

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

Development of a Non-equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Irradiation Device for in vivo Cancer Treatment

○柳生義人¹, 馬場雄成², 大島多美子³, 日比野祐介¹, 竹市悟志¹, 佐竹卓彦¹, 猪原武士¹, 川崎仁晴¹, 林信哉² (1 佐世保高専, 2 九大総理工, 3 長崎大学)

E-mail ✉: yyagy@kosen.ac.jp Phone ☎: 0956-34-8528



【ABSTRACT】 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でいる。多孔質膜を介して、気相から液相に輸送された**活性酸素種(ROS)**をKIデンブ法により確認し、また、**ヒト肝芽腫由来細胞Hep G2**に対して、多孔質膜を通過した活性酸素種が細胞死を誘導することが明らかとなった。今後、多孔質膜内での化学反応と活性種の輸送・拡散機構の解明 および **がん細胞凝集体(スフェロイド)**に対する不活化効果の検証・作用機序の解析を行う。

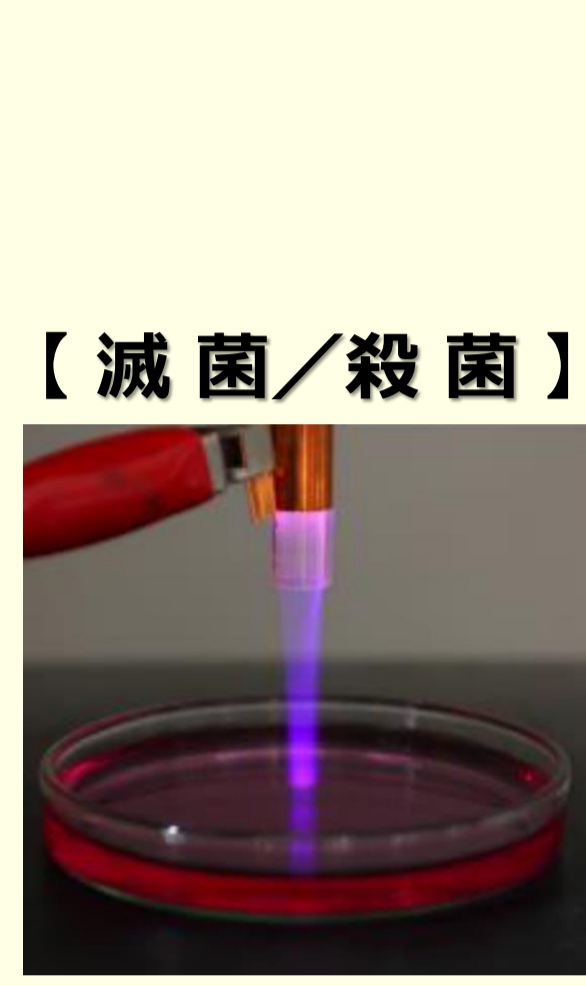
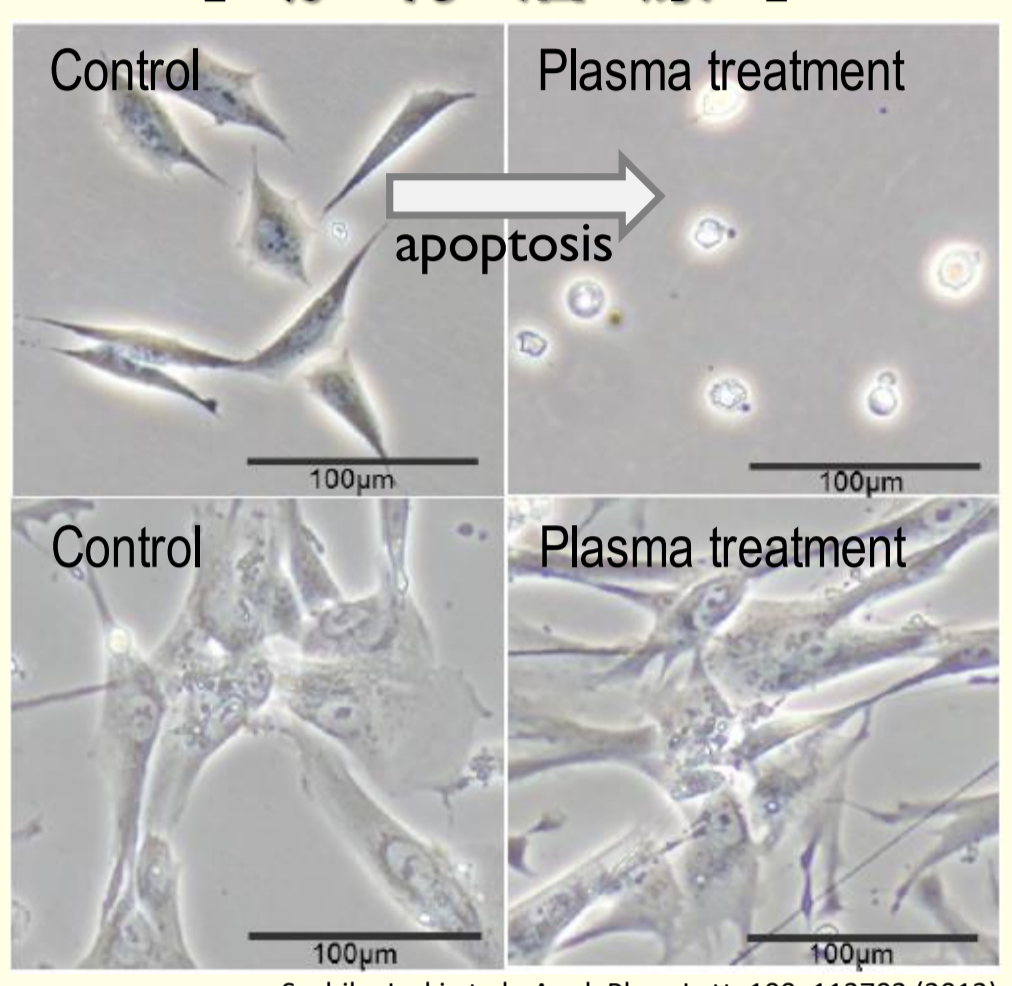
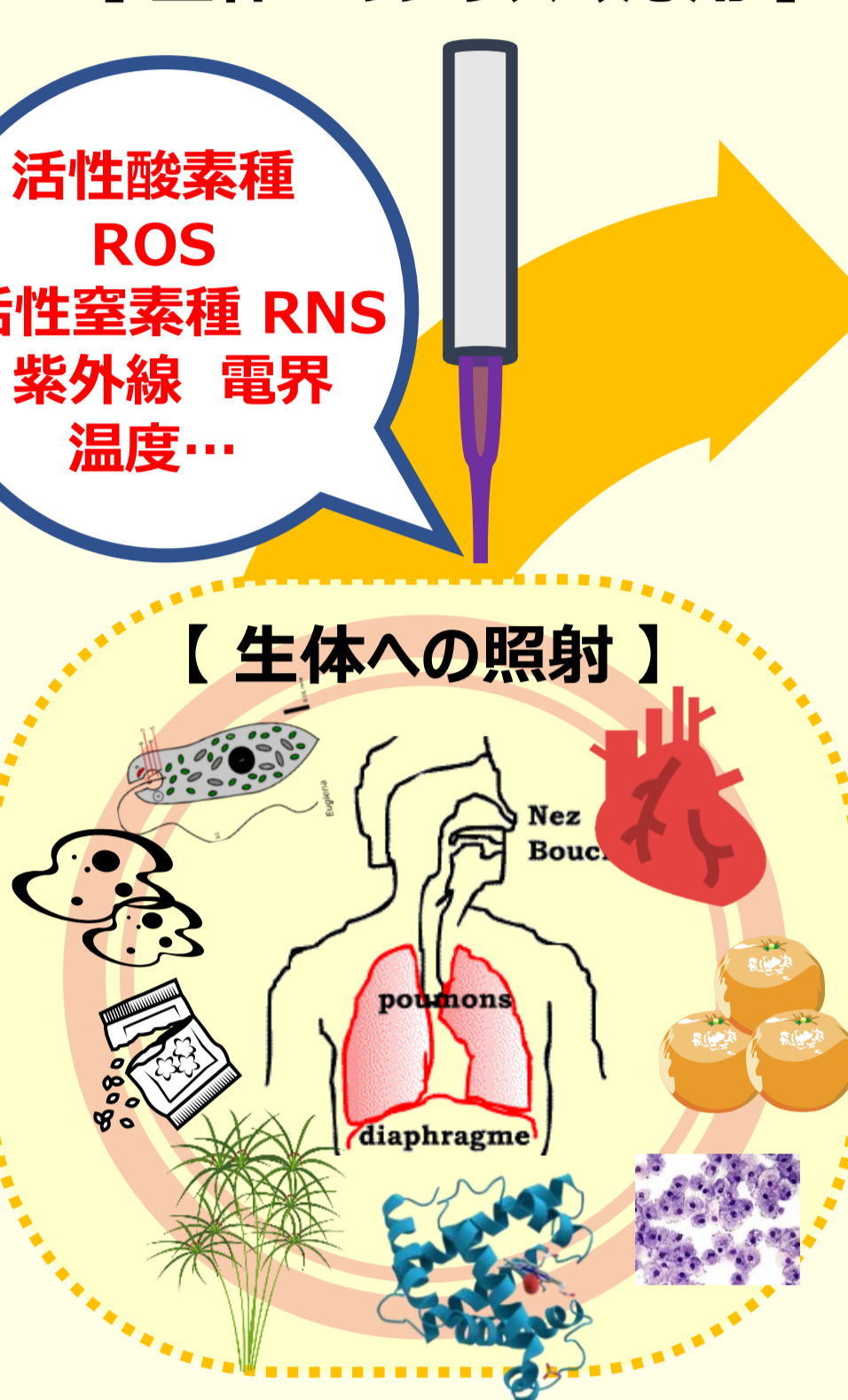
はじめに

