

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24108009

研究課題名(和文) プラズマ・ナノマテリアル動態学の創成と安全安心医療科学の構築

研究課題名(英文) Creation of kinetics and establishment of safety medical science on plasma nano material

研究代表者

田中 昭代(Tanaka, Akiyo)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10136484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 99,100,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマの安全性評価としてマウス皮膚、酵母、カイコ、口腔がん細胞へのプラズマ照射およびマウスを用いたプラズマ活性培養液(PAM)の影響評価、水中プラズマ法による金属ナノ粒子の作製と体内分布の解析を行った。酵母、カイコ、口腔がん細胞へのプラズマ照射では明らかな量-反応関係は観察されなかったが、マウス皮膚へのプラズマ照射ではプラズマ源とマウス皮膚との距離に依存して、皮膚病変が発現し、プラズマ源と皮膚間距離との間で皮膚障害発現の安全閾が示唆された。さらに、PAMのマウス腹腔内投与では明らかな組織障害は観察されず、PAMによる副作用の発現は非常に少ないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the health effects of plasma irradiation on the skin of normal hairless mice, *Saccharomyces cerevisiae*, silkworm, oral cancer cell or plasma-activated medium (PAM) when administered to mice via repeated intraperitoneal injections. In vivo kinetics of nanoparticles synthesized by discharge plasmas in water was analyzed. Clear dose-response relations were not observed by irradiation to *Saccharomyces cerevisiae*, silkworm, and oral cancer cell. From the histopathological changes in the mice skin after plasma irradiation, slight to mild skin lesions in the epidermis were seen just after irradiation until termination of observation periods and the severity of these lesions worsened with the passage of time. Concerning the health effect of PAM, clear lesions were not manifested in the PAM-treated mice. It would seem that a less toxic effect is manifested when PAM is injected intraperitoneally in mice.

研究分野：衛生学

キーワード：プラズマ ナノマテリアル 健康影響評価 体内動態 医療科学 プラズマ照射水

1. 研究の背景

大気圧低温プラズマは大気圧でガス温度が室温近傍の放電プラズマであり、プラズマ中で生成した化学活性種は生体表面から最大 0.1mm 程度の深さまで到達し、即時的作用を引き起こすため、止血、臓器癒着防止など、近年、急速に医療に用いられ始めている。一方、現状では、プラズマ照射による外科手術時の止血効果や火傷の治癒促進、皮膚がん治療、さらにプラズマを培養液に照射して得られるプラズマ活性培養液 (Plasma-activated medium: PAM) 腹腔内注入による卵巣がん治療など臨床応用が先行しているが、プラズマ照射や PAM の健康影響評価は世界的にもほとんど行われていない。健康影響評価が定まっていない状況での早急なプラズマ医療応用は将来的な発がんなど副作用が危惧され、安全性に関する評価とガイドラインの構築は急務であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、大気圧低温プラズマの安全性評価として (1) 極細大気圧プラズマ装置を用いたマウス皮膚への影響評価、(2) PAM の腹腔内投与による影響評価、(3) 酵母を用いた遺伝子発現解析によるプラズマ照射安全性評価、(4) カイコを用いたプラズマ照射影響評価、(5) 口腔がん細胞を用いたプラズマ照射影響評価 (6) 水中プラズマ法による金属ナノ粒子の作製と体内分布の解析を行い、プラズマ照射による副作用の有無、安全性評価および安全性に関するガイドラインの構築を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 極細大気圧プラズマ装置を用いたマウス皮膚への影響評価

8 週齢のヘアレスマウス (20 匹、) を用いた。プラズマ源として極細大気圧プラズマ源を用いて、ヘアレスマウス背部皮膚へ 20 秒間、電極とヘアレスマウス皮膚間距離は 20 mm、30mm、40mm、50mm (4 箇所/マウ

