

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05096

研究課題名(和文) プラズマジェット乱流場を用いた溶液中活性種制御とがん幹細胞選択的の死滅効果の検証

研究課題名(英文) Control of the reactive species production in liquid by using the plasma-jet turbulence flow and the selective killing of cancer stem cells by plasma activated liquid

研究代表者

内田 儀一郎 (Giichiro, Uchida)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：90422435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養液へのプラズマ照射により、多種多様なアミノ酸のうち特にメチオニンとトリプトファンが顕著に酸化・分解されることを見出した。その原因として、プラズマ/液体相互作用によって生成されるOHなどの短寿命活性種が、酸化・分解反応を大きく促進することを明らかにした。さらにプラズマを照射したメチオニン水溶液とトリプトファン水溶液を子宮頸内膜腺がん細胞に投与し、プラズマ照射アミノ酸水溶液のがん細胞殺傷効果を評価した結果、その投与によりがん細胞生存率が大きく低下することを見出した。これよりメチオニンとトリプトファンからの新たな生成物が、がん細胞殺傷に大きく寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ照射細胞培養液をがん細胞に投与した際、がん細胞が選択的に殺傷されることが報告されている。しかしながら、細胞培養液には、グルコース、15種類のアミノ酸、8種類のビタミン、4種類の無機塩が添加されているため反応は複雑なものとなり、プラズマ照射溶液と細胞との相互作用の詳細は未解明であった。本研究の学術的意義は、この複雑なプラズマ照射による細胞培養液成分の化学変化を詳細に解析し、がん細胞死滅現象との因果関係を解析した点にある。また、本研究成果の社会的意義は、新たながん治療法としての可能性が期待されているプラズマ医療応用の発展に貢献した点にある。

研究成果の概要(英文)：We present evidence for the decomposition and oxidation of amino acids in aqueous solution following irradiation with a nonequilibrium plasma jet. Of 15 amino acids tested in cell culture medium, plasma irradiation induced a marked chemical change in methionine and tryptophan due to the effective production of reactive oxygen species by plasma-water interaction. We also report that plasma-treated methionine and tryptophan aqueous solutions can kill cancer cells, greatly decreasing the viability of human endometrial carcinoma (HEC-1) cancer cells due to the presence of decomposition or oxidation products generated from the amino acid. Plasma-treated methionine and tryptophan aqueous solutions also induced an anti-cancer effect on cancer-initiating cells.

研究分野：プラズマ理工学

キーワード：プラズマ医療 非平衡プラズマジェット アミノ酸 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、大気圧非平衡プラズマの医療応用研究が精力的に推進されている。プラズマと細胞との相互作用に関して、プラズマを細胞に直接照射する研究に加え、近年はプラズマで処理した溶液を細胞に投与する間接照射に関する研究が展開されている。溶液は薬剤として広く患部に投与できること、また、点滴として体内に注入できる可能性があることなどが大きな利点となる。プラズマを純水に照射したプラズマ照射水の場合は、溶液の組成変化は比較的単純であり、溶液中で生成された活性酸素や活性窒素が細胞の反応を誘起することなど、相互作用のメカニズムの理解が進んでいる。一方、プラズマをグルコースやアミノ酸などを含む細胞培養液に照射したプラズマ照射細胞培養液の場合は、細胞反応はかなり複雑となり、詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

細胞培養液は、純水にグルコース、15種類のアミノ酸、8種類のビタミン、4種類の無機塩が添加されており、プラズマ照射により、これらの成分も化学的に変化する。よって、細胞作用に関して、活性酸素、活性窒素に加え、培養液成分からの新たな反応生成物の影響も考慮する必要がある。近年、このようなプラズマ照射細胞培養液をがん細胞に投与した際、がん細胞が選択的に殺傷されることが報告された。このような細胞殺傷の選択性の発現は、現在の手術治療、抗がん剤治療、放射線治療、免疫治療に続く、新たながん治療法の可能性を期待させる。本研究では独自のプラズマジェットを駆使し、様々な照射条件で作製した溶液をがん細胞に投与し、その殺傷効果を評価する。さらに、細胞培養液成分の化学変化の様子を液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて詳細に解析し、がん細胞死滅現象との因果関係を明らかにする。

