

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04003

研究課題名（和文）炎症性腸疾患への治療応用の為のプラズマ照射溶液中の活性種とヒトT細胞への影響調査

研究課題名（英文）Research on Active Species Produced in Plasma Treated Solutions and Their Effect on Human T Cells

研究代表者

寺西 研二（TERANISHI, Kenji）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（理工学域）・准教授

研究者番号：80435403

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プラズマ照射溶液を炎症性腸疾患（IBD）の治療に応用することを最終目標とし、人体に投与可能な生理食塩水に放電プラズマを照射した溶液（プラズマ照射生理食塩水：PTS）がヒトT細胞株（Jurkat細胞）に及ぼす影響とPTS中に生成される化学活性種について調査した。各種放電ガスを用いた際にPTS中に生成される化学活性種を明らかにするとともに、PTSに曝露したJurkat細胞は初期アポトーシスを經由して細胞死に至ることなどを明らかにすることができ、本研究を通してプラズマ照射溶液がJurkat細胞に及ぼす影響の機構に迫ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人体に投与可能な生理食塩水にプラズマを照射した際に生成される活性種の特性和同生理食塩水が免疫細胞に及ぼす影響を調査することは、プラズマ照射溶液を炎症性腸疾患の治療に応用する上で極めて重要である。本研究を通して明らかになった各種放電ガスを用いて生成したプラズマ照射生理食塩水（PTS）中の化学活性種の濃度特性については、化学活性種と細胞影響の関係を今後より詳細に検討する際の重要な基礎データになり得る。また、PTSに曝露したJurkat細胞が初期アポトーシスを經由して細胞死に至る結果は、PTSにより免疫細胞の活性を制御できる可能性を示唆しており、この点についても今後より詳細な検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effects of physiological saline solution treated by discharge plasma (referred to as plasma-treated saline (PTS) solution) on a human T-cell line (Jurkat cells) and chemical active species produced in the PTS solution were investigated for the final objective of applying the plasma treated solution to the therapy of the inflammatory bowel disease (IBD). Chemical reactive species produced in the PTS solution using several kinds of discharge gases were clarified. Also, it was found that Jurkat cells exposed to the PTS solution resulted in the cell death via early apoptosis. Through this study I was able to approach the mechanism of the effect of the PTS solution on Jurkat cells.

研究分野：放電プラズマ工学

キーワード：放電プラズマ 炎症性腸疾患 活性酸素種 活性窒素種 ヒトT細胞 プラズマ照射溶液

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の指定難病である炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病に大別され、その患者数は近年急増の傾向を示している。現時点で根治療法が未確立であるため、薬物療法を中心に寛解に向けた長期治療が行われているが、ステロイド剤の副作用や TNF- 抗体製剤の薬価が高いなどの問題があり、経済的負担や精神的苦痛も多大である。このような IBD の根治療法は未確立であるが、腸内細菌に対する異常な免疫応答が同疾患の発症の主要因であると言われている。従って、腸内細菌に対する免疫応答の制御が、安全で低コストかつ簡便な方法で実現できれば、患者は少ない経済的負担で本疾患の長期寛解を維持できることから、病的・精神的苦痛からも解放され、患者の QOL 向上が期待できる。