ス) でプラズマ照射を行った。照射直後 (30 分後)、1 日、3 日、7 日目に背部皮膚組織の病理組織学的評価を行った。さらに、照射部位の皮膚の色度変化を画像ソフト (Image J) を用いて色度変化量より照射効果を定量評価した。

(2) PAM の腹腔内投与による健康影響評価
実験動物として 12 週齢の C57BL/6N (28 匹、) を用いた。実験群は 4 群 [PAM 群、Medium

群 (PAM negative control)、Cisplatin 群 (positive control)、NaCl 群 (negative control)] に分けた。Cisplatin 群を除いた 3 群の各試料 (PAM、Medium、NaCl)

1ml/匹を腹腔内に 2 週間連続投与を行った。Cisplatin 群では Cisplatin 0.4ml/匹を腹腔内に週 1 回、2 週間で 2 回投与した。投与開始より 15 日目にマウスは安楽死させ、各臓器の病理組織学的変化について光顕、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて評価した。

(3) 酵母を用いた遺伝子発現解析によるプラズマ照射安全性評価

酵母 (*S. cerevisiae*) にアルゴン LF プラズマジェットで 10 分間照射を行った。照射後 0 時間、18 時間 (対数増殖期)、24 時間、50 時間培養後にマイクロアレイ解析を行った。

(4) カイコを用いたプラズマ照射影響評価

まゆへ変化する直前のカイコ幼虫 (5 令) にトーチ型 DBD プラズマを個別に直接照射を行った。放電電圧 (6kV ~ 8kV) や照射時間 (0.5 ~ 5 分) を変化させ、一つの条件で 10 匹のカイコに照射を行い、照射後、飼育を続け、変化を観察した。

(5) 口腔がん細胞を用いたプラズマ照射影響評価

複数の口腔がん細胞株に対して *in vitro* での直接照射による検討を行った。培養液を吸引、細胞へプラズマを直接照射して、

24時間後に WST-8 を用いて細胞数を評価、効果を確認した。

(6) 水中プラズマ法による金属ナノ粒子の作製と体内分布

金属ナノ粒子としてインジウムナノ粒子を水中放電プラズマにより作製した。純水中に挿入したインジウムの棒対平板電極間にパルス電圧を印加して放電を生成した。放電電圧及び周波数はそれぞれ 15.2kV, 7.6kHz とした。放電から O, H, In の発光スペクトルが観測された。H のシュタルク広がりから得た電子密度は $2.2 \times 10^{17} / \text{cm}^3$ であった。放電終了後、溶液の上澄み液を回収し TEM 及び動的散乱法を用いて粒子を観察した。体内動態解析のためナノ粒子をラットに皮下投与した。投与後 36 週まで観察し、ラットの主要臓器のインジウム濃度を ICP-MS を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 極細大気圧プラズマ装置を用いたマウス皮膚への影響評価

照射直後からプラズマ源と皮膚間距離が 20mm、30mm ではヘアレスマウス皮膚の白色化や発赤腫脹等の肉眼的変化が観察され、7 日目まで持続した。皮膚間距離が 40mm、50mm では肉眼所見は観察されなかった。組織学的には皮膚間距離が 20mm、30mm では照射直後より軽度の表皮上皮の肥厚が観察され、照射 3 日目以降皮膚表皮に炎症細胞の集積が認められ、これらの病変の程度は 7 日目まで進展した(表 1)。皮膚間距離が 40mm、50mm では組織学的な変化は観察されな

表1 皮膚病変の経時変化

皮膚病変(n=5)	照射距離	30分	1日	3日	7日
表皮・真皮組織	20 mm	-	-	± ~ +	± ~ +
炎症細胞の集積	30 mm	-	-	± ~ +	± ~ +
表皮上皮の肥厚	20 mm	±	±	+	+
	30 mm	±	±	± ~ +	+
表皮細胞核の分裂	20 mm	±	±	±	±
	30 mm	±	±	±	±

