

# 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

筒井千尋<sup>\*1</sup>, 平田孝道<sup>\*\*\*\*</sup>, 小町俊文<sup>\*\*\*</sup>, 岸本拓巳<sup>\*\*\*</sup>,  
森 晃<sup>\*\*\*</sup>, 秋谷昌宏<sup>\*\*\*\*</sup>, 山本俊昭<sup>\*\*</sup>, 田口 亮<sup>\* \*\*\*</sup>

(2010年9月14日受付; 2010年12月24日受理)

## Tissue and Cell Activation Using Micro-Spot Atmospheric Pressure Plasma Source

Chihiro TSUTSUI,<sup>\*1</sup> Takamichi HIRATA,<sup>\*,\*\*\*</sup> Toshifumi KOMACHI,<sup>\*\*\*</sup> Takumi KISHIMOTO,<sup>\*\*\*</sup>  
Akira MORI,<sup>\*\*\*</sup> Masahiro AKIYA,<sup>\*,\*\*\*</sup> Toshiaki YAMAMOTO<sup>\*\*</sup> and Akira TAGUCHI,<sup>\*\*\*</sup>

(Received September 14, 2010; Accepted December 24, 2010)

The atmospheric pressure plasma is indispensable not only for sterilization, disinfection, decomposition of hazardous materials, and surface modification, but also for the cultivation and development of complex new areas which require a diverse perspective, involving biomedical science. From the above-mentioned background, we carried out the experiments about the direct ion/radical irradiation to the tissue and cell using micro-spot atmospheric pressures plasma source. When plasma irradiated cells and burn wounds of rat, it promotes the cell growth and evidence of healing that the interaction due to ion/radical collisions on the culture surface causes a substantial effect on the cell proliferation that is present in the cells.

### 1. はじめに

「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<sup>1)</sup>。近年、パルス・プラズマを用いた皮膚の改質および再生治療に関する報告があり、プラズマ照射による血液凝固作用や、火傷、糖尿病性壞死などによる皮膚創傷の改善もしくは治癒が見られるだけではなく、正常細胞には影響を与えず

**キーワード:** プラズマ医工学、再生医療、細胞増殖、創傷治癒促進

\* 東京都市大学ナノカーボンバイオデバイス研究センター  
(158-0082 東京都世田谷区等々力 8-15-1)

Nano Carbon Bio Device Research Center, Tokyo City University, 8-15-1 Todoroki, Setagaya-ku, Tokyo 158-0082, Japan

\*\* 東京都市大学工学部電気電子工学科 (158-8557 東京都世田谷区玉堤 1-28-1)

Department of Electrical and Electronic Engineering, Tokyo City University, 1-28-1 Tamazutsumi, Setagaya-ku, Tokyo 158-8557, Japan

\*\*\*東京都市大学工学部生体医工学科 (158-8557 東京都世田谷区玉堤 1-28-1)

Department of Biomedical Engineering, Tokyo City University, 1-28-1 Tamazutsumi, Setagaya-ku, Tokyo 158-8557, Japan

にガン細胞(メラノーマ細胞)の増殖を抑制するといった効果も示されている<sup>2)</sup>。しかし、短期間のプラズマ照射によって表皮の再生が促進されるというメカニズムについては未だ不明な点が多くあるのが現状である。

このように、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、分子生物学、生化学などの多方面な観点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と考えている。

以上の背景から、我々は生体への熱的かつ電磁的ダメージが極めて低いマイクロスポット大気圧プラズマ源を用いた生体組織・細胞への直接照射に関する基礎実験および評価・分析を行っている。

### 2. 実験装置および方法

実験装置の概要図を図1に示す。ガラスキャビラリー(プラズマ発生部の内径: 8 mm, 先端部の内径: 1 mm)内にタンゲステン電極(直径: 1 mm)を導入し、外部に筒状グランド電極を設置した同軸状構造である。プラズマを発生させるための高電圧は、外部制御型高電圧電源装置により発生させる。プラズマ発生条件は、印加電圧: 5–9 kV、周波数: 1–3 kHz、ヘリウム(He)ガス流量: 1 L/min、プラズマ照射時間: 1–100 secである。

