

プロジェクトレビュー

プラズマ-バイオ融合科学への新展開

Toward New Developments of Plasma-Bio Interdisciplinary Science

1. はじめに

島山力三, 永津雅章¹⁾東北大学大学院工学研究科, ¹⁾静岡大学創造科学技術大学院

(原稿受付日: 2011年5月30日)

近年注目されている医療-バイオ分野の研究に携わる本学会会員と、他学会所属（電気学会あるいは応用物理学会など）の研究者が交流を図るとともに、当該分野における先進的な研究を推進し、我が国におけるプラズマ-バイオ融合科学の新学術領域創成に資することを目的として、2008年に「プラズマ-バイオ融合科学への新展開」が、プラズマ・核融合学会専門委員会として発足した〔主査：島山力三(東北大)、幹事：永津雅章(静岡大)、同：金子俊郎(東北大)、同補佐：荻野明久(静岡大)、委員：18名〕。

本専門委員会での予想される効果として、以下の3点が挙げられる。(a)これまで個別に行われてきた医療分野へのプラズマ応用、あるいはバイオプロセスへのプラズマ応用に関する研究を体系的に推進し、国際的に評価される研究成果の発信 (b) 科学研究費補助金などの外部資金獲得に向けた取り組み (c) プラズマ-バイオ融合科学の研究推進によって生み出される産業イノベーション創出 (図1を参照のこと)。

主な活動実績を以下に簡潔に纏める。

- (1) 2009 (平成21) 年9月に開催された電気学会研究会に本専門委員会が協賛として参加した。他にも機械学会が協賛として参画があり、プラズマ-バイオ融合科学の重要な基盤となるテーマ、“液中・界面プラズマの科学と応用”に関する研究会が活発に行われた。
- (2) 2009 (平成21) 年12月のプラズマ・核融合学会第26回年会において、“プラズマ-バイオ融合科学への新展開”と題してシンポジウムを開催した。約100名の参加者があり、本研究活動について紹介を行うとともに学会会員との総合討論を通して活動の広報に努めた。なお、プログラムは、はじめに〔永津(静岡大)〕、ソフトなバイオ界面の特異な性質と新機能創成〔前田(理研)〕、ナノバイオ・医療におけるプラズマ技術の展開

〔一木(東大)〕、液中気泡内プラズマによる殺菌および有機フッ素化合物分解〔安岡(東工大)：電気学会〕、プラズマナノバイオエレクトロニクス研究の最新動向〔島山(東北大)〕、Plasma Medicineの国際ネットワーク〔浜口(大阪大)〕、総合討論〔白谷(九大)、寺嶋(東大)〕、まとめ〔金子(東北大)〕の構成であった。

- (3) 2010 (平成22) 年2月に本専門委員会と東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会との合同研究会として、“プラズマナノバイオエレクトロニクスの基礎研究およびプラズマ-バイオ融合科学への新展開 (第2回専門委員会)”を開催した。プログラムは、LB膜味覚センサの研究/大気圧プラズマ源を用いた生体組織・細胞の活性化〔秋谷・平田(東京都市大)〕、カーボンナノチューブの電子準位と複合機能〔中嶋(九大)〕、カーボンエレクトロニクスをめざしたカーボンナノチューブとグラフェンの成長制御〔吾郷(九大)〕、ナノホーンのDDS応用可能性〔湯田坂(産総研)〕、マイルドなプラズマを用いた血液止血器具の開発をめざしておよびプラズマ凝固装置を用いた内視鏡治療の現状について〔榊田・池原・丹羽(産総研・和歌山県立医科大)〕、DLCプラズマコーティング技術の生体医療機器への応用〔中谷・新田・岡本(トーヨーエイテック株)〕、プラズマ化学修飾を用いた医療用材料の低温プロセス〔荻野・野口・永津(静岡大)〕、液相プラズマ利用DNA-CNT電子デバイスの形成と電気特性制御〔金子・李・島山(東北大)〕、DNAの高次構造転移：荷電によるナノ構造制御〔吉川(京大)〕、分子生物学におけるプラズマの応用-プラズマを用いた分子導入方法の確立〔佐藤(BBKバイオ株)〕、バイオパーティクルの迅速計数とプラズマによるウイルス不活化メカニズム〔水野(豊橋技科大)〕の構成であった。

1. Introduction

HATAKEYAMA Rikizo and NAGATSU Masaaki

authors' e-mail: hatake@ecei.tohoku.ac.jp, tmnagat@ipc.shizuoka.ac.jp

- (4) 上記合同研究会に引き続き、若手研究者を中心とした“プラズマ・バイオ研究の将来戦略”と題してパネルディスカッションを開催し、若手研究者の育成に注力した。
- (5) 本専門委員会のメンバーにより申請した平成21年度科研費・新学術領域研究「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」[代表者：白谷（九大）]が採択された。また、平成23年度同新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」[代表：堀（名大）]および特別推進研究「内包ナノカーボン基盤プラズマナノバイオトロンクス」[代表：畠山（東北大）]を申請した。さらに、本専門委員会の発展的継承の平成23年度プラズマ・核融合学会専門委員会「プラズマ科学の医療応用」[主査：浜口（阪大）]が採択・発足され、活動を開始した。

以上の経過を踏まえて、本プロジェクトレビューでは、以下の5つの課題に焦点を絞って論じ、本専門委員会の纏めとする。まず第一は、生体高分子電解質であるDNAを例にとり、そのソフトな界面が示すユニークな基礎的現象とバイオセンシングおよびロジックゲートへの応用に関する“生体高分子ソフトインターフェースの科学”である[前田

瑞夫（理研）]。第二は、近年世界的に、急激な広がりで見られているプラズマ医療分野の中で、実験データの集積が主で踏み込んだ内容の研究例が少ない段階にある、“プラズマ医療におけるプラズマ生体相互作用”分野の最近の動向についてである[浜口智志（阪大）]。第三は、先進的液相および気液界面プラズマを利用する新機能性ナノカーボン—DNA—ナノ粒子ネットワークのバイオ・医療・デバイス応用をめざした、“プラズマナノバイオトロンクス研究の最新動向”に関してである[金子俊郎・畠山力三（東北大）]。第四は、バイオエレクトロニクス立場からパルス電界による、生体一次作用、細胞内ストレス反応、細胞活性化、がん治療、創傷治療などに関する最新の研究を紹介する、“パルス高電界の生体作用と先端医療応用”である[勝木淳（熊本大）他]。第五は、プラズマによる滅菌、表面化学修飾、ヘパリン固定化など非熱平衡プラズマのバイオ・医療分野への応用に関する最近の研究動向を紹介する、“バイオ・医療分野におけるプラズマ科学技術の展開”についてである[永津雅章・荻野明久（静岡大）]。

本プロジェクトレビューが学会員皆様の当該課題に対する理解と日頃の研究活動の一助になれば、非常に幸いである。

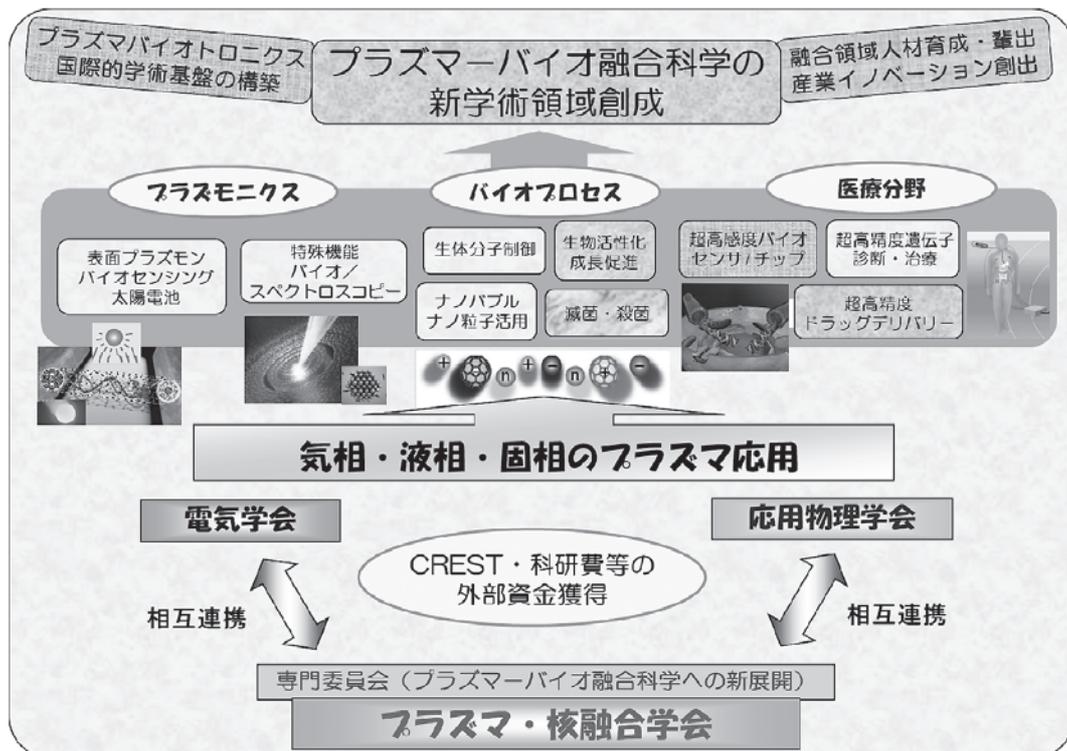


図1 プラズマバイオ融合科学創成に関する活動と波及効果の概略。



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

2. 生体高分子ソフトインターフェースの科学

前田 瑞夫

独立行政法人 理化学研究所

(原稿受付：2011年6月6日)

Keywords:

soft-interface, polyelectrolyte, biopolymer, DNA, aptamer, ion sensor, molecular sensor, gene sensor, logic gate

2.1 ソフトインターフェースとは

タンパク質・核酸・多糖類などの生体高分子、液晶や両親媒性分子の集合体、コロイドなど、大きな内部自由度を特徴とする有機物質を総称してソフトマターという。外部からの刺激により構造や性質が大きく変化する、いわゆるソフトな性質がその大きな特徴である。これらソフトマターと呼ばれる分子群がつくる界面は、一般の二相間に見られる"sharp"な境界面ではなく、むしろ三次元的に厚みのある"diffuse"した空間領域を形成することが多い。このような界面を de Gennes はソフトインターフェースと名付けた[1]。

すなわち「ソフトな界面」とは、二相間の「境界面 (interface)」ではなく、もちろん固体の表面 (surface) でもなく、むしろ二相のあいだに存在する新たな領域であって、「界面域」ないし「界面圏」とでも表現されるべき「境界相 (inter-phase)」である。ソフトな界面の構成因子としては、ソフトマターそのものに加え、溶媒分子や共存塩類をも含めて考えなければならない。すなわちこの領域においては、高分子鎖が厚み方向の組成の揺らぎを伴い活発に分子運動を示す相として存在する。このような相はしかしバルクとも性質が大きく異なるものである。ソフトインターフェースは、疎水性効果、クーロン力、エントロピー、浸透圧などが関与する特異な場であり、バルクとは異なるエネルギー状態と分子運動状態を示す。

特にソフトマターと水との界面においては、この三次元的空間領域内に溶媒分子、基質分子、イオンなどが介在しており、これら分子やイオンなどの相互作用を通じて構造や物性が動的に変化する点が重要である。ソフトインターフェースは様々な物質により形成される。その多くは人工または天然の高分子電解質であるが、中性・無荷電の水溶性高分子も同じく重要であるし、自己組織化単分子膜 (Self Assembled Monolayer: SAM) のような分子集合体もこの範疇に入れることができよう。

2.2 ソフト界面における不思議な現象

ナノテクノロジーは、表面・界面という古くからある未解明の研究課題に新たな光を当てた。de Gennes が予言したとおり、特に原子間力顕微鏡に代表されるようなナノ計測技術の飛躍的な進展は表面を直接観察することを可能とし、これがさらにバイオサイエンスの分野にも波及してきている。加えてバイオセンシングの観点からも、表面や界面の精密計測ならびにナノ構造制御において近年著しい進歩が見られている。

しかし、抗体や遺伝子などのバイオ素子を基板表面上に固定すると、その活性・特異性が著しく低下してしまうのが一般的であった。そこで筆者らはバイオ素子を固体に直接結合させるのではなく、水に溶存する高分子を介してこれを行うことの重要性を指摘し「バイオコンジュゲート材料」に関する研究プロジェクトを、振興調整費 (01-03年度先導的研究の推進) の助成により進めてきた。ここで、高分子の構造を精密に制御し、その親水性・疎水性や荷電のバランス・密度などを変化させたところ従来の知識では理解できない、いくつかの新奇な界面現象に遭遇したのである。

たとえばソフト界面での分子認識において、以下のような異常現象が見出されている。DNA 固定化ナノ粒子を研究していた筆者らは、二重鎖 DNA を表層に密生させたナノ粒子のコロイド安定性が、DNA 自由末端側の塩基対構造に明敏に応答するという奇妙な現象に遭遇した。図1に示すとおり、自由末端にミスマッチ (一塩基変異) が存在すると、完全相補 (フルマッチ) の場合と比べて、高イオン強度における安定性が著しく増大するのである[2]。これについては後で詳しく述べるが、DNA 密生相とバルクの界面における分子構造のわずかな変化が、マクロでダイナミックな現象に増幅されたことを意味している。この DNA ナノ粒子が示す新奇現象を用いた一塩基多型診断の原理は、高い信頼性を有するとして国内外で注目を集めている。しかし分子レベルでの機構は未解明のままである。界面における分子鎖状態の解明が待たれている。

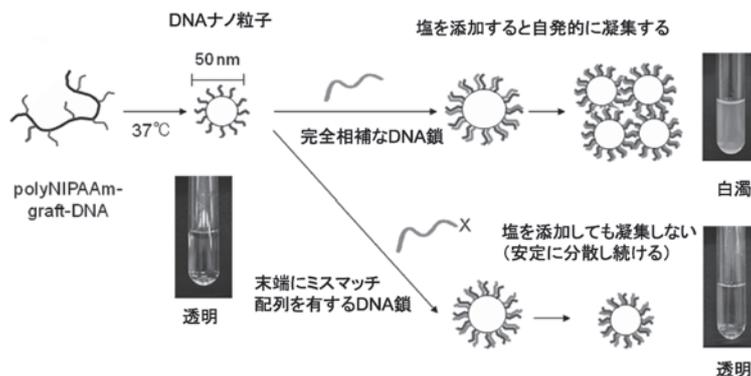


図1 自己組織化による DNA ナノ粒子の形成とその塩基配列特異的非架橋凝集現象.

一方、筑波大・長崎幸夫らは、抗体と水溶性高分子（ポリエチレングリコール：PEG）が密に配置された表面を構築する過程において、抗体の活性が PEG の共固定によって増強され、これまでにない高い感度を有する抗体基板が調製できることを見出した[3]。この「界面増強酵素免疫法（Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay: ELISA）」とも言うべき新奇現象の分子機構はまだ明らかでないが、PEG が抗体タンパク質の立体構造を安定化している可能性があり、今後のソフトインターフェースの特性解析研究に興味もたれる。

このような背景から、文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究（領域提案型）に応募するに至った。08年度に発足した本領域では、生体分子を含む界面構成因子を動的・空間的に捉えるソフトインターフェースの分子科学という新しい視点から、精密な界面制御技術や三次元的な界面評価技術を開発し、界面が関与する新奇現象・物性を見出しつつ新たな分子認識デバイス開発を進めることを目的として、異なる学問分野の研究者が参画し、新たな融合学術領域の創成をめざしている。

2.3 DNA がつくる界面

DNA はヌクレオチド単量体が縮合してできた重合体であり、それぞれのヌクレオチドはリン酸化された五炭糖に、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) とチミン (T) の 4 種類の塩基のいずれかが結合したものである。すなわち DNA はリン酸基に負電荷を有する高分子電解質である。DNA は二本のポリヌクレオチド鎖が互いに巻き付いて二重らせんを形成する。

前述したとおり、この DNA が作り出すソフトなインターフェースは大変にユニークな性質を持っている [2]。改めて図 1 をご覧いただきたい。一本鎖 DNA を表層に密生させた高分子ミセル (DNA 担持ナノ粒子) は高塩濃度下においても、水中に安定に分散しており透明である。ところが、粒子上の一本鎖 DNA (プローブ DNA) に対し完全に相補な DNA を作用させ二重鎖を形成させると、ある塩濃度条件以上においてはコロイド安定性が低下し直ちに凝集してしまう。この凝集は、あとから加えた DNA による粒子間架橋によるものではなく、自発的粒子凝集によるものであり、非架橋型凝集と呼んでいる。

さらに興味深いのは、そのコロイド安定性が二重鎖 DNA の自由末端の塩基対構造に明敏に反応する点である。自由末端の塩基にミスマッチ (変異) が存在すると、1 M を超える高塩濃度下でも安定に分散したままである。ここで重要なのは、変異型 DNA も同様に二重鎖を形成しているにもかかわらず、完全相補のときと異なり粒子が安定に分散しているということである。すなわち DNA 密生層が示す物性の変化がコロイド安定性という尺度に変換される点が最大の特徴である。また古典的な架橋型粒子凝集反応 [4] が反応に数時間を要することに比べ、数分以内という極めて短時間に粒子凝集が平衡に達することから [2, 5], 簡便かつ迅速な新しい一塩基多型 (SNPs) 解析法の原理として期待されている。

DNA 担持ナノ粒子が示す特異な界面現象は、疎水核として図 1 に示したポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (polyNIPAAm) のほか、図 2 に示すように金ナノ粒子についても同様に観察される。polyNIPAAm は下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature: LCST) を示す代表的な高分子であり、LCST 以上で疎水性を示す。プローブ DNA をグラフトした polyNIPAAm 共重合体の場合、LCST 以上では polyNIPAAm セグメントが脱水和により凝集し、疎水核となる。その表層に DNA が密生したミセル構造が形成されていると考えられる。このミセル分散液は透明であるのに対し、ナノ粒子上のプローブ DNA に完

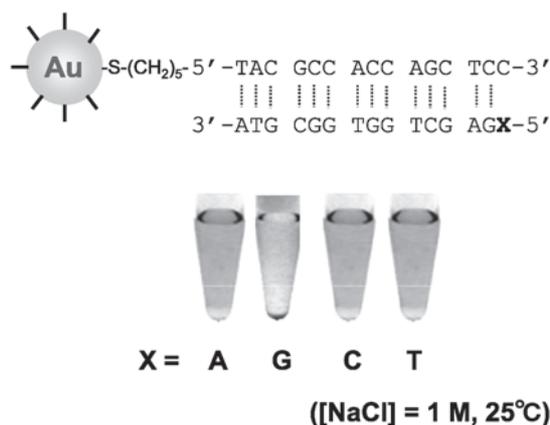


図2 DNA 修飾金ナノ粒子の塩基配列特異非架橋的凝集現象 (末端が相補的な塩基対 (X=G) のときのみ青色に変化)。

全に相補的な DNA が系中に存在すると粒子の凝集が進行し、溶液が白濁する[6]。金ナノ粒子の場合、片末端をチオール化したプローブ DNA を用いて粒子表面に固定化する。金ナノ粒子が水に分散していると、系はプラズモン共鳴によるきれいな赤色を呈するが、プローブと相補的な DNA の添加により二重鎖が形成されると自発的な粒子の凝集に伴って青色に変化する[5]。

疎水核の材質が何であれ、DNA 担持ナノ粒子による遺伝子診断では末端に変異部位を持つてくるのが一つの鍵となる。これに関して佐藤らは、一塩基プライマー伸長法と組み合わせた DNA 担持ナノ粒子による一塩基多型診断法を報告した[7]。一塩基変異が認められる遺伝子領域の増幅反応産物において一塩基伸長反応を行い、これをサンプル DNA として、金ナノ粒子に固定化したプローブ DNA と完全相補であれば粒子の自発凝集を起し、変異があれば分散したままとなることが示された。

DNA 担持ナノ粒子の非架橋型凝集は、相補的かつ鎖長が同じであれば、切れ目の入った二重鎖構造においても生じる。Tang らは 9 量体 DNA をグラフトさせた PNIPAAm を用いて、長鎖 DNA (39 量体) の一塩基変異が識別可能であることを報告している[8]。39 量体のサンプル DNA が相補鎖 (正常型) である場合、粒子表面に固定化されている 9 量体 DNA、プローブ DNA (10 量体) および補助 DNA (20 量体) はいずれもサンプル DNA と二重鎖を形成する。結果として粒子の自発凝集が起きる。一方でサンプル DNA 鎖中央部 (検出サイト) を一塩基置換した場合は、プローブ DNA との二重鎖形成に至らず安定に分散したままとなる。

2.4 DNA 修飾ナノ粒子の凝集機構

粒子表面で DNA が完全二重鎖を形成すると粒子の分散安定性が低下する原因については今もって、明快な説明はできていない。いくつか仮説が考えられている。考える要素として、静電反発と DNA 鎖によるエントロピー反発がある。前者は二重鎖形成に伴う静電反発の減少である。一本鎖 DNA が二重鎖を形成すると、リン酸基間距離が短縮されて粒子表面の負電荷密度は上昇する。しかしながら、これを打ち消すように系中の金属イオンとリン酸基とのイオン対形成が促進するといわれており、結果的に二重鎖の方が一本鎖よりも電氣的に中和される。したがって、塩に対する分散安定性が低下するということである。後者すなわちエントロピー反発は、二重鎖形成に伴う DNA 鎖の剛直化に起因する効果である。二重鎖がとりうるコンフォメーションの自由度が低下するため、反発力が薄れるのではないかと考えている。しかし、静電反発とエントロピー反発の寄与を明確に区別して議論することは容易ではないように思われる。

末端の一塩基だけの変異導入でなぜ粒子安定性に違いが出るのかについても、その機構はよくわかっていない。一塩基分だけ一本鎖状態であると考えた場合、やはり静電反発と立体反発力のような相互作用が存在するのではないかと推察される。これに関連して佐藤らは、DNA 担持ナノ粒

