

報告番号	甲 第 12295 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 大気圧マイクロ波励起プラズマを用いた癌細胞選択的抗腫瘍効果に関する研究
(Study on selective antitumor effect by atmospheric microwave-excited pressure plasma)

氏 名 高橋 洋平

論 文 内 容 の 要 旨

近年、大気圧下で電子温度が高く、ガス温度が低い「非平衡大気圧プラズマ」の生成が実現し研究が盛んに行われている。低圧環境を実現するための真空機器を必要とする低圧プラズマと比較すると、大気圧プラズマ処理は安価で簡便であり、熱処理による効果によって性能が向上するような用途、例えば微粒子合成や表面処理などへの応用開発が行われている。この非平衡大気圧プラズマを医療・農業・殺菌などを目的としたバイオ分野への応用研究は幅広く進められており、新規ながん治療法としての非平衡大気圧プラズマの利用は大きな注目を集めている。特に、非平衡大気圧プラズマを照射した細胞培養液 (Plasma-activated medium; PAM) が、正常細胞の生存率を低下させずに、がん細胞をアポトーシス死に誘導することが報告されたことで生体への適用が容易になったことから、世界的に研究が広がった。しかしその作用メカニズムは未解明な部分があるのが現状である。作用メカニズムを解明するためには、気相において非平衡大気圧プラズマから生成する活性種と液体と相互作用することで液相中に生成する活性種や培養液成分の変化を理解することが必要である。

本研究ではマイクロ波励起プラズマに着目した。マイクロ波励起プラズマは、電極を使用せずにプラズマを生成することができるため、メンテナンスまでの時間を長くすることができる、電極由来の汚染を防ぐことができるなどのメリットが挙げられる。さらに連続的な放電が可能なので単位時間あたりの電子や発光種の被照射物への総供給量は大きくできることが期待されるという点でも興味深い。しかし、マイクロ波励起プラズマのがん治

療応用に関する報告例は少ない。マイクロ波電源は将来小型・軽量化が進み安価になることが期待できるため、マイクロ波励起プラズマはがん治療応用のために検討すべき技術であると言える。

本研究では、マイクロ波励起プラズマ源に着目し、細胞培養液への間接照射によって癌細胞や正常細胞の生存率への影響を検討することでがん治療への応用可能性を示すことを目的とした。マイクロ波励起プラズマのプラズマ診断や、がん細胞を死滅させる活性種であることが報告されている過酸化水素 (H_2O_2) と亜硝酸イオン (NO_2^-) の生成速度を測定し、パルス放電である 60Hz 大気圧プラズマと比較することで、マイクロ波励起プラズマの特長を示し、さらに、 H_2O_2 と NO_2^- 以外の抗腫瘍成分を特定するために、PAM 中に含まれるアミノ酸やビタミンなどの有機化合物の変化を詳細に解析した。

第 1 章 序論

第 1 章では、本研究の目的とその背景について説明した。非平衡大気圧プラズマの発展と、新たながん治療法開発への期待の高まりを説明し、非平衡大気圧プラズマを用いたがん治療法開発の意義を述べた。非平衡大気圧プラズマの直接照射および間接照射によってがん細胞だけがアポトーシス死へ誘導され、正常細胞はその影響を受けないという現象は、さまざまなプラズマ源と異なる臓器由来の細胞において報告されているが、そのメカニズムについてはまだ不明なところが多い。本研究では、これまであまり検討されていなかったマイクロ波励起プラズマに着目した。

第 2 章 マイクロ波励起プラズマの生成と評価方法

第 2 章では、マイクロ波励起プラズマの生成方法を説明した。スリースタブチューナーでインピーダンスを最小になるようにマッチングをとることで、プラズマの伸びが長くなった。また、マイクロ波励起プラズマの気相中におけるプラズマ計測の原理と方法について述べた。発光分光法によって、得られたスペクトルから電子密度やガス回転温度の算出した方法を説明した。また、OH ラジカルの絶対密度を算出するために行ったレーザー誘起蛍光法 (LIF) の原理と絶対密度の算出方法を記述した。さらに細胞生存率を評価するために行ったアッセイにおける MTS アッセイの反応式を示し、490 nm の吸光度から算出する原理を説明した。PAM に含まれる過酸化水素、亜硝酸イオンの定量には比色計測を用いた。培養液成分の変化を示すために行った LC-MS/MS と NMR の原理についても説明している。

第 3 章 マイクロ波励起プラズマの診断

第 3 章では、マイクロ波励起プラズマの気相診断の結果を示した。マイクロ波励起プラズマの H_β の発光スペクトルからシュタルク拡がりによる半値全幅を抽出し、電子密度は $7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ と算出した。60Hz 大気圧プラズマ ($2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$) と比較すると、電子密度は 1/30 であるが他のプラズマ源とは同等の値を示した。ガス回転温度は N_2 2nd positive

