

## プラズマ活性溶液：作用機序解明と臨床応用・産業化を目指して

田中，宏昌  
名古屋大学未来社会創造機構

水野，正明  
名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター

豊國，伸哉  
名古屋大学医学系研究科生体反応病理学

丸山，彰一  
名古屋大学医学系研究科腎臓内科

他

<https://doi.org/10.15017/1515912>

---

出版情報：福岡醫學雑誌. 106 (4), pp.71-76, 2015-04-25. 福岡医学会  
バージョン：  
権利関係：

## プラズマ活性溶液：作用機序解明と臨床応用・産業化を目指して

- <sup>1)</sup>名古屋大学 未来社会創造機構  
<sup>2)</sup>名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター  
<sup>3)</sup>名古屋大学医学系研究科 生体反応病理学  
<sup>4)</sup>名古屋大学医学系研究科 腎臓内科  
<sup>5)</sup>名古屋大学医学系研究科 消化器外科2  
<sup>6)</sup>名古屋大学医学系研究科 産婦人科

田中宏昌<sup>1)</sup>, 水野正明<sup>2)</sup>, 豊國伸哉<sup>3)</sup>, 丸山彰一<sup>4)</sup>,  
 小寺泰弘<sup>5)</sup>, 吉川史隆<sup>6)</sup>, 堀 勝<sup>1)</sup>

### はじめに

近年、大気圧プラズマの医療応用、農業応用が盛んに研究されている。我が国においては、九州大学の白谷正治教授を領域代表とする新学術領域「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」において大気圧プラズマの農業応用研究が盛んに行われている。医療応用においては、名古屋大学の堀勝教授を領域代表として新学術領域「プラズマ医療科学の創成」が2012年に立ち上がり医工連携の枠組みの中で、大気圧プラズマの様々な医療応用研究が活発に進められるようになった。現在、福岡と名古屋はプラズマ医療・農業における2大拠点形成している。

名古屋大学では大気圧プラズマのがん治療への応用に積極的に取り組んでいる<sup>1)</sup>。プラズマナノ工学研究センターと関連企業との産学連携により独自に開発された超高電子密度大気圧プラズマ発生装置を用いて、産婦人科、消化器外科、腎臓内科、眼科、皮膚科、生体反応病理学、環境労働衛生学などと共同で各種疾患の治療、特になん治療に重点を置いたプラズマ医療研究を展開している。医工連携の成果から産出されたシーズは名大病院先端医療・臨床研究支援センターにてシーズの育成、臨床試験から保険診療（産業化）までをサポートする体制も整備されており、これらの連携体制をより強力に組織化するために2013年8月1日にプラズマ医療国際イノベーションセンターが設立された。このような背景において、我々はプラズマ照射された溶液による抗腫瘍効果を見出しプラズマ活性溶液と名付けた。現在、プラズマ活性溶液の作用機序の解明、腹腔内投与における有効性、安全性試験等を行っている。本稿ではこれらの活動を紹介し、プラズマ活性溶液の臨床応用と産業化の可能性について述べる。

### 1. プラズマがん治療研究の歴史

2004年オランダのStoffelsら<sup>2)</sup>の研究グループが独自に開発したプラズマニードルと呼ばれる大気圧プラズマ装置を培養細胞に照射して以来、様々な種類のがん（培養）細胞に大気圧プラズマが照射され、その抗腫瘍効果が報告されてきた。初期に報告されたプラズマの効果は細胞の剥離現象であったが、間もなくプラズマ照射によりがん細胞にプログラム細胞死として知られるアポトーシスを誘導しうることが報告され始めた<sup>3)4)</sup>。大気圧プラズマは大気中の窒素、酸素、水蒸気などと反応して活性種（ラジカル）を産生することが知られていたが、更に細胞内に活性酸素・窒素種（RONS）を産生することが報告され始め

Hiromasu TANAKA<sup>1)</sup>, Masaaki MIZUNO<sup>2)</sup>, Shinya TOYOKUNI<sup>3)</sup>, Shoichi MARUYAMA<sup>4)</sup>, Yasuhiro KODERA<sup>5)</sup>, Fumitaka KIKKAWA<sup>6)</sup> and Masaru HORI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University

<sup>2)</sup>Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital

<sup>3)</sup>Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>4)</sup>Department of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>5)</sup>Department of Gastroenterological Surgery 2, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>6)</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Plasma-Activated Solution : Mechanism of Action, Clinical Application, and Industrialization

