

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/103695

発行日 平成29年10月5日 (2017.10.5)

(43) 国際公開日 平成28年6月30日 (2016.6.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/19 (2006.01)	A 6 1 K 31/19	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/194 (2006.01)	A 6 1 K 31/194	
A 6 1 K 33/10 (2006.01)	A 6 1 K 33/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2016-565922 (P2016-565922)	(71) 出願人 504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/006419	
(22) 国際出願日 平成27年12月23日 (2015.12.23)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-261364 (P2014-261364)	(74) 代理人 100087723 弁理士 藤谷 修
(32) 優先日 平成26年12月24日 (2014.12.24)	(74) 代理人 100165962 弁理士 一色 昭則
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100206357 弁理士 角谷 智広
	(72) 発明者 水野 正明 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
	(72) 発明者 堀 勝 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

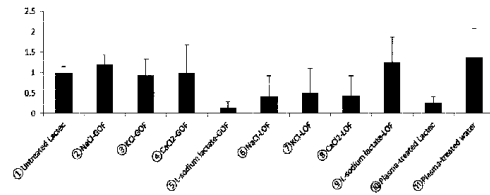
(54) 【発明の名称】 抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質

(57) 【要約】

【課題】 正常細胞にほとんど影響を与えることなく癌細胞を選択的に死滅させることができるとともに患者の体内に投与することの可能な抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質を提供することである。

【解決手段】 この抗癌剤の製造方法は、水溶液準備工程と、プラズマ照射工程と、を有する。水溶液準備工程では、乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する第1の水溶液を準備する。プラズマ照射工程では、第1の水溶液にプラズマを照射して第2の水溶液とする。

【選択図】 図 1 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

第 1 の水溶液を準備する水溶液準備工程と、  
前記第 1 の水溶液にプラズマを照射して第 2 の水溶液とするプラズマ照射工程と、  
を有し、

前記第 1 の水溶液は、

乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、  
のうちの少なくとも一つを含有すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 1 の水溶液は、

リンゲル液であること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 1 の水溶液は、

乳酸リンゲル液であること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

20

**【請求項 4】**

請求項 2 に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 1 の水溶液は、

酢酸リンゲル液であること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

**【請求項 5】**

請求項 2 に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 1 の水溶液は、

重炭酸リンゲル液であること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

30

**【請求項 6】**

請求項 1 から請求項 5 までのいずれか 1 項に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 1 の水溶液は、

塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、のうちの少なくとも一つを

含有すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 から請求項 6 までのいずれか 1 項に記載の抗癌剤の製造方法において、

塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、のうちの少なくとも一つを前

記第 2 の水溶液に添加して第 3 の水溶液とする成分添加工程を有すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

40

**【請求項 8】**

請求項 1 から請求項 7 までのいずれか 1 項に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記第 2 の水溶液もしくは前記第 3 の水溶液を冷凍する冷凍工程を有し、

前記第 2 の水溶液もしくは前記第 3 の水溶液は、

塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、を含有すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

**【請求項 9】**

請求項 8 に記載の抗癌剤の製造方法において、

50

前記冷凍工程では、

前記第 2 の水溶液もしくは前記第 3 の水溶液を - 1 9 6 以上 0 以下の範囲内で冷凍すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

【請求項 1 0】

請求項 1 から請求項 9 までのいずれか 1 項に記載の抗癌剤の製造方法において、

前記プラズマ照射工程では、

筒形状部を備える第 1 電極を前記第 1 の水溶液の外に配置するとともに第 2 電極を前記第 1 の水溶液の中に配置し、

前記第 1 電極の前記筒形状部から前記第 1 の水溶液に向かってガスを照射し、

その状態で前記第 1 電極と前記第 2 電極との間に電圧を印加すること

を特徴とする抗癌剤の製造方法。

10

【請求項 1 1】

第 1 の水溶液を準備する水溶液準備工程と、

前記第 1 の水溶液にプラズマを照射して第 2 の水溶液とするプラズマ照射工程と、

を有し、

前記第 1 の水溶液は、

乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有すること

を特徴とする輸液の製造方法。

20

【請求項 1 2】

リンゲル液にプラズマを照射して製造されたものであること

を特徴とする抗癌剤。

【請求項 1 3】

リンゲル液にプラズマを照射して製造されたものであること

を特徴とする輸液。

【請求項 1 4】

$\text{CH}_3\text{CO}$  または  $\text{CH}_3\text{COCOO}$  を有し、

癌細胞を選択的に死滅させること

を特徴とする抗癌物質。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書の技術分野は、抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質に関する。さらに詳細には、プラズマを利用して製造される抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質に関するものである。

【背景技術】

【0002】

プラズマ技術は、電気、化学、材料の各分野に応用されている。そして、近年においては、医療への応用が活発に研究されるようになってきた。プラズマの内部では、電子やイオン等の荷電粒子の他に、紫外線やラジカルが発生する。これらには、生体組織の殺菌をはじめとして、生体組織に対する種々の効果があることが分かってきている。

40

【0003】

例えば、特許文献 1 には、プラズマの直接照射により、血液凝固（特許文献 1 の実施例 4、段落 [0063] - [0068] 参照）と、組織滅菌（特許文献 1 の実施例 5、段落 [0069] - [0074] 参照）と、リーシュマニア症（特許文献 1 の実施例 6、段落 [0075] - [0077] 参照）と、に対して効果があることが記載されている。そして、プラズマは、メラノーマ細胞（悪性黒色腫細胞）を死滅させる効果があると記載され

50

ている（特許文献1の実施例7、段落[0078]参照）。

【0004】

また、特許文献2には、pHが4.8以下となるように調整された液体にプラズマを照射することにより、液体中の菌を殺菌する技術が開示されている（特許文献2の段落[0020]等参照）。また、スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロペルオキシラジカル等が殺菌効果を担っている可能性がある旨が記載されている（特許文献2の段落[0090] - [0099]等参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2008-539007号公報

【特許文献2】国際公開第2009/041049号

【特許文献3】国際公開第2013/128905号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ところで、このような癌の治療においては一般に、1)癌細胞を死滅させるとともに、2)正常細胞に影響を与えないように、癌細胞を選択的に死滅させることが好ましい。たとえ、癌細胞を死滅させることができたとしても、そのために多数の正常細胞を死滅させると、患者に加わる肉体的負担が大きいためである。そのため、このように癌細胞を選択的に死滅させる治療技術が望まれている。しかし、癌細胞を選択的に死滅させることは容易ではない。また、特許文献1では、正常細胞への影響の程度が明らかではない。

【0007】

そのため特許文献3に記載されているように、本発明者らは、癌細胞を選択的に死滅させる抗腫瘍水溶液に関する技術を研究開発した（特許文献3の段落[0085] - [0087]および図16等参照）。この抗腫瘍水溶液は、正常細胞にほとんど影響を与えることなく癌細胞を選択的に死滅させることができる。また、この抗腫瘍水溶液は、培養した細胞のみならずマウスに対しても抗腫瘍効果を発揮した（特許文献3の段落[0145] - [0152]および図45、46等参照）。

【0008】

しかし、培養成分を含有する抗腫瘍水溶液を患者の体内に投与することは困難である。培養成分が患者の身体に与える影響を無視できないからである。

【0009】

本明細書の技術は、前述した従来技術が有する問題点を解決するためになされたものである。すなわちその課題とするところは、正常細胞にほとんど影響を与えることなく癌細胞を選択的に死滅させることができるとともに患者の体内に投与することの可能な抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

第1の態様における抗癌剤の製造方法は、第1の水溶液を準備する水溶液準備工程と、第1の水溶液にプラズマを照射して第2の水溶液とするプラズマ照射工程と、を有する。第1の水溶液は、乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する。

【0011】

この抗癌剤の製造方法は、抗腫瘍効果を奏する抗癌剤を製造する方法である。また、この抗癌剤は、リンゲル液であってもよい。そのため、輸液として用いることができる。つまり、この抗癌剤は、患者に静脈注射をするための点滴である。また、患者の臓器等を洗浄することもできる。

10

20

30

40

50

## 【0012】

第2の態様における抗癌剤の製造方法においては、第1の水溶液は、リンゲル液である。

## 【0013】

第3の態様における抗癌剤の製造方法においては、第1の水溶液は、乳酸リンゲル液である。

## 【0014】

第4の態様における抗癌剤の製造方法においては、第1の水溶液は、酢酸リンゲル液である。

## 【0015】

第5の態様における抗癌剤の製造方法においては、第1の水溶液は、重炭酸リンゲル液である。

## 【0016】

第6の態様における抗癌剤の製造方法においては、第1の水溶液は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する。

## 【0017】

第7の態様における抗癌剤の製造方法は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、のうちの少なくとも一つを第2の水溶液に添加して第3の水溶液とする成分添加工程を有する。

## 【0018】

第8の態様における抗癌剤の製造方法は、第2の水溶液もしくは第3の水溶液を冷凍する冷凍工程を有する。第2の水溶液もしくは第3の水溶液は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、を含有する。

## 【0019】

第9の態様における抗癌剤の製造方法においては、冷凍工程では、第2の水溶液もしくは第3の水溶液を -19.6 以上 0 以下の範囲内で冷凍する。

## 【0020】

第10の態様における抗癌剤の製造方法においては、プラズマ照射工程では、筒形状部を備える第1電極を第1の水溶液の外に配置するとともに第2電極を第1の水溶液の中に配置する。そして、第1電極の筒形状部から第1の水溶液に向かってガスを照射し、その状態で第1電極と第2電極との間に電圧を印加する。

## 【0021】

第11の態様における輸液の製造方法は、第1の水溶液を準備する水溶液準備工程と、第1の水溶液にプラズマを照射して第2の水溶液とするプラズマ照射工程と、を有する。第1の水溶液は、乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する。

## 【0022】

第12の態様における抗癌剤は、リンゲル液にプラズマを照射して製造されたものである。

## 【0023】

第13の態様における輸液は、リンゲル液にプラズマを照射して製造されたものである。

## 【0024】

第14の態様における抗癌物質は、 $\text{CH}_3\text{CO}$ または $\text{CH}_3\text{COCOO}$ を有する。そして、この抗癌物質は、癌細胞を選択的に死滅させる。

## 【発明の効果】

## 【0025】

本明細書では、正常細胞にほとんど影響を与えることなく癌細胞を選択的に死滅させる

10

20

30

40

50

ことができるとともに患者の体内に投与することの可能な抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質が提供されている。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】実施形態のプラズマ発生装置のガス噴出口を走査するロボットアームの構成を説明するための概念図である。

【図2】図2．Aは第1のプラズマ発生装置の構成を示す断面図であり、図2．Bは電極の形状を示す図である。

【図3】図3．Aは第2のプラズマ発生装置の構成を示す断面図であり、図3．Bはプラズマ領域の長手方向に垂直な断面における部分断面図である。

10

【図4】実施形態における第3のプラズマ発生装置の概略構成を示す図である。

【図5】実施形態における第3のプラズマ発生装置の上部構造を示す概略構成図である。

【図6】実施形態における第3のプラズマ発生装置の下部構造を示す概略構成図である。

【図7】実施形態において第3のプラズマ発生装置がプラズマを照射している場合を説明するための図である。

【図8】実験Aにおいて第2のプラズマ発生装置を用いて5000個のU251SP細胞に対して抗癌剤を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

【図9】実験Aにおいて第2のプラズマ発生装置を用いて10000個のU251SP細胞に対して抗癌剤を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

【図10】実験Aにおいて第3のプラズマ発生装置を用いて5000個のU251SP細胞に対して抗癌剤を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

20

【図11】実験Aにおいて第3のプラズマ発生装置を用いて10000個のU251SP細胞に対して抗癌剤を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

【図12】実験Bにおいて10000個のU251SP細胞に対して種々のサンプル水溶液を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

【図13】実験CにおいてU251SP細胞に対して冷凍工程および解凍工程を経た抗癌剤を供給した場合の生存細胞数の割合を示すグラフである。

【図14】実験Dにおいて抗癌剤の選択性を示すグラフである。

【図15】実験Eにおいて実験方法を説明するための図である。

【図16】実験Eにおいて摘出した皮下腫瘍を示す写真である。

30

【図17】実験Eにおいて皮下腫瘍の体積の時間変化を示すグラフである。

【図18】実験Eにおいてヌードマウスの体重変化を示すグラフである。

【図19】実験Eにおいて摘出した皮下腫瘍の体積および重量を示すグラフである。

【図20】実験Fの実験手順を示す図である。

【図21】実験Fにおいて乳酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液でSKOV3を処理した場合のSKOV3の生存率を示すグラフである。

