

【公開版】

平成30年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「食品・飲料品・医薬品分野における
抗酸化機能製品の見える化を実現する
活性酸素量の最適制御可能な活性酸素生成装置の開発」

研究開発成果等報告書

令和元年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 一般財団法人大阪科学技術センター

目 次

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	6
1-3 成果概要	6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8
第2章 本論	
2-1 研究開発実施内容	
【I】 活性酸素生成用の低温大気圧プラズマ生成源の高度化開発	9
【I-1】 活性酸素生成用の低温大気圧プラズマ生成源の高度化	
【I-2】 活性酸素の安定的生成をモニタリングする方法の開発	
【II】 低温大気圧プラズマによる活性酸素生成量の定量化と制御法の開発	12
【II-1】 活性酸素の定量的計測手法の開発	
【II-2】 活性酸素生成量の制御法の開発	
【III】 低温大気圧プラズマを用いた活性酸素生成装置の開発と検証	17
【III-1】 シングルサンプル用の活性酸素生成装置の開発	
【III-2】 マルチサンプル用の活性酸素生成装置の開発	
【III-3】 活性酸素生成量の安定性向上	
【IV】 抗酸化物質と生体試料に対する活性酸素の検証試験	22
【IV-1】 抗酸化物質に対する活性酸素の作用の検証試験	
【IV-2】 細胞に対する活性酸素の作用の検証試験	
第3章 全体総括	
3-1 研究開発成果	26
3-2 研究開発後の課題・事業化展開	26

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

研究開発の背景

活性酸素種(ROS: Reactive Oxygen Species)による酸化ストレスは、がんや生活習慣病等の原因の1つと考えられている。ROSを消去、抑制および低減する機能は抗酸化能と総称される(図1-1)。この機能を謳うことによる高付加価値化が食品業界だけでなく化粧品あるいは製薬業界等で大きなビジネスへと展開しつつある。実際に、平成27年4月に開始された

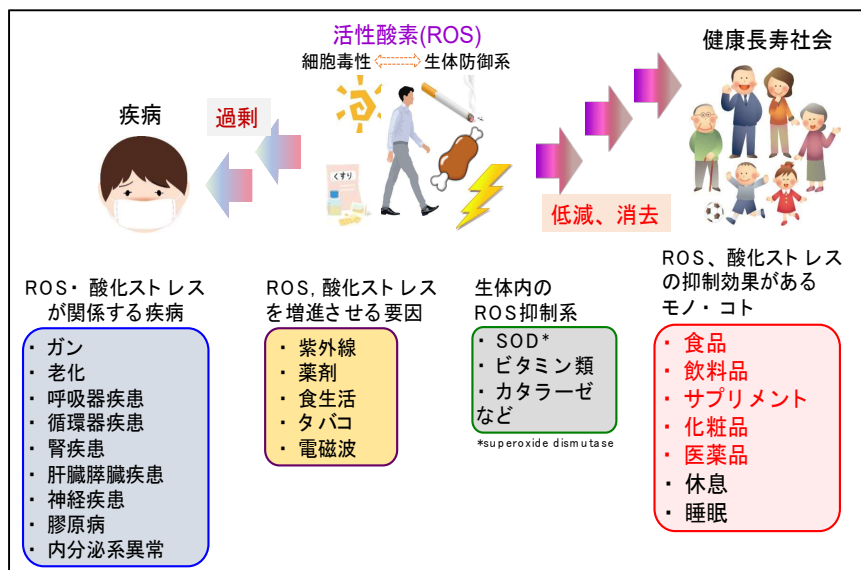


図 1-1 ROS および酸化ストレスの影響と抑制系

機能性表示食品制度において当初は「機能性」として表示されなかった「抗酸化」が記された商品が平成28年以降に相次いで発表された。これは、消費者の酸化ストレスを低減・消去できる「抗酸化機能食品」への強いニーズと企業や大学において従来から行われてきた抗酸化研究の成果が一致したあらわれであると考えられる。その後も食品・飲料品メーカーや医薬品メーカーは、高い抗酸化機能を有する製品、物質の開発や成分の探索を精力的に進めている。

大学や産業界では、今なお抗酸化能の定量評価は試験管中(*in vitro*)における手法が主流である。さらに、現在の一般的な研究手法では試薬を用いたROS生成がほぼ全てであり、生体内(*in vivo*)には存在しない試薬の使用など、*in vivo*環境とは程遠く限定的な評価系であるとされる場合がある。ゆえに、「抗酸化機能」は本来生体内で発揮されるものであることから、*in vitro*における高い抗酸化能が生体内(*in vivo*)において直接的な効果効能を発揮しているかは未だ明らかになっていない。加えて、生体試料の分析には必須の多量分析が困

【公開版】

難であることなど、多くの課題が山積している。このような抗酸化研究の進展には、生体に近い環境において生成した ROS を用いて、抗酸化活性の評価と生体試料(細胞や組織)などを用いた生物学的な評価を定量的かつ定性的に並列に行わなければならない。

近年、大気圧非熱平衡プラズマ(低温大気圧プラズマ;以下、大気圧プラズマ)がバイオ・医療分野において試薬を使わず、活性酸素種を直接的に作用できる技術として注目されている。しかし、現在販売されており入手できる大気圧プラズマ装置は、定量的な ROS 生成、実験の再現性や効果の再現度が低いとみなされている。ゆえに、前述のような問題の解決としては不十分かつニーズを満たせていない。そこで本事業では、下記の目的および目標を掲げ、「安定動作可能な大気圧プラズマ装置の開発」、「装置性能の評価」および「実用例の検討」を一貫して推進した。

研究目的及び目標

抗酸化評価に関して特に ROS の生成について、川下ユーザーから下記のように様々な要望が出されている。これを参考に研究の目的および目標値を設定した。

・人体に吸収された抗酸化物質と人体内で生成する ROS の作用を調べるため、生体試料(主に培養細胞)へ直接 ROS を供給したい。

・対象とする細胞の種類や利用目的に応じて ROS の種類および ROS 生成量を自由に制御したい。

・生体が相手のため、測定対象および測定検体は膨大な数となる。多量の試料の分析・多量のデータ処理が必要。多量の試料分析のため、マイクロプレートを用いて短時間で測定したい。

すなわち、ROS を「区別して生成でき」「生体試料に直接供給可能」「一定量、一定時間制御し、大量の対象物に対して同時に生成可能」な技術が求められている。これらを実現するために、本事業では従来の大気圧プラズマ装置の問題点を慎重に検討し(表 1)、装置の電源、電気回路の構成や大気圧プラズマ生成源となる電極部の設計および大気圧プラズマの照射条件最適化を行い、活性酸素種の定量的制御のために、下に示す 5 つの必須性能「再現性」、「操作性」、「定量性」、「細胞への適用性」および「多量のデータ分析への適用性」に対して数値目標を設定し推進した(表 2)。また、これまでの知見から、制御する活性酸素種をヒドロキシルラジカル(以後、 $\cdot\text{OH}$ または OH ラジカル)に定め、研究開発を進めた。

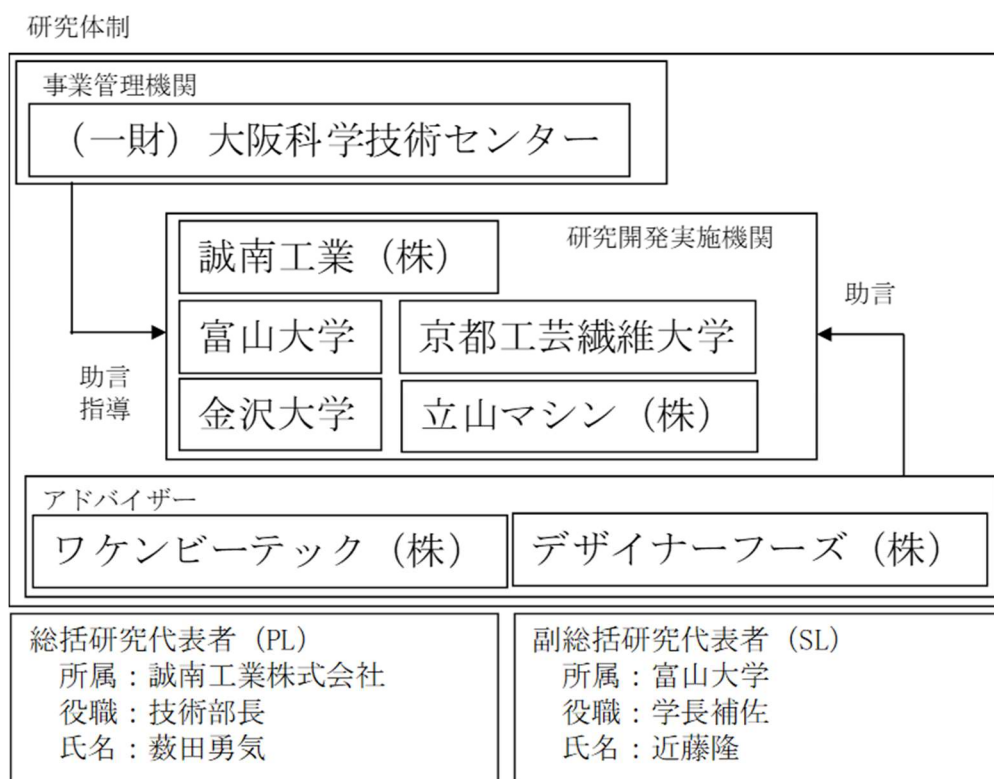
表 1 大気圧プラズマ装置に関する従来技術と検討項目

課題	従来技術	検討項目
再現性	化学反応であるため反応時間の制御が困難	・OH 生成量の変動幅
操作性	複雑な前処理や操作が必要。凍結試薬の場合は、解凍に数時間	・OH 生成までに要する時間
定量性	試薬調製条件、反応時間に対する依存性が大きいため定量化と制御が困難	・OH 生成量、 プラズマ照射ユニットの連続使用時間
細胞への適用性	薬品が細胞に強く影響するため適用できない	液温上昇、 細胞死の定量 (アポトーシスの発現)
多量のデータ分析への適用性	人手による操作のため多量の試料に対する分析が困難	複数枚のマイクロプレート間の ・OH 生成量の変動幅

