

プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

3. プラズマ医療におけるプラズマ生体相互作用

浜口 智志

大阪大学大学院工学研究科

(原稿受付：2011年5月16日)

Keywords:

atmospheric-pressure plasma, plasma medicine, plasma-tissue interaction, free radicals, argon plasma coagulation, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), hydroxyapatite

3.1 はじめに

半導体超微細加工や機能性薄膜堆積等の材料プロセスにプラズマ技術は欠くことのできないものであることは広く知られている。今日も、半導体素子の更なる微細化や新しいエレクトロニクス材料の導入に伴う新プロセスの開発等、様々な需要に応えるため、プラズマプロセス技術は日々進歩を遂げている。プラズマプロセスの対象となる被処理材は、半導体チップをはじめとする電子デバイス用の材料がよく知られているが、近年、医療に関与する被処理材に対するプラズマ処理への関心が高まっている。医療分野の被処理材として、無機材料や人工的に合成された高分子材料（有機ポリマー）等ばかりでなく、生物・生体組織そのものを対象にすることもある。プラズマ技術の応用の主目的が、病氣や怪我等の治療、あるいはその支援に用いられる場合は、この技術はプラズマ医療と呼ばれる。

プラズマ医療研究は、最近の研究動向を見ると、大きく分けて、次の三分野に分けられる。第一の分野は、プラズマを用いた医療材料の表面改質・表面処理であり、この分野の研究は、長い歴史をもつ[1-4]。例えば、医学・生物学分野の研究で広く使われるシャーレ（ペトリ皿）の多くは、酸素プラズマ処理されて表面の親水性が高められており、また、金属製人工関節の表面にハイドロキシアパタイトを溶射で接着する場合にも、熱プラズマが用いられる。近年も、細胞培養支持体材料としてのポリマーの、プラズマによる成膜・表面改質、あるいは、高分子以外の材料（ガラス、セラミックス等）の細胞培養担体のプラズマによる微細形状制御などの研究が精力的に進められている。

第二の分野は、プラズマによる滅菌技術であり、この研究も長い歴史がある[5,6]。プラズマ滅菌は、医療分野だけに限らず、より一般的な衛生管理の分野で、既に実用化されている。しかしながら、プラズマ処理による滅菌の機構がいまだに十分に理解されておらず、また、芽胞形成菌など、プラズマで処理されにくい細菌も存在し、さらには、細菌ばかりでなく、ウィルス[7]やプリオンなどの不活性

化も衛生管理の観点から重要であり、今後も更なる技術開発が求められる。

第三の分野として挙げられるのは、プラズマによる生体組織の直接的な処理をめざした医療応用である。既に医療の現場では、アルゴンプラズマ凝固（APC）法[6-8]と呼ばれるプラズマを使う治療法が導入されており、日本では特に、アレルギー性鼻炎や花粉症の治療としてAPC法による下鼻甲粘膜焼灼術や、また、消化器外科手術において、消化器内視鏡下のAPC装置による切開剥離法等が広く実践されている。これらは、基本的にプラズマの熱を使って組織を焼灼するものであり、特に後者の例を安全に施術するには、外科医に極めて高度な技術が要求されることが知られている。しかしながら、近年、このようなプラズマの熱的な作用を使うのではなく、低温大気圧プラズマ（気体の温度が室温に近い大気圧プラズマ）によっても、止血、血管新生、臓器癒着防止、細胞増殖等、様々な「治療効果」が得られる可能性の高いことが知られてきた。これらは、プラズマによって生成されたフリーラジカル等の反応活性種が生体と相互作用する結果得られるものであると広く考えられているが、その詳細は、いまだよく知られておらず、今後の研究の進展が期待される。また、狭い意味では、この第三の分野のみを「プラズマ医療」と呼ぶこともある。

本章では、この第三の分野の、狭い意味での「プラズマ医療」におけるプラズマと生体の相互作用について、現在知られている知見を簡単にまとめる。プラズマが生体に与える影響の源としては、プラズマの発生する熱、イオンの加速による物理的衝撃（気相から被処理材への運動量とエネルギーの輸送）、ラジカル、励起原子・分子、電子、光（特に紫外線）等による（運動量輸送はほとんど伴わない）エネルギー輸送が考えられる。プラズマのもつこれらの作用の中で、どの作用が生体にもっとも大きな影響を与えるかは、用いるプラズマの性質に依存する。本章は、この中で、主として、ラジカル等の反応活性種の作用に注目して、議論を進める。

「プラズマ医療」におけるプラズマと生体の相互作用の研究を一つの研究分野として見ると、この分野は、基本的には、知られていないことが極めて多く、学問としてはほとんど確立していないといっている状況にある。いまこの研究の最前線で行われていることの多くは、現象データの集積、つまり、プロセスレシピ（プロセス条件）とプロセス結果の関連付けを、生物学的・医学的对象について行うことであり、一方、観測データの機構解明までにつながる研究はまだ少ない。この状況は、ちょうど1970年代に、プラズマプロセスが半導体プロセスに導入され始めたころに似ているかもしれない。当時、プラズマと物質の相互作用の機構がよく分からないままに、半導体プロセスの需要と研究者の勘と経験に頼って、多くの種類のプラズマ、放電条件、ガス種などが、網羅的に調べられた。その後の半導体市場の爆発的な拡大とともに、マイクロデバイス用のプラズマプロセスの研究は1980年代以降、急速に発展し、学問領域として確立していった。もちろん、プラズマ医療の研究が、今後、それと同様な発展の歴史をたどるかどうかはわからない。ただ、プラズマと生体との相互作用に関連して最近知られてきた様々な実験事実は、プラズマがなぜ生体にそのような作用を起こすのか、素朴な好奇心を刺激するものが多い。長年、生体に対する様々な物理的刺激を研究してきた生物・医学研究分野の専門家にとっても、プラズマによる生体への刺激は、その機構が自明でないものが多いようである。この意味だけでも、プラズマ医療の研究を深めることは学術的に意義深いものであると筆者は考えている。

