T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

# 論文 / 著書情報
# Article / Book Information

| | |
|---|---|
| 題目(和文) | 大気圧低温プラズマが皮膚由来培養細胞の生体応答に与える影響の基礎研究 |
| Title(English) | Fundamental study on influence of atmospheric low temperature plasma for biological response of cultured cells derived from skin |
| 著者(和文) | 三宅智子 |
| Author(English) | tomoko miyake |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第11218号,<br>授与年月日:2019年6月30日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:沖野 晃俊,岡村 哲至,奥野 喜裕,佐藤 千明,松本 義久,岩澤 篤郎,伊藤 典彦 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第11218号,<br>Conferred date:2019/6/30,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 論文要旨 |
| Type(English) | Summary |

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

# 論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

| | | | |
|---|---|---|---|
| 専攻：<br>Department of | 創造エネルギー　　専攻 | 申請学位（専攻分野）：<br>Academic Degree Requested | 博士<br>Doctor of　（　理学　） |
| 学生氏名：<br>Student's Name | 三宅　智子 | 指導教員（主）：<br>Academic Supervisor(main) | 沖野　晃俊 |
| | | 指導教員（副）：<br>Academic Supervisor (sub) | |

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）


大気圧低温プラズマは高密度な活性種を生成でき，生体にも熱損傷なく照射できるため，医療分野への応用に向けた研究が進められている。その中でも，創傷治癒は糖尿病や一般的に床ずれと呼ばれる褥瘡等の皮膚疾患と関係しているため，注目を集めている。大気圧低温プラズマによる創傷治癒を実用化するためには，効果の検証やメカニズムの解明だけでなく，安全性の評価が必要である。特に，プラズマを照射する，皮膚を構成する線維芽細胞や幹細胞などの生体応答解析は不可欠であるが，これまで，プラズマが表皮幹細胞など皮膚の幹細胞に及ぼす影響に関する報告はほとんどなかった。そこで本研究では，iPS 細胞を表皮角化細胞であるケラチノサイトに分化誘導し，大気圧プラズマ照射が皮膚由来培養細胞に与える影響を詳細に調べた。本論文は，「大気圧低温プラズマが皮膚由来培養細胞の生体応答に与える影響の基礎研究」と題し，6 章構成となっている。以下に本論文の概要をまとめる。

第 1 章「序論」では，大気圧低温プラズマ照射が，DNA 損傷などの生体に与える影響について背景を述べた。幹細胞の DNA 損傷はがんや老化と関係するため，プラズマが幹細胞に及ぼす影響を調べることの重要性を指摘した。

第 2 章「プラズマバブル水による皮膚常在菌の殺菌」では，プラズマを直接溶媒中にバブリング導入して作製したプラズマバブル水による，皮膚常在菌の殺菌効果を調べた。皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌に $CO_2$ プラスマバブル水を処理すると，初期生菌数 $10^6$〜$10^7$ CFU/mL から 2 桁低下し，殺菌効果が確認できた。正常ヒト皮膚線維芽細胞に $CO_2$ プラスマバブル水を処理しても生存率が低下しないことを明らかにした。次に $CO_2$ プラズマバブル水が細胞の DNA 損傷に及ぼす影響を確認したところ，DNA 二本鎖切断ではなく，弱い酸化ストレスが生じている可能性が示唆された。$CO_2$ プラズマバブル水の効果に起因する活性種を同定するために，電子スピン共鳴法，吸光光度法，イオンクロマトグラフィ，NMR により測定した結果，HO・は 1.4 mM，$^1O_2$ は 75.6 mM，$H_2O_2$ は 4.2 mM 含まれていることが明らかになり，$H_2O_2$ 以外の長寿命の化合物は確認できなかった。この結果より，$^1O_2$ 等の短寿命の活性種から生成した中程度の寿命の化合物が殺菌効果に寄与しているが，その化合物の細胞毒性は低いことが示唆された。

第 3 章「iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトの DNA 損傷応答」では，プラズマが幹細胞および，幹細胞から分化誘導したケラチノサイトにおよぼす影響を調べるために，iPS 細胞からケラチノサイトを作製した。iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトにおいて，表皮基底層の分化マーカーである K14，p63 が発現していることを確認した。表皮基底層には幹細胞と前駆細胞が存在するが，分化誘導したケラチノサイトが幹細胞，前駆細胞どちらの性質に近いのか確認するために，マーカー分子である integrin α6 と CD71 の発現をリアルタイム PCR で調べた。その結果，継代数が少ないケラチノサイトほど integrin α6 の発現が高く，幹細胞に近い性質を有することが示唆された。プラズマ照射の比較対象として，DNA 損傷応答解析でよく用いられる放射線を線維芽細胞，iPS 細胞，ケラチノサイトに照射し，細胞応答の違いを比較した。γ 線を 2Gy 照射後 72 時間における生存率は，線維芽細胞では 72%，ケラチノサイトでは 91〜97%であったのに対し，iPS 細胞は 10%であった。iPS 細胞に γ 線を 1，2，5 Gy 照射した時の，4 時間後のアポトーシス率は，5.7%，34%，38%であり，線量依存的にアポトーシスが増加しており，放射線照射による生存率の低下はアポトーシスによる細胞死が原因であることが明らかになった。