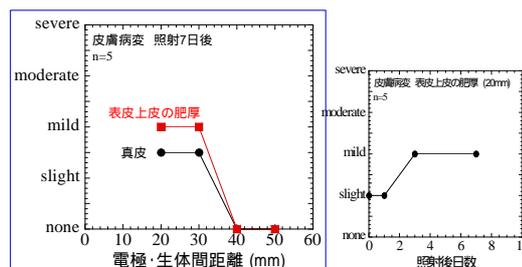
-; none, ±; slight, +; mild, 2+; moderate, 3+; severe

照射距離が40、50mmでは明らかな皮膚障害は観察されなかった。

った。

以上の結果より、20 秒照射の場合、プラズマ源から 30mm以下の場合には皮膚障害が発現する可能性があるが、少なくとも

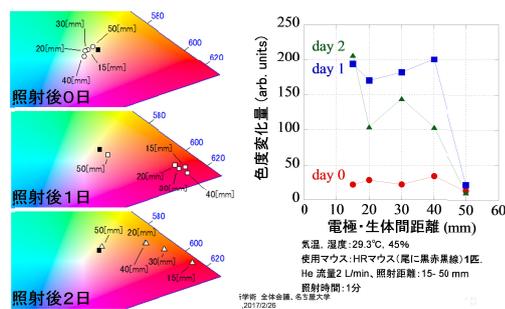
図1 皮膚病変の電極・生体間距離依存性



プラズマ源から 40mm以上の距離が皮膚障害発現の可能性は低いと考えられた(図 1)。

皮膚の色度変化による照射効果の定量評価では、照射直後では皮膚間距離 20mm から 50mm では色度の変化量は差がなかったが、照射 1 日目、2 日目では 20mm、30mm、40mm で色度の変化量が大きく、さらに、1 日目に比べて 2 日目の変化量は大きく増加した。しかし、皮膚間距離 50mm では、2 日目まで色度変化は観察されなかった(図 2)。色度変化量と皮膚組織の

図2 色度を用いた照射効果の簡易定量



病変の程度とは対応していた。

今回の結果より、プラズマ 20 秒照射時のプラズマ源からの皮膚間距離が 30mm以下では皮膚障害が発現する可能性があるが、少なくともプラズマ源から 40mm以上の距離では皮膚障害の可能性は低いことが明らかになった。さらに、皮膚障害の評価法において色度を用いることで簡易にプラズマ照射効果を定量できる可能性が

示唆された。

(2) PAM の腹腔内投与による健康影響評価

2 週間の投与期間中の体重変化について各群間で有意な差は認められず、PAM 腹腔内投与による全身影響は発現しなかった。光顕による臓器障害に関し、Cisplatinum 群で肝臓、

表2 主要臓器の病変の程度(光顕)

実験群	肝臓	腎臓	肺	膵臓	脾臓	小腸	大腸
PAM	±	±	±	-	-	-	±
NaCl	±	±	±	-	-	-	±
Cisplatinum	+	+	+	-	-	-	±
Medium	±	±	±	-	-	-	±

病変の程度

-:なし; ±: 軽微+軽度; 2+:中等度; 3+: 重度

腎臓、肺において他の3群に比べて、やや強く発現した。膵臓、脾臓、小腸、大腸ではすべての群で明らかな病変は観察されなかった(表2)。

TEM による超微形態への影響観察では Cisplatinum 群で肝臓、腎臓、脾臓において軽微な変化が観察され、さらに小腸では明らかな病変が発現した。しかし、他の PAM 群、Medium 群、NaCl 群では変化は観察されなかった(表3)。

以上の結果より、マウスを用いた PAM の連続2週間腹腔内投与(1ml/匹)では、光顕、電顕での観察により Cisplatinum に比べて明確な組織障害は認められず、PAM による副作用の発現は非常に少ないと考えられた。

(3) 酵母を用いた遺伝子発現解析によるプラズマ照射安全性評価

表3 超微形態への影響(透過型電顕)

