

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：82626
 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：24108006
 研究課題名（和文）医療用マイルドプラズマによる創傷治癒の確立とプラズマ-組織細胞相互作用の解明

 研究課題名（英文）Elucidation of interactive mechanism on wound healing process after low temperature plasma treatment

 研究代表者
 池原 譲（Ikehara, Yuzuru）

 国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

 研究者番号：10311440
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 112,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プラズマ処置を行った動物モデルを対象に実施した分子生物学的・生化学的な解析と、確立した各種のプラズマ計測によって、1) プラズマによる止血処置は、生体恒常性のバランスを保った出血制御を可能とすること、そして2) 質の異なるプラズマが、それぞれに特徴的な赤血球溶血と血清タンパク質の凝集を生じる機構を明らかにした。さらに、生体恒常性への影響が最小限となるプラズマ処置は、バイオマテリアル工学では生体分子の加工に、再生医療においては組織・臓器のトリミング等のプロセス技術として、その進化の可能性が明確になったと結論する。

研究成果の概要（英文）：We found that the low temperature plasma (LTP) treatment with the helium plasma jet could induce protein aggregation, and turned erythrocytes to be a source for clot via hemolysis. As an essential point in our system is that the clot formation is extended to red blood cells and serum proteins, we proposed whole blood clots formation as a new process linked with LTP treatment.
 At the end of this project, we feel that suitable equipment-independent parameters are we still needed to understand the observed effects and be clear the concept of hemostasis by LTP treatment. Nevertheless, we successfully reached to propose a new concept that LTP treatment is a tissue processing technology keeping homeostatic balance as analogous application as semiconductor fabrication, from the viewpoint of applied physics and pathology.

研究分野：病理学

キーワード：病理解析 プラズマ解析 タンパク凝集 低侵襲止血

1. 研究開始当初の背景

大気圧下で発生させたプラズマのガス温度を室温付近で維持できるようになり、治療技術としての利用可能性が見出された。いくつかの研究グループが、医工連携研究を展開し、止血または創傷治療

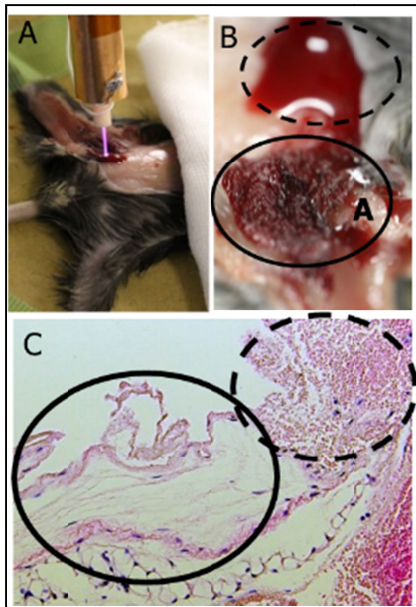


図 1. A-C:プラズマ止血 (実線)と自然凝固のエリア(破線)。

への利用を目的に研究を進めていた状況である。申請者らは、止血処置に利用可能なプラズマ発生装置を開発し、熱による作用とは異なるその作用と効果をマウスモデルで明らかにしてきた(図1)。

(1) 電源やガス種の検討やデバイスの工夫により、組織障害がなく、止血効果が最も高いプラズマ発生装置の開発スキームを確立した。

(2) 当時の性能は、マウスの大腿動脈からの出血に対し、ヘリウムプラズマを照射することで血液凝固物が形成され、出血は速やかに停止する。

プラズマ照射は血液凝固を生じるが、処置部周囲や深層の脂肪組織に、損傷を生じない。

(3) プラズマに対する各種の計測技術、温度計測、質量分析手法、電流計測手法などを確立していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが開発を進めてきた医療用プラズマ発生装置の使用で明確となる「低侵襲性」や「血液凝固やその後の創傷治療効果」について、その作用原理・メカニズムを明らかにすることである(図1)。具体的には、1) プラズマが作用する生体分子ネットワークの探索(担当:池原、中西)と、2) プラズマによるタンパク凝集・分散の解析(榎田、金、池原)であり、その応用展開として、プラズマ照射による3) タンパク質の機能変化や形状加工を中心とした医薬品製造プロセス等における利用可能性にむけた道筋の探索である。

