

一般セッション(口頭講演) | 8 プラズマエレクトロニクス：8.4 プラズマライフサイエンス

■ 2023年9月21日(木) 9:00 ~ 11:30 | 会場 B201 (市民会館)

■ [21a-B201-1~9] 8.4 プラズマライフサイエンス

栗田 弘史(豊橋技科大)

◆ 奨励賞エントリー

9:00 ~ 9:15

[21a-B201-1] 低圧高周波水プラズマ照射によるポリイミドフィルム表面の滅菌特性

○山中 綺良々¹、林 信哉¹ (1.九州大総理工)

◆ 奨励賞エントリー

9:15 ~ 9:30

[21a-B201-2] 水への酸素ラジカル照射にて水中に生成される殺菌物質の寿命測定

○(M2)山本 ヒロミ アルウィ¹、岩田 直幸²、堀 勝³、伊藤 昌文¹ (1.名城大、2.名古屋大、3.低温プラズマ科学技術センター)

9:30 ~ 9:45

[21a-B201-3] 高密度大気圧プラズマ源によって生成されたイオン種と中性活性種の照射距離依存性

○(M2)杉江 恭輔¹、呉 準席²、田中 宏昌³、堀 勝³、伊藤 昌文¹ (1.名城大理工、2.大阪公立大工、3.名古屋大)

◆ 奨励賞エントリー

9:45 ~ 10:00

[21a-B201-4] プラズマ合成五酸化二窒素によるアミノ酸化学修飾の分析

○大場 優人¹、佐々木 渉太¹、高島 圭介¹、金子 俊郎¹ (1.東北大院工)

10:00 ~ 10:15

[21a-B201-5] 低温大気圧プラズマによるタンパク質の凝集機構に関する研究

○石原 悠景^{1,2}、清水 鉄司²、榊田 創^{1,2} (1.筑波大、2.産総研)

◆ 奨励賞エントリー

10:30 ~ 10:45

[21a-B201-6] 一酸化窒素ラジカル照射による液相中の線維芽細胞の増殖促進

○森 康雅¹、小栗 楓子¹、村田 富保¹、堀 勝²、伊藤 昌文¹ (1.名城大、2.低温プラズマ科学技術センター)

◆ 奨励賞エントリー

10:45 ~ 11:00

[21a-B201-7] カーボンナノウォール上でのヒト間葉系幹細胞の多分化能制御に関する研究

○(M2)小島 悠暉¹、近藤 博基²、石川 健治²、堀 勝²、田中 宏昌² (1.名大院工、2.名大低温プラズマセンター)

◆ 奨励賞エントリー

11:00 ~ 11:15

[21a-B201-8] SiC被覆カーボンナノウォール足場上での電気刺激重畳培養における骨芽細胞の挙動

○小野 浩毅¹、近藤 博基^{1,2}、石川 健治^{1,2}、竹内 和歌奈³、上原 賢一⁴、安原 重雄⁴、堀 勝²、田中 宏昌^{1,2} (1.名大院工、2.名大低温プラズマ科学研究センター、3.愛工大、4.JAC Ltd.)

◆ 奨励賞エントリー

11:15 ~ 11:30

[21a-B201-9] PAL内成分ががん細胞に誘発するオートファジーの評価

○(M2)山川 太嗣¹、中村 佳江²、梶山 広明²、豊國 伸哉²、水野 正明²、石川 健治²、堀 勝²、田中 宏昌² (1.名大院工、2.名大)

低圧高周波水プラズマ照射によるポリイミドフィルム表面の滅菌特性

Sterilization properties of polyimide film surface by low-pressure

RF water plasma irradiation

九大総理工¹, [○]山中 綺良々¹, 林 信哉¹,

Kyushu Univ.¹, [○]Kirara Yamanaka¹, Nobuya Hayashi¹

e-mail: hayashi.nobuya.056@m.kyushu-u.ac.jp

1. 研究背景および研究目的

近年, 国内外で宇宙機の開発や宇宙機を用いた宇宙探査の研究が注目されている. 現状では, 探査機を含む多くの宇宙機は地球上の微生物が付着した状態で打ち上げられ航行しており, 将来他の惑星や衛星等を探査する際に, 現地の生態系を微生物レベルで汚染させる可能性がある. また, 探査を終えた宇宙機が地球上に未知の微生物を持ち込んでしまう可能性も想定される. 従って, このようなクロスコンタミネーションを防ぐための手法の確立が今後の深宇宙探査には必須である. 近年, 薬剤不使用で高い素材適合性を持つプラズマ滅菌技術の研究が盛んであり, 様々な活性粒子を用いたプラズマ滅菌の有用性が報告されている¹⁾. 本プラズマ滅菌法を宇宙機表面の滅菌にも適用する可能性が検討され始めている. 本研究では, 低圧高周波水プラズマで生成した活性種を用いて, 表面保護のために宇宙機で使用されているポリイミド積層フィルムの滅菌特性およびプラズマの適合性を調べた.