表 2 本事業の目標値と最終到達値

課題	目標値	最終到達値
再現性	反応時間制御が容易 ±50%以内	繰り返しの操作再現性 シングルおよびマルチ照射装置 ± 8 および 18 % 以下
操作性	試薬の前処理は不要 25 分で ROS の安定生成	試薬の前処理は不要 電源投入後、15 分で ROS の安定生成。
定量性	物理的操作による制御 1 ml の液量に対して、1 分照射 で、1 μ M 以上	物理的操作による制御 300 μ L の溶液に対して 1 分で、20 μ M 以上
細胞への適用性	特殊な溶媒不要 1 分照射時に +2 $^{\circ}$ C 以下 1 分照射により、ヒトリンパ腫 細胞 U937 に対して、15%以上	特殊な溶媒不要 1 分間照射 +1 $^{\circ}$ C未満 達成 アポトーシス U937 細胞 ; 15 %/1min 達成 MDCK II 細胞 ; 50 %/1 min 以上達成
多量のデータ分析への適用性	物理的制御が容易 ±50%以内、・OH 生成装置の連続 使用時間 10 分以上	装置の設計完了 マルチ型安定性 8 穴同時 ±18% 装置の連続使用 30 分以上 安定

1-2 研究体制



1-3 成果概要

【I】 活性酸素生成用の低温大気圧プラズマ生成源の高度化開発

活性酸素種(ROS)のヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)を安定生成するために、プラズマ装置の回路設計、電極の形状および配置の最適化を進めた。その結果、電源を特定の高周波数電源を使用することで、本事業の目標値である「生体サンプルや水への大気圧プラズマ照射において1分間で温度上昇を2度未満」を上回る 1°C 以下を達成した。また、この時、「生成するOHラジカル量 $1\ \mu\text{M}/\text{分}$ 」を大幅に上回る $20\ \mu\text{M}/\text{分}$ を達成した。さらに、目標値「安定生成までの時間を25分」に対して「15分」を達成した。

【II】 低温大気圧プラズマによる活性酸素生成量の定量化と制御法の開発

低温大気圧プラズマによるOHラジカルの生成量の定量化として、ESRによる定量方法を構築した。これは安定ニトロキシドラジカルを用いる方法でこれまでのスピントラッピング法に比べて低コストで簡便な手法である。本法を用いて本事業で開発した装置の性能について、印加電圧、ガス流量、照射距離の物理的パラメーターに対して、対象試料容溶液中のOH

【公開版】

ラジカル量の評価を網羅的に行った。それらの実験結果から、物理的パラメーターを操作することで、OH ラジカル量を制御し、表示できるソフトウェアを装置に搭載した。

【Ⅲ】低温大気圧プラズマを用いた活性酸素生成装置の開発と検証

大気圧プラズマを1サンプルに作用できるシングルタイプ、またその小型装置および96マイクロプレートを用いて8つのサンプルに同時に作用できるマルチタイプおよびその一体型装置を作成した。再現性の事業目標は、当初±50%以内に設定したが、開発した装置の誤差はシングルタイプではOHラジカル生成量は±8%、マルチタイプでは誤差±18%以下と極めて安定な動作を可能とした。この安定な動作について、事業目標では連続10分以上としていたが、30分以上と3倍以上の安定性が見られた。間欠運転においても、最低1時間は安定であった。

【Ⅳ】抗酸化物質と生体試料に対する活性酸素の検証試験

従来では、大気圧プラズマを処理することでOHラジカルを生成する際に温度上昇することが問題であったが、テーマ【Ⅰ】で温度上昇は1°C/分以下の成果をえており、目標値は十分に達成した。さらに、生体サンプルに対してはpHの変化も重大な影響となる。これについても、本事業で開発した装置は30分の照射でpHは変化しなかった。

開発した大気圧プラズマ装置を用いて、低分子有機物とOHラジカルの抗酸化活性を評価したところ、その抗酸化活性は二次反応速度定数と相関性のある値を示した。これは、本装置がOHラジカルを定量的に生成し、評価方法も妥当であることを示している。更に、アポトーシス誘導を評価したところ、本事業ではヒトリンパ腫U937細胞に対してアポトーシス誘導15%/分を、別の細胞としてイヌ腎臓細胞MDCKⅡ細胞においては50%/分を達成した。この結果は細胞によって活性酸素に対する感受性が異なることを示している。このことから細胞工学的な研究において、安定的な活性酸素(OHラジカル)処理装置として本事業で開発した大気圧プラズマ装置が応用できる可能性を示している。

本事業で開発した装置を実際の研究現場で使用した際に現在の20μM/分以上の60から100μM/分のOHラジカル生成量を求められることがあった。今後の課題として、安定生成の機能を維持した状態でOHラジカル生成量を増大する改良を行う必要がある。

1 - 4 当該研究開発の連絡窓口

誠南工業株式会社 技術部

藪田勇氣

〒559-0011 大阪市住之江区北加賀屋 4-3-24

TEL : 06-6682-6788

FAX : 06-6682-6750

e-mail:yabuta@seinan-ind.co.jp

第2章 本論

2-1 研究開発実施内容

【I】活性酸素生成用の低温大気圧プラズマ生成源の高度化開発

【I-1】活性酸素生成用の低温大気圧プラズマ生成源の高度化

本事業では照射サンプルに熱的影響がない低温大気圧プラズマの開発を目指している。元来、プラズマが生成する際に光エネルギーと熱エネルギーが同時に放出され、処理対象物が加熱される可能性がある。本事業では、大気圧プラズマを照射して生成する活性酸素種のみを細胞などの生体に作用させる事を目的としており、熱的影響は避けなければならない。これに関して、大気圧プラズマを水溶液中に照射し活性酸素種(ROS)の一種であるOHラジカルを安定的に生成するためには、プラズマの生成に関する電源・回路およびプラズマ照射条件の最適化が必要である。本サブテーマでは電源回路の開発、プラズマ生成に関する放電周期(電源の周波数)の最適化を試みた。

高電圧によってヘリウム(He)が励起され、励起したヘリウムのほとんどは直ちに低いエネルギー状態に遷移する。この時、特定のエネルギー準位に遷移するときに、光エネルギーとして放出され、特定波長の光(発光)が観測される。これを観測する手法が発光分光分析法(Optical emission spectroscopy ;以下OES)である。大気圧プラズマ生成の簡易で確度の高いモニタリングに向けて、OESスペクトルを計測しながら、照射対象の温度を熱電対温度計(図2-1)およびサーモグラフィーを用いて測定した。

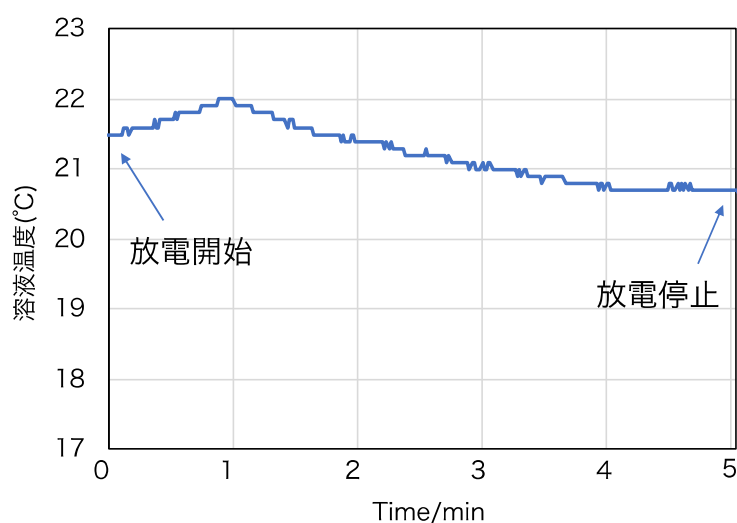


図 2-1 大気圧プラズマ照射による超純水の温度変化
超純水 1000 μ L、印加電圧 6 kV、照射時間 5 分

【公開版】

結果として、電源の周波数の最適化を検討したところ、市販されている汎用高周波電源（100 V）を使用すると、熱電対温度計では大気圧プラズマ照射直後 0.5 度液温が上昇するがその後、4 分間連続して照射すると温度が 1.2 度低下したのちに一定となった（図 2-1）。これは、大気圧プラズマそのものが高温ではなく、ヘリウムガスによる気化熱によって対象サンプルが冷却されたと考察した。加えて、その時のサンプル溶液は連続的な照射 30 分以上でも全くの pH の変化は見られなかった。よって、本事業で開発した大気圧プラズマ装置は、処理サンプルへの熱的、液性の変化による損傷を及ぼすことが極めて少ない、画期的な大気圧プラズマ装置であることを明らかにした。

