

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32678

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13392

研究課題名(和文) 大気圧プラズマと細胞刺激発生装置の併用による脳神経細胞の修復及び機能回復

研究課題名(英文) Restoration and functional recovery of brain neurons by using of atmospheric pressure plasma and cell stimulation generation device

研究代表者

平田 孝道(Hirata, Takamichi)

東京都市大学・工学部・教授

研究者番号：80260420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブ(CNT)を用いた立体ナノ構造の構築のため、Plasma-Activation (PA)法により化学修飾したCNT上での心筋細胞培養に関する基礎実験を行った。顕微鏡による心筋細胞の観察の結果、CNT上でも心筋細胞が培養できることを確認した。さらに生体埋め込み用ワイヤレス型電気刺激装置の試作を行った。この装置は2つのコイルを共振器として利用する磁界共振方式による電極伝送回路を内蔵しており、一定周波数の電気刺激の発生が可能である。この装置と同スケールの模擬デバイスによる埋め込み実験を行った結果、小動物では大きさの問題があったものの、中動物では問題は無いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We did the basic experiment concerning the cardiomyocyte culture on CNT that modified the chemistry by the Plasma-Activation (PA) method for the construction of the solid nano structure to use Carbon nanotubes (CNT). We confirmed the cardiomyocyte was able to be cultured also on CNT as a result of the observation of the cardiomyocyte with the microscope. In addition, We made the wireless type electricity stimulation device for the living body burial for trial purposes. This device builds the electric power transmission circuit by the magnetic field resonance method to use two coils as a resonator into, and can generate the stimulation by electricity of a constant frequency. There was a problem of the size in small animals as a result of experimenting the burial with this device and a mock device of the same scale. It turned out that there was no problem in an middle animal.

研究分野：プラズマ工学

キーワード：化学修飾CNT 立体ナノ構造 細胞刺激発生装置 脳神経細胞再生

## 1. 研究開始当初の背景

液相中もしくは気相 - 液相界面反応場を利用した“新規プラズマ”に関する研究は、国内外の大学や民間研究所で盛んに行われている。特に「大気圧プラズマ」は、滅菌・殺菌、有害物質分解、表面改質のみならず、ナノ・バイオ・メディカルの多面性を必須とする複合新領域の開拓・発展には必要不可欠である。更に、「パルス・プラズマを用いた皮膚の改質・再生治療」もしくは「プラズマを用いた細胞・組織への遺伝子(DNA)導入」など、「プラズマ医療」と称される新分野の研究が世界的に進行している。

一方、胚性幹細胞(ESC)及び人工多能性幹細胞(iPSC)による組織や臓器の再生、並びに脊髄損傷部位へのiPS細胞移植による脊髄修復などの中枢神経系再生に関する研究が進展している。特に、東京女子医科大学の岡野光夫教授のグループでは、厚さ約1mmの心筋細胞シートを創製することが可能であるが、体外培養では積層できないという現状がある。つまり、ナノスケールで立体的な細胞ネットワークを構築することが可能であれば、更なる積層化が可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、「大気圧プラズマ源による細胞増殖因子物質の活性化」、「カーボンナノチューブ(CNT)を用いた立体ナノ構造の構築」、並びに「ワイヤレス電送回路・極低電力LSIを搭載した細胞増殖誘発刺激発生装置の併用による脳神経細胞の修復及び機能回復」を目的とする。研究期間内における到達目標は、以下の通りである。(1)培養細胞及び動物に対するプラズマ照射実験を行い、安定した細胞増殖のための最適値を確立する。(2)細胞を伸長させるための“足場”となる誘導物質をCNT表面に化学修飾し、立体構造による細胞の垂直方向への伸長を促進

させるための構造最適値を把握する。(3)ワイヤレス電送回路・極低電力LSIを搭載した細胞増殖誘発刺激発生装置の試作を行い、生体埋め込みに適した仕様の策定を行う。更に、長時間培養・埋め込みにて生じると想定される複数要因に関する評価及び装置の機能向上に関する総合的評価を行う。

## 3. 研究の方法

3年間の研究期間を以下に示すような3チーム体制にて実施する予定である。

チーム → 各種細胞及び小動物へのプラズマ照射による細胞内成長因子の活性化・細胞増殖、チーム → 繊維状CNT表面への化学修飾処理・立体構造の構築、チーム → ワイヤレス電送回路・極低電力LSIを搭載した細胞増殖誘発刺激発生装置の設計・開発。

