熱傷部位における大気圧低温プラズマ照射を用いた治療効果の検討及び治癒機序解明に関する研究

電気・化学専攻　医用工学領域　2281288　森　勇輝
(主査：森　晃 教授　副査：小林　千尋 講師，坂口　勝久 准教授)

1. 緒言

熱傷とは，熱湯・火炎・電流・化学薬品などにより皮膚面に高熱が加わり損傷されたものを指し，創傷の一つとして分類される。現在の治療法では，感染症予防及び創傷治癒促進を目的として，外用薬及び創傷被覆材が用いられる。長期的な使用や過度な塗布は皮膚萎縮や薬物アレルギー反応といった副作用を発症する可能性がある。また，熱傷の重症度が高くなると手術が必要となり患者の負担が大きくなる。したがって，侵襲性が低く創傷治癒期間の短縮が可能となる新たな治療法の開発が必要である。

近年，大気圧低温プラズマ(Atmospheric Low Temperature Plasma: ALTP)において，医療目的の研究が行われている。プラズマは，原子や分子が陽イオンと電子に電離した状態を指し，固体・液体・気体に次ぐ第 4 の状態と表現される。プラズマ中では，電離した原子核と電子により様々な現象が生じる。これまでプラズマ照射により，糖尿病性壊死や火傷等による皮膚創傷の治癒効果が示されている[1]。しかし，皮膚が再生するにあたり詳細な機序については判明していない事項が多い。そこで本研究では，皮膚創傷の中でも受傷後に後遺症を形成し得る熱傷に着目し，ALTP を用いた低侵襲かつ創傷治癒期間の短縮が可能な医療の実現を目指している。本稿では，人為的に作成した熱傷部位に対して ALTP を照射した後の熱傷患部の状態，炎症性サイトカイン・血管新生に関連する遺伝子発現解析を行い，ALTP 照射が創傷治癒過程に与える影響について検討した。

2. ALTP の成分分析

ALTP 照射により生成される物質の同定として，吸光光度法を原理とするデジタルパックテスト(共立理 化学研究所，日本)を用いて ALTP 照射溶液中に含まれる H_2O_2, NO_2, NO_3 を定量した。また，ALTP 発生パラメータにおける電圧値を変化させた際の濃度計測も併せて行った。本研究で用いている ALTP は He ガスに高電圧をかけることで発生させるため，He のみを照射した場合の濃度を比較対象とした。

2.1 測定方法

図 1 に示す ALTP 発生装置を用いて，1.5[mL]の生理食塩水に照射することで ALTP 照射溶液を作製した。比較対象として，He ガスのみを照射した生理食塩水を用いた。SUS304 製リング電極を用いてガラス製のピペットを誘電体とし，プロセスガスとして He ガスを用いることで安定したプラズマを生成した。表 1 に ALTP 生成条件を示す。また，表 2 に各サンプルの測定条件を示す。印加電圧値は本装置にて安全に ALTP を生成し得る発生条件の中で，最高値であった 13[kV]とした。さらに，ALTP 発生条件を変更することで各物質量の生成量に変化が現れるかを確認するため，印加電圧値を 8[kV]に変更した際の濃度計測も行った。なお，各条件のサンプル数は 3 とした。

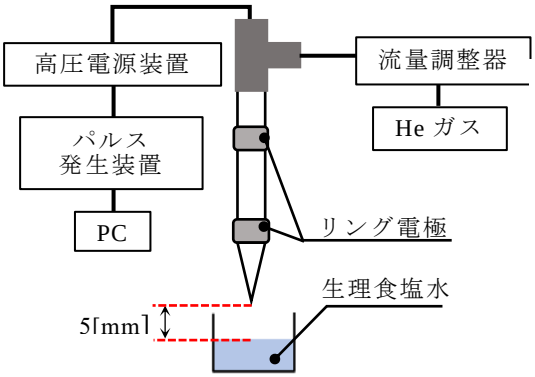

図 1　実験環境の概要

表 1　ALTP 発生条件

周波数 [kHz]	印加電圧 [kV]	波形	照射時間 [s]	ガス流量 [L/min]
3.0	8.0 13.0	矩形波	90	1.0

表 2　デジタルパックテストの仕様

項目	型番	計測可能範囲 [mg/L]	分解能
H_2O_2	DPM-H2O2	0.1～2.0	0.01
NO_2	DPM-NO2	0.02～0.80	0.01
NO_3	DPM-NO3	1.0～4.5	0.1

