



## 小特集 大気圧プラズマ-液相反応プロセスにおける診断技術の進展

# 5. 電子スピン共鳴法を活用した プラズマバイオ反応プロセスの診断

## 5. Diagnostics of Plasma-Bio Reaction Processes by Electron Spin Resonance (ESR)

石川健治, 近藤 隆<sup>1)</sup>, 竹田圭吾, 呉 準席<sup>2)</sup>, 橋爪博司, 田中宏昌,  
近藤博基, 太田貴之<sup>2)</sup>, 伊藤昌文<sup>2)</sup>, 関根 誠, 堀 勝  
ISHIKAWA Kenji, KONDO Takashi<sup>1)</sup>, TAKEDA Keigo, OH Jun-Seok<sup>2)</sup>, HASHIZUME Hiroshi,  
TANAKA Hiromasa, KONDO Hiroki, OHTA Takayuki<sup>2)</sup>, ITO Masafumi<sup>2)</sup>, SEKINE Makoto and HORI Masaru  
名古屋大学, <sup>1)</sup>富山大学, <sup>2)</sup>名城大学

(原稿受付: 2017年1月30日)

プラズマバイオ反応を理解する上で、生物の活動環境に存在する液相が強く影響するため、プラズマの生物作用の理解には、ダイナミクスな液相反応プロセスの診断が意義深い。プラズマがもたらす反応場の非熱的、非平衡プロセスでは、熱平衡状態に依らず活性種・フリーラジカルの反応速度が支配する機構の理解が欠かせない。そのためには、ラジカルの定量的な情報が重要である。本章では、液相・生体の反応プロセス診断について、電子スピン共鳴法によるラジカル測定に基づき行った結果について紹介する。プラズマ起因で生成する活性種と生体との相互作用とプラズマ生物化学の体系化が得られ、その暁には恒常性をもつ生体にプラズマ作用を意図的に与え、生体反応の工学を創成したい。

### Keywords:

electron spin resonance (ESR), spin-trapping, radical, VUV, plasma medicine, plasma agriculture, plasma aquaculture, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> ion, peroxynitrite (ONOO), reactive oxygen nitrogen species (RONS)

### 5.1 序 プラズマバイオ反応プロセス

大気圧で非平衡プラズマ (NEAPP) の生成が盛んに研究されるようになり、Iwasaki らは電子密度  $>10^{15} \text{ cm}^{-3}$  をもつ NEAPP 源を報告した [1]。液体や生体へのプラズマ照射が注目されはじめ [2]、この高密度プラズマ源の利用をはじめとして、様々な応用に展開を広げている。2012 年に Iseki らが培養細胞にプラズマ照射した結果、繊維芽細胞が生存のまま、卵巣がん細胞が選択的に死滅されることを発見し [3]、2014 年に Tanaka らと Utsumi らは、プラズマを照射した細胞培養液で細胞培養するだけで、がん細胞が選択死滅することを報告した。このプラズマ照射した培養液はプラズマ活性溶液 (Plasma Activated Medium: PAM) と呼ばれ [4]、ヒトの薬物耐性卵巣がんをマウス皮下に接種して、そこに PAM を投与して腫瘍の拡大の抑制が実証された [5]。PAM の抗腫瘍効果には、プラズマ照射により発生した化学種の関与があるものの、その全容解明には至っていない。

培養液の前に、プラズマ照射した純水 (Plasma treated water: PTW) について精力的に分析され、2010 年に Ikawa らと 2012 年に Tani らが、純水中にスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) の生成を報告した [6, 7]。2011 年に Shimizu らは PTW 液中に、NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> の生成 [8]、Sato

Nagoya University, Nagoya, AICHI 464-8603, Japan

らは細胞培養液にプラズマを照射して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成が報告された [9]。電離放射線を照射した水中の  $\cdot\text{H}$ ,  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{O}\cdot$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  などのラジカル生成は、放射線化学の分野では良く知られている [10]。プラズマの液体への照射でも、多くの活性種の生成に疑いはないものの、液相活性種の解析結果には (i) プラズマ源の相違、(ii) 培養液では有機物、無機イオンなど、液体の化学組成に依存しており、プラズマ活性溶液、延いてはプラズマ-液相の相互作用の解明は難を極める (図 1)。一つの結論というよりは、むしろ、そのダイナミクスを診断することによって、時々刻々の分析結果が理解に重要と思われる。

本章では、バイオ応用液相中の定量的なプロセス診断が望まれており、プラズマ活性溶液内の液相に発生する化学種を、主に電子スピン共鳴法によって解析した結果を紹介し、反応プロセス診断について考察する。

### 5.2 電子スピン共鳴法による液相ラジカル解析手法

電子スピン共鳴 (ESR) 法は、静磁場下でゼーマン分裂した量子準位間の遷移による吸収を観測する手法である [11, 12]。ゼーマンエネルギーの共鳴条件は、 $h\nu = g\beta H$  で与えられ、ここで H は磁場、 $\nu$  は振動数、 $h$  はプランク定