【I-2】活性酸素の安定的生成をモニタリングする方法の開発

繊細な取り扱いが必要な生体関連サンプルに対して、大気圧プラズマ処理を行う際に、プラズマ照射条件を安定化するためのモニタリング方法を検討した。まず、基礎的な条件を見出すために、プラズマ照射サンプル周囲の雰囲気（ガス）を空気から不活性なヘリウムガスに置換した実験系の構築を試みた。次に、水溶液への大気圧プラズマ照射で生成するヒドロキシルラジカル生成量を制御するためのモニタリング法を検討した。モニタリング対象であるプラズマ発光、照射時間、電圧、電流、温度および湿度と ESR 法で評価した OH ラジカルの生成量との相関から検討した。

具体的には、試料室内の雰囲気（湿度、温度）を日内、日間にわたってモニタリングすると同時に、大気圧プラズマの生成状態を OES 測定で観測した。合わせて、ESR 法を用いてヒドロキシルラジカルの生成量を測定した。大気圧プラズマ装置の電源投入直後から一定の時間で OES スペクトルとヒドロキシルラジカルの生成を ESR 法で同時に計測した。まず、He ガスを流し、電圧を印加すると約 3 分間は大気圧プラズマ発光が観測されなかった。その後、大気圧プラズマ生成を確認した直後、規則的なピーク配列を有する強い OES 信号が観測された（図 2-2a）。これは、装置の電源が Off の時に装置内に入り込む空気由来の窒素 (N_2) の OES 信号であると文献から推測した。そして、He ガスを 1 L/分で連続的に 15 分流しながら OES スペクトルを観測し続けると N_2 由来の信号が減弱し、308 nm および 706 nm にピークを有する鋭い信号が明瞭に観測された。それぞれ、文献から OH ラジカルおよび He の励起状態に由来する発光信号であると同定した（図 2-2b）。そして、1 L/分で He ガスを断続的に約 6 時間（ガス体積合計約 360 L）流しても 308 nm (OH ラジカル) のピークは一定の強度で観測され続

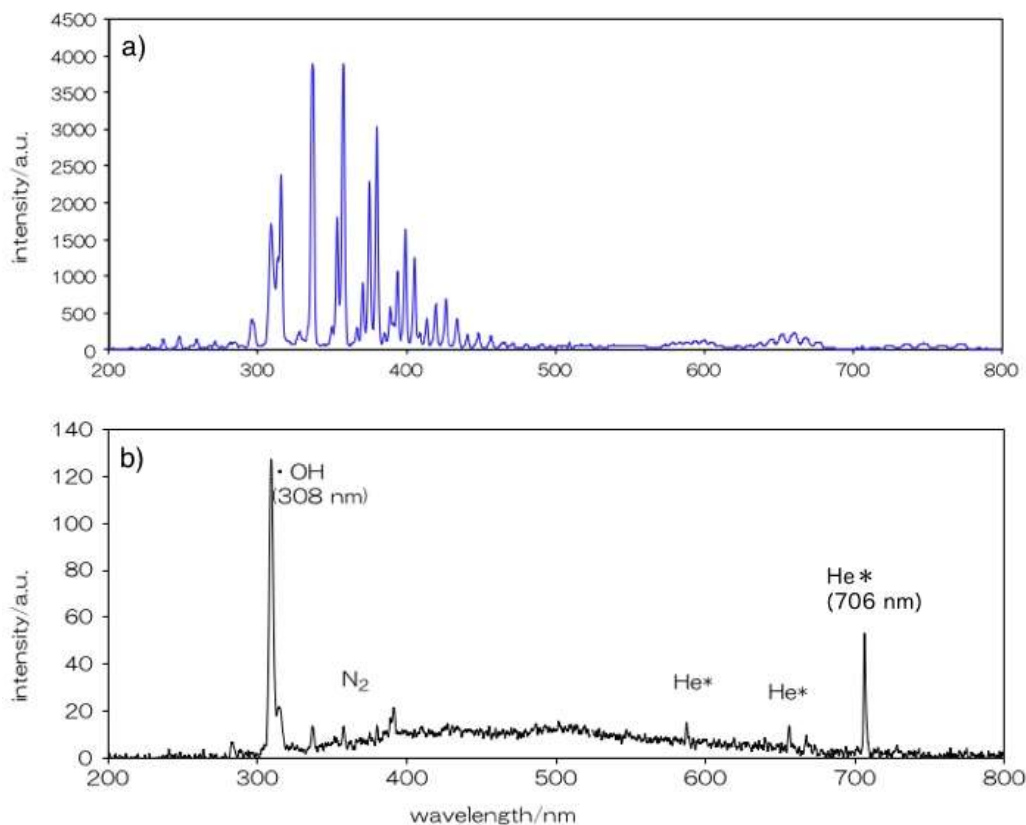


図 2-2 He 大気圧プラズマの OES スペクトル

a) 電源投入直後の OES スペクトル。b) 放電開始 15 分後の OES スペクトル

308 nm OH ラジカル、330 - 400 nm 付近に N_2 および 706 nm に励起 He 由来の信号を示した。

けた。OH ラジカルの OES 信号は He ガスボンベ内に存在する数 ppm 程度の水蒸気または系内の樹脂製チューブに付着した水由来であると文献から推察した。ここで得られた OES スペクトルから、電源投入からの時間 15 分をウォームアップ時間とした。

次に、OH ラジカルを高感度に検出できる優れた方法として、スピントラッピング試薬 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMP0) をもちいたスピントラッピング ESR (ST-ESR) 法で検討した。ウォームアップ前では大気圧プラズマを DMP0 水溶液に照射しても信号がほとんど観測されなかった。しかし、ウォームアップ後 (15 分後) には DMP0 に OH ラジカルが付加した DMP0/OH が観測された。ここで、DMP0/OH 信号強度と 308 nm の OES 信号強度と比較すると、両者に相関は見られなかった。一方で、706 nm (He 励起状態) の強度と DMP0/OH の信号強度に相関が見られた。続けて同様の計測をテレフタル酸 (TA) と OH ラジカルの反応で生成する HTA をプローブとした蛍光検出法 (TA 法) でも行ない、OES 信号の 706 nm および 308 nm のピーク強度と HTA の生成量の関連を比較したところ、ST-ESR 法と同様に 706 nm の OES 信号と HTA の生成量に関連性が見られた。以上から、706 nm の OES 信号をモニタリングすると大気圧プ

ラズマ照射装置の安定性向上が見込めると結論した。

さらに、所定の大気圧プラズマ照射条件（下記サブテーマ【II-2】に示す、安定生成条件）において、ウォームアップ時間中の OH ラジカルの生成量を TEMPOL 法で評価した（詳細サブテーマ【II-1】）。装置の電源投入直後は OH ラジカルの生成が見られなかったが、その後時間が経過するにつれて、OH ラジカルの生成が確認され、15 分以上経過すると OH ラジカル生成量は約 20 μM (TEMPOL 量 80 μM) で一定に達した（図 2-3）。そして、一定に達した時の OH ラジカルの生成量変動幅は $\pm 8\%$ であった（詳細【II-1】）。よって、He 大気圧プラズマ装置は電源投入から 15 分で安定し、連続使用 10 分間の OH ラジカルの安定生成を維持できた。よって、事業目標 ROS の生成までの時間 25 分以内、連続使用時間 10 分を達成した。

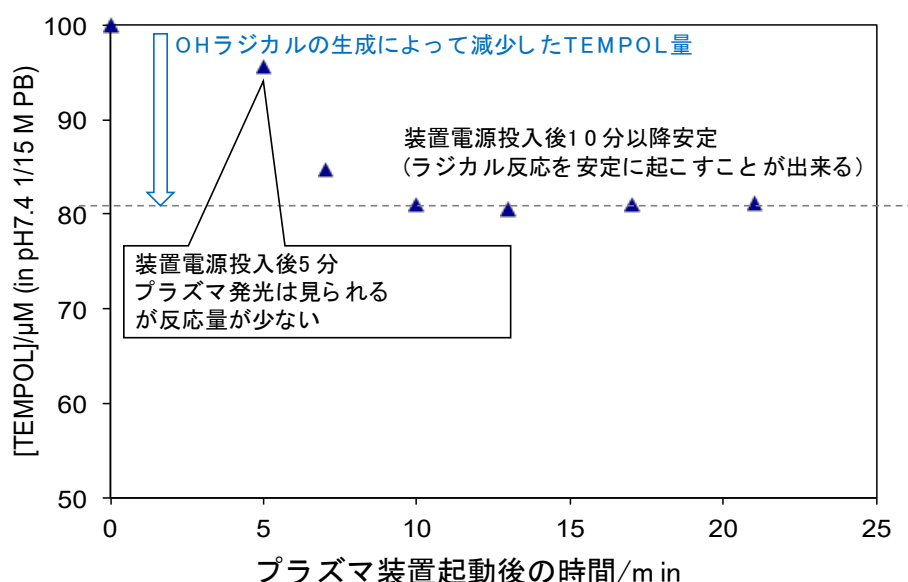


図 2-3 TEMPOL 法で評価した大気圧プラズマ装置起動後の時間と OH ラジカル生成による TEMPOL 減少量：プラズマ照射条件 印鑑電圧 6kv、He ガス流量 1L/min、ノズルサンプル間隔 1mm、照射時間 60 秒