2.2 成分分析結果

図 2～4 に物質毎の活性種濃度結果を示す。He ガスのみを照射した条件下では全項目で計測可能範囲の最低値を示したが，ALTP 照射を行った場合には有意に H_2O_2，NO_2 の濃度上昇が確認された。NO_3 においては，He ガスのみを照射したものと印加電圧値 8[kV]にて ALTP を照射したもの間で同様の計測結果を示した。しかし，印加電圧値 13[kV]では濃度が上昇する傾向にあることも確認された。

以上の結果より，ALTP 発生時に ROS や RNS といった活性種が生成されることが示された。また，印加電圧値を上昇させることで生成される活性種濃度が増加することを確認した。

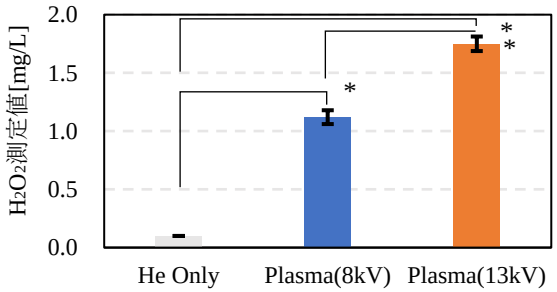

図2　H_2O_2における平均濃度結果
(N=3, S.E.) (*p<0.05)

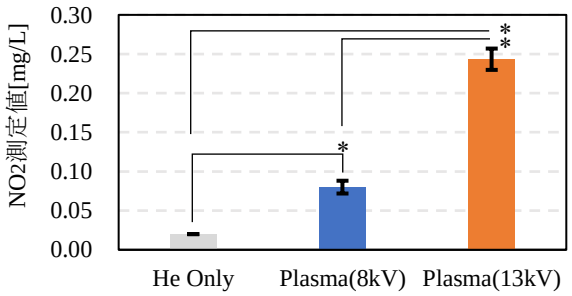

図3　NO_2における平均濃度結果
(N=3, S.E.) (*p<0.05)

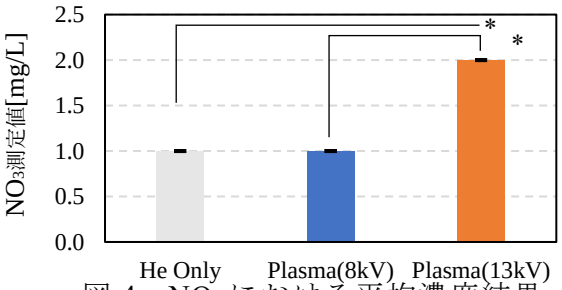

図 4　NO_3 における平均濃度結果
(N=3, S.E.) (*p<0.05)

3.　ALTP 照射が熱傷部位に与える影響の調査

3.1 実験目的

ALTP が熱傷部位に与える影響を検討する為，本実験ではラット熱傷モデルを用いて

コントロール群と ALTP 照射群における治癒期間の比較を行った。加えて，ALTP 発生パラメータの変更が治癒期間に与える影響についても検討を行った。

3.2 実験方法

ラット熱傷モデルは，10 週齢 20 匹(Wistar 種，雄性，SPF)を用いて作製した。熱傷作製後，無処置群(Control 群)とプラズマ照射を行う ALTP 照射群における熱傷部位の比較を行った。なお，各郡におけるサンプル数は 10 とした。

麻酔下にてラット背面に熱傷作製装置を使用し，各個体につき 2 箇所の熱傷を作製した。熱傷作製装置は，ハンダゴテを電動ステージに搭載し，皮膚と接触した位置にて 2 秒間停止させた後，元の位置に戻るように制御した。熱傷作製装置の熱源には，直径 5[mm]の銅を先端に取り付けた，ハンダゴテ(太洋電機産業 KS-60R，消費電力: 55[W])を使用した。

3.3 ALTP 照射方法及び評価方法

ラット背面に作製した熱傷部位に対し，表 1 に示した ALTP 生成条件にて熱傷部位直上 5[mm]より ALTP 照射を行った。プラズマ群のうち，8.0[kV]による ALTP 照射群をサンプル数 4，13.0[kV]による ALTP 照射群をサンプル数 6 とした。また，ALTP 照射が治癒効果に与える影響を評価する方法として，熱傷部位より直上撮影を 30 日間行い，得られた画像を用いて外見評価を行った。