corresponding author's e-mail: ishikawa.kenji@nagoya-u.jp

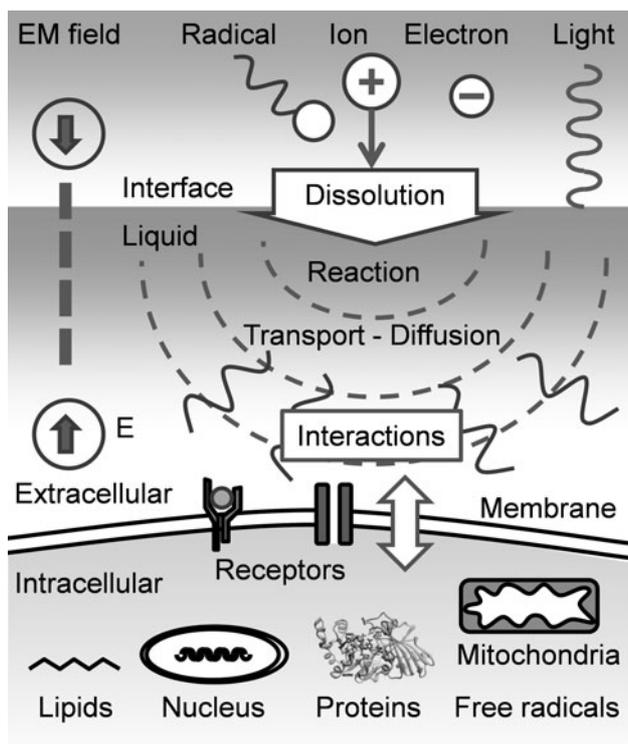


図1 バイオ応用における液相解析の意義。

数,  $\beta$  はボーア磁子,  $g$  は  $g$  値と呼ばれる比例定数であり, 自由電子で 2.00023 であり, ラジカルの上の対電子では原子核上の電子雲の排斥効果によりシフトするので,  $g$  値からラジカルを与える中心原子の情報得られる。すなわち, 0.3 T 程度の静磁場の条件下で,  $g$  値が 2 程度のサンプルは, マイクロ波 (X バンド: 9 GHz) で共鳴吸収が見られる。サンプルを空洞共振器に入れ, 微弱な磁場変調を 100 kHz で与え, この 100 kHz に同調変化する信号成分のみロックイン検出し, 熱雑音の影響を抑えて測定する。パルス・マイクロ波を使った測定や高磁場下での高分解能測定する方法もある。測定上の注意点には, スピン数が少ないサンプルで測定マイクロ波パワーを上げると飽和現象が見られるため, 事前に飽和特性を測定しておき, 感度よくスピンの観測でき, 定量観測できる測定条件とする。空洞共振器内でサンプル配置は, その占有因子 (フィリングファクター) を変えるので, サンプル状態と同条件で測定された既知スピン数を参照してスピン数定量を行う。

電子スピンの周囲の核スピンとの間で超微細相互作用を生じ, 共鳴吸収線が分裂する [13]。この分裂パターンから対電子のミクロな環境の周囲の原子核配置の情報得られる。磁場下では, 電子スピン量子数  $S$  は  $2S+1$  の縮退が解けて分裂し,  $S=1/2$  の時 1 本の吸収線が見られる。核スピン量子数  $I$  も同様に量子状態は  $2I+1$  に分裂し, 状態間の遷移選択則を満たす吸収線が観測される。多くの核で  $I=1/2$  であるが,  $^{14}\text{N}$  は  $I=1$  であり, 3 状態の縮退が解けて 3 本線が観測される。この吸収線の分裂幅を超微細相互作用定数  $A$  とも呼び, 電子と核の距離や核種に依存する。 $^{31}\text{P}$  の  $A$  は大きく分裂幅が大きい。原理的に, 電子スピンの核スピンに直接関与するフェルミ接触相互作用, 電子

スピンと核スピンとの間でスピンスピン双極子相互作用を主な原因とする。すなわち, ラジカルの分子構造が特定できる。

遷移金属では  $d$  電子や  $f$  電子をもち, それらの総価電子数は 18 である。フントの法則により, 対電子からなる低スピン状態だけでなく, 平行スピンをもつ高スピン状態の両方が見られる [14]。例えば, ヘモグロビンはポルフィリン骨格に中心鉄をもつ 8 面体配位子場を構成しているが, 基底でも Jahn-Teller 効果で構造変化を起こし, 縮退が解かれている。そのため  $g$  値は異方性をもち, 高スピン状態のピークは  $g_{\perp}$  値 (電子スピンの向きが磁場に垂直) が 6 近傍である。また, 酸素が結合すると電子を与え低スピン状態となり, これらの違いを検知でき, 化学種の価数の状態を知ることができる場合がある。

短寿命のラジカルの直接検出は難しく, 比較的長寿命なニトロソ等の化合物で捕捉するスピントラッピング法によって ESR 測定する。代表的なスピントラップ剤に DMPO, ほかに PBN, BPMO, DEPMPO, CYPMPPO などがある。いずれもラジカルを捕捉して, ニトロソ ( $\text{R}-(\text{R}')\text{N}+\text{O}^-$ ) やニトロソ ( $\text{R}-(\text{R}')\text{N}=\text{O}$ ) のラジカル付加体 (アダクト) を形成して, その ESR 計測から捕捉したラジカルを間接的に分析する。NO ラジカルの捕捉観測には, C-PTIO を使った  $\text{C-PTIO}+\cdot\text{NO}\rightarrow\text{C-PTI}+\cdot\text{NO}_2$  の反応を利用する方法が使われる。NOC7 は NO の発生剤で捕捉のチェックに利用できる。DBNBS は炭素中心ラジカル (メチル ( $\cdot\text{CH}_3$ ) ラジカルなど) の捕捉によく使われる [15]。スピントラップ剤は, 捕捉ラジカル量に比で十分多くしなければ, トラップ剤の量に律速されるので, 系に影響を与えずラジカル量にのみ信号が依存する量を使用する。この条件を満たすトラップ剤の添加量は, かなり多め (数 10 mM 以上, ここで M はモル濃度で mol/l) になることが多い。トラップ剤自身の分解や精製が不十分で不純物が問題となる場合もあり, 注意を要する。プラズマ照射の液相解析の場合には, 照射前ないし照射直後にスピントラップ剤を混合して ESR ガラス管に移動した直後 1 分以内に測定を開始して, 信号を得る。そのアダクトの分解があるので, 時間経過とともに信号強度は低下する [16-18]。フローセルにして実時間で観察する方法は望ましいが実験系を組むには工夫を要する。また, 計測したラジカルの定量には, 安定なフリーラジカルである TEMPOL を参照して濃度校正に使用する。