3.2 アルゴンプラズマ凝固（APC）装置

まず、本稿で主として対象とする低温プラズマの議論をする前に、現在の医療現場で既に実用化されているアルゴンプラズマ凝固（APC）装置について簡単に紹介する[8-11]。この装置は、図1にあるように、アルゴン気体を流し込み、アルゴン雰囲気中の金属電極に交流電圧を印加して、プラズマを発生させ、その熱で組織を焼灼するもので

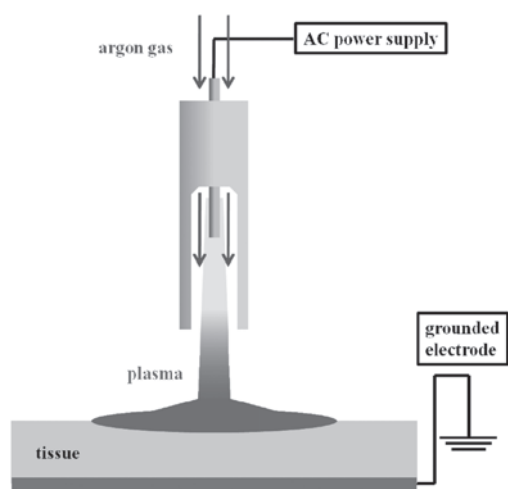


図1 APC装置の概念図。電源は、通常、数百kHz、100W程度の交流電源を用い、生体組織を通して電流が流れる。アルゴンを放電ガスとして用いる[8-11]。

ある。通常印加電圧用の電源として、周波数は数百kHz程度、入力パワーは100W程度のものを用いる。焼灼により組織表面が破壊されるので、APC装置は、組織の切断や腫瘍の破壊に用いる。一方、APC装置により破壊された組織が凝固することを利用して、止血等にも利用される。APC装置による組織の切断、破壊、凝固作用は、いずれも、即効性が高いのが特徴である。APC法の場合は、電気メス・高周波メスなどと異なり、患部に装置（電極部等）を直接触れさせずに使用するため、非接触型の医療機器である。しかし、電極と組織との距離の微妙な違いによって、組織がプラズマから受ける熱量が大きく異なるため、まれに、手術中にあやまって健常な器官を穿孔して、大きな合併症を引き起こすこともある。このため、APC装置を外科手術で用いる際には、極めて熟練した技術が必要とされている。こうした背景から、現在、日本ではAPC装置の活用は、その使用を安全に行うことが確実にできる特定の疾患への活用にはほぼ限られている。また、熱を用いて組織を凝固する代替治療法として、上述の、電気メスや、レーザー治療、マイクロ波治療などがある。

3.3 低温大気圧プラズマ装置

上述したように、プラズマを用いた医療機器は、既に実際の医療現場に入っている。しかし、近年、プラズマ医療として注目を集めている装置は、APC装置のように、プラズマの熱的性質を活用したものではなく、むしろ、その熱的要素を取り除いたプラズマ装置である[12,13]。ここでは、図2に低周波プラズマジェットとプラズマ針、および、平板型誘電体バリア放電（DBD）と呼ばれている3種類のプラズマ発生装置の概要を示す。

図2(a)に示す「低周波プラズマジェット」装置は、通常ヘリウムまたはアルゴンを放電気体として用い、印加電圧の周波数は数十kHz程度の低周波、印加電圧は10kV程度以下を用いる。この装置は、プラズマペンシルと呼ばれることもある[14,15]。図2(b)に示す「プラズマ針」装置[10,16,17]は、構造的には図1に示すAPCに似ているが、通常、内部電極が針のように細い。また、APCとの大きな違いは、電源として、十数MHz程度の高周波（RF波）で低電力（数W程度以下）の電源を用いるため、プラズマが内部導体（針）の先端部にコロナ状に生成される。入力パワーをあげ、被処理物に近づけると、被処理物との間にグロー放電のような放電を生成する。図2(c)に示すのは、平行平板型の「DBD放電」装置である。通常、大気圧において、数十kVの高圧パルス電圧を電極間に印加すると、電極間の距離が1mm程度の場合、電極間にグロー放電のような放電が観測される。接地（グラウンド）電極のないものは、浮遊電極（FE）DBD装置と呼ばれることもある[18]。

いずれのプラズマ装置も、大気圧で放電する装置であり、気体の温度が室温程度と低いのが特徴である。また、いずれの放電も、電子の中性粒子（原子・分子）に対する衝突周波数が高いため、電子温度も比較的低く、数eV程度であると予想される[19]。一方、イオンの温度は、一般に、気体とほぼ同じ室温であると考えられている。低周波

