

小特集 プラズマが誘導する生体応答とそのバイオ・医療応用

3. 大気圧プラズマによる組織の活性化と医療応用

3. Tissue Activation Using Atmospheric Pressure Plasma and Its Medical Application

平田 孝道¹⁾, 筒井 千尋¹⁾, 金井 孝夫²⁾, 工藤 美樹³⁾, 岩下 光利⁴⁾, 森 晃¹⁾
 HIRATA Takamichi¹⁾, TSUTSUI Chihiro¹⁾, KANAI Takao²⁾, KUDO Yoshiki³⁾,
 IWASHITA Mitsutoshi⁴⁾ and MORI Akira¹⁾

¹⁾東京都市大学工学部医用工学科, ²⁾東京女子医科大学実験動物中央施設,

³⁾広島大学医学部産婦人科, ⁴⁾杏林大学医学部産婦人科

(原稿受付: 2015年7月15日)

我々は、医療分野において注目されている大気圧ヘリウムプラズマ源を用いた脂肪組織の溶解、生体組織・細胞への直接照射による創傷・火傷治癒、並びにプラズマ吸入による心疾患（心筋梗塞）の緩和治療を行っている。本稿ではまず、生体組織の改質・再生のメカニズムについて紹介し、続いて、著者らによる研究事例として、大気圧プラズマ照射による火傷治癒、プラズマ制御による火傷治癒機構の解明、プラズマ吸入による心筋梗塞の緩和治療、低酸素性脳症モデルラットへのプラズマ吸入について紹介した後、今後の展望について説明する。

Keywords:

atmospheric pressure plasma, plasma medicine, plasma irradiation/inhalation, disease treatment

3.1 はじめに～大気圧プラズマと医療

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。特に、「大気圧プラズマ」は、真空装置が不要であるために装置本体並びに処理に要するコストが低い、加工対象や試料を真空排気処理せずに直接的プラズマ処理が可能であるため、連続処理が可能である（生産性が高い）などの特徴がある。ただし、欠点もあり、低気圧プラズマ処理に比べて大気雰囲気中の温度やガス流に大きく左右されるために安定したプラズマ生成が難しいという点もある。近年、表面改質及び有害物質分解[1]のみならず、「バクテリオファージ、バクテリア、並びに大腸菌の不活性を含む滅菌・殺菌に関する研究」[2-4]には、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・発展が必要不可欠であるといえる。しかし、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、特に医療・バイオに関する応用展開は、欧米に比べて若干の遅れがあるというのが現状である。更に、「浮遊電極型誘電体バリア放電を用いた皮膚の改質・再生」[5]、「マイクロ放

電プラズマを用いたバクテリアの不活化」[6]、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、蛋白質、医薬系低分子化合物の導入」[7]などは、プラズマを医療に応用した事例として注目されているが、メカニズムが未だ解明されておらず、その解明が今後の展開に重要なキーポイントと成り得ると考えている。

3.2 生体組織の改質・再生のメカニズム

生体組織の改質・再生のメカニズムに関しては幾つかの要因が考えられるが、その中でも「電磁界に起因した細胞内成長因子の活性化」及び「プラズマにより発生した活性物質による成長因子の活性化」についての世界的動向を以下に述べる。

電磁界に起因した細胞内成長因子の活性化

具体的な事例としては、パルスパワー技術[8]を用いたガン治療[9]、ガン細胞の不活化[10]、並びに創傷治療[11,12]が挙げられる。パルスパワーの特徴は、大電力かつ対象への作用時間が極めて短いことである。長時間かけて電流を流す場合には、与えた熱エネルギーに伴って抵抗体の温度が上昇するが、同時に放射や熱伝導によってエネルギーが散逸する。これに対してエネルギー散逸の時間に比べて極めて短時間に大電流を流した場合、放射損失は避けられないが熱伝導損失は大きくならないため、より高い温

