

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32678

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K03814

研究課題名(和文) 消化器癌に対するプラズマバブル噴霧投与の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of plasma bubble spray administration and clinical application to gastrointestinal cancer

研究代表者

森 晃 (MORI, AKIRA)

東京都市大学・理工学部・教授

研究者番号：60219996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、大腸癌の罹患率は高く代表的な治療法には、内視鏡治療、腹腔鏡手術といった外科治療、薬物療法等がある。大腸癌初期であれば手術で取り除くことが可能であるが、進行していた場合は薬物療法や対処療法が選択される。内視鏡治療以外の治療法ではいずれも侵襲性が高く、患者の負担が大きい点が特に問題である。そこで低侵襲な治療法という観点から、Atmospheric Low Temperature Plasma(ALTP)を用いた大腸癌の新規治療法について検討した。その結果、大腸癌モデルラット及び大腸がん細胞において、ALTPの細胞培養液への照射やALTP照射腸洗浄液が一定の効果があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではin vivo、in vitroの両方の側面からプラズマ照射溶液の評価を行った。大腸癌細胞単体への評価として、培養液プラズマ照射群の細胞数が有意に減少した。更に、大腸癌モデルラットでの評価で病理組織検査の結果から、プラズマ照射生理食塩水液を尾静脈注射した群では臓器転移や深部浸潤抑制の傾向が見られた。従って、本研究によりプラズマ照射溶液が大腸癌細胞死と転移抑制の作用を有することが示唆された。今後は、プラズマ照射溶液による大腸癌細胞抑制作用機序を検討することが必要である。癌治療において手術、放射線、薬物療法でも効果が認められない場合にプラズマ医療も考慮される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer affects a large number of people. In recent years, research on medical applications of atmospheric low temperature plasma (ALTP) has been actively conducted. In vivo and in vitro experiments were conducted using plasma-treated saline (PTS) and plasma-treated medium (PTM) prepared by submerged bubbling treatment using ALTP. In vivo experiments using a rat model of colorectal cancer revealed that PTS administration to the colon slowed tumor progression based on endoscopic and histopathological observations. As a result of culturing colorectal cancer cells with PTM, cell proliferation was inhibited. Also, cell death was induced by cell swelling. The qPCR revealed that PTMs induced cell death of cancer cells through signaling of tumor necrosis factor (TNF- α), an inflammatory cytokine. Therefore, the inhibition of cancer progression by PTS in the rat model occurs by inducing cell death through the dissolution of ALTP components in the liquid.

研究分野：プラズマ医学

キーワード：がん治療 大気圧低温プラズマ プラズマ照射水

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気体に比べて高密度な媒質(水、イオン性溶液)中でプラズマを発生させる「液中プラズマ」、必要に応じた面積・体積にプラズマを発生し、マイクロなスポット領域でプロセスを行う「マイクロプラズマ」、大気圧下の空間もしくはガス流体中で非平衡プラズマを発生させる「大気圧プラズマ」等を駆使した液相中もしくは気相-液相界面反応場を利用した新規プラズマの生成基礎及び応用展開に関する研究は、国内外の大学や民間研究所の化学・固体物理・ナノ材料分野で盛んに行われてきている。特に、大気圧プラズマは滅菌・殺菌、有害物質分解、表面改質のみならず、ナノテクノロジー、バイオテクノロジー、メディカルサイエンスの多面性を必須とする複合新領域の開拓・発展には必要不可欠である。米国では、「プラズマ照射を用いた皮膚の改質、再生治療」は実用化が先行している。さらには、プラズマ照射培養液腹腔内投与が腹膜播種した膵癌に対して抗腫瘍効果があるとされているが、その物理的メカニズムが未だ解明されていない。その状況を解決する手段として、プラズマ理工学方面からのメカニズム解明が重要なキーポイントと成り得る。日本では、消化器癌(胃、大腸癌など)の罹患数が多い背景から、これまでの皮膚などの表面病変に加え、大気圧プラズマ源利用による消化器へのプラズマ投与方法に関する技術開発と細胞制御及び組織再生の解明とを確立することは、日本におけるナノ及びバイオテクノロジー産業の現状を活性化することになる。

2. 研究の目的

大気圧プラズマ照射の医療応用が世界的に行われている。高齢化により日本では、胃癌、大腸癌を合わせた消化器癌の罹患数と死亡数が多いが、その消化器病変に対して、直接プラズマ照射は不可能である。大腸癌の代表的な治療法には、内視鏡治療、開腹手術や腹腔鏡下手術といった外科治療、薬物療法等がある。大腸癌初期であれば手術で取り除くことが可能であるが、進行していた場合は薬物療法などが選択されるが、その効果はあまり期待できない。そこで、消化器(内臓)病変への新しいプラズマ治療として、プラズマを生理食塩水あるいは、細胞培養液に照射しバブリングさせ、その活性化液による治療法を下記の方法により確立する。