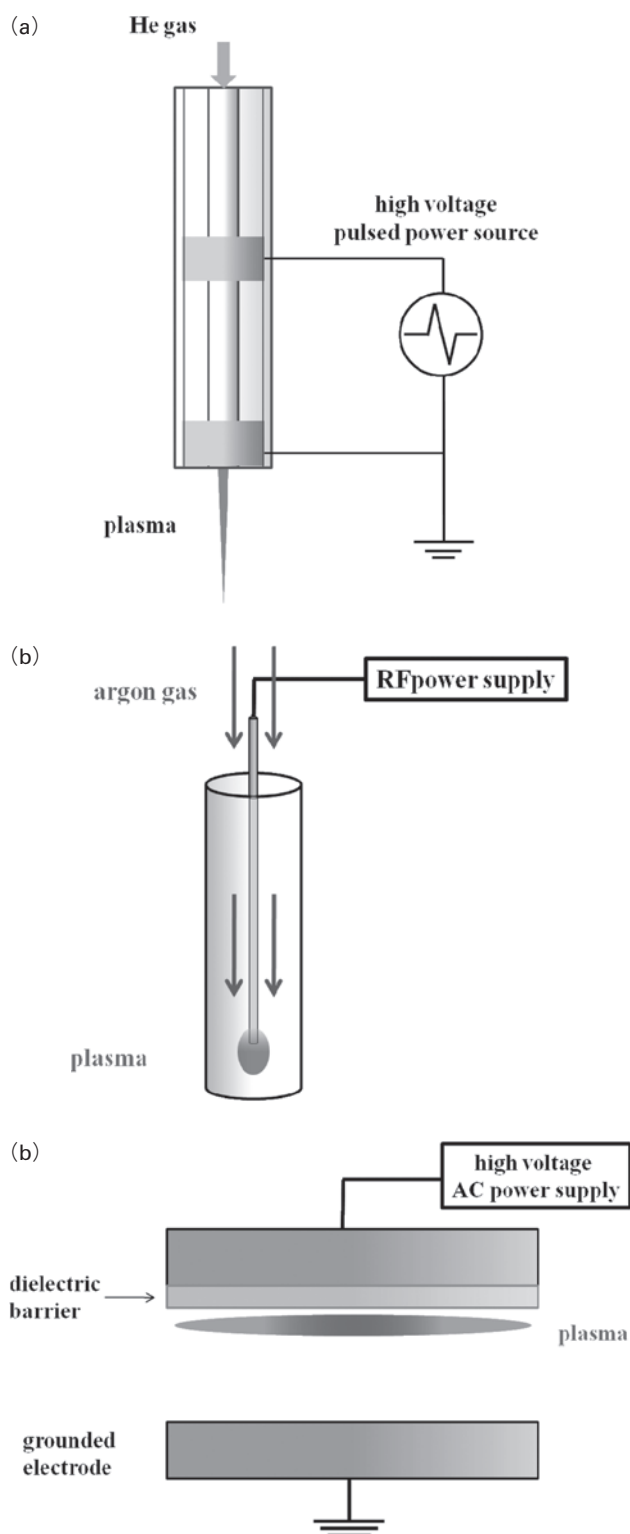


図2 低温大気圧プラズマ生成装置の例. (a)低周波プラズマジェット装置[14,15]. (b)プラズマ針[10,16,17]. (c)平板型DBD装置[19].

プラズマジェット装置(a)とDBD装置(c)の気体温度が低いのは、放電している時間が極めて短く（通常数十ナノ秒程度）、放電周期が長い（0.05-1 ミリ秒程度の間隔）ことにより、気体が加熱されて温度が上がる前に放電が消えて、気体の冷却が十分に起こるためである。一方、プラズマ針(b)では、放電に用いる電力は通常低く、数 W 以下ではあ

るが、MHz 程度の高周波 (RF 波) の電源を用いるため、放電は連続的に起こる。しかし、それでも、気体温度が低いのは、プラズマが小さく、高速で流れる気体を十分に加熱できないためである。また、イオンへのエネルギー移行についていえば、特に、DBD装置(c)の場合、印加電圧に数十 kV 以上の高電圧を用いることも多いため、その場合、イオンと中性粒子（原子・分子等）間の衝突周波数は確かに高いが、それでも、電圧印加時にイオンは数十 eV 程度に加速され得る。

また、いずれの装置も、大量の励起原子・分子やラジカルを生成し、それらの内、寿命の長いものは、気体流ののって、被処理材（例えば、生体組織）まで到達する。例えば、励起原子一つでも、生体組織に接して基底状態に落ちるとき、組織表面に数 eV のエネルギーを付与する可能性があるため、そのエネルギー付与が、生体組織表面で、何らかの化学反応を引き起こすことは十分に考えられる。このような低温大気圧プラズマでは、荷電粒子密度は中性粒子密度よりはるかに低い。そのため、たとえ、イオンが数十 eV の運動エネルギーをもつほどまでに加速されていても、反応活性種が表面と接触する際に表面に供給するエネルギー総量は、イオンが表面と衝突して表面に供給するエネルギー総量と同程度、あるいは、それ以上に高い可能性もある。

3.4 気相中のラジカル生成

前節で示したような大気中の放電によって生成されるイオンやラジカル種・励起種の種類は極めて多く、また、それらの密度計測も、一部の粒子種をのぞいて容易ではないため、放電条件と生成されるイオン・ラジカル・励起種の種類と量等については、一般に、詳しいことは知られていない。特に、医療応用の観点からいうと、生物的作用が強いと考えられる粒子種 $^1\text{O}_2$ (一重項酸素), O_3 (オゾン), OH (水酸基ラジカル/ヒドロキシルラジカル), O_2^- (スーパーオキシド), HO_2 (ヒドロペルオキシラジカル), H_2O_2 (過酸化水素), NO (一酸化窒素), NO_2 (二酸化窒素) 等が、プラズマ生成により、気相中でどのくらいの量生成されるかがが興味の対象となる。このうち、水素を含むものは、当然、空気中の水分がその生成元となる。このため、プラズマによる各種の反応種を系統的に調べるためには、空気成分である窒素・酸素およびプラズマ生成用気体（ヘリウムやアルゴン等）ばかりでなく、空気中に存在する水の電離・励起・解離・結合等を調べる必要がある。このような系では、生成される粒子種、およびそれらをつなぐ化学反応式は膨大な数となり、計算に必要な反応係数も知られていないものが多い。

しかしながら、いくつかの計算・計測例は知られている。1970年代からオゾン生成のための大気圧放電の研究は盛んに行われ、例えば、空気中の大気圧放電のゼロ次元モデル計算結果は、[20,21]などに挙げられている。最近では、プラズマ針および低周波プラズマジェット He と N_2 の系[22,23]の2次元流体計算、また、水の影響を考慮した計算では、He と H_2O の系のゼロ次元シミュレーション