子を利用した遺伝子診断マイクロチップの開発研究において、示唆に富む結果を報告している[9]。完全相補の二本鎖 DNA 担持金ナノ粒子は、金平板上に固定化された二本鎖 DNA が完全相補である場合にその上に吸着する。この現象を利用し、塩基対配列の違いによる粒子の吸着傾向を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) イメージング法により調べたところ、最も強い吸着はもちろん相補的な末端間で観測されたが、ミスマッチ末端間においてもプリン塩基 (A, G) を含む場合、弱いながら、ある程度の相互作用があることが認められている。この結果は、二重鎖末端間で何らかの相互作用が働くことを示唆する。一方でこれら応答が出たミスマッチは非ワトソン・クリック型の塩基対をある程度の安定性を持って形成することのできるペアであり、自由度減少の寄与も同様に考えられる。今後その検証を様々な手法を用いて行なっていく必要があるだろう。

2.5 DNA ナノ粒子を用いるバイオセンシング

重金属イオンのなかで水銀 (II) イオン (Hg^{2+}) は、DNA 二重鎖中のチミン-チミン (T-T) ミスマッチペア部に取り込まれ、T- Hg^{2+} -T ペアを形成することが知られている。金山らは最近、末端近傍に T-T ミスマッチペアを有する DNA 二重鎖を担持したナノ粒子分散液が、高塩濃度条件下で安定に分散するのに対し、 Hg^{2+} 共存下でのみ分散安定性が大きく低下することを見出した[10]。これは、T-T ミスマッチ部位に Hg^{2+} を取り込んだ DNA 二重鎖が、完全相補 DNA 二重鎖と共通した振る舞いを粒子上で示すことを意味しており、DNA ナノ粒子の水銀イオン検出への応用可能性を示唆するだけでなく、前節まで紹介してきた DNA ナノ粒子の特異的凝集現象がどのようなメカニズムで誘起されるのかという問題に対し、大きなヒントを示してくれているようにも思える。

上述の DNA 密生層が示す現象を活用すれば、DNA 担持ナノ粒子は遺伝子診断のみならず、簡便で迅速なバイオセンサーとしての展開が可能である。その一例として機能性核酸と呼ばれる DNA アプタマーを活用した標的分子の比色検査法への展開がある[11]。DNA アプタマーとは、ある特定の分子などを特異的に認識することが可能な一本鎖 DNA のことである。ここでは、アデノシン 5' -三リン酸 (ATP) を特異的に認識する 25 量体 DNA を利用して ATP センサー開発を試みている。PNIPAAm 鎖にグラフトさせた 11 量体 DNA と 14 量体の補助 DNA が DNA アプタマーと相補的であるシステムの場合では、系中に ATP が存在すると二重鎖形成には至らず、粒子が分散したままとなる。ATP 以外のヌクレオチド三リン酸 (グアノシン 5' -三リン酸 (GTP), シチジン 5' -三リン酸 (CTP), ウリジン 5' -三リン酸 (UTP)) を添加したコントロール実験では、アプタマーはグラフトされた DNA と補助 DNA とで安定な二重鎖を形成し、ある塩濃度以上で粒子凝集を生じて系が白濁する。一方、ATP が存在した場合に系が白濁するようにシステムを構築する方法も提案している。これは ATP が存在していれば、DNA アプタマーがこれと複合体をつくるの

に対し、11量体の補助 DNA が PNIPAAm 鎖にグラフトされた DNA と完全二重鎖を形成するように設計し、粒子凝集を促すものである。宮本らはこれで 0.25 mM の ATP の存在を目視検出することが可能だと報告している。

小川らはアプタザイムを利用して、DNA ナノ粒子のバイオセンシングへの適用を報告している [12]。アプタザイムとは特定の分子などに応答して自己切断反応を引き起こす機能性核酸のことである。すなわちアロステリック・リボザイムである。標的分子が存在するとアプタザイムの自己切断が起こり、その結果生じた切断片 (RNA) が金ナノ粒子表面に固定化された DNA とハイブリダイズすることで、可視検出可能な粒子凝集を引き起こすという仕組みである。その具体例を図 3 に示す。化学物質テオフィリン (T) に対するアプタザイムを例に示している。T が存在するとアプタザイムに構造変化が起こり、分子内の特定場所で切断反応が進行する。切断して生じる RNA 鎖は共存する DNA 固定化ナノ粒子に結合し、その非架橋凝集を引き起こすため、これを色変化として検出することが可能となる。すなわちテオフィリン (T) の検出が可能となる。少量の切断 RNA によって粒子凝集が引き起こされることから、他のアプタザイムに依存したセンサーシステムと比較して検出感度が高いという特色がある。

2.6 ロジックゲート

小川らはまた、アプタザイムと DNA ナノ粒子の組み合わせにより、分子レベルの論理ゲート設計に成功している [13]。ここでは先の図 3 が論理ゲートの基本単位 (YES ゲート) となる。これを二つ組み合わせて OR ゲートとしたのが図 4 である。ここでは T に対するアプタザイムに加

えて、環状 GMP (G) に対するアプタザイムを用意する。いずれも自己切断によって生じる RNA 断片の配列は同じにしておく。用意する DNA ナノ粒子は、この RNA 断片に回答する配列とする。この組み合わせにより、T にも G にも回答する、すなわち OR ゲートが構築される。

AND ゲートも同様に構築することができる。しかし、その設計には DNA ナノ粒子の非架橋凝集原理に依拠した

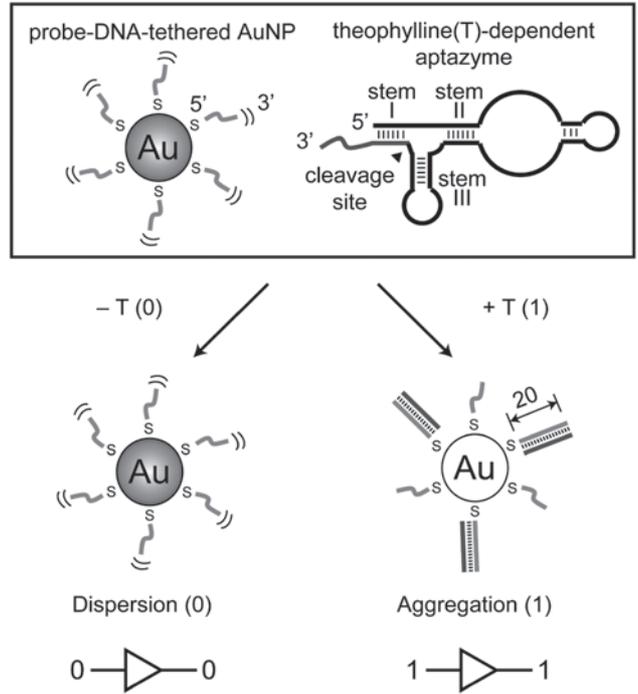


図 3 アプタザイムを用いる薬剤センサの原理 (YES 型論理ゲート)。

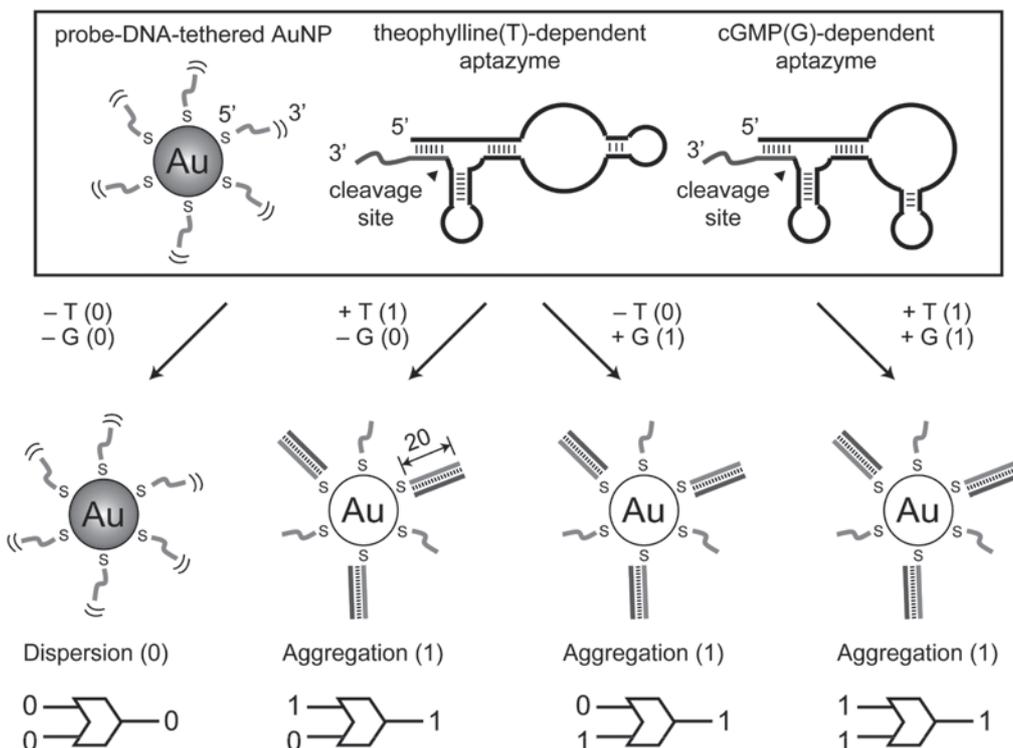


図 4 アプタザイムと DNA ナノ粒子の非架橋凝集を利用した OR 型論理ゲート。

ちょっとしたアイデアが使われる。すなわちここで用意する二つのアプタザイムは、やはり T と G に対するものであるが、前者では切り離される RNA 配列が30塩基としてある。したがって T 存在下で切断反応が起きても、金ナノ粒子上では一本鎖部分がはみ出すことになる (16塩基分)。したがって凝集に伴う色変化は見られない。一方、G に対するアプタザイムは、このはみでた16塩基の部分に結合するような RNA が切り出されるように設計しておく。これにより、T と G の両方が存在して初めて、図 5 に示すように完全な二重らせんが粒子上に形成されることになる。つまり AND 応答が得られるという仕組みである。

2.7 おわりに

ここでは主に、生体高分子電解質である DNA を例にとり、そのソフトな界面が示すユニークな現象を解説した。そのなかで、界面の分子鎖密度を制御しその物性や機能を詳細に解析していくと、新しく有用な現象が次々と発見されることを示した。生体高分子のような動的な性質をもつソフトマターが主役となる場、すなわち生体高分子ソフトインターフェースでは、生体高分子の電解質としての性質、ならびにイオン・水分子との関わりが複雑に絡み合いながら界面としての機能を発現しており、まだまだチャレンジングな課題が数多く残されているように感じられる。異分野からの協力も含めた基礎科学的研究をこれまで以上

に強力に推進する必要がある。

参考文献

- [1] P.G.de Gennes, *Soft Interfaces: The 1994 Dirac Memorial Lecture* (Cambridge University Press, 1997).
- [2] M. Maeda, *Polym. J.* **38**, 1099 (2006).
- [3] Y. Nagasaki, H. Kobayashi, Y. Katsuyama, T. Jomura and T. Sakura, *J. Coll. Inter. Sci.* **309**, 524 (2007).
- [4] N.L. Rosi and C.A. Mirkin, *Chem. Rev.* **105**, 1547 (2005).
- [5] K. Sato, K. Hosokawa and M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8102 (2003).
- [6] T. Mori and M. Maeda, *Polym. J.* **34**, 624 (2002).
- [7] K. Sato, H. Hosokawa and M. Maeda, *Nucleic Acids Res.* **33**, e4(2005).
- [8] Z. Tang, T. Takarada, Y. Sato and M. Maeda, *Chem. Lett.* **33**, 1602(2004).
- [9] Y. Sato, K. Hosokawa and M. Maeda, *Colloids Surf. B* **62**, 71 (2008).
- [10] N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Chem. Commun.* **47**, 2077 (2011).
- [11] D. Miyamoto, Z. Tang, T. Takarada and M. Maeda, *Chem. Comm.* 4743 (2007).
- [12] A. Ogawa and M. Maeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6517 (2008).
- [13] A. Ogawa and M. Maeda, *Chem. Commun.* 4666 (2009).

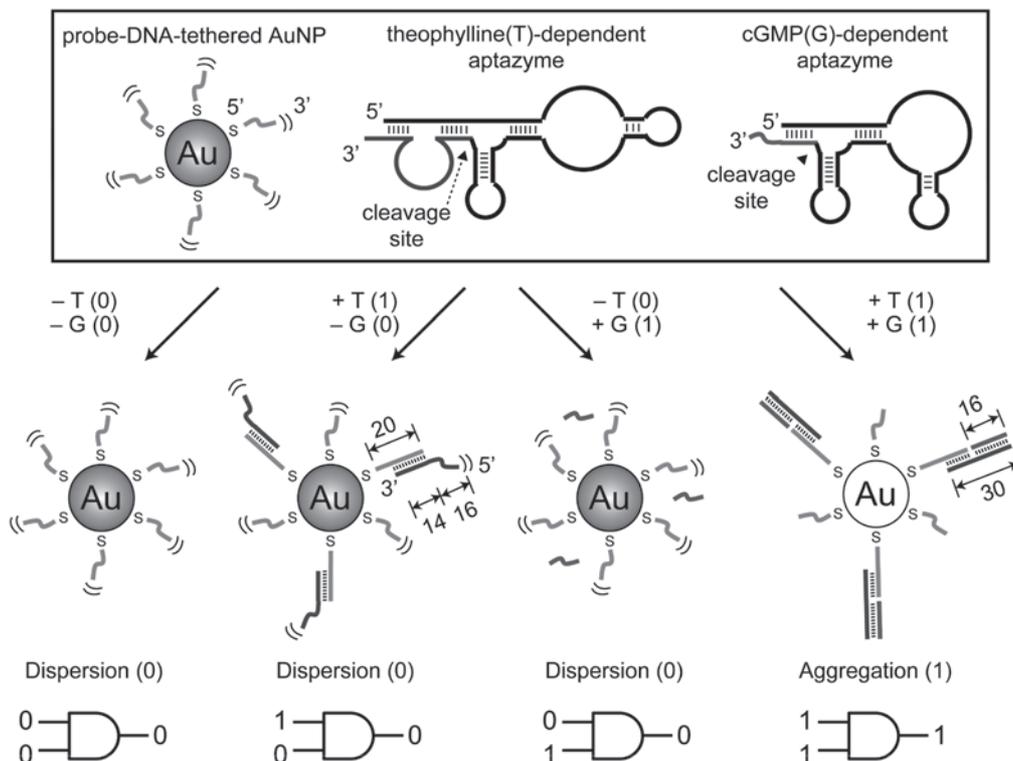


図 5 アプタザイムと DNA ナノ粒子の非架橋凝集を利用した AND 型論理ゲート。



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

3. プラズマ医療におけるプラズマ生体相互作用

浜口智志

大阪大学大学院工学研究科

(原稿受付：2011年5月16日)

Keywords:

atmospheric-pressure plasma, plasma medicine, plasma-tissue interaction, free radicals, argon plasma coagulation, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), hydroxyapatite

3.1 はじめに

半導体超微細加工や機能性薄膜堆積等の材料プロセスにプラズマ技術は欠くことのできないものであることは広く知られている。今日も、半導体素子の更なる微細化や新しいエレクトロニクス材料の導入に伴う新プロセスの開発等、様々な需要に応えるため、プラズマプロセス技術は日々進歩を遂げている。プラズマプロセスの対象となる被処理材は、半導体チップをはじめとする電子デバイス用の材料がよく知られているが、近年、医療に関与する被処理材に対するプラズマ処理への関心が高まっている。医療分野の被処理材として、無機材料や人工的に合成された高分子材料(有機ポリマー)等ばかりでなく、生物・生体組織そのものを対象にすることもある。プラズマ技術の応用の主目的が、病気や怪我等の治療、あるいはその支援に用いられる場合は、この技術はプラズマ医療と呼ばれる。

プラズマ医療研究は、最近の研究動向を見ると、大きく分けて、次の三分野に分けられる。第一の分野は、プラズマを用いた医療材料の表面改質・表面処理であり、この分野の研究は、長い歴史をもつ[1-4]。例えば、医学・生物学分野の研究で広く使われるシャーレ(ペトリ皿)の多くは、酸素プラズマ処理されて表面の親水性が高められており、また、金属製人工関節の表面にハイドロキシアパタイトを溶射で接着する場合にも、熱プラズマが用いられる。近年も、細胞培養支持体材料としてのポリマーの、プラズマによる成膜・表面改質、あるいは、高分子以外の材料(ガラス、セラミックス等)の細胞培養担体のプラズマによる微細形状制御などの研究が精力的に進められている。

第二の分野は、プラズマによる滅菌技術であり、この研究も長い歴史がある[5,6]。プラズマ滅菌は、医療分野だけに限らず、より一般的な衛生管理の分野で、既に実用化されている。しかしながら、プラズマ処理による滅菌の機構がいまだに十分に理解されておらず、また、芽胞形成菌など、プラズマで処理されにくい細菌も存在し、さらには、細菌ばかりでなく、ウイルス[7]やプリオンなどの不活性

化も衛生管理の観点から重要であり、今後も更なる技術開発が求められる。

第三の分野として挙げられるのは、プラズマによる生体組織の直接的な処理をめざした医療応用である。既に医療の現場では、アルゴンプラズマ凝固(APC)法[6-8]と呼ばれるプラズマを使う治療法が導入されており、日本では特に、アレルギー性鼻炎や花粉症の治療としてAPC法による下鼻甲粘膜炎焼灼術や、また、消化器外科手術において、消化器内視鏡下のAPC装置による切開剥離法等が広く実践されている。これらは、基本的にプラズマの熱を使って組織を焼灼するものであり、特に後者の例を安全に施術するには、外科医に極めて高度な技術が要求されることが知られている。しかしながら、近年、このようなプラズマの熱的な作用を使うのではなく、低温大気圧プラズマ(気体の温度が室温に近い大気圧プラズマ)によっても、止血、血管新生、臓器癒着防止、細胞増殖等、様々な「治療効果」が得られる可能性の高いことが知られてきた。これらは、プラズマによって生成されたフリーラジカル等の反応活性種が生体と相互作用する結果得られるものであると広く考えられているが、その詳細は、いまだよく知られておらず、今後の研究の進展が期待される。また、狭い意味では、この第三の分野のみを「プラズマ医療」と呼ぶこともある。

本章では、この第三の分野の、狭い意味での「プラズマ医療」におけるプラズマと生体の相互作用について、現在知られている知見を簡単にまとめる。プラズマが生体に与える影響の源としては、プラズマの発生する熱、イオンの加速による物理的衝撃(気相から被処理材への運動量とエネルギーの輸送)、ラジカル、励起原子・分子、電子、光(特に紫外線)等による(運動量輸送はほとんど伴わない)エネルギー輸送が考えられる。プラズマのもつこれらの作用の中で、どの作用が生体にもっとも大きな影響を与えるかは、用いるプラズマの性質に依存する。本章は、この中で、主として、ラジカル等の反応活性種の作用に注目して、議論を進める。

「プラズマ医療」におけるプラズマと生体の相互作用の研究を一つの研究分野として見ると、この分野は、基本的には、知られていないことが極めて多く、学問としてはほとんど確立していないといっている状況にある。いまこの研究の最前線で行われていることの多くは、現象データの集積、つまり、プロセスレシピ（プロセス条件）とプロセス結果の関連付けを、生物学的・医学的对象について行うことであり、一方、観測データの機構解明までにつながる研究はまだ少ない。この状況は、ちょうど1970年代に、プラズマプロセスが半導体プロセスに導入され始めたころに似ているかもしれない。当時、プラズマと物質の相互作用の機構がよく分からないままに、半導体プロセスの需要と研究者の勘と経験に頼って、多くの種類のプラズマ、放電条件、ガス種などが、網羅的に調べられた。その後の半導体市場の爆発的な拡大とともに、マイクロデバイス用のプラズマプロセスの研究は1980年代以降、急速に発展し、学問領域として確立していった。もちろん、プラズマ医療の研究が、今後、それと同様な発展の歴史をたどるかどうかはわからない。ただ、プラズマと生体との相互作用に関連して最近知られてきた様々な実験事実は、プラズマがなぜ生体にそのような作用を起こすのか、素朴な好奇心を刺激するものが多い。長年、生体に対する様々な物理的刺激を研究してきた生物・医学研究分野の専門家にとっても、プラズマによる生体への刺激は、その機構が自明でないものが多いようである。この意味だけでも、プラズマ医療の研究を深めることは学術的に意義深いものであると筆者は考えている。

3.2 アルゴンプラズマ凝固（APC）装置

まず、本稿で主として対象とする低温プラズマの議論をする前に、現在の医療現場で既に実用化されているアルゴンプラズマ凝固（APC）装置について簡単に紹介する[8-11]。この装置は、図1にあるように、アルゴン気体を流し込み、アルゴン雰囲気中の金属電極に交流電圧を印加して、プラズマを発生させ、その熱で組織を焼灼するもので

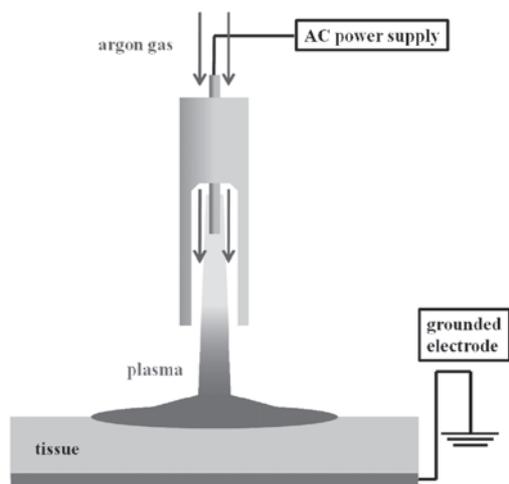


図1 APC装置の概念図。電源は、通常、数百kHz、100W程度の交流電源を用い、生体組織を通して電流が流れる。アルゴンを放電ガスとして用いる[8-11]。

ある。通常印加電圧用の電源として、周波数は数百kHz程度、入力パワーは100W程度のものを用いる。焼灼により組織表面が破壊されるので、APC装置は、組織の切断や腫瘍の破壊に用いる。一方、APC装置により破壊された組織が凝固することを利用して、止血等にも利用される。APC装置による組織の切断、破壊、凝固作用は、いずれも、即効性が高いのが特徴である。APC法の場合は、電気メス・高周波メスなどと異なり、患部に装置（電極部等）を直接接触させずに使用するため、非接触型の医療機器である。しかし、電極と組織との距離の微妙な違いによって、組織がプラズマから受ける熱量が大きく異なるため、まれに、手術中にあやまって健全な器官を穿孔して、大きな合併症を引き起こすこともある。このため、APC装置を外科手術で用いる際には、極めて熟練した技術が必要とされている。こうした背景から、現在、日本ではAPC装置の活用は、その使用を安全に行うことが確実にできる特定の疾患への活用にはほぼ限られている。また、熱を用いて組織を凝固する代替治療法として、上述の、電気メスや、レーザー治療、マイクロ波治療などがある。

