

大気圧低温プラズマ照射処理を行った 生理食塩水が低酸素脳症モデルラットに与える影響

松田 清香^{*、1}, 細井戸 健人, 小林 千尋, 森 晃

(2018年9月13日受付; 2019年2月18日受理)

Influence of Physiological Saline Solution Subjected to Atmospheric Pressure Low Temperature Plasma Irradiation on Hypoxic Ischemic Encephalopathy Model Rats

Sayaka MATSUDA^{*,1}, Kento HOSOIDO, Chihiro KOBAYASHI and Akira MORI

(Received September 13, 2018; Accepted February 18, 2019)

Atmospheric-pressure plasmas are currently applied in clinical settings such as burn healing, in many cases, without any explanation for its mechanism. In preceding studies, it has been reported that the atmospheric pressure plasma generates angiogenesis of the damaged region. The purpose of our study is whether the atmospheric-pressure plasmas is effective to Hypoxic Ischemic Encephalopathy (HIE). Plasma irradiated physiological saline was used as a method of treatment of HIE. Administration of the plasma irradiated physiological saline improved the part where damage was received by HIE. This effect may be caused by nitrogen oxide of the physiological saline by plasma irradiation.

1. はじめに

原子や分子が陽イオンと電子に電離した状態であるプラズマは、エネルギーの極大性・高い活性などの様々な性質を持つことが知られている。近年、大気圧低温プラズマ（気体の温度が室温に近い大気圧プラズマ）の医療応用を目指し研究が行われている¹⁾。大気圧低温プラズマは医療分野において材料改質や医療器具の滅菌の他、生体の組織や細胞などに対して用いることで疾患や創傷部位に対する治療への応用が期待されている²⁻⁷⁾。

プラズマによる治療効果は、プラズマの性質が関与していると考えられている⁸⁻¹²⁾。しかし、プラズマによる生体の治療機序については未だ不明な点が多く、明確な根拠が得られていないのが現状である。

我々の研究グループでは、プラズマによる治療機序を解明する手段として、大気圧低温プラズマを実験動物や細胞に照射した実験結果から情報を集めている。大気圧低温プラズマを用いた先行研究より複数の作用が判明した¹³⁾。ラットに作製した熱傷に対してプラズマ照射した実験では血管新生を伴う熱傷治療促進作用が確認された^{14,15)}。また、ラットに対してプラズマ吸入した実験では動脈血酸素飽和度 (SpO₂) の増加作用及び血行動態の変化が確

認された¹⁶⁾。

具体的な疾患治療の先行研究としては、Drexel 大学より、プラズマをヒトの皮膚に照射することで難治性皮膚病の治療傾向が報告されている¹⁷⁾。また、低温プラズマの照射によりマウスの腫瘍の増殖を遅らせ、延命効果をもたらすようながん治療分野の成果も報告されている¹⁸⁾。

本研究では、低酸素脳症 (HIE: Hypoxic Ischemic Encephalopathy) を対象疾患として検討を実施する。HIE は、有効な治療方法が確立されておらず、効果的な治療法の発見が必要とされている疾患である。HIE に対して大気圧低温プラズマを投与することで HIE の要因となる脳内の虚血・低酸素状態が改善されれば、脳機能の保持・回復が期待できる。

本稿では HIE モデルラットに対して、プラズマ照射処理を行った生理食塩水を用いた。プラズマ照射処理を行った生理食塩水を投与したことによる HIE への影響とプラズマ照射を行った生理食塩水に対する検討を通して生体、特に HIE に対するプラズマの影響因子の推定を行う。なお、生体への投与方法として先行研究にて検証された吸入と、本稿にて提唱する血管内への投与でプラズマの吸収の過程は同一とはいえない。しかしながら、肺もしくは表皮細胞からプラズマによる産生物が血管内に吸収される場合と、プラズマによる産生物が血管などに直接導入される場合は、どちらもプラズマによって産生した物質が血管内に含まれる点では類似する箇所があるといえる。つまり、プラズマが持つ何らかの作用には吸入と血管内への投与とで類似する箇所と大きく異なる箇所が両立していると考えられる。

キーワード: 大気圧プラズマ, プラズマ医療, 低酸素脳症

^{*} 東京都市大学大学院工学研究科生体医工学専攻

(〒158-8557 東京都世田谷区玉堤 1-28-1)