2. 実験装置および方法

実験装置の概略図を図1に示す. 内径210mm, 長さ500mm, 内容積17Lのステンレス製円筒型真空チャンバーの内壁に沿って電極を設置した. 減圧したチャンバー内に液体の水を直接導入, 気化させた後, 電極に高周波電力(13.56MHz)を供給して容量結合型プラズマを生成した. 導入する水の流量をニードルバルブで調整し, チャンバー内の水蒸気圧力を任意に設定することが可能である. 実験試料には, 2×2 cmのポリイミドフィルムに *Geobacillus stearothermophilus* (好熱菌) 芽胞を 2.0×10^6 個塗布したものをサンプルとした. RF電力を60W一定としてサンプルにプラズマ照射を行い, インキュベーターで58℃, 24時間培養後, サンプルの滅菌評価を行った.

3. 実験結果および考察

図2にポリイミドフィルム表面の滅菌結果とOHラジカルの発光強度の圧力変化を示す. プラズマ照射時間180minで水蒸気圧力が10,

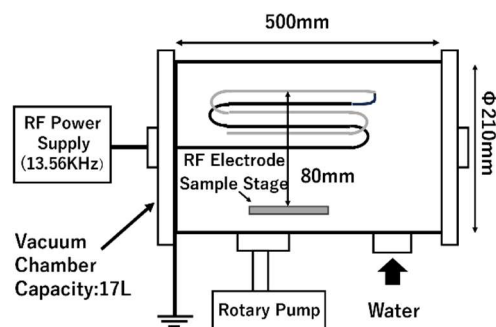


図1 低圧高周波水プラズマ滅菌器の概略図.

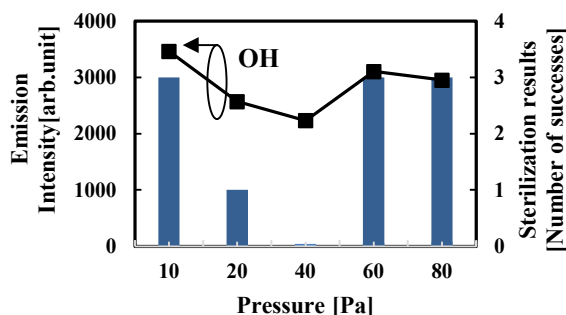


図2 OHラジカルの発光および滅菌成功率の水蒸気圧力依存性.

60, 80 Paの条件下ではサンプルすべてが滅菌された. 一方, 圧力20 Paと40 Paにおいては完全な滅菌を行うことができなかった.

水プラズマの滅菌因子を特定するために水プラズマの発光分光測定を行った結果, 非常に酸化力が強い活性酸素種であるOHラジカル(OH*)が滅菌に大きく寄与していることが分かった. 図2より, 滅菌に成功している10, 60, 80 Paではサンプルを滅菌するのに十分な量のOH*が生成されており, OH*の生成量が少ない20Paと40Paでは滅菌が不十分となっている.

水プラズマのポリイミドフィルムへの適合性を調べるために, 滅菌前後のポリイミドフィルムのIRスペクトルを計測した. 滅菌処理により表面の化学結合のピークが最大で30%程度減少することが分かった.

(1) M. Noda, Y. Sakai, Y. Sakaguchi, N. Hayashi, Biocontrol Science.25,4, (2021)

水への酸素ラジカル照射にて水中に生成される殺菌物質の寿命測定

Lifetime measurement of bactericidal species generated in water by oxygen radical irradiation

名城大¹, 名古屋大², 低温プラズマ科学技術センター³

°(M2)山本 ヒロミ アルウィ¹, 岩田 直幸², 堀 勝³, 伊藤 昌文¹

Meijo Univ.¹, Nagoya Univ.², Center for Low-Temperature Plasma Sciences³

°Hiromi Alwi Yamamoto¹, Naoyuki Iwata², Masaru Hori³, Masafumi Ito¹

E-mail: 223427040@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

近年、プラズマによる殺菌効果が注目されている。非平衡大気圧プラズマを水溶液に照射すると、ヒドロペルオキシラジカル ($\text{HOO}\cdot$) などの短寿命の殺菌物質が生成されることが複数の研究者によって報告されているが[1]、原子状酸素 ($\text{O}\cdot$) 等のプラズマ中で生成される他の物質の殺菌効果についてはあまり議論されていない。また、我々はこれまでに電気的中性酸素ラジカルを照射した水中での殺菌効果を報告した[2]。しかし、どんな物質が殺菌効果に寄与するか未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、酸素ラジカルを照射した水中で発生する殺菌物質の寿命を測定し、殺菌物質の特定を試みた。

2. 実験方法

ペルチェ素子 (TAISEI Co. Ltd.) を用いて、プラズマ照射される液体の温度を制御した。脱イオン水 3mL を $\phi 38\text{mm}$ ディッシュに分注し、装置上に設置した。水溶液の温度は 0.5°C に制御された。Ar (4.97slm) と O_2 (30sccm) を導入した電気的中性酸素ラジカル生成装置 (FPA10, FUJI Co. Ltd.) を用い、サンプルを 7 分間照射した。酸素ラジカル生成装置は、超高密度 (約 10^{14} cm^{-3}) の $\text{O}\cdot$ が主に照射できる[3]。照射後、サンプルの温度を 0.5°C に制御しながら数 10 秒間エイジングした後、大腸菌懸濁液 ($1 \times 10^7\text{ mL}^{-1}$) を 0.3 mL のラジカル照射液に懸濁し、 0.5°C で 7 分間静置した。その後、大腸