3.3 低温大気圧プラズマ装置

上述したように、プラズマを用いた医療機器は、既に実際の医療現場に入っている。しかし、近年、プラズマ医療として注目を集めている装置は、APC装置のように、プラズマの熱的性質を活用したものではなく、むしろ、その熱的要素を取り除いたプラズマ装置である[12,13]。ここでは、図2に低周波プラズマジェットとプラズマ針、および、平板型誘電体バリア放電（DBD）と呼ばれている3種類のプラズマ発生装置の概要を示す。

図2(a)に示す「低周波プラズマジェット」装置は、通常ヘリウムまたはアルゴンを放電気体として用い、印加電圧の周波数は数十kHz程度の低周波、印加電圧は10kV程度以下を用いる。この装置は、プラズマペンシルと呼ばれることもある[14,15]。図2(b)に示す「プラズマ針」装置[10,16,17]は、構造的には図1に示すAPCに似ているが、通常、内部電極が針のように細い。また、APCとの大きな違いは、電源として、十数MHz程度の高周波（RF波）で低電力（数W程度以下）の電源を用いるため、プラズマが内部導体（針）の先端部にコロナ状に生成される。入力パワーをあげ、被処理物に近づけると、被処理物との間にグロー放電のような放電を生成する。図2(c)に示すのは、平行平板型の「DBD放電」装置である。通常、大気圧において、数十kVの高圧パルス電圧を電極間に印加すると、電極間の距離が1mm程度の場合、電極間にグロー放電のような放電が観測される。接地（グラウンド）電極のないものは、浮遊電極（FE）DBD装置と呼ばれることもある[18]。

いずれのプラズマ装置も、大気圧で放電する装置であり、気体の温度が室温程度と低いのが特徴である。また、いずれの放電も、電子の中性粒子（原子・分子）に対する衝突周波数が高いため、電子温度も比較的低温で、数eV程度であると予想される[19]。一方、イオンの温度は、一般に、気体とほぼ同じ室温であると考えられている。低周波

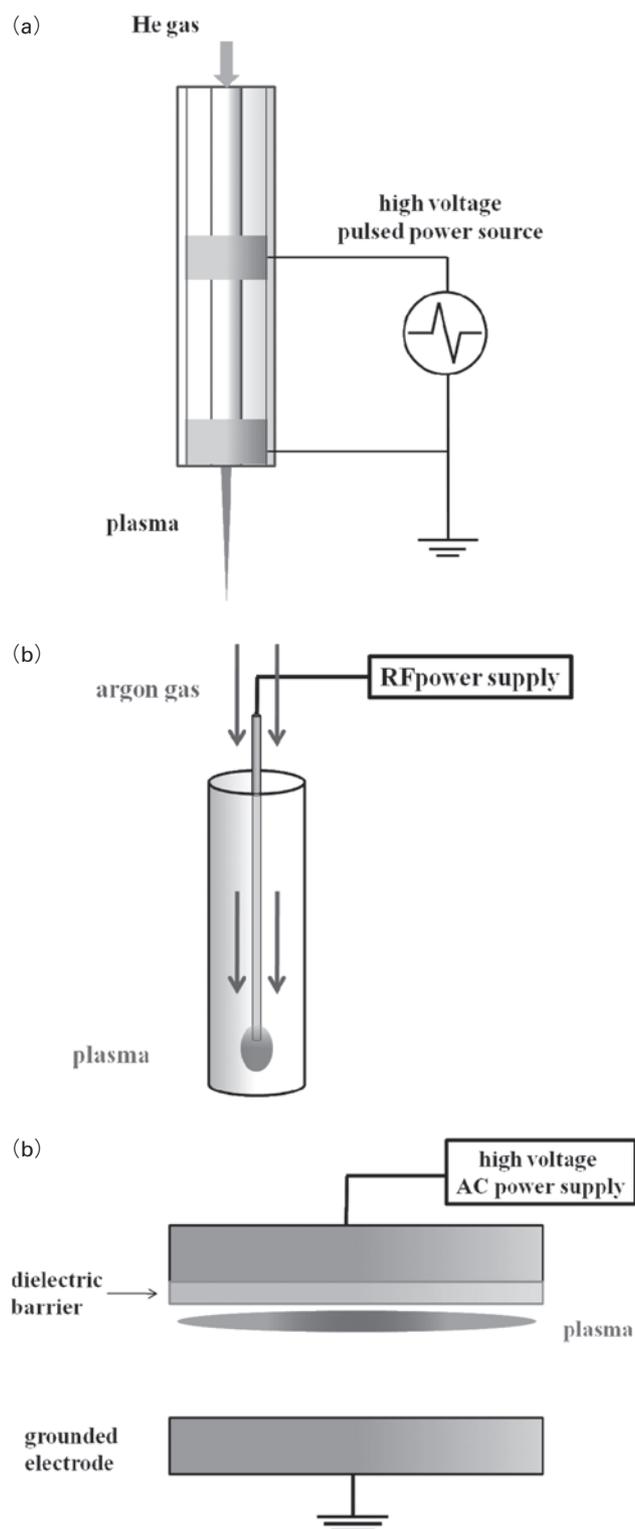


図2 低温大気圧プラズマ生成装置の例。(a)低周波プラズマジェット装置[14,15]. (b)プラズマ針[10,16,17]. (c)平板型DBD装置[19].

プラズマジェット装置(a)とDBD装置(c)の気体温度が低いのは、放電している時間が極めて短く(通常数十ナノ秒程度)、放電周期が長い(0.05-1ミリ秒程度の間隔)ことにより、気体が加熱されて温度が上がる前に放電が消えて、気体の冷却が十分に起こるためである。一方、プラズマ針(b)では、放電に用いる電力は通常低く、数W以下ではあ

るが、MHz程度の高周波(RF波)の電源を用いるため、放電は連続的に起こる。しかし、それでも、気体温度が低いのは、プラズマが小さく、高速で流れる気体を十分に加熱できないためである。また、イオンへのエネルギー移行についていえば、特に、DBD装置(c)の場合、印加電圧に数十kV以上の高電圧を用いることも多いため、その場合、イオンと中性粒子(原子・分子等)間の衝突周波数は確かに高いが、それでも、電圧印加時にイオンは数十eV程度に加速され得る。

また、いずれの装置も、大量の励起原子・分子やラジカルを生成し、それらの内、寿命の長いものは、気体流の流れて、被処理材(例えば、生体組織)まで到達する。例えば、励起原子一つでも、生体組織に接して基底状態に落ちるとき、組織表面に数eVのエネルギーを付与する可能性があるため、そのエネルギー付与が、生体組織表面で、何らかの化学反応を引き起こすことは十分に考えられる。このような低温大気圧プラズマでは、荷電粒子密度は中性粒子密度よりはるかに低い。そのため、たとえ、イオンが数十eVの運動エネルギーをもつほどまでに加速されていても、反応活性種が表面と接触する際に表面に供給するエネルギー総量は、イオンが表面と衝突して表面に供給するエネルギー総量と同程度、あるいは、それ以上に高い可能性もある。

3.4 気相中のラジカル生成

前節で示したような大気中の放電によって生成されるイオンやラジカル種・励起種の種類は極めて多く、また、それらの密度計測も、一部の粒子種をのぞいて容易ではないため、放電条件と生成されるイオン・ラジカル・励起種の種類と量等については、一般に、詳しいことは知られていない。特に、医療応用の観点からいうと、生物的作用が強いと考えられる粒子種 $^1\text{O}_2$ (一重項酸素)、 O_3 (オゾン)、OH(水酸基ラジカル/ヒドロキシラジカル)、 O_2^- (スーパーオキシド)、 HO_2 (ヒドロペルオキシラジカル)、 H_2O_2 (過酸化水素)、NO(一酸化窒素)、 NO_2 (二酸化窒素)等が、プラズマ生成により、気相中でどのくらいの量生成されるかがが興味の対象となる。このうち、水素を含むものは、当然、空気中の水分がその生成元となる。このため、プラズマによる各種の反応種を系統的に調べるためには、空気の成分である窒素・酸素およびプラズマ生成用気体(ヘリウムやアルゴン等)ばかりでなく、空気中に存在する水の電離・励起・解離・結合等を調べる必要がある。このような系では、生成される粒子種、およびそれらをつなぐ化学反応式は膨大な数となり、計算に必要な反応係数も知られていないものが多い。

しかしながら、いくつかの計算・計測例は知られている。1970年代からオゾン生成のための大気圧放電の研究は盛んに行われ、例えば、空気中の大気圧放電のゼロ次元モデル計算結果は、[20,21]などに挙げられている。最近では、プラズマ針および低周波プラズマジェットHeと N_2 の系[22,23]の2次元流体計算、また、水の影響を考慮した計算では、Heと H_2O の系のゼロ次元シミュレーション

[24]などが知られている。特に、HeとH₂Oの系のプラズマのゼロ次元シミュレーション[24]では、生物学的活性の高いOHやH₂O₂が高い密度で生成されることが示されている。また、このモデルでは、H₂Oのクラスター生成もモデル化しており、多くのイオンが水分子のクラスター（クラスターイオン）となっていることがシミュレーションで示されている。また、HeとH₂O系プラズマにおけるイオンに関しては、実験的に、その存在比も詳しく調べられており、正負いずれの極性においても、水分子のクラスターイオンが多数存在することが確認されている[25]。

3.5 液相中のラジカル生成

生体組織は、皮膚のように表面が乾燥しているものがある一方、傷などによって露出した皮下組織のように、血液等の体液に覆われているものもある。培養細胞に対するプラズマ照射の実験を行う場合も、細胞は通常培養液に覆われている。そのため、前節で述べた、プラズマによって生成された気相中の活性種は、生体組織に直接接触する前に、しばしば、生体組織を取り囲む液体に取り込まれる。

前節で、気相中の活性種について、まだ十分な知見が得られていないことを述べたが、気相中の活性種が液体に取り込まれる際にどのように変化するか、および、取り込まれた活性種は、液体中でどのような活性種として存在するか等については、さらに、知られていない。放射線化学の分野で、液中の活性種については、既に多くの知見が得られているので、今後のプラズマ液体相互作用に関する研究では、放射線化学の分野の知見が活用できるかもしれない。例えば、水溶液中の電子の周りには水分子が集まり（水和）、水のクラスターを形成している（水和電子クラスター）ことが知られている。同様に、水溶液中では、正負のイオンも水和していると考えられるため、気相中の水のクラスターイオンは、クラスターのまま、水溶液中に取り込まれる可能性もある。水溶液以外の溶媒でも、電子や正負イオンは、溶媒和を形成している可能性が高く、また、水溶液中の反応を通して、他の活性種に変化する。また、水溶液中の活性種の種類と濃度は、当然、溶媒のpH（水素イオンH⁺濃度）にも大きく依存する場合があります。そのため、反応活性種を含む溶液の生物学的作用は、pHによって大きく異なる場合がある[26]。

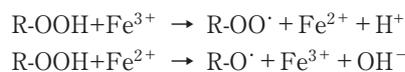
さて、仮に溶液中に存在する反応活性種がすべてわかったとしても、それら活性種と生体の相互作用について、まだ知られていないことが極めて多い。そのため、活性種の物理的的同定や解析ができただけでは、プラズマの医療的効果はまだわかったことにはならない。

例えば、最近NOの生理的効果が、医学界でかなりの注目を集めている[27, 28]。それ以外にも、生体との相互作用が強い酸素および酸素を含む化合物として、先に述べた、¹O₂、O₃、OH、O₂⁻、HO₂、H₂O₂、NO、NO₂等があるが、これらを総称して、活性酸素（ROS）という。特に、一酸化窒素NOとスーパーオキシドO₂⁻の反応から生成されるONOO⁻（ペルオキシナイトライト）、さらに、それから派生するONOOH（HNO₃、過酸化亜硝酸）、N₂O₃（三酸化二

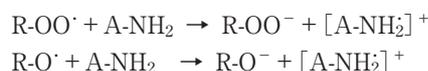
窒素）等Nを含む活性の高い化学種は活性窒素（RNS）と呼ばれる。NO₂などは、ROSともRNSとも呼ばれるので、通常は、これらをまとめて、ROS/RNSと書く。大気圧プラズマを水溶液の近くで発生させると、大気中で生成された電子、イオン、活性種が水溶液に溶け込み、これらROS/RNSが水溶液中に生成されると考えられる。

生きた細胞などは通常、細胞が生きていくのに十分な養分を含んだ溶液の中に存在している。このような水溶液には、タンパク質をはじめとする多種の化学種が溶質として混合しているため、仮にプラズマから非常に活性の高いROS/RNSがその水溶液中に供給されたとしても、これらの溶質と即座に反応して、ROS/RNSが細胞表面に届かない可能性もある。比較的活性が弱く、すなわち、溶液中での寿命が長く、しかも、細胞等の生体に何らかの作用を行うROS/RNSが、プラズマ医療の観点からは重要になる。

このような長寿命のROS/RNSを各活性種ごとに個別に、しかも、簡便に計測する技術は現在のところ存在しない。しかしながら、医療の分野では、既に臨床でも活用されているd-ROMs（derivatives of reactive oxygen metabolites）テストという、溶液中のROS量を評価する方法が知られている[29]。この方法を用いると、ROSの一種であるヒドロペルオキシドR-OOH（Rは炭化水素基）が含まれていると考えられる水溶液に、牛の血清等を混ぜ、血清中の鉄イオンとの反応（フェントン反応）



を利用して、さらに



の発色反応を利用して、この発色（赤色）を吸光計測して、R-OOHの存在量を評価することが可能となる。ここで、A-NH₂は、N,Nジエチルパラフェニレンジアミンと呼ばれる物質である。このテストでは、RがすべてHであった場合の発色を基準として、R-OOHの量を推定しているだけで、実際のR-OOHの量はわからない。ただ、この計測値が上昇することで、溶液中のR-OOHの量が増加することはわかる。

図3は、図2(a)のプラズマジェット装置で、細胞培養用液体培地DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）にプラズマを一定時間照射したときのd-ROMsテストの結果を示す[30]。プラズマジェット装置は、図3(a)にあるように、100 μlのDMEMの水面へプラズマ（発光部分）の端が接するように、DMEMを入れたマイクロプレートの最表面から4 mm離れた位置にプラズマ装置の射出口が来る位置で固定した。このテストでは、培地内に生成されたラジカル計測装置として、FREE（WISMALL社）を用いた。計測では、牛胎児血清（FBS）を60%混ぜたDMEMにプラズマを一定時間照射し、計測に必要なサンプル液20 μlをとり、酸性緩衝液と混合し、呈色液クロモゲン入りキューベットに移したあと遠心分離を1分行い、その後、吸

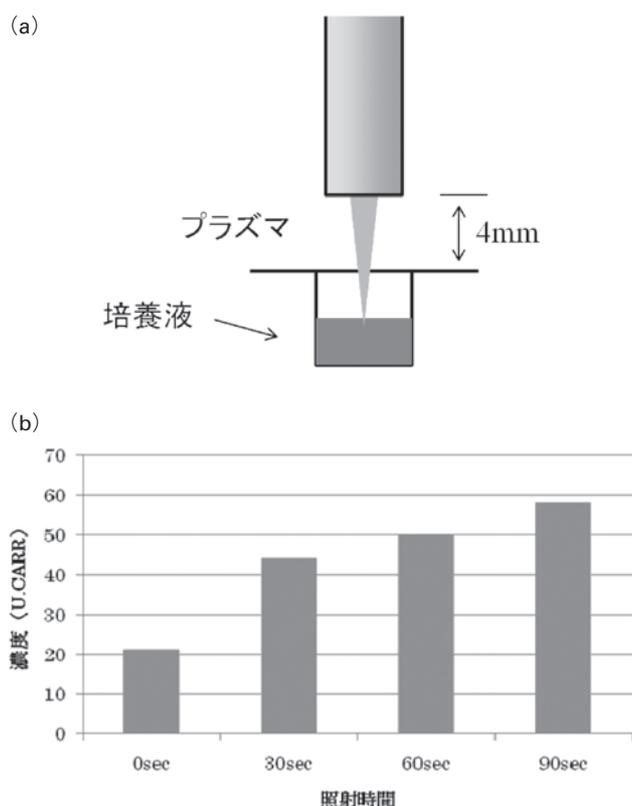


図3 DMEM 培地への低温大気圧プラズマ照射実験. 図2 (a)の低周波プラズマジェット装置から照射されるプラズマ(発光部)の先端が培地用液面に接するように装置を配置した.(b)DMEM中に生成されたR-OOHの H_2O_2 相当量のプラズマ照射時間依存性.

光計測を行った. プラズマには, Heを放電気体として用い, 電極間に ± 5 kVの電圧を周波数20 kHzで印加した. 計測値はU. CARR (Carratelli unit) という独特の単位で示されているが, $1 \text{ U. CARR} = 0.08 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ の H_2O_2 に相当するR-OOHの量という意味である. 計測結果を示す図3 (b)からわかるように, プラズマ照射時間が長くなるにつれて, 培地中に存在するR-OOHの量が増えていることがわかる. この計測では, 前述したように, R-OOHの種類やその正確な量はわからないが, プラズマ照射によって, R-OOHの量が増えていることはわかる. また, この結果から, R-OOH以外のROS/RNSの量も増えているであろうことが推測される. このように, プラズマ照射により, 培養液中に何らかのROS/RNSが生成されていることは確実である.

3.6 プラズマによる細胞増殖

生きた細胞(例えば細菌等)に一定量以上の大気圧低温プラズマを照射すると, 細胞が不活化することが知られており, この手法を用いて, 大気圧低温プラズマを用いた滅菌研究が広く行われている[5, 6, 26]. しかし, 大気圧低温プラズマの照射量が少ないときは, 細胞に逆に刺激を与え, その増殖を促進することが知られている. 例えば, Kalghatgi[31]らは, 平面型のFE-DBD装置(正負ピーク間電位差20 kV, 500 Hz~1.5 kHzの正負パルス電圧)を用いて, ブタ大動脈内皮細胞(PAEC)へのプラズマ照射実験

を行った. 実験は大気中で行われ, 平面型DBD装置の誘電体表面とサンプルまでの距離は2 mm, サンプルは顕微鏡用カバーガラス上に載せたPAECで, $50 \mu\text{l}$ の無血清培地に浸されている. このサンプルにプラズマを一定時間(5秒~120秒)照射し, 照射後すぐにプラズマ処理されたサンプル細胞の培養を開始した. 実験条件の詳細は文献[31]に記載されているが, このような条件下では, プラズマ照射時間が30秒以下の場合, 照射1日後から5日後までの間の4日間で, 細胞数が数倍に増え, その増え方は, 照射時間が長いほど大きいことが示されている. また, 一般に内皮細胞は血管新生増殖因子を産生することが知られているが, この実験でも, プラズマ処理されたPAECは, 照射後長時間にわたって, 血管新生増殖因子の一つである線維芽細胞成長因子(FGF)-2を産生し続けることが観測されている. またFGF中和抗体を同時に投与した場合にはPAECの増殖が抑制されることから, FGF-2がPAECの増殖促進効果をもつこともこの実験で確認されている.

筆者の研究グループでも, 間葉系の細胞を中心に, 様々な細胞に大気圧低温プラズマを照射する実験を行ったので, ここでその一例を紹介する. 我々の実験では, 図2 (a)のプラズマジェット型の大気圧プラズマを用いて, 図3 (a)と同じ条件で, DMEM中に培養している細胞に対して, 一定時間プラズマを照射した. この実験では, 96ウェルマイクロプレートのいくつかのウェルに, 十分な間隔をおいて, 1ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ のDMEMを入れ, 1ウェルあたり約3000個の細胞培養を行った. 細胞を培養するウェルの間隔を十分にあげたのは, 1つのウェルにプラズマ照射している間に, 他のウェルにそのプラズマ照射の影響が及ばないようにするためである. 上述したKalghatgiらの実験では, カバーガラス上に垂らした培地が非常に薄く細胞を覆っているだけであるが, 我々の実験では, 細胞がマイクロプレートのウェル内壁に接着しているため, プラズマによって生成された活性種が, 培地のDMEMに溶け込み, 細胞に作用するまで, 少なくとも数mm程度の距離にわたって輸送される必要がある.

図4に, 我々の実験結果の一例を挙げる. 図4の例で用

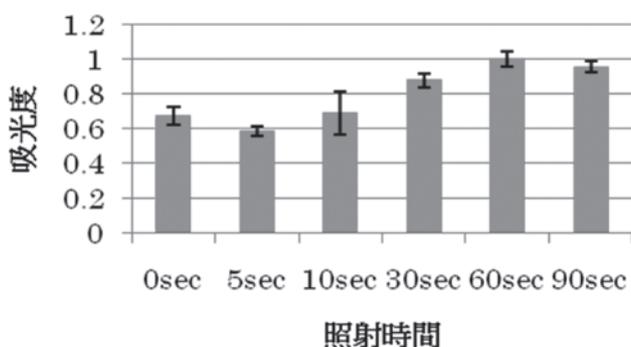


図4 DMEM中に培養されているヒト滑膜細胞(HS)へ低周波大気圧プラズマジェット装置を図3 (a)の配置で, 一定時間(横軸の値)照射した後, そのままの培養液で6時間 CO_2 インキューベーター内で培養し, その後, WST-8アッセイによって生細胞数を評価したもの. 縦軸が生細胞数に比例する. この結果は, 60秒程度の照射までは, プラズマを照射するほど細胞増殖が促進されることを示している.

