

# 大気圧低温プラズマの生物応用に関する研究

2022 年

東京都市大学大学院

総合理工学研究科

高橋 玄宇

# 目次

略語一覧 .....	1
第1章 序論 .....	2
1.1 はじめに .....	3
1.2 プラズマとは .....	3
1.2.1 プラズマの性質 .....	3
1.3 大気圧低温プラズマ .....	6
1.3.1 皮膚損傷に対する大気圧プラズマ照射 .....	6
1.3.2 がん細胞に対する大気圧プラズマ照射 .....	7
1.3.3 植物に対するプラズマ照射 .....	10
1.4 本研究の目的 .....	12
1.5 本論文の概要 .....	12
参考文献 .....	14
第2章 大腸がん細胞に対する ALTP の効果 .....	15
2.1 緒言 .....	15
2.2 MC3T3-E1 に対する PTM の暴露評価 .....	15
2.2.1 実験結果及び考察 .....	17
2.3 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地の暴露評価 .....	18
2.3.1 実験方法 .....	18
2.3.2 実験結果及び考察 .....	19
2.4 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地の暴露評価 .....	21
2.4.1 実験方法 .....	21
2.4.2 実験結果及び考察 .....	23
2.5 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地及び過酸化水素添加培地への暴露 評価 .....	24
2.5.1 実験方法 .....	24
2.5.2 実験結果及び考察 .....	25
2.6 結言 .....	26
参考文献 .....	27
第3章 大腸がんに対する ALTP の効果 .....	29
3.1 緒言 .....	29
3.2 がんとは .....	29
3.2.1 がんの性質 .....	29
3.2.2 がんの発生機序 .....	30
3.2.3 大腸がんについて .....	32
3.3 実験方法 .....	35
3.3.1 大腸がんモデルラットの作製 .....	35
3.3.2 プラズマ照射生理食塩水の作成方法 .....	36
3.3.3 大腸がんモデルラットに対する PTS の投与方法 .....	37
3.3.4 大腸がんモデルラットに対する遺伝子発現解析 .....	38
3.4 実験結果 .....	42
3.4.1 内視鏡観察結果 .....	42
3.4.2 病理組織検査結果 .....	52
3.4.3 遺伝子発現解析による評価 .....	57

3.5 結言 .....	60
参考文献 .....	64
第4章 骨芽細胞様細胞及び骨折モデルラットに対する ALTP の効果 .....	67
4.1 緒言 .....	67
4.2 骨の構造と形成 .....	67
4.2.1 骨の構造 .....	67
4.2.2 骨の形成及び修復機序 .....	68
4.3 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に対する PTM の曝露と分化促進 .....	69
4.3.1 骨分化と石灰化 .....	69
4.3.2 実験方法 .....	69
4.3.3 実験結果及び考察 .....	70
4.4 骨折モデルラットの作成及び評価方法 .....	71
4.4.1 実験方法 .....	71
4.4.2 ALTP の照射条件 .....	73
4.4.3 実験結果及び考察 .....	73
参考文献 .....	74
第5章 植物に対する ALTP 照射の評価 .....	75
5.1 緒言 .....	75
5.2 実験方法 .....	75
5.3 実験結果及び考察 .....	77
5.4 結言 .....	79
参考文献 .....	80
第6章 結論 .....	81
謝辞 .....	84
発表論文一覧 .....	85

## 略語一覽

ALTP	:	Atmospheric Low Temperature Plasma
ROS	:	Reactive Oxygen Species
RNOS	:	Reactive Nitrogen Oxide Species
NO	:	Nitric Oxide
PTM	:	Plasma Treated Medium
PTS	:	Plasma Treated Medium Saline
TNF- $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
FBS	:	Fetal Bovine Serum
APC	:	Adenomatous Polyposis Coli
IL-1 $\beta$	:	Interleukin 1 beta
IL-6	:	Interleukin 6
IL-10	:	Interleukin 10
WIF1	:	Wnt Inhibitory Factor 1
AOM	:	Azoxymethane
CT	:	Computed Tomography
gp130	:	Glycoprotein 130
Jak	:	Janus Kinase
PI3K	:	Phosphoinositide 3-kinase
Akt	:	Protein kinase B
mTOR	:	mechanistic Target Of rapamycin
STAT3	:	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TRADD	:	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
FADD	:	Fas-associated protein with death domain
Bid	:	BH3 interacting-domain death agonist
tBid	:	truncated BH3 interacting-domain death agonist
Cyt-c	:	Cytochrome c
TRAF2	:	TNF Receptor-Associated Factor 2
NF- $\kappa$ B	:	Nuclear Factor-kappa B
AP-1	:	Activator Protein 1
TGF- $\beta$	:	Transforming Growth Factor $\beta$
Wnt	:	Wingless and Int-1
TCF	:	T cell factor
HIF-1 $\alpha$	:	Hypoxia Inducible Factor
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
eNOS	:	endothelial Nitric Oxide Synthase
ATF4	:	Activating transcription factor 4
ALP	:	Alkaline Phosphatase
Runx2	:	Runt-related transcription factor 2

# 第1章 序論

## 1.1 はじめに

プラズマは固体、液体、気体に次ぐ第4の物質の状態であり、自然界においてはオーロラや雷として観測される。人類がプラズマを火花放電として生成することが可能になったのは、17世紀頃までさかのぼる。当時はプラズマの名称は存在しておらず、発光性に着目した静電気放電の研究に用いられた。その後も水銀灯やネオン管等の照明としての工業利用を経て、近代に至ってはトランジスタ等の近代の半導体産業を支える重要な手段として盛んに研究が行われていた[1]。

近年ではプラズマを利用した分野の広がりとして、医療分野が挙げられる。医療分野では、発光性と化学反応性を用いた滅菌や、導電性を利用した凝固・焼灼、あるいはバイオマテリアルのための表面改質など、多岐にわたる目的で用いられている。また、大気圧下でのプラズマ生成技術が進歩したことにより、生体に対して直接プラズマを照射することで、再生医療やがん治療等に対する研究もおこなわれている。一方で、それらの技術が実用化されている例は少なく、プラズマによって生成されるラジカルが生体に与える影響を理解することは今後のプラズマ技術の発展の一助と成り得る。

本研究では大気圧下で生成され、室温と同程度の温度である大気圧低温プラズマ(ALTP: Atmospheric Low Temperature Plasma)に着目し、動物やその細胞、そして植物に対してALTPが与える影響とその機序について検討を行った。

## 1.2 プラズマとは

物質はエンタルピーの上昇によってその状態を固体から液体、液体から気体へと変化させる。更に温度が上昇すると、原子、分子の一部が電離し、陽イオンと電子に分離してプラズマへと状態が変化する(図 1-1)。プラズマとは、気体中の原子や分子が電離して生成した陽イオンと電子がほぼ等量混ざり合っている状態であり、平均的には中性の状態を保っている媒質と定義される。主な性質としては、導電性、化学的反応性、発光性、粒子のエネルギーの極大性が挙げられる。

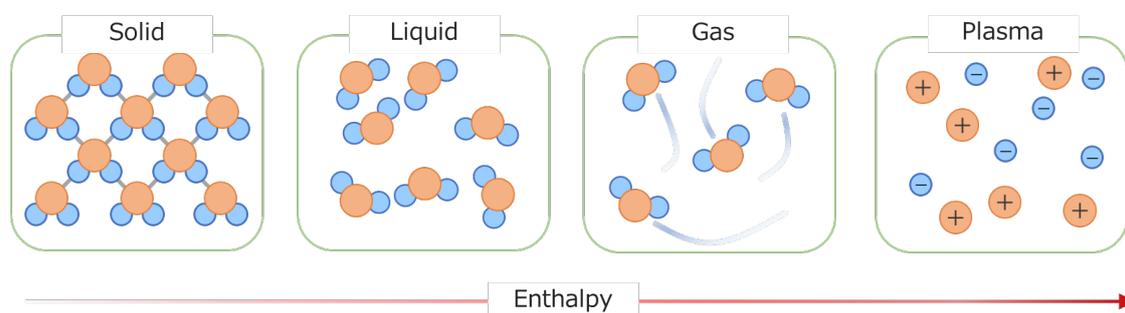


図 1-1 物質の状態とその状態変化[2]

### 1.2.1 プラズマの性質

プラズマ内では気体分子が激しく衝突することで電離(図 1-2)等の現象が起こり、多数の正イオンと電子が高い密度で発生している[3]。

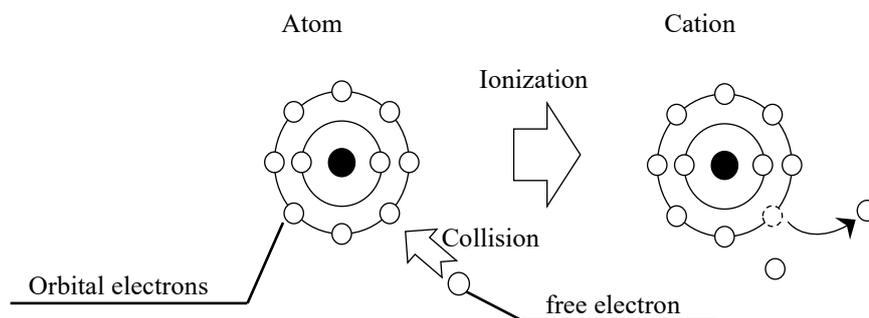


図 1-2 自由電子の衝突による原子の電離[2]

## ・導電性

導電性とは、荷電粒子を加速することで電荷の移動が生じる性質である。プラズマに電圧を印加すると、荷電粒子であるイオンと電子の移動に伴ってプラズマ中に電流が流れ、導電性が生じる。プラズマ内に存在する、原子と分子の一部が電離していないものを不完全電離プラズマといい、原子と分子の全てが電離しているものを完全電離プラズマという。不完全電離プラズマでは、電子とイオンが衝突して電離状態が弱まり、導電率が下がる。

## ・化学的反応性

化学的反応性とは、分子の状態が不安定な為、容易に酸化還元反応を起こす性質である。プラズマの化学的反応性が高い理由として、ラジカルの存在が挙げられる。ラジカルとは不対電子を持つ原子、分子のことで、最外殻が不安定なために酸化還元反応を起こし易い性質を持つ。プラズマ内では粒子同士が激しく衝突しており、それによって電離、解離、励起の現象が生じてラジカル等が発生する。図 1-3 に電子の衝突による分子の解離イメージを示す。

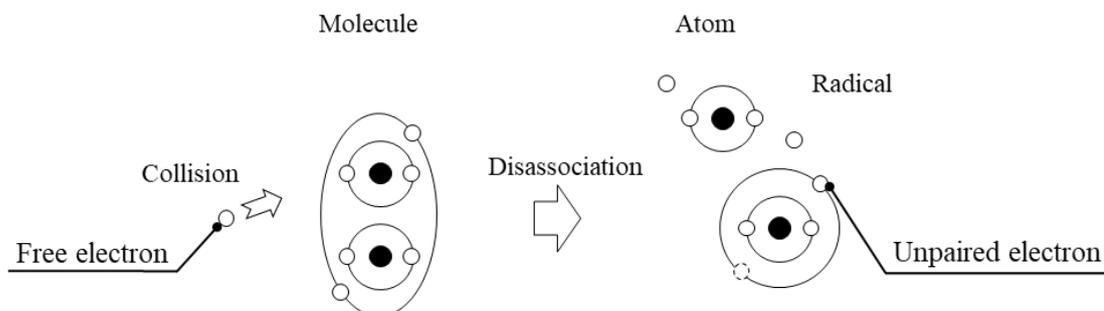


図 1-3 自由電子の衝突による分子の解離[2]

## ・発光性

発光性とは、物質が光を発する性質のことである。発光性には電子の励起と脱励起と呼ばれる現象が関係している。図 1-4 に電子の衝突による励起と脱励起のイメージを示す。

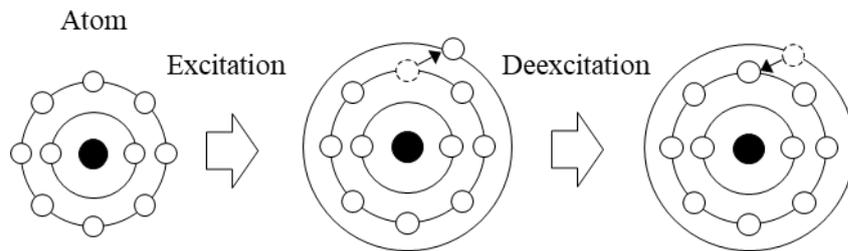


図 1-4 自由電子の衝突による励起・脱励起[2]

励起とは、自由電子の衝突エネルギーが解離より小さい場合に分子内の電子が弾かれ、元いた軌道より上の軌道を回る現象のことである。脱励起とは、励起状態では電子が不安定であるため、短時間で元の軌道に落ちる現象のことである。このとき、衝突エネルギーは元の軌道に戻るエネルギーより大きいため、余剰分のエネルギーが光となって放出される。

#### ・粒子のエネルギーの極大性

プラズマは高温によって粒子が振動し、粒子間の衝突が活発になり衝突力が増す。それに伴い、原子、分子の電離、解離、励起が起きる。衝突が活発になることで発生するエネルギーは、温度上昇に伴い増大する。

### 1.3 大気圧低温プラズマ

大気圧低温プラズマとは、大気圧下で生成した非熱平衡プラズマである。大気圧低温プラズマの特徴は大気圧下で生成ができ真空設備が不要なため、機械の設置面積を削減できる点である。さらにプラズマが低温であるため照射対象物に熱負荷を与えないため、生体に対しての使用が可能である。以下に大気圧低温プラズマを用いた既往の研究について述べる。

#### 1.3.1 皮膚損傷に対する大気圧プラズマ照射

大気圧下で生成されたプラズマは、反応性の高さにより一酸化窒素(Nitric Oxide: NO)等の活性酸化窒素種(Reactive nitrogen oxide species: RNOS)を発生することが知られている。RNOS はニトロソ化および酸化ストレスの誘発、必須酵素の不活性化、細胞内の鉄貯蔵量の減衰、微生物 DNA の損傷、過酸化脂質による微生物細胞膜の破壊等の作用があり、強い殺菌性を示す。そのため、医療分野では呼吸器疾患以外の外傷においても NO を用いた治療法が検討されてきた。そこで ALTP が ROS を生成することに着目し、ALTP を用いた皮膚損傷治療への応用が検討されている。

Shulutko らでは、糖尿病性壊死の患者に対してプラズマ照射を行ったところ、有意な治療結果が報告された。図 1-5 に示すように、治療前では広範囲に広がっていた病変部が 2 カ月間で 10 回の照射を行った結果、病変部の大きさは治療前と比べて 1/3~1/4 程度に縮小し、患部の切断を行う必要性が 1.9 倍も減少した。欠損した皮膚や粘膜が回復する過程では、通常は肉芽細胞が形成された後に表皮細胞が増殖する上皮化が生じる。これはプラズマの生成物としての RNOS が患部の殺菌を行ったことに加えて、ROS 及び RNOS による血管新生が促進されたことで、上皮化が促されたと考えられる[4]。



図 1-5 プラズマ照射前後の患部の比較[5]

### 1.3.2 がん細胞に対する大気圧プラズマ照射

T.Koji らの研究では、4 種の胃がん細胞(SC-2-NU, NUGC4, MKN28, MKN45) に対しての効果が検討された[6]。それぞれの細胞は各ウェル 100[ $\mu$ L]の培地に  $1 \times 10^3$  個,  $5 \times 10^3$  個,  $1 \times 10^4$  個で播種され,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  濃度 5%, 湿度 95% で 24 時間インキュベートされた。その後, 培地を非平衡大気圧プラズマ曝露培地に交換された。24 時間後, PremixWST-1(Takara-Bio, Japan)を用いて細胞生存率の検討が行われた。図 1-6 に各細胞の 24 時間後の細胞生存率とプラズマ照射時間の比較結果を示す。

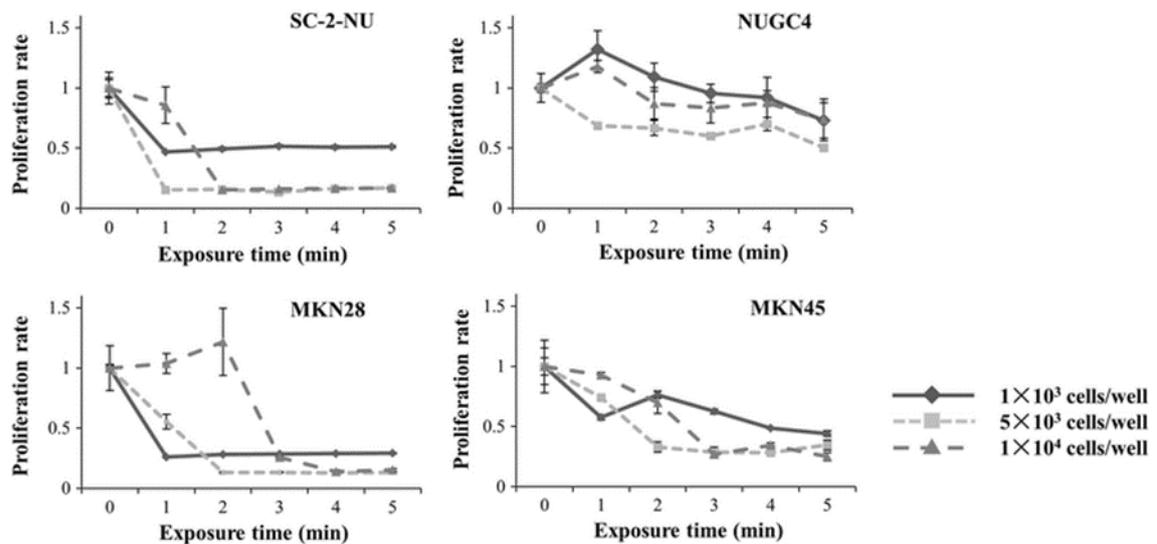


図 1-6 大気圧低温プラズマ処理を行った各細胞の増殖曲線[7]

対照群である曝露時間 0 min の細胞群以外では細胞の密度に関わらず増殖率が減少していることがわかる。なお、他の胃癌細胞においてもプラズマ処理が施された場合、細胞増殖率の減少が見られた。従って、大気圧低温プラズマにはがん細胞の増殖を阻害する作用をもつことが示唆された。

また、*in vivo* の研究では M. Keidar らによってメラノーマ細胞(B16-F10)に対して効果があることが示された。メラノーマとは、悪性黒色腫とも呼ばれる悪性度が非常に高い皮膚がんの一種である。B16-F10 細胞は C57BL/6 マウスにおける B16-F0 細胞株の転移を 10 回繰り返すことで株化されており、特に浸潤能や転移能が高く、悪性度が高いとされている。ヌードマウスに対して B16-F10 細胞を移植し、腫瘍の最大直径が 5 mm に成長した後、プラズマ照射(1日1回、2分間)を行った。結果、図 1-7 に示すように照射群と比べて腫瘍の大きさの増加が抑えられた。生存日数に関しても同様に、図 1-8 に示すように大幅な増加が確認された。

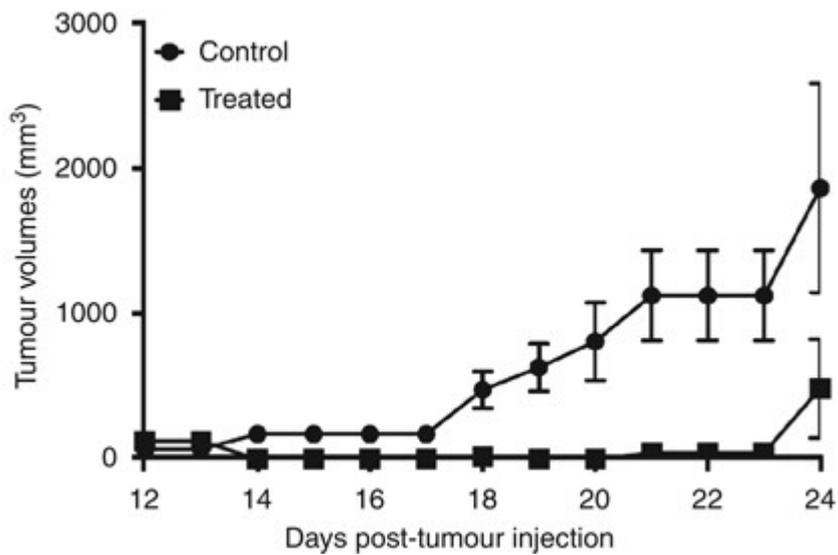


図 1-7 メラノーマ細胞の移植を行ったマウスに対する大気圧低温プラズマの照射が腫瘍の成長に与える影響[8]

$$(V=0.52(X^2 \times Y))$$

Control: 無処置

Treated: 大気圧低温プラズマ処理(2.5 分間のプラズマ処理)

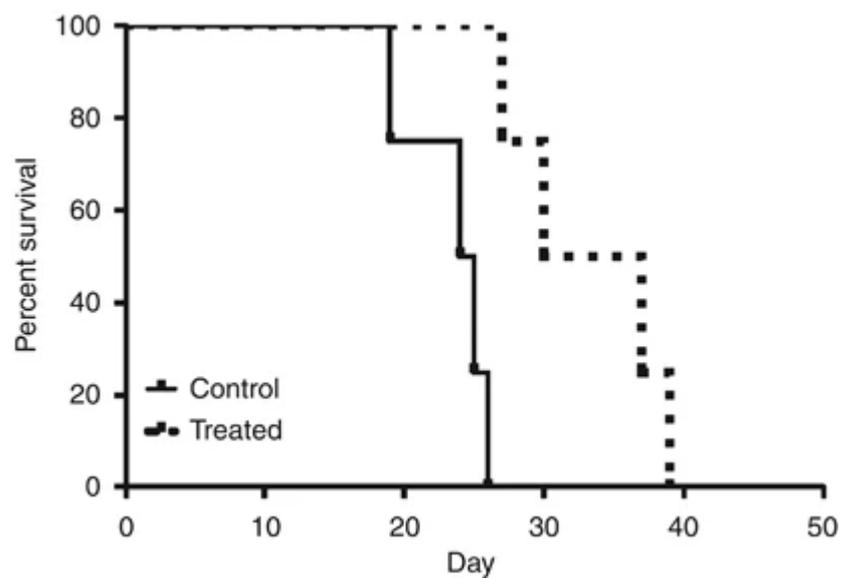


図 1-8 メラノーマ細胞の移植を行ったマウスの生存率の比較[8]

Control: 無処置

Treated: 大気圧低温プラズマ処理(2.5 分間のプラズマ処理)

### 1.3.3 植物に対するプラズマ照射

植物に対するプラズマ照射においては、薬剤を用いず安価な植物の発芽や成長の促進誘導の手法として期待されている。表面誘電体バリア放電を用いたシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)の根の成長促進に関する報告では、図 1-9 に示すようにプラズマ照射を行った純水に暴露させることで、その成長率を促進させることが明らかになった。

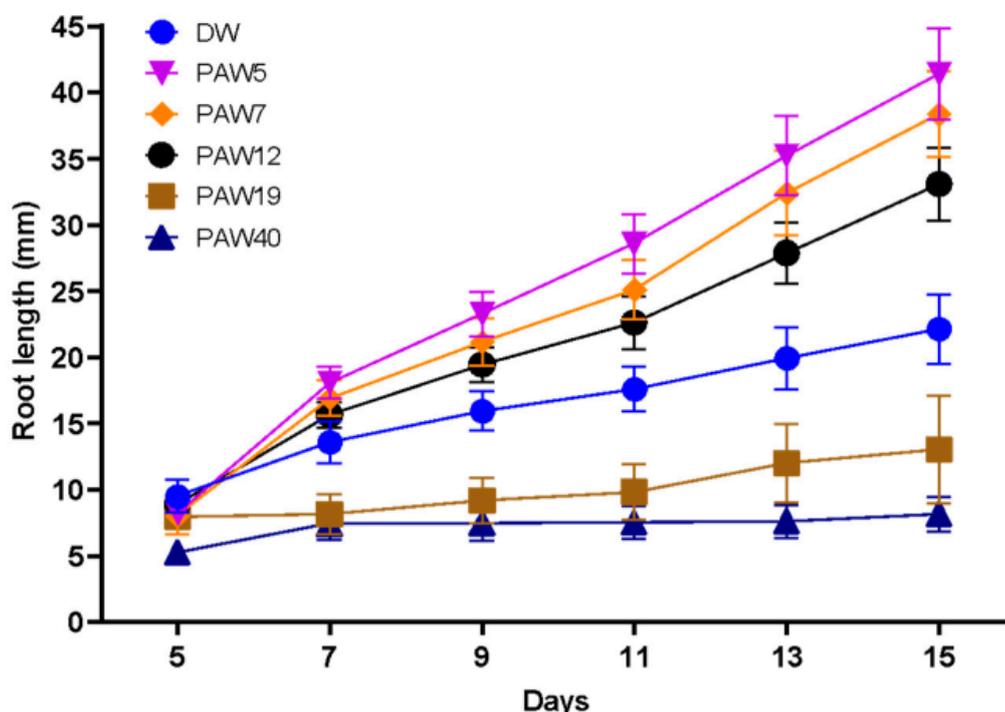


図 1-9 プラズマ活性水がシロイヌナズナの根の伸長に与える影響[9]

DW: 純水

PAW5: 処理時間 5 分

PAW7: 処理時間 7 分

PAW12: 処理時間 12 分

PAW19: 処理時間 19 分

PAW40: 処理時間 40 分

プラズマを利用した発芽率の報告では、レタス(*Lactuca Sativa* L.)に対してプラズマ処理水の曝露を行ったところ、発芽率の向上が確認された。レタスの種子 20 粒に対してプラズマ処理水(処理時間 5, 10, 15, 20, 25, 30 分)を浸漬させ、24 時間毎に処理水を 1 mL ずつ加水して 3 日間観察を行った。図 1-10 にプラズマ処理水の処理時間と発芽率を示す。発芽率は種子の総数に対して発芽した種子数から定義した。