【図22】実験Fにおいて酢酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液でSKOV3を処理した場合のSKOV3の生存率を示すグラフである。

【図23】実験Fにおいて重炭酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液でSKOV3を処理した場合のSKOV3の生存率を示すグラフである。

40

【図24】実験GにおいてNMRにより<sup>1</sup>Hを観測した結果を示すグラフである。

【図25】図24を拡大したグラフである。

【図26】実験GにおいてNMRにより<sup>13</sup>Cを観測した結果を示すグラフである。

【図27】図26を拡大したグラフである。

【図28】実験Hにおいてサンプル水溶液の抗腫瘍効果を調べた実験結果を示すグラフ(その1)である。

【図29】実験Hにおいてサンプル水溶液の抗腫瘍効果を調べた実験結果を示すグラフ(その2)である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

50

以下、具体的な実施形態について、抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質を例に挙げて図を参照しつつ説明する。

【0028】

(第1の実施形態)

第1の実施形態について説明する。

【0029】

1. 抗癌剤製造装置

1-1. 抗癌剤製造装置の構成

本実施形態の抗癌剤製造装置PMは、図1に示すように、プラズマ照射部P1と、アーム口ポットM1とを有している。プラズマ照射装置P1は、プラズマを発生させるとともに、そのプラズマを溶液に向けて照射するためのものである。

10

【0030】

アーム口ポットM1は、図1に示すように、プラズマ照射装置P1の位置をx軸、y軸、z軸方向のそれぞれの方向に移動させることができるようになっている。なお、説明の便宜上、プラズマを照射する向きを-z軸方向としている。これにより、溶液の液面と、プラズマ照射部P1との間の距離を調整することができる。また、この抗癌剤製造装置PMは、予めプラズマ照射時間を設定することにより、その時間だけプラズマを照射することができるものである。

【0031】

プラズマ照射装置P1には、後述するように、3種類の方式(第1のプラズマ発生装置P10および第2のプラズマ発生装置P20および第3のプラズマ発生装置P30)がある。そして、いずれの方式を用いてもよい。なお、第3のプラズマ発生装置P30は、図1のように、口ポットアームM1等を有していない。

20

【0032】

1-2. 第1のプラズマ発生装置

図2.Aはプラズマ発生装置P10の概略構成を示す断面図である。ここで、プラズマ発生装置P10は、プラズマを点状に噴出する第1のプラズマ発生装置である。図2.Bは、図2.Aのプラズマ発生装置P10の電極2a、2bの形状の詳細を示す図である。

【0033】

プラズマ発生装置P10は、筐体部10と、電極2a、2bと、電圧印加部3と、を有している。筐体部10は、アルミナ( $Al_2O_3$ )を原料とする焼結体から成るものである。そして、筐体部10の形状は、筒形状である。筐体部10の内径は2mm以上3mm以下である。筐体部10の厚みは0.2mm以上0.3mm以下である。筐体部10の長さは10cm以上30cm以下である。筐体部10の両端には、ガス導入口10iと、ガス噴出口10oとが形成されている。ガス導入口10iは、プラズマを発生させるためのガスを導入するためのものである。ガス噴出口10oは、プラズマを筐体部10の外部に照射するための照射部である。なお、ガスの移動する向きは、図中の矢印の向きである。

30

【0034】

電極2a、2bは、対向して配置されている対向電極対である。電極2a、2bの対向面方向の長さは、筐体部10の内径より小さい。例えば1mm程度である。電極2a、2bには、図2.Bに示すように、対向面のそれぞれに凹部(ホロー)Hが多数形成されている。そのため、電極2a、2bの対向面は、微細な凹凸形状となっている。なお、この凹部Hの深さは、0.5mm程度である。

40

【0035】

電極2aは、筐体部10の内部であってガス導入口10iの近傍に配置されている。電極2bは、筐体部10の内部であってガス噴出口10oの近傍に配置されている。そのため、プラズマ発生装置P10では、電極2aの対向面の反対側からガスを導入するとともに、電極2bの対向面の反対側にガスを噴出するようになっている。そして、電極2a、2b間の距離は、24cmである。電極2a、2b間の距離は、これより小さい距離であってもよい。

50

## 【 0 0 3 6 】

電圧印加部 3 は、電極 2 a、2 b 間に交流電圧を印加するためのものである。電圧印加部 3 は、商用交流電圧である、60 Hz、100 V を用いて 9 kV に昇圧するとともに、電極 2 a、2 b 間に電圧を印加する。

## 【 0 0 3 7 】

ガス導入口 10 i からアルゴンを導入するとともに、電圧印加部 3 により、電極 2 a、2 b 間に電圧を印加すると、筐体部 10 の内部にプラズマが発生する。図 2 . A の斜線で示すように、プラズマが発生する領域をプラズマ発生領域 P とする。プラズマ発生領域 P は、筐体部 10 に覆われている。

## 【 0 0 3 8 】

## 1 - 3 . 第 2 のプラズマ発生装置

図 3 . A はプラズマ発生装置 P 20 の概略構成を示す断面図である。ここで、プラズマ発生装置 P 20 は、プラズマを線状に噴出する第 2 のプラズマ発生装置である。図 3 . B は、図 3 . A のプラズマ発生装置 P 20 のプラズマ領域 P の長手方向に垂直な断面における部分断面図である。

## 【 0 0 3 9 】

プラズマ発生装置 P 20 は、筐体部 11 と、電極 2 a、2 b と、電圧印加部 3 と、を有している。筐体部 11 は、アルミナ ( $Al_2O_3$ ) を原料とする焼結体から成るものである。筐体部 11 の両端には、ガス導入口 11 i と、多数のガス噴出口 11 o とが形成されている。ガス導入口 11 i は、図 3 . A の左右方向を長手方向とするスリット形状をしている。ガス導入口 11 i からプラズマ領域 P の直上までのスリット幅 (図 3 . B の左右方向の幅) は 1 mm である。

## 【 0 0 4 0 】

ガス噴出口 11 o は、プラズマを筐体部 11 の外部に照射するための照射部である。ガス噴出口 11 o は、円筒形状もしくはスリット形状である。円筒形状の場合のガス噴出口 11 o は、プラズマ領域の長手方向に沿って一直線状に形成されている。ガス噴出口 11 o の内径は 1 mm 以上 2 mm 以下の範囲内である。また、スリット形状の場合には、ガス噴出口 11 o のスリット幅を 1 mm 以下とすることが好ましい。これにより、安定したプラズマが形成される。また、ガス導入口 11 i は、電極 2 a と電極 2 b とを結ぶ線と交差する向きにガスを導入するようになっている。

## 【 0 0 4 1 】

電極 2 a、2 b および電圧印加部 3 については、図 1 に示したプラズマ発生装置 P 10 と同じものである。そして、同様に、商用交流電圧を用いて、電極 2 a、2 b 間に電圧を印加する。これにより、プラズマを一直線状に噴出することができる。

## 【 0 0 4 2 】

また、この一直線状にプラズマを噴出するプラズマ発生装置 P 20 を図 3 . B の左右方向に列状に並べて配置すれば、プラズマをある長方形の領域にわたって平面的に噴出することができる。

## 【 0 0 4 3 】

## 1 - 4 . 第 3 のプラズマ発生装置

図 4 は、第 3 のプラズマ発生装置 P 30 の概略構成を示す概念図である。プラズマ発生装置 P 30 は、収容している溶液にプラズマを照射するためのものである。

## 【 0 0 4 4 】

図 4 に示すように、プラズマ発生装置 P 30 は、第 1 電極 110 と、第 2 電極 210 と、第 1 の電位付与部 120 と、第 2 の電位付与部 220 と、第 1 のリード線 130 と、第 2 のリード線 230 と、ガス供給部 140 と、ガス管結合コネクタ 150 と、ガス管 160 と、第 1 電極保護部材 170 と、第 2 電極保護部材 240 と、第 1 電極支持部材 180 と、密閉部材 191 と、結合部材 192 と、容器 250 と、封止部材 260 と、架台 270 と、を有している。

## 【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50



#### 1 - 4 - 1 . 電極の概略構成

第1電極110は、筒形状部110aを有している。そして、その筒形状部110aの内部にプラズマガスを供給することができるようになっている。つまり、第1電極110の内部は、ガス供給部140と連通している。第1電極110は、筒形状部110aから第2電極210に向けてガスを吹き出すようになっている。そして、第1電極110の先端部は、注射針形状をしている。つまり、第1電極110の先端部は、第1電極110の軸方向に垂直な方向に対して傾斜する傾斜面を有している。そして、第1電極110の先端部には、マイクロホローが形成されている。

##### 【0046】

第2電極210は、第1電極110と対向する電極である。第2電極210は、棒状電極である。第2電極210は、円柱形状である。もしくは、多角柱形状であってもよい。もしくは、先端の尖った針形状であってもよい。ここで、第2電極210は、先端部211を有している。第2電極210の先端部211は、イリジウムを含有するイリジウム合金でできている。例えば、イリジウムと白金との合金である。または、イリジウムと白金とオスミウムとの合金である。イリジウム合金は、硬度が高く、耐熱性に優れている。そのため、イリジウム合金は、第2電極210に好適である。また、イリジウムの代わりに、白金を用いてもよい。もしくは、パラジウムであってもよい。または、イリジウムと白金とパラジウムとのうちの少なくとも一種以上を含む金属もしくは合金であるとよい。また、放電時には、第2電極210は、容器250に収容されている溶液に浸かっている。

10

20

##### 【0047】

第1の電位付与部120は、第1電極110に周期的に変化する電位を付与するためのものである。第2の電位付与部220は、第2電極210に周期的に変化する電位を付与するためのものである。ここで、第1の電位付与部120と第2の電位付与部220とのうちのどちらか一方は、接地されていてもよい。第1のリード線130は、第1電極110と第1の電位付与部120とを電気的に接続するためのものである。第1のリード線130は、ニッケル合金もしくはステンレスであるとよい。第2のリード線230は、第2電極210と第2の電位付与部220とを電気的に接続するためのものである。第2のリード線230は、ニッケル合金もしくはステンレスであるとよい。これにより、第1電極110と第2電極210との間に高周波の電圧が印加されることとなる。つまり、第1の電位付与部120および第2の電位付与部220は、第1電極110と第2電極210との間に電圧を印加するための電圧印加部である。

30

##### 【0048】

#### 1 - 4 - 2 . ガス供給経路

プラズマ発生装置P30は、前述したように、ガス供給部140と、ガス管結合コネクタ150と、ガス管160と、を有している。そのため、ガス供給部140は、ガス管160およびガス管結合コネクタ150を介して、第1電極110の筒形状部の内部にプラズマガスを供給する。ここで、ガス供給部140は、例えば、Arガスを供給する。もしくは、その他の希ガスを供給してもよい。もしくは、酸素ガス等その他のガスを微量含んでいてもよい。そのため、プラズマガスは、第1電極110から容器250に収容されている溶液に向けて吹き付けられることとなる。

40

##### 【0049】

#### 1 - 4 - 3 . 上部構造の構成

図5は、プラズマ発生装置P30の上部構造を示す図である。図5に示すように、第1電極110は、先端部111を有している。先端部111は、図4に示すように、第2電極210に対面する位置に配置されている。第1電極110の先端部111は、傾斜面111aを有している。傾斜面111aは、第1電極110の軸方向に垂直な面に対して傾斜している面である。また、先端部111には、マイクロホロー111bが形成されている。マイクロホロー111bは、長さ0.5mm以上1mm以下、幅0.3mm以上0.5mm以下の微小な凹部である。

50

## 【 0 0 5 0 】

また、前述したように、プラズマ発生装置 P 3 0 は、密閉部材 1 9 1 と、結合部材 1 9 2 と、を有している。密閉部材 1 9 1 は、図 4 に示す容器 2 5 0 に取り付けるとともに容器 2 5 0 の内部を密閉するためのものである。結合部材 1 9 2 は、第 1 電極 1 1 0 とガス管結合コネクタ 1 5 0 とを、密閉部材 1 9 1 等を介して連結するための部材である。

## 【 0 0 5 1 】

## 1 - 4 - 4 . 下部構造の構成

図 6 は、プラズマ発生装置 P 3 0 の下部構造を示す図である。前述したように、プラズマ発生装置 P 3 0 は、容器 2 5 0 と、封止部材 2 6 0 と、架台 2 7 0 と、を有している。容器 2 5 0 は、内部に溶液を収容することができるようになっている。ここで、溶液とは、培養液等の水溶液、その他の水溶液や有機溶剤をも含むこととする。また、容器 2 5 0 は、第 1 電極 1 1 0 および第 2 電極 2 1 0 を内部に収容している。また、容器 2 5 0 は、目盛を有しているとよい。容器 2 5 0 の内部に収容されている溶液の量を計量するためである。

