

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第 号		学位申請者氏名		三宅 智子	
		氏名	職名		氏名	職名
論文審査 審査員	主査	沖野晃俊	准教授	審査員	松本義久	准教授
	審査員	奥野喜裕	教授		岩澤篤郎	東京医療保健大学 ・教授
		岡村哲至	教授		伊藤典彦	鳥取大学・准教授
		佐藤千明	教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「大気圧低温プラズマが皮膚由来培養細胞の生体応答に与える影響の基礎研究」と題し、大気圧低温プラズマを創傷治療などの医療に応用するための準備段階としてプラズマがヒト細胞に与える影響を調べたもので、6章構成となっている。

第1章「序論」では、大気圧低温プラズマ照射が、DNA 損傷などの生体に与える影響について背景を述べている。幹細胞のDNA 損傷はがんや老化と関係するため、プラズマが幹細胞に及ぼす影響を調べる事が重要であると指摘している。

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結果をまとめている。皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌に CO₂ プラズマバブル水を処理すると、初期生菌数 10⁶~10⁷ CFU/mL から2桁低下し、殺菌効果が確認できたとしている。正常ヒト皮膚線維芽細胞に CO₂ プラズマバブル水を処理しても生存率が低下しないことを明らかにしている。CO₂ プラズマバブル水が細胞のDNA 損傷に及ぼす影響を確認したところ、DNA 二本鎖切断ではなく、弱い酸化ストレスが生じている可能性を示している。CO₂ プラズマバブル水の効果に起因する活性種を同定するために、電子スピン共鳴法、吸光光度法、イオンクロマトグラフィ、NMR により測定した結果、HO・は 1.4 mM、¹O₂ は 75.6 mM、H₂O₂ は 4.2 mM 含まれていることが明らかになり、H₂O₂ 以外の長寿命の化合物は確認できなかったとしている。この結果より、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が示唆されたと述べている。

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

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ている。CO₂ ガスバージ環境下で CO₂ プラズマを照射すると、プラズマ照射後48時間で全てのiPS細胞は死滅したが、同条件で、線維芽細胞では82%、ケラチノサイトでは71%の生存率であったとしている。そして、DNA 損傷応答のマーカーであるγH2AXの発現率および53BP1フォーカス形成率を指標にして、CO₂ プラズマ照射1時間後のDNA 損傷を調べている。γH2AXは線維芽細胞で99%、iPS細胞で99%、ケラチノサイトで100%の発現率であったが、53BP1のフォーカス形成率は、線維芽細胞で55%、iPS細胞で0%、ケラチノサイトで0%であったと報告し、この結果より、プラズマ処理によって酸化ストレスが生じている可能性が示されたと述べている。

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CO₂ガスバージ環境下で、CO₂プラズマを直接照射し、毛髪表面の組成変化をXPSにより解析している。CO₂プラズマを照射した毛髪では、表面のC, Siが減少し、O, N, Sが増加していたと述べている。またC-Sが減少し、S=O/S-Oが増加していたことから、毛髪表面に付着していたシャンプーなどに含まれるシリコンだけでなく、毛髪表面の脂質である18-MEA(メチルエイコサン酸)も除去されている可能性が得られたとしている。この結果より、プラズマ照射により、毛髪表面を親水化することができ、トリートメント剤等の浸透を促進するなどの応用可能性が得られたと述べている。

第6章「総括」では、この論文で得られた成果を総括するとともに、同一人物の皮膚由来培養細胞である線維芽細胞、iPS細胞、ケラチノサイトの生体応答を比較することの重要性をまとめている。また、これらの細胞を用いて作製した3D皮膚モデルによる解析など、今後の課題および展望について記述している。

以上を要するに、本論文は、iPS細胞を用いてヒト皮膚モデルを構築し、それに対する大気圧低温プラズマの影響を明らかにしたもので、理学的貢献するところが大きい。よって本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。