

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), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11218号, 授与年月日:2019年6月30日, 学位の種別:課程博士, 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), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11218号, Conferred date:2019/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

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

東京工業大学 大学院総合理工学研究科 創造エネルギー専攻

三宅 智子

指導教員 沖野 晃俊 准教授

令和元年6月

目次

第 1 章	序論	1
1.1	緒言	1
1.1.1	DNA 損傷と修復	1
1.1.2	大気圧プラズマの医療応用	2
1.1.3	iPS 細胞	4
1.1.4	DNA 損傷と老化, がん	4
1.1.5	皮膚とケラチノサイト	5
1.2	本論文の目的	6
1.3	本論文の構成	6
	第 1 章の参考文献	7
第 2 章	プラズマバブル水による皮膚常在菌の殺菌	13
2.1	緒言	13
2.2	プラズマバブル水の作製	14
2.2.1	マルチガスプラズマジェットによるプラズマバブル水の作製	14
2.2.2	プラズマバブル水の温度, pH 測定	15
2.3	プラズマバブル水による殺菌効果	17
2.4	プラズマバブル水が細胞に与える影響	19
2.4.1	細胞培養	19
2.4.2	コールターカウンターによる生存率の測定	19
2.4.3	WST-8 アッセイによる生存率の測定	21
2.4.4	免疫染色による DNA 損傷応答解析	25
2.5	プラズマバブル水の成分分析	28
2.5.1	電子スピン共鳴法と吸光光度法による活性種の測定	28
2.5.2	イオンクロマトグラフィー, NMR による成分分析	29
2.6	まとめ	33
	第 2 章の参考文献	34
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	36
3.1	緒言	36
3.2	細胞培養	36
3.2.1	iPS 細胞の培養方法	36

3.2.2	初代培養ケラチノサイトの培養方法	37
3.3	iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導	38
3.4	分化マーカー分子の発現確認	39
3.4.1	免疫染色によるマーカー分子の発現確認	39
3.4.2	ウエスタンブロットによる K14, p21 の発現比較.....	41
3.4.3	RT-PCR による遺伝子発現の確認.....	42
3.4.4	リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量.....	43
3.5	3D 皮膚オルガノイドの構築.....	44
3.5.1	3D 皮膚オルガノイドの作製.....	44
3.5.2	3D 皮膚オルガノイドのマーカー分子の発現.....	45
3.5.3	3D 皮膚オルガノイドの薬剤透過試験.....	46
3.6	DNA 損傷応答の比較.....	48
3.6.1	免疫染色による γ -H2AX と 53BP1 の発現確認.....	48
3.6.2	ウエスタンブロットによる ATM, KAP1, p53 のリン酸化確認	50
3.6.3	免疫染色による p16 の発現確認.....	52
3.6.4	WST-8 アッセイによる生存率の測定	54
3.6.5	TUNEL アッセイによるアポトーシスの測定	56
3.7	まとめ.....	58
	第 3 章の参考文献.....	59
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	62
4.1	緒言	62
4.2	温度制御マルチガスプラズマジェットによる照射方法.....	62
4.2.1	温度制御マルチガスプラズマジェット	62
4.2.2	細胞培養.....	65
4.2.3	細胞へのプラズマ照射方法	65
4.3	WST-8 アッセイによる細胞生存率の測定	65
4.4	免疫染色による DNA 損傷応答の測定.....	68
4.5	まとめ.....	72
	第 4 章の参考文献	72
第 5 章	プラズマ照射が毛髪に及ぼす影響.....	74
5.1	緒言	74
5.2	マルチガスプラズマジェットによる照射.....	74

5.3	温度制御マルチガスプラズマジェットによる照射	79
5.3.1	空気中でのプラズマ照射	79
5.3.2	雰囲気制御環境下でのプラズマ照射	82
5.4	まとめ	84
第5章の参考文献		85
第6章	結論	87
6.1	総括	87
6.2	今後の課題と展望	90
謝辞		92

第 1 章 序論

1.1 緒言

相補性という概念を Niels Bohr が提唱して以来^{[1][2]}, 相補性は, 多くの分野で使われている。Bohr は, 物理学において, 光の粒子性と波動性のように互いに相反する性質が補い合うことで完全な系が形成されるという概念を提唱した。その後, 相補性は生物学, 心理学, 経済学, 美術などの分野でも広く用いられるようになった。

1953 年に James D. Watson と Francis H. C. Crick は, DNA が 2 本のポリヌクレオチド鎖からなる二重らせん構造を形成することを発見した^[3]。生物の遺伝情報は, DNA を構成するアデニン(A), チミン(T), グアニン(G), シトシン(C)の 4 種類の塩基配列にコードされており, DNA 二重らせん構造は, A-T 間, G-C 間で水素結合を形成することで構造を維持している。そのため, 2 本のポリペプチド鎖の塩基配列は相補的となっている。この DNA の相補性は, DNA の高次構造維持だけでなく, 遺伝子発現, 複製, DNA 損傷の修復など様々な生命現象において重要な役割を担っている。

1.1.1 DNA 損傷と修復

生体は常に酸化ストレスなどの内因性, 外因性の要因により DNA 損傷を受けており, 様々な修復機構を働かせることで恒常性を維持している。DNA 損傷の内因性要因の一つとして, 代謝で生成する活性酸素がある。ミトコンドリアの電子伝達系で ATP を生産するときに, スーパーオキシド, 過酸化水素, ヒドロキシラジカルなどの活性種が生成する^[4]。これらの活性種により, DNA 鎖のヌクレオチドと塩基をつなぐ N-グリコシド結合が切断され, 塩基が遊離する。塩基が遊離した部位を AP サイト(apurinic/apyrimidinic site)と呼び, ヒトでは通常, 細胞 1 個あたり 10000 個の AP サイトが 1 日に生じるとされている^[5]。DNA 損傷の外因性要因は, 紫外線, 化学物質, 放射線などがあるが, 1Gy の γ 線照射により AP サイトは細胞 1 個あたり 500 個生じる^{[6][7]}。DNA 損傷は, 塩基遊離以外にも, 置換基除去や修飾により塩基の化学構造が変化する塩基損傷, DNA 鎖架橋, DNA 鎖切断がある。DNA 鎖切断は, DNA 二本鎖の片方だけが切断される DNA 一本鎖切断(SSB; Single strand break)と二本鎖の両方が切断される DNA 二本鎖切断(DSB; Double strand break)に区別できる。特に, DNA 二本鎖切断は, 重篤な損傷であり, 修復されないと細胞が死滅する。

DNA 損傷の種類に応じて, 異なる修復機構が働き, 多くの分子が関与することで, 損傷を修復する。塩基除去修復は, 塩基損傷部分の N-グリコシド結合を切断し, 生じた AP サイトを AP エンドヌクレアーゼで除去し, もう一方の DNA 鎖を鋳型として DNA ポリメラーゼで DNA を合成し, 新たに合成した DNA と元々の DNA を DNA リガーゼで結合する。ヌクレオチド除去修復は, 紫外線で生じるピリミジンダイマーの修復に使われる機構である。損傷部位の前後

を含めた数十塩基を取り除き、一本鎖状態にし、DNA ポリメラーゼで除去部分の DNA を合成する。この二つの修復機構は、DNA 二本鎖のうち、損傷していない DNA 鎖を鋳型として DNA を再合成できるため、正確な修復が可能である。DNA が相補的な二本鎖であるために、エラーの少ない修復ができるという利点がある。

DSB の修復機構は、相同組換え修復(HR; Homologous recombination)と非相同末端結合(NHEJ; Non-homologous end joining)の二種類がある。HR は染色体中の相同な染色分体である姉妹染色分体を鋳型として、DNA を修復する。まず、DSB 部位をエキソヌクレアーゼ活性がある MRN(MRE11-RAD50-NBS1)複合体が認識し、損傷部位を分解して一本鎖にする。一本鎖に RPA,RAD51 などが結合し、相補的な塩基配列をもつ DNA を探して対合し、ヘテロ二本鎖を形成する。そして、その塩基配列を鋳型として DNA を合成する。HR も姉妹染色分体の相同な塩基配列を利用した修復であり、正確性の高い修復が可能な機構である。NHEJ では切断で生じた DNA 末端を、直接結合する。DSB 部位に Ku70/Ku80 が結合した後、プロテインキナーゼである DNA-PKcs が結合し、自己リン酸化、および他の修復酵素をリン酸化する。最後に Xrcc4/DNA リガーゼIVにより DNA が結合し修復が完了する。NHEJ は HR のように鋳型 DNA を必要とせず、迅速に修復可能だが、結合部位における塩基の欠失や挿入も生じる場合があり、不正確な修復機構である。

1.1.2 大気圧プラズマの医療応用

プラズマとは、電離気体であり、固体、液体、気体に続く第 4 の状態を示す。自然界では、オーロラや、雷、ロウソクの火がプラズマであるが、蛍光灯やプラズマテレビ、空気清浄機など多くの製品にプラズマが活用されている。プラズマは、放電、レーザー光、放射線、衝撃波など、高いエネルギーを気体に与えることで生成されるが、工業的には放電によってプラズマを生成することが多い。プラズマを定常的に生成するためには、放電で生じた荷電粒子が電界中で再結合する前に、他の粒子に衝突して、その粒子を電離する必要がある。気圧が高すぎると、平均自由行程が短く、荷電粒子は十分加速する前に他の粒子と衝突し、その粒子を電離できない。反対に、気圧が低すぎると、平均自由行程が長く、荷電粒子は他の粒子と衝突しにくい。従来技術では電極間距離が数センチであることが多く、 10^{-3} 気圧程度の低気圧において最もプラズマを生成しやすかった。低気圧プラズマでは、真空装置が必要であり、真空装置に入れることができない大型の物体や、生体などへの照射は困難であった。近年、大気圧下でプラズマを生成する技術開発が精力的に行われ、大気圧下で 100°C 以下の低温のプラズマを高密度に発生することが可能となった^[8]。大気圧プラズマの主な生成方法は、電極間放電、誘電体バリア放電、空洞共振器を用いたマイクロ波放電、誘導コイルを用いた高周波放電などがある。大気圧下で定常的な放電を行うと、中性粒子の密度は高く、拡散が小さいため、粒子の衝突頻度が高くなり、プラズマ中の電子、中性粒子、イオンの温度が等しくなる。熱平衡状態になったプラズマを熱プラズマと呼ぶ。それに対して、大気圧下でパルス電圧を印加することに

より、質量の軽い電子のみが選択的にエネルギーを受け取り加速し、質量の重い中性粒子やイオンはほとんど加速せず、ガス温度よりも電子温度が高い状態にすることができる。この非平衡状態になったプラズマを大気圧非平衡プラズマ、もしくは大気圧低温プラズマと呼ぶ。我々の研究室では、主に、電極間放電、および誘電体バリア放電のリモートプラズマ装置を開発しており、温度制御により、 -54°C ~ 160°C の大気圧低温プラズマを生成できる技術を開発した^[9]。大気圧低温プラズマでは、真空装置が不要であり、装置が小型化できるだけなく、熱に弱い材料や、生体への照射も可能である。従来は、Ar や He などのプラズマを発生させやすい希ガスを原料ガスとして用い、プラズマを発生させていたが、我々の研究室では N_2 , O_2 , CO_2 , 空気などの原料ガスを用いて安定したプラズマを発生させる技術を開発^[10]した。これにより、様々な原料ガス種での大気圧低温プラズマの生成が可能となり、様々な分野への応用が期待されている。

このような大気圧低温プラズマの技術開発により、大気圧プラズマを医療分野に応用する研究が盛んに行われている。例えば、殺菌^{[11][12]}、止血^{[13][14]}、創傷治癒^{[15]-[17]}、がん治療^{[18][19]}などが報告されている。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。世界の創傷治癒の市場規模は、2017 年で 237 億 7200 万米ドル^[20]であり、今後も市場は拡大すると予測されている。そのため、皮膚に対するプラズマ照射の影響を調べた先行研究は多く、皮膚の殺菌^[21]、糖尿病ラットの創傷治癒促進^[22]、抗炎症効果^[23]も報告されている。プラズマ照射により、皮膚のバリア機能が低下しないことも確認されている^[24]。また、プラズマ照射による抗菌ペプチドの発現増加^[25]、コラーゲンやフィブロネクチンの発現増加^[26]、血管新生に関わる増殖因子の発現増加^[15]など多くの報告がある。

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、安全性の評価も必要である。特に、プラズマ照射が生体の DNA 損傷等に及ぼす影響は重要であり、多くの先行研究が報告されている^{[27][28]}。プラズマの照射量や強度によっては、塩基損傷、DSB,SSB などの DNA 損傷が生じることも報告されており、遺伝毒性が生じる可能性も懸念されている。大気圧低温プラズマは、新しい技術であり、長期の臨床試験データがまだ十分に得られていないことも課題である。

プラズマが生体に及ぼす影響には、プラズマによって生成される活性種が関与していると考えられており、用いる原料ガスの種類によって生じる活性種が異なる^[10]。従来の研究では、原料ガスとして、希ガスを用いており、プラズマ照射環境も雰囲気制御せず空気中で照射している事も多かった。そのため、効果メカニズムが不明なことが多い。我々の研究室では、希ガス以外の原料ガスを用いたプラズマを生成でき、原料ガスの種類と効果の関係性だけでなく、プラズマ中に生成される活性種を分析することにより、効果メカニズムの解明につなげることが可能である。

1.1.3 iPS 細胞

人工多能性幹細胞 (iPSCs; induced pluripotent stem cells) は 2006 年に Yamanaka らが、マウス線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子を導入し、作製した細胞株である^[29]。その後、ヒト皮膚線維芽細胞からも同様に iPS 細胞を作製した^[30]。iPS 細胞は ES 細胞のように、分化万能性と自己複製能を持つ細胞で、再生医療分野を中心に研究が盛んに行われている。ES 細胞は受精卵から作製するため、倫理的な問題があり、制約が多だけでなく、ES 細胞から分化させた細胞や組織を移植する場合に、患者とは異なるドナー由来の細胞であるため、拒絶反応が生じてしまう。iPS 細胞は体細胞を元に作製するため、倫理的問題もなく、患者自身の細胞であるため、拒絶反応の心配もない。iPS 細胞から組織を再生し、神経変性疾患など多くの疾患の治療に用いることができるが、高齢ドナーから作製した iPS 細胞は、ゲノム安定性が低下していることが報告されている^[31]。ゲノムを安定に維持するためには、DNA 修復機構が正常に機能している必要があるが、高齢ドナーでは、DNA 損傷応答が低下している事も報告されている。2013 年に世界で初めて行われた iPS 細胞の臨床試験である滲出型加齢黄斑変性患者に対する自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植では、対象患者 2 人のうち 1 人は移植に成功し、腫瘍形成も認められず、安全性が確認されている。しかしながら、もう 1 人の患者から作製した iPS 細胞ではゲノム安定性が低下していることがわかり、移植は行われなかった^[32]。iPS 細胞は、再生医療だけでなく、疾患のメカニズム解明による新しい治療方法の探索、医薬品開発に向けた効果や安全性試験など、様々な事に活用できる。プラズマ照射が iPS 細胞や iPS 細胞由来の細胞、組織に及ぼす影響に関しては、これまでほとんど報告されていない。

1.1.4 DNA 損傷と老化, がん

1.1.1 で述べたように、内因性、外因性の要因により常に DNA 損傷は生じ、DNA 修復機構により修復されている^{[33][34]}。修復しきれなかった損傷は蓄積し、加齢に伴い、内因性の DNA 損傷が蓄積する^[33]。幹細胞における DNA 損傷の蓄積は幹細胞の減少、機能低下につながり、様々な老化現象を引き起こす。例えば、皮膚付属器官である毛包組織において DNA 損傷により幹細胞が枯渇するとメラニン生産能力の低下や毛包のミニチュア化により、白髪、薄毛などの老化現象にいたることが報告されている^{[35][36]}。内因性の DNA 損傷だけでなく、放射線などによる外因性の DNA 損傷でも幹細胞の枯渇、それに伴う老化現象が報告されている^[36]。これらの研究は主にマウスを用いて実験されており、多くの知見が得られているが、DNA 損傷応答はマウスとヒトで異なることも多く^[37]、ヒトでのメカニズム解明も求められている。皮膚がんは大きくメラノーマと非メラノーマに分けられ、メラノーマは、メラニン色素を生産する細胞であるメラノサイトががん化した腫瘍であり、過度な UV 暴露により発症リスクが増加する。非メラノーマである、基底細胞がんや扁平上皮がんは、放射線被曝によって発症リスクが増加す

ることが報告されている^[38]。皮膚がんの90%を占める基底細胞がんは転移しにくく死亡率は低いですが、扁平上皮がんは転移しやすい^[39]。基底細胞がんにおける TP53, CDKN2A (p16) などの突然変異も確認されており^[40], ゲノム不安定性が, がんにつながることを示唆している。また, 正常皮膚細胞やがん細胞に対するプラズマ照射の影響を解析した研究は多くあるが, 幹細胞に対する影響を調べたものは報告されていない。

1.1.5 皮膚とケラチノサイト

皮膚は体の表面を覆っている層であり, 成人では体重の約16%をしめる最も大きな臓器である。皮膚は, 表皮, 真皮, 皮下組織からなり, 表皮は, 角質層, 顆粒層, 有棘層, 基底層の4層構造を形成する。角化細胞(ケラチノサイト)は表皮の95%をしめ, 他には色素細胞(メラノサイト)やランゲルハンス細胞, メルケル細胞などが存在する。角質層は脱核し, 角化したケラチノサイトが重層化した構造をとり, 皮膚のバリアとして機能し, 水の蒸散と透過や微生物感染を防ぐ^[41]。基底層には幹細胞と前駆細胞が存在し, 幹細胞はケラチノサイト全体の1%, 前駆細胞は10%をしめており, 有棘層, 顆粒層へと分化する^[42]。

ES 細胞や iPS 細胞からケラチノサイトに分化誘導する研究はこれまで多数報告されている^{[43]-[51]}。マウスの ES 細胞から作製した胚様体(EB; embryoid body)に対して, レチノイン酸(RA; retinoic acid)を処理すると神経に分化し^{[52][53]}, 外胚葉に BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4)を処理すると神経への分化を阻害し, 表皮へと分化する^{[54]-[56]}ため, ケラチノサイトへの分化誘導には, RA, BMP4 が用いられてきた。2003年に Green らはヒト ES 細胞を重度複合免疫不全(SCID; severe combined immunodeficiency)マウスに移植し, 2ヶ月後に形成された小瘤をフィーダー細胞上で培養すると, ケラチノサイト様の細胞が生じ, p63, ケラチン14(K14)が発現していることを報告している^[43]。2011年 Itoh らは, ヒト iPS 細胞をマトリゲルでコートしたディッシュ上に培養後, RA と BMP4 を作用させケラチノサイトに分化誘導した。正常なヒト線維芽細胞由来の iPS 細胞からだけでなく, ジストロフィー表皮水疱症の患者細胞由来の iPS 細胞からも同様にケラチノサイトを誘導し, それぞれのケラチノサイトから三次元皮膚を構築して比較した。患者細胞はコラーゲンIVをコードする COL7A1 が欠損しているため, 患者の iPS 細胞由来の三次元皮膚はコラーゲンIVが発現していなかった^[57]。2017年 Kajiwara らは, 自己 iPS 細胞を用いた MMC(脊髄髄膜瘤; 脊髄が皮膚に覆われず, 神経障害などが起きる疾患)の胎児治療を目的として, iPS 細胞からケラチノサイト, 三次元皮膚を作製し, ラットの MMC 胎児治療を行なったという報告をしている^[50]。これらの先行研究では, 基底層のケラチノサイトマーカーとして, K14, p63 が用いられている。K14 はケラチン5(K5)とヘテロ二量体を形成し, 細胞骨格として機能している。p63 は1998年に p53 のホモログとしてクローニングされ^[58], プロモーターは2つあり, 複数のスプライシングバリエントが存在する。主に上皮の基底層に発現しており, 複数あるアイソフォームの中で, N 末端の転写活性化ドメイン1を欠く $\Delta Np63$ が主に発現している。p63 の標的遺伝子は K14 以外にも, 細胞間接着や表

皮バリア機能に関わるインテグリン $\alpha 3$, クローデイン 1, 毛髪や歯の発達に関わる DLX3, 四肢の発達に重要な DLX5,6 などが報告されている^[59]。p63 は表皮発達において凝縮したクロマチンに直接結合できるパイオニア因子であり, p63 が発現していない ES 細胞や上皮以外の体細胞では p63 の標的遺伝子部分は閉じたクロマチン状態を維持している。p63 が発現すると, BAF のようなコレギュレーターと共に作用して, クロマチン構造を開く。そして, 発現を誘導しない遺伝子の部分には, H3K4me1 をマークし, 発現を誘導する部分には, H3K27ac をマークするという一連のエピジェネティックな修飾が行われる^{[60][61]}。

1.2 本論文の目的

大気圧低温プラズマは高密度な活性種を生成でき, 熱損傷なく生体に照射できるため, 止血, 創傷治癒, がん治療などの医療分野への応用に向けて, 様々な放電形式の装置が開発されている。特に, 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おり, プラズマ照射による創傷治癒や殺菌ができれば, 治療や予防が可能となる。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, 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。

1.3 本論文の構成

本論文は, 6 章構成となっている。

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。殺菌効果が得られた条件で作製した CO₂ プラズマバブル水が, 正常ヒト皮膚線維芽細胞に及ぼす影響の解析も行った。殺菌効果に起因する活性種を同定するために成分分析を行った結果も記述する。

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, プラズマ照射が幹細胞および, 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, 先行研究を参考に iPS 細胞からケラチノサイトを作製し, プラズマ照射の比較対照として, まずは放射線による DNA 損傷応答を解析した。DNA 損傷応答解析でよく用いられる γ 線を細胞に照射し, DNA 損傷応答などを解析した結果を述べる。

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結果を記述する。

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 Ar, CO₂ 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。毛髪へのプラズマ照射により, トリートメント剤等の毛髪への浸透を促進するなどの応用可能性を述べる。

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, 今後の課題および展望についてまとめた。

第1章の参考文献

- [1] 山本義隆, ニールス・ボーア論文集1 因果性と相補性, 岩波書店 (1999).
- [2] N. Bohr, The Quantum Postulate and the Recent Development of Atomic Theory, *Nature*, **14**, pp. 580-590 (1928).
- [3] J. D. Watson and F. H. C. Crick, MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, **173**, 4356, pp. 737-738 (1953).
- [4] R. De Bont and N. van Larebeke, Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data, *Mutagenesis*, **19**, 3, pp. 169-185 (2004).
- [5] T. Lindahl and B. Nyberg, Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid, *Biochemistry*, **11**, 19, pp. 3610-3618 (1972).
- [6] M. E. Lomax, L. K. Folkes, and P. O'Neill, Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy, *Clin. Oncol.*, **25**, 10, pp. 578-585 (2013).
- [7] 松本義久, 人体のメカニズムから学ぶ放射線生物学. メジカルビュー社 (2017).
- [8] 沖野晃俊, 大気圧プラズマの技術とプロセス開発. シーエムシー出版 (2011).
- [9] T. Oshita, H. Kawano, T. Takamatsu, H. Miyahara, and A. Okino, Temperature Controllable Atmospheric Plasma Source, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **43**, 6, pp. 1987-1992 (2015).
- [10] T. Takamatsu, Kodai Uehara, Yota Sasaki, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Norihiko Ito, Takeshi Azuma, Masahiro Kohno and Akitoshi Okino, Investigation of reactive species using various gas plasmas, *RSC Adv.*, **4**, 75, pp. 39901-39905 (2014).
- [11] H. Kawano, T. Takamatsu, Y. Matsumura, H. Miyahara, A. Iwasawa, and A. Okino, Influence of Gas Temperature in Atmospheric Non-Equilibrium Plasma on Bactericidal Effect, *Biocontrol Sci.*, **23**, 4, pp. 167-175 (2018).

- [12] P. Brun, G. Bernabe, C. Marchiori, M. Scarpa, M. Zuin, R. Cavazzana, B. Zaniol and E. Martines, Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization, *J. Appl. Microbiol.*, **125**, 2, pp. 398-408 (2018).
- [13] Y. Nomura, T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, and A. O. T. Azuma, Investigation of blood coagulation effect of non-thermal multi-gas plasma jet on in vitro and in vivo for endoscopic use, ICPM6, pp. P2-6-1 (2016).
- [14] M. Kurosawa, T. Takamatsu, H. Kawano, Y. Hayashi, H. Miyahara, S. Ota, A. Okino, M. Yoshida, Endoscopic Hemostasis in Porcine Gastrointestinal Tract Using CO2 Low-Temperature Plasma Jet, *J. Surg. Res.*, **234**, February, pp. 334-342 (2019).
- [15] S. Arndt, P. Unger, M. Berneburg, A. K. Bosserhoff, and S. Karrer, Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode, *J. Dermatol. Sci.*, **89**, 2, pp. 181-190 (2018).
- [16] B. Haertel, T. von Woedtke, K. D. Weltmann, and U. Lindequist, Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing, *Biomol. Ther.*, **22**, 6, pp. 477-490 (2014).
- [17] G. Xu, X. Shi, J. Cai, S. Chen, and P. Li, Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice, *Wound Repair Regen.*, **23**, 6, pp. 878-884 (2015).
- [18] J. Gay-Mimbrera, M. C. García, B. Isla-Tejera, A. Rodero-Serrano, A. V. García-Nieto, and J. Ruano, Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer, *Adv. Ther.*, **33**, 6, pp. 894-909 (2016).
- [19] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, and K. Takeda, Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer ' s solution for anti-tumor effects, *Sci. Rep.*, October, pp. 1-11 (2016).
- [20] The Worldwide Market for Advanced Wound Care Products, Kalorama Information (2018).
- [21] S. Y. Moon, D. B. Kim, B. Gweon, W. Choe, H. P. Song, and C. Jo, Feasibility study of the sterilization of pork and human skin surfaces by atmospheric pressure plasmas, *Thin Solid Films*, **517**, 14, pp. 4272-4275 (2009).
- [22] S. Fathollah, S. Mirpour, P. Mansouri, A. R. Dehpour, M. Ghoranneviss, N. Rahimi, Z. S. Naraghi, R. Chalangari and K. M. Chalangari, Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats, *Sci. Rep.*, **6**, pp. 1-9 (2016).

- [23] M. A. Bogle, K. A. Arndt and J. S. Dover, Evaluation of Plasma Skin Regeneration Technology in Low-Energy Full-Facial Rejuvenation, *Arch. Dermatol.*, **143**, 2, p. 168 (2007).
- [24] G. Daeschlein, S. Scholz, R. Ahmed, A. Majumdar, T. V. Woedtke, H. Haase, M. Niggemeier, E. Kindel, R. Brandenburg, K. D. Weltmann and M. Jünger, Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture., *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, **10**, 7, pp. 509-15 (2012).
- [25] S. Arndt, M. Landthaler, J. L. Zimmermann, P. Unger, E. Wacker, T. Shimizu, Y. F. Li, G. E. Morfill, A. K. Bosserhoff and S. Karrer, Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on β -Defensins, Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes In Vitro and In Vivo, *PLoS One*, **10**, 3, p. e0120041 (2015).
- [26] J. H. Choi, H. W. Lee, J. K. Lee, J. W. Hong, and G. C. Kim, Low-temperature atmospheric plasma increases the expression of anti-aging genes of skin cells without causing cellular damages, *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 2, pp. 133-140 (2013).
- [27] K. P. Arjunan, V. K. Sharma, and S. Ptasincka, Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA—a review, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 2, pp. 2971-3016 (2015).
- [28] D. Boehm and P. Bourke, Safety implications of plasma-induced effects in living cells - a review of in vitro and in vivo findings, *Biol. Chem.*, **400**, 1, pp. 3-17 (2018).
- [29] K. Takahashi and S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, **126**, 4, pp. 663-676 (2006).
- [30] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *Cell*, **131**, 5 pp. 861-872, (2007).
- [31] M. Skamagki, C. Correia, P. Yeung, T. Baslan, S. Beck, C. Zhang, C. A. Ross, L. Dang, Z. Liu, S. Giunta, T. P. Chang, J. Wang, A. Ananthanarayanan, M. Bohndorf, B. Bosbach, J. Adjaye, H. Funabiki, J. Kim, S. Lowe, J. J. Collins, C. W. Lu, H. Li, R. Zhao and K. Kim, ZSCAN10 expression corrects the genomic instability of iPSCs from aged donors, *Nat. Cell Biol.*, **19**, 9, pp. 1037-1048 (2017).
- [32] M. Mandai, A. Watanabe, Y. Kurimoto *et al.*, Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 11, pp. 1038-1046 (2017).
- [33] D. J. Rossi, D. Bryder, J. Seita, A. Nussenzweig, J. Hoeijmakers, and I. L. Weissman, Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age, *Nature*, **447**, 7145, pp. 725-729 (2007).

- [34] C. R. R. Rocha, L. K. Lerner, O. K. Okamoto, M. C. Marchetto, and C. F. M. Menck, The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells, *Mutat. Res. – Rev. Mutat. Res.*, **752**, 1, pp. 25-35 (2013).
- [35] H. Matsumura, Y. Mohri, N. T. Binh, H. Morinaga, M. Fukuda, M. Ito, S. Kurata, J. Hoeijmakers and E. K. Nishimura, Stem cells: Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis, *Science*, **351**, 6273 (2016).
- [36] K. Inomata K. Inomata, T. Aoto, N. T. Binh, N. Okamoto, S. Tanimura, T. Wakayama, S. Iseki, E. Hara, T. Masunaga, H. Shimizu and E. K. Nishimura, Genotoxic Stress Abrogates Renewal of Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation, *Cell*, **137**, 6, pp. 1088-1099 (2009).
- [37] D. B. Lombard, K. F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa and F. W. Alt, DNA repair, genome stability, and aging, *Cell*, **120**, 4, pp. 497-512 (2005).
- [38] E. H. Epstein, Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog., *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 10, pp. 743-54 (2008).
- [39] M. T. Martin, A. Vulin, and J. H. Hendry, Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation, *Mutat. Res. – Rev. Mutat. Res.*, **770**, pp. 349-368 (2016).
- [40] B. Krynitz, G. Edgren, B. Lindelo, E. Baecklund, C. Brattstro, H. Wilczek and K. E. Smedby, Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008–A Swedish population-based study, *Int. J. Cancer*, **132**, 6, pp. 1429-1438 (2012).
- [41] 清水宏, あたらしい皮膚科学, 中山書店 (2011).
- [42] F. Amiot, W. Rachidi, M. T. Martin, G. Lemaitre, P. Vaigot, and G. Harfourche, Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells, *Radiother. Oncol.*, **83**, 3, pp. 267-276 (2007).
- [43] H. Green, K. Easley, and S. Iuchi, Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 26, pp. 15625-15630 (2003).
- [44] C. M. Metallo, L. Ji, J. J. D. Pablo, and S. P. Palecek, Retinoic Acid and Bone Morphogenetic Protein Signaling Synergize to Efficiently Direct Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells, *Stem Cells*, **26**, 2, pp. 372-380 (2007).
- [45] H. Guenou, X. Nissan, F. Larcher, J. Feteira, G. Lemaitre, M. Saidani, M. D. Rio, C. C Barrault, F. X. Bernard, M. Peschanski, C. Baldeschi and G. Waksman, Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study, *Lancet*, **374**, 9703, pp. 1745-1753 (2009).

- [46] Y. Sugiyama–Nakagiri, T. Fujimura, and S. Moriwaki, Induction of skin–derived precursor cells from human induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **11**, 12 (2016).
- [47] G. Bilousova, J. Chen, and D. R. Roop, Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage, *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 4, pp. 857–864 (2011).
- [48] O. Veraitch, T. Kobayashi, Y. Imaizumi, W. Akamatsu, T. Sasaki, S. Yamanaka, M. Amagai, H. Okano and M. Ohyama, Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ectodermal Precursor Cells Contribute to Hair Follicle Morphogenesis In Vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 6, pp. 1479–1488 (2013).
- [49] A. Petrova A. Celli, L. Jacquet *et al.*, 3D in vitro model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Reports*, **2**, 5, pp. 675–689 (2014).
- [50] K. Kajiwara, T. Tanemoto, S. Wada *et al.*, Fetal Therapy Model of Myelomeningocele with Three-Dimensional Skin Using Amniotic Fluid Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells, *Stem Cell Reports*, **8**, 6, pp. 1701–1713 (2017).
- [51] L. Larribère, M. Galach, D. Novak, K. Arevalo, H. C. Volz, H. J. Stark, P. Boukamp, M. Boutros and J. Utikal, An RNAi Screen Reveals an Essential Role for HIPK4 in Human Skin Epithelial Differentiation from iPSCs, *Stem Cell Reports*, **9**, 4, pp. 1234–1245 (2017).
- [52] G. Bain, D. Kitchens, M. Yao, J. E. Huettner, and D. I. Gottlieb, Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro, *Developmental Biology*, **168**, 2, pp. 342–357 (1995).
- [53] M. Li, L. Pevny, R. Lovell–Badge, and A. Smith, Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection, *Curr. Biol.*, **8**, 17, pp. 971–S2 (2004).
- [54] Y. Sasai, Regulation of neural induction by the Chd and Bmp–4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*., *Nature*, **376**, pp. 333–336 (1995).
- [55] P. A. Wilson and A. H. Brivanou, Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP–4, *Nature*, **376**, pp. 331–333 (1995).
- [56] H. Kawasaki *et al.*, Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity, *Neuron*, **28**, 1, pp. 31–40 (2000).
- [57] M. Itoh, M. Kiuru, M. S. Cairo, and A. M. Christiano, Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa–induced pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**, 21, pp. 8797–8802 (2011).
- [58] A. Yang, M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M. D. Fleming, V. Dotsch, N. C. Andrews, D. Caput and F. McKeon, p63, a p53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products

- with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities, *Mol. Cell*, **2**, pp. 305-316 (1998).
- [59] E. N. Kouwenhoven, H. van Bokhoven, and H. Zhou, Gene regulatory mechanisms orchestrated by p63 in epithelial development and related disorders, *Biochim. Biophys. Acta. Gene. Regul. Mech.*, **1849**, 6, pp. 590-600 (2015).
- [60] E. Soares and H. Zhou, Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 7, pp. 1179-1190 (2018).
- [61] X. Bao, A. J. Rubin, K. Qu, J. Zhang, Paul G. Giresi, H. Y. Chang and P. A. Khavari, A novel ATAC-seq approach reveals lineage-specific reinforcement of the open chromatin landscape via cooperation between BAF and p63, *Genome Biol.*, **16**, 1, pp. 1-17 (2015).