1

【生体へのプラズマ応用】

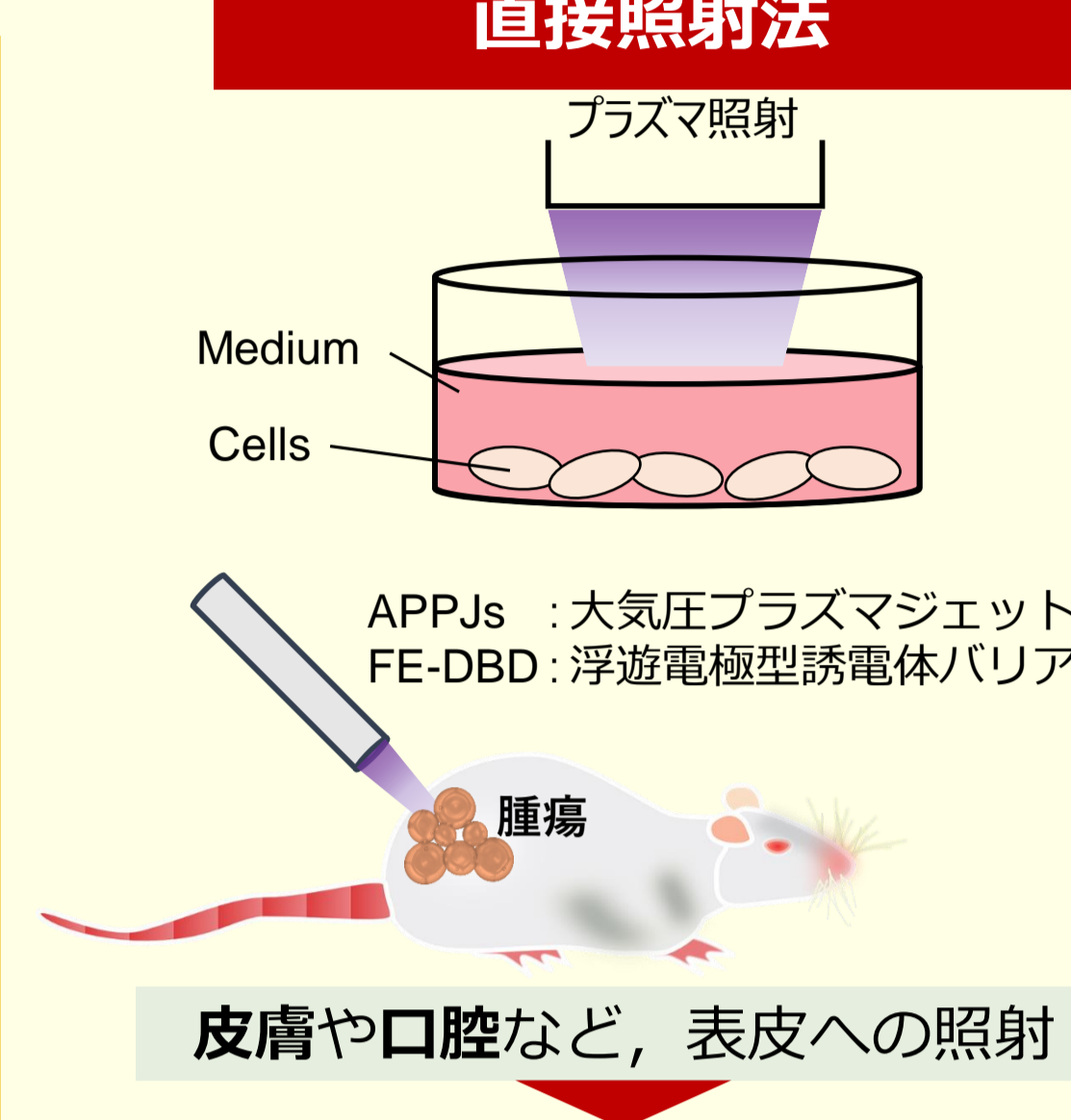
【がん治療】

【創傷/火傷/皮膚治療】

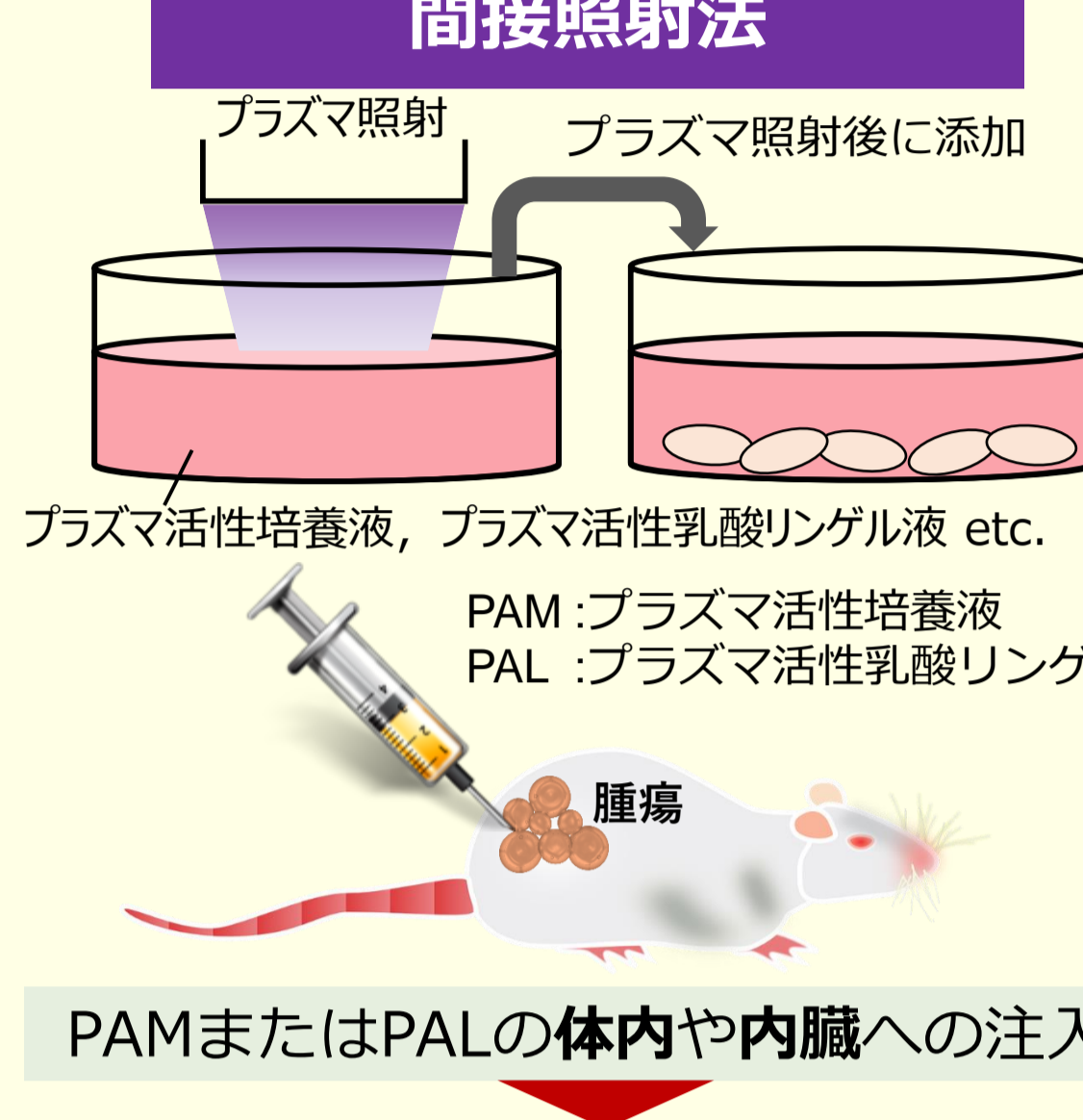


◆プラズマ照射法

直接照射法