3. 研究の方法

(1) プラズマ照射による止血処置と、従来の止血装置を用いた場合の止血処置後に生じる創傷治療プロセスの違いを明確にするた

め、網羅的な遺伝子・タンパク質発現解析を進めて、プラズマを照射した場合に特徴的である分子群の発現制御を探索する。また、in vivoでのプラズマ照射状態を可能な限り再現した生化学実験系を構築し、大気圧低温プラズマ照射の作用によってもたらされる分子ダイナミクスを検出し解析する。

(2) 生化学実験用プラズマ発生システムを用い試験環境を制御して、生体物質へ質の違うプラズマを照射した際に、どのような物理量が、どのように反応して構造を変化せしめるかを捉えて、生体分子へのプラズマの作用機序を体系化するために、電気、イメージング、真空紫外～赤外波長域の受動・能動分光、化学プローブ、及び電子スピン共鳴計測等の多くの手法を駆使して解析する。

(3) プラズマ処置によるタンパク質の機能変化や形状加工が実現可能であるかどうかについて、医薬品製造プロセスへの利用可能性を探索する目的で行う。

4. 研究成果

(1) プラズマによる血液凝固は、血液の主たる構成成分である赤血球や血漿主成分のアルブミン(図2)やイムノグロブリンを凝集せしめて膜状構造を形成することを明らかにした(研究成果:4,20,30)。プラズマ処理により生じたこれらの血液凝固物が出血点を塞ぐことで達成されるのであるが、プラズマによって生じる血液凝固物は、自然な血液凝固や止血糊の使用で生じものとは全く異なるものであった。そこで、外科手術で利用されてきた電気凝固は、通電によって発生した熱を利用して出血点を焼き

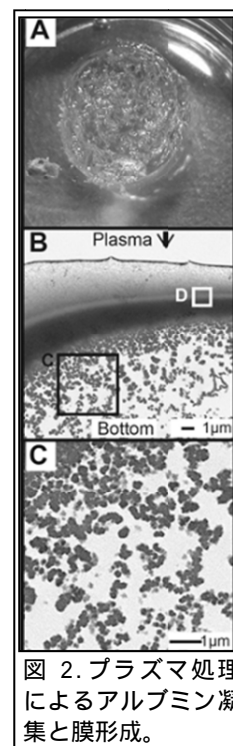


図 2. プラズマ処理によるアルブミン凝集と膜形成。

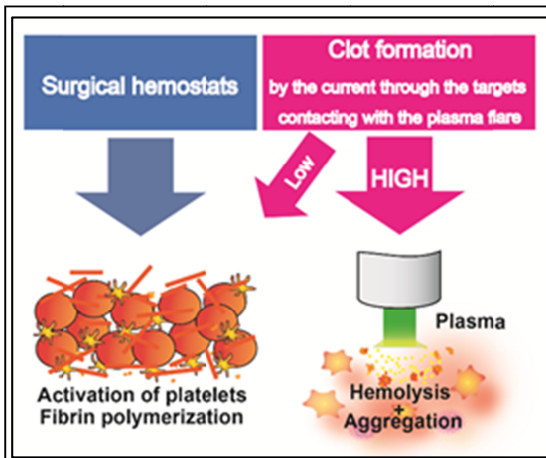


図 3. 止血糊等で誘導される生理的な血液凝固と、プラズマ処置による血液凝固の違い。

固めて塞ぐメカニズムとの差別化を行い、プラズマ処置の低侵襲性を明確にした(図2, 3)(研究成果:1,3,18,20,21,25 図書:1-3)。重要な点は、研究目的3)に示すタンパク質の形状加工、医薬品製造プロセスにおける剤型加工技術としての利用可能性を明らかにしたことで、大気圧低温プラズマ技術の利用は、ナノ~サブミクロンサイズのタンパク質粒子形成を介した膜状構造の成長技術で利用できる(図2)。これは、「シリコン等を加工するためのプロセス科学であったプラズマ工学を、生体分子や組織・細胞を加工するためのプロセス科学へと進化する可能性を明確にする」もので、プラズマ工学に生体分子の形状と機能とシステムをデザインする新たなプロセス科学としての発展を示唆するものであると考えている。

