Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo

Nomura, Yudai

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2017-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7031号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007031

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet *in vitro* and *in vivo*

in vitro と *in vivo* における低温マルチガスプラズマジェットの
血液凝固効果に関する研究

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座消化器内科学分野
（指導教員：西　愼一　教授）

野村　雄大

Background：消化管出血は日常臨床で比較的よく遭遇する疾患であり，そしてそれは時に致命的となりうる．日本ではいくつかの治療法が確立されている，例えば，内視鏡的クリップ法や局注療法（純エタノールまたは高調食塩水），高周波凝固装置，アルゴンプラズマ凝固療法（APC）などである．しかし，高周波凝固装置やAPCは組織傷害も強く，新たな潰瘍の発生や消化管穿孔の原因となりうるなど，それぞれの治療法にはいくつかの問題点がある．
低温大気圧プラズマは近年新たな医療技術として注目を集めている．プラズマは荷電粒子，励起状態の原子や分子，ラジカル，紫外線などの活性種で構成されており，これらの発生した構成成分が殺菌や血液凝固，創傷治癒などの効果をもたらすと考えられている．低温プラズマはこれらの効果を熱によるダメージを与えることなく生み出すことができる．我々は低温プラズマにより組織傷害なく止血を可能とする新たな内視鏡装置としての可能性を *in vitro* と *in vivo* で検証した．また，今までの研究の多くはプラズマを発生させるガス種としてヘリウムやアルゴンなどが使用されているが，我々が使用するマルチガスプラズマジェットは様々なガス種で低温プラズマを作ることができる．今までの研究で，ガス種によりプラズマの親水化能や殺菌能力に有意な違いがあることが確認されており，今回はガス種による凝固反応の違いを評価することができる．我々は，この研究で内視鏡治療で用いる新たな血液凝固装置として，低温プラズマのもつ可能性を *in vitro* と *in vivo* において検証した．

Materials and methods：我々の使用したマルチガスプラズマジェットは共同研究者の東京工業大学の研究員によって開発されたもので，ペン型の筐体の内部で発生した低温プラズマをガス流で先端のピンホールから噴出しジェット状に標的にプラズマを照射することができる．
3人の健常ボランティアの血液に低温プラズマをあてて血液凝固効果を検証した．採血した血液にクエン酸を添加し，そこから10μLずつ使用した．照射距離は7mmに固定し，プラズマジェットのガス流量は5L/minで行った．マルチガスプラズマジェットを用いて，アルゴン，酸素，ヘリウム，窒素，人工空気（酸素20%＋窒素80），二酸化炭素でプラズマを発生させ，血液滴の表面全体が凝固した時間を凝固時間として，ガス種による凝固時間の違いを評価した．
さらに採血した血液を抗凝固剤として，クエン酸，EDTA-2K，ヘパリン，EDTA-2K＋アセチルサリチル酸の4種類を使用し，それぞれにプラズマ照射し，血液凝固の違いを調べた．これにより低温プラズマの血液凝固のメカニズムが血液凝固カスケードのどこに作用するのかの推測できると考えた．
さらに本研究では，ブタを使用し生体での止血効果と安全性を評価した．ブタの胃と肝臓に対して人工的に出血創を作り，そこに低温プラズマジェットを照

射し止血効果を評価した．その後，照射部位の組織標本を切り出し，HE 染色での観察と TUNEL アッセイにより組織傷害の有無と DNA 損傷とアポトーシスについて APC と比較し評価した．

