

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289071

研究課題名(和文)真空紫外光で生成した活性種による革新的医療プロセスの開発

研究課題名(英文)Development of medical technology using reactive species produced by vacuum ultraviolet light

研究代表者

小野 亮(Ono, Ryo)

東京大学・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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真空紫外光(100～200nm)の光化学反応を用いてO₂やH₂OからOやOHなどの活性種を生成し、これら活性種の生体反応を利用して癌治療や創傷治癒を行う新しい医療プロセスを提案した。装置を作製して活性種計測を行い、シミュレーションで予想した通りの活性種が生成されていることを確認した。本手法でOHを生成して菌に照射し、創傷治癒で重要とされる殺菌を行えるだけのOHを照射できることを示した。本手法は、現在盛んに研究されているプラズマ医療で、各活性種の治療効果を定量的に測定する手段としても有用であることも示し、プラズマ医療の発展にも大きく貢献できることを示した。

研究成果の概要(英文)：We proposed a new medical technology utilizing reactive species produced by photochemical process using vacuum ultraviolet light (VUV). It would be used for, for example, cancer treatment and wound healing. The VUV light produces such as O and OH from O₂ and H₂O. We made the equipment and confirmed that the system produces reactive species with densities expected by simulation. We treated bacteria with OH radicals produced by this system and showed that this system can produce sufficient amount of OH radicals to cause sterilization, which is important for wound healing. It was shown that this method can also be used for quantitative analysis of medical effect of each reactive species in plasma medicine which is intensively studied these days. This method contributes to the development of plasma medicine.

研究分野：プラズマ工学

キーワード：プラズマ医療 真空紫外光 活性種 レーザー計測 エキシマランプ

1. 研究開始当初の背景

放電プラズマを生体に照射して医療を行う「プラズマ医療」が、近年盛んに研究されている。プラズマで生成された O, N, OH, O₃, HO₂, NO, O₂などの活性種が患部に作用し、癌治療、怪我治療、止血、殺菌などの治療効果を発揮する。特に癌治療は切除手術、化学療法、放射線治療に続く第4の治療法として期待が高まっている。

プラズマ医療の実用化には、どの活性種が治療に効果的、あるいは人体に有害かを明らかにする原理解明が必須である。しかし、プラズマには50種以上の活性種と1000にも及ぶ反応が存在するため、原理解明は容易ではない。このような背景のもと、本研究ではプラズマ医療に代わる新しい手法として、より簡単な反応系で「活性種による医療」を実現する手法を提案する。石英管に O₂/He または H₂O/He を流し、そこに真空紫外光を照射する。真空紫外光は O₂ や H₂O を解離して様々な反応を誘起し、プラズマ医療で治療効果が高いと言われている O, OH, O₃, HO₂, O₂(a¹Δ_g)等の活性種を生成する。これら活性種をそのまま患部に照射して、治療を行う。プラズマ医療では50種の活性種と1000の反応が存在するのにに対し、本手法ではおよそ7種の活性種と50の反応が存在するのみである。プラズマ医療と同様の効果が期待できると同時に、反応が極めてシンプルのため、治療機序の解明が容易で、活性種の濃度制御も容易である利点がある。

近年盛んに研究されているプラズマ医療は、医療に革新をもたらす可能性を秘めており、プラズマ業界だけでなく医学界からも期待の声が大きい。その一方で、

- (i) 反応が複雑で原理解明が容易ではない。
- (ii) 人体に対する影響の不明な活性種が他種生成され、予期せぬ副作用が懸念される。
- (iii) 活性種の種類が多いため、治療に効果がある特定の活性種だけを濃度制御するのが困難。

といった問題がある。本手法は、これらの欠点をすべてクリアできる可能性がある。また副次的な効果として、本研究で様々な活性種の治療効果が明らかになれば、プラズマ医療の原理解明にも貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では以下の4つの項目に取り組み、装置の開発および治療効果の検証を行う。

