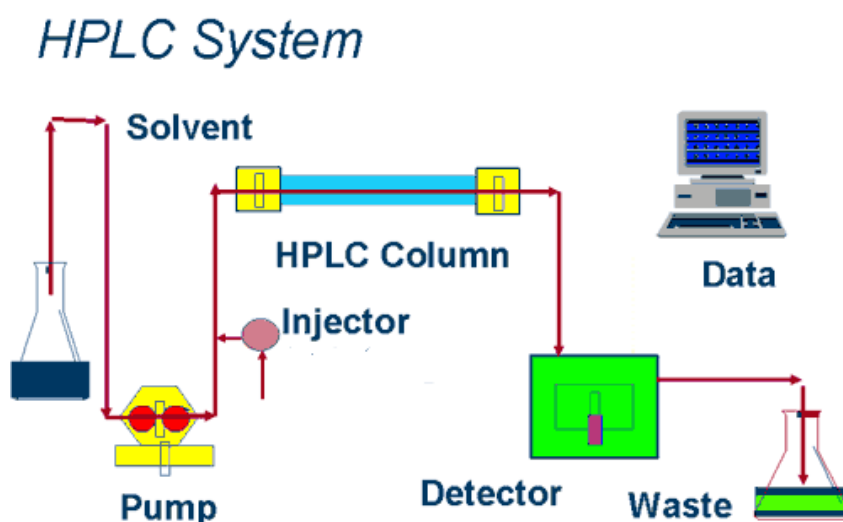


図 2.13 HPLC システム。^[26]

HPLC によって分離された試料をイオン化させる方法には一般的にエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が用いられる。^[27] ESI 法では、HPLC による分離液をキャピラリーから噴出させる際、2000 V から 4000 V の高電圧を印加して帯電させる。帯電の影響により液滴の溶媒は蒸発、帯電イオンの分裂を繰り返す (イオン蒸発)。最終的には液滴から単一物質 (分子) を抽出する。

イオン化されたイオンは質量分析部において、質量/電荷(m/z)別に識別される。トリプル四重極 (MS/MS) は2つの四重極質量分析計で電子衝突室を挟んで直列に連結したものである(図 2.14)。1つ目の MS 部 (MS-1) では、イオンが分離され目的質量を有するイオンを選択的に衝突室に導入する。衝突室内の電子によってイオンは開裂する。開裂は化合物によって異なるため、分子構造から解離イオン化したフラグメントイオンの m/z を示す。2つ目の MS 部 (MS-2) では、電子衝突室で形成したフラグメントイオンを質量分離し、イオンを検出部に導入する。このように 2 段階の質量イオン選択段階によって、極微量成分であっても、フラグメントパターンから物質を特定して検出することが可能になる。

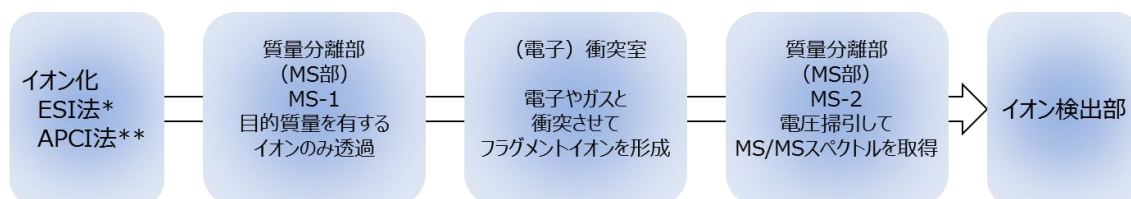


図 2.14 トリプル四重極型質量分析計の構成。

*ESI 法 : エレクトロスプレーイオン化法

**APCI 法 : 大気圧化学イオン化法

2.13 核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

核磁気共鳴(NMR)は原子核のスピンの状態に関係した現象であり、有機分子に含まれる水素や炭素原子の結合状態に関する情報を与えるので、分子構造の解析に欠くことのできない手段となっている。^[28] 磁場のもとでは、原子核スピンのエネルギー準位が分裂し、その大きさが個々の原子の結合や電子状態に依存しており、また原子核の間に相互作用があるので、それらを観測し解析する。

原子核は固有の核スピン量子数を有しており、その値がゼロではない核は核スピンを持つ。磁場中に核スピンの置かれると、ゼーマン効果によってスピン状態エネルギー準位は分裂し、そのエネルギー差を検出することによって、核スピンの状態を得ることができる。核スピンをもつ代表的な元素は、¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁹F, ³¹P であり、これらは NMR の測定対象である。^[28]

磁場のないところでは核スピンの向きはランダムであるが、磁場をかけるとその磁場と同じ向きの安定な状態(α スピン)と逆向きの不安定な状態(β スピン)に分かれる。 α スピンと β スピンのエネルギー差 ΔE は印加した磁場(外部磁場)の強度 B_0 に比例し、式(2.23)で与えられる。

$$\Delta E = h\nu = h(\gamma/2\pi)B_0 \quad (2.23)$$

h はプランク定数、 γ は磁気回転比と呼ばれ原子核に固有の値である。¹H の磁気回転比は $\gamma = 2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ である。2つのスピン状態のエネルギー差 ΔE はラジオ波(マイクロ波)のエネルギー(周波数 ν)に相当し、ラジオ波を吸収すると α スピン状態の核の一部が反転して β スピン状態になる。励起された核は同じ周波数のラジオ波を放

射して α スピン状態に戻る。この状態を核磁気共鳴と呼び、NMR 装置では放射されるラジオ波の時間波形を検知し、フーリエ変換して NMR スペクトルを得る。^[28]

本研究では¹H-NMR を用いた。¹H はほとんどの有機化合物に含まれ、核スピンを持つ同位体¹H の天然存在度がほぼ 100% であることから測定感度が高いので、細胞培養液に含まれる有機化合物の結合状態を解析する方法として適していると言える。^[28]

¹H-NMR のシグナル面積は、分子に含まれる水素原子の数に比例することから、シグナルを与えた H の相対的な数に対応する。^[28] 本研究では、プラズマ照射前の DMEM とマイクロ波励起プラズマを照射した PAM の面積値を比較することによって、マイクロ波励起プラズマの照射によって変化した H を含む化学結合の量を評価した。

参考文献

- [1] 日本学術振興会プラズマ材料化学第 153 員会編、大気圧プラズマ 基礎と応用
オーム社、**2009**。
- [2] E. E. Kunhardt, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **2000**, 28, 189.
- [3] F. Tochikubo, T. Chiba and T. Watanabe, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1999**, 38, 5244.
- [4] S. Kanazawa, M. Kogoma, T. Moriwaki and S. Okazaki, *J. Phys. D : Appl. Phys.*,
1988, 21, 838.
- [5] R. Bartnikas, *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **1968**, 1, 659.
- [6] K. Takaki, D. Kitamura and T. Fujiwara, *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **2000**, 33, 1369.
- [7] K. kabouzi, M. D. Calzada, M. Moison, K. C. Tran and C. Trassy, *J. Appl. Phys.*,
2002, 91, 1008.
- [8] H. Inui, K. Takeda, H. Kondo, K. Ishikawa, M. Sekine, H. Kano, N. Yoshida and M.
Hori, *Appl. Phys. Express*, **2010**, 3, 126101.
- [9] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito and M. Hori, *Appl.*
Phys. Lett., **2008**, 92, 081503.
- [10] Y. Iwata, H. Sakamoto, H. Inui and M. Hori, *J. Surf. Finish. Soc. Jpn.*, **2011**, 62,
311.
- [11] F. Jia, N. Sumi, K. Ishikawa, H. Kano, H. Inui, J. Kularatne, K. Takada,
H. Kondo, M. Sekine, A. Kono and M. Hori, *Appl. Phys. Express.*, **2011**, 4,
026101.
- [12] J.M. Luque, M. D. Calzada, and M. Saez, *J. Phys. B*, **2003**, 36, 1573.
- [13] C. Yubero, M. D. Calzada , and M.C. Garcia, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **2005**, 74, 2249.
- [14] Q. Wang, I. Koleva, V.M. Donnelly, and D.J. Economou, *J. Phys. D*, **2005**, 38,

- 1690.
- [15] A. Ionascut-Nedelcescu¹, C. Carlone, U. Kogelschatz, D.V. Gravelle, and M.I. Boulos, *J. Appl. Phys.*, **2008**, 103, 063305.
- [16] C.O. Laux, T.G. Spence, C.H. Kruger, and R. N. Zare, *Plasma Sources Sci. Technol.* **2003**, 12, 125.
- [17] 後藤俊夫, 森正和 *量子エレクトロニクス* (昭晃堂, 1998) pp.44-45。
- [18] A. Y. Nikiforov, C. Leys, M. A. Gonzalez and J. L. Walsh, *Plasma Sources Science and Technology*, **2015**, 24, 34001.
- [19] H. R. Griem, *Plasma Spectroscopy*, (McGraw-Hill, New York) **1964**.
- [20] H. Honl and F. London, *Z. Physik*, **1925**, 33, 803.
- [21] 中川雄介 *東京大学学位論文* **2011**。
- [22] S. Yonemori, R. Ono and T. Oda, *Proceedings of Industry Applications Society Annual Meeting (IAS)*, **2012**, IEEE.
- [23] CellTiter 96[®] 製品プロトコールファイル。
<https://www.promega.jp/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?la=ja-jp>.
- [24] http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS_services.html.
- [25] <http://www.funakoshi.co.jp/contents/63028>.
- [26] https://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Waters_HPLC_MS_TitlePg.html.
- [27] 望月直樹, *薬学雑誌*, **2011**, 131, 1019。
- [28] https://pub.maruzen.co.jp/book_magazine/yuki_shohan/web/spectrum_kettei/4NM R.pdf.

第3章

マイクロ波励起プラズマの診断

この章では、マイクロ波励起プラズマの特性を把握するために、発光分光法による発光種の同定、発光種の分布、電子密度、ガス回転温度の計測結果について記述する。さらに、OHラジカル密度をレーザー誘起蛍光(LIF)法によって計測し、さらにOHラジカルによるLIF強度分布について検討した結果を記述する。

3.1 背景

本章では、マイクロ波励起プラズマから気相中に生成する活性種を把握するために、プラズマ計測を行った。マイクロ波励起プラズマの電子密度(=プラズマ密度)やガス回転温度等の諸物性を把握し、公開されている他の大気圧プラズマ源と比較することで、マイクロ波励起プラズマの特徴を得ることを目的に進めた。

3.2 発光分光法

3.2.1 実験方法

分光器には Andor 社製の Shamrock SR-500-B10 を用いた。回折格子の刻線数は 2400 lines/mm、ブレイズ波長は 300 nm である。紫外線撮影用 UV レンズ (UV-105mmF4.5, ニコン) を用いて測定領域に焦点を合わせ、iCCD センサー (iStar, DH334T-18U-03, Andor) で検出した。測定したい波長範囲が一度に取得できる回折

格子の分光波長範囲よりも広い場合は、回折格子を走査しながら計測し、その重なり(オーバーラップ)を10%とした。

測定箇所はマイクロ波励起プラズマの出射口から5 mm 下の位置とした。また、細胞培養液へのプラズマ照射中の発光種を特定するために、プラズマの下に細胞培養液を含むシャーレを置いた状態で測定した(図 3.1)。

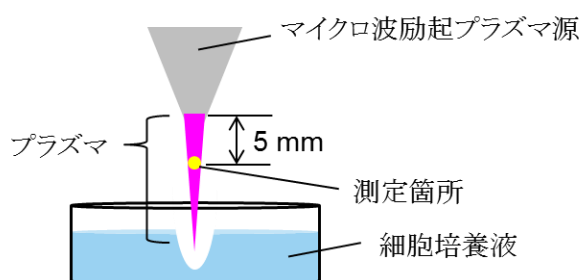


図 3.1 発光分光測定の実験時の様子と測定箇所。

発光種の分布は、レンズと測定対象であるプラズマの間にバンドパスフィルターを設置して、所望の発光のみをiCCDカメラで検出し、2次元イメージを得た。使用したバンドパスフィルター(Andover Corporation 製)の特性について、表 3.1 に整理した。

表 3.1 バンドパスフィルターの中心波長と半値全幅。

発光種	中心波長 (nm)	半値全幅 (nm)	品番
•NO (A-X)	248	10	248FS10-50,
•OH (A-X)	310	10	310FS10-50,
Ar (4p-4s)	750.3	0.8	010FC14-50, (custom)
O (3p-3s)	844.6	1	010FC14-50, (custom)

3.2.2 発光種の同定

図 3.2 にマイクロ波励起プラズマの発光スペクトルを示す。放電条件は、Ar 流量 2 slm, 電源出力 50W である。測定箇所は、プラズマの出射口から 5 mm 下の位置に焦点をおき測定を行った。700 nm から 870 nm の波長域に現れるピークは、ほとんどが流したガスの Ar 原子の発光および大気から巻き込まれた酸素原子の発光に帰属された (図 3.3)。Ar の原子発光は他の発光に比べて圧倒的に強度が高くマイクロ波励起プラズマの発光の大部分を占めることがわかった。

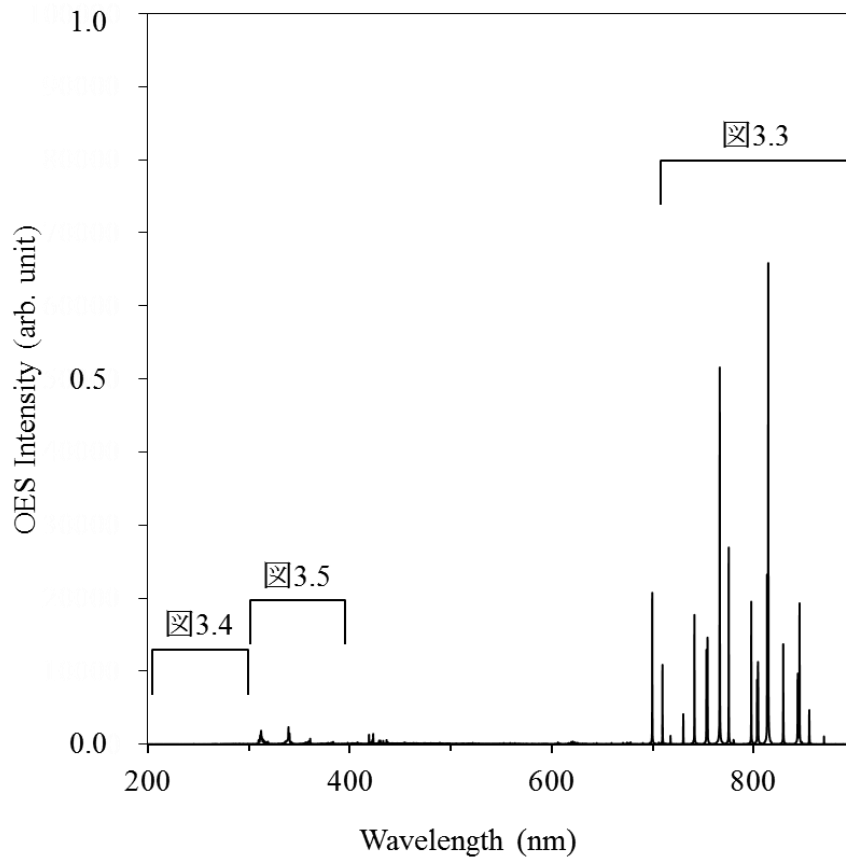


図 3.2 マイクロ波励起プラズマの発光スペクトル。

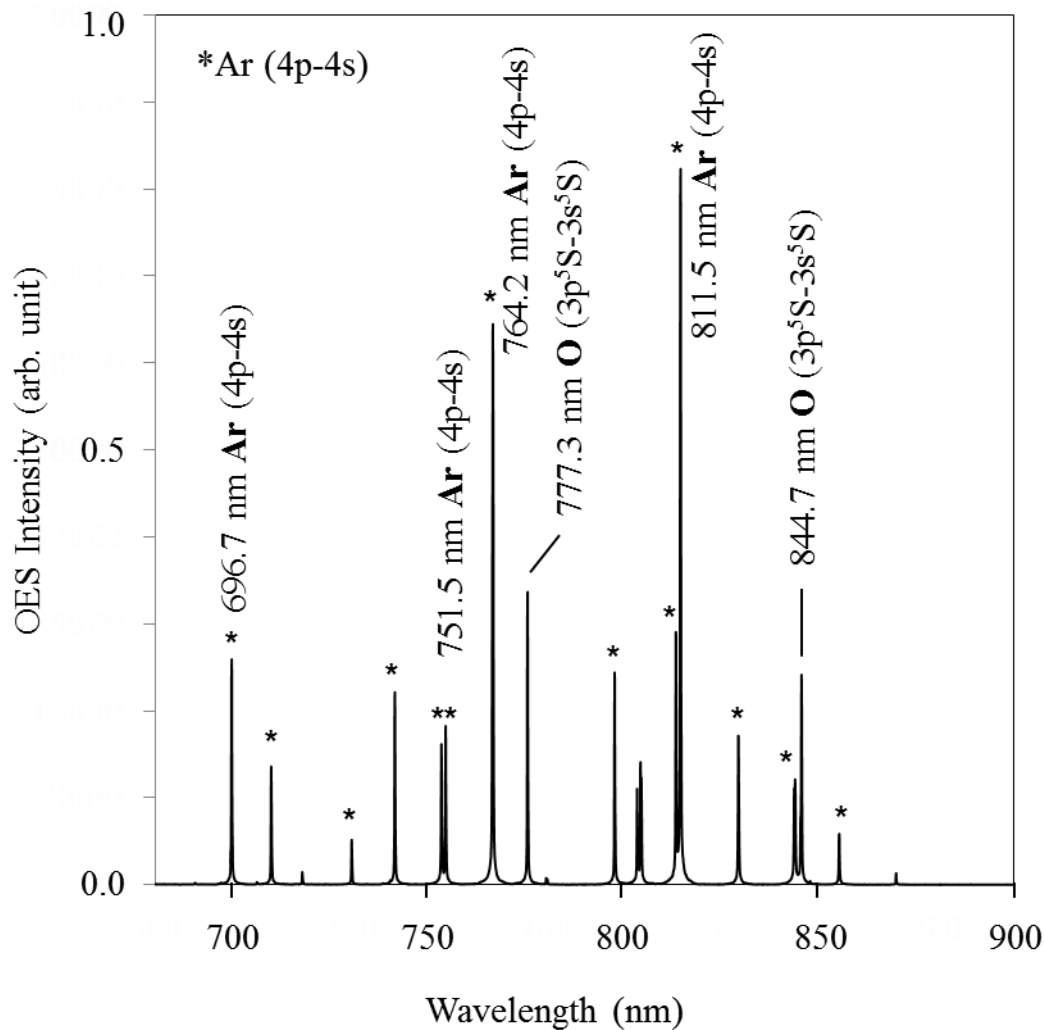


図 3.3 マイクロ波励起プラズマの発光スペクトル (690 nm から 900 nm)。

図 3.4 に 180 nm から 280 nm の範囲の発光スペクトルを示す。非常に弱い NO- γ ($A^2\Sigma^+-X^2\Pi$)の発光ピークが観測された。それぞれのピークは 226.9 nm は振動準位 $v'=0$ から $v''=0$ (以下(0,0)と示す。), 237.0 nm は (0,1), 247.9 nm は (0,2), 259.6 nm は (0,3)の発光に帰属される。図 3.5 に 280 nm から 390 nm の範囲の発光スペクトルを示す。309.4 nm に観測されたピークは OH ラジカル ($A^2\Sigma^+-X^2\Pi$)間の発光

に帰属される。NO- γ に比べると強い発光を示した。さらに、強いN₂の2nd positive system (C³Π-B³Π)の発光が 330 nm から 380 nm 付近に観測された。各発光ピークは、337.1 nm は (0,0), 353.7 nm は (1,2), 357.7 nm は (0,1), 375.5 nm は (1,3), 380.5 nm は(0,2)の遷移に帰属される。^[1]

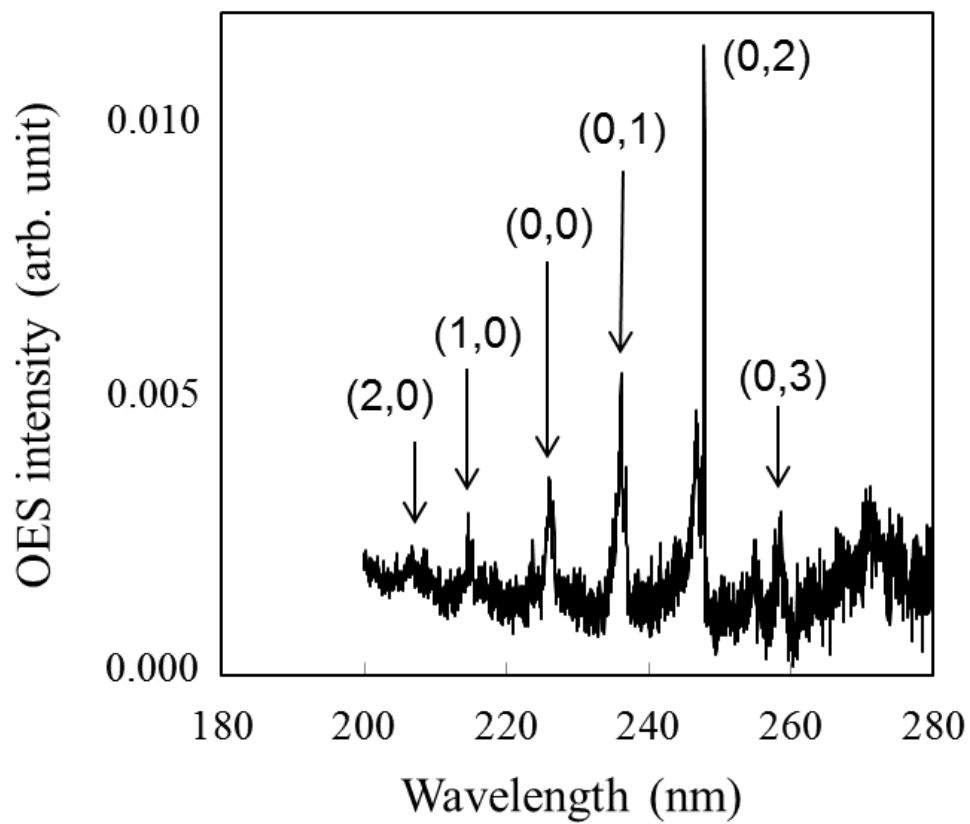


図 3.4 マイクロ波励起プラズマの発光スペクトル(180 nm から 280 nm)。

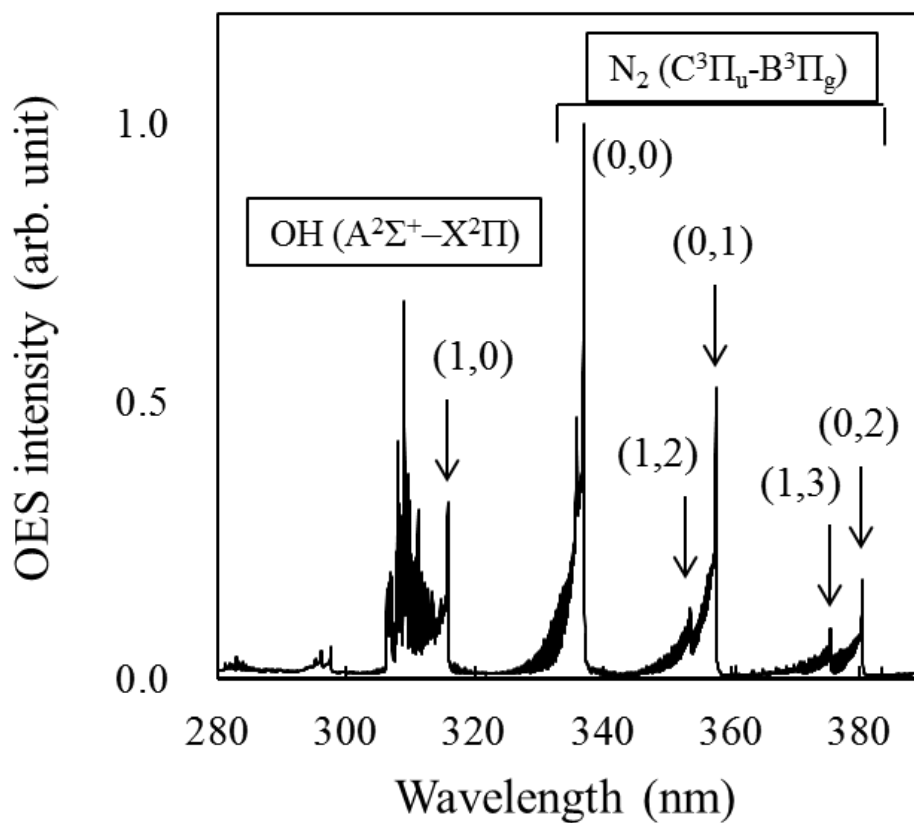


図 3.5 マイクロ波励起プラズマの発光スペクトル (280 nm から 390 nm)。

図 3.6 にバンドパスフィルターを用いた各発光種の発光分布を示す。図 3.6(a)に示したフィルターなしの条件で得た発光分布は、ほとんどの発光はプラズマ出射口から 6 mm の範囲に存在しており、プラズマ先端に向けて徐々に弱くなっていく様子が確認された。つまり、マイクロ波励起プラズマの発光種は出口から 6 mm までの範囲で見られる。O 原子、Ar 原子の発光は非常に強く、プラズマ領域の中央に分布している。

O原子は液中の活性種の生成に寄与していることが知られている。^[2-6] O原子とH₂Oが反応し、H₂O₂を生成することは良く知られている。^[7,8] Ar原子も同様に他の粒子と衝突して活性種を生成することができる。

OHラジカルの発光はプラズマ出射口から約6 mmの領域に位置している。また、ArやO原子の発光分布がプラズマ領域の中心に狭く分布しているのに対し、OHラジカルは、分布に拡がりが見られた。これは、大気中成分との反応によるOHラジカルの生成が寄与していることを示唆している。OHラジカルは、大気中の水分や酸素から生成すると考えられる。OHラジカルは液中にH₂O₂を生成する主な活性酸素種であり、気相中で2OH•→H₂O₂という反応が進行する。生成したH₂O₂が液体に溶解する。

