

博士論文 (要約)

ヘリウムプラズマジェットの 活性種レーザー分光計測及び 活性種供給量に基づく細胞反応の評価

Measurement of reactive species in a helium
plasma jet and assessment of cell reaction
based on reactive species dose

指導教員 小野 亮 准教授

東京大学新領域創成科学研究科

先端エネルギー工学専攻

47-127024 米森 星矢

目次

| | |
|------------------------------|-----------|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1 大気圧プラズマの特徴 | 1 |
| 1.2 大気圧ヘリウムプラズマジェットとその応用 | 3 |
| 1.3 プラズマ医療応用の原理と背景 | 7 |
| 第2章 実験原理及び実験装置 | 17 |
| 2.1 プラズマ診断・活性種計測の手法とその特徴 | 17 |
| 2.2 大気圧ヘリウムプラズマジェット | 20 |
| 2.3 色素レーザー | 24 |
| 2.4 OPO レーザー | 25 |
| 2.5 LIF 法 | 28 |
| 2.5.1 OH-LIF | 30 |
| 2.5.2 O-TALIF | 37 |
| 2.5.3 NO-LIF | 40 |
| 2.6 シャドウグラフ | 41 |
| 第3章 LIF 法による活性種の計測 | 44 |
| 3.1 OH-LIF | 45 |
| 3.1.1 OH ラジカルの時間変化 | 50 |
| 3.1.2 異なる表面上における OH ラジカル密度分布 | 51 |
| 3.1.3 ヘリウム流速と活性種密度分布の関係 | 52 |
| 3.1.4 活性種生成と背後電極の関係 | 53 |
| 3.1.5 OH ラジカルの2次元分布 | 54 |
| 3.1.6 考察: OH ラジカルの生成機構 | 56 |
| 3.2 O-TALIF | 60 |

| | | |
|--------------|--------------------------------------|------------|
| 3.2.1 | O 原子密度分布の時間変化 | 61 |
| 3.2.2 | 表面の状態と O 原子密度の関係 | 61 |
| 3.2.3 | 放電ガスの組成と O 原子密度の関係 | 63 |
| 3.2.4 | O 密度の 2 次元分布 | 64 |
| 3.2.5 | 考察: O 原子の生成機構 | 64 |
| 3.3 | NO-LIF | 67 |
| 3.3.1 | 放電ガスの組成による NO 密度の変化 | 67 |
| 3.3.2 | NO の 2 次元分布 | 68 |
| 3.3.3 | NO の生成機構 | 68 |
| 3.4 | 活性種のフラックス | 71 |
| 第 4 章 | 放電極性と活性種密度の関係 | 76 |
| 4.1 | 放電極性と活性種生成の関係 | 76 |
| 4.2 | 正極性・負極性放電における印加電圧と活性種密度の関係 | 80 |
| 4.3 | ICCD カメラを用いたプラズマ進展の計測 | 81 |
| 4.3.1 | 放電極性と放電進展の関係 | 81 |
| 4.3.2 | 表面の状態とプラズマ進展の関係 | 84 |
| 4.4 | 考察: 放電極性の放電進展への影響と活性種密度の変化 | 87 |
| 第 5 章 | 活性種の dose と細胞実験による指標の検討 | 90 |
| 5.1 | 各種細胞へのプラズマ照射の効果 | 92 |
| 5.1.1 | 細胞数の変化における培地の影響 | 92 |
| 5.1.2 | 細胞数の変化における放電ガスの影響 | 97 |
| 5.2 | プラズマ照射による細胞周期の変化 | 100 |
| 5.2.1 | プラズマの照射と細胞周期の関係 | 100 |
| 5.2.2 | 加湿プラズマによる細胞周期への影響 | 103 |
| 5.3 | 考察: プラズマ照射による活性種供給量と細胞数の関係 | 105 |
| 第 6 章 | 結論 | 110 |
| 6.1 | 研究成果 | 110 |

| | |
|---------------------|------------|
| 6.2 今後の課題 | 112 |
| 謝辞 | 113 |
| 参考文献 | 114 |
| 発表文献・業績 | 132 |
| 付録 A | 136 |

第1章 序論

1.1 大気圧プラズマの特徴

プラズマとは気体を構成する中性分子や単原子分子が電離し、正の電荷をもつイオンと負の電荷をもつ電子とに別れて飛び回っている状態である。全体として電氣的に中性な物質であり、物質の三態である固体・液体・気体に加えてプラズマは物質の第四状態と呼ばれる。

プラズマ中には電子、正イオン、中性粒子が存在する。プラズマ中のそれぞれの密度を n_e , n_i , n_n とするとプラズマの定義にしたがえば $n_e \simeq n_i$ である。ここで、プラズマの電離度 β は以下のように表される。

$$\beta = \frac{n_e}{n_e + n_n}$$

太陽や核融合プラズマ中では粒子のすべてが電離しており、 $\beta = 1$ である。このようなプラズマを完全電離プラズマという。一方、 $10^{-2} < \beta < 1$ の場合を強電離プラズマ、 $\beta < 10^{-2}$ であるプラズマを弱電離プラズマという。大気圧での放電プラズマや火炎プラズマはほとんどが弱電離プラズマである。また、プラズマ中において電子温度 T_e 、ガス温度 T_n 、イオン温度 T_i が等しい場合、そのようなプラズマを熱平衡プラズマ、プラズマ中の電子とイオン・中性粒子が熱平衡状態にないプラズマを非熱平衡プラズマと言う^{1,2}。

大気圧下では、パッシェンの法則に基づき放電が起こりにくくなるうえに、プラズマが熱化してしまうために、プラズマは真空下ないし低圧条件で生成されるのが一般的であった。しかしながら、短パルス幅の印加電圧や希ガスを用いた放電により、大気圧下でもプラズマを生成することが可能となり³、以来様々な大気圧プラズマの生成やその基礎機構に関する研究が行われてきた。

大気圧下でプラズマを生成すると、高効率でラジカルやイオンなどの活性種を生成することができる。これらの活性種は熱的・物理的なプロセスだけではなく酸化/還元などの化学的なプロセスを可能にするとして、大気圧プラズマは様々な場面で応用されている。例えば空気清浄機のような電気機器から、ガス処理、半導体表面処理、水処理といった多岐に渡る応用がなされており、工業的にも欠かすことのできない存在である。大気圧プラズマには様々な種類があるが、以

下にその代表的な放電の幾つかを示す。

・バリア放電 (Dielectric barrier discharge)

誘電体を挿入した電極間に高電圧を印加することによって得られる放電。誘電体を挿入することにより、電荷は移動するが電流は流れにくくなるため、短絡しにくいことから金属電極同士の放電に比べて高い電圧を印加することができる。多数の反応性の高い活性種を生成することができる。バリア放電では誘電体がスパークの発生を防ぐため、熱平衡プラズマへと移行しにくい。また、放電が進展していくと誘電体中に逆電界が発生するため、放電空間中の電界強度が弱まり放電が自動的に停止する。有害ガス処理の有効な手法として用いられることが多いが、他にも太陽電池の表面処理や、熱負荷に弱い物質の表面改質などにも用いられる。放電には周波数 $10^3 \sim 10^4$ Hz 程度の交流が用いられることが多い。放電時に大きな音が出ないことから無声放電とも呼ばれ、工業的には紫外線利用以外のオゾン生成などに用いられる。また、プラズマディスプレイなどにも応用され、広く用いられる放電形式である。

・沿面放電 (Creeping discharge)

電極を誘電体に埋設し、高電圧を印加することによって得られる放電。バリア放電とは異なり誘電体の表面に沿って樹枝状の放電路が形成される。広範囲にわたってプラズマを発生させることができるため、広い反応場を作ることが出来る。応用例としては、表面改質、異常電流の計測などがある。沿面放電は火花放電の場合、絶縁体表面の改質を伴わないフラッシュオーバーと改質を伴うトラッキングで区別される。異常電流の計測などではトラッキングが用いられる。

・グローコロナ放電 (Glow corona discharge)

不平等電界において発生する持続的な放電。このとき電極付近に観測される発光部をコロナと呼ぶ。多くの場合グロー放電は希ガスを放電ガスとして用いる放電であり、アルゴンやヘリウムなどが用いられることが多い。希ガスを用いたグロー放電は、放電開始電圧が低いながらも反応場の広い均一なプラズマを形成できる。また、バリア放電に比べてプラズマ中の電子による衝突の影響が小さいため、半導体などデリケートな製品の表面加工などに向いている。

・ストリーマコロナ放電 (Streamer corona discharge)

不平等電界によって発生する筋状のプラズマをストリーマと呼び、この際の放電をストリーマコロナ放電と呼ぶ。

針-平板電極の針電極側に正極性の高電圧を印加していくと、陰極付近の偶存電子が外部電界

E_0 によって加速され電子なだれとなって陽極へと進む。このとき電離によって発生したイオンの移動度は電子の移動度に比べて非常に小さいので、イオンは静止しているとみなすことができる。陽極に達した電子なだれは陽極に吸収される一方、静止している正イオンは電極間に取り残される。このイオンが電界 E_r を形成するが、 $E_r \geq E_0$ であるとき E_r により陽極付近で小さな電子なだれが発生する。この小さな電子なだれは電極間の正イオン群に吸収され、プラズマ状態となる。このプラズマ領域は細い筋状（ストリーマ）となって陰極方向へと伸びていく。ストリーマが陰極に到達すると電極間がプラズマ・チャンネルで短絡される。ストリーマ理論は Meek、Loeb らによって提唱された⁴⁻⁶。 α 作用と光電離作用および空間電荷電界を考慮した理論であり、タウンゼント理論では説明がつかない大気圧不平等電界中の放電をうまく説明している。

・アーク放電 (Arc discharge)

放電電流を大きくしていくと、陰極降下電圧は 10 ~ 20 V 程度に到達し、アーク放電と呼ばれる状態に達する。アーク放電では、陰極面の極近傍に陰極点 (Cathode spot) とよばれる小さな輝点が生じ、その点に集中して電流が流れる。そのため、陰極点での電流密度は極めて大きくなり、タングステン電極の場合 10^4 A/cm²、銅電極の場合 10^7 A/cm² にも達するといわれる⁷。このとき、金属電極は電流により加熱されるため沸点の低い電極は金属蒸気を放出する。陰極点でそのような高密度の電流が流れる要因としては、 γ 作用の他に、熱電子放出、電界放出などが考えられているが、電極近傍の現象は明らかでない部分も多い。

・大気圧プラズマジェット

本研究の研究対象でもあるプラズマジェットは、放電に用いるガスによって物理的な特性やそれに伴う用途も大きく変化する。例えば空気を放電ガスに用いる場合、一般的に印加電圧は交流では 30 kV 程度、ガス温度は高温であることが多く、表面改質などに用いられる。一方、アルゴンやヘリウムなどの希ガスを用いたプラズマは、放電電圧も空気に比べて 10 kV 程度であるものが多く、ガス温度も 300 ~ 700 K 程度と比較的低温である。このプラズマジェットは熱に弱い対象にも照射が可能であるため、新しい応用が研究されている。第 2 章で本研究で用いた大気圧ヘリウムプラズマジェットをはじめ医療応用に用いられるプラズマジェットの詳細を説明する。

1.2 大気圧ヘリウムプラズマジェットとその応用

前述のような大気圧プラズマの中でも大気圧非熱平衡プラズマは、電子温度が高くガス温度が低いという特徴を持つ。また、既存のプラズマに対して大きな真空容器を必要としないため一般

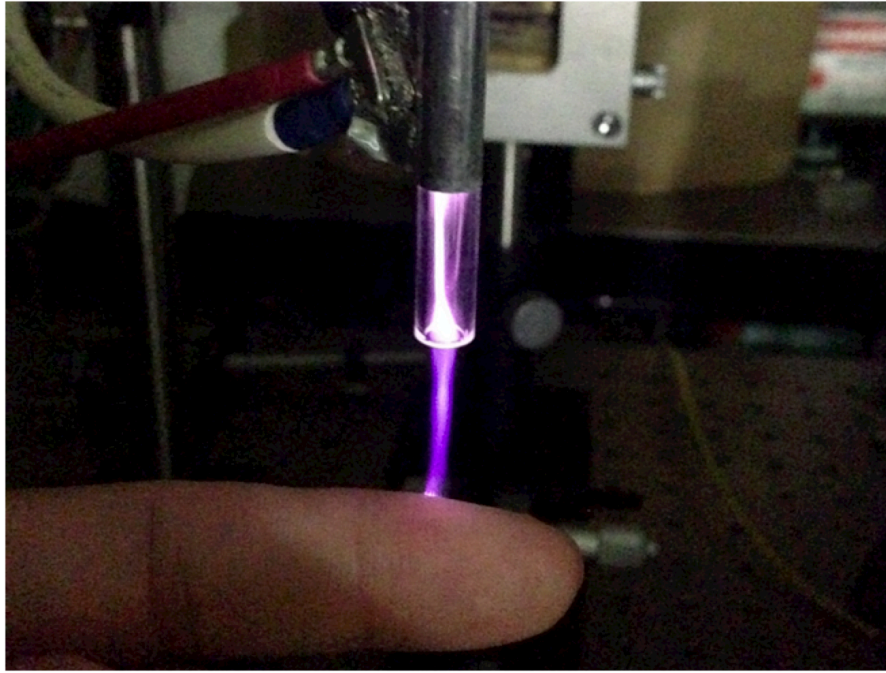


図 1.1 大気圧ヘリウムプラズマジェットの写真。人体が直接接触できるほど低温なプラズマである。

的に装置が小型であり、安価で取り扱いが容易などの利点がある。こうした非熱平衡プラズマの1つである大気圧ヘリウムプラズマジェットは、放電によるガス温度の上昇がほとんどなく、ガス温度は通常室温 (300 K) 程度である。そのため照射表面に熱負荷を与えることなくプロセスを行えると考えられている^{8,9}。この極めて熱負荷の小さいプラズマジェットを用いることによって、既存のプラズマではできなかった生体などの熱負荷に弱い物体を対象としたプラズマプロセスが可能だとして注目を集めている¹⁰⁻¹⁵。

このプラズマジェットは装置そのものは安価で作成可能だが、比較的高価なヘリウムガスを用いることから付加価値の高いプロセス、主に医療応用を想定とし種々の研究が行われている。

現在このプラズマジェットにより行われる医療応用には、以下の様なものがある。

- がん治療: がん細胞や組織へのプラズマ照射によりがんの成長抑制や細胞死を誘起する。
- 創傷治療: 傷口へのプラズマ照射により治癒の促進や後遺症の軽減などの効果を得る。
- 止血: 手術中などに傷口からの出血を短い時間で止血することが出来る。主に Ar プラズマジェットが用いられる。
- 殺菌: プラズマを照射することにより殺菌を行う。薬剤耐性のある菌の殺菌や、薬品より数桁高い殺菌作用を持つなどの利点がある。
- 美容, 歯科治療など: 細胞の活性化や殺菌における原理を応用したプロセス。

がん治療

近年、このプラズマジェットを用いたがん治療が世界的に注目を集めている¹⁶⁻²³。プラズマ医療の実現に向け、*in vivo*(動物、生体)実験や*in vitro*(細胞、生体外)実験が多く行われている²⁴。例えば*in vitro*の実験ではがん細胞にこのプラズマジェットを照射すると、がん細胞の細胞数減少が観測されることが分かっている。また、プラズマ照射による細胞死の誘導では、正常細胞よりもがん細胞の方がプラズマ照射による細胞死が起こりやすいという選択性も細胞・動物実験により報告されている^{25,26}。プラズマによる細胞死は、細胞膜などが物理的に破壊され細胞死を起こすネクロシスではなく、細胞が自死を起こすアポトーシスの誘発が主であるという特徴を持つ。これはプラズマにより生成される活性種(イオンやラジカル)が細胞内や細胞膜に対しストレスを与え、細胞内部におけるアポトーシス(自然死)を誘発することに起因すると考えられているものの、その詳細な機構や効果のある癌細胞死の種類などに関して、明らかでない点が多く残されている²⁷。

殺菌

外傷部分にプラズマジェットを照射することによって、細菌などの殺菌が可能であることが知られている^{28,29}。この殺菌機構に関しては未だに完全に明らかになってはいないものの、被照射部分のpHなどのパラメータを最適に調整すると、非常に高い殺菌効果が得られることがわかっている³⁰。

創傷治療

プラズマ医療応用の中でも、上記がん治療や殺菌はプラズマにより生体組織にダメージを与えるプロセスであるのに対し、プラズマを用いた怪我の治療も広く研究されている³¹⁻³³。図1.2はプラズマ創傷治療の一例であり、皮膚潰瘍へのプラズマ照射により、治癒を促進したり傷跡が小さくなるという結果が報告されている³⁴。これはReactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS)と呼ばれる、活性酸素・窒素種が細胞へ与えるストレスに起因するという原理はプラズマがん治療等と同じであるが、主要な役割を果たす活性種は異なると考えられている。アポトーシスに至ることなく細胞へのストレスを与え増殖を促すプロセスの制御が必要とされている。

止血

プラズマジェットの医療応用としてすでに実用されているのが止血プロセスである。プラズマを傷口に照射することで止血を促すことが出来るため、外科手術などでは重要な応用手法である。これまでのプラズマ止血プロセスの多くはArプラズマジェットを用いたものであり、熱的に患部

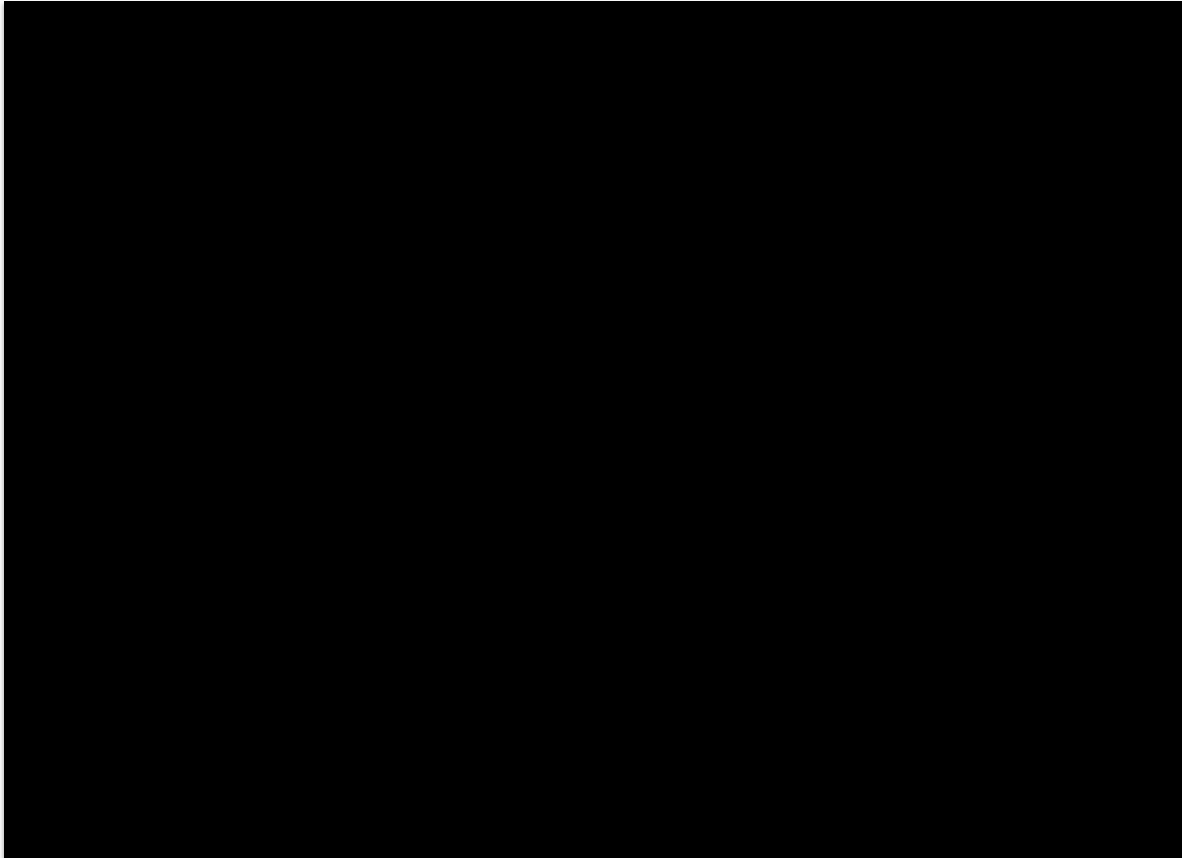


図 1.2 (左) プラズマによる皮膚潰瘍治療の報告例。プラズマ照射に伴い治癒が促進されている。(右) プラズマによる止血の例。外科手術などに応用される¹⁶。

を止血するものであった。しかし昨今のプラズマジェットによる止血プロセスはプラズマにより生成される活性種などの影響によるものであり、低温プラズマが既存のプラズマよりも低侵襲の医療プロセスを可能にすることを示唆している^{35,36}。

今までプラズマ応用に関する研究は数多く行われてきたが、それらが実用されているのは大気中の揮発性物質の処理、オゾン生成、電気集塵や空気清浄、または一部の家電製品などであった³⁷。プラズマは物理的にはユニークな研究対象であり、それに関わる基礎研究からさまざまな物理現象が明らかになってきたものの、「プラズマを用いるアドバンテージは？」という工学的な意味を議論されることもしばしばであった。というのもプラズマというのは今まで大型の装置を必要としたり、危険を伴う高電圧電源装置を用いるものだったからである。しかし上述のように、近年では新しいプラズマ源が開発・研究されている。生体のようなある程度湿った表面に対するプラズマプロセスは、既存の熱負荷の大きいプラズマでは出来なかったものである。これらのプラズマ応用が実現すれば、プラズマを用いることへの大きなアドバンテージを生み、プラズマの

新しい価値を創造しうるものであるとし、これらのプラズマに寄せられる注目は日に日に大きくなっていく。プラズマを用いた歯科治療により、ドリルを用いる必要がなくなり治療時の不快感が低減できる、プラズマがん治療により抗癌剤の副作用や手術のリスクを回避できる可能性がある、などといった可能性は「プラズマによる生活の質の向上」という新たな側面を生み出しうる³⁸⁻⁴⁰。

1.3 プラズマ医療応用の原理と背景

前述のとおりプラズマ医療応用の範囲は多岐に渡るが、本研究では特にプラズマによるがん治療応用に注目したい。

現状で、がんの治療法は主に次の3つである。

1. **外科治療:** 外科手術により主要部分を切除する治療法。転移を防ぐために主要部分だけでなく周辺部分も切除するため、手術自体のリスクも大きく術後の回復にも一般的に時間が掛かる。初期のがんに対しては有効な治療法であるが、がんが全身に転移してしまった場合には外科手術では対応しきれない事例が多い。
2. **化学療法:** 抗がん剤などの薬品を用いた治療法。転移してしまったがんや外科手術で対応できないがん(リンパや血液)に対して有効な治療法である。一方で抗がん剤の副作用が大きいことや、根治までの時間や費用が大きくなってしまいうというデメリットがある。
3. **放射線治療:** 重粒子線などを用いて、切開などを伴わず身体の内部を治療する手法である。重粒子線が運動エネルギーを失う直前に大きなエネルギーを発する原理を利用した治療法であり、今では初期の癌から中期～末期の癌まで広く用いられる治療法である。生殖器や脳などの部位のがんに対しては行えないことや、位置選択性の不十分さから被曝の可能性も0ではないことがデメリットとして挙げられる。

プラズマによるがん治療は、これらに次ぐ第4の治療法としても注目を集めている。また、プラズマによるがん治療は低侵襲性などの利点を持っているが、それに加えて治療法そのものが増えることもメリットである。がんは同種のがんでも抗癌剤や放射線治療が効果が薄いものがあったり、変異を起こしてこれまでの治療法の効果が薄れることがある。そのためプラズマ医療プロセスが確立されることによるメリットは、低侵襲な治療法が増え特定のがんへの効果的な治療法ができうることと、がん治療の選択肢が増えることのメリットがある。

上述のように大気圧低温プラズマは、物理的にユニークな特性を有するのみならず種々の応用に向け非常に注目される存在である。しかしながら、低温なプラズマが医療応用においてどのよ

うに生体反応を引き起こすのか、という基礎的な反応機構についてはあまり明らかになっていない。そのため、医療応用において必要不可欠である**安全性の検証・確立**や**反応の制御**が未だに困難であるという問題を有する。

プラズマ医療分野における先行研究から、RONSと呼ばれる活性種、特にその中でも高い活性力を持つ OH, O, N, NO, O₂(a), O₃, O₂⁻, HO₂, H₂O₂, 硝酸イオンなど多く活性種がプラズマ医療プロセスにおいて主要な役割を果たすと考えられている⁴¹⁻⁴⁴。しかしながら、多くの研究は定性的な結果に基づいており、反応の制御にはまだまだ活性種の密度など定量的な知見が不足しているのが現状である。

プラズマ医療分野では、これまでに活性種の計測例は少なく、“医療効果のある”と考えられている活性種が対象である生体などに“どのくらい”供給されているかは明らかになっていなかった。

上記問題点の解決には、次の2つの知見が必要である。

1. 主要な活性種の特定向けた各種活性種の医療効果検証
2. 医療における定量的な指標の基礎の確立

図 1.3 は、先行研究による報告で、正常細胞とがん細胞では、投入した ROS(活性酸素種)の量に関係し細胞死/ 増殖など細胞の挙動が異なることが分かっている⁴⁵。図 1.3 より、正常細胞お

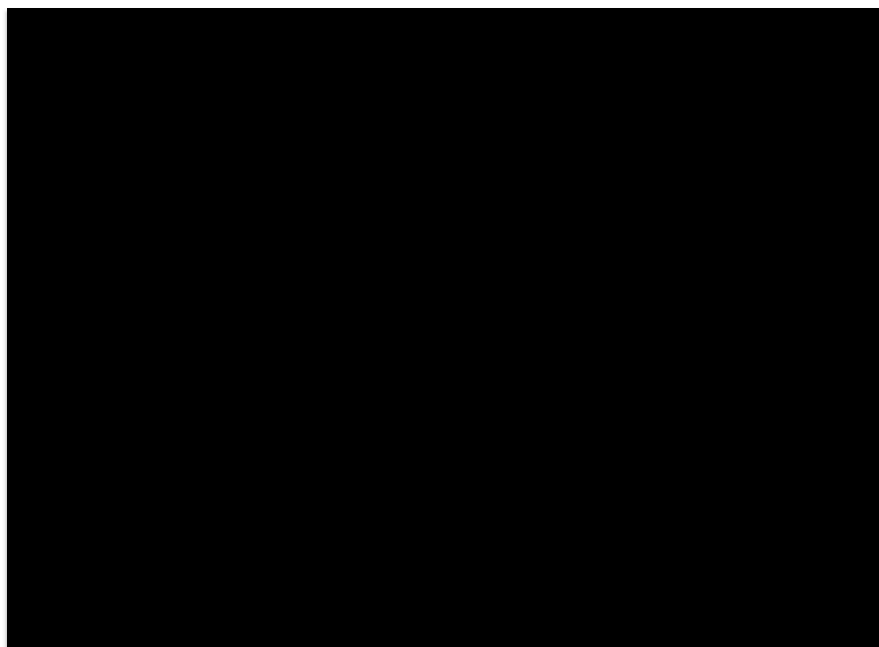


図 1.3 ROS dose 量と細胞死の関係⁴⁵。左は ROS の dose に対する正常細胞の応答、右は ROS の dose に対するがん細胞の応答。

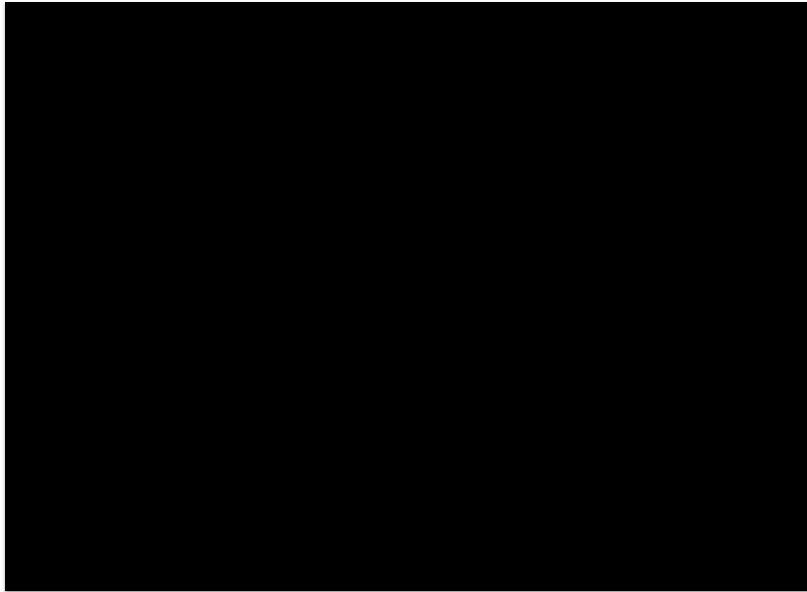


図 1.4 プラズマによる細胞のアポトーシス様⁴⁷。

よびがん細胞が細胞増殖/細胞死ということなる2つの挙動を示すには ROS の dose 量が関係しており、共に閾値を持つことが分かる。また、正常細胞とがん細胞では ROS に対する感度が異なっており、がん細胞のほうが ROS に対して敏感に応答すると考えられている。ROS の投入量 (dose 量) によって細胞へのストレスと考えられているが、これは以下のように、

- 酸化ストレスの小さい時 → 環境に負けないように細胞増殖を起こす
- 酸化ストレスが細胞の許容範囲を超えた時 → 細胞死を起こす

という細胞が環境に適応しようとする原理に基づくと推測される⁴⁶。

プラズマ医療における特徴の1つは、細胞のアポトーシスが ROS によって引き起こされることである。アポトーシスについての詳細は後述する。図 1.4 はプラズマ照射の後、アポトーシスを起こした細胞を染色した結果を示したものであるが、先行研究ではプラズマ照射により細胞のアポトーシスが誘発されることが実験的に確認されている⁴⁷。

それゆえ、プラズマによりがん細胞のアポトーシスを誘導するためには、有効な活性種を任意の量で供給できることが必要となる。

このような背景のもと、本研究では主に活性種の計測に基づく尺度: “活性種の総供給量” を計測することから医療効果の評価における知見の1つを提供することを目的とする。医療効果の定量的な比較には、動物実験を含め臨床的な検証が必要であるが、本研究ではその検証への第一歩として活性種の総投入量の定量とそれに基づく細胞応答を評価する。

細胞の死の種類を大きく二分すると、アポトーシスとネクローシスに分けられる。アポトーシ

スの場合には細胞が周囲からの刺激(酸化ストレス)などに伴い細胞内での信号が活性化されると、プログラムに基づき自死を起こす^{48,49}。DNAの二重螺旋切断やたんぱく質の活性などにより引き起こされる。この場合細胞は機能を失う過程で、徐々に小さくなり周囲へ影響をほとんど与えず最終的に自死する。

ネクローシスの場合には、細胞は物理的な刺激に伴いその構造を保てなくなり細胞死に至る。細胞膜が物理的に破壊された場合、中の組織液が流出し他の細胞を刺激する。この刺激は炎症などを引き起こすため、ネクローシスによる細胞死を引き起こさないことが、低侵襲な治療には必要である⁵⁰。

RONSの投入量があまりにも多すぎると、照射対象のpHが急激に変化する、表面が乾燥し細胞へのダメージが増えるなどの作用も増え、アポトーシスだけではなくネクローシスをも引き起こすことがある。そのため、プラズマ医療では有効な活性種を適切な量供給することが最も肝要である。

たとえば、大気圧プラズマの進展機構は広くストリーマ理論により説明されるが、大気圧中でのストリーマの進展機構は非常に複雑であり明らかでない部分も多く残されている。大気圧・大気中での放電ではプラズマが進展の過程で空気中の分子と化学反応をおこすことにより活性種を生成するが、その機構はプラズマと空気中の分子との反応や活性種同士の化学反応が影響するため非常に複雑となる。大気圧ヘリウムプラズマジェットも同様にプラズマが進展するにあたり生成された活性種がプラズマ医療プロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられているものの、その機構に関してはいまだにあまり明らかになっていない。

医療応用のみならず、大気圧ヘリウムプラズマジェットによるプラズマプロセスでは、プラズマで生成されるラジカルやイオンなどの活性種が重要な役割を果たす。大気圧ヘリウムプラズマジェットの活性種計測例はいくつかあり、例えばOH、O原子、準安定 $\text{He}(2^3\text{S}_1)$ 、 N_2^+ をレーザー誘起蛍光法(LIF)やレーザー吸収法で測定した例がある⁵¹⁻⁵⁵。また、Ar/He APPJで準安定 $\text{Ar}(1s_5)$ をレーザー計測した例や⁵⁶、発光種を発光分光法(OES)で測定した例⁵⁷⁻⁵⁹、一重項酸素をInGaAs検出器により計測した例もあり⁶⁰、大気圧ヘリウムプラズマジェットによる活性種生成は次第に明らかになりつつあるもののまだ十分ではない。

大気圧ヘリウムプラズマジェットの医療応用に際し最も障害となるのが、反応のメカニズムが現時点では明確でなく、プラズマプロセスの制御が十分に行われないうことである。プラズマが生体反応を引き起こすプロセスには、電子の供給による電気的な刺激と、活性種の化学的作用の2つが考えられている。そのうち、がん治療などのブレイクスルーとして期待される細胞のアポトーシスの誘発には、プラズマにより生成される活性種が重要な役割を果たすと考えられている。

大気圧ヘリウムプラズマジェットを照射すると、細胞内の特定のタンパク質やDNAが変質す

る。これは、活性種が直接反応する機構の他に、ある特定のタンパク質が活性種と選択的に反応し、その結果細胞に信号を送るといった細胞内での反応を間接的に誘発する機構によるものと考えられる¹⁶。細胞のアポトーシスはこのように、ミクロな細胞内部ないしはDNAレベルでの反応が関係している。しかしながらこのような反応は実のところどのような活性種に起因するものかは諸説あり、未だに明らかになっていない。反応の主役となる活性種の同定には、どうしても定量的な考察・議論が必要となってくる。そのため、さまざま条件で生成される活性種の絶対密度、およびその生成機構を明らかにすることで、プラズマプロセスの制御が可能となる。

以下、アポトーシスや活性種に関しての基本的な説明を示す。

アポトーシス

前述のように、プラズマがん治療の最大の特徴の1つは、プラズマ照射による細胞のアポトーシスの誘導である。これにより、低侵襲な治療が可能になるが、アポトーシスは細胞内での様々な経路により起こる。アポトーシスの機序は諸論ありここで全てを議論することは出来ないが、酸化ストレスによるアポトーシスのメカニズムを簡単に説明する。

アポトーシスの基本的な機序は、外部からの化学的・物理的刺激により細胞の構造が変化することに端を発する。DNAが二重螺旋構造を保てなくなり断片化(fragmentation)が起こることでアポトーシスへの細胞内シグナルが伝達される。

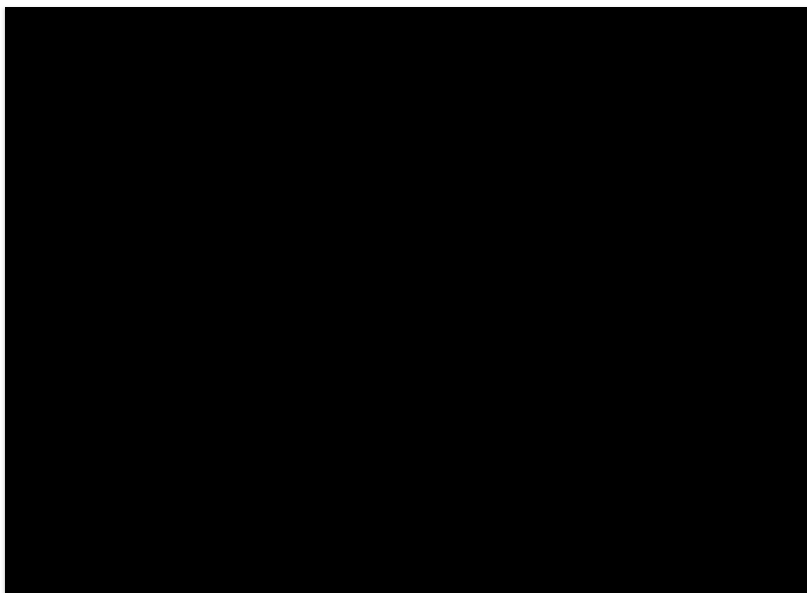


図 1.5 Maらによるアポトーシスの起こるメカニズムのモデル図⁶¹。

図 1.5 は Ma らによるアポトーシスのモデルの模式図である⁶¹。Ma らによれば、(a): ROS が細胞膜に到達したのち、(b): 細胞内に ROS が蓄積されることで、小胞体からの Ca^{2+} の放出が促される。(c): 放出された Ca^{2+} や ROS の影響により、ミトコンドリアから Cytochrom-c と呼ばれるヘムタンパクが放出される。核の内部で DNA の断片化が起こりアポトーシスが誘発される。

また、カスパーゼの活性もアポトーシスにおいては重要な機序である。i): 細胞への酸化ストレスによりミトコンドリアが Cytochrome-c を放出する、または ii): 小胞体へのストレスによりカスパーゼ-12 が活性化されると、カスパーゼ-9 が活性化されるこのように活性化されたカスパーゼは、カスパーゼ・カスケードと呼ばれる機構により、次々と複数のカスパーゼを活性化していく。カスパーゼ活性の経路は数多くあるが、最終的にカスパーゼ-3 → カスパーゼ-6 → カスパーゼ-7 の順に活性化されることでアポトーシスに至る⁵⁰。

アポトーシスの検出方法としては、細胞構造の変化により細胞内部にだけ存在する phosphatidylserine(PS) が Ca^{2+} の存在下で特異的に反応する Annexin V Assay やカスパーゼ活性を検出するなどの幾つかの手法が存在する。

Bystander 効果

プラズマによるアポトーシスの誘導では、ROS の影響を受けた細胞がアポトーシスを起こす基本的な機序に加え、アポトーシスを起こした細胞の隣の細胞がアポトーシスを起こして機能を失う “Bystander (傍観者)” 効果も重要であると考えられている。Bystander 効果は、アポトーシスを起こした隣の細胞の溶解の影響により DNA の断片化を起こしたことに起因すると考えられている⁶²。細胞の Bystander 効果には、Cytotoxic T cell (細胞傷害性 T 細胞) が重要な役割を果たすと考えられている^{63,64}。また、細胞死の Bystander 効果は ROS による酸化ストレス、中性粒子や α 粒子の照射によっても起こると考えられており、その伝播のシステムの解明に向けて研究が行われている^{65,66}。プラズマがん治療プロセスでは、生物の表皮にプラズマを照射したにも関わらず、内部のがん細胞が影響をうけるといった現象が観測されている。これは表皮からの刺激が内部に浸透する (影響が伝播していく) ことに合わせて、細胞の Bystander 効果も影響を与えていると考えられている。

RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species)

前述の通り、プラズマ医療応用ではプラズマにより生成される ROS: Reactive Oxygen Species, RNS: Reactive Nitrogen Species (以下総称では RONS と呼ぶ) と呼ばれる活性種が主要な役割を

表 1.1 OH ラジカルの主な生成・消滅反応^{86,87}

| 生成 | | 消滅 | |
|---|----|--|-----|
| $\text{H}_2\text{O} + \text{e}^- \rightarrow \text{H} + \text{OH} + \text{e}^-$ | R1 | $\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ | R7 |
| $\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH} + \text{OH}$ | R2 | $\text{OH} + \text{OH} + \text{M} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{M}$ | R8 |
| $\text{N} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH} + \text{NH}$ | R3 | $\text{OH} + \text{N} \rightarrow \text{NO} + \text{H}$ | R9 |
| $\text{H} + \text{HO}_2 \rightarrow 2\text{OH}$ | R4 | $\text{OH} + \text{O} \rightarrow \text{H} + \text{O}_2$ | R10 |
| $\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O} + \text{OH}$ | R5 | $\text{OH} + \text{H} \rightarrow \text{O} + \text{H}_2\text{O}$ | R11 |
| $\text{H} + \text{O} + \text{M} \rightarrow \text{OH} + \text{M}$ | R6 | $\text{OH} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ | R12 |
| | | $\text{OH} + \text{NO} + \text{M} \rightarrow \text{HONO} + \text{M}$ | R13 |

果たすと考えられている⁶⁷⁻⁷²。RONSは細胞内でも生成され、それらのRONSはDNAの損傷やアポトーシスの誘導等の作用を引き起こすと考えられている⁷³⁻⁷⁵。その一方で、プラズマ医療では適切な量のRONSを外部より供給することにより生物的な作用を引き起こすといういわば“諸刃の剣”であり安全性の検証はRONSの制御にかかっているととも考えられる⁷⁶⁻⁷⁸。プラズマにより生成される活性種の種類は数10以上であるが、その中でも主要な役割を果たすと考えられているものを以下に示す。

- OH ラジカル

本研究でも計測の対象であるOHラジカルは、体内でも発生し老化や細胞死などの多くのプロセスに関連する活性酸素種として知られている。OHは医療のみならずガス中の有害物質の処理や、水中の有機物分解、集塵などの工業分野での応用にも非常に重要な役割を果たす活性種の1つである⁷⁹。空気中での寿命は短く数 μs 程度であり、生体内ではたんぱく質の半径ほどの移動度しか持たない⁸⁰。しかしながら、YusupovらによればOHラジカルは水中では HO_2 、 H_2O_2 よりも大きな拡散係数を持つと考えられており、例えば臓器などへの照射に際し表面に存在する水膜程度は移動することも予想される⁸¹。

その高い反応性から液中でも様々な化学反応を起こし2次的な活性種の生成に大きく寄与する。医療でも細胞死に大きく影響すると言われる H_2O_2 はOHラジカルの最終生成物であり、高い活性力を持つOHは医療にも効果的であると考えられる。これまでもいくつかの先行研究で、OHの引き起こすアミノ酸からのH原子の引き抜きなども細胞への影響があると考えられており、OHラジカルが細胞死の誘発に効果的であるとの報告もなされている⁸²⁻⁸⁵。表1.1は、OHラジカルの主な生成・消滅反応である。表からも分かるように、



図 1.6 Frein らによる NO と O_2^- のバランスとそれに基づくフェントン反応のモデル⁸⁹。

OH ラジカルの生成には H_2O が大きく影響する。本研究でも OH ラジカルの生成機構を評価する際に、 H_2O の影響を考慮しその考察を行った。

- O 原子

O 原子はプラズマ中では主に O_2 の解離により生成される。不対電子を有するフリーラジカルの一種で、ROS の中でも OH に次ぐ酸化力を持ち、OH と同じく医療以外のプラズマプロセスにも重要な役割を果たす⁷²。これまでも放電ガスに酸素を混入したプラズマによる医療効果の評価などから、細胞のアポトーシス誘導に O 原子が重要な役割を果たすと考えられている^{47,73}。本研究でも O 原子の計測を行っているが、プラズマ医療での重要な活性種として、2 光子吸収レーザー誘起蛍光法 (TALIF 法) を始めとして多くの計測実験が行われている⁸⁸。

- NO

NO は代表的な RNS の 1 つであり、生体内・細胞内で信号発生プロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられている。特に細胞内では、 O_2^- と NO とのバランスによってシグナルの発生が起これると考えられている。図 1.6 は、Frein らによる NO と O_2^- のバランスに基づく反応経路の模式図である⁸⁹。NO と O_2^- の反応による主な生成物は $ONOO^-$ であるが、

ONOO⁻も医療プロセスにおいて重要な役割を果たす。NOの密度が大きい場合には、N₂O₃が最終生成物となり、NOとO₂⁻の密度がどちらも大きい場合には、NO₂が最終生成物となる。一方で、NOの密度に比べてO₂⁻が大きい場合、O₂NOO⁻やNO₂⁻が最終生成物となり、フェントン反応の要因となる。Haber-Weiss反応によりFe(III)→Fe(II)の還元反応が起こる過程で、OHラジカルが生成される。前述のようにOHラジカルは数μs、たんぱく質の半径ほどの移動度しか持たないが、NOとの反応により生成されるONOO⁻はOHの10⁴程度大きい移動度を持つ^{89,90}。NOは創傷治療において中心的な役割を果たす活性種の1つであり、プラズマ照射によるGrowth Factorの生成に影響すると考えられている⁹¹。

● H₂O₂

H₂O₂は液中で安定に存在し、OHの結合反応及びRONSの液中の反応に伴い生成される。液中で安定なため、RONSの液中での最終生成物となることが多く、医療応用のように湿った表面に対するプラズマの照射では微量であれ液中で確実に生成されるRONSの1つである。また、Superoxide dismutaseとの反応により細胞内でも生成され、正常細胞及びがん細胞内でのシグナル生成・伝達に大きく関わっていると考えられている^{92,93}。液中で生成されたH₂O₂は電氣的に中性であり、細胞膜を通過できることから細胞内におけるシグナルの発生において最も重要な活性種の1つであると考えられており、大気圧プラズマジェットを対象とした計測研究なども行われている⁹⁴⁻⁹⁶。図1.7は、Rheeら⁹⁷によるH₂O₂によるシグナル発生のメカニズムの模式図である。このモデルによれば、細胞膜のレセプターがリガンド結合を起こした際にO₂⁻生成酵素'Nox'が活性化される。活性化された'Nox'は主にSuperoxide Dismutase (SOD)とO₂⁻の反応に伴いH₂O₂を生成する。細胞質基質(cytosol)の中に入ったH₂O₂は2つの酵素(protein tyrosine kinase, protein tyrosine phosphatase)と反応し酵素を酸化状態にする。結果的にH₂O₂はたんぱく質の窒化を促す上に、細胞内の酵素との反応に伴いH₂O₂酵素分子自体の減少を引き起こす。これまでもH₂O₂による細胞死の誘発は確認されているものの、プラズマによる医療効果はH₂O₂だけでは説明がつかないものも多く、他の活性種との複合的な効果が予想される⁹⁸。

● ラジカルスカベンジャー

ラジカルスカベンジャーは酵素の一種であり、人間の体内にも多く存在する。例えばMn(II)のようにO₂⁻と選択的に反応するSOD(スーパーオキシドジスムターゼ)などがあり、体内で発生した活性酸素種などが細胞に影響を及ぼさないよう、選択的に消費される⁹⁹。図1.7に示されるように、細胞内にも存在するラジカルスカベンジャーは、細胞内でのシグナル生成にも大きく影響する。

実験上でも、ラジカルスカベンジャーの影響を考察することは重要である。例えば、*in vitro* 実験においても培地に含まれる多くのスカベンジャーが実験結果に大きく影響する。本研究ではプラズマの照射による細胞死の影響を評価するために、照射時の培地の影響を評価したが、培地の種類によって細胞死の様子は大きく異なる。また、生体内は抗体としてのラジカルスカベンジャーが多量に存在しているため、生体内での反応にはラジカルスカベンジャーと RONS の反応生成物も影響することが考えられる。そのため、プラズマによる活性種 (RONS) の生成～細胞死を評価するためには、出来る限りラジカルスカベンジャーの影響を排除する、または正しくコントロールすることが必要である。

本研究ではプラズマ医療における問題点を踏まえ、活性種の供給量と細胞応答の関係を明らかにすることを目的としたものである。当研究室の有する高い計測技術を用い、各種活性種の供給量を定量した。また、医療効果の評価への導入としてがん細胞を用いた *in vitro* 実験を行うことで、活性種の供給量と生体の反応を評価した。

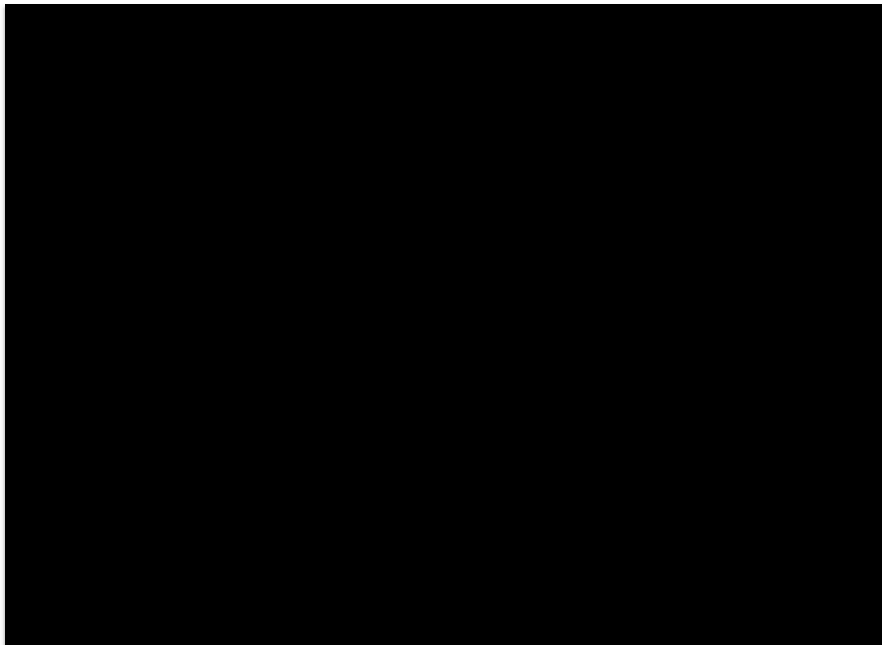


図 1.7 Rhee らによる H_2O_2 の細胞シグナル誘起のモデル図⁹⁷。

第2章 実験原理及び実験装置

2.1 プラズマ診断・活性種計測の手法とその特徴

プラズマにより生成された活性種を計測する手法は、プラズマ中における計測、生成された活性種の液中での計測や気中での計測など多岐に渡る。本研究では、主にレーザー計測法を用いて活性種の計測を行った。本章では、本研究で用いた計測手法の詳細のほか、先行研究などで活性種の計測に用いられている手法を説明する。