- (1): プラズマバブル液の開発と成分評価。
- (2): 細胞培養液にプラズマ照射したプラズマバブル照射液の正常細胞と大腸癌細胞への影響。
- (3): 大腸癌動物実験モデルでのプラズマバブル液による評価。

3. 研究の方法

(1): プラズマバブル液の開発と成分評価

従来型の大気圧ペンシルプラズマの構造を基に、絶縁円筒の中心にプラズマ生成用電極(直径0.5~1.0mmのタンタル線)を通した同軸構造の大気圧プラズマ生成部を作製した。ガラスキャピラリー(プラズマ発生部の内径: 8mm、先端部の内径: 1mm)内にタングステン線(直径: 1mm)を導入し、外部に筒状グランド電極を設置した同軸状構造とする。キャピラリー先端に10cmのシリコンチューブを装着し、生理食塩水が入ったピーカーにシリコンチューブの先端を入れてプラズマフローでバブリングさせた。プラズマ発生条件は周波数3.0kHz、印加電圧13kV、バブリング時間300秒とした。プラズマはヘリウムガスにより発生させ、ガス流量は1.0L/minである。6mlの生理食塩水に対して大気圧低温プラズマをバブリングし、プラズマ照射水を作製した。照射されたプラズマによって培養液中に生成された分子の一種である、過酸化水素の濃度をデジタルパックテスト(DPM-H2O2、協立理化学研究所、n=7)を用いて測定した。

(2): 細胞培養液にプラズマ照射したプラズマバブル照射液の正常細胞と大腸癌細胞への影響

大気圧低温プラズマが大腸癌に与える影響を調査するため、ヒト結腸腺癌細胞由来である COLO205細胞を用いて大気圧プラズマ照射培地の評価を行った。実験の際には12 well培養容器上に10%FBS含有RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 培地を1 mLずつ添加し、大気圧プラズマ照射装置先端のガラスキャピラリー先端より5mmの距離を置いて照射した。その後、COLO 205細胞を12 well培養容器上に 1.0×10^5 cells/mLずつ播種し、37 °C, CO2濃度5%で培養した。大気圧低温プラズマ(プラズマ発生条件、周波数3.0kHz、印加電圧13kV、パブリング時間300秒) COLO 205細胞に照射し、12、24、48、72時間後に各wellに対して0.5 mLの0.05% Trypsin-EDTA を加えて細胞を遊離した。遊離した細胞を1500rpmで5分間遠心して回収し、血球プラズマが通常細胞の細胞増殖に与える影響を評価した。実験の際には12 well培養容器(ポリプロピレン製: 6cm²/well) 上に10% Fetal Bovine Serum(FBS)(Thermo Fisher Scientific, Inc.) 含有Alpha modification of Eagle's MEM(MEM)(Thermo Fisher Scientific, Inc.) 培地を1 mLずつ添加し、大気圧プラズマ照射装置先端のガラスキャピラリー先端より5 mmの距離を置いて照射した。

TNF- α は腫瘍壊死因子と呼ばれ、細胞に対して侵襲的なダメージが生じた際に速やかに分泌される、最も一般的な生体反応のシグナル伝達物質である。TNF- α は、特にアポトーシスを誘因するので大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地暴露群で測定した。測定方法は、大気圧低温プラズマをCOLO 205細胞に照射し、24、48、72、96時間後に各wellに対して800 μ LのISOGENE (NIPPON GENE Co, Ltd.) を添加し、細胞を回収した。RNAフリー水320 μ Lを加えて15秒間混合し15000 rpmで15分間4 遠心した。上清800 μ Lを回収し、再度15000rpmで遠心した。沈殿に0.5mLのイソプロパノールを1mL添加し、12000rpmで5分4 で遠心した。上清を除去し、70%エタノール1 mLを加えて12000rpmで5分4 で遠心した。エタノールを除去し、沈殿しているRNAに10 μ LのRNAフリー水を加えて懸濁した。回収したRNA 4 μ g、Oligo dTプライマー0.5 μ Lを加え、滅菌水を加えて8.5 μ Lにメスアップし、70 °Cで10分間加温した。氷上で冷却し、SuperScript (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて逆転写反応(25 10 分、42 50 分、72 °C、15分)を行い、cDNAを合成した。得られたcDNAをリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いて遺伝子発現解析を行った。炎症性サイトカインの指標としてTNF- α (Forward: TCCTTCAGACACCCTCAACC, Reverse: AGGCCCCAGTTTGAATTCTT) を、ハウスキーピング遺伝子として *-actin* (Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC, Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG) を用いて測定した(n=6)。