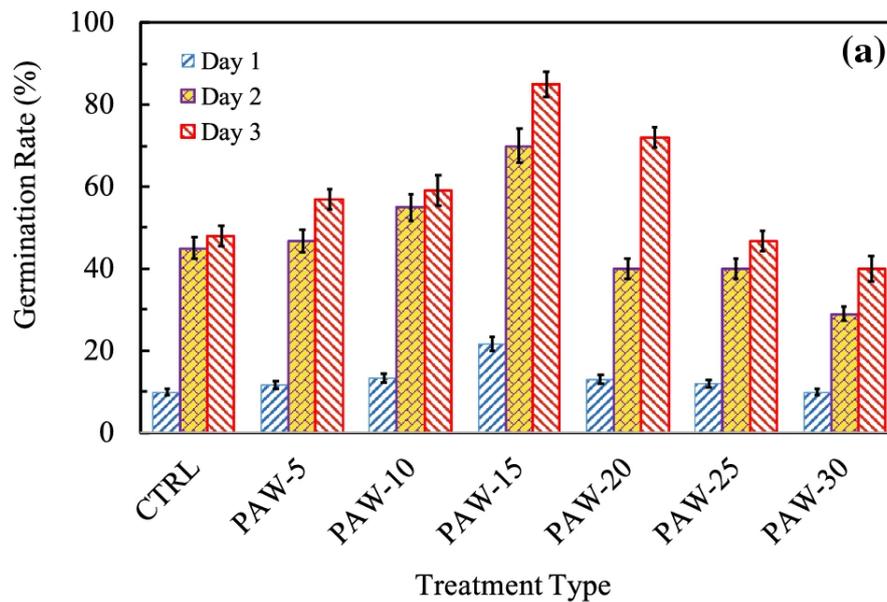


図 1-10 プラズマ処理から3日間の *Lactuca Sativa L.*の種子の発芽率[10]

動物に対するプラズマ照射では ROS, RNOS がその影響を担っていると考えられていたが、植物に対しても同様である。RNOS は植物の成長や発達などの様々な機序を制御する。また、ROS は植物のシグナル伝達と成長に関与するタンパク質を生成し、細胞の伸長・分裂・細胞周期の制御を行うことが示唆されている。しかし、高濃度の ROS はゲノムの二本鎖切断により DNA の損傷を引き起こし、細胞の生存率に影響を与える可能性があるため、発育に最適な条件を求めることが必要とされている。

## 1.4 本研究の目的

大気圧下でパルス状に電圧を印加することで、電子のみが選択的にエネルギーを受け取るため、電子温度が高くガス温度が室温と同程度のプラズマが生成可能である。ALTP は生成物の反応性の高さとガス温度の低さから、生体への照射に適している。ALTP の既往の研究としては、がん細胞の増殖抑制や再生医療、そして植物の発芽・成長促進など多岐にわたる。しかし、代表的な生成物である ROS や RNOS は一般的には生体に対して害があることが知られている。がんでは ROS 炎症反応を増悪させ、浸潤や転移、上皮間葉転換を促す。また、通常細胞においても過度の ROS はミトコンドリアに障害を与えてアポトーシスを誘引する。しかし、近年では過度の ROS, RNOS はがん細胞をアポトーシスに導き、微量では正常細胞や植物の活性化が期待されている。

そこで本研究では、ALTP を用いた新規のがん治療法の検討や、骨折の分化促進、種子の発芽促進等の生体応用について検討した。

## 1.5 本論文の概要

本論文は6つの章から構成されており、図 1-11 にその概要について示す。また、表 1-1 に各実験系と照射方法の一覧について示す。

第一章では研究背景としてプラズマの概要及び ALTP の既往の研究、本研究の目的について述べた。

第二章では培養大腸がん細胞を用いた ALTP 処理培地の検討を行った。また、正常細胞に対して ALTP 処理培地を添加することで、ROS や RNOS といったラジカルが生体に対して負の影響を与えないことを示した。

第三章では ALTP を用いた大腸がんの増殖抑制を検討するため、*in vivo* での検討を行った。大腸がんモデルラットに対して ALTP 処理を行った生理食塩水の投与による治療法についての研究は他にはなく、また、低侵襲であることも有用である。

第四章では、骨折モデルマウスに対して ALTP の直接照射を行った。また、マウス頭蓋冠細胞の分化アッセイに際して ALTP 処理培地を暴露することで、分化の促進について検討した。

第五章では種子に対する ALTP の効果を検討した。評価指標として、バイオフィトン測定することで、侵襲的な評価が行えることを示した。

第六章では各章を総括し、本論文の結論を述べた。

表 1-1 本論文における ALTP の照射対象と照射条件の一覧

照射対象	大腸がん細胞 (2章)	大腸がんモデルラット (3章)	骨芽細胞 (4章)	骨折モデルラット (4章)	種子 (5章)
照射方法	培地に照射後, 細胞へ投与	溶液に照射後, 腸内投与 溶液に照射後, 尾静脈投与	培地に照射後, 細胞へ投与	直接照射	直接照射
照射時間	1 mL に対して 90 秒	6 mL に対して 90 秒	2 mL に対して 10, 30, 60, 90 秒	90 秒	900 秒

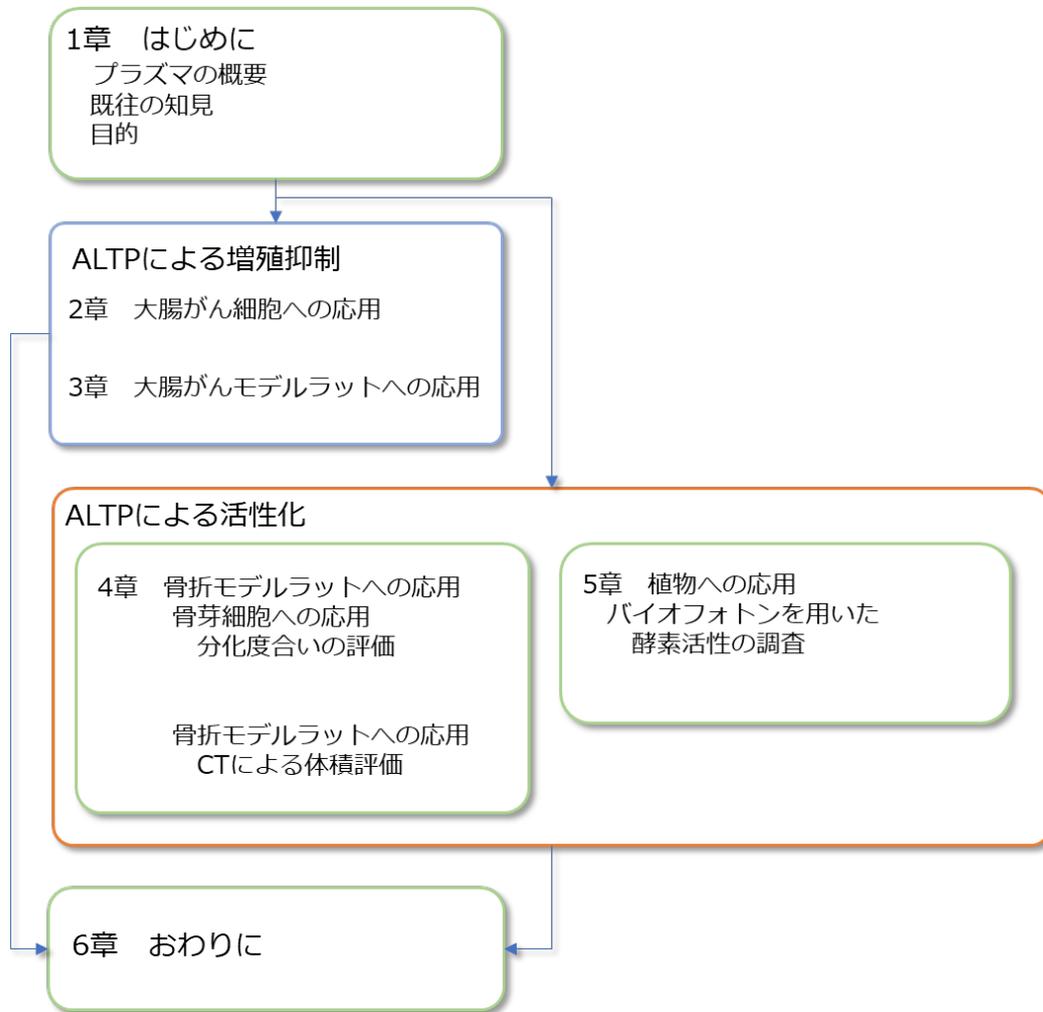


図 1-11 本論文の各章の構成

## 参考文献

- [1] 板谷良平, “20世紀におけるプラズマ物理の歴史と将来展望,” *応用物理*, vol. 69, no. 8, pp. 971–977, 2000, Accessed: Jul. 24, 2022, doi: 10.11470/oubutsu1932.69.971.
- [2] F. F. Chen, “Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion,” *Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion*, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-22309-4.
- [3] 竹生修己, “大気圧プラズマ—基礎と応用—,” 株式会社オーム社, pp. 370–376, 2007.
- [4] C. Xia, Q. Meng, L. Z. Liu, Y. Rojanasakul, X. R. Wang, and B. H. Jiang, “Reactive Oxygen Species Regulate Angiogenesis and Tumor Growth through Vascular Endothelial Growth Factor,” *Cancer Res*, vol. 67, no. 22, pp. 10823–10830, Nov. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0783.
- [5] B. L. Adler and A. J. Friedman, “Nitric oxide therapy for dermatologic disease,” *Future Sci OA*, vol. 1, no. 1, Aug. 2015, doi: 10.4155/FSO.15.37/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG.
- [6] K. Torii *et al.*, “Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells,” *Gastric Cancer*, vol. 18, pp. 635–643, 2015, doi: 10.1007/s10120-014-0395-6.
- [7] G. Takahashi, T. Hirata, and A. Mori, “Non-contact and non-invasive monitoring of plant growth combining atmospheric pressure remote plasma treatment and detection of plant-derived biophotons,” *Jpn J Appl Phys*, vol. 60, no. 10, p. 100905, Sep. 2021, doi: 10.35848/1347-4065/AC22EB.
- [8] M. Keidar *et al.*, “Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy,” *Br J Cancer*, vol. 105, pp. 1295–1301, 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.386.
- [9] D. H. Ka *et al.*, “Plasma-Activated Water Modulates Root Hair Cell Density via Root Developmental Genes in *Arabidopsis thaliana* L,” 2021, doi: 10.3390/app11052240.
- [10] P. Lariguet, P. Ranocha, M. de Meyer, O. Barbier, C. Penel, and C. Dunand, “Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*,” *Planta*, vol. 238, pp. 381–395, 2013, doi: 10.1007/s00425-013-1901-5.

## 第2章 大腸がん細胞に対する

### ALTP の効果

#### 2.1 緒言

1章で述べたように ALTP の効果は多岐に渡るため、本章では培養細胞に対して *in vitro* における ALTP 照射実験を行うことで、細胞に対してどのような影響があるかを明らかにした。また、ALTP に含まれる ROS や RNOS といった物質は反応性が高く、通常の上皮細胞に対して障害を与える危険性もある。そこで本研究では、ヒト結腸腺癌細胞 COLO 205 及びマウス頭蓋冠細胞 MC3T3-E1 を用いて大気圧低温プラズマ照射培地 (PTM: Plasma Treated Medium) の暴露による評価を行った。

#### 2.2 MC3T3-E1 に対する PTM の暴露評価

ALTP の細胞への影響を調査する方法として、照射した細胞の細胞増殖曲線を作成し、増殖能を評価することが挙げられる。そこで我々は正常細胞である MC3T3-E1 細胞を用いて、ALTP が通常細胞の細胞増殖に与える影響を評価した。

実験の際には 12 well 培養容器 (ポリプロピレン製: 6 cm<sup>2</sup>/well) 上に 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 含有 Alpha modification of Eagle's MEM (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 培地を 1 mL ずつ添加し、ALTP 照射装置先端のガラスキャピラリー先端より 5 mm の距離を置いて照射した。また、プラズマ照射時の印加電圧を変更することで照射結果に差が生じると考え、印加電圧を 8 kV 及び 13 kV で設定して実験を行った。その後、MC3T3-E1 細胞を 12 well 培養容器上に  $1.0 \times 10^5$  cells/mL ずつ播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で培養した。ALTP を MC3T3-E1 細胞に照射し、12, 24, 48, 72 時間後に各 well に対して 0.5 mL の 0.05% Trypsin-EDTA を加えて細胞を遊離した。遊離した細胞を 1500 rpm で 5 分間遠心して回収し、血球計算盤で細胞数を計算した。対照実験群として、ALTP を生成する際に必要な He のみを照射した群と比較を行った。図 2-1 に PTM 作成時の ALTP 照射装置の概要、表 2-1, 2-2 に照射条件及び各装置について示す。

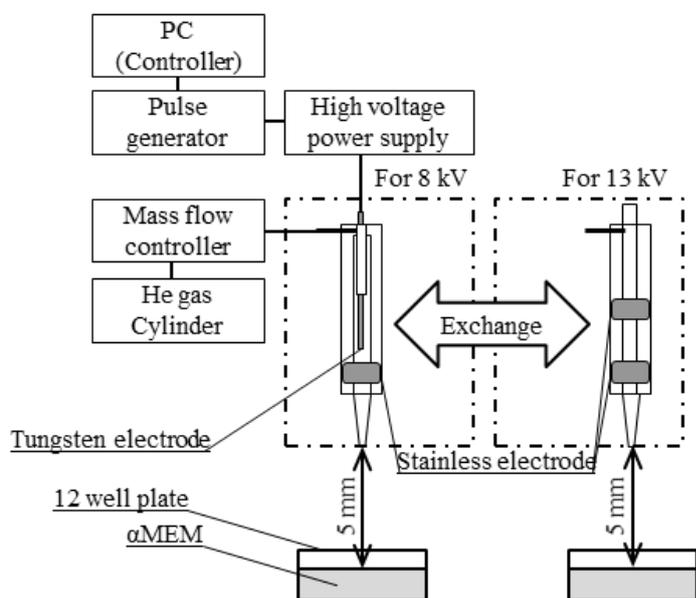


図 2-1 PTM 作成時の ALTP 照射装置の概要

表 2-1 ALTP の照射条件

ガス種	流量	印可電圧	周波数	波形	照射時間	照射距離
ヘリウム	1.0 L/min	8, 13 kV	3 kHz	矩形	90 sec	5 mm

表 2-2 ALTP 発生装置に用いた機器の一覧

Apparatus	Manufacturer	Name of product
Pulse Generator	NF Corporation	WAVE FACTORY 1941
High Voltage Power Supply	NF Corporation	HVA4321
Mass Flow Controller	KOFLOC	8500MC-0-1-1

### 2.2.1 実験結果及び考察

図 2-2 にプラズマ照射培地暴露後 12, 72 時間後の MC3T3-E1 細胞の顕微鏡画像, 図 2-3 に各時間の細胞数の推移を示す。顕微鏡画像では判別しにくいですが, 照射 12 時間後ではプラズマ照射群が若干細胞密度が少なく, 照射 72 時間後ではほぼコンフルエントな状態まで増殖している。細胞数の推移では, 電圧が高いほど 24, 48 時間後の細胞数は対照群と比べて有意に低下したが, 72 時間後においてはどの群もほぼ等しい程度まで増殖した。従って通常細胞では癌細胞とは異なり, ALTP による生成物が時間経過によって代謝されたことが示唆された。

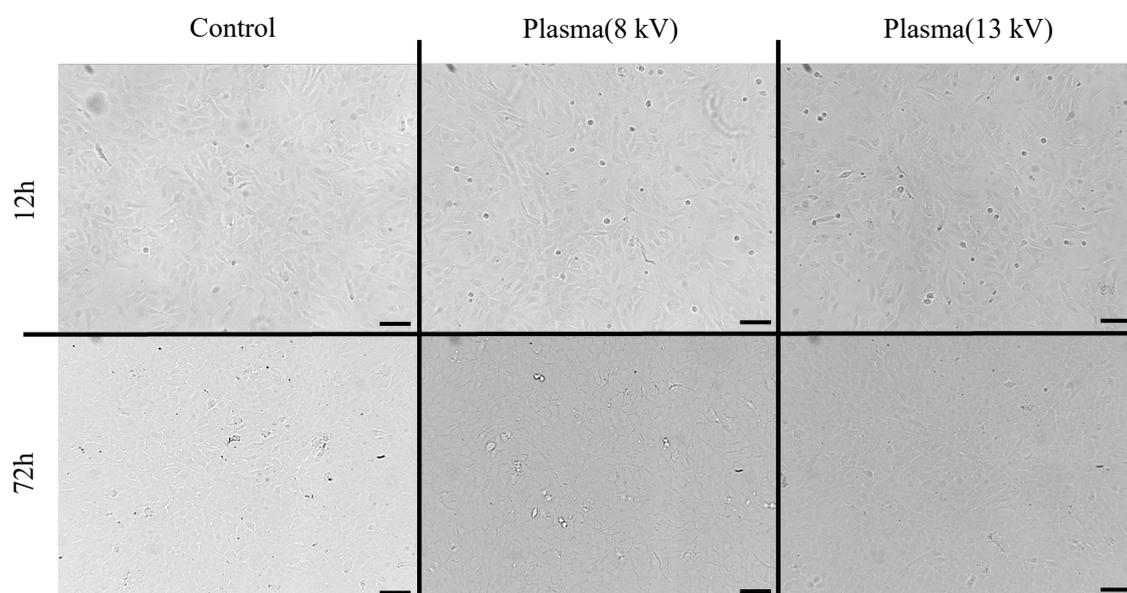


図 2-2 ALTP 照射後の MC3T3-E1 細胞の顕微鏡写真 (Scale bar: 100  $\mu$ m)[1]

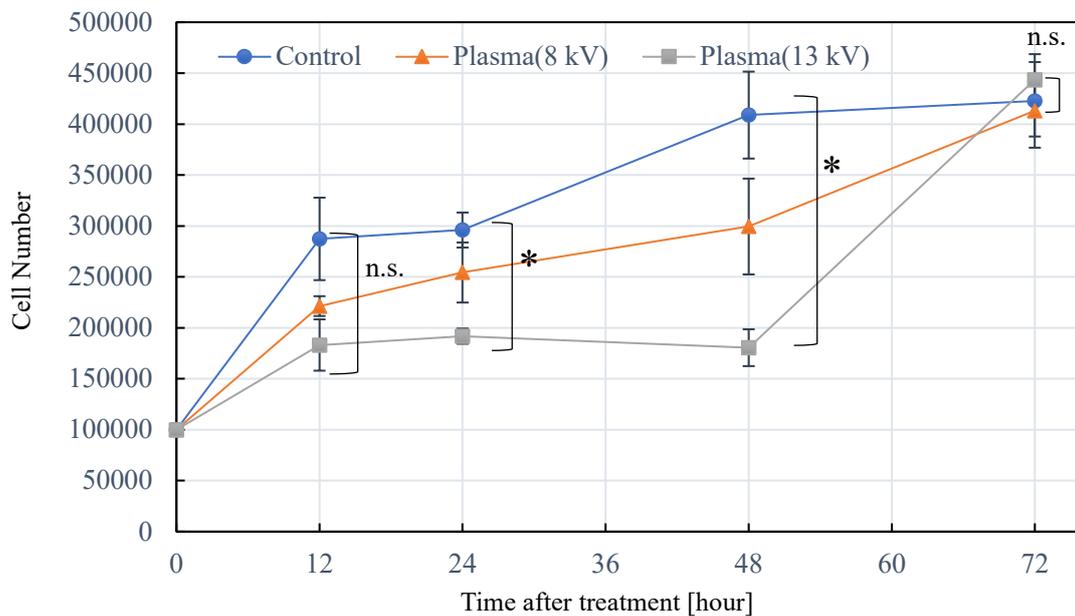


図 2-3 PTM 曝露を行った MC3T3-E1 の細胞数の推移[1]  
(n=3, S.D., \*: p<0.05, n.s.: not significant)

## 2.3 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地の暴露評価

大気圧低温プラズマが大腸癌に与える影響を調査するため、ヒト結腸腺癌細胞由来である COLO 205 細胞を用いて大気圧プラズマ照射培地の評価を行った。

### 2.3.1 実験方法

図 2-4 に示すように 12 well 培養容器上に 10%FBS 含有 RPMI1640(Thermo Fisher Scientific, Inc.)培地を 1 ml ずつ添加し、大気圧プラズマ照射装置先端のガラスキャピラリー先端より 5 mm の距離を置いて照射した。その後、COLO 205 細胞を 12 well 培養容器上に  $1.0 \times 10^5$  cells/ml ずつ播種し、37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% でインキュベートした。12, 24, 48, 72 時間後に各 well に対して 0.5 ml の 0.05% Trypsin-EDTA を加えて細胞を遊離した。遊離した細胞を 1500 rpm で 5 分間遠心して回収し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。対照実験群として、大気圧低温プラズマを生成する際に必要な He のみを照射した群と比較を行った。

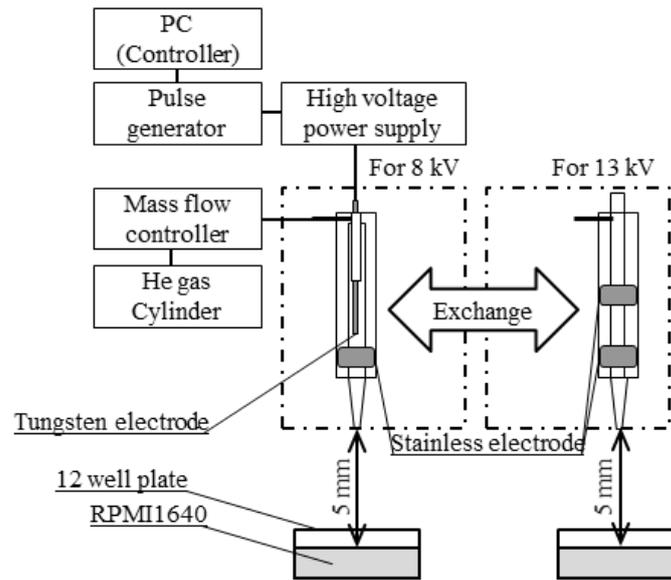


図 2-4 PTM 作成時の ALTP 照射装置の概要

### 2.3.2 実験結果及び考察

図 2-5 にプラズマ照射培地暴露後 12, 72 時間後の COLO 205 細胞の顕微鏡画像, 図 2-6 に時間毎の細胞数の推移を示す。プラズマ照射 12 時間後ではいずれの群も well 底面に細胞が付着していた。72 時間後では対照群は多くの細胞が底面に付着し増殖しているのに対し, 照射群では細胞数が減少していた。また, 印可電圧が 13 kV の群では他の二群と比べて死細胞や細胞壁が崩壊している細胞が多くみられた。細胞数の推移では, プラズマを照射した両群において, 対照群と比較して有意に細胞死の促進, あるいは細胞増殖の抑制が行われたことが明らかとなった。ROS の存在はがんの浸潤, 転移において有利に働くとされている一方で, 過度の酸化ストレスはがん細胞を死に導くことも知られている。がん細胞は通常細胞と異なり ROS や RNOS の代謝能が未成熟であり, 代謝の限界を超えて曝された場合はアポトーシスを誘発する[2-4]。従って本実験の結果から, COLO 205 細胞は過度の酸化ストレスに曝されたことで細胞数が減少し, 一方で通常細胞では代謝が問題なく行われたことで, 細胞がコンフルエントな状態まで増殖したと考えられる[6]。

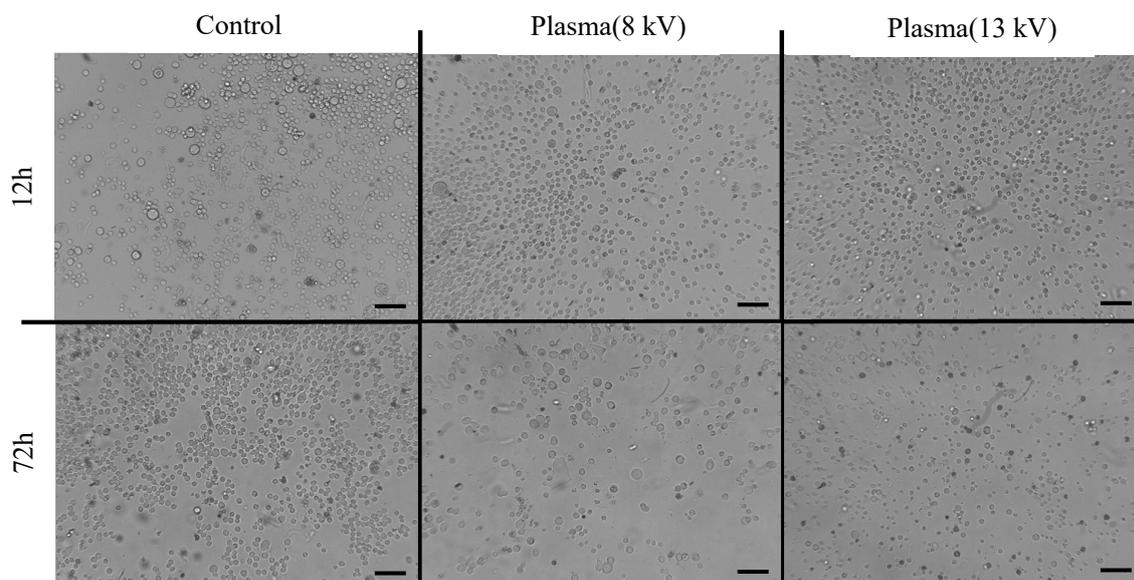


図 2-5 ALTP 照射後の COLO205 細胞の顕微鏡写真 (Scale bar: 100 um) [1]

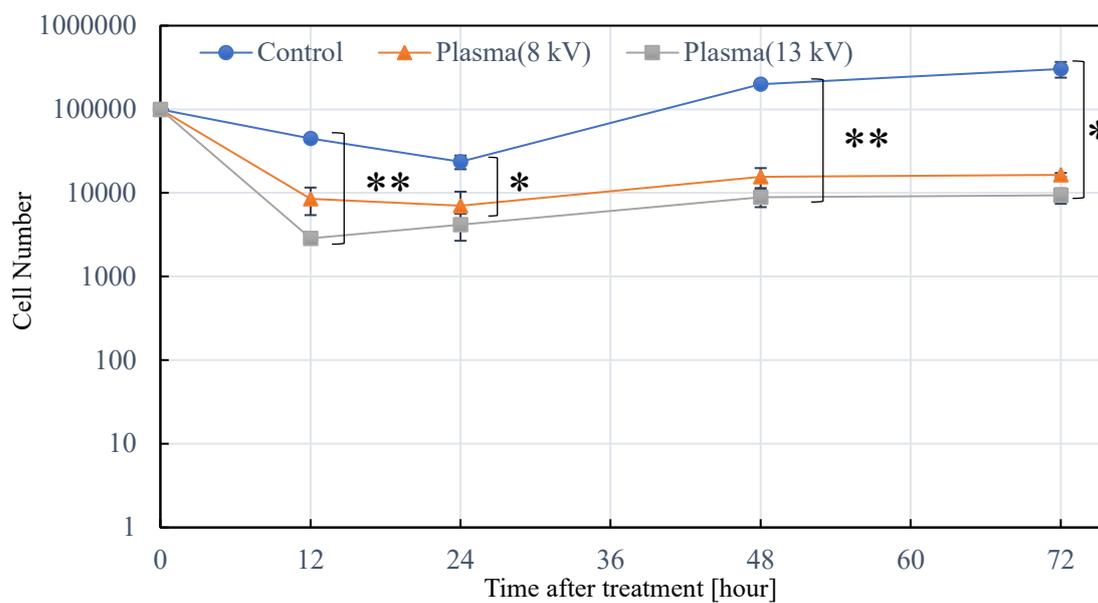


図 2-6 PTM 曝露を行った COLO205 細胞の細胞数の推移[1]  
(n=7, S.D., \*: p<0.05, \*\*: p<0.005, n.s.: not significant)