- **発光分光法**

発光分光 (OES: Optical Emission Spectroscopy) 法と呼ばれるこの手法は、プラズマの発光を分光器などを用いて計測する手法である。プラズマ中の活性種の中でも、励起種が脱励起する際の蛍光を観測する受動的な計測法であり、時間的な挙動や絶対密度の算出は一般的には難しい。また、基底準位の活性種を計測することは原理的には不可能である。しかしながら OES は実験がレーザー計測等に比べ容易であり、一般的な分光装置で計測を行えることから、プラズマ中の状態や活性種の種類などの計測には広く用いられる手法である。この手法の応用例として、準安定準位の $O_2(a)$ の計測や $NO-\gamma$ バンドの計測から温度を見積もる手法窒素分子の First Negative System (FNS) と Second Positive System (SPS) の発光強度比から電界を見積もる計測手法などがあり、応用の幅は多岐に渡る^{100,101}。

- **レーザー誘起蛍光法**

レーザー誘起蛍光 (LIF: Laser-Induced Fluorescence) 法と呼ばれるこの手法は、レーザーで励起された活性種が脱励起する際の蛍光を観測することで活性種の密度や温度を計測する手法である。活性種の準位間のエネルギーに相当する励起/ 蛍光波長 (エネルギー) を選択することによりポテンシャルの明らかな任意の活性種の計測が可能となる。一般的にプラズマ中での活性種の寿命は $1 \sim 100 \mu s$ 程度と非常に短いですが、数 10 ns のパルスレーザーを用いることで短寿命な活性種の計測が可能である。LIF 法は空間的・時間的に高い分解能を持ち、化学反応において重要な基底準位の活性種を感度良く計測できるという利点がある。高価なレーザー装置を必要とし、計測・絶対密度校正には技術やノウハウを必要とするもの

の、プラズマ診断を始め活性種の計測に広く用いられる手法である。測定原理や計算法などの詳細は次節で述べる。

● レーザー吸収法

レーザー吸収 (LAS) 法と呼ばれるこの手法は、任意の活性種がレーザー波長と同じ波長域に吸収波長を有することを利用し、入射レーザー光強度の変化から活性種の密度や計測する手法である。大気圧プラズマでは、オゾンが紫外線を吸収することを利用し、エキシマレーザーを用いたオゾン計測や、Ar レーザーを用いた SiH₂ などの計測例がある。ヘリウムやアルゴンを用いたプラズマジェット計測でも、クエンチングの影響を補正する必要がなく、広く用いられる計測法の1つである。

● キャビティリングダウン法

キャビティリングダウン (CRDS: Cavity Ring Down Spectroscopy) 法は吸収法の一つである。これは高反射ミラーを用いたキャビティ内でレーザーを複数回反射させ、実効光路長を大きくすることによって LAS で問題となった計測感度の低さを補うものである。キャビティ内の活性種がミラー間を往復するレーザー光を吸収する現象を利用し、レーザー強度の減衰の減衰からその密度を求める手法である。この手法は、LIF 法で問題となるクエンチングなどの影響を考慮しなくてもよいという利点をもつが、往復するレーザー光が同一地点を通るような微細なアラインメントの必要があり、LIF 法と比較して空間分解能は低くなる。また、レーザー光強度の時間変化を計測する必要があり、パルスレーザーを用いた LIF 法と比べて時間分解能も低くなる。

● ラマン散乱分光法

ラマン散乱分光法と呼ばれるこの手法は、入射光のエネルギーが分子の回転や振動によって変化し、入射光とは異なる波長の散乱光となって計測される事を利用した分光法である。入射光は分子の固有遷移に共鳴している必要がないため、任意の光源を用いて計測が行える。しかし自然放出ラマン散乱光の強度は非常に弱く、入射光と波長が同じであるレイリー散乱光に比べ 3, 4 桁小さくなる。そのため大気圧放電における N₂, O₂ など主要分子の計測などでは有力だが、微量の分子を計測する際には計測感度が問題となる。これに反して、2つの励起光源を用いるコヒーレント反ストークスラマン分光法 (CARS: Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy) は、強い背景光が存在する領域でも適用できる¹⁰²。励起光 (ω_1) 及び誘導光としての Stokes 光 (ω_2) を入射した際に、 $\omega_1 - \omega_2$ の分極率のゆらぎが生じる。これはさらに ω_1 の光を吸収し、結局 $\omega_4 = 2\omega_1 - \omega_2$ の光を放出する。 ω_4 は誘導放出で3つの入射光のそれぞれの波数ベクトル k_1, k_2, k_3 に関して $\Delta k = 2k_1 - k_2 - k_3 = 0$ を満たし、反ス

トックス光と同じ波長のコヒーレントな信号光である¹⁰³。CARS法は通常のラマン散乱分光法に比べて数桁以上大きい信号光を発生するため、高感度の計測が可能であるが、装置が高価であり、計測が非常に難しいなどの特徴がある。

● 電子スピン共鳴法

液中の活性種の計測には、電子スピン共鳴法が広く用いられる。ESR(Electron Spin Resonance) または EPR(Electron Paramagnetic Resonance) 装置を用い計測する。液中の活性種に強磁場をかけると、ラジカル中の不対電子がゼーマン分裂を起こし、2つのエネルギー準位に分離する。その準位間のエネルギー差に相当するマイクロ波を照射しマイクロ波のエネルギー吸収を計測する。スピントラップ剤を用いて OH ラジカルや O₂ など不対電子を持つラジカルを液中で計測した例があり、液中での活性種計測も現在では盛んに行われている¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。固体中での計測も可能であり、固体物理の分野でも広く用いられる計測法である。

● 質量分析法 (Mass Spectroscopy)

質量分析法は気中の活性種の計測に広く用いられる。質量の違いによる、電界中における移動度の違いから活性種を分析する手法であり、レーザーでは計測の難しいイオンなどの荷電粒子の計測が可能である。プラズマジェット計測ではオリフィスにジェットが進展するため、プラズマ中での活性種の位置的な分解能は無いが、数 ppb~ppm 程度の高い感度を持つ計測法である。これまでも荷電粒子を含む様々な活性種の計測が行われており、活性種の密度や生成機構の解明が行われている¹⁰⁸⁻¹¹¹。

レーザー誘起蛍光法は、プラズマ診断に広く用いられる計測法であり、プラズマプロセスにおいて重要な役割を果たす基底状態の活性種の密度や温度などの分布を計測することができ、空間的・時間的に高分解能を有する。当研究室ではストリーマ放電により生成される活性種の計測を多く行っており、高いレーザー計測技術・ノウハウを有する¹¹²⁻¹¹⁶。本研究では、大気圧ヘリウムプラズマジェットにより生成される活性種の中でも、医療プロセスにおいて特に重要だと考えられる活性種の OH ラジカル, NO, O 原子に対して LIF 計測を行い、その絶対密度とプラズマ中における分布、密度の時間変化を求めた。またそれらの結果から、各活性種の生成機構と表面への供給フラックス (及び供給 dose 量) を考察した。

これまでのプラズマ計測は、実際の医療応用を模擬した条件下での実験はそれほど多くなく計測実験の結果と生物実験の結果が実際に結びついていないことも多かった。プラズマ医療の実現に関しては、様々な研究分野の研究が行われている。プラズマの照射から細胞死が起こり医療効果が得られるまでのプロセスを図 2.1 に示す。高密度プラズマを生成できたり、熱的なダメージ

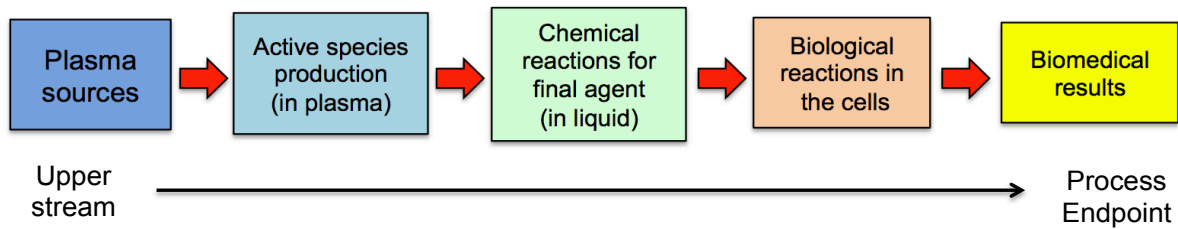


図 2.1 プラズマ医療における研究の細分分野の概略図。

が小さいなどの新しいプラズマ源の開発を上流とし、気中での活性種の計測、気中から供給された活性種の水中での化学反応とそれに伴う活性種の生成、細胞内でのシグナル発生、そして下流の医療効果に至る。本研究では、実際に医療プロセスにおいて重要な活性種を気中で計測したものであり、医療プロセスにおける上流部分、反応のトリガーとなる部分に着目したものである。

2.2 大気圧ヘリウムプラズマジェット

図 2.2 は本研究で用いた大気圧ヘリウムプラズマジェットの模式図である。この先細り状のプラズマジェットは、ヘリウムの流れる石英管の表面から高電圧を印加することによって生成される。ヘリウムプラズマジェットの生成に関して印加される電圧は、通常 5 ~ 10 kV, 5 ~ 15 kHz 程度である。希ガスを用いたプラズマジェットとして他にアルゴンを用いた RF(Radio Frequency) 放電により生成されるアルゴンプラズマジェットや^{117,118}、空気を吹き出し放電するアークプラズマジェットなどがある¹¹⁹。

このプラズマジェットは高電圧電極のみでも生成可能であるが、一般的にはガス流の上流または下流側に、放電を安定させるための接地電極を設ける¹²⁰。このとき、各電極の幅、材質、ノズル先端からの距離、また 2 電極間の間隔に伴い放電が変化することが明らかになっている¹²¹⁻¹²³。本研究では先行研究をもとにして、各実験においてプラズマジェットが安定するような条件で電極を設けた。

さらに大気圧ヘリウムプラズマジェットの生成において最も特筆すべき点は、このプラズマジェットが微視的には“Plasma bullet”と呼ばれる電離フロントの進展により形成される間欠的な放電機構を持つということである。プラズマジェットの研究では、plasma bullet の進展に注目したものも多い¹²⁴。図 2.3 に plasma bullet の進展のイメージ図を示す。図 2.3 に見られるように、plasma bullet はリング上または球状であるが、大気圧ヘリウムプラズマジェットは希ガスであるヘリウムを用いた放電であることから、周囲の空気とプラズマの相互反応が電離フロントがこのような形状で進展する要因であると考えられている^{73,125-129}。

図 2.4 に、大気圧ヘリウムプラズマジェットによる発光の分光計測結果を示す。OH などの活性種が生成されていることや、 N_2 , O_2 などに由来する活性種の発光が計測されており、分子や原子との反応で活性種を生成していると考えられる。

通常、大気圧ヘリウムプラズマジェットにおいてはガス流速は数 m/s であるのに対し、plasma bullet の進展速度は $10^4 \sim 10^5$ m/s 程度である。また、plasma bullet の進展速度は進展に伴い加速・減速し、その進展速度は印加電圧の大きさ、パルス幅、交流-パルス波形、などの種々のパ

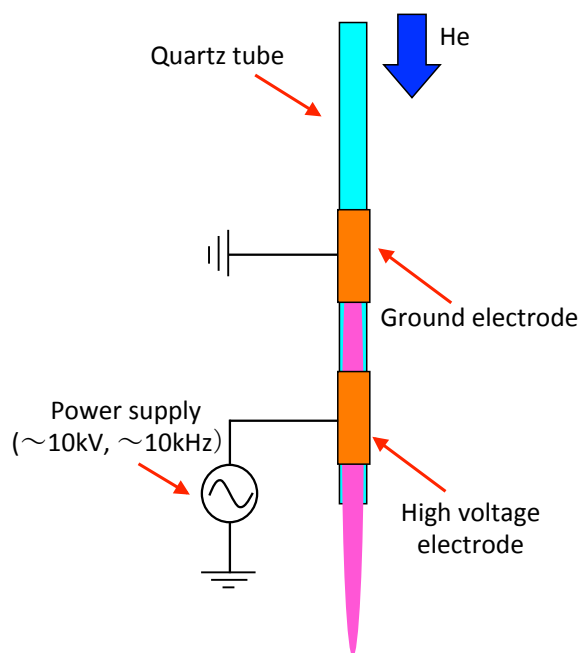


図 2.2 大気圧ヘリウムプラズマジェットの装置模式図。

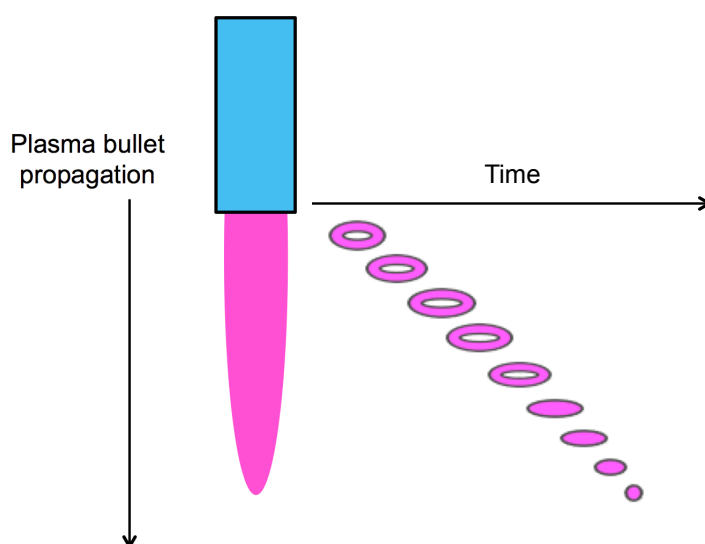


図 2.3 Plasma bullet の進展のイメージ図。

ラメータにより変化することが明らかになっている¹³⁰。例えば、正弦波交流・正極性パルスを用いた放電では plasma bullet が発生し、パルスの立ち上がり幅などに比例して進展速度は大きくなる。先行研究によれば、このプラズマジェットとガス流を直交させた時、ヘリウムの流れに沿って放電が進展することが明らかになっている^{131,132}。更にこのプラズマジェットは、図 2.2 に表されるようにガス流上流側にも進展する。Ar/He(5%) プラズマジェットを用いた先行研究では、plasma bullet の発生は、誘電体 (石英管) 内部の DBD 放電からは独立した現象であるとの報告もある¹³³。Plasma bullet は DBD 生成の約 10 ns ほど前に発生しており、これは接地電極を外した場合 50 ns ほど前に発生するというユニークな振る舞いを見せる。このような進展をする要因はまだあまり明らかになっていない。これらの知見より、plasma bullet の進展はガスを媒介としたストリーマ様電離フロントの進展であり、生成された活性種や電離フロントがガス流によって移動するアフターグロー式の放電とは異なる放電形態であることが分かる^{123,128,133,134}。

表 2.1 に各原子・分子の準安定準位のポテンシャルエネルギー及び寿命を示す。ヘリウムの準安定準位はポテンシャルエネルギーが他の準安定準位原子・分子に比べて非常に大きく、回転や振動といったエネルギーを有しないため、 10^5 s 程度の非常に長い寿命を持つ。これから、ヘリウムを用いた放電では他の分子や原子がヘリウムとの衝突によってエネルギーを獲得しづらく、ガス温度の上昇が起こりにくくなり、プラズマのガス温度は低温となる¹³⁵。また、放電開始電圧の低いヘリウムを用いることで、大気圧下でも容易にプラズマの形成が可能である。

このプラズマジェットは高電圧電極からガス流上流・下流ともに進展する。V-I 波形から求められる放電電力のうち、一部が上流側、残りが下流側の放電に費やされると考えられる。

表 2.2 に表されるように、大気圧プラズマジェットには RF 放電を用いたアルゴンプラズマジェッ

表 2.1 各分子・原子の準安定準位のポテンシャルエネルギーと自然放出寿命¹³⁶

(分子は様々な準安定準位が存在するが、主要なもののみ記してある)

| 原子・分子 | 基底項 | 準安定準位 | ポテンシャルエネルギー | 寿命 τ [s] |
|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| | X | M | ($v = 0$) [eV] | |
| He | 1^1S_0 | 2^3S_1 | 19.82 | 6×10^5 |
| Ar | 3^1S_0 | 4^3P_2 | 11.55 | > 1.3 |
| H ₂ | $1^1\Sigma_g^-$ | $c^3\Pi_u$ | 11.75 | $0 \sim 10^{-3}$ |
| N ₂ | $1^1\Sigma_g^+$ | $A^3\Sigma_u^-$ | 6.17 | $1.3 \sim 2.6$ |
| O ₂ | $3^3\Sigma_g^-$ | $a^1\Delta_g$ | 0.98 | 2.7×10^3 |

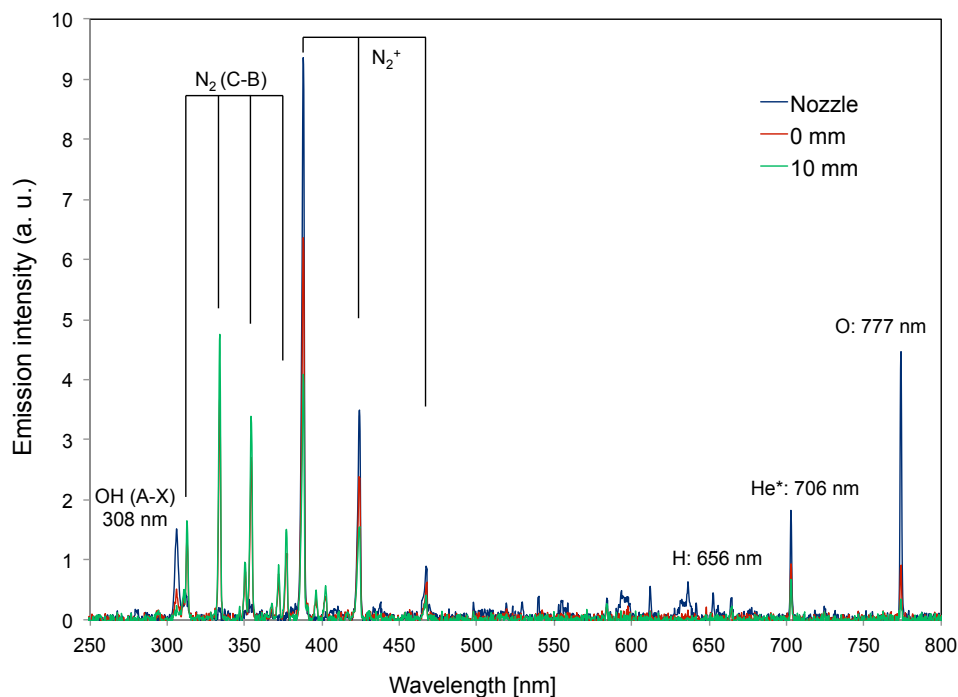


図 2.4 大気圧プラズマジェット中の活性種の発光。

表 2.2 大気圧プラズマジェットの種類とその特徴。

| | ガス温度 T_g [K] | 電子温度 T_e [eV] | 主な応用分野 |
|-----------------|----------------|-----------------|---------|
| アークプラズマジェット | ≥ 2000 | ≤ 1 | 成膜、ガス処理 |
| RF アルゴンプラズマジェット | 500 ~ 750 | ≤ 1 | 表面処理、生体 |
| ヘリウムプラズマジェット | 約 300 | ≤ 1 | バイオ・医療 |

トや、空気を用いたアークプラズマジェットなどがある。特にアルゴンプラズマジェットに関しては、しばし低温プラズマジェット (low-temperature plasma jet) としてヘリウムプラズマジェットと混同されるが、これには注意が必要である。ヘリウムプラズマジェットにおいて特徴的な進展機構である plasma bullet は RF アルゴンプラズマジェットでも同様に起こる現象である¹³⁷。しかしそのプラズマ中におけるガス温度は一般に 500 ~ 700 K 程度であり、既存のアークプラズマジェットなどに比べて低温ではあるものの、人体に直接照射するのではなく、アフタグロウの領域 (plasma effluent) に含まれる活性種によるプラズマプロセスが中心である¹³⁸。

アルゴンプラズマジェットにより生成される準安定準位 Ar, OH, NO などの活性種は、ヘリウムプラズマジェットにより生成されるそれらの活性種に比べて $10 \sim 10^3$ 倍程度高密度であることが明らかになっている^{56,86,139-141}。しかし、アルゴンプラズマジェットおよびヘリウムプラズマ

ジェット中の電子密度、電子温度に関してはどちらもそれぞれ $10^{19} \sim 10^{20} \text{ m}^{-3}$ 、1 eV 程度であるため¹⁴⁴、先行研究では、両プラズマ中においては電子衝突やヘリウムやアルゴンの準安定準位活性種により、ラジカルやイオンが生成されると考えられている^{142,143}。

希ガスのように不活性なガス中では、ラジカルなどの活性種の寿命は増長される。そのため主にプラズマ発光領域において生成された活性種は、生成領域から離れた場所でも反応を起こすことができる。アルゴンプラズマジェットはガス温度が高く、生体応用にはプラズマジェットから照射対象を離して使用する必要があるが、一般的にそのギャップ長 (石英管などキャピラリーの径) は小さく、アルゴンガスが高濃度である領域はヘリウムプラズマジェットに比べて小さくなる。そのため希ガスによる活性種の輸送機構はそれほど寄与できず、結果反応場は狭い領域に限定されてしまう。RF アルゴンプラズマジェットはしばしマイクロプラズマジェット (microplasma jet) などとも称され、径方向の広がり は 1 mm 以下であるものが多い。

バイオ・生体応用には大気圧ヘリウムプラズマジェットが広く用いられるプラズマ源であるが、プラズマ源の開発や、統一されたデバイス (kINPen Med など) が普及するなどヘリウムプラズマジェットと同様にアルゴンプラズマジェットも広く研究されるようになってきている¹⁴⁵。

2.3 色素レーザー

色素レーザーは蛍光性の有機分子を液体溶媒に溶かす液体レーザーであり、波長可変レーザーとして広く用いられるレーザーである。本研究では Lamda Physik 社製の SCANmate を用いた。その装置模式図を図 2.5 に示す。

励起光源には Nd:YAG レーザーの 3 倍波 (355 nm) を用いる。色素溶液の入ったキャビティに励起光が入射すると、色素に特有の波長の蛍光が得られる。これをグレーティングを用いて任意の波長を取り出し同様に色素溶液を励起したキャビティに入射させることでレーザーの増幅を行う。Pre-/Main Amp を通過したレーザー光は、非線形光学結晶である BBO 結晶を通過することで一部が倍波となる。その後屈折率の違いを利用しプリズムで倍波のみを取り出す。BBO: β -BaB₂O₄ は広い波長域における位相整合角と透過性を有する負の一軸性結晶で、高調波発生やパラメトリック発振に頻繁に利用される。BBO は出力を最大とするため位相整合を取る必要があるが、変換効率は紫外領域では一般的に 20% 以下である。本研究で OH, NO, O, Xe の計測において用いた色素とその条件を簡単に表 2.3 示す。

色素レーザーの応用の幅は広く、エキシマ励起の色素レーザーのようなものから、色素をスイッチングに用い極短パルスを生成するピコ秒レーザーまで多岐に渡る。

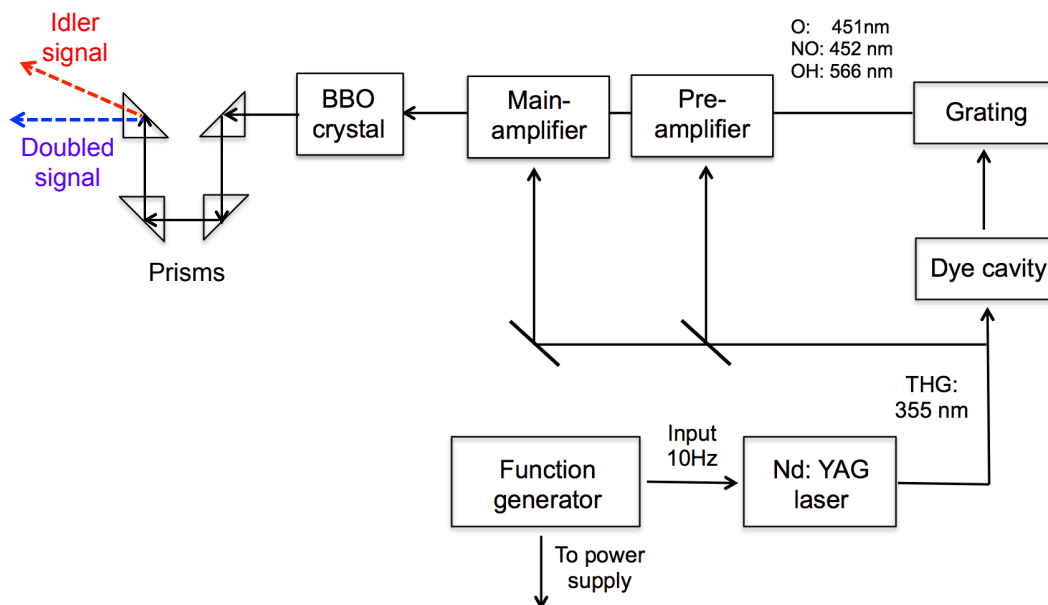


図 2.5 色素レーザーの装置模式図。

表 2.3 本研究で用いた色素レーザーの波長とそれに対応する溶媒、濃度など。

| 測定対象, 波長 | 色素名, 溶媒 | 濃度 |
|----------------|------------------------|--------------------|
| OH, 283.009 nm | Rhodamine 575, Ethanol | 4×10^{-4} |
| NO, 226.180 nm | Coumarin 450, Methanol | 3×10^{-4} |
| O, 225.750 nm | Coumarin 450, Methanol | 3×10^{-4} |
| Xe, 225.44 nm | Coumarin 450, Methanol | 3×10^{-4} |

2.4 OPO レーザー

OH ラジカルの LIF 計測には、KrF エキシマレーザーによる $P_1(8)$ 枝の 248.161 nm 励起を用いた LIPF (Laser induced predissociative fluorescence) 法などによっても計測されるが、強い迷光を伴い S/N 比が低下する上、励起効率もそれほど高くないため、10 ppm 程度の OH ラジカル密度が必要である。実際に大気圧ヘリウムプラズマジェットの KrF エキシマレーザーを用いた LIPF 計測を行ってみたが、OH ラジカルの蛍光は観測されなかった。他の励起波長としては OH の $A^2\Sigma(v=1)-X^2\Pi(v=0) P_1(3)$ の 283 nm 励起などは高精度で OH-LIF 計測を行うことが出来るためよく用いられる。

本実験においても、283 nm のレーザー光を用いた $A^2\Sigma(v=1)-X^2\Pi(v=0) P_1(3)$ 遷移を用い

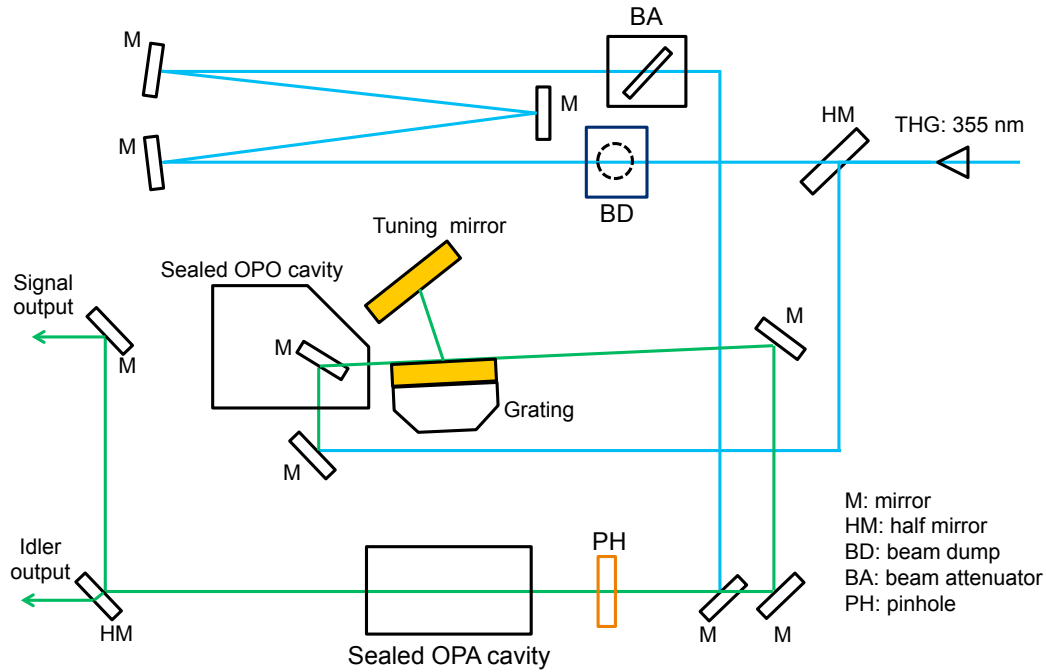


図 2.6 OPO レーザーの装置光学系。

た。光源には OPO(Optical Parametric Oscillation) レーザーを用いた。図 2.6 に OPO レーザー (Continuum Powerlite, Sunlite EX OPO) の光学系を示す。

OPO レーザーは YAG レーザーの 2 倍波または 3 倍波を基本とし、非線形光学結晶の組み合わせにより任意の波長を出力することが可能となる波長可変レーザーであり、色素レーザーなどと並び汎用性の高いレーザーである。非線形光学結晶の進歩により、今では紫外～遠赤外までさまざまな波長のレーザー光をつくることのできる^{146,147}。Powerlite のユニットで生成された YAG の 3 倍波 (THG: 355 nm) は、ハーフミラーに入射した後 2 光路に分かれる。そのうち 1 つのレーザー光は OPO ユニット及びグレーティングを経て、ソフトウェアを用いて設定した波長において発振される。もう 1 つのレーザー光は OPA(Optical Parametric Amplifier) ユニットにおいてシグナル光をパラメトリック増幅するために使われる。パラメトリック発振は周波数下方変換器であるから、ポンプ光 355 nm よりも短い波長の光は原理的に生成できない。本実験で用いた OPO は 450 nm ～ 1.8 μm の発振が確保され、225 nm ～ 450 nm のレーザー光は OPO によるシグナル光に SHG をかけて生成している。しかし SHG の変換効率は 10 ～ 20% 程度であるから、パラメトリック発振器のみでは短波長域において十分な出力を得ることができない。そこで Sunlite EX では OPO の後段にパラメトリック増幅器 (OPA) を配置し、シグナル光を増幅することで SHG 後でも十分な光強度が得られるようにしている。そうして得られたシグナル光とアイドラー光はそれぞれ射出口へと向かい、シグナル光のみ非線形光学結晶にて 2 倍波へと変換される。(最後の

非線形結晶は選択した波長によっては使われないこともある。) 発振器の部分では、ポンプ光はインプットカップラ (レンズ) で集光され非線形結晶 (BBO) に入射する。OPO 発振器部分では BBO の位相整合角はステッピングモーターにより制御され発振波長に対して最大の変換効率が得られるようになっている。結晶を透過したポンプ光はバックミラーで反射され、回折格子とチューニングミラーによる外部共振器を経て共鳴波長で発振する。発振波長の制御はチューニングミラーの位置・角度をステッピングモータで変化させて行う。

2.5 LIF 法

LIF(Laser-Induced Fluorescence) 法は前述のように、プラズマプロセスにおいて重要な役割を果たす基底準位の活性種を高感度で計測可能な手法である。図 2.7 に、LIF 法における準位と遷移の過程の模式図を示す。原子や分子をレーザーで励起すると、幾つかの経路により脱励起する。

- **自然放出 (Spontaneous Emission)**

外部からのエネルギーに関係なく、準位間のエネルギー差に相当する蛍光を発生し脱励起する現象を自然放出という。自然放出の確率はアインシュタインの A 係数で与えられ、各励起準位における原子や分子の種類に固有の値である。後に述べる誘導放出やクエンチングの影響が無視出来る状況下でも、励起種は自然放出係数で定まる値より長く存在することはできない。自然放出による蛍光は全方向に一様に放射される。LIF 法ではこの自然放出による蛍光を観測する。

- **誘導放出 (Stimulated Emission)**

レーザー光により基底準位 X から励起準位 A に励起された活性種は、レーザーパルス幅の間、レーザーのエネルギーに誘起され遷移準位間のエネルギー差に相当する蛍光を放出して脱励起する。このように励起状態にある原子や分子が外部からのエネルギーに関して脱励起する現象を誘導放出という。これは励起光が強い場合ほど起こりやすく、放出される光は入射光とコヒーレントな光となる。誘導放出される光子が入射光と同じエネルギー、位相、方向を持つことから、誘導放出はレーザーの発振原理ともなっている。レーザー強度を I としたとき、遷移確率は BI で表される。このとき、 B はアインシュタインの B 係数である。

- **クエンチング**

放電により生成された活性種は自然放出や誘導放出の他にも、他の分子や原子と衝突することによりそのエネルギーを失う。これは蛍光を伴わない脱励起過程であり、クエンチング(消光)と呼ばれる。クエンチングは真空ないしは低圧プラズマではそれほど問題にはならないが、分子や原子が高密度で存在する大気圧下では、活性種の脱励起過程に非常に大きく影響する。すなわち大気圧下の LIF 計測では、計測される活性種の蛍光はクエンチングにより実際よりも小さくなる。大気中での放電や、空気を放電ガスに用いるアークプラズマジェットでは、各分子や原子に固有のクエンチング係数と分子や原子の密度をかけることでこの影響を補正できる。

しかし、クエンチングの影響がほとんど無視出来るヘリウムを用いたプラズマジェットでは、プラズマ中の各位置における空気混合比が異なることに起因し、クエンチング補正が非

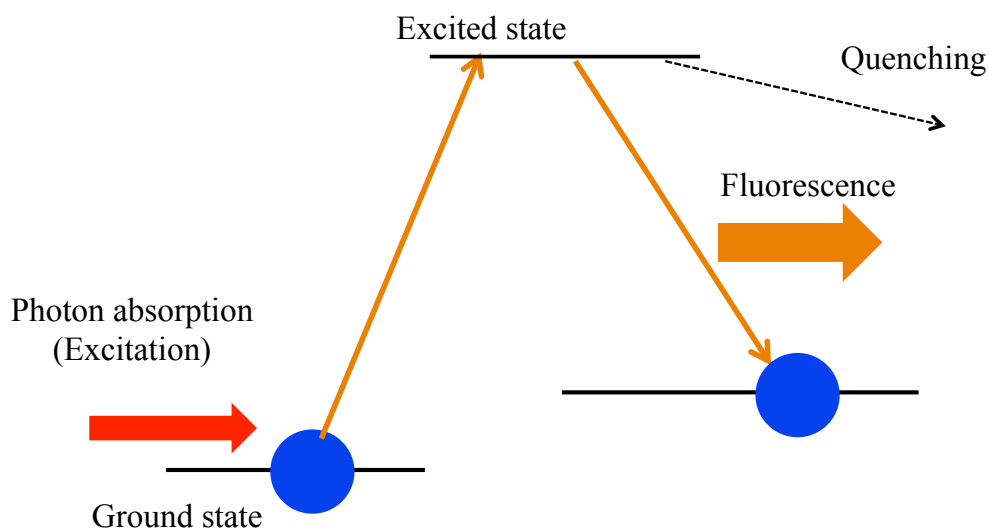


図 2.7 LIF 計測における励起と脱励起の遷移過程。

常に複雑となる。これは大気圧ヘリウムプラズマジェットにより生成される活性種の定量的計測を困難にする大きな要因である。

- **振動エネルギー移行 (VET: Vibrational Energy Transfer)¹⁴⁸**

LIF では通常、基底準位にある活性種を励起する際、電子励起準位と共に振動励起準位も変化する。この際、振動励起状態にある活性種は周囲の分子との衝突により下の振動準位へと遷移する。この現象は振動エネルギー移行 (VET) と呼ばれる。クエンチングは主に電子励起準位の遷移をとまなう現象であるのに対し、振動エネルギーの遷移を特に VET と呼ぶ。

- **回転エネルギー移行 (RET: Rotational Energy Transfer)**

振動エネルギー移行が振動準位間での遷移であるのに対し、回転エネルギー移行 (RET) は回転準位間における同様の遷移である。衝突に起因する遷移であるため、大気中では RET が起こることがわかっているが、ヘリウム中での RET の影響についてはあまりわかっていない。

LIF 法ではレーザーにより励起された活性種が自然放出による脱励起する際の蛍光を観測する。このとき、励起レーザー光波長および観測される蛍光の波長は、各準位間のエネルギー差に相当するものであり、各活性種において固有の値である。それゆえ LIF 法は高い選択性を持ち、波長可変レーザーなどと組み合わせることで様々な活性種の計測が可能となる。

2.5.1 OH-LIF

OH ラジカルと LIF 法についての基礎的な記述は上記の通りであるが、本研究では LIF 法により OH ラジカルの絶対密度およびその 2 次元分布を計測する。OH ラジカルに対する LIF 計測に際して、本研究では励起枝 $P_1(3)$ を選択した。

本研究における OH-LIF の準位間での遷移の様子を図 2.8 に示す。OH の $A^2\Sigma(v=1)-X^2\Pi(v=0)$ の $P_1(3)$ を 283 nm で励起し、 $A^2\Sigma(v=1)-X^2\Pi(v=1)$ の蛍光 309 nm と、 $A^2\Sigma(v=1 \rightarrow v=0)$ の振動エネルギー移行 (VET) を経て計測される $A^2\Sigma(v=0)-X^2\Pi(v=0)$ の蛍光 315 nm の 2 つの蛍光を計測する。

このとき各準位における OH 密度の時間変化を表すレート方程式は以下のようになる。

$$\begin{cases} \frac{dN_1(t)}{dt} = BI(t)n(t) - \Gamma_1(t)N_1(t) \\ \frac{dN_0(t)}{dt} = Q_V N_1(t) - \Gamma_0 N_0(t) \end{cases} \quad (2.1)$$

ここで N_1 , N_0 は励起準位 $A^2\Sigma(v=1)$, $A^2\Sigma(v=0)$ の OH 数密度、 $n(t)$ は下準位 $X^2\Pi(v=0)$ の数密度、 B は誘導吸収係数、 I はレーザー光強度、 $\Gamma_1(t) = B'I(t) + Q + Q_V + A_1$, $\Gamma_0 = Q + A_0$ は励起準位 $A^2\Sigma(v=1)$, $A^2\Sigma(v=0)$ の脱励起速度、 B' は誘導放出係数、 Q はクエンチング速度、 Q_V は VET 速度、 A_1 , A_0 は自然放出係数である。 Q と Q_V は、測定点の空気-ヘリウム混合比と、表 2.4 のクエンチング係数 k_q および VET 係数 k_V から得られる。

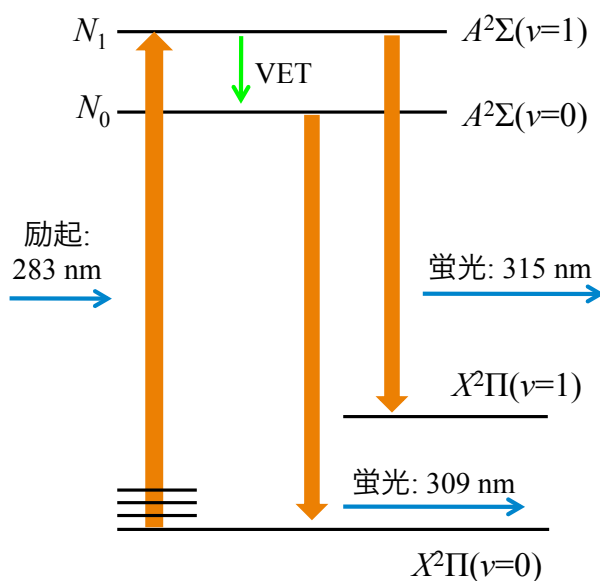


図 2.8 本研究における OH-LIF のエネルギー準位図。

表 2.4 クエンチング係数 (k_q) 及び VET 係数 (k_V)¹⁴⁹⁻¹⁵¹

| Collider | k_q (10^{-10} cm ³ s ⁻¹) | k_V (10^{-10} cm ³ s ⁻¹) |
|------------------|--|--|
| H ₂ O | 7.610 | 0.127 |
| O ₂ | 1.444 | 2.208 |
| N ₂ | 0.153 | 0.910 |
| H ₂ | 2.113 | 3.33 |
| He | 0 | 0 |

レーザーパルスの半値幅を τ として、レーザー波形は矩形波で近似する。すなわち $t \leq \tau$ では $I(t) = I_0$ 、 $t > \tau$ では $I(t) = 0$ とする。本実験では $\tau = 5$ ns である。式 (2.1) の下準位密度 $n(t)$ は、レーザーのポンピングによる減少と、周囲の回転準位からの回転エネルギー移行 (RET) による増加により複雑に時間変化する。本実験で用いたレーザー強度下では、大気圧空気中では RET が十分に大きく $n(t) \cong n_0$ と見なせることを先行研究⁷⁹で確認しているが、空気-ヘリウム混合気で RET がどの程度の大きさになるかは不明である。

本実験では簡単のため、空気-ヘリウム混合気中でも RET が十分発生すると仮定し、 $n(t) \cong n_0$ とする。もしヘリウム中では RET がほとんど発生しないとすると、この仮定のもとでは実際よりも 40% ほど大きな OH 密度が得られる。したがって本実験では、RET の不確定性により、OH 密度を最大で 40% 過大評価している可能性がある。

$n(t) = n_0$ の仮定のもとでは、レート方程式は以下のように解ける。

$$\begin{cases} N_1(t) = \frac{BI n_0}{\Gamma_1} (1 - e^{-\Gamma_1 t}) \\ N_0(t) = \frac{Q_V BI n_0}{\Gamma_1} \left[\frac{1}{\Gamma_0} (1 - e^{-\Gamma_0 t}) + \frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} (e^{-\Gamma_1 t} - e^{-\Gamma_0 t}) \right] \end{cases} \quad (t \leq \tau) \quad (2.2)$$

$$\begin{cases} N_1(t) = N_1(\tau) e^{-\Gamma_1 (t-\tau)} \\ N_0(t) = N_0(\tau) e^{-\Gamma_0 (t-\tau)} + \frac{Q_V N_1(\tau)}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left[e^{-\Gamma_0 (t-\tau)} - e^{-\Gamma_1 (t-\tau)} \right] \end{cases} \quad (t > \tau) \quad (2.3)$$

これを用いて、LIF 信号波形 $I_{\text{LIF}}(t)$ は次式で与えられる。

$$\begin{aligned}
 I_{\text{LIF}}(t) &= cV[a_1N_1(t) + a_0N_0(t)] \\
 &= cV\left[a_1N_1^0e^{-\Gamma_1t} + a_0\left\{N_0^0e^{-\Gamma_0t} + \frac{Q_VN_1^0}{\Gamma_1 - \Gamma_0}(e^{-\Gamma_0t} - e^{-\Gamma_1t})\right\}\right] \\
 &= cV\left[\left\{a_1 - a_0\frac{Q_V}{\Gamma_1 - \Gamma_0}\right\}N_0^0e^{-\Gamma_1t} + a_0\left\{N_0^0 + \frac{Q_V}{\Gamma_1 - \Gamma_0}N_1^0\right\}e^{-\Gamma_0t}\right] \quad (2.4)
 \end{aligned}$$

ここで c は LIF 信号の集光立体角や PMT の感度較正值を考慮した集光係数、 V は LIF 測定体積、 a_1 と a_0 は $1 \rightarrow 1$ および $0 \rightarrow 0$ の蛍光に関する自然放射係数とフィルタの透過率を考慮した係数である。また、レーザーパルス照射直後の $N_1(t)$ 、 $N_0(t)$ をそれぞれ N_1^0 、 N_0^0 とした。式 (2.3) より、 $t > \tau$ において $I_{\text{LIF}}(t)$ は Γ_1 および Γ_0 の 2 つの速度で double exponential に減衰する。 Γ_1 と Γ_0 は空気-ヘリウム混合比で決まるので、この $I_{\text{LIF}}(t)$ の減衰速度から空気-ヘリウム混合比を求めることができる。減衰時定数は、例えば空気濃度 0.01% では 700 ns、15% では 6 ns 程度となる。

空気濃度が薄く $I_{\text{LIF}}(t)$ の減衰が遅い場合、 $I_{\text{LIF}}(t)$ の波形はレーザー照射で鋭く立ち上がった後、double exponential にゆっくりと減衰する。このとき OH 密度 n_0 は、LIF 信号の最初のピーク $I_{\text{LIF}}(\tau) \propto n_0$ から得られる。しかし空気濃度が高く $I_{\text{LIF}}(t)$ の減衰速度が速い場合、 $I_{\text{LIF}}(t)$ の波形はレーザーパルスの波形とほぼ等しくなり、複雑な形状をとる。このときは、 $I_{\text{LIF}}(t)$ の複雑なプロファイルを考慮しなくて済むように、LIF 信号の積分値 $\int I_{\text{LIF}}(t)dt \propto n_0$ から n_0 を求める。 n_0 を求めるには、式 (2.2) に含まれる Γ_1 、 Γ_0 、 Q_V が必要である。これらの値は前述のように、空気混合比の測定結果と表 2.4 の各係数から求める。

具体的に、ヘリウムプラズマジェットでは、位置によって空気-ヘリウム混合比が異なる。そのためクエンチングの影響が位置依存性を持つため、以下の 2 通りについて考察する必要がある

- 組成ガスがほぼ He であり、自然放出による脱励起が支配的なとき
- 放電ガス中に空気が数 % 混入し、クエンチングが無視できない場合

空気が希薄でクエンチング、VET が無視できるとき

実験結果から推定される Q, Q_V が $BI (> 10^8 \text{ [1/s]})$ に対して無視できると考えると、レーザーが照射されている時間領域でのレート方程式は簡単になり

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -BIn + BIN_1 \\ \frac{dN_1}{dt} = BIn - BIN_1 \end{cases} \quad (2.5)$$

と書ける。これを初期条件 $n(t=0) = n_0, N_0(t=0) = N_1(t=0) = 0$ の下で解くと

$$N_1(t) = \frac{1}{2}n_0(1 - e^{-2BI t}) \quad (2.6)$$

となるから、LIF 信号のピーク値

$$I_{LIF}(\tau) = cVA_1N_1h\nu = \frac{1}{2}cVn_0A_1h\nu(1 - e^{-2BI\tau}) \quad (2.7)$$

より n_0 を計算できる (τ はレーザー照射時間)。

空気によるクエンチ、VET が無視できず、脱励起の多くを占める場合

プラズマ中に混入した空気濃度が大きく、クエンチングや VET の影響が無視できない場合、OH の蛍光の減衰時定数はレーザーのパルス波形に近づく。そのときは従来のように LIF 信号の積分値から OH 密度を求める。しかし前述のように、本研究で用いたレーザーは $\tau = 5$ ns であり、計測可能な空気-ヘリウム混合比は最大で 10% 強である。そのため、空気濃度が 10% 以上の領域では、空気濃度をどのように求め、クエンチングの影響を補正するかが大きな問題になる。

空気濃度が 10% より大きいとき、 $e^{-\Gamma_1\tau} \ll 1, e^{-\Gamma_0\tau} \ll 1$ となり、以下の式が成り立つ。

$$\begin{aligned} cV \int_0^\tau a_1 N_1(t) dt &= cV \frac{a_1 B I n}{\Gamma_1} \left[\tau + \frac{1}{\Gamma_1} (e^{-\Gamma_1 \tau} - 1) \right] \cong cV \frac{a_1 B I \tau}{\Gamma_1} n \\ cV \int_0^\tau a_0 N_0(t) dt &\cong cV \frac{a_0 Q_V B I n}{\Gamma_1} \left[\frac{1}{\Gamma_0} \left(\tau - \frac{1}{\Gamma_0} \right) + \frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left(\frac{1}{\Gamma_1} - \frac{1}{\Gamma_0} \right) \right] \\ &\cong cV \frac{a_0 Q_V B I n}{\Gamma_0 \Gamma_1} \left(\tau - \frac{1}{\Gamma_0} \right) \end{aligned} \quad (2.8)$$

このとき、LIF 信号の積分値は以下の関係式で表される。

$$\begin{aligned} \int_0^\tau I_{LIF}(t) dt &= cV \int_0^\tau [a_1 N_1(t) + a_0 N_0(t)] dt \\ &= \frac{cV B I n_0}{\Gamma_1} \left[a_1 \tau + \frac{Q_V}{\Gamma_0} a_0 \left(\tau - \frac{1}{\Gamma_0} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.9)$$

$$= f n_0 \quad (2.10)$$

このとき、 f は比例定数とすると、空気濃度が 10% ~ 100% の間で変化するとき f は 3.4 倍変化する。言い換えれば、空気濃度が 10% よりも大きく計測不可能であるとき、濃度を 50% とし密度算出すれば、誤差は 2 倍の範囲内に収まるということである。大気圧下での絶対密度の計測は様々なパラメータに影響されるため、真の値に対しての 2 倍の誤差は許容範囲であるといえる。しかしこの求め方はあくまで近似的であることに留意しなければならない。真の値を求める際には、LIF 法による空気-ヘリウム混合比の他にも、 O_2 、 N_2 など空気中の主要分子を対象にしたラマン散乱分光法などの結果と合わせることでさらに精度の高い絶対密度計測を行うことができる。本論文末尾の付録 A に LIF 計測における物理定数の補正と、LIF 計測実験および絶対密度計算における誤差要因を記載する。

空気濃度が 1% ~ 10% 程度の領域であるとき

今まで、クエンチングが無視出来るときと、脱励起のほとんどがクエンチングや VET である場合について考察した。本実験では空気濃度が 1% 以下の場合には式 (2.7) を用いて OH 密度を算出し、空気濃度が 10% 以上の領域では、式 (2.10) を用いて算出した。これは経験的に空気混合比が 1% 近辺で式 (2.7) と式 (2.10) の値が近くなったことから整合性のある使い分けだといえる。これはあくまで本実験において OH ラジカルの LIF 計測に限定された条件であり、他の活性種の計測にも同様であるかは不明である。しかしながら、空気濃度が 1% ~ 10% 程度の領域であるときには、これら 2 式は大きな誤差を孕むことになるため、以下のような過程を経て OH 密度を求めることとなる。