いたのは、ヒト滑膜細胞 (HS) で、プラズマ照射後 6 時間 CO₂ インキューベーター内で培養したものを、WST-8 アッセイによって生細胞数を評価したものである [30]。横軸は、プラズマ照射時間を表す。縦軸は本アッセイによる吸光度を示しているが、この値が生細胞数に比例する。各プラズマ照射時間に対して、3 度実験を繰り返し、その平均値がプロットされている。

この結果からわかるように、30 秒以上照射したものは、明らかに細胞増殖が進んでいる。また、このデータでは示していないが、照射時間が長すぎると、細胞は死滅する。また、照射時間と増殖の割合については、細胞の種類に極めて強く依存し、細胞によっては、増殖が見られずに短時間の照射で死滅するものもある。また、当然、プラズマのパラメータ (投入パワー、ガス流量) や、プラズマと培養液表面との距離、培養液の量等にも、細胞増殖率は依存する [30]。図 4 の HS 細胞のプラズマ照射による増殖についても、上記 PAEC の場合 [31] と同様に、プラズマ照射による何らかの成長因子の産生が誘起された結果と想像されるが、その機構については、まだ調べられていない。

なお、上記のプラズマ照射による細胞増殖実験において、実は、プラズマ照射する培養液中に細胞が入っている必要はない。細胞の入っていない新しい培養液にプラズマを直接一定時間照射し、その培養液内で新たに (プラズマ処理されていない) 細胞を培養すると、図 4 と同様に、培養液へのプラズマ照射時間によって、細胞の増殖率が変換ることが既に確認されている。文献 [31] にその例が示されているが、筆者らのグループにおいても、上記 HS 細胞およびその他の細胞で、同様の結果を確認している [30]。こうした結果から、培養細胞に対するプラズマ照射による効果は、プラズマ照射によって培養液中に生成される長寿命の化学的活性種によるものであることが想像される。

3.7 低温プラズマによる創傷治療

前節に書いたように適量のプラズマによる生体への刺激は、生体の活性を上げることが知られている。プラズマ照射のこの効果を端的に示す例が、低温プラズマによる創傷治療の可能性であろう [8, 19]。例えば、プラズマを用いた一酸化窒素療法 (NO therapy) の例として、数百人規模の栄養障害性潰瘍患者の臨床治療例が文献 [19] に紹介されており、また、プラズマ医療関連の学会でも、低温大気圧プラズマを使った創傷治療例の紹介は多い。筆者らのグループでも、図 2 (a) のプラズマジェット型の装置による実験で、マウスの背中中の皮膚を全層性に切除して筋膜を露出させた直径約 1 cm の円形皮膚全層欠損創に、プラズマを照射することにより、創の治癒が早まる場合があることを確認した。

ただし、プラズマ医療の典型例として幅広く喧伝されている低温プラズマによる創傷治療ではあるが、厳密に管理された環境下の動物実験で、十分な統計精度をもつプラズマ創傷治療データの報告は、比較的少ない。例えば、Shekhter ら [32] は、120 匹のラット (1 グループ 30 匹) を用い、各ラットの背中肩胛骨間に作製した面積 300 mm² の皮膚全

層欠損創に対して、大気圧放電により生成した NO 気体を 60 秒ずつ数日間供給したもの、しないもの、無菌創の場合、感染創の場合などについて、創面積の時間変化を欠損創作製後 30 日以上にわたって求めることにより、一酸化窒素療法の有効性を示した。また、Ermolaeva ら [33] は、14 匹のラット (1 グループ 7 匹) を用い、ラットの頭部に作製した感染創に、低温大気圧アルゴンプラズマを毎日 10 分ずつ 5 日間照射した際の創面積の時間変化を、最初の治療日から 18 日間にわたって観測し、プラズマ治療の有効性を示している。

3.8 プラズマ医療の数値シミュレーション研究

前節までに、プラズマ医療に関する実験的研究の例をいくつか挙げた。プラズマと生体の相互作用に、医療としての治療効果が期待できそうな現象がいくつか見つかったため、多くの研究機関で、それらのデータを蓄積しているというのが、現在の研究段階であり、その生物学的効果の機構を解明するところまで進んでいる研究例は数少ない。こうした状況から、理論やシミュレーションを用いたプラズマ医療の研究は、現状では、ほとんど行われていない。プラズマ医療に関係する分野でシミュレーションの行われている研究テーマは、現在、大気圧放電そのものに関するシミュレーションがほとんどである [34]。

例えば、Babaeva と Kushner [35] は、最近、皮膚組織を、現実の細胞組織に近い形状と誘電率・導電率をもった誘電体としてモデル化し、その皮膚細胞モデルに、ナノ秒程度のパルス幅をもつ高電圧で生成された大気圧プラズマ (ストリーマー) が照射されるシミュレーションを行っている。窒素・酸素が 4 : 1 の比で混合された乾燥空気中の放電の 2 次元系において、プラズマは流体モデルで解かれ、中性粒子輸送、放射輸送、光電離の効果を取り入れたモデルとなっている。イオン衝撃および VUV 光子吸収による 2 次電子放出の効果も取り入れられている。

このシミュレーションを見てあらためて気づかされるのは、30 kV 程度の高電圧を印加して生成した DBD が、皮膚から 2 mm 程度しか離れていない場合、細胞には極めて大きな電場 (数十 kV/cm) がかかるということ、および、細胞 (特に細胞質) の比誘電率が極めて高いため、細胞がある程度の電気抵抗率をもっているにもかかわらず、数ナノ秒の放電現象では、細胞表面に正味の電荷が蓄積されるということである。このモデルでは、誘電率 (電気感受率) の周波数依存性はないと仮定しているが、有限の電気抵抗があるため、誘電緩和時間 (誘電率と電気抵抗率の比) と放電パルス時間の関係が問題となる。文献 [35] によると、細胞の誘電緩和時間は、電気伝導度の低い細胞膜で 6 μs 程度、電気伝導度の高い細胞質で 0.5 ns 程度になるため、数ナノ秒の放電では、細胞表面に十分電荷が蓄えられ、細胞内の電圧をさらに高める。細胞が構造をもち、それぞれの物質の誘電率と電気伝導度が大きく異なるために、数ナノ秒程度の (生物の運動・輸送等の時間スケールに比べると) 極めて短い時間の間だけではあるが、細胞内に極めて大きな電場が大きな空間分布をもって存在することがこの

シミュレーションで示されている。

電磁場や強いイオン衝撃を受けたときに、細胞がどのように反応するかを数値シミュレーションで示すためには、現在我々がもつ物理モデルを超えたモデル化がまず必要である。一方、プラズマ刺激に対する細胞や生体組織の生物学的作用のモデル化の議論とは別に、それらを取り囲む大気や液体におけるプラズマ物理現象で、現在我々の知っている物理モデルの範囲で解決できる問題にもかかわらず、まだ解決されていない問題も多い。例えば、第4節でも述べたように、低温大気圧放電による気相中のラジカル生成反応は極めて複雑で、特にある程度の湿度がある場合、与えられた放電における各種反応活性種の時空間分布については、まだ十分に理解されているとはいえない。このような系に対する、より精度が高く、また、拡散や対流による各種粒子の輸送も考慮した2次元・3次元の数値シミュレーションは、今後、発展していくと考えられる。

また、今後理論・シミュレーション研究が必要な領域として考えられるのは、プラズマと液面の界面を通した荷電粒子や電気的中性な活性種の反応と輸送、および、液中における反応活性種の反応と輸送であろう。これらの現象については、今後、計測の技術も進歩することが考えられ、実験と理論・シミュレーションの精密な比較もいずれ可能となるだろう。これらの研究により、生体組織の表面に到達する反応活性種の種類と量がわかれば、あとは、生物学・医学の分野で確立されている実験的手法を用いることにより、それらの生体組織に対する効果が明らかになると考えられる。こういうことが行われて初めて、プラズマから生物学的作用までの一連の関係が明確化する。

3.9 まとめ

本章では、近年、「プラズマ医療」と呼ばれている研究分野の中でも、プラズマと生体の直接相互作用に関する分野の最近の動向の概要について紹介した。本文中にも何度か述べたが、この分野の研究は、現在、実験データの集積が進められている段階にあり、プラズマと生体の相互作用メカニズムの解明など、より踏み込んだ内容の研究はまだ数少ない。プラズマ医療の研究が、実際の医療現場で活用されるためには、プラズマ条件と生物学的効果の相関について十分なデータの蓄積が必要である。これらが達成された後、プラズマを人体に用いたときの安全性等を担保し、更に、代替治療法に比べて、プラズマを用いた治療法が同等かそれ以上の効果があることを明確にする必要がある。この意味で、プラズマ医療研究は、まだ緒に就いたばかりであり、臨床応用までは、まだまだ先が長い。しかし、学術的な観点からいうと、プラズマから生成されるどの活性種あるいはどの物理的要因が、どのように生物に作用するのか、その機構がまったくわかっていない現象も数多く、極めて興味深い学術分野である。

本章第1節で述べた広義の「プラズマ医療」の3研究分野のうち、臨床応用の観点からいうと、より現実的なものは、むしろ、第一の分野（プラズマによる医療部材の表面改質、表面コーティング）および第二の分野（滅菌）であ

る。プラズマの医療部材の表面改質については、例えば、ポリマーや生体親和性の高い金属材料等の表面改質の研究が幅広く行われている。また、生きた組織ではないが、骨などの動物由来の材料のプラズマ処理の研究等も行われている。例えば、骨表面（牛の大腿骨から取り出した緻密骨）の表面を低温大気圧プラズマ処理して家兎の大腿骨に移植する実験において、プラズマ処理が骨新生を促進する効果があることも報告されている[36]。

また筆者らのグループは、多孔質ハイドロキシアパタイト（HA）製人工骨のプラズマ処理の研究を行っているが、動物を用いた in-vivo の実験において、プラズマ処理[37]は、HAの細胞親和性を向上させ、人工骨の骨伝導能・骨誘導能を高めることを示唆するデータが得られている。このように、人工骨に限らず、多様な人工臓器・医療機器において、表面材料の改良とプラズマ表面処理技術が向上することにより、それらの生体親和性がより高まる可能性がある。

プラズマ医療の研究は、近年、世界的に急激な広がりを見せて発展している。本章では、紙面が限られていたため、それらの興味深い数多くの研究成果を紹介できなかった。既に本章本文中に参考文献としても挙げてあるものも多いが、比較的最近出版されたプラズマ医療関係の解説記事、例えば、文献[5, 8, 12, 13, 18, 34, 38, 39]等には、より多くの最近の研究成果が報告されているので、興味のある読者は、これらの文献も参照されることを勧める。

謝辞

本稿の執筆にあたり、大阪大学工学研究科の増田一仁、金澤龍也、李大成、安藤あゆみの各氏、大阪大学医学系研究科の森口悠、金子恵子、岡田潔、柗座康夫、富田哲也、名井陽、吉川秀樹の各氏から得た助言や議論が極めて有益であった。特に、図3および図4のデータは、増田一仁、森口悠、岡田潔、名井陽、吉川秀樹の各氏との共同研究によって得、文献[30]に掲載されているデータである。ここに謹んで謝意を表す。

参考文献

- [1] 石原一彦(編): バイオマテリアルの基礎 (日本医学館, 2011).
- [2] Buddy D. Ratner *et al.* *Biomedical Engineering Desk Reference* (Academic Press, 2009).
- [3] A. Milella, R. Di Mundo, F. Palumbo, P. Favia, F. Fracassi and R. d'Agostino, *Plasma Process. Polym.* **6**, 460 (2009).
- [4] P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang and N. Huang, *Mat. Sci. Eng. R36*, 143 (2002).
- [5] J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, Th. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen and K.-D. Weltmann, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 013002 (2011).
- [6] M. Laroussi, *Plasma Process. Polym.* **2**, 391 (2005).
- [7] H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, *Plasma Process. Polym.* **7**, 301 (2010).
- [8] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Shultz, A. Fridman, and K. Harding, *Plasma Process. Polym.* **7**, 194 (2010).
- [9] A. Postgate, B. Saunders, J. Tjandra and J. Vargo, *Endo-*

- scopy **39**, 361 (2007).
- [10] E. Stoffels, *Contrib. Plasma Phys.* **47**, 40 (2007).
- [11] J. Raiser and M. Zenker, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39**, 3520 (2006).
- [12] K. D. Weltmann, E. Kindel, T. von Woedtke, M. Hähnel, M. Stieber and R. Brandenburg, *Pure Appl. Chem.* **82**, 1223. (2010)
- [13] M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. van Dijk and J. L. Zimmermann, *New J. Phys.* **11**, 115012 (2009).
- [14] M. Teschke, J. Kedzierski, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec, J. Engemann, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **33**, 310 (2005).
- [15] M. Laroussi and X. Lu, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 113902 (2005).
- [16] E. Stoffels, A.J. Flikweert, W.W. Stoffels and G.M.W. Kroesen, *Plasma Sources Sci. Technol.* **11**, 383 (2002).
- [17] E. Stoffels, Y. Sakiyama and D. Graves, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 1441 (2008).
- [18] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman, *Plasma Process. Polym.* **5**, 503 (2008).
- [19] C.W. Lo and S. Hamaguchi, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 375201 (2011).
- [20] S. Yagi and M. Tanaka, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **12**, 1509 (1979).
- [21] B. Eliasson and U. Kogelschatz, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **19**, 309 (1991).
- [22] Y. Sakiyama and D.B. Graves, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39**, 3644 (2006).
- [23] Y. Sakiyama, D.B. Graves, J. Jarrige and M. Laroussi, *Appl. Phys. Lett.* **96**, 041501 (2010).
- [24] D.X. Liu, P. Bruggeman, F. Iza, M.Z. Rong and M.G. Kong, *Plasma Sources Sci. Technol.* **19**, 025018 (2010).
- [25] P. Bruggeman, F. Iza, D. Lauwers and Y. A. Gonzalvo, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43**, 012003 (2010).
- [26] S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi, *Plasma Process. Polym.* **7**, 33 (2010).
- [27] M.B. Witte and A. Barbul, *Am. J. Surg.* **183**, 406 (2002).
- [28] J. Lienmann, J. Scherer, N. Bininov, P. Rajasekaran, R. Kovacs, R. Gesche, P. Awakowicz and V. Kolb-Bachofen, *Nitric Oxide* **24**, 8 (2011).
- [29] A. Alberti, L. Bolognini, D. Macciantelli and M. Caratelli, *Res. Chem. Intermed.* **26**, 253 (2000).
- [30] 増田一仁 卒業論文「低周波大気圧プラズマジェット照射による細胞増殖促進プロセスの解析」大阪大学工学部応用理工学科生産科学コース(2010年3月).
- [31] S. Kalghatigi, G. Friedman, A. Fridman and A.M. Clyne, *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 748 (2010).
- [32] A.B. Shekhter, V.A. Serezhnikov, T.G. Rudenko, A.V. Pekshev and A.F. Vanin, *Nitric Oxide* **12**, 210 (2005).
- [33] S.A. Ermolaeva, A.F. Varfolomeev, M.Y. Chernukha, D. S. Yurov, M.M. Vasiliev, A.A. Kaminskaya, M.M. Moisenovich, J.M. Romanova, A.N. Murashev, I.I. Selezneva, T. Shimizu, E.V. Sysolyatina, I.A. Shaginyan, O.F. Petrov, E.I. Mayevsky, V.E. Fortov, G.E. Morfill, B.S. Naroditsky and A.L. Gintsburg, *J. Med. Microbiology* **60**, 75 (2011).
- [34] H.-W. Lee, G.-Y. Park, Y.-S. Seo, Y.-H. Im, S.-B. Shim and H.-J. Lee, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 053001 (2011).
- [35] N.Y. Babaeva and M.J. Kushner, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43**, 185206 (2010).
- [36] 今出真司, 森 隆治, 内尾祐司: 日整会誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.) **83**, S1036 (2009).
- [37] D.-S. Lee, Y. Moriguchi, K. Okada, A. Myoui, H. Yoshikawa and S. Hamaguchi, *IEEE Trans. Plasma Sci.* (2011) *in press*.
- [38] M. Laroussi, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **37**, 714 (2009).
- [39] W. Kim, K.-C. Woo, G.-C. Kim and K.-T. Kim, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 013001 (2011).



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

4. プラズマナノバイオトロニクス研究の最新動向

金子 俊郎, 島山 力三

東北大学 大学院工学研究科 電子工学専攻

(原稿受付日: 2011年5月13日)

Keywords:

liquid related plasma, plasma ion irradiation, bio-molecule, nano particle, fullerene, carbon nanotube

4.1 はじめに

生命体が持つ俊敏でフレキシブルな神経系, 多種多様な感覚器, 複雑な記憶と演算処理を行う脳組織は, いずれもがコンパクトかつ省エネルギーで情報処理を行っている。このようなシステムは, 現在の半導体デバイス技術では不可能であるが, 「バイオエレクトロニクス」は, この生命体の持つ優れた特性をエレクトロニクス技術に活用しようというものであり, ナノテクノロジー, バイオテクノロジー, エレクトロニクスを融合した学際領域の研究である。さらに, 現在, 物理的機構(電子, イオン, 電場, 熱, 放射)および化学的反応(酸化, 窒化, 還元)の制御性に富む反応性プラズマを利用したナノスケールのプロセスを, バイオ起源物質・材料・デバイス創製の観点でバイオエレクトロニクスに応用しようとする「プラズマナノバイオトロニクス」が, 重要かつ魅力的な研究課題として認知されるに至っている。このプラズマナノバイオトロニクスは, 製薬, バイオ材料コーティング, ドラッグデリバリー, イメージング, バイオチップ, バイオセンシング, バイオコンピューティング等の次世代ナノ・バイオ・医療・エレクトロニクスシステムの構築をめざした新しい生命関連科学技術研究として展開されている。

プラズマナノバイオトロニクスの研究は, 大きく二つに分類できると考えている。一つは, プラズマイオン操作等により新規ナノ複合物質を創製しバイオ・医療分野へ応用することであり, もう一つは, プラズマプロセスにより生体分子自体を使ったナノ電子デバイスを作製することである。前者は, ドラッグデリバリーや生体イメージング用のナノ複合物質形成が代表例であり, 後者では, DNAプローブを用いたバイオセンシングやバイオコンピューティング等を実現するナノバイオエレクトロニクスデバイス作製が相当する。

この生体分子を用いた複合物質創製や電子デバイス作製には, 生体分子が安定に存在できる液相が不可欠であり, 液体中もしくは液体と接触して生成されたプラズマが有用であると考えられ, これらの先進的液相プラズマの生成と

応用も重要な研究課題となっている。

このような背景の下, 筆者らは, DNAやタンパク質に代表されるナノスケールの生体分子材料とフラーレン, カーボンナノチューブに代表されるナノカーボン物質や金属・半導体ナノ粒子で構成される新規ナノ複合物質が, 自己組織化, 分子認識, 高効率形成等の特徴を有しており, 上述したナノバイオ・医療分野への応用が期待されていることから, これらの形成にプラズマ理工学的手法を活用し, 独自の「プラズマナノバイオトロニクス」学術領域を創成することをめざしている。

本章では, このプラズマナノバイオトロニクス研究の動向として, 先進的液相プラズマを利用したカーボンナノチューブをカプセルとして用いてDNA等を体内へ輸送するドラッグ・DNAデリバリーシステムへの応用, 磁気共鳴画像(MRI)の造影剤等への応用が期待される磁性金属を内包した新機能性フラーレンの創製へ向けた取り組み, さらにはDNAとカーボンナノチューブの電気的特性を活用した新たなナノバイオエレクトロニクスデバイスの創成について, 筆者らの研究成果を中心に述べる。

4.2 プラズマイオン操作によるバイオ・医療応用ナノ複合物質創製

4.2.1 ドラッグデリバリーシステム応用ナノ複合物質

まず, プラズマイオン操作によるバイオ・医療応用の新機能性ナノ複合物質創製として, ドラッグデリバリーに応用するため, DNAのカーボンナノチューブ(CNT)への挿入技術と内包されたDNAのCNTからの放出技術の開発について述べる。

筆者らはこれまで, CNT内部へ様々な原子・分子を注入する手法として, これらをプラズマ化(イオン化)し, プラズマ中に形成した電場による静電的な力を用いて内包させる「プラズマイオン照射法」を独自に開発してきた[1]。このようにCNT内部空間へ異種原子・分子を内包させるためにはイオン化が必須であるが, DNAに代表される生体高分子は一般的に熱に弱く, プラズマが生成される減圧

下の気相中ではイオン化することが困難である。しかしながら、それらは大気圧下の溶液中においては容易にイオンとして存在し、中でも DNA は水溶液中において分子内に存在するリン酸基のため多価負イオンとして存在することが分かっている。このようなイオンを含む溶液は一般に電解質溶液と呼ばれ、電解質溶液中のイオンは、気体プラズマと同様に電場を印加することでその挙動を制御することが可能であるため、筆者らはこれらを「電解質プラズマ」と定義し[2]、図1に示すような“プラズマイオン照射法”を適用して DNA を内包した CNT の創製を実現した[3]。

図1に電解質プラズマ実験装置図を示す。5 cm³の DNA 水溶液中に 5 mm×40 mm のアルミニウム製アノード、およびカソード電極を挿入し、直流電圧 V_{DC} および高周波電圧 V_{RF} を独立に印加する。アノード電極上には、直径 1–2 nm の単層カーボンナノチューブ (SWNT) および直径 3–5 nm の二層カーボンナノチューブ (DWNT) を塗布してある。