1) Department of Medical Engineering, Tokyo City University, TOKYO 158-8557, Japan

2) Institute of Experimental Animal Facility, Tokyo Women's Medical University, Shinjuku, TOKYO 162-8666, Japan

3) Department of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University, HIROSHIMA 734-8551, Japan

4) Department of Obstetrics and Gynecology, Kyorin University, TOKYO 181-8611, Japan

Corresponding author's e-mail: hirata@bme.tcu.ac.jp

度まで加熱することが可能である。ゆえに、パルスパワーは系のエネルギー散逸・緩和の定数よりも短時間でエネルギーのやりとりを行うことによって、より大きいエネルギー密度を実現するための技術であると考えることができる。

プラズマ由来活性物質による成長因子の活性化

プラズマ中には、数多くの中性分子、イオン種、ラジカル種が存在する。特に大気を用いた場合、窒素酸化物が生成される。中でも一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) は、窒素と酸素からなる無機化合物であり、不対電子を有するフリーラジカル、半減期は3～6秒程度、常温で無色・無臭、水に溶けにくいという性質を有する。一方、過剰なNOの産生は、自己免疫疾患、リウマチ性関節炎、糖尿病、心臓血管系虚血、脳虚血等の様々な疾病を誘発する恐れもあることが明らかになっている。近年注目されているNO吸入療法は、薬物治療や呼吸管理などの従来治療法では救命が困難である重症呼吸不全に対して劇的な効果を示す新しい治療法である[13]。「血流調整因子」である内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF) の主要物質がNOであることが1987年に判明し、生体内で起こる様々な現象にNOが重要な役割を果たしていることが明らかになった[14-16]。1991年、肺高血圧の羊を対象とした実験でNO吸入が選択的に肺動脈の血管平滑筋を弛緩させ、肺血管を拡張させる作用のあることが証明され、「NO吸入療法」の臨床応用が開始された。この手法は、新生児の新生児遷延性肺高血圧や、開心術後の心臓の負荷軽減、原発性肺高血圧症の治療などに利用される。

更に、NOガスを火傷もしくは静脈性潰瘍（糖尿病を主因とした静脈の血行障害に起因した創傷）の患部に吹き付けて治療する「NO-therapy」も存在する。特に、熱傷深度の高い火傷の場合、治癒に相当な時間を要するが、この手法を施すことによって皮膚の再生を促進させることが可能であるという報告もある[5]。ただし、細胞増殖を含む細胞内成長因子への関与については、様々なシグナル伝達経路が数多く存在するため、明確な伝達経路の特定には至っていないのが現状である。

3.3 大気圧プラズマ照射による火傷治癒

我々は、大気圧プラズマ源を用いた生体組織・細胞への直接照射を行い、再生治療も視野に入れた“プラズマ医療”に関するメカニズム解明及び応用を目的とした評価・分析を行っている[17, 18]。ここでは、研究成果の一部を紹介する。

大気圧プラズマ発生装置の概略を図1に示す。プラズマを発生させるリアクタは、ガラスキャピラリー（プラズマ発生部の内径：6 mm、先端部の内径：1 mm）内に直径1 mmのタングステン電極を導入し、外部に筒状グラウンド電極を設置した同軸構造である。プラズマを発生させる高電圧は外部に接続した高電圧電源によって発生させる。本研究におけるプラズマの発生条件は、印加電圧：8 kV_{peak-to-peak}、周波数：3 kHz（矩形波）、ヘリウム (He) ガス流量：1 L/min、照射距離：5 mm、照射時間：90秒である。この条件は、*in vitro* 実験にて行われた先行

研究の結果より、株化細胞 (NIH3T3細胞株) 及びブタ大動脈内皮細胞 (POAEC) の増殖がもっとも認められた条件であるが、*in vivo* 実験にて行われた先行研究において、60秒照射した場合よりもコントロールとの有意な差がみられたことから、照射時間は90秒とした。