た<sup>5)6)</sup>。これらの事実から、プラズマがん治療研究にはフリーラジカルの生物学が有用であると認識されるに至った。

2010年ごろからヌードマウスを用いた *in vivo* でのプラズマ照射の成果が報告されるようになり、様々ながん種の担癌マウスにおいてプラズマ照射により腫瘍の縮小が確認された<sup>7)8)</sup>。今後、臨床応用に向けて、疾患モデル動物実験におけるプラズマ照射の効果の検討や副作用の少ないプラズマドーズの最適化などが行われなければならない。またプラズマ照射によるがん細胞の細胞死に関する作用機序の解明も必須である。

## 2. 超高密度大気圧プラズマ発生装置による卵巣がんの治療

名古屋大学プラズマナノ工学研究センターでは電子密度が通常の誘電体バリア放電方式に比べて高い ( $\sim 2 \times 10^{16}$ ) 独自の大気圧プラズマ発生装置を開発した<sup>9)</sup>。電子密度の高い大気圧プラズマ発生装置は高濃度のラジカルを発生することが期待される。また、ロボットアームにプラズマ発生装置を取り付けることで、照射場所、照射時間をプログラムにより制御可能にし、ハイスループットなプラズマ照射実験を可能にした。このような大気圧プラズマ発生装置を用いて、名古屋大学医学系研究科産婦人科との共同研究により卵巣がんの治療を目指した研究開発を開始した<sup>10)</sup>。

我々はまず、ディッシュ上に播種した卵巣がん培養細胞に対して大気圧プラズマを照射することで卵巣がん培養細胞にどのような影響を与えるのかを顕微鏡観察により調べることにした。卵巣がん培養細胞を35mm ディッシュに播種しディッシュの中心から8.75mm 離れた点をP領域、プラズマ照射点近傍をQ領域、反対側に8.75mm 離れた点をR領域と定義した。P領域において大気圧プラズマをそれぞれ、30秒、60秒、180秒、300秒照射し続け、翌日それぞれP領域、Q領域、R領域の卵巣がん培養細胞を観察したところ、180秒以上照射したP領域では卵巣がん培養細胞はほとんど剥がれており、Q領域に剥がれずに存在していた細胞に関しては形態に異常が観察された。

次に35mm ディッシュ上の卵巣がん培養細胞にまんべんなくプラズマが照射されるようにロボットアームが所定の時間でスキャンされるようにプログラムした。このような条件の下で2種類の卵巣がん培養細胞と2種類の正常線維芽培養細胞に対してプラズマ照射したところ、600秒照射後の卵巣がん培養細胞においては80%近くの細胞が殺傷されるのに対し、線維芽培養細胞においては80%近くの細胞が生存するという結果が得られた。すなわち大気圧プラズマは卵巣がん細胞を選択的に殺傷することが分かった。

更に、卵巣がん培養細胞のAnnexin VとPropidium Iodide (PI) の2重染色によるフローサイトメトリ解析や、切断されたPoly ADP ribose polymerase (PARP) のウェスタンブロッティングによる検出から卵巣がん培養細胞はプラズマ照射によりアポトーシスを誘導していることが分かった。

これらの結果から卵巣がん治療において大気圧プラズマが手術、放射線療法、抗癌剤治療に次ぐ第4の治療法として期待されるようになった。

## 3. プラズマ活性溶液による脳腫瘍培養細胞の選択的殺傷とその細胞内分子機構

卵巣がん培養細胞の固定点プラズマ照射実験においてP領域にプラズマを照射したとき照射時間が短いときはR領域の細胞はほとんど影響を受けていなかったが、300秒照射したときR領域の細胞の密度が小さくなっている（すなわち一部の細胞は剥がれる、細胞死を起こす、あるいは細胞増殖を止めている）ことが観察された。この結果からプラズマが直接照射されていない領域でもプラズマ照射の影響を受けていることが示唆された。我々は培養液がプラズマ照射されることにより培養液そのものが抗腫瘍効果を有したのではないかと考えた。そこで、プレートあるいはディッシュに播種された培養細胞にプラズマを直接照射するのではなく、培養液にプラズマを照射しプラズマ照射された培養液を培養細胞に投与する実験を行うことにした<sup>11)</sup> (図1)。