## 4. 研究成果

研究の成果を以下に示す。

平成27年度

細胞を伸長させるための“足場”となるCNT表面に化学修飾処理を施し、更なる細胞ネットワークの構築を促進させるための基礎実験を行った。実験結果は、以下の通りである。本研究ではアミノ基の修飾方法としてプラズマアクティベーション(Plasma-Activation, PA)と化学修飾(Chemical Modification, CM)の両方を用いた。修飾後はフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いてCNT表面の評価を行った。FT-IRの結果により、PAとCMのどちらの化学修飾方法でも、CNT表面のアミノ基修飾を確認したが、スペクトルを比較した場合PAの方が有効であると考えられる。また、生体適合性の評価実験として、NIH3T3細胞を用いた*in vitro*実験を行った。実験の結果から、PAとCMの両者とも、CNTの生体適合性を向上させたことが細胞増加率より確認できた。どちらの化学修飾方法も有効ではあるが、

PAの方が有効的であると考えられるため、PAについて重点を置き、より有効的な処理時間の検討を行った。処理時間の検討を前述の実験と同様に行い、FT-IRによる測定の結果から、15分間と20分間の処理時間のみがCNT表面にアミノ基を修飾させていることが確認できた。NIH3T3細胞を用いた *in vitro* 実験では、細胞増加率から15分間の処理時間が最も生体適合性を向上させたことがわかった。これらの結果を踏まえ、CNTの生体適合性を向上させるには、15分間のPAが最も有効であることが判明した。

#### 平成28年度

デバイスの埋め込みを想定した生物学的実験を行った。埋め込み対象デバイスとしては、シリコーン樹脂(PDMS:ポリジメチルシロキサン)にてコーティング処理を施したワイヤレス電力電送用フレキシブル基板(縦:78mm、横:54mm)を用いた。埋め込み実験には、2匹のラット(未処理:1匹、デバイス埋め込み:1匹)を用いた。ただし、実験条件を統一するため、未処理ラットにもデバイス埋め込みラットと同じ大きさに皮膚の切開を施した。デバイス埋め込み期間が14日間であったが、デバイス内への体液浸潤、体動によるデバイスの破損などがなく、LEDの点灯が定常的に確認できたことから、回路には問題が無いことが判明した。ラットの皮下組織とデバイスの間にはコラーゲン繊維性結合組織膜(生体特有の「カプセル化」現象)が形成されて体液が溜まっているのが確認された。この理由としては、ラットの体動に起因したデバイスの“ずれ”によって空洞が形成されて体液が溜まったものと考えられる。さらに、炎症反応の有無を確認するため、血液中白血球値の測定を行った。一般的にラットの白血球値は67~216( $\times 100/\mu\text{L}$ )であり、216( $\times 100/\mu\text{L}$ )を超えた場合には炎症反応があるといえる。埋め込み5日目及び6

日目で数値が上昇したことから、デバイスを異物と認知した可能性があるものと考えられる。ただし、白血球値:216( $\times 100/\mu\text{L}$ )を越えなかったが、炎症反応の初期段階であることが判明した。

#### 平成29年度

本年度は、細胞を伸長させるための“足場”となるカーボンナノチューブ(CNT)上での神経幹細胞の培養実験と、ワイヤレス伝送装置の試作を行った。実験結果は、以下の通りである。CNTバイオデバイスの開発において、CNT上、電極上、シリコンウエハー上での細胞培養とそれらの生体適合性向上が重要不可欠である。そこで、心筋細胞を用いたCNT及び電極上での細胞培養と細胞拍動の観察に関する基礎実験を行った。実験手順は、以下の通りである。単層カーボンナノチューブ(SWNT)を細胞培養用カルチャーカバーガラス上に塗布・乾燥させた後、マグネトロン型プラズマ発生装置(周波数:50 Hz、電圧・電力:1 kV・20 W)内のサンプルホルダーに固定させてプラズマイオン照射処理を行った。次に、プラズマアクティベーション処理を施したカルチャーカバーガラスを装着したディッシュチャンバーに、ラット心筋細胞を含む培地を注入してCO<sub>2</sub>-インキュベーターに導入・培養を行った。培養実験は、インキュベーター温度:37℃、加湿器温度40℃、細胞培養用ガスの種類と流量:Air/5%-CO<sub>2</sub>、40-45ml/minの条件下にて行った。分化培地下で培養した心筋細胞の顕微鏡写真より、心筋の拍動を確認したことから、SWNT上でも心筋細胞が培養できることを確認した。次に、生体埋め込みを想定したワイヤレス型電気刺激装置の試作を行った。この装置は2つのコイルを共振器として利用する磁界共振方式による電極伝送回路を内蔵しており、一定周波数の電気刺激を発生させることが可能である。給電側基板と受電側基

