Development of single nanometer-sized ultrafine oxygen bubbles to overcome the hypoxia-induced resistance to radiation therapy via the suppression of hypoxia-inducible factor-1α

低酸素誘導因子-1αの抑制による、放射線療法に対する（低酸素誘導）耐性を克服するためのナノメートルサイズの超微細酸素バブルの開発

Departments of General Surgical Science, and Molecular Pharmacology and Oncology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma 371-8511; Sigma Technology Inc., Hitachinaka, Ibaraki 312-0053; Big Data Center for Integrative Analysis, Gunma University Initiative for Advance Research (GIAR), Maebashi, Gunma 371-8511; Research Center for Ultra-High Voltage Electron Microscopy, Osaka University, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan; Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI 53792; Wisconsin Nanobubble Research and Development Institute, Verona, WI 53593, USA

Received June 28, 2017; Accepted January 12, 2018
DOI: 10.3892/ijo.2018.4248

Abstract.
Radiation therapy can result in severe side-effects, including the development of radiation resistance. The aim of this study was to validate the use of oxygen nanobubble water to overcome resistance to radiation in cancer cell lines via the suppression of the hypoxia-inducible factor 1-α (HIF-1α) subunit. Oxygen nanobubble water was created using a newly developed method to produce nanobubbles in the single-nanometer range with the ΣPM-5 device. The size and concentration of the oxygen nanobubbles in the water was examined using a cryo-transmission electron microscope. The nanobubble size was ranged from 2 to 3 nm, and the concentration of the nanobubbles was calculated at 2x1018 particles/ml. Cell viability and HIF-1α levels were evaluated in EBC-1 lung cancer and MDA-MB-231 breast cancer cells treated with or without the nanobubble water and radiation under normoxic and hypoxic conditions in vitro. The cancer cells grown in oxygen nanobubble-containing media exhibited a clear suppression of hypoxia-induced HIF‑1α expression compared to the cells grown in

media made with distilled water. Under hypoxic conditions, the EBC‐1 and MDA‐MB231 cells displayed resistance to radiation compared to the cells cultured under normoxic cells. The use of oxygen nanobubble medium significantly suppressed the hypoxia-induced resistance to radiation compared to the use of normal medium at 2, 6, 10 and 14 Gy doses. Importantly, the use of nanobubble media did not affect the viability and radiation sensitivity of the cancer cell lines, or the non-cancerous cell line, BEAS-2B, under normoxic conditions. This newly created single-nanometer range oxygen nanobubble water, without any additives, may thus prove to be a promising agent which may be used to overcome the hypoxia-induced resistance of cancer cells to radiation via the suppression of HIF-1α.

要約

放射線療法は、放射線耐性の発達を含む重度の副作用をもたらし得る。この研究の目的は、低酸素誘導因子1-α（HIF-1α）サブユニットの抑制を介して癌細胞株における放射線耐性を克服するための酸素ナノバブル水の使用を検証することであった。酸素ナノバブル水は、ΣPM-5装置を用いて単一ナノメートル範囲のナノバブルを生成する新開発の方法を用いて作製された。凍結透過型電子顕微鏡を用いて、水中の酸素ナノバブルの大きさと濃度を調べた。ナノバブルのサイズは2〜3nmの範囲であり、ナノバブルの濃度は2×10 18個/ mlで計算した。細胞生存率およびHIF-1αレベルは、生体外で正常酸素状態および低酸素状態の下でナノバブル水および放射線の有無にかかわらず処置したEBC-1肺癌およびMDA-MB-231乳癌細胞で評価した。酸素ナノバブル含有培地中で増殖させた癌細胞は、低酸素誘導HIF-1α発現の明らかな抑制を、蒸留水で作製した培地中で増殖させた細胞と比較して示した。低酸素条件下で、EBC-1（肺癌）およびMDA-MB231（乳癌）細胞は、酸素正常細胞下で培養された細胞と比較して放射線に対する耐性を示した。酸素ナノバブル媒体の使用は、2,6,10および14Gy線量での正常培地の使用と比較して、低酸素誘発放射線耐性を有意に抑制した。　重要なことに、ナノバブル媒体の使用は、正常酸素状態の癌細胞株または非癌細胞株BEAS 2Bの生存率および放射線感受性に影響しなかった。　このようにして新たに作製された単一ナノメートル範囲の酸素ナノバブル水は、HIF-1αの抑制によって、放射線に対する癌細胞の低酸素誘導耐性を克服するために使用できる有望な薬剤であると言える。