[24]などが知られている。特に、HeとH₂Oの系のプラズマのゼロ次元シミュレーション[24]では、生物学的活性の高いOHやH₂O₂が高い密度で生成されることが示されている。また、このモデルでは、H₂Oのクラスター生成もモデル化しており、多くのイオンが水分子のクラスター（クラスターイオン）となっていることがシミュレーションで示されている。また、HeとH₂O系プラズマにおけるイオンに関しては、実験的に、その存在比も詳しく調べられており、正負いずれの極性においても、水分子のクラスターイオンが多数存在することが確認されている[25]。

3.5 液相中のラジカル生成

生体組織は、皮膚のように表面が乾燥しているものがある一方、傷などによって露出した皮下組織のように、血液等の体液に覆われているものもある。培養細胞に対するプラズマ照射の実験を行う場合も、細胞は通常培養液に覆われている。そのため、前節で述べた、プラズマによって生成された気相中の活性種は、生体組織に直接接触する前に、しばしば、生体組織を取り囲む液体に取り込まれる。

前節で、気相中の活性種について、まだ十分な知見が得られていないことを述べたが、気相中の活性種が液体に取り込まれる際にどのように変化するか、および、取り込まれた活性種は、液体中でどのような活性種として存在するか等については、さらに、知られていない。放射線化学の分野で、液中の活性種については、既に多くの知見が得られているので、今後のプラズマ液体相互作用に関する研究では、放射線化学の分野の知見が活用できるかもしれない。例えば、水溶液中の電子の周りには水分子が集まり（水和）、水のクラスターを形成している（水和電子クラスター）ことが知られている。同様に、水溶液中では、正負のイオンも水和していると考えられるため、気相中の水のクラスターイオンは、クラスターのまま、水溶液中に取り込まれる可能性もある。水溶液以外の溶媒でも、電子や正負イオンは、溶媒和を形成している可能性が高く、また、水溶液中の反応を通して、他の活性種に変化する。また、水溶液中の活性種の種類と濃度は、当然、溶媒のpH（水素イオンH⁺濃度）にも大きく依存する場合があります。そのため、反応活性種を含む溶液の生物学的作用は、pHによって大きく異なる場合がある[26]。

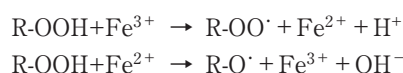
さて、仮に溶液中に存在する反応活性種がすべてわかったとしても、それら活性種と生体の相互作用について、まだ知られていないことが極めて多い。そのため、活性種の物理的同定や解析ができれば、プラズマの医療的効果はまだわかったことにはならない。

例えば、最近NOの生理的効果が、医学界でかなりの注目を集めている[27, 28]。それ以外にも、生体との相互作用が強い酸素および酸素を含む化合物として、先に述べた、¹O₂、O₃、OH、O₂⁻、HO₂、H₂O₂、NO、NO₂等があるが、これらを総称して、活性酸素（ROS）という。特に、一酸化窒素NOとスーパーオキシドO₂⁻の反応から生成されるONOO⁻（ペルオキシナイトライト）、さらに、それから派生するONOOH（HNO₃、過酸化亜硝酸）、N₂O₃（三酸化二

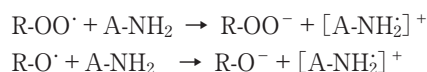
窒素）等Nを含む活性の高い化学種は活性窒素（RNS）と呼ばれる。NO₂などは、ROSともRNSとも呼ばれるので、通常は、これらをまとめて、ROS/RNSと書く。大気圧プラズマを水溶液の近くで発生させると、大気中で生成された電子、イオン、活性種が水溶液に溶け込み、これらROS/RNSが水溶液中に生成されることが考えられる。

生きた細胞などは通常、細胞が生きていくのに十分な養分を含んだ溶液の中に存在している。このような水溶液には、タンパク質をはじめとする多種の化学種が溶質として混合しているため、仮にプラズマから非常に活性の高いROS/RNSがその水溶液中に供給されたとしても、これらの溶質と即座に反応して、ROS/RNSが細胞表面に届かない可能性もある。比較的活性が弱く、すなわち、溶液中での寿命が長く、しかも、細胞等の生体に何らかの作用を行うROS/RNSが、プラズマ医療の観点からは重要になる。

このような長寿命のROS/RNSを各活性種ごとに個別に、しかも、簡便に計測する技術は現在のところ存在しない。しかしながら、医療の分野では、既に臨床でも活用されているd-ROMs（derivatives of reactive oxygen metabolites）テストという、溶液中のROS量を評価する方法が知られている[29]。この方法を用いると、ROSの一種であるヒドロペルオキシドR-OOH（Rは炭化水素基）が含まれていると考えられる水溶液に、牛の血清等を混ぜ、血清中の鉄イオンとの反応（フェントン反応）



を利用して、さらに



の発色反応を利用して、この発色（赤色）を吸光計測して、R-OOHの存在量を評価することが可能となる。ここで、A-NH₂は、N,Nジエチルパラフェニレンジアミンと呼ばれる物質である。このテストでは、RがすべてHであった場合の発色を基準として、R-OOHの量を推定しているだけで、実際のR-OOHの量はわからない。ただ、この計測値が上昇することで、溶液中のR-OOHの量が増加することはわかる。

図3は、図2(a)のプラズマジェット装置で、細胞培養用液体培地DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）にプラズマを一定時間照射したときのd-ROMsテストの結果を示す[30]。プラズマジェット装置は、図3(a)にあるように、100 μlのDMEMの水面へプラズマ（発光部分）の端が接するように、DMEMを入れたマイクロプレートの最表面から4 mm離れた位置にプラズマ装置の射出口が来る位置で固定した。このテストでは、培地内に生成されたラジカル計測装置として、FREE（WISMALL社）を用いた。計測では、牛胎児血清（FBS）を60%混ぜたDMEMにプラズマを一定時間照射し、計測に必要なサンプル液20 μlをとり、酸性緩衝液と混合し、呈色液クロモゲン入りキューベットの移したあと遠心分離を1分行い、その後、吸

