

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04436

研究課題名（和文）がん治療に効果的な低周波を重畳した高周波高電圧バーストパルス発生回路の開発と効果

研究課題名（英文）Development and effects of a high-frequency, high-voltage burst pulse generating circuit superimposed with effective low-frequency wave in cancer treatment

研究代表者

南谷 靖史（Minamitani, Yasushi）

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10323172

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）：細胞への効果を高めるためのバーストパルス発生装置のスイッチの固体化，および高周波に重畳する低周波の効果の調査を行った。成果として，二次スイッチのギャップスイッチを固体スイッチに置き換えることが可能となり，高周波に任意の低周波を重畳する基盤ができた。高周波に重畳する低周波の効果については，バーストパルスの出力段数10段の安定化を図り，重畳する周波数を半分にした結果，印加した総パルス数は同じでも10段の波形では5段の波形と比較して明らかに細胞死をおこす割合が増えた。これは一度に印加するバーストパルス数が増えたことで重畳する周波数が低くなり連続してパルスを印加している時間が増えた効果と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポトーシス作用でがんが治癒するというのは元々体に備わっている機能でがんが治癒するということであり，副作用の少ないがん治療が期待できる。がんは日本人の死亡原因1位で，人口10万人に250人の割合で，がんで死亡している。2位の心疾患の2倍の死亡率である。がんを外科治療より簡単に，放射線，化学治療のように副作用もなく安全，簡便に行えと，市民生活にこの上ない安心感を与えることが可能になる。しかも粒子線治療のような巨大で高価な装置でなく，コンパクトで安価な装置を作ることが可能となるので，高度先進医療施設だけでなく，中小の病院でも非外科治療導入が可能になり，市民が容易に安価で治療を受けられるようになる。

研究成果の概要（英文）：We investigated replacing the gap switch of the burst pulse generator to a solid-state switch to enhance the effect on cells, and the effect of superimposing low frequency on high frequency. As a result, it became possible to replace the gap switch of the secondary switch with the solid-state switch, and a foundation was established for superimposing any low frequency on high frequency. Regarding the effect of superimposing low frequency on high frequency, we made stabilizing the burst pulse output of 10 trains and halved the superimposed frequency. As a result, the rate of cell death was clearly higher with a 10 trains waveform compared to a 5 trains waveform, even though the total number of pulses applied was the same. This is thought to be the effect of increasing the number of burst pulses applied at once, which lowered the superimposed frequency and increased the time for continuous pulse application.

研究分野：パルスパワー

キーワード：パルス電界 バーストパルス がん細胞 アポトーシス ネクローシス 細胞膜 絶縁破壊 活性種

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死因第1位はがんであり、3人に1人はがんで死亡している。人間の身体の細胞は日々分裂、増殖、アポトーシスを繰り返している。アポトーシスとは、異常が発生または老化した細胞において、細胞がまるで自殺するかのように自然に消滅してしまう細胞死のことである。アポトーシスがうまく機能すれば、異常が生じた細胞は増殖できずに処理され消滅する。ところが、栄養不足、毒物、外傷などの外的環境要因によって遺伝子に突然変異が生じると、アポトーシスが作用せず死亡すべき細胞が死滅しなくなる。このようにして生じた過剰な細胞のうち、命を脅かすものをがんと呼ぶ。

がん治療には外科治療、化学治療、放射線治療などが行われているが、いずれも人体に対する負担が大きく、脱毛、食欲不振、嘔吐、疲労感などの副作用を伴うため問題となっている。そこで近年、副作用を伴わない可能性のあるがん治療として、パルスパワーを用いることが注目されている。これは、がん細胞にナノ秒パルスパワーによる高電界(数十 kV/cm)を印加することでアポトーシスを引き起こせることが最近の研究で明らかにされたことによる[1]。時間幅が数ナノ程度の極短パルス電界は数十 MHz の以上周波数成分を持っており、この高周波のパルス電界を細胞に印加すると細胞にアポトーシスを誘導できると考えられている。

ナノ秒パルス高電界が細胞に与える効果の研究はアメリカでも21世紀から始まった研究で、日本でもここ10年ほどでようやく始まったばかりであり、医学研究者でナノ秒オーダのパルス高電界でがんを治療する研究をしている人はいない。これはナノ秒のパルス高電圧を発生する装置が存在していないため、ナノ秒オーダの高電圧パルス印加するという発想がなかったためと考えられる。本研究でがん細胞に効果のあるコンパクトな高強度高周波パルス電磁波発生装置を開発し医療研究者に提供できれば医学的な見地からの研究が日本でも進むことが期待できる。

