

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：赤松 憲

所属機関・部局・職名：量子科学技術研究開発機構(QST) 量子生命科学

研究所 DNA 損傷化学研究チーム チームリーダー

連絡先 住所：〒619-0215 京都府木津川梅美台 8-1-7

TEL：0774-80-3186

E-Mail：akamatsu.ken@qst.go.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマによって生じる DNA 損傷の特徴の解明—フェムト秒近赤外レーザーフィラメントによるプラズマとの比較—	
	英文	Characterization of DNA damage induced by cold atmospheric plasma – comparison with that by femtosecond NIR laser filamentation –	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	赤松 憲
		研究分担者	<ul style="list-style-type: none"> ・中野敏彰 (QST 量子生命科学研究所 DNA 損傷化学研究チーム 主幹研究員) ・板倉隆二 (QST 関西光量子科学研究所 超高速光物性研究グループリーダー) ・遠藤友随 (QST 関西光量子科学研究所 超高速光物性研究グループ 主任研究員) ・赤木 浩 (QST 関西光量子科学研究所 超高速光物性研究グループ 上席研究員)
		センター担当教員	田中 宏昌 教授 (プラズマバイオ部門)
	英文	研究代表者	Ken Akamatsu, QST
		研究分担者	Toshiaki Nakano, QST
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka
研究実績概要 (成果等)	低温大気圧ヘリウムガスのプラズマジェット (He-CAP) を超らせん状プラズミド DNA 溶液に照射し、CAP による DNA 損傷の生成速度及び、生成する損傷の種類等について調べた。さらに、標準線源である X 線の場合と比較した。その結果、CAP による塩基損傷生成速度/鎖切断速度の比は、X 線の場合のそれより有意に小さいことが分かった。現時点ではその理由は不明であるが、RONS (活性酸素窒素種) のスペクトル、He-CAP、X 線それぞれで生じるラジカル種の初期運動エネルギーの相違など様々な原因が考えられる。レーザーフィラメントでも塩基損傷生成速度/鎖切断速度の比が X 線のそれより小さいという結果が得られているので、He-CAP の結果と併せてその現象の理由を今後明らかにしていきたい。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)			

低温プラズマによって生じる DNA 損傷の特徴の解明
—フェムト秒近赤外レーザーフィラメントによるプラズマとの比較
Characterization of DNA damage induced by cold atmospheric plasma – comparison
with that by femtosecond NIR laser filamentation –

研究代表者 赤松 憲・量研・量子生命・DNA 損傷化学・チームリーダー
研究分担者：中野敏彰・量研・量子生命・DNA 損傷化学・主幹研究員
研究分担者：板倉隆二・量研・関西光量子・超高速光物性・グループリーダー
担当教員：田中宏昌・名古屋大学・プラズマバイオ・教授

1. 研究目的

フェムト秒近赤外レーザーは凸レンズによって水などの媒体中に集光すると非線形屈折率に起因する自己収束によってさらに集光されプラズマ化が起こる。プラズマ場は周囲より屈折率が小さいので脱集光される。集光と脱集光の繰り返しが生じ、その結果光強度が高いフィラメント（細い繊維上のスジ）が形成される。我々は最近、このフィラメントを DNA 水溶液中に発生させることで、標準的な電離放射線である X 線では見られない特徴的な DNA 損傷が生じることを明らかにしている（論文執筆中）。しかしながら、レーザーフィラメントによる“特殊な”プラズマは、市販の、あるいは発生機序の異なる他のプラズマ発生装置によるものと、ラジカル種（活性酸素等）発生やその後の DNA 損傷効果にどのような違いがあるのか不明である。レーザーを含め様々なプラズマ発生装置を駆使しながら、プラズマ発生の条件と DNA に及ぼす化学的影響、また X 線など通常の電離放射線との違いを明らかにしたい。

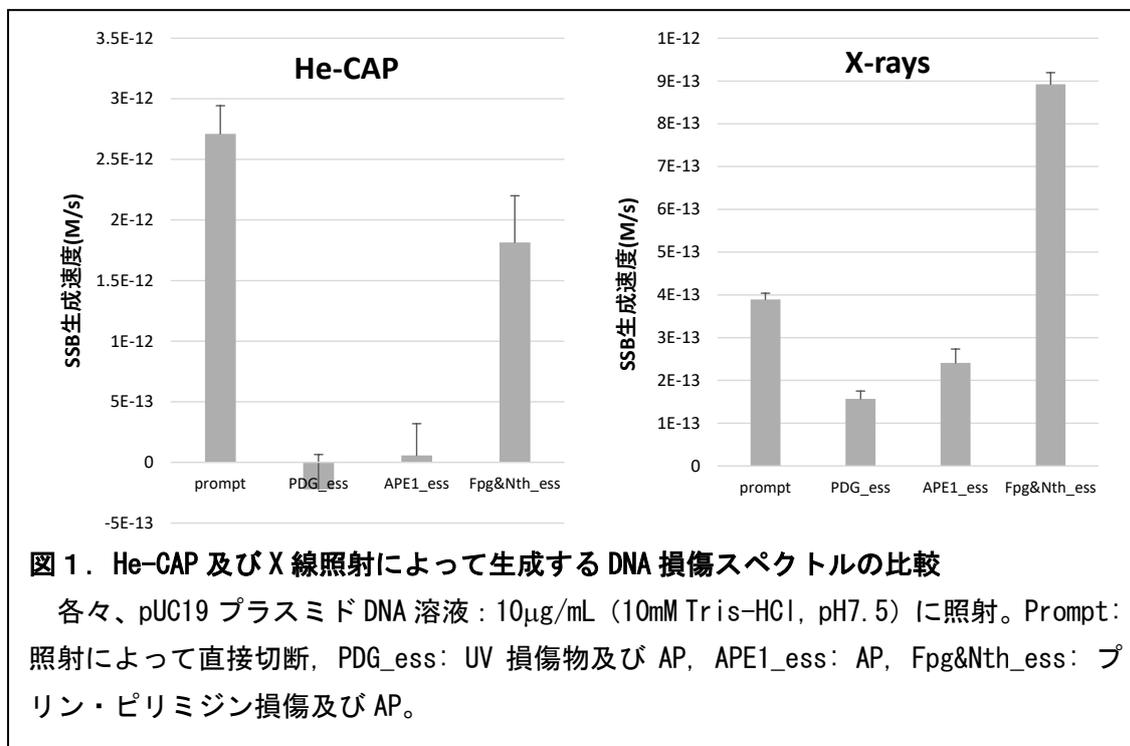
2. 研究内容と成果

プラズマ照射実験の初めの試みとして、まずは低温大気圧ヘリウムガスのプラズマジェット (He-CAP) を超らせん状プラスミド DNA 溶液に照射し、CAP による DNA 損傷の生成速度及び、生成する損傷の種類等について調べた。さらに、標準線源である X 線の場合と比較した。超らせん構造を持つ環状 DNA は、切断が一か所入る（1 本鎖切断：SSB）だけで形状が大きく変わって開環状(oc)型になり、さらに切断箇所近傍の相補鎖にも切断が入ると DNA の 2 本鎖が切断され(2 本鎖切断:DSB)され直鎖状(lin)となる。分子量が同じこれら 3 種類の DNA は、通常のアガロース電気泳動法で容易に分離・定量できる。また、照射した DNA 試料に損傷塩基除去修復酵素 (BER 酵素) を作用させると、損傷塩基や脱塩基部位(AP)の部分に鎖切断が入り SSB に変換される。したがって、BER 酵素の有無それぞれの SSB 量の差 (enzyme-sensitive site: ess) をとると、損傷塩基 (脱塩基部位含む) の量を見積もることが可能である。He-CAP 及び X 線の照射条件は以下の通りである。

・ He-CAP: NU global 製、7kV、60Hz、2L/min (He gas flow), 照射容器 : 24 穴プラスチックプレート、ノズル—液面距離 : 約 12mm

・ X 線 : OM-303M 型(NIC 製)、target: W, 70kV, 3mM, Al filter: 0.5mm

He-CAP と X 線を比較した結果の一部を図 1 に示す。



照射の Dose を同じ単位で比較することはできないので、両者の SSB 生成速度同士を比較しても意味がない。しかしながら、例えば各々の prompt を基準にして、相対的に Fpg&Nth サイト (塩基損傷及び AP) がどれくらいできるか、という比較は可能である。そのような指標で両者を比較すると、He-CAP は X 線と比較して Fpg&Nth サイトや PDG 及び APE1 サイトが生じにくいことが分かった。その理由は定かではないが、この違いに両者の特徴が現れていると考えられる。一方、レーザーフィラメントで生じる DNA 損傷も、Fpg&Nth サイトができにくいという結果を得ている。活性酸素種・窒素種 (RONS) の種類と量、DNA と反応する際の運動エネルギーの違いなど様々な原因が考えられる。今後の課題として引き続き取り組んでいきたい。

【研究成果の公表状況】

< 国際・国内会議 >

- ・ Akamatsu, K., Kondo T., Tanaka, H. Spectrum of DNA damage induced by cold atmospheric He-plasma irradiation in comparison with that by X-rays. ISPlasma2024, Nagoya University, 2024.3.5.

謝辞 He-CAP の照射及び EPR による OH ラジカル量評価等のサポートをいただきました近藤 隆 客員教授 (cLPS) に感謝いたします。

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：五十里 彰

所属機関・部局・職名：岐阜薬科大学・薬学部・副学長 兼 教授

連絡先 住所：〒501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4

TEL：058-230-8124

E-Mail：ikari@gifu-pu.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	上皮癌バリアに対する大気圧低温プラズマ照射溶液の効果		
	英文	Effect of plasma-activated solution on epithelial cancer barrier		
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	五十里 彰	
		研究分担者	研究分担者 原 宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授 吉野 雄太・岐阜薬科大学・薬学部・助教 江口 博晶・岐阜薬科大学・薬学研究科・博士後期課程	
		センター担当教員	田中 宏昌 教授・バイオシステム科学部門	
	英文	研究代表者	Akira Ikari, Gifu Pharmaceutical University, Professor	
		研究分担者	Hirokazu Hara, Gifu Pharmaceutical University, Professor Satoshi Endo, Gifu Pharmaceutical University, Associate Professor Yuta Yoshino, Gifu Pharmaceutical University, Assistant Professor	
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka, Nagoya University, Professor	
研究実績概要 (成果等)	これまでに我々は、肺腺癌細胞に細胞間接着分子のクローディン-2 (CLDN2) が高発現し、抗癌剤抵抗性を亢進することを報告した。2022 年度の本助成により、大気圧低温プラズマ照射溶液 (PAM) が CLDN2 発現を低下させ、抗癌剤抵抗性を改善することを発見した。今年度は低濃度 PAM の作用機序を検討した。その結果、PAM は CLDN2 の脱リン酸化を介して発現を低下させた。3 次元スフェロイドモデルにおいて、PAM は酸化ストレスの軽減を介して抗癌剤毒性を亢進した。本研究により、PAM の作用機序が明らかになり、癌補助療法薬としての臨床応用が期待される。			
特筆事項 (受賞、産業財産権 出願取得状況等)	なし			

上皮癌バリアに対する大気圧低温プラズマ照射溶液の効果

Effect of plasma-activated solution on epithelial cancer barrier

五十里 彰・岐阜薬科大学・薬学部・副学長 兼 教授

原 宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授

吉野 雄太・岐阜薬科大学・薬学部・助教

田中 宏昌・名古屋大学・バイオシステム科学部門・教授

1. 研究目的

これまで共同研究者の原らは、大気圧低温プラズマ照射溶液 (PAM) が抗腫瘍効果をもつことを見出し、活性酸素種の産生、タンパク質の酸化修飾、解糖系・電子伝達系の阻害によるエネルギー産生障害が関与することを解明した (ABB, 2018 年)。癌細胞では正常細胞に比べて糖代謝機構が亢進しているため、PAM の効果が強く現れると考えられる。生体内で癌細胞は微小環境を形成し、その内部は低酸素・低栄養の慢性的なストレス状態になっている。ストレス状態は治療抵抗化や再発に寄与することが報告されているが、ストレス形成機構は大部分が不明であり、治療薬も未開発である。近年申請者は癌細胞における細胞間接着分子の発現と機能に着眼し、肺腺癌組織にクローディン-2 (CLDN2) が高発現し、解糖系のグルコース代謝とエネルギー産生の調節に関与することを発見した (IJMS, 2021 年)。さらに、微小環境を模倣した *in vitro* スフェロイド細胞を用いて、CLDN2 が抗癌剤抵抗性を亢進することを解明した (BBA, 2020 年 & BBA, 2018 年)。CLDN2 は正常肺組織に発現していないため、肺腺癌における新規治療標的として有用であると考えられる。2022 年度の本助成により、PAM が CLDN2 発現を選択的に低下させ、抗癌剤抵抗性を改善することを発見した。しかし、抗癌剤抵抗性の改善における PAM の作用機序は未解明である。そこで本研究では、PAM の活性成分と作用機序を検討した。

2. 研究内容と成果

細胞培養用の DMEM 培地に大気圧低温プラズマを照射し、PAM を調製した。本研究では、癌治療における PAM の補助的な役割を解明するため、大きな細胞毒性を示さない 10 μ L/100 μ L 以下の濃度で使用した。

ヒト肺腺癌由来 A549 細胞および PC-3 細胞に PAM を 24 時間処理したところ、CLDN2 の mRNA 量とタンパク質量が減少した。CLDN2 タンパク質の安定性が低下したため、翻訳後修飾の関与を検討したところ、PAM 処理によりセリンリン酸化量が低下した (図 1)。これまでに脱リン酸化 CLDN2 はタイトジャンクションから細胞内へ移行し、リソソームで分解されることが報告されているため、PAM は同経路を介して CLDN2 の

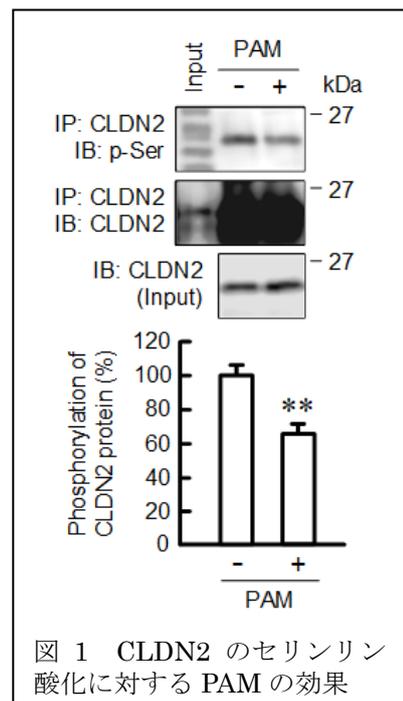


図 1 CLDN2 のセリンリン酸化に対する PAM の効果

発現低下を誘導することが示唆された。また、種々阻害剤などを用いてプロテアソームやオートファジーの関与を検討したが、これらの関与は観察されなかった。

A549 細胞をトランスウェルに培養し、細胞間透過性に対する PAM の関与を検討した。その結果、PAM の濃度に依存して上皮膜間電気抵抗値 (TER) が増加した。CLDN2 はカチオンポアを形成することが報告されており、CLDN2 発現の低下によりカチオン透過性が低下したため、TER が増加したと示唆された。また、PAM 処理によりドキシソルビシン (DXR、アントラサイクリン系抗癌剤) の透過性が亢進した。CLDN2 は低分子に対する細胞間バリアを形成することが報告されており、CLDN2 発現の低下により低分子バリア機能が低下することが示唆された。

低接着丸底ウェルプレートで A549 細胞を培養することにより、*in vivo* の癌凝集塊を模倣したスフェロイドが形成される。スフェロイドに低濃度 PAM を 24 時間処理したところ、活性酸素種蛍光プローブである CellRox の蛍光強度が減少した。また、酸化ストレス応答因子である Nrf2 の発現量も減少したため、PAM はスフェロイドの酸化ストレスを軽減することが示唆された。スフェロイド内のストレスは、抗癌剤抵抗性の亢進に寄与することが報告されている。そこで、スフェロイド細胞を用いて、抗癌剤毒性に対する PAM の効果を検討した。DXR の濃度依存的に細胞生存率が減少し、この効果は PAM 共処理によって増強された。また、PAM による Nrf2 発現の低下と抗癌剤毒性の亢進は、CLDN2 過剰発現によって阻害された (図 2)。

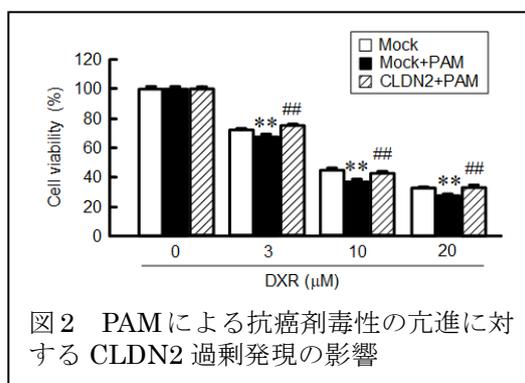


図 2 PAM による抗癌剤毒性の亢進に対する CLDN2 過剰発現の影響

本研究により、PAM は CLDN2 のセリンリン酸化量の低下を介して、CLDN2 タンパク質量を低下させることが明らかになった。また、PAM 共処理により、スフェロイドの酸化ストレスが軽減し、抗癌剤毒性が増強したことから、PAM は肺腺癌の新たな補助療法薬になると考えられる。今後、PAM の有効成分や癌移植モデル動物における PAM の有効性を検証することにより、PAM の臨床活用が期待される。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Eguchi H., Yu Y., Yoshino Y., Hara H., Tanaka H., Ikari A.: Plasma-activated medium ameliorates the chemoresistance of human lung adenocarcinoma cells mediated via downregulation of claudin-2 expression. Arch. Biochem. Biophys., 751, 109846 (2023)

<国際・国内会議>

- Hiroaki Eguchi, Yaqing Yu, Yuta Yoshino, Hiromasa Tanaka, Hirokazu Hara, Akira Ikari: Elevation of chemosensitivity of human lung adenocarcinoma cells by plasma-activated medium mediated by reduction of claudin-2 expression, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024, Nagoya University, 2024 年 3 月 3~7 日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：池田浩也

所属機関・部局・職名：静岡大学・総合科学技術研究科・教授

連絡先 住所：〒432-8011 浜松市中央区城北 3-5-1

TEL：053-478-1317

E-Mail：ikedahiroya@shizuoka.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	プラズマ処理による低次元シリコン材料のフォノン輸送制御	
	英文	Control of phonon transport in low-dimensional Si by plasma process	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	池田 浩也・静岡大学・総合科学技術研究科・教授
		研究分担者	濱崎 拓・静岡大学・総合科学技術研究科・助教 笠木 亮汰・静岡大学・総合科学技術研究科・修士2年 吉森 優大・静岡大学・総合科学技術研究科・修士1年
		センター担当教員	近藤 博基・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Hiroya Ikeda
		研究分担者	Hiromu Hamasaki, Ryota Kasagi, Yudai Yoshimori
		センター担当教員	Hiroki Kondo
研究実績概要 (成果等)	熱電変換に基づいた環境発電デバイスや自己発電型生体センサの実現に向けてシリコンの熱電特性向上を目的として、シリコンをナノスケールに加工したときのフォノン輸送について調べた。極薄シリコン層表面のラフネスをプラズマ処理により制御して、ゼーベック係数測定を行ったが、面内均一且つ期待するラフネスの形成が難しく、シリコン表面と電極とのコンタクトが取れず測定できなかった。そのため溶液エッチング処理に切り替えて、表面ラフネスを制御したところ、所望のラフネスを形成することに成功した。この極薄シリコン層のゼーベック係数を測定したところ、バルクに比べてフォノンドラッグ成分が抑制されたと考えられる低減が観察された。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)			

プラズマ処理による低次元シリコン材料のフォノン輸送制御

Control of phonon transport in low-dimensional Si by plasma process

池田 浩也・静岡大学・総合科学技術研究科・教授

濱崎 拓・静岡大学・総合科学技術研究科・助教

笠木 亮汰・静岡大学・総合科学技術研究科・修士 2 年

吉森 優大・静岡大学・総合科学技術研究科・修士 1 年

近藤 博基・名古屋大学・プラズマ科学部門・准教授

1. 研究目的

熱電変換に基づいた環境発電デバイスや自己発電型生体センサの実現に向けて、シリコンの熱電特性向上を目指している。シリコンを熱電変換材料として見た場合、室温・体温近傍における高いゼーベック係数は魅力的であるが、高い熱伝導率が問題となる。そのためナノワイヤ化によりフォノン速度を低減することが期待されている。しかしながら室温近傍におけるシリコンのゼーベック係数にはフォノンドラッグ効果による成分が含まれているため、ナノワイヤ化によりゼーベック係数も低減してしまう。

本研究ではフォノンドラッグ効果と熱伝導のそれぞれに寄与するフォノン波数が異なることに着目し、ゼーベック係数を保持しつつ熱伝導率を低減することを目指す。そのためにシリコンナノワイヤ壁面のラフネスをプラズマ処理により制御して、フォノンドラッグ効果に与える影響をフォノン輸送の観点から明らかにする。

2. 研究内容と成果

シリコン表面を表面粗さ 2 nm 程度まで制御して荒らすため、大気圧プラズマ処理を行った(図 1)。処理時間を 0~1200 秒の間で系統的に変えたシリコン表面を原子間力顕微鏡 (AFM) により確認したところ、表面ラフネスを 0.1~1.0 nm の範囲で制御できることがわかった。しかしながら、照射範囲が狭いため面内均一性に乏しく、その後のゼーベック係数測定には不向きであった。処理中に試料を面内回転させるなどラフネスの面内均一性の向上を試みたものの十分に改善されなかった。さらに、ゼーベック係数測定に必要なアルミ電極とのオーミックコンタクトが取れなかった。プラズマ処理により、シリコン表面にフッ化物などの反応生成物が残存していたためと考えている。

試料全面を同時に処理できるように、大口径の

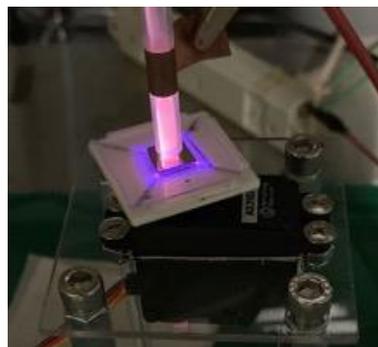


図 1 : 大気圧プラズマ処理の様子と処理後のシリコン表面

真空プラズマ装置（名古屋大学低温プラズマ科学研究センター施設）により表面処理を行った。ラフネスの面内均一性は改善されたが、照射時間や電極電圧など様々なパラメータを試行しても表面ラフネスが 0.3 nm 程度にしかならず、研究対象としたい 1~2 nm が得られなかった。研磨処理による表面ラフネスの増大を試みたところ、表面ラフネスは 1.8 nm まで増加したが、研磨の際の異方性が出てしまい本研究には不向きであった（図2）。

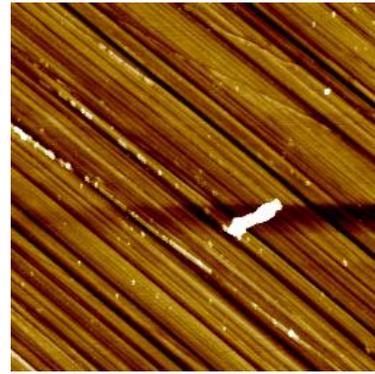


図2：研磨処理後のシリコン表面のAFM像

そのため、表面ラフネス制御を水酸化カリウム（KOH）溶液によるウェットエッチングに切り替えた。膜厚 55 nm の絶縁膜上シリコン（SOI: Si on insulator）層に対して、ピラニア溶液により表面に薄い酸化膜を形成後、KOH 水溶液によりエッチングを行った。得られた表面ラフネスにばらつきはあるものの、0.1~4.3 nm の範囲の表面ラフネスを形成することができた。この中から表1に示す試料についてゼーベック係数測定を行ったところ、0.25~0.4 mV/K のゼーベック係数が得られた。これらの値はバルクシリコンの実験値よりも小さく、キャリア輸送から計算されるゼーベック係数に近い値を示した。すなわち、バルクシリコンの値との差（減少分）は、ゼーベック係数のフォノンドラッグ成分が低減したことに起因すると考えられる。

表1：ゼーベック係数測定に用いた SOI 試料

表面ラフネス [nm]	SOI 膜厚 [nm]	キャリア濃度 [cm^{-3}]
0.1	52	2.0×10^{18}
0.88	30	3.3×10^{19}
1.25	33	2.6×10^{18}
4.26	38	2.3×10^{18}

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：伊藤 昌文

所属機関・部局・職名：名城大学・理工学部・教授

連絡先 住所：〒468-8502

TEL：052-838-2306

E-Mail：ito@meijo-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	酸素ラジカル活性化トリプトファン溶液による植物成長促進機序の解明	
	英文	Analysis of the plant growth mechanism promoted by oxygen-radical-treated tryptophan solutions	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	伊藤 昌文・名城大学・理工学部・教授
		研究分担者	塚越 啓央・名城大学・農学部・准教授
		センター担当教員	橋爪博司・プラズマバイオ部門
	英文	研究代表者	Masafumi Ito
		研究分担者	Hironaka Tsukakoshi
		センター担当教員	Hiroshi Hashizume
研究実績概要 (成果等)	本研究では、酸素ラジカル処理による根の伸長率の測定、ラジカル処理で生成された物質の分析や遺伝子発現解析によって、酸素ラジカル処理された L-Trp 溶液によるシロイヌナズナの成長促進効果とメカニズムについて調査を行った。その結果、酸素ラジカル処理 L-Trp 溶液の分取を行い、分取溶液 R3 に成長促進効果が一番大きく得られたことから、分取溶液 R3 に含まれる物質である Trp と FKYN が成長促進物質であることが推察された。さらに遺伝子発現解析の結果から、酸素ラジカル処理 L-Trp 溶液は植物の鉄吸収遺伝子群 (FRO2 など) に作用し、鉄吸収効率を上昇させることで、根の成長を促していることが示唆された。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	PCT出願 JST 出願支援決定 2023 年 12 月 12 日通知 発明の名称：トリプトファン分解物の製造方法、フォルミルキヌレニンの製造方法、キヌレニンの製造方法、トリプトファンラジカル含有水溶液の製造方法、および、殺菌用水溶液 発明者：堀 勝、橋爪 博司、石川 健治、岩田 直幸 (名古屋大学)、伊藤 昌文、西川 泰弘、荒木 祥多 (名城大学) 出願人：学校法人名城大学[50%]、国立大学法人東海国立大学機構[50%] 出願番号：特願 2023-020290 (2023-02-13 出願)		

酸素ラジカル活性化トリプトファン溶液による植物成長促進機序の解明

Analysis of the plant growth mechanism promoted by oxygen-radical-treated tryptophan solutions

伊藤昌文・名城大学・理工学部・教授

塚越啓央・名城大学・農学部・准教授

橋爪博司・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・講師

1. 研究目的

国際連合によると、現在約 70 億人の世界人口は 2100 年には 100 億人を突破すると考えられている。この爆発的に増加する人口のため、食料品の需要は著しく増加している。この一つの解決策として、植物工場のように作物を管理して大量生産する技術が注目を集めている。しかし、これら栽培法は設備に雑菌が侵入すると、作物が雑菌に侵されやすいという欠点を持つ。この欠点を解決法として、大気圧プラズマによって処理した水(プラズマ処理水)を用いた殺菌手法が、高効率・低コスト・安全性を供えており期待されている。我々は液体肥料(有機物)を大気圧プラズマ処理することで、pH4.8 以上の水耕栽培至適条件下でも効果的な殺菌効果と植物の成長促進が同時に得られる処理溶液を開発してきた。また、この溶液に含まれるアミノ酸類による植物の成長促進効果も見られ、我々はモデル植物シロイヌナズナを用いてその作用機序の解明を進めている。酸素ラジカル活性化トリプトファンはシロイヌナズナの根の成長促進効果を示した。酸素ラジカル活性化トリプトファン処理後のシロイヌナズナの根を用いた RNAseq による網羅的遺伝子発現解析の結果、鉄イオン吸収遺伝子群の発現に影響がみられた。そこで、本申請研究では酸素ラジカル活性化トリプトファンが植物の鉄吸収能力に与える影響と根の成長促進メカニズムを解析することを目的とした。

2. 研究内容と成果

電氣的に中性な粒子のみを照射できる大気圧ラジカル源(FPA10、FUJI 製)を用い、50 mM の L-Trp 溶液を調製した。ラジカル照射条件は、照射時間 5 分、照射距離 10 mm、ガス流量 Ar: 4.96 slm, O₂:0.03 slm とした。

本実験ではシロイヌナズナの野生種である Columbia-0(Col-0)を対象とした。シロイヌナズナ用生育培地に上記照射条件で調整した酸素ラジカル活性化 L-Trp 溶液を 1000 倍希釈となるように注入した。シャーレに培地を流し込み固化した培地上に Col-0 を播種し、グロースチャンバーでシャーレを地面に対して垂直に置き、温度 22 °C、白色蛍光灯(光量:30 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)による長日条件(16 h Light/ 8 h Dark)で培養した。生育させたシロイヌナズナの根と胚軸の境界線を洗浄したメスで切断し、根から RNA 抽出を行った。抽出した RNA から逆転写反応で得た cDNA を用い、リアルタイム PCR(RT-qPCR)を行い、以前我々が同定した鉄吸収に関わる遺伝子発現量の調査を行った。

Fig. 1 に酸素ラジカル処理 L-Trp 溶液含有培地、未照射の L-Trp 溶液含有培地と PB 液のみ含有培地におけるシロイヌナズナの遺伝子発現量の経時変化（タイムコース）の一例を示す。

Fe³⁺還元に関する遺伝子である FRO2 は、酸素ラジカル処理 L-Trp によって発現量の値が処理後 3 日目で増大していることが確認された。これらの結果から酸素ラジカル処理 L-Trp 溶液植物の鉄吸収遺伝子群（FRO2 など）に作用し、鉄イオンの吸収を効率化することで、根の成長を促していることが示唆された。

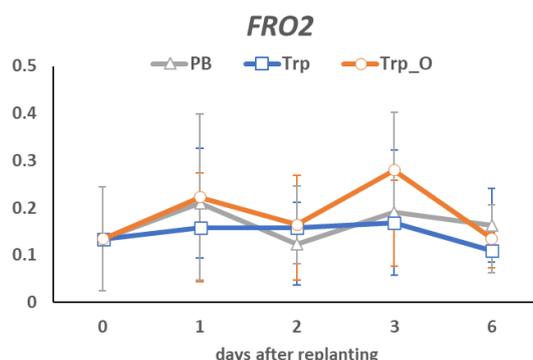


Fig. 1 Gene expression analysis of iron absorption system by oxygen-radical-activated L-Trp solution

参考文献

- [1] V. Stoleru, *et al.*, *Sci. Rep.* **10**, 20920 (2020).
- [2] N. Iwata, *et al.*, *Plasma Process. Polym.* **16**, e1900023. 2019.

