

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: yyagyu@sasebo.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、体液や組織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。気相から液相に輸送される**活性酸素種(ROS)**をK12蛍光法により確認し、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 **がん細胞集集体(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

【生体へのプラズマ活用】

活性酸素種 ROS
活性酸素種 RNS
紫外線 電圧 電流

【生体への照射】

＜プラズマ活用＞

- 低温プラズマ(LTP; Low temperature plasma)技術は、ライフサイエンスの様々な研究分野に活用され、大きな注目を集めている。
- 特に医療応用では、がん細胞への低温プラズマ照射が、細胞死の新しいメカニズムとして、期待されている。

【がん治療】 **【創傷/火傷/皮膚治療】** **【滅菌/殺菌】**

◆プラズマ照射法

直接照射法

間接照射法

液相と気相との分離・透過への制御
最新の研究成果から、生体内への照射

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、体液や組織などで満たされ、プラズマの生成に不利な環境である。プラズマを生成可能な多孔質膜を用いた多孔質膜プラズマ源の開発。
- 生体内での直接照射が難しい場合

Solution

- 生体内でプラズマを生成可能な、気相のプラズマ生成機構を利用し、ガス透過、液体透過可能な多孔質膜を利用し、多孔質膜を通過した活性酸素種(ROS)ががん細胞に輸送される。
- 多孔質膜プラズマ源の開発に着手

【多孔質膜プラズマ源】による生体内での直接照射法の検討

＜利点＞

- プラズマの活性種を生体内のがん細胞に直接輸送
- カテーテルを用いて、プラズマを体内に挿入
- 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

【多孔質膜プラズマ源】による生体内での直接照射法の検討

＜利点＞

- 生体内でプラズマを生成可能な、気相のプラズマ生成機構を利用し、多孔質膜を通過した活性酸素種(ROS)ががん細胞に輸送される。
- 多孔質膜を通過した活性酸素種(ROS)ががん細胞に輸送される。
- 多孔質膜を通過した活性酸素種(ROS)ががん細胞に輸送される。

ヒト肝芽腫由来細胞HepG2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; JCRB10541に与える影響を検証する。

実験装置

95ml plate 多孔質膜プラズマ源

実験条件

細胞: ヒト肝芽腫由来細胞 Hep G2; JCRB1054 (Human hepatoma-derived cell)
培養液: DMEM
培養時間: 8h, 24h, 48h, 72h
測定: Cell Counting-kit 8 (CCK-8)

結果

Hep G2細胞とプラズマ照射時間および生成ガスの関係

● 生存細胞率は、ほとんど変化なし
● 活性酸素種 (種別) の発生量に依存して低下が考えられる

＜生成ガス: N₂＞

- 生存細胞率は、ほとんど変化なし
- 活性酸素種 (種別) の発生量に依存して低下が考えられる

＜生成ガス: Air, O₂＞

- 生存細胞率は、照射直後から急激に低下
- 60秒以上経過するにつれて低下が顕著
- 活性酸素種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にプラズマ照射を行うことで、細胞の生存率が低下する。

● Hep G2細胞の細胞死は、主に活性酸素種によって誘導されることを示唆された。

● 多孔質膜プラズマ源の巻数とHepG2細胞生存率の関係

- HepG2細胞の生存率は、プラズマ照射直後から低下
- 照射時間120秒で、生存細胞率が10%以下まで減少
- 多孔質膜プラズマ源の巻数の増加に伴って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極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酸素種が増えたことが示唆された。

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。

実験装置

多孔質膜プラズマ源
K12蛍光法

実験条件

電源: 8kV
圧力: 100~500ppa
気体組成: 空気(酸素19%)
照射時間: 0~180sec
K12蛍光法: K12蛍光法0.3% (K12)
酸化還元電位: OH radical 2.0V
Atomic oxygen 24.0V
Ozone 2.0V
H₂O₂ 1.7V
Hydroperoxyl radical HO₂ 1.70V
Nitric oxide NO (Thermo Fisher)
NO検出試薬: NO₂/NO Assay Kit (Green Reagent) (G-Kit) (Wako)

結果

K12蛍光法によるプラズマ照射による活性酸素種(ROS)の発生を測定

● プラズマ生成時の膜内電圧は小さいため、活性酸素種(ROS)の発生は少ない。

H₂O₂検出

● O₂ >> H₂O₂ >> NO₂
● O₂は、15秒以上経過すると増加し、照射終了後も減少する。

NO₂/NO検出

● Green: NO₂検出試薬の検出結果を示す。NO₂は、NO₂検出試薬と反応して、NO₂検出試薬の色を呈する。

● NO₂は、照射終了後に増加し、照射終了後も減少する。

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、主に活性酸素種の影響を受けると示唆された。

【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 およびがん細胞集集体(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。

● 本研究の一部は、日本学術振興会JSPS科研費21K040120助成を受けたものです。ここに心より感謝申し上げます。