<sup>1</sup> ctsutsui@tcu.ac.jp

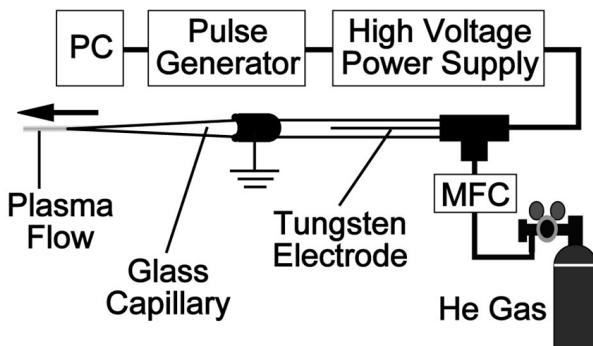


図1 マイクロスポット大気圧プラズマ源の概略図

Fig.1 Schematic of the experimental set-up.

## 2.1 培養細胞株に対するプラズマ照射実験

実験は、12穴培養容器(ポリプロピレン製:6 cm<sup>2</sup>/well)上にマウス繊維芽細胞株(NIH3T3)を1×10<sup>5</sup>個含有した培地を展開し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(培養条件:温度:37°C, CO<sub>2</sub>ガス濃度:5%)内にて24時間培養し、無血清培地への培地交換を行った後、未処理(コントロール), Heガスフロー処理、並びにプラズマ照射処理を施した場合について比較した。処理時間はそれぞれ、1, 10, 100秒とし、プラズマ照射処理後CO<sub>2</sub>インキュベーター内にてさらに24時間培養した後、まずは細胞形態を光学顕微鏡により観察した。その後、培養容器の底面に張り付いているNIH3T3細胞株の生細胞のみを、トリプシン処理により剥離させ、各条件における細胞数を計数した。これにより、各条件下における細胞の増殖率変化を検討した。また、NIH3T3細胞株を血清含有培地にて7日間継続培養し、1日1回90秒間のプラズマ照射およびHeガスフロー処理を施した際の細胞増殖曲線の違いについても検討した。

これらの実験により、単発プラズマ照射による照射時間依存的細胞増殖の傾向と、累加照射時の継続培養による影響の両面から、細胞増殖に対するプラズマ照射の影響を検討した。図2に細

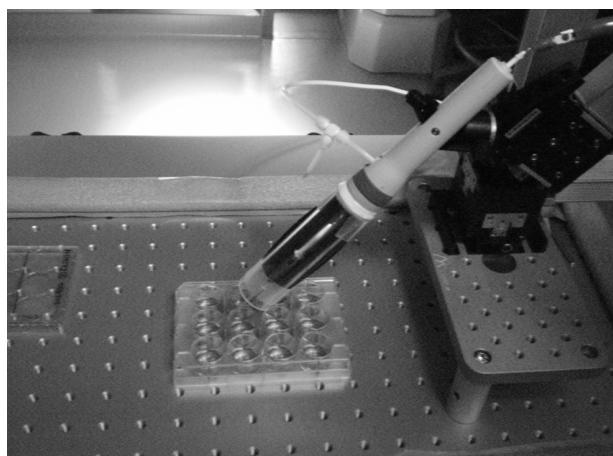


図2 細胞に対するプラズマ照射実験の様子

Fig.2 Visualization of the plasma irradiation for NIH3T3 cell line.



図3 ラットに対するプラズマ照射実験の様子

Fig.3 Visualization of the plasma irradiation for Male Wistar rat.

胞に対するプラズマ照射時の写真を示す。培地厚は6mm、6cm<sup>2</sup>の底面積に接着させた細胞に対して1mm径のキャビラリーから1L/minの流量にてプラズマを照射した。照射距離は培地から5mm、ウェルの中心とキャビラリーの先端とを一致させた部位にて照射を行った。

