大気圧低温プラズマ生成電圧条件の変化に伴う活性種量の変動が皮膚損傷の治癒に与える影響

電気・化学専攻　医用工学領域　2281275　深澤　猛
(主査：森　晃 教授　副査：小林　千尋 講師，坂口　勝久 准教授)

1. 緒言

皮膚損傷とは外的/内的要因で起こる皮膚組織の物理的な損傷を指す。皮膚損傷は，創閉鎖の長期化により細菌やウイルスが侵入することで，創感染を引き起こす。また，創感染の症状に加え，加齢や睡眠不足，過度なストレス，疲労など免疫力が低下することで，菌血症や敗血症などの疾患に繋がる可能性がある。従って，皮膚損傷には治癒期間の短縮が求められる。従来の皮膚損傷の治療法として，被覆材を使用する方法に加え，消毒薬を使用する方法がある。被覆材は，傷口を乾燥させず痂皮を形成しないため，傷痕を残さず再生させる効果がある。しかし，長期間の貼付により傷口の滲出液が炎症反応を引き起こし，治癒の経過を遅らせる原因となる。加えて，密閉状態を保つため，繁殖する嫌気性菌が増殖し，創感染を発症する危険性が高まる。一方，消毒薬は病原体を死滅させ，化膿を防止する効果がある。しかし，正常な組織や細胞に対しても毒性を示すため，炎症細胞の死滅や線維芽細胞の増殖抑制に繋がり，治癒の経過を遅らせる原因となる[1]。加えて，病原体だけでなく常在菌も死滅させるため，創感染発症の危険性が高まる。そのため，皮膚損傷には新規治療法が必要であると考えた。特に，新規治療法の中でも，再生医療に関する効果が報告されている大気圧低温プラズマ(ALTP：Atmospheric Low Temperature Plasma)に着目した。本研究では，皮膚損傷に対する適切な電圧条件(波高値，Duty 比)及び ALTP の治療効果の検討を目的とする。本稿では，電圧と治療効果の関係，皮膚損傷に対する ALTP の有効性，電圧条件の違いが皮膚損傷の治癒に与える影響について述べる。

2. 電圧条件と治療効果の関係

2.1 ALTP 生成条件の選定

ALTP の生成原理より，ALTP の生成量は電極に印加される電圧の大きさに関係することが考えられる[2]。本研究では，電圧と比例関係にある電界に着目し，関係式の導出を行う。ALTP の生成にあたり，α 作用と γ 作用が ALTP の生成量に影響を与える。α 作用は，電極間に満たされたガスと電子の衝突電離により電子数が倍増する性質である。一方，γ 作用は陰極に 1 つの正イオンが衝突することで，陰極から複数の電子が放出される性質である。そこで，ALTP 生成には α 作用，γ 作用に関与するガス種と電子の衝突回数が重要と考える。式 2 に$\alpha = \alpha$係数(衝突電離の回数)，A, B =定数(電極間の気体に依存)，E[V/m] =電界，p[Pa] =圧力の関係式を示す。(E>0，p>0)

$$\alpha = pA\exp\left(-\frac{\beta}{E/p}\right) = pAe^{\left(-\frac{\beta}{E/p}\right)} \qquad (1)$$

式 1 より，衝突電離の回数は電界強度と圧力に依存する。本学の ALTP 発生装置は

He ガスの電離により ALTP を生成しているため，パッシェンの法則より定数 A，B の値はそれぞれ A=2.26$[m^{-1}\,P_a^{-1}]$, B=25.6$[V/(mPa)]$となる。式 3 にn[個$/m^3$] =電子数密度，n_0[個$/m^3$] =初期電子数, $\alpha = \alpha$係数(衝突電離の回数), $x[m]$ =移動距離の関係式を示す。

$$n = n_0 \mathrm{e}^{\alpha x} \qquad (2)$$

式 2 より，電子数密度は衝突電離の回数と正の相関がある。そのため，陽極に到達する電子数密度は，衝突電離の回数と同様に電界強度と圧力に依存する。従って，電圧値の上昇に伴い ALTP 生成が活性化すると考えられる。また，ALTP 生成量の増加に伴い，ALTP と大気中の窒素や酸素の衝突により生じる活性種量の増加が見込める。そこで，ALTP 生成条件の 1 つである電圧値を上昇させることで，皮膚損傷に対して高い治療効果が得られると推察した。以上より本研究では電圧条件に着目し，電圧値の高い条件下での ALTP による治癒の促進効果に期待し，最適な照射条件の検討を行う。