96ウェルプレートにそれぞれ1,000, 5,000, 10,000細胞播種した脳腫瘍培養細胞にプラズマ照射した培養液を投与すると1分照射のプラズマ照射溶液では1,000細胞の脳腫瘍培養細胞を殺傷するが5,000細胞

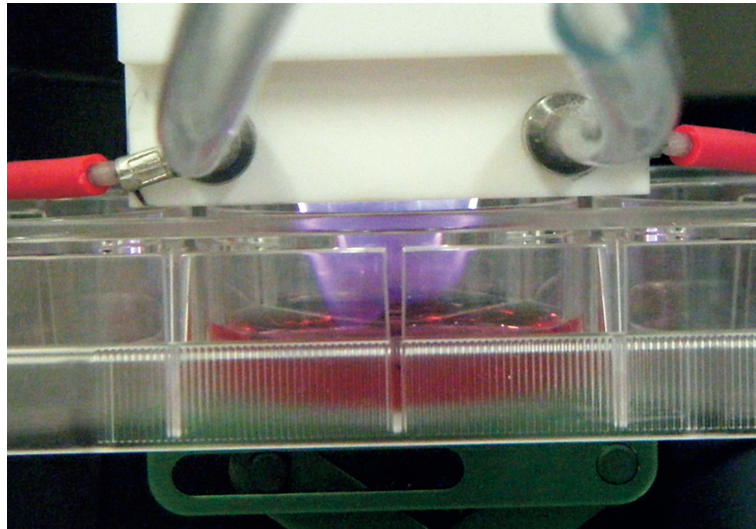


図1 超高密度大気圧プラズマ装置によるプラズマ活性培養液の作成

胞以上の細胞は殺傷しなかった。3分以上プラズマ照射された培養液は、10,000細胞を殺傷した。これらの結果から、プラズマ照射により培養液中の栄養分など生存に必須な成分を破壊したのではなく、プラズマ照射により培養液中に毒性のある物質が生成され脳腫瘍培養細胞を殺傷したことが示唆された。プラズマ照射した後1時間、8時間放置したプラズマ照射培養液は抗腫瘍効果を有するが18時間放置したプラズマ照射培養液は抗腫瘍効果を有しないことからプラズマ照射により生じた細胞毒性を持つ物質は数時間以上の活性を保持することが分かった。次に10,000細胞の正常アストロサイト培養細胞に対して3分間プラズマ照射した培養液を投与してもほとんど影響を与えなかったことから、このプラズマ照射培養液は脳腫瘍培養細胞を選択的に殺傷することが分かった。プラズマ照射溶液を投与した細胞からはアポトーシスの分子マーカーである切断されたCaspase3/7が検出されたことからプラズマ照射溶液は脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導することが分かった。我々はこのプラズマ照射された培養液をプラズマ活性培養液(Plasma-activated medium あるいはPAM)と名付けた。

我々は次にプラズマ活性培養液が脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導する細胞内分子機構を調べた。脳腫瘍培養細胞を含む多くのがん細胞においてはしばしば生存・増殖シグナリングと呼ばれるシグナル伝達経路が恒常的に活性化されている。生存・増殖シグナル伝達経路にはRAS-MAPKシグナル伝達経路やPI3K-AKTシグナル伝達経路などが知られているが、U251SP脳腫瘍培養細胞においては、EGFR遺伝子やPTEN遺伝子の突然変異のために両方のシグナル伝達経路が活性化されている。これらのシグナル伝達経路はアポトーシスを抑制し細胞を増殖させる働きを担っているため、生存・増殖シグナリングが恒常的に活性化されたがん細胞では細胞死から逃れ無限に増殖すると考えられている。我々はプラズマ活性溶液を投与した脳腫瘍培養細胞について、生存・増殖シグナリングがどのような影響を受けるのかを調べたところ、生存・増殖シグナリングネットワークのハブとも呼べるシグナル分子、活性型のAKT、活性型のERK1/2(MAPK)がプラズマ活性溶液により抑制されることが分かった<sup>12)</sup>。これらの結果から、プラズマ活性溶液は生存・増殖シグナリングを抑制することにより脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導するという細胞内分子モデルを構築した。