## 2.2 生体に対するプラズマ照射実験

生体組織へのプラズマ照射実験にはラット(Wistar, ♂, SPF)を用い、ガス麻酔による無意識下状態にて実験を行った。ラット背面には電気メスを用いて二箇所の火傷を形成し、片側にのみ1日1回90秒間のプラズマ照射を施した。なお、照射距離はラット表皮から5mmの位置にて行った。これを30日間に亘り継続し、火傷の治癒状態を目視にて観察・記録を行った。なお、火傷形成時における電気メスの設定は、出力電圧:30W、周波数:500kHzで行い、火傷の深度は皮フの炭化が確認される深度3(真皮全層・皮下組織傷害)となるように制御した。また、プラズマ照射時におけるラットの体表面温度をサーモグラフにて計測した。ラットに対するプラズマ照射時の写真を図3に示す。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 培養細胞株に対するプラズマ照射実験

NIH3T3細胞株に対するプラズマ照射実験の結果、Heガスをフローさせた場合、培地がガス攪拌されることにより細胞が培養ディッシュ底面から剥離し、細胞増殖が処理時間に比例して阻害されている。しかし、プラズマを照射することにより、この阻害効果は抑制され、むしろ細胞は増殖傾向を示すことが判明した(図4)。また、90秒間のプラズマ照射およびHeガスフロー処理後24時間培養した細胞をヘマトキシリニーエオシン(HE)染色すると、ディッシュ中央部において細胞密度に明らかな差が見られた(図5)。

これらの結果から、プラズマの照射は、培養細胞株に対して増殖を促進することが示唆された。

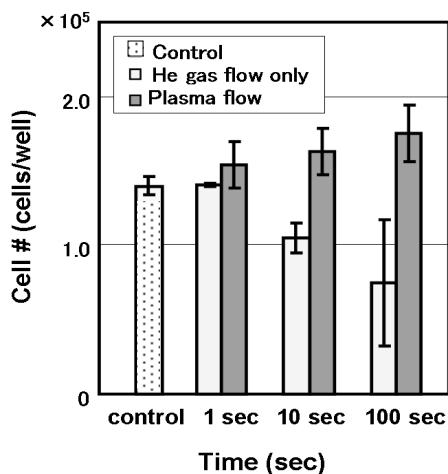


図4 細胞増殖のプラズマ照射時間依存性

Fig. 4 Dependency of cell number against plasma irradiation time.

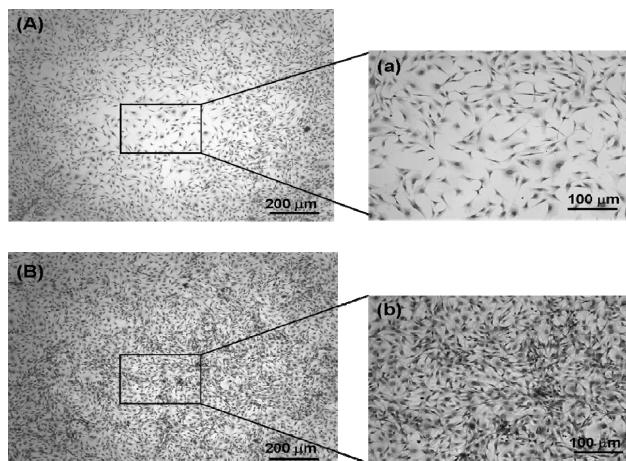


図5 NIH3T3 細胞増殖のHE染色像

(A) He ガスフロー処理 ( $\times 4$ ), (a) 同 ( $\times 20$ ). (B) プラズマ処理 ( $\times 4$ ), (b) 同 ( $\times 20$ ).

Fig. 5 HE staining of NIH3T3 cell line.

(A) He gas flow only ( $\times 4$ ), (a) ( $\times 20$ ).(B) Plasma irradiation ( $\times 4$ ), (b) ( $\times 20$ ).

### 3.2 NIH3T3 細胞株に対するプラズマ照射時の細胞増殖速度の検討

NIH3T3 細胞株に対して He ガスフローおよびプラズマ照射処理を1日 90 秒間行い、各群の細胞数の増加を1週間プロットすることにより、細胞増殖曲線を作成した(図 6)。He ガスフロー群およびプラズマ照射処理群の増殖曲線を比較したところ、プラズマ照射群の増殖曲線が明らかに左側へシフトしていることが分かる。これは、プラズマを照射することにより、NIH3T3 細胞株が細胞増殖促進という変化を細胞集団単位で起こしていることを表している。この増殖曲線より算出した各群の倍加時間はそれぞれ、フローラー群:25.8 時間、プラズマ照射群:18.8 時間であった。本施設で通常培養している NIH3T3 細胞の倍加時間は約 23 時間であり、