3. 電圧条件(波高値)毎の ALTP の治療効果比較実験

本研究では以下の目的で ALTP 照射実験を実施した。

・電圧条件(波高値)と ALTP の治療効果の関係を調査

3.1 実験条件/実験方法

ALTP 生成にはリング電極を用いた ALTP 発生装置を使用する。表 1 に ALTP 生成条件を示す。

表 1　ALTP の生成条件

照射時間 [s]	周波数 [kHz]	ガス流量 [L/min]	照射距離 [mm]	電圧 [kV]	ガス種	波形	Duty 比
60	3.0	1.0	5.0	8，13	He	矩形波	0.5

表 1 の電圧条件の選定にあたり，皮膚障害に関する本学の先行研究において最も治療効果が示唆された 8[kV]に加え，ALTP 発生装置の電圧限界である 13[kV]を本実験で用いる条件とする。また，皮膚損傷モデルラットには Wistar(雄性，SPF，12 週齢)を用いる。対象疾患とする皮膚損傷の深さは表皮から皮下組織までとし，直径 8[mm]の生検トレパンを用いて作製する。作製にあたり，1 匹の皮膚損傷モデルラットに対する損傷箇所は 2 箇所とし, ALTP 照射群と未処置群(control)で治癒経過の比較を行う。また，損傷部に対し，ALTP8[kV]，ALTP13[kV]の二種類の条件で個体毎に ALTP 照射を 24 時間に 1 回の頻度で行った。本実験では control，ALTP8[kV]，ALTP13[kV]の各群 3 匹のモデルラットを用いて，ALTP 照射による治療効果の検討を行った。評価方法として，皮膚損傷の創収縮の速度を比較する面積評価と，細胞の代謝に伴い放出される光子量を比較するバイオフォトン計測の 2 つを実施することで，皮膚損傷に対する ALTP の有効性の調査をする。

3.2 面積の平均変化率による評価

3.2.1 色域による輪郭抽出と面積の測定原理

本研究において測定者に依存しない再現性の高い面積測定を実現するため，自動輪郭検出プログラムと ImageJ を用いて面積評価を行った。自動輪郭検出プログラムにより，

設定した閾値を基準に皮膚と皮膚損傷の境界を検知し，損傷部の輪郭を検出する。その後，輪郭内を全て閾値 255(黒)に変換し，元画像に上書きを行う。閾値 255(黒)に変換後，ImageJ を用いて上書きした画像内から色域(黒：閾値 255)を抽出し，色域領域の面積測定を行う。また，測定した面積から変化率を算出し，皮膚損傷に対する ALTP の治療効果を評価する。変化率は基準とする 0 日目から n 日目までに減少した面積の割合を比率で表すことで算出した。式 3 に面積の変化率の算出方法を示す。

$$\text{変化率}[\%] = \frac{0\text{日目の面積} - n\text{日目の面積}[\mathrm{mm}^2]}{0\text{日目の面積}[\mathrm{mm}^2]} \times 100 \qquad (3)$$

式 3 で算出した各群の面積の変化率の合計を各群の個体数で平均し，control 群と ALTP 照射群の平均変化率を比較することで評価を行う。

3.2.2 実験結果/考察

面積の平均変化率を算出することで面積評価を行った。結果より，ALTP13[kV]は他群と比較し，14 日間を通して面積の平均変化率に上昇傾向が見られた。従って，電圧値が高い程，皮膚損傷の治癒期間短縮に有効である可能性が示唆された。

