

Oral presentation | 8 Plasma Electronics : 8.4 Plasma life sciences

📅 Fri. Sep 20, 2024 9:00 AM - 11:45 AM JST | Fri. Sep 20, 2024 12:00 AM - 2:45 AM UTC 🏛️ A33 (TOKI MESSE 3F)

[20a-A33-1~10] 8.4 Plasma life sciences

Nobuya Hayashi(Kyushu Univ.), Hiromasa Tanaka(Nagoya University)

9:00 AM - 9:15 AM JST | 12:00 AM - 12:15 AM UTC

[20a-A33-1]

Decomposition characteristics of persistent lignin using atmospheric-pressure air glow plasma

○(M2)Yui Ishikawa¹, Hiroyuki Kato¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹, Masafumi Ito¹ (1.Meijo Univ.)

9:15 AM - 9:30 AM JST | 12:15 AM - 12:30 AM UTC

[20a-A33-2]

Degradation Analysis of Cellobiose treated with Atmospheric-pressure Air-Glow Discharge

○(M2)Keitaro Ono¹, Kazuma Okamoto¹, Ryuichi Ohashi¹, Hiroyuki Kato¹, Masashi Kato¹, Motoyuki Shimizu¹, Masafumi Ito¹ (1.Meijo Univ.)

9:30 AM - 9:45 AM JST | 12:30 AM - 12:45 AM UTC

[20a-A33-3]

Aggregation of Albumin by DC Plasma at Atmospheric Pressure

○Tetsuji Shimizu¹, Hayate Tanaka^{1,2}, Hajime Sakakita^{2,3} (1.AIST, 2.Tsukuba Univ., 3.Meijo Univ.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

9:45 AM - 10:00 AM JST | 12:45 AM - 1:00 AM UTC

[20a-A33-4]

Elucidation of the sterilization mechanism of the surface of a spacecraft using low-pressure water plasma

○Kirara Yamanaka¹, Yoshihito Yagyu¹, Nobuya Hayashi¹ (1.Kyushu Univ.)

10:00 AM - 10:15 AM JST | 1:00 AM - 1:15 AM UTC

[20a-A33-5]

Bactericidal effect of oxygen-radical-activated pyrrole solution with temperature control

○(M2)Takuya Watanabe¹, Daiji Kitagawa¹, Kenji Ishikawa², Masaru Hori², Masafumi Ito¹ (1.Meijo Univ., 2.Nagoya Univ.)

10:15 AM - 10:30 AM JST | 1:15 AM - 1:30 AM UTC

[20a-A33-6]

Bactericidal effect of oxygen-radical-activated indole solution at neutral pH region

○(M1)Daiji Kitagawa¹, Takuya Watanabe¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹, Kenji Ishikawa², Masaru Hori², Masafumi Ito¹ (1.Meijo Univ., 2.Nagoya Univ.)

10:45 AM - 11:00 AM JST | 1:45 AM - 2:00 AM UTC

[20a-A33-7]

Numerical modeling on selective cell death induction by plasma

Ippei Saito¹, Motohiro Tomita¹, ○Tomoyuki Murakami¹ (1.Seikei Univ.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

11:00 AM - 11:15 AM JST | 2:00 AM - 2:15 AM UTC

[20a-A33-8]

Numerical Analysis of Influence of Power at Cell Induced by Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma Irradiation on Cell Death

○Takuya Ishihara¹, Taiga Nakajima¹, Ippei Yagi², Kosuke Tachibana³, Satoshi Uchida², Akinori Oda¹ (1.Chiba Inst. Technol., 2.Tokyo Metropolitan Univ., 3.Oita Univ.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

11:15 AM - 11:30 AM JST | 2:15 AM - 2:30 AM UTC

[20a-A33-9]

Effect of Electrical Stimulus in Gene Transfection Using Plasma and Pulsed Electric Field

○(M2)Yoshiyuki Takashima¹, Shota Sasaki¹, Toshiro Kaneko¹ (1.Tohoku Univ.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

11:30 AM - 11:45 AM JST | 2:30 AM - 2:45 AM UTC

[20a-A33-10]

Effect of Electrical Stimulation on Human Mesenchymal Stem Cells

○Koki Ono¹, Ayako Tanaka¹, Kenji Ishikawa¹, Wakana Takeuchi², Kenichi Uehara³, Shigeo Yasuhara³, Masaru Hori¹, Hiromasa Tanaka¹ (1.Nagoya Univ., 2.Aichi Inst. Tech., 3.Japan Advanced Chemicals)

大気圧グロープラズマによる難分解質リグニンの分解特性

Decomposition characteristics of persistent lignin using atmospheric-pressure air glow plasma

名城大¹, °(M2)石川雄偉¹, (D)加藤大志¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹, 伊藤昌文¹

°Yui Ishikawa¹, Hiroyuki Kato¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹, Masafumi Ito¹
(1.Meijo Univ.,)

E-mail: 233427002@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

近年、非食用の廃材などを用いたバイオエタノール生産は、持続可能な社会を実現するための方法として期待されている。木材の細胞は、糖が、成分の3割を占める難分解性のリグニンと絡み合っている。現在、これらの分解に酸やアルカリ性の薬品が用いられているが、廃液を抑制する代替手法が求められている。[1]