ラジカル選択的に反応の進む消去剤が,  $\text{H}_2\text{O}_2$  はカタラーゼ,  $\text{O}_2\cdot^-$  にはスーパーオキシドデミュスターゼ (SOD),  $\text{HO}\cdot$  にはマンニトールなどの組み合わせで知られている。他に消去剤として, ヒスチジン, アスコルビン酸, ピルビン酸, グルタチオンなどの有効性が知られている [19]。これら消去剤を添加した場合に ESR のスピントラップされる捕捉信号が消えれば, ラジカル発生に確証を得られる可能性が高くなる。

ESR 信号の吸収線型は, 古典描像で歳差運動に見られる垂直方向と面内方向の 2 つの緩和時間をもつローレンツ型となる [14]。一方で, スピン環境の不均一での拡がりやす

ピン-スピン相互作用による揺らぎの効果が強ければガウス型である。g 値異方性のあるサンプルからは、非対称な線型となる粉末パターンが観測される。吸収線型を議論するには実線幅の 1/3 程度に変調磁場を設定する。測定スペクトルは、超微細構造について A の分裂幅の分配で、信号強度比を整数比と仮定して、吸収線を再現するスペクトル計算を行い、フィッティングにより信号の解析ができる。すなわち複雑なスペクトルであって、ラジカルが多数存在していても、それらを分離して解析できる。

### 5.3 液相ラジカルの診断

液相生成する活性酸化種 (ROS と呼ばれる) は、Fricke 法や KI 法などの簡易手法で調べられるが、化学組成はわからない[20]。そのため、ESR を使ったラジカル解析が与える情報は大変有益である。プラズマ照射によって発生する ROS には、 $H_2O_2$  があり、その生成経路には、気相で生成した OH や O が液面に到達して、 $\cdot OH + \cdot OH \rightarrow O + H_2O$ 、 $HO_2 \cdot + HO_2 \cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 、 $\cdot OH + \cdot OH \rightarrow H_2O_2$  などの反応が挙げられる。また紫外光で  $H_2O$  の解離、 $H_2O + h\nu \rightarrow \cdot OH + H \cdot$  が知られている。もし液相で  $H_2O$  が解離して  $\cdot OH$  が生成し、再結合により  $H_2O_2$  生成は必ず起きる反応でもある。Ar や He の希ガスを流してプラズマを生成する場合、真空紫外線の発光が大気による遮断効果は低いことから、光解離の影響を考慮しなければならない。プラズマ源から生じる発光の影響は  $MgF_2$  ガラス (波長 > 115 nm 透過) を培養液の上に被せて  $\cdot OH$  や  $O_2$ 、 $\cdot NO$  の生成を分析した[21] (図 2)。また、ジェット型など、プラズマ源から吹き出した発光部を液相から離れた場合と接触した場合について調べた。

ESR スピントラップ法で、DMPO の OH アダクトは g 値 2.006 に、N 核の超微細構造  $A_N=1.49$  mT,  $\beta$  位の H 核から  $A_{H\beta}=1.49$  mT の 1:2:2:1 の強度比の 4 本線が観測される。DMPO-H アダクトでは、 $A_N=1.66$  mT,  $A_{H\beta}=2.25$  mT の 1:1:2:1:2:1:2:1:1 の 9 本線が観測される。CYPMPPO-OOH アダクトでは、g 値 2.006 に、 $A_N=1.34$  mT,  $A_{H\beta}=1.19$  mT,  $A_P=5.15$  mT, CYPMPPO-OH は g

値 2.006 に  $A_N=1.37$  mT,  $A_{H\beta}=1.37$  mT,  $A_P=4.88$  mT の信号が観測される。これら信号の検出に基づき、プラズマを照射した培養液中の ROS 発生プロセスを診断した。

$H_2O$  に VUV 照射した後に DMPO-OH と DMPO-H の発生がみとれ、光解離が実際に検出される (図 2 右)。プラズマ照射した際、DMPO-OH が支配的に見られ、DMPO-H が少ないことは特徴である。また、 $MgF_2$  透過窓の有無でプラズマ光の影響をみてやると、DMPO-OH の生成に大差は認められない。しかしながら、 $H_2O_2$  の生成量を比較すると、プラズマ照射された場合のみ、多く液相に検出される。少なくとも、 $H_2O + h\nu \rightarrow \cdot OH + H \cdot$  の光解離を生じた  $\cdot OH$  が再結合反応  $\cdot OH + \cdot OH \rightarrow H_2O_2$  による生成は支配的でない。すなわち、酸素原子など化学種が輸送され液面反応で  $H_2O_2$  が生成することが支配的である (図 3)。既に、純水においては、Jabionowski らがプラズマ VUV 光の照射による  $H_2O_2$  生成を議論し、 $MgF_2$  越しの光照射だけでは生成  $H_2O_2$  を説明できず、 $O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 H_2O_2$  や  $2H + O_2 \rightarrow H_2O_2$  で生成すると解釈した[22]。  $\cdot OH$  の再結合以外の  $H_2O_2$  生成反応が支配的との考えが支持されている。