DNA は溶液中で負イオンとして存在するため、直流電場を印加することでアノードへの DNA 負イオン照射を行うことができる。また、高周波電場を印加すると、溶液中で糸玉形状を呈している DNA が分子内分極と高周波電場との相互作用で伸長することがわかっているため[4]、伸長した DNA を CNT に照射することで DNA の内包効率が向上することが期待できる。本実験では、シトシン(C)、グアニン(G)、アデニン(A)で構成される1重螺旋 DNA を用いており、1本の DNA 内に存在する塩基数(鎖長)を添字 x で C_x のように表す。

図2に透過型電子顕微鏡 (TEM) によって観察した DNA 負イオン照射後の (a)SWNT 像および (b)DWNT 像を示す。ここでは、30塩基で構成されている長さ 10 nm 程度の A_{30} および C_{30} を用いている。図2 (a)では SWNT 内部に1次構造物質が内包されていることがわかる。上下の図は同じ写真であり、下図では内包物質を黒線で示している。この物質の長さは用いた DNA である A_{30} (~10 nm) とほぼ同一であるため、SWNT 内部に DNA が内包した像観察に初めて成功したと言える[3]。

一方、SWNT よりも直径の太い DWNT に DNA 負イオンを照射した場合には [図2 (b)], 非常に多数の DNA が密集して内包されているのがわかる。また DWNT の場合には、直流電場のみでも十分に DNA が内包されており、内直

径が太い場合には高周波電場による DNA の伸長作用なしでも内包されることが明らかとなった[5]。

これらの DNA 内包 CNT をドラッグデリバリーシステムに応用する際には、生体内で病変部位に輸送し、CNT 内部から DNA を放出する必要がある。病変部位への輸送に関しては、CNT はそのままでは疎水性で生体適合性が悪いいため、親水性の分子で表面修飾することで水溶性とすることによって生体内に導入でき[6]、CNT の蛍光発光性[7]を利用して、レーザー光等で励起して発光させた CNT を観測しながら細胞へ誘導できると考えられている。

一方、CNT 内部からの DNA の放出に関しては、いくつかの方法が提案されているが、筆者らは電界により放出する手法を提案している。その原理実証を行う目的で、図3 (a)に示すように C_{30} を内包した CNT を塗布した電極を水中に挿入し、挿入時とは逆方向の電場を印加後、電極を挿入した水の紫外・可視光吸収特性を測定した。その結果、図3 (b)に示すように、電場印加時間の増加とともに、水中に存在する DNA の吸収ピーク (275 nm) が次第に増加することが観測され、CNT に内包されていた DNA が水中に放出されたことを示している[8]。

これまでに、電解質プラズマ中での印加電場による分子操作によって、DNA の CNT への挿入と CNT からの放出について述べてきた。さらに高効率で操作することを目的として、光照射によって操作可能である金属ナノ粒子を DNA に結合させた複合材料の形成を行い、さらに、この複合材料の CNT への挿入実験を行った。これらは、ナノ粒子

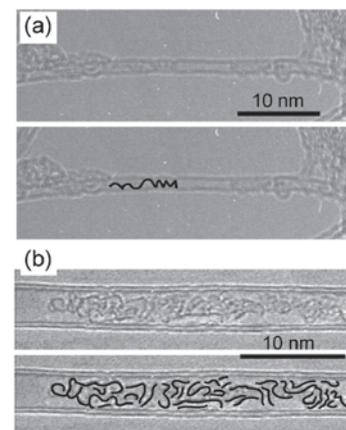


図2 DNA を内包した (a)単層カーボンナノチューブと (b)二層カーボンナノチューブ。

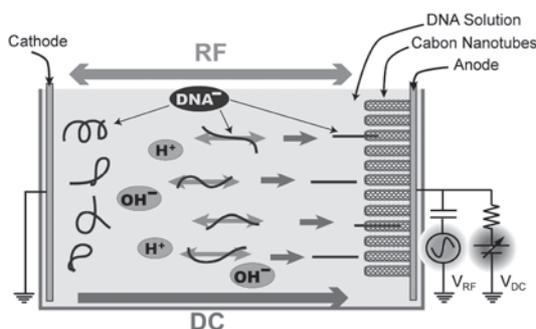


図1 電解質プラズマ実験装置概略図。

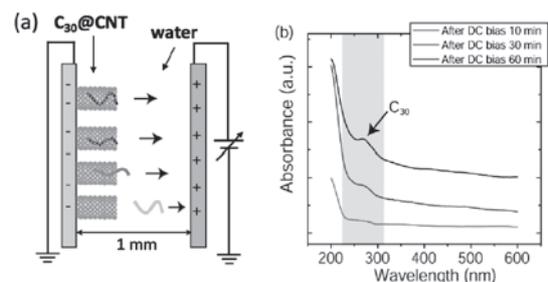


図3 (a)DNA 放出実験装置。(b)DNA 放出後の水溶液の紫外・可視光吸収スペクトル。

の表面プラズモン共鳴を利用した高感度センサとして、また光によりナノ粒子を操作し、薬剤としてのDNAを自在にカプセルとしてのCNTから出し入れする手法として利用できる。

図4に、ナノ粒子合成に使用した気相-液相界面プラズマ実験装置[9]を示す。ここでは、液体中に挿入した電極と気相中の電極間の放電によりプラズマを生成し、そのプラズマからの電子およびイオンを液体に照射することで、プラズマ還元法を用いて液相中でナノ粒子を合成し[10-12]、同時に液中に存在するDNAと反応させて複合物質を形成した。

図5に、DNAの濃度を変化させて気相-液相界面プラズマの照射により形成した金ナノ粒子の水溶液の(a)写真および(b)(c)そのときの紫外・可視光の吸収特性を示す。DNAの濃度を増加させるのに従って、水溶液の色が次第に濃い赤紫色に変化し、約550 nmの吸収強度が増大していくことがわかる。これは、Auナノ粒子の表面プラズモン共鳴により、入射光の振動電場とAuナノ粒子内の自由電子が波長500-600 nm領域で共鳴的に振動するためである。この結果は、DNA濃度の増大により金ナノ粒子の合成量が増大することを示しているが、これは金ナノ粒子が形成される過程においてDNAがナノ粒子の表面を修飾し、ナノ粒子を親水化することで、金ナノ粒子が高密度で溶解したためと考えられる。また、このときの吸収光のピーク

を示す波長がDNA濃度によって変化しているが、これは金ナノ粒子の粒径が変化したことと、表面にDNAが修飾したことでその誘電率が変化したことが原因と考えられる。

ここで興味深い点は、図5(c)で示したように、DNAの種類によって吸収光のピーク波長のDNA濃度依存性が異なっていることである。これは、DNAを構成する塩基の結合エネルギーの差異によって生じていると考えているが、この結果からDNAの塩基の種類と濃度によって、金ナノ粒子の粒径を制御できることが明らかとなった。

これらの金ナノ粒子の形状を詳細に調べるため、それぞれの濃度で合成された金ナノ粒子を透過型電子顕微鏡(TEM)で観測した。その結果を図6に示す。DNAを導入することで金ナノ粒子の粒径が急激に小さくなるが($C_{DNA} > 0.2 \mu\text{M}$)、ある閾値を超えると($C_{DNA} > 1.5 \mu\text{M}$)ナノ粒子が凝集していくことがわかる。これは、プラズマ照射により金化合物が還元され、金ナノ粒子が合成されていく際にDNAが金ナノ粒子の表面を覆うことで、金ナノ粒子がそれ以上成長できずに小さい粒径が維持されるが、DNA濃度がある閾値を超えると、負電荷を有するDNAが金ナノ粒子の有する正電荷を遮蔽し中和してしまい、クーロン力が作用しなくなるため凝集していくものと考えられる。したがって、DNA濃度等を詳細に変化させることで、粒径や凝集の度合いを制御できることが明らかとなった。

現在は、ドラッグ(DNA)デリバリーへの応用をめざし、プラズマイオン照射法を用いることによって、これらのDNA-金ナノ粒子複合物質をCNT内部へ挿入する実験を行っており、さらには光によるナノ粒子のマニピュレートによって、高効率でDNAの操作が可能になるかどうかについても調べている。

また、このようにして形成された金ナノ粒子とCNTの複合物質は、タンパク質高感度センシング等への適用[13]も考えられ、幅広いバイオ・医療応用が期待できる。

4.2.2 磁気共鳴画像造影剤応用ナノ複合物質

プラズマイオン操作によって創製した新規物質として、フラーレン内部に異種原子・分子を挿入した内包フラーレンがあり、磁気共鳴画像(MRI)の造影剤やマイクロ波・交流磁場加熱治療法等のバイオ・医療分野への応用が期待されている[14]。MRI造影剤に関しては、通常は常磁性の

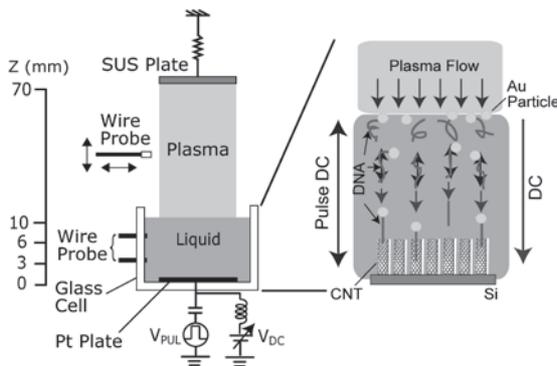


図4 気相-液相界面プラズマ実験装置概略図。

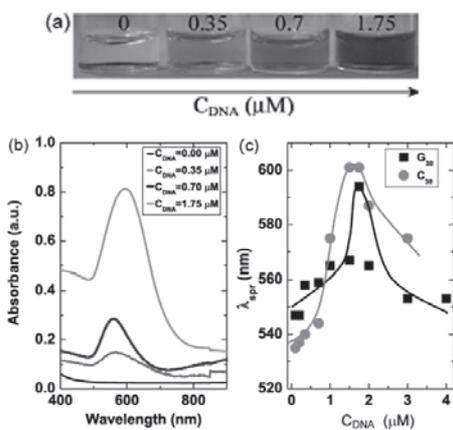


図5 プラズマ照射により形成した金ナノ粒子水溶液の写真および紫外・可視光吸収スペクトル、吸収光ピーク波長のDNA濃度依存性。

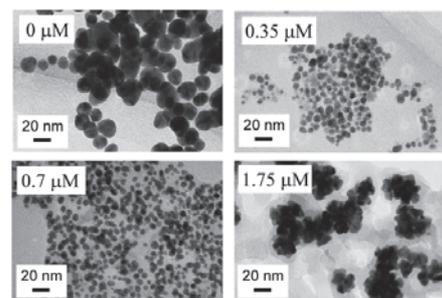


図6 プラズマ照射により形成した金ナノ粒子の透過型電子顕微鏡像のDNA濃度依存性。

ガドリニウムや鉄、ニッケル等の磁性金属が使用され、周囲のプロトンとの相互作用により造影効果を発現するが、これらを直接体内に投与することは副作用が問題となる。そこで、これらの常磁性金属をフラーレンの籠の中に閉じ込め無害化するとともに、フラーレンを水溶化することで使用後に体外へ排出されやすくすることが提案されている。しかし、現在までに、ガドリニウムを内包したフラーレンは報告されているものの、一般的なフラーレンであるC₆₀に比べて合成効率が2桁程度低いC₈₂等の高次フラーレンに内包されたものであり、また、鉄等の磁性金属に至っては、磁性金属と炭素の結合エネルギーが弱いため[15]、ならびに実験系構築の難解さから、フラーレンへの内包の明確な報告例は未だに存在しない。一方で、分子動力学を用いたシミュレーションにより、イオン照射法を用いることでニッケル原子内包フラーレン (Ni@C₆₀) の合成が可能であることが示されている[16]。そこで、既に形成されたフラーレン (C₆₀) に、ニッケルイオンを照射する“プラズマイオン照射法”を用いることでNi@C₆₀ の合成を試みた[17]。

実験は、図7に示す ECR 放電型プラズマ生成装置 (以下、ECR 装置) を用いた。ECR 放電により高密度のアルゴンプラズマを生成し、それが負バイアスを印加したニッケルプレート (V_{pl})、ニッケルグリッド (V_g) をスパッタすることでニッケル原子、およびイオンを発生させるため、アルゴン-ニッケル混合プラズマが生成される。

典型的なプラズマパラメータは、 $n_e = 10^{12} \text{ cm}^{-3}$ 、 $T_e = 5 \text{ eV}$ 程度であった。 V_{pl} の負方向への増加に伴いニッケルイオンの発光強度が顕著に増加し、ニッケルイオン生成量が制御可能であることが明らかとなっている。また、それぞれの空間電位は基板電位によらず一定であるため、フラーレンを堆積させる基板の電位を変化させることでイオン照射エネルギーの制御が可能である。

このプラズマを利用し Ni@C₆₀ 合成実験を行い、典型的な合成試料に関し質量分析した結果を図8 (a)に、炭素とニッケルの天然同位体比から計算した Ni@C₆₀ の予測同位体比を図8 (b)に示す。これより、赤の色で示す質量数778をはじめとする質量ピークが検出され、さらに理論的に予測される Ni@C₆₀ の同位体比と一致することが明らかとなった。これらの質量スペクトルは、ニッケルプレート電極への負電位印加によりニッケルイオンの生成量を増加させる等の条件を最適化した場合のみ検出されている。

これらの試料は、十分な量の硝酸と合成試料を混合・攪拌し、C₆₀ の外側に存在するニッケルを除去した場合にも質量ピークが検出されたこと、またニッケル外接 C₆₀ 合成実験の結果より、一つの Ni と一つの C₆₀ で構成される物質の質量スペクトルが検出されていないことから[18]、本研究において検出された質量スペクトルは Ni 外接 C₆₀ 由来のものではなく、Ni 内包 C₆₀ のものであると考えられる。また、イオン照射エネルギーが約 35 eV の場合に最も質量数 778 の質量検出強度が高くなるという結果も得られており、これはシミュレーション結果とほぼ一致していることから、Ni を内包したフラーレンが確実に合成されているとい

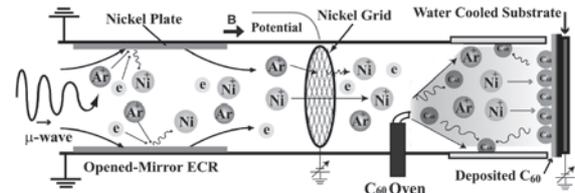


図7 ECR 放電型プラズマ生成装置概略図。

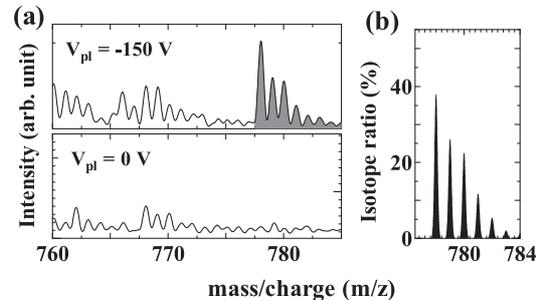


図8 合成試料に関する典型的な質量スペクトル。

える。今後、この Ni 内包フラーレンを大量に合成し、MRI 造影剤としての特性評価を行っていく予定である。

4.3 液相プラズマプロセスによるバイオエレクトロニクスデバイス創成

これまで述べた液相プラズマプロセスにより生体分子である DNA を用いた複合物質の形成に成功している。これらの DNA とナノカーボン、ナノ粒子との複合物質は、その特異的な電氣的・光学的・磁氣的特性によりナノバイオエレクトロニクスデバイスとしての応用が期待されている。この新規な電氣的特性が期待できる DNA を内包した SWNT を、図9に示すような電界効果トランジスタ (FET) のチャネルとしてソース-ドレイン間に架橋し、ゲート電圧 V_G およびソース-ドレイン電圧 V_{DS} を変化させ、ソース-ドレイン電流 I_{DS} を測定することで、その特性を調べた。

図10に DNA 内包 SWNT で作製した FET の電気 (伝達) 特性を示す。DNA 照射前の Pristine SWNT [図10(a)点線] は、 V_G が負の値で I_{DS} が上昇する p 型半導体特性を示しており、一方、シトシン (C₃₀) を内包した SWNT [図10(a)細実線] は、その p 型の半導体特性が強まっている。これは、SWNT からシトシンへの電荷移動が生じ、SWNT が正孔リッチ状態になることで p 型半導体特性が強まったためと考えられる。これらの結果に対して、グアニン (G₃₀) を内包した SWNT は図10(a)の太実線で示すようにまったく反対

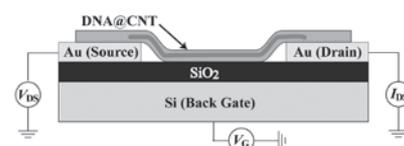


図9 DNA 内包カーボンナノチューブを用いた電界効果型トランジスタ。

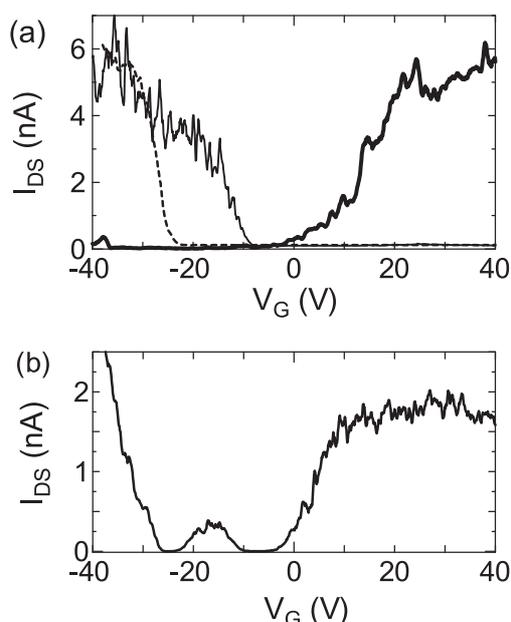


図10 DNA内包SWNT電界効果型トランジスタの電気特性。(a) 空のSWNT (点線), C₃₀内包SWNT (細実線), G₃₀内包SWNT (太実線), (b)G₃₀部分内包SWNT.

の, V_G が正の値で I_{DS} が増加する n 型の電気特性を示すことが観測された. ここでは, シトシンの場合とは反対に, グアニンから SWNT へ電荷移動が生じ, SWNT が電子リッチ状態になり, n 型半導体特性に変化したと考えられる [19].

一方, 同様の DNA 負イオン照射条件において, 図10 (b) に示すように, V_G が正の値とともに負の値でも I_{DS} が増加する電気特性が得られ, さらにその場合に $V_G = -20$ V 近傍で新たなピークが観測されることがわかった. これは, DNA の伸長度や SWNT の配向度等に差異が生じることで DNA の内包効率が変化し, SWNT を n 型半導体特性に変化させるグアニンが部分的に SWNT に内包されることによって, 内包されていない p 型半導体特性領域との間で pn 接合が形成されるために生じることが明らかとなった. この現象は, アルカリ金属-ハロゲン原子内包 SWNT の pn 接合 [20] で得られた結果とも一致している.

これらの DNA と SWNT との電荷移動は, DNA の塩基と SWNT のイオン化ポテンシャル (酸化還元電位) の違いによって生じたものと考えられる. すなわち, グアニンは 4 種の塩基の中で最も低い酸化電位を示し, シトシンは比較的高い酸化電位を示すこと [21], さらに, SWNT のイオン化ポテンシャルがグアニンとシトシンの中間に存在し, その結果, グアニンは SWNT に電子を供給し, シトシンは SWNT より電子を受け取ることで, それぞれ電子ドナーおよびアクセプタとして機能し, SWNT の電気特性における n 型発現及び p 型強化に至ったものと考えられる [19]. このように塩基の種類によって CNT の電気特性を制御でき, 塩基の組み合わせによって pn 接合が形成できることを実証した.

さらに, この FET を 10 K 程度の低温まで冷却し電気特性を測定したところ, 図11に示すように V_G 対して I_{DS} が間

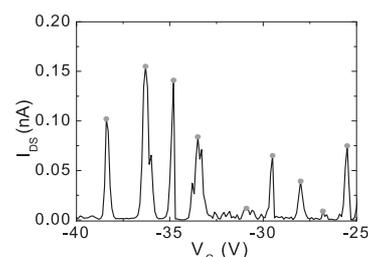


図11 低温 (10 K) における DNA 結合カーボンナノチューブ電界効果型トランジスタの電気特性.

欠的に流れており, クーロン振動と呼ばれる量子効果現象が発現していることが明らかとなった [22]. これは, DNA がカーボンナノチューブの内部または表面で量子ドットとして機能したためと考えられ, 低消費電力の量子エレクトロニクスデバイスへの応用が期待されている.

4.4 将来展望

本章では, プラズマナノバイオエレクトロニクス研究の最新動向として, 筆者らが行っているドラッグ・DNA デリバリーを目的とした, 液相プラズマ中の DNA 負イオン照射による DNA とナノカーボン・ナノ粒子との複合物質の創製と DNA の放出技術開発について述べるとともに, MRI 造影剤等への応用をめざした磁性元素内包フラーレン合成についても言及した. 一方, 塩基配列を制御した DNA を CNT へ内包することで, CNT の電気的特性を制御でき, さらに DNA を量子ドットとして機能させることで, 新たな量子効果デバイスへの道も拓きつつある.

DNA 等の生体分子は, 自己組織化能力, 自己修復能力を有していることと, プラズマの照射により活性化する等の特異な性質を持っているため, 今後は自己修復によるエラーフリーのデバイスや回路を自己拡張するデバイス等の新概念のバイオエレクトロニクスに発展する可能性があり, 多方面の角度からの研究が望まれる.

最後に, 本研究における共同研究者の李永峰助教, 陳強博士, 馬越達也氏に心より感謝申し上げます.