近年、我々は大気圧下で空気を用いて液体を連続処理できる大気圧空気グロー放電 (Atmospheric-pressure Air Glow Discharge: AAGD) 装置を開発し、装置やランニングコストの低減が見込めることを報告した。[2]

本研究では、リグニン分解の代替手法として AAGD の可能性を評価した。

2. 実験手法

リグニン 20 mg を 5 ml の純水に懸濁した。リグニン懸濁液に浸したリング電極を用いて、大気中に露出した針電極と液面との 8.5 mm の間に AAGD プラズマを発生させた。陰極と陽極の間に、2.5 kV (60 kHz) の高電圧、入力電圧 25 W を印加し放電を発生させた。放電中のリグニン懸濁液は 1500 rpm で磁気攪拌した。処理時間は、0 分 (未処理)、5 分、10 分とした。処理されたリグニンは、60 % テトラヒドロフランで溶解し、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器に接続されたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用して測定した。SEC 測定はサイ

ズ排除カラム (WP 300 diol、細孔径 5 μ m、カラムサイズ 7.5×250mm、GL-Sciences Inc.) を用いて行った。PDA 検出器の検出波長は 190～400 nm に設定した。

3. 実験結果

図 1 は、磁気攪拌を行い AAGD で処理したリグニン溶液を SEC で検出した際の最初に検出されたピークの高さの推移と照射時間の依存性を示したグラフである。

AAGD 処理によりピークは減少した。また、磁気攪拌を行いながら照射した際、その減少速度は上昇した。攪拌を行うことで沈殿したリグニンが気液界面まで浮き上がり短寿命活性種がリグニンの分解に寄与したことが示唆される。

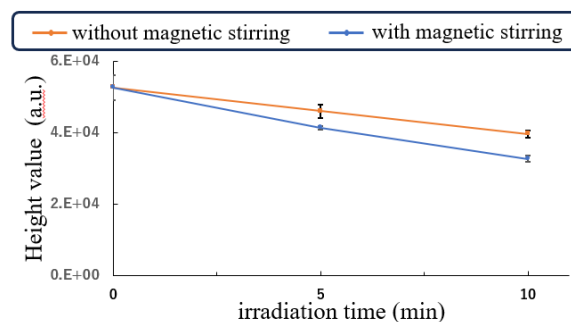


Fig. 1 波長 254 nm における AAGD 処理したリグニンの SEC 測定結果

謝辞

この研究の一部は JSPS 科研費(22H01213)の支援を受けた。

参考文献

- [1] Y. Cao, *et al.*, J. Agric. Food Chem. **68**, 451-460, (2020).
- [2] V. Gamaleev, *et al.*, Appl. Sci **9**, 3505 (2019).

大気圧空気グロー放電処理したセロビオースの分解特性評価

Degradation Analysis of Cellobiose

treated with Atmospheric-pressure Air-Glow Discharge

名城大¹, ○(M2)大野桂太郎¹, 岡本和真¹, 大橋龍一¹, (D)加藤大志¹,志水元亨¹, 加藤雅士¹, 伊藤昌文¹Meijo Univ.¹, °Keitaro Ono¹, Kazuma Okamoto¹, Ryuichi Ohashi¹, Hiroyuki Kato¹,Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹, Masafumi Ito¹

E-mail: 233427006@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

全世界的な SDGs および脱炭素の機運が高まり化石資源に頼らない社会構築が喫緊の課題となっている。現在、バイオ燃料の製造には非可食性バイオマスである稲わら等に含まれるセルロースを糖化後、酵母を利用したエタノール発酵が試みられている。その過程では植物細胞壁中で複雑に絡み合っているセルロースを破壊する必要がある、大量の酸やアルカリを用いた化学的処理が行われている。しかしながら、これらの方法は環境負荷が大きく、廃液処理には薬剤耐性の高い装置や中和工程が必要である。[1,2] 本研究では、低コストで環境負荷の小さい大気圧空気グロープラズマ (Atmospheric-pressure Air Glow Discharge: AAGD) を用いて、セルロースの構成糖であるセロビオースの分解特性を評価した。[3]

2. 実験方法

AAGD によるセロビオース及びその分解産物は、ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) を用いて解析した。5 mM のセロビオース溶液を AAGD で照射した。針電極と液面間の放電距離は 8.5 mm で、印加したピーク電圧は 2.5 kV、周波数は 60 kHz、電力は 25 W であった。照射後、プラズマ照射した試料 500 µL をエバポレーターによって乾燥させた。メトキシアミ

ン塩酸、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドにより試料を誘導体化し、GC-MS に供した。

3. 実験結果

図 1 に AAGD によるセロビオースの分解を示す。

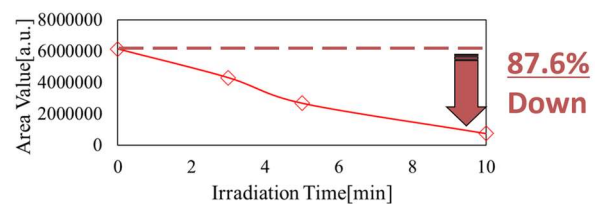


Fig1. Degradation of Cellobiose by AAGD

横軸はプラズマ照射時間、縦軸はエリア値を示している。AAGD の照射時間の増加に伴い、セロビオース濃度は低下し、10 分間の AAGD 照射によって、5 mM セロビオースの 87.6%が減少した。

発表では、セロビオースの分解生成物及びグルコースの測定結果についても併せて報告する予定である。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科研費 JP22H01213 の助成を受けた。

【参考文献】

- [1] Y. Zhang, et al., Biotechnol Biofuels 11, 178(2018).
- [2] Y. kim, et al., Enzyme and Microbial Technology 48 (2011).
- [3] V. Gamaleev, et al., Appl. Sci., 9, 3505 (2019).