【II】低温大気圧プラズマによる活性酸素生成量の定量化と制御法の開発

【II-1】活性酸素の定量的計測手法の開発

これまでの大気圧プラズマ装置を用いた基礎研究や応用研究において、水溶液への照射で観測される OH ラジカル量を厳密に定量した例は見られない。また、大気圧プラズマを照射したサンプル中の OH ラジカル生成量を意図的に制御できる装置は皆無である。そこで本サブテーマでは、テーマ【III】で開発した大気圧プラズマ装置を用いて、生成するヒドロキシルラジカルの定量計測法を検討した。サブテーマ【I-2】で使用した TA 法は、安価かつ簡便な検出法として多用されるが、様々な副反応により OH ラジカルの検出値が変化する可能

性があり、数値の信頼性が乏しい。そこで、本サブテーマでは定量法が確立されているスピントラッピング ESR 法を採用した。OH ラジカルは生体内における酸化ストレスに関与する。そこで、OH ラジカル生成法として周知され、医学分野における研究手法として有用な X 線照射法との比較を試みた。X 照射では水溶

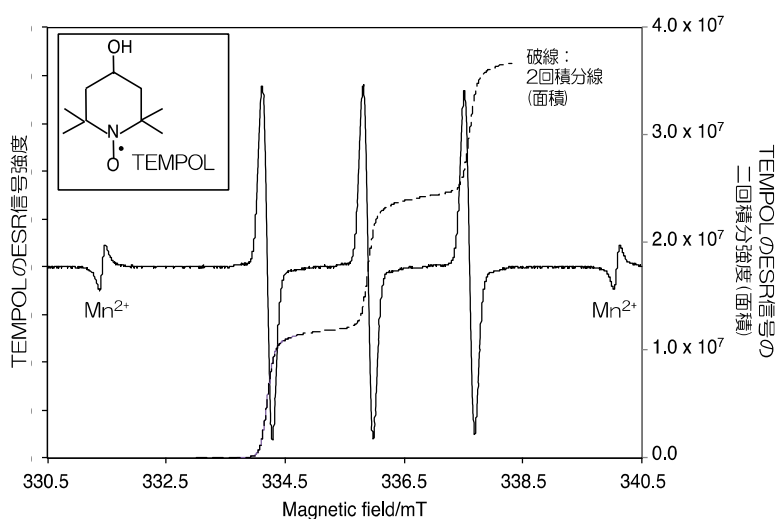


図 2-4 TEMPOL の ESR 信号と 2 回積分曲線(点線)。Inset; TEMPOL の分子構造

液への X 照射では線量 1 Gy(グレイ)あたり、生成する OH ラジカル量が 0.29 $\mu\text{M}/\text{min}$ と定められており、大気圧プラズマと X 線照射による OH ラジカル量の比較を行った。

まず、水溶液中のラジカル種の定量するためにはスピントラッピング ESR 法で OH ラジカルを捕捉検出し、水溶性安定ニトロキンドラジカル 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine 4-hydroxyl (TEMPOL)を使用してあらかじめ作成した検量線により評価した。TEMPOL は 1 分子 1 ラジカル粉末であり分子量(172.2)を用いて水溶液(リン酸緩衝液: PB pH7.4 1/15M)の濃度を計算できる。具体的には、窒素の核スピン 1 に由来する 3 本線の TEMPOL の ESR 信号強度面積と TEMPOL 溶液濃度が比例することを利用して(図 2-4)、ラジカル定量の検量線を作成した(図 2-5)。続けて、一定の大気圧プラズマ生成照射条件(印加電圧 6 kV, He ガス流量 1L/min、照射時間 60 秒、照射距離 1 mm; 条件については【II-2】に詳説)で 10 mM DMPD 水溶液に大気圧プラズマを照射し、DMPD/OH の ESR 信号(窒素核による 3 本分裂と水素核による 2 本分裂の重なりから 1:2:2:1 の信号を示す)を観測した。そして、低磁場側の

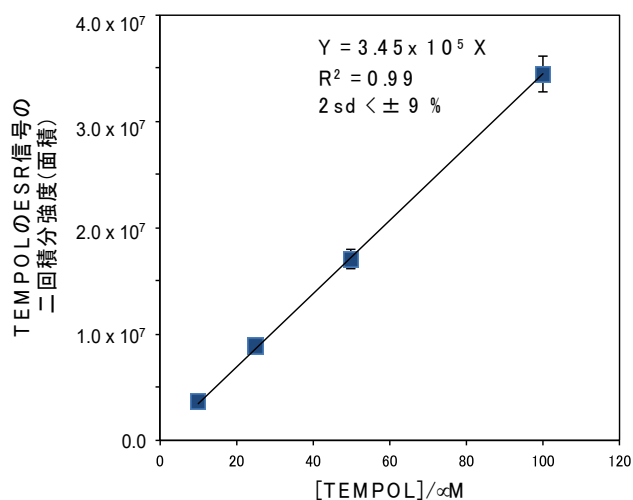


図 2-5 TEMPOL 濃度と ESR 信号の 2 回積分強度の関係 (TEMPOL の検量線)

DMP0/OH の ESR 信号の面積強度の 6 倍から DMP0/OH 全体の面積を求め、前述の検量線 (図 2-5) から DMP0/OH 濃度 (OH ラジカル生成量) を見積もった (図 2-6)。同様の実験を 3 回繰り返し、OH 生成濃度の平均 $19.2 \mu\text{M}$ ($\mu = 10^{-6}$, $\text{M} = \text{mol/L}$) を求めた。

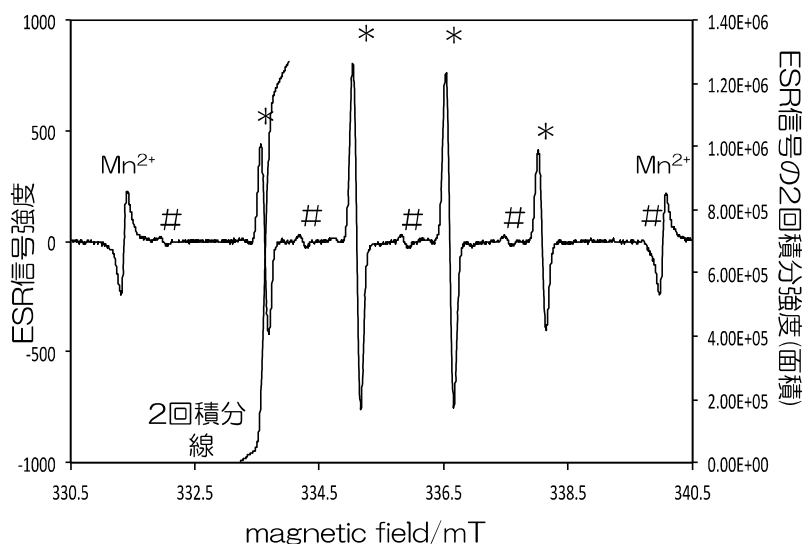
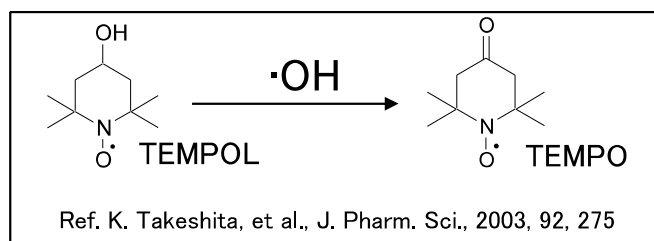


図 2-6 DMP0/OH の ESR スペクトル(*). #は DMPO/H.