第2章 プラズマバブル水による皮膚常在菌の殺菌

2.1 緒言

近年、大気圧低温プラズマ装置が開発され、熱に弱い物質や生体にプラズマを照射することが可能となっている^[1]。医療分野では、殺菌、止血、創傷治癒、がん治療を目的とした研究が行われている。その中でも創傷治癒は注目されており、皮膚に対するプラズマ照射の影響を調べた研究は多く報告されている^{[2][3]}。

これまでの研究では、He や Ar などの希ガスを用いてプラズマを生成し、実験に用いることが多かった^{[4][5]}が、本研究室では、様々な原料ガスを使って大気圧プラズマを発生させる技術がある^{[6]-[10]}。ガスの種類によって、プラズマ由来のラジカルなどの活性種が異なり、得られる効果に違いがあり、特に CO₂ は殺菌と止血に効果的である^{[8]-[10]}。三原子分子である CO₂ を原料ガスとして放電し、大気圧下で高密度なプラズマを安定に生成することは困難であり、CO₂ プラズマに関する研究はこれまでほとんどなかった。CO₂ プラズマを応用することができれば、様々なメリットがある。CO₂ は He や Ar などの希ガスよりも非常に安価であり、ランニングコストの削減となる。CO₂ は液体として充填できるため、ポンベ交換頻度を減少できる。また、不燃性で安定な化合物であり、食品分野等で活用されているため、ポンベの流通網が整備されている。そのため、医療機関以外でも導入可能であり広く応用することが可能である。

生体にプラズマを照射する方法として、直接照射だけでなく溶媒中にプラズマを導入して作製したプラズマ処理水を用いる方法がある^[11]。プラズマ処理水が培養細胞および個体に及ぼす影響について多くの研究が報告されている^{[12]-[14]}。創傷治癒の過程は、炎症期、増殖期、成熟期の3期に大別でき、創傷部位に炎症細胞が浸潤し、病原体の侵入を防ぎながら皮膚を再構築するためには、全てのフェーズにおいて、清潔な湿潤環境が必要となる^[15]。そのため、皮膚に対してプラズマによる創傷治癒促進を行うためには、直接照射よりもプラズマ処理水が適していると考えられる。また、プラズマ処理水は広い面積に対する短時間での処理に適しており、他の皮膚疾患の治療や予防にも応用可能である。

本章では、将来的に、CO₂ プラズマ処理水(プラズマバブル水)を創傷治癒促進や皮膚疾患の治療、および予防に応用するために、殺菌効果、成分、培養細胞へ及ぼす影響を調べた。

2.2 プラズマバブル水の作製

2.2.1 マルチガスプラズマジェットによるプラズマバブル水の作製

プラズマバブル水の作製に用いたマルチガスプラズマジェット (DFMJ-02, Plasma Concept Tokyo) の構造図を図 2-1 に示した。アルミ製の電極間距離を 1mm に調整し、電極間放電リモートプラズマを生成した。図 2-2 にプラズマバブル水作製装置のモデル図を示した。マルチガスプラズマジェットをガラス容器の底部にセットし、プラズマを気泡として室温の滅菌水(ナカライテスク)200 mL 中に直接導入した。印加電圧は 9 kV, 周波数は 16 kHz, 原料ガスの流量は 3 LPM である。本研究で採用したプラズマバブリング方式では、液面上部からプラズマを照射するのに比べて、生成したプラズマを周囲の空気に触れることなく液中に導入できる^[16]。本研究ではこのプラズマバブリング方法によって作製したプラズマバブル水を plasma bubbled-up water (PBW) と呼ぶ。

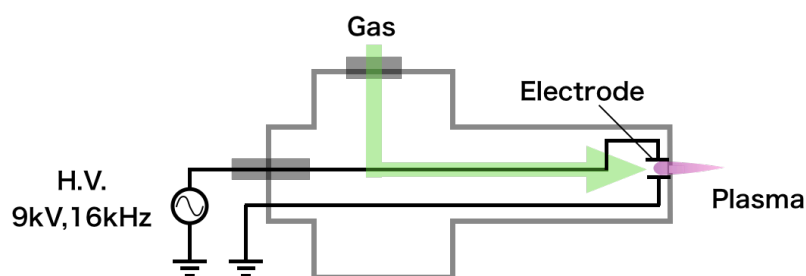


図 2-1 マルチガスプラズマジェットの構造図

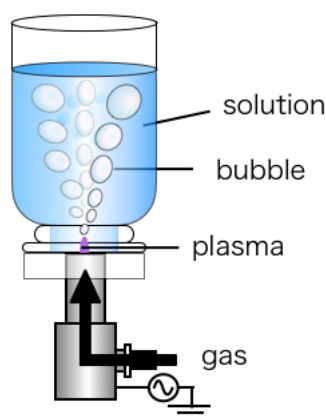


図 2-2 プラズマバブル水作製装置のモデル図

2.2.2 プラズマバブル水の温度, pH 測定

生体や細胞に PBW を処理し、殺菌や創傷治癒を行う場合、タンパク質などの生体高分子の変性を防ぐために、温度は 42°C 以下、pH は弱酸性～中性であることが求められる。そこで、まず始めに、マルチガスプラズマジェットの出口から 2.5 mm におけるプラズマガス温度を熱電対で測定した。原料ガスは、Ar, N₂, CO₂, Air(N₂ 80%, O₂ 20%の混合ガス), O₂ を用いて、原料ガスだけを装置に流入したときのガス温度、プラズマを生成したときのプラズマガス温度を測定した結果を図 2-3 に示した。原料ガスのみの場合は 22.2°C～25.0°C であるが、プラズマを生成した場合は、Ar で 32.9°C, N₂ で 51.5°C, CO₂ で 52.3°C, Air で 53.5°C, O₂ で 53.0°C であった。プラズマを生成することにより、プラズマガス温度が上昇し、50°C を超えることがわかった。次に、PBW の水温を測定し、プラズマバブリング時間との関係を図 2-4 に示した。水温は、水深 70 mm の部位の温度を測定した。Ar, N₂, CO₂, Air, O₂ いずれの PBW でも水温は 1-4°C 上昇し、最も水温が上昇した CO₂ でもバブリング 10 分間後の水温は 26.6°C であった。PBW であれば、熱損傷を与えることなく、生体を処理することができることが明らかになった。次に、同様の条件で、PBW の pH を調べた。図 2-5A に原料ガスだけをバブリングしたときの pH とバブリング時間の関係を示した。CO₂ では pH 4 程度まで低下しており、炭酸の酸解離定数 pKa は 3.6 であるため、炭酸の解離による pH の低下であることが考えられた。プラズマを生成しプラズマバブリングした時の pH を図 2-5B に示した。ガスバブリングと同様にプラズマバブリングでも CO₂ では pH が低下する傾向であったが、プラズマ生成に伴う pH の大きな変化はみられなかった。以上の結果より、CO₂ PBW では、pH が低下するため、コントロールとして、ガスバブリングを用いること、pH 緩衝作用のある溶媒を用いることの必要性が明らかになった。

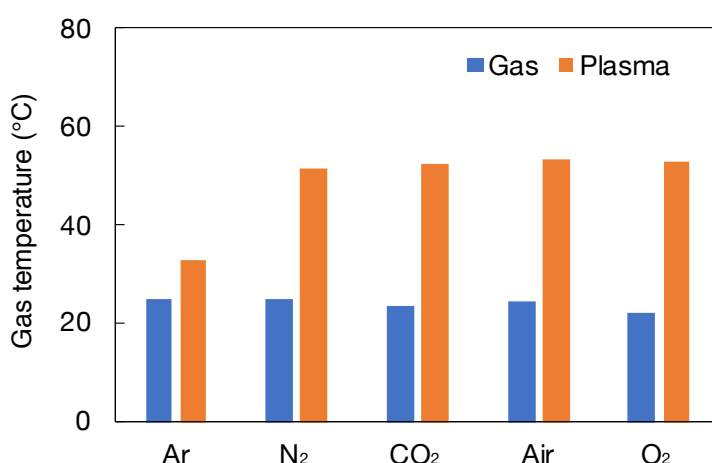


図 2-3 装置出口におけるプラズマガス温度の比較

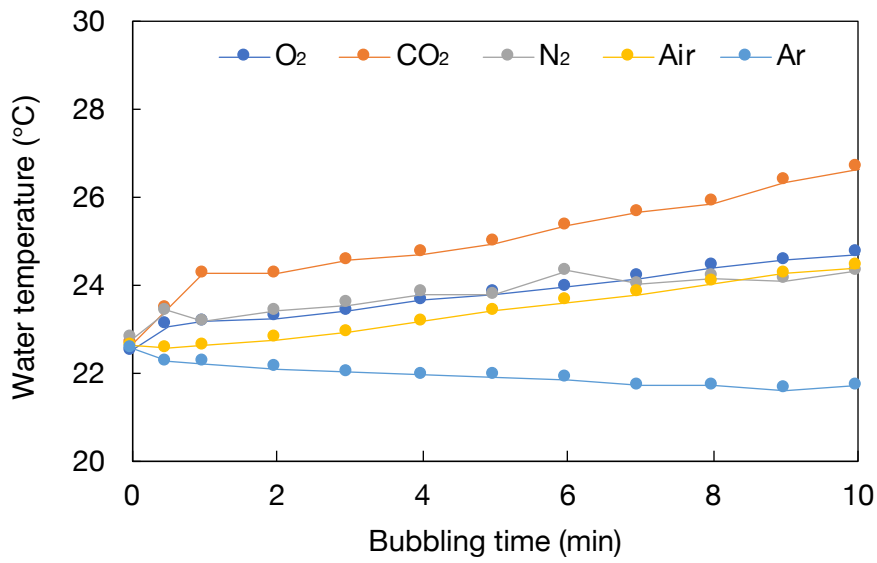


図 2-4 プラズマバブリング時間と水温の関係

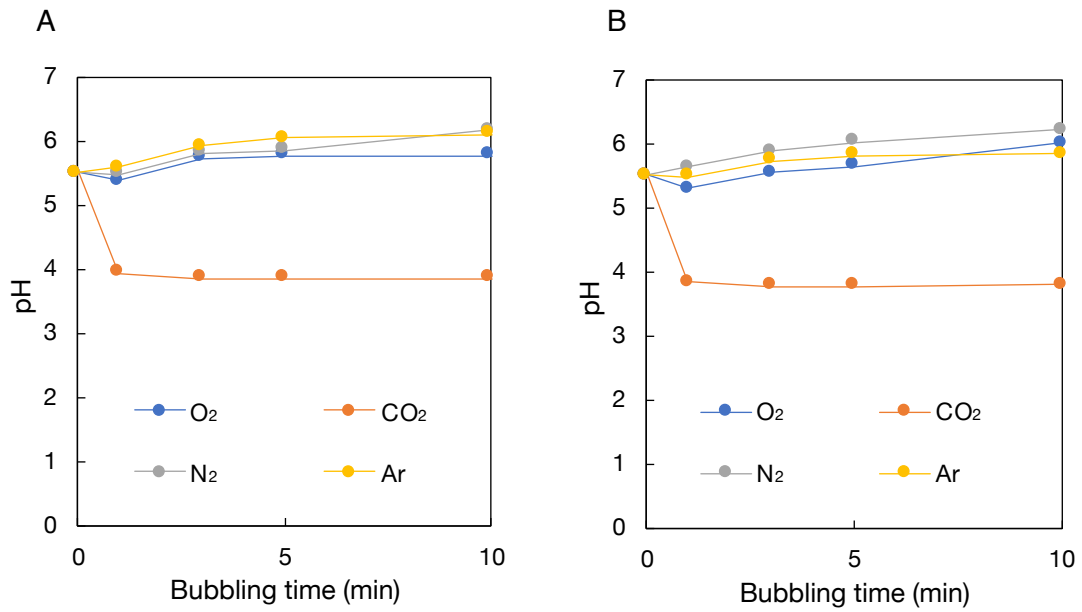


図 2-5 バブリング時間と pH の関係
A;ガスバブリング, B;プラズマバブリング

2.3 プラズマバブル水による殺菌効果

皮膚には、多種類の常在菌が存在し、常在菌のバランスを保つことが重要である。皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)は皮脂を分解し、グリセリンと脂肪酸を生産することで、皮膚バリア機能を保つだけでなく、皮膚表面を弱酸性にし、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の増殖を抑制する^[17]。重度のアトピー性皮膚炎患者では黄色ブドウ球菌が増加していることが報告されており^[18]、皮膚表面がアルカリ性に傾くと、黄色ブドウ球菌が増殖し、皮膚炎などの皮膚疾患症状が生じる。皮膚常在菌のバランスが崩れた時に、特定の菌のみを殺菌し、皮膚常在菌のバランスを正常に保つことができれば、疾患に至る前に予防できる可能性がある。そこで、表 2-1 に示した *S. aureus*, *S. epidermidis* それぞれ 2 種類の菌株を用いて、プラズマバブル水のガス種による殺菌効果の違いを確認した。

2.2.1 で示した方法で作製した 990 μl の PBW に初期菌数 $10^6 \sim 10^7$ (CFU/ml) に調節した 10 μl の菌液を加え、室温で 1 時間保存後、段階希釈を行った。寒天培地にて 37°C で 18 時間培養後、コロニーカウント法により生存菌数を算出した。精製水を溶媒として 5 分間プラズマバブルリングを行い作製した PBW による殺菌結果を図 2-6 に示した。原料ガスは Ar, N₂, CO₂, O₂ をそれぞれ用いて PBW を作製し、ガス種による違いを比較した。Ar と N₂ では生存菌数の大きな低下は見られなかったが、CO₂ では 2 桁程度生存菌数が低下した。O₂ では *S. aureus* ATCC 6538 以外の 3 菌株で検出下限値である 200 CFU/ml まで低下した。O₂ PBW では、オゾンと過酸化水素が生成され、殺菌効果に寄与していると考えられる。

空气中で Ar プラズマを直接照射した時に大腸菌などのグラム陰性菌は、*S. aureus*, *S. epidermidis* などのグラム陽性菌よりも生存率が低下することが報告されている^[19]。グラム陽性菌の中でも菌種や株によってプラズマに対する感受性が異なり、Ar プラズマを 2 分間照射することにより *S. aureus* ATCC 6538 では、生存率が 30% 低下したが、*S. epidermidis* Se14990 では同条件で 10% の生存率であることが示されている。*S. aureus* ATCC6538 は我々の実験でも用いた菌株であり、O₂ PBW 処理により、他の菌株よりも生存率が低下しなかったため、プラズマ処理に対する耐性が高いと考えられる。

次に、DPBS(ナカライテスク)を溶媒として用いて、同様に PBW を作製し、殺菌に用いた結果を図 2-7 に示した。Ar では生存菌数の低下は見られなかったが、N₂, CO₂, O₂ では 3 桁以上の生存菌数低下が見られた。DPBS には 0.02% 塩化カリウム, 0.02% りん酸二水素カリウム, 0.8% 塩化ナトリウム, 0.115% りん酸水素二ナトリウムが含まれている。N₂ PBW では塩化ナトリウムがプラズマ中の活性種と反応し、次亜塩素酸が生成されることで精製水では見られなかった殺菌効果が得られたと考えられる。*S. epidermidis* NBRC 12993 では、N₂ PBW, CO₂ PBW 処理で他の 3 種類の菌株に比べて生存率の低下がわずかに抑えられていた。これらの結果より、原料ガスや用いる溶媒を変化させることにより、菌株の種類によって殺菌効果を制御できることが示唆された。

表 2-1 実験に使用した細菌

細菌名	細胞バンク	細菌株名
<i>S. aureus</i>	ATCC	6538
<i>S. aureus</i>	ATCC	25923
<i>S. epidermidis</i>	NBRC	12993
<i>S. epidermidis</i>	ATCC	12228

ATCC; American Type Culture Collection
NBRC; National Institute of Technology and Evaluation Biological Center

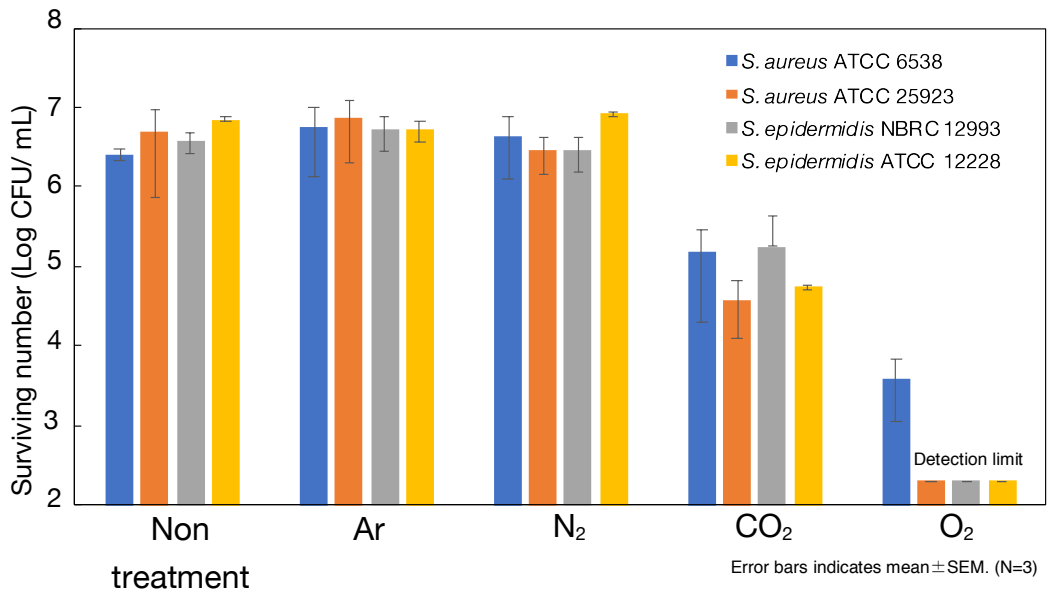


図 2-6 精製水で作製した PBW の殺菌効果の違い

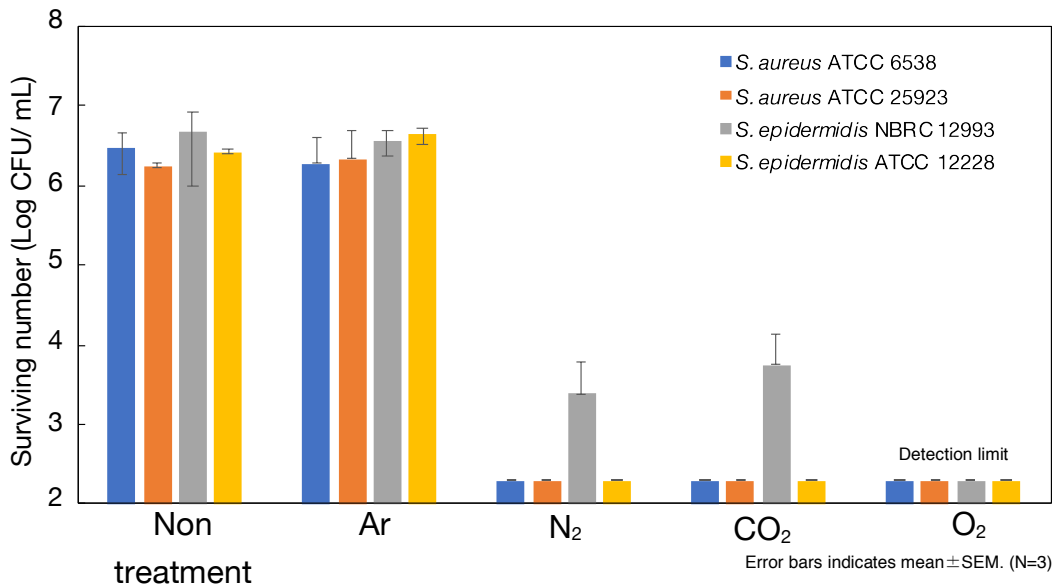


図 2-7 DPBS で作製した PBW の殺菌効果の違い

2.4 プラズマバブル水が細胞に与える影響

2.4.1 細胞培養

本章で使った細胞を表 2-2 に示した。いずれも東京工業大学 先端原子力研究所 松本研究室所有の細胞株を実験に用いた。HeLa, U2OS, RPE は DMEM(High Glucose)(ナカライテスク)に, 10% Newborn calf serum(BCS) (Hyclone), 100 units/ml ペニシリン(PS), 0.5% ストレプトマイシン(SM) (ナカライテスク)を添加したものをを用い, 5% CO₂ 存在下, 湿潤状態 37°Cで培養を行った。NB1RGB は 10% Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone), PS/SM を添加した DMEM を用いた。

表 2-2 実験に使用した細胞

細胞名	細胞バンク	細胞株名	由来
HeLa	ATCC	CCL-2	ヒト子宮頸癌由来細胞
U2OS	ATCC	HTB-96	ヒト骨肉腫由来細胞
RPE	ATCC	CRL-4000	正常ヒト網膜色素上皮細胞
NB1RGB	RCB		正常ヒト皮膚線維芽細胞
HF19	RCB		正常ヒト肺線維芽細胞

ATCC; American Type Culture Collection
RCB; Riken Cell Bank

2.4.2 コールターカウンターによる生存率の測定

24 ウェルプレートに 8×10^4 個/well の細胞を播種し, 24 時間培養した後, プラズマ処理を行った。2.2.1 に示した方法で滅菌水を用いて CO₂ PBW を作製し, 培地を除去したウェルに 1 ml ずつ作製直後の CO₂ PBW を分注し, 室温にて 5 分間反応させた。その後, DPBS 1 ml で 2 回洗浄し, 500 μ l の培地を加え, 24 時間培養を行った。DPBS 1ml で 1 回洗浄後, 0.05% トリプシン 200 μ l 処理により細胞を剥離し, 培地 500 μ l/well で細胞を懸濁して作製した細胞懸濁液 100 μ l を 希釈液であるアイソトン 10 ml に混合した。その希釈液をコールターカウンター装置(Z1, ベックマンコールター)により細胞数を計測した。コールターカウンター装置は, 粒度分布測定装置であり, 8-20 μ m の粒子を計測する条件で, 1 ウェルあたり 3 回測定した。表 2-2 に示した細胞は全て接着細胞であり, 細胞が生存している時のみ, 24 ウェルプレートに接着している。培地を取り除き, DPBS で洗浄後, トリプシンで接着細胞を剥がして, 細胞数を数えることにより, 生細胞数を計測した。

コールターカウンターによる細胞生存率測定方法の妥当性を評価するために, U2OS の初期細胞数を 3×10^4 – 10^5 個の範囲で変化させて 48 時間培養した後の細胞数を計測した。図

2-8 に初期細胞数と培養 48 時間後細胞数の関係を示した。初期細胞数と測定値は線型性を示し、相関係数、0.9926 と高い相関が得られたことから、測定方法の妥当性が確認できた。

2.3 で示した皮膚常在菌の殺菌と同様の条件で作製した PBW を培養細胞に対して処理した時の、生存率に及ぼす影響を調べた。滅菌水で CO₂ PBW を作製し、U2OS, HeLa, HF19, RPE に処理した場合の生存率を図 2-9 に示した。コントロールとして、滅菌水-CO₂ ガスバブリング水を実験に用いた。培養細胞は、滅菌水のみ処理であっても浸透圧が増加するため、生存率が、20~50%まで低下した。CO₂ ガスバブリング水処理、CO₂ PBW 処理でも滅菌水処理と同程度の生存率であり、プラズマ処理による大幅な低下は見られなかった。

次に、DPBS を用いて作製した PBW で、同様に生存率を調べた結果を図 2-10 に示した。DPBS 処理では浸透圧が増加せず、細胞の生存率は低下しないが、DPBS-CO₂ PBW においても生存率は大きく低下せず、CO₂ ガスバブリング水と同程度であった。

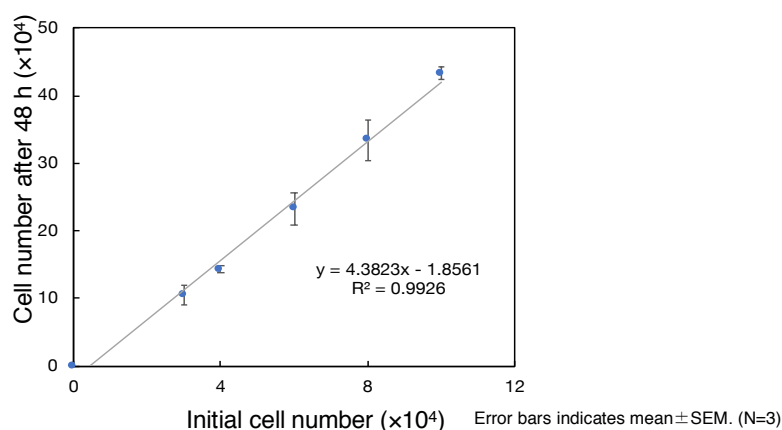


図 2-8 U2OS 初期細胞数と 48 時間培養後の細胞数の関係

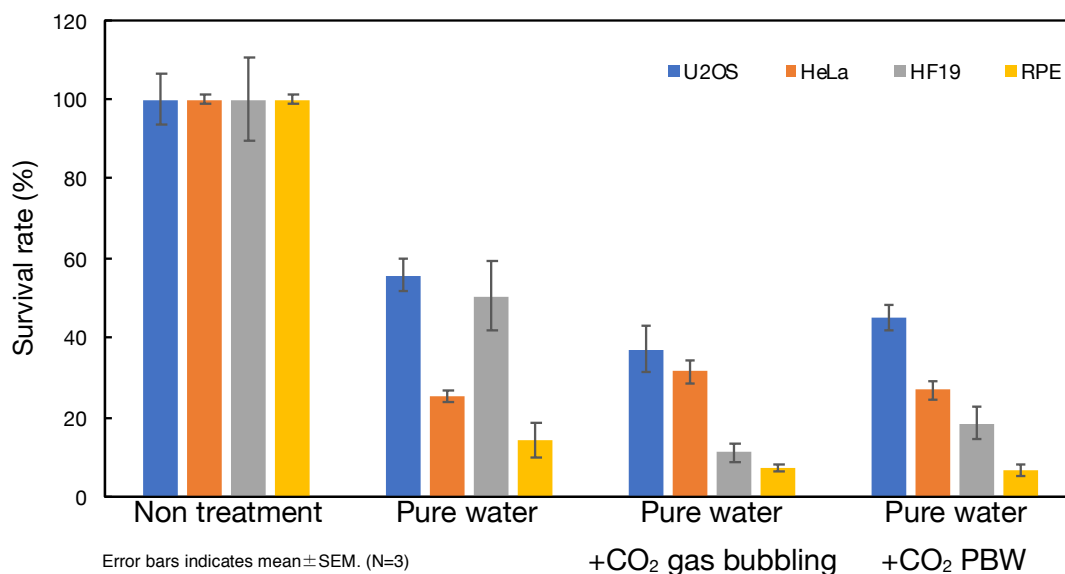


図 2-9 滅菌水で作製した CO₂ PBW 処理が培養細胞に及ぼす影響

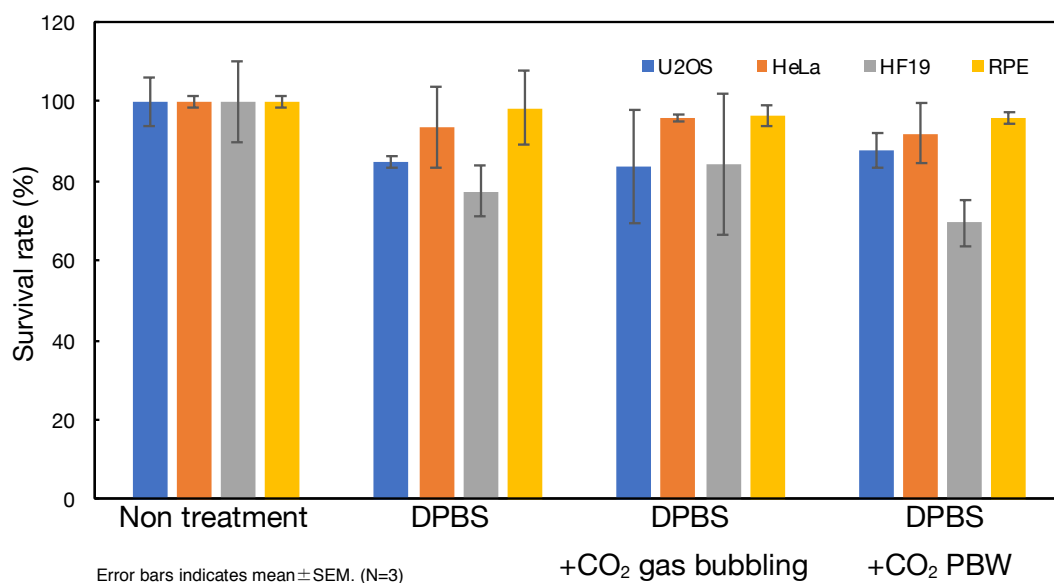


図 2-10 DPBS で作製した CO₂PBW 処理が培養細胞に及ぼす影響

2.4.3 WST-8 アッセイによる生存率の測定

WST-8 アッセイは、細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH; nicotinamide adenine dinucleotide) の電子伝達に関連した代謝活性を測定し、細胞の生存率を算出する方法である。96 ウェルプレートに 5×10^4 個/ml の細胞懸濁液を 100 μ l ずつ入れ、24 時間培養した後、2.2.1 に示した方法で作製した CO₂ PBW を 10 μ l/well ずつ入れ、24 時間培養した。その後、WST-8 試薬を 10 μ l/well ずつ添加後、一定時間培養し、プレートリーダー iMark (BioRad) で 450nm の吸光度を測定した。データの信頼性が得られるのは、吸光度の値が 2 以下の場合であるため、WST-8 試薬を加えた後の培養時間と吸光度の関係を図 2-11 に示した。HeLa, RPE, U2OS, NB1RGB の四種類の細胞で調べた所、WST-8 の反応時間が 2 時間のときに、全ての細胞で吸光度が 2 以下であったため、反応時間を 2 時間とした。WST-8 による生存率測定方法の妥当性を評価するために、U2OS の初期細胞数を 0.3×10^4 – 3×10^4 個/well と変化させ、48 時間培養後にアッセイを行った結果を図 2-12 に示した。初期細胞数と測定値は線型性を示し、相関係数 0.9885 と高い相関が得られたことから、測定方法の妥当性が確認できた。

滅菌水で CO₂ PBW を作製し、NB1RGB, HeLa, U2OS に 10 μ l /well ずつ加え 24 時間培養後の生存率を図 2-13 に示した。コントロールとして、滅菌水、CO₂ ガスバブリング水を用いた。今回の実験系では培地 100 μ l に滅菌水 10 μ l を添加しているため、2.4.2 のコールターカウンターでの計測時より浸透圧の増加が抑えられている。滅菌水のみ処理では NB1RGB, HeLa, U2OS の生存率は 82–97% であり、CO₂ ガスバブリング水処理では 85–89% と同程度であった。CO₂ PBW 処理では、73–84% であり、PBW による大幅な生存率の低下は見られなかった。

DPBS を用いて CO₂ PBW を作製し、同様に生存率を調べた結果を図 2-14 に示した。DPBS のみ処理では生存率は 72-100%, CO₂ ガスバブリング水処理では 75-95%, CO₂ PBW 処理では 64-103%であった。HeLa では DPBS のみ処理で 73%と生存率が低下している理由は不明であるが、PBW により、大幅な生存率低下は確認されなかった。

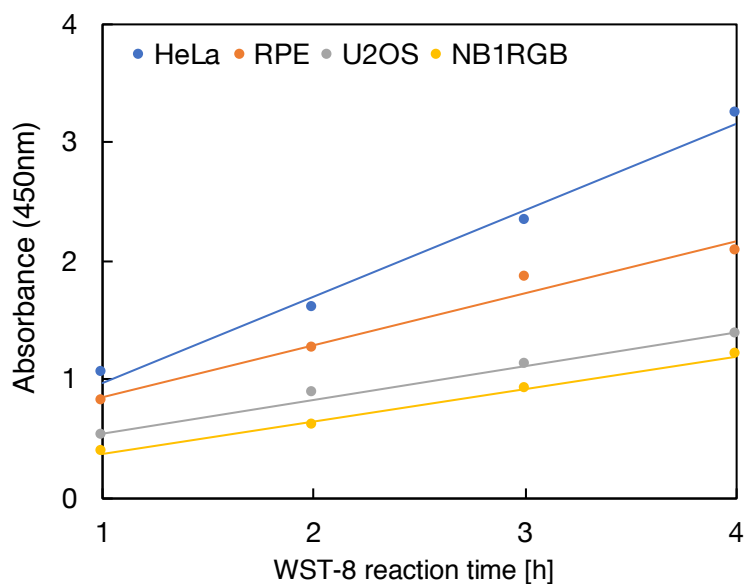


図 2-11 WST-8 反応時間と吸光度の関係

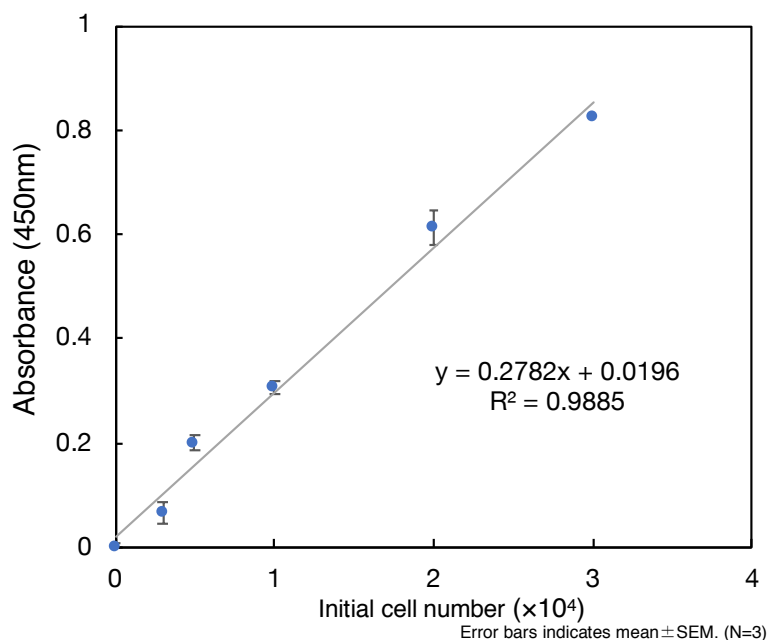


図 2-12 U2OS 初期細胞数と 48 時間培養後の吸光度の関係

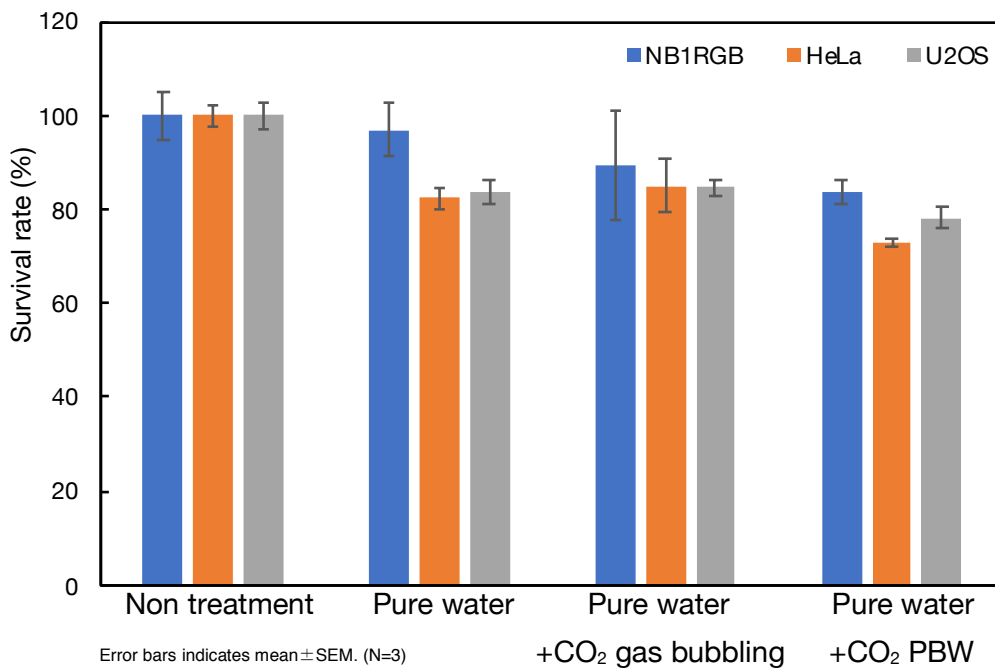


図 2-13 滅菌水で作製した CO₂PBW 処理が培養細胞に及ぼす影響

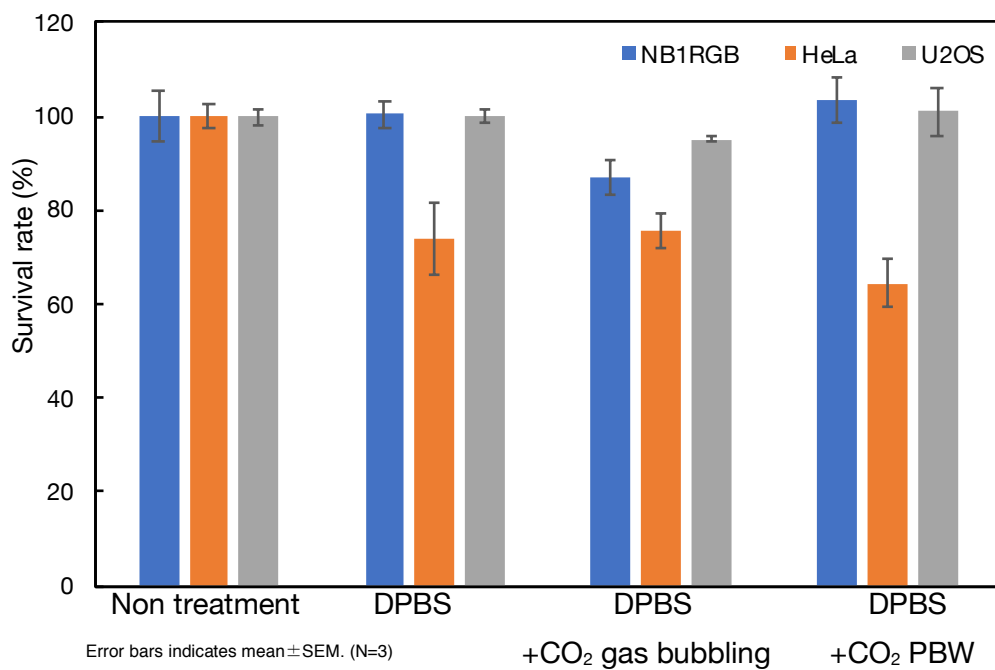


図 2-14 DPBS で作製した CO₂PBW 処理が培養細胞に及ぼす影響

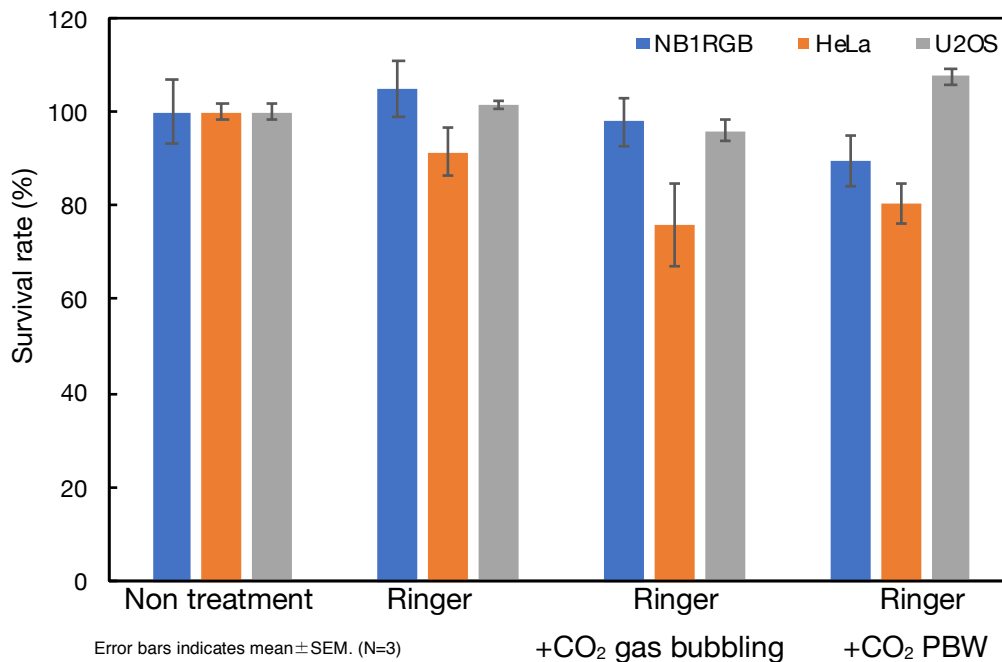


図 2-15 L-乳酸ナトリウムリンゲル液で作製した CO₂PBW 処理が培養細胞に及ぼす影響

プラズマを照射した培地などを培養細胞に処理すると、がん細胞はアポトーシスが誘導されやすいが、正常細胞では誘導されにくいという選択的アポトーシスが報告されている^{[12][13]}。その時に、培地に含まれている成分によって、生存率に及ぼす影響が異なることも示されている^[13]。上述したように、滅菌水と DPBS で作製した CO₂ PBW では、コントロールに比較して、大幅な生存率の低下がみられなかった。そこで、L-乳酸ナトリウムリンゲル液中の L-乳酸ナトリウムがプラズマ処理水によるがん細胞の選択的アポトーシスに関与しているという報告があり^[12]、我々の作製した PBW でも同様の現象が確認できるか調べた。L-乳酸ナトリウムリンゲル液は 0.2 g/L 塩化カルシウム、0.3 g/L 塩化カリウム、6 g/L 塩化ナトリウム、3.1 g/L L-乳酸ナトリウムを含む。L-乳酸ナトリウムリンゲル液を用いて CO₂ PBW を作製し、同様に実験を行った結果を図 2-15 に示した。L-乳酸ナトリウムリンゲル液処理では生存率は 91-105%、CO₂ ガスバブリング水処理では 76-98%、CO₂ PBW 処理では 80-108%であり、コントロールに比べて、PBW 処理で大幅な生存率の低下は見られなかった。先行研究^[12]では、がん細胞として、U251SP(悪性脳腫瘍)、SK-OV-3(卵巣がん)、SiHa(子宮頸がん)、正常細胞として、MCF10A(上皮細胞)、ケラチノサイトを実験に用いている。Ar を原料ガスとして用いて作製したプラズマを L-乳酸ナトリウムリンゲル液に照射し、プラズマ処理溶液を生成している。先行研究では、正常細胞よりもがん細胞でプラズマ処理水により生存率が大幅に低下しているが、本研究では、正常細胞、がん細胞どちらの細胞でも、細胞の生存率は低下しなかった。この理由として、用いている細胞、プラズマ源、原料ガスが異なることが考えられる。