大気圧直流放電プラズマ照射によるアルブミン凝集

Aggregation of Albumin by DC Plasma at Atmospheric Pressure

産総研¹, 筑波大², 名城大³ °清水 鉄司¹, 田中 颯^{1,2}, 榊田 創^{1,3}

AIST¹, Univ of Tsukuba², Meijo Univ³ °Tetsuji Shimizu¹, Hayate Tanaka^{1,2}, Hajime Sakakita^{1,3}

E-mail: tetsuji.shimizu@aist.go.jp

低温大気圧プラズマによる処理は熱損傷を伴わないため、生物学・医学分野にまで広がっており、これまでに様々な応用研究が行われてきた。プラズマを用いた止血への展開はその一例である[1]。プラズマによる止血の作用機序として、血小板凝集・凝固系たんぱくの凝集、非凝固系たんぱくの凝集、および溶結凝固が挙げられる[1,2]。本研究では非凝固系たんぱく、特にアルブミンの凝集に着目して実験を行った。これまでの研究で、アルブミンの凝集には、プラズマから輸送される荷電粒子の液面への堆積による静電的作用が関与していることが示唆されてきた[3,4]。しかしながら、詳細な凝集機構の理解には至っていない。本発表では、大気圧環境下で直流放電プラズマを生成し、アルブミン溶液へと照射し、アルブミンの凝集能について議論する。

アルブミン濃度 50 mg/ml の溶液を石英製シャーレ内に準備し、その液面から 1 mm 離れたところに針電極を設置した。アルブミン溶液中に白金製のワイヤを挿入し、針電極・ワイヤ間に直流高電圧を印加することによってプラズマを生成し、液面へプラズマ処理を行った。正の高電圧を印加した場合、図 1 に示すように液面上でアルブミンの凝集を観察した。この時に流れる直流電流は 5 mA に設定した。ワイヤからは溶液中に直流電流が流れたため、電気分解を起こした結果ガスの発生を観察した。本発表では、アルブミン凝集に対する正負極性の違いや、高速度カメラによる凝集の観察、さらにガス発生量について議論する。

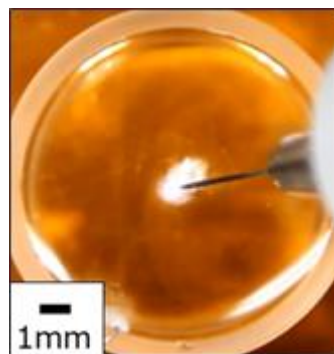


図 1 プラズマ照射によるアルブミン凝集。放電維持電圧は+400 V、電流は 5 mA であった。
プラズマ処理時間は 3 秒である。

参考文献

- [1] H. Sakakita et al. Jpn. J. Appl. Phys. **60** (2021) 020502.
- [2] K. Miyamoto et al. J. Clin. Biochem. Nutr. **60** (2017) 25.
- [3] T. Shimizu et al. AIP Advances **10** (2020) 125216.
- [4] T. Shimizu et al. Jpn. J. Appl. Phys. **61** (2022) SI1016.

低圧水プラズマによる宇宙機表面の滅菌メカニズムの解明

Elucidation of the sterilization mechanism of the surface of a spacecraft

using low-pressure water plasma

九大総理工¹, [○](M2) 山中 綺良々¹, 柳生 義人¹, 林 信哉¹

Kyushu Univ.¹, [○](M2) Kirara Yamanaka¹, Yoshihito Yagyu¹, Nobuya Hayashi¹

E-mail: yamanaka.kirara.570@s.kyushu-u.ac.jp

1. 研究背景および研究目的

深宇宙探査機が他の惑星に着陸して探査を行った後に地球に帰還する際には、惑星保護の観点から探査機の滅菌が国際宇宙空間研究委員会（COSPAR）の惑星保護方針により要求されている。宇宙空間という極限環境に存在すると想定される細菌は、放射線や高温に高い耐性を持つと考えられ、地球上で代表的な極限環境菌として、120℃以上の温度耐性を持つ好熱菌芽胞や、10,000Gy のガンマ線にも耐性を持つ放射線耐性菌が存在する。そのため、従来の滅菌法である乾熱や放射線などの滅菌法では細菌を死滅させることができない問題がある。その場合の一つの選択肢であるプラズマ滅菌法には、これまで主に酸素ガスが原料として研究がなされてきた。

しかしながら、酸素プラズマ中の活性酸素種では、好熱菌芽胞の完全な死滅が難しく、放射線耐性菌の完全な死滅が可能であることが確認されており[1]、酸素プラズマ滅菌法だけでは、極限環境微生物の滅菌を完全に行うことができない。そのため、酸素プラズマ中の活性酸素種よりも強い酸化力や、紫外線領域の発光を持つ OH ラジカルを多く生成することが可能である、液体の水を原料とした低圧水プラズマ滅菌法が検討されている。本研究では、宇宙探査機表面の滅菌を目標として、低圧水プラズマ滅菌法による極限環境微生物の不活性化特性を従前の酸素プラズマ滅菌法と比較することで、低圧水プラズマ滅菌法の滅菌メカニズムの解明を試みた。

