

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 25 日現在

機関番号：86202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791237

研究課題名(和文) 新生仔低酸素脳症の治療法としての大気圧プラズマの有用性

研究課題名(英文) atmospheric pressure plasma inhalation as a treatment for hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者

近藤 朱音 (KONDO, AKANE)

独立行政法人国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター(臨床研究部(成育)、臨・その他部局等・周産期医長)

研究者番号：00384884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマは既に様々な医学の分野で用いられ、臨床的には熱傷の治療に有効であるとの報告があり、皮膚潰瘍の治療への応用も始まっている。これらを通してプラズマ照射により細胞成長因子が産生され細胞の自己増殖を活性化すると考えられている。今回の研究では有効な治療のない新生児脳虚血性病変に対する治療として大気圧プラズマの有効性を検討した。一方、気体状であるプラズマの吸入を用いた治療は研究段階である。本研究では大気圧プラズマは吸入においても血管新生などに有効であり、吸入による生体の影響としては血圧低下、心拍数上昇などの影響があること、また血管拡張の作用は一酸化窒素を介するものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atmospheric plasma has been used as clinical treatment equipment originally for thermal burn, and recently this equipment is applied for diabetic skin ulcer. These previous studies showed that plasma have an effect on cell proliferation through cell growth factor. In this study, we examined the effect of inhalation of atmospheric plasma on hypoxic encephalopathy with rat model. Neonatal hypoxic encephalopathy is very difficult condition and there is no effective treatment for damaged brain at present. This study showed that inhalation of plasma could introduce angiogenesis and neurogenesis. The result also showed that inhalation of plasma effect on hemodynamics such as reducing blood pressure and gaining the heart rate. These effects are suspected to relate to nitric oxide produced by vascular endothelial cell.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：大気圧プラズマ 低酸素脳症 血管内皮 一酸化窒素

### 1. 研究開始当初の背景

新生児の脳の虚血性病変に対する有効な治療法はまだ確立されていない。障害された神経細胞の再生を促すための神経成長因子の投与や脳低体温療法などが試みられているがどちらもまだ有効な治療とまでは至っていない。そのため現時点ではなるべく虚血状態を作らないこと良いとされており、胎児除脈の予防や子宮内感染の予防などについて慎重に管理している。

しかし、分娩時の低酸素状態を100%回避することは不可能であり、また早産や低出生体重児は増加傾向にあるため今後の新生児予後を見ると脳の虚血性病変に対する有効な治療は産科医療に関わる全ての医療者が待ちわびているものの一つである。

正期産における低酸素状態は分娩時のものがほとんどであるが、低出生体重児に脳室周囲白質軟化症に陥りやすい原因についてはいくつか理由を挙げることができる。

a.解剖学的特徴：脳室周囲白質は脳室側からの動脈と脳表からの動脈の灌流境界領域に一致しており特に低出生体重児では虚血に陥りやすい。

b.脳血流自動調節機構の未熟性：低出生体重児の脳血流自動調節機構は未熟であるため、その調節範囲は狭く低血圧により容易に脳は低灌流状態になってしまう。

c.低出生体重児における大脳白質の脆弱性：大脳白質は神経細胞の軸索と髄鞘を形成するオリゴデンドログリア細胞などのグリア細胞と血管により構築されているが、オリゴデンドログリア細胞は急速に分化しており、その代謝は活発であるため虚血により生じるブドウ糖供給の途絶やグルタミン酸放出による障害を受けやすい。

研究者はこれまでに大気圧プラズマが培養細胞を増殖させることを確認しており、さらにラット新生仔を用いた研究にて出生後の脳の虚血性病変に対して大気圧プラズマを吸入させることにより虚血辺縁部の機能血管数が有意に増加することを報告している。(第46回日本産科周産期新生児学会、2010.7)

### 2. 研究の目的

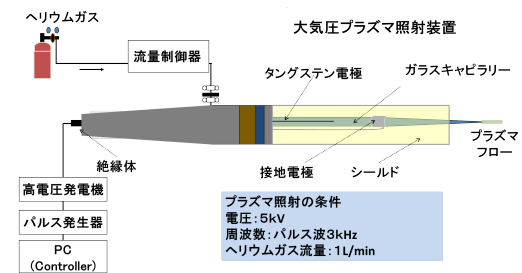
血管新生は神経再生促進において必須であり、血流が豊富になることで神経再生は活発になることが想定される。大気圧プラズマの吸入療法は簡便に実施することが可能な治療方法でもあり、今後大動物での治療効果について検討し、また本治療法の安全性についての評価をすることで虚血後脳症についての治療の可能性を探るものである。

### 3. 研究の方法

(1)既に用いている脳虚血ラットについて大気圧プラズマの吸入量や回数について最も有効である吸入方法について検討を重ねていく。また機能血管の増生後の神経細胞の増生についても検討した。