プラズマ照射によって  $H_2O_2$  を生成する機構には、O 原子の共存下では  $\cdot OH + O \cdot \rightarrow HO_2 \cdot + O_2$  から、 $HO_2 \cdot + H \cdot \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$  や  $HO_2 \cdot + O \cdot \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$  の反応が  $\cdot OH$  を生成する[49]。  $\cdot OH$  再結合生成や光照射より

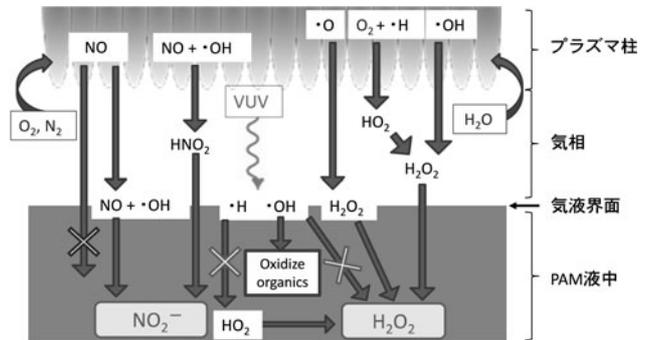


図 3  $H_2O_2$  と  $NO_2$  に係わる液相の主要反応のまとめ (参考文献 [21] の図 8 を引用)。

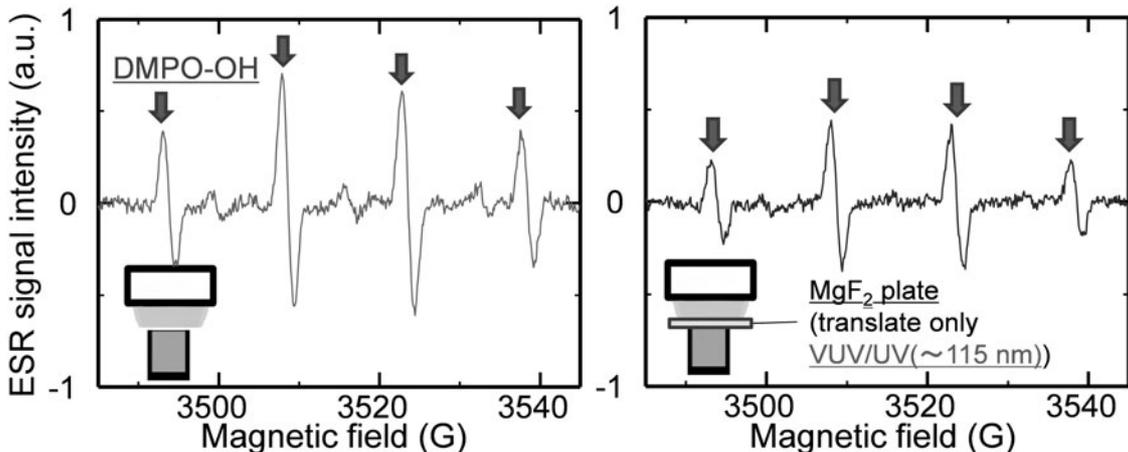


図 2 DMPO アダクトの ESR スペクトル VUV 光照射の有無の比較、 $H_2O_2$  はプラズマ照射しないと有意にみられない (参考文献 [21] の図 3 を引用)。

も、液面で  $O\cdot + H_2O \rightarrow \cdot OH + \cdot OH \rightarrow H_2O_2$ , や、励起状態の  $O\cdot$  が関係して  $O\cdot (^1D) + H_2O \rightarrow H_2O_2$  の反応経路が優先する。気相活性種の組成にも依存して、プラズマ源からの距離依存性も踏まえ、ROSの生成機構は診断されるべきである。また、以上の説明からも酸素存在下での理解は難しさを増し、pHやイオンの存在も大きな影響を与えることも示唆している。

リン酸バッファ(PB)やリン酸バッファ生理食塩水(PBS)にプラズマ部や光の照射を遮断してラジカルのみを照射した結果、 $H_2O_2$ 量は $Cl^-$ の存在で減少する。pHが緩衝されている状況では、非常に早い反応で $\cdot OH$ が $Cl^- + \cdot OH \rightarrow HOCl$ の生成経路を経て、 $H_2O_2$ と $HOCl$ ,  $ClO^-$ を生成する[23]。ここで、ケミカルの添加、 $NaClO \rightarrow Na^+ + OCl^-$ でも同様の効果を想像するかもしれないが、 $HOCl$ の生成効果に違いがあり、プラズマ特有の効果が見られる。 $ClO^-$ は細胞毒性があるため、重要なテーマである。また同様の観点から、緩衝剤(バッファ)として入れた重曹などから発生する $CO_3^{2-}$ なども重要である。

プラズマ源の気相解析からNOが検出され[24]、 $NO\cdot$ の気相中生成は、 $N_2 + O\cdot \rightarrow NO\cdot + N\cdot$ や $N\cdot + O_2 \rightarrow NO\cdot + O\cdot$ が主な反応経路である。 $NO\cdot + OH\cdot \rightarrow HNO_2$ を生じ、液相の $NO_2^-$ は $HNO_2$ の溶液中解離により生成する。一方 $NO\cdot$ の水への溶解は非常に低いので、直接気相中から溶解して液中反応するとは考え難く、むしろ $HNO_2$ や $HNO_3$ を形成して液相に溶解する。気相と液相の境界は明確ではなく気液界面近傍であり、空間分布の解明は今後の研究の課題である。 $HNO_3$ の解離定数は $pK_a$  1.4であり、 $HNO_2$ は $pK_a$  3.38であるため、pHが中性では $NO_2^-$ が主に存在するが、プラズマが酸化しやすいにもかかわらず、培養液中では $NO_3^-$ が少ないことは注目している。

