

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420220

研究課題名(和文) 超短パルス高電界がん治療法のための分散性非線形パルス形成線路での電磁波生成と効果

研究課題名(英文) Radiation of electromagnetic wave by dispersive nonlinear pulse formation line for cancer treatment method by ultra-short pulse high electric field and its effect

研究代表者

南谷 靖史 (Minamitani, Yasushi)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10323172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞にナノ秒パルスパワーによる高電界強度を印加することで、がん細胞にアポトーシスを引き起こすことができることが最近の研究で明らかになっている。これまでパルス電磁波発生装置にはLC反転回路を使用してきたが、出力されるバーストパルスの持続時間が短く、細胞に与えられるエネルギーが少ないという問題点があった。そこで本研究では、磁気スイッチを用いた非線形伝送線路を導入し、持続時間が長くかつ高電圧のバーストパルスを出力できる装置を検討した。ここでは細胞への電界印加のための線路の回路素子の最適化および高周波化を行った。そして細胞にバーストパルスを印加し効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：The cancer treatment by an ultra-short pulse high electric field is one of new biological applications. It is shown that cancer is able to be treated by nanosecond pulsed high electric field. This work focuses on the development of a high power nanosecond pulsed electromagnetic wave generator for the cancer treatment and effect on cancer cells by the developed apparatus. We have developed a pulsed power generator that outputs the multiple pulses continuously by a NLTL (Nonlinear Transmission Line) using magnetic switches. The NLTL makes the pulse train by delaying the propagation of the pulse through the magnetic switch of each ladder. In this study, we have carried out optimization of the transmission line and higher frequency. In addition, high power burst pulses made by the developed apparatus up to 5 ladder stages have been applied to the cancer cells. Here, we have used HeLa-S3 that is subspecies of human cervical cancer as the cancer cell.

研究分野：パルスパワー工学

キーワード：非線形伝送線路 磁気スイッチ バーストパルス がん治療 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

がんは細胞がDNAの異常によりアポトーシス(異常をきたした細胞が自己の所属する生体を守るために起こす自殺現象)を自発的に行えなくなり、異常細胞が死なずに増殖して発生する。

高等生物の細胞、真核細胞はDNAが核膜で覆われていて、さらに核膜を細胞膜が覆う二重構造になっている。核膜も細胞膜も電気抵抗が大きく、細胞全体を簡単な電気等価回路で表すと核膜、細胞膜をコンデンサ、核質、細胞質を抵抗で表すことができる。等価回路の細胞に印加する電界の周波数を変化させると細胞膜と核膜とで電圧分布が変化する。細胞に印加する電圧は周波数が低い場合にはほとんどが細胞膜にかかるが、電界の周波数を高くすると静電容量の大きな細胞膜にかかる電圧は減少し、核膜に電圧がかかるようになる。さらに周波数を高くすると細胞膜にも核膜にも電圧はかからなくなり、細胞質に大きな電流が流れることで印加電圧が保たれる。このように電界の周波数を変えることで細胞内の電界分布を制御でき、異なる導電率と誘電率を有する細胞内の任意の組織に局所的な電界を印加することが可能になる。ナノ秒幅のパルス電圧は数百MHzの周波数成分を持つ。この超短パルス高電界を細胞に印加すると細胞内の細胞小器官に直接電界が作用し、細胞にアポトーシス作用を誘発できることがアメリカで確認されている。数十ナノ秒の高電界パルスをマウスの腫瘍に印加して、実際にがんが治癒することも示されている。

2. 研究の目的

患部に電界を印加する一番単純な方法は針電極を患部まで突き刺し電界を供給する方法であり、アポトーシス誘導検証実験では使われているが、臓器等の複雑な部位への電界供給が難しい。そこでアンテナで放射した高強度パルス電磁波を、集束板で患部にスポット集束することで高電界を患部に印加する方法が提案されている。しかし治療に必要な周波数と電界強度が得られる高強度高周波バーストパルス電磁波放射装置は存在しないため、細胞への高強度の高周波パルス電磁波印加実験は行うことができない。そこで本研究では患部に高電界パルスを印加できる高強度高周波バーストパルス電磁波放射装置の研究を行い、細胞へのパルス電磁波による高電界印加実験を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1) 高出力高周波バーストパルスを出力する非線形パルス形成線路の検討