ラット実験系では組織学的な検討は容易であるが、実際の機能についての検討が困難であるため大動物を用いて歩行などの運動機能についての検討を試みた。動物の種類については研究者が以前より山羊胎仔(児)の血流についての研究を行っていることから、研究対象として実績のある山羊を用いた。

使用したプラズマ発生装置は以前より使用しているヘリウムガスを用いて発生させた大気圧プラズマ(印加電圧：5KV、周波数：3kHz、He ガス流量：1L/min)を用いた。

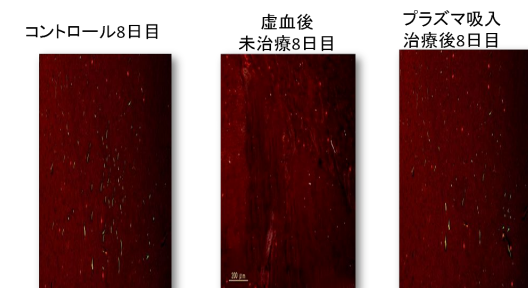


(2)研究を進める中で大動物を用いて繰り返し行う検討は予算内での継続が難しいと判断し、ラットを用いた研究を主として行った。これまで大気圧プラズマを吸入した場合の血管新生以外の生体におよぼす影響について検討されていなかったため、ラットがプラズマを吸入している間の血圧、心拍数など全身状態に及ぼす影響について生体モニターを用いて検討した。

(3)大気圧プラズマ吸入による血圧の変動が、NO吸入の際の血管拡張による変化と類似していたためその変化について生体モニター及び血中NOを測定し比較検討した。

### 4. 研究成果

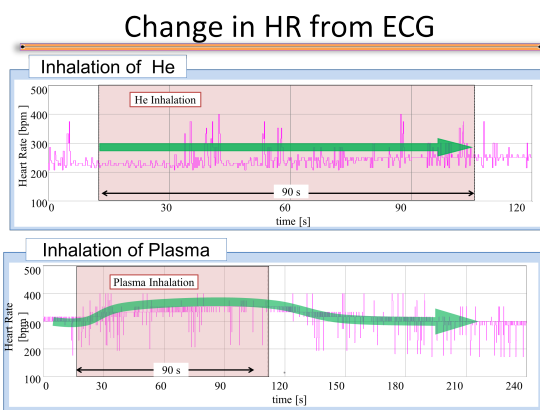
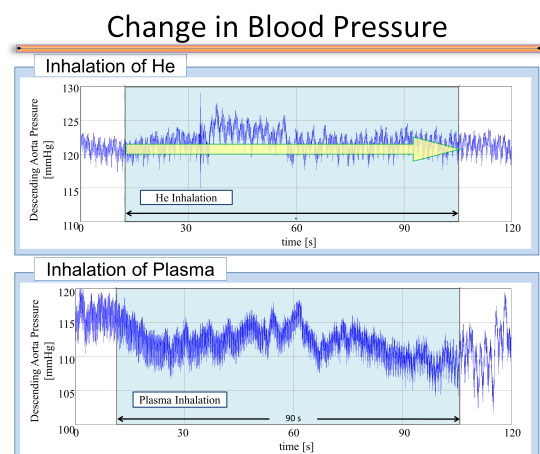
(1)初年度はこれまで同様ラットの脳虚血モデルを用いて大気圧プラズマによる治療効果について検討を重ねる。虚血モデルは右総頸動脈を結紮して行う。虚血後は経時的に脳切片を作成し、虚血辺縁部の血管数を測定する。機能血管数を計測するためトマトレクチンを心腔内投与して識別する。組織観察は蛍光抗体法を用い、共焦点レーザー顕微鏡下に行う。治療群では虚血後24時間後より大気圧プラズマ吸入を連日行い、未治療群と比較し、大気圧プラズマが最も有効に作用する量及び治療期間について検討した。



赤の蛍光は血管新生、緑の蛍光は機能血管数を示しているが、1 日以内での回数を変更してもあまり大きな変化はなく、プラズマの容量性変化についても変化を認めなかった。そのため1回のみ吸入で以後の研究を行うこととした。

脳虚血後の運動機能の評価についても引き続き検討したが、脳虚血の範囲が大きくともその機能は代償されることが多く容量依存の変化を明らかにすることは非常に困難であった。そこで以後ラットの脳虚血モデルは画像での評価なども検討することとした。2014年に研究室に小動物のCT撮像装置が設置され、現在検討を継続中である。

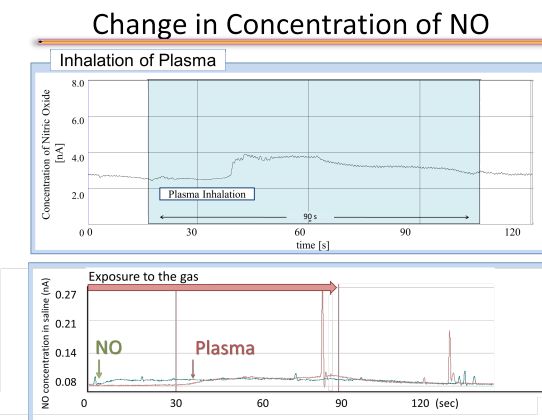
(2) 何回かの大動物のモデルを用いて検討を進める中で、全身モニターを装着しているとプラズマ吸入によって血圧低下などの循環動態の変化があることが明らかとなり、その点からプラズマ吸入の生体に及ぼす影響についてラットを用いて検討した。