間接照射法



当初の研究報告から、進展がない 名古屋大学研究グループにより、研究開発が進む

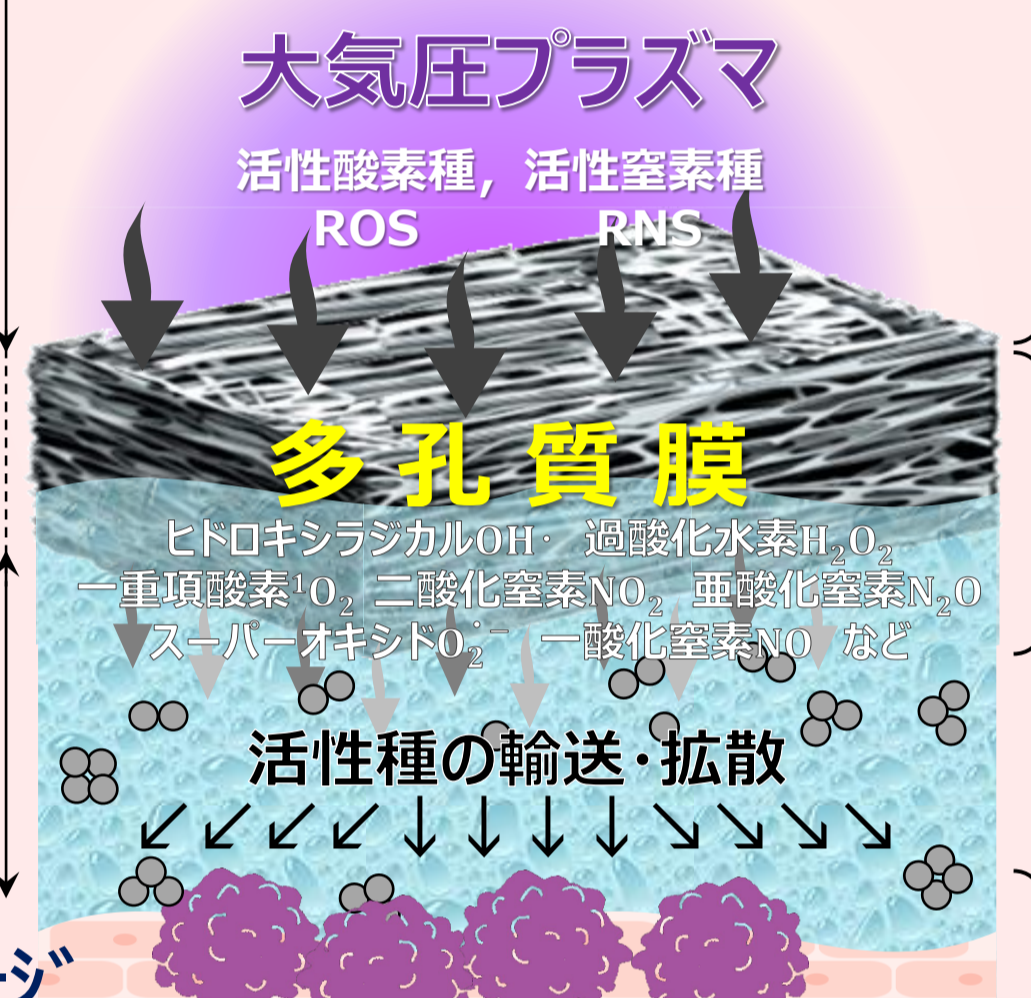
Goal プラズマによる生体内がん治療法の確立に向け、生体内で利用可能な医療用プラズマデバイスを開発する。