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- (Plenary) M. Ito, M. Hori, Biological Applications using High-density Atmospheric-pressure Plasmas, 13th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2023), Busan, Korea, 6, November, 2023.
- (Invited) Masafumi Ito, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato, Hironaka Tsukagoshi, Yasuhiro Nishikawa, Masaru Hori, Carbon-Neutral Biorefinery Processes Enhanced by Atmospheric-Pressure Plasmas, 4th International Workshop on Plasma Agriculture, Kwangwoon University, Seoul, Korea, June 18-22, 2023.
- Shota Araki, Tomomichi Ota, Hironaka Tsukagoshi, Naoyuki Iwata, Masaru Hori, Masaru Hori, Masafumi Ito, Highly efficient purification of L-tryptophan derivatives produced by oxygen-radical treatment, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024, Nagoya University, Japan, 5, March, 2024.
- 荒木祥多, 塚越啓央, 堀勝, 伊藤昌文, “シロイヌナズナにおける酸素ラジカル処理 L-トリプトファン溶液中の成長促進物質”, 第33回日本MRS年次大会, I-P15-003, 横浜, 11月14-16日, 2023.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：内田儀一郎

所属機関・部局・職名：名城大学・理工学部・教授

連絡先 住所：〒468-8502 名古屋大学天白区塩釜口 1-501

TEL：052-838-2579

E-Mail：uchidagi@meijo-u.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	低温プラズマを用いた半導体ナノ構造膜形成プロセスの開発	
	英文	Development on a process for semiconductor nano-structured films by using low temperature plasmas	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	内田儀一郎・名城大学・理工学部・教授
		研究分担者	平松 美根男・名城大学・理工学部・教授 竹田 圭吾・名城大学・理工学部・准教授 太田 貴之・名城大学・理工学部・教授
		センター担当教員	堤 隆嘉 講師
	英文	研究代表者	Prof. Giichiro Uchida, Meijo University
		研究分担者	Prof. Mineo Hiramatsu, Meijo University Prof. Keigo Takeda, Meijo University Prof. Takayuki Ohta, Meijo University
		センター担当教員	Prof. Takayoshi Tsutsumi
研究実績概要 (成果等)	本研究では Li イオン電池の負極応用を視野に入れ、IV族半導体薄膜のナノ構造を制御可能な低温プラズマプロセスを開発することを目的とする。今年度の主要な成果として以下の 2 つを実証した。 1) SiSn ナノワイヤー径を 136–605 nm の範囲で制御した。また、Si コア周辺に S 結晶 Sn が付着したコアシェル構造であることを明らかにした。 2) Li イオン電池を試作し、従来グラファイト負極の約 3 倍の 1,219 nm の高容量で劣化なく駆動することを実証した。		
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)	特になし。		

低温プラズマを用いた半導体ナノ構造膜形成プロセスの開発

Development on a process for semiconductor nano-structured films by using low temperature plasmas

内田儀一郎・名城大学・理工学部・教授
平松美根男・名城大学・理工学部・教授
竹田圭吾・名城大学・理工学部・教授
太田貴之・名城大学・理工学部・教授
堤隆嘉・名古屋大学・大学院工学研究科・講師

1. 研究目的

次世代の高容量 Li イオン電池の実現には Li を大量に吸蔵できる負極の開発が必要不可欠である。本研究では理論容量が従来のカーボン材料の約 5-10 倍である IV 族半導体材料 Si と Ge に着目して Li イオン電池用の高容量負極開発を行う。IV 族半導体の負電極応用に際してはその物性に加え、クラックを抑制可能なナノ構造の探索が極めて重要となる。そこで本研究では、ナノ構造を制御可能な低温プラズマを用いた新たな材料プロセスを開発する。また、実際に様々なナノ構造膜負極を用いた Li イオン電池を評価し、電池に最適なナノ構造を明らかにする。

2. 研究内容と成果

本年度は SiSn ターゲットを用いたスパッタリングにより単一行程で作製した Si ナノワイヤーの直径制御と Li イオン電池の特性評価を行った。図 1a にガス圧力を変化させた時の Si ナノワイヤーの SEM 像を示す。ガス圧力を 100、300、500 mTorr と増大させるとワイヤー径は 287、155、136 nm と減少した。断面 SEM 像から分かるようにワイヤーは基板から垂直に成長しており、また、成長途中で多数枝分かかれし繊維状となるとが明らかになった。ターゲットと基板の距離を 20 mm から 10 mm へと減少させると直径は 605 nm までに増大し、形態は繊維状ワイヤーからナノロッド状態へと変化した(図 1b 参照)。Si ナノワイヤーの TEM 像を図 1c に示す。図の青色領域の Si コア表面に多数の緑色領域の Sn が観測でき、結晶 Sn がナノ粒子として Si ワイヤーに付着した Si/Sn コアシェル構造であることが明らかになった。

図 2 に Si ナノワイヤーを負極とする Li イオン電池の容量の充放電サイクル特性を示す。充放電の電流が比較的小さい時(0.01 C-rate、通常グラファイト負極試験とほぼ同じ電流量)、グラファイト電極の容量 372 mAh/g の約 3 倍の 1,219 mAh/g の高容量で、かつ劣化なく動作した。¹⁾ 10 倍の充放電の電流の時(0.1 C-rate)、緩やかに容量の低下は観測されるものの安定して駆動し、200 サイクル後の容量は 644 mAh/g で容量維持率は 59% となった。本研究では低温プラズマプロセスで作製した独自の Si/Sn コアシェルナノワイヤーが次世代の Li イオン電池負極材料に有望であることが明らかになった。

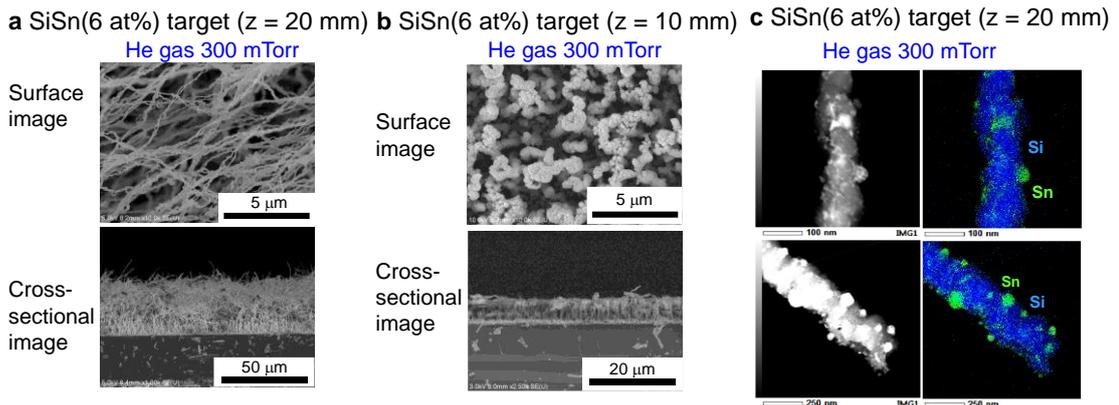


図 1. SiSn 単一スパッタプロセスで作製した Si/Sn ナノワイヤーの SEM 像と TEM 像。

Spider-like-network structure (Sn content of 6at%, 300mTorr, z = 20 mm)

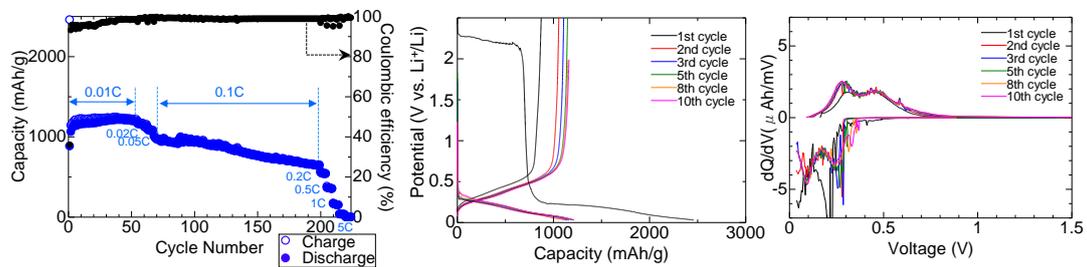


図 2. Si/Sn コアシェルナノワイヤー(図 1a)を負極とした Li イオン電池のサイクル特性。従来のグラファイト負極の約 3 倍の高容量を実証した。

【研究成果の公表状況】

- 1) **G. Uchida**, K. Masumoto, M. Sakakibara, Y. Ikebe, S. Ono, K. Koga, T. Kozawa, “Single-step fabrication of fibrous Si/Sn composite nanowire anodes by high-pressure He plasma sputtering for high-capacity Li-ion batteries”, Scientific Reports Vol. 13, 14280 (2023).
- 2) T. Omae, T. Yamada, D. Fujikake, T. Kozawa, **G. Uchida**, “Development of nanostructured Ge/C anodes with a multistacking layer fabricated via Ar high-pressure sputtering for high-capacity Li⁺-ion batteries”, Applied Physics Express Vol. 17, 026001 (2024).

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 大塚 智裕

所属機関・部局・職名：岐阜薬科大学・岐阜薬科大学・助教

連絡先 住所：〒501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1 丁目 25 番地 4

TEL：058-231-8100

E-Mail：otsuka-to@gifu-pu.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	アレルギー疾患に対する低温プラズマの作用の分子機構の解明		
	英文	The effect of non-thermal plasma on allergic disease		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	大塚 智裕・岐阜薬科大学・薬学部・助教	
		研究分担者	原 宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授 神谷 哲朗・岐阜薬科大学・薬学部・准教授	
		センター担当教員	田中 宏昌・教授・プラズマバイオ部門	
	英文	研究代表者	Tomohiro Otsuka・Gifu Pharmaceutical University・Assistant professor	
		研究分担者	Hirokazu Hara・Gifu Pharmaceutical University・Professor Tetsuro Kamiya・Gifu Pharmaceutical University・Associate professor	
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka・Nagoya University・Professor	
研究実績概要 (成果等)	本研究では、低温プラズマ (NTP) および NTP 活性化酢酸リンゲル液 (PAA) の即時型アレルギー反応に対する影響について検討した。PAA は好塩基球細胞において抗原誘発及びカルシウムイオノフォア誘発の脱顆粒反応を抑制し、炎症性サイトカインの mRNA 発現も抑制した。また、その作用は H ₂ O ₂ 消去剤であるカタラーゼ処理により減弱した。一方、NTP の直接照射によっても脱顆粒反応は抑制された。さらに、NTP の直接照射および PAA の添加のいずれも、抗原刺激による F-actin の構造変化を抑制した。これらの結果より、NTP の直接照射及び間接照射のいずれも即時型アレルギー反応を抑制し、間接照射の作用には H ₂ O ₂ が関与していると考えられた。			
特筆事項	なし			

アレルギー疾患に対する低温プラズマの作用の分子機構の解明

The effect of non-thermal plasma on allergic disease

大塚 智裕・岐阜薬科大学・薬学部・助教

原 宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授

神谷 哲朗・岐阜薬科大学・薬学部・准教授

田中 宏昌・教授・プラズマバイオ部門

1. 研究目的

低温プラズマ (NTP) の照射 (直接照射) または活性化溶液投与 (間接照射) の有用性は抗がん作用や皮膚の創傷治癒などで報告されているが、アレルギー疾患に対する作用は不明な点が多い。申請者は、NTP 活性化酢酸リンゲル液 (PAA) の処置により (間接照射)、即時型アレルギーの中心として働くマスト細胞・好塩基球細胞の脱顆粒が抑制されることを見出した。脱顆粒の抑制によって顆粒中に含まれるヒスタミン等の放出が抑制されるため、アナフィラキシー、花粉症、気管支喘息などのアレルギー疾患の治療に応用できる可能性がある。よって本研究では、NTP のアレルギー性疾患に対する臨床応用への基盤的研究として、マスト細胞・好塩基球細胞に対する作用の詳細について検討を行った。

2. 研究内容と成果

2-1. PAA による脱顆粒抑制に寄与する活性種の同定

NTP をアレルギー疾患に用いる際、間接照射の形態が適用しやすさの面で望ましいと考え、PAA を作製しその作用を検討した。酢酸リンゲル液 200 μL に対し 40 秒間 NTP を照射することで PAA を調製し、4% の濃度となるよう培養液に添加した。ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 培養系に対し抗原刺激により脱顆粒を引き起こす即時型アレルギーモデル系を用いて検討を行ったところ、培養系への PAA の添加は脱顆粒を抑制した。また、 H_2O_2 を消去するカタラーゼを添加すると PAA の作用はほぼ消失することから、PAA の作用には主に H_2O_2 が関与していると考えられた。なお、100-2000 μM H_2O_2 が濃度依存的に脱顆粒を抑制する報告があること、本条件で作製した PAA には約 8 mM の H_2O_2 が含まれていること (培養液中の終濃度は約 320 μM) からも、 H_2O_2 の関与が示唆される。

また、生成する活性種の違いによる効果の有無について検討するために、NTP の直接照射による脱顆粒への影響を確認した。予測に反し、NTP の直接照射によっても脱顆粒は抑制された。NTP の直接照射は PAA 処置よりも生成する H_2O_2 濃度は低いことが予想されることから、PAA とは別の活性種が抑制作用にかかわる可能性が考えられた。NTP 照射により溶液中に生成する活性酸素種・活性窒素種のうち、一酸化窒素については脱顆粒を抑制することが知られていることから、今後は一酸化窒素を含む活性種の関与について引き続き検討を行う必要がある。

2-2. 脱顆粒のシグナル経路に着眼した PAA の脱顆粒抑制機序の解明

申請者はこれまでに、抗原刺激による脱顆粒のみでなくカルシウム (Ca) イオノフォアである A23187 の刺激による脱顆粒についても PAA が抑制作用を持つことを確認している。このことから、NTP は抗原刺激により活性化するシグナル経路の中でも、Ca²⁺ の細胞内流入以降に作用している可能性が考えられた。よって、Ca²⁺ 流入刺激により顆粒を細胞膜に移行させる F-actin の関与について検討するため、ローダミン・ファロイジンを用いて F-actin を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。抗原刺激により F-actin の細胞膜付近の波打ち構造 (membrane ruffling) が観察され、F-actin の重合・脱重合が促進されていることを確認した。また、PAA の添加および NTP の照射によりこれらの反応が抑制された。よって NTP の直接照射および間接照射のいずれについても、脱顆粒の抑制のメカニズムに F-actin の membrane ruffling の抑制がかかわる可能性が考えられた。

2-3. サイトカイン産生に対する NTP の作用の検討

マスト細胞や好塩基球細胞は、抗原刺激によりヒスタミンを含む顆粒の放出のほかに、脂質メディエーターや炎症性サイトカインを産生・分泌することによりアレルギー反応にかかわることが知られている。炎症性サイトカインの産生は、抗原による IgE 受容体 (FcεRI) 刺激により開始されることが脱顆粒反応と共通しているが、その後のシグナル経路が脱顆粒反応とは異なることが報告されている (図参照)。よって、これらに対する NTP の作用は脱顆粒反応とは別に確認する必要があるため、炎症性サイトカインの mRNA 発現に対する PAA の作用を RT-PCR 法により検討した。

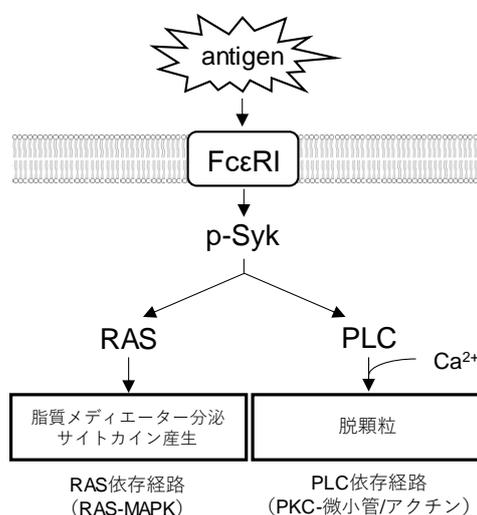


図 アレルギー反応シグナル

抗原刺激により即時型アレルギーにかかわるサイトカインである IL-4、IL-6、TNF-α の mRNA 発現は亢進し、PAA の処置により抑制された。よって、PAA の炎症性サイトカイン発現の抑制作用も、アレルギー反応の抑制に寄与する可能性が考えられた。

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

Tomohiro Otsuka, Tetsuro Kamiya, Kaho Sato, Hiroyuki Tanaka, Hiromasa Tanaka, and Hirokazu Hara: Non-thermal plasma inhibits allergic degranulation and cytokine expression in RBL-2H3 cells, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024/APSPT-13, Nagoya, May 3-7, 2024.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：金子 俊郎

所属機関・部局・職名：東北大学・大学院工学研究科・教授

連絡先 住所：〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05

TEL：022-795-7116

E-Mail：kaneko@tohoku.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	短寿命活性種を含むプラズマ-液体界面の物質輸送モデルの構築	
	英文	Formulation of substance transport model at plasma-liquid interface including short-lived reactive species	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	金子 俊郎
		研究分担者	佐々木 渉太（東北大学・大学院工学研究科・助教） 高島 圭介（東北大学・大学院工学研究科・助教） 武田 一希（東北大学・大学院工学研究科・大学院生）
		センター担当教員	石川 健治・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Toshiro Kaneko
		研究分担者	Shota Sasaki (Assistant Prof., Tohoku Univ.) Keisuke Takashima (Assistant Prof., Tohoku Univ.) Kazuki Takeda (Grad. Student, Tohoku Univ.)
		センター担当教員	Kenji Ishikawa・Plasma science division
研究実績概要 (成果等)	本研究では、低温大気圧プラズマの医療・農業応用を推進する上で欠かせない知見であるプラズマ(気体)-液体界面の物質(活性種)輸送機構を明らかにすることを目的として、実験を行った。液体を細くかつ高速化した高速微細液柱をプラズマ中に導入するという独自の実験系により、これまでに、短寿命活性窒素種の一つである N_2O_3 の時空間分布観測に成功した。今年度はその反応系を詳細に理解するべく 0 次元 N_xO_y 反応モデルの計算結果と比較し、NO, NO_2 が十数倍程度、界面で高濃度局在している可能性を示す結果を得た。		
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)	[受賞] 武田 一希, 佐々木 渉太, 高島 圭介, 金子 俊郎: 第 54 回応用物理学会講演奨励賞, プラズマ-高速水流を用いた液相短寿命活性窒素種減衰の実験的検出, 2023 年 9 月 19 日。		

短寿命活性種を含むプラズマ—液体界面の物質輸送モデルの構築 Formulation of substance transport model at plasma-liquid interface including short-lived reactive species

金子 俊郎・東北大学・大学院工学研究科・教授
佐々木 渉太・東北大学・大学院工学研究科・助教
高島 圭介・東北大学・大学院工学研究科・助教
武田 一希・東北大学・大学院工学研究科・大学院生
石川 健治・名古屋大学・プラズマ科学部門・教授

1. 研究目的

近年、低温大気圧プラズマを用いた革新的医療・農業応用が多数報告されている。多くの場合、液体接触する低温プラズマが用いられ、液相中に供給される活性種や反応後の活性有機物が作用因子とされている。しかしながら、プラズマ（気体）—液体界面の物質／エネルギー輸送には未だ不明な点が多く、このことがプラズマの作用を完全に理解し制御できない理由であると考えられる。本研究では、プラズマ中の気相活性種と溶液中の液相活性種を観測し、プラズマ（気体）—液体界面の物質（活性種）輸送を明らかにすることを目的とする。申請者はこれまで、FT-IR や LIF を用いた気相活性種の測定や吸収・蛍光分光や ESR を用いた液相活性種の測定を行ってきた。さらに、液体を細くかつ高速化した高速微細液中をプラズマ中に導入するという独自の実験系を確立し、OH ラジカルや短寿命活性窒素種（RNS）の一つである N_2O_3 減衰を捉えることに成功してきた。本年度は特に N_xO_y に関連する反応系を詳細に理解するべく、0次元反応モデルの計算結果と昨年度の実験結果を比較し、RNS の界面輸送における重要な知見を得る事を目指した。

2. 研究内容と成果

図 1 (a) に本研究で用いる高速微細液流導入プラズマ装置の概略図を示す。本系は比較的均一なプラズマ—液体界面をもち、 $v = 10$ m/s を超える高速水流に対して目的活性種の検出試薬を距離 (d_g) 制御注入する。これにより 1 ms 以下のオーダーで消えていく短寿命活性酸素種 (ROS)・活性窒素種 (RNS) の減衰を観測可能としている。短寿命 RNS の検出においては、捕捉剤として有用な p-ヒドロキシフェニル酢酸(p-HPA)を使用し、最終生成物である NO_3^- と NO_2^- の同時定量を行った。この

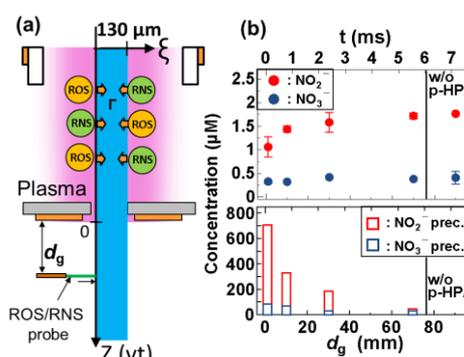


図 1: 高速微細液流導入プラズマ装置の (a) 概略図 (b) 蓄積 NO_2^- , NO_3^- 濃度および前駆体濃度の d_g 依存性。

時, p-HPA によって短寿命 RNS が捕捉された分だけ NO_3^- や NO_2^- の蓄積濃度が減少すると解釈し, 定量を行った. 図 1 (b) に蓄積 NO_2^- 及び NO_3^- 濃度と p-HPA 導入無しの条件より算出した各種前駆体濃度の d_g 依存性を示す. 照射直後から時間が経過するにつれて, NO_2^- のみが 700 nM ほど濃度増加していることから, 前駆体による NO_2^- 生成反応の寄与を明らかとしていた.

本年度はこの生成時間推移を説明するべく, 33 の非平衡反応式と 7 の平衡反応式を含んだ 0 次元反応モデルによる数値解析を行った. 図 2(a) は初期濃度 $[\text{NO}]_0 = 700 \text{ nM}$, $[\text{NO}_2]_0 = 140 \text{ nM}$ かつ室温 (298 K) を想定した各活性種濃度の時間変化である. ここで計算による NO_2^- の生成時間推移と実験結果に着目すると, 両者の間に大きな乖離が見られる. これは NO, NO_2 を始めとした短寿命 RNS が界面近傍において不均一に分布していることを示唆している. 図 2(b) は初期濃度 $[\text{NO}]_0 = 10 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_2]_0 = 2 \mu\text{M}$ とした際の規格化された各活性種濃度の時間推移である. 高濃度局在を模擬した計算では, 実験結果による NO_2^- の生成時間推移と良い一致を示したことから, 短寿命 RNS においても, 界面近傍にて $10000 \text{ nM} / 700 \text{ nM} = 14$ 倍程度の高濃度局在している可能性を見出した.

この結果は, これまで未知であった短寿命活性窒素種による $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$ 生成経路を含めたプラズマ誘起液相反応場解明に向けた重要な知見といえる.

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- [Plenary] T. Kaneko, S.Sasaki, K.Takashima, “Innovative technology for controlled synthesis of reactive species using gas-liquid interfacial plasmas and its applications”, 25th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC25), Kyoto, Japan, 2023/5/2.
- T. Kaneko, “Decaying Characteristics of Short-lived Reactive Nitrogen Species Generated by Gas-liquid Interfacial Plasma”, 13th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2023), Busan, Korea, 2023/11/7.
- [Invite] T. Kaneko, K.Takeda, S.Sasaki, K.Takashima, “Gas-liquid interfacial plasmas: Controlled generation of short-lived reactive species and its applications”, 7th Asia-Pacific Conference on Plasma Physics (AAPPs-DPP2023), Aichi, Japan, 2023/11/16.
- [Invite] T. Kaneko, K.Takeda, S.Sasaki, K.Takashima, “Atmospheric pressure plasma with high-speed liquid flow: basic science and its application”, 97th IUVSTA Workshop, Cerklje na Gorenjskem, Slovenia, 2023/12/19.

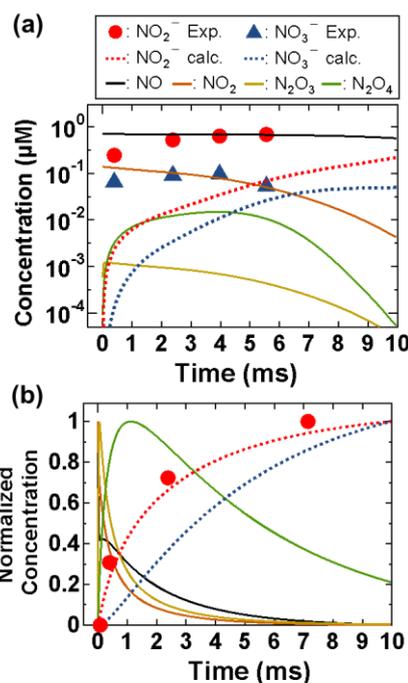


図 2: 0 次元モデルによる (a) $[\text{NO}]_0 = 700 \text{ nM}$, $[\text{NO}_2]_0 = 140 \text{ nM}$ (b) $[\text{NO}]_0 = 10 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_2]_0 = 2 \mu\text{M}$ として計算された活性種濃度の時間変化.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 川崎 仁晴

所属機関・部局・職名：佐世保工業高等専門学校・電気電子工学科・教授

連絡先：〒857-1193 長崎県佐世保市沖新町 1-1

TEL : 0956-34-8468 FAX : 0956-34-8468

E-Mail : h-kawasa@sasebo.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	粉体ターゲットを用いたスパッタリング法による傾斜機能性半導体薄膜の作製に関する研究	
	英文	Preparation of hydrogen embrittlement prevention semiconductor film by sputtering deposition using powder target	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	川崎 仁晴・佐世保高専・電気電子工学科・教授
		研究分担者	柳生義人（佐世保高専）、猪原武士（佐世保高専）、日比野祐介（佐世保高専）、佐竹卓彦（佐世保高専）
		センター担当教員	大野 哲靖 教授・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Hiroharu Kawasaki
		研究分担者	Yoshihito Yagyū, Takeshi Ihara, Yuusuke Hibino, Takahiko Satake
		センター担当教員	Noriyasu Ohno
研究実績概要 (成果等)	<p>1) Tahahiko Satake, Hiroharu Kawasaki and Shinichi Aoqui, Preparation of Ti and Fe composition gradient thin films by sputtering with mixed powder targets, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology Vol.21, No.3, pp. 218-223 (2023)</p> <p>2) Tahahiko Satake, Hiroharu Kawasaki and Shinichi Aoqui, Indium-gallium-zinc oxide thin-film preparation via single-step rf sputter deposition using mixed-oxide powder targets, ARCHIVES OF ELECTRICAL ENGINEERING Vol72(2), pp.555-563(2023)</p> <p>3) 川崎仁晴 粉体材料のスパッタリングによる各種機能性薄膜の作製, 表面と真空, Vol.67, No.2 71-76 (2024).</p>		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	ISPlasma2024 の学会発表に invite 講演を行った。		

和文共同利用・共同研究課題名 (14pt ゴシック体)

Project Title in English: (12pt Times)

川崎仁晴・佐世保工業高等専門学校・電気電子工学科・教授

大野哲靖・名古屋大学工学研究科電気工学専攻・教授

1. 研究目的 (12pt ゴシック体)

物理的機構を基軸としたプラズマプロセス (スパッタリングやPLD法) は、その安全性と高い費用対効果から半導体開発などの最先端科学で使用されているが、多元素混合材料や低融点材料を利用する場合に欠点があった。申請者らは粉体をそのままターゲットとして利用する新しい材料作製法を開発し、多元素混合機能性薄膜や低融点材料を含む透明導電性薄膜の作製に成功してきた。本申請では、粉体ターゲットを設置するホルダーを工夫し、1度の成膜でたくさんの条件による薄膜作製となるような成膜装置 (一種のコンビナトリアル法) を開発する。この装置が開発できれば、粉体ターゲットによる薄膜作製の最適化が簡便にできるだけでなく、2次元分布を持つ機能性薄膜の作製や、新しい反応による新規な薄膜の創生に役立てることができる。

2. 研究内容と成果 (12pt ゴシック体)

水素の侵入により構造物が脆く壊れる「水素脆化」は、金属材料の最大の破壊要因であり、その損失はGDPの1% (数兆円) 以上とも言われている。一方、水素エネルギー関連機器は、常に高圧の水素ガスに晒されるため関連機器は耐水素脆化能力をもつ高価な金属を利用しており、水素エネルギー利用普及を妨げる要因の一つとなっている。我々は以前よりこれを解決するため、水素脆化防止薄膜の作製を行っている。例えば、ステンレス鋼SUS316Lやアルミニウム合金A6061-T6でコーティングする研究をおこない、80%以上の水素脆化防止効果があることを明らかにした。しかしながら、さらに安価なSUS304等の母材に対しては、薄膜と母材の界面構造が大きく異なるため効果は小さく、薄膜の剥離などの問題も発生した。本研究では、数種類の粉体ターゲットをもちいたプラズマプロセスで、基板と薄膜の界面ではより密着性がよく、高圧水素に密着する薄膜側では水素脆化防止効果が高いような傾斜機能性薄膜の作製を試みた。実験は基本的には通常のスputterアップタイプの成膜装置であり、下部パワー電極に粉体ターゲットを設置する。対向する上部アース電極にSi基板等を銀ペースト等で付着させ、その上に成膜する。混合粉体ターゲットを用いる場合は粉体のサイズができるだけ同じサイズなるように加工し、ミキサー (自作) で24時間以上混合させてから利用した。

TiO₂とSUSの混合粉体ターゲットを利用して作製した薄膜表面形状の、混合比依存性を図1に示す。どの薄膜も島状構造であることが分かる。これは通常のTiO₂やSUS固体ター

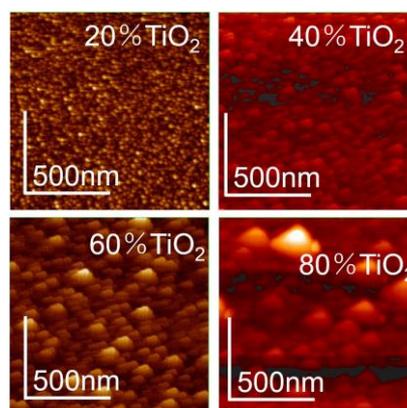


図1 粉体ターゲットを利用して作製した薄膜表面形状のTiO₂混合比依存性

ゲットを用いたときのスパッタリング成膜の結果とほぼ同じである。また、TiO₂の混合比が増加すると、粒径が大きくなることが分かる。ここには示していないが、XRDを用いて表面の結晶性を調べた結果、TiO₂の混合比が増加するほどアナターゼピークが強くなり、結晶性が向上していることが分かった。

薄膜作製を行う場合、粉体をターゲットホルダに封入して利用する。この時、二種類以上の元素粉体を1つのターゲットホルダ内に封入し、それを利用して薄膜作製を行えば1度の成膜で、2種類以上の元素混合薄膜の作製が可能となる。この方法を利用して、多元素混合薄膜の作製を、数種類作製した。図2に、酸化チタンとSUS304の粉体を混合させて作製した薄膜の膜中元素組成比と粉体ターゲットの混合比との関係を示す。結果から膜中の組成比とターゲット中の混合比はほぼ1:1の関係にあることが分かった。この結果を利用すれば、組成比を制御した状態で薄膜作製が可能であることが示唆される。

一方、機械工具等に利用される薄膜には、基板と薄膜との強い密着性が必要となるものがある。これを実現させる方法として膜厚方向へ元素組成比が徐々に変化する傾斜機能性薄膜がある。この傾斜機能性薄膜の作製を行った。TiO₂とSUS304の粉体ターゲットを準備し、これらの混合比(質量比)をSUS100%からTiO₂10%/SUS90%、TiO₂20%/SUS80%と10%ずつTiO₂粉体の混合比を増加させて11種類の混合粉体ターゲットを準備する。SUSの基板上にまずSUS100%粉体を利用して1時間成膜する。その後TiO₂10%/SUS90%に変更し、同様に1時間成膜する。これを繰り返して最後にTiO₂100%で成膜することで傾斜機能性薄膜の作製を試みた。成膜の後XPSで薄膜のTiとFeの組成比をArイオンによる深さ方向分析を行った結果を図5に示す。結果から2つの元素組成比は深さ方向に傾斜して存在することが分かる。

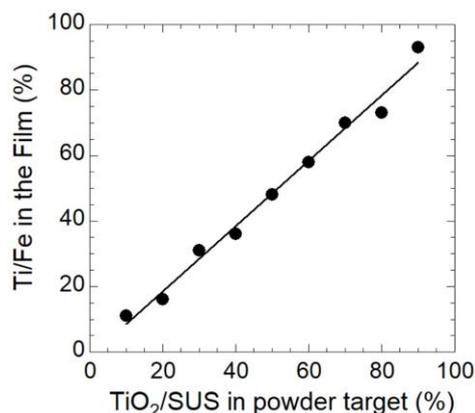


図2 膜中元素組成比と粉体ターゲットの混合比との関係

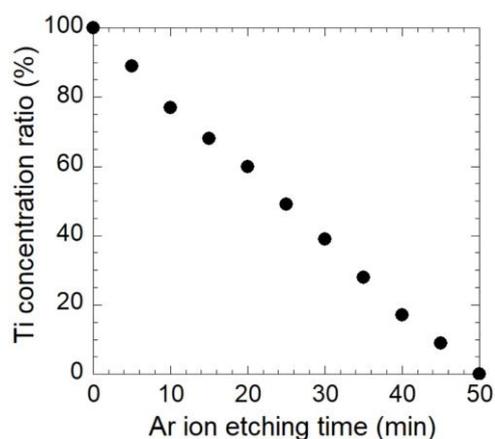


図3 作成した薄膜のTiとFeの組成比の深さ方向分析結果

【研究成果の公表状況】(12pt ゴシック体)

<原著論文> (11pt 明朝体, Times)

- T. Satake, H. Kawasaki, S. Aouki, Preparation of Ti and Fe composition gradient thin films by sputtering with mixed powder targets, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology Vol.21, No.3, pp. 218-223 (2023). 他 計3本

<国際・国内会議> (11pt 明朝体, Times)

- Hiroharu Kawasaki, Yoshihito Yagyu, Takeshi Ihara, Yusuke Hibino, Takahiro Satake And Yoshiaki Suda, Trial of elemental gradient functional thin films preparation by sputtering with mixed powder targets and their applications, ISPlasma2024, 名古屋大学, 2024年3月4~6日. 他8件

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：朽津 和幸

所属機関・部局・職名：東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・教授

連絡先 住所：〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

TEL：04-7122-9404

E-Mail：kuchitsu@rs.tus.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	低温プラズマ照射に対する植物の初期応答メカニズムの解明		
	英文	Molecular mechanisms for initial responses of plants to low-temperature plasma irradiation		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	朽津和幸・東京理科大学・創域理工学部・生命生物科学科・教授	
		研究分担者	奥村賢直・九州大学・情報エレクトロニクス部門・助教	
		センター担当教員	石川健治・半導体プロセス科学部門	
	英文	研究代表者	Kazuyuki Kuchitsu, Tokyo Univ. of Sci., Professor	
		研究分担者	Takamasa Okumura, Kyushu Univ., Assistant professor	
		センター担当教員	Kenji Ishikawa, Nagoya Univ., Professor	
研究実績概要 (成果等)	<p>蛍光実体顕微鏡下でモデル植物ゼニゴケ無性芽にペン型低温プラズマを照射、または種々の活性種を与え、植物細胞内の細胞内 H_2O_2 濃度、Ca^{2+} 濃度等の動態を非破壊蛍光ライブイメージング法により解析する実験系を確立した。最近我々が発見したプラズマ照射直後に過酸化水素が細胞内に導入されると共に細胞膜に局在する Ca^{2+} チャンネルが活性化され、細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇する反応に関与する Ca^{2+} チャンネル等の因子を探索するため、多くの候補遺伝子変異株を作出した。またプラズマ発生装置で発生する種々の長寿命活性種を添加した時の初期応答を解析した。H_2O_2 を細胞外に添加すると、直ちに細胞内の H_2O_2 濃度が上昇すると共に細胞質 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇が誘導された。他の活性種についても解析を進めた。</p>			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)				