2.4.4 免疫染色による DNA 損傷応答解析

1 章で述べたように、DNA の二本鎖切断(DSB; Double Strand Break)は放射線のように外的因子だけでなく、細胞内で生じた活性酸素などによっても生じる。過酸化水素処理などで誘導される酸化ストレス応答では、DSB よりも塩基損傷による DNA 一本鎖切断(SSB; Single Strand Break)が生じることが多いと報告されている。そこで、作製した CO₂ PBW を培養細胞に対して処理することにより、DSB が生じているのか確認した。DNA 損傷応答の中で、H2AX のリン酸化と 53BP1(p53 binding protein 1)の集積を指標に解析した。DSB が生じたクロマチン部位を MRN(MRE11-RAD50-NBS1)複合体が認識し、ATM をリクルートし自己リン酸化する。その ATM により H2AX の Ser139 がリン酸化され、リン酸化された H2AX を γ -H2AX と呼ぶ。H2AX はヌクレオソームを構成するヒストンの H2A のバリエーションである。その後、シグナル伝達が進み、DSB 部位に 53BP1 が集積することにより、修復タンパク質を集め、DNA を修復する^[20]。

カバーガラスを入れた 24 ウェルプレートに 2×10^4 個の細胞(NB1RGB)を播種し、24 時間培養した。その後、培地を抜いてから、各溶媒で 5 分間プラズマバブリングを行い作製した CO₂ PBW を 1 ml 入れ、室温で 5 分間静置後、DPBS で 2 回洗浄した。その後、培地を入れ 1 時間培養した。DPBS で 2 回洗浄後、4% パラフォルムアルデヒドを 200 μ l 加え、室温で 10 分間放置し、細胞を固定した。DPBS で 2 回洗浄後 0.5% TritonX-100/DPBS 4°Cにて 5 分間放置し、透過処理を行った。DPBS で 2 回洗浄後 1% BSA/PBST で 1000 倍に希釈した抗リン酸化 H2AX(S139)抗体(mouse, cat# 05-636, MerckMillipore), および抗 53BP1 抗体(rabbit, cat# A300-272A, Bethyl Laboratories)溶液 150 μ l 加え、湿潤環境の室温にて 3-4 時間、一次抗体を反応させた。PBST で 3 回洗浄後、1% BSA/PBST で 1000 倍に希釈した Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (Molecular Probes), Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse IgG (Molecular Probes) 溶液 150 μ l 加え、遮光湿潤環境で室温にて 1 時間、二次抗体を反応させた。PBST で 5 回洗浄後、0.1 μ g/ml DAPI を含む mounting medium 7 μ l を滴下したスライドガラスの上にカバーガラスをのせ遮光環境の室温で 1 時間以上乾燥させた。蛍光顕微鏡(IX7, オリンパス)を用いて 20 倍レンズにて撮影を行った。

まず始めに、確実に DNA 損傷が生じる条件で NB1RGB を処理して、免疫染色を行った結果を図 2-16 に示した。放射線照射は、東京工業大学 コバルト照射施設にて行った。線源はコバルト 60 を用いた。コバルト 60 は 1 崩壊あたり、1.17MeV, 1.33MeV のエネルギーを持つ γ 線を 1 個ずつ放出し、半減期は 5.27 年である。約 6 ヶ月ごとに指頭型電離箱を用いて線量率を測定し、減衰補正した。本研究では、線量率は 0.44-2.61 Gy/min, 照射線量は 1-5 Gy の範囲で γ 線照射を行った。DNA 損傷応答の先行研究では、同程度の照射量での報告が多いことに加え、日本でのがんに対する放射線治療での γ 線照射量が一回 2 Gy であることが多いため、この条件に設定した。 γ 線を 5 Gy 照射すると、細胞核内での γ -H2AX と 53BP1 の発現がフォーカス状になり、DSB 部位への集積が確認された。ヒドロキシウレア(HU; Hydroxyurea)は抗がん剤で、リボヌクレオチドレダクターゼを阻害し、細胞内 dNTP 含量を低下させることで

SSB 修復を阻害する。マイトマイシン C(MMC; MitomycinC)も抗がん剤で, DNA を架橋し複製阻害する。2mM HU 処理, 1 μ g/ml MMC 処理により, γ -H2AX と 53BP1 いずれもフォーカスを形成しているが, HU では核全体に小さなフォーカスが形成されており, γ 線や MMC とは異なる傾向であった。HU の傾向は, H₂O₂ 処理と近く, 0.5 mM H₂O₂ では γ -H2AX の発現が強く核全体に広がっていた。

滅菌水で CO₂PBW を作製し, NB1RGB に処理後, 免疫染色した結果を図 2-17A に示した。コントロールとして, 滅菌水, 5 分間 CO₂ ガスバブリングを行った滅菌水を同様に処理した時の結果を示した。CO₂PBW, CO₂ ガスバブリング処理どちらも, γ -H2AX の発現が確認できたが, 53BP1 のフォーカスは見られなかった。図 2-5 で示したように, 滅菌水への CO₂ プラズマバブリング, CO₂ ガスバブリング, いずれも溶媒の pH が 4 程度まで低下しているため, pH の低下により生じた現象であると考えられた。pH, 浸透圧を調整している溶媒である DPBS, L-乳酸ナトリウムリンゲル液で CO₂PBW を作製し, NB1RGB に処理後, 免疫染色した結果を図 2-17B, 図 2-17C に示した。どちらも, CO₂PBW 処理で, γ -H2AX と 53BP1 の発現がフォーカス状になっている細胞が見られた。図 2-16 で示したコントロールの処理の中で, H₂O₂ に近い傾向であり, この結果より, CO₂PBW 処理で弱い酸化ストレスが生じていると考えられた。

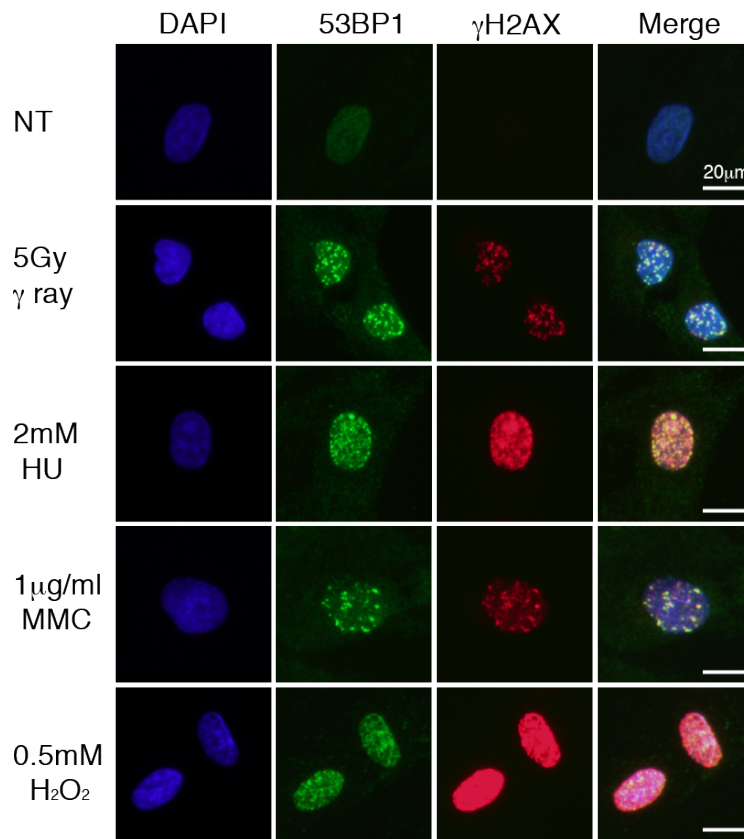


図 2-16 NB1RGB に対する γ 線, HU, MMC, H₂O₂ 処理の影響

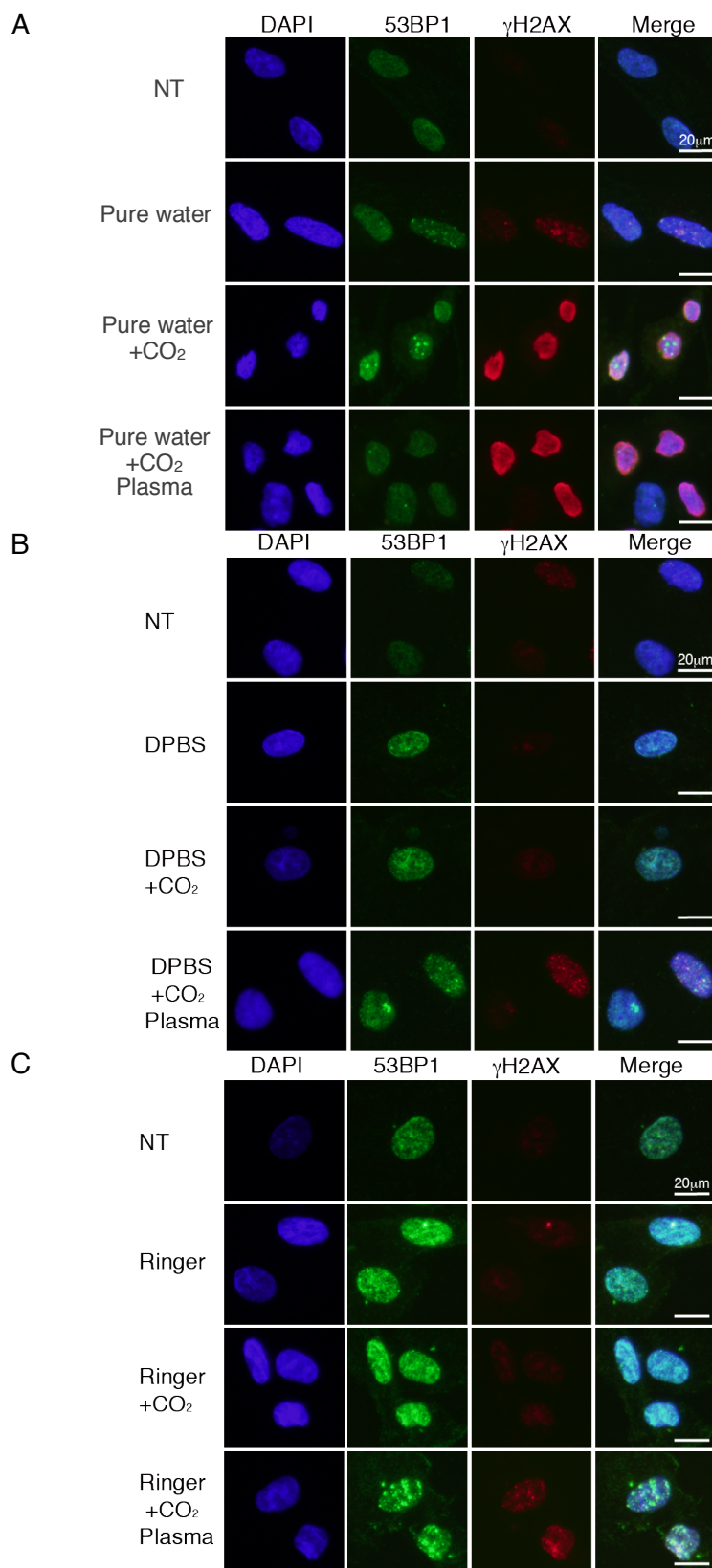


図 2-17 滅菌水, DPBS, L-乳酸ナトリウムリンゲル液で作製した CO₂PBW 処理の NB1RGB に対する影響

2.5 プラズマバブル水の成分分析

2.5.1 電子スピン共鳴法と吸光光度法による活性種の測定

CO₂ PBW 中に生成した活性種を調べるために、電子スピン共鳴法 (ESR; Electron Spin Resonance)と吸光光度法による活性種測定を行った。短寿命活性種であるヒドロキシルラジカル (HO \cdot) および一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、スピントラッピング剤として、5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (DMPO), 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC)を使用し、スピントラッピング剤に 5 分間 CO₂ プラズマバブリングを行い、ESR (JES-FA100, 日本電子)で測定した。ESR の測定条件を表 2-3 に示した。

オゾン (O₃) および過酸化水素 (H₂O₂) は分光光度計 (U-2900, 日立ハイテクノロジーズ) を用いて測定した。精製水を用いて 5 分間 CO₂ プラズマバブリングを行い作製した CO₂ PBW をインディゴ試薬と反応させた後、350 nm の吸光度の変化からオゾン定量した。インディゴは、300 nm と 600nm 付近に吸収極大があり、O₃ によってインディゴが酸化されるとイチサンへと変化する。イチサンは、可視領域に吸収波長がないため、イチサンの生成に伴い、300 nm と 600nm の吸光度は減少する。この吸光度の減少率から O₃ を定量した。

H₂O₂ は 200 μM キシノールオレンジ, 150 mM 硫酸アンモニウム鉄 (II), 150 mM 硫酸および 200 mM ソルビトールを含む溶液と反応させた後、440 nm の吸光度を測定した。H₂O₂ による Fe²⁺ の酸化で生じた Fe³⁺ はキシノールオレンジと結合する。キシノールオレンジは、440 nm に吸収極大があるが、Fe³⁺ と結合すると、吸収極大が 580 nm にシフトする。440nm の吸光度の減少率から H₂O₂ を定量した。

CO₂ PBW 中の HO \cdot , $^1\text{O}_2$, O₃, H₂O₂ を定量した結果を図 2-18 に示した。HO \cdot は 1.4 μM , $^1\text{O}_2$ は 75.6 μM , H₂O₂ は 4.2 μM , O₃ は検出限界以下であった。先行研究では、培地や溶媒に Ar プラズマを上から照射した時に、700 μM -1 mM の H₂O₂ が生成するため、H₂O₂ とその他発生した活性種によって細胞のアポトーシスが誘導され細胞死に至ると考えられてきた^{[12][13][21]}。また、プラズマ処理液を希釈して、H₂O₂ が 50 μM に調整した溶液でも、細胞死誘導効果があることが示されている^[12]。これまでの研究では、H₂O₂ が細胞死の誘導に関与しているが、H₂O₂ 以外の活性種も関与していると考えられている。本研究で作製した CO₂ PBW にも H₂O₂ は含まれているが、4.2 μM と低濃度であること、 $^1\text{O}_2$ の濃度は 75.6 μM であるが、寿命がマイクロ秒オーダーで短時間であることから、2.3 で示した皮膚常在菌の殺菌効果に関与する活性種が他に存在すると考えられた。

表 2-3 ESR の測定条件

Microwave frequency	9.424818 GHz
Sweep Time	2 min
Modulation frequency	100 kHz
Measured magnetic field	335.5±5 mT
Modulation width	0.1 mT
Time constant	0.1 s

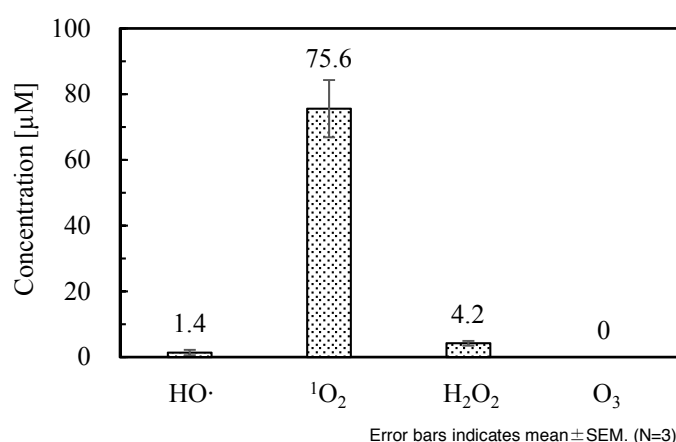


図 2-18 CO₂ PBW 中の活性種の濃度

2.5.2 イオンクロマトグラフィー, NMR による成分分析

プラズマ処理水を作製する方法は、2.1.1 で示した方法以外にも、様々な手法が開発されている^[11]。その中で、DBD を用いて作製した CO₂ プラズマ処理水中に、過ギ酸が含まれることが報告されている^[22]。過ギ酸には殺菌作用があり、寿命も 12 時間程度と比較的長寿命である^[23]。そこで、我々の研究室で作製した CO₂ PBW 中にも過ギ酸が含まれているのか、他に含まれている化合物があるのかを明らかにするために、イオンクロマトグラフィー(ICS-1500, Dionex)分析を行った。イオンクロマトグラフィーの条件を表 2-4 に示した。まず、コントロールとして、Gehrらの方法^[24]を参考に合成した過ギ酸(sPFA)と 50 mg/L ギ酸(FA)をイオンクロマトグラフィーで分析した結果を図 2-19 に示した。過ギ酸は 85% ギ酸と 95% 硫酸、35% 過酸化水素水を用いて、40°C 90 分間反応させて合成し、溶液中のギ酸が 50 mg/L となるように希釈して分析した。ギ酸、合成過ギ酸溶液共に、2.2 min 付近にギ酸のピークが見られた。合成過ギ酸溶液では 20 min 付近に硫酸のピークは確認できたが、それ以外に、ピークは確認できなかった。次に、精製水に対して、5 分間 CO₂ ガスバブリングした溶液をイオンクロマトグラフィーで分析した結果を、図 2-20 A に、CO₂ プラズマバブリングにより作製した CO₂ PBW の結果を図 2-20 B に示

した。それぞれ作製後、室温で、5 分間、24 時間、72 時間保存した後、分析した。CO₂ PBW 作製後 5 分では 2.6 min 付近にピークが存在し、その後保存時間の経過に伴い、ピークは消失した。このピークが過ギ酸、もしくは、他に、プラズマにより生成した化合物由来のピークである可能性も考えられたが、CO₂ ガスバブリングでも同様の傾向であったため、CO₂ ガス由来のピークであると考えられた。合成した過ギ酸溶液でも過ギ酸と思われるピークが得られなかったことから、今回用いたイオンクロマトグラフィーの条件では、過ギ酸を検出することは困難であることが明らかになった。

表 2-4 イオンクロマトグラフィーの条件

Column	IonPac AS12A
Eluent	AS12A (2.7 mM Na ₂ CO ₃ 0.3mM NaHCO ₃)
Flow rate	1.5 ml/min
Column temperature	35°C
Suppressor current	22 mA

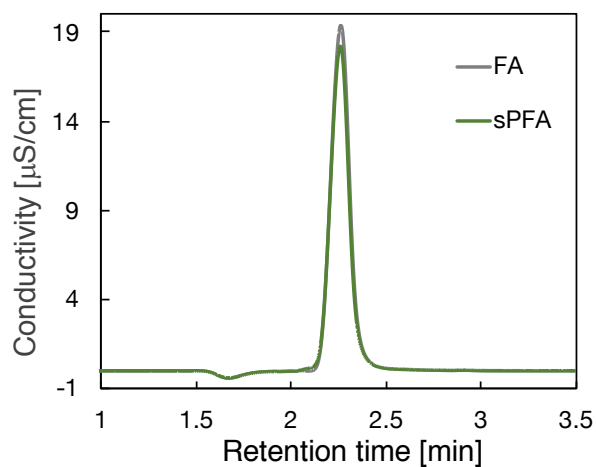


図 2-19 ギ酸と合成過ギ酸のイオンクロマトグラフィーでの分析

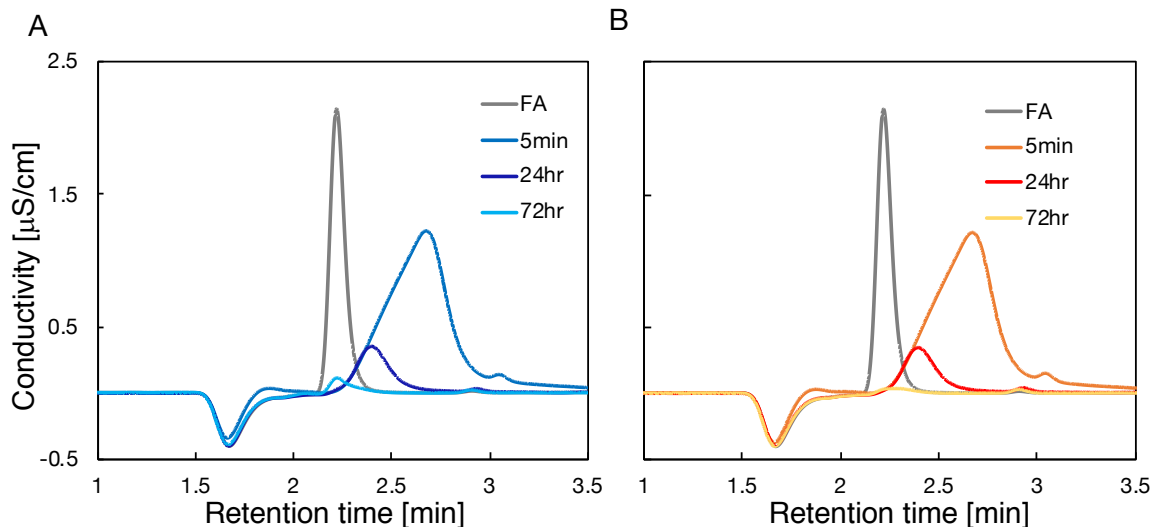


図 2-20 CO₂ PBW, CO₂ガスバブリング水のイオンクロマトグラフィーでの分析

A; CO₂ガスバブリング水, B; CO₂PBW

次に、CO₂ PBW を核磁気共鳴法(NMR; Nuclear Magnetic Resonance)により測定した。分析には、400 MHz NMR 装置 (ECX-400, 日本電子)を用いた。NMR 分析条件を表 2-5 に示した。イオンクロマトグラフィーでの分析と同様に、50 mg/L ギ酸(FA)と合成過ギ酸(sPFA)を NMR で分析した結果を図 2-21 に示した。合成過ギ酸は、合成後 1 時間室温保存してから分析した。ギ酸は 164.5 ppm 付近にシングルピークが見られたが、合成過ギ酸では、164 ppm 付近に二つのピークが検出できた。この 164 ppm のピークが過ギ酸であると考えられた。次に、CO₂ガスバブリングを 5 分間行って作製した溶液を NMR で分析した結果を図 2-22 A に、CO₂ PBW の結果を図 2-22 B に示した。CO₂ PBW は作製後室温で 30 分間保存してから分析を行った。CO₂ PBW では、164 ppm 付近にピークは見られず、124 ppm 付近に小さなピークが検出された。この 124 ppm のピークは、CO₂ガスバブリングでも確認されたため、CO₂ガス由来であると考えられる。

以上の結果より、本研究で作製した CO₂ PBW 中には、過ギ酸は存在しない、もしくは生成されていたとしても、すぐに分解して他の成分になっている可能性が高いことが明らかになった。また、イオンクロマトグラフィー、NMR での分析により、CO₂ガス以外の成分が検出されなかったことから、陰イオン性の化合物や C 由来の化合物の中で、長寿命の活性種は CO₂ PBW 中には含まれていないことも明確にすることができた。そのため、¹O₂等の短寿命の活性種から生成した中程度の寿命を持つ化合物が殺菌効果に寄与している可能性が示唆された。

表 2-5 NMR の分析条件

Resonance frequency	100.525 MHz
Observation nucleus	^{13}C
Spectral width	31407 Hz
Relaxation delay	1.54 s

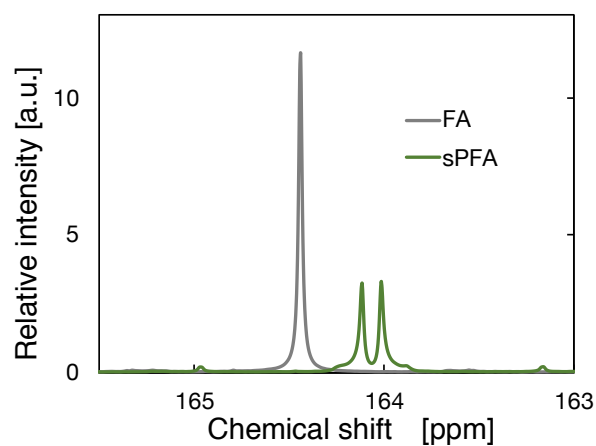


図 2-21 ギ酸と合成過ギ酸の NMR での分析

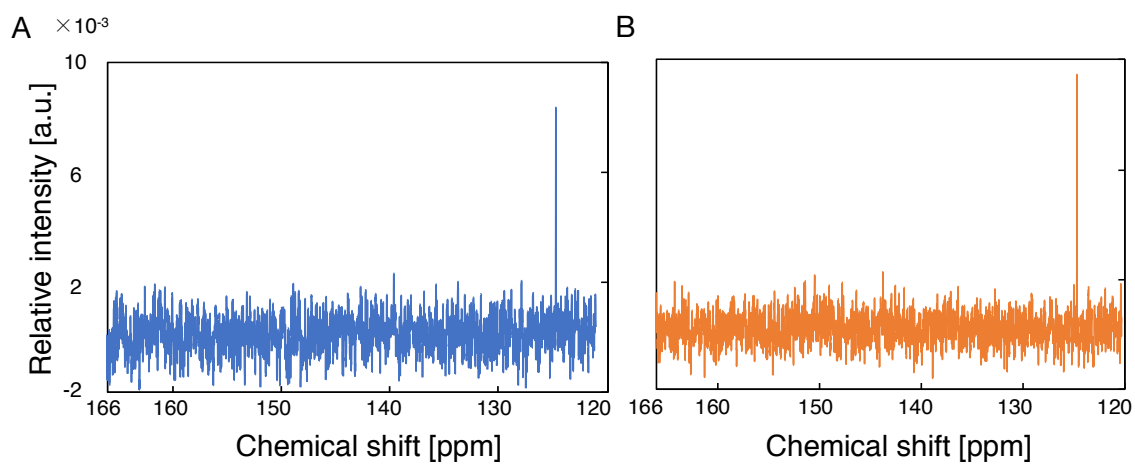


図 2-22 CO_2 PBW, CO_2 ガスバブリング水の NMR での分析

A; CO_2 ガスバブリング水, B; CO_2 PBW

2.6 まとめ

本章ではプラズマバブル水による、皮膚常在菌の殺菌効果の確認、培養細胞に及ぼす影響の解析、殺菌効果に寄与する成分の分析に関して記述した。

始めに、皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌に対する CO₂ PBW の殺菌効果を確認した。滅菌水を溶媒として作製した CO₂ PBW では、初期生菌数 10⁶~10⁷ CFU/ml から 2 桁程度生存菌数が低下する効果が得られた。DPBS を用いて作製した CO₂ PBW では、3 桁~検出限值である 200 CFU/ml まで低下し、精製水よりも高い殺菌効果が得られた。

殺菌効果が得られた条件で、培養細胞に CO₂ PBW を処理すると、コントロールに比べ、生存率は大きく低下しないことが明らかになった。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞の DNA 損傷に及ぼす影響を確認したところ、CO₂ PBW 処理は、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。

CO₂ PBW の効果に起因する活性種を同定するために、精製水を用いて作製した CO₂ PBW を電子スピン共鳴法、吸光光度法により測定した結果、HO•は 1.4 μM、¹O₂は 75.6 μM、H₂O₂は 4.2 μM 含まれているが、O₃は含まれていないことを明らかにした。¹O₂は短寿命であり、H₂O₂の寿命は長い、低濃度であるため、効果に直接関与しているとは考え難い。そこで、イオンクロマトグラフィー、NMR により、他の長寿命活性種が含まれているか分析したが、長寿命の化合物は、検出されなかった。これらの結果より、CO₂ PBW では ¹O₂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を明らかにした。

本研究では、殺菌効果に起因する成分の同定までは至らなかった。CO₂ PBW による創傷治癒を実用化するためには、効果に起因する成分の同定が求められる。しかしながら、長寿命の活性種が検出されなかったことから、残留性が少なく、廃液処理などの問題を考慮する必要がないため、将来的に様々な応用方法が考えられる。例えば、小型のプラズマバブル水発生装置を開発することにより、災害時の救命救急や難民キャンプ、僻地医療における殺菌装置として活用できる可能性がある。実用化するためには、使用する溶媒を、精製水ではなく、水道水や RO 水など現実的に利用しやすい溶媒での効果、安全性、生成される成分を解析することも求められる。また、表皮常在菌を皮膚模倣支持体などに付着させた状態で効果が得られるのかについても確認する必要がある。本研究において、弱い酸化ストレスが生じている可能性が得られたため、その刺激により、成長因子や抗菌ペプチドの発現が増加している可能性も考えられる。今後は、創傷治癒に関連する遺伝子発現の変化を明らかにするなど、メカニズム解明も期待される。

第2章の参考文献

- [1] T. von Woedtke, S. Reuter, K. Masur, and K. D. Weltmann, Plasmas for medicine, *Phys. Rep.*, **530**, 4, pp. 291-320 (2013).
- [2] S. Fathollah, S. Mirpour, P. Mansouri, A. R. Dehpour, M. Ghoranneviss, N. Rahimi, Z. S. Naraghi, R. Chalangari and K. M. Chalangari, Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats, *Sci. Rep.*, **6**, pp. 1-9 (2016).
- [3] G. Daeschlein, S. Scholz, R. Ahmed, A. Majumdar, T. V. Woedtke, H. Haase, M. Niggemeier, E. Kindel, R. Brandenburg, K. D. Weltmann and M. Jünger, Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture., *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, **10**, 7, pp. 509-15 (2012).
- [4] Y. Liu, Q. Liu, Q. S. Yu, and Y. Wang, Nonthermal Atmospheric Plasmas in Dental Restoration, *J. Dent. Res.*, **95**, 5, pp. 496-505 (2016).
- [5] J. Gay-Mimbrera, M. C. Garcia, B. Isla-Tejera, A. Rodero-Serrano, A. V. Garcia-Nieto, and J. Ruano, Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer, *Adv. Ther.*, **33**, 6, pp. 894-909 (2016).
- [6] T. Takamatsu, A. Kawate, K. Uehara, T. Oshita, H. Miyahara, D. Dobrynin, G. Fridman, A. Fridman and A. Okino, Bacterial Inactivation in Liquids Using Multi-Gas Plasmas, *Plasma Med.*, **2**, 4, pp. 237-247 (2012).
- [7] T. Takamatsu, Kodai Uehara, Yota Sasaki, Hidekazu Miyahara, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Norihiko Ito, Takeshi Azuma, Masahiro Kohno and Akitoshi Okino,, Investigation of reactive species using various gas plasmas, *RSC Adv.*, **4**, 75, pp. 39901-39905 (2014).
- [8] H. Kawano, T. Takamatsu, Y. Matsumura, H. Miyahara, A. Iwasawa, and A. Okino, Influence of Gas Temperature in Atmospheric Non-Equilibrium Plasma on Bactericidal Effect, *Biocontrol Sci.*, **23**, 4, pp. 167-175 (2018).
- [9] Y. Nomura, T. Takamatsu, H. Kawano, H. Miyahara, A. Okino, M. Yoshida and T. Azuma, Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo, *J. Surg. Res.*, **219**, pp. 302-309 (2017).
- [10] M. Kurosawa, T. Takamatsu, H. Kawano, Y. Hayashi, H. Miyahara, S. Ota, A. Okino, M. Yoshida, Endoscopic Hemostasis in Porcine Gastrointestinal Tract Using CO₂ Low-Temperature Plasma Jet, *J. Surg. Res.*, **234**, February, pp. 334-342 (2019).
- [11] P. Bruggeman and C. Leys, Non-thermal plasmas in and in contact with liquids, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, **42**, 5 (2009).

- [12] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, and K. Takeda, Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects, *Sci. Rep.*, October, pp. 1-11 (2016).
- [13] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. I. Kondo, and M. Hori, Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network, *Free Radic. Biol. Med.*, **79**, pp. 28-44 (2015).
- [14] T. Tasaki, T. Ohshima, E. Usui, S. Ikawa, K. Kitano, N. Maeda and Y. Momoi, Plasma-treated water eliminates *Streptococcus mutans* in infected dentin model, *Dent. Mater. J.*, pp. 1-7 (2017).
- [15] 井上雄二, 創傷・褥瘡・熱傷ガイドライン—1:創傷一般ガイドライン, 日本皮膚科学会誌, **27**, 8, pp. 1659-1687 (2017).
- [16] H. Kawano, T. Takamatsu, Y. Matsumura, H. Miyahara, A. Iwasawa, T. Azuma and A. Okino, Investigation of Bactericidal factors in CO₂ Plasma Bubbling, in *ICPM6*, pp. P2-34-3 (2016)
- [17] 清水宏, あたらしい皮膚科学, 中山書店 (2011).
- [18] A. L. Byrd, C. Deming, S. K. B. Cassidy, O. J. Harrison, W. I. Ng, S. Conlan, Y. Belkaid, J. A. Segre and H. H. Kong, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis, *Sci. Transl. Med.*, **9**, 397, eaal4651 (2017).
- [19] A. S. Ermolaeva, A. F. Varfolomeev, M. Y. Chernukha *et al.*, Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds, *J. Med. Microbiol.*, **60**, 1, pp. 75-83 (2010).
- [20] S. Panier and S. J. Boulton, Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 1, pp. 7-18 (2014).
- [21] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. Kondo and M. Hori, Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury, *Sci. Rep.*, **6**, February, pp. 1-12 (2016).
- [22] M. Kawasaki, T. Morita, and K. Tachibana, Facile Carbon Fixation to Performic Acids by Water-Sealed Dielectric Barrier Discharge., *Sci. Rep.*, p.1 (2015).
- [23] D. H. B. Ripin, G. A. Weisenburger, D. J. Ende, D. R. Bill, P. J. Clifford, C. N. Meltz and J. E. Phillips, Execution of a performic acid oxidation on multikilogram scale, *Org. Process Res. Dev.*, **11**, 4, pp. 762-765 (2007).
- [24] R. Gehr, D. Chen, and M. Moreau, Performic acid (PFA): Tests on an advanced primary effluent show promising disinfection performance, *Water Sci. Technol.*, **59**, 1, pp. 89-96 (2009).