上図に示す様に大気圧プラズマの吸入により血圧は低下する傾向であることが明らかとなった。比較対象はプラズマ発生源として用いているヘリウムガスである。これは大気圧プラズマによる血管拡張が起こっていることが想定され、血管拡張作用のある一酸化窒素が血管内で増加しているものと思われる。心拍数の変化については大気圧プラズマの直接的な影響であるとは考えにくく、血圧

が低下したことで生体の恒常性が働き、心拍数が上昇していると考えられた。またこれらの変動は大気圧プラズマの吸入を停止することで血圧、心拍数ともに元に戻る可逆性的変化であることが分かった。どちらの変化についても脳虚血に対する治療として大気圧プラズマを吸入することの弊害となりにくいものであると考えられる。

(3) 大気圧プラズマには多くの様々な物質が含まれるが、その中に一酸化窒素があることは以前より知られている。今回の実験モデルにおいて大気圧プラズマを吸入させた場合と一酸化窒素を吸入させた場合の血中濃度の変化について比較したところ、一酸化窒素を吸入するとすぐにその濃度が上昇するが、大気圧プラズマでは吸入開始から約10秒程度経ってから血中濃度が上昇することが明らかとなった。



図は血中一酸化窒素濃度の変化を示す。一酸化窒素を吸入した場合のこれについては大気圧プラズマの含む一酸化窒素が微量であることから、直接的に血中濃度が上がったのではなく、プラズマに含まれる他の物質が血管内皮細胞に作用して一酸化窒素を産生した可能性もあり現在検討中である。またプラズマの組成については様々な研究が行われており、従来モデルでの検討だけでなく実際に発生したプラズマからの微量な物質の検出を行っている研究者もある。中には生体に有害であるとされる物質の報告もあるため、最終的な臨床応用に向けては有用な事象のみの検討ではなく、それら有害物質の影響も含め、引き続き生体への影響について検討したいと考える。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)  
プラズマ照射治療に使用するプラズマ吸入がラットの下行大動脈圧に与える影響の検

討

村田茂、森晃、和多田雅哉、平田孝道、筒井千尋、山崎慶子、米川侑希、近藤朱音  
クリニカルエンジニアリング 臨床工学ジャーナル Vol.23, p652-653

プラズマ吸入がラットの循環器系に与える影響の検討

村田 茂、森晃、和多田雅哉、平田 孝道、筒井千尋、近藤朱音、高橋 玄宇  
日本 AEM 学会誌  
Vol. 21 (2013) No. 2 p. 260-265

〔学会発表〕(計7件)

2012年10月

第21回 MAGDA コンファレンス in 仙台  
プラズマ吸入がラットの循環器系に与える影響の検討

村田茂、森晃、和多田雅哉、平田孝道、筒井千尋、近藤朱音

2012年3月

第59回応用物理学会 東京  
大気圧プラズマ源から発生したプラズマの吸入による疾患治療  
平田孝道、村田茂、筒井千尋、近藤朱音、森晃

2012年4月

第64回日本産科婦人科学会学術講演会  
大気圧放電プラズマによる虚血後血管新生低酸素性脳症ラットモデルを用いた吸入治療の試み  
近藤朱音、森晃、三塚加奈子、佐藤茂、高橋千果、石本人士、和泉俊一郎、三上幹男

2012年5月

第51回日本生体医工学会大会  
プラズマ吸入が生体に与える影響の検討  
村田茂、森晃、和多田雅哉、平田孝道、筒井千尋、近藤朱音

2012年6月

4th International Conference on Plasma Medicine(ICPM4)  
Treatment of Diseases by Inhalation of Atmospheric Pressure Plasma Flow  
Takamichi Hirata<sup>1</sup>, Shigeru Murata<sup>1</sup>, Chihiro Tsutsui, Akane Kondo, Akira Mori

2013年12月

International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology (APSPT-8)  
The effect of inhalation of Atmospheric Pressure Discharge Plasmas and Nitric Oxide(NO)  
Akane Kondo, Akira Mori, Kazumi Takahashi, Kanako Mitsuzuka, Takamichi Hirata, Kazuhisa Maeda

2014年5月

第26回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム

大気圧低温プラズマの吸入がラットの血圧及び血中一酸化窒素濃度に与える影響の検討

高橋玄宇、森晃、和多田雅哉、平田孝道、筒井千尋、近藤朱音

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤朱音 (KONDO Akane)

四国こどもとおとなの医療センター 周産期医長

研究者番号：00384884