

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 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：24654195

研究課題名(和文)生理学的薬物動態(PBPK)モデルによるプラズマ生体相互作用の解析

研究課題名(英文)Analyses of plasma-biosystem interaction by PBPK model simulation

研究代表者

浜口 智志(Satoshi, Hamaguchi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60301826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生理学的薬物動態(PBPK)モデルとは、生体中の薬物(化学物質)の吸収・分布・代謝・排出(ADME)を記述する数学モデルである。本研究では、プラズマ照射による血液凝固プロセスを記述するPBPKモデルを構築し、これに、プラズマ照射された液体中の反応活性種(ROS/RNS等)生成シミュレーションの結果と併せて、プラズマ照射の生体に対する効果を解析すること目的とした。PBPK数値シミュレータは、実用に供するにはまだ発展の余地が残っているが、本研究の成果により、プラズマ生成反応活性種と血液凝固プロセスの関係が定性的に明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model is a mathematical model that describes absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of chemical substances in a living body. The goal of study is to analyze plasma effects based on simulation results of reactive species (ROS/RNS) generated in liquid by plasma application and their biological effects predicted by a PBPK mode created in this study. Numerical simulations based on a PBPK model needs to be further developed due to the lack of rate constant data in literature. However, the study has deepened our qualitative understanding of the relation of plasma generated reactive species and blood coagulation processes.

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：プラズマ プラズマ医療 生理的薬物動態モデル PBPKモデル シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

近年、気体温度の低い大気圧プラズマを生体に直接照射することにより、止血や創傷治療の効果があることが知られ、その原理の探求や新しい医療応用を目指すプラズマ科学が注目され、「プラズマ医療」と呼ばれている[1-3]。この分野では、プラズマにより気相中で生成された反応活性種 [活性酸素(ROS)・活性窒素(RNS)等]が、血液などの液体に輸送され、そこで様々な反応を誘起して、最終的に生理学的作用を生体にもたらす。近年、プラズマが気相中に生成する反応活性種は実験的・理論的に精力的に研究されているが、それらが輸送される先の液相中の化学反応・および生体中での生理学的反応に関する理論・シミュレーション研究は、本課題研究が開始されるまで、ほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

生理学的薬物動態(PBPK)モデルとは、生体中の薬物(化学物質)の吸収・分布・代謝・排出(ADME)の0次元モデル(グローバルモデル)であり、生理学の分野で長く活用されている数学モデルである。本研究では、機構のよく知られている血液凝固プロセスに注目し、プラズマ照射による血液凝固プロセスを記述するPBPKモデルを構築することを目的とした。更に、プラズマ照射された液体(血液)中の反応活性種(ROS/RNS等)生成のグローバルモデル・シミュレーションを行った。これにより、構築したPBPKモデルと、プラズマ照射により生体内で生成されると予想されるROS/RNSを総合的に考察することにより、プラズマ医療の大きな課題である、低温大気圧プラズマ照射による止血・血管再生・創傷治療の生理学的機構の解明に大きく資することが期待される。

具体的には、生理学的機構・生化学反応系がよく知られた血液凝固プロセス[4]に注目し、PBPKモデルを構築した。また、液相中の化学反応に関するグローバルモデルのシミュレーションは、システムを可能な限り単純化するためには、本研究では、1気圧の大気と平衡状態にあり、窒素と酸素の溶存純水を溶媒として仮定し、文献から知られた典型的な低温大気圧プラズマが生成する反応種が溶媒に熱速度で照射される際の、純粋中に生成される反応生成物を数値シミュレーションにより解析した(図1)。

3. 研究の方法

血液凝固系では、様々な血液凝固因子の作用により止血が行われることが知られている。このよく知られた機構をもとに、研究初年度は、プラズマ照射をうけた血液に対

するPBPKモデルの構築を行った。また、並行して、プラズマ照射された溶液中の反応活性種(ROS/RNS等)の濃度の時間変化を記述する反応方程式(グローバル)モデルを構築した。後者のモデル化に関しては、放射線化学の分野でデータベース化されている反応速度などの情報をもとにモデルの構築を行った。研究2年目は、これらのモデルをもとに、プラズマ照射による血液凝固機構の解析を行った。