Graduate School of Engineering, Major in Biomedical Engineering, Tokyo City University, 1-28-1 Tamazutsumi, Setagaya-ku, Tokyo 158-8557, Japan

¹ g1781424@tcu.ac.jp

本稿では、初めにHIEについて述べ、次にHIEモデルラットの作製方法について述べる。その後プラズマ照射処理の方法及びHIEモデルラットへの投与方法と結果を述べる。最後にプラズマ照射生理食塩水を用いた実験とその結果を示し、プラズマがHIEに与える影響について考察を行う。

2. HIEとは

HIEは、心停止、窒息などにより脳の血流停止・低下が起き脳で低酸素状態や虚血状態などが継続した結果起こる脳疾患の1つである。

新生児期に意識障害や呼吸障害がみられる状態は新生児脳症と総称される。新生児脳症は1,000人の出生に対し1~6人程度で発生する。新生児脳症を発生した場合、50~80%はHIEに分類される^{19,20)}。脳が低酸素状態、もしくは虚血状態に陥った場合、神経細胞や周囲の血管などが障害される。HIEの治療方法としては対症療法しか存在しておらず、積極的な治療方法は現状存在しない。また、有効な対症療法の一つである脳低温療法は重症のHIEに効果が少ないことや治療可能な時間が短いことなどの欠点も確認されており、より効果的な治療法の発見が必要とされている。このような病態を持つHIEはプラズマによる生体への好ましい影響として挙げられる血管拡張や血管新生の促進、SpO₂の増加が良好に働く可能性が高いと考えられる。また、HIEの改善が見られた場合にプラズマが実際の生体組織や組織内を通る血管に対しても効果を有することが確認できるため適切な対象疾患であるといえる。

次章よりHIEモデルラットに対する具体的な検討方法を述べる。

3. HIEモデルラットに対する大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の投与

HIEモデルラットにプラズマ照射生理食塩水の投与実験の方法および結果、考察を示す。本稿に記載の動物実験は本学倫理委員会の承認の下、適切な被験動物の取り扱いに留意して行われたものである。

3.1 HIEモデルラットの作製方法

実験に使用するHIEモデルラットの作製を行った。本処置には、1週齢の新生児ラット（wistar, SPF）を使用した。ラットのような齧歯類は低酸素環境に強い低酸素負荷を虚血負荷と共に行った²¹⁾。

まず、ラットが動かないようにセボフレン（セボフルラン）を用いて全身麻酔を行った。虚血負荷は左総頸動脈を2回結紮することによって行った。低酸素負荷は、低酸素環境に曝露させることで行った。低酸素環境は、Fig.1に示すように保育器を用いた装置に、ラットを収容

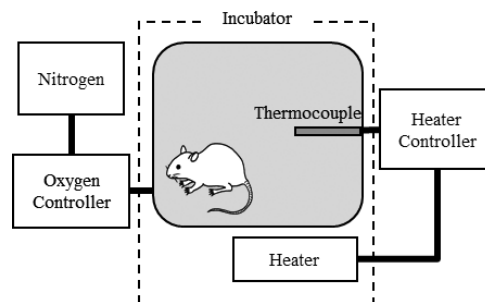


図1 低酸素負荷環境
Fig.1 Schematic diagram of low oxygen load.

し気温37℃、酸素濃度8%、窒素濃度92%の低酸素環境下に、2時間曝露させた。酸素および窒素濃度の調整には小動物実験用酸素コントローラ（Oxygen controller, ProOx M110, BioSpherix）を用いた。本装置は、低酸素環境を作製する際は窒素を供給することで濃度調整を行う装置であるため窒素ガスボンベと組み合わせて使用した。