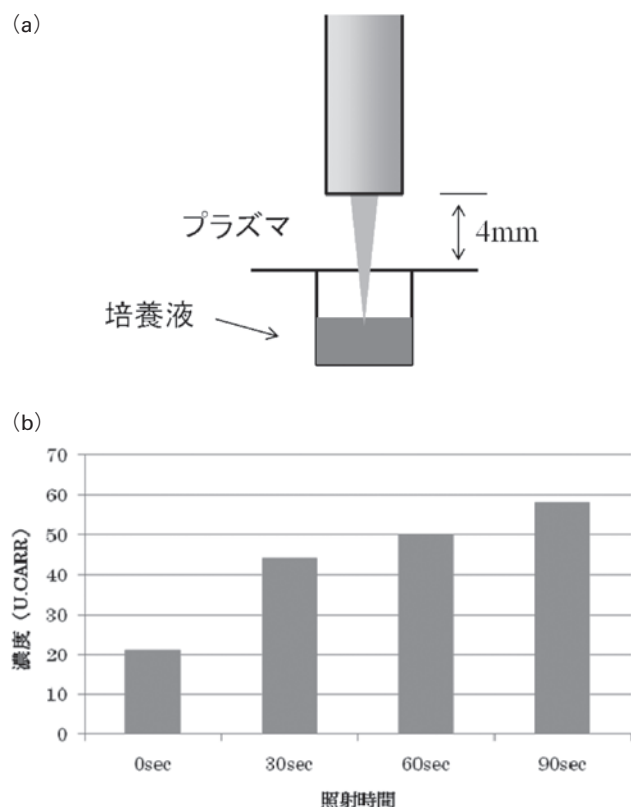


図3 DMEM 培地への低温大気圧プラズマ照射実験. 図2 (a)の低周波プラズマジェット装置から照射されるプラズマ(発光部)の先端が培地用液面に接するように装置を配置した. (b)DMEM中に生成されたR-OOHの H_2O_2 相当量のプラズマ照射時間依存性.

光計測を行った. プラズマには, He を放電気体として用い, 電極間に ± 5 kVの電圧を周波数20 kHzで印加した. 計測値はU.CARR (Carratelli unit) という独特の単位で示されているが, $1 \text{ U.CARR} = 0.08 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ の H_2O_2 に相当するR-OOHの量という意味である. 計測結果を示す図3 (b)からわかるように, プラズマ照射時間が長くなるにつれて, 培地中に存在するR-OOHの量が増えていることがわかる. この計測では, 前述したように, R-OOHの種類やその正確な量はわからないが, プラズマ照射によって, R-OOHの量が増えていることはわかる. また, この結果から, R-OOH以外のROS/RNSの量も増えているであろうことが推測される. このように, プラズマ照射により, 培養液中に何らかのROS/RNSが生成されていることは確実である.

3.6 プラズマによる細胞増殖

生きた細胞 (例えば細菌等) に一定量以上の大気圧低温プラズマを照射すると, 細胞が不活化することが知られており, この手法を用いて, 大気圧低温プラズマを用いた滅菌研究が広く行われている [5, 6, 26]. しかし, 大気圧低温プラズマの照射量が少ないときは, 細胞に逆に刺激を与え, その増殖を促進することが知られている. 例えば, Kalghatgi [31] らは, 平面型のFE-DBD装置 (正負ピーク間電位差 20 kV, 500 Hz~1.5 kHzの正負パルス電圧) を用いて, プタ大動脈内皮細胞 (PAEC) へのプラズマ照射実験

を行った. 実験は大気中で行われ, 平面型DBD装置の誘電体表面とサンプルまでの距離は2 mm, サンプルは顕微鏡用カバーガラス上に載せたPAECで, 50 μl の無血清培地に浸されている. このサンプルにプラズマを一定時間 (5秒~120秒) 照射し, 照射後すぐにプラズマ処理されたサンプル細胞の培養を開始した. 実験条件の詳細は文献[31]に記載されているが, このような条件下では, プラズマ照射時間が30秒以下の場合, 照射1日後から5日後までの間の4日間で, 細胞数が数倍に増え, その増え方は, 照射時間が長いほど大きいことが示されている. また, 一般に内皮細胞は血管新生増殖因子を産生することが知られているが, この実験でも, プラズマ処理されたPAECは, 照射後長時間にわたって, 血管新生増殖因子の一つである線維芽細胞成長因子 (FGF)-2を産生し続けることが観測されている. また FGF 中和抗体を同時に投与した場合には PAEC の増殖が抑制されることから, FGF-2がPAECの増殖促進効果をもつこともこの実験で確認されている.

筆者の研究グループでも, 間葉系の細胞を中心に, 様々な細胞に大気圧低温プラズマを照射する実験を行ったので, ここでその一例を紹介する. 我々の実験では, 図2 (a)のプラズマジェット型の大気圧プラズマを用いて, 図3 (a)と同じ条件で, DMEM中に培養している細胞に対して, 一定時間プラズマを照射した. この実験では, 96ウェルマイクロプレートのいくつかのウェルに, 十分な間隔において, 1ウェルあたり100 μl のDMEMを入れ, 1ウェルあたり約3000個の細胞培養を行った. 細胞を培養するウェルの間隔を十分にあげたのは, 1つのウェルにプラズマ照射している間に, 他のウェルにそのプラズマ照射の影響が及ばないようにするためである. 上述したKalghatgiらの実験では, カバーガラス上に垂らした培地が非常に薄く細胞を覆っているだけであるが, 我々の実験では, 細胞がマイクロプレートのウェル内壁に接着しているため, プラズマによって生成された活性種が, 培地のDMEMに溶解込み, 細胞に作用するまで, 少なくとも数mm程度の距離にわたって輸送される必要がある.