3. 研究の方法

図1に本実験で使用した2つのプラズマジェット装置の概要を示す。(a)は周波数5 kHzの矩形波電圧で駆動した低周波プラズマジェットであり、Heガスをガラス管に供給する。周辺に外気を遮断するシールドガスを流せるように工夫している。一方、(b)は新規に開発した60 MHz高周波プラズマジェットで、Arガスをガラス管に供給し駆動する。この2種類のプラズマと溶液との相互作用を評価するために、様々な放電ガス条件でプラズマを照射した時の細胞培養液中の H_2O_2 濃度と NO_2^- 濃度をそれぞれ測定した。濃度測定は、 H_2O_2 と NO_2^- にそれぞれ反応し、その濃度に比例して吸光度が変化する試薬を添加し、その試薬のプロトコルに従い評価した(H_2O_2 : Thermo Fisher Scientific, Amplex Red Hydrogen Peroxide/Preoxidase Assay Kit, NO_2^- : DOJINDO, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Assay Kit-C II)。

次にプラズマ照射による細胞培養液の成分変化を、液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて詳細に解析した。具体的には、プラズマ照射細胞培養液中のグルコース、15種類のアミノ酸、4種類のビタミンの濃度変化をプラズマ照射前と照射後で比較した。

最後にプラズマを照射したアミノ酸水溶液と子宮頸内膜腺がん細胞(HEC-1)の相互作用を解析した。具体的にはプラズマを照射したメチオニン水溶液とトリプトファン水溶液のがん細胞殺傷効果を評価した。図2に細胞実験の手順を示す。プラズマジェットをメチオニン水溶液とトリプトファン水溶液にそれぞれ接触照射し、これを通常の細胞培養液に1:1の割合で添加した。ここで添加後の溶液サンプルのpHは細胞の生存に適切な7-8程度であった。このサンプルをHEC-1に投与した後、24時間37°Cの条件で培養し、その後、細胞増殖率(生存率)を測定した。また、がん幹細胞の殺傷効果を評価するために、細胞のALDH(Acetaldehyde Dehydrogenase)を検出できる試薬(StemCell Technologies Inc. Corp., Aldefluor kit)を添加し、細胞のALDH活性度をフローサイトメトリ - 法により評価した。

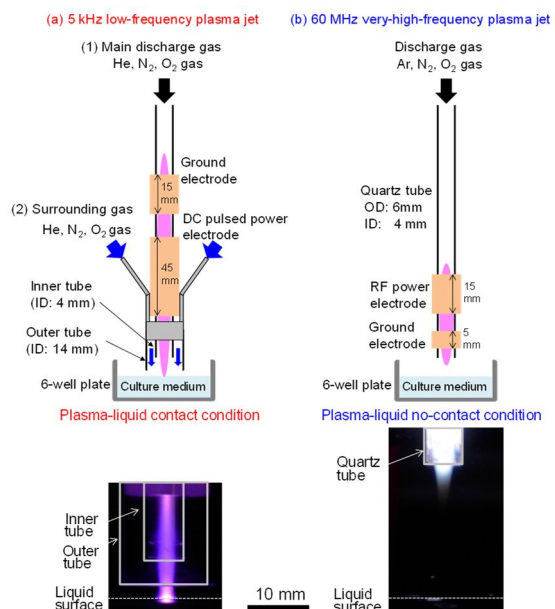


図1 実験装置の概略。(a) 5 kHz 低周波 He プラズマジェットと(b) 60 MHz 高周波 Ar プラズマジェットを溶液に照射し、プラズマ照射溶液を作製した。