- 1) 真空紫外光による活性種生成装置を開発する。真空紫外光源には、エキシマランプを使用する。
- 2) 本手法における活性種生成反応シミュレーションを開発する。
- 3) 上記1)で開発した装置の活性種密度を計測し、シミュレーション結果と比較することで、シミュレーションが活性種密度を正しく計算できているかどうかを確認する。

- 4) 本研究で開発した装置の治療効果を検証するため、細菌や細胞等に活性種を照射して、その生体反応を調べる。これらの実験結果と上記2, 3の知見をもとに、どの活性種にどのような治療効果があるかも調べ、治療原理の解明も行う。

3. 研究の方法

(1) 真空紫外光による活性種生成装置の開発

本研究で用いる、真空紫外光による活性種生成装置を開発する。内径2mm程度の石英管に反応ガスを流し、石英管の外側に配置したランプから反応ガスに真空紫外光を照射する。反応ガスが真空紫外光に照射される時間と、その後に患部に到達するまでの時間を石英管の長さで調節することで、活性種の生成反応を制御する。真空紫外光源には、波長172nmのXe₂エキシマランプや、146nmのKr₂エキシマランプを利用する。前者はH₂O、後者はO₂の光解離反応断面積が大きく、本手法に適している。エキシマランプは市販されているが、高価なため、バリア放電を用いたエキシマランプの自作を試みる。

(2) 活性種生成反応シミュレーションの開発

本研究で開発した装置の、活性種生成反応シミュレーションを開発する。本手法では石英管を流れる反応ガスの流量をある程度低く抑え、乱流ではなく層流になるように条件を設定する。石英管は2mm程度と細いため、径方向に対してガス組成が均一と近似すると、石英管の流れ方向の一次元シミュレーションを用いることができる。50程度の素反応のレート方程式を解き、流れ方向の活性種密度の変化を数値計算する。シミュレーションの結果は、次の(3)で述べる活性種密度の測定結果と比較して、その信頼性を確かめる。

(3) 活性種密度計測

本研究で開発した装置の活性種密度を計測する。OHはレーザー誘起蛍光法(LIF: laser-induced fluorescence)、Oは二光子励起LIF(TALIF: two-photon absorption LIF)、O₃はレーザー吸収法、O₂(a¹Δ_g)は赤外発光分光、O₂(b¹Σ_g⁺)は発光分光法、H₂O₂は検知管、HO₂は半導体レーザー吸収法で測定できる。すべてを測定するのは困難であるが、測定できるものから順に測定し、シミュレーション結果と比較する。

(4) 細胞および細菌への照射実験と治療に有効な活性種の解明

本研究で開発した手法で生成した活性種を細胞や細菌に照射し、生体に対する効果を調べ、治療効果があるかどうかを検証する。同時に、それぞれの生体効果と活性種密度の関係を調べ、どの活性種にどのような治療効果があるかも調べる。

4. 研究成果

(1) 真空紫外光による活性種生成装置の開発
 プラズマ医療で治療効果が高いと考えられている OH の生成を目的として、装置の開発を行った。OH は H_2O を真空紫外光で光解離して生成する。 H_2O の光解離には、波長 172 nm の Xe_2 エキシマランプが最も光解離断面積の大きい波長域にあるため、これを光源とした。 Xe_2 エキシマランプは照射寿命が 1000 時間以下と短寿命にも関わらず非常に高価なため、当初は自作を試みた。しかし期待したほどの照度が得られず、また従来の 1/6 の価格で購入できる安価な Xe_2 エキシマランプ（ウシオ電機、Mini-Excimer）がちょうど発売されたため、これを購入して用いることにした。