近年、放電プラズマを様々な疾患の治療に活用する「プラズマ医療」に関する研究が盛んに行われている。中でも、大気圧低温プラズマのがん細胞に対する抗腫瘍効果が注目され、大気圧低温プラズマの照射が、卵巣がん培養細胞を選択的に殺傷することや、プラズマを照射した培養液が脳腫瘍培養細胞を選択的に殺傷する効果などが報告されている。このような大気圧低温プラズマの各種がん細胞に対する抗腫瘍効果は、がん細胞だけでなく他の様々な細胞に対しても適用できる可能性を示唆しており、放電プラズマの様々な疾患の治療への応用に向けた基礎研究が行われている。このような中で、研究代表者は放電プラズマの IBD への治療応用を目指した基礎研究を行ってきた。最終的には、放電プラズマを照射することで生成された化学活性種を含む溶液を IBD 患者体内に投与し、血液中の過剰な免疫細胞に対してアポトーシスを誘導することにより、腸内細菌に対する異常な免疫応答を制御し、本疾患の長期寛解を維持する治療法の確立を目指している。本治療法の実現には、プラズマ照射溶液に含まれる化学活性種の特性と、同溶液を免疫細胞に投与した際のアポトーシス誘導とその制御の可否について調査することが極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人体に投与可能な生理食塩水などに放電プラズマを照射し、生成される化学活性種の特性について明らかにするとともに、同溶液をヒト T 細胞株 (Jurkat 細胞) に投与した際のアポトーシス誘導の可否に加え、プラズマ照射溶液による細胞影響のメカニズムに迫ることで、IBD の新しい治療法の実現に向けた研究を推進することである。

3. 研究の方法

(1) プラズマ照射生理食塩水 (PTS) の生成方法

図 1 は本研究で使用した生理食塩水へのプラズマ照射装置である。本装置は 2 本の異なる内径を有する試験管から構成され、これらが同軸に配置されている。大口径の試験管内には 16 mL の 0.9w/v%生理食塩水(生理食塩液 大塚生食注, (株)大塚製薬工場)を入れ、その液面から 3 mm 上に小口径の試験管の底部が来るように配置した。小口径の試験管内の底部にはハンダが充填され、ここに交流高電圧を印加することで、小口径試験管底部と生理食塩水液面との間で誘電体バリア放電が発生する。プラズマ生成用の電源には、直流電源 (KX-100H, (株)高砂製作所) とインバータネオトランス (CR-N16, (株)小寺電子製作所) を使用し、10 kVp-p, 周波数 12 kHz の正弦波交流高電圧を高電圧電極に印加した。放電ガスにはアルゴンガス(ガス流量: 1 L/min) を使用し、生理食塩水へのプラズマ照射時間を 15 分とした。本研究では、上述した装置と方法により放電プラズマを照射した生理食塩水をプラズマ照射生理食塩水 (PTS) と呼称し、以下に述べる方法で Jurkat 細胞に曝露し、PTS が Jurkat 細胞に及ぼす影響等について調査した。

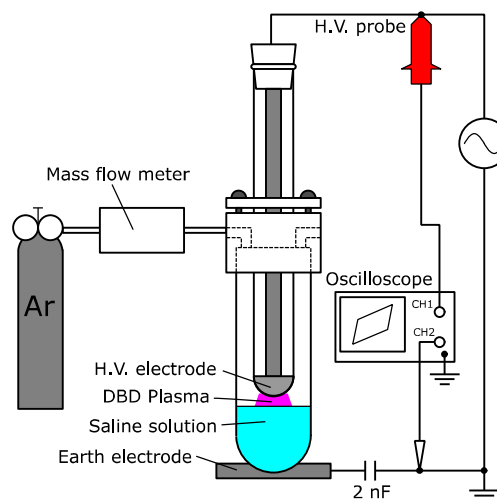


図 1 プラズマ照射装置

(2) PTS が Jurkat 細胞に及ぼす影響の調査

本研究では、自己免疫細胞のモデルとしてヒト白血病由来 T 細胞株 (Jurkat 細胞, RBC0806) を使用した。細胞数を調整した Jurkat 細胞に PTS を 5 mL 投与し、30 分間インキュベータ内で保管することで PTS に曝露した。曝露終了後には、遠心分離機を用いて細胞と PTS を分離し、PTS を取り除いたあと新鮮な液体培地 (RPMI 1640 培地 + 10% FSB) に懸濁して最大 30 時間培養した。

