マイクロスポットプラズマ源による血管新生の促進 筒井 千尋^{*,1}, 平田 孝道^{*,**}, 横井 由貴子^{**}, 小町 俊文^{**}, 岸本 拓巳^{**}, 村田 茂^{**}, 森 晃^{**}, 秋谷 昌宏^{*,**}, 山本 俊昭^{***}, 田口 亮^{*,**} (2011年9月12日受付; 2012年6月7日受理)

Effect of Neoangiogenesis Using Micro-spot Plasma Chihiro TSUTSUI,^{*,1} Takamichi HIRATA,^{*,**} Yukiko YOKOI,^{**} Toshifumi KOMACHI,^{**} Takumi KISHIMOTO,^{**} Shigeru MURATA,^{**} Akira MORI,^{**} Masahiro AKIYA,^{*,**} Toshiaki YAMAMOTO^{***} and Akira TAGUCHI^{*,**}

(Received September 12, 2011; Accepted June 7, 2012)

Using an *in vivo* and *in vitro* model, we investigated the effect of the atmospheric pressure plasma irradiation to endothelial cells and burn wounds of rat. In the plasma exposure experiment using endothelial cell proliferation was inhibited in proportion to processing time. However, it was found that this inhibitory effect was suppressed by plasma irradiation and cells are rather on an increase trend. And, in comparison with the cell growth curve for the He gas flow group , the curve for the plasma irradiation group was shifted to the left. Doubling time calculated from the multiplication curves were 28.8 h for the flow group and 24.0 h for the plasma irradiation group. We investigated expression analysis in the subsequent experiment with focus on factors related to angiogenesis, it was found that the transient overexpression of VEGF are observed in 24 h from the plasma irradiation. Plasma irradiation was used to cure the burn back dermis of rats, and we devoted attention to angiogenesis, which is a key component of the healing mechanism. We performed an intravenous injection of tomato-lectin, which merges specifically with neovascular endothelial cells. plasma irradiation promoted angiogenesis in the wound tissues. This proliferative effect is likely related to several growth factor release due to plasma-induced reactive ion/radical interaction.

1. はじめに

Inst. Electrostat. Jpn.

文

論

大規模な真空排気装置が必要無く、大気中にてプラズマを 発生させることが可能である大気圧放電プラズマは、滅菌・ 殺菌¹⁻⁴⁾や細胞への遺伝子導入⁵⁾などに応用するべく各所で 盛んな研究が行われている.一方、これらの応用研究に追従 する形で、近年、パルス・プラズマを用いた皮膚の改質、再 生治療に関する報告がある⁹.この報告によると、プラズマ

キーワード:大気圧プラズマ,再生医療,血管新生

 * 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 * 東京教主士学工学如件体质工学利。(158-9557 東京教研研究

***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

** 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

ctsutsui@tcu.ac.jp

照射により,血液凝固作用や,火傷,糖尿病性壊死などによ る皮膚創傷の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.しかし,短期間のプラズマ の照射によって,なぜ表皮を再生させることが出来るのかと いうメカニズムや生体のどのような経路を辿っているのかに ついては,一酸化窒素⁶⁰や活性酸素種⁷⁰の影響などが示唆され ているものの,未だ明確な答えが無いのが現状である.

このように、実用化が先行しているにもかかわらず、メカ ニズムが未解明という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解析 が重要なキーポイントと成り得る.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(マイクロスポットプラズマ)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及び評価・ 分析を行っている.これまでに我々は

- (1) 培養細胞に対するプラズマイオン照射処理により、細胞倍加時間が短縮される.
- (2) ラット体表面に形成した火傷に対してプラズマイオ

ン照射を行うことにより,非照射火傷と比較して早期 の治癒が見られる.

という2点について明らかにしてきた⁸⁾.

これらの結果から,我々は,血管新生に着目した.血管新 生とは,組織や細胞がダメージを受けた際に,それを回復す るために起こす一連の生体反応である.これが起こる際に発 現が上昇する成長因子(繊維芽細胞増殖因子:FGF-2,血管 内皮増殖因子:VEGF)^{9,10}に着目し,ブタ大動脈内皮細胞

(POAEC) におけるプラズマ照射時の発現変化を調べた. さらに,背部に電気メスで火傷を形成したラットに対するプラズマ照射時の新生血管を観察するために,血管内皮細胞特異的に結合能を有するトマトレクチンを用いて染色を行った.