図4に, 我々の実験結果の一例を挙げる. 図4の例で用

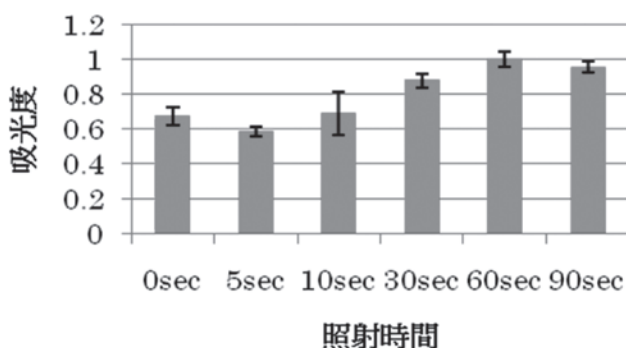


図4 DMEM中に培養されているヒト滑膜細胞 (HS) へ低周波大気圧プラズマジェット装置を図3 (a)の配置で, 一定時間 (横軸の値) 照射した後, そのままの培養液で6時間 CO_2 インキューベーター内で培養し, その後, WST-8アッセイによって生細胞数を評価したもの. 縦軸が生細胞数に比例する. この結果は, 60秒程度の照射までは, プラズマを照射するほど細胞増殖が促進されることを示している.

いたのは、ヒト滑膜細胞 (HS) で、プラズマ照射後 6 時間 CO₂ インキューベーター内で培養したものを、WST-8 アッセイによって生細胞数を評価したものである [30]。横軸は、プラズマ照射時間を表す。縦軸は本アッセイによる吸光度を示しているが、この値が生細胞数に比例する。各プラズマ照射時間に対して、3 度実験を繰り返し、その平均値がプロットされている。

この結果からわかるように、30 秒以上照射したものは、明らかに細胞増殖が進んでいる。また、このデータでは示していないが、照射時間が長すぎると、細胞は死滅する。また、照射時間と増殖の割合については、細胞の種類に極めて強く依存し、細胞によっては、増殖が見られずに短時間の照射で死滅するものもある。また、当然、プラズマのパラメータ (投入パワー、ガス流量) や、プラズマと培養液表面との距離、培養液の量等にも、細胞増殖率は依存する [30]。図 4 の HS 細胞のプラズマ照射による増殖についても、上記 PAEC の場合 [31] と同様に、プラズマ照射による何らかの成長因子の産生が誘起された結果と想像されるが、その機構については、まだ調べられていない。

なお、上記のプラズマ照射による細胞増殖実験において、実は、プラズマ照射する培養液中に細胞が入っている必要はない。細胞の入っていない新しい培養液にプラズマを直接一定時間照射し、その培養液内で新たに (プラズマ処理されていない) 細胞を培養すると、図 4 と同様に、培養液へのプラズマ照射時間によって、細胞の増殖率が変換ることが既に確認されている。文献 [31] にその例が示されているが、筆者らのグループにおいても、上記 HS 細胞およびその他の細胞で、同様の結果を確認している [30]。こうした結果から、培養細胞に対するプラズマ照射による効果は、プラズマ照射によって培養液中に生成される長寿命の化学的活性種によるものであることが想像される。

3.7 低温プラズマによる創傷治療

前節に書いたように適量のプラズマによる生体への刺激は、生体の活性を上げることが知られている。プラズマ照射のこの効果を端的に示す例が、低温プラズマによる創傷治療の可能性であろう [8, 19]。例えば、プラズマを用いた一酸化窒素療法 (NO therapy) の例として、数百人規模の栄養障害性潰瘍患者の臨床治療例が文献 [19] に紹介されており、また、プラズマ医療関連の学会でも、低温大気圧プラズマを使った創傷治療例の紹介は多い。筆者らのグループでも、図 2 (a) のプラズマジェット型の装置による実験で、マウスの背中中の皮膚を全層性に切除して筋膜を露出させた直径約 1 cm の円形皮膚全層欠損創に、プラズマを照射することにより、創の治癒が早まる場合があることを確認した。

ただし、プラズマ医療の典型例として幅広く喧伝されている低温プラズマによる創傷治療ではあるが、厳密に管理された環境下の動物実験で、十分な統計精度をもつプラズマ創傷治療データの報告は、比較的少ない。例えば、Shekhter ら [32] は、120 匹のラット (1 グループ 30 匹) を用い、各ラットの背中肩胛骨間に作製した面積 300 mm² の皮膚全

層欠損創に対して、大気圧放電により生成した NO 気体を 60 秒ずつ数日間供給したもの、しないもの、無菌創の場合、感染創の場合などについて、創面積の時間変化を欠損創作製後 30 日以上にわたって求めることにより、一酸化窒素療法の有効性を示した。また、Ermolaeva ら [33] は、14 匹のラット (1 グループ 7 匹) を用い、ラットの頭部に作製した感染創に、低温大気圧アルゴンプラズマを毎日 10 分ずつ 5 日間照射した際の創面積の時間変化を、最初の治療日から 18 日間にわたって観測し、プラズマ治療の有効性を示している。

3.8 プラズマ医療の数値シミュレーション研究

前節までに、プラズマ医療に関する実験的研究の例をいくつか挙げた。プラズマと生体の相互作用に、医療としての治療効果が期待できそうな現象がいくつか見つかったため、多くの研究機関で、それらのデータを蓄積しているというのが、現在の研究段階であり、その生物学的効果の機構を解明するところまで進んでいる研究例は数少ない。こうした状況から、理論やシミュレーションを用いたプラズマ医療の研究は、現状では、ほとんど行われていない。プラズマ医療に係る分野でシミュレーションの行われている研究テーマは、現在、大気圧放電そのものに関するシミュレーションがほとんどである [34]。

例えば、Babaeva と Kushner [35] は、最近、皮膚組織を、現実の細胞組織に近い形状と誘電率・導電率をもった誘電体としてモデル化し、その皮膚細胞モデルに、ナノ秒程度のパルス幅をもつ高電圧で生成された大気圧プラズマ (ストリーマー) が照射されるシミュレーションを行っている。窒素・酸素が 4 : 1 の比で混合された乾燥空気中の放電の 2 次元系において、プラズマは流体モデルで解かれ、中性粒子輸送、放射輸送、光電離の効果を取り入れたモデルとなっている。イオン衝撃および VUV 光子吸収による 2 次電子放出の効果も取り入れられている。