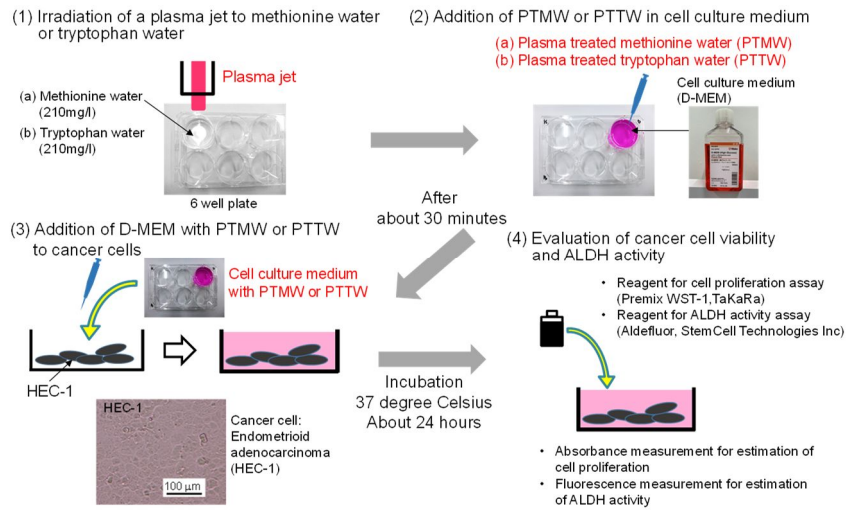


図 2 細胞実験の手順。プラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液を子宮類内
膜腺がん細胞(HEC-1)に投与しがん細胞殺傷能を評価した。

4. 研究成果

低周波と高周波の2つのプラズマジェットと溶液との相互作用を評価するために、様々な放電ガス条件でプラズマを照射した時の細胞培養液中の H_2O_2 濃度と NO_2^- 濃度をそれぞれ測定した。表 1 に示すように通常の低周波プラズマジェットの直接照射においては、 H_2O_2 が主要成分となり、 N_2 ガスを He ガス中に添加すると H_2O_2 濃度と同程度まで NO_2^- 濃度は増大した。一方、60 MHz 高周波プラズマジェットにおいては、図 1(b) に示すようにプラズマジェットの先端を溶液から離れた非接触状態で溶液に照射した。このような状態で、さらに窒素ガスを添加することにより、 H_2O_2 に比べ NO_2^- が 15 倍高濃度の溶液が生成された。今回、2 種類のプラズマジェットを使用することにより、細胞培養液中の H_2O_2 濃度と NO_2^- 濃度の割合を 0~15 の間で制御できることが明らかになった。

次にプラズマ照射による細胞培養液の成分変化を、液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて詳細に解析した。その結果、アミノ酸の中の特にメチオニンとトリプトファンの濃度がプラズマ照射後、大きく低減することが明らかになった。図 3(a) と図 3(b) にそれぞれ示すように、特にプラズマを直接接触した表 1 に記載の条件 1、2 サンプルにおいて、メチオニンとトリプトファンの濃度の大きな減少が観測された。

表 1 プラズマ照射条件とプラズマ照射培養液中の H_2O_2 、 NO_2^- 濃度。低周波、高周波プラズマジェットにより 0~15 の広範囲で H_2O_2 と NO_2^- の濃度比を制御した。

Condition number	Plasma source	Gas condition for plasma production	Applied voltage (kV)	Plasma irradiation time (min)	H_2O_2 ($\mu\text{mol/l}$)	NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$)
1	LF plasma jet (plasma contact)	He: 3 slm / O_2 : 5 sccm	10	8	27.6	0.2
2	LF plasma jet (plasma contact)	He: 3 slm / N_2 (80%) O_2 (20%): 6 sccm	10	5	34.3	24.2
3	VHF plasma jet (plasma no-contact)	Ar: 3slm	1.0	2	30.8	35.8
4	VHF plasma jet (plasma no-contact)	Ar: 3 slm / N_2 (80%) O_2 (20%): 40 sccm	2.2	1	35.3	199.2
5	VHF plasma jet (plasma no-contact)	Ar: 3 slm / N_2 (80%) O_2 (20%): 100 sccm	2.1	1	33.3	474.1