第 4 章「iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトへのプラズマ照射」では，線維芽細胞，iPS 細胞，およびケラチノサイトに対してプラズマを直接照射し，細胞応答の違いを比較した。$CO_2$ ガスパージ環境下で $CO_2$ プラズマを照射すると，プラズマ照射後 48 時間で全ての iPS 細胞は死滅したが，同条件で，線維芽細胞では 82%，ケラチノサイトでは 71%の生存率であった。DNA 損傷応答のマーカーである γH2AX の発現率および 53BP1 フォーカス形成率を指標にして，$CO_2$ プラズマ照射 1 時間後の DNA 損傷を調べた。γH2AX は線維芽細胞で 99%，iPS 細胞で 99%，ケラチノサイトで 100%の発現率であったが，53BP1 のフォーカス形成率は，線維芽細胞で 55%，iPS 細胞で 0%，ケラチノサイトで 0%であった。この結果より，プラズマ処理によって酸化ストレスが生じている可能性が示された。

第 5 章「プラズマ照射が毛髪に及ぼす影響」では，皮膚付属器官である毛髪に対して $CO_2$ ガスパージ環境下で，$CO_2$ プラズマを直接照射し，毛髪表面の組成変化を XPS により解析した。$CO_2$ プラズマを照射した毛髪では，表面の C，Si が減少し，O，N，S が増加していた。また C-S が減少し，S=O/S-O が増加していたことから，毛髪表面に付着していたシャンプーなどに含まれるシリコンだけでなく，毛髪表面の脂質である 18-MEA(メチルエイコサン酸)も除

去されている可能性が得られた。この結果より，プラズマ照射により，毛髪表面を親水化することができ，トリートメント剤等の浸透を促進するなどの応用可能性が得られた。

第 6 章「総括」では，本論文で得られた成果を総括するとともに，同一人物の皮膚由来培養細胞である線維芽細胞，iPS 細胞，ケラチノサイトを用いて生体応答を比較することの重要性を述べた。また，これらの細胞から作製した 3D 皮膚モデルによる解析など，今後の課題および展望について記載した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（博士課程）
Doctoral Program

# 論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

| | | | |
|---|---|---|---|
| 専攻：<br>Department of | 創造エネルギー　　専攻 | 申請学位（専攻分野）：<br>Academic Degree Requested | 博士<br>Doctor of　（　理学　） |
| 学生氏名：<br>Student's Name | 三宅　智子 | 指導教員（主）：<br>Academic Supervisor(main) | 沖野　晃俊 |
| | | 指導教員（副）：<br>Academic Supervisor(sub) | |

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

Atmospheric low temperature plasma can generate high density reactive species and can irradiate to living body without thermal damage, so many researches to apply for the medical field are advanced. Wound healing has been noted to be related with diabetes and skin diseases such as bedsores. In order to put the atmospheric low temperature plasma into practical use for wound healing, it is necessary not only to confirm effect, to elucidate mechanism but also to evaluate safety. Especially biological response analysis of fibroblasts and stem cells constituting skin is important. In this study, atmospheric low temperature plasma was treated on fibroblasts, iPS cells, and keratinocytes, which are cultured cells derived from skin, and the biological response was analyzed. Plasma bubbled-up water prepared by bubbling plasma directly into the solvent was treated into skin indigenous bacteria, and high bactericidal effect was confirmed. And that plasma treatment under the same conditions does not reduce the survival rate of fibroblasts. In order to analyze the effect of plasma treatment on stem cells, keratinocytes were differentiated from iPS cells. As a result of examining the expression level of the marker molecules, it was revealed that the keratinocytes with less passage number are closer to stem cells. By direct irradiation of $CO_2$ plasma to cells using a temperature-controllable multi-gas plasma jet developed in our laboratory, the survival rate of iPS cells was significantly reduced compared to fibroblasts and keratinocytes. As a result of investigating DNA damage response after plasma treatment, it was revealed that the cause of the decrease in the survival rate of iPS cells is likely to be oxidative stress, and the possibility of DNA double strand breaks is low.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).