以上のHIEモデルラット作製処置を行ったラットを本稿ではHIEモデルラットと呼称する。

3.2 生理食塩水への大気圧低温プラズマ照射処理方法

プラズマは、以下に示す方法で発生させた。発生装置は、矩形波発振器（Pulse Generator, WAVE FACTORY 1941, 株式会社エヌエフ回路設計ブロック）・電圧増幅器（HVPS: High Voltage Power Supply, HAVA4321, 株式会社エヌエフ回路設計ブロック）・ガス流量調節器（MFC: Mass Flow Controller, FCST1005FC-4F2-F1L-H, コフロック株式会社）を用いた。プラズマの発生時には、Heガスを流入させることでHeガスボンベからプラズマ発生部に至る流路内をHeガスで満たした。大気圧低温プラズマの発生部には、プラズマ発生部の内径が8 mm、先端部の内径が1 mmのガラスキャピラリーを用いた。ガラスキャピラリー内部には直径1 mmの円柱形状のタングステン電極を導入し、ガラスキャピラリー外部には筒状のタングステン製の接地電極を設置した同軸構造である。電極にパルス幅100 μsの正負両極パルス電圧を印加させることでプラズマを発生させた。本研究で用いる装置は、タングステン電極-接地電極間でのみプラズマを放電し生成した活性種を、ガラスキャピラリー先端から吹き流す機構である。Fig.2に大気圧低温プラズマ発生装置の概念図を、Table 1に大気圧低温プラズマの発生条件を示す。

塩化ナトリウム量4.5 g/500 mL、電解質濃度Na⁺, Cl⁻各154 mEq/L、pH4.5~8.0の生理食塩水（大塚生食注、大塚製薬株式会社）をプラスチック製の容器（15 W×10 D×20 H mm）に対し1.6 mL注入した。また、容器中の気相に対する外気の流入などの影響を防ぐため容器に対しプラスチックパラフィンフィルム（パラフィルム、

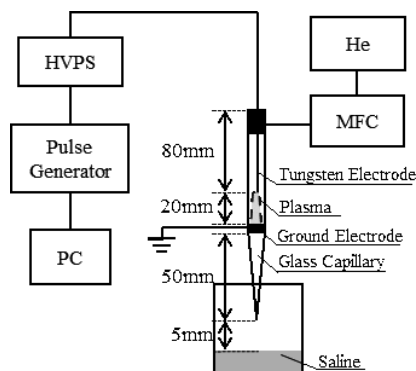


図2 プラズマ発生装置の概念図

Fig.2 Model of atmospheric pressure plasma irradiation to normal saline.

表1 大気圧低温プラズマの発生条件

Table 1 Set value of plasma generator.

Gas	Flow	Voltage
He	1 (L/min)	8 (kVp-p)
Frequency	Waveform	Treatment time
5 (kHz)	square	300 (sec)

Chicago, Pechiney Plastic Packaging Company) を用いて蓋をした。プラスチックパラフィンフィルムの蓋に対してガラスキャピラリーの先端のみが入る穴をあけるように刺入した。ガラスキャピラリーの先端は液面より5 mm 上方に位置しプラズマの副生成物である活性種を吹き付けた。本手法によって処理を行った生理食塩水を本稿では大気圧低温プラズマ照射生理食塩水と呼称する。なお、類似の研究報告として殺菌・がん治療などの効果を目的とした PAM (Plasma activate medium, 大阪大学, 名古屋大学) が報告されている。しかし、本研究とは母ガスが異なる点、プラズマ発生条件が異なる点、対象および対象疾患が異なる点で大きく異なる²²⁾。特に対象疾患に着目すると、本研究のように HIE を対象としプラズマによる治療効果を検討する報告は確認されておらず、本研究の独自性といえる。

3.3 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水のHIEモデルラットへの投与方法

対象臓器である脳に近く血管系への吸収が期待される脳室内投与が HIE モデルラットを生存させた状態で行える投与方法であるためこれを実施した。脳室とは側脳室・第三脳室・第四脳室のことをいう。脳室液は脳室内を循環しており各脳室への投与の差はないと考えられる。以下に投与方法を簡潔に示す。

モデルラット作製処置の直後に 0.05 mL のプラズマ照射生理食塩水を側脳室に投与した。投与は 27 G の注射針を用いて頭皮の上から頭蓋を貫き行った。

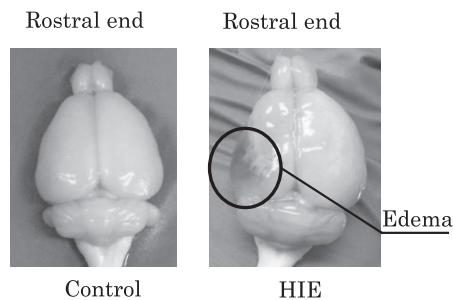


図3 脳浮腫

Fig.3 Left brain edema.