一方で、ST-ESR 法は OH ラジカルの高感度検出および定量に有効な手法ではあるが、高度な実験技術が必要な計測であることと、使用する DMP0 試薬が高額 (¥22,000 円/ 1mL 以上) であり、大気圧プラズマ装置の性能評価のために多用することはコスト的に不相当であると考えた。そこで、装置の性能評価を簡素化、低コスト化するための新規の OH ラジカル定量的計測手法の開発を検討した。

前述の TEMPOL (¥3,900/1 g) は水溶液中で OH ラジカルと反応すると信号が消失する。これを元に OH ラジカル生成量マーカーとして使用できる可能性を学術論文から得て “TEMPOL 法” を開発した (図 2-7)。TEMPOL ラジカルは中性において水温 4°C から 30°C で非常に安定であり、1 mM 溶液 ($m = 10^{-3}$) は最低 1 ヶ月保管できる。希釈した TEMPOL 溶液 ($100 \mu\text{M}$) に対して大気圧プラズマを照射すると、水溶液中で OH ラジカルと TEMPOL が反応し TEMPOL の ESR 信号が $23.3 \mu\text{M}$ 減弱した。同じプラズマ照射条件で記録した



TEMPOL 信号の減少度合いとスピント 図 2-7 TEMPOL と OH ラジカルの反応

【公開版】

ラッピング ESR 法で DMP0/OH の生成量を比較すると、原点を通る良好な比例関係が得られた。この結果から、TEMPOL 法で評価した OH ラジカル生成量はスピントラッピング ESR 法に対して 10 % 以内のばらつきに収まった。このことから、大気圧プラズマ装置の性能評価法として、低コストな TEMPOL 法を採用できると判断し、OH ラジカルの定量法として主に使用した(サブテーマ I-2)。

次に、大気圧プラズマによるヒドロキシルラジカル生成能力を X 線照射法と比較した。X 線を水溶液に照射すると H_2O の結合切断によりヒドロキシルラジカルと水素原子が生成する。この時、X 線照射強度 1 Gy で $0.29 \mu M$ のヒドロキシルラジカルが生成し、X 線強度を増減すると生成するヒドロキシルラジカル生成量が比例的に変化することが知られている。そこで、大気圧プラズマ照射で観測した DMP0/OH 濃度を Gy 換算した(図 2-8)。図 2-8 に示した通り、ガス流量が 1 L/min を越えると生成する DMP0/OH が一定に達した。これは、スピントラッピング ESR 測定およびラジカル反応に特徴的な現象であり、ESR 検出されるラジカル種(DMP0/OH)飽和状態に達した時、OH ラジカルとさらに反応して ESR 検出されない反磁性物質になる頻度が上昇したと考えられる。すなわち、これは、本実験系においては 1 分以上の大気圧プラズマ照射は過剰の OH ラジカルを生成し、副反応を起こす可能性を示している。このことから、大気圧プラズマによる OH ラジカル生成時間は 1 分以下が妥当であるとした。

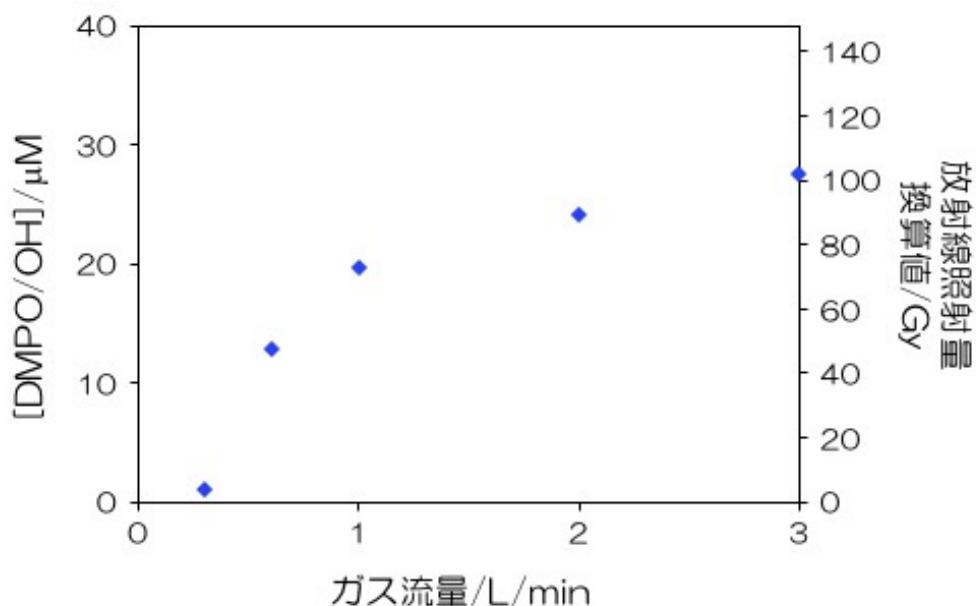


図 2-8 大気圧プラズマ照射条件(ガス流量)による OH ラジカル生成量の変化と放射線照射量換(Gy)算値。(大気圧プラズマ照射条件 印加電圧 6 kv, 照射距離 1mm 照射時間 1分)

【Ⅱ-2】活性酸素生成量の制御法の開発

これまで、大気圧プラズマによる OH ラジカルの生成メカニズムについて様々な報告がなされているが、OH ラジカル生成量を高度に制御するためには大気圧プラズマによる OH ラジカルの生成機序から検討する必要がある。そこで、OH ラジカルの生成メカニズムについて検討した。次に、サブテーマ I-2 のモニタリング法と合わせて、大気圧プラズマ生成と照射条件変化(印加電圧、ガス流量、雰囲気ガス種、照射位置、照射時間)における OH ラジカルの生成量を検討した。まず、大気圧プラズマの生成照射条件である印加電圧(V)、ガス流量(f)、照射時間(t)および照射距離(d)が OH ラジカルの生成量にどのような影響があるかを相関性から評価した。まず、f、t および d をそれぞれ 1 L/min、60 sec、1 mm で一定として V を 4 kV から 10 kV まで変化させると、DMP0/OH 生成量は V に直線的に比例して増加した。また、前述のように、t、d、V を一定として f を変化させると f = 1 以上で OH ラジカルがほぼ一定となる結果が得られた(図 2-8)。同様にして、1 つの変化量に対して他を一定値として DMP0/OH の生成量を評価し、結果から、f = 1 L/min、t = 60 秒、d = 1 mm、V = 6 kV が最適条件であることを見いだした。さらに、f = 1 L/min、d = 1 mm においては照射雰囲気について周囲を He ガス置換した条件とサンプル周囲が大気の時で、ESR 観測結果が同じであったことから、本条件が照射雰囲気が擬似的に He に置換されている事と同等であることを見いだした。この結果を元に、f、t、d、V を変数とする、OH ラジカル生成量のプロットおよびそのシミュレーションから、設定した条件において、300 mL の水溶液中で生成する、OH ラジカルの量を表示する機能を大気圧プラズマ装置に搭載した(図 2-9)。



図 2-9 OH ラジカル生成量の表示画像

次に、本大気圧プラズマ装置で制御できる OH ラジカルの生成量について、日内・日間の変動を2週間に渡って計測した。同時に、大気圧プラズマ装置周囲の雰囲気温度、湿度が OH ラジカル生成量に影響しないかを、デジタル湿温度計でモニタリングした。OH ラジカル生成量は TEMPOL 法を用いた。その結果、最適化した大気圧プラズマ照射条件で変動幅を不偏標準偏差(SD)で評価すると、温度湿度に関係なく、日間(±8.3%)および日内(±8.4%)となり最終目標値(±50%)を大幅に達成した(図2-10)。これは大気圧プラズマ照射条件を精密に制御する有効性を示している。これは、前述の d = 1 の条件において、周囲が空気であっても擬似的に He 置換され、安定的に動作したことと同様の結果を示していると考えられる。

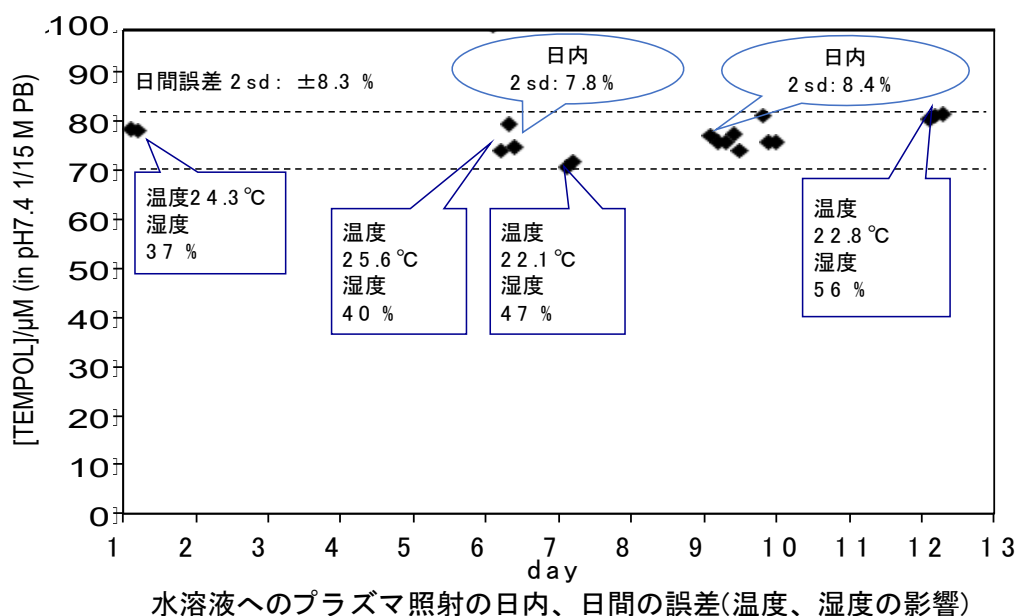


図 2-10 TEMPOL 法で評価した大気圧プラズマで生成した OH ラジカルの日間誤差と日内誤差

【Ⅲ】低温大気圧プラズマを用いた活性酸素生成装置の開発と検証

【Ⅲ-1】シングルサンプル用の活性酸素生成装置の開発

本事業では、大型サンプルステージ付き活性酸素生成装置、小型の活性酸素生成装置および一体型活性酸素生成装置を開発した。大型サンプルステージ付き活性酸素生成装置は装置の安定性向上、サンプルへの大気圧プラズマ照射方法の条件最適化で使用し、安定した OH ラジカル生成を実現した。さらに、細胞への大気圧プラズマで誘導されるアポトーシス(IV-2)で応用的に使用した。小型の装置は、サンプルステージ付き装置と性能的に同等かつ、実