これらの実験を通して、プラズマによる組織再生がどのような生体反応に由来するものなのかを調査・検討した.

2. 実験装置および方法

実験装置の概要図を図1に示す. なお,実際の実験時は, 感電防止のためこの装置の外側にシールドを設置して実験を 行っている.ガラスキャピラリー(プラズマ発生部の内径:8 mm,先端部の内径:1mm)内にタングステン電極(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:8kVpp,周波数:3kHz(矩形波),ヘリウム(He) ガス流量:1L/min,プラズマ照射時間:60sである.

2.1 大動脈内皮細胞に対するプラズマ照射実験

実験は、培養容器(ポリプロピレン製)上にブタ大動脈内 皮細胞(POAEC)を 6×10^4 個含有した培地を展開し、 CO_2 インキュベーター($37^{\circ}C$, 5% CO_2)内にて 24 時間培養後、 無血清培地への培地交換を行った後、プラズマ照射処理およ び He ガスフロー処理を施した場合と未処理(コントロール) の場合について細胞数を比較した。各条件とも3ウェルの平



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.

均値を取っている.まずは、無処理(control),1秒,10秒, 30秒,60秒,90秒,120秒,180秒の処理時間にて最適照射 時間の検討を行った.プラズマ処理および He ガスフロー処 理後 CO_2 インキュベーター内にてさらに24時間培養し、細 胞形態を光学顕微鏡により目視観察した.その後、培養容器 の底面に張り付いている POAEC 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.

さらに、この実験により、最も増殖率が高かった 60 秒の照射 (および He ガスフロー処理)を1日1回行いながら7日間 継続培養し、プラズマ処理あるいは He ガスフロー処理各条 件下での細胞増殖曲線を作成した.図2に POAEC に対する プラズマ照射時の写真を示す.

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, 3, SPF)を用い、ガス麻酔下にて実験を行った. 12 匹のラット 背面に電気メス(Metran, SL-5)を用いて5×5mm²の面積に て火傷を形成し、6匹について1日1回90秒間のプラズマイ オン照射を施した.これを He ガスフローのみ照射の対象群6 匹とともに、30日間に亘って継続的に暴露させ、火傷の治癒 の様子を目視にて観察・記録した. さらに、 ラット頚静脈よ り FITC 標識トマトレクチン (Sigma-Aldrich, L0401) を投与 し、全身を灌流固定後、火傷を施した部位の皮膚薄切切片を 作製,新生血管の様子を共焦点レーザー顕微鏡(Olympus, FLUOVIEW BX61W1, FV1000-D フィルタセット内 NIBA 使 用)にて観察した.なお、火傷形成時の電気メスの設定は、 出力電圧 30 W, 周波数 500 kHz で行い, 火傷の深度は皮フの 炭化が確認される深度三(真皮全層・皮下組織傷害)とする ようにコントロールした. 図3にラットに対するプラズマ照 射時の写真を示す.



- 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 porcine endothelial cell (POAEC).



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.

2.3 FGF-2, VEGFの発現解析

ISOGEN(日本ジーン)を用いてプラズマ照射前およびプ ラズマ処理後12,24,36,48時間後のPOAECよりtotal RNA を抽出し,DNase I(プロメガ)処理した.その後total RNA 1µgを用い,Super ScriptIII RTase (Invitrogen)を用いて RT を行 い, cDNA を合成した.合成した cDNA をテンプレートとし て用い,FGF-2 および VEGF の PCR 増幅を行った.PCR 反 応を行った後,臭化エチジウムを含む 2%アガロースゲルを 用いた電気泳動により PCR 産物を確認した.

3. 実験結果及び考察

3.1 大動脈内皮細胞に対するプラズマ照射実験

大動脈内皮細胞に対するプラズマイオン照射実験の結果, 株化細胞(NIH3T3細胞株)における同様の実験⁶と同じく, He ガスをフローさせた場合,培地がガス撹拌されることによ 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,He ガスフローと共に プラズマを発生・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した(図4).これらの結果 から,プラズマイオンの照射は,株化細胞のみならず,単離 細胞に対しても増殖促進効果を及ぼすことが示唆された.