ラットの背面に人為的に形成した熱傷部位に対して1日1回プラズマ照射を30日間に亘って行った目視観察の結果を図2に示す。観察開始直後には、炭化した皮膚とその周辺に炎症が認められる典型的な第III度熱傷の様相を呈していたが、4日目から表皮に瘡蓋（かさぶた）が生じ始めた。2週間ほど経過した段階では、プラズマ照射を行った創傷部は全面に渡って完全な瘡蓋に覆われた[図2(b)]。一方、図2(a)に示す未処置のコントロールでは部分的に瘡蓋が形成し始めているものの、プラズマ照射を行った創傷部と比較して明らかに治癒が遅れている。更に、21日経過後にはプラズマ照射を行った創傷部は瘡蓋も殆どが剥離し、その下に新たな表皮が再生しているのが観察された。

図3にラット皮膚の切片標本をトマトレクチン染色した試料の共焦点レーザー顕微鏡観察結果を示す。図3(a)に示す未照射の熱傷部位と比較して、プラズマ照射を行った皮膚組織においてより多くの新生血管が観察された[図3(b)]。この結果について、独立した非連続切片からのランダムサンプリングにより、新生血管数を算定したところ、図3(c)に示すようにプラズマ照射を行った熱傷部位では、未照射の熱傷組織と比較して有意に新生血管が増加していることが判明した。

3.4 プラズマ制御による火傷治癒機構の解明

プラズマ中のイオン種及びラジカル種の生成量を変化さ

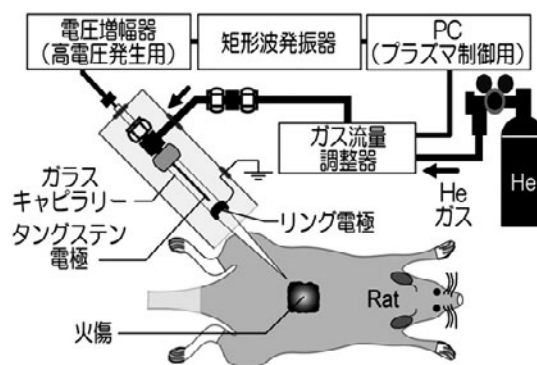


図1 大気圧プラズマ発生装置概要図。

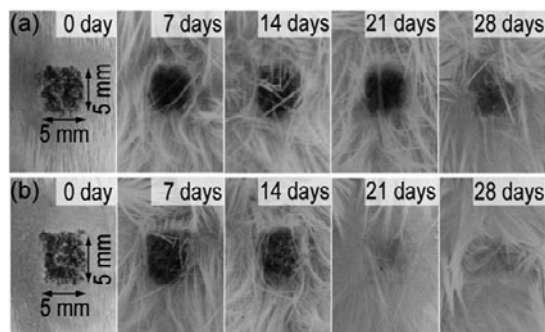


図2 熱傷部位の経過観察(a)未照射 及び(b)プラズマ照射。

せた場合における火傷面積の評価を行い、火傷治癒に寄与する要因を明確するための実験を行った[19]。プラズマ発生用印加電圧の周波数を1, 2, 3, 4, 5 kHzと変化させてイオン種及びラジカル種の生成量を変化させたプラズマ照射を行った場合における熱傷の目視観察及び面積算定結果を図4に示す。未照射及び周波数1, 2 kHzによるプラズマ照射を行ったラットでは、熱傷形成12日後までは熱傷面積の大きな変化はみられなかったが、12日後から27日後にかけて減少した後に、30日後にかけて緩やかに減少し、完治する傾向がみられた。一方、周波数3, 4, 5 kHzの場合で