【公開版】

験的な性能も保証できている。本装置は、本事業で開発した大気圧プラズマ装置を気軽に使用したいとのニーズから、一から設計し卓上の高安定性の大気圧プラズマ装置として開発した。本装置は、電源およびガス制御系の設置面積は A4 サイズに収まる小型となっている。また、大気圧プラズマノズルは電源、およびガス制御系から半径約 1 メートルの範囲で自由に移動できる。ノズルを固定する台を取り付けることで照射高さを固定して使用できる(図 2-11)。また、電源系およびガス流量制御系を同じように使用し、電極部分を取り替えることでマルチサンプル用の活性酸素生成装置(小型)を貸し出し用に開発した。

小型活性酸素生成装置(ジェット型)仕様

- ・ 電源 AC 100 V
- ・ 入力電圧 40, 60, 80 100 V 4段階
- ・ プラズマ放電部印加電圧 4, 6, 8, 10 kV の 4段階
- ・ ガス流量 最大 10 L/min
- ・ 装置サイズ (300 x 250 x 150 mm:プラズマ照射ノズル部分を除く)

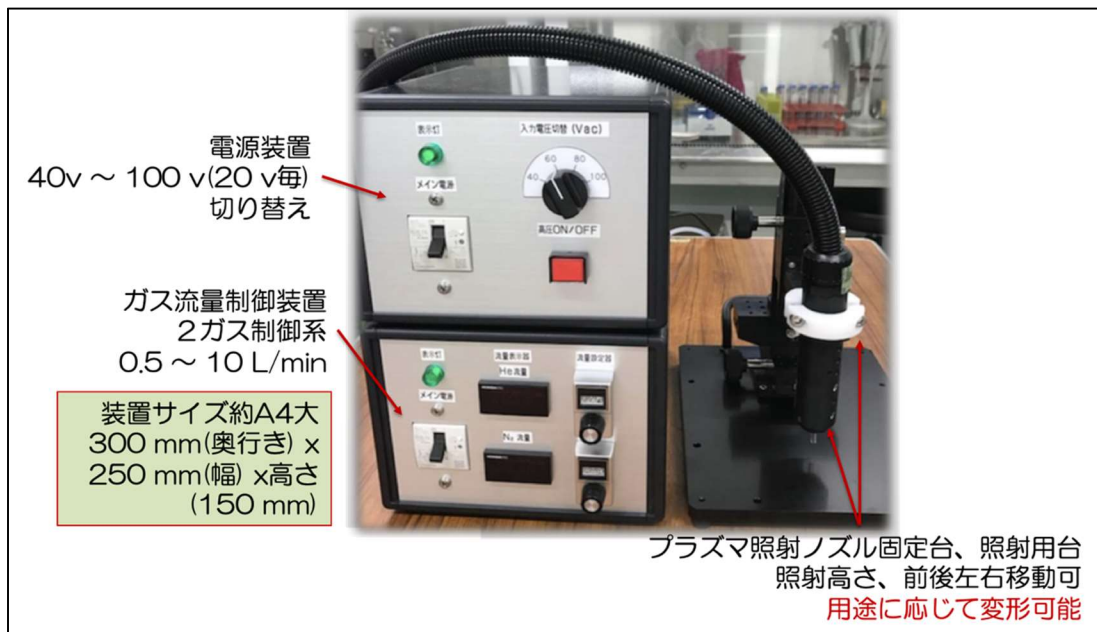


図 2- 11 活性酸素生成装置(ジェット型)の仕様と特徴

本小型装置は、バイオ分野、化学分野のユーザーに実際に使用され、細胞、菌、有機分子に対する大気圧プラズマで生成する OH ラジカルの反応として有効である可能性が示唆された。

【Ⅲ-2】マルチサンプル用の活性酸素生成装置の開発

サブテーマⅢ-1 で開発したシングルサンプル用の ROS 生成装置の開発およびテーマ【Ⅱ】で得た OH ラジカル生成の安定化の知見を元に、複数の試料への同時照射を可能にする平行平板型電極を製作した(図 2-12a)。また、平行平板型プラズマ源と制御系を一体型とした装置を開発した(図 2-12b)。

平行平板型電極は、ガスを幅 140 mm に均等に拡散させる機構が組み込まれ、He が流れる電極間 1.0 mm に電圧が印加されると He-大気圧プラズマが発生し、96 穴 (well) マイクロプレートの一列 8 試料に同時に照射できる。

本装置の性能を評価するために、隣り合う 3 つの well に TEMPOL 溶液を入れ真ん中の well に対してサブテーマ(Ⅲ-1)で開発したシングル用電極を用いて大気圧プラズマを照射すると、照射したサンプルのみが反応した。また、well 間の壁上で大気圧プラズマを照射したが、その壁に接触している TEMPOL 溶液は全く反応しなかった。よって、平行平板型電極を用いると、96 穴プレートの 1 列の 8 サンプルに同時かつ独立して大気圧プラズマを照射できることが示された。

平行平板型電極の取り付け(左：下からの写真) 発光部(右：下部から鏡で撮影)



平行平板型電極と96穴プレートの位置関係

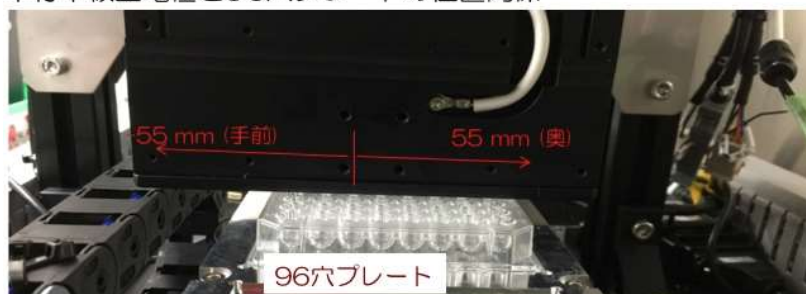


図 2-12a ROS-01 型装置に取り付けた並行平板型電極(PP02-01)および 96 穴マイクロプレートへの照射条件



図 2-12b 一体型マルチサンプル用活性酸素生成装置

次に、平行平板電極を使用して TEMPOL 法を用いて OH ラジカル量と安定性について評価した。8 つの well に同じ TEMPOL 溶液を入れて照射をおこなうとその生成量には一定の傾きが見られ、 $2.8 \mu\text{M}$ から $4.8 \mu\text{M}$ まで最大-最小間誤差 170 %が生じた(図 2-13)。

次に、電極の設計および組立過程を検証して、電極出口の間隙(設計値 1.0 mm)が片側に 0.1 mm 偏っていることが判明した。その結果、間隙の狭い部分に向かって OH ラジカルの生成量

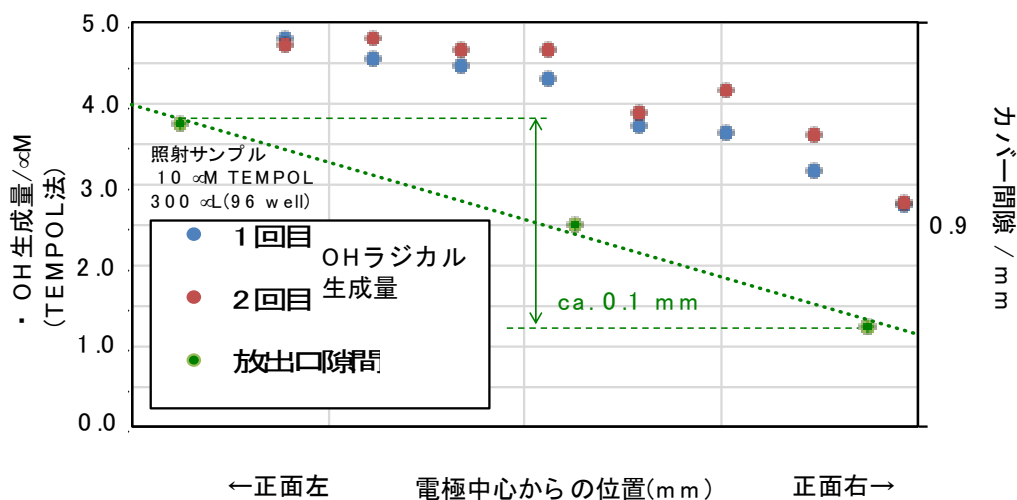


図 2-13 平行平板型電極を用いた大気圧プラズマ照射で生成した OH ラジカルとガス放出口の間隙の関係

【公開版】

が減少していることが明らかになった。そこで、間隙が一定となるように再調整し、TEMPOL法で評価(試行回数 3回)すると、誤差は±18 % (最終目標 ±50 %)まで減少した(図 2-14)。さらに本結果を詳細に解析すると、ガス拡散機構に起因して誤差が生じている可能性が浮上した。すでに、目標値(±50 %以内)を達成しているが、今後マルチサンプルへの OH ラジカルの生成、作用の誤差を低減するための拡散機構の再検討を行う必要がある。