実験群	肝臓	腎臓	肺	膵臓	脾臓	小腸	大腸
PAM	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Cisplatinum	+	+	-	-	±	+	-
Medium	-	-	-	-	-	-	-

-:変化なし; ±:ほとんど変化なし; +:変化あり

プラズマ照射後の酵母では多くの遺伝子が発現し、発現した遺伝子数はプラズマ照射直後が最も多く、培養時間の経過に伴って減少し、元の状態に戻る傾向を示した。DNA マイクロアレイの結果から、特に増減量の多かった発現遺伝子100個を比較しその役割別に割合で比較した。プラズマ照射直後では約半分の遺伝子が「ストレス応答系」を示しており、酵母はプラズマ照射をストレスの一種として捉えていることが明らかとなった。

以上より、プラズマ照射に伴う遺伝子変動はプラズマ照射直後は非常に活発であるが、時間の経過と共に次第に落ち着きを取り戻すことが明らかとなった。安全性を完全に保障するには至らなかったが、Ar プラズマジェットおよび大気圧 DBD プラズマの複数のプラズマ源に対して、照射対象である酵母は、プラズマ照射から時間が経過するに従い照射前の状態に戻る傾向を示すことができた。

(4) カイコを用いたプラズマ照射影響評価

プラズマ照射後のカイコの生存率は、いずれの実験条件下でも時間経過とともに減少した。さらに、その減少経過は、放電電圧が高いほど、プラズマ照射時間が長いほど早く減少する傾向が見られた。プラズマ照射直後には、カイコの表皮には変化はなかったが、数時間後には照射部分が黒く変色した。さらに数日後には黄色のカビのようなものが観測され、最終的に死に至った。カイコが死んだ要因として、放電電流すなわち荷電粒子がもっとも大きな影響を与えていることが考えられた。

(5) 口腔がん細胞を用いたプラズマ照射影響評価

細胞株によりプラズマの感受性が異なり、正常細胞へは障害を与えない強度で口腔がん細胞への照射が可能であること、複

数回照射では、単回照射と比較し高い効果が期待できることが明らかになった。照射時間や照射方法を工夫することで、正常細胞への副作用を軽減し癌細胞特異的な照射が可能であることが示唆された。

(6) 水中プラズマ法による金属ナノ粒子の作製と体内分布

一次粒子及び二次粒子の平均粒径はそれぞれ約7nm、315nmであった。XRD分析の結果、生成粒子はInまたはIn(OH)₃であり、その質量比は8:2であった。ラット主要臓器でインジウムが検出され、各臓器のインジウム濃度は観察期間終了時の36週まで経時的に増加した。さらに、膀胱尿でインジウムナノ粒子が検出され、インジウムナノ粒子が皮下から脈管系へ吸収され、体内循環により尿へと移動していることが確認された。以上の結果より、プラズマ水中法で作製したナノ粒子が体内動態解析に有効であることが明らかになった。

(1)～(6)の安全性評価実験より、皮膚とプラズマ源からの距離が安全閾を保つことができればプラズマ照射による皮膚障害発現の可能性は低く、さらに、PAM投与による副作用の発現は非常に少ないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計87件)

1. T. Sarinont, R. Katayama, Y. Wada, K. Koga, M. Shiratani, Plant Growth Enhancement of Seeds Immersed in Plasma Activated Water, MRS Advances, 2017. 10.1557/adv.2017.178 (査読有)
2. Y. Toyokawa, Y. Yagyu, T. Misawa, A. Sakudo, A new roller conveyer system of non-thermal gas plasma as a potential control measure of plant pathogenic bacteria in primary food production, Food Control, 72 (2016) 62-72. 10.1016/j.foodcont.2016.07.031(査読有)