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

3.1 緒言

大気圧低温プラズマによる創傷治癒の実用化に向けて、効果検証やメカニズム解明、安全性評価を行う必要がある。特に、大気圧低温プラズマが皮膚の幹細胞に及ぼす影響を明らかにするために、本章では、iPS細胞から表皮角化細胞であるケラチノサイトに分化誘導し、3D皮膚モデルを作製し、プラズマのコントロールとして放射線を照射した。ES細胞やiPS細胞からケラチノサイトに分化誘導する多数の先行研究^{[1]-[9]}の中で、Kajiwaraら^[8]の論文を参考にした。この論文を選択した理由は、iPS細胞からケラチノサイトへの分化誘導条件を複数比較した中で、最も迅速にケラチノサイトを誘導し、3D皮膚を構築する方法を発見していたこと、再構築した3D皮膚を用いて、ラットの脊髄髄膜瘤の胎児治療に成功していたことが理由である。はじめに、iPS細胞から分化誘導したケラチノサイトでの分化マーカーの発現等を調べ、作製した細胞の特性を解析した。その後、DNA損傷応答解析でよく用いられる γ 線を線維芽細胞、iPS細胞、iPS細胞由来ケラチノサイトに照射し、細胞応答の違いを調べることで、プラズマ照射の影響を調べるためのコントロールデータを取得した。

3.2 細胞培養

3.2.1 iPS細胞の培養方法

ヒト皮膚由来線維芽細胞であるNB1RGBをRNAリプログラミング法により初期化し、iPS細胞を作製した。RNAリプログラミングには、Stemgen[®] StemRNA[™]-NM Rrprogramming Kit (Stemgent)を用いた。作製したiPS細胞のクローンのうち、本研究では主にクローン2(C2)を用いた。C2は幹細胞のマーカーであるNANOG, OCT4, SSEA4, KLF4の発現、三胚葉への分化、神経幹細胞への分化が確認できており、RNAシーケンスによるmRNAの網羅的発現解析も実施した細胞である^[10]。図3-1にNB1RGB, iPS細胞NB1RGB C2を位相差顕微鏡で撮影した写真を示した。iPS細胞NB1RGB C2は、リプログラミング前の線維芽細胞NB1RGBとは細胞の大きさも形態も異なり、コロニー状に増殖する。iPS細胞が発表された当初は、 γ 線照射やマイトマイシンC処理により増殖を止めたマウス胎児由来線維芽細胞などの細胞をフィーダー細胞として用い、フィーダー細胞の上にiPS細胞を培養する方法が主流であった^{[11][12]}。しかしながら、再生医療に用いるためには動物由来成分を使用しないことが求められており、現在は、フィーダー細胞を使わないフィーダーフリー培養が主流になっている。本研究でもiPS細胞はフィーダーフリー培養を行った。培養に用いるディッシュをiMatrix 511 (ラミニン511)でコートすることにより、フィーダー細胞がなくてもiPS細胞は増殖が可能となる。また、iPS細胞

は、継代時に単一細胞状態になると、アポトーシスを誘導して死滅するため、ROCK inhibitor (Rho associated protein kinase inhibitor)である Y27632 を含んだ培地で継代後 24 時間培養することで、アポトーシスを抑制した。以下に本研究で行った iPS 細胞の培養方法を記述する。iPS 細胞は、6 cm ディッシュで培養し、約 60%コンフルエント時に継代した。DPBS 2 ml で 2 回洗浄後、0.5 ml の TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific)を加え、37°C で 5 分間反応させた後、5ml の Nutristem XF/FF Culture Medium (Reprocell)で細胞を懸濁し、1000rpm 5 分間遠心した。その後沈殿した細胞を Nutristem に 5 μ M の Y27632 (WAKO)を添加した培地 4 ml で懸濁し、6 cm ディッシュに 2×10^4 個の細胞が含まれるように希釈後、5 μ l の iMatrix-511 silk (Nippi)を添加し、5% の CO₂ 存在下、湿潤状態 37°C で培養した。24 時間後に培地を 4 ml の Nutristem に換え、24 時間ごとに培地交換を行ない、一週間程度で次の継代を行った。コントロールとして、Yamanaka らが樹立した iPS 細胞である 201B7 (Riken Cell Bank)^[12]も同様に培養し、実験に用いた。

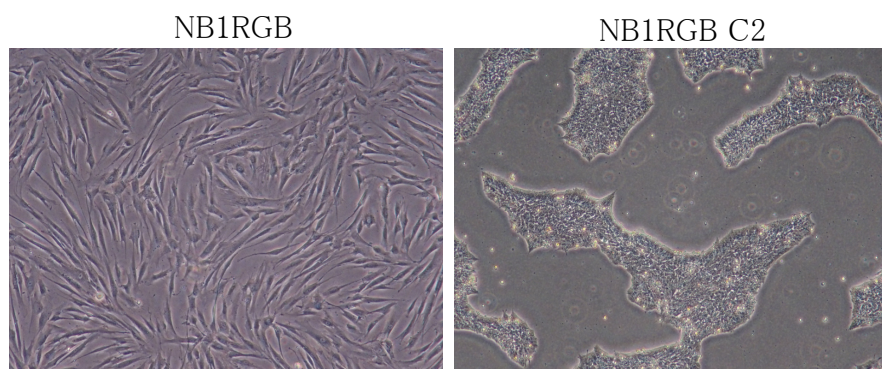


図 3-1 線維芽細胞 NB1RGB, iPS 細胞 NB1RGB C2 の位相差顕微鏡写真

3.2.2 初代培養ケラチノサイトの培養方法

iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトのコントロールとして、2 種類の初代培養ケラチノサイトである HEKn^[13]と HPEKp を実験に用いた。図 3-2 に HEKn と HPEKp を位相差顕微鏡で撮影した写真を示した。HEKn (Thermo Fisher Scientific)は EpiLife (Thermo Fisher Scientific)に Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) (Thermo Fisher Scientific)および 60 μ M 塩化カルシウムを添加した培地を用いて培養した。HPEKp (CELLnTEC)は CnT-PR(CELLnTEC)を用いて培養した。継代は、DPBS での洗浄、TrypLE Select 処理後、Defined Trypsin Inhibitor & Trypsin Neutralizer (Invitrogen)で細胞を懸濁し、遠心し、沈殿した細胞を 4×10^3 個/cm² 程度に希釈して培養した。継代後、24 時間後に培地交換し、その後は 2,3 日おきに培地交換を行い、80 %コンフルエント程度で継代した。

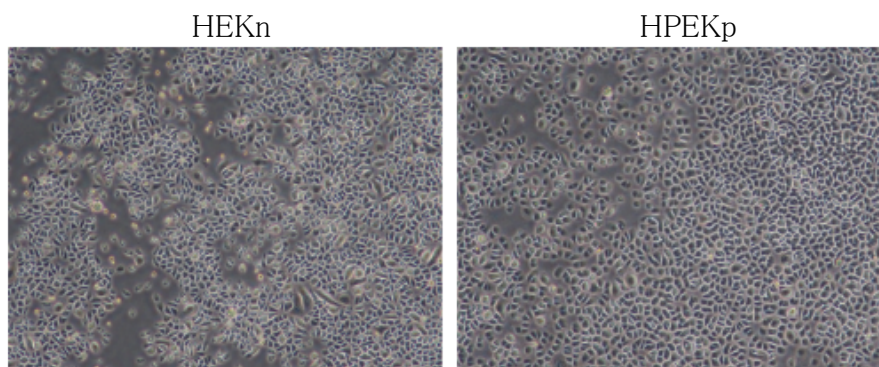


図 3-2 初代培養ケラチノサイト HEKn と HPEKp の位相差顕微鏡写真

3.3 iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導

iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導プロトコルの概略図を図 3-3 に示した。8×10⁴ 個の NB1RGB C2 を 10 cm ディッシュにまき、5 μM Y27632 を添加した Nutristem 8ml に 13 μl の iMatrix-511 silk を加え、1 日培養した。24 時間後に defined keratinocyte serum-free medium (DKSFM) (Thermo Fisher Scientific) に 1 mM Retinoic acid (RA) (Sigma) と 10 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&Dsystems) を添加した培地に変えた。4 日目に 20 ng/mL EGF (R&Dsystems) を含む DKSFM に培地を変え、14 日目まで培養した。1 回目の継代は 14 日目に行なった。DPBS 4 ml で 2 回洗浄後、1 ml の TrypLE Select を 37°C で 5 分間反応させたのち、5ml の DKSFM で細胞を懸濁し、1000 rpm で 5 分間遠心した。その後沈澱した細胞を DKSFM で懸濁し、3 × 10⁴ 個/cm² となるように希釈してディッシュに播種した。ディッシュはあらかじめ、0.03 mg/mL type I collagen (Advanced BioMatrix) と 0.01 mg/mL fibronectin (Sigma) を含む DPBS を 4 ml 入れ 37°C で 1 時間コートしたものをを用いた。37°C インキュベーターで、1-2 時間細胞を接着させた後、培地を 10 μM Y27632 と 20 ng/mL EGF を含む DKSFM に変え、2 回目の継代まで培養した。この培養条件は、iPS 細胞由来のケラチノサイトの分化効率、ケラチノサイトの細胞増殖率がどちらも向上すると報告されている先行研究^[8]を参考に決定した。2 回目の継代は 24 日目に、3 回目の継代は 34 日目に同様に行った。それぞれ継代後 7 日目の細胞を実験に用いており、21 日目の細胞を Keratinocytes (KCs) 1stP、31 日目を KCs 2ndP、41 日目を KCs 3rdP とする。

iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導開始後 1~42 日目までの間、位相差顕微鏡で撮影した細胞の写真を図 3-4 に示した。RA, BMP4 を加えた分化誘導開始 3, 4 日目には iPS 細胞とは異なる形状のコロニーが形成され、4 日目に EGF を添加した培地に変えると、細胞増殖スピードが上がり、20~30 日目付近では、図 3-2 で示した初代培養ケラチノサイトに近い形態の細胞が増えた。40 日目付近では、細胞内に液胞のような組織が生じる細胞が増えており、老化している可能性も生じた。

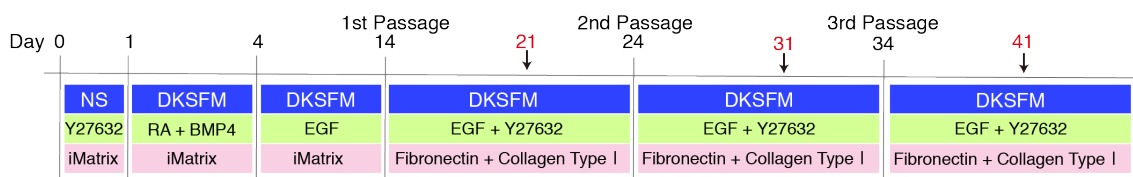


図 3-3 iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導プロトコル概略図

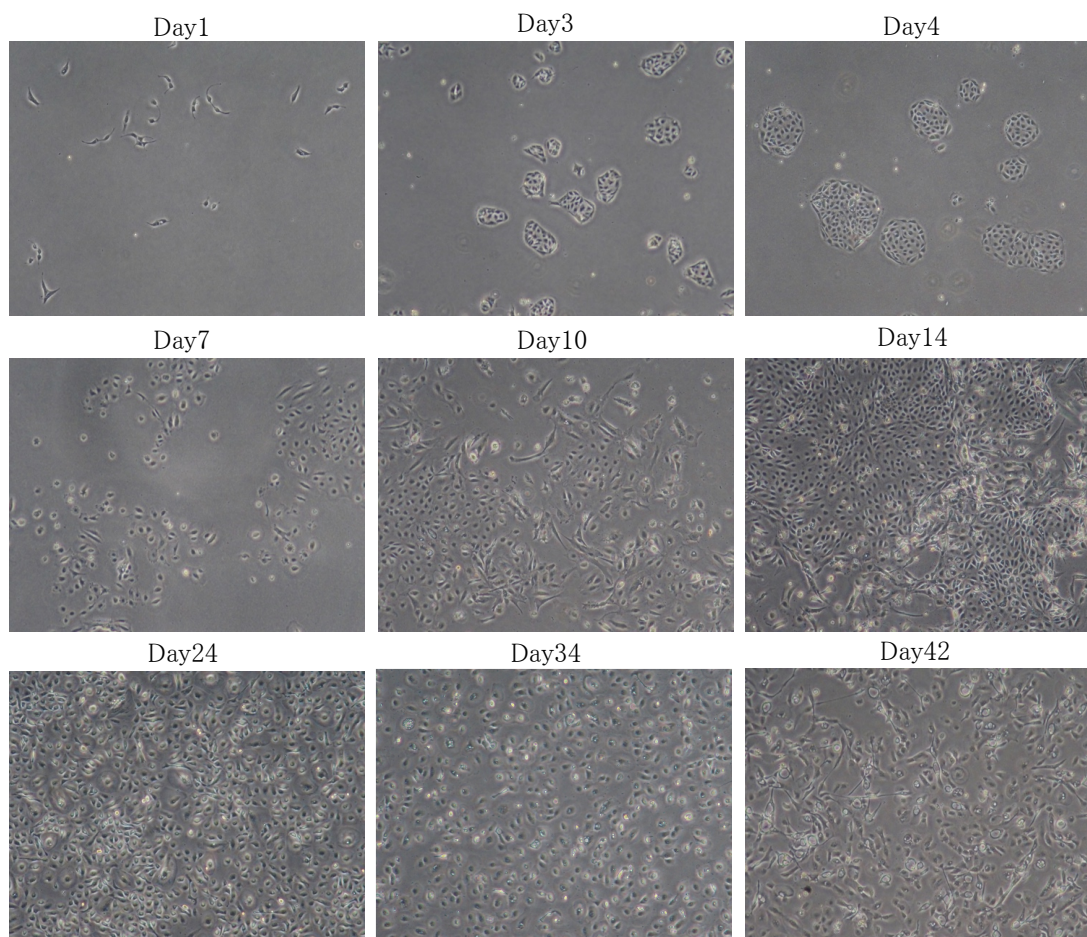


図 3-4 iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導中細胞の位相差顕微鏡写真

3.4 分化マーカー分子の発現確認

3.4.1 免疫染色によるマーカー分子の発現確認

幹細胞のマーカーである OCT4 と NANOG, 基底層ケラチノサイトのマーカーである K14 と p63, 細胞周期調節因子である p21 の各細胞における発現を免疫染色によって調べた。免疫染色は、2.4.4 で示した方法で行った。一次抗体として p63 (mouse, cat# ab735, Abcam)を 100 倍の希釈率で用い, OCT4 (rabbit, cat# 09_0023, Stemgent), NANOG (rabbit, cat# RCAB002P-F, REPROCELL), p21 (mouse, cat# 05-636, MerckMillipore), K14 (mouse, cat#

MA5-11599, Thermo Fisher Scientific)を 1000 倍の希釈率で用いた。iPS 細胞のみカバーガラスに張り付きにくいいため、24 ウェルプレートに直接貼り付けて免疫染色を行った。免疫染色の結果を図 3-5 に示した。OCT4, NANOG は iPS 細胞のみで発現しており, K14, p63 は分化誘導したケラチノサイト(KCs 1stP, 2ndP, 3rdP)と, 初代培養ケラチノサイト HEK_n で発現していた。p21 は NB1RGB とケラチノサイトでは発現していたが, iPS 細胞では発現が見られなかった。

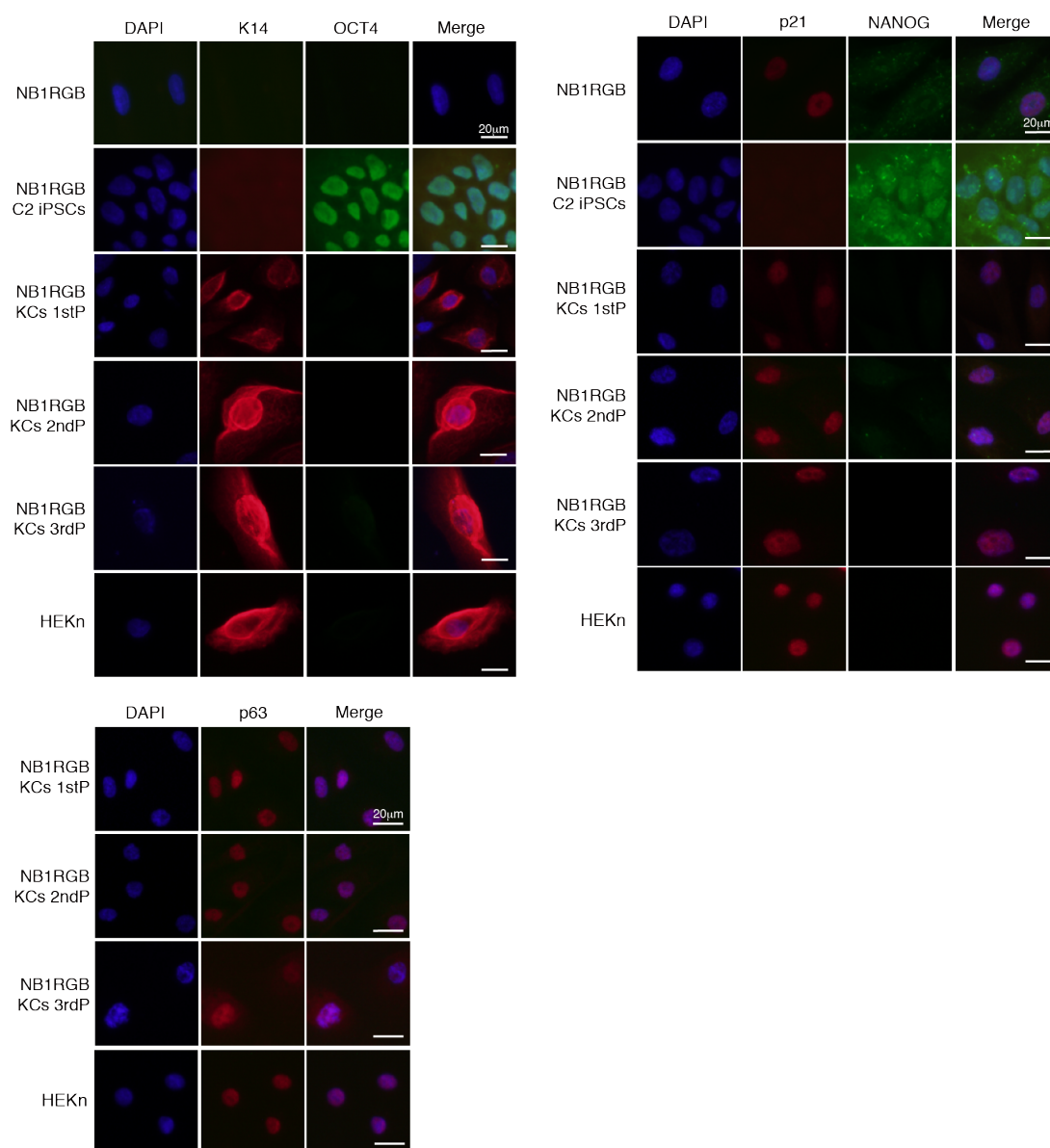


図 3-5 免疫染色による分化マーカーの発現比較

3.4.2 ウェスタンブロットによる K14, p21 の発現比較

3.4.1 で示した免疫染色の結果から, K14, p21 の発現量が細胞によって異なる可能性が得られたため, ウェスタンブロットにより発現量の比較を行った。細胞を DPBS で 2 回洗浄後, RIPA バッファー(50 mM Tris HCl pH8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.5% sodium deoxycholate)で溶解した。TaKaRa BCA Protein Assay Kit (Takara Bio)によりタンパク質の定量を行い, 20 µg のタンパク質を 30 mA/gel の定電流により1時間, 電気泳動し, SDS-PAGE を行った。その後, 100 V の定電圧で 90 分間, PVDF膜に転写した。1% スキムミルク/TBST を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った後, 一次抗体を 4°Cで一晩反応させた。一次抗体は 3.4.1 で示した, K14, p21 を認識する抗体を用い, ローディングコントロールは, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (mouse, cat# 636571, MerckMillipore)を 1000 倍希釈で使用した。その後, TBST で 3 回洗浄後, 二次抗体を室温遮光条件で 1 時間反応させた。二次抗体は, Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP 488(Agilent Technologies), Polyclonal Swine Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP 594(Agilent Technologies)をそれぞれ, 2000 倍希釈して用いた。TBST で 5 回洗浄した後, Western Sure™ (LI-COR)および C-DiGit™(LI-COR)を用いて目的タンパク質を検出した。

各細胞の K14, p21 の発現量を比較した結果を図 3-6 に示した。K14 は分化誘導したケラチノサイト(KCs 1stP, 2ndP,3rdP)と初代培養ケラチノサイト HEKn で発現しており, 分化誘導したケラチノサイトでは, 継代数が増加するにしたがい, 発現量も増加していた。p21 の発現は U2OS, NB1RGB, HEKn に比較して, 分化誘導したケラチノサイトでは高い傾向にあった。ケラチノサイトは分化誘導時に PKC, p38 経路を介して, p53, p21 の発現を増加させることで, ケラチノサイトの増殖を抑制することが報告されており^[14], 今回の結果とも整合性が高い。iPS 細胞である, NB1RGB C2, 201B7 では p21 の発現が確認できなかった。NB1RGB C2 で p21 の mRNA 発現レベルが低いことは, RNA シークエンスでも確認できており^[10], ES 細胞, iPS 細胞で p21 の発現が抑制されていることは既に報告されている^{[15][16]}。体細胞では, DNA 損傷時に p53 によって p21 の発現が誘導され, 細胞周期が停止し, DNA を修復する。しかしながら, ES 細胞では, p53 が発現しているにも関わらず, p21 の発現レベルが低く, 細胞周期が停止されない。ES 細胞では, DNA 損傷時に細胞周期を止めて, DNA 損傷を修復するのではなく, アポトーシスによる細胞死を誘導して, ゲノム安定性を維持すると考えられている^[17]。

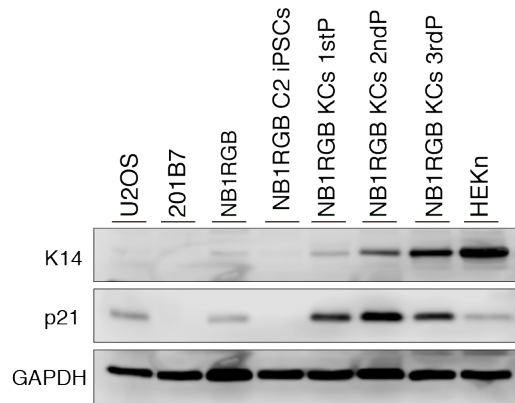


図 3-6 ウェスタンブロットによる K14, p21 の発現比較

3.4.3 RT-PCR による遺伝子発現の確認

分化誘導したケラチノサイトの分化段階を調べるために、インテグリン α 6(ITGA6)およびトランスフェリンレセプター(CD71)の mRNA 発現レベルを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって分析した。ITGA6, CD71 の発現は、表皮基底層ケラチノサイト集団の中の幹細胞, 前駆細胞を識別するために重要である^{[18][19]}。ITGA6^{high}/CD 71^{low} はケラチノサイト幹細胞を示し, ITGA6^{high}/CD 71^{high} はケラチノサイト前駆体を示す。

細胞を DPBD で 2 回洗浄後, FastGeneTM RNA Basic kit (Nippon Genetics)を用いて, 全 RNA を抽出した。吸光度を測定して RNA 濃度を算出した。500 ng の全 RNA を PrimeScriptTM High Fidelity RT-PCR Kit と TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP 650 (Takara Bio)にて RT-PCR を行った。アニーリングは, 65°C で 5 分間行い, cDNA への逆転写は 42°C で 30 分間行った。95°C で 5 分間処理し, 酵素反応を止めた。PCR は表 3-1 に示したプライマー^{[20]-[22]}を用いて 98°C 10 秒間, 55°C 5 秒間, 72°C 1 分間を 30 サイクル行った。

表 3-1 PCR に用いたプライマーの配列

ITGA6	forward	5'-GGCCTTATGAAGTTGGTGGGA-3'
ITGA6	reverse	5'-AGAGGCCAGACCTTCTCCAT-3'
CD71	forward	5'-GAGGAGCCAGGAGAGGACTT-3'
CD71	reverse	5'-ACGCCAGACTTTGCTGAGTT-3'
GAPDH	forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH	reverse	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

RT-PCR の結果を図 3-7 に示す。iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト KCs 1stP, 2ndP は ITGA6^{high}/CD 71^{high} を示した。これは、KCs 1stP, 2ndP がケラチノサイト前駆体である可能性を示唆している。それに対して、KCs 3rdP はコントロールの初代培養ケラチノサイトである HEK_n と同様に、ITGA6^{low}/CD 71^{low} を示した。一方、線維芽細胞および iPS 細胞は ITGA6^{low}/CD 71^{high} を示した。線維芽細胞および iPS 細胞における ITGA6 および CD 71 の発現は、RNA シークエンスの結果^[10]と一致していた。

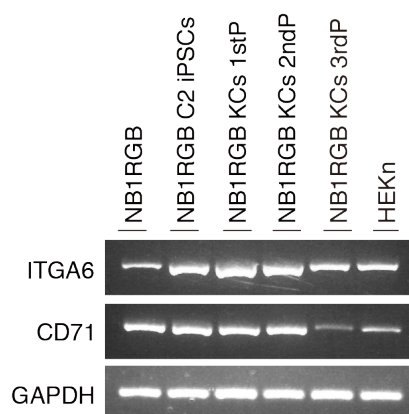


図 3-7 RT-PCR による ITGA6, CD71 の発現比較

3.4.4 リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

3.4.3 で明らかにした細胞による ITGA6 および CD71 の発現量の違いを定量評価するために、リアルタイム PCR を行った。3.4.3 で用いた cDNA, プライマーに加え、FastStart SYBR Green Master (Roche), EcoTM RealTimePCR System (illumina)を用いた。まず、Taq ポリメラーゼを 95°C で 10 分間処理し活性化した後、PCR は 95°C で 15 秒間処理により鋳型 DNA を一本鎖状態にし、60°C で 1 分間処理により DNA 鎖を伸長し、40 サイクル実施した。GAPDH, CD71, ITGA6 の発現レベルは、6 段階希釈したそれぞれの検量線から算出し、GAPDH に対する、ITGA6 および、CD71 の比率を求めた。検量線の相関係数は 0.98 以上であった。統計処理は、T 検定(P < 0.05)を用いた。

qRT-PCR で算出した GAPDH に対する ITGA6 および、CD71 の比率を図 3-8 に示した。KCs 1stP は ITGA6: 7.80, CD71: 0.43 であり、KCs 2ndP は ITGA6: 5.53, CD71: 0.48 であった。CD71 に対する ITGA6 の比率は KCs 2ndP よりも KCs 1stP の方が高く、幹細胞に近い性質を持っていると考えられた。

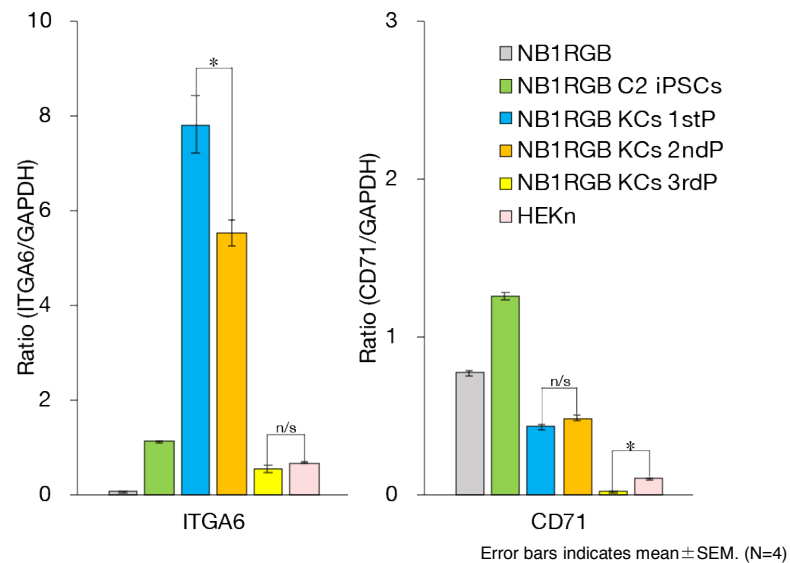


図 3-8 リアルタイム PCR による ITGA6, CD71 の発現定量

3.5 3D 皮膚オルガノイドの構築

3.5.1 3D 皮膚オルガノイドの作製

分化誘導したケラチノサイトの機能を調べるために、3D 皮膚オルガノイドを作製した。図 3-9 にオルガノイド構築の概略図を示した。24 ウエルプレートに 0.4 μm の穴径のインサート (Thermo Fisher Scientific) を入れ、I 型コラーゲンゲル(新田ゼラチン)中に 2×10^4 個の NB1RGB をまき、1 週間 DMEM で培養した。分化誘導したケラチノサイト(KCs 1stP), もしくは初代培養ケラチノサイト(HEKn, HPEKp)を 15×10^4 個をコラーゲンゲル包埋した線維芽細胞の上にまき、各培地で、2 日間培養した。その後、6 cm ディッシュにインサートを移し、インサート内部の培地を抜きケラチノサイト層を大気に触れるようにした(Air Lift)。インサートの外には、塩化カルシウム濃度を 1.8 mM に調整した培地を、細胞層と同じ高さまで入れ、2,3 日おきに培地交換を行い、14 日間培養した。

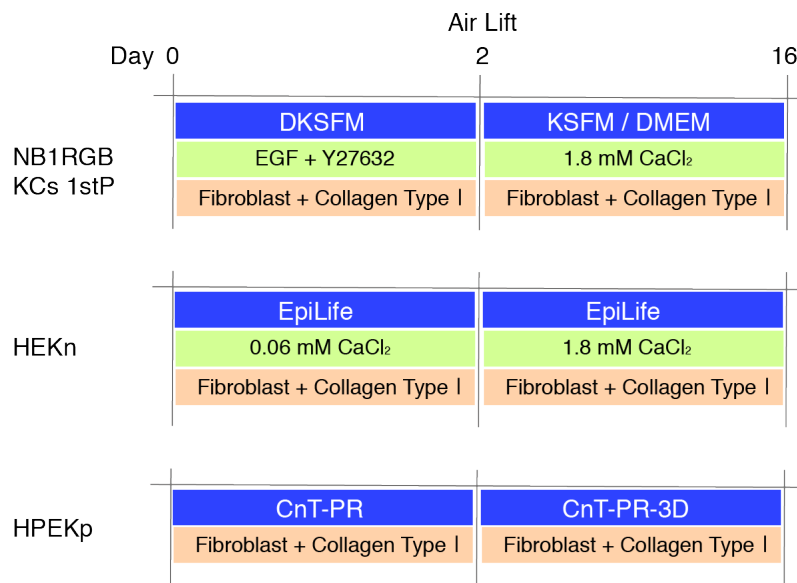


図 3-9 ケラチノサイトから 3D 皮膚オルガノイド構築の概略図

3.5.2 3D 皮膚オルガノイドのマーカー分子の発現

再構築した 3D 皮膚オルガノイドを組織免疫染色し、マーカー分子の発現を調べた。3D 皮膚オルガノイドを作製開始 16 日目に固定を行った。12 ウエルプレートに移したインサート内外に 4% パラホルムアルデヒド/DPBS を入れ、4°C で 4 時間～一晩処理した。その後、25% スクロース/DPBS 溶液中にインサートを移し、4 時間～一晩処理した。オルガノイドをインサートから取り出し、OCT コンパウンドで包埋し、-80°C で保存した。その後、クライオスタット (CM1850, Leica) で 10 μm のスライス幅の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (松浪ガラス工業) に貼り付けた。冷風をあて、2 時間乾燥後、ヒスト VT ワン (ナカライテスク) 中に入れ 100°C に加熱した。室温に戻るまで 1 時間程度放置後、一次抗体を室温で 2 時間反応させた。一次抗体以降は、2.4.4 で示した方法で免疫染色を行った。一次抗体は K14 (mouse, cat# MA5-11599, Thermo Fisher Scientific), K10 (rabbit, cat# 905403, BioLegend) を 500 倍の希釈率で用いた。K14 は表皮基底層のマーカーとして、K10 は有棘層から顆粒層 (基底上層) のマーカーとして用いた。組織免疫染色した結果を図 3-10 に示した。初代培養ケラチノサイト HEKn と同様に、分化誘導したケラチノサイト KCs 1stP においても基底層のマーカーである K14 の上部に基底上層のマーカーである K10 の層が見られた。この結果より、本研究で iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト KCs 1stP には皮膚を再構築できる機能があることが明らかになった。

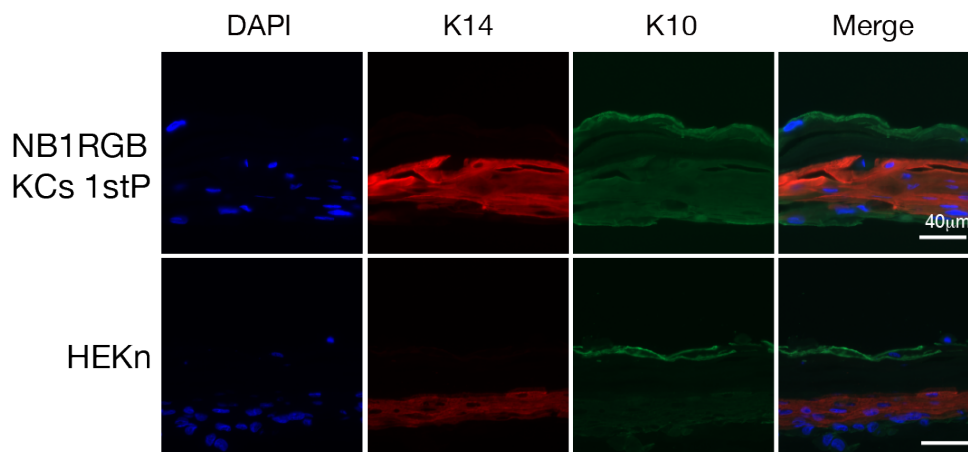


図 3-10 3D 皮膚オルガノイドにおける K14, K10 の発現

3.5.3 3D 皮膚オルガノイドの薬剤透過試験

iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトを用いて再構築した 3D 皮膚オルガノイドの生理的機能を調べるために、薬剤透過試験を行って皮膚バリア機能を評価した。コントロールとして、初代培養ケラチノサイト(HEKn, HPEKp)を用いて同様に再構築した 3D 皮膚オルガノイドを用いた。薬剤透過試験には親水性物質としてカフェイン(WAKO), 疎水性物質としてアミノピリン(WAKO)を用いた。まず、既知の濃度の薬剤溶液を HPLC で分析し、検量線を作製した。HPLC の条件は、表 3-2, 表 3-3 に示した。DPBS で一定濃度になるように調製した標準溶液を分析した結果を図 3-11 に示した。カフェイン, アミノピリン共に、相関係数が 0.99 以上であった。図 3-8 で示した方法により作製した 3D 皮膚オルガノイドを用いて作製開始 16 日目に薬剤透過試験を行った。12 ウェルプレートに入れたインサート内外に DPBS を入れ 5 分間 37°C でインキュベートし洗浄した後、インサート内に、DPBS で 1 mg/ml に調製したカフェイン, もしくはアミノピリンを添加した。リザーバーには DPBS を入れた。37°C で一定時間インキュベート後、リザーバーから 1 ml の溶液を採取し HPLC で分析した。サンプルを採取した後、リザーバーには DPBS を 1 ml 添加し、一定量を保った。図 3-12 に KCs 1stP, HEKn, HPEKp から作製した 3D 皮膚オルガノイドにおけるカフェインの薬剤透過率の違いを示した。薬剤透過開始 30 分後における薬剤透過率は、KCs 1stP が 2.2%, HEKn が 2.5%, HPEKp が 1.7%であった。図 3-13 にアミノピリンでも同様に薬剤透過率を分析した結果を示した。薬剤透過開始 30 分後における薬剤透過率は、KCs 1stP が 3.4%, HEKn が 3.9%, HPEKp が 3.0%であった。この結果より、KCs 1stP は初代培養ケラチノサイトと同程度のバリア機能を有することが明らかになった。

表 3-2 HPLC 条件

Pump	PU4180	JASCO
UV detector	UV4075	JASCO
Interface box	LC-Net II /ADC	JASCO
Column	Unifinepak C18 04250-5M 4.6 mmI.D. x 250 mmL	JASCO
Column temperature	Room Temperature	
Flow rate	1.0 ml/min	
Injection volume	20 μ l	

表 3-3 HPLC での薬剤分析条件

Compound	Mobile phase	Detection
Caffeine	Acetonitrile : Water = 10 : 90	254 nm
Aminopyrine	Acetonitrile : Water containing 0.1% phosphoric acid and 5 mM SDS = 45 : 55	254 nm