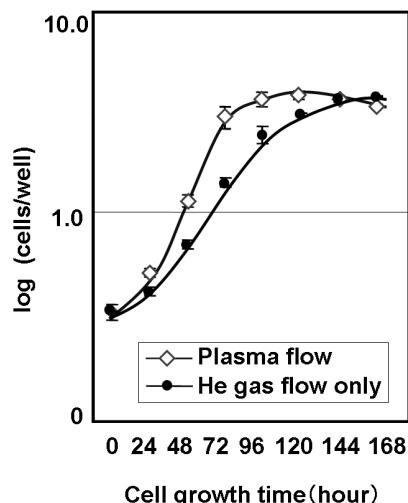


図6 NIH3T3 細胞に対するプラズマ照射時の細胞増殖曲線

Fig. 6 Cell growth curve of plasma irradiation for NIH3T3 cell line.

プラズマ照射を行うことによって細胞の倍加時間は明らかに早くなっていることが判明した。

この現象の細胞生物学的意味は本実験からのみでは不明であるが、プラズマ電界あるいは培地表面へのイオン・ラジカルの衝突などによる相互作用が細胞内の増殖因子や成長因子へ影響を及ぼしていると考えられる。

### 3.3 ラット火傷に対するプラズマ照射実験

プラズマ照射時のラット体表温度は 40 度付近で維持されており、本装置で皮フ表面に過熱が生じることは無い(図 7 (B))。また、照射直後から約 1 分程度は 3 5 度程度の保温効果が維持されている(図 7 (C), (D))。

ラット背部に形成した火傷へのプラズマ照射を1日1回90秒間行い、30 日間に亘り創傷面の観察を行った結果を図 8 に示す。左側の火傷がプラズマ照射処理を施した創傷面、右側は He ガスフローを吹き付けただけのコントロール創傷面である。観察開始直後には、炭化した皮フとその周辺が赤みを帯び、典型的な第三度火傷に相当していたが、4 日目から表面に瘡蓋が生じ始めた。2 週間ほど経過の後に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。一方、コントロール側は部分的に白色の瘡皮(かさぶた)が形成し始めているものの、プラズマ照射を行った創傷面と比較して治癒は明らかに遅れている(図 8: 14 days および 21 days)。さらに、28 日間経過後には、プラズマ照射創傷部は瘡皮も殆どが剥離し、その下に新たな表皮が再生していることが目視にて明瞭に確認できる(図 8: 28 days)。

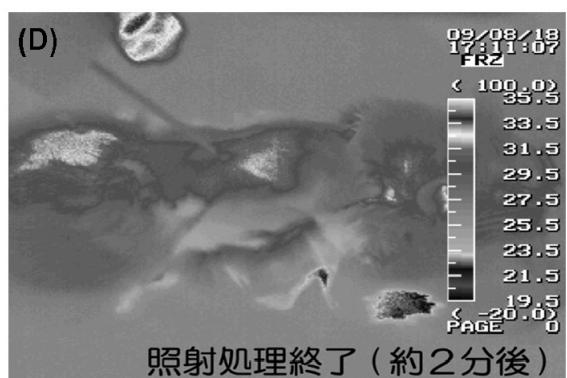
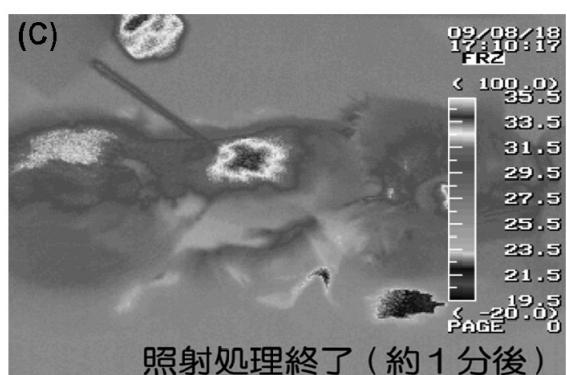
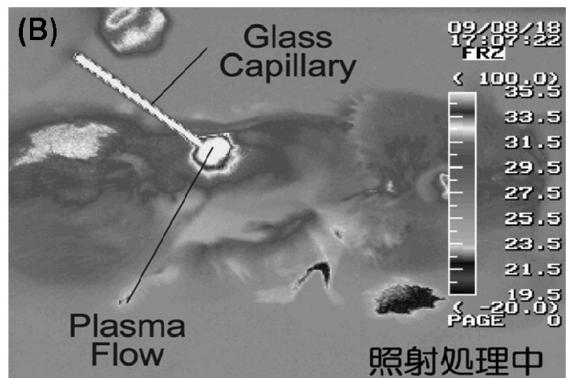
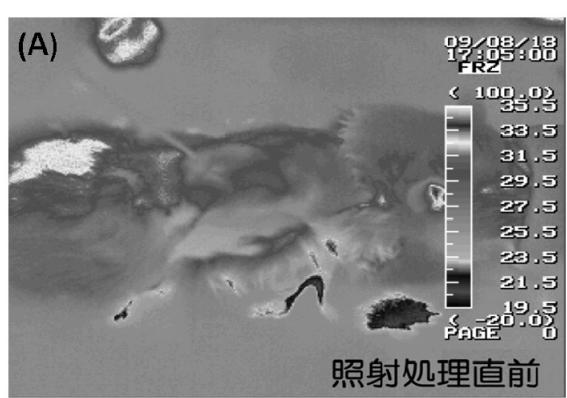