溶液中の $NO\cdot$ を調べるために、C-PTIOを使用して、 $A_N = 0.82$  mTの1:2:3:2:1の5本線が $NO\cdot$ をトラップして、C-PTIの $A_N = 0.98$ と0.44 mTの9本線で観測されることから $NO\cdot$ の存在を検出した(図4)。意図的にNOC7( $NO\cdot$ 発生剤の1種)を添加して $NO\cdot$ を30  $\mu M$ 発生させた場合、C-PTIが確認できる。プラズマを照射した培地から $NO\cdot$ はC-PTIの検出以下であった(図4)。そのため、液相に $NO\cdot$ 単体はほとんど存在しないのは間違いないだろう。

$H_2O_2$ と $NO_2^-$ の生成パスにおいて、気相中で $H_2O_2$ を生成して溶解する効果と、 $O\cdot$ 原子から $H_2O_2$ を生成する経路が支配的であり、光解離の $OH\cdot$ の再結合で $H_2O_2$ を生成する経路は無視できる(図3)。むしろ生成した $OH\cdot$ は培養液中の含有化合物との反応を考慮しなければならない。培地には、無機イオンをはじめ、単糖(グルコース)、pH緩衝剤(重曹)、アミノ酸、ビタミン等の30種以上の化合物が含まれている。多くの活性種の消滅を考えれば、含有割合の多いグルコースや重曹などの関わるラジカル消去反応の理解が重要性を増している[25]。これは含有化合物の反応物の一部の酸化を突き止めており[26]、抗腫瘍効果の発現に寄与することも推察し、仮説レベルながら考え、その実証を進めている。

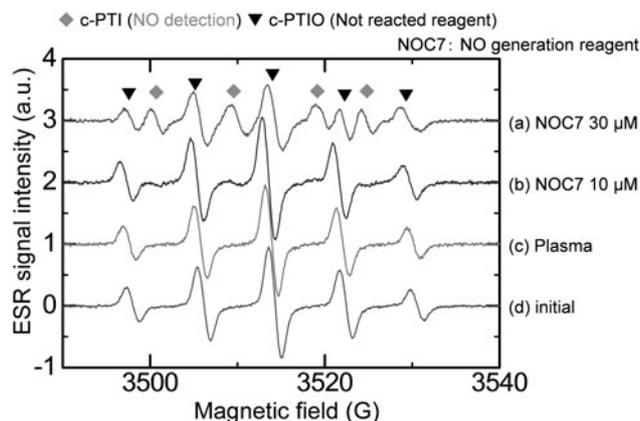


図4 C-PTIによる液相NOの捕捉例 プラズマ生成によって有意なNOは見られない(参考文献[21]の図7を引用)。

pH依存的に $NO_2^-$ は $NO_3^-$ との平衡がずれていく。ただし、培地では緩衝されていることもあり、 $NO$ と $O_2$ と $ONOO^-$ が平衡し、 $NO_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O=NOOH + H_2O$ ,  $O=NOOH \rightarrow OH + NO_2$ , を保っている。 $ONOO^-$ はFeTPPSの消去剤を添加して、その生成を確認した。ラジカルを観測に併せて、生成物の比色法、UV/VIS吸光、イオンクロマトグラフィー分析の結果を併せ、反応系のシステム解析を総括的に進める必要がある。

反応系の様相はプラズマ源に依存している。1.1 MHzのRF駆動のkINPenではRPMI培地に照射すると、1分間あたり60  $\mu M$ の $H_2O_2$ と、26  $\mu M$ の $NO_2^-$ の生成が見られる[27](図5(a))。別のプラズマ源で、60 HzのAC駆動のNEAPPではDMEM培地に照射して1分間あたり17  $\mu M$ の $H_2O_2$ と、642  $\mu M$ の $NO_2^-$ の生成が見られる[28](図5(a))。水への照射では $NO_2^-$ 生成に引き続きpHの低下を伴い、 $NO_3^-$ に置換されるが、培地への照射した後の測定データは少ない。他にも、大気中でプラズマ生成するグライディングアーク(Glidarc)の結果では、1分間あたり2  $\mu M$ の $H_2O_2$ と、320  $\mu M$ の $NO_2^-$ 、26  $\mu M$ の $NO_3^-$ の生成が見られる[29]。ほとんど $H_2O_2$ 生成がみられていないのは興味深い。他にも、WendeらはRPMI培地に $H_2O_2$ の200  $\mu M$ と $NO_2$ の約30  $\mu M$ の生成を観測し[30]、UchidaらはHeのDBDプラズマジェット[31]の吹き出しから周囲の大気組成( $N_2$ と $O_2$ の比)を変えた場合、 $N_2$ 比率を増加に伴い $H_2O_2$ が増加し、大気巻き込み具合を照射距離で変え、 $NO_2^-/H_2O_2$ 比を制御した[32]。Kurakeらが、 $H_2O_2$ と $NO_2^-$ の濃度依存的な細胞生存率曲線を示し、(図5(a,b)) $H_2O_2$ と $NO_2^-$ の共存が相乗的に細胞生存率を低下させる実験結果に基づき抗腫瘍効果の制御に意味深い。成長因子として添加されるタンパク(Fatal bovine serum)の有無で、プラズマ照射後に生成した $H_2O_2$ の濃度の違いも示している[33]。現在、プラズマバイオ応用のプロセス診断を行う上で $NO_2^-/H_2O_2$ 比が注目されるパラメータとなった。(図5(a))詳細に議論する必要もあるが、がん細胞特異的に殺傷効果の発現、すなわち選択性には、この比率が大きいつきに生じやすく、プラズマ照射パラメータの指標にもなりうる。

