

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04312

研究課題名(和文)放電プラズマを用いた免疫治療など癌治療技術の開発と原理解明

研究課題名(英文)Cancer treatment including immunotherapy using discharge plasma

研究代表者

小野 亮 (Ono, Ryo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90323443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放電プラズマを用いた癌の免疫治療について、マウスを使った動物実験を行った。マウスの癌腫瘍にプラズマを照射すると、プラズマを照射していない箇所にある同種の癌腫瘍にも抗腫瘍効果が現れることを動物実験で実証した。また、この全身性の抗腫瘍効果は少なくとも3週間以上は持続することを示した。生化学分析から、このときマウスの体内で、癌に対する免疫が活性化している可能性を示した。この他、プラズマで生成されたどの活性種が癌治療に効いているかを調べる研究に関連して、プラズマの活性種密度のレーザー計測も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、申請者が4年前に初めて動物実験で見つけた、プラズマで癌の免疫治療を行える可能性について、マウスを使った動物実験で検証することに成功した。本研究により、転移癌や切除した腫瘍の再発抑制にも効果を発揮する癌の免疫治療を、副作用が少なく極めて安価なプラズマで実現できる可能性が示唆され、新しい癌治療の可能性に道を拓いた点で大きな意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：We performed experiments on mice related to cancer immunotherapy using discharge plasma. It was demonstrated that when a cancer tumor in mouse was treated using plasma, anti-tumor effects also appeared in the same type of cancer tumor in the area not treated with the plasma. Furthermore, the systemic anti-tumor effects were kept for at least more than 3 weeks. Biochemical analyses exhibited that this long-term systemic anti-tumor effect was likely caused by immune response specific to the cancer in the mouse. Reactive species in the plasma were also measured using laser spectroscopy concerning a study of which type of reactive species produced in the plasma are effective for the cancer treatment.

研究分野：プラズマ工学

キーワード：プラズマ医療 癌治療 免疫治療 活性種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

放電プラズマに「癌治療」の効果があることが2007年に発見されてから、プラズマ癌治療の研究が国内外で精力的に進められている。2010年から始まったマウスの動物実験では、腫瘍の縮小やマウスの生存期間延長などの効果が得られている[1]。また、癌細胞と健常細胞にプラズマを照射すると、癌細胞がより多く死滅する「選択性」があることも報告されている。プラズマを外科手術、放射線治療、化学療法に次ぐ第4の治療法とすべく、研究が進められている。

プラズマ癌治療では、プラズマで生成されるOH、O、Nなどの「活性種」に治療効果があると考えられている。しかしこれを実際に測定した例はほとんどなく、どの活性種に治療効果があるのかよく分かっていない。また、活性種は寿命が短いので腫瘍内部まで浸透せず、治療効果は腫瘍の表層部1 mm以下の範囲に限定されるという説もある。このように治療原理が未解明で、かつ治療範囲が腫瘍表層に限定される可能性に加え、プラズマ癌治療の動物実験の例がまだ少ないことから、この手法が実際に使えるかどうか手探りの状態が続いている。

このような背景のもと、申請者はマウスを使った先行研究で、プラズマを「癌の免疫治療」に適用できる可能性を世界で初めて示した[2]。マウスの両脚に腫瘍を作成し、片方の腫瘍のみプラズマを照射すると、未照射側の腫瘍にも抗腫瘍効果が見られた。これはプラズマがマウスの癌に対する免疫を高めたものと考えられ、免疫不全マウスでは見られなかった。「プラズマの効果は照射部位に限定される」という定説を覆す成果であり、全身に転移した腫瘍をも免疫効果で治療できる可能性を示している。このような癌に対する免疫力向上は、放射線治療では一部知られているが、プラズマでこれを示したのは世界初である。放射線より副作用が小さい可能性があるプラズマでこれを示した意義は大きい。

## 2. 研究の目的

本研究では、先に述べた免疫治療を含めたプラズマ癌治療の実験を行い、治療に適したプラズマ照射条件を求める。また、プラズマ中の活性種密度を計測し、どの活性種が治療に効いているかを調べる治療原理の解明も行う。以下の3つの項目に取り組む。

### (1) マウスを使った動物実験

申請者が発見したプラズマによる癌の免疫治療を発展させるとともに、プラズマのパラメータを変化させて治療に適した照射条件を求める。

### (2) 培養した癌細胞へのプラズマ照射実験

(1)の動物実験は回数が極めて限られるため、プラズマのパラメータサーチには限界がある。そこで、癌細胞への照射実験を行いパラメータサーチを行い、動物実験を補完する。