低温プラズマ照射に対する植物の初期応答メカニズムの解明 Molecular mechanisms for initial responses of plants to low-temperature plasma irradiation

研究代表者 朽津和幸・東京理科大学・創域理工学部・教授

研究分担者 奥村賢直・九州大学・情報エレクトロニクス部門・助教

研究所担当教員 石川健治・半導体プロセス科学部門・教授

1. 研究目的

研究代表者らが研究分担者の協力を得て最近確立したゼニゴケの低温プラズマ照射実験系を用いて、プラズマ照射に対する植物の初期応答メカニズムの解明を目指す。近年、植物種子への低温プラズマ照射による発芽・成長促進効果が報告されている。大気中でプラズマを発生させると、様々な活性酸素・窒素種が生成されるため、その作用機序には、活性種の関与が想定されているが、分子メカニズムはほとんど不明である。プラズマ農業応用の最適化や実用化には、基盤となる分子レベルの知見が必須となる。

研究代表者らは最近、蛍光実体顕微鏡下でモデル植物ゼニゴケにペン型低温プラズマを照射し、植物細胞内の初期応答反応を非破壊イメージング法により解析する実験系を確立し、プラズマ照射直後に過酸化水素が細胞内に導入されると共に細胞膜に局在する Ca^{2+} チャンネルが活性化され、細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇するという初発反応を発見した。細胞内には多数の Ca^{2+} センサータンパク質があり、情報伝達に関与すると考えられるが、同時に H_2O_2 のみならず、窒素酸化物、活性窒素種、カルボニル化合物、有機酸などの有機化合物の活性体なども生成され、植物における応答に関与する可能性がある。本研究では、ゼニゴケの遺伝子欠損変異体に応用し、低温プラズマ照射に対する初発反応に関与する因子の探索・同定を試みる。また、長寿命の活性酸素窒素種である H_2O_2 , NO_3^- , NO_2^- 水溶液や長寿命活性種を含むプラズマ活性水を添加し、初期応答を解析することにより、プラズマ活性水に対する植物の初発反応と応答メカニズムを詳細に解析する。

2. 研究内容と成果 (12pt ゴシック体)

蛍光実体顕微鏡下でモデル植物ゼニゴケ無性芽にペン型低温プラズマを照射、または種々の活性種を与え、植物細胞内の細胞内 H_2O_2 濃度、 Ca^{2+} 濃度等の動態を非破壊蛍光ライブイメージング法により解析する実験系を確立した。

最近我々が発見したプラズマ照射直後に過酸化水素が細胞内に導入されると共に細胞膜に局在する Ca^{2+} チャンネルが活性化され、細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇する反応に関与する Ca^{2+} チャンネル等の因子を探索するため、多くの候補遺伝子変異株を作出した。

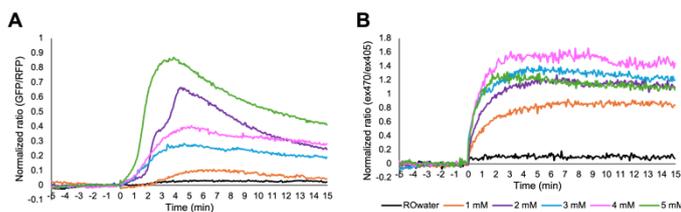


図1 H_2O_2 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変動 (A) と細胞内 H_2O_2 変動 (B) の解析

初期応答を解析するために、蛍光実体顕微鏡下にてリアルタイムイメージング観察できる実験系を立ち上げた。ゼニゴケの無性芽は、ペン型プラズマ照射実験の条件に合わせ、1%スクロースを添加した1/2 B5 固形培地上で14日間培養したものをを用いた。

プラズマ発生装置で発生する種々の長寿命活性種を添加した時の初期応答を解析した。 H_2O_2 を細胞外に添加すると、直ちに細胞内の H_2O_2 濃度が上昇すると共に細胞質 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇が誘導された。(図1)他の活性種についても解析を進めた。

今後、本実験系をプラズマ活性水溶液に展開し、プラズマ照射における植物初発反応関連因子を突き止めるとともに、遺伝子欠損変異体を用いて各長寿命活性種応答性 Ca^{2+} チャネルの探索を行う。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Shoko Tsuboyama, Takamasa Okumura, Pankaj Attri, Kazunori Koga, Masaharu Shiratani & Kazuyuki Kuchitsu, Growth control of *Marchantia polymorpha* gemmae using nonthermal plasma irradiation. *Scientific Reports* 14: 3172 (2024)
- Kenshiro Watanabe, Kenji Hashimoto, Kota Hasegawa, Hiroki Shindo, Yushin Tsuruda, Kamila Kupisz, Mateusz Koselski, Piotr Wasko, Kazimierz Trebacz, Kazuyuki Kuchitsu, Rapid Propagation of Ca^{2+} Waves and Electrical Signals in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* 65: pcad159
- Takafumi Hashimoto, Kenji Hashimoto, Hiroki Shindo, Shoko Tsuboyama, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura, Kazuyuki Kuchitsu, Enhanced Ca^{2+} binding to EF-hands through phosphorylation of conserved serine residues activates MpRBOHB and chitin-triggered ROS production. *Physiologia Plantarum* 175(6): e14101
- Masayuki Kogoshi, Daiki Nishio, Nobutaka Kitahata, Hayato Ohwada, Kazuyuki Kuchitsu, Hideyuki Mizuno & Takamitsu Kurusu, Novel in silico screening system for plant defense activators using deep learning-based prediction of reactive oxygen species accumulation. *Plant Methods*, 19(1): 142.

<国際・国内会議> (紙面の関係で、代表的なもののみ)

- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「モデル植物ゼニゴケを用いた低温プラズマ照射の初発反応と成長に対する影響の解析」、第71回応用物理学会春季学術講演会、東京都市大学、2024年3月22日~25日
- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「大気圧低温プラズマ照射によるゼニゴケの初発反応と成長に対する影響」第65回日本植物生理学会年会、神戸大学、2024年3月17日~19日
- 坪山祥子, 朽津和幸, 「ゼニゴケの細胞分裂・成長制御における活性酸素種の役割と、低温プラズマ照射の影響の解析」、第二回プラズマ種子科学研究会、名古屋大学、2024年1月6日~7日
- 朽津和幸, 坪山祥子, 橋本貴史, 橋本研志, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 低温プラズマによる植物の成長制御の分子メカニズム: 植物における活性酸素種の生理的役割 第33回日本MRS年次大会 2023年11月15日 基調講演(招待)
- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「ゼニゴケを用いて植物へのプラズマ照射効果の分子機構解明を目指す」、第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会、千葉大学、2023年9月11日~13日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：熊谷慎也
所属機関・部局・職名：名城大学・理工学部・教授
連絡先 住所：〒468-8502
TEL：052-838-2307
E-Mail：skumagai@meijo-u.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	プラズマ刺激による高度細胞機能制御手法の開発	
	英文	Development of control method of cell functions using plasma stimulation	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	熊谷慎也・名城大学・理工学部・教授
		研究分担者	伊藤昌文・名城大学・理工学部・教授
		センター担当教員	石川 健治
	英文	研究代表者	
		研究分担者	
		センター担当教員	
研究実績概要 (成果等)	<p>本研究では、プラズマやプラズマを照射した溶液が、細胞、タンパク質、アミノ酸などのバイオ試料に及ぼす作用を、各種機器等を用いて詳細に解析し、得られる知見を活用して、細胞をはじめとするバイオ試料の機能を高度に制御する手法を開発することを目的としている。</p> <p>本年度は、プラズマ照射刺激による細胞挙動変化の解析と、プラズマ及びプラズマ処理アミノ酸溶液と脂質二重膜との反応素過程解析手法の開発を行い、多くの学会発表の成果を上げた。特に、細胞挙動変化の解析では、評価手法の最適化を行い、プラズマの作用が細胞の最表面である細胞膜に及んだ際に、細胞膜を構成する脂質分子の配列状態が秩序相から無秩序相へと変わることが明らかになった。</p>		
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)			

プラズマ刺激による高度細胞機能制御手法の開発

Development of control method of cell functions using plasma stimulation

熊谷慎也・名城大学・理工学部・教授

伊藤昌文・名城大学・理工学部・教授

石川健治・名古屋大学・プラズマ科学部門・教授

1. 研究目的

本研究では、プラズマやプラズマを照射した溶液が、細胞、タンパク質、アミノ酸などのバイオ試料に及ぼす作用を、センター所有の各種機器（多重コヒーレント反ストークスラマン散乱分光（Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering: Multiplex CARS）顕微鏡、液中高速原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy: AFM）、液体クロマトグラフィ質量分析装置（LC/MS）、電子スピン共鳴（ESR）装置等）を用いて、詳細に解析する。そして、得られる知見を活用し、細胞をはじめとするバイオ試料の機能を高度に制御する手法を開発することを目的としている。本研究を通じて、プラズマの医療やプラズマ農業応用での安全性を保証する重要な知見を得て、低温プラズマ科学の深化・発展に寄与することを目指す。

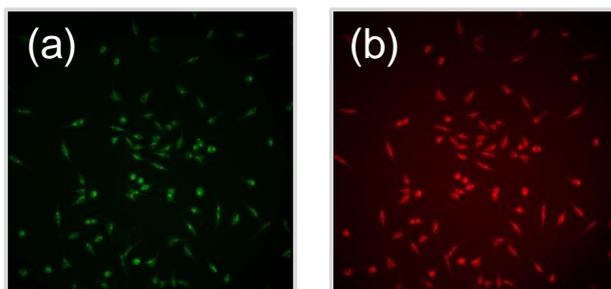
2. 研究内容と成果

2023年度は、プラズマ照射刺激による細胞挙動変化の解析と、プラズマ及びプラズマ処理アミノ酸溶液と脂質二重膜との反応素過程解析手法の開発を行い、学会発表の成果を上げた。本報告では、前者にフォーカスして報告する。

細胞試料に対して、プラズマを照射した際、プラズマの作用が最初に及ぶのは、細胞の表面、即ち、細胞膜である。細胞膜は脂質分子で構成される脂質二重膜構造をしている。本研究ではプラズマの作用で引き起こされる細胞膜の構造変化の詳細な解析を試みた。

細胞試料としては、マウス線維芽細胞 L929 を使用した。培養ディッシュから培養液を除いた後、平面型 DBD プラズマ源を用いてプラズマ照射を行い、再び、培地でディッシュを満たした。続いて、細胞膜の構造変化を評価するため、ソルバトクロミック蛍光試薬（LipiORDER, フナコシ）を滴下した。蛍光顕微鏡で観察すると、秩序相状態にある脂質分子からは緑色蛍光が観測され、無秩序相状態にある蛍光試薬からは赤色蛍光が観測される（図1）。これらの蛍光強度の比（赤色蛍光強度／緑色蛍光強度）を算出することで、プラズマ照射強度に対する細胞膜構造の変化を評価できる。

図1: ソルバトクロミック蛍光試薬を用いた際のマウス線維芽細胞 L929 の蛍光顕微鏡像。波長フィルター越しに高感度モノクロカメラで取得した画像に疑似カラーをつけて表している。(a) 秩序相状態、(b) 無秩序相状態。



蛍光顕微鏡画像から、緑色および赤色の蛍光強度情報を抽出するために、画像解析を行った。位相差顕微鏡画像から細胞のマスク画像をつくり、このマスク画像と蛍光顕微鏡画像の論理演算を行うことで、背景光信号を除き、細胞からの緑色・赤色蛍光強度信号を抽出した。これらの計測手順の最適化を行った後、細胞膜の構造変化を評価した。

実験では、プラズマの照射時間が長くなるにつれて、蛍光強度比（赤色蛍光強度／緑色蛍光強度）が大きくなる結果となった。つまり、プラズマの作用によって細胞膜の脂質分子の配列状態が乱れ、秩序相状態から無秩序相状態へと変化することが明らかになった。脂質分子の配列状態は、細胞膜の流動性と関連があり、秩序相状態の脂質分子は動きにくく、無秩序状態にある脂質分子は動きやすい状態にある。本成果は、プラズマの作用で引き起こされる細胞膜変形を理解する上で重要といえる。

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- Ryunosuke Tsuji, Yuto Ando, Shinya Kumagai, “Analysis of cell membrane structure exposed to plasma for clarification of the mechanism of plasma gene transfection”, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024/APSPT-13, Nagoya Univ., Mar 4-7, 2024.
- Hayata Okino, Shinya Kumagai, “Development of micro perfusion culture system for promoted cell growth”, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024/APSPT-13, Nagoya Univ., Mar 4-7, 2024.
- S. Araki, N. Iwata, Y. Nisikawa, M. Hori, M. Ito “Highly efficient purification of L-tryptophan derivatives produced by oxygen radical treatment”, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024/APSPT-13, Nagoya Univ., Mar 4-7, 2024.
- K. Okamoto, H. Kato, M. Maebayashi, M. Shimizu, M. Kato, M. Hori, M. Ito, “Degradation of carboxymethyl cellulose in water using ambient-Ar glow discharge”, ISPlasma2024/IC-PLANTS2024/APSPT-13, Nagoya Univ., Mar 4-7, 2024.
- S. Kumagai, H. Okino, R. Yamamoto, K. Tomoda, M. Kobayashi, “Development of non-thermal atmospheric pressure plasma exposure microsystems aiming for cell control”, CiRA 2023 International Symposium, Kyoto University, Nov. 29, 30 2023.
- 喜村柚希乃、熊谷慎也、”細胞活性に対するプラズマ刺激効果の解析”, 第 84 回応用物理学会秋季学術講演会、熊本、2023 年 9 月 19 日～23 日.
- S. Kumagai, M. Kobayashi, T. Shimizu, M. Sasaki, “Plasma-on-Chip: A Microdevice for Direct Plasma Exposure of Cultured Cells”, ICPIG XXXV 2023, Egmond aan Zee, Jul. 9-14, 2023.
- S. Kato, Y. Ando, K. Tomoda, M. Kobayashi, S. Kumagai “MICRO PLASMA GENE TRANSFECTION SYSTEM FOR UNIFORM EXPRESSION”, The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers2023), Jun. 25-29, 2023.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 近藤伸一

所属機関・部局・職名： 岐阜薬科大学・薬学部・教授

連絡先 住所：〒501-1196 岐阜市大学西 1 丁目 25 番地 4

TEL：058-230-8114

E-Mail：skondo@gifu-pu.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	大気圧プラズマを用いた高分子表面改質	
	英文	Polymer surface modification with atmospheric pressure plasma treatment	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	近藤伸一・岐阜薬科大学・薬学部・教授
		研究分担者	土井直樹・岐阜薬科大学・薬学部・講師
		センター担当教員	石川健治・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Shin-ichi Kondo
		研究分担者	Naoki Doi
		センター担当教員	Kenji Ishikawa
研究実績概要 (成果等)	本研究では、各種高分子に大気圧プラズマ照射を経時的に行い、その質量変化より分解特性を評価した。また、処理後の試料について走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた形状変化についても検討した。その結果、ポリメタクリル酸メチルは大気圧プラズマ照射により有意な重量減少は認められなかったものの、SEM 画像より細孔が観測され分解によると推察される形状変化が認められた。ポリスチレンにおいても有意な重量変化は認められなかったが、SEM 画像より大気圧プラズマ照射の熱的効果も合わせり滑らかな形状になることを見出した。		
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)			

大気圧プラズマを用いた高分子表面改質

Polymer surface modification with atmospheric pressure plasma treatment

近藤伸一・岐阜薬科大学・薬学部・教授

土井直樹・岐阜薬科大学・薬学部・講師

石川健治・名古屋大学・工学部・教授

1. 研究目的 (12pt ゴシック体)

大気圧プラズマでは、プラズマが大気（主に窒素や酸素）とも反応し、高分子表面処理を行うことから、低圧プラズマ表面処理よりもより複雑な反応が起きていると予想される。本研究では、種々の高分子表面への大気圧プラズマ照射により惹起される表面変化を、窒素ガスを用いる低圧プラズマ表面処理との比較により明らかにし、大気圧プラズマの表面処理特性の解明を目指す。本申請者らは、これまでアルゴンガスあるいは酸素ガスを用いた各種高分子への低圧プラズマ表面処理による表面改質を行っており、生成するラジカルの構造についても明らかにしている。2022 年度では、各種高分子表面への窒素ガスを用いた低圧プラズマ表面処理を行い、その生成ラジカル構造が Ar プラズマ照射ラジカルと本質的に同一であることを見出した。その知見を基に、本年度は大気圧プラズマ表面処理の特性について検討する。

2. 研究内容と成果 (12pt ゴシック体)

これまでの低圧プラズマの知見より、プラズマ分解性高分子とプラズマ架橋性高分子とに大別することが可能であることを見出している。代表的なプラズマ分解性および架橋性高分子に対して大気圧プラズマ照射を経時的に行い、その質量変化より分解特性を評価した。また、処理後の試料について、全反射赤外分光 (ATR-FTIR) 測定による官能基の変化や走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた形状変化についても検討した。

(結果・考察)

岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室にあるジェット型大気圧プラズマ装置 (Ar) を用いて、高分子試料へのプラズマ表面処理を行った。(図 1)

まず、本プラズマ照射装置による試料への加熱効果についての知見を得るため、プラズマガス中に温度計を設置し温度変化を測定した。図 2 は、その結果を示したものである。なお、照射距離を 1cm、2cm、3cm とし、0~5 分までは 30 秒間のプラズマ照射の後、30 秒間プラズマ照射を止め、5~10 分では 1 分間のプラズマ照射後、1 分間プラズマ照射を止めて経時的に測定した。30 秒間隔の時には累積時間が 1~2 分間で定常化し 1 cm の照射距離では約 80°C に達した。また、1 分間隔にするとさらに約 10°C 上昇することが示された。

次に、ポリメタクリル酸メチル (PMMA)、ポリメタクリル酸 (PMAA)、ポリスチレ

ン (PSt)、低密度ポリエチレン (LDPE)、高密度ポリエチレン (HDPE)、ポリエチレンテレフタレート (PET) をモデル高分子として用い、プラズマ照射時間による重量減少について検討を行った。高分子試料 300 mg を打錠機を用いて 750 kg/cm² の打錠圧にて 10 分間圧縮することにより直径 13 mm の錠剤試料を調製した。各種錠剤試料をプラズマ照射距離を 1 cm とし、累積 5 分間まで経時的にプラズマ照射を行い、重量を測定した。図 3 は PSt の結果であるが、有意な重量変化は認められなかった。また、他の高分子試料においても同様な結果が得られた。低圧プラズマの場合では高分子試料の有意な重量減少が認められ、高分子の分解により低分子化した成分が低圧のため気化したためと考えられる。しかしながら、大気圧下では低分子化したとしても約 80°C の熱では分解物が気化できないため重量減少が認められなかったと推察される。また、プラズマ照射前後での高分子錠剤の ATR-FTIR スペクトルを比較したが、いずれの高分子においても有意な差異は認められなかった。

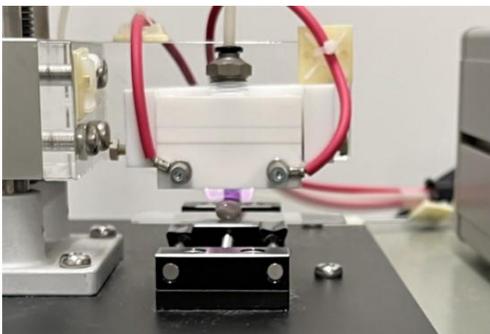


図 1 大気圧プラズマ装置

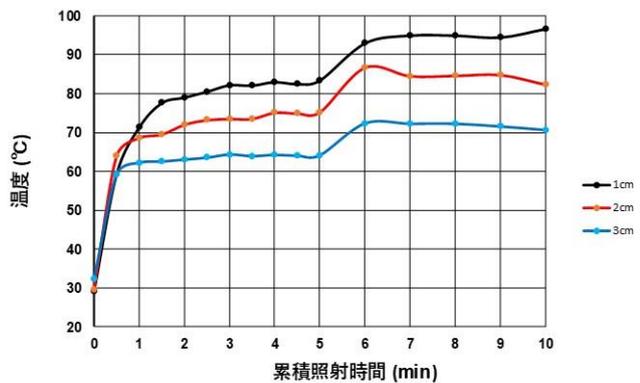


図 2 大気圧プラズマ照射時の温度の経時変化

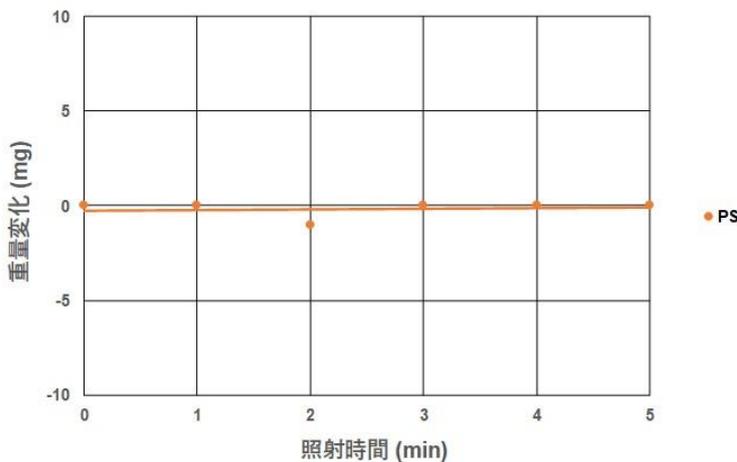


図 3 PSt への大気圧プラズマ照射による重量変化

次に、SEMによる錠剤表面の形状変化について検討を行った。図4は、PMMAとPStに5分間大気圧プラズマ照射を行った時のSEM画像を未処理の物とともに示したものである。PMMAはプラズマ照射により多数の細孔が形成されるのに対し、PStでは照射前よりも滑らかな表面であることが観測された。PMMAはプラズマ分解型高分子であり、大気圧プラズマ照射により有意な重量減少は認められなかったものの分解によると推察される形状変化が引き起こされることが示唆された。一方、プラズマ架橋型高分子であるPStは、大気圧プラズマ照射の熱的効果も合わさり滑らかな形状へと変化したものと推察された。

以上の知見より、大気圧プラズマ照射により有意な重量変化は認められなかったものの、表面形状変化が引き起こされていることを明らかにした。

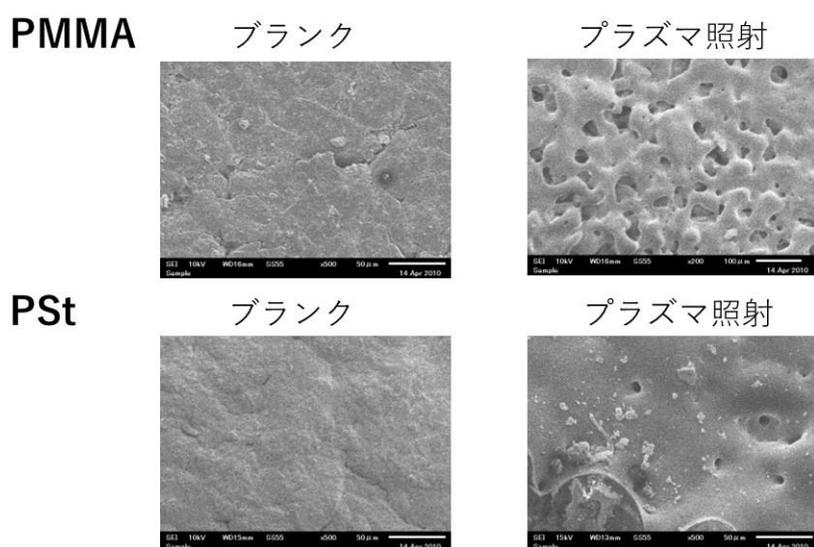


図4 大気圧プラズマ照射前後でのPMMAおよびPStのSEM画像

【研究成果の公表状況】(12pt ゴシック体)

無し

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：近藤 隆

所属機関・部局・職名：名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・
客員教授

連絡先 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

TEL：052-788-6075

FAX：052-789-3462

E-Mail：tasakondo@khc.biglobe.ne.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマ照射アミノ酸結晶におけるフリーラジカル生成機構の解明	
	英文	Elucidation of the mechanism on free radical formation in amino acid crystals exposed to low temperature plasma	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	近藤 隆・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・ 客員教授
		研究分担者	熊谷 純・名古屋大学・未来材料・システム研究所 (IMaSS) 材料創製部門 材料プロセス部, 准教授 平山亮一・量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所, 主任研究員
		センター担当教員	石川 健治教授・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Takashi Kondo, Nagoya University
		研究分担者	Jun Kumagai, Nagoya University Ryoichi Hirayama, National Institutes for Quantum Science and Technology
		センター担当教員	Kenji Ishikawa
研究実績概要 (成果等)	<p>大気圧プラズマ条件では汎用性のある線量計が求められている。そこで、アラニン結晶が放射線線量計として利用されていることに注目して、この結晶に大気圧プラズマを照射し、スピン捕捉法で調べたところ、初めて脱アミノラジカルを認めた。本脱アミノラジカル生成特性を調べるために Linear Energy transfer (LET) の異なる放射線 (X 線、Ar, Fe イオン線) を用いた。全 21 種類のアミノ酸について Ar プラズマ照射後スピン捕捉剤でラジカル中間体が有意に捕捉できた例は 5 例あったが、安定して脱アミノラジカルが認められるのは、アラニンおよびスレオニンであった。アラニンに照射時間を変えて、Ar プラズマ照射したところ、照射時間に依存して増加したが、10 分照射では増加の程度は頭打ち</p>		

	<p>となった。照射後の時間依存性を調べたところ、1か月では約40%減衰した。照射距離の影響を調べたところ、10 mmで脱アミノラジカルは認められなくなった。本脱アミノラジカル測定におけるLET依存性はなかった。今後の生成機序の解明が求められるが、本システムは大気圧プラズマにも有効であり、LETに依存することなく、放射線との比較に有用と思われる。</p>
特筆事項 (論文発表、受賞、産業財産権出願取得状況等)	2023年度日本ソノケミストリー学会功績賞(令和5年12月7日)

低温プラズマ照射アミノ酸結晶におけるフリーラジカル生成機構の 解明

Elucidation of the mechanism on free radical formation in amino acid crystals exposed
to low temperature plasma

研究代表者・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・客員教授

研究分担者・熊谷 純・名古屋大学・未来材料・システム研究所, 准教授

平山亮一・量子科学技術研究開発機構, 主任研究員

研究所担当教員氏名・名古屋大学・石川健治教授・プラズマ科学部門

1. 研究目的

大気圧プラズマは極めて高効率に水溶液中に活性酸素種を生成する。以前より大気圧プラズマによる細胞死について、①溶液中の活性酸素種の生成量の測定、②細胞内の各活性酸素種の発生量の測定、③アルゴン担体ガスへの窒素添加効果、④高温による細胞膜透過性の影響、⑤細胞内グルタチオン低減効果、⑥白金および金ナノ粒子の添加効果等について、細胞生物学的に検討してきた。大気圧プラズマは理工学分野のみならず、医学および農業応用の研究が進んでいる。課題はそのドーズの測定である。OH ラジカルの測定、過酸化水素の定量、KI 溶液からのヨウ素の遊離など水溶液系の化学的測定は可能であるが、試薬調製や取り扱いが容易とは言えない。また、大気圧プラズマ条件では放射線化学で使用されている各種活性種の G 値も利用できず、汎用性のある線量計が求められている。そこで、アラニン結晶が放射線線量計として利用されていることに注目してこの結晶に大気圧プラズマを照射し、スピン捕捉法で調べたところ、初めて脱アミノラジカルを認めた。本研究では各種アミノ酸結晶に生じるラジカルの直接測定とその後のスピン捕捉法で得られる脱アミノラジカルを測定し、放射線 (X 線、Fe イオン線) のそれと比較することを目的とする。

2. 研究内容と成果

大気圧プラズマ照射には基礎的な照射条件が確立している名古屋大学が開発した高密度 Ar プラズマを利用した。照射試料を直接 ESR 測定するとともに DBNBS (3, 5-Dibromo-4-nitrosobenzenesulfonic acid sodium salt) スピン捕捉剤を含む溶液に溶解して、捕捉されたフリーラジカルの測定を行った。照射試料について、線量依存性、照射後の時間依存性、プラズマ照射の距離依存性について定量的に調べた。また、Linear Energy transfer (LET) 依存性を調べるための LET の異なる X 線 (9.4 keV/ μm)、Ar イオン (90 keV/ μm) および Fe イオン (440 keV/ μm) を用いた。

全 21 種類のアミノ酸について Ar プラズマ照射後スピン捕捉剤でラジカル中間体が有意に捕捉できた例は、アラニン、スレオニン、リシン、トリプトファン、ヒスチジンであった。前 3 者で脱アミノラジカルが認められた (図 1)。このうち、リシンは湿度に影響すると思われるが、再現性に問題があった。トリプトファン、ヒスチジンではニト

ロキシドと思われる有意な3本のピークが認められた。従って、アラニンおよびスレオニンが脱アミノラジカル生成候補アミノ酸であることが判明した。アラニンに照射時間を変えて、Ar プラズマ照射したところ、照射時間に依存して5分照射までは増加したが、10分照射では増加の程度は頭打ちとなった(図2)。照射後の時間依存性を調べたところ、1か月で約40%減衰した。また、照射距離の影響を調べたところ、10mmで脱アミノラジカルは認められなくなった。X線との比較で、用いたAr プラズマ照射1分間は86 Gyに相当した。また、本脱アミノラジカル測定におけるLET依存性はなかった。今後は低温プラズマによる脱アミノラジカル機序について調べる予定である。

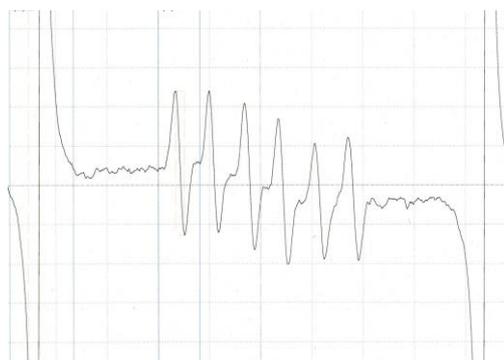


図1 アラニン照射後認められた脱アミノラジカルのESRスペクトル

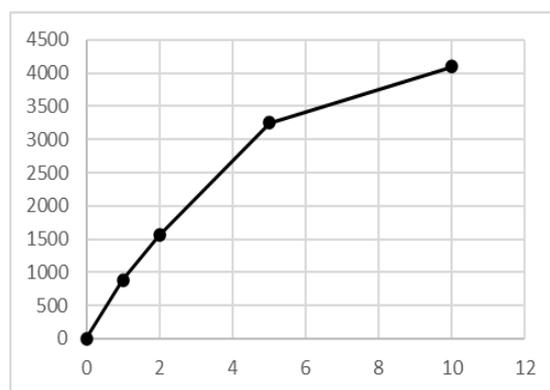


図2 脱アミノラジカルの照射時間(分)依存性。縦軸はESRピークの相対値。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- ・Ishikawa K, Takeda K, Yoshimura S, Kondo T, Tanaka H, Toyokuni S, Nakamura K, Kajiyama H, Mizuno M, Hori M. Generation and measurement of low-temperature plasma for cancer therapy: a historical review. *Free Radic Res.* 2023 Dec;57(3):239-270. doi: 10.1080/10715762.2023.2230351.
- ・Li P, Zhao QL, Rehman MU, Jawaid P, Cui ZG, Ahmed K, Kondo T, Saitoh JI, Noguchi K, Isofraxidin enhances hyperthermia-induced apoptosis via redox modification in acute monocytic leukemia U937 cells. *Mol Med Rep.* 2023 Feb;27(2):41. doi: 10.3892/mmr.2023.12928.
- ・近藤 隆、橋爪 博司、田中 宏昌、石川 健治、堀 勝、低温大気圧プラズマによるフリーラジカル生成とその生物学的意義—放射線との比較—*化学工業* 74(2), 120-126, 2023.
- ・近藤 隆、橋爪博司、田中宏昌、石川健司、齋藤淳一、堀 勝、低温プラズマおよびハイパーサーミア併用効果を用いたがん治療の可能性、*Thermal Medicine* 39-3, 21-30, 2023.
- ・近藤 隆、超音波の生物作用—治療応用に関する課題と展望、*超音波 Techno* 36-1, 37-42, 2024.