## 2.4 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地暴露群の炎症性サイトカイン比較

大気圧低温プラズマが COLO 205 細胞に与える影響を調査するため、Real-time polymerase chain reaction(リアルタイム PCR)法を用いた遺伝子発現解析により炎症性サイトカインの発現量を比較した。

本研究では炎症性サイトカインの指標として *TNF- $\alpha$*  を用いた。*TNF- $\alpha$*  は腫瘍壊死因子と呼ばれ、細胞に対して侵襲的なダメージが生じた際に速やかに分泌される、最も一般的な生体反応のシグナル伝達物質である。*TNF- $\alpha$*  は生体に対して炎症反応、細胞分化におけるシグナル伝達経路の活性化といった様々な反応を示すが、特にアポトーシスを誘引することが広く知られている[7],[8]。従って、大気圧低温プラズマを照射した COLO205 細胞の *TNF- $\alpha$*  の発現量を対照群と比較することで、細胞内で生じている現象についての調査が可能である。

### 2.4.1 実験方法

実験の際には 12 well 培養容器上に 10%FBS 含有 RPMI1640 培地を 1 ml ずつ添加し、大気圧プラズマ照射装置先端のガラスキャピラリー先端より 5 mm の距離を置いて照射した。その後、COLO 205 細胞を 12 well 培養容器上に  $1.0 \times 10^5$  cells/ml ずつ播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%でインキュベートした。大気圧低温プラズマを COLO 205 細胞に照射し、24, 48, 72, 96 時間後に各 well に対して 800  $\mu$ L の ISOGENE (NIPPON GENE Co., Ltd.)を添加し、細胞を回収した。RNA フリー水 320  $\mu$ L を加えて 15 秒間混合し 15000 rpm, 15 分間 4°C, 遠心した。上清 800  $\mu$ L を回収し、再度 15000 rpm で遠心した。沈殿に 0.5 mL のイソプロパノールを 1 mL 添加し、12000 rpm, 5 分 4°Cで遠心した。上清を除去し、70%エタノール 1 mL を加えて 12000 rpm, 5 分間 4°Cで遠心した。エタノールを除去し、沈殿している RNA に 10  $\mu$ L の RNA フリー水を加えて懸濁した。

回収した RNA 4  $\mu$ g, Oligo dT プライマー 0.5  $\mu$ L を加え、滅菌水を加えて 8.5  $\mu$ L にメスアップし、70°Cで 10 分間加温した。氷上で冷却し、SuperScript II(Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて逆転写反応(25°C10 分, 42°C50 分, 72°C15 分)を行い、cDNA を合成した。

得られた cDNA をリアルタイム PCR システム(Applied Biosystems)を用いて遺伝子発現解析を行った。炎症性サイトカインの指標として *TNF- $\alpha$* (Forward: TCCTTCAGACACCCTCAACC, Reverse: AGGCCCCAGTTTGAATTCTT)を、ハウ

スキッピング遺伝子として *β-actin*(Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC, Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG)を使用した。PCR の反応条件を以下に示す。

・リアルタイム PCR 反応条件

95°C	10 分	
95°C	15 秒	} 45 サイクル
60°C	1 分	
60°C	1 分	} Melt Curve
95°C	15 秒	

## 2.4.2 実験結果及び考察

図 2-7 に時間毎の  $TNF-\alpha$  の発現量の比較を示す。12 時間後までは対照群と PTM の間に有意差はなかったが、24 時間後以降には有意な差が生じた。従って、プラズマ照射培地は  $TNF-\alpha$  のシグナル伝達経路を介してがん細胞の細胞死を誘導することが示された。

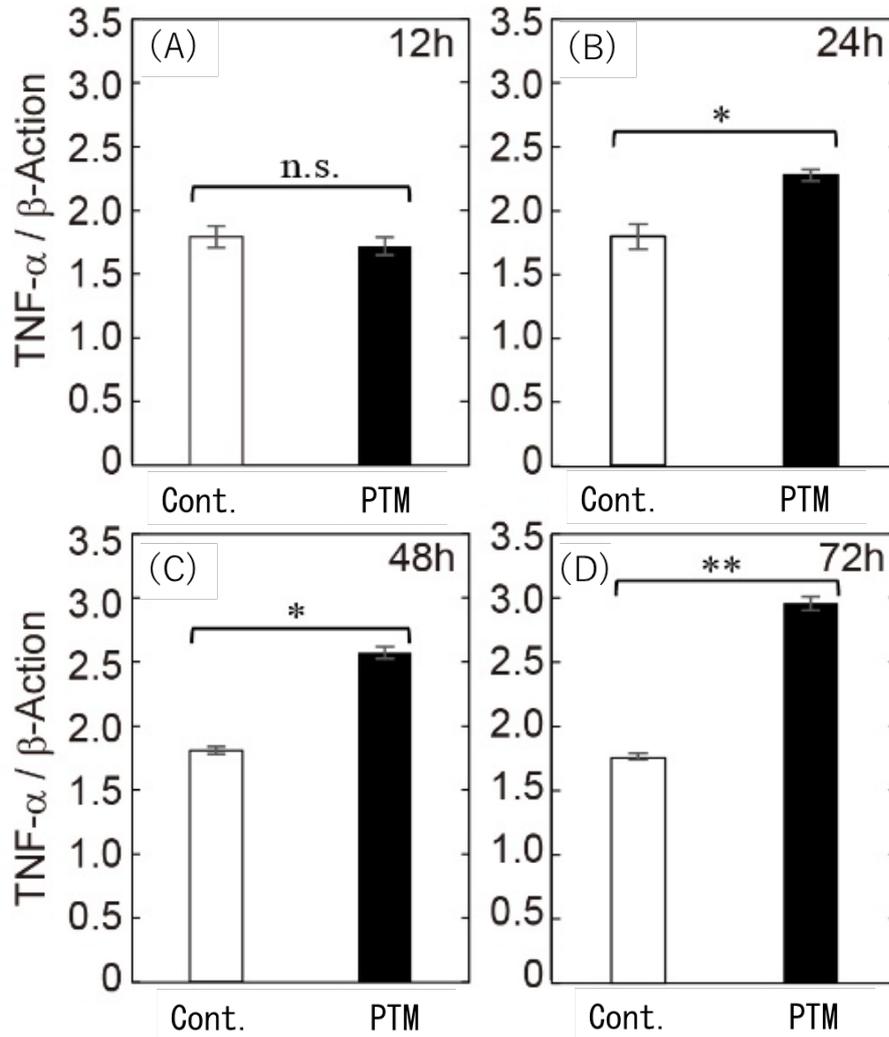


図 2-7 ALTP 照射後 12~24 時間の  $TNF-\alpha$  遺伝子の発現量の比較[9]

(A): 12 h

(B): 24 h

(C): 48 h

(D): 72 h

Cont.: 無処置群

PTM: Plasma treated medium 曝露群

(n=7, S.D.) \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.005$ , n.s.: not significant).

## 2.5 大腸癌細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地及び過酸化水素添加培地への暴露評価

ALTP による生成物は様々であるが、細胞死に直接影響を与える代表的な物質として過酸化水素がある。過酸化水素は水溶液中できわめて強い酸化力をもつヒドロキシラジカルを生成しやすい[10]。従って、過酸化水素の濃度を調査することで、大気圧低温プラズマによる細胞増殖の抑制経路の特定を行うことが可能である。そこで本研究では、ALTP の照射によって生成される過酸化水素の濃度を測定し、同濃度の過酸化水素を添加した培地で培養を行い、ALTP 照射培地との比較を行う。

### 2.5.1 実験方法

PTM と同量の過酸化水素添加培地を作成するため、PTS 作成時の過酸化水素の濃度をデジタルパックテスト(DPM-H202, 協立理化学研究所)を用いて測定した。測定時の ALTP に対する印可電圧は 13 kV とした。

実験の際には 12 well 培養容器上に 10%FBS 含有 RPMI1640 培地を 1 mL ずつ添加し、大気圧プラズマ照射装置先端のガラスキャピラリー先端より 5 mm の距離を置いて照射した。また、過酸化水素暴露群として、過酸化水素を得られた濃度から終濃度 1.05 mg/L となるよう培地に添加した。その後、COLO 205 細胞を 12 well 培養容器上に  $1.0 \times 10^5$  cells/mL ずつ播種し、37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% でインキュベートした。大気圧低温プラズマを COLO 205 細胞に照射し、12, 24, 48, 72 時間後に各 well に対して 0.5 mL の 0.05% Trypsin-EDTA を加えて細胞を遊離した。遊離した細胞を 1500 rpm で 5 分間遠心して回収し、血球計算版で細胞数を計算した。照射時の印可電圧は 13 kV, 対照実験群として大気圧低温プラズマを生成する際に必要な He のみを照射した群と比較を行った。

### 2.5.2 実験結果及び考察

図 2-8 にプラズマ照射培地暴露及び過酸化水素暴露 96 時間後の顕微鏡画像を示す。対照群は視野すべてに細胞が存在しており、正常に増殖している。一方、過酸化水素暴露群では細胞の数は少なく、黒点のような死細胞が多く観察された。また、プラズマ照射培地暴露群では対照群と比べて細胞数が少なく、その形状においても変化が生じていた。図 2-9 に示す時間毎の細胞数の推移では、対照群と他の 2 群で有意な差が生じていた。また、プラズマ照射培地群と過酸化水素暴露群でも有意な差が生じており、プラズマ照射培地暴露群の方が多くの細胞が死滅あるいは増殖の抑制が生じていた。

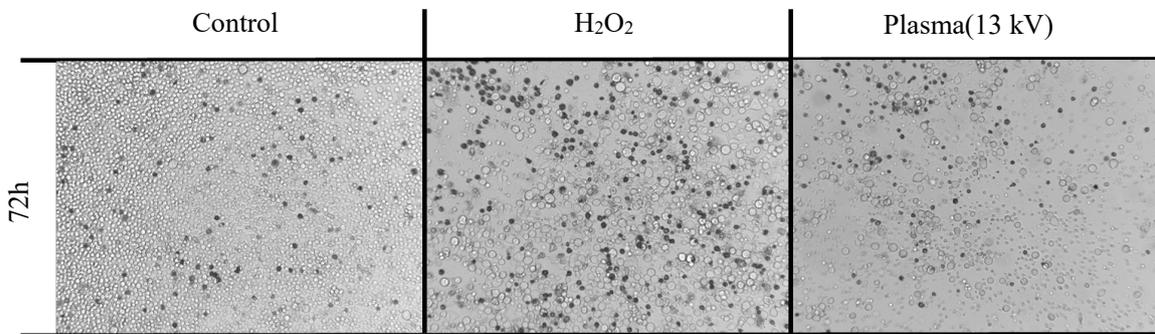


図 2-8 PTM 及び過酸化水素曝露後の COLO205 細胞の顕微鏡写真 (Scale bar: 100 um)

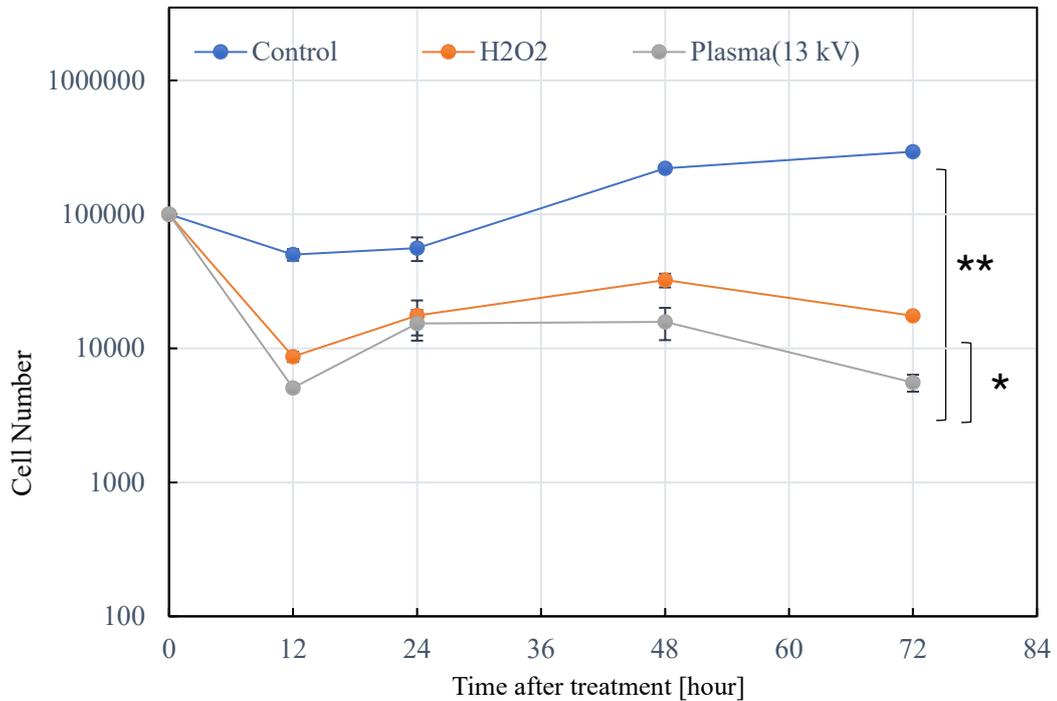


図 2-9 PTM 及び過酸化水素の曝露を行った COLO205 細胞の細胞数の推移 (n=7, S.D.) \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.005).

## 2.6 結言

図 2-8, 2-9 より, 正常細胞と比較して癌細胞では ALTP の効果の感受性が高いことが示唆された。正常細胞と比べて癌細胞は抗酸化物質の代謝が難しいため, 細胞死や増殖の抑制を生じやすい。従って, ALTP を大腸がん治療に用いる際の副作用, 特に他の正常細胞に対して有害な影響を与えにくい。

大腸がん細胞に対する PTM の暴露において, 時間経過によって細胞の増殖が抑制及び細胞死が促進され,  $TNF-\alpha$  の発現量に関しても増加した。また, 72 時間後においても対照群と比較して有意に細胞数に差が生じていることから, ALTP の照射は一定期間効果が続くことも判明した。

ALTP による細胞死の原因を同定するため過酸化水素暴露群との比較を行った結果, 細胞数がプラズマ照射培地暴露群の方が有意に少なかった。従って, プラズマ照射培地による細胞死の誘導は過酸化水素のみではなく, ROS や RNOS 等の複数の要因が絡み合っていることが明らかとなった[11]。更に ALTP 照射群と過酸化水素暴露群と比較しても有意な差が生じていたため, 過酸化水素のみを暴露するよりがん細胞に対して有用であるといえる。

## 参考文献

- [1] G. TAKAHASHI, N. OKUNO, A. MORI, and M. WATADA, “Effect of Medium Irradiated with Atmospheric Pressure Plasma on Cultured Colorectal Cancer Cells,” *Journal of the Japan Society of Applied Electromagnetics and Mechanics*, vol. 29, no. 2, pp. 489–494, 2021, doi: 10.14243/JSAEM.29.489.
- [2] C. Rodrigues *et al.*, “Human Aquaporin-5 Facilitates Hydrogen Peroxide Permeation Affecting Adaption to Oxidative Stress and Cancer Cell Migration,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 7, 2019, doi: 10.3390/cancers11070932.
- [3] R. Sarkar *et al.*, “Effect of cigarette smoke extract on mitochondrial heme-metabolism: An in vitro model of oral cancer progression,” *Toxicology in Vitro*, vol. 60, pp. 336–346, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.TIV.2019.06.016.
- [4] C. Kim, H. S. Song, H. Park, and B. Kim, “Activation of ER Stress-Dependent miR-216b Has a Critical Role in Salvia miltiorrhiza Ethanol-Extract-Induced Apoptosis in U266 and U937 Cells,” *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 1240*, vol. 19, no. 4, p. 1240, Apr. 2018, doi: 10.3390/IJMS19041240.
- [5] S. M. Kim, D. Y. Hur, S. W. Hong, and J. H. Kim, “EBV-encoded EBNA1 regulates cell viability by modulating miR34a-NOX2-ROS signaling in gastric cancer cells,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 494, no. 3–4, pp. 550–555, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.BBRC.2017.10.095.
- [6] V. Aggarwal *et al.*, “Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements,” *Biomolecules 2019, Vol. 9, Page 735*, vol. 9, no. 11, p. 735, Nov. 2019, doi: 10.3390/BIOM9110735.
- [7] G. Vilema-Enríquez, A. Arroyo, M. Grijalva, R. I. Amador-Zafra, and J. Camacho, “Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: Potential therapeutic implications,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1908164.
- [8] P. C. Rath and B. B. Aggarwal, “TNF-Induced Signaling in Apoptosis,” *Journal of Clinical Immunology 1999 19:6*, vol. 19, no. 6, pp. 350–364, 1999, doi: 10.1023/A:1020546615229.
- [9] G. Takahashi *et al.*, “The Effects of Plasma-Activated Saline and Medium on Colorectal Cancer in Rat Models and the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line COLO 205,” *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, vol. 7, no. 1, p. 8, 2022, doi: 10.11648/J.IJCOCR.20220701.12.
- [10] R. J. Buszek, M. Torrent-Sucarrat, J. M. Anglada, and J. S. Francisco, “Effects of a single water molecule on the OH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 116, no. 24, pp. 5821–5829, Jun. 2012, doi: 10.1021/JP2077825/SUPPL\_FILE/JP2077825\_SI\_001.PDF.
- [11] B. Bonavida and H. Garban, “Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics,” *Redox Biol*, vol. 6, pp. 486–494, Dec. 2015, doi:

10.1016/J.REDOX.2015.08.013.

## 第3章 大腸がんに対する ALTP の効果

### 3.1 緒言

通常の生体内で行われる細胞分裂は、必要に応じて制御されて行われている。制御を逃れ、自律的に増殖した細胞の塊を腫瘍と呼ぶ。腫瘍には良性腫瘍と悪性腫瘍が存在し、後者が“がん”と同義である。腫瘍の中でも浸潤・転移、悪液質、アポトーシスの回避などの性質をもつものが悪性腫瘍と定義される[1]。日本人の死因第一位であるがんの中で、肺がん、大腸がん、胃がんは部位別死亡者数上位に挙げられる。そのうち、大腸がんの罹患者数は年々増加し、2012年以降は罹患者数1位になっている。2章では大腸がん細胞へのPTMの曝露によって効果を実証した。そこで本章では、生体におけるがんの概要と大腸がんについて述べ、大腸がんモデルラットに対するALTPの効果について示す。

### 3.2 がんとは

#### 3.2.1 がんの性質

細胞増殖の制御を逃れて自ら増殖する自律性増殖は、良性・悪性の両方に見られるが、浸潤・転移、悪液質、アポトーシスの回避などは悪性腫瘍のみに見られる性質である。浸潤とは、がん細胞が周囲の組織を破壊しながら、増殖して広がることを示す。転移とは、がん細胞が血管やリンパ管に侵入し、最初にごん細胞が発生した組織から離れた場所でごん細胞を増殖させることを示す。がん細胞は、浸潤・転移を繰り返すことで体中に広がる。悪液質とは、必要以上のエネルギー消費と食欲不振を招き、脂肪や筋肉量が減少し、免疫力が低下することである。抗がん剤への耐久力が落ちるため、治療の難易度が上がり、生活の質の低下に繋がる。生体には、有害な細胞や余った細胞、老化した細胞が自らのプログラムによって計画的に死ぬアポトーシスと呼ばれる機構がある。アポトーシスと細胞周期の制御は、p53遺伝子により行われている[2]。しかし、がんにおいてはp53遺伝子の働きが阻害されるため、がん細胞はアポトーシスを逃れて生存し、増殖する。また、がんでは炎症反応が見られる場合が多い。炎症反応が生じると増殖・分化を刺激する因子が産生されるため、がんは増殖する際にこの因子も利用していると考えられている。

### 3.2.2 がんの発症機序

がんは細胞の核の中の遺伝子に異常が発生し、制御を逃れて増殖することで腫瘍として形成される。正常細胞には、がん遺伝子と同じ塩基が違う配列を持つ、原がん遺伝子と呼ばれるものが存在する。原がん遺伝子は、正常な状態では細胞の増殖を調節するが、塩基配列が変わりがん細胞に変異し、増殖して腫瘍を形成する。塩基配列が変わる機序は複数存在するが、そのほとんどは転座による点突然変異と呼ばれるものである。転座とは、染色体の一部が切断されて、別の部分に付着することである。また、一種類のがん遺伝子で腫瘍が発生することはなく、複数のがん遺伝子により腫瘍が発生するとされている。大腸がんが発生する際には、食生活や煙草などの生活習慣を原因とする場合と、家族性大腸ポリポシスやリンチ症候群など、遺伝的な要素を原因とする場合がある。

家族性大腸ポリポシスとは、大腸ポリポシスが遺伝的に発生する場合の名称である。家族性大腸ポリポシスを放置すると、ほとんどの場合で大腸がんへと発展する。ポリポシスとは、ポリープが粘膜一面に広がって発生した状態である。ポリープとは、粘膜面に発生するイボ状のできもののことである。図 3-1 にポリープとがん、腺腫の関係を示す。

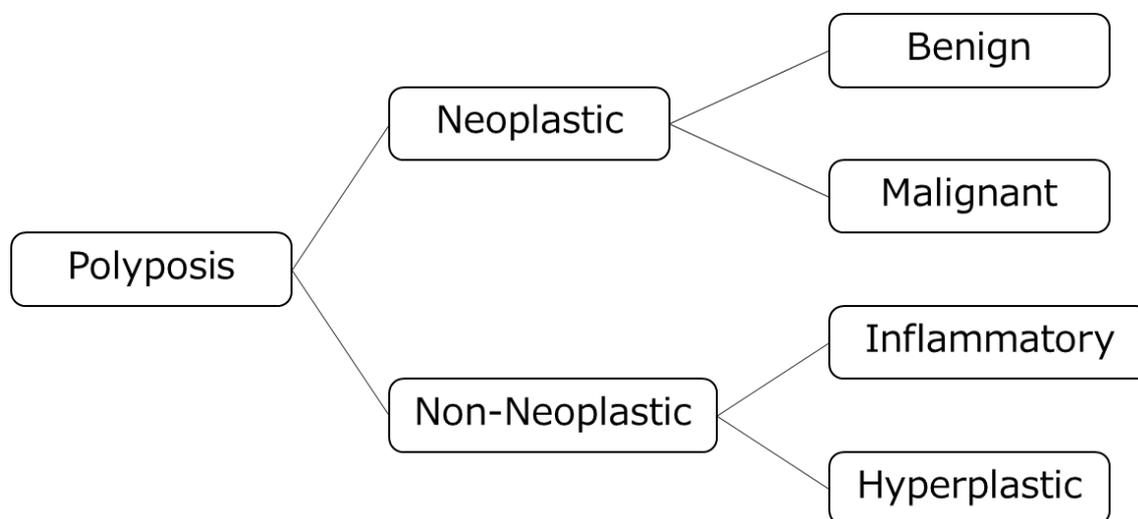


図 3-1 ポリープの分類[3]

家族性大腸ポリポーシスは APC(Adenomatous Polyposis Coli)遺伝子に変異することで生じる[4]。APC 遺伝子とは、本来細胞の増殖、分化、がん化に関わる重要なシグナルの伝達を調整する因子である。染色体の内に存在する遺伝子は、父母から遺伝情報を受け継ぐため、異なる二つの遺伝情報をもつ。異なる二つの遺伝情報をもつ遺伝子是对立遺伝子と呼ばれる。APC 遺伝子の 1 対の対立遺伝子のうち一つに変異が起こり、さらにもう一方の APC 遺伝子も欠損することでがん化する。APC 遺伝子の機能が失われると、染色体の数的異常や一部の欠失、遺伝子の増幅、転座などの異常が発生する。数的異常は通常 2 本で 1 対の染色体が 3 本で一对になる、あるいは 1 本しかできないなどである。染色体の重複は、染色体の一部が二重に作られることである。大腸上皮にて染色体異常に伴う細胞の異常が起こると、そのまま異常な細胞の塊になり、ポリープやポリポーシスへと発展する。がんは、少なくとも 2 箇所以上のがん遺伝子により発生する。また、大腸がんの 70~80%は APC 遺伝子に変異があるとされている。家族性大腸ポリポーシスは、APC 遺伝子に変異して起こる症状であるため、大腸がんが発生しやすいと考えられる。

細胞には、DNA 複製の際に発生する塩基対合のミスマッチを発見し、修復するミスマッチ修復遺伝子が存在する。リンチ症候群はミスマッチ修復遺伝子の変異を原因とする遺伝性の疾患である。そのため、同じ塩基配列が繰り返し続く反復配列において、反復回数に異常が発生する。反復配列は、細胞増殖や DNA 修復、アポトーシスなどに関わる遺伝子産物に含まれるため、腫瘍の発生率が上昇する。リンチ症候群は常染色体の優性遺伝を介して遺伝すると考えられている。リンチ症候群で大腸がんが発生する確率は男性で 54~74%、女性で 30~52% である。家族性大腸ポリポーシスと比較すると確率は低いものの、相関関係がないと言い切れない確率で発生する。リンチ症候群は、ほかにも子宮内膜がんや卵巣がん、胃がんなどを引き起こす。