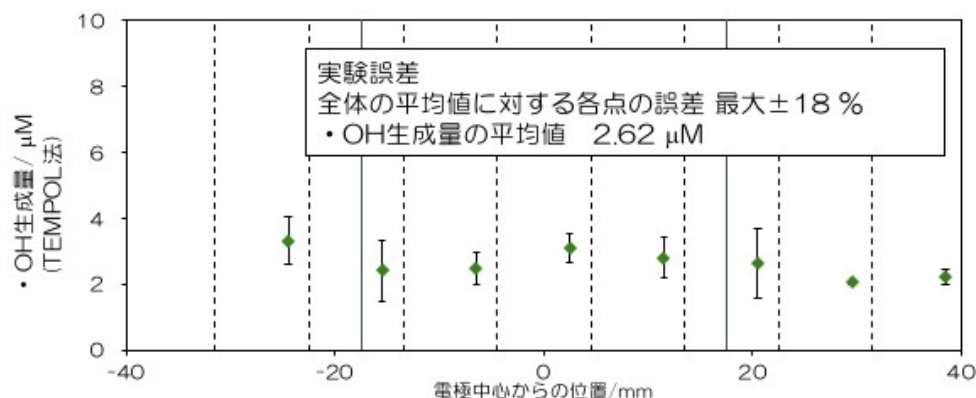


図 2-14 ガス放出間隙を調整後の OH ラジカル生成量。縦の実線および破線は拡散板の位置

【Ⅲ-3】活性酸素生成量の安定性向上

ヘリウムガスを連続的に流し、かつ照射対象サンプルがノズルに近接している場合に異常放電が多発した。また、プラズマノズルを合計 400-500 時間使用すると経時変化によって内部が劣化することが見られた(図 2-15)。この劣化および異常放電により、OH ラジカルの生成安定性が低下することが明らかとなった。これは、電極部の異常放電は大気圧プラズマノズルを組み立てた際に生じるわずかな隙間にヘリウムガスが侵入することで起きていると考えられた。また、高電圧が印加されている周辺で電氣的な損傷が生じている可能性が見られた。そこで、パッキン材を用いて電極と電圧が集中する部分の絶縁・固定と隙間を埋めることを検討した。検討した素材のなかにはわずかな空間が生じることによる異常放電が見られた。検討したなかで唯一、問題を改善できるものがあった。本対策によって高電圧のかかるプラズマ源の安全性の改善も見込める。

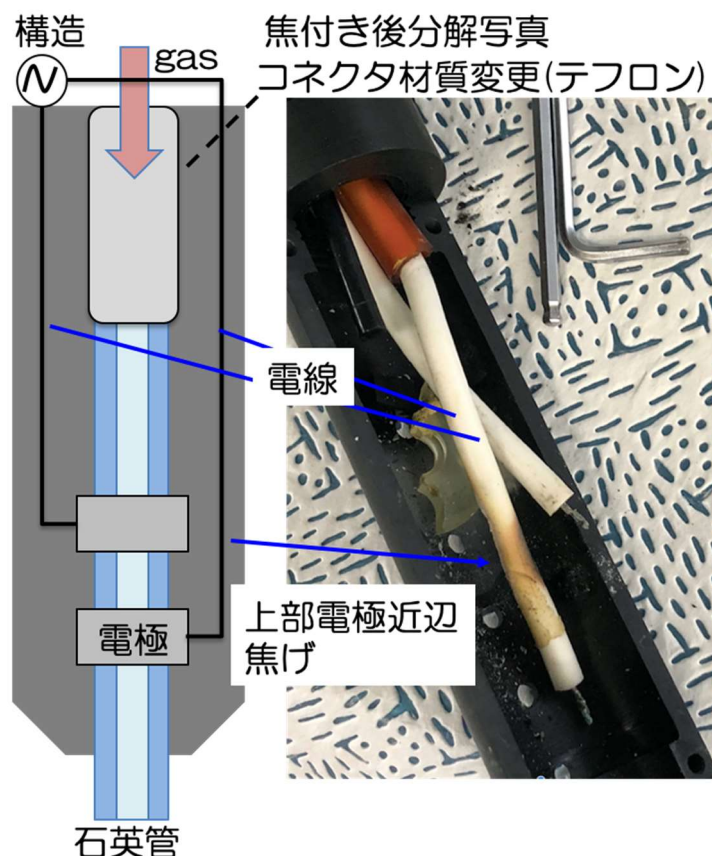


図 2-15 異常放電により損傷した大気圧プラズマ源の構造と内部

【IV】抗酸化物質と生体試料に対する活性酸素の検証試験

【IV-1】抗酸化物質に対する活性酸素の作用の検証試験

OH ラジカルは最も強力な活性酸素種であり、拡散律速に匹敵する速度で有機物と反応する。このことから、OH ラジカルはバイオ分野から化学、工業分野で盛んに検討されている。これらの研究において、放射線による水の分解、過酸化水素の紫外線分解、過酸化水素と鉄錯体による Fenton 反応が OH ラジカルの生成手法に多用されてきた。しかし、特にバイオ分野や素材評価においては、放射線や過酸化水素、紫外線はそれ自体がサンプルに影響があり、厳密な検討することができなかった。本事業では、試薬などを使わない OH ラジカル生成をテーマ【Ⅲ】で開発した大気圧プラズマ装置を使用して実現した。本サブテーマでは、OH ラジカルに対する抗酸化物質の消去活性を検討した。

【公開版】

まず、抗酸化物質の OH ラジカル消去活性について、スピントラッピング ESR 法で検討した。まず、スピントラッピング ESR 法で抗酸化評価を行うためには、OH ラジカルに対する抗酸化物質と DMPO が競争反応の速度論的に妥当な測定条件を検討する必要がある。そこで、一定の大気圧プラズマ照射条件において、DMPO 濃度を変えて生成する DMPO/OH 濃度を評価すると DMPO 濃度が 10 mM 以上で DMPO/OH 濃度が 20 μM で一定となった(図 2-16)。すなわち、本測定系において、開発した大気圧プラズマ装置では 1 分間に 20 μM の OH ラジカルが生成していることを示している。この時の DMPO 濃度 5 mM 以上が競争反応の測定条件を満たしている(図 2-16)。そこで、測定条件を十分に満たす 10 mM の DMPO 溶液を用いて抗酸化物質としてマニトール、エタノールおよびグリシンと OH ラジカルの反応速度定数を評価した。さらに、前述の TA 法を同様の取り扱いでマニトールの抗酸化評価を行なった。いずれの結果においても、大気圧プラズマ照射条件を最適化した際には、大気圧プラズマで生成した OH ラジカルを対象とした抗酸化評価法として有用であることが示された。

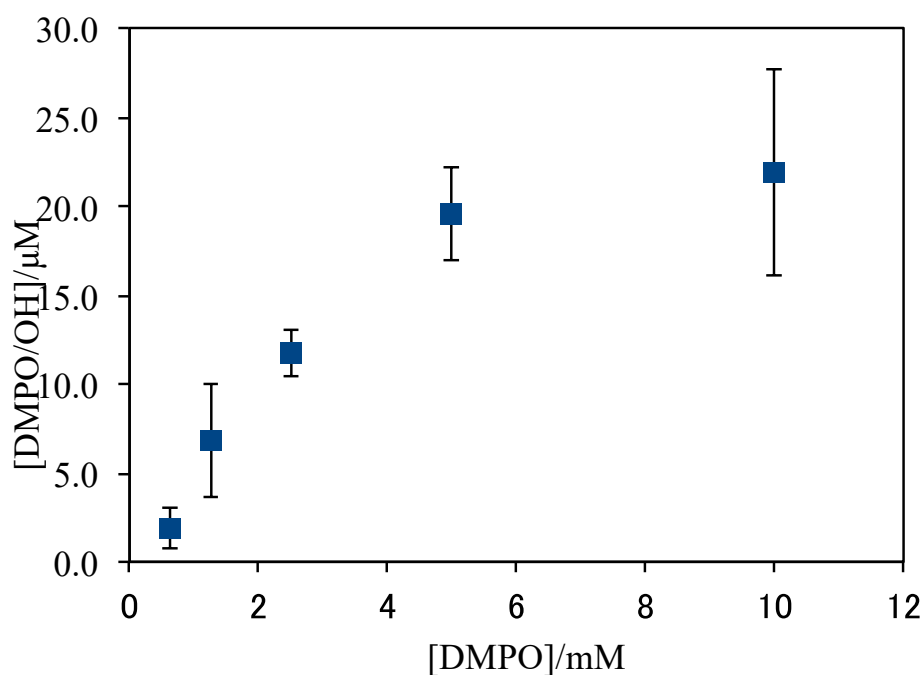


図 2-16 DMPO 濃度と大気圧プラズマ照射で生成した DMPO/OH 濃度の関係：大気圧プラズマ照射条件 印加電圧 6kv、照射時間 1分、照射距離 1mm、ガス流量 1L/min