<国際・国内会議>

- Kondo T, Kumagai J, Hirayama R, Hashizume H, Tanaka H, Ishikawa K, Hori M, Low-temperature plasma- and radiation-induced free radicals of solid-state amino acids. ISPlasma 2024, Nagoya. 2024年3月3～8日
- 近藤 隆, 村谷珠輝, 古澤之裕, 斉藤淳一, 橋爪博司, 田中宏昌, 石川健司, 堀 勝, 大気圧プラズマ誘発細胞死の温熱による増強, 第40回日本ハイパーサーミア学会, 伊勢原, 2024年9月8～9日
- 近藤 隆, 熊谷 純, 橋爪博司, 田中宏昌, 石川健治, 堀 勝, アミノ酸水溶液のプラズマ化学および放射線化学ースピン捕捉法による検討, 第66回放射線化学討論会, 名古屋, 2024年9月27～29日
- Kondo T, Kumagai J, Hirayama R, Hashizume H, Tanaka H, Ishikawa K, Hori M, Low temperature plasma chemistry and radiation chemistry of aqueous solutions of amino acids. A spin trapping study. 第66回日本放射線影響学会, 東京, 2023年11月6～8日
- 近藤 隆, 教育講演、大気圧プラズマの生物応答—超音波との比較—日本超音波医学会、超音波分子診断治療研究会、福岡、2023年12月18日
- 近藤 隆, 村谷珠輝, 古澤之裕, 斉藤淳一, 橋爪博司, 田中宏昌, 石川健司, 堀 勝, 低温プラズマ誘発細胞死の温熱による増強—直接照射から照射溶液へ, 第24回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム, 東京, 2024年2月17～18日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 佐々木 渉太

所属機関・部局・職名：東北大学・大学院工学研究科・助教

連絡先 住所：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05

TEL：022-795-7046

E-Mail：s.sasaki@tohoku.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマ技術を活用したヒトコロナウイルスの不活化	
	英文	Inactivation of human coronavirus using cold plasma	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	佐々木 渉太
		研究分担者	
		センター担当教員	田中 宏昌・バイオシステム科学部門
	英文	研究代表者	Shota Sasaki
		研究分担者	
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka
研究実績概要 (成果等)	ヒトカゼコロナウイルス (HCoV-229E) を効率的に不活化する低温プラズマ技術の開発を目指して、高いウイルス不活化能を有する活性種や活性物質を同定することを目的として実験を行った。その結果、気相活性種 N_2O_5 , O_3 , NO/NO_2 の中で、 N_2O_5 が最も高いウイルス不活化能を有することを明らかにした。さらに、液相活性種を用いた対照実験により、 N_2O_5 によるウイルス不活化は、同濃度の NO_3^- 添加や pH 減少では説明が付かなかったことから、 N_2O_5 が溶解する際に一時的に生成される中間体 (NO_2^+ , $[\text{NO}_2^+\text{NO}_3^-]$) が不活化因子である可能性が示唆された。この結果は、 N_2O_5 の気液界面反応場活用により、飛沫中ウイルスの高効率不活化の実現を期待させるものである。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	とくになし		

低温プラズマ技術を活用したヒトコロナウイルスの不活化

Inactivation of human coronavirus using cold plasma

佐々木 渉太・東北大学・大学院工学研究科・助教

田中 宏昌・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授

1. 研究目的

昨今の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に代表されるように、ヒトコロナウイルスが引き起こす大規模な感染症流行は、2000 年以降だけで三度も引き起こされており、今後も新たな感染症の出現が危惧されている。従って、ヒトコロナウイルスに対する効率的な不活化技術の開発が急務の課題である。

低温大気圧プラズマは、ガス温度を低く保ちながら、高い電子温度を持つ非平衡反応場を容易に作り出し、ラジカルを含む活性種・荷電粒子・紫外線などの不活化因子を、その場合成し同時供給できることから、強力なウイルス不活化への活用が期待されている。しかしながら、低温プラズマによるヒトコロナウイルス不活化の研究は数少なく、プラズマ由来の不活化因子を完全に同定するには至っていない。

本研究では、ヒトコロナウイルスを効率的に不活化する低温プラズマ技術の開発を目指して、本年度はプラズマ活性ガス・活性液等を用いて、高いウイルス不活化能を有する活性種や活性物質を同定することを目的とする。

2. 研究内容と成果

まずは、ヒトカゼコロナウイルスの一種である HCoV-229E (※新型コロナウイルス SARS-CoV-2 とは異なる旧型のヒトコロナウイルス) を用いて、ウイルス感染価を評価可能な実験系を構築した。感染価はエンドポイント希釈による TCID₅₀ 法を用いて評価を行った。

次に、これまでに開発してきた五酸化二窒素 (N₂O₅) 等を空気から選択合成するプラズマ装置を用いて、HCoV-229E ウイルスを含有する液滴 200 μL に対して、気相活性種を暴露する実験系を構築した (図 1)。

プラズマ選択合成した N₂O₅ ガスを HCoV-229E ウイルスに暴露したところ、プラズマを直接接触させることなく、2 分の処理でウイルス感染価を 2~3 桁程度減少 (99 ~ 99.9% の不活化に対応) させることに成功した。一方で、オゾン (O₃) や NO_x (一酸化窒素 NO/二酸化窒素 NO₂ の混合) ガスでも、HCoV-229E ウイルス不活化効果は見られたが、5 分の処理でウイルス感染価を 1 桁減少させる程度であった。使用した O₃ 密度は、N₂O₅ 密度より 3 倍高いこと、NO_x 密度もおおよそ 2 倍高いことを鑑みると、N₂O₅ は O₃ や NO_x と

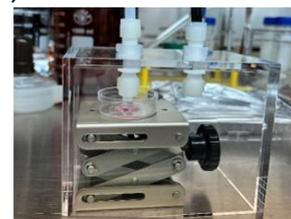
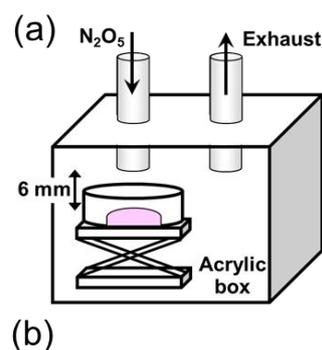


図 1:ヒトカゼコロナウイルスの不活化試験実験系の(a)概略図と(b)写真。

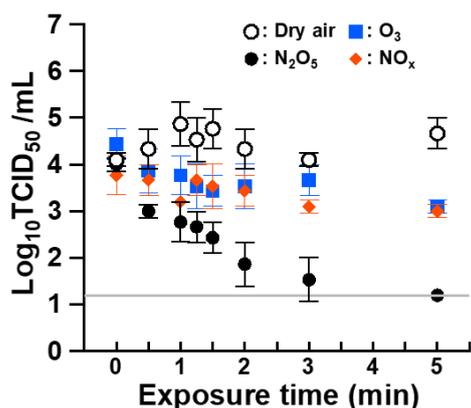


図 2: HCoV-229E ウイルス感染価の各活性種含有ガス暴露時間依存性.

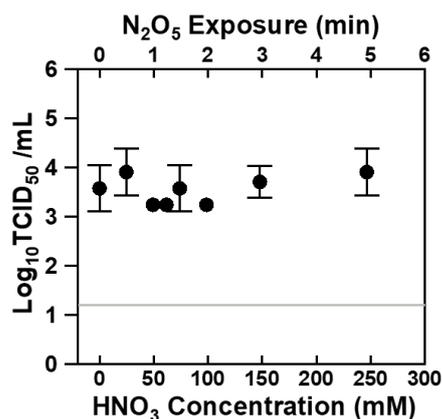


図 3: HCoV-229E ウイルス感染価の硝酸濃度依存性. 上軸は, N₂O₅ 暴露時間相当で示している.

比較して, 高いウイルス不活化効果を有する活性種であるといえる. N₂O₅ は O₃ や NO_x と比較して非常に高い水溶解性を有していることから, 液中への活性種輸送効率が極めて高い. この特性が, 高いウイルス不活化能を示す要因の一つではないかと予想される.

N₂O₅ によるウイルス不活化要因を明らかにするために, 硝酸 (HNO₃) を用いた対照実験を行った. 前準備として, 200 μL の純水に対して, 同様に N₂O₅ を暴露した際の NO₃⁻ 濃度を吸収分光法で調べたところ, NO₃⁻ 濃度は暴露時間に対して線形増加し, およそ 50 mM/min の生成レートであった. N₂O₅ 暴露時間に対応した濃度の HNO₃ 溶液を用いて, HCoV-229E ウイルスを処理したところ, 最大 300 mM (pH < 1 になっているのを確認済) の HNO₃ 処理でも, ウイルス感染価を有意に減少させることは無かった. 従って, 少なくとも N₂O₅ 溶解後の一様に生成された HNO₃ もしくは pH 低下が, 不活化の主因子ではないといえる. N₂O₅ は, 溶解の際, 一時的に反応活性の高い中間体 (NO₂⁺, [NO₂⁺·NO₃⁻]) を生成することが知られている. N₂O₅ 暴露時間相当の HNO₃ 添加でウイルス不活化効果が見られなかったことは, これらの中間体によるウイルス不活化への重要な寄与を示唆している. N₂O₅ 溶解に伴う中間体生成場は, 気液界面近傍で形成されるため, 比表面積の高い液滴, すなわち飛沫中のウイルス不活化に適している可能性があり, 今後さらなるメカニズム解明が望まれる.

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- ・ S. Sasaki, S. Osana, M. Yamaya, H. Nishimura, R. Nagatomi, and T. Kaneko, “Inactivation of Human Coronavirus Using Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric Pressure Plasmas”, 4th International Conference on Data Driven Plasma Science (ICDDPS-4)/14th EU Japan Joint Symposium on Plasma Processing (JSPP-14), Okinawa, Japan, 2023/04/18.
- ・ S. Sasaki, S. Osana, M. Yamaya, H. Nishimura, R. Nagatomi, and T. Kaneko, “Inactivation effect of plasma-generated reactive oxygen and nitrogen species on human coronavirus”, 25th International Symposium on Plasma Chemistry, Kyoto, Japan, 2023/05/22.
- ・ 佐々木 渉太, 高島 圭介, 金子 俊郎, “実験と数値計算によるプラズマ誘起液相化学反応の理解”, 第 33 回日本 MRS 年次大会, 神奈川県横浜市, 2023/11/15.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 佐々木 東

所属機関・部局・職名：北海道大学 大学院獣医学研究院 講師

連絡先 住所：〒060-0818 北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目

TEL： 011-706-9588

E-Mail： n.sasaki@vetmed.hokudai.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマによる膀胱癌治療法に関する基礎的検討	
	英文	Intravesical administration of low-temperature plasma for bladder cancer	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	佐々木東・北海道大学・大学院獣医学研究院・講師
		研究分担者	滝口 満喜・北海道大学・大学院獣医学研究院・教授 安井 博宣・北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授 近藤 隆・低温プラズマ科学研究センター・バイオシステム 科学部門・客員教授
		センター担当教員	田中 宏昌・教授・バイオシステム科学部門
	英文	研究代表者	Noboru Sasaki
		研究分担者	Mitsuyoshi Takiguchi Hironobu Yasui Takashi Kondo
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka
研究実績概要 (成果等)			
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	なし		

低温プラズマによる膀胱癌治療法に関する基礎的検討

Intravesical administration of low-temperature plasma for bladder cancer

佐々木 東・北海道大学・大学院獣医学研究院・講師

滝口 満喜・北海道大学・大学院獣医学研究院・教授

安井 博宣・北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授

近藤 隆・低温プラズマ科学研究センター バイオシステム科学部門・

客員教授

田中 宏昌・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター バイオシステム科学
部門・教授

1. 研究目的 (12pt ゴシック体)

人の膀胱癌の 70%は診断時に膀胱表層に病変の限局しており、経尿道内視鏡による摘出、その後の膀胱内注入療法が標準治療である。しかし、5年再発率が 50%、そのうち 30%は膀胱全摘が必要なステージに進行する。膀胱全摘を行うと生活の質が低下するため、進行した膀胱癌に対する膀胱温存療法が必要である。犬の膀胱癌は診断時に 90%で腫瘍が膀胱壁全体に浸潤、50%以上で転移が存在し、人の進行した膀胱癌に相当する。現存の治療は膀胱摘出もしくは緩和療法のみであり、新規治療法は有用性が高い。また、犬の膀胱癌に対する新規治療法の開発は獣医学領域だけでなく、その類似性から人の進行した膀胱癌治療法開発となりうる。本研究では低温プラズマを用いた膀胱内局所療法の可能性を探索する。

2. 研究内容と成果

プラズマ照射溶液の膀胱内注入療法の開発に向けた芽生え期の今年度は、プラズマ照射溶液の殺細胞効果の確認を行った。ヒト膀胱癌由来株細胞 UM-UC-3 をラット I 型コラーゲン内に包埋した 3 次元培養を膀胱癌モデルとして作成した。この 3 次元モデルに ①プラズマ照射乳酸リングル (PAL)、②プラズマ照射時間 2 倍の PAL plus、③プラズマ非照射の乳酸リングルをそれぞれ 1 時間ずつ作用させた。各種溶液を除去して 24 時間培養したのち、光学顕微鏡で写真撮影を行い、殺細胞効果を主観的に評価した。これまでに我々が他の研究で使用していた腫瘍細胞密度の高い培養の場合、PAL および PAL plus 群において細胞密度の低下ならびに細胞のない領域、つまり殺細胞効果が主観的に確認できた (図 1)。さらに、3 次元培養に入れる細胞を 8 分の 1 にした低密度培養の場合には PAL および PAL plus の作用がより顕著に表れ、ほとんどの腫瘍細胞が死滅している印象を受けた (図 2)。

今年度の予備的検討により、PAL もしくは PAL plus 原液による膀胱癌株細胞に対する殺細胞効果の感触が得られた。一方で、原液によるそれら殺細胞効果に細胞選択性がある印象は感じられず、今後は正常膀胱上皮細胞を比較対象とした検討の必要性を感じた。プラズマ照射溶液の抗腫瘍効果に関する先行研究同様に、PAL もしくは PAL plus

原液の至適希釈倍率の探索が必要である。今後は、それら至適条件の設定とともに、活性酸素種の定量などにより作用機序の解明を進めていきたい。

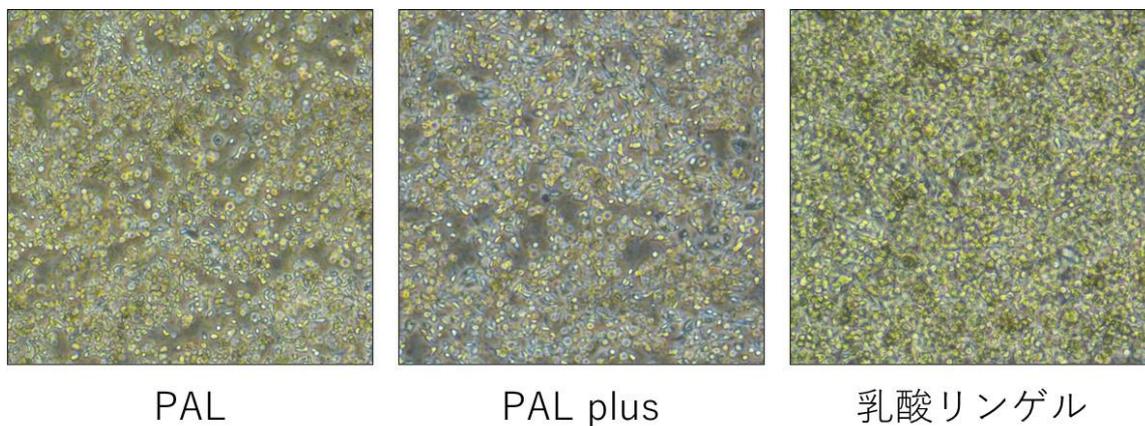


図1 高密度培養での写真

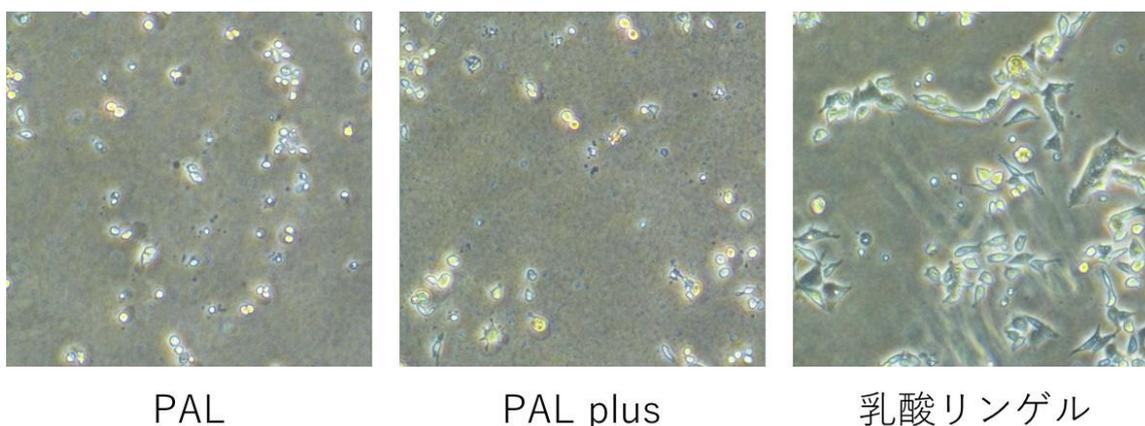


図2 低密度培養での写真

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- ・ なし

<国際・国内会議>

- ・ なし

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：佐藤康太郎

所属機関・部局・職名：名古屋大学・医学系研究科・助教

連絡先 住所：〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

TEL：052-744-2348 FAX：052-744-2352

E-Mail：kotarosato1123@med.nagoya-u.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	(重点テーマ) 腫瘍微小環境に着目したフェロトーシス誘発プラズマ活性化乳酸リンゲル液による癌治療の創成		
	英文	Creation for cancer treatment with ferroptosis-induced Plasma-activated Lactate ringer's solution focusing on tumor microenvironment		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	佐藤康太郎・名古屋大学・医学系研究科・助教	
		研究分担者	赤塚慎也・名古屋大学・医学系研究科・講師 楊 茗・名古屋大学・医学系研究科・博士後期課程 1 年	
		センター担当教員	豊國伸哉・名古屋大学・医学系研究科・教授	
	英文	研究代表者	Kotaro Sato・Nagoya University Graduate School of Medicine・Assistant professor	
		研究分担者	Shinya Akatsuka・Nagoya University Graduate School of Medicine・Assistant professor Ming Yang・Nagoya University Graduate School of Medicine・Ph.D. student	
		センター担当教員	Shinya Toyokuni・Nagoya University Graduate School of Medicine・Professor	
研究実績概要 (成果等)	論文：Ferroptosis induced by plasma-activated Ringer's lactate solution prevents oral cancer progression」が「Oral diseases」(IF 3.8)に受理された。発表：①がん微小環境に着目したフェロトーシス誘発プラズマ活性化乳酸リンゲル液による癌治療の創成 第 77 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 ②Ferroptosis induced by plasma-activated Ringer's lactate solution prevents oral cancer progression Global Plasma Forum 2023			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)	なし。			

腫瘍微小環境に着目したフェロトーシス誘発

プラズマ活性化乳酸リンゲル液による癌治療の創成

Creation for cancer treatment with ferroptosis-induced Plasma-activated Lactate ringer's solution focusing on tumor microenvironment

佐藤康太郎・名古屋大学・医学系研究科・助教
赤塚慎也・名古屋大学・医学系研究科・講師
楊 茗・名古屋大学・医学系研究科・博士後期課程 1 年
豊國伸哉・名古屋大学・医学系研究科・教授

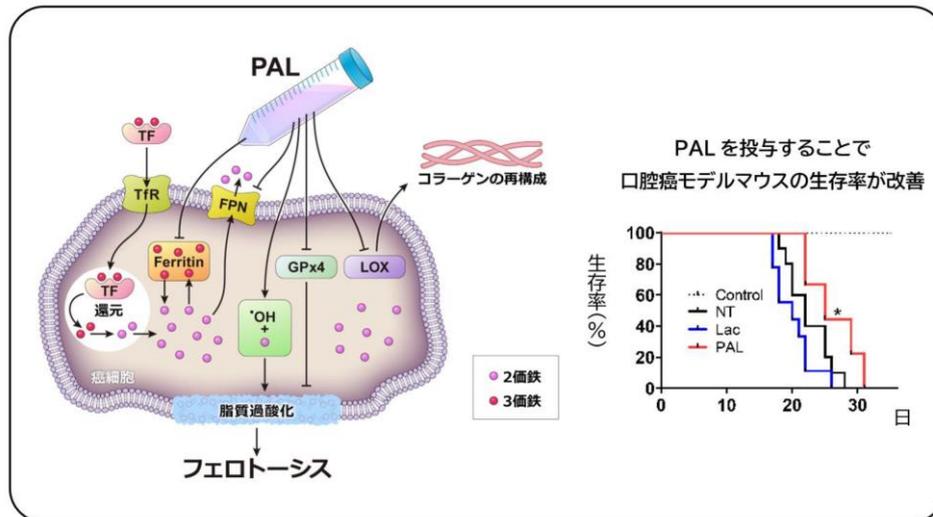
1. 研究目的

本研究室では 2012 年より低温プラズマ (Non-thermal plasma: NTP) の生物作用の研究を開始し、プラズマは局所に酸化ストレスを負荷することを見いだした。また、プラズマ直接照射 (直接法) は口腔扁平上皮癌や悪性中皮腫特異的にフェロトーシスを起こすことを見いだしている。最近では、臨床応用への利便性を考慮したプラズマを乳酸リンゲル液に照射した液体 (プラズマ活性化乳酸リンゲル液: Plasma-activated Lactate ringer's solution: PAL) を用いた間接法も同様に癌特異的にフェロトーシスを起こすことが判明してきている。本プロジェクトの目的は、プラズマの間接法の口腔癌に対する直接的ならびに周囲の微小環境への間接的作用の分子メカニズムを明らかにし、臨床応用へとつなげることである。

2. 研究内容と成果

口腔癌細胞と正常細胞を用いて、PAL による細胞生存率、遊走、浸潤能の変化および細胞死の種類を評価した。In vivo では神戸大学より譲渡いただいた口腔癌モデルマウスを用いて PAL の効果を検討した。In vitro では PAL 投与により、口腔癌細胞では正常細胞と比較して低濃度で殺細胞効果を示し、遊走および浸潤能の減弱がみられた。またフェリチン、フェロポーチン (FPN) の低下、脂質過酸化、ミトコンドリアの形態変化などがみられ、フェロトーシスが起きていることを確認した。また、Lysyl oxidase (LOX) の有意な発現低下がみられた。In vivo では PAL 投与により発癌が抑制され、生存率は有意に延長した。組織学的に LOX の発現低下およびコラーゲンの形成抑制がみられ、さらにフェロトーシスが引き起こされていることを確認した。

以上より、PAL は口腔癌細胞に対してフェロトーシスを引き起こし、さらにコラーゲンの形成を抑制することで転移を抑制させる可能性が示唆された。



PAL は癌細胞内の触媒性 2 価鉄を上昇させるなどして鉄代謝に影響を与え、脂質過酸化を引き起こし、フェロトーシスを引き起こします。また、LOX を低下させることで口腔癌の進行を抑える可能性が示唆されました。

TF:トランスフェリン, TfR:トランスフェリンレセプター, FPN:フェロポーチン, ●OH:ヒドロキシラジカル, GPx4:グルタチオンペルオキシダーゼ 4, LOX:リシルオキシダーゼ

NT:無治療群, Lac:ラクテート投与群, PAL: PAL 投与群

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Sato K, Yang M, Nakamura K, Tanaka H, Hori M, Nishio M, Suzuki A, Hibi H, Toyokuni S
Ferroptosis induced by plasma-activated Ringer' s lactate solution prevents oral cancer progression, Oral Diseases, in press.

<国内会議>

- 佐藤康太郎、日比英晴, がん微小環境に着目したフェロトーシス誘発プラズマ活性化乳酸リンゲル液による癌治療の創成, 第 77 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 岡山, 2023 年 5 月 12 日

<国際会議>

- Ming Yang, Kotaro Sato, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Masaru Hori, Miki Nishio, Akira Suzuki, Hideharu Hibi, Shinya Toyokuni, Ferroptosis induced by plasma-activated Ringer' s lactate solution prevents oral cancer progression, Global Plasma Forum, Aomori, 2023 年 10 月 15 日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：定塚勝樹

所属機関・部局・職名：自然科学研究機構

アストロバイオロジーセンター・助教

連絡先 住所：〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中 38

TEL： 0564-55-7692

E-Mail： kjozuka@nibb.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	プラズマが誘導する細胞応答の分子遺伝学的解析	
	英文	Molecular genetic analysis of plasma-induced cellular responses	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	定塚勝樹
		研究分担者	
		センター担当教員	吉村信次
	英文	研究代表者	Katsuki Johzuka
		研究分担者	
		センター担当教員	Shinji Yoshimura
研究実績概要 (成果等)	出芽酵母のプラズマ刺激に対する耐性能の原因が <i>PRM1</i> 遺伝子の変異であることを特定した。本年度は自然界に生育する株の <i>PRM1</i> 遺伝子を調べた結果、調べた全ての株で耐性型に保存されていることが判明した。プラズマ耐性能が自然界での生育で果たす役割が興味深い。 <i>PRM1</i> 制御下にある <i>PRM2</i> の変異もプラズマ耐性能に寄与する。本年度は <i>PRM2</i> の制御に関わり、細胞の形態変化に関わる制御経路で働く複数の遺伝子群の変異株でも、 <i>prm1</i> , <i>prm2</i> 変異株と同様にプラズマ耐性能を示すことが新しく判明し、細胞形態変化とプラズマ耐性能の関係が見えてきた。また <i>prm2</i> 変異株は栄養飢餓に対しても極めて高い耐性能を示すこともわかった。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)			

プラズマが誘導する細胞応答の分子遺伝学的解析 Molecular genetic analysis of plasma-induced cellular responses

定塚勝樹・自然科学研究機構・アストロバイオロジーセンター・助教
吉村信次・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・特任准教授

1. 研究目的

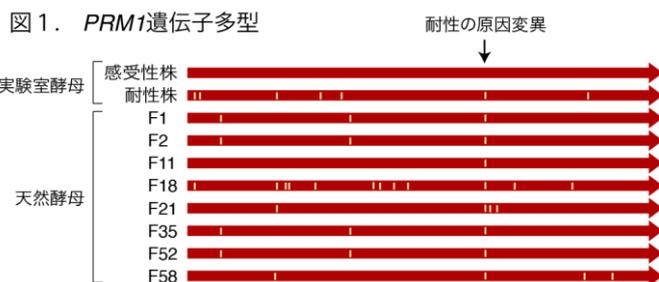
本研究の目的は、酵母をモデルに、低温大気圧プラズマの直接暴露がひき起こす細胞応答に働く遺伝子ネットワークを見出し、分子レベルでプラズマが誘導する細胞応答システムを理解することにある。

これまでに、温度制御可能な低温大気圧ヘリウムプラズマジェット照射装置を利用して、細胞に熱ショックを与えることなく再現性の高い直接照射ができる実験条件を確立した。出芽酵母の細胞にプラズマジェット直接暴露を行うと、照射時間に応じて生存率が低下した。同じ条件で直接暴露しても生存率がほとんど低下しない変異株（耐性株）を見出し、その原因遺伝子 *PRM1* の変異を特定した。解析の結果、*PRM1* の制御下にある *PRM2* が変異した場合もプラズマ直接暴露に対して耐性化することがわかってきた。本研究ではこの *PRM2* に注目して、プラズマ直接暴露刺激に対する細胞の適応力獲得に寄与する遺伝子ネットワークとその働きを理解することを目的とした。

2. 研究内容と成果

本年度は以下の項目について新しい成果を得た。

- a) ガス温度を制御可能なヘリウムプラズマジェットと従来一般的なヘリウムプラズマジェットの物理化学的特性を比較して、大きな違いが無いことが判明した。またこの装置を利用して、寒天培地上の細胞にプラズマジェットを直接照射実験した場合の照射時間による温度変化の様子と、プラズマによって発生する紫外線が細胞に与える影響について詳細に調べ、それらの結果を論文として発表した。
- b) 実験室酵母ではなく、自然界から新たに採取した 8 種の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株を用いて *PRM1* の遺伝子配列を決定した。その結果、異なる株間での多型(SNP)は散在して観られたものの、プラズマ耐性化に関わる点変異は全ての株で耐性型に保存されていることが判明した (図 1)。この結果から、自然界に生育する出芽酵母は、基本的にプラズマ刺激に対する耐性能を有していると考えられる。この結果から次の 2 点が、今後の興味深い課題として挙げられた。
- ① 酵母細胞に元々備わっている“プラズマ刺激に適応す



る能力”は、自然界で生育するうえでどの様に貢献しているのか？ ② ゲノム配列決定に使われ、最も標準的な実験室野生型として使われている株ではプラズマ刺激に感受性を示す。つまりプラズマ刺激に対応する能力は、多くの実験室で野生型として利用されている株では、見過ごされていた新規のストレス応答システムである可能性がある。

- c) プラズマ照射に耐性能を示す *prm1* 及び *prm2* 変異株では、細胞分裂後に母娘細胞の分離が完了しないという共通した性質を有していた。このことから、分裂後期から **G1** 期にかけての何らかの過程の変化が原因となって、プラズマ耐性能に寄与していると推測できる。これまでの他の研究室からの報告を参考にすると、**PRM2** の働きに関わる遺伝子群として、分裂期での細胞周期の進行に関わる幾つかの過程が関係することが考えられる。本年度はこれらの中で、分裂後期から **G1** 期の進行に関与する **FEAR, MEN** といった制御系と、その下流で働く経路に注目した。プラズマ耐性能を指標にしらべたところ、他の生物でも保存されており、細胞形態や生育状態の変化に関与が疑われている制御経路で働く複数の遺伝子の変異で、*prm1* や *prm2* 変異と同様なプラズマ耐性能が観られることが新しく判明した。このことから、細胞形態に関与する制御の変化がプラズマ耐性能に関わることが考えられる。また *prm2* 変異株は、実験室で野生型として標準的に利用されている株と比較しても、栄養飢餓状態 (**N** 源飢餓) に対して非常に高い耐性を示すこともわかってきた。プラズマ耐性能と栄養飢餓に対する適応能力との関係が興味深い。
- d) 出芽酵母と進化的に離れている分裂酵母を利用して、プラズマ照射により誘導される細胞応答を、**RNA-seq** 法により調べた。分裂酵母でも、プラズマジェットの直接照射によって細胞の生存率が低下する。同じ条件で照射した場合でも、生存率の低下がほとんど生じない変異株を得て、その耐性能に働く原因遺伝子変異を特定した。それらの結果をまとめて論文として発表した。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Yoshimura S., Otsubo Y., Yamashita A., Johzuka K., Tsutsumi T., Ishikawa K., Hori M. Development of an experimental system for cell viability assays of yeasts using gas-temperature controllable plasma jets. *Jpn. J. Appl. Phys.* 62: p.1011- 1015 (2023)
- Otsubo Y., Yamashita A., Goto Y., Sakai K., Iida T., Yoshimura S., Johzuka K. Cellular responses to compound stress induced by atmospheric-pressure plasma in fission yeast. *J. Cell Sci.* 136: jcs261292 (2023)

<国際・国内会議>

- 定塚勝樹^{1,2}, 吉村信次^{3,4}, 山下朗⁵, 大坪瑤子⁵ (1 自然科学研究機構・アストロバイオロジーセンター, 2 総研大, 3 核融合科学研究所, 4 名古屋大学低温プラズマ科学研究センター, 5 東京大学・総合文化研究科) 「プラズマが誘導する細胞応答の分子機構」, 日本分子生物学会 第46回年会, 神戸ポートアイランド, 2023年11月27日~12月1日.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：白谷正治

所属機関・部局・職名：九州大学・プラズマナノ界面工学センター・センター長

連絡先 住所：〒819-0395 福岡市西区元岡 744

TEL：092-802-3734

E-Mail：siratani@ed.kyushu-u.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	大気圧低温プラズマ照射溶液中の電荷輸送に関する量子コンピューティングモデリング		
	英文	Quantum computing modelling of charge transport in liquid irradiated with atmospheric plasma		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	白谷正治・九州大学・プラズマナノ界面工学センター・センター長	
		研究分担者	古閑一憲教授・板垣奈穂教授・木山治樹准教授・Pankaj Attri 特任准教授・鎌滝晋礼准教授・奥村賢直助教・山下尚人助教 所属・部門：九州大学・プラズマナノ界面工学センター	
		センター担当	石川 健治 教授・プラズマ科学部門	
	英文	研究代表者	Masaharu Siratani, Kyushu Univ. Center of Plasma Nanointerface Engineering, Kyushu University, Director	
		研究分担者	Prof. K. Kazunori, Prof. N. Itagaki, Assoc. Prof. H. Kiyama, Assoc. Prof. A. Pankaj, Assoc. Prof. K. Kamataki, Asst. Prof. T. Okumura, and Asst. Prof. N. Yamashita, Center of Plasma Nanointerface Engineering, Kyushu University.,	
		センター担当	Prof. K. Ishikawa, Nagoya Univ.	
研究実績概要 (成果等)	電荷輸送刺激が細胞内および細胞外の分子輸送を誘導する一方、電荷輸送刺激による致死効果は低いことを実験的に示した。また、この分子輸送のメカニズムについて、接着細胞を含む実験系の等価回路に基づく数値シミュレーションを使用して検討したところ、細胞の上部の細胞膜に優先的に一次的な穿孔が起こることを明らかにした。さらに、量子機械学習アルゴリズムの適用する上で、現在の量子サポートベクトルマシン(量子 SVM)の特性と適用可能範囲について検討した。古典 SVM に比べ複雑な分類が可能であるが、計算時間が長いことがボトルネックであることがわかった。			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)				

大気圧低温プラズマ照射溶液中の電荷輸送に関する

量子コンピューティングモデリング

Quantum computing modelling of charge transport in liquid irradiated with atmospheric plasma

白谷 正治 センター長・九州大学・プラズマナノ界面工学センター
 分担者：古閑一憲 教授・板垣奈穂 教授・木山治樹 准教授・Pankaj Attri
 特任准教授・鎌滝晋礼 准教授・奥村賢直 助教・山下尚人 助教
 ・九州大学・プラズマナノ界面工学センター
 石川健治 教授・名古屋大学・プラズマ科学部門

1. 研究目的

プラズマ医療・プラズマ農業などの分野では、大気圧低温プラズマを照射したり、大気圧低温プラズマ照射溶液中の電荷輸送が重要な役割を果たしていると予想されるが、研究例は極めて限られている。本研究では、この電荷輸送の情報をプラズマ照射に伴う流れの変化から推定するとともに、その輸送に関する量子コンピューティングモデリングを構築する。これらの実験およびモデリングは、類似の研究がほとんど無い極めて挑戦的なものである。