NO-γの発光ピークは非常に弱く、プラズマ領域の周囲に拡散している。NOの生成過程は、



というZeldovich反応が説明されている。^[9] 上記の式によると、O原子が大気中の窒素と反応してNOを生成する。

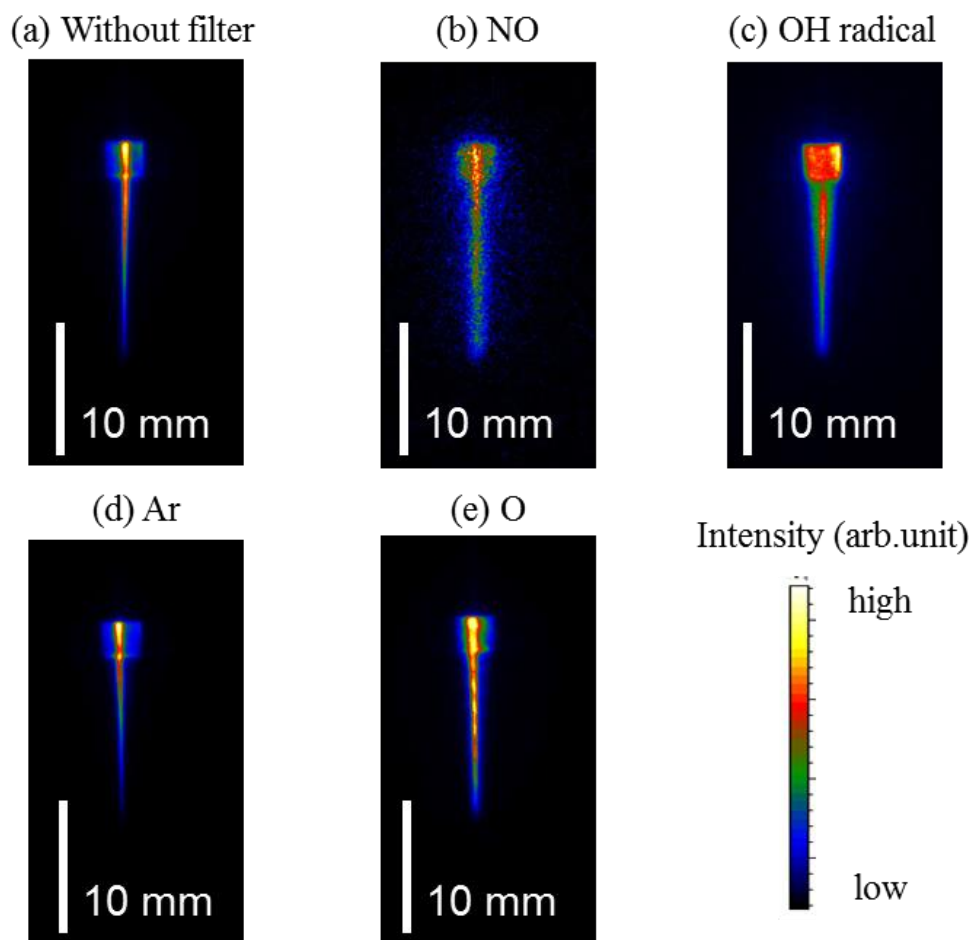


図 3.6 各発光種の発光分布。

3.2.3 マイクロ波励起プラズマの電子密度

観察された H_{β} の発光スペクトル (486.13 nm) と、2.5.2 章において示したように各種スペクトル広がり を考慮して計算したスペクトルのフィッティング結果を図 3.7 に示す。ローレンツ関数のうちシュタルク広がり に起因するスペクトルの半値全幅は 0.1588 nm であり、電子密度は $7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と見積もられた。

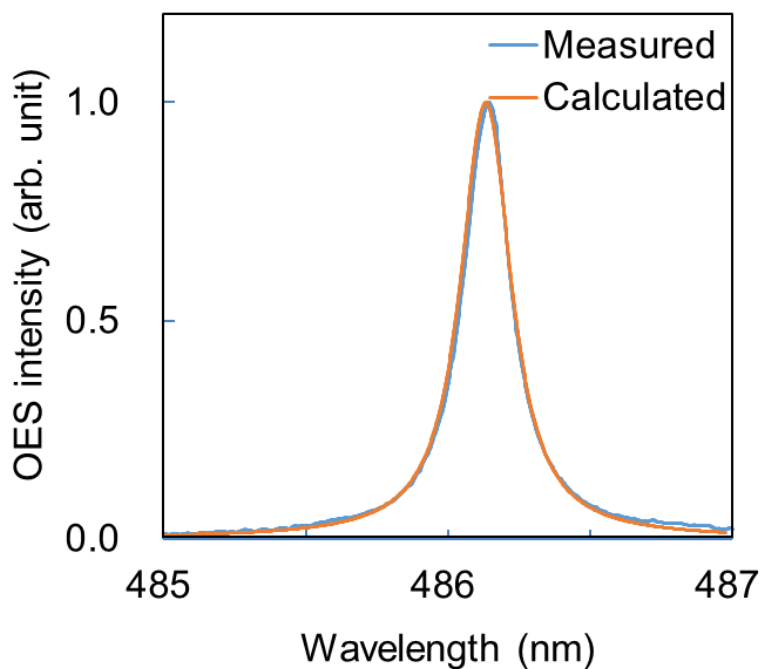


図 3.7 マイクロ波励起プラズマの H_{β} 発光スペクトル。

マイクロ波励起プラズマの電子密度は、2.3 章で示した名古屋大学の堀研究室で開発された $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ ^[10] と高密度の 60 Hz 非平衡大気圧プラズマの 1/30 であった。He ガスによる 60 Hz 大気圧プラズマの電子密度は $1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ 、^[11] マイクロ波誘導プラズマは、 $4.6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 、^[12] Ar の RF プラズマジェットは $1.34 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と報告されている。^[13]

3.2.4 マイクロ波励起プラズマのガス回転温度

図 3.8 に N_2 の 2nd positive system ($C^3\Pi-B^3\Pi$) の発光スペクトルと、2.6 章に記述した方法によってフィッティングしたスペクトルを示す。プラズマ出射口から 5 mm 下の発光が強い箇所におけるガス回転温度は、 $1600\text{ K} \pm 30\text{ K}$ と概算された。

岩崎らが報告している 60 Hz 大気圧プラズマのガス回転温度は 1850 K から 2150 K であり、^[10] マイクロ波励起プラズマとほぼ同じガス温度を示している。また、マイクロ波誘導プラズマは、386 K と報告されている。^[12] ガス回転温度は 1600 K と高いが、培養液にマイクロ波励起プラズマを照射した前後の培養液の液温を温度計で測定したところ照射前は 303 K であり、照射後は 313 K であった。プラズマ照射による培養液の蒸発量は 0.044 g であり照射前の DMEM の質量の 1.5% 程度の減少であった。1600 K というガス回転温度は本研究で用いたマイクロ波励起プラズマ領域において最も発光の強いプラズマ出射口から 5 mm 下の位置で測定したガス回転温度である。照射後の培養液の蒸発量を考慮すると、ガス回転温度を計測した発光部では解離の余剰エネルギーの影響で十分緩和されていないこと、また培養液面に最も近いプラズマ先端ではガス流によって急激に冷却されていることが、ガス回転温度が高く見積もられた要因として考えられる。

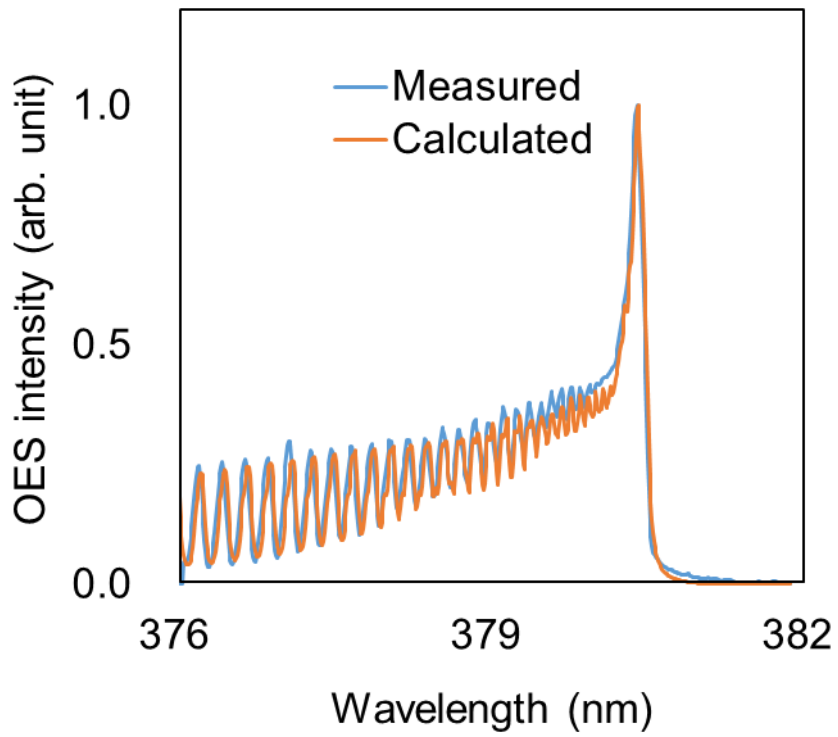


図 3.8 マイクロ波励起プラズマの N₂ 2nd positive system (C³Π-B³Π)の
発光スペクトル。

3.3 レーザー誘起蛍光法 (Laser Induced Fluorescence, LIF)

3.3.1 実験方法

図 3.9 に実験系の概略を示す。励起光には光パラメトリック発振(Optical Parametric Oscillation, OPO)レーザーを用いた。OPO レーザーは非線形光学効果を利用した広域波長可変レーザーで、第二高調波発生(second harmonics generation, SHG)と組み合わせることで 225 nm~1.8 μm のレーザー光を生成することができる。^[14] 282 nm に設定した OPO レーザーを直径 2 mm 程度に絞り、マイクロ波励起プラズマの測定箇所を通過するように調整する。一方で紫外線撮影用レンズ(Nikon Rayfact, UV-105mmF4.5)で測定箇所に焦点を合わせ、Andor 社製の分光器で分光して蛍光スペクトルを得た。分光器は外部トリガを用い、OPO レーザーのパルスタイミング(約 10 Hz)に合わせることで、282nm のレーザー光で励起して緩和する蛍光のみを分光器に取り込むことが可能となる。タイミングは Delay Generator (DG535, Stanford Research Systems)を使用し、Photo Detector で取り込んだレーザーのパルス波形をオシロスコープで確認しながら、Delay 時間を設定した。

また、励起レーザーをシリンドリカルレンズでシート状にすることでマイクロ波励起プラズマ領域全体の OH ラジカルを測定することができる(図 3.10)。このときの LIF シグナルをバンドパスフィルター(中心波長 310 nm, FWHM 10 nm, 310FS14-50, Andover corp.)を介して iCCD に取り込むことによって、OH ラジカルの LIF 発光分布を取得した。

図 3.10 に示すように 10 mm 角の石英ガラスセルに純水を入れ、マイクロ波励起プラズマ出射口と液面の距離によって OH ラジカル密度の分布がどのように変化するかを確認した。マイクロ波励起プラズマ源は 2 slm の Ar を流通させながら放電するため、そのガス圧によって、液表面は凹形状となる。本計測では、マイクロ波励起プラズマによ

って凹形状を形成している領域のOHラジカル分布を取得した。また、培養液(DMEM)を用いた場合、凹形状の領域では培養液に含まれるフェノールレッドによって励起光が吸収されてしまいOHラジカルが励起されないため、本計測では純水を用いた。

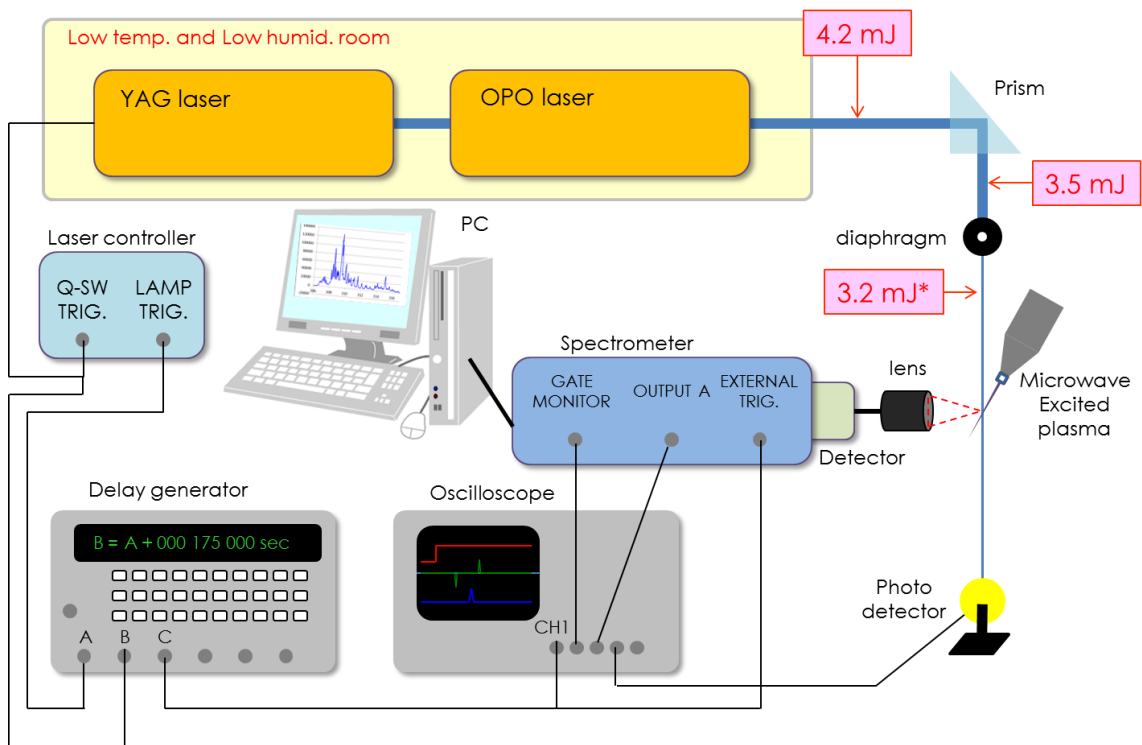


図 3.9 LIF 計測に使用した実験系の概略。

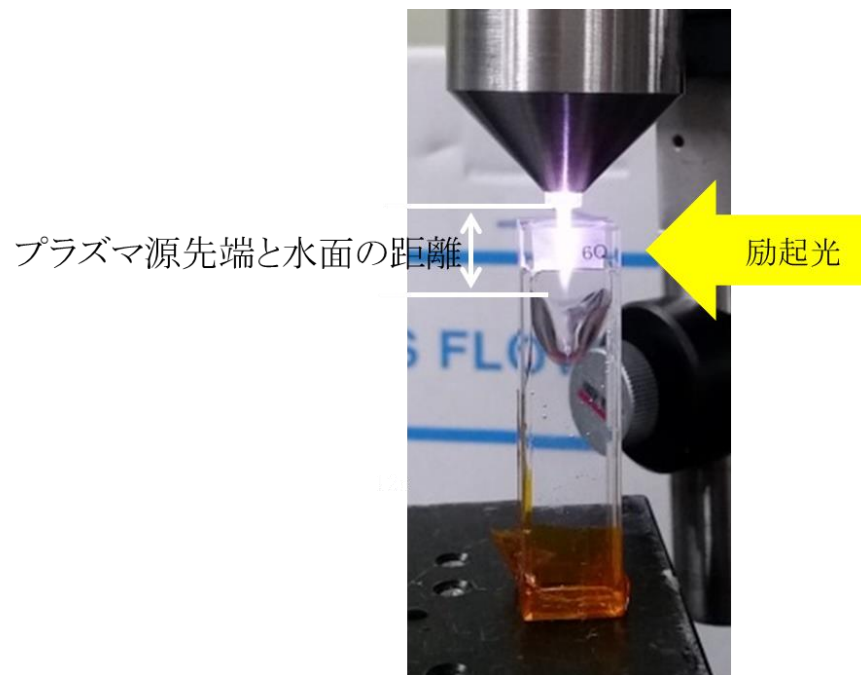


図 3.10 マイクロ波励起プラズマの OH ラジカル密度分布取得時の様子。

3.3.2 OH ラジカルの絶対密度

図3.11に得られたLIFスペクトルを示す。 $A^2\Sigma(v'=0)\rightarrow X^2\Pi(v''=0)$ の緩和蛍光を示す309 nmのピークと、 $A^2\Sigma(v'=1)\rightarrow X^2\Pi(v''=1)$ の緩和蛍光を示す315 nmのピークが観測された。

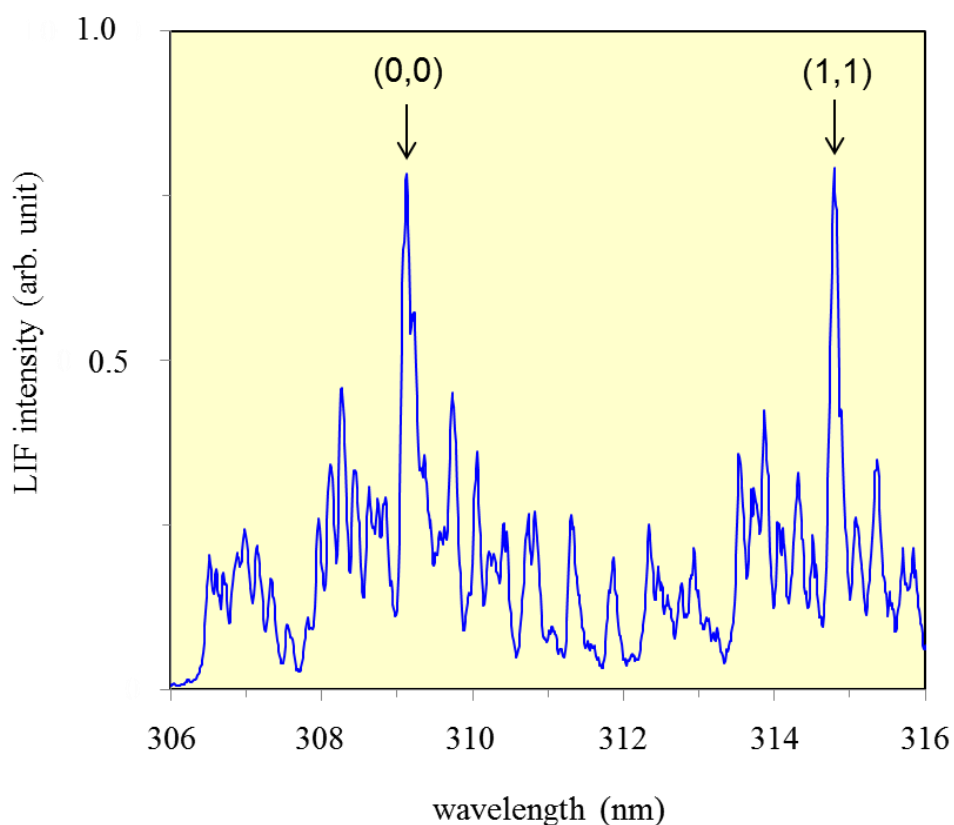


図 3.11 マイクロ波励起プラズマの LIF スペクトル。

図 3.12 に Delay time を 20 nsec から 600 nsec に掃引したときの各ピーク強度の変化を示す。LIF のピーク強度は、(b) プラズマ出射口から 5 mm 下の位置で最大となり、発光分光法による発光種の分布の結果と一致している。Delay time 掃引による 315 nm のピーク強度の変化が Rayleigh 散乱のピーク強度と同じ傾向であるのに対し、309

nm のピークは、Rayleigh 散乱のピークよりも遅れて最大のピーク強度となった。これは、OH ラジカルエネルギー準位における振動緩和 (Vibrational Energy Transfer, VET) の時間に対応していると考えられる。また、309 nm のピークは大気中でクエンチングの影響を受けて緩やかに減衰する様子が観測された。図 3.13 に(b)プラズマ出射口から 5 mm 下の位置における Decay 曲線を示す。図中の Γ_0 は $A^2\Sigma(v'=0) \rightarrow X^2\Pi(v''=0)$ の遷移 (309 nm のピーク) 及び Γ_1 は $A^2\Sigma(v'=1) \rightarrow X^2\Pi(v''=1)$ の遷移 (315 nm のピーク) の減衰係数である。2.7 節で示したように、 $\Gamma_0 = A_0 + Q$ であり、 A_0 は十分小さく無視できることから、 $Q_v = \Gamma_1 - (A_1 + Q + BI)$ より Q_v を算出し、この Γ_0 、 Q_v および、 Γ_1 を式(2.21)に代入して算出した OH ラジカルの絶対密度は、プラズマ出射口から 5 mm 下の位置において、 $1.9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と算出された。

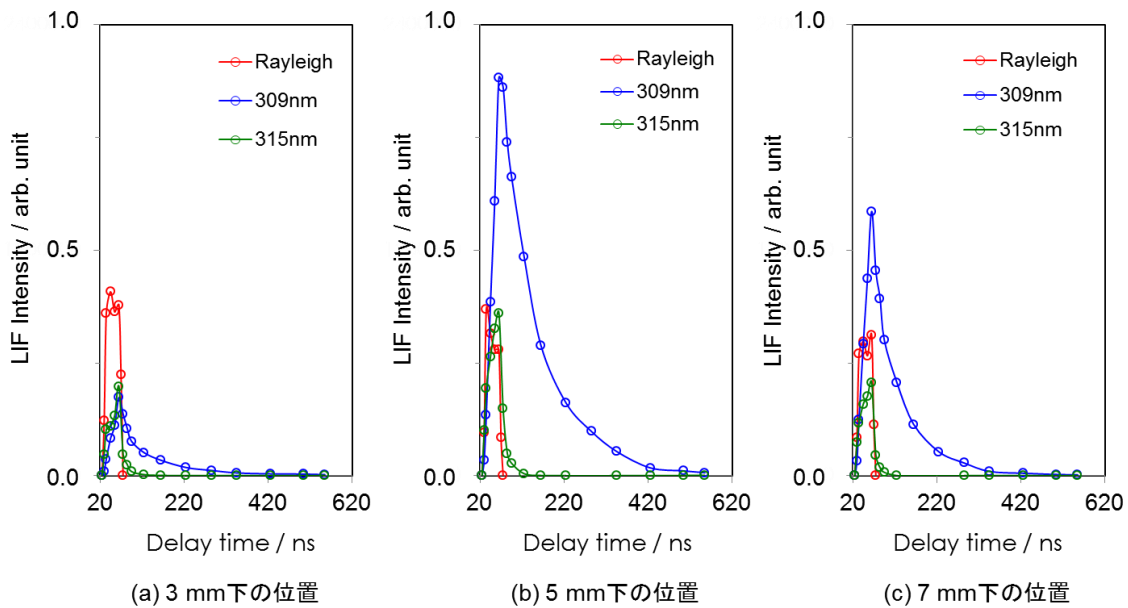


図 3.12 Delay time を 20 nsec から 600 nsec に掃引したときの Decay 曲線。

(a) プラズマ出射口から 3 mm 下の位置。

(b) プラズマ出射口から 5 mm 下の位置。

(c) プラズマ出射口から 7 mm 下の位置。

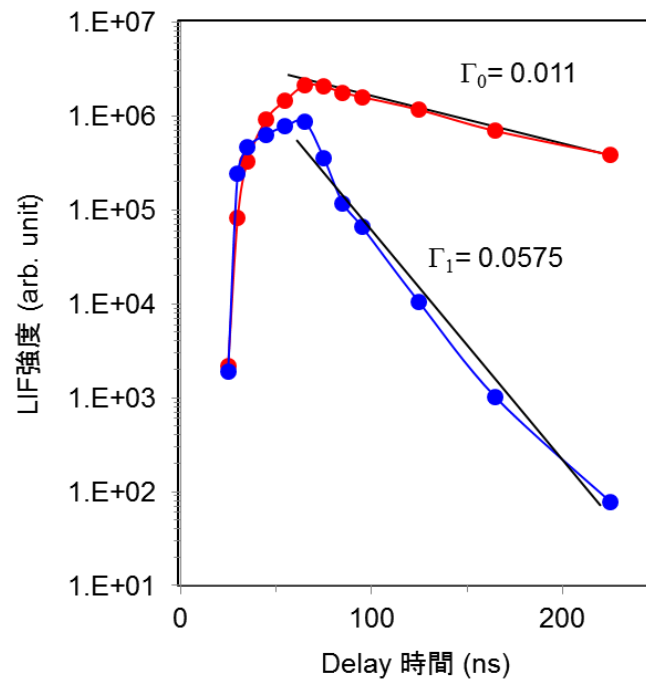


図 3.13 Decay 曲線より算出した減衰係数。

3.3.3 LIF 法による OH ラジカルの LIF 強度分布

水は電子と式(3.1)のような反応式によって OH ラジカルを生成するため、水の存在量は OH ラジカル生成量と深く関わりがあると考えられる。^[15]



本実験では、電子と液体が相互作用していることを確認するために、マイクロ波励起プラズマ源の下方に液体を設置し、マイクロ波励起プラズマと液面の距離と OH ラジカルの LIF 強度分布の関係について検討した。

発光分布を測定する場合と同様にレンズとマイクロ波励起プラズマの間にバンドパスフィルターを設け、OH ラジカルの LIF 強度分布を取得した。

図 3.14 に OH ラジカルの LIF 強度分布を示す。(b)と(c)を比較すると、最も強い蛍光を示している箇所は同じ位置であり、石英セルおよび水が存在していても LIF 強度を比較できると判断した。液面とプラズマが近い位置にある(c)の方が、LIF 強度が強いことから、液面から蒸発する水も OH ラジカル源となることが示唆される。

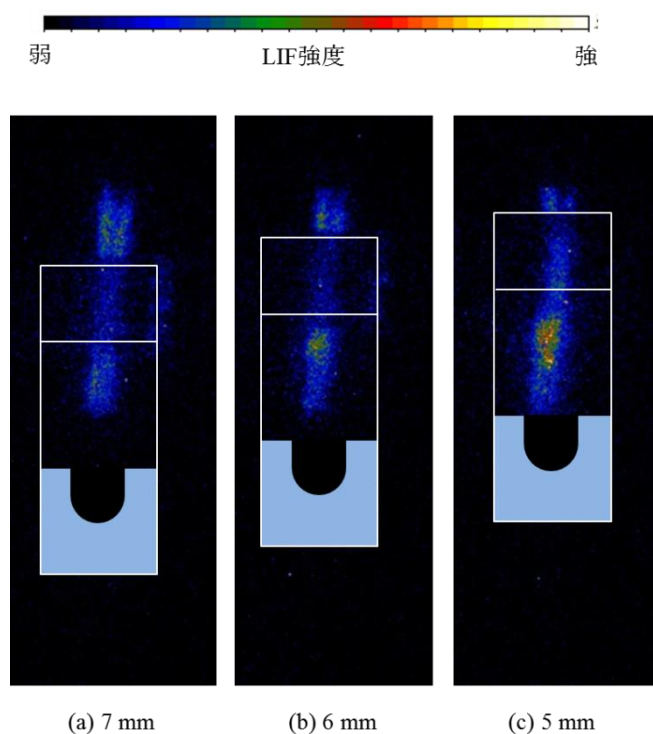


図 3.14 プラズマ出射口と液面の距離を変化させたときの OH ラジカル LIF 強度分布。

(a) 7 mm (b) 6 mm (c) 5 mm

OH ラジカルの生成と水の関係は以下のように考えられる。気相において、プラズマ源から生成した電子によって水 (H_2O) は、 $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{H}$ に解離する。^[15] さらに、 $\cdot\text{OH}$ と O 原子によって $\cdot\text{HO}_2$ が生成すると、は $\cdot\text{H}$ や $\cdot\text{O}$ と反応し、 $\cdot\text{OH}$ を生成することも考えられ

る。このような連鎖反応と、マイクロ波励起プラズマの連続放電によって、OH ラジカルの高効率生成が期待される。生成した $\cdot\text{OH}$ は気相で H_2O_2 の生成に寄与し、さらに培養液成分を酸化させていると考えられる。第 5 章にて、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM 中の OH ラジカル濃度、 H_2O_2 濃度を定量して、マイクロ波励起プラズマの特性を検討していく。