ブタ大動脈内皮細胞に対してプラズマ照射および He ガス フロー処理を1日60秒間行い,各条件の細胞数の増加を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 5).He プラズマ処理細胞(plasma exp.),He ガスフロー処理 細胞(flow cont.)それぞれの増殖曲線を比較したところ,He プラズマ処理細胞の増殖曲線が明らかに左側へシフトしてお り,ブタ大動脈内皮細胞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おり,本装置が株化細胞 のみならず,単離細胞に対しても有意な増殖促進効果を示す





Fig. 4 Dependency of cell number against He gas flow time.



図 5 POAEC に対するプラズマ照射時の細胞増殖曲線 Fig. 5 Cell growth curve of plasma irradiation for POAEC.

ことが判明した. この増殖曲線より算出した各条件の倍加時 間はそれぞれ, He プラズマ処理細胞:24.0 時間, He ガスフ ロー処理細胞:28.8 時間であった. 本施設で通常培養してい るブタ大動脈内皮細胞の倍加時間は約27 時間であり,プラズ マ照射を行うことで, 細胞の倍加時間は明らかに早くなって いると言える.

3.2 プラズマ照射処理後のブタ大動脈内皮細胞における FGF-2, VEGF の発現解析

プラズマ照射による細胞の増殖促進メカニズム,および, 細胞生物学的意味は本実験の結果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 ぼしていると予想される⁸⁾.そこで,我々は,血管新生を惹 起する代表的な成長因子である血管内皮成長因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)および繊維芽細胞成長因子 2 (Fibroblast Growth Factor-2: FGF-2)に着目し、この二つの 成長因子のプラズマ照射前と照射後の発現量変化について調 べた. その結果、FGF-2 には明らかな変化は認められなかっ たが、プラズマ照射 24 時間後、一過性に VEGF の発現が上 昇した(図 6).

血管新生の機序は、はじめに FGF-2 の発現が上昇し、その 後 VEGF の発現が上昇するというカスケードをたどる.今回 の実験では VEGF の発現上昇は確認できたが、FGF-2 につい ては捉えることが出来なかった.しかし、FGF-2 は血管新生 以外にも様々な生理作用を調節する遺伝子であり、ホメオス タシス維持の観点から、長時間に渡って発現が維持されるこ とは殆ど無い^{10,11)}.従って、本実験では血管新生を直接刺激 する下流遺伝子である VEGF の発現のみが捉えられたという 可能性が高い.今後は、DNA マイクロアレイなどの、遺伝子 発現を網羅的に解析することが可能な手法を用いて、同様の検 討を行う必要性がある.それにより、血管新生以外にも細胞内で 生じている生理学的変化を捉えることが可能となり、より詳細な検 討が出来ると考えられる.

3.3 ラット火傷に対するプラズマ照射実験

培養細胞への He プラズマ処理の際は、最適処理時間は 60 秒であったが、生体に対するプラズマ照射の場合、各条件に おける個体数1で行ったプレ実験において 60 秒よりも 90 秒 照射の方がコントロールとの有意な差が見られたことから、 ラットへの照射時間は 90 秒とした. ラットへ背部に形成した



- 図 6 POAEC に対するプラズマ照射後の VEGF/FGF-2 発 現変化
- Fig. 6 Expression changes of VEGF/FGF-2 after the plasma irradiation for POAEC.



図 7 ラット背面火傷に対するプラズマ照射の影響 (a Fig. 7 Effect of plasma irradiation for rat dorsal burning. (a

(a) He ガスフローのみ, (b) プラズマ照射.
(a) He gas flow only, (b) plasma irradiation.







He gas flow only $(\times 40)$: A, light vision; B, dark vision; C, merge. Plasma irradiation $(\times 40)$: D, light vision; E, dark vision; F, merge.

火傷へのプラズマ照射を1日90秒間行い,30日間に亘り創 傷面の観察を行った結果の代表例を図7に示す.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 三度火傷の様相を呈していたが、4日目から表面に瘡蓋(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.一方、コントロール側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面と比較して明らかに 治癒が遅れている.さらに、21日経過後には、プラズマ照射 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 ていることが見て取れる(図7).

なお、図中に示したラットは代表的な一例であるが、他の 五例においても同様の結果を得ており、プラズマ照射条件下 では早くて 20 日、遅くとも 30 日程で治癒するのに対して、 コントロールでは全ての個体で治癒に 30 日以上を必要とし た. Fridman らは我々と同じく大気圧プラズマ発生装置を用 いて糖尿病性壊死の回復という臨床応用研究を報告しており⁹、



図 9 ラット皮膚のトマトレクチン陽性細胞数 Fig. 9 Tomato lectin positive cells of rat skin.