3.4 実験結果

図 5 に各条件における熱傷部位の経過観察画像を示す。経過観察画像による外見比較では，ALTP 照射を行うことで治癒までの日数が短い傾向にあった。特に，14 日付近にて熱傷部位の治癒状態の違いが顕著に確認された。また，プラズマ群において，高電圧を印加させた条件下(13[kV])にて治癒期間がより短い傾向にあることが示された。

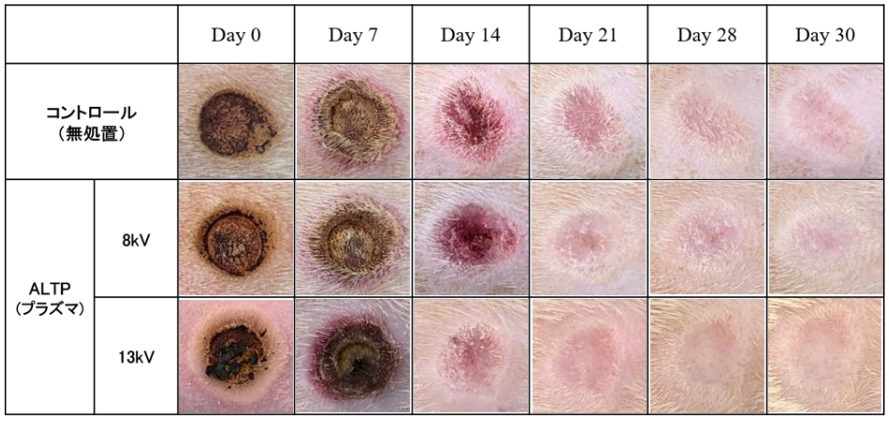

図 5　ALTP 照射条件変更時の治癒過程比較

3.5 考察

本実験の結果より，ALTP 照射が熱傷部位の治癒を促進することが示唆された。ALTP 生成時に発生した ROS や RNS が細胞・組織単位の活性化を誘起し，治癒を促進した可能性がある。また，ALTP 照射群において印加電圧値の差異による治癒期間の違いが確認された。本実験環境においては，印加電圧値が高い条件下(13[kV])にて最も治癒の促進が確認されたことから，印加電圧値の増加に伴い，生成される ROS/RNS 濃度の上昇(図 2~4)と治癒期間の短縮に関連性があると考える。また，患部状態に差異が確認さ

れた 14 日目付近は，創傷治癒過程における増殖期に分類される。以上より，ALTP 照射による ROS/RNS と増殖期における肉芽形成や血管新生には関連があると考えられる。しかし，本実験結果からでは ALTP 照射が生体内部に与える影響については不明確である。そのため, ALTP 照射が生体内部に与える影響について検討する必要がある。

4. 増殖期における ALTP 照射の有効性検討

4.1 実験目的

前章にて，ALTP 照射は熱傷部位の治癒を促進することが示唆された。さらに，高電圧下にて生成した ALTP 照射が, より治癒期間の短縮に効果的であることを確認した。しかし，ALTP 照射による創傷治癒に対する作用機序は未だ判明していない。そこで，まず初めに前章の結果より治癒状態の差異が顕著に確認された増殖期に着目し，創傷治癒時において重要である血管新生に関連する遺伝子発現解析を行うことで ALTP 照射が増殖期に与える影響を評価した。

4.2 実験方法

前章の結果より，最も治癒の促進が確認された ALTP 照射条件(13.0[kV])にて熱傷部位に対し 1 日 1 度の ALTP 照射を 14 日間実施した。一般的に増殖期に該当する 7，14 日目にて採取した組織を用いてリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析では血管内皮細胞増殖因子 A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A: VEGF-A*)，低酸素誘導因子 *1α* (*Hypoxia-Inducible Factor-1a: HIF-1α*)，間質細胞由来因子 1 (*Stromal Cell-Derived Factor-1: SDF-1(CXCL12)*)を対象遺伝子とし，内在性標準遺伝子として *β-actin* を用いた[2][3]。Student t 検定を用いて 2 群間の統計解析を行なった。