## 【 0 0 5 2 】

封止部材 2 6 0 は、第 2 電極保護部材 2 4 0 と、容器 2 5 0 との間の隙間を塞ぐためのものである。封止部材 2 6 0 として、例えば、オーリングが挙げられる。容器 2 5 0 の密閉性を確保し、溶液が容器 2 5 0 の底部に漏れ出すのを防止するものであれば、これ以外の部材を適用してもよい。架台 2 7 0 は、容器 2 5 0 その他の各部材を支持するためのものである。

## 【 0 0 5 3 】

## 2 . プラズマ発生装置により発生されるプラズマ

## 2 - 1 . 第 1 のプラズマ発生装置および第 2 のプラズマ発生装置

プラズマ発生装置 P 1 0 、 P 2 0 により発生されるプラズマは、非平衡大気圧プラズマである。ここで、大気圧プラズマとは、0 . 5 気圧以上 2 . 0 気圧以下の範囲内の圧力であるプラズマをいう。

## 【 0 0 5 4 】

本実施の形態では、プラズマ発生ガスとして、主に Ar ガスを用いる。プラズマ発生装置 P 1 0 、 P 2 0 により発生されるプラズマの内部では、もちろん、電子と、Ar イオンとが生成されている。そして、Ar イオンは、紫外線を発生する。また、このプラズマは大気中に放出されているため、酸素ラジカルや窒素ラジカル等を発生させる。

## 【 0 0 5 5 】

このプラズマのプラズマ密度は、 $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  以上  $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$  以下の範囲内である。なお、誘電体バリア放電により発生されるプラズマにおけるプラズマ密度は、 $1 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3} \sim 1 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  程度である。したがって、プラズマ発生装置 P 1 0 、 P 2 0 により発生されるプラズマのプラズマ密度は、誘電体バリア放電により発生されるプラズマのプラズマ密度に比べて、3 桁程度大きい。したがって、このプラズマの内部では、より多くの Ar イオンが生成する。そのため、ラジカルや、紫外線の発生量も多い。なお、このプラズマ密度は、プラズマ内部の電子密度にほぼ等しい。

## 【 0 0 5 6 】

そして、このプラズマ発生時におけるプラズマ温度は、およそ 1 0 0 0 K 以上 2 5 0 0 K 以下の範囲内である。また、このプラズマにおける電子温度は、ガスの温度に比べて大きい。しかも、電子の密度が  $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  以上  $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$  以下の範囲内の程度であるにもかかわらず、ガスの温度はおよそ 1 0 0 0 K 以上 2 5 0 0 K 以下の範囲内である。このプラズマの温度は、プラズマの発生しているプラズマ領域 P での温度である。したがって、プラズマの条件や、ガス噴出口から液面までの距離を異なる条件とすることにより、液面の位置でのプラズマ温度を室温程度とすることができる。

## 【 0 0 5 7 】

また、三重項酸素原子の密度（ラジカル密度）は、 $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  以上  $1 . 6 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$  以下の範囲内である。アルゴンガスに対して混入する酸素ガスの量を調整するこ

10

20

30

40

50

とにより、この三重項酸素原子の密度を調整することができる。

【 0 0 5 8 】

## 2 - 2 . 第 3 の プラズマ 発生 装置

図 7 は、プラズマ発生装置 P 3 0 がプラズマを発生させている様子を模式的に示す図である。プラズマ発生装置 P 3 0 により発生されるプラズマは、非平衡大気圧プラズマである。

【 0 0 5 9 】

図 7 に示すように、ガス供給部 1 4 0 から供給されるプラズマガスは、第 1 電極 1 1 0 から矢印 K 1 の向きに放出される。そして、第 1 電極 1 1 0 と第 2 電極 2 1 0 との間に高周波の電圧を印加すると、第 1 電極 1 1 0 と第 2 電極 2 1 0 との間にプラズマ発生領域 P G 1 が形成される。図 7 のプラズマ発生領域 P G 1 は、概念的に描かれている。

10

【 0 0 6 0 】

第 1 の電位付与部 1 2 0 および第 2 の電位付与部 2 2 0 が、第 1 電極 1 1 0 と第 2 電極 2 1 0 との間に電圧を印加する電圧印加時には、第 2 電極 2 1 0 は、液体の内部に配置されている。このように、第 1 電極 1 1 0 と第 2 電極 2 1 0 との間には、容器 2 5 0 に収容されている液体と大気とがある。そして、第 1 電極と第 2 電極とを結ぶ線が、液体の液面 L L 1 と交差している。

【 0 0 6 1 】

そのため、液体の液面 L L 1 と第 1 電極 1 1 0 との間にプラズマが発生する。このとき、液体の液面 L L 1 は、第 1 電極 1 1 0 から矢印 K 1 の向きに放出されるプラズマガスの風圧を受けて、液体の側に向かって凹んでいる。そして、液体の内部では溶液が部分的に電気分解し、気化する。その気化したガスの内部でもプラズマが発生する。また、プラズマ発生領域 P G 1 は、液体の液面 L L 1 に接触している。

20

【 0 0 6 2 】

以上により、大気もしくは水に由来するラジカルが発生する。そして、溶液にラジカルが照射されることとなる。これにより、ラジカルは、水分子もしくは溶液中の溶質と反応する。

【 0 0 6 3 】

## 3 . 抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) の効果

本実施形態の抗腫瘍水溶液は、L - 乳酸ナトリウムを含有する水溶液にプラズマを照射したものである。この抗腫瘍水溶液は、後述するように、抗腫瘍効果を有する。つまり、この抗腫瘍水溶液に浸した癌細胞は死滅するが、正常細胞はほとんど死滅しない。そのため、本実施形態の抗腫瘍水溶液を抗癌剤として利用することができる。

30

【 0 0 6 4 】

## 4 . 抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) を用いた治療方法

### 4 - 1 . 想定される治療方法

本実施形態の抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) を用いた治療方法として以下の方法を想定している。腫瘍性病変 ( 良性、悪性を問わない ) および腫瘍性病変に関する病態 ( 転移や播種など ) に対し、抗癌剤を直接または間接的に投与する。ここでいう投与とは、臓器、組織、細胞に抗癌剤を直接または間接的に接触させることあるいは影響を及ぼすすべての行為をいうものとする。つまり、投与とは、例えば、噴霧、暴露である。間接的に投与する場合として、例えば、布や脱脂綿等に含ませて腫瘍性病変に接触させる場合が挙げられる。

40

【 0 0 6 5 】

### 4 - 2 . 具体例

例えば、消化器、肝胆道、血管またはそれらに関連する臓器または組織あるいは細胞から発生した腫瘍性病変に対し、抗癌剤を直接または間接的に投与する。または、脳腫瘍や癌にみられる播種 ( 髄腔内、胸腔または腹腔内播種など ) に対し、抗癌剤を髄腔内、胸腔または腹腔内に投与する。

【 0 0 6 6 】

## 5 . 抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) の製造方法

50

## 5 - 1 . 水溶液準備工程

まず、第1の水溶液を準備する。第1の水溶液とは、プラズマを照射する前の水溶液のことをいう。第1の水溶液は、乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する。また、第1の水溶液は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムとのうちの少なくとも一つを含有するものであってもよい。そして、第1の水溶液は、リンゲル液であるとよい。リンゲル液は、乳酸リンゲル液と、酢酸リンゲル液と、重炭酸リンゲル液と、を含む。

【0067】

10

## 5 - 2 . プラズマ照射工程

## 5 - 2 - 1 . 第1のプラズマ発生装置および第2のプラズマ発生装置

次に、抗癌剤製造装置PMによりプラズマ発生領域に発生させた非平衡大気圧プラズマを第1の水溶液に照射する。プラズマを照射する際における液面とプラズマ噴出口との間の距離は、例えば、1cmである。また、この距離は、1mm以上3cm以下の範囲内で変えてもよい。このプラズマのプラズマ密度は、 $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。そして、このプラズマにおけるプラズマ温度は、およそ1000K以上2500K以下の範囲内である。ただし、このプラズマ温度は、液面では、室温程度(300K程度)まで下げることができる。また、酸素ラジカル密度は、 $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上 $1.6 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ 以下の範囲内である。これらのプラズマ条件を表1に示す。これらの条件は、あくまで一例である。

20

【0068】

[表1]

条件	数値範囲	
液面 - 噴出口距離	1 mm 以上	3 cm 以下
プラズマ密度	$1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ 以上	$1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ 以下
プラズマ温度	1000 K 以上	2500 K 以下

【0069】

なお、抗腫瘍効果を有する抗癌剤を製造するためには、プラズマ密度時間積を、次の条件を満たすようにするとよい。

30

$$1.2 \times 10^{18} \text{ sec} \cdot \text{cm}^{-3} \text{ 以上}$$

ここで、プラズマ密度時間積とは、プラズマ発生領域におけるプラズマ密度と、大気圧プラズマをこの水溶液に照射した時間(照射時間)との積である。

【0070】

## 5 - 2 - 2 . 第3のプラズマ発生装置

プラズマ発生装置P10、P20の代わりに、プラズマ発生装置P30によりプラズマ発生領域に発生させた大気圧プラズマを第1の水溶液に照射してもよい。第1電極110を第1の水溶液の外に配置するとともに第2電極210を第1の水溶液の中に配置する。そして、第1電極110の筒形状部110aから第1の水溶液に向かってガスを照射する。そして、その状態で第1電極110と第2電極210との間に電圧を印加する。

40

【0071】

このように、第1の水溶液にプラズマを照射することにより、第1の水溶液を第2の水溶液にする。この第2の水溶液は、抗腫瘍効果を備える抗癌剤である。

【0072】

## 5 - 3 . 成分添加工程

次に、第2の水溶液に塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムとのうちの少なくとも一つを添加して第3の水溶液とする。

【0073】

## 6 . 変形例

## 6 - 1 . 成分添加工程

50

成分添加工程については、必ずしも実施しなくともよい場合がある。

【0074】

#### 6 - 2 . 第 1 電極

本実施形態のプラズマ発生装置 P 3 0 では、第 1 電極 1 1 0 の筒形状部 1 1 0 a は、円筒形状である。しかし、円筒形状に限らない。筒形状であれば、多角形状であってもよい。

【0075】

#### 7 . 本実施形態のまとめ

以上詳細に説明したように、本実施形態の抗癌剤は、乳酸と、乳酸ナトリウムと、乳酸カリウムと、乳酸カルシウムと、酢酸と、酢酸ナトリウムと、酢酸カリウムと、酢酸カルシウムと、クエン酸と、クエン酸ナトリウムと、クエン酸カリウムと、クエン酸カルシウムと、炭酸水素カリウムと、炭酸水素カルシウムと、のうちの少なくとも一つを含有する第 1 の水溶液にプラズマを照射したものである。この抗癌剤は、癌細胞を好適に死滅させる。また、第 1 の水溶液は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、を含むリンゲル液である。そして、プラズマ照射後の第 2 の水溶液は、正常細胞にほとんど影響を与えない。そのため、患者の体内に投与しても、患者の身体にほとんど負荷を与えない。そのため、多様な投与方法がある。

10

【0076】

#### ( 第 2 の実施形態 )

第 2 の実施形態について説明する。第 2 の実施形態では、抗癌剤の製造方法が第 1 の実施形態と異なっている。そのため、抗癌剤の製造方法についてのみ説明する。

20

【0077】

#### 1 . 抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) の製造方法

本実施形態の抗癌剤の製造方法は、水溶液準備工程と、プラズマ照射工程と、冷凍工程と、を有する。水溶液準備工程およびプラズマ工程は、第 1 の実施形態と同様である。そのため、冷凍工程について説明する。

【0078】

#### 1 - 1 . 冷凍工程

この冷凍工程は、プラズマを照射した後の第 2 の水溶液もしくは第 3 の水溶液に対して実施する。この第 2 の水溶液もしくは第 3 の水溶液は、抗癌剤である。この工程では、第 2 の水溶液もしくは第 3 の水溶液を冷凍する。そのために、第 2 の水溶液もしくは第 3 の水溶液を - 1 9 6 以上 0 以下で冷凍する。具体的には、冷凍庫に保存する。冷凍庫として、例えば、生物実験用冷蔵庫 ( 例えば、日本フリーザー株式会社製のバイオフリーザー G S - 5 2 0 3 K H C ) を用いることができる。