板(共に、縦 40 mm×横 75 mm)により構成されている。この装置と同一スケールのダメージデバイスを用いて埋め込み実験を行った結果、小動物への埋め込みには問題があったが、中動物への埋め込みには問題は無いことが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

小林千尋, 森 晃, 平田孝道, 特集テーマ「プラズマ(加工)とその応用技術の現状と将来動向」大気圧プラズマを用いた細胞・組織の活性化メカニズムと再生医療への応用, 光技術コンタクト誌, 査読無, 2016, 28-34.

清水鉄司, 平田孝道; - 第 5 章 プラズマ刺激による細胞応答と応用 その 2 -、機械の研究, 査読無, 第 68 巻, 第 3 号, 2015, 228-233.

〔学会発表〕(計 27 件)

国際会議論文(外国語)

Y. Oki, S. Tsurubayashi, T. Yoshikawa, C. Kobayashi, and T. Hirata, "Biocompatibility Evaluation with Amino Group-Modified Carbon Nanotube Films and Rats", TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (BME 2017), 2017年10月27日.

T. Yoshikawa, Y. Oki, S. Tsurubayashi, C. Kobayashi, and T. Hirata, "Investigation of Relationship between Healing Effect by Plasma Irradiation and NO Concentration", TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (BME 2017), 2017年10月27日.

C. Kobayashi, T. Yoshikawa, A. Mori, and T. Hirata, "Promotion of Angiogenesis Using Atmospheric Pressure Plasma Derived FGF-2/VEGF", The 70th Annual Gaseous Electronics Conference, Pittsburgh / USA, 2017年11月7日.

R. Tanaka, S. Shigekuni, S. Matsuda, T. Tamura, C. Kobayashi, A. Mori, and T. Hirata, "Healing Mechanism Clarification of Plasma Irradiated Wound by Quantification and Detection of Superoxide Dismutase (SOD) Activity", The 70th Annual Gaseous Electronics Conference, Pittsburgh / USA, 2017年11月7日.

平田孝道, 筒井千尋, 金井孝夫, 工藤美樹, 岩下光利, 森 晃; 大気圧プラズマの照射吸入による疾患治療と救急救命医療, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 2016 年 9 月 14 日.

T. Hirata, C. Tsutsui, A. Mori, T. Kanai, Y. Kudo, T. Izawa, and M. Iwashita, Disease Treatment and Critical Care by Irradiation/Inhalation of Atmospheric Pressure Plasma, The 13th Asia-Pacific Conference on Plasma Science and Technology (APCPST2016), Shanghai / China, 2016年5月20日.

平田孝道; 大気圧プラズマの照射・吸入による疾患治療, 独)日本学術振興会プラズマ材料科学第153委員会 プラズマ材料科学, 2016年2月8日.

筒井千尋, 森 晃, 平田孝道; 大気圧プラズマを用いた新たな疾患治療と一酸化窒素の寄与、新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同公開シンポジウム「新学術の最前線～プラズマと生物と医療の協奏曲～」, 2015 年 8 月 5 日.

T. Hirata, C. Tsutsui, A. Mori, T. Kanai, Y. Kudo, T. Izawa, and M. Iwashita, Medical Treatment Using Biomedical Plasma Techniques, XXXIIth International Conference on Phenomena in Ionized Gases (ICPIG), Iasi/Romania, 2015年7月28日.

〔その他〕

ホームページ等

- 東京都市大学工学部医用工学科  
<http://www.bme.tcu.ac.jp>
- プラズマ再生医療合同チーム  
<http://www.bme.tcu.ac.jp/rmct/index.html>
- 東京都市大学 プラズマ ライフサイエンス イノベーション 合同チーム  
<https://www.facebook.com/東京都市大学-プラズマ-ライフサイエンス-イノベーション-合同チーム-1444771279075322/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 孝道 (HIRATA, Takamichi)

東京都市大学・工学部・教授

研究者番号: 80260420

(2)研究分担者

高宮 真 (TAKAMIYA, Makoto)

東京大学・大規模集積システム設計教育研究センター・准教授

研究者番号: 20419261