波長 172 nm の光をよく通すグレードの石英管（内径 2 mm）に $\text{H}_2\text{O}/\text{He}$ 混合気を通し、エキシマランプ光を混合気に照射する装置を作成した。ランプと石英管は、石英管の加熱を防ぐためにある程度離して設置した。172 nm の真空紫外光は空気中の O_2 に吸収されるため、空気中を 1 mm 進んだだけでも大きく減衰してしまう。そのため、ランプと石英管の間に N_2 ガスを流し、真空紫外光が O_2 に吸収されずに石英管に到達するようにした。本装置を用いて OH を生成することに成功し、研究成果は論文として発表した（Journal of Physics D: Applied Physics, Vol. 47, No. 44, 2014, 445203）。

OH の他に、O を生成する装置も開発した。当初は、 O_2/He 混合気に、 O_2 の光解離断面積が大きい波長 146 nm の Kr_2 エキシマランプ光を照射して O 原子を生成する予定であった。しかし Kr_2 エキシマランプは入手が困難であったことや、石英が 146 nm の光を透過しないため本実験に使用できないなど種々の困難があったため、別の手法を開発した。 O_3/He ガスに波長 248 nm の KrF エキシマレーザーを照射し、 O_3 を $\text{O} + \text{O}_2$ に光解離する手法である。 O_3 を計算通りにエキシマレーザーで光解離できることを確認し、研究成果は論文として発表した（Journal of Physics D: Applied Physics, Vol. 48, No. 27, 2015, 275201）。

(2) 活性種生成反応シミュレーションの開発

(1) で開発した装置のシミュレーションを開発した。13 種類の粒子種（ He , O_2 , H_2O , O , $\text{O}(^1\text{D})$, O_3 , OH , H , H_2 , $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$, $\text{O}_2(b^1\Sigma_g^+)$, HO_2 , H_2O_2 ）46 種類の反応を含めたシミュレーションである。得られた研究成果については、次の「(3) 活性種密度計測」で一緒に述べる。

(3) 活性種密度計測

O_3 , OH , $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$, H_2O_2 の密度を計測し、シミュレーション結果と比較した。 O_3 は波長 254 nm の低圧水銀ランプを用いた吸収法、OH はレーザー誘起蛍光法、 $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ は 1.27 μm の近赤外発光計測、 H_2O_2 は検知管を用い