3.4 結論

本章では、マイクロ波励起プラズマの計測を行った。マイクロ波励起プラズマの発光種は、NO、OH ラジカル、 N_2 、O 原子、Ar であり、特に Ar 原子、O 原子の発光が支配的であった。マイクロ波励起プラズマでは、プラズマ出射口から 6 mm 下までの領域での発光が強くほとんどの発光種が存在している。これらの発光種は 60Hz 大気圧プラズマと発光種は同一であるが、特に NO ラジカルの発光強度がマイクロ波励起プラズマの方が小さかった。マイクロ波励起プラズマの電子密度は $7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ とガス回転温度は $1600 \text{ K} \pm 30 \text{ K}$ であった。60Hz 大気圧プラズマ ($2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$) と比較すると、電子密度は 1/30 であるが他のプラズマ源とは同等の値を示した。ガス回転温度は高く見積もられた可能性はあるが、60Hz 大気圧プラズマとほぼ同等という結果が得られた。一方、LIF 計測から、OH ラジカル密度は $1.9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ であり、60Hz 大気圧プラズマとほぼ同桁の OH ラジカル密度であることがわかった。LIF 強度分布から水との距離が近いほど OH ラジカルの LIF シグナルが大きくなる傾向が見られ、OH ラジカルは大気中の水蒸気、酸素の他に細胞培養液から蒸発する水分からも生成することが示唆された。60Hz 大気圧プラズマでも細胞培養液の設置距離によって OH ラジカル密度が変化することがわかっており、両プラズマ源間の相違はない。マイクロ波励起プラズマと 60Hz

大気圧プラズマの相違点としては、電子密度が低いことと NO ラジカルの発光強度比が小さいことが挙げられる。60Hz 大気圧プラズマはパルス放電であるのに対し、マイクロ波励起プラズマは連続的な放電であるため、細胞培養液への単位時間あたりの電子の供給量が多くなることが予想される。さらに、OH ラジカルの生成反応には電子が寄与しているため、細胞培養液中の OH ラジカルの生成量も多くなる。マイクロ波励起プラズマの特長を理解するために、細胞培養液中の OH ラジカル生成速度や癌細胞の殺傷効果について、次章以降で述べる。

参考文献

- [1] H. Uchiyama, Q-L. Zhao, M. A. Hassan, G. Andocs, N. Nojima, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori and T. Kondo, *PLoS ONE* **2015**, 10, e0136956.
- [2] F. Jia, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kano, J. Kularatne, H. Kondo, M. Sekine and M. Hori, *Plasma Source Sci Technol* **2014**, 23, 025004.
- [3] K. Takeda, M. Kato, F. Jia, K. Ishikawa, H. Kano, M. Sekine and M. Hori, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2013**, 46, 464006.
- [4] K. Takada, T. Kumakura, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine and M. Hori, *Applied Phys Express* **2017**, 10, 036201.
- [5] K. Takeda, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine and M. Hori, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2017**, 50, 195202.
- [6] S. Bekeschus, K. Wende, M. M. Hefny, K. Rodder, H. Jablonowski, A. Schmidt, T. von Woedtke, K-D. Weltmann, and J. Bebedikt, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 2791.
- [7] J. R. Bolton and S. R. Cater, *Aquatic and surface photochemistry*, Boca Raton, FL, **1994**, 467.
- [8] H. Jablonowski, M. A. C. Hansch, M. Dunnbier, K. Wende, M. U. Hammer, K-D. Weltmann, S. Reuter and T. von Woedtke, *Biointerphases* **2015**, 10, 029506.
- [9] A. Fridman, *Plasma Chemistry* **2008** (Cambridge University Press, New York, USA)
- [10] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito and M. Hori, *Applied Physics Letters*, **2008**, 92, 081503.
- [11] C. T. Liu, T. Kumakura, K. Ishikawa, H. Hashizume, K. Takeda, M. Ito, M. Hori, and J. S. Wu, *Plasma Sources Science and Technology*, **2016**, 25, 65005.
- [12] A. F. H. van Gessel, E. A. D. Carbone, P. J. Bruggeman and J. J. A. M. van der

Mullen, *Plasma Sources Science and Technology*, **2012**, 21, 015003.

[13] A. F. H. van Gessel, R. Brandenburg and P. J. Bruggeman, *Applied Physics Letters* **2013**, 103, 064103.

[14] 中川雄介 東京大学学位論文 **2011**。

[15] P-M. Girard, A. Arbabian, F. Michel, G. Bayvukke, V. Puech, M. Dutreix and J. S. Sousa, *Sci Rep* **2016**, 6, 29098.

第 4 章

マイクロ波励起プラズマを照射した培養液の 細胞殺傷効果

4.1 背景

癌治療への医療応用には、大気圧プラズマの直接照射よりも間接照射の方が有利である。それは、癌は体内の臓器に発生する 경우가ほとんどであり、開腹手術が必要になるからである。さらに、腫瘍が臓器の裏側などに存在している場合には、大気圧プラズマ源を照射することが難しくなってしまう。一方で、液体を用いた間接照射では、上記の直接照射の問題点を回避することができるため、非常に有効である。

60Hz 大気圧プラズマの間接照射つまり 60Hz 大気圧プラズマを照射した培養液 (Plasma-activated medium, PAM) の癌細胞選択的抗腫瘍効果は既に報告されている。^[1] しかし、本論文第 3 章でプラズマ計測を行ったマイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM による癌細胞、および正常細胞の生存率の評価は報告されておらず、興味深い。

マイクロ波励起プラズマは、電子密度が $7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と 60Hz 大気圧プラズマ ($2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$) と比較すると電子密度は 1/30 である。しかし、マイクロ波励起プラズマは連続放電で駆動できるため、他のパルス放電プラズマと比べて、全体として密度は高くなることが考えられる。したがって、連続放電によってパルス放電の大気圧プラズマ以上の電子や OH ラジカルが細胞培養液に供給される。

また、マイクロ波励起プラズマによって生成する OH ラジカルの量は細胞培養液とマイクロ波励起プラズマの照射距離によって異なることが本論文第 3 章で示されており、細胞培養液中に生成する活性酸素種の量も照射距離に依存し、癌細胞の生存率にも影響を与えられられる。

本章では、マイクロ波励起プラズマの照射距離を変更して PAM を作製し、癌細胞の生存率を比較することで、マイクロ波励起プラズマから生成する OH ラジカルの生成量の影響を検討した。さらにマイクロ波励起プラズマの特長である連続放電が癌細胞の生存率に与えている影響を評価するために、パルス放電である 60Hz 大気圧プラズマと同じ照射時間で癌細胞生存率の比較を行った。また、選択的な抗腫瘍効果を確認するために同条件で作製した PAM を用いて正常細胞の生存率も評価した。

4.2 マイクロ波励起プラズマで作製したプラズマ活性培養液 (PAM) による HeLa 細胞の生存率評価

4.2.1 マイクロ波励起プラズマ照射距離の HeLa 細胞生存率への影響

前章のマイクロ波励起プラズマのプラズマ計測の結果、マイクロ波励起プラズマのプラズマ領域のうち、出射口から 6 mm の範囲において強く発光しており、発光種が多く分布していることを明らかにした。さらに、OH ラジカルの密度もこの範囲において高密度であった。OH ラジカルは代表的な活性酸素種である H_2O_2 や NO_2^- の生成に寄与していると考えられるため、癌細胞の生存率に影響を与えていることが予想される。そこで、照射距離による HeLa 細胞の生存率への影響を検討した。

図 4.1 にマイクロ波励起プラズマの照射距離を 5 mm, 20 mm としたときの HeLa 細胞の生存率を示す。96 ウェルの 1 ウェルあたりの HeLa 細胞の細胞播種は 5,000 個/ウェルとした。また、マイクロ波励起プラズマの照射時間は 30 秒とした。

マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM (希釈前、照射距離: 5 mm) を作用させることで、癌細胞の生存率がコントロールと比較して 1% に低下していることから、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM で培養することによって、癌細胞の生存率を低下させることが明らかになった。さらに、希釈前の PAM で比較すると、照射距離 5 mm で作製した PAM の方が HeLa 細胞の殺傷能力が高く、照射距離と活性酸素窒素種の生成量には関係があり、照射距離が近いほど多くの活性酸素窒素種が PAM 中に生成していることが示唆された。マイクロ波励起プラズマの発光種は出射口から 6 mm の範囲において多く生成しており、発光種により生成した活性酸素窒素種が細胞生存率に影響を与えている。発光種から生成する活性酸素窒素種については次章以降で詳細に議論する。

PAM を希釈していくと、活性酸素窒素種の濃度が薄くなっていくため、徐々に細胞生存率が向上していく。PAM を 256 倍まで希釈しても照射距離 5 mm で照射して作製した PAM は約 45% の HeLa 細胞を死滅させており、マイクロ波励起プラズマ源は、報告されている他の大気圧プラズマ源で作製した PAM よりも HeLa 細胞の生存率を低下させる活性酸素窒素種を多く含む可能性が示唆された。

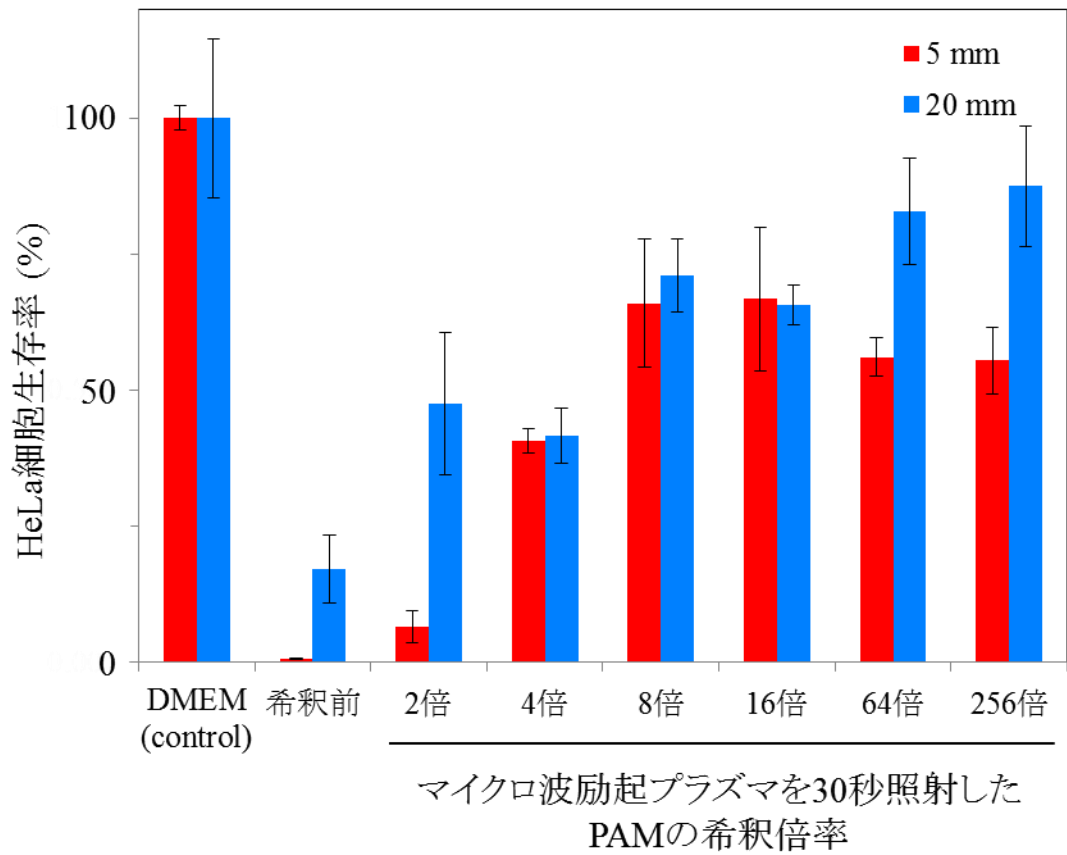


図 4.1 マイクロ波励起プラズマの照射距離を 5 mm, 20 mm で
作製した PAM による HeLa 細胞生存率。

4.2.2 マイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマで作製した PAM による HeLa 細胞生存率の比較

図 4.2 にマイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマで作製した PAM によって HeLa 細胞を培養し、その 24 時間後の生存率を示す。照射時間は各プラズマ源において 30 秒、60 秒、120 秒とした。照射距離はマイクロ波励起プラズマ、60Hz 大気圧プラズマともに 5 mm とした。また、HeLa 細胞の播種数は 5,000 個/ウェルとした。

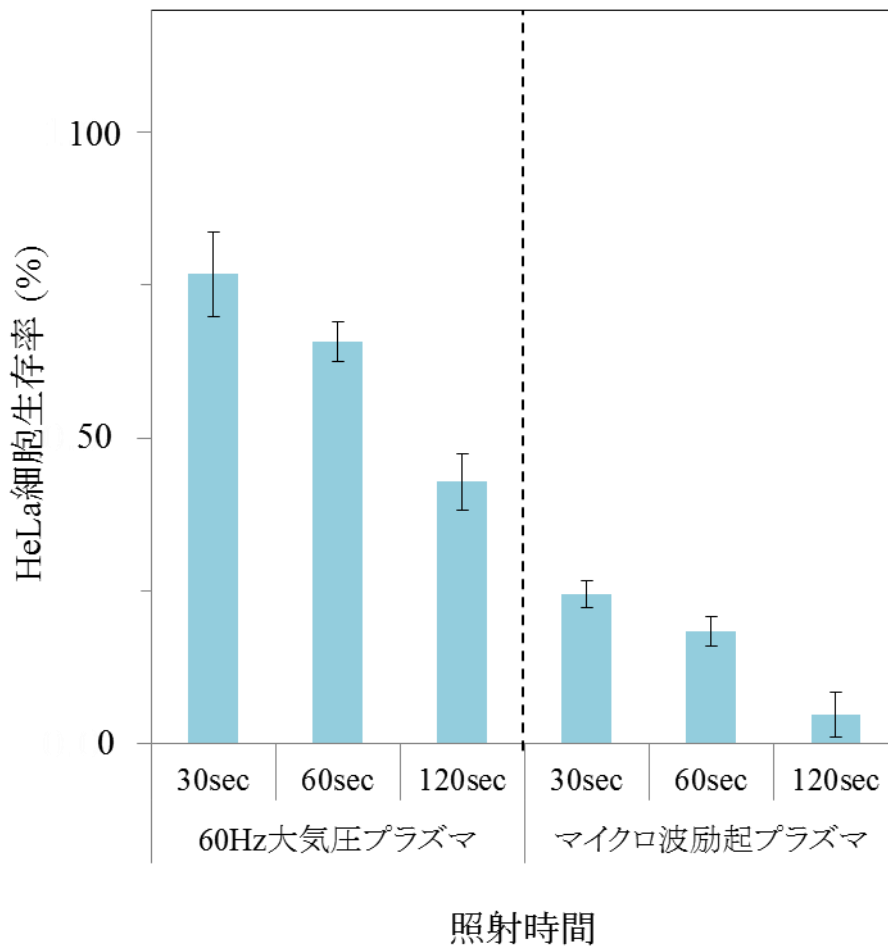


図 4.2 マイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマで作製した PAM による HeLa 細胞生存率。

照射時間を長くすることで、癌細胞の生存率は徐々に減少したことから、プラズマの照射によって DMEM 内に癌細胞を死滅させる活性酸素窒素種が増加していくことが示唆される。マイクロ波励起プラズマを 120 秒照射すると、HeLa 細胞の生存率は 5% に減少するのに対し、60Hz 大気圧プラズマを 120 秒照射して作製した PAM では HeLa 細胞の生存率は 43% であり同じ照射時間において、マイクロ波励起プラズマの方が HeLa 細胞の殺傷能力が高い。60Hz 大気圧プラズマは電子密度が $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ の高密度プラズマ源^[2]だが、癌細胞の殺傷能力という観点では、マイクロ波励起プラズマの方が高い殺傷能力を示した。

60Hz 大気圧プラズマ源は約 8 msec 周期のパルス放電プラズマであることが報告されている。^[3] さらに、60Hz 大気圧プラズマはリモートであるので、電子の供給量は少ない。一方で、マイクロ波励起プラズマは連続放電であるため、全体の電子密度は高く、単位時間あたりに供給される電子は多いことが考えられる。例えば水は電子によって $\text{H}_2\text{O} + e \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{H}$ のような解離反応が起こり活性酸素種である OH ラジカルを生成し、 $\cdot\text{H}$ も O 原子などと反応しやすいラジカルである。マイクロ波励起プラズマ照射による活性酸素窒素種の生成については、次章以降で詳細に述べる。

4.3 マイクロ波励起プラズマで作製した PAM による正常細胞の

生存率への影響

マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM は癌細胞 (HeLa 細胞) の生存率を 60Hz 大気圧プラズマよりも短時間で低下させることがわかったが、癌治療法としての応用を考える場合、正常細胞への影響を考慮しなければならない。正常細胞として MCF10A 細胞を用いて PAM を作用させたときの生存率を評価した。

図 4.3 に個別に培養した MCF10A 細胞および HeLa 細胞に対して PAM を作用させた後の細胞生存率を示す。MCF10A 細胞では、すべての PAM を作用させた場合における生存率は 85%以上を維持していた。一方で、HeLa 細胞では、希釈倍率 2 倍までは生存している HeLa 細胞がほとんどなく、4 倍で 27%となり、更なる希釈によって徐々に生存率が増加した。MCF10A 細胞と HeLa 細胞の生存率の差が最も大きくなる希釈倍率は、2 倍のときであり、MCF10A 細胞 91%、HeLa 細胞 3%、選択比は約 31 倍であった。以上のことから、マイクロ波励起プラズマ製 PAM が癌細胞を選択的に殺傷する能力を有していることがわかった。

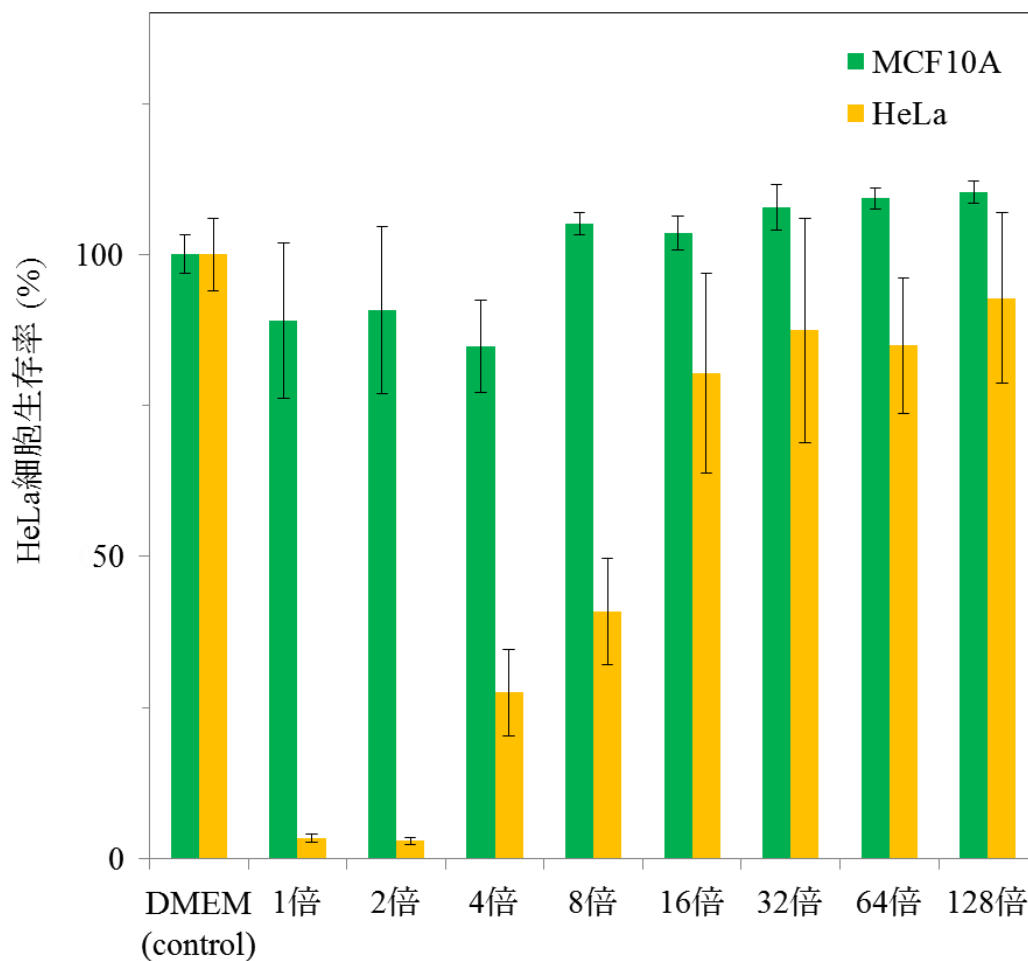


図 4.3 マイクロ波励起プラズマを照射した PAM による MCF10A 細胞および HeLa 細胞の生存率。

このような選択的な抗腫瘍効果は、癌細胞および正常細胞において活性種から受ける影響の感受性の違いによって現れていると考えられている。癌細胞の活性種による影響は癌細胞の代謝^[4]や細胞内のシグナル伝達ネットワーク^[5]によって引き起こされている可能性があるが、臓器によって、代謝やシグナル伝達経路はさまざまであり、分子生物学的見地からのさらなる研究が期待される。

4.4 結論

マイクロ波励起プラズマを細胞培養液に照射して作製した PAM で HeLa 細胞を培養することによって、HeLa 細胞の生存率を減少させる効果があることがわかった。HeLa 細胞の生存率は、マイクロ波励起プラズマの照射距離が近いほど低下していることから、HeLa 細胞の生存率を低下させる原因となる成分はマイクロ波励起プラズマの照射距離が近いほど DMEM 内に生成することがわかった。HeLa 細胞の生存率を低下させる成分は、OH ラジカルなどの活性酸素窒素種が候補として挙げられる。また、マイクロ波励起プラズマは、60Hz 大気圧プラズマよりも電子密度が小さいにも関わらず、60Hz 大気圧プラズマよりも短時間で HeLa 細胞の生存率を低下させる PAM を作製できるといふ大きな利点を示すことを明らかにした。

マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM で正常細胞である MCF10A 細胞を培養しても、MCF10A 細胞の生存率はあまり影響を受けず、HeLa 細胞が 3% の生存率しか示さない PAM で培養しても MCF10A 細胞の生存率は 91% であり、マイクロ波励起プラズマによって癌細胞のみを殺傷する効果が得られることが示唆された。

参考文献

- [1] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori, *Plasma Medicine*, **2011**, 1, 265.
- [2] M. Iwasaki, H. Inui, Y. Matsudaira, H. Kano, N. Yoshida, M. Ito and M. Hori, *Applied Physics Letters*, **2008**, 92 081503.
- [3] K. Takeda, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine, and M. Hori, *The 60th JSAP Spring Meeting*. **2016**, 29p-B9-13.
- [4] N. Kurake, *Doctoral thesis of Nagoya Univ.*,**2017**.
- [5] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori, *Plasma Medicine*. **2011**, 1, 265.

第 5 章

マイクロ波励起プラズマを照射した 培養液中の活性種の定量

5.1 背景

大気圧非平衡プラズマの照射によって、活性酸素窒素種 (RONS) が照射した溶液内に生成することが知られている。^[1] RONS としては PAM 中で長寿命である H_2O_2 と NO_2^- が挙げられる。また、 H_2O_2 は細胞死を誘導することが知られている。^[2-4] また、 NO_2^- もバクテリアを死滅させる活性窒素種であることが報告されている。^[5,6] これらの H_2O_2 と NO_2^- による細胞死または殺菌の効果のメカニズムについては、分子生物学的な反応による研究が報告されている。^[6,7] したがって、 H_2O_2 と NO_2^- の生成量は、癌治療を指向したプラズマ源の特性を評価する上で重要な因子である。

倉家らは、パルス放電である 60Hz 大気圧プラズマの照射による DMEM 中に生成した H_2O_2 を AmplexRed 試薬、 NO_2^- を、Oxiselect 試薬を用いて定量し、 H_2O_2 、 NO_2^- の生成速度はそれぞれ $0.35 \mu\text{M/s}$ 、 $10.5 \mu\text{M/s}$ であることを報告している。^[8] さらに、60 Hz 大気圧プラズマの照射によって PAM 中に生成した量の H_2O_2 と NO_2^- を添加して、U251SP 細胞 (ヒトグリオーマ細胞) の生存率を評価している。^[8] NO_2^- のみを添加しても U251SP 細胞の細胞殺傷効果は見られなかったが、 H_2O_2 は細胞生存率の低下を引き起こすことがわかった。さらに興味深いことに、 H_2O_2 と NO_2^- を両方添加すると、 H_2O_2 単

独の細胞生存率の低下をさらに促進しており、 H_2O_2 と NO_2^- による相乗効果を説明している。^[8]

以上から、 H_2O_2 と NO_2^- の生成量は癌細胞と正常細胞の選択的抗腫瘍効果を担う主な活性酸素窒素種である。本章では、マイクロ波励起プラズマ照射による PAM 中の OH ラジカル、 H_2O_2 と NO_2^- の生成について評価した結果を示す。

5.2 ESR スピントラップ法による OH ラジカル生成量

プラズマ照射による H_2O_2 と NO_2^- は、OH ラジカルとの反応によって生成していると考えられる。OH ラジカルはプラズマの紫外線および深紫外線による水の光解離によって生成し、 H_2O_2 の生成に寄与する。 H_2O_2 の生成反応としては主に(5.1)に示す反応式が挙げられる。



一方で、 HNO_2 の生成にも OH ラジカルが寄与しており、生成反応としては(5.2)が考えられる。



気相中におけるマイクロ波励起プラズマ領域には OH ラジカルが生成していることを発光分光測定やレーザー誘起蛍光法を用いて明らかにした。しかし、マイクロ波励起プラズマの照射によって液中に生成する H_2O_2 と NO_2^- の生成量について考察するに

は、液中での OH ラジカルについて検討する必要がある。液中での OH ラジカルの寿命は短い、上記の反応式のように液中で長寿命の活性種の生成に用いられることから、マイクロ波励起プラズマの照射によって液中に生成する OH ラジカルの生成量はマイクロ波励起プラズマの高い癌細胞殺傷能力を考察する上で重要である。そこで、ESR スピントラップ法を用いて、マイクロ波励起プラズマと 60 Hz 大気圧プラズマの照射による DMPO-OH の生成量について検討した。

図 5.1 にマイクロ波励起プラズマを照射した PAM 中の DMPO スピンアダクトの ESR スペクトルを示す。DMPO-OH(●)、非常に弱い DMPO-H(■)のピークが観測された。・OH、・H は、水の解離によって生成したものであると考えられる。MgF₂ 板を置いてラジカルの影響を除外したときの DMPO-OH と DMPO-H の生成量は、MgF₂ を置かない場合の生成量の 62%、52% であることが報告されており、半分以上は紫外光による水の解離によって生成した・OH、・H であることがわかる。DMPO-OH のピーク強度は、照射時間を増やすと増大していく傾向にあった。図 5.2 に照射時間に対する DMPO-OH のピーク強度(積分値)の変化を示す。90 秒までは単調に増加していくが、次第に飽和する傾向が見られた。この理由としては、添加した DMPO の量が DMPO スピンアダクトとして消費されてしまったこと、また、照射時間を増やして PAM 中の OH ラジカルが多くなっていくと DMPO-OH の生成と分解が起こり次第に生成速度と分解速度が等しくなっていくためと考えられる。^[9]