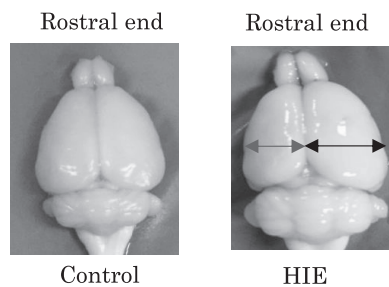


図4 脳萎縮

Fig.4 Left brain hemisphere atrophy.

3.4 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水のHIEモデルラットへの投与結果

前章記載の条件で投与を行った HIE モデルラットに対して投与 21 日後、病理解剖にて HIE 病態の評価を実施した。HIE 発症によって、脳の外見に変化が生じることが先行研究より明らかである。よって、脳の外見的变化を確認するために脳摘出を行った。

ラットに腹腔投与による全身麻酔を行った。細胞・組織の自己腐敗を防ぎ、生きている時の状態に近いまま安定化させることを目的に固定を行った。固定法は、10% 中性ホルマリン液を使用し灌流法を用いた。

固定した脳の摘出を行った。先行研究よりモデルラットの HIE 病態として脳浮腫および脳萎縮が確認されている。Fig.3 に脳浮腫、Fig.4 に脳萎縮を示す。本研究において作製されるモデルラットは左総頸動脈を結紮することによる負荷を行っていることから、左脳にのみ病態が確認されることが明らかになっている。そのため Fig.3 に示す脳浮腫では、左脳の脳実質が水分に置換し、欠損していることがわかる。Fig.3 の図中に円で囲った部分は脳実質が水分に置換され、透明化し背景が透けている。また、Fig.4 に示す脳萎縮では、右脳に比べ左脳が小さく萎縮していることがわかる。Fig.4 図中に示した矢印の長さの左右差からも左脳が右脳と比較し小さい。本研究では、CT (LCT-200, 日立アロカメディカル株式会社) を用いることで左右半球の面積比や左右半球の直径比を計測することで定量的に判断している。モデ

表2 病理解剖結果

Table 2 Pathological autopsy result.

	Brain hemisphere Atrophy	Edema
Control (n=6)	0%	100%
Plasma (n=6)	33.3%	66.7%

ルラット作製処置を行った個体と未処置の個体の左右半球を計測，比較するとモデルラット作製処置を行った個体（n=10）は5%～10%の差，未処置の個体（n=10）は0%～3%の差が左右半球で確認されている．そのため，本研究では単純CTを用いて計測を行い左右半球で5%以上差がある場合を脳萎縮としている．Fig.3, 4より脳浮腫は脳萎縮と比較して脳の実質が水分に置換し，欠損していることから重度の病態であると考えられる．

Table 2 に大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を投与した投与群と He のみ照射した生理食塩水を投与したコントロール群の病理解剖結果の比較を示す．

Table 2 よりコントロール群では重度の病態である脳浮腫を示す個体のみが確認されたが，投与群ではより軽度の病態である脳萎縮を示す個体が存在することがわかる．つまり，大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を投与することによってHIEの症状が軽減する可能性が示された．

また，投与した結果，投与を行った両群とも全ての個体が病理解剖を実施する投与後21日間まで生存した．

3.5 プラズマ照射生理食塩水に対する検討

前項よりプラズマ照射生理食塩水をHIEモデルラットに投与することでHIEの症状が軽減された可能性があるという結果が得られた．本章では本稿のプラズマ照射処理の方法を用いた際のプラズマ照射生理食塩水の特性を調査するため行った実験の方法及び結果，考察を示す．

3.5.1 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の含有物調査実験

プラズマ照射によって生成する物質として窒素酸化物（Nitrogen Oxides）が挙げられる．窒素酸化物は，二酸化窒素に代表される強い酸化作用による細胞毒性に由来する生体への悪影響が知られている．しかしながら窒素酸化物の一種である一酸化窒素においては生体内での生理機能に関与していることが明らかであり，特に血管拡張作用が知られている．これらの物質がプラズマ照射生理食塩水中に確認できることは明らかであるが，その含有量を調査することでHIEに好影響を与えた因子に窒素酸化物が含まれるか否かを検討する．また，プラズマの照射によって産生される主要な化合物である過酸化水素についても測定を実施し，含有の有無を検討する．