2. 研究の目的

超短パルス高電界がん治療法とは、がん細胞にナノ秒オーダの高電界(数十 kV/cm 程度)を印加して、細胞にアポトーシス作用を再生させ、手術することなしにがんを治療する方法である。この方法においては、超短パルス高電界の持つ周波数成分、電界強度が細胞小器官に与える効果を調べる必要がある。そして、患部にどのようにして高電界を印加するかが重要であり、本研究の最終目標はこれらの解明と、そのような高電界を印加できる装置の開発である。そのため、本研究課題では超短パルス高電界による非外科がん治療法におけるパルス高電界印加装置の検討、及びがん細胞への効果の確認を行う。

3. 研究の方法

高周波パルスは温度との相乗効果で細胞死効率が上昇することが分かっている[6-8]。また、バーストパルスは低周波波形の重畳が起こるので、シングルパルスより細胞死効果が高い[9]。そこで、150MHz のパルス列の高周波高電界5段バーストパルス(低周波成分30MHz)、および10段バーストパルス(低周波成分15MHz)で印加を行い、列数の増加による細胞死誘導効率および細胞に投入されるパルス数を統一した場合を調査した。また印加時の細胞温度はがん細胞を効果的に殺せる温度を想定し、40℃に設定した。

4. 研究成果

4.1 実験装置

本実験に用いた5段バーストパルス発生装置等価回路図を図1に示す。実験装置はバーストパルスの発生回路とそれに充電を行う昇圧充電回路から成り立っている。バーストパルス発生回路は、可飽和リアクトルとコンデンサを組み合わせた非線形伝送線路(NLTL)となっている^[3]。右側から左側にコンデンサが充電され、ギャップスイッチが動作すると右側のコンデンサから順次パルスの伝搬が行われる。この時、強磁性体コアは飽和状態に遷移し、磁気飽和に時間を要することでパルスが遅れて伝搬し、NLTLのLC列分の独立したパルスを出力できる。また、回路の動作は次の通りである。トリガ回路から出力されたパルスによってスイッチが導通し、コンデンサに蓄えられた電荷がトランスに流れ込み、相互インダクタンスにより2次側に昇圧されCに電荷が蓄えられる。これによりパルス形成線路が充電される。ガスギャップスイッチの絶縁破壊電圧に達した時、スイッチが導通し負荷にパルスが印加される。なお、10列バーストパルスを用いる際は10列のNLTLに置き換えて実験を行った。

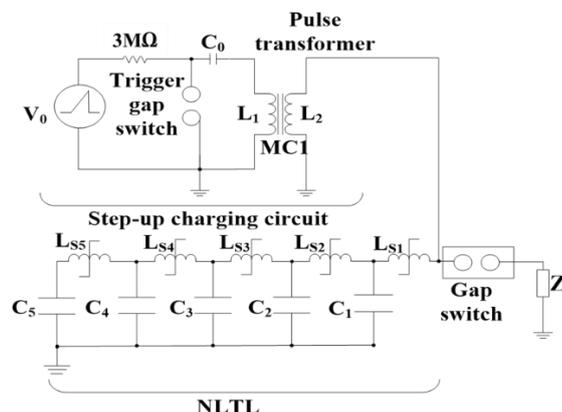


図1 バーストパルス発生装置等価回路図(5段)

4.2 バーストパルス5段および10段のパルス列を同数印加での細胞死亡率

4.2.1 実験方法

培養した酵母をマイクロチューブに1000 μ L分注し、3800rpmで5分間遠心分離を行った。遠心分離後、900 μ L培地を抜き取り、PBS 88.2mLと純水11.8mLを混合させた導電率15mS/cmの溶液を900 μ L入れ、よく懸濁した。この導電率は実際の体の値に近づけたものである。その後、細胞数を 1.0×10^6 CFU/mLにしたものを試料液とした。試料液200 μ Lを電極間隔1mmのキュベットに入れパルス電界を印加した。表1に印加条件を示す。バースト5段印加波形を図2、バースト5段周波数特性を図3、バースト10段印加波形を図4、バースト10段周波数特性を図5に示す。図3より、150MHzと30MHz付近にスペクトルが出ていること、図5より、150MHzと15MHz付近にスペクトルが出ていることがわかる。試料液への温度印加は電極付き容器を用意し、恒温バスで40 $^{\circ}$ Cに設定した温水を循環させることで行った。コントロールはパルス電界印加以外同条件のポジティブコントロールと、細胞への負荷がないネガティブコントロールを用意した。また、細胞数の減少を正確に把握するため、時間経過による細胞数変化も行った。