このシミュレーションを見てあらためて気づかされるのは、30 kV 程度の高電圧を印加して生成した DBD が、皮膚から 2 mm 程度しか離れていない場合、細胞には極めて大きな電場 (数十 kV/cm) がかかるということ、および、細胞 (特に細胞質) の比誘電率が極めて高いため、細胞がある程度の電気抵抗率をもっているにもかかわらず、数ナノ秒の放電現象では、細胞表面に正味の電荷が蓄積されるということである。このモデルでは、誘電率 (電気感受率) の周波数依存性はないと仮定しているが、有限の電気抵抗があるため、誘電緩和時間 (誘電率と電気抵抗率の比) と放電パルス時間の関係が問題となる。文献 [35] によると、細胞の誘電緩和時間は、電気伝導度の低い細胞膜で 6 μ s 程度、電気伝導度の高い細胞質で 0.5 ns 程度になるため、数ナノ秒の放電では、細胞表面に十分電荷が蓄えられ、細胞内の電圧をさらに高める。細胞が構造をもち、それぞれの物質の誘電率と電気伝導度が大きく異なるために、数ナノ秒程度の (生物の運動・輸送等の時間スケールに比べると) 極めて短い時間の間だけではあるが、細胞内に極めて大きな電場が大きな空間分布をもって存在することがこの

シミュレーションで示されている。

電磁場や強いイオン衝撃を受けたときに、細胞がどのように反応するかを数値シミュレーションで示すためには、現在我々がもつ物理モデルを超えたモデル化がまず必要である。一方、プラズマ刺激に対する細胞や生体組織の生物学的作用のモデル化の議論とは別に、それらを取り囲む大気や液体におけるプラズマ物理現象で、現在我々の知っている物理モデルの範囲で解決できる問題にもかかわらず、まだ解決されていない問題も多い。例えば、第4節でも述べたように、低温大気圧放電による気相中のラジカル生成反応は極めて複雑で、特にある程度の湿度がある場合、与えられた放電における各種反応活性種の時空間分布については、まだ十分に理解されているとはいえない。このような系に対する、より精度が高く、また、拡散や対流による各種粒子の輸送も考慮した2次元・3次元の数値シミュレーションは、今後、発展していくと考えられる。

また、今後理論・シミュレーション研究が必要な領域として考えられるのは、プラズマと液面の界面を通した荷電粒子や電気的中性な活性種の反応と輸送、および、液中における反応活性種の反応と輸送であろう。これらの現象については、今後、計測の技術も進歩することが考えられ、実験と理論・シミュレーションの精密な比較もいずれ可能となるだろう。これらの研究により、生体組織の表面に到達する反応活性種の種類と量がわかれば、あとは、生物学・医学の分野で確立されている実験的手法を用いることにより、それらの生体組織に対する効果が明らかになると考えられる。こういうことが行われて初めて、プラズマから生物学的作用までの一連の関係が明確化する。

3.9 まとめ

本章では、近年、「プラズマ医療」と呼ばれている研究分野の中でも、プラズマと生体の直接相互作用に関係する分野の最近の動向の概要について紹介した。本文中にも何度か述べたが、この分野の研究は、現在、実験データの集積が進められている段階にあり、プラズマと生体の相互作用メカニズムの解明など、より踏み込んだ内容の研究はまだ数少ない。プラズマ医療の研究が、実際の医療現場で活用されるためには、プラズマ条件と生物学的効果の相関について十分なデータの蓄積が必要である。これらが達成された後、プラズマを人体に用いたときの安全性等を担保し、更に、代替治療法に比べて、プラズマを用いた治療法が同等かそれ以上の効果があることを明確にする必要がある。この意味で、プラズマ医療研究は、まだ緒に就いたばかりであり、臨床応用までは、まだまだ先が長い。しかし、学術的な観点からいうと、プラズマから生成されるどの活性種あるいはどの物理的要因が、どのように生物に作用するのか、その機構がまったくわかっていない現象も数多く、極めて興味深い学術分野である。

本章第1節で述べた広義の「プラズマ医療」の3研究分野のうち、臨床応用の観点からいって、より現実的なものは、むしろ、第一の分野（プラズマによる医療部材の表面改質、表面コーティング）および第二の分野（滅菌）であ

る。プラズマの医療部材の表面改質については、例えば、ポリマーや生体親和性の高い金属材料等の表面改質の研究が幅広く行われている。また、生きた組織ではないが、骨などの動物由来の材料のプラズマ処理の研究等も行われている。例えば、骨表面（牛の大腿骨から取り出した緻密骨）の表面を低温大気圧プラズマ処理して家兎の大腿骨に移植する実験において、プラズマ処理が骨新生を促進する効果があることも報告されている[36]。

また筆者らのグループは、多孔質ハイドロキシアパタイト（HA）製人工骨のプラズマ処理の研究を行っているが、動物を用いた in-vivo の実験において、プラズマ処理[37]は、HAの細胞親和性を向上させ、人工骨の骨伝導能・骨誘導能を高めることを示唆するデータが得られている。このように、人工骨に限らず、多様な人工臓器・医療機器において、表面材料の改良とプラズマ表面処理技術が向上することにより、それらの生体親和性がより高まる可能性がある。

プラズマ医療の研究は、近年、世界的に急激な広がりを見せて発展している。本章では、紙面が限られていたため、それらの興味深い数多くの研究成果を紹介できなかった。既に本章本文中に参考文献としても挙げてあるものも多いが、比較的最近出版されたプラズマ医療関係の解説記事、例えば、文献[5, 8, 12, 13, 18, 34, 38, 39]等には、より多くの最近の研究成果が報告されているので、興味のある読者は、これらの文献も参照されることを勧める。