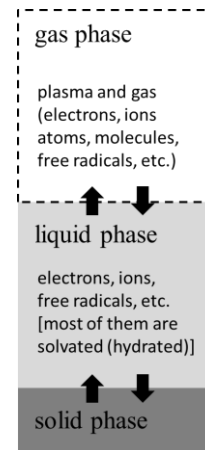


図1：気相中の放電プラズマが、血液などの液相を通して生体と相互作用する際のイオン・電子・ラジカル等の輸送概念図

シミュレーション

一次元反応拡散方程式

$$\frac{d[X_i]}{dt} = D_i \frac{d^2[X_i]}{dz^2} + \tilde{R}_i$$

化学反応速度式

$$\tilde{R}_i = -k_{ij}[X_i][X_j] + k_{kl}[X_k][X_l] + \dots$$

[X]_i : 液中濃度
t : 時間
D_i : 拡散係数
z : 距離(深さ方向)
k_{ij} : 反応速度定数

37 species, 111 chemical reactions

計算モデル概念図

- ✓ 初期状態の水は純水 (pH=7)
- ✓ 1気圧の大気と平衡になるように酸素と窒素が溶存
- ✓ 水中から大気中への化学種の輸送は、ヘンリーの法則により決定
- ✓ イオンは水中から大気中へ輸送されない

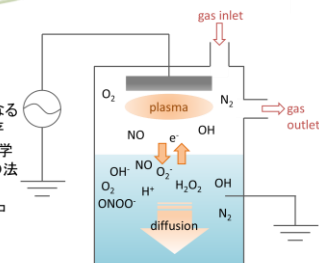


図2：液相中のROS/RNS生成シミュレーションの概念図。このモデルでは、37の化学種、111の化学反応式を解く。

上述したように、本研究で行ったグローバルモデルによる液相中の反応活性種（ROS/RNS 等）の濃度の時間依存性シミュレーションでは、プラズマ照射条件を指定する必要がある。プラズマ照射条件は、過去に行われた、気相における反応シミュレーションや実験データをもとに、決定した。本シミュレーションでは、37 の化学種と、111 の化学反応を用いて、ROS/RNS の時間発展を決定しました。また、同様のシミュレータとして、RNS は除くものの、ROS とフェントン反応を組み合わせたシミュレータも併せて構築した。また、深さ方向への輸送を含めた、1次元シミュレータも開発した。図2に液相反応活性種シミュレーションの概念図を示す。

4. 研究成果

血液凝固の PBPK モデルの構築においては、既存の研究[4-7]成果を活用した。生理学的な血液凝固反応に関しては、すでに多数の理論が専門家より提案され、その概要はすでに理解されている。プラズマ照射によるプラズマ凝固の促進は、プラズマによって生成された活性種が、血液凝固に関与する多数の反応経路の内、どこに作用するかを明らかにすることが重要である。

低温大気圧プラズマを血液に照射した場合、プラズマによる血液中の水分に生成される各種 ROS/RNS の酸化作用により、血液中の Ca^{2+} イオンの増加を引き起こすと考えられている。プロリアシン (S100-A7) のようなカルシウム結合タンパクが、血液中で、プラズマによって、生成された反応活性種により、 Ca^{2+} イオンが血液中に生成される。実際の血液の凝固因子の反応系は、一般に、非常に複雑であり、例えば、組織が外傷等をうけ、出欠すると、一連の凝固因子が活性化され、細胞内のカルシウム貯蔵器官である小胞体へ、カルシウムイオン放出を促す信号が伝達される。プラズマ照射では、この一連の反応と似た状態が、血液中のカルシウムイオンの生成促進を通して、形成されると考えられる。

しかしながら、プラズマにより生成された活性種が、カルシウムイオン放出の促進だけに貢献しているかどうかは、今後、より研究をすすめて、明らかにする必要がある。というのも、プラズマ照射により、血液中に生成される活性種の種類は極めて多く、それぞれが、異なる反応速度を持ち、反応過程に多様な時間スケールが存在する。例えば、OH ラジカルのような極めて反応性の高いものは、血液表面のタンパク質等高分子を酸化する一方、より安定な、過酸化水素 (H_2O_2)、硝酸、亜硝酸は、血液中に生成されると、これらも、多様な凝固因子（蛋白質）と反応することが

予想される。

尚、血液は、その 60%が血漿であり、血漿の 90%は水分である。そのため、プラズマ照射により、その水分中に生成される反応活性種が、長期的な時間スケール（数秒から数分程度）の化学反応を、プラズマに暴露された血液面の表面近傍領域を中心に、誘起すると考えられる。