まず、レーザー照射中のレート方程式は、

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -BIn + A_0N_0 + BIN_1 \\ \frac{dN_0}{dt} = Q_VN_1 - \Gamma_0N_0 \\ \frac{dN_1}{dt} = BIn - \Gamma_1N_1 \end{cases} \quad (2.11)$$

となる。前節と同様 $\Gamma_0 \equiv A_0 + Q$ 、 $\Gamma_1 \equiv A_1 + Q + Q_V + BI$ である。He に対する空気混合比がある程度大きい場合、光励起により減少した $n(t)$ は RET で即座に補充されると考え、 $n(t) = n_0$ で一定とする。このとき上のレート方程式はとなる。これを初期条件 $n(t=0) = n_0$ 、 $N_0(t=0) = N_1(t=0) = 0$ の下で解くと、

$$\begin{cases} n(t) = n_0 \\ N_0(t) = n_0 Q_V B I \left[\frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left(\frac{e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1} - \frac{e^{-\Gamma_0 t}}{\Gamma_0} \right) + \frac{1}{\Gamma_1 \Gamma_0} \right] \\ N_1(t) = n_0 B I \frac{1 - e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1} \end{cases} \quad (2.12)$$

が得られる。

ここで、レーザーパルスの時間幅を τ_L として、 $t \leq \tau_L$ での LIF 信号を計算すると

$$\begin{aligned} I_{\text{LIF}}(t \leq \tau) &= \int_0^{\tau_L} (N_1 A_1 + N_0 A_0) dt \\ &= \left[\frac{n_0 B I A_1}{\Gamma_1} \left(t + \frac{e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1} \right) \right]_0^{\tau_L} \\ &\quad + n_0 Q_V B I A_0 \left[\frac{t}{\Gamma_1 \Gamma_0} - \frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left(\frac{e^{-\Gamma_1 t}}{\Gamma_1^2} - \frac{e^{-\Gamma_0 t}}{\Gamma_0^2} \right) \right]_0^{\tau_L} \end{aligned} \quad (2.13)$$

となる (定数項 cV は省略した。以降でも同じ)。空気混合比が高く Γ_1, Γ_0 が十分大きい場合、 $e^{-\Gamma_1 \tau}, e^{-\Gamma_0 \tau} \ll 1$ であることを考慮すると、式 (2.13) の定積分は下の様に近似できる。

$$\begin{aligned} I_{\text{LIF}}(t \leq \tau) &\cong \frac{n_0 B I A_1}{\Gamma_1} \left(\tau_L - \frac{1}{\Gamma_1} \right) + n_0 Q_V B I A_0 \left\{ \frac{\tau_L}{\Gamma_1 \Gamma_0} + \frac{1}{\Gamma_1 - \Gamma_0} \left(\frac{1}{\Gamma_1^2} - \frac{1}{\Gamma_0^2} \right) \right\} \\ &= \frac{n_0 B I A_1}{\Gamma_1} \left(\tau_L - \frac{1}{\Gamma_1} \right) + n_0 Q_V B I A_0 \left(\frac{\tau_L}{\Gamma_1 \Gamma_0} - \frac{\Gamma_1 + \Gamma_0}{\Gamma_1^2 \Gamma_0^2} \right) \end{aligned} \quad (2.14)$$

次に、レーザー照射後のレート方程式は

$$\begin{cases} \frac{dN_0}{dt} = Q_V N_1 - \Gamma_0 N_0 \\ \frac{dN_1}{dt} = -\Gamma'_1 N_1 \end{cases} \quad (2.15)$$

である。ここで、 $\Gamma'_1 = A_1 + Q + Q_V$ は誘導放出項 BI がない場合の $A^2\Sigma(v=1)$ の減衰定数である。変数 t では計算が煩雑となるため以降では $u = t - \tau_L$ を変数として用いる。前小節の結果か

ら、 $u = 0$ における初期条件として

$$N_0(u = 0) \cong \frac{n_0 Q_V B I}{\Gamma_1 \Gamma_0}$$

$$N_1(u = 0) \cong \frac{n_0 B I}{\Gamma_1}$$

を用いてレート方程式を解くと、

$$N_1(u) = \frac{n_0 B I}{\Gamma_1} e^{-\Gamma'_1 u}$$

$$N_0(u) = \frac{n_0 Q_V B I}{\Gamma_1} \left\{ \frac{\Gamma'_1 e^{-\Gamma_1 u}}{\Gamma_0 (\Gamma'_1 - \Gamma_0)} - \frac{e^{-\Gamma'_1 u}}{\Gamma'_1 - \Gamma_0} \right\}$$

が得られる。このとき、LIF 信号における $t > \tau_L$ 部分の寄与は

$$I_{\text{LIF}}(t > \tau) = \int_{\tau_L}^{\infty} (N_1 A_1 + N_0 A_0) dt = \int_0^{\infty} (N_1 A_1 + N_0 A_0) du$$

$$= \frac{n_0 B I A_1}{\Gamma_1 \Gamma'_1} + \frac{n_0 Q_V B I A_0}{\Gamma_1} \left\{ \frac{\Gamma'_1}{\Gamma_0^2 (\Gamma'_1 - \Gamma_0)} - \frac{1}{\Gamma'_1 (\Gamma'_1 - \Gamma_0)} \right\}$$

$$= \frac{n_0 B I A_1}{\Gamma'_1 \Gamma_1} + \frac{n_0 Q_V B I A_0 (\Gamma'_1 + \Gamma_0)}{\Gamma_1 \Gamma'_1 \Gamma_0^2} \quad (2.16)$$

となる。

式 (2.14)、(2.16) から、全時間域における LIF 信号の積分値は

$$I_{\text{LIF}} = I_{\text{LIF}}(t \leq \tau_L) + I_{\text{LIF}}(t > \tau_L)$$

$$= \frac{n_0 B I A_1}{\Gamma_1} \left(\tau_L + \frac{1}{\Gamma'_1} - \frac{1}{\Gamma_1} \right) + \frac{n_0 Q_V B I A_0}{\Gamma_1 \Gamma_0} \left(\tau_L + \frac{1}{\Gamma'_1} - \frac{1}{\Gamma_1} \right)$$

$$= n_0 B I \left(\frac{A_0 Q_V}{\Gamma_1 \Gamma_0} + \frac{A_1}{\Gamma_1} \right) \left(\tau_L + \frac{1}{\Gamma'_1} - \frac{1}{\Gamma_1} \right) \quad (2.17)$$

となる。

これは空気中放電での計算式

$$I_{LIF} \sim cVn_0BI\tau_L \left(\frac{A_0Q_V}{\Gamma_1\Gamma_0} + \frac{A_1}{\Gamma_1} \right) \quad (2.18)$$

中の τ_L に補正項 $\frac{1}{\Gamma'_1} - \frac{1}{\Gamma_1}$ が付加された形となっている。空気中放電では BI の影響がクエンチ・VET に比べて小さいため式 (2.17) で $\Gamma_1 \cong \Gamma'_1$ となり、式 (2.18) に一致する。

He プラズマジェット中では BI と Q, Q_V は同程度のオーダーであるから、この補正項の影響が無視できなくなり、空気混合比 3.7% においては $\tau_L + \frac{1}{\Gamma'_1} - \frac{1}{\Gamma_1} \sim 1.5\tau_L$ 程度となる。

ここで得られる OH 密度 n_0 は、励起遷移 $P_1(3)$ の下回転準位の密度である。プラズマジェットはほぼ室温であるため、OH の回転温度 (\simeq ガス温度) を 300 K と仮定し、 n_0 から $\text{OH}(X^2\Pi, v=0)$ の密度を求める。

2.5.2 O-TALIF

原子のレーザー計測には 2 光子吸収レーザー誘起蛍光法 (Two-photon Absorption LIF: TALIF) が用いられる。TALIF 法の計測原理は LIF 法とほとんど同じであるが、励起時に吸収される光子の数が LIF とは異なり 2 個である。原子の励起には真空紫外光 (10 ~ 200 nm) に相当するエネルギーの光子を必要とするが、大気圧下での計測では真空紫外光は酸素に吸収され計測できない。そのため、その半分のエネルギーに相当する光子を 2 個吸収させ原子を励起する。本研究では 226 nm の励起波長を用い、遷移過程 $3p^3P \leftarrow 3s^3S_1^0$ における 845 nm の蛍光を観測した。

TALIF 法では、LIF 法でのレート方程式においてアインシュタインの B 係数の代わりに光子と O 原子の衝突断面積を考えることで各準位における数密度の時間変化を表す。この時のレート方程式は以下ようになる。

$$\frac{dN_1}{dt} = -\sigma^{(2)}\Phi^2N_1 \quad (2.19)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \sigma(2)\Phi^2N_s - (A + Q + \sigma_{pi}\Phi)N_2 \quad (2.20)$$

ここで $\sigma^{(2)}$ は 2 光子励起の光子衝突断面積、 Φ_2 は $2p^3P$ は光束密度である。また、 N_1 は $\text{O}(2p^3P)$ の密度、 N_2 は $\text{O}(3p^3P)$ の密度を表す。レート方程式 (2.20) を解くと、TALIF 蛍光強度 I_{TALIF} は以下の式で表される¹⁴⁹。

$$I_{\text{TALIF}} = c \int_0^\tau N_2 dt = c \frac{\sigma I_L^2}{Q} N_1^0 \tau \quad (2.21)$$

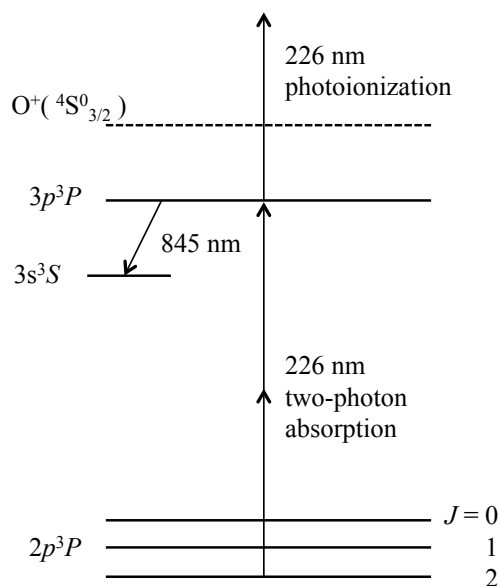


図 2.9 O-TALIF におけるエネルギー準位図。

式 (2.21) において、 τ はレーザーパルス幅、 c は LIF 比例定数であり、立体角やフィルタ透過率、ホトマルの量子効率を考慮した係数である。また、 A 、 Q はそれぞれ自然放出係数およびクエンチング係数である。

ヘリウムプラズマジェット中では、各位置で空気-ヘリウム混合比がそれぞれ異なるが、ここでも筆者らの過去の OH-LIF により空気-ヘリウム混合比を算出する手法を用い、空気-ヘリウム混合比を求め、適宜クエンチングの影響を補正した。各種分子のクエンチング係数を表 2.5 に示す¹⁵⁰⁻¹⁵³。式 (2.21) に表されるように、TALIF 信号強度 I_{TALIF} は、励起レーザー光強度の 2 乗に比例する。そのため、TALIF 計測においてはレーザーをレンズ等で集光することにより、高いレーザーエネルギー密度を得ることが必要であるがレーザーエネルギー密度 (J/cm^2) が大きすぎるために TALIF 信号が飽和することがある。

図 2.10 にレーザーエネルギーと TALIF 信号の関係を示す。図 2.10 に示されるように、レーザーエネルギーが $0.03 \sim 0.1$ (mJ) のときには TALIF 信号はレーザーエネルギーのおおよそ 2 乗に比例していることが分かる。本研究では、TALIF 信号が飽和しない上記のエネルギー領域において計測を行った。

OH-LIF では蛍光強度から計算により、NO-LIF では NO 標準ガスを用いることで密度を求めた。O-TALIF ではレーザーエネルギー密度を向上させるために、レンズを用いて集光するため、レーザー断面積を求めることが難しくなる。実際に計算することは可能であるが、エアリーディスクの影響もあり正確な密度を求めることは難しい。

TALIF 法による原子の計測では、近い励起波長を持つ希ガスを標準ガスに用いた較正法が用い

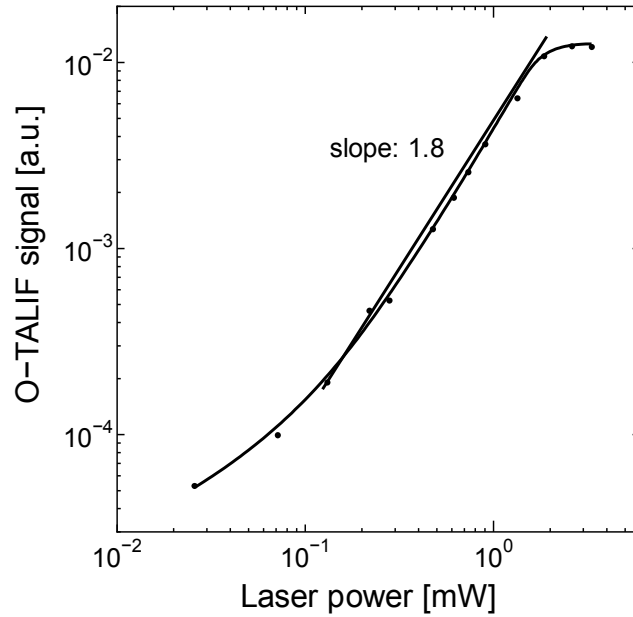


図 2.10 レーザーエネルギーと O-TALIF 信号強度の関係。

られる。例えば H-TALIF や N-TALIF では Kr が、O-TALIF では Xe が較正用のガスとして用いられる^{53,154-156}

Xe-TALIF 法による O 原子密度の較正では、同じ実験系での計測の条件のもと、次の式に従い Xe-TALIF 信号と O-TALIF 信号強度を比較することで O 原子密度を求める。

$$n_X = \frac{T_R \nu_R}{T_X \nu_X} \cdot \frac{\sigma_R^{(2)}}{\sigma_X^{(2)}} \cdot \frac{a_R}{a_X} \cdot \frac{S_X}{S_R} \cdot n_R \quad (2.22)$$

式 (2.22) において、 T はバンドパスフィルターの透過率、 ν は PMT の量子効率、 a は branching ratio 係数、 S は TALIF 信号強度を表し、添字 X, R はそれぞれ O 原子と Xe 原子を意味する。また $\sigma_R^{(2)}, \sigma_X^{(2)}$ はそれぞれ Xe と O の光子衝突断面積であり、本研究では先行研究に基づき $\sigma^{(2)}(\text{Xe}) / \sum_{J' \sigma_{J \rightarrow J'}}^{(2)}(\text{O}) = 1.9$ を用いた。

Xe-TALIF による較正法では LIF と同じ誤差要因が考えられ、2 倍 ~ 3 倍の誤差を持つと考えられる。図 2.11 は Xe-TALIF 計測の実験の模式図である。アクリルの密閉容器をロータリーポンプで真空 ($\leq 10^{-2}$ Torr) にした後、Xe でリンスし Xe を 1 atm で封入する。石英窓からレーザーを入射させ 90 度方向への蛍光を観測した。その他の実験条件: レンズの焦点距離, PMT 電圧, 計測体積などは O-TALIF 実験を行った際と同様である。

また、Xe-TALIF 法でも TALIF 信号強度はレーザーエネルギー密度の 2 乗に比例すると考えられ、O 原子の密度較正には飽和のない条件下での計測が必要である。図 2.12 は Xe-TALIF 信号とレーザーエネルギーの関係を示したものである。図から飽和のない条件下での計測が行われてい

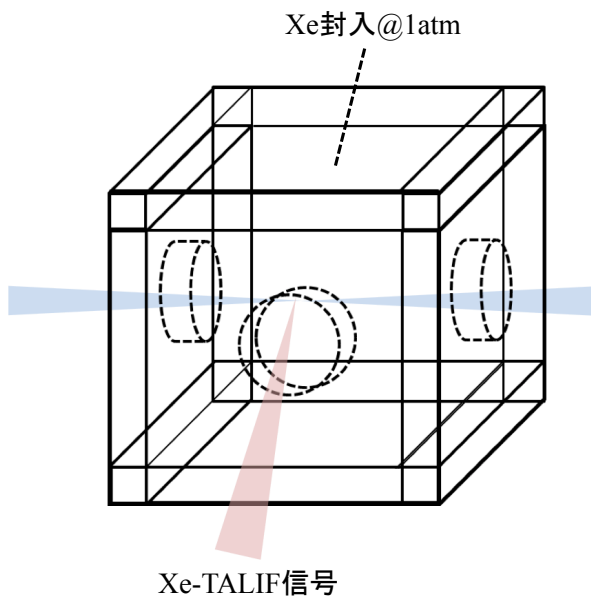


図 2.11 Xe-TALIF 較正の計測系模式図。

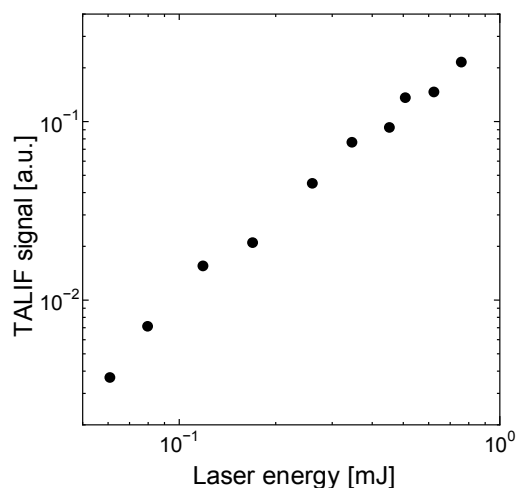


図 2.12 Xe-TALIF 信号とレーザーエネルギーの関係。

ることが分かる。

2.5.3 NO-LIF

プラズマ医療応用でも、NO は主に創傷治療への応用で効果があると考えられている。NO は N, O などの化学反応に伴い生成される。プラズマ中における主な NO 生成の反応を以下に示す。

表 2.5 Xe, O 原子に対する各分子のクエンチング係数¹⁵⁴

| Collider | Quenching coefficient for Xe $\times 10^{-10}$ [cm ⁻³ /s] | Quenching coefficient for O $\times 10^{-10}$ [cm ⁻³ /s] |
|------------------|---|--|
| N ₂ | 14.0 | 3.6 |
| O ₂ | 20.6 | 3.7 |
| H ₂ O | 28.5 | 49 |
| Xe | 5.05 | — |
| He | 2.33 | 0.07 |



またプラズマ中で NO は主に以下の反応で消滅する。



$A^2\Sigma^+ \leftarrow X^2\Pi(0, 0)$ 各枝の遷移波長を図 2.13 に示す。レーザーにより $A^2\Sigma^+ (v = 0)$ に励起された NO は、下準位に遷移する際に蛍光を発する。主な蛍光に、 $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi(0, 1)$ (波長 237nm) , $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi(0, 2)$ (波長 248nm) , $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi(0, 3)$ (波長 258nm) , $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi(0, 4)$ (波長 272nm) 等がある。

表 2.6 は NO-LIF において用いたクエンチング係数の値である。これらの値を用いてクエンチング補正を行った。本プラズマではガス温度は、室温とほとんど等しく 300 K 程度であると考えられる。NO の密度を求める際には同じ実験系で温度の等しい標準ガスを用い、LIF 信号強度とクエンチング係数の比を求めれば良い¹⁵⁷。

2.6 シャドウグラフ

シャドウグラフは気体の密度差から生じる屈折率の違いを利用し気体の流れを計測する手法である。シャドウグラフの実験系模式図の例を図 2.14 に示す。プラズマ源をコリメートされたコヒーレントな光が通過すると、密度差による屈折率の違いでレーザー光が屈折を起こす。屈折を起こした光をスクリーンへ写像し、その像をカメラなどで観測することで密度のゆらぎを計測する手法である。シャドウグラフではプラズマ源 (被写体) を通過してからの距離 (光路長) が大きいほど密度のゆらぎが大きく画像に映るが、光源の平行度やコリメートの誤差が計測の精度に大きく影響する。被写体まではシャドウグラフと同様の実験系を用い、通過後の光を集光しナイフエッジやピンホールで屈折光以外を切る手法はシュリーレン法と呼ばれる。

当研究室でもこれまでにストリーマ放電のシュリーレン計測を行っている他、プラズマジェットのスリーレン計測による流れの可視化の実験結果が報告されている¹⁵⁹⁻¹⁶²。

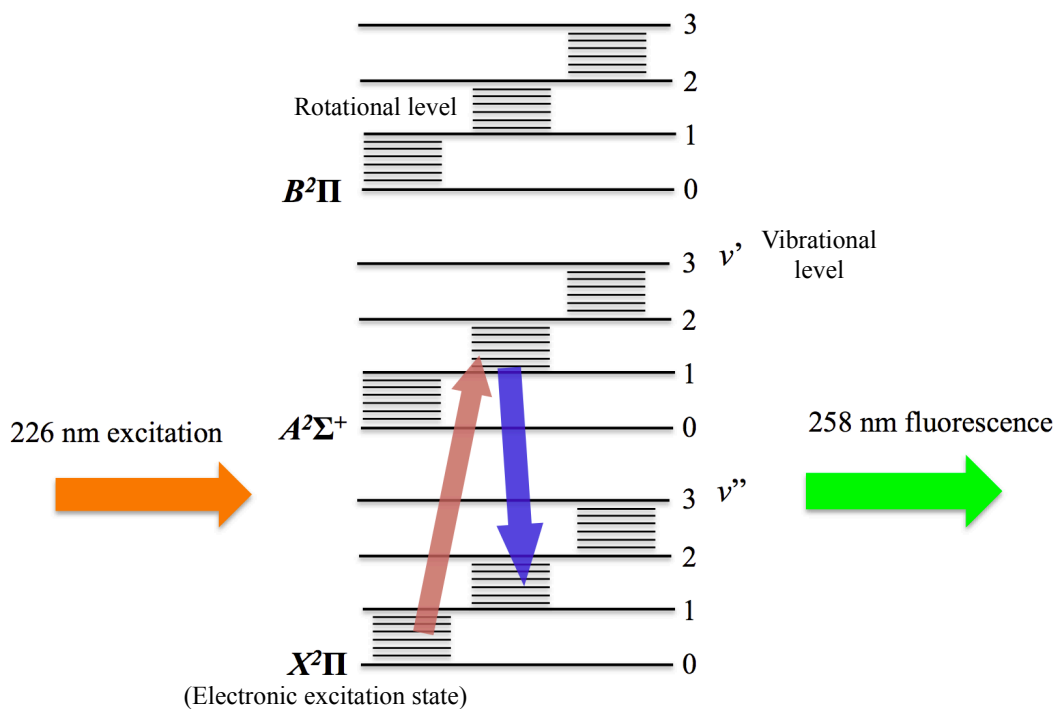


図 2.13 本研究における NO-LIF のエネルギー準位図。

表 2.6 NO($A^2\Sigma^+$) における各種クエンチング係数の値¹⁵⁸

| Collider | Quenching Coefficient [cm^3s^{-1}] |
|--------------|--|
| N_2 | 4.3×10^{-13} |
| O_2 | 1.7×10^{-10} |
| NO | 2.6×10^{-10} |

プラズマジェットの流れの可視化から、“plasma bullet”の進展と流れの関係を考察した先行研究や、流れ込む空気による活性種の生成を考察した例がある。本研究でも、シャドウグラフを用いて空気の巻き込みと活性種の生成の関係を考察している。光源には、平行度が高いレーザー光が用いられることが多く本研究でもエキシマレーザーを光源として用いた他にも、スペイシャルフィルターを用いて平行度を向上させた半導体レーザー（レーザーポインタ）を用いることで簡易ながらも精度の高いシャドウグラフ実験を行うことが出来る。

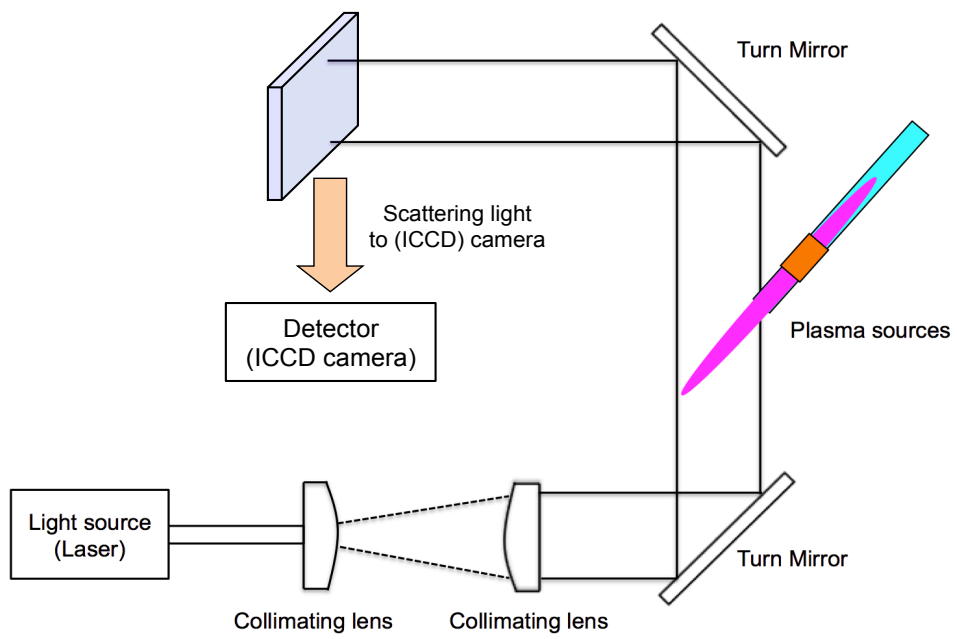


図 2.14 シャドウグラフ計測系の実験系模式図。ICCD カメラや通常のカメラでスクリーンへの写像を撮影する。

第3章 LIF法による活性種の計測

1.3節でも説明したが、大気圧ヘリウムプラズマジェットにより生成される活性種の絶対密度計測は筆者の以前の論文を含めこれまでも幾つか例があるが、多くの計測例は“実際に医療で用いられる条件”を想定したものではなく、プラズマジェットが大気中に吹き出す場合の計測結果であった¹⁶³⁻¹⁶⁵。また、表面に進展する場合でも発光分光や電力計測などの先行研究例に限られており、活性種の供給量に繋がるような定量的な計測例はほとんどなかった^{166,167}。

しかしながら、プラズマ医療応用においては、プラズマジェットは皮膚、臓器などの生体表面に照射されることが想定される。ICCDカメラを用いた先行研究などでも、大気圧中にプラズマジェットが吹き出す場合と何らかの表面に進展する際には、plasma bulletの進展が大きく異なることが明らかになっている。

前章にも記述したように、Plasma bulletの進展はプラズマによる活性種の生成に大きく影響するため、“どのような状況を想定し活性種の計測を行うか”により計測結果の有用性が大きく左右される。表面にプラズマが進展する際に活性種の生成に影響を及ぼすパラメータには以下のようなものが考えられる。

- ヘリウム流量: プラズマ進展範囲や周辺空気の巻き込みに大きく影響
- 照射対象までの距離: プラズマの進展範囲, 表面の温度変化, また周辺空気の巻き込みに影響
- 照射対象の条件: 水分量, 導電率, 粗さなどがプラズマの強度や進展範囲に影響
- 放電電圧, 投入電力: プラズマによる活性種の生成量, 表面の温度変化等に影響
- 背後電極の有無: 放電の強度に影響
- 放電ガスの組成: 放電の強さ, 活性種の生成量などに大きく影響

上記以外にも、周辺空気の湿度などプラズマ進展とそれに伴う活性種生成に影響するパラメータは無数にあるが、その全てを制御することは難しい。しかし上記のパラメータはいずれも実際の医療応用を念頭においた際に制御可能なパラメータである。更に、その制御可能なパラメータを変化させ活性種の密度分布の変化を見ることでプラズマ中における活性種の生成機構を考察することが可能である。本章では、活性種の生成機構の考察を目的としてOH, NO, Oを対象とした計測実験の結果を報告する。

3.1 OH-LIF

前章 2.5.1 節で説明したように、大気圧ヘリウムプラズマジェット中では、空気-ヘリウム混合比の値に応じて LIF 信号強度を補正し活性種の密度を求める必要がある。本研究では OH-LIF 信号の減衰時間、すなわち蛍光の寿命からプラズマ中における空気濃度を求めクエンチングの影響を補正する手法を用いた。ヘリウムプラズマジェットによる活性種の生成には周囲から混入した空気中の分子 (N_2 , O_2 , H_2O) が必要であるが、空気濃度を求めることでそれらの分子が生成にどの程度寄与するかという定量的な議論を行う。

これまでの筆者らの研究で、ヘリウムプラズマジェットによる OH ラジカルの生成には、配管の中やガスボンベの中などに含まれる H_2O が放電ガス中に不純物として混入し、それが OH ラジカルの生成に大きく影響することが明らかになっている¹⁶³。筆者の先行研究において計測された放電ノズル中における OH 密度と H_2O 濃度の関係を、図 3.1 に示す¹⁶³。図 3.1 の結果から、 $[H_2O] \leq 400$ ppm において H_2O のおおよそ 1% が OH に解離していることが予想される。一方で、バブリングを用いずにボンベからの He をそのまま流した実験でも、約 $3 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}$ の OH 密度が観測された。LIF 計測における OH の蛍光の減衰時間から He を加湿しない場合にも He 中には 10 ppm 程度の H_2O が存在すると計測された。表 3.1 に示されるように、He にもともと含まれる H_2O 濃度は 1.2 ppm なので、配管を通る間に内壁に吸着した水分で 10 ppm まで加湿されたものと考えられる。また、このとき生成された OH ラジカル密度は 0.1 ppm であったことから、 H_2O の解離率は約 1% となる。

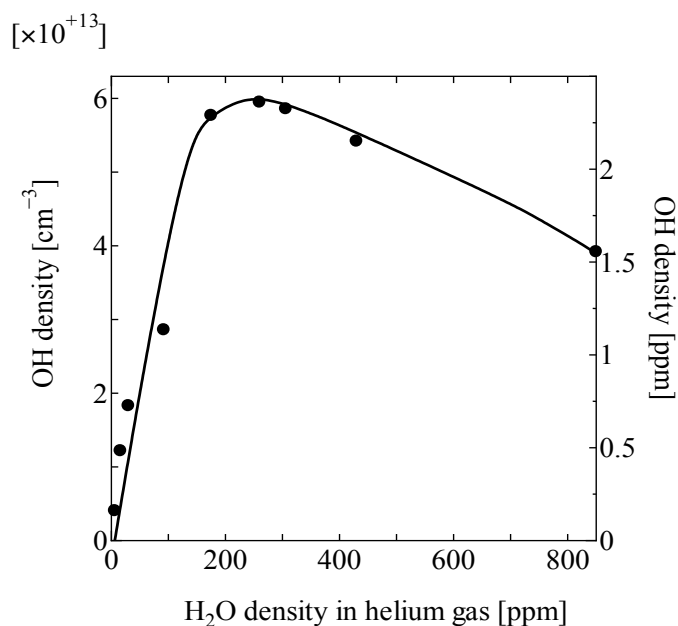


図 3.1 放電ガス中の H_2O 濃度と OH ラジカル密度の関係。

表 3.1 ヘリウムガスに含まれる不純物 (Helium purity 99.99%)。

| Impurities | Density [ppm] |
|------------------|-----------------|
| H ₂ O | 1.21 (at 300 K) |
| O ₂ | 0.2 |
| N ₂ | 0.5 |
| CO | 0.5 |
| CO ₂ | 0.5 |
| CH ₄ | 0.5 |

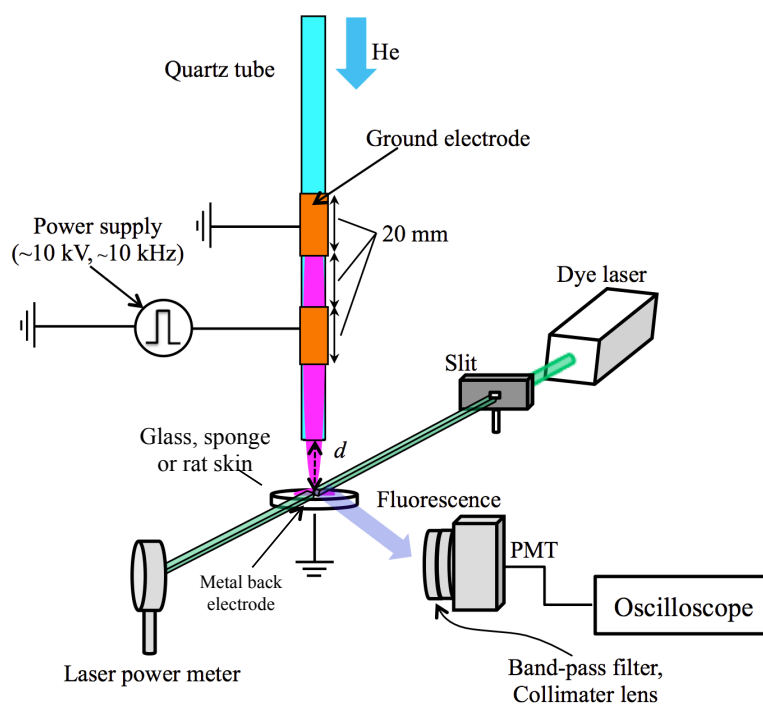


図 3.2 LIF 計測実験系。

実験系

レーザーを用いた計測では、レーザーの入射した領域におけるプラズマとの相互反応を見るため、プラズマジェットのある点における反応を計測することが出来る。図 3.2 に本研究における LIF 計測実験系を示す。

色素レーザーから出射した 283 nm のレーザー光はスリットを用いることでその断面積を調整する。図 3.2 に表されるように、医療用での条件を模擬するために対象表面に対してプラズマジェットが鉛直方向に進展する場合を想定した。プラズマジェットの中心軸から r 軸を取り、 r 方

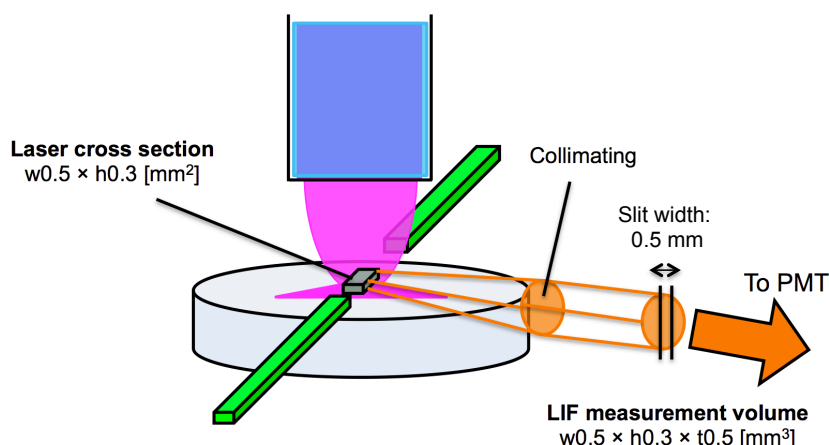


図 3.3 LIF 計測領域の調整の様子。

向への OH の蛍光を計測した。観測された蛍光は $A^2\Sigma(v=1)-X^2\Pi(v=1)$ の蛍光 309 nm と、 $A^2\Sigma(v=1 \rightarrow v=0)$ の振動エネルギー移行 (VET) を経て計測される $A^2\Sigma(v=0)-X^2\Pi(v=0)$ の蛍光 315 nm の 2 つの蛍光である。表面近傍からの蛍光は、その半分が PMT 受光面に届き、残りの半分は表面に吸収・散乱されると仮定した。

レーザー断面積はスリットを用いて $w0.5 \times h0.3 \text{ mm}^2$ の薄いシート状とした。ノズルは x, y ステージを用いて r, y 方向にそれぞれ 0.25 mm, 5 mm ずつ移動させてプラズマ中の OH 密度分布を計測した。 y はプラズマ中心軸からレーザーの進行方向への軸方向である。また OH の蛍光の減衰速度から、空気-ヘリウム混合比の 2 次元分布を計測した。OH の蛍光は中心波長 313 nm、FWHM=10 nm のバンドパスフィルタ及び光電子増倍管 (PMT: Photomultiplier Tube) を用いて計測した。LIF 計測における計測体積の調整の模式図を図 3.3 に示す。PMT 前面に幅 0.5 mm のスリットを設置することにより、LIF 信号の計測体積を $w0.5 \times h0.3 \times t0.5 \text{ mm}^3$ とした。

プラズマ医療応用では、前述のように活性種の投入量が重要である。そのため、各照射条件における活性種投入量を見積もるためには、表面のごく近傍での活性種密度分布を求める必要がある。OH-LIF 実験では薄いレーザー状のシートを表面に入射させ表面近傍の OH 密度の径方向分布を計測した。また、より実際の医療に近い条件を模擬し、表面の条件が活性種の密度分布に与える影響を評価するために **ラット表皮**、**ガラス表面**、**純水を含んだ多孔質のスポンジ** の 3 つの表面を対象表面として用いた。

レーザーエネルギー密度は 5 mJ/cm^2 とし、図のようにレーザー入射後のレーザーパワー密度をパワーメーターにて常時測定した。LIF の詳細は前節 2.5.1 で述べたとおりである。放電周波数 10 kHz に対して、レーザーは 10 pps (パルス幅 10 ns) で発振させた。放電パルス (電流パルス) の立ち上がり時に plasma bullet が発生し、活性種の生成は plasma bullet の発生に伴い行われる。

そのことから、数 kHz の放電パルスの立ち上がりの間での活性種の時間変化を計測することで、プラズマにより生成された活性種の時間的な挙動を議論することが可能となる。

図 3.4 は、ヘリウム流量が 1.5, 3.0, 6.0 l/min の場合のプラズマジェットの進展の写真である。図 3.4 (c) に見られるように、流量が大きい場合には沿面放電の進展が軸対称ではなくなっていることが分かる。流量が小さい場合には軸対称の様に見えるが、微視的には非対称となっていることが予想される。この場合、活性種の密度も軸対称でなくなっていることが予想されるが、実際には放電の非対称な形状は 10^{-1} s のオーダーで表面をほぼ均一な頻度で回転しており、512 回の LIF 信号計測時間 (約 1 分) の間には活性種の密度はほとんど軸対称になっていると考えられる。本研究では、表面近傍においては活性種密度は軸対称に分布していると仮定し、径方向の密度計測を行った。

LIF 計測においては、放電電圧とレーザーの発振を同期することで、放電パルスの発生後任意のタイミングでレーザーを入射させることが出来る。LIF 計測における放電の V-I 波形を図 3.5 に示す。放電パルスのピークを 0 s とし、その後 5, 25, 50, 75 μ s でレーザーを入射させ LIF 計測を行った。

大気圧ヘリウムプラズマジェットによる OH ラジカルの生成機構は 2 つ考えられる。1 つは、図 3.6 の右に表されるように周辺空気に含まれる H_2O がプラズマと反応して解離し、プラズマと周辺空気の界面で OH が生成されるケースである。plasma bullet がリング状に進展することから、プラズマジェットの外縁部は活性な領域として知られており、OH ラジカルも同様にプラズマジェットと空気との界面で生成されると予想される。もう 1 つはヘリウムガス中に含まれている微量の H_2O の解離による OH ラジカルの生成である。本実験で使用したヘリウムにはもともと 1.2 ppm 程度の H_2O が不純物として含まれており、さらにヘリウムが配管や石英管を流れる間にこれらの内壁に付着した水分により加湿される。このとき、図 3.6 の左に表されるように OH はプラズマ中心部で生成され、プラズマ中心部において密度が大きい分布になると予想される。

また、図 3.1 に見られるように $H_2O \leq 400$ ppm の範囲において、グラフの傾きは一定となることから解離率は一定である。しかし、 $H_2O > 400$ ppm において、 H_2O 濃度は増えても OH ラジカル密度は緩やかに減少している。大気圧ヘリウムグロー放電は、不純物濃度が高いと放電が安定しないことが知られているが¹⁶⁸、大気圧ヘリウムプラズマジェットでも同様に加湿による放電の不安定化により、OH の生成が飽和していると考えられる。同様の実験では、 H_2O の添加に伴い OH ラジカルの発光は強くなるものの、 H_2O 濃度が閾値を超えると OH ラジカルの発光が弱くなることがわかっている。このとき、OH ラジカルの回転温度は 450 ~ 850 K と変化し、振動温度は 1500 ~ 5500 K と変化することがわかっている¹⁶⁹。このように放電のエネルギーは温度上

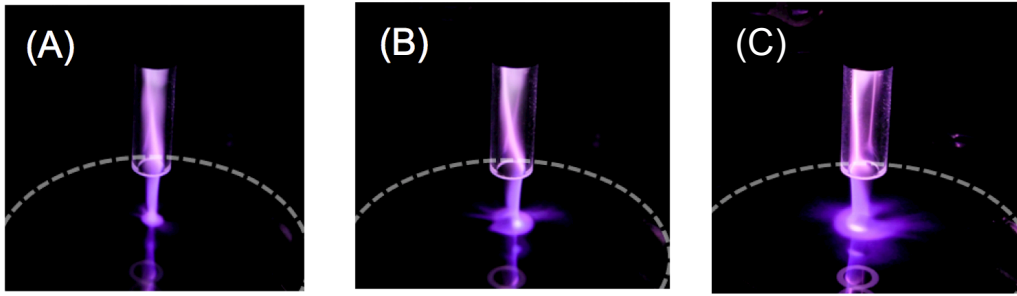


図 3.4 ヘリウム流量 (A) 1.5 l/min, (B) 3.0 l/min, (C) 6.0 l/min におけるプラズマジェット進展の写真。照射対象はガラス板、背後電極あり。

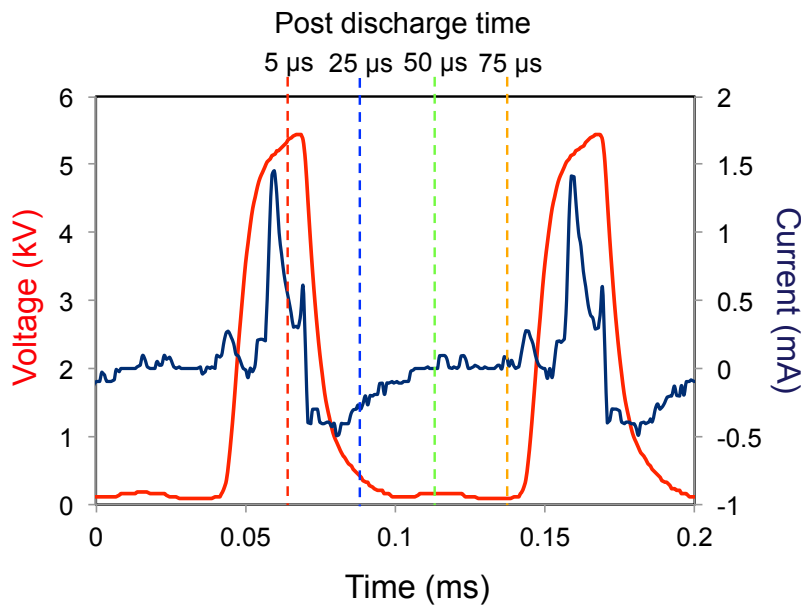


図 3.5 LIF 計測実験における電圧 – 電流波形。

昇に費やされ、生成には寄与できない可能性がある。

各条件における OH ラジカルの計測

大気中では、励起された OH ラジカルの多くはクエンチングにより脱励起するが、プラズマ中の位置によってその脱励起速度 (蛍光の減衰時間) は大きく異なる。一例として空気濃度が 0.05% と 1% の場合の LIF 信号波形を図 3.7 に示す。図 3.7 に見られるように、空気濃度が大きい場合には LIF 信号は相対的に減衰が早くなっている事がわかる。実験による LIF 信号波形と前節 2.5.1 中で説明した理論波形とをフィッティングし空気濃度を求めた。LIF 信号の減衰時間から空気–ヘリウム混合比を求める手法は感度が高く、クエンチング係数などの影響を受けるという欠点はあるが 0.01% のオーダーで空気濃度を求めることができる¹⁶³。

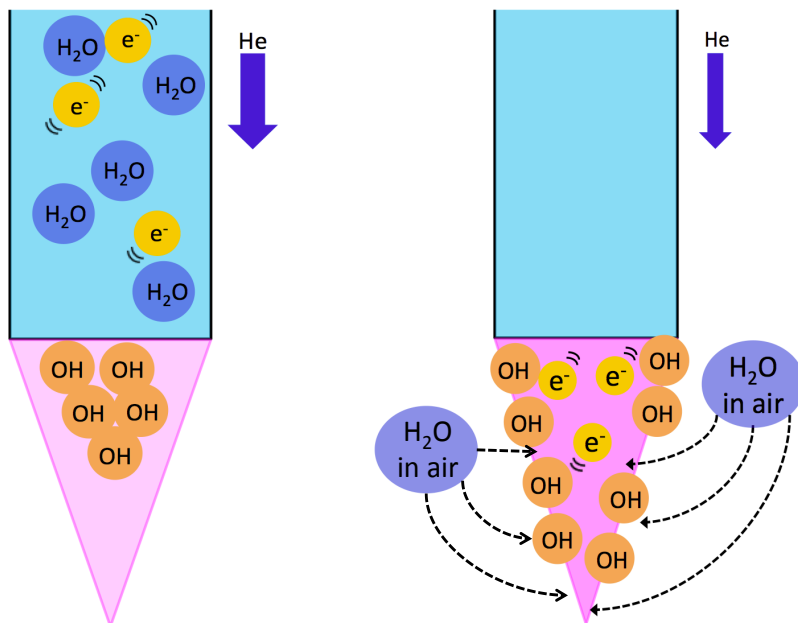


図 3.6 プラズマジェット中において想定される OH ラジカルの生成機構。

3.1.1 OH ラジカルの時間変化

まず最初に、プラズマにより生成された OH ラジカルの時間的な密度の変化を計測した。活性種の生成量を求めるためには、その密度の時間変化を求め単位時間あたりの密度の積分を求めな

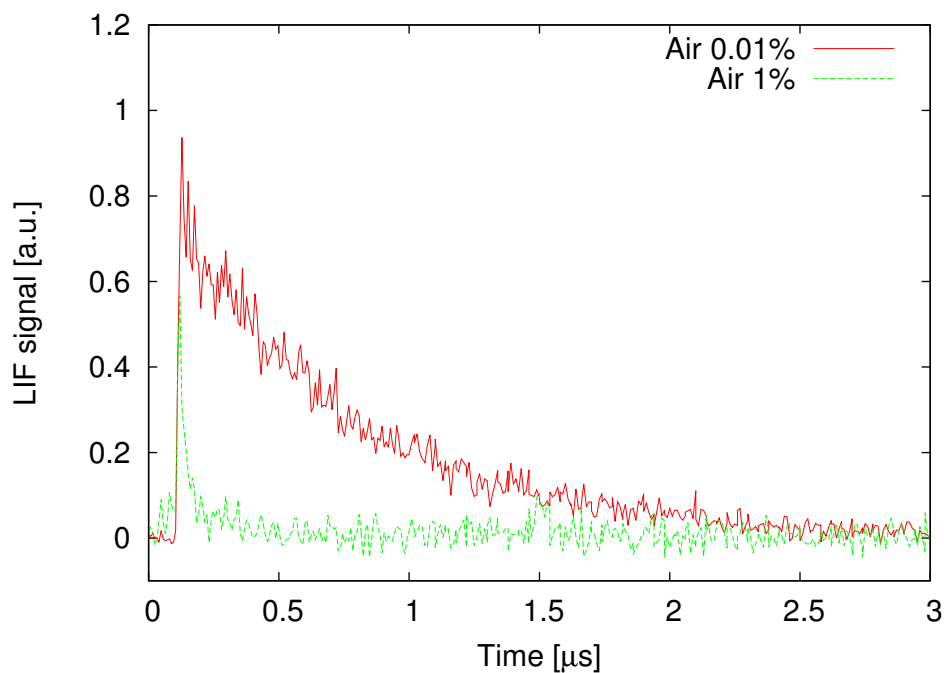


図 3.7 LIF 信号波形の時間変化。縦軸が信号強度、横軸が時間。

ければならないためである。

図 3.8 に、ラットの表皮近傍における OH ラジカル密度径方向分布の時間変化を示す。前述の通り、計測タイミングはパルスの立ち上がり後 5, 25, 50, 75 μs 後である。図 3.8 より、OH ラジカルの密度及びその径方向への分布は、時間的にほとんど変化していないことが分かる。径方向の距離に関して OH ラジカル密度は単調に減少しており、プラズマジェットを中心軸上で密度が最大となっていることが分かる。その最大密度は $1.2 \times 10^{13} [\text{cm}^{-3}]$ であり、プラズマジェットの外縁部分では $5 \times 10^{11} [\text{cm}^{-3}]$ 程度まで減少する。

3.1.2 異なる表面上における OH ラジカル密度分布

医療応用においては、臓器や皮膚などへの表面の進展が想定され、その際にはプラズマジェットの進展とそれに伴う活性種の生成は表面の条件により影響を受けると考えられる。ここでは、上述の 3 つの表面を用いて、それぞれの表面近傍における OH ラジカルの径方向密度分布を計測した。

その結果を図 3.9 に示す。図 3.9 に見られるように、OH ラジカルの径方向分布に関しては

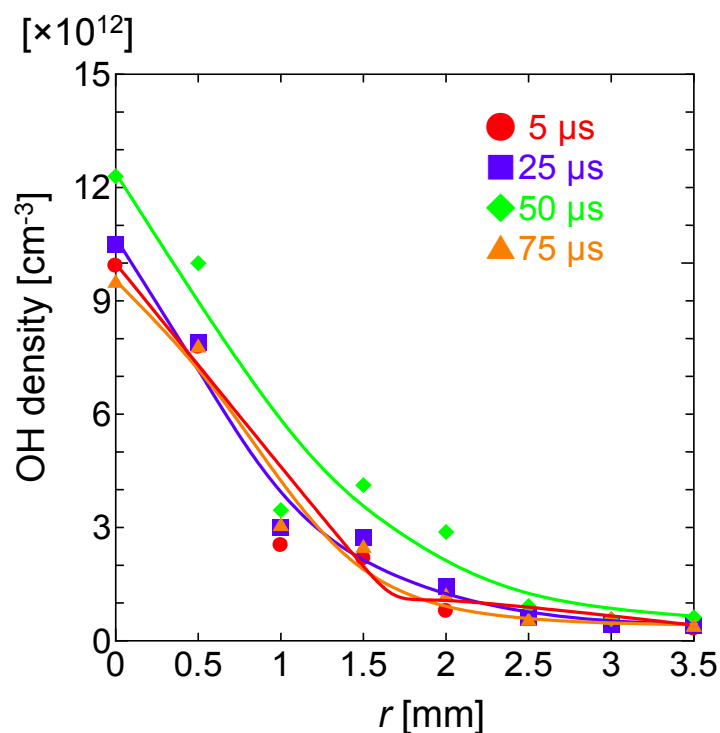


図 3.8 ラット表面近傍における OH ラジカル密度径方向分布の時間変化。 $d = 10 \text{ mm}$, He: 1.5 l/min.