Introduction

Progress in peri-operative management and adjuvant therapy has led to the improved survival of patients with lung cancer (1-3). It has been reported that adjuvant radiation therapy is effective and is often performed to eliminate lung cancer cells (4,5). However, radiation therapy often induces radiation resistance and severe side-effects, including

radiation-induced lung disease (RILD), which may range from treatable acute pneumonitis to lethal fibrosis (6-8). Therefore, overcoming resistance to radiation without inducing additional severe side-effects is vital for the treatment of patients with refractory lung cancer.

はじめに

周術期管理と（化学療法、放射線療法などの）補助療法の進歩により、肺がん患者の生存率が向上した（1-3）。 補助的な放射線療法が効果的であり、しばしば肺癌細胞を排除するために行われることが報告されている（4,5）。 しかしながら、放射線療法は、放射線耐性および放射線誘発性肺疾患（RILD）を含む重度の副作用を誘発することがあり、この副作用は、治療可能な急性肺炎から致死線維症（6〜8）にまで及んでいる。 したがって、難治性肺癌患者の治療には、重篤な副作用をさらに引き起こさずに放射線に対する耐性を克服することが不可欠です。

Rapidly growing tumors located at a distance from the supporting vasculature results in the characteristic tumor microenvironment of low oxygen and nutrients (9,10). The hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) subunit is an important regulator of cellular oxygen homeostasis and hypoxia adaptation (11-13). In general, it has been reported that cancer cells under hypoxic conditions acquire resistance to radiation therapy, and to most types of chemotherapy in various types of cancer, via the accumulation of HIF-1α (14-19).

支持脈管構造から一定距離に位置する急速に成長する腫瘍は、低酸素および低栄養素の特徴的な腫瘍微小環境をもたらす（9,10）。 低酸素誘導因子1α（HIF-1α）サブユニットは、細胞酸素恒常性および低酸素適応の重要な調節因子である（11,13）。 一般に、低酸素状態の癌細胞は、HIF-1αの蓄積によって、様々なタイプの癌におけるほとんどのタイプの化学療法や放射線療法に対する耐性を獲得することが報告されている（14,19）。

High expression levels of HIF-1α have been reported to be associated not only with radiation resistance, but also with a poor prognosis of patients with lung cancer (20-23). Shibamoto *et al* reported that the administration of a HIF-1 inhibitor, in adjunction with radiation, significantly suppressed the proliferation of lung cancer cell lines *in vivo* (24). However, some HIF-1 inhibitors may induce deleterious side-effects in non-cancerous tissues. Therefore, a therapeutic HIF-1-targeting strategy without side-effects may be an ideal radiation sensitizer for refractory cancers which are resistant to radiation in

clinical practice.

HIF-1α の高発現レベルは、放射線耐性だけでなく、肺癌患者の予後不良（20-23）と関連することが報告されている。 Shibamoto らは、放射線併用療法において HIF-1 阻害剤を投与すると、生体内での肺癌細胞株の増殖が有意に抑制されることを報告している（24）。 しかしながら、いくつかの HIF-1 阻害剤は、非癌性組織において有害な副作用を誘発し得る。 したがって、副作用のない治療用 HIF-1 標的化戦略は、臨床診療において放射線に耐性のある難治性癌のための理想的な放射線増感剤であり得る。

Strategies for the treatment of hypoxia to overcome resistance to radiation have included the development of several radiosensitizers, and methods for directly increasing blood oxygenation, such as pure oxygen or carbogen breathing, ozone therapy, hyperbaric oxygen therapy, hydrogen peroxide injections and the administration of suspensions of oxygen carrier liquids, including ultrafine oxygen nanobubble water (25). However, these experimental models have shown limited success owing to unwanted side-effects and insufficient efficacy. To improve the therapeutic significance of HIF-1α targeting, we focused on the creation of oxygen nanobubbles in a single-nanometer range. As previously indicated, smaller bubbles are more stable and possibly more effective in penetrating target cells (26).