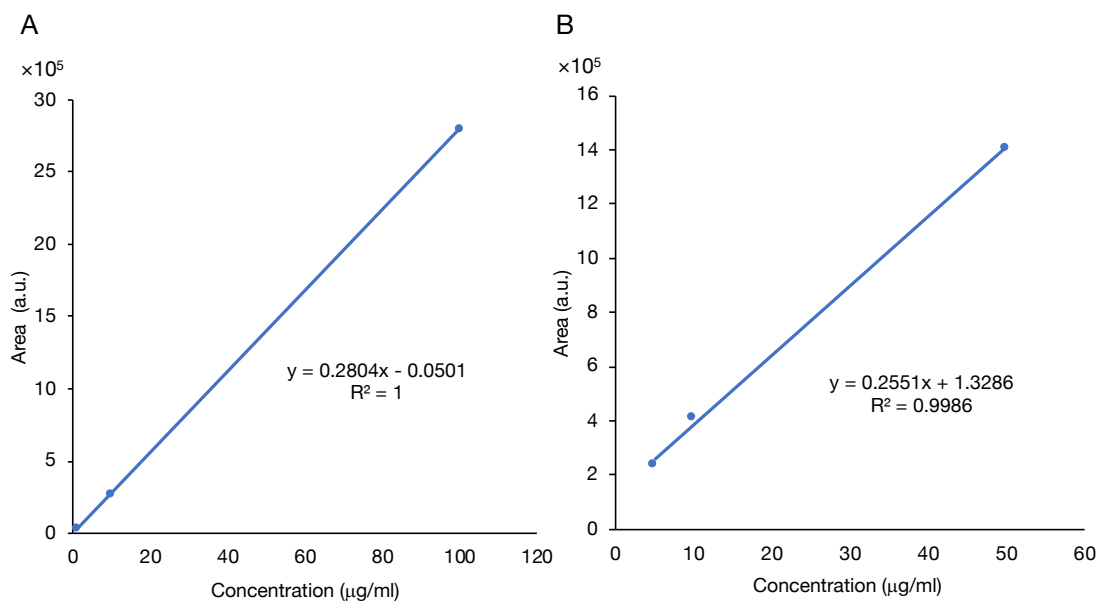


図 3-11 HPLC での検量線

A; カフェイン B; アミノピリン

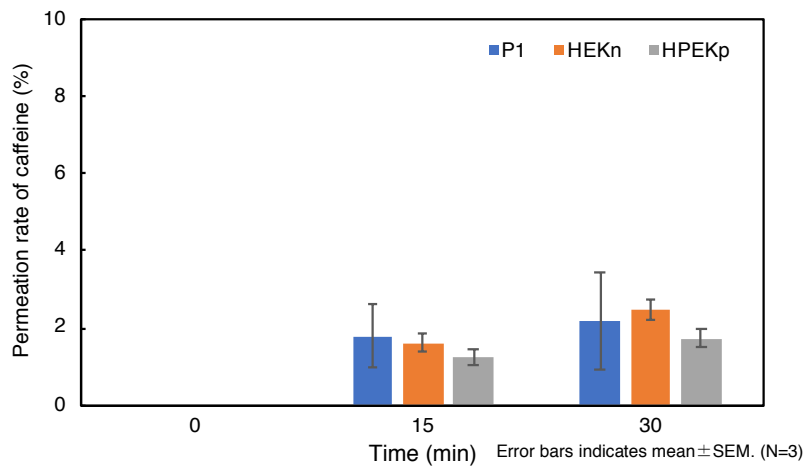


図 3-12 3D 皮膚オルガノイドでのカフェイン透過率

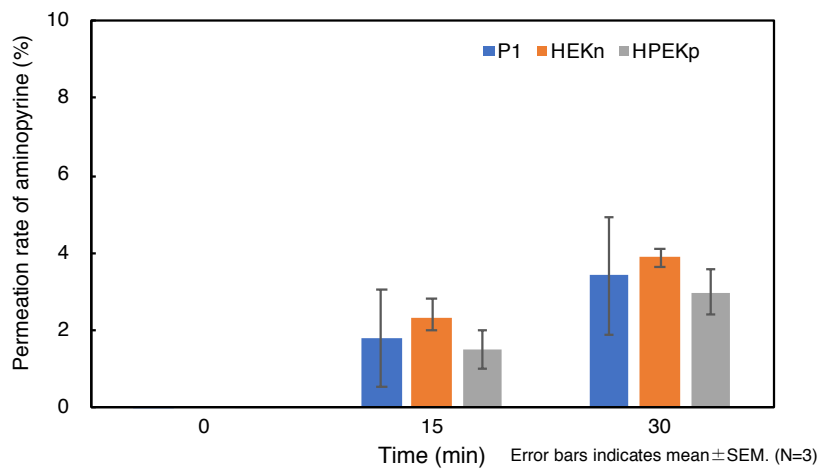


図 3-13 3D 皮膚オルガノイドでのアミノピリン透過率

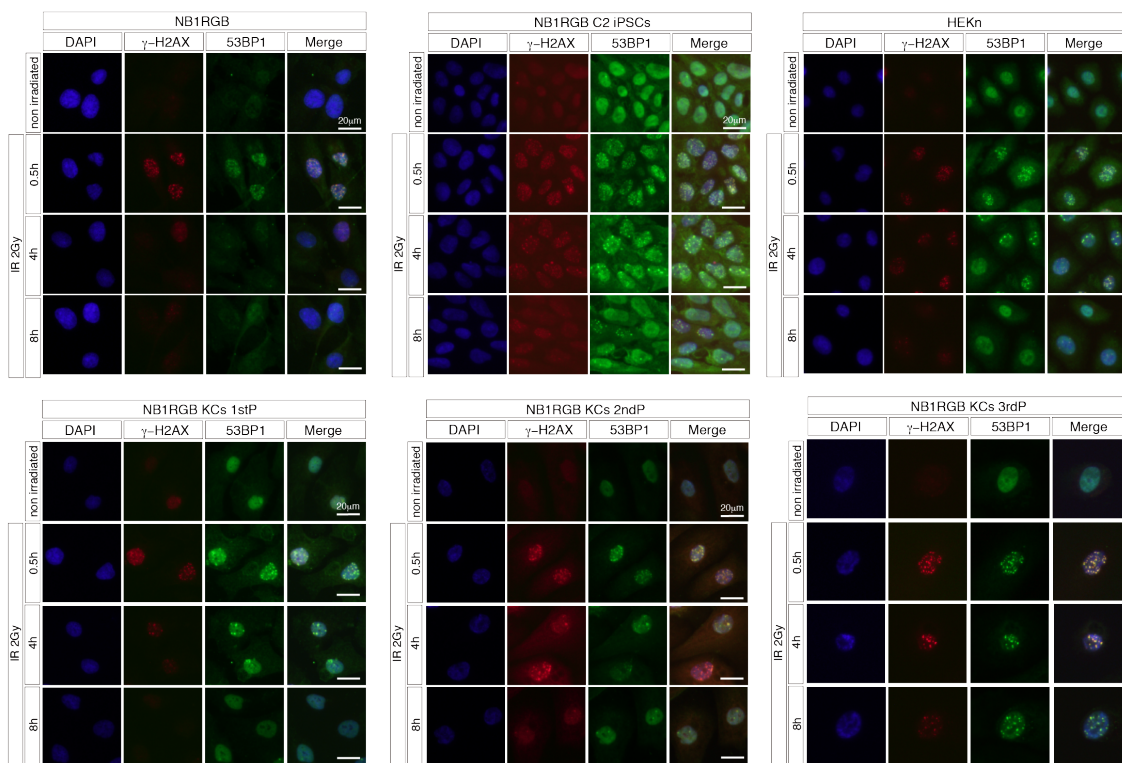
3.6 DNA 損傷応答の比較

3.6.1 免疫染色による γ -H2AX と 53BP1 の発現確認

細胞ごとの DNA 損傷応答を比較するために、線維芽細胞 NB1RGB, iPS 細胞 C2, iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト(KCs 1stP, 2ndP, 3rdP), 初代培養ケラチノサイト HEKn に γ 線を 2Gy 照射し, DSB(DNA double strand break)のマーカである γ -H2AX および 53BP1 の局在変化を免疫染色によって解析した。 γ -H2AX, 53BP1 は DNA 損傷修復応答の初期段階で, DSB 部位に集積する分子である。免疫染色は 2.4.4 で示した方法で行った。図 3-14A に γ 線照射後, 各時間培養後の細胞の写真を示した。 γ -H2AX または 53BP1 のフォーカスが一つの

細胞あたり 10 個以上有する細胞を陽性と評価した。各条件で 200 個の細胞を数え、その陽性率を図 3-14B に示した。照射 4 時間後において、線維芽細胞での陽性率は γ -H2AX:31%, 53BP1:18%であったのに対して、iPS 細胞では、 γ -H2AX:57%, 53BP1:55%であり、iPS 細胞では、DNA 修復活性が残存していた。DNA 損傷した iPS 細胞の多くは、DNA 修復を完了せずに、アポトーシスへと移行するため、修復活性が残存していると考えられる。ケラチノサイト KCs 1stP では、 γ -H2AX:28%, 53BP1:17%と DNA 修復活性が、線維芽細胞と同程度まで減少したが、KCs 2ndP では γ -H2AX:38%, 53BP1:28%, KCs 3rdP では γ -H2AX:75%, 53BP1:64%と陽性率が増加した。ケラチノサイトの継代数が増えるにしたがい、増殖スピードも低下するため、分化が進み、DNA 修復遅延が生じていると考えられた。

A



B

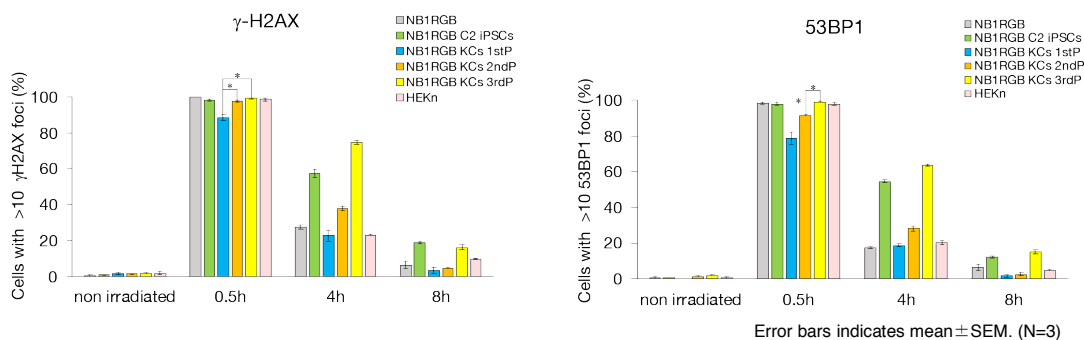


図 3-14 3D 免疫染色による DNA 損傷応答の比較

3D 皮膚オルガノイドを作製開始 16 日目に γ 線を 2Gy 照射して 1 時間後に固定をした。その後は 3.5.2 で記述した方法と同様に組織免疫染色を行った。一次抗体は K14, 53BP1 を用いて染色した結果を図 3-15 に示した。初代培養ケラチノサイト HEKn から作製したオルガノイドと同様に, KCs 1stP から作製したオルガノイドでも基底層ケラチノサイトにおいて, 53BP1 のフォーカスが生じており, DNA 損傷応答が確認できた。

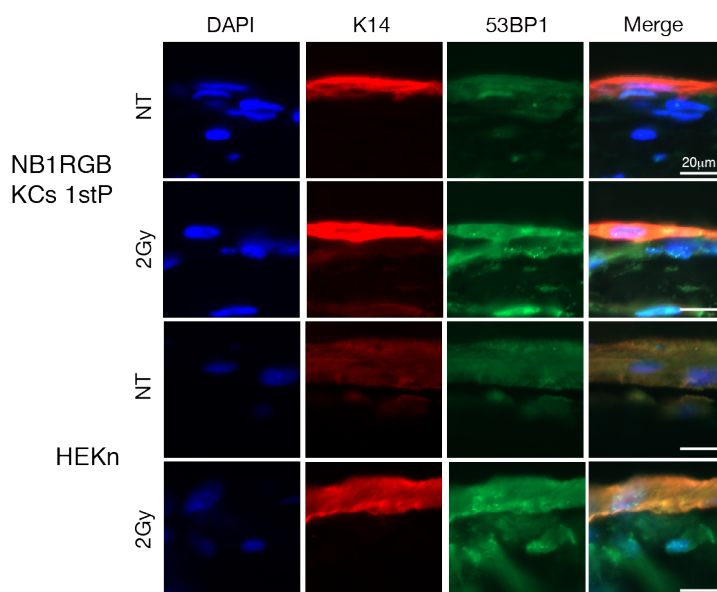


図 3-15 3D 皮膚オルガノイドの DNA 損傷応答

3.6.2 ウェスタンブロットによる ATM, KAP1, p53 のリン酸化確認

次に、DNA 損傷応答の比較をするために、ウェスタンブロットにより、ATM のリン酸化 (Ser1981), KAP1 のリン酸化 (Ser824), p53 のリン酸化 (Ser15) を調べた。DNA 損傷時にリン酸化された ATM, KAP1, p53 は p21 の発現を誘導し、細胞周期を停止する^[23]。細胞は、DNA 損傷時に突然変異導入や染色体異常および細胞のがん化を防止するために、細胞周期を止めて、その間に DNA を修復する。通常、細胞周期が G1 期の細胞では、RB が転写因子 E2F に結合し、E2F の活性を抑制している。E2F は DNA ポリメラーゼなどの細胞増殖に必要な遺伝子の発現を調節しており、S 期に入る直前で、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) によって RB がリン酸化されると、E2F との結合が解離し、E2F が活性化する。活性化された E2F により、様々な遺伝子発現がおこり、DNA 複製を開始し、細胞は増殖する。DNA 損傷などの刺激により誘導される p21 は CDK インヒビターであり、RB のリン酸化を抑制することにより、G1 期から S 期への移行を抑制する^[24]。

一次抗体は、p53 (mouse, cat# sc-126, Santa Cruz Biotechnology), S15P-p53 (mouse, cat# 9286, Cell Signaling Technology), p21 (mouse, cat# 556431, BD Biosciences), KAP1 (rabbit,

cat# ab10484, abcam), S824P-KAP1 (rabbit, cat# A1106, BETHYL), ATM (mouse, cat# A300-767A, Sigma-Aldrich), S1981P-ATM (rabbit, cat# ab81292, abcam) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (mouse, cat# 636571, MerckMillipore) を用いた。抗体の希釈率は全て 1000 倍で行い、3.4.2 で示した方法でウェスタンブロットを行った。

線維芽細胞, iPS 細胞, KCs 1stP, KCs 2ndP, KCs 3rdP, HEK_n に γ 線を 2Gy 照射し、1, 4 時間培養後の発現を調べた結果を図 3-16 に示した。線維芽細胞, KCs 2ndP, KCs 3rdP では、照射 1 時間後に KAP1 のリン酸化が見られたが、4 時間では脱リン酸化されていた。KCs 1stP では、1 時間で生じた KAP1 のリン酸化が、4 時間では減少していたが残存していた。p53 のリン酸化は線維芽細胞, KCs で 4 時間まで持続していた。それに対して、iPS 細胞では KAP1, p53 のリン酸化は強く、4 時間まで持続していた。KAP1, p53 の下流に存在する p21 の発現は、線維芽細胞では照射後増加していたが、iPS 細胞では DNA 損傷後も発現が確認できなかった。KCs では未照射でも p21 の発現が見られ、DNA 損傷により顕著な増加は見られなかった。P-ATM は矢印で示した目的のバンド以外の位置にもバンドが確認できた。NB1RGB では、照射 4 時間後に、iPS 細胞では、未照射から照射 4 時間後まで、高分子側にバンドがあり、このバンドは、ATM では確認できなかった。この結果より、リン酸化された ATM 特異的に、グリコシル化、ユビキチン化などの修飾がされている可能性も考えられる。また、iPS 細胞においては照射 4 時間後に低分子量側にもバンドが見られた。このバンドは、ATM では増加していないことから、リン酸化 ATM 特異的な分解産物であると考えられた。iPS 細胞では DNA 損傷後にアポトーシスに移行する細胞が増えるため、カスパーゼによって切断されている可能性も考えられる。

コントロールとして用いた初代培養ケラチノサイト HEK_n での発現は KCs と近い傾向であるが、バンドの強度は異なっていた。これは他の 5 種類の細胞が、全て、NB1RGB 由来の細胞で同じ系統の細胞株であるが、HEK_n のみ異なる系統の細胞株であることが原因と考えられた。

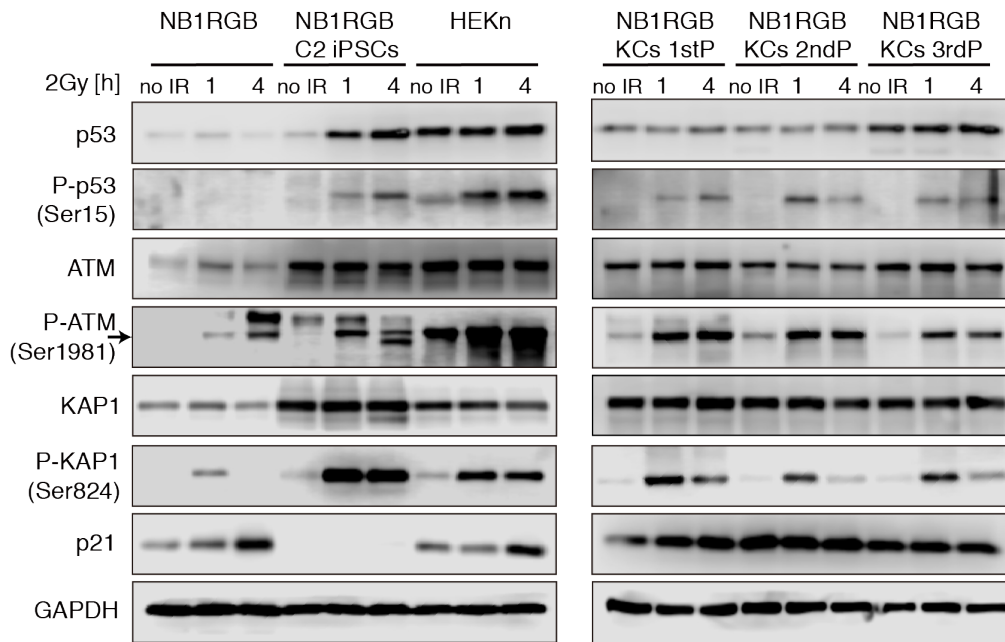


図 3-16 ウェスタンブロットによる DNA 損傷応答分子の発現比較

3.6.3 免疫染色による p16 の発現確認

3.4.2, 3.6.2 で示したように, iPS 細胞では, p53 のリン酸化が亢進しているにも関わらず, p21 の発現は劇的に減少していた。また, iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトでは, 未照射でも p21 が発現しており, DNA 損傷により顕著な増加は見られなかった。そこで, p21 とは別経路で, RB のリン酸化を抑制し CDK インヒビターとして機能する p16 が p21 と同じ傾向であるのか調べるために, 免疫染色によって調べた。免疫染色は 2.4.4 で示した方法で行い, 一次抗体は p16 (mouse, cat# 675602, BioLegend) を 1000 倍に希釈して用いた。線維芽細胞, iPS 細胞, KCs 1stP, KCs 2ndP, KCs 3rdP に γ 線を 2Gy 照射し, 72 時間培養後に p16 の免疫染色を行った結果を図 3-17A に示した。各条件で 200 個の細胞を数え, p16 陽性率を図 3-17B に示した。iPS 細胞では, 照射後も, p16 の発現が確認できず, p21 と同様に p16 も発現が抑制されていることが明らかになった。KCs では, 未照射でも p16 が発現しており, DNA 損傷によりさらに発現レベルが増加していた。3.6.2 で示したように KCs では DNA 損傷時に p21 の顕著な発現誘導が見られなかったが, p16 は発現誘導が起こっており, 異なる傾向であった。

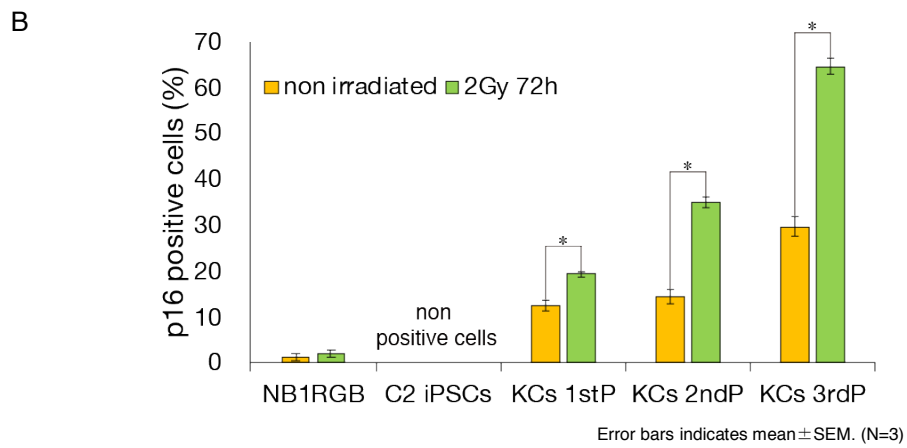
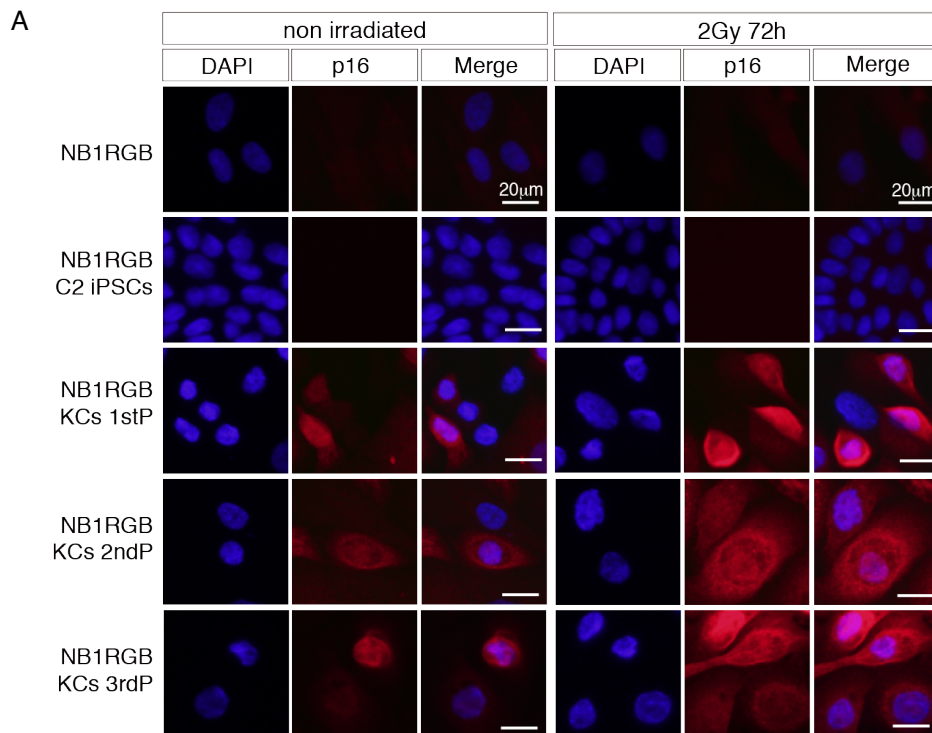


図 3-17 免疫染色による p16 の発現比較

3.6.4 WST-8 アッセイによる生存率の測定

ヒト新生児皮膚から単離したケラチノサイト集団から、ITGA6 と CD71 をマーカーとしてフローサイトメトリーにより単離した幹細胞と前駆細胞に対する γ 線照射の影響を調べた研究が報告されている^{[18][19]}。ITGA6 の発現が高く、CD71 が低い細胞を幹細胞、どちらも発現が高い細胞を前駆細胞としている。幹細胞はケラチノサイト集団の 1%、前駆細胞は 10%であった。 γ 線を 2 Gy 照射後の生存率を XTT アッセイ、コロニーカウントで調べた結果、幹細胞はどちらの方法でも生存率が低下せず、放射線抵抗性を示したが、前駆細胞は生存率が低下し、放射線感受性を示した。マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、前駆細胞よりも幹細胞の方が低下している遺伝子が多く、特に bcl2, BIRC5 などのアポトーシスに関する遺伝子は低下していた^[18]。また、コメットアッセイと免疫染色によりケラチノサイト幹細胞が、前駆細胞よりも DNA 損傷修復が速いことが報告されている。 γ 線照射により幹細胞では FGF2 シグナル伝達経路が誘導されることにより、前駆細胞よりも迅速な修復が行われる^[19]。

3.4.3, 3.4.4, 3.6.1 で示したように、KCs 1stP は KCs 2ndP よりも ITGA6/CD71 の比率が高く、DNA 損傷修復速度が早いため、幹細胞に近い性質を持っている可能性が得られた。そこで、DNA 損傷後の細胞生存率を 2.4.3 で示した WST アッセイによって調べた。 γ 線を 1, 2, 5 Gy 照射後、24 時間または 72 時間培養し、細胞生存率を算出した結果を図 3-18 に示した。

線維芽細胞は 2 Gy 照射時に 24 時間:93.9%、72 時間:72.4%と中程度の生存率低下であったが、iPS 細胞は、1 Gy でも 24 時間:47.2%、72 時間:44.8%と生存率が低下し、2, 5 Gy と線量が増加するに伴い、生存率は大きく低下した。KCs 1stP, KCs 2ndP, KCs 3rdP では、1, 2 Gy ではいずれも生存率の低下は見られなかったが、5 Gy では KCs 1stP でのみ生存率が 24 時間:75.9%、72 時間:68.7%に低下した。

ケラチノサイトが幹細胞、前駆細胞、基底上層細胞へと分化するに伴い、放射線に対する感受性が変化するという報告がある。特に前駆細胞は、サイクリング前駆細胞と後期前駆細胞で異なる性質を持ち、サイクリング前駆細胞よりも後期前駆細胞の方が放射線感受性は低下する^[25]。本研究と先行研究の結果から、KCs 1stP は幹細胞に近い前駆細胞で、KCs 2ndP, KCs 3rdP はより分化が進んだ後期前駆細胞であると考えられた。

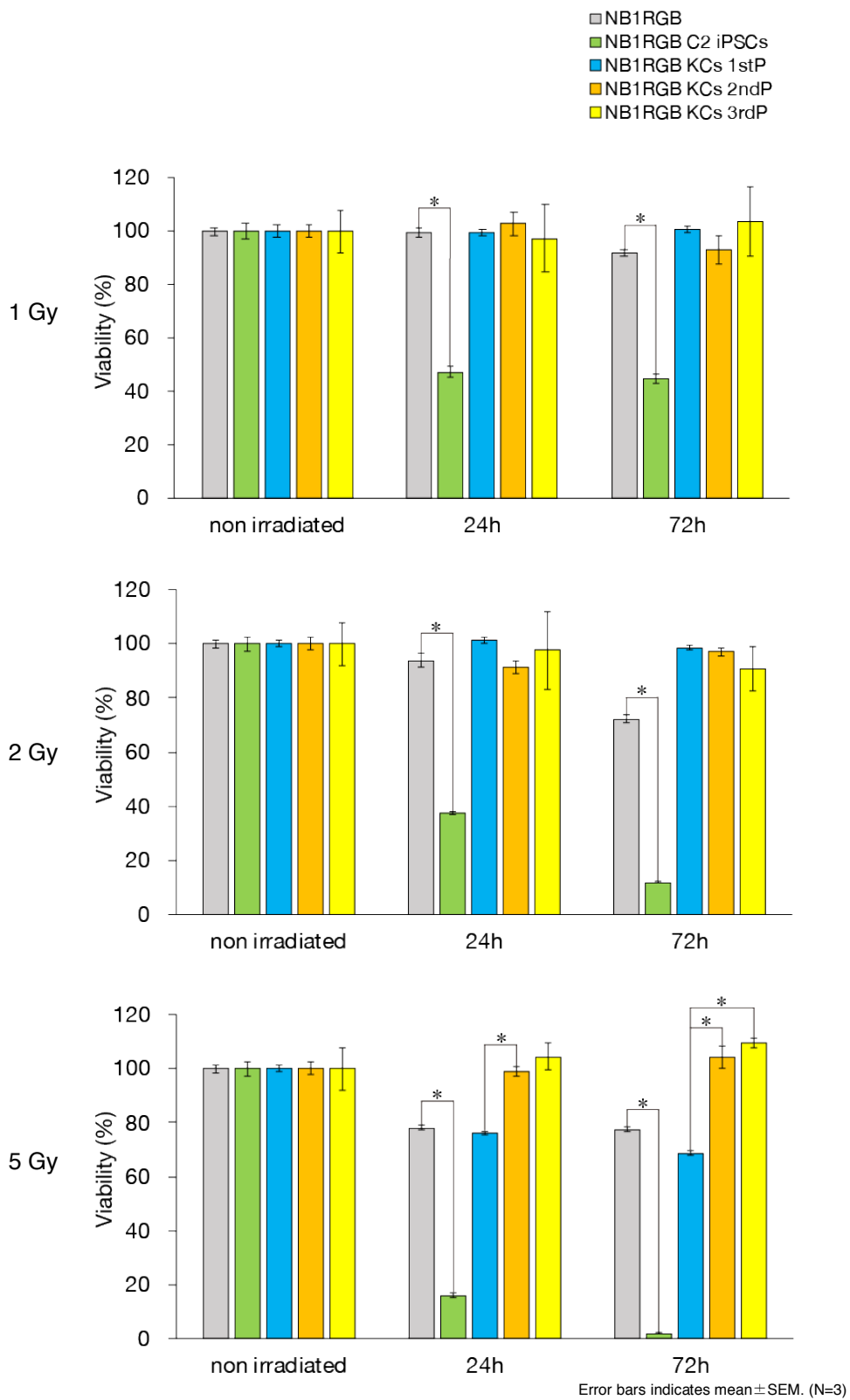


図 3-18 WST-8 アッセイによるγ線照射後の生存率の違い

3.6.5 TUNEL アッセイによるアポトーシスの測定

3.6.4 で示した γ 線照射による細胞生存率の低下が、アポトーシスでの細胞死が原因であるか調べるために、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)アッセイを行った。アポトーシスが誘導されると、核の凝集、DNA 断片化、カスパーゼの活性化などの変化が生じ、細胞死へと至る。TUNEL アッセイは DNA 断片化を検出する方法である。DNA 断片化で生じた 3'-OH 末端に、FITC などで蛍光標識したヌクレオチドを、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)により重合し、検出する。

2.4.4, 3.4.1 で示した免疫染色と同様に 24 ウェルプレートに、NB1RGB, iPS 細胞, KCs 1stP, KCs 2ndP, KCs 3rdP を培養し、 γ 線を 1, 2, 5 Gy 照射した。4 時間培養後、Apoptag Fluorescent Direct in situ Apoptosis Detection Kit (MerckMillipore)を用いてアポトーシスを検出した。細胞を DPBS で洗浄した後、100%メタノールを -30°C で 10 分間処理し、固定した。DPBS 洗浄を 2 回行った後、エタノール:酢酸=2:1 で -30°C で 5 分間処理した。DPBS で 2 回洗浄した後、equilibration buffer で 10 秒以上処理した後、TdT を加えて 37°C で 1 時間反応させた。0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI で核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

図 3-19A に、未処理と 5 Gy 照射後の細胞の写真を示した。5 Gy 照射後の写真は、TUNEL 陽性の細胞を選定して掲載した。各条件で 200 個の細胞を数え、アポトーシス陽性率を図 3-19B に示した。iPS 細胞では、線量の増加に伴い、1 Gy:5.7%, 2 Gy:34.2%, 5 Gy:38.0%とアポトーシス陽性率が増加した。線維芽細胞と分化誘導したケラチノサイトでは、アポトーシス誘導率は低い傾向であったが、KCs 1stP は 5 Gy 照射時に、9.7%にアポトーシス率が増加していた。この結果より、 γ 線照射時の生存率低下は、アポトーシスによる細胞死が原因であることが示唆された。

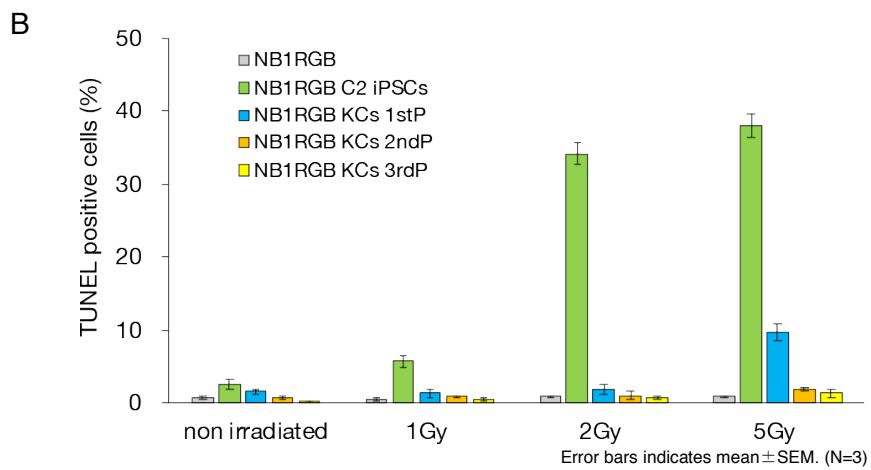
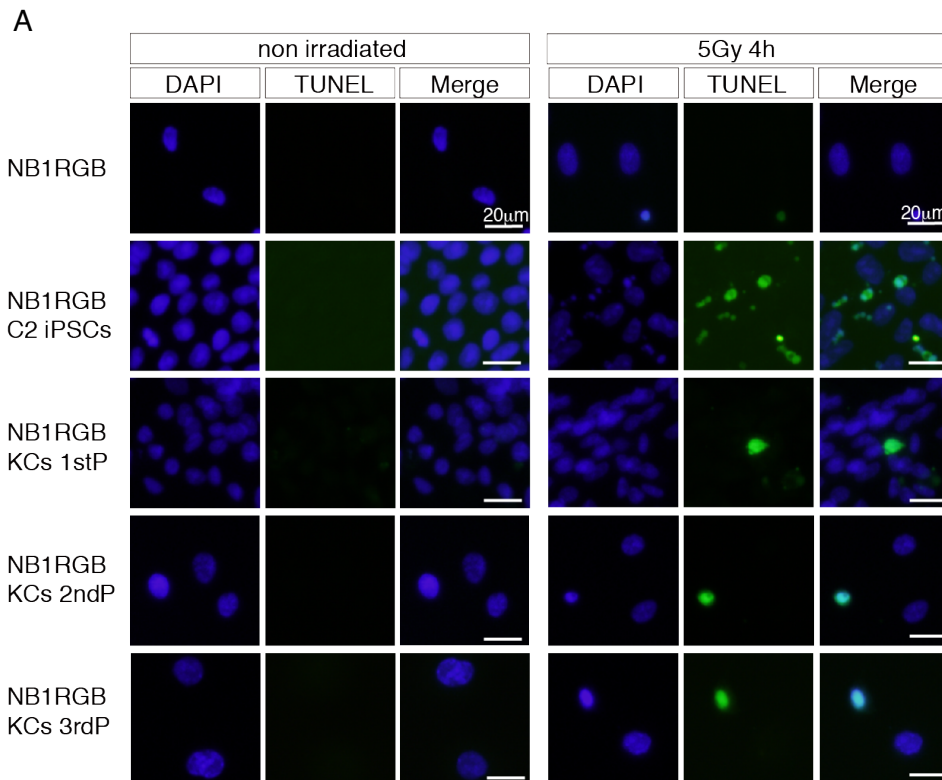


図 3-19 TUNEL アッセイによるアポトーシスの比較

3.7 まとめ

本章では、iPS 細胞から表皮角化細胞であるケラチノサイトに分化誘導し、線維芽細胞、iPS 細胞、iPS 細胞由来ケラチノサイトにおける γ 線照射時の DNA 損傷応答の違いを解析した。特に、iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトは継代数の違い(KCs 1stP, 2ndP, 3rdP)により、幹細胞、前駆細胞どちらの性質に近いのか調べた。

ケラチノサイトの分化マーカーである、K14, p63 は初代培養ケラチノサイト(HEKn)と同様に、分化誘導したケラチノサイト(KCs)で発現していた。KCs では継代数が増加するにしたがい、K14 発現量が増加することも明らかにした。KCs 1stP を用いて 3D 皮膚オルガノイドを再構築し、基底層のマーカーである K14 の上部に基底上層のマーカーである K10 の層を確認した。また、3D 皮膚オルガノイドの生理的機能を調べるために、薬剤透過試験を行って皮膚バリア機能を評価した結果、KCs 1stP は HEKn と同程度のバリア機能を有することを明らかにした。以上の結果より、本研究で iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト KCs 1stP には皮膚としての生理的機能を持った 3D オルガノイドを再構築できることを示した。

KCs が幹細胞と前駆細胞どちらの性質を持っているのか調べるために、ITGA6 と CD 71 の発現を調べた結果、前駆細胞である可能性が示唆された。KCs は継代数の増加に伴い CD71 に対する ITGA6 の比率が低下し、DNA 損傷修復速度が遅くなること、KCs 1stP のみ放射線照射により細胞生存率が低下し、アポトーシス率が増加したことから、KCs 1stP は幹細胞に近い前駆細胞で、KCs 2ndP, KCs 3rdP はより分化が進んだ後期前駆細胞であると考えられた。

KCs においては、細胞周期を止める p21, p16 の発現が増加していたが、iPS 細胞ではどちらの発現も確認できなかった。iPS 細胞において、p21 の上流に位置する、ATM, KAP1, p53 のリン酸化は DNA 損傷により増加しているが、p21 の発現誘導は見られなかった。iPS 細胞では放射線量の増加に伴い、生存率が低下しアポトーシスが増加していることから、DNA 損傷時に、細胞周期を止める応答ではなく、アポトーシスによる細胞死を誘導することで、ゲノム安定性を維持する機構が働いていると考えられた。

本研究では、線維芽細胞、iPS 細胞、iPS 細胞由来ケラチノサイトでの DNA 損傷応答を比較するための基礎的データを取得した。分化誘導したケラチノサイトの継代数によって細胞の性質が異なる可能性は得られたが、それぞれの細胞集団の中で、幹細胞、前駆細胞がどの程度の比率で存在するのかフローサイトメトリーで分析するところまでは至らなかった。またケラチノサイトや 3D 皮膚オルガノイドにおける他のマーカー分子の発現なども比較する必要がある。今後は、RNA シークエンス等での網羅的な発現解析を行う必要がある。iPS 細胞において、p21, p16 の発現が抑制されているという劇的な結果が得られたが、これまでの先行研究では、その機構は、エピジェネティックな修飾や miRNA が関与することが報告されている。しかしながら、不明な点も多く、幹細胞のゲノム安定性維持機構に関わる重要な現象であり、さらなる解明が求められる。

第3章の参考文献

- [1] H. Green, K. Easley, and S. Iuchi, Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 26, pp. 15625-15630 (2003).
- [2] C. M. Metallo, L. Ji, J. J. de Pablo, and S. P. Palecek, Retinoic Acid and Bone Morphogenetic Protein Signaling Synergize to Efficiently Direct Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells, *Stem Cells*, **26**, 2, pp. 372-380 (2007).
- [3] H. Guenou, X. Nissan, F. Larcher, J. Feteira, G. Lemaitre, M. Saidani, M. D. Rio, C. C Barrault, F. X. Bernard, M. Peschanski, C. Baldeschi and G. Waksman, Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study, *Lancet*, **374**, 9703, pp. 1745-1753 (2009).
- [4] Y. Sugiyama-Nakagiri, T. Fujimura, and S. Moriwaki, Induction of skin-derived precursor cells from human induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **11**, 12 (2016).
- [5] G. Bilousova, J. Chen, and D. R. Roop, Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage, *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 4, pp. 857-864 (2011).
- [6] O. Veraitch, T. Kobayashi, Y. Imaizumi, W. Akamatsu, T. Sasaki, S. Yamanaka, M. Amagai, H. Okano and M. Ohyama, Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ectodermal Precursor Cells Contribute to Hair Follicle Morphogenesis In Vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 6, pp. 1479-1488 (2013).
- [7] A. Petrova A. Celli, L. Jacquet et al., 3D in vitro model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Reports*, **2**, 5, pp. 675-689 (2014).
- [8] K. Kajiwara, T. Tanemoto, S. Wada et al., Fetal Therapy Model of Myelomeningocele with Three-Dimensional Skin Using Amniotic Fluid Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells, *Stem Cell Reports*, **8**, 6, pp. 1701-1713 (2017).
- [9] L. Larribère, M. Galach, D. Novak, K. Arevalo, H. C. Volz, H. J. Stark, P. Boukamp, M. Boutros and J. Utikal, An RNAi Screen Reveals an Essential Role for HIPK4 in Human Skin Epithelial Differentiation from iPSCs, *Stem Cell Reports*, **9**, 4, pp. 1234-1245 (2017).
- [10] M. Shimada, K. Tsukada, N. Kagawa, Y. Matsumoto, Transcriptional alteration after ionizing radiation exposure in human fibroblasts, iPSCs and NPCs, *NCBI-GEO*, GSE113125 (2019).