当初は分散性の非線形パルス形成線路を用いる予定であったが、パルスの出力電圧に対する振幅の割合が大きくとれないことが判明したため、非線形パルス形成線路を用い

た高出力高周波パルス発生回路を検討した。非線形パルス形成線路とは可飽和リアクトルとCのはしご型線路の等価回路構成となっている。この回路は方形波を生成するパルス形成線路のはしご型回路のインダクタを磁気スイッチで構成することで、フェライトコアの持つ非線形性により格段の波形が重ね合わさらないようにして振動波を出力する原理である。これにより連続した高周波波形が出力できる。

(2) 高周波バーストパルス高電界の Hela 細胞への影響

製作した装置を用いがん細胞である Hela-S3 細胞への影響について調査した。Hela 細胞への影響はPI染色法による細胞死の観察とTUNEL法によりDNAの断片化を解析することで、アポトーシスの徴候を観測した。

4. 研究成果

(1) 磁気スイッチ型非線形パルス形成線路の開発  
概要

我々の研究室においてはこれまでパルス電磁波発生装置の出力にはLC振動回路を使用してきた。しかしこの装置はバーストパルスの持続時間が短く、すぐ減衰してしまい、1回のパルスで細胞に与えられるエネルギーが少ないという問題があった。そこで伝送線路型パルス形成回路に磁気スイッチを組み合わせた磁気スイッチ型非線形伝送線路(NLTL:Non-Linear Transmission Line)を考案した。この装置はNLTLの各コンデンサにより出力されるパルスのタイミングを磁気スイッチで遅らせることで回路に組み合わせたLC段数分のパルスを連続で出力でき、長時間持続可能なバーストパルスを出力する回路である。本研究では磁気スイッチ型NLTLを用いたバーストパルス発生装置を製作し、出力電圧波形を確認した。そしてNLTLの特性を調べるため、回路のパラメータを変更して出力特性を調べた。

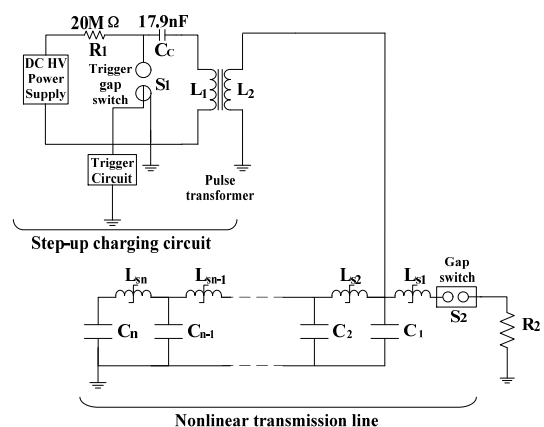


図1 磁気スイッチ型非線形伝送線路バーストパルス発生装置

## 磁気スイッチ型非線形伝送線路を用いた高周波バーストパルス発生装置

### 1.1 回路構成及び動作

高周波バーストパルス発生装置の回路図を図1に示す。回路は昇圧充電回路、磁気スイッチ型 NLTL で構成されている。昇圧充電回路は直流高圧電源、充電抵抗  $R_1$ 、充電用コンデンサ  $C_C$ 、トリガトロンギャップスイッチ  $S_1$ 、トリガ回路および昇圧用のパルストランス(5:20)から構成されている。 $R_1$  は  $C_C$  への充電用の抵抗で抵抗値は  $2M$  である。また  $C_C$  の静電容量は  $17.9nH$  である。NLTL は LC 梯子型パルス形成回路と磁気スイッチを組み合わせたパルス形成回路であり、コンデンサ  $C_n$  と磁気スイッチ  $L_{sn}$  で梯子型回路を構成している。また  $R_2$  はパルス電界印加負荷の模擬抵抗である。 $L_{sn}$  のコアおよび巻き数、 $C_C$  の静電容量、 $L_{sn}$  と  $C_C$  の組み合わせ段数、模擬抵抗  $R_2$  は実験に応じて適宜変更した。