放射線耐性を克服するための低酸素治療の戦略には、いくつかの放射線増感剤の開発、純酸素やカルボゲンの呼吸、オゾン治療、高圧酸素療法、過酸化水素の注射や懸濁液の投与など、 超微細酸素ナノバブル水（25）を含む酸素キャリヤ液体の混合物である。 しかしながら、これらの実験モデルは、望ましくない副作用および不十分な有効性のために限定された成功を示している。 HIF-1α ターゲティングの治療的意義を改善するために、我々は単一ナノメートル範囲の酸素ナノバブルの創出に焦点を当てた。先に示したように、より小さいバブルはより安定であり、おそらくは標的細胞への浸透においてより有効である（26）。

In this study, we sought to validate a newly developed method to create oxygen nanobubble water in the single nanometer range, and to examine its effect on HIF-1α expression and hypoxia-induced resistance to radiation across multiple cancer cell lines.

本研究では、新たに開発された単一ナノメートル範囲の酸素ナノバブル水を生成する方法を検証し、HIF-1α の発現、および複数の癌細胞株の（低酸素によって誘導される）

対放射線耐性への影響を調べる。

Materials and methods

Formation of nanobubble by ΣPM-5. Oxygen nanobubble water was prepared by a nanobubble water preparation device ΣPM-5 (bellows pump type) (27). In brief, oxygen and pure water were mixed at 0.4 MPa and pushed out from the nozzle. The oxygenated water collided at high velocity to create nanobubble.

材料及び方法

ΣPM-5 によるナノバブルの形成 ナノバブル水生成装置 ΣPM-5（ベローズポンプ式）(27) により酸素ナノバブル水を生成した。手短に言えば、酸素と純水を 0.4MPa で混合し、ノズルから押し出した。 酸素化された水は高速で衝突してナノバブルを作製する。

Characterization of nanobubble using a cryo-transmission electron microscope. The nanobubble water was diluted 100-fold for measurement. Pure water with or without diluted nanobubble was rapidly frozen using Vitrobot Mark IV (FEI Co., Ltd., Hillsboro, OR, USA). The samples were embedded in amorphous ice for observation. The sample thickness was 200 nm. Nanobubbles embedded in amorphous ice at a sample temperature of about -193˚C were directly observed using a cryo-transmission electron microscope Titan Krios (FEI Co., Ltd.). The electron beam used for observation is approximately 20 electrons/Å2 by the low-dose technique, and there is almost no increase in sample temperature during photography.

クライオ電子顕微鏡を用いたナノバブルの評価

ナノバブル水を 100 倍に希釈して測定した。 Vitrobot Mark IV（FEI Co.,Ltd., Hillsboro, OR, USA）を用いて、希釈ナノバブルの有無にかかわらず純水を急速凍結させた。 試料を非晶質氷中に埋め込んで観察した。 試料の厚さは 200nm であった。 約 -193℃のサンプル温度でアモルファス氷に埋め込まれたナノバブルは、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios（FEI Co., Ltd.）を用いて直接観測された。 観測に用いた電子線は、低線量法で約 20 電子/Å2 であり、撮影時の試料温度の上昇はほとんどない。

Cell lines.