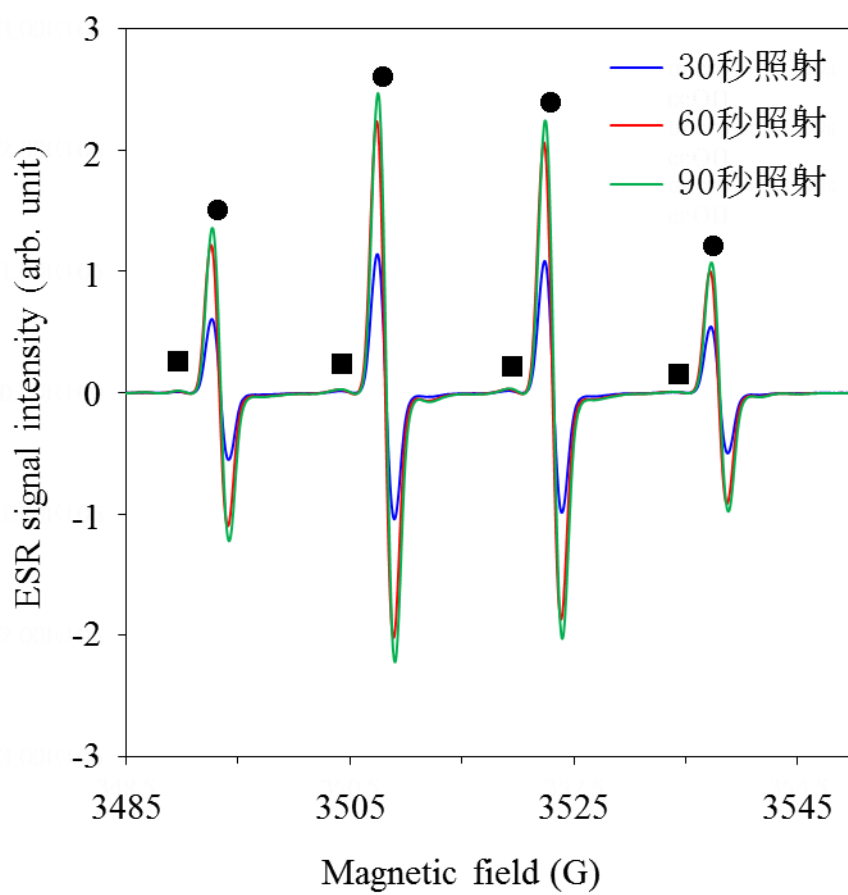


図 5.1 マイクロ波励起プラズマを照射した PAM 中の
DMPO スピンアダクトの ESR スペクトル。

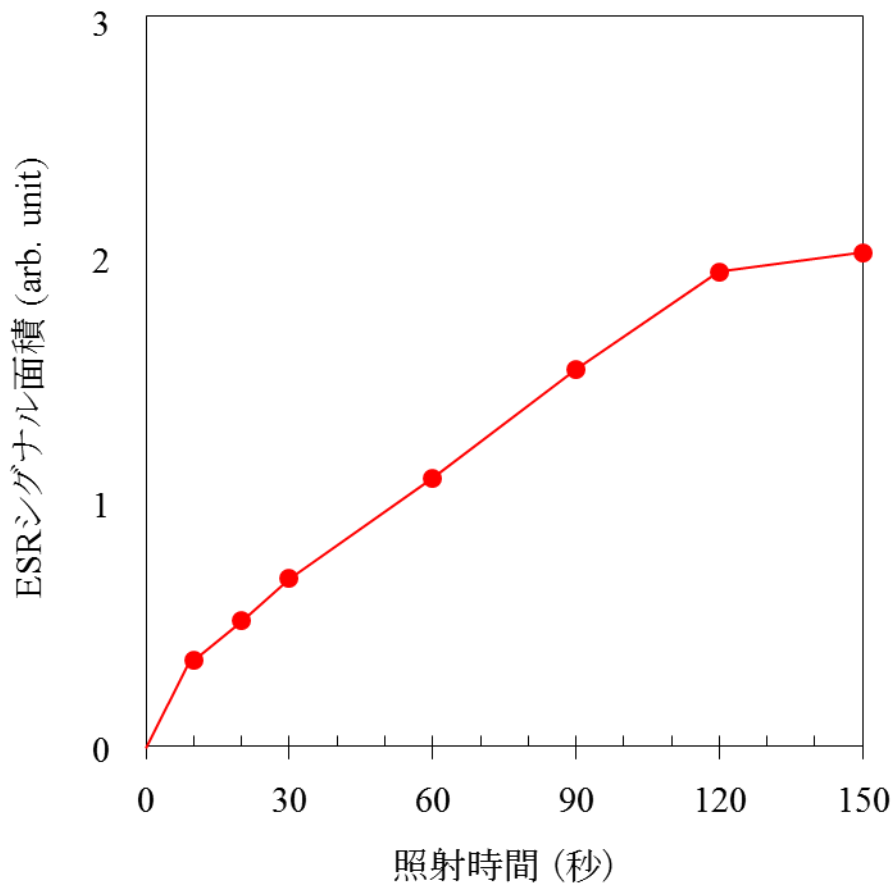


図 5.2 照射時間に対する ESR シグナルの増加。

図 5.3 にマイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマ照射による DMPO スピンアダクトの生成量を示す。照射時間は 120 秒とした。 $\cdot\text{OH}$ ラジカルや $\cdot\text{H}$ ラジカルなどの活性酸素種はマイクロ波励起プラズマの方が多く生成していることがわかった。前述のとおり、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルや $\cdot\text{H}$ ラジカルは水と光や電子によって解離して生成する。マイクロ波励起プラズマは連続放電しているため、一定時間あたりに DMEM に供給される光および電子は多くなる。この影響によって、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルや $\cdot\text{H}$ ラジカルが多く生成すると考えられる。

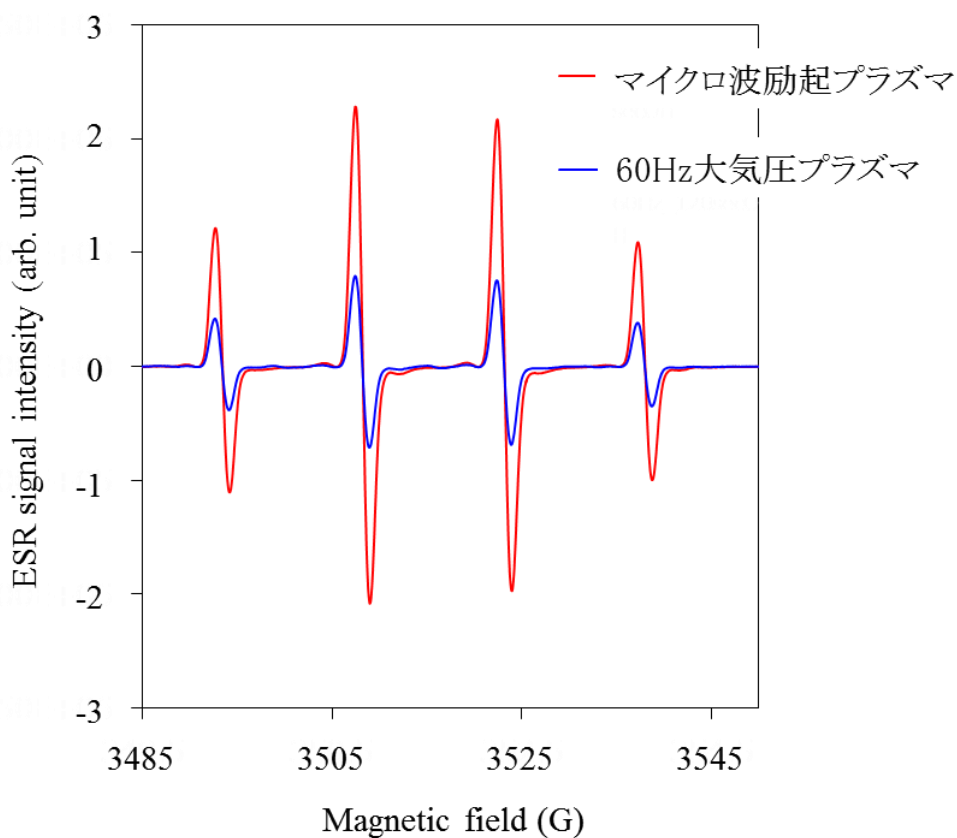


図 5.3 マイクロ波励起プラズマと 60Hz 大気圧プラズマの DMPO アダクト生成量。

5.3 過酸化水素(H₂O₂)の生成

図 5.4 にマイクロ波励起プラズマの照射時間と PAM 中の H₂O₂ の濃度の関係を示す。照射時間 105 秒までの生成速度は 6.9 μM/s、105 秒から 180 秒までの生成速度は 2.2 μM/s であった。105 秒以上の照射において H₂O₂ の生成速度が遅くなる要因としては、PAM 中に生成した H₂O₂ がプラズマによって発光した UV 光で分解されることにより、見かけの生成量が減少したことが推測される。

照射時間 180 秒までの生成速度を平均すると、H₂O₂ の生成速度は 6.0 μM/s であった。60Hz 大気圧プラズマの照射による H₂O₂ の生成速度は、0.35 μM/s である。^[8] マイクロ波励起プラズマの照射による H₂O₂ の生成速度は 60Hz 大気圧プラズマよりも 17 倍速い。

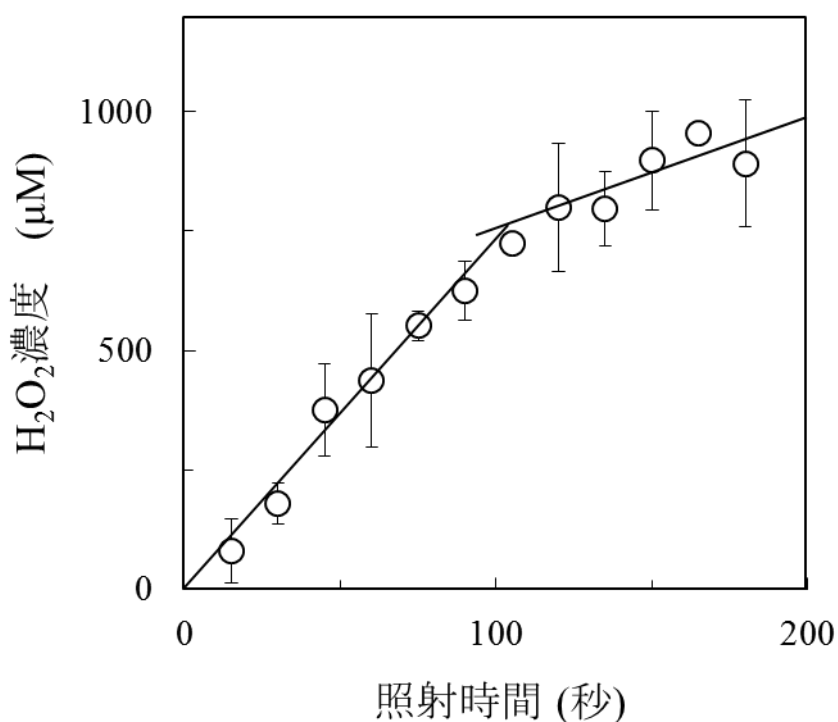


図 5.4 マイクロ波励起プラズマの照射時間と PAM 中の H₂O₂ の濃度。

5.4 亜硝酸イオン(NO_2^-)の生成

図 5.5 にマイクロ波励起プラズマの照射時間と PAM 中の NO_2^- の濃度の関係を示す。 NO_2^- の照射時間 105 秒までの生成速度は $2.5 \mu\text{M/s}$ であったが、105 秒から 180 秒の生成速度は $0.8 \mu\text{M/s}$ と遅くなった。時間とともに生成速度が飽和する傾向は H_2O_2 でも見られており、長時間照射による NO_2^- の分解が考えられる。照射時間 180 秒までの生成速度を平均すると、マイクロ波励起プラズマの照射による NO_2^- の生成速度は $2.2 \mu\text{M/s}$ であり、60Hz 大気圧プラズマ($10.5 \mu\text{M/s}$)と比較すると、60Hz 大気圧プラズマの方が約 4.7 倍 NO_2^- の生成速度が速い。

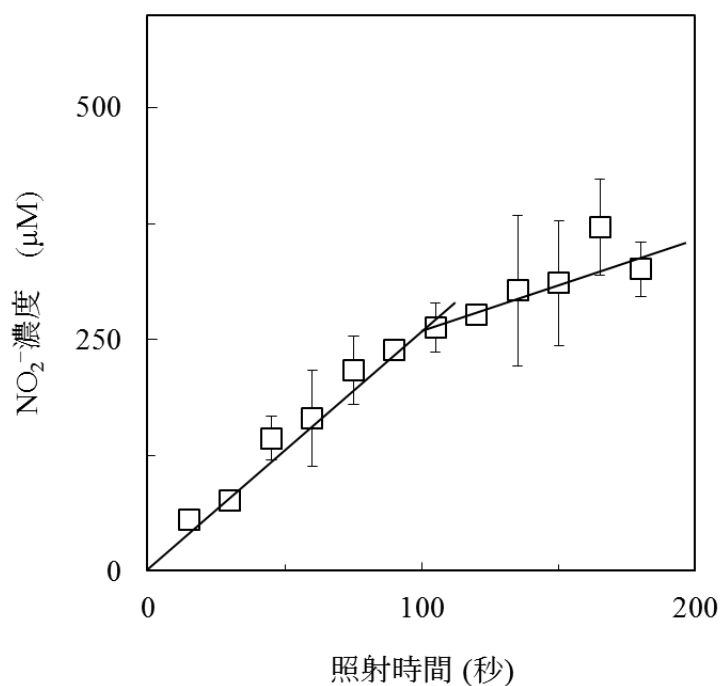


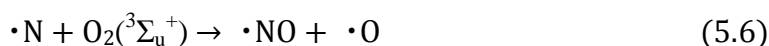
図 5.5 マイクロ波励起プラズマの照射時間と PAM 中の NO_2^- の濃度。

パルス放電プラズマによる H_2O_2 と NO_2^- の生成速度についてはいくつかの報告がある。Girardらは、PBS にバイポーラ電源 (20 kHz, 8 kV) による He プラズマを照射したときの H_2O_2 と NO_2^- の生成速度はそれぞれ $6.67 \mu\text{M/s}$ 、 $6.67 \mu\text{M/s}$ と報告している。^[10] 矩形波パルス電源 (10 kHz, 10 kV) のプラズマでは、それぞれ $10.67 \mu\text{M/s}$ 、 $3.33 \mu\text{M/s}$ 、^[11] AC 1 kHz, 15 kV の He プラズマジェットでは、 $0.99 \mu\text{M/s}$ 、and $0.05 \mu\text{M/s}$ 、^[12] 30 kHz, 3 kV の He プラズマジェットでは $0.61 \mu\text{M/s}$ 、and $0.17 \mu\text{M/s}$ ^[13] などである。

マイクロ波励起プラズマの H_2O_2 の生成速度が速いのは、連続放電の影響が大きいと考えられる。連続放電によってパルス放電プラズマよりも電子や光が多く生成するため、気相中で OH ラジカルが生成し、 $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ という反応によって過酸化水素が生成し、液体に溶けるという機構が考えられる。

一方で、 NO_2^- の生成量が少ないのは大気中の窒素の取り込み量が小さいことが考えられる。 NO_2^- は $\cdot\text{NO}$ と $\cdot\text{OH}$ の式(5.2)で示す反応によって生成する。

窒素からの $\cdot\text{NO}$ の生成反応は式(5.3)から(5.6)が挙げられる。^[1] 大気中の窒素の取り込み量は PAM 中の NO_2^- の生成に影響を与えていることが示唆される。



大気中の気体の取り込み量はプラズマが発生するときに最大となることが報告されており、^[14] 連続放電であるマイクロ波励起プラズマでは取り込み量が小さくなると示唆される。また、マイクロ波励起プラズマはジェット型なのでプラズマ領域の表面積は小さく、大気中の窒素が取り込まれる量も少ないことも影響している可能性がある。さらに、マ

マイクロ波励起プラズマの照射中には培養液面は凹形状となっているため、窒素源となる空気がプラズマと培養液面の間空間に存在しにくくなることも要因として考えられる。

5.5 PAM 中の H_2O_2 と NO_2^- の濃度と HeLa 細胞生存率の関係

図 5.6 に H_2O_2 と NO_2^- の濃度を希釈して変化させたときの、HeLa 細胞と MCF10A 細胞の生存率を示す。

濃度はマイクロ波励起プラズマを 120 秒照射して作製した PAM 中の H_2O_2 と NO_2^- 濃度を希釈なしとして、2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 倍に希釈することでプロットした。表 5.1 に希釈倍率と H_2O_2 、 NO_2^- の濃度を示す。希釈にはマイクロ波励起プラズマを照射していない DMEM を用いたため、 H_2O_2 と NO_2^- の比率 ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$) は 2.3 で一定となる。

表 5.1 PAM の希釈倍率とそれぞれの H_2O_2 、 NO_2^- 濃度。

$$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{NO}_2^- = 2.3 \text{ (一定)}$$

希釈倍率	H_2O_2 濃度 (μM)	NO_2^- 濃度 (μM)
1	179.9	76.7
2	90.0	38.3
4	45.0	19.2
8	22.5	9.6
16	11.2	4.8
32	5.6	2.4
64	2.8	1.2
128	1.4	0.6
256	0.7	0.3

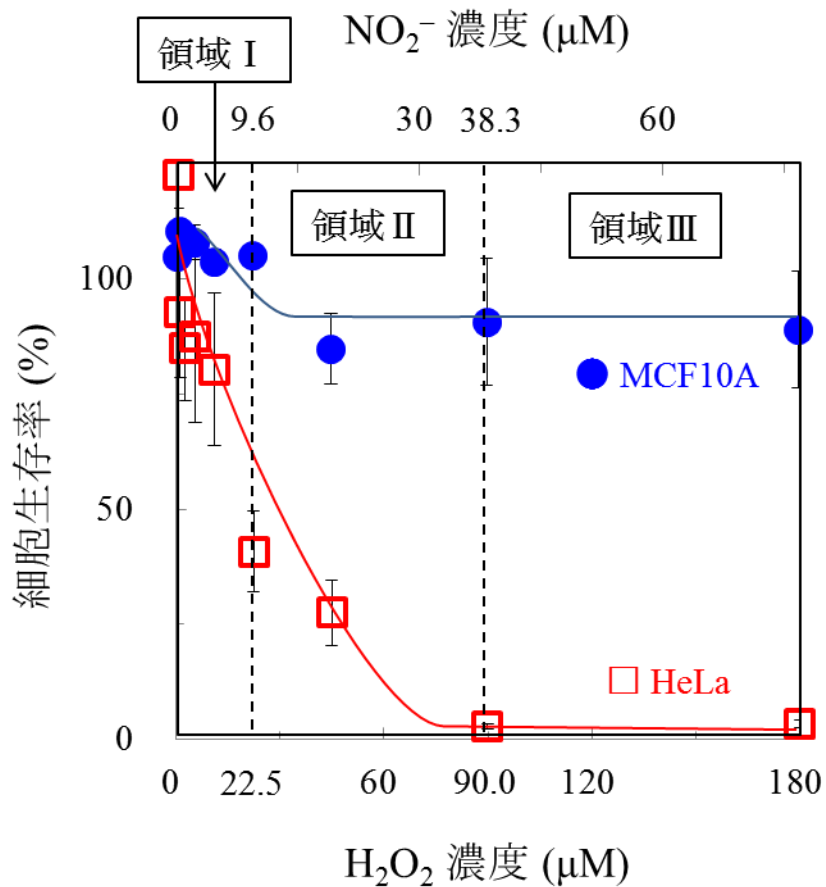


図 5.6 H₂O₂とNO₂⁻の濃度を希釈して変化させたときの HeLa 細胞と MCF10A 細胞の生存率。

H₂O₂の濃度が22.5 μM、NO₂⁻の濃度が9.6 μMよりも低い領域(領域 I)では約80%の HeLa 細胞が生存したままであり、抗腫瘍効果を有していない。H₂O₂の濃度が23 μM以上、NO₂⁻の濃度が10 μM以上の領域(領域 II)では急激に HeLa 細胞の生存率50%を下回るように低下し始め、H₂O₂の濃度が90 μM、NO₂⁻の濃度が38 μM以上の領域(領域 III)では HeLa 細胞はほとんど生存していない。このとき、MCF10A 細胞は85%から90%の生存率を維持しており、大きな生存率の違いが観察された。

5.6 H₂O₂とNO₂⁻の相乗効果とPAMとの比較

マイクロ波励起プラズマによって生成したH₂O₂とNO₂⁻によるHeLa細胞の生存率への影響を確認するために、それぞれをDMEMに添加してPAMと比較した。調製した培養液およびPAMの条件は以下の4条件である。

- ① NO₂⁻ (38 μM)
- ② H₂O₂ (90 μM)
- ③ NO₂⁻ (38 μM) + H₂O₂ (90 μM)
- ④ PAM (マイクロ波励起プラズマを120秒照射してPAMを作製し、2倍希釈)

図5.7にDMEMに下記4つの試料で24時間培養した後のHeLa細胞の生存率を示す。①-③における濃度は④(マイクロ波励起プラズマを120秒照射してPAMを作製し、2倍希釈)のそれぞれの濃度から決定している。つまり、マイクロ波励起プラズマを120秒照射して作製したPAM中のH₂O₂とNO₂⁻の濃度は、180 μM、76 μMであったため、添加後のDMEM中のH₂O₂とNO₂⁻の濃度はそれぞれ90 μM、38 μM(図5.6内 領域Ⅲの閾値)とした。

倉家らは60Hz大気圧プラズマにおいてNO₂⁻を添加しても細胞生存率はほとんど変化していないことを報告しており、^[7] マイクロ波励起プラズマにおいてもNO₂⁻ (38 μM)では、細胞生存率はコントロールと比較して80%程度であったことから、NO₂⁻はHeLa細胞生存率を低下させている成分ではないと考えられる。一方で、H₂O₂の癌細胞への毒性はよく知られており、図5.7②の実験結果からも約76%のHeLa細胞の生存率が低下している。さらに、H₂O₂とNO₂⁻の混合物においてはHeLa細胞の生存率が14%まで低下させる2つの活性酸素窒素種の相乗効果が確認できた。この相乗効果

は H_2O_2 と NO_2^- の反応生成物、例えば ONOOH の生成^[15,16]によるものも考えられるが、まだ明らかにされていない。

PAM では、 H_2O_2 と NO_2^- の混合物よりも多くの HeLa 細胞が死滅していることから、特定できていない H_2O_2 と NO_2^- 以外の抗腫瘍成分の存在が示唆される。マイクロ波励起プラズマからは、OH ラジカルや O 原子などの酸化力が高い活性種が多く生成しているため、細胞培養液中に含まれるアミノ酸やビタミンなどの有機化合物が分解、酸化の影響を受けて、癌細胞に抗腫瘍効果を示す物質を生成していることが考えられる。細胞培養液中の成分の変化については、第 6 章で述べる。

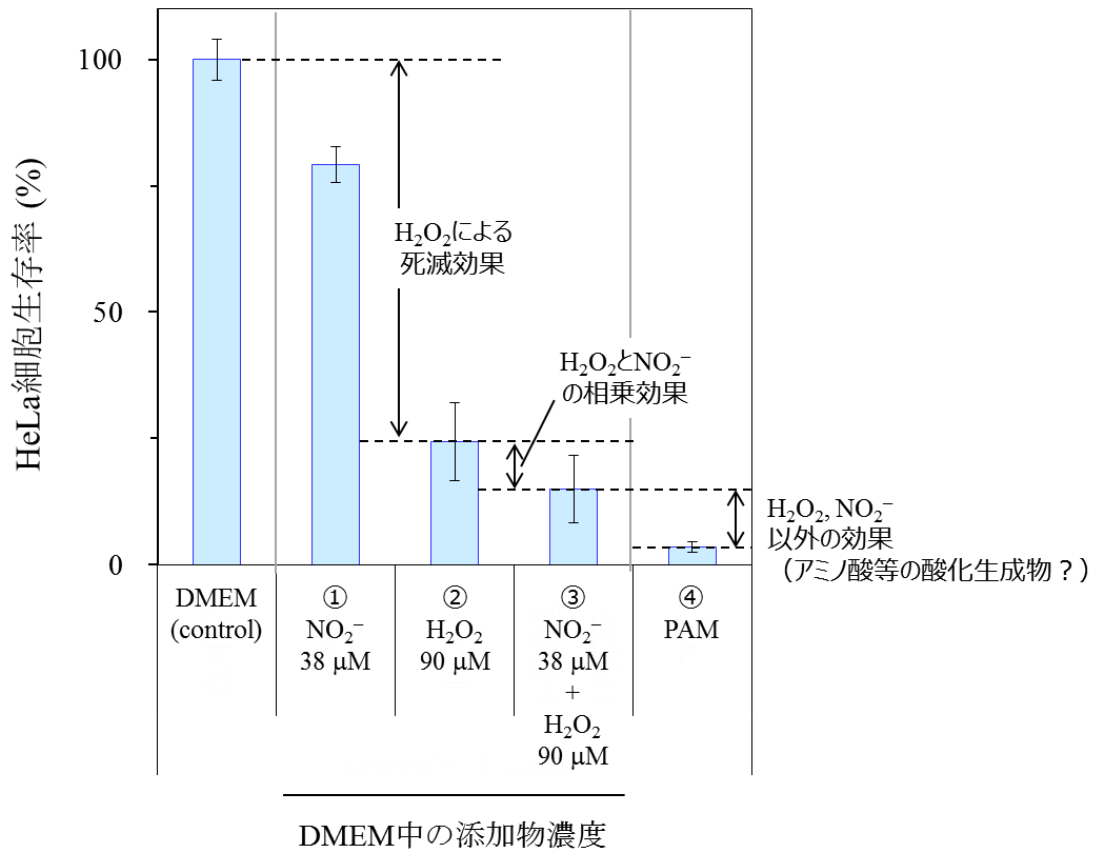


図 5.7 H₂O₂、NO₂⁻、さらに H₂O₂ と NO₂⁻ の混合物を添加した DMEM による 24 時間培養後の HeLa 細胞の生存率。

5.7 結論

本章では、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM に含まれる活性種について検討した。ESR 測定の結果、マイクロ波励起プラズマの照射によって PAM 中に $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{H}$ の DMPO アダクトが検出され、そのシグナル強度は、パルス放電である 60Hz 大気圧プラズマよりも 2 倍以上多いことがわかった。 $\cdot\text{OH}$ の生成機構はその 50-60%が水の光による解離由来であることがわかっており、マイクロ波励起プラズマの連続で強い発光によって $\cdot\text{OH}$ の生成量が多くなっている。

また、PAM 中に含まれる H_2O_2 と NO_2^- の生成速度を比色計測で測定した。 H_2O_2 の生成速度は、徐々に飽和していく傾向が見られ、照射時間 105 秒までの範囲では $6.9 \mu\text{M/s}$ 、105 秒から 180 秒までの範囲では $2.2 \mu\text{M/s}$ であった。60Hz 大気圧プラズマ ($0.35 \mu\text{M/s}$) と比較すると、約 17 倍速い生成速度を示しており、マイクロ波励起プラズマの連続放電によって多くの電子が大気中の水分や細胞培養液から蒸発した水分と反応して $\cdot\text{OH}$ を生成し、気相中で生成した H_2O_2 が DMEM へ溶解したと考えられる。また、 NO_2^- の生成速度は、照射時間 105 秒までは $2.5 \mu\text{M/s}$ であったが、105 秒から 180 秒の生成速度は $0.8 \mu\text{M/s}$ と遅くなった。平均すると NO_2^- の生成速度は、 $2.2 \mu\text{M/s}$ であり、60Hz 大気圧プラズマ ($10.8 \mu\text{M/s}$) よりも生成速度は遅い。 NO_2^- の生成量は窒素源となる大気中の窒素の取り込み量に依存すると考察しており、取り込み量が多くなるプラズマ点灯回数がパルス放電よりも少ないこと、またプラズマ領域の表面積が小さいことも理由として考えられる。

マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM を希釈して、癌細胞と正常細胞の生存率に大きな相違が見られる H_2O_2 と NO_2^- の濃度を確認したところ、 H_2O_2 濃度は $90 \mu\text{M}$ 以上、かつ NO_2^- 濃度が $38 \mu\text{M}$ 以上の領域であることがわかった。

マイクロ波励起プラズマの照射によって生成した H_2O_2 と NO_2^- の濃度の DMEM を HeLa 細胞に作用させたところ、 H_2O_2 と NO_2^- による相乗効果が見られた。しかし、PAM は H_2O_2 と NO_2^- の混合物よりも多くの HeLa 細胞を死滅させており、これら以外の活性酸素窒素種および DMEM に含まれるアミノ酸などの成分の酸化生成物が抗腫瘍効果を示している。

参考文献

- [1] N. Kurake, *Doctoral thesis of Nagoya Univ.*, **2017**.
- [2] T. Sato, M. Yokoyama, and K. Johkura, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2011**, 44, 372001.
- [3] H. Jablonowski, M. A. C. Hansch, M. Dunnbier, K. Wende, M.U. Hammer, K-D. Weltmann, S. Reuter and T. von Woedtke, *Biointerphases*, **2015**, 10, 029506.
- [4] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek, *Sci. Technol.* **2014**, 23, 015019.
- [5] C.A.J van Gils, S. Hofmann, B.K.H.L. Boekema, R. Brandenburg, and P.J. Bruggeman, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2013**, 46, 175203.
- [6] Z. Machala, B. Tarabova, K. Hensel, E. Spetlikova, L. Sikurova, and P. Lukes, *Plasma Process. Polym.* **2013**, 10, 649.
- [7] S. Bekeschus, J. Kolata, C. Winterbourn, A. Kramer, R. Turner, K.D. Weltmann, B. Broker, and K. Masur, *Free Radical Research*, **2014**, 48, 542.
- [8] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno and M. Hori, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2016**, 605, 102.
- [9] 関口和宏、久保正樹、米本年邦, *SCEJ 39th Autumn Meeting*, L123。
- [10] P-M. Girard, A. Arbabian, F. Michel, G. Bayvukke, V. Puech, M. Dutreix and J. S. Sousa, *Sci Rep*, **2016**, 6, 29098.
- [11] J. Chauvin, F. Judee, M. Yousfi, P. Vicendo and N. Merbahi, *Sci Rep* **2017**, 7, 4562.
- [12] J. Duan, X. Lu and G. He, *J. Appl. Phys.* **2017**, 121, 013302.
- [13] D. Yan, H. Cui, W. Zhu, N. Nourmohammadi, J. Milberg, L. G. Zhang, J. H. Sherman and M. Keidar, *Sci Rep*, **2017**, 7, 4479.
- [14] K. Takeda, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine, and M. Hori, *The 60th JSAP Spring*

Meeting. **2016**, 29p-B9-13.