2. 実験装置および方法

低圧水プラズマ生成のために円筒形の SUS 製真空チャンバーで実験を行った。真空チャンバーの内壁に沿って高周波電極を設置し、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。プラズマ生成原料である水を液体のまま直接チャンバー内に導入し、気化させることで純粋な水プラズマを生成した。

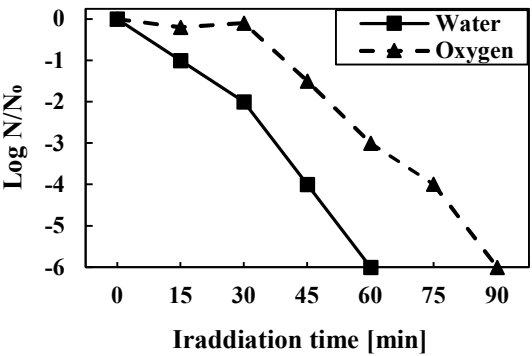


Fig.1 各プラズマを照射した際の生残菌数の時間依存性

好熱菌芽胞 (*Geobacillus Stearothermophilus*) を用いたペーパーストリップ上のバイオロジカルインジケータ (BI) に水または酸素プラズマを圧力 60 Pa の条件で照射し、無菌保障レベル SAL $\leq 10^{-6}$ に到達するまでの生残菌数のプラズマ照射時間依存性を計測した。また、放射線耐性菌 (*Deinococcus radiodurans*) の滅菌特性は、スライドガラス上の菌サンプルにプラズマを照射し、培養後に培養液の濁度測定により生残菌数のプラズマ照射時間依存性を調べた。

3. 実験結果および考察

Fig.1 に各プラズマを照射した際の好熱菌芽胞の生残菌数の時間依存性を示す。水プラズマまたは酸素プラズマを照射した結果、無菌保障レベル SAL $\leq 10^{-6}$ の到達にそれぞれ 60 min または 90 min を要した。水プラズマ滅菌法の方が、酸素プラズマに比べ 30 分早く無菌保障レベルに到達した。これは、水プラズマ中に生成される OH ラジカルや 300nm 付近の紫外線により好熱菌の遺伝子が影響を受けたためと考えられる。一方、放射線耐性菌については、酸素プラズマの場合にのみ不活化ができることから、活性酸素種で菌表面の細胞膜がダメージを受け不活化に至った可能性が考えられる。

[1] S. Kimura, S. Ishikawa, N. Hayashi, K. Fujita, Y. Inatomi, S. Suzuki, Frontiers in Microbiology 14, 1253436, 2023.

温度制御した酸素ラジカル活性化ピロール溶液の殺菌効果

Bactericidal effect of oxygen-radical-activated pyrrole solution with temperature control

名城大¹, 名古屋大², [○](M2)渡邊 拓哉¹, (M1)北川 大慈¹, 石川 健治², 堀 勝², 伊藤 昌文¹

Meijo Univ.¹, Nagoya Univ.², [○]Takuya Watanabe¹, Daiji Kitagawa¹, Kenji Ishikawa², Masaru Hori²,
Masafumi Ito¹

E-mail: 233427041@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

近年、プラズマの農業応用や医療応用に関する研究が盛んに行われており、特にプラズマ処理溶液を用いた殺菌技術が注目されている。以前、我々はアミノ酸の一種であるトリプトファン溶液にプラズマ中の電氣的に中性なラジカル種を照射すると強い殺菌効果を示すことを報告した。[1] また、トリプトファンの構造の一部であるピロールもラジカル処理により強力な殺菌効果を発揮することを確認した。しかしながら、ラジカル処理によりピロール溶液中に生成される殺菌の要因となる物質は非常に寿命が短く、常温下ではすぐにその効果が失われる。そこで、本研究では溶液温度を制御したラジカル活性化ピロール溶液の殺菌効果について調査した。

2. 実験方法

実験では、200 mM リン酸緩衝液を溶媒とし、10 mM ピロール溶液を調整した。3 mL のピロール溶液に、溶液温度をペルチェ装置(TAISEI Co. Ltd.)で 0, 5, 10, 15, 20 °C に制御しながら、大気圧ラジカル発生装置 (Tough Plasma FPA10, FUJI CORP., Japan) を用いて酸素ラジカルを 5 分間照射した。[2] ガスの流量は酸素原子密度が最大となる Ar:4.97 slm と O₂:30 sccm とし、照射距離は 10 mm に固定した。ラジカル処理後、温度制御しながら 0.3 mL のラジカル処理液を大腸菌懸濁液 (1×10⁸ CFU/mL) に置換し、5 分間静置した。その後、試料 0.1 mL を寒天培地に塗布し、24 時間培養した後、コロニーカウント法により大腸菌の生菌数を測定した。