### (3) 癌治療に有効な活性種の同定

プラズマの活性種をレーザー分光計測し、癌治療に効果が高い活性種を同定する。しかし、プラズマでは数10種から100種類以上の活性種が同時に生成されるため、治療効果のある活性種の完全な同定は困難である。そこで、申請者がこれまで開発した、特定の活性種のみを細胞等に照射する手法の研究も継続する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスを使った動物実験

マウスの両脚に皮膚癌細胞を注射して、腫瘍を生成する。右脚の腫瘍のみプラズマを照射し、左右両脚の腫瘍の成長速度を計測する。そして、両脚ともにプラズマを照射していない参照用のマウスの両脚の腫瘍の結果と比較する。右脚にプラズマを照射したマウスでプラズマを照射していない左脚の腫瘍の成長速度が遅くなれば、これはプラズマ照射による遠達治療効果であり、免疫効果の可能性がある。また、プラズマを照射した右脚の腫瘍の成長速度がそれよりもさらに遅くなっていけば、それは直接照射の効果である。このような癌治療の動物実験では一般に腫瘍を完治させることはできないが、このように腫瘍の成長速度を遅らせる実験は放射線治療、化学療法、プラズマ医療の研究で一般的に用いられている。プラズマ照射は、例えば1日10分間程度照射し、これを5日間程度継続する。実験終了後にマウスの血液等を試薬で調べ、免疫がどの程度活性化したかを測定する。また腫瘍の切片を試薬で染色することで、癌細胞がどのような経路で死滅したかを調べる。

もしプラズマでマウスの癌に対する免疫が活性化されていけば、その免疫の効果は長期間継続

続するはずである。この長期の免疫効果を調べるための「再チャレンジ実験」も行う。再チャレンジ実験では、マウスの右脚に腫瘍を生成しプラズマ照射する。その後、腫瘍を手術で切除して、免疫が活性化するのに十分な 2~3 週間待つ。その後、今度はマウスの反対側の脚、すなわち左脚に腫瘍を再度皮下注射で生成する。もしもマウスの免疫が活性化していれば、この左脚に再チャレンジした腫瘍の成長は抑制されるはずである。

### (2) 培養した癌細胞へのプラズマ照射実験

プラズマのパラメータを様々に振って培養液中の癌細胞に照射し、癌細胞を死滅させるのに最適なプラズマパラメータを探索する。動物実験に使用すると同じ癌細胞(B16F10 マウスメラノーマと CT26 大腸癌)を用いて実験する。

### (3) 癌治療に有効な活性種の同定

動物実験で使用しているストリーマ放電およびヘリウムプラズマジェットについて、レーザーで活性種計測を行い、どの活性種が癌治療に効いているかを調べるための基礎データとする。本研究では、プラズマ医療で重要と考えられている OH ラジカルおよび O ラジカルの計測を行う。計測にはレーザー誘起蛍光法(LIF: laser-induced fluorescence)を用いる。また、O<sub>2</sub>分子の準安定準位 O<sub>2</sub>(a)の赤外発光分光計測も行う。活性種の生成に重要な、放電中の電子密度計測計測も行う。電子密度計測には、レーザー干渉計測を用いる。

申請者が開発した、特定の活性種のみを細胞に照射する手法の継続研究も行う。Xe<sub>2</sub>エキシマランプの 172 nm の真空紫外光を用いて、石英管に流れる Ar/H<sub>2</sub>O もしくは Ar/O<sub>2</sub> の H<sub>2</sub>O や O<sub>2</sub>分子を光解離し、OH や O などの活性種を生成する手法である(VUV法)[3]。本手法で生成された様々な活性種や化学種の密度を計測し、本手法のシミュレーションと比較してシミュレーションを検証する。