図3は、本研究で行った数値シミュレーションによって得られた純水中での、プラズマ生成活性種の反応プロセスの例である。図は、横軸が時間、縦軸が、溶液中の各化学種の濃度を、いずれも、対数表示している。この計算例では、プラズマ照射によって誘起された反応の素過程を明らかにするために、システムを単純化し、気相プラズマ中に生成される OH ラジカルだけを取り出し、その反応を調べている。また、血漿系の鉄イオンの役割を明らかにするために、モデルとして、比較的高濃度の Fe^{2+} イオンを初期条件として設定している。これにより、フェントン反応による OH ラジカルや鉄化合物の生成を調べた。シミュレーションは、図2で、拡散係数 $D=0$ と置いたゼロ次元（グローバルモデル）計算であり、溶媒中の攪拌が十分早く起こったことを仮定しているが、定性的には、血液などの液体表面における反応過程を模擬していると解釈できる。

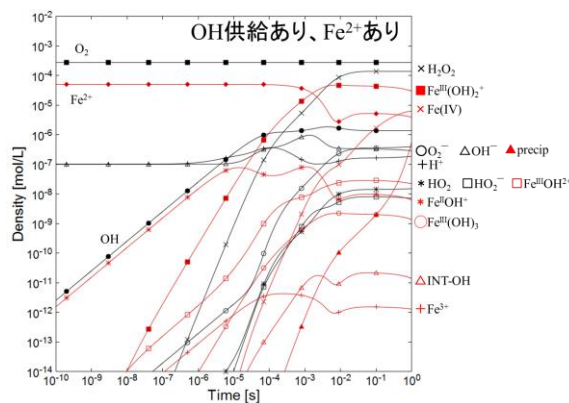


図3：気相中の放電プラズマが、血液などの液相を通して生体と相互作用する際のイオン・電子・ラジカル等の輸送概念図。計算は、時刻0で溶液がプラズマに暴露され始めたと仮定している。横軸が、プラズマ照射時間、縦軸は各化学種の濃度を対数表示したもの。

以上、本研究成果をまとめると以下のようになる。

(1) 大気圧低温プラズマを溶液に照射する際に、溶液中に生成される反応活性種を数値的に予言するシミュレーションコードを開発した。シミュレーションでは、グローバルモデルを仮定し、気相中のプラズマ生成反応種（イオン、電子、各種分子や反応活性種）を指定し、中性種は、熱速度で表面に到達し、また、ヘンリーの法則を通して、液相表面からの脱離を仮定している。また、荷電粒子種の入射フラックスは、液体を通過する電流値で指定される。

(2) 特に、血液へ照射される反応系のうち、鉄イオンとの反応を明らかにするために、溶液中でのフェントン反応を、シミュレーション系に導入した。

(3) 血液凝固のPBPKモデルの構築にあたっては、医学・生物分野ですでに導入されている血液凝固モデルを活用した。実際の血液凝固プロセス全体を数値シミュレーション化するには、より大規模な研究が必要であるが、定性的に、プラズマ照射により、血漿中でのCa²⁺イオンの放出促進の機構について、プラズマ照射により結晶中に生成される反応活性種とカルシウム結合タンパクとの相互作用について、可能性のある反応経路を明らかにした。

参考文献

- [1] 浜口智志 プラズマ核融合学会誌第 87 巻第 10 号 696 (2011)
- [2] 浜口智志 パリティ (2013) 1 月号 pp16-17.
- [3] 浜口智志 ケミカルエンジニアリング vol. 58 (12) (2013) 915-921 (35-41).
- [4] W. C. Ober, D. U. Silverthorn, C. W. Garrison, A. C. Silverthorn, and B. R. Johnson, "Human physiology, an integrated approach" (3rd edn. Benjamin-Cummings Publishing Company, 2004) 912.
- [5] G. Fridman, M. Peddinghaus, H. Ayan, A. Fridman, M. Balasubramanian, A. Gutsol, A. Brooks, G. Friedman, Plasma Chem Plasma Process (2006) 26:425-442
- [6] Lawson JH, Kalafatis M, et al (1994) J Biol Chem 269(37):23357
- [7] K.C. Jones K.G. Mann, J. Biol. Chem. 269 23367(1994).

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)

- (1) "Grid-pattern formation of extracellular matrix on silicon by low-temperature atmospheric-pressure plasma jets for

neural network biochip fabrication," Ayumi Ando, Hidetaka Uno, Tsuneo Uris, and Satoshi Hamaguchi, Appl. Surf. Sci. 276 (1) (2013) 1- 6 .