我々の実験もそれを踏襲した結果となった.この報告では、プラ ズマの発生に伴って生じる一酸化窒素(NO)が血流の回復や血 管の弛緩に寄与することで創傷を治癒させると予想していた.し かし、我々の実験では、この結果以外にも血管内皮細胞の増殖 促進および遺伝子発現の変化を捉えていることから、単純な血 管拡張効果にとどまらない細胞レベルでの変化が起こっていると 考えられる.

そこで, 我々は, このラット皮膚に対して新生血管内皮特異的 に結合するトマトレクチンを用いて蛍光染色を行った. その結果, 未照射のラットと比較して, プラズマ照射群のラット皮膚において より多くの新生血管が観察された(図 8). 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, 総血管数 における新生血管の割合をグラフ化したところ, 図9に示すように, プラズマ照射群のラットでは, 非照射群ラット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.

これらの結果から、大気圧プラズマ照射により生じる「細胞増 殖活性化」や「創傷治癒促進」は、単純な NO による血流改善や 血管拡張効果のみに由来するものではなく、よりミクロな細胞レ ベルでの遺伝子発現変化を引き金として「血管新生」という積極 的な組織回復を行っていることが示唆された。

4. まとめ

本研究は、マイクロスポットプラズマ発生装置を用い

- 1. 血管内皮細胞の増殖への影響
- 2. 損傷した生体組織の再生

を検討したものであり、その結果、以下の事柄を明らかにした.

- (1) 血管内皮細胞に対するプラズマ照射処理により、細胞 倍加時間が短縮される.
- (2) ラット体表面に形成した火傷に対してプラズマイオン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見られる.
- (3) これらの現象は, FGF-2/VEGF 系によって引き起こされ る血管新生作用である可能性が示唆された.

これらの効果が発現するメカニズムについては不明であ るが、大気圧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、その刺激によって細胞内 の遺伝子が発現し、これらの因子が細胞増殖の活性化や内因 性一酸化窒素合成酵素などの産生を促しているという説が考 えられる^{11,12)}.このことは、単純に大気圧プラズマ源によっ て発生した一酸化窒素を作用させることとは異なり、生体あ るいは細胞自らの生理作用を変化させているということであ る.今後は、プラズマ源の何が生体に作用しているのかを調 査し、治癒メカニズムを明らかにしていくことを目標とする. これらのことが明らかになれば、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」新 しい治療法を生み出すことも可能になるだろう.

なお、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

- M. Laroussi: Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. Plasma Process. Polym., 2 (2005) 391.
- H. Yasuda, M. Hashimoto, M.M. Rahman, K. Takashima and A. Mizuno: States of biological components in bacteria and bacteriophages during inactivation by atmospheric dielectric barrier discharges. Plasma Process. Polym., 5 (2008) 615
- S. Ikawa, K. Kitano and S. Hamaguchi: Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. Plasma Process. Polym., 7 (2010) 33
- J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, Th. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen and K-D. Weltmann: Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. J. Phys. D: Appl. Phys., 44 (2011) 013002
- Y. Sakai, V. Khajoee, Y. Ogawa, K. Kusuhara, Y. Katayama and T. Hara: A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. J. Biotechnol., **121** (2006) 299
- G Fridman, G Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets and A. Fridman: Applied Plasma Medicine. Plasma Process. Polym., 5 (2008) 503
- S. Kalghatgi, G Friedman, A. Fridman and A.M. Clyne: Endothelial cell. proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast. growth factor-2 release. Ann. Biomed. Eng., 38 (2010) 748
- 8) 筒井千尋,平田孝道,小町俊文,岸本拓巳,森 晃,秋谷昌宏,山本俊昭,田口 亮: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.静電気学会 誌,35(2011)20
- 9) N. Ferrara and T. Davis-Smyth: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr. Rev., **18** (1997) 4
- 10) G. Seghezzi, S. Patel, C.J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E.S. Robbins, R.L. Shapiro, A.C. Galloway, D.B. Rifkin and P. Mignatti: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. J. Cell Biol., **141** (1998) 1659
- D.S. Gelinas, P.N. Bernatchez, S. Rollin, N.G. Bazan and M.G. Sirois: Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. Br. J. Pharmacol., 137 (2002) 1021
- J.D. Hood, C.J. Meininger, M. Ziche and H.J. Granger: VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. Am. J. Physiol., 274 (1998) H1054