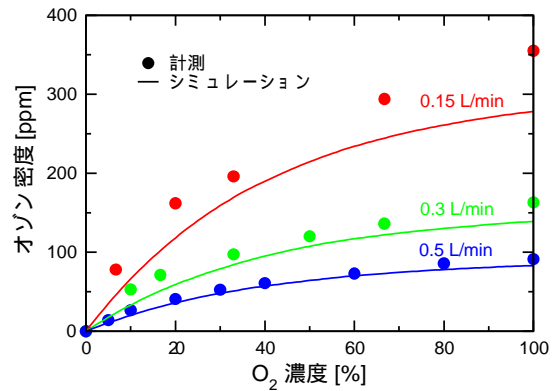


図 1 オゾン濃度の計測およびシミュレーション結果の比較。

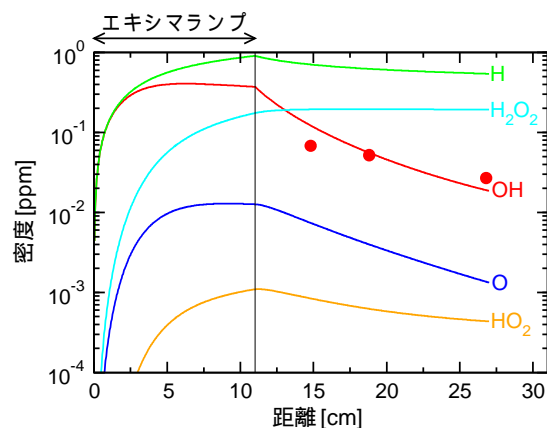


図 2 OH 密度の計測結果と各活性種密度のシミュレーション

て計測した。その結果、 O_3 と OH 密度はシミュレーション結果とよく一致し、 H_2O_2 密度も 2 倍以内の差でシミュレーション結果と一致した。 $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ についてはシミュレーション結果と数倍の差が生じたが、原因を突き止めるには至らなかった。例として、 O_3 および OH の計測結果とシミュレーションの比較を、それぞれ図 1 と 2 に示す。いずれも、計測結果とシミュレーションは良い一致を示している。このように、 $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ については計測結果とシミュレーションにある程度の差が生じたものの、その他の活性種密度については両者が良く一致することを示し、本シミュレーションが妥当なレベルで活性種密度を計算できることを示した。これで、本手法にシミュレーションを併用することで、密度が既知の OH など特定の活性種を発生させ、その殺菌効果などを調べる準備が整った。

(4) 細胞および細菌への照射実験と治療に有効な活性種の解明

本手法を用いて殺菌実験を行い、OH の殺菌効果を調べることに成功した。殺菌は重要な医療効果の一つであり、創傷治療などで主

要な役割を果たす。本研究成果により、本手法が創傷治療などに利用できる可能性を示すことができた。

殺菌実験について説明する。寒天培地上に枯草菌を塗布し、これを本手法（以下 VUV 法）で殺菌した。作動ガスには He と He/H₂O を用いた。その結果、He では殺菌が起きず、He/H₂O でのみ殺菌が生じた。H₂O の光解離で生じた活性種、すなわち OH, H, O, HO₂, H₂O₂ のいずれかが殺菌したことを示している。ランプの照射位置から細菌までの距離を大きくすると殺菌効果が著しく減少したことから、この 5 種類の活性種のうち短寿命の活性種が殺菌していることが分かった。したがって、寿命の長い H₂O₂ は殺菌した活性種の候補から外すことができる。

次に、He/H₂O に 1% の O₂ を混ぜて殺菌実験を行った。この He/H₂O/O₂ では、H は瞬時に O₂ と反応して HO₂ になるため、He/H₂O のときと比べて H 密度は著しく減少し、HO₂ 密度は著しく増加する。また O は O₂ と反応して O₃ になるため、O 密度は著しく減少する。一方で、OH 密度はほとんど変化しない。He/H₂O と He/H₂O/O₂ の殺菌効果を比較したところ、両者はほとんど変わらなかった。この結果から、殺菌は両者で密度が変化しない活性種、すなわち OH によるものと結論できた。

本手法では活性種の定量的な制御が可能のため、どれだけ活性種を供給すればどれだけ治療効果が得られるかという、定量的な評価が可能である。本研究では、OH 供給量と枯草菌殺菌率の間の関係を測定し、OH による殺菌効果の定量的な評価も行った。

このように本研究では、本手法が活性種生成量を定量的に制御し、これを用いて殺菌という治療効果が得られることを示した。本手法が医療に利用できる可能性を示し、またその治療原理、すなわちどの活性種がどのような効果を引き起こしているかの定量的な評価にも成功した。

本研究成果を国内外の様々な学会等で発表したところ、プラズマ医療の原理解明に本手法を使ってはどうかというコメントが多かった。したがって本研究では、この点も踏まえ、VUV 法と共にプラズマ医療の研究にも精力的に取り組み、プラズマ医療における活性種と治療効果の関係を調べる研究も行った。そして、VUV 法の実験で注目した OH に注目し、プラズマ医療における OH の効果を検証する実験も行った。その結果、プラズマによる癌細胞の不活化実験において、細胞不活化率と OH 密度との間に相関が観測された。一方で、O や NO 密度とは相関が観測されなかった。今後、プラズマ医療の研究に対応した VUV 法の実験をさらに進めることで、プラズマ医療の原理解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 13 件)

I. Yagi, Y. Shirakawa, K. Hirakata, T. Akiyama, S. Yonemori, K. Mizuno, R. Ono, and T. Oda, Measurement of OH, O, and NO densities and their correlations with mouse melanoma cell death rate treated by a nanosecond pulsed streamer discharge, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 48, No. 42, 2015, 424006