The EBC-1 human lung cancer cell line was purchased from the RIKEN Cell Resource Center of Biomedical Research (Tsukuba, Japan), and the MDA-MB-231 human breast cancer cell line and BEAS-2S non-cancerous human bronchial cell line were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Baseline culture medium was

prepared using RPMI-1640 medium (Wako, Osaka, Japan), which was dissolved in water with or without the oxygen nanobubble. The cells were cultured in filtered (0.22 μm) nanobubble or normal RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin antibiotics, and incubated at 37˚C and 5% CO2. For hypoxia, the cells were incubated under hypoxic conditions (1% O2) using the BIONIX-1 hypoxic culture kit (Sugiyamagen, Tokyo, Japan) for 24 h.

細胞株

EBC-1 ヒト肺癌細胞株は理化学研究所細胞生物資源研究センター（Tsukuba、Japan）から購入し、MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞株及び BEAS-2S 非癌性ヒト気管支細胞株は、American Type Culture Collection（Manassas, VA, USA）から入手した。 酸素ナノバブルの有無にかかわらず水に溶解した RPMI-1640 培地（和光、大阪、日本）を用いてベースライン培地を調製した。 細胞を、10％ウシ胎仔血清および 1％ペニシリンおよびストレプトマイシン抗生物質を補充した濾過（0.22μm）ナノバブルまたは正常 RPMI-1640 で培養し、37℃および 5％CO 2 で培養した。 低酸素では、細胞を BIONIX-1 低酸素培養キット（Sugiyamagen, Tokyo, Japan）を用いて低酸素条件（1％O2）下で 24 時間培養した。

Analysis of cell viability under normoxic and hypoxic conditions

Cell viability was analyzed using the Cell Counting kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). The cells were seeded 4x103/100 μl per well in 96-well plates. After 24 h, normal RPMI-1640 medium was changed with meda with or without oxygen nanobubbles, and the cells were incubated under normoxic (21% O2, room air) or hypoxic conditions (1% O2). Following 24 h of incubation, the cells were irradiated at 2, 6, 10, and 14 Gy doses using an X-ray machine (Faxitron RX-650; Faxitron X-Ray LLC, Lincolnshire, IL, USA) with 100 kV, Al 0.3 mm filter. Following a 72-h incubation post-radiation, 10 μl of CCK-8 solution were added to each well and the plates were incubated at 37˚C for 2 h. The absorbance was detected at 450 nm using a plate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

正常酸素状態および低酸素状態下での細胞生存度の分析

細胞生存率は、Cell Counting kit-8（CCK-8; 同仁化学研究所、熊本、日本）を用いて分析した。 細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 4×10 3 /100μl 播種した。 24 時間後、正常な RPMI-1640 培地を酸素ナノバブルの有無にかかわらずメダで交換し、正常酸素（21％O2、室内空気）または低酸素条件（1％O2）下で培養した。 24 時間の培養の後、100kV の Al を含む X 線装置（Faxitron RX-650;米国イリノイ州リンカン

シャーの Faxitron X-Ray LLC）を用いて、細胞に 2,6,10 および 14Gy 線量を照射した 0.3mm フィルター。 放射線照射後 72 時間の培養後、10μl の CCK-8 溶液を各ウェルに添加し、プレートを 37℃で 2 時間培養した。 吸光度は、プレートリーダー（Bio-Rad、Hercules、CA、USA）を用いて 450nm で検出した。

Protein extraction and western blot analysis.

Protein extraction was performed using lysis buffer [10% glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.5% NP40, 4 μg/ml aprotonin, PMSF, proteasome inhibitor MG-132 and 1 mM DTT]. Total protein (10 μg) was electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel, and then electroblotted at 300 mA for 90 min on a nitrocellulose membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Western blot analysis was used to confirm the protein expression of HIF-1α and HSC70: These proteins were detected using anti-HIF-1α rabbit polyclonal antibody (1:1,000) (Cell Signaling Technology, Cat. no. 3716) and anti-HSC70 mouse monoclonal antibody (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Cat. no. sc-7298). HSC70 expression was used as a loading control. The signals were detected using the ECL Select Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) and Image Quant LAS 4000 software (GE Healthcare Life Sciences).