この装置の動作原理について説明する。まず直流高圧電源により  $R_1$  を通して1次側コンデンサの  $C_C$  を充電し、トリガ回路を動作させることでトリガトロンギャップスイッチが導通し、 $C_C$  が昇圧用トランスを通して放電され、昇圧された電圧が2次側に印加される。パルストランスにより昇圧された電圧は磁気スイッチ型 NLTL に供給される。供給された電圧は NLTL の磁気スイッチを  $L_{s2}$  から  $L_{s1}$  まで順に左方向へ飽和しながら  $C_1$  から  $C_n$  を充電する。回路の全ての  $C_n$  が充電されるとギャップスイッチ  $S_2$  が導通し、 $C_1$  より負荷へパルスの伝搬が行われる。この時  $C_1$  と  $C_2$  の間に電位差を生じて磁気スイッチに電圧が印加されることで強磁性体コアの磁束密度が飽和状態に遷移する(磁気飽和)。強磁性体コアが磁気飽和すると、コイルのインダクタンスは空芯コイル同様に非常に小さな値となり  $C_1$  と  $C_2$  の間は導通し、 $C_2$  からパルスが伝搬する。すなわち磁気スイッチの磁気飽和に時間を要することで  $C_2$  のパルスが遅れて伝搬される。この動作が  $C_n$  のコンデンサまで行われることで NLTL に組み合わせた LC 段数分の独立したパルスを連続で出力することができる。図2に非線形伝送線路の各段コンデンサでのパルス波形の概略を示す。

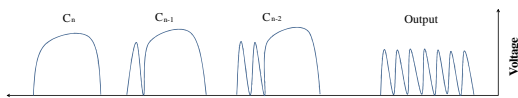


図2 磁気スイッチ型 NLTL コンデンサパルス波形概略

### 1.2 LTspice によるシミュレーション

NLTL を作製する前に回路シミュレーションソフトである LTspice を利用して回路動作のシミュレーションを行った。シミュレーションより NLTL 内でのバーストパルスの形

成過程を確認した。

### 2.1 非線形伝送線路を模擬した回路構成

シミュレーションに用いた NLTL の回路図を図3に示す。回路素子には直流電圧源、コンデンサ、インダクタ、電圧制御スイッチを使用した。電圧制御スイッチはスイッチ端子と電圧入力端子をもっており、スイッチ部はデフォルトでスイッチが閉じている時のオン抵抗は  $1$  である。今回、磁気スイッチは

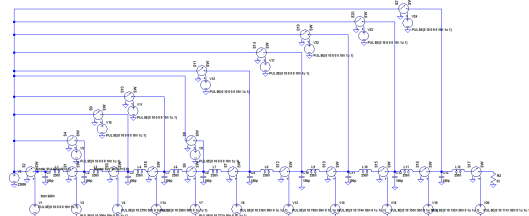


図3 LTspice での磁気スイッチ型非線形伝送線路模擬回路

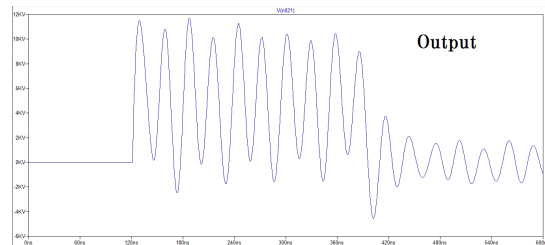


図4 LTspice による出力波形

インダクタとこの電圧制御スイッチを用いて構成した。回路はコンデンサと磁気スイッチを模擬したインダクタおよび電圧制御スイッチを梯子状に多段に組み合わせた構成となっている。またコンデンサに別の電圧制御スイッチを接続することで全てのコンデンサへの初期充電値を制御している。磁気スイッチに見立てたインダクタと電圧制御スイッチはスイッチの遅延時間を設定することでパルスの出力を任意の時間で遅らせることが可能である。

