

博士論文（要約）

癌治療に向けたナノ秒パルスプラズマの活性種計測と生体評価

(Radical Measurement and Biomedical Evaluation  
of Nanosecond Pulse Plasma for Cancer Treatment)

八木 一平

# 目次

第1章	序論	6
1.1	研究の背景	6
1.2	癌	7
1.2.1	現状	7
1.2.2	治療法	7
1.2.3	特徴	8
1.3	細胞と組織	10
1.3.1	細胞の構造	10
1.3.2	培養細胞	10
1.3.3	組織	10
1.3.4	生体シグナル細胞外シグナル	11
1.3.5	アポトーシスとネクローシス	11
1.3.6	活性種の作用	13
1.4	プラズマの医療応用	17
1.4.1	プラズマ	17
1.4.2	熱プラズマによる医療機器	17
1.4.3	低温プラズマ発生方式	19
1.4.4	低温プラズマによる癌治療	23
第2章	ナノ秒パルスプラズマの特性	25
2.1	ナノ秒パルスプラズマの発生装置	25
2.1.1	プラズマ照射装置	25
2.1.2	パルス電圧発生装置	25
2.1.3	ナノ秒パルス電源の出力特性	28
2.2	ナノ秒パルスプラズマの特性制御	31
2.2.1	照射エネルギー	31
2.2.2	放電様相	32
2.2.3	発光スペクトル	33
2.3	プラズマ照射による表面温度特性	35
2.4	プラズマ照射による副生成物	38
2.5	活性種の生成特性	39
2.6	まとめ	43
第3章	ナノ秒パルスプラズマによる活性種生成特性	44
3.1	プラズマの分光計測	44
3.2	レーザー誘起蛍光法(LIF)の原理	46
3.3	湿潤表面の湿度分布計測	48
3.3.1	実験装置	48

3.3.2	NO[X <sup>2</sup> Π, ν=0]のLIF計測 .....	50
3.3.3	湿潤表面の湿度分布 .....	52
3.3.4	湿度環境下の活性種生成 .....	55
3.3.5	考察 .....	59
3.4	液面近傍の活性種計測と活性種供給量の制御 .....	61
3.4.1	活性種計測の実験方法 .....	61
3.4.2	NOラジカルの計測 .....	63
3.4.3	OHラジカルの計測 .....	68
3.4.4	Oラジカルの計測 .....	72
3.4.5	活性種(NO, OH, O)投入量の制御 .....	77
3.5	まとめ .....	80
第4章	株化細胞へのプラズマ照射による影響 .....	81
4.1	実験方法 .....	81
4.1.1	実験概要 .....	81
4.1.2	実験装置 .....	82
4.1.3	実験手順 .....	82
4.1.4	培地および試薬 .....	84
4.1.5	細胞増殖曲線 .....	84
4.2	導入ガスによる細胞生存率の影響 .....	86
4.3	アポトーシス評価 .....	87
4.3.1	TUNEL法によるアポトーシス検出 .....	87
4.3.2	アポトーシス発現時間の検討 .....	91
4.3.3	ガスフローによる影響 .....	94
4.4	ネクロシスの評価 .....	95
4.5	アポトーシス誘導要因の検討 .....	96
4.5.1	培地厚みの影響 .....	96
4.5.2	長寿命活性種の影響 .....	98
4.6	ナノ秒パルスと通常パルスの比較 .....	100
4.7	活性種制御によるガン細胞への影響 .....	101
4.8	本章のまとめ .....	106
第5章	マウス腫瘍へのプラズマ照射による影響 .....	107
5.1	マウス皮下腫瘍モデルの作成 .....	107
5.1.1	ガン細胞の準備 .....	107
5.1.2	マウスの準備 .....	107
5.2	プラズマ照射 .....	107
5.3	プラズマ照射後の腫瘍観察 .....	109
5.4	まとめ .....	111
第6章	結論 .....	112

## 概要

大気圧低温プラズマは、医療分野において材料改質や医療器具の滅菌のほか、治療を目的とした“プラズマ医療”に応用されている。すでに熱プラズマを利用した電気メスやアルゴンプラズマ凝固 (APC) による組織の切除や焼灼は臨床応用が進んでいる。一方近年、気体温度が室温程度の低温プラズマを用いることで、組織の止血や傷病治療の促進といった治療効果が報告されており、低侵襲な手術デバイス、傷病治療および新たなガン(癌)治療などの発展に大きな期待が寄せられている。

特にガン治療の分野では、低温プラズマの照射によりマウス腫瘍の増殖を遅らせ、延命効果をもたらすという画期的な成果が複数報告されている。負担の大きい現行の切除手術に替わり、低刺激であり熱損傷や炎症の少ない低温プラズマによるガンの治療方法の確立が望まれている。そのため、より実用的かつ効果的なデバイスの開発と、安全性確保の観点から生体-プラズマ間の反応機構を解明することが求められている。

本研究ではナノ秒オーダーのパルス高電圧を用いて“ナノ秒パルスプラズマ”と呼ぶ低温プラズマ源を提案している。放電プラズマは極めて短時間に高温状態に移行するため、従来のプラズマ源は希ガスやバリア素材の利用により高温化を防いでいる。それらの手法に対して、本研究ではパルス高電圧により能動的に放電プラズマを制御するため、金属電極と生体の間にプラズマを発生し、直接生体に曝すことが出来る。この手法は既存の電気メスにパルス電圧を印加することで低温プラズマ治療を行うことが出来るため、現行の内視鏡や腹腔鏡への適用が容易である特徴をもつ。加えて、多様なガス種によりプラズマの生成が可能であるため、医療効果をもたらすと考えられる高反応性の活性種(OH, O<sub>2</sub>, NO など)を生体近傍で生成・供給することが出来る。また、ガス構成比により活性種の割合を制御できるため、各活性種が生体に与える効果の検証に適している。

本研究では、ナノ秒パルスプラズマを生体および生体模擬材料に照射した際の投入電力や表面温度の変化および発光分光により諸特性を把握する。また、ナノ秒パルスプラズマから対象表面に供給される活性種のうち、生体に大きく影響すると考えられる O, OH, NO についてレーザー誘起蛍光法(LIF : laser-induced fluorescence)を用いて密度計測を行う。加えて、ナノ秒パルスプラズマを培養細胞およびマウスに対して照射し、生体作用の検証および作用因子の検討を行う。

プラズマ医療において、ナノ秒パルス高電圧によるプラズマ制御は初めての試みであり、プラズマ中に存在する複数の活性種を直接計測した研究、および活性種の生成量を個別に変化させ、生体への影響を定量的に評価した研究はいずれも世界初である。

本研究の成果として、ナノ秒パルスプラズマを半値幅 8 ns 程度のパルス高電圧により生成し、O<sub>2</sub>および N<sub>2</sub> ガス中において金属電極からストリーマコロナ状の均一な放電が観測された。従来型のパルス高電圧(80 ns)と比べると OH ラジカル生成量は同等程度にも関わらず、照射対象の温度上昇を数度程度に抑えることができた。この結果から温度上昇に敏感な生体に対して低温プロセスを実現することを示した。

ナノ秒パルスプラズマの照射条件により、培養細胞はアポトーシス細胞死を誘導すること、および細胞増殖を促進することを示した。比較実験により、アポトーシス細胞死は主にプラズマ中の短寿命な酸素系活性種またはイオンにより誘導される可能性を示した。

生体表面付近の湿度環境が活性種の生成に大きな影響を与えることを示した。プラズマ医療では、乾

乾燥ガスを湿潤対象に流すシステムが一般的である。このようなシステムにおいて、活性種の生成・反応機構に影響を与える湿度分布を無視することはできない。本計測により湿度分布は乾燥ガス流に大きく左右され、同様に活性種の生成量にも大きく影響する。

3種類の活性種(O, OH, NO)について、湿潤表面に供給される活性種の総量を計測し、それらは酸素分圧および湿度分布により能動的に変化させることが出来ることを示した。

上記の活性種が培養細胞に与える影響を評価した。OH ラジカルの供給量が増加するほど、培養したガン細胞(B16F10)の生存率は減少することが分かった。これはプラズマ中の“何が生体に作用するのか”を示唆する重要な結果である。

総括として、ナノ秒パルスプラズマを提案し、その低温プロセスの実現と培養細胞およびマウスへの作用を広く調査することができた。加えて、活性種が生体に及ぼす影響を定量的に議論することにより、今後のプラズマ医療の実現に向けて大きな知見を得ることができた。

## 第1章 序論

本研究ではガン治療を目指した新しいプラズマ源を提案し、それを用いてガン細胞やマウスの腫瘍組織への影響を調査した。そこで以下では研究の背景に加え、細胞や組織、ガンの現状と特徴および治療法について述べ。近年注目されているプラズマを使った医療応用の研究例を紹介しながら、既存の低温プラズマ源とそれを用いたガン治療の研究例を提示し、その問題点と解決手法として新たに提案するナノ秒パルスプラズマについて述べる。

### 1.1 研究の背景

プラズマ医療に関する研究は大きく3つの分野に分類することが出来る。1つ目は医療材料の表面処理であり、人工関節や細胞培養材料など人工物と生体の親和性を高める用途に利用されている。2つ目は滅菌技術であり、医療器具や食品への滅菌・保存技術として古くから研究されている。3つ目は”Plasma medicine”と呼ばれる治療目的の研究である。治療目的のプラズマ医療応用には従来より電気メスやアルゴンプラズマ凝固(APC)法があり、主にプラズマの熱を使って組織を焼灼するために使用されている。

一方で近年、熱的な利用ではなく、気体温度が室温に近い低温プラズマを用いることで、照射組織に対する血液凝固(止血)、細胞死の誘導、細胞増殖の促進などの効果が報告されている[1]。これらはプラズマ中のラジカル等(O<sub>2</sub>, NO, OH, etc.)の活性粒子が直接/間接的に作用するためだと考えられているが、活性粒子の生成はプラズマ源や照射環境に大きく依存するため、活性種と生体の相互作用はその多くが未解明である。そのため研究の最前線では実験条件と結果の関連づけを行うなかで、主要因の特定と反応メカニズムの解明が求められている。将来的にプラズマ制御により活性種の最適量を供給することで、期待する医療効果を導くことが目標となる。

本研究の目的は低温プラズマを用いて、ガン(癌)治療を目指した新しいプラズマ源を提案し、その医療効果を検証することにある。ガンは日本人の3大死因であり、発生部位は肺・大腸・胃など主に呼吸器や消化器が挙げられる。一般に手術は電気メスによる切除が行われるが、低温プラズマの特性を利用することで、選択的にガン細胞を殺す作用や低侵襲で癒着の少ない止血、損傷組織の治癒促進などの新たな効用を期待することができる。

生体組織は温度上昇に対して敏感であり、数度の温度上昇により壊死するため、生体へのプラズマ照射は高い安全性と低温性が求められる。一方、プラズマ状態を実現するために発生する放電は容易にアーク(熱平衡、1万度の高温状態)に移行してしまうため、本研究では10ナノ秒以下の極めて短い時間のみ放電を発生させ、熱平衡に至る前にプラズマの消弧を行うことにより低温プラズマの発生を実現した。本論文では、このナノ秒パルスによる医療用低温プラズマの物理的特性とプラズマ照射時の株化細胞およびマウス動物への生体作用や治療効果を報告する。

## 1.2 癌

悪性腫瘍（悪性新生物）には“がん”、“ガン”および“癌”の表記がある。医療分野において“がん”と“ガン”は悪性腫瘍の全てを表す。一方、“癌”は悪性腫瘍のうち上皮性のものを指す。そのため、白血病や骨肉種・筋肉腫などは癌に含まない。本研究では広義のガンを対象としており、ひらがな表記による混同を避けるため“がん”ではなく“ガン”を使用するものの、社会一般では“癌”の表記が多く認知度が高いことを考え、論文タイトルおよび目次の一部に“癌”を使用する。また“ガン”または“腫瘍”は一塊の悪性腫瘍とし、“ガン細胞”はガン化した細胞を表す。

### 1.2.1 現状

世界全体で年間 800 万人がガンにより亡くなっている。日本人のガン死亡率（図 1-1）は 1980 年に脳血管疾患を抜いて死因第一位となった。2011 年の死亡者数は年間 35 万人、罹患者数は 70 万人を超え、さらに増加傾向を示している[2], [3]。ガンの部位別死亡率（図 1-2）によれば、男女とも肺ガン、肝臓ガン、大腸ガンなどの呼吸器・消化器系の増加が顕著である。こうした現状から有効なガン治療の確立が求められている。

### 1.2.2 治療法

現代医学において明確な効果が示されている対処方法は、手術、放射線治療、抗ガン剤である。これ以外の治療方法は代替治療と呼ばれている。現実的には単一の方法に頼るのではなく、複数の手法を合わせた“集学的治療”が一般である。以下に手術、放射線治療、抗ガン剤の特徴を述べる[4]。

#### (a) 手術療法

手術療法は、臓器にとどまっている腫瘍と周囲のリンパ線を切り取る治療法である。浸潤・転移前であれば完全に治すことが出来る点が最大のメリットである。通常周囲の正常組織を含んで切除するため、臓器や身体機能の低下や容姿の変化があり、同時に高齢者には負担が大きい。そこで近年では内視鏡や腹腔鏡を使った手術が増えている。また、転移後は手術による有効性が乏しいため、放射線療法や化学療法と併用することが多い。

#### (b) 放射線療法

放射線療法には、①外部から照射する外部放射線治療、②放射性同位元素を体内に導入する小線源放射線治療と内用放射線治療がある。多くの場合、X 線、電子線、炭素など重粒子線による外部照射が行われる。放射線治療は副作用が少ないため、高齢者や末期ガン患者への適用が良いほか、臓器機能や美容を保つ目的に合致する。放射線治療は種類（頭頸部ガン、肺ガン、食道ガンなどのうち扁平上皮腫瘍）によっては根治の可能性がある。一方、それ以外のガンに対しては手術と組み合わせた利用のほか、緩和的な用途で用いる。標準的な治療期間は週 5 回、1 か月前後である。副作用には急性放射線障害や慢性的放射線障害がまれに生じることがある。

#### (c) 化学療法

化学療法とは抗ガン剤、ホルモン剤などを使った治療である。化学療法は均等に全身へ作用するため、

全身に転移したガンには有効である。白血病や睾丸腫瘍などには完治することが期待できる。しかし、ほとんどのガンに対しては、抗ガン剤だけでガンを完治させることはできないため、ガン細胞の増殖を抑えて進行を遅らせることが目的となる。近年、分子標的薬と呼ばれるガン細胞を選択的に捉える薬剤の開発が進められているが、単体での治癒は難しいようである。

以上のことから、早期ガンの治療には手術療法を用いる場合が多い。最大の課題は患者への負担であり、侵襲性の低い手術手法の開発が望まれている。後述の低温プラズマにより腫瘍組織にアポトーシスを誘導し、かつ周辺組織に炎症や癒着などの負荷が少ない治療を実現すれば、その意義は大変大きいと言える。また、構造面において柔軟でコンパクトなデバイスを提案することができれば、開腹時の手術機器としての利用のほか、内視鏡や腹腔鏡などへの適用も可能になると考えられる。

### 1.2.3 特徴

ガン細胞は、正常な細胞に比べ 2 つの遺伝的特徴を持つ[3]–[6]。その細胞や子孫細胞が(1)正常な制御を外れて増殖し、(2)ほかの細胞があるはずの場所に浸潤し定着する。人体に致命的な症状をもたらすには、この 2 つの特徴が組み合わされた場合である。第 1 の性質のみ持つ細胞は、異常増殖する塊となり、腫瘍を作るが良性であり、外科手術で完全に除去することができる。ここに第 2 の性質が加わると悪性腫瘍となり、血流やリンパ管に入り、体内の新たな部位に二次腫瘍を作る。

ガンが発生する原因はまだ解明されていない。原因としてタバコや酒、パピローマウイルスの感染やアスベストなどの環境因子が考えられるが、これらに曝されてもガンにならない人がいることから根本的な原因とは言えない。ガンの原因は諸説ある。長年信じられてきた理論によると、「ガンに関連する遺伝子には 2 つのグループがある。1 つはガン抑制遺伝子(p53 など 15 種類以上)と呼ばれ、細胞の分裂能力を制御する働きをする。もう 1 つは発がん遺伝子(BRAF, c-fos など 100 種類以上)であり、ガン細胞の分裂を促す。これらの遺伝子に変異することが原因となりガンが発生する。」というものである。一方、たいていの腫瘍は同一の遺伝的変異を持つわけではなく、むしろ個々のガン細胞は遺伝的多様性を備えており、上記の理論では説明できない例が複数存在する。そのため、ガンは遺伝子群の欠陥ではなく、もっと複雑な過程の結果だとする主張も存在する。



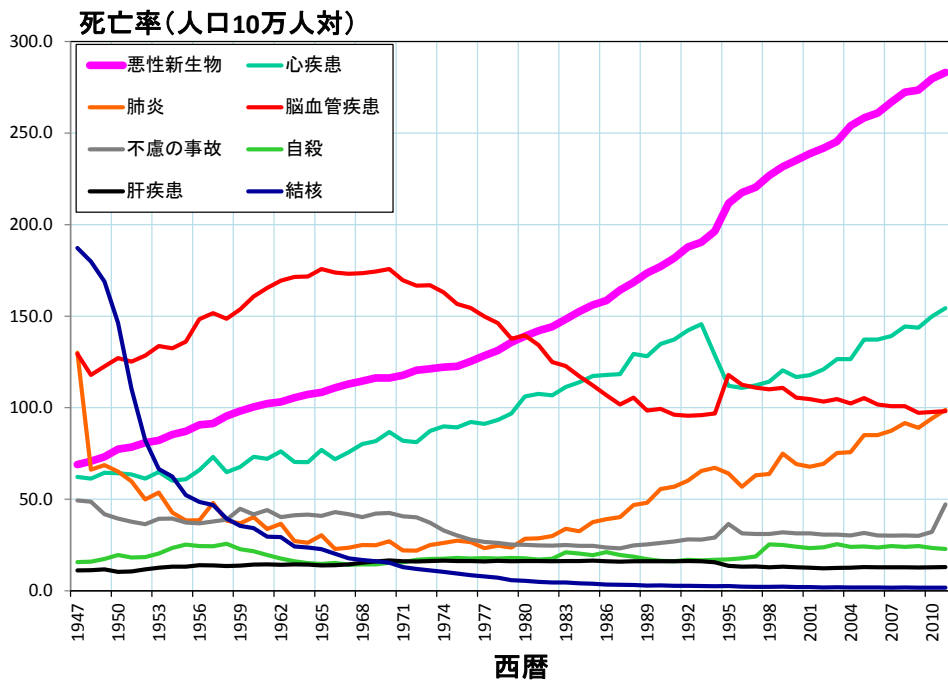


図 1-1 日本人のガン死亡率の推移[2]

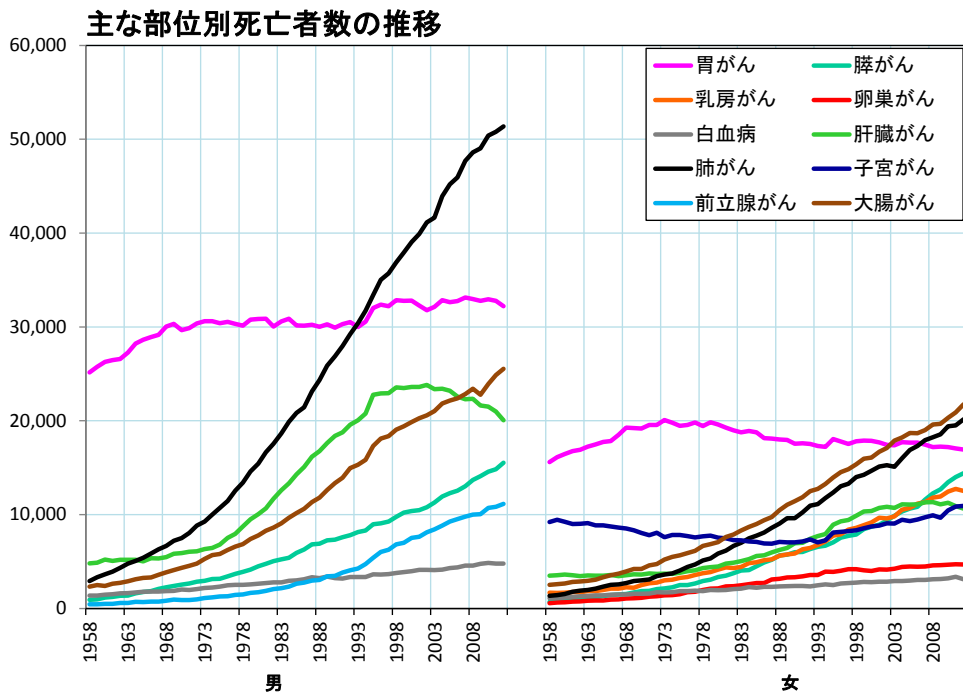


図 1-2 日本人の部位別ガン死亡者数の推移[2]

### 1.3 細胞と組織

薬剤や化粧品のほか、本研究のような医療機器を用いて生体への影響を評価する場合、一般的に細胞や動物を使った実験を行う。培養細胞を用いた試験管内の実験を *in vitro*、動物や組織・臓器を用いた実験を *in vivo* と区別されている。生きた状態で実験を行う *in vivo* は、より高度な生体評価が可能である。一方、細胞実験(*in vitro*)は結果の導出時間が短縮され、低コストに詳細な比較実験を行うことができる。

#### 1.3.1 細胞の構造

典型的な動物細胞は直径 10-20  $\mu\text{m}$  程度である。細胞の内部は細胞小器官や細胞質ゾルで満たされており、細胞膜によって化学成分を外界から分離している。細胞膜は脂質分子からなる厚さ約 5 nm の 2 重の薄膜で構成され、栄養物や老廃物のやり取りなど多くの働きを持つ。細胞膜の機能のほとんどは膜タンパクによって行われ、①輸送体によるイオンポンプや②連結体（インテグリンなど）による細胞外マトリックスとの結合、③外部からのシグナルを感知して細胞内に伝える受容体などがある。プラズマにより生成されたラジカルや活性種に対する応答や細胞膜の損傷を検知する機能も知られており、上記の膜機能はプラズマ照射による生体反応をもたらす重要な役割を担っている[5]。

#### 1.3.2 培養細胞

培養細胞とは多細胞生物から特定の細胞を分離（単離）し、人為的に生体外で増殖・維持された細胞である。細胞の培養技術は、W. Roux（1885 年、発生学者）がニワトリ胚の神経板組織を生理食塩水で数週間生かしたことに始まり、現在では多種類の細胞の長期培養が可能である。

本研究で用いる培養細胞は NIH3T3 および B16F10 である。NIH3T3 は NIH Swiss マウス *Mus musculus* の胚細胞由来の線維芽細胞であり、標準的な線維芽細胞モデルとして広く使われている[6]。B16F10 は、黒色 C57BL/6 マウスの悪性黒色腫に由来したマウス B16 メラノーマ細胞株のうち、高確率で肺転移を引き起こす細胞である。B16 細胞はガン転移の分子機構の解明に導入された最初の代表的な細胞であり、ガン転移を阻止する薬剤開発や各種治療法の評価のための標準的実験系の材料として汎用されている[6]。NIH3T3 と B16 を使用する理由は、どちらも細胞実験に広く使用されるほか、真皮内の細胞マトリックス（後述）を形成する線維芽細胞(NIH3T3)と表皮基底層のメラノーマ細胞(B16)は隣接して存在しているためである。これらの細胞は、皮膚に加えて、まれに発生する直腸や食道などの粘膜上の腫瘍を、模擬する上で使用されており、プラズマによるガン治療の研究にも頻繁に用いる[7]–[10]。

#### 1.3.3 組織

組織とは多細胞生物を構成する協同的な集団であり、動物の組織は結合組織、上皮組織、神経組織、筋組織の 4 種類に分類される。これらの組織は細胞と細胞外マトリックスにより構成されている(図 1-3)。細胞外マトリックスとは細胞を包み込む家のようなもので、コラーゲンなどのタンパク質構造体によって作られており、柔軟性と強靭性を兼ね備えている。一方、上皮組織は細胞外マトリックスが乏しく、細胞同士が直接結合している。本研究の動物実験に用いるマウス(CDF1♀, 交雑系)は図 1-3 と同様の構造を持ち、その皮膚下にマウスメラノーマ細胞(B16F10)を注入することで皮膚ガンを形成する。この場合、マウスメラノーマ細胞は本来の皮膚下で増殖することから、同所性移植モデルと呼ばれる。

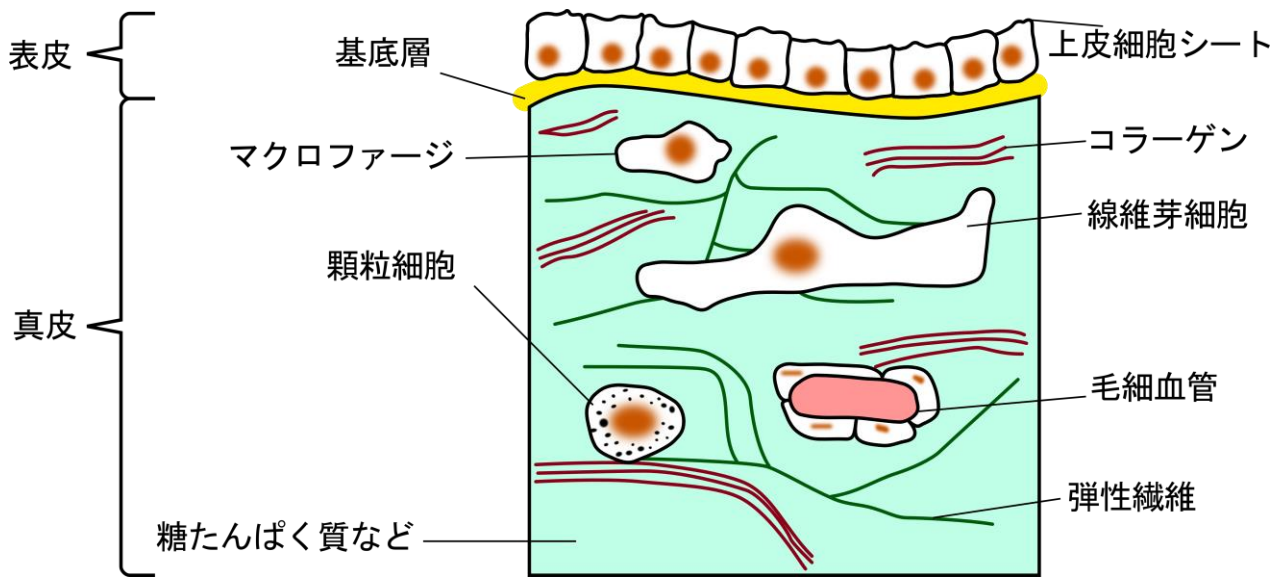


図 1-3 細胞外マトリックス

#### 1.3.4 生体シグナル細胞外シグナル

多細胞生物の細胞は、数百種類におよぶ細胞外分子を使って互いにシグナル伝達を行う。シグナル分子にはタンパク質、ペプチド、アミノ酸などがあり、伝達の範囲や速度も役割によって異なる。例えば、血中で全身に広がるホルモン伝達、周辺細胞への拡散によるパラクリン型伝達、毎秒 100m もの速度で電気シグナルを送信する神経型伝達神経、接触型シグナル伝達が挙げられる。この中には、生存のために絶えず送られるシグナルも存在し、これを欠くとほとんどの細胞はアポトーシス（後述）と呼ばれる細胞死を迎える。このシグナル分子のやり取りの中で、多細胞生物は膨大な細胞数の調整を行っている。また一酸化窒素(NO)は、局所的に平滑筋細胞を弛緩させて血管を拡張し血流を良くする働きや、神経伝達シグナルの役割も担う。NO は細胞外の酸素や水と反応(半減期 5-10 秒)し硝酸塩や亜硝酸塩となる。NO はプラズマによっても生成されるため、その影響が調査されている[1], [11], [12]。

#### 1.3.5 アポトーシスとネクローシス

多細胞生物の細胞数は細胞分裂と細胞死の速度を厳密に制御することで保たれている。不要な細胞はプログラム細胞死と呼ばれる自らのプログラムを活性化して消滅する。動物にもっとも一般的な細胞死はアポトーシス(apoptosis)である。例として、マウス胚の脚は扇状に成長した後(図 1-4)、指と指の間がアポトーシスによって除去される[5]。他にも、オタマジャクシの尻尾が成長と共に切り離されることなど、個体の形成において重要な機能を果たしている。また、細胞は UV や酸化ストレスなどにより損傷し、機能不全に陥るとアポトーシスを起こす。アポトーシスの過程では図 1-5(b)-(c)のように、細胞骨格が壊れ、核膜が分散し、核 DNA は分解されて断片化する。その際、マクロファージと呼ばれる食細胞によって内容物が漏れる前にこれらの細胞に取り込まれてしまうため、後述のネクローシスのように炎症反応は起こらない。

一方、ネクロシス（壊死）は過度な外的刺激の結果として生じる細胞死である。物理的破壊、化学的損傷、血流の減少や酸素欠乏などにより発生し、通常は膨張・破裂して内容物を放出する（図 1-5(a)）。その際に周囲に害を与える炎症反応を起こす。外科手術は力学的・熱的ストレスを与えるため、少なからずネクロシスを引き起こす。傷の修復過程で炎症反応や傷跡・瘡蓋を形成するため、ネクロシスの起こらない外科手術はそれだけで有益である。

本研究では低温プラズマを用いて組織の加熱を最小限に止めることでネクロシスの発生を抑え、より侵襲の少ないアポトーシスの誘導を実現する。またガン細胞に対してアポトーシスを誘導することで、低侵襲なガン治療の提案している。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-4 マウス胚の手が分化する様子[5]：(A)指の間がアポトーシスして、(B)1 日程度で指を

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-5 電子顕微鏡下の写真[5]：(A)ネクロシスによる細胞内部の放出(⇒炎症要因)。(B)-(C)アポトーシス細胞に食細胞が集まり、徐々に解体され栄養分は周辺組織によりリサイクルされる

### 1.3.6 活性種の作用

反応性の高い化学物質である活性種（主にラジカル）は、細胞内外で酸化ストレスを与えるほかに、生体の恒常性を維持するため、殺菌・ウイルス除去、および生体内外のシグナル伝達に利用される[13]。活性種の一例を表 1-1[14]に示す。中でも酸素系活性種(ROS: reactive oxygen species)と窒素系活性種(RNS: reactive nitrogen species)は生物学的に重要な役割を持つことが知られており、生体内では NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などが一定量生成されている。

一方、生体はレドックス(redox)と呼ばれる制御機構を持ち、ラジカル量を調整している。活性種の消滅には抗酸化酵素（SOD: スーパーオキシドジスムターゼ, GPX, カタラーゼなど）、抗酸化物質（グルタチオン, ビタミン A・E など）が使われている。

細胞内には ROS を使ったシグナル伝達機構が存在する。図 1-6 のように閾値を上回る ROS や 2 次オキシダントが局所的に発生した場合、周囲に酸化・還元反応が伝搬する。これは外部から投入される ROS についても、細胞内に生理的なシグナルを伝えることが出来る可能性を示唆している。またプラズマ照射による ROS 供給についても、定常(DC)的な照射とパルス状の照射では効果に違いがあると予想される。

これらの活性種は細胞内外に酸化ストレスをもたらす。その度合いにより、図 1-7 のように細胞増殖 ⇒ アポトーシス ⇒ 壊死（ネクローシス）を引き起こすことが知られている。活性種によるアポトーシス(1.3.5 節参照)は酸化ストレスによる細胞傷害性が原因と考えられており、プラズマ医療についても同様の作用機序が示されている[12], [15], [16] (図 1-8)。一方、ROS がアポトーシス発現の仲介役となり、アポトーシス誘導機構(NF-κB, p53, カスパーゼ)に働きかけているとの報告もある[17]。つまり、活性種は、酸化ストレスによる細胞損傷因子とシグナル物質として 2 つの側面をもつと考えられている。

現在、アポトーシスに対する ROS の影響は多くの調査がなされており、結果や内容については相反するものが少なくない。細胞や組織の種類のほか、ROS の種類と量によって結果が大きく異なるためである。プラズマ医療の場合も同様にプラズマ源や細胞・培地により大きく結果が異なり、しばしば相反する結果が現れる。この事実からプラズマ医療における研究には、プラズマ中の活性種の種類と生成量を計測し、活性種ごとの影響を定量的に評価することが求められる。その上で、生体内の反応機構が特定することができれば、プラズマ源の最適化や医療安全性の確保に大きく貢献することが出来る。そこで、本研究では、プラズマ源の活性種量を個別に計測し、それらをプラズマパラメータによって制御することで、生体効果に対する個別の活性種の影響を評価する。

表 1-1 活性種の一例[14]

Free radicals	Non-radicals
<b>ROS</b>	<b>ROS</b>
Superoxide, $\text{O}_2^{\bullet-}$	Hydrogen peroxide, $\text{H}_2\text{O}_2$
Hydroxyl, $\text{OH}^{\bullet}$	Hypobromous acid, $\text{HOBr}^*$
Hydroperoxyl, $\text{HO}_2^{\bullet}$ (protonated superoxide)	Hypochlorous acid, $\text{HOCl}$
Carbonate, $\text{CO}_3^{\bullet-}$	Ozone, $\text{O}_3$
Peroxyl, $\text{RO}_2^{\bullet}$	Singlet $\text{O}_2^1\Delta\text{g}^+$
Alkoxy, $\text{RO}^{\bullet}$	Organic Peroxides, $\text{ROOH}$
Carbon dioxide radical, $\text{CO}_2^{\bullet-}$	Peroxynitrite, $\text{ONOO}^-$
Singlet $\text{O}_2^1\Sigma\text{g}^+$	Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^-$
	Peroxynitrous acid, $\text{ONOOH}$
	Peroxomonocarbonate, $\text{HOOCO}_2^-$
	Nitrosoperoxycarbonate, $\text{ONOOCO}_2^-$
<b>RCS</b>	<b>RCS</b>
Atomic chlorine, $\text{Cl}^{\bullet}$	Hypochlorous acid, $\text{HOCl}$
	Nitryl chloride, $\text{NO}_2\text{Cl}$
	Chloramines
	Chlorine gas ( $\text{Cl}_2$ )
	Bromine chloride ( $\text{BrCl}$ )*
	Chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ )
<b>RBS</b>	<b>RBS</b>
Atomic bromine, $\text{Br}^{\bullet}$	Hypobromous acid ( $\text{HOBr}$ )
	Bromine gas ( $\text{Br}_2$ )
	Bromine chloride ( $\text{BrCl}$ )
<b>RNS</b>	<b>RNS</b>
Nitric oxide, $\text{NO}^{\bullet}$	Nitrous acid, $\text{HNO}_2$
Nitrogen dioxide, $\text{NO}_2^{\bullet}$	Nitrosyl cation, $\text{NO}^+$
Nitrate, $\text{NO}_3^{\bullet}$	Nitroxyl anion, $\text{NO}^-$
	Dinitrogen tetroxide, $\text{N}_2\text{O}_4$
	Dinitrogen trioxide, $\text{N}_2\text{O}_3$
	Peroxynitrite, $\text{ONOO}^-$
	Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^-$
	Peroxynitrous acid, $\text{ONOOH}$
	Nitronium cation, $\text{NO}_2^+$
	Nitryl chloride, $\text{NO}_2\text{Cl}$
	Peroxyacetyl nitrate, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-6 ROS によるシグナル伝達機構[13]：グルタチオンは細胞内に豊富に存在する抗酸化剤（還元剤）であり、(a)ROS や 2 次オキシダントによる酸化ストレスを受けると、グルタチオンは還元型(GSH)から酸化型(GSSG)に変換される。(b)閾値を超える量の ROS により、酸化還元状態の変化がシグナルとなり様々な分子を経て細胞内に伝搬していく。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-7 酸化ストレス(ROS 投入量)による生体反応[13]

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-8 アポトーシスの作用機序[15] : (a)第 1 段階 : プラズマ由来の酸素系活性種(ROS)が生成される。(b)第 2 段階 : プラズマ由来の ROS が細胞内の ROS の蓄積と小胞体からの  $\text{Ca}_2^+$ の放出を誘導する。(c)第 3 段階 : 細胞内 ROS や  $\text{Ca}_2^+$ がミトコンドリアの機能不全や DNA の断片化を導く。



## 1.4 プラズマの医療応用

### 1.4.1 プラズマ

プラズマとは正と負の荷電粒子が等しく存在する電氣的に中性な物質である。自然界では雷や炎のほか、太陽などの恒星を含め宇宙の 99%以上はプラズマであると言われる。人工のプラズマは気体放電を利用した蛍光灯やアーク溶接のほか、核融合から新素材開発や表面処理などエレクトロニクス分野まで幅広く利用されている。

プラズマを特徴づける物理量として密度と温度が挙げられる。プラズマ中に存在する電子、正イオン、中性粒子の密度を  $n_e$ ,  $n_i$ ,  $n_n$  とすると、プラズマ中の電離した分子の割合を示す電離度  $\beta$  は以下の式で表される。

$$\beta = \frac{n_e}{n_e + n_i} \quad (1.1)$$

太陽のコロナや核融合炉の高温プラズマでは 100%電離しているのに対し、大気圧下における放電は  $\beta < 10^{-3}$  の弱電離プラズマと呼ばれる。また、大気圧付近で気体放電によりプラズマを発生させる場合、電子、イオン、中性粒子の間で激しい衝突が起こり、粒子の運動エネルギーの交換が高速に行われる。電子、イオン、中性粒子の温度をそれぞれ  $T_e$ ,  $T_i$ ,  $T_n$  とすると、最終的には三者の温度が等しい熱平衡 ( $T_e \approx T_i \approx T_n$ ) へ移行する。このようなプラズマを熱プラズマと呼び、大気圧下では 10000 K 程度の高温となる。