生体内で利用可能な「多孔質膜プラズマ源」の開発

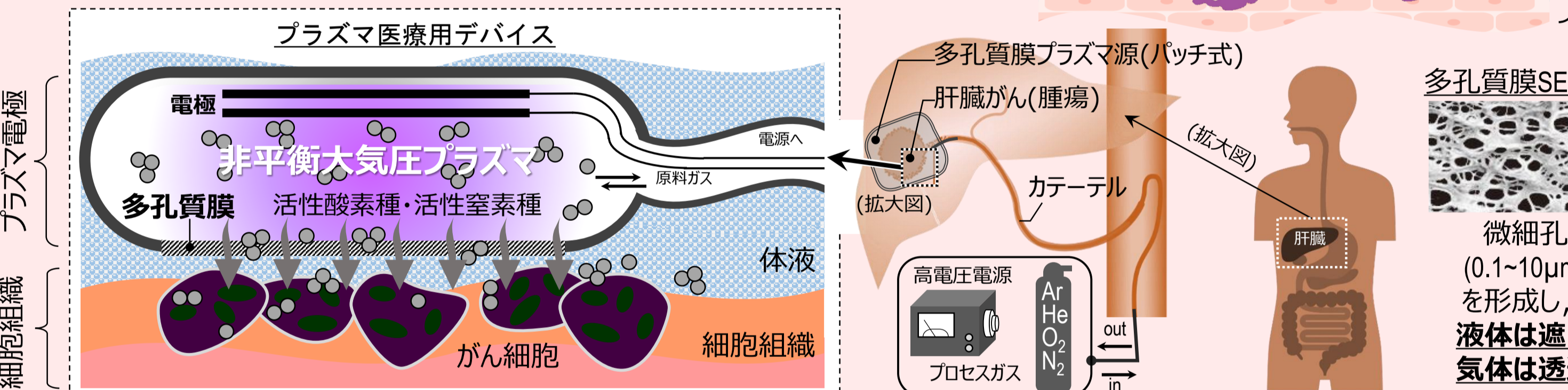
2

Problem
・生体内は、体液や臓器などで満たされ、プラズマの生成が抑制される = プラズマ生成に不利な環境
→ 生体内での直接照射法が難しい要因

Solution
・生体内でプラズマを生成するには、気相のプラズマ領域と液相を分離する必要がある
→ 多孔質膜を利用：ガス透過、液体遮断
気相と液相を多孔質膜で分離することで、がんの発生部位に関係なく、プラズマを照射できるのでは!?
→ 「多孔質膜プラズマ源」の開発に着手

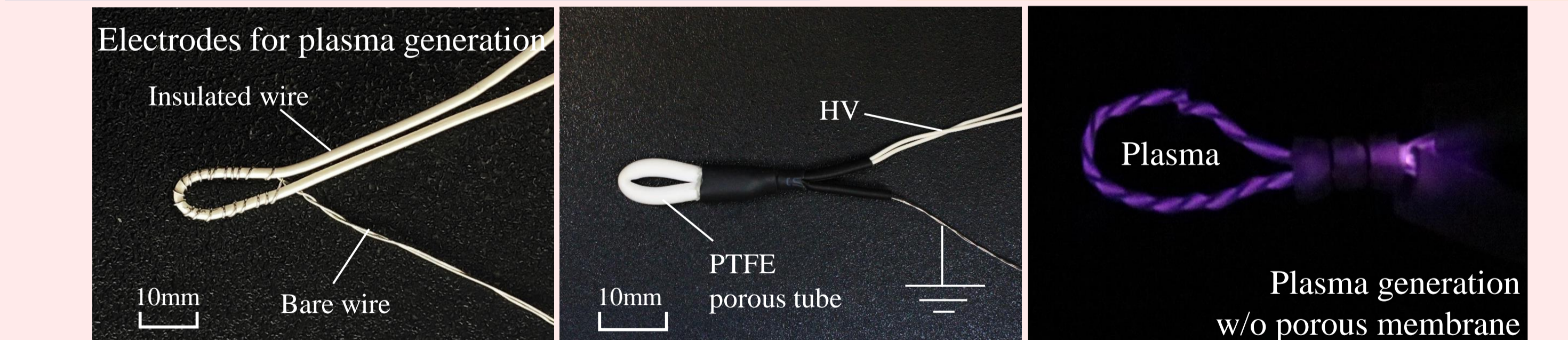


・「多孔質膜プラズマ源」による生体内プラズマ直接照射法のイメージ



<利点>
● プラズマ中の活性種を生体内のがんに直接輸送
● カテーテルなどを用いて、プラズマ電極を体内に挿入
● 高濃度の活性種を照射できる
・「多孔質膜プラズマ源」の開発

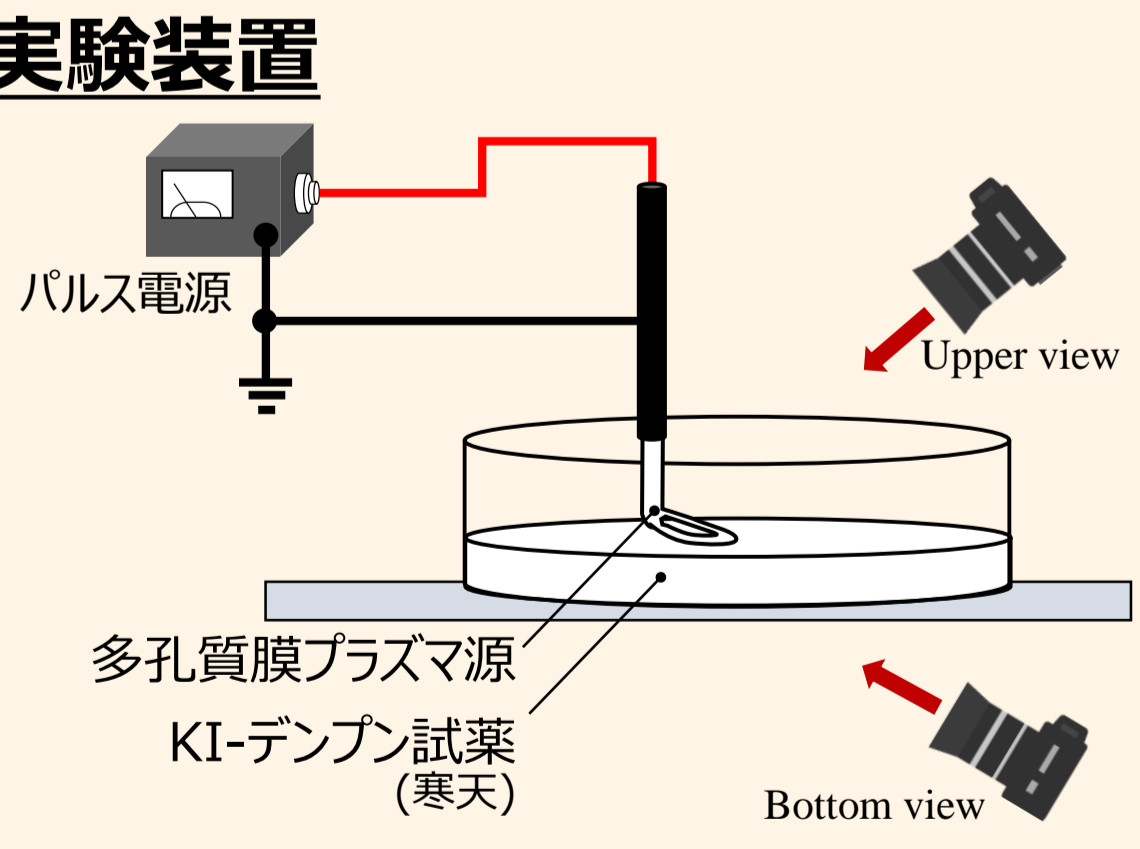
✓ 体内や臓器に発生するがんに対する直接照射法の可能性
✓ 生体内でのプラズマ照射による新しいがん治療法開発の可能性