## 4. 研究成果

### (1) マウスを使った動物実験

マウスの左右の脚に腫瘍を作成し、右脚の腫瘍のみストリーマ放電を照射した。1日10分間照射を行い、照射開始から3日目の腫瘍体積(V<sub>3</sub>)と照射直前の0日目の腫瘍体積(V<sub>0</sub>)の腫瘍体積の比を測定した。全部で30匹程度のマウスについて、累積度数をプロットした結果を図1に示す。図1(a)はプラズマを照射していない側、すなわち左脚の腫瘍の結果で、右脚の腫瘍にプラズマを照射した「照射群」と、何も照射していない「コントロール群」の結果を比較している。左脚の腫瘍はプラズマを照射していないにもかかわらず、照射群のほうが3日目の腫瘍体積が小さくなっている。これは、右脚の腫瘍にプラズマを照射したら、左脚の腫瘍にも抗腫瘍効果が現れたことを示しており、プラズマによる抗腫瘍遠達効果が確認できた。また、免疫反応が生じた時にマウスの脾臓で産生されるサイトカイン IFN-γ もプラズマ照射群のマウスでのみ大きな数値が観測され、この遠達効果が免疫によるものであることが示唆された。この実験結果はプラズマ医療のコミュニティでも非常に大きな関心を引き起こし、本研究成果は Journal of Physics D: Applied Physics の招待論文として掲載され、2017年の同雑誌の Highlights of 2017にも選出された。また、本研究成果について、数多くの国内外の招待講演も行った。

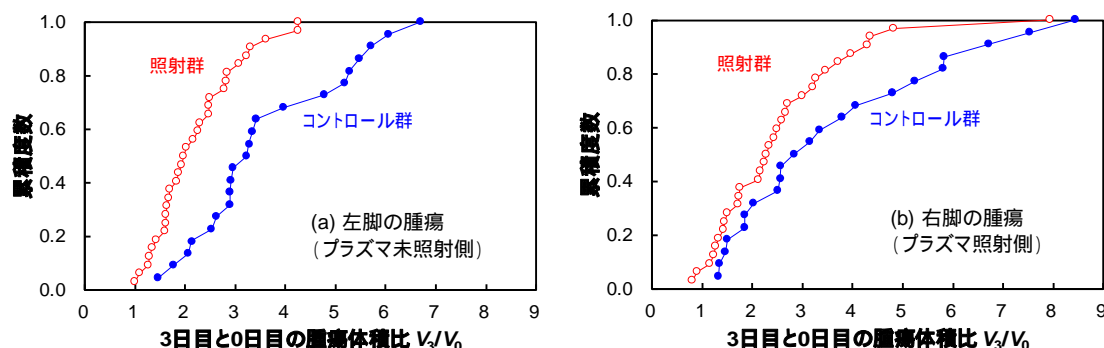


図1 マウスの左右両脚にメラノーマの腫瘍を作成し、右脚の腫瘍のみプラズマ照射した時の、0日目と3日目の腫瘍体積の比の累積度数。

再チャレンジ実験も行った。マウスの右脚にメラノーマ腫瘍を作成し、1日10分間ずつ、5日間プラズマ照射を行った。その後腫瘍を切除し、14日間待った後、今度は反対側の左脚にメラノーマ腫瘍を作成し、この左脚の腫瘍体積を測定した。その結果、図2のように、プラズマを照射した照射群では腫瘍の成長遅れが観測された。また、腫瘍を切除してフローサイトメトリーで分析を行い、免疫反応が活発な時に発生するCD8なども産生されていることを測定した。右脚の腫瘍にプラズマを照射したことでマウスのメラノーマに対する免疫が活性化し、その免疫の効果が少なくとも3週間以上体内で持続し、全身性の抗腫瘍効果が表れたことを示唆する結果である。本研究成果は、IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciencesに論文を投稿し掲載された。

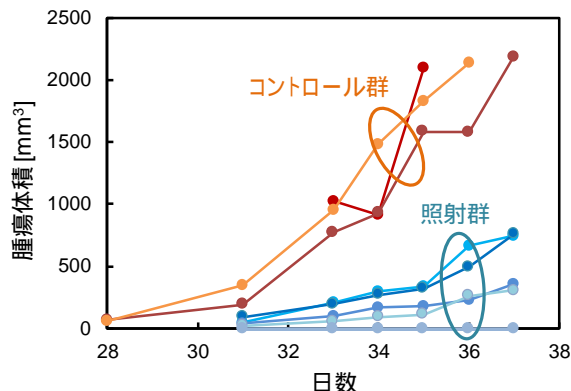


図2 再チャレンジ実験の結果。0~4日目までプラズマ照射を行い、4日目に腫瘍を切除後、18日目に反対側の脚に腫瘍を再移植した。この再移植した腫瘍の体積変化をプロットしている。

この他、B16F10メラノーマ以外の癌に対しても同様の効果が得られるかどうかを確認するため、CT26大腸癌を用いた再チャレンジ実験も行った。B16F10は免疫原性が低い、すなわち免疫が効きにくい癌であり、CT26は反対に免疫原性の高い癌である。そのため、CT26ではプラズマ照射無しでも1回目の腫瘍を作成した段階である程度の免疫反応が発生し、2回目の再移植がある程度拒絶されるといった違いは観測されたが、プラズマ照射による効果も観測された。まだ実験回数が十分ではなく、今後の継続研究が必要だが、少なくともプラズマによる免疫誘起と思われる現象が、B16F10に特有の現象でないことは確認できた。