参考文献

- [1] R. Hatakeyama, T. Kaneko, W. Oohara, Y.F. Li, T. Kato, K. Baba and J. Shishido, *Plasma Sources Sci. Technol.* **17**, 024009 (2008).
- [2] T. Kaneko, T. Okada and R. Hatakeyama, *Contrib. Plasma Phys.* **47**, 57 (2007).
- [3] T. Okada, T. Kaneko, R. Hatakeyama and K. Tohji, *Chem. Phys. Lett.* **417**, 288 (2006).
- [4] M. Washizu and T.B. Jones, *J. Electrostatics* **38**, 199 (1996).
- [5] Y.F. Li, T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Small* **6**, 729 (2010).
- [6] M. Prato, K. Kostarelos and A. Bianco, *Acc. Chem. Res.* **41**, 60 (2008).
- [7] T. Kato and R. Hatakeyama, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8101 (2008).
- [8] Y.F. Li, S. Chen, T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Chem. Commun.* **47**, 2309 (2011).
- [9] T. Kaneko, K. Baba and R. Hatakeyama, *J. Appl. Phys.* **105**, 103306 (2009).

- [10] K. Baba, T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Appl. Phys. Express* **2**, 035006 (2009).
- [11] T. Kaneko, K. Baba, T. Harada and R. Hatakeyama, *Plasma Process. Polym.* **6**, 713 (2009).
- [12] T. Kaneko, Q. Chen, T. Harada and R. Hatakeyama, *Plasma Sources Sci. Technol.* **20**, 034014 (2011).
- [13] F. N. Ishikawa, B. Stauffer, D.A. Caron and C. Zhou, *Biosens. Bioelect.* **24**, 2967 (2009).
- [14] M. Mikawa, H. Kato, M. Okumura, M. Narazaki, Y. Kanazawa, N. Miwa and H. Shinohara, *Bioconjugate Chem.* **12**, 510 (2001).
- [15] Y. Yamaguchi *et al.*, *Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. B* **65**, 431 (1999).
- [16] E.C. Neyts and A. Bogaerts, *Carbon* **47**, 1028 (2009).
- [17] T. Umakoshi, H. Ishida, T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Plasma Fusion Res.* **6**, 1206015 (2011).
- [18] E.K. Parks, K.P. Kerns, S.J. Riley and B.J. Winter, *Phys. Rev. B* **59**, 13431 (1999).
- [19] T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Appl. Phys. Express* **2**, 127001 (2009).
- [20] T. Kato, R. Hatakeyama, J. Shishido, W. Oohara and K. Tohji, *Appl. Phys. Lett.* **95**, 083109 (2009).
- [21] K.H. Yoo, D.H. Ha, J.O. Lee, J.W. Park, J. Kim, H.Y. Lee, T. Kawai and H.T. Choi, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 198102 (2001).
- [22] Y.F. Li, T. Kaneko and R. Hatakeyama, *Appl. Phys. Lett.* **96**, 023104 (2010).



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

5. パルス高電界の生体作用と先端的医療応用

勝木 淳, 矢野正彦¹⁾, 光武和典¹⁾, 諸富桂子, 安部恵祐¹⁾, 矢野憲一, 秋山秀典¹⁾
 熊本大学バイオエレクトリクス研究センター, ¹⁾熊本大学大学院自然科学研究科

(原稿受付: 2011年8月18日)

Keywords:

bioelectrics, PEF, electroporation, stress response, apoptosis, cancer treatment, platelet activation

5.1 はじめに

電気ショックの生体作用に関する議論の発端は18世紀のファラデーの時代に遡る[1]。その後、19世紀末に犬の心室細動を電気ショックによって停止させる実験が行われた。1947年には初めて人体に電気ショックが使用され、今日の自動除細動装置、いわゆるAED (Automated External Defibrillator) につながっている。その他、今日では精神疾患の治療法としても利用されている。これら従来の電気ショックは神経刺激に基づいており、生体に不可逆的な変化を与えるものではない。このため、瞬時電力は除細動で用いられる比較的強い電気ショックでも高々1kW程度である。一方、時間幅1μs以下でかつ瞬時電力1MW以上の、いわゆるパルスパワーは、1960年頃から非加熱電界殺菌[2]やエレクトロポレーション[3]のように、細胞膜の構造を強制的に変化させるための手段として用いられてきた。21世紀に入り、パルスパワー発生装置の高性能化と生体分析技術の飛躍的な進歩によって、パルスパワーの生物応用が新しい展開を見せている。パルスパワーは、誘電物質の集合体である生体内において強力な電磁力として細胞を構成する部位に作用し、その構造・機能の変化をもたらす。さらに、ストレス応答などの二次的な生体反応を誘導する。しかも、パルスパワーの適用条件を調節してストレスを変化させることによって、多様な生体応答を引き出すことが可能である。このような物理ストレスで誘導される生体反応は、がん治療[4,5]や創傷治療[6]などの医療応用のほか、美容分野への応用も検討されている。パルスパワーの対象は動物細胞にとどまらず、植物の発芽促進や成長制御[7-9]、品種改良[10]のための物理刺激としても利用されている。このパルスパワーを生物に利用する分野をバイオエレクトリクス (Bioelectrics) と呼び、2004年以降単独で毎年国際会議が開催されるほど活発である。本章では、パルス高電界の生体作用と医療分野への応用に絞って最新の研究を紹介し、今後の展開についてもふれる。

5.2 パルス高電界の生体への物理作用

5.2.1 パルス電界の生体一次作用

細胞は、核、小胞体、ミトコンドリア、などのオルガネラ、核酸やタンパク質といった巨大生体分子、アミノ酸などの低分子、金属イオン、それに媒質としての水分子から成る。これらはみな誘電物質であるがゆえ、強電界下では電氣的・機械的なストレスを受ける。さらに、構造、分極、電気抵抗、粘性などの違いから、それぞれが受けるストレスは異なる。強電界の生体作用を考える上で2つの重要なメカニズムがある。最も重要なのは約8nmと薄く物質の透過性を能動的に制御する生体膜の存在である。生体膜は受動的な荷電粒子の流れを遮断するので、細胞内外の電界・電流分布に及ぼす影響は極めて大きい。外部電界に対する細胞膜の役割を理解するために、図1のような細胞単純モデルに狭帯域の交流電界を印加した場合の電界分布を

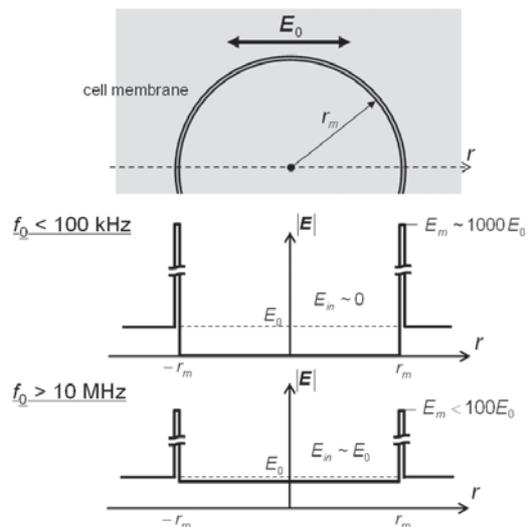


図1 生体細胞の単純モデルおよび外部交流電界下の電界分布 (模式図)。 E_0 , E_m , E_{in} はそれぞれ印加電界, 細胞膜上および細胞内部の電界。 r_m は細胞の半径, f_0 は外部電界の周波数。

考える。相対的な関係から、細胞膜は絶縁膜、細胞内部および外部は導電性媒体とみなせる。細胞の直径を $15\ \mu\text{m}$ 、細胞膜の静電容量を $1\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、細胞内および懸濁液の導電率を $100\ \Omega\text{cm}$ として電界を計算すると[11]、周波数 $100\ \text{kHz}$ 程度以下では細胞膜上の電界は外部電界の約1000倍に達する。このとき、細胞内電界はほとんどゼロである。周波数を大きくすると膜のインピーダンスが小さくなって細胞内部に電流が流れこむようになり、 $10\ \text{MHz}$ を超えると細胞内電界は外部と同程度になる。図2は、振幅 $3\ \text{kV}/\text{cm}$ 、持続時間 $200\ \mu\text{s}$ のバースト交流電界に曝したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の顕微鏡写真である[12]。周波数 $300\ \text{kHz}$ の場合、細胞膜が壊れて内部物質が漏れ出している。一方、 $10\ \text{MHz}$ では一見膜の損壊は見られないが、コントロールと比べると内部構造が際立って見える。さらに $100\ \text{MHz}$ の場合、細胞膜は壊れないまま一部の細胞が膨潤化しており、明らかにコントロールとは異なる細胞内反応が起こっていると推察される。以上の議論では細胞膜について述べたが、同様の膜で覆われる核、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内オルガネラでも、周波数領域は異なるものの同様の現象が起こると考えられる。

2番目の生体作用は核酸やタンパク質などの生体高分子への物理ストレスである。生体分子は概して負に帯電し、しかも分子中で電荷が局在しているため、強電界下では結合した分子間や分子内ユニット間に静電的な強いストレスが生じる。このストレスは、条件によっては分子構造の変化をもたらす。鷺津ら[13]や金子ら[14]が $1\ \text{kV}/\text{cm}$ 程度の高周波電界を用いて液中でDNA伸縮の操作を行っていることや、Schoenbachらがパルス電界によってアルツハイマー病の原因物質と見られている β アミロイドファイバーを粉砕している[15]こと等から、強電界が生体分子にとって重大なストレスとなることがわかる。さらに、分子それぞれの外部電界に対する応答時間 (誘電緩和時間) が異なることから、特定周波数の振動電界を与えることによって

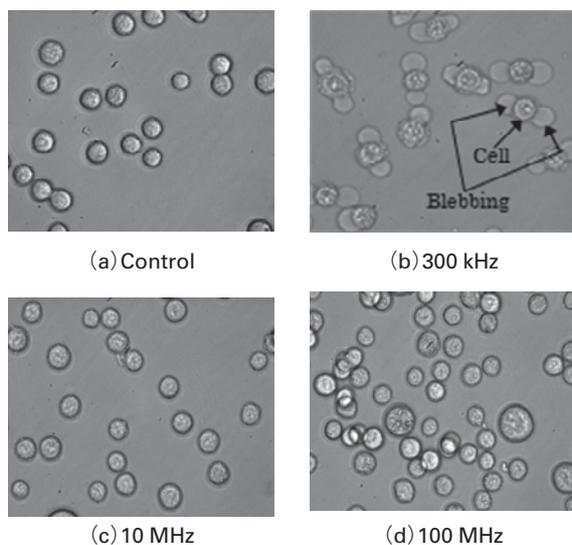


図2 バースト交流電界 ($3\ \text{kV}/\text{cm}$, $200\ \mu\text{s}$) を印加したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の顕微鏡写真[12] (パルス印加10分後に撮影。細胞の直径は約 $15\ \mu\text{m}$)。

部位選択的にストレスを付与することが可能である。

5.2.2 細胞内ストレス反応

外部から与えられた化学または物理ストレスは細胞に何らかの構造変化をもたらす。この変化をきっかけに、生存および細胞死を導く様々なタンパク質の連鎖反応 (シグナル伝達) が起動する。結局、細胞の生死は生存シグナルと細胞死シグナルのバランスによって決定される。したがって、ストレスの種類や強さを適当に調節することによって、細胞を死に導くことができ、逆に、生存シグナルを優位にして細胞を活性化させることも可能である。

パルス電界の電界強度または印加回数がある程度以上にすると、動物細胞に自発的な細胞死 (アポトーシス: apoptosis) を引き起こす。アポトーシスとは生物個体をより良い状態に保つために引き起こされる能動的な細胞死であり、古い細胞や傷ついた細胞などの個体にとって不要な細胞は生体内で常にアポトーシスによって取り除かれている。しかし、多くのがん細胞は一部のタンパク質が機能せずアポトーシスが起こりにくい状態にある。アポトーシスは、化学物質の他、紫外線、放射線などの物理刺激によって誘導されることは知られており、2003年以降パルス電界によっても様々な動物細胞にアポトーシスが誘導されることがわかってきた。特に時間幅が $100\ \text{ns}$ 以下のナノ秒パルス電界 (nsPEF) の印加後に、ミトコンドリアの膜透過性亢進とチトクロームCの放出、カスパーゼと称するタンパク質分解酵素の活性化、小胞体からのカルシウム放出など、アポトーシスに関連する反応が様々な細胞で検出されている[16]。図3(a),(b)は、それぞれ適当な条件のパルス電界を印加したHeLa細胞の顕微鏡写真、およびアポトーシス特有のDNA断片化現象を蛍光分子プローブ (TUNEL法) によって検出した結果である。蛍光分子の蛍光輝度が強いほど細胞内DNAの断片化が進んでいること

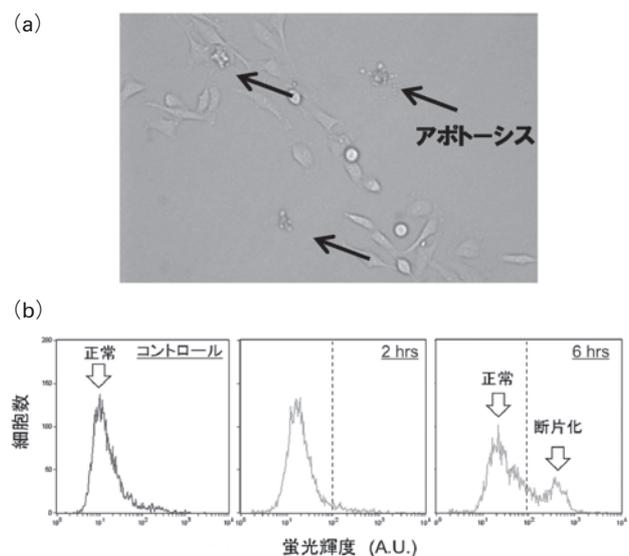


図3 ナノ秒パルス高電界 ($12.5\ \text{kV}/\text{cm}$, $100\ \text{ns}$, 100回) によるHeLa細胞へのアポトーシス誘導。(a)パルス電界によってアポトーシスを起こしたHeLa細胞。(b)アポトーシス様DNA断片化を検出する蛍光分子プローブの対蛍光輝度ヒストグラム。(左からコントロール、パルス印加2および6時間後の細胞)。

を示す。さらに、6時間程度でゆっくりと反応が進んでいることもアポトーシスであることを裏付ける。筆者らは、nsPEFによって誘導されるアポトーシスメカニズムの解明に注力している。パルス印加後、細胞膜や小胞体に関連する遺伝子発現の増加や、パルスによって細胞膜に生じた小孔（ナノポア）から流入したカルシウムイオンが細胞膜近傍のアポトーシス関連タンパク質を活性化していること等を突き止めており（図4）、メカニズムの全貌が明らかになりつつある[17, 18]。

5.2.3 過渡的温熱作用

パルスとはいえ生体に電界を印加すると生体内で少なからずジュール熱が発生する。パルスの繰り返し速度を大きくするなどして積極的にジュール加熱すると、ミリ秒から秒単位の間に数10℃の温度変化を生体を与えることができる。従来は、パルス電界の非熱作用の研究が進められてきたが、温熱療法で用いられる43~45℃を数10分間維持するような温度履歴とは異なり、パルス電界で実現可能な急峻な温度履歴が新しい生体ストレスとして注目されている。この過渡的温熱作用と電界の組み合わせによって、がん細胞に効率的にアポトーシスを誘導できることが示されている[19]。

5.2.4 細胞活性化

5.2.2節で述べたように、パルス電界の条件によっては細胞を活性化させることも可能である[12]。図5は、培養しながら細胞数を自動計測する装置（xCELLigence）を用いて得たHela細胞の細胞増殖曲線であり、適度な強さのバースト交流電界への暴露によって細胞の増殖速度が大きくなる例である。パラメータは交流電界の周波数である。繰り返しパルスのインターバルは十分長いので、処理時の温度上昇は高々7℃であり、温熱作用は無視できる。パルス印加した細胞の増殖速度はコントロールに比べて概ね大きいことがわかる。特筆すべきは増殖速度が周波数3MHzで極大になることである。電界分布計算[11]から、死に至らしめない程度の適度な電界が細胞膜に生じたときに増殖が活発になる傾向がある。最近の遺伝子解析から、パルス電界印加によって細胞周期に関わる遺伝子の発現量が変化するなど、メカニズム解明のための情報が集まりつつある。

5.3 医療・健康分野への応用

5.3.1 がん治療

前節で述べたように、ナノ秒パルス高電界（nsPEF）を用いると薬剤を用いずにがん細胞にアポトーシスを誘導することができる。図6は、マウスの脚で成長させたメラノーマ（Melanoma, 悪性黒色腫）をクリップ式の電極で挟んでnsPEF処理（40 kV/cm, 300 ns, 100回）を定期的に繰り返した場合の患部の回復状況を示したものである[4]。左列は患部背後から照射した光の透過光、右列は表面の様子である。この場合、日数の経過とともにがんが縮小し結果的に65日で完治している。メラノーマに対しては臨床実験も進んでいる[20]。このように、nsPEFは一部のがんに対して、培養細胞と組織のいずれに対しても不

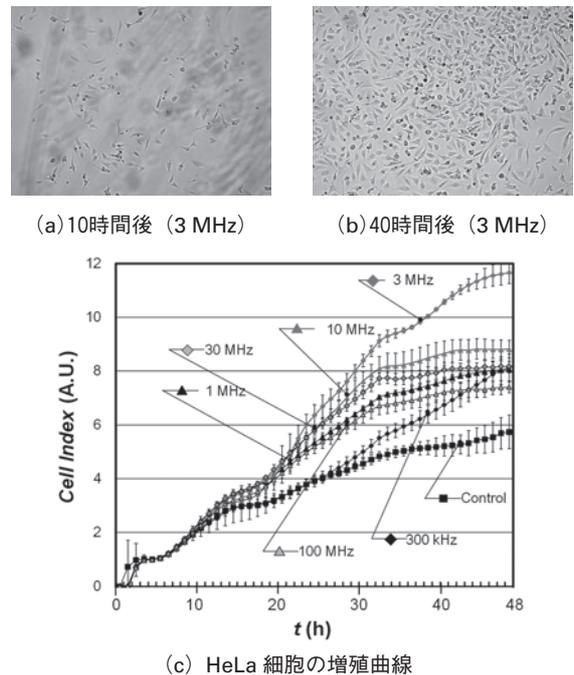


図5 適度なバースト交流電界を印加した細胞の顕微鏡写真と増殖曲線（t=4hの細胞数で正規化）。バースト交流電界は、振幅3 kV/cm, 持続時間200 μs, 印加回数30回を一定とし、周波数を0.3-100 MHzの範囲で変化させた。

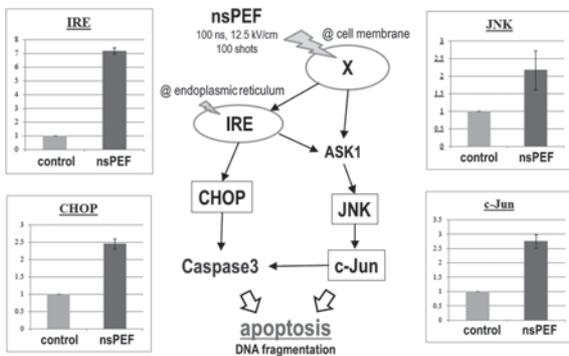


図4 nsPEF印加後のアポトーシス関連遺伝子の発現解析結果とアポトーシス関連シグナル経路。IRE, CHOP, JNK, c-Jun, caspase3, X(未特定)はタンパク質。棒グラフは各タンパク質をコードする遺伝子の発現量（左がコントロール, 右がパルス印加2時間後）。

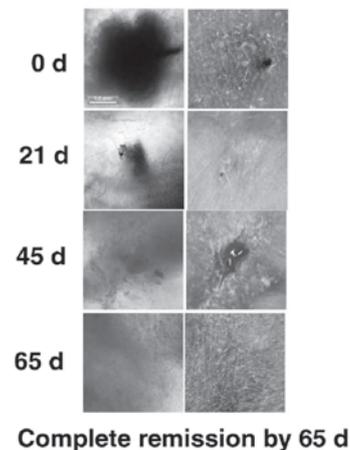


図6 nsPEFによるマウスメラノーマ(M116)の治療[4]。nsPEF処理（40 kV/cm, 300 ns, 100回）を0, 1, 2, 21, 22および23日目に実施。左列は患部の透視像, 右列は表面の様子である。

活化効果があることが確認されている。現在、他種のがんに対する効果が調べられている。

パルス高電界の細胞膜穿孔作用をドラッグデリバリー (Drug Delivery) として利用することも可能である。抗癌剤を患部に経皮投与した直後に電極をあててエレクトロポレーションを施すと薬剤は即座に患部の細胞で吸収されて効果を発揮する。この治療法を電気化学療法 (Electrochemotherapy, ECT) と呼び、欧米で臨床研究が進められている [5, 21]。

身体の深部のがんに対してパルス電界を使えるようにするために、2つの電界印加方式が検討されている。1つ目は内視鏡手術で用いられるような器具に電極を取り付けるなどして、体内に電極を持ち込んで電界を患部に直接印加する方法である。2つ目は、体外で発生させたパルス電磁エネルギーを電磁反射鏡等によって非侵襲的に体内患部に収束させる方法である。図7は回転楕円体反射鏡の第1焦点 ($z=0.15$ m) 付近に設置したアンテナから放射された800 MHzのパルス電磁波が第2焦点 ($z=0.4$ m) 付近に収束する様子を表している (シミュレーション)。電磁波の整合性のため、システムは体内と同等の誘電率の液体中に設置される。皮下脂肪による電磁エネルギーの吸収や臓器等の体内組織の電磁特性を考慮した高度なアンテナ設計が要求される。

5.3.2 創傷治療

nsPEFは出血を伴う創傷の治療にも効果がある。創傷治療とは、血小板を活性化させ生体本来の機能によって傷口を塞ぐことである。血小板は、通常の血液の中では滑らかな表面であるが、出血時には刺激物質により多数の長い突起を出し金平糖のような形になる (図8)。同時に新たに細胞膜上に細胞接着因子が発現し凝集する。血小板は血管内皮に接着・凝集して傷口を塞ぎ、一次止血栓を形成する。その後、血小板から各種凝固因子が放出されて、血液にあるフィブリンが凝固し、二次止血栓が形成されて止血が完了する。nsPEFは血小板を活性化させる作用があることがわかってきた。カルシウムは血小板の活性に関わる作用物質であり、nsPEFによって細胞膜に形成されるナノポアを通して外部から、または小胞体からカルシウムを放出させる [6]。血小板に限らず皮膚組織に対しても5.2.4節で述べた活性化作用があり、複合的な作用によって治療が促進されると考えられる。