菌の生存数を CFU アッセイにより推定した。

3. 実験結果

図 1 に示すように、0 秒のエイジングでは大腸菌性菌数に 2.9 Log の減少が確認された。また、10 秒のエイジングで 2.2 Log の減少が確認され、100 秒まで殺菌効果の減衰が確認された。これらの結果から、 0.5°C の環境下で殺菌物質の半減期は 7.4 秒と推定された。

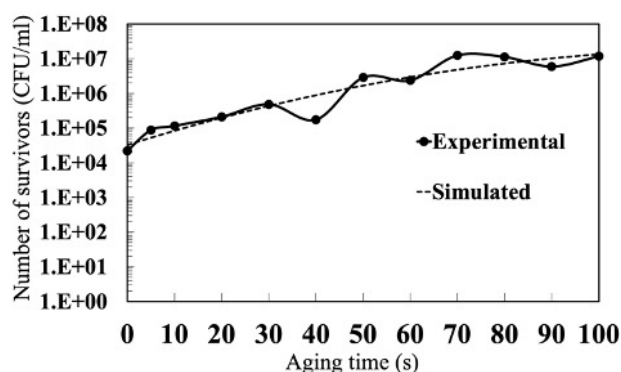


Fig. 1 Number of survival *E. coli* as a function of aging time.

4. 考察

殺菌物質の一種である $\text{HOO}\cdot$ の半減期は 0°C で 74 分と報告されている[1]。本研究の殺菌物質の半減期は $\text{HOO}\cdot$ より明らかに短いため、電気的中性酸素ラジカル処理水中に生成する殺菌物質は $\text{HOO}\cdot$ よりも不安定な物質であり、他の殺菌物質の存在が示唆された。

謝辞

この研究の一部は、JSPS 科研費 (19H05462, 22H01213) の支援を受けた。

参考文献

- [1] S. Ikawa, et al., J. Phys. D: Appl. Phys. **49**, 4254 (2016).
- [2] N. Iwata, et al., Plasma Process Polym., e1900055 (2019).
- [3] H. Hashizume, et al., Appl. Phys. Lett. **103**, 153708 (2013).

高密度大気圧プラズマ源によって生成されたイオン種と 中性活性種の照射距離依存性

Irradiation Distance Dependence of Ion and Neutral Active Species Generated

Using a High-Density Atmospheric Pressure Plasma Generator

名城大¹, 大阪公立大², 名古屋大³ ○(M2) 杉江恭輔¹, 吳 準席², 田中宏昌³, 堀 勝³, 伊藤昌文¹

Meijo Univ.¹, Osaka Metropol. Univ.², Nagoya Univ.³

°Kiyosuke Sugie¹, Jun-Seok Oh², Hiromasa Tanaka³, Masaru Hori³, Masafumi Ito¹

E-mail: 223427021@ccmailg.meijo-u.ac.jp

近年、非平衡大気圧プラズマは医療・農業分野への応用が盛んに研究されており、特にプラズマ活性化乳酸リングル液によるがん細胞の選択的殺傷効果が注目されている。[1] プラズマ活性化乳酸リングル液の調整時には高密度大気圧プラズマ源を用いる。気相から液相にかけてプラズマ中の電氣的に中性な活性種密度の距離依存性は竹田らにより報告されているが、イオン種も含めた依存性は報告されていない。[2] そこで、本研究では高密度大気圧プラズマ源を用いて生成されたイオンと中性活性種の気相分布を測定し、照射距離による液中活性種濃度の影響を調査した。

高密度大気圧プラズマ源から生成された正負イオン種と中性活性種を大気圧四重極質量分析器 (Hidden Analytical Ltd.: HPR60-EQP300 system)[3] を用いて測定した。正負イオン種は二次イオン質量分析(SIMS)モードで、中性活性種は出現質量分析法を用いて測定された。プラズマ源には Ar : 2 slm の作動ガスを導入し、10 kV, 60 Hz の交流電圧を印加した。プラズマ源とオリフィスの距離を 3, 6, 9, 12 mm として測定することで、気相中のイオンと中性活性種の分布を調査した。

図1に照射距離を3mmとしたときの正負イオン種の測定結果を示す。この図から照射距離が最も近い 3 mm の時点では NO_x⁻や O₂⁺だけでなく、N⁺や O⁻といった単原子イオン種が測定された。また、他のイオンより密度は少なくなるが OH⁻や H₃O⁻、H₃O₂⁻のような大気中の水分子由来と考えられるイオン種も測定された。この結果よりプラズマの出口付近では大気を巻き込んで種類の豊富なイオン種が得られたと考えられる。

発表ではイオン種のみならず中性活性種や液中の長寿命活性種についても考察する。

【謝辞】本研究は、科研費助成金番号(19H05462 及び 22H01213)により支援された。

【参考文献】

- [1] D. Ito *et al.*, *Appl. Phys. Express*, **15**, 056001 (2022).
- [2] K. Takeda *et al.*, *J. of Phys. D: Appl. Phys.*, **50**, 195202 (2017).
- [3] J.-S. Oh *et al.*, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **30**(3), 317 (2017).