3. 実験結果

実験結果を Fig. 1 に示す。大腸菌の生菌数は、ピロール溶液の温度が下がるにつれて減少し、溶液温度 0, 5, 10 °C で滅菌基準に達した。この結果から、ピロール溶液中で酸素ラジカル照射により生成されるピロール由来の殺菌種は、室温では反応性が高く、短寿命であることが示唆

された。また、0, 5, 10 °C においてピロール溶液に酸素ラジカル照射してその後大腸菌に作用させた殺菌効果と大腸菌をあらかじめピロール溶液に懸濁した溶液に直接ラジカルを照射した場合の殺菌効果が同程度であったことから、0, 5, 10 °C では殺菌種の寿命が長くなり、大腸菌に効果的に作用することが示唆された。

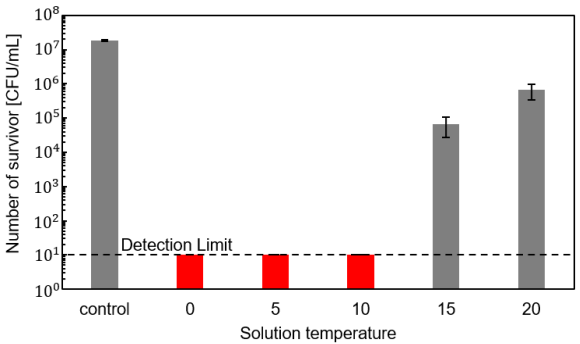


Fig. 1 Survival number of *E. coli* treated with radical-activated pyrrole solution as a function of solution temperature.

4. まとめ

本研究では、ペルチェ素子により溶液温度を制御した酸素ラジカル処理ピロール溶液に大腸菌を懸濁し、ラジカル活性化ピロール溶液の殺菌効果の溶液温度による変化を調査した。大腸菌の死滅率は、ピロール溶液の温度が下がるにつれて増加した。酸素ラジカル照射によりピロール溶液中に生成する殺菌要因となる物質は、室温では非常に反応性が高く、非常に短寿命のラジカル種であることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (19H05462, 22H01213) の支援を受けて実施された。

参考文献

[1] N. Iwata, et al., *Environmental Technology & Innovation* 33, 103496(2024)
[2] H. Hashizume, et al., *Appl. Phys. Lett.* 103, 153708 (2013).

酸素ラジカル活性化インドール溶液による中性 pH 領域での殺菌効果

Bactericidal effect of oxygen-radical-activated indole solution at neutral pH region

名城大¹, 名古屋大², [○](M1)北川 大慈¹, (M2)渡邊 拓哉¹, 志水 元亨¹, 加藤 雅士¹,

石川 健治², 堀 勝², 伊藤 昌文¹

Meijo Univ.¹, Nagoya Univ.², [○]Daiji Kitagawa¹, Takuya Watanabe¹, Motoyuki Shimizu¹,

Masashi Kato¹, Kenji Ishikawa², Masaru Hori², Masafumi Ito¹

e-mail:243427013@ccmailg.meijo-u.ac.jp

1. はじめに

プラズマによる処理は工業分野にとどまらず、農業や医療へと応用されている。プラズマを用いた殺菌は、残留毒性の強い殺菌剤を用いずに電気エネルギーから生成された物質を基に残留毒性の少ない殺菌に利用できるという点で注目されている。近年の研究により、トリプトファンにプラズマ処理を行うことで中性の pH 領域で強力な殺菌効果が確認されている。[1]そこで、本研究ではトリプトファンの環構造部分であるインドールによる殺菌効果について調査した。

2. 実験方法

本研究では 1.0×10^8 [CFU/mL] に調製されたリン酸緩衝液 (pH 6.3) への大腸菌の懸濁液 0.3 mL とリン酸緩衝液を溶媒とするインドール溶液 2.7 mL を混合した溶液を添加した直径 38 mm のシャーレに対して非平衡大気圧ラジカル発生装置 (Tough Plasma FPA10, FUJI Corp., Tokyo, Japan) を用いて、電氣的に中性な活性物質のみを選択的に照射した。照射距離は 10 mm、ガスの流量は供給される酸素原子の密度が最大となる $O_2: 0.03$ slm, $Ar: 4.97$ slm とした。[2] 照射後の処理液は、大腸菌の濃度が 1.0×10^6 から 1.0×10^2 [CFU/mL] まで 10 倍ずつ適宜希釈され、寒天培地 (Difco™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 上に塗布された。これを 37°C で 24 時間培養したのち、コロニーカウント法を用いて大腸菌の生菌数を測定した。

3. 実験結果

大腸菌の懸濁液と 1 mM インドールの混合溶液に対して、酸素ラジカルを 5 分間照射することで大腸菌が滅菌基準まで殺菌されることが確認された (Fig.1)。また、酸素ラジカルの照射時間に伴い殺菌効果が増加していることから、インドールへの酸素ラジカル照射により生じた殺菌因子が大腸菌の殺菌に関与していることが考えられる。