一方、低い圧力の下では、電子は衝突によってあまり運動エネルギーを失わないため、非熱平衡 ( $T_e \gg T_i, T_n$ ) となる。このようなプラズマを低温プラズマと呼ぶ。なお、大気圧下においても熱化しないよう放電モードを制御する手法が提案されており、1.4.3 節でよく使用される放電生成の手法とその特徴を述べる。

### 1.4.2 熱プラズマによる医療機器

近年、大気圧下での熱プラズマを用いた医療機器の開発が進んでおり、すでに製品化され発売されている [18]–[22]。熱プラズマによる医療機器は主に滅菌機器 [23]–[28]、歯科治療 [29]–[31]、皮膚治療 [32]、創傷治療の分野で利用されている [23]。また、歯科・皮膚・創傷治療において、組織の切開や止血を伴う手技では、アルゴンガス中で高周波プラズマを直接対象に照射する止血・焼灼デバイス (図 1-9, [33]) や高周波プラズマによる電気メス [34] (図 1-10) が広く普及している。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-9 アルゴンプラズマ凝固デバイスの概略と使用時の様子[33]。円筒管からアルゴンガスを流し、高周波の印加により生体との間で熱プラズマを生成する。出血部位など導電率の高い方へプラズマが誘導されるため、止血や表面を薄く焼灼する場合に使用する。

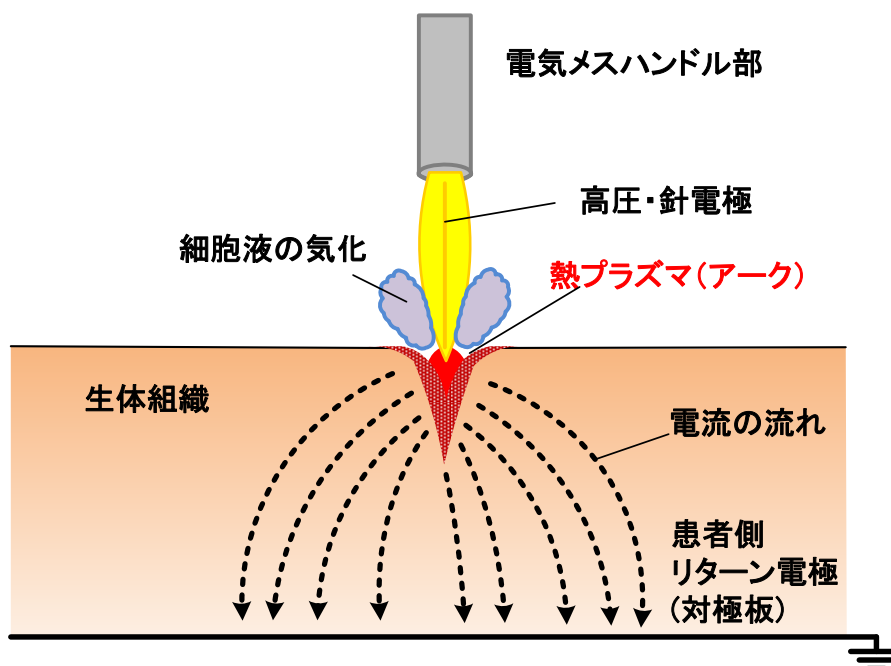


図 1-10 電気メス (モノポーラ) の概略：金属状の高圧電極に低周波高電圧を印加し、生体間で熱プラズマを形成する。生体内の水分が蒸散・気化する際の機械的エネルギーで切開操作が可能。熱プラズマにより止血を同時に行う。

### 1.4.3 低温プラズマ発生方式

電極間に高電圧を印加した場合、ストリーマ・コロナ放電やアーク放電が発生する(図 1-11)。これらの放電は時間経過とともに、高電圧側から1次ストリーマと呼ばれる放電が進展し接地電極に到達した後、再度高電圧側から2次ストリーマと呼ばれる放電が進展する。さらに2次ストリーマが接地側に到達した場合、グランド側電極から電子の供給によりアーク放電へと移行し、電極間は加熱され高温状態(1万度程度)になる。一方、生体組織は温度上昇に対して非常に繊細であるため、低温プラズマの発生にはアーク放電の制御が重要となる。ここでは代表的な低温プラズマの発生方式を説明する。

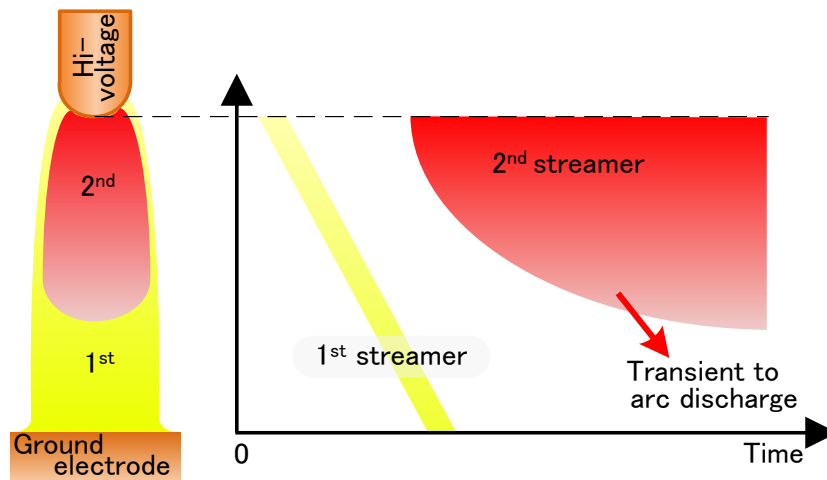


図 1-11 大気圧放電の様子：棒電極と接地電極間に高電圧を印加するとストリーマ放電の進展後、アーク放電に移行する過程で電極間は加熱され高温になる。

#### (a) プラズマジェット

図 1-12 にプラズマジェットの構造を示す。プラズマジェットは誘電体の筒の外部に電極を設置して高電圧を印加し、筒中の放電生成物（活性種、イオン・電子などの荷電粒子）をガス流に乗せて先端から吹き付けるものである。通常 10 kV 程度の低周波(10 kHz-100 kHz)やパルス高電圧で駆動し、主に He や Ar などの希ガスを用いる。プラズマジェットは簡易な構造に加え、交流電源を用いることで比較的容易に低温プラズマを生成できる点で、プラズマ医療分野では最も普及している。筒に柔軟な誘電体を用いた装置[7]、単一の細胞に照射(直径 15 $\mu$ m)することが出来る装置[35], [36]などが提案されている。

プラズマジェットは上流で生成したラジカルや化学種を吹き流す機構であるため、反応性が高い短寿命の活性種は届きにくいという側面がある。このため、直接放電を届ける下記の手法と比べ、間接的な本手法はその殺菌能力を評価した際に大きく劣ることが指摘されている[37]。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-12 プラズマジェット[12]

#### (b) 誘電体バリア放電

誘電体バリア放電（DBD: Dielectric Barrier Discharge）プラズマとは、図 1-13 のように、ある間隔で置かれた電極上を誘電体で覆い、高電圧を印加することによって発生する放電である。電源には交流電源(50 Hz-100 kHz 程度)やパルス高電圧を用いることが多い。放電により生じた空間電荷が誘電体表面に蓄積するため、放電は数十 ns 程度の極短時間で消滅する。オゾン生成や大気汚染物質の除去などの分野で広く用いられており、安定した低温プラズマの形成が可能である。

簡単に低温プラズマを発生することができる反面、医療応用では誘電体バリア素材が生体組織により汚染し、放電様相が大きく影響を受けることが考えられる。また一般に硬質なバリア素材を使用するため、形状の自由度や柔軟性に欠けるという側面もある。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-13 誘電体バリア放電(DBD)方式[12]

### (c) プラズマニードル

プラズマニードルは、図 1-14 のように先端の尖った直径 0.1~1mm 程度の金属針と、ガス流を与えるための 3-6 mm 程度の絶縁チューブから構成される。主に RF によって駆動し、導入ガスとして He や Ar を用い、金属先端で発生するコロナ放電によって活性粒子を生成する。また、ガス流速により周辺ガスの巻き込みが生じ、多様な化学種が生成される。

希ガス(He, Ar)を利用することで実験室内では安定したプラズマの発生が可能である。一方、プラズマ領域は比較的高純度の希ガスで満たされている必要がある（不純物密度～数%）。人体の内部・外部環境は雰囲気や湿度が多様な状況が想定され、プラズマの安定的な運用の障害となる。また、RF 放電はインピーダンスに強く影響するため、照射対象とのマッチングをとる必要があり、精密な位置制御の実現が課題となる。

この図はインターネット公表に対する著作権者からの  
許諾が得られていないため、表示できない。

図 1-14 プラズマニードル[12]

### (d) ナノ秒パルスプラズマ

本研究で提案するナノ秒パルスプラズマの照射方法について述べる。図 1-15 に、照射装置と著者本人の指に照射した写真を示す。構造の詳細説明は 2 章に譲り、ここでは最大の特徴である①放電ガスの自由度、②電極構造の自由度、③低温性の実現について述べる。

まず、ナノ秒パルスプラズマ照射装置はプラズマニードルと同様の電極構造とガス導入機構を持つ。つまり、ガラス管から任意のガスを導入し、管内の金属電極と生体間で放電プラズマを発生させることで生体をプラズマに直接曝し、高密度な短寿命活性種を効率的に供給することが出来る。

①放電ガスについて。アーク（高温）阻止のために、プラズマニードルは希ガス(He, Ar)を使用するのに対し、本手法はナノ秒オーダーのパルス状電圧を使用するため、多様なガス種（本研究では O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He を使用）によりプラズマ生成が可能となる。希ガスを使用する手法の場合、呼吸を阻害し窒息のリスクがあるため大用量・長時間の利用が制限される。また、周辺空気の混入率が数%に達すると放電が安定しない問題があるが、本手法は酸素や窒素が 100%の場合にも低温プラズマを安定して生成することが出来る。また、ガス種を変更することでプラズマ中に含まれる放電生成物（特に活性種）の種類や量を制

御することが可能になる。本研究では、活性種計測と合わせることで、活性種の生成割合を制御し、細胞生存率への影響を評価する。

②電極構造について。本手法は誘電体バリアが必要ないため、多様な電極形状において放電プラズマの生成が可能である。本研究では細胞実験で照射範囲を広くとるために棒状電極(直径 3 mm)と計測用に針状電極(曲率半径約 40 $\mu$ m)を使用する。これは用途の問題であり、例えば歯科治療などの狭小部には金属ワイヤ先端を患部に近づけることでプラズマ照射が可能になる。また、印加電圧波形によりアーク放電(熱プラズマ)の生成も可能であることから、既存の電気メスを利用した熱プラズマと低温プラズマの併用も可能であると考えられる。たとえば、内視鏡や腹腔鏡などの小型機器に搭載する際、すでに実装されている電気メスと低温プラズマデバイスが併存するメリットは大きい。言い換えると、既存デバイスに適用可能であるため、低温プラズマ機能の導入コストを大きく下げ、既存デバイスの使用者にも広く普及するポテンシャルを持っている。

③低温性の実現について。大気圧プラズマが熱平衡に達するまでの時間は数~数百ナノ秒程度と高速であるため、治療目的のプラズマ医療分野において放電プラズマのパルス制御はこれまで実現していない。本研究グループは、パルス幅 10 ns 以下の高電圧パルス(20-30 kV)の形成技術を有しており[38], [39], 金属電極と生体間で発生する放電プラズマにおいて、2 次ストリーマ(1.4.3 節参照)によるガス温度の上昇および有害な副生成物の生成を抑制することが出来る。これはプラズマ医療において最も重要な安全性を確保するために不可欠な特徴である。なお、ナノ秒パルスプラズマの低温性・副生成物の低減については 2 章で述べる。

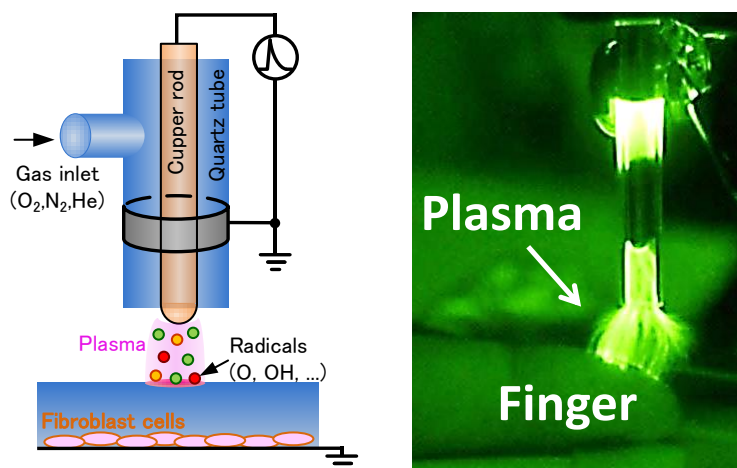


図 1-15 ナノ秒パルス放電

#### 1.4.4 低温プラズマによる癌治療

ここでは本研究のようにガン治療に向けた低温プラズマの先行研究を紹介し、その問題点を整理する。これまでのプラズマの医療応用研究はプラズマデバイスの開発とそれらの医療効果の検証に分けることが出来る。前節でプラズマデバイスの特徴は述べたので、ここでは細胞や動物を使った実験結果について述べる。

プラズマを使った細胞実験は2003年 Stoffels (Eindhoven 大)らがマウス細胞の剥離を確認したことに始まる[40]。その後、同グループにより線維芽細胞などの剥離作用や生存率が低温プラズマの照射時間に依存することが報告された。続いてヒト非小細胞肺癌に同様の結果が報告された[41]。プラズマの照射量により、低量ではアポトーシスが、高量ではネクローシスが発生し、それらはプラズマ中の短寿命な成分によって引き起こされると結論付けた[42]。その後、人のメラノーマ(悪性黒色腫, ホクロ様のガン)、肝臓や肺など多くのガン細胞で同様の結果が得られた。一方、プラズマ照射後の細胞には最大で6.5 nmの穴があき、そこからプラスミドによるDNA導入が確認された[43]。プラズマ由来のROSは、薬剤耐性のヒト大腸ガンの外部チャネル(特定サイズ以下のタンパクや分子輸送用のドア)を閉じる効果を仲介しているとの報告もある[10], [44]。

動物を用いた実験では、2010年 Vandamme (Orlean 大)らによりマウス後足のグリオーマ(脳)腫瘍に対するDBDプラズマの照射が行われた。5日連続の照射により腫瘍サイズと生存期間の延長が確認された[45], [46]。上記の腫瘍縮小はアポトーシスと細胞停止の結果であり、ROSが主な仲介役であることが示された[47]。Keiderらはプラズマジェットにより、Vitro実験では正常細胞に影響を与えず、ガン細胞のみを選択的に減少させ、Vivo実験においてもわずか1回の照射によりヌードマウスの延命効果を得たことを報告して、ガン治療が劇的に変化する可能性を示唆している[9]。以上の点を踏まえて、低温プラズマを用いたガン治療分野は今後成長が期待できる分野である。一方、以下のような課題が残されている[48]。

- マウス腫瘍の縮小や成長停止などの良好な治療結果は得られるものの、照射後数日で腫瘍の増殖が発生することから腫瘍の完治に至るような結果はない。
- 内視鏡と相性の良いデバイスも報告されており、特定分野で利用されるデバイス開発も必要となる。特にプラズマの生化学的な効果を利用することがカギとなる。例えば細胞表面のナノホールや、それを利用したドラッグデリバリー、および薬剤の取込みなどである
- 標準的なプラズマ計測手法により、プラズマ中の影響因子が定量され、同時に生化学的な評価を行うこと。それにより各種プラズマ源や生体評価を比較検討することが出来る。
- Vitro実験は液中の反応など人工的な部分が多く存在するため、今後の実験は同所性の腫瘍モデルを使った実験を行うことが重要であり、皮膚ガンや大腸ガンなどは良い候補である。(当然、他の特異な腫瘍モデルについても引き続き研究が必要である。)

以上より、動物実験においてプラズマ照射による腫瘍の縮小効果が複数報告されており、新たなガン治療方法の確立に向けて研究が進展している。一方、プラズマによるガン治療は比較的新しい研究分野であり、現状では、1.4.3節で述べたプラズマジェットやDBDなどの照射方法を用い、各研究グループがその治療効果を評価し、ガン治療デバイスとしての実用化を目指していることが窺える。こうした中、本研究は“ナノ秒パルスプラズマ”による低温プラズマの照射方法を提案し、細胞および動物実験に適

用した初めての報告となる。

また、現状では“プラズマがどうして効くのか？”は未解明であるため、その要因の特定および反応機構の解明が求められている。しかし、大気中の活性種計測は一般的に難しいため、その直接計測を行っている研究グループは限られている。特に、プラズマ医療では治療対象の表面近傍に存在する活性種を計測することが極めて重要であり、その知見は非常に乏しい。本研究は、生体への効果が大きいと予測されるプラズマ中の活性種[NO( $X^2\Pi$ ,  $v=0$ ), OH( $X^2\Pi$ ,  $v=0$ ), O( $^3P$ )]を計測し、ガス構成やガス流量によりそれらの活性種量を制御することで、生体への影響を定量的に評価した初めての報告となる。



## 第2章 ナノ秒パルスプラズマの特性

本研究ではナノ秒パルス高電圧による低温プラズマを提案するにあたり、そのプラズマ特性を理解する必要がある。本章では、プラズマ照射デバイス、およびプラズマ生成に使用するパルス電源について述べる。さらに、プラズマ照射時の放電様相と発光分光計測および対象の温度特性について実験結果を説明する。最後に、通常のパルス放電と比較して、本研究のナノ秒パルスプラズマの優位点をまとめる。

### 2.1 ナノ秒パルスプラズマの発生装置

#### 2.1.1 プラズマ照射装置

図 2-1 にプラズマ照射装置および主な照射対象の模式図を示す。金属電極は直径 3 mm の銅製円柱形状をしており、均一な放電を発生させるために放電部先端を曲率半径 1.5 mm の半球状とした。銅電極を内径 4 mm、厚み 1 mm のガラス管で同心円状に囲い、上部のコネクタ側面から金属電極とガラス管の間にガスを導入する事でプラズマ領域のガス構成を制御することができる。ガラス管の下端から 20 mm の位置に幅 5 mm のアルミテープをガラス外面に巻き、接地をとる。このテープを配置する事により安定して電極と照射対象の間に放電が発生するためである。金属電極上部に後述のナノ秒パルス電源の高圧電極を接続した。なお、ナノ秒パルス電源については次節で解説する。

プラズマ照射対象(図 2-2)には、放電観測用にガラス板(厚み 0.5 mm)と寒天培地(厚み 4 mm, 寒天 1.5% wt)、細胞実験に液体培地(PS/血清有の DMEM, RPMI-1640)、動物実験にマウス(CDF1♀, 6 week)を棒電極の直下に配置した。電極と照射対象の距離はノブ式ジャッキおよびマイクロメータを用いて調整した。

電力計測のため、対象の下には接地電極を配置し、そこに流れる電流をロゴスキーコイル(Bergoz CT-D1.0, 最大 1 kA, 立上り 0.7 ns)により取得した。出力電圧は高圧プローブ(Tektronix P6015A, 最大 40 kV, 最大 75 MHz)を棒状金属電極に接続することで取得し、デジタルオシロスコープ(DPO3054, 2.5 GS/s)上で記録した。

#### 2.1.2 パルス電圧発生装置

ナノ秒オーダーのパルス高電圧を生成するためには、極めて高速なスイッチングが求められる。本研究では半導体開放スイッチ(Semiconductor Opening Switch: SOS)ダイオードと呼ばれる電流遮断素子を用いてスイッチングを実現した。以下に自作した電源回路と動作の説明を行う。

図 2-3 および図 2-4 に SOS ダイオードを用いたナノ秒パルス電圧の発生回路を示す。1 次側回路(図 2-3 Loop1)は充電用コンデンサ  $C_1$ 、インダクタ  $L_1$ 、スイッチ MOS-FET により構成し、2 次側(図 2-3 Loop2)はコンデンサ  $C_2$ 、インダクタ  $L_2$  に加え出力端に SOS ダイオードとアレスタ(避雷器)を並列しており、昇圧用パルストランス  $PT$  を介して 1 次側と 2 次側は結合している。MOS-FET には Behlke 社製 HTS400-20(定格 20kV/200A)を用い、外部トリガ信号と同期をとる。昇圧用パルストランスとして過飽和磁性体コア(日立金属株式会社製 FT-3L)を巻数 3:9 で使用した。これは飽和磁束密度  $B_s$ 、および残留磁束密度  $B_r$  とすると、 $B_r/B_s$  が 5%と低いことから繰り返し動作に適している。SOS には、VOLTAGE MULTIPLIERS 社の高速リカバリーダイオード K100UF(定格 10 kV/100 A, 逆回復時間 100 ns)を 4 直列にして接続した。アレスタ(避雷器)は、一定以上の電圧が印加されるとガス入りの放電管内で放電することによりインピーダンスが急激に低下して短絡状態を形成する素子である。回路

中ではアレスタ(Mitsubishi Materials DSA-362MA)を使用することで任意の電圧(20-30kV)で電圧波形を急激に立ち下げる役割を果たす。

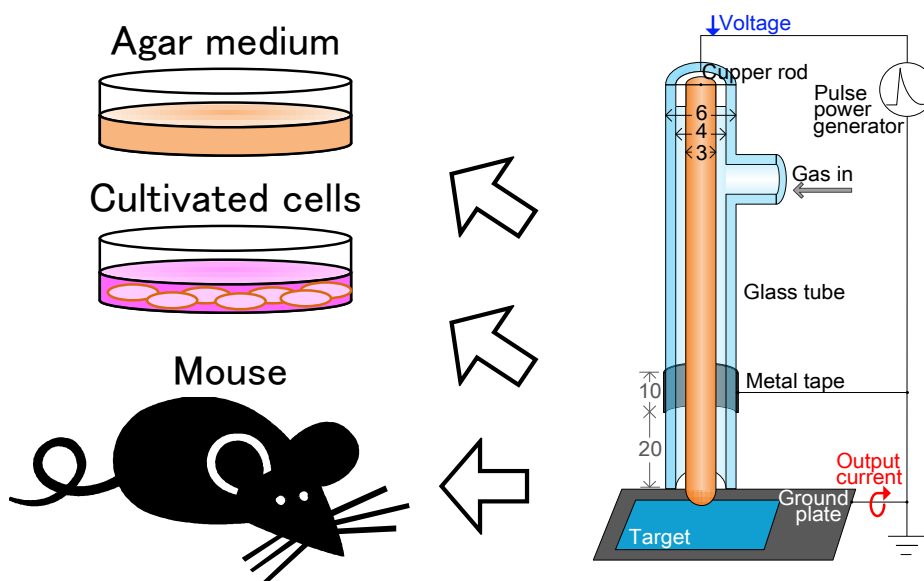


図 2-1 プラズマ照射装置と照射対象

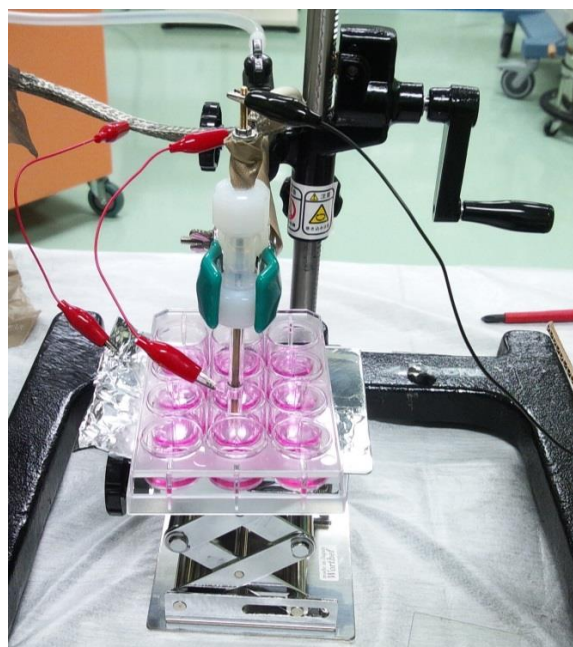


図 2-2 プラズマ照射装置 (培養細胞への照射)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 2-3 SOS ダイオードを用いたパルス電圧の発生回路

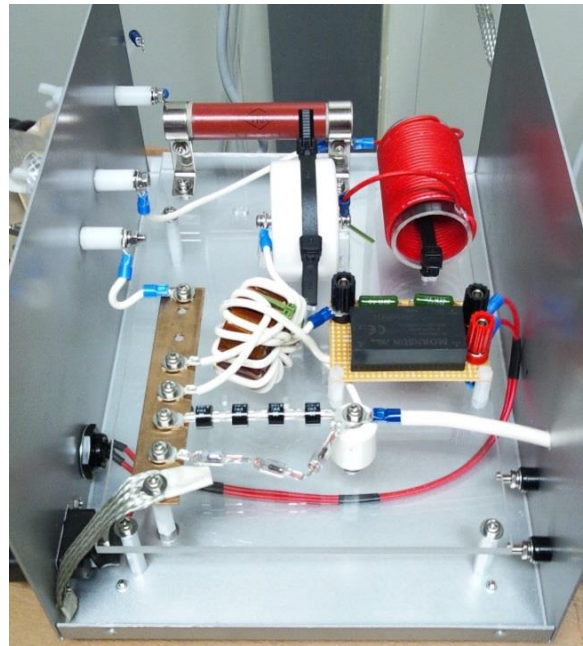


図 2-4 パルス電源の発生回路

回路動作を以下に示す。直流電源によりコンデンサ  $C_1$  が電圧  $v_0$  に充電された状態で MOS-FET がオンすると、 $C_1$  に充電されたエネルギーは PT を介して昇圧され  $C_2$  に転送される。次に、 $C_2$  の充電が十分に行われ磁性体コア (PT) が飽和すると、そのインピーダンスが急激に低下しほぼ導通状態となる。この間、順方向電流が流れこむ SOS ダイオードの pn 接合面にはキャリアの蓄積が起これ、続く極性反転時には、蓄積した電荷は逆方向電流となって流れるが、ある時間を経て空乏層の拡大 (蓄積電荷が消滅) により急速に電流遮断が生じる。その際、2 次側インダクタンスの作用 (誘導起電力) により半導体開放スイッチ両端に正極性パルス電圧  $v_{out}$  が発生する。各点の電流はロゴスキーコイル (Bergoz CT-D1.0)、電圧は高圧プローブ (Tektronix P6015A) を用いて計測し、デジタルオシロスコープ (Tektronix TDS3054B) により記録した。

図 2-5 に MOS-FET の周辺回路を示す。上記のパルス電源装置と他の計測機器の同期をとるため、および、動作電圧や周波数の安定を図るため、高電圧スイッチ MOS-FET (Behlke HTS400-20) を使用した。この MOSFET は、素子構造により高速スイッチング動作に適しており、直並列接続することで高耐圧・高電流容量を実現している。本回路において、スイッチング後の電圧立下り (90-10%) はおよそ 20 ns であり、およそ MOSFET 素子単体の速度と同程度である。購入時に Switch-ON の持続時間は 10  $\mu$ s と設定し、パルス動作中に OFF 状態にならない。また、電源動作後の数  $\mu$ s は電磁ノイズによる MOSFET の不測の動作を防いでいる。MOSFET を駆動するため、安定した直流電圧 ( $5 \pm 0.25$  V、電流容量 1 A) を供給した。安定動作には電源によるノイズ対策が不可欠であり、次のような対策を組み合わせた。

- パルス電源回路と MOSFET 周辺回路の接地配線はなるべく近づけ、一点接地とする。
- 周辺回路の配線を短く設計し、ループを回避するため配線を振る。
- トリガ信号の入力部分には 50  $\Omega$  の並列抵抗を配置したほか、絶縁トランスによりファンクションジェネレータと絶縁する。
- パルス電源回路と周辺回路を別々の金属ケースに入れ、金属製の電磁波防止布等で覆う。
- 大電流の流れる電源回路やプラズマ照射装置から、トリガ信号を離して配置する。

### 2.1.3 ナノ秒パルス電源の出力特性

パルス電圧を定義する場合、パルス幅と立上り時間をしばしば用いる。ここで、パルス幅とは半値全幅 (Full-Width Half Maximum: HWHM) をさし、最大電圧値の半分 (50% 電圧) を立上り時に超えてから、立下り時に下回るまでの時間を表す。また、立上り時間は電圧立上りにおける最大電圧値の 10% から 90% に至るまでの時間を表す。

ナノ秒パルス高電圧の発生装置 (パルス電源) とプラズマ発生装置を用いて放電を発生させた際の、ナノ秒パルス電源回路における出力特性を計測した。回路パラメータは、図 2-3 において  $C_1 = 2000$  pF、 $C_2 = 200$  pF、 $L_1 = 20$   $\mu$ H、 $L_2 = 2$   $\mu$ H とした。取得した電流電圧波形を図 2-6 に示す。磁性体コアの 1 次側電圧を  $v_1$ 、2 次側の電圧  $v_2$ 、1 次側電流  $i_1$ 、SOS に流れる電流  $i_{SOS}$ 、出力電圧  $v_{out}$  と表示している。時刻 0 ns より磁性体コア (PT) の 1 次側電圧  $v_1$  が昇圧され、2 次側電圧  $v_2$  に最大 10 kV の電圧が印加される。次に磁性体コアが飽和し、1 次側印加電圧が減衰する過程で SOS に対し逆方向電流が流れ始める (117 ns)。その後逆方向電流の遮断 (168 ns) が生じ、パルス電圧が発生する。上記の回路構成では放電のパルス半値幅 (半値全幅: FWHM) が 40 ns 程度であるが、回路パラメータの最適化によりパルス幅 10 ns 以下の電圧発生が可能になっている。

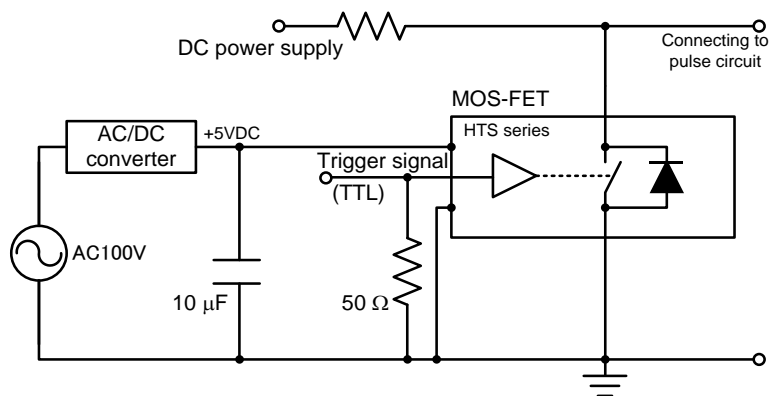


図 2-5 MOS-FET の周辺回路

具体的には  $C_1 = 2000 \text{ pF}$ ,  $C_2 = 200 \text{ }\mu\text{F}$ ,  $L_1 = 20 \text{ }\mu\text{H}$ ,  $L_2 = 2 \text{ }\mu\text{H}$  とし、逆方向電流の遮断速度 ( $di/dt$ ) を向上させる事で立上り・立下りの急勾配化を実現している。次に、実際にプラズマを発生させた際の実出力電流・電圧を計測した。雰囲気ガスは  $\text{O}_2$ 、電極とガラス板を配した接地側とのギャップ長は  $5 \text{ mm}$  である。図 2-7 に放電時の出力波形を示す。電圧の印加開始時刻を  $0 \text{ ns}$  とした。パルス立ち上がり時間  $6.3 \text{ ns}$ 、パルス幅  $8.8 \text{ ns}$  であり、 $10 \text{ ns}$  以下の短いパルスの生成を可能にした。本研究ではこれをナノ秒パルスと呼ぶ。

ナノ秒パルスと一般的なパルスによる比較を行ううえで、回路中(図 2-3)を  $C_1 = 2000 \text{ pF}$  に変更する事で出力パルス幅が  $110 \text{ ns}$  となり、1 桁ほどパルス幅の長い電圧を形成した。それぞれの電圧波形を図 2-7 に示す。今後、ナノ秒パルスを **Short pulse**、および一般的なパルスを **Long pulse** と呼ぶ。表 2-1 にそれぞれの最大電圧、立上り時間、パルス幅を示す。

表 2-1 パルス電圧の諸特性

	最大電圧 kV	パルス立上り時間[ns] (10-90%)	パルス幅[ns] (50-50%)
ナノ秒パルス (Short pulse)	24	7.6	6.4
通常パルス (Long pulse)	24	80	110

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 2-6 パルス電源の各電圧・電流波形

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 2-7 ナノ秒パルス電圧(Short pulse)と一般的なパルス電圧(Long pulse)  
Short pulse: 最大電圧 24 kV, 立上り時間 7.6 ns, パルス幅\_半値全幅 6.4 ns)  
Long pulse: 最大電圧 24 kV, 立上り時間 80 ns, パルス幅\_半値全幅 110 ns)

## 2.2 ナノ秒パルスプラズマの特性制御

### 2.2.1 照射エネルギー

多くの場合、プラズマ照射時の投入エネルギーは活性種の投入量に影響を与えるため、それによってもたらされる生体作用も異なることが報告されている[49]。それゆえプラズマへの投入エネルギーを知ることは重要である。

本節では細胞実験を想定して、細胞培養用 12 ウェルプレート内に 0.5 mL の培養液を入れた際の投入エネルギーを計測した。O<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>、He の 3 種のガスを各 1 L/min の流量で導入し、放電周波数は細胞・動物実験と同じく 30 Hz とした。図 2-8 に各ギャップ長における投入エネルギー量の関係を示す。エネルギーは棒状金属電極に印加したパルス電圧と、ウェルプレート背面の接地金属板に流れる電流の積を時間積分することで算出した。印加電圧は全てナノ秒パルス電圧(Short pulse, 図 2-7)であり、測定は各距離ごとに 10 回分のエネルギーの平均値を取り標準偏差を表している。

ギャップ長 1 mm から 15 mm にかけて、いずれのガス種においてもギャップ長が小さくなるほど投入エネルギー量は増加する傾向が得られた。投入エネルギーを比較すると、He→N<sub>2</sub>→O<sub>2</sub>の順に大きくなる。第 4 章の細胞実験ではギャップ長 5 mm を使用する。この場合、O<sub>2</sub>および N<sub>2</sub>ガス中の投入エネルギーおよび電力を表 2-2 に示す。電力密度は、次節に述べる放電様相から放電照射面積を約 0.28-0.38 cm<sup>2</sup> として算出した。

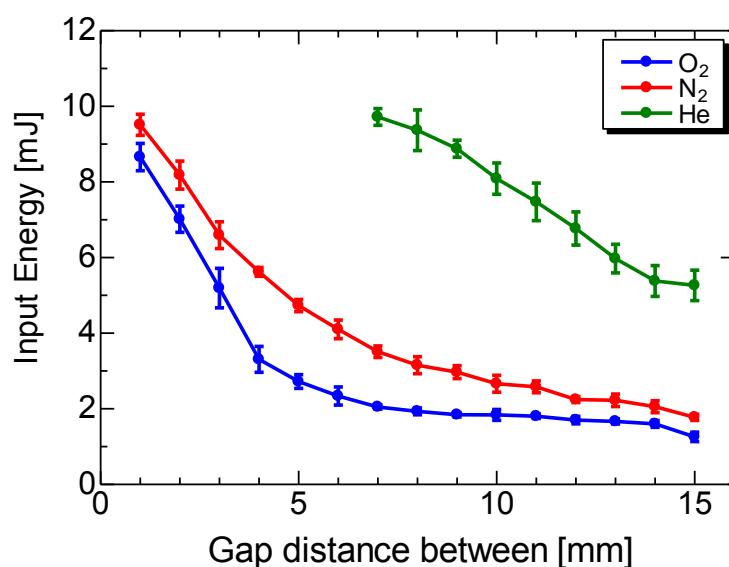


図 2-8 電極間の距離による投入エネルギー

表 2-2 ガス種による照射エネルギー

	投入エネルギー[mJ/pulse]	電力[mW]	電力密度[mW/cm <sup>2</sup> ]
酸素	2.7	82	210-290
窒素	4.7	140	370-500

## 2.2.2 放電様相

前節の投入エネルギー計測と同じ条件下で撮影した放電様相を図 2-9 に示す。放電様相は Image Intensified Camera (Hamamatsu Photonics C9016)とデジタルカメラ(NIKON D3100)を使用した。各条件によって放電の発光強度は大きく異なるため、ゲインは各放電プラズマを観測できるよう適宜調整した。シャッター時間は全条件で 1/30 秒 であり、一回分のパルス放電を記録した。

図 2-9(a)明視野は電極と培地の位置関係を把握するためのものであり、電圧は印加していない。(b)-(d)列はそれぞれ  $O_2$ 、 $N_2$ 、 $He$  ガス中の放電プラズマの様相である。発光強度は  $O_2 \rightarrow N_2 \rightarrow He$  の順に大きくなる。また、ナノ秒パルス放電により 0.5-15 mm の範囲でスパークやアーク放電には至らず、熱プラズマの発生を抑制することが示された。

(b) $O_2$  ガス中で、10 mm 以上では放電は培地に到達しない。細胞実験において  $O_2$  プラズマ照射を行う際は、肉眼で放電の有無を確認でき、二次ストリーマが培地表面まで到達しないギャップ長 5 mm の条件を採用した。この時、放電は直径約 6-7 mm(約 0.28-0.38  $cm^2$ )に広がっており、これはウェルの底面積 350  $mm^2$ のおおよそ 4 割にプラズマが照射されていることを示す。

(c)列を見ると、 $N_2$  プラズマは  $O_2$  プラズマに比べて発光が強く、各ギャップ長で放電を確認できる。ギャップ長 10 mm でも放電が培地まで一部到達し、15 mm 以上では到達しなくなる。ここでもナノ秒パルスによってスパークやアーク放電を抑制できている事が分かる。

(d)列を見ると、 $He$  は希ガス元素であり、放電開始電圧が  $N_2$  や  $O_2$  と比べて低いため、15 mm 以上離れてもプラズマ照射が可能である。