## (2) 培養した癌細胞へのプラズマ照射実験

ストリーマ放電、プラズマジェット、VUV法の3通りで培養液中のB16F10メラノーマ細胞を処理し、処理後の細胞の生存率を測定する実験を行った。当初、この実験でプラズマ照射の最適条件を探し、また癌細胞の不活化に効いている活性種を特定する目的があったが、動物実験が進むにつれ、マウスの体内で起きている免疫反応を細胞実験で模擬するのは容易ではないとの結論に至った。したがって、本研究では細胞実験よりも動物実験に重点を置く形になったが、細胞実験もいくつか行った。

一連の実験を通して、プラズマで生成されるOHの細胞不活化効果を測定することを試みた。まず、VUV法で様々な実験を行い、B16F10の不活化に対するOHとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の寄与を測定した。次に、過酸化水素水溶液をバブリングした空気を細胞に吹き付け、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のみの効果を分離して測定した。最後に、プラズマジェットのOH密度をレーザー計測し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がほとんど存在しない条件でOHを吹き付けてB16F10の不活化を測定した。その結果、OHはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>よりも1桁程度強い効果があることが分かった。CT26についても、同様の結果を得た。

## (3) 癌治療に有効な活性種の同定

がん治療に有効な活性種の同定に必要な基礎データを取得するため、プラズマ中の活性種密度計測を行った。動物実験で用いたストリーマ放電について、OHラジカルとOラジカル密度を計測した。OH密度はLIFで測定し、O密度はO + O<sub>2</sub> + M → O<sub>3</sub> + Mの三体反応で生成されるO<sub>3</sub>を二次元光解離LIFとよばれる手法で測定して求めた。

OHの計測では、放電パルス後のOH密度の時間変化を測定した。空気中で放電した場合、放電パルスで10 ppmオーダーのOHが生成され、これがOラジカルとの反応で10 μs程度の時定数で擬一次的に1桁程度急減する様子が観測された。Oラジカルは主にO + O<sub>2</sub> + M → O<sub>3</sub> + Mの反応で10 μs程度の時定数で減少するため、このOH + Oの反応も10 μs程度で終わり、その後OHは主にOH + OH (+ M)の再結合反応で減少する様子が観測された。一方、O<sub>2</sub>を排除した加湿N<sub>2</sub>雰囲気では、OHが1 msオーダーの長寿命となることが分かった。共同研究先にシミュレーションを依頼し、このOHの長寿命がHやHO<sub>2</sub>のサイクル反応で維持されていることが分かった。Oラジカル密度の計測では、空気中の放電パルスで1000 ppmオーダーのOラジカ

ルが生成されることを示し、これが放電条件でどのように変化するかも測定した。OH と同様に共同研究先のシミュレーション結果と比較し、2~3 倍程度の誤差で O 密度の測定結果とシミュレーション結果が一致することを示した。この研究成果は、現在 Journal of Physics D: Applied Physics に投稿中である。

プラズマ医療で広く使われるヘリウムプラズマジェットでの OH 密度計測も行った。プラズマジェットの上流から下流にわたる全領域で OH 密度の時間空間分解計測を行い、シミュレーションと比較してよい一致を示した。シミュレーション結果から、OH の生成消滅反応も特定した。また、OH 密度が放電エネルギー密度と放電周波数の 2 つのパラメータのみで与えられることも示し、OH 密度を決める要因の特定と定式化に成功した。この研究成果は、英文雑誌に投稿予定である。この他、 $O_2(a)$ 密度の赤外発光分光計測も行い、Journal of Physics D: Applied Physics に論文が掲載された。

特定の活性種を照射するために開発した、VUV 法のシミュレーションの検証も行った。VUV 法で生成される  $O_3$ 、 $H_2O_2$ 、 $H_2$ 、OH の密度を様々な実験条件で測定し、シミュレーションと比較した。その結果、10%~50%程度の誤差でシミュレーションと計測結果が一致することを示し、本手法がプラズマ医療の活性種の効果を測定するうえで有用であることを示した。この研究成果は、現在 Plasma Sources Science and Technology に投稿中である。