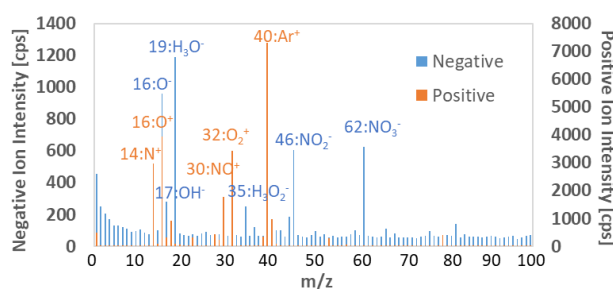


Fig 1. Positive and Negative Ion at 3mm

プラズマ合成五酸化二窒素によるアミノ酸化学修飾の分析

Analysis of amino acid chemical modification by plasma-generated dinitrogen pentoxide

東北大院工 °大場 優人, 佐々木 渉太, 高島 圭介, 金子 俊郎

Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ.

°Yuto Oba, Shota Sasaki, Keisuke Takashima, Toshiro Kaneko

E-mail: oba.yuto.r6@dc.tohoku.ac.jp

大気圧空気プラズマ技術は、少ない電力で空気を活性酸素・窒素種 (RONS) にその場で変換でき、医療・農業分野など多方面での応用が期待されている。RONS の中でも、五酸化二窒素 (N_2O_5) は、強い酸化・ニトロ化作用を持ち、水中で一時的に生成される中間体によって特異的な反応性を示すことが知られている。近年、本研究グループは、これまで合成・保管が困難なために利用されてこなかった N_2O_5 の選択合成に成功し、様々な RONS 組成 (e.g., O_3 , NO/NO_2 , N_2O_5 , $\text{N}_2\text{O}_5 + \alpha$) をその場供給可能なプラズマ源を開発した [1]。この新しいプラズマ源によって、 N_2O_5 が殺菌・殺ウイルス効果 [2] や植物免疫活性効果 [3] を有することを明らかにしてきたが、その作用機序には未だ不明な点が多くある。さらに、 N_2O_5 と生物の基本要素であるアミノ酸やタンパク質との反応に関する知見も乏しい状況にある。そこで本研究では、 N_2O_5 と 18 種類のアミノ酸 (L-Tyr, L-Trp, L-Phe, L-Cys, L-Met, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Ala, L-Ser, L-Pro, L-Lys, L-Glu, L-His, L-Asp) の反応を分析した。

実験は、図 1 に示すような装置および手法で行った。水で湿らせたアミノ酸粉体に対して、所定時間 RONS ガスを照射し、溶かした溶液を液体クロマトグラフィー-フォトアレイダイオード検出器-質料分析計 (LC-PDA-MS) にて測定した。 N_2O_5 処理した 18 種のアミノ酸の中で、L-Trp の顕著な着色反応が見られた。また、空気 (Control)・ NO_x (NO/NO_2) では着色はほとんど見られず、 O_3 処理では少し褐色がかかった着色反応であった。LC-PDA 分析の結果を元に作成した 3D PDA カラーマップや MS の結果を詳細に分析したところ、 N_2O_5 処理では 5-ニトロ-トリプトファンをはじめとした数種類のニトロ化物が、 O_3 処理ではキヌレニンなどの酸化物が多く検出された。講演では、それぞれの RONS ガス処理における反応機構を議論する。

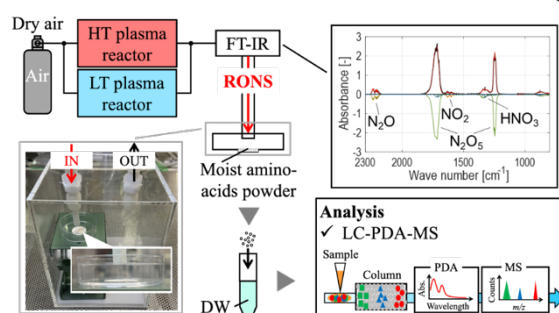


図 1 実験装置の構成と分析手法

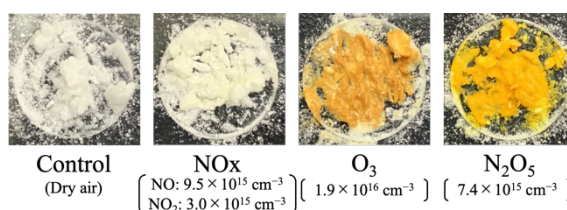


図 2 L-Trp へ 5 分間 RONS 処理した後の写真

- [1] S. Sasaki, K. Takashima and T. Toshiro, Ind. Chem. Res. **60** 798 (2021).
- [2] S. Kumagai *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys. **61** SA0808 (2021).
- [3] D. Tsukidate *et al.*, PLOS ONE **17** e0269863 (2022).