[15] S. Hippeli and E. F. Elstner, *Zeitschrift für Naturforschung C*, **1997**, 52, 555.

[16] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek *Plasma Sour. Sci. Technol.*

2014, 23, 015019.

第 6 章

マイクロ波励起プラズマ照射による培養液成分の変化

6.1 背景

第 5 章で述べたとおり、DMEM にマイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM は、DMEM に H_2O_2 と NO_2^- を添加した試料よりも、HeLa 細胞を殺傷する能力が高い。言い換えれば、 H_2O_2 や NO_2^- 以外の抗腫瘍成分が DMEM へのマイクロ波励起プラズマ照射によって生成されていることが示唆される。最優先に考慮すべきは、マイクロ波励起プラズマから発生する、OH ラジカル、NO、O 原子による DMEM 培養液成分の酸化生成物の HeLa 細胞生存率への影響である。

倉家らは、DMEM 中に存在している H_2O_2 の生成過程について検討し、気相中で大気圧プラズマ によって生成した OH ラジカル、O 原子、H 原子、電子が反応して H_2O_2 が生成し、それが DMEM 中に溶解していることを報告している(図 6.1)。^[1]

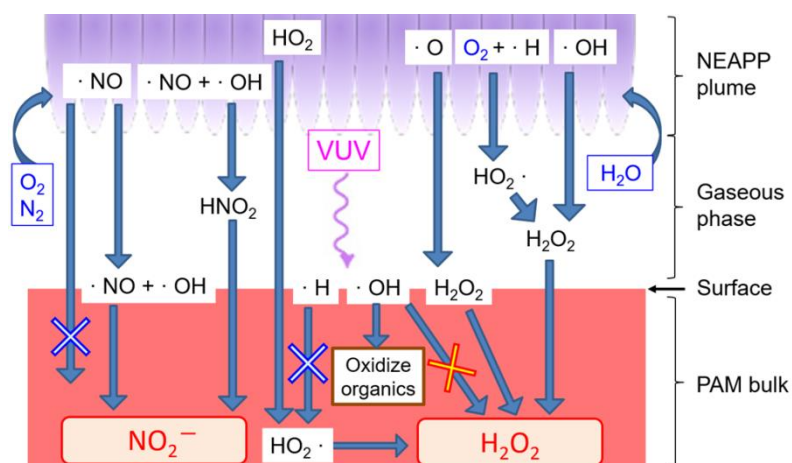


図 6.1 気相中、気液界面、PAM 中における活性酸素素種の反応経路。^[1]

青字:供給物、黒字:中間体(前駆体)、赤字:抗腫瘍成分

液相で2つのOHラジカルによる H_2O_2 の生成やOHラジカルとH原子の反応による $\text{HO}_2\cdot$ の生成よりも上記の気相中反応の方が早く進行する。大気圧プラズマの照射によって、水分子はOHラジカルとO原子に分解するが、これらは、DMEM中に含まれるアミノ酸やビタミン等の有機物の酸化に消費されると示唆している。

DMEMには無機塩、アミノ酸、ビタミンおよび細胞培養のための添加物が含まれている(表6.1)。Kalghatgiらは、プラズマ照射によって11種類のアミノ酸の過酸化物が生成することを報告し、特にメチオニンやセリンの過酸化物はDNA損傷を起こさないことを報告している。^[2]さらに、Takaiらは20種類のアミノ酸を純水にそれぞれ溶解させ、アルキル化、酸化、水酸化およびアミノ酸の二量化が進行していることをNMRによって同定しており、特に硫黄原子を含むメチオニンやシステインはプラズマ照射に対して敏感に変化することを報告している。^[3]また、プラズマ照射によってグルコースとCaとの反応によりシュウ酸カルシウムが生成することが報告されている。^[4]

表 6.1 DMEM (D5796) の成分と含有濃度。

	成分	濃度 (g/L)
無機塩	CaCl ₂	0.2
	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001
	MgSO ₄	0.09767
	KCl	0.4
	NaHCO ₃	3.7
	NaCl	6.4
	NaH ₂ PO ₄	0.109
アミノ酸	L-Arginine·HCl	0.084
	L-Cystine·2HCl	0.0626
	L-Glutamine	0.584
	Glycine	0.03
	L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.042
	L-Isoleucine	0.105
	L-Leucine	0.105
	L-Lysine·HCl	0.146
	L-Methionine	0.03
	L-Phenylalanine	0.066
	L-Serine	0.042
	L-Threonine	0.095
	L-Tryptophan	0.016
	L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	0.10379
L-Valine	0.094	
ビタミン	Choline Chloride	0.004
	Folic Acid	0.004
	myo-Inositol	0.0072
	Niacinamide	0.004
	D-Pantothenic Acid·0.5Ca	0.004
	Pyridoxine·HCl	0.00404
	Riboflavin	0.0004
	Thiamine·HCl	0.004
その他添加物	D-Glucose	4.5
	Phenol Red·Na	0.0159

PAM の癌細胞選択的抗腫瘍効果と DMEM 成分の変化との相関を得ることは、作用機序の理解のために重要な検討課題であり、 H_2O_2 と NO_2^- 以外の新たな抗腫瘍成分を特定することは大気圧プラズマによる癌治療の進展に不可欠であると考えられる。

本章では、マイクロ波励起プラズマを照射することにより変化した PAM の成分を照射前の DMEM と比較することによって同定することを目的とした。同定の方法は高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) および ^1H 核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) 法を用いた。さらに、特定した培養液成分について、癌細胞への応答性を評価するために、DMEM またはマイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM に試薬を添加して、培養液成分の変化による影響を検討した。

6.2 実験方法

6.2.1 細胞培養液へのマイクロ波励起プラズマの照射

前章までと同様の方法でマイクロ波励起プラズマ源を生成し、DMEM (D5796、Sigma-Aldrich) に照射して PAM を作製した。プラズマ出射口から培養液表面の距離は、5 mm とし、照射時間は 30 秒から 180 秒間とした。

6.2.2 LC-MS/MS の測定方法および条件

LC-MS/MS 測定で使用する試薬には、HPLC 用グレードのアセトニトリル (>99.9%、高速液体クロマトグラフィー用、関東化学)、ギ酸 (約 99%、高速液体クロマトグラフィー用、和光純薬工業) を用い、0.1%ギ酸溶液、および 0.1%ギ酸含有アセトニトリル溶液を、純水 (18.2 MΩ·cm) を用いて調製した。内標準溶液には 2-イソプロピルリンゴ酸 (98%, Sigma-Aldrich) を純水に溶解し、0.5 mol/L とした。

LC 部は LC-30A システム、MS 部は LCMS-8050 (ともに株式会社島津製作所製) をそれぞれ用いた。

試料の前処理方法を以下に示す。

- 1) 試料 25 μL に内標準溶液 5 μL を加えた。
- 2) 1) にアセトニトリル 50 μL を加えて攪拌した。
- 3) 遠心分離 (10000 rpm, 5 分, 室温) 後の上清 20 μL と純水 180 μL を混和し測定試料とした。

なお、同様の操作を純水で行ったものをブランク試料とした。

定量性の信頼度確認試料は以下のように調製した。

- 1) 試料を純水で 2, 5, 10, 20 倍希釈した。
- 2) 1) の試料各 25 μL に内標準溶液 5 μL をそれぞれ加えた。
- 3) アセトニトリル 50 μL を加えて攪拌した。
- 4) 遠心分離 (10000 rpm, 5 分, 室温) 後の上清 20 μL と純水 180 μL を混和し測定試料とした。

LC 測定の測定条件を以下に記す。直径 3 μm の分析カラム (Discovery HS F5-3, 2.1 mm × 150 mm, 3 μm, Sigma-Aldrich) を用い、移動相には 0.1%ギ酸溶液 (移動相 A) と 0.1%ギ酸含有アセトニトリル溶液 (移動相 B) を用いた。グラジエント条件表 6.2 に示す。流速は 0.35 mL/min、注入量は 1 μL、カラム温度は 40°C に設定した。

表 6.2 移動相 B のグラジエント条件。

Time (min)	0.0	1.4	3.5	7.5	10.3	13.7	13.8	17.0
B conc. (%)	0	0	25	35	95	95	0	0

MS 部の測定条件は、LC/MS/MS メソッドパッケージ 細胞培養プロファイル(島津製作所製)に記載の MS 条件に従った。

定量性の信頼度を確認するために相関係数を算出した。プラズマ処理前の DMEM を純水で 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍に希釈した試料および希釈していない DMEM を測定し、希釈倍率に対して試料中各化合物のピーク面積値を内標準物質(2-イソプロピルリンゴ酸)のピーク面積値で除した補正值をプロットし、相関係数を算出した。

6.2.3 $^1\text{H-NMR}$ の試料調製法および測定方法・条件

マイクロ波励起プラズマを照射して各条件で作製した PAM 400 μL に対して 0.2 mol/L のリン酸緩衝液(pH7.4、試薬特級、和光純薬工業)200 μL と 1 mmol/L の 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム重水溶液(TSP-*d4*、ISOTEC, US)50 μL を加えて試料溶液とした。5 mm 径の NMR 試料管を用いて NMR 測定を行った。装置は AVANCE III (Bruker Biospin)、プロトン核観測周波数は 500.1 MHz であった。温度は 25°C に設定し、積算回数は 256 回とした。なお、NMR シグナル(FID)を取り込む前に、水に選択的にラジオ波を照射し、水のプロトン核の磁化を飽和させて水の NMR シグナルを小さくする事前飽和法によって水由来のシグナルを除去した。NMR スペクトルの同定には、Human Metabolome Database^[5]および Spectral Database for Organic Compounds^[6]を参照した。

6.3 実験結果および考察

6.3.1 LC-MS/MS

マイクロ波励起プラズマ照射前の DMEM および 120 秒照射後の MS スペクトルのピーク面積値を表 6.3 に示す。表中の相関係数は定量性の信頼度を示しており、1 に近いほどデータの信頼性が高いことを表している。また、120 秒間のプラズマ照射後のピーク面積値から照射前のピーク面積値を差し引いた値を図 6.2 に示す。マイクロ波励起プラズマを 120 秒照射することによって DMEM 中に含まれるメチオニンスルホキシドが 0.954 から 28.020 に 29.4 倍増加した。メチオニンスルホキシドは DMEM (D5796) を構成している成分ではないが、自然に酸化されているので、マイクロ波励起プラズマ照射前もピークが見られた。さらに、DMEM 中のメチオニンのピーク面積は、14.470 から 1.460 に急激に減少した。このことから、メチオニンがプラズマ照射によってメチオニンスルホキシドに酸化されたことがわかった。メチオニンスルホキシドは、メチオニンのスルフィド基に酸素が結合しスルホニル基を形成した構造を有しており、メチオニンはアミノ酸の中で酸化の影響を受けやすい成分である。^[7,8] メチオニンは必須アミノ酸のひとつであり、メチオニンの欠乏は細胞の生存率に影響を与える可能性がある。

リシンのピーク面積は、32 から 28 にわずかに減少した。本測定では検出物質として最終生成物は挙げられなかったが、リシンはイミン体を経由して最終的に酸化するとアルデヒド構造を有する化合物を形成することが報告されている。^[9]

ジスルフィド結合を有するシスチンのピーク面積は、マイクロ波励起プラズマの照射によって約 7%減少した。スルフィド結合を有するメチオニンが 90%減少しているのに対し、ジスルフィド結合は酸化の影響を受けにくいことが示唆された。

トリプトファンのピーク面積比は 6.758 から 5.517 に約 18%減少した。トリプトファンの酸化生成物は、芳香族環においてが 1 個または 2 個の OH 基が結合した化合物が挙

げられる。また、マイクロ波励起プラズマ照射によって4倍(ピーク面積値が0.008から0.032へ増加)に増加しているキヌレニン(トリプトファン)のインドール環のうち窒素を含有している芳香環が開環し、N-FormylKynurenineが生成した後、即座にアルデヒド基が還元されてキヌレニンが生成することが報告されている。^[10]

LC-MS/MSにより検出されたDMEM中に含まれるアミノ酸の反応性の順序は、メチオニン>>トリプトファン>リシン>シスチン=チロシン>他のアミノ酸であった。

LC-MS/MSの結果から、DMEMに含まれている成分は全て検出することができた。そのうち、マイクロ波励起プラズマの照射によりメチオニン、トリプトファン、リシン、シスチン、チロシンなどが変化しており、特にメチオニンが酸化してメチオニンスルホキドが生成するという反応が大きいことがわかった。また、LC-MS/MS検出しづらい成分の変化を特定するために¹H-NMR測定を行った。

表 6.3 LC-MS/MS で検出された
マイクロ波励起プラズマ照射前後の DMEM 成分のピーク面積値。

成分	ピーク面積値		相関係数
	プラズマ 照射前	プラズマ 照射後	
Arginine	25.712	27.395	1.000
Cystine	21.775	20.329	0.998
Glutamine	1.122	1.050	0.997
Glycine	2.139	2.086	1.000
Histidine	23.225	23.344	1.000
Isoleucine	6.836	6.909	0.998
Leucine	2.955	3.037	0.996
Lysine	32.020	28.464	0.998
Methionine	14.470	1.460	0.999
Phenylalanine	21.011	20.302	0.999
Serine	14.272	14.399	1.000
Threonine	29.828	30.845	0.997
Tryptophan	6.758	5.517	0.999
Tyrosine	15.603	14.576	0.998
Valine	13.349	14.193	0.997
Alanine	0.039	0.035	N.D.
Glutamic acid	6.662	7.164	0.988
Kynurenine	0.008	0.032	N.D.
Methionine sulfoxide	0.954	28.020	1.00

表 6.3 のつづき

	Choline	6.234	6.602	0.998
	Folic acid	2.246	2.062	0.999
DMEM 中の ビタミン	Niacinamide	14.391	14.951	0.998
	Pantothenic acid	1.451	1.847	0.999
	Pyridoxine	26.851	20.283	0.998
	Riboflavin	0.684	0.621	0.998

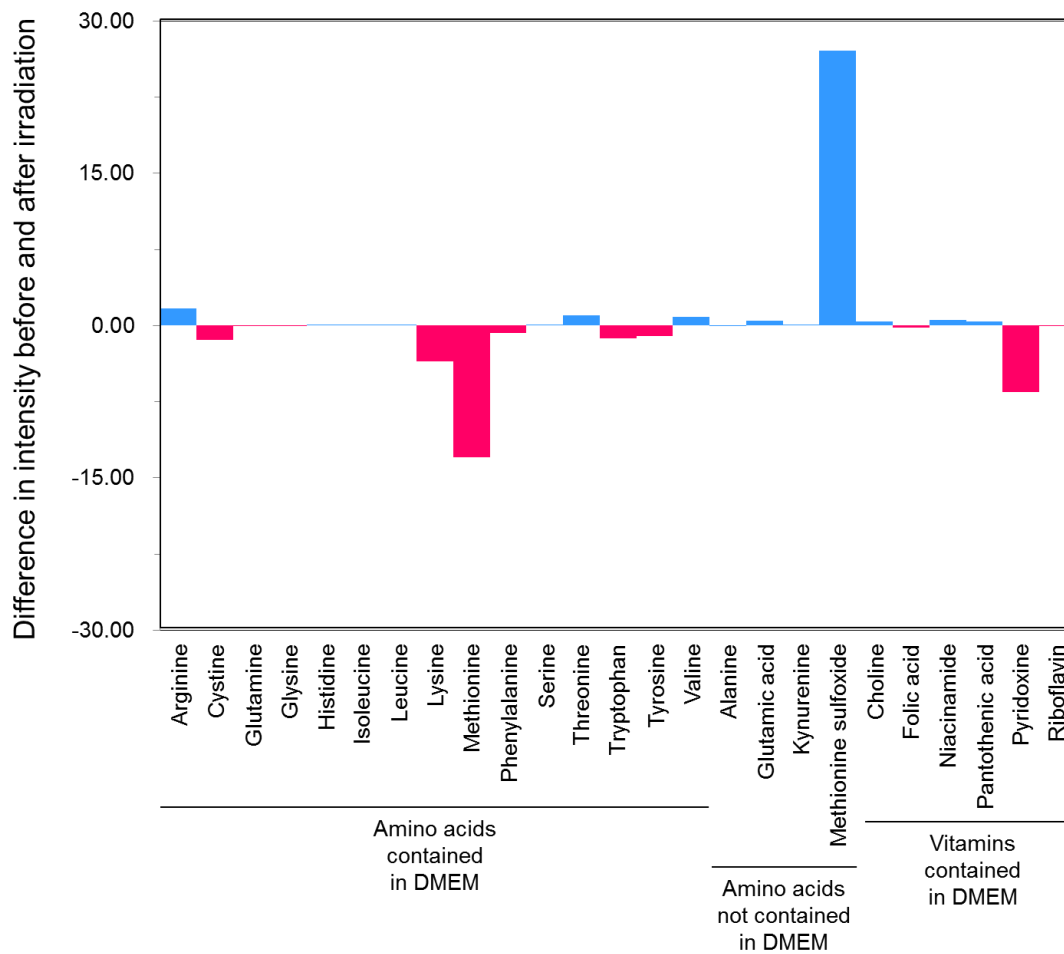


図 6.2 LC-MS/MS で検出されたマイクロ波励起プラズマ照射前後の DMEM 成分のピーク面積値の変化。

縦軸は(照射後のピーク面積) - (照射前のピーク面積)を示す。

6.3.2 $^1\text{H-NMR}$

図 6.3 に 0 ppm から 9 ppm の化学シフト範囲における NMR スペクトルを示す。試料は、マイクロ波励起プラズマを 180 秒間照射して作製し、プラズマ照射前の DMEM と比較して示している。8.46 ppm にプラズマ照射前には検出されなかったピーク(●)が 180 秒間のマイクロ波励起プラズマ照射によって発現した。図 6.4 にプラズマ照射時間を 60 秒、120 秒、180 秒としたときの 8.46 ppm のピークの変化を示す。照射時間が増えるにしたがってピーク強度は増加しており、マイクロ波励起プラズマ照射による生成物であることが示唆される。データベースを参照したところ、このピークはギ酸 (HCOOH) であると考えられる。大気圧プラズマ照射によるギ酸の生成は田中らによって報告されているが、^[11] 細胞生存率への影響については報告されておらず興味深い。ギ酸の生成量を定量して細胞生存率への影響を検討することは今後の検討課題として挙げられる。

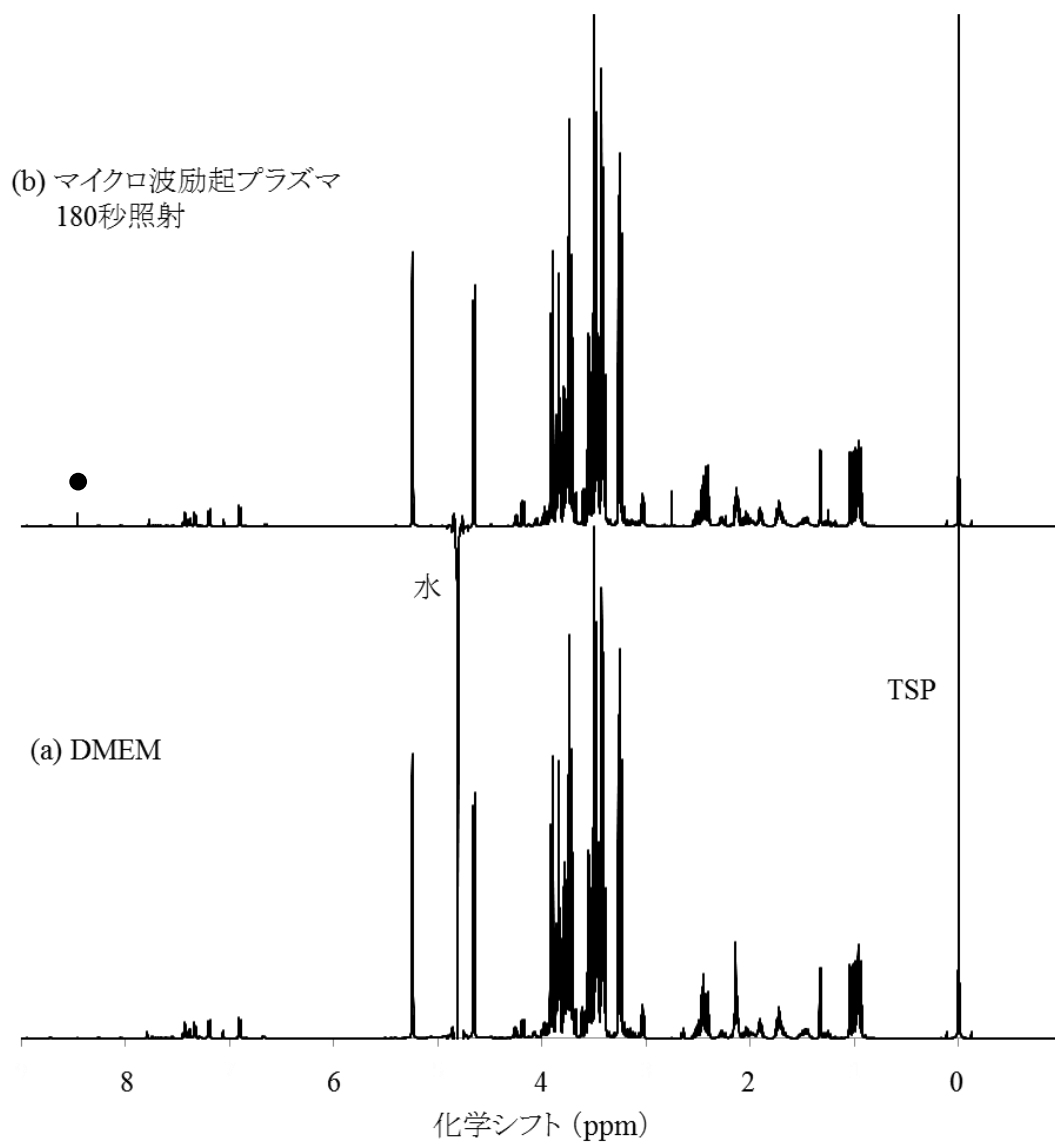


図 6.3 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較 (0 ppm から 9 ppm)。

(a) DMEM (b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

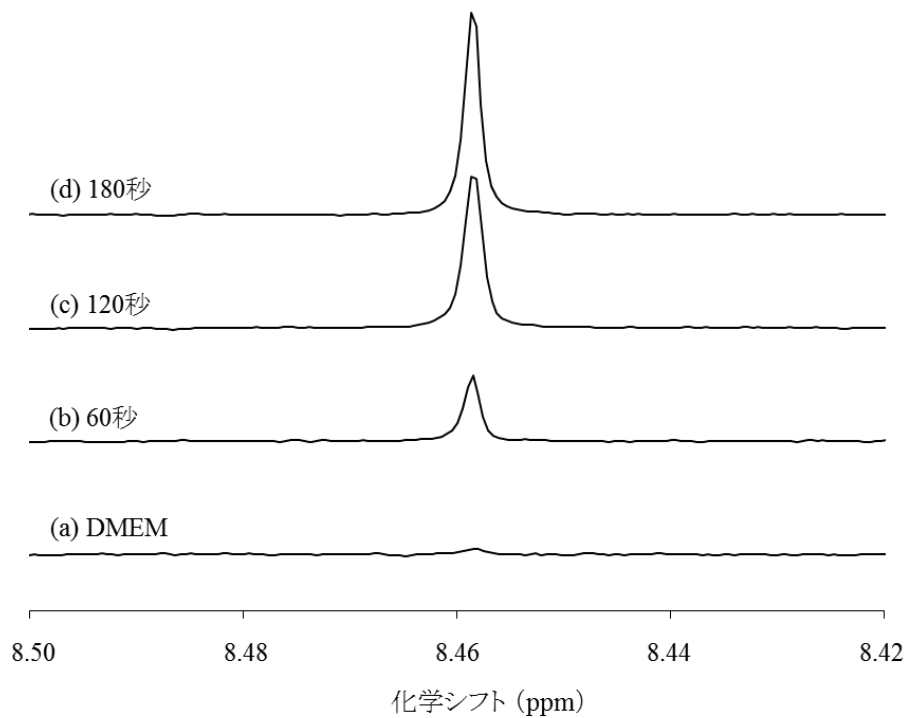


図 6.4 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較 (8.42 ppm から 8.50 ppm)。

