

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：57301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04012

研究課題名(和文) 生体内がん治療に向けた医療用プラズマデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a Novel Atmospheric Plasma Device for in vivo Cancer Treatment

研究代表者

柳生 義人 (Yagyu, Yoshihito)

佐世保工業高等専門学校・電気電子工学科・教授

研究者番号：40435483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞への非平衡大気圧プラズマ照射は、新たな低侵襲がん治療法として期待されているが、体液や臓器などで満たされた生体内は、プラズマ生成に不利な環境である。本研究では、生体内プラズマ直接照射法の開発に向け、多孔質膜を用いて液相と気相を分離し、生体内のがん細胞の部位によらず、プラズマを照射できる「多孔質膜プラズマ源」の研究開発に取り組んだ。多孔質膜を介して、気相から液相に輸送された活性種(ROSSs, RONs)を検出試薬により確認し、また、ヒト肝芽腫由来細胞Hep G2に対して、多孔質膜から滲出した活性酸素種が細胞死を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞へのプラズマ照射は、副作用が少なく低侵襲な新規がん治療法として有望視されている。大気圧プラズマにより生成される高エネルギーかつ高密度の活性種は、薬剤抵抗性を示すがん細胞に対しても効果的であるが、すべての部位に適用可能なプラズマ直接照射法は開発されていない。本研究では、多孔質膜により液相と気相を分離することで、生体内のがん細胞の部位によらずプラズマを照射できるプラズマ源の開発に取り組み、ヒト肝芽腫由来細胞へ与える影響を明らかにした。手軽にかつ高度に制御された低温化学反応場を提供することで、国内外で大きな社会問題となっているがん疾患に対し、創薬に代わる新たな治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-equilibrium atmospheric pressure plasma is expected to be a novel minimally invasive cancer treatment. However, the body is an unfavorable environment for plasma generation because it is filled with body fluids and organs. In this study, we have developed a porous membrane plasma source that can irradiate plasma inside the body by using a porous membrane to separate the liquid and gas phases. Reactive species (ROSSs and RONs) generated by plasma in as phase transported to the liquid phase through the porous membrane were confirmed. It was also found that ROSSs induced cell death of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2.

研究分野：プラズマ応用

キーワード：非平衡大気圧プラズマ プラズマ医療 プラズマ医療用デバイス 多孔質膜 マイクロプラズマ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「がん」は日本人の死因第1位の疾患であり、効果的な治療法の開発は喫緊の課題である。プラズマ照射によるがん細胞の不活化は世界的に注目され、副作用が少なく低侵襲な新しい治療法として有望視されている。大気圧プラズマにより生成される高エネルギーかつ高密度の活性種は、薬剤抵抗性を示すがん細胞に対しても効果的であるが、体液や臓器などで満たされた生体内は、プラズマ生成に不利な環境である。生体内がん療法の確立に向けて、すべての部位のがんに対し、活性種を直接投与できる万能な非平衡大気圧プラズマ源の開発が求められる。手軽にかつ高度に制御された低温化学反応場を提供することで、国内外で大きな社会問題となっているがん疾患に対し、創薬に代わる新たな治療法の確立が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、多孔質膜を用いてプラズマ領域と反応場を分離することで、がんの発生部位に影響を受けない万能なプラズマデバイスを開発する。また、大気圧下において種類や濃度を制御した活性種を生成する。活性種をがん細胞やその凝集体(スフェロイド)に直接投与することでがん組織に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 多孔質膜プラズマ源の開発

多孔質膜でプラズマ源を覆うことで、気相と液相を分離した多孔質膜プラズマ源を開発した(図2)。プラズマ生成部は、絶縁被覆電線にステンレス電線を巻き付けて沿面放電型とし、多孔質膜内に封入した。高電圧電源は、温度上昇を抑制するため、磁気パルス圧縮型電源(MPC3010S-50SP, 株式会社末松電子製作所)を使用し、高压側に絶縁電線、低压側にステンレス電線を接続し、8kV, 500ppsを印加した。

(2) 活性種の確認

多孔質膜を介して、気相から液相に輸送される活性酸素種、活性窒素種の有無をKI-デンプン試薬, H₂O₂検出試薬(Amplex® Red試薬, Thermo Fisher社), NO検出試薬(NO₂/NO₃ Assay Kit-CII Griess Reagent Kit, 同仁化学研究所)を用いて検証した。このときの雰囲気ガスは、酸素(90%), 窒素(99%), 乾燥空気(N₂ 80%, O₂ 20%)とした。