30

【0079】

この冷凍庫で冷凍した第 2 の水溶液の温度もしくは第 3 の水溶液の温度は、 - 2 8 以上 - 1 4 以下の範囲内である。また、第 2 の水溶液の温度もしくは第 3 の水溶液の温度は、この範囲に限らない。通常、冷凍温度であればよい。例えば、 - 1 9 6 以上 0 以下の範囲内である。好ましくは、 - 1 9 6 以上 - 1 0 ° 以下である。より好ましくは、 - 1 5 0 以上 - 2 0 以下である。さらに好ましくは、 - 8 0 以上 3 0 以下である。このように、冷凍工程では、第 2 の水溶液もしくは第 3 の水溶液を冷凍することにより、冷凍状態の第 4 の水溶液を作製する。

40

【0080】

#### 2 . 冷凍した抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) における抗腫瘍効果の持続時間

##### 2 - 1 . 第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) の抗腫瘍効果

第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) の抗腫瘍効果について説明する。冷凍前の第 2 の水溶液は、抗腫瘍効果を奏する。特許文献 3 に記載の抗癌剤の抗腫瘍効果の持続時間は、8 時間以上 1 8 時間未満であった ( 特許文献 3 参照 ) 。第 1 の実施形態の抗癌剤における抗腫瘍効果の持続時間も同程度と推測できる。

【0081】

50

## 2 - 2 . 第 4 の水溶液 ( 冷凍後 ) の抗腫瘍効果

一方、本実施形態の製造方法で製造された抗癌剤、すなわち冷凍状態の第 3 の水溶液では、抗腫瘍効果を保持し続ける。実際、冷凍保冷期間が 28 日以上 of 抗癌剤は、解凍後に抗腫瘍効果を発揮する。つまり、抗癌剤は、長期間にわたって冷凍保存することができる。そして、この抗癌剤の冷凍および解凍によって、抗腫瘍効果が失われることはほとんどない。これについては後述する。

【 0 0 8 2 】

## 2 - 3 . 第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) の抗腫瘍効果についての考察

冷凍前の抗癌剤は、何らかの抗腫瘍物質を含んでいると考えられる。この抗腫瘍物質は、特許文献 2 で挙げられているような、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロペルオキシラジカル等のラジカルではないと考えられる。その理由として、( 1 ) 殺菌効果と抗腫瘍効果とは効果そのものが異なること、( 2 ) 効果の持続時間が異なること、( 3 ) 効果と pH 依存性との関連性が異なっていること、の 3 つが挙げられる。

10

【 0 0 8 3 】

まず、一つ目の殺菌効果と抗腫瘍効果との違いは言うまでもない。また、本実施形態の抗癌剤は、選択性を有している。この抗癌剤は、正常細胞にはほとんど影響はないが、癌細胞を選択的に死滅させる。これは、全ての細胞に対して過酷な生存環境をもたらすのではなく、癌細胞という標的に絞って選択的に死滅させることを意味している。

【 0 0 8 4 】

次に、持続時間について説明する。特許文献 2 では、例えば、スーパーオキシドアニオンラジカルは、水中でも数秒間存在できるとの記載がある ( 特許文献 2 の段落 [ 0 0 9 0 ] - [ 0 0 9 3 ] 等参照 ) 。それに対して、第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) は、少なくとも 8 時間以上抗腫瘍効果が持続すると考えられる。

20

【 0 0 8 5 】

## 3 . 変形例

第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) および第 3 の水溶液 ( 冷凍前 ) の原材料は、リンゲル液であるとよい。つまり、第 2 の水溶液 ( 冷凍前 ) および第 3 の水溶液 ( 冷凍前 ) は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、を含有するとよい。

【 実施例 】

30

【 0 0 8 6 】

### 1 . 実験 A ( 抗癌剤における抗腫瘍効果 )

本実験は、第 2 のプラズマ発生装置 P 2 0 および第 3 のプラズマ発生装置 P 3 0 を用いて製造された抗癌剤について行った実験である。

【 0 0 8 7 】

#### 1 - 1 . 用いた癌細胞

本実験では、癌細胞としてグリオーマを用いた。グリオーマは、神経膠細胞 ( グリア細胞 ) に発生する神経膠腫である。すなわち、脳腫瘍の一種である。グリオーマとして、具体的には、U 2 5 1 S P を用いた。

【 0 0 8 8 】

40

#### 1 - 2 . 実験方法

##### 1 - 2 - 1 . 癌細胞の培養

上記の癌細胞を、96 ウェルプレートに培養して癌細胞培養地を作製した。用いた培養液は、DMEM と血清 ( FBS ) と抗生物質 ( ペニシリン・ストレプトマイシン ) とを混合した溶液である。1 ウェル当たり播種した細胞数は 5 0 0 0 個および 1 0 0 0 0 個であった。また、1 ウェル当たり供給した培養液の容積は 0 . 2 mL であった。癌細胞を培養する培養期間は 2 4 時間であった。

【 0 0 8 9 】

ここで、DMEM が含有する培養成分は、塩化カルシウム、硝酸第二鉄・9 H<sub>2</sub> O、硫酸マグネシウム ( 無水 )、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸

50

ーナトリウム（無水）、L-アルギニン・HCl、L-シスチン・2HCl、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン・HCl・H<sub>2</sub>O、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン・2Na・2H<sub>2</sub>O、L-バリン、塩化コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、D-パントテン酸、ピリドキシン・HCl、リボフラビン、チアミン・HCl、D-グルコース、フェノールレッド・Naである。

#### 【0090】

##### 1-2-2. 抗癌剤（抗腫瘍水溶液）の作製

癌細胞培養地を用意するのとは別に、抗癌剤（抗腫瘍水溶液）を作製した。抗癌剤は、ラクテック（登録商標）と同じ成分の水溶液にプラズマを照射した溶液（PAL: Plasma Activated Lactec（Lactecは登録商標））である。ラクテック（登録商標）は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、L-乳酸ナトリウムと、を含有する。塩化ナトリウムの濃度は、6.0g/Lである。塩化カリウムの濃度は、0.3g/Lである。塩化カルシウム水和物の濃度は、0.2g/Lである。L-乳酸ナトリウムの濃度は、3.1g/Lである。

10

#### 【0091】

プラズマの照射時間は、5分であった。ガスの種類としてアルゴンガスを用いた。プラズマ発生装置P20では、プラズマ発生領域と溶液1との間の距離は、2mmであった。プラズマ発生装置P30では、第1電極110と溶液1の液面との間の距離は、6mmであった。

20

#### 【0092】

##### 1-2-3. 癌細胞培養地への抗癌剤（抗腫瘍水溶液）の供給

次に、癌細胞を培養した96ウェルプレートの培養液をサンプル水溶液と交換した。癌細胞がサンプル水溶液に浸かっている時間は、24時間であった。そして、その後、サンプル水溶液を通常の培養液に交換した。その後、MTSアッセイにより、生存している細胞数の割合を調べた。

#### 【0093】

##### 1-3. 実験結果

図8は、第2のプラズマ発生装置P20を用いて5000個の細胞に抗癌剤を供給した場合を示す。図8の縦軸は、生存細胞数の割合である。ここで、「Untreated」は、プラズマを照射しなかった場合を示している。そして、このプラズマを照射しなかった場合を100%として基準にした。

30

#### 【0094】

図8に示すように、抗癌剤は、強い抗腫瘍効果を示した。抗癌剤を4倍に薄めたもの、16倍に薄めたもの、64倍に薄めたもののそれぞれについて、抗腫瘍効果を示した。しかし、抗癌剤を256倍に薄めたものについては、抗腫瘍効果を示さなかった。

#### 【0095】

図9は、第2のプラズマ発生装置P20を用いて10000個の細胞に抗癌剤を供給した場合を示す。図9の縦軸は、生存細胞数の割合である。ここで、「Untreated」は、プラズマを照射しなかった場合を示している。そして、このプラズマを照射しなかった場合を100%として基準にした。

40

#### 【0096】

図9に示すように、抗癌剤は、強い抗腫瘍効果を示した。抗癌剤を4倍に薄めたもの、16倍に薄めたもののそれぞれについて、抗腫瘍効果を示した。しかし、抗癌剤を64倍に薄めたもの、256倍に薄めたものについては、抗腫瘍効果を示さなかった。

#### 【0097】

図10は、第3のプラズマ発生装置P30を用いて5000個の細胞に抗癌剤を供給した場合を示す。図10の縦軸は、生存細胞数の割合である。ここで、「Untreated」は、プラズマを照射しなかった場合を示している。そして、このプラズマを照射しな

50

かった場合を100%として基準にした。

【0098】

図10に示すように、抗癌剤は、強い抗腫瘍効果を示した。抗癌剤を4倍に薄めたもの、16倍に薄めたもの、64倍に薄めたもののそれぞれについて、抗腫瘍効果を示した。しかし、抗癌剤を256倍に薄めたものについては、抗腫瘍効果を示さなかった。

【0099】

図11は、第3のプラズマ発生装置P30を用いて10000個の細胞に抗癌剤を供給した場合を示す。図11の縦軸は、生存細胞数の割合である。ここで、「Untreated」は、プラズマを照射しなかった場合を示している。そして、このプラズマを照射しなかった場合を100%として基準にした。

10

【0100】

図11に示すように、抗癌剤は、強い抗腫瘍効果を示した。抗癌剤を4倍に薄めたもの、16倍に薄めたもののそれぞれについて、抗腫瘍効果を示した。しかし、抗癌剤を64倍に薄めたもの、256倍に薄めたものについては、抗腫瘍効果を示さなかった。

【0101】

2. 実験B (抗癌剤の原材料)

本実験は、プラズマ発生装置P20を用いて製造された抗癌剤について行った実験である。

【0102】

2-1. 用いた癌細胞

本実験では、癌細胞としてグリオーマを用いた。グリオーマは、神経膠細胞(グリア細胞)に発生する神経膠腫である。すなわち、脳腫瘍の一種である。グリオーマとして、具体的には、U251SPを用いた。

20

【0103】

2-2. 実験方法

2-2-1. 癌細胞の培養

上記の癌細胞を、96ウェルプレートに培養して癌細胞培養地を作製した。用いた培養液は、DMEMと血清(FBS)と抗生物質(ペニシリン・ストレプトマイシン)とを混合した溶液である。1ウェル当たり播種した細胞数は10000個であった。また、1ウェル当たり供給した培養液の容積は0.2mLであった。癌細胞を培養する培養期間は24時間であった。

30

【0104】

2-2-2. サンプル水溶液の作製

癌細胞培養地を用意するのは別に、サンプル水溶液を作製した。サンプル水溶液は、下記の水溶液にプラズマを照射して作製した。点滴成分として、ラクテック(登録商標)を基準とした。ラクテック(登録商標)は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、L-乳酸ナトリウムと、を含有する。塩化ナトリウムの濃度は、6.0g/Lである。塩化カリウムの濃度は、0.3g/Lである。塩化カルシウム水和物の濃度は、0.2g/Lである。L-乳酸ナトリウムの濃度は、3.1g/Lである。

【0105】

そして、表2に示すように、11種類のサンプル水溶液を作製した。表2に示す例1-11のサンプル水溶液は、いずれもラクテック(登録商標)とほぼ同じ成分を有する。表2に示すように、サンプル水溶液は、溶液1と溶液2とを混合した水溶液である。溶液1は、プラズマを照射した溶液である。溶液2は、プラズマを照射しなかった溶液である。溶液1と溶液2とを混合すると、前述したラクテック(登録商標)とほぼ同じ成分となるようにしてある。つまり、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、L-乳酸ナトリウムと、を溶液1または溶液2のいずれかに混合することとした。

40

【0106】

例えば、表2の例2では、溶液1として、濃度がラクテック(登録商標)の2倍の塩化ナトリウム水溶液を作製した。また、溶液2として、塩化カリウムと、塩化カルシウムと

50



、L-乳酸ナトリウムと、を混合するとともに、濃度をラクテック（登録商標）の2倍とした。これらの溶液1と溶液2とを、仮にプラズマを照射しないで混合すると、ラクテック（登録商標）と同じものが製造される。

## 【0107】

例1のサンプル水溶液は、通常のラクテック（登録商標）と同じものである。例2は、NaCl-GOF（Gain of Function）である。つまり、塩化ナトリウム水溶液にプラズマを照射し、その他の成分を添加したものである。例3は、KCl-GOFである。つまり、塩化カリウム水溶液にプラズマを照射し、その他の成分を添加したものである。例4は、CaCl<sub>2</sub>-GOFである。つまり、塩化カルシウム水溶液にプラズマを照射し、その他の成分を添加したものである。例5は、L-sodium lactate-GOFである。つまり、L-乳酸ナトリウム水溶液にプラズマを照射し、その他の成分を添加したものである。