Results and discussion：プラズマを発生させるガス種を変更し行った実験では，アルゴン，酸素，ヘリウム，窒素，人工空気，二酸化炭素の血液凝固時間はそれぞれ 14.7，7.6，6.8，9.2，6.8，7.9 秒であり，アルゴンは他のガス種に比較して血液凝固が遅い傾向が認められた．酸素やヘリウム，窒素，人工空気，二酸化炭素の間では凝固時間に明らかな差は認めなかった．ガスのみではすべてのガス種で 30 秒間血液に吹きかけても血液凝固は認めなかった．過去の報告で，血液凝固には OH ラジカルのような活性酸素種（ROS）が重要な役割をしているとされていたが，窒素やヘリウムでも凝固能に大きな差がないことより血液凝固には OH ラジカルだけでなく他の ROS や活性種が影響していることを示唆する．また，低温プラズマによる殺菌と親水化の報告でも今回同様アルゴンがその効果がもっとも弱かった．アルゴンによるプラズマはほかのガス種に比べて活性種の発生が不十分なのかもしれない．
次に抗凝固剤を変えて行った実験ではすべての抗凝固剤添加血液で凝固を認め，一方，ガスのみを吹きかけたものでは凝固は認めなかった．凝固の状態に肉眼的には明らかな差は認めなかった．これは，プラズマによる血液凝固が凝固過程の複数の段階に作用しているか，フィブリンの重合や血小板の凝集などの血液凝固の根本的な最終の段階に直接関与しているためと考えられた．
ブタを使った止血実験では，胃粘膜と肝臓表面どちらの出血創についても低温プラズマ照射をすることで，速やかな止血が観察された．低温プラズマの発生には，医療応用の観点から窒素と二酸化炭素を使用した．低温プラズマ照射後，組織を取り出し HE 染色と TUNEL 染色を行い光学顕微鏡で観察した．同様に APC を 1 秒照射した組織も観察し比較した．低温プラズマ照射では，HE 染色，TUNEL 染色のどちらでも明らかな変化は認めなかった．一方，APC の照射では肉眼的にも明らかに熱による変化を認めたが，HE 染色で胃で 1.4mm，肝臓で 1.6mm の深さまで熱変性を認めた．TUNEL アッセイでも同領域で DNA 損傷を反映し染色されていた．

Conclusion：今回の実験で我々は低温プラズマジェットによる血液凝固効果をヒトの血液を使用した *in vitro* の実験だけでなく，ブタの胃と肝臓による *in vivo* の実験でも確認した．同時に *in vivo* での安全性も確認した．これらの結果は低温プラズマが新たな止血療法として，様々な外科分野で使用される可能性を示唆する．

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2724 号	氏 名	野村 雄大
論文題目 Title of Dissertation	Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo in vitro と in vivo における低温マルチガスプラズマジェットの 血液凝固効果に関する研究		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 寺邑浩人 副 査 Vice-examiner 掛地吾弘 副 査 Vice-examiner 伊藤 [illegible]		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Background：消化管出血は日常臨床で比較的よく遭遇する疾患であり，そしてそれは時に致命的となりうる．日本ではいくつかの治療法が確立されている，例えば，内視鏡的クリップ法や局注療法（純エタノールまたは高調食塩水），高周波凝固装置，アルゴンプラズマ凝固療法（APC）などである．しかし，高周波凝固装置や APC は組織傷害も強く，新たな潰瘍の発生や消化管穿孔の原因となりうるなど，それぞれの治療法にはいくつかの問題点がある．

低温大気圧プラズマは近年新たな医療技術として注目を集めている．プラズマは荷電粒子，励起状態の原子や分子，ラジカル，紫外線などの活性種で構成されており，これらの発生した構成成分が殺菌や血液凝固，創傷治癒などの効果をもたらすと考えられている．低温プラズマはこれらの効果を熱によるダメージを与えることなく生み出すことができる．

我々は低温プラズマにより組織傷害なく止血を可能とする新たな内視鏡装置としての可能性を *in vitro* と *in vivo* で検証した．また，今までの研究の多くはプラズマを発生させるガス種としてヘリウムやアルゴンなどが使用されているが，我々が使用するマルチガスプラズマジェットは様々なガス種で低温プラズマを作ることができる．今までの研究で，ガス種によりプラズマの親水化能や殺菌能力に有意な違いがあることが確認されており，今回はガス種による凝固反応の違いを評価することができる．

我々は，この研究で内視鏡治療で用いる新たな血液凝固装置として，低温プラズマのもつ可能性を *in vitro* と *in vivo* において検証した．

Materials and methods：我々の使用したマルチガスプラズマジェットは共同研究者の東京工業大学の研究員によって開発されたもので，ペン型の筐体の内部で発生した低温プラズマをガス流で先端のピンホールから噴出しジェット状に標的にプラズマを照射することができる．