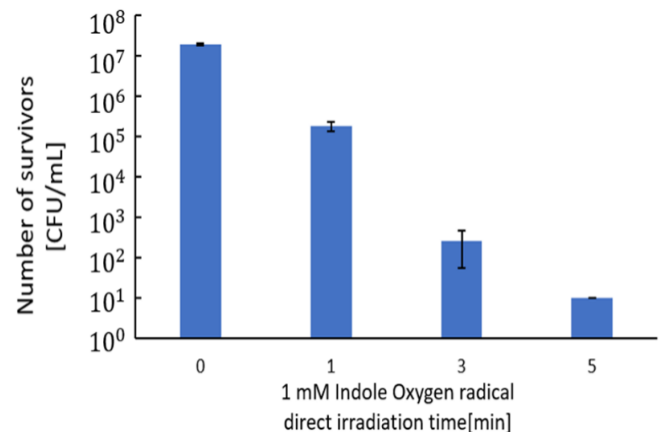


Fig.1 Number of survivors of *E.coli* in indole solution treated with oxygen radicals

4. まとめ

トリプトファンと構造の近いインドールに懸濁した大腸菌に酸素ラジカルを照射した場合における殺菌効果について調査した。今後は、温度調整器付きペルチェ冷却ユニットを用いて、溶液の温度を低温で一定にして殺菌因子の寿命の測定を行い、HPLC を用いて殺菌因子を分取し、その構造や殺菌メカニズムの特定を行う。そこから得た情報を基に、トリプトファンによる殺菌メカニズムと比較検討を行う。

謝辞

この研究の一部は JSPS 科研費 JP19H05462 及び JP22H01213 の支援により行われた。

参考文献

- [1] N. Iwata, H. Kato, M. Shimizu, M. Kato, M. Ito, M. Hori, Environmental Technology & Innovation, 33, 103496 (2023).
- [2] H. Hashizume, T. Ohta, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, and M. Ito: Appl. Phys. Lett. 103, 153708 (2013).

プラズマによる選択的細胞死誘導の数理モデリング

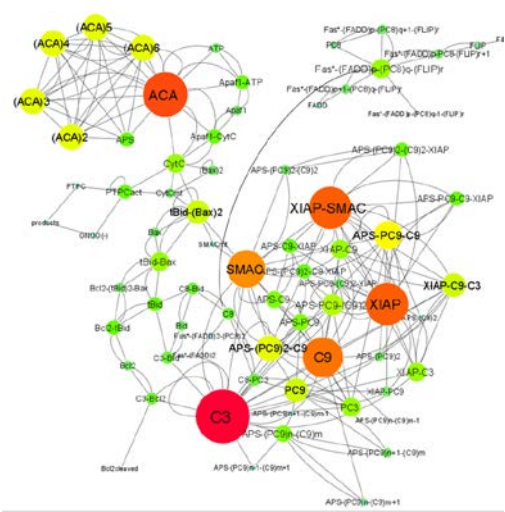
Numerical modeling on selective cell death induction by plasma

成蹊大学, 齋藤 聡平, 富田 基裕, [○]村上 朝之

Seikei University, Ippei Saito, Motohiro Tomita and [○]Tomoyuki Murakami

E-mail: tomo-murakami@st.seikei.ac.jp

近年、低温プラズマの生体医療分野への応用の観点から様々な実験研究が行われており、プラズマにより生成される化学的活性種の細胞機能に与える影響に関する多くの知見が得られている。一方、プラズマが生成する活性酸素窒素種によって誘起される細胞内反応機構の詳細には不明な点も多く、その解明には理論的・数理的なアプローチが必要不可欠である。これまでに著者らは、低温プラズマによって誘発された活性酸素/窒素種が細胞内ミトコンドリアのレドックスを介した機能とエネルギー代謝に及ぼす影響を定量化する生化学反応数理モデルを開発してきた [1]。本研究では、プラズマ活性種による細胞死の誘導を記述する数理モデルを開発し数値シミュレーションを行う。特に、正常細胞と癌細胞に対するプラズマの効果の違い、すなわち”選択性”に関する定量的な知見を得ることを目的とする。ここでは低温プラズマの特徴である多彩な活性酸素窒素種の組み合わせ（過酸化水素・OH ラジカル・NO ラジカルなど）をフラックス変数として実装する。さらに、癌細胞および正常細胞の特性の違いを反映する、細胞膜透過性・代謝反応・酵素反応・DNA 損傷修復機能等を実装する。本モデルによりプラズマ活性種による選択的な細胞死誘導に関する定量的な検討を行うことが出来る。図 1 に細胞内反応のシステムネットワーク図を示す。



低温大気圧プラズマ照射による
細胞への電力が細胞死に及ぼす影響の数値解析

Numerical Analysis of Influence of Power at Cell Induced by Nonthermal Atmospheric
Pressure Plasma Irradiation on Cell Death

千葉工業大学¹, 東京都立大学², 大分大学³

°(M2)石原 卓也¹, 中島 大雅¹, 八木 一平², 立花 孝介³, 内田 諭², 小田 昭紀¹

Chiba Inst. Technol.¹, Tokyo Metropolitan Univ.², Oita Univ.³

°T. Ishihara¹, T. Nakajima¹, I. Yagi², K. Tachibana³, S. Uchida², A. Oda¹

E-mail: s19a4011js@s.chibakoudai.jp

1. はじめに

低温大気圧プラズマは大気圧下で効率的に活性種を生成できることから滅菌・創傷治療などの医療・バイオ分野へ応用されている。その特性を利用して、従来の遺伝子導入法と比較して細胞への遺伝子導入効率が高いプラズマ遺伝子導入法が発見された[1]。しかし、プラズマと細胞の電氣的相互作用については未解明であり、かつ照射されるプラズマはパルス状であるため、細胞への電氣的作用の解析が必要である。