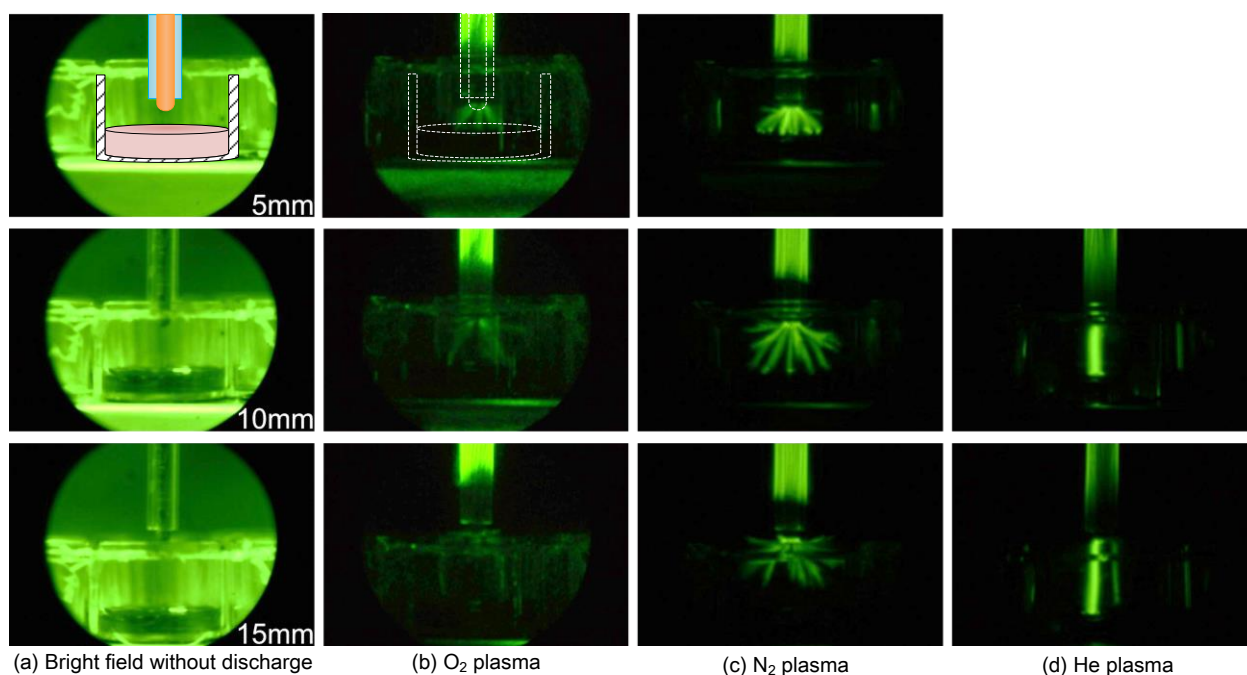


図 2-9 放電ガスと電極間距離による放電様相の変化



放電様相を比較するため、ギャップ長 5 mm において O<sub>2</sub> ガスを導入し Short pulse および Long pulse を印加した。図 2-10 にパルス幅を変化させた際の放電様相を示す。図 2-10(c) Long pulse の場合、スパーク放電と思われる強い発光が培地まで到達しており、通常のパルスではスパーク放電を抑制できない事が分かる。一方、図 2-10(b)の Short pulse の場合、ストリーマ放電が扇状に広がり培地表面に照射されており、スパークやアーク放電の抑制に有効であり、熱的刺激の少ない低温プラズマの生成が期待できる。

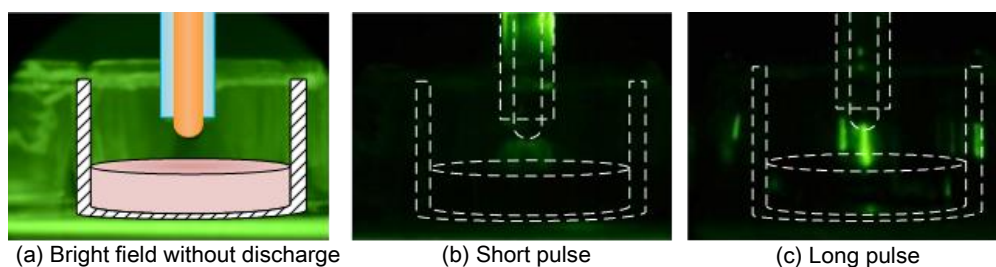


図 2-10 パルス幅による放電様相

### 2.2.3 発光スペクトル

O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He の 3 種のガスについて、各々のプラズマ発光スペクトルを測定した。中心部に半径 4 mm の穴の開いたゴム栓でウェルを塞ぎ、実験系模式図 2-1 で示した金属電極及びガラス管を挿入した。ガラス管は半径 3 mm であることから、ゴム栓とガラス管の間にはドーナツ型の空間が生まれ、そこが導入されたガスの排出口の役割を果たしている。ウェル側部には分光器の端子が丁度収まる大きさの穴を空けており、ここから分光計測を行う。分光器は Ocean Optics 社製 USB2000-1 を使用し、ガス流量は全て 1 L/min, 培地量 1 ml の条件で測定を行った。分光器のファイバー先端は培地と気層の界面を向いており、気液界面近傍の発光スペクトルを取得している。

図 2-11 に O<sub>2</sub> 導入時のスペクトルを示す。O 原子(777 nm) の強いピークがあり、酸素分子ガスの解離により酸素原子が存在することがわかる。また一般に強い発光を持つ窒素発光 (SPS: Second Positive System, FNS: First Negative System) が観測されないことから、本実験では細胞培養容器の密閉により外部雰囲気巻き込みを十分に防ぐことが可能である。

図 2-12 に N<sub>2</sub> 導入時のスペクトルを示す。313~406 nm にかけて窒素分子 (Second positive system) の発光が見られた。

図 2-13 に He 導入時の発光スペクトルを示す。ヘリウム原子に加え、OH ラジカル および N<sub>2</sub> (Second positive system) の発光が観測された。OH ラジカルは照射対象から生じる水分の解離によって生じている。一方、N<sub>2</sub> のスペクトルは外部からのガスの巻き込みを示している。励起された He の寿命が長いことから放電の発生領域が広がり、外部から巻き込まれたガス種による発光が生じたものと考えられる。また、He プラズマの特徴として、O<sub>2</sub> プラズマのスペクトルに比べ、波長 380 nm 以下の UV-A 領域の発光強度が 1~3 桁のオーダーで大きい。

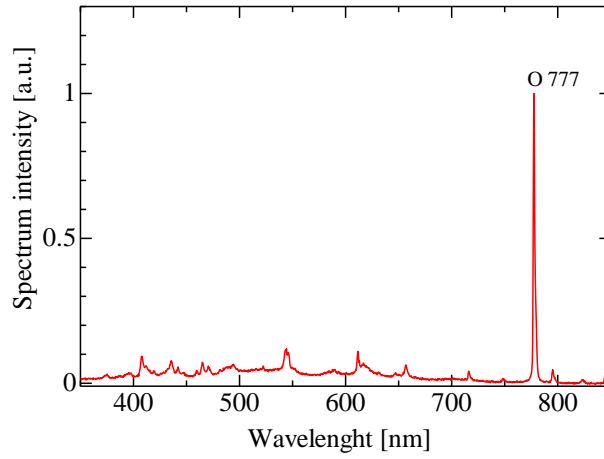


図 2-11 O<sub>2</sub> 導入時の発光スペクトル

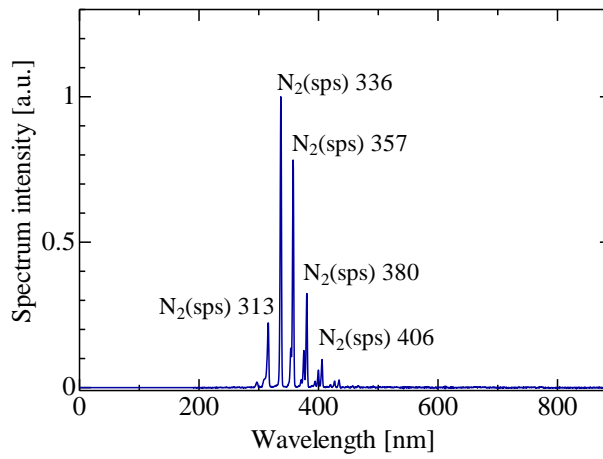


図 2-12 N<sub>2</sub> 導入時の発光スペクトル

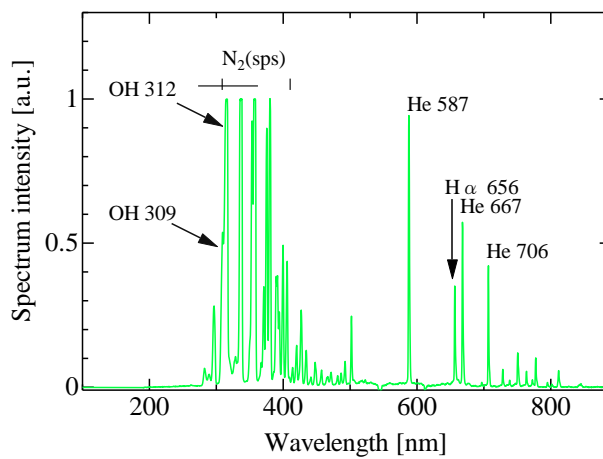


図 2-13 He 導入時の発光スペクトル

### 2.3 プラズマ照射による表面温度特性

本節ではプラズマ照射時の対象温度の変化を調べる。治療用途の場合、照射対象は水分量や導電率などが異なり、プラズマは大きく影響を受ける。従って、プラズマ照射対象として一般化されたモデルを提示することは難しい。そこで、本節では調理用の皮付き鳥モモ肉、人体組成を模擬した寒天培地、細胞実験で用いる液体培地に対して、プラズマの照射による表面温度の変化を評価した。温度分布は赤外線サーモグラフィ(NEC Avio H2640)を用いて計測した。

図 2-14 に、皮付き鶏モモ肉(厚み約 5 mm)に対し、ナノ秒パルス(Short pulse, 図 2-7 参照)を繰り返し周波数 30 Hz にて 10 分間照射した際の放電画像と温度分布を示す。電極間隔は 1 mm とし、放電は直径約 6 mm の範囲に様に照射されている。照射部分の中心(電極直下)は外円部に対して約 3.2 K の温度上昇を示しており、照射 1 分程度で温度上昇は落ち着きそれ以上の変化は確認されなかった。

図 2-15 および図 2-16 に、図 2-7 で示したナノ秒パルス(Short pulse)と通常のパルス(Long pulse)を繰り返し周波数 30 Hz とした場合の表面温度の分布および時間変化を示す。図 2-15 の対象は(a)-(b)寒天培地(厚み 4 mm, 寒天 1.5%wt), および(c)-(d)液体培地(DMEM)を用いた。中心部と外円部の温度差はそれぞれ(a)1.7 K, (b)7.0 K, (c)0.6 K, (d)1.1 K となった。寒天培地は対流による温度拡散が少ないため、液体培地に対して高温になったものと考えられる。また、Short pulse と Long pulse では、いずれも Long pulse の場合に温度上昇が大きい。その理由は、図 2-10 のパルス幅による放電様相の違いからも分かるように Long pulse では放電の維持時間が長くなり、放電路の熱化が進展するためであると考えられる。図 2-16 より、対象表面の温度は照射後からおおよそ 60 秒まで増加し、その後一定となる。

図 2-17 に、Long pulse による寒天培地へのプラズマ照射時の温度変化を示す。対象表面の温度上昇は照射時間の経過とともに上昇し、おおよそ 60 秒以降は一定となる。また、温度上昇の程度は周波数とともに増加する。直流高電圧電源の出力電力容量の制限のため、本実験装置で行う生体のプラズマ照射実験は繰り返し周波数を 30Hz としている。

ここでプラズマ照射時体の温度上昇がもたらす影響に関して、歯髄の神経細胞の場合、わずか 2.2 K の温度上昇で細胞が損傷をはじめ、5 K では 11%, 15 K では 60%の細胞が温度上昇により死滅する[50]ことが知られている。本実験では人体組成を模擬した寒天培地[51], [52]を用いた場合に、表面温度は Long pulse において 7.0 K 上昇した。ナノ秒パルスプラズマを用いることでより熱損傷の少ない低温プロセスを実現することが可能となる。

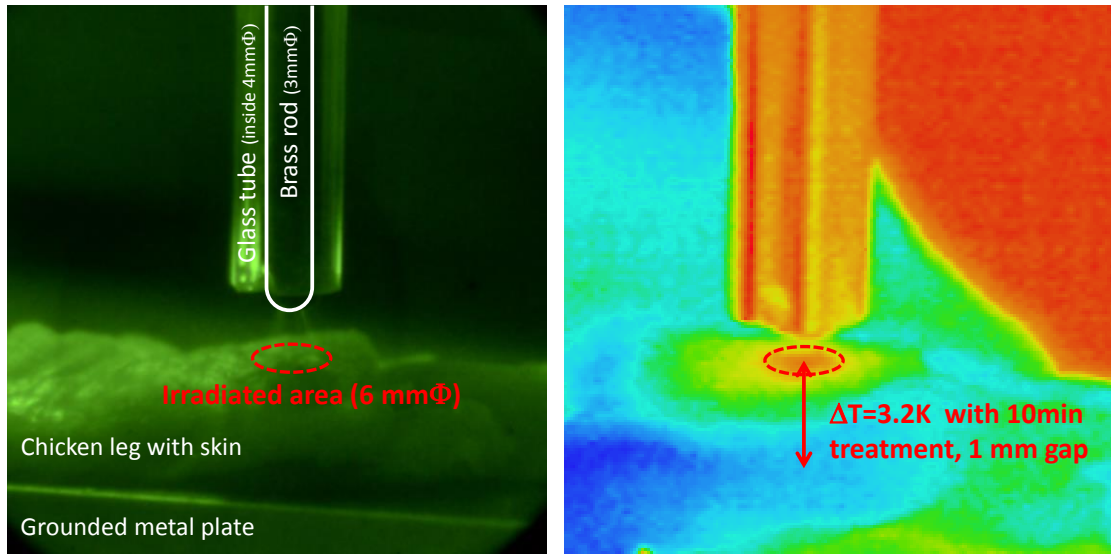


図 2-14 皮付きの鶏肉への照射時の放電様相と温度分布

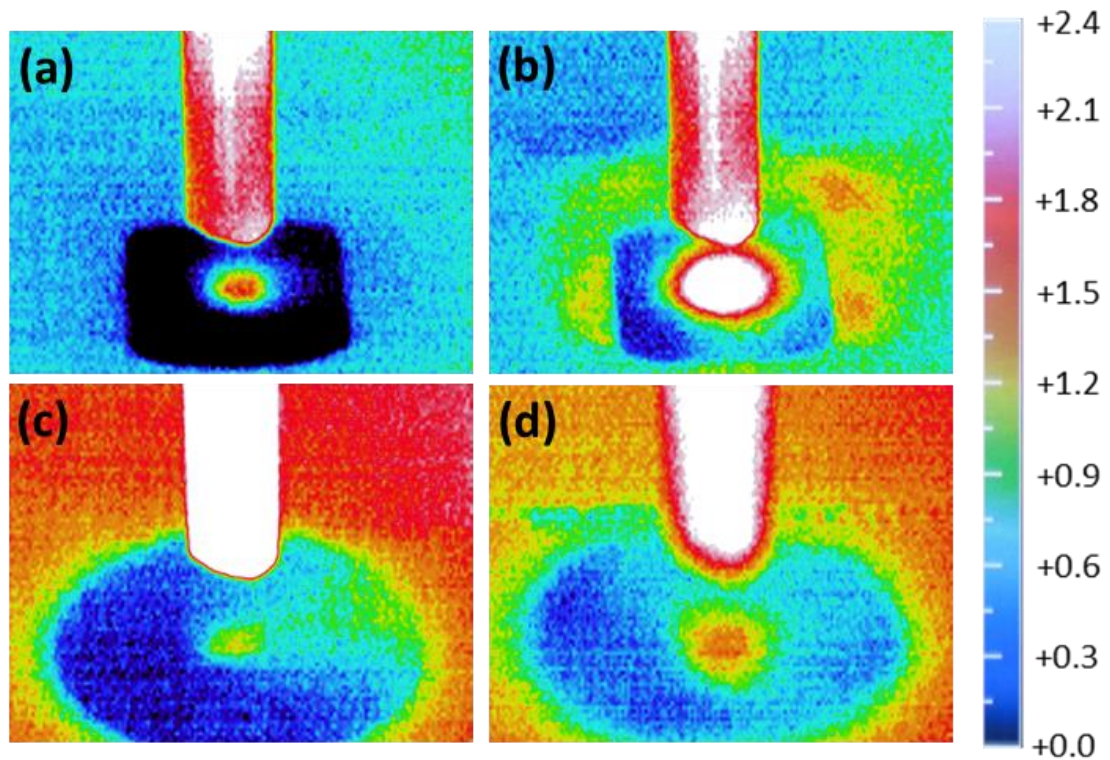


図 2-15 Short pulse(左)と Long pulse(右)によるプラズマ照射した時の表面温度の変化  
(寒天培地: (a) - (b), 液体培地: (c) - (d))

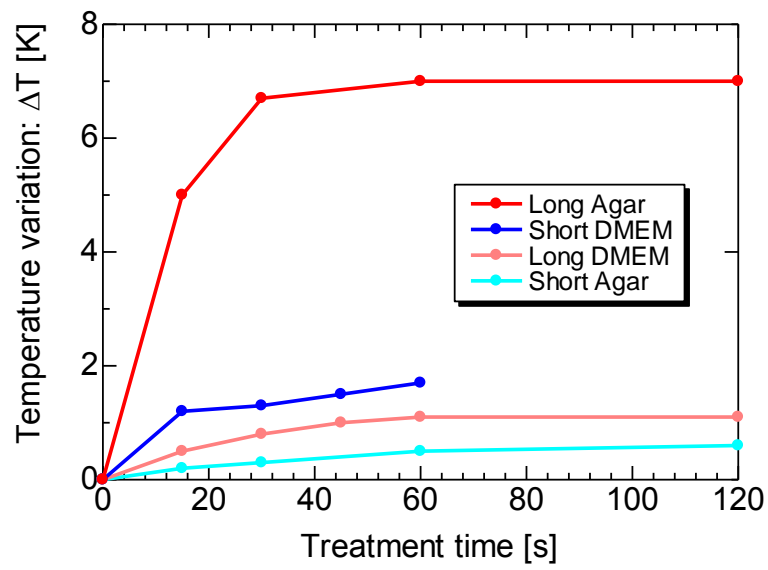


図 2-16 パルス幅および対象表面による温度上昇  
(パルス繰返 30Hz)

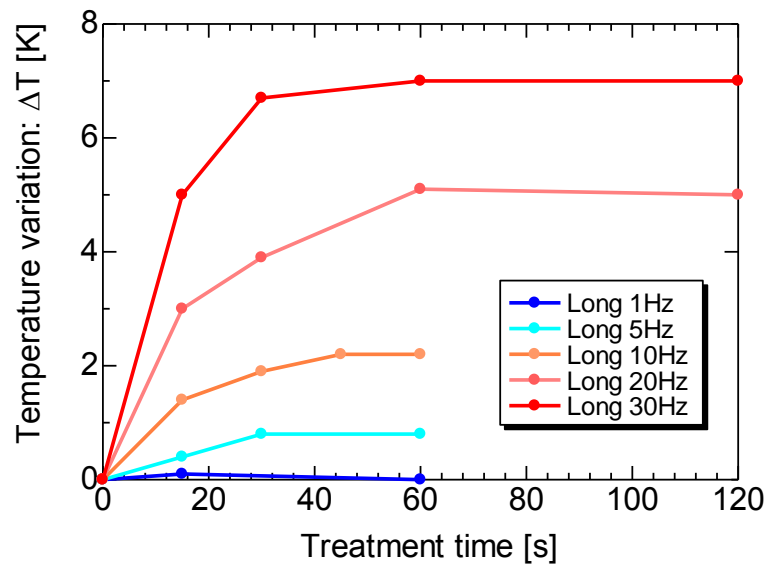


図 2-17 周波数による対象表面の温度上昇

## 2.4 プラズマ照射による副生成物

空気雰囲気下では副生成物としてNO<sub>x</sub>が生じる。これらは濃度により生体に有害となる場合がある。またNOは細胞内で生産され、シグナル物質として周辺組織に伝搬されることで毛管壁の平滑筋を弛緩させる働きを持つ。一方、NOは細胞外の酸素や水と反応して硝酸塩や亜硝酸塩になることも考慮すると、プラズマ照射による副生成物の供給は極力避けることが望ましい。そのためNO<sub>x</sub>を代表してNO計(Best Sokki Ltd. BCL511)により生成量を評価した。放電様相の観察のために、Image Intensifierユニット(Hamamatsu Photonics K. K., C9016)とCMOSセンサカメラ(Nikon Corporation, D3100)により放電画像を取得した。医療目的を想定すると実際の皮膚や寒天培地などが望ましいが、それらの表面は一般的に凹凸を持ち、ガス流による乾燥などで変化するため、長時間の計測に向かない。そのためプラズマ照射対象は背面に金属板を配置したガラス板を使用した(図2-18)。

NOの生成量はShort pulseとLong pulseにおいて、それぞれ0.7および9.6 ppmとなり、Short pulseによるNOの生成量はLong pulseの1/10以下である。NOは主に2次ストリーマ(後述)により生成されるため[53]、NO生成量の違いは2次ストリーマの伸展長と発生時間による違いから生じている。

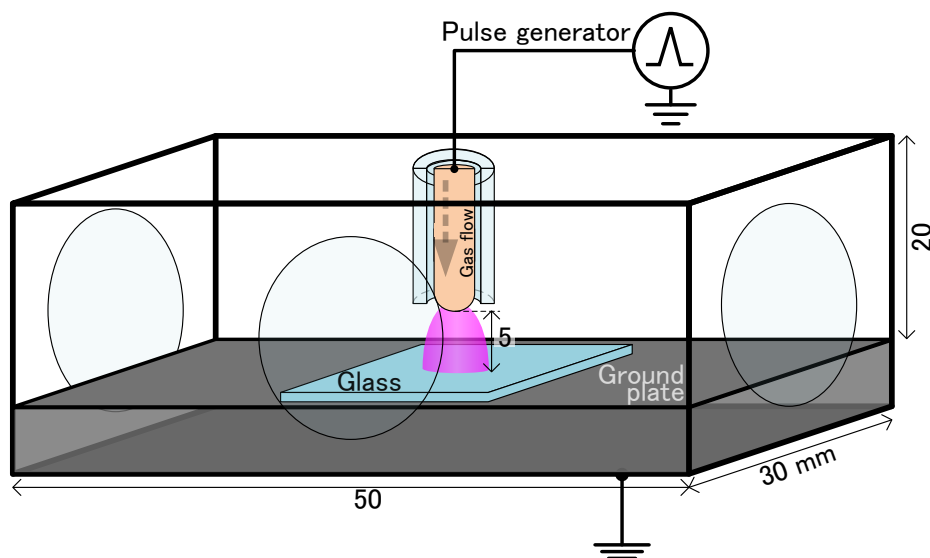


図 2-18 観測用ガス密閉容器

## 2.5 活性種の生成特性

図 2-19 に  $N_2$  second positive の発光強度分布を示す。導入ガスは模擬空気、相対湿度 20%とした。図 9 において、いずれの放電もストリーマと呼ばれる糸状の放電が観測される[54], [55]。Long pulse は Short pulse に比べ全領域で発光強度が大きく、ガラス板表面で沿面に放電が広がっている。図 10 は図 9 の垂直方向の発光強度分布を示す。Anode 近傍では両者の発光強度はおおよそ等しく、中央部分では Long pulse は Short pulse よりも発光強度が強い。また、対象表面付近の発光強度はおおよそ等しく、パルス波形によらず同程度の放電が対象に届いていることが分かる。

図 2-20 に一般的なパルス放電における進展過程の模式図を示す。電極間に電圧を印加すると、陽極から陰極に向けて 1 次ストリーマと呼ばれる糸状の放電が進展を開始する。1 次ストリーマが陰極に到達すると、電極間に電界が再度分配されることで、再度陽極から 2 次ストリーマと呼ばれる放電が進展を開始する。過度な電圧が印加されない限り 2 次ストリーマは電極間でとどまり、気体分子の加熱にエネルギーが消費される。ここで、プラズマ照射の対象となる陰極表面に対して、ラジカル生成源となる放電が届く機会は 1 次ストリーマの到達時のみであり、それ以降の 2 次ストリーマは陽極側でラジカルおよび荷電粒子を生成するものの、対流や拡散により対象表面へ供給される量は大きく減衰する他、2 次ストリーマによって電極間の領域で温度上昇が生じる。生体へのプラズマ照射を考えた場合、生体の加熱や有害な副生成物の生成は極力少ないことが望まれる。

図 2-19 の分布を取る理由として、2 次ストリーマの進展距離に違いがあるためである。Anode から 1 次ストリーマが進展し Cathode に到達すると、2 次ストリーマは 1 次ストリーマを追うように進展を開始し、その伸展長は印加電圧に依存する[56]。しかし同様の最大電圧値を印加したにも関わらず、Short pulse はパルス幅が短いため、2 次ストリーマが十分に進展する前に放電が終了すると考えることができる。一方で十分に高い電圧を印加しない限り、2 次ストリーマは対象表面に届かないため、1 次ストリーマのみが対象表面に到達し、化学活性な物質を供給することができる。その点で両者のパルスによる対象表面の発光強度は同程度になったものと考えられる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 2-19 電極間の発光強度分布

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 2-20 ストリーマ放電の進展過程



図 2-21 に、2 次元 LIF により取得した OH 分布 ((a)Short pulse, (b)Long pulse) を示す。OH 分布は放電 30 回分の積算であり、放電は棒状陽極からガラス面に向けておおよそ均一に分布した。図 2-22(左)に垂直方向の OH 分布を示す。図 2-22(右)にガラス表面上の OH 密度分布を示す。放電条件は図 2-21 と同じだが、計算領域はガラス面から 0.5 mm 分とした。図 2-21 における OH 分布は図 2-19 と同様の分布を成している。ガラス面上では 1 次ストリーマおよび沿面放電により生成された OH ラジカルはおおよそ 0.3mm 程度の厚みを持って分布していることが分かる。(その根拠：レンズ+I.I. unit と CCD カメラ全体の最小分解能[1 フォトンの広がり]=116  $\mu\text{m}$ )

OH ラジカルは放電チャンネル中で生成され[57]、主に 2 次ストリーマ中で形成される[58]。図 2-22 の垂直方向の OH 分布を見ると、電極間の中央部分で Long pulse による生成量は Short pulse よりも多い。一方、対象表面の OH 生成量は両者で同程度となっている。この理由は図 2-19 の放電様相から 2 次ストリーマの進展長の違い、および 1 次ストリーマのみが対象表面に到達するためである。また OH ラジカルは寿命が  $10^{-5}\sim 10^{-4}$  秒程度と短いため、対象近傍で生成された OH のみが表面に供給される。

OH に代表される化学的活性種を対象近傍で生成し、供給する直接方式のプラズマ照射方法において、ナノ秒パルス放電は、温度上昇および NO 生成量を抑制する優位性を持ち、さらに OH ラジカルの供給量は通常のパルス放電と同程度であり十分な医療効果を期待することができる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 2-21 LIF により観測した電極間の OH ラジカル分布

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 2-22 電極間の OH ラジカル分布：(左)垂直方向分布，(右)水平方向分布

## 2.6 まとめ

本章では本研究で提案するナノ秒パルスプラズマの発生装置，電源動作について述べた。また，通常のパルス放電と比較して，そのプラズマの物理的利点を述べた。

- **“ナノ秒パルスプラズマ”**：ナノ秒オーダーの短いパルス高電圧（最大電圧 24kV，パルス半値全幅 6.4ns）を印加することで，照射対象物と金属電極の間で放電プラズマを形成し，直接プラズマに対象物を曝す手法であり，そのプラズマ源の事を指す。
- **プラズマ照射装置**：円筒ガラス管(内径 4mm $\square$ )で覆われた棒状金属電極(3mm $\square$ )にパルス状高電圧を印加することで，ガラス管から流れる任意の雰囲気下において放電プラズマを生成することが出来る。
- **放電特性**：O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He ガス中で，放電様相や発光スペクトルの他，放電エネルギーや電力密度を調べた。
- **温度特性**：生体の模擬材料として，鳥モモ肉，寒天培地や細胞培養液に対してナノ秒パルスプラズマを照射し，その温度上昇が通常のパルス放電プラズマと比較して，生体に損傷を与えない程度の低温なプラズマ照射を可能にすることを示した。
- **副生成物**：プラズマ中で生成される副生成物のうち，生体影響の大きいと思われる NO 濃度を調べた結果，通常のパルス放電に比べ，ナノ秒パルスプラズマは NO 発生を 1/10 以下に低減し，およそ 0.7ppm(30Hz 照射時)であった。
- **活性種生成能**：放電様相の比較により，ナノ秒パルスプラズマは通常パルス放電と比べ，2 次ストリーマの進展長が短く，放電の熱化抑止に寄与しているほか，上記の副生成物の生成を低減する効果があった。また，対象表面付近での OH ラジカル密度は同程度であることから，生体表面に作用する活性種の生成能に違いは見られなかった。

以上より，ナノ秒パルス放電プラズマは，幅広いガス種類(O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He)においてプラズマ生成が可能であり，放電の熱化を抑制することが出来る。対象の温度上昇や副生成物の抑制に有効であることから，本研究の提案する“ナノ秒パルスプラズマは”低温で安全性の高い，プラズマ照射に有効な方法であると言える。

### 第3章 ナノ秒パルスプラズマによる活性種生成特性

生体の表面は湿潤な環境にあるため、プラズマ中で水分は様々な活性種源となる。さらに、計測対象の密度を知るためには、校正ガス中の水分量を知る必要がある。そのため、本章では、生体へのプラズマ照射を行う実験条件において、プラズマ領域の湿度分布を計測する。また、湿度環境が与える活性種生成への影響を評価する。

これまでの研究において、プラズマ中に含まれる活性種が種々の生体作用をもたらすと考えられている。1.3.6節に述べたように、酸素系活性種（ROS）は生体内外でも重要な役割を果たしており、プラズマの生体作用においても主要な役割を演じていると考えられる。そのため、本章ではプラズマ中で特に酸化力の強い酸素原子  $O(^3P)$  および、ヒドロキシルラジカル  $OH(X^2\Pi, v=0)$ 、そして生体シグナル物質として認識されている  $NO(X^2\Pi, v=0)$  を計測する。特に細胞実験を模擬した培養液の表面近傍における活性種密度を計測することで、プラズマ照射による活性種の投入量を見積もる。その上で、ガス構成比、およびガス流量（湿度）を変化させることで3種類の活性種を能動的に制御することを可能にする。

本節では、3.1 - 3.2 節でプラズマ計測手法およびレーザー誘起蛍光法の原理について述べる。3.3 節では、湿度分布計測と湿度環境下における活性種生成の影響について述べる。3.4 節以降では上記の  $NO$ 、 $OH$ 、 $O$  について液面近傍の活性種密度の計測結果について述べる。

#### 3.1 プラズマの分光計測

プラズマの物理的性質を把握したり、プラズマパラメータを制御するためには、正確で精密な計測が不可欠である。プラズマの計測には、プローブ計測、マイクロ波計測、分光計測、粒子計測（質量分析）などが挙げられる。大気圧低温プラズマの計測には、この中でも擾乱を与えない非接触の計測が重要であり、プラズマとの相互作用（透過、反射、散乱）を利用した光学的手法をしばしば用いる[59]–[67]。

光学的手法には、発光分光法とプラズマからの発光分析による粒子種の同定や密度の計測方法があり、発光スペクトル分布から振動・回転温度などの内部エネルギーを求めることが出来る。また、発光を伴わない粒子種に対して、逆にレーザー光を入射させることにより、準安定粒子やラジカル粒子の密度測定が可能である。

レーザー分光法は複雑な化学反応系における原子・分子の密度や温度の計測に適しており、高感度かつ時間・空間分解能に優れた手法である。本研究では主にプラズマ中の中性粒子を計測するため、ここではレーザー分光法の種類と特徴について述べる。[59]–[67]

##### (a) 発光分光法

プラズマの自然発光を直接分光計測する手法である。この手法は、計測対象が励起状態にあり、これが脱励起する際の蛍光を測定する。このため計測対象は励起状態の分子・原子・イオンに限られ、基底状態の物質は計測できないという短所を持つ。例えば空気放電において、窒素分子の電子励起準位  $N_2(C^3\Pi_u)$  が脱励起する際の蛍光を分光することで、放電直後のガス温度・ $N_2(C^3\Pi_u)$  密度等を計測することが出来る。同様の手法で、火炎中の赤色は励起酸素分子からの蛍光であり、これらを測定することで火炎中のガス温度を計測することができる。

### (b) ラマン散乱法

吸収、発光を用いない分子のレーザー計測法としてラマン散乱法がある。ラマン散乱は散乱光のエネルギーが入射光のエネルギーに対して測定対象分子の振動または回転エネルギー分だけ増減する現象である。ラマン散乱光のシフト(ラマンシフト)は散乱分子の振動定数によって決まり、波長の逆数となる波数(単位:  $\text{cm}^{-1}$ )で表される。入射光の波長を $\lambda_r$ とすると、ラマン散乱光の波長は次式によって与えられる。

$$\lambda_r = \left(\frac{1}{\lambda} - \Delta\nu\right)^{-1} \quad (3-1)$$

また、ラマン散乱光強度を決定するラマン散乱断面積 $\sigma_R$ は $\lambda^{-4}$ に比例するため、短波長レーザーを用いることで測定感度が向上する。ラマン散乱法は後述するLIF法と比較し、著しく感度が低いため、微量種の測定には適さず、窒素や酸素など密度の高い物質の測定に適している。

### (c) レーザー誘起蛍光法

レーザー誘起蛍光法(LIF: Laser-induced fluorescence)は、レーザーを用い特定の原子・分子のみを共鳴波長で励起させ、これが脱励起する際の蛍光を計測し、計測対象物質の密度や分布などを測定する手法である。LIF法は他の測定法と比較し計測感度が非常に高く、低密度物質の測定に適している。計測限界は約 $10^{10} \text{cm}^{-3}$ である。活性種密度は必ずしも高いとは限らないため、活性種計測に適した手法であるといえる。詳しい原理については後で述べる。

### (d) レーザー吸収法

レーザー吸収法とは、プラズマに特定波長のレーザーを照射し、レーザーの吸収度合からその波長に対応する分子の数密度を測定する手法である。光源としてレーザーの他、フラッシュランプなどのインコヒーレントな光源を用いる場合もある。この場合測定感度の点などではレーザーに劣るが、実験装置が非常に安価に構築できる。吸収長の長さが計測感度に大きく影響するため実際の計測では、光共振器を使用し、入射レーザーを被測定プラズマに対して多数回往復させることで、実効的な吸収長を増大させる手法が多く取り入れられている。

### 3.2 レーザ誘起蛍光法(LIF)の原理

レーザー誘起蛍光法(LIF: Laser-induced fluorescence)は前述の通り、ラジカルや分子の測定にしばしば利用され、感度の高い分光法である。図 3-1 に示すように、重率が 1 の準位を 2 つもつ系を挙げて LIF 法について説明する。各準位間の遷移において LIF 法は次の 3 つを考える必要がある。

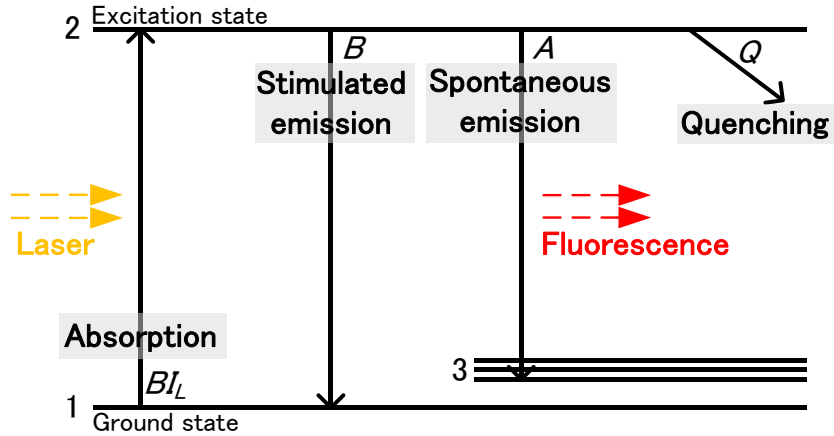


図 3-1 LIF 法の原理

**自然放射(Spontaneous emission) :** 励起状態にある粒子が一定時間を経過した後、自動的に下準位へとエネルギー準位に相当した光子を放出し、脱励起する過程である。エネルギー準位 2 における分布密度を  $N_2$  とすると、自然放射によるこの準位の密度減少は

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right) = -AN_2 \quad (3-2)$$

と表す。A は Einstein の A 係数である。放出光は全方位に均一であり、位相および偏光ともにランダムである。

**吸収(Absorption) :** エネルギー準位 1 の原子が励起準位とのエネルギー差に相当する光エネルギーを吸収して、励起準位へと遷移する過程である。エネルギー準位 1 における分布密度を  $N_1$  とすると、吸収による  $N_1, N_2$  の密度変化は

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right) = -\left(\frac{dN_1}{dt}\right) = BN_1 I_L \quad (3-3)$$

と表せる。B は Einstein の B 係数、 $I_L$  は光のエネルギー密度である。

**誘導放射(Stimulated emission) :** 光子吸収と逆の過程。2 つの準位間のエネルギーに相当する波長の入射光により、光子を放出して下準位へと遷移する。誘導放射による  $N_2$  の密度減少は

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right) = -BN_2 \quad (3-4)$$

と表すことができる。この場合、 $B$ は吸収過程と同じ Einstein の  $B$  係数である。誘導放射過程により放出される光子は、入射光とコヒーレントであるため、入射光はこの過程により増幅される。