低温大気圧プラズマによるタンパク質の凝集機構に関する研究

Protein aggregation by low-temperature atmospheric pressure plasma

筑波大¹, 産総研², °石原 悠景^{1,2}, 清水 鉄司², 榊田 創^{1,2}

Tokuba Univ.¹, AIST², °Yukei Ishihara^{1,2}, Tetsuji Shimizu², Hajime Sakakita^{1,2}

E-mail: s2220826@s.tsukuba.ac.jp

近年開発されている低温大気圧プラズマ源は、熱ダメージを与えずに表面処理を行うことができるため、生物・医療分野への応用が研究されている。手術時における止血法として、焼灼止血が用いられる場合があるが、この手法では止血部位以外にも熱傷が生じてしまう。そのため、組織挫滅を伴わない、患者への負担を限りなく低く抑えることが可能な低温プラズマ処理による止血が提案された[1]。

先行研究により、血液中タンパク質の凝集がプラズマ処理による止血作用機序の1つであることがわかっており、そしてタンパク質の凝集には電気的作用が関与していることが示唆された[2]。しかしその詳細な機構は明らかになっておらず、血液中タンパク質の凝集に関しては不明点が多い。本研究では、低温大気圧プラズマによるタンパク質凝集機構の理解を目標として実験を行っている。

血液中のタンパク質で最も多く含まれているアルブミンに着目し、図1に示すアルブミン凝集実験装置を用いてプラズマ処理実験を行った。針電極に約2.5 kV_{pp}の矩形波交流高電圧を印加し、針電極先端と液面の間にプラズマを生成した。プラズマ処理により、図2に示すようなアルブミン凝集物が生成される。アルブミン凝集物の成長過程を記録し、画像解析することで凝集物面積の時間発展を求めた。周波数等、プラズマ処理条件を変化させた際に、凝集物面積の時間発展にどのような差が生じるかを調べた。発表では、プラズマ処理によって生じた凝集物の成長過程とプラズマ処理条件の相関について議論する。

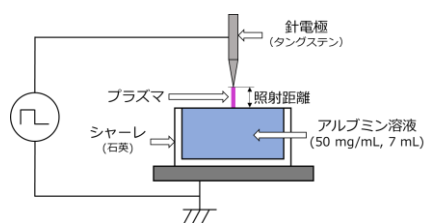


図1. 実験装置図。

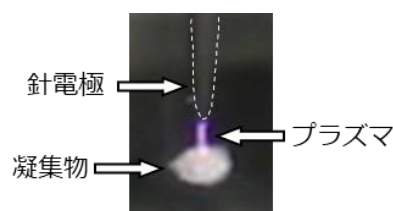


図2. 溶液表面におけるアルブミンの凝集。

参考文献

- [1] Sakakita, H. and Ikehara, Y.: Irradiation Experiments on a Mouse Using a Mild-plasma Generator for Medical Applications, Plasma and Fusion Research 5, S2117, 2010.
- [2] Sakakita, H. and Yamada, H. and Shimizu, T. and Fujiwara, M. Kato, S. and Kim, J. and Ikehara, S. and Shimizu, N.: Effects of electric charges on serum protein aggregation induced by a low temperature atmospheric pressure plasma, J. Phys. D: Appl. Phys. 54, 2021.

一酸化窒素ラジカル照射による液相中の線維芽細胞の増殖促進

Nitric oxide radical irradiation promotes the proliferation of fibroblasts in liquid

名城大¹, 低温プラズマ科学技術センター²

○(M2) 森 康雅¹, 小栗 楓子¹, 村田 富保¹, 堀 勝², 伊藤 昌文¹

Meijo Univ.¹, Center for Low-Temperature Plasma Sciences²,

○Yasumasa Mori¹, Kazane Oguri¹ Tomiyasu Murata¹, Masaru Hori² and Masafumi Ito¹

E-mail: 223427039@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

近年、非平衡大気圧プラズマ(NEAPP)の生物学的応用について多くの研究がされており、最も注目されている NEAPP の利用の一つには医療応用がある。我々の先行研究では、NEAPP 中の電気的中性なラジカル種のみを照射できる非平衡大気圧ラジカル源を用いてマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 を処理した。その結果、線維芽細胞の増殖が促進し、ラジカル源から照射される NO[•]のドーズ量に依存したことから NO[•]が気相中の増殖促進種と特定された。[1]しかしながら、ラジカル源から照射された NO[•]が液相中を拡散して直接細胞の増殖を促進するか、または液相中で他の活性種と反応した後に線維芽細胞に影響するかは未解明であった。本研究では、ラジカル源から照射された NO[•]の線維芽細胞の増殖促進における液相中での寄与を評価した。

2. 実験方法

NO[•]の照射には、非平衡大気圧ラジカル源 (Tough Plasma, FPA10, Fuji Co., Ltd.)を用いた。[2]NO[•]の消去剤である c-PTIO(100 μM)を含む、または含まない細胞懸濁液の 3 mL を直径 38 mm のディッシュに入れ、ラジカル源の照射口から 10 mm の位置に設置し、10~30 秒間処理した。ラジカル処理した細胞懸濁液を回収し、上澄みを捨てて細胞培養液に再懸濁し、1.0×10⁵ cells/mL の濃度に調整した。濃度調整された細胞懸濁液を 96-well プレートに 160 μL ずつ