### 3.2.3 大腸がんについて

図 3-2 に我が国における 2018 年のがんの部位別死亡者数を示す。

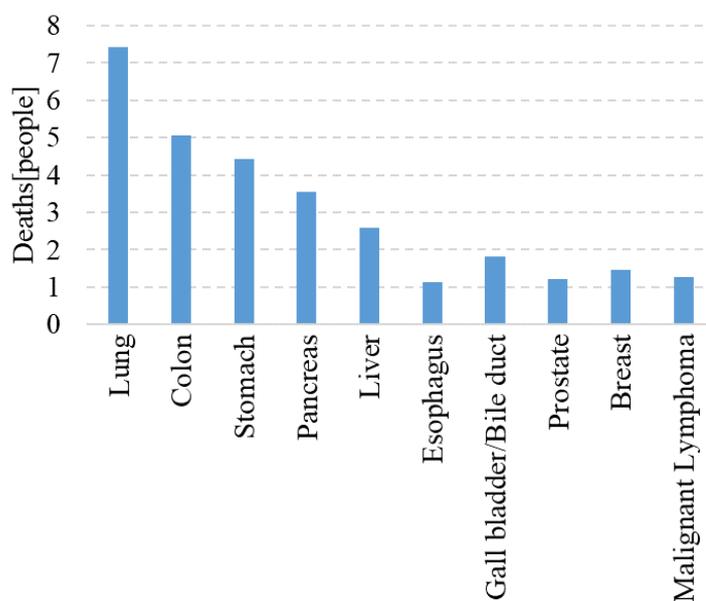


図 3-2 日本の部位別がん死亡者数(2018) [5]

また、特に死亡者数の多かった肺癌、大腸がん及び胃がんの罹患者数の年次推移について図 3-3 に示す。大腸がんの罹患者数は年々増加し、2012 年以降は罹患者数の 1 位となっており、今後も増加が予測される。

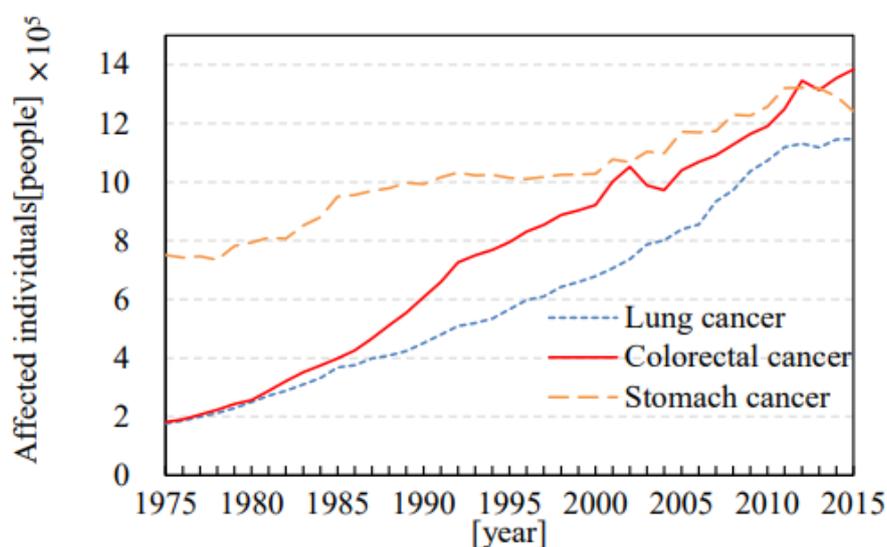


図 3-3 肺癌、大腸癌及び胃癌の罹患者数数の年次推移[5]

大腸がんにはステージ別分類が存在する。ステージは表 3-1～3-3 に示す壁深達度，リンパ節転移，遠隔転移の三要素によって 0～4(表 3-4)までに分類される [6]。

表 3-1 大腸がんの壁深達度による分類

記号	壁深達度
T0	がんをみとめない
Tis	がんが粘膜内に留まる
T1	がんが粘膜下層までにとどまり，内括約筋に及んでいない
T2	がんが内括約筋に及ぶが，連合縦走筋までにとどまる
T3	がんが連合縦走筋を超えて浸潤する
T4	がんが肛門拳筋または隣接臓器に浸潤している

表 3-2 大腸がんのリンパ転移の深度による分類

記号	リンパ節転移
N0	リンパ節転移を認めない
N1	腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が 3 個以下
N2	腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が 4 個以上
N3	主リンパ節に転移を認める

表 3-3 大腸がんの遠隔転移による分類

記号	遠隔転移
M0	遠隔転移を認めない
M1	遠隔転移を認める
M1a	腹膜転移を除き，1 臓器に遠隔転移を認める
M1b	腹膜転移を除き，2 臓器に遠隔転移を認める
M1c	腹膜転移を認める

表 3-4 がんのステージ分類

遠隔転移		M0				M1		
						M1a	M1b	M1c
リンパ節 転移		N0	N1/N1a/N1b	N2a	N2b/N3	Any N		
壁 深 達 度	Tis	0						
	T1a/T1b	I	IIIa			IVa	IVb	IVc
	T2							
	T3	IIa	IIIb					
	T4a	IIb						
	T4a	IIc	IIIc					

ステージ 0 の Tis がん, T1 がんの場合, 治療方法は原則的に腫瘍部の外科的切除が選択される。外科的切除は, 大腸の病巣部を切除し, 切除組織を回収する方法である。本治療方法は切除した組織で標本を作製し, 病理組織学的に観察し, 病変の遺残があれば追加治療が必要となる。切除方法には分割切除や粘膜下層剥離などが挙げられるが, 不完全切除率が高いことや, 技術的難易度が高いなどの問題点が挙げられる。

ステージ 0~IIIでは, 直腸もしくはリンパ節切除が選択される。本治療方法においても病理組織学的に観察し, 病変の遺残があれば追加治療が必要となる。ステージIVや再発性のがんでは原発巣, 転移巣の切除の他, 薬物療法, 放射線療法が選択される。薬物療法は広い範囲への細胞増殖の阻害や転移の阻害などの治療効果を期待して行われる。薬物療法で使用される薬は正常組織を含んで効果が及ぶため, 血液細胞の減少, 吐き気, 脱毛の症状や感染症への罹患の可能性を高めるなどの有害事象が報告されている。放射線治療は術後の再発抑制や腫瘍量の減少を期待して行われる。放射線治療は補助放射線療法と緩和的放射線療法に大別される。補助療法は切除手術前, 術中, 術後に照射が行われる。術前照射は, 早期症例への過剰治療の危険性と合併症の増加の危険性が高まる。術後照射は術中の腫瘍細胞の散布を防止できないことが欠点として挙げられる。

従って大腸がんの治療方法はいずれも患者への副作用や術者負担が大きいという問題点を抱える。低侵襲な治療法という観点から, ALTP を用いた大腸癌の新規治療法について検討した。



AOM を皮下注射した 1 週間後から、発がん促進剤であるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS: Dextran Sulfate Sodium)を 2%含ませた飲料水の投与を 1 週間行った。DSS は潰瘍性大腸炎に似た症状を引き起こす。腸炎は大腸粘膜における一酸化窒素の産生を増加させ、発がんを促進することが先行研究により示唆されている[9]

### 3.3.2 プラズマ照射生理食塩水の作成方法

本実験に用いる大気圧プラズマ発生装置の概要を図 3-5 に、プラズマ発生条件及び使用機器一覧を表 3-5, 3-6 に示す。プラズマ発生部では He ガス中のタングステン電極とグラウンド電極間に電圧を印加し、大気圧下においてプラズマを発生させた。プラズマ照射生理食塩水(PTS: Plasma Treated Saline)は図 3-5 のプラズマ発生装置を用いて、腸内投与では 3 mL, 尾静脈注射では 6 mL の生理食塩水に照射することで作製した。

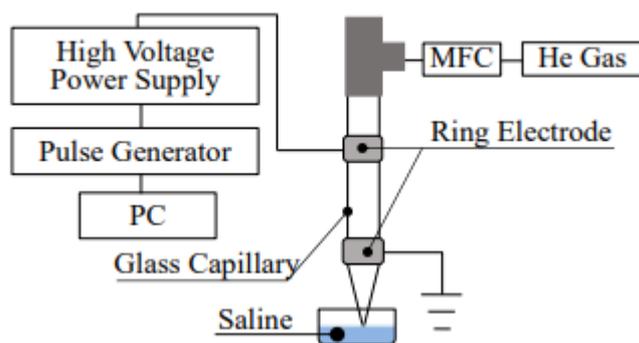


図 3-5 ALTP を用いた PTS 作成装置の概要[10]

表 3-5 プラズマ照射条件

Gas	Flow rate	Applied voltage	Frequency	Wave form	Inhalation time
He	1.0 L/min	13 kV	3 kHz	Square	90 sec

表 3-6 ALTP 発生装置に用いた機器の一覧

Apparatus	Manufacturer	Name of product
Pulse Generator	NF Corporation	WAVE FACTORY1941
High Voltage Power Supply	NF Corporation	HVA4321
Mass Flow Controller	KOFLOC	8500MC-0-1-1

### 3.3.3 大腸がんモデルラットに対する PTS の投与方法

本実験では対照群を n=3, 腸内投与群を n=3, 尾静脈注射群 n=4 とした。対照群では, ALTP の照射を行っていない生理食塩水を腸内に 0.5 mL 投与した。腸内投与群では, PTS を週に 2 度腸内投与した。腸内投与は肛門よりシリコンチューブを 10 cm 程度差し込み, シリンジより PTS 及び生理食塩水を注入した。尾静脈注射はラットの尾静脈より 0.5 mL の PTS を投与することで行った。図 3-6 に実験の時系列を示す。

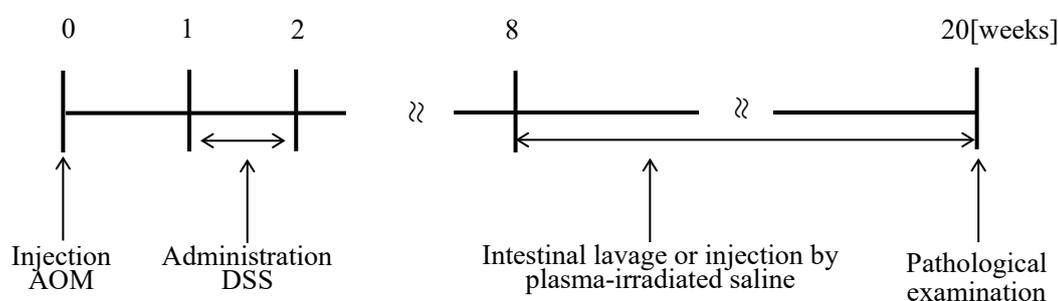


図 3-6 PTS 投与実験の流れ

また, 週に 2 度, 内視鏡システム FTS4400(FUJIFILM Co., Ltd.)のカメラ部をラットの肛門部より挿入し, 腸内の様子を観察した。AOM 投与から 20 週後にラットより大腸を摘出し, ヘマトキシリン・エオジン(HE:Hematoxylin Eosin)染色を施して組織標本を作製した。作製した組織標本から病理組織検査を行い, 腫瘍状態を評価した。なお, 本研究における動物実験は全て「研究機関等における動

物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)」に則った、本学の動物実験生命倫理委員会の承認を経て実施されている。また、実験は全て Vetorphale(Meiji Seika Pharma Co., Ltd.), Domitor(NipponZenyaku Kogyo Co., Ltd.), Dormicum Injection(Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd.)の三種混合麻酔を用いた麻酔下で行った。飼育に際して、用いたラットは全て 12 時間の明暗サイクルで個別飼育を行い、餌及び水は自由に摂取させた。

### 3.3.4 大腸がんモデルラットに対する遺伝子発現解析

本実験では腫瘍の進行度合いの評価として、*IL-1 $\beta$* , *WIF1*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  の発現解析を行った。AOM 投与 20 週後に、KAD ラットの腸より腫瘍組織を摘出し、1 mL の RNA 抽出用試薬 ISOGEN(NIPPON GENE CO., Ltd.)を用いて細胞を溶解し、回収した。室温にて 5 分間放置した後、クロロホルム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.)200  $\mu$ L 加え、激しくシェイクした。室温にて 3 分間放置した後、10000 rpm, 4°Cで 15 分間遠心して RNA を含む上澄みの水層を回収した。回収した上澄みに 160  $\mu$ L のイソプロパノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.)を加え、転倒混和にて混合した。室温にて 10 分放置した後、10000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心し、上澄みを取り除いた。500  $\mu$ L の 70% エタノールを加えて混合し、8500 rpm, 4°Cで 5 分間遠心した。エタノールを加え、遠心する工程は 2 回行った。上澄みを捨てた後、風乾し、回収した RNA を RNA フリー水で懸濁し、total RNA 溶液とした。次に、cDNA 合成を行った。FastGeneTM ScriptaseII 5X Ready Mix Odt(LS65)(NIPPON Genetics Co., Ltd.)2  $\mu$ L, RNA1  $\mu$ g 分の total RNA 溶液、全体で 10  $\mu$ L となるよう RNA フリー水を加えて混合した。サーマルサイクラーにて逆転写反応(25 °C10 分間, 42 °C 60 分間, 85 °C 5 分間行い、cDNA を得た。次に、TBGreen Premix Ex TaqTM II ROX plus(Takara Bio Co., Ltd.)及び StepOne TM Real-Time PCR system(Thermo Fisher SCIENTIFIC Co., Ltd)を用いてリアルタイム PCR を行った。TBgreen 5  $\mu$ L, フォワードプライマー0.8  $\mu$ L, リバースプライマー0.8  $\mu$ L, ROX difference dye0.2  $\mu$ L, RNA フリー水 2.2  $\mu$ L, 4 倍希釈 cDNA 溶液 1  $\mu$ L を混合し、PCR 反応溶液 10  $\mu$ L を調製した。StepOne にて 42°C 5 分, 95 °C10 秒にて逆転写反応を行い、その後 95 °C 5 秒, 60 °C 30 秒を 45 サイクル繰り返すことで PCR 反応を行った。なお、*IL-1 $\beta$*  はプライマー0.4  $\mu$ L, RNA フリー水 2.2  $\mu$ L とした。本実験では腫瘍の進行度の評価として、*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *WIF1*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  の発現量を比較し

た。*IL-1 $\beta$*  は転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化することで炎症を促進する作用を持つ[11]。一方で、*IFN- $\gamma$*  との相乗効果により、マクロファージを活性化することで抗腫瘍効果をもつとされている。多くの論文において炎症の評価の指標に用いられている。*IL-6* は PI3 k/Akt 経路を介して転写因子の STAT3 複合体を形成し、腫瘍の増殖を促す。図 3-7 に *IL-6* の活性化経路を示す。

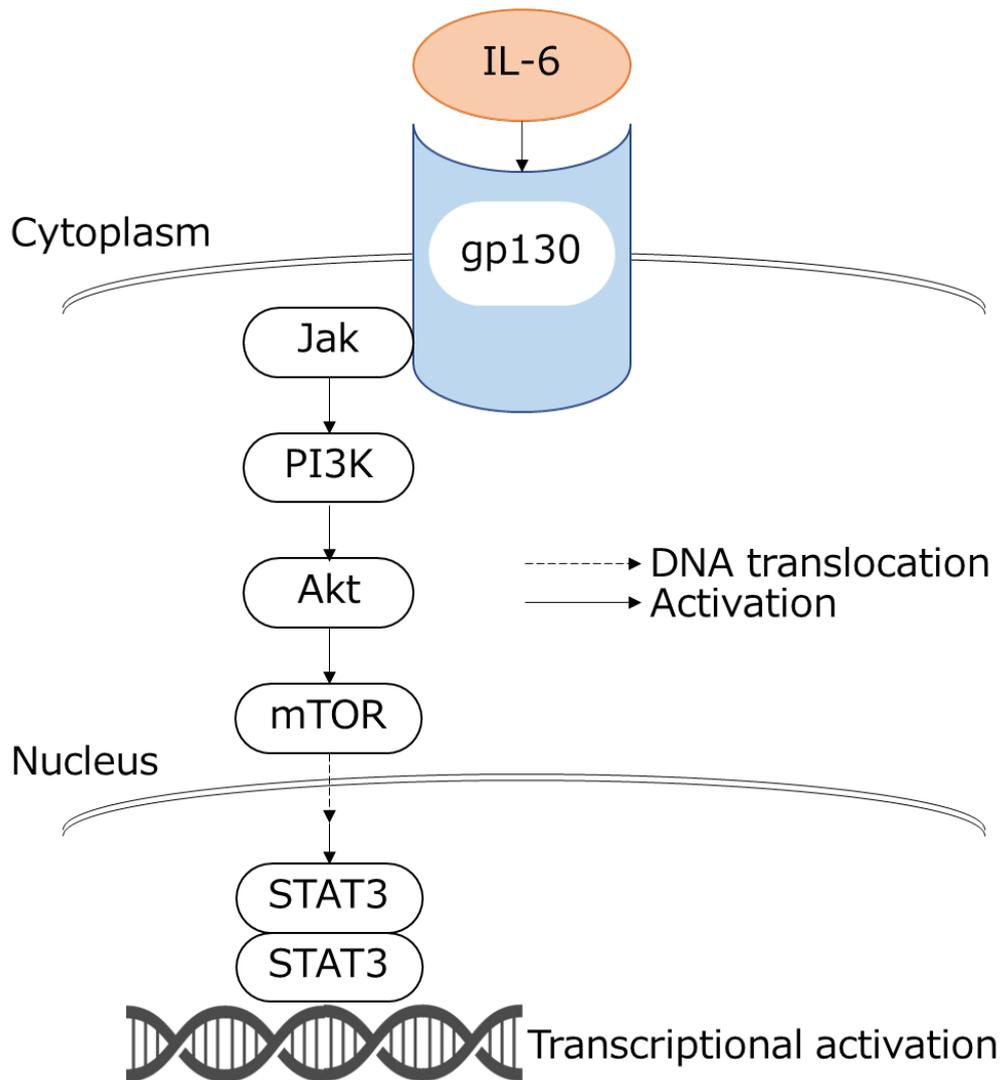


図 3-7 *IL-6* の活性化経路[12]

TNF- $\alpha$  は腫瘍の壊死を誘導する炎症性サイトカインである。図 3-8 に TNF- $\alpha$  の活性化経路を示す。

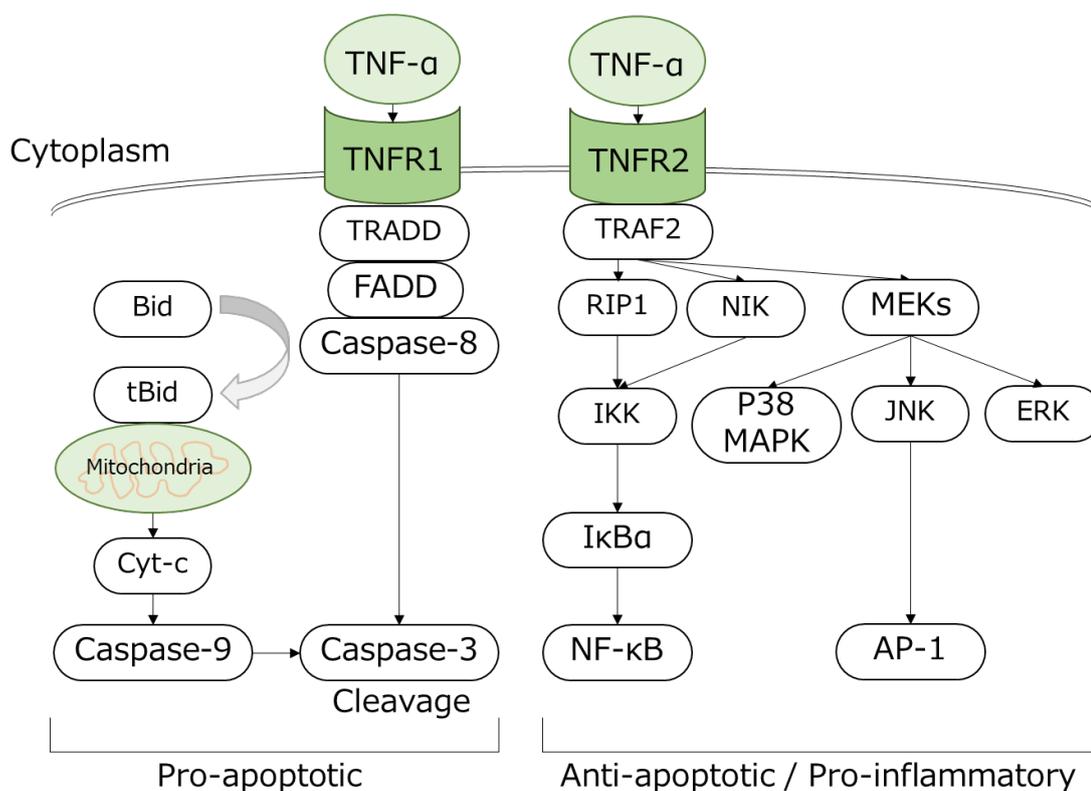


図 3-8 TNF- $\alpha$  の活性化経路[13, [14]

TNF- $\alpha$  は炎症性サイトカインの一種であり、転写因子である NF- $\kappa$ B の亢進を促す一方で、Caspase-1, 2, 8 の誘起によってアポトーシスを誘起する。図 3-8 のように、細胞の転写を促す作用と細胞死を誘導する作用の二面性を有している。IL-10 は受容体である IL-10R と結合し、最終的には STAT3 をリン酸化する。STAT3 は核内で AIR 因子を活性化し、IL-6 や TNF- $\alpha$ , IL-1 等の炎症性サイトカインを抑制する[15]。WIF1 は遺伝子の転写を調節する Wnt シグナル伝達を妨害することで腫瘍抑制遺伝子として機能すると考えられているため、大腸がん患者では WIF1 のメチル化が多く報告されている[16]。本実験では内部標準として  $\beta$ -actin を選定した[17]。

以下に本実験で用いたプライマー配列及び反応条件を示す。

・プライマー

*β-actin*

Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC

Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG

*IL-1β*

Forward: GAACTGGATCCGATGTGGAC

Reverse: TTCCGTCCGTTCCATAAATC

*WIF1*

Forward: AGCCATTCCCGTCAATATCCA

Reverse: TCTGCCATGATGCCTTTATCCA

*IL-6*

Forward: GAGGATACTCACTCCCAACAGACC

Reverse: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA

*IL-10*

Forward: CAGACCCACATGCTCCGAGA

Reverse: CAAGGCTTGGCAACCCAAGTA

*TNF-α*

Forward: CCACGCTCTTCTGTCTACTGA

Reverse: AAGGTACARCCCATCKGCTG

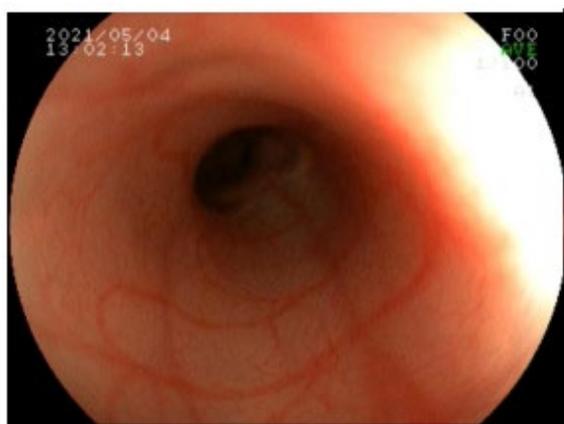
・反応条件

95°C	10分	}	40 サイクル
95°C	15秒		
60°C	1分		
60°C	1分	}	Melt Curve
95°C	15秒		

### 3.4 実験結果

#### 3.4.1 内視鏡観察結果

図 3-9 に Control 群, 図 3-10 に腸内投与群, 図 3-11 に尾静脈注射群の AOM 投与日の腸内の様子を示す。図 3-9, 3-10 より, AOM 投与日の腸内には異常がないことが確認された[18]。



Rat A



Rat B



Rat C

図 3-9 AOM 投与前の Control 群の大腸の内視鏡画像



Rat D

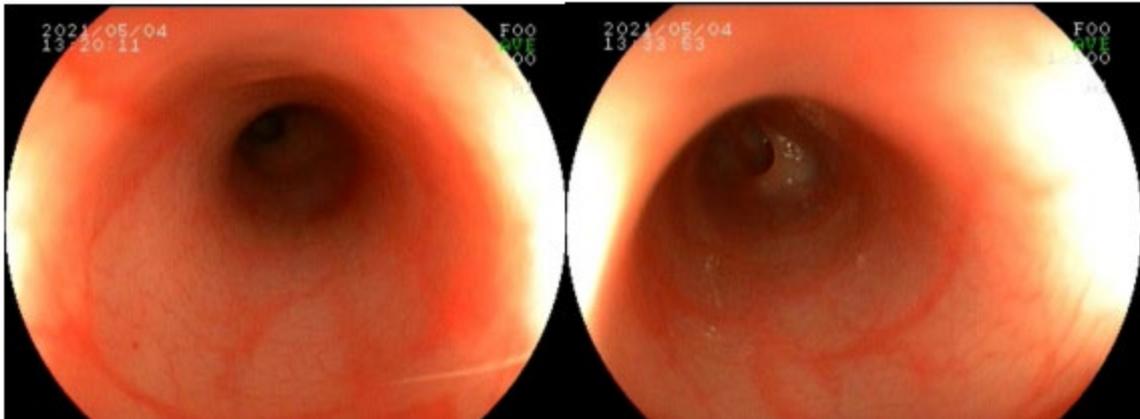


Rat E



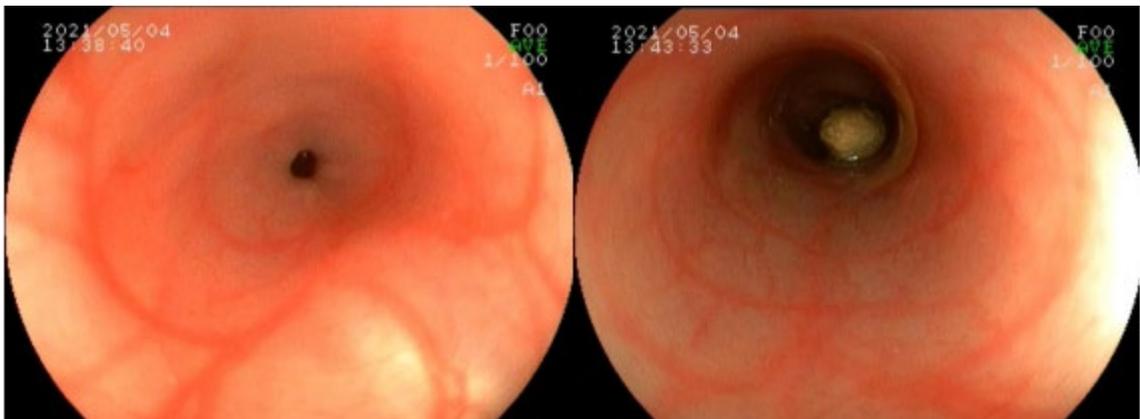
Rat F

図 3-10 AOM 投与前の腸内投与群の大腸の内視鏡画像



Rat G

Rat H



Rat I

Rat J

図 3-11 AOM 投与前の尾静脈投与群の大腸の内視鏡画像

図 3-12 に Control 群, 図 3-13 に腸内投与群, 図 3-14 に尾静脈投与群の処置開始日(AOM 投与 8 週間後)の腸内の様子を示す。



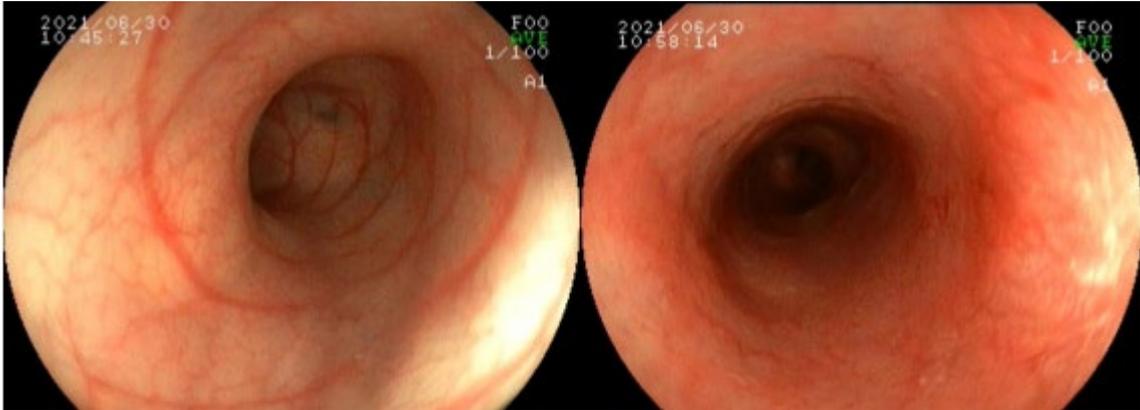
Rat A

Rat B



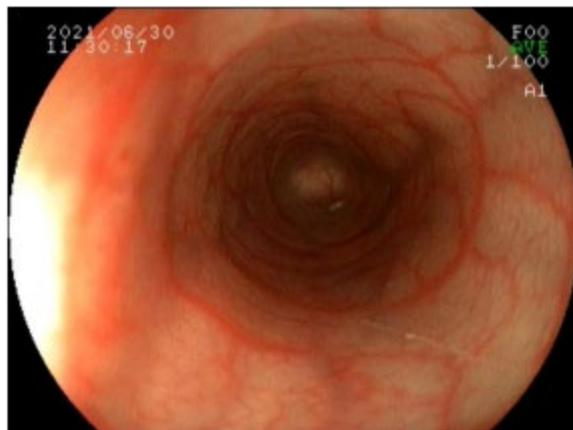
Rat C

図 3-12 処置開始日(AOM 投与 8 週間後)の腸内の内視鏡画像(Control 群)