- [11] K. Takahashi and S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, **126**, 4, pp. 663-676 (2006).
- [12] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *Cell*, **131**, 5, pp. 861-872 (2007).
- [13] Y. Jung, K. Ms, S. Lee, and H. B. Lee, Oleic acid enhances keratinocytes differentiation via the upregulation of miR-203 in human epidermal keratinocytes, *J Cosmet Dermatol*, **18**, pp. 383-389 (2019).
- [14] K. Saha, G. Adhikary, S. R. Kanade, E. A. Rorke, and R. L. Eckert, P38 δ regulates p53 to control p21^{Cip1} expression in human epidermal keratinocytes, *J. Biol. Chem.*, **289**, 16, pp. 11443-11453 (2014).
- [15] Y. Itahana, J. Zhang, J. Goke, L. A. Vardy, R. Han, K. Iwamoto, E. Cukuroglu, P. Robson, M. A. Pouladi, A. Colman and K. Itahana, Histone modifications and p53 binding poise the p21 promoter for activation in human embryonic stem cells, *Sci. Rep.*, **6**, May, pp. 1-13 (2016).
- [16] D. Dolezalova, M. Mraz, T. Barta, K. Plevova, V. Vinarsky, Z. Houlubcova, J. Jaros, P. Dvorak, S. Pospisilova and A. Hampl, MicroRNAs regulate p21^{Waf1/Cip1} protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **30**, 7, pp. 1362-1372 (2012).
- [17] M. I. Aladjem, B. T. Spike, L. W. Rodewald, T. J. Hope, M. Klemm, R. Jaenisch and G. M. Wahl, ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage, *Curr. Biol.*, **8**, 3, pp. 145-155 (1998).
- [18] F. Amiot, W. Rachidi, M. T. Martin, G. Lemaitre, P. Vaigot, and G. Harfourche, Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells, *Radiother. Oncol.*, **83**, 3, pp. 267-276 (2007).
- [19] G. Harfouche, P. Vaigot, W. Rachidi, O. Rigaud, S. Moratille, M. Marie, G. Lemaitre, N. O. Fortunel, M. T. Martin, Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells, *Stem Cells*, **28**, 9, pp. 1639-1648 (2010).
- [20] L. Beer, V. Mlitz, M. Gschwandtner, T. Berger, M. S. Narzt, F. Gruber, P. M. Brunner, E. Tschachler and M. Mildner, Bioinformatics approach for choosing the correct reference genes when studying gene expression in human keratinocytes, *Exp. Dermatol.*, **24**, 10, pp. 742-747 (2015).

- [21] N. V. R. Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Bruce Poppe, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, 7, p. 0034.1-0034.11 (2002).
- [22] K. T. Chan, M. Y. Choi, K.K.Y. Lai, W. Tan, L. N. Tung, H. Y. Lam, D. K. H. Tong, N. P. Lee and S. Law, Overexpression of transferrin receptor CD71 and its tumorigenic properties in esophageal squamous cell carcinoma, *Oncol. Rep.*, **31**, 3, pp. 1296-1304 (2014).
- [23] L. A. Donehower, Phosphatases reverse p53-mediated cell cycle checkpoints, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 20, pp. 7172-7173 (2014).
- [24] N. Ohtani, D. J. Mann, and E. Hara, Cellular senescence: Its role in tumor suppression and aging, *Cancer Sci.*, **100**, 5, pp. 792-797 (2009).
- [25] M. T. Martin, A. Vulin, and J. H. Hendry, Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation, *Mutat. Res.*, **770**, pp. 349-368 (2016).

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

4.1 緒言

大気圧プラズマを生体の殺菌，創傷治癒，がん治療などへ応用するために研究が盛んに行われており，それに伴い，プラズマ照射が DNA 損傷に及ぼす影響も調べられている^{[1]-[6]}。用いられているプラズマ源や細胞は多種多様ではあるが，処理時間や出力に応じて用量依存的に DNA 損傷が増加することが明らかになっている。しかしながら，これまでの先行研究では，プラズマ源の温度制御や照射時の雰囲気制御がなされておらず，温度や混入した周辺空気の影響があった。本章での実験では，先行研究までの手法に加え，プラズマガスの温度制御や，照射時の雰囲気制御を行い，空気の影響を排除した実験系でも調べた。また，実験に用いられている細胞は，線維芽細胞やがん細胞などであることが多く，幹細胞に対するプラズマ照射の影響については明らかにされていない。1章で述べたように，幹細胞における DNA 損傷は老化やがんと関係しており，大気圧プラズマを臨床応用するためには幹細胞に及ぼす影響を調べる必要がある。

本章では幹細胞に及ぼすプラズマ照射の影響を調べるために，3章で構築した実験系を用いて，線維芽細胞，iPS細胞，および iPS細胞から分化誘導したケラチノサイトにプラズマを照射し，生存率と DNA 損傷応答の違いを解析した。

4.2 温度制御マルチガスプラズマジェットによる照射方法

4.2.1 温度制御マルチガスプラズマジェット

本研究室で作製した温度制御マルチガスプラズマジェット^[7]を実験に用いた。装置の 3D-CAD データを図 4-1 に示した。装置内流路に温度制御した流体を流し，筐体の温度を制御する。その後，筐体内部にらせん状に配置した流路に原料ガスを流すことで，筐体との熱交換により原料ガスの温度を制御する。この機構により，プラズマのガス温度を制御することができる。この装置は，内部に複雑な流路を含む構造であるため，3D プリンターを用いて図 4-1 の 3D-CAD データからアルミニウム製の装置を作製した。図 4-2 に作製した装置の写真を示した。この装置に，9 kV, 16 kHz の交流電圧を印加し，CO₂，O₂，N₂，He，Ar，を原料ガスとしたプラズマを生成した。原料ガスの種類によって，発生するプラズマの色，輝度の違いが確認できた。この装置の熱流体解析の結果を図 4-3 に示した。装置に流入する温度制御流体をエレングリコール，温度を-15℃，圧力を 0.2 MPa，原料ガスを CO₂，温度を 20℃，体積流量を 5 LPM の条件で計算すると，装置出口のガス温度は-3.5℃であった。実際に，3D プリン

ターで作製した装置のガス出口 2 mm 部位における原料ガス温度, プラズマガス温度を熱電対により測定し, 温度制御流体の温度に対する変化を図 4-4 に示した。ガス流量は 3 LPM で行った。全てのガス種において, ガス温度, プラズマガス温度は温度制御流体の温度に対して線形を示し, いずれも相関係数が 0.98 以上と高い相関を示した。プラズマガス温度は, ガス種によって異なり, CO₂, He, N₂, Ar の順に高温であった。測定したプラズマガス温度の中で, 最も温度が高かった CO₂ プラズマでも温度制御流体温度が 20°C の時に, プラズマガス温度が 40.4°C であり, 生体や細胞に照射する際に熱損傷を与える 42°C を超えないことがわかった。今回の結果より, 温度制御を行うことにより, CO₂, N₂, He, Ar 全ての原料ガスを用いて, 熱損傷を与えることなくプラズマ照射できることが明らかになった。

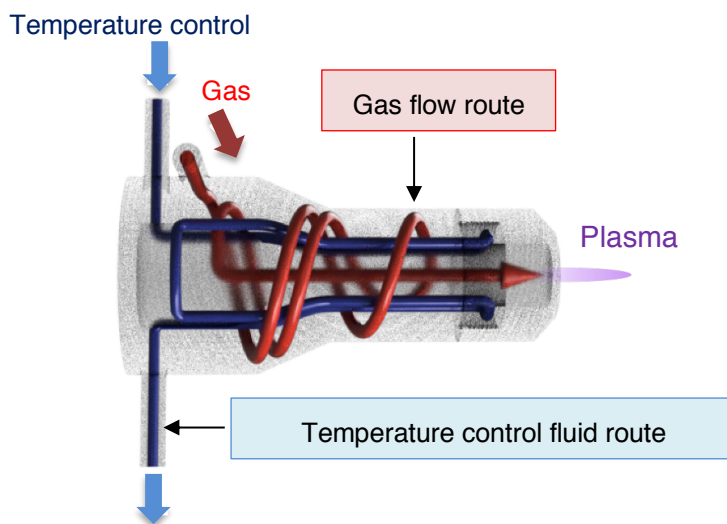


図 4-1 温度制御マルチガスプラズマジェットの構造

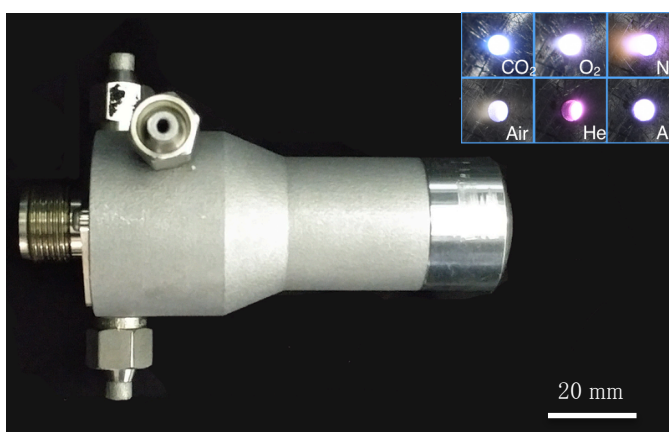


図 4-2 温度制御マルチガスプラズマジェット

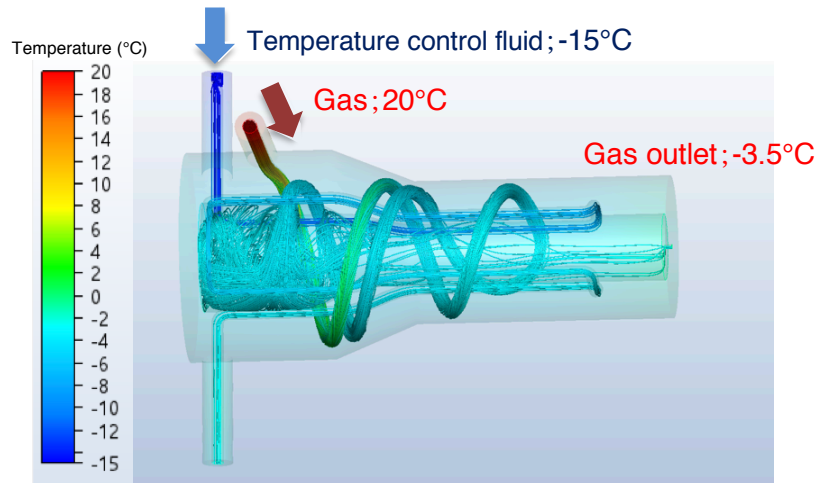


図 4-3 温度制御マルチガスプラズマジェット熱流体解析

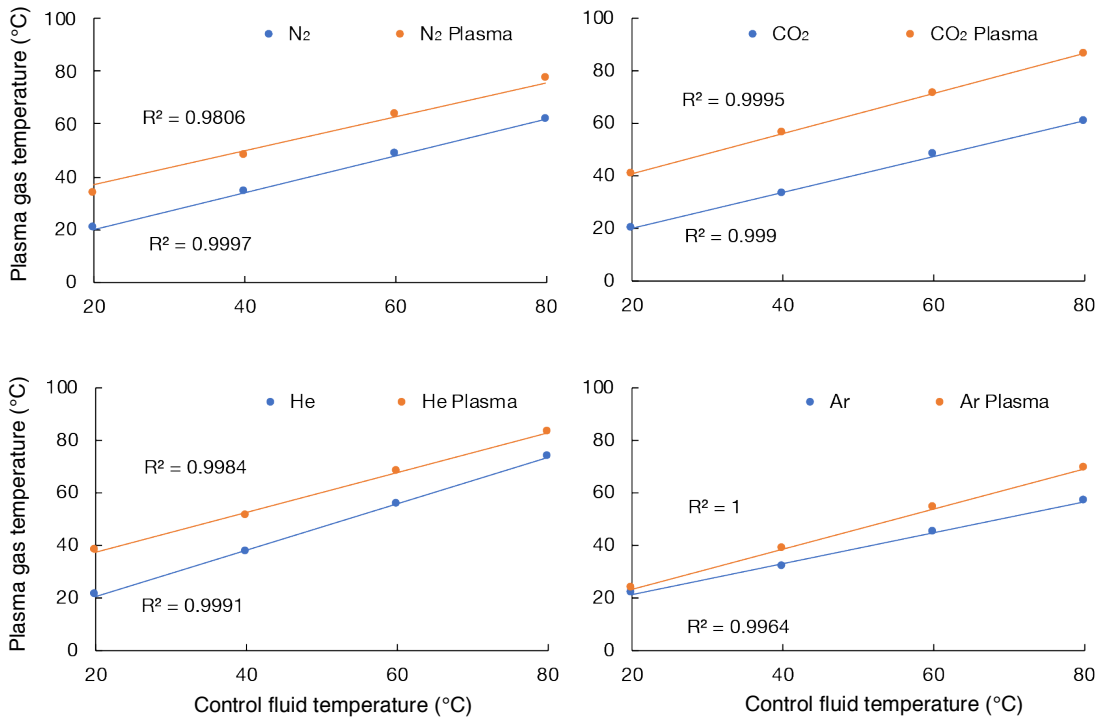


図 4-4 プラズマガス温度の測定

4.2.2 細胞培養

細胞は、3章で述べた線維芽細胞(NB1RGB), iPS 細胞(C2), iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト 2nd Passage 細胞(KCs 2ndP)を実験に用いた。KCs 2ndP を用いた理由は、細胞の形状が最も初代培養ケラチノサイトに似ているため、選定した。24 ウエルプレートに NB1RGB を 1.2×10^4 個/well, C2 を 1.0×10^4 個/well, KCs 2ndP を 1.0×10^4 個/well ずつ播種し、それぞれ、2, 3, 7 日間培養した後、プラズマを照射した。

4.2.3 細胞へのプラズマ照射方法

クリーンベンチの中に、アクリル板で作製したパージ装置を配置し、パージ装置の中に、温度制御マルチガスプラズマジェット、細胞を培養した 24 ウエルプレートを入れた。プラズマ装置のプラズマガス出口から、24 ウエルプレートの底までの距離が、12.5 mm となるようにセットし、照射距離を一定にした。24 ウエルプレートには、500 μ l の培地を入れた状態で細胞への照射を行った。原料ガスは、あらかじめ、シリカゲルで脱水した CO₂, N₂, Ar を 2 LPM の流量で温度制御マルチガスプラズマジェットに投入し、同時にパージ装置内にも用いる原料ガスと同じガスを注入した。パージ装置内の酸素濃度を測定し、パージができていることを確認した。この条件で、初期温度 21.1°C の水に対して CO₂ プラズマで 120 秒照射した時の液温は 28.4°C であったため、プラズマガスの温度制御をせず、照射を実施した。

4.3 WST-8 アッセイによる細胞生存率の測定

プラズマ照射後、CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。その後、培地を抜き、1 ml の DPBS で洗浄後、トリプシンで 24 ウエルプレートから接着している細胞を剥がし、96 ウエルプレートに細胞をまきなおした。未処理の細胞が、NB1RGB は 5.0×10^3 個/well, C2 は 8.0×10^3 個/well, KCs 2ndP は 3.2×10^3 個/well ずつ含まれるように調整し、他の処理も同じ希釈率で 96 ウエルプレートに播種した。96 ウエルプレートで 48 時間培養後に 2.4.3 で示した方法で WST-8 アッセイを行い、細胞生存率を算出した。プラズマ照射により死滅した細胞は、照射後 48 時間の間に、24 ウエルプレートから剥がれ、培地中に浮遊するため、生細胞のみを 96 ウエルプレートに播種することができる。未処理の細胞と同じ希釈率で播種することにより、コントロールに対する生存率を算出することが可能である。

確実に生存率が低下するコントロールとして、NB1RGB, iPS 細胞, KCs 2ndP に γ 線を 5 Gy 照射した時の生存率を図 4-5 に示した。未処理に対する γ 線 5 Gy 照射の生存率は、NB1RGB が 62%, iPS 細胞が検出限界以下の 0%, KCs 2ndP が 112% となり、NB1RGB は中程度の感受性、C2 は高い感受性、KCs 2ndP は高い耐性を示した。この結果は、3章で示した結果と同じ傾向であった。

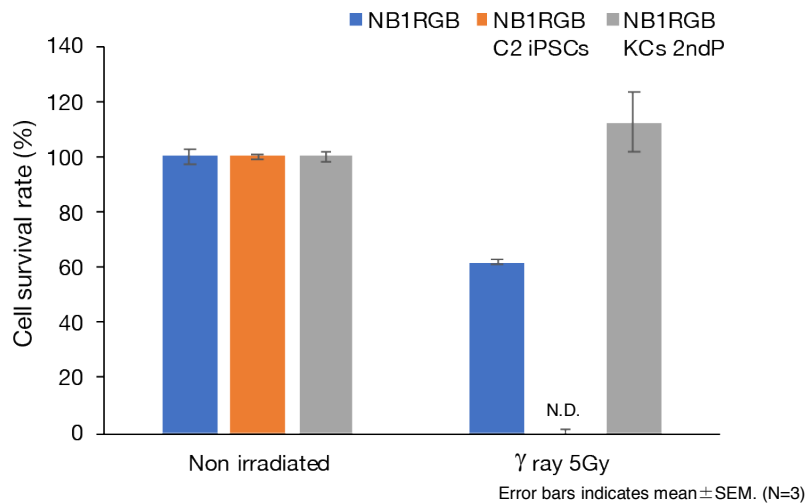


図 4-5 ̳線 5Gy 照射時の細胞生存率

図 4-6 に NB1RGB に対して 60 秒間プラズマ照射, もしくはガスのみ照射した時の生存率を示した。ガスのみ照射を 100%として生存率を算出した。CO₂ プラズマをパーズありで照射した時は, 生存率が 82%であり, CO₂ パーズなしでは 91%であった。N₂ パーズなし, Ar パーズなしでは, それぞれ 103%, 101%であり生存率は低下しなかった。同様の条件で, iPS 細胞でプラズマ照射後の生存率を調べた結果を図 4-7 に示した。iPS 細胞では全てのプラズマ照射条件で, 生存率は 0%であった。

図 4-8 に NB1RGB, C2 と同様の条件でケラチノサイト KCs 2ndP にプラズマ照射した時の生存率を示した。KCs 2ndP では, CO₂ パーズありで 71%, CO₂ パーズなしで 1%であった。3 章で述べた̳線により DNA 損傷を与えた場合と同様に iPS 細胞はプラズマ処理に対して高い感受性があり, NB1RGB は中程度の感受性であった。しかしながら, ケラチノサイトは CO₂ パーズなし照射の時に, 高い感受性があり, 空気が含まれている場合に生存率が大きく低下した。

図 4-9 に iPS 細胞 C2 に CO₂ プラズマをパーズありで照射した時の, 照射時間と生存率の関係性を示した。未処理をコントロールとして生存率を算出した。5 秒間の照射で生存率は 74%に低下し, 30 秒以上の照射では 0%であった。これらの結果より, iPS 細胞はプラズマ照射に対して線維芽細胞やケラチノサイトに比べ, 高い感受性があり, 用量依存的に細胞死が誘導されることが明らかになった。

本実験で用いた温度制御マルチガスプラズマジェットでの直接照射は 2 章で示したプラズマバブル水での照射よりも短寿命の活性種が細胞に作用しやすく, プラズマ生成により生じた UV の影響なども考慮する必要がある。また, 2 章では, NB1RGB や U2OS に与えるプラズマバブル水の影響を調べており, iPS 細胞や iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトへの影響は調べていない。iPS 細胞やケラチノサイト に対するプラズマバブル水の影響も今後解析する必要がある。

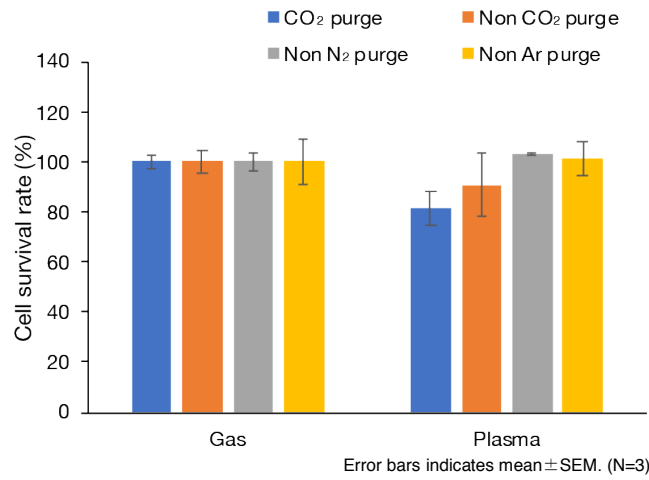


図 4-6 プラズマ照射時のNB1RGB の生存率

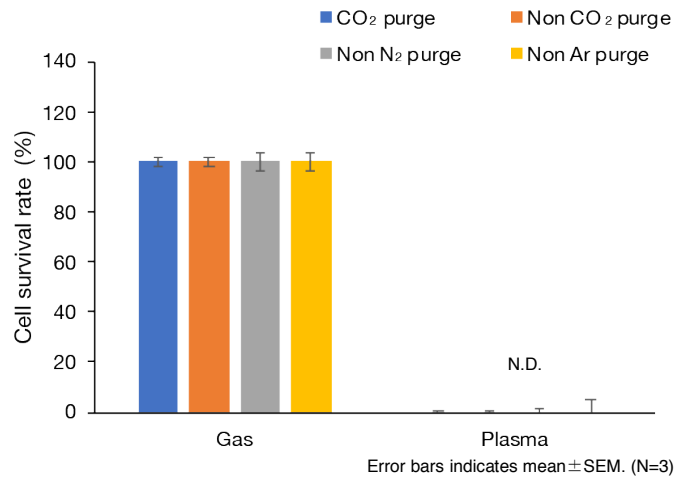


図 4-7 プラズマ照射時のiPS 細胞 C2 の生存

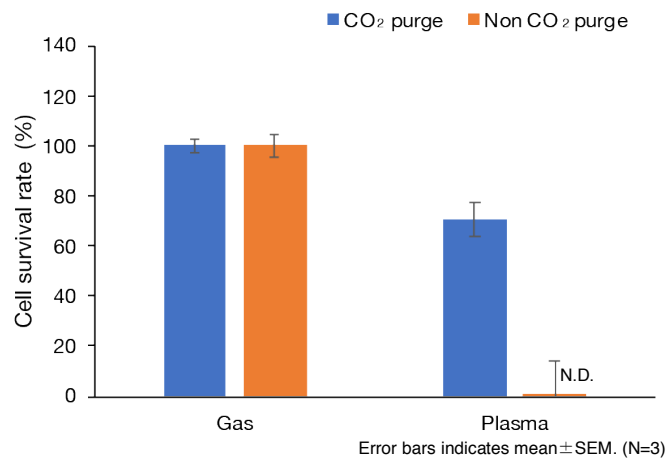


図 4-8 プラズマ照射時のケラチノサイト KCs 2ndP の生存率

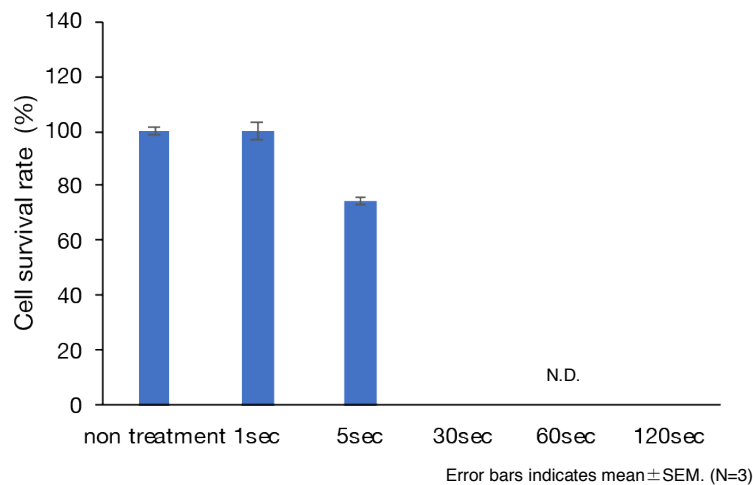


図 4-9 プラズマ照射時の iPS 細胞 C2 の生存率と照射時間の関係

4.4 免疫染色による DNA 損傷応答の測定

CO₂, Ar プラズマを NB1RGB, iPS 細胞 C2, iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト KCs 2ndP に対して照射し, DNA 損傷応答を調べた。ページなしで, 60 秒間照射した後, CO₂ インキュベーターで 1 時間培養した後, 免疫染色を行った。免疫染色は, 2.4.4 で示した方法で行った。図 4-10 に DSB(DNA double strand break)のマーカである, γ -H2AX と 53BP1 の免疫染色の写真を示した。 γ -H2AX または 53BP1 のフォーカスが一つの細胞あたり 10 個以上有する細胞を陽性と評価した。各条件で 200 個の細胞を数え, その陽性率を図 4-11 に示した。

γ -H2AX は 3 種類全ての細胞においてコントロールのガス照射では見られなかったが, プラズマ照射時には確認された。53BP1 の陽性率は, NB1RGB において CO₂ プラズマ照射時に 55 %, Ar プラズマ照射時に 61 %であったが, iPS 細胞とケラチノサイトでは 0.2%以下であった。NB1RGB で 53BP1 のフォーカスを形成した細胞は, H2AX もフォーカスを形成していた。それに対して, 53BP1 がフォーカスを形成していない細胞は, H2AX のリン酸化が細胞全体に強く見られた。53BP1 がフォーカスを形成せず H2AX のリン酸化が細胞全体で強い傾向は, iPS 細胞, ケラチノサイトのプラズマ照射時にも同様にみられた。H2AX のリン酸化は DNA 二本鎖切断以外にも生じる可能性もあり, 53BP1 がフォーカスを形成せず H2AX のリン酸化が細胞全体で強いという現象は過酸化水素や UV 照射時にみられる現象と近い。プラズマ照射時に発生する過酸化水素や UV により, 酸化ストレスが生じ, 塩基損傷などの DNA 損傷が生じている可能性がある。そのため, 酸化的な塩基損傷である 8-オキシグアニンの生成を調べることにより, プラズマ照射が細胞に及ぼす影響を解析できる可能性がある。今回は, ページなしの環境下でプラズマ照射を行ったため, 混入した空気の影響が大きく, Ar, CO₂ どちらの条件

でも同様の傾向であった。しかしながら、細胞の種類によって、プラズマ照射に対する応答性が異なることが明らかになった。NB1RGB に対しては 2 章のプラズマバブル水処理、本章のプラズマ直接照射両方行っており、直接照射では酸化ストレスが強い傾向であった。この原因として、直接照射では UV や短寿命の活性種も細胞に影響することが考えられる。iPS 細胞や iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトにおけるプラズマバブル水処理時の DNA 損傷応答を調べることは今後の課題である。

生体や培養細胞へのプラズマ照射により、DNA 損傷等を調べている先行研究では、空気中での直接照射での結果が多く報告されている。がん細胞においては、プラズマ照射による細胞内の ROS/RNS が増加し、酸化ストレスによりアポトーシスが誘導される。この現象には主に H_2O_2 が関与していると考えられている^{[2][8][9][10]}。また、プラズマ照射の安全性評価のために、Bリンパ球細胞である TK6 を用いて小核試験を行い、変異原性を調べた結果が報告されている。Ar, N_2 , O_2 を用いて作製したプラズマを TK6 に照射すると、未処理と同程度の小核率であり、変異原性はどの照射条件でも確認されていなかった^[11]。ヒト皮膚、ヒト皮膚由来細胞の DNA 損傷に対するプラズマ照射の影響も調べられている。ヒト皮膚にプラズマ照射を行うことにより、基底層の γ -H2AX の発現が増加し、アポトーシスも増えているが、同時に、細胞増殖のマーカーである Ki-67 も増加していた^[3]。不死化したケラチノサイトの細胞株である HaCaT にプラズマ照射すると、ATM, p53, Chk1/2 などの活性が上がり、成長因子やサイトカインの発現が増加するという報告もある^[6]。また、メラノーマ細胞にプラズマを照射すると p21 の発現誘導が生じ、SA- β -gal 陽性細胞が増え、細胞老化が生じているという報告もある^[12]。細胞の種類、プラズマ装置、照射条件の違い、着目する細胞応答によって、得られる結果は異なるが、これまでの先行研究では、プラズマ照射により、酸化ストレスが生じて、その強度によってアポトーシスへ至る、もしくは細胞が増殖するという傾向である。本研究でも、酸化ストレスが生じている可能性が示唆されており、先行研究で報告されている傾向と類似している。

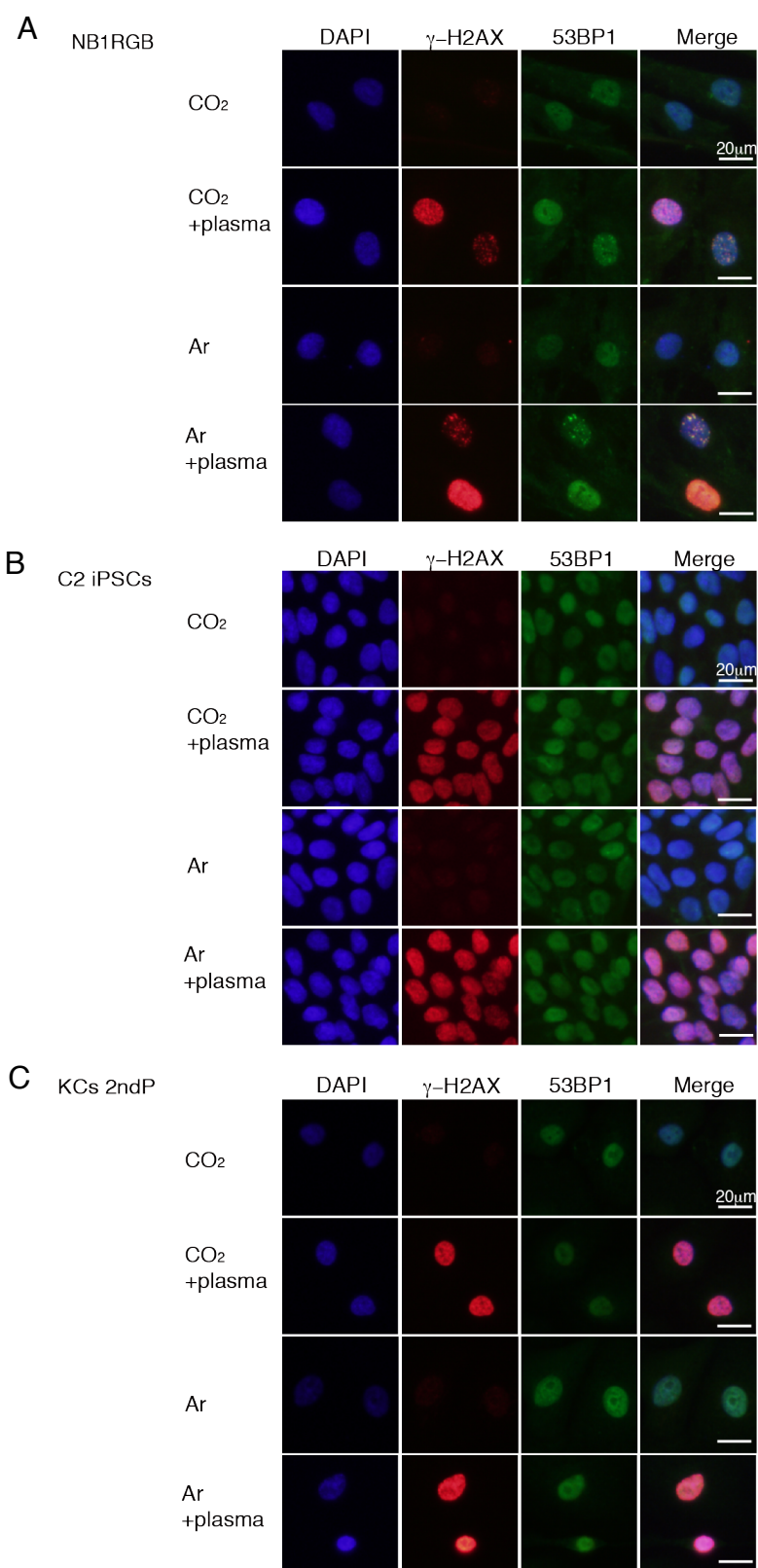


図 4-10 プラズマ照射時の γ -H2AX と 53BP1 の変化

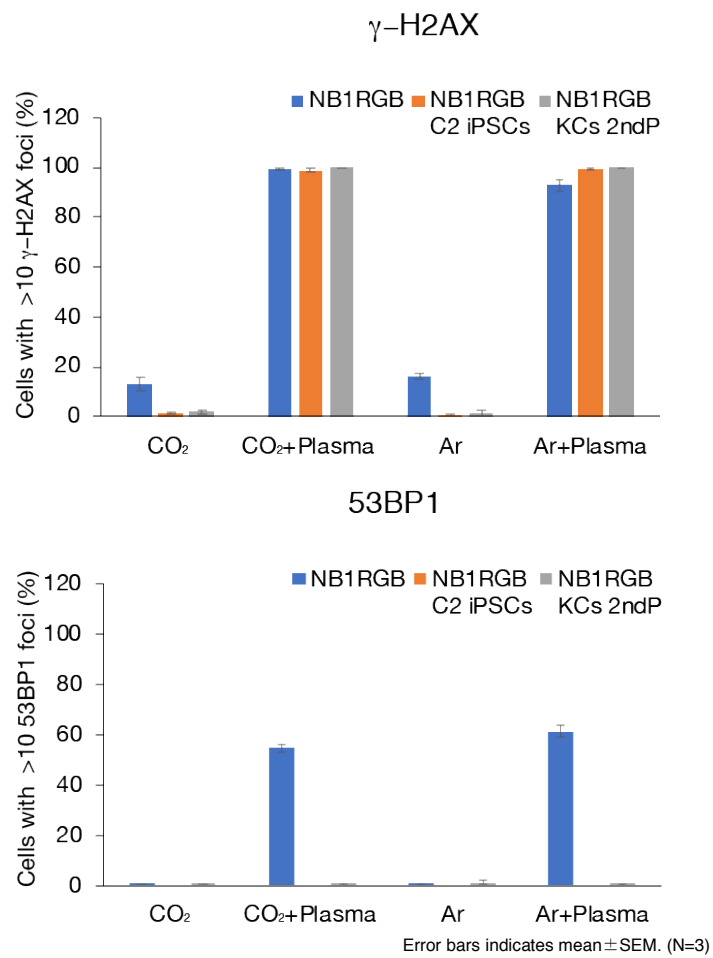


図 4-11 プラズマ照射時の γ -H2AX と 53BP1 の変化

4.5 まとめ

本章では、線維芽細胞, iPS 細胞, および iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトにプラズマを照射し, 生存率と DNA 損傷応答の違いを解析した。

iPS 細胞はプラズマ照射に対する感受性が高く, 全ての条件で大幅に生存率が低下した。CO₂ パージの有無で比較すると, NB1RGB はパージの有無で大きな差がなかったが, ケラチノサイトではパージの有無によってプラズマ照射が生存率に与える影響が異なり, パージなしで空気が混入すると生存率が大幅に減少した。これらの結果から, ガス種の違いによる影響を調べるためには雰囲気制御下での照射は必須であることが再認識された。