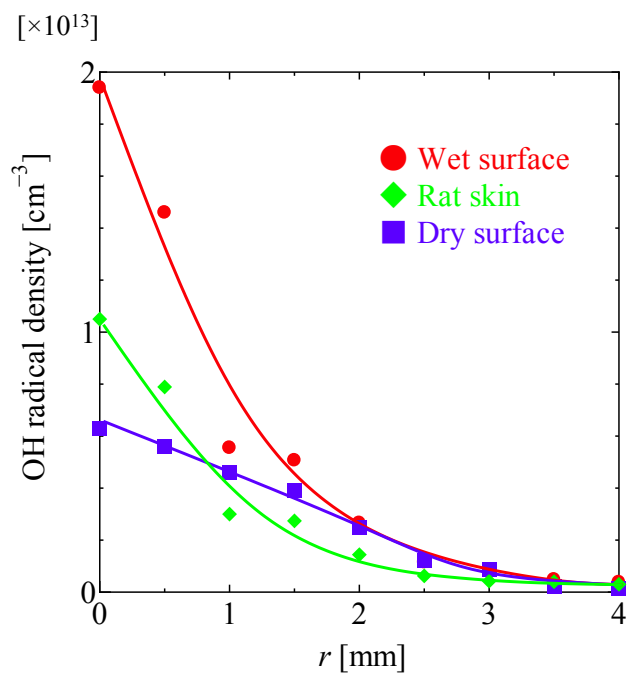


図 3.9 ラット表皮, 湿潤表面, 乾燥表面近傍における OH ラジカル密度分布。 $d = 10$ mm, He: 1.5 l/min.

中心が最大となり径方向に減少という共通のものであるが、絶対密度に関しては湿潤(スポンジ)表面 → ラット表皮 → ガラス(乾燥)表面の順番に大きくなっていることが分かる。湿潤表面上における OH ラジカルの最大密度が 2×10^{13} [cm⁻³] 程度であるのに対し、乾燥表面では約 1/3 となる 6×10^{12} [cm⁻³] 程度である。

OH ラジカルはプラズマ中で主に電子衝突: $e + H_2O \rightarrow H + OH + e$ により生成されることが分かっている。鉛直方向に進展するプラズマジェットにより自由電子は対象表面より蒸散する H₂O と衝突し OH を生成するというモデルが考えられる。そのため、H₂O の多い湿潤環境では OH の密度が大きくなり図 3.9 のような結果が得られたと考えられる。OH の生成に大きく寄与する機構であると考えられる。これに関しては後ほど議論する。

3.1.3 ヘリウム流速と活性種密度分布の関係

プラズマ医療応用においては、プラズマジェットをどのような距離やガス流量で照射すべきかというガイドラインが将来的には必要となるであろう。また、それは活性種の量などの定量的な指標によって制御されるべきである。しかしこれまでに、プラズマが表面に進展する条件においてガス (He や Ar) 流量や照射距離などの影響はあまり評価されておらず、活性種の計測実験の先

行研究などもほとんどなかった。ここでは、OH ラジカルの密度分布を基準として He 流量と照射距離 (d の値) がどのような影響を及ぼすかを計測した。

図 3.10 に OH ラジカルの径方向密度分布と d の値との関係を示す。 d の値は 10, 20, 30 mm とし He 流量は 3.0 l/min とした。図 3.10 から見られるように、 d の値が小さくなる、すなわちジェットが表面に近い距離から照射される場合には OH ラジカルの密度のピークは中心軸上に存在するのに対し、 d の値が大きくなるにつれてプラズマジェットの外縁部へとシフトしている事が分かる。

次に、He 流量と OH ラジカル密度径方向分布の関係を図 3.11 に示す。He 流量は 1.5, 3.0, 6.0 l/min とし、 d は 10 mm とした。図 3.11 より、流量が小さい場合には d の値を変化させた際と同じく中心で密度が最大となるのに対し、流量が大きくなると OH 密度のピークは外側にシフトしていることが分かる。このように、He 流量や d の値が大きくなり、表面近傍での He 流速が大きくなると絶対密度や密度分布が変化することが分かった。これはプラズマジェットによる空気の巻き込みや plasma bullet の進展に変化が起こったためと考えられる。これに関してものちほど詳しく議論することとする。

3.1.4 活性種生成と背後電極の関係

医療応用においてプラズマが進展する表面は通常接地された環境である。経験的に、対象表面の背後電極の有無により放電の強度が変化することは定性的にはわかるが、その変化が活性種の生成にもたらす影響は定量的に明らかになっていなかった。医療応用を模擬できるような対象表面を実験的に確認するためには、背後電極の有無 (接地されているか) がどのような影響をおよぼすかは必要な知見である。ここでは、ガラス表面において背後電極の有無と OH ラジカル密度分布の関係を計測した。

図 3.12 は、背後電極の有無と OH ラジカル密度分布の関係を表したものである。図中の赤色のプロット (背後電極有) と青色のプロット (背後電極なし) を比較してみると、背後電極が存在する場合には、背後電極がない場合よりも密度が 1.5 倍程度大きくなっていることが分かる。 $r \leq 3.0$ mm の領域ではほとんど変化していないが、中心部分では特に背後電極の影響が大きく見られる。これは背後電極の存在により中心部分での放電が強くなり OH ラジカルの生成量が増えたと予想される。この結果から、医療応用を模擬した実験を行う際には背後電極の有無も活性種の投入量に影響することが定量的に実験で確認された。

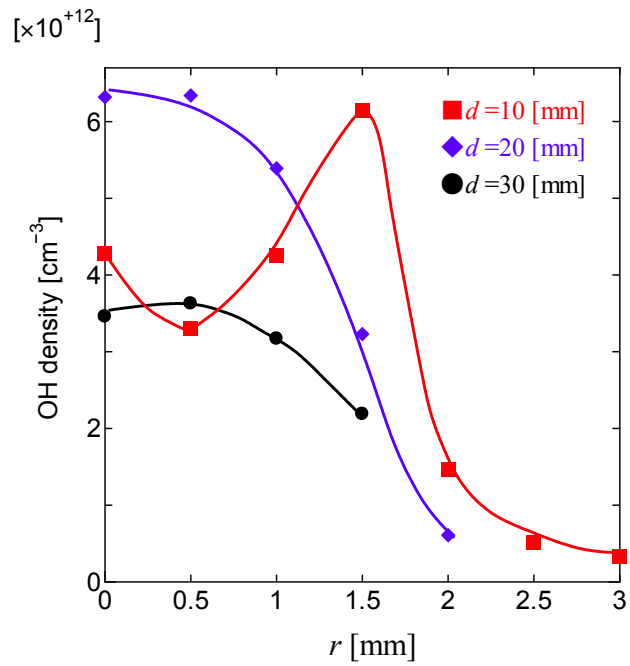


図 3.10 d の値とガラス表面近傍における OH ラジカル密度軸方向分布の関係。背後電極あり、He: 3.0 l/min.

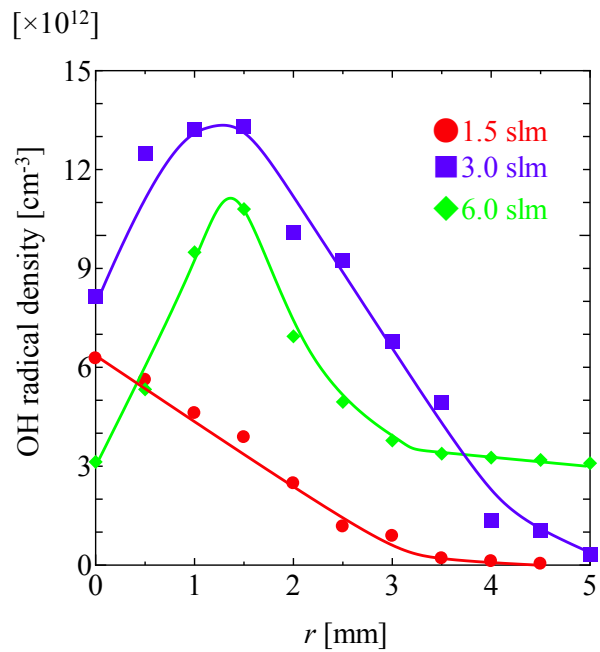


図 3.11 ヘリウム流量とガラス表面近傍における OH ラジカル密度軸方向分布の関係。背後電極あり、 $d = 10$ mm.

3.1.5 OH ラジカルの 2 次元分布

図 3.13 は、プラズマジェットがガラス表面に進展する際の、プラズマ中における空気-ヘリウム混合比および OH ラジカル密度の 2 次元分布を表したものである。 x, y, z ステージを用いて石

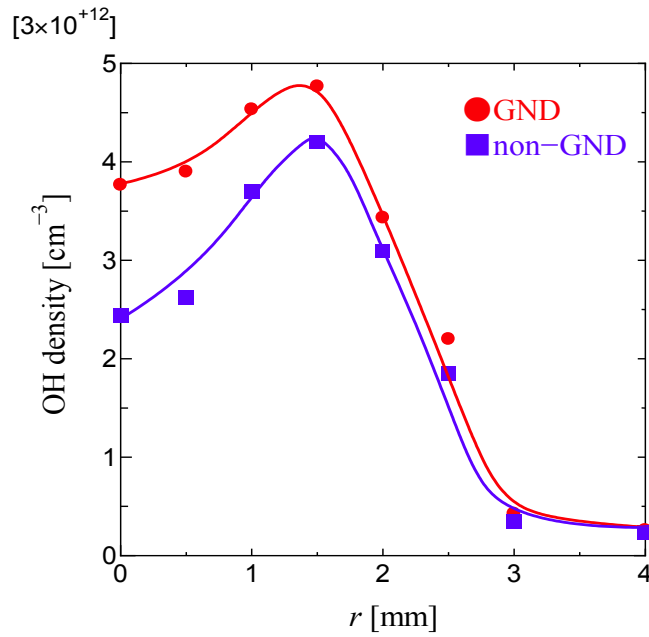


図 3.12 背後電極の有無とガラス表面近傍における OH ラジカル密度分布の関係。 $d = 10$ mm, He: 1.5 l/min.

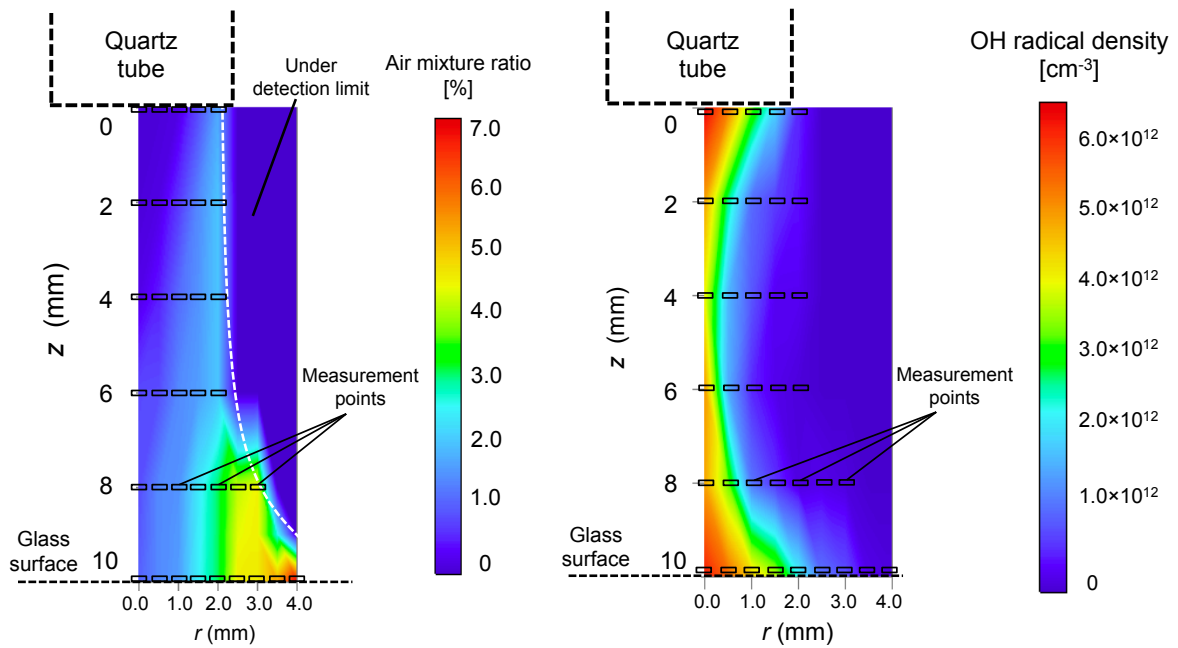


図 3.13 プラズマジェット中の空気-ヘリウム混合比及び OH ラジカル密度の 2 次元分布。 He 流量: 1.5 l/min, $d = 10$ mm, ガラス表面使用.

石英管を動かすことで、図中“Measurement points”と示される点での LIF 計測を行った。2次元分布はそれぞれの計測点の値を graphR を用いてコンタープロットにより補完した。図 3.13 の左の

分布は、プラズマ中における空気濃度を表したものであり、プラズマジェットの出射する石英管からの距離に関して、空気濃度が大きくなっていることが分かる。表面近傍、プラズマジェットのエッジ部分での空気濃度は7.5%程度である。ノズル近傍・ジェットの中心軸上では、0.1%以下と空気濃度が低くなっているが、径方向にはジェットの先細りの形状のように空気濃度が変化している。

それに対し、図右側のOHラジカル密度分布では、プラズマ中心軸上におけるOHラジカルの密度が大きくなっていることが分かる。石英管近傍と表面近傍でのOHラジカル密度が最大となりその密度は $6 \times 10^{12} [\text{cm}^{-3}]$ である。

図3.13の分布より、OHラジカルの密度分布と空気-ヘリウム混合比の分布は異なった分布を持ち、これまでの3.1.1節, 3.1.2節, 3.1.3節の結果と合わせて議論することで、OHラジカルの生成機構を考察することが出来る。

3.1.6 考察: OHラジカルの生成機構

これまでの計測結果により、以下のような事実が明らかになった。

- プラズマ中でのOHラジカル密度は時間的にほとんど変化しない。
- 表面への流速が大きくなるとOHラジカル密度のピークは径方向外側にシフトする。
- 医療で用いられるような条件 ($d = 10 \text{ mm}$, He流量: 1.5 l/min) ではOHラジカル密度は表面近傍、中心軸上で大きくなる。

前述のとおり、プラズマ中におけるOHラジカルの生成は主に H_2O の解離に伴い行われる。表3.2に、OHラジカルの生成と消滅に関わる主な反応を示す。

OHの生成は主に、 H_2O の電子やO原子による解離に由来する。プラズマ中に存在する H_2O は、(1) 石英管から出てくる放電ガスにそもそも含まれるもの; (2) 周辺空気から混入するもの; (3) 対象表面から蒸散するものが考えられる。先行研究¹⁶³では放電ガスが実験系を通る内に10 ppm程度まで加湿されることが分かっているが、これは図3.13におけるOHラジカル密度が、石英管の出口付近で大きくなっていることに関係すると考えられる。一方で、表面に付着した H_2O の解離もOHの重要な生成機構であると考えられる。図3.9では、表面の水分量に関係し表面近傍のOHラジカル密度が変化することが確認された。これは同時に、湿った表面にプラズマジェットが進展する場合には、OHラジカルの生成を0にすることは出来ず、生体に対するプラズマプロセスでは常にOHラジカルの影響が存在することを示している。

上記2つのOHラジカル生成機構を定量的に確かめることが出来たものの、それだけでは図3.13に示されるOHラジカル密度分布を説明することは出来ない。OHラジカルが表面近傍及びジェット

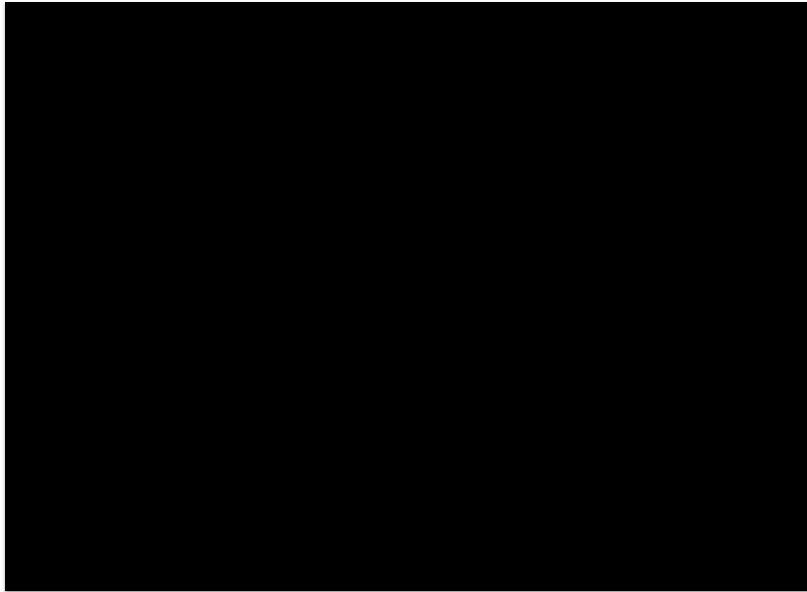


図 3.14 (左) 本研究で得られた表面近傍での He 流れのシャドウグラフ画像; (右) 先行研究におけるヘリウム流のシュリーレン画像¹⁷²。

トの中心軸上で密度が大きくなる理由を以下のように推測する。

(i) 表面近傍での乱流から、プラズマへの空気の巻き込みが起こった

(ii) 中心軸上で OH ラジカルの寿命が長くなった

図 3.14 に、シャドウグラフにより得られた表面近傍での He 流の様子を示す。左は本研究において、ガラス表面にヘリウム流が進展する場合のシャドウグラフ画像である。層流で石英管から表面へ進展した He 流は、表面に近づくとつれ乱流となる。表面到達後は上向きの運動量を持つ流れとなり、渦を形成していることが分かる。図 3.14 の右は先行研究において撮影された、He 流が表面に進展する場合の流れのシュリーレン画像である¹⁷²。左の図と同じように、He 流が渦を形成していることが分かる。この渦により周辺空気はプラズマジェット中に巻き込まれたと考え

表 3.2 OH ラジカルの主な生成, 消滅反応^{170,171}。

| 生成 | 消滅 |
|---|--|
| $e + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H} + \text{OH} + e$ | $\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ |
| $\text{O}(^1\text{D}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{OH}$ | $\text{OH} + \text{OH} + \text{M} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{M}$ |
| $\text{N}_2(\text{A}^3\Sigma^+) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2 + \text{OH} + \text{H}$ | $\text{OH} + \text{O} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}$ |
| | $\text{OH} + \text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ |

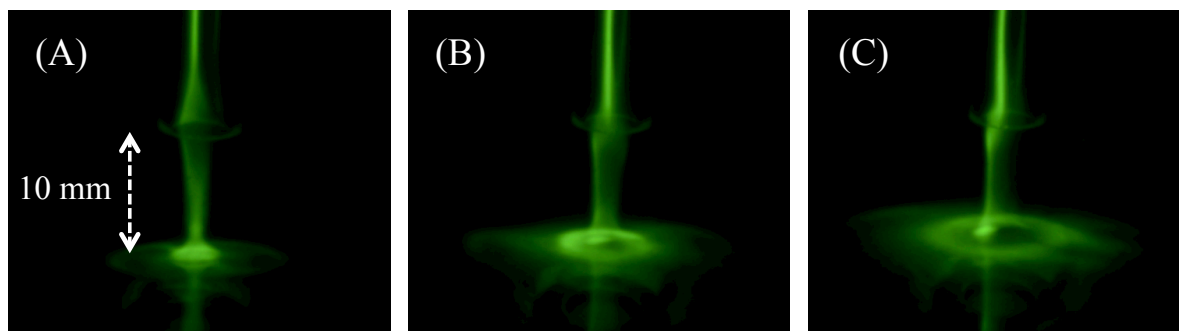


図 3.15 プラズマジェットがガラス表面に進展する際の ICCD 画像。ヘリウム流量: 1.5, 3.0, 6.0 l/min。

られる。

次に、プラズマジェットがガラス表面に進展する際の ICCD 画像を図 3.15 に示す。図より、表面上では沿面放電が起こり、円状またはリング状の放電が起こっていることが分かる。Karakas らによれば、ヘリウムプラズマが放電するにはある程度、おおよそ 0.1 ~ 50% の空気濃度が必要だと考えられており、空気との境界層で放電が起きていることが分かる¹⁷³。表面近傍では発光が大きくなっており、放電の活性な領域となっている。この放電の活性領域と、プラズマにより巻き込まれる空気の触れ合う領域で H_2O の解離が効率的に起こった結果、図 3.13 のような OH ラジカル密度分布になったと考えられる。本研究では、湿度や室温を一定に調整した条件下での計測を行ったため、実験時は 300 K, RH = 30 ~ 50% 程度で一定であった。Reuter らの研究報告によれば、周辺空気に含まれる H_2O は OH の生成及びそれに伴う H_2O_2 の生成に大きな影響を及ぼすと考えられている⁵⁴。そのため、活性種の供給量に基づく医療効果の比較を目的とする場合、周辺空気の状態も十分に考慮する必要がある。また、流量が大きくなるにつれて放電の活性領域はリング状に変化していることが分かる。これは、図 3.10, 3.11 に示される結果と合わせて考えると、やはり表面上の H_2O や巻き込まれた周辺空気が放電活性領域で効率的に解離されたためであると考えられる。一方、図 3.13 のようにヘリウム流量が 1.5 l/min 程度の時には、プラズマジェット中心軸上で放電が強くなり、効率よく H_2O の解離が起こった結果、中心軸上・表面近傍での OH 密度が大きくなったと考えられる。図 3.13 では、OH ラジカルの密度が大きくなっている領域 (表面近傍、 $0 \leq r \leq 1.5$ mm) では、空気濃度は 2% 程度である。相対湿度を考慮しても、200 ppm 程度の H_2O が含まれていることとなり、プラズマ中に巻き込まれた H_2O の解離により OH が生成されていると考えられる。

プラズマジェットと空気の境界付近では、OH 以外にも様々な活性種が生成されている^{52,53,55}。これらの活性種が OH と反応することで OH が消滅し、中心軸上で OH の密度が大きくなってい

ることが予想される。代表的な例として O 原子があるが O 原子は OH と高速に反応するため、例えば 100 ppm 程度の O 原子が存在すると、OH は O と反応して 10 μ s の時定数で減少する。さらに、プラズマジェットのエッジ部分では、OH ラジカルは空気中の N₂, O₂ と反応し瞬時に消滅する¹⁷⁴。したがって、プラズマジェットと空気の境界付近でも、プラズマによる空気中の H₂O が解離に伴い OH が生成されるが、これが他の活性種との反応で瞬時に減少する¹⁷⁵。OH ラジカルの時間変化を見ても、時間的に大きな変化がないことから、プラズマのエッジ部分では生成と消滅のバランスが取れていると考えられ、相対的に OH の寿命の長い (消滅反応の少ない) 中心軸上ではバランスされた密度が大きくなったと考えられる。

OH 密度あたりの LIF 信号強度は、ヘリウム中の空気濃度が高いほど小さくなるが、これは空気のクエンチングにより、LIF 信号が減少するためである。そのためプラズマジェット中では、OH ラジカル密度の LIF 計測下限値が場所によって異なる。本実験での OH 密度測定下限値は、組成ガスの多くが空気であるようなプラズマジェット外周部分では 10¹⁰ cm⁻³、ヘリウム中では 10⁹ cm⁻³ 程度となり、1 桁程度の差が見られる。ヘリウムなどのガスを用いたプラズマジェットの LIF 計測を行う際に、留意すべき点である。

また、OH-LIF 計測では吸収法 (キャビティリングダウン法) と比較して密度が小さく計測されることが報告されている。密度にして数倍程度の誤差が 2 つの計測法で確認されており、その原因は以下のように考えられる。

- クエンチング係数の誤差

LIF 計測において大きな誤差要因となるのはクエンチング係数の誤差である。LIF 計測における絶対密度の計算では、クエンチング係数を考慮する必要がある。しかし Dillece らによれば、クエンチング係数の値は文献によって異なり最大で 5 倍程度の差が存在する¹⁷⁶。例えば、大気圧・空気中での計測においてクエンチング係数が 5 倍異なる場合、本研究における OH 密度は 10 倍程度異なる。キャビティリングダウンのような吸収法ではクエンチングを考慮する必要が無いので、この係数の違いが誤差の要因の 1 つと考えられる。

また大気圧ヘリウムプラズマジェット中では空気濃度を求め、クエンチングの影響を補正しなければならないが、空気濃度の見積りやそれに伴うクエンチング補正も、クエンチング係数に大きく依存するため、更にクエンチング係数の誤差の影響を大きく受けることとなる¹⁷⁷。

- H₂O の影響

OH ラジカルの密度を正しく見積るためには、計測領域におけるガス温度を正しく見積る必要がある。多くの場合に、OH ラジカルの回転温度をボルツマン分布から求め、回転温度

≈ ガス温度と仮定しガス温度を求める手法が用いられる。しかしながら、H₂O 密度が大きい場合、OH(A - X) の遷移発光は H₂O の影響を大きく受けるためガス温度を実際よりも過大評価する可能性が指摘されている^{178,179}。本研究ではガス温度を 300 K と仮定して絶対密度を算出したが、このようなガス温度の誤差も密度の誤差に影響する。

本研究では電子衝突による H₂O の解離が主な生成機構であると考えられるが、その他にも H₂O の増加に伴い OH 密度が変化することが明らかになっている。Bruggeman らによれば、大気圧プラズマのような電離度が比較的低い (~0.01) プラズマでは、OH の主な生成機構は電子衝突や再結合反応 H + O = OH であり、化学反応の寄与も大きいと考えられている¹⁸⁰。

3.2 O-TALIF

OH ラジカルと同様に、プラズマ医療で重要だと考えられている O 原子の生成機構を考察するために、プラズマジェット中の O 原子をレーザー計測した。計測法は前 2.5.2 節における TALIF 計測法に従った。O 原子の生成機構は、主に O₂ の解離に伴うと考えられる。O 原子の生成、消滅の主な反応を表に示す。

表 3.3 に示されるように、O 原子の主な生成は O₂ の解離に由来する。そのため O 原子の生成機構には周辺空気が大きな役割を果たすと考えられる。まず最初に OH と同様に、表面の条件や He 流量を変化させた結果を報告する。前述のように、O-TALIF 計測には、飽和しない程度にレーザーエネルギー密度を大きくすることが感度を得るために重要である。O-TALIF 実験の実験系は、OH-LIF とほとんど同様であるが、図 3.16 に示されるようにシリンドリカルレンズを用いて縦方向へレーザーを集光した。色素レーザーのプロファイルがガウシアンであると仮定すると、

表 3.3 O 原子の主な生成, 消滅反応¹⁸¹⁻¹⁸³。

| 生成 | 消滅 |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| $O^* + He \rightarrow O + He$ | $O + O_2 + He \rightarrow O_3 + He$ |
| $e + O_2 \rightarrow O + O^* + e$ | $2O + He \rightarrow O_2 + He$ |
| $e + O_2 \rightarrow 2O + e$ | $O + O_3 \rightarrow 2O_2$ |
| $O^* + O_3 \rightarrow O_2 + 2O$ | |
| $OH + OH \rightarrow H_2O + O$ | $OH + O \rightarrow O_2 + H$ |

焦点距離 f が分かっている場合、集光点でのビームウエストは以下の式で求めることができる。

$$d_0 = \frac{4\lambda f}{\pi D_{in}} \quad (3.1)$$

ここで d_0, f, λ はそれぞれビームウエスト径、レンズの焦点距離、ビーム波長を表す。 D_{in} は入射ビーム径である。しかしながら、実際にはエアリーディスクの影響やビームのガウシアン以外のモードを持つ場合にはレーザー断面積を理論的に求めることは難しい。本研究では Xe-TALIF 法を用いることで、断面積を求めずに O 原子の絶対密度を校正した。

3.2.1 O 原子密度分布の時間変化

OH の場合と同様に、活性種の投入量を見積もるためには活性種密度の時間変化を求めることが重要である。O 原子の表面における径方向密度分布を計測した。医療応用を模擬するために、対象表面にラットの表皮を用いた際の計測結果を図 3.17 に示す。ヘリウム流量は 1.5 l/min, $d = 10$ mm でプラズマを照射した。図 3.17 に示されるように、放電後 5, 25, 50, 75 μs で計測された O 原子密度は時間的にほとんど変化していないことが分かる。O-TALIF は計測誤差や偏差が OH-TALIF に比べ大きく、OH-LIF よりは時間的な差があるように見えるが、複数回の実験で有意な傾向を認められなかったため、これは実験誤差によるものであると考えられる。

注目すべきは、O 原子の密度の最大値が $r = 1.5 \sim 2.0$ mm 付近に存在することである。このような分布は、全ての計測点 (5, 25, 50, 75 μs) で同じであった。中心軸上で密度が最大となる場合とは明らかに異なり、ジェットによる沿面放電のエッジ部分で O 原子密度が最大となっている。これについては、後ほど詳しく議論することとする。

3.2.2 表面の状態と O 原子密度の関係

OH ラジカルでは表面からの H_2O 蒸散が生成に大きく影響していたが、O 原子の生成に表面の条件がどのように影響するかといった研究はこれまでほとんどなかった。OH ラジカルは O 原子と素早く反応するため、OH ラジカルの生成に関係のあるパラメータは、O 原子の生成にも影響をおよぼす事が多い。O 原子に関しても、プラズマジェットがガラス表面に進展する場合とラット表皮に進展する際の径方向密度分布を計測した。その結果を図 3.18 に示す。

図 3.19 に示されるように、湿潤表面 (ラット表皮) にプラズマジェットが進展する場合に比べ、乾燥表面 (ガラス表面) にプラズマジェットが進展する場合は O 原子密度が 2.5 倍ほど大きくなっていることが分かる。また、径方向分布に関しては先程の結果と同じく、 $r = 2.0$ mm 付近で密度のピークを持っている。OH-LIF における図 3.9 では、O 原子の大きくなるガラス表面近傍にお

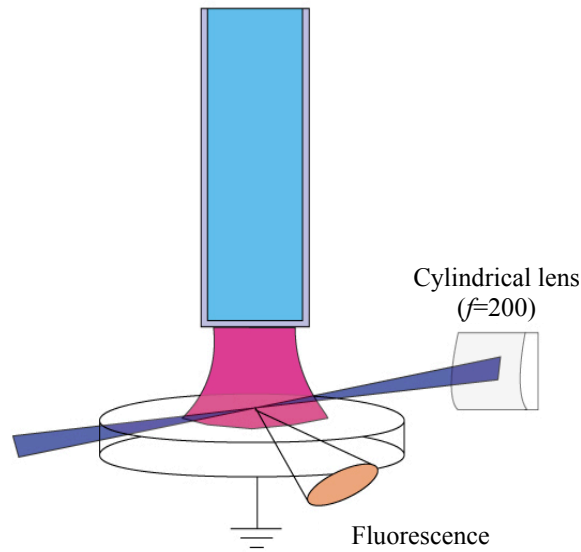


図 3.16 O-TALIF の実験系模式図。集光光学系以外は OH-LIF と同じ。

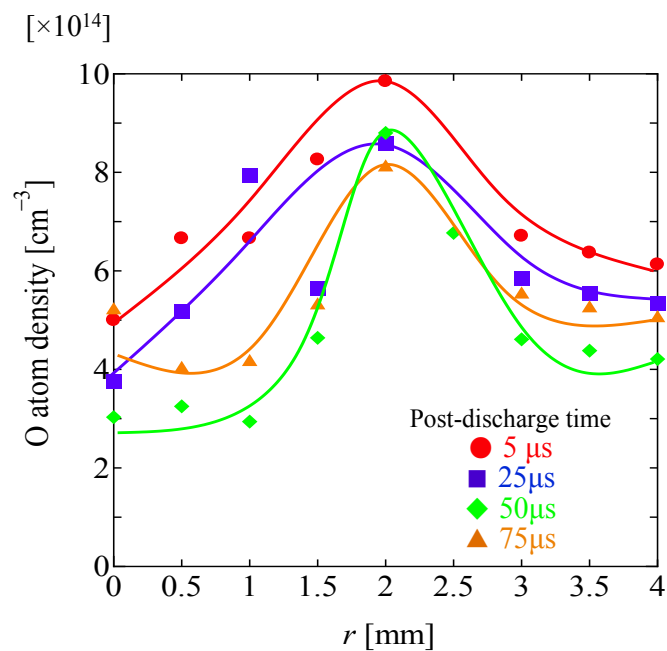


図 3.17 ラット表皮近傍における O 原子密度の径方向分布の時間変化。

ける $r = 2$ mm 地点の OH 密度が、ラット表皮近傍の同地点における OH 密度よりも大きくなっている。これは LIF 計測の誤差によるものと、表面近傍での流速の変化によるものであると考えられる。ラット表皮はガラス表面に比べて表面が粗く、ヘリウムの表面近傍における流れも変化する。ガラス表面近傍では中心軸上で出来た活性種がヘリウム流によって運ばれ、 $r = 2$ mm 付近での OH 密度がラット表皮近傍よりも大きくなったものと予想される。

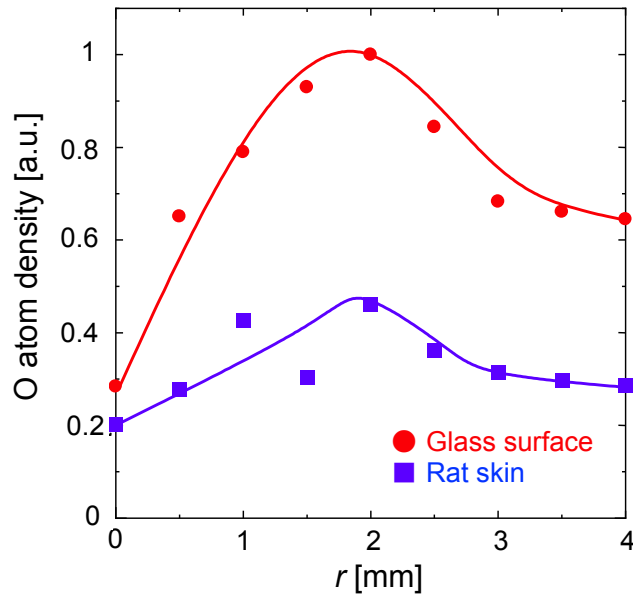


図 3.18 乾燥表面、湿潤表面近傍における O 原子密度分布。

表面の条件により、O 原子の密度分布にも変化が起こることが明らかになった。この変化の原因としては、i) OH ラジカルとの反応、ii) 放電領域の変化が考えられる。i) O 原子は、OH ラジカルとの反応により消滅する。そのため、OH ラジカルが多く生成される湿潤表面上に比べて、OH ラジカル密度の小さい乾燥表面上では O 原子と OH ラジカルの反応が起きにくく、O 原子密度が大きくなったと考えられる。ii) また、O 原子は表面近傍の O_2 が解離されることに伴い生成される。図 3.19 に見られるように、湿潤表面上では乾燥表面上と比べて表面近傍での放電領域が狭くなる。これは誘電率や導電率、表面の粗さなどに起因するものであると考えられる。

3.2.3 放電ガスの組成と O 原子密度の関係

先行研究の多くでは、O 原子による医療効果、主になん治療プロセスへの有用性を評価するために、放電ガスに O_2 を添加する手法が多く用いられてきた。しかし、ヘリウムプラズマジェットでの放電ガス組成と O 原子密度の関係は明らかになっていない部分も多かった。図 3.20 は、放電ガスに任意の量の O_2 を添加した場合の、O 原子密度を表したものである。図中の点が表すように、 O_2 添加に伴い O-TALIF 信号が強くなっていくが、1% 程度まで O_2 濃度が大きくなると O-TALIF 信号が小さくなっていくことが分かる。実際に、 O_2 濃度が 1.5% 程度まで大きくなると、プラズマジェットが消えてしまう。 $[O_2] = 0.5\%$ 程度が最も O-TALIF 信号が大きく、最適な濃度が存在するという点では、OH ラジカルと同じである。

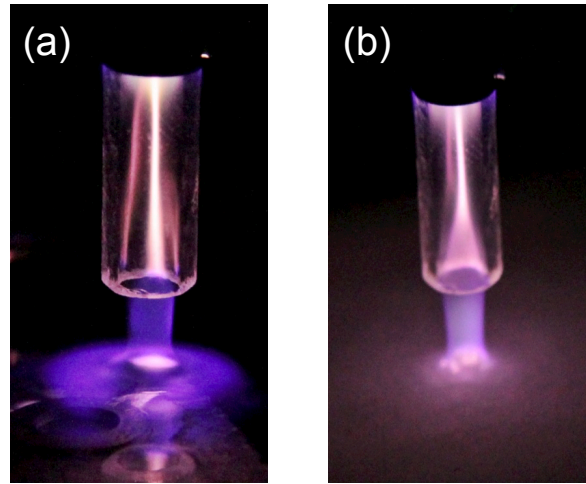


図 3.19 (a) 乾燥表面と (b) 湿潤表面にプラズマジェットが進展する際の放電の様相。乾燥表面 (a) はガラス表面を、湿潤表面 (b) には純水を含ませた多孔質のメラミンスポンジを使用。He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

3.2.4 O 密度の 2 次元分布

前節 3.1.5 と同様に、プラズマジェットが表面に進展する際の O 原子密度と空気-ヘリウム混合比の 2 次元分布を図 3.21 に示す。図 3.21 の左の分布は空気-ヘリウム混合比を表しており、右の分布は O 原子密度の 2 次元分布を表している。

O 原子の 2 次元分布から、O 原子の密度は表面近傍及びプラズマのエッジ部分で最大となっていることが分かり、その密度は最大で $1.2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ である。図 3.21 から分かるように、OH ラジカル密度の 2 次元分布とは異なり空気濃度の大きい領域で O 原子密度が大きくなっていることが分かる。O 原子の密度が最大となる領域 ($r = 2.5$ mm) 付近では空気濃度は約 5.5%、このとき $[\text{O}_2]: 1\% = 10^4 \text{ ppm}$ となる。おおよそ $1.2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3} = 50 \text{ ppm}$ であるから、O 原子密度の最大となる領域ではプラズマ中における O_2 の解離率は 0.5% 程度であると考えられる。

3.2.5 考察: O 原子の生成機構

これまでの実験結果をもとに、O 原子の生成機構を考察する。表 3.3 に示されるように、O 原子の生成の多くは O_2 の解離や O^* の反応に由来する。O 原子密度の 2 次元分布からも分かるように、 O_2 濃度の大きい領域では O 原子が大きくなっていることが分かる。これは O_2 の濃度と解離率のバランスが最も良いところで O 原子密度が最大になったと考えられる。プラズマジェットの中心部分では O_2 の濃度は 1% 程度であるが解離率は 0.1 ~ 0.5% となり、O 原子密度は小さい。

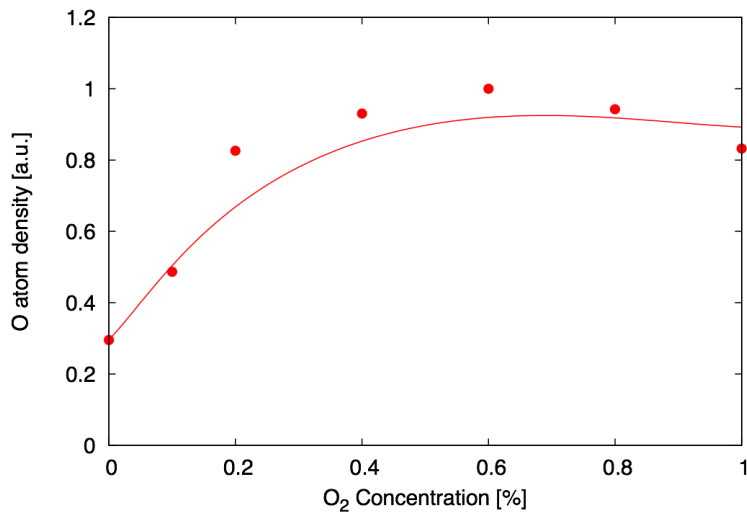


図 3.20 放電ガス中の O₂ 濃度と O 原子密度の関係。

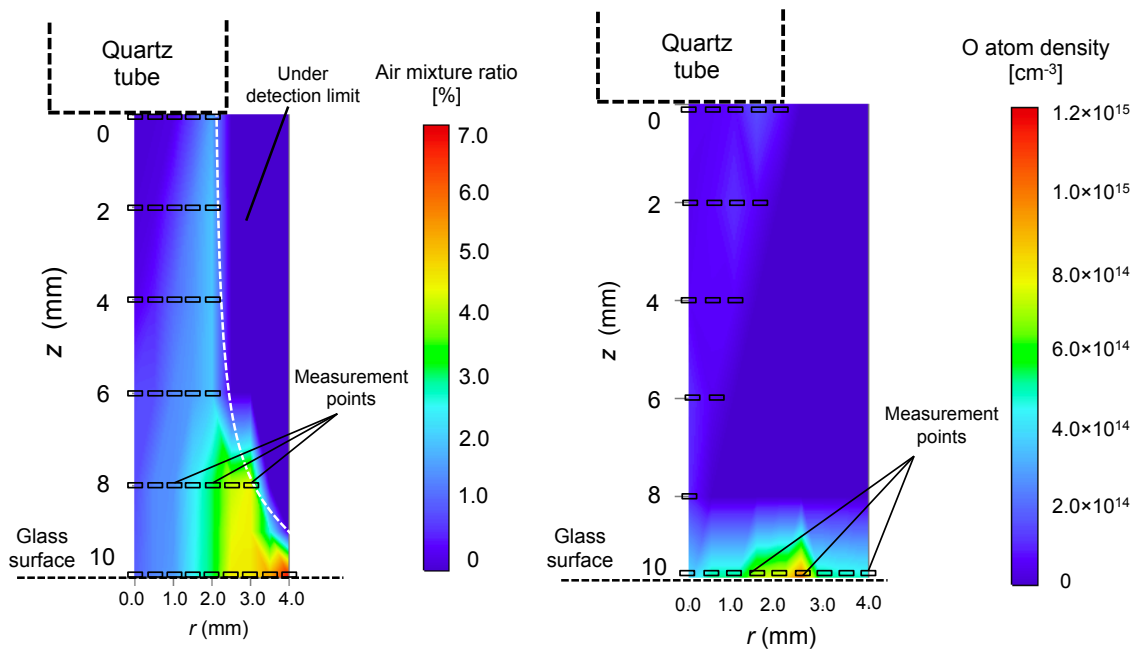


図 3.21 プラズマジェット中の空気濃度および O 密度原子の 2 次元分布。

OH ラジカル密度は中心軸上で最大となることが分かったが、表 3.3 にあるように O 原子は OH ラジカルと高速で反応し消滅する。そのため、中心軸上では OH ラジカルとの反応で O 原子密度が小さくなったと考えられる。

また、先行研究では O₃ も同様にプラズマジェットの外側の領域で密度が最大になることが知られている¹⁸⁴。表 3.3 では O 原子の生成が O₃ に由来して行われることが分かるが、同時に O 原子の消滅にも O₃ が大きく関わっている。プラズマジェットと空気の境界領域では O₂ との反応が盛

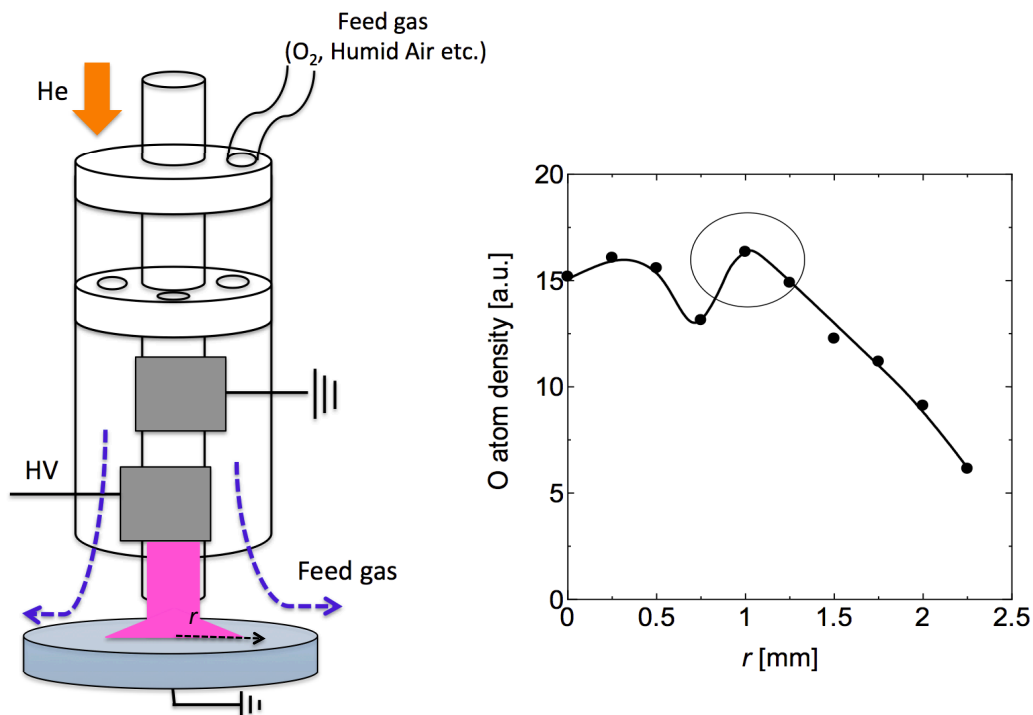


図 3.22 2層プラズマジェットを用いた際のO原子密度分布。

んになり、密度が大きくなるという機構が予想される。

O原子が周辺から混入する空気により生成されていることを確認するために、追加実験を行った。図3.22に示されるような実験系を用い、プラズマジェットを2層化した。中心軸上にはヘリウムの流れる石英管を設置し、その外側にO₂, N₂など任意のガスを流すことにより、プラズマと外気の境界部分での巻き込みを増やす事ができる。O原子がO₂の解離により生成されるのであれば、外側の層にO₂を流すことにより境界部分での巻き込みや解離を促進することが出来ると予想できる。

その際のO原子密度分布を図3.22の右側に示す。図3.22からも分かるように、プラズマと外側のガスの境界部分($r = 1 \sim 2$ mm)でO原子の密度が局所的に大きくなっていることが分かる。この結果から、外側のO₂の流れがプラズマ中に巻き込まれ、境界面付近でO₂が解離することによりO原子密度が大きくなっていると考えられる。このようなデバイスを用いれば、O原子の選択的な生成が可能となることが考えられる。

3.3 NO-LIF

NOは以前より、プラズマ医療の中でも創傷治療などに効果があると考えられていた¹⁸⁵。その一方で、NO_xなどにより生成される窒素系のイオンが近年ではがん治療などの細胞の不活性化プロセスにおいても重要な役割を果たすと考えられている。OH, Oと同様にLIF法を用いた計測から、プラズマ中におけるNOの密度分布を求め、その結果からNOの生成機構を考察した。

3.3.1 放電ガスの組成によるNO密度の変化

OH(3.1節), O(3.2節)の計測から、放電ガスの組成はプラズマ中における活性種の生成に大きく影響することが分かっている。NOは主に表3.4の反応で生成・消滅する。表3.4からも分かるように、プラズマ中でのNOは主にN原子, O原子, N₂(A)等の活性種同士の化学反応に伴い2次的な生成物として生成される。そのため、N, O原子の生成に影響をおよぼすガス組成、つまり放電ガス中のN₂, O₂濃度が大きく影響すると予想される。図3.23は、空気のごく近傍地点において、放電ガス中のN₂濃度と生成されるNO密度の関係を表したものである。

図3.23から分かるように、NOの生成量は0 ≤ [N₂] ≤ 0.2%の領域において、NO濃度が増加していることが分かる。OH, O原子の場合と同様に[N₂] ≥ 0.2%の領域ではNO密度が減少しており、放電ガス中におけるHe密度が低下すると活性種密度が減少することが分かる。[N₂] ≥ 5%ではプラズマが消失してしまうことから、N₂濃度の増加によりNO密度が減少することは、プラズマの放電強度が低下したことや、表3.4中の消滅反応が増加したことなどに起因するものと考えられる。

表 3.4 NOの主な生成, 消滅反応¹⁵⁷。

| 生成 | 消滅 |
|---|-----------------------------------|
| $N + O_2 \rightarrow NO + O$ | $N + NO \rightarrow N_2 + O$ |
| $O + N_2 \rightarrow NO + N$ | $O + NO + M \rightarrow NO_2 + M$ |
| $N + O + M \rightarrow NO + M$ | |
| $N_2(A^3\Sigma_u^+) + O \rightarrow NO + N$ | |
| $O + NO_2 \rightarrow O_2 + NO$ | |