- (a) DMEM
- (b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 60 秒照射)
- (c) PAM (マイクロ波励起プラズマ 120 秒照射)
- (d) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

180 秒間プラズマ照射した試料の NMR スペクトルの 8.0 ppm および 6.7 ppm 付近のシグナルの強度はプラズマ照射前の DMEM のシグナルと比較して 1/10 に減少していた (図 6.5)。DMEM 中でこれらの化学シフトにピークが発現する化合物としては、トリプトファン、葉酸、ピリドキサーールが候補として挙げられる。

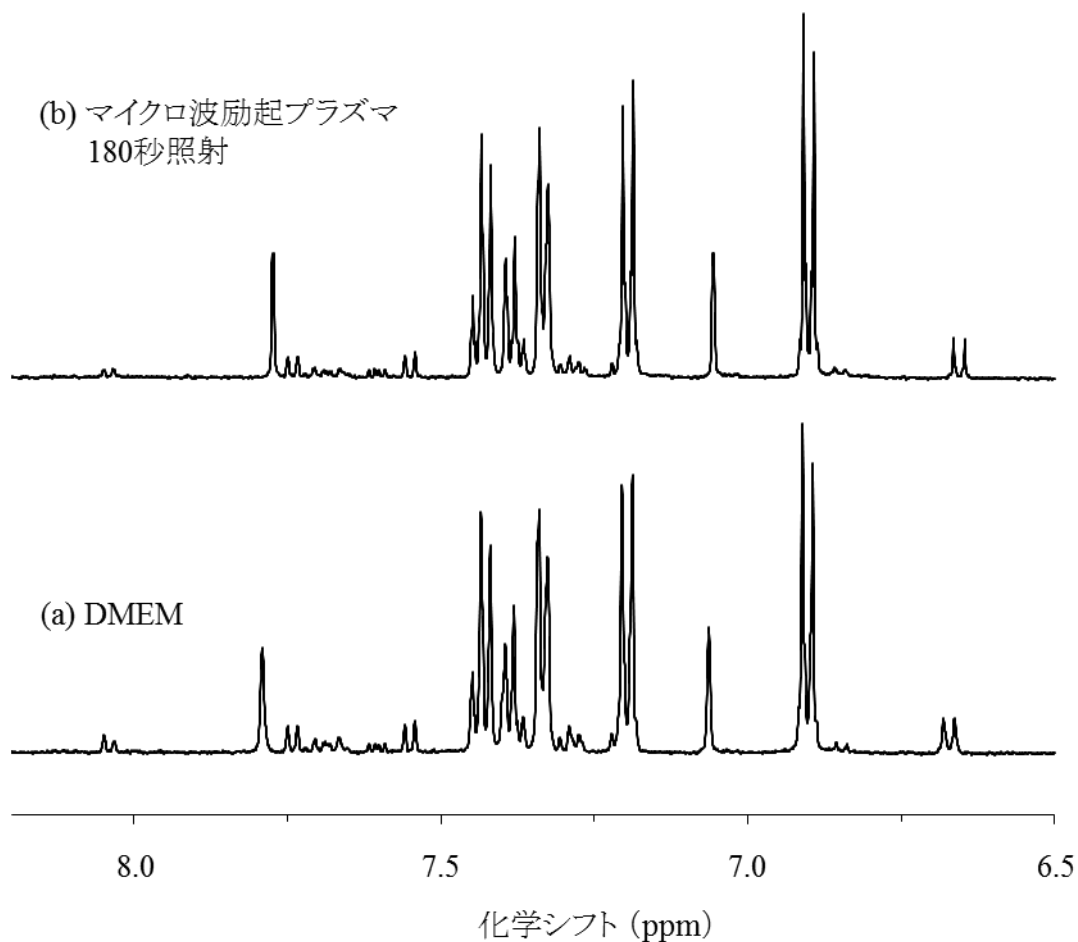


図 6.5 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較(6.5 ppm から 8.4 ppm)。

(a) DMEM (b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

図 6.6 に 2.9 ppm から 5.0 ppm の化学シフト範囲における NMR スペクトルを示す。マイクロ波励起プラズマ照射時間を増やすにつれて、4.1 から 4.2 ppm のシグナル強度の増加が観測された。このシグナル領域はヘテロ核結合の飽和炭化水素が観測される領域で、アミノ酸の $\text{C}\alpha$ プロトン等が観測される。180 秒照射した試料では、3.7 ppm 付近のシグナル強度が処理前の DMEM と比較して増加、120 秒、180 秒照射した試料では、3.0 ppm 付近のシグナル強度が DMEM と比較して増加していた。この領

域もヘテロ核結合の飽和炭化水素が観測される領域で、糖由来のプロトン等が観測される。

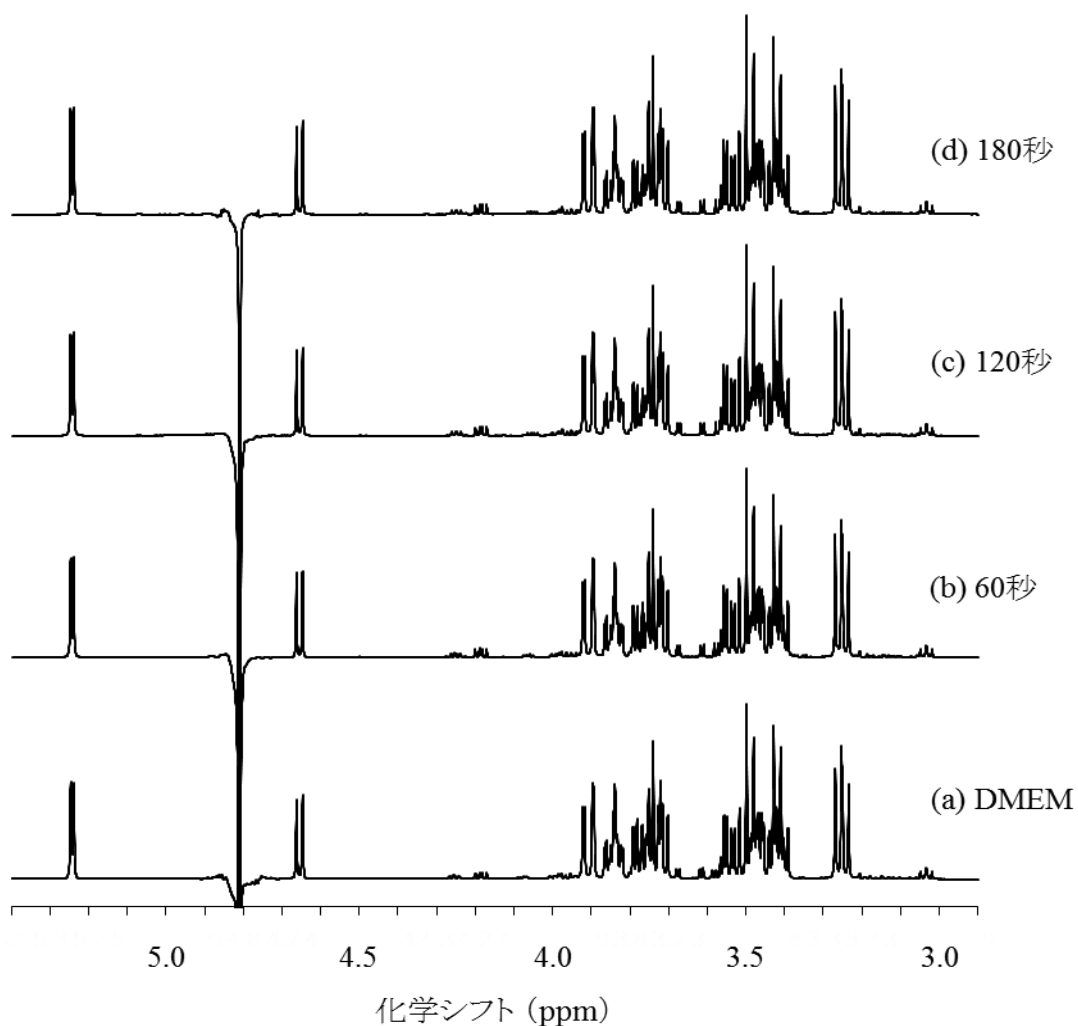


図 6.6 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較 (2.9 ppm から 5.5 ppm)。

- (a) DMEM
- (b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 60 秒照射)
- (c) PAM (マイクロ波励起プラズマ 120 秒照射)
- (d) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

図 6.7 に 1.8 ppm から 3.0 ppm の化学シフト範囲における NMR スペクトルを示す。マイクロ波励起プラズマを照射した試料では、ヘテロ核結合の飽和炭化水素が観測される 2.7 ppm から 2.9 ppm の領域で新たにシグナルが観測された。特に、2.75 ppm 付近(▼)のシグナル強度の増加が大きく、メチオニンスルホキシドの S 原子の第一近接メチル基と推測される。また、マイクロ波励起プラズマを照射した試料において、2.65 ppm 付近(▽)のシグナル強度が DMEM と比較して減少または消失していた。このシグナルはメチオニンの S 原子の第一近接メチレン基と推測される。以上より、LC-MS/MS の結果が示すようにメチオニンスルホキシドのシグナル強度の増加とメチオニンのシグナル強度の減少が NMR スペクトルからも観測された。

マイクロ波励起プラズマ照射による 2.5 ppm、2.3 ppm、2.0 ppm のシグナル強度の増加、2.1 ppm 付近(○)のシグナル強度の減少は、メチオニンがメチオニンスルホキシドに変化したために、側鎖メチレン、メチルのプロトンの化学シフト値が変化したためであると考えられる。

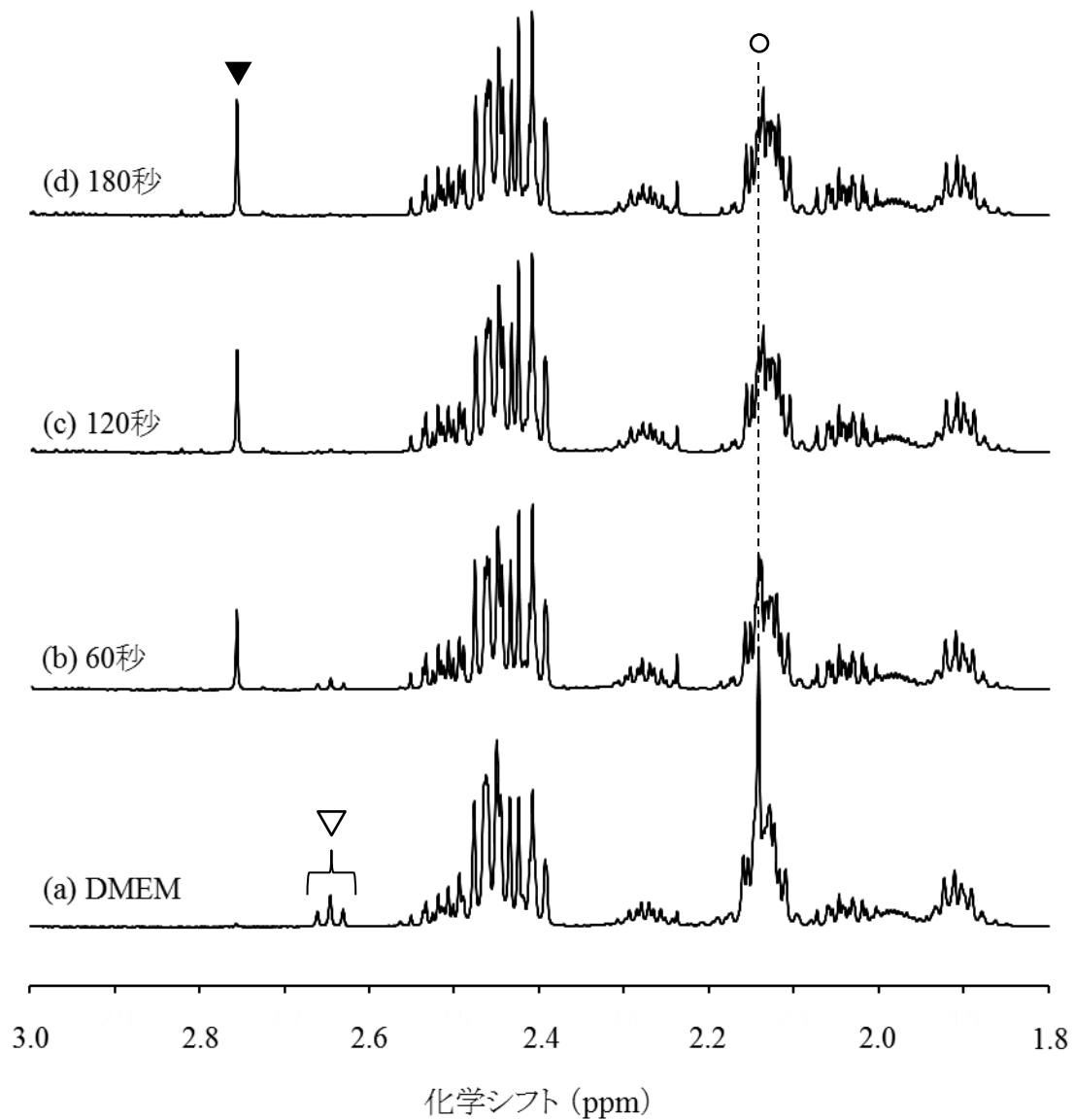


図 6.7 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較 (1.8 ppm から 3.0 ppm)。

(a) DMEM

(b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 60 秒照射)

(c) PAM (マイクロ波励起プラズマ 120 秒照射)

(d) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

図 6.8 に 0.50 ppm から 1.75 ppm の化学シフト範囲における NMR スペクトルを示す。1.2 ppm から 1.3 ppm に観測されているシグナルの強度が DMEM と比較して増加していた。さらに 180 秒間マイクロ波励起プラズマを照射した試料では、1.1 ppm から 1.2 ppm に観測されているシグナル強度が DMEM と比較して増加していた。これらのシグナル(◆)は、脂質等の飽和炭化水素由来のシグナルであると推測される。

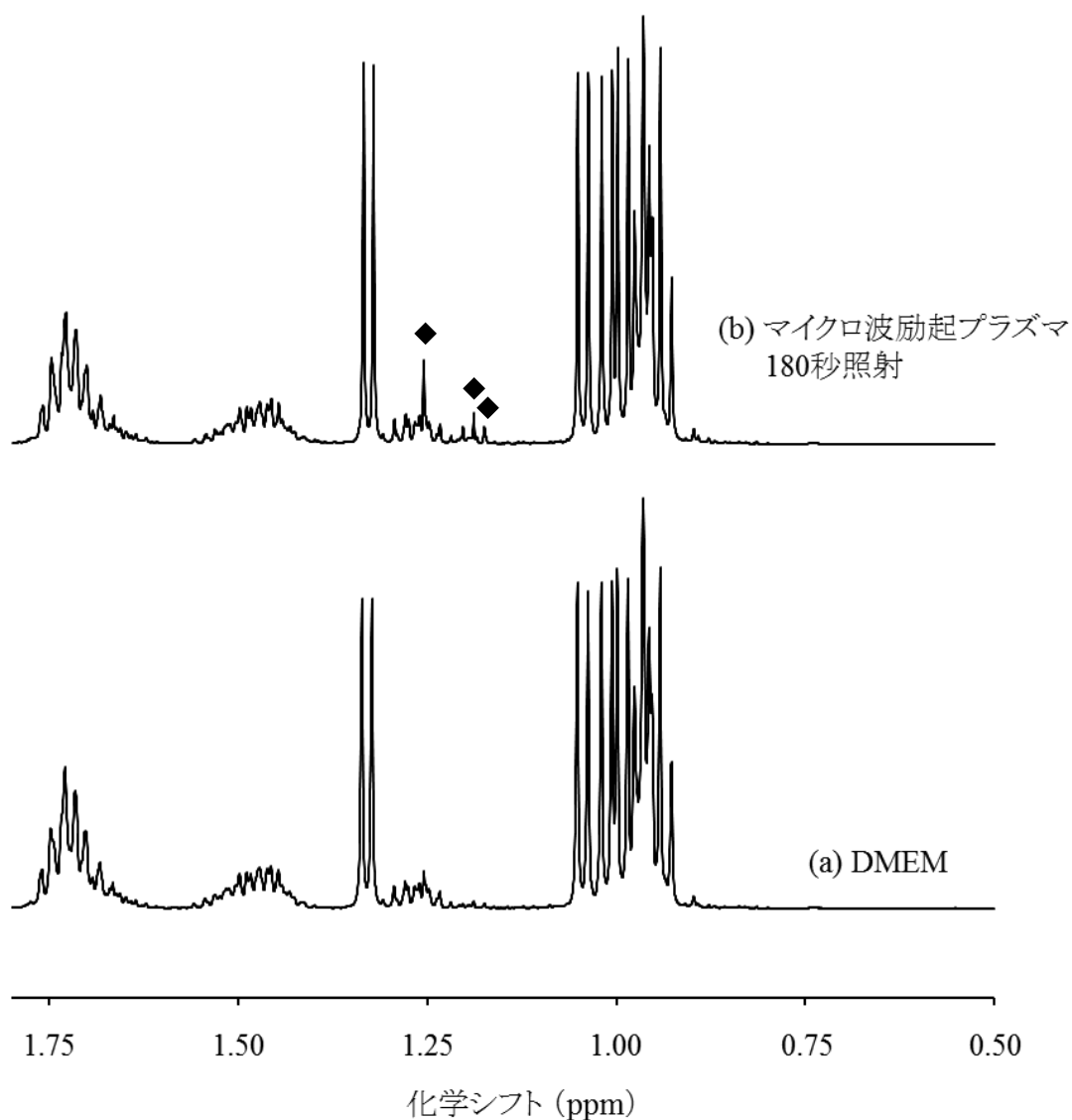


図 6.8 ^1H -NMR スペクトルの比較 (0.50 ppm から 1.75 ppm)。

(a) DMEM (b) PAM (マイクロ波励起プラズマ 180 秒照射)

6.3.3 メチオニンの減少およびメチオニンスルホキシド増加の HeLa 細胞生存率への影響

LC-MS/MS および NMR 測定の結果、マイクロ波励起プラズマの照射によって DMEM 中に含まれるメチオニン(図 6.9 (a))がメチオニンスルホキシド(図 6.9 (b))に酸化されることを明らかにした。メチオニンスルホキシドはメチオニンのスルフィド基に酸素が結合してスルフィニル基を形成した構造を有する。プラズマ照射による酸化は①メチオニンの減少と②メチオニンスルホキシドの増加が同時に起こっている。つまり、PAM による HeLa 細胞の生存率減少の原因であるかを確認するためには、どちらが HeLa 細胞の生存率減少に寄与しているかを検討する必要がある。そこで、DMEM にメチオニンスルホキシドを添加し HeLa 細胞への毒性評価および PAM にメチオニンを添加した試料による HeLa 細胞生存率への影響を評価した。

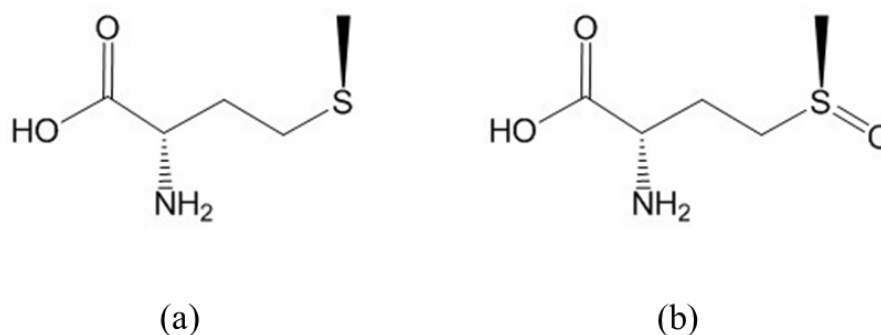


図 6.9 (a)メチオニンおよび(b)メチオニンスルホキシドの構造式。

DMEM 中のメチオニンの減少が HeLa 細胞の生存率に及ぼす影響を評価した方法を以下に記す。LC-MS/MS の結果、マイクロ波励起プラズマを照射することによってメチオニンは 1/10 に減少することがわかった。メチオニンは、DMEM (D5796) に 0.03

g/Lの濃度で含まれているため、減少量は0.027 g/Lと計算することができる。この減少した量を PAM に添加して、HeLa 細胞の生存率が向上するかを確認した。メチオニン (M9625、Sigma-Aldrich)を純水に 1 g/L の濃度となるように調製し、マイクロ波励起プラズマを 120 秒間照射した PAM 2 mL に 50 μ L のメチオニン溶液を添加して試料とした。なお、培養液に純水を添加すると浸透圧の変化により生存率に影響することが考えられるため、比較として PAM 2 mL に 50 μ L の純水を添加した試料も作製した。これらの試料による HeLa 細胞の生存率を MTS アッセイによって評価した。

図 6.10 に PAM にメチオニンを添加した試料を HeLa 細胞に作用させた場合の細胞生存率を示す。PAM に純水を添加しても、HeLa 細胞の生存率は変化していない一方で、HeLa 細胞の生存率はメチオニンの添加によって向上しており、この結果から必須アミノ酸に分類されるメチオニンの減少は、HeLa 細胞の生存率を減少させる要因であることが示唆された。

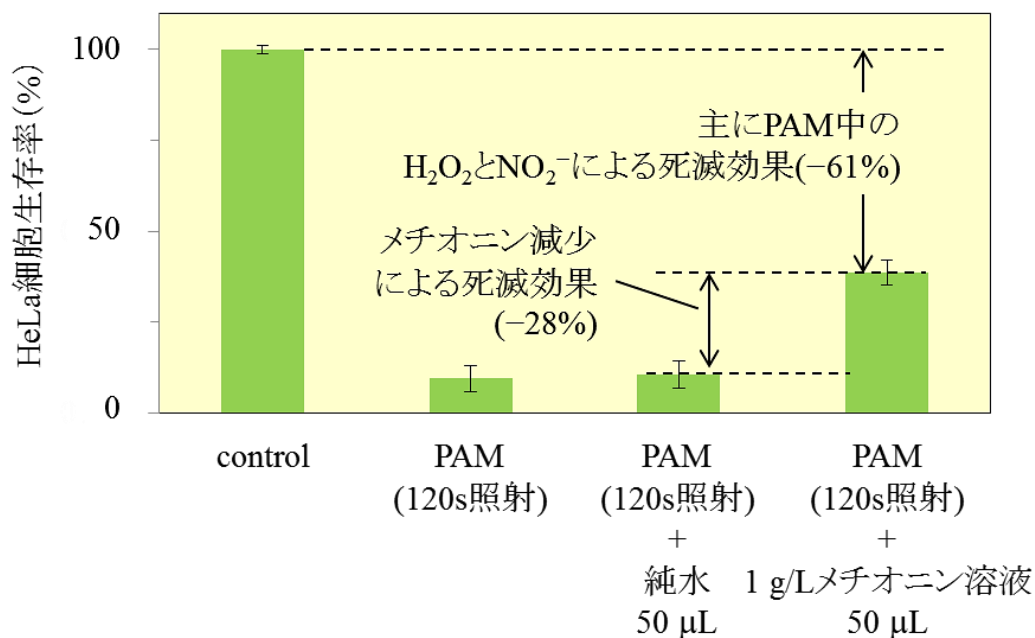


図 6.10 PAM(マイクロ波励起プラズマ 120 秒照射)にメチオニンを添加した試料の HeLa 細胞生存率への影響。

メチオニンスルホキシドの HeLa 細胞への毒性の評価は以下のように行った。メチオニンスルホキシドの増加量はマイクロ波励起プラズマ 120 秒間の照射によって 29.4 倍になっている。ここで、メチオニンスルホキシドがメチオニンから 1 mol 等量で生成すると仮定する。メチオニンの DMEM 中濃度は 0.03 g/L (=0.20 mmol/L) であるため、120 秒間のマイクロ波励起プラズマ照射後のメチオニンスルホキシドの濃度は 5.88 mmol/L となる。メチオニンスルホキシドの分子量を 165.21 とすると、120 秒プラズマ照射後の PAM に含まれるメチオニンスルホキシドの濃度は 0.97 g/L と概算される。以下の実験では、DMEM 2 mL に対して 3 mg、5 mg、7 mg のメチオニンスルホキシド (M1126, Sigma-Aldrich) を添加した。さらに、PAM 中に生成したメチオニンスルホキシド量よりも多い 25、50、75 mg を添加してその影響を確認した。

図 6.11 にメチオニンスルホキシドの毒性を評価するために、DMEM に 3、5、7 mg および 25、50、75 mg のメチオニンスルホキシドを DMEM に添加した試料による HeLa 細胞の生存率を示す。メチオニンスルホキシド 7 mg 以下の添加量では、HeLa 細胞の生存率は変化せず、メチオニンスルホキシドによる HeLa 細胞の毒性は見られなかった。しかし、25、50、75 mg と添加量を増やしたところ、HeLa 細胞の生存率は減少した。先述の通り、LC-MS/MS のピーク面積の変化から算出した 120 秒間のマイクロ波励起プラズマ照射によるメチオニンスルホキシドの生成量は 2 mL の PAM 中に 2~4 mg と計算される。以上の結果から、マイクロ波励起プラズマの照射によって生成される量のメチオニンスルホキシドでは、HeLa 細胞の生存率に影響を与えないことが示唆された。