#### <引用文献>

- [1] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J. M. Pouvesle and A. Le Pape, ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma,” International Journal of Cancer, Vol. 130, 2012, 2185–2194
- [2] 秋山、米玉利、白川、水野、小野、2015 年静電気学会春期講演会、2015, 83; T. Akiyama, K. Yonetamari, Y. Shirakawa, K. Mizuno, and R. Ono, 22nd Int. Symp. Plasma Chem., 2015, P-III-10-23
- [3] R. Ono, Y. Tokumitsu, S. Zen, and S. Yonemori, Production of reactive species using vacuum ultraviolet photodissociation as a tool for studying their effects in plasma medicine: simulations and measurements, J. Phys. D: Appl. Phys. Vol. 47, 2014, 445203

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 10 件)

Y. Inada, A. Komuro, R. Ono, A. Kumada, K. Hidaka, M. Maeyama, Two-dimensional electron density measurement of pulsed positive secondary streamer discharge in atmospheric-pressure air, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 52, 2019, 185204

DOI: 10.1088/1361-6463/ab0725

R. Ono, T. Nakamura, and Z. Xiang, Photofragmentation laser-induced fluorescence of ozone using narrowband and broadband KrF excimer lasers, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 52, 2019, 045201

DOI: 10.1088/1361-6463/aaec44

K. Mizuno, Y. Shirakawa, T. Sakamoto, H. Ishizaki, Y. Nishijima, and R. Ono, Plasma-induced suppression of recurrent and re-inoculated melanoma tumors in mice, IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences, 査読有, Vol. 2, 2018, pp. 353–359

DOI: 10.1109/TRPMS.2018.2809673

R. Ono, Rapid temperature increase in the vicinity of anode and cathode in the afterglow of pulsed positive streamer discharge, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 51, 2018, 245202

DOI: 10.1088/1361-6463/aac31d

Y. Inoue and R. Ono, Measurement of singlet delta oxygen in an atmospheric-pressure helium-oxygen plasma jet, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 50, 2017, 214001

DOI: 10.1088/1361-6463/aa6c53

Y. Inada, K. Aono, R. Ono, A. Kumada, K. Hidaka, M. Maeyama, Two-dimensional electron density measurement of pulsed positive primary streamer discharge in atmospheric-pressure air, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 50, 2017, 174005

DOI: 10.1088/1361-6463/aa65ee

K. Mizuno, K. Yonetamari, Y. Shirakawa, T. Akiyama, and R. Ono, Anti-tumor immune response

induced by nanosecond pulsed streamer discharge in mice, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 50, 2017, 12LT01 (invited) (Highlights of 2017 in Journal of Physics D: Applied Physics)

DOI: 10.1088/1361-6463/aa5dbb

R. Ono, K. Yonetamari, Y. Tokumitsu, S. Yonemori, H. Yasuda, and A. Mizuno, Inactivation of *Bacillus atrophaeus* by OH radicals, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 49, 2016, 305401

DOI: 10.1088/0022-3727/49/30/305401

〔学会発表〕(計 51 件)

R. Ono, Optical diagnostics in atmospheric-pressure non-thermal plasma, Europhysics Conference on the Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases 2018, 2018 (invited)

R. Ono, K. Mizuno, T. Sakamoto, H. Ishizaki, and Y. Nishijima, Plasma-induced long-term immune effect on cancer tumors in mice, 7th International Conference on Plasma Medicine, 2018 (invited)

R. Ono, A. Iwase, and H. Ishizaki, Supply of reactive species onto liquid surface produced using vacuum ultraviolet photolysis and measurement of their effects on liquid treatment, The 10th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing, 2017 (invited)

R. Ono, Measurement of propagation, radical densities, temperature, and electron density of streamer discharge, 6th EUCASS Aerospace Thematic Workshop, Fundamentals of Aerodynamic Flow and Combustion Control by Plasma, 2017 (invited)

R. Ono, K. Mizuno, and Y. Shirakawa, Immunotherapy of melanoma in mice using nanosecond pulsed streamer discharge, 4th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, 2017 (invited)

R. Ono, Immunotherapy of cancer using plasma and measurement of reactive species effective for plasma medicine, 26th Annual Meeting of The Materials Research Society of Japan, 2016 (invited)

R. Ono, Measurement of reactive species in atmospheric pressure plasmas, 2016 Plasma Processing Science Gordon Research Conference, 2016 (invited)

R. Ono, Optical diagnostics and selective supply of reactive species for plasma medicine, 18th International Congress on Plasma Physics, 2016 (invited)

6 . 研究組織

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。