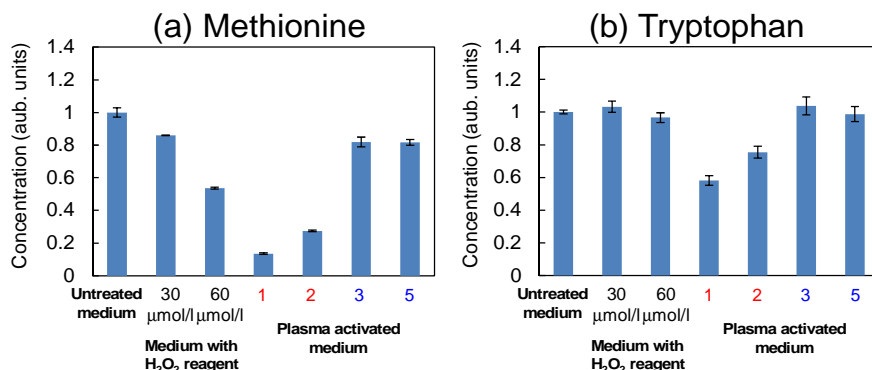


図 3 プラズマ照射細胞培養液中のアミノ酸成分(a)メチオニンと(b)トリプトファンの濃度変化。プラズマを照射することにより、2 つの濃度が大きく減少した。番号は表 1 に記載の照射条件を示す。

プラズマ照射により、細胞培養液中で大きく濃度が減少した2種類のアミノ酸、メチオニンとトリプトファンについてさらに実験を行った。メチオニンとトリプトファンを210 mg/lそれぞれ添加した純水に5 kHz プラズマジェットを照射し、メチオニンとトリプトファンの質量スペクトルの変化を質量分析装置(Shimadzu, LCMS-2020)で詳細に測定した。図4(a)に示すようにメチオニンの質量スペクトル強度($m/z = 150$)は、プラズマ接触照射5分、10分で徐々に減少し、新たなスペクトルが $m/z = 121, 166$ に観測された。これはメチオニンの分解物と酸化物にそれぞれ対応する。図4(b)に示すトリプトファンも同様に、プラズマ接触照射5分、10分でそのスペクトル強度($m/z = 205$)は徐々に減少していき、新たなスペクトルが $m/z = 221, 237$ に観測された。これらはトリプトファンの酸化物に対応する。このように、プラズマの液面への接触により、アミノ酸の分解物と酸化物が新たに生成されることが明らかになった。

このようなアミノ酸の化学的な変化を誘起する活性種を明らかにするために、メチオニンとトリプトファン水溶液に H_2O_2 試薬をそれぞれ添加し、質量スペクトルの変化を同様に測定した。 H_2O_2 試薬添加前後でメチオニンとトリプトファンの質量スペクトル強度は変化せず、これよりアミノ酸の酸化・分解反応は H_2O_2 以外の活性種で誘起されていることが明らかになった。そこで、プラズマ照射により水溶液中で生成する活性酸素種をさらに詳細に分析した。その結果、図5に示すように、プラズマ照射時間と共に、OH ラジカルや $ONOO^-$ の濃度が増大していく様子が新たに観測された。特にOH ラジカルは、 H_2O_2 に比べ有機物に対する酸化力が2桁以上高いことが知られており、このような酸化力の高い短寿命ラジカルがアミノ酸の酸化・分解反応を誘起した可能性が示唆された。

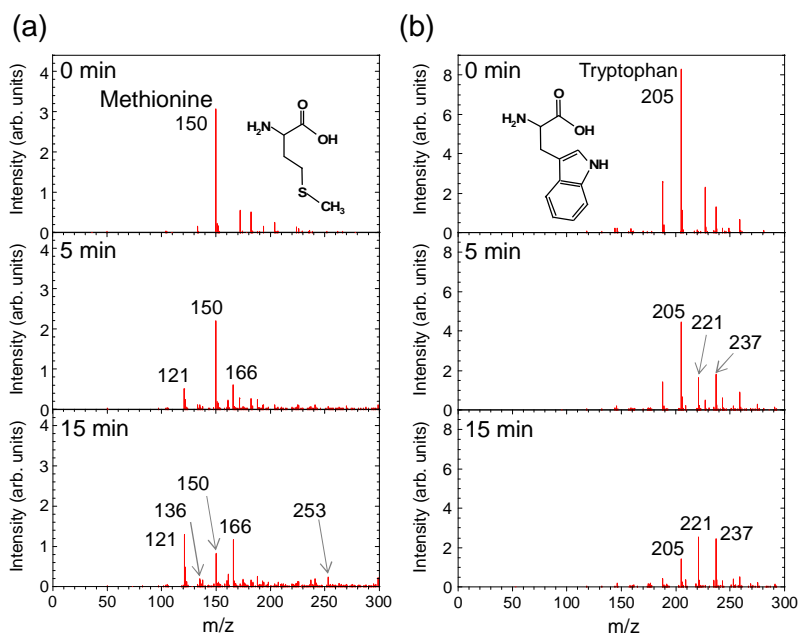


図4 (a)メチオニンと(b)トリプトファンの質量スペクトルの変化。プラズマ照射5分、10分後、メチオニンとトリプトファンの質量スペクトル強度150と205は減少し、新たな酸化物、分解物の生成が確認された。