**クエンチング(Quenching)** : 他の粒子との衝突過程である。衝突によりエネルギーを失うため、光子を放出することがない。クエンチング係数を  $Q$  とすると。この過程による  $N_2$  の密度減少は、

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right) = -QN_2 \quad (3-5)$$

上記の式(3.2)-(3.5) をまとめたレート方程式を以下に示す。

$$\frac{dN_1}{dt} = AN_2 - BI_L(N_1 - N_2) \quad (3-6)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = -(A + Q)N_2 + BI_L(N_1 - N_2) \quad (3-7)$$

レーザ光を入射する直前を初期状態  $N_1(0)=N_0$ ,  $N_2(0)=0$  とし、このレート方程式(3.6), (3.7)を解く。レーザパルス光を時間幅  $\tau$  の矩形波と仮定すると、最終的には

$$\begin{aligned} N_2(t) &= k_1 N_0 I_L (1 - e^{-(A+Q)t}) & (t \leq \tau) \\ &= k_1 N_0 I_L (1 - e^{-(A+Q)\tau}) e^{-(A+Q)(t-\tau)} & (t \geq \tau) \end{aligned} \quad (3-8)$$

と  $N_2$  は求められるので、自然放射による蛍光は

$$I_A = \int_0^\infty AN_2 dt \quad (3-9)$$

$$= k_1 AN_0 I_L \left\{ \int_0^\tau (1 - e^{-(A+Q)t}) dt + (1 - e^{-(A+Q)\tau}) \int_\tau^\infty e^{-(A+Q)(t-\tau)} dt \right\} \quad (3-10)$$

$$= k_2 AN_0 I_L \quad (3-11)$$

と表される。ただし  $k_1, k_2$  は  $\tau, A, B, Q$  によって決定される定数である。この時蛍光は基底状態の初期密度  $N_0$  に比例するため、LIF 信号として測定し密度を調べることができる。絶対密度を測定する場合は  $k_1, k_2$  を導出し、測定系の感度などを考慮に入れる必要がある。

### 3.3 湿潤表面の湿度分布計測

大気中の湿度計測は、古くから伸縮湿度計や乾湿湿度計が使用されているほか、多孔質セラミックや吸湿性高分子膜を有し容量や抵抗値の変動を検出する電気式湿度計が普及している[68]。また近年では、吸湿機構によるファイバー内の特性変化を応用した光学素子の研究[69]–[72]が盛んに行われており、特に Fiber Bragg grating と呼ぶ光ファイバー内の回折格子による湿度計測は汎用性が高く多点観測を可能にする[73]。一方で、これらの計測手法は空間・時間分解能に限度があり、装置による擾乱をもたらすため空間中の湿度分布の計測に適さない。

本研究では、水面および寒天培地に対してガス流を伴う湿度分布を、レーザー誘起蛍光法(LIF)により NO 分子の蛍光の減衰速度の変化を用いて計測した。NO は湿度計測に適した蛍光の減衰速度をもつため、微量の NO をトレーサーとして背景ガスに導入した。

#### 3.3.1 実験装置

図 3-2 に、実験系の概略を示す。NO( $X^2\Pi$ ,  $v=0$ )分子の励起源として、波長可変光パラメトリック発振器(OPO laser: Continuum, Sunlite EX)で発振したレーザー光を倍波発生器(SHG: Continuum, Sunlite FX-S)に入射させ、任意波長のレーザー光を得た。湿度計測時のレーザー光は幅 200  $\mu\text{m}$  のスリットを通すことで、図 3-3 に示す垂直方向分布を持ったビームを計測対象面に対して平行に入射させた。NO の蛍光は、迷光の影響を低減するためレーザーと垂直方向からレンズで集光し、干渉フィルタを用いて測定対象波長以外の光を遮断した後、光電子増倍管(PMT : Photomultiplier tube)により検出した。

図 3-4 にガス容器の概略を示す。アクリル製の密封容器(50×30×20  $\text{mm}^3$ )のなかに、石英ガラス管(内半径 2 mm, 厚み 1 mm)を水面(または寒天表面)から 5 mm 離して垂直に配置し、上端から任意のガスを流した。室内温度は 22°C (飽和水蒸気圧 2644 Pa, 数密度 2.61%) に設定した。また、ガラス管の内部には金属針を、水面から 5 mm 離して垂直に配置した。本実験の電源は、第 2 章で述べたナノ秒パルス(Short pulse)と同じである。針電極を使う理由は、現状の医療用プラズマ研究はプラズマジェットやプラズマニードル(1.4.3 節, [74])をよく使用しており、今回の計測結果による知見を広く適用したいと考えたためであり、より一般性の高い針形状電極とした。また、予備実験により針電極の有無による湿度分布の影響は無視できるほど小さいことが分かっている。計測対象として水面および寒天培地を用いた理由は、細胞実験における液体培地、および生体表面や殺菌実験を模擬した寒天を想定しているためである。



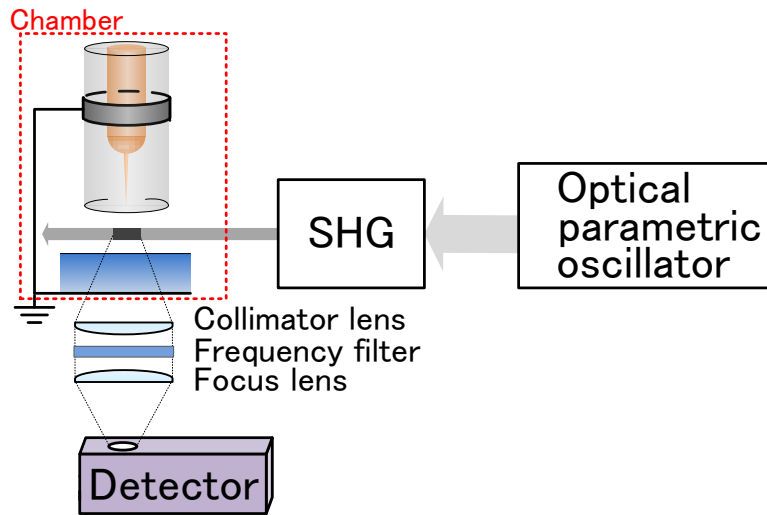


図 3-2 レーザー誘起蛍光法(LIF)による湿度計測の実験系

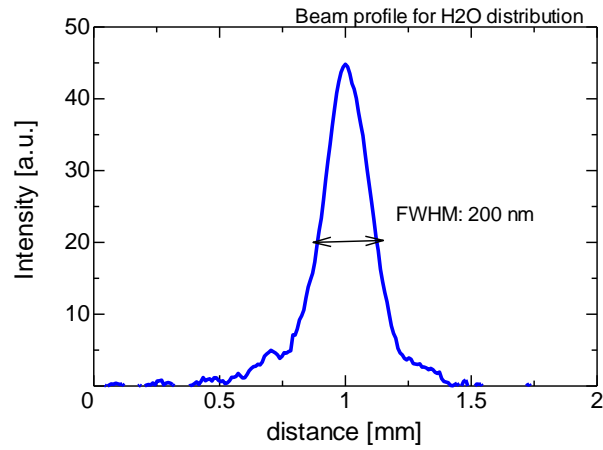


図 3-3 レーザービームの垂直方向分布

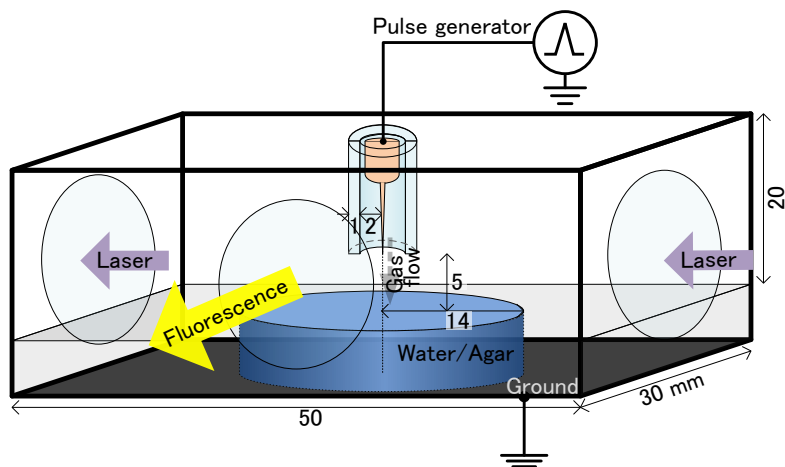


図 3-4 湿度計測におけるガス密閉容器

### 3.3.2 NO[X<sup>2</sup>Π, v=0]の LIF 計測

図 3-5 に湿度計測に用いる NO-LIF のエネルギー準位を示す[65], [75]。波長 226 nm に調整したレーザー光を雰囲気中(NO/N<sub>2</sub>)に照射することで、NO の基底準位 X<sup>2</sup>Π(v=0)から Q<sub>2</sub>(10)枝を使用して励起準位 A<sup>2</sup>Σ(v=0)に励起し、ここから下準位 X<sup>2</sup>Π(v=2, 3)に緩和する際の蛍光を観測する。このとき蛍光強度 I<sub>LIF</sub>は、レーザー光強度 I<sub>L</sub>と基底状態の粒子数密度 n<sub>1</sub>の積に比例し、

$$I_{LIF} = cB_{12}I_L n_1 \frac{A_{23}}{\Gamma_2} \quad (3-12)$$

となる[65], [75]。ここで、c は実験条件に依存する定数、B<sub>12</sub>は X<sub>2</sub>Π(v=0)-A<sub>2</sub>Σ(v=0)間の吸収係数、A<sub>23</sub>および Γ<sub>2</sub> = A<sub>23</sub>+Q<sub>2</sub>は自然放出係数および減衰係数(寿命の逆数)を表す。Q<sub>2</sub>は上準位 A<sub>2</sub>Σ(v=0)のクエンチング係数であり、各粒子のクエンチング係数を表 3-1 に示す。NO/N<sub>2</sub> 雰囲気を加湿する場合、H<sub>2</sub>O のクエンチ速度が支配的であるため、蛍光の減衰速度は H<sub>2</sub>O 密度に依存する。NO の蛍光の減衰波形は光電子増倍管 (PMT) により取得し、300 回分を平均した。NO 密度は 100 ppm 以下で使用することでレーザーパワーに対して線形であることを確認しており、本研究では NO-LIF 信号を十分観測できる範囲であり、かつ NO によるクエンチングの影響を抑えるため、NO 密度を 50 ppm として使用した。

一般的なプラズマ医療の細胞・臨床実験は開放系(大気中)で実施される。一方、本実験はガスチャンバー(図 3-4)内において、NO/N<sub>2</sub> ガスを吹き流すことで行う。この理由は、NO をトレーサーとして導入し NO 励起種のクエンチング速度を利用した計測を行うためである。トレーサーの条件は①背景ガスによるクエンチングより H<sub>2</sub>O によるクエンチングが桁違いに大きい。②そのクエンチングによる減衰がレーザーパルス幅よりも十分に長い時間で起こることである。今回の実験では、窒素に対して H<sub>2</sub>O のクエンチング速度が 910 倍大きいいため、少量の H<sub>2</sub>O の存在に対して、励起種の減衰速度が大きく増加するためである。同様に空気中に存在する酸素に対してもクエンチング速度が大きい(表 3-1)、本実験を開放系で行うことはできない。

図 3-6 に任意の湿度における(a)NO-LIF 信号の時間変化、および(b)NO-LIF の減衰時定数と湿度の関係を示す。レーザーのパルス時間幅は約 3 ns であり、レーザー強度が 6%以下に収まった時刻を図 3-6(a)における t=0 としているため、レーザーによる誘導吸収・放出および迷光の影響を受けずに、NO-LIF 信号の減衰時間を計測することができる。湿度校正には、2 段のバブリング飽和層(水中で乾燥ガスをバブリングすることにより水蒸気で飽和したガスを得ることができる)を利用し、およそ 100%RH の湿度環境を実現した後、乾燥ガスと混合することで任意の湿度を実現した。これにより蛍光の減衰速度を観測することで、測定領域の空間中の湿度を見積もることが出来る。また、図 3-6(b)に示した理論曲線は、[NO]=50 ppm として表 3-1 のクエンチング係数より算出したものである。理論曲線はおおよそ実測値と一致している。一方、低湿度域と高湿度域で多少のずれがあるが、実測値から湿度と減衰時刻の関係(校正値)を求めるため、精度には影響がない。実験では容器を高さ方向に 0.2 mm、水平方向に 1 mm 間隔で移動し、レーザー照射領域をスライドすることにより任意の領域の湿度を取得し、2次元の湿度分布を計測した。

次に本計測の時空間分解能と測定精度について述べる。計測領域は、レーザービームの断面積および蛍光観測に用いるスリット幅により決定する。本実験ではレーザー断面積(0.2×1 mm<sup>2</sup>)と、幅 1 mm のスリットを用いたため、計測領域(空間分解能)は 0.2 mm<sup>3</sup>程度となる。時間分解能は NO の減衰時間(5-220 ns)程度である。そのため、本手法は極めて高い空間・時間分解能を得ることができる。一方、本計測は高湿度領域において減衰時定数の差分が小さくなる。LIF 信号の計測はサンプリング周期 200 ps のオシロスコープにより行うため、最大で 8%RH の誤差が生じる。

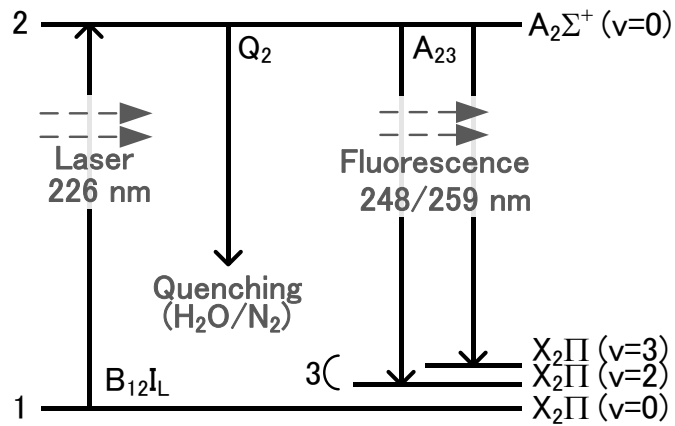


図 3-5 NO-LIF のエネルギー遷移図

表 3-1 NO(A)のクエンチング係数

Collider	Coefficient at 300K [cm <sup>3</sup> /s]
NO [100]	$2.3 \times 10^{-10}$
N <sub>2</sub> [100]	$\sim 8.3 \times 10^{-14}$
O <sub>2</sub> [100]	$1.6 \times 10^{-10}$
H <sub>2</sub> O [101]	$7.58 \times 10^{-10}$
Collision free lifetime [101], [102]	210-220 ns

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-6 (a)任意湿度における NO-LIF 信号の時間変化、(b) 湿度と NO-LIF 信号減衰の校正曲線とクエンチング係数から求めた理論値

### 3.3.3 湿潤表面の湿度分布

図 3-7 に各条件における湿度分布を示す。(a)は装置概略と計測領域、(b)-(c)は寒天表面上に対して乾燥ガス(NO: 50 ppm)の流量 0.1 および 0.3 L/min、(d)-(f)は水面上に 0.05、0.1 および 0.3 L/min とした場合の相対湿度分布である。密閉容器ではなく、ガス流がない開放空間の場合、長時間の質量変化から求めた水面の平均的な蒸散速度は 16 mg/h/cm<sup>2</sup> である。この速度は密閉容器内部を 10 秒程度でほぼ飽和状態 (100% RH) にするほど高速である。寒天表面と水面のいずれにおいても、背景ガスがほぼ 100% の環境に対し、乾燥ガス流量が増えることでガラス管出口から対象表面に対して、相対湿度の低い (乾燥) 領域が広がる。0.3 L/min では乾燥空気が対象表面に到達した後、水平方向に広がる様子を確認できる。これ以上の流速を与えた場合も同様に乾燥領域が拡大する。

図 3-8 に対象表面近傍の ( $r$ -axis,  $z = 0$ ) の相対湿度分布を示す。相対湿度は、いずれの流量・対象においても中心軸から離れるほど上昇する。これは対象面から供給された水分を含みながらガスが中心軸から外側に向かって流れているためだと考えられる。同流量における寒天と水面の湿度を比べると、中心軸地点では水面のおよそ 6-7 割となる。これは寒天より水面から蒸発量が多いためである。

図 3-9(a)に水面上の垂直方向( $z$  軸,  $r=0$ )の湿度分布を示す。計測に使用したビーム強度は垂直方向に半値幅約 200  $\mu\text{m}$  のガウス分布を持つため、図 3-9(a)で示した湿度は計測領域内の平均値を表す。つまり、垂直方向の分解能は 200  $\mu\text{m}$  程度である。流量が大きくなるほど高湿度域は狭く、界面近傍でわずかに湿度の上昇が確認できるほどである。一方、水面は湿度 100% であることが知られており[76]、高流量・高流速では境界層が極めて狭く、本計測の分解能以下になっていると考えられる。つまり、100  $\mu\text{m}$  以下の領域で湿度が急激に上昇していることが予想される。一方、流量が小さい 0.05 L/min の場合、界面から高湿度域が広がる。前述のように、液界面は理論的に 100%RH になるため、実測値は界面近傍で約 90%を示しているが、これは高湿度域に生じる計測誤差の可能性があり、おおよそ 100%RH であると考えられる(3.3.2 計測誤差の記述を参照)。

図 3-9(b)に、水平方向から強制対流(層流)を与えた場合に現れる表面付近の一般的な湿度分布の模式図を示す[76]。表面近傍は拡散により水蒸気が運ばれる拡散層と対流が支配的な対流層に区分される。拡散層では Fick の法則[77]により湿度勾配が線形になることが知られており、拡散層内は活性種の原料となる水分が多分に含まれた領域である。ところで、本実験における流れは垂直方向から水平方向に変化しており、図 3-9(a)のモデルを厳密に適用することはできない。しかし、本実験でも上流は移流、表面近くは拡散が支配的なことは明らかで、かつ湿度分布( $r=0$  の  $z$  軸方向)の形状が図 3-9 (a)に似ているため、本実験でも拡散層と定義する。拡散層内部は移流が支配する領域と異なり、大量の水分を含み、水由来の活性種(OH など)が大量に生成される特別な領域である。また、これらの活性種は一般に寿命が数 100  $\mu\text{s}$  と短いため、水面近傍で作られた活性種は唯一水面や生体と直接反応することが出来る。そうした意味で拡散層の厚みを議論することは重要である。また、本実験のように医療用プラズマ装置の典型的な実験系において、拡散層の厚さを計算することは困難であるため、本研究のような湿度分布の計測が必要になる。

図 3-9(c)に、図 3-9(a)から求めた拡散層の厚み( $z$ -axis,  $r=0$ )を示す。図 3-9(a)の分解能は計測域(200  $\mu\text{m}$ )分の平均値を表す。一方、液界面近傍は図 3-9(b)で示したように比較的線形な分布を持つことが知られている。そのため、垂直方向の計測ステップを 50  $\mu\text{m}$  とすることで、ビーム高さ(200  $\mu\text{m}$ )以下の領域を観測することが出来る。結果として、ガス流量の増加とともに拡散層は 0.05 L/min 時の 960  $\mu\text{m}$  から急激に減少し、1 L/min 時に 130  $\mu\text{m}$  となることが示された。一方、高流量・高流速において、拡散層の厚みは本計測の分解能以下になっていることも予想されるため、これ以上の界面近傍についての議論は難しい。繰り返しになるが、この拡散層内はそれ以外の

領域と比較して、湿度が高く、活性種の原料となる水分を大量に含んでいる。また、この拡散層は界面近傍に位置することから、水分由来で寿命の短い活性種は液面との反応に関与することが出来る。次節では、水分由来の短寿命活性種の代表例である OH ラジカルの計測を行い、界面近傍の湿度環境が及ぼす活性種生成への影響を評価する。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため、表示できない。

図 3-7 NO-LIF による湿度分布計測の結果：(a)計測領域、(b)-(c)寒天上でガス流量 0.1 と 0.3 L/min、(d)-(f)水面上で 0.05-0.3L/min

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため、表示できない。

図 3-8 水面および寒天表面上での径方向の湿度分布( $z \doteq 0$  mm)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-9 (a)垂直方向の湿度分布、(b)水平向きの流れ場における理想的な湿度分布、(c)拡散層の厚み

### 3.3.4 湿度環境下の活性種生成

前節では、湿潤対象に向けて乾燥ガスを流した際の湿度分布を計測したが、ガス流量によりその分布は大きく影響されることが判明した。湿潤表面へのプラズマ照射が想定される医療分野や表面処理において、湿度分布はプラズマ形成および活性種密度に大きく影響を及ぼすことが考えられる。そのため本節では、最大の酸化力を持つ活性酸素種であり、水分を原料として生成される OH ラジカルについてその生成量およびプラズマ照射対象の表面への供給量を調査する。

図 3-10 に OH-LIF で用いるエネルギー準位を示す[78], [79]。波長 282 nm に調整したレーザー光をプラズマ中に照射することで、基底準位  $X^2\Pi(v=0)$  にある OH を  $P_1(3)$  枝により励起準位  $A^2\Sigma(v=1)$  に励起し、ここから下準位  $X^2\Pi(v=1,0)$  に緩和する際の蛍光を観測する。このとき蛍光強度  $I_{LIF}$  は、レーザー光強度  $I_L$  と基底状態の粒子数密度  $n_1$  の積に比例し、

$$I_{LIF} = cB_{12}I_L n_1 \left( \frac{A_3 Q_v}{\Gamma_2 \Gamma_3} + \frac{A_2}{\Gamma_2} \right) \quad (3-13)$$

となる[79]。ここで、 $c$  は実験条件に依存する定数、 $B_{12}$  は  $X^2\Pi(v=0)$ - $A^2\Sigma(v=1)$  間の吸収係数、 $A$  及び  $\Gamma$  は自然放出係数および減衰係数（寿命の逆数）であり、 $A$ ,  $\Gamma$  における添字の 3, 2 はそれぞれ  $A^2\Sigma(v=0)$ ,  $A^2\Sigma(v=1)$  準位に関わるものである。 $Q_v$  は  $A^2\Sigma(v=1)$ - $A^2\Sigma(v=0)$  の振動緩和係数である。各準位の  $A$  係数および  $B$  係数は計算することができるので[80], [81], 蛍光強度から  $X^2\Pi(v=0)$  状態の OH ラジカル密度を求めることが出来る[57], [79], [82]–[85]。

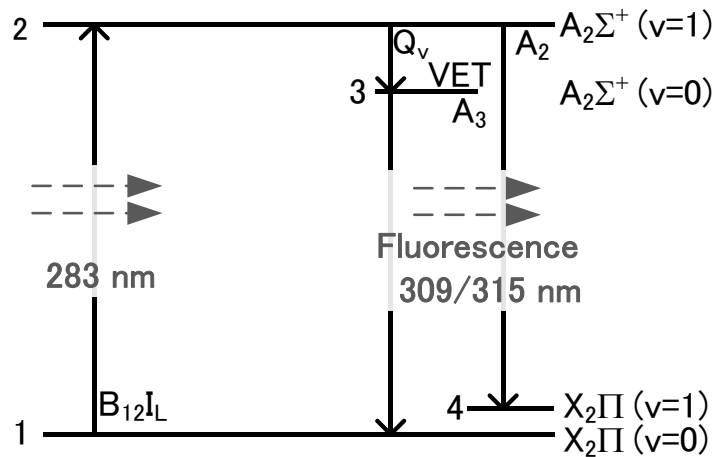


図 3-10 OH-LIF のエネルギー遷移図

図 3-11 に、OH-LIF の実験系を示す。OH ラジカルを生成するため、2 章で述べたナノ秒パルス電圧をガス容器内の針電極に印加することで放電プラズマを発生させた。パルス高電圧はパルスジェネレータによる放電トリガ信号に同期し、チャンバー内の金属針に印加する（図 3-4）。放電トリガに対しレーザー発振トリガを遅延させることで、放電から 3  $\mu$ s 後にレーザーを入射した。レーザー断面積は高さ 5  $\times$  幅 1 mm<sup>2</sup> として金属電極と水面の間の全域に対して水面と平行にレーザーを入射した。OH ラジカルの蛍光は ICCD カメラを用い、放電 100 回分を平均することで 2 次元分布を取得した。

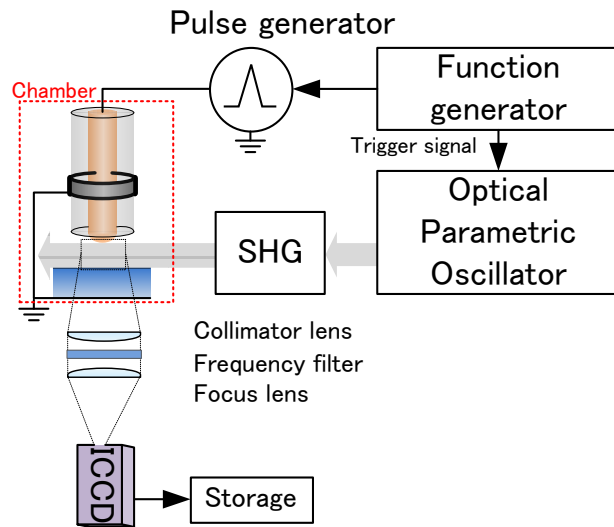


図 3-11 OH-LIF の実験系

#### (a) 均一湿度環境での OH ラジカル計測

湿度は放電形成そのものに強く影響するため、水面上の複雑な湿度環境下では湿度分布と放電形成やラジカル生成を同時に議論することは難しい。そのため、水面上の計測の前に、均一な湿度環境の下で放電形成および OH ラジカル生成への湿度依存性を調査した。

実験はガラス板で覆われた平板電極と針電極を 5 mm の間隔で配置し、導入ガス( $N_2$ , 流量 0.5 L/min)を加湿することで放電空間全域を均一な湿度環境に設定した。その上で、ナノ秒パルスプラズマが生じた際の放電様相、消費電力、窒素  $N_2$ (second positive)の発光強度、および OH ラジカル密度を計測した。

図 3-12 に窒素雰囲気下で湿度を 0, 20, 100%とした場合の放電プラズマの発光分布 ( $N_2$  second positive)を示す。写真は放電 30 回分の積算値である。写真では雰囲気ガス中の湿度環境により、放電の広がりや発光強度に違いがみられる。

加湿雰囲気下での消費電力(図 3-13),  $N_2$ (second positive)の発光強度(図 3-14), および OH ラジカル密度(図 3-15)を示す。加湿により消費電力は減少し, RH0%と比較して RH100%では 59%まで低下する。放電の発光強度も同様に減少し, RH100%において 35%まで低下する。つまり, 湿度の増加に対して放電の強度は低下する傾向にある。一方, OH ラジカル密度は加湿により 40%まで増加し, その後飽和する。この傾向は先行研究とおおよそ一致する[79]。

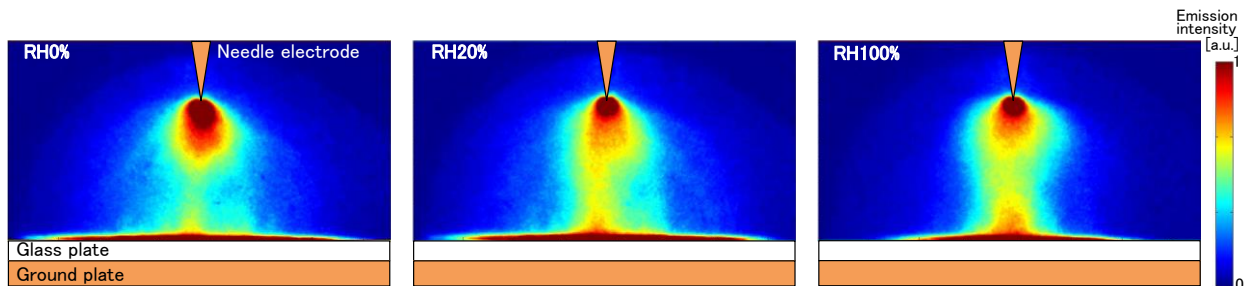


図 3-12 導入ガスを加湿した際の  $N_2$ (second-positive)発光分布



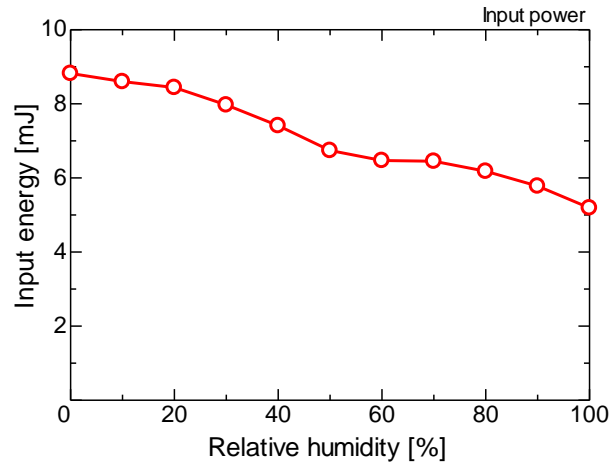


図 3-13 導入ガスを加湿した際の投入電力

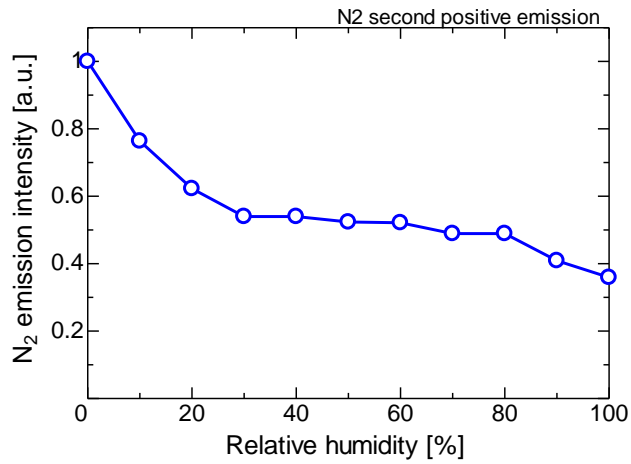


図 3-14 導入ガスを加湿した際の N<sub>2</sub>(second-positive)発光強度の (放電 30 発分, 全域の積算値)

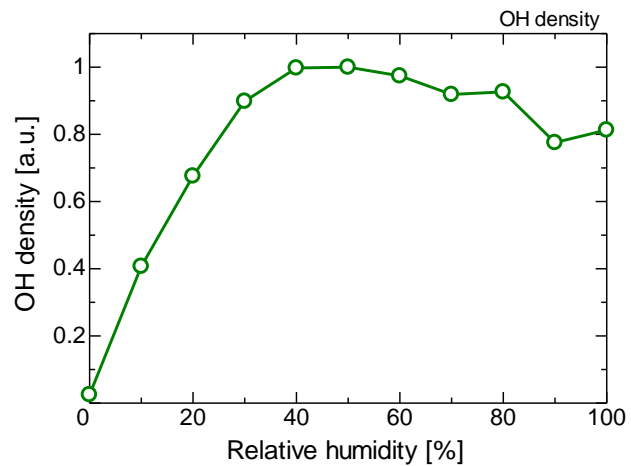


図 3-15 導入ガスを加湿した際の OH ラジカル生成量 (放電後 3 μs 時の放電全域)

### (b) 湿潤表面上での OH ラジカル計測

図 3-16 に、水面に向けて乾燥窒素を流した際の放電様相 ( $N_2$  second positive) と OH ラジカルの 2 次元分布を示す。OH ラジカル計測において各点でのクエンチング係数は湿度に大きく依存するため、ここでは図 3-7(d)-(f)の湿度分布より各点のクエンチング係数を補正した。導入ガスの流量を 0.01-0.3 L/min とした場合、ガス流量が増加するほど窒素の発光強度は増加し、針先と水面の間でストリーマ放電が形成される。また、ガス流量の増加に伴い電極間の OH ラジカルの生成量は低下する。これは、ガス流量が増加することで、電極間の水面近傍まで乾燥したガスが届くためであり、2.2 節(図 3-14, 図 3-15)でも示したように、湿度を減らすと  $N_2$  second positive の発光量は増加し、OH ラジカルの生成量が低下する結果と定性的に一致する。ところで、放電様相 (図 3-16(a)-(c)) では水面上を沿面放電が  $r=5$  mm ほど進展していることが分かる。一方、図 3-16(d)-(f)において、OH は  $r=0-3$  mm の領域内に多く、発光分布と一致しない。これは、観測領域の違いに起因している。つまり、放電様相を示す窒素発光は  $r=0$  mm を中心に軸対象に広がる放電領域全体を観測しており、奥行方向を積分している。一方、OH ラジカルは金属針を中心にレーザー幅の 1 mm 分を積分しているため、軸対称かつ糸状に伸展する沿面放電に対して中心は毎回観測できるのに対し、外側ほど計測領域から外れやすく観測されない OH ラジカルが存在することになる。そのため、針中心から離れた部分でその違いが生じている。

図 3-17 に、各流量における OH ラジカル密度の時間変化を示す。放電発生後 3  $\mu$ s から 1000  $\mu$ s までのタイミングでレーザーを照射することで、放電発生から各時刻のラジカル密度を計測した。計測領域は  $z=0-0.2$  mm である。ここでは OH ラジカルの減衰時定数は  $\tau_{OH}=20-100$   $\mu$ s であることが分かる。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-16 流量 0.05-0.3L/min による(a)-(c) $N_2$ (second positive)の発光、(d)-(f)OH ラジカルの密度分布

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-17 各流量における OH ラジカル密度の時間変化(計測領域  $z=0-0.2$  mm)

### 3.3.5 考察

本実験の結果から、水面や寒天培地のように水分を含む対象に対して放電を照射する場合、表面から水分の供給が多分に存在し、乾燥ガスの流量（流速）に依存して湿度分布が劇的に変化する。また、電極間の湿度により放電形成やラジカル生成量が大きく変化することが分かった。

ここでは、水面に到達する OH の供給量について考えてみる。まず、ガス流量により水面上の湿度分布は大きく変化し、拡散層の厚みは  $1000\ \mu\text{m}$  から  $100\ \mu\text{m}$  程度まで減少することが分かった(図 3-9(c))。この拡散層とは拡散により粒子が移動する領域であり、対流の影響を受けにくいと考えられる。この領域で生成された OH ラジカルもまた拡散によって移動することになる。一方、プラズマ中で生成された OH の減衰寿命  $\tau_{\text{OH}}$  は  $\tau_{\text{OH}}=20-100\ \mu\text{s}$  程度と非常に短い。この時間内に OH ラジカルが拡散しながら進む距離（平均 2 乗変位） $L_{\text{diff}}$  は、

$$L_{\text{diff}} = \sqrt{2D_{\text{OH}} \cdot \tau} \cong 30 - 65\ \mu\text{m} \quad (3-14)$$

であり、湿度分布の拡散層の厚みよりも短い。ここで、 $D_{\text{OH}} \cong 0.22\ \text{cm}^2/\text{s}$  は OH ラジカルの拡散係数である。図 3-18 に水面上の湿度分布の模式図を示す。2つの条件として(a)ガス流量の少ない  $0.05\ \text{L}/\text{min}$ 、および(b)流量の多い  $1\ \text{L}/\text{min}$  を想定している。OH ラジカルの生成量は湿度に大きく依存する(図 3-15)ため、拡散層の内部で多くの OH ラジカルが生成される。今回、OH ラジカルの拡散距離は  $65\ \mu\text{m}$ ( $0.05\ \text{L}/\text{min}$ )および  $30\ \mu\text{m}$ ( $1\ \text{L}/\text{min}$ )であるため、(a)流量が少ない場合、図 3-18(a)のラインと  $65\ \mu\text{m}$  で囲まれた台形（水玉模様の部分）の内部で生成された OH は拡散により水面に供給されることになる。一方、(b)流量の多い場合、図 3-18 (b)のラインと  $30\ \mu\text{m}$  で囲まれた台形（横線模様）の内部から供給される。つまり、湿度分布の拡散層の内部、かつ OH 拡散距離以内の領域で生成された OH ラジカルのみが水面に供給され、生体に作用する。

図 3-19 に、ガス流量における界面の OH ラジカルの供給量を示す。図 3-16 より OH 密度は領域  $z=0-65\ \mu\text{m}$  の OH ラジカル密度平均を取得した。また、図 3-17 より OH ラジカルの時間変化を時間積分して密度の積をとる

ことにより、図 3-19 の OH ラジカル供給量は水面近傍( $z=0-65 \mu\text{m}$ )での OH ラジカル密度の時間積分を表している。流量の増加に伴い、OH ラジカル供給量は減少する。一方、ガス流量を 1 L/min まで増加すると最大値から 6%程度まで減少するが、水面近傍では未だに OH ラジカルが存在する。加えて、高流量領域では、より水面近傍で湿度上昇が顕著になるため、計測領域内の OH ラジカル量は同じであったとしても、より近傍で生成された OH ラジカルは界面到達までに減衰が少なく、より高密度の活性種供給が可能になると考えられる。従って、高流量・高流速ほど OH 供給量は過小評価されており、計測結果よりも多くの OH ラジカルが供給されると期待できる。

本実験では流量の多い 1 L/min の場合において乾燥領域が広がるため、一見 OH ラジカルの発生がないと考えられる状況にあっても、実際には水面近傍で湿度が増加する領域が観測され、放電が界面に到達することで OH ラジカルの生成が確認された。従来、乾燥ガス中では OH ラジカルが出来ないと考え、種のバイオ実験(殺菌・生体組織)が取り扱われてきたが、湿潤対象を用いた場合、乾燥ガス中で完全に OH ラジカルを排除することが困難であることを示す重要な知見である。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-18 液体界面へ供給される OH ラジカルの見積り

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-19 液体界面へ供給される OH ラジカルの流速依存性: 界面近傍( $0-65 \mu\text{m}$ )の OH 密度  
を、放電後 3-100  $\mu\text{s}$  分の時間積分より導出