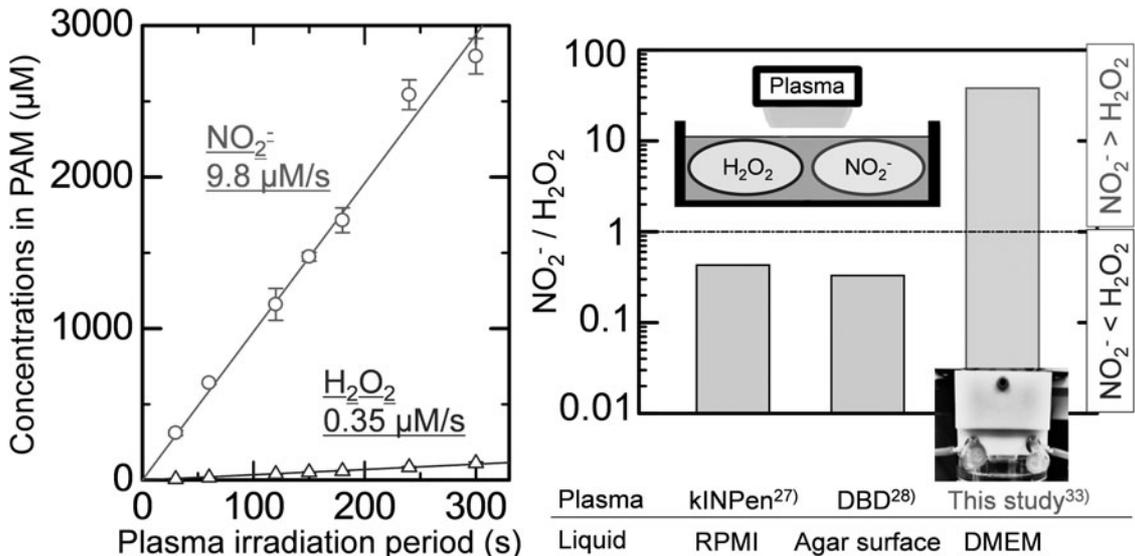


図5 (a) プラズマ照射培地内に発生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量とその NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 比のプラズマ源の比較 (参考文献 [27, 28, 33] の図を引用)。

さらに、プラズマ発光部を照射させた場合には、荷電粒子や励起粒子が影響し、多量の OH を生成する。アルコールは OH の消去剤でもあるが、ROS の二次反応として生成するアルキルラジカルの発生、R-OH+OH→R·+CH<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O によるメチルラジカルの発生などを、DBNBS によって A<sub>N</sub>=1.37 mT, A<sub>Hβ</sub>=1.0 mT をもつ信号で観察できる [34]。R をアルキルとした場合、鎖長によりメチレンラジカル (CH<sub>2</sub>) やメチンラジカル (CH) が重畳して検出され、その解析から異なる比率で発生していることがわかる。このことから、液相に OH の生成は、反応の起点として働き、プラズマのもたらす多様な非平衡な反応を生じるモタになりうると思われる。

### 5.4 プラズマ反応プロセスの診断

液相の診断からバイオプロセスを誘起するラジカルの検出であるが、実際にプラズマプロセス中の生体内のフリーラジカルの診断はさらに有益である。ここでは、Hashizume らが報告した、みかんの保存中の腐敗で問題となるミドリカビ胞子に酸素原子を照射すると発芽しなくなる不活性化効果を取り上げる [35]。この不活性化機構には、胞子壁に物理的な損傷は見られないにも拘わらず、細胞内のオルガネラの酸化的崩壊が顕微鏡で確認されていて、細胞内酸化のバイオプロセス診断が重要となってきた。そのため、この過程を ESR で、その場実時間観察した。ミドリカビを ESR 測定管に微細孔フィルタで塞いで入れておき、プラズマを発生させたガスに曝した (図 6)。処理前にミドリカビの胞子からは、強いラジカル信号が見られる。すなわち、胞子は休眠状態であると緑色を呈し、発芽能力も有していて、ESR で検出されたセミキノン様の還元状態のフリーラジカルが生体防御機能を果たしているのだろう (図 7)。酸素プラズマを発生させて酸素原子を曝した最中の ESR 信号を実時間で観測した結果、処理の進展にともなってラジカル信号は減少する様子が観察された (図 7)。酸素原子が照射されることで、セミキノン様の信