播種し、37 °C、CO₂ 濃度 5%で 24 時間培養し、MTS アッセイにより、細胞生存活性の評価を行った。ラジカル未照射の線維芽細胞が示す吸光度に対するラジカル処理した線維芽細胞の吸光度の比によって、細胞生存率を算出した。

3. 実験結果

図 1 より、c-PTIO を含まない線維芽細胞懸濁液を処理した場合、15 s 照射にて約 36%の増殖促進効果があった。一方、c-PTIO を含む細胞懸濁液に対してラジカルを照射した場合、増殖促進効果が低下し、15 s 照射でも促進率が 13%にとどまった。この結果は、ラジカル源にて液相中に生成される NO[•]が c-PTIO にて消去され、増殖促進効果が低下したことを示唆する。

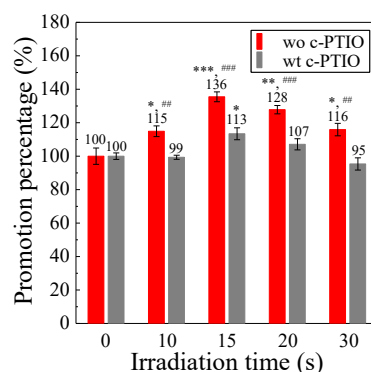


図 1 c-PTIO を含む、または含まない細胞懸濁液への NO[•]照射による増殖促進効果

謝辞

この研究の一部は、JSPS 科研費(JP19H05462 と JP22H01213)の支援を受けた。

参考文献

- [1] Y. Hori, et. al., Plasma Process Polym. 18, 2000225 (2021).
- [2] H. Hashizume, et. al., Appl. Phys. Lett., 103, 15378 (2013).

カーボンナノウォール上でのヒト間葉系幹細胞の 多分化能制御に関する研究

Multipotency control of hMSC in culturing on carbon nanowalls

名大院工¹, 名大低温プラズマ科学研究センター²

○(M2) 小島 悠暉¹, 近藤 博基², 石川 健治², 堀 勝², 田中 宏昌²

Nagoya Univ. Eng.¹, Nagoya Univ. Center for Low-temperature Plasma Sciences²,

○Yuki Kojima¹, Hiroki Kondo², Kenji Ishikawa², Masaru Hori², Hiromasa Tanaka²

E-mail: kojima.yuki.n1@s.mail.nagoya-u.ac.jp

はじめに：ヒト間葉系幹細胞(hMSC)は、骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞などへの多分化能を有する。一方、カーボンナノチューブなどのナノ構造基材が、細胞の形態や分化に影響を与えることが報告されている^[1]。本研究では、細胞培養足場として、基板に垂直に成長した多層グラフェンシートから構成され、特異な三次元構造や電気伝導性、液中での堅牢性を有するカーボンナノウォール(CNWs)に注目した^[2]。これまでに、CNWs上でのhMSCの培養において、細胞形態の変化と神経細胞への分化を示唆する結果を得ている^[3]。本研究では、CNWs上で電気刺激を重畳した培養において、骨芽細胞への分化を明らかにしたので報告する。

実験方法：ラジカル注入型プラズマ励起化学気相堆積装置 (RI-PECVD) を用いて、Ti(500nm)/SiO₂(1μm)/Si 基板上に CNWs を成長させた(Fig. 1)。その後、Ti 電極経由で電気刺激(10, 200k, 2MHz)を重畳しながら、CNWs上でhMSCを14日間培養した。この時、細胞培養培地には、未分化維持培地を用いた。骨芽細胞分化の判定には、Alizarin Red S 染色を行い、溶出液の450 nm 吸光度の測定により行った。なお、48 ウェルプレートにおいて未分化維持培地及び分化誘導培地を用いた結果を、ネガティブコントロール (neg_ctrl) 及びポジティブコントロール (pos_ctrl) とした。

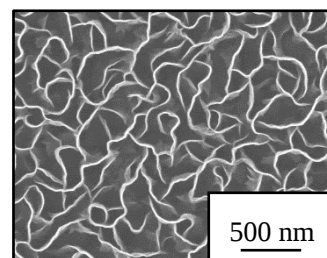


Fig. 1 SEM image of CNWs

結果と考察：Fig. 2 は、Alizarin Red S 溶出液の450 nm 吸光度である。CNWs上での細胞の培養において、未分化維持培地を用いたにも関わらず、骨芽細胞への分化が確認された。一方、2 MHz の電気刺激を印可した場合の吸光度は、電気刺激なし (noES)と比較してわずかに低い結果が得られた。これらの結果は、CNWsが、hMSCを神経細胞や骨芽細胞などへの多様な分化を誘導することを示している。発表では、脂肪細胞などへの分化も含め、CNWs足場によるhMSCの分化誘導の作用機序を体系的に考察する。