10

## 【0108】

例6は、NaCl-LOF（Loss of Function）である。つまり、塩化ナトリウムを除く成分を含む水溶液にプラズマを照射し、塩化ナトリウムを添加したものである。例7は、KCl-LOFである。つまり、塩化カリウムを除く成分を含む水溶液にプラズマを照射し、塩化カリウムを添加したものである。例8は、CaCl<sub>2</sub>-LOFである。つまり、塩化カルシウムを除く成分を含む水溶液にプラズマを照射し、塩化カルシウムを添加したものである。例9は、L-sodium lactate-LOFである。つまり、L-乳酸ナトリウムを除く成分を含む水溶液にプラズマを照射し、L-乳酸ナトリウムを添加したものである。

20

## 【0109】

例10は、プラズマ照射ラクテックである。つまり、ラクテック（登録商標）の2倍の水溶液にプラズマを照射し、Milli-Q水で2倍に薄めたものである。例11は、プラズマ照射水である。つまり、Milli-Q水にプラズマを照射し、それにラクテック（登録商標）の2倍の水溶液を混合したものである。

## 【0110】

プラズマの照射時間は、2分であった。ガスの流量は、0.4slmであった。ガスの種類としてアルゴンガスを用いた。プラズマ発生領域と溶液1との間の距離は、13mmであった。

30

## 【0111】

2-2-3. 癌細胞培養地への抗癌剤（抗腫瘍水溶液）の供給

次に、癌細胞を培養した96ウェルプレートの培養液をサンプル水溶液と交換した。癌細胞がサンプル水溶液に浸かっている時間は、24時間であった。そして、その後、サンプル水溶液を通常の培養液に交換した。その後、MTSアッセイにより、生存している細胞数の割合を調べた。

## 【0112】

## 【表2】

	サンプル水溶液	原材料溶液	
		溶液1	溶液2
	溶液 (溶液1+溶液2)	プラズマ照射	プラズマ未照射
例1	Untreated Lactec	N/A	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate
例2	NaCl-GOF	NaCl	KCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate
例3	KCl-GOF	KCl	NaCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate
例4	CaCl <sub>2</sub> -GOF	CaCl <sub>2</sub>	NaCl, KCl, L-sodiumlactate
例5	L-sodiumlactate-GOF	L-sodiumlactate	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub>
例6	NaCl-LOF	KCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate	NaCl
例7	KCl-LOF	NaCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate	KCl
例8	CaCl <sub>2</sub> -LOF	NaCl, KCl, L-sodiumlactate	CaCl <sub>2</sub>
例9	L-sodiumlactate-LOF	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub>	L-sodiumlactate
例10	Plasma treated Lactec	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate	Milli-Q
例11	Treated Water	Milli-Q	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , L-sodiumlactate

40

## 【0113】

50

## 2 - 3 . 実験結果

実験結果を図 1 2 に示す。図 1 2 の縦軸は、生存細胞数の割合である。ここで、例 1 を基準の 1 とした。

### 【 0 1 1 4 】

図 1 2 に示すように、例 5 - 8、例 1 0 のサンプル水溶液は、抗腫瘍効果を示した。例 5 のサンプル水溶液が最も高い抗腫瘍効果を示した。例 5 の生存細胞数の割合は、0 . 1 程度であった。例 1 0 の生存細胞数の割合は、0 . 2 ~ 0 . 3 程度であった。例 6 - 8 の生存細胞数の割合は、0 . 4 ~ 0 . 5 程度であった。

### 【 0 1 1 5 】

例 5 - 8、例 1 0 に共通する事項は、溶液 1 が L - 乳酸ナトリウムを含有していることである。つまり、L - 乳酸ナトリウムを含む第 1 の水溶液にプラズマを照射することにより、抗癌剤が製造されることを示している。また、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムが入っていても、抗腫瘍効果が失われることはほとんどない。そのため、例えば、例 5 の抗癌剤を、患者の体内に投与することが可能である。

### 【 0 1 1 6 】

また、本実験では、L - 乳酸ナトリウムを用いた。しかし、D - 乳酸ナトリウムであっても同様の効果を奏すると考えられる。また、乳酸、乳酸カリウム、乳酸カルシウムであっても同様の効果を奏すると考えられる。

### 【 0 1 1 7 】

## 3 . 実験 C ( 抗癌剤の冷凍)

本実験は、プラズマ発生装置 P 3 0 を用いて製造された抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) について行った実験である。

### 【 0 1 1 8 】

### 3 - 1 . 用いた癌細胞

本実験では、癌細胞としてグリオーマを用いた。グリオーマは、神経膠細胞 ( グリア細胞 ) に発生する神経膠腫である。すなわち、脳腫瘍の一種である。グリオーマとして、具体的には、U 2 5 1 S P を用いた。

### 【 0 1 1 9 】

### 3 - 2 . 実験方法

#### 3 - 2 - 1 . 癌細胞の培養

上記の癌細胞を、9 6 ウェルプレートに培養して癌細胞培養地を作製した。用いた培養液は、D M E M と血清 ( F B S ) と抗生物質 ( ペニシリン・ストレプトマイシン ) とを混合した溶液である。1 ウェル当たりに播種した細胞数は 5 0 0 0 個であった。また、1 ウェル当たりに供給した培養液の容積は 0 . 2 m L であった。癌細胞を培養する培養期間は 2 4 時間であった。

### 【 0 1 2 0 】

#### 3 - 2 - 2 . 抗癌剤 ( 抗腫瘍水溶液 ) の作製

癌細胞培養地を用意するのは別に、抗癌剤を作製した。抗癌剤は、ラクテック ( 登録商標 ) と同じ成分の水溶液にプラズマを照射したものである。ラクテック ( 登録商標 ) は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、L - 乳酸ナトリウムと、を含有する。塩化ナトリウムの濃度は、6 . 0 g / L である。塩化カリウムの濃度は、0 . 3 g / L である。塩化カルシウム水和物の濃度は、0 . 2 g / L である。L - 乳酸ナトリウムの濃度は、3 . 1 g / L である。

### 【 0 1 2 1 】

プラズマの照射時間は、2 分であった。ガスの種類としてアルゴンガスを用いた。プラズマ発生装置 P 3 0 では、第 1 電極 1 1 0 と溶液 1 の液面との間の距離は、6 m m であった。

### 【 0 1 2 2 】

そして、抗癌剤をバイオフィューザー G S - 5 2 0 3 K H C ( 日本フリーザー株式会社製 ) の内部で冷凍した。冷凍温度は - 1 5 0 度であった。冷凍時間は、1 2 時間であった。

10

20

30

40

50

そして、冷凍していない抗癌剤と、1回だけ冷凍および解凍を行った抗癌剤と、冷凍および解凍を2回繰り返した抗癌剤と、を製造した。

【0123】

3-2-3. 癌細胞培養地への抗癌剤（抗腫瘍水溶液）の供給

次に、癌細胞を培養した96ウェルプレートの培養液を抗癌剤と交換した。癌細胞が抗癌剤に浸かっている時間は、24時間であった。そして、その後、抗癌剤を通常の培養液に交換した。その後、MTSアッセイにより、生存している細胞数の割合を調べた。

【0124】

3-3. 実験結果

図13は、冷凍および解凍の実施による生存細胞数の割合の変化を示すグラフである。 10

図13の縦軸は、生存細胞数の割合である。

【0125】

図13に示すように、冷凍しなかった場合には、1倍の抗癌剤と、4倍に薄めた抗癌剤とが、抗腫瘍効果を示した。また、16倍に薄めた抗癌剤は、ある程度の抗腫瘍効果を示した。64倍に薄めた抗癌剤は、抗腫瘍効果を示さなかった。

【0126】

図13に示すように、冷凍および解凍を1回だけした場合には、1倍の抗癌剤は、抗腫瘍効果を示した。4倍に薄めた抗癌剤は、ある程度の抗腫瘍効果を示した。16倍に薄めた抗癌剤および64倍に薄めた抗癌剤は、抗腫瘍効果を示さなかった。

【0127】

図13に示すように、冷凍および解凍を2回繰り返した場合には、1倍の抗癌剤は、抗腫瘍効果を示した。しかし、4倍に薄めた抗癌剤および16倍に薄めた抗癌剤は、抗腫瘍効果を示さなかった。 20

【0128】

このように、抗癌剤を冷凍保存しても抗腫瘍効果のある程度は維持できる。ただし、その抗腫瘍効果は、冷凍および解凍の繰り返しにより、ある程度失われた。

【0129】

4. 実験D（抗癌剤の選択性）

図14は、抗癌剤の選択性を示すグラフである。図14(a)は、U251細胞に対する結果を示すグラフである。図14(b)は、MCF10A細胞に対する結果を示すグラフである。図14(c)は、新生児ケラチノサイト細胞に対する結果を示すグラフである。前述のように、U251細胞は癌細胞である。MCF10A細胞および新生児ケラチノサイト細胞は、正常細胞である。 30

【0130】

本実験では、これらの細胞に同等の条件でプラズマを照射したラクテック（登録商標）を用いた。図14(a)では、プラズマを40秒照射した抗癌剤に暴露することにより、U251細胞は死滅している。一方、図14(b)および図14(c)に示すように、プラズマを40秒照射した抗癌剤に暴露した場合に、MCF10A細胞および新生児ケラチノサイト細胞は死滅しなかった。つまり、実施形態の抗癌剤は、癌細胞を死滅させるとともに正常細胞をほとんど死滅させない。このように、この抗癌剤は、癌細胞を選択的に死滅させることができる。 40

【0131】

5. 実験E（生物実験）

5-1. マウス

図15は、本実験の実験方法を模式的に示す図である。実験用マウスとして、生後8週齢のメスのBALB/c-nu/nuヌードマウス（日本エスエルシー株式会社製）を用いた。

【0132】

5-2. 癌細胞

癌細胞として、ヒト子宮頸がん細胞株（SiHa, ATCC）を用いた。

【0133】

## 5 - 3 . 実験方法

100 μL の PBS に浮遊させた 1500 細胞のヒト子宮頸がん細胞株 (SiHa) を 100 μL のマトリゲル (BD Biosciences 社製) と混ぜ合わせて合計 200 μL の細胞懸濁液を作製した。そして、その細胞懸濁液をヌードマウスの脇腹に皮下注射した。その際に、マウス一匹あたり両脇腹に一箇所ずつ、合計 2 箇所に播種した。そして、細胞を播種した 10 匹のヌードマウスを 2 つのグループに分けた。1 つ目のグループのマウスには、通常のラクテック (登録商標) を両脇腹に注入した。2 つ目のグループのマウスには、5.5 mL のラクテック (登録商標) にプラズマを 10 分間照射した溶液 (PAL: Plasma Activated Lactec) を両脇腹に注入した。この PAL は、実施形態で説明した抗癌剤である。これらのラクテック等の投与を 1 週間に 3 10  
回ずつ行った。1 回あたりに一箇所に投与した量は、200 μL であった。そして、42 日後に、これら 2 グループのマウスから皮下腫瘍を取り出した。

【0134】

## 5 - 4 . 実験結果

図 16 は、実験開始から 42 日目にマウスから取り出した皮下腫瘍を示す写真である。図 16 に示すように、通常のラクテック (登録商標) を投与したマウス (Control) から摘出した皮下腫瘍は、プラズマを照射したラクテック (登録商標) を投与したマウス (PAL) から摘出した皮下腫瘍よりも大きい傾向にある。また、マウスによる個体差はある程度ある。しかし、同じマウスでは、左右で腫瘍の大きさの違いはほとんどなかった。 20

【0135】

図 17 は、マウスの皮下腫瘍の体積の時間変化を示すグラフである。図 17 の横軸は、日数である。図 17 の縦軸は、皮下腫瘍の体積である。皮下腫瘍の体積  $V_1$  については、次式で近似して算出した。つまり、皮下腫瘍の形状を回転楕円体で近似した。

$$V_1 = \left( \frac{\pi}{6} \right) \times a_1 \times b_1^2$$

$V_1$  : 皮下腫瘍の体積

$a_1$  : 皮下腫瘍の長径

$b_1$  : 皮下腫瘍の短径

なお、長径  $a_1$ 、短径  $b_1$  については、デジタルノギスを用いておおよその値を測定した。 30

【0136】

図 17 に示すように、通常のラクテック (登録商標) を投与したマウス (Control) から摘出した皮下腫瘍は、プラズマを照射したラクテック (登録商標) を投与したマウス (PAL) から摘出した皮下腫瘍よりも大きかった。また、通常のラクテック (登録商標) を投与したマウスでは、30 日経過後に、急激に皮下腫瘍が成長している。