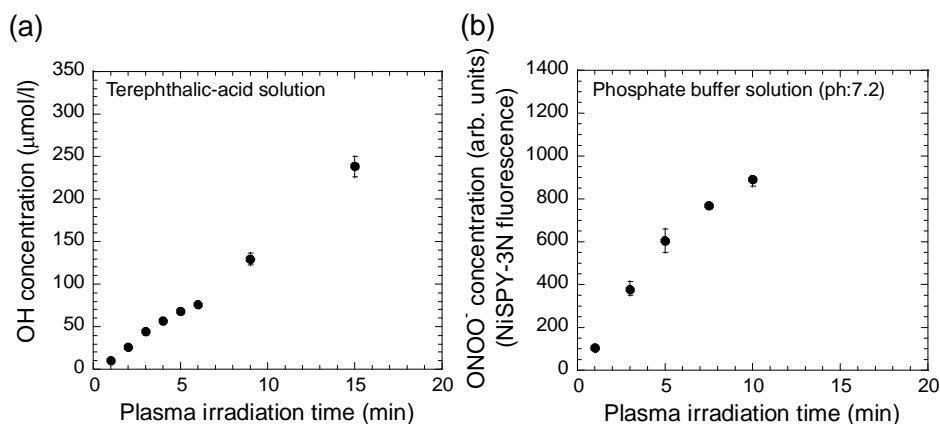


図5 (a)OH ラジカル濃度と(b) $ONOO^-$ 濃度 (NiSPY-3N 蛍光強度)のプラズマ照射時間依存性。プラズマ照射時間に比例して、これら短寿命活性種の濃度は増大した。

最後にプラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液を子宮類内膜腺がん細胞(HEC-1)に投与し細胞殺傷能を評価した。図 6(a)にプラズマ照射メチオニン水溶液(サンプル番号 6)、図 6(b)にプラズマ照射トリプトファン水溶液(サンプル番号 4)の細胞増殖率を示す。細胞数 5,000 と 10,000 の結果を並べて表示している。通常の細胞培養液に比べ、プラズマ照射メチオニン水溶液、プラズマ照射トリプトファン水溶液ともに細胞生存率が大きく低下した。プラズマ照射純水においても、細胞生存率の低下が観測されたが、この低下の度合いは H_2O_2 試薬添加のサンプルと同程度であり、 H_2O_2 の効果と推測される。それらに比べて、プラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液の細胞生存率は極めて低く、この結果はメチオニンとトリプトファンからの新たな生成物が、がん細胞殺傷に大きく寄与したことを示唆している。

このようにプラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液が、がん細胞殺傷に有効であることが明らかになった。そこで次に、がん幹細胞の殺傷について検証した。がん幹細胞は、がん非幹細胞よりも増殖能が高く、また、抗がん剤や放射線照射に対しても耐性が高く、殺傷が困難とされている。本研究では、幹細胞と非幹細胞の識別を、ALDH(Acetaldehyde Dehydrogenase)の活性度を評価することにより行った。一般的に幹細胞は ALDH が活性であることが報告されている。図 7 に示すように、プラズマ未照射の通常の細胞培養液においては、幹細胞は全体の 20 – 30% の割合だった。一方、プラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液の投与後のサンプルでは、幹細胞の割合が全体の 5 – 6% 程度とプラズマ未照射の 20 – 30% から大きく減少した。この結果は、プラズマ照射メチオニン水溶液とトリプトファン水溶液が特にがん幹細胞の殺傷に有効であることを示唆している。