免疫染色では線維芽細胞, iPS 細胞, および iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトにおいて, DNA 二本鎖切断ではなく, 酸化ストレスが生じている可能性が示唆された。線維芽細胞は, γ -H2AX と 53BP1 の局在変化が iPS 細胞やケラチノサイトとは異なり, 細胞によってプラズマ照射に対する応答が異なる可能性が示された。

本研究ではパージ条件下で照射するための装置開発が発展途中であり, 安定して雰囲気制御下で細胞や生体にプラズマ照射を行うための実験系の構築が課題である。特に, 3章で構築した 3D 皮膚オルガノイドへのプラズマ照射の影響や, 酸化ストレスに関係する遺伝子発現, iPS 細胞からケラチノサイトへの分化過程に与えるプラズマ照射の影響など基礎的な解析が求められる。

第 4 章の参考文献

- [1] K. P. Arjunan, V. K. Sharma, and S. Ptasinska, Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA—a review, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 2, pp. 2971-3016 (2015).
- [2] W. H. Chung, Mechanisms of a novel anticancer therapeutic strategy involving atmospheric pressure plasma-mediated apoptosis and DNA strand break formation, *Arch. Pharm. Res.*, **39**, 1, pp. 1-9 (2016).
- [3] S. Hasse, T. D. Tran, O. Hahn, S. Kindler, H. R. Metelmann, T. V. Woedtke and K. Masur, Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma, *Clin. Exp. Dermatol.*, **41**, 2, pp. 202-209 (2016).
- [4] N. Kumar, P. Attri, D. K. Yadav, J. Choi, E. H. Choi, and H. S. Uhm, Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet, *Sci. Rep.*, **4**, pp. 1-13 (2014).
- [5] J. W. Chang, S. U. Kang, Y. S. Shin, K. I. Kim, S. J. Seo, S. S. Yang, J. S. Lee, E. Moon, S. J. Baek, K. Lee, C. H. Kim, Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-

- triggering sub-G 1 arrest via the ATM/p53 pathway, *Arch. Biochem. Biophys.*, **545**, pp. 133-140 (2014).
- [6] S. Hasse, S. Bekeschus, K. Wende, A. Schmidt, K. Jarick, and T. von Woedtke, Cold Physical Plasma Modulates p53 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocytes, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 7017363, pp. 1-16 (2019).
- [7] 守屋翔平, 低侵襲高速殺菌のための温度制御マルチガスプラズマジェットの開発, 東京工業大学学士論文 (2018).
- [8] D. Yan, H. Cui, W. Zhu, A. Talbot, L. G. Zhang, J. H. Sherman and M. Keidar, The Strong Cell-based Hydrogen Peroxide Generation Triggered by Cold Atmospheric Plasma, *Sci. Rep.*, **7**, 1, pp. 1-9 (2017).
- [9] A. M. Hirst, M. S. Simms, V. M. Mann, N. J. Maitland, D. O'connell, and F. M. Frame, Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells, *Br. J. Cancer*, **112**, 9, pp. 1536-1545 (2015).
- [10] E. Turrini, R. Laurita, A. Stancampiano, E. Catanzaro, C. Calcabrini, F. Maffei, M. Gherardi, V. Colombo and C. Fimognari, Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis and Oxidative Stress Pathway Regulation in T-Lymphoblastoid Leukemia Cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 4271065, pp. 1-13 (2017).
- [11] S. Bekeschus, A. Schmidt, A. Kramer, H. R. Metelmann, F. Adler, T. V. Woedtke, F. Niessner, K. D. Weltmann and K. Wende, High throughput image cytometry micronucleus assay to investigate the presence or absence of mutagenic effects of cold physical plasma, *Environ. Mol. Mutagen.*, **59**, 4, pp. 268-277 (2018).
- [12] S. Arndt, E. Wacker, Y. F. Li, T. Shimizu, H. M. Thomas, G. E. Morfill, S. Karrer, J. L. Zimmermann and A. K. Bosserhoff, Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells, *Exp. Dermatol.*, **22**, 4, pp. 284-289 (2013).

第5章 プラズマ照射が毛髪に及ぼす影響

5.1 緒言

大気圧低温プラズマは、創傷治癒、がん治療、止血などの医療だけでなく、表面処理でも応用されており、多くの研究が報告されている。例えば、再生医療の分野においては、細胞の足場として用いられているポリマーにプラズマを照射して表面を親水化することで、細胞の接着性、増殖性が向上することが報告されている^[1]。人工心臓や心臓弁などに使われている低密度ポリエチレンをプラズマ処理後、キトサンでコーティングし、親水性を高め、血漿タンパク質の吸着抑制により血栓を予防することも検討されている^[2]。また、種子にプラズマを照射し、親水性、湿潤性を上げることで発芽率を向上できるという報告もある^[3]。天然繊維である羊毛や麻の表面処理にも応用されている^{[4]-[7]}。従来から、羊毛では、低気圧プラズマによる防縮効果が報告されていた。プラズマ照射により、繊維表面の脂質を除去し、親水基を付与することで、親水化する^{[8]-[10]}。防縮加工だけでなく、プラズマ照射後ポリシロキサンなどでコートし繊維を柔らかくする表面改質効果や、プラズマ照射後の薬剤浸透促進効果も報告されている。羊毛と構造が類似している人毛(毛髪)に対するプラズマ照射の影響も報告されている^[11]。原料ガスはAr, He 単独もしくは1% O₂を添加したものを用い、DBD(Dielectric Barrier Discharge)のリモートプラズマを毛髪に照射し、毛髪表面の脂質が除去されることを示している。雰囲気制御したという記載がないため、おそらく空気中での照射結果であると思われ、さらに、CO₂, O₂, N₂, 空気など他の原料ガスでの比較はされていない。

そこで、本研究では、2章で用いたマルチガスプラズマジェット、4章で用いた温度制御マルチガスプラズマジェットを用いて、プラズマを毛髪に照射した。ガス種の違いや雰囲気制御の有無など条件を変えて、プラズマ照射が毛髪表面の組成変化に及ぼす影響を X 線光電子分光(XPS; X-ray photoelectron spectroscopy)により解析した。

5.2 マルチガスプラズマジェットによる照射

カラー、ブリーチ、パーマなどの化学処理をしていない中国人女性同一人物の毛髪(ビューラックス)を、ビューライト NA-25S(三洋化成工業)を希釈して作製した1%ラウレス硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、未処理毛として実験に用いた。未処理毛に対して、ブリーチ、パーマ、ブリーチの順に処理した毛髪をダメージ毛として用いた。ブリーチは、ルベルプラチナブリーチ、マテリア オキシW 6%(タカラベルモント)を用い、パーマは、プライアリラクサー(タカラベルモント)を用いて処理した。

ステンレス製のワッシャーに導電性カーボンテープを貼り、その上に未処理毛、もしくはダメージ毛を乗せ、マルチガスプラズマジェット(DFMJ-02, Plasma Concept Tokyo)を用いてプラズマを照射した。プラズマ装置の出口から毛髪までの距離が、3 mm となるように調整した。印

加電圧は 9 kV, 周波数は 16 kHz, 原料ガスは空気を用い, 流量は 6 LPM, 空気中で 90 秒間照射した。照射後, 真空状態を数時間維持し, 毛髪中の水を除去してから, XPS(ESCA-1700R, ULVAC-PHI)により分析した。XPS のスリット幅は 0.8×2.0 mm, アルミモノクロ線源を用いて分析した。スペクトルは C1s における 285 eV のピークに対して補正した。

毛髪の表面には, 18-メチルエイコサン酸(18-MEA; 18-Methyleicosanoic acid)という脂肪酸が存在し, 毛髪表面の疎水性を維持している。18-MEA の構造式を図 5-1 に示した。18-MEA は毛髪最表面のケラチンタンパク質にチオエステル結合で結合しており, 洗髪や紫外線, パーマ, カラーなどの要因により, 毛髪表面から脱離すると毛髪の疎水性が低下する^{[12][13]}。図 5-2 に 18-MEA の脱離に伴うシステイン酸の生成モデル図を示した。18-MEA が脱離すると, ケラチンタンパク質が露出した状態になり, システイン酸が生成する。

未処理毛, ダメージ毛, それぞれにプラズマ照射した時の元素組成の違いを表 5-1 に, 各元素のスペクトルを図 5-3 に示した。未処理毛とダメージ毛を比較すると, 薬剤によるダメージ処理により, C1s は低下し, N1s は増加していた。O1s, Si2p は大きな変化がなかった。S2p は 164 eV 付近の C-S のピークが減少し, 168 eV 付近の S-O/S=O のピークが増加していた。プラズマ照射により, 未処理毛, ダメージ毛共に, C1s, N1s は低下し, O1s は増加, Si2p は低下, S-O/S=O が増加していた。



図 5-1 18-メチルエイコサン酸(18-MEA)の構造

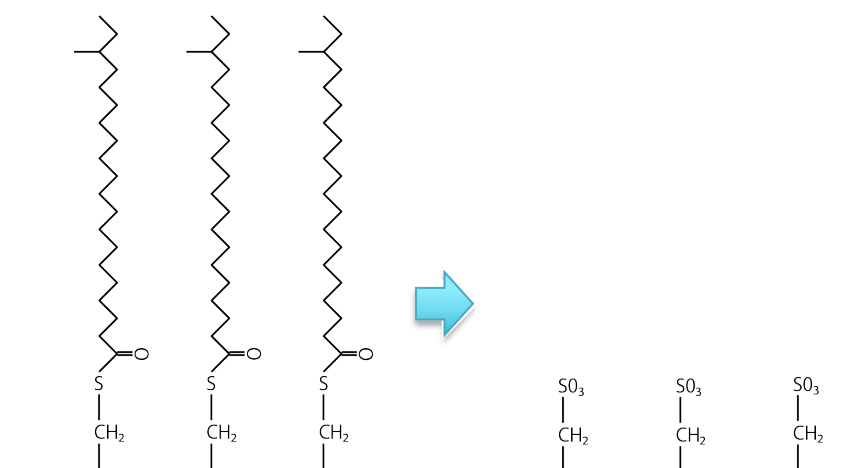


図 5-2 18-MEA の脱離に伴う, システイン酸の生成

表 5-1 プラズマ照射による未処理毛, ダメージ毛表面の元素組成変化

Element	Virgin hair	Virgin hair + Air plasma	Damaged hair	Damaged hair + Air plasma
C1s	76.44	51.11	64.33	36.27
N1s	2.54	2.34	7.78	5.97
O1s	17.88	44.75	22.49	55.44
Si2p	2.39	0.75	3.03	1.04
S2p	0.75	1.16	2.37	1.27

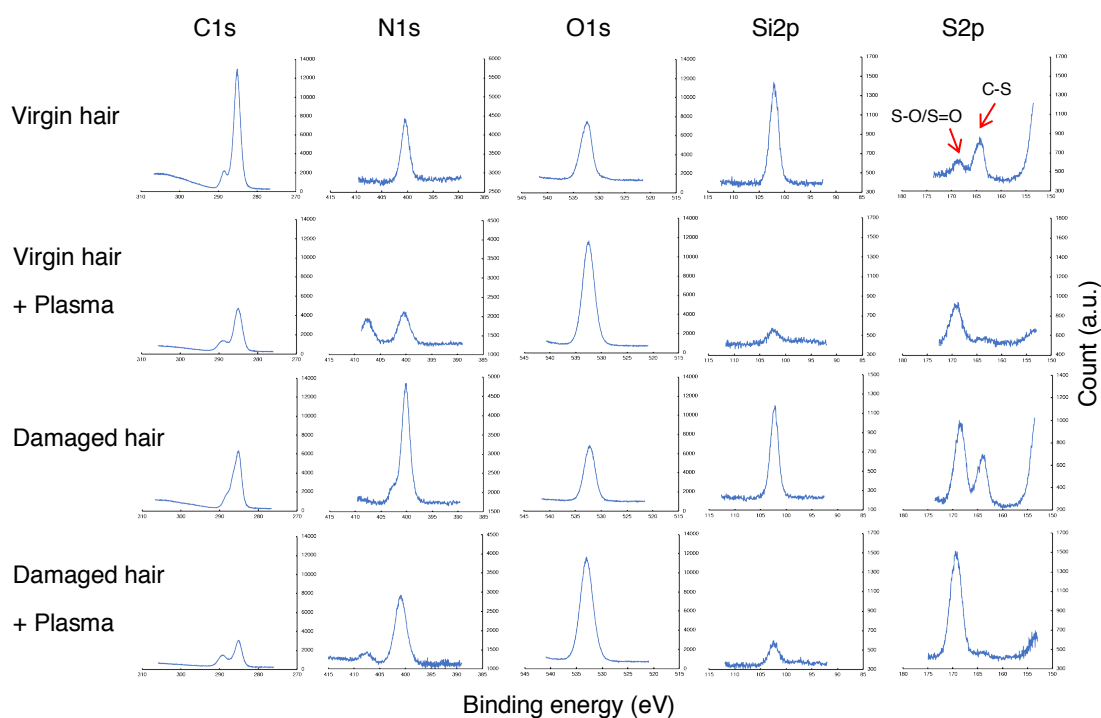


図 5-3 プラズマ照射による未処理毛, ダメージ毛表面の XPS スペクトルの違い

表 5-2 プラズマ照射による未処理毛, ダメージ毛表面の化学種の変化

Element	Binding energy (eV)	Possible chemical species	Relative atomic concentration (%)			
			Virgin hair	Virgin hair + Air plasma	Damaged hair	Damaged hair + Air plasma
C1s	285.0	C-C/C-H	65.9	31.4	43.8	27.8
	286.1	C-N/C-S	0	6.9	2.1	0.4
	286.7	C-O	1.7	2.1	11.7	0
	288.1	NH-C=O	6.2	0	5.4	0
	289.0	O-C=O	2	10.7	1.2	8.1
N1s	400.4	C-N	2.5	2.3	6.9	2.7
	402.8	NH ₄ ⁺	0	0	0.7	0
	407.3	NO ₃ ⁻	0	0	0	3.2
O1s	531.9	C=O	10.6	42.6	8.2	4.2
	533.1	C-O	7.4	2.1	14	51.2
Si2p	102.3	Si-O	2.9	0.7	3.4	1
S2p	163.9	C-S	0.6	0.1	1	0
	168.2	S-O/S=O	0.3	1.1	1.7	1.2

図 5-3 に示した XPS スペクトルをガウス関数近似によりピーク分離し, プラズマ照射による未処理毛, ダメージ毛の化学種の変化を比較した結果を表 5-2 に示した。未処理毛では, S-O/S=O よりも C-S の方が多いが, 薬剤によるダメージ処理により, 逆転し, S-O/S=O の方が多くなっている。また, C-C/C-H が減り, C-N/C-S が増えていることから, 18-MEA の一部分が脱離していると考えられた。未処理毛へのプラズマ処理により, S-O/S=O が多くなっていることから, 18-MEA のほぼ全てが脱離されていることが示唆された。ダメージ毛へのプラズマ照射では, C-C/C-H が減り, C-N/C-S は増加せず, C-O が増えていることから, さらに酸化分解が進んでいる可能性が生じた。NO₃⁻, C=O, C-O などの酸素, 窒素を含む置換基がプラズマ照射により増加している箇所があるのは, 原料ガスとして, 空気を用いてプラズマを生成しているためと考えられた。また, Si は毛髪由来の成分ではなく, シャンプーなどに含まれているシリコン由来のものであり, パーマなどの化学処理をしていない毛髪でも検出される。Si2p は未処理毛で 2.9%, ダメージ毛で 3.4%であったが, プラズマ照射により, 未処理毛で 0.7%, ダメージ毛で 1%と低下した。プラズマ照射によりシリコンが除去できることが示唆された。先行研究^[11]でも 18-MEA は除去されていたが, シリコンは除去されていなかったことから, 本研究の方が強いプラズマ照射条件であることが明確になった。

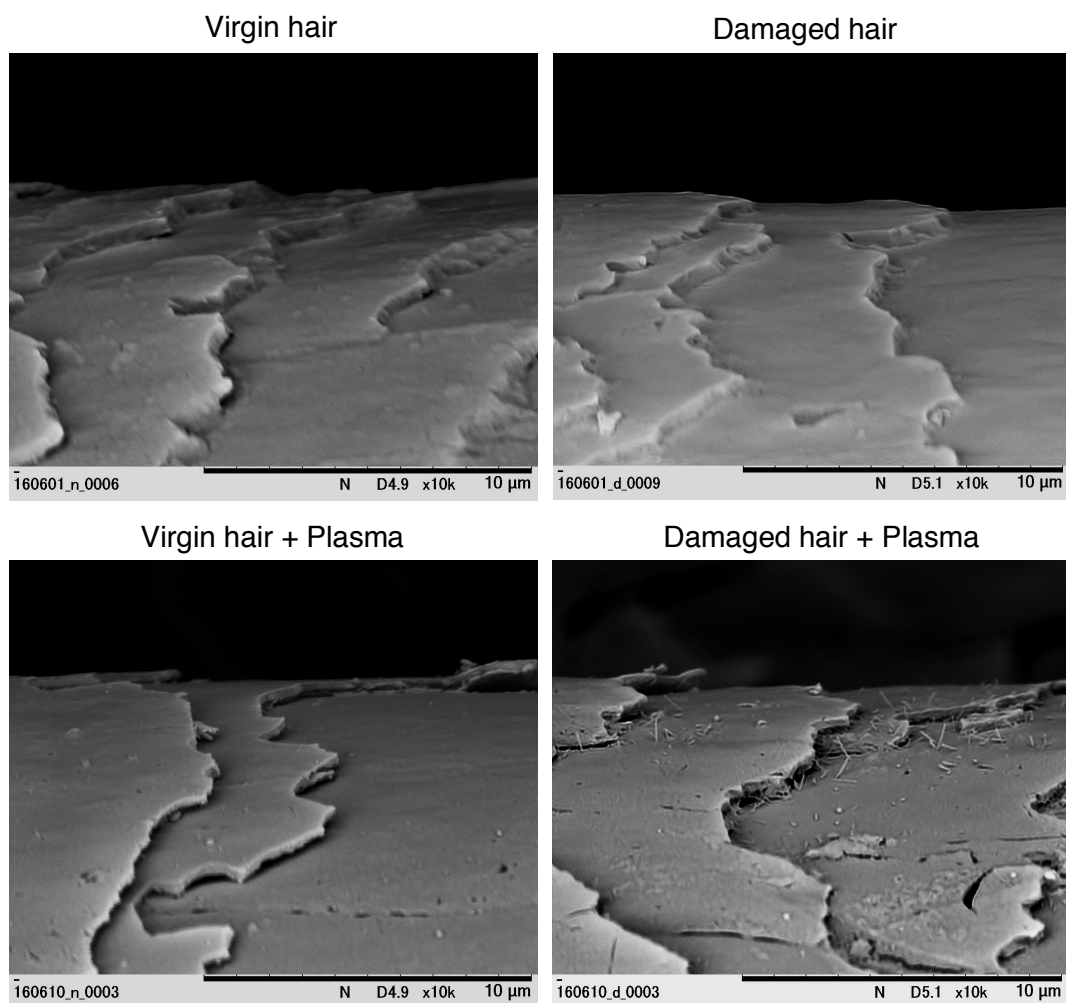


図 5-4 プラズマ照射による未処理毛, ダメージ毛の表面形状の違い

図 5-4 にプラズマ照射後の毛髪表面を SEM(Miniscop TM3030, 日立ハイテクノロジーズ)で撮影した写真を示した。毛髪は, Au 蒸着し, 加速電圧 15kV にて, 反射電子を観察した。未処理毛, ダメージ毛ともに, プラズマ照射によって, キューティクル細胞の下に隙間が生じていることから, 表面の脂質組織に加え, キューティクルの細胞膜複合体(CMC; Cell Membrane Complex)やエンドキューティクルなども除去されている可能性が得られた。また, ダメージ毛に対するプラズマ処理により, キューティクル表面の損傷も見られた。キューティクル層において, CMCは, キューティクル細胞同士の接着に寄与する。薬剤による化学処理などにより, 毛髪が損傷し, 18-MEA の脱離, CMC やエンドキューティクルの減少により, 毛髪内部の成分が流出しやすくなるとともに, 毛髪外部からの薬剤浸透も容易になる。今回の条件でのプラズマ照射によっても, 18-MEA や CMC, エンドキューティクルへの影響が確認でき, プラズマ照射後の薬剤浸透促進効果も期待できる結果が示された。しかしながら, 毛髪の損傷も確認されたため, プラズマ照射の条件を検討する必要性が生じた。

5.3 温度制御マルチガスプラズマジェットによる照射

5.3.1 空気中でのプラズマ照射

40歳代日本人女性から採取した同一人物の毛髪を1%ラウレス硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、未処理毛として実験に用いた。プラズマ照射のコントロールとして、パーマ、ブリーチ、アイロン、擬似日光処理の毛髪も作製した。未処理毛に対して、5.2で示した条件でパーマ処理を5回行った毛髪をパーマ処理毛、ブリーチ処理を3回行った毛髪をブリーチ処理毛とした。未処理毛に対して、プライア SS ストレートアイロン(タカラベルモント)を用いて、180°Cで2秒間スルーすることを150回繰り返した毛髪をアイロン処理毛とした。擬似日光処理毛は、アイスーパーキセノンテスターXER-W75(岩崎電気)にて、キセノンアークランプ光を180 W/cm²のエネルギーで72時間、未処理毛に照射して作製した。これは、真夏の30日分の日光照射量と同程度である。

ステンレス製のワッシャーに導電性カーボンテープを貼り、その上に未処理毛を乗せ、本研究室で作製した温度制御マルチガスプラズマジェット^[14]を用いてプラズマ照射を行った。プラズマ照射では、プラズマ装置のプラズマガス出口から毛髪までの距離が、3 mmとなるように調整した。印加電圧は9 kV、周波数は16 kHz、原料ガスは空気、N₂、O₂、CO₂、Ar、Heを用い、流量は2 LPM、空気中で30秒間照射した。プラズマ照射後、5.2と同様にXPS測定を行った。コントロールの物理化学的処理毛(パーマ、ブリーチ、アイロン、擬似日光)は、上記と同様にステンレス製ワッシャーに貼った導電性カーボンテープの上に乗せ、5.2と同様にXPS測定を行った。

図5-5に各処理の元素組成の違いを示した。空気、CO₂、O₂、Heによるプラズマ照射では、C1s、N1sの低下、O1sの増加、Si2pの低下が見られ、5.2で示した空気プラズマ照射と同様の傾向であった。N₂、Arによるプラズマ照射では、C1sの低下、O1sの増加、Si2pの低下は同様の傾向であったが、N1sはプラズマ照射により増加していた。空気中でのプラズマ照射のため、Ar、Heによって生成したプラズマでも、巻き込んだ空気中の窒素、酸素などの影響を受けていると考えられる。また、コントロールとして用いた物理化学的処理(パーマ、ブリーチ、アイロン、擬似日光)に比較して、プラズマ処理ではいずれの条件でも変化が大きいことも明らかになった。

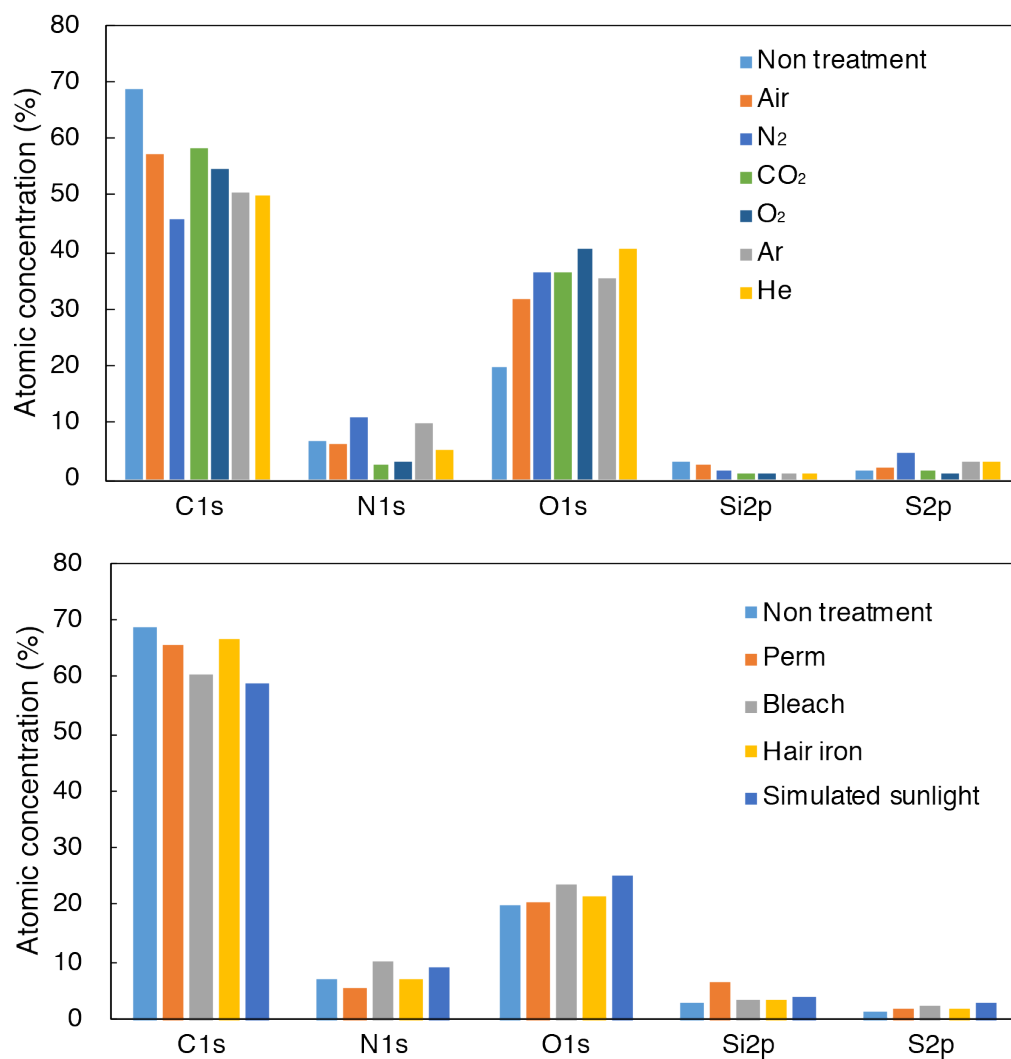


図 5-5 プラズマ照射, および物理化学処理による毛髪表面の元素組成変化

表 5-3,5-4 にスペクトルをピーク分離し、各処理の化学種の違いを比較した結果を示した。全てのガスにおいて、プラズマ照射によって、S-O/S=O が増加していたことから、18-MEA が脱離している可能性が得られた。コントロールの物理化学的処理では、ブリーチ、擬似日光処理では、S-O/S=O が増加し 18-MEA が脱離しているが、パーマ、アイロン処理では、S-O/S=O は増加せず、18-MEA の脱離以外の変化が生じていると考えられた。

以上のように、ガス種によって、プラズマ処理後の表面状態が異なる可能性が示唆されるデータが取得できたが、照射時に空気が混入すると、空気の影響が大きいことも明らかになった。

表 5-3 プラズマ照射による毛髪表面の化学種の変化

Element	Binding energy (eV)	Possible chemical species	Relative atomic concentration (%)						
			NT	Air	N ₂	CO ₂	O ₂	Ar	He
C1s	285.0	C-C/C-H	32.82	24.74	28.34	44.53	38.59	30.76	34.00
	286.1	C-N/C-S	25.03	17.69	0.00	5.89	2.73	0.76	1.81
	286.7	C-O	2.94	3.73	7.71	0.00	2.92	4.79	4.48
	288.1	NH-C=O	4.95	1.53	1.87	0.00	0.00	0.73	0.26
	289.0	O-C=O	2.83	9.71	7.89	7.63	10.39	13.44	9.18
N1s	400.4	C-N	5.72	3.67	6.46	1.97	1.60	7.15	3.40
	402.8	NH ₄ ⁺	1.14	2.14	4.58	0.53	0.90	2.48	1.95
	408.2	NO ₃ ⁻	0.00	0.51	0.00	0.26	0.50	0.21	0.00
O1s	531.9	C=O	14.32	22.56	22.79	35.02	0.24	30.35	38.83
	533.1	C-O	5.68	9.17	13.80	1.18	40.21	5.03	1.54
Si2p	102.3	Si-O	3.02	2.43	1.88	1.21	0.93	1.29	1.18
S2p	163.9	C-S	0.77	0.46	0.61	0.09	0.16	0.32	0.22
	168.2	S-O/S=O	0.77	1.65	4.08	1.70	0.82	2.70	3.13

表 5-4 物理化学的処理による毛髪表面の化学種の変化

Element	Binding energy (eV)	Possible chemical species	Relative atomic concentration (%)				
			NT	Perm	Bleach	Hair iron	Simulated sunlight
C1s	285.0	C-C/C-H	32.71	27.16	7.27	15.26	31.84
	286.1	C-N/C-S/C-OH	25.73	0.89	14.61	0.03	6.20
	286.7	C-O	2.46	25.49	21.42	31.58	11.71
	288.1	NH-C=O/CHO	5.08	5.26	1.63	6.27	5.31
	289.0	O-C=O/CO ₃ ²⁻	2.60	6.90	15.52	13.40	4.05
N1s	400.4	C-N	5.72	1.27	0.02	1.06	7.73
	402.8	NH ₄ ⁺ /N ₃	1.14	3.63	10.17	5.47	1.18
	406.0	unknown	0.00	0.61	0.00	0.69	0.00
O1s	531.9	C=O	14.32	7.49	0.00	7.32	19.82
	533.1	C-O/SO ₃ ⁻	5.68	0.00	23.44	0.00	5.54
	535.5	NO ₃ ⁻	0.00	13.14	0.00	14.01	0.00
Si2p	102.3	Si-O	3.02	1.77	3.31	0.47	3.71
	104.2	unknown	0.00	4.56	0.00	2.72	0.00
S2p	163.9	C-S	0.77	0.93	1.02	0.98	0.71
	168.2	S-O/S=O	0.77	0.91	1.59	0.73	2.20

5.3.2 雰囲気制御環境下でのプラズマ照射

プラズマ照射時に空気が混入するのを防ぐために、4章で使用したパージ装置を用いて、雰囲気制御環境下で毛髪に対してプラズマを照射した。アクリル板で作製したパージ装置の中に、温度制御マルチガスプラズマジェット、未処理毛を乗せたワッシャーをセットした。原料ガスは、あらかじめ、シリカゲルで脱水した CO₂, Ar を 2 LPM の流量で温度制御マルチガスプラズマジェットに投入し、同時にパージ装置内にも原料ガスと同じガスを注入した。パージ装置内の酸素濃度を測定し、パージができていることを確認した後に、プラズマを 30 秒間照射した。プラズマ照射後、5.2 と同様に XPS 測定を行った。コントロールとして、ガスだけを同様の条件で照射した毛髪も XPS 測定した。図 5-6 に各処理の元素組成の違いを示した。5.2, 5.3.1 で示した空気中でのプラズマ照射と同様に、プラズマ照射により、C1s の低下, O1s の増加, Si2p の低下が確認できたが、その変化率は、CO₂ に比べて Ar の方が小さい傾向であった。表 5-5 にスペクトルをピーク分離し、各処理の化学種の違いを比較した結果を示した。Ar, CO₂ どちらもプラズマ照射により、S-O/S=O が増加しており、この結果より、どちらも毛髪

表面の 18-MEA が脱離していることが明らかになった。人毛(毛髪)には、常温常湿において 12%程度の水が含まれている。今回は、原料ガスはプラズマ装置に投入する前に水を除去したが、毛髪自体に含まれている水の影響により、Ar プラズマでも活性種が生成し、18-MEA を脱離している可能性もあると考えられた。今後は、同様の条件下で毛髪的水分量とプラズマの効果調べるなどの課題が明確になった。

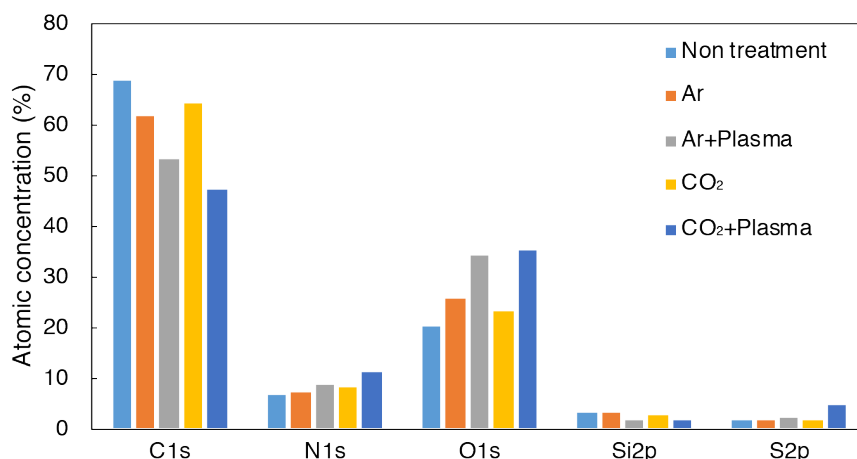


図 5-6 雰囲気制御環境下でのプラズマ照射による毛髪表面の元素組成の変化

表 5-5 雰囲気制御環境下でのプラズマ照射による毛髪表面の化学種の変化

Elements	Binding energy (eV)	Possible chemical species	Relative atomic concentration (%)				
			NT	Ar	Ar+ Plasma	CO ₂	CO ₂ + Plasma
C1s	285.0	C-C/C-H	32.71	12.43	34.13	34.64	28.80
	286.1	C-N/C-S	25.73	0.00	8.91	9.50	4.62
	286.7	C-O	2.46	24.26	1.74	10.76	0.00
	288.1	NH-C=O	5.08	6.77	0.00	6.69	12.25
	289.0	O-C=O	2.60	18.51	8.36	2.69	1.55
N1s	398.0	unknown	0.00	0.00	1.59	0.00	0.77
	400.4	C-N	5.72	6.69	7.19	6.88	10.47
	402.8	NH ₄ (+)	1.14	0.71	0.00	1.20	0.00
O1s	531.9	C=O	14.32	7.96	9.57	12.60	5.66
	533.1	C-O	5.68	17.72	24.66	10.42	29.53
Si2p	100.2	unknown	0.00	1.02	0.32	0.00	0.50
	102.3	Si-O	3.02	2.21	1.26	2.92	1.23
S2p	163.9	C-S	0.77	1.03	0.77	0.89	1.43
	168.2	S-O/S=O	0.77	0.68	1.50	0.82	3.18

5.4 まとめ

本章では、皮膚付属器官である毛髪に対してプラズマ照射し、毛髪表面の組成変化を分析した。その結果、毛髪表面に存在する脂肪酸である 18-MEA やシャンプーやトリートメント由来のシリコンがプラズマ処理によって、脱離することが明らかになった。そのため、プラズマ照射により、毛髪表面を親水化することができ、トリートメント剤や色素等の浸透を促進するなどの応用可能性が得られた。しかしながら、プラズマ照射後、毛髪表面形状を観察することにより、キューティクル層の CMC やエンドキューティクルなどの組織もプラズマにより脱離しており、損傷が確認された。そのため、プラズマ照射により、薬剤の浸透が促進され毛髪の内部に入る量が増えたとしても、日常生活の洗髪により、浸透させた薬剤や毛髪内部成分が流出する懸念も生じた。ガス種の選定やプラズマ出力の調整により、毛髪の損傷を抑えながら、親水化できる条件を探す、もしくは、親水化して薬剤を毛髪内部に浸透させたのち、毛髪表面をコーティングすることで、薬剤や毛髪内部成分の流出を防ぐことが求められる。

プラズマ照射による毛髪組織の損傷を抑える条件を検討するため、空気中でのプラズマ照射におけるガス種による効果の違いを調べた。全てのガス種において、プラズマ照射により C1s の低下、O1s の増加、Si2p の低下、S-O/S=O の増加が見られたことから、18-MEA が除去されていることが明らかになった。N₂、Ar によるプラズマ照射では、N1s が増加しており、窒素由来の置換基が付与されている可能性が得られた。空気中でのプラズマ照射のため、Ar や He によって生成したプラズマでも、巻き込んだ空気中の窒素、酸素などの影響を受けていると考えられる。また、コントロールとして用いた物理化学的処理(パーマ、ブリーチ、アイロン、擬似日光)に比較して、プラズマ処理ではいずれの条件でも変化が大きいことも明らかになった。そこで、雰囲気制御環境下で Ar と CO₂ プラズマによる毛髪処理の比較を行ったところ、空気中での照射に比べ、Ar プラズマでの組成変化率が低下したが、18-MEA の脱離には大きな差が得られなかった。

今後は、雰囲気制御下でプラズマ照射の条件検討を行い、毛髪の損傷を抑えながら毛髪を親水化できる条件があるのか、プラズマ照射後に薬剤の浸透率が向上するのか、等を TOF-SIMS を併用しながら解析するなどの課題が考えられる。

第5章の参考文献

- [1] M. Wang, Y. Zhou, D. Shi, R. Chang, J. Zhang, M. Keidar and T. J. Webster, Cold atmospheric plasma (CAP)-modified and bioactive protein-loaded core-shell nanofibers for bone tissue engineering applications, *Biomater. Sci.*, Advance Article (2019).
- [2] K. N. Pandiyaraj, M.C. Ramkumar, A. A. Kumar, P. V. A. Padmanabhan, M. Pichumanib, A. Bendavid, P. Cools, N. D. Geyter, R. Morent, V. Kumar, P. Gopinath, P. G. Su, R. R. Deshmukhg, Evaluation of surface properties of low density polyethylene (LDPE) films tailored by atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) assisted co-polymerization and immobilization of chitosan for improvement of antifouling properties, *Mater. Sci. Eng. C*, **94**, June 2018, pp. 150-160 (2019).
- [3] A. R. M. da Silva, M. L. Farias, D. L. S. da Silva, J. O. Vitoriano, R. C. de Sousa, and C. Alves-Junior, Using atmospheric plasma to increase wettability, imbibition and germination of physically dormant seeds of *Mimosa Caesalpiniaefolia*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **157**, pp. 280-285 (2017).
- [4] W. Chunxia and Q. Yiping, Study on Wettability Improvement and Its Uniformity of Wool Fabric Treated by Atmospheric Pressure Plasma Jet, *J. Appl. Polym. Sci.*, **123**, 2, pp. 1000-1006 (2012).
- [5] Y. Li, J. Sun, P. Cheng, Y. Jiang, Z. Zhou, Q. Zhang and Y. Qiu, Aging of hydrophobized surfaces of ramie fibers induced by atmospheric pressure plasma treatment with ethanol pretreatment, *J. Adhes. Sci. Technol.*, **27**, 22, pp. 2387-2397 (2013).
- [6] N. Maryam, G. C. Peter, D. Ron, and W. Xungai, Use of low-level plasma for enhancing the shrink resistance of wool fabric treated with a silicone polymer, *J. Text. Institute*, **102**, 11, pp. 948-956 (2011).
- [7] N. Maryam, G. C. Peter, R. John, P. B. Rex, and W. Xungai, Effects of Plasma Treatment of Wool on the Uptake of Sulfonated Dyes with Different Hydrophobic Properties, *Text. Res. J.*, **80**, 4, pp. 312-324 (2010).
- [8] C. Canal, R. Molina, E. Bertran, and P. Erra, Study on the influence of scouring on the wettability of keratin fibers before plasma treatment, *Fibers Polym.*, **9**, 4, pp. 444-449 (2008).
- [9] C. Canal, F. Gaboriau, R. Molina, P. Erra, and A. Ricard, Role of the active species of plasmas involved in the modification of textile materials, *Plasma Process. Polym.*, **4**, 4, pp. 445-454 (2007).
- [10] C. Canal, R. Molina, E. Bertran, and P. Erra, Polysiloxane softener coatings on plasma-treated wool: Study of the surface interactions, *Macromol. Mater. Eng.*, **292**, 7, pp. 817-824 (2007).