細胞生存率の調査にはトリパンブルー染色法を用いた。トリパンブルー染色液で染色した細

胞を血球計算盤内に導入し、位相差顕微鏡を用いて生細胞数と死細胞数を計数した。細胞生存率 α は次式より求めた。

$$\alpha = \frac{N_L}{N_L + N_D} \times 100 (\%)$$

ここで、 N_L と N_D はそれぞれ生細胞数と死細胞数である。

アポトーシス検査では、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (556547, BD Pharmingen) を用いて染色した細胞をフローサイトメータ (FACSVerse 651154, BD biosciences) により解析した。

(3) PTS 生成時のプラズマの発光解析

図 1 の装置を用いて PTS を生成している際の放電発光について、発光分光測定と時間分解写真撮影を行った。発光分光測定には、マルチチャンネル分光器 (Fastvert S-2431, (株)相馬光学) を使用した。測定範囲波長は 200 から 800 nm、露光時間と積算回数をそれぞれ 400 ms と 5 回とした。放電発光の時間分解写真撮影には、高速度 ICCD カメラ (C6653, 浜松ホトニクス (株)) を用いて撮影し、得られた画像は USB 画像入力ユニット (MTCB-D500, マイクロ・テクニカ (株)) を介してパソコンで記録・解析した。

(4) Ar-N₂, Ar-Air を放電ガスとした際の活性酸素・窒素種 (RONS) の検出

図 1 の装置の放電ガスにアルゴンガスと窒素、あるいはアルゴンガスと空気の混合ガスを用い、PTS を放電処理した際の活性酸素・窒素種 (RONS) の生成特性について調査を行った。混合比率はアルゴン 80% に対して窒素あるいは空気を 20% とし、Ar-N₂ と Ar-Air の 2 種類の混合ガスについて実験を行った。実験に使用した生理食塩水、放電処理時間 (15 分)、電極間距離 (3 mm)、放電ガス流量 (1 L/min) などの実験条件は (1) 節と同じである。本実験において活性酸素種 (H₂O₂) と活性窒素種 (NO₂⁻, NO₃⁻) の測定には、パックテスト (WAK-NO₂, WAK-NO₃, (株)共立理化学研究所) とデジタルパックテスト・マルチ (DPM-MT, (株)共立理化学研究所) を使用した。

4. 研究成果

(1) PTS に曝露した Jurkat 細胞の細胞生存率

Jurkat 細胞を PTS に 30 分間曝露した後、3 から 30 時間培養した際と同細胞の生存率を調査した結果、プラズマ照射していない生理食塩水に曝露した Jurkat 細胞の生存率 (PSS Control) の減少は殆んど見られないのに対し、PTS に曝露した Jurkat 細胞の生存率は培養 3 時間後から減少し、21 時間後には 33.7%、30 時間後には 28.2% まで低下した。これらの結果から、PTS に曝露された Jurkat 細胞はその後の培養において細胞死を引き起こすことがわかった (図 2)。

