

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：32678

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21340173

研究課題名（和文）低侵襲型マイクロスポット大気圧プラズマ源による
神経細胞組織の活性化研究課題名（英文）Nerve cell tissue activation by a low invasion type micro spot
atmospheric pressure plasma source

研究代表者

平田 孝道 (HIRATA TAKAMICHI)

東京都市大学・工学部・准教授

研究者番号：80260420

研究成果の概要（和文）：

培養細胞の顕微鏡像によれば、プラズマを照射させた場合、培養細胞は順調に増殖することが判明した。さらに、ラットを用いた火傷患部へのプラズマ照射実験を行った。その結果、照射対象部位には感電的負傷に起因した痕跡が無く、皮膚には治癒に起因した白色の痂皮が形成されていることも判明した。したがって、プラズマ電界もしくは培地表面へのイオン/ラジカルの衝突等による相互作用が細胞内の成長因子増殖に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

According to the typical microscope images of culture cells, healthy growth was observed for plasma irradiation. Furthermore, in an experiment testing the effects of plasma irradiation on rats that were artificially given burn wounds, no evidence of electric shock injuries was found in the irradiated areas. In fact, the observed evidence of healing and improvements of the burn wounds. Therefore, it appears that the interaction due to ion/radical collisions on the culture surface causes a substantial effect on the proliferation of growth factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：プラズマ理工学

科研費の分科・細目：プラズマ科学・プラズマ科学

キーワード：大気圧プラズマ、成長因子、プラズマ吸入

1. 研究開始当初の背景

気体に比べて高密度な媒質（水、イオン性溶液）中でプラズマを発生させる「液中プラズマ」、必要に応じた面積・体積にプラズマを発生し、ミクロなスポット領域でプロセスを行う「マイクロプラズマ」、大気圧下の空間もしくはガス流体中で非平衡プラズマを発生させる「大気圧プラズマ」等を駆使した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”の生成基礎及び応用展開に関する研究は、国内外の大学や民間研究所の化学・固体物理・ナノ材料分野で盛んに行われている。しかし、本研究課題のように、プラズマ科学、デバイス工学、表面・界面化学、生体分子学等の学際的分野を駆使した研究は、欧米に比べて若干の遅れがあるというのが現状である。特に前述の“新規プラズマ”の中でも「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、ナノテクノロジー・バイオテクノロジー・メディカルサイエンス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、プラズマの応用事例として近年注目されつつある「パルス・プラズマを用いた皮膚の改質・再生治療 [http://portrait-plasma.com/]」もしくは「プラズマ方式分子導入装置を用いた細胞及び組織への遺伝子(DNA)、蛋白質、医薬系低分子化合物の導入 [B B K バイオ (http://www.biob.jp)]」など、実用化が先行しているにもかかわらず物理的メカニズムが未だ解明されていない状況を解決する手段として、プラズマ理工学方面からのメカニズム解明が重要なキーポイントと成り得る。以上の背景から、本研究課題である低侵襲型マイクロスポット大気圧プラズマ源による神経細胞組織の活性化に関する開発技術を確立することは、日本におけるナノ及びバイオテクノロジー産業の現状を活性化して国際競争力強化に直結する新産業創出のキーポイントと成り得ると考えている。

2. 研究の目的

本研究課題では、低侵襲型マイクロスポット大気圧プラズマ源の開発・特性評価による気相-プラズマ-液相界面反応場の挙動解明、並びに生体組織への直接照射による細胞活性化を目指した基礎研究を行う。

3. 研究の方法

3年間の研究期間を以下に示すような3段階の手順にて実施した。

フェーズⅠ：低侵襲型マイクロスポット大気圧プラズマ源の製作・生体物質による検証

マイクロスポット大気圧プラズマ源の作製及び特性評価、並びに生体由来物質レベルでの実験・検証を行なった。具体的には、単なる表面改質としての使用ではなく、生体への使用が前提条件であるため、生体組織への侵襲性を軽減させるための構造(プラズマ生成部と反応部に静電的な電位差が生じないような構造)を有するプラズマ源を作製した。また、作製したマイクロスポット大気圧プラズマ源の安全性を確認するため、生体由来物質によるプラズマ照射実験を行なった。