4.2.2 実験結果

図6にネガティブコントロールから求めた40 $^{\circ}$ Cの細胞死結果及び、時間経過による細胞数の減少を示す。結果から、バーストパルス10段が、バーストパルス5段と比較すると、より細胞死効果が高いことが分かる。その理由として、1ppsの条件下において5段と10段では投入パルス数に2倍の差があるため、投入パルス数の多い10段の細胞死効果が向上したと考えられる。

表1 印加条件

	5段バーストパルス	10段バーストパルス
電界強度[kV/cm]	80	
パルス幅[ns]	3.25	3.42
立ち上がり時間[ns]	2.78	2.45
繰り返し時間[pps]	1	
印加回数[shot]	100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000	
温度[$^{\circ}$ C]	40	

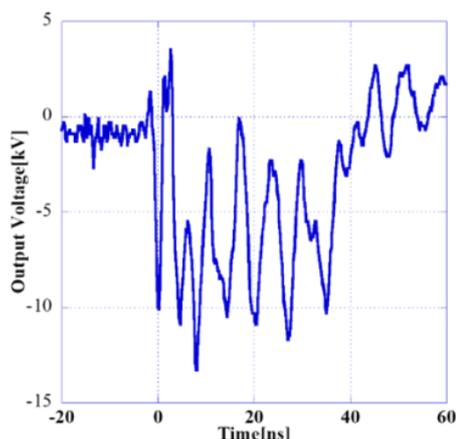


図2 出力波形(5段)

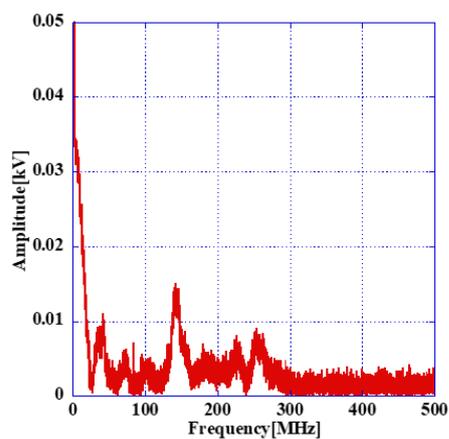


図3 周波数スペクトル(5段)

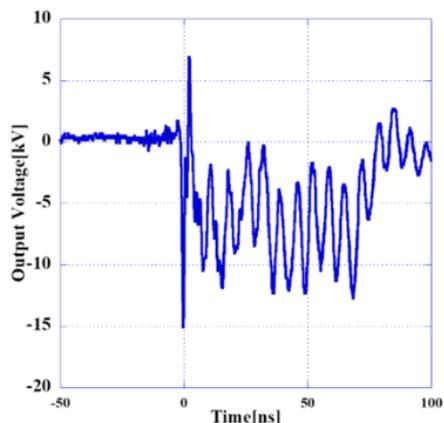


図4 出力波形(10段)

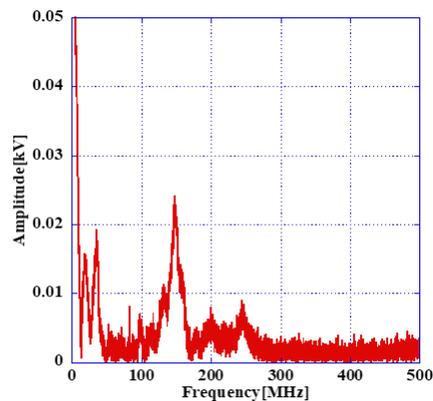


図5 周波数スペクトル(10段)

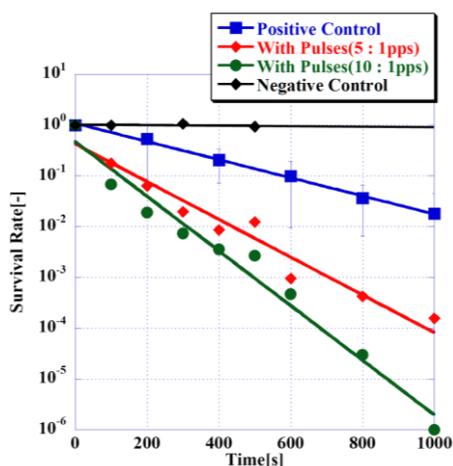


図6 バーストパルスの細胞死効果と時間経過での細胞数変化

4.3 パルス列数増加による優位性調査

同一の条件下での細胞死性能はバーストパルス列数の多いパルスが優れていることが確認できた。これは、細胞に投入されるパルス数の違いによるものである。そこで、細胞に投入されるパルス数を統一し、投入電力、エネルギーを同じにした場合、パルス列数の違いが殺菌結果にどのように反映されるかの調査を行った。