2. 研究内容と成果

2-1. プラズマ照射溶液中の電荷輸送に対する細胞の挙動

プラズマ照射により、活性種だけでなく、電荷、反応性化学種、紫外線、電場、磁場、衝撃波が発生する。これまで、反応性化学種の影響が主に議論されてきた。ここでは、大気圧プラズマにより誘起される電荷輸送による生物学的効果を理解するために、細胞株を用いて電荷輸送による電位刺激を受けた細胞の挙動を調べた。

図 1(a)に示すように、パルスプラズマを培地に照射した。Potential

stimulation および Control からは放電由来の化学種が不検出であったことから放電由来の化学種が、細胞が存在する処理区へは到達していないと結論付けた。細胞濃度アッセイから、電荷輸送刺激によって細胞の 20%未満が不活化され、残りの細胞がその後増殖

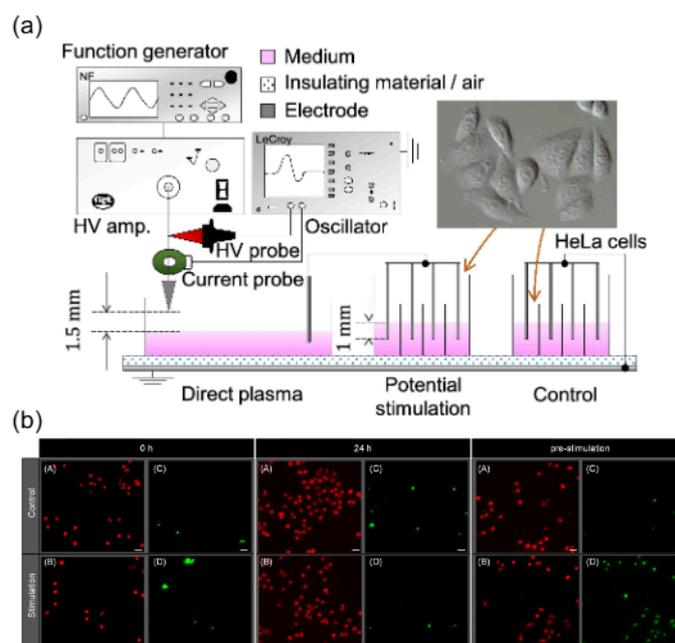


図 1 (a)実験装置概略図と(b)細胞膜物質透過性亢進

することを明らかにした。蛍光顕微鏡観察は電荷輸送刺激により膜を介する分子輸送の可能性を明らかにした（図 1(b)-“pre-stimulation”）。これらの結果は、電荷輸送刺激が細胞内および細胞外の分子輸送を誘導する一方、電荷輸送刺激による致死効果は低いことを示す。この分子輸送のメカニズムについて、接着細胞を含む実験系の等価回路に基づく数値シミュレーションを使用して検討したところ、細胞の上部の細胞膜に優先的に一次的な穿孔が起こることを明らかにした。電荷輸送刺激による穿孔は懸濁液中の細胞内容物濃度の上昇からも支持された。以上の結果は、分子生物学へのプラズマ科学の貢献に加え、プラズマ照射による生物学的応答誘導の根底にある機序解明につながる重要な結果である。今後、蛍光リアルタイムイメージング法で得られた生体応答由来の荷電粒子の時空間的な流れを検討するために、量子重ね合わせと組み合わせた検討を行う。よって、次項目では、量子サポートベクトルマシーンを用いた検討を試みた。

2.2. 量子サポートベクトルマシーン: quantum support vector machine(QSVM)

量子コンピュータとは、量子重ね合わせなどの量子の特性を使った全く新しい仕組みのコンピュータである。将来の期待される分野として、最適化、機械学習、量子化学や金融などが挙げられている。その中で今回は、データ分類器の一種であるサポートベクトルマシーン(SVM)の特徴量空間として量子状態空間を使う量子機械学習アルゴリズムである量子サポートベクトルマシーン(QSVM)の適用に焦点を当てた。QSVM は、古典 SVM で使用されていたガウスクERNELなどを量子KERNELを用いることで古典データを量子状態に埋め込み、量子状態ベクトル空間を特徴量空間として超平面で分類することができる。QSVM でのマッピングでは、連続な値を量子状態の位相にエンコードすることで行うという特徴がある。本研究では、IBM 製の量子コンピュータ用のオープンソースフレームワークである Qiskit を用いた。図 2 に SVM 及び QSVM を用いたテストデータの 2 値データにおける分類結果を示す。QSVM の方がより複雑な分類をしていることがわかる。課題としては現状 QSVM の方が計算時間が長いことが挙げられる。

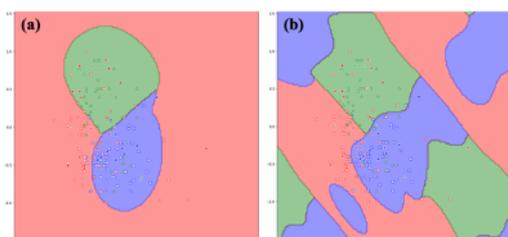


図 2 (a)SVM と (b)量子 SVM モデルによる分類結果の一例

今後の研究方針として、プラズマ照射による細胞の挙動や、植物の種子の発芽の有無や成長促進効果などを目的関数としたとき、プラズマ発光スペクトルの発光種を説明関数として、どのような発光を持つプラズマ状態のときに発芽有無や成長促進の大きさなどを QSVM を用いることで、精度良く分類できる可能性がある。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Tsuboyama S., Okumura T., Attri P., Koga K., Shiratani M., Kuchitsu K., Growth control of *Marchantia polymorpha* gemmae using nonthermal plasma irradiation, *Scientific Reports*, (2024.2). Okumura T., Chia-Hsing C., Koga K., Shiratani M., Sato T., Influence of electric potential-induced by atmospheric pressure plasma on cell response, *Scientific Reports* 13, 15960 (2023.9).

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：竹内 和歌奈

所属機関・部局・職名：愛知工業大学・工学部・准教授

連絡先 住所：〒470-0356

TEL：056-48-8121

E-Mail：wtakeuchi@aitech.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	SiC/CNW 足場基材の表面形態および電気刺激が幹細胞の細胞挙動に与える影響		
	英文	Effects of surface morphology and electrical stimulation for SiC/CNW cell scaffolds on cellular behavior of stem cells		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	竹内 和歌奈 愛知工業大学 工学部 准教授	
		研究分担者	(株)ジャパン・アドバンスト・ケミカルズ(JAC) 安原重雄(取締役)、財津優、名古屋大学 鳴瀧彩絵 教授 名古屋大学 D1 小野浩毅	
		センター担当教員	堀 勝	
	英文	研究代表者	Wakana Takeuchi, Aichi Institute of Technology	
		研究分担者	S. Yasuhara and Y. Zaitso, Japan Advanced Chemicals Ltd., A. Narutaki, Nagoya Univ., K. Ono, D1 student, Nagoya Univ.	
		センター担当教員	M. Hori	
研究実績概要 (成果等)	昨年度の結果から CNW のエッジに対して SiC の被覆率が細胞増殖に影響を与えることがわかった。今年度は SiC で被覆した CNW 上の細胞へ電気刺激を印加することで細胞にどのような影響を与えるか調査した。電気伝導性を変化させるために Al ドーピングを実施し、その有無で細胞増殖を比較したところドーピングをしていない試料で電気刺激によって細胞増殖が 104%促進された。			
特筆事項 (論文発表、受賞、産業財産権出願取得状況等)	特になし			

SiC/CNW 足場基材の表面形態および電気刺激が幹細胞の細胞挙動に与える影響

Effects of surface morphology and electrical stimulation for SiC/CNW cell scaffolds on cellular behavior of stem cells

竹内 和歌奈 愛工大 工学部 准教授
安原 重雄 (株)ジャパンアドバンスケミカルズ(JAC)
取締役 技術開発本部長
財津 優 (株)ジャパンアドバンスケミカルズ(JAC)
技術開発本部 開発部
鳴瀧 彩絵 名古屋大学 大学院工学研究科 教授
小野 浩毅 名古屋大学 工学研究科 D1

1. 研究目的

本研究では再生医療において重要な要素である細胞制御可能な細胞培養足場作成を目的としてカーボンナノウォール(CNW)構造足場の表面形態と表面の電気伝導度が細胞培養に与える影響を調査した。幹細胞と比較して扱いやすい骨芽細胞を使用することで作成した足場の細胞への影響を評価した。昨年度までプロセス条件で変化しない CNW の壁の厚みを変えるためシリコンカーバイド(SiC)を CNW にコーティングすることで壁の厚みの変化による細胞増殖への影響をこれまで調査してきた。今年度は Al を *in situ* で SiC にドーピングすることで SiC の電気伝導性を変化させ、Al ドープ SiC/CNW 上の細胞に電気刺激(ES)印加することで骨芽細胞にどのような影響を及ぼすか調査した。

2. 研究内容と成果

Ti(500nm)/SiO₂(1000nm)/Si 基板上に CNW をラジカル注入型プラズマ化学気相成長法で成膜した。原料ガスにメタンと水素を使用し、それぞれ流量を 100、50 sccm、圧力 1 Pa、ヒーター温度 650°C で成膜した。SiC は原料ガスにビニルシランを使用し、熱 CVD 法によって 7 分間成膜した。また、トリメチルアルミニウムをドーパントガスとして SiC に *in situ* でドーピングを行った。SiC のコーティング前とコーティング後、*in situ* Al ドーピング SiC でコーティングした後の CNW の表面 SEM 像を図 1 に示す。SEM 像の結果からコーティングによって CNW の壁の厚みが増加したことがわかる。また、同一の成膜時間でドーピングの有無によって壁の厚みが異なった。これは Al の導入による活性化エネルギーの低下により SiC の成膜レートが上昇したことが原因と考えられる。次に、作製した足場の化学結合状態を XPS で測定した。得られた Al2p スペクトルの測定結果を図 2 に示す。この結果から Al ドープした試料は組成レベルで試料にドーピングされたことがわかる。次に、CNW、SiC/CNW、Al ドープ SiC/CNW(Al-SiC/CNW)上でそれぞれ骨芽細胞を 4 日間培養後の細胞増殖率の結果を図 3 に示す。本研究では

Control として商用培養皿を使用し、Control の結果を 100%として増殖率を示す。この結果から CNW 上の骨芽細胞は電気刺激の有無によって細胞増殖に有意な差は観測されなかった。SiC/CNW 上では電気刺激によって細胞増殖が 104%促進された。一方、Al-SiC/CNW 上では電気刺激によって細胞増殖に有意な差は見られなかった。この結果について、Al ドープした試料は組成レベルでドープされており、電気的には金属に近いと考えられる。CNW も主な構成要素であるグラフェンが金属的性質を持つため、この結果から SiC の持つ容量成分が電気刺激印加における細胞挙動制御に重要な役割を持つことが示唆された。

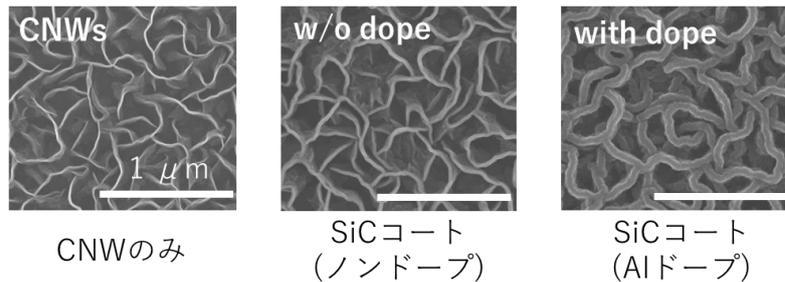


図 1 CNW 上に SiC をコーティングした時の表面 SEM 像

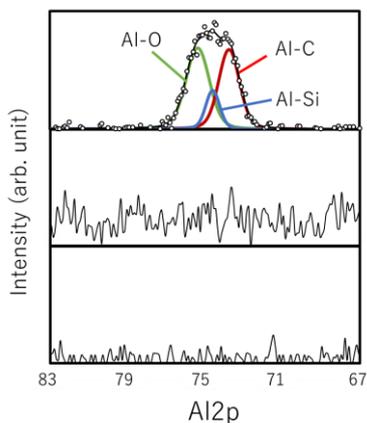


図 2 作成した足場の Al2p 軌道の XPS スペクトル

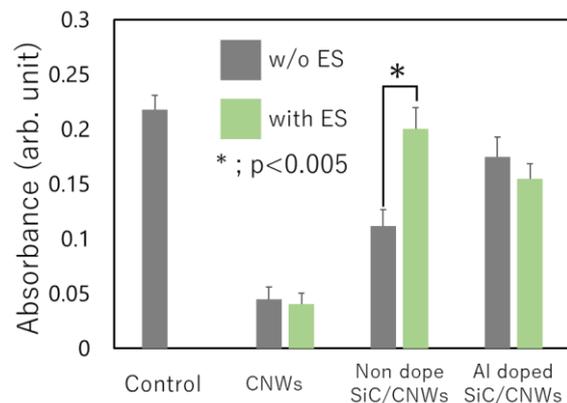


図 3 作成した足場上で ES 印加と細胞増殖の関係

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

1. Y. Tsuchiizu, K. Ono, K. Uehara, N. Taoka, S. Yasuhara, and W. Takeuchi, “Formation of Al-incorporated SiC thin film by chemical vapor deposition of vinylsilane mixed with Trimethylaluminum”, Jap. J. of Appl. Phys. S1103743 R1, 22 January (2024) (accepted).

<国際・国内会議>

1. K. Ono, H. Kondo, K. Ishikawa, W. Takeuchi, K. Uehara, S. Yasuhara, H. Tanaka, and M. Hori, “Cellular Response to Electrical Stimulation on Carbon Nanowalls Coated with Silicon Carbide”, AEPSE2023, (BPEX, Busan city, Korea), Tu1b-5 (Oral), 7 November (2023).
2. Y. Tsuchiizu, K. Ono, K. Uehara, G. Saeki, N. Taoka, S. Yasuhara, and W. Takeuchi, “Effect of Hydrogen during SiC Thin Film Grown by CVD Method Using Vinylsilane and Trimethylaluminum”, APSPT-13/ISPlasma 2024/IC-PLANTS2024, Poster 1314, Nagoya, 6 March (2024).

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者 (研究代表者) : 田中 学

所属機関・部局・職名 : 九州大学・工学研究院・准教授

連絡先 住所 : 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4

TEL : 092-802-2755 FAX : 092-802-2785

E-Mail : mtanaka@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	アーク放電法によるナノ炭素材料の表面分析に基づく生成機構解明	
	英文	Surface analysis of nano-carbon materials fabricated by arc discharge	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	田中学・九州大学・工学研究院・准教授
		研究分担者	兒玉直人・名古屋大学・大学院工学研究科・助教
		センター担当教員	兒玉直人・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Manabu Tanaka
		研究分担者	Naoto Kodama
		センター担当教員	Naoto Kodama
研究実績概要 (成果等)	<p>アーク放電を用いたナノ炭素材料の合成は幅広く研究されており、様々なナノ炭素材料の開発が進行している。一方で、その生成機構に関する理解は、未だ充分でない。そこで本研究では、特定波長に注目した高速度イメージング技術を用い、アーク放電を用いたナノ炭素材料の生成過程における基礎現象を解明することを目的とする。</p> <p>本年度の研究では、前年度で構築した二次元分光観測系を用いてラジカルの時空間分布を計測する際の、ターゲットラジカルの選定を実測・理論計算面から検討した。また、原料として用いる固体高分子材料ごとの、炭素材料の生成温度域の際を理論計算から検討した。</p>		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	なし		

アークを用いたナノ炭素材料の選択的生成にむけた ラジカル分布の計測

Radical distribution during nano-carbon synthesis using arc discharge

田中学・九州大学・工学研究院・准教授

1. 研究目的

熱プラズマを用いることで、様々な形態のナノ炭素材料を生成可能であることが報告されている。一方で、熱プラズマ中において様々な形態のナノ炭素材を選択的かつ大量に生成する条件、もしくは生成を抑制する条件は明らかではない。本研究では、熱プラズマ中の熱的平衡領域および外縁部の非平衡領域において、ナノ炭素材料のプリカーサー（ラジカル、クラスター）がどのような存在形態であるのかを、発光分光観測を主としたプラズマ診断をベースとして調査する。さらに、プリカーサーと生成物の相関関係を明らかにすることで、ナノ炭素材料の生成機構を解明する。

本年度の研究では、前年度で構築した二次元分光観測系を用いてラジカルの時空間分布を計測する際の、ターゲットラジカルの選定を実測・理論計算面から検討した。

2. 研究内容と成果

プラズマ中および周囲の主要なプリカーサ（前駆体ラジカル）の濃度・分布と生成物の関係およびナノ炭素材料の生成機構を検討するために、以下の2つのサブテーマを実施した。

サブテーマ I: ナノ炭素生成過程におけるプリカーサーの可視化

前年度の研究では、検出器として高速度カメラを利用することで、単波長の発光スペクトルに対して $30 \times 40 \text{ mm}^2$ 程度の空間放射強度分布を時間分解で測定可能な測定系を構築した。図 1 に、構築した測定系とナノ炭素材料生成用のアーク装置の配置図を示す。一方で、本測定系では波長方向の掃引はできないため、ラジカル分布計測のために観測する波長を事前に決める必要がある。そこで、時間・波長分解計測が可能な分光器(Ocean

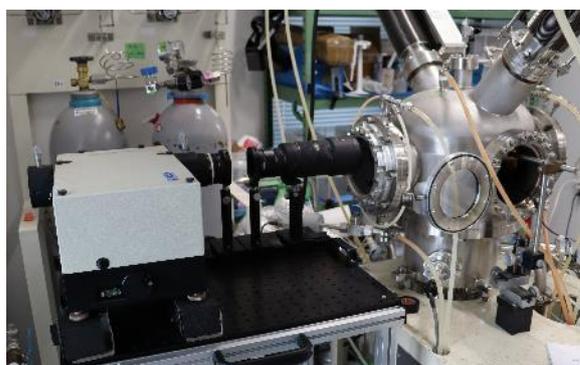


図 1 構築したラジカル分布観測系とアーク装置

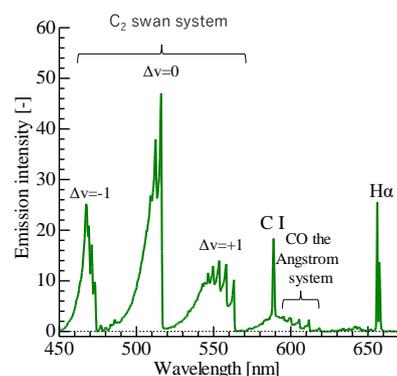


図 2 POM 使用時の発光スペクトル

Optics Ocean HR2, 波長分解能 : 0.3 nm)を用いて、プロセス下におけるアークからの発光スペクトルを同定した。実験条件として、Ar アークに対して POM を炭素源として導入した。観測の結果、図 2 に示すように CO や C₂ 由来のバンドスペクトルなどが観測された。従って、POM 原料の場合は、CO や C₂ 由来のバンドスペクトルに対して図 1 の分光器を用いた観測を行うことで、ラジカルの空間分布を計測が可能である。この結果は、サブテーマ 2 の検討結果とも整合している。

サブテーマ II : 炭素材料生成過程における化学反応系の推定

本研究で原料として用いる高分子材がアークによって分解された後にナノ炭素材の前駆体となるラジカルを検討すること、および、高分子材の種類ごとの炭素材の生成温度・および濃度の関係を定量評価することを目的として、凝縮相の生成を考慮したガス組成計算を行った。Gibbs の自由エネルギー最小化法に基づくハンドメイドの計算コードを作成し、計算に用いた。計算の結果、例えば、PF、PE などの C-H 結合を多量に含む高分子材では、熱分解・再結合過程で C₂H₂ が前駆体ラジカルとなり凝縮相炭素が生成される可能性が高いことが示唆された。また、C₂H₂ が生成されるよりも高温の領域では C₂、H、および C が生成された。一方で、PC、POM、PMMA、PET などの C-O 結合が含まれる高分子材では、C₂H₂ と共に CO や C₂ が凝縮相炭素の前駆体として作用する可能性が高いことが示唆された。また、図 2 に示すように、凝縮相炭素の生成温度や生成量には、高分子材の種類ごとに大きな違いがみられた。従って、PF や PE を原料として用いる場合は、C₂ swan system のスペクトルや H もしくは C 原子スペクトルを、POM や PC の場合は CO the Angstrom system のスペクトルをサブテーマ I で述べた分光器で観測することで、前駆体ラジカルの分布を推定可能なことが示唆された。

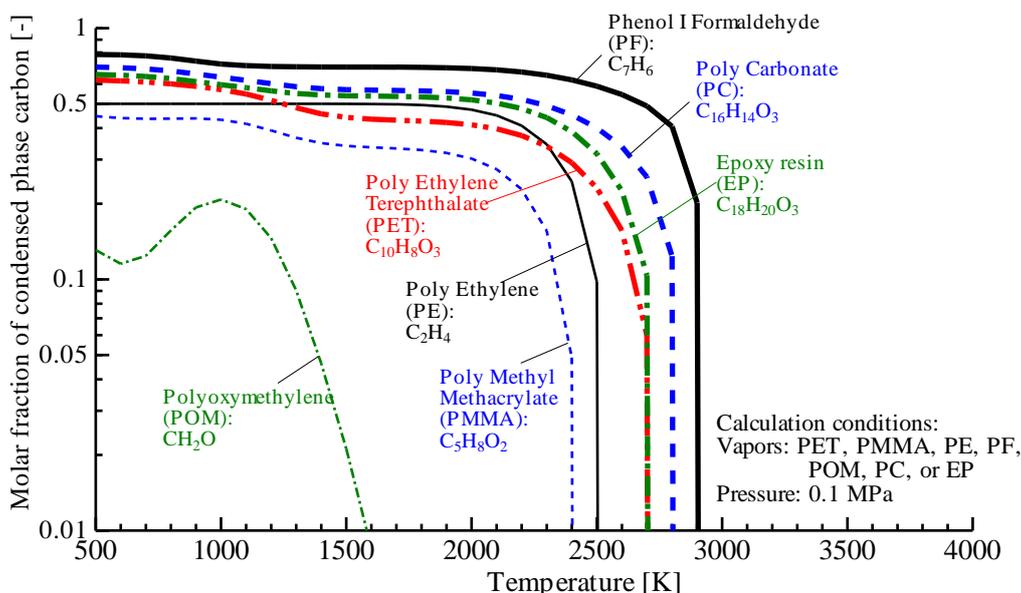


図 2 原料として用いる高分子材の種類の違いによる凝縮相炭素の生成の違い

【研究成果の公表状況】

<原著論文> 該当なし。

<国際・国内会議> 該当なし。

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：田中康規

所属機関・部局・職名：金沢大学・電子情報通信学系・教授

連絡先 住所：〒920-1192 石川県金沢市角間町

TEL：076-234-4846

E-Mail：tanaka@ec.t.kanazawa-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	熱プラズマにより大量生成したナノ粒子の表面分析	
	英文	Surface Analysis of Nanoparticles Synthesized by Thermal Plasmas	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	田中康規・金沢大学・電子情報通信学系・教授
		研究分担者	中野裕介・金沢大学・電子情報通信学系・助教 石島達夫・金沢大学・電子情報通信学系・教授
		センター担当教員	兒玉直人・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Yasunori Tanaka
		研究分担者	Yusuke Nakano, Tatsuo Ishijima
		センター担当教員	Naoto Kodama
研究実績概要 (成果等)	本研究では、トーチに二つのコイルで駆動する「タンデム型変調誘導熱プラズマ装置 (Tandem-MITP)」を開発し、これに原料間歇導入(TCFE)を組み合わせた「Tandem-MITP + TCFE 法」を用いて、機能性ナノ粒子を大量生成できるようにした。本年度はタンデム型変調誘導熱プラズマにおける変調条件を対象とした。生成したナノ粒子の表面分析を走査型トンネル顕微鏡などで行い、ナノ粒子生成実験条件と生成されたナノ粒子表面状態の関係を明らかにした。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	[1] 長瀬, 古川, 田中, 他, 原料間歇導入を伴うタンデム型 Ar+H ₂ 変調熱プラズマで生成した Si ナノ材料特性評価, 2022 年電気学会全国大会 WEB8-A4, 1-094, 2022		

熱プラズマにより大量生成したナノ粒子の表面分析 Surface Analysis of Nanoparticles Synthesized by Thermal Plasmas

田中康規・金沢大学・電子情報通信学系・教授
石島達夫・金沢大学・電子情報通信学系・教授
中野裕介・金沢大学・電子情報通信学系・助教
兒玉直人・名古屋大学・プラズマ科学部門・助教

1. 研究目的

筆者らは、近年独自に開発した変調型誘導熱プラズマ(MITP)をさらに発展させた「タンデム変調誘導熱プラズマ(Tandem-MITP)」と、原料をプラズマ変調同期して間歇する手法(TCFF)を組み合わせた「PMITP+TCFF 法」を開発している。これにより、熱プラズマの温度場・流速場を精細に制御し、イオンドープナノ粒子、コートナノ粒子などを極めて大量に生成(数百 g/h から数 kg/h オーダ)することを検討している。当該年度においては、2 コイルで生成するタンデム変調熱プラズマを用いて光触媒用酸化ナノ粒子(ZnO, TiO₂ 系)の本格的な大量生成(kg/h オーダ)を狙う。タンデム変調誘導熱プラズマは、原料導入時のロバスト性と変調に伴う温度変動幅の拡張を行える画期的な方式である。このようなタンデム変調技術によるナノ粒子の大量生成はこれまでに検討されていない。本研究では、この大量生成したナノ粒子の表面分析を走査型トンネル顕微鏡などで行い、ナノ粒子生成実験条件と生成されたナノ粒子表面状態の関係を明らかにする。さらに PMITP+TCFF 法の数値解析モデルを構築し、各パラメータに対する熱プラズマ温度分布、生成されるナノ粒子エアロゾル分布を求める。

2. 研究内容と成果

筆者らがこれまで開発してきた「変調誘導熱プラズマ(MITP)」は、高いガス温度、高い化学反応性を時空間に制御できるという特徴を有し、さらに無電極放電のため汚染物質混入が非常に少ないという特徴を持つ。しかし MITP は外部からの擾乱に対し比較的容易に不安定となる。そのため例えばナノ粒子生成プロセス時にトーチ内に大量の原料粉体を投入すると、条件によっては熱プラズマが消滅する場合があります。材料の大量処理時における MITP の安定維持の課題があった。この課題に対し、筆者らは「タンデム型 MITP 装置」を開発している[1]。タンデム型 MITP では、設置された2つのコイルに流す高周波電流を独立に変調制御することで、安定的かつ効率的なプロセスが可能となる。本報告では、Tandem MITP に対する電磁熱流体解析に加え、原料粉体の挙動とナノ粒子の核生成および粒子成長を計算した。Tandem MITP の下段コイル電流変調に対する原料供給位相を変更時の原料蒸発およびナノ粒子生成への影響を検討した。

開発した数値解析モデルは、熱プラズマ解析部、原料粒子解析部、ナノ粒子エアロゾル解析部からなる。熱プラズマ解析部では熱プラズマを電磁熱流体とみなし、質量・運

動量・エネルギー保存方程式のほか、2 コイル電流が作る電磁場をベクトルポテンシャルに関するポアソン方程式から解いている。原料粒子解析部では粒子をラグランジュ粒子として取り扱い、質量・運動量・エネルギー式を熔融・蒸発を考慮しながら計算する。ナノ粒子エアロゾル解析部では動力学方程式をモーメント法で計算し、均一核生成、不均一凝縮、凝集を考慮し、生成されたナノ粒子エアロゾルの生成と輸送を解いている。

計算条件としては次のようにした：トーチ上部からシースガス Ar を 90 slpm で導入し、トーチ中央部の水冷チューブからキャリアガス Ar 4 slpm とともに Si 原料を平均 1.0 g/min/rad で供給した。上下段の時間平均投入電力はともに 10 kW にした。コイル電流は上段を無変調、下段を 0%SCL で変調した。On-time/ Off-time はともに 10 ms とした。周期定常状態において、 $t = 0-10$ ms を Off-time, $t = 10-20$ ms を On-time とした。

コイル電流の変調波形のオン遷移に対する原料供給の位相遅れ時間として、 $t_d = 0$ ms, 5 ms, 10 ms, 15 ms と設定し、結果を比較した。

図 1 に $t=20$ ms における 2 次元温度分布を示す。同図(a)は $t_d = 0$ ms, すなわちコイル電流変調と原料供給を同期した条件, 同図(b)は $t_d=10$ ms で電流変調と原料供給を逆位相とした条件である。トーチ中心軸における温度低下は原料投入タイミングに依存しており、熱プラズマから原料への入熱が変化する。その結果、コイル電流変調に対し

逆位相で原料供給すると、原料蒸発効率が向上した。逆位相で原料を導入すると、投入された原料粒子が変調温度領域に多く存在し、続く On-time 時の高温熱プラズマによる原料蒸発が促されたためである。図 2 に蒸発効率と生成粒子の平均粒径を示す。前述のように逆位相で供給することで蒸発効率が向上し、さらにナノ粒子の粒子径が小さくなった。これは、蒸発効率が向上したことでより高密度の蒸発蒸気が発生し、過飽和が生じやすくなり、均一核生成が促進された結果、生成ナノ粒子の成長が抑制されたためである。

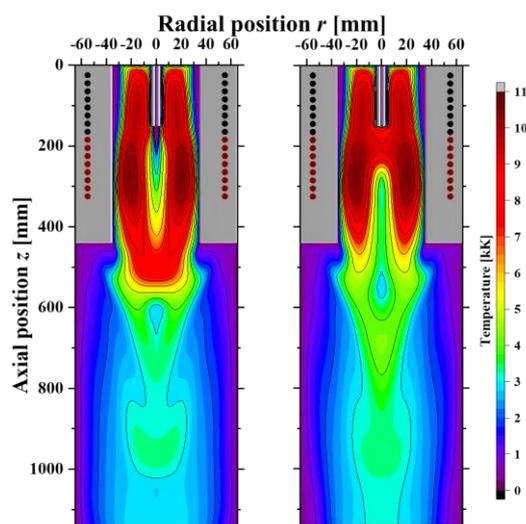


図 1. タンデム型変調熱プラズマの温度の計算結果(左 $t_d=0$ ms, 右 $t_d=10$ ms)

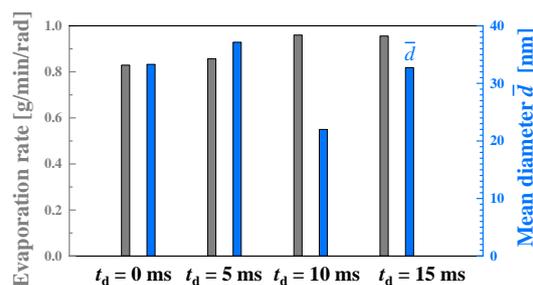


図 2. 原料蒸発レートと平均粒径の原料投入タイミング依存性の計算結果

【研究成果の公表状況】

[1] 岡野, 長瀬, 田中, 中野, 石島, 末安, 渡邊, 中村, 「ナノ粒子生成用タンデム変調熱プラズマの熱流動場に対するキャリアガス O_2 導入の影響の数値解析」, 2023 年電気学会全国大会 1-073, 2023

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：梅根一夫

所属機関・部局・職名：自然科学研究機構・基礎生物学研究所・助教

連絡先 住所：〒444-8787

TEL：0564-59-5932

E-Mail：tsugane@nibb.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマによる動く遺伝子‘トランスポゾン’の転移誘導の分子メカニズムの解明	
	英文	Elucidation of the molecular mechanism of low-temperature plasma treatment for transposon activation	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	梅根一夫・基礎生物学研究所・IBBP センター・助教
		研究分担者	古閑一憲・九州大学大学院・システム情報学研究院・教授 奥村賢直・九州大学大学院・システム情報学研究院・助教
		センター担当教員	吉村信次・プラズマ科学部門(クロスアポイントメント)・ 特任准教授
	英文	研究代表者	Kazuo Tsugane・National Institute for Basic Biology・ Research associate
		研究分担者	Koga Kazunori・Kyushu University・Professor Takamasa Okumura・Kyushu University・Research associate
		センター担当教員	Shinji Yosimura・Nagoya University・Center for Low- temperature Plasma Sciences・Designated associate professor
研究実績概要 (成果等)	トランスポゾン <i>nDart</i> の転移を葉の斑によって確認することができる <i>pyl-stb</i> 系統の玄米に低温プラズマを照射して転移を誘導できる条件を明らかにした。古閑先生・奥村先生が作成された SDBD 装置を利用して、距離 1mm・3 分照射において転移を誘導できることを明らかにした。これらの個体を生育させたところ、生育が進んだ葉には斑が生じないことが判明した。つまり低温プラズマ照射は発芽後の短期間においてのみトランスポゾンの転移を誘導していた。この時期における遺伝子の発現の変動を明らかにするために RNA-seq 解析を行った。また、種子の発芽への低温プラズマ照射の影響についても研究を開始した。解析対象は保存して 10 年以上が経過して発芽率の低下したイネの台中 65 系統を用いた。低温プラズマをこの種子に照射して発芽への影響を確認したところ、発芽の促進が観察できた。今後は発芽に伴う遺伝子発現の変動を明らかにすることで、発芽率の変化に伴う低温プラズマの影響を分子的に解明していく予定である。		
特筆事項(受賞、 産業財産権出願 取得状況等)			

