

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24654194

研究課題名(和文) 大気圧低温プラズマによる止血機序の解明と内視鏡装置への適用

研究課題名(英文) Hemostatic mechanism and application of endoscope of blood coagulation by low temperature atmospheric plasma

研究代表者

北野 勝久 (Kitano, Katsuhisa)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20379118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマによる止血に関して、内視鏡用のデバイスの開発と止血機序の解明に関する研究を行った。マウスの大腿静脈からの出血は致死性であるが生存が可能であった。臓器断面からの止血も良好に行え、病理診断によると体細胞へのダメージは皆無であった。赤血球が形を保ったままの血餅が得られたことから、血液凝固因子にトリガーが入っており、トロンビン活性がフィブリノゲン分解を直接活性化していると推察される。

研究成果の概要(英文)：For blood coagulation by low temperature atmospheric plasma, plasma device for endoscope was developed and its hemostatic mechanism was evaluated. The lethality bleed from femoral vein of mouse was controlled with clarity. The bleed from internal organ with partial ablation was also controlled. By pathology assessment, no damage against body cell was seen. Because the shape of red blood cell was kept in blood clot, it seems that some of blood coagulation factor is triggered and plasma directly activate thrombin activation or fibrinogen degradation.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学

キーワード：大気圧低温プラズマ プラズマ医療 止血 血液凝固因子

1. 研究開始当初の背景

1980年代後半に臨床応用され、現在に至っているアルゴンプラズマ凝固(Argon Plasma Coagulation:APC)装置は、人体をアースとしてモノポーラー電極(誘電体バリア無)を用いて生成した熱化したアルゴンプラズマを利用し、熱凝固を行う事で止血を行っている。電流集中により深く焼結されてしまう事があるために、壁の薄い消化管に内視鏡処置として用いた場合、重篤な合併症である消化管穿孔が生じてしまう恐れがある。

G. Fridmanらの研究では、大気圧低温プラズマによる止血効果に関する興味深い実験結果は得られているものの、急峻な高電圧パルスの誘電体バリア放電により空気をプラズマ化しているため、生成活性種の制御は不十分であり、止血機序に関する研究は困難だと思われる。

人体に対して止血デバイスとして用いるためには、人体に流れる電流を制限して、心室細動は言うまでもなく痛み(筋肉刺激)を抑制する必要がある。筋肉刺激による痛感、周波数により異なっており、例えば商用周波数では1mA程度の電流で痛みを感じ始めるものの、350kHzでは420mAまで許容される。そのため、電気メスやAPCでは350kHz程度の電源を用いている。

2. 研究の目的

大気圧プラズマを人体組織へ直接的に照射して医療行為を行うPlasma Medicineと呼ばれる研究分野は世界的に高い注目を浴びており、止血、創傷治療、消毒、癒着防止、脱色などの研究が進められつつある。この中で、止血は米国Drexel Univ.のA. Fridmanのグループで積極的に研究が進められている。研究代表者は大気圧低温プラズマの一つであるLF(Low Frequency)マイクロプラズマジェット(以下、LFジェット)の放電物理の研究を進め、大気中のヘリウムガス流束により媒質制限された空間における部分放電現象である事を明らかにしており、図1に示す様な大気圧低温プラズマを、単電極からなる簡易な装置で安価(1000円程度)に発生可能とした。また、液体の殺菌に関して従来よりも100倍程度短時間でできる低pH法を開発しており、その研究を通じて気相中に



図1 LFジェット

生成された活性種が液中へ侵透し、生体高分子への化学修飾を誘起することで、液中で高い殺菌作用などが得られる事を明らかにした。国立がん研究センターと共同研究を進めるなか、これまで進めてきた技術・知見を活かし、内視鏡手術でプラズマ止血を行うデバイスを開発するという着想に至った。

このような最終目的に対して、必要となるプラズマデバイスの試作、止血メカニズムの解明等を進めるのが本申請課題の目的となる。

3. 研究の方法

LFプラズマジェットと呼ばれる大気圧低温プラズマ源をがんセンターに設置し実験を行った。プラズマ源はガス流量ならび電圧を可変にしてある。LFジェットは誘電体バリア放電を用いているために、10kHz程度の電圧波形を用いているにも関わらず、本質的に電流波形はパルス状になるために、より高周波の成分を有しており、電撃の回避という観点からも治療用デバイスとして適している。