プラズマ照射によりがん細胞内にROSを生成することが一般的に知られているが、プラズマ活性培養液も脳腫瘍培養細胞の細胞内にROSを誘導することを確認した。また、N-acetyl cysteine(NAC)と呼ばれるROSのスカベンジャーを前処理した脳腫瘍培養細胞ではプラズマ活性培養液による抗腫瘍効果が弱まることからプラズマ活性培養液による細胞死の一因としてROSが寄与していることが証明された。

プラズマ活性培養液が細胞内にROSを誘導することや生存・増殖シグナリングの活性を抑制すること



から、プラズマ活性溶液の作用機序に関して多くの知見を得ることができたが、細胞の種類によるプラズマ活性溶液の感受性の違いの細胞内分子機構はまだ分かっていない。プラズマ活性溶液の選択的殺傷効果は細胞によりプラズマ活性溶液の効果が違うことを意味しており、今後、様々な細胞に対する様々なプラズマ活性溶液による細胞応答の細胞内分子機構を解明し、プラズマ活性溶液による抗腫瘍効果の作用機序の理解を深めてゆく。

#### 4. 超高密度大気圧プラズマとフリーラジカルの生物学

名古屋大学医学系研究科生体反応病理学では、フリーラジカルの生物学を用いて超高密度プラズマが生体に与える影響を調べている<sup>13)</sup>。

フリーラジカルの生物学において、過酸化脂質の定量検査法として2-チオバルビツール反応性物質 (TBARS) 検査、脂質酸化損傷マーカーとして知られる4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE)、アクロレインなど様々なツールが開発されてきた。我々が開発した超高密度大気圧プラズマをフォスファチジルコリン等の脂質やラットの肝臓ホモジネートに照射したときの効果を TBARS 検査により調べた。その結果、プラズマ照射により過酸化脂質が上昇することが分かった。また、5ミリ角のラット肝臓にプラズマ照射することにより HNE やアクロレインといった脂質過酸化物修飾蛋白を生成した。

ヒドロキシラジカルにより DNA の構成要素である4つの塩基のうち G (グアニン) は8-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン (8-OH-dG) に変化する。8-OH-dG は複製時にグアニンからチミンへの変異を引き起こすため発がんリスクの上昇に関連すると言われている。8-OH-dG の抗体は DNA 酸化損傷マーカーとしてよく用いられている。超高密度大気圧プラズマ装置をグアニン、プラスミド DNA、ラットのゲノム DNA に照射し8-OH-dG を用いて DNA 酸化損傷を評価したところ、プラズマ照射は酸化損傷塩基を産生することが分かった。更に核酸が複雑になると損傷効率が下がることが分かった。

以上より、プラズマの直接照射により脂質酸化損傷、DNA 酸化損傷が検出された。今後、このようなフリーラジカルの生物学に基づくツールを利用してプラズマの生体照射に対する安全性 (副作用を少なくして治療効果をもたらすプラズマ照射のドーズ等) を評価してゆく必要がある。

#### 5. プラズマ活性溶液を用いた動物実験

がんの化学療法においてシスプラチン、パクリタキセルといった抗癌剤が卵巣がん、胃がんの治療によく用いられているが、抗癌剤耐性のがん細胞が生じ再発することが問題となっている。またこれらのがんが腹腔内に転移することにより、癌性腹膜炎と呼ばれる治療が非常に困難な症状に陥ることがよくある。

名古屋大学産婦人科学では、これらの抗癌剤に耐性を持つ卵巣がん培養細胞を樹立し、プラズマ活性培養液による効果を調べた<sup>14)</sup>。その結果プラズマ活性培養液は抗癌剤耐性卵巣がん培養細胞にもその親株となる卵巣がん培養細胞に対しても同様に抗腫瘍効果を示すことが分かった。また、プラズマ活性培養液は抗癌剤耐性卵巣がん培養細胞においても ROS を生成し、NAC による抗腫瘍効果の減弱が確認された。更に、L-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO) と呼ばれるグルタチオン合成酵素の阻害剤を前処理することにより細胞内の ROS を上昇させた状態でプラズマ活性培養液を投与すると抗腫瘍効果が増強されることから、抗癌剤耐性卵巣がん培養細胞においてもプラズマ活性培養液により細胞内に誘導される ROS が抗腫瘍効果の一因となっていることが分かった。