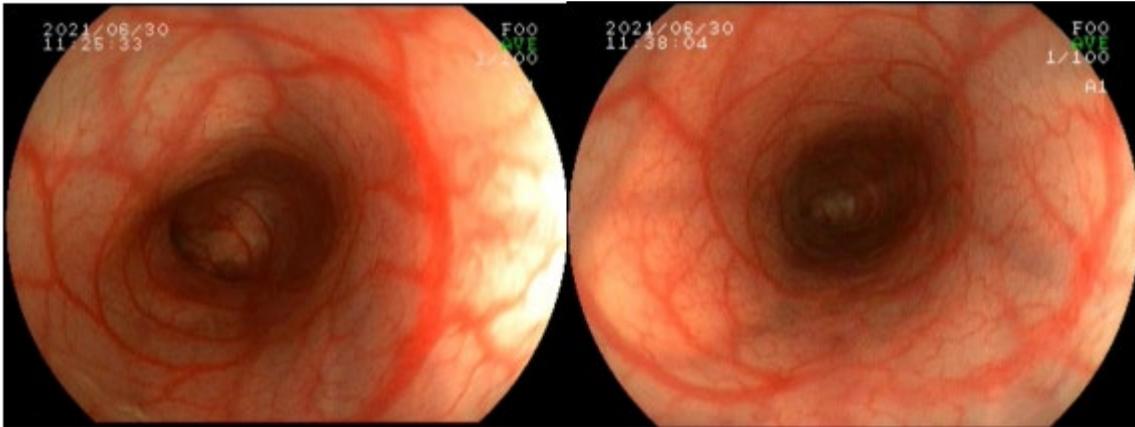
Rat D

Rat E



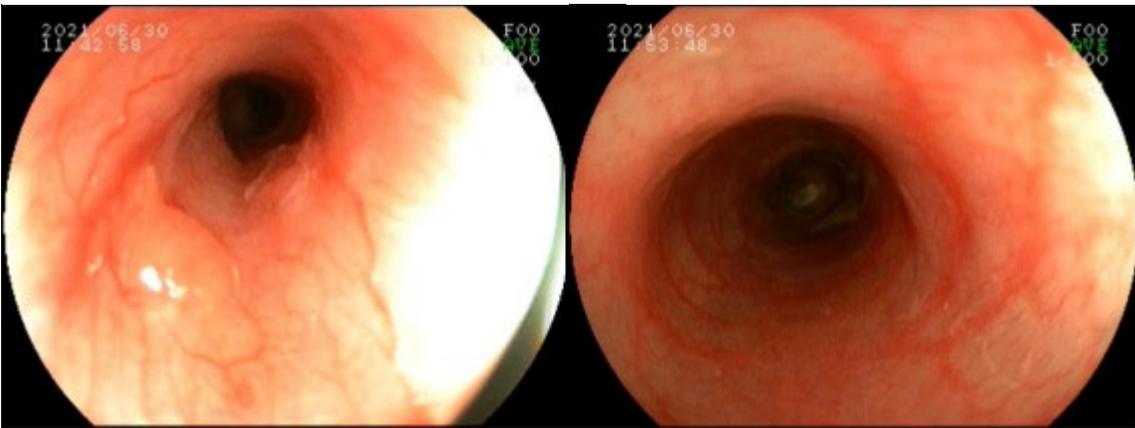
Rat F

図 3-13 処置開始日(AOM 投与 8 週間後)の腸内の内視鏡画像(腸内投与群)



Rat G

Rat H

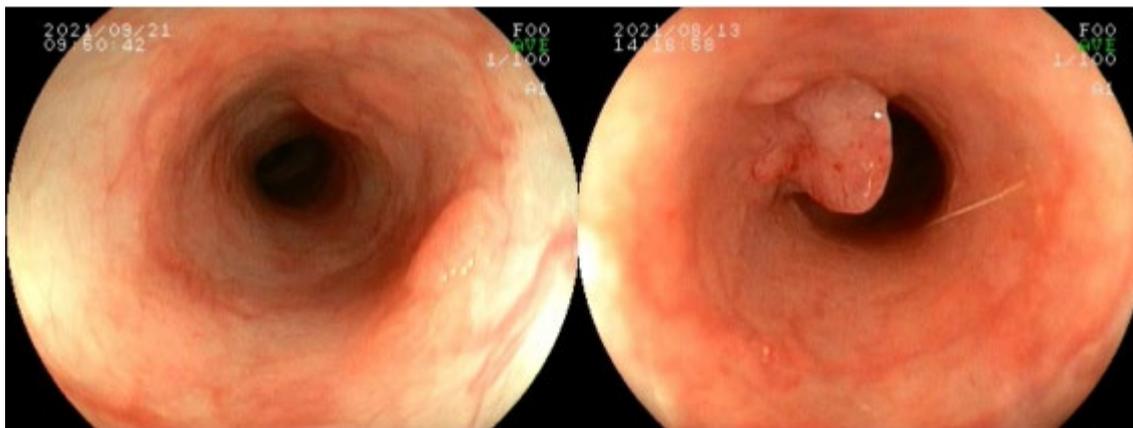


Rat I

Rat J

図 3-14 処置開始日(AOM 投与 8 週間後)の腸内の内視鏡画像(尾静脈投与群)

図 3-15 に Control 群, 図 3-16 に腸内投与群, 図 3-17 に尾静脈注射群の摘出前の腸内の様子を示す。



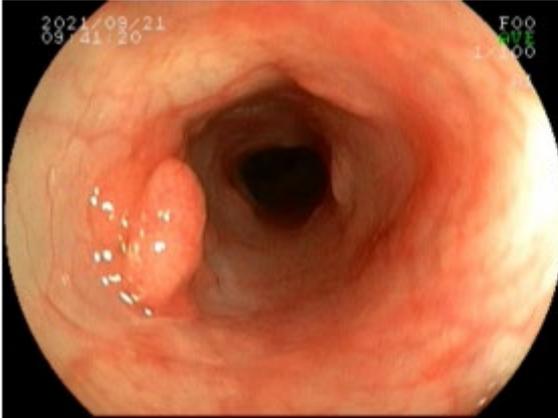
Rat A

Rat B

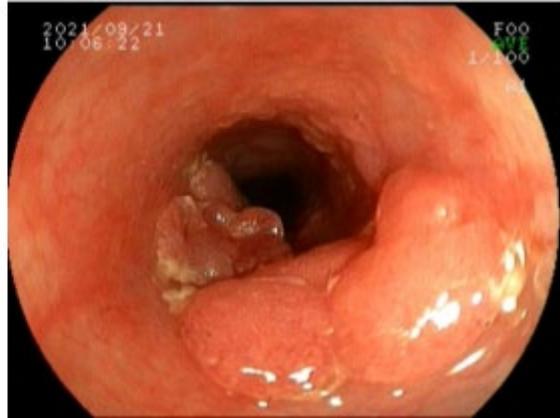


Rat C

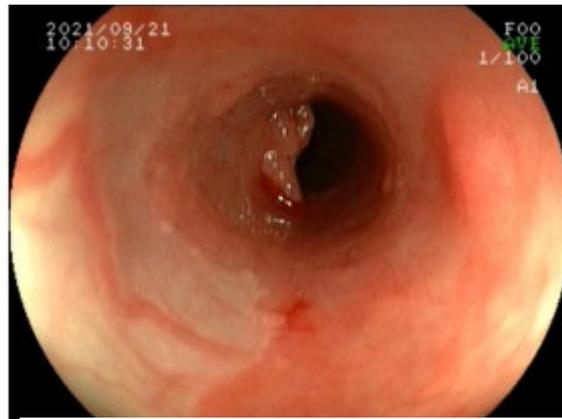
図 3-15 腸摘出時の腸内の内視鏡画像(Control 群)



Rat D



Rat E



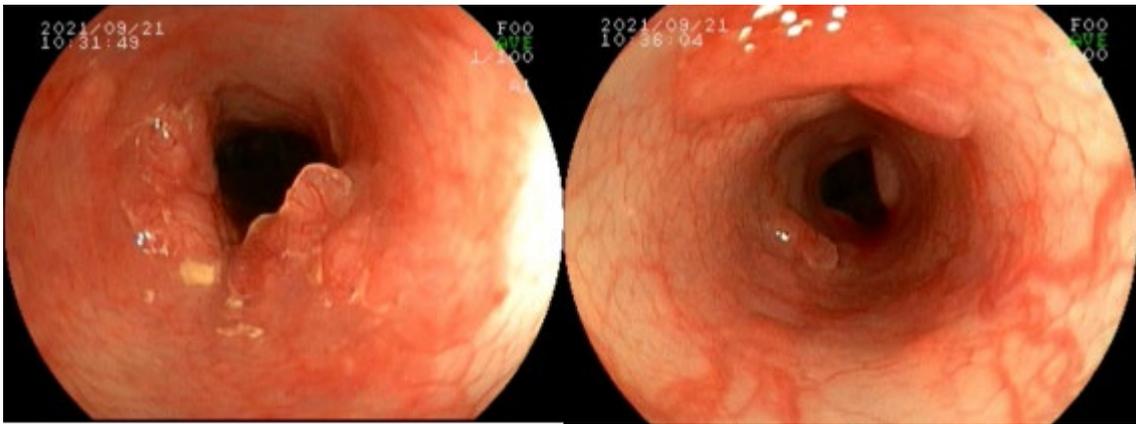
Rat F

図 3-16 腸摘出時の腸内の内視鏡画像(腸内投与群)



Rat G

Rat H



Rat I

Rat J

図 3-17 腸摘出時の腸内の内視鏡画像(尾静脈投与群)

図 3-18 に Control 群, 図 3-19 に腸内投与群, 図 3-20 に尾静脈注射群の腫瘍数の推移を示す。腫瘍の発生時期に個体差は生じるものの, 全てのラットにおいて腫瘍が発生していることを確認した。また, Control 群のラット B は衰弱が認められたため, 14 週に安楽死ののち, 腸の摘出を行った。腸内投与群のラット F は, 摘出日に既に死亡を確認した。

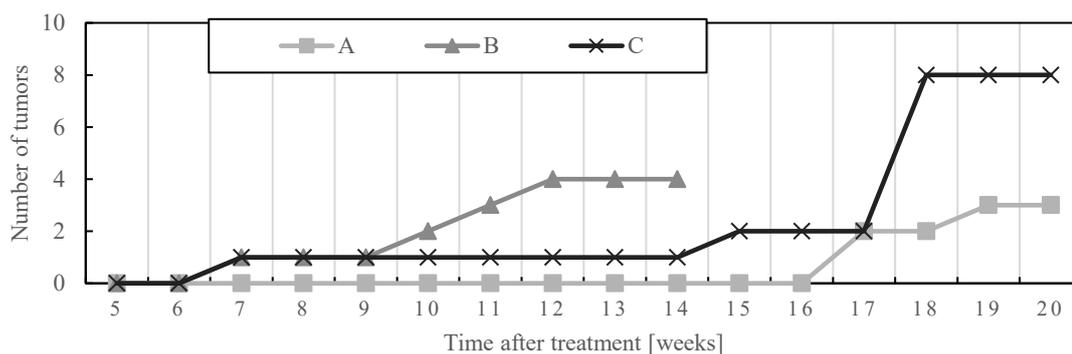


図 3-18 一週間ごとの腸内の腫瘍数の推移(Control 群)

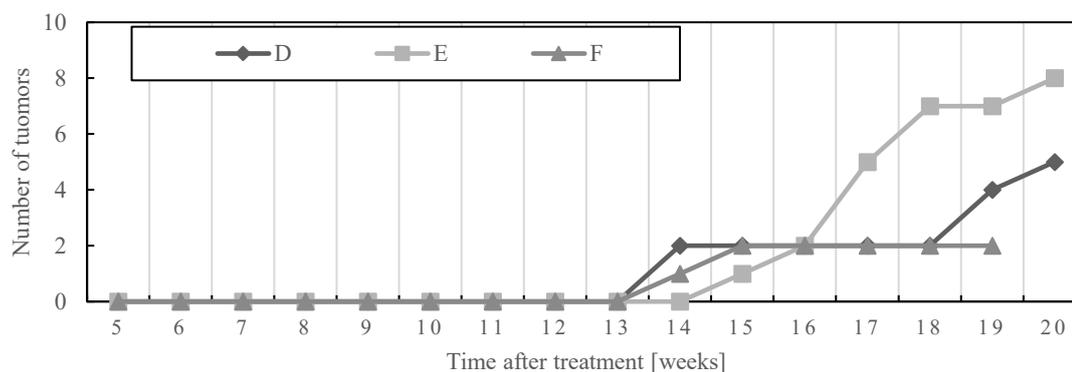


図 3-19 一週間ごとの腸内の腫瘍数の推移(腸内投与群)

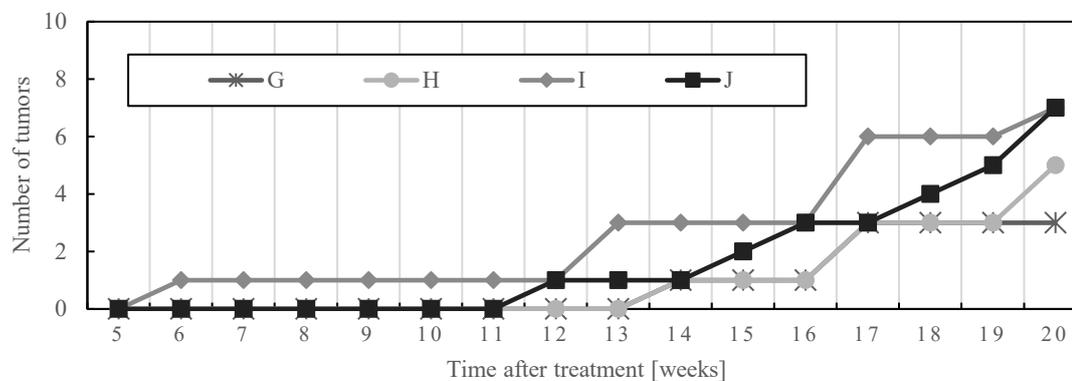
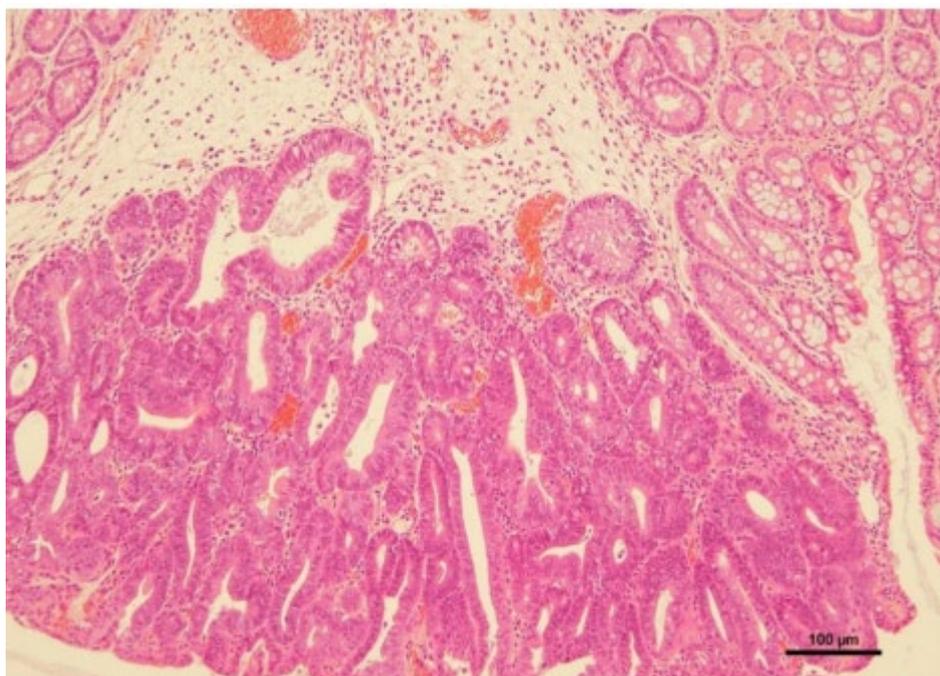


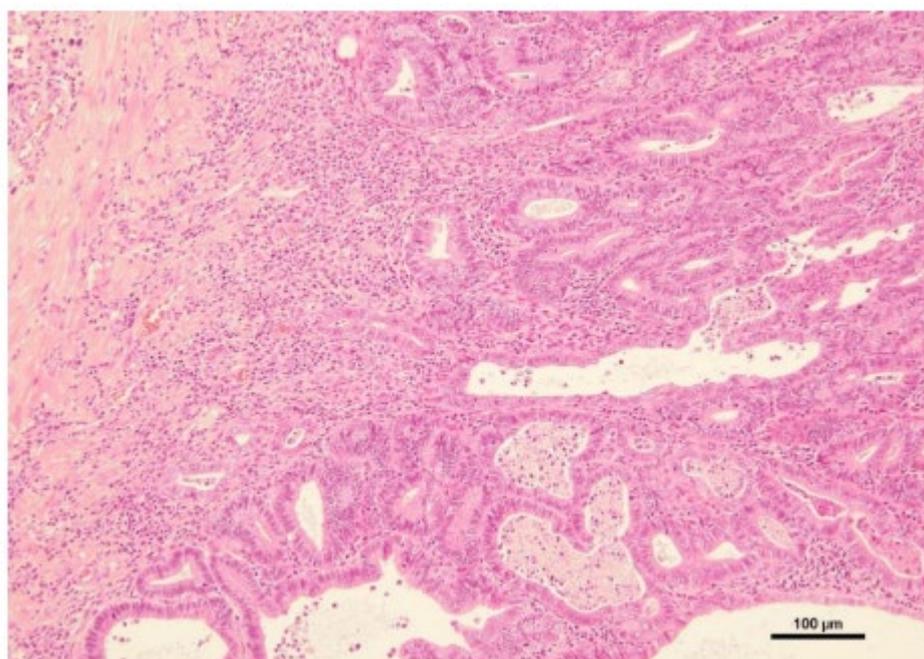
図 3-20 一週間ごとの腸内の腫瘍数の推移(尾静脈投与群)

### 3.4.2 病理組織検査結果

図 3-21 に Control 群, 図 3-22 に腸内投与群, 図 3-23 に尾静脈注射群の病理組織検査画像を示す。また, 表 3-7 に病理組織検査の結果を示す。