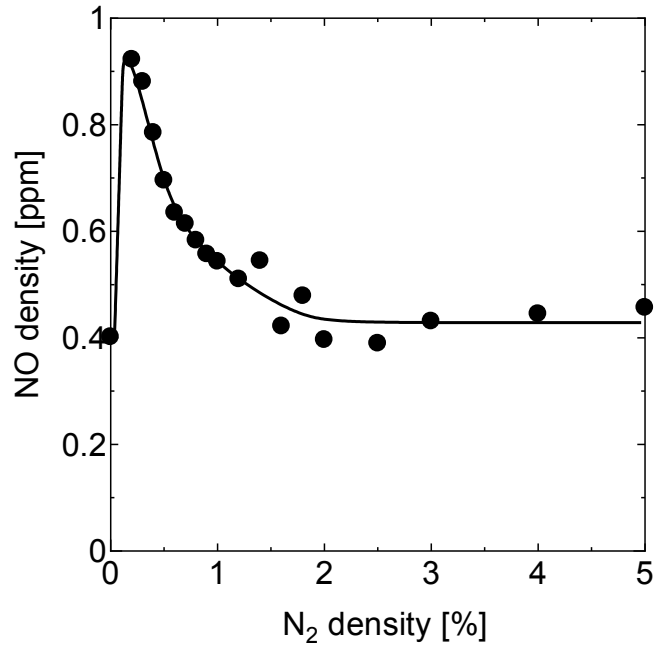


図 3.23 放電ガス中の N₂ 濃度を变化させた際の NO 密度変化。

3.3.2 NO の 2 次元分布

OH ラジカル、O 原子の計測結果からも分かるように、活性種の 2 次元分布はその生成機構を考察する際に大変重要な知見をもたらす。NO でもこれまでと同様の手法を用いて、プラズマ中の活性種 2 次元分布を用い、OH-LIF において取得した空気濃度の 2 次元分布と比較した。ヘリウム流量が 1.5 l/min, $d = 10$ mm の際の NO のプラズマジェット中における 2 次元分布を図 3.24 に示す。図の左側がプラズマ中の空気濃度、図の右側が NO の 2 次元分布である。図 3.24 より、NO はプラズマジェットの中心部では密度が小さく、ジェットの外縁部で密度が最大となっていることが分かる。NO 密度はノズル先端部分で 0.1 ppm 程度と最も小さくなりガラス板の近傍、ジェットのエッジ部分 ($r = 4.0$ mm) 付近では 7.5 ppm 程度となる。

3.3.3 NO の生成機構

ここではこれまでの計測結果を元に、NO の生成機構に関して考察する。図 3.23 に示される結果から、NO は N₂ や N との反応に由来して生成されていると考えられる。また、NO の 2 次元分布と空気濃度分布と比較しても、空気濃度の濃い部分で NO 密度が大きくなっていることから、NO は N₂ など空気中に含まれる分子により生成することが分かる。しかしながら、主要な分子 (H₂O, O₂) の解離に伴う OH ラジカルや O 原子の生成とは異なり、NO は N 原子や O 原子の化学

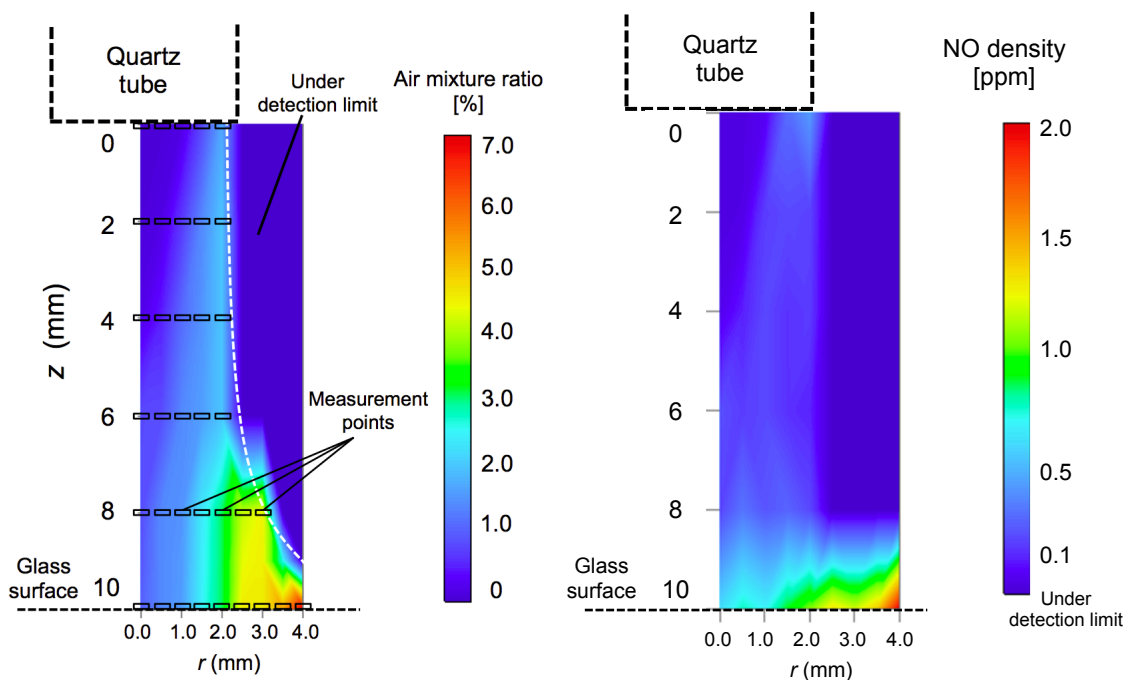


図 3.24 プラズマジェット中の空気濃度および NO 密度原子の 2 次元分布。

反応に伴い生成や消滅する。そのため、 N_2 や O_2 を放電ガスに添加することで NO の原料となる N 原子や O 原子が増加し NO の生成が促されることが予見される。

NO の計測実験を行う過程で、ほとんど空気の入っていないと考えられる石英管の内部においても NO が検出された。OH のように実験系に含まれる不純物が生成に影響していることも考えられるため、以下の 2 つの条件を変化させ、石英管内部における NO の計測を行った。

- 1). 実験開始時 (0 hrs) からヘリウムを流した時間
- 2). 継手の種類 (真空用ハイグレードと安価なプラスチック継手)

これら 2 つのパラメータはともに、ジェットのノズル先端に至るまでに混入した不純物の影響を評価することを目的としている。真空用ハイグレード継手には Swagelock を、安価なプラスチック継手には PISCO チューブフィッティングを用いた。1) の実験条件に関しては、ヘリウムを流した時間が長ければ配管中に存在する空気濃度は徐々に小さくなると考えられる。また、2) の実験条件に関しては、配管の途中における空気の混入が存在するのであれば、真空用のハイグレード配管を使用したほうが混入する空気を減らすことが出来る。

その結果を図 3.25 に示す。図 3.25 の横軸に He を流し続けた時間 (0 ~ 90 min)、縦軸に NO の密度 [ppm] を示す。赤いプロットは安価な継手を使用した際、青いプロットは真空用の継手を使用した際の NO の密度変化の様子を表している。図より、真空用の継手を使った際には、NO 密度は安価な継手に比べて半分以下に減少している事がわかる。また、どちらの継手を使用した際

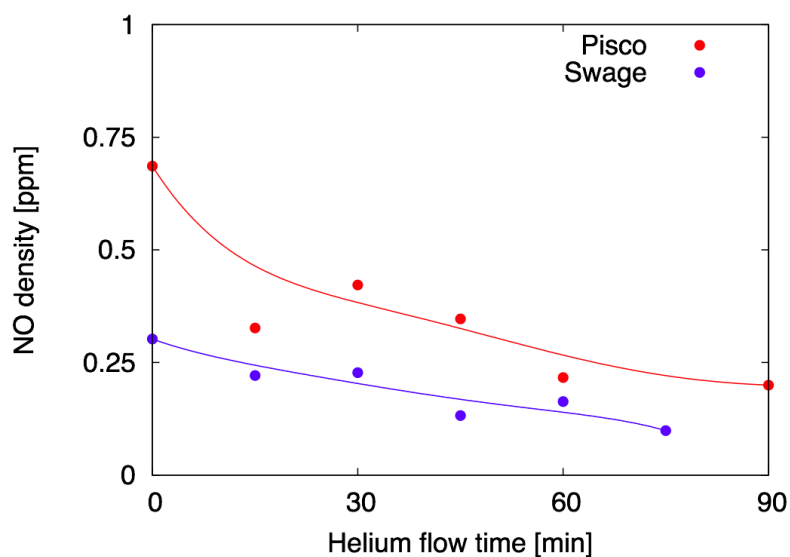


図 3.25 真空用継手とプラスチック継手を使った際の石英管内部における NO 密度の変化。

にも、NO の密度はヘリウムを流した時間に比例して減少している。これより、NO の生成に関して、継手などから混入した微量の空気や、配管内に存在する残存空気が影響していることが考えられる。実際のプラズマ医療応用では、病院など医療施設で使用されることが想定される。このような実際の応用時には、使用するまでの時間などを微細に調整することは難しいため、これより、NO のような RONS がプラズマプロセスにおいて大きく影響する場合には、実験系や実験を始めてからの時間や条件も考慮する必要がある。

3.4 活性種のフラックス

これまでの計測結果から、OH, O, NO の生成機構や典型的な条件における密度分布を求めることが出来た。それらの計測結果を元に、各種活性種が表面に供給される量つまりフラックスを算出する。図 3.26 に、活性種の供給モデルの模式図を示す。上流 (石英管内部) で放電ガス中の不純物に由来し生成された活性種は、ヘリウム流により表面に供給される。その一方で、表面近傍で O_2 や H_2O の解離により生成された活性種も同様にヘリウム流で表面に供給される。表面近傍での密度は放電パルス間でほとんど一定であるため、それらが全てヘリウム流により供給されると考えると、単位時間あたりの供給フラックスは、

表面近傍での密度 $[cm^{-3}] \times$ ヘリウム流速 $[cm/s]$

で求めることが出来ると仮定できる。今回フラックスを求めたのは、典型的なヘリウムプラズマジェット照射条件と考えられる、He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm, 石英管内径: 4 mm であり、単位時間、単位面積あたりに流れるヘリウムの体積はヘリウム流速 (2 m/s) \times 活性種の広がる面積である。

図 3.27, 3.28 および 3.29 にそれぞれ OH, O, NO のフラックス分布図を示す。フラックス分布図の x, y 軸はそれぞれ図左側の写真中の x, y 軸に対応する。前述のように、プラズマの進展は

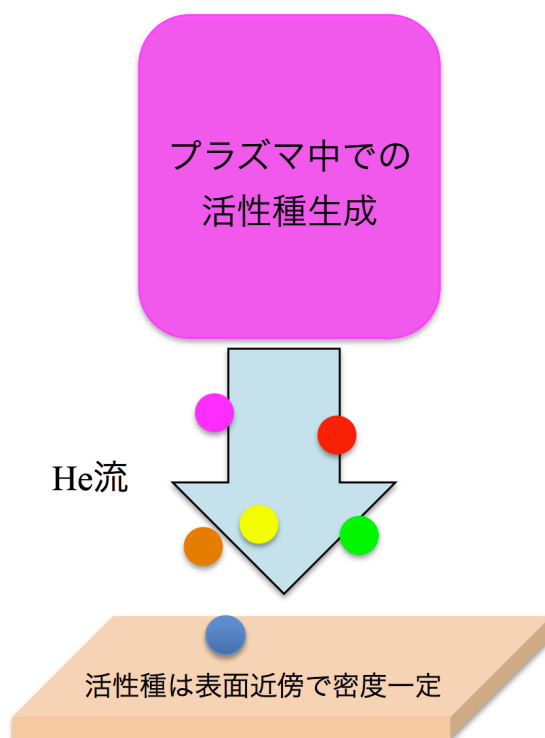


図 3.26 プラズマジェットによる活性種の供給モデル。

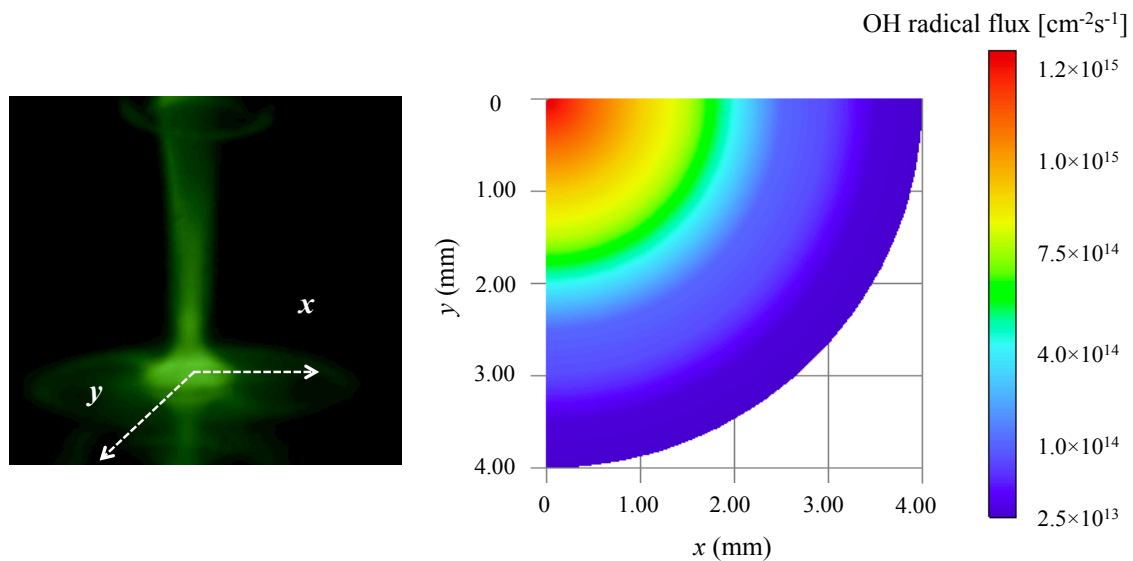


図 3.27 プラズマジェットによる OH のフラックス分布図。

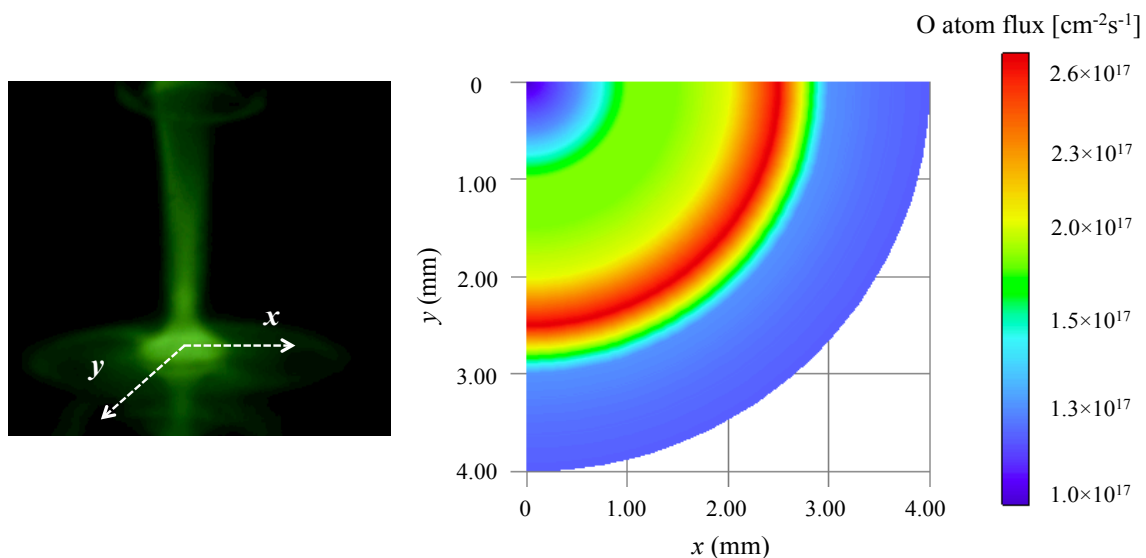


図 3.28 O 原子のフラックス分布図。

計測時間である 50 s の時間では、表面近傍でほとんど均一な進展であると仮定できる。そのため、図 3.27, 3.28 および 3.29 の値は、 x 軸方向への分布を計測し、軸対称の仮定のもと、コンタープロットを用いて 2 次元分布を取得した。OH ラジカルのフラックスはプラズマジェット中心軸上で最大となり、軸から外側に向かうにつれて小さくなっていることが分かる。それに対し O 原子のフラックスは異なった分布を示す。O 原子のフラックスは $r = 2.5$ mm 付近で最大となり、そこから離れるにつれて減少する。計測した半径 4 mm 以内の領域では、OH ラジカルのフラックスは $2.5 \times 10^{13} \sim 1.2 \times 10^{15} [\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ の範囲であるのに対し、O 原子のフラックスは $1.0 \times 10^{17} \sim 2.6 \times 10^{17} [\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ の範囲である。

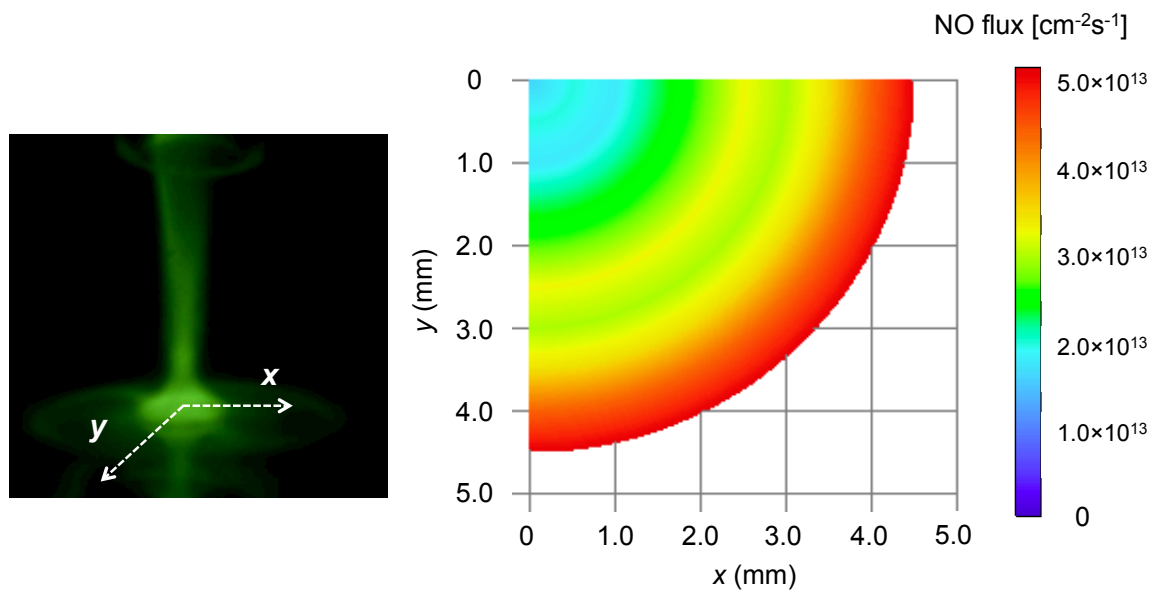


図 3.29 NO のフラックス分布図。

図 3.29 のフラックスは、OH ラジカルや O 原子のフラックス分布図と異なり、単調に軸からの距離に対して NO が増加していることが分かる。フラックスの値は $1.0 \sim 5.0 \times 10^{13} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ である。

このように典型的な実験条件において、層流を仮定した条件下でのフラックスの近似値を求めることに成功した。これは今までにない計測結果であり、活性種の供給量を求める上で大変重要な知見であるが、その一方でフラックスの分布図は種々の実験条件により異なることもこれまでの実験で明らかになっている。そのため、動物実験や細胞実験を経てがん治療/ 創傷治療/ 殺菌などの各種プロセスにおいて最適な実験条件を探ることが肝要である。生物実験を通して得られた活性種の供給量により細胞死/ 細胞増殖の閾値を実験的に求めるなどの定量的な評価が可能となり、同時に $\frac{\text{細胞死}}{\text{特定の活性種 A の供給量}}$ を考えることで、活性種 A の医療効果を評価することが出来る。

例えば図 3.30 は、細胞実験でよく用いられる生理食塩水 (PBS) とレーザー計測などで水面として用いられる純水の表面にそれぞれプラズマジェットが進展する場合の ICCD 画像である。画像からも分かるように、PBS に進展する際にはプラズマの発光が大きくなっていることが分かる。この場合におけるそれぞれの表面への NO 供給量を図 3.31 に示す。純水表面にプラズマが進展する場合と PBS 表面に進展する場合を比較すると、PBS 表面へは純水表面に対して 3 倍ほど多い NO が供給されていることが分かる。そのため動物実験の結果を評価するためには生きた動物の表面近傍での計測や、細胞実験では同じ培地や膜厚などの条件で計測実験を行うことにより、よ

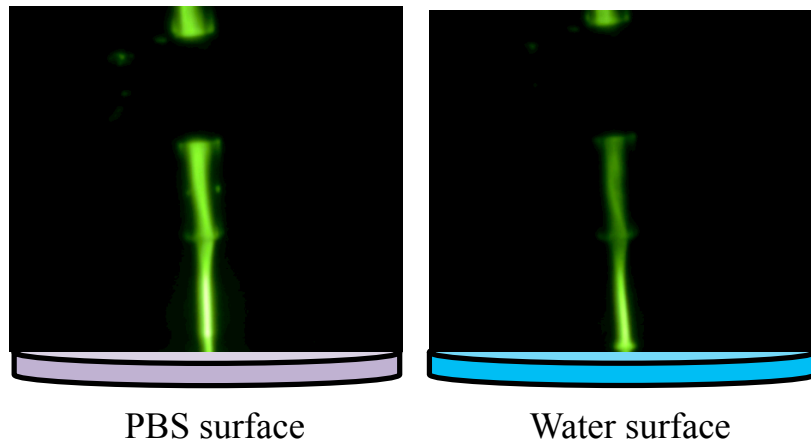


図 3.30 PBS と純水にプラズマジェットが進展する際の ICCD 画像。

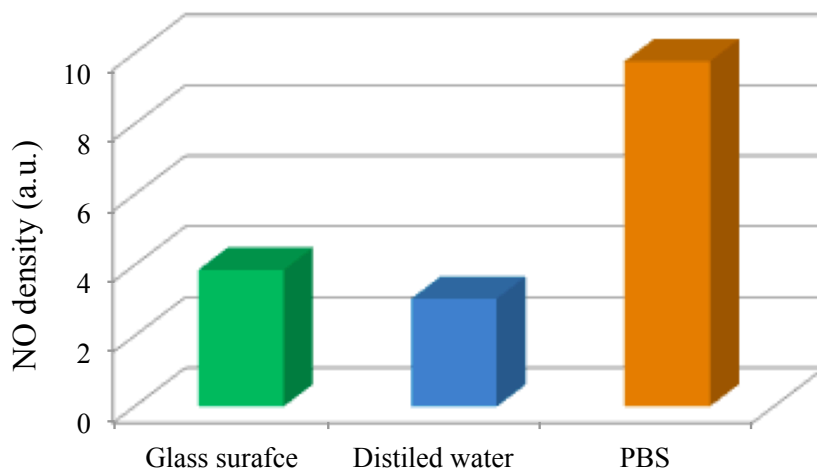


図 3.31 各表面への NO の供給密度。

り精度の高い定量的な評価が可能となる。

また、供給フラックスの見積りに関しても、現在の供給モデルではヘリウム流により全ての位置で鉛直に表面近傍の活性種が供給されると仮定している。プラズマジェット中心軸上ではヘリウム流の鉛直成分が大きいですが、径方向に遠ざかるにつれて、ヘリウム流の水平方向成分が大きくなる。これは図 3.14 にも示される結果からも予想できる。そのため、より詳細なフラックスの分布図を求め供給量の見積り精度を上げるためには、表面近傍での流体モデルなどから、実際に表面近傍での活性種がどの程度供給されているかを計算する必要があると考えられる。

Natalia らの先行研究では、数値計算シミュレーションを用いて誘電体バリア放電 (DBD) により供給される活性種のフラックスを求めている。ギャップ間距離 1 mm, 空气中, 印加電圧 40 kV の条件で表面に進展する際には、O, O₃, O₂(¹Δ), OH, H₂O₂, NO のフラックスはそれぞれ以下

のようになる¹⁸⁶。

- O: $0.1 \sim 1.6 \times 10^{15} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$
- O₃: $1 \sim 4 \times 10^{19} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$
- O₂(¹Δ): $2 \sim 8 \times 10^{18} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$
- OH: $0.3 \sim 1.5 \times 10^{17} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$
- H₂O₂: $0.1 \sim 0.8 \times 10^{16} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$
- NO: $1 \sim 8 \times 10^{18} \text{ [cm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]}$

O, OH のフラックスに関しては、本研究で求めたプラズマジェットによる供給量と近い値であるが、空気中における DBD では、ヘリウムプラズマジェットよりも多くの NO が供給されていることが分かる。

一方 Murakami らの先行研究ではプラズマ中に混入した空気の影響から、OH ラジカルや O 原子、NO の密度計算を行っている¹⁸⁷。これは 0 次元での空気混合比と含有水分量 (relative humidity) の影響を評価したものであるが、当研究における計測点での OH, O, NO の密度と良い一致を示している。また、O 原子の生成において電子衝突が主要なパスであることや、水分量と OH ラジカルの関係なども、本研究と良い一致を示している。

第4章 放電極性と活性種密度の関係

前章までの結果から、プラズマジェットが何らかの表面に進展する際、表面の状態、印加電圧、流量、照射対象までの距離など、様々なパラメータによって放電の進展や活性種の密度分布が変化することが明らかになった。プラズマジェットの放電においては、これまでそのほとんどがRF放電、交流高電圧 (kHz)、正極性パルス高電圧 (kHz) などが用いられてきたが、負極性パルスを用いた放電はほとんど例がなかった。大気圧ヘリウムプラズマジェットの基礎的な放電機構であるストリーマ理論では、放電極性によって活性種密度や放電進展特性などが変化することが明らかになっている¹⁸⁸⁻¹⁹⁰。そのためプラズマジェットにおいても、放電極性による放電進展の変化と活性種生成への影響を評価することで、基礎的な物理機構の解明に近づくことが期待される。

先行研究では、放電パラメータによる plasma bullet 速度や進展の距離、及び進展の機序などが多く報告されている¹¹⁷。また、数値計算を用いた plasma bullet 進展のシミュレーションも多く存在し、plasma bullet の進展の機序や時間的な電子密度、電子温度の変化といった大変重要な結果が報告されている^{191,192}。しかしながら、3章の LIF 計測結果からも分かるように、対象表面や放電パラメータなどが変化すると活性種の密度も大きく変化する。放電極性を変化させた際の進展の変化もこれまでも先行研究はあるが、そのほとんどがプラズマジェットが大気中に進展するものであり、表面への進展を想定したものではなかった¹⁹³⁻¹⁹⁵。実際に湿った表面など医療応用に近い条件では、極性を変化させた際にどのような進展をするのかはあまり知られておらず、前章の LIF 計測結果と合わせてその影響を議論する必要がある。

本章では、プラズマジェットが表面に進展する際に、放電極性を変化させ LIF 計測実験を行った。また、放電極性が活性種生成に与える影響を考察するために、LIF 計測実験でも取り扱ったような照射に関する各種パラメータを変化させ、放電進展の変化を ICCD カメラを用いて計測した。

4.1 放電極性と活性種生成の関係

前章までと同様に、活性種の表面近傍の密度に着目する。極性を正極・負極性と変化させた際の OH, NO, O 原子の密度変化から、特定の活性種を選択的に生成する可能性を考察する事ができる。前章と同じ条件において、OH, O 原子を対象とした LIF 計測実験を行った。計測領域は表

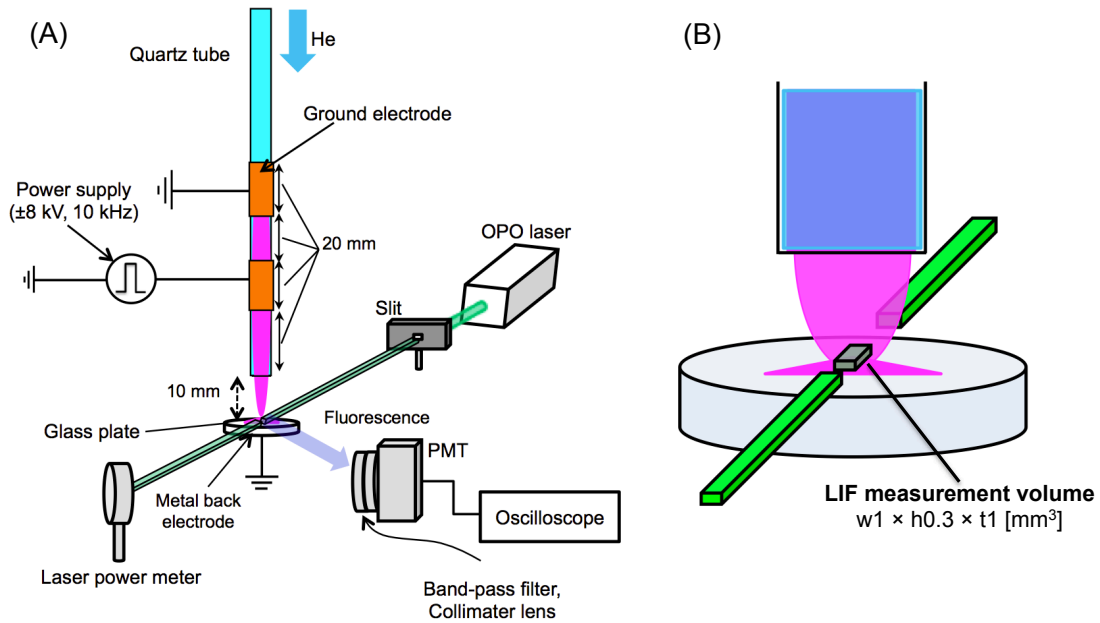


図 4.1 (A) LIF 実験系模式図および (B) LIF 計測領域の図。

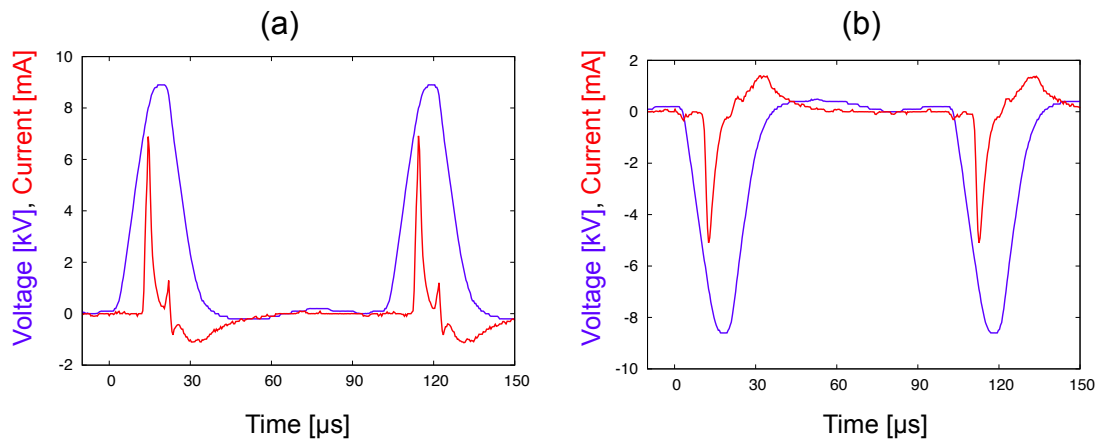


図 4.2 正極性、負極性放電の電圧－電流波形。

面の近傍における径方向の密度分布である。LIF 計測の実験系模式図および計測領域を図 4.1 に示す。プラズマジェットが鉛直下向きに進展する際、ノズル先端と表面の間での plasma bullet の進展を計測した。ノズル先端と表面との距離は 10 mm とし、ヘリウム流量は 1.5 l/min とした。ガラス板は厚さ 5 mm, 半径 4 cm のものを用い背後には接地電極を設置した。図 4.2 は、プラズマジエットの放電における電圧－電流波形である。印加電圧は ± 8 kV、パルス幅は $25 \mu\text{s}$ 、周波数は 10 kHz とし、正極性と負極性のパルスを用いた。図 4.2 より、正極性・負極性パルス印加時ともに、パルスの立ち上がり時および立ち下がり時において放電電流が流れていることが分かる。ICCD による画像計測にて詳細は後述するが、この 2 回の放電パルス観測時に放電が起こって

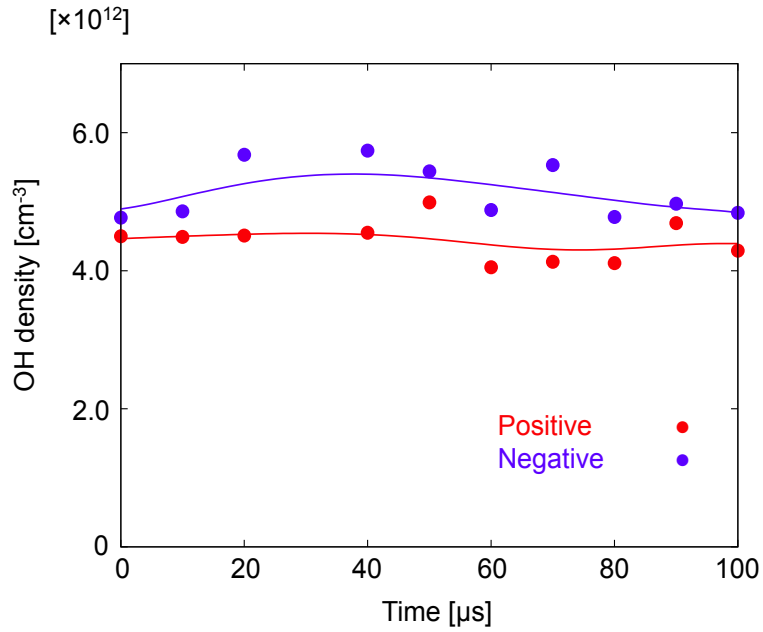


図 4.3 正極性、負極性放電時の OH 密度の時間変化。±8 kV, 10 kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

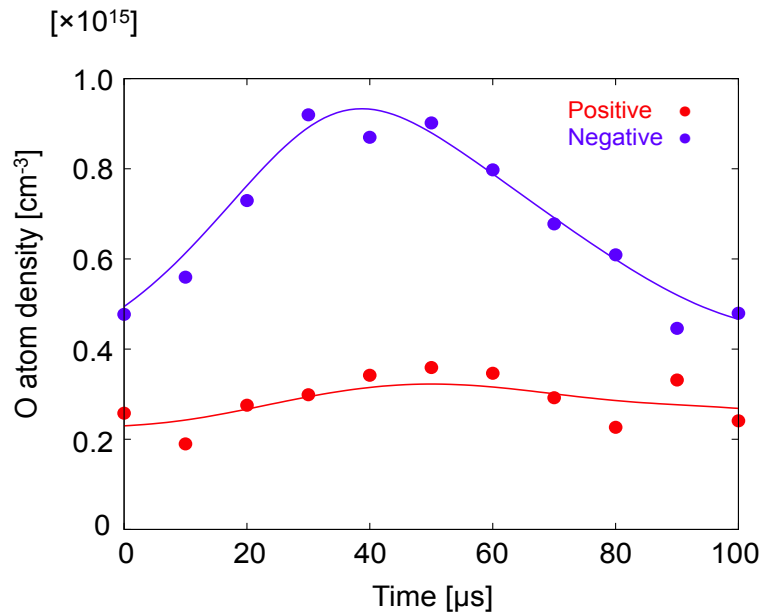


図 4.4 正極性、負極性放電時の O 原子密度の時間変化。±8 kV, 10 kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

ることが予想される。また、LIF 計測及び ICCD カメラによる画像計測においては、図 4.2 中におけるパルス立ち上がり時の 0 [s] を基準とした。

正極性・負極性パルスを用いて放電を起こした際の、OH および O 原子密度の計測結果を図 4.3, 4.4 に示す。図 4.3 に示されるように、放電極性の変化に伴う OH ラジカルの密度変化は観測され

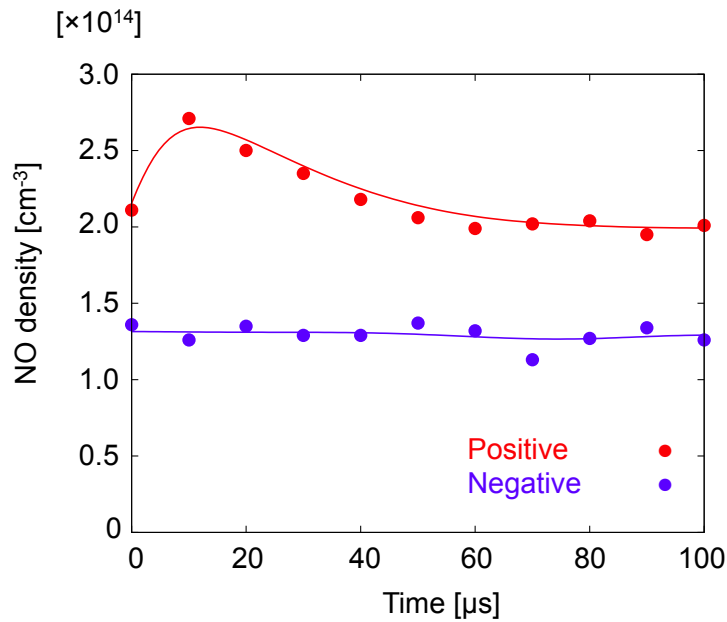


図 4.5 正極性、負極性放電時の NO 密度の時間変化。±8 kV, 10 kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

なかった。また、両極性において OH 密度の時間変化は観測されなかった。これは前章の計測結果とも矛盾しない。それに対し、図 4.4 の結果では、放電極性が負極性パルスの場合正極性に対し O 原子の密度が 3 倍ほど大きくなっていることが分かる。また、O 原子密度は $0 \leq t \leq 30$ の時間において、増加しその後密度が減少していることが分かる。正極性の場合には O 密度の時間的な変化は小さく、負極性において顕著な傾向といえる。

図 4.5 に、放電極性を変化させた際の NO 密度の時間変化を示す。図 4.5 から、プラズマジェット中心軸上では NO 密度は時間的にあまり変化していないが、正極性放電においては $t = 10 \mu\text{s}$ で NO 密度が増加していることが分かる。

放電極性を変化させた際には、正極性放電の場合、負極性放電に比べて NO 密度は 1.5 倍程度増加している事がわかる。NO は前節 3.3 でも述べたように、プラズマ中における N 原子や O 原子の生成に伴い、化学反応を経て生成される。O 原子が増加した場合には、NO も増加する事が予想されるが本実験結果からはむしろ逆の傾向が観測される。NO は N 原子の反応でも生成されるが、正極性放電では N 原子が増えるなど、他の活性種密度が増加している可能性が考えられる。他の活性種の計測データが少ないため、詳細な生成機構の議論は難しいが、極性により活性種密度の変化が起こることが分かる。

4.2 正極性・負極性放電における印加電圧と活性種密度の関係

前節の計測結果から、極性を変化させた際、O原子やNOの密度が変化することが分かった。この結果に基づけば、O原子を選択的に生成するには負極性放電が効果的であり、NOを効果的に生成するには正極性放電のほうが有効であるといえる。これらの知見は、例えばO原子の医療プロセスにおける効果をOHラジカルの量を変化させることなく評価することが出来るため、医療プロセスの基礎機構解明に重要な知見である。NOに関しても同様に、NOが医療プロセスにおいて重要な場合には、正極性放電を用いることで効率的なプロセスを行うことが出来ると考えられる。先行研究においては、RF放電プラズマジェットの入力パワーに関して活性種密度が増加することは確認されているものの、kHzの高電圧を用いたヘリウムプラズマジェットでは、印加電圧の影響は定量的に評価されていなかった^{86,140,196}。本説では、正極性・負極性放電において印加電圧の影響を、活性種の密度という観点から評価する。

図4.6は、正極性・負極性放電におけるプラズマ中におけるOH密度と印加電圧の関係を表したものである。図4.6に表されるように、正極性・負極性放電ともに印加電圧の変化によるOH密度の変化は観測されなかった。次に、正極性・負極性放電におけるプラズマ中におけるNO密度と印加電圧の関係を図4.7に示す。正極性放電においては、印加電圧の変化によるNO密度の変化は観測されなかったが、負極性放電ではNO密度は印加電圧の増加に伴い増加していることが

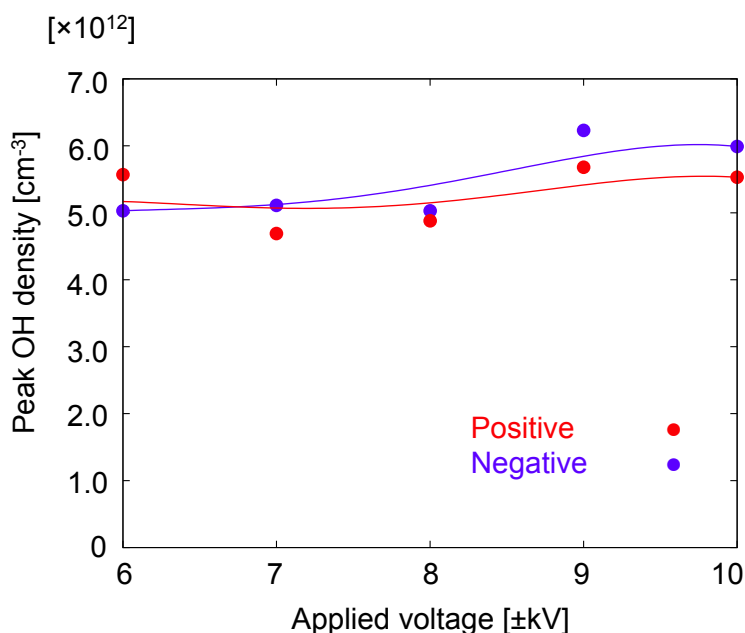


図 4.6 印加電圧と OH 密度の関係。正極性、負極性共に放電周波数は 10kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

分かる。図 4.8 は、O 原子密度と印加電圧の関係を、正極性と負極性でそれぞれ計測したものである。図 4.8 から、正極性放電の場合には印加電圧が大きくなっても O 原子密度はほとんど変化していないのに対し、負極性放電の場合には電圧が大きくなるに伴い O 原子密度が大きくなっていくことが分かる。電圧が 6 kV を下回ると放電が起こらなくなるため、比較の範囲は 6 ~ 10 kV であるが、負極性の -6 kV の場合に比べて -10 kV の場合には O 原子密度が 4 ~ 5 倍程度まで大きくなっていることが分かる。このように、印加電圧により活性種密度が変化するが、それは活性種の種類や極性に関係するものであることが分かる。

4.3 ICCD カメラを用いたプラズマ進展の計測

4.3.1 放電極性と放電進展の関係

これまでの実験結果から、放電極性による活性種の密度分布の変化は、放電極性による放電進展の変化に伴うものであると推察できる。表面に進展する plasma bullet の計測例と同じく、放電極性とプラズマ進展の関係もこれまであまり詳細には議論されてこなかった。本説では、ICCD カメラを用いた画像計測の結果から、放電極性による放電進展への影響を評価する。

図 4.9 は、ICCD カメラ (Andor iStar 334T) を用いた放電進展の計測実験系の模式図である。

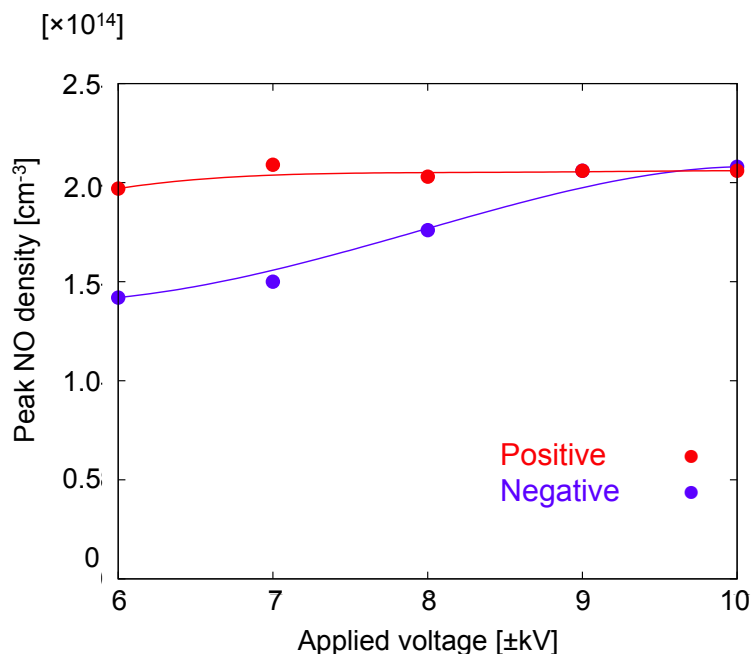


図 4.7 印加電圧と NO 密度の関係。正極性、負極性共に放電周波数は 10kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

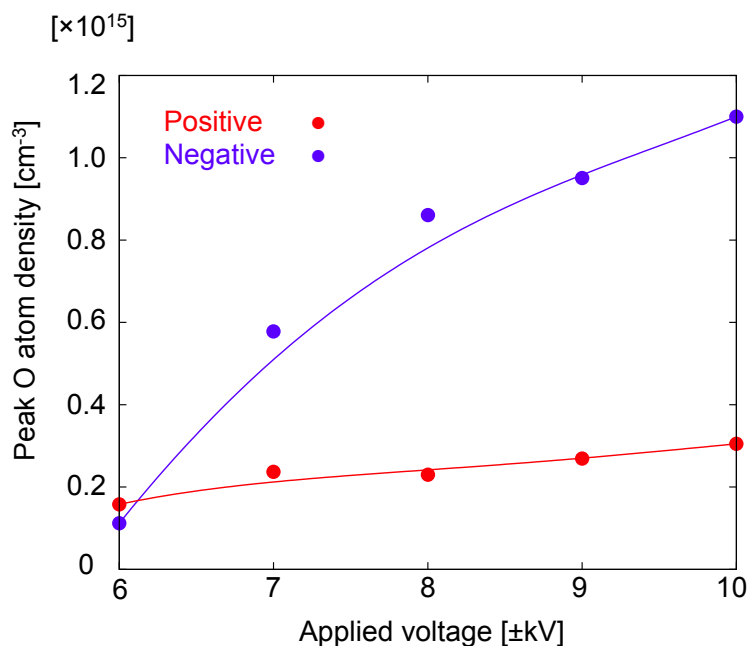


図 4.8 印加電圧と O 原子密度の関係。正極性、負極性共に放電周波数は 10kHz, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

ICCD はプラズマジェットを中心軸から 200 mm 離れた地点に設置し、焦点距離を無限大としたカメラのレンズ先端に平凸コリメータレンズ ($f = 200$ mm) を設置した。プラズマジェットの進展する表面は、ガラス表面、純水、生理食塩水 (PBS)、鶏肉などの表面を用いた。生体を模するための鶏肉は市販のものを用い、サイズは約厚さ 1 cm × 幅 5 cm × 長さ 10 cm のものを用いた。純水や PBS は、円柱形の穴の空いたプラスチック板を用いた。円柱形の穴の大きさは深さ 3 mm × 半径 2 cm、底面の厚さ 3 mm のものを用いた。

まず最初に、ガラス表面にプラズマジェットが進展する際のプラズマの進展を観測した。図 4.10 にガラス表面への進展の様子を示す。図よりプラズマの進展は、

- (1) Plasma bullet がノズルから飛び出す。
- (2) そのまま表面に到達する。到達時には発光が強くなる。
- (3) 表面に沿ってストリーマ状の沿面放電が進展する。
- (4) ノズル近傍での 2 次発光が起こる。

といった進展の機序が観測されている。

これは針 - 平板間でのストリーマ放電における機構に似ており、plasma bullet の進展がストリーマ理論で説明できることを直感的に示している。

また、図からヘリウム流量が大きい際には沿面放電の範囲が広がることやストリーマの径が

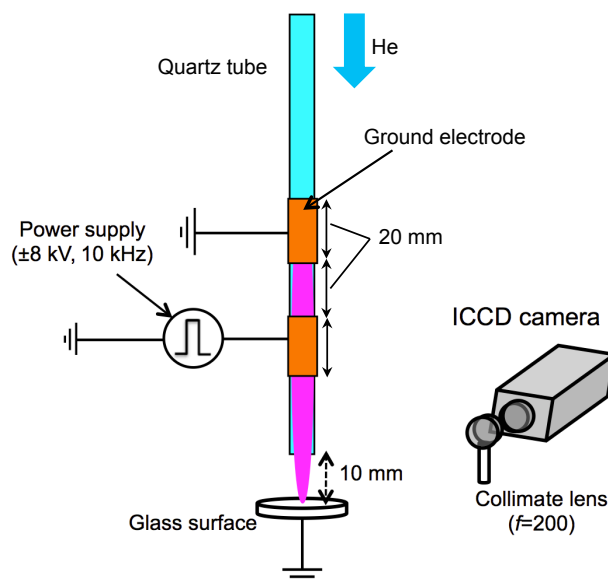


図 4.9 ICCD カメラを用いた放電進展の計測実験系模式図。

大きくなる (plasma bullet の径が大きくなる) ことも分かる。ヘリウムの流量が関係して 2 次発光の強さや発光のタイミングが変化しているが、放電のジッターが 500 ns ほどあり、それに起因すると考えられる。また、先行研究ではヘリウム流量 (流速) が大きくなりすぎると plasma bullet の速度が遅くなることが分かっており、これも計測タイミングのズレに影響すると考えられる。

前章の OH, O 原子の LIF 計測結果では、ヘリウム流量が大きくなるにつれて活性種の密度分布が変化していた。ICCD カメラによる放電一回分の観測 (図 4.10 の (E)) でも流量が 1.5 l/min の時に比べて 6.0 l/min の時には表面近傍での発光がリング状となっていることが分かる。ヘリウムプラズマジェットは、空気-ヘリウム混合領域で発光するが、ヘリウム濃度が 0.1% 以下の領域や 40% 以上の領域では発光が弱くなり観測されなくなる¹⁷³。そのため、図 4.10 に見られるようなリング状の放電画像は、もともとリング状の plasma bullet が、流量が増えるに伴い中心での空気濃度が低くなりリング状を維持したまま表面に到達することによるものであると考えられる。

図 4.11 に、正極性・負極性パルスを用いて放電した際、プラズマジェットがガラス板に進展する場合の進展の ICCD 画像を示す。図 4.11 に示されるように、正極性放電と負極性放電では以下のような進展の違いが見られる。

- ▷ 1 回目の発光ピークの形状: 正極性ではストリーマの進展に伴う筋状の沿面放電が、負極性ではグロー様の沿面放電が見られる。
- ▷ 放電後約 20 μs に見られる 2 回目の発光強度: 負極性のほうが発光強度が大きい。
- ▷ 放電後約 10 μs に見られる 1 回目の発光強度: 正極性のほうが発光強度が大きい。

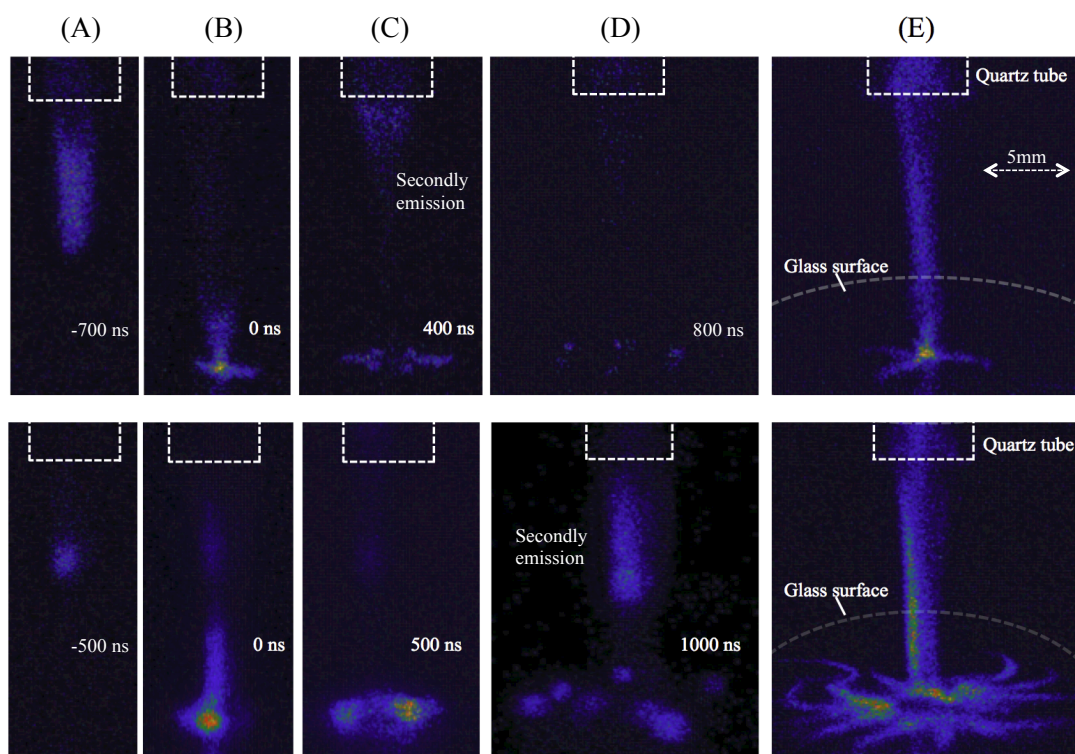


図 4.10 ガラス表面への plasma bullet の進展 ICCD 画像。(上列) He: 1.5 l/min, (下列) He: 6.0 l/min. (A) 電流パルスピーク前; (B) 電流パルスピーク地点; (C) 電流パルスピーク後; (D) 電流パルスピーク後; (E) 放電 1 回の発光。(A) ~ (D) 露光時間: 50 ns, (E) 50 ns.