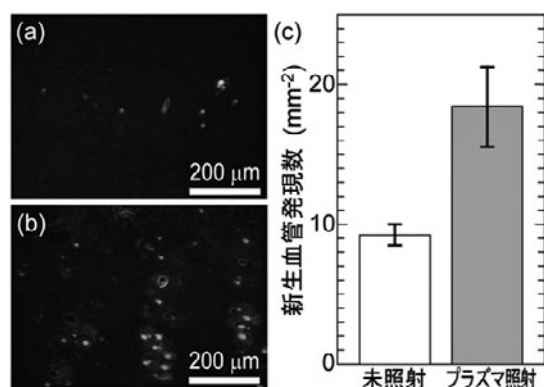


図3 ラット皮膚のトマトレクチン染色[(a)未照射, (b)プラズマ照射]及び(c)ラット皮膚における新生血管発現数
*X \pm SD of 6 rats, $p < 0.01$.

	コントロール	印加電圧周波数 (kHz)				
		1	2	3	4	5
0日						
7日						
14日						
21日						
28日						

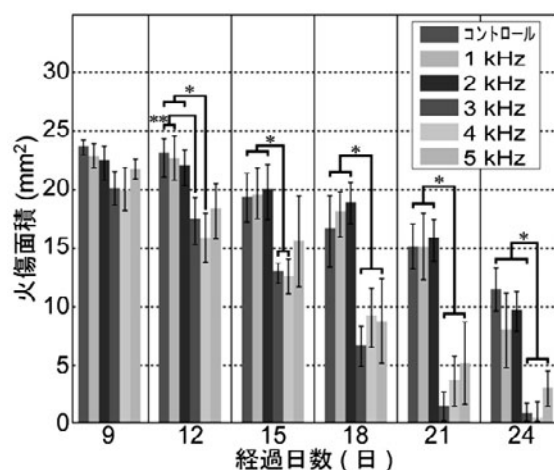


図4 熱傷面積の経時変化 (n=3).

は、熱傷形成6日後付近から緩やかに減少する傾向があり、21日後には3 kHzによるプラズマ照射を行った熱傷組織はほぼ再生した。また、熱傷部位の組織がほぼ再生している状態に至るまでの期間は4 kHz:24日間、5 kHz:27日間を擁しており、最も早く完治した3 kHzに比べて約3日ずつ遅れる傾向がみられた。更に、周波数3, 4 kHzの熱傷部位では、未照射及び周波数1, 2 kHzの熱傷部位と比較して、熱傷形成12日後から24日後にかけて熱傷面積が減少していることが判明した。また、プラズマ発生部から発生した励起光の発光分光計測の結果より、創傷治癒に最も効果があった条件で発生させたプラズマ中にはHe原子由来のピークの他に、窒素の第2正帯 (Second Positive System: SPS) 及びイオン、水酸基ラジカル、水素原子などが多く生成されることが判明している。一般的に、大気圧プラズマによる放電ではプラズマ源周辺の窒素、酸素、並びに水分子等に起因した様々なイオン、ラジカル種、並びに励起種が生成されている。特に医療応用の観点からは、一重項酸素($^1\text{O}_2$)、オゾン(O_3)、水酸基ラジカル/ヒドロキシラジカル(OH)、スーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)、ヒドロキシラジカル(HO_2)、過酸化水素(H_2O_2)等の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: RO) や、一酸化窒素(NO)、二酸化窒素(NO_2)、ペルオキシナイトライト(ONOO^-)、ペルオキシ亜硝酸(ONOOH)、三酸化二窒素(N_2O_3)などの活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species: RNS) が気相中で生成されている。

以上の結果より、プラズマ照射による火傷患部の殺菌・滅菌により治癒が促進されるのではなく、プラズマ源から発生したイオン種及びラジカル種、並びに大気由来の副生成物による電気化学的刺激を含む組織表面反応が成長因子を活性化して血管新生を促進し、熱傷の治癒を促進させているものと考えられる。