(2) 試作した生化学実験用プラズマ発生システムは、生体分子界面におけるプラズマ特性の計測を実現し、同一装置における実験条件の違いが、どの物理量に違いを生じさせるのか、また、同一の実験条件下で装置が異なる場合に、どの物理量に違いが生じるのかをそれぞれ見出し、プラズマの質の違いによる凝集・分散に関わると考えられる

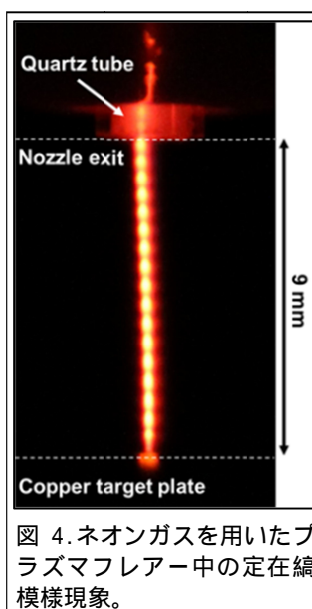


図4. ネオンガスを用いたプラズマフレア中の定在縞模様現象。

要素の候補を示した。特に、プラズマ装置から被照射物に至る空間において、誘電体バリア放電を用いた大気圧プラズマフレアにおいて、図4に示す縞模様放電現象を世界で初めて観測した(研究成果10)。

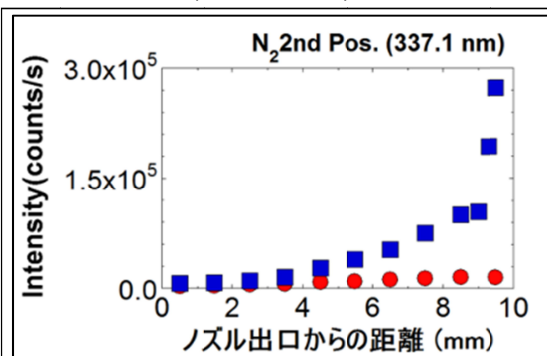


図5. 窒素励起分子の発光強度空間分布(ノズル出口から10 mmの位置に被照射物有、被照射物無し)。

また、図5に示すように、被照射物表面において、励起された粒子が多く生成されることを見出したのに加え、リアルタイムのプラ

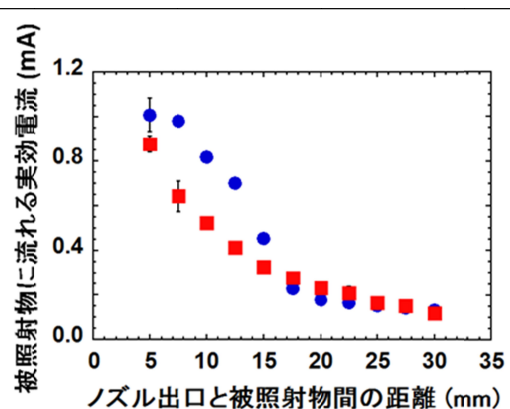


図6. 実効電流のノズル出口から被照射物までの距離依存性。(産総研装置、名古屋大装置)。

ズマ電流・電圧計測の知財化を進めた(知財6)。更には図6に示すように、異なるプラズマ装置間の比較を行う上でも重要な指標となることを見出した(研究成果12)。

以上の学術的知見は、International Electrotechnical Commission (IEC)において、新規国際規 IEC 60601-2-76 (low energy ionized gas haemostasis equipment)の原案に活かされた。また医科学における当該研究の波及として、血液凝固が炎症における免疫活性化のプラットフォームとなることを発見した研究への展開をあげることができる。活性化した血小板は、CD69 受容体のリガンドとなる Myosin light chains 9/12 を放出して網目状構造を形成し、CD69 と Myosin light chains 9/12 の結合を介して炎症細胞を集積することで炎症応答を促進するなど、基礎免疫学における新たな制御メカニズム解明への展開である(研究成果7)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計139件)内査読有70件