5.4 まとめと今後の展望

パルスパワーはユニークな新規生物刺激法であり、その一形態であるパルス高電界の生体作用と医療応用の一部を紹介した。その他にも細胞分化制御などの試みが行われている。医療応用研究は、国際的な枠組みの中で、メカニズム解明・制御をめざした基礎研究と臨床などの応用の2つの方向があり、国内では前者、欧米では主に後者が進められている。医療応用を進めるためには医薬系研究者と産業界を巻き込んだ体制が不可欠である。そのために、着実な研究成果に基づくバイオエレクトロニクスを産業界に訴え続けることが肝要である。

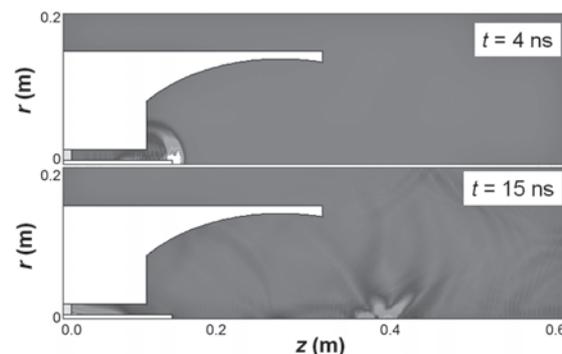


図7 非侵襲的体内パルス電磁エネルギー照射システムの水中共振電磁波伝搬シミュレーション (800 MHz, 10 ns パルス)。



(a) 不活状態

(b) 活性化状態

図8 nsPEF電界による血小板の活性化 [6]。

本章では医療分野に限定し述べたが、パルスパワーの物理刺激は、食品、農業、漁業、環境など、生物に関わるあらゆる分野で利用できる。現在、農業応用が最も進んでおり、パルスパワーの利用価値が広く認知されるようになった。他分野においても大きな可能性を秘めており、今後の展開が楽しみである。

参考文献

- [1] R. Becker, G. Selden, *The Body Electric* (William Morrow New York, 1987).
- [2] A. Sale and J. Hamilton: *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 789 (1967).
- [3] E. Neumann and K. Rosenheck: *J. Membrane Biol.* **10**, 279 (1972).
- [4] R. Nuccitelli, U. Pliquett, N. Chen, W. Ford, R.J. Swanson, S.J. Beebe, J.F. Kolb and K.H. Schoenbach, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **343**, 351 (2006).
- [5] S.B. Dev, D.P. Rabussay, G. Widera and G.A. Hofmann, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**, 206 (2000).
- [6] S.J. Beebe, P.F. Blackmore, J. White, R.P. Joshi and K.H. Schoenbach, *Physiol. Meas.* **25**, 1077 (2004).
- [7] S. Tsukamoto, T. Maeda, M. Ikeda and H. Akiyama, *Proc. 14th IEEE Int. Pulsed Power Conf.*, 2003, **2**, 1116 (2003).
- [8] K. Takaki, K. Kanetsawa, N. Yamazaki, S. Mukaigawa, T. Fujiwara, K. Takahashi, K. Yamasita and K. Nagane, *Proc. 16th IEEE Int. Pulsed Power Conf.*, 2007, **2**, 1253 (2007).
- [9] C.J. Eting, S. Bonnet, M. Pacher, H. Puchta and W. Frey, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat.* **16**, 1322 (2009).
- [10] D. Wang, X. Lin, K. Hirayama, Z. Li, O. Takeshi, W. Zhang, T. Namihira, S. Katsuki, H. Takano, S. Takio and H. Akiyama, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **38**, 39 (2010).
- [11] N. Nomura, M. Yano, S. Katsuki, H. Akiyama, K. Abe and S.-I. Abe, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat.* **16**, 1288

- (2008)
- [12] M. Yano, K. Abe, H. Akiyama, S. Katsuki, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. *in print* (2011).
- [13] M. Washizu and O. Kurosawa, IEEE Trans. Industry Applications **26**, 1165 (1990).
- [14] Y.F. Li, T. Kaneko and R. Hatakeyama, Small **6**, 729 (2010).
- [15] K.H. Schoenbach, A. Munyanyi, Y. Sun, L.H. Greene, R.P. Joshi, J.T. Camp and J.C. Collin, Proc. 2011 Int. Bioelectrics Symp. 12 (2011).
- [16] K.H. Schoenbach *et al.*, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. **14**, 1088 (2007).
- [17] K. Morotomi-Yano, Y. Uemura, S. Katsuki, H. Akiyama and K-I. Yano, Biochem. Biophys. Res. Comm. **408**, 471 (2011).
- [18] M. Yano, M. Yano, K. Abe, S. Katsuki and H. Akiyama, Proc. 18th IEEE Int. Pulsed Power Conf., 2011, *in print* (2007).
- [19] S. Katsuki, K. Mitsutake, M. Yano, H. Akiyama, T. Slauto and H. Kai, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. **17**, 678 (2010).
- [20] R. Heller, K.H. Schoenbach, J.F. Kolb, S. Xiao, S.J. Beebe, M. Malik, B. Hargrave and L. Heller, Proc. 2011 Int. Bioelectrics Symp. 5 (2011).
- [21] G. Sersa, I. Edhemovic, E. Brecej, D. Miklavcic, B. Kos, A. Zupanic, B. Mali and J. Tomaz, Proc. 2011 Bioelectrics Symp. 15 (2011).



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

6. バイオ・医療分野におけるプラズマ科学技術の展開

永津 雅章, 荻野 明久
 静岡大学創造科学技術大学院
 (原稿受付: 2011年7月21日)

Keywords:

plasma medicine, bio-medical application, plasma science, plasma technology, plasma sterilization, plasma modification

6.1 はじめに

近年、非熱平衡プラズマを用いたバイオ・医療分野における研究が注目されている。非熱平衡プラズマを用いたバイオ・医療分野における低温プロセスでは、用途あるいは処理対象物は様々であるが、プラズマ中で生成される励起状態の原子や分子種、プラズマから放射される紫外線域の光子、およびプラズマ荷電粒子が重要な役割を果たしている点では、これまでの半導体、金属、ポリマーを基板材料として用いたプラズマプロセスと基本的に同じであると考えられる。しかしながら、バイオ・医療応用におけるプロセスにおける大きな違いは、対象物が、微生物や細胞などの複雑な分子組成をもち、生物学的な機能を有する材料である点である。バイオ・医療分野におけるプラズマ応用を考える上で、当然のことながら、目的に対してどのようなプラズマを用いればよいかを考慮する必要がある。また、従前の方法と比べて、プラズマを用いることによるメリットは何かを考える必要がある。

図1はバイオ、医療、ナノテクノロジーの3分野に限定して、プラズマ科学技術との関係を示している。勿論、プ

ラズマ応用はそれ以外にも、光源、環境・エネルギー、材料創製など多岐に及ぶことは周知のとおりであるが、ここではナノテクノロジーと関係づけたバイオ・医療分野への応用に限定して記述することにする。

以下、本章の前半では、M. Kong 他[1]、およびG. Morfill 他[2]らによるプラズマ医療に関するレビューの記載内容も参考として、最近のトピックスや研究の動向を紹介し、後半は著者らが現在行っている研究の紹介をする。

6.2 バイオ・医療分野へのプラズマ応用に関する最近の研究動向

特に、医療分野へのプラズマ応用では、現在多くの研究者によって研究が進められている。医療器具の滅菌・殺菌に関する研究は、1980年代から実用化をめざした研究が活発に行われ、1990年代から急激に増加している。図2はWeb of Science (Thomson Reuters 社) を用いて"Plasma Sterilization" or "Plasma Inactivation"で検索した1992年以降の論文数の年度ごとの推移を示している。2010年途中の調査データであるため、2010年度は実際には下図の数値より増えているものと思われる。最近20年間で急激に研究論文数が増加しており、欧文論文誌の特集としても扱われるようになってきている。

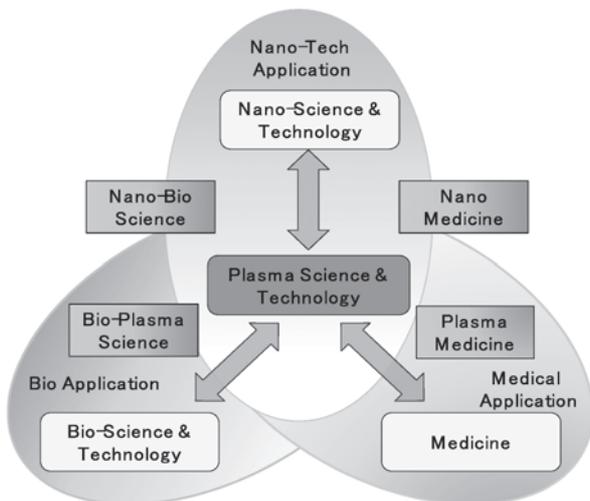


図1 プラズマ科学技術のバイオ・医療応用との関連。

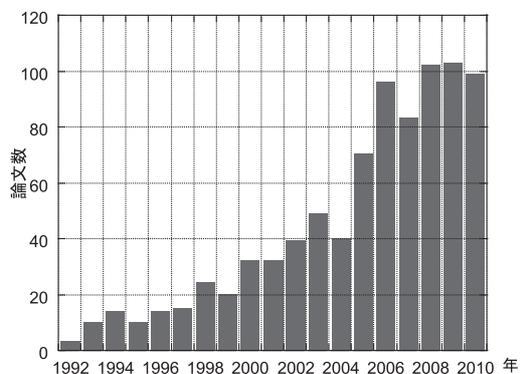


図2 1992年以降のプラズマ滅菌関係の論文数の推移。

プラズマの医療応用の中でも、医療現場で用いられているアルゴンプラズマ凝固 (Argon Plasma Coagulation, APC) 法は、1970年代から研究が進められ、大気圧下での非熱平衡プラズマを用いて臨床応用されており[3]、止血やアレルギー性鼻炎の治療に用いられている。プラズマの医療応用に関する研究は、2007年に米国 Drexel 大学の A. Fridman を中心として、"Plasma Medicine"に関する第1回国際会議が開催され、Plasma Medicine に関するジャーナルも刊行されている。ここで、Plasma Medicine は図1に示したように、プラズマ科学技術と医学が融合した新しい学際的分野であり、A. Fridman は "a new field at the intersection of plasma science and technology with biology and medicine - Plasma Medicine" と表現している。

プラズマプロセスによるバイオ・医療応用は様々であるが、プラズマ微細加工技術を駆使したバイオチップ作製[4]や、ドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System; DDS) への適用をめざしたテーラーメイドな薬剤創製[5]、磁性体ナノ微粒子表面へのアミノ基などのプラズマ化学修飾[6]や化学修飾した表面上への糖鎖などの固定化[7]など、新たな研究の展開が進められている。これらの微細加工技術や化学修飾には、一般的に低圧力放電プラズマが主に用いられている。一方、医療分野でのプラズマ応用では、真空ポンプを用いずに大気圧下での処理が可能であり、さらに、低温プロセスが可能なプラズマ源が求められている。

図3は Stoffels らにより開発されたプラズマニードル装置を示しており、電極の先端にプラズマを発生させ、虫歯治療などの歯科医療に用いることを提案した[8]。プラズマの生成は、装置の中心部の針状電極と対象物との間の高周波放電により針電極先端のみに、局所的にプラズマが生成される。このプラズマニードルを用いた菌の不活化に関する研究も行われており、プラズマから放射される紫外線発光に加えて、水分を含んだ対象物表面から蒸発してくる水分子から生成される OH ラジカルが、菌の不活化に関与しているものと考えられている。また、大気圧プラズマジェットの研究開発も精力的に行われており、周波数が数 kHz から数 10 kHz の可聴周波数領域の高電圧や数 MHz から数 10 MHz の高周波 (RF) が用いられている。図4は周波数 13.56 MHz の RF を用いた大気圧プラズマジェットの電極構造を示しており[9]、プラズマジェットは円筒系ノズルの先端から吹き出される構造である。低圧下および大気圧下における非熱平衡プラズマでは、一般に電子温度

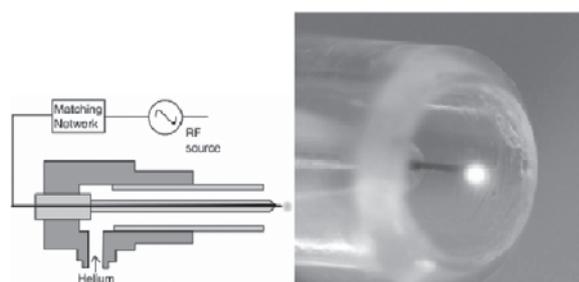


図3 プラズマニードル装置の概略図(左)と放電写真(右)[8].

は数 eV のオーダーであり、これらの電子とガスとの衝突励起で生成された反応性の高い励起原子により、DNA、タンパク質、細胞膜などの分子結合を分解させることが可能である。低圧力放電プラズマでは、放電に用いたガスの中性粒子は電子との衝突が少ないためにエネルギーを獲得できず、室温に近い温度で維持されるため、プラスチックなどの非耐熱性対象物の処理が可能となる。これらの非熱平衡プラズマを用いた医療応用に関するレビューの詳細については、Kong 他[1]、あるいは Morfill 他[2]によるレビューを参照されたい。

6.3 低圧力マイクロ波プラズマを用いた滅菌実験における最近の結果から

ソフト界面を有する微生物やタンパク質などのバイオ高分子とプラズマとの相互作用に関する研究は、プラズマ科学の新たな学際領域への展開を図る上で極めて重要である。著者らのグループでは、低圧力マイクロ波プラズマによる芽胞菌 (およびエンドトキシン) の不活化、およびマイクロ波プラズマによるペプチドおよびアミノ酸などの生物機能の不活化に関する研究を実施してきた[10-12]。以下、四重極質量分析器 (QMS) を用いた酸素プラズマによる芽胞菌エッチングの検証実験の結果[13]について紹介する。

実験はマイクロ波励起表面波プラズマ装置を用いて行った。生物指標体として、芽胞を形成した耐熱性菌である *Geobacillus Stearothermophilus* 菌を用い、真空容器内部のステージ上のシャーレに設置した。酸素プラズマによるエッチングを実験的に検証するため、QMS を取り付け、シャーレ上の金属板の可動シャッターを開閉し、エッチング生成物の検出を行った。図5は、酸素プラズマ照射時におけるシャッターを開閉した時の QMS 信号の時間波形を示している。

図5に示したように、 H_2O ($m/e = 18$) および CO_2 ($m/e = 44$) 成分が検出されており、菌細胞の水素および炭素成分の酸素原子によるエッチングによる生成物と考えられる。図6は窒素・酸素混合ガスプラズマを用いた場合の、プラズマ照射前(左)と1分間照射後の FE-SEM による菌形状の比較を示している。プラズマ照射により、菌表面がエッチングされ、表面がザラザラに変化していることがわかる。

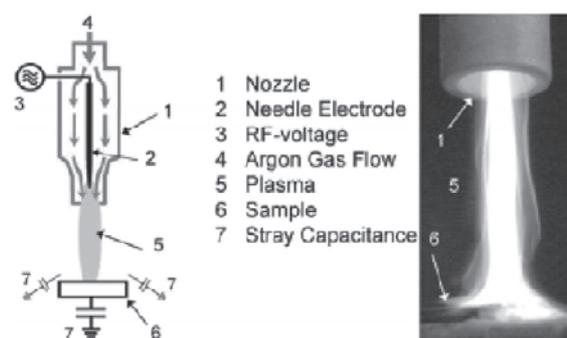


図4 大気圧プラズマジェット装置の概略図(左)と放電写真(右)[9].

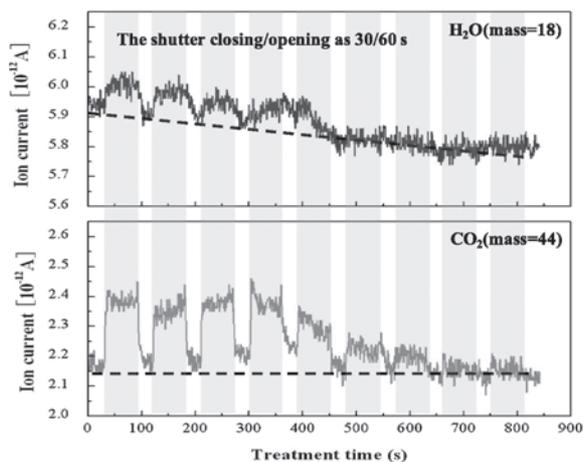


図5 酸素プラズマ照射時の $m/e = 18$ および $m/e = 44$ 成分の OMS 信号波形[13].

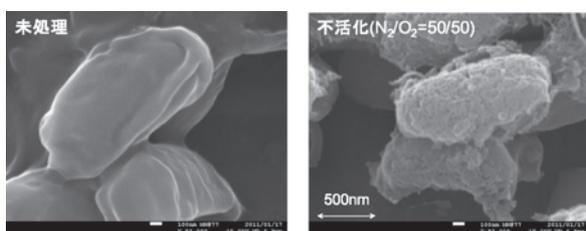


図6 窒素・酸素プラズマ照射前(左図)および照射後(右図)の *G. Stearotherophilus* 菌の FE-SEM 写真.

菌の不活化プロセスとエッチング現象との関係を明らかにするために、酸素プラズマを用い、マイクロ波パワーを変化させたときの菌形状の変化と不活化との関係を調べた。図7はマイクロ波パワーを400 W、600 W、および800 Wと変化させたときの *G. Stearotherophilus* 菌の生残特性を示している[13]。ここで、白抜き記号でプロットしたデータは、LiF光学フィルタで電子、イオン、励起原子・分子などのプラズマ粒子をブロックした時の結果を示しており、塗りつぶしてプロットしたデータは、直接プラズマにさらした場合の結果を示している。なお、LiF光学フィルタは波長120 nm以上のプラズマ放射光を透過できるため、LiF板でプラズマをブロックした場合の結果は、プラズマ放射光のみによる効果を示している。

図から明らかのように、直接プラズマ照射の方が短時間で6ケタの菌の死滅が得られることがわかる。なお、図7において、生残特性が異なる傾きをもつのは、使用した生物指標体の芽胞菌がクランプ(菌の重なり)を形成するため、裏側の菌を死滅するのに時間がかかるようになるためである。現在使用している菌の場合では、約0.1%がクランプを形成しているものと考えている。

6.4 医療用材料開発へのプラズマ応用

6.4.1 ドラッグデリバリーシステム用磁性体ナノ微粒子のプラズマ表面化学修飾

近年、金などの金属ナノ微粒子の医療関係への応用に関する研究が精力的に行われている[14-16]。特に、グラフェンによりカプセル化された鉄などの磁性体金属微粒子

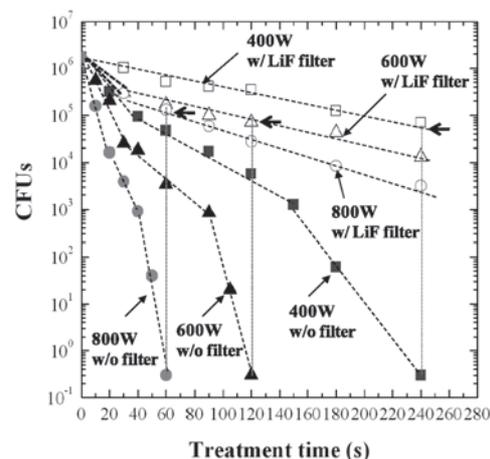


図7 酸素プラズマにおける芽胞菌の生残特性のマイクロ波パワー依存性[13].