3.5 プラズマ吸入による心筋梗塞の緩和治療

細胞・組織の活性化に重要な役割を果たしている窒素酸化物の中でも「NO吸入療法」による肺疾患治療もしくは「NO-therapy」による創傷治療の観点から、我々は心疾患及び呼吸器疾患の治療を目的としたイオン種及びラジカル種を含む大気圧プラズマ吸入による実験・評価を行った[20]。特に、ここでは、虚血性心疾患の1つである心筋梗塞発症モデルラットを用いた心筋梗塞の緩和治療に関する実験を行った。

実験装置の概要を図5に示す。プラズマ発生装置本体は、火傷治療に用いたプラズマ源と同様に、ガラスキャピラリー内にタングステン線を導入し、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、印加電圧:8 kV_{pp}、周波数:3 kHzであり、ヘリウム(He)ガス流量:1 L/min、プラズマ照射時間:90秒である。イオン種及びラジカル種を含むプラズマは、ガラスキャピラリー先端に接続したシリコンチューブ(長さ:L=1000 mm)を介して小動物の肺に吸入する。実験に用いた小動物はラットであり、ガス麻酔による無意識下状態にて実験を行った。また、図5に示すように、カテーテル

型 NO センサを腹部大動脈に直接挿入し、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。更に、心筋梗塞モデルラットにおける血流量の変動については、経皮的動脈血酸素飽和度（ SpO_2 、動脈血中の酸素と結合しているヘモグロビンの割合）を計測して評価した。実験に使用した心筋梗塞モデルラットは、心臓の左心室にある左冠状動脈を糸で結紮して虚血状態にしたものであり、（財）動物繁殖研究所（茨城県かすみがうら市）に作製を委託した。