大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の作製は前章記載

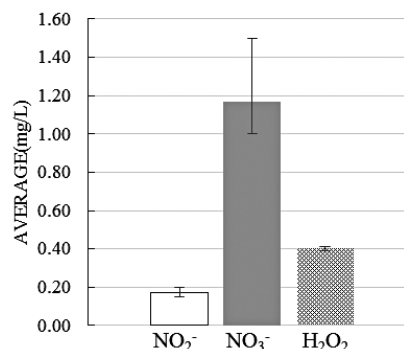


図5 窒素酸化物および過酸化水素の濃度

Fig.5 Content of nitrogen oxide and hydrogen peroxide.

図中のエラーバーは各回 n=4 のデータ区間を示す．

の通りの方法で行った．作製した大気圧低温プラズマ照射生理食塩水に対し，バックテストおよびデジタルバックテスト（共立理化学研究所）を用いて含有されている亜硝酸イオンと硝酸イオン，過酸化水素の量を測定した．なお，最も有効性が見込まれる一酸化窒素は不安定な物質であり本稿記載の方法では測定できないため，今回はそれに準ずる窒素酸化物を測定した．プラズマ照射による生理食塩水中の窒素酸化物および過酸化水素の濃度をFig.5に示す．なお，照射以前の各物質の含有量は，窒素化合物は検出不能，H₂O₂は0.10 mg/lであった．

Fig.5より本稿の実験系を用いて，プラズマを照射することによる窒素酸化物および過酸化水素の産生とプラズマ照射によって産生された化合物が生理食塩水に溶解する量が得られた．

結果として，過酸化水素量はヒトおよびラットの血中含有量の下限值と同様であり，血中への投与によって大きな影響を及ぼす量とはいえず，血中の過酸化水素分解作用によって処理可能なレベルと考えられる²³⁾．

また，プラズマ照射によるpHの変化についてコンパクト型水質計（LAQUAtwin-pH-11B, HORIBA）を用いて測定を実施した．プラズマ照射以前のpHが6.5であったのに対し，プラズマ照射後のpHは6.7であった．これはプラズマ照射によって生じた物質によってpHが変化したものと考えられる．なお，上記のpHの変化は使用した生理食塩水の保証pH範囲内であり，かつ照射前後で性質の変化がないことから個体への影響は限りなく低いと考えられる．

3.5.2 プラズマ照射生理食塩水による血球細胞毒性の調査

前項より大気圧低温プラズマ照射生理食塩水に含まれる窒素酸化物量を確認した．今回の検討においてプラズマ照射生理食塩水は血中に直接投与されており，細胞および生体への悪影響が無いとは断言できない．

そこで大気圧低温プラズマ照射生理食塩水とラットの

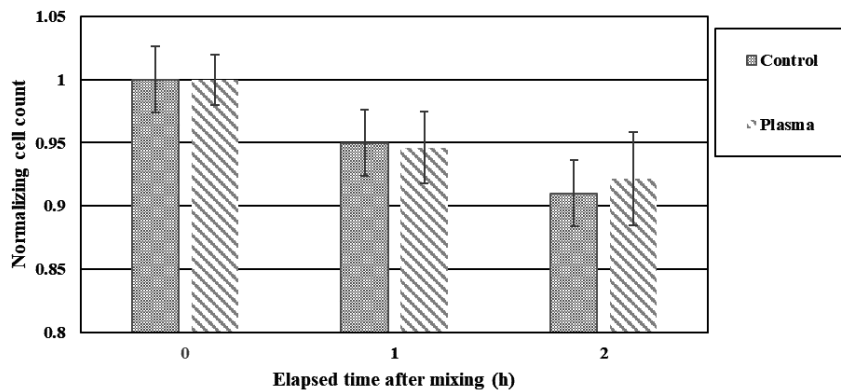


図6 混合後の血球数の変化

Fig.6 Changes in the Blood cell count after mixing.