放電のパルス幅、電圧、周波数などのパラメータは同じであるものの、放電進展には大きな変化が見られるという点で興味深い結果である。このような放電様式の変化はバリア放電でも典型的に見られる¹⁹⁷。先行研究では、1次放電により生成されたガラス表面の電荷により、放電パルスの立ち下がりによる2次放電が起こったと報告されており、本研究でも同様の現象が起こっていると考えられる¹⁹⁸。次節では、進展の変化に伴う活性種の生成量の変化に関して報告する。

4.3.2 表面の状態とプラズマ進展の関係

前章の結果に示されるとおり、プラズマジェットの進展する対象表面の水分量は活性種の生成機構に大きく影響する。実際の医療応用における活性種の生成機構や量を考察するためには、それらの条件における plasma bullet の進展機構を考察する必要がある。ここでは、プラズマジェットが市販の鶏肉や純水といった湿った対象に進展する際の plasma bullet の進展を ICCD カメラ

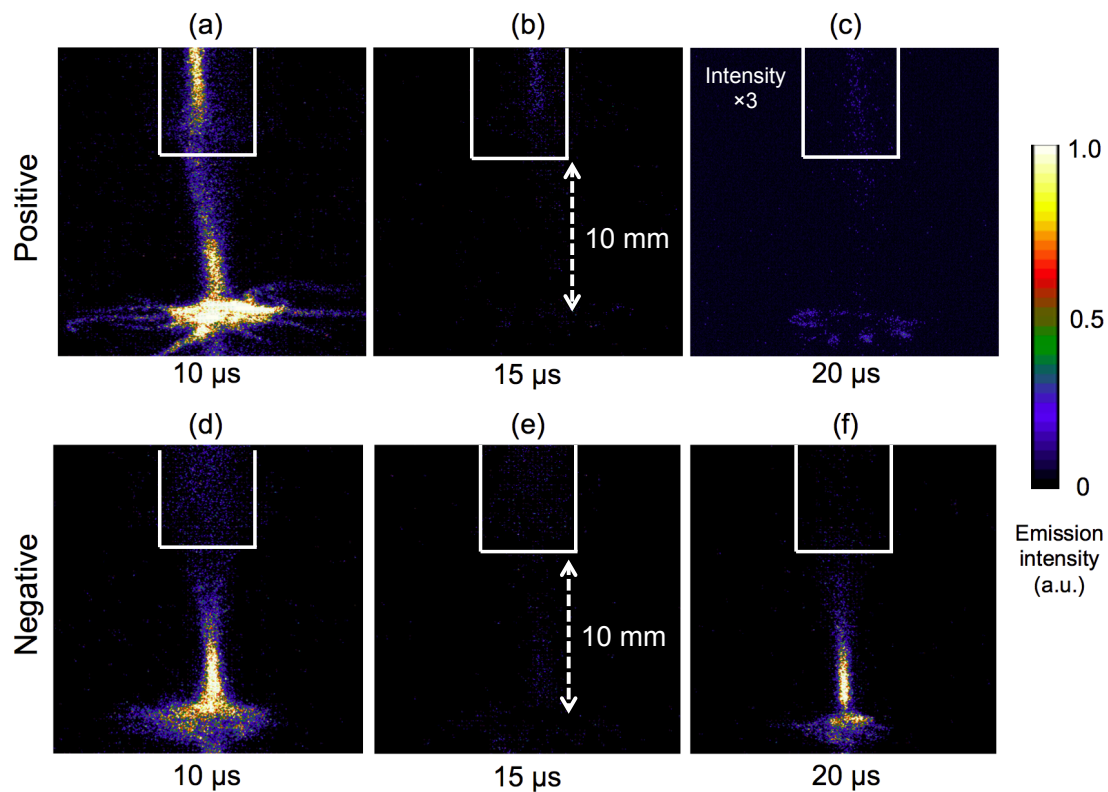


図 4.11 印加電圧を正極性、負極性と変化させた際の plasma bullet の進展 ICCD 画像。(a) 正極性での 1 次放電; (b) 放電間; (c) 正極性での 2 次放電; (d) 負極性での 1 次放電; (e) 放電間; (f) 負極性での 2 次放電。

にて計測した。

図 4.12, 4.13 に鶏肉の表面、及び水の表面への plasma bullet の進展の ICCD 画像をそれぞれ示す。図 4.12 から鶏肉の表面に進展する際にはガラス表面への進展と比較して以下のような変化が見られる。

★ ストリーマ状の沿面放電が観測されなくなる。

★ 発光強度が弱くなり、進展の範囲が狭くなる。

表面近傍での発光が強くなる要因としては、鶏肉の表面はガラス表面と比較して導電率が高くプラズマが強くなったためと考えられる。また、沿面放電の進展は絶縁物表面で起こるため導電率の大きい湿った鶏肉の表面上では沿面放電が進展しなくなったと考えられる。

純水の表面への進展をガラス表面への進展と比較すると以下のような変化が見られる。

★ 沿面放電の進展が観測されなくなる。

★ Secondary emission(2 次放電) が観測されなくなる。

一般的に、純水と人間の皮膚の抵抗は共に 100 kΩ 程度である。しかし、鶏肉の表面には水分

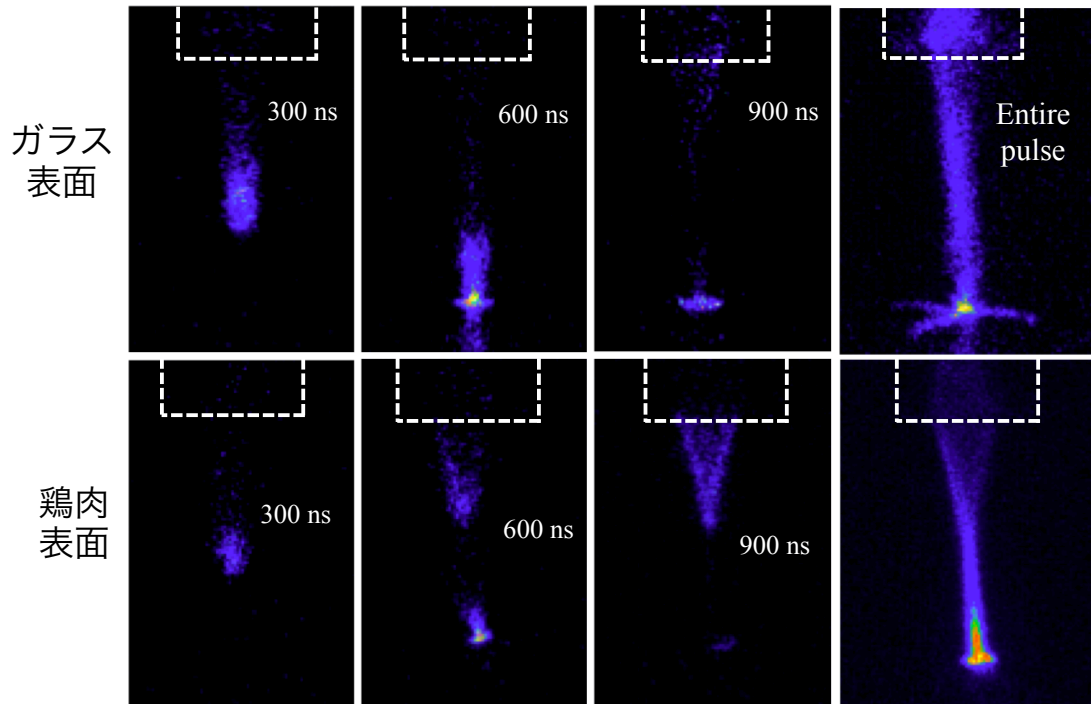


図 4.12 ガラス表面 (上列) および鶏肉の表面 (下列) にプラズマジェットが進展する際の plasma bullet の進展 ICCD 画像。He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

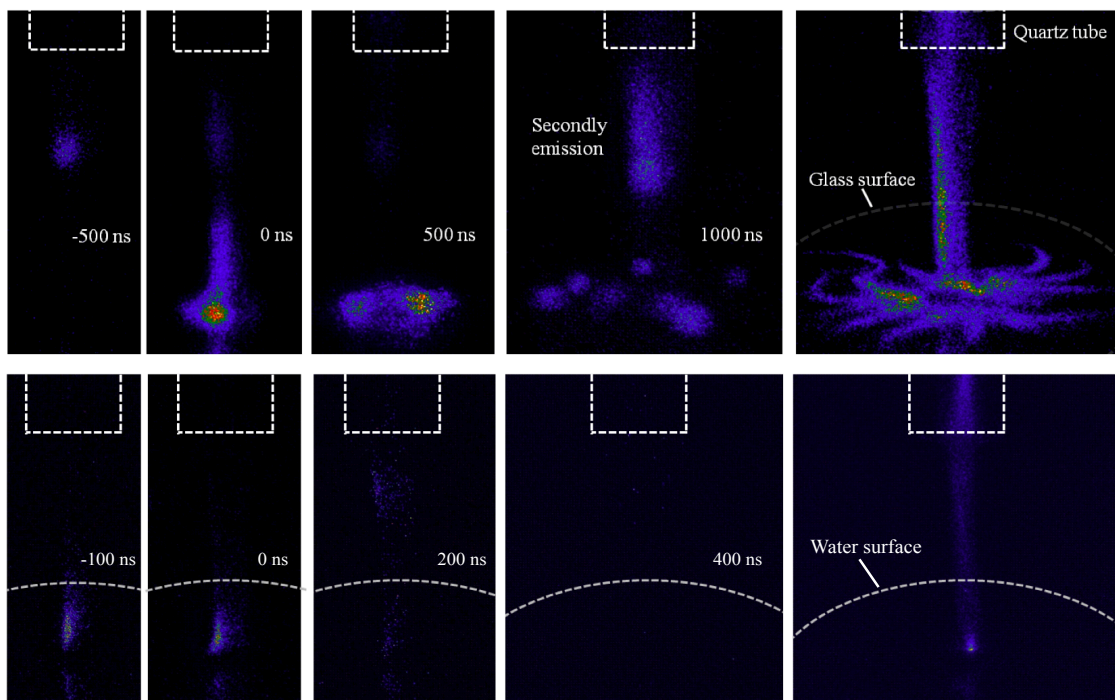


図 4.13 ガラス表面 (上列) と純水表面 (下列) への plasma bullet の進展の様子。露光時間 50 ns, He: 1.5 l/min, $d = 10$ mm.

が多く存在し、その水分は不純物を多く含んでいるため導電率は純水よりも大きくなると考えられる。このことから、沿面放電の進展に加え secondary emission の発生にも対象表面の導電率や表面の粗さ、水分量などが大きく影響すると考えられる。このように表面の状態、特に導電率や誘電率、水分量などはプラズマの進展に大きく影響する。前章では湿った表面での OH, O 原子密度などの変化を計測したが、図 4.12 に示される ICCD 画像計測結果のような放電機構の変化が起こっていたと考えられる。

4.4 考察：放電極性の放電進展への影響と活性種密度の変化

負極性放電においては、2 度目の発光のピークが正極性に比べて顕著に大きくなる。図 4.4 のような O 原子の増加はこの 2 回目の発光の増加に起因していると考えられ、2 回目の発光では O 原子は効率よく生成されているのに対し、OH ラジカルの生成は影響を受けないと予想できる。

Urabe ら⁵¹ と McCay ら¹⁹⁹ によれば、ヘリウムプラズマジェットもストリーマ放電と同様にパルス立ち上がり時と立ち下がり時の 2 回の放電で構成されている事が分かっている。また、2 回目の発光は発光時間が長く、He^m の密度が大きくなる事が報告されており、本研究における O 原子の密度の増加も同様に、放電極性による 1 次放電と 2 次放電の割合の変化が影響しているのではないかと考えられる^{195,200}。

Karakas らによって、1 回目の発光に比べて 2 回目の発光は電子温度が高いことが報告されており、これが正極性と負極性の活性種密度の違いにも影響を及ぼしていると考えられる²⁰¹。本章の実験では、1 回目の放電と 2 回目の放電が異なる放電形態を見せ、それぞれの放電によって効率的に生成される活性種の種類が異なるという結果を示唆している。

一方、負極性放電においては、O 原子は印加電圧に関係し大きく変化することが分かる。図 4.14 は、印加電圧と 2 次放電の強度の変化を表したものである。図 4.14 より、負極性放電の場合には、印加電圧の変化に伴う 2 次放電の強度が正極性に比べて大きいことが分かる。印加電圧が -6 kV のときの 2 次放電の発光強度は -10 kV のときの発光強度と比較して 4 ~ 5 倍程度大きくなっていることがわかる。これは図 4.8 において観測された、印加電圧と O 原子密度の変化と同様の変化であり、印加電圧の変化に伴う O 原子密度の変化は、2 次放電の強度の変化によるものと予想される。

Joh らの先行研究によれば、パルスの形状や立ち上がり/立ち下がりの速度に関係し、plasma bullet の進展の速度や電子密度が変化することが明らかになっている^{73,202}。また、Murakami らによれば、NO の生成反応は $\text{NO}_2 + \text{O} \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2$ が主であり、消滅反応は $\text{NO} + \text{O} \rightarrow \text{NO}_2$ が主である。この生成・消滅の早さ (バランス) は放電ガス中の空気濃度と相対湿度 (H_2O 濃度) に

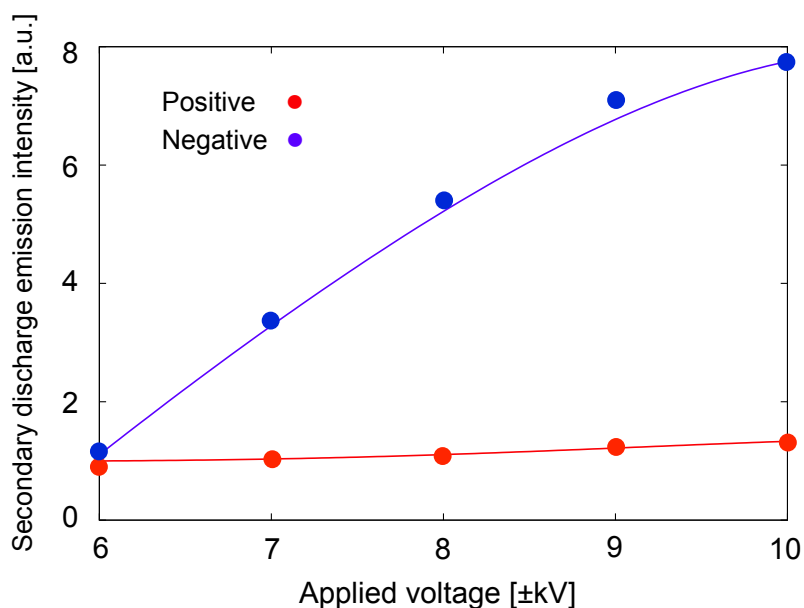


図 4.14 印加電圧と 2 回目の発光強度の関係。発光強度は LIF 計測領域における積算強度。

よって変化する^{187,203}。

図 4.15 は正極性・負極性放電における印加電圧と放電電力の関係である。印加電圧が ± 6 kV の場合には電流が小さく精度の良い電力の計測が難しかったため、印加電圧 7 ~ 10 kV における放電電力を示している。図 4.15 に見られるように、印加電圧の増加に伴い放電電力が増加していることが分かる。電力の増加は正極性・負極性共に同様の傾きであり、放電電力は 1 ~ 2 W 程度であることが分かる。このように印加電圧の増加に伴い放電電力が増加したことも、NO や O 原子などの密度が印加電圧により変化したことの要因の 1 つであると考えられる。RF プラズマジェットのような放電形態のことなるプラズマジェットでは、放電電力に伴い OH ラジカルや NO などの密度が増加したことが報告されているが、kHz のヘリウムプラズマジェットでは OH ラジカルの密度は放電電力によって変化せず、異なる傾向を示すことが分かる^{177,204}。

ストリーマ放電においても、負極性は放電が安定しないなどの理由で、一般的な現象論がまだ確立されていないのが現状である。Plasma bullet の進展はストリーマ理論により説明される部分が多く、極性を変化させた際の放電進展の変化や活性種の密度変化についての知見は不足しているのが、本研究の実験結果から放電極性を変化させた際には放電の進展様式が変化することと、それに伴いある特定の活性種の密度が変化することが明らかになった。これは極性を変化せることによって、活性種の供給量を変化させることが出来るという点から、プラズマ医療プロセスにおける効率化と反応の制御に繋がることが考えられる。

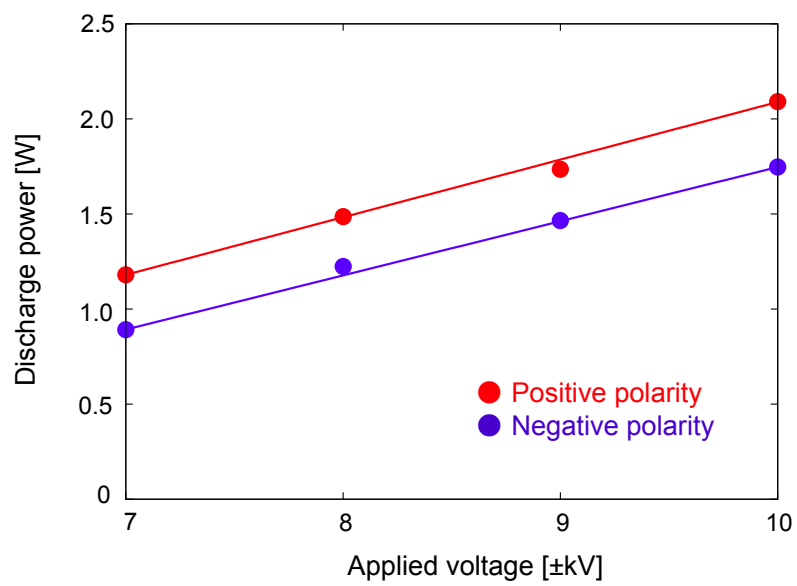


図 4.15 正極性・負極性放電における印加電圧と放電電力の関係。放電周波数は 10 kHz.

第5章 活性種の dose と細胞実験による指標の 検討

この章までは、レーザー計測を中心とし各種活性種の計測を行った。その結果、OH, O, NO といったいくつかの活性種に関してその生成機構を明らかにすることに成功した。これまでに、大気圧プラズマジェットが供給する活性種の絶対量はあまり知られておらず、更にはプラズマジェットが表面に進展する際の表面近傍における活性種の密度分布などはほとんど分かっていなかった。実際の応用では、この計測結果を用いて、どのような指標を確立するかが重要である。今回はその一例として、LIF 計測結果から RONS 供給量と細胞数の変化を観測した。LIF 計測結果では、放電ガスの組成を変化させた際に OH, O, NO の密度を選択的に変化させることができる。細胞実験では、放電ガスの組成を変化させた際の細胞数の減少速度をそれぞれ求めることで、細胞数が半減するまで OH, O, NO 供給量と細胞減少速度の相関を計測した。これまでも多くの細胞実験に関する先行研究から、細胞死の機序や有効な活性種の見積りなど多くの有用な知見が得られている。

プラズマにより生成される活性種は様々であるが、細胞の反応を引き起こす主要な活性種はまだ同定されておらず、諸説あるのが現状である。実際には、単一の活性種だけが医療効果を持つのではなく、複数の活性種が複合的にはたらいっていると考えられる。

Bekeschus らによると、直接プラズマジェットを照射する場合とプラズマジェットの先端が液面に接触しない非接触の場合では同様に細胞数の減少が観測されており、プラズマ中で生成された活性種が液面に届くことで細胞が反応を起こすことが確認されている²⁰⁵。この結果は、プラズマにより生成される活性種のうち短寿命の活性種だけではなく、間接照射でも液面に到達する長寿命の活性種も医療効果があることを示唆している。また、細胞が球状に組織を形成している Spheroid を用いた実験では、活性種は組織表面を酸化・還元するだけではなく、組織内部へ効果が浸透している事が確認されている。

Plewa らの先行研究によれば、HCT116 がん細胞の Spheroid を用いた実験で ROS が細胞内部まで影響し DNA へのダメージを与えていることが分かっている²⁰⁶。これらの結果は、プラズマ照射が細胞へ酸化ストレスを与える過程の中では、液面に到達した短寿命/長寿命活性種が液中での化学反応などにより他の物質に変化し、細胞へ作用しているという可能性を示唆している。

また、Ngo らの先行研究では、細胞がアポトーシスを起こさない場合には細胞の増殖が起こることが観測されており、プラズマジェットの照射時間やガスの組成が重要なパラメータであると考えられている²⁰⁷。

上記のように、プラズマにより生成された活性種が生体反応を引き起こす過程では、様々な条件が影響する。本章では、活性種の供給量と細胞反応の計測結果を報告する。

細胞実験の目的としては、OH, O, NO がそれぞれ増加/ 減少する実験条件において細胞数の変化をみることにより特に大きな影響を持つ活性種を検討することである。

実験対象としては、以下の3つの細胞を利用した。

- CHO-K1: CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞は正常細胞として広く細胞実験に用いられる。正常細胞とがん細胞のストレスへの挙動の違いを観測するために CHO 細胞を用いた。培養培地は通常 F-12 HAM を用いる。
- B16-F10 GFP: マウス皮膚がん細胞。プラズマジェットによるがん治療プロセスでは皮膚がんへの照射は考えられる応用例の1つである。培養培地は一般的に DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium や RPMI: Roswell Park Memorial Institute -1640 を用いる。先行研究でも皮膚がんへの応用の可能性が示唆されている²⁰⁸。
- HeLa-fucci: 一般にがん細胞として広く用いられる HeLa 細胞 (ヒト由来子宮頸がん) に fucci という色素を付加したもの。G, S などの細胞周期により fucci の蛍光が変化する。本研究ではプラズマによるがん治療効果は、細胞周期の変化/ 増殖の抑制にあると考え HeLa-fucci 細胞を用いた。培養培地は DMEM を用いる。

細胞実験では、小型で安価のパルス発生型電源 (ロジー電子 LHV-12AC) を用いて放電系を構成した。図 5.1 に大気圧ヘリウムプラズマジェットの V - I 波形を示す。図 5.1 に示されるように、ピーク値 7 kV、パルス幅約 35 μ s、周波数 8.4 kHz の正極性パルス放電であり、放電電力は 2.5 W 程度であった。

細胞実験では、実際の人体とは異なり非常に簡略化された系での生物-活性種の間関係を観測することになる。そのため、実際のがん治療においては動物実験など *in vivo* での実験が不可欠である。しかしながら細胞実験を行うことで、有効な活性種やその量的な影響を多くのサンプルで検討することが可能となる。LIF 計測とは異なり、細胞実験では電源の同期を行う必要がないため小型で持ち運び可能な装置での実験を行った。

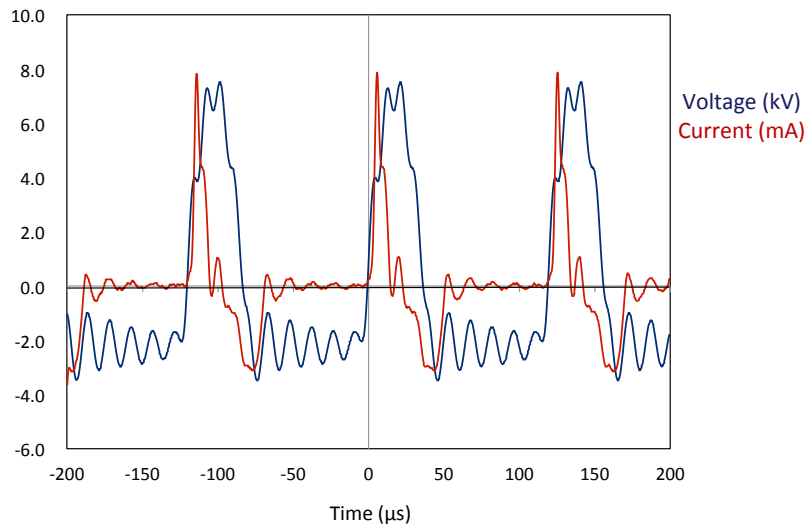


図 5.1 プラズマジェット放電の V-I 波形。

5.1 各種細胞へのプラズマ照射の効果

まず最初に、照射時間をパラメータに取り、各種細胞へのプラズマ照射を行った。照射時間をパラメータとした理由としては、全ての活性種供給量と線形の関係をもつパラメータであると考えられるためである。

ここではプラズマの照射時間を 20, 40, 90, 180 s と変化させた。また、プラズマと照射液面の距離は 5 mm で一定とした。図 5.2 に細胞へのプラズマ照射の様子を示す。図のように照射時には 1 つのウェルのみにはプラズマが進展し他のウェルへの影響は無視できると考えられる。

5.1.1 細胞数の変化における培地の影響

まず、プラズマ照射による細胞数の変化の計測において、照射条件の 1 つである培地が与える影響を評価した。培地は *in vitro* の実験を行うにあたり細胞とプラズマの間に必ず存在するが、これまでの研究で培地の成分により細胞数の変化のようすが大きく異なることが報告されている。

プラズマによって生成された ROS/RNS は、液面や生体表面に到達すると界面で反応を起こし化学反応を起こす。この時生成された水和イオンや硝酸系のイオンが細胞死に影響すると考えられている²⁰⁹⁻²¹¹。しかし培地には ROS のスカベンジャーが含まれている場合もあり、その場合にはプラズマの効果は大きく損なわれる²¹²。

CHO, B16F10 の 2 種類の細胞と RPMI, F12HAM, DMEM の 3 種類の培地を用いて実験を行った。実験は以下の手順に基づき行った。また、照射の際には 3 種類の培地の他に、生理食塩水: Phosphate Buffered Saline (PBS) も用いた。

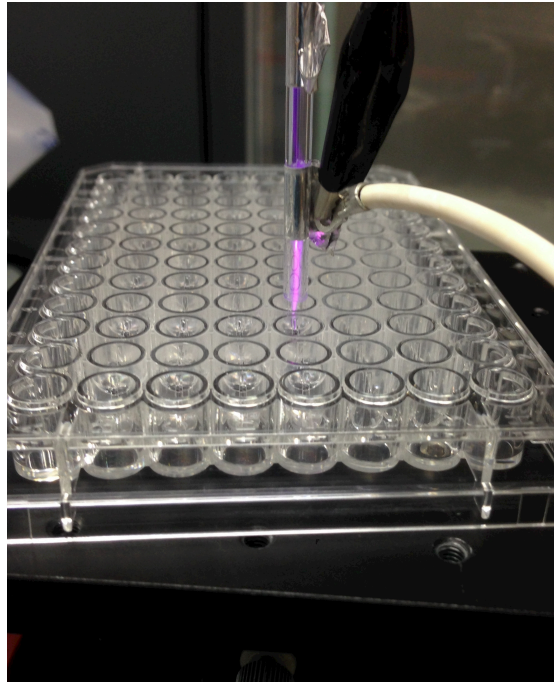


図 5.2 細胞へのプラズマ照射の様子。プラズマジェットと培地の距離はマイクロメーターで調整できる。

1. 各種細胞を 5000 cell/well 程度の濃度にし 96 well plate (BD Falcon) に 200 μ l ずつ分注する。サンプルのウェル数は通常 4 ウェルとした。
2. 細胞が定着するまで 24 時間程度インキュベーターにて培養する。
3. RPMI, PBS, F12HAM, DMEM を実験条件に応じて 200 μ l ずつ分注し、照射を行う。
4. 細胞に応じて培地を入れ替える。(照射時に培養用の培地と同じであれば交換しない)
5. 24 時間後に MTT アッセイを用いて細胞数を計測する。

上記手法では、PBS を照射時に用いた場合には必然的に培地を交換することになり、プラズマ照射により液中に生成された長寿命の活性種の影響は照射時間のみに限定される。それに対して照射時に培地を用いた場合には培地を交換しないため、液中に生成された長寿命の活性種の影響を考慮する必要がある。MTT アッセイとは、酵素活性を測定する比色定量法であり、培養細胞の生存率や増殖率の計測に広く用いられる手法である。MTT(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole) は生細胞により紫色のホルマザンへ還元される。この色が濃い、つまり細胞数が多い場合には 500 - 600 nm の波長の吸収が起こりやすいため、各ウェルの吸光度から細胞数を求めることが出来る。

図 5.3 に照射時の培地に F12HAM を用いた際のプラズマ照射による細胞数の変化を示す。プラズマ照射の時間に伴い細胞数が減少していることが分かる。一方、図 5.4 の結果は、培地に RPMI を用いた際の細胞数の変化とプラズマ照射時間の関係を表している。F12HAM を用いた場合とは異なり、照射 20 s 後にはほとんどの細胞が死滅していることが分かる。更に時間幅を短くした場合の細胞数の変化を図 5.5 に示す。照射 2 s 程で細胞数は減少し始めており、10 s 照射では細胞数は 30% 程度まで減少していることが分かる。

これらの実験結果から、細胞死には培地の種類が大きく影響していることが分かる。一般的に培地には血清 (FBS: Fetal Bovine Serum) が含まれている。細胞増殖に不可欠な FBS であるが、同時に多くのラジカルスカベンジャーを含んでいる。前節 1.3 にあるように、ラジカルスカベンジャーがある場合にはラジカルは特異的な反応が起こる。RONS の投入により細胞死が起こる要因としては、プラズマにより生成された活性種に由来して液中で生成された物質によるものであると考えられる。

F12HAM では RPMI や DMEM に比べ栄養素となるアミノ酸などが多く含まれる。そのため、これまでの実験結果は、F12HAM 中には細胞死を促す活性種のスカベンジャーが含まれていたことに起因すると考えられる。

次に、CHO 細胞を対象とした照射実験の結果を示す。図 5.6, 5.7 はそれぞれ CHO 細胞へのプラズマ照射を、照射培地に F12HAM と PBS を用いた際の実験結果である。図 5.6 の結果から見

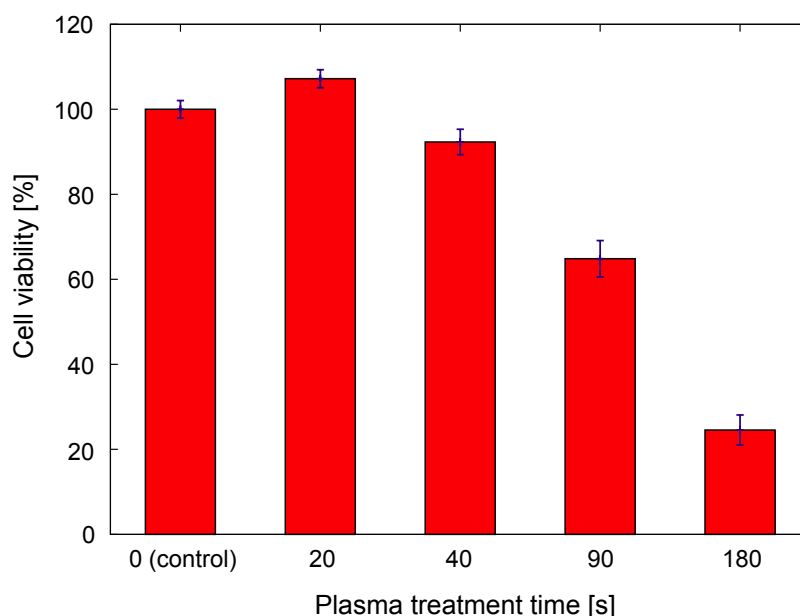


図 5.3 照射時の培地に F12HAM を使った際の B16-F10 細胞数とプラズマ照射時間の関係。培養時の培地は RPMI-1640.

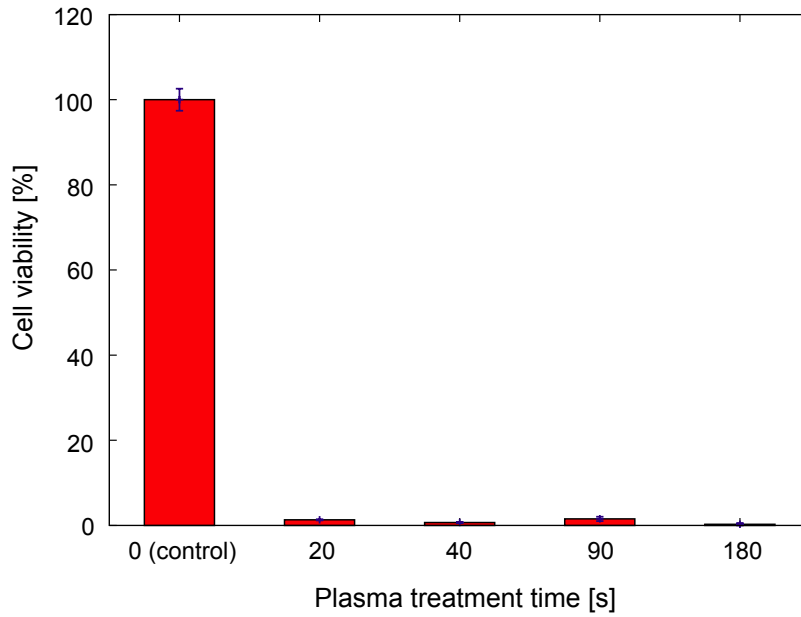


図 5.4 照射時及び培養時の培地に RPMI を用いた際の B16F10 細胞数とプラズマ照射時間の関係その 1。

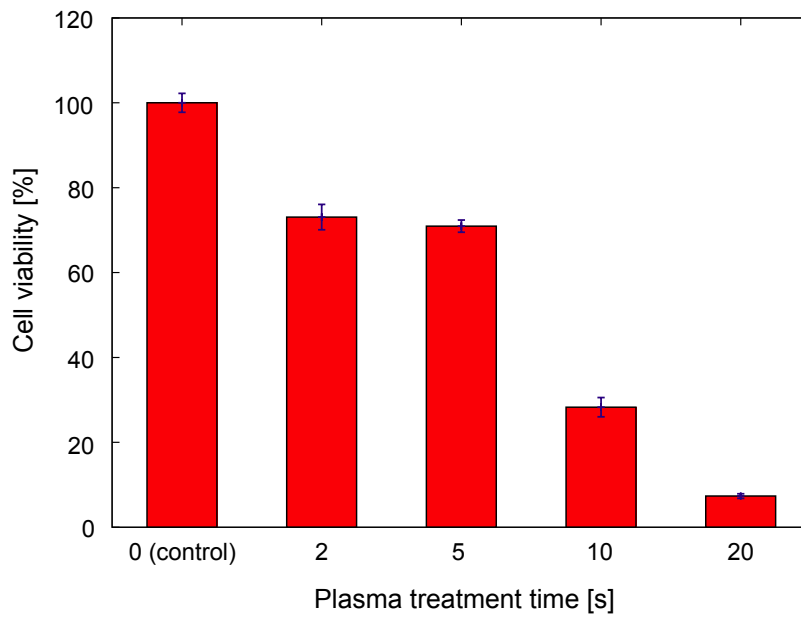


図 5.5 照射時及び培養時の培地に RPMI を用いた際の B16F10 細胞数とプラズマ照射時間の関係その 2。

られるように CHO 細胞にプラズマ照射を行った際、20 s では細胞数が増加し、その後減少していることが分かる。培地の影響を極力抑えるために照射培地に PBS を用いた際の照射時間と細胞数の関係を図 5.7 に示す。照射に掛かる時間は数 10 分であるため、PBS 中に供給された長寿命活

性種と細胞の反応時間は数10分程度である。図5.7より、照射培地にPBSを用いた際には細胞数は照射時間に関係し単調に減少していることが見て取れる。このことから、細胞の増加や減少に関わる液中での物質は、培地の成分により大きく異なると考えられる。

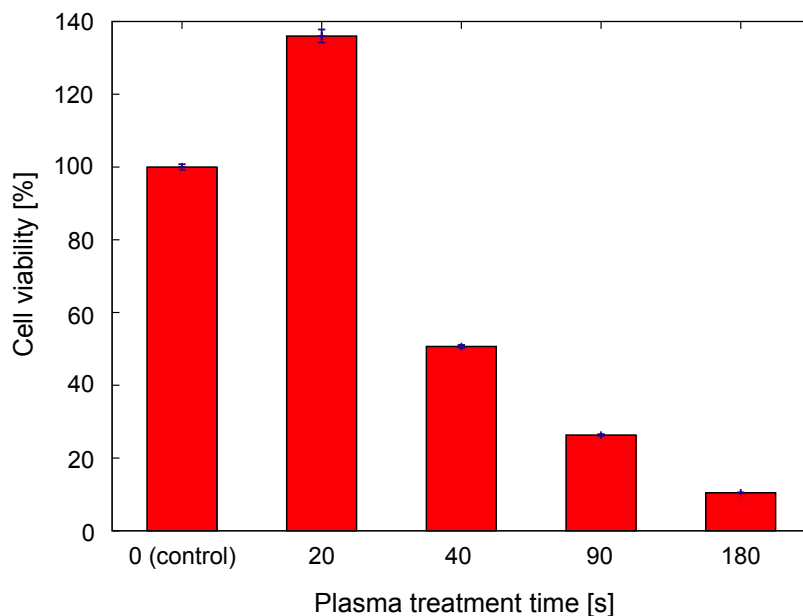


図 5.6 照射時および培養時の培地に F12HAM を用いた際の CHO 細胞数とプラズマ照射時間の関係。

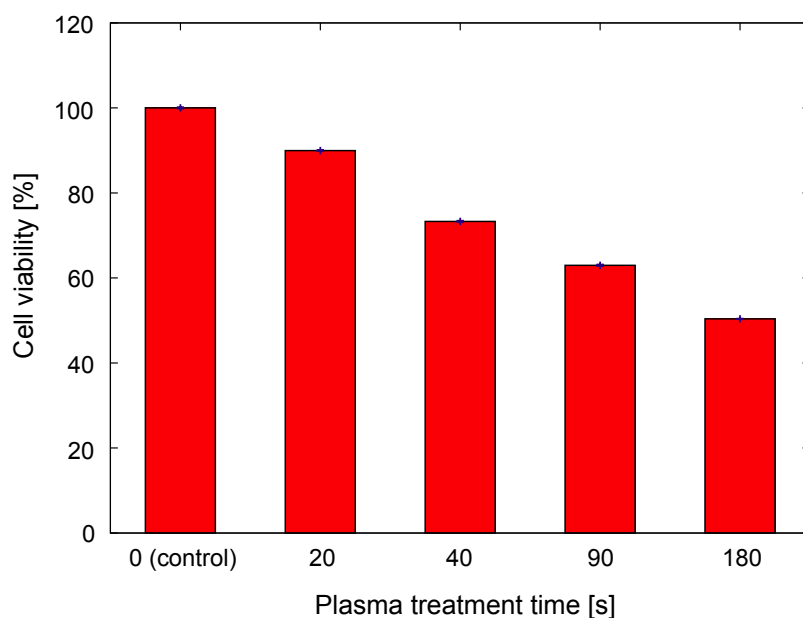


図 5.7 照射時の培地に PBS を用いた際の CHO 細胞数とプラズマ照射時間の関係。培養時の培地は F12HAM.