フェーズⅡ：各種培養細胞を用いたプラズマ照射実験、並びに小動物による予備実験

前年度からの継続事項である各種培養細胞を用いたプラズマ照射実験(特に、異種細胞に対する活性化の評価)、並びに小動物を対象とした予備実験を行なった。対象とする細胞は、表皮細胞、心筋細胞、肝細胞であり、生命維持及び新陳代謝に必要と思われる細胞に着目した培養実験を行なった。さらに、培養細胞の実験結果を踏まえた上で、小動物を対象とした皮膚・皮下組織に対するプラズ

マ照射予備実験を行なった。具体的には、動物用自動血球計数器を用いた血液検査による小動物の生体情報(特に、炎症状態)把握を行なった。ここで、使用する小動物はラット(ウイスター種)であり、主な測定項目は赤血球数、白血球数、血小板数である。

フェーズⅢ：小動物を用いた皮下組織及び末梢神経系に対する細胞活性化の検証実験

前年度に実施した培養細胞の実験結果を踏まえながら、小動物(ラット)等を用いた皮下組織及び末梢神経系へのプラズマ照射による細胞・組織の活性化に関する検証実験を行なった。実験手順は、以下の通りである。具体的には、麻酔による無意識下処置を施したラットの目的部位に直接プラズマ照射を行い、表面上の変化を観察した。特に、皮膚に人工的な炎症を起こさせたラットを用いて治癒状態を観察し、無処理の場合と比較した。また、自動血球計数器を用いた血液検査による炎症状態の把握を行なった。具体的な測定項目としては、赤血球数、白血球数、血小板数である。さらに、詳細な生体機能の評価を行うために、生化学検査を行なった。具体的な検査項目としては、肝機能、腎機能、アレルギー、サイトカイン(細胞から分泌されるタンパク質で、特定細胞に情報伝達をするもの)である。以上の結果を踏まえながら、プラズマ照射条件を変えた実験を行い、血液・生化学検査の結果と比較しながら総合的に評価した。具体的な照射条件としては、印加電圧(直流、パルス波)、ガス種(単一、混合)、ガス流量である。

4. 研究成果

低侵襲型マイクロスポット大気圧プラズマ源の製作、並びに培養細胞を用いたプラズマ照射実験

マイクロスポット大気圧プラズマ装置の製作を行った。大気圧プラズマ発生装置本体は、ガラスキャピラリー(プラズマ発生部の内径:8 mm、先端部の内径:1 mm)内にタングステン線(直径:1 mm)を導入し、外部に筒状グラウンド電極を設置した同軸状構造である。プラズマ発生条件は、以下の通りである。印加電圧:5-9 kVpp、周波数:1-3 kHzであり、ヘリウム(He)ガス流量:1-1.5 L/min、照射距離:5-10 mm、プラズマ照射時間:1-300 secの範囲にてプラズマの発生実験を行った。実験は、培養容器(ポリプロピレン製)上にマウス繊維芽細胞(NIH3T3)を含有した培地を展開し、プラズマイオン照射処理を施した場合と未処理の場合について行った。更に、プラズマ処理を施した培養容器をCO₂-インキュベーター(培養条件:温度:37°C、CO₂ガス濃度:5%)に導入し、長時間培養と光学顕微鏡による直接観察を行った。Heガスのみをフローさせた場合、培地内での

ガス攪拌に起因した細胞の浮遊化が促進されたために細胞の成長が阻害されている。一方、プラズマを発生させた場合、細胞の浮遊化が殆んどみられず、順調に増殖することが判明した。したがって、プラズマ電界もしくは培地表面へのイオン/ラジカルの衝突等による相互作用が細胞内の成長因子に起因した増殖に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