### 3.4 液面近傍の活性種計測と活性種供給量の制御

本章ではこれまで細胞実験を模擬した液体界面上の湿度分布がガス流量により大幅に変化し、界面への活性種供給量も影響を受けることを報告した。本節ではその知見を活かし、界面への活性種供給量を能動的に制御しようと試みる。冒頭で述べた通り、プラズマ中の全ての活性種を計測することは難しいため、今回は生体への影響の大きい  $\text{NO}(\text{X}^2\Pi, v=0)$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}$  の3種類の活性種を計測し、上記のガス流量の他に、ガス構成比( $\text{O}_2/\text{N}_2$ )をパラメータとして、これら活性種の生成割合を調整(制御)する。以下では、全体に共通する計測装置と手法について述べた後、 $\text{NO}$   $\text{OH}$ ,  $\text{O}$  の順番に計測結果を報告する。

#### 3.4.1 活性種計測の実験方法

図 3-20 に、レーザー誘起蛍光法(LIF)の計測系を示す。全体の構成は 3.3 節と同様に、各活性粒子の励起源として、波長可変光パラメトリック発振器(OPO laser: Continuum, Sunlite EX)で発振したレーザー光を倍波発生器(SHG: Continuum, Sunlite FX-S)に入射させ、任意波長のレーザー光(横 1 mm×高さ 1 mm)を円筒型レンズ( $f=200$  mm)により垂直方向に集光した。焦点付近ではエアリーディスクと呼ばれる回折限界が存在するため、最小のビーム高さ  $d$  mm は、

$$d = 2.44 \frac{\lambda \cdot f}{D} \cong 110 \mu\text{m} \quad (3-15)$$

となる。ここで、 $\lambda$ はレーザー波長 226 nm,  $f$ は焦点距離 200 mm,  $D$ は開口半径(元のビーム半径)0.5 mm である。図 3-21 のようにレーザー光路に蛍光ガラスを配置し、その蛍光を拡大レンズ付きのデジタルカメラで取得した。図 3-22(a)は取得したビームの蛍光強度分布であり、図 3-22(b)に垂直方向のビーム半値幅とビーム強度を示す。ここからビーム幅は式(3-15)で求めた値と同程度になることがわかる。レーザー光はビーム進行方向に対して全観測域(約 20 mm)に渡り平行であり、ビーム幅は一定であることがわかる。そのため、計測時に界面等でビームの遮断や反射の影響を低減し、界面から 100  $\mu\text{m}$  の領域を観測することが出来る。各活性粒子の蛍光は、迷光の影響を低減するためレーザーと垂直方向からレンズで集光し、スリット(横幅 1 mm)を用いることで電極直下(1×1 mm<sup>2</sup>)の領域から発生する蛍光のみを取得する。つまり、本実験の観測領域は 1×1×0.1 mm<sup>3</sup>である。さらに干渉フィルタを用いて測定対象波長以外の光を遮断した後、光電子増倍管(PMT: Photomultiplier tube)により検出した。

図 3-23 にガス容器の概略を示す。アクリル製の密封容器(50×30×20 mm<sup>3</sup>)のなかに、石英ガラス管(内半径 2 mm, 厚み 1 mm)を細胞培養液 RPMI から 5 mm 離して垂直に配置し、上端から任意のガスを流した。室内温度は 22°C (飽和水蒸気圧 2644 Pa, 数密度 2.61%) に設定した。また、ガラス管の内部には金属電極(先端曲率半径 1.5mm)を、液面から 5 mm 離して垂直に配置した。印加電圧は第 2 章で述べたナノ秒パルス(Short pulse)である。照射対象に細胞培養液を選んだ理由は、同実験条件で細胞実験を行い、活性種と細胞生存率の関連を調べるためである。細胞培養液を用いるに当たり、質量変化から求めた水分蒸散速度がほぼ等しいことから液面上の湿度分布は水面と変化がないと考えられる。本節で行う 3 種類の活性種計測は全てこの計測系を使用する。

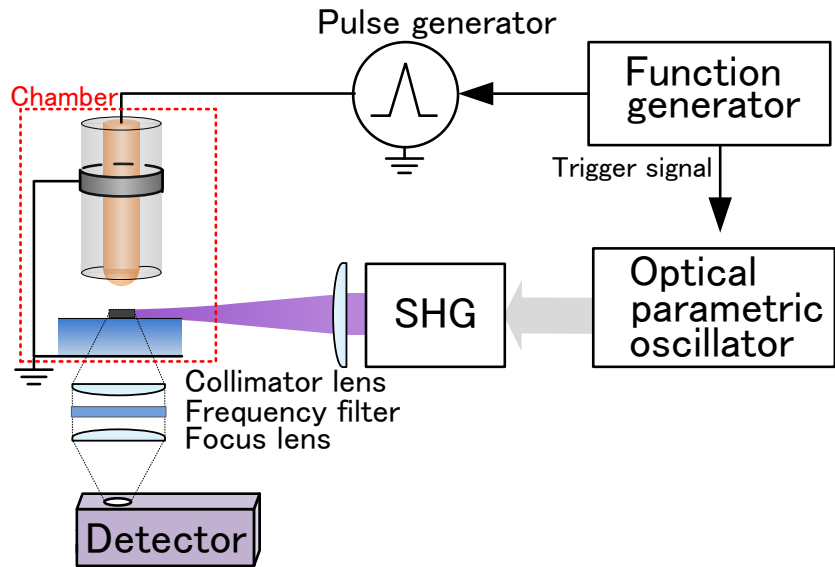


図 3-20 レーザー誘起蛍光法(LIF)によるラジカル計測の実験系

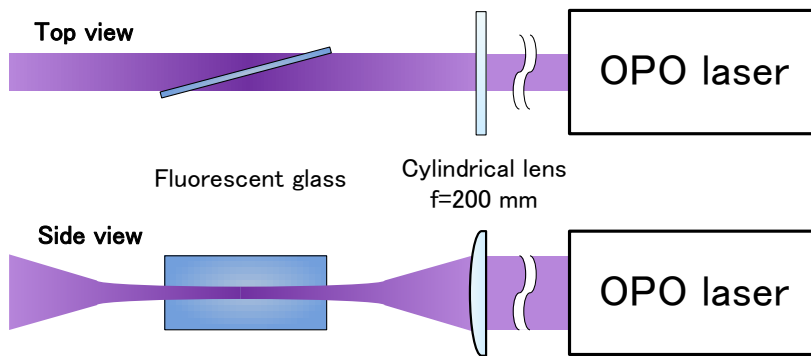


図 3-21 ビームプロファイルの評価方法

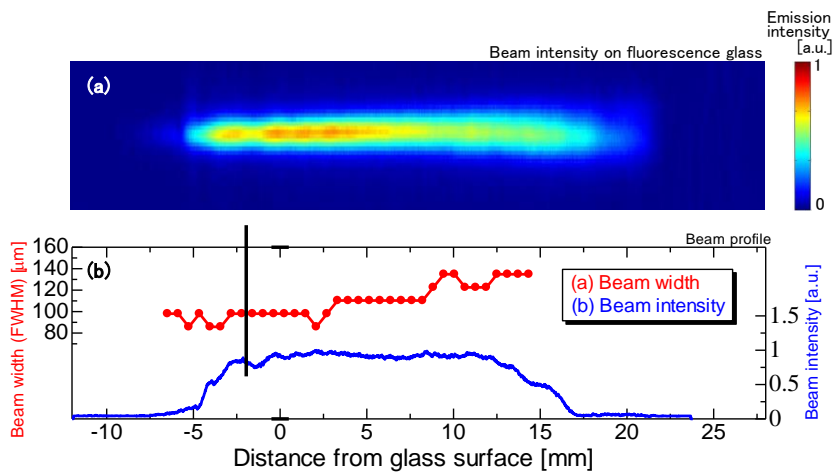


図 3-22 ビームプロファイル

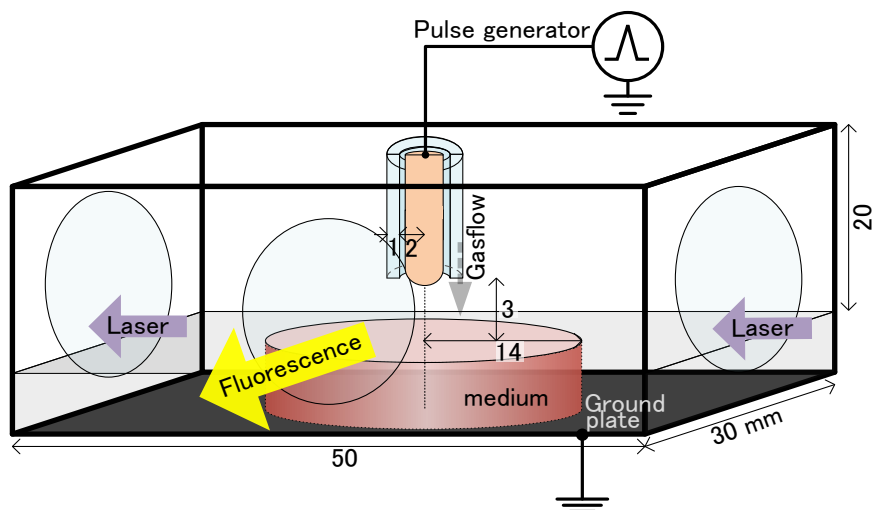


図 3-23 活性種計測時のガス密閉容器

### 3.4.2 NO ラジカルの計測

NO( $X^2\Pi$ ,  $v=0$ )の計測原理は 3.3.2 節ですでに述べた。絶対密度の導出のために、標準ガス NO(1000ppm)/N<sub>2</sub> を別個の N<sub>2</sub> ガスと混合することで任意の密度に設定し、計測領域の NO 濃度と NO-LIF 強度を校正した。また、3.4.1 節で述べたように計測領域(縦横高さ: 1×1×0.1 mm<sup>3</sup>)は電極直下の培養液表面に接触するように設定した。

#### (a) 界面近傍の NO 密度

図 3-24 に、ガス構成比(O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>)を変化させた際の NO 密度を示す。計測時刻は放電終了から 3 μs 後としており、計測時の放電ノイズに影響を受けない最短の時刻である。ガス流量の条件は 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 L/min としている。酸素密度が 20-60%の広範囲において NO 密度が高い。これは NO 生成の原料となる O<sub>2</sub> と N<sub>2</sub> の両者が必要であるため、予想通りの結果と言える。

図 3-25 に、ガス構成比およびガス流量を変化させた際の NO 密度を示す。これは図 3-24 を 2 次元グラフとして表したものであり、黒点が計測点を表し、中間は各計測点を平均した値を示している。3.3.3 節の湿度分布計測の結果(図 3-9(a))より、各流量と湿度の関係は表 3-2 のように対応している。そのため、グラフの横軸はガス流量に加え相対湿度を表示する。計測点のうち、最大の NO 密度は[O<sub>2</sub>]=50%, 0.5 L/min のとき、 $1.7 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ である。

表 3-2 ガス流量と液界面近傍の湿度の関係

ガス流量[L/min]	液界面の湿度[%RH]
0.05	100
0.1	64.7
0.3	18.0
0.5	6.9
1.0	2.5

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-24 酸素濃度に対する NO 密度（放電から 3  $\mu$ s 後）

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-25 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の NO ラジカル密度（放電から 3  $\mu$ s 時）



(b) NO 密度の時間変化

前節の 3.4.2(a)において、放電後 3 μs 時点の NO ラジカル密度を計測した。一方、放電後の NO 密度は経時的に変化するため、プラズマ照射対象への活性種の供給量を評価するためには、活性種密度の時間変化を観測する必要がある。本節では NO 密度の時間変化について述べる。

図 3-26 に、酸素濃度に対する NO 密度の時間変化を示す。ガス流速は 1 L/min であり、計測領域の平均湿度は 2.5%RH である。酸素濃度の増加により減衰速度は増加し、減衰時定数は  $\tau(1/e)=700\text{-}5000 \mu\text{s}$  である。表 3-3 に、中性分子による NO の主な分解反応とその反応係数を示す。反応相手の粒子(N, O, NO<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>)のうち、N, O は減衰時間が 100 μs 以内と短いため、比較的長寿命かつ密度が高い O<sub>3</sub> との反応(No.4)が主体になるものと考えられる。

表 3-3 中性粒子による NO 分解反応[86], [87]

No.	反応	反応係数 [cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ]
1	N + NO → N <sub>2</sub> + O	3 × 10 <sup>-11</sup>
2	O + NO + O <sub>2</sub> → NO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-31</sup> (300/T) <sup>1.6</sup>
3	O + NO + N <sub>2</sub> → NO <sub>2</sub> + N <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-31</sup> (300/T) <sup>1.6</sup>
4	O <sub>3</sub> + NO → O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub>	4.6 × 10 <sup>-14</sup>
5	NO + O → O <sub>2</sub> + N	1.39 × 10 <sup>-11</sup> exp(-19400/T)
6	NO + NO <sub>3</sub> → 2NO <sub>2</sub>	2 × 10 <sup>-11</sup>
7	NO + NO <sub>3</sub> → 2NO + O <sub>2</sub>	2.71 × 10 <sup>-11</sup> T <sup>-0.23</sup> exp(-947/T)
8	OH + NO + M → HNO <sub>2</sub> + M	

図 3-27 と図 3-28 は、酸素濃度 20% および 80% における NO 密度の時間変化を示す。ガス流速を 0.05-1.0 L/min とすることで、計測領域の平均湿度は 100-2.5%RH(表 3-2)となる。どちらの酸素濃度においても、低流量・高湿度環境下で減衰時間が早くなる。これは湿度環境で OH ラジカルが生成され、主に反応(No.8)により NO 密度が減少するためだと予想される。

本研究のプラズマはパルス状に発生するため、プラズマ発生後の活性種は指数関数的に減衰する。液体表面に届く活性種を評価するためには、対象である液体近傍の活性種を継時的に評価する必要がある。一方、界面に存在する活性種が全て液体内で化学反応に寄与するとは限らないため、ここでは界面近傍の活性種量がある一定の割合で液体内の反応に寄与すると仮定して、活性種近傍において時間積分した活性種量を“活性種の投入量”と定義した。

図 3-29 に、ガス構成比(O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>)およびガス流量を変化させた際の NO ラジカル投入量を示す。各条件(ガス構成比とガス流量)において、液体界面への活性種の投入量  $n_{dose}$  を以下の式より求めた。

$$n_{dose} = \int_{t=3\mu s}^{\tau} n_t dt \quad [s \cdot cm^{-3}] \quad (3-16)$$

ここで、 $n_t [cm^{-3}]$  は各時刻における OH ラジカル密度、 $\tau [s]$  は減衰時定数を表す。各時刻の活性種密度および減衰時定数は図 3-27 および図 3-28 より求めた。ここでの投入量  $n_{dose}$  はパルス放電の繰り返し周波数を 1 Hz として計算しており、『4 章：細胞実験』では 30 Hz とするため、 $n_{dose} \times 30 [s \cdot cm^{-3}]$  となる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-26 酸素濃度に対する NO 密度の時間変化

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-27 ガス流量に対する NO 密度の時間変化(酸素濃度 20%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-28 ガス流量に対する NO 密度の時間変化(酸素濃度 80%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-29 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の NO ラジカル投入量

### 3.4.3 OH ラジカルの計測

OH( $X^2\Pi$ ,  $v=0$ )の計測原理は3.3.4節にて述べた。ここでは絶対密度の導出のため、本研究室の中川雄介さん(2011年度卒)によるOH-LIF計測の手法を参考にした[66], [79]。3.4.1節で述べたように、計測領域(縦横高さ:  $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3$ )は電極直下の培養液表面に接触するように設定した。

#### (a) 界面近傍のOH密度

図3-30に、ガス構成比( $O_2/N_2$ )を変化させた際のOH密度を示す。計測時刻は放電終了から3  $\mu\text{s}$ 後とした。ガス流量の条件は0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 L/minである。放電中の酸素濃度や湿度の影響は本研究室により、反応過程の詳細な検討がなされており[65]、ガス流量が少ない条件では計測領域の湿度がより高くなるため(図3-9)、水分を原料とするOHラジカルの生成量が増加する。また、中性粒子によるOHの主な分解反応(表3-2)から、酸素濃度が増加した場合、再結合反応(No.1-2)に加えて、酸素原子と高速に反応するため、OHラジカルが減少したと予測される。

表 3-4 中性粒子によるOH分解反応[88], [89]

No.	反応	反応係数 [ $\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ ]
1	$\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$	$5.56 \times 10^{-20} T^{2.42} \exp(970/T)$
2	$\text{OH} + \text{OH} + \text{M} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{M}$	$6.9 \times 10^{-31} (T/300)^{-0.8} [\text{N}_2]$
3	$\text{O} + \text{OH} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}$	$2.0 \times 10^{-10} T^{0.352} \exp(113/T)$
4	$\text{O}_3 + \text{OH} \rightarrow \text{HO}_2 + \text{O}_2$	$1.9 \times 10^{-12} \exp(-1000/T)$

図3-31に、ガス構成比およびガス流量を変化させた際のOHラジカル密度を示す。これは図3-32を2次元グラフとして表したものであり、黒点が計測点を表し、中間は各計測点を平均した値を示す。3.3.3節の湿度分布計測の結果(図3-9(a))より、各流量と湿度の関係(表3-2)より、グラフの横軸に相対湿度を表示した。計測点のうち、最大のOH密度は $[\text{O}_2]=0\%$ 、0.05 L/minのとき、 $1.7 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ である。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-30 酸素密度に対する OH 密度

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-31 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の OH ラジカル密度 (放電から 3  $\mu s$  時)

## (b) OH 密度の時間変化

3.4.3 節(b)において、放電後 3  $\mu\text{s}$  時点の OH ラジカル密度を計測した。一方、放電後の OH 密度は経時的に変化するため、プラズマ照射対象への活性種の供給量を評価するためには、3.4.2 と同様に活性種密度の時間変化を観測する必要がある。本節では OH 密度の時間変化について述べる。

図 3-32 と図 3-33 に、酸素濃度 20% および 80% における OH 密度の時間変化を示す。ガス流速を 0.05-1.0 L/min とすることで、計測領域の平均湿度は 100-2.5%RH(表 3-2)となる。どちらの酸素濃度においても、低流量・高湿度環境下で減衰時間が早くなる。これは湿度が高い環境で OH ラジカルがより多く生成され、主に再結合反応(No.1-2)により OH 密度が減少するためだと予想される。また、酸素濃度 20% における減衰時定数は  $\tau(1/e)=20-80 \mu\text{s}$  であるのに対し、酸素濃度 80% では  $\tau(1/e)=8-65 \mu\text{s}$  と短い。この違いは、酸素原子やオゾンとの反応(表 3-4, No.3-4)が寄与していると予想される。

本研究のプラズマはパルス状に発生するため、プラズマ発生後の活性種は指数関数的に減衰する。液体表面に届く活性種を評価するためには、対象である液体近傍の活性種を継時的に評価する必要がある。一方、界面に存在する活性種が全て液体内で化学反応に寄与するとは限らないため、ここでは界面近傍の活性種量がある一定の割合で液体内の反応に寄与すると仮定して、活性種近傍において時間積分した活性種量を“活性種の投入量”と定義した。

図 3-34 に、ガス構成比( $\text{O}_2/\text{N}_2$ )およびガス流量を変化させた際の OH ラジカル投入量を示す。各条件(ガス構成比とガス流量)において、液体界面への活性種の投入量  $n_{\text{dose}}$  を以下の式より求めた。

$$n_{\text{dose}} = \int_{t=3\mu\text{s}}^{\tau} n_t dt \quad [\text{s} \cdot \text{cm}^{-3}] \quad (3-17)$$

ここで、 $n_t[\text{cm}^{-3}]$  は各時刻における OH ラジカル密度、 $\tau[\text{s}]$  は減衰時定数を表す。各時刻の活性種密度および減衰時定数は図 3-32 および図 3-33 より求めた。ここでの投入量  $n_{\text{dose}}$  はパルス放電の繰り返し周波数を 1 Hz として計算しており、『4 章：細胞実験』では 30 Hz とするため、 $n_{\text{dose}} \times 30 [\text{s} \cdot \text{cm}^{-3}]$  となる。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 3-32 ガス流量に対する OH 密度の時間変化(酸素濃度 20%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-33 ガス流量に対する OH 密度の時間変化(酸素濃度 80%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-34 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の OH ラジカル投入量

### 3.4.4 O ラジカルの計測

#### (a) TALIF 法の原理

ここでは O( $3P$ )の計測に用いる 2 光子吸収レーザー誘起蛍光法(TALIF : two-photon absorption laser-induced fluorescence)について述べる[90], [91]。

酸素ラジカルは全角運動量の違いにより、わずかにエネルギー差のある 3 つの基底準位( $2p^3P$ ,  $J=0, 1, 2$ )を持つ。この基底準位を励起するには真空紫外が必要であるが、酸素原子に吸収されるため空气中を伝搬できない。この場合、真空紫外よりも波長の長い光子を 2 つ吸収させて励起する (2 光子吸収)。図 3-35 に、酸素原子ラジカルの TALIF 測定原理を示す。基底準位の O ラジカルは 226 nm の光子を 2 つ吸収して励起準位( $3p^3P$ ,  $J=0, 1, 2$ )へ遷移する。励起準位も同様に 3 つ存在するがこれらは測定上区別する必要がないほどエネルギー準位が接近している。励起した O ラジカルは自然放射により 845 nm の光子を放出して下準位に落ちる( $3p^3P \rightarrow 3s^3S$ )。この 845 nm の発光強度から基底準位の密度を測定する。基底準位  $2p^3P$  と励起準位  $3p^3P$  の数密度  $N_1$  と  $N_2$  は、以下のレート方程式により表される。

$$\frac{dN_1}{dt} = -\sigma I_L^2 N_1 \quad (3-18)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \sigma I_L N_1 - (A + Q + \sigma_{pi} I_L) N_2 \quad (3-19)$$

$I_L$  はレーザー強度、 $A$  と  $Q$  は励起準位  $3p^3P$  の自然放出係数およびクエンチング係数、 $\sigma$  は  $2p^3P \rightarrow 3p^3P$  の 2 光子吸収断面積、 $\sigma_{pi}$  は  $3p^3P$  のイオン化吸収断面積である。これを LIF と同様の条件 (レーザー強度が十分に弱く、 $\sigma_{pi} I_L \ll Q$  かつ  $\sigma I_L^2 \ll Q$  が成立する場合) で解くと、TALIF 信号強度  $I_{TALIF}$  は、

$$I_{TALIF} = c \frac{\sigma_{pi} I_L^2}{Q} N_1^0 \tau \quad (3-20)$$

となる。ここで、 $\tau$  はレーザーパルス幅、 $c$  は集光効率を示す。

式(3-20)より、信号強度はレーザーパワー密度の 2 乗に比例し、基底準位にある酸素原子ラジカルに比例する。2 光子吸収断面積  $\sigma$  は通常の吸収断面積に比べて小さいため、計測感度が劣る。そこで、レーザー光を集光しながら TALIF 信号強度を増大させる手法をとる。本計測でも 3.4.1 で述べたように、円筒型レンズにより集光する。一方、上記の仮定によりレーザー強度は制限されるため、計測領域のレーザー強度を見積もる必要がある。本計測では図 3-22 から求めたビーム断面積( $1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ )中に、レーザーパルス幅 3 ns 程度のレーザー( $0.1 \text{ J/pulse}$ )を用いるため、レーザー強度はおよそ  $33 \text{ MW/cm}^2$  となり、(式 3-20)を適用することが出来る。計測領域(縦横高さ :  $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3$ )は NO や OH と同様に、電極直下の培養液表面に接触するように設定した。



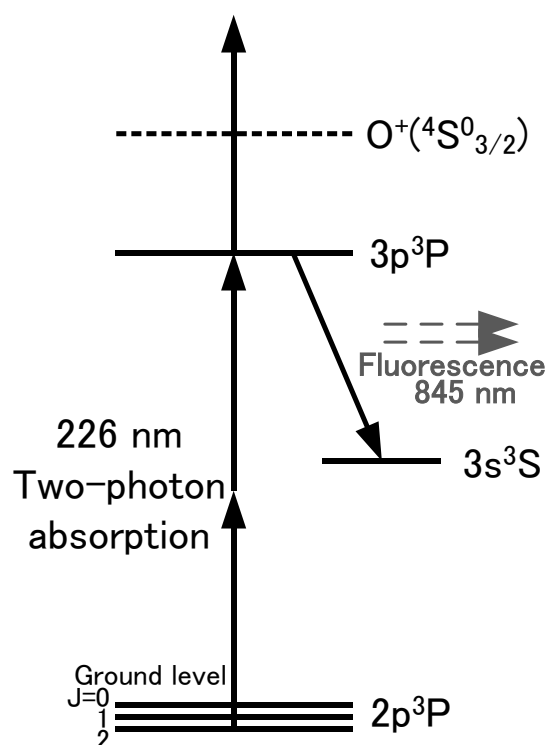


図 3-35 TALIF 計測に用いる酸素原子のエネルギー準位

### (b) 界面近傍の O 密度

図 3-36 に、ガス構成比( $O_2/N_2$ )を変化させた際の O ラジカル密度を示す。計測時刻は放電終了から  $3 \mu s$  後とした。ガス流量の条件は 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 L/min である。エラーバーは 0.5 L/min において、放電 10 発分の標準偏差を示す。いずれの流量においても、酸素濃度が大きくなるにつれて O 密度が増加し、 $[O_2]=80\%$ 以上では減少する。O ラジカルは酸素分子を原料として電子解離や励起原子・分子との解離反応により生成される[[86], [92]–[95]]。一方、 $[O_2]=80\%$ 以降の O 密度の減少が生じる原因は酸素濃度 90-100%で O 密度のバラつきが大きく、毎回の放電が比較的弱く、かつ不安定になるためだと推測される。

図 3-37 に、ガス構成比およびガス流量を変化させた際の O ラジカル密度を示す。これは図 3-36 を 2 次元グラフとして表したものであり、黒点から求めた計測点を表し、中間は各計測点を平均した値を示す。3.3.3 節の湿度分布計測の結果 (図 3-9(a)), 各流量と湿度の関係 (表 3-2) より、グラフの横軸に相対湿度を表示した。計測点のうち、最大の O 密度は $[O_2]=80\%$ , 1.0 L/min のときである。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-36 酸素密度に対する O 密度 (放電後 3  $\mu$ s)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-37 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の O ラジカル密度 (放電から 3  $\mu$ s 時)

### (c) O 密度の時間変化

3.4.3 節(b)において、放電後 3 μs 時点の O ラジカル密度を計測した。一方、放電後の O 密度は経時的に変化するため、プラズマ照射対象への活性種の供給量を評価するためには、3.4.2 と同様に活性種密度の時間変化を観測する必要がある。本節では O 密度の時間変化について述べる。

図 3-38 に、酸素濃度に対する O 密度の時間変化を示す。ガス流速は 1 L/min であり、計測領域の平均湿度は 2.5%RH である。酸素密度の増加により減衰速度は増加し、減衰時定数は  $\tau(1/e)=12\text{-}34 \mu\text{s}$  である。表 3-5 に、中性分子による O ラジカルの主な分解反応とその反応係数を示す。酸素濃度が増加するほど反応相手の酸素やオゾンの密度が増加するためであると考えられる。

表 3-5 中性粒子による O 分解反応[86], [88], [89], [95]

No.	反応	反応係数 [ $\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ ]
1	$\text{O} + \text{O}_2 + \text{M} \rightarrow \text{O}_3 + \text{M}$	
2	$\text{O} + \text{O} \rightarrow \text{O}_2$	
3	$\text{O} + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}_2$	
4	$\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{OH}$	
5	$\text{O} + \text{OH} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}$	$2.0 \times 10^{-10} T^{0.352} \exp(113/T)$

図 3-39 と図 3-40 に、酸素濃度 20%および 80%における O 密度の時間変化を示す。ガス流速を 0.05-1.0 L/min とすることで、計測領域の平均湿度は 100-2.5%RH(表 3-2)となる。どちらの酸素濃度においても、低流量・高湿度環境下で減衰時間が早くなる。3.4.3(b)でも述べたように高湿度下では OH ラジカルが多く生成され、 $\text{H}_2\text{O}$  や OH と分解反応(No.4-5)が進むためではないかと考えられる。また、酸素濃度 20%における減衰時定数は  $\tau(1/e)=7\text{-}16 \mu\text{s}$  であるのに対し、酸素濃度 80%では  $\tau(1/e)=6\text{-}10 \mu\text{s}$  と短い。この違いは、酸素原子・分子やオゾンと反応(No.1-3)するためであると予想される。

本研究のプラズマはパルス状に発生するため、プラズマ発生後の活性種は指数関数的に減衰する。液体表面に届く活性種を評価するためには、対象である液体近傍の活性種を継時的に評価する必要がある。一方、界面に存在する活性種が全て液体内で化学反応に寄与するとは限らないため、ここでは界面近傍の活性種量がある一定の割合で液体内の反応に寄与すると仮定して、活性種近傍において時間積分した活性種量を“活性種の投入量”と定義した。

図 3-41 に、ガス構成比( $\text{O}_2/\text{N}_2$ )およびガス流量を変化させた際の O ラジカル投入量を示す。各条件(ガス構成比とガス流量)において、液体界面への活性種の投入量  $n_{\text{dose}}$  を以下の式より求めた。

$$n_{\text{dose}} = \int_{t=3\mu\text{s}}^{\tau} n_t dt \quad [\text{s} \cdot \text{cm}^{-3}] \quad (3-21)$$

ここで、 $n_t[\text{cm}^{-3}]$ は各時刻における O ラジカル密度、 $\tau[\text{s}]$ は減衰時定数を表す。各時刻の活性種密度および減衰時定数は図 3-39 および図 3-40 より求めた。ここでの投入量  $n_{\text{dose}}$  はパルス放電の繰り返し周波数を 1 Hz として計算しており、『4 章：細胞実験』では 30 Hz とするため、 $n_{\text{dose}} \times 30 [\text{s} \cdot \text{cm}^{-3}]$ となる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-38 酸素濃度に対する O 密度の時間変化

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-39 ガス流量に対する O 密度の時間変化(酸素濃度 20%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-40 ガス流量に対する O 密度の時間変化(酸素濃度 80%)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-41 ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量を変化させた際の O ラジカル投入量

#### 3.4.5 活性種(NO, OH, O)投入量の制御

ここまで 3 種類の活性種(NO, OH, O)の計測を行い，ガス構成比( $O_2/N_2$ )およびガス流量により各活性種の密度および界面への投入量が変化することを述べた。本節ではここまでの知見を踏まえ，放電条件を変更することで各活性種の界面への投入量を能動的に変化させる。つまり，活性種投入量を制御する試みである。

図 3-42 は，ガス構成比およびガス流量を変化させた際の各活性種の投入量であり，図 3-29 と図 3-34 と図 3-41 を再掲載した。ここで，4 章の細胞実験において各活性種の影響を検証するため，ガス構成比とガス流量のうち，Case(A)はガス流量のみを，Case(B)はガス構成比のみをパラメータとして変更する。

Case(A)は $[O_2]=0\%$ として，流量を 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 L/min とする。図 3-43 は，この条件における各活性種の投入量の比率を示す。縦軸は相対量であり，全計測条件における最大投入量で規格化している。ここでは，ガス流速が減少すると OH ラジカルの生成量が増加し，0.1 L/min において最大となる。一方，NO ラジカル密度は一定であり，O ラジカルはガス構成比によりほとんど生成されない。そのため，この Case(A)により，今回計測した活性種のうち OH 密度だけを変化させることができる。

Case(b)は流量を 0.5 L/min とし，ガス構成比を $[O_2]=0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100\%$ とする。図 3-44 は，この条件における各活性種の投入量の比率を示す。縦軸は上記と同じく相対量である。この条件において NO 密度は主に低酸素濃度側で高く，高酸素側では NO 密度が大きく減少する。一方，O 密度は，酸素濃度の増加により増加し， $[O_2]=80\%$ で最大となる。そのため，この Case(B)により，NO ラジカルおよび O ラジカルの密度を大きく変化させることが出来る。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-42 各条件における活性種の投入量：(a)NO, (b)OH, (c)O

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-43 Case(A) : ガス流量による各活性種投入量

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 3-44 Case(B) : ガス構成比( $O_2/N_2$ )による各活性種投入量

### 3.5 まとめ

本章では、生体へのプラズマ照射を念頭に、湿潤対象から生じる湿度分布を計測し、水分が及ぼす活性種生成への影響を調べた。さらに、湿潤対象の表面近傍において3種類の活性種(NO, OH, O)を計測し、各活性種の生成量および対象への供給量を能動的に変化させることに成功した。

- **湿度分布計測**：湿潤対象(水面)に乾燥ガス流を与え、対象面上の湿度分布を LIF 法により計測した結果、乾燥ガス流の流量(0.05→1.0 L/min)に依存して湿度分布が大きく変わり、拡散層の厚みが1→0.1 mm へと変化した。
- **湿度環境が活性種生成に与える影響**：水分を原料とする OH ラジカルの生成量は湿度環境に大きく影響を受け、1パルスにより水界面に供給される OH ラジカル量は100→6%(0.05→1.0 L/min)に減少する。一方、乾燥ガス中では OH ラジカルの生成はないとする考えに対し、やはり OH ラジカルを完全に排除することが難しいことを示した
- **活性種制御**：上記の知見を活かし、ガス流量(湿度)とガス構成比(O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>)をパラメータとして3種類の活性種(NO, OH, O)を計測した結果、それぞれが1パルスあたりに液界面に供給される活性種投入量を見積もることが出来た。さらに、上記のパラメータのうち、ガス流量では OH ラジカル投入量、ガス構成比では O ラジカルと NO ラジカルの投入量を制御することに成功した。



## 第4章 株化細胞へのプラズマ照射による影響

本章では、2章で述べたナノ秒パルス電圧による“ナノ秒パルスプラズマ”を株化細胞に照射し、各種パラメータが細胞に与える影響を評価する。4.1節では本研究で行った細胞実験全体に共通する、基本的な手順をまとめる。4.2節では  $O_2$ 、 $N_2$ 、 $He$  の3種類の雰囲気ガスが細胞に与える影響を検証し、4.3節でアポトーシス細胞の検出を行い、アポトーシス発現時間の検討、およびガス流による影響を評価する。4.4節ではネクローシス発生の有無を検証する。4.5節ではアポトーシス誘導要因を検討するために、液体培地の厚み、およびオゾンによる影響を評価する。4.6節ではナノ秒パルス(Short pulse)と一般的なパルス幅の電圧(Long pulse)により生じるプラズマが細胞に与える影響を検証する。4.7節では3章で計測した活性種の割合を制御し、各条件における細胞の生存率を評価した。

本章で行われた細胞実験は、東京都市大学工学部生体医工学科の平田孝道先生と筒井千尋先生、および東京大学の片岡一則先生、三浦裕先生、水野和恵様との共同研究であり、本研究室の安田拓真さん、平方健太さん、秋山雄俊さんの協力のもと行われた。

### 4.1 実験方法

#### 4.1.1 実験概要

細胞実験は、基本的に3日間を一区切りとして行う。図4-2に細胞実験の手順を示す。1日目に、細胞培養液で満たされた培養ウェル中に株化細胞(NIH3T3 および B16F10)を蒔きこむ。その後24時間、 $CO_2$ インキュベータにて培養することで株化細胞はウェルの底面に接着・固定する。そして、2日目(24時間後)に、各条件でプラズマ照射を行う。さらに24時間後の3日目には、死細胞の多くは浮遊しているため、培養液の上澄みを廃棄することで、生きた細胞を血球計算盤による計数やMTTアッセイという手法により評価する。次節では、細胞実験に関わる詳細な事項をまとめる。

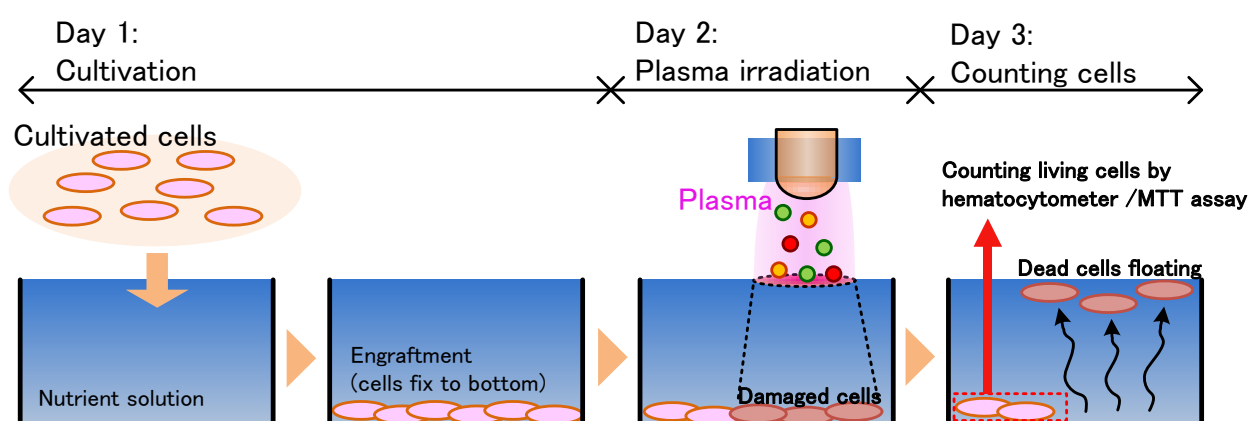


図 4-1 細胞実験の手順

#### 4.1.2 実験装置

図 4-2 に、細胞実験で使うプラズマ照射装置と照射対象の関係を示す。2 章に述べたプラズマ照射装置を用い、照射対象である培養細胞の入ったウェルプレート（well plate）を接地電極板の上に配置して、接地板の下に配したマイクロメータにより 10  $\mu\text{m}$  オーダーの距離調整を行う。照射装置の金属棒先端と培養液面の距離をプラズマ照射距離と定義し、いずれも 5 mm とした。培養液の厚みと培養液量の関係は、事前に緑色レーザーの透過率、およびマイクロメータにより計測（誤差 10  $\mu\text{m}$  程度）している。実験中の温度は 20°C 程度に管理され、プラズマ照射実験以外は外部空気と触れないように密閉し、細胞操作時はクリーンベンチ内において操作を行った。