3.3 バイオフォトン計測による評価

3.3.1 バイオフォトンの概要

バイオフォトンは人や植物などの生物が生命活動に伴い放射する肉眼で観測不可能な微弱な光子である。光子は細胞成長や細胞内情報伝達などの代謝活動に伴う活性酸素を起源として化学発光を行う。また，光子の発光強度は細胞のエネルギー代謝や細胞増殖，生理活性に影響する。特に，光子はミトコンドリアの細胞呼吸における酸化還元の過程で産生された活性酸素に反応し，分解されるエネルギーの脱励起時に発光する。本実験では，ALTP の細胞増殖の促進によるミトコンドリアの早期再生及び生体の活性酸素量の変化に着目し，control 群と ALTP 照射群のフォトン放出総量をフォトンカウンタにより計測を行う[3]。

3.3.2 計測条件

損傷部から放出される光子量をフォトンカウンタにより計測を行った。正確な光子量の計測に当たり，遅延発光による影響を除去する必要がある。遅延発光とは光に曝された物質を暗室に移動した際，光子レベルで発光が持続する現象を指す。そこで，本実験では外部の照明を落とした暗室下且つ 1 回毎の計測間隔を 5 分間空けることで遅延発光による影響を除去し計測を行った。加えて，センサ部と損傷部との距離を 10[mm]，1 回の計測データ数を 1[min]で 600[samples]として計測を行った。

3.3.3 実験結果/考察

皮膚損傷に対する ALTP の有効性の調査を目的として，損傷部に対するフォトン放出量の計測を行い，control，ALTP8[kV]，13[kV]におけるフォトン放出総量の平均変化率を算出した。結果より，ALTP13[kV]は 14 日間を通してフォトンの放出総量が高い傾向が見られた。また，ALTP 照射群は未処置群と比較し Day1，4，9，13 において有意差を確認された。以上より，ALTP から生成された活性酸素種(ROS: Reactive Oxygen Species)及び活性窒素種(RNS: Reactive Nitrogen Species)による細胞増殖の促進効果に伴い，細胞/血流の回復による代謝活動の早期再開が考えられる。特に，再生したミトコンドリア数が増加し，代謝時の活性酸素量が増大したと考える。以上より，ALTP によ

りミトコンドリアから産生される活性酸素が増加し，レドックスシグナル伝達経路を刺激したことで，細胞の生存・増殖に制御が傾いた可能性が考えられる。加えて，ALTPがミトコンドリアを早期に再生し，創閉鎖を促進した可能性が示唆された[5]。

4. 現治療法と新規治療法の治療効果比較実験

本研究では以下の目的で ALTP 照射実験を実施した。

・ALTP と消毒薬の治療効果の比較

4.1 実験条件/実験方法

本実験では未処置群 3 匹，ALTP13[kV]群 3 匹，消毒薬群 3 匹を用いて，ALTP の有効性の検討を行った。評価方法として，面積の平均変化率を算出し創収縮の速度を比較する面積評価と，治癒に関与する成長因子の発現量を比較する RT-qPCR 法を用いた遺伝子発現解析の 2 つを実施することで皮膚損傷に対する ALTP の影響検討を行った。本実験では経過観察用の損傷と遺伝子発現解析用の 2 種類の損傷を作製し，Day4 に後者の損傷に対し直径 8[mm]の生検トレパンを用いて組織採取を行った。

4.2 実験結果/考察

4.2.1 面積の平均変化率による評価

面積の平均変化率を算出することで面積評価を行った。結果より，ALTP 照射群は未処置群と比較し Day8 までの面積の平均変化率に上昇傾向が見られた。加えて，ALTP13[kV]は他群と比較し，14 日間を通して面積の平均変化率に上昇傾向が見られた。従って，ALTP 照射は皮膚損傷に対する治癒期間短縮に有効である可能性が示唆された。