4.3 実験結果

4.3.1 *VEGF-A* の遺伝子発現解析結果

図 6,7 に受傷後 7，14 日目における *VEGF-A* の発現量解析結果を示す。

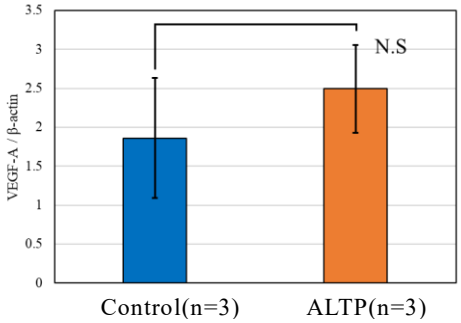

図 6　受傷後 7 日目の *VEGF-A* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

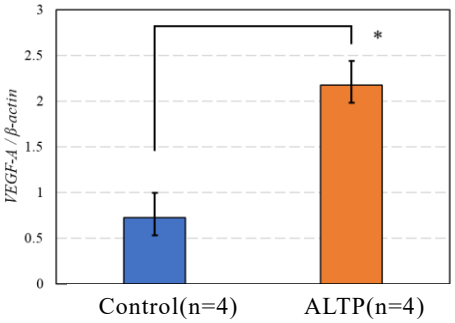

図 7　受傷後 14 日目の *VEGF-A* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05)

図 7-1 より受傷後 7 日目における ALTP 照射群では Control 群との間に有意な差は確認されなかったが, 発現量が増加傾向にあることが確認された。また図 7-2 より受傷後 14 日目では，ALTP 照射を行うことで *VEGF-A* の発現量に有意な差が確認された。

4.3.2 *SDF-1* の遺伝子発現解析結果

図 8 に受傷後 14 日目における *SDF-1* の発現量解析結果を示す。

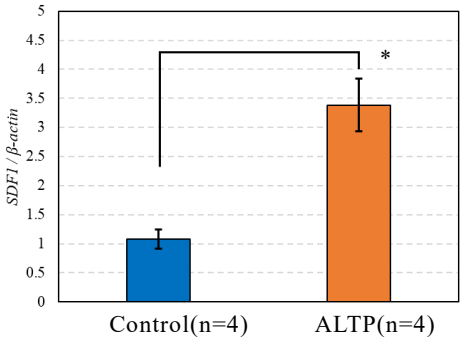

図 8　受傷後 14 日目における *SDF-1* の発現量比較
(S.E.M., *:p<0.05)

図 8 より ALTP 照射群では *SDF-1* の発現量に有意な差が確認された。

4.3.3 *HIF-1α* の遺伝子発現解析結果

図 9,10 に受傷後 7,14 日目における *HIF-1α* の発現量解析結果を示す。

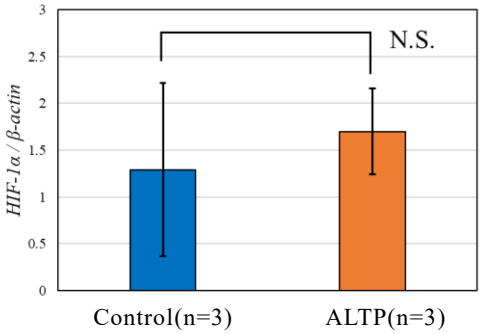

図 9　受傷後 7 日目の *HIF-1α* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

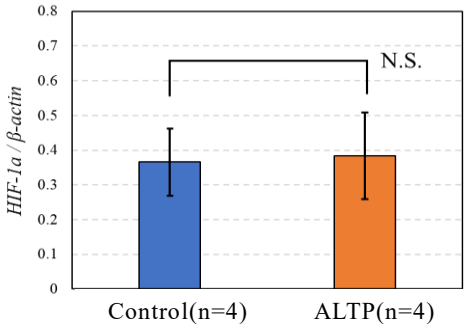

図 10　受傷後 14 日目の *HIF-1α* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

図 9,10 より ALTP 照射群にて発現量が増加する傾向にあったが，有意な差は確認されなかった

4.4 考察

図 7,8 より 14 日目において ALTP 照射群では *VEGF-A* および *SDF-1* の発現量が有意に増加することが示された。*VEGF-A* は血管新生の過程にて，主に血管内皮細胞に作用する増殖因子であり，細胞の分裂や遊走，分化等を誘導し新たな血管を形成する。*SDF-1* は受傷部位に血管内皮前駆細胞の遊走/保持を誘導するが，血管内皮細胞上に発現する CXCR4 に対しても結合し，血管新生を促進させる。したがって，ALTP 照射によって *VEGF-A* および *SDF-1* の発現が上昇し，それらを介する血管新生経路を通じて創傷部における血管新生が促進されたと考えられる。