謝 辞

本稿の執筆にあたり、大阪大学工学研究科の増田一仁、金澤龍也、李大成、安藤あゆみの各氏、大阪大学医学系研究科の森口悠、金子恵子、岡田潔、梶座康夫、富田哲也、名井陽、吉川秀樹の各氏から得た助言や議論が極めて有益であった。特に、図3および図4のデータは、増田一仁、森口悠、岡田潔、名井陽、吉川秀樹の各氏との共同研究によって得、文献[30]に掲載されているデータである。ここに謹んで謝意を表する。

参 考 文 献

- [1] 石原一彦(編)：バイオマテリアルの基礎（日本医学館，2011）。
- [2] Buddy D. Ratner *et al.* *Biomedical Engineering Desk Reference* (Academic Press, 2009).
- [3] A. Milella, R. Di Mundo, F. Palumbo, P. Favia, F. Fracassi and R. d'Agostino, *Plasma Process. Polym.* **6**, 460 (2009).
- [4] P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang and N. Huang, *Mat. Sci. Eng. R36*, 143 (2002).
- [5] J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, Th. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen and K.-D. Weltmann, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 013002 (2011).
- [6] M. Laroussi, *Plasma Process. Polym.* **2**, 391 (2005).
- [7] H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, *Plasma Process. Polym.* **7**, 301 (2010).
- [8] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Shultz, A. Fridman, and K. Harding, *Plasma Process. Polym.* **7**, 194 (2010).
- [9] A. Postgate, B. Saunders, J. Tjandra and J. Vargo, *Endo-*

- scopy **39**, 361 (2007).
- [10] E. Stoffels, *Contrib. Plasma Phys.* **47**, 40 (2007).
 - [11] J. Raiser and M. Zenker, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39**, 3520 (2006).
 - [12] K. D. Weltmann, E. Kindel, T. von Woedtke, M. Hähnel, M. Stieber and R. Brandenburg, *Pure Appl. Chem.* **82**, 1223. (2010)
 - [13] M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. van Dijk and J. L. Zimmermann, *New J. Phys.* **11**, 115012 (2009).
 - [14] M. Teschke, J. Kedzierski, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec, J. Engemann, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **33**, 310 (2005).
 - [15] M. Laroussi and X. Lu, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 113902 (2005).
 - [16] E. Stoffels, A.J. Flikweert, W.W. Stoffels and G.M.W. Kroesen, *Plasma Sources Sci. Technol.* **11**, 383 (2002).
 - [17] E. Stoffels, Y. Sakiyama and D. Graves, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 1441 (2008).
 - [18] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman, *Plasma Process. Polym.* **5**, 503 (2008).
 - [19] C.W. Lo and S. Hamaguchi, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 375201 (2011).
 - [20] S. Yagi and M. Tanaka, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **12**, 1509 (1979).
 - [21] B. Eliasson and U. Kogelschatz, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **19**, 309 (1991).
 - [22] Y. Sakiyama and D.B. Graves, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39**, 3644 (2006).
 - [23] Y. Sakiyama, D.B. Graves, J. Jarrige and M. Laroussi, *Appl. Phys. Lett.* **96**, 041501 (2010).
 - [24] D.X. Liu, P. Bruggeman, F. Iza, M.Z. Rong and M.G. Kong, *Plasma Sources Sci. Technol.* **19**, 025018 (2010).
 - [25] P. Bruggeman, F. Iza, D. Lauwers and Y. A. Gonzalvo, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43**, 012003 (2010).
 - [26] S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi, *Plasma Process. Polym.* **7**, 33 (2010).
 - [27] M.B. Witte and A. Barbul, *Am. J. Surg.* **183**, 406 (2002).
 - [28] J. Lienmann, J. Scherer, N. Bininov, P. Rajasekaran, R. Kovacs, R. Gesche, P. Awakowicz and V. Kolb-Bachofen, *Nitric Oxide* **24**, 8 (2011).
 - [29] A. Alberti, L. Bolognini, D. Macciantelli and M. Caratelli, *Res. Chem. Intermed.* **26**, 253 (2000).
 - [30] 増田一仁 卒業論文「低周波大気圧プラズマジェット照射による細胞増殖促進プロセスの解析」大阪大学工学部応用理工学科生産科学コース(2010年3月).
 - [31] S. Kalghatigi, G. Friedman, A. Fridman and A.M. Clyne, *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 748 (2010).
 - [32] A.B. Shekhter, V.A. Serezhnikov, T.G. Rudenko, A.V. Pekshev and A.F. Vanin, *Nitric Oxide* **12**, 210 (2005).
 - [33] S.A. Ermolaeva, A.F. Varfolomeev, M.Y. Chernukha, D. S. Yurov, M.M. Vasiliev, A.A. Kaminskaya, M.M. Moisenovich, J.M. Romanova, A.N. Murashev, I.I. Selezneva, T. Shimizu, E.V. Sysolyatina, I.A. Shaginyan, O.F. Petrov, E.I. Mayevsky, V.E. Fortov, G.E. Morfill, B.S. Naroditsky and A.L. Gintsburg, *J. Med. Microbiology* **60**, 75 (2011).
 - [34] H.-W. Lee, G.-Y. Park, Y.-S. Seo, Y.-H. Im, S.-B. Shim and H.-J. Lee, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 053001 (2011).
 - [35] N.Y. Babaeva and M.J. Kushner, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43**, 185206 (2010).
 - [36] 今出真司, 森 隆治, 内尾祐司: 日整会誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.) **83**, S1036 (2009).
 - [37] D.-S. Lee, Y. Moriguchi, K. Okada, A. Myoui, H. Yoshikawa and S. Hamaguchi, *IEEE Trans. Plasma Sci.* (2011) *in press*.
 - [38] M. Laroussi, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **37**, 714 (2009).
 - [39] W. Kim, K.-C. Woo, G.-C. Kim and K.-T. Kim, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 013001 (2011).