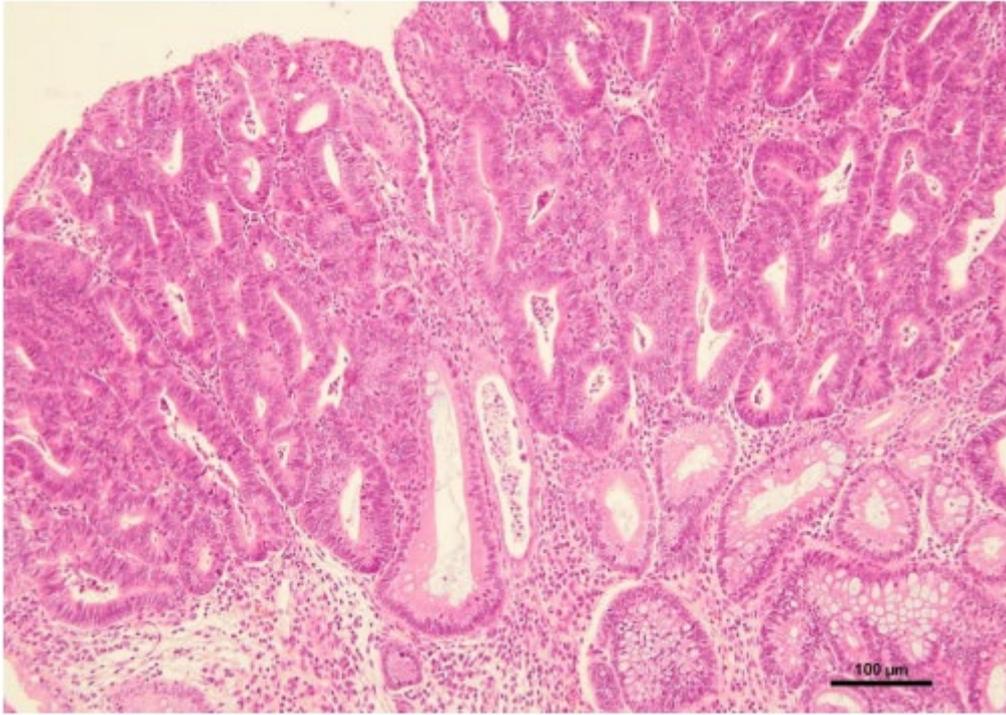


Rat A



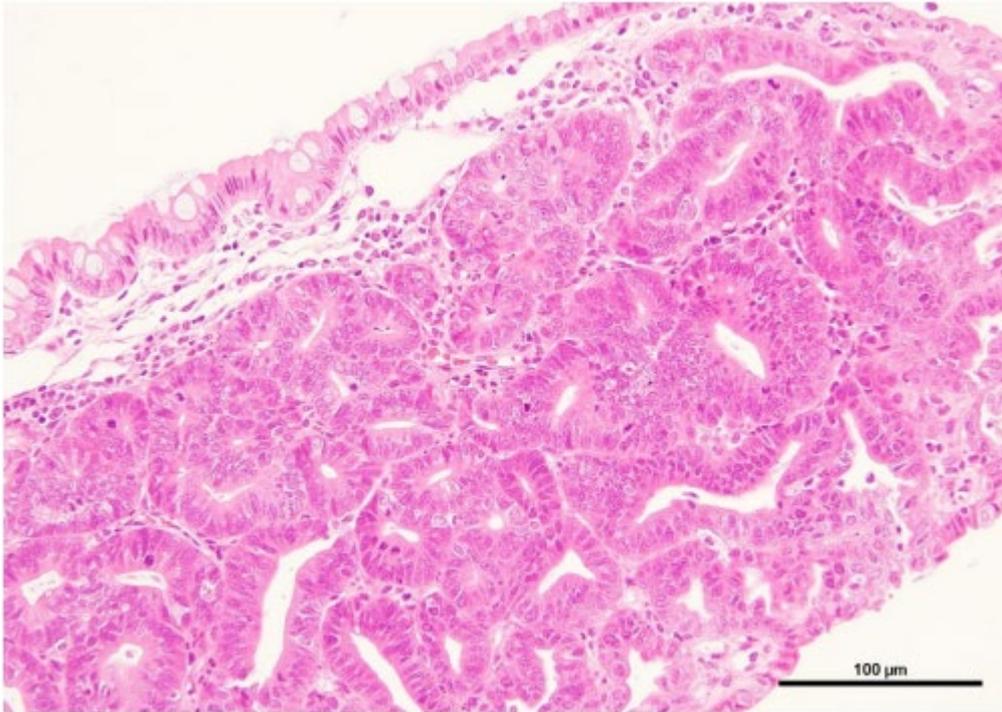
Rat C

図 3-21 Control 群の病理画像

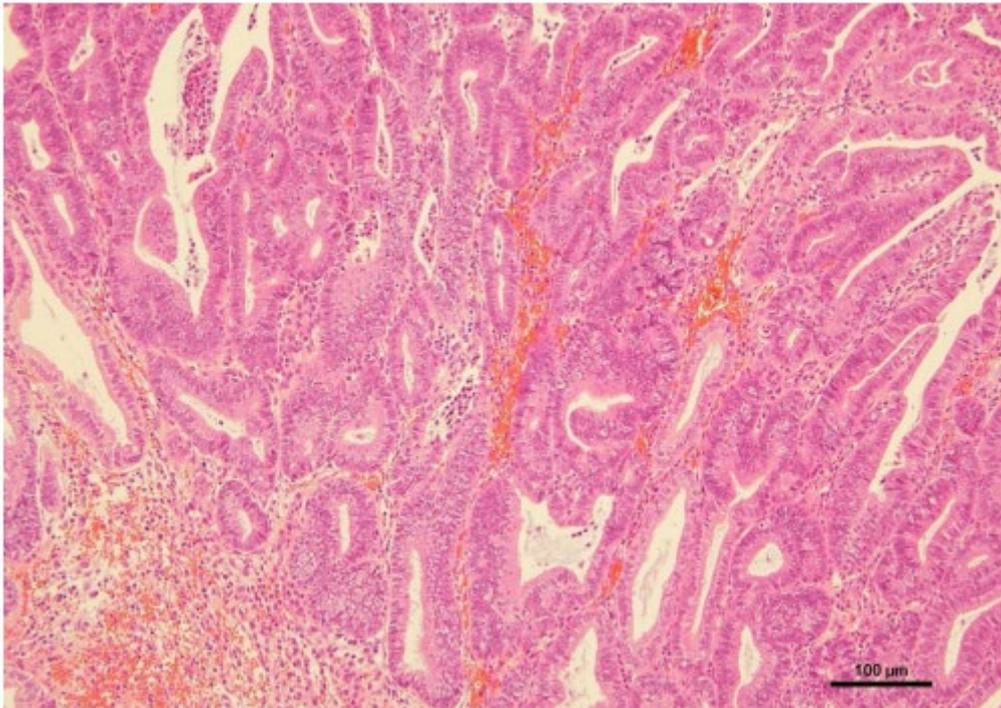


Rat D

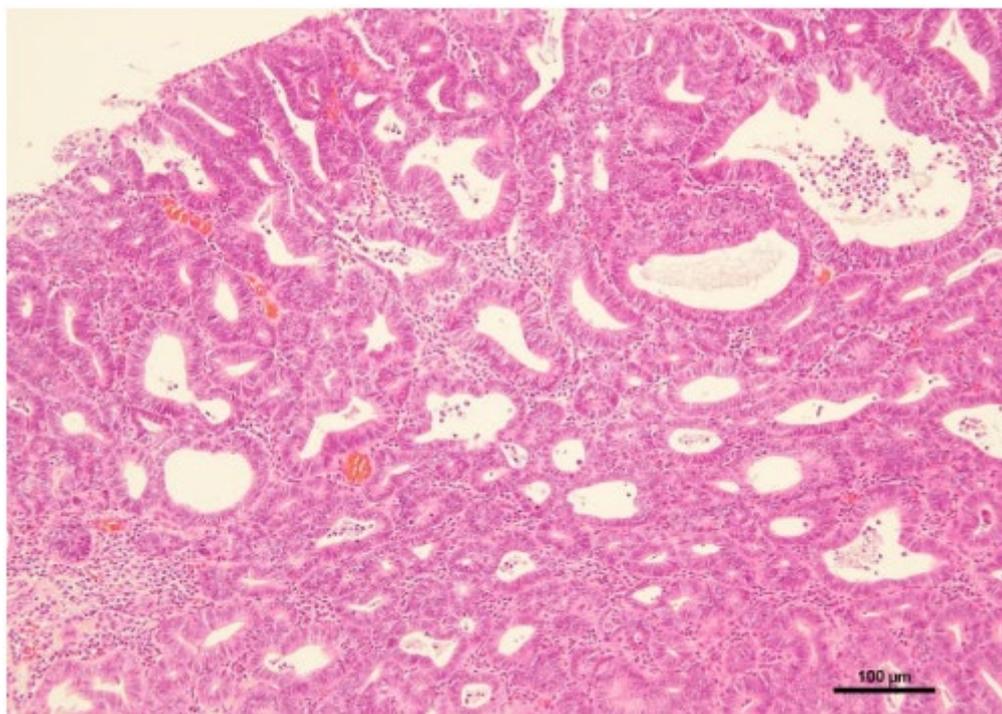
図 3-22 腸内投与群の病理画像



Rat G



Rat H



Rat J  
図 3-23 尾静脈投与群の病理画像

図 3-21～23 より，いずれのラットにおいても一つ一つの細胞の形が通常時と比べ大きく歪み，異型度が強いことが確認できた。また，腸腺は通常状態において楕円形をしているが，本実験では形が歪んでいることから，高分化型管状腺がんであると診断された。さらに，表 3-7 より，尾静脈注射群のラットは，3 匹中 2 匹で粘膜固有間質までの転移浸潤が確認され，Control 群，腸内投与群と比べ転移浸潤の進行が遅い傾向が確認された。

表 2-7 腫瘍の異型度及び浸潤性の比較

No.	Pathological finding	State of invasion
A	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into submucosal tissue
C	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into submucosal tissue
D	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into submucosal tissue
G	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into the stroma in Lamina propria
H	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into submucosal tissue
J	well-differentiated tubular adenocarcinoma	Metastatic invasion into the stroma in Lamina propria

### 3.4.3 遺伝子発現解析による評価

本実験では *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *WIF1*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  の発現量を比較した。図 3-24～28 に各遺伝子の発現量の比較を示す。

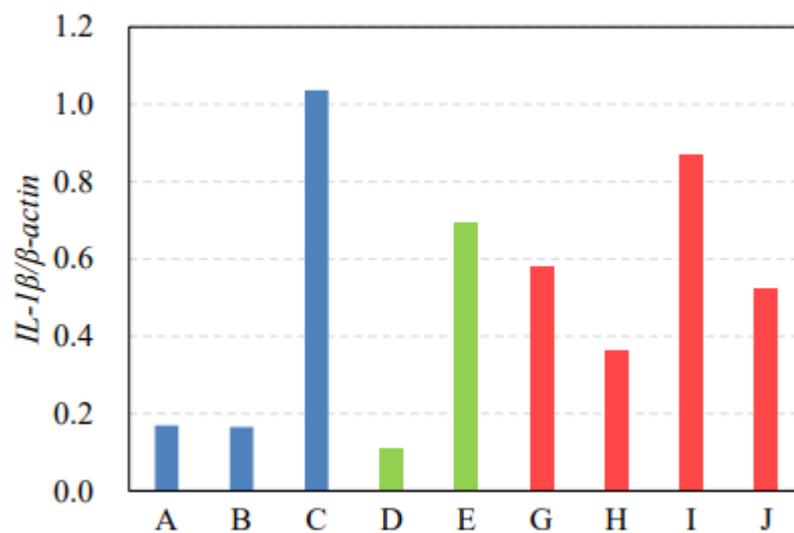


図 3-24 *IL-1 $\beta$*  の遺伝子発現量の比較

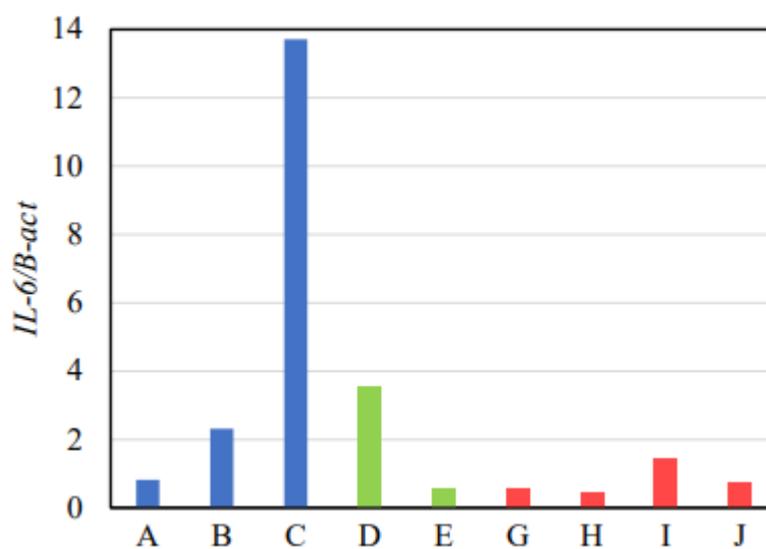


図 3-25 *IL-6* の遺伝子発現量の比較

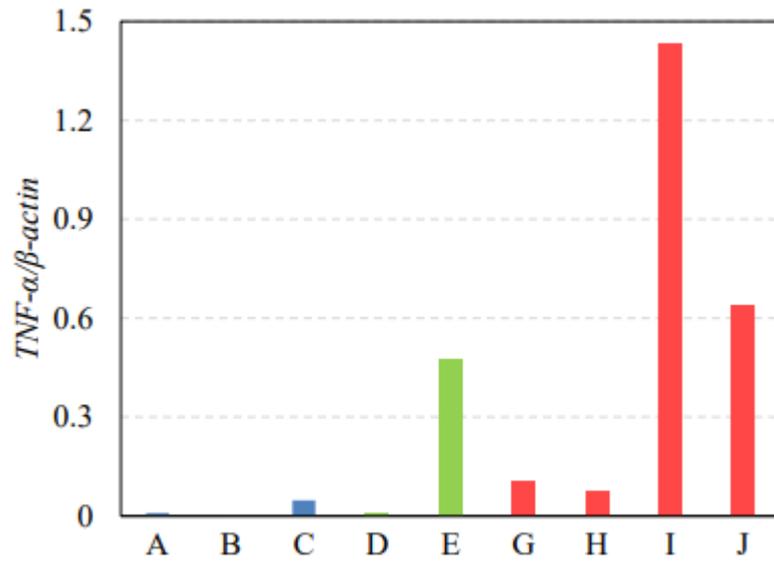


図 3-26 *TNF- $\alpha$*  の遺伝子発現量の比較

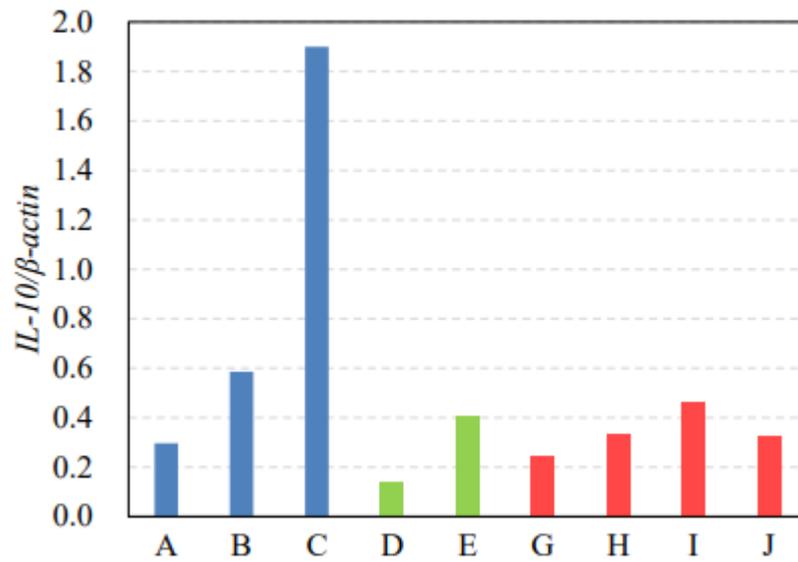


図 3-27 *IL-1 $\beta$*  の遺伝子発現量の比較

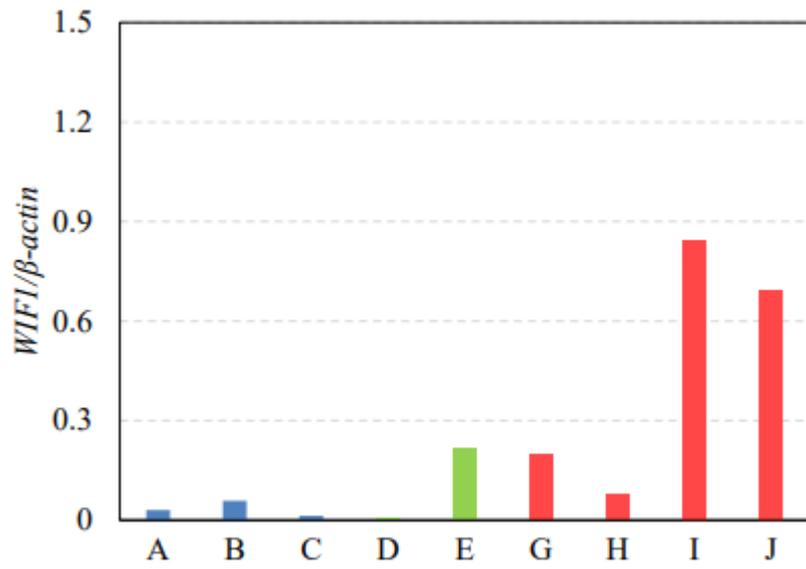


図 3-28 *Wif1* の遺伝子発現量の比較

### 3.5 結言

図 3-18~3-20 より、各ラットにおいて腫瘍発生時期の個体差は大きかったものの、腸内投与群及び尾静脈注射群では腫瘍の発生時期に遅れが生じている傾向があった。また、ラット C, F は実験の過程で衰弱したため、安楽死させた後、大腸の摘出を行った。図 3-21~3-23, 表 3-7 より、いずれのラットにおいても異型度が強く、腺がんであると診断された。尾静脈注射群のラットは、3 匹中 2 匹で粘膜固有間質までの転移浸潤が確認され、Control 群、腸内投与群と比べ転移浸潤の進行が遅い傾向が見られた。進行の鈍化が確認された要因として、PTS による酸化ストレスが加わったことにより E-カドヘリンの発現を増加させ、転移を抑制したものと考えられる[19]。E-カドヘリンは細胞接着に関連する因子であり、発現が減少すると転移能を獲得する。また、E-カドヘリンはグルタチオンレダクターゼ阻害剤による酸化ストレスによって発現増加が確認されているため、プラズマ照射水の尾静脈投与群での浸潤の遅れが確認されたものと考えられる。腸内投与群において転移抑制が見られなかった理由としては、投与する際に流入したプラズマ照射水が短時間で体外に排出され、腸壁から吸収されるプラズマ照射水の量が少なかったこと原因であると考えられる。ラット A, B はそれぞれ腫瘍の発生が非常に遅かった個体、衰弱により他のラットよりも早期に摘出を行った個体である。従って、遺伝子発現解析についてはラット C と比較した。

図 3-24 より、尾静脈注射群と腸内投与群はラット C と比べやや発現量が少ない傾向が見られた。図 3-26 より、*IL-6* はラット C が非常に高く、次いでラット D, B が高い傾向が見られた。図 3-27 より、*IL-6* の発現量が高かった個体については、*TNF- $\alpha$*  の発現量が低い傾向が見られた。先行研究において、*IL-6* は *TNF- $\alpha$*  の発現上昇を阻害する作用をもつことが示唆されている。従って、*IL-6* によって B, C, D の *TNF- $\alpha$*  の発現上昇が抑制されたと考えられる。また、尾静脈注射群における *TNF $\alpha$*  の発現上昇は、成長因子 *TGF- $\beta$*  による転写因子 NF- $\kappa$ B 刺激に伴う内因性経路の発現上昇によるものと考えられる[20]。*TGF- $\beta$*  については後述する。図 3-27 より、*IL-10* はラット C のみ高いという結果が得られた。*IL-10* は *TGF- $\beta$*  と *IL-6* によって産生されるため、*IL-6* に伴ってラット C のみ高かったと考えられる。また、*IL-10* は *IL-1 $\beta$*  や *IL-6* を抑制する抗炎症性サイトカインであるが、*IL-6* や *IL-1 $\beta$*  の抑制の傾向は見られなかった。図 3-28 より、*WIF1* は尾静脈注射群にて高い傾向が見られた。図 3-29 に *WIF1* と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を示す。

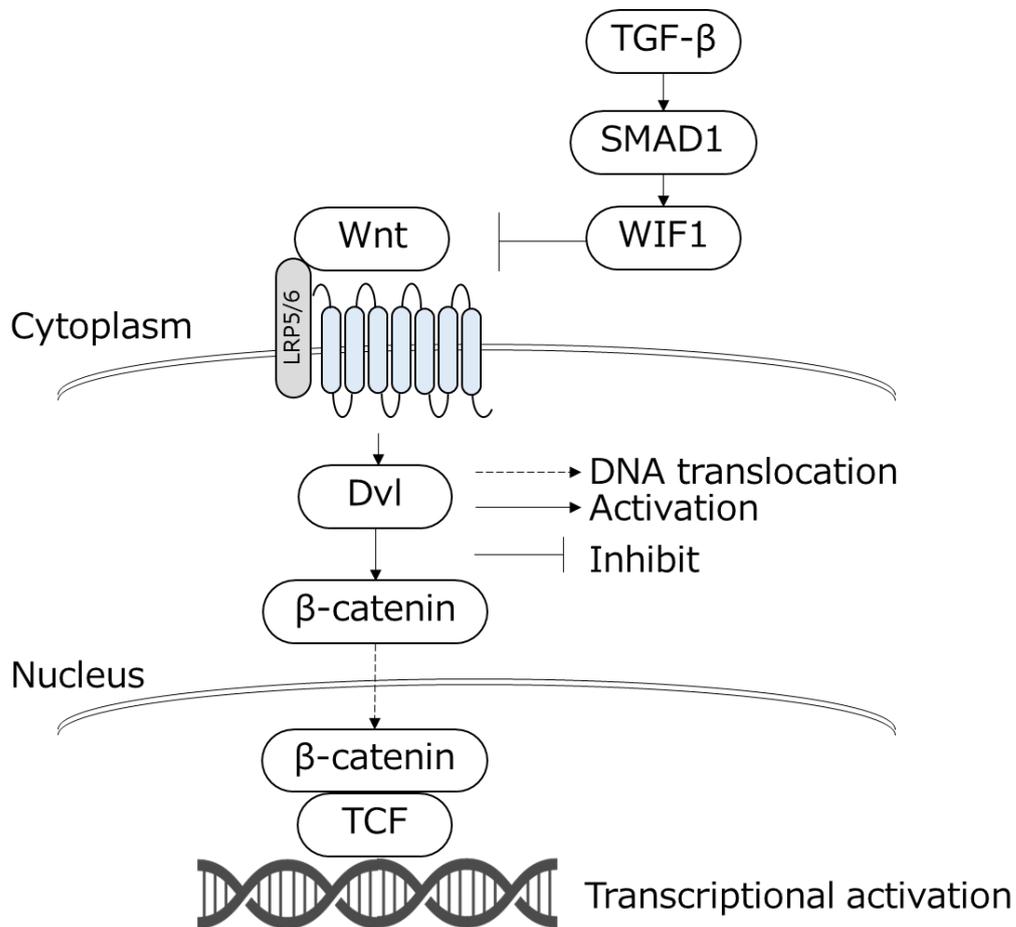
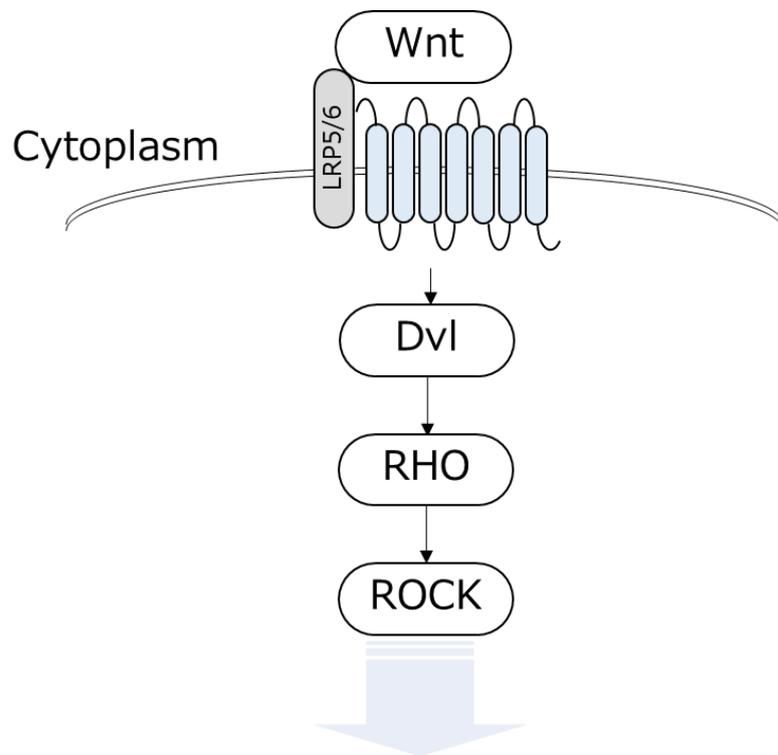


図 3-29 WIF1 及び Wnt/β-catenin のシグナル伝達経路[19, 20]

図 3-29 より、Wnt は Frizzled 受容体と結合することで、β-catenin の安定化と核への移行を促す。核内へ移動した β-catenin は転写因子 TCF と結合し転写活性を促す。WIF1 は Wnt に直接結合することで、Wnt の Frizzled への結合を阻害する。WIF1 の上流因子には SMAD1 という転写因子が存在する。SMAD1 は TGF-β によって活性化される[23]。TGF-β は過酸化水素への曝露に伴い、下流因子の活性化を誘導することが示唆されている[24]。従って、尾静脈注射群では ROS によって TGF-β を刺激し、WIF1 が上昇したと考えられる。WIF1 の発現上昇により、Wnt/β-catenin 経路の転写抑制が示唆された。図 3-30 に Wnt/PCP シグナル経路を示す。Wnt は Frizzled 受容体と結合することで、ROCK タンパクの活性化を促し、細胞骨格に影響を及ぼす。



Convergent extension movement

図 3-30 Wnt/PCP シグナル伝達経路[25]

図 3-31 に Wnt/ Ca<sup>2+</sup>シグナル経路を示す。

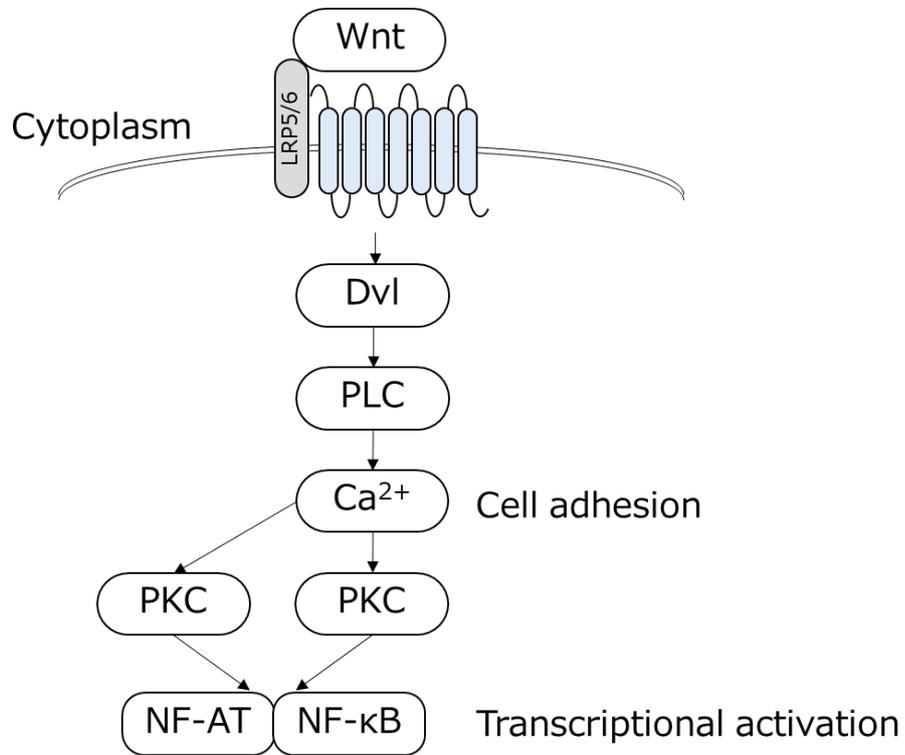


図 3-31 Wnt/Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達経路[26]

Wnt は Frizzled 受容体と結合することで, PLC タンパクの活性化を促して細胞質内 Ca イオンを放出する。カドヘリンは Ca イオン存在化で細胞接着を促す。また, 下流経路では転写因子 NF-κB の活性化を促す[27]。従って本研究では, WIF1 の Wnt シグナル経路における転写抑制が期待できると結論付けた。

## 参考文献

- [1] World Health Organization, “Cancer.” <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Jul. 28, 2022).
- [2] B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, and A. Strasser, “How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?,” *Cell Death Differ*, vol. 25, pp. 104–113, 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.169.
- [3] JSCCR | 大腸癌研究会, “JSCCR | 大腸癌研究会.” [http://www.jscqr.jp/guideline/2016/hereditary\\_particular.html#no2](http://www.jscqr.jp/guideline/2016/hereditary_particular.html#no2) (accessed Jul. 25, 2022).
- [4] L. Smith, S. Anti, N. White, and S. N. Saldanha, “The Genetics and Epigenetics of Colorectal Cancer Health Disparity,” *Epigenetic Mechanisms in Cancer*, pp. 87–115, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-809552-2.00004-8.
- [5] 国立がん研究センターがん情報サービス, “がん登録・統計(人口動態統計).” [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/data/dl/index.html#incidence](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html#incidence) (accessed Jul. 25, 2022).
- [6] National Cancer Institute, “Cancer Staging - NCI.” <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging> (accessed Jul. 25, 2022).
- [7] K. Yoshimi *et al.*, “Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat,” *Cancer Sci*, vol. 100, no. 11, pp. 2022–2027, 2009, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01287.x.
- [8] J. Chen and X. F. Huang, “The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications,” *Cancer Biol Ther*, vol. 8, no. 14, pp. 1313–1317, Jul. 2009, doi: 10.4161/CBT.8.14.8983.
- [9] H. Tazawa *et al.*, “Chronic inflammation-derived nitric oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells,” *Exp Cell Res*, vol. 319, no. 18, pp. 2835–2844, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.YEXCR.2013.08.006.
- [10] T. K. C. T. K. A. M. Takamichi Hirata, “Healing burns using atmospheric pressure plasma irradiation,” *Jpn J Appl Phys*, vol. 53, 2014, doi: 10.7567/JJAP.53.010302.
- [11] N. Kaneko, M. Kurata, T. Yamamoto, S. Morikawa, and J. Masumoto, “The role of interleukin-1 in general pathology,” *Inflammation and Regeneration 2019 39:1*, vol. 39, no. 1, pp. 1–16, Jun. 2019, doi: 10.1186/S41232-019-0101-5.
- [12] O. Audun, W. Haabeth, K. B. Lorvik, H. Yagita, B. Bogen, and A. Corthay, “Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells,” 2016, doi: 10.1080/2162402X.2015.1039763.
- [13] Bharat B. Aggarwal, Shishir Shishodia, Kazuhiro Ashikawa, and Alok C. Bharti, “The Role of TNF and Its Family Members in Inflammation and Cancer: Lessons from Gene Deletion,” *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, vol. 1, no. 4, pp. 327–341, Mar. 2005, doi: 10.2174/1568010023344571.