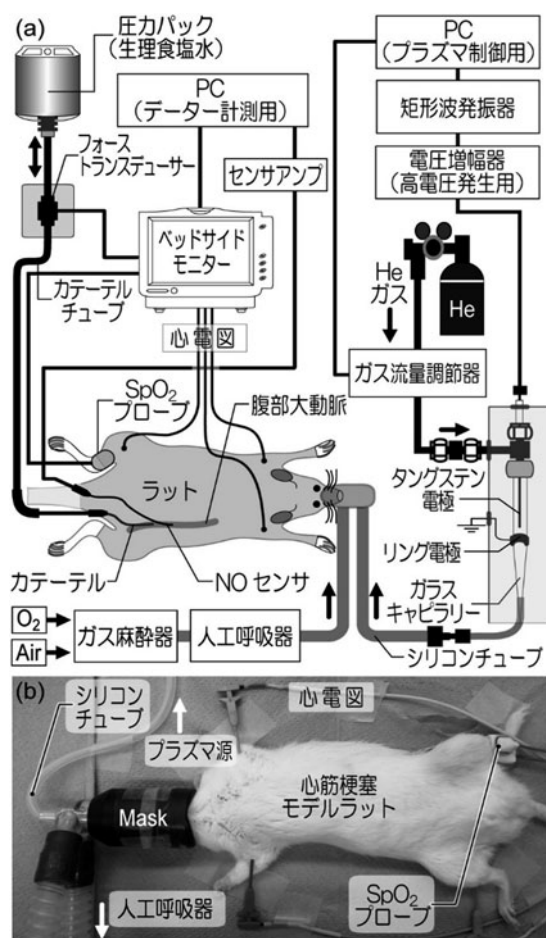


図5 実験装置概要図。

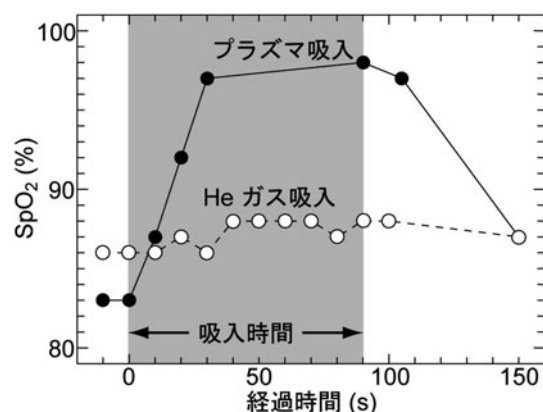


図6 各種吸入における SpO_2 の時間変動。

図6は SpO_2 の時間変動を示したものである。He ガス吸入の場合には SpO_2 に変化は殆どみられなかったが、プラズマ吸入の場合には SpO_2 が83%→97%に増加する傾向がみられた。 SpO_2 改善の理由としては、血管拡張による酸素濃度の増加によるものと考えられ、プラズマ吸入が心内膜虚血に起因した心臓機能低下による血流量の減少を改善できる可能性があることが示唆された。

図7は大動脈内血圧及び NO 濃度の時間変動を示したものである。血圧測定の結果、プラズマ吸入では血圧の降下（最高／最低：89/81 mmHg→73/60 mmHg）がみられた。更に、プラズマ吸入開始から30秒後には血液中 NO 濃度が増加したのみならず、血圧の降下に対応して増加傾向を示すことが判明した。比較のために行った高濃度 NO ガス吸入においても血圧の降下がみられ、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。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。

したがって、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、並びに原発性肺高圧症や新生児遷延性肺高圧症などの呼吸器疾患の治療に有効であるのみならず、細胞代謝の促進にも大きく寄与しているものと考えている。

3.6 プラズマ吸入による低酸素脳症の緩和治療

一般的に、心筋梗塞、心停止、窒息などにより引き起こされる低酸素性虚血性脳症（低酸素脳症）は、全身への血液循環不全に起因した低酸素・虚血による刺激への異常反応、痙攣、意識障害）などの脳神経障害を起こす異常の総称であり、脳低温療法や人工呼吸管理などの処置方法はあるが、抜本的な治療法がない。ゆえに我々は、虚血性脳疾患の中でも窒息や狭窄により発症する低酸素脳症に注目した低酸素脳症モデルラットへのプラズマ吸入による実験・評価を行った[21]。

ラット（種：Wister, 生後：6～7日）を用いて、ガス麻酔下で左総頸動脈の結紮を行い、保育器（酸素濃度：8%）内に2時間曝露した後、通常の飼育を行った。生後6週目を経過した時点において、血管造影剤を心腔内へ投与した後、X線CTにより脳血管の断層撮影、並びに摘出し

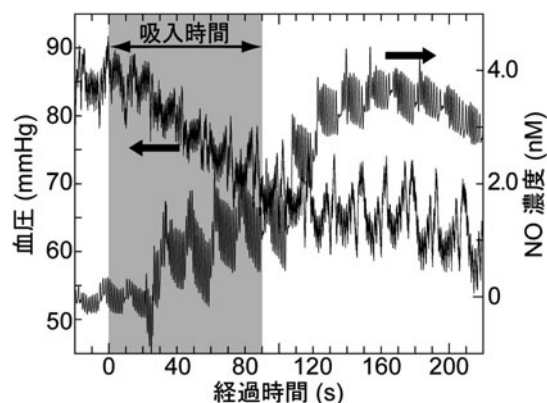


図7 プラズマ吸入時の血圧及び血液中 NO 濃度の時間変動。

た脳の目視観察を行った。CT断層撮影診断には、実験動物用X線CT（日立アロカメディカル株式会社製、Latheta LCT-200）を用いた。

プラズマ吸入を施したラットの脳血管CT断層撮影画像及び摘出した脳の目視観察写真を図8に示す。通常、脳血管は左右が対称であるのに対して、モデルラットの場合には左右の対称性が失われている[矢印部分：図8(a)]。目視観察結果の場合も同様に、矢印領域における脳の左右対称性が失われており、脳浮腫（脳の間質組織の含水量が異常に増加した状態。脳出血、脳梗塞、脳腫瘍、脳外傷部位の周辺部にみられる）を確認した。プラズマ吸入に酸素ガスを添加した場合と酸素・笑気混合ガスを添加した場合を比較すると、酸素・笑気混合ガスの添加では浮腫の拡大が抑制されているという結果が得られた[図8(b)]。