図7 プラズマ照射前後のラット体表面温度変化  
(A) 照射処理直前, (B) 照射処理中, (C) 照射終了後1分, (D) 照射終了後2分.

Fig.7 Surface temperature change of plasma irradiation for rat body. (A) Before plasma irradiation, (B) During plasma irradiation, (C) 1 min. after plasma irradiation, and (D) 2 min after plasma irradiation.

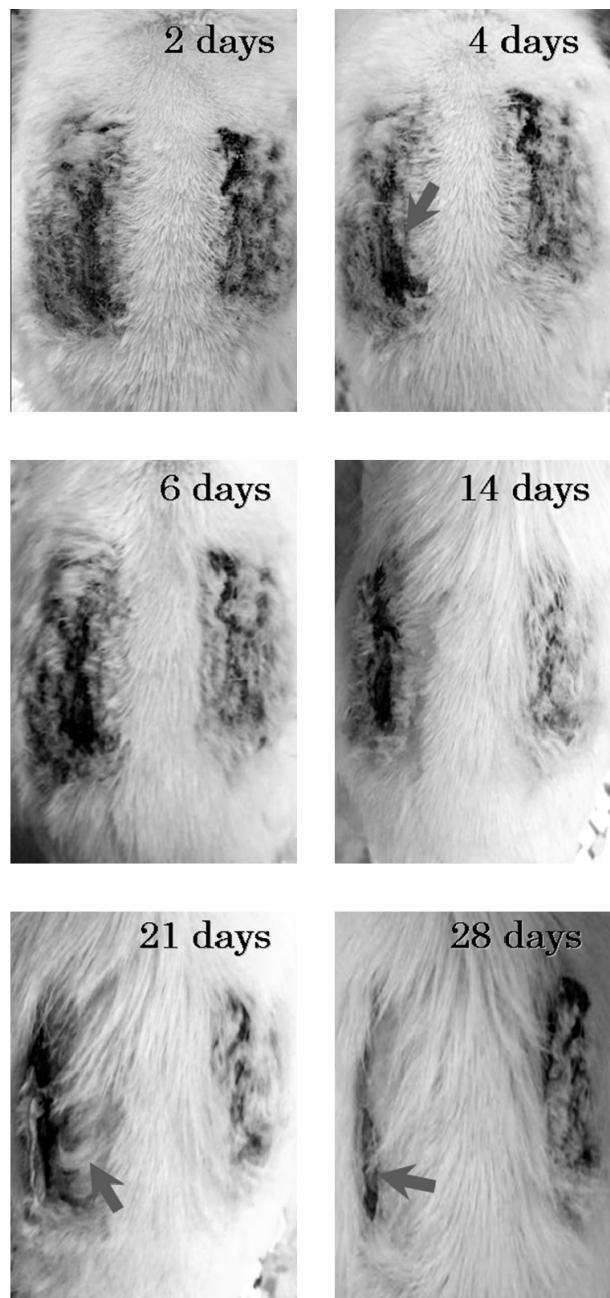
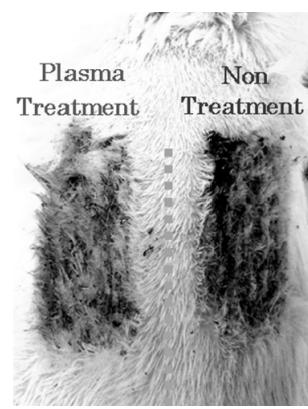