(3) : 大腸癌動物実験モデルでのプラズマバブル液による評価

In vitroからin vivoでの評価も重要であるために、プラズマ照射腸洗浄液を作製して大腸癌モデルラットに使用して大腸癌治療に対する大気圧低温プラズマの有効性を検討した。大腸癌モデルラットの作製では、Apc遺伝子に変異を持つKyoto Apc Deltaラット(KAD、三協ラボサービス、雄性KADラット)にAzoxymethane (AOM、和光純薬工業)とDextran Sodium Sulfate (DSS、和光純薬工業)を投与し作製した(n=6)。大気圧低温プラズマを腸洗浄液に照射しプラズマバブル腸洗浄液を作製しその有効性を検討するため、大腸癌モデルラットに対してプラズマバブル腸洗浄液で洗浄を群(n=6)とプラズマ処置を行っていない洗浄液で洗浄したコントロールラット(n=6)を比較した。さらに、プラズマバブル腸洗浄液を直接尾静脈注射した群(n=6)とプラズマ処置を行っていない洗浄液を尾静脈注射した群(n=6)で比較検討した。

4 . 研究成果

(1) : プラズマ装置の評価として、ヘリウムガスのみとプラズマ発生によるパブリング液の比較

において、硝酸、亜硝酸、過酸化水素が、プラズマ照射水はヘリウムガスのみ照射を行った生理食塩水よりも有意に高い濃度で検出された。また、2時間までの測定ではどの成分においてもプラズマ照射液では減衰しないことが判明した。従って、腸内洗浄後、プラズマ照射水が腸内に滞留している間は硝酸、亜硝酸、過酸化水素は減衰せずに保持されているものと考えられた。結論として、プラズマ照射水においては硝酸、亜硝酸、過酸化水素が生成されることが確認できた。また、それぞれの成分は2時間経過しても減衰しないことが明らかとなった。

(2)：ヒト結腸腺癌細胞 COLO 205 及び正常細胞としてマウス頭蓋冠細胞MC3T3-E1を用いて大気圧低温プラズマ照射培地の暴露による評価を行った実験結果では、プラズマ照射培地での正常細胞では細胞数に変化はなく、プラズマ照射培地による大腸癌細胞で優位に減少していることが確認された。これは、プラズマ照射培地暴露後の12時間、72時間後の比較では、72時間後が優位に大腸癌細胞が減少していた。従って、本研究のプラズマ照射培地使用による癌細胞実験の結果から、現在広く検討が行われている化学療法で正常細胞に対する影響がなく、癌細胞に特異的な治療法の開発がプラズマ照射で可能かもしれないと考えられた。さらに、細胞死の経路を同定するため、*TNF-* の発現量を測定したが、その発現量に変化はなかった。大気圧低温プラズマによる細胞死は*TNF-* によらない機構で生じていることが分かった。今後は細胞死、増殖抑制経路の検討を行っていくとともに、癌細胞に対してより効果の高い照射条件などについても調査を行う。

(3)：大腸癌モデルラットに対してプラズマバブル腸洗浄液で洗浄を行った場合とプラズマ処置を行っていない洗浄液で洗浄したコントロールラットと比較した場合、腫瘍の浸潤度合いは同程度であった。しかし、プラズマバブル腸洗浄液を直接尾静脈注射した群では、プラズマ処理をしていない洗浄液群の比較で腫瘍の浸潤が遅延つまり癌の進展抑制効果が観察された。しかしながら、これらの要因について、プラズマ照射に伴う活性酸素種による殺腫瘍効果及び腫瘍抑制効果があったことが示唆されるが、その機序解明は今後の検討を必要とする結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高橋 玄宇、森 晃	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of atmospheric low temperature plasma on the rat model of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電機学会雑誌	6. 最初と最後の頁 155-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14243/jsaem.30.155	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 高橋 玄宇、奥野 菜々子、森 晃	4. 巻 29
2. 論文標題 大気圧プラズマの照射が培養細胞に与える影響の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本AEM学会誌	6. 最初と最後の頁 118-123
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 Kira Jinno, Takamichi Hirata, Asahi Watanabe, Shinnosuke Hatakeyama, Tomohiro Akiyama, Genu Takahashi, Masaki Kobayashi and Akira Mori	4. 巻 59
2. 論文標題 Extremely weak light emission during the healing process by biophotons emitted from wounds irradiated with atmospheric pressure plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/abb718	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥野 菜々子
2. 発表標題 大気圧低温プラズマ照射溶液が大腸がんモデルラットに与える影響
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥野 菜々子、森 晃
2. 発表標題 大腸癌モデルラットに対する大気圧低温プラズマの影響の検討に向けた プラズマ照射水の成分分析
3. 学会等名 日本AEM学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	小林 千尋 (Kobayashi Tihiro) (00570699)	東京都市大学・理工学部・講師 (32678)	
研究分担者	工藤 美樹 (Kudou Yoshiki) (80241082)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	平田 孝道 (Hirata Takamichi) (80260420)	東京都市大学・理工学部・教授 (32678)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------