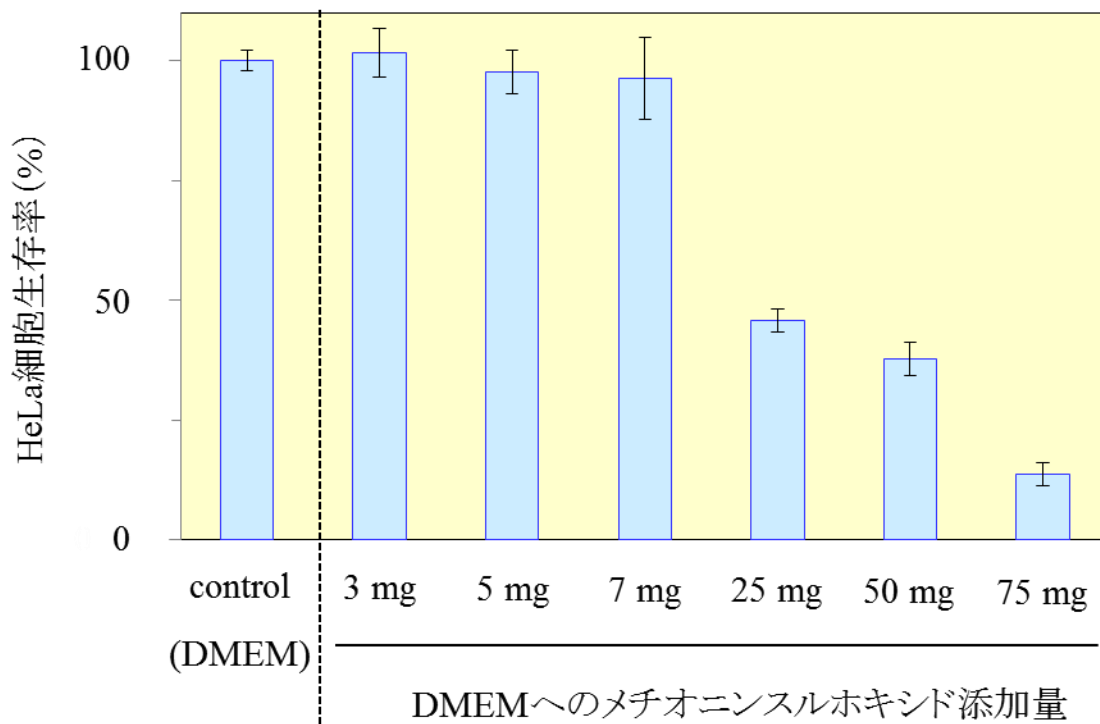


図 6.11 DMEM にメチオニンスルホキシドを添加した試料の HeLa 細胞生存率への影響。

6.4 マイクロ波励起プラズマ照射によるメチオニンの酸化

マイクロ波励起プラズマは、連続放電により多くの電子が供給されることによって多量の OH ラジカルを生成していることが示唆されており、また、発光分光測定の結果から、O 原子も DMEM に供給されていると考えられる。メチオニンを酸化させているのは OH ラジカルや O 原子等の活性酸素種であると示唆される。メチオニンを構成するメチ

ルチオエーテル基はアミノ酸の中で酸化を受けやすいと考えられており、^[11-14] 活性酸素種によってスルホキシド構造となる。メチオニンスルホキシドは還元酵素であるメチオニンスルホキシドリダクターゼ (**MsrA** および **MsrB**) によってメチオニンに還元される。**MsrA** は立体異性体であるメチオニンスルホキシドの **S** 体、**MsrB** は **R** 体の還元酵素を示す。^[15-18] したがって、メチオニンは活性酸素種のスカベンジャーとしての役割を持つと考えられている。以上より、**HeLa** 細胞もメチオニンスルホキシドをメチオニンに還元する^[19] ことによって無毒化しているため、プラズマ照射によって生成する量のメチオニンスルホキシドでは、生存率に変化がみられない。また、メチオニンスルホキシドの添加量を増やすと、メチオニンへの還元が不十分となり、残存したメチオニンスルホキシドによって生存率が減少する。

メチオニンは細胞の増殖に必要な必須アミノ酸であり細胞培地に含まれている。メチオニンは、**HeLa** 細胞の細胞増殖周期の **S** 期から **G2/M** 期に細胞内に集積し、**G2/M** 期の後期で急激に低下することが報告されている。つまり **HeLa** 細胞が増殖を活発に行うためにはメチオニンの細胞内集積が必要になる。本研究において、マイクロ波励起プラズマの照射によってメチオニンが減少したことが **HeLa** 細胞の生存率低下を招くことがわかった。

一方で、メチオニンの減少による **HeLa** 細胞の生存率の減少は、培養プレート内という環境で行った実験結果であるが、**PAM** による腫瘍縮小の効果は、メチオニンが供給されるマウスを用いた **in-vivo** 実験でも確認が認められている。^[20] つまり、**in-vivo** 実験では、メチオニンが減少していないにも関わらず腫瘍が縮小する効果が認められていることから、メチオニンの減少では **in-vivo** の実験結果を説明することはできない。大気圧プラズマを照射した **PAM** による **in-vivo** の腫瘍縮小の現象を理解するためには、プラズマ照射によって新たに生成する抗腫瘍成分の解明が望まれる。

6.5 結論

本章では、 H_2O_2 と NO_2^- 以外に DMEM に含まれるアミノ酸やビタミン等の有機化合物のプラズマによる変化を LC-MS/MS と $^1\text{H-NMR}$ で分析し、メチオニンがメチオニンスルホキシドに酸化されることを見出した。メチオニンスルホキシドの生成量はマイクロ波励起プラズマ照射前の 29.4 倍であり、DMEM 中のメチオニンの減少量も 90%と著しい。メチオニン以外のアミノ酸では、トリプトファン、リシン、シスチン、チロシンがマイクロ波励起プラズマの照射によって減少したが、その減少量は 7%から 18%とメチオニンの減少量と比較すると少なかった。また、DMEM に含まれていない成分の増加は LC-MS/MS からは確認できなかったため、 $^1\text{H-NMR}$ 分析を行い、マイクロ波励起プラズマの照射によってメチオニンの減少、メチオニンスルホキシドの生成のほかにギ酸の生成が示唆された。

メチオニンスルホキシドを DMEM に添加してその HeLa 細胞生存率への影響を検討したところ、マイクロ波励起プラズマの照射で生成した量 (2 mL の DMEM に対してメチオニンスルホキシド 3 mg から 5 mg) では、HeLa 細胞の生存率低下は見られなかった。一方で、PAM にマイクロ波励起プラズマ照射によって減少した分のメチオニンを添加したところ、添加前の PAM と比較して 28%の生存率の向上が確認でき、メチオニンの減少が HeLa 細胞に影響を与えていることを見出した。

メチオニンスルホキシドの生成はプラズマ照射によって生成する量では HeLa 細胞の生存率には影響を与えていないが、一方で *in vitro* の実験において、必須アミノ酸であるメチオニンの減少による HeLa 細胞の生存率の減少は観測された。

参考文献

- [1] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Hashizume, K. Nakamura, H. Kajiyama, T. Kondo, F. Kikkawa, M. Mizuno, and M. Hori, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2017**, 50, 155202.
- [2] S. Kalghatgi, C. M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, and J. Azizkhan-Clifford, *PLoS One*, **2011**, 6, 1.
- [3] E. Takai, T. Kitamura, J. Kuwabara, S. Ikawa, S. Yoshizawa, K. Shiraki, H. Kawasaki, R. Arakawa, and K. Kitano, *J. Phys. D.: Appl. Phys.*, **2014**, 47, 285403.
- [4] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, Y. Yamanishi, and M. Hori, *Appl. Phys. Express*, **2016**, 9, 96201.
- [5] Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/>
- [6] Spectral Database for Organic Compounds (SDBS),
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- [7] C. Schöneich, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2005**, 1703, 111.
- [8] S. Nomoto, A. Shimoyama, and S. Shiraishi, *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 1009.
- [9] H. W. Lee, S. H. Nam, A-A. H. Mohamed, G. C. Kim and J. K. Lee, *Plasma Process. Polym.*, **2010**, 7, 274.
- [10] E. R. Stadtman and R. L. Levine, *Amino Acids*, **2003**, 25, 207.
- [11] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kajiyama, F. Utsumi, F. Kikkawa and M. Hori, *Scientific Reports*, **2016**, 6, 36282.
- [11] 戸田年総、*基礎老化研究* **2011**, 35, 17。
- [12] H. Weissbach, F. Etienne, T. Hoshi, S. H. Heinemann, W. T. Lowther, B. Matthews, G. St John, C. Nathan, and N. Brot, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, 397,

172.

- [13] R. Levine, *IUBMB Life*, **2000**, 50, 301.
- [14] H. Olteanu and R. Banerjee, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 35558.
- [15] V. K. Singh, J. Moskovitz and G. Branlant, *Microbiology*, **2003**, 149, 2739.
- [16] S. Boschi-Muller, A. Gand, and G. Branlant, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, 474, 266.
- [17] S. V. Novoselov, H. Y. Kim, D. Hua, B. C. Lee, C. M. Astle, D. E. Harrison, B. Friguet, M. E. Moustafa, B. A. Carlson, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev, *Antioxid. Redox Signal*, **2010**, 12, 405.
- [18] J. Moskovitz and D. B. Oien, *Antioxid. Redox Signal*, **2010**, 12, 829.
- [19] K. Das, G. De la Garza, S. Maffi, S. Saikolappan and S. Dhandayuthapani, *PloS ONE*, **2012**, 7, e36247.
- [20] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano, M. Hori and F. Kikkawa, *PLoS ONE*, **2013**, 8, e81576.

第7章

プラズマによる細胞生存率への系統的な考察

7.1 背景

前章までに、マイクロ波励起プラズマの気相計測や癌細胞殺傷能力、PAM 中の H_2O_2 , NO_2^- の生成速度を評価して、60Hz 大気圧プラズマと比較してきた。しかし比較として用いた 60Hz 大気圧プラズマは 2 つの針電極間で生成した放電をガス流れによって押し出すように設計した幅約 20 mm のシート状であり、ジェット型であるマイクロ波励起プラズマとは、プラズマ領域の体積が異なるが、リモートプラズマであるため被照射物に電界がかからない。そのため、マイクロ波励起プラズマの特徴である、「細胞培養液に電界がかからない」ことの影響を考察することができなかった。さらに、プラズマ領域の体積は大気中の窒素や酸素の取り込み量に影響を与えると考えられ、活性酸素窒素種の生成量にも大きな影響を与える。

本章では、ジェット型パルスストリーマ放電の気相診断と、照射によって培養液に生成した H_2O_2 , NO_2^- の生成速度および HeLa 細胞の生存率評価を行い、マイクロ波励起プラズマと比較することで、プラズマによる電界の影響を考察した。

7.2 ジェット型パルスストリーマ放電の気相診断

ジェット型パルスストリーマ源の装置構成を図 7.1 に示す。ジェット型パルスストリーマ放電の放電は、He ガスを内筒に 2 slm 流通させながら、60 Hz、9 kV の交流電圧を印加して生成した。電極はガスが流通している石英ガラス製の 2 箇所銅箔巻きつけた。

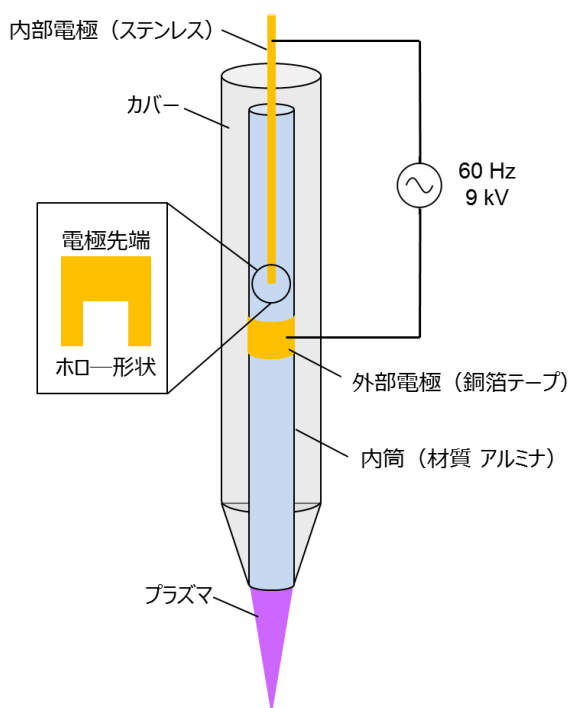
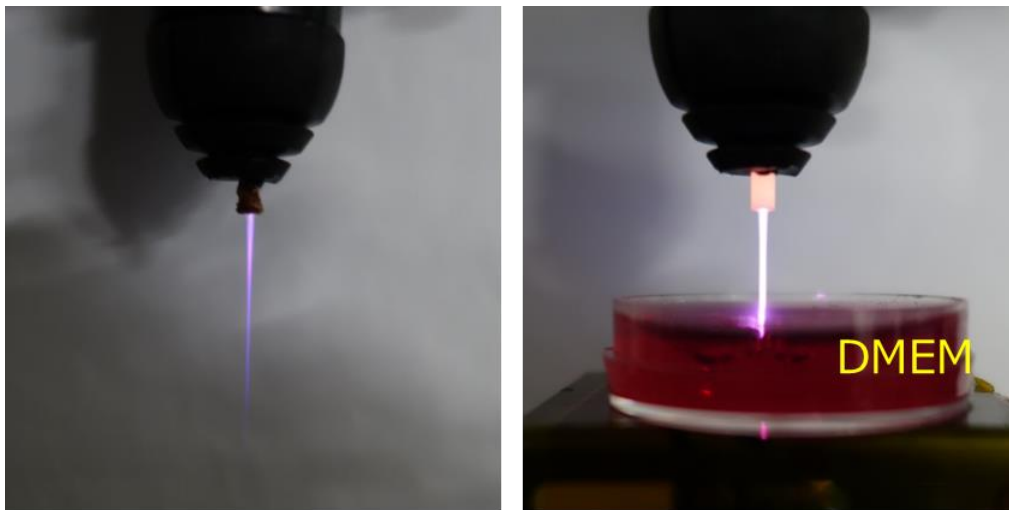


図 7.1 ジェット型パルスストリーマ源の装置構成。

図 7.2 に本章での実験に用いたジェット型パルスストリーマ放電の様子を示す。プラズマの下部に DMEM (導体) を設置することで、ガス管内部で帯電した発光粒子が DMEM に引き寄せられ、発光が強くなった。荷電粒子が培養液に当たっていることから、DMEM には電界が印加された状態であることを確認した。



(a)DMEMなし

(b)プラズマ下にDMEMを設置

図 7.2 ジェット型パルスストリーマ放電の様子。

図 7.3 にバンドパスフィルターを用いた各発光種の分布を示す。バンドパスフィルターを設けていない場合、つまり全ての発光の和は導体である DMEM の液面に近いほど強くなった。また、放電に用いた He は出射口周辺と DMEM 液面付近において発光強度が強くなっているが、それら以外にも、均一に分布していた。

NO の発光分布に着目すると、He などのシャープな分布とは異なっており、プラズマ領域の近傍まで均一に分布している様子が見られた。NO は大気中の窒素が解離してさらに O 原子などと反応して生成すると考えられるため、窒素を取り込んでいるプラズマ領域周辺においても発光が検出されたと考えられる。

一方で、O を含む O 原子と OH ラジカルの発光分布は DMEM 液面に近いほど発光が強くなる分布が得られた。O 源としては大気中の酸素や水分も考えられるが、このジ

ジェット型パルスストリーマ放電では、培養液から蒸発した水蒸気を取り込んで解離が起こり、O 原子や OH ラジカルを生成していることが示唆された。

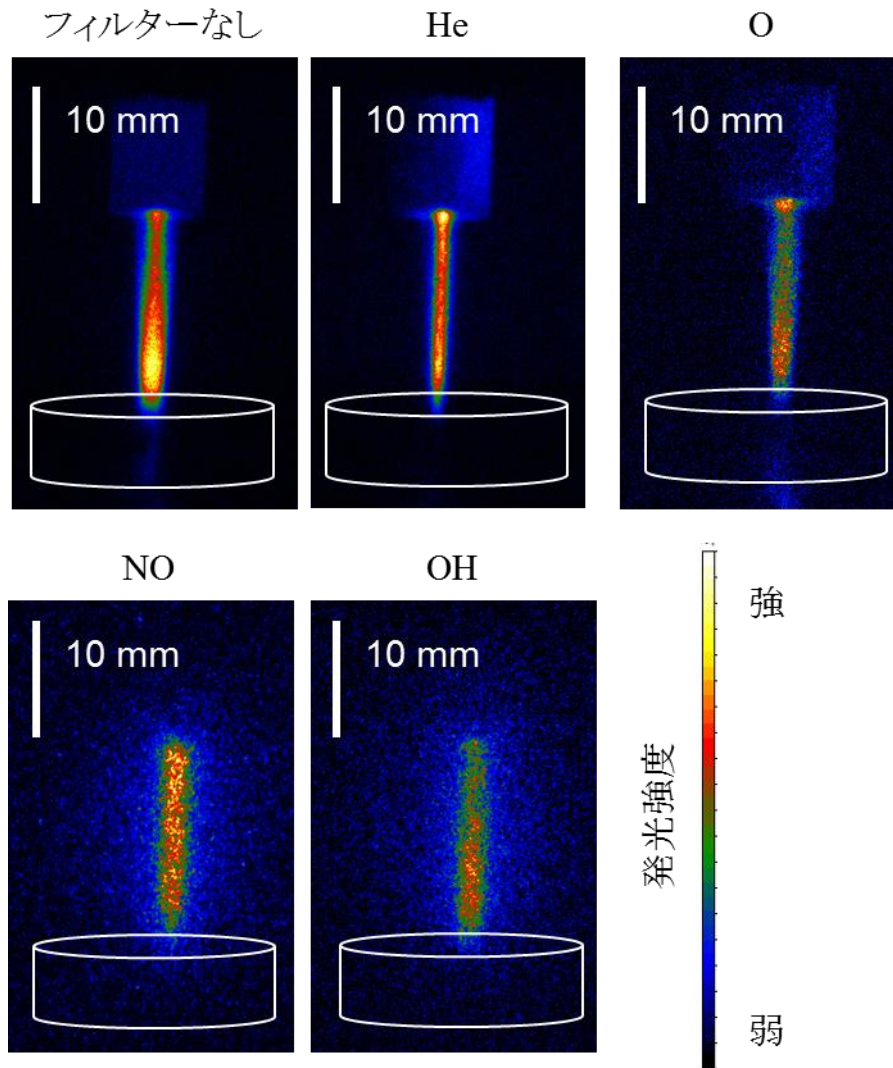


図 7.3 ジェット型パルスストリーマ放電の発光種の分布。

7.3 ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度およびガス回転温度

7.3.1 ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度

図7.4にジェット型パルスストリーマ放電の H_{β} 発光スペクトルを示す。測定は、ジェット
の噴出方向と同軸からスペクトルを取得した。また、Heに0.4%の H_2 を混合したガス
を用いた。マイクロ波励起プラズマと同様に、シュタルク拡がりの半値全幅を抽出し、電
子密度を計算したところ $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ であった。マイクロ波励起プラズマは 7×10^{14}
 cm^{-3} であり、電子密度は同じオーダーのプラズマであることを確認した。

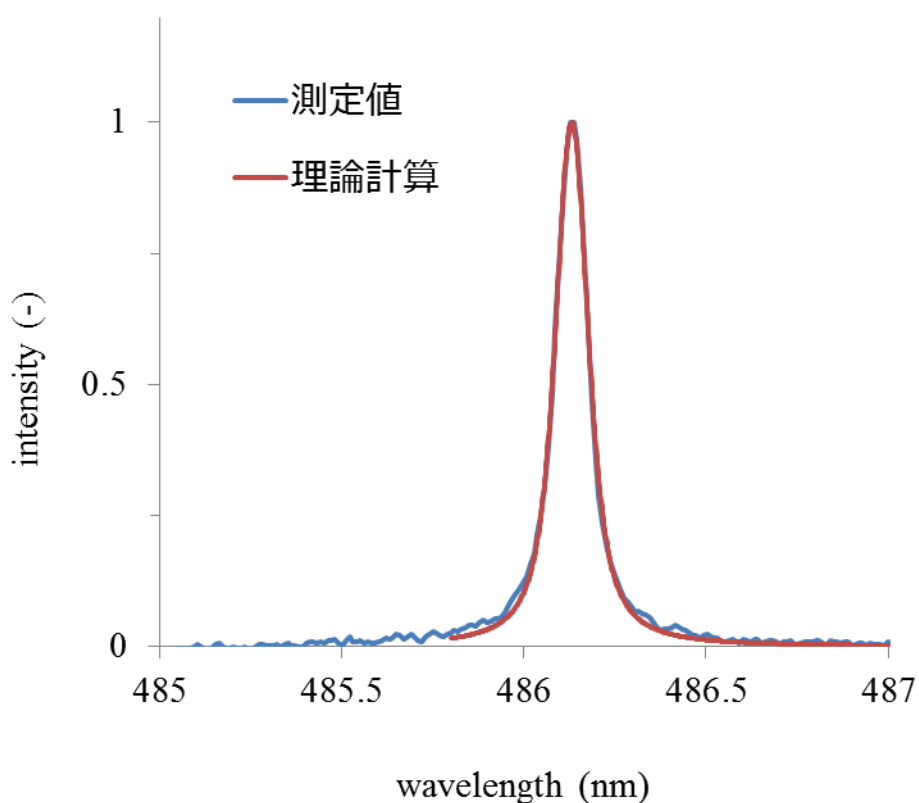


図 7.4 ジェット型パルスストリーマ放電の H_{β} 発光スペクトル。

7.3.2 ジェット型パルスストリーマ放電のガス回転温度

図 7.5 にジェット型パルスストリーマ放電の N_2 2nd positive system の発光スペクトルを示す。理論値とフィッティングしたところ、520 K の理論スペクトルと良い一致を示した。マイクロ波励起プラズマのガス回転温度は 1600 K であった。

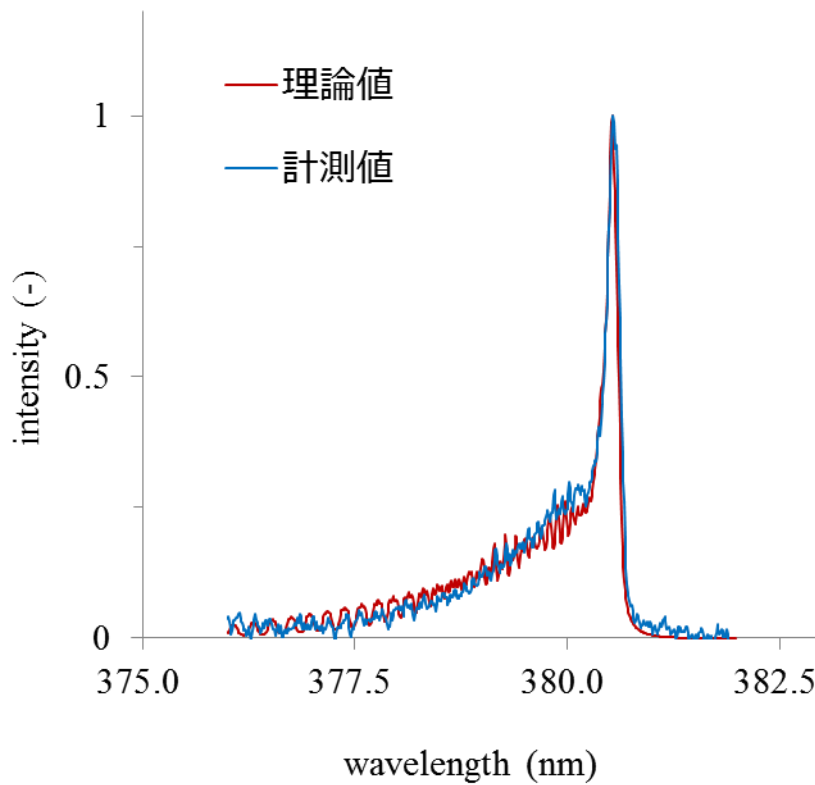


図 7.5 ジェット型パルスストリーマ放電の N_2 2nd positive system の発光スペクトルと理論スペクトルのフィッティング。

7.4 ジェット型パルスストリーマ放電による PAM 中 H_2O_2 と NO_2^- 濃度

ジェット型パルスストリーマ放電の気相診断の結果、活性酸素窒素種である NO 、 OH ラジカル、 O 原子などの発光種は全て共通して存在しており、分布に違いがあることを確認した。図 7.6 に DMEM にジェット型パルスストリーマ放電の照射時間に対する H_2O_2 濃度および NO_2^- 濃度の変化を示す。

ジェット型パルスストリーマ放電では、 NO_2^- がほとんど生成していなかった。また、 H_2O_2 の生成速度も $0.28 \mu\text{M/s}$ とマイクロ波励起プラズマと比較すると $1/20$ 倍遅いことがわかった。60Hz 大気圧プラズマの照射による H_2O_2 の生成速度は $0.35 \mu\text{M/s}$ と報告されており、^[1] ほとんど同じ生成速度だった。プラズマ領域の影響は大気中からの取り込みに関しては影響が大きいことが予想されるが、培養液からの蒸発した水蒸気による影響が支配的であることが示唆される。

一方で、 NO_2^- の生成速度は同じ電源を使用しているにも関わらず 60Hz 大気圧プラズマと比較して圧倒的に小さい。前述のとおり、 NO_2^- の窒素源は大気中からなので、プラズマ領域の違いが大きく影響したことが要因として挙げられる。また、 NO_2^- の生成反応に寄与するガス温度が 520 K と小さいことも要因として考えられる。

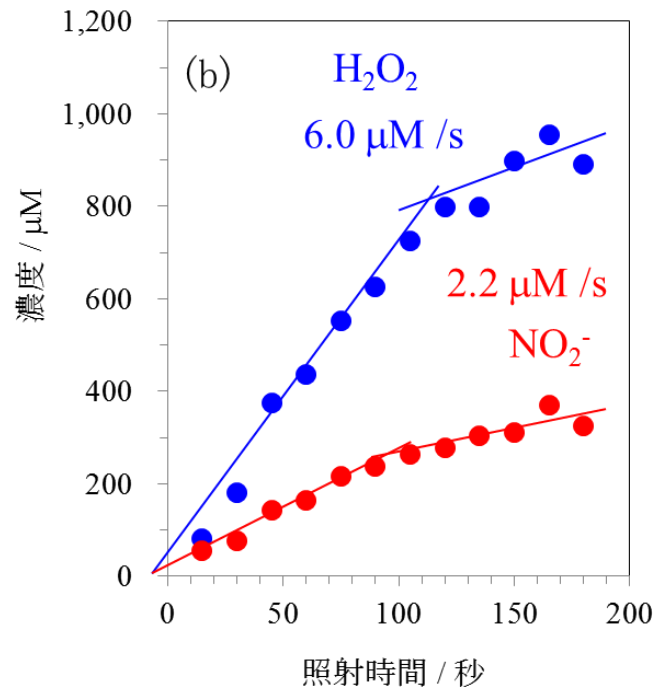
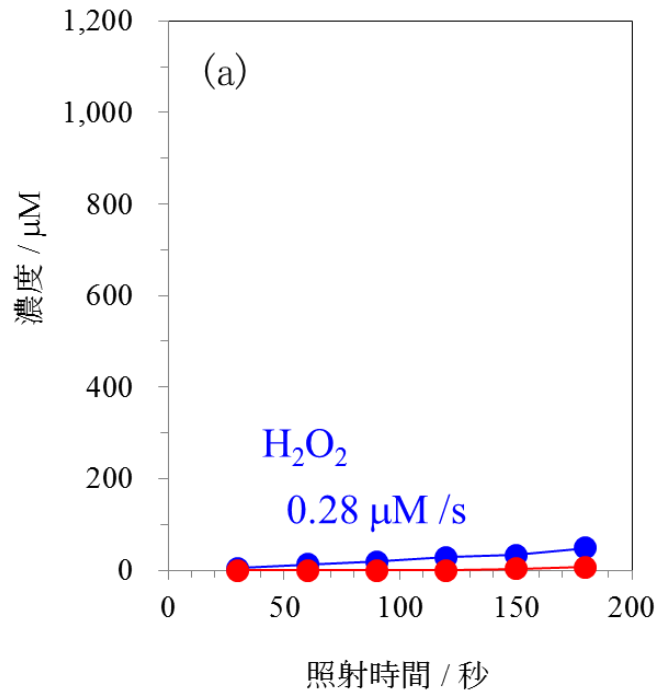