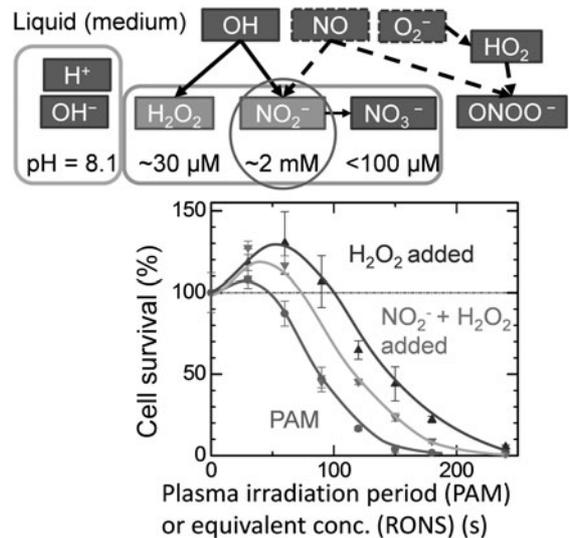


図5 (b) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の生成パスと、細胞生存率に与える H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の相乗効果と PAM の効果 (参考文献 [33] の図 4 を引用)。

号が弱まり、過酸化ラジカルの信号に変化する。同時に、胞子は不活性化していき、ESR 信号の減少と不活性化には関連がある [36] (図 7)。おそらく、抗酸化ストレス物質の消去能のバランスが崩れ、細胞内の恒常性を保っている生体適応が逸脱していく過程で、過度の酸化によるオルガネラ破壊の現象と考えている。少なくとも、プラズマのバイオ作用を診断する上で、生体内のフリーラジカルのダイナミクス挙動も診断されることが望ましい。プロセス最中の実時間の生体ラジカル信号の観察が、生体の適応反応を解明するに欠かせない。

プラズマプロセスでは、化学活性なラジカルを反応場に供給し、非熱的に多様な反応を進行させる。生成した活性種が二次的に逐次反応を進展させ、プラズマで刺激を受けた系には熱プロセス、熱平衡で見られない反応を見いだせる。この反応が解析できれば、別の観点からは、系の反応系を人工的にプログラムして制御でき、プラズマ生物化学といえるような新たな学問領域をも開拓する。単純な生体