内視鏡手術で止血デバイスとして用いるためには、内視鏡の鉗子口(内径約3mm)より照射装置を導入する必要がある。マイクロプラズマに類されるLFジェットは内径10μm程度のプラズマ生成も可能であり、アフターグローではなく放電フロントの伝搬によるダイレクトプラズマをリモートプラズマの様に生成できることから止血デバイスのプラズマ源として適している。

4. 研究成果

実際に治療現場で使われているAPC用のプローブは外径2.3mm、長さ2200mmとなっており、実用化を考えるとこのサイズでのプラズマ生成が必須となる。このため、放電装置のデモンストレーションとしてこのAPCプローブを改良することで、図2に示す様にプローブ先端からLFジェットの生成することに成功した。APCプローブは内部に放電用の金属配線が設置されており、先端部で金属電極からアルゴンガスに対して放電を直接行い、誘電体バリア無しのプラズマ生成となっているために、そのままの電極構造では低温プラズマの生成が不可能である。その

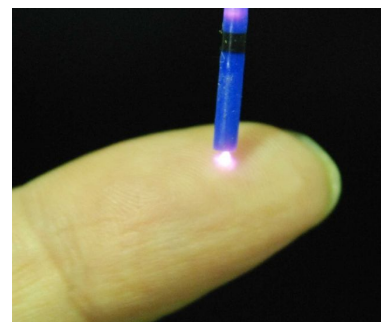


図2 APCプローブの先端から放出されるLFジェット

ため、APC プローブの根元部の外周に高電圧電極を取り付けることにより、静電結合的に内部の金属電極へ電力供給を行うこととした。電気的には、高電圧電源と金属電極の間にコンデンサを挿入していることになり、静電容量により電流制限を行うことで非平衡プラズマの生成を行っている。このような放電を行うときは APC プローブに対してヘリウムガスを供給している。内視鏡プローブとして LF プラズマジェットを利用可能であることを実証したので、次からは単独の LF ジェットにより実験を行った。

マウスを用いた動物実験により止血効果を確認した。まず、採血した後にシャーレ上に滴下した血液に対してプラズマを照射する実験を各種パラメーターで行ったところ、プラズマ炎の先が血液に触れている場合のみに止血効果が見られることが分かった。ほんの少しでも非接触にすることで止血効果が激減したことから、止血凝固に作用しているのは、プラズマ発光部中のみが存在する短寿命活性種であると推察される。これは低 pH 法における殺菌実験とは異なり、明らかに作用因子となる活性種が異なっていることを示している。

止血実験では、流出している血液が 10 秒程で止血され、血液のごく表層のみで薄膜状に凝固が進んでいることが肉眼による観察でわかっており、少なくとも熱的な凝固では無く、いずれかの血液凝固因子に生化学的なトリガーが入っていることが示唆されている。これらの実験事実から、低温プラズマによる止血は、人体組織内部への熱ダメージが APC に比べて大幅に低減できることが期待される。

それ自身は生体高分子と化学的な結合をしない He ガスを用いた LF ジェットを血液に照射しているが、プラズマ発光部が血液に接している場所のみで一様な血液凝固が薄膜状に見られたことから、凝固因子として、空気中の酸素や窒素を由来とする励起化学種ではなく、He プラズマそのものに含まれる短寿命活性種であると考えられる。その中でも、電子によるプラズマ化学反応が重要であると推察しており、より電子密度の高いプラズマ生成が効果的であると考えている。幸



図3 マウスを用いた内臓からの止血実験の様子

い、LF ジェットはリモートプラズマではなく、単電極による部分放電が誘電体パイプ外部でのガス流束内部で生じている放電形態であるために、高い電子密度のプラズマを表面へ照射することが容易であり、止血デバイス開発は非常に有効であると期待できる。

プラズマ止血の研究で類似したものの散見されるが、臨床現場において止血に使われる方法は多くの方法があり、そのような手法に対して付加価値のある止血を行う必要がある。マウスの尻尾や大型動物の皮膚からの出血に対する研究が散見されるが、それらのほとんどは生体が兼ね備えている止血機構により自然と止血が行われるために臨床的な価値は少ない。そのためターゲットとした止血は、一つは腫瘍切除後の実質臓器の断面からの止血であり、もう一つは、自然に止血が行われる毛細血管ではなく、止血処置が必要な太い血管からの出血に対する止血である大腿静脈からの出血である。このような止血を内視鏡もしくは腹腔鏡での手術へ適用することを念頭に研究を進めている。