プラズマ装置から発生する発光について、分光器を用いて計測を行なった。具体的には、プラズマ照射条件を変えた実験を行った結果、使用ガス種のイオン・ラジカルに相当する発光波長ピークを検出し、細胞表面もしくは近傍にイオン種・ラジカル種が確実に到達していることが判明した。一方、プラズマ照射時間に対する細胞数変化、並びに細胞内成長因子と密接な関係があると近年注目されている細胞内産出性一酸化窒素 (NO) の測定を行った。実験は、培養容器上にマウス繊維芽細胞 (NIH3T3) を含有した無血清培地を展開し、プラズマ照射処理を施した。更に、プラズマ照射処理を施した培養容器を CO₂-インキュベーターに導入し、24 時間培養と光学顕微鏡による直接観察を行った。NO の測定は、カテーテル型 NO センサを用いた。まず、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行った NIH3T3 細胞の顕微鏡写真観察の結果、He ガスのみの場合には未処理に比べて明らかな減少がみられた。プラズマフローの場合、細胞が順調に増殖することが判明した。また、プラズマ照射時間に対する細胞数変化より、He ガスのみの場合、60 sec 以上では減少傾向であるのに対して、プラズマフローの場合には約 120 sec 近くまではほぼ一定の細胞数が維持されることが判明した。したがって、プラズマと培地表面の相互作用が細胞内の成長因子増殖に大きな影響を及ぼしていると考えられる。また、プラズマ照射時間に対する NO 濃度変化 (細胞内産出性 NO は、NO 合成酵素 (NOS) によってアルギニンと酸素とから合成される) の測定を行った結果、照射直後は培地の電位変動に起因した急峻な変化が見られるが、約 40 sec で最大値となり、その後は緩やかに減少する傾向が観測された。この結果は、薬物を使用した他の研究グループが報告している傾向とほぼ同様の変化を示すことが判明した。

小動物を用いたプラズマ照射実験

培養細胞の増殖結果との比較を行うために、人工的に皮膚の火傷を発生させた小動物へのプラズマ照射を行い、照射患部の治癒状態について評価を行った。マイクロスポット大気圧プラズマ源のプラズマ発生条件は、印加電圧：8 kVpp、周波数：3 kHz (矩形波)、He ガス流量：1 L/min、照射距離：5-10 mm、プラズマ照射時間：90 sec である。照射実験

に用いた小動物は、ラット (種：ウイスター、飼育状態：無菌、性別：オス) 及びミニブタ (性別：メス) であり、ガス麻酔による無意識下状態にて実験を行った。照射対象となる皮膚の火傷は、手術用電気メスを用いて形成した。

火傷患部へのプラズマ照射実験を行なった場合におけるサーモグラフを用いた体表面温度の測定結果より、照射部の温度は 40~45°C 程度であり、火傷を起こす温度には到達していないことが判明した。また、火傷形成直後からの目視観察においては、6 日目の患部観察では照射対象部位には外傷性火傷や感電的負傷に起因した痕跡が見当たらないのみならず、一部の皮膚には治癒に起因した白色の痂皮 (かさぶた) が形成されていることも判明した。