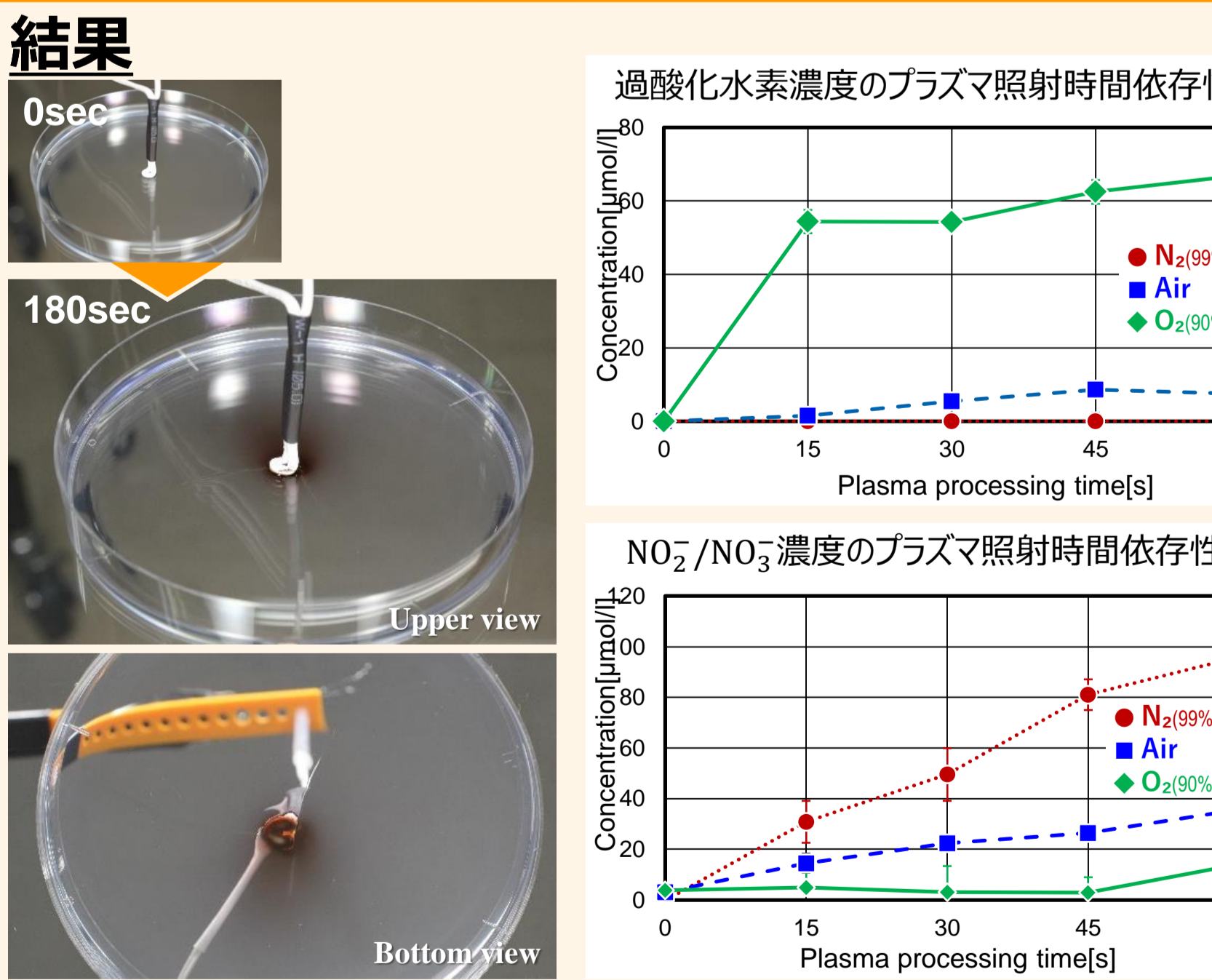
活性種の検出：ROS, H₂O₂, NO

3

目的
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検証する。



実験条件
・パルス電源 : 8kV, 100~500pps (MPC3010S-50SP; 株式会社末松電子製作所)
・処理時間 : 0~180sec
・KI-デンブ試薬 : ヨウ化カリウム0.3%, デンブ 0.5% (寒天) 0.75%
酸化還元電位 : OH radical 2.80V, Atomic oxygen 2.42V, Ozone 2.07V, H₂O₂ 1.78V, Hydroperoxy radical HO₂ 1.70V
・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)