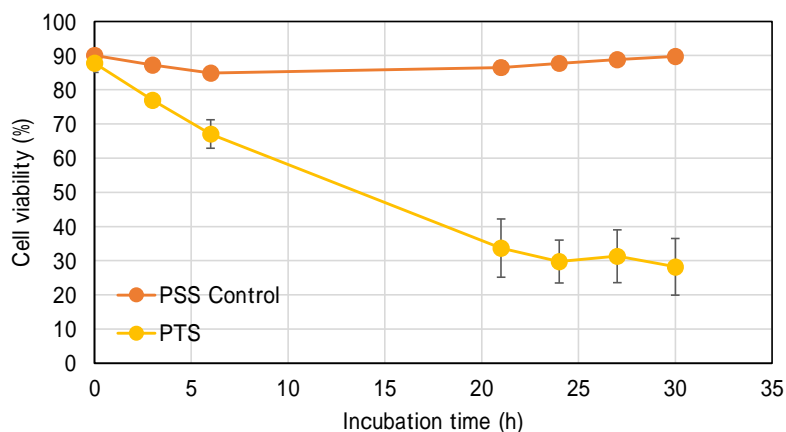


図 2 培養時間に対する Jurkat 細胞の生存率の変化

(2) PTS に曝露した Jurkat 細胞に対するアポトーシス検査

図 2 より、PTS に曝露した Jurkat 細胞は細胞死を引き起こすことが明らかになったが、細胞死の詳細を調査するために、PTS に曝露した Jurkat 細胞を 3 時間、6 時間、24 時間培養した後、アポトーシス検査を実施したところ、3 時間培養した時点で PTS に曝露した Jurkat 細胞において初期アポトーシスを引き起こした細胞の割合が増加し、培養 6 時間後には初期アポトーシスの割合はさらに増加するとともに死細胞の割合も増加した。培養 24 時間後には、初期アポトーシスの割合は減少し、死細胞の占める割合が大きくなった。これらの結果から、PTS に曝露された Jurkat 細胞は初期アポトーシスを経由して細胞死に至ることが予想される (図 3)。

また、PTS の化学特性として、溶液の pH、導電率、過酸化水素濃度、塩化物イオン濃度について調査したところ、表 1 の結果を得た。同表より、溶液の pH は生理食塩水へのプラズマ照射の有無にほとんど影響を受けないこと、電気伝導率はプラズマ照射により若干増加すること、PTS 中には 6.4 mg/L 程度の過酸化水素が生成され、プラズマ照射により生理食塩水中の塩化物イオン濃度は減少することがわかった。

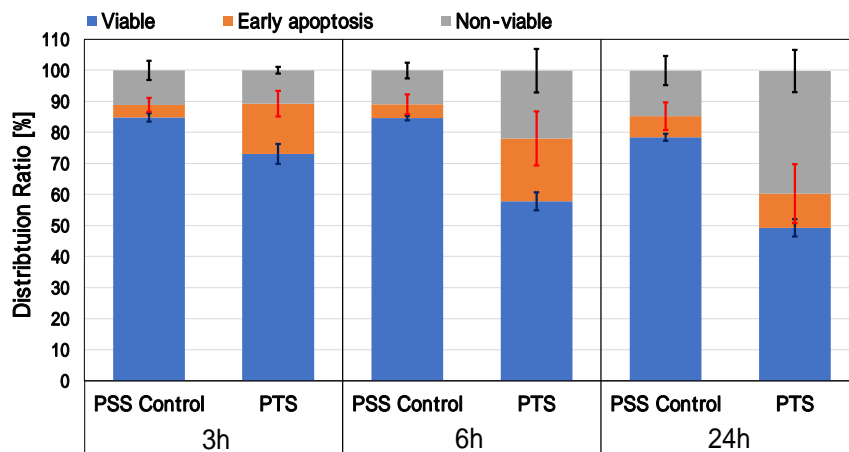


図3 アポトーシス検査の結果

表1 PTSの化学特性

	プラズマ処理前	処理後1分	処理後2分	処理後7分
pH	5.65±0.4	5.76±0.3		5.58±0.2
電気伝導率 (mS/cm)	14.67±0.04	15.14±0.08		15.08±0.03
過酸化水素濃度 (mg/L)			6.4±0.2	6.4±0.2
塩化物イオン濃度 (g/L)	6.7±0.5		5.4±0.4	5.5±0.6

(3) PTS生成時のプラズマの発光解析

PTS生成時のプラズマの発光スペクトルをマルチチャンネル分光器により測定した結果、309 nm にピークを有するOHラジカルからの発光に加え、697 nm から795 nm の波長範囲に多数のアルゴンからの発光ピークが観測された。この結果から、PTS中で検出された過酸化水素は、プラズマ中あるいは気液界面で生成されたOHラジカルの再結合により形成されたものと予想される。なお、同様の分光測定を純水に対して行ったところ、全体の発光強度は弱くなったものの、観測される発光スペクトルのピーク波長に違いは見られないことから、プラズマ中で生成される種 (species) については、塩化ナトリウムの有無による違いはないものと予想される (図4)。

PTS生成時のプラズマからの発光を高速ICCDカメラで時間分解したところ、小口径の試験管底部表面に強いプラズマ発光と、生理食塩水表面に向かって発生する筋状のプラズマ発光が