マウスの場合、大腿静脈を切断すると 5 分程度で心臓停止し死に至るが、プラズマ照射を工夫することにより止血が可能であり、照射後にマウスが生存することが統計的に有意な差があることが実証できた。内視鏡手術時でも同様に一定程度の太さの静脈からの止血は可能であると期待できる。

臓器断面からの出血に関する止血を試みた(図3)。ナイフで肝臓や腎臓を部分的に切除し、出血部位の止血を試みた。プラズマの発光部が直接当たる場合のみに進行することがわかった。凝固に関与する因子としては、電子といった寿命の短い活性種が関わっていることが推察される。病理切片の診断によると細胞はほぼ損傷を受けておらず、止血部の血餅においても赤血球が形を保っており、非常に低侵襲な止血が行われていると評価できる(図4)。類似する研究では赤血球の形態が変化してしまっているものも見られるが、おそらく止血は低温プラズマの化学活性により進行しているのと同時に、プラズマガスの温度が高いために副作用として熱的なダメージが進行しただけと考えられる。

ただし問題点としては、血液凝固は表層のみで進行するために血餅と組織の融着を行

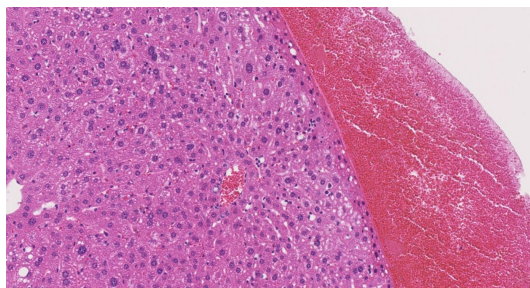


図4 部分切除した肝臓の止血断面の病理切片

うためには、事前にできる限り余分な血液を脱脂綿等により除去しておくこと効率が良い。

血液凝固のメカニズムの解明に関する研究を進めた。血液の抗凝固薬であるヘパリンが入っている血液に対する止血を試みた。疾患のために体内における血液凝固を防ぐためにヘパリンを常時飲用している患者がいるが、そのような患者は止血凝固機構が働かないために、出血がなかなか止まらないという問題があり、そのような患者に対してプラズマ止血が行えると実用上のメリットが大きい。採血した後ヘパリンを混合した血液に対してプラズマ照射を行ったところ、ヘパリンの有無にかかわらず止血が進むことがわかった。ヘパリンは止血カスケードのIXとX因子を阻害するはずであり、これよりも下流側での凝固を促進しており、トロンビン活性がフィブリノゲン分解を直接活性化すると推察される。このことから、ヘパリンを投与された患者に対してもプラズマ止血は有効であると考えられ、プラズマ止血の適用範囲が広がる事が期待される。

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. "Chemical Modification of Amino Acids by Atmospheric-Pressure Cold Plasma in Aqueous Solution", Eisuke Takai, Tsuyoshi Kitamura, Junpei Kuwabara, Satoshi Ikawa, Shunsuke Yoshizawa, Kentaro Shiraki, Hideya Kawasaki, Ryuichi Arakawa, and Katsuhisa Kitano, Journal of Physics D: Applied Physics (2014). (accepted)
2. "Degeneration of amyloid-s fibrils caused by exposure to low-temperature atmospheric-pressure plasma in aqueous solution", Eisuke Takai, Gai Ohashi, Tomonori Yoshida, Karin Margareta Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Katsuhisa Kitano and Kentaro Shiraki, Appl. Phys. Lett. 104, 023701 (2014).
3. "Molecular mechanism of plasma sterilization in solution with the reduced pH method :importance of permeation of HOO radicals into the cell membrane", Eisuke Takai, Satoshi Ikawa, Katsuhisa Kitano, Junpei Kuwabara, Kentaro Shiraki, Journal of Physics D: Applied Physics, 46, 295402, (2013).
4. "Free radicals induced in aqueous solution by non-contact atmospheric-pressure cold plasma", A. Tani, Y. Ono, S. Fukui, S. Ikawa, K. Kitano, Appl. Phys. Lett. 100, 254103 (2012).
5. "Extracellular matrix patterning for cell alignment by atmospheric

pressure plasma jets", A. Ando, T. Asano, A. Sayed, R. Tero, K. Kitano, T. Urisu, S. Hamaguchi, Jpn. J. Appl. Phys. 51, 036201 (2012).