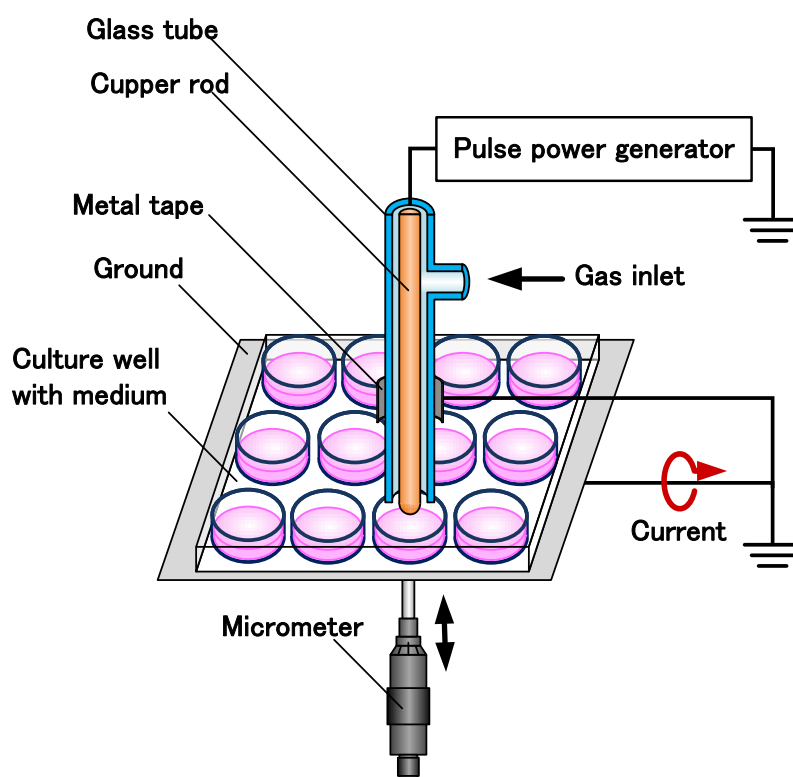


図 4-2 プラズマ照射装置と照射対象

#### 4.1.3 実験手順

以下に 1 日目の細胞蒔きこみ時に共通する基本的な手順を示す[96]。

1. フラスコに培養された細胞株を用意し、古い培地を取り除き、細胞表面を PBS により洗浄する。
2. PBS を取り除いたらトリプシン試薬を加え、インキュベータ(37°C, [CO<sub>2</sub>]=5%)に約 3 分間静置する。
3. フラスコにトリプシンと同量の培地を追加し、トリプシンの活性を止める。

4. ピペッティングによりフラスコから細胞を剥離した後、細胞懸濁液を遠沈管に移し、遠心分離を行う。
5. 遠沈管の底に細胞が沈殿していることを確認し、トリプシン・培地の混合液のみ除去する。
6. 新しく培地を加え、沈殿した細胞を懸濁する。
7. 懸濁液中の細胞の計数と希釈を繰り返す事で、懸濁液の細胞濃度を  $1.0 \times 10^5$  cells/ml 程度にする。
8. 濃度調整した細胞懸濁液をウェルプレートに各 1 ml 展開し、24 時間培養する。残りの細胞を用いて継代培養を同時に行う。
9. 24 時間後、培養細胞の培地を取り除き、細胞表面を PBS で洗浄する。
10. PBS を除去し、(血清入り培地の代わりに)無血清培地を 0.5 ml/well(12 ウェルの場合) 加える。
11. 細胞にプラズマ照射を行う。実験装置の構造や配置は 2 章と同様である。
12. プラズマ照射後、PBS で一度洗浄し、新しい無血清培地を 1 ml/well 加えて更に 24 時間培養する。
13. 培養細胞に 1-3 の操作を行いウェル底面から剥離し、ピペッティングで均一になるまで攪拌し、血球計算盤で計数する。

以下に各操作についての補足を行う。細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/ml 程度の濃度で撒き込む事により、24 時間後のプラズマ照射時には、細胞が対数増殖期にあたるように調整した。これにより、定常期以降に起こる細胞の死滅による影響を回避できる。また、プラズマ照射後に無血清培地を用いて細胞を培養する理由は、無血清培地中には増殖因子が存在しないため基本的に細胞数の変動が起こらず、プラズマの効果による増減のみを観察する事が出来るからである。

プラズマ照射時のみ培地の量を 0.5 ml に下げる理由は、培地がアポトーシスの原因となる要素を吸収するスカベンジャーの役割を果たす可能性を考慮し、培地の量を極力減らして実験を行うためである。NIH3T3 および B16F10 は「接着細胞」に分類されるため、プラズマ照射時もウェル底面に張り付いた状態にある。従って、放電と細胞の間には常に培地が存在しており、プラズマの効果を検証する際には培地の量を減らし、その影響を少なくすることが望ましい。しかし、あまり少ない培地量で長時間インキュベータ外に細胞を静置すると、乾燥によって細胞がネクローシスしてしまう可能性があるため、0.5ml 程度が乾燥せずにかつ培地を減らせる適当な分量と判断し、上記のような操作を行っている。なお、培地厚みがプラズマの効果に与える影響については 4.5 節で検証している。

細胞実験は、各条件について基本的に 3 サンプル(ウェル)を用意し、計数時には 3 サンプルの平均値および標準偏差を計算する。また、各実験にはプラズマ処理を行わずに培養のみを行う「コントロール(cnt)」群を用意し、プラズマ照射群と生存率の比較を行うことで、毎回の細胞増殖のバラつきによる影響を防ぐ。つまりコントロール群の生存細胞数を 100%とし、各条件の生細胞数との差分をプラズマ照射の効果として評価する。

プラズマ照射から細胞の計数までに 24 時間の培養時間を取る理由は、アポトーシスの発現は瞬間的ではなく、数時間～数十時間を要すると考えられるためである。なお、アポトーシス発現にかかる時間については、4.2 節で詳しく検証する。

#### 4.1.4 培地および試薬

上記の培養手順において登場する試薬類について補足する。

##### (a) 培養液

微生物や生物組織の培養において、培養対象に生育環境を提供するものである。炭素源やビタミン、無機塩類といった栄養素の供給源となる他、細胞の増殖に必要な足場や液相を与える物理的な要素もある。本研究では DMEM および RPMI 培地という赤色の液体培地に血清を添加したものを常用の「培地」として用いている。DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培地はヒト、サル、ハムスター、ラット、マウス、ニワトリの細胞を含むほとんどの種類の細胞に対応しており、細胞培養において広く用いられている。DMEM はアミノ酸、塩（塩化カルシウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、ナトリウム塩化物、リン酸二水素ナトリウム）、グルコース、ビタミン（葉酸、ニコチンアミド、リボフラビン、B12）等に加え、鉄を含む。血清は増殖因子の一種であり、血清を添加しない無血清培地中では、NIH3T3 は増殖できない（生存は可能）。RPMI は開発当初リンパ球や浮遊細胞の培養に使用されたが、現在では多くの細胞実験に用いる。培地に含まれる成分には若干の違いがあり、中にはスカベンジャーとして機能する物もあると予想される。既存のプラズマ医療研究では DMEM などが使用されることが多い反面、培地によるプラズマの効果を検証する研究は少ない。本研究でも培地による効果の違いは若干あるものと考えられるが、明確な結論に至っていない。今後、溶液内の化学反応を含めた詳細な検討が必要である。

##### (b) PBS

PBS(Phosphate Buffered Saline：リン酸緩衝生理食塩水)は、細胞生物学・生化学等の細胞を扱う実験でよく利用される緩衝液（pH の変化を抑える働きを持つ溶液）である。PBS は生体内で普遍的に存在するイオンで構成される為、細胞に対して無毒であり、等張（浸透圧が等しい状態）になるように調製されて細胞洗浄溶液として用いられる。

##### (c) トリプシン試薬

トリプシンは膵臓に含まれる消化酵素の一種であり、ヒトの腸内で食物中のタンパク質を分解する役割を果たしている。培養細胞に作用させると、細胞を融解することで培養容器底面に接着した細胞を剥離させる事が出来る。しかし当然長時間作用させると細胞が融解して成長に悪影響を与えてしまい、プラズマの効果の検証が難しくなるため、トリプシンを細胞に作用させる時間は極力短くすることが望ましい。

#### 4.1.5 細胞増殖曲線

細胞の増殖過程について以下に示す。細胞を新しい液体培地に蒔きこんで一定の環境条件下で培養すると、細胞が培地に含まれる栄養物質を摂取して生育を始め、細胞数が増加する。この時、細胞数の変化を測定すると、図 4-3 に示すような増殖曲線が得られる。培養の初期は「停滞期」と呼ばれ、新しい培養環境へ適応、定着する時期である。細胞数の増加は殆ど無いが、細胞内は代謝的に活発であり、培地から栄養物質を取り込んで増殖に必要な酵素を合成している。停滞期の期間は細胞の種類や培地の組成、その時の培地の状態などによって変化する。一般に、増殖が活発な状態で蒔きこまれた細胞であれば 1~2 時間で増殖を開始するが、状態次第では長くて数時間かかる事もある。生育に必要な栄養物質が

与えられると、細胞は対数的に増殖を始める。この時期を「対数増殖期」といい、最も速い速度で増殖する。対数増殖期において、細胞の代謝は一定であり、一定の分裂時間で細胞分裂を繰り返している。細胞が分裂して細胞数が 2 倍になる時間“倍化時間”は細胞種によって異なるが、個々の細胞においては一定の培養条件では一定である。本研究で使用する細胞(NIH3T3 および B16F10)の倍化時間もおよそ 24 時間である。対数増殖期の培養細胞は生体組織と性質が近く、プラズマ照射実験に適している。そのため細胞を対数増殖期に維持する事は重要である。培地中の栄養物質が消費されると共に、乳酸・酢酸と言った代謝産物が培地中に蓄積し始める。その後培地中の栄養物質が減少し、細胞同士の接触障害が発生する事で、細胞の増殖が低下する時期を「定常期」という。生成された代謝産物によって培地 pH が変化し、細胞毒を示す代謝物質が生成されることもある。細胞の生育が低下し、細胞分裂によって新しい細胞が生成すると同時に同数の細胞が死滅する時期であるため、定常期における培地中の生細胞数は一定となる。培地中の栄養物質が完全に消費されると細胞は分裂できなくなり、生育が停止して死滅し始める。この時期を「死滅期」と呼び、生細胞数は指数関数的に減少する。

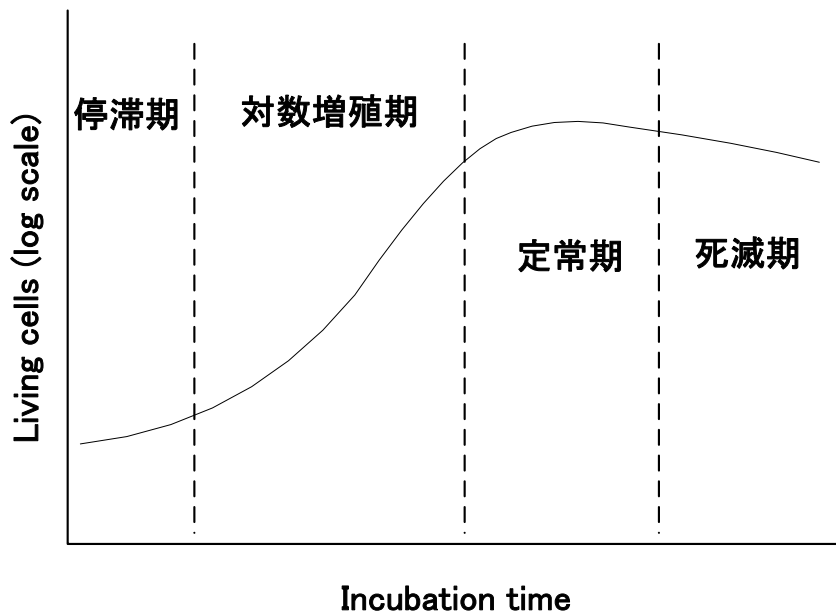


図 4-3 細胞の増殖曲線

## 4.2 導入ガスによる細胞生存率の影響

本節では O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He の 3 種の雰囲気ガス下でプラズマを照射し、各々が細胞(線維芽細胞, NIH3T3)に与える影響を検証した。照射条件として高電圧パルス出力は 28 kV, 雰囲気ガスの流量は 3 種いずれも 1 L/min とした。プラズマ照射時間は各 10 秒, 100 秒であり, 照射時の電極 - 培地間距離は O<sub>2</sub> プラズマを 5 mm, N<sub>2</sub> を 10 mm, He を 15 mm とした。O<sub>2</sub> プラズマは肉眼での観測が容易かつ二次ストリーマの進展具合による放電のばらつきが少なかったギャップ長 5 mm を基準とした。また, N<sub>2</sub> プラズマの放電ギャップ長を 10 mm にすることで, 投入エネルギー測定結果図 2-8 における O<sub>2</sub> プラズマの 5 mm gap 時と, 投入エネルギーを揃える事が出来る。He に関しては投入エネルギーを他 2 種と揃える事が困難であるため, 最大限長くして 15 mm に配置した。

図 4-4 に, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He の 3 種の雰囲気ガス下でプラズマを照射し, 24 時間培養した細胞群の細胞生存率の変化を示す。縦軸はコントロール群 cnt (未照射群) に対する生存細胞数の割合 (%) である。前節の通り, プラズマ照射の際は各条件について 3 ウェルを使用し, 計数時には 3 ウェルの平均値を取っている。各棒グラフにおけるエラーバーはその標準偏差を示す。O<sub>2</sub> プラズマを照射した細胞群は, プラズマ照射時間に応じて細胞数が減少 (= 死滅) しており, 100 秒間照射した細胞群はコントロール群に対して細胞数が 25% 程度減少した。ここで, O<sub>2</sub> プラズマによる細胞数の減少幅が一見小さいように見える。しかし, 2.2.2 節で述べたように, 本プラズマ源の照射範囲は直径 6-7 mm (0.28-0.38 cm<sup>2</sup>) であり, これはウェル面積のおよそ 4 割程度である。つまり, 残りの 6 割程度は照射範囲の外に位置する。また後述の 4.3.1 節 (図 4-8) において, 細胞がアポトーシス細胞死を示す範囲がおおよそ照射範囲内であることから, 図 4-4 の O<sub>2</sub> プラズマによる生存率が 75% 程度となる実験結果は, プラズマ照射範囲内の細胞のほとんどが死滅していることを示している。

一方, He プラズマを作用させた場合, 細胞数の増加が確認された。10 秒間照射した細胞群では約 50%, 100 秒間照射した細胞群では約 30% 程度, コントロール群に対しての増加が見られた。He プラズマは細胞の増殖や成長に寄与する事が示唆されており [11], この結果はそれと矛盾しない。N<sub>2</sub> プラズマに関しては 10 秒間照射した細胞群が最も増加し, 100 秒間照射した細胞群も 10 秒の細胞群ほどではないが増加するという He プラズマと同様の変化が見られ, 細胞の活性化に寄与していた。ただし増加幅は He より小さく, 10 秒間照射した細胞群では約 32%, 100 秒間照射した細胞群では約 12% 程度, コントロール群に対しての増加が見られた。

3 種類の雰囲気ガスのうち, O<sub>2</sub> ガスを用いたプラズマのみが細胞死を引き起こす事が出来た。よって O<sub>2</sub> プラズマは本研究の趣旨であるアポトーシスを細胞に誘導している可能性がある。以下に細胞死の原因を検討する。熱的效果について検討すると, 電極・培地間距離が 5 mm の際に O<sub>2</sub> プラズマから投入されるエネルギーはパルス 1 発当たり約 2.8 mJ であり, 放電周波数 30 Hz で 100 秒間放電を行ったことから合計で約 8.4 J 程度のエネルギーが供給されたことになる。このエネルギーが全て培養液の温度上昇に使用されたと仮定すると, 温度上昇幅は約 4°C 程度と見積られる。プラズマ照射を行う際の部屋の温度は常温で約 25°C 程度であるため 4°C 温度上昇により 29 °C となる。通常細胞は 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養される事を考えると, O<sub>2</sub> プラズマによる温度上昇の効果は無視できるほど小さいものと考えられる。分光計測結果より, He プラズマは O<sub>2</sub> プラズマに比べて遥かに強い UV 領域の発光強度を持ちながらも細胞に活性化の作用を与えている事から, UV による影響が支配的なものであるとは考えにくい。

O<sub>2</sub> プラズマと N<sub>2</sub> プラズマを比較すると、投入エネルギーは同程度に揃えてあり、どちらもストリーマ放電の形態をとり、発光強度はむしろ N<sub>2</sub> プラズマの方が大きい（放電様相の比較図 2-9 参照）。それにも関わらず、両者で真逆の効果を引き起こしていることから、ストリーマヘッドの局所的高電界や、電流の刺激による効果も支配的とは考えにくい。この他の要素としては、O<sub>2</sub> プラズマに固有の酸素系活性種 ROS やイオンが大きな役割を果たしている可能性がある。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-4 プラズマ中のガス種による細胞生存率（照射 24 時間後）

### 4.3 アポトーシス評価

#### 4.3.1 TUNEL 法によるアポトーシス検出

前節において O<sub>2</sub> プラズマを細胞群に照射すると、細胞死を引き起こす事が出来た。本節では“O<sub>2</sub> プラズマ照射による細胞死は本研究が目的とするアポトーシスなのか”を検証するため、TUNEL 染色法を用いて検証を行った。TUNEL 染色法はアポトーシス検出にしばしば用いられる手法である。1 章で述べたように、アポトーシス過程において DNA は断片化を起こす。本試薬を使い、断片化した核内を染めることでアポトーシス細胞の検出を可能にする。本実験手順は、TUNEL 染色に至るまでの細胞培養やプラズマ照射の手順(4.1 節)および放電に関する実験条件(4.2 節)と同様である。ここではウェルプレートのサイズのみが異なり、今回はウェルプレートに 4 穴培養プレート (Lab-Tek Chamber Slide 4well Glass Slide, ウェル径 : 18 mm×9 mm, 側面 : ポリプロピレン製底面 : ガラス製) に NIH3T3 細

胞株を  $1.0 \times 10^4$  cells/ml にて蒔きこんで行った。これは TUNEL 染色に利用する試薬量の関係で、12 ウェルプレートでは大きすぎてしまうためである。

プラズマ照射から 24 時間培養後に培地を取り除き、PBS で洗浄を行った後 TUNEL 染色によってアポトーシスの検出を行った。この染色作業には TREVIGEN 社製 TUNEL 染色キット「TACS 2 TdT-Blue Label InSitu ApoptosisDetection Kit」を使用した。

正常細胞とプラズマ処理を行った細胞群以外に、「ポジティブコントロール」と呼ばれる細胞群を作成した。ポジティブコントロールはヌクレアーゼを用いて細胞の DNA を強制的に断片化させた細胞群であり、この細胞群に TUNEL 染色を施すと全ての細胞が染色される事になる。よって、ポジティブコントロールは染色が適切に行われているかの指標としての役割を果たしており、染色の成功例として捉えることができる。ポジティブコントロールの作成において、ヌクレオチド溶液を加えて 1 時間  $\text{CO}_2$  インキュベータ内に静置する事でヌクレアーゼを作用させる、という作業を挟む事で行われる。図 4-5 に通常細胞、および TUNEL 染色におけるポジティブコントロールの細胞群を示す。ポジティブコントロールの細胞群は全て核が青色に染色されており、これにより今回の染色が適切に行われていることを確認した。

図 4-6 に  $\text{O}_2$  プラズマを照射した細胞群の TUNEL 染色結果を示す。左側は照射時間が 10 秒間のものである。ごく一部の細胞で青色の染色が見られ、その細胞はアポトーシスが進行中であることがわかる。図 4-6 右側は照射時間 100 秒間のものである。10 秒照射のものに比べてアポトーシスを起こした細胞の割合が明らかに多い事が確認できる。以上から、 $\text{O}_2$  プラズマは NIH3T3 細胞にアポトーシスを誘導する効果を持つ事が分かった。また、 $\text{O}_2$  プラズマを照射する時間が長い方が、より多くの細胞がアポトーシスを起こすという結果も得られた。前節の実験によって、「 $\text{O}_2$  プラズマは照射時間に応じて細胞数の減少割合が大きくなる」という知見が得られており、今回の TUNEL 染色によって「プラズマ照射時間に応じてアポトーシス細胞の割合が増加する」という結果を得られた。アポトーシス細胞の量だけでなく、各細胞のアポトーシスの進行度についても差が見られた。

**一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。**

図 4-7 は TUNEL 染色を施した細胞をレンズ倍率  $\times 40$  で観察した際の写真である。左の写真が  $\text{O}_2$  プラズマ 10 秒照射、中央および右の写真が 100 秒照射のものである。10 秒照射のウェルに見られるアポトーシス細胞は、細胞の形は正常細胞と同様のものが残っているが核のみが染色された状態である。これは DNA の断片化が始まったばかりの状態であり、アポトーシス発生過程の初期段階にあたる。一方で 100 秒照射を施された**一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。**



図 4-7 右の染色細胞では、核の凝縮が進み核以外の細胞質がほとんど残っていない。これはアポトーシスの進行が終盤まで進んだ状態であり、この後核の小胞化によりアポトーシスが完了する直前のものである。100 秒照射のウェルにはこの他にも**一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者**

**全員の同意が**

**得られていないため、表示できない。**

図 4-7 中央のように、細胞質の凝縮は進んでいるものの未だ原型を留めた状態の細胞も存在が確認された。この細胞のアポトーシスの進行は未だ中盤であり、先に述べた状態に至るまでまだ時間を要する状態である。つまりプラズマ照射から 24 時間後の時点における各細胞のアポトーシス進行度には差があり、プラズマを長時間照射した細胞群の方が全体的にその進行が早まっている事が分かる。またこれらの他にも、アポトーシスのプロセスが開始されているものの DNA の断片化に未だ至っていない細胞（これからアポトーシスするもの）や、若しくは既に小胞化までが完了しているため染色過程の洗浄によって流失してしまった細胞も存在していたと予想される。以上のことから細胞に対するアポトーシス誘導効果は、O<sub>2</sub>プラズマ由来の要素の累積によって引き起こされると考えられる。

次に、ウェル内のアポトーシス細胞の分布を観察する。図 4-8 に O<sub>2</sub>プラズマを 100 秒間照射し、TUNEL 染色した細胞（×4 倍）を示す。写真右上が、プラズマ照射を行った際に電極の中心直下に位置していた場所であり、左下に行くにつれて照射範囲の外側となる。ウェル内の位置に対応する細胞の特徴を観察すると、中心から半径 3 mm の範囲には細胞が少なく空白が目立つ状態である。この範囲は金属電極の直下に当たる。そこから外側に移動した中心から半径 3~6 mm の範囲では、アポトーシスが進行中である、核が青色に染色された細胞が比較的多い。そして中心から半径 6 mm 以上の範囲では染色された細胞が殆どおらず、正常な細胞が多くなる。つまり、中心部に近づくにつれて細胞数は減少し、かつアポトーシスを発現した細胞の割合が高くなるという分布になっている。

細胞の減少の主たる要因がアポトーシスであり、かつアポトーシスがプラズマによる局所的な要素の累積によって誘発されるという先に得られた考察を踏まえると、中心部付近の細胞の減少は以下のように説明できる。中心部に近い領域の細胞はパルス放電の累積による効果を受けやすい事からアポトーシスを起こした細胞の割合が高く、かつその進行も早まったために、TUNEL 染色の作業を行うプラズマ照射から 24 時間後の時点でアポトーシスの進行が既に完了しており、TUNEL 分析における洗浄の過程で流出してしまった。そして中心部からやや外れた周辺部では、中心部ほどパルス放電の累積がないため TUNEL 染色の時点でアポトーシスが進行中のものが多く残り、放電の届かない範囲ではアポトーシスが起こらなかったものと考えられる。しかしながら、中心部における細胞の死滅は、中心部でネクロシスが多発している可能性も残されている。よって、次節では O<sub>2</sub>プラズマによるネクロシス誘発の有無についても検証する（4.4 節）。

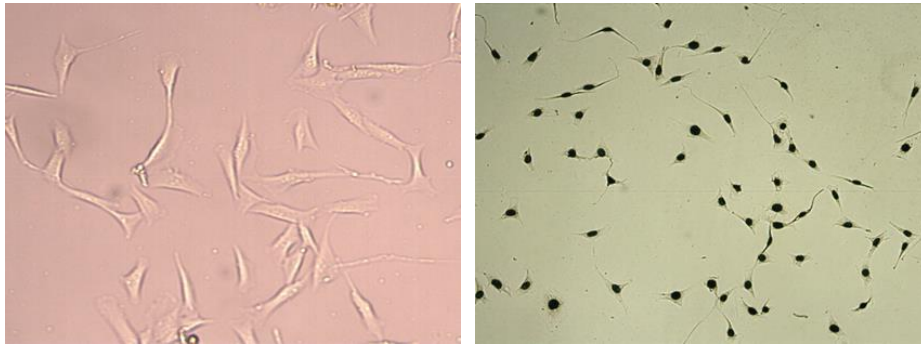


図 4-5 正常細胞（左）と、アポトーシスを強制的に発現した細胞群の TUNEL 染色結果（右）

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-6 O<sub>2</sub> プラズマ照射 24 時間後の TUNEL 染色(x4) 左：10 秒，右：100 秒照射

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-7 O<sub>2</sub> プラズマ照射 24 時間後の TUNEL 染色(x40) 左：10 秒，中/右：100 秒照射

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-8 O<sub>2</sub>プラズマ照射 24 時間後の TUNEL 染色(x4) : 右上隅は照射中心を示す。電極(直径 3 mm)の直下の細胞数が減少している。ガラス管(直径 6 mm)の下はアポトーシス発現しており、プラズマ照射の効果に分布が存在することがわかる。

#### 4.3.2 アポトーシス発現時間の検討

図 4-9 に、プラズマ照射後に生じる細胞死の時間推移についての模式図を示す。ネクローシスは細胞死は過度の外部刺激を受ける事による即時的な反応である。一方で、アポトーシスは生化学的な反応を必要とするため発現までに数時間～数日を要すると考えられている。実際に皮膚ガン細胞に DBD プラズマを作用させた研究例では、24 時間後のアポトーシスの割合は 25% 程だったのに対し、72 時間後になるとその割合は約 70% に伸びるといふ報告もある[97]。本研究では「プラズマ処理から 24 時間後」というタイミングで生細胞の計数を行っているが、前節の TUNEL 染色結果では同一ウェルの中でも各細胞のアポトーシスの進行度は異なっており、この後アポトーシス細胞が爆発的に増加する可能性もあれば、ほとんど変化しない可能性もある。図 4.7 に沿って説明すれば、点線で示した「プラズマ処理から 24 時間後」という現在の計数時刻は、実際はどの位置にあるのかは分からない。つまりアポトーシスの誘導割合を検証するに当たっては、プラズマ照射から何時間後の観察が適切であるのかを把握しておく必要がある。そのために以下の実験を行った。

図 4-10 に実験方法の模式図を示す。O<sub>2</sub>プラズマを 100 秒間照射した細胞群、およびコントロール群のそれぞれを培養する。24 時間おきに計数を行う事で各時刻での細胞の減少割合を調査した。なお、今回の実験では無血清培地ではなく血清入り培地を用いて培養を行っている。これは今回の実験での培養時間が数日間の長期間に渡るため、無血清培地では貧栄養状態による細胞死が起こってしまう恐れがあり、その可能性を排除するためである。その他の実験条件は同様である。

図 4-11 に、コントロール群と O<sub>2</sub> プラズマを照射した細胞群各細胞群の成長の様子を示す。コントロール群の増殖の様子を増殖曲線(図 4-3) を参考に考察すると、蒔きこみ時~プラズマ照射時が停滞期、プラズマ照射から 24~72 時間後までが対数増殖期で、72 時間後以降に定常期に入る、という推移になる。プラズマ処理群は、プラズマ照射直後まではコントロール群と細胞数はほぼ変わらない。培養などの条件が完全に同じなため、これは当然であるが、細胞の蒔きこみの精度が適切である事がこの段階でわかる。プラズマ照射から 24 時間後以降で細胞数の減少を確認できるが、減少幅は常に一定とは言えず、72 時間後には差が狭まってきている。24 時間後と 48 時間後では 24 時間後の方が細胞数の開きが大きいことから、アポトーシスのピークはプラズマ照射直後~48 時間後までの間に起こっていると考えられる。72 時間後では差が埋まっているのは、コントロール群ではウェル内に細胞が増加して成長が定常期に入る事で成長速度が落ちるが、一方でプラズマ処理群はアポトーシスによって一度細胞数が間引かれたために、照射から 72 時間後でも細胞の成長は対数増殖期にあっていたためと考えられる。以上から、本実験系におけるプラズマ処理から 24 時間後という計数タイミングは、アポトーシスの誘導割合を観察するのに妥当なものであると言える。

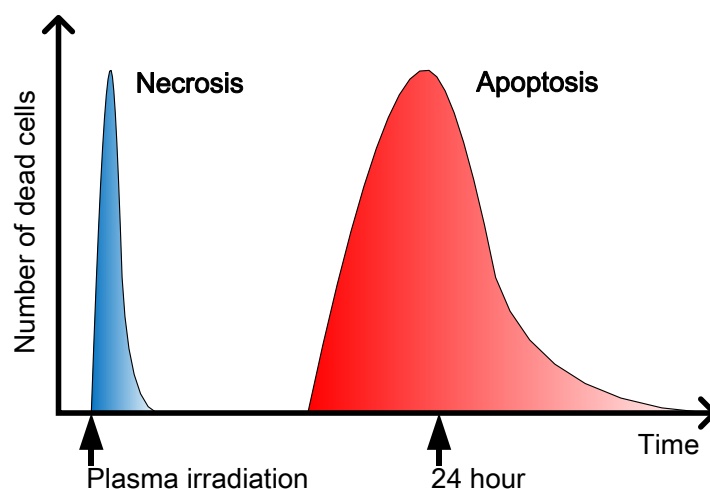


図 4-9 アポトーシスとネクローシスの発現時間 (概念図)

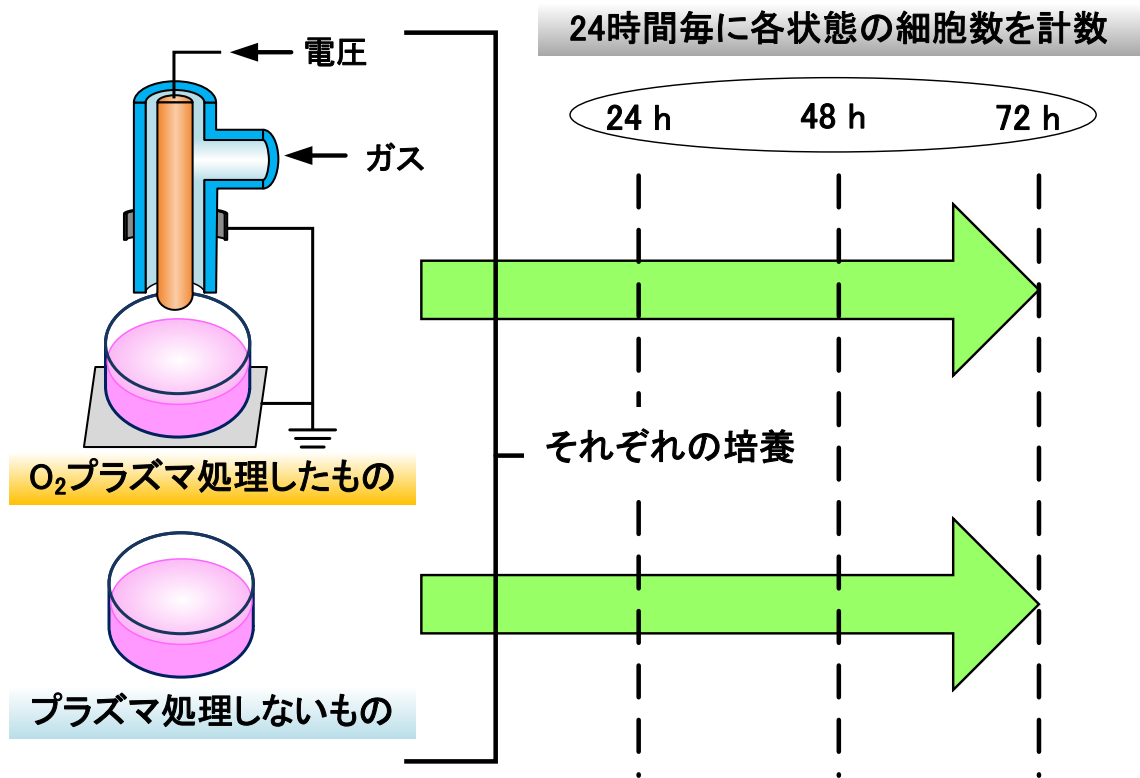


図 4-10 実験概要：アポトーシスの発生時間の検討

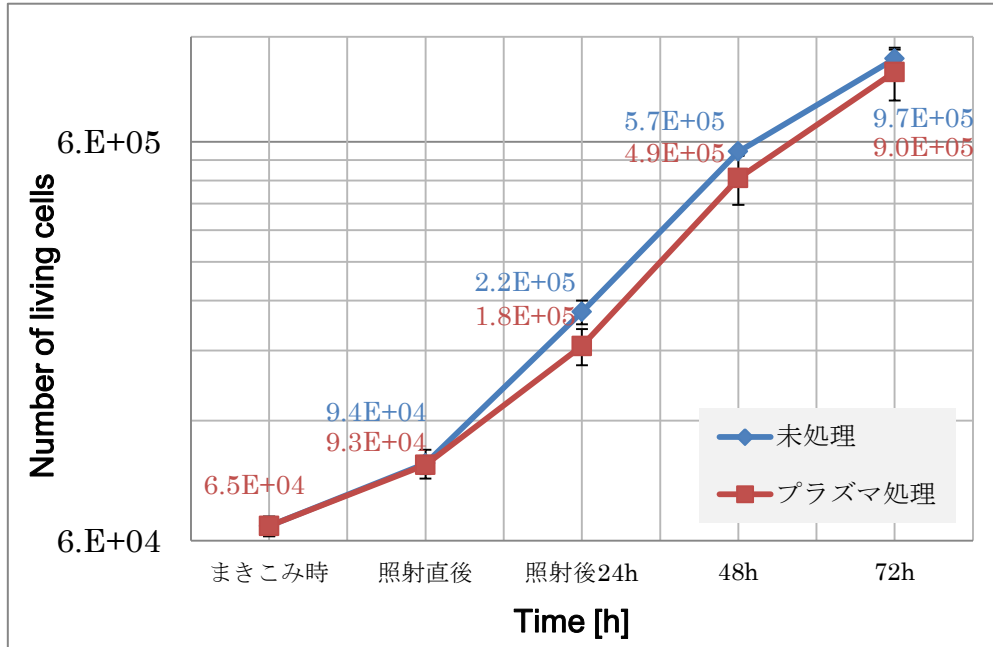


図 4-11 細胞数の時間変化 (図 4-10 の実験結果)

### 4.3.3 ガスフローによる影響

これまで本研究で確認された細胞死はアポトーシスが主であり、それは $O_2$ プラズマによる効果と捉えて議論を進めてきた。しかし、誘導したアポトーシスが、導入された $O_2$ ガスのフローによる影響である可能性がまだ残されている。例えばガスフローによって培地を攪拌する際に細胞が乾燥すれば、細胞数の増減に何らかの影響を及ぼし得る。そこで、導入ガスのフローによる影響の有無を調査した。プラズマ照射実験の際、実験条件は前節と同様にして、電圧を印加せずに $O_2$ ガスフローのみを吹き付けた細胞を培養する事で、ガスフローのみが細胞の成長に与える影響を図る事が出来る。コントロール群、およびガスフローを100秒間吹き付けた細胞群を24時間培養した結果を図4-12に示す。ガスフロー吹き付け群はコントロール群に対する有意差は見られなかった事から、ガスフローによる培地の攪拌や細胞の乾燥が原因で、細胞の生存状態に悪影響を及ぼす効果は無いと言える。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-12 ガス流( $O_2$ )による影響評価

#### 4.4 ネクロシスの評価

本節では O<sub>2</sub> プラズマ、およびガスフローが細胞に引き起こすネクロシスの割合を調査する。4.3.2 節でも述べたように、アポトーシスが発現するには一定の時間を要する。言い換えれば、細胞が何らかの指令を受けたり、あるいは修復不可能な傷を負う事で自死が発現を始める。逆に外傷によるネクロシスは細胞が外的刺激によって無理やりに引き起こされる即死である。よってプラズマ照射、もしくはガスフロー吹き付けの直後に生細胞の計数を行い、その時点で細胞が減少していれば、それはプラズマ照射やガスフローにより細胞にネクロシスを引き起こす効果があると言える。またこの手法により、プラズマにより引き起こされるネクロシス細胞の割合が分かるため、それと死細胞全体の割合を比較すれば、プラズマが引き起こした細胞死全体における、アポトーシスとネクロシスの構成比を知ることができる。細胞死の内訳は、本研究で使用したプラズマ照射デバイスが生体に与えるダメージを測る指標として有用である。実験条件は 4.2 節のものと同様として、O<sub>2</sub> プラズマ 100 秒間照射、またはガスフロー 100 秒間吹き付けの直後(1 時間以内) に各細胞群における生細胞の計数を行った結果を図 4-13 に示す。ガスフロー、O<sub>2</sub> プラズマ共にコントロール群に対する有意差は見られなかったため、ガスフローによる培地の攪拌や細胞の乾燥、プラズマによる衝撃などの影響でネクロシスを発現する細胞の数は無視できるほど少ないと言える。従ってプラズマガス種による細胞数の増減(図 4-4)は全て、プラズマ中に含まれる熱や荷電粒子、活性種、電磁界、電流、UV 等の要素によって誘導されたものであると考えられる。また、その中でも O<sub>2</sub> プラズマの引き起こす細胞死は、ほぼ全てが本研究の趣旨であるアポトーシスによるものであり、本研究で使用したプラズマ照射装置は細胞に対してネクロシスによる被害をほとんど与えていないという事も分かる。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-13 O<sub>2</sub> プラズマ照射直後の生細胞数