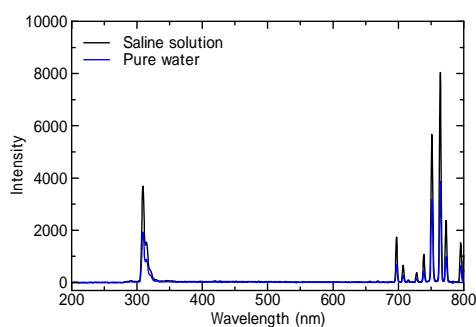


図4 プラズマの発光スペクトル

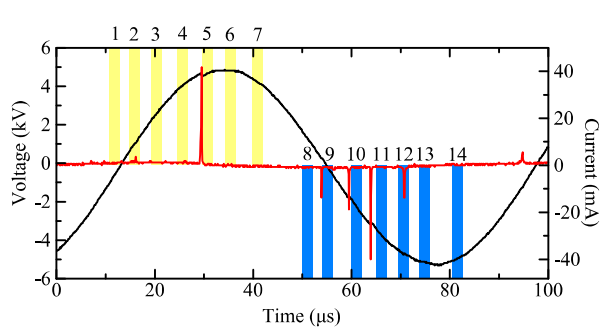


図5 電圧・電流波形と画像撮影タイミング

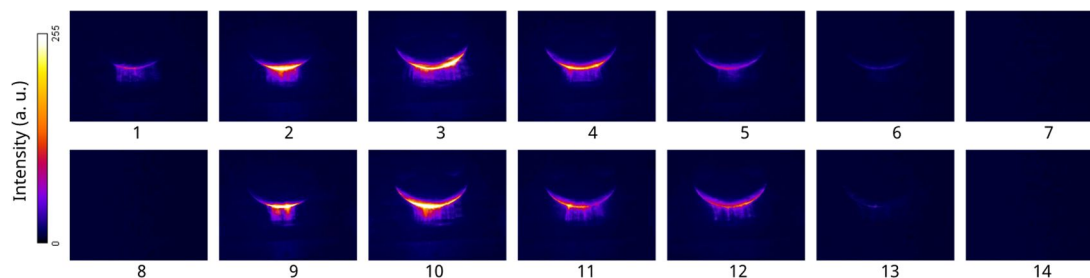


図6 プラズマ発光の時間分解画像

観測され、これらは特に印加正弦波電圧波形が正と負に立ち上がる時間で強く発光することがわかった(図5, 図6)。

(4) Ar-N₂, Ar-Air 混合ガスを放電ガスとした際の活性酸素・窒素種 (RONS) の検出

放電ガスにアルゴンと窒素 (Ar-N₂) の混合ガスならびにアルゴンと空気 (Ar-Air) の混合ガスを用いて PTS を生成し、PTS 中の過酸化水素濃度、亜硝酸イオン濃度、硝酸イオン濃度について調査したところ (図7), 両混合ガスともに過酸化水素が検出され、放電電力の増加に伴いその濃度は増加した。一方、亜硝酸イオン濃度については、Ar-N₂ 混合ガスでは放電電力の増加にともない増加するのに対し、Ar-Air 混合ガスでは放電電力 2.5 W 以上になると減少する特性を示した。これは Ar-Air 混合ガスにおいて硝酸イオン濃度が放電電力 2 W 付近から急増することを考慮すると、亜硝酸イオンがオゾンにより酸化され、硝酸イオンに変換されたことで減少したものと予想される。なお、Ar-N₂ 混合ガスで生成した PTS 中において、硝酸イオンは不検出となったことから、これらの混合ガスを使い分けることで、PTS 中での硝酸イオンの生成の有無を制御できる可能性があることから、今後はこの特性を活性窒素種の細胞影響の調査に活用したいと考えている。