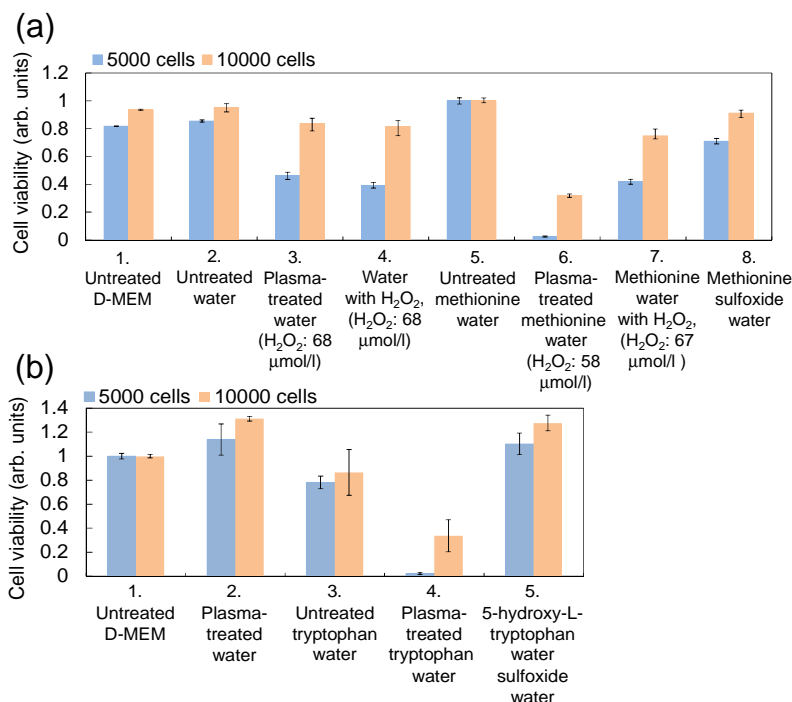


図 6 子宮類内膜腺がん細胞(HEC-1)の生存率評価。(a)プラズマ照射メチオニン水溶液(サンプル番号 6)。(b)プラズマ照射トリプトファン水溶液(サンプル番号 4)。全てのサンプルはD-MEMと1:1の割合で希釈した後、細胞に投与した。プラズマ照射メチオニン水溶液とプラズマ照射トリプトファン水溶液の投与で細胞生存率が大きく低下した。