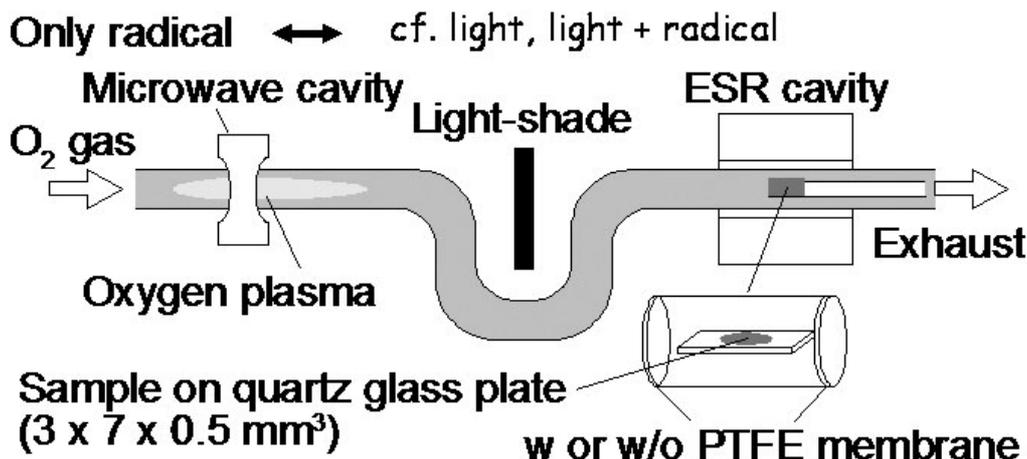


図6 フリーラジカル検出で利用した ESR セットアップ (参考文献[36]の図1を引用)。

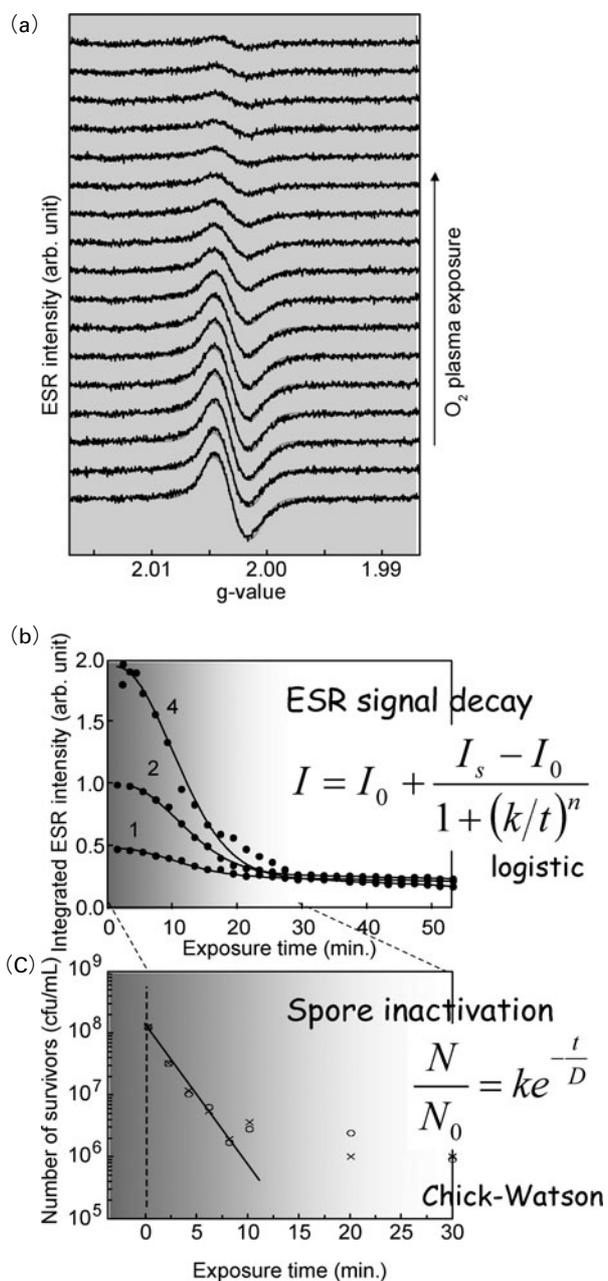


図7 (a)得られた実時間 ESR 信号変化(b)ESR 信号強度, (c)胞子不活性化のプラズマ照射時間依存性 (参考文献[36]の図4, 5を引用)。

内に豊富に見られる  $H_2O_2$ ,  $NO_2$  共に単純な化学種が、直接的に抗腫瘍効果に影響を及ぼすとは言い難く、その本質は未だに解明されておらず、さらなる研究が必要である。また、非平衡なプラズマ誘起バイオプロセスのダイナミクスはフリーラジカルのその場実時間観察による解明も望まれるところである。

謝 辞

本章をまとめるにあたり、倉家尚之、水野寛子、小林剛士、民谷和浩、坂倉峻亮、内山英史、大沼章子、加藤昌志、中村香江、梶山広明、吉川史隆、豊國伸哉、水野正明、Chih Tung Liu、山田大将、池原謙、榊田創、上田真史、片岡洋祐、秋元義弘、池田純一郎、横山直明らには有益な情報を提供いただきました。ここに感謝の意を表します。

本文中に登場する略語

- DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)
- PBN (N-tert-butyl-ca-phenyl nitron.)
- BPMO (5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide)
- DEPMPO (5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide)
- CYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide)
- C-PTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-loxyl 3-oxide)
- NOC7 (1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene)
- TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy)
- DBNBS (3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate)

参考文献

- [ 1 ] M. Iwasaki *et al.*, J. Appl. Phys. **92**, 081503 (2008).
- [ 2 ] 例えば、プラズマ・核融合学会誌 2011年10月号小特集「プラズマ・バイオ融合科学への新展開」.
- [ 3 ] S. Iseki *et al.*, Appl. Phys. Lett. **100**, 113702 (2012).
- [ 4 ] H. Tanaka *et al.*, Plasma Med. **1**, 265 (2011).

- [ 5 ] F. Utsumi *et al.*, PLoS ONE **6**, e81576 (2014).
- [ 6 ] S. Ikawa *et al.*, Plasma Process. Polym. **7**, 33 (2010).
- [ 7 ] A. Tani *et al.*, Appl. Phys. Lett. **100**, 254103 (2012).
- [ 8 ] T. Shimizu *et al.*, J. Photopolym. Sci. Technol. **24**, 421 (2011).
- [ 9 ] T. Sato *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. **44**, 372001 (2011).
- [10] 例 え ば, W. Tian, M.J. Kushner. J. Phys. D: Appl. Phys. **47**, 165201 (2014).
- [11] 伊達宗行：電子スピン共鳴（培風館，1978）。
- [12] 大矢博昭，山内 淳：電子スピン共鳴（講談社サイエンスティフイック，1989）。
- [13] スリクタ：磁気共鳴の原理（シュプリンガー，1998）。
- [14] 山内 淳：磁気共鳴-ESR-（サイエンス社，2006）。
- [15] H. Uchiyama *et al.*, PLoS One **10**, e136956 (2015).
- [16] B. Kalyanaraman *et al.*, Photochem. Photobiol. **36**, 5 (1982).
- [17] K. Makino *et al.*, J Phys Chem. **87**, 1369 (1983).
- [18] A.J. Carmichael *et al.*, Radiat. Res. **100**, 222 (1984).
- [19] P.J. Bruggeman *et al.*, Plasma Sources Sci. Technol. **25**, 053001 (2016).
- [20] T. Kondo, Experimental method in sonochemistry, in *Sonochemistry and the Acoustic Bubble* (Elsevier, 2015), p. 119.
- [21] N. Kurake *et al.*, J. Phys. D:Appl. Phys. **50**, 155202 (2017).
- [22] H. Jablonowski *et al.*, Phys. Plasma **22**, 122008 (2015).
- [23] T. Kobayashi *et al.*, J. Phys. D:Appl. Phys. **50**, 155208 (2017).
- [24] K. Takeda *et al.*, J. Phys. D:Appl. Phys. **50**, 195202 (2017).
- [25] N. Kurake *et al.*, Appl. Phys. Express **9**, 096201 (2016).
- [26] H. Tanaka *et al.*, Sci. Rep. **6**, 36282 (2016).
- [27] S. Bekeschus *et al.*, Free Radical Res. **48**, 542 (2014).
- [28] N. Mertens *et al.*, Plasma Process Polym. **11**, 910 (2014).
- [29] A. Fridman *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. **38**, R1 (2005).
- [30] K. Wende *et al.*, Biointerphase **10**, 029518 (2015).
- [31] G. Uchida *et al.*, J. Appl. Phys. **120**, 203302 (2016).
- [32] T. Ito *et al.*, Japan. J. Appl. Phys. **56**, 01AC06 (2017).
- [33] N. Kurake *et al.*, Archiv. Biochem. Biophys. **605**, 102 (2016).
- [34] W. Bors, K. Stettmaier, J. Chem. Soc. Perkin Trans. **2**, 1509 (1992).
- [35] H. Hashizume *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys. **54**, 01AG05 (2015).
- [36] K. Ishikawa *et al.*, Appl. Phys. Lett. **101**, 013704 (2012).