図中のエラーバーは各回 n=3 のデータ区間を示す。

血液を混和させ血球細胞が特異に損傷されるかの調査実験を実施した。

3.2節に示す方法で大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を作製した。また、ラットから採取した血液に血液凝固を防ぐためのヘパリン添加生理食塩水を加えたラットの血液サンプルを作製した。その後、大気圧低温プラズマ照射生理食塩水とラットの血液サンプルを1:1の割合で混和した。作製した混和物から一定時間経過毎に微量を抜き出し、顕微鏡を用いて血球を計数した。コントロール群として同様の手順でHe照射生理食塩水を混和したものを使用した。作製した混和物は赤血球の安定保存温度である2~6℃に保って保管し、混和から2時間経過まで観察を行った。顕微鏡で計数した結果をFig.6に示す。なお図中のエラーバーは各回、計数位置を3回変更し測定したもののデータ区間のばらつきを指したものである。また、時間経過による減少量を示すために計数した細胞から算出される平均含有血球量では無く、測定開始時の血球量で正規化した値を用いた。

Fig.6より、大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を混和したことによる明らかな細胞の減少を確認することはできなかった。つまり、大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を混和することによって明らかな血球細胞への毒性はないものと考えられる。従って、プラズマ照射生理食塩水の脳室内投与によって赤血球に対する悪影響は存在せず、何らかのプラズマ照射による影響がHIEに対し、ポジティブな効果を示したと考えられる。

3.5.3 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水がHIEに与える影響因子の推定

以上より大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の投与によるHIEの症状軽減効果と大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の生体への影響の一端を確認することができた。

上記の結果を基にすると、大気圧低温プラズマ照射生

理食塩水を脳室内投与することによって「低酸素脳症の要因となる現象の緩和」もしくは「低酸素脳症によって損傷した部位の改善」が起きたものと考えられる。

「低酸素脳症の要因となる現象の緩和」として挙げられる効果は大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の投与によって血管拡張作用が生じ、血流が回復することが仮説の1つとして挙げられる。この仮説の場合、影響因子は一酸化窒素であると考えられる。実際に大気圧低温プラズマ照射生理食塩水中には一酸化窒素の半減体である硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの存在が確認されている。しかしながら一酸化窒素は液体に溶けにくく、また不安定で半減期が短い物質であることが知られている。これらを踏まえると必ずしも一酸化窒素が効果の主な影響因子では無い可能性も示唆される。

「低酸素脳症によって損傷した部位の改善」として挙げられる効果は大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の投与によって複数の化学物質が脳室内液および脳血管内に生じたことが刺激となり、何らかの内因性作用の興奮を引き起こすことで細胞の修復が促されたことが仮説として挙げられる。この仮説の場合、大気圧低温プラズマ照射によって生理食塩水中に生じる物質の経時的な解析とそれが血球や生体内環境に及ぼす影響をより精緻に検証する必要がある。本研究の結果のみで推定することは困難であるといえる。

4. おわりに

本研究は、大気圧低温プラズマ照射生理食塩水を用い

1. HIEモデルラットへの脳室内投与による影響
 2. 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の窒素酸化物量
 3. 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水の細胞毒性
- 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) HIEモデルラットに対する大気圧低温プラズマ照射

生理食塩水の脳室内投与により, HIE 症状が軽減される.

- (2) 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水中に硝酸イオン・亜硝酸イオンなどの窒素酸化物が産生されている.
- (3) 大気圧低温プラズマ照射生理食塩水は明らかな血球細胞毒性は無く, (1) に示す現象は窒素酸化物によって引き起こされる血管拡張などのプラズマ照射による影響の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. しかしながら, 大気圧プラズマにより生じたイオンやラジカルが空気中の分子や生理食塩水の分子へ衝突することにより, その刺激によって化学反応や物質の合成が促され, それによって産生されたなんらかの因子が細胞増殖の活性化や血管拡張や血流の増加などに関与する内因性一酸化窒素合成酵素の産生を促しているという説が考えられる. これは, 単純に一酸化窒素をバブリングさせた生理食塩水を投与することとは異なり, 複雑なバランスで生理食塩水に変化が生じている可能性を示すものである.

今後は, プラズマを照射することによってどのような作用が生じているのかを調査し, HIE に確認された症状軽減の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, これまでの消極的な対症療法のみであった HIE の療法とは一線を画する新しい積極的治療法を生み出すことも可能になるだろう.