これまで筆者らは、プラズマと細胞との相互作用の解明を目的に、本プラズマとプラズマ照射層の等価回路モデルからなる連成モデルを構築し、駆動周波数が及ぼす細胞への電氣的作用の解析結果を報告した[2]。本報告では、照射部での大気圧プラズマによる消費電力密度が細胞への電氣的作用に及ぼす影響を検討した。

2. 解析手法

本研究で用いた計算モデルは、低温大気圧プラズマモデルとプラズマ照射層の等価回路モデルから構成される。前者のモデルは数密度連続の式とポアソンの式からなる局所電界近似に基づく空間一次元流体モデル[3]であり、後者のモデルは緩衝液層、細胞層（細胞質と細胞膜から構成）、培養プレート層の計3層からなるプラズマ照射層を各部の抵抗およびコンデンサで置き換えて等価回路にしたモデルである[4]。前者のモデルから得られる放電電流が、後者のモデルにおける各部の電流や電圧としてどう伝搬するかをキルヒホッフの電圧則と電流則に基づいて解析した。

3. 結果および考察

Fig. 1 に、正弦波交流電圧印加時の低温大気圧 He/N₂(20ppm) プラズマ中の電圧・電流波形を示す。プラズマ照射層の等価回路における細胞層や培養プレート層のコンデンサの作用により半周期に一度パルス放電が発生している。Fig. 2 に、一周期平均値とパルス放電時の細胞膜での消費電力密度の空間分布を示す。照

射層中心部への低温大気圧プラズマ照射による細胞膜での消費電力密度に着目すると、他の箇所と比較して一桁高い。また、パルス放電時 (Fig. 2 中の赤色の実線) は周期平均値 (Fig. 2 中の青色の実線) の約3倍高い値を示す。以上の結果から、細胞層中心部の細胞膜への消費電力密度がパルス放電時に瞬間的に高くなるため、細胞死の電氣的作用の一因であることが示唆される。その他結果の詳細は、講演当日に報告する。

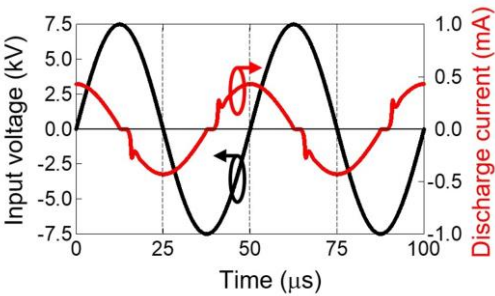


Fig. 1 Simulated voltage-current waveforms in nonthermal atmospheric pressure He/N₂(20ppm) plasma.

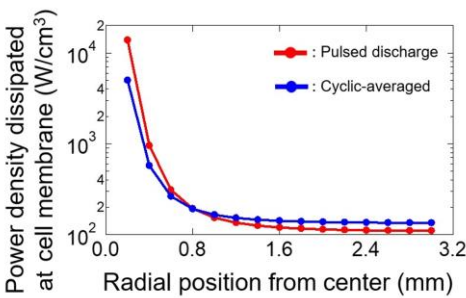


Fig. 2 Simulated spatial distribution of the power density at cell membrane.

4. 謝辞

本研究は、科学研究費補助金 (24929106, 代表: 内田 諭) の助成を受けて遂行された。ここに謝意を表する。

文 献

[1] M. Jinno et al., *Plasma Sources Sci. Technol.*, **26**, 065016 (2017).
[2] 石原ら, 2024 年第 71 回応用物理学会春季学術講演会, 22a-12H-4 (2024).
[3] Yu. B. Golubovskii et al., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 39 (2003).
[4] Y. Kido et al., *PLoS ONE*, **16** e0245654 (2021).

プラズマ・パルス電場複合遺伝子導入法における電気刺激の効果

Effect of Electrical Stimulus in Gene Transfection

Using Plasma and Pulsed Electric Field

東北大院工

○高島 正行, 佐々木 渉太, 金子 俊郎

Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ.

○Yoshiyuki Takashima, Shota Sasaki, Toshiro Kaneko

E-mail: yoshiyuki.takashima.t4@dc.tohoku.ac.jp

近年、遺伝子や薬剤分子など細胞外の分子を生細胞内に導入する分子導入技術は、iPS細胞の作成や低侵襲な癌治療に代表されるように、医療分野をはじめとした幅広い分野で需要が高まっている。しかしながら、従来法には導入効率や細胞生存率が低い、適用可能細胞が限られるなどの課題があり、新しい遺伝子導入法が求められている。

我々の研究グループでは、液中で発生させた微小なプラズマ (液中プラズマ) [1] と短パルス電場を組み合わせた複合法 (Fig 1) により、高効率・高細胞生存率・低膜損傷な遺伝子導入が可能であることを報告してきた。一方で、液中プラズマあるいは短パルス電場の電気刺激 (電界強度や電流密度) の最適化はこれまで行われておらず、改良の余地がある。そこで今回、主として電気刺激に着目し、それらを制御した際の遺伝子導入結果について調べたので報告する。