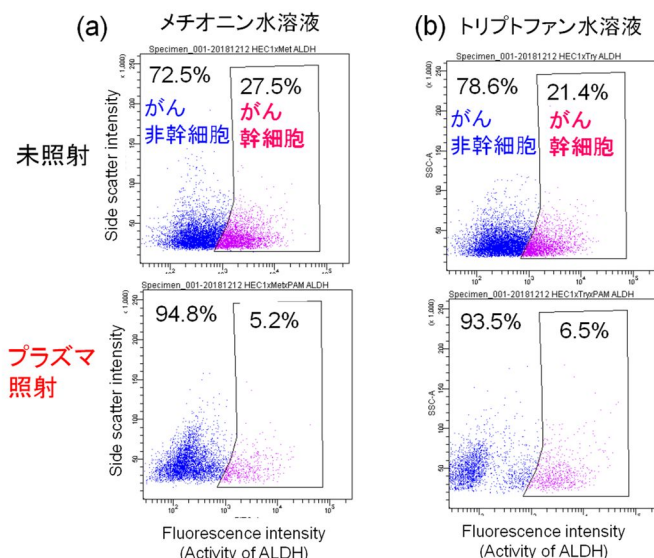


図 7 子宮類内膜腺がん細胞(HEC-1)の ALDH 活性度評価。(a)プラズマ照射メチオニン水溶液と(b)プラズマ照射トリプトファン水溶液の投与で ALDH 活性度が大きく低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 内田儀一郎, 池田純一郎, 竹中弘祐, 節原裕一	4. 巻 9(3)
2. 論文標題 大気圧低温プラズマジェット照射溶液によるがん細胞殺傷に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 スマートプロセス学会誌	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 G. Uchida, Y. Mino, T. Suzuki, J. Ikeda, T. Suzuki, K. Takenaka, Y. Setsuhara	4. 巻 9
2. 論文標題 Decomposition and oxidation of methionine and tryptophan following irradiation with a nonequilibrium plasma jet and applications for killing cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://www.nature.com/articles/s41598-019-42959-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 内田儀一郎, 竹中弘祐, 川崎敏之, 古閑一憲, 白谷正治, 節原裕一	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 大気圧非平衡Heプラズマジェットと溶液との相互作用に関する可視化研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 スマートプロセス学会誌	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 G. Uchida, T. Ito, J. Ikeda, T. Suzuki, K. Takenaka, Y. Setsuhara	4. 巻 57
2. 論文標題 Effect of plasma-activated medium produced by direct irradiation on cancer cell killing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 96201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.57.096201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 G. Uchida, K. Takenaka, J. Ikeda, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Studies on selective production of RONS and chemical change of amino acids in plasma-treated solutions
3. 学会等名 XXXIV International Conference on Phenomena in Ionized Gases, 10th International Conference on Reactive Plasmas (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 G. Uchida, J. Ikeda, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Decomposition and oxidation of amino acids following irradiation with a plasma jet and applications for killing cancer cells
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田儀一郎, 池田純一郎, 鈴木天翔, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 プラズマ接触照射で作製したプラズマ活性培養液のがん細胞殺傷効果
3. 学会等名 第35回プラズマ核融合学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. Uchida, T. Suzuki, J. Ikeda, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Control of RONS in plasma-activated solutions and their application to cancer cell killing
3. 学会等名 28th Annual meeting of MRS-Japan 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. Uchida, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Control of ROS and RNS productions in liquid by using a nonthermal high-frequency plasma jet
3. 学会等名 2nd Asia-Pacific Conference on Plasma Physics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. Uchida
2. 発表標題 Studies of selective production of RONS in the plasma-treated water and interaction between the plasma and amino acids
3. 学会等名 The 71st Annual Gaseous Electronics Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田儀一郎, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 大気圧プラズマプロセスの最前線 -異材接合から医療応用まで-
3. 学会等名 第22回電子デバイス実装研究委員会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田儀一郎, 池田純一郎, 鈴木天翔, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 様々なプラズマ照射条件で作製されたプラズマ活性培養液のがん細胞殺傷効果
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田儀一郎
2. 発表標題 プラズマ生成の基礎とプラズマ制御
3. 学会等名 第11回プラズマエレクトロニクスインキュベーションホール(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Uchida, Y. Mino, Tailto, Kosuke Takenaka, Yuichi Setsuhara
2. 発表標題 Irradiation of a nonequilibrium plasma jet to liquid water with amino acids
3. 学会等名 IUMRS The15th Intesrnational Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田儀一郎, 伊藤泰喜, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 長尺高周波非平衡プラズマジェットの開発
3. 学会等名 第78回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Uchida, T. Ito, K. Takenaka, J. Ikeda, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Development of an atmospheric pressure very-high-frequency plasma jet
3. 学会等名 The 11th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田儀一郎, 美濃祐資, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 非平衡プラズマジェット照射溶液中のアミノ酸成分に関する液体クロマトグラフ質量分析
3. 学会等名 Plasma Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Mino, G. Uchida, T. Suzuki, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Oxidation and decomposition of amino acids in water induced by plasma irradiation
3. 学会等名 27th Annual Meeting of MRS-Japan 2017 International Symposium "Frontier of nano-materials based on advanced plasma technologies" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Uchida, Y. Mino, T. Suzuki, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Development of a 60 MHz nonthermal plasma jet and selective production of reactive oxygen and nitrogen species in the plasma treated water
3. 学会等名 27th Annual Meeting of MRS-Japan 2017 International Symposium "Frontier of nano-materials based on advanced plasma technologies" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Uchida, Y. Mino, T. Suzuki, K. Takenaka, Y. Setsuhara
2. 発表標題 Analysis of amino acids in plasma-activated water with mass spectrometer
3. 学会等名 10th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials (ISPlasma 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田儀一郎, 美濃祐資, 鈴木天翔, 竹中弘祐, 節原裕一
2. 発表標題 非平衡プラズマジェットと水溶液中アミノ酸との相互作用に関する研究
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	節原 裕一 (Setsuhara Yuichi)		
研究協力者	竹中 弘祐 (Takenaka Kosuke)		
研究協力者	池田 純一郎 (Ikeda Jun-Ichi ro)		
研究協力者	茂田 正哉 (Shigeta Masaya)		