図8 ラット背面火傷に対するプラズマ照射の影響  
Fig. 8 Effect of plasma irradiation for rat dorsal burning.

#### 4. まとめ

本研究は、大気圧プラズマ発生装置を用いて、培養細胞の分化・増殖への影響および損傷した生体組織の治療・再生について検討したものであり、その結果、以下の事柄が判明した。

- (1) 大気圧プラズマ発生装置を用いたNIH3T3細胞に対するプラズマ照射により、照射時間依存的に細胞増殖が活性化される。
- (2) 培養細胞に対する1日1回90秒間のプラズマ照射処理により、細胞の倍加時間が短縮される。
- (3) ラットに形成させた火傷へのプラズマ照射において、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ず、安全なプラズマ照射が可能である。
- (4) ラット体表面に形成した火傷に対してプラズマ照射を行うことにより、非照射火傷と比較して早期の治癒が確認された。これらの効果のメカニズムについては不明であるが、プラズマにより生じたイオンやラジカルが細胞や組織表面へ衝突することにより、その刺激が細胞内の各種増殖因子、サイトカインなどの産生を促しているという説が考えられる。このことは、これまでの薬剤による「不足を補う」療法とは一線を画する「自己治癒力を高める」療法として非常に注目度の高い治療法と成り得ると考えている。

さらに、現在我々は脳-機械インターフェース(Brain-Machine Interface, BMI)を目的とした生体インターフェース用神経融合型カーボンナノチューブ(CNT)バイオデバイス開発を中心としたCNT上、神経再生型電極上、シリコンウエハー上の各種細胞(上皮・心筋細胞)および万能細胞(主として神経幹細胞)の培養とそれらの生体適合性評価に関する研究も展開している<sup>3)</sup>。そこで、細胞再生能力を有する幹細胞を用いた実験を行っており、特に注目しているのがヒト由来臍帯血(胎児と母体を繋

ぐ胎児側の組織である“へその緒”中に含まれる血液)である。この細胞には白血病や再生不良性貧血などの難治性血液疾患治療に不可欠な造血幹細胞(赤血球、白血球、血小板に分化可能な幹細胞)が多量に含有されているのみならず、再生医療への応用が期待されている前駆細胞(神経細胞、肝細胞、上皮細胞などの組織への多分化能を有する細胞)も含まれている。今後は、この幹細胞含有ヒト臍帯血へプラズマ照射を行うことにより、効果的な組織適合性を向上もしくは付与することを最終目標とした、分化に対する影響も含めた検討を行う予定である。

本稿の執筆に際し実験にご協力頂いた、東京都市大学生体医工学科の横井由貴子、村田茂、澤田佳那子、佐藤和子、坂谷祐一郎、同電気電子工学科の猪俣茂、杉原悠公、鈴木雄一郎(敬称略)に感謝の意を表する。

本研究は文部科学省科学研究費基盤研究(B)「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」、並びに文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生体インターフェース用ナノカーボン／量子デバイス複合型バイオチップの開発」の一環として行われた。

#### 参考文献

- 1) M. Hashimoto, M. Rahman, K. Takashima, A. Mizuno: Plasma Process. Polym., **5** (2008) 615-621.
- 2) G. Friedman, A. Gutsol, AB. Shekter, VN. Vasilets, A. Fridman, Plasma Process. Polym., **5** (2008) 503-533.
- 3) 平田孝道、島谷祐一、田口亮: 第56回応用物理学関連会講演会 講演予稿集, p. 24 (2009).