今回はコンデンサ  $C$  とインダクタ  $L$  の組み合わせ段数を  $10$  段とし、各素子の値を  $C=190pF$ 、 $L=230nH$ 、 $R=33$  とした。またこのとき出力されるパルスの周期は  $T=41.54ns$  であるため、パルスの半周期分の時間である  $21ns$  をスイッチの遅延時間と設定した。以上の条件で入力電圧を  $22kV$  とした場合の回路動作のシミュレーションを行った。

### 2.2 シミュレーション結果

シミュレーションにより出力された電圧波形を図4に示す。出力電圧波形より  $10$  個の連続したパルスが出力されている。またこのときの最大電圧は  $11.5kV$  となっており出力が減衰しないほぼ同等(最少電圧  $10kV$ )のパルスが生成されている。パルス電圧は入力電圧 ( $22kV$ ) の半分となってしまうがこれはパルス形成回路における伝搬現象によるものである。また、パルスの振幅に差が

生じているのはスイッチのオン抵抗によるものである。シミュレーション結果よりスイッチによりパルスの伝搬に遅延を生じさせることで入力電圧に対して電圧値が半分の減衰のない LC 段数分の連続したパルスを出力することが可能なことが分かった。

### 非線形伝送線路による高周波バーストパルス発生

シミュレーション結果からスイッチング動作によりパルスの伝搬に遅延を生じさせることで単パルスの連続出力が可能であることが分かった。そこで、実際に磁気スイッチ型 NLTL を作製し、高周波バーストパルス発生回路の出力パルス電圧の調査を行った。

#### 1. 非線形伝送線路の設計

磁気スイッチの巻き数を変更し、実験を行うにあたり各巻き数の磁気スイッチを用いた場合の NLTL の理論値を求めることとした。NLTL の回路素子はシミュレーションと同じで、コンデンサ  $C_0$  を 190pF とした。NLTL の磁気スイッチに用いるフェライトコアを Fair-Rite:43Material (61 × 12.7 × 35.5) とし、コイルの巻き数を 2, 4, 6, 8, 10 回巻とした場合のインダクタンスを以下の式で求めた。

$$L = \frac{k \times \mu_0 \times \pi \times a^2 \times N^2}{l} \quad (1)$$

ここで  $\mu_0$ : 真空の透磁率,  $a$ : コイルの半径,  $l$ : コイルの長さ,  $N$ : コイルの巻き数,  $k$ : 長岡係数である。磁気スイッチの巻き数に対する回路のパラメータを求めると表 1 のようになった。

表 1 非線形伝送線路の定数

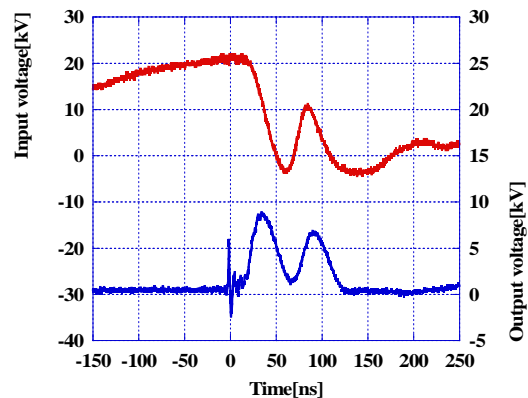
|                             | 2回巻    | 4回巻    | 6回巻    | 8回巻    | 10回巻   |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| コイルの半径a[mm]                 | 6.4    | 6.4    | 6.4    | 6.4    | 6.4    |
| コイルの長さl[mm]                 | 6.4    | 12.8   | 19.2   | 25.6   | 32     |
| 長岡係数k                       | 0.5311 | 0.6884 | 0.7699 | 0.8181 | 0.8499 |
| インダクタンスL[nH]                | 53.68  | 139.15 | 233.43 | 330.74 | 429.45 |
| 特性インピーダンスZ <sub>0</sub> [Ω] | 16.81  | 27.06  | 35.05  | 41.72  | 47.54  |
| 負荷抵抗R <sub>L</sub> [Ω]      | 17     | 25     | 33     | 50     | 50     |
| 共振周波数f[MHz]                 | 49.84  | 30.95  | 23.9   | 20.08  | 17.62  |