5.1.2 細胞数の変化における放電ガスの影響

LIF 計測でも明らかになったように、活性種の生成量は放電ガスの組成により大きく異なる。即ち、特定の活性種の供給量を増加させたい場合には放電ガスの組成を調節すればよい。本節では、放電ガスの組成をパラメータに取り、その時の細胞数の変化を計測した。

放電ガスに O₂ を添加した場合

がん治療プロセスにおいては、O 原子が重要な役割を果たすと考えられている。前節 3.2 の図 3.20 にあるように、プラズマにより生成される O 原子の密度は、放電ガス中の O₂ 濃度が 0.5% 程度の時に最大となる。O 原子のがん治療効果を評価するために、O₂ を約 0.5% 混合した放電ガスを用いて細胞実験を行った。照射対象には B16F10 を用いたが、先の実験結果を踏まえて、放電ガスをパラメータとした実験では培地の影響を最小限にするために以下の手順で実験を行った。

1. 5000 cell/well 程度の濃度で分注し、24 時間インキュベートする。
2. 培地を取り除き、常温の PBS を 200 μ l ずつ分注。
3. 同様にプラズマ照射。
4. 照射後培地を RPMI に変更、24 時間インキュベート後、MTT アッセイで細胞数を評価。

図 5.8 に、放電ガスに O₂ を混入した際のプラズマ照射時間と細胞数の変化を示す。図 5.8 より、プラズマ照射時間 40 s 程度までは細胞数はほとんど変化していないが、90 s では約 45% くらいまで減少していることが分かる。

放電ガスに N₂ を添加した場合

O₂ 混合プラズマと同様の実験を、N₂ 混合プラズマにおいても行った。N₂ 添加に伴い NO や N といった RNS の増加が予想される。先行研究では、O₂ の場合と同様に添加率 0.25% 程度の場合に N 原子の量が最大となることが確認されている²¹³。実験に際しては添加率を 0.5% 以下にすることが難しかったため、N₂ の添加率を 0.5% とし照射を行った。

図 5.9 は N₂ 添加プラズマを照射した際の、照射時間と細胞数の関係を表したものである。図 5.9 より、プラズマ照射により細胞数は単調に減少している事がわかる。また、放電ガスに He のみを用いた場合と図 5.10 の結果と比較すると細胞死への影響が大きくなっていることが分かる。これは Tian らの先行研究の結果が示唆する、細胞死には窒素系の水中イオンが主要な役割を果たすという機構と少なからず一致する。図 3.23 に示されるように、放電ガスへの N₂ の添加により

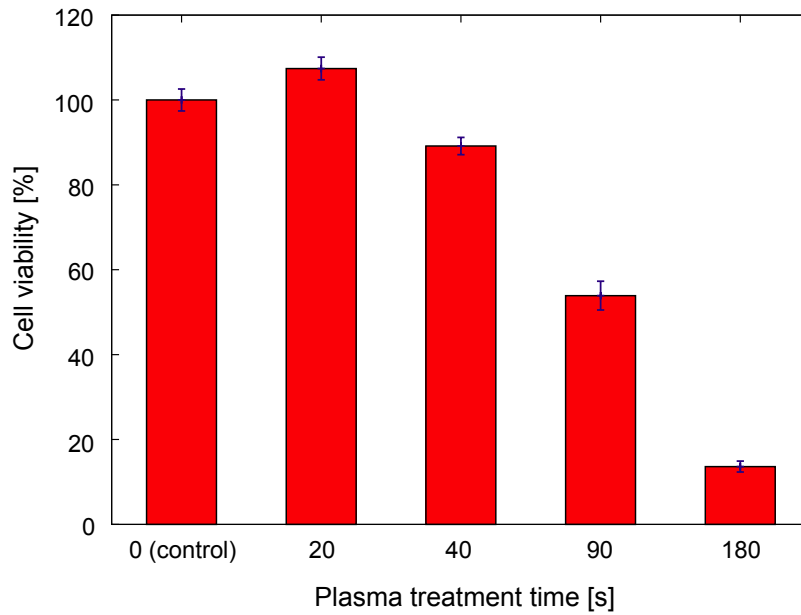


図 5.8 放電ガスに O₂ を混入した際のプラズマ照射時間と B16F10 細胞数の変化。照射時には PBS を使用、照射後 RPMI に交換。

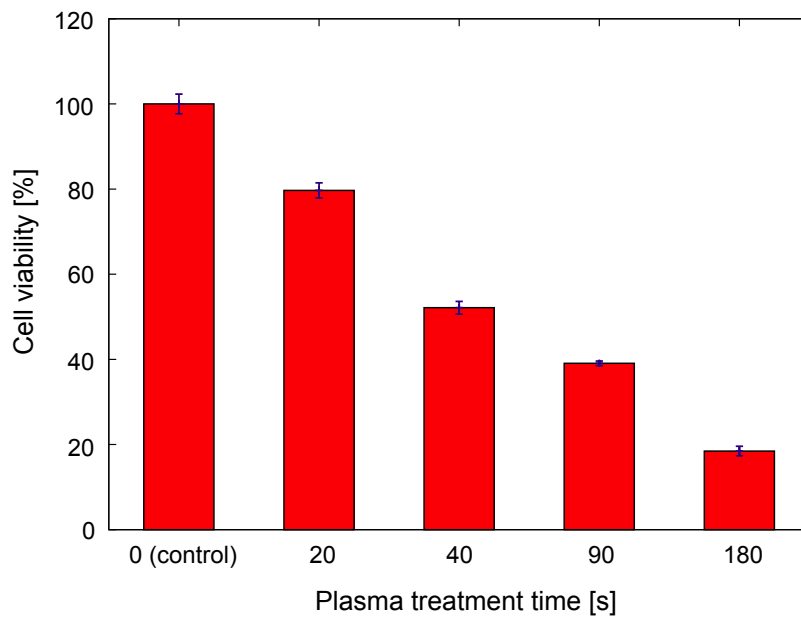


図 5.9 放電ガスに N₂ を混入した際のプラズマ照射時間と B16F10 細胞数の変化。照射時に PBS を使用、培養時の培地には DMEM を使用。

NO をはじめとした窒素系の活性種の生成量が増加し、水中で HNO_{2aq}, HNO_{3aq}, HOONO_{aq} などの物質や NO_{2aq}⁻, NO_{3aq}⁻, ONOO_{aq}⁻ などのイオンが増加したことが要因と考えられる。

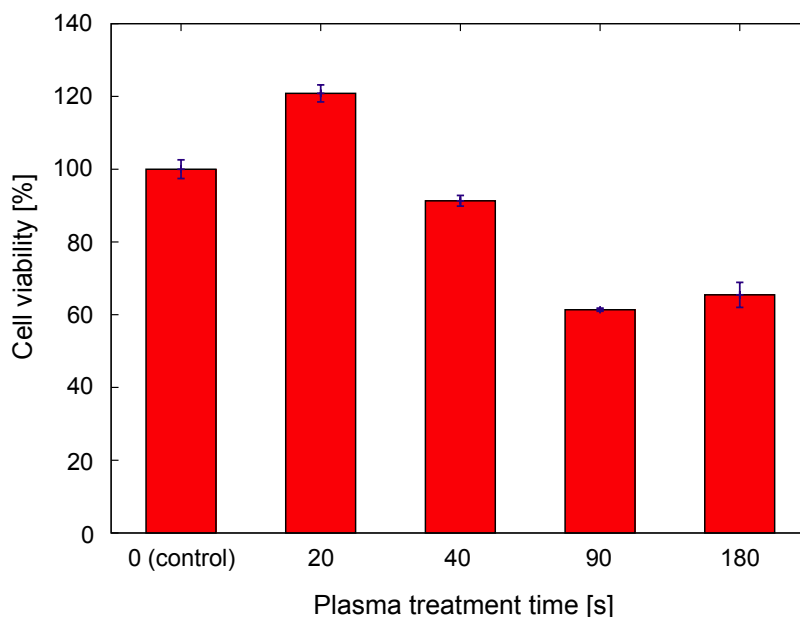


図 5.10 放電ガスにヘリウムをそのまま用いた際の B16-F10 細胞数とプラズマ照射時間の関係。照射時に PBS を使用、培養時の培地は DMEM を使用。

放電ガスを加湿した場合

プラズマにより生成される活性種の中でも、OH は特に活性力が高く様々なプロセスで主要な役割を果たすと考えられている。筆者の以前の研究をもとに、OH ラジカルのもたらす細胞死への影響を考察した^{163,214}。これまでも殺菌、細胞死誘導などの実験で OH ラジカルや O 原子が細胞死を誘発する可能性が考えられている。図 5.10, 5.11 はそれぞれ放電ガスを加湿しない場合、および RH= 1% に加湿した場合の、プラズマ照射時間と細胞数の変化を表したものである。これまでの実験で、プラズマにより生成された活性種がスカベンジャーなど培地中の成分と反応し、細胞死を誘発している可能性が示唆されている。加湿プラズマを用いた細胞実験でも同様に、その影響を小さくするためにプラズマ照射時の培地を PBS を用いて実験を行った。これにより、細胞が自然に減少しない条件下で pH の変化やスカベンジャーの影響を最小限に抑えることが可能となる。

ヘリウムをそのまま放電ガスとして用いた場合では、細胞数の減少は緩やかになり、H₂O 濃度を大きくした場合には細胞数の減少が早くなるといった結果が得られた。RH = 0 ~ 1% の領域では、相対湿度の値に比例して OH の生成量は単調に増加する¹⁶³。この結果から、がん細胞 (B16F10) の細胞死にはプラズマにより生成される OH ラジカルと相関があることが示唆される。

OH ラジカルの影響を評価するために、CHO 細胞と Hela-fucci 細胞でも同様の実験を行った。

その結果を次に示す。図 5.12 は、放電ガスにヘリウムを用いてプラズマ照射を行った際の細胞数の変化を計測した結果である。ヘリウム流量は 500 ml/min、照射時及び照射後の培地は DMEM を用いた。図より、Hela 細胞は他のがん細胞と同じようにプラズマ照射時間に伴い減少していることが分かる。次に、図 5.13 にヘリウムガスを加湿した際のプラズマ照射時間と細胞数減少の関係を示す。ガスは相対湿度で 0.3% 程度に加湿した。図 5.13 より、先ほどと同様にプラズマ照射に伴い細胞数が減少していることが分かる。図 5.12 と比較すると、細胞数の減少は同じような傾向を示しており、乾燥したヘリウムを用いた場合と同じような医療効果が得られていることが分かる。

5.2 プラズマ照射による細胞周期の変化

5.2.1 プラズマの照射と細胞周期の関係

プラズマを用いたがん治療プロセスでは、*in vivo* 実験により腫瘍そのものが小さくなった結果の報告に加え、プラズマ照射により腫瘍の成長が抑制された結果も報告されている^{47,215}。これはプラズマ照射に伴う腫瘍への酸化ストレスに基づき腫瘍の成長が抑制された結果であると考えられるが、微視的にがん細胞がどのような挙動を起こすのかどうかは明らかになっていない。

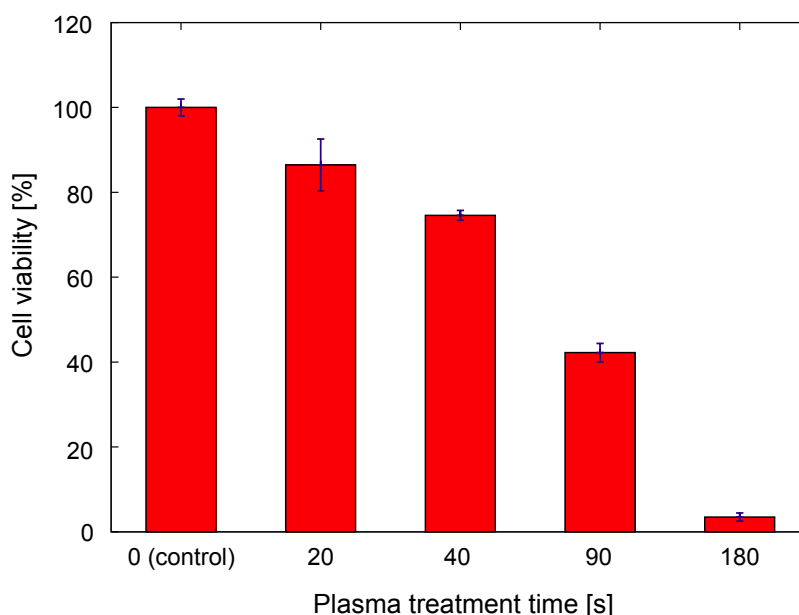


図 5.11 放電ガスを加湿した際の B16 細胞数とプラズマ照射時間の関係。RH = 1%, 照射時に PBS を使用。

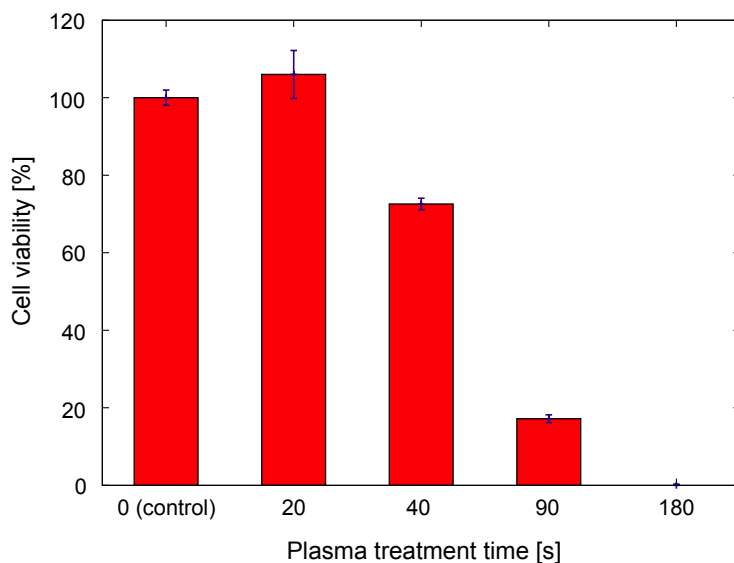


図 5.12 HeLa 細胞を用いた際のプラズマ照射時間と細胞数の変化。放電ガス: ヘリウム, 流量 500 ml/min, 照射時に PBS を使用。

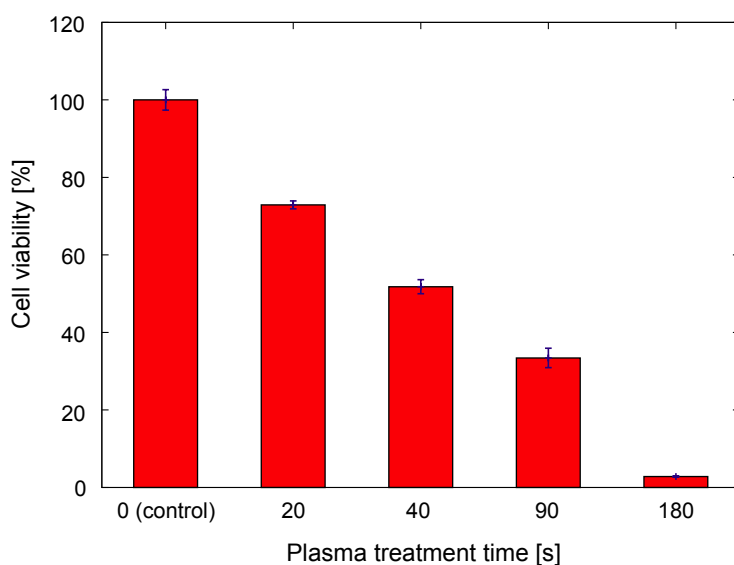


図 5.13 HeLa 細胞を用いた際のプラズマ照射時間と細胞数の変化。加湿条件下: RH = 0.3%, 照射時に PBS を使用。

本研究で用いた HeLa-fucci 細胞は、HeLa 細胞に fucci(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) という蛍光たんぱく質が導入されている。MBL: 医学生物研究所の説明によれば、Fucci は “細胞周期の特定の時期にのみ存在する Geminin と Cdt1 という 2 つのタンパク質に、それぞれ緑色 (monomeric Azami-Green1: mAG1) とオレンジ色 (monomeric Kusabira-Orange2: mKO2) の蛍光タンパク質を融合して細胞周期を可視化できるようにしたプローブ” であり、これ

らを細胞に導入すると、S/G2/M 期に緑色、G1 期にオレンジ色の蛍光が核に観察される²¹⁶。細胞周期は細胞分裂を行う M 期と、それ以外の間期に分けられる。間期はさらに G1, S, G2 の 3 つの期間に細分することが出来る。G1 では細胞の成長が、S では DNA の複製が、G2 では細胞の成長と分裂への準備が行われる⁵⁰。Fucci の導入された HeLa-fucci を用いることで、腫瘍を形成する細胞が周期のどの時期にあるかを計測することが出来る。本実験の手順を以下に示す。

1. HeLa-fucci を 5000 [cell/well] 程度の濃度にし、96 well plate に 200 μ l ずつ分注する。
2. 1 日インキュベートした後、注入した全ての well の 1/3 にプラズマ照射を行う。照射時の培地には PBS を使い、照射時間は 0 (cnt), 10, 20, 30, 60, 120 s, 照射距離は 5 mm とした。
3. 照射後培地を DMEM に交換し、24 時間インキュベートする。
4. プラズマ照射を行っていない残りのセルの半分 (全体の 1/3) に 1 日目と同様のプラズマ照射を行う。照射後、培地を DMEM に交換し 24 時間インキュベート。
5. IN Cell Analyzer 100 (GE Healthcare) を使い、プレート上の全てのウェルを評価する。タンパク質の励起波長はそれぞれ mAG1: 492 nm, mK02: 551 nm を使い、計測蛍光波長はそれぞれ mAG1: 505 nm, mK02: 565 nm とした。

図 5.14 は、In Cell Analyzer を用いて計測した細胞の画像である。(a) 明視野で見える細胞の核が、(b)Hoechst によって染色されている事がわかる。(b) の細胞核数より全細胞数を計数し、(c) と (d) の細胞数の全細胞数に対する割合から、プラズマ照射による細胞周期への影響を評価することが出来る。

計測の結果、それぞれの照射細胞における G1-S 期の細胞と S-G2 期の細胞の数が明らかになった。その結果を図 5.15, 5.16 に示す。

図 5.15, 5.16 から照射 1 日後の細胞には S-G2 周期の細胞が多く存在し、照射 2 日後の細胞には G1-S 期の細胞が多く存在することが分かる。また、照射 1 日後の場合、照射時間が最も短い 10 s の照射では、細胞周期の S-G2 が増えていることが分かる。その一方で、照射 2 日後の HeLa-fucci では照射時間に単純に関係して G1-S 期が増えていることが分かる。照射 1 日後と 2 日後の細胞周期の割合をそれぞれ図 5.17 に示す。

図 5.17 より、照射 1 日後、つまり照射後の経過時間が少ない細胞の方が G1-S 期の細胞に対する S-G2 期の細胞数の割合が大きくなっていることが分かる。照射 0 s、つまりコントロールの細胞ではその割合はほとんど同じであるが、照射 20 s まででは S-G2 期の細胞が増殖している、つまり成長期にある細胞が増加しているのが分かる。それに対し、プラズマ照射時間が長い場合、60 s 以上になると休止期の細胞が増えているのがわかる。この結果は、照射時間が短い場合に

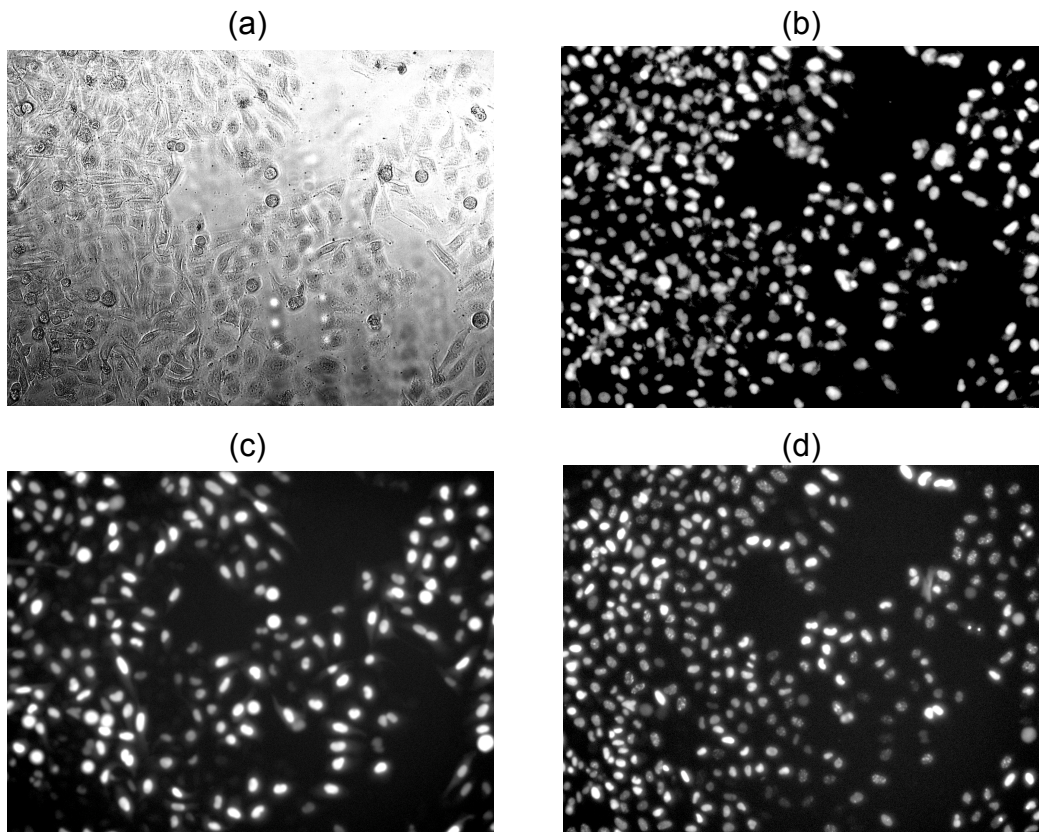


図 5.14 In Cell Analyzer により撮影された細胞の様子。(a) 明視野画像; (b)Hoechst による細胞核染色; (c)S/G2/M 期の細胞による緑色の蛍光; (d)G1 期にあるオレンジ色の蛍光。

は酸化ストレスにより成長が促進されているが照射時間が長い場合には細胞周期が乱れ成長が遅れている可能性を示唆している。

5.2.2 加湿プラズマによる細胞周期への影響

図 5.18, 5.19 は、放電ガスを加湿したヘリウムプラズマジェットを用いた場合に、プラズマ照射による細胞周期への影響を表したものである。実験手法は前述の手法と同様であり、放電ガスは RH = 0.5% となるように加湿した。図 5.18 は照射 1 日後の HeLa-fucci 細胞周期 G1-S と S-G2 にある細胞数を表したものであり、図 5.19 は照射 2 日のデータを表したものである。2つの図より、照射 1 日後にはプラズマ照射を 10 秒行った場合には成長期にある細胞が多く、照射時間が長い場合には図 5.20 より、加湿プラズマを照射した場合、照射 1 日後、つまり照射後の経過時間が少ない細胞の方が G1 - S 期の細胞に対する S-G2 期の細胞数の日が大きくなっていることが分かる。照射 0 s、つまりコントロールの細胞ではその割合はほとんど同じであるが、照射 20 s まででは

S-G2 期の細胞が増殖している、つまり成長期にある細胞が増加しているのが分かる。それに対し、プラズマ照射時間が長い場合、60 s 以上になると休止期の細胞が増えているのがわかる。

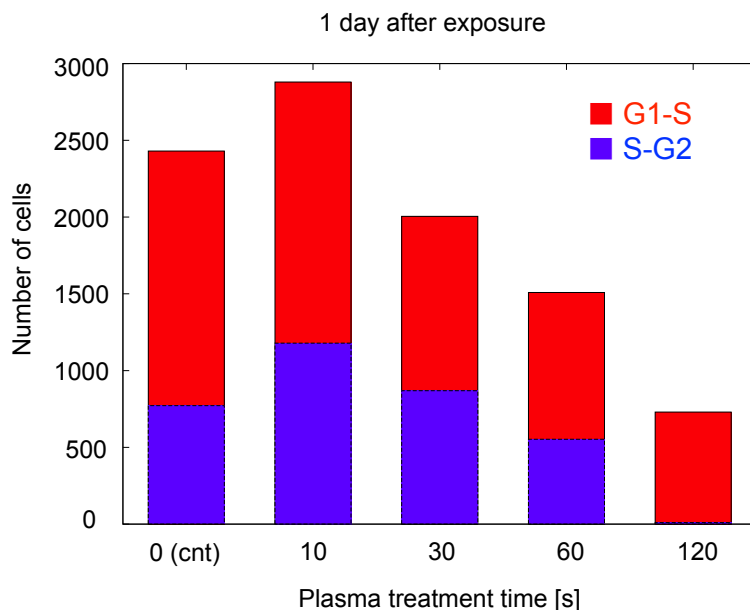


図 5.15 培養 1 日目にプラズマを照射した場合の、プラズマ照射時間と細胞周期の関係。縦軸は HeLa-fucci の G1-S 期と S-G2 期の細胞数。照射時の培地は PBS, 培養時の培地には DMEM を使用。放電ガスは加湿なし。

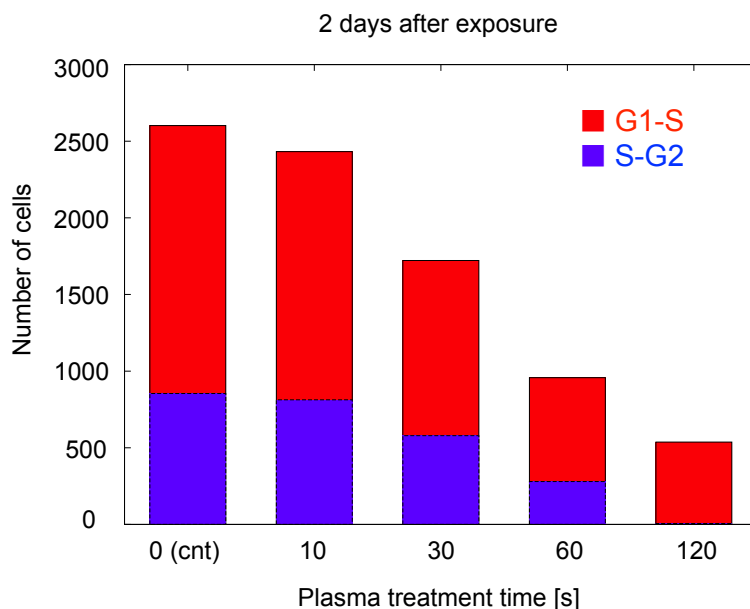


図 5.16 培養 2 日目にプラズマを照射した場合の、プラズマ照射時間と細胞周期の関係。縦軸は HeLa-fucci の G1-S 期と S-G2 期の細胞数。照射時の培地は PBS, 培養時の培地には DMEM を使用。放電ガスは加湿なし。

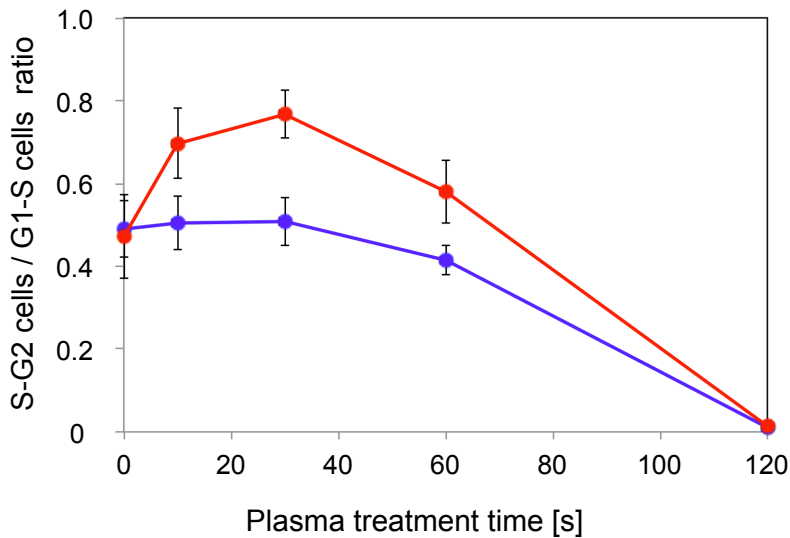


図 5.17 培養 1 日目と 2 日目の HeLa 細胞における、G1-S 期の細胞に対する S-G2 期の細胞の割合。

この結果は、照射時間が短い場合には酸化ストレスにより成長が促進されているが照射時間が長い場合には細胞周期が乱れ成長が遅れている可能性を示唆している。

5.3 考察: プラズマ照射による活性種供給量と細胞数の関係

序論でも述べたとおり、本研究の目的は有効な活性種の同定と、定量的な尺度によるプラズマ医療効果の評価である。がん細胞に関しては、全ての照射条件で細胞数は単純に減少したため、細胞死 / 細胞増殖の閾値の見積りは難しいが、各活性種による細胞死への影響を以下の指標 (Index) で評価できる。

$$\begin{aligned} \frac{1}{\text{Index}} &= \frac{\text{死細胞数}}{\text{活性種の総供給量}} \\ &= \frac{\text{死細胞数 [cell]}}{\text{平均フラックス [cm}^{-2}\text{s}^{-1}] \times \text{プラズマの照射領域 [cm}^2] \times \text{照射時間 [s]}} \end{aligned}$$

Index を仮に I とした場合、 I は 1 つの細胞が細胞死を起こすのに必要な活性種の量を表す。各種がん細胞毎に正確な I の値を求めることは非常に難しいが、いくつかの照射条件における指標 I を比較することで、各種活性種による細胞死への影響を評価することが出来る。図 5.21 は、放電ガスを加湿した際の、OH, NO, O 原子の密度と放電ガス中の H₂O の関係を模式的に表したも

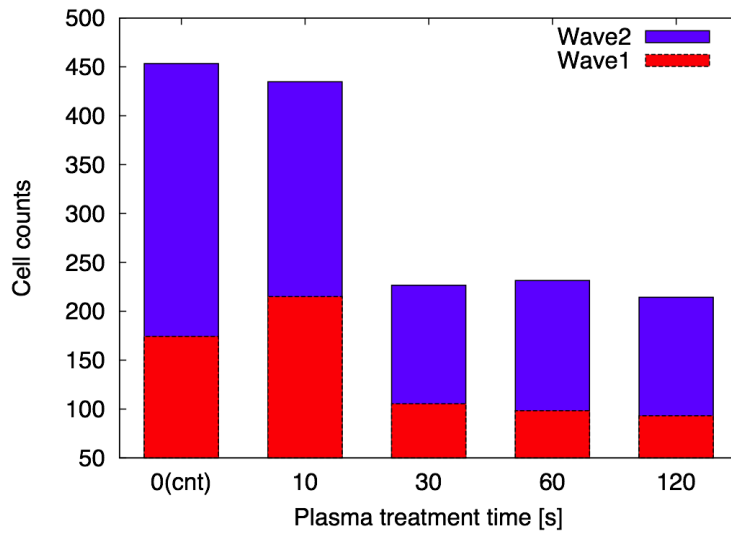


図 5.18 培養 1 日目に加湿プラズマを照射した場合の、プラズマ照射時間と細胞周期の関係。縦軸は HeLa-fucci の G1-S 期と S-G2 期の細胞数。照射時の培地は PBS, 培養時の培地には DMEM を使用。

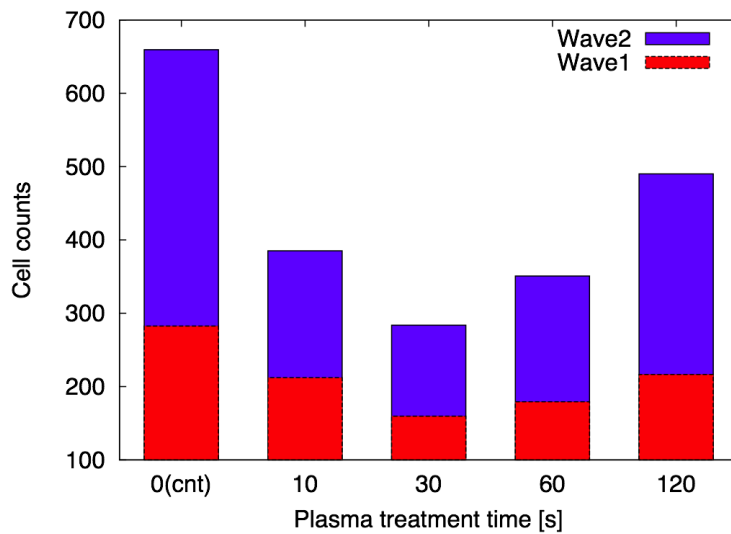


図 5.19 培養 2 日目に加湿プラズマを照射した場合の、プラズマ照射時間と細胞周期の関係。縦軸は HeLa-fucci の G1-S 期と S-G2 期の細胞数。照射時の培地は PBS, 培養時の培地には DMEM を使用。

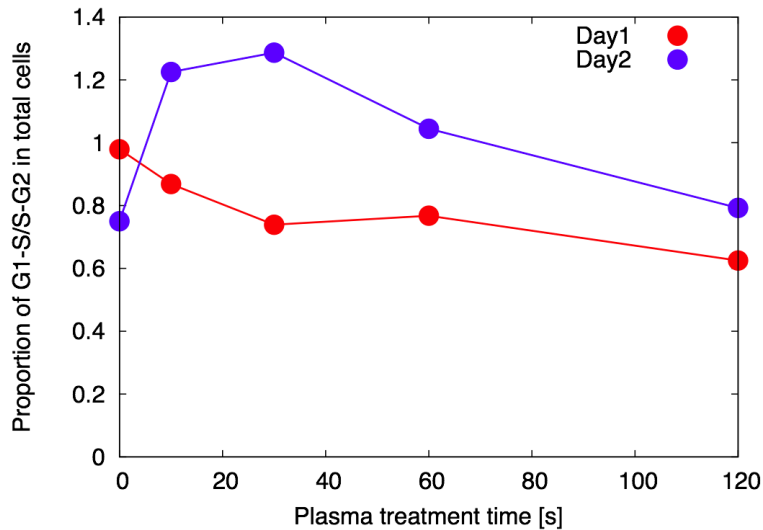


図 5.20 加湿プラズマを照射した時の培養 1 日目と 2 日目の Hela 細胞における、G1-S 期の細胞に対する S-G2 期の細胞の割合。

表 5.1 H₂O, N₂, O₂ 添加時のプラズマ照射時において、細胞半減時間までに供給される各種活性種の量。

| | O ₂ , 0.5% ($t_h = 80$ s) | H ₂ O, RH = 1% ($t_h = 15$ s) | N ₂ , 0.5% ($t_h = 40$ s) |
|-----------------------|--|--|--|
| OH [Particles] | 5×10^{15} | 9×10^{15} | 4×10^{15} |
| O [Particles] | 7×10^{18} | 9×10^{16} | 3×10^{17} |
| NO [Particles] | 4×10^{18} | 6×10^{16} | 2×10^{18} |

のである。密度はあくまで概要であるが、図 5.21 のように、ガス組成を変化させると各種活性種の密度が変化する。前述のとおり、ガス組成を変化させると細胞死の様子も変化するため、ガス組成を変化させた際の活性種密度と細胞死の関係を評価する。

ここでは、プラズマ照射に伴い、細胞数が半減するまでの時間 t_h を基準とし、それまでに供給された各活性種量を尺度として用いた。前述のように、放電ガスの組成を変化させた際には各活性種の密度が相互的に変化する。そのため、例えば細胞数が半減するまでの時間が 2 倍となっている時にある活性種の単位時間あたりの供給量が半分となっていれば、その活性種は細胞死との相関があると考えることが出来る。

本章でこれまでに報告した研究結果では、放電ガスに H₂O, N₂, O₂ を加えたものである。各実験条件における細胞数の変化を図 5.22 に表す。図 5.22 において、H₂O 添加時 (RH = 1%)、N₂ 添

加時 (0.5%)、O₂ 添加時 (0.5%) の条件において細胞数が半減するまでの時間 t_h はそれぞれ、15 s, 40 s, 80 s である。この照射時間において供給される OH, O, NO の総量を表 5.1 に示す。表 5.1 より、各条件において O 原子と NO の供給量は細胞の半減時間と相関がないが、OH ラジカルはいずれも $4 \sim 9 \times 10^{15}$ [Particles] 程度で細胞の半減事件と相関があることが分かる。

前述のように、プラズマ医療では様々な活性種が複合的に作用していると考えられており、この結果からは、必ずしも OH ラジカルが細胞の不活性化において主要な役割を果たすという因果関係を結論付けることは出来ない。ここで用いた指標 (Index) の値は、細胞を起こした細胞数を供給された活性種の量で割ったものであり、OH, NO, O 原子の効果を比較したものである。そのため、これ以降には供給された活性種の量 (各活性種のフラックス) のより正確な見積りや、更に多くの数の活性種を同様の指標で評価する必要がある。しかしながら、これまでに活性種の投入量を求めそのような定量的な尺度に基づき細胞実験を行った例はなく、今後各種活性種の医療効果を検証する際には不可欠な指標である。

現在当研究室では、真空紫外 (VUV: Vacuum Ultraviolet) を用いた医療用デバイスにより、限られた種類の活性種のみを生成・供給する手法を開発中である²¹⁷。このようなデバイスを用いて、同様の手法に基づき特定の種類の活性種を供給した際の細胞・生物中の主要の反応を見ることで、有効活性種の同定や細胞増殖/細胞死などの機構の制御が可能となることが期待される。

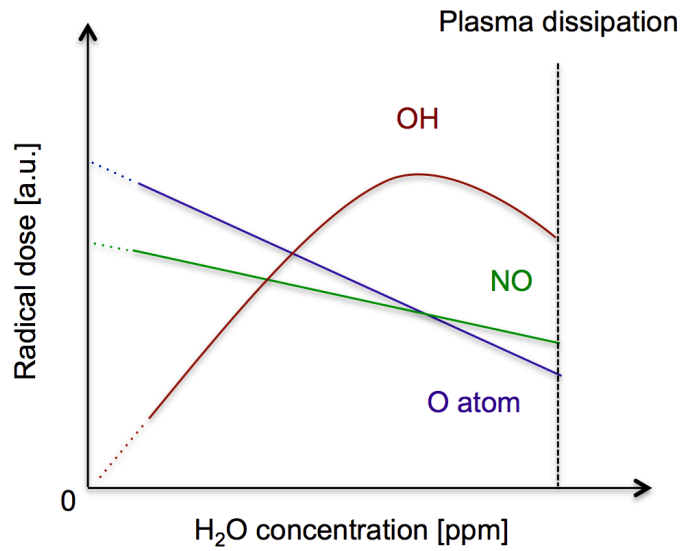


図 5.21 放電ガス中における H_2O 量と OH, NO, O 原子密度の関係を表した概略図。

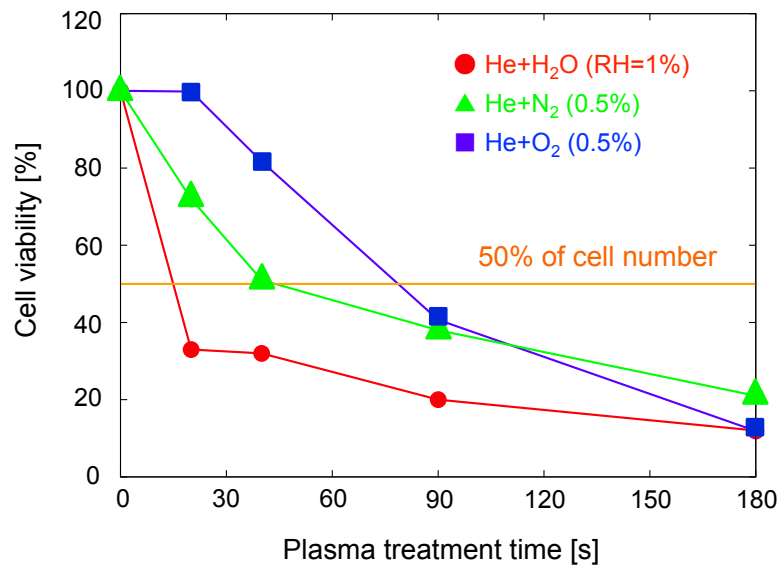


図 5.22 放電ガスにそれぞれ H_2O , N_2 , O_2 を添加した際の細胞数の時間的な変化。

第6章 結論

6.1 研究成果

「プラズマ医療の実現」という大きな目標のもと、本研究はプラズマ医療プロセスにおける原理解明および定量的な指標の提案を目的として行われた。このような目的に基づき、主に LIF 法による活性種計測から、医療プロセスにおいて重要だと考えられている OH, O, NO の生成機構の考察や定量化を行った。また、放電における極性というパラメータの検討および LIF 計測結果に基づく *in vitro* 実験から定量的な指標の検討を行った。

本研究で得られた知見を以下に示す。

● OH ラジカル, O 原子, NO の生成機構解明

OH ラジカル、O 原子、NO の LIF 計測実験を行い、各種実験条件における密度分布や密度の変化から活性種の生成機構をそれぞれ考察した。その結果、OH ラジカルの3つの生成機構(空気中の H₂O の解離、表面の H₂O の解離、放電ガス中に不純物として含まれる H₂O の解離)が OH の生成量に大きく影響することが明らかになった。O 原子や NO は周囲から混入する空気中の O₂ や N₂ の解離が主な生成機構であり、プラズマ中に周囲から混入する空気中の O₂ のうち 0.5% 程度が解離して O 原子が生成されていることが明らかになった。活性種の生成機構を解明することにより活性種の選択的な生成が可能となる。これは生物実験を通して、医療効果の大きい活性種を同定する際に必要な知見である。また、医療プロセスを行う際に有効だと思われる活性種の選択的な供給から効率的なプラズマプロセスを行うことが可能となる。

● OH ラジカル, O 原子, NO のフラックス計測

LIF 計測の実験結果から、プラズマジェットが表面に進展する際の活性種の供給フラックスを求めた。その結果、後の細胞実験での細胞応答の評価の基準となる供給 dose を求めることが出来た。*in vitro* 実験において、照射対象に PBS を用いた場合、供給 dose 量は OH ラジカルが 2.5×10^{14} , O 原子が 1.3×10^{16} , NO が 1.1×10^{15} [particle/s] であることがわかった。実験条件において異なるものの、このように供給 dose を実験的に求めた先行例はほと

んどなく、今後の動物実験などにおける医療効果の評価において重要な知見であると考えられる。

● 放電極性が活性種密度に与える影響の評価

これまであまり検討されていなかったパラメータである放電極性を変化させ、その時の OH, O 原子, NO の密度分布を計測した。その結果、放電極性によって O, NO の密度分布が変化する事がわかった。負極性のパルスを印加した場合には、正極性と比較して OH, NO の密度変化は見られなかったものの、O 原子の密度が2～3倍ほど顕著に増加することが明らかになった。また、正極性・負極性放電の両条件において放電電圧を変化させたところ、負極性放電において O 原子密度の電圧依存が確認された。OH 密度は放電電圧や極性によってほとんど変化しなかったが、NO 密度は正極性放電の方が負極性放電よりも大きくなることがわかった。

このように、活性種の密度分布が極性により変化する原理を考察するために ICCD カメラを用いた画像計測を行った。その結果、パルスの立ち上がり時に1回目の放電が、立ち下がり時に2回目の放電が観測され、負極性放電では2回目の放電の発光強度が顕著に大きくなることが確認された。この結果から、O 原子は2回目の放電で効率的に生成されていると予想される。このことから、放電極性を変化させることで O 原子など特定の活性種を選択的に供給することが出来ると考えられる。

● 細胞実験による活性種の量と細胞応答の評価

プラズマジェット照射による細胞の応答を評価するために、細胞実験を行った。これにより以下の事実が明らかになった。

－ OH, O 原子, NO による細胞不活性効果の比較

活性種の供給量と細胞死の関係を指標 I を用いて評価した、その結果、がん細胞の細胞死誘導には気相中から供給される活性種の中でも、 H_2O に由来する活性種が効果的であるとの結果が示唆された。本研究で計測された活性種の中で、その供給量に基づき細胞不活性化への影響を評価したところ OH ラジカルと相関があることが明らかになった。これは必ずしも OH に医療効果があるということの十分条件ではないが、医療効果を持つ可能性の高い活性種の1つとして、今度も評価される必要のある活性種である。これまでに OH ラジカルの供給量を実験的に計測した例は殆ど無く、そのような定量的な指標に基づいた医療効果の評価の基礎を提案できたことは本研究の成果の1つである。

6.2 今後の課題

本研究により活性種の計測や細胞実験は様々な知見を得ることが出来たが、“プラズマ医療の実現”には多くの課題がまだ残っている。以下は本研究の成果を踏まえての今後の課題である。

▷ 動物実験による医療効果の比較

in vivo 実験と *in vitro* 実験では、プラズマの効果が異なるという結果はこれまでも多く報告されている。生物の体内では様々な抗体やフィードバック機構が存在するため、がん細胞の細胞死を効果的に誘導するにはより効率的なプロセスが必要となる。実際に *in vitro* 実験では効果の確認されたプラズマ照射でも、*in vivo* 実験では有効な結果が得られなかった事例も多く、やはり医療効果の評価し臨床応用につなげるためには動物実験が必要であると考えられる。本研究では OH ラジカル供給量が細胞の不活性化と強い相関を持つという結果が得られたが、*in vivo* 実験でも OH ラジカルを選択的に供給し、 $\frac{\text{腫瘍サイズ}}{\text{活性種 dose 量}}$ のような評価を行う必要がある。

▷ 他のプラズマ源による評価

第2章でも記述がある通り、RF プラズマジェットや DBD など、医療応用の可能な低温なプラズマ源はヘリウムプラズマジェット以外にも研究されている。それぞれのプラズマ源が特徴を有する一方、共通の尺度に基づくそれぞれのプラズマ源の有効性の比較は未だになされていない。また、本研究成果は「RONS が医療効果の最重要要因であり、有効な活性種を同定する事が肝要」との前提に基づいているが、他のプラズマ源でも特定の活性種、例えば OH ラジカルなどで同様の医療効果が得られるかどうかを尺度 (Index) に基づき評価しなければならない。各種プラズマ源での計測実験や生物実験は広く行われており、今後それらプラズマ源の評価が待たれるところである。

▷ 液中での化学反応を考慮した有効な活性種の同定

本研究は第1章の図 2.1 にあるように、プラズマ源 → 気相中の物理化学反応 → \rightleftharpoons → 細胞の応答に関して行われたものである。気相中から液相へ供給される活性種はいわば反応の“引き金”であり、実際に細胞などへ酸化ストレスを与えるのは気相中より供給された活性種に端を発する液中の活性種である。液中での反応や最終的な生成物を見積もるには気相中での計測結果が必要であるものの、液中での反応シミュレーションや計測実験なども増えつつあり、今後の詳細な検討が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの人にご協力頂きました。指導教員の小野先生には、いつも懇切丁寧なご指導・ご鞭撻を頂きました。研究を通して専門知識だけではなく様々な能力や経験を得ることが出来たのも、小野先生のお陰だと感謝しております。研究の楽しさを教えてくださって本当にありがとうございました。片岡研究室の水野和恵様にも大変お世話になりました。生物実験など、当研究室での経験がなく知識の少ない分野で有用な知見が得られましたのも、水野様の優しく丁寧なご協力のお陰だったと感謝致しております。片岡研究室の片岡先生、三浦先生にも施設を共有して頂きましたり、ご助言を頂きましたりと大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。東京都市大学の平田先生、筒井先生にも生物実験を行うに辺り試料を提供して頂きご助言を頂きましたりと大変お世話になりました。今後もプラズマ医療分野の発展のため、色々とお話出来ましたら幸いです。豊橋技術科学大学の水野彰先生、栗田先生にも生物実験を行うにあたり大変お世話になりました。学会でのディスカッションだけではなく、同じ研究グループとして当分野の発展に貢献出来たことを大変嬉しく思います。御二方に心より感謝申し上げます。

小野亮研究室の皆様にも、大変お世話になりました。博士課程の全君は、ミーティングの運用など研究室を盛り上げてくれました。修士2年の皆さんも、研究だけではなく私生活などでいつも面白い話を聞かせてくれてました。修士1年・卒論生の皆様も一緒に研究を行うことで改めて基本に立ち返ることが出来ました。研究室の運用からその他の行事など、充実した研究生生活を遅れましたのも皆様のお陰です。

また、3ヶ月間でしたが国連教育科学文化機関 (UNESCO) バンコク・オフィスにて科学教育分野でのインターンにおいてご指導・ご鞭撻頂きました Dr. Jayakumar Ramasamy にもこの場をお借りして感謝申し上げます。

皆様のご協力なくしては本研究は成り立ち得なかったものと考えます。本研究及び私の研究生生活を支えてくださいました全ての皆様に心よりの感謝を申し上げ、本論文を閉じたいと思います。

参考文献

- [1] 関口忠 “プラズマ理工学” オーム社 (1979)
- [2] 菅井秀郎 “プラズマエレクトロニクス” オーム社 (2000)
- [3] S. Okazaki, M. Kogoma, M. Uehara and Y. Kimura “Appearance of stable glow discharge in air, argon, oxygen and nitrogen at atmospheric pressure using a 50 Hz source” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **26** 889-892 (1993)
- [4] J. M. Meek “A Theory of Spark Discharge” *Phys. Rev.* **57** 142 (1940)
- [5] L. B. Loeb “Fundamental Processes of Electrical Discharge in Gases” *John Wiley & Sons* (1939)
- [6] L. B. Loeb “Ionizing Waves of Potential Gradient” *Science* **148** 1417 (1965)
- [7] 林 泉 著 “高電圧プラズマ工学” 丸善株式会社 **第 5 章** (1994)
- [8] M. Laroussi and X. Lu “Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications” *Appl. Phys. Lett.* **87** 113902 (2005)
- [9] S. D. Anghel and A. Simon “An alternative source for generating atmospheric pressure non-thermal plasmas” *Plasma Sources Sci. Technol.* **16** B1 – B4 (2007)
- [10] L. Tian, H. Nie, N. P. Chatterton, J. Branford-White, Y. Qui and L. Zhu “Helium/oxygen atmospheric pressure plasma jet treatment for hydrophilicity improvement of grey cotton knitted fabric” *Appl. Surf. Sci.* **257** 7113 – 7118 (2011)
- [11] H. W. Herrman, I. Henins, J. Park and G. S. Selwin “Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ)” *Phys. Plasmas* **6** 2284 (1999)
- [12] L. Marcinauskas, Silinskas and A. Grigonis “Influence of standoff distance on the structure and properties of carbon coatings deposited by atmospheric plasma jet” *Appl. Surf. Sci.* **257** 2694 – 2699 (2011)
- [13] H. S. Uhm and Y.C. Hong “Various microplasma jets and their sterilization of microbes” *Thin Solid Films* **519** 6974 – 6980 (2011)

- [14] Y. Ren, C. Wang and Y. Qiu “Aging of surface properties of ultra high modulus polyethylene fibers treated with He/O₂ atmospheric pressure plasma jet” *Surf. Coat. Technol.* **202** 2670 – 2676 (2008)
- [15] H. Furusho, K. Kitano, S. Hamaguchi and Y. Nagasaki “Preparation of Stable Water-Dispersible PEGylated Gold Nanoparticles Assisted by Nonequilibrium Atmospheric-Pressure Plasma Jets” *Chem. Mater.* **21** 3526 – 3535 (2009)
- [16] Gregory Friedman, Gary Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Friedman “Applied Plasma Medicine” *Plasma Process. Polym.* **5** 503 – 533 (2008)
- [17] Q. S. Yu and C. Huang “Sterilization effects of atmospheric cold plasma brush” *Appl. Phys. Lett.* **88** 013903 (2006)
- [18] J. Y. Kim, Y. Wei, J. Li and S. Kim S “Cell Internal Treatable Microplasma Jet in Cancer Therapies” *64th Gaseous Electronics Conferences Bulletin* **21** (2011)
- [19] 筒井千尋、平田孝道 他 “マイクロスポットプラズマ源による血管新生促進メカニズム” 静電気学会講演論文集’ 11 149 – 154 (2011)
- [20] Y. Sakai, V. Khajoe, Y. Ogawa, K. Kusuhara, Y. Katayama and T. Hara, “A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma” *J. Biotechnol.* **121** 299 – 308 (2006)
- [21] H. Ayan, E. D. Yildirim, D. D. Pappas and W. Sun “Development of a cold atmospheric pressure microplasma jet for freeform cell printing” *Appl. Phys. Lett.* **99** 111502 (2011)
- [22] D. O’Connell, L. J. Cox, W. B. Hyland, S. J. McMahon et al. “Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA” *Appl. Phys. Lett.* **98** 043701 (2011)
- [23] L. Brullè, M. Vandamme, D. Riès, E. Martel, E. Robert, S. Lerondel, V. Trichet, S. Richard, J-M Pouvesle, A. Le Pape *PLoS ONE* **7** e52653 (2012)
- [24] J. Schlegel, J. Köritzner and V. Boxhammer “Plasma in cancer treatment” *Clinical Plasma Medicine* **1** 2 – 7 (2013)
- [25] M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston and B. Trink “Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy” *Brit. J. Cancer* **105** 1295 – 1301 (2011)
- [26] B. Gweon, M. Kim, D. Kim, H. Kim, H. Jung, J. H. Shin and W. Choe “Differential responses of human liver cancer and normal cells to atmospheric pressure plasma” *Appl. Phys. Lett.* **99** 063701 (2011)

- [27] H. J. Ahn, K. Il Kim, G. Kim, E. Moon, S. S. Yang, J-S Lee “Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals” *PLoS ONE* **6** e28154 (2011)
- [28] K. Kim, G. Kim, Y. C. Hong and S. S. Yang “A cold micro plasma jet device suitable for bio-medical applications” *Microelectron. Eng.* **87** 1177 – 1180 (2010)
- [29] H. Yasuda, M. Hashimoto, M. M. , K. Takashima and A. Mizuno “States of Biological Components in Bacteria and Bacteriophages during Inactivation by Atmospheric Dielectric Barrier Discharges” *Plasma Process. Polym.* **5** 615 – 621 (2008)
- [30] S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi “Effects of pH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions due to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Application” *Plasma Process. Polym.* **7** 33 – 42 (2010)
- [31] A. V. Nastuta, I. Topala, C. Grigoras, V. Pohoata and G. Popa “Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 105204 (2011)
- [32] R. S. Tipa “Plasma-Stimulated Wound Healing” *IEEE Trans. Plasma Sci.* **39** 2978 – 2979 (2011)
- [33] G. Lloyd, Gary Friedman, S. Jafri, G. Schultz, A. Fridman and K. Harding “Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care” *Plasma Process. Polym.* **7** 194 – 211 (2010)
- [34] J. Heinlin, G. Isbary, W. Stolz, G. Morfill, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, T. Nosenko, J. L. Zimmermann and S. Karrer “Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology” *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **25** 1 – 11 (2011)
- [35] V. Kwan, M. J. Bourke, S. J. Williams, P. E. Gillespie, M. A. Murray, A. J. Kaffes, M.S. Henriquez and R. O. Chan “Argon Plasma Coagulation in the Management of Symptomatic Gastrointestinal Vascular Lesions: Experience in 100 Consecutive Patients with Long-Term Follow-Up APC in the Management of Vascular Lesions” *Am. J. Gastroenterol.* **101** 58 – 63 (2006)
- [36] H-W Kwak, W. J. Lee, S. M. Woo, B. H. Kim, J-W Park, C-M Kim, T. H. Kim, S-S Han, S. H. Kim, S-J Park and M. C. Kook “Efficacy of argon plasma coagulation in the treatment of radiation-induced hemorrhagic gastroduodenal vascular ectasia” *Scand. J. Gastroentero.* **49** 238 (2014)
- [37] 小田哲治 “環境汚染揮発性有機物質の除去” *プラズマ・核融合学会誌* **74** 146 (1998)