4.2.2 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析により ALTP 及び市販消毒薬が治癒過程に与える影響について評価を行った。ALTP から生成される ROS/RNS は血管新生を促進するとされる。一方，市販消毒薬に含まれるアラントインは毛細血管を含む肉芽組織の形成を促進する。従って，本実験では血管形成の促進に着目し，遺伝子発現解析の対象遺伝子として，血管内皮細胞増殖因子(*VEGF-a*：*Vascular endothelial growth factor-a*)に加え，*VEGF* の上流に位置する低酸素誘導性転写因子(*HIF-1α*：*hypoxia-inducible factor-1α*)を選定した[5]。

結果より，*VEGF-a* の発現量を群毎に平均化した際，全ての群で同程度の遺伝子発現量が確認された。一方，*HIF-1α* の発現量を平均化した際，未処置群に遺伝子発現量が高くなる傾向を確認した。しかし，control 群の 1 つである C2 は，*VEGF-a/HIF-1α* の発現量において他の個体より明らかに高い数値であったため，C2 を除いた傾向の確認も行った。C2 を外した際，治療群の *VEGF-a* の発現量は，未処置群と比較し，増加傾向が見られた。加えて，*HIF-1α* の発現量は ALTP13[kV]群>消毒薬群>未処置群の順で発現量に差異が見られた。以上より，ALTP から生成された ROS/RNS 及び消毒薬に含まれるアラントインが *VEGF-a/HIF-1α* の発現を誘導し，血管新生及び毛細血管の形成を促進した可能性が示唆された。また，C2 の遺伝子発現量が高かった原因として個体差による影響が考えられる。Day4 での C2 の面積の変化率が他の個体と比較し高い水準であった。従って，C2 の *VEGF-a/HIF-1α* の発現量の増加原因として，線維芽細胞/血管内皮細胞の遊走から血管新生に至るまでの過程が早期に完了した可能性が考えられる。

5. 電圧条件(Duty 比)と活性種の関係

本章では，Duty 比の違いによる活性種濃度変化の調査を目的として ALTP 照射実験を実施した。評価方法として，面積の平均変化率，RT-qPCR による遺伝子発現解析，バイオフォトン計測による評価を行う。

5.1 電圧条件と出力電圧の関係

2 章より出力電圧の上昇に伴い ALTP 生成が活性化すると考えられる。特に，出力電圧は ALTP 生成時の波形の違いに伴う出力電圧の変化を利用することで，活性種量の多い ALTP 生成条件の検討を行う。

5.2ALTP 成分分析(Duty 比の比較)

5.2.1 実験条件/実験方法

本実験では，3.3 と同様のデジタルパックテスト(共立理化学研究所)を用いて ALTP 照射溶液中に含まれる HO_2，NO_2，NO_3 の濃度計測を行った。濃度定量における計測条件は，ALTP11[kV0-p](Duty 比 10%)，ALTP11[kV0-p](Duty 比 50%)，ALTP11[kV0-p](Duty 比 90%)とした。本装置の交流波形における最大出力振幅範囲は 1~13[kVp-p](V_{0-p}=±6.5[kV])である。また，本学の ALTP 発生装置のパルス波の機器設定における出力振幅制限は±11[kV_{0-p}]である。そのため，本実験での電圧値は出力振幅制限を考慮し，11[kV0-p]に設定した。また，各条件のサンプル数は 3 とし，測定を行った。

5.2.2 実験結果/考察

He ガスを照射した条件下では最低値を示した。一方，ALTP 群では電圧条件(Duty 比)を変化させたことで，活性種濃度に差異が見られた。また，ALTP11[kV0-p](Duty 比 90%)は他群と比較し，有意に NO_2，NO_3，H_2O_2 の濃度上昇が確認された。以上より，Duty 比及び出力電圧の上昇に伴い，活性種濃度が増加した可能性が示唆された。