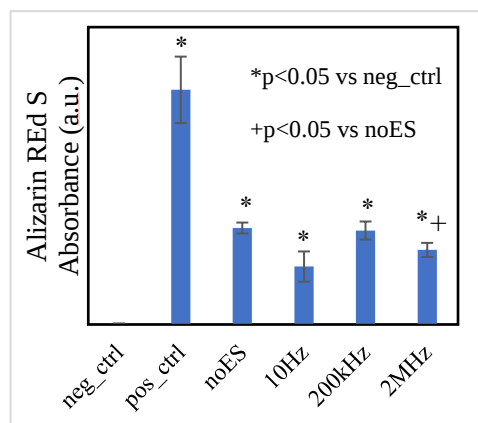


Fig. 2 Quantitative determination of Alizarin Red S (n=4)

[1] S. Namgung. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **5**, 9, 7383 (2011)

[2] M. Hori *et al.*, J. Vac. Soc. Jpn. **49**, 368(2006).

[3] 小島ら, 第 70 回応物 (2023) 17a-A409-2

SiC 被覆カーボンナノウォール足場上での電気刺激重畳培養における骨芽細胞の挙動 Osteoblast behaviors in electrical stimulating culture on SiC-coated carbon nanowalls

名大院工¹, 名大低温プラズマ科学研究センター², 愛工大³, JAC Ltd.⁴

○小野 浩毅¹, 近藤 博基^{1,2}, 石川 健治^{1,2}, 竹内 和歌奈³, 上原 賢一⁴, 安原 重雄⁴,
堀 勝², 田中 宏昌^{1,2}

Nagoya Univ. Eng.¹, Nagoya Univ. cLPS², Aichi Inst. Tech.³, Japan Advanced Chemicals Ltd.⁴

○Koki Ono¹, Hiroki Kondo^{1,2}, Kenji Ishikawa^{1,2}, Wakana Takeuchi³, Kenichi Uehara⁴,

Shigeo Yasuhara⁴, Masaru Hori² and Hiromasa Tanaka^{1,2}

E-mail: ono.koki.w1@s.mail.nagoya-u.ac.jp

【背景】カーボンナノウォール(CNW)は、グラフェンシートが基板に対して垂直に配向したナノ構造材料であり、新しい細胞培養足場として注目されている。これまでに、CNW の壁密度が異なる足場上に骨芽細胞様骨肉腫細胞(Saos-2)を播種し、足場を介して電気刺激(ES)を印加したところ、ES の強度や周波数によって増殖促進や分化促進を制御できる可能性が示されている[1]。一方、CNW 上に炭化ケイ素(SiC)を被覆することによって、商用培養皿と同等にまで細胞増殖率が向上可能であることも見出されている[2]。そこで本研究では、SiC 被覆した CNW 上の細胞に対して ES を印加することで、CNW のエッジ形状と ES 重畳による、細胞挙動への相乗効果を明らかにした。またこの時、SiC の成膜中に Al を In-situ 添加することで、SiC の電気伝導度を向上させた。

【実験方法】CNW は、ラジカル注入型プラズマ励起化学気相成長法(RI-PECVD)によって、Ti(500 nm)/SiO₂(1000 nm)/Si 基板上に成長した。また原料ガスとしてビニルシランを用いた熱 CVD (750 °C, 7 分間)によって、CNW 上に SiC (30nm)を成膜した。この時、Ar とトリメチルアルミニウム(TMA)を、それぞれ希釈ガス及びドーパントガスとして使用した。Saos-2 細胞を CNW 及び SiC 被覆した CNW(SiC/CNW)上にそれぞれ播種し、播種後 1 日後に、ES を 3 日間印加した。また Al 添加した SiC 膜の電気特性を測定するため、高抵抗 Si 基板($\geq 2 \times 10^4 \Omega \cdot \text{cm}$)上に SiC 膜(50nm)を成膜し、四探針法で抵抗率を測定した。Saos-2 細胞の細胞生存率は、MTS アッセイにより測定した。

【実験結果】四探針測定の結果、ノンドープの SiC 膜が測定不可能だったのに対し、Al 添加した SiC 膜の抵抗率は $3.16 \Omega \cdot \text{cm}$ と測定された。Fig. 1 は、CNW および SiC/CNW 上に播種した細胞の 4 日後の生存率である。ES 印加なしでは SiC 被覆によって細胞増殖率が有意に増大しているのに対し、SiC への Al 添加の有無に対しては細胞生存率に有意な差は見られなかった。一方、ES 印加した場合では、CNW 上において細胞増殖率が 8%増加したのに対し、SiC/CNW 上では 18%増大した。これは、ES 印加と SiC/CNW 足場を重畳した細胞培養の有効性を示唆している。 [1] T. Ichikawa, *et al.*, ACS Appl. Bio Mater., 2, 2698 (2019). [2] K. Ono, *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys., 62, SA1017 (2023).