- [38] S. Rupf, A. Lehmann, M. Hannig, B. Schäfer, A. Schubert, U. Feldmann and A. Schindler “Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet” *J. Med. Microbiol.* **59** 206 – 212 (2010)
- [39] S. H. Nam, H. W. Lee, J. W. Hong, H. J. Lee and G. C. Kim “Enhanced Long-Term Color Stability of Teeth Treated with Hydrogen Peroxide and Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jets” *Plasma Process. Polym.* **11** 1010 – 1017 (2014)
- [40] G. C. Kim, H. W. Lee, J. H. Byun, J. Chung, Y. C. Jeon and J. K. Lee “Dental Applications of Low-Temperature Nonthermal Plasmas” *Plasma Process. Polym.* **10** 199 – 206 (2013)
- [41] J. S. Sousa, G. Bauville, B. Lacour, V. Puech, M. Touzeau and J. L. Ravanat “DNA oxidation by singlet delta oxygen produced by atmospheric pressure microdischarge” *Appl. Phys. Lett.* **97** 141502 (2010)
- [42] S. Wakao, B. L. Chin, H. K. Ledford, R. M. Dent, D. Casero, M. Pellegrini, S. S. Merchant and K. K. Niyogi “Phosphoprotein SAK1 is a regulator of acclimation to singlet oxygen in *Chlamydomonas reinhardtii*” *eLIFE* **3** e02286 (2014)
- [43] S. G. Sokolovski, S. A. Zolotovskaya, A. Goltsov, C. Pourreyron, A. P. South and E. U. Rafailov “Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells” *Scientific Reports* **3** 03484 (2013)
- [44] A. A. Ionin, I. V. Kochetov, A. P. Napartovich and N. N. Yuryshv “Physics and engineering of singlet delta oxygen production in low-temperature plasma” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40** R25 (2007)
- [45] D. Trachootham, J. Alexandre and P. Huang “Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?” *Nat. Rev. Drug Discov.* **8** 579 (2009)
- [46] R. A. Carins, I. S. Harris and T. W. Mak “Regulation of cancer cell metabolism” *Nat. Rev. Cancer* **11** 85 – 95 (2011)
- [47] M. Vandamme, E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, L. A. Pape and M. J. Pouvesle “Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results” *Plasma Process. Polym.* **7** 264 (2010)
- [48] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence and J. J. Collins “A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics” *Cell* **130** 797 – 810 (2007)
- [49] J. Han, S. H. Back, J. Hur, Y-H Lin, R. Gildersleeve, J. Shan, C. L. Yuan, D. Krokowski, S. Wang, M. Hatzoglou, M. S. Kilberg, M. A. Sartor and R. J. Kaufman “ER-stress-

- induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death” *Nat. Cell Biol.* **15** 481 – 490 (2013)
- [50] B. Alberts, 中村桂子, 松原謙一 “Essential 細胞生物学” 南江堂 (2011)
- [51] K. Urabe, T. Morita, K. Tachibana and B. N. Ganguly “Investigation of discharge mechanisms in helium plasma jet at atmospheric pressure by laser spectroscopic measurements” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43** 095201 (2010)
- [52] Y. Sakiyama, N. Knake, D. Schröder, J. Winter, V. Schluz-von der Gathen and D. B. Graves “Gas flow dependence of ground state atomic oxygen in plasma needle discharge at atmospheric pressure” *Appl. Phys. Lett.* **97** 151501 (2011)
- [53] S. Reuter, K. Niemi, V. Schluz-von der Gathen and H. F. Döbele “Generation of atomic oxygen in the effluent of an atmospheric pressure plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **18** 015006 (2009)
- [54] J. Winter, K. Wende, K. Masur, S. Iseni, Münnbier, M. U. Hammer, H. Tresp, K-D Weltmann and S. Reuter “Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 295401 (2013)
- [55] N. Knake, S. Reuter, K. Niemi, V. Schluz-von der Gathen and J. Winter 2008 “Absolute atomic oxygen density distributions in the effluent of a microscale atmospheric pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** (2008)
- [56] B. L. Sands, R. J. Leiweke and B. N. Ganguly “Spatiotemporally resolved Ar ($1s_5$) metastable measurements in a streamer-like He/Ar atmospheric pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43** 282001 (2010)
- [57] J. J. Liu and M. G. Kong “Sub-60°C atmospheric helium-water plasma jets: modes, electron heating and downstream reaction chemistry” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 345203 (2011)
- [58] Q. Xiong, X. Lu, Y. Xian, J. Liu, C. Zou, Z. Xiong, W. Gong, K. Chen, X. Pei, F. Zou, J. Hu, Z. Jiang and Y. Pan “Experimental investigations on the propagation of the plasma jet in the open air” *J. Appl. Phys.* **107** 073302 (2010)
- [59] W. C. Zhu, Q. Li, X. M. Zhu and Y. K. Pu “Characteristics of atmospheric pressure plasma jets emerging into ambient air and helium” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 202002 (2009)
- [60] J. S. Sousa, K. Niemi, L. J. Cox, Q. Th. Algwari, T. Gans and D. O’Connell “Cold atmospheric pressure plasma jets as sources of singlet delta oxygen for biomedical applications” *Appl. Phys. Lett.* **109** 123302 (2011)

- [61] R. N. Ma, H. Q. Feng, Y. D. Liang, Q. Zhang, Y. Tian, B. Su, J. Zhang and J. Fang “An atmospheric-pressure cold plasma leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulating intracellular reactive oxygen species and calcium” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 285401 (2013)
- [62] S. R. Burrows, A. Fernan V. Argaet and A. Suhrbier “Bystander apoptosis induced by CD8+ cytotoxic T cell (CTL) clones: implications for CTL lytic mechanisms” *Int. Immunol.* **5** 1049 – 1058 (1993)
- [63] G. H. Holm, C. Zhang, P. R. Gorry, K. Peden, D. Schols, E. De Clercq and D. Gabuzda “Apoptosis of Bystander T Cells Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Increased Envelope/Receptor Affinity and Coreceptor Binding Site Exposure” *J. Virol.* **78** 4541 – 4551 (2004)
- [64] S. Dreschers, C. Gille, M. Haas, J. Grosse-Ophoff, M. Schneider, A. Leiber, H-J Bühring and T. W. Orlikowsky “Infection-induced Bystander-Apoptosis of Monocytes Is TNF-alpha-mediated” *PLoS ONE* **8** e53589 (2013)
- [65] I. Seth, J. L. Schwartz, R. D. Stewart, R. Emery, M. C. Joiner and J. D. Tucker “Neutron Exposures in Human Cells: Bystander Effect and Relative Biological Effectiveness” *PLoS ONE* **9** e98947 (2014)
- [66] I. Feine, I. Pinkas, Y. Salomon and A. Scherz “Local Oxidative Stress Expansion through Endothelial Cells - A Key Role for Gap Junction Intercellular Communication” *PLoS ONE* **7** e41633 (2012)
- [67] David B. Graves “The emerging role of reactive and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **45** 263001 (2012)
- [68] M. G. Kong “Plasma medicine: an introductory review” *New. J. Phys.* **11** 115012 (2009)
- [69] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge “Free Radicals in Biology and Medicine” *New York: Oxford University Press* (2007)
- [70] M. A. Torres ”ROS in biotic interactions” *Physiol. Plantarum* **138** 414 – 29 (2010)
- [71] P. Wojtaszek “Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection” *Biochem. J.* **322** 81 – 692 (1997)
- [72] C. H. Foyer and G. Noctor “Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications” *Antioxid. Redox Signaling* **11** 861 – 905 (2009)
- [73] H. M. Joh, J. Y. Choi, S. J. Kim, T. H. Chung and T-H Kang “Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet” *Scientific Reports* **4** 06638 (2014)

- [74] P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look and T. J. Mitchison “A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish” *Nature* **459** 996 (2009)
- [75] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J.-M. Pouvesle and A. Le Pape “ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma” *Int. J. Cancer* **130** 2185 – 2194 (2012)
- [76] E. Novo and M. Parola “Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis” *Fibrogenesis Tissue Repair* **1** 1 – 58 (2008)
- [77] B. Halliwell “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life” *Plant Physiol.* **141** 312 – 22
- [78] C. Welz, S. Becker, Y-F Li, T. Shimizu, J. Jeon, S. Schwenk-Zieger, H. M. Thomas, G. Isbary, G. E. Morfill, U. Harréus “Effects of cold atmospheric plasma on mucosal tissue culture” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 045401 (2013)
- [79] Y. Nakagawa, R. Ono and T. Oda “Density and temperature measurement of OH radicals in atmospheric-pressure pulsed corona discharge in humid air” *J. Appl. Phys.* **110** 073304 (2011)
- [80] P. Pacher, J. S. Beckman and L. Liaudet “Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease” *Physiol. Rev.* **87** 315 (2007)
- [81] M. Yusupov, E. C. Neyts, P. Simon, G. Berdiyrov, R. Snoeckx, A. C. T. van Duin and A. Bogaerts “Reactive molecular dynamics simulations of oxygen species in a liquid water layer of interest for plasma medicine” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 025205 (2014)
- [82] J. Van der Paal, S. Aernouts, A. C. T. van Duin, E. C. Neyts and A. Bogaerts “Interaction of O and OH radicals with a simple model system for lipids in the skin barrier: a reactive molecular dynamics investigation for plasma medicine” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 395201 (2013)
- [83] M. Y. Choi, S. K. Kang, Il G. Koo, J. H. Cho, Jae-Chul Jung and G. J. Collins “He-H₂O₂ Plasma Jet Irradiation of Tissue Surfaces: Study of Dominant Pathways For Plasma Chemical Tissue Removal” *IEEE Trans. Plasma Sci.* **41** 907 (2013)
- [84] K. Ninomiya, T. Ishijima, M. Imamura, T. Yamahara, H. Enomoto, K. Takahashi, Y. Tanaka, Y. Uesugi and N. Shimizu “Evaluation of extra- and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric-pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 425401 (2013)
- [85] R. M. Abolfath, A. C. T. van Duin and T. Brabec “Reactive Molecular Dynamics Study on the First Steps of DNA Damage by Free Hydroxyl Radicals” *J. Phys. Chem. A* **115** 11045 – 11049 (2011)

- [86] C. Wang and Srivastave “OH number densities and plasma jets operating with different plasma gases (Ar, Ar/N₂, and Ar/O₂)” *Eur. Phys. J. D* **60** 465 – 477 (2010)
- [87] R. Atkinson, D. L. Baulch, R. A. Cox, J. N. Crowley, R. F. Hampson, R. G. Hynes, M. E. Jenkin, M. J. Rossi and J. Troe “Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Volume I - gas phase reactions of O_x, HO_x, NO_x and SO_x species” *Atmos. Chem. Phys.* **4** 1461 – 738 (2004)
- [88] C. Jiang and C. Carter “Absolute atomic oxygen density measurements for nanosecond-pulsed atmospheric-pressure plasma jets using two-photon absorption laser-induced fluorescence spectroscopy” *Plasma Sources Sci. technol.* **23** 065006 (2014)
- [89] D. Frein, S. Schildknecht, M. Bachschmi and V. Ullrich “Redox regulation: a new challenge for pharmacology” *Biochem. Pharmacol.* **70** 1 – 13 (2005)
- [90] C. C. Winterbourn and M. B. Hampton “Thiol chemistry and specificity in redox signaling Free Radical” *Biol. Med.* **45** 549 – 61 (2008)
- [91] S. Arndt, P. Unger, E. Wacker, T. Shimizu, J. Heinlin, Y-F Li, H. M. Thomas, G. E. Morfill, J. L. Zimmermann, A-K Bosserhoff and S. Karrer “Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing *In Vitro* and *In Vivo*” *PLoS ONE* **8** e79325 (2013)
- [92] M. D. Brand “The sites and topology of mitochondrial superoxide production” *Experimental Gerontology* **45** 466 – 472 (2010)
- [93] W. W. Wheaton, S. E. Weinberg, R. B. Hamanaka, S. Soberanes, L. B. Sullivan, E. Anso, A. Glasauer, E. Dufour, G. M. Mutlu, G. S. Budigner, N. S. Chandel “Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis” *eLIFE* **3** e02242 (2014)
- [94] H. J. Formana, J. M. Fukutob, T. Millerb, H. Zhanga, A. Rinnaa and S. Levya “The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal” *Arch. Biochem. Biophys.* **477** 183 – 195
- [95] T. Sato, M. Yokoyama and K. Johkura “A key inactivation factor of HeLa cell viability by a plasma flow” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 372001 (2011)
- [96] J. Winter, H. Tresp, M. U. Hammer, S. Iseni, S. Kupsch, A Schmidt-Bleker, K. Wende, M D’unnbier, K. Masur, K-D Weltmann and S. Reuter “Tracking plasma generated H₂O₂ from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 285401 (2014)
- [97] H. Rhee, L. Polak and E. Fuchs “Lhx2 Maintains Stem Cell Character in Hair Follicles” *Science* **312** 1946 – 1949

- [98] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa and M. Hori “Plasma-Activated Medium Selectivity Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signalling Molecule, AKT Kinase” *Plasma Medicine* **1** 265 – 277 (2011)
- [99] M. J. Daly, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, R. D. Leapman, B. Lai, B. Ravel, S-M W. Li, K. M. Kemner and J. K. Fredrickson “Protein Oxidation Implicated as the Primary Determinant of Bacterial Radioresistance” *PLoS Biol.* **5** e92 (2007)
- [100] C. O. Laux¹, T. G. Spence, C. H. Kruger and R. N. Zare “Optical diagnostics of atmospheric pressure air plasmas” *Plasma Sources Sci. Technol.* **12** 125 – 138 (2003)
- [101] M. Šimek “The modelling of streamer-induced emission in atmospheric pressure, pulsed positive corona discharge: N₂ second positive and NO- γ systems” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35** 1967 (2002)
- [102] 大澤敏彦, 小保方富夫 “レーザー計測” 裳華房 **8** レーザー分光による計測 (1994)
- [103] 日本化学会 編 “第5版 実験化学講座 9 物質の構造I 分光 上” 丸善株式会社 **8** 分光 (2003)
- [104] H. Wu, P. Sun, H. Feng, H. Zhou, R. Wang, Y. Liang, J. Lu, W. Zhu, J. Zhang and J. Fang “Reactive Oxygen Species in a Non-thermal Plasma Microjet and Water System: Generation, Conversion, and Contributions to Bacteria Inactivation – An Analysis by Electron Spin Resonance Spectroscopy” *Plasma Process. Polym.* **9** 417 – 424 (2012)
- [105] H. Tresp, M. U. Hammer, J. Winter, K-D Weltmann and S. Reuter “Quantitative detection of plasma-generated radicals in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 435401 (2013)
- [106] A. Tani, S. Fukui, S. Ikawa and K. Kitano “Diagnostics of superoxide anion radical induced in liquids by atmospheric-pressure plasma using superoxide dismutase” *Jpn. J. Appl. Phys.* **54** 01AF01 (2015)
- [107] S. R. Plimpton, M. Golkowski, D. G. Mitchell, C. Austin, S. S. Eaton, G. R. Eaton, C. Golkowski and M. Voskuil “Remote Delivery of Hydroxyl Radicals via Secondary Chemistry of a Nonthermal Plasma Effluent” *Biotechnol. Bioeng.* **110** 1936 (2013)
- [108] M. Dünbier, A Schmidt-Bleker, J. Winter, M. Wolfram, R. Hippler, K-D Weltmann and S. Reuter “Ambient air particle transport into the effluent of a cold atmospheric-pressure argon plasma jet investigated by molecular beam mass spectrometry” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 435203 (2013)

- [109] B. T. J. van Ham, S. Hofmann, R. Brandenburg and P. J. Bruggeman “*In situ* absolute air, O₃ and NO densities in the effluent of a cold RF argon atmospheric pressure plasma jet obtained by molecular beam mass spectrometry” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 224013 (2014)
- [110] D. Maleti, N. Pua, S. Lazovi, G. Malovi, T. Gans, V Schulz-von der Gathen and Z. Lj Petrovi “Detection of atomic oxygen and nitrogen created in a radio-frequency-driven micro-scale atmospheric pressure plasma jet using mass spectrometry” *Plasma Phys. Contr. F.* **54** 124046 (2012)
- [111] E. Takai, T. Kitamura, J. Kuwabara, S. Ikawa, S. Yoshizawa, K. Shiraki, H. Kawasaki, R. Arakawa and K. Kitano “Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 285403 (2014)
- [112] R. Ono and T. Oda “Measurement of gas temperature and OH density in the afterglow of pulsed positive corona discharge” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** 035204 (2008)
- [113] R. Ono, Y. Yamashita, K. Takezawa, and T. Oda “Behaviour of atomic oxygen in a pulsed dielectric barrier discharge measured by laser-induced fluorescence” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38** 2812 (2005)
- [114] Y. Teramoto, R. Ono and T. Oda “Measurement of N₂(A) metastable in N₂ pulsed positive corona discharge with trace amounts of additives” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 235209 (2009)
- [115] Y. Teramoto, R. Ono and T. Oda “Production mechanism of atomic nitrogen in atmospheric pressure pulsed corona discharge measured using two-photon absorption laser-induced fluorescence” *J. Appl. Phys.* **111** 113302 (2012)
- [116] Y. Teramoto and R. Ono “Measurement of vibrationally excited N₂(*v*) in an atmospheric-pressure air pulsed corona discharge using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)” *J. Appl. Phys.* **116** 073302 (2014)
- [117] R. Bussiahn, E. Kindel, H. Lange and K-D Weltmann “Spatially and temporally resolved measurements of argon metastable atoms in the effluent of a cold atmospheric pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43** (2010)
- [118] A. Shashurin, M. N. Shneider, A. Dogairu, R. B. Miles and M. Keider “Temporary-resolved measurement of electron density in small atmospheric plasmas” *Appl. Phys. Lett.* **96** 171502 (2011)
- [119] 行村 建 “放電プラズマ工学” 電気学会・オーム社共同編集 **8・2・2** (2008)
- [120] 北野勝久, 井川聡, 浜口智志 “小型プラズマ発生装置を用いた殺菌” *Bioindustry* (2009)

- [121] J. L. Walsh, J. J. Shi and M. G. Kong “Contrasting characteristics of pulsed and sinusoidal cold atmospheric plasma jets” *Appl. Phys. Lett.* **88** 171501 (2006)
- [122] K. Urabe, Y. Ito, O. Sakai and K. Tachibana “Interaction between Dielectric Barrier Discharge and Positive Streamer in Helium Plasma Jet at Atmospheric Pressure” *Jpn. J. Appl. Phys.* **49** 106001 (2010)
- [123] L. Chen, P. Zhao, X. Shu, J. Shen and Y. Meng “On the mechanism of atmospheric pressure plasma plume” *Phys. Plasmas* **17** 083502 (2010)
- [124] M. G. Kong, B. N. Ganguly and R. F. Hicks “Plasma jets and plasma bullets” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 030201 (2012)
- [125] N. M. Bourdet, M. Laroussi, A. Begum and E. Karakas “Experimental investigations of plasma bullets” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 055207 (2009)
- [126] M. Teschke, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec and J. Engemann “High-Speed Photographs of a Dielectric Barrier Atmospheric Pressure Plasma Jet” *IEEE Trans. Plasma Sci.* **33** 310 – 311 (2005)
- [127] Q. T. Algwari and D. O’Connell “Electron dynamics and plasma jet formation in a helium atmospheric pressure dielectric barrier discharge jet” *Appl. Phys. Lett.* **99** 121501 (2011)
- [128] G. V. Naidis “Modelling of streamer propagation in atmospheric-pressure helium plasma jets” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43** 402001 (2010)
- [129] J. Shi, F. Zhong, J. Zhang, D. W. Liu and M. G. Kong “A hypersonic plasma bullet train traveling in an atmospheric dielectric-barrier discharge jet” *Phys. Plasmas* **15** 013504 (2008)
- [130] D. Breden, K. Miki and L. L. Raja “Self-consistent two-dimensional modeling of cold atmospheric-pressure plasma jets/bullets” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034011 (2012)
- [131] 北野勝久, 谷口和成, 酒井道, 高木浩一, 浪平隆男, 服部邦彦 “大気圧プラズマをつけてみよう” *J. Plasma Fusion Res.* **No.1** 19 – 28 (2008)
- [132] X. P. Lu, Q. Xiong et al. “A cold plasma cross made of three bullet-like plasma plumes” *Thin Solid Films* **518** 967 – 970 (2009)
- [133] B. L. Sands, B. N. Ganguly and K. Tachibana “A streamer-like atmospheric pressure plasma jet” *Appl. Phys. Lett.* **92** 151503 (2008)
- [134] G. V. Naidis “Simulation of streamer propagation along helium jets in ambient air: Polarity-induced effects” *Appl. Phys. Lett.* **98** 141501 (2011)

- [135] 日本学術振興会プラズマ材料科学第 153 委員会 編 “大気圧プラズマ 基礎と応用” オーム社
4.4.2 章 (2009)
- [136] J. S. Chang, R. M. Hobson, 市川幸好, 金田輝男 “電離気体の原子・分子過程” 東京電機大
学出版 第 4 章 (1982)
- [137] X. Lu, M. Laroussi and V. Puech “On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets
and plasma bullets” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034005 (2012)
- [138] W. Van Gaens and A. Bogaerts “Reaction pathways of biomedically active species in an
Ar plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **23** 035015 (2013)
- [139] Q. Xiong, A. Yu. Nikiforov, L. Li, P. Vanraes, N. Britun, R. Snyders, X. P. Lu and C.
Leys “Absolute OH density determination by laser induced fluorescence spectroscopy in
an atmospheric pressure RF plasma jet” *Eur. Phys. J. D* **8** 30474 (2012)
- [140] A. F. H. van Gessel, K. M. J. Alards and P. J. Bruggeman “NO production in an RF
plasma jet at atmospheric pressure” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 265202 (2013)
- [141] J. Voráč, P. Dvořák, V. Procházka, J. Ehlbeck and S Reuter “Measurement of hydroxyl
radical (OH) concentration in an argon RF plasma jet by laser-induced fluorescence”
Plasma Sources Sci. Technol. **22** 025016 (2013)
- [142] E. Karakas “CHARACTERIZATIONS OF ATMOSPHERIC PRESSURE LOW TEM-
PERATURE PLASMA JETS AND THEIR APPLICATIONS” *ProQuest Dissertations
And Theses; Thesis (Ph.D.)–Old Dominion University* **72 – 07** (2011)
- [143] Q. Xiong, A. Nikiforov, N. Britun, R. Snyders, C. Leys and X. Lu “A simple profile-fitting
method to determine the metastable and resonant densities in a cold atmospheric pressure
argon plasma jet” *J. Appl. Phys.* **110** 073302 (2011)
- [144] S. Hofmann, A. F. H. van Gessel, T. Verreycken and P. Bruggeman “Power dissipation,
gas temperatures and electron densities of cold atmospheric pressure helium and argon
RF plasma jets” *Plasma Sources Sci. Technol.* **20** 065010 (2011)
- [145] INP Greifswald webpage: [http://www.inp-greifswald.de/web3.nsf/index?
OpenPage&Eintrag=A6109FFA202F67A5C1257AFD002A2A7E&Language=eng](http://www.inp-greifswald.de/web3.nsf/index?OpenPage&Eintrag=A6109FFA202F67A5C1257AFD002A2A7E&Language=eng)
- [146] 池上 健 “産総研 TODAY Vol. 5” 産業技術総合研究所 No. 5 (2005)
- [147] H. Inaba, T. Ikegami et al. “Phase Locking of a Continuous-wave Optical Parametric Oscil-
lator to an Optical Frequency Comb for Optical Frequency Synthesis” *IEEE J. Quantum
Electron.* **40** No. 7 (2004)
- [148] G. W. Flynn, C. S. Parmenter and A. M. Wodtke “Vibrational Energy Transfer” *J. Phys.
Chem.* **100** 12817 – 12838 (1996)

- [149] J. D. Bamford, E. L. Jusinski and K. W. Bischel “Absolute two-photon absorption and three photon ionization cross sections for atomic oxygen” *Phys. Rev. A* **34** 185 (1986)
- [150] U. Meier, K. Kohse-Höinghaus and Th Just “H and O atom detection for combustion applications: study of quenching and laser photolysis effects” *Chem. Phys. Lett.* **126** 567 (1986)
- [151] U. Rahmann, W. Kreutner and K. Kohse-Höinghaus “Rate-equation modeling of single- and multiple-quantum vibrational energy transfer of OH($A^2\Sigma^+$, $v' = 0$ to 3)” *Appl. Phys. B* **69** 61 – 70 (1999)
- [152] L. R. Williams and F. R. Crosley “Collisional vibrational energy transfer of OH ($A^2\Sigma^+$, $v = 1$)” *J. Chem. Phys.* **104** 6507 (1996)
- [153] M. Tamura, A. B. Pamela, E. H. Joel, L. Jorge and B. J. Jay “Collisional quenching of CH(A), OH(A), and NO(A) in low pressure hydrocarbon flames” *Combust. Flame* **114** 502 (1998)
- [154] K. Niemi, V. Schulz-von der Gathen and H. F. Döbele “Absolute calibration of atomic density measurements by laser-induced fluorescence spectroscopy with two-photon excitation” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **34** 2330 (2001)
- [155] K. Niemi, V. Schulz-von der Gathen and H. F. Döbele “Absolute atomic oxygen density measurements by two-photon absorption laser-induced fluorescence spectroscopy in an RF-excited atmospheric pressure plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **14** 375 (2005)
- [156] A. Goehlich, T. Kawetzki and H. F. Döbele “On absolute calibration with xenon of laser diagnostic methods based on two-photon absorption” *J. Chem. Phys.* **108** 9362 (1998)
- [157] 山田剛, “大気圧パルスバリア放電における NO 挙動特性の解明” 本学修士論文 (2002)
- [158] F. Tochikubo and T. H. Teich “Optical Emission from a Pulsed Corona Discharge and Its Associated Reactions” *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** 1343 (2000)
- [159] R. Ono and T. Oda “Visualization of Streamer Channels and Shock Waves Generated by Positive Pulsed Corona Discharge Using Laser Schlieren Method” *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** 321 (2004)
- [160] E. Robert, V. Sarron, T. Darny, D. Riés, S. Dozias, J. Fontane, L. Joly and J-M Pouvesle “Rare gas flow structuration in plasma jet experiments” *Plasma Sources Sci. Technol.* **23** 012003 (2014)
- [161] M. Ghasemi, P. Olszewski, J. W. Bradley and J. L. Walsh “Interaction of multiple plasma plumes in an atmospheric pressure plasma jet array” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 052001 (2012)

- [162] P. K. Papadopoulos, P. Vafeas, P. Svarnas, K. Gazeli, P. M. Hatzikonstantinou, A. Gkelios and F Clément “Interpretation of the gas flow field modification induced by guided streamer (‘plasma bullet’) propagation” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 425203 (2014)
- [163] S. Yonemori, Y. Nakagawa, R. Ryo and T. Oda “Measurement of OH density and air-helium mixture ratio in atmospheric-pressure helium plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **45** 225202 (2012)
- [164] X. P. Lu, Z. H. Jiang, Q. Xiong, Z. Y. Tang and Y. Pan “A single electrode room-temperature plasma jet device for biomedical applications” *Appl. Phys. Lett.* **92** 151504 (2008)
- [165] A. F. H. van Gessel, E. A. D. Carbone, P. J. Bruggeman and J. J. A. M. van der Mullen “Laser scattering on an atmospheric pressure plasma jet: disentangling Rayleigh, Raman and Thomson scattering” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 015003 (2012)
- [166] M. Qian, C. Ren, D. Wang, J. Zhang and G. Wei “Stark broadening measurement of the electron density in an atmospheric pressure argon plasma jet with double power electrodes” *J. Appl. Phys.* **107** 063303 (2010)
- [167] Goran B. Sretenović, Ivan B. Krstić, Vesna V. Kovačević, Bratislav M. Obradović, and Milorad M. Kuraica “Spectroscopic measurement of electric field in atmospheric-pressure plasma jet operating in bullet mode” *Appl. Phys. Lett.* **99** 161502 (2011)
- [168] F. Massines, A. Rabehi, P. Decomps, R. B. Gadri, P. Segur and C. Mayoux “Experimental and theoretical study of a glow discharge at atmospheric pressure controlled by dielectric barrier” *J. Appl. Phys.* **83** 2950 (1998)
- [169] A. Y. Nikiforov, A. Sarani and C. Leys “The influence of water vapor content on electrical and spectral properties of an atmospheric pressure plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **20** 015014 (2011)
- [170] D. L. Baulch, C. T. Bowman, C. J. Cobos, R. A. Cox, Th. Just, J. A. Kerr, M. J. Pilling, D. Stocker, J. Troe, W. Tsang, R. W. Walker and J. Warnatz “Evaluated Kinetics Data for Combustion Modelling: Supplement II” *J. Phys. Chem. Ref. Data* **34** 757 (2005)
- [171] A. C. Gentile and M. J. Kushner “Reaction chemistry and optimization of plasma remediation of N_xO_y from gas streams” *J. Appl. Phys.* **78** 2074 (1995)
- [172] Jun-Seok Oh, O. T. Olabanji, C. Hale, R. Mariani, K. Kontis and J. W. Bradley “Imaging gas and plasma interaction in the surface-chemical modification of polymers using micro-plasma jets” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 155206 (2011)

- [173] E. Karakas, M. Koklu and M Laroussi “Correlation between helium mole fraction and plasma bullet propagation in low temperature plasma jets” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43** 155202 (2010)
- [174] M. Capitelli, C. M. Ferreira, B. F. Gordiets and A. I. Osipov “Plasma Kinetics in Atmospheric Gases” (*Springer*) **Chapter 10** (2000)
- [175] N. Srivastava and C. Wang “Effects of water addition on OH radical generation and plasma properties in an atmospheric argon microwave plasma jet” *J. Appl. Phys.* **110** 053304 (2011)
- [176] G. Dilecce “Optical spectroscopy diagnostics of discharges at atmospheric pressure” *Plasma Sources Sci. Technol.* **23** 015011 (2014)
- [177] T. Verreycken, R. Mensink, R. van der Horst, N. Sadeghi and P. J. Bruggeman “Absolute OH density measurement in the effluent of a cold atmospheric-pressure Ar–H₂O RF plasma jet in air” *Plasma Sources Sci. Technol.* **22** 055014 (2013)
- [178] P. Bruggeman, F. Iza, P. Guns, D. Lauwers, M. G. Kong, Y. A. Gonzalvo, C. Leys and D. C. Schram “Electronic quenching of OH(A) by water in atmospheric pressure plasmas and its influence on the gas temperature determination by OH(A – X) emission” *Plasma Sources Sci. Technol.* **19** 015016 (2010)
- [179] T. Verreycken, A. F. H. van Gessel, A. Pageau and P. Bruggeman “Validation of gas temperature measurements by OES in an atmospheric air glow discharge with water electrode using Rayleigh scattering” *Plasma Sources Sci. Technol.* **20** 024002 (2011)
- [180] P. Bruggeman and D. C. Schram “On OH production in water containing atmospheric pressure plasmas” *Plasma Sources Sci. Technol.* **19** 045025 (2010)
- [181] D. S. Stafford and M. J. Kushner “O₂(¹Δ) production in He / O₂ mixtures in flowing low pressure plasmas” *J. Appl. Phys.* **96** 2451 (2004)
- [182] A. V. Phelps “COMPILATION OF ELECTRON CROSS SECTIONS USED BY A. V. PHELPS” jila.colorad.edu/~avp/collision_data/electronneutral/ELECTRON.TXT
- [183] J. Waskoenig, K. Niemi, N. Knake, L. M. Graham, S. Reuter, V. Schluz-von der Gathen and T. Gans “Atomic oxygen formation in a radio-frequency driven micro atmospheric pressure plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **19** 045018 (2010)
- [184] D. Ellerweg, A. von Keudell and J. Benedikt “Unexpected O and O₃ production in the effluent of He/O₂ micro plasma jets emanating into ambient air” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034019 (2012)

- [185] 筒井千尋, 平田孝道, 小町俊文, 岸本拓巳, 森 晃, 秋谷昌宏, 山本俊昭, 田口 亮 “マイクロスポット大気圧プラズマ源による細胞および生体組織の活性化” 静電気学会誌 **35** 20 – 24 (2011).
- [186] N. Yu Babaeva and M. J. Kushner “Reactive fluxes delivered by dielectric barrier discharge filaments to slightly wounded skin” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 025401 (2013)
- [187] T. Murakami, K. Niemi, T. Gans, D. O’Connell and W. G. Graham “Afterglow chemistry of atmospheric-pressure helium” *Plasma Sources Sci. Technol.* **22** 045010 (2013)
- [188] T. M. P. Briels, J. Kos, G. J. J. Winands, E. M. van Veldhuizen and U. Ebert “Positive and negative streamers in ambient air: measuring diameter, velocity and dissipated energy” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** 234004 (2008)
- [189] Muaffaq A Jani, K. Takaki and T. Fujiwara “Streamer polarity dependence of NO_x removal by dielectric barrier discharge with a multipoint-to-plane geometry” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **32** 2560 – 2567 (1999)
- [190] B. Sun, M. Sato, J. Sid Clements “Optical study of active species produced by a pulsed streamer corona discharge in water ” *J. Electrostat.* **39** 189 – 202 (1997)
- [191] G. V. Naidis “Modelling of plasma bullet propagation along a helium jet in ambient air” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 215203 (2011)
- [192] “Formation and dynamics of plasma bullets in a non-thermal plasma jet: influence of the high-voltage parameters on the plume characteristics” *Plasma Sources Sci. Technol.* **19** 065005 (2010)
- [193] C. Jiang, M. T. Chen and M. A. Gundersen “Polarity-induced asymmetric effects of nanosecond pulsed plasma jets” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 232002 (2009)
- [194] E. Robert, V. Sarron, D. Riès, S. Dozias, M. Vandamme and J-M Pouvesle “Characterization of pulsed atmospheric-pressure plasma streams (PAPS) generated by a plasma gun” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034017 (2012)
- [195] T. Shao, W. Yang, C. Zhang, Zhi. Fang, Y. Zhou and E. Schamiloglu “Temporal evolution of atmosphere pressure plasma jets driven by microsecond pulses with positive and negative polarities” *Europhys. Lett.* **107** 65004 (2014)
- [196] A. F. H. van Gessel, B. Hrycak, M. Jasiński, J. Mizeraczyk, J. J. A. M. van der Mullen and P. J. Bruggeman “Temperature and NO density measurements by LIF and OES on an atmospheric pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 095201 (2013)
- [197] V. Gibalov and G. J. Pietsch “The development of dielectric barrier discharges in gas gaps and on surfaces” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **33** 2618 (2000)

- [198] R. Wild, T. Gerling, R. Bussiahn, K-D Weltmann and L. Stollenwerk “Phase-resolved measurement of electric charge deposited by an atmospheric pressure plasma jet on a dielectric surface” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 042001 (2014)
- [199] K. McCay, J-S Oh, J. L. Walsh and J. W. Bradley “Mass spectrometric diagnosis of an atmospheric pressure helium microplasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** 464018 (2013)
- [200] C. Douat, M. Fleury, M. Laroussi “Interaction Between Two Counterpropagating Plasma Bullets” *IEEE Trans. Plasma Sci.* **39** 2298 (2011)
- [201] E. Karakas, M. A. Akman and M. Laroussi “The evolution of atmospheric-pressure low-temperature plasma jets: jet current measurements” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034016 (2012)
- [202] Z. Xiong and M. J. Kushner “Atmospheric pressure ionization waves propagating through a flexible high aspect ratio capillary channel and impinging upon a target” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 034001 (2012)
- [203] T. Murakami, K. Niemi, T. Gans, D. O’Connell and W. G. Graham “Afterglow chemistry of atmospheric-pressure helium-oxygen plasmas with humid air impurity” *Plasma Sources Sci. Technol.* **23** 025005 (2014)
- [204] A. V. Pipa, S. Reuter, R. Foest and K-D Weltmann “Controlling the NO production of an atmospheric pressure plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **45** 085201 (2012)
- [205] S. Bekeschus, K. Masur, J. Kolata, K. Wende, A. Schmidt, L. Bundscherer, A. Barton, A. Kramer, B. Bróker and K-D. Weltmann “Human Mononuclear Cell Survival and Proliferation is Modulated by Cold Atmospheric Plasma Jet” *Plasma Process. Polym.* **10** 706 – 713 (2013)
- [206] J-M Plewa, M. Yousfi, C. Frongia, O. Eichwald, B. Ducommun, N. Merbahi and V. Lobjois “Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids” *New J. Phys.* **16** 043027 (2014)
- [207] M-H Thi Ngo, J-D Liao, P-L Shao, C-C Weng and C-Y Chang “Increased Fibroblast Cell Proliferation and Migration Using Atmospheric N₂/Ar Micro-Plasma for the Stimulated Release of Fibroblast Growth Factor-7” *Plasma Process. Polym.* **11** 80 – 88 (2014)
- [208] X-M Shi, Z-S Chang, X-L Wu, G-J Zhang, Z-Y Peng, Z-Y Dong and X-J Shao “Inactivation Effect of Argon Atmospheric Pressure Low-Temperature Plasma Jet on Murine Melanoma Cells” *Plasma Process. Polym.* **10** 808 – 816 (2013)
- [209] W. Tian and M. J. Kushner “Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 165201 (2014)

- [210] S. A. Nizkorodov and P. O. Wennberg “First Spectroscopy Observation of Gas-Phase HOONO” *J. Phys. Chem. A* **102** 855 (2002)
- [211] H. Hippler, S. Nasterlack and F. Striebel “Reaction of OH + NO₂ + M: Kinetic evidence of isomer formation” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** 2959 – 2964 (2002)
- [212] Y. Lee, K. Kim, K-T Kang, J-S Lee, S. S. Yang, W-H Chung “Atmospheric-pressure plasma jet induces DNA double-strand breaks that require a Rad51-mediated homologous recombination for repair in *Saccharomyces cerevisiae*” *Arch. Biochem. Biophys.* **560** 1 – 9 (2014)
- [213] E. Wagenaars, T. Gans, D. O’Connell and K. Niemi “Two-photon absorption laser induced fluorescence measurements of atomic nitrogen in a radio-frequency atmospheric pressure plasma jet” *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 042002 (2012)
- [214] S. Yonemori and R. Ono “Flux of OH and O radicals onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet measured by laser-induced fluorescence” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 125401 (2014)
- [215] M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape and J-M Povesle “Response of Human Glioma U87 Xenografted on Mice to Non Thermal Plasma Treatment” *Plasma Medicine* **1** 27 – 43 (2011)
- [216] 株式会社 医学生物研究所 (MBL) ホームページ <http://ruo.mbl.co.jp/product/flprotein/fucci.html>
- [217] R. Ono, Y. Tokumitsu, S. Zen and S. Yonemori “Production of reactive species using vacuum ultraviolet photodissociation as a tool for studying their effects in plasma medicine - simulations and measurements” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 445203 (2014)

発表文献・業績

学術論文 (筆頭)

1. S. Yonemori, Y. Nakagawa, R. Ryo and T. Oda “Measurement of OH density and air-helium mixture ratio in atmospheric-pressure helium plasma jet” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **45** 225202 (2012)
2. S. Yonemori and Ryo Ono “Flux of OH and O radicals onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet measured by laser-induced fluorescence” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 125401 (2014)
3. S. Yonemori and R. Ono “Effect of discharge polarity on the propagation of atmospheric-pressure helium plasma jets and the densities of OH, NO, and O radicals” *Biointerphase* (投稿中)

学術論文 (非筆頭)

1. R. Ono, Y. Tokumitsu, S. Zen and S. Yonemori “Production of reactive species using vacuum ultraviolet photodissociation as a tool for studying their effects in plasma medicine - simulations and measurements” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47** 445203 (2014)
2. R. Ono, I. Yagi, Y. Shirakawa, K. Hirakata, T. Akiyama, S. Yonemori, K. Mizuno and T. Oda “Measurement of OH, O, and NO densities and their correlations with mouse melanoma cell death rate treated by a nanosecond pulsed streamer discharge” *J. Phys. D: Appl. Phys.* (投稿中)

国際学会

1. S. Yonemori, Y. Nakagawa, R. ono and T. Oda “ Measurement of OH density and mixture ratio of ambient air in atmospheric pressure helium plasma jet using laser induced fluorescence” *64th Gaseous Electronics Conference bulletin* **69** 2011

2. Seiya Yonemori, Ryo Ono and Tetsuji Oda “Distribution of OH radicals on the humid surfaces” *Bioelectronics2012 P-2 A-1* Kumamoto Japan, 2012 November 5th - 8th
3. Seiya YONEMORI, Ryo ONO and Tetsuji ODA “Measurement of OH radical in the effluent of an atmospheric-pressure helium plasma jet” *IEEE IAS Annual Meeting 2012 2012-EPC-320* 2012 October 7th - 11th
4. Seiya YONEMORI, Ryo ONO and Tetsuji ODA *65th Gaseous Electronics Conference QR2.4* Austin, TX USA, 2012 October 22th - 26th
5. Seiya Yonemori, Ryo Ono and Tetsuji Oda “Measurement of O atom nearby object surface using two-photon absorption laser induced fluorescence” *12th SNU-UoT Joint Seminar* Seoul, South Korea, **D23** 2013 March
6. S. Yonemori, R. Ono and T. Oda “Measurement of O and OH radicals produced by an atmospheric pressure helium plasma jet nearby the surfaces” *31st ICPIG* Granada, Spain, **PS1-119** 2013 July
7. S. Yonemori and R. Ono “Behavior of OH and O atom produced by an atmospheric-pressure helium plasma jet nearby the surfaces” *Joint Symposium on Plasma and Electrostatics Technologies for Environmental Application* Gero, Japan 2013 May 19-21
8. Seiya Yonemori and Ryo Ono “Measurement of O and OH radical produced by an atmospheric pressure helium plasma jet nearby rat skin”, *66th Gaseous Electronics Conference, SF3 5* Princeton NJ USA, 2013 September 30th - October 4th
9. S. Yonemori, R. Ono and T. Oda “Study on production and distribution of NO in an atmospheric-pressure helium plasma jet”, *ICRP-8 SPP-31, NO. 5A-PM-O3* Fukuoka Japan, 2014 February 3rd - 7th
10. Seiya Yonemori and Ryo Ono “Measurement of reactive oxygen species flux onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet” *3rd Global COE Workshop between BGI and University of Tokyo*, Tokyo Japan, 2014 March 20th
11. Seiya Yonemori and Ryo Ono “Effect of voltage polarity and surface condition on active species production by an atmospheric-pressure helium plasma jet”, *5th International Conference on Plasma Medicine*, Nara Japan, 2014 May 18th - 23rd

12. Seiya Yonemori and Ryo Ono “Measurement of OH, NO, O and N atoms in helium plasma jet for ROS/RNS controlled biomedical processes” *67th Gaseous Electronics Conference ET1.00004* Raleigh, NC USA, November 2nd - 7th 2014
13. Seiya YONEMORI, Kazue MIZUNO and Ryo ONO “EVALUATION OF THE CELL REACTION TO PLASMA JET EXPOSURE BASED ON THE DOSE OF REACTIVE SPECIES” *The 2nd International Workshop on Plasma for Cancer Treatment (IWPCT-2)* Nagoya Japan, 2015 March 16-17th

国内学会

1. 米森 星矢, 寺本 慶之, 小野 亮, 小田 哲治 “ラマン散乱分光法による大気圧低温プラズマジェットの背景ガス中の N₂ 密度計測” 2011 年度静電気学会春期講演会論文集 **1p-3** 2011
2. 米森 星矢, 寺本 慶之, 小野 亮, 小田 哲治 “Measurement of N, O atom and NO density generated by atmospheric pressure plasma using Laser Induced Fluorescence” 第 24 回プラズマ材料科学シンポジウム 2011. 7. 19, 20 大阪大学
3. 米森 星矢, 中川 雄介, 小野 亮, 小田 哲治 “大気圧低温プラズマジェットにより生成される OH ラジカルの計測” 電気学会プラズマ研究会 2011. 8. 5 ~ 7. 大阪工業大学
4. 米森 星矢, 中川 雄介, 小野 亮, 小田 哲治 “大気圧ヘリウムプラズマジェットの周辺空気の混合比と OH ラジカル密度の関係” 2011 年秋季 第 72 回応用物理学会学術講演会 講演予稿集 **31a-ZJ-15** 2011
5. 米森 星矢, 中川 雄介, 小野 亮, 小田 哲治 “LIF 法による大気圧ヘリウムプラズマジェット中の OH ラジカル計測” 2011 年度 第 35 回静電気学会全国大会論文集 **12pA-6** 2011
6. S. Yonemori, Y. Nakagawa, R. ono and T. Oda “Measurement of OH radicals in atmospheric pressure helium plasma using laser induced fluorescence” *Plasma Conference 2011 Proceeding* **23G05** 2011
7. 米森 星矢, 中川 雄介, 小野 亮, 小田 哲治 “大気圧ヘリウムプラズマジェット中の OH ラジカル計測” 第 13 回静電気学会春期講演会, 2012 年 3 月 6 日
8. 米森星矢, 小野亮, 小田哲治 “湿潤表面上における OH ラジカルの分布計測” 第 12 回 プラズマ新領域研究会, 東京大学 東京, **PST-12-132**, 2012 年 12 月

9. Seiya Yonemori and Ryo Ono “Measurement of O atom and OH radical in the vicinity of rat skin” 第 26 回プラズマ材料科学シンポジウム, 九州大学 福岡, **24a-B-4**, 2013 年 9 月
10. 米森星矢, 小野亮, 小田哲治 “大気圧ヘリウムプラズマジェットにより生成される O, OH 密度分布のラット表皮近傍における計測” 第 37 回静電気学会全国大会, 千葉大学 千葉, 2013 年 9 月 10, 11 日
11. 米森星矢, 小野亮, 小田哲治 “大気圧ヘリウムプラズマジェットにより生成される O, OH ラジカルの表面近傍における計測” 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会 同志社大学 京都 **17p-P2-14**, 2013 年 9 月 16~20 日
12. 米森星矢, 小野亮 “大気圧ヘリウムプラズマジェットによる OH, O ラジカルの供給フラックス計測”, 静電気学会 2014 年春期講演会, 東京, 2014 年 3 月 2 日
13. 米森星矢, 小野亮 “放電条件・表面条件が大気圧ヘリウムプラズマジェットによる活性酸素種生成に与える影響”, 平成 26 年電気学会全国大会, 松山, 2014 年 3 月 18 ~ 20 日
14. 米森星矢, 水野和恵, 小野亮 “大気圧ヘリウムプラズマジェットによる活性種の供給量と細胞応答の関係” 2015 年度 (第 16 回) 静電気学会春期講演会, 東京, 2015 年 3 月 5 日

受賞歴

1. 2012 年 9 月: “増田賞”, 2012 年度 第 36 回静電気学会全国大会
2. 2013 年 9 月: “トレック・宍戸 奨励賞”, 2012 年度 第 36 回静電気学会全国大会
3. 2012 年 9 月: “エクセレントプレゼンテーション賞”, 2012 年度 第 36 回静電気学会全国大会
4. 2013 年 10 月: “宍戸賞”, 静電気学会
5. 2013 年 3 月: “エクセレントプレゼンテーション賞”, 第 13 回静電気学会春期講演会
6. 2013 年 3 月: “優秀賞” 平成 26 年第 14 回静電気学会春期講演会
7. 2013 年 9 月: “エクセレントプレゼンテーション賞”, 2013 年度 第 37 回静電気学会全国大会
8. 2013 年 9 月: “トレック・宍戸 奨励賞”, 2013 年度 第 37 回静電気学会全国大会
9. 2014 年 3 月: “日高賞”, 東京大学 GCOE セキュアライフ・エレクトロニクス発表会
10. 2014 年 3 月: “優秀賞” 平成 26 年第 15 回静電気学会春期講演会

付録 A

LIF 計測の詳細補足

本研究で用いた各種係数の値を以下に示す。

表 A.1 OH-LIF で用いた各種係数の値。

| 係数 | 数値 | 単位 |
|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 自然放出係数 A_1 | 1.46×10^6 | s^{-1} |
| 自然放出係数 A_0 | 1.34×10^6 | s^{-1} |
| a_1 | 9.64×10^4 | s^{-1} |
| a_0 | 8.59×10^4 | s^{-1} |
| 誘導放出係数 B | 5.35×10^8 | $m^2 J^{-1} s^{-1}$ |
| 統計重率 g_J | 4/3 | |
| LIF 比例定数 c | 1.43×10^{12} | $C^{-1} \Omega^{-1} V$ |
| レーザーパルス幅 τ | 5.0×10^{-9} | s^{-1} |
| PMT 増幅率 (PMT 電圧: 750V) | 8.75×10^4 | V |
| ppm | 2.5×10^{13} | cm^{-3} |

クエンチング係数の温度補正式。 k_{q0} は T_0 におけるクエンチング係数。

$$k_q = k_{q0} \times \sqrt{\frac{T_0}{K}} \quad T_0 = 1600K$$

遷移する振動準位ごとの補正係数。

$$f(v') : k(v' = e \rightarrow f) = (v' = 1 \rightarrow 0) \quad k(v' = 1) = 0.85 \times k(v' = 0)$$

$$k(v' = 2) = 0.70 \times k(v' = 0)$$

$$k(v' = 3) = 0.60 \times k(v' = 0)$$

LIF 計測誤差

LIF 計測実験により活性種の絶対密度を求めるうえでは、計測装置の誤差はじめ、物理定数の誤差などの複数の誤差が影響する。例えば OH-LIF 計測実験の場合には、以下のような誤差要因

が考えられる。

- PMT 前面のスリット幅及びレーザー断面積調整のためのスリットの面積誤差: 約 20%
- レーザーパワーメーターの装置計測誤差: 約 3%
- PMT の量子効率の較正時における標準光源の出力、フィルター透過率などの誤差: 約 20%
- A, B 係数の文献ごとの値の違い (誤差): それぞれ約 15%
- クエンチング係数及び VET 係数の文献による違い (誤差)

この中でも、最も大きな密度の誤差要因となるのは Γ_1 及び Γ_2 の値である。これらは、選択する文献によっては最大で 200% 程度異なる。この場合、例えば最もクエンチング及び VET 係数の誤差の影響を受ける大気中 (空気濃度 100%) の計測では、OH 密度は最大で 2.7 倍程度異なることとなる。一方、空気濃度が 1% 以下の場合には、密度の誤差は 2 倍程度となる。

TALIF 計測ではレーザーパワーの誤差が 2 乗で影響するが、本研究では、計測におけるレーザーパワーメーターの誤差やオシロスコープの誤差などの要因を出来る限り排除するために LIF 信号の 512 回の平均値をとっている。