- [11] C. Öngel, M. Keleş, E. Acar, and Ö. Birer, Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment of Human Hair Fibers, *J. Bio-Tribo-Corrosion*, **1**, 1, pp. 1-7 (2015).
- [12] L. N. Jones and D. E. Rivett, The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibres, *Micron*, **28**, 6, pp. 469-485 (1997).
- [13] M. Okamoto, K. Ishikawa, N. Tanji, and S. Aoyagi, Investigation of the damage on the outermost hair surface using ToF-SIMS and XPS, *Surf. Interface Anal.*, **44**, 6, pp. 736-739 (2012).
- [14] 守屋翔平, 低侵襲高速殺菌のための温度制御マルチガスプラズマジェットの開発, 東京工業大学学士論文 (2018).

6 章 結論

6.1 総括

本論文では、大気圧低温プラズマによる創傷治癒を実用化し、褥瘡等の皮膚疾患の治療や予防を行うために、プラズマ照射が皮膚由来培養細胞に与える影響を調べ、安全性評価に関わる基礎的データを取得した。同一人物の皮膚由来培養細胞である、線維芽細胞、iPS細胞、iPS細胞から分化誘導したケラチノサイトにおいて、DNA損傷応答を比較した。第1章では、医療分野における大気圧低温プラズマの現状と課題、皮膚を構成する線維芽細胞や幹細胞のDNA損傷応答に対する大気圧低温プラズマの影響を解析する意義を述べた。第2章以降の各章で得られた結果を以下にまとめる。

第2章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(PBW)による、皮膚常在菌の殺菌効果の確認、培養細胞に及ぼす影響の解析、殺菌効果に寄与する成分の分析に関して記述した。

本研究では、特に、CO₂ PBWに着目してデータを取得した。CO₂ PBWを創傷治癒促進や皮膚疾患の治療、および予防に応用することができれば、様々なメリットがある。CO₂はHeやArなどの希ガスよりも非常に安価であり、液体として充填できるため、ポンプ交換頻度を減らすことができる。また、不燃性で安定な化合物であり、食品分野等で活用されているため、ポンプの流通網が整備されている。そのため、医療機関以外でも導入可能であり広く応用することが可能である。また、創傷治癒では清潔な湿潤環境が必要であり、広い面積を処置することも想定されるため、直接照射よりもPBWが適している。

始めに、皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌に対するCO₂ PBWの殺菌効果を確認した。精製水を溶媒として作製したCO₂ PBWでは、初期生菌数10⁶~10⁷ CFU/mlから2桁程度生存菌数が低下する効果が得られた。DPBSを用いて作製したCO₂ PBWでは、3桁~検出限界である200 CFU/mlまで低下し、精製水よりも高い殺菌効果が得られた。殺菌効果が得られた条件で、培養細胞にCO₂ PBWを処理すると、コントロールに比べ、生存率は大きく低下しないことが明らかになった。正常細胞として、NB1RGB, RPE, HF19, がん細胞としてHeLa, U2OSを用いたが、正常細胞とがん細胞での傾向に違いは得られなかった。CO₂ PBW処理が正常ヒト皮膚線維芽細胞のDNA損傷に及ぼす影響を確認したところ、 γ 線照射時のような γ -H2AX, 53BP1の局在変化は見られなかった。そのため、CO₂ PBW処理によるDNA二本鎖切断が起きている可能性は低いことが示唆された。しかしながら、DPBSやL-乳酸ナトリウムリンゲル液で作製したCO₂ PBWによる処理では、H₂O₂処理時と類似した γ -H2AX, 53BP1の局在変化が見られた。この変化により、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。CO₂ PBWの効果に起因する活性種を同定するために、精製水を用いて作製したCO₂ PBWを電子スピン共鳴法、吸光光度法により測定した結果、HO \cdot は1.4 μ M, ¹O₂は75.6 μ M, H₂O₂は4.2 μ M含まれているが、O₃は含まれていないことを明らか

にした。 $^1\text{O}_2$ は短寿命であり、 H_2O_2 の寿命は長いが低濃度であるため、殺菌や培養細胞への影響に直接関与しているとは考え難い。そこで、イオンクロマトグラフィー、NMR により、他の長寿命活性種が含まれているか分析したが、過ギ酸などの長寿命の化合物は、検出されなかった。以上の結果より、 CO_2 PBW では $^1\text{O}_2$ 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 章では、大気圧低温プラズマが皮膚の幹細胞に及ぼす影響を明らかにするために、iPS 細胞から表皮角化細胞であるケラチノサイトに分化誘導し、3D 皮膚モデルを作製した。DNA 損傷応答解析でよく用いられる γ 線を線維芽細胞、iPS 細胞、iPS 細胞由来ケラチノサイトに照射し、DNA 損傷応答の違いを解析した。特に、iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイト(KCs) が継代数の違い(1stP, 2ndP, 3rdP)により、幹細胞、前駆細胞どちらの性質に近いのか解析した結果を記述した。

始めに、iPS 細胞からケラチノサイトを分化誘導し、分化マーカーの発現を調べた。ケラチノサイトの分化マーカーである、K14, p63 は初代培養ケラチノサイト(HEKn)と同様に、KCs で発現していた。KCs では継代数が増加するにしたがい、K14 発現量が増加した。KCs 1stP を用いて 3D 皮膚オルガノイドを再構築した結果、基底層のマーカーである K14 の上部に基底上層のマーカーである K10 の層を確認した。また、3D 皮膚オルガノイドの生理的機能を調べるために、薬剤透過試験を行って皮膚バリア機能を評価した結果、KCs 1stP は HEKn と同程度のバリア機能を有することを明らかにした。KCs が幹細胞と前駆細胞どちらの性質を持っているのか調べるために、ITGA6 と CD 71 の発現を調べた結果、前駆細胞である可能性が示唆された。KCs は継代数の増加に伴い CD71 に対する ITGA6 の比率が低下し、DNA 損傷修復速度が遅くなること、KCs 1stP のみ放射線照射により細胞生存率が低下し、アポトーシス率が増加したことから、KCs 1stP は幹細胞に近い前駆細胞で、KCs 2ndP, KCs 3rdP はより分化が進んだ後期前駆細胞であると考えられた。KCs においては、細胞周期を止める p21, p16 の発現が増加していたが、iPS 細胞ではどちらの発現も確認できなかった。iPS 細胞において、p21 の上流に位置する、ATM, KAP1, p53 のリン酸化は DNA 損傷により増加しているが、p21 の発現誘導は見られなかった。iPS 細胞では放射線量の増加に伴い、生存率が低下しアポトーシスが増加していることから、DNA 損傷時に、細胞周期を止める応答ではなく、アポトーシスによる細胞死を誘導することで、ゲノム安定性を維持する機構が働いていると考えられた。

第 4 章では、幹細胞に及ぼすプラズマ照射の影響を調べるために、3 章で構築した実験系を用いて、線維芽細胞、iPS 細胞、および KCs にプラズマを照射し、生存率と DNA 損傷応答の違いを解析した。

CO_2 ガスパーシ環境下で CO_2 プラズマを細胞に照射すると、プラズマ照射後 48 時間で全ての iPS 細胞は死滅したが、線維芽細胞は 82%, KCs は 71%の生存率であった。 CO_2 ガスパーシせず空气中で CO_2 プラズマを細胞に照射すると、全ての iPS 細胞は死滅し、線維芽細胞は 91%, KCs は 1%の生存率であった。これらの結果より、iPS 細胞はプラズマ照射に対する感受性が高く、ケラチノサイトは空気が混入することにより大幅に生存率が低下することが明

らかになった。また、プラズマを直接照射する場合には、雰囲気制御が必須であることが再認識された。 γ -H2AXと53BP1の免疫染色により、線維芽細胞、iPS細胞、KCsにおいて、DNA二本鎖切断ではなく、酸化ストレスが生じている可能性が示唆された。線維芽細胞は、 γ -H2AXと53BP1の局在変化がiPS細胞やケラチノサイトとは異なり、細胞によってプラズマ照射に対する応答が異なる可能性を示した。本研究では、同一人物の皮膚由来培養細胞である線維芽細胞、iPS細胞、KCsを解析することにより、細胞応答の違いを解析した。違う系統の細胞を用いると、個体差の影響があり、細胞の種類による違いなのか、個体差によるものなのか、判別が難しくなる。特に、プラズマ照射は照射雰囲気の影響などを受けやすく、基礎的データを取得するためには、同一個体のサンプルを用いることが重要であることが示唆された。

第5章では、髪表面での組成変化をXPSで解析し、皮膚付属器官である毛髪に対するプラズマ照射により毛髪表面の脂質18-MEAが脱離することを記述した。

未処理毛、ダメージ毛に空気プラズマを空气中で照射すると、C1s、N1sは低下し、O1sは増加、Si2pは低下、S-O/S=Oが増加していたことから、毛髪表面の18-MEA、シリコンが除去されていることが明らかになった。プラズマ照射により、毛髪表面を親水化することができ、トリートメント剤や色素等の浸透を促進できる可能性が得られた。しかしながら、プラズマ照射後、毛髪表面形状をSEMにより観察するとキューティクル層のCMCやエンドキューティクルなどの組織がプラズマ照射によって脱離しており、損傷が確認された。そのため、プラズマ照射によって、薬剤の浸透が促進され毛髪の内部に入る量が増えたとしても、日常生活の洗髪で、浸透させた薬剤や毛髪内部成分が流出する懸念も生じた。次に、空气中でのプラズマ照射におけるガス種による効果の違いを調べた結果、空気、N₂、O₂、CO₂、Ar、He全てのガス種において、プラズマ照射によりC1sの低下、O1sの増加、Si2pの低下、S-O/S=Oの増加が見られたことから、18-MEAとシリコンが除去されていることが明らかになった。N₂、Arによるプラズマ照射では、N1sが増加しており、窒素由来の置換基が付与されている可能性が得られた。空气中でのプラズマ照射のため、ArやHeによって生成したプラズマでも、巻き込んだ空气中の影響を受けていると考えられる。そこで、雰囲気制御環境下でArとCO₂プラズマによる毛髪処理の比較を行ったところ、空气中での照射に比べ、Arプラズマでの組成変化率は低下したが、18-MEAの脱離には大きな差が得られなかった。毛髪自体に含まれている水の影響により、Arプラズマでも活性種が生成し、18-MEAを脱離している可能性があると考えられた。今後は、同様の条件下で毛髪の水分量とプラズマの効果を調べるなどの課題が明確になった。

以上の結果から、CO₂ PBWでは皮膚常在菌の殺菌が可能であるが、細胞毒性は低く、実用化できる可能性があること、iPS細胞から分化誘導したケラチノサイトは幹細胞、前駆細胞に近い性質を持ち、3D皮膚オルガノイドを再構築できることを示した。また、同一人物の皮膚由来培養細胞である線維芽細胞、iPS細胞、iPS細胞から分化誘導したケラチノサイトでは、プラズマ照射によって酸化ストレスが生じており、特にiPS細胞は線維芽細胞とケラチノサイトに比べ、

プラズマ照射に対する感受性が高いことを明らかにした。同一人物の皮膚由来培養細胞を比較することにより、プラズマ照射が皮膚の幹細胞に与える影響を解析することが重要であると結論づけた。

6.2 今後の課題と展望

本研究では、CO₂ PBW の殺菌効果に起因する成分の同定までは至らなかった。プラズマ照射による創傷治癒を実用化するためには、効果に起因する成分の同定が求められる。しかしながら、長寿命の活性種が検出されなかったことから、残留性が少なく、廃液処理などの問題を考慮する必要がないため、将来的に様々な応用方法が考えられる。例えば、小型のプラズマバブル水発生装置を開発することにより、災害時の救命救急や難民キャンプ、僻地医療における殺菌装置として活用できる可能性がある。実用化するためには、使用する溶媒を、精製水ではなく、水道水や RO 水など現実的に活用できる溶媒に置き換えた場合においても、効果、安全性、生成される成分を解析することが求められる。また、表皮常在菌を皮膚模倣支持体などに付着させた状態で効果が得られるのかについても確認する必要がある。本研究において、弱い酸化ストレスが生じている可能性が得られたため、その刺激により、成長因子や抗菌ペプチドの発現が増加している可能性も考えられる。今後は、創傷治癒に関連する遺伝子発現の変化を明らかにするなど、メカニズム解明も期待される。

第3章において分化誘導したケラチノサイトの継代数によって細胞の性質が異なる可能性は得られたが、それぞれの細胞集団の中で、幹細胞、前駆細胞がどの程度の比率で存在するのかフローサイトメトリーで分析するところまでは至らなかった。またケラチノサイトや3D皮膚オルガノイドにおける他のマーカー分子の発現なども比較する必要があり、今後は、RNA シークエンス等での網羅的な発現解析を行う必要がある。iPS 細胞において、p21, p16 の発現が抑制されているという劇的な結果が得られたが、これまでの先行研究では、その機構は、エピジェネティックな修飾や miRNA が関与することが報告されている。しかしながら、不明な点も多く、幹細胞のゲノム安定性維持機構に関わる重要な現象であり、さらなる解明が求められる。

第4章、第5章で用いたバッチ条件下でプラズマを照射するための装置開発は発展途中であり、安定した雰囲気制御下で細胞や生体にプラズマ照射を行うための実験系の構築が必要である。雰囲気制御をしながら、第3章で構築した3D皮膚オルガノイドへのプラズマ照射の影響や、酸化ストレスに関係する遺伝子発現、iPS 細胞からケラチノサイトへの分化過程に与えるプラズマ照射の影響などを基礎的に解析することが求められる。また毛髪処理においても、雰囲気制御下でのプラズマ照射条件検討を行い、毛髪の損傷を抑えながら毛髪を親水化できる条件があるのか、プラズマ照射後に薬剤の浸透率が向上するのかを解析する必要がある。プラズマ照射により、毛髪表面の親水性、疎水性が制御できると、美容技術として広く応用できるため、期待される技術である。また、毛髪用化粧品の研究開発だけでなく、材料の接着実

験や機器分析時においても、毛髪に付着しているシリコンが影響を及ぼすことも懸念されており、プラズマ処理により、シリコン除去ができることはメリットがある。

本研究では、大気圧低温プラズマ照射の生体への影響を調べるための基礎実験として、iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトを用いて、解析を行った。この実験系により、同一人物における細胞の種類による違いを解析することができるだけでなく、分子生物学的手法を用いた解析を行い、メカニズム解明や、疾患との関係も調べることができる。例えば特定の遺伝子を siRNA や CRISPR-Cas9 によってノックダウンやノックアウトする、ベクターをトランスフェクションし過剰発現した時の影響を調べることも可能である。しかしながら、大気圧プラズマを応用するためには、これらの基礎的な研究だけではなく、様々な人の細胞で多様性を調べることが重要である。人種、年齢、性別、体質、生活習慣、疾患などの違いにより、プラズマ照射時の影響がどのように違うのか、外科手術で除去された皮膚を用いた実験や、ヒトの細胞から構築した皮膚モデルなどを用いた実験などを行い調べることも求められる。

謝辞

本研究は東京工業大学大学院総合理工学研究科創造エネルギー専攻 沖野研究室, および, 松本研究室において行いました。多くの方にご指導いただき, 博士論文を完成させることができました。末尾となりましたが, 皆様に御礼申し上げます。

まず, 本研究を進めるにあたり, 多大なるご指導および寛大なご配慮を頂きました科学技術創成研究院未来産業技術研究所 准教授 沖野晃俊先生に心より感謝申し上げます。研究室の PI として研究費申請, 共同研究, 学生の指導などを精力的に行うだけでなく, 様々な学内外の取り組みに主体的に参加される姿勢が, ボスとしての私の目標です。特に, どんなに忙しくても, 学生を相対評価ではなく絶対評価し, 一人一人の成長を見守り, 見捨てることなく最後まで責任を全うする姿にはいつも感動していました。先生のおかげで博士論文を完成させることができました。本当にありがとうございました。

科学技術創成研究院先導原子力研究所 准教授 松本義久先生に心より感謝申し上げます。細胞実験に関するご指導だけでなく, 松本研究室の設備を全て使わせていただくという寛大なご配慮をいただきましたおかげで, 非常に多くの実験を行い, 結果を出すことができました。先生の寛大な雰囲気がとても心地よく, アジア近隣諸国からの学生や卒業生が募ってくる国際的で多様な研究室で過ごした経験は私の素晴らしい財産になりました。

科学技術創成研究院先導原子力研究所 助教 島田幹男先生に心より感謝申し上げます。実験を行って論文発表するという一連の流れを驚異的なスピードで行う方法をご指導いただきました。第一線で活躍される研究者の島田先生の隣で研究することにより, 有形無形の多くのことを学ぶことができました。特に, 論文化に向けて様々なことを調べてトライし続けることの楽しさが実感できたことは, 非常に価値がありました。島田先生のおかげで, 東工大にいながら, 京都に戻ったようで, 楽しい日々でした。

東京大学大学院理学系研究科地殻化学実験施設, 株式会社プラズマコンセプト東京代表取締役社長 宮原秀一先生に心より感謝申し上げます。研究だけでなく, 様々な幅広い知見, 知識, ご経験があり, 活躍される宮原先生からは多くのことをご指導いただきました。特に, 学会発表の抽象化作成にあたり, 非常に短時間で的確なアドバイスをいただき, 圧倒的な能力に驚愕しました。朝, 大関さんや村上さんも一緒に宮原先生から色々な話を伺うことがとても楽しく, 沖野研での楽しみの一つでした。

東京医療保健大学大学院医療保健学研究科 教授 岩澤篤郎先生に心より感謝申し上げます。殺菌, 活性種の測定に関してご指導いただきました。岩澤先生は殺菌, 微生物の知識, 研究のご経験が豊富で, 皮膚常在菌に関するアドバイスも的確にいただきました。プラズマによる殺菌のメカニズム解明を行うことができず, 心残りです。先生の研究室の雰囲気がとても穏やかで居心地よく, ミーティングで伺う機会がとても楽しみでした。

東京医療保健大学大学院医療保健学研究科 准教授 松村有里子先生に心より感謝申し上げます。殺菌、活性種の測定に関してご指導いただきました。どんなデータに関する的確な助言、対応策を丁寧にお教えいただきました。また、後輩の育成に関して相談させていただいた時に、明瞭な答えをいただき、私の不安を一瞬で解消してくださいました。先生のようにみんなに元気を与えられるような存在になりたいと思います。

科学技術創成研究院先導原子力研究所 准教授 鷹尾康一郎先生に心より感謝申し上げます。イオンクロマトグラフィーや NMR によるプラズマバブル水の分析をご指導いただきました。鷹尾先生に分析目的をお伝えすると、方法の決定、測定、的確な助言と迅速な対応をしてくださいました。先生の的確さ、迅速な対応ができるところまではなかなか到達できませんが、今後の大きな目標とさせていただきます。

物質理工学院応用科学系 准教授 本倉健先生に心より感謝申し上げます。XPS による毛髪分析をご指導いただきました。お忙しい中、XPS の操作方法を丁寧にお教えくださったおかげで、きれいなデータが取得できました。操作方法だけでなく、解析方法やデータの解釈の仕方など多くのことを教えていただきました。穏やかな物腰で的確に対応していただきとてもありがたく思いました。

生命理工学院 准教授 二階堂雅人先生に心より感謝申し上げます。3D 皮膚モデルの組織免疫染色に必要なクライオスタットをお借りしました。いつも快く対応していただき、先生のお言葉に甘えてたくさん使わせていただけたおかげで、キレイな組織断面を作製することができました。

鳥取大学農学部動物医療センター 准教授 伊藤典彦先生に心より感謝申し上げます。本研究では、伊藤先生と一緒に実験するところまで進められなかったことが心残りです。伊藤先生とディスカッションすることができ、情熱を持って様々なことに取り組むことの大切さを教えていただきました。お忙しい中、論文審査員も引き受けてくださり、ありがとうございました。

東京薬科大学生命科学部 助教 青木元秀先生に深く感謝いたします。青木先生には LA-ICPMS を始め様々なことをお教えいただきました。また、メタロミクス研究フォーラムでは口頭発表させていただき、貴重な経験をさせていただきました。とてもパワフルな先生で、青木先生とお話すると、元気をもらえて、投稿論文の実験、執筆も頑張れたような気がします。先生のようにアクティブに研究し、ネットワークを広げていけるような研究者になりたいと思います。

技術部すずかけ台設計工作部門 山本典彦氏に深く感謝いたします。ジェットのキャップ、電極、冷却装置などの作製にあたり、多大なるご協力をいただきました。初めてご相談に伺ったときに、とても親身にアドバイスをいただいたことがきっかけとなり、その後も川野くんをはじめ沖野研のみんながお世話になって、有り難く思っています。

コバルト照射施設の依田功氏に深く感謝いたします。細胞に DNA 損傷を与えるための γ 線照射にご協力いただきました。他の方との実験を調整しながら、細胞のコンディションに応じて、臨機応変にいつも快く照射を引き受けてくださいました。依田さんのおかげで多くのデー

タが取得できました。2Gy 46 秒間照射中、依田さんとのフリートークが楽しく、いつも元気をいただいていた。

学位審査にあたり、本学工学院機械系 教授 岡村哲至先生、同学院機械系 教授 奥野喜裕先生、科学技術創成研究院フロンティア材料研究所 教授 佐藤千明先生には審査員を担当いただきました。中間発表でもたくさんの助言いただき、本論文を完成させることができました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室秘書の大関杏子さんに深く感謝いたします。スーパー秘書の大関さんが様々なことを配慮しながら仕事を迅速に進めている姿を見て、いつも尊敬していました。アウトドアや美容に関する知識が豊富で、いろいろなことを教えていただき、嬉しく思っていました。

沖野研究室秘書の村上奈津子さんに深く感謝いたします。村上さんはとても集中力があり、仕事が早く、困った時はいつも村上さんを頼らせていただきました。とても元気でパワフルで、雰囲気明るくしてくれる村上さんに、会えると嬉しくて、元気を分けてもらっていました。

沖野研究室元秘書の上井陽子さんに深く感謝いたします。沖野研の後も大岡山の事務でお世話になりました。学生証のことなどで困った時に、丁寧にお教えいただきありがとうございました。大岡山で上井さんを見つけた時は、嬉しくて大きな声で呼んでしまいました。

沖野研究室卒業生の川野浩明博士(現在、富士フイルム株式会社)に深く感謝いたします。川野くんは同時期に博士入学だったこともあり、いつも助けてくれました。実験はもちろん、研究室の雑務もこなし、色々なことにチャレンジする川野くんと一緒だとどんな時も楽しくて、素敵な思い出ばかりです。多くの実験を一緒に行い、多くの悩みを共有することができ、川野くんのおかげで有意義な学生生活が過ごせました。

沖野研究室卒業生の相田真里博士(現在、宇宙航空開発研究機構)に深く感謝いたします。分析で困ったことがあるといつも助けてくれました。相田さんのテンポの良さが心地よくて、元気な相田さんと話すに関西に戻ったような気がしてとても楽しかったです。研究だけでなく、美容に対する探究心、向上心が高く、感心していました。

沖野研究室卒業生の高松利寛博士(現在、東京理科大学研究推進機構生命医科学研究 所 助教)に深く感謝いたします。高松さんにはテーマの選定や他の研究室での実験のことなど様々なことを相談させていただきました。一緒にISPCに参加した時には、色々なことをお教えいただきとても勉強になりました。医療機器の研究開発に対する熱い思いと行動力がある、沖野研の尊敬する先輩の1人です。

沖野研究室卒業生の岩井貴弘博士(現在、理化学研究所放射光科学研究センター 特別 研究員)に深く感謝いたします。元素分析の文献調査の時に、初心者の私でもわかるように装置のことや分析方法をお教えてくださいました。ゆるい雰囲気の中にも研究に対するストイックな姿勢が感じられ、岩井さんが沖野研に来られると嬉しくて、色々お聞きしてしまいました。

沖野研究室卒業生の大下貴也博士(現在、積水化学工業株式会社)に深く感謝いたします。沖野研に数々の伝説を残した先輩で、卒業後もその伝統は川野くんに引き継がれていま

した。卒業後もお会いした時に温度制御DBDのことなどお教えいただきとても勉強になりました。

沖野研究室卒業生の掛川賢博士(現在, 株式会社日立ハイテクサイエンス)に深く感謝いたします。フライス盤での工作にあたり助けていただきました。掛川くんのおかげでフライス盤が使えるようになり, 楽しくてずっと加工し続けて掛川くん心配されたのもよい思い出です。

沖野研究室卒業生の井上裕貴氏(現在, イーグル工業株式会社)に深く感謝いたします。発光分析の方法を教えてくださいました。井上くんはとても礼儀正しく, 話しているとても清々しい気持ちになりました。鍛え上げられた筋肉美のおかげで研究室がとても楽しい雰囲気になりました。

沖野研究室卒業生の小林智裕氏(現在, 住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。プラズマバブリングの方法を教えてくださいました。小林くんのソフトで独特な説明方法が面白くて, 楽しく学ぶことができました。ファンネルから水を抜く時にいつも小林くんの顔が浮かび, 楽しくなってしまいます。

沖野研究室卒業生の鎗柄直人氏(現在, 住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。いつもみんなのことを考え, サポートしてくれていました。鎗柄くんの作ったトーチを見せてもらったことや, 就職活動, 釣り, 漫画などいろいろな話を聞いたことが, 楽しい思い出です。

沖野研究室卒業生の堂山英之氏(現在, 住友精密工業株式会社)に深く感謝いたします。温度制御に関わる実験でご協力いただき, 熱電対での測定方法を教えてくださいました。堂山くんと話していると, とても知識量が多く, 開発に対する思いもよく伝わってきました。

沖野研究室卒業生の菅原修馬氏(現在, 日立建機株式会社)に深く感謝いたします。菅原くんは頼みごとをされるといつも快く引き受けてくれて, 助けてくれました。赤色が好きな菅原くんが髪の毛を赤色に染めた時に, 頭皮も染まっちゃいましたと見せてくれたのが, 懐かしい思い出です。

沖野研究室卒業生の細田駿介氏(現在, 川崎重工業株式会社)に深く感謝いたします。ドロップレットによる単一細胞分析を行ってくれました。研究に対する高い意識があり, 積極的にいろんな分析手法を習得していました。プレゼンが上手でいつも早めに準備して練習する姿勢がとても印象的でした。

沖野研究室卒業生の細田順平氏(現在, 株式会社メイテック)に深く感謝いたします。プラズマバブル水の殺菌実験, 細胞実験の一部を一緒に行いました。順平さんは心身ともにタフで, 一日中実験しても全然疲れることなく, 元気いっぱいでした。本論文のデータ取得には欠かせない存在でした。

沖野研究室卒業生の林悠太氏(現在, オリンパス株式会社)に深く感謝いたします。林くんはとても気配りができるので, 貴重な存在でした。個性豊かなメンバー揃いの中で調整役として配慮いただいて, とても助かりました。内視鏡ジェットの工作にずっとコツコツ取り組んでいる姿も素敵でした。

沖野研究室卒業生の小笠原大介氏(現在,株式会社クレハ)に深く感謝いたします。オガジェットのパラメータがとても綺麗で初めて見た時は、衝撃的でした。実家から届く、りんごジュースがとても美味しく、いつも遠慮なくいただいていたました。

沖野研究室卒業生の馬場美岬女史(現在,日本マイクロソフト株式会社)に深く感謝いたします。プラズマバブル水の実験を一緒に行いました。美岬さんは理解や習得が非常に早く、スムーズに実験をすることができました。実験の合間にいろいろな話をする事ができ、とても楽しい時間が過ごせました。

沖野研究室卒業生の阿部哲也氏(現在,日産自動車株式会社)に深く感謝いたします。阿部くんがパソコン作業するときに、ブルーライトカットメガネを使っていたので、私も見習って、D論はブルーライトカットメガネをつけて書きました。

沖野研究室卒業生の河野聡史氏(現在,コニカミノルタ株式会社)に深く感謝いたします。ドロップレットによる単一細胞の元素分析を一緒に行いました。河野くんは細胞培養が上手で筋がよく、一回教えただけでマスターしてくれました。残念ながら、ドロップレットでの測定はなかなかできませんでしたが、できることを精一杯一緒に頑張りました。みんなの様子を常に気にかけ、研究室のムードメーカーで楽しい雰囲気にしてくれました。

沖野研究室卒業生の岡本悠生氏(現在,日本たばこ産業株式会社)に深く感謝いたします。XPS による毛髪分析を一緒に行いました。岡本くんはいつも全力で研究に取り組んでおり、XPS の測定、解析を驚異的なスピードで行ってくれました。その勢いある感じがとても素敵でした。岡本くんの努力のおかげで、本論文のデータが取得できました。

沖野研究室博士課程 1 年の末永祐磨氏に深く感謝いたします。本論文作成にあたり、確認、修正をたくさん行っていただき、本論文の作成には欠かせない存在でした。川野くんの卒業後、たくさんの役割を引き継いで大変ですが、末永くんは器用で頑張り屋さんなので、今後も沖野研を盛り立てて、活躍されることを楽しみにしています。

沖野研究室修士課程 2 年の守屋翔平氏に深く感謝いたします。温度制御マルチガスプラズマジェットでの実験を一緒に行いました。守屋くんはモノ作りに長けており、まだ修士課程だったのかというくらいの活動量です。守屋くん作のジェットなくしては、本論文のデータ取得はできませんでした。今後のご活躍も期待しています。

沖野研究室修士課程 2 年の吉田真優子女史に深く感謝いたします。吉田さんはいつも冷静で、落ち着いているので、話していても安心します。学会発表練習では、電子回路の説明を淡々とわかりやすくしていた姿が印象的でした。

沖野研究室修士課程 2 年の阿部優凜氏に深く感謝いたします。阿部くんの机周辺の美しさには驚くものがありますが、独自の方法で、周りを楽しくしてくれる所が素敵だと思います。

沖野研究室修士課程 2 年の高木拓希氏に深く感謝いたします。高木くんは無人販売を担当してくれていました。夜遅くまで沖野研で研究する時に、利用させていただくことができとても有り難く感じていました。

沖野研究室修士課程 1 年の飯島勇介氏に深く感謝いたします。温度制御マルチガスプラズマジェットでの実験を一緒に行いました。実験が上手な飯島くんのおかげで、細胞へのプラズマ照射がスムーズにでき、本論文のデータを取得することができました。毛髪への照射も手伝っていただき、とても助かりました。

沖野研究室卒業生の山崎翔矢氏(現在, 電気電子系安岡研究室)に深く感謝いたします。新規テーマにチャレンジし、試行錯誤しながら取り組んでいる姿がとても素敵でした。一酸化炭素の測定機器のことなど、間接的にしかお手伝いできませんでしたが、もっとサポートできればと思っていました。

松本研究室卒業生の松宮雅典氏(現在, JFE スチール), 山口基貴氏(現在, 農林中央金庫), 加瀬直也氏(現在, 野村証券), 山崎あかね女史(現在, キヤノン), 木村彦乃女史(現在, 東京都福祉保健局), 香川望氏(現在, 日立製作所), 松本研究室博士課程 3 年の土屋尚代女史, Anie Day Asa 女史, 博士課程 2 年の塚田海馬氏, 吉田和起氏, 修士課程 2 年の今村力也氏, 修士課程 1 年の Milai Enhkbaatar 氏には, 一緒に松本研で実験やディスカッションしていただき心より感謝いたします。

タカラベルモント株式会社 開発本部 岡本宏司本部長, 柴野輝美マネージャーはじめ, 開発本部のみなさまには, 本研究を始めるにあたり, 多大なるご理解とご支援を賜り, 心より感謝いたします。

タカラベルモント株式会社 化粧品研究開発部 大西日出男部長, 久下宗一所長, 青池広樹氏はじめ, 化粧品研究開発部のみなさまには, 本研究の継続, 本論文の完成まで寛大なご配慮とご支援をいただき, 深く感謝いたします。

他にも, 学会やセミナー, 学内イベントなどでお世話になった先生, 学生, 事務の方々や, 取引会社, ジャーナル編集者, 査読者など, 多くの皆様にご指導, ご協力をいただきましたおかげで本論文を作成することができました。そして, 研究に多大なる理解を示し, サポートしてくれた, 友人, 家族, 両親, はるちゃん, かんちゃん, 夫に厚く御礼申し上げます。

令和元年 6 月
三宅 智子