は、強酸の中でも安定であり、ドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System; DDS) などへの医療応用が考えられている。しかしながら、これらの微粒子の医療診断や薬物療法への応用を可能にするためには、ナノ微粒子の生体適合性や、液体中での分散性の向上が不可欠である。磁性ナノ微粒子を用いた DDS では、ウイルスとほぼ同じ大きさ(数10 nm程度)の磁性体コアに、人間の細胞膜と同じコレステロールやリン脂質から組成される脂質分子膜でカプセル化し、抗ガン剤などの薬物を微粒子表面に付与して用いられる。一般に、血液中に3 nmより小さい物質であると、血液中の栄養を吸収するように自然に吸収したり、排出したりするように働くが、400 nm以上の大きさのものは異物として認識され、分解して排出される。このため DDS では、一般に4-400 nmの大きさのものが用いられている。以下に、我々のグループで行ったRFプラズマを用いた磁性体ナノ微粒子の表面修飾、および多糖類の固定化に関する実験結果を紹介する。

実験では、直流アーク法により作製したグラフェン層でカプセル化された磁性体ナノ微粒子を用い[17]、アルゴンプラズマによる前処理を行った後、アンモニアプラズマによるアミノ基修飾を行った。図8はプラズマ処理前および処理後の微粒子に、それぞれ蛍光色素SDPエステルを反応させ、励起光の波長494 nmを照射して測定した蛍光顕微

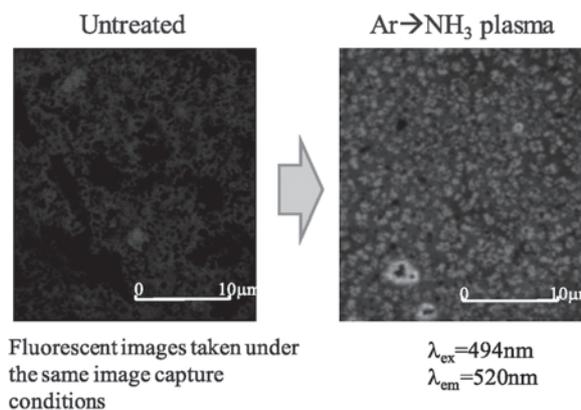


図8 蛍光色素による鉄ナノ微粒子のアミノ基修飾の確認。

鏡写真を示している。図から明らかなように、プラズマ処理後のサンプルは緑色の蛍光を示しており、アミノ基の修飾が微粒子表面に一様に行われていることを示している。

本研究成果を踏まえ、このプロセスをバイオセンサの作製に応用するための予備実験として、次にカーボンナノチューブアレイ基板を用いたカーボンナノチューブのアミノ基修飾の確認実験を行った。図9は熱CVD実験装置を用い、直径1 μm のドット状のNi触媒上に垂直配向成長させたカーボンナノチューブアレイ基板のFE-SEM写真を示している。図から長さ5 μm 程度の多層カーボンナノチューブが垂直配向成長している様子がわかる。

アルゴンプラズマによる前処理および引き続き行ったアンモニアプラズマ処理によって、カーボンナノチューブ表面のみにアミノ基修飾が実現できていることが確認できおり、この実験結果は、カーボンナノチューブ表面に、アミノ基と選択的に結合する多糖類を固定化することが可能であることを示唆している。

6.4.2 プラズマによる医療用ポリマー材料表面のアミノ基修飾とヘパリン固定化

ポリマーは、自由な形成が可能、柔軟、破損などの恐れが少なく取り扱いが容易であり、さらに安定であるという利点があるため、医療器具用材料として広く使用されている。医療器具に求められる条件として、生体に優しく、かつ安全性が高い材料であることが最も重要な要件である。

特に体内に挿入する医療器具では生体適合性を保持させることが重要であり、また血液接触性器具では特に、抗血液凝固性(抗血栓性)を有することが必要とされている。カテーテル、ステントなどの体内に挿入して用いる医療器具では、その血液適合性の低さから、短時間の体外血液循環においてもヘパリンなど抗凝血、抗血栓性剤の投与が必要である。大量の抗凝血剤(ヘパリン)の投与は、脂質代謝や骨代謝異常、血小板機能不全、溶血、アレルギー反応などの副作用の原因になり、患者の出血リスクが高まるば

かりでなく、術後の止血時間が大幅に増加し、患者のみならず術者への負担が大きくなるため、長時間にわたる使用は制限されている。血液凝固に関しては、異物と生体組織の界面が直接的に影響しているといわれている[18]。つまり、医療材料の生体適合性を向上させるには、表面に抗凝血性を付加することで実現される。これまでも、医療用ポリマーの表面改質に関して、様々な研究が行われており[19]、ヘパリンのコーティングも検討・実施されているが、多くの化学的処理が必要で、廃液処理の面の問題などから、ドライプロセスで表面処理を行うプラズマ修飾が目目されている。

ここでは、カテーテルのような血液接触性の医療器具に使用されるポリウレタン(PU)を対象に、抗凝血剤として広く知られているヘパリンを、簡便にポリマー表面に修飾し、抗血液凝固性の付加を行うことを目標とした。ヘパリンの固定化は、表面波プラズマを用いてポリマー表面にアミノ基を化学的に修飾し、ヘパリンの末端との反応により固定化することとした。

サンプルに対するプラズマ処理は、2.45 GHz マイクロ波励起表面波プラズマ装置で生成したアルゴンプラズマ、アンモニアプラズマ(圧力13 Pa)を用いて行った[20]。アルゴンプラズマはサンプル表面のクリーニングおよび活性化のために前処理として30 s、アンモニアプラズマはアミノ基の修飾のために60 s処理を行った。ヘパリンの固定作業は、プラズマ処理した後、サンプルを真空容器から取り出し、すぐにヘパリン溶液に浸漬した後、取り出して室温、低湿度下で乾燥させることで行った。その後、固定化されなかったヘパリンを取り除く目的で、エタノール中で3分間1分ごとにエタノールを変えながら超音波洗浄を行った。ヘパリン溶液は濃度1%で調製し、溶媒は90%の純水と10%のエタノールを混合して用いた。エタノールを混ぜるのは、ヘパリン溶液がポリマー表面から弾かれなくようにするためと、固定化により生じる水を脱水するためである。ヘパリンの固定と表面の化学構造の関係を調べるために、プラズマ処理を行った時のPUの化学構造を、光電子分光分析装置(X-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS)により解析した。プラズマ処理によるアミノ基修飾の定量分析では、Faviaら[21]によって報告された4-Trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA)による第一級アミノ基の誘導体化を行った。

表1はプラズマ未処理のPUサンプルと、各条件でのプラズマ処理後のサンプルのXPS解析の結果を示している。ここで、アミノ基の定量評価を行うため、誘導体化法

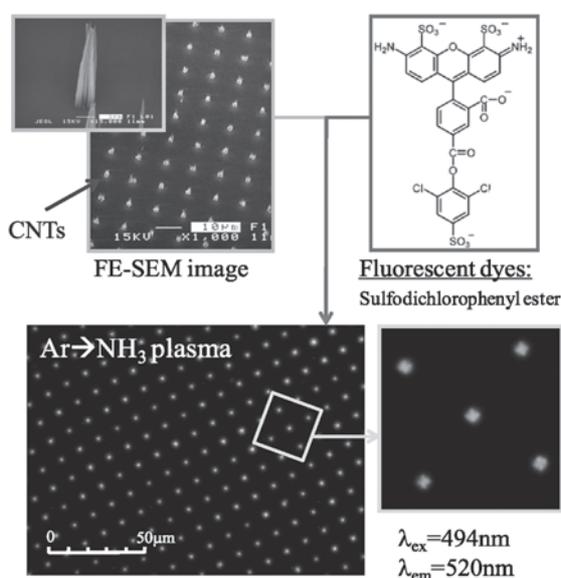


図9 プラズマ表面修飾によるカーボンナノチューブ表面のアミノ基修飾。

表1 プラズマ未処理および処理後のサンプルのXPS解析結果。

Treatment	Atomic composition (%)				-NH ₂ /C ratio (%)	-NH ₂ /N ratio (%)
	C	O	N	F		
Untreated	73.7	23.7	2.3	0.3	0.15	4.8
Ar plasma pretreated	73.3	22.2	2.4	2.1	0.95	29
NH ₃ plasma treated without pretreatment	72.9	17.0	4.6	5.5	2.52	40
NH ₃ plasma treated with pretreatment	76.4	13.8	3.7	6.0	2.64	54

を用いており、表中のF原子は第一級アミノ基に結合したTFBA成分に由来するものであり、この割合からアミノ基の修飾率 ($-\text{NH}_2/\text{C}$) および選択率 ($-\text{NH}_2/\text{N}$) を評価した。結果は、未処理、アルゴンプラズマによる前処理のみ、前処理なしでアンモニアプラズマ処理のみ、前処理のあとにアンモニアプラズマ処理したサンプルの比較を示す。表よりプラズマ処理により酸素の元素比が減少し、窒素の元素比が増加していることがわかる。これは、アルゴンプラズマでは、表面のクリーニングやエッチングの効果、アンモニアプラズマでは、アミノ基の修飾と表面の還元が主な原因であると考えられる。また、アンモニアプラズマ処理によりアミノ基の修飾がなされており、2.5%程度のアミノ基の修飾率が得られた。前処理の有無によるアミノ基の修飾率に大きな差はみられなかったが、アルゴンプラズマによる前処理を行うことで、アミノ基の選択率がわずかに向上したことがわかる。

プラズマ処理後のC=Oの増加の原因として、プラズマ処理により生成された活性点(ダングリングボンド)が、大気曝露や、真空容器内の在留酸素などと結合した可能性、および、C-OがC=Oに変化した可能性などが考えられる。アンモニアプラズマ処理では、C-Nの増加が確認され、アミノ基の修飾によるものと考えられる。また、アンモニアプラズマ処理後のC-OおよびC=O-Oの減少は、プラズマ中の水素による還元作用によると思われる。

プラズマ処理後、ヘパリンを固定化したPU表面をXPSで解析した。ヘパリンはD-グルクロン酸あるいは α -L-イブロン酸とD-グルコサミンが1, 4結合により重合した直鎖の多糖の総称であり、分子量は5000~20000程度と長く複雑な分子構造をもつ。このため、XPSによる浅い表面解析ではややばらつきを含む結果となるが、アミノ基の修飾率 ($-\text{NH}_2/\text{C}$) の増加と共にヘパリン固定化量 (S/C) も増加することがわかった[7]。

図10は、血漿カルシウム再加凝固時間を測定し、サンプル表面の抗凝血性を比較した結果である。この測定は採血時に脱カルシウム作用(一般的にはクエン酸ナトリウムを用いてカルシウムイオンを結合させる)で抗凝血剤を使用して分取した血漿にカルシウムイオン(Ca^{2+})を再添加した時の凝固時間である。本実験では、ヘパリンの抗凝血作用が非常に強いいため、凝固系因子の活性化を行う試薬(aPTT)を添加し、凝固因子が働いてフィブリンが析出する時間を分光的に測定した。図から、ヘパリンを固定化したPU表面における血液凝固時間は大幅に延長され、28時間経過後も凝固しないことが確認された。

6.5 おわりに

本章では、非熱平衡プラズマのバイオ・医療分野への応用に関する最近の研究の動向を紹介した。また、著者らのグループで行った、低圧力マイクロ波プラズマを用いたプラズマ滅菌の最近の成果、およびドラッグ・デリバリー・システムへの応用をめざした磁性体ナノ微粒子のプラズマ表面修飾、血液抗凝固特性付加を目的としたポリマー表面のアミノ基修飾とヘパリンの固定化に関する研究成果を紹介した。

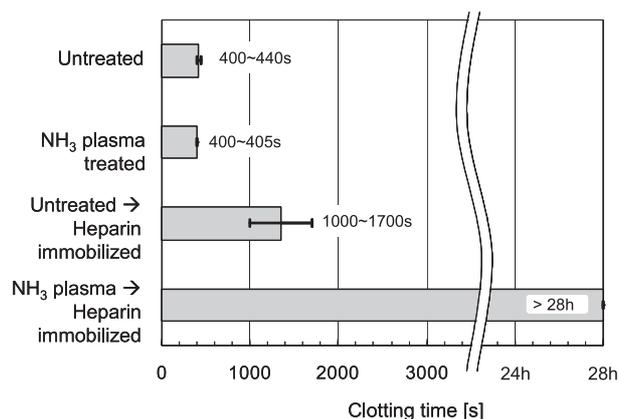


図10 各サンプルの血液抗凝固特性の比較。

介した。なお、本研究の遂行にあたり、協力いただいた研究室のYing Zhao氏、Teguh Endah Saraswati氏、および博士修士課程学生諸君に感謝します。

参考文献

- [1] M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko and T. Shimizu, *New J. Phys.* **11**, 115012 (2009).
- [2] G.E. Morfill, M.G. Kong and J.L. Zimmermann, *New J. Phys.* **11**, 115011 (2009).
- [3] 崎山幸紀：小特集“医療バイオ分野へのプラズマ応用、プラズマ治療・手術”，*プラズマ・核融合学会誌* **83**, 613 (2007).
- [4] 一木隆範：*応用物理* **80**, 0128 (2011).
- [5] 葛谷昌之：*応用物理* **76**, 0357 (2007).
- [6] T.E. Saraswati, T. Matsuda, A. Ogino and M. Nagatsu, *Diam. Relat. Mater.* **20**, 359 (2011).
- [7] A. Ogino, S. Noguchi and M. Nagatsu, *Advanced Materials Research* **222**, 297 (2011).
- [8] E. Stoffels, I.E. Kieft, R.E.J. Sladek, L.J.M. van den Bedem, E.P. van der Laan and M. Steinbuch, *Plasma Sources Sci. Technol.* **15**, S169 (2006).
- [9] K.D. Weltmann, R. Brandenburg, T. Woetke, J. Ehlbeck, R. Foest, M. Stieber and E. Kindel, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41**, 194008 (2008).
- [10] Y. Zhao, A. Ogino and M. Nagatsu, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 191501 (2011).
- [11] Y. Zhao, M.K. Singh, A. Ogino and M. Nagatsu, *Thin Solid Films* **518**, 3590 (2010).
- [12] I. Motrecu, A. Ogino, S. Tanaka, T. Fujiwara, S. Kodani, H. Kawagishi, G. Popa and M. Nagatsu, *Soft Matter* **7**, 4845 (2011).
- [13] Y. Zhao, A. Ogino and M. Nagatsu, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 191501 (2011).
- [14] M. Bystrzejewski, S. Cudzilo, A. Huczko, H. Lange, G. Soucy, G. Cota-Sanchez and W. Kaszuwara, *Biomolecular Eng.* **24**, 555 (2007).
- [15] Q.A. Pankhurst, N.K.T. Thanh, S.K. Jones and J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, 224001 (2009).
- [16] C. Sun, J.S.H. Lee and M.Q. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1252 (2008).
- [17] M. Nagatsu, T. Yoshida, M. Mesko, A. Ogino, T. Matsuda, T. Tanaka, H. Tatsuoka and K. Murakami, *Carbon* **44**,

- 3336 (2006).
- [18] 大塚英典, 片岡一則: 表面技術 54, 973 (2003).
- [19] T. Chandy, G.S. Das, R.F. Wilson and G.H.R. Rao, *Biomaterials* 21, 699 (2000).
- [20] A. Ogino, M. Kral, K. Narushima, M. Yamashita and M. Nagatsu, *Jpn. J. Appl. Phys.* 45, 8494 (2006).
- [21] P. Favia, M.V. Stendardo and R. D'Agostino, *Plasma Polym.* 1, 1 (1996).



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

7. おわりに

永津 雅章, 畠山 力三¹⁾

静岡大学創造科学技術大学院, ¹⁾東北大学大学院工学研究科

(原稿受付: 2011年8月21日)

近年, 医療-バイオ分野へのプラズマ応用に関する関心が高まっている. 当該分野の研究を体系的に推進するには, プラズマ生成, 制御, および診断を専門とするプラズマ科学に関わる研究者のみならず, 医療, バイオ分野の研究者との有機的連携が不可欠である. 筆者らは, 医療-バイオ分野へのプラズマ応用に関する研究をわが国において有機的に推進するため, プラズマ・核融合学会会員に加えて非会員, 合計22名の研究者で構成したプラズマ・核融合学会「プラズマバイオ融合科学への新展開」専門委員会(主査: 畠山力三(東北大), 幹事: 永津雅章(静大), 金子俊郎(東北大))を2008年度に立ち上げ, 2年間にわたり研究会開催および学会年会でのシンポジウムの開催などの活動を行ってきた.

一方, この時期, 海外においても, 「Plasma Medicine」と呼ばれる医療分野へのプラズマ応用に関する研究が精力的に進められ, 2007年にPlasma Medicineに関する国際会議(1st International Conference on Plasma Medicine)が開催され, 回を重ねて2012年6月には第4回国際会議がフランスで開催される予定となっている. さらに, 欧文ジャーナルのNew Journal of Physics[1]やPlasma Processes and Polymers[2]でも, 「Plasma Medicine」に関する特集が企画されるなど, 新たな研究領域としての関心が世界的に高まってきている. わが国においても, 2007年にプラズマ滅菌に関する研究開発委員会が日本学術振興会に設置され, プラズマ関係者のみならず, 医学系, 生物系の研究者と連携した新たな学術分野の構築に向けた交流が進められている[3].

本プロジェクトレビューでは, 「はじめに」において紹介がされたように, 専門委員会の活動成果の纏めるにあたり, プラズマ以外の分野で活躍されている方にも執筆をお願いした. 2009年度プラズマ・核融合学会年会シンポジウムにおいて当専門委員会が企画した「プラズマバイオ融合科学への新展開」において, 非常に興味あるご講演を頂いた理化学研究所の前田瑞夫先生には, 「生体高分子ソフトインターフェースの科学」と題して, プラズマバイオ融合科学の展開にとって重要なソフトインターフェースの科学について, プラズマ・核融合学会会員の皆様にもわかりやすく執筆いただいた.

また, 専門委員会委員であり, Plasma Medicineに関する国際会議の組織委員である浜口智志先生(阪大)には, 「プラズマ医療におけるプラズマ生体相互作用」と題して, プラズマが生体組織に及ぼす効果について, 最近の様々な研究事例を挙げてわかりやすく執筆いただいた. また, 金子俊郎先生と畠山力三先生(東北大)には, 「プラズマナノバイオトロンクス研究の最新動向」と題して, 液相プラズマを利用したカーボンナノチューブ内包DNAのドラッグ・デリバリー・システムへの応用, 磁気共鳴画像(MRI)造影剤等への応用をめざした磁性金属を内包した新機性能性フラーレンの創製, さらにDNAとカーボンナノチューブの電気的特性を活用した新たなナノバイオエレクトロニクスデバイスの創製などについて, 最近の研究成果をご紹介いただいた. また, 勝木淳先生(熊本大)には, 「パルス高電界の生体作用と先端的医療応用」と題して, 短パルスによる高電界の生体分子に及ぼす相互作用やその医療応用に関する最近の研究成果を紹介いただいた. 最後に, 永津(静大)らによる「バイオ・医療分野におけるプラズマ科学技術の展開」と題して, プラズマ滅菌および医療用材料開発へのプラズマ応用に関する最近の研究成果の紹介を行った.

プラズマと生体組織あるいは生体高分子との相互作用に関する研究は, 端緒に着いたばかりであるが, プラズマ応用の観点から, 今後その展開が大いに期待される新学術領域である. 現在, プラズマ表面相互作用の研究は, 低気圧から大気圧までの気相のみならず, 液相や気液混相, さらに超臨界状態にまで研究対象を広げている. 従来, プラズマと対向する材料は金属や半導体などの固体が主であったが, 液体や生体高分子のような, いわゆるソフトマターやソフトインターフェイスが今後の重要な研究対象になるであろう. 医療-バイオ分野におけるプラズマ科学は, まだわからないことばかりであるが, そこから得られる成果は, きっと技術立国日本の将来を拓く推進力となるものと確信している.

本プロジェクトレビューを終えるにあたり, 執筆いただいた諸先生方に改めて厚く感謝申し上げるとともに, プロジェクトレビューとして取り上げていただいた学会編集委員会の山崎委員長はじめ, 原稿の閲読をいただいた編

7. Conclusion

NAGATSU Masaaki and HATAKEYAMA Rikizo

corresponding author's e-mail: tmnagat@ipc.shizuoka.ac.jp

集委員諸氏の方々に厚くお礼を申し上げます。本プロジェクトレビューが、当該研究分野への研究者、特に若手研究者に関心をもっていただく機会となれば幸いです。

参考文献

- [1] G.E. Morfill, M. G. Kong and J. L. Zimmermann, Focus on Plasma Medicine , New J. Phys. **11** , 115011 (2009).
- [2] M.Laroussi, A.Fridman, P. Favia, M. R. Wertheimer (Editor) Special Issue: Plasma Medicine, Plasma Process. Polym. **7**, Issue 3-4, 193 (2010).
- [3] 日本学術振興会・研究開発専門委員会「プラズマ照射による医療用品，エンドトキシンならびにプリオン不活化法と応用」に関する研究開発専門委員会（委員長：新谷英晴（中央大学），2008.10.01～2011.09.30）。

プロジェクトレビュー執筆者紹介



はたけ やま りき ぞう
畠山 力三

東北大学大学院工学研究科教授。1976年3月東北大学大学院工学研究科電子工学専攻博士課程修了（工学博士）。同助手、助教授を経て1997年12月より現職（物性工学講座プラズマ基礎工学分野担当）。プラズマ科学の基礎と応用に従事しています。



なが つ まさ あき
永津 雅章

静岡大学創造科学技術大学院，教授。創造科学技術大学院長。主な研究分野：プラズマ生成，プラズマ応用（プラズマのバイオ・医療応用，材料表面プロセス）。最近，大学院博士課程を希望する日本人学生が全体的に少なくなった感が否めませんが，外国人留学生を受入れて，何とか研究力の維持を図っています。



まえ だ みず お
前田 瑞夫

独立行政法人 理化学研究所，主任研究員。主な研究分野：高分子化学，分析化学，バイオ材料学。経歴：1983年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了，工学博士。東大工学部助手，九州大学工学部助教授，同教授を経て2002年より現職。最近はワイフの劇場通いにつきあうことが息抜きです。大掛かりな東宝ミュージカルも小さな芝居小屋の舞台も素直に楽しめる歳になりました。



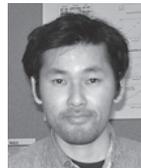
はま ぐち さと し
浜口 智志

大阪大学工学研究科教授。東京大学理学部物理学科卒，同大学院修士・博士課程を経て，ニューヨーク大学クーラン数理科学研究所（大学院数学科）博士課程修了。理学博士，Ph.D. 専門はプラズマおよびプラズマ表面相互作用の理論・シミュレーション。



かね こ とし ろう
金子 俊郎

東北大学大学院工学研究科准教授。1997年3月東北大学大学院工学研究科電子工学専攻博士課程修了，同助手を経て2004年1月より現職。主な研究テーマは，ナノ・バイオ・医療へのプラズマ応用の観点から，液体中または液体と接したプラズマの生成・制御とそれを利用した新規ナノバイオ物質の創製である。一方で，核融合プラズマや宇宙プラズマにおいて観測される現象のメカニズムを室内実験で明らかにすることを目指して，磁化プラズマ中の不安定性や構造形成，電磁波による波動吸収・加熱等に関する基礎的な研究にも従事している。



かつ き すな お
勝木 淳

1991年熊本大学大学院修士課程修了。同大学工学部助手，助教授を経て，2007年から同大学バイオエレクトリクス研究センター教授。博士（工学）。2000年に米国 Old Dominion 大学客員研究員。最近は，水中高速放電現象，Zピンチ放電プラズマの光源応用，バイオエレクトリクス（パルスパワーによる動物細胞制御）に従事。プライベートでは壮年ソフトボールにハマっており，全国制覇をめざしている（2010年ベスト8）。



おきの あき ひさ
萩野 明久

静岡大学創造科学技術大学院，准教授。専門分野はプラズマ応用で，現在は主に材料表面の機能性向上を目的としたプラズマ処理に関する研究に従事している。実験・研究以外では，時間を気にせず楽しめるサイクリングやランニングで体を動かすのが好きだが，最近あまりできず体力の低下が心配。妻と1歳半になる娘とで近くの公園を散歩し，図書館によって本を借りてくる週末のひとつと娘の成長を楽しみにしている。