6. 出力電圧と治療効果の関係解明

本章では，ALTP の出力電圧と治療効果の関係調査を目的として ALTP 照射実験を実施した。評価方法として，面積の平均変化率，RT-qPCR による遺伝子発現解析，バイオフォトン計測による評価を行う。

6.1 実験条件/実験方法

本実験では control 群 3 匹，ALTP13[kVp-p](V0-p=±6.5[kV])群 3 匹，ALTP11[kV0-p](Duty 比 90%)群 3 匹を用いる。評価方法として，面積評価，バイオフォトン計測，遺伝子発現解析の 3 つを実施した。本実験では経過観察兼バイオフォトン計測用の損傷と遺伝子発現解析用の 2 種類の損傷を作製し，Day3 に後者の損傷に対し直径 8[mm]の生検トレパンを用いて組織採取を行った。

6.2 実験結果/考察

6.2.1 面積の平均変化率による評価

図 1 に個体毎の面積の変化率，図 2 に群毎の面積の平均変化率を示す。

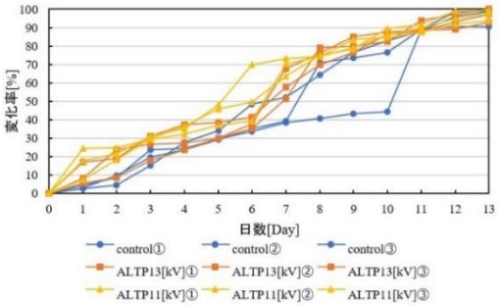


図 1 個体毎の面積の変化率

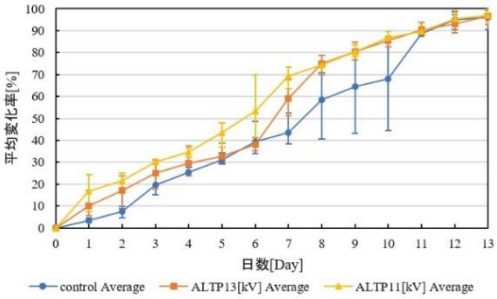
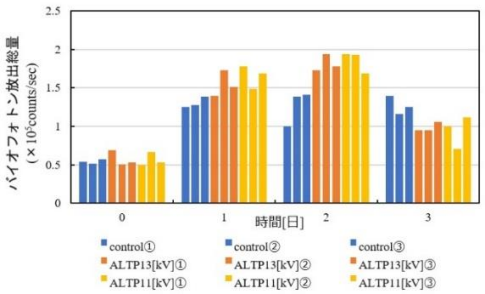


図 2 群毎の面積の平均変化率

図 2 より，6 日目を除き，ALTP 照射群は control 群と比較し平均変化率が上昇傾向にあることが確認された。6 日目以降に再び上昇傾向が見られた理由として，急激な面積変化が起こる痂皮剥離の時期が control 群よりも早期であったことが考えられる。また，ALTP11[kV0-*p*]群は ALTP13[kVp-p]群と比較し 8 日目までの治癒期間が短い傾向が確認された。以上より，出力電圧の違いにより生じる活性種量の差が面積の変化率に影響を与えた可能性が示唆された。

6.2.2 バイオフォトン計測による評価

4，5 章より ALTP 照射は治癒過程の初期段階に影響を与える傾向が見られたため，Day0-Day3 にかけて損傷部に対するフォトン放出総量の計測を行った。図 3 に個体毎の損傷部における平均フォトン放出総量，図 4 に群毎の損傷部における平均フォトン放出総量を示す。