【0137】

図 18 は、マウスの体重の時間変化を示すグラフである。図 18 の横軸は、日数である。図 18 の縦軸は、マウスの体重である。ヌードマウスの体重は、1 グループ目の通常のラクテック (登録商標) を投与したマウスと、2 グループ目のプラズマを照射したラクテック (登録商標) を投与したマウスとで、ほとんど同じであった。また、実験開始から、ヌードマウスの体重は、増加傾向にあるが、それほど変化していない。 40

【0138】

図 19 は、42 日目に摘出した皮下腫瘍の体積および重量を示すグラフである。皮下腫瘍の体積  $V_2$  については、次式で近似して算出した。

$$V_2 = \left( \frac{\pi}{6} \right) \times a_2 \times b_2 \times h_2$$

$V_2$  : 皮下腫瘍の体積

$a_2$  : 皮下腫瘍の長径

$b_2$  : 皮下腫瘍の短径

$h_2$  ; 皮下腫瘍の高さ (厚み)

なお、長径  $a_2$ 、短径  $b_2$ 、高さ  $h_2$  については、デジタルノギスを用いて測定した。 50

## 【0139】

図19(a)に示すように、プラズマを照射したラクテック(登録商標)(PAL)を投与したマウスの皮下腫瘍の体積は、プラズマを照射しなかったラクテック(登録商標)(Control)を投与したマウスの皮下腫瘍の体積の30%程度であった。また、図19(b)に示すように、プラズマを照射したラクテック(登録商標)(PAL)を投与したマウスの皮下腫瘍の重量は、プラズマを照射しなかったラクテック(登録商標)(Control)を投与したマウスの皮下腫瘍の重量の30%程度であった。

## 【0140】

このように、プラズマを照射しなかった通常のラクテック(登録商標)には、抗がん作用は認められなかった。一方、プラズマを照射したラクテック(登録商標)では、通常のラクテック(登録商標)に比べて、皮下腫瘍の体積および重量を70%程度抑制した。このように、プラズマを照射したラクテック(登録商標)には、抗がん作用が認められた。

10

## 【0141】

## 6. 実験F(他のリンゲル液)

本実験は、プラズマ発生装置P30を用いて製造された抗癌剤(抗腫瘍水溶液)について行った実験である。

## 【0142】

## 6-1. 用いた癌細胞

本実験では、癌細胞として卵巣癌細胞を用いた。具体的には、SKOV3を用いた。

20

## 【0143】

## 6-2. 実験方法

## 6-2-1. 癌細胞の培養

上記の癌細胞を、96ウェルプレートに培養して癌細胞培養地を作製した。用いた培養液は、RPMIと血清(FBS)と抗生物質(ペニシリン・ストレプトマイシン)とを混合した溶液である。1ウェル当たり播種した細胞数は5000個であった。また、1ウェル当たり供給した培養液の容積は0.1mLであった。癌細胞を培養する培養期間は24時間であった。

## 【0144】

## 6-2-2. 抗癌剤(抗腫瘍水溶液)の作製

癌細胞培養地を用意するのは別に、抗癌剤を作製した。抗癌剤の材料として、乳酸リンゲル液と、酢酸リンゲル液と、重炭酸リンゲル液とを用いた。乳酸リンゲル液の成分は、実験A等で用いたラクテック(登録商標)と同じである。

30

## 【0145】

酢酸リンゲル液は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、酢酸ナトリウムと、を含有する。塩化ナトリウムの濃度は、6.0g/Lである。塩化カリウムの濃度は、0.3g/Lである。塩化カルシウム水和物の濃度は、0.2g/Lである。酢酸ナトリウム水和物の濃度は、3.8g/Lである。

## 【0146】

重炭酸リンゲル液は、塩化ナトリウムと、塩化カリウムと、塩化カルシウムと、塩化マグネシウムと、炭酸水素ナトリウムと、クエン酸ナトリウムと、を含有する。塩化ナトリウムの濃度は、5.84g/Lである。塩化カリウムの濃度は、0.3g/Lである。塩化カルシウムの濃度は、0.22g/Lである。塩化マグネシウムの濃度は、0.2g/Lである。炭酸水素ナトリウムの濃度は、2.35g/Lである。クエン酸ナトリウムの濃度は、0.2g/Lである。

40

## 【0147】

これら3種類のリンゲル液にプラズマを照射した。プラズマの照射時間は、10分であった。ガスの種類としてアルゴンガスを用いた。プラズマ発生装置P30では、第1電極110と溶液1の液面との間の距離は、3mmであった。

## 【0148】

## 6-2-3. 癌細胞培養地への抗癌剤(抗腫瘍水溶液)の供給

50

そして、図 20 に示すように、癌細胞を培養した 96 ウェルプレートの培養液を抗癌剤と交換した。癌細胞が抗癌剤に浸かっている時間は、24 時間であった。そして、その後、抗癌剤を通常の培養液に交換した。その後、MTS アッセイにより、生存している細胞数の割合を調べた。

【0149】

### 6-3. 実験結果

#### 6-3-1. 乳酸リンゲル液

図 21 は、乳酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液で SKOV3 を処理した場合の SKOV3 の生存率を示すグラフである。図 21 に示すように、乳酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液は、卵巣癌細胞 (SKOV3) に対して抗腫瘍効果を示した。その強度は、全 SKOV3 細胞の 50% を死滅させうる希釈率が 78 倍希釈であった。

10

【0150】

#### 6-3-2. 酢酸リンゲル液

図 22 は、酢酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液で SKOV3 を処理した場合の SKOV3 の生存率を示すグラフである。図 22 に示すように、酢酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液は、卵巣癌細胞 (SKOV3) に対して抗腫瘍効果を示した。その強度は、全 SKOV3 細胞の 50% を死滅させうる希釈率が 53 倍希釈であった。

【0151】

#### 6-3-3. 重炭酸リンゲル液

図 23 は、重炭酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液で SKOV3 を処理した場合の SKOV3 の生存率を示すグラフである。図 23 に示すように、重炭酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液は、卵巣癌細胞 (SKOV3) に対して抗腫瘍効果を示した。その強度は、全 SKOV3 細胞の 50% を死滅させうる希釈率が 1/3 倍希釈であった。

20

【0152】

このように、乳酸リンゲル液と、酢酸リンゲル液と、重炭酸リンゲル液と、のそれぞれにプラズマを照射した水溶液は、いずれも卵巣癌細胞 (SKOV3) に対して抗腫瘍効果を示した。抗腫瘍効果の強さは、乳酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液、酢酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液、重炭酸リンゲル液にプラズマを照射した水溶液、の順であった。このように、乳酸リンゲル液に限らず、これらの種々のリンゲル液は、プラズマを照射することにより抗腫瘍効果を示した。また、卵巣癌細胞 (SKOV3) に対して抗腫瘍効果を奏した。

30

【0153】

また、抗癌剤の原材料は、酢酸ナトリウムに限らず、酢酸、酢酸カリウム、酢酸カルシウムであってもよいと考えられる。同様に、抗癌剤の原材料は、炭酸水素ナトリウムやクエン酸ナトリウムに限らず、クエン酸、クエン酸カリウム、クエン酸カルシウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素カルシウムであってもよいと考えられる。

【0154】

### 7. 実験 G (NMR)

#### 7-1. 乳酸ナトリウム水溶液

本実験では、プラズマを照射していない乳酸ナトリウム水溶液と、プラズマを照射した乳酸ナトリウム水溶液と、について NMR を実施した。そのために、市販の乳酸ナトリウム水溶液を用いた。乳酸ナトリウム水溶液の濃度は 50% である。プラズマを照射した乳酸ナトリウム水溶液は、乳酸ナトリウム水溶液に 5 分間だけプラズマを照射することにより作製された。その際にプラズマ発生装置 P20 を用いた。そして、NMR を用いて、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C について観測した。

40

【0155】

#### 7-2. 実験結果

図 24 は、<sup>1</sup>H を観測した結果を示すグラフである。図 24 の上側にプラズマを照射していない乳酸ナトリウム水溶液の結果を示す。この図以降の図も同様である。図 24 の下側にプラズマを照射した乳酸ナトリウム水溶液の結果を示す。図 24 に示すように、プラ

50

ズマの照射の有無によらず、OHに由来するピークと、CHに由来するピークと、 $\text{CH}_3$ に由来するピークと、が観測された。そして、プラズマを照射した乳酸ナトリウム水溶液のピークとプラズマを照射していない乳酸ナトリウム水溶液のピークとの間で、大きな差はみられなかった。

【0156】

図25は、図24の拡大図である。図25に示すように、 $\text{CH}_3\text{COCOOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CO}$ 、といった構造を示すピークが、プラズマ照射後に大きくなっている。その他の点については、プラズマの照射前後で様相は大きく変わっていない。

【0157】

図26は、 $^{13}\text{C}$ を観測した結果を示すグラフである。図26に示すように、 $\text{COOH}$ に由来するピークと、CHに由来するピークと、 $\text{CH}_3$ に由来するピークと、が観測された。 $^{13}\text{C}$ を観測した結果、プラズマの照射前後で様相は大きく変わっていない。

10

【0158】

図27は、図26の拡大図である。図27では、図26と同様に、プラズマの照射前後で様相は大きく変わっていない。

【0159】

このように、プラズマを照射することにより、乳酸ナトリウムの基本的構造が大きく変化するわけではない。そして、プラズマを照射することにより、 $\text{CH}_3\text{COCOOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CO}$ が増加した。そのため、 $\text{CH}_3\text{COCOOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CO}$ が抗腫瘍効果に何らかの形で寄与していると考えられる。つまり、抗癌物質は、官能基 $\text{CH}_3\text{COCO}$ または官能基 $\text{CH}_3\text{CO}$ を有していると考えられる。

20

【0160】

#### 8．実験H（酢酸リンゲル液の成分）

本実験は、プラズマ発生装置P30を用いて製造された抗癌剤（抗腫瘍水溶液）について行った実験である。

【0161】

##### 8-1．用いた癌細胞

本実験では、癌細胞として卵巣癌細胞を用いた。具体的には、SKOV3を用いた。

【0162】

##### 8-2．実験方法

30

###### 8-2-1．癌細胞の培養

上記の実験Fと同様に癌細胞を培養した。

【0163】

###### 8-2-2．サンプル水溶液の作製

本実験では、7種類のサンプル水溶液を用いた。これらのサンプル水溶液は、実験BのGOFと同じ考え方により製造された水溶液である。つまり、水溶液A1と水溶液A2とを用意する。ここで、水溶液A1と水溶液A2とを混合すると実験Fで用いた酢酸リンゲル液となる。本実験では、水溶液A1のみにプラズマを照射して、その後水溶液A1と水溶液A2とを混合する。

【0164】

40

第1のサンプル水溶液は、プラズマを照射していない酢酸リンゲル液である。第2のサンプル水溶液は、純水にプラズマを照射し、その後高い濃度の酢酸リンゲル液を混合したものである。第3のサンプル水溶液は、酢酸ナトリウム水溶液にプラズマを照射し、その後酢酸リンゲル液の他の成分を混合したものである。第4のサンプル水溶液は、酢酸リンゲル液にプラズマを照射し、その後酢酸リンゲル液を混合したものである。第5のサンプル水溶液は、塩化ナトリウム水溶液にプラズマを照射し、その後酢酸リンゲル液の他の成分を混合したものである。第6のサンプル水溶液は、塩化カリウム水溶液にプラズマを照射し、その後酢酸リンゲル液の他の成分を混合したものである。第7のサンプル水溶液は、塩化カルシウム水溶液にプラズマを照射し、その後酢酸リンゲル液の他の成分を混合したものである。

50

## 【 0 1 6 5 】

上記において、酢酸リンゲル液の成分は実験 F で用いたものと同じである。そして、プラズマの照射時間は、5 分であった。ガスの種類としてアルゴンガスを用いた。プラズマ発生装置 P 3 0 では、第 1 電極 1 1 0 と溶液 1 の液面との間の距離は、1 0 mm であった。

## 【 0 1 6 6 】

## 8 - 2 - 3 . 癌細胞培養地へのサンプル水溶液の供給

そして、実験 F と同様に癌細胞にサンプル水溶液 1 からサンプル水溶液 7 を供給した。その後、M T S アッセイにより、生存している細胞数の割合を調べた。

## 【 0 1 6 7 】

## 8 - 3 . 実験結果

図 2 8 および図 2 9 は、実験結果を示すグラフである。図 2 8 および図 2 9 に示すように、第 3 のサンプル水溶液および第 4 のサンプル水溶液は、抗腫瘍効果を示した。その他のサンプル水溶液は、抗腫瘍効果を示さなかった。これは、酢酸リンゲル液に含まれる成分のうち酢酸ナトリウムが抗腫瘍物質の原材料であることを示している。この結果は、実験 G と矛盾のない結果である。