- (2) "Efficient modification of the surface properties of interconnected porous hydroxyapatite by low-pressure low-frequency plasma treatment to promote its biological performance," Dae-Sung Lee, Yu Moriguchi, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa and Satoshi Hamaguchi, J. Phys. D: Appl. Phys. 45(37) (2012) 372001 (5pp).

[学会発表] (計 20 件)

- (1) "Numerical analysis of nano-second pulsed discharge near atmospheric pressure," Satoshi Hamaguchi and Chieh-Wen Lo, International Workshop "Physics of Microplasmas" (30 May -1 June, 2012: Bochum, Germany) [invited].
- (2) "Plasma Surface Modification of Artificial Bones for Bone Regeneration," Yu Moriguchi, Dae-Sung Lee, Kazuto Masuda, Myoui Akira, Hideki Yoshikawa, and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of 4th International Conference on Plasma Medicine* (17-21 June 2012, Orléans, France) p. 48.
- (3) "Cell proliferation enhanced by atmospheric-pressure plasma application for cells of interest in orthopedics," Kazuto Masuda, Satoshi Hamaguchi, Yu Moriguchi, Tatsuya Kanazawa, Ayumi Ando, Kiyoshi Okada, Akira Myoui, and Hideki Yoshikawa, in *Book of Abstracts of 4th International Conference on Plasma Medicine* (17-21 June 2012, Orléans, France) p. 169.
- (4) "Numerical Simulation of Reactive Species in Liquids in Contact with Atmospheric Pressure Plasmas," Tatsuya Kanazawa and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of 4th International Conference on Plasma Medicine* (17-21 June 2012, Orléans, France) p. 93
- (5) "Plasma treatment of artificial bones" Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstract of the 2nd International Symposium for Plasma Biosciences (SPB2012)* (Aug. 12 - 14, 2012, Seoul, Korea) p. 25 [invited]
- (6) "Chemically reactive species in liquids generated by atmospheric-pressure plasmas and their roles in plasma medicine," Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of The 8th International Conference on Atomic and Molecular Data and Their Applications (ICAMDATA-8: Sep. 30-Oct. 4, 2012, National Institute of Standards and*

- Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA) p.44 [invited]
- (7) "Plasma Biomedicine in Orthopedics," Satoshi Hamaguchi, in *Bulletin of the American Physical Society* 57 (8) (2012) (Workshop on Plasma Biomedicine, 65th Annual Gaseous Electronics Conference, Oct. 22-26, 2012, Austin, TX) p.18 [invited].
 - (8) "Plasma surface modification of porous hydroxyapatite artificial bones," Yu Moriguchi, Dae-Sung Lee, Kazuto Masuda, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi, Myoui Akira, in *Book of Abstracts of Orthopaedic Research Society (ORS) 2013 Annual Meeting* (Jan. 26-29, 2013, San Antonio, TX, USA)
 - (9) "Free radicals in liquid generated by atmospheric-pressure plasma application and their effects on biological systems," Satoshi Hamaguchi, in *a Book of Abstracts of 2013 International Forum on Functional Materials (IFFM2013) and 3rd International Symposium for Plasma Bioscience (ISPB2013-3), 2nd International Symposium on Chemical & Biological Detection (ISCB2-2), 2nd International Symposium on Medical Diagnosis Using Bionano Sensor*, June 27-29, 2013, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea) p. 144 [invited].
 - (10) "Dynamical structures of reactive species distributions in plasmas and liquids for low-temperature plasma medical devices," Satoshi Hamaguchi, in *Proceedings of the 40th European Physical Society (EPS) Conference on Plasma Physics* (Espoo, Finland, 1st-5th July 2013) I1.303 [invited].
 - (11) "Generation of free radicals in liquid by atmospheric-pressure plasmas and its application to biology and medicine," Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of the 12th Asia Pacific Physics Conference (APPC12) and Asia-Europe Physics Summit (ASEPS)* (International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba, Japan, July 14-19, 2013). D2-3-I1, p. 87 [invited].
 - (12) "Numerical simulation of ROS/RNS generation in liquid and their effects on biological systems," Tatsuya Kanazawa and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of the 21st International Symposium on Plasma Chemistry* (Cairns, Australia, 4th-9th August, 2013).
 - (13) "Generation of ROS/RNS in liquid exposed to an atmospheric-pressure plasma," Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of 2012 Japan Society of Applied Physics (JSAP)- Material Research Society (MRS) Joint Symposia* (Sept. 16-20, 2013, Doshisha University Kyotanabe Campus, Kyoto) 16p-M-3-5 [invited].
 - (14) "Effects of Reactive Species Generated by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasmas on Mouse Embryonic Stem (ES) Cells," Taichi Miura, Ayumi Ando, Kazumi Hirano, Chika Ogura, Tatsuya Kanazawa, Masamichi Ikeguchi, Shoko Nishihara, and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of 2012 Japan Society of Applied Physics (JSAP)-Material Research Society (MRS) Joint Symposia* (Sept. 16-20, 2013, Doshisha University Kyotanabe Campus, Kyoto) 16p-M3-3.
 - (15) "Reaction-diffusion simulation of ROS/RNS in liquid exposed to an atmospheric-pressure plasma," Kazumasa Ikuse, Tatsuya Kanazawa, and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of 8th International Conference on Reactive Plasmas / 31st Symposium on Plasma Processing (ICRP-8/SPP-31:February 4-7, 2014, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan), 4P-PM-S09-P26.*
 - (16) "Improvement of biocompatibility of hydroxyapatite and polystyrene surface for cell culture by low-pressure plasmas," Dai Itsuki, Tomoko Ito, Satoshi Sugimoto, Yu Moriguchi, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS)* (February 26-28, 2014, Osaka, Japan), P03.
 - (17) "Numerical simulation of chemical reactions and diffusion of ROS/RNS in water exposed to an atmospheric-pressure plasma," Kazumasa Ikuse and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS)* (February 26-28, 2014, Osaka, Japan), P05.
 - (18) "Reactive species generated in water irradiated by low-temperature atmospheric-pressure plasma jets," Kensaku Goto, Tomoko Ito, Kazumasa Ikuse, Dai Itsuki, and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS)* (February 26-28, 2014, Osaka,