3 人の健常ボランティアの血液に低温プラズマをあてて血液凝固効果を検証した．採血した血液にクエン酸を添加し，そこから 10 μL ずつ使用した．照射距離は 7mm に固定し，プラズマジェットのガス流量は 5L/min で行った．マルチガスプラズマジェットを用いて，アルゴン，酸素，ヘリウム，窒素，人工空気（酸素 20%＋窒素 80），二酸化炭素でプラズマを発生させ，血液滴の表面全体が凝固した時間を凝固時間として，ガス種による凝固時間の違いを評価した．

さらに採血した血液を抗凝固剤として，クエン酸，EDTA-2K，ヘパリン，EDTA-2K＋アセチルサリチル酸の 4 種類を使用し，それぞれにプラズマ照射し，血液凝固の違いを調べた．これにより低温プラズマの血液凝固のメカニズムが血液凝固カスケードのどこに作用するのかの推測できると考えた．

さらに本研究では，ブタを使用し生体での止血効果と安全性を評価した．ブタの胃と肝臓に対して人工的に出血創を作り，そこに低温プラズマジェットを照射し止血効果を評価した．その後，照射部位の組織標本を切り出し，HE 染色での観察と TUNEL アッセイにより組織傷害の有無と DNA 損傷とアポトーシスについて APC と比較し評価した．

Results and discussion：プラズマを発生させるガス種を変更し行った実験では，アルゴン，酸素，ヘリウム，窒素，人工空気，二酸化炭素の血液凝固時間はそれぞれ 14.7，7.6，6.8，9.2，6.8，7.9 秒であり，アルゴンは他のガス種に比較して血液凝固が遅い傾向が認められた．酸素やヘリウム，窒素，人工空気，二酸化炭素の間では凝固時間に明らかな差は認めなかった．ガスのみではすべてのガス種で 30 秒間血液に吹きかけても血液凝固は認めなかった．過去の報告で，血液凝固には OH ラジカルのような活性酸素種（ROS）が重要な役割をしているとされていたが，窒素やヘリウムでも凝固能に大きな差がないことより血液凝固には OH ラジカルだけでなく他の ROS や活性種が影響していることを示唆する．また，低温プラズマによる殺菌と親水化の報告でも今回同様アルゴンがその効果がもっとも弱かった．アルゴンによるプラズマはほかのガス種に比べて活性種の発生が不十分なのかもしれない．
次に抗凝固剤を変えて行った実験ではすべての抗凝固剤添加血液で凝固を認め，一方，ガスのみを吹きかけたものでは凝固は認めなかった．凝固の状態に肉眼的には明らかな差は認めなかった．これは，プラズマによる血液凝固が凝固過程の複数の段階に作用しているか，フィブリンの重合や血小板の凝集などの血液凝固の根本的な最終の段階に直接関与しているためと考えられた．
ブタを使った止血実験では，胃粘膜と肝臓表面どちらの出血創についても低温プラズマ照射をすることで，速やかな止血が観察された．低温プラズマの発生には，医療応用の観点から窒素と二酸化炭素を使用した．低温プラズマ照射後，組織を取り出し HE 染色と TUNEL 染色を行い光学顕微鏡で観察した．同様に APC を 1 秒照射した組織も観察し比較した．低温プラズマ照射では，HE 染色，TUNEL 染色のどちらでも明らかな変化は認めなかった．一方，APC の照射では肉眼的にも明らかに熱による変化を認めたが，HE 染色で胃で 1.4mm，肝臓で 1.6mm の深さまで熱変性を認めた．TUNEL アッセイでも同領域で DNA 損傷を反映し染色されていた．

Conclusion：今回の実験で我々は低温プラズマジェットによる血液凝固効果をヒトの血液を使用した *in vitro* の実験だけでなく，ブタの胃と肝臓による *in vivo* の実験でも確認した．同時に *in vivo* での安全性も確認した．これらの結果は低温プラズマが新たな止血療法として，様々な外科分野で使用される可能性を示唆する．

本研究は低温プラズマについて、その止血効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったガス種による血液凝固効果の比較や *in vivo* での止血効果や組織傷害について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。