

報告番号	甲 第 11912号
------	------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Study on biomedical and chemical reactions in culture medium irradiated with non-equilibrium atmospheric pressure plasmas
(非平衡大気圧プラズマ照射培養液内における生体および化学反応に関する研究)

氏 名 倉家 尚之

論 文 内 容 の 要 旨

非平衡大気圧プラズマ (Non-equilibrium atmospheric pressure plasma: NEAPP) の高い反応性による様々な応用が報告されているが、その作用メカニズムは解明されていない。その応用方法としては大別してプラズマ照射液を対象に作用させる方法 (間接照射) とプラズマを対象に直接照射する方法 (直接照射) の 2 種類が存在し、それらを包括的に理解する必要がある。本研究では細胞培養液を対象とし、間接照射の応用としてがん治療、直接照射の応用としてシュウ酸カルシウム結晶合成を研究対象としてプラズマ培養液間の相互作用を包括的に解明した。

Chapter 1 Introduction

本章においてはNEAPPの一般的な作用機構と今回対象にした応用について説明している。がん治療のニーズは主に先進国で高まっている。溶液を用いることで生体内への適用が注射等で容易に行えるため、プラズマを照射した細胞培養液 (Plasma Activated Medium: PAM) を用いて間接的にプラズマの効果を適用した。その効果は細胞およびマウスで十分確認されており、その未解明なメカニズムの解明が急務であった。プラズマで生成される活性種のうち比較的長寿命なものがPAM内に残留し抗腫瘍効果を示していると考えられる。また、その生成には短寿命な活性種が前駆体として働いていると考えられる。

シュウ酸には多くの工業的用途があるが、現在の合成法では時間がかかる、複雑でコ

ストがかかる等の欠点がある。私はプラズマによるシュウ酸カルシウム結晶合成を提案する。シュウ酸カルシウム結晶合成が実現すればそこから工業的価値のあるシュウ酸を容易に合成することが出来る。また、短時間（数分）かつ 2 プロセスで合成できる可能性がある。プラズマによる有機分解、アミノ酸の酸化等の文献やタンパク質結晶化の文献があるが、シュウ酸カルシウム結晶合成に関しは今回が初の試みであり、まずは基礎的な現象の理解が求められている。

Chapter 2 Experimental setup and evaluation methods of PAM and crystals

本章においては本研究で用いた装置および実験方法について述べている。非平衡大気圧プラズマ源と照射溶液（培養液）は全実験で同じものを用いた。

Chapter 3 Quantitative measurement of RONS in the PAM

本章では PAM 内の短寿命および長寿命活性種の定量的計測結果について述べている。プラズマ照射水に対してのこれらの研究はある程度進んでいたが、PAM 内の解析はほとんど行われていなかった。

短寿命活性種では $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{H}$ が検出され、水の光分解による生成が考えられた。一方で NO や $\cdot\text{O}_2^-$ などは生成が見られなかったが、それぞれ溶解度が低いこと、pH が 8 程度でバッファーされていることをその原因として挙げている。

長寿命活性種では H_2O_2 、 NO_2^- および NO_3^- の生成が見られた。 H_2O_2 と NO_2^- のみプラズマ照射時間に比例する生成が見られ、プラズマ照射の直接の効果で生成していると考えられた。本プラズマ源における $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ 比は他のプラズマ源に比してかなり大きく、窒素活性種の原料であると考えられる気相窒素分子の巻き込みが多いプラズマ源であることが示唆された。

有機成分について、プラズマの照射により変化している傾向が見られたが、有機酸等の活性成分についてはプラズマが接触した状況でのみ生成が見られた。このことから少なくとも有機酸の寄与は PAM では少ないと考えられるが、接触でプラズマ処理を行っているシュウ酸カルシウム合成においては大いに寄与していると考えられる。

Chapter 4 H_2O_2 and NO_2^- generation mechanism in the PAM

本章においては PAM 内の未解明な長寿命 RONS 生成機構について議論している。プラズマに比例する形で生成していること、また H_2O_2 は先行研究でがん細胞殺傷効果が報告されており、 NO_2^- は本プラズマ源で特徴的に多量の生成が見られたため、特に H_2O_2 と NO_2^- に着目して解析を行った。

H_2O_2 の前駆体である $\cdot\text{OH}$ はプラズマ光による水の分解が主な生成機構であることを明らかにしたが、プラズマ光のみ照射した場合、 H_2O_2 の生成は確認できなかった。このことから液相の反応は H_2O_2 生成にほとんど寄与しておらず、気相での反応すなわちプラズマ内

部での $\cdot\text{OH}$ 再結合反応や、気液界面での反応すなわちO原子と水との反応による生成が考えられた。また、 H_2O_2 の生成に寄与しなかった $\cdot\text{OH}$ は前章で記述した有機成分の改質に使われている可能性がある。