図 9,10 より，ALTP 照射群では *HIF-1α* の発現量が増加する傾向にあったが，有意な差は確認されなかった。そのため，ALTP 照射による *HIF-1α* の発現増大が今回遺伝子発現解析を行った 7,14 日目よりも早期に行われていた可能性が考えられる。

以上の結果より，ALTP 照射による *VEGF-A/SDF-1* を介した血管新生促進が示唆された。また，*HIF-1α* においては ALTP 照射による有意な差は確認できなかった。*HIF-1α* は今回組織採取を行った 7,14 日目より早期に発現が上昇している可能性が考えられるため，より早期に組織採取を行い，発現量を調査する必要性がある。

5. 炎症期における ALTP 照射の有効性検討

5.1 実験目的

本章では，炎症性細胞の遊走や血管新生を上方で制御する遺伝子が発現する炎症期に着目し，ALTP 照射と炎症期の関係性について検討を行う。そこで，炎症性サイトカインに関する遺伝子発現解析を行い，ALTP 照射が炎症期に与える影響を評価した。

5.2 実験方法

炎症期における ALTP 照射の有効性を検討するためには，熱傷作製後に生じる痂皮を剝離する必要がある。そこで，熱傷作製後に痂皮剝離を行うことで患部を露出させた。その後，各個体 2 箇所の患部に対し，1 日 1 度の ALTP 照射を連続 6 日間行い，一般的に炎症期に該当する 3, 24, 72 時間後にて採取した組織を用いてリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析ではインターロイキン 6(*Interleukin-6:IL-6*)，低酸素誘導因子 *1α* (*Hypoxia-Inducible Factor-1a: HIF-1α*)を対象遺伝子とし，内在性標準遺伝子として *β-actin* を用いた[2][4]。Student t 検定を用いて 2 群間の統計解析を行なった。

5.3 実験結果

図 11,12 に受傷後 3, 24, 72 時間における *IL-6* および *HIF-1α* の発現結果を示す。

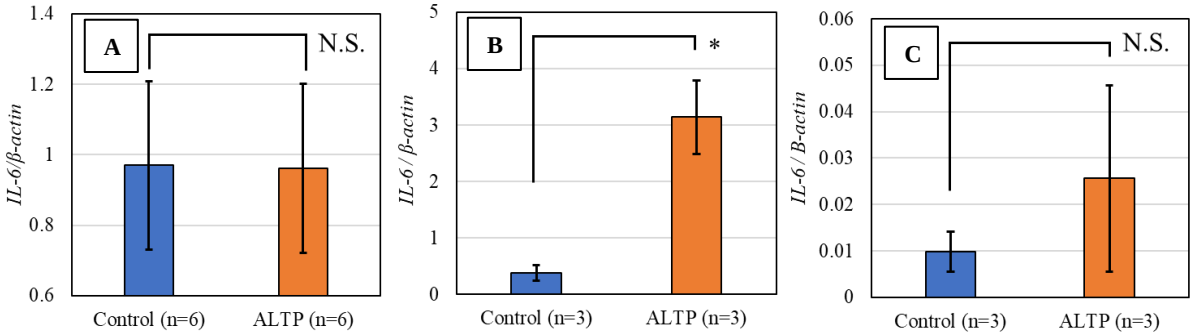

図 11　*IL-6* の発現量比較
(A):受傷後 3 時間 (B):受傷後 24 時間 (C):受傷後 72 時間
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