3. K. Koga, T. Sarinont, T. Amano, H. Seo, N. Itagaki, N. Hayashi, M. Shiratani, Simple method of improving harvest by nonthermal air plasma irradiation of seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.), Appl. Phys. Express, 9 (2016) 016201. 10.7567/APEX.9.016201 (査読有)
4. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, Y. Kiyohara, Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters, J Occup Health, 57 (2015) 189-192. 10.1539/joh.14-0123-BR (査読有)
5. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Synthesis of Indium-Containing Nanoparticles in Aqueous Suspension Using Plasmas in Water for Evaluating Their Kinetics in Living Body, J. Nanosci. Nanotechnol., 15 (2015) 9298-9302. 10.1166/jnn.2015.11427 (査読有)
6. S. Kitazaki, T. Sarinont, K. Koga, N. Hayashi, M. Shiratani, Plasma induced long-term growth enhancement of *Raphanus sativus* L. using combinatorial atmospheric air dielectric barrier discharge plasmas, Current Applied Physics, 14 (2014) S149-S153. 10.1016/j.cap.2013.11.056 (査読有)
7. A. Sakudo, N. Shimizu, Y. Imanishi, K. Ikuta, N₂ Gas Plasma Inactivates Influenza Virus by Inducing Changes in Viral Surface Morphology, Protein, and Genomic RNA, BioMed Res. Int., 2013 (2013)694269. 10.1155/2013/694269 (査読有)

8. A.Tanaka, M. Hirata, M. Shiratani, K. Koga, Y. Kiyohara, Subacute pulmonary toxicity of copper indium gallium diselenide following intratracheal instillations into the lung of rats, J Occup Health, 54 (2012) 187-195.
[10.1557/opl.2012.1074](#) (査読有)

他 79 編

【学会発表】(計 338 件)

1. Y. Yagyū, N. Hayashi, Y. Hatayama, T. Yamasaki, T. Ohshima, M. Koshimura, T. Miyamoto, H. Kawasaki, T. Ihara and Y. Suda, ICRP-9/GEC-68/SPP-33, Hawaii, USA, 2015 年 10 月 14 日.
2. K. Koga, T. Amano, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, The 21st Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics & The Workshop for NU-SKKU Joint Institute for Plasma-Nano Materials, Yangyang, Korea, 2015 年 10 月 4 日.
3. A.Tanaka, M.Hirata, N.Matsumura, K. Koga, M.Shiratani, Y. Kiyohara, The 10th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE2015), Jeju, Korea, 2015 年 9 月 20-24 日.

他 335 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 内田儀一郎, 古閑一憲, 白谷正治
出版社：株式会社エヌ・ティー・エス
書名：「高効率太陽電池 化合物・集光型・量子ドット型・Si・有機系・その他新材料」
(第3章2節「ダブルマルチホロー放電プラズマCVDによる窒化シリコンナノ粒子の生成と量子ドット増感型太陽電池への応用」を執筆) 発行年：2012年5月、
総ページ数：376 (執筆ページ：188-196)

他 1 件

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

林信哉、中東朱里、白谷正治、古閑一憲、動

植物成長促進方法、特許、016-152796、2016年8月25日取得
他 1 件

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 昭代 (TANAKA, Akiyo)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号 10136484

(2)研究分担者

米須 章 (YONESU, Akira)
琉球大学・工学部・教授
研究者番号 90220764

古閑 一憲 (KOGA, Kazunori)

九州大学・システム情報科学研究院・准教授
研究者番号：90315127

柳生 義人 (YAGYU, Yoshihito)

佐世保工業専門学校・電気電子工学科・准教授
研究者番号：40435483

北崎 訓 (KITAZAKI, Satoshi)

福岡工業大学・工学部・助教
研究者番号：70713147

山下 佳雄 (YAMASHITA, Yoshio)

佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：50322300

(3) 連携研究者

續 輝久 (TSUZUKI, Teruhisa)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号 (40155429)

作道 章一 (SAKUDO, Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授
研究者番号 (10397672)

内田 儀一郎 (UCHIDA, Giichiro)

大阪大学・接合科学研究所・准教授
研究者番号 (90422435)