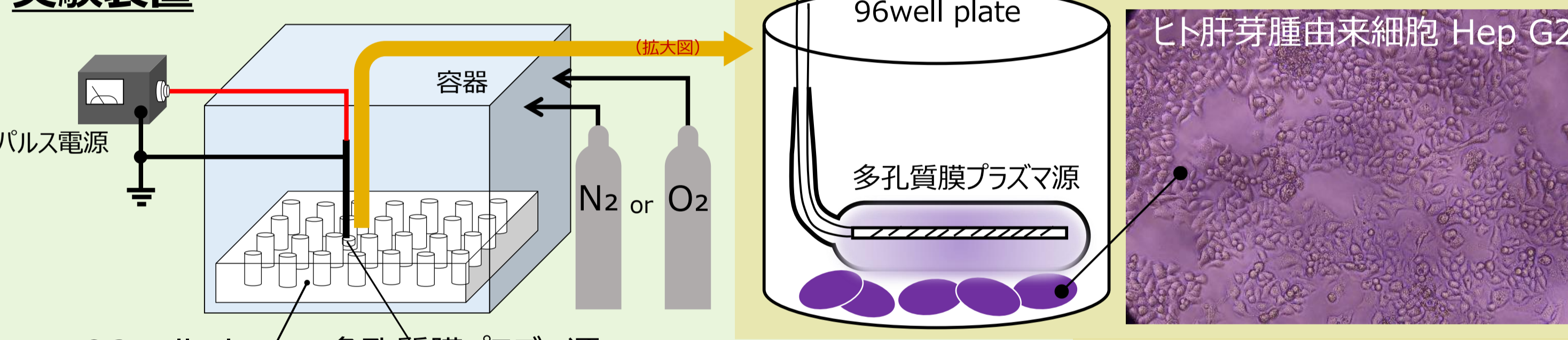
・**KI-デンブ試薬**
プラズマ電極周辺の試薬が、時間と共に変色することを確認
→ 多孔質膜プラズマ源から**活性酸素種(ROS)**の発生を確認
→ プラズマ生成時の漏れ電流は小さいため、**感電しない**(8kV印可, 15mA程度)
・**H₂O₂濃度**
O₂ >> Air >> N₂
→ O₂では、15秒までH₂O₂濃度が増加後、飽和する傾向を示す。
・**NO₂⁻/NO₃⁻濃度**
(※ Griess法：一酸化窒素NOが酸化されて生じるNO₂を検出。NOを簡便に測定できるため、広く使用される。)
N₂ >> Air >> O₂
→ N₂では、照射時間按比例して増加傾向を示す。Airにおいて、一酸化窒素NOの生成を確認した。

ヒト肝芽腫由来細胞HepG2への影響

4

目的
多孔質膜プラズマ源から発生する活性種が、ヒト肝芽腫由来細胞(Hep G2; JCRB1054)に与える影響を検証する。

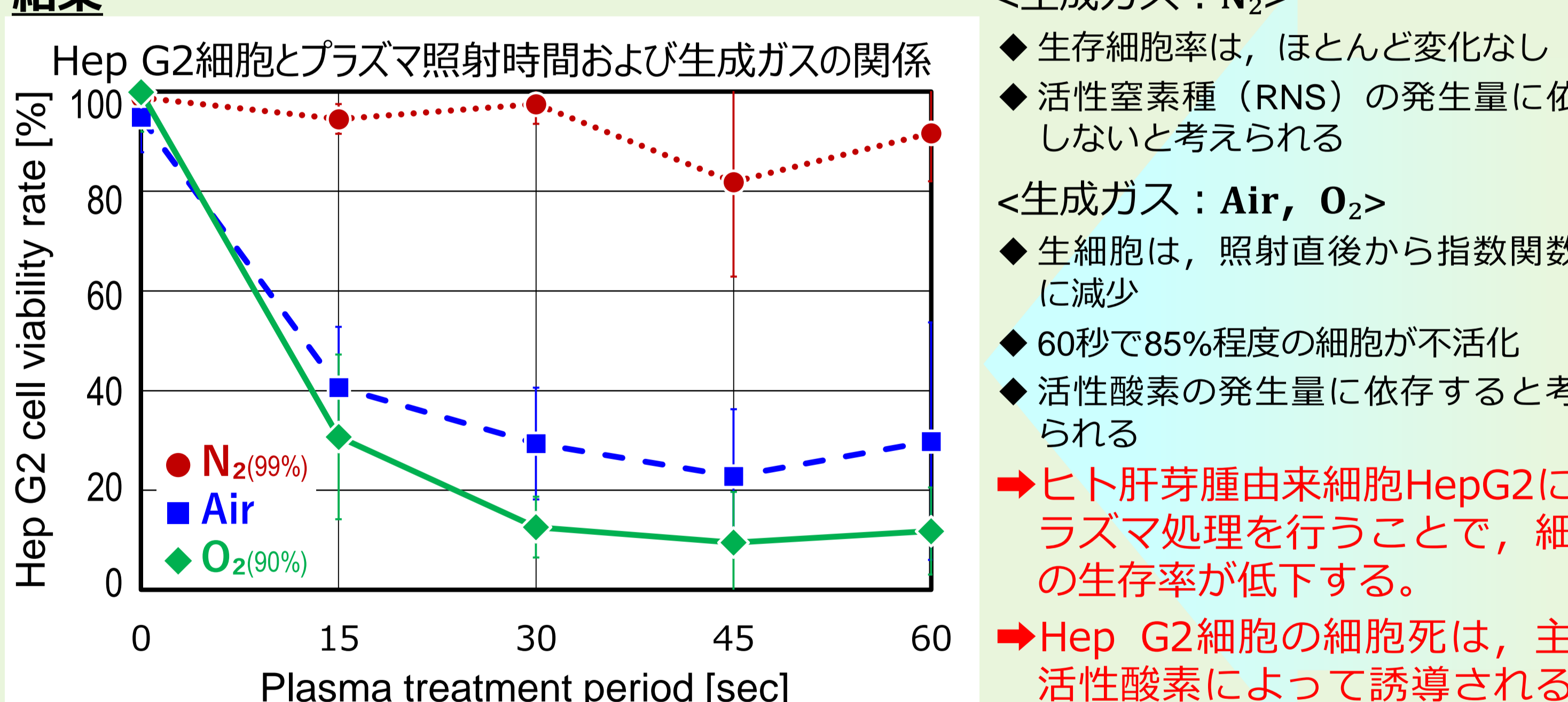
実験装置



実験条件

細胞: ヒト肝芽腫由来細胞 Hep G2; JCRB1054 (hepatoblastoma-derived cell)
処理時間: 0~120sec
印加電圧: 8kV, 500pps (MPC3010S-50SP; 株式会社末松電子製作所)
評価: Cell Counting-kit 8 (同仁化学研究所)