(3) ヒト肝芽腫由来細胞株Hep G2への影響

多孔質膜プラズマ源から発生する活性種が、生細胞への影響をみるため、ヒト肝芽腫由来細胞株(Hep G2; JCRB1054)に与える影響を検証する。Hep G2細胞は、10%ウシ胎児血清(BioWest S.A.S)およびペニシリン-ストレプトマイシン溶液(富士フィルム和光純薬株)を加えたD-MEM(富士フィルム和光純薬株)を用いて、37°Cに設定した5% CO₂インキュベーター内で培養した。96ウェルプレートに1×10⁴ cells/wellとなるように分注したHep G2細胞にプラズマ処理を行った。24時間の培養後、生細胞数測定キットCell counting kit-8(同仁化学研究所)を用いて生細胞数を計測した。

(4) ヒト肝芽腫由来細胞株 Hep G2 凝集体(スフェロイド)への影響

3次元培養を可能にするHappy Cell ASM(Vale Life Sciences Pty Ltd)を用いた。ヒト肝芽腫細胞Hep G2を遠心分離を行い回収した後、Happy Cell ASM培地を用いて、細胞密度が5×10⁵ Cells/mlとなるように滴下し、96ウェルプレートへ100μlずつ播種した。前培養を24時間行った後、プラズマ処理を0~120秒間行い、24時間後の生細胞率の変化を調査した。



図1. 「多孔質膜プラズマ源」による生体内プラズマ直接照射法のイメージ



図2. 多孔質膜プラズマ源

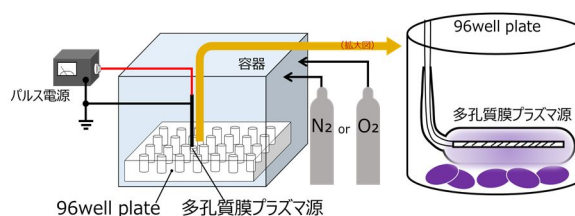


図3. 多孔質膜プラズマ照射実験の概略図

4. 研究成果

(1) 活性種の確認

KI-デンブ試薬が、活性酸素種と反応することで、青紫色に呈色することを利用して、活性酸素種の分布を可視化した。多孔質膜内のプラズマにより発生した活性酸素種が、多孔質膜内から滲出し、同心円状に広がることを確認した(図4)。以上より、多孔質膜プラズマ源から活性酸素種の発生を確認した。

また、 H_2O_2 濃度は、 $O_2 \gg Air \gg N_2$ となり、 O_2 では、0~15秒で H_2O_2 濃度が増加し、その後、飽和する傾向を示した(図5)。また、雰囲気ガスが空気の場合、増加傾向を示すものの、酸素と比較して、約8分の1であった。雰囲気ガスを窒素とした際には H_2O_2 の生成は、ほぼゼロであった。 NO_2^-/NO_3^- 濃度は、 $N_2 \gg Air \gg O_2$ となり、 N_2 およびAirにおいて、照射時間に対して増加傾向を示した(図6)。雰囲気ガスを窒素で充填させた際にはNO濃度は、60sで $13\mu\text{mol/l}$ となり最も増加した。雰囲気ガスを空気としたとき、緩やかに濃度が増加した。以上より、多孔質プラズマ源が生成する活性種は、プロセスガスに依存し、その濃度は、プラズマ処理時間に依存することがわかる。