プラズマ吸入による疾患治療

細胞・組織の活性化に重要な役割を果たしている一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) に着目し、細胞・組織の再生、並びに心疾患及び呼吸器疾患治療を目的としたプラズマ吸入による実験・評価を行なった。実験に用いた小動物はミニブタであり、ガス麻酔による無意識下状態にて実験を行った。カテーテル型 NO センサを腹部大動脈に挿入した血管造影用カテーテルの端末から直接導入し、プラズマを直接肺に吸入した時の血液中 NO 濃度の測定を行った。また、血管内圧 (血圧) は、カテーテル末端に接続した血圧測定用マイクロ圧力センサにより測定した。さらに、吸入効果の比較・検討を行うため、医療用高濃度 NO ガスを用いた。血圧測定の結果、He ガス吸入の場合には血圧に変化はなかったが、プラズマ吸入では血圧の降下 (最高/最低：110/65 mmHg → 90/40 mmHg) がみられた。比較のために行なった高濃度 NO ガス吸入においても血圧の降下 (最高/最低：125/90 mmHg → 105/50 mmHg) がみられ、一般的に報告されている NO による血管拡張作用に起因した血圧降下が計測された。さらに、血液中の NO 濃度測定においても、NO が検出されたのみならず、血圧降下と同様の時間変化をすることが判明した。ゆえに、プラズマ吸入と高濃度 NO ガス吸入では、同様の血圧変動がみられたことから、NO に起因した血圧降下であると考えられる。特に、プラズマ吸入における大気中 NO 濃度が高濃度 NO ガスに比べて非常に低い (プラズマ：0.5 ppm 以下、NO ガス：10 ppm 以下) ことから、NO は肺から吸収されたのではなく、肺胞内の肺上皮細胞又は血管内皮細胞で産出された可能性が大きいと考えている。従って、実験にて得られた NO に起因した血管拡張による血圧降下は、狭心症や心筋梗塞などの心疾患、並びに新生児遷延性肺高血圧などの呼吸器疾患の治療に有効であると考えている。

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 3 件)

- ① T. Hirata, C. Tsutsui, T. Kishimoto, A. Mori, M. Akiya, T. Yamamoto, and A. Taguchi; Fat liquefaction of adipose tissue using atmospheric-pressure plasma irradiation, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有り、Vol. 50, No. 8, 2011, 080217.
- ② A. Mori, A. Kondo, T. Hirata, and C. Tsutsui; Non-invasive measurement of fetal augmentation index by fetal aortic diameter pulse and flow velocity waveforms, Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica 査読有り、Vol. 90, Issue 8, 2011, 839–845.
- ③ 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、査読有り、第 35 巻、第 1 号、2011、20–24。

[学会発表] (計 16 件)

- ① 小町俊文、筒井千尋、平田孝道、秋谷昌宏、マイクロスポット大気圧プラズマ源を用いた生体組織再生の検討、第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012 年 3 月 17 日、早稲田大学。
- ② 岸本拓巳、筒井千尋、平田孝道、森 晃、秋谷昌宏、マイクロスポット大気圧プラズマ源を用いた再生医療 (5)、第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012 年 3 月 17 日、早稲田大学。
- ③ 平田孝道、村田 茂、筒井千尋、近藤朱音、森 晃、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、第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012 年 3 月 17 日、早稲田大学。
- ④ T. Hirata, C. Tsutsui, and A. Mori, Regenerative Medicine Using Novel Biomedical Plasma Techniques, The Eighth International Conference on Flow Dynamics (ICFD), 2011 年 11 月 10 日, Sendai/Japan.
- ⑤ 筒井千尋、平田孝道、横井由貴子、小町俊文、岸本巧巳、村田 茂、森 晃、秋谷昌宏、山本俊昭、田口 亮；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、第 35 回静電気学会全国大会、平成 23 年 (2011)9 月 13 日、東京理科大学。
- ⑥ 猪股 茂、平田孝道、筒井千尋、江原由泰、山本俊昭；大気圧非熱平衡プラズマを用いた細胞の活性化・不活性化、第 35 回静電気学会全国大会、2011 年 9 月 13 日、東京理科大学。