6. "Protein Inactivation by Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution", Eisuke Takai, Katsuhisa Kitano, Junpei Kuwabara, Kentaro Shiraki, Plasma Processes and Polymers 9, 77-82 (2012).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. "Cryopreservation of the plasma treated water for disinfection treatment in dental and surgical therapies based on the reduced pH method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Tomoko Ohshima, Hiromitsu Yamazaki, Emi Usui, Yasuko Momoi, International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS), Osaka University, Feb. 26-28, (2014). (invited)
2. "Strong bactericidal activity of the plasma treated water for medical application based on the reduced pH method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Tomoko Ohshima, 8th International Conference on Reactive Plasmas 31st Symposium on Plasma Processing, Fukuoka, Feb. 3-7, (2014).
3. "Toward medical applications of atmospheric pressure plasmas with room temperature ~ Physics, Chemistry, Biochemistry, Molecular biology, Medicine ~", K. Kitano, 2013 Japan-Taiwan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2013), (2013). (Plenary)
4. "Freezing preservation of the plasma treated water for disinfection treatment in dental and surgical therapies based on the reduced pH method", Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Atsushi Tani, Yoichi Nakashima, Hiromitsu Yamazaki, Tomoko Ohshima, Kazuhiro Kaneko, Masaaki Ito, Takeshi Kuwata, Atsushi Yagishita, 21st International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 21), August 4-9, Cairns Convention Centre, Queensland, Australia, (2013).
5. "Plasma treated water with the reduced pH method for effective

- disinfection in dental and surgical treatment”, K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Oshima, E. Usui, Y. Momoi, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A. Yagishita, The 12th Asia Pacific Physics Conference of AAPPS (APPC-12), Makuhari, Chiba, July 14-19, (2013).
6. “Plasma photonics”, K. Kitano, Fundamentals and Applications of Nanophotonics, Photovoltaics and Bio-photonics”, Morocco Optics and Photonics Center, MAScIR, Rabat, Morocco, March 7-8, (2013).
7. “Innovative disinfection for dental and surgical therapies combined with the plasma treated water and the reduced pH method”, K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Oshima, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A. Yagishita, 4th International Conference on Plasma Medicine, (Orleans, France), June 17-21, (2012).
8. “The reduced pH method with indirect plasma for safe and effective disinfection in dentistry and surgery”, K. Kitano, S. Ikawa, A. Tani, H. Yamazaki, T. Oshima, K. Kaneko, M. Ito, T. Kuwata, A. Yagishita, The 39th IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), (Edinburgh, UK), July 8-12, (2012).
9. “Toward Medical Applications of Atmospheric Pressure Plasmas ~ Physics, Chemistry, Biochemistry, Molecular biology, Medicine~”, K. Kitano, IUMRS-ICEM2012, Yokohama, (2012/9/27).

〔図書〕(計3件)

1. 北野勝久、井川聡、谷篤史、大島朋子 : 「プラズマジェットを用いた殺菌メカニズムと消毒応用」、静電気学会誌、37、3、112-116、(2013)
2. 北野勝久、谷篤史、井川聡、大島朋子 ; 「プラズマプロセスの新展開 医療応用の可能性」、クリーンテクノロジー、日本工業出版、2月号、(2013)
3. 北野勝久 ; 「冷たいプラズマを用いた液中誘起化学反応のバイオ応用 ~重合から殺菌まで~」、化学と教育、60巻9号、p380、(2012)

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称 : 「Plasma producing apparatus and method of plasma production」
発明者 : 北野勝久、浜口智志、青木裕紀

権利者 : 大阪大学
種類 : 米国登録
番号 : US8232729
取得年月日 : 2012/7/31
国内外の別 : 国外

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.plasmabio.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
北野 勝久 (Kitano Katsuhisa)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号 : 20379118

(2)研究分担者

金子 和弘 (Kaneko Kazuhiro)
国立がん研究センター・東病院・科長
研究者番号 : 30286786

伊藤 雅昭 (Ito Masaaki)

国立がん研究センター・東病院・医長
研究者番号 : 0312144

(3)連携研究者

桑田 健 (Kuwata Takeshi)
国立がん研究センター・東病院・医長
研究者番号 : 00327321

駒井 好信 (Komai Yoshinobu)

国立がん研究センター・東病院・医員
研究者番号 : 50527067

合志 健一 (Koushi Kenichi)

国立がん研究センター・東病院・レジデント
研究者番号 : 70626829

井川 聡 (Ikawa Satoshi)

大阪府立産業技術総合研究所・主任研究員
研究者番号 : 80393297