#### 2. 実験方法及び結果

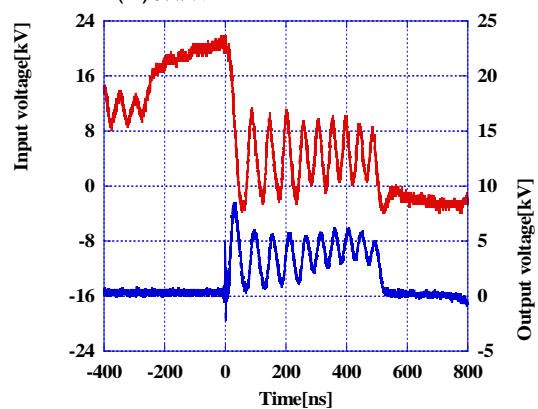
実験回路を図 1 に示す。表 1 より磁気スイッチにフェライトコア (Fair-Rite: 43Material, OD61 × W12.7 × ID35.5) を 1 個 6 回巻とした場合、飽和後のインダクタンスは計算より 233.43nH である。これより負荷抵抗  $R$  は 33 とした。NLTL に入力する電圧は 22kV とし、LC の組み合わせ段数を 2~10 段と変更した場合の出力電圧波形の測定を行った。

NLTL の LC 組み合わせ段数を 2 段, 10 段と変化させた場合の入出力電圧波形を図 5 に示す。図 5 より LC 組み合わせ段数が 2 段の場合では 2 個のパルスが出力し、LC 組み合わせ段数が 10 段の場合では 10 個のパルスが出力していることが分かる。また、出力波形のパルス電圧は入力波形のパルス電圧の半分となった。この結果より、磁気スイッチを用い

ることでシミュレーションと同様にパルスの伝搬に遅延が生じ、LC 組み合わせ段数分の連続したパルスを出力できた。



(a) 段数 2



(b) 段数 10

図 5 磁気スイッチ型非線形伝送線路の入出力波形

### (2) 発生パルスの高周波、高電圧化およびがん細胞への印加

#### 概要

この装置は線路の LC 段数分の独立したパルスを連続で出力することが可能であるが、周波数が 20 MHz 程度までしか上がらない問題点があった。そこで同軸状に装置を形成することで回路のインダクタンス成分及びコンデンサ成分を小さくし 100 MHz 以上の周波数を出力できるよう、装置の改良を行った。さらに作製した装置を実際に HeLa-S3 細胞へ印加し、HeLa 細胞への影響を調査した。

#### 磁気スイッチ型非線形伝送線路を用いた高周波バーストパルス発生装置

図 6 (a), (b) にそれぞれ LC 段数を 2 段に形成した場合の出力電圧波形及び周波数スペクトル, 図 6 (c), (d) に 3 段に形成した場合の出力電圧波形及び周波数スペクトル, 図 6 (e), (f) に 3 段に形成した場合の出力電圧波形及び周波数スペクトルをそれぞれ示す。この場合 C1 から C6 の充電電圧は 34 kV である。

図の結果は、一般的に細胞核に作用しアポトーシスを誘発できると言われている 100 MHz より高い周波数を得ることが出来ている。

そこで実際ががん細胞へのパルス印加を試みた。

## HeLa 細胞への印加実験

### 1 印加条件

実験ではヒト子宮がんの亜種である HeLa-S3 を供試細胞とした。印加条件は、電界強度が低く印加回数が少ない条件 1 と、電界強度が高く印加回数が多い条件 2 の 2 パターンで実験を行った。