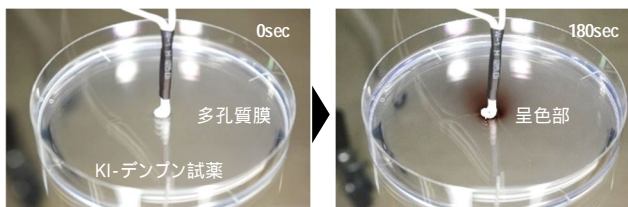


図4. KI-デンブ試薬の呈色反応の様子

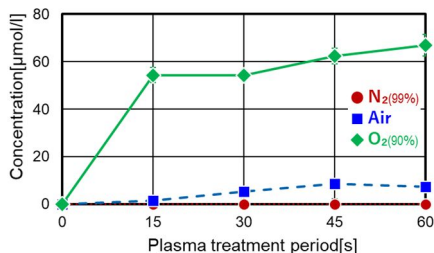


図5. 過酸化水素濃度のプラズマ照射時間依存性

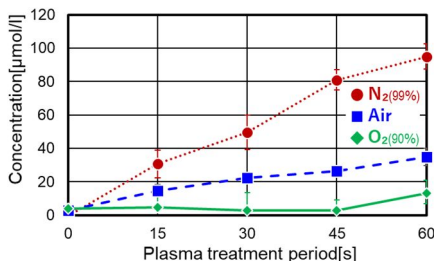


図6. NO_2^-/NO_3^- 濃度のプラズマ照射時間依存性

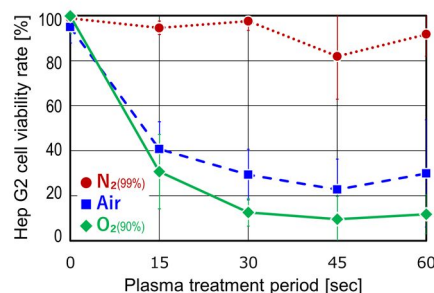


図7. プラズマ照射時間に対するHep G2細胞生存率

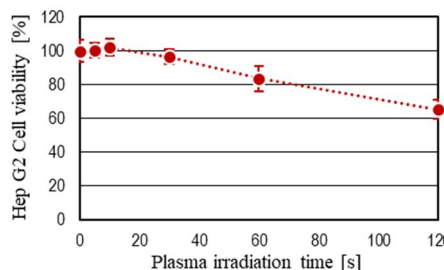


図8. プラズマ照射時間に対する3次元培養Hep G2細胞の生細胞率の変化

(2) ヒト肝芽腫由来細胞株Hep G2への影響

Hep G2細胞の生存率は、プロセスガスが酸素、乾燥空気するとき、プラズマ照射時間と共に減少する傾向を示した(図7)。窒素の場合、Hep G2細胞の細胞生存率への影響は見られなかった。酸素、乾燥空気では、0~15秒で細胞生存率が低下し、その後は80~85%程度の細胞が不活化した。活性窒素種は細胞生存率に影響を与える主要因ではなく、多孔質膜プラズマ源から発生した活性酸素種が、Hep G2細胞の生存率に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

(3) ヒト肝芽腫由来細胞株Hep G2凝集体(スフェロイド)への影響

スフェロイド培養したHep G2細胞の生存率は、プラズマ照射時間に依存して減少する傾向を示し、120秒で約65%まで減少した(図8)。多孔質膜プラズマ源は、スフェロイド培養したHep G2細胞の生細胞率を減少することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Yagyu, Y. Baba, T. Ohshima, Y. Hibino, K. Moriyama, T. Satake, T. Ihara, H. Kawasaki and N. Hayashi
2. 発表標題 Development of a novel plasma device for cancer treatment and irradiation effects on the hepatoblastoma-derived cell, Hep G2
3. 学会等名 International Conference on Phenomena in Ionized Gases XXXV (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳生義人, 馬場雄成, 大島多美子, 日比野祐介, 竹市悟志, 佐竹卓彦, 猪原武士, 川崎仁晴, 林信哉
2. 発表標題 生体内で利用可能な非平衡大気圧プラズマ照射装置の研究開発
3. 学会等名 2023年第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳生義人, 馬場雄成, 日比野祐介, 竹市悟志, 佐竹卓彦, 大島多美子, 川崎仁晴, 林信哉
2. 発表標題 多孔質膜を用いた生体内で利用可能な大気圧プラズマ源の研究開発
3. 学会等名 第39回九州・山口プラズマ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳生義人, 大島多美子, 日比野祐介, 竹市悟志, 佐竹卓彦, 猪原武士, 川崎仁晴, 林信哉
2. 発表標題 スフェロイド培養したHep G2細胞に多孔質膜プラズマ源が与える影響
3. 学会等名 2024年第71回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 濱村航大, 柳生義人, 馬場雄成, 大島多美子, 日比野祐介, 猪原武士, 佐竹卓彦, 川崎仁晴, 林信哉
2. 発表標題 生体内がん治療に向けたプラズマデバイスの開発および肝がん細胞への照射効果
3. 学会等名 第39回プラズマ・核融合学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱村航大, 柳生義人, 馬場雄成, 林信哉
2. 発表標題 生体内がん治療に向けた大気圧低温プラズマ照射装置の研究開発
3. 学会等名 電気設備学会 2022年(第4回)学生研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 プラズマ発生装置及びそれをを用いた治療装置	発明者 柳生義人, 林信哉	権利者 独立行政法人国立高等専門学校機構, 国立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-181278	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------