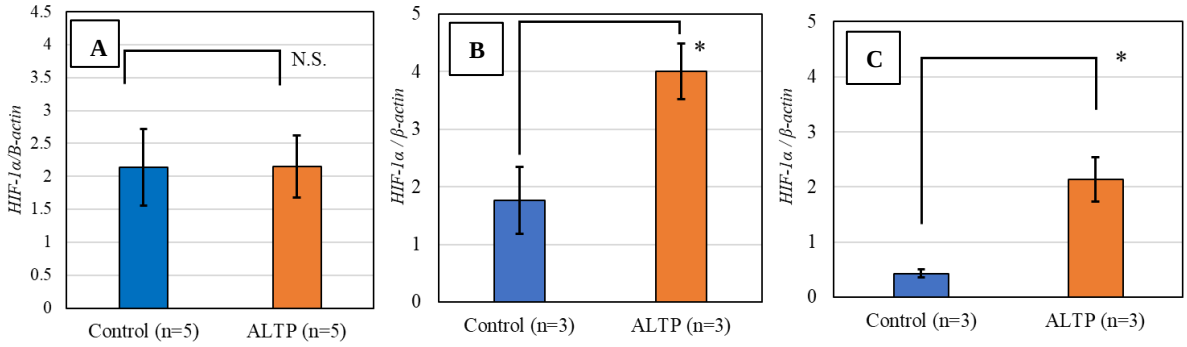

図 12　*HIF-1a* の発現量比較
(A):受傷後 3 時間 (B):受傷後 24 時間 (C):受傷後 72 時間
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

図 11 より，対象群と比較して受傷後 24 時間では ALTP 照射群において有意に *IL-6* の発現量が上昇していることが判明した。一方で，3，72 時間後には有意な差は確認されなかった。図 12 より，ALTP 照射群において 24，72 時間後にて有意に *HIF-1α* の発現量が上昇した。一方で，3 時間後には有意な差は確認されなかった。

5.4 考察

図 11 より，ALTP 照射によって受傷後 24 時間に *IL-6* 発現量が有意に増加したことから，受傷後早期に炎症性細胞の遊走能力を増強した可能性が示唆された。また，受傷後 3 時間では *IL-6* の発現に有意な差は確認されなかったが，*HIF-1α* を通じたカスケードにて生体内部に影響を与えている過程であると考える。同様に有意な差は確認されなかった受傷後 72 時間では，既に炎症が鎮静化にシフトしていることを示しているものと考えられる。図 12 より，ALTP 照射群にて受傷後 24, 72 時間に *HIF-1α* の発現量が有意に増加したことから，ALTP 照射が受傷後早期に低酸素環境下である受傷部にて ROS レベルを上昇させたことで，*HIF-1α* の転写を活性化し，炎症性細胞の遊走や活性化を促進した可能性がある。受傷後 3 時間では有意な差は確認されなかったことから *HIF-1α* 発現量増加に必要な時間および ROS/RNS が不足していた可能性が考えられる。

以上より，*IL-6* および *HIF-1α* 双方の発現量が増加したことから，ALTP 照射による ROS/RNS 産生がマクロファージをはじめとする炎症性細胞の動員や活性化，細胞増殖因子の放出等を強化したことで，創傷治癒が促進したことが示唆された。一方で，炎症性サイトカインの発現や，血管新生促進遺伝子の発現にも影響を与える *HIF-1α* について，治癒過程と発現量の関係性を更に調査すべきである。

6　炎症期における *HIF-1α* の遺伝子発現と治癒日数の関係性

6.1 実験目的

前章の結果より，炎症期における炎症性サイトカインや増殖期における血管新生促進因子の発現を誘導する *HIF-1α* における時間経過に伴う発現量の変動に着目した。そこで本章では，受傷後からの経過に伴う *HIF-1α* の発現量を検討する。

6.2 実験方法

前章の実験にて作製した cDNA を用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現を行った。本実験では，受傷後 3 時間と 24 時間の比較，受傷後 24 時間と 72 時間の比較を行った。遺伝子発現解析に用いた方法はすべて，前章と同様である。*HIF-1α* を対象遺伝子とし，*β-actin* を内在性標準遺伝子とした[2][4]。Student t 検定を用いて 2 群間の統計解析を行なった。