- [14] B. B. Aggarwal *et al.*, “TNF blockade: an inflammatory issue.,” *Ernst Schering Res Found Workshop*, no. 56, pp. 161–186, 2006, doi: 10.1007/3-540-37673-9\_10/COVER.
- [15] D. A. Braun, M. Fribourg, and S. C. Sealfon, “Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 5, pp. 2986–2993, Feb. 2013, doi: 10.1074/JBC.M112.386573.
- [16] H. Hu *et al.*, “Diagnostic value of WIF1 methylation for colorectal cancer: a meta-analysis,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 4, pp. 5378–5386, Jan. 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.23870.
- [17] X.-Q. Hao, H.-G. Zhang, Z.-B. Yuan, D.-L. Yang, L.-Y. Hao, and X.-H. Li, “Prenatal exposure to lipopolysaccharide alters the intrarenal renin&ndash;angiotensin system and renal damage in offspring rats,” *Hypertension Research*, vol. 33, pp. 76–82, 2009, doi: 10.1038/hr.2009.185.
- [18] G. Takahashi *et al.*, “The Effects of Plasma-Activated Saline and Medium on Colorectal Cancer in Rat Models and the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line COLO 205,” *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, vol. 7, no. 1, p. 8, 2022, doi: 10.11648/J.IJCOCR.20220701.12.
- [19] X. Li, J. Wu, X. Zhang, and W. Chen, “Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells,” *Free Radic Biol Med*, vol. 129, pp. 256–267, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.07.025.
- [20] M. J. McGeachy *et al.*, “TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology,” *Nat Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 1390–1397, Dec. 2007, doi: 10.1038/NI1539.
- [21] G. Liang *et al.*, “Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration,” *Oncol Lett*, vol. 10, no. 3, pp. 1527–1532, Sep. 2015, doi: 10.3892/OL.2015.3475/HTML.
- [22] A. Steensberg, C. P. Fischer, C. Keller, K. Møller, and B. K. Pedersen, “IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 285, no. 2 48-2, pp. 433–437, Aug. 2003, doi: 10.1152/AJPENDO.00074.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/H10731370003.JPEG.
- [23] B. Xu *et al.*, “Smad1 and its target gene Wif1 coordinate BMP and Wnt signaling activities to regulate fetal lung development,” *Development*, vol. 138, no. 5, pp. 925–935, Mar. 2011, doi: 10.1242/DEV.062687.
- [24] D. Y. Rhyu *et al.*, “Role of Reactive Oxygen Species in TGF-β1-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Tubular Epithelial Cells,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 3, pp. 667–675, Mar. 2005, doi: 10.1681/ASN.2004050425.

- [25] K. C. M. Hermans, E. P. Daskalopoulos, and W. M. Blankesteyn, "Interventions in Wnt signaling as a novel therapeutic approach to improve myocardial infarct healing," *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2012, doi: 10.1186/1755-1536-5-16/TABLES/1.
- [26] A. De, "Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview," *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 43, no. 10, pp. 745–756, Oct. 2011, doi: 10.1093/ABBS/GMR079.
- [27] M. Sen and G. Ghosh, "Transcriptional Outcome of Wnt-Frizzled Signal Transduction in Inflammation: Evolving Concepts," *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 7, pp. 4441–4445, Oct. 2008, doi: 10.4049/JIMMUNOL.181.7.4441.

## 第4章

### 骨芽細胞様細胞及び

### 骨折モデルラットに対する ALTP の効果

#### 4.1 緒言

骨の治癒期間は、部位によっては約12週間と長期に及ぶ場合がある。そこで、ALTPの照射によって骨形成促進効果を示すことで細胞分化や細胞増殖の促進など細胞の活性化が見込まれ、骨の損傷に対する治癒促進が可能であると考えた。本章ではALTPの骨形成に与える影響を明らかにするため、骨芽細胞を用いてALTPの照射実験を行った。また、骨折モデルラットを作成し、患部に対してALTPの照射を行い、CTを用いて経過観察を行った。

#### 4.2 骨の構造と形成

ALTPの照射が骨に与える影響の検討を行うに当たって本章では、骨の構造と形成、修復機序について述べる。

##### 4.2.1 骨の構造

成人では大小合わせて約206個の骨が存在しており、骨の役割は大きく分けて5つに分類される。第1に支持作用である。骨は骨格によって頭や内臓などの器官の重量を支え、姿勢を保ち体の支柱となる機能である。第2に保護作用である。骨格を形成し、頭蓋腔や胸腔、脊柱管、骨盤腔などを形成し、衝撃に弱い脳や内臓などの重要な器官を納め、保護を行っている。第3に運動作用である。骨は腱により相互に連結しており、支点・力点・作用点を形成する。付着する筋の収縮により、可動性のある関節を支点として運動が行われる。第4に造血作用がある。骨髄では赤血球や白血球、血小板が新生される。第5に貯蔵作用がある。カルシウムを始めとしてリン、ナトリウム、カリウム等の電解質が骨中に貯蔵される、必要に応じて血液中に放出される。

骨は主に骨膜、骨質、骨髄の三つから構成され、骨質は皮質骨と海綿骨2つに分けられる。骨膜は、皮質骨を被い、骨と周辺組織との結合を担う。骨膜内には血管が豊富に存在し、さらに骨を形成する能力を有する骨芽細胞に分化が可能

な骨原性細胞も存在する[1]。

皮質骨は主に血管を通すハバース層板とフォルクマン管から構成される強固な骨質である。ハバース層板は、血管を中心として骨の長軸方向に長い層板による円柱状の組織である。一方でフォルクマン管はハバース層板に垂直方向に存在し、血管を中心とした一層のみの骨質からなる。また、フォルクマン管は骨膜面から骨内面への血管の導入やハバース層板やハバース層板内の血管との連結を行う[2]。

海綿骨は、皮質骨で囲まれた髓腔内に存在し、骨梁が海綿状に配置される。海綿骨は海綿状に骨梁が存在することで、次の役割を持つ。骨が受ける力学的負荷の方向を分散することで力を分解し、骨の力学的負荷に対する抵抗を増強している。また、海綿状に骨梁が存在することで骨質の表面積は大きくなり、骨梁表面での骨芽細胞による骨形成が容易に行える。また、海綿骨は血管系が少なく、骨髓の血管から栄養や酸素の供給を受ける。骨髓は、髓腔を満たす軟組織であり赤色髓と黄色髓に分けられる。赤色髓では造血が盛んに行われ、黄色髓は造血能が減退した脂肪細胞からなる。また、骨髓には間質、血管系、造血系細胞などの様々な細胞が存在する。特に、骨髓内に存在する間葉系幹細胞は骨芽細胞や破骨細胞などの細胞へ分化が可能な細胞である。

#### 4.2.2 骨の形成及び修復機序

骨組織は、骨の形成を行う骨芽細胞、骨を破壊する破骨細胞、骨形成の促進と抑制の役割を担う骨細胞から成り立っており、人体ではそれらの細胞によって骨代謝が行われている[3]。骨代謝のバランスが崩れると、骨吸収が骨形成を上回り骨密度の低下を引き起こす。骨密度の低下は、骨が脆くなり骨折が起こりやすくなる原因にもなる。

### 4.3 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に対する PTM の曝露と分化促進

#### 4.3.1 骨分化と石灰化

分化とは、異なる機能を持つ細胞へと変化することであり、骨芽細胞は間葉系幹細胞から前骨芽細胞、未熟骨芽細胞、成熟骨芽細胞を経て、骨細胞へと分化する。骨芽細胞分化過程において、骨芽細胞から骨形成に影響を与える物質が産生される。物質の働きにより骨の硬さの決定や、石灰化が促進される。正常な硬い骨が形成されるためには、骨芽細胞が石灰化し骨基質となる必要がある[4]。

#### 4.3.2 実験方法

マウス頭蓋冠由来である MC3T3-E1 細胞は分化を開始する前の細胞は典型的な形態を示し、自発的に分化する細胞が少ない。そこでヒドロコルチゾン、 $\beta$ -グリセロフォスフェート、アスコルビン酸等が含まれる骨芽細胞分化誘導試薬を用いて分化を促進させた。

実験には 6 ウェルプレートを使用し、MC 3 T3-E1 細胞を  $3 \times 10^5$  cell/well ずつ播種した後、分化誘導培地を 4 mL ずつ添加した。分化誘導開始日を 0 日目とし、培地の全量交換を 6, 10 日目に行った。分化誘導開始から 14 日目に、ALTP の照射を行った分化誘導培地に交換を行った。ALTP の照射は 2 章で行ったものと同様の装置を用い、印可電圧 13 kV で 10,20,60,90 秒間の照射を行った。照射部先端から液面までの距離は 5 mm とした。分化誘導培地交換から 5 日目に石灰化評価キット (PG Research, Tokyo, Japan) を用いて骨芽細胞により形成された石灰化結節を染色、色素を溶出して分化の進行度を評価した。溶出液の吸光度は Nano Drop (Thermo Fisher SCIENTIFIC, MA, USA) を用いて測定した。Control として、分化誘導を行っていない MC3T3-E1 を 19 日間培養したものを用いた。

### 4.3.3 実験結果及び考察

図 4-1 に MC3T3-E1 の染色後の色素の吸光度測定結果を示す。細胞の形態には Control 群と ALTP 照射群での変化は見られなかったが、吸光度には大きな変化が確認された。

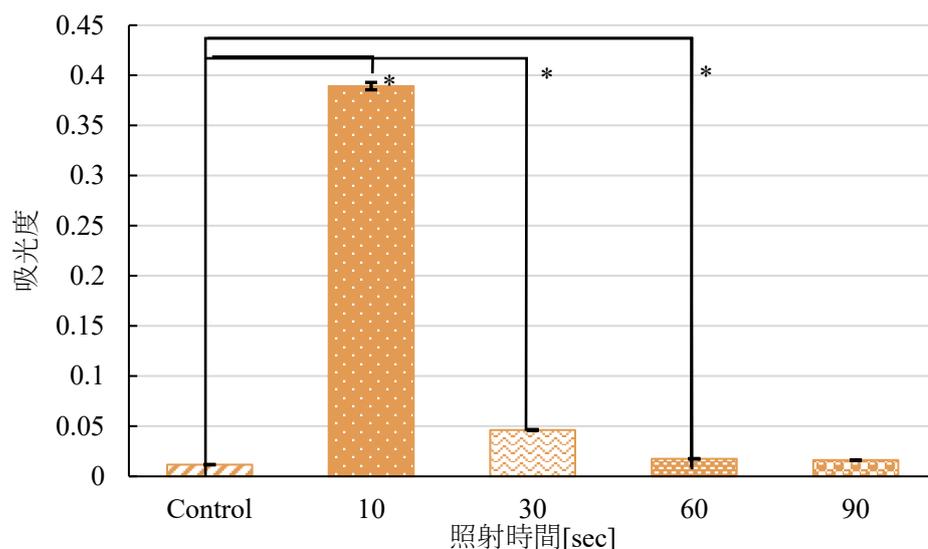


図 4-1 各照射条件におけるアリザリンレッドの吸光度測定 (n=3, S.D., \*: p<0.05)

骨形成に関わるシグナル伝達経路は、ALTP が生成する ROS や RNS により活性化されると考えられている。シグナル伝達経路である MAPK は、細胞の代謝、増殖などの細胞活動に関与している。MAPK には、代表として ERK, JNK などが存在する。MAPK ファミリーの 1 つである JNK が抑制されると、骨の石灰化が抑制されるため、骨芽細胞の分化においては JNK の活性化が必須である。また ERK は ROS や RNS に含まれる NO により増加し、細胞の転写因子の活性化や細胞増殖を促進する。図 4-2 に骨形成に関するシグナル伝達経路を示す[5]。ROS は図 4-5 に示したシグナル伝達経路を活性化することにより、増殖、分化など様々な細胞活動へ影響を与えていることが示唆されている。一方で、高濃度の ROS は骨芽細胞の活性や分化を阻害して石灰化や骨形成を抑制する作用を呈するため、至適濃度での ALTP の曝露が骨分化には重要であることが示された。

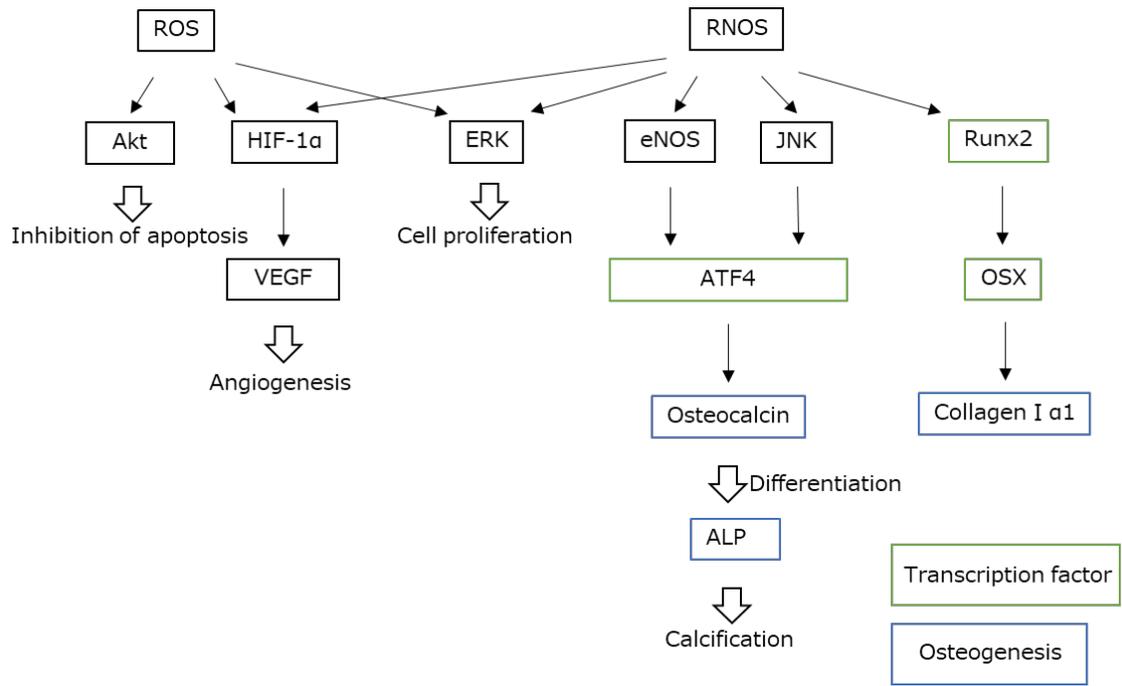


図 4-2 骨形成に関連するシグナル伝達経路[6]

#### 4.4 骨折モデルラットに対する ALTP の直接照射

##### 4.4.1 骨折モデルラットの作成及び評価方法

骨折モデルは麻酔下のラットの筋組織を縦 20 × 横 2 mm, 縦 15 × 横 2 mm, 縦 10 × 横 2 mm の 3 パターンで切開したのち, 尾部をバイスで固定し, 第 5 尾椎骨に対して図 4-3 に示すような斜め背面方向からドリル(φ1.0 mm, 回転数: 800 rpm)を挿入して作製した。サンプル数は ALTP の照射処理を施したプラズマ照射群 3 匹 × 3 条件分, 未処理の Control 群 3 匹とした。

本実験では損傷部の体積の評価を行うため, 実験動物用 X 線 CT 装置(Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル株式会社, 日本) を用いた。撮影頻度は週に一度, 麻酔下で行った。

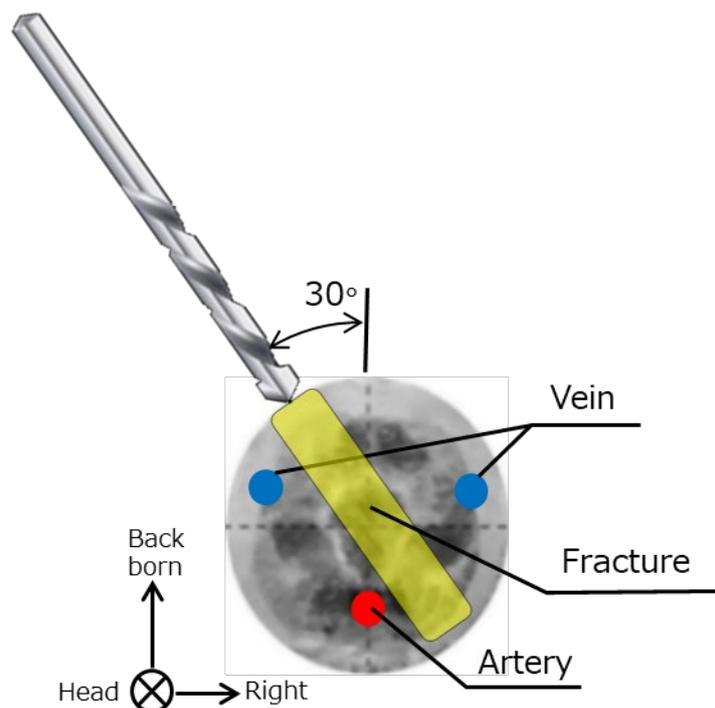


図 4-3 第 5 尾椎骨の損傷方法

#### 4.4.2 ALTP の照射条件

ALTP の照射装置は 3.2 節で使用した装置と同じものを用いて、印可電圧 8 kV、照射距離 5 mm、照射時間 90 秒を 1 日 1 度行った。照射の際はセボフルラン、笑気、酸素を混合したガス麻酔を吸入させ、無意識下にて行った。

#### 4.4.3 実験結果及び考察

体積増加量は各条件群において測定を行い 3 匹の平均値を算出した。図 4-4 に損傷後の体積を基準とした第五尾椎骨の平均体積増加量を示す。

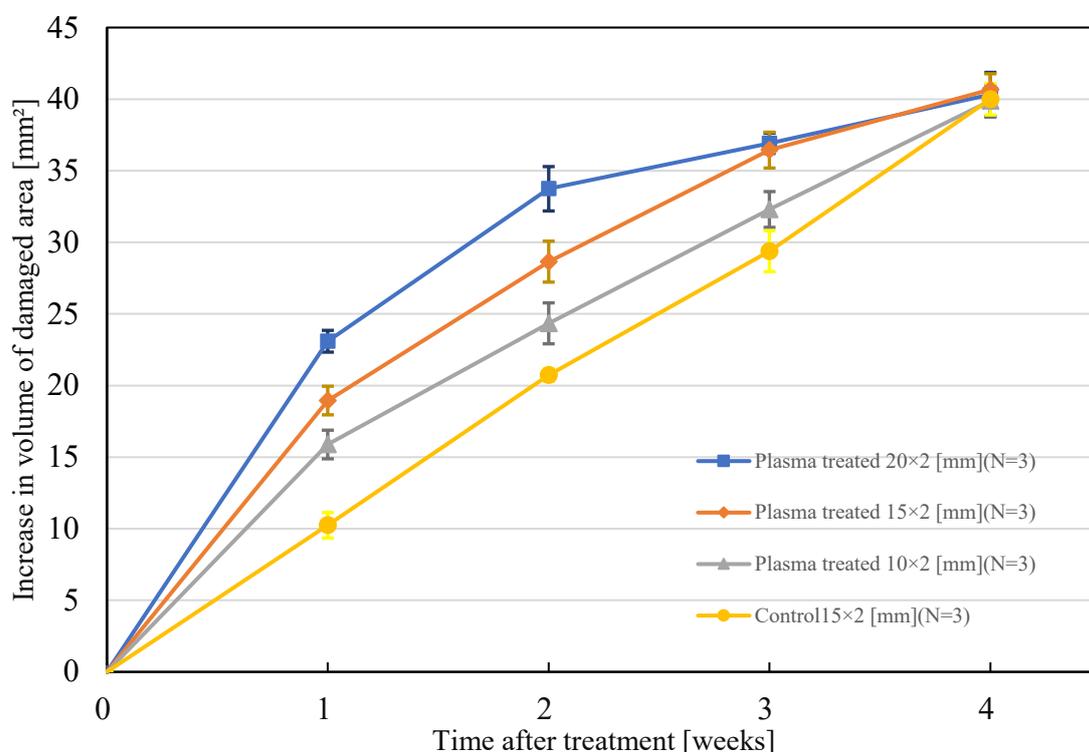


図 4-4 損傷直後の体積を基準とした第 5 尾椎骨の体積増加量の推移 (n=3, S.D)

図 4.4 より、Control 群における体積増加量は線形的増加であり、プラズマ照射群における増加量は対数的増加であった。特に損傷 1 週間後の増加率では Plasma treated 20×2 mm の群と Control 15×2 mm の群とで有意な差が確認された。最終的には全ての損傷部位で骨の欠損が回復したため差は無くなったが、ALTP の照射が回復初期において血管新生を促し、骨形成を促進させたのではないかと考えられる。また、ALTP 照射群の皮膚の切開範囲が広いほど体積増加量の傾きが大きかったため、ALTP の照射面積が広いほど治療効果があったと考えられる。

## 参考文献

- [1] M. T. Valenti, L. D. Carbonare, and M. Mottes, "Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions," *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 41, vol. 18, no. 1, p. 41, Dec. 2016, doi: 10.3390/IJMS18010041.
- [2] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *BioMed Research International*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/421746.
- [3] G. D. Roodman, "Cell biology of the osteoclast," *Experimental Hematology*, vol. 27, no. 8, pp. 1229–1241, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0301-472X(99)00061-2.
- [4] L. de Metabolismo Ósseo LIM-, D. de Reumatologia, C. Danilevicius, J. Lopes, and R. Pereira, "Bone metabolism and vascular calcification," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, no. 4, pp. 435–442, 2007, doi: 10.1590/S0100-879X2007000400001.
- [5] E. Kozhemyakina, A. B. Lassar, and E. Zelzer, "A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation," *Development*, vol. 142, no. 5, pp. 817–831, Mar. 2015, doi: 10.1242/DEV.105536.
- [6] M. Arai, Y. Shibata, K. Pugdee, Y. Abiko, and Y. Ogata, "Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells," *IUBMB Life*, vol. 59, no. 1, pp. 27–33, Jan. 2007, doi: 10.1080/15216540601156188.

# 第5章 植物に対する ALTP 照射の評価

## 5.1 緒言

本研究では、大気圧遠隔プラズマ処理と植物由来のバイオフィトン測定を組み合わせ、植物の成長過程を非接触・非侵襲で測定した。

## 5.2 実験方法

図 5-1 に示すように、USB フォトンカウンター (M014-01; 波長範囲: 230-700 nm, average dark count: 50 CPS [maximum: 100 CPS]; OPTOMECHATRONIX. Inc., Japan.) を小型簡易暗室 (B-S1-CN; SCIENTEX Inc., Japan) に設置し、種子を播種したバイアル (または細胞培養皿) から放出されるバイオフィトン測定した。フォトンカウンターとバイアル (または細胞培養皿) の上面との距離は 10mm に設定した。本実験では、水耕栽培で短期間 (1 週間程度) に生育が可能な種子 (*Raphanus sativus* L.) を用いた。

脱脂綿を詰めたバイアル (パイレックスガラス) に滅菌水を注ぎ、その上に種子を播種した。1 皿あたりの種子の数は 20 個とした。種子の培養条件は装置内清浄度: Class 1000, 温度範囲: 20-30°C, 湿度: 25-27% である。ALTP の照射条件は印可電圧: 7 kV, 周波数: 3 kHz, ガス種類: Helium (He), 流量: 1 L/min, 照射時間: 300 s とした。また、バイオフィトンの測定の際には外部の光を遮断するため、簡易暗室を用いた。

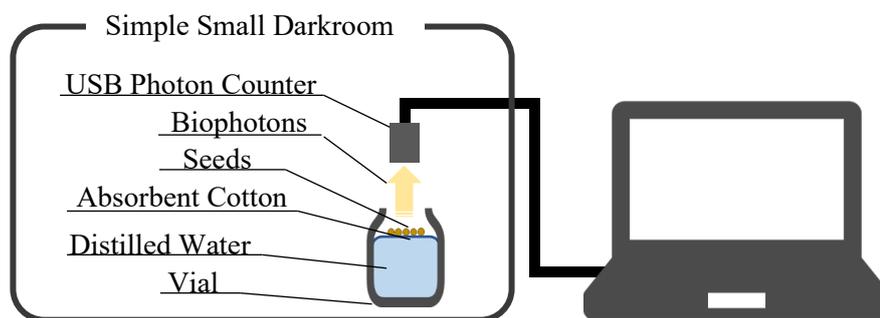


図 5-1 バイオフィトンの観察実験装置の概要

図 5-2 に示すように、簡易暗室に測定対象を設置した後でも 200 秒間程度は遅

遅延発光が持続することが判明した。遅延発光は双曲線的な減衰を示すため、測定前に暗室に10分間放置することで発光を除去した[2]。また、図5-3、5-4に純水のみを加えた場合の成長状況と、時間毎のバイオフィオンの推移を示す。

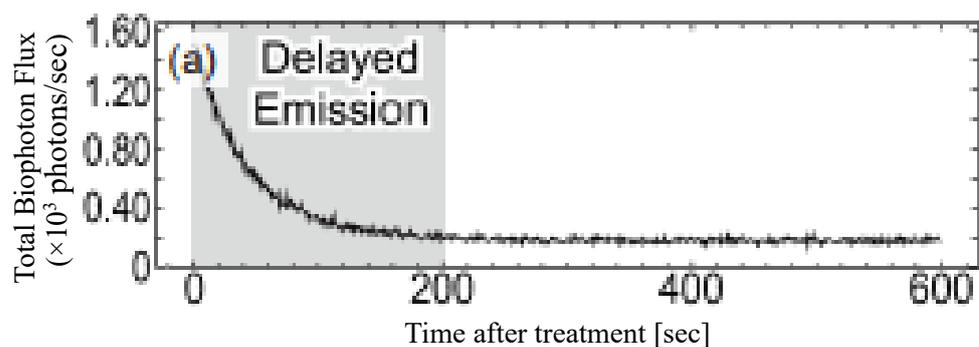


図 5-2 種子の遅延発光[1]