## 【 符号の説明 】

## 【 0 1 6 8 】

P 1 ... プラズマ照射装置

M 1 ... ロボットアーム

P M ... 抗癌剤製造装置

P 1 0、P 2 0、P 3 0 ... プラズマ発生装置

1 0、1 1 ... 筐体部

1 0 i、1 1 i ... ガス導入口

1 0 o、1 1 o ... ガス噴出口

2 a、2 b ... 電極

P ... プラズマ領域

H ... 凹部 ( ホロー )

1 1 0 ... 第 1 電極

1 2 0 ... 第 1 の電位付与部

1 3 0 ... 第 1 のリード線

1 4 0 ... ガス供給部

1 5 0 ... ガス管結合コネクター

1 6 0 ... ガス管

1 7 0 ... 第 1 電極保護部材

2 1 0 ... 第 2 電極

2 2 0 ... 第 2 の電位付与部

2 3 0 ... 第 2 のリード線

2 4 0 ... 第 2 電極保護部材

2 5 0 ... 容器

2 6 0 ... 封止部材

2 7 0 ... 架台

10

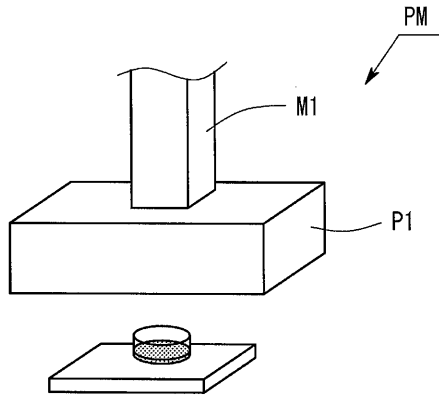
20

30

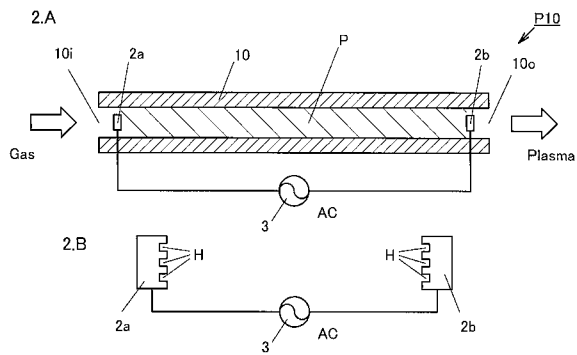
40



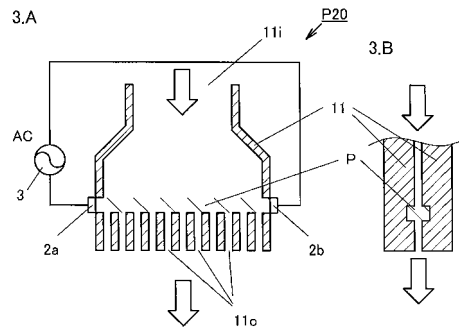
【 図 1 】



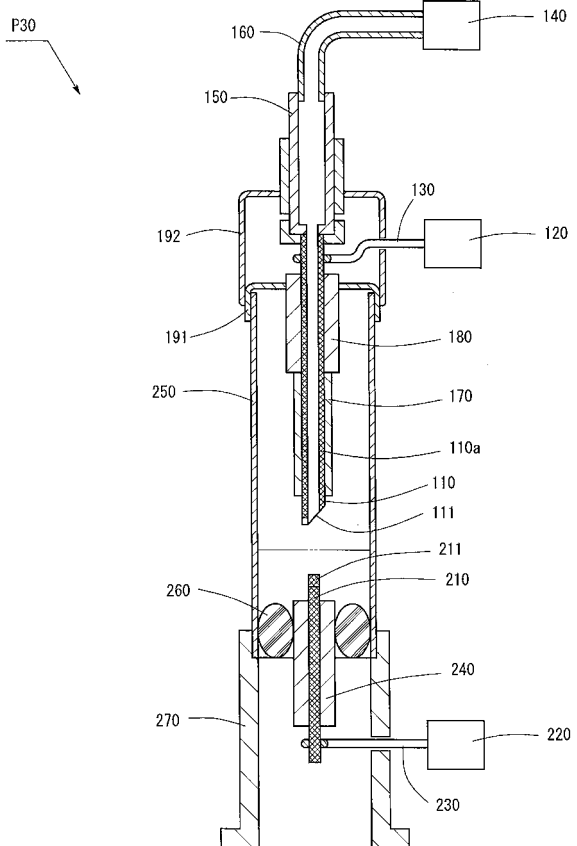
【 図 2 】



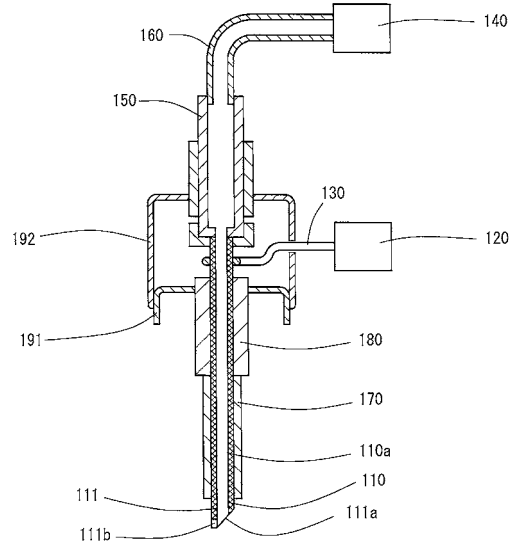
【 図 3 】



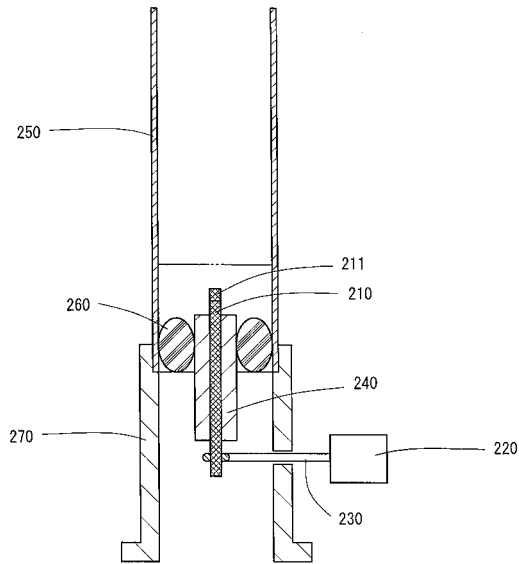
【 図 4 】



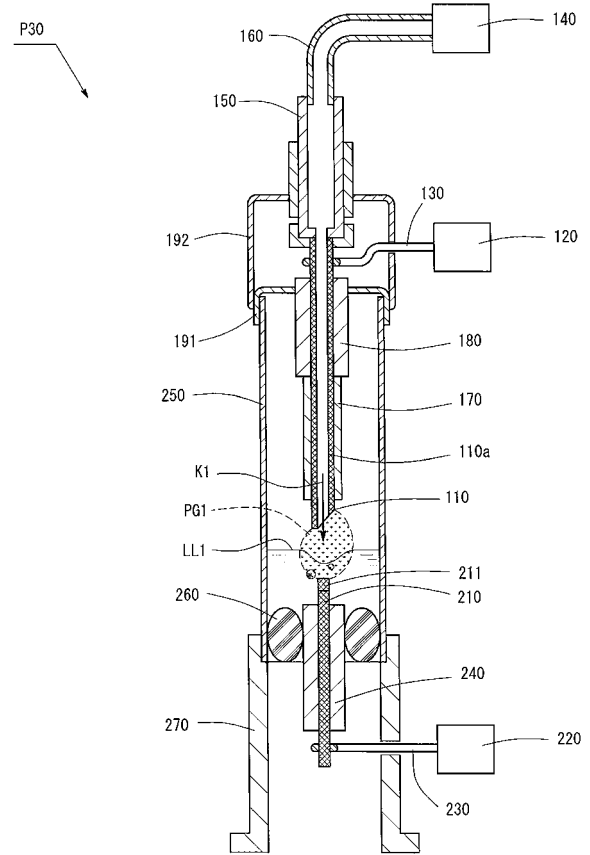
【 図 5 】



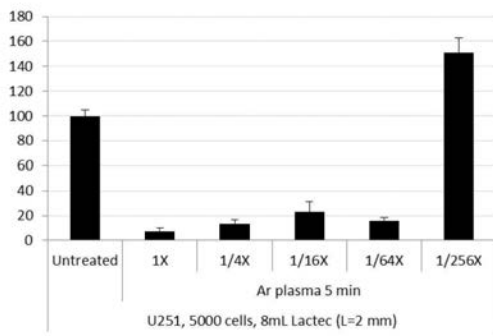
【 図 6 】



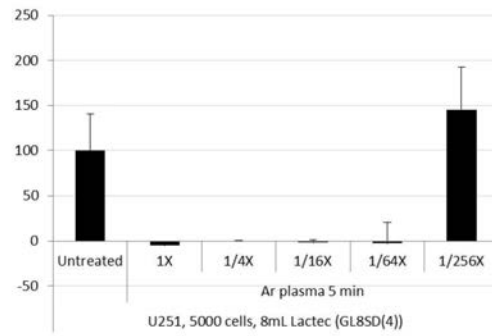
【 図 7 】



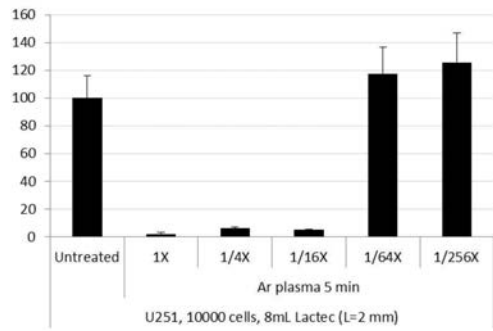
【 図 8 】



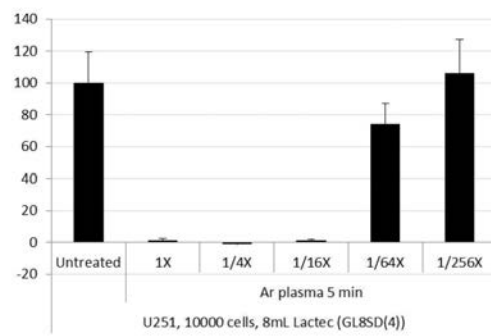
【 図 10 】



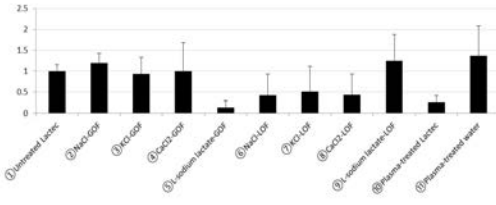
【 図 9 】



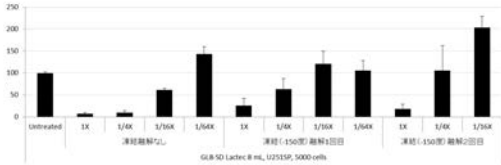
【 図 11 】



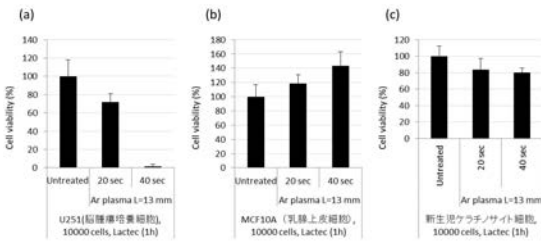
【 図 1 2 】



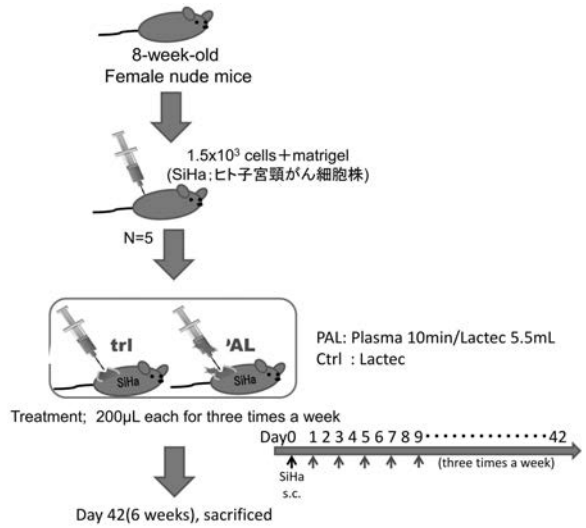
【 図 1 3 】



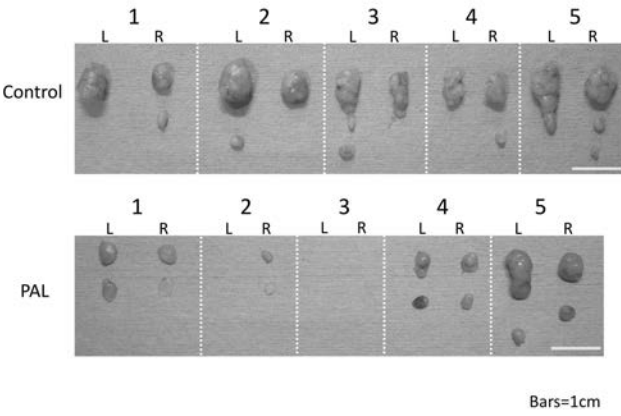
【 図 1 4 】



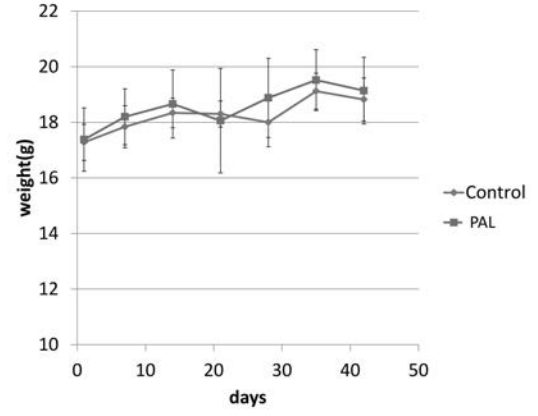
【 図 1 5 】



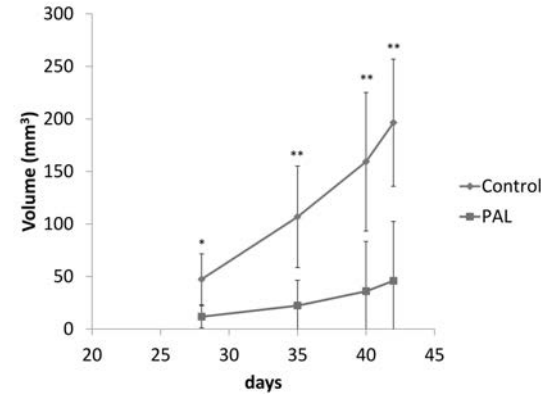
【 図 1 6 】



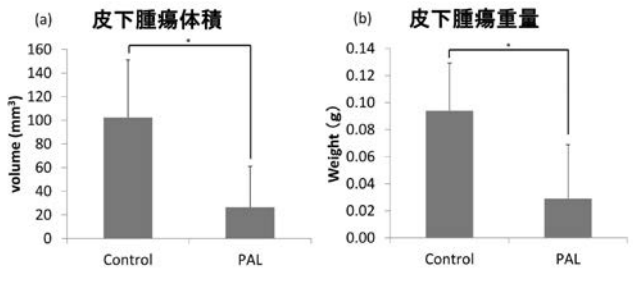
【 図 1 8 】



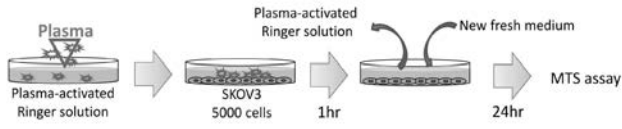
【 図 1 7 】



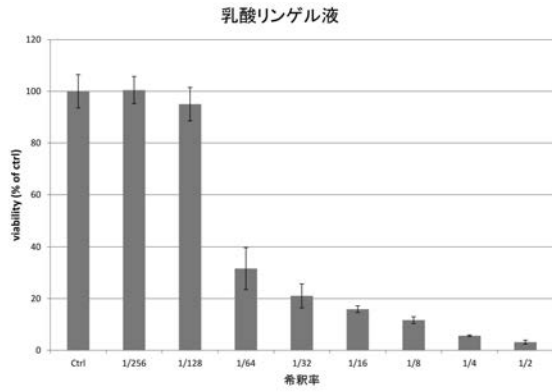
【 図 1 9 】



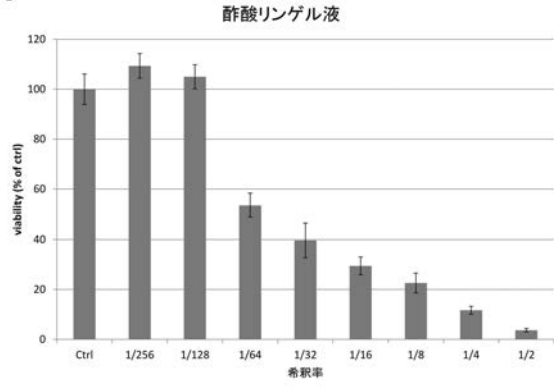
【図 2 0】



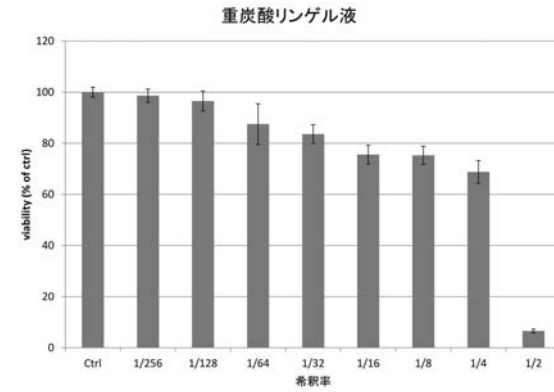
【図 2 1】



【図 2 2】

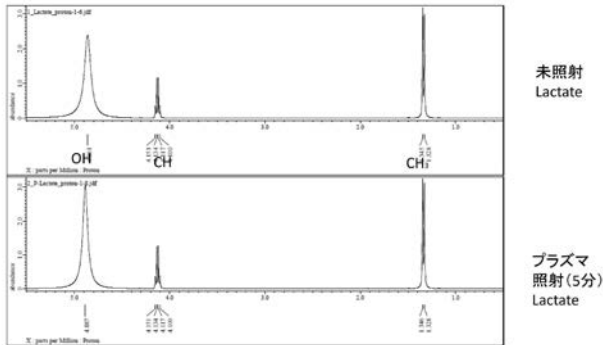


【図 2 3】



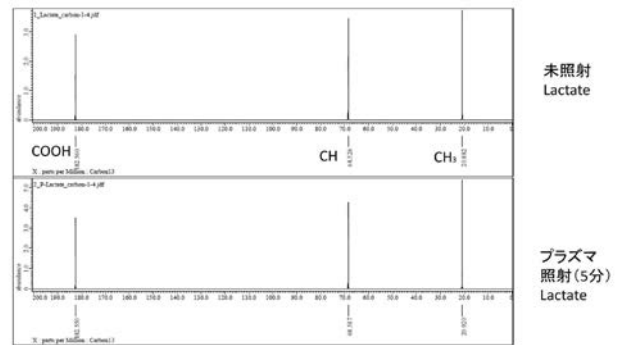
【図 2 4】

プロトン



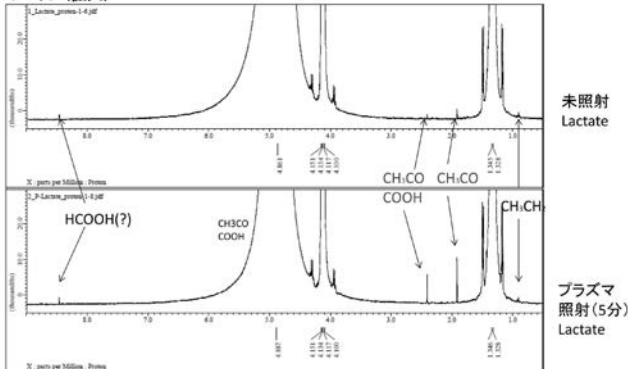
【図 2 6】

カーボン



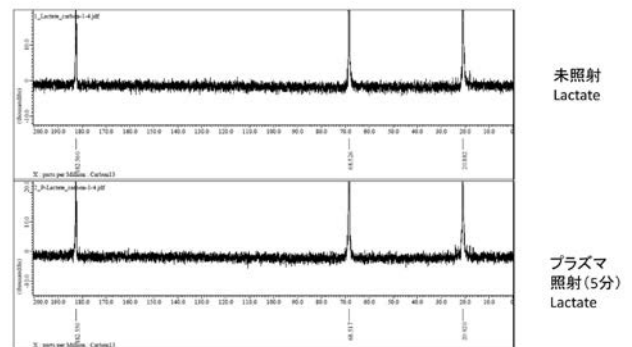
【図 2 5】

プロトン(拡大)

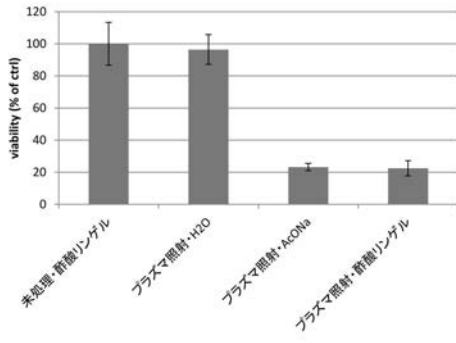


【図 2 7】

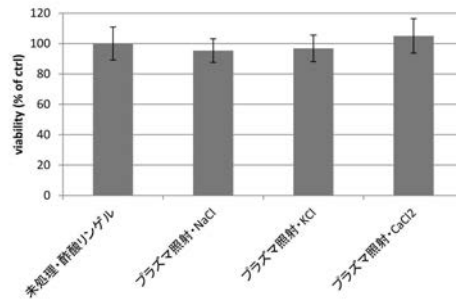
カーボン(拡大)



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2015/006419
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K41/00(2006.01)i, A61K31/19(2006.01)i, A61K33/14(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K41/00, A61K31/19, A61K33/14, A61P35/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEI Liu, et al., Total synthesis and cytotoxicity of (-)-jorumycin and its analogues, Tetrahedron, 2012, 68(13), 2759-64 See Table 1	14