【IV-2】細胞に対する活性酸素の作用の検証試験

前述のように、これまではバイオ分野において細胞など生体試料に対する OH ラジカルの影響を評価するためには、過酸化水素などの試薬や放射線照射など強力なエネルギーを用いなければならなかった。これらの方法は、OH ラジカルを生成するだけでなく、細胞そのものに悪影響を与えることになり、信頼性のある評価ができなかった。本事業では、試薬を使わず、熱や液性の変化なく OH ラジカルを生成できる装置を開発した。本サブテーマでは実際に培養細胞に対して OH ラジカルを作用させて装置の評価を行った。

これまでの研究で、特定の細胞への大気圧プラズマ照射によっては、細胞が減少・死滅することが報告されている。これは細胞のアポトーシス(自死)を誘発していると推測されている。そこで本事業では、大気圧プラズマで生成した OH ラジカル生成量とアポトーシスの関連を明らかにする。細胞は U937(ヒトリンパ腫細胞)および MDCK II (イヌ腎臓尿管上皮細胞)を用いた。細胞死 (アポトーシスの発現) の定量には、TUNEL 法の評価キットを用いて検討した(図 2-17)。

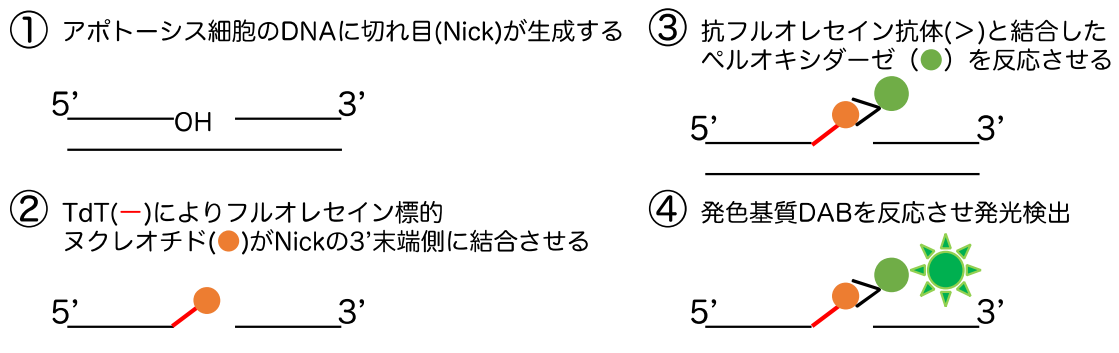


図 2-17 TUNEL 法の原理

大気圧プラズマの条件はテーマ【II】で検討した条件(印加電圧 6 kv、He ガス流量 1 L/min、距離 1 ~ 5 mm 照射時間 1 分)でプラズマ照射を行い、アポトーシスの誘発率を評価した。さらに、複数の同型の大気圧プラズマ装置を用いて、テーマ【III】で開発した装置の設置場所や使用者、また器差に関する情報についても収集した。まず、MDCKII(イヌ腎臓尿管上皮細胞)に大気圧プラズマを照射時間(20 秒-120 秒)および印加電圧(4 kv -10 kv)を変化させて照射すると、それぞれに依存して細胞死が認められた(図 2-18)。次に、この細胞死の機序を検討するために、TUNEL 法を用いてアポトーシスの検討を行なった。すると、24

穴プレートで培養した MDCK II に対して印加電圧 6 kv、ガス流量 1 L/分、照射時間 1 分、照射距離 5 mm で大気圧プラズマを照射すると、1 日後に 50 %のアポトーシスが観測され(図 2-19)、3 日後にはほぼ全ての細胞が死に至った。

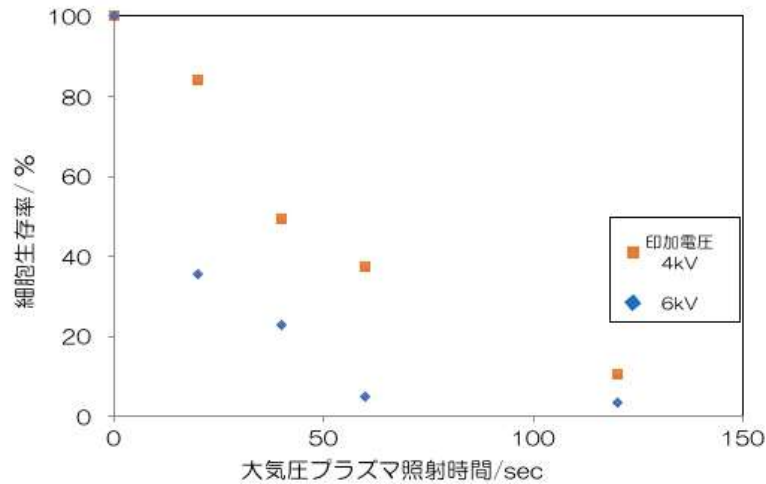


図 2-18 大気圧プラズマ照射時間と MDCK II 細胞生存率

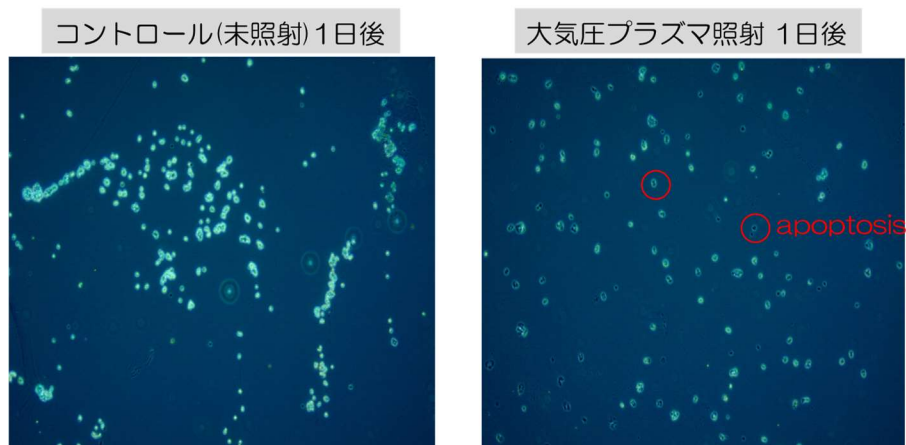


図 2-19 TUNEL 法で検出した MDCK II 細胞。左 ; コントロール、右 ; 大気圧プラズマ照射 1 日後。中が黒い細胞(例 : 赤い丸)がアポトーシスを起こした細胞を示す

さらに、アポトーシスを定量的に評価するために U937(ヒトリンパ腫細胞)を用いて、アネキシン V-FITC および PI 染色後、フローサイトメトリー法で測定を行った。大気圧プラズマ装置を用いて、所定の条件で U937(2×10^5 細胞/ml)に大気圧プラズマを照射すると、照射時間に依存してアポトーシスの増加が認められた。照射 1 日後の測定では照射 1 分で 5 % (誤差 ± 1 %) の細胞死が観測された。つぎに、細胞の濃度や条件を検討し U937 細胞を 15 %/1 分間でアポトーシスを起こすことが判明した。これは、事業目標値を達成している。

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

開発した活性酸素生成装置について

- ・ 生体サンプルへの活性酸素種(OH ラジカル)を定量的に作用できる大気圧プラズマ装置を開発した。
- ・ 1 サンプル用、マルチサンプル用の活性酸素生成装置を開発した。作用できる OH ラジカルの誤差は 1 サンプル用で±8 %以内、マルチサンプル用で±18 %以内と高い安定性を示した。
- ・ OH ラジカルの生成量は装置で制御可能な物理的パラメーターによってコントロールできる。

活性酸素生成装置を用いた生体サンプルへの応用について

- ・ 開発した大気圧プラズマ装置は処理対象に対して熱的損傷や pH 変化を及ぼさず OH ラジカルを作用できる。すなわち、「抗酸化活性の見える化」に向けた ROS 生成装置となりうる。
- ・ 低分子量抗酸化物質の OH ラジカル消去評価に応用可能である。
- ・ 培養細胞に対して、1 分間で 5 %から 50 %のアポトーシスを誘導できた。

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

研究開発後の課題

- ・ 生成する OH ラジカル量を現在の 20 μM /分から最大で 5 倍を求められている。現在の安定した動作を維持した状態で OH ラジカル生成量を増大させる技術開発を行う。
- ・ OH ラジカル以外の活性種の選択的生成がニーズに挙げられている。今後の検討課題としてあげられる。

事業化展開

性能を担保できたことから、事業期間内に大気圧プラズマ装置の無償貸与を進めた。そこでユーザー層の調査および要望を収集した。ユーザーは本事業でターゲットとしたバイオ分野、食品分野だけでなく、化学分野や医学分野、農業分野の研究開発から産業分野まで含まれていた。また、装置の使用方法についても多様なニーズが収集できた。これは、安定した OH ラジカルの生成を達成し、活性酸素(OH ラジカル)の由来について基礎的な研究を行い知見が蓄積できたことによってもたらされた成果であると推測できる。収集できたニーズを元に装置を改良・改造し、多様な分野に応用できる大気圧プラズマ装置の製品化を目指す。