まず、遺伝子導入に適した電気刺激を明らかにするために、短パルス電場のみを用いて実験を行った。その際、印加電源に定電流パルス電源 (パルス幅: 数 μ s) を用い、エレクトロポレーションバッファ (EPB) の組成を変えることで導電率及び浸透圧を制御し、電極形状や電極間距離を変えることで、細胞懸濁液に加わる電界強度や電流密度を独立に制御した。細胞にはヒト乳がん細胞 (MCF-7) を使用し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードしたプラスミドDNAを導入物質として用いた。処理48h後にフローサイトメトリーにより導入効率を、血球計算盤により細胞生存率を評価した。

EPBの導電率を制御し、短パルス電場処理を行った際の遺伝子導入結果を示す (Fig 2) 。 0.02 A/mm² 以下の電流密度では、電界強度に依らず導入効率が低いこと、0.02 A/mm² 以上の電流密度で、電界強度依存的に導入効率が向上することが明らかとなった。講演では、さらに詳細な電界強度と電流密度による影響やEPBの組成による影響について議論する。

[1] R. Honda, et al., Jpn. J. Appl. Phys. **59**, 040904 (2020).

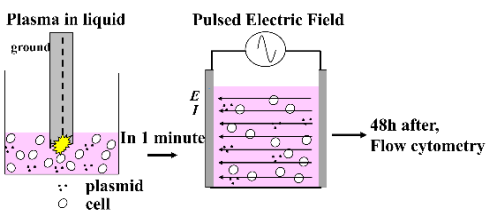


Fig 1. Combined method with plasma and pulsed electric field

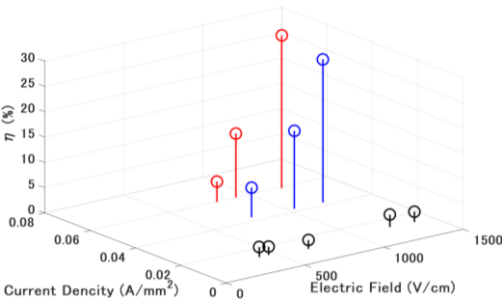


Fig 2. gene transfection efficiency (η) as a function of the applied electric field ($400 \leq E \leq 1230$ V/cm) with the constant applied peak current density ($J \approx 0.013, 0.042, 0.060$ A/mm²).

SiC 被覆カーボンナノウォール上でのヒト間葉系幹細胞への電気刺激印加の効果

Effect of Electrical Stimulation on Human Mesenchymal Stem Cells

on SiC-Coated Carbon Nanowalls

名大¹, 愛工大², ジャパンアドバンスケミカルズ³, [○]小野 浩毅¹, 田中 文子¹,
石川 健治¹, 竹内 和歌奈², 上原 賢一³, 安原 重雄³, 堀 勝¹, 田中 宏昌¹
Nagoya Univ.¹, Aichi Inst. Tech.², Japan Advanced Chemicals³,
[○]Koki Ono¹, Ayako Tanaka¹, Kenji Ishikawa¹, Wakana Takeuchi², Kenichi Uehara³,
Shigeo Yasuhara³, Masaru Hori¹, and Hiromasa Tanaka¹

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、その特異な形状とグラフェン由来の導電性から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、再生医療に用いられる多分化能を持つ間葉系幹細胞を SiC 被覆した CNW 上で培養し ES を印加することで、CNW のエッジ形状と ES 重畳による、間葉系幹細胞への相乗効果が細胞の増殖や分化に及ぼす影響を調査した。

【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、希釈ガスとして Ar を用いて熱 CVD(700 °C、5, 15, 30 分)によって、CNW 上に SiC を成膜した。間葉系幹細胞を CNW および SiC 被膜下 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。商用培養皿をコントロールとして間葉系幹細胞の細胞生存率は MTS アッセイによって測定した。

【実験結果】Fig.1 に 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。SiC 被覆によって細胞生存率が有意に上昇していることがわかる。また、ES 印加した場合では、CNW 上、および SiC を 15 分コーティングした足場において細胞増殖率が有意に上昇した。SiC を 15 分コーティングした CNW 上では CNW のみと比べて ES によって高い増殖効果があり、商用培養皿と同等の細胞増殖率が得られた。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).

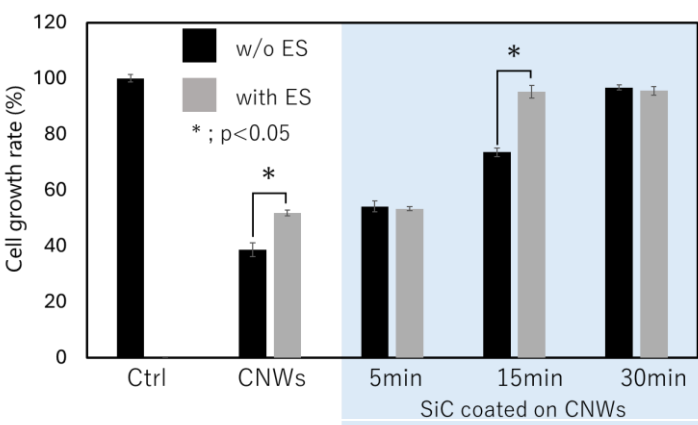


Fig.1 Cell viability of human mesenchymal stem cells with and without ES on CNW and SiC/CNW after 4 days