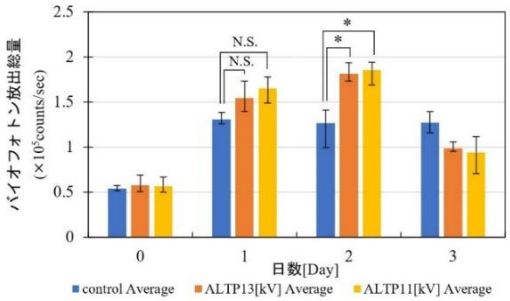


図 3 個体毎のバイオフォトン放出総量 図 4 群毎の平均バイオフォトン放出総量

{control (N=3) ， ALTP11[kV] (N=3)，13[kV](*p<0.05)}

図 4 より，Day2 における治療群のフォトン放出総量は control 群と比較し有意な増加が確認された。従って，治療群は細胞の遊走から増殖までの段階が早期であったため，ミトコンドリアの再生により産生される活性酸素が増大したことで，フォトン放出量が増加した可能性が考えられる。また，Day0-Day3 間において 4･2･2 と同様の傾向が見られたため，再現性の高い結果が得られたと考える。以上より，出力電圧を上昇させたことで生成される ROS/RNS が増加し，細胞増殖及び創閉鎖を促進した可能性が示唆された。本結果より，ALTP から生成された外因性の ROS が細胞や組織表面へ衝突し，受容体の刺激及びシグナル伝達物質の核内への移動することで，転写因子

である *HIF-1α* の活性化され血管新生に関与する遺伝子の発現を誘導したことが考えられる。加えて，遺伝子発現の誘導により，ミトコンドリア由来の内因性の ROS が増加し，レドックス制御が生存・増殖に傾いたことで，血管新生及び細胞増殖が促進したことが示唆された。

6.2.3 遺伝子発現解析

図 5 に個体毎の *HIF1-a* 発現量，図 6 に群毎の *HIF1-a* の発現量を示す。

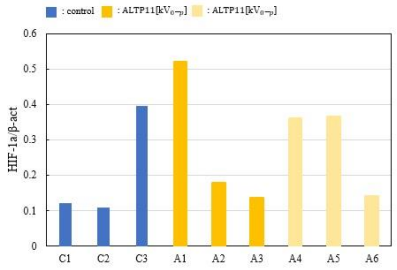


図 5 個体毎の *HIF1-a* 発現量

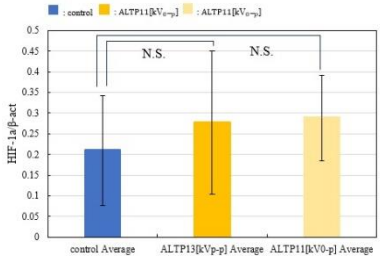


図 6 群毎の *HIF1-a* の発現量

(*p<0.05)(S.D.)(N.S.=not significant)

図 6 に示すように，治療群は control 群と比較し，*HIF-1α* の発現量に増加傾向が見られた。図 7 に個体毎の *VEGF-a* 発現量，図 8 に群毎の *VEGF-a* の発現量を示す。

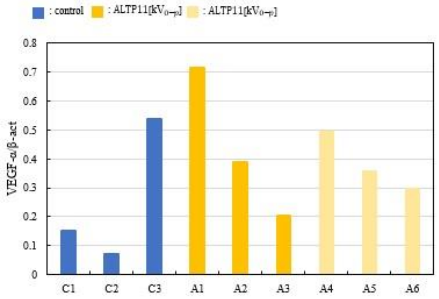


図 7 個体毎の *VEGF-a* 発現量

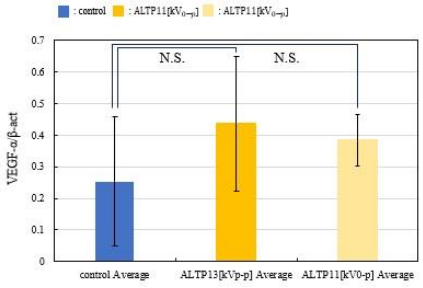


図 8 群毎の *VEGF-a* の発現量

(*p<0.05)(S.D.)(N.S.=not significant)