タンパク質抽出およびウエスタンブロット分析

溶解緩衝液[10％グリセロール、10mM トリス-HCl（pH7.5）、1mM EDTA、400mM NaCl、0.5％NP40,4μg/ ml アプロトニン、PMSF、プロテアソーム阻害剤 MG-132 および 1mM を用いてタンパク質抽出を行った DTT]。 全タンパク質（10μg）を 10％ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、次いでニトロセルロース膜（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）上で 300mA で 90 分間電気ブロッティングした。 ウエスタンブロット分析を用いて、HIF-1α および HSC70 のタンパク質発現を確認した：これらのタンパク質は、抗 HIF-1α ウサギポリクローナル抗体（1：1,000）（Cell Signaling Technology、カタログ番号 3716）および抗 HSC70 マウスモノクローナル抗体（1：1,000）（Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc-7298）である。 HSC70 発現をローディングコントロールとして用いた。 ECL Select Western Blotting Detection System（GE Healthcare Life Sciences、米国ペンシルベニア州ピッツバーグ）および Image Quant LAS 4000 ソフトウェア（GE Healthcare Life Sciences）を用いてシグナルを検出した。

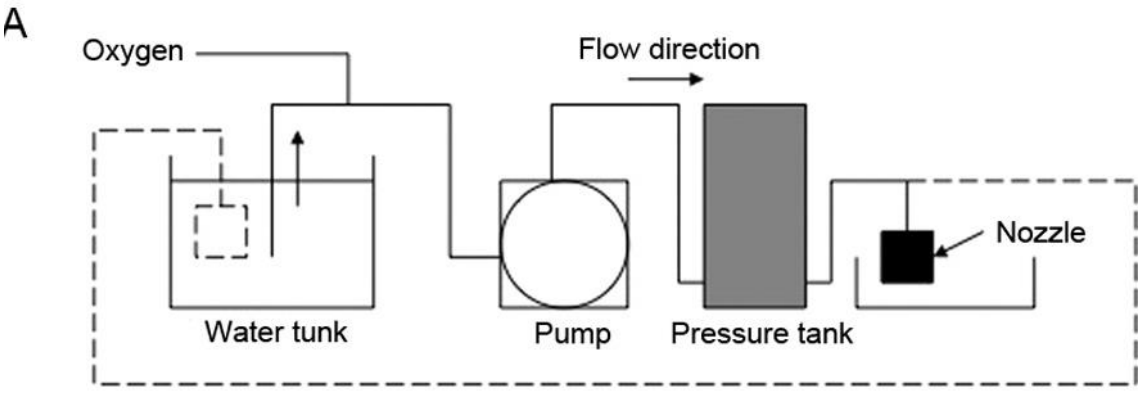
Radiation treatment under normoxic and hypoxic conditions.

Following a 24-h pre-incubation, the EBC-1 and MDA-MB231 cells in 96-well plates were exposed to hypoxic (1% O2) and normoxic conditions with normal or oxygen

nanobubble medium for 6 and 24 h, and then treated with radiation. The O2 concentration was continuously evaluated using O2 concentration measuring devices (Oxy-M O2 monitor, Jikco) in the bags. Cell viability was evaluated by CCK-8 assay after 72 h of incubation under normoxic conditions. An X-ray machine (Faxitron RX-650; Faxitron X-Ray LLC) with 100 kV, Al 0.3 mm filter was used as the radiation source for treatment.

正常酸素状態および低酸素状態下での放射線治療

24時間のプレ培養の後、96ウェルプレート中のEBC-1およびMDA-MB231細胞を、低酸素（1%O 2）および正常または酸素ナノバブル媒体による酸素正常状態に 6 時間および 24 時間曝露し、その後、放射線で処理した。 O2 濃度測定装置（Oxy-M O2 モニター、Jikco）をバッグ内に用いて、O2 濃度を連続的に評価した。 細胞生存率は、酸素正常条件下での 72 時間の培養後に CCK-8 測定によって評価した。 治療のための放射線源として、100kV の Al 0.3mm フィルターを備えた X 線装置（Faxitron RX-650; Faxitron X-Ray LLC）を使用した。