図 7.6 各プラズマ源による H_2O_2 および NO_2^- 生成速度。

(a) ジェット型パルスストリーマ放電 (b) マイクロ波励起プラズマ [第 5 章 図 5.4 および図 5.5]

7.5 ジェット型パルスストリーマ放電の照射によって作製した PAM の

HeLa 細胞生存率

図 7.7 にジェット型パルスストリーマ放電を照射して作製した PAM による HeLa 細胞の生存率を示す。マイクロ波励起プラズマと照射時間を同一にしたところ、マイクロ波励起プラズマの方が、短時間で多くの HeLa 細胞を死滅させることができる。

電界の影響について考慮するために、マイクロ波励起プラズマで作製した PAM を、ジェット型パルスストリーマ放電で生成した H_2O_2 量と同程度になるように希釈して比較した。図 7.8 はマイクロ波励起プラズマ、60Hz 大気圧プラズマおよびジェット型パルスストリーマによる PAM 中の H_2O_2 濃度と HeLa 細胞生存率の関係を示している。ジェット型で比較すると、同じ H_2O_2 濃度においてもマイクロ波励起プラズマの方が HeLa 細胞を死滅させる効果が高い。また同程度の H_2O_2 濃度で比較すると、 H_2O_2 濃度が約 20 μM 以下の領域では、 NO_2^- 生成速度が速い 60Hz 大気圧プラズマが HeLa 細胞の生存率を低下させているが、約 20 μM 以上の領域では NO_2^- の影響が顕著になり、ジェット型であるマイクロ波励起プラズマやパルスストリーマ放電による HeLa 細胞の生存率が低下する傾向が見られた。

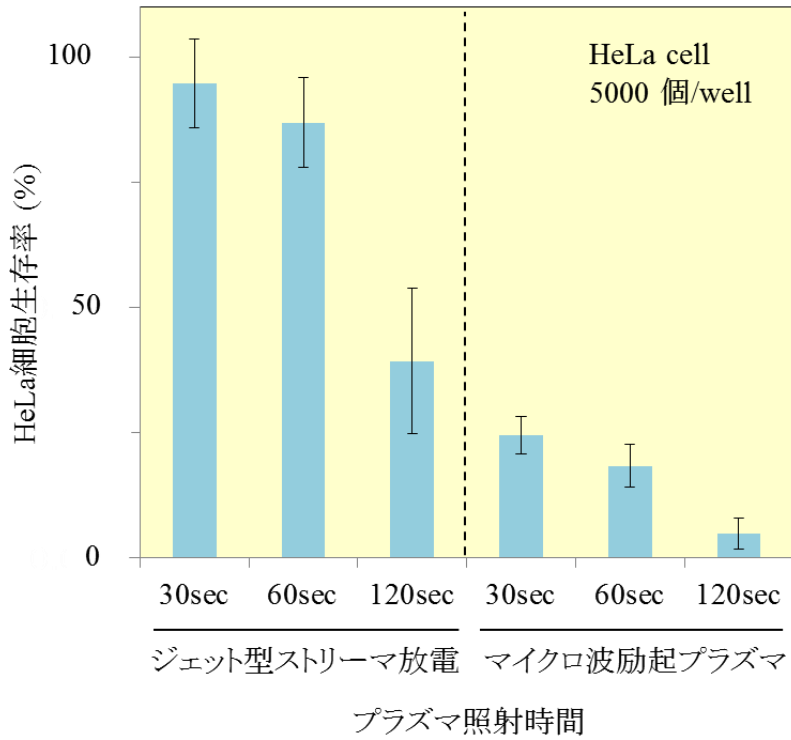


図 7.7 HeLa 細胞生存率の比較。

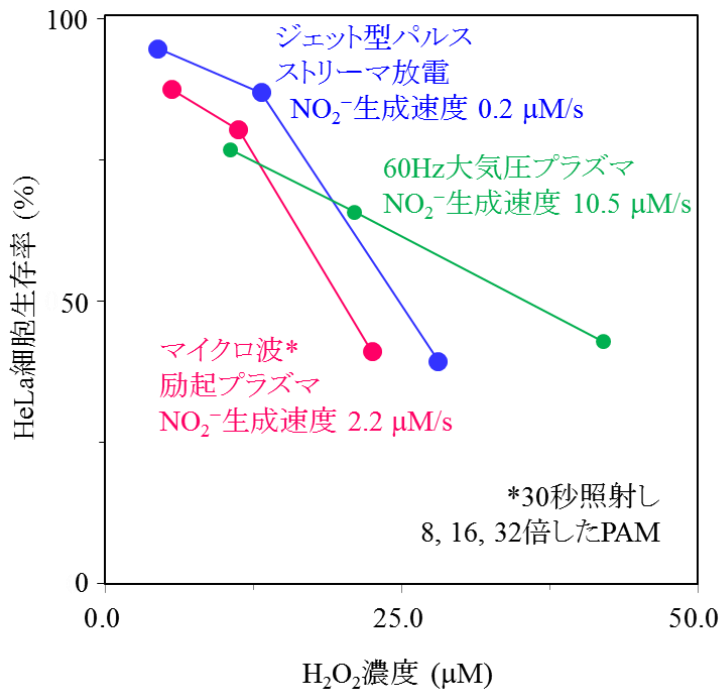


図 7.8 H₂O₂ 濃度に対する HeLa 細胞生存率。

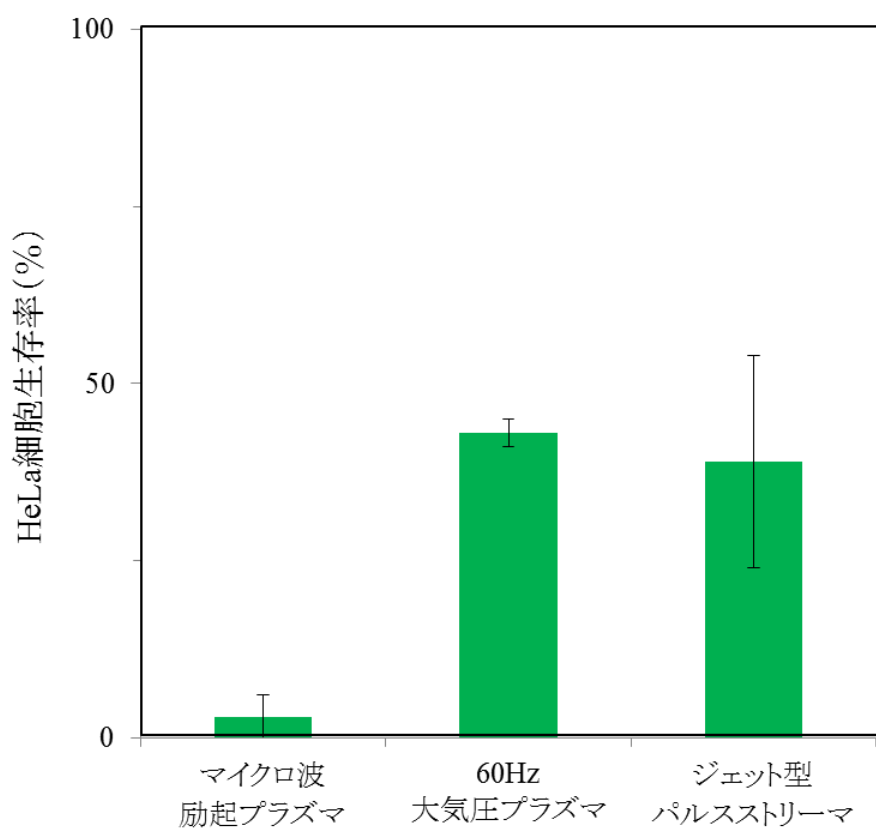
7.6 結論

被照射物に印加される電界の影響を考察するために、ジェット型パルスストリーマ放電のプラズマ計測と照射によって培養液に生成した H_2O_2 , NO_2^- の生成速度および HeLa 細胞の生存率評価を行った。ジェット型パルスストリーマ放電の発光種はマイクロ波励起プラズマと同じであったが、O 原子、 $\cdot\text{OH}$ は液面に近いほど多く存在する傾向が見られた。ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度は $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ でマイクロ波励起プラズマと同程度であったが、ガス回転温度は 520 K とマイクロ波励起プラズマよりも低く見積もられた。ジェット型パルスストリーマ放電では NO_2^- の生成が見られないことから、 NO_2^- の生成には、プラズマ領域の表面積が関係していると考えられる。

表 7.1 および図 7.9 に各プラズマ源の電子密度、間接照射法 (PAM) による癌細胞の生存率および電界の大きさの影響を示す。マイクロ波励起プラズマの各プロットは、 H_2O_2 の濃度を他のプラズマ源と同範囲にするために、DMEM (プラズマ未照射) を用いて 8 倍、16 倍、32 倍に希釈している。マイクロ波励起プラズマは電子密度が 60Hz 大気圧プラズマよりも低いにも関わらず、希釈してもなお同じ照射時間で作製した PAM による癌細胞の殺傷能力が高いという特徴を有する。また、マイクロ波励起プラズマと同じジェット型のパルス放電と比較しても、HeLa 細胞の生存率の差は 40% 以上であり、連続放電によって DMEM への単位時間あたりの活性種の供給量が多いことが大きく影響していると考えられる。ジェット型パルスストリーマ放電は、プラズマ照射時に DMEM に対して電界の影響を与えるが、HeLa 細胞の生存率、つまり PAM 内活性種の生成に影響していることは確認できず、連続放電であるマイクロ波励起プラズマによる高効率活性種生成の効果の方が圧倒的に大きいことがわかった。

表 7.1 各種プラズマ源の電子密度と癌細胞生存率の比較。

	電子密度 (cm^{-3})	PAM 作用による癌 細胞生存率* (%)	電界の強さ
マイクロ波励起プラズマ	7×10^{14}	3	△
60Hz 大気圧プラズマ	2×10^{16}	43	△
ジェット型パルスストリーマ	1×10^{14}	39	◎



各プラズマを120秒照射して作製したPAM

図 7.9 各種プラズマ源による HeLa 細胞生存率の比較。

参考文献

- [1] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiya, F. Kikkawa, M. Mizuno and M. Hori, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2016**, 605, 102.

第 8 章

結論

8.1 本研究のまとめと成果

本研究では、マイクロ波励起プラズマ源に着目し、細胞培養液への間接照射によって癌細胞や正常細胞の生存率への影響を検討することで癌治療への応用可能性を示すことを目的とした。マイクロ波励起プラズマのプラズマ診断や、癌細胞を死滅させる活性種であることが報告されている H_2O_2 と NO_2^- の生成速度を測定し、パルス放電である 60Hz 大気圧プラズマと比較することで、マイクロ波励起プラズマの特長を示し、さらに、 H_2O_2 と NO_2^- 以外の抗腫瘍成分を特定するために、PAM 中に含まれるアミノ酸やビタミンなどの有機化合物の変化を詳細に解析した。

マイクロ波励起プラズマは、電子密度や OH ラジカル濃度は 60Hz 大気圧プラズマと同等であるが、より短時間で癌細胞を殺傷することができる PAM を作製することができることを示した。高い癌細胞殺傷能力の要因を明らかにするために、マイクロ波励起プラズマ照射によって PAM 中に生成する活性酸素窒素種である H_2O_2 と NO_2^- の生成速度を測定したところ、 H_2O_2 の生成速度が $6.0 \mu\text{M/s}$ と 60Hz 大気圧プラズマ ($0.35 \mu\text{M/s}$) の約 17 倍速いことがわかった。マイクロ波励起プラズマは連続的に放電しており、パルス放電の 60Hz 大気圧プラズマよりも単位時間あたりの放電時間が長い。このため UV や電子による水の解離、単原子との衝突などの影響が大きくなり OH ラジカルの生成量が増加して、高い H_2O_2 生成速度が実現できたと考えられる。また、マイクロ波励起プラズマ照射による培養液成分の変化を解析したところ、マイクロ波励起プラズマから生成する活性酸素種によってメチオニンがメチオニンスルホキシドに酸化しているこ

とを見出した。これらの癌細胞生存率との関係を検討したところ、メチオニンスルホキシドに毒性はなく、必須アミノ酸であるメチオニンが減少したことが癌細胞の生存率低下に寄与していることを明らかにした。

以下に、各章で得られた知見をまとめる。

第 1 章では、本研究の目的とその背景について説明した。非平衡大気圧プラズマの発展と、新たな癌治療法開発への期待の高まりを説明し、非平衡大気圧プラズマを用いた癌治療法開発の意義を述べた。非平衡大気圧プラズマの直接照射および間接照射によって癌細胞だけがアポトーシス死へ誘導され、正常細胞はその影響を受けないという現象は、さまざまなプラズマ源と異なる臓器由来の細胞において報告されているが、そのメカニズムについてはまだ不明なところが多い。本研究では、これまであまり検討されていなかったマイクロ波励起プラズマに着目した。

第 2 章では、マイクロ波励起プラズマの生成方法を説明した。スリースタブチューナーでインピーダンスを最小になるようにマッチングをとることで、プラズマの伸びが長くなった。また、マイクロ波励起プラズマの気相中におけるプラズマ計測の原理と方法について述べた。発光分光法によって、得られたスペクトルから電子密度やガス回転温度の算出した方法を説明した。また、OH ラジカルの絶対密度を算出するために行ったレーザー誘起蛍光法 (LIF) の原理と絶対密度の算出方法を記述した。さらに細胞生存率を評価するために行ったアッセイにおける MTS アッセイの反応式を示し、490 nm の吸光度から算出する原理を説明した。PAM に含まれる過酸化水素、亜硝酸イオンの定量には比色計測を用いた。培養液成分の変化を示すために行った LC-MS/MS と NMR の原理についても説明している。

第 3 章では、マイクロ波励起プラズマの気相診断の結果を示した。H β の発光スペクトルからシュタルク拡がりによる半値全幅を抽出し、マイクロ波励起プラズマの電子密度

は $7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と算出した。60Hz 大気圧プラズマ ($2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$) と比較すると、電子密度は 1/30 であるが他のプラズマ源とは同等の値を示した。ガス回転温度は N_2 2nd positive system のスペクトルから、 $1600 \text{ K} \pm 30 \text{ K}$ であったが、ガス回転温度が高く見積もられている可能性がある。マイクロ波励起プラズマの発光種は、NO ラジカル、OH ラジカル、 N_2 , Ar 原子, O 原子であり、Ar 原子と O 原子の発光はプラズマ出射口から 6 mm までの範囲かつプラズマ中心部で発光していた。一方で、NO ラジカルと OH ラジカルは大気中の窒素、酸素、水蒸気を原料として生成するため、大気と接するプラズマの外側にも発光種が分布していることを示した。これらの発光種は 60Hz 大気圧プラズマと同一であるが、NO ラジカルの発光強度がマイクロ波励起プラズマでは小さいことがわかった。OH ラジカルを 282 nm のレーザーで励起し、検出された LIF スペクトルから絶対密度を算出したところ、プラズマ出射口から 5 mm 下の測定箇所では $1.9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と算出した。LIF の 2 次元イメージから、プラズマの下に水を設置し、その照射距離が近いほど OH ラジカルの LIF 強度が上昇することを示した。このことから、OH ラジカルは大気中の酸素、水分からだけでなく、蒸発した水が電子によって解離して生成していることが示唆された。マイクロ波励起プラズマのプラズマ中 OH ラジカルの絶対密度は 60Hz 大気圧プラズマと同程度であるにも関わらず、 H_2O_2 生成速度の生成速度はマイクロ波励起プラズマの方が 17 倍程度速い(第 5 章に詳述)。このことから、マイクロ波励起プラズマは、連続放電によって活性種の生成効率が高いという特徴があることがわかった。

第 4 章では、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM によって癌細胞選択的な抗腫瘍効果が得られることを、癌細胞と正常細胞の生存率の違いから検討した。マイクロ波励起プラズマのを照射して作製した PAM で、HeLa 細胞(癌細胞)および MCF10A 細胞(正常細胞)を培養したところ、MCF10A 細胞の生存率は約 90%を維持しているにも関わらず、HeLa 細胞は約 3%の生存率であり、選択的な抗腫瘍効果があ

ることを明らかにした。また、60Hz 大気圧プラズマと比較すると、マイクロ波励起プラズマは短時間の照射で多くの HeLa 細胞を死滅させる PAM を作製できることがわかった。

第 5 章では、マイクロ波励起プラズマを照射した PAM 中に含まれる H_2O_2 濃度と NO_2^- 濃度を定量した。 H_2O_2 生成速度は $6.0 \mu\text{M/s}$, NO_2^- 生成速度は $2.2 \mu\text{M/s}$ であった。60Hz 大気圧プラズマでは、 H_2O_2 生成速度は $0.35 \mu\text{M/s}$, NO_2^- 生成速度は $10.5 \mu\text{M/s}$ と報告されており、起こりうるそれぞれの反応式から、マイクロ波励起プラズマでは連続放電によって Ar 原子、電子、OH ラジカル、O 原子などが生成しており、これらによって OH ラジカルの生成速度が速くなっていることを示した。一方、 NO_2^- は、窒素源となる大気中の窒素の取り込み量がマイクロ波励起プラズマでは少ないことが考えられる。これは、プラズマ領域の表面積が関係していると推測している。

PAM を希釈することで、選択的抗腫瘍効果と H_2O_2 濃度、 NO_2^- 濃度の関係を検討したところ、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 90 \mu\text{M}$ 以上、 $[\text{NO}_2^-] = 38 \mu\text{M}$ 以上の範囲で明確な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。これらの濃度を DMEM に添加し、同濃度を有する PAM と比較すると、PAM の方が多くの HeLa 細胞を殺傷する能力を有しており、他の抗腫瘍成分が存在することが示唆された。

第 6 章では、 H_2O_2 と NO_2^- 以外のまだ特定できていない抗腫瘍成分を特定するために、マイクロ波励起プラズマの照射による DMEM に含まれるアミノ酸やビタミンなどの有機化合物の変化を詳細に解析し、マイクロ波励起プラズマの照射によってメチオニンがメチオニンスルホキシドに酸化されることを見出した。メチオニンスルホキシドを DMEM に添加して毒性を確認したが、プラズマ照射で生成する量では、毒性は認められなかった。一方で、培養液内のメチオニンの減少は、細胞生存率の低下に影響を与えていることがわかった。

第7章では、マイクロ波励起プラズマの特徴をより明確にするために、被照射物に電界を印加するジェット型パルスストリーマ放電の気相診断、 H_2O_2 濃度、 NO_2^- 濃度の定量と HeLa 細胞の生存率評価を行った。ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度は $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ でマイクロ波励起プラズマと同程度であったが、ガス回転温度は 520 K とマイクロ波励起プラズマよりも低く見積もられた。ジェット型パルスストリーマ放電では NO_2^- の生成が見られないことから、プラズマジェットにおける NO_2^- の生成速度が遅いのは、プラズマ点灯時のガスの取り込みの影響よりも、プラズマ領域の表面積が関係していると考えられる。

以上を総括すると、本研究の成果として、非平衡大気圧プラズマによる癌治療応用を目指したプラズマ源としてマイクロ波励起プラズマに着目し、プラズマ診断結果を示してその特性を明らかにしたこと、癌細胞／正常細胞間で細胞生存率に違いがあったこと、連続放電という特徴によって活性種を高効率に生成できることを見出したことが挙げられる。マイクロ波励起プラズマによる活性種の高効率生成という特徴は、パルス放電で実現することが困難なものあり、プラズマ活性溶液製造プロセスという観点で大きな利点を持つ有望なプラズマ源であることを示した。

8.2 将来展望

本研究では、マイクロ波励起プラズマの連続放電による高効率活性種生成の効果やメチオニンの酸化によるメチオニンスルホキシドの生成という新たな知見が得られたが、将来展望として以下が挙げられる。

●マイクロ波励起プラズマは OH ラジカルを多く生成することができるが、抗腫瘍効果と PAM 中に生成している H_2O_2 と NO_2^- の生成比に関する考察が不十分であった。したがって、プロセスガスに窒素や酸素を最適な流量比に制御しながらプラズマを生成

することによって、 NO_2^- の生成量を増加させるための検討を進め、抗腫瘍効果の発現に有効な $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{NO}_2^-]$ を特定することが重要である。さらに、 H_2O_2 と NO_2^- の反応による抗腫瘍成分の生成についても議論を深めることができる。

●メチオニンの減少による HeLa 細胞の生存率低下は *in-vitro* 実験における現象を説明することはできるが、マウスはメチオニンの供給を受けるためモデルマウスにおける腫瘍の縮小という *in-vivo* 実験を説明することはできない。LC-MS/MS は既知の成分の定量は得意だが、未知の成分の特定には不向きである。DMEM のように 30 種類以上の成分を含む培養液の変化を化学的に分析するには限界があり、別の分析方法が必要である。着目する成分を絞り込むために、アミノ酸やビタミンなどの構成成分の添加量が異なる DMEM に同条件でプラズマを照射し、抗腫瘍効果を比較することで、抗腫瘍効果に大きな影響を与える成分を絞りこむことも有効と考えられる。着目する成分を絞った上で GC-MS 法などを用いることで、プラズマを照射したことによる成分の変化を特定することが可能であると考えられる。

また、乳酸リンゲル液(ラクテック)にプラズマを照射した溶液(Plasma-activated lactic, PAL)も癌細胞だけを選択的に殺傷することができることが報告されている。PAL 中の H_2O_2 濃度は $8 \mu\text{M}$ であり、PAM の $30 \mu\text{M}$ よりも少ないにも関わらず、PAM と同様に癌細胞をアポトーシス誘導する効果が得られていることから、PAM とは異なるメカニズムでアポトーシスに誘導していることを示唆している。PAL の効果は、乳酸ナトリウム ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$) 存在下でのみ特異的に発現し、PAL の成分を NMR で分析したところ、アセチル基 (CH_3CO^-) やピルビン酸 ($\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$) の構造を持つ物質が生成している。PAM 中にもこれらが生成している可能性がある。

さらに、別のアプローチとして抗腫瘍成分を体内に運ぶ役割をするキャリアの存在や癌細胞側の受容体を検討することで成分の絞り込みを行うなどが挙げられる。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、御指導、御協力をいただきました多くの方々に感謝申し上げます。

本研究において、最先端研究の遂行と学位取得の機会を与えてくださいました指導教官の名古屋大学大学院工学研究科 堀勝教授に深く感謝申し上げます。また、本論文の副査として査読していただきました名城大学理工学部 伊藤昌文教授、名古屋大学大学院工学研究科 西澤典彦教授、中里和郎教授に深く感謝申し上げます。

本研究について、副査をしていただくと同時に、丁寧に学術論文に関する議論をして頂きました名古屋大学大学院工学研究科 石川健治特任教授に深く感謝申し上げます。

プラズマ計測の研究について、共同研究開始当初から多くの御指導と御助言をいただきました名城大学理工学部 竹田圭吾准教授に深く感謝申し上げます。また、多くの分子生物学的な考察を与えてくださいました名古屋大学未来社会創造機構 田中宏昌特任准教授に深く感謝申し上げます。さらに、細胞培養の方法や細胞を用いた実験方法について懇切丁寧に御教授くださいました名古屋大学未来社会創造機構 橋爪博司特任講師に深く感謝申し上げます。

私に会社に籍を置きながら学位を取得する機会を与えてくださり、本研究に関する多くの御助言や相談に応じてくださいました株式会社ニコン光技術研究所第五研究課 瀧優介課長に深く感謝申し上げます。また、学位取得を後押ししていただきました株式会社ニコン 研究開発本部 岩崎豊副本部長、材料・要素技術研究所 渡辺俊二所長、光技術研究所 国場英康所長に感謝申し上げます。同僚であります光技術

研究所第五研究課の皆様には、本研究の進捗について相談にのって頂くとともに、暖かい励ましを頂きました。深く感謝申し上げます。

また、名古屋大学において研究を行うにあたり、御指導、御助言を頂きました名古屋大学大学院工学研究科 近藤博基準教授、堤隆嘉助教に深く感謝申し上げます。

本研究のプラズマ計測の実験にあたり、安藤睦氏、梁思潔氏、熊倉匠氏、倉増廉氏に多大なる御協力いただきましたことに深く感謝申し上げます。

培養細胞や分子生物学実験にあたり倉家尚之氏、古田凌氏、神農大輝氏、黒川幸宏氏、細井祐吾氏に多大なる御協力をいただいたことに深く感謝申し上げます。

また名古屋大学の実験室で共に研究を行った孫昶達氏、天野智貴氏、加古隆氏、張彦氏、Mr. Timothy Ryan Brubaker、今井駿氏、杉浦啓嗣氏、東松真和氏、福永祐介氏、Mr. Borude Ranjit Rohidas、今村真人氏、植山稔正氏、高橋美香氏、市川知範氏、岡部萌氏、解錫同氏、郝彦氏、勝野楓氏、武田直己氏、村上開士氏、山岡壮太郎氏に深く感謝申し上げます。

また、研究を陰から支えて頂きました秘書の桑原陽子様、廣田和代様、寺澤妙子様、本田彩様深く感謝申し上げます。

最後に、私の学位取得に理解を示し、健康に気を配りながらいつも応援してくれた、妻・志保に心から感謝の意を表します。

2018年3月

学術雑誌論文

1. Y. Takahashi, Y. Taki, K. Takeda, H. Hashizume, H. Tanaka, K. Ishikawa and M. Hori, “Reduced HeLa cell viability in methionine-containing cell culture medium irradiated with microwave-excited atmospheric-pressure plasma” *Plasma Process Polym.*, accepted, (2018).
2. Y. Takahashi, Y. Taki, K. Takeda, H. Hashizume, H. Tanaka, K. Ishikawa and M. Hori, “Cytotoxicity on cancer HeLa cells sensitively against normal MCF10A cells in cultivations with cell culture medium treated by microwave-excited atmospheric pressure plasmas”, *J. Phys. D:Appl. Phys.*, accepted, (2018).

国際会議

1. Y. Takahashi, Y. Taki, K. Takeda, H. Hashizume, H. Tanaka and M. Hori, “Selective antitumor effect of the plasma-activated medium produced by atmospheric pressure plasma with high plasma density” AVS 64th International Symposium & Exhibition Oct.29-Nov.3, Tampa (U.S.), PB+BI+PS-TuM4 (2017).

国内会議

1. 高橋洋平, 瀧優介, 竹田圭吾, 橋爪博司, 田中宏昌, 堀勝 「マイクロ波励起プラズマを用いた プラズマ活性培養液の選択的抗腫瘍効果」, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会 2017 年 9 月 5 日-8 日, 福岡, 5a-S22-2.

特許

1. 高橋洋平, 堀勝, 田中宏昌, 橋爪博司 「癌細胞の細胞死誘導剤の製造方法、及び癌細胞の細胞死誘導方法」 特願 2017-160045、出願中.