図 8 に示すように，治療群は control 群と比較し，*VEGF-a* の発現量に増加傾向が見られた。従って，治療群の *HIF-1α/VEGF-a* の発現量増加により血管新生が促進された可能性が示唆された。しかし，個体差による影響が大きく *HIF-1α, VEGF-a* 共に発現量に有意な差を確認できなかったため，今後採取する組織切片の N 数を増やし傾向を再確認する必要があると考える。また，Day2 の治療群は control 群と比較しフォトン放出量に有意な差が見られた。従って，産生された ROS がシグナル伝達のメディエーターとして機能し細胞増殖が促進された可能性が考えられる。治療群は control 群と比較し *HIF-1α*(転写因子)，*VEGF-a*(内因性遺伝子)共に発現量に増加傾向が見られたため，外因性・内因性の ROS の刺激により細胞の生存増殖に制御が傾いたことによる治癒の促進

が示唆された。加えて，面積変化率と遺伝子発現解析の関係を確認するため，組織採取用の損傷において Day0~Day3 までの面積測定を行った。図 9 に個体毎の面積変化率を示す。図 10 に群毎の面積の平均変化率を示す。

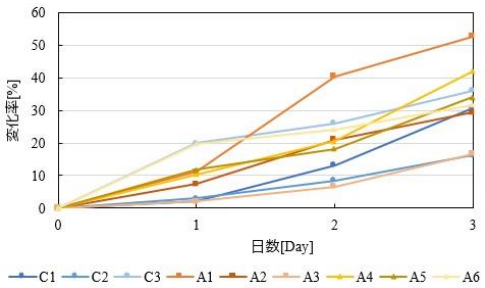


図 9 個体毎の面積の平均変化率

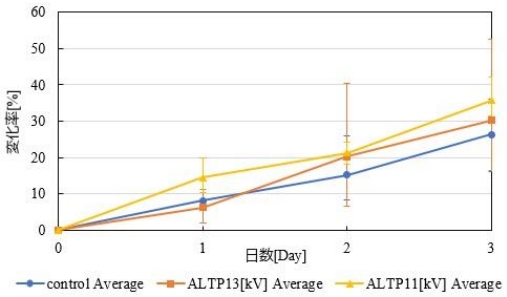


図 10 群毎の面積の平均変化率

図 9 に示すように，A1，A4 は control 群と比較し Day3 の変化率に高い傾向が見られた。一方，C2，A3 は control 群と比較し変化率が低い傾向が見られた。また，図 5，7 に示すように，C3，A1，A4，A5 は他の個体と比較し，*HIF-1α*，*VEGF-a* が多く発現が見られた。また，図 5，7 に示すように，*HIF-1α*，*VEGF-a* は図 9 と同様の個体で発現が多く見られた。以上より，*HIF-1α*，*VEGF-a* の発現量増加の原因が個体差に起因する可能性が示唆された。

7. 結言

本稿では，電圧条件と治療効果の関係，皮膚損傷に対する ALTP の有効性，電圧条件の違いが皮膚損傷の治癒に与える影響について述べた。実験結果から皮膚損傷に対する ALTP の有効性に加え，出力電圧の増加に伴い細胞増殖/血管新生が促進される傾向が示唆された。従って，ALTP 生成に関与する出力電圧が高い程，細胞増殖/血管新生の促進が増強され，治癒期間短縮に繋がると考えられる。以上より，ALTP11[kV_{0-p}](Duty 比 0.9)が皮膚損傷に対し最も有効な電圧条件であると結論付けられた。

参考文献

[1] 高岡駅南クリニック，傷を消毒しない理由，https://www.ekinan-clinic.com/publication/189, 2021.7.20

[2] 行村建，”放電プラズマ工学”，オーム社，2008.4.15

[3] M Kobayashi et al., “In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress”,Neuroscience Research,Volume 34,No.2,pp103-113,1999

[4] 高清水一慶 et al., “ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果に関する研究”，第 12 回日本創傷外科学会, 1-4, 2021.6.14

[5] Jiao Cheng et al.，″Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1α/ROS/VEGF″，International Journal of Molecular Medicine，Vol.43，pp. 945-955，2018