印加条件 1 と 2 の詳細をそれぞれ表 2, 3 に示す。

### 2 実験結果

#### 2.1 印加強度の違いによる細胞死の観測

表 2 印加条件 1

| 印加条件 1         | 周波数      | 周波数     |
|----------------|----------|---------|
|                | 130[MHz] | 30[MHz] |
| 電界強度[kV/cm]    | 50       | 30      |
| 印加回数[shot]     | 200      | 20      |
| 印加繰り返し周波数[pps] | 1        | 1       |
| バーストパルス段数      | 1, 5     | 1, 5    |

表 3 印加条件 2

| 印加条件 2         | 周波数      | 周波数     |
|----------------|----------|---------|
|                | 130[MHz] | 30[MHz] |
| 電界強度[kV/cm]    | 100      | 40      |
| 印加回数[shot]     | 500      | 200     |
| 印加繰り返し周波数[pps] | 3        | 1       |
| バーストパルス段数      | 1, 5     | 1, 5    |

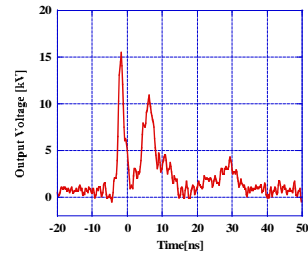
図 7 に 30 MHz, 図 8 に 130 MHz のパルス電界を細胞へ印加した細胞死の割合を表したものをそれぞれ示す。図 7 より, 30 kV/cm, 20 shots(印加条件 1)では, 印加後細胞死の割合が 1 段及び 5 段でそれぞれ 1.53%, 10.3%と死亡率が低い, 40 kV/cm, 200 shots(印加条件 2)では印加後細胞死の割合が 1 段及び 5 段でそれぞれ 69.8%, 75.2%となり, 細胞死の割合は高くなっている。図 8 から同様に 50 kV/cm, 200 shots(印加条件 1)では細胞死の割合は低い, 100 kV/cm, 500 shots(印加条件 2)では細胞死の割合は高くなっている。

これらの結果より, 表 3 の条件では印加強度が強すぎ細胞のほとんどに印加時に致死影響を与え, ネクローシスを起こしていることが推測される。一方, 表 2 の条件では 12 時間経過してもあまり細胞死を起こしていないため, 印加強度が弱すぎたと考えられる。

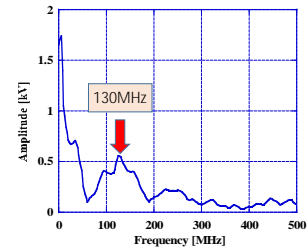
以上より, 今後はこの間の印加条件を詳しく調べていくことで, がん細胞にアポトーシスを引き起こす印加条件を明らかにすることが出来ると考えられる。