## 4.5 アポトーシス誘導要因の検討

### 4.5.1 培地厚みの影響

培地には様々な成分が添加されておりイオンなども豊富に含まれている。そして本研究ではプラズマを直接照射してはいるものの、放電が実際に届いているのは培地に対してであり、細胞に到達している訳ではない。そのためもし培養液がアポトーシスの原因要素と高速に反応するスカベンジャー（高い反応性の物質と自らが反応し、無害化する中和剤または抗酸化剤）の役割を果たしていれば、プラズマによるアポトーシス誘導効果が減少する事になる。逆に、培養液の量がアポトーシス誘導に大きな影響を与えているという事が分かれば、アポトーシスの原因は培地に遮られるものであるという手がかりを得る事にも繋がる。そこで、プラズマ照射の際にウェルに入れる培地の量を変化させ、その他の実験条件は 4.2 節のものと同様とする事で、培地の厚みがプラズマのアポトーシス誘導に与える効果について検証した。培地の量は 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0 ml とした。それぞれの培地量に対応する厚みについて表 4-1 に示す。培地の厚みは、緑色レーザーポイントによる透過光強度、およびマイクロメータにより計測した。

表 4-1 培地液量と培地厚みの関係

培地の液量 [ml]	培地の厚み [mm]
0.3	0.15
0.4	0.48
0.5	0.81
0.75	1.63
1.0	2.41

また、培地量を 0.3 ml まで減らす場合、ガスフローによる乾燥の影響が表れる可能性がある。そこで、4.3.3 節の手法と同様に、0.3 ml 培地中の細胞に対してガスフローを吹き付け、吹き付け直後と 24 時間後で生細胞数を計数した結果を図 4-14 に示す。吹き付け直後の段階で約 11%の細胞が減少しており、これは乾燥などによってネクローシスを起こしたものと考えられる。また、24 時間後も生細胞の割合が変化しておらず、24 時間後までに別形態の細胞死、即ちアポトーシスを誘発した細胞は見られなかった。従って、ネクローシスのみが発生していると考えられる。また、培地量が 0.5 ml でフローによるネクローシスが見られず、0.3 ml では約 11%のネクローシスが見られたことから、培地量が 0.4 ml の際にも一定程度のネクローシスを起こす事が予想される。しかし、本細胞実験において、細胞の蒔きこみと計数を合わせて 10%程度の誤差を認めてしまうため、これ以下の細胞数の変化を見出すのは難しい。今回の 0.4ml の条件では細胞の約 5%がネクローシスにより減少していると仮定する。培地量を変化させ、各細胞群に対して O<sub>2</sub>プラズマ照射を行った結果を図 4-15 に示す。また、培地量 0.3 ml の際に見られた 11%のネクローシス、および培地量 0.4 ml では仮定した 5%のネクローシス分を差し引いたプロットも表示した。こちらは細胞死全体からアポトーシスの効果のみを評価することを目的としている。

図 4-14 の結果より、培地が薄くなるのと共に生細胞数は減少し、特に培地厚 146  $\mu\text{m}$  では 46%程度の細胞がアポトーシスによって死滅したことになる。これまでの実験条件（培地厚 814  $\mu\text{m}$ ）では約 25%の細胞をアポトーシスさせていたため、細胞死滅効果が約 2 倍に上昇したことになり、培地厚みはアポ



トーシスの誘導に大きな影響を与えている事が分かる。以上のことから、プラズマ中から供給されるアポトーシスの原因要素は、図 4-16 のように培地により遮られ、培地厚みが少なくなるほど、効果的に細胞に届くことが予想される。また、4.2 節において、 $N_2$  や  $He$  のプラズマでは細胞死が起こらず、 $O_2$  プラズマのみがアポトーシスを誘導した事から、本実験のアポトーシス細胞死は  $O_2$  プラズマに固有な酸素系活性種 ROS, あるいはそれらと培地の成分が反応することによる生成物 ( $OH$  ラジカルなど) が主たる要因である可能性を示した。今回の結果はそれを裏付ける内容であると考えられる。

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-14 培地量 0.3 ml (培地厚 0.15 mm) におけるガス流の影響

一部が共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため、表示できない。

図 4-15 培地厚みがアポトーシス細胞死に与える効果

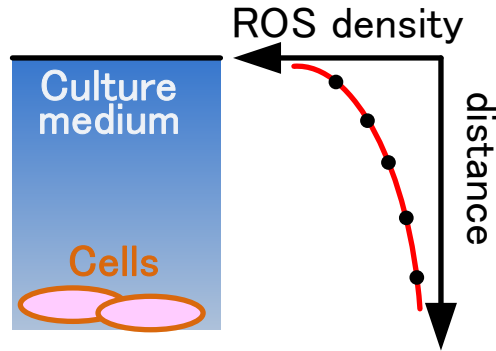


図 4-16 考察：培地厚みによる効果

#### 4.5.2 長寿命活性種の影響

本節では  $O_2$  ガスから生成される長寿命の活性粒子による影響を検証する。 $O_2$  プラズマから生成される代表的な活性種として、 $O$  原子、オゾン( $O_3$ )、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )が挙げられる。空気中で  $O$  原子の寿命は  $5\sim 100\ \mu s$  程度である (3 章および[90], [98])。一方、オゾンは数時間、 $O_2^-$  は数 10 秒[99] におよぶ長寿命活性種である。よって、これらの寿命差を利用する事で、細胞実験においてオゾンなどの長寿命種のみを作用させることが可能になる。図 4-17 に実験方法の模式図を示す。銅電極の先端が金属テープの脇に来るまで位置を引き上げた状態で電圧を印加し、その他の実験条件は 4.2 節と同様である。 $O_2$  ガスフローの流量は  $1\ L/min$  である事と、ガラス管内のガスが通過する部分の断面積は  $5.50\ mm^2$  である事から、ガスフローの流速は約  $3\ m/s$  と計算される。銅電極の通常時の位置は培地表面から  $5\ mm$  の位置にあった事から、今回の実験系電極先端から培地までの距離は  $5\ mm$ (放電ギャップ長) $+20\ mm$ (ガラス管先端から金属テープまでの距離)  $=25\ mm$  になる。従って、ガス流で運ばれる放電生成物は培地表面に到達するまで最短で  $8.3\ ms$  かかる事になる。この値は前述した  $O$  原子の寿命の 80 倍以上になるため、ガスフローが培地表面に到達する際に  $O$  原子は既に解離されて殆ど存在せず、オゾンやスーパーオキシドアニオンなどの長寿命種のみが作用するという状況になる。よって、今回の実験により  $O_2$  プラズマから生成されるオゾン単体による効果を観察する事が可能である。

図 4-18 に、オゾン処理を施した細胞群と、コントロール群との生細胞数の比較を示す。コントロール群に対する有意差は見られないため、本研究の細胞実験において、上記のような長寿命種がアポトーシス細胞死に与える影響は無視できるほど小さいと考えられる。

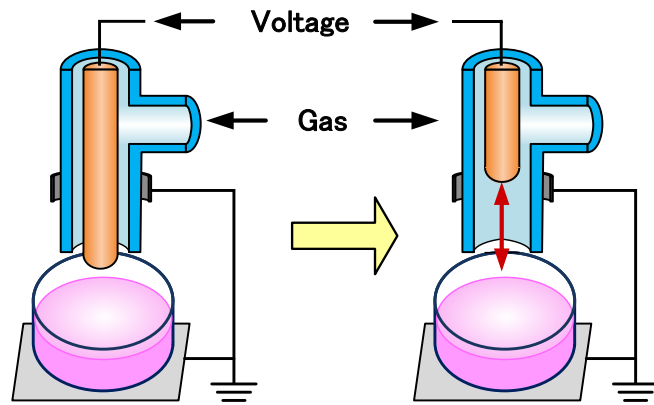


図 4-17 オゾンのみ照射する際の実験系

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 4-18 オゾンによる影響

#### 4.6 ナノ秒パルスと通常パルスの比較

本節では、パルス幅の変化により放電プラズマが細胞に与える影響を検証する。4.1-4.5 節で使ったナノ秒パルス電圧(Short pulse), および 2.1.3 節で述べた一般的なパルス電圧(Long pulse)を用い、O<sub>2</sub> ガス中で 2 種類のパルスによるプラズマを細胞に照射した。実験の概要を以下に示す。Short pulse による O<sub>2</sub> プラズマ, および Long pulse による O<sub>2</sub> プラズマを 100 秒間照射した細胞群をそれぞれ 2 群ずつ用意した。各々 1 群はプラズマ照射直後 (照射から 1 時間以内) に, もう 1 群はプラズマ照射から 24 時間培養後に計数を行い, 各時間のコントロール細胞群と比較した。放電条件などは 4.2 節における実験と同様である。直後計数と 24 時間培養後の計数の両方を行う事で, 4.4 節で述べたように, 2 種類のプラズマによるアポトーシスとネクローシスの割合を知る事が出来る。

図 4-19 に, Short pulse による O<sub>2</sub> プラズマ照射群, および Long pulse による O<sub>2</sub> プラズマ照射群について計数結果を示す。Short pulse の場合, 照射直後はコントロール群のものに対して有意差は見られず, 4.4 節のネクローシス割合との再現性がある結果である。一方で, Long pulse による O<sub>2</sub> プラズマの場合, 照射直後には約 25%の細胞が死滅しており, ネクローシスが発生していると考えられる。Short pulse と Long pulse の放電様相の比較(2 章)より, O<sub>2</sub> ガス中では Long pulse の場合のみスパーク放電(ギャップ長 5 mm)の発生が確認されており, 今回の Long pulse によるネクローシスは, 放電による熱や衝撃波, 電流などによる外的刺激により引き起こされたものであると推測される。

次に, 照射 24 時間後の結果を見ると, Short pulse の場合, コントロール群に対して 25%の細胞が死滅しており, この結果は 4.2 節で行った O<sub>2</sub> プラズマの効果を検証する実験で得られた結果と再現性が取れている。Long pulse の場合も約 25% の細胞が死滅しているが, プラズマ照射直後の細胞生存率と変わらず, 照射から 1~24 時間後の間に新たに細胞死はほとんど起こっていないことを示す。つまりアポトーシスの誘導による細胞数の減少が見られず, ネクローシスのみが発生していると言える。

以上の結果より, ナノ秒パルス(Short pulse)を用いた O<sub>2</sub> プラズマは, 培地に対してスパーク放電を抑制しながら直接的なプラズマ照射を行う事が可能であり, その結果, 細胞にネクローシスを殆ど引き起こすことなくアポトーシスのみを誘導できる事が確認できた。また, 一般的なパルス(Long pulse)を用いた O<sub>2</sub> プラズマはスパーク放電が生じ, 結果として細胞にネクローシスのみを引き起こす事が確認された。

一部が共同著作物であり, インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため, 表示できない。

図 4-19 O<sub>2</sub> 雰囲気下で Short/Long pulse によるプラズマ照射した場合の生存率  
赤棒: 照射直後, 青棒: 照射 24 時間後

#### 4.7 活性種制御によるガン細胞への影響

本章ではこれまでマウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いて、ナノ秒パルスプラズマが与える影響について述べてきた。要約すると、上記のプラズマにより、主にアポトーシス細胞死を誘導することが分かった。さらに、アポトーシスを誘導する因子として、寿命の短い酸素系活性種(Reactive Oxidation Species: ROS)またはイオンなどの荷電粒子であることが分かった。また、他グループの研究報告では、生体作用を導く要因は活性種であり、特に ROS が有力であると指摘されている[12], [15], [16]。そこで本節ではアポトーシス誘導要因が何らかの ROS であると仮定し、“どの活性種がアポトーシス細胞死の作用因子であるか”に焦点を当てて研究を進める。

まず、表 1-1 に示した通り酸素系活性種(ROS)は複数存在し、プラズマ中ではこれらが相互反応しながら存在するため、1 種類を単独に作り出すことは困難である。一方、1 章でも述べたように、生命科学やプラズマ医療分野の研究により、いくつかの活性種は細胞内外において酸化剤やシグナル伝達物質としての知見が得られている。そこで、3 章では、これらの活性種のうち、プラズマ中で大量に生成され、かつ生体への影響が大きいと予想される活性種である OH, O, NO の計測を行った。その上で、プラズマ照射条件であるガス流量およびガス構成比( $O_2/N_2$ )をパラメータとして変化させることにより、上記 3 種類の活性種の生成割合を制御可能であることが分かった。本節では同じ照射条件を採用することで、細胞培養液の表面近傍に存在する各活性種の影響を評価する。

図 4-20 に、プラズマ照射時のガス流量を変化させた際の活性種(O,NO,OH)の投入量の相対比を示す。3 章で詳細を述べたが、ガス流量を変化させることで液体表面の湿度分布が大きく変化する。それにより水分を原料とする OH ラジカルの生成量が大きく上昇する。0.1→0.05 L/min にかけて OH ラジカル量が減少する理由は、多湿状態のため放電電力が低下するためである。雰囲気ガスの組成は  $[N_2]=100\%$  ( $[O_2]=0\%$ )であり、本来 NO の発生はあり得ないが、溶液中の溶存  $O_2$ ,  $N_2$  や有機物の蒸散は防ぐことが出来ないためだと思われる。

図 4-21 に、ガス流を変化させた際の生細胞率を示す。実験条件は 4.2 節で述べた方法と同様であり、相違点は、92 ウェル(ウェル内径 6.2 mm)を使用し、培養液 40  $\mu$ l とした点、およびガン細胞 B16F10 を用い、細胞生存率を評価するために MTT アッセイを使用した点である。この実験系の変更理由は、12 ウェルでは照射範囲が限られ、生存率の変化が乏しいためである。また、これまで実験設備の制約により線維芽細胞 NIH3T3 を使用していたが、ガン細胞の使用でより実際的なガン治療に向けた細胞実験を行うためである。最後に、MTT アッセイは実際の細胞数ではなく、細胞代謝物を染色することで生細胞数を間接的に評価する手法である。図 4-21 より、ガス流量の増加に伴い、細胞数の生存率が増加する傾向がみられる。エラーバーが大きいため厳密に有意差を求めることが難しいが、2 度の実験により再現性が確認されている。

図 4-22 に、ガス流量を変化させた際の OH ラジカル投入量と細胞生存率の関係を示す。OH ラジカル投入量は、培養液面の近傍に存在する OH ラジカル密度の時間積分値を示している。次に、細胞生存率は図 4-21 の結果を使用した。図 4-22 の結果は、OH ラジカルの投入量と細胞の生存率に相関があることを示している。サンプル数は 5 点であり、高投入量においては生存細胞がほとんどいない状態ではあるが、一定の相関関係を示していると考えられる。一方、本実験はガス流量を変更し、液面近傍の湿度分布が変化することを利用して、間接的に OH ラジカルの投入量を制御している。言い換えれば、液面近傍の湿度分布に依存して変化する活性種は OH ラジカルだけではない可能性がある。それを加味すると、

今回の結果から導かれる結論は，“細胞生存率はプラズマ照射領域の湿度環境に依存しており，OH ラジカルとの相関がある”ということである。今後，ラジカルスカベンジャー（ラジカル中和剤）を培養液に添加するなどして，OH ラジカルのみを消去するなどして原因要素の特定を進めていくことで，より明確な OH ラジカルの影響が判明すると期待できる。本結果は OH ラジカルの影響を議論する上で重要な知見であると考ええる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 4-20 プラズマ照射時のガス流量を変化させた際の液面近傍の活性種密度(O,NO,OH)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 4-21 プラズマ照射時のガス流量を変化させた際の細胞生存率

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 4-22 ガス流速を変化させた際の OH ラジカル密度（投入量）と細胞生存率の関係

図 4-23 に，プラズマ照射時のガス構成比を変化させた際に生じる活性種(O,NO,OH)投入量の相対比を示す。投入量は培養液面の近傍に存在する各活性種密度の時間積分値を示している。3 章で詳細を述べたが，ガス構成比( $O_2/N_2$ )を変化させることでガスを原料とする O ラジカルおよび NO ラジカルの生成量が大きく変化する。ガス流速を 0.5 L/min としており，高湿度下に比べて OH ラジカルの生成量は 1/10 程度に低減している。また高酸素下では，より高密度になる O ラジカルが OH ラジカルと高速に反応するため，高酸素(80-100%)では O ラジカル投入量の減少がみられる。雰囲気ガスが  $[N_2]=100\%$  ( $[O_2]=0\%$ ) のとき，本来 NO の発生はあり得ないが，溶液中の溶存酸素/窒素や有機物の蒸散は防ぐことが出来ないためだと思われる。

図 4-24 に，ガス構成比を変化させた際の細胞生存率を示す。ガス構成比  $[N_2]=100\%$ ，および  $[O_2]=100\%$  において，生存率の低下がみられる。これらの結果は，2 度の実験により再現性が確認されている。

図 4-25 に，ガス構成比を変化させた際の NO および O ラジカル投入量と細胞生存率の関係を示す。細胞生存率は図 4-24 の結果を使用した。図 4-25 の結果は，O ラジカルおよび NO ラジカルの投入量に依存して，いずれも細胞の生存率が上昇することを示している。つまり，本実験条件においては O ラジカルと NO ラジカルによる生細胞数の減少に相関は見られなかった。しかし，1 章で説明したように，上記の酸化剤により生じる細胞の酸化ストレスは程度により細胞増殖⇒アポトーシス⇒ネクローシスを発現することが知られており，今回の結果だけで，O および NO ラジカルによって細胞が酸化ストレスおよびアポトーシス発現と関与がないかどうかを判断することは出来ない。一方で，本プラズマ源の照射時間 100 秒においては，ガス構成比よりも湿度環境の影響が大きく影響していることは確かであり，低温プラズマによる医療効果をもたらす要因として，湿度管理の重要性は大きいと考えられる。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 4-23 プラズマ照射時のガス構成比( $O_2/N_2$ )を変化させた際の液面近傍の活性種密度(O,NO,OH)

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 4-24 プラズマ照射時のガス構成比( $O_2/N_2$ )を変化させた際の細胞生存率



一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が  
得られていないため，表示できない。

図 4-25 プラズマ照射時の O, NO ラジカル密度（投入量）と細胞生存率の関係

## 4.8 本章のまとめ

本章では、ナノ秒パルスプラズマによる細胞への影響を調査した。以下にそのまとめを述べる。

### (a) 雰囲気ガスによる影響

O<sub>2</sub> プラズマのみ照射時間に応じて細胞数が減少し、N<sub>2</sub>, He プラズマでは細胞数の増加が確認された。以下に細胞死の原因を検討する。投入エネルギーから見積もられる温度上昇は最大 4°C 程度であることから、熱による影響は小さいと考えられる。活性化の効果を持つ He プラズマの方が O<sub>2</sub> より UV 領域の発光強度ははるかに強いことから、UV による効果も支配的とは考えにくい。N<sub>2</sub> プラズマに細胞死の効果が表れないから、ストリーマヘッドの局所的高電界や、電流の刺激による効果も支配的とは考えにくい。

### (b) アポトーシスの検出

TUNEL 染色法により、O<sub>2</sub> プラズマが細胞にアポトーシスを誘導した事を確認した。プラズマ照射時間に応じてアポトーシス細胞の数や、アポトーシス発現の程度が進行していることが分かった。電極に近いほど細胞が少なく、アポトーシス細胞の割合が高いという分布を得た。以上より、O<sub>2</sub> プラズマのアポトーシス誘導効果はプラズマ照射時間で制御可能で、かつ、アポトーシスはプラズマ中に含まれる局所的な要因の累積によって引き起こされるものと考えられる。

### (c) アポトーシス要因の検討

O<sub>2</sub> ガスフローが細胞に悪影響を及ぼす効果は無視できるほど小さい事が分かった。よって、細胞の増減は全てがプラズマによって引き起こされる効果であると考えられる。また、O<sub>2</sub> ガスフロー、およびプラズマ照射が細胞にネクローシスを起こす効果は確認されなかった。

液体培地の厚みを薄くすることで、細胞死滅効果が最大約 2 倍程度に上昇した。この結果も、アポトーシスの主要因は O<sub>2</sub> プラズマに固有な酸素系活性種 (O 原子や O<sub>3</sub> など)、および培養液成分を原料とした生成物 (OH ラジカルなど) である可能性を示している。

オゾンやスーパーオキシドなどの比較的寿命の長い活性種による影響は無視できるほど小さい。

### (d) パルス幅の影響

ナノ秒パルス (Short pulse)、および通常のパルス (Long pulse) による O<sub>2</sub> プラズマの効果を比較したところ、Long pulse のみネクローシスと思われる細胞死が見られた。Long pulse 使用時は放電がスパーク状態に移行していた事から、スパークによる熱や電流・衝撃波等がネクローシスの原因と予想される。ナノ秒パルスはアーク放電やスパーク放電の抑制に有効であり、通常のパルス放電では実現できない低侵襲なプラズマ照射とその結果としてネクローシスを起こさず、主にアポトーシスを誘導することが出来る。

以上より、O<sub>2</sub> プラズマ中に含まれる熱や荷電粒子、活性種、電磁界、電流、UV といった要素のうち、アポトーシス誘導因子として、荷電粒子と短寿命の酸素系活性種が有力であることが分かった。

(e) 上記の知見を踏まえ、3 章で計測した酸素系活性種 (NO, OH, O) について、それぞれ液界面への供給量を制御した中で、ガン細胞 (B16F10) の生存率を評価した結果、OH ラジカルの供給量に依存して細胞生存率が減少する傾向を示した。また、O や NO の投入量の増加により細胞生存率の増加傾向を示した。この結果より、細胞生存率は界面近傍の湿度環境に強く依存し、OH ラジカル供給量と相関があるということが分かった。

## 第5章 マウス腫瘍へのプラズマ照射による影響

本研究では、ガン治療に向けたナノ秒パルスプラズマを提案し、そのプラズマ特性や活性種の生成能力を評価した。さらに、マウス細胞実験において、特定の照射条件により細胞生存率が増加または減少することや、酸素プラズマによりアポトーシス細胞死を導くことを示した。そこで本章では動物実験により、腫瘍組織へのプラズマ照射の効果を検証する。

本章で行われた動物実験は東京大学の片岡一則先生、三浦裕先生、および水野和恵様との共同研究であり、本研究室の平方健太さん、秋山雄俊さんの協力のもと行われた。また、この動物実験は東京大学大学院医学系研究科の動物実験実施規則に則り行われた。

### 5.1 マウス皮下腫瘍モデルの作成

#### 5.1.1 ガン細胞の準備

マウス腫瘍モデルの作成あたり、ガン細胞はマウスメラノーマ B16F10 を使用した。凍結細胞を回復し、RPMI-1640 培地(FBS10%, P/S1%)にて培養する、大型の T225 フラスコにコンフルエント状態手前まで増殖した細胞を使用する。ここから、4.1.3 節「実験手順」の 1-6 番を行い、最後に  $2.0 \times 10^7$  cell/ml の細胞懸濁液を 2 mL 作成する。

#### 5.1.2 マウスの準備

マウスは CDF1♀ (6 週齢) を合計 11 匹使用した。マウスを購入後、環境変化に順応させるため温度と湿度が管理された専用施設で飼育する。7 週齢の時点で、右足付け根の皮下にガン細胞(B16F10, 0.1 ml) を移植する。この部位は皮膚が柔軟であり、腫瘍の成長を妨げることが少ない。また、心肺動作により腫瘍部位の変動が少ない場所である。一方で、マウスのひざ下にはリンパ節が存在し、そこからリンパ節転移が起こりやすい場所でもある。ガン細胞の移植後、数日間を経て腫瘍組織を形成し、皮膚から半球状に盛り上がってくる。この腫瘍の短径・長径サイズがおおよそ 5 mm になる時点でプラズマ照射を開始する。本研究ではガン細胞の移植から 5 日を要した。

本実験は、マウスに皮下腫瘍を作成し、最大 3 週間の経過観察を要するため、SCAW のカテゴリ D に分類される。そのため人道的エンドポイントを「プラズマ照射から 3 週間経過した時点、もしくはマウス体重が主要移植日より 20%以上減少した時点」と設定した。

### 5.2 プラズマ照射

図 4-15 に、マウス腫瘍に対するプラズマ照射の実験概要を示す。イソフルレン麻酔器が接続された呼吸マスクをマウスに被せ、金属製の設置電極板の上で、うつ伏せの状態に寝かせる。その際腫瘍が胴体と足の関節に埋もれてしまい、腫瘍へ効率的にプラズマ供給が行う事が難しい。よって腫瘍の直下に直径 1 cm 程の金属球を設置し、また腫瘍の大きささだけくり抜いた紙テープによりマウスとアクリル板を固定することで、腫瘍を浮き上がらせるようにした。

照射条件として、細胞実験で細胞死の効果を確認できた  $O_2$  ガス (ガス流量は 0.5 L/min) を使用してパルス繰返し 30 Hz として“ナノ秒パルスプラズマ”を照射する。照射間隔 (電極と腫瘍間の距離) は 1 mm と 2 mm に設定する。マウスは合計 11 匹使用し、未照射とプラズマ照射(1 mm)を 4 匹ずつ、プラズマ照射(2 mm)を 3 匹とした。

照射方法は腫瘍の頂点に 10 分間の連続照射を行い、1 日 1 回の照射を 5 日間繰り返した (図 5-2)。しかし照射 3 日目に患部を確認したところ、瘡蓋 (かさぶた) が形成された。この原因としてスパーク放電の発生が考えられる。予備実験(2.3 節, 図 2-14 参照)において鶏肉へ照射したときと異なり、腫瘍へ照射すると図 5-2 のようなスパークプラズマを確認した。これにより照射部に何らかの炎症を及ぼしていると考え、3 日目から照射方法を変更した。頂点に 10 分間連続照射するのではなく、腫瘍の前後左右 4 か所から 2.5 分ずつ照射する方法に変更した。

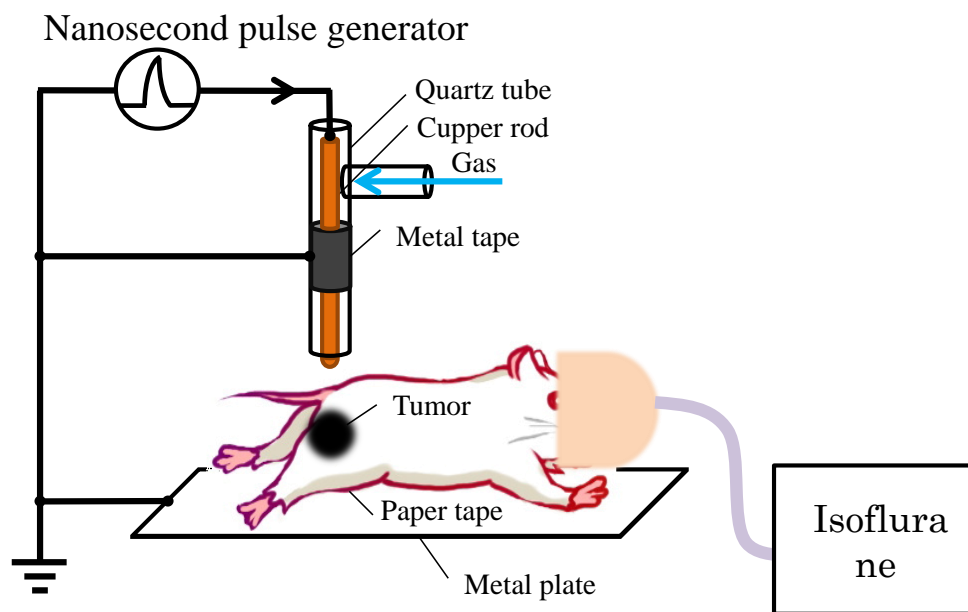


図 5-1 マウス腫瘍に対するプラズマ照射の実験系

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 5-2 マウス腫瘍への酸素プラズマ照射(照射距離 1 mm)

### 5.3 プラズマ照射後の腫瘍観察

本節では O<sub>2</sub> ガスを導入したプラズマを皮下腫瘍に照射し、腫瘍サイズの経時変化を評価する。皮膚と水平方向に腫瘍の短径と直径を測り、皮膚面と垂直方向の腫瘍高さを計測する。腫瘍サイズは以下の式により表される。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{高さ} \text{ [mm}^3\text{]} \quad (5-1)$$

腫瘍組織は半球状になることが多いが、腫瘍体積の算出は、球ではなく直方体の体積を広く用いる。本実験では、腫瘍の短径、長径、および高さを 2 回ずつ計測し、その平均から腫瘍体積を計算する。サンプルごとに腫瘍の成長速度が若干異なるため、移植後 6 日目の照射直前に計測した腫瘍体積により規格化する。その後、同じ条件下で 3-4 匹の腫瘍体積の平均値および、腫瘍体積の標準偏差（エラーバー）を示す。本実験では、6 日目にほぼすべてマウス腫瘍が 5 mm 径になったため、プラズマ照射を開始し、5 日間連続で毎回 10 分間照射した。その後、経過観察 3 週間行う。

図 5-3 に腫瘍の経過観察結果を示す。まず未照射群については、測定値に振れ幅があるものの日数と共に単調に増加している。しかし当初の予定では指数関数的に腫瘍が拡大することを想定していたが、経過観察をしていく中である程度の閾値に落ち着いている様子である。この原因として、ガン細胞の状態や注射の精度、及びマウスの免疫による排除が考えられる。まずガン細胞の状態により期待した増殖が得られなかった。また皮下注射の際に、皮下の一定の深さに細胞を埋め込む必要がある。深いと体内に流れ出てしまい、浅いと細胞懸濁液が体外に逆流してしまう。ゆえに注射の精度が綺麗なガン細胞の成長を促進する要因となる。さらにマウス自体が免疫を持っており、異物を排除しようという作用が働く。これは埋め込まれた細胞に関しても同様で、ガン細胞成長の抑制に機能している。事実、今回の実験において未照射群としていたマウスのうち 1 匹の腫瘍が消失した。しかし残る 2 匹のマウスの腫瘍は順調に成長しており、単調な増加を確認できた。

次に照射距離 2 mm の場合、3 日目以降の腫瘍体積は減少している。照射部に瘡蓋ができたが、照射終了後 3~5 日後には瘡蓋が全て剥離した。しかし、1 匹分において、瘡蓋が取れた下にガン細胞が残っていることが確認できた。この細胞は再度成長することが予想される。

最後に照射距離 1 mm の場合、照射期間中、および照射期間後一定期間に体積が増加した。これは炎症により生じた瘡蓋が原因であると考えられる。照射距離が 2 mm の場合にも瘡蓋はできるが、1 mm の瘡蓋の方が大きく、これが見かけ上の体積の増加に繋がったと考えられる。その後の経過観察により、3 匹のうち 2 匹分の瘡蓋は照射終了から 7 日後に剥離した。しかし 1 匹の瘡蓋は 18 日後にまで患部に残存した。このことから照射距離が 1 mm の場合は、個体差はあるものの、かなり程度の強い炎症を引き起こしていたと考えられる。また図 5-4 に照射距離 1 mm のマウスの経過観察写真を示す。瘡蓋自体は照射終了後 6 日で剥離し、傷口が見える状態になった。その後次第に治癒が進み、2 週間経過後にはほぼ傷口がわからないほどにまで回復している。以上の結果から、炎症が生じるものの、プラズマ照射により腫瘍の縮小効果が得られた。

一部が共同著作物であり，インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため，表示できない。

図 5-3 プラズマ照射による腫瘍体積の縮小効果

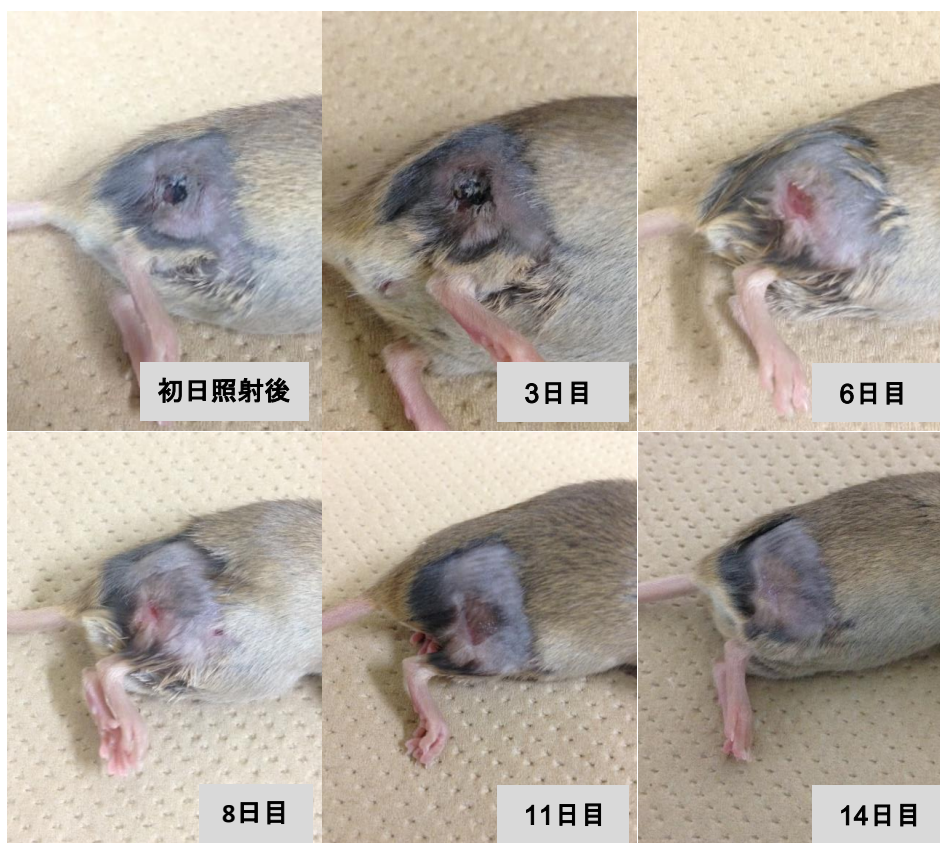


図 5-4 腫瘍部位の経時変化：痂蓋が発生し剥離後に腫瘍組織が縮小している。

## 5.4 まとめ

本章では、ナノ秒パルスプラズマによる腫瘍組織への影響を調査した。以下にそのまとめを述べる。

- マウス腫瘍モデルの作成

電気工学専攻の著者にとってバイオ系実験の立上げは容易でない。その中でも細胞実験や動物実験は未知の体験の連続であり、共同研究において実験手順の指導を受け、設備を借りて行うものの、マウスに皮下腫瘍モデルを作ること自体がプラズマガン治療に向けた成果の一つであると言える。

- マウス腫瘍へのプラズマ照射では、鳥モモ肉を使った予備実験と異なり、生体のインピーダンスが予想以上低かったため、スパークに近い放電が発生してしまった。そのため、腫瘍組織に対して熱的ダメージに由来すると考えられる炎症反応と瘡蓋の形成が確認された。

- 腫瘍体積を経時観察した結果、プラズマ照射を行ったマウスはいずれも腫瘍体積が大きく減少する結果を得た。観察期間内において腫瘍体積が再度増加する傾向は見られず、特に 21 日以降は腫瘍体積も小さい状態で推移した。

- 腫瘍部位の経時変化によると、プラズマ照射初日以降、腫瘍部に瘡蓋が形成されたものの、日数経過とともに順次瘡蓋の剥離が生じ、その後には腫瘍組織が縮小し、または確認できないほど小さくなるマウスも確認された。

以上の事から、マウス腫瘍モデルを用いた実験は、プラズマの予期せぬ熱化が生じたものの、総じて腫瘍の縮小効果が得られた。今後はプラズマ照射条件を最適化し、低温照射の中で腫瘍縮小とアポトーシス発現の確認を行うことが望まれる。

## 第6章 結論

本研究では“ナノ秒パルスプラズマ”と呼ぶプラズマ源を提案し、その物理特性や活性種生成能を評価した。さらにこのプラズマを細胞やマウス皮下腫瘍モデルに照射することで、ガン治療に向けた生体効果を評価した。以下に本研究で得られた知見を述べる。

● 『2章：ナノ秒パルスプラズマの特性』において、

**ナノ秒パルスプラズマ：**ナノ秒オーダーの短いパルス高電圧（最大電圧 24kV、パルス半値全幅 6.4ns）により、O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He ガス中で低温プラズマを発生・照射することが可能になった。

**温度特性：**生体の模擬材料として、鳥モモ肉、寒天培地や細胞培養液に対してナノ秒パルスプラズマを照射し、その温度上昇が通常のパルス放電プラズマと比較して、生体に損傷を与えない程度の低温なプラズマ照射を可能にすることを示した。

**副生成物：**プラズマの副生成物のうち、生体影響の大きいと思われる NO 濃度は、通常のパルス放電に比べ、ナノ秒パルスプラズマは NO 発生を 1/10 以下に低減し、およそ 0.7ppm(30Hz 照射時)となった。

**活性種生成能：**放電様相の比較により、ナノ秒パルスプラズマは通常パルス放電と比べ、2次ストリーマの進展長が短く、放電の熱化抑止に寄与し、副生成物の生成を低減する効果がある。照射対象の表面の OH ラジカル密度はパルス幅によらず同程度であり、より低温・低害のプラズマ照射を期待できる。

● 『3章：ナノ秒パルスプラズマの活性種生成』において、

**湿度分布計測：**湿潤対象に乾燥ガス流を与え、対象面上の湿度分布を LIF 法により計測した結果、乾燥ガス流の流量(0.05→1.0 L/min)に依存して湿度分布が大きく変わり、拡散層の厚みが 1→0.1 mm へと変化した。

**湿度環境が活性種生成に与える影響：**水分を原料とする OH ラジカルの生成量は湿度環境に大きく影響を受け、1パルスあたりに水面に供給される OH ラジカル量は 100%→6%(0.05→1.0 L/min)に減少する。一方、乾燥ガス中では OH ラジカルの生成はないとする一般的な考えに対し、OH ラジカルの完全な排除が困難であることを示した。