system のスペクトルから、 $1600\text{ K} \pm 30\text{ K}$ であったが、ガス回転温度が高く見積もられている可能性がある。マイクロ波励起プラズマの発光種は、NO ラジカル、OH ラジカル、 N_2 , Ar 原子, O 原子であり、Ar 原子と O 原子の発光はプラズマ出射口から 6 mm までの範囲かつプラズマ中心部で発光していた。一方で、NO ラジカルと OH ラジカルは大気中の窒素、酸素、水蒸気を原料として生成するため、大気と接するプラズマの外側にも発光種が分布していることを示した。これらの発光種は 60Hz 大気圧プラズマと同一であるが、NO ラジカルの発光強度がマイクロ波励起プラズマでは小さいことがわかった。OH ラジカルを 282 nm のレーザーで励起し、検出された LIF スペクトルから絶対密度を算出したところ、プラズマ出射口から 5 mm 下の測定箇所では $1.9 \times 10^{14}\text{ cm}^{-3}$ と算出した。LIF の 2 次元イメージングから、プラズマの下に水を設置し、その照射距離が近いほど OH ラジカルの密度が上昇することを示した。このことから、OH ラジカルは大気中の酸素、水分からだけでなく、蒸発した水が電子によって解離して生成していることが示唆された。マイクロ波励起プラズマのプラズマ中 OH ラジカルの絶対密度は 60Hz 大気圧プラズマと同程度であるにも関わらず、 H_2O_2 生成速度の生成速度はマイクロ波励起プラズマの方が 17 倍程度速い(第 5 章に詳述)。マイクロ波励起プラズマは、連続放電によって活性種の生成効率が高いという特徴があることがわかった。

第 4 章 マイクロ波励起プラズマを照射した培養液の細胞殺傷効果

第 4 章では、マイクロ波励起プラズマを照射して作製した PAM によって、HeLa 細胞(がん細胞)の生存率は減少するが、MCF10A 細胞(正常細胞)は影響を受けておらず、細胞特異的に生存率の変化が見られることを明らかにした。また、60Hz 大気圧プラズマと比較すると、マイクロ波励起プラズマでは短時間で HeLa 細胞が死滅する PAM を作製することができることを示した。

第 5 章 マイクロ波励起プラズマを照射した培養液中の活性種の定量

第 5 章では、マイクロ波励起プラズマを照射した PAM 中に含まれる H_2O_2 濃度と NO_2^- 濃度を定量した。 H_2O_2 生成速度は $6.0\text{ }\mu\text{M/s}$ 、 NO_2^- 生成速度は $2.2\text{ }\mu\text{M/s}$ であった。60Hz 大気圧プラズマでは、 H_2O_2 生成速度は $0.35\text{ }\mu\text{M/s}$ 、 NO_2^- 生成速度は $10.5\text{ }\mu\text{M/s}$ と報告されており、起こりうるそれぞれの反応式から、マイクロ波励起プラズマでは連続放電によって Ar 原子、電子、OH ラジカル、O 原子などが生成しており、これらによって OH ラジカルの生成速度が速くなっていることを示した。一方、 NO_2^- は、窒素源となる大気中の窒素の取り込み量がマイクロ波励起プラズマでは少ないことが考えられる。これは、プラズマ領域の表面積が関係していると推測された。

PAM を希釈することで、選択的抗腫瘍効果と H_2O_2 濃度、 NO_2^- 濃度の関係を検討したところは $[\text{H}_2\text{O}_2] = 90\text{ }\mu\text{M}$ 以上、 $[\text{NO}_2^-] = 38\text{ }\mu\text{M}$ 以上の範囲で明確な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。これらの濃度を DMEM に添加し、同濃度を有する PAM と比較すると、

PAMの方が多くのHeLa細胞を殺傷する能力を有しており、他の抗腫瘍成分が存在することが示唆された。

第6章 マイクロ波励起プラズマ照射による培養液成分の変化

第6章では、 H_2O_2 と NO_2^- 以外のまだ特定できていない抗腫瘍成分を特定するために、マイクロ波励起プラズマの照射によるDMEMに含まれるアミノ酸やビタミンなどの有機化合物の変化を詳細に解析し、マイクロ波励起プラズマの照射によってメチオニンがメチオニンスルホキシドに酸化されることを見出した。メチオニンスルホキシドをDMEMに添加して毒性を確認したが、プラズマ照射で生成する量では、毒性は認められなかった。一方で、培養液内のメチオニンの減少は、細胞生存率の低下に影響を与えていることがわかった。

第7章 プラズマによる細胞生存率への系統的な考察

第7章では、マイクロ波励起プラズマの特徴をより明確にするために、被照射物に電界を印加するジェット型パルスストリーマ放電の気相診断、 H_2O_2 濃度、 NO_2^- 濃度の定量とHeLa細胞の生存率評価を行い、マイクロ波励起プラズマ、60Hz大気圧プラズマと比較した。ジェット型パルスストリーマ放電の電子密度は $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ でマイクロ波励起プラズマと同程度であったが、ガス回転温度は520 Kとマイクロ波励起プラズマよりも低く見積もられた。ジェット型パルスストリーマ放電により作製したPAMのHeLa細胞死滅効果は60Hz大気圧プラズマと同等であり、電子密度や照射時の電界の有無よりもマイクロ波励起プラズマによるプラズマの連続生成という特長がHeLa細胞の殺傷能力に影響していることを明らかにした。

第8章 結論

第8章では、本研究の結論と将来展望を述べた。

これまで報告例の少なかったマイクロ波励起プラズマのプラズマ計測と癌細胞/正常細胞間で細胞生存率の違いがあることを示し、新たながん治療法に適用可能なプラズマ源であることを示した。マイクロ波励起プラズマの連続放電という特徴によって活性種を高効率に生成できることを示し、さらに、プラズマの照射によって培養液中のメチオニンがメチオニンスルホキシドに酸化されるという新たな知見が得られ、メチオニンの減少がHeLa細胞の生存率減少に影響していることを明らかにした。

しかし、メチオニンの減少はin vivoでの腫瘍縮小の効果を説明できないことから、がん細胞を殺傷する因子は他にも存在しており、それを探索することが今後の課題として挙げられる。この抗腫瘍成分を特定し、それらの知見をプラズマ源の設計へと発展させることで、非平衡大気圧プラズマによるがん治療の実現に繋がると考えられる。