低温プラズマによる動く遺伝子‘トランスポゾン’の転移誘導の分子メカニズムの解明

Elucidation of the molecular mechanism of low-temperature plasma treatment for transposon activation

母根一夫・自然科学研究機構・基礎生物学研究所・助教
古閑一憲・九州大学大学院・システム情報学研究院・教授
奥村賢直・九州大学大学院・システム情報学研究院・助教
吉村信次・名古屋大学・プラズマ科学部門・特任准教授

1. 研究目的

低温プラズマ照射された生物では生育促進などが報告されているが、どのような分子的な変化を生じているのか未解明な部分が多く残されている。この現象には少なくとも関連する遺伝子の発現が変動していると思われる。低温プラズマ照射によってDNA配列を変える変異は報告されていないので、遺伝子の発現を変動させる何らかの変化をゲノムに起こしているはずである。本課題はプラズマ照射による生物の影響を解明するために、遺伝子よりもゲノム中の割合の多い転移因子“トランスポゾン”の活性化によるゲノムの変化を検出し、エピジェネティカルな変化について解明することを目指している。また種子の保存性の上昇を目的として、プラズマ照射した種子の発芽に係わる遺伝子の変動についても解析を試みている。

2. 研究内容と成果

イネの *pyl-stb* 変異体はトランスポゾン *nDart* の挿入により黄葉を示し、*nDart* が転移すると黄色地に緑色の斑を持った葉を生じる。これまでの 8000 粒に加え今年度は 2000 粒の *pyl-stb* の種子に低温プラズマを照射して、発芽して斑入りとなった植物を選抜して解析をおこなった。これまでの解析から低温プラズマ照射によるトランスポゾンの転移は発芽後の 3 葉期前後のみに観察されていることから、短い期間においてのみ誘導がおきていると考えられる。この結果は申請者が脱メチル化剤などの薬剤やイオンビームなどでトランスポゾンを活性化できた系統にくらべて、極めて短期間の誘導であり、別のエピジェネティカルな変化を生じている可能性が考えられた。そこでプラズマ照射した *pyl-stb* 実生の第 3 葉から RNA を抽出して発現に変動の見られる遺伝子を解析し、発現の上昇していた遺伝子をおよそ 44、発現の低下していた遺伝子がおよそ 110 検出することができた。これらのなかで分子機能が解明されている遺伝子は、核酸への結合能力を有しているもの、活性酸素の除去に関連することが報告されている抗酸化物質グルタチオンの様々な代謝に関与するトランスフェラーゼ、フラボノイドの一種であるケルセチンの修飾に係わる因子などが検出された。ケルセチンは明所で発芽させた植物において蓄積されることが報告されている。グルタチオンは休眠を打破して発芽を促進する効果があるため、低温プラズマ照射がこれらの蓄積を促進している可能性が示唆

された。ゲノムをエピジェネティックに変化させる可能性のある遺伝子としてヒストンメチルトランスフェラーゼが検出された。これらの遺伝子発現の変化について解析を続けている。

また低温プラズマ照射による種子の発芽率の改善についても研究を開始した。解析対象は保存して10年以上が経過して発芽率の低下したイネの台中65系統の3系統を用いた(図1)。この系統では播種後4日目の発芽率に注目してみると未照射の系統(09-23-18-1)では発芽が観察されなかったのに対し、低温プラズマを照射した系統(09-23-18-1P)において23%の発芽が観察された。4日目では新しい野生型種子(T65-1)においても照射した種子の発芽率は98%なのに対し、未照射では70%ほどであり、発芽の促進が観察された。4日目で発芽が観察されなかった他の系統でも8日目までには低温プラズマ照射した系統では20~30%程度の発芽率の促進が観察された。今後は発芽に伴う遺伝子発現の変動を明らかにすることで発芽に係わる低温プラズマの影響を分子的に解明していく予定である。また、低温プラズマセンターの田中教授よりプラズマ活性化水の提供を受けて、この系統および野生植物である難保存性植物に散布して発芽の促進効果について検討を行っている。

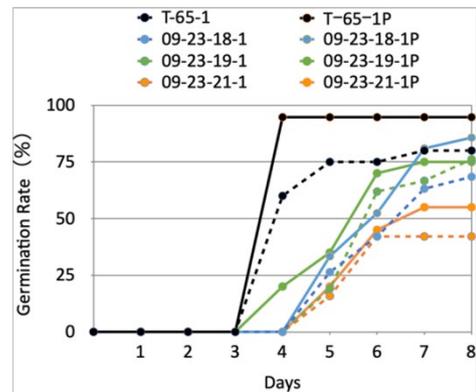


図1 低温プラズマ照射によるイネ種子の発芽率の変化。保存期間の短い野生系統(T-65-1)および長期保存した(09-23-18~21)系統にプラズマ照射(P:実線)および未照射(点線)。

【研究成果の公表状況】

特になし

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：坪山 祥子

所属機関・部局・職名：東京理科大学・創域理工学部・生命生物科学科・ポストドクトラル研究員

連絡先 住所：〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

TEL：04-7124-1501 (内線 3414)

E-Mail：tsuboyama@rs.tus.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	植物の成長に対するプラズマ照射の影響の簡便な評価法の確立と関与する標的因子の探索・同定		
	英文	A simple evaluation method for the effect of plasma irradiation on plant growth, and search for the target factors involved.		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	坪山 祥子・東京理科大学・創域理工学部・ポストドクトラル研究員	
		研究分担者	朽津 和幸・東京理科大学・創域理工学部・教授 古閑 一憲・九州大学・情報エレクトロニクス部門・教授	
		センター担当教員	石川 健治・半導体プロセス科学部門	
	英文	研究代表者	Shoko Tsuboyama, Tokyo Univ. of Sci., Post doctoral researcher	
		研究分担者	Kazuyuki Kuchitsu, Tokyo Univ. of Sci., Professor Kazunori Koga, Kyushu Univ., Professor	
		センター担当教員	Kenji Ishikawa, Nagoya Univ., Professor	
研究実績概要 (成果等)	<p>これまでに確立したゼニゴケ無性芽への SDBD 照射法を基盤にして、死細胞検定を指標とした簡易的な最適プラズマ照射量検定法の確立を行った。現在、種子への応用を試みている。また、プラズマ照射の細胞分裂への影響を検証するために、細胞分裂マーカーを可視化した株に SDBD プラズマ照射し、解析を行った。今後、さらに詳細な解析を進める予定である。</p> <p>本年度はゼニゴケ無性芽への SDBD 照射法に関する原著論文を 1 報発表し、以上の結果に関して、9 回の国内外の学会・研究会での発表を行った。</p>			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)				

植物の成長に対するプラズマ照射の影響の簡便な評価法の確立と関与する標的因子の探索・同定

A simple evaluation method for the effect of plasma irradiation on plant growth, and search for the target factors involved.

研究代表者 坪山祥子・東京理科大学・創域理工学部・生命生物科学科・
ポストドクトラル研究員

研究分担者

朽津和幸・東京理科大学・創域理工学部・生命生物科学科・教授
古閑一憲・九州大学・情報エレクトロニクス部門・教授

研究所担当教員 石川健治・名古屋大学・半導体プロセス科学部門・教授

1. 研究目的

近年、植物の種子等への低温プラズマ照射による発芽・成長促進効果が報告されているが、プラズマ農業応用の最適化や実用化・社会実装には、基盤となる分子レベルの知見が必須となる。大気中でプラズマを発生させると、様々な活性酸素窒素種が生成されるため、その作用機序には、活性種の関与も想定されているが、分子メカニズムはほとんど不明である。申請者らは最近、モデル植物ゼニゴケを用いて、成長に対するプラズマ照射の影響を解析する実験系を構築し、低強度では強度依存的に成長が促進される一方で、高強度では特徴的な細胞死が誘導され、成長が抑制されることを見出した。この実験系を基盤として、プラズマ照射の影響の簡便な評価方法を確立し、種子植物に応用することにより、ラボからフィールドまで汎用性の高い技術を確立する。また、遺伝学的解析に適したモデル植物であるゼニゴケの利点を生かして、遺伝子発現の網羅的解析、遺伝子欠損変異体の利用などの遺伝学的解析、非破壊イメージング解析など、様々な分子生物学的実験手法を駆使することにより、プラズマ照射による植物の成長制御に関与する因子の同定とプラズマ照射の影響の分子メカニズムの解明を目指す。さらに、プラズマ照射時に生成される気相活性種を、名古屋大学低温プラズマ科学研究センターの石川教授らと共同で分析し、植物の応答や遺伝子発現変動をもたらす気相活性種の同定を試みる。

2. 研究内容と成果

適度なプラズマ照射は植物にポジティブな効果を持つ一方、過剰なプラズマ照射はネガティブに作用する。現在、植物へのプラズマ照射量の評価は、種子発芽試験や成長試験など、時間と労力のかかる方法で行っている。本研究では、これまでに確立したゼニゴケ無性芽へのスケーラブル誘電体バリア放電 (SDBD) 装置照射実験を基盤に、最適プラズマ照射量の簡易検定法の確立を目指した。ゼニゴケ無性芽に SDBD プラズマ照射すると、照射電圧依存的に、成長促進効果と成長抑制効果がある (Tsuboyama *et al.* 2024)。本研究において、成長促進効果から成長抑制効果に切り替わる 6.48 kV_{pp} 以上の

電圧において、組織の辺縁部での細胞死が観察された。さらに強い電圧では辺縁部に加え、組織内部の細胞も死滅していた (図 1)。当初、死細胞検定にはヨウ化プロピジウム (PI) 染色を行っていたが、試薬が高価であること、観察に共焦点蛍光顕微鏡が必須なことから、安価かつ実体顕微鏡で容易に観察できるエバンスブルー染色法の確立を行った。エバンスブルー染色においても、PI 染色と同様の結果を得られたことから (図 2)、種子植物への応用にはエバンスブルー染色を採用することとし、現在、シロイヌナズナ種子を用いて、発芽率試験による過剰プラズマ照射量の検討と、種子のエバンスブルー染色の条件検討を行っている。

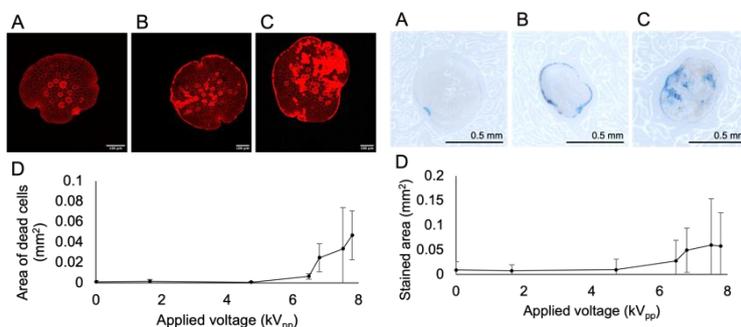


図1 SDBDプラズマ照射2時間後の無性芽のPI染色 (A-C)コントロール(A)、印加電圧6.48 kV_{pp}照射(B)、印加電圧7.52 kV_{pp}照射(C)の無性芽の共焦点蛍光顕微鏡写真 (D)死細胞領域のサイズ比較

図2 SDBDプラズマ照射2時間後の無性芽のエバンスブルー染色 (A-C)コントロール(A)、印加電圧6.48 kV_{pp}照射(B)、印加電圧7.8 kV_{pp}照射(C)の無性芽の顕微鏡写真 (D)染色領域のサイズ比較

また、プラズマ照射による

細胞分裂活性への影響を解析するため、細胞周期進行に関与する *CYCD1* を可視化した *proMpCYCD;1:MpCYCD;1Nter-tdTomato-NLS* 株を用いて、SDBD プラズマ照射した。プラズマ照射区においてわずかに蛍光領域が増加している可能性が示唆されたが、明確な差はなかったため、今後、リアルタイム PCR などを用いた詳細な遺伝子発現変動解析を行う予定である。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>計1件

- Shoko Tsuboyama, Takamasa Okumura, Pankaj Attri, Kazunori Koga, Masaharu Shiratani, Kazuyuki Kuchitsu, “Growth control of *Marchantia polymorpha* gemmae using nonthermal plasma irradiation”, *Scientific Reports*, 14(1)

<国際・国内会議>計9件 (以下には代表者が発表者である4件のみ記載)

- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「モデル植物ゼニゴケを用いた低温プラズマ照射の初発反応と成長に対する影響の解析」、第71回応用物理学会春季学術講演会、東京都市大学、2024年3月22日~25日
- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「大気圧低温プラズマ照射によるゼニゴケの初発反応と成長に対する影響」第65回日本植物生理学会年会、神戸大学、2024年3月17日~19日
- 坪山祥子, 朽津和幸, 「ゼニゴケの細胞分裂・成長制御における活性酸素種の役割と、低温プラズマ照射の影響の解析」、第二回プラズマ種子科学研究会、名古屋大学、2024年1月6日~7日
- 坪山祥子, 奥村賢直, 古閑一憲, 白谷正治, 朽津和幸, 「ゼニゴケを用いて植物へのプラズマ照射効果の分子機構解明を目指す」、第40回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会、千葉大学、2023年9月11日~13日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者 (研究代表者) : 寺嶋 和夫

所属機関・部局・職名 : 東京大学・新領域創成科学研究科・教授

連絡先 住所 : 〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5 基盤棟 504

TEL : 04-7136-3799 FAX : 04-7136-3798

E-Mail : kazuo@plasma.k.u-tokyo.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	フェムト秒レーザー生成プラズマを含む液中プラズマにより処理された表面改質粒子の分析	
	英文	Surface analysis of surface-modified-particles treated by plasmas in solution including femtosecond laser generated plasmas	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	寺嶋和夫・東京大学・新領域創成科学研究科・教授
		研究分担者	伊藤剛仁・東京大学・新領域創成科学研究科・准教授 宗岡均・東京大学・新領域創成科学研究科・助教 小池健・東京大学・新領域創成科学研究科・大学院生 (博士 2 年) 長谷川瑠偉・東京大学・新領域創成科学研究科・大学院生 (修士 1 年)
		センター担当教員	石川健治 教授・プラズマ科学部門
	英文	研究代表者	Kazuo Terashima・The University of Tokyo・Graduate School of Frontier Sciences・Professor
		研究分担者	Tsuyohito Ito・Hitoshi Muneoka・Takeru Koike・Rui Hasegawa
		センター担当教員	Kenji Ishikawa・Professor
研究実績概要 (成果等)	絶縁性かつ高熱伝導性フィラーである六方晶窒化ホウ素 (hBN) に対しフェムト秒レーザーを用いた表面改質を行い、電子スピン共鳴(ESR)を用いて評価を行った。その結果、放電による液中プラズマ処理とは異なる傾向の観察に成功した。得られた結果について今後洞察を深めることで、さらなる液中プラズマ表面改質プロセスのメカニズム解明が期待できる。		
特筆事項(受賞、産業財産権出願取得状況等)	特になし		

フェムト秒レーザー生成プラズマを含む 液中プラズマにより処理された表面改質粒子の分析

Surface analysis of surface-modified-particles treated by plasmas in solution
including femtosecond laser generated plasmas

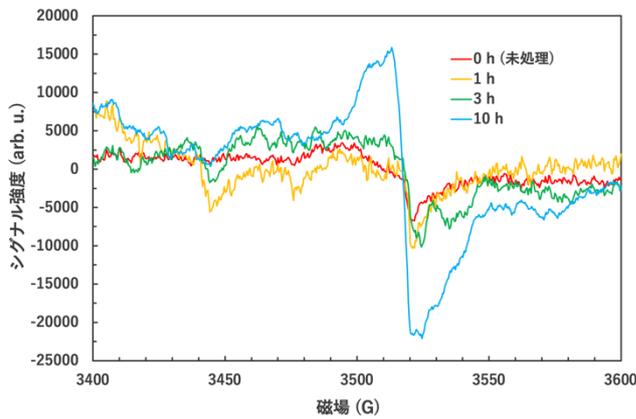
寺嶋和夫・東京大学・新領域創成科学研究科・教授
伊藤剛仁・東京大学・新領域創成科学研究科・准教授
宗岡均・東京大学・新領域創成科学研究科・助教
小池健・東京大学・新領域創成科学研究科・大学院生
長谷川瑠偉・東京大学・新領域創成科学研究科・大学院生
石川健治・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授

1. 研究目的

現代のIoT時代をリードするフレキシブル機器の発展や電子回路の集積化に伴い、電子デバイスからの発熱密度が増大する中、放熱性を高める熱マネジメント材料として用いる、金属並みの高熱伝導性とゴムのような柔軟性を兼ね備えた材料が求められている。我々は高い熱伝導性を示す機能性無機粒子を柔軟かつ強靱なスライドリングポリマー中にフィラーとして分散させることによって、従来にない高い熱伝導性と柔軟性を兼ね備えた複合材料(タフコンポジット)を開発してきたが、その最重要な要素技術となるのが無機粒子に対するプラズマ表面改質である。液中プラズマを用いて処理された粒子表面は極性基で修飾されて液中・コンポジット中での分散性が向上する事が示されており、これまでの共同研究でも反応性に富んだ表面層の形成が示されてきた。更なる機能性向上には高度なプラズマプロセス制御に基づく無機粒子の表面改質設計が鍵となるが、液中プラズマを用いた表面改質機構は未解明な点が残されている。そこで液中プラズマプロセスの更なる理解を目指して、フェムト秒レーザーによるレーザー生成液中プラズマ反応場の開発とその診断に着手した。本研究では主にレーザー生成液中プラズマ処理された無機粒子に対する、電子スピン共鳴を主体とした結合状態の分析及び表面改質評価を目的とする。

2. 研究内容と成果

我々はこれまでの共同利用・共同研究において、高熱伝導性かつ絶縁性無機粒子である六方晶窒化ホウ素(hexagonal boron nitride; hBN)の液中放電による液中プラズマ表面改質について分析を進めてきた。これまでの共同研究の成果として、液中放電プラズマ処理によるhBN粒子へのダングリングボンド形成を確認しており、またその後の官能基修飾の過程について、電子スピン共鳴法(ESR)やX線光電子分光(X-ray photo electron spectroscopy; XPS)を用いて確認した結果、大気中での経過日数に応じて、形成したThree-boron centers(TBC)と呼ばれるhBNのダングリングボンド由来のスペクトルが年単位の



長期間をかけて減少していく様子、そして日数経過によって液中プラズマ処理 hBN に B-O 結合由来のピークが増加する様子を捉えることに成功してきた。

本年度はさらなる液中プラズマ表面改質プロセスのメカニズム解明のため、放電による液中プラズマに加え、フェムト秒レーザーを用いて生成し

た液中プラズマの生成に着手した。この液中放電反応場とは異なる反応場を用いて hBN の表面改質を行い、改質後の hBN の結合状態について ESR を用いて評価し分析を行った。ESR スペクトル測定の結果 (図 1) から、液中放電プラズマ処理と同様に、hBN のマイクロ波共鳴吸収が増加することが確かめられた。一方で、その吸収波形は液中放電プラズマ処理とは大きく異なる傾向を示した。超微細構造を用いたスペクトル解析の結果、フェムト秒レーザー生成液中プラズマ処理 hBN には TBC に加えて、 $V_B O_N$ とされる、hBN を構成するホウ素原子サイトが空孔となっており、隣接する窒素原子サイトが酸素原子に置換されている格子欠陥が形成されていることが示唆された。その相違を生む原因は今後の研究対象ではあるものの、液中放電プラズマを用いた hBN 処理はラジカルを始めとする化学活性種による化学反応を主とする反応機構が想定されるのに対し、フェムト秒レーザー生成液中プラズマを用いた hBN 処理は化学反応に加えてフェムト秒レーザーの極端な強電場に由来するアブレーションやクーロン爆発を含む反応機構が想定されるので、こうした hBN 処理過程の相違が処理結果に反映されている可能性がある。以上より、液中プラズマ生成手法の変化がもたらす表面改質状態の変化について電子スピン共鳴を通じて評価を行い、その変化の一端の観察に成功した。得られた結果について今後洞察を深めることで、さらなる液中プラズマ表面改質プロセスのメカニズム解明が期待できる。

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- Kenichi Inoue, Naoto Takagi, Tsuyohito Ito, Yoshiki Shimizu, Kenji Ishikawa, Kohzo Ito, Masaru Hori and Kazuo Terashima, Subsequent functionalization of hexagonal boron nitride after plasma processing in solution for preparation of polymer composite materials, 25th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC25), Kyoto, 21~26 May, 2023, POS-7-105
- Kenichi Inoue, Naoto Takagi, Tsuyohito Ito, Yoshiki Shimizu, Kenji Ishikawa, Masaru Hori and Kazuo Terashima, Quantitative Analysis of Reactive Sites on Hexagonal Boron Nitride Treated by Plasma in Solution, 2023 Materials Research Society (MRS) Fall Meeting, Boston, 26 Nov ~ 1 Dec, 2023, SF04.08.02

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：布村 正太

所属機関・部局・職名：

産業技術総合研究所・電子光基礎技術研究部門・上級主任研究員

連絡先 住所：〒305-8568 つくば市梅園 1-1-1

TEL：029-861-5075

E-Mail：s.nunomura@aist.go.jp

共同利用・共同研究課題	和文	プラズマイオン照射に伴う半導体ナノ界面の欠陥の発生と修復	
	英文	Defect creation and recovery in semiconductor nano-interface by plasma ion irradiation	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	布村正太 産業技術総合研究所・電子光基礎技術研究部門・ 上級主任研究員
		研究分担者	
		センター担当教員	堤 隆嘉 名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・ 物質科学部門
	英文	研究代表者	Shota Nunomura (AIST)
		研究分担者	
		センター担当教員	Takayoshi Tsutsumi (Nagoya Univ.)
研究実績概要 (成果等)	本研究では、先端ロジック半導体や高効率太陽電池に用いられる SiO ₂ /Si スタックにおける界面欠陥の発生と修復を解明することを目的とする。本年度は、レジストアッシングを想定し、SiO ₂ /Si スタックへの O ₂ プラズマ照射実験を行った。具体的には、酸化膜の膜厚(5nm-20nm)を変えたサンプルを準備し、イオンエネルギーと照射時間を変えた実験を行った。その結果、イオンエネルギー、照射時間に加え、酸化膜の膜厚が界面欠陥の発生に強い影響及ぼすことを見出した。また、アニール温度を最適化することで界面欠陥を概ね修復可能であることも示した。得られた結果・知見を各種学会で発信し、また、論文 2 編 (<i>J. Vac. Sci. Technol.</i> , <i>J. Appl. Phys</i>) として学術雑誌に公開した。		
特筆事項 (受賞、産業財産権 出願取得状況等)			

プラズマイオン照射に伴う半導体ナノ界面の欠陥の発生と修復 Defect creation and recovery in semiconductor nano-interface by plasma ion irradiation

布村 正太・産業技術総合研究所・電子光基礎技術研究部門・上級主任研究員
堤 隆嘉・名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター 物質科学部門・講師

1. 研究目的

先端半導体において、酸化膜/シリコン (SiO_2/Si) 界面における欠陥 (格子欠陥、ダングリングボンドや不純物等) は、デバイス特性および信頼性の低下を招く (図 1)。そのため、界面における欠陥の発生と修復を理解しこれらの欠陥を制御することが重要である[1]。界面欠陥は、通常、デバイス作製時の成膜、加工、アニール等のプロセスにより、意図せず導入されることが知られているが、その詳細は理解されていない。そこで、本研究では、STI (shallow trench isolation) やコンタクトホール形成、レジストのアッシングを念頭に、酸素プラズマを熱酸化膜付きシリコンウエハに照射し、その後、アニールを施すことで、 SiO_2/Si 界面の欠陥の発生と修復を調査した。

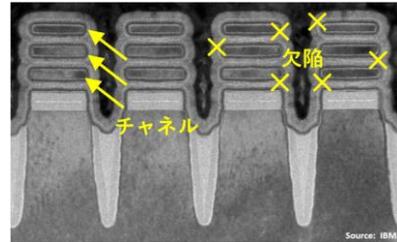


図 1 最先端ロジック GAAFET 構造の一例。三層のナノシートチャンネルの周りを酸化膜・HKMG が取り囲む構造。IBM より引用。チャンネル周りの欠陥の低減がデバイス性能の向上に直結する。

2. 研究内容と成果

図 1 に実験装置の概要を示す[2]。二周波容量結合型プラズマ装置を用いてプラズマ照射実験を行った。装置内に O_2 ガスを導入し、上部電極に高周波(100MHz)100W を供給し、下部電極に低周波(2MHz)を印加することで、イオンエネルギーを制御したプラズマを生成した。下部電極上に、構造 (thermal SiO_2 / 高抵抗 FZ Si (525 μm thermal SiO_2) を有するサンプルを設置した。酸化膜 (thermal SiO_2) の膜厚 (5-20nm)、イオンエネルギー (floating-300eV)、照射時間 (1s-100s) を変えて実験を行った。その後、サンプルにアニール処理 (100-300 $^\circ\text{C}$, 30min) を施した。 SiO_2/Si 界面の欠陥は、基板 Si の少数キャリアのライフタイムにより評価した。ライフタイムの測定には、QSSPC (Quasi-Steady-State Photoconductance) 法を用い、キャリア注入量 10^{15}cm^{-3} にて評価した。サンプルの準備およびライフタイムの測定は産総研にて行い、プラズマ照射実験は名大低温プラズマセンターにて行った。

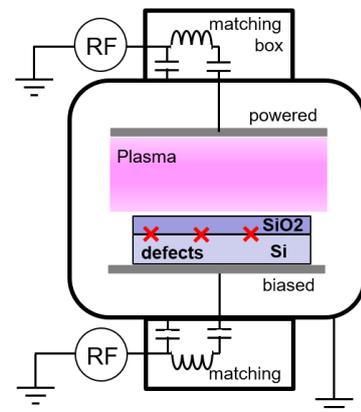


図 2 プラズマ照射実験。 SiO_2/Si の界面欠陥を×で示す[2]。

図2に、酸化膜厚 10nm のサンプルにおける O₂ プラズマ照射及びアニール後のキャリアのライフタイムの変化を示す。プラズマ照射に伴い、ライフタイムが低下し、界面欠陥が発生することがわかる。また、ライフタイムの低下は、照射イオンのエネルギーの増加に伴い、より顕著になることから、高エネルギーイオンの照射により界面欠陥がより多く形成されることもわかる。一方、アニールに伴い、ライフタイムが回復することから、プラズマ照射によって形成された界面欠陥が修復されることが確認できる。欠陥の修復は、アニール温度が高い場合、よい高い効果が得られ、約 300°C でほぼすべての欠陥が修復されることが確認できる。但し、ライフタイムの回復は完全ではなく、アニール後に残留欠陥が残ることも示唆される。

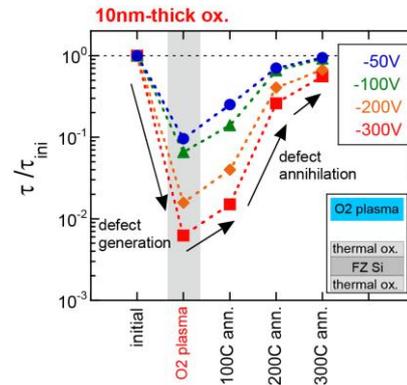


図2 キャリアライフタイムの測定結果。ライフタイムはプラズマ照射に伴い減少し、アニールにより回復する。パラメータは、下部電極の自己バイアス電圧[2]。

上述の実験より、O₂ プラズマ照射に伴う SiO₂/Si 界面欠陥の発生と修復に関する基礎データを取得しデバイスの高性能化に関する知見を得た。今後は、プロセスガスを先端半導体ロジックや各種メモリ用途に変え、半導体デバイス全般の高性能化に向けた具体的な指針・方策を提供・発信していく。

[1] S. Nunomura, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **56**, 363002 (2023).

[2] S. Nunomura *et al.*, *J. Appl. Phys.* **135**, 053301 (2024).

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Shota Nunomura, Takayoshi Tsutsumi, Isao Sakata, and Masaru Hori, Plasma processing and annealing for defect management at SiO₂/Si interface, *J. Vac. Sci. Technol. B* **41**, 052202 (2023).
- Shota Nunomura, Takayoshi Tsutsumi, Isao Sakata, and Masaru Hori, O₂ and Ar plasma processing over SiO₂/Si stack: Effects of processing gas on interface defect generation and recovery, *J. Appl. Phys.* **135**, 053301 (2024).

<国際・国内会議>

- 布村 正太, 坂田 功, 堤 隆嘉, 堀 勝, “プラズマ誘起欠陥の発生と修復 ～酸素プラズマが SiO₂/Si 界面に及ぼす影響～”, 2023 年 第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 熊本城ホール, 2023/9/19-23.
- 布村 正太, 坂田 功, 堤 隆嘉, 堀 勝, “プラズマ誘起欠陥の発生と修復～RIE-SiO₂に伴う SiO₂/Si 界面の欠陥評価～”, 2024 年 第 71 回 応用物理学会 春季学術講演会, 東京都市大学世田谷キャンパス, 2024 年 3 月 22 日(金)～25 日(月).

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 原 宏和

所属機関・部局・職名： 岐阜薬科大学・薬学部・教授

連絡先 住所：〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4

TEL： 058-230-8100

E-Mail： harah@gifu-pu.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマを利用したがん治療の新規治療戦略の確立		
	英文	Development of novel strategies in cancer treatment using non-thermal plasma		
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	原 宏和・岐阜薬科大学・臨床薬剤学研究室・教授	
		研究分担者	神谷哲朗・岐阜薬科大学・臨床薬剤学研究室・准教授 江坂幸宏・岐阜薬科大学・薬品分析化学研究室・教授 高須蒼生・岐阜薬科大学・薬品分析化学研究室・助教	
		センター担当教員	石川健治 教授・プラズマ科学部門	
	英文	研究代表者	Hirokazu Hara (Professor; Gifu Pharma. Univ.)	
		研究分担者	Tetsuro Kamiya (Associate professor; Gifu Pharma. Univ.) Yukihiro Esaka (Professor; Gifu Pharma. Univ.) Soo Takasu (Assistant professor, Gifu Pharma. Univ.)	
		センター担当教員	Kenji Ishikawa (Professor; Plasma Medical Science Global Innovation Center, Nagoya University)	
研究実績概要 (成果等)	本研究では、低温プラズマ (NTP) の抗がん活性に対するアミノ酸、特にグルタミン (Gln) とメチオニン (Met) の影響を検証した。1) Gln 代謝経路の影響：Gln 代謝の律速酵素であるグルタミナーゼの阻害により NTP の細胞傷害性が増大したことから、Gln 代謝の阻害薬は、NTP の抗がん活性を増強するための有効な手段になることが示された。2) NTP 照射による Met 酸化修飾：NTP 照射した Met 溶液は強い細胞傷害活性を有しているが、その機序は不明である。今回、NTP 照射により Met 溶液中にどのような Met 酸化修飾体が生成するかを LC-MS/MS を用いて解析し、主要な生成物として methionine sulfoxide と dehydromethionine を同定した。			
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)				

低温プラズマを利用したがん治療の新規治療戦略の確立（継続）

Development of novel strategies in cancer treatment using non-thermal plasma

研究代表者 原 宏和・岐阜薬科大学・臨床薬剤学研究室・教授
研究分担者 神谷哲朗・岐阜薬科大学・臨床薬剤学研究室・准教授
江坂幸宏・岐阜薬科大学・薬品分析化学研究室・教授
高須蒼生・岐阜薬科大学・薬品分析化学研究室・助教
研究所担当 石川健治・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授

1. 研究目的

本研究の目的は、低温プラズマ（NTP）をがん治療に利用するための新規戦略の開発に取り組み、「プラズマ医療」の発展に向けた技術基盤の確立につながるエビデンスを得ることである。本申請研究では、アミノ酸、特にグルタミン（Gln）とメチオニン（Met）に着目し、1) 細胞内の Gln 代謝経路の阻害によるプラズマ活性化培地（PAM）の細胞傷害増強効果の解明、2) NTP を照射した Met 溶液で生成する細胞傷害物質の同定、に取り組んだ。

2. 研究内容と成果

2-1. PAM の細胞傷害に対する Gln 代謝阻害の増強効果

Gln は生体内でグルタミン酸（Glu）に代謝され、生体の抗酸化物質であるグルタチオン（GSH）の構成成分となる。それゆえ、Gln 代謝の阻害は GSH 産生を減少させることから、細胞の抗酸化能を低下させる可能性がある。昨年度、Gln から Glu の変換を担うグルタミナーゼ（GLS）の阻害剤により、PAM による細胞傷害が増強することを報告した。本年度は、siRNA による GLS ノックダウンが PAM の細胞傷害に及ぼす影響を検討した。その結果、GLS をノックダウンした細胞では、PAM による DNA 損傷や細胞傷害が増大した。以上の結果から、GLS 阻害剤による Gln 代謝阻害は、PAM の抗がん活性を増強するための有効な手段になることが示された。

2-2. NTP 照射 Met 溶液の抗がん活性の検証

Met はがん細胞の生存にも重要なアミノ酸であるが、NTP 照射した Met 溶液は強い細胞傷害活性を示すことが報告されている。そこで、NTP 照射 Met 溶液による細胞傷害の機序解明に取り組んだ。

NTP 照射溶液として、酢酸リンゲル液（AR）あるいは Met を含む AR（Met/AR）に NTP を照射した溶液 plasma-activated AR（PAA あるいは Met/PAA）を作製し、ヒト高転移性乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞に対する NTP 照射溶液の傷害性を測定した。PAA に比較し、Met/PAA で細胞傷害は著しく増大した。NTP 照射による細胞傷害には H₂O₂ が関与していることが報告されている。しかし、カタラーゼ処理した Met/PAA（Met/PAA/Cat）でも Met/PAA と同程度の細胞傷害が認められたことから、Met と NTP の反応により生成する

H₂O₂以外の物質が細胞傷害を誘発させていると考えられた。

そこで、Met/PAA中にどのようなMetの酸化修飾体が生成しているかをLC-MS/MSを用いて解析した。Methionine sulfoxide (MetS)とdehydromethionine (De-Met)が主要な生成物として同定された。しかし、既報と同様に、MetSは細胞傷害性を示さなかった。De-Metは市販品がないことから、De-Metの細胞傷害性については、今後De-Metを合成するなどして、その傷害性を評価する必要がある。また、PAA/Met/Catによる細胞傷害は、PAA/Met/Catを抗酸化物質であるGSHやN-acetylcysteineで前処理することで抑制された。さらに、GSH処理したPAA/Met/CatではDe-Metが減少した。以上の結果から、Met/ARのNTP照射により生じるDe-MetがMet/PAAの細胞傷害に部分的に寄与している可能性が示された。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Shu Tanaka, Sae Hayashi, Tomohiro Otsuka, Tetsuro Kamiya, Kenji Ishikawa, Hirokazu Hara: Inhibition of glutamine metabolism increases sensitivity to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Radical Research* (in press).