次に抗癌剤耐性卵巣がん培養細胞及びその親株となる卵巣がん培養細胞をヌードマウスの皮下に注入したところ、10日後には腫瘍形成が確認された。プラズマ活性溶液をこれらの担癌マウスに皮下注射したところ、腫瘍の成長を抑える効果が見出された。すなわち、*in vivo* においてもプラズマ活性溶液の抗腫瘍効果が確認された。

胃がん治療においても卵巣がん同様、腹膜播種の治療が大きな課題となっているが、4種類の胃がん培養細胞にプラズマ活性溶液を投与したところ、効き方の違いはあるが、概して抗腫瘍効果を示すことが分かった<sup>15)</sup>。プラズマ活性溶液はこれらの胃がん培養細胞にも ROS を誘導しアポトーシスを誘導すること

が分かった。

現在、卵巣がんと胃がんの腹膜播種モデルマウスに対するプラズマ活性溶液の抗腫瘍効果を調べている。生体内では様々なラジカルスカベンジャーや物理的障壁が存在し、プラズマ活性溶液の効果を減弱させたりするため、疾患モデル動物において、プラズマ活性溶液の効果を調べることは臨床応用上極めて重要である。またプラズマ活性溶液の腹腔内投与により生体内の正常な組織や細胞に毒性がないか、また遺伝毒性などないかを調べることも必須である。今後、副作用が少なく抗腫瘍効果の大きいプラズマ活性溶液やその投与法の開発を行ってゆく。

### おわりに

大気圧プラズマの医療応用、特にがん治療への応用はますます注目を集めており、2014年3月には第1回目の国際プラズマがん治療ワークショップ (International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, IWPCCT) がジョージワシントン大学で開催されるに至った。2015年3月には第2回目のIWPCCTが名古屋大学で開催されることに決定され、プラズマがん治療は、国際的に重要なプロジェクトとして位置づけられるようになった。新学術領域「プラズマ医療科学の創成」では、プラズマがん治療に関わる基礎研究とプラズマ活性溶液のような新たなシーズの発掘を行い、名大病院先端医療・臨床研究支援センターでは様々なシーズの育成、知財戦略、規制当局への対応を通じて臨床応用・産業化の促進を行う。プラズマ活性溶液が一刻も早く、がん治療を初めとする様々な治療へと応用されるよう励みたい。

### 参 考 文 献

- 1) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Okazaki Y, Toyokuni S, Maruyama S, Kikkawa F and Hori M : Plasma Medical Science for Cancer Therapy.~toward cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma~. IEEE Transactions on Plasma Science, 2014.
- 2) Kieft IE, Broers JL, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FC and Stoffels E : Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO k1 cells. Bioelectromagnetics. 25 : pp. 362-368, 2004.
- 3) Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V and Friedman G : Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. Plasma Chemistry and Plasma Processing. 27 : pp. 163-176, 2007.
- 4) Kieft IE, Kurdi M and Stoffels E : Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. Ieee Transactions on Plasma Science. 34 : pp. 1331-1336, Aug 2006.
- 5) Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS and Lee JS : Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. Plos One. 6 : 2011.
- 6) Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, Arjunan KP, Podolsky E, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J and Brooks AD. Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species (Retracted article. See vol. 41, pg. 656, 2013) Annals of Biomedical Engineering. 39 : pp. 674-687, 2011.
- 7) Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A and Pouvesle JM : Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts : Preliminary Results. Plasma Processes and Polymers. 7 : pp. 264-273, 2010.
- 8) Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R and Trink B : Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. Br J Cancer. 105 : pp. 1295-1301, 2011.
- 9) Iwasaki M, Inui H, Matsudaira Y, Kano H, Yoshida N, Ito M and Hori M : Nonequilibrium atmospheric pressure plasma with ultrahigh electron density and high performance for glass surface cleaning. Applied Physics Letters. 92, 2008.
- 10) Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F and Hori M : Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. Applied Physics Letters. 100 : 2012.
- 11) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F and Hori M : Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival

- Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine*. 1 : pp. 265-277, 2011.
- 12] Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Maruyama S, Kikkawa F and Hori M : Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells. *Plasma Medicine*. 2 : p. 12, 2012.
- 13] Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Mizuno M, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M and Toyokuni S : Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr*. 55 : pp. 207-215, 2014.
- 14] Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M and Kikkawa F : Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Plos One*. 8 : p. e81576, 2013.
- 15] Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Sugimoto H, Nomoto S, Natsume A, Fujiwara M, Mizuno M, Hori M, Saya H and Kodera Y : Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer*. 2014.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です.)