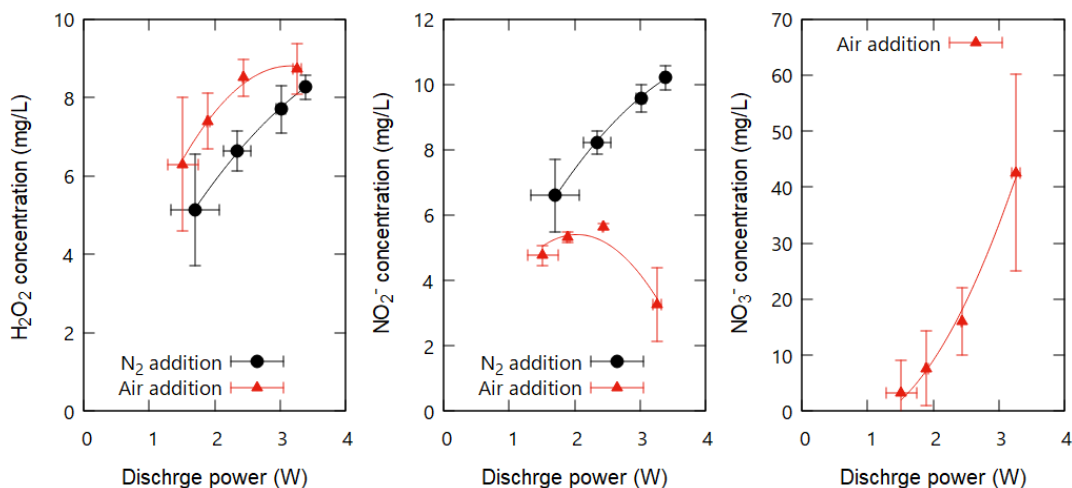


図7 Ar-N₂ と Ar-Air 混合ガスにより生成した PTS 中の活性酸素・窒素種の濃度

<引用文献>

岡本 隆一：日本臨床免疫学会誌，Vol. 40，No. 4，p.258 (2017)

田中 宏昌，水野 正明，豊國 伸哉，丸山 彰一，小寺 泰弘，吉川 史隆，堀 勝：福岡医誌，Vol. 106，No. 4，pp. 71-76 (2015)

(独)日本学術振興会第153委員会：プラズマ材料科学スクール資料「プラズマ医療の基礎と応用」，平成28年2月8日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eiji Oyama, Akihiro Shirai, Tadahiko Nakagawa, Masahiro Sogabe, Toshiya Okahisa and Kenji Teranishi
2. 発表標題 Effects of Physiological Saline Solution Treated by Ar Dielectric Barrier Discharge on Proliferation of Jurkat Cell
3. 学会等名 74th Annual Gaseous Electronics Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大山 永治, 立石 義憲, 中川 忠彦, 白井 昭博, 曾我部 正弘, 岡久 稔也, 寺西 研二
2. 発表標題 アルゴン誘電体バリア放電を照射した生理食塩水に曝露した Jurkat 細胞の生存率
3. 学会等名 令和3年 電気学会 基礎・材料・共通部門大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近清唯人, 中川忠彦, 白井昭博, 曾我部正弘, 岡久稔也, 寺西研二
2. 発表標題 誘電体バリア放電を生理食塩水に照射した際に生成される活性酸素・窒素種の生成特性
3. 学会等名 令和6年電気学会全国大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学 / 教育研究者総覧
<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/155803/profile-ja.html>
 徳島大学 / 教育研究者総覧 --- 寺西 研二
<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/155803/work-ja.html>

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	白井 昭博 (SHIRAI Akihiro) (40380117)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	岡久 稔也 (OKAHISA Toshiya) (60304515)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授 (16101)	
研究分担者	曾我部 正弘 (SOGABE Masahiro) (60732790)	徳島大学・キャンパスライフ健康支援センター・教授 (16101)	
研究分担者	中川 忠彦 (NAKAGAWA Tadahiko) (40634275)	島根県立大学・看護栄養学部・講師 (25201)	

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
---------	---------