<国際・国内会議>

- 田中柊佑, 林 克恵, 大塚智裕, 神谷哲朗, 石川健治, 原 宏和: グルタミナーゼ1阻害剤による低温プラズマ照射培地の抗がん作用増強効果, 第69回日本薬学会東海支部総会・大会, 名古屋, 2023年7月8日 (田中柊佑、学生優秀発表賞)
- 棚橋さくら, 藤澤恒星, 高須蒼生, 大塚智裕, 神谷哲朗, 石川健治, 江坂幸宏, 原 宏和: プラズマ照射メチオニン溶液の抗がん活性増強効果, 第96回日本生化学会大会, 福岡, 2023年10月31~11月2日
- 原 宏和: プラズマ駆動生化学反応, 第二回プラズマ種子科学研究会, 名古屋, 2024年1月6日~7日

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：兵藤文紀

所属機関・部局・職名：岐阜大学・医学系研究科・薬理病態学

連絡先 住所：〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1

TEL：058-230-6437

E-Mail：hyodo.fuminori.i4@f.gifu-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマの生体レドックス応用を目指したプローブ反応性評価		
	英文	Evaluation DNP probe for monitoring redox reaction after irradiation of atmospheric cold plasma		
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	兵藤文紀	
		研究分担者	<ul style="list-style-type: none"> ● 松尾政之・岐阜大学・医学系研究科・放射線医学分野・教授 ● アブデルアジム・エルヘラリー・岐阜大学・医学系研究科・先端画像開発講座・研究員 	
		センター担当教員	● 田中宏昌 教授・バイオシステム科学部門	
	英文	研究代表者	Fuminori Hyodo・ Department of Pharmacology, School of Medicine Gifu University・ Professor	
		研究分担者	Masayuki Matsuo・ Department of Radiology, School of Medicine Gifu University・ Professor ELHELALY ABDELAZIM ELSAYE Frontier Science for imaging, department of Radiology, School of Medicine Gifu University・ Researcher	
		センター担当教員	Masahiro Tanaka Department of Electrical Engineering, Graduate School of Engineering, Professor	
研究実績概要 (成果等)	本年度は、超偏極（DNP）MRI に活用しているプローブであるニトロキシルラジカルについて、低温プラズマで水溶液中で発生させた活性酸素種（Reactive oxygen species）との反応性に関する基礎研究を実施し、ニトロキシルラジカルの1つであるCmPはプラズマにより誘発されるROSにより還元的な代謝を受けることが明らかとなった。			
特筆事項 (受賞、産業財産権 出願取得状況等)	なし			

低温プラズマの生体レドックス応用を目指したプローブ反応性評価

Evaluation DNP probe for monitoring redox reaction

after irradiation of atmospheric cold plasma

兵藤文紀・岐阜大学・医学系研究科薬理病態学分野・教授
松尾政之・岐阜大学・医学系研究科放射線医学分野・教授
エルヘラリー アブデルアジム・岐阜大学・医学系研究科・研究員
田中宏昌・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授

1. 研究目的

活性酸素やフリーラジカルは様々な疾患においてその憎悪と病態の進展に関与することが知られている。我々はこれまでの研究において、電子スピンと核スピンの二重共鳴による MRI の高感度化技術である超偏極 (dynamic nuclear polarization : DNP)MRI を用いてフリーラジカルの可視化や活性酸素が惹起する生体の酸化還元 (レドックス) 変動の評価法の構築および疾患応用研究を推進してきた。低温プラズマ照射では様々な活性酸素種が産生されることが知られており、本研究では、将来的な生体計測への応用を指向して、プラズマ照射を施行した肝懸濁液や単離ミトコンドリアなどの生体サンプルにおいて、DNP-MRI 用のレドックスプローブを用いた反応性を検証し、レドックスイメージングへの応用の可能性を探ることを目的とする。

2. 研究内容と成果

生体レドックスイメージングに用いる DNP-MRI 計測では、活性酸素との反応性を持つニトロキシルラジカルがプローブとして用いられている。ニトロキシルプローブは分子構造により異なる細胞膜透過性を示すため、それらを使い分けることで細胞膜内外のレドックス反応を分離して解析することが可能である。本研究では、細胞膜透過性プローブである 3-carbamoyl PROXYL および Tempol を用いて、プラズマ照射により生体サンプル (臓器組織液もしくはミトコンドリア溶液) で産生される活性酸素との反応性を検証した。

プラズマ発生源としては、活性

化学種生成装置 SE-ASG (図 1、誠南工業株式会社) を使用して、直接プラズマを溶液に照射する Direct mode (DM) および、プラズマを発生させた後、ヒドロキシルラジカルのみを照射する Remote mode (RM) にて実験を行った。

まず、装置によりどれぐらいのヒドロキシルラジカルが産生されるかを検討する目的で、ヒドロキシルラジカルのスピントラップ剤として知られる DMPO を用いた電子スピン共鳴法 (ESR) によるラジカル産生実験を実施した。DMPO は水に溶解し 10mM の溶液を作製

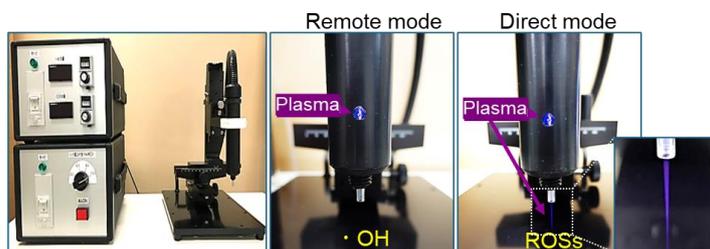


図1. 研究に用いた低温プラズマ発生装置

し、実験に使用した。作製した DMPO 水溶液に DM および RM にて直接照射を行った後、ESR で DMPO-OH の信号を確認した (図 2)。次に照射時間によるラジカル産生を検討したところ、DM および RM とともに照射時間に依存して ESR 信号は増強した。DM と RM での比較検証では、DM における DMPO-OH の信号強度が相対的に高かった。

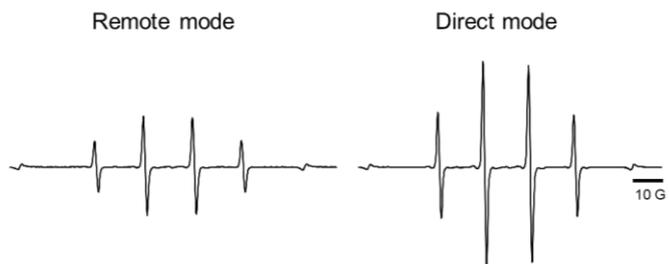


図2. RMおよびDMにより産生したヒドロキシルラジカルの ESR信号.スピントラップ剤(DMPO)を使用

DNP 用レドックスプローブ (細胞膜透過性および非透過性) とプラズマ照射との反応性検討においては、まず CmP および Tempol の種々の濃度のレドックスプローブを作製し、還元剤としてグルタチオン (GSH) を含む水溶液を調製した。その後 RM および DM にてプラズマを照射した。照射後、すぐに ESR にて残存プローブのラジカル計測を行い、プラズマ

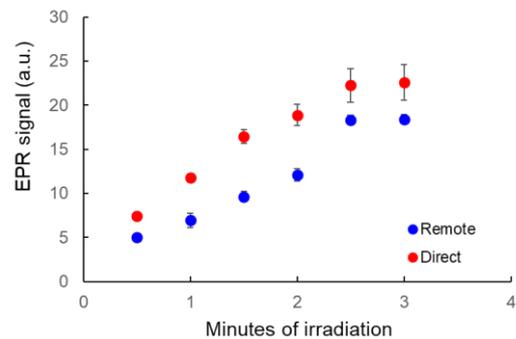


図3. RMおよびDMにより産生したヒドロキシルラジカルのESR信号の比較

照射により反応したラジカル濃度を算出し反応性を検証した。CmP ラジカルは、グルタチオンの共存下において、RM および DM によるプラズマ照射にてラジカルが消失することがわかった。また CmP のラジカル強度は、RM および DM とともに照射時間に依存して減少することが明らかとなった。CmP ラジカルの消失割合も DM では RM に比べより顕著に後進していることが明らかとなった。今後、これらの減少を利用して DNP-MRI により反応の可視化へ展開する予定である。

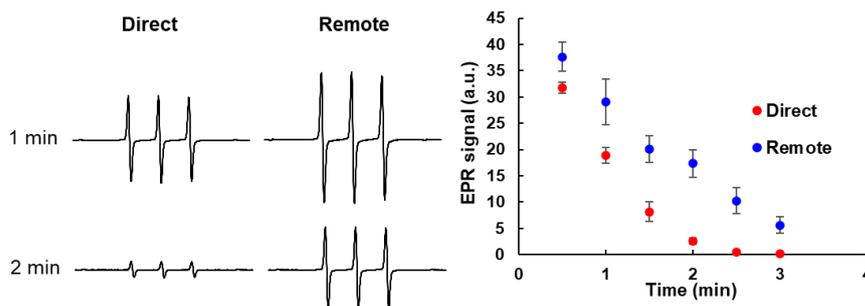


図4. RMおよびDMによるプラズマ照射におけるニトロキシルラジカル (CmP)のラジカル量の変化

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：古澤 之裕

所属機関・部局・職名：富山県立大学・工学部・准教授

連絡先 住所：〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

TEL：0766-56-7500

E-Mail：furusawa@pu-toyama.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	(重点テーマ) 低温大気圧プラズマによる DNA 損傷応答	
	英文	DNA damage response induced by cold atmospheric plasma	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	古澤之裕
		研究分担者	田淵圭章 (富山大学) 近藤 隆 (名古屋大学)
		センター担当教員	教授・田中宏昌・バイオシステム部門
	英文	研究代表者	
		研究分担者	
		センター担当教員	
研究実績概要 (成果等)			
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)			

低温大気圧プラズマによる DNA 損傷応答

DNA damage response induced by cold atmospheric plasma

古澤之裕・富山県立大学・工学部・准教授

田渕圭章・富山大学・学術研究部薬学和漢系・教授

近藤 隆・名古屋大学低温プラズマ科学研究センター・特別教授

田中宏昌・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センターバイオシステム部門・
教授

1. 研究目的

大気圧プラズマは、創傷治癒のほか、免疫調節や癌治療への応用が期待されている新たな医療技術である。大気圧プラズマが生物作用を示す機序として、生体内の酸化還元シグナルの制御が見出されている。例えばプラズマ照射により細胞外のみでなく、細胞内でも活性酸素種の生成がおこり、DNA に対して塩基損傷や一本鎖切断などの DNA 損傷を誘発することが知られている。

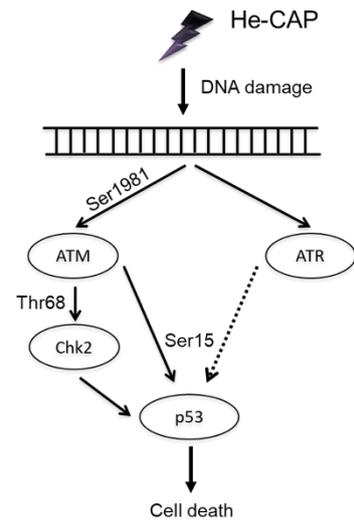
細胞内で DNA 損傷がおこると、細胞周期停止と DNA 修復を行う「DNA 損傷応答経路」が活性化し、細胞は生存を試みる。そのため、癌治療の増感を目的として、生存シグナルである DNA 損傷応答経路の阻害剤が開発され、DNA 損傷を誘発する放射線との併用療法を試みる臨床試験が行われている。放射線応答は古くから研究されている一方、新しい技術である大気圧プラズマの細胞応答に関する研究の歴史は浅く、活性化する DNA 損傷応答分子の種類とそれらの役割について不明な点が多い。

本研究では、大気圧プラズマの照射による活性化する DNA 損傷応答経路に係る分子とその機序を明らかにし、分子標的薬を用いたプラズマ誘発がん細胞死の増感が可能となるか否かを検討することを目的とした。

2. 研究内容と成果 (12pt ゴシック体)

本研究では、DNA 損傷応答経路の中心的制御因子である p53 を変異・欠損していないヒト白血病細胞「Molt-4」に対して大気圧ヘリウム低温プラズマ (He-CAP) を照射し、p53 のシグナル応答や He-CAP 誘発細胞死に対する役割を調べた。野生型 p53 を保有する Molt-4 細胞では、He-CAP に 20-60 秒間照射すると、照射時間依存的にアポトーシスおよびネクロトーシス細胞死が誘導された。また、DNA 損傷センサータンパク質として知られる Ataxia telangiectasia mutated (ATM) の Ser1981 部位のリン酸化は、He-CAP 照射 1 時間後時点で既に誘導されていた。ATM の基質であるヒストン H2AX の Ser139 部位のリン酸化も観察されたことから、He-CAP により Molt-4 細胞の DNA 損傷応答経路が十分に誘導されることが示された。また、ATM の基質である p53 の Ser15 部位のリン酸化も He-CAP 暴露の 1~6 時間後に確認できた。Ku55933 (ATM 阻害剤) で前処理すると p53 のリン酸化は顕著に抑制されたが、VE-821 (ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR)阻害剤) で前処理すると p53 のリン酸化はほとんど抑制されなかった。こ

のことから、He-CAP による p53 のリン酸化は ATM に依存していると推測された。ATM の基質としてリン酸化を受け、下流の p53 の安定化や転写活性の促進にはたらくチェックポイントキナーゼ 2 についても、He-CAP 照射した細胞でリン酸化レベルが上昇することが確認できた。ATM 阻害剤および Chk2 阻害剤は、いずれも Molt-4 細胞における He-CAP 誘発細胞死を抑制したことから、ATM-Chk2-p53 軸が He-CAP による細胞死関連の DNA 損傷応答経路であることが明らかとなった。



【研究成果の公表状況】（12pt ゴシック体）

<国際・国内会議>（11pt 明朝体, Times）

- ・ 村谷珠輝, 近藤隆, 古澤之裕 Cold atmospheric plasma induces cell death through activation of the ATM-Chk2-p53 pathway, ISPlasma2024, 名古屋大学, 2023年3月4日～37日.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：町田千代子

所属機関・部局・職名：中部大学・特定教授

連絡先 住所：〒487-8501 愛知県春日井市松本町 1200

TEL：0568-51-6276

E-Mail：cmachida@isc.chubu.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	低温プラズマ処理溶液によるカビの生育に対する効果の解明	
	英文	Elucidation of the effect of low-temperature plasma treatment solution on fungal growth	
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	町田千代子（中部大学・特定教授）
		研究分担者	金政 真（中部大学・応用生物学部・准教授） 金丸 京子（中部大学・応用生物学部・准教授） 橋爪博司（名古屋大学・特任講師）
		センター担当教員	橋爪博司 バイオシステム科学部門
	英文	研究代表者	Chiyoko Machida (Chubu Univ., Senior Research Professor)
		研究分担者	Shin Kanamasa; Kyoko Kanamaru (Chubu Univ.) Hiroshi Hashizume (Nagoya Univ.)
		センター担当教員	Hiroshi Hashizume
研究実績概要 (成果等)	本研究では、カビのモデルとして糸状菌を用いて、低温プラズマ処理溶液（乳酸ナトリウム）を含む液体最少培地で培養し、分生子の発芽や菌糸伸長への影響を観察したところ、分生子が膨張し伸長菌糸が太くなることが確認された。その効果の分子的解明をすることにより、今後、低温プラズマ処理液のカビに対する汎用性の向上が期待される。		
特筆事項（受賞、産業財産権出願取得状況等）	無		

低温プラズマ処理溶液によるカビの生育に対する効果の解明

Elucidation of the effect of low-temperature plasma treatment solution on fungal growth

研究代表者 町田千代子・中部大学・特定教授

研究分担者 金政 真・中部大学・応用生物学部・准教授

金丸京子・中部大学・応用生物学部・准教授

橋爪博司・名古屋大学・未来社会創造機構・特任講師

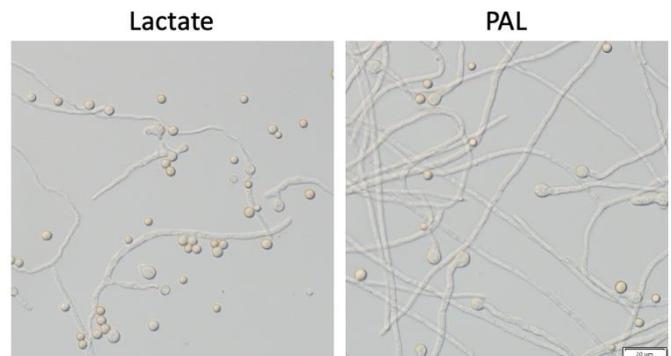
研究所担当教員 橋爪博司・バイオシステム科学部門・特任講師

1. 研究目的

糸状菌は、いわゆるカビの種類に属すが、分子生物学的研究が最も進んでいるものの一つである。しかしながら、低温プラズマが糸状菌の生育にどのような効果を持つかについてはほとんど研究されていない。そこで、本研究では、多くの有用な酵素や代謝物を生産し、モデル生物となっている *Aspergillus nidulans* を用いて、低温プラズマ照射液（乳酸ナトリウム）を培地に加えた場合の効果について解析した。カビの生育促進に着目した分子的解明をすることにより、応用研究へとつなげることを目的とした。

2. 研究内容と成果

A. nidulans は、多くの有用な酵素や代謝物を生産することから応用面でも有用な糸状菌である。*A. nidulans* を、低温プラズマ照射乳酸ナトリウム溶液（PAL）を含む液体最少培地で培養し、分生子の発芽と菌糸伸長への影響を落射蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、低温プラズマ未照射の乳酸ナトリウム液（Lactate）を含む培地と比べ、PAL を含む培地で培養した場合には分生子が膨張し、伸長菌糸が太くなることが確認された。糸状菌では、休眠している分生子が再び活動を開始する際には、分生子が給水して膨張後、菌糸伸長を開始するため、この観察結果は、処理溶液による *A. nidulans* の生育促進を示唆すると考えられた。さらに、ミトコンドリア局在タンパク質 CoxA（チトクローム C オキシダーゼ A）と GFP（緑色蛍光タンパク質）の融合タンパク質を用いて観察したところ、膨張した分生子や太い菌糸内にミトコンドリアが分布する観察結果を得た。分生子の発芽時において、酸素消費速度や ATP 生産量が 2 倍程度増加する測定結果も得られており、PAL によるミトコンドリアへの効果が *A. nidulans* の生育を促進することが示唆された。*A. nidulans* の類縁菌である、麹菌 *A. oryzae* は発酵生産で利用される実用の糸状菌株である。*A. oryzae* の野生株である RIB40 株についても同様に PAL を含む培地で培養したところ、未照射の乳酸ナトリウムを含む培地に比べて、分生子の発芽率が上昇し、菌糸



30°Cで30時間培養後の*A. oryzae*の生育の様子を示す。プラズマ未照射の乳酸ナトリウム添加（左図、Lactate）では分生子の発芽率が10%程度であるのに対して、PALの添加（右図）では、発芽率が50%程度に上昇し、さらに菌糸伸長が促進された。

の伸長が促進することが認められた（図参照）。PAL は *Aspergillus* 属糸状菌の生育を促進する効果があると考えられる。

酒・醤油・味噌などの発酵食品の生産に使用される実用麹菌株には数百種類あり、発酵食品の種類によって使い分けられている。生産時には、米や大豆に麹菌の分生子を着生させた種麹が不可欠だが、実用株の中には分生子の発芽率や菌糸伸長が遅く、種麹の生産効率が悪い株がある。PAL の添加によって、分生子の着生率が向上した良質な種麹の生産が可能になり、発酵食品の生産向上に貢献できると期待される。引き続きミトコンドリア機能を中心に、PAL による糸状菌の生育促進効果を解析することが必要である。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

該当なし

<国際・国内会議>

該当なし

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：松浦寛人

所属機関・部局・職名：大阪公立大学・研究推進機構・教授

連絡先 住所：〒599-8570 堺市学園町 1-2

TEL：072-254-7149

E-Mail：matsu.plasma@omu.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	プラズマ界面反応におよぼす酸素添付の効果	
	英文	Effect of oxygen addition on plasma surface interaction	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	松浦寛人・大阪公立大学・研究推進機構・教授
		研究分担者	朝田良子・大阪公立大学・研究推進機構・助教 武村祐一朗・近畿大学・理工学部・准教授 (他大学院生 3 名)
		センター担当教員	豊田浩孝・プラズマ科学部門・教授
	英文	研究代表者	Hiroto Matsuura・OMU・Res. Prom. Org.・Professor
		研究分担者	Ryoko Asada・OMU・Res. Prom. Org.・Assist. Professor Yuichiro Takemura・Kindai・Sci.Eng.・Assoc. Professor (Other 3 graduate students)
		センター担当教員	Hiroataka Toyoda・Plasma Science Division・Professor
研究実績概要 (成果等)	アルゴンプラズマジェットに酸素ガスを添付する効果を調べた。PVA KI サンプルの呈色反応は照射時間とともに増大するが、このプロセスは酸素ガスの添付により促進されることが示された。また、プラズマジェットの熱流束は、ジェットの発光領域の下流まで分布していることが測定された。この熱流束も ROS の多寡を反映していると考えられ、酸素添付による増大が確かめられた。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)			

プラズマ界面反応におよぼす酸素添付の効果

Effect of oxygen addition on plasma surface interaction

松浦寛人・大阪公立大学・研究推進機構・教授

朝田良子・大阪公立大学・研究推進機構・助教

武村祐一朗・近畿大学・理工学部・准教授

豊田浩孝・名古屋大学・プラズマ科学部門

1. 研究目的

本研究は、大気圧プラズマの照射を受けた液体および固体での界面反応を引き起こす活性酸素ラジカル(ROS)の生成過程についての知見を得ることを目的とする。液体とプラズマの反応を利用したものは化学プローブとして、また固体との反応を利用したものは触媒プローブとして提案されている。大気圧プラズマによる ROS の生成量に影響を与える大きなファクターとして、放電ガスに添付する酸素量が挙げられる。従って、これらのプローブに付随する化学反応を検討しつつ、酸素ガスの混合量を変えた時に、計測される ROS の最適化を進め、界面反応についての新たな知見を得ることを目的とする。

2. 研究内容と成果

本研究では ROS の生成量を二つの方法で評価し、比較した。第一の方法は PVA-KI 化学プローブの呈色反応である。細胞の不活化実験等でよく利用される 96 ウェルプレートに PVA-KI 液を入れ、アルゴンプラズマジェットで 25 mm の間隔で照射した。右の写真に見られる様に、放電ガスに酸素を添付することにより呈色反応が促進されている。これは、プラズマジェット内での ROS の生成が増大したことを示していると考えられる。

第二の方法はジェットの熱流束分布の測定である。96 ウェルプレートの純水に 10 分間のプラズマ照射を行った。照射前後の小さな温度上昇から、水が受けた熱量、すなわちプラズマ熱流束を評価した。測定した領域ではいわゆるプラズマジェットの発光が認められ

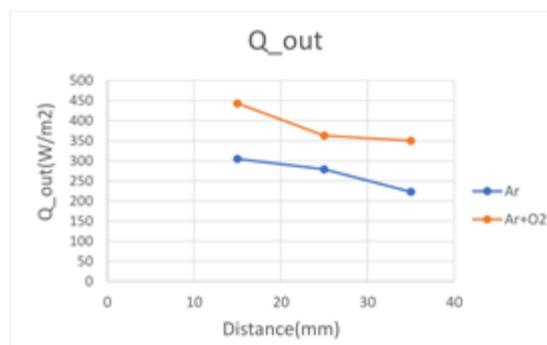
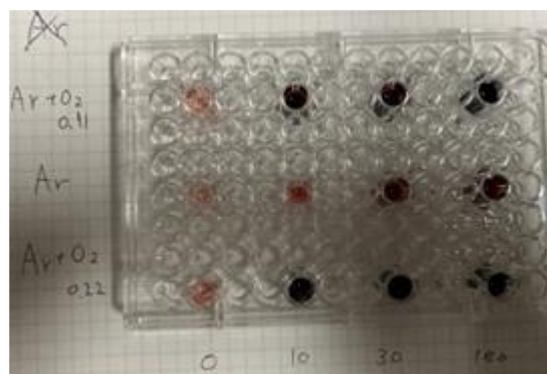


図 1 異なる酸素添付プラズマで照射された PVA-KI サンプルとプラズマジェット軸方向の熱流束分布。

ず。荷電粒子、特に電子がほとんど存在しないにもかかわらず、優位な熱流束が存在することがわかる。これは中性の粒子、例えば ROS によって運ばれていると考えると ROS 量の目安となる。そして、酸素を添付することにより増大することは、PVA-KI の結果と矛盾しない。今後、プラズマ電子と水分子が直接反応する界面反応が起こる場合にもこれらの測定を拡張することを計画している。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

・ T.N.Tran, M.Hu, T.Ogasawara, Y.Iwata, H.Suzuki, J.Sakamoto, M.Akiyoshi, H.Toyoda, H.Matsuura, “Polyvinyl alcohol-potassium iodide gel probe to monitor the distribution of reactive species generation around atmospheric-pressure plasma jet”, Plasma Science and Technology, Vol.25, 2023, (発行済)DOI 10.1088/2058-6272/ac9891.

<国際・国内会議> (11pt 明朝体, Times)

- ・ H.Matsuura, T.Nakano, Y.Okamoto, M.Hu, T.N.Tran, R.Asada, Y.Iwata, H.Suzuki, H.Toyoda, "Study on oxygen gas addition effect on radical production of argon atmospheric pressure plasma", 15th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, Gifu University, March 6, 2023.
- ・ 松浦寛人、トラントラングエン、岡本陽太、胡敏、仲野匠、岩田悠揮、鈴木陽香、豊田浩孝, “大気圧プラズマによるラジカル生成に及ぼす酸素ガス混合の効果”, 第 70 回応用物理学会春季学術講演会、上智大, 令和 5 年 3 月 15 日.
- ・ 仲野匠、胡敏、トラントラングエン、朝田良子、松浦寛人, “触媒金属が受けるプラズマ熱流束の増加現象を用いたラジカル密度測定”, 第 70 回応用物理学会春季学術講演会、上智大, 令和 5 年 3 月 15 日.
- ・ H.Matsuura, T.Nakano, "Consideration on heat generation by catalytic reaction of platinum plate", 25th International Symposium on Plasma Chemistry, Kyoto, May 26, 2023.
- ・ 関林、松浦寛人、仲野匠, “パルス電源を用いた気液界面放電の基礎特性”, 応用物理学会関西支部 2023 年度第 2 回講演会、関西学院, 令和 5 年 11 月 2 日.
- ・ H.Matsuura, T.Nakano, L.Guan, R.Asada, "Comparison of chemical probe reaction and biological effect of atmospheric pressure plasma jet under radical production promotion condition", 13th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering, Busan, November 7, 2023.
- ・ T.Nakano, H.Matsuura, M.Akiyoshi, R.Asada, "Study on Energy Carriers' contribution of Atmospheric Pressure Plasma Jet", 44th International Symposium on Dry Process, Nagoya, November 22, 2023.
- ・ 松浦寛人、中野匠、ブイスアンニャットソン、朝田良子, “プラズマ熱流束のエネルギーキャリアに関する再考察”, プラズマ・核融合学会第 40 回年会講演会、盛岡, 令和 5 年 11 月 27 日.

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 本岡 大社

所属機関・部局・職名： 名古屋大学大学院・医学系研究科・助教

連絡先 住所：〒 466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地

TEL：052-744-2087 FAX：052-744-2091

E-Mail：motooka@med.nagoya-u.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	(重点テーマ) ナノマテリアルのレドックス触媒作用と低温プラズマ照射がこれに及ぼす影響の評価		
	英文	Evaluation of Redox catalysis of nanomaterials and the effect of low-temperature plasma irradiation on it.		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	本岡大社 (名古屋大学大学院・医学系研究科・助教)	
		研究分担者	豊國伸哉 (名古屋大学大学院・医学系研究科・教授) 片渕充沙子 (名古屋大学大学院・医学系研究科・特別研究学生)	
		センター担当教員	田中宏昌教授・バイオシステム科学部門	
	英文	研究代表者	Motooka Yashiro, Assistant professor, Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine	
		研究分担者	Toyokuni Shinya, Professor, Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine Katabuchi Misako, graduate student, Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine	
		センター担当教員	Tanaka Hiromasa, Professor, Center for Low-temperature Plasma Sciences, Nagoya University	
研究実績概要 (成果等)	通電性の新規 2 次元カーボンナノマテリアルである X 存在下でプラズマ活性化リンゲル液 (PAL-X) を作成すると、過酸化酸素の産生効率が約 20% 上昇することを明らかにした。この一方 X は抗酸化作用も有することも見出し、さらに、PAL-X では活性酸素種の減衰速度が早く、通常の PAL よりむしろ緩徐に細胞傷害性を示すことを明らかにした。			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況)	特記事項なし。			

ナノマテリアルのレドックス触媒作用と 低温プラズマ照射がこれに及ぼす影響の評価

Evaluation of Redox catalysis of nanomaterials and
the effect of low-temperature plasma irradiation on it

本岡大社・名古屋大学大学院・医学系研究科・助教

豊國伸哉・名古屋大学大学院・医学系研究科・教授

片渕充沙子・名古屋大学大学院・医学系研究科・特別研究学生

田中宏昌・名古屋大学大学院・バイオシステム科学部門・教授

1. 研究目的

ナノマテリアルの中には活性酸素種の産生を表面で触媒するものが存在することが知られている。しかし、このナノマテリアルのレドックス触媒性を規定する因子は未だ明らかにされていない。活性酸素種は細胞死の誘導や殺菌などの作用を持つことから、レドックス触媒性をコントロールできればナノテクノロジーのさらなる発展に寄与すると考えられる。今回私たちは、カーボンナノチューブ、酸化グラフェン、マキシミンなどのカーボンナノマテリアルや、タルク、アスベストなどの珪酸塩鉱物由来のマテリアル、ポリスチレンやポリエチレン由来のマイクロプラスチックに関して、低温プラズマの照射がレドックス触媒性の規定因子になるかどうかを明らかにすることを目的として検討する。

2. 研究内容と成果

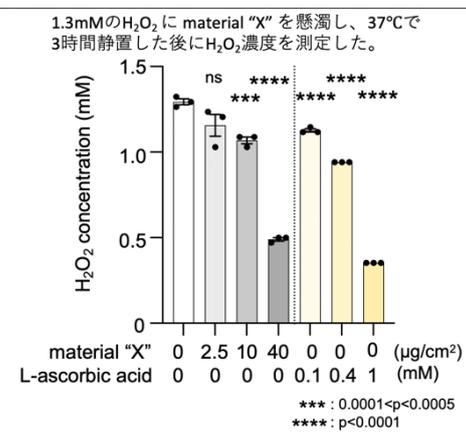
本研究の主たる発見として、特定のナノマテリアルを懸濁した状態で低温プラズマ照射による液体の活性化を行うと、 H_2O_2 の産生量が増加することを見出した。

以下に検討内容を列挙する。

いくつかのマテリアルを検討した結果、導電性をもつ新規 2 次元カーボンナノマテリアルである”X”が活性酸素種のスカベンジ効果を有することを見出した (図 1)。

次に低温プラズマ照射がそれぞれのマテリアルの性質に及ぼす影響について検討を試みた。個体 (粉体) への低温プラズマ照射ではマテリアルが飛散し再現性の高い実験が困難であったため、懸濁液への照射実験を進めた。この中で、導電性をもつ”X”を水や酢酸リング

図1: material "X" は抗酸化作用を示す。



ルなどに懸濁した際に、低温プラズマ照射による液中における H_2O_2 の産生効率が約 20% 向上することを見出した (図 2)。

さらに、このように”X”懸濁下で低温プラズマ照射によって活性化した酢酸リンゲル液 (PAL-X) について評価したところ、通常の低温プラズマ照射によって活性化した酢酸リンゲル液 (PAL) と同等の殺細胞効果が細胞実験で観察された。ただし、タイムラプス撮影で効果が現れるまでに要する時間を評価したところ、卵巣癌細胞株に対し PAL は 3-4 時間で効果を現わすのに対し、PAL-X は 4-6 時間で効果が現れた。PAL-X では PAL に比べて H_2O_2 の減衰が早いことを確認しており、PAL-X の効果出現の遅れは、PAL-X 作成後に残存した”X”の影響と考えている。