- Japan), P08.
- (19) “Oxidation of Potassium Iodide in Aqueous Environment by Atmospheric Plasma Jets,” Masato Kiuchi, Kuniaki Honjo, Tomoko Ito and Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of International Symposium on Non-equilibrium Plasma and Complex-System Sciences (IS-NPCS)* (February 26-28, 2014, Osaka, Japan), P11.
- (20) “Numerical simulation of dynamics of chemically reactive species in water generated by atmospheric pressure plasmas,” Satoshi Hamaguchi, in *Book of Abstracts of COST (European Cooperation in Science and Technology) TD1208 Annual Meeting “Electrical discharges with liquids for future applications”* (10-13 March, 2014, Lisbon, Portugal), p.22 [invited].

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 「プラズマの医療応用」浜口智志 パリテイ (2013) 1月号 pp16-17.
- (2) 「プラズマ医療の最新動向」浜口智志 ケミカルエンジニアリング vol. **58** (12) (2013) 915-921 (35-41).
- (3) “Chemically reactive species in liquids generated by atmospheric-pressure plasmas and their roles in plasma medicine,” Satoshi Hamaguchi, AIP Conf. Proc. **1542** *Eighth International Conference on Atomic and Molecular Data and Their Applications ICAMDATA-2012 (ed. by John D. Gillaspay, Wolfgang L. Wiese, and Yuri A. Podpaly)* (2013) 214-222.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 「バイオセラミックスを含む人工骨の改質方法と、その方法で改質された人工骨」
発明者: 浜口智志、吉川秀樹、名井陽、森口悠、増田一仁、小嶋保次、大野信男、小泉 剛、時政大造

権利者: 国立大学法人大阪大学、株式会社電子技研

種類: 知的財産権

番号: 特願 2012-085854

出願年月日: 2012/04/04

国内外の別: 国内

名称: 「エッチング方法および装置」

発明者: 唐橋一浩、浜口智志、瀬木利夫、松尾二郎、木下啓蔵、溝谷浩平

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 知的財産権

番号: 特願 2014-41240

出願年月日: 2014/03/04

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: Plasma producing apparatus and method of plasma production”

発明者: K. Kitano, S. Hamaguchi and H. Aoki,

権利者: 同上

種類: 知的財産権 (米国特許)

番号: US8232729

取得年月日: 2012/6/31

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ

<http://www.camt.eng.osaka-u.ac.jp/hamaguchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜口 智志 (HAMAGUCHI, SATOSHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 60301826