### (3) おわりに

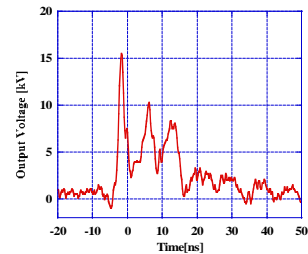
NLTL を用いた高周波バーストパルス発生



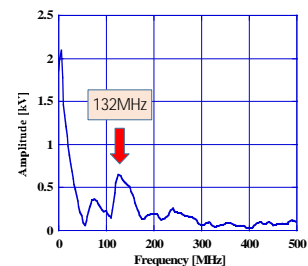
(a) 2 段 NLTL の出力電圧波形



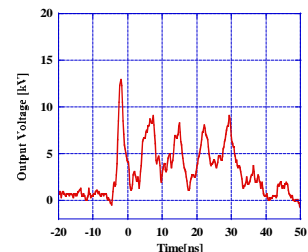
(b) 2 段 NLTL の周波数スペクトル



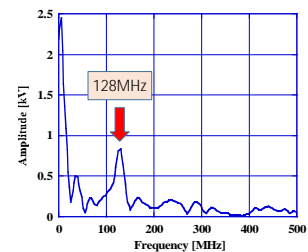
(c) 3 段 NLTL の出力電圧波形



(d) 3 段 NLTL の周波数スペクトル



(e) 5 段 NLTL の出力電圧波形



(f) 5 段 NLTL の周波数スペクトル

図 6 NLTL の出力電圧波形と周波数スペクトル

ル

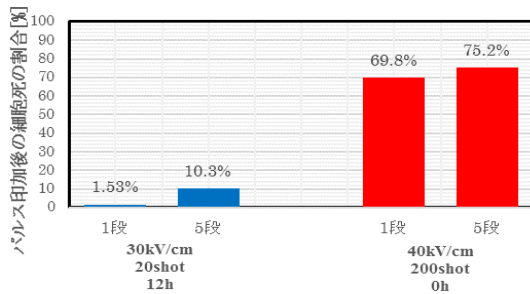


図7 パルス電界 30 MHz を印加した時の細胞の死亡率

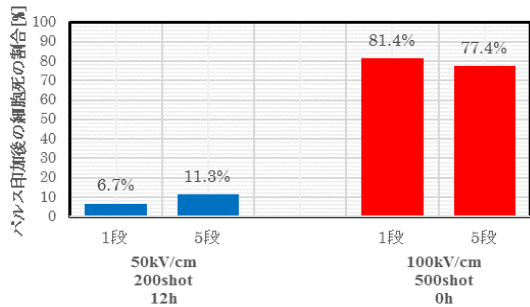


図8 パルス電界 130 MHz を印加した時の細胞の死亡率

装置を作製し、実際に低周波数 30 MHz と高周波数 130 MHz のバーストパルス電界を HeLa 細胞へ印加し、その影響を調べた。電界強度 50 kV/cm で 130 MHz のバースト数 5 のパルス電界を印加した場合は DNA の断片化が見られたことから、アポトーシスが起きている可能性がある。電界強度 40 kV、印加回数 200 shots 及び、電界強度 100 kV、印加回数 500 shots の条件においては、印加直後に細胞がほとんど死亡していることから、アポトーシスではなく外的影響によって細胞死したと考えられる。

今後の予定として、今回実験した間の条件について実験を行い、アポトーシスが起きる条件を調査する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

佐藤浩美, 安啓太, 南谷靖史, 大西伸明, 藤原裕介, 松林恭平, 宮川大輝, 勝木淳, 「がん治療のための磁気スイッチを用いた高出力バーストパルス発生装置の開発とバーストパルスががん細胞へ与える影響」, 電気学会プラズマ・パルスパワー・放電合同研究会, PST-17-004 PPT-17-004 ED-17-024 pp. 17-21, (2017), (査読無)

Riku Kageyama, Yuta Kobayashi, Kenji Tamura, Koki Saito, Yasushi Minamitani, “Difference of Cell Death of Budding Yeast for Frequency Components of Pulsed Electric Field”, IEEE Transactions on Plasma Science, Vol. 44, Issue 5, pp. 877 - 884, 2016, (査読有)

安啓太, 額賀拳, 南谷靖史, 「バイオエ

レクトリクス応用のための磁気スイッチを用いたバーストパルス発生装置の開発」, 電気学会プラズマ・パルスパワー・放電合同研究会, PST-16-040, PPT-16-040, ED-16-067, pp. 7-11, (2016), (査読無)

〔学会発表〕(計 7 件)

Keita Yasu, Yasushi Minamitani, Ken Nukaga, “Development of high power burst pulse generator based on magnetic switch for bioelectrics application”, 2016 International Power Modulator and High Voltage Conference, 2016 年 7 月 7 日, San Francisco, USA, Palace Hotel

額賀拳, 南谷靖史, 「がん治療を目的とした非線形伝送線路を用いた高強度バーストパルス電磁波発生装置の開発」, 平成 27 年電気学会全国大会, 2015 年 3 月 24 日, 東京都世田谷区, 東京都市大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南谷 靖史 (MINAMITANI, YASUSHI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 1 0 3 2 3 1 7 2