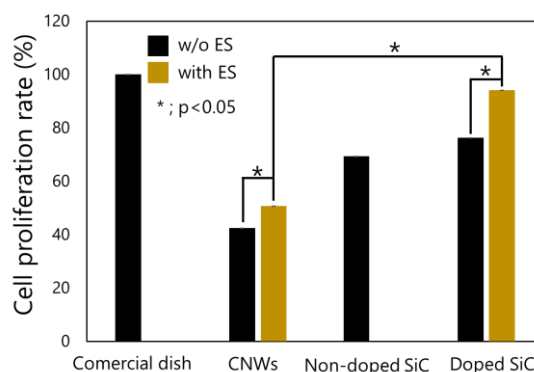


Fig.1 Cell viability of Saos-2 cells with and without ES on CNW and SiC/CNW after 4 days

PAL 内成分ががん細胞に誘発するオートファジーの評価

Evaluation of autophagy expression in cancer cell using the component in PAL

名大院工¹, 名大² ○(M2) 山川 太嗣¹, 中村 香江², 梶山 広明², 豊國 伸哉², 水野 正明², 石川 健治², 堀 勝², 田中 宏昌²

Nagoya Univ. Eng.¹, Nagoya Univ.², °Taishi Yamakawa¹, Kae Nakamura², Hiroaki Kajiyama², Shinya Toyokuni², Masaaki Mizuno², Kenji Ishikawa², Masaru Hori² and Hiromasa Tanaka²

E-mail: yamakawa.taishi.m3@s.mail.nagoya-u.ac.jp

はじめに 点滴液への大気圧非平衡プラズマ照射にて作製されるプラズマ活性乳酸リングル液 (PAL) が、がん細胞を選択的に殺傷させることが報告^[1]されて以降、その作用機序の解明が行われている。その一つとして PAL 処理後、細胞死からの保護的プロセスとしてオートファジーが作用^[2]し、PAL 処理によるがん細胞殺傷効果を弱めることが分かった。本研究において作製した PAL においても PAL 処理後にオートファジーが誘導されることを前回報告した^[1]。このオートファジー誘発物質を特定すべく PAL 内成分別にがん細胞を処理し、オートファジー誘導の評価を行ったので報告する。

実験方法 電圧 15 kV、周波数 60 Hz のプラズマ源を有する密閉チャンバー内を、酸素濃度が 0.2 % 以下となるまで Ar 10 slm でパージした。乳酸リングル液 10 ml を入れた 60 mm ディッシュをプラズマ噴出口と液面との距離が 4 mm となるよう設置し、プラズマ源に総流量 2.0 slm となるよう、Ar 80 %、O₂ 10 %、N₂ 10 %の比率でガスを供給し、この条件で生成されたプラズマを 5 分間照射して PAL を作製した。PAL は乳酸リングル液で 64 ~ 256 倍に希釈され、MCF-7 を 2 時間処理した。

その後、細胞培養液に再置換し、4 時間後に蛍光観察を行った。

実験結果 PAL 未処理サンプル(ctrl) を基準として、64 ~ 256 倍希釈 PAL、H₂O₂、NO₂のそれぞれで処理した蛍光強度比を図 1 に示す。PAL で処理した結果、希釈倍率の増加に伴い蛍光強度が増強された。一方で、H₂O₂、NO₂のそれぞれで処理すると、PAL 処理にみられた希釈倍率の増加に伴い蛍光強度が増加する傾向は得られなかった。オートファジーは、隔離膜形成を阻害する役割を担う ATG8 が ROS (Reactive Oxygen Species) により不活性化されることで誘導され、ROS がオートファジー誘導に重要な役割を担う^[2]。しかし、PAL 内に含まれる ROS である H₂O₂ と NO₂-それぞれでの処理では、PAL 処理とは異なる傾向が得られたことから、PAL 内の ROS 以外に含まれる有機活性種によるオートファジー誘導への関与が示唆された。

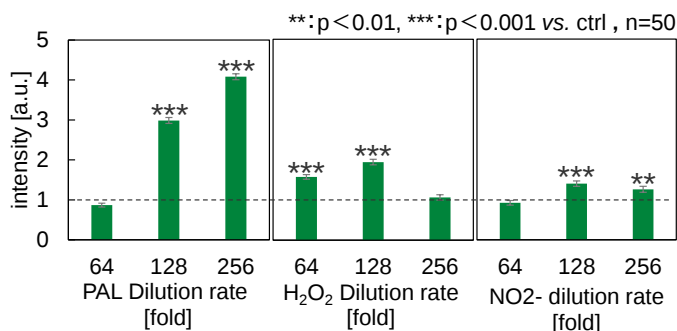


Fig.1 Fluorescence intensity of MCF-7 using PAL and ROS

度が増強された。一方で、H₂O₂、NO₂-のそれぞれで処理すると、PAL 処理にみられた希釈倍率の増加に伴い蛍光強度が増加する傾向は得られなかった。オートファジーは、隔離膜形成を阻害する役割を担う ATG8 が ROS (Reactive Oxygen Species) により不活性化されることで誘導され、ROS がオートファジー誘導に重要な役割を担う^[2]。しかし、PAL 内に含まれる ROS である H₂O₂ と NO₂-それぞれでの処理では、PAL 処理とは異なる傾向が得られたことから、PAL 内の ROS 以外に含まれる有機活性種によるオートファジー誘導への関与が示唆された。

参考文献

[1]山川ら, 第 70 回応物春(2023)17a-A409-6 [2] E E. Essick *et.al.*, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 3(2010)