- ⑦ T. Hirata, C. Tsutsui, T. Komachi, T. Kishimoto, A. Mori, M. Akiya, T. Yamamoto, and A. Taguchi, Biomedical Plasma for the Regenerative Medicine Applications, The 3rd International Conference on Microelectronics and Plasma Technology (ICMAP-2011), 2011 年 7 月 6 日, Dalian/China.
- ⑧ 平田孝道、筒井千尋、小町俊文、岸本拓巳、佐藤和子、森 晃、山本俊昭、秋谷昌宏、田口 亮；マイクロスポット大気圧プラズマ源を用いた再生治療 ④、第 58 回応用物理学関係連合講演会、2011 年 3 月 25 日、神奈川工科大学。
- ⑨ T. Hirata, C. Tsutsui, T. Komachi, T. Kishimoto, Y. Sakatani, A. Mori, M. Akiya, T. Yamamoto, and A. Taguchi, Activation of Cell Irradiated by An Atmospheric-Pressure Plasma for the Biomedical Applications, American Vacuum Society (AVS) 57th International Symposium & Exhibition, , 2010 年 10 月 20 日, Albuquerque, New Mexico/ USA.
- ⑩ T. Hirata, C. Tsutsui, T. Komachi, T. Kishimoto, A. Mori, T. Yamamoto, M. Akiya, and A. Taguchi, Direct Measurement of Nitric Oxide Produced from Cell Under the Atmospheric Pressure Plasma Irradiation, The 7th International Conference on Reactive Plasmas (ICRP-7)/63rd Gaseous Electronics Conference (GEC-63) /28th Symposium on Plasma Processing (SPP-28), 2010 年 10 月 6 日, Paris/France.
- ⑪ 筒井千尋、平田孝道、横井由貴子、小町俊文、岸本巧巳、村田 茂、澤田佳那子、佐藤和子、森 晃、猪俣茂、杉原悠公、鈴木雄一郎、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、第 34 回静電気学会全国大会、2010 年 9 月 6 日、鳥取大学。
- ⑫ T. Hirata, C. Tsutsui, A. Mori, T. Yamamoto, M. Akiya, A. Taguchi, Micro-Spot Atmospheric Pressure Plasma Production for the Bio-Medical Application, The 11th International Workshop of Advanced Plasma Processing and Diagnostics, 2010 年 7 月 8 日, Jeju/Korea.
- ⑬ 平田孝道、筒井千尋、坂谷祐一郎、森 晃、堀井敦史、山本俊昭、田口 亮；マイクロスポット大気圧プラズマ源を用いた再生治療(1)、第 57 回応用物理学関係連合講演会、2010 年 3 月 19 日、東海大学。
- ⑭ 筒井千尋、平田孝道、森 晃、山本俊昭、田口 亮；大気圧放電プラズマ源を用いた生体組織の再生治療、ナノ・バイオメディカル学会 第 2 回大会、平成 22 年(2010)2 月 22 日、大阪大学。
- ⑮ T. Hirata, C. Tsutsui, Y. Yokoi, Y. Sakatani, A.

Mori, A. Horii, T. Yamamoto, and A. Taguchi,
Micro-Spot Atmospheric Pressure Plasma
Production for the Biomedical Applications,
The Sixth Asia-Pacific International
Symposium on the Basic and Application of
Plasma Technology (APSPT-6), 2009年12月
15日, Hsinchu/Taiwan.

- ⑩ 平田孝道、筒井千尋、横井由貴子、坂谷祐
一郎、森 晃、堀井敦史、山本俊昭、田口
亮; マイクロスポット大気圧プラズマ源を
用いた生体組織・細胞の活性化、第33回
静電気学会全国大会、平成21年(2009)9
月10日、東京都市大学。

〔図書〕(計1件)

平田孝道、シーエムシー出版、大気圧プラズ
マの技術とプロセス開発、2011、248-252

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bme.tcu.ac.jp/index.html>

<http://www.bme.tcu.ac.jp/rmct/top.html>

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・准教授
研究者番号：80260420

(2) 研究分担者

島谷 祐一 (SHIMATANI YUICHI)
東京都市大学・工学部・准教授
研究者番号：20154263

畠山 力三 (HATAKEYAMA RIKIZO)
東北大学・工学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：00108474