X	PING Cheng, et al., Ethyl pyruvate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via regulation of the HMGB1-RAGE and AKT pathways, Biochem Biophys Res Commun, 2014.01, 443(4), 1162-8 See Fig. 1	14
X A	WO 2013/128905 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY), 06 September 2013 (06.09.2013), claims; examples & US 2015/0030693 A1 claims; examples	1, 2, 5-13 3, 4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 February 2016 (23.02.16)		Date of mailing of the international search report 22 March 2016 (22.03.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 6 4 1 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K41/00(2006,01)i, A61K31/19(2006,01)i, A61K33/14(2006,01)i, A61P35/00(2006,01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K41/00, A61K31/19, A61K33/14, A61P35/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	WEI Liu, et al., Total synthesis and cytotoxicity of (-)-jorumycin and its analogues, Tetrahedron, 2012, 68(13), 2759-64 See Table 1	14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 23.02.2016		国際調査報告の発送日 22.03.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 安藤 公祐 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4496

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/006419
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	PING Cheng, et al., Ethyl pyruvate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via regulation of the HMGB1-RAGE and AKT pathways, Biochem Biophys Res Commun, 2014.01, 443(4), 1162-8 See Fig. 1	14
X A	WO 2013/128905 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 2013.09.06, 請求項、実施例等 & US 2015/0030693 A1, CLAIMS, EXAMPLES	1, 2, 5-13 3, 4



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 33/06 (2006.01)</b>		A 6 1 K 33/06	
<b>A 6 1 K 33/14 (2006.01)</b>		A 6 1 K 33/14	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 吉川 史隆  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 梶山 広明  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 内海 史  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 中村 香江  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 石川 健治  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 竹田 圭吾  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 田中 宏昌  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 加納 浩之  
愛知県みよし市黒笹いずみ 2 丁目 3 番地 8 N U エコ・エンジニアリング株式会社内

F ターム(参考) 4C084 AA11 MA02 MA17 NA05 NA14 ZB261  
4C086 AA01 AA02 MA03 MA04 MA17 NA05 NA14 ZB26  
4C206 AA01 AA02 DA07 DA34 MA03 MA04

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。