**活性種制御：**上記の知見を活かし、ガス流量（間接的に湿度）とガス構成比(O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>)をパラメータとして3種の活性種(NO, OH, O)を計測した結果、それぞれが1パルスあたりに液界面に供給される活性種投入量を見積もることが出来た。さらに、上記パラメータのうち、ガス流量では OH ラジカル投入量、ガス構成比では O ラジカルと NO ラジカルの投入量を制御できることが分かった。

● 『4章：株化細胞へのプラズマ照射による影響』において、

**雰囲気ガスによる影響：**O<sub>2</sub> プラズマのみ照射時間に応じて細胞数が減少し、N<sub>2</sub>, He プラズマでは細胞数の増加が確認された。細胞死の原因として、熱や UV、局所的高電界や電流刺激による効果は限定的であり、本実験では細胞死の要因ではないと考えられる。

**アポトーシス**

TUNEL 染色法により O<sub>2</sub> プラズマが細胞にアポトーシスを誘導した事を確認した。プラズマ照射時間に応じてアポトーシス細胞数や、発現の程度が進行することが分かった。電極直下に近いほど細胞が少なく、アポトーシス細胞の割合が高いという分布を得た。一方、ガスフローのみの影響は無視できる。



オゾンやスーパーオキシドなどの比較的寿命の長い活性種による影響は無視できるほど小さい。培養液の厚みを薄くすると、細胞死滅効果が最大約 2 倍程度に上昇した。

### パルス幅の影響

ナノ秒パルス (Short pulse), および通常のパルス(Long pulse)による O<sub>2</sub>プラズマの効果を比較したところ、Long pulse のみネクロシスと思われる細胞死が見られた。Long pulse 使用時は放電がスパーク状態に移行していた事から、スパークによる熱や電流・衝撃波等がネクロシスの原因と予想される。ナノ秒パルスはアーク放電やスパーク放電の抑制に有効であり、通常のパルス放電では実現できない低侵襲なプラズマ照射とその結果としてネクロシスを起こさず、主にアポトーシスを誘導することが出来る。

以上より、O<sub>2</sub>プラズマ中に含まれる熱や荷電粒子、活性種、電磁界、電流、UV といった要素のうち、アポトーシス誘導因子として、イオンや短寿命の酸素系活性種が有力であることが分かった。

### 活性種制御による生細胞率

上記の知見を踏まえ、3章で計測した酸素系活性種(NO, OH, O)について、それぞれ液面への供給量を制御した中で、ガン細胞(B16F10)の生存率を評価した結果、OH ラジカルの供給量に依存して細胞生存率が減少する傾向を示した。また、O や NO の投入量の増加により細胞生存率の増加傾向を示した。この結果より、細胞生存率は界面近傍の湿度環境に強く依存し、OH ラジカル供給量と相関があるということが分かった。

- 『5章：マウス腫瘍へのプラズマ照射による影響』において、

### マウス腫瘍へのプラズマ照射

生体のインピーダンスが想定以上に低く、スパーク状の放電が発生した。そのため腫瘍組織に対して熱的ダメージに由来すると考えられる炎症反応と瘡蓋の形成が確認された。

### 腫瘍体積を経時観察

プラズマ照射を行ったマウスはいずれも腫瘍体積が大きく減少する結果を得た。観察期間内において腫瘍体積が再度増加する傾向は見られず、特に 21 日以降は腫瘍体積が小さい状態で推移した。

### 腫瘍部位の経時変化

プラズマ照射初日以降、腫瘍部に瘡蓋が形成されたものの、日数経過とともに順次瘡蓋の剥離が生じ、その後には腫瘍組織の縮小が確認された。

以上の結果を要約すると、本研究で提案したナノ秒パルスプラズマは低温・低害なプラズマ源である。マウス繊維芽細胞に照射した場合、プラズマ中の雰囲気ガス種により細胞の死滅や増殖促進という効果が得られた。本研究では特に酸素ガス中でプラズマ照射を行うことで、マウス細胞に対してアポトーシス細胞死を確認した。アポトーシス細胞死はガン治療を行う上で、周辺組織に炎症を起こさず、ガン細胞がソフトに死滅していくことを期待できる。また、このガン細胞死が荷電粒子や短寿命な活性種によりもたらされている可能性を示した。さらに、プラズマ医療で一般的に用いる実験系において、活性種生成に周辺の湿度環境が大きく影響しており、その湿度環境を計測・制御することで、生体に供給する活性種量を制御できることを示した。この知見を踏まえ、3種類の活性種の発生量を変化させることで、培養細胞の生存率への影響を評価した。結果として、湿度環境が細胞生存率に大きく影響を与え、OH ラ

ジカルの投入量に相関があることを示した。これまで、プラズマ医療に関する研究においてプラズマ中の複数の活性種を同条件で計測した研究例、および活性種の供給量を定量的に変更し細胞への影響を評価した研究例はなく、いずれも世界初の報告となる。加えて、マウス腫瘍モデルへのプラズマ照射により腫瘍体積の縮小が確認された。これらの結果により、本研究のナノ秒パルスプラズマがガン治療に向けて優れた効果を有していることが分かった。

## 謝辞

本研究を行うにあたり大変多くの方にご支援・ご助力を頂きました。

小野亮先生には、博士研究の立上げから終始適切なご指導を頂き、学術面だけでなく人間的にも成長する機会を沢山頂きました。大変感謝しております。小田哲治先生には、研究の立上げから貴重なご意見に加えて共同研究などの機会を頂きました。大変感謝しております。東京都市大学の平田孝道先生と筒井千尋先生には、細胞実験の初期より多くの助言と技術的なご指導を頂き、加えて学会等々でも親しくして頂き感謝しております。本学・医学系研究科の片岡一則先生，三浦裕先生，水野和恵様には，癌細胞やマウスを用いた実験にご支援・ご助力を頂きました。特に水野様には，医療分野に疎い我々を優しく導いて頂いたことに感謝を述べさせていただきます。

豊橋技術科学大学の水野彰先生，栗田弘史先生，中島知子様には，殺菌実験の手解きに加え，学会等でも毎度親しくして頂きありがとうございました。岩手大学の高木浩一先生には，学士・修士研究の時からご指導を頂いており，ナノ秒パルス電源の技術は本研究の核心になっています。ありがとうございました。

本研究室の卒業生である安田拓真くん，三谷成くんには，本研究の立上げより生物実験に参加してもらい，東京都市大学の筒井様のご指導の下，細胞実験の土台を気づいてくれました。同じく平方健太くんには，細胞・動物実験を主導して進め有意義な成果を数多く残してくれました。社会に出てからも大いに活躍してください。小松真之くんは，学部生から殺菌実験を立上げてくれました。今後の研究成果も楽しみにしています。秋山雄俊くんは，すでに単独で生物実験を進めており，今後も動物実験など忙しくなりそうですが頑張ってください。最後に，博士在学中の3年間，数々の障壁をこのメンバーと乗り越えることが出来てとても幸せでした。どうもありがとうございました。

## 参考文献

- [1] G. Fridman, G. Friedman, and A. Gutsol, “Applied plasma medicine,” *Plasma Process.*, 2008.
- [2] “人口統計,” 厚生労働省, 2013. [Online]. Available: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/>.
- [3] 日経サイエンス編集部, *がんを知り、がんを治す—研究最前線と新薬開発 (別冊日経サイエンス 160)*. 2008.
- [4] 中川 恵一, *ビジュアル版 がんの教科書*. 三省堂, 2006.
- [5] B. Alberts, *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*, vol. 1. Garland, New York, 1998.
- [6] 徹秋山 and 和義河府, *細胞・培地活用ハンドブック—特徴, 培養条件, 入手法などの重要データがわかる*. 2007.
- [7] J. Y. Kim, S.-O. Kim, Y. Wei, and J. Li, “A flexible cold microplasma jet using biocompatible dielectric tubes for cancer therapy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 96, no. 20, p. 203701, 2010.
- [8] G. J. Kim, W. Kim, K. T. Kim, and J. K. Lee, “DNA damage and mitochondria dysfunction in cell apoptosis induced by nonthermal air plasma,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 96, no. 2, p. 021502, 2010.
- [9] M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston, and B. Trink, “Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy,” *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 9, pp. 1295–1301, 2011.
- [10] A.-R. Lupu, N. Georgescu, A. Călugăru, L. Cremer, G. Szegli, and F. Kerek, “THE EFFECTS OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA JETS ON B16 AND COLO320 TUMORAL CELLS,” *Rom. Arch.*, vol. 30, no. 4, p. 136, 2009.
- [11] C. Tsutsui, T. Hirata, T. Komachi, T. Kishimoto, A. Mori, M. Akiya, T. Yamamoto, and A. Taguchi, “マイクロスポット大気圧プラズマ源による 細胞および生体組織の活性化 Tissue and Cell Activation Using Micro-Spot Atmospheric Pressure Plasma Source,” vol. 1, pp. 20–24, 2011.
- [12] D. B. Graves, “The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 26, p. 263001, 2012.

- [13] 中村肇, 増谷弘, and 淀井淳司, 酸化ストレスドックスの生化学. 日本生化学会, 共立出版, 2000.
- [14] B. Halliwell, "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?," *J. Neurochem.*, vol. 97, no. 6, pp. 1634–58, Jun. 2006.
- [15] R. N. Ma, H. Q. Feng, Y. D. Liang, Q. Zhang, Y. Tian, B. Su, J. Zhang, and J. Fang, "An atmospheric-pressure cold plasma leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulating intracellular reactive oxygen species and calcium," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 28, p. 285401, 2013.
- [16] W. Kim, K.-C. Woo, G.-C. Kim, and K.-T. Kim, "Nonthermal-plasma-mediated animal cell death," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 1, p. 13001, 2011.
- [17] M. Meyer, R. Schreck, and P. A. Baeuerle, "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor.," *EMBO J.*, vol. 12, no. 5, p. 2005, 1993.
- [18] "ERBE company website." [Online]. Available: <http://www.erbe-med.com/de/medical-technology/public/Home?chl>.
- [19] "Plasma Surgical company website."
- [20] "Medtronic company website." [Online]. Available: <http://newsroom.medtronic.com/phoenix.zhtml?c=251324&p=irol-newsArticle&ID=1775942&highlight=>.
- [21] "ArthroCare company website." [Online]. Available: <http://www.arthrocare.com/default.htm>.
- [22] "Olympus company website." [Online]. Available: <http://www.olympus-global.com/en/>.
- [23] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Schultz, A. Fridman, and K. Harding, "Gas plasma: medical uses and developments in wound care," *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 194–211, 2010.
- [24] H. C. Baxter, G. A. Campbell, A. G. Whittaker, A. C. Jones, A. Aitken, A. H. Simpson, M. Casey, L. Bountiff, L. Gibbard, and R. L. Baxter, "Elimination of transmissible spongiform encephalopathy infectivity and decontamination of surgical instruments by using radio-frequency gas-plasma treatment," *J. Gen. Virol.*, vol. 86, no. 8, pp. 2393–2399, 2005.
- [25] R. L. Baxter, H. C. Baxter, G. A. Campbell, K. Grant, A. Jones, P. Richardson, and G. Whittaker, "Quantitative analysis of residual protein contamination on reprocessed surgical instruments," *J. Hosp. Infect.*, vol. 63, no. 4, pp. 439–444, 2006.

- [26] S. Perni, G. Shama, J. L. Hobman, P. a. Lund, C. J. Kershaw, G. a. Hidalgo-Arroyo, C. W. Penn, X. T. Deng, J. L. Walsh, and M. G. Kong, "Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with *Escherichia coli* mutants," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 90, no. 7, p. 073902, 2007.
- [27] X. T. Deng, J. J. Shi, and M. G. Kong, "Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: Capability and mechanisms," *J. Appl. Phys.*, vol. 101, no. 7, p. 74701, 2007.
- [28] X. T. Deng, J. J. Shi, H. L. Chen, and M. G. Kong, "Protein destruction by atmospheric pressure glow discharges," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 90, no. 1, p. 13903, 2007.
- [29] X. Lu, Z. Jiang, Q. Xiong, Z. Tang, X. Hu, and Y. Pan, "An 11 cm long atmospheric pressure cold plasma plume for applications of plasma medicine," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 92, p. 81502, 2008.
- [30] H. J. Lee, C. H. Shon, Y. S. Kim, S. Kim, G. C. Kim, and M. G. Kong, "Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115026, 2009.
- [31] C. Jiang, M. Chen, A. Gorur, C. Schaudinn, D. E. Jaramillo, J. W. Costerton, P. P. Sedghizadeh, P. T. Vernier, and M. A. Gundersen, "Nanosecond pulsed plasma dental probe," *Plasma Process. Polym.*, vol. 6, no. 8, pp. 479–483, 2009.
- [32] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, "Applied plasma medicine," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, 2008.
- [33] J. Raiser and M. Zenker, "Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 39, no. 16, p. 3520, 2006.
- [34] D. Palanker, A. Vankov, and P. Jayaraman, "On mechanisms of interaction in electrosurgery," *New J. Phys.*, vol. 10, no. 12, p. 123022, 2008.
- [35] J. Y. Kim, Y. Wei, J. Li, and S.-O. Kim, "Cell Internal Treatable Microplasma Jets in Cancer Therapies," *Bull. Am. Phys. Soc.*, vol. 56, 2011.
- [36] J. Y. Kim, J. Ballato, P. Foy, T. Hawkins, Y. Wei, J. Li, and S.-O. Kim, "Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 28, no. 1, pp. 333–338, 2011.
- [37] G. Fridman, A. D. Brooks, M. Balasubramanian, A. Fridman, A. Gutsol, V. N. Vasilets, H. Ayan, and G. Friedman, "Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal

- Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. 4, pp. 370–375, May 2007.
- [38] K. Takaki, I. Yagi, and T. Fujiwara, “Influence of Circuit Parameter on Ozone Synthesis Using Inductive Energy Storage System Pulsed Power Generator.” .
- [39] I. Yagi, S. Okada, T. Matsumoto, D. Wang, T. Namihira, and K. Takaki, “Streamer propagation of nanosecond pulse discharge with various rise times,” *Plasma Sci. IEEE Trans.*, vol. 39, no. 11, pp. 2232–2233, 2011.
- [40] E. Stoffels, I. E. Kieft, and R. E. J. Sladek, “Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 23, p. 2908, 2003.
- [41] E. Stoffels, I. E. Kieft, R. E. J. Sladek, L. J. M. Van den Bedem, E. P. Van der Laan, and M. Steinbuch, “Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 15, no. 4, p. S169, 2006.
- [42] E. Stoffels, A. J. M. Roks, and L. E. Deelman, “Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 599–605, 2008.
- [43] M. Leduc, D. Guay, R. L. Leask, and S. Coulombe, “Cell permeabilization using a non-thermal plasma,” *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115021, 2009.
- [44] A.-R. Lupu and N. Georgescu, “Cold atmospheric plasma jet effects on V79-4 cells,” *Roum Arch Microbiol Immunol*, vol. 69, pp. 67–74, 2010.
- [45] M. Vandamme, E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, and J. Pouvesle, “Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 3 -4, pp. 264–273, 2010.
- [46] M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, and J.-M. Pouvesle, “Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment,” *Plasma Med.*, vol. 1, no. 1, 2011.
- [47] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, and B. Legrain, “ROS implication in a new antitumor strategy based on non -thermal plasma,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2185–2194, 2012.
- [48] J. Schlegel, J. Köritzer, and V. Boxhammer, “Plasma in cancer treatment,” *Clin. Plasma Med.*, 2013.

- [49] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, and A. Fridman, “Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue,” *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115020, 2009.
- [50] L. Zach and G. Cohen, “Pulp response to externally applied heat,” *Oral Surg*, vol. 19, pp. 515–530, 1965.
- [51] Q. Chen, J. Li, K. Saito, and H. Shirai, “The characterization of radio-frequency discharge using electrolyte solution as one electrode at atmospheric pressure,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 41, no. 17, p. 175212, Sep. 2008.
- [52] H. Kato and T. Ishida, “Development of an agar phantom adaptable for simulation of various tissues in the range 5-40 MHz.(Hyperthermia treatment of cancer),” *Phys. Med. Biol.*, vol. 32, no. 2, p. 221, 1987.
- [53] R. Ono and T. Oda, “Nitrogen oxide  $\gamma$ -band emission from primary and secondary streamers in pulsed positive corona discharge,” *J. Appl. Phys.*, vol. 97, no. 1, p. 13302, 2005.
- [54] J. M. Meek, “A theory of spark discharge,” *Phys. Rev.*, vol. 57, no. 8, p. 722, 1940.
- [55] R. Ono, Y. Nakagawa, and T. Oda, “Effect of pulse width on the production of radicals and excited species in a pulsed positive corona discharge,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 48, p. 485201, 2011.
- [56] R. Ono and T. Oda, “Formation and structure of primary and secondary streamers in positive pulsed corona discharge—effect of oxygen concentration and applied voltage,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 16, p. 1952, 2003.
- [57] R. Ono and T. Oda, “Dynamics and density estimation of hydroxyl radicals in a pulsed corona discharge,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 35, no. 17, p. 2133, 2002.
- [58] R. Ono and T. Oda, “Measurement of gas temperature and OH density in the afterglow of pulsed positive corona discharge,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 41, no. 3, p. 35204, 2008.
- [59] 学, 山本, 精一, and 村山, プラズマの分光計測. 1995.
- [60] 堤井信力 and 小野茂, プラズマ気相反応工学. 2000.
- [61] 金田輝男, 電離気体の原子・分子過程. 東京電機大学出版局, 1982.
- [62] 菅井秀郎, プラズマエレクトロニクス. オーム社, 2000.



- [63] 大澤敏彦 and 保方富夫, “レーザ計測, pp20-26.” 裳華房, 1994.
- [64] 静電気学会, 静電気ハンドブック. オーム社, 2006.
- [65] 小野亮, 「レーザ誘起蛍光法による大気圧放電プラズマ中の OH ラジカルの測定」. 本学博士論文, 1999.
- [66] 中川雄介, 有害ガス放電分解の反応機構解明を目的とする大気圧プラズマ中 OH ラジカルのレーザ計測. 本学博士論文, 2012.
- [67] 寺本慶之, レーザ計測による大気圧ストリーマ中窒素系活性種  $N_2(A_3\Sigma^+u)$ ,  $N$ ,  $N_2(v)$  の生成・反応機構解明. 本学博士論文, 2012.
- [68] 7th ed. WMO(World Meteorological Organization) No. 8, *Guide to Meteorological Instruments and Methods of Observation: Measurement of Humidity.pdf*. 2008, p. Chap. 4.
- [69] Q. Zhou, M. R. Shahriari, D. Kritz, and G. H. Sigel Jr, “Porous fiber-optic sensor for high-sensitivity humidity measurements,” *Anal. Chem.*, vol. 60, no. 20, pp. 2317–2320, 1988.
- [70] F. Mitschke, “Fiber-optic sensor for humidity,” *Opt. Lett.*, vol. 14, no. 17, pp. 967–969, 1989.
- [71] A. Kharaz and B. E. Jones, “A distributed optical-fibre sensing system for multi-point humidity measurement,” *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 47, no. 1, pp. 491–493, 1995.
- [72] W. C. Michie, B. Culshaw, A. McLean, M. Konstantaki, and S. Hadjiloucas, “Distributed water ingress and water potential measurements using fibre optics,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 19, no. 1, pp. 35–44, 1997.
- [73] P. Kronenberg, P. K. Rastogi, P. Giaccari, and H. G. Limberger, “Relative humidity sensor with optical fiber Bragg gratings,” *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 16, pp. 1385–1387, 2002.
- [74] J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, T. Von Woedtke, R. Brandenburg, T. Von dem Hagen, and K. D. Weltmann, “Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 1, p. 13002, 2011.
- [75] 山田剛, 「大気圧パルスバリア放電における NO 挙動特性の解明」. 本学修士論文, 2003.
- [76] 政文, 上田, 湿度と蒸発・基礎から計測技術まで. コロナ社, 2000.
- [77] A. Fick, “Ueber diffusion,” *Ann. Phys.*, vol. 170, no. 1, pp. 59–86, 1855.
- [78] J. Luque and D. R. Crosley, “LIFBASE, Database and spectral simulation for diatomic molecules,” *SRI Int. Rep. MP-99-009*, 1999.

- [79] Y. Nakagawa, R. Ono, and T. Oda, "Density and temperature measurement of OH radicals in atmospheric-pressure pulsed corona discharge in humid air," *J. Appl. Phys.*, vol. 110, no. 7, p. 73304, 2011.
- [80] L. R. Williams and D. R. Crosley, "Collisional vibrational energy transfer of OH ( $A \Sigma, v'=1$ )," *J. Chem. Phys.*, vol. 104, p. 6507, 1996.
- [81] C. Y. Chan, R. J. O'Brien, T. M. Hard, and T. B. Cook, "Laser-excited fluorescence of the hydroxyl radical: relaxation coefficients at atmospheric pressure," *J. Phys. Chem.*, vol. 87, no. 24, pp. 4966–4974, 1983.
- [82] R. Ono and T. Oda, "Measurement of hydroxyl radicals in an atmospheric pressure discharge plasma by using laser-induced fluorescence," *Conf. Rec. 1998 IEEE Ind. Appl. Conf. Thirty-Third IAS Annu. Meet. (Cat. No.98CH36242)*, vol. 3, pp. 1777–1783, 1998.
- [83] R. Ono and T. Oda, "Dynamics of ozone and OH radicals generated by pulsed corona discharge in humid-air flow reactor measured by laser spectroscopy," *J. Appl. Phys.*, vol. 93, no. 10, p. 5876, 2003.
- [84] S. Yonemori, Y. Nakagawa, R. Ono, and T. Oda, "Measurement of OH density and air–helium mixture ratio in an atmospheric-pressure helium plasma jet," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 22, p. 225202, 2012.
- [85] "111202 YAGI UT\_odaono\_lab %40Joint Seminar 2011.pdf." .
- [86] O. Eichwald, M. Yousfi, A. Hennad, and M. D. Benabdessadok, "Coupling of chemical kinetics, gas dynamics, and charged particle kinetics models for the analysis of NO reduction from flue gases," *J. Appl. Phys.*, vol. 82, no. 10, pp. 4781–4794, 1997.
- [87] H. Matzing, "Chemical kinetics of flue gas cleaning by irradiation with electrons," *Adv. Chem. Phys.*, vol. 80, pp. 315–402, 1991.
- [88] D. L. Baulch, C. T. Bowman, C. J. Cobos, R. A. Cox, T. Just, J. A. Kerr, M. J. Pilling, D. Stocker, J. Troe, and W. Tsang, "Evaluated kinetic data for combustion modeling: supplement II," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 34, p. 757, 2005.
- [89] R. Atkinson, D. L. Baulch, R. A. Cox, R. F. Hampson Jr, J. A. Kerr, M. J. Rossi, and J. Troe, "Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: supplement VI. IUPAC subcommittee on gas kinetic data evaluation for atmospheric chemistry," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 26, p. 1329, 1997.

- [90] R. Ono, K. Takezawa, and T. Oda, "Two-photon absorption laser-induced fluorescence of atomic oxygen in the afterglow of pulsed positive corona discharge," *J. Appl. Phys.*, vol. 106, no. 4, p. 043302, 2009.
- [91] 武澤慶, 「2光子励起レーザー誘起蛍光法によるストリーマ状大気圧パルスコロナ放電における酸素原子ラジカルの挙動観測」. 本学修士論文, 2006.
- [92] 小室淳史, 「振動励起分子を考慮した ストリーマ放電シミュレーション」. 本学博士論文, 2011.
- [93] B. Eliasson, M. Hirth, and U. Kogelschatz, "Ozone synthesis from oxygen in dielectric barrier discharges," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 20, no. 11, p. 1421, 1987.
- [94] B. M. Penetrante, J. N. Bardsley, and M. C. Hsiao, "Kinetic analysis of non-thermal plasmas used for pollution control," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 36, no. part 1, pp. 5007–5017, 1997.
- [95] F. Tochikubo and H. Arai, "Numerical simulation of streamer propagation and radical reactions in positive corona discharge in N<sub>2</sub>/NO and N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/NO," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 41, p. 844, 2002.
- [96] 安田拓真, ナノ秒高電圧パルス励起大気圧プラズマによる細胞のアポトーシス処理. 本学修士論文, 2013.
- [97] G. Fridman, A. Shereshevsky, M. M. Jost, A. D. Brooks, A. Fridman, A. Gutsol, V. Vasilets, and G. Friedman, "Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 27, no. 2, pp. 163–176, 2007.
- [98] R. Ono and T. Oda, "Ozone production process in pulsed positive dielectric barrier discharge," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 1, p. 176, 2007.
- [99] N. I. Goldstein, R. N. Goldstein, and M. N. Merzlyak, "Negative air ions as a source of superoxide," *Int. J. Biometeorol.*, vol. 36, no. 2, pp. 118–122, 1992.
- [100] G. Black, R. L. Sharpless, and T. G. Slanger, "Collisional quenching of NO ( $B^2\Pi_{g^-}$ )  $v'=0$  produced by the reaction of N ( $^2D$ ) with N( $^2O$ )," *J. Photochem.*, vol. 5, no. 6, pp. 435–445, 1976.
- [101] I. S. Mcdermid and J. B. Laudenslager, "Radiative lifetimes and electronic quenching rate constants for single-photon-excited rotational levels of no ( $A^2\Sigma^+$ ,  $v'=0$ )," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, vol. 27, no. 5, pp. 483–492, 1982.
- [102] J. Brzozowski, N. Elander, and P. Erman, "Direct Measurements of Lifetimes of Low-lying Excited Electronic States in Nitric Oxide," *Phys. Scr.*, vol. 9, no. 2, p. 99, 1974.

## 研究業績

### 投稿論文

1. 八木一平, 向川政治, 高木浩一, 藤原民也, 郷富夫, “高速リカバリーダイオードを用いた誘導性エネルギー蓄積方式パルスパワー電源におけるオゾン生成効率”, 電気学会誌 A Vol.130, No.6, pp549-554, 2010
2. 八木一平, 向川政治, 高木浩一, 藤原民也, 郷富夫, “誘導性パルスパワー電源を用いたオゾン生成効率のパルス幅依存性”, 放電学会誌 第 29 回放電学会若手セミナー優秀ポスター発表賞受賞論文 Vol.52, No.4, pp10-11, 2009
3. 八木一平, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “全固体素子ナノ秒パルス電源を用いた放電の進展と窒素発光”, プラズマ応用科学, Vol. 18, No. 2, 2010
4. Ippei Yagi, Sho Okada, Takao Matsumoto, Douyan Wang, Takao Namihira, and Koichi Takaki, “Streamer Propagation of Nanosecond Pulse Discharge with Various Rise Times”, IEEE Trans. Plasma Sci., Vol. 39, No. 11, pp. 2232-2233, 2011
5. Ippei Yagi, Yusuke Nakagawa, Ryo Ono, Tetsuji Oda and Koichi Takaki, “Direct plasma treatment by 8-nanosecond pulse discharge for biomedical applications”, Journal of Physics D: Applied Physics , 投稿中
6. Ippei Yagi, Takuma Yasuda, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Chihiro Tsutsui, Takamichi Hirata, and Koichi Takaki, “Biological Effects of Fibroblast Cells by Ultrashort Nanosecond Pulsed Discharge without Dielectric Barrier”, Japanese Journal of Applied Physics, 投稿中
7. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, and Koichi Takaki, “Measurement of humidity and OH density distributions in pulsed streamer discharge on wet surface with perpendicular dry gas flow”, Journal of Physics D: Applied Physics ,投稿中

### 投稿論文非筆頭

1. Koichi Takaki, Ippei Yagi, Tamiya Fujiwara, “Influence of Circuit Parameter on Ozone Synthesis Using Inductive Energy Storage System Pulsed Power Generator ”, IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation, Vol. 18, No. 5, pp. 1752-1758, 2011
2. Katsuyuki Takahashi, Ippei Yagi, Koichi Takaki, and Naoya Satta, “Development of Pulsed Discharge Inside Bubble in Water”, IEEE Trans. Plasma Sci., Vol. 39, No. 11, pp. 2654-2655, 2011
3. 角田貴俊, 高木浩一, 八木一平, “高速リカバリーダイオードと可飽和コア併用型ナノ秒パルス電源の開発とアレスタによるオゾン生成効率の向上”, 放電研究, Vol. 56, No. 2, 2013

## 国際学会発表

1. Ippei Yagi, Seiji Mukaigawa, Koichi Takaki, Tamiya Fujiwara, and Tomio Go, “Improvement of Ozone Yield Using Double Loop Inductive Energy Storage System Circuit with Fast Recovery Diode”, The sixth Asia-Pacific International Symposium on the Basic and Application of Plasma Technology (APSPT), B03, Hsinchu, Taiwan R.O.C, Dec 2009
2. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Electric Field Measurement of Pulsed Corona Discharge Using Inductive Energy Storage Pulsed Power Generator”, 2nd ISNPEDADM - 2011(New electrical technologies for environment), Noumea, New Caledonia, Nov 2011
3. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Electric Field in Pulsed Corona Discharge”, Plasma Conference 2011, 23E03, Kanazawa Japan, Nov. 2011
4. Ippei Yagi, Takuma Yasuda, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Chihiro Tsutsui, Takamichi Hirata, Koichi Takaki, “Apoptosis Induction on Fibroblast Cells by Atmospheric Pressure Plasma Treatment Using Nanosecond Pulsed Power Generator”, 4th international conference on plasma medicine, Poster No.116, p.116, Orleans France, Jun. 2012
5. Ippei Yagi, Takuma Yasuda, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Chihiro Tsutsui, Takamichi Hirata, Koichi Takaki, “Nano-seconds Pulsed Discharge Plasma Inducing Apoptotic Behavior in Fibroblast Cell Lines”, Bioelectrics 2012 9th International Bioelectrics Symposium, P-1 A-6, Kumamoto Japan, Sep. 2012
6. Ippei Yagi, Yusuke Nakagawa, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Measurement of Hydroxyl Radical in an Atmospheric Pressure Plasma Driven by Nano-second Pulsed Discharge”, 5th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, P1012A, Nagoya Japan, January. 2013
7. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Measurement of Plasma Characteristics Driven by Nanoseconds Pulsed Power Generator”, 40th Conference on Plasma Physics, P4.305, Helsinki Finland, July. 2013
8. Ippei Yagi, Yusuke Nakagawa, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Measurement of OH Radicals in Non Thermal Plasma Driven by Nanoseconds Pulsed Power Generator”, International Conference on Phenomena in Ionized Gases (ICPIG-2013), PS1-70, Granada Spain, July. 2013

## 国内学会発表

1. 八木一平, 向川政治, 高木浩一, 藤原民也, 郷富夫, “高速リカバリーダイオードを用いた誘導性エネルギー蓄積方式パルスパワー電源におけるオゾン生成効率”, 電気学会 パルスパワー・放電合同研究会, PPT-09-102, ED-09-146, 熊本, 2009年10月
2. 八木一平, 向川政治, 高木浩一, 藤原民也, 郷富夫, “誘導性パルスパワー電源を用いたオゾン生成効率のパルス幅依存性”, 放電学会 若手セミナー, 神奈川, 2009年11月
3. 八木一平, 向川政治, 高木浩一, 藤原民也, 郷富夫, “誘導性パルスパワー電源を用いたオゾン生成効率のパルス幅依存性”, 放電学会 年次大会, A-3-4, 東京, 2009年11月

4. 八木一平, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “半導体オープニングスイッチを用いたパルス電源による放電進展のパルス幅依存性”, 電気学会 パルスパワー・放電合同研究会, PPT-10-024, ED-10-022, 長岡, 2010年5月
5. 八木一平, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “ナノ秒パルス電源を用いた放電の進展と電子エネルギーの遷移”, プラズマ科学のフロンティア 2010 研究会, 7, 岐阜 NIFS, 2010年9月
6. 八木一平, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “半導体オープニングスイッチを用いたパルス電源による放電進展のパルス幅依存性”, 放電学会 年次大会, D-2-2, 東京 日大理工, 2010年11月
7. 八木一平, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “SOS 方式ナノ秒パルス電圧を用いた放電発生とその特性”, NIFS 研究会「パルスパワー技術を基礎とするプラズマの物理とその応用」, NIFS 多治見, 2010年12月
8. 八木一平, 高木浩一, 岡田翔, 松本宇生, 王斗艶, 浪平隆男, “パルス電圧立上り時間によるストリーマ進展速度の影響”, 静電気学会 第12回春季講演会, 1-p-1, 東京大学, 2011年03月
9. 八木一平, 高村匠, 千葉寿, 高木浩一, 浪平隆男, 小野亮, “全固体ナノ秒パルス電源の開発と放電特性”, 電気学会 パルスパワー・放電合同研究会, PPT-11-010, ED-11-033, 岩手, 2011年6月
10. 八木一平, 高木浩一, 岡田翔, 松本宇生, 王斗艶, 浪平隆男, 小野亮, 小田哲治, “全固体ナノ秒パルス電源を用いたストリーマ進展速度と発光分光計測”, 静電気学会 第35回静電気学会全国大会, 12pA-1, 東京理科大学, 2011年09月
11. 八木一平, 小野亮, 小田哲治, 高木浩一, “全固体ナノ秒パルス電源を用いたパルス高電圧とストリーマ挙動”, 電気学会 基礎・材料・共通部門大会, VIII-8, 東京, 2011年9月
12. 八木一平, 三谷成, 安田拓真, 小野亮, 小田哲治, 筒井千尋, 平田孝道, 高木浩一, “ナノ秒パルス電源を用いた大気圧プラズマの生体細胞への影響”, 静電気学会 第13回春季講演会, 1p-4, 東京大学, 2012年03月
13. 八木一平, 安田拓真, 小野亮, 小田哲治, 筒井千尋, 平田孝道, 高木浩一, “低侵襲プラズマを用いたマウス繊維芽細胞のアポトーシス誘導”, 電気学会 パルスパワー・放電合同研究会, PPT-12-021, ED-12-049, 山形, 2012年5月
14. 八木一平, 安田拓真, 小野亮, 小田哲治, 筒井千尋, 平田孝道, 高木浩一, “ナノ秒パルス放電による生体反応”, 電気学会 プラズマ・パルスパワー合同研究会, PST-12-083, PPT-12-089, 岩手, 2012年8月
15. 八木一平, 中川雄介, 小野亮, 小田哲治, 高木浩一, “ナノ秒パルス電源を用いた医療用低侵襲プラズマ OH ラジカル密度計測”, 静電気学会 第36回静電気学会全国大会, 13pB-7, 八戸, 2012年09月
16. 八木一平, 中川雄介, 小野亮, 小田哲治, 高木浩一, “ナノ秒パルス放電中のプラズマ特性”, 電気学会 プラズマ・パルスパワー合同研究会, PST-12-086, PPT-12-109, 東京大学, 2012年12月
17. 八木一平, 中川雄介, 小野亮, 小田哲治, 高木浩一, “ナノ秒パルス放電中におけるプラズマ諸特性の計測”, 静電気学会 第14回春季講演会, 1p-3, 東京大学, 2013年03月
18. 八木一平, 中川雄介, 小野亮, 小田哲治, 高木浩一, “レーザー誘起蛍光法による相対湿度の局所計測”, 静電気学会 第37回春季講演会, 11aC-9, 千葉大学, 2013年09月
19. 八木一平, 平方健太, 水野和恵, 小野亮, 小田哲治, “プラズマ医療における活性種投入量と細胞生存率の関係”, 静電気学会 第15回春季講演会, 東京工業大学, 2014年03月 (発表予定)

20. 八木一平, 水野和恵, 小野亮, 小田哲治, “プラズマ医療における活性種と細胞生存率の影響”, 電気学会全国大会, EL21-A4, 1-149, 愛媛大学, 2014年3月(発表予定)

#### その他発表

1. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Electric Field Measurement of Nanosecond Pulsed Corona Discharge”, The 11th Seoul National University - University of Tokyo Joint Seminar on Electrical Engineering, B23, Tokyo, Dec. 2011
2. 八木一平, “低侵襲プラズマを用いたマウス線維芽細胞のアポトーシス誘導”, 東京大学 グローバル COE 「セキュアライフ・エレクトロニクス」平成 23 年度 博士課程学生報告会, p.258, 東京, 2012 年 3 月
3. Ippei Yagi, Ryo Ono, Tetsuji Oda, Koichi Takaki, “Measurement of Plasma Characteristics Driven by Nanoseconds Pulsed Power Generator”, The 12th Seoul National University - The University of Tokyo Joint Seminar on Electrical Engineering, D21, Seoul, Korea, Mar. 2013
4. 八木一平, “ガン治療に向けたナノ秒パルスプラズマの利用”, 東京大学 グローバル COE 「セキュアライフ・エレクトロニクス」平成 25 年度 博士課程学生報告会, 東京, 2014 年 3 月(発表予定)

#### 受賞・表彰

1. 放電学会 優秀ポスター発表賞 2009年11月13日
2. プラズマ科学のフロンティア 2010 研究会 学生ポスター賞 2010年9月3日
3. 静電気学会 優秀論文賞 2011年3月3日
4. 静電気学会 エクセレントプレゼンテーション賞 2011年3月3日
5. 電気学会 東北支部 優秀論文賞 2011年6月1日
6. 電気学会 放電研究会 基礎・材料・共通部門表彰 2011年9月21日
7. 静電気学会 シシド賞 2011年10月
8. 静電気学会 トレック・宍戸奨励賞 2012年9月13日
9. 静電気学会 エクセレントプレゼンテーション賞 2012年9月14日
10. 静電気学会 エクセレントプレゼンテーション賞 2013年3月7日
11. 静電気学会 増田賞 2013年9月10日
12. 静電気学会 トレック・宍戸奨励賞 2013年9月10日
13. 静電気学会 エクセレントプレゼンテーション賞 2013年9月11日
14. 電気学会 優秀論文発表賞 A 賞 2013年9月12日