4.3.1 実験方法

4.2.1と同様の手順で実験を行った。印加条件を表2に示す。

表2 印加条件

	5段バーストパルス	10段バーストパルス
電界強度[kV/cm]	80	
パルス幅[ns]	3.25	3.42
立ち上がり時間[ns]	2.78	2.45
繰り返し時間[pps]	1	0.5
印加回数[shot]	200,400,600,800,1000	100,200,300,400,500
温度[°C]	40	

4.3.2 実験結果

図7にネガティブコントロールから求めた印加温度40°Cにおけるバーストパルスの細胞死効果を示す。繰り返し時間を調整し、5段バーストパルスと同じ投入パルス数、投入電力、投入エネルギーである0.5ppsの10段バーストパルスも5段バーストパルス数より優れた細胞死効果を示した。この理由として、重畳周波数が低くなったため、一度に多くのパルスを投入でき、細胞により多くのストレスを与えることができた為、であると考えられる。

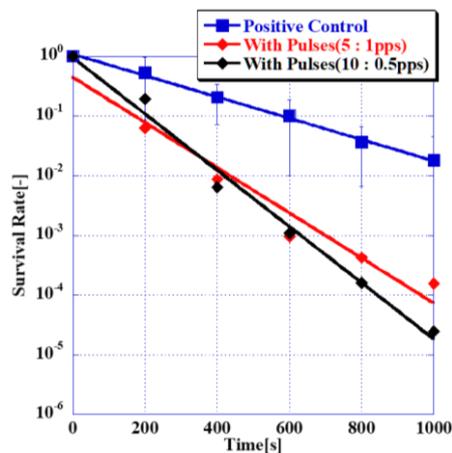


図7 パルス列数による殺菌効果の比較(40°C)

参考文献

- [1] 秋山秀典・他：「高電界パルスパワー工学」，オーム社，pp.1-4，85-133(2003)
- [2] R. P. Joshi and K. H. schoenbach： “Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulse :A numerical simulation study” ， The American Physical Society, Vol.62, No.1, PP.1025-1033 (2000)
- [3] 安啓太：「2016年度修士学位論文 磁気スイッチ型非線形伝送線路を用いたがん治療用高周波バーストパルス電磁波発生と効果の研究」，PP.13-19
- [4] 安啓太：「2016年度修士学位論文 磁気スイッチ型非線形伝送線路を用いたがん治療用高周波バーストパルス電磁波発生と効果の研究 PP28-29
- [5] 秋山秀典・他：「高電界パルスパワー工学」，オーム社，pp.99-100(2003)
- [6] Takayuki Ohshima, Kanako Okuyama, and Masayuki Sato： “Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of Escherichia coli.” ， Journal of Electrostatics, Vol.55, PP.227-235 (2002)
- [7] V. O. Marquez, G. S. Mittal, and M.W. Griffiths： “Destruction and Inhibition of Bacterial Spores by High Voltage Pulsed Electric Field.” ， Journal of Food Science, Vol.62, PP.399-401 (1997)
- [8] H.Hülshager, J.Potel, E.-G. Niemann： “Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength.” ， Radiat Environ Biophys, Vol.20, PP53-65 (1981)
- [9] 峯村直弥：「2020年度修士学位論文 生鮮食品の包装状態での殺菌を可能とする高周波高電界バーストパルスの印加方法と条件の検討」，PP.49-51

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hiromi Sato, Yasushi Minamitani, Gen Urabe, Taichi Kamezaki, Shuji Okamoto, Sunao Katsuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Difference by Frequencies on Cell Killing Effect by Superposing Low Frequency on high frequency Bipolar Burst Pulse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEE Transactions on Plasma Science	6. 最初と最後の頁 4365-4373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TPS.2020.3033968	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 俊輝, 強瀬 隆慶, 南谷 靖史, 横井 愛加, 中野 晃
2. 発表標題 高周波バーストパルスの出力パルス列数に対する細胞死割合の比較
3. 学会等名 令和5年電気学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤俊輝, 南谷靖史, 横井愛加, 中野晃
2. 発表標題 高周波バーストパルスの出力パルス列数の細胞に対する影響
3. 学会等名 電気学会 放電・プラズマ・パルスパワー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤俊輝, 南谷靖史, 横井愛加, 中野晃
2. 発表標題 高周波バーストパルス電界における出力パルス列数の細胞死への影響
3. 学会等名 令和5年静電気学会全国大会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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