1. K. Miyamoto, S. Ikehara, Y. Ikehara, H. Sakakita, (4人中2.3.4番目) Low temperature plasma equipment applied on surgical hemostasis and wound healings, J Clin Biochem Nutr. 査読有、2017:60(1):25-28. DOI: 10.3164/jcbrn.16-60.
2. Y. Akimoto, S. Ikehara, J. Kim, H. Sakakita, Y. Ikehara, (9人中2.4.8.9番目) Galectin expression in healing wounded skin treated with low-temperature plasma: Comparison with treatment by electrical coagulation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 査読有、2016:605:86-94. DOI: 10.1016/j.abb.2016.01.012.
3. K. Miyamoto, S. Ikehara, H. Sakakita, H. Nakanishi, Y. Ikehara, (16人中2.5.12.16番目) Red Blood Cell Coagulation Induced by Low-temperature Plasma Treatment, Archives of Biochemistry and

- Biophysics. 査読有、2016:605:95-101. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.023.
4. M. Kaibori, K. Matsui, Y. Ikehara, (15人中12番目) Evaluation of fluorescence imaging with indocyanine green in hepatocellular carcinoma, *Cancer Imaging*, 査読有、2016:16(6). DOI: 10.1186/s40644-016-0064-6.
 5. H. Yamada, H. Sakakita, J. Kim, H. Nakanishi, Y. Ikehara, (13人中2.5.11.13番目) Spectroscopy of reactive species produced by low-energy atmospheric-pressure plasma on conductive target material surface, *Journal of Physics D, Applied Physics*, 査読有、49-394001. 2016:1-11. DOI: 10.1088/0022-3727/49/39/394001.
 6. K. Hayashizaki, M. Y. Kimura, Y. Ikehara, (19人中17番目) Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation, *Sci. Immunol.* 査読有、2016; 1(3) 9154. DOI: 10.1126/sciimmunol.aaf9154.
 7. S. Yamamoto, H. Nakanishi, (6人中5番目) Ex vivo culture of circulating tumor cells using magnetic force-based coculture on a fibroblast feeder layer. *Biotechnol J.* 査読有、2016;11(11):1433-1442. DOI: 10.1002/biot.201600084.
 8. H. Suzuki, H. Nakanishi, (8人中3番目) Impact of total lesion glycolysis measured by 18F-FDG-PET/CT on overall survival and distant metastasis in hypopharyngeal cancer. *Oncol Lett.* 査読有、2016;12(2):1493-1500. DOI:10.3892/ol.2016.4765
 9. Y. Fujiwara, H. Sakakita, Y. Ikehara and J. Kim, (9人中2.8.9番目) Observations of multiple stationary striation phenomena in an atmospheric pressure neon plasma jet, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有、2016; 55(1): 010301.1-3. DOI: 10.7567/JJAP.55.010301.
 10. H. Yamada, H. Sakakita, J. Kim, Y. Ikehara, H. Nakanishi, (15人中3.9.12.14番目) Bending and turbulent enhancement phenomena of neutral gas flow containing an atmospheric pressure plasma by applying external electric fields measured by schlieren optical method, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有、2016; 55(1S), 01AB08; 1-5. DOI: 10.7567/JJAP.55.01AB08.
 11. H. Sakakita, J. Kim, Y. Ikehara, (8人中1.3.8番目) Study of the Power Distribution of Each Impedance in the Electrical Circuit of Ionized Gas Coagulation Equipment. *Plasma Medicine*, 査読有、2016: 5(2-4)189-203. DOI: 10.1615/PlasmaMed.2016015853.
 12. J. Kim, H. Sakakita, S. Ikehara, H. Nakanishi, Y. Ikehara, (9人中1.2.4.5.9番目) Study on Thermal Characteristics of Ionized Gas Coagulation Equipment, *Plasma Medicine*, 査読有、2016: 5(2-4)199-108. DOI: 10.1615/PlasmaMed.2016015879.
 13. K. Yambe, K. Konda, H. Sakakita, (4人中4番目) Dependence of Plasma Plume Formation on Applied Voltage Waveform in Atmospheric-Pressure Plasma, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 査読有、2016; 44(1); 107-112. DOI: 10.1109/TPS.2015.2506784.
 14. A. Matsuda, A. Kuno, Y. Ikehara, H. Nakanishi, (10人中4.10番目) Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1, *Anal Chem*, 査読有、2015; 87(14): 7274-7281. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01329.
 15. M. Ueda, D. Yamagami, Y. Ikehara, (12人中11番目) Histological and Nuclear Medical Comparison of Inflammation After Hemostasis with Non-Thermal Plasma and Thermal Coagulation, *Plasma Processes and Polymers*, 査読有、2015; 12(12): 1338-1342. DOI: 10.1002/ppap.201500099.
 16. E. Iio, M. Ocho, Y. Ikehara, (15人中6番目) A novel glyco-biomarker, *Wisteria floribunda* agglutinin macrophage colony-stimulating factor receptor, for predicting carcinogenesis of liver cirrhosis, *Int J Cancer*, 査読有、2015;138(6): 1462-1471. DOI: 10.1002/ijc.29880.
 17. S. Ikehara, H. Sakakita, Y. Ikehara, J. Kim, H. Nakanishi, (14人中1.2.5.8.11番目) Plasma blood coagulation without involving the activation of platelets and coagulation factors, *Plasma Processes and Polymers*, 査読有、2015: 12(12): 1348-1353. DOI: 10.1002/ppap.201500132.
 18. J. Ikeda, Y. Tsuruta, H. Sakakita, Y. Ikehara, (6人中4.6番目) Anti-Cancer Effects of Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Cancer-Initiating Cells in Human Endometrioid Adenocarcinoma Cell, *Plasma Processes and Polymers*, 査読有、2015; 12(12): 1370-1376. DOI: 10.1002/ppap.201500097.
 19. M. Ueda, T. Fukushima, Y. Ikehara, (8人中7番目) Synthesis and evaluation of a radioiodinated peptide probe targeting $\alpha 6$ integrin for the detection of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、2014;14;445(3):661-666. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.086.
 20. M. Ocho, A. Togayachi, Y. Ikehara, (12人中10番目) Application of a