DOI:10.1088/0022-3727/48/42/424006

R. Ono and Y. Tokumitsu, Selective production of atomic oxygen using laser photolysis as a tool for studying its effect in plasma medicine, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 48, No. 27, 2015, 275201

DOI:10.1088/0022-3727/48/27/275201

S. Yonemori, T. Kamakura, and R. Ono, Effect of discharge polarity on the propagation of atmospheric-pressure helium plasma jets and the densities of OH, NO, and O radicals, Biointerphases, 査読有, Vol. 10, No. 2, 2015, 029514

DOI:10.1116/1.4919709

I. Yagi, R. Ono, T. Oda and K. Takaki, Two-dimensional LIF measurements of humidity and OH density resulting from evaporated water from a wet surface in plasma for medical use, Plasma Sources Science and Technology, 査読有, Vol. 24, No. 1, 2015, 015002

DOI:10.1088/0963-0252/24/1/015002

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, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 47, No. 44, 2014, 445203

DOI:10.1088/0022-3727/47/44/445203

A. Komuro and R. Ono, Two-dimensional simulation of fast gas heating in an atmospheric pressure streamer discharge and humidity effects, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 47, No. 15, 2014, 155202

DOI:10.1088/0022-3727/47/15/155202

S. Yonemori and R. Ono, Flux of OH and O radicals onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet measured by laser-induced fluorescence, Journal of Physics D: Applied Physics, 査読有, Vol. 47, No.

12, 2014, 125401
DOI:10.1088/0022-3727/47/12/125401
R. Ono, Y. Nakagawa, Y. Tokumitsu, H. Matsumoto, and T. Oda, Effect of humidity on the production of ozone and other radicals by low-pressure mercury lamps, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 査読有, Vol. 274, 2014, pp. 13-19
DOI:10.1016/j.jphotochem.2013.09.012

[学会発表](計79件)

R. Ono, Measurement of reactive species in atmospheric-pressure nonthermal plasma used for plasma medicine, 9th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology / 28th Symposium on Plasma Science for Materials, 12/12 ~ 15, Nagasaki University (Nagasaki, Japan) (2015) (Keynote Lecture)

R. Ono, Measurement of radicals for plasma medicine, 4th Japan-Korea Joint Symposium on Plasma and Electrostatics Technologies for Environmental Application, 12/10 ~ 11, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan) (2015) (invited)

R. Ono, Measurement of reactive species for plasma medicine, 68th Annual Gaseous Electronics Conference / 9th International Conference on Reactive Plasmas, 10/12 ~ 16, Hawaii, USA (2015) (invited)

K. Yonetamari, Y. Shirakawa, T. Akiyama, K. Mizuno, and R. Ono, Verification of antitumor effect in vivo using nanosecond pulsed streamer discharge, 68th Annual Gaseous Electronics Conference / 9th International Conference on Reactive Plasmas, 10/12 ~ 16, Hawaii, USA (2015)

K. Yonetamari, Y. Tokumitsu, S. Yonemori, R. Ono, H. Yasuda, and A. Mizuno, Sterilization of Bacillus atrophaeus using OH radicals supplied by vacuum ultraviolet method, 68th Annual Gaseous Electronics Conference / 9th International Conference on Reactive Plasmas, 10/12 ~ 16, Hawaii, USA (2015)

T. Akiyama, K. Yonetamari, Y. Shirakawa, K. Mizuno, and R. Ono, In vitro and in vivo experiments on treatment of mouse melanoma using nanosecond pulsed streamer discharge, 22nd International Symposium on Plasma Chemistry, 7/5 ~ 10, Antwerp, Belgium (2015)

R. Ono, Measurement of radicals in atmospheric-pressure nonthermal plasma for plasma medicine, International Workshop on Diagnostics and Modelling for Plasma Medicine, 5/23 ~ 24, Nara Prefectural New Public Hall (Nara, Japan) (2014) (invited)

6. 研究組織

(1) 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