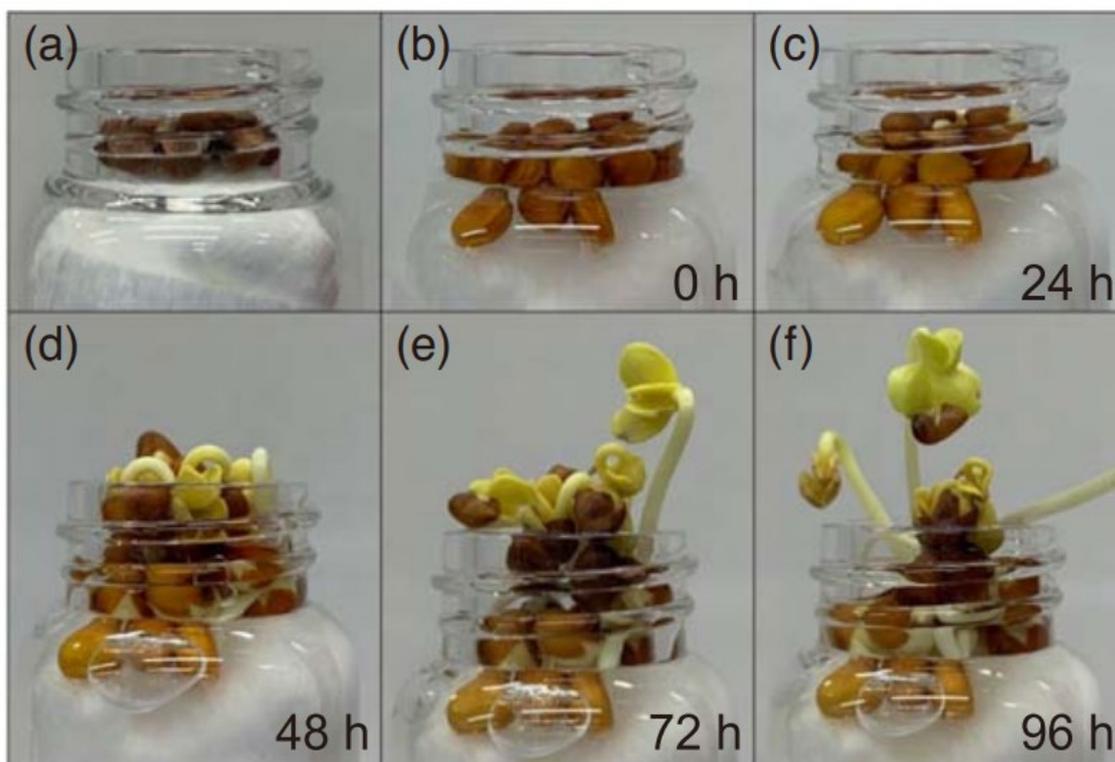


図 5-3 種子の成長過程[1]

- (a) 加水前
- (b) 加水 30 分後
- (c) 加水 24 時間後
- (d) 加水 48 時間後
- (e) 加水 72 時間後
- (f) 加水 96 時間後

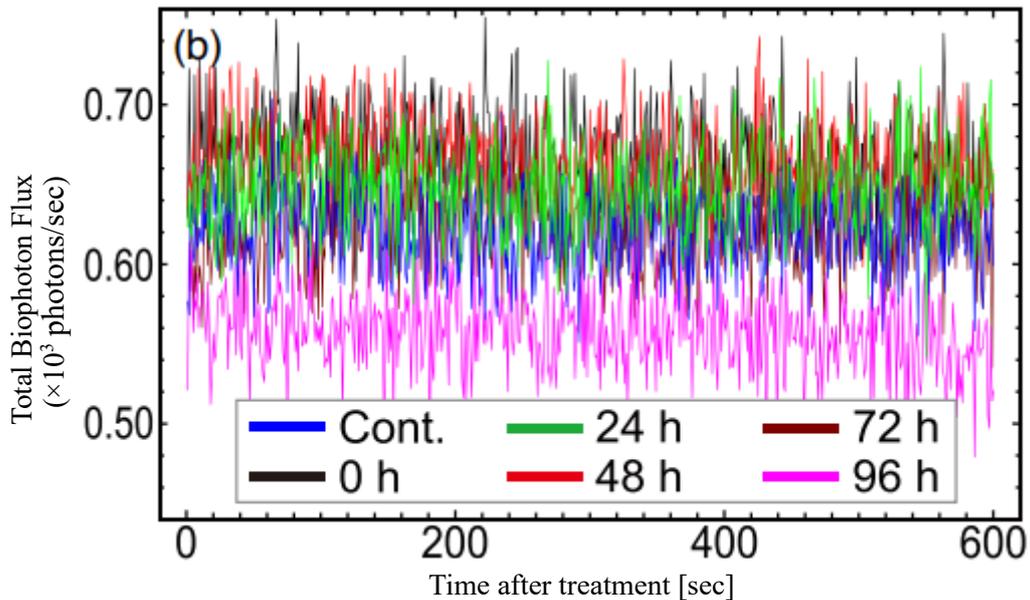


図 5-4 各時間におけるバイオフィオンの測定[1]

### 5.3 実験結果及び考察

図 5-4,5-5 に時間毎のバイオフィオン強度の総量平均値の時間推移を示す。動物のバイオフィオンを評価する際は平均値( $\text{photon/s/cm}^2$ )ではなく、光源光度、つまり光の強さ Total Flux( $\text{photons/sec}$ )で示すため、本稿においても  $\text{photons/sec}$  で表す。図 5-4, 5-5 に示すように、Total Flux は発芽数の増加に応じて増加するが、96 時間後では優位に減少した。また、6 時間後までの発光状態を観察した結果、1 時間後の図中矢印( $\uparrow$ )に示すようなピーク波形が観察されたこれは休眠していた乾燥種子が、給水により水分を吸収することで代謝活動が行われるためである。種子内の貯蔵物質は成長と共に消費されるため暗条件下での酵素の活性は時間と共に低下し、フォトンの放出量も減少する。一方、発芽した根は酸素によって呼吸活性が上昇し、細胞分裂が活発に生じるためにフォトンの放出量も上昇する。

図 5-5 に未処理の種子と ALTP 照射を行った種子から放出されるバイオフィオンの時間変化を示す。未処理の種子では図 5-4(d)と同様にバイオフィオンは徐々に減少している。一方で ALTP 処理を行った種子では増加傾向にあり、種子内部で成長 促進や抗酸化活性の増強などの反応が生じていたためと考えられる。

活性酸素を含むプラズマ流を照射することで、成長促進や抗酸化活性の増強などの反応が生じるため、エピジェネティックな遺伝子発現が誘導されると考えられている[3]。エピジェネティックな変化は突然変異とは異なり、DNAの塩基配列の変化を伴わずにDNAの周囲のヒストンのアセチル化やDNAのメチル化等の複数の機序により、細胞分裂後も遺伝子の発現が変動するものである。このような制御は化学的に安定な修飾によって実現されるが、酸化ストレスなどの外的要因によって修飾はダイナミックに変化する[3], [4]。

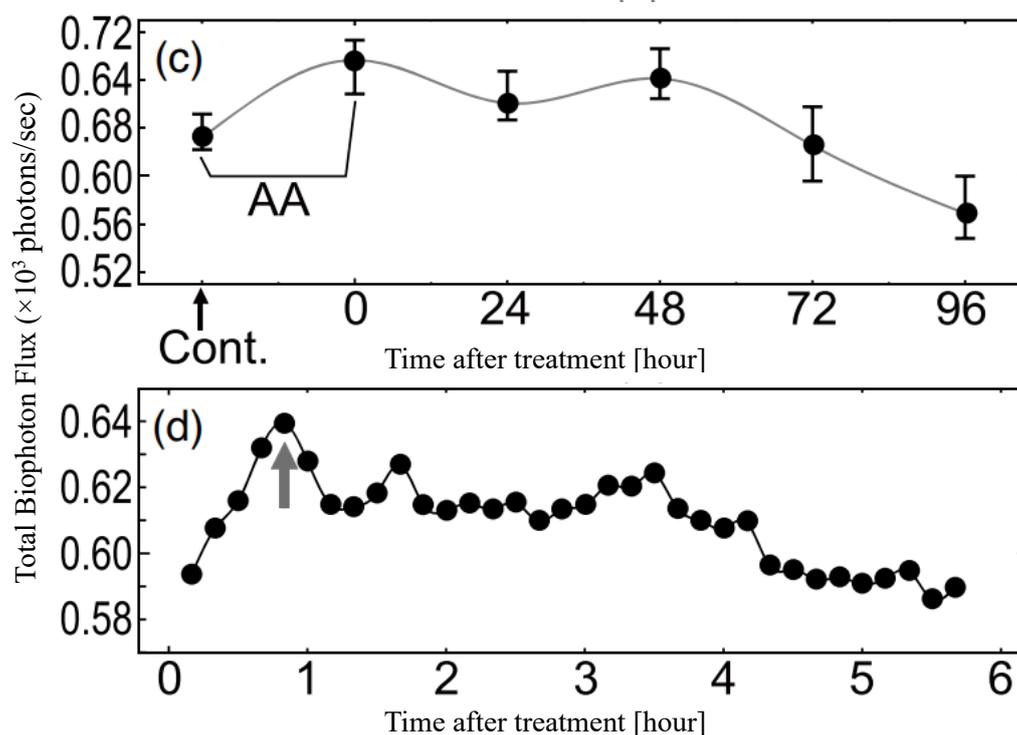


図 5-4 各時間におけるバイオフィオンの推移[1]  
(c): 0~96 時間  
(d): 0~6 時間

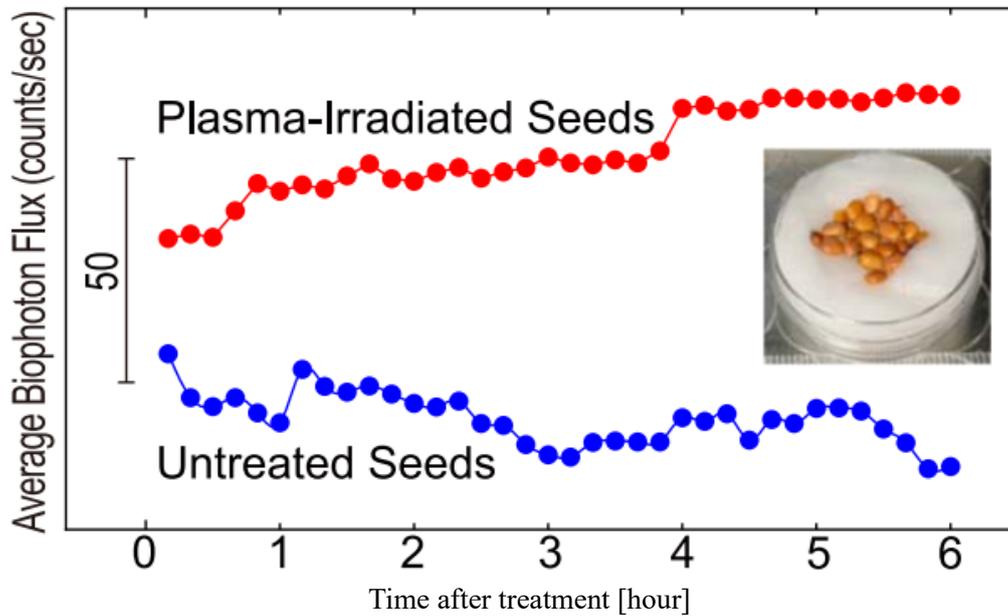


図 5-5 種子から放出されるバイオフィotonの推移[1]

#### 5.4 結言

ALTP 未照射群の種子のバイオフィoton量は緩やかに減少し，ALTP 処理群の種子のバイオフィoton量は徐々に増加することがわかった。これらの結果は，プラズマ照射が種子の呼吸や酵素の活性化を持続させることを示している。

また，バイオフィotonを用いた非接触・非侵襲的な計測により，植物の生育状況や環境ストレス，ダメージなどをリアルタイムに計測することができ，ALTPの植物への影響の解明にも大きく貢献したと言える。

## 参考文献

- [1] G. Takahashi, T. Hirata, and A. Mori, “Non-contact and non-invasive monitoring of plant growth combining atmospheric pressure remote plasma treatment and detection of plant-derived biophotons,” *Jpn J Appl Phys*, vol. 60, p. 100905, 2021, doi: 10.35848/1347-4065/ac22eb.
- [2] R. P. Bajpai, “Coherent Nature of the Radiation Emitted in Delayed Luminescence of Leaves,” *J Theor Biol*, vol. 198, no. 3, pp. 287–299, Jun. 1999, doi: 10.1006/JTBI.1999.0899.
- [3] R. Nakano, K. Tashiro, R. Aijima, and N. Hayashi, “Effect of Oxygen Plasma Irradiation on Gene Expression in Plant Seeds Induced by Active Oxygen Species,” *Plasma Med*, vol. 6, no. 3–4, pp. 303–313, 2016, doi: 10.1615/PLASMAMED.2016019093.
- [4] A. P. Feinberg, “Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease,” *Nature 2007 447:7143*, vol. 447, no. 7143, pp. 433–440, May 2007, doi: 10.1038/nature05919.
- [5] A. Petronis, “Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases,” *Nature 2010 465:7299*, vol. 465, no. 7299, pp. 721–727, Jun. 2010, doi: 10.1038/nature09230.

## 第6章 結論

本学位論文では、ALTP を用いた生体応用の幅を広げるべく、その対象を動物、細胞、そして植物まで行い、また、照射方法や感受性の違いから、照射対象の増殖抑制や活性化等の相反する作用があることを見出した。

第2章及び第3章では、大腸がんに対するALTPの作用を調査した。また、治療への応用を考慮するため、ALTPの直接照射ではなく、培地や生理食塩水に暴露させ、ALTPによる生成物を利用して検討した。大腸がんモデルラットに対するPTS投与実験では瘍発生時期の個体差は大きかったものの、腸内投与群及び尾静脈注射群では腫瘍の発生時期に遅れが生じている傾向があった。また、尾静脈注射群のラットでは3匹中2匹で粘膜固有間質までの転移浸潤が確認され、Control群、腸内投与群と比べ転移浸潤の進行が遅い傾向が見られた。また、大腸がん細胞に対するPTMの曝露を行った結果、がん細胞は抗酸化物質の代謝能が低いため、細胞死や増殖の抑制を促した。従って、大腸がんモデルラットの大腸がんにおいても、腫瘍部分に対して同様の効果があったと考えられる。一方で、ALTPによる生成物の具体的な作用機序を解明するまでには至っていない。そこで今後は、PTSの投与を行った大腸がんモデルラットの大腸に対して生じる影響を、腫瘍組織及び正常組織の両面から解析していく必要がある。

第4章では骨折モデルラット及び骨芽細胞様細胞に対して、組織の活性化を促すためにALTPの照射を行った。骨折治療に関してはALTPの直接照射が可能であると考えたため、骨折モデルラットに対しては直接照射を行った。骨芽細胞に対するALTP処理培地の曝露では、ALTP照射群での骨芽細胞の分化が有意に確認された。また、骨折モデルラットにおいても同様に、Control群と比較してALTP照射群では優位に骨組織の回復が認められた。骨芽細胞では細胞の分化が促されており、その効果がモデルラットに対しても同様であった可能性がある。また、ALTPの生成物であるNOが組織周辺の血管新生を促し、骨損傷部位の回復を促している可能性もある。一方で、骨組織の回復の指標としてCTを用いた体積評価を行っているが、回復した組織の質についてはさらなる検討が必要である。

第5章では、種子に対するALTPの直接照射が与える影響を調査した。先行研究においては種子の発芽率や成長度が議論されていたが、内部での変化については言及されていなかった。そこで、本研究ではバイオフィトンを用いることで、

非侵襲かつ連続的に内部の活性を測定が可能であることを示した。また、ALTPの照射により内部の活性化が促されていることが示されたため、今後は種子のみならず、葉や茎などの植物組織に対しても調査を行う。

本研究においてがんの増殖抑制や骨芽細胞の分化といった相反する効果が得られた要因として、ALTPの照射条件の違いがあげられる。ALTPの照射装置はほぼ同様の装置を用いているが、大腸がんモデルラット及び培養細胞については間接的に、また、骨折モデルラット及び種子に対しては直接ALTPの照射が行われた。その結果、各条件で生成されたラジカルの量や感度の違いによってさまざまな効果が得られることが判明した。表 6-1 に本論で述べたALTPの照射実験と照射時間及び効果について示す。増殖抑制についてはALTPの間接的な照射になるため、溶媒に対して長時間のALTPの曝露が効果的であった。一方、骨折モデルラットについては直接照射であったが、照射時間は90秒で効果が表れた。骨折モデルラットの損傷部は痲疲の形成が早く、ALTPによる生成物が損傷内部まで届きにくいいため、長時間の曝露を行わないと効果が得られず、また、ROSやRNOSが滞留するわけではないため、生体に対しても害を与えにくい。一方で、骨芽細胞の分化は短時間の間接照射が最適であった。MC3T3細胞は比較的分化能が高く、外的刺激によって影響を受けやすい。そのため、短時間の照射が活性化を促すには最適であったと考えられる。一方で、種子に対しては300秒間の直接照射を行っており、ALTPの生成物の曝露環境が最も高い。しかし、植物種子は固い種皮に覆われているためALTPの生成物の感受性が低いため、長時間の曝露を行う必要があることが判明した。

表 6-1 ALTP 照射実験，照射条件とその効果

照射対象	大腸がん細胞 (2章)	大腸がん モデルラット (3章)	骨芽細胞 (4章)	骨折モデル ラット (4章)	種子 (5章)
照射方法	培地に照射後、 細胞へ投与	溶液に照射後、 腸内投与 溶液に照射後、 尾静脈投与	培地に照射後、 細胞へ投与	直接照射	直接照射
照射時間	1 mL に対して 90 秒	6 mL に対して 90 秒	2 mL に対して 10, 30, 60, 90 秒	90 秒	900 秒
増殖抑制/ 活性化	増殖抑制	増殖抑制	活性化	活性化	活性化

今後の展望としては、各実験系における最適な照射条件の検討や ALTP による生成物の詳細な成分分析を行う必要がある。大腸がんの治療法として用いるためには腸内投与と比較して尾静脈投与で効果がある傾向であったが、尾静脈投与では患部に対して選択的に PTS が作用するとは考えにくい。そのため、最適な照射条件を求めつつも、PTS を用いたドラッグデリバリーシステムの開発が必要である。骨折モデルについても同様に、いかに損傷部に ALTP の効果を選択的に与えられるかの検討が重要である。また、種子については種皮への浸透を考慮するために PTS のように溶液に暴露し、投与することでより短時間での照射時間で効果が発現するのではないかと考える。

本研究を通して、ALTP の生体応用についての展望を述べたが、機序については未解明の部分も多い。しかし、各実験において得られた効果をもって、大気圧低温プラズマの生体応用の幅を広げることが出来たと考えられる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、あたたかいご指導と激励を受け賜りました東京都市大学 森 晃教授に心からの感謝の意を表します。先生のご指導なくして本稿の提出、そして博士号の取得は叶わなかったと言っても過言ではありません。卒業後に進路の決まらない私を拾ってくださったこと、また、学部在学時より様々なご迷惑をおかけしたこと、心よりのお礼とお詫びを申し上げます。

また、工学的な立場から様々なアドバイスをして頂きました東京都市大学 和多田 雅哉教授にも心からの感謝の意を表します。生物寄りの思考になってしまったため、先生の助言は大変身にしみいるものばかりでした。研究や研究室にて、自由な裁量を持って動くことができたのは先生のおかげです。

本論文を提出するにあたり、社会福祉法人康和会久我山病院 病院長 岩下 光利先生、広島大学病院 病院長 工藤 美樹先生、東京都市大学 中嶋 達人教授の3名の先生に副査をお願いいたしました。副査の皆様には予備審査、公聴会を通して多くの指導をして頂き、至らぬ点が多々あったと思いますが、誠にありがとうございました。

加えて、医用工学科の先生方におきましても、研究のアドバイスや叱咤激励の言葉を受け賜りましたこと、謹んでお礼申し上げます。

臨床器械工学研究室の学生及び卒業生の皆様におきましても、本論を作成するにあたっての諸々を手伝って頂き、誠にありがとうございました。

最後に、進学時より励ましや支援をしてくれた友人の皆様、そして当人の希望を否定せず、博士号の取得を応援してくれた家族に対しても深くお礼申し上げます。

ありがとうございました。

2022年9月22日 臨床器械工学研究室にて

高橋 玄宇

# 発表論文一覧

## 査読付き論文

- [1] T. Hirata, G. Takahashi, A. M. Loordhuswamy, A. Subramanian, and A. Mori, "Evaluation of intracellular materials by biophotons released from cultured cells irradiated with atmospheric-pressure plasma," *Jpn J Appl Phys*, vol. 61, no. 3, p. 038003, Mar. 2022, doi: 10.35848/1347-4065/AC5263.
- [2] 奥野 菜々子, 高橋 玄宇, 森 晃, 吉野 響太, 本田 雅貴, 篠原 克弥, 小林 千尋, 和多田 雅哉, "大腸がん細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地による細胞障害の検討," *日本AEM学会*, vol. 30, no. 2, pp. 130–135, Aug. 2022, doi.org/10.14243/jsaem.29.118
- [3] G. Takahashi *et al.*, "Effects of atmospheric low temperature plasma on the rat model of colorectal cancer," *Journal of the Japan Society of Applied Electromagnetics and Mechanics*, vol. 30, no. 2, pp. 155–160, 2022, doi: 10.14243/JSAEM.30.155.
- [4] G. Takahashi *et al.*, "The Effects of Plasma-Activated Saline and Medium on Colorectal Cancer in Rat Models and the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line COLO 205," <http://www.sciencepublishinggroup.com>, vol. 7, no. 1, p. 8, Jan. 2022, doi: 10.11648/J.IJCOCR.20220701.12.
- [5] G. Takahashi, T. Hirata, and A. Mori, "Non-contact and non-invasive monitoring of plant growth combining atmospheric pressure remote plasma treatment and detection of plant-derived biophotons," *Jpn J Appl Phys*, vol. 60, no. 10, p. 100905, Sep. 2021, doi: 10.35848/1347-4065/AC22EB.
- [6] 高橋 玄宇, 奥野 菜々子, 平田 孝道, 森 晃, 和多田 雅哉, "大気圧プラズマの照射が培養細胞へ与える影響の検討," *日本AEM学会誌*, vol. 29, no. 1, pp. 118–123, Dec. 2021, Accessed: Sep. 25, 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.14243/jsaem.29.118>

## 学会発表

- [1] 皮膚損傷に対する大気圧低温プラズマによる治療効果の検討 2022年電気学会産業応用部門大会 ○深澤 猛, 森 勇輝, 吉野 響太, 高橋玄宇, 森 晃 2022年8月30日
- [2] 皮膚損傷における大気圧低温プラズマ照射治療の有効性の検討2022年電気学会産業応用部門大会 ○森 勇輝, 吉野 響太, 森 晃, 高橋玄宇 2022年8月30日
- [3] 大気圧低温プラズマ溶液が大腸がんを与える影響の検討 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会抄録集2021 ○奥野菜々子, 高橋玄宇, 森晃, 吉野響太, 本田雅貴, 篠原克弥, 小林千尋, 和多田雅哉 2021年12月11日
- [4] 大気圧低温プラズマによるヒト肺腺がん細胞への治療効果の検討 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会抄録集2021 ○吉野響太, 奥野 菜々子, 本田 雅貴, 高橋 玄宇, 和多田 雅哉, 森 晃 2021年12月11日
- [5] 大腸がん細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地による細胞障害の検討 第30回MAGDAコンファレンス in 広島 -電磁現象及び電磁力に関するコンファレンス-○奥野 菜々子, 高橋 玄宇, 森 晃, 吉野 響太, 本田 雅貴, 篠原 克弥, 小林 千尋, 和多田 雅哉 2021年12月6日
- [6] Effects of atmospheric low temperature plasma on the rat model of colorectal cancer 第30回MAGDAコンファレンス in 広島 -電磁現象及び電磁力に関するコンファレンス- ○Genu TAKAHASHI, Nanako OKUNO, Kyota YOSHINO, Katsuya SHINOHARA, Masaki HONDA, Chihiro KOBAYASHI, Masaya WATADA, and Akira MORI 2021年12月6日
- [7] 大気圧低温プラズマによるヒト肺腺がん細胞に対する治療効果の検討 第30回MAGDAコンファレンス in 広島 -電磁現象及び電磁力に関するコンファレンス- ○吉野 響太, 奥野 菜々子, 本田 雅貴, 高橋 玄宇, 和多田 雅哉, 森 晃 2021年12月6日
- [8] 大気圧プラズマを照射した植物から放出されたバイオフィトンを用いた植物成長の非接触・非侵襲モニタリング 第38回プラズマ・核融合学会 ○平田 孝道, 高橋 玄宇, 森 晃 2021年11月12日
- [9] 大気圧プラズマ処理培地が培養細胞へ与える影響 第29回MAGDAコンファレンス in 大津 -電磁現象及び電磁力に関するコンファレンス- ○高橋 玄宇, 奥野 菜々子, 森 晃, 和多田 雅哉 2020年12月22日
- [10] 大気圧プラズマの照射が培養細胞へ与える影響の検討 第32回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム ○高橋 玄宇, 奥野 菜々子, 平田 孝道, 和多田 雅哉, 森 晃 2020年5月20日
- [11] 大腸癌モデルラットに対する大気圧低温プラズマの影響の検討に向けたプラズマ照射水の成分分析 第32回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム ○奥野 菜々子, 森 晃, 高橋 玄宇, 和多田 雅也, 小林 千尋, 平田 孝道 2020年5月20日
- [12] 大気圧プラズマが骨形成に与える影響の検討 平成27年電気学会全国大会 ○橋本 涉, 高橋 玄宇, 森 晃, 和多田 雅哉 2015年3月24日
- [13] 大気圧低温プラズマの吸入がラットに与える影響とその原因の調査 第23回 MAGDA コンファレンス in高松-電磁現象および電磁力に関する

- るコンファレンス- ○高橋 玄宇, 森 晃, 和多田 雅哉, 平田 孝道,  
筒井 千尋 2014年12月4日
- [14] The effect of atmospheric plasma inhalation for aortic pressure and  
concentration of Nitric oxide in blood using rat. 第26回「電磁力関連の  
ダイナミクス」シンポジウム ○高橋 玄宇, 森 晃, 和多田 雅哉, 平田  
孝道, 筒井 千尋, 近藤 朱音 2014年5月25日
- [15] プラズマ吸入がラットの下行大動脈に与える影響 第25回「電磁力  
関連のダイナミクス」シンポジウム ○高橋 玄宇, 森 晃, 和多田 雅  
哉, 平田 孝道, 筒井 千尋, 近藤 朱音 2013年5月15日