以上の結果より、NOや笑気などの窒素酸化物を含むプラズマ吸入が救命救急治療における初期段階において有効な手段と成り得ると考えている。

3.7 おわりに～日本におけるプラズマ医療

プラズマを用いた細胞内因子の活性及び不活性のメカニズムについては、多角的な生体組織及び生体へのプラズマ照射実験による基礎データの構築と、プラズマ理工学、分子生物学、シグナル制御を含む異なる分野間を横断的に網羅した学術的取り組みが重要であると考えている。特に、この分野の基盤確立は、日本における再生医療を含めた医学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可能性を秘めているといえる。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究（研究領域提案型）「プラズマによる細胞／組織の活性化・改質及び再生医療への応用展開」の一環として行われた。

参考文献

- [1] N. Takahashi *et al.*, *Water Res.* **28**, 1563 (1994).
- [2] H. Yasuda *et al.*, *Plasma Process Polym.* **7**, 301 (2010).
- [3] T. Sato *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **89**, 073902 (2006).

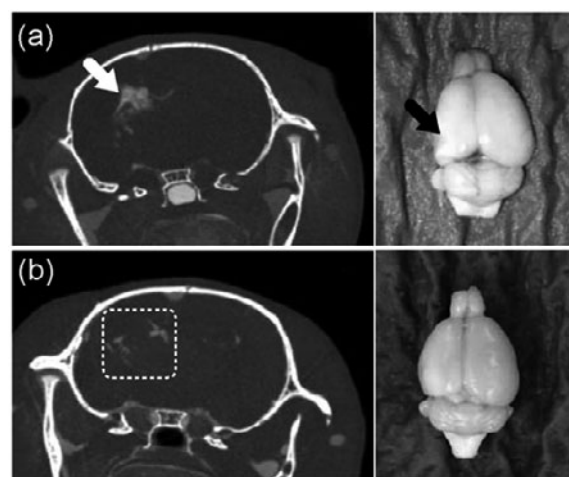


図8 CT断層撮影画像及び摘出脳の目視観察写真。(a)酸素ガス添加プラズマ吸入、(b)酸素・笑気混合ガス添加プラズマ吸入。

- [4] S. Ikawa *et al.*, *Plasma Process Polym.* **7**, 33 (2010).
- [5] G. Fridman *et al.*, *Plasma Process Polym.* **5**, 503 (2008).
- [6] T. Shimizu *et al.*, *New J. Phys.* **13**, 23026 (2011).
- [7] Y. Sakai *et al.*, *J. Biotechnol.* **121**, 299 (2006).
- [8] 勝木淳他：プラズマ・核融合学会誌 **87**, 268 (2011).
- [9] M. Zemazar, *Electrochemotherapy, Electro-genetherapy and Transdermal Drug delivery* (Humana Press, 2000).
- [10] R. Nuccitelli *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 351 (2006).
- [11] J. Zhang *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **471**, 240 (2008).
- [12] G.G. Ginsberg *et al.*, *Gastrointestinal Endoscopy* **55**, 807 (2002).
- [13] 公文啓二編著：一酸化窒素吸入療法（メディカルレビュー社，1999）。
- [14] R.F. Furchgott, *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**, 1870 (1999).
- [15] F. Murad, *Angew. Chem. Int., Ed.* **38**, 1856 (1999).
- [16] L.J. Ignarro, *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**, 1882 (1999).
- [17] 筒井千尋他：静電気学会誌 **35**, 20 (2011).
- [18] 筒井千尋他：静電気学会誌 **36**, 235 (2012).
- [19] T. Hirata *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 010302 (2014).
- [20] C. Tsutsui *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 060309 (2014).
- [21] H. Saitou *et al.*, *Plasma Conference 2014, Niigata/Japan*, 18PB-068 (2014).