- Glycoproteomics-Based Biomarker Development Method: Alteration in Glycan Structure on Colony Stimulating Factor 1 Receptor as a Possible Glycobiomarker Candidate for Evaluation of Liver Cirrhosis, J Proteome Res, 査読有、2014; 13(3):1428-1437. DOI: 10.1021/pr400986t.
21. T. Yamaguchi, S. Ikehara, H. Nakanishi, Y. Ikehara, (4人中1.2.3.4番目) A genetically engineered mouse model developing rapid progressive pancreatic ductal adenocarcinoma, The Journal of Pathology, 査読有、2014; 234(2): 228-238. DOI: 10.1002/path.4402.
 22. A. Kuno, Y. Ikehara, (11人中2番目) A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis, Sci Rep, 査読有、2013; 3:1065. DOI: 10.1038/srep01065.
 23. Y. Ikehara, H. Sakakita, S. Ikehara, H. Nakanishi, (5人中1.2.4.5番目) Formation of membrane-like structures in clotted blood by mild plasma treatment during hemostasis, Journal of Photopolymer Science and Technology, 査読有、2013;26(4), 555-557. DOI: 10.2494/photopolymer.26.555.
 24. H. Ozaki, H. Matsuzaki, H. Nakanishi, Y. Ikehara, (7人中5.6番目) Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model, Clin Exp Metastasis., 査読有、2012; 29(3): 229-238. DOI: 10.1007/s10585-011-9445-1.
 25. K. Ito, A. Kuno, Y. Ikehara, (20人中3番目) Lect-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients, Hepatology, 査読有、2012; 56(4): 1448-1456. DOI: 10.1002/hep.25815.

〔学会発表〕(計 152 件) 内招待 67 件

〔図書〕(計 6 件)

1. 池原 譲、静電気学会、静電気学会誌、出血制御における従来手法と低温プラズマ法の比較、2014、38(4)、171-176.
2. 榊田 創、池原 譲 他、養賢堂、機械の研究、連載講座 高度物理刺激と生態応答(9)：第5章プラズマ刺激による細胞応答と応用 その3、5.7 低侵襲プラズマ止血機器の開発、2016：68(4)、319-321.
3. 宮本 健司、池原 早苗、榊田 創、池原 譲、応用物理学会、応用物理、低温プラズマ

技術を取り入れた手術用止血装置、2016：85(9)、793-796.