6.3 実験結果

図 13,14 に *HIF-1α* における受傷後 3,24 時間，受傷後 24,72 時間の比較結果を示す。

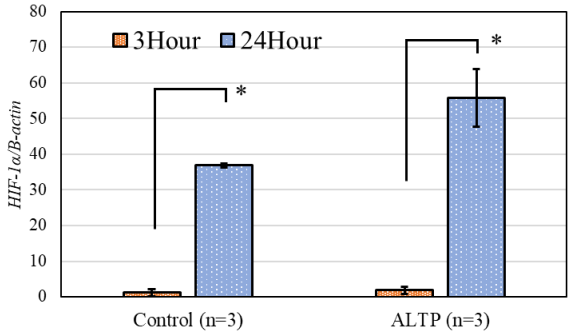

図 13 受傷後 3, 24 時間の *HIF-1a* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

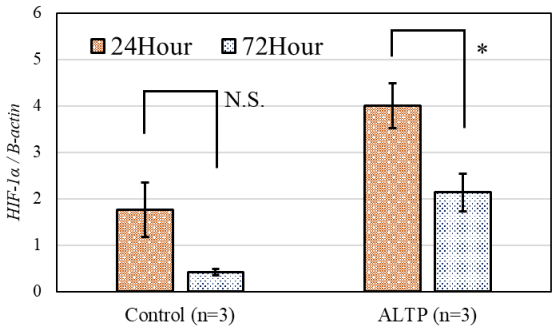

図 14 受傷後 24, 72 時間の *HIF-1a* 発現量
(S.E.M., *:p<0.05, N.S.= not significant)

図 13 より，受傷後 3,24 時間の比較では，両群にて 24 時間に向かうにつれ *HIF-1α* 発現量が増加する傾向にあることを確認した。また，ALTP 照射を行うことで発現量がより増大する結果となった。図 14 より，受傷後 24,72 時間の比較では，両群にて発現量の減少が見られた。図 13,14 より，両群にて受傷 24 時間後をピークとした推移が確認された。また，ALTP 照射によって各期間にて *HIF-1α* 発現の増強傾向を確認した。

6.4 考察

図 13,14 より，両群の *HIF-1α* 発現量の推移は同様であったが，ALTP 照射による発現量の増大が確認されたことから，ALTP 照射が *HIF-1α* の転写を安定化させたものと考えられる。ALTP 照射時に生成される ROS はプロリン水酸化酵素(Prolyl hydroxylase domain enzyme: PHD)の補因子である Fe^{2+}を酸化することで，RNS は PHD を S-ニトロシル化することで不活性化することで *HIF-1α* を安定化させる。そして，創傷部位は低酸素環境であることから，PHD が *HIF-1α* を分解するために必要な酸素量を減少させる。以上の観点から，低酸素環境である創傷部に対する ALTP 照射による ROS や RNS が炎症期における受傷部位に作用することで，*HIF-1α* の転写が活性化したと考える。

7 結言

本研究では ALTP 照射を行った後の熱傷部位の評価を行い，新規治療方法として有用か検討を行った。本研究における結果として，ALTP 照射により熱傷部位に対して治癒の促進が示された。また，遺伝子発現解析から ALTP 照射が受傷後早期に *HIF-1α* の転写を安定化し発現量を増加させることで，炎症期における炎症性サイトカインの一種である *IL-6* の発現上昇や，増殖期における血管新生促進因子である *VEGF-A* や *SDF-1* の発現上昇を促進することで，創傷治癒過程の炎症期・増殖期に影響を与え，創傷治癒期間の短縮に寄与したことが示唆された。今後の展望として，遺伝子発現解析に加え，病理組織検査による炎症性細胞の浸潤やタンパクレベルでの測定を行うことで，本研究にて示唆された炎症性細胞の遊走促進や血管新生促進に対する，より詳細な評価が可能であると考える。更に *in vitro* の観点から，マクロファージや血管内皮細胞や線維芽細胞に大気圧低温プラズマを曝露した際の動態を検証することで，本研究にて示唆された創傷治癒過程に対する大気圧低温プラズマの作用機序の解明に繋がると考える。

参考文献

[1] G. Fridman et al, Applied Plasma Medicine, *Plasma Process and Polymers,* Vol.5, Issues 6, pp.503.-533, 2008.

[2] S Qiu et al, Von Hippel-Lindau (VHL) Protein Antagonist VH298 Improves Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats by Activating Hypoxia-Inducible Factor- (HIF-) 1 Signaling, Journal of Diabetes Research, Vol.2019, 2019.

[3] Y Zhao et al, Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Cerebral Ischemic Injury via Notch Pathway-Mediated Up-Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1α in Rats, Cellular and Molecular Neurobiology, Vol.35, pp.1093-1103, 2015.

[4] Chao Tang et al, Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats, Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol.133, 2021.