参考文献

- 1) 浜口智志: プラズマ医療におけるプラズマ生体相互作用. *J. Plasma Fusion*, **87** (2011) 696
- 2) N. Takahashi, T. Nakai, Y. Satoh and Y. Katoh: Variation of biodegradability of nitrogenous organic compounds by ozonation. *Water Research*, **28** (1994) 1563
- 3) H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takasima and A. Mizuuno: Biological Evaluation of DNA Damage in Bacteriophages Inactivated by Atmospheric Pressure Cold Plasma. *Plasma Processes and Polymers*, **7** (2010) 301
- 4) T. Sato, T. Miyahara, A. Doi, T. Urayama and T. Nakatani: Sterilization mechanism for *Escherichia coli* by plasma flow at atmospheric pressure. *Applied Physics Letters*, **89** (2006) 073902
- 5) 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 Processes and Polymers*, **7** (2010) 33
- 6) T. Shimizu, Y. Sakiyama, D. Graves, J. Zimmermann and G. Morfill: The dynamics of ozone generation and mode transition in air surface micro-discharge plasma at atmospheric pressure. *New Journal of Physics*, **14** (2012) 1-11
- 7) Y. Sakai, V. Khajoe, Y. Ogawa, K. Kusuha, Y. Katayama and T. Hara: A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. *J. Biotechnol*, **121** (2006) 299
- 8) 平田孝道, 筒井千尋, 金井孝夫, 工藤美樹, 岩下光利, 森 晃: 3. 大気圧プラズマによる組織の活性化と医療応用. *J. Plasma Fusion Res.*, **91** (2015) 771
- 9) 勝木 淳, 高木 浩, 浪平隆男: パルスパワー技術の応用. *プラズマ・核融合学会誌*, **87** (2011) 268
- 10) M. Jaroszeski, R. Heller and R. Gilbert: *Electrochemotherapy, Electro-genotherapy and Transdermal Drug delivery*, Humana Press, **37** (2000) 497
- 11) R. Nuccitelli, U. Pliquett, X. Chen, W. Ford, R. James Swanson, S.J. Beebe, J.F. Kolb and K.H. Schoenbach: Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343** (2006) 351
- 12) J. Zhang, P. F. Blackmore, B. Y. Hargrave, S. Xiao, S. J. Beebe and K. H. Schoenbach: Nanosecond pulse electric field (nanopulse): A novel non-ligand agonist for platelet activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **471** (2008) 240
- 13) G.G. Ginsberg, A.N. Barkun, J.J. Bosco, J.S. Burdick, G.A. Isenberg, N.L. Nakao, B.T. Petersen, W.B. Silverman, A. Slivka and P.B. Kelsey: The argon plasma coagulator February 2002. *Gastrointestinal Endoscopy*, **55** (2002) 807
- 14) 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
- 15) 筒井千尋, 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: マイクロスポットプラズマ源による血管新生の促進. *静電気学会誌*, **36** (2012) 235
- 16) H. Saitou: Plasma Conference 2014, Niigata/Japan, 18PB-068 (2014)
- 17) G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets and A. Fridman: *Applied Plasma Medicine. Plasma Process and Polymers*, **5** (2008) 503
- 18) 田中宏昌, 水野正明, 豊國伸哉, 丸山彰一, 小寺泰弘, 足立哲夫, 寺崎浩子, 加藤昌志, 吉川史隆, 堀 勝: 4. プラズマ活性溶液の細胞影響. *J. Plasma Fusion Res.*, **91** (2015) 776
- 19) 医療情報科学研究所: 病気が見える Vol.7 脳・神経 第1版. pp.1-213, メディックメディア出版 (2011)
- 20) J. J. Volpe: Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.*, **72** (2012) 156
- 21) 脇田 諭, 渡邊寛輝, 松田清香, 森 晃, 和多田雅哉, 平田孝道, 小林千尋: 大気圧低温プラズマによる低酸素脳症治療効果の検討に向けたモデルラットに対する評価方法の検討. *日本 AEM 学会誌*, **25** (2017) 149-150
- 22) N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno and M. Hori: Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **605** (2016) 102-108
- 23) S. D. Varma and P. S. Devamanoharan: Hydrogen peroxide in human blood. *Free Radic Res Commun.*, **14** (1991) 125-131