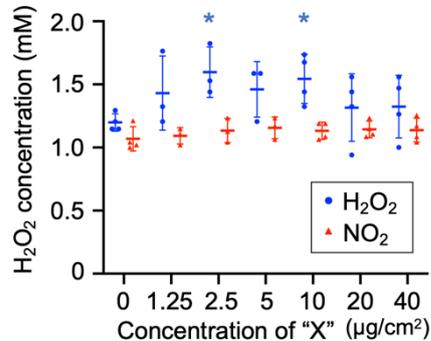
本検討では、material “X”を懸濁することでプラズマ照射による液体の活性化効率が上昇することを明らかにした。PAL 産生にかかるエネルギーを減らすことを目標として、本物質を PAL 産生系に組み込む方向で現在追加検討中である。

【研究成果の公表状況】

本研究の結果はまだ学会および論文で発表していません。

図2: material “X” を懸濁すると、PAL作成時の H_2O_2 の産生量が増加する。

material “X” を酢酸リンゲル液に懸濁し、Arガスの低温プラズマを5分間照射した後に H_2O_2 、 NO_2 を測定した。



2023 年度
名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：余語克紀
所属機関・部局・職名：名古屋大学医学系研究科総合保健学専攻・助教
連絡先 住所：〒461-8673 名古屋市東区大幸南 1-1-20
TEL：052-719-1103
E-Mail：yogo@met.nagoya-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	金ナノ粒子併用プラズマ治療に向けた DNA 損傷の増強効果の検証	
	英文	Study of DNA damages induced by plasma with gold nanoparticles	
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	余語克紀・名古屋大学・医学系研究科・総合保健学専攻・助教
		研究分担者	
		センター担当教員	田中宏昌・バイオシステム科学部門
	英文	研究代表者	Katsunori Yogo, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Assistant Professor
		研究分担者	
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka, Biosystem science division, Professor
研究実績概要 (成果等)	本申請では、DNA 指向性を持つ金ナノ粒子を開発し、プラズマ照射と金ナノ粒子の併用によって、プラズマ治療への効果増強が期待できないかと考えた。まず <i>in vitro</i> でプラズマ照射による DNA 損傷を定量的に明らかにし、金ナノ粒子併用での効果増強、もしくは保護効果を調べることを目的とする。今年度は、損傷評価に適したプラズマ照射 100 秒の範囲でデータをとった。データのバラつきは小さくなってきたが、金ナノ粒子併用による増強を示唆するデータは、まだ得られていない。今後、照射法の再現性を高め、実験回数を増やして、効果の増強があるか明らかにしたい。また金ナノ粒子表面の修飾分子の影響も調べたい。		
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	なし		

金ナノ粒子併用プラズマ治療に向けた DNA 損傷の増強効果の検証 Study of DNA damages induced by plasma with gold nanoparticles

余語克紀・名古屋大学・医学系研究科総合保健学専攻・助教
田中宏昌・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授

1. 研究目的

がん放射線治療の効果を高めるために、金ナノ粒子の併用が有望であるが、金ナノ粒子を大量に必要とする点が臨床応用に向け課題の一つである。放射線によるがん細胞の死滅は、活性酸素等による DNA 損傷が引き金になっていることが知られているため、金ナノ粒子にプラス電荷を修飾し、DNA 指向性を持つ金ナノ粒子を開発した。In vitro 実験で、放射線誘発 DNA 損傷に対するプラス金ナノ粒子の増強効果を調べたところ、従来から 200-1,000 倍薄い濃度で十分な DNA 損傷の増強効果（約 1.5 倍）を得られ、金ナノ粒子の用量を減らすための解決の糸口を得た。本申請では、同様の効果がプラズマ照射と金ナノ粒子の併用でも得られ、プラズマ治療への増強効果が期待できないかと考えた。まず in vitro でプラズマ照射による DNA 損傷を定量的に明らかにし、金ナノ粒子併用での効果増強を調べることを目的とする。

2. 研究内容と成果

【1. DNA 損傷と活性酸素種の生成の評価】

プラズマ照射によって DNA に生じる変化を調べた。鶴舞の先端医療・臨床研究支援センターにある JR 2200N mini (JANOME ; 通称"幅広") からの大気圧低温アルゴンプラズマを用いた。プラスチックチューブの蓋を容器として利用し、溶液 20 μ l を入れ、解放系として液面へプラズマを照射した。プラズマは、吹き出し口に直径~6mm 程度の絞りをつけて、容器サイズに合わせて照射した。

基質に超らせん状 (プラスミド) DNA を用いることで、DNA 切断を DNA 電気泳動法で高感度に検出した。DNA 2 本鎖切断は直線状、1 本鎖切断は開いた環状、切断なしは超らせん状 DNA のバンドとなり、照射前後の割合をとった。また金ナノ粒子のあり

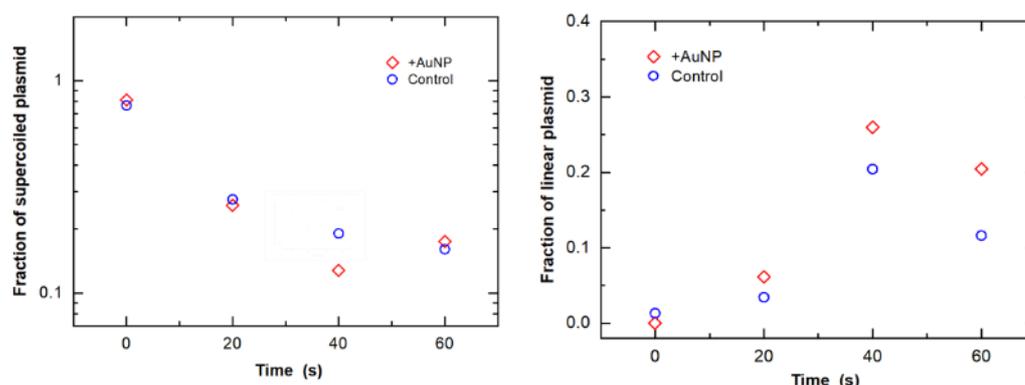


図 1. プラズマ誘発の DNA 損傷に対する金ナノ粒子の影響 (左;超らせん状 DNA の割合による一本鎖損傷の評価, 右;直線状 DNA の割合変化による二本鎖損傷の評価)

なしで、プラズマ誘発の DNA 損傷に変化がないか調べた。

前年度までの実験で、プラズマの照射時間にあたりをつけ、100 秒以内で照射時間をふればよいことが分かった。今年度は、この範囲で照射時間を均等に変えデータをとった。プラズマ誘発の DNA 損傷は、照射時間とともに増えた (図 1)。およそ照射 60 秒で、超らせん状 DNA (損傷なし) の割合が 0.1 (10%) に減り、この範囲で詳しくデータをとればよいことが分かった。プラズマの照射に慣れ、以前よりデータのバラつきは小さくなってきた。しかし、金ナノ粒子添加による DNA 損傷の増強については、現時点では、まだ有意差が見られていないと考えている。

特異的な蛍光試薬を用いて活性酸素種 (ROS) の生成を調べた。DNA 実験と同じプラズマ照射 10-100 秒のデータが不足していたため追加した (図 2)。照射およそ 60-80 秒で、ROS 蛍光試薬の輝度が最大になり、その後、100 秒では減少した。放射線照射で同様の実験を行っても、輝度 5 倍以上のところまで飽和は起きていないため、測定系の問題ではなく、プラズマ特有の現象ではないかと考えている。プラズマ誘発の ROS が溶液表面に生じることが関係しているのではないかと考えているが、輝度が一定値で飽和せず、100 秒で減少する原因はよく分かっていない。また DNA 標的型金ナノ粒子 (表面電荷プラス; アミノ基修飾) と一般的な金ナノ粒子 (表面電荷マイナス; 還元剤のクエン酸吸着による) の ROS 生成量を比較した。金ナノ粒子の添加によって、プラズマ誘発の ROS 生成量は減少し、プラス金ナノ粒子の方がより ROS 生成が減った。表面にあり、反応性の高いアミノ基が、ROS (ラジカル) 消去作用を示しているのではないかと考えられる。金ナノ粒子の表面修飾の違いにより、DNA 損傷に対しても同様の変化が見られるのか、確かめたい。引き続き、サンプル照射法の再現性を高め、実験回数を増やして、効果の増強、もしくは保護効果があるのか明らかにしたい。

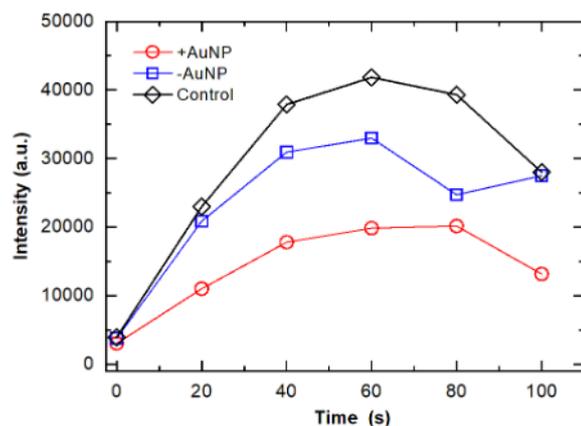


図 2. プラズマ照射による活性酸素種(ROS)生成に対する金ナノ粒子の影響

【2.ESR 測定 of 検討】

プラズマ誘発による ROS 生成を蛍光法で調べたが、蛍光色素は OH ラジカル以外にも反応する。データを相補するため、ESR 測定法での実験も始めた (協力; 近藤隆先生)。

【研究成果の公表状況】 なし

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 吉岡 泰

所属機関・部局・職名：名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

連絡先 住所：〒〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町名古屋大

TEL：052-789-2537

E-Mail：yoshioka.yasushi.k4@f.mail.nagoya-u.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	低温プラズマを利用した植物遺伝子改変方法の確立		
	英文	Application of low temperature plasma to improve genetic modification technology in plants		
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	吉岡 泰・名古屋大学・理学研究科・准教授	
		研究分担者	橋爪博司・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・特任講師 伊藤正樹・金沢大学・生命理工学類・教授 岩川秀和・金沢大学・生命理工学類・研究員 峯田敬斗・金沢大学・生命理工学類・博士後期1年	
		センター担当教員	橋爪博司・バイオシステム科学部門	
	英文	研究代表者	Yasushi Yoshioka, Grad Sch Sci, Nagoya Univ.	
		研究分担者	Hiroshi Hashizume, Cent Low-temp Plasma Sci, Nagoya Univ, Designated Lecturer Masaki Ito, Grad Sch Nat Sci Tech, Kanazawa Univ, Professor Hidekazu Iwakawa, Grad Sch Nat Sci Tech, Kanazawa Univ, Researcher Keito Mineta, Grad Sch Nat Sci Tech, Kanazawa Univ, Grad Student	
		センター担当教員	Hiroshi Hashizume	
研究実績概要 (成果等)	今年度、GFP タンパク質を付加した Cas9 タンパク質 (Cas9-GFP) を大腸菌で発現させて粗精製し、精製した Cas9-GFP が試験管内で Cas9 活性を持つことを確認した。さらに、精製した Cas9-GFP が He ガス低温プラズマを 75 秒間直接照射することによって、約 50%の効率でラン幼植物体 (プロトコーム) に取り込まれ、一部のプロトコーム細胞において Cas9-GFP は核に局在することを示した。また、He ガス低温プラズマを 10 秒間シロイヌナズナ芽生えに直接照射することによって、植物の成長に顕著な影響を与えることなしに子葉表皮細胞、胚軸表皮細胞に GFP タンパク質が導入されることを示した。			
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)	該当なし			

低温プラズマを利用した植物遺伝子改変方法の確立

Application of low temperature plasma to improve genetic modification technology in plants

研究代表者 吉岡 泰・名古屋大学・理学研究科・准教授
研究分担者 橋爪 博司・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・
特任講師
伊藤 正樹・金沢大学・生命理工学類・教授
岩川 秀和・金沢大学・生命理工学類・研究員
峯田 敬斗・金沢大学・生命理工学類・D1
研究所担当 橋爪 博司・名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・
特任講師

1. 研究目的

本研究の目的は商業価値の高い花卉であるコチョウランを材料として、低温プラズマ照射によってゲノム編集に必要なタンパク質と RNA 分子を細胞に導入し、遺伝子組み換え体の作出を必要としない遺伝子改変法を確立することである。さらに、低温プラズマ照射によるコチョウラン以外の植物へのタンパク質、RNA 分子の導入条件の確立によって汎用性のある技術の確立を目指す。

2. 研究内容と成果

今年度ゲノム編集に必要な Cas9 タンパク質の C 末端に GFP を融合した組換え Cas9-GFP 遺伝子を作製し、Cas9-GFP を可溶性タンパク質として粗精製し、試験管内で標的 DNA 配列を二本鎖切断する活性を持つことを確認した。精製した Cas9-GFP タンパク質を用い、低温プラズマ照射によるコチョウランの球状幼植物体（プロトコーム）への Cas9-GFP タンパク質の直接導入条件を検討した。He ガス低温プラズマを直接プロトコームに照射した後に Cas9-GFP 溶液をプロトコームに滴下する方法（直接照射法）、および、プロトコームを Cas9-GFP タンパク質溶液に浸した状態で He ガス低温プラズマを照射する方法（液中照射法）を試した。その結果、いずれにおいてもプロトコームに Cas9-GFP が導入されたが、直接照射法では $44\pm 5\%$ 、液中照射法では $21\pm 6\%$ のプロトコームに Cas9-GFP が導入され、Cas9-GFP のプロトコーム細胞への導入には直接照射法が適していると考えられた（図 1）。ゲノム編集を行うためには Cas9-GFP タンパク質が核局在することが必要であり、そのために Cas9-GFP タンパク質には核移行に必要なシグナル配列が付加されている。しかしながら、プロトコームに導入した Cas9-GFP において核移行が観察されたものはわずかであった（図 2）。そのため、今後 Cas9-GFP に付加する核移行シグナル配列の位置を検討する必要があることが示唆された。コチョウラン以外の植物にタンパク質を直接導入する条件を検討するために、シロイヌナズナ芽生えに He ガス低温プラズマを直接照射し、GFP タンパク質の導入条件を検討した。その結果、10 秒間の直接照射によって、植物の成長に顕著な影響を与えることなしに子葉表皮細胞、胚軸表皮細胞に GFP タンパク質が導入された。今後、Cas9-GFP を用いた導入条件の検討を行うと共に、シロイヌナズナ以外の植物を用いた条件検討が必要である。

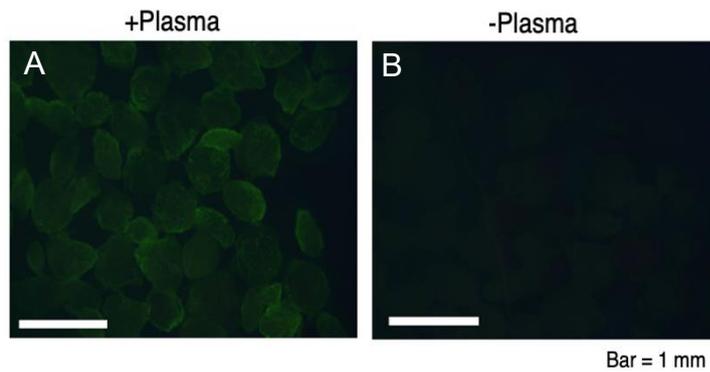


図1 低温プラズマ照射によるプロトコームへの Cas9-GFP タンパク質の導入

低温プラズマ照射によって GFP タンパク質を導入したプロトコームの GFP 蛍光画像。(A)He ガス低温プラズマを直接プロトコームに 75 秒間照射した後、Cas-GFP タンパク質を滴下し 1 時間後に観察した。(B)プラズマ照射を行わず Cas-GFP タンパク質を滴下したプロトコーム。44±5%のプロトコームで GFP 蛍光が観察された($n=3$)。

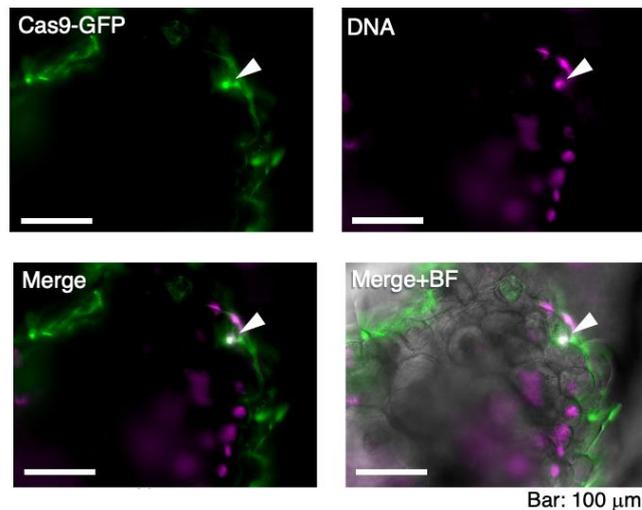


図2 Cas9-GFP の核移行

Cas9-GFP を導入したプロトコームの核 DNA を Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡を用いて GFP と DNA を同時観察した。DNA 蛍光はマゼンタの疑似カラーで示してある。矢じりは核局在した Cas9-GFP を示す。Merge は GFP と DNA 蛍光画像の重ね合わせ、Merge+BF は GFP、DNA 蛍光画像、明視野像の重ね合わせ画像。

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

該当なし

<国際・国内会議>

該当なし

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）： 吉野 雄太

所属機関・部局・職名： 岐阜薬科大学・薬学部・助教

連絡先 住所：〒501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4

TEL： 058-230-8100 (内線 3668)

E-Mail： yoshino-yu@gifu-pu.ac.jp

共同利用・共同研究課題	和文	(重点テーマ)大気圧低温プラズマ照射溶液の皮膚創傷治癒作用における miRNA の役割の解明		
	英文	Role of miRNAs in skin wound healing induced by plasma-activated solution		
研究チーム (氏名・所属機関・部局・職名)	和文	研究代表者	吉野 雄太・岐阜薬科大学・薬学部・助教	
		研究分担者	五十里 彰・岐阜薬科大学・薬学部・副学長 兼 教授 原 宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授	
		センター担当教員	田中 宏昌 教授・バイオシステム科学部門	
	英文	研究代表者	Yuta Yoshino, Gifu Pharmaceutical University, Assistant professor	
		研究分担者	Akira Ikari, Gifu Pharmaceutical University, Professor / Vice President Hirokazu Hara, Gifu Pharmaceutical University, Professor	
		センター担当教員	Hiromasa Tanaka, Nagoya University, Professor	
研究実績概要 (成果等)	大気圧低温プラズマ照射培地 (PAM) を処理した表皮細胞から分泌される Exosome において、表皮分化制御に重要な miRNA である has-miR-203a が有意に減少した。プラズマ適用による皮膚創傷治癒促進作用のメカニズムの一端として表皮細胞由来 Exosome 中の miRNA を介した表皮分化制御が寄与する可能性が示された。今後、異種細胞間情報伝達によるプラズマ適用による創傷治癒促進の機構解析するため、表皮由来 Exosome の皮膚線維芽細胞における作用を解析する予定である。			
特筆事項 (受賞、産業財産権出願取得状況等)				

大気圧低温プラズマ照射溶液の皮膚創傷治癒作用 における miRNA の役割の解明

Effect of plasma-activated solution on barrier function in keratinocyte.

研究代表者 吉野雄太・岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究分担者 五十里彰・岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究分担者 原宏和・岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究所担当教員 田中 宏昌・名古屋大学・バイオシステム科学部門・教授

1. 研究目的

分泌型細胞外小胞の一種である Exosome は miRNA、タンパク質、脂質を含んでおり、多様な細胞間コミュニケーションを仲介する重要な液性因子である。皮膚においても表皮細胞と真皮線維芽細胞との Exosome 由来 miRNA を介したシグナルが皮膚創傷治癒において重要であると報告されている。

大気圧低温プラズマ照射溶液 (PAM) は抗腫瘍効果を持つ (共同研究者の原ら) だけでなく、正常組織に対しても創傷治癒促進作用、pH 適正化作用、抗菌活性など有益な皮膚生理作用が知られている。しかし、Exosome 由来 miRNA を介した皮膚細胞間相互作用に及ぼす PAM の作用は不明である。

申請者はこれまでに、表皮細胞間バリア機能が PAM の処理により一過性に低下することを明らかにした (2022 年度採択課題 22026)。その際、PAM による細胞遊走促進作用を確認しているが、詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、ヒト皮膚細胞を用いて創傷治癒に重要な増殖能・遊走能に及ぼす主要な Exosome 由来 miRNA の発現を解析し、PAM による皮膚創傷治癒促進作用の制御機構を解明する。

2. 研究内容と成果

2-1. PAM 処理後の表皮細胞由来 Exosome 回収

検討にはヒト表皮由来 HaCaT 細胞を用いた。過去の検討において、PAM 濃度 30% は表皮細胞に細胞毒性を示さなかったため、PAM の処理濃度は 30% とした。細胞をコンフルエント状態まで培養し、PAM 30% 含有培地で 3 時間処理した。その後、無血清培地に交換して 24 時間培養し、培養上清を回収した。ExoIsolator Exosome Isolation Kit (Dojindo) を用いて、Exosome を回収した。

2-2. PAM 処理後の表皮細胞由来 Exosome 中の miRNA 発現量の解析

Exosome から、NucleoSpin® miRNA (マッハライ・ナーゲル) を用いて miRNA を含む RNA を抽出し、Mir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (クローンテック) を用いたりアルタイム PCR 法により各 miRNA の発現量を解析し。解析対象としては、PubMed に掲載されている文献情報に基づき表皮細胞機能と関連報告のある miRNA 31 種類を選定した。

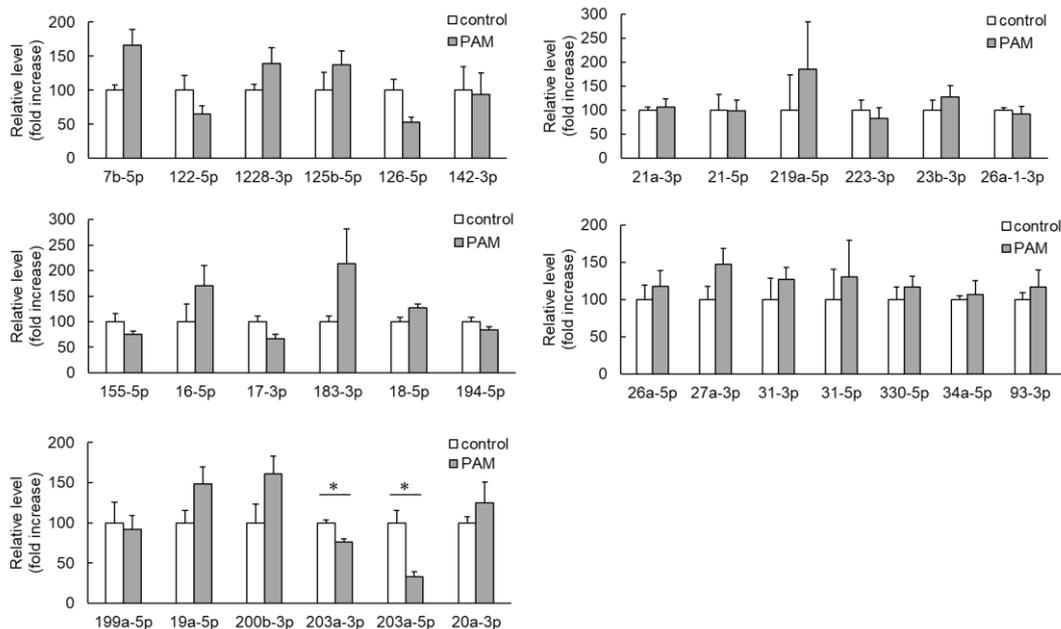


図1. PAM処理後細胞のExosome中に含まれる表皮関連miRNA発現量の解析

無処置細胞由来 Exosome と比較し、PAM 処置細胞由来 Exosome において表皮分化制御と関連が報告されている hsa-miR-203a 3p および 5p の発現量が有意に減少した (図 1)。過去の報告において、has-miR-203a はカルシウム依存性表皮分化誘導時に発現亢進し、表皮幹細胞性の転写因子 Δ Np63 の発現を抑制することが知られている (Ma et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2017)。本結果から、PAM 処理によって Exosome 中の hsa-miR-203a が減少することで、周囲の表皮細胞の増殖を促進し、損傷修復を促進させる可能性が示された。しかし、hsa-miR-203a がどの程度皮膚創傷治癒過程に寄与するのかは、未だ不明である。そのため、hsa-miR-203a の阻害剤を処理した場合の細胞増殖能・細胞遊走能などについて今後の詳細な解析が必要である。また、Exosome を介した細胞間伝達情報は同種細胞間だけでなく異種細胞間 (表皮角化細胞-メラノサイト、表皮角化細胞-真皮線維芽細胞など) において重要であるため、他細胞種に及ぼす影響の解析も必要である。

以上の結果から、PAM を処理した表皮細胞から分泌される Exosome において、表皮分化制御に重要な miRNA である has-miR-203a が有意に減少することが示された。プラズマ適用による皮膚創傷治癒促進作用のメカニズムの一端として表皮細胞由来 Exosome 中の miRNA を介した表皮分化制御が寄与する可能性が考えられる。

【研究成果の公表状況】

<国際・国内会議>

- 宮本知佳、吉野雄太、遠藤智史、田中宏昌、原宏和、五十里彰, 表皮角化細胞間バリア機能に対する大気圧低温プラズマ照射溶液の作用, 日本薬学会第 144 年会 (横浜) 2024 年 3 月 28 日~31 日 (発表予定)

2023 年度

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター共同利用・共同研究報告書

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター長 殿

申請者（研究代表者）：吉村信次

所属機関・部局・職名：核融合科学研究所・研究部・准教授

連絡先 住所：〒509-5292 岐阜県土岐市下石町 322-6

TEL：0572-58-2187

E-Mail：yoshimura.shinji@nifs.ac.jp

共同利用・共同 研究課題	和文	分裂酵母実験に用いるプラズマジェットの特性評価		
	英文	Characterization of a plasma jet used in fission yeast experiments		
研究チーム (氏名・所属 機関・部局・職 名)	和文	研究代表者	吉村信次・核融合科学研究所・ヘリカル研究部・准教授	
		研究分担者		
		センター担当教員	大野哲靖・プラズマ科学部門	
	英文	研究代表者	Shinji Yoshimura, National Institute for Fusion Science, Associate Professor	
		研究分担者		
		センター担当教員	Noriyasu Ohno, Plasma science division, Professor	
研究実績概要 (成果等)	分裂酵母への直接照射の影響を調べる実験に用いているプラズマジェットの特性を評価するために、分布反射型 (Distributed Bragg Reflector : DBR) レーザーを用いた準安定状態のヘリウム原子 H (2^3S_1) のレーザー吸収分光 (LAS) 計測系を構築した。初期データとして、放電電圧立ち上がり時にレーザー光のシャープな吸収と指数関数的な減衰が観測された。計測系を改良し S/N を向上させることで、プラズマルーム中のヘリウム準安定原子の空間分布測定やクエンチ機構の考察へとつなげたい。			
特筆事項 (受賞、産業財産 権出願取得状況 等)				

分裂酵母実験に用いるプラズマジェットの特性評価

Characterization of a plasma jet used in fission yeast experiments

吉村信次・核融合科学研究所・研究部・准教授

大野哲靖・名古屋大学・工学研究科・教授

1. 研究目的

プラズマバイオコンソーシアムと関連して核融合科学研究所と基礎生物学研究所との共同研究として実施している分裂酵母への常温プラズマジェットの直接照射実験において、プラズマに耐性をもつ変異体が特定され、次世代シーケンス解析によってその原因遺伝子が決定され始めている。この実験では、照射中の温度をその生物にとっての常温条件 (normothermic condition) に保つことが重要であるため、プラズマジェットへ供給するヘリウムガスをペルチェ素子によって冷却しているが、その特性評価は不十分であった。本共同研究では、昨年度の真空紫外吸収分光 (VUVAS) による基底状態の酸素原子 $O(^3P_j)$ 密度分布計測に引き続き、波長 1083nm の分布反射型 (Distributed Bragg Reflector : DBR) レーザーを用いた準安定状態のヘリウム原子 $H(2^3S_1)$ のレーザー吸収分光 (LAS) 計測系を構築することで、プラズマジェットの特性を評価する。

2. 研究内容と成果

本研究には、ペルチェ素子による導入ガス冷却部をもつ大気圧ヘリウムプラズマジェット装置 (S. Yoshimura, et al., Controlling feeding gas temperature of plasma jet with Peltier device for experiments with fission yeast, Jpn. J. Appl. Phys. 58, SEEG03 (2019).) を用いた。図 1 に LAS 計測系を示す。ヘリウム準安定原子の 2^3S-2^3P 遷移に対応する波長 1083.6 nm の DBR レーザーを光源として用いた。コリメーターレンズ通過後のレーザー光の強度は 50–100 mW 程度であった。吸収を観測するためにはレーザー強度を十分小さくする必要があるため、 $1/2$ 波長板と偏光ビームスプリッター (PBS) によってプラズマジェットのプルームを通過する方向のレーザー強度を調整し、さらに光学密度 (O.D.) 3.0 の ND フィルターで 10 μ W オーダーまで低下させた。Yb 帯域用反射ミラーによって、

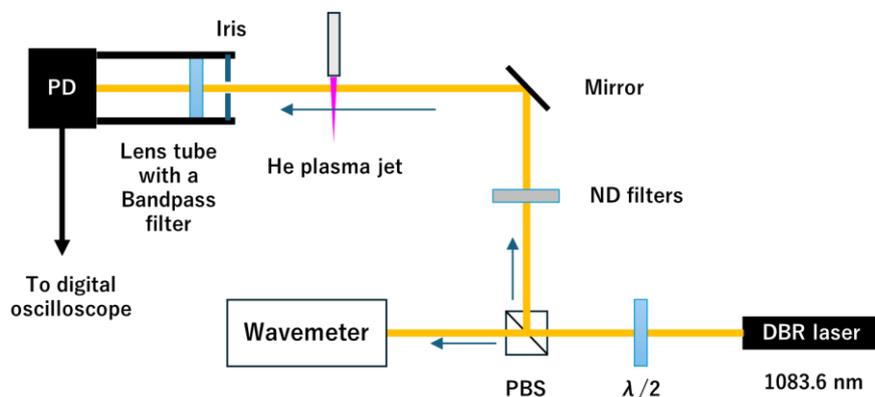


図 1 レーザー吸収分光 (LAS) 計測系の概略

プラズマジェットのノズル直下（約 2 mm）を通過したビームは、アイリスと中心波長 1070 nm、半値全幅 10 nm のバンドパスフィルター付きのレンズチューブを取り付けた増幅フォトディテクター（PDA50B2, Thorlabs）で検出される。

図 2 に初期実験の結果を示す。図 2 はデジタルオシロスコープ（T3DSO2304, TELEDYNE）を用いて 100 MS/s で取得したフォトディテクター（PD）出力（上）と高圧電源（LHV-10AC-24, ロジー電子）の放電電圧（下）である。放電電圧をトリガーとして 1024 回平均を行っている（赤色の実線は 50 点隣接平均によるスムージング）。電圧の立ち上がり時（横軸の時刻で 約 2 μ s）にシャープな吸収と指数関数的な減衰が観測されている。

現時点では S/N が低いため、吸収率や減衰率の詳細な評価は行っていないが、今後、迷光の除去や装置の改良によって S/N を向上させることで、プラズマプルームにおける準安定ヘリウム原子の空間分布およびクエンチ機構の考察につなげたいと考えている。準安定ヘリウム原子は、ヘリウム雰囲気中ではヘリウム中性原子との三体衝突によってクエンチされるが、大気中では窒素分子や酸素分子のペニング電離も重要な過程となると考えられる。昨年度、VUVAS によって計測したプラズマプルーム中の酸素原子の空間分布と準安定ヘリウム原子の空間分布を比較することで、何らかの相関が見つかれば興味深い。最終的には、レーザー波長を変化させながら吸収を計測することで、ドップラースペクトルの取得を目指している。そのためには、レーザー波長の校正やプラズマジェットの位置制御が必要となる。また、今年度はコリメートしたレーザー光を用いたが、レンズで絞ることにより詳細な空間分布の測定も行いたい。

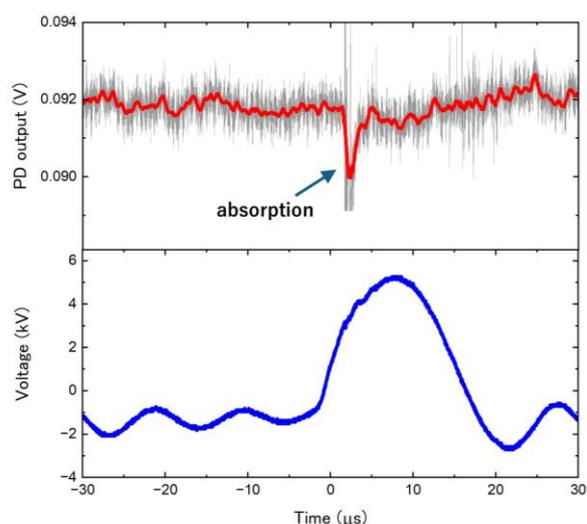


図 2 フォトディテクター信号の時間変化とプラズマジェットの放電電圧

【研究成果の公表状況】

<原著論文>

- Shinji Yoshimura, Yoko Otsubo, Akira Yamashita, Katsuki Johzuka, Takayoshi Tsutsumi, Kenji Ishikawa, and Masaru Hori, Development of an experimental system for cell viability assays of yeasts using gas-temperature controllable plasma jets, Japanese Journal of Applied Physics **62**, SL1011 (2023).

<国際・国内会議> (11pt 明朝体, Times)

該当なし