NO_2^- の前駆体であるNOは液相にほとんど溶け込んでいないということを明らかにした。原因はNOの溶解度の低さが考えられ、気相で $\cdot\text{OH}$ 等の成分と反応することでより溶解度の高い NO_2^- に変化してからの流入が支配的であろうと考えられた。

Chapter 5 H_2O_2 and NO_2^- contribution to antitumor effect of the PAM

本章ではPAM内に生成が確認された長寿命RONSについてそれらの抗腫瘍効果への寄与を議論している。 H_2O_2 の抗腫瘍効果への寄与は報告されていたが、他の長寿命活性種の寄与や複数の活性種の複合的効果に関しては未解明であった。

まず、本研究で選択した正常細胞・がん細胞について選択的抗腫瘍効果を確認した。また、その際、死細胞内にRONSが検出され、その寄与が示唆された。そこでRONSに着目し、以下の実験ではRONSを添加した培養液を用いて検証を行っている。

NO_3^- の添加によっては単体の効果・複合的な効果いずれも見られず、PAMの抗腫瘍効果を論じる上では無視することが出来ると考えられた。

H_2O_2 の添加によっては先行研究と同様ある程度の抗腫瘍効果が見られた。 NO_2^- は単体では効果がなかった。一方で、 H_2O_2 と NO_2^- を同時に添加することで抗腫瘍効果が強まったため、 H_2O_2 と NO_2^- による相乗的抗腫瘍効果が新たに発見された。

また、一方でPAMはその相乗的抗腫瘍効果よりもさらに強い効果を示したため、他の抗腫瘍効果がまだ残っていることも示唆された。

Chapter 6 Intracellular metabolism pathways disordered by the PAM

本章ではPAMによるがん細胞内の代謝（メタボリズム）への影響について議論している。これまで細胞内のタンパク質やRONSの動き（細胞内シグナリング）を知ることで細胞内におけるPAMの作用機構が明らかにされてきたが、細胞内代謝に着目した解析は行われていなかった。細胞内代謝は他の解析方法に比し、外乱に対する早い反応が特徴であり、PAMによる数十分～数時間オーダーで誘起される細胞内の反応を追いやすいと考えられる。

今回はがん細胞の増殖に関わり、その活性化ががん細胞を特徴づける解糖系代謝経路においてその代謝フローの堰止めがあることを発見した。 NAD^+ というヌクレオチドの減少がPAMにより誘起されたことがその原因であると特定した。この解糖系の堰き止めによりエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）の大幅な減少が見られ、他のバイオマスについても減少が考えられたことから、抗腫瘍効果への寄与が示唆された。この効果は先述したRONS相乗的抗腫瘍効果が支配的であることも明らかになった。解糖系に依存しているのはがん細胞に特異的であるため、この機構がPAM抗腫瘍効果の選択性に寄与している可能性が考えられた。

Chapter 7 Analysis of calcium oxalate crystals synthesized by the NEAPP

本章では培養液へのプラズマ直接照射により生成した結晶様粒子の組成・構造解析およびその生成ダイナミクスについて論じている。

生成した粒子はシュウ酸カルシウム二水和物 (COD) の結晶であることが明らかになり、プラズマの効果により培養液内の成分から合成されていることが示唆された。また、結晶の生成ダイナミクスの観察により結晶の合成速度・数もプラズマ照射時間と共に増加していることが明らかになり、プラズマによる結晶化駆動力・種結晶生成の促進効果が示唆された。

Chapter 8 Essential components of the oxalate crystal synthesis by the NEAPP

前章でプラズマによる培養液内でのシュウ酸カルシウム結晶合成が示唆された。しかしながら、本研究で用いた培養液は 30 種類以上の有機・無機成分からなる水溶液であり、実際に合成に寄与している成分はその中の一部であると考えられる。本章においては本結晶合成におけるプラズマ照射液内の最低必須成分を明らかにし、さらにそれらの役割についても議論している。

考察に基づく液成分のスクリーニングによりグルコース、 CaCl_2 および NaHCO_3 の 3 種類が最低限必要であるということを知り、さらにそれらの結晶生成における役割はそれぞれシュウ酸合成の原料、Ca イオンの供給および pH の調整であったということを知り、シュウ酸の合成においてはプラズマによる酸化力や高エネルギー電子の寄与が示唆された。

Chapter 9 Conclusions

本章にて結論を述べている。本研究ではプラズマ照射培養液の応用という観点でその間接的・直接的な効果を包括的に調査した。液相とプラズマの反応は特にウェットな表面を扱うバイオ応用では避けて通れない部分である。間接的な効果においては長寿命活性種等比較的安定な成分が支配的であるのに対し、直接的な効果においては短寿命活性種やプラズマ中の荷電粒子等の不安定で高反応性を持つ成分が支配的であり、それらを考慮した上で手法を選択することが好ましい。いずれの場合も現状の技術にブレイクスルーを起こしうる非常に有用な効果が発見され、本博士論文で解明された結果は非平衡大気圧プラズマの応用の進歩に寄与すると確信している。