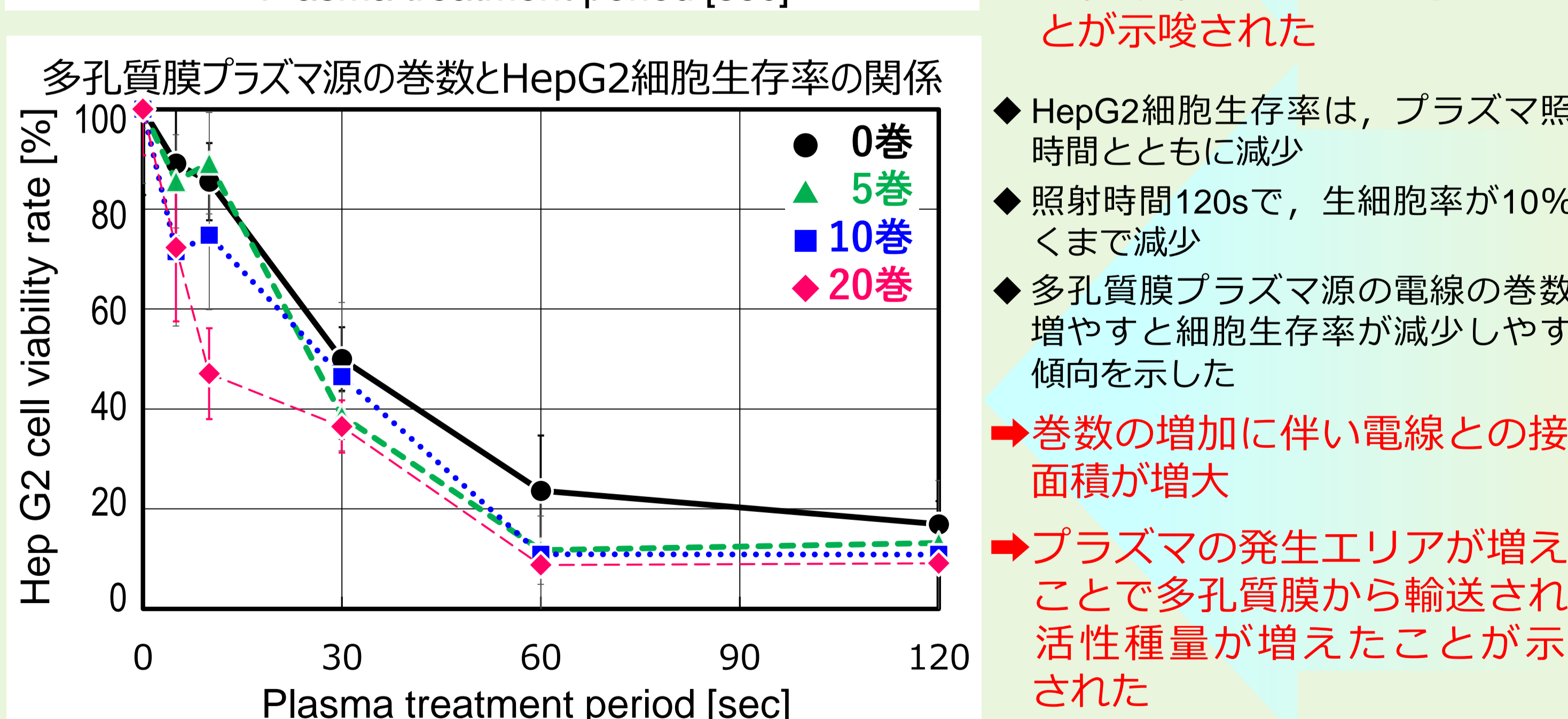
結果



<生成ガス: N₂>
◆ 生存細胞率は、ほとんど変化なし
◆ 活性窒素種 (RNS) の発生量に依存しないと考えられる

<生成ガス: Air, O₂>
◆ 生細胞は、照射直後から指数関数的に減少
◆ 60秒で85%程度の細胞が不活化
◆ 活性酸素の発生量に依存すると考えられる

→ ヒト肝芽腫由来細胞HepG2にプラズマ処理を行うことで、細胞の生存率が低下する。
→ Hep G2細胞の細胞死は、主に活性酸素によって誘導されることが示唆された



◆ HepG2細胞生存率は、プラズマ照射時間とともに減少
◆ 照射時間120sで、生細胞率が10%近くまで減少
◆ 多孔質膜プラズマ源の電線の巻数を増やすと細胞生存率が減少しやすい傾向を示した

→ 巻数の増加に伴い電線との接触面積が増大
→ プラズマの発生エリアが増えることで多孔質膜から輸送される活性種量が増えたことが示唆された

まとめ、今後の予定

5

- これまで、**生体内でのプラズマ直接照射は困難**であった。
- 多孔質膜を用いて、**液相と気相を分離**することで、生体内で利用可能な、「**多孔質膜プラズマ源**」を開発した。
- 多孔質膜プラズマ源から、**活性酸素種(ROS)の生成を確認**した。
- HepG2細胞の細胞死を確認し、主に活性酸素の影響を受けることが示唆された。

【今後の予定】 多孔質膜での化学反応と活性種の輸送・拡散機構の解明 および **がん細胞凝集体(スフェロイド)**の不活化効果の検証・作用機序の解析を行う。

謝辞 本研究の一部は、日本学術振興会JSPS科研費 21K04012の助成を受けたものです。ここに心より感謝申し上げます。