4. J. Kim and H. Sakakita, "Microwave excited atmospheric pressure plasma jet using microstrip line for the synthesis of carbon nanomaterials", Microwave Discharges: Fundamentals and Applications, UCOPress, Editorial Universidad de Córdoba, 2015, http://www.unebook.es/es/libro/microwave-discharges-fundamentals-and-applications_50226

〔産業財産権〕

出願状況(計 27 件)

1. プラズマ照射処理装置、その制御方法、凝固物の評価装置、及び、膜の製造方法
発明者：池原 譲、池原 早苗
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2016-129295 号
出願年月日：平成 28 年 6 月 29 日
国内外の別：国内
2. プラズマ照射処理装置、その評価装置及び評価方法、その制御装置及び制御方法、並びに、膜の製造方法
発明者：池原 譲、池原 早苗、宮本 健司
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2016-043933 号
出願年月日：平成 28 年 3 月 7 日
国内外の別：国内
3. プラズマ評価装置
発明者：榊田 創、池原 譲、木山 學
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 6074792 号
取得年月日：平成 29 年 1 月 20 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/yuzuru-ikehara/>

<https://unit.aist.go.jp/esprit/group/ip-lasmap.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池原 譲 (IKEHARA, Yuzuru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：10311440

(2)研究分担者

榊田 創 (SAKAKITA, Hajime)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
電子光技術研究部門・研究グループ長
研究者番号：90357088

金 載浩 (KIM, Jaeho)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
電子光技術研究部門・主任研究員
研究者番号：30376595

中西 速夫 (NAKANISHI, Hayao)
愛知県がんセンター(研究所)
遺伝子病理診断部・研究員
研究者番号：20207830

池原 早苗 (IKEHARA, Sanae)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
創薬基盤研究部門・産総研特別研究員
研究者番号：50598779

(3)連携研究者

山岸 正裕 (YAMAGISHI, Masahiro)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：00220252

山家 清之 (YAMBE, Kiyoyuki)
新潟大学自然科学研究科・准教授
研究者番号：90452474

北川 元生 (KITAGAWA, Motoo)
千葉大学大学院医学研究院・准教授
研究者番号：40262026

永野 富郎 (NAGANO, Tomio)
ディー・アール・シー株式会社
研究者番号：50572228

板垣 宏和 (ITAGAKI, Hirotomo)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
電子光技術研究部門・産総研特別研究員
研究者番号：00793184

山口 高志 (YAMAGUCHI, Takshi)
千葉大学大学院医学研究院・助教
研究者番号：60626563

(4)研究協力者

牧野内 進 (MAKINOUCHI, Susumu)
渡辺 俊二 (WATANABE, Shunji)
宮本 健司 (MIYAMOTO, Kenji)
藤野 真哉 (FUJINO, Shinya)
松本 広行 (MATSUMOTO, Hiroyuki)
以上 5 名 株式会社ニコン

吉野 将人 (YOSINO, Masato)

村中 俊郎 (MURANAKA, Toshiro)
以上 2 名 村中医療器株式会社

木山 學 (KIYAMA, Satoru)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
電子光技術研究部門

橋本 美香 (HASHIMOTO, Mika)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
創薬基盤研究部門

Vanni Antoni
The Institute of Ionized Gases (IGI-CNR,
Italy)・Director

Matteo Zuin
CNR, Italy

Tetsuji Shimizu
terraplasma GmbH(Garching, Germany)

藤原 正純 (FUJIWARA, Masanori)
藤原 大 (FUJIWARA, Yutaka)
山田 大将 (YAMADA, Hiromasa)
山岸 祐介 (YAMAGISHI, Yusuke)
中宮 明久 (NAKANOMIYA, akihisa)
野中 淳司 (NONAKA, Atushi)
箕輪 祐貴 (MINOWA, Yuki)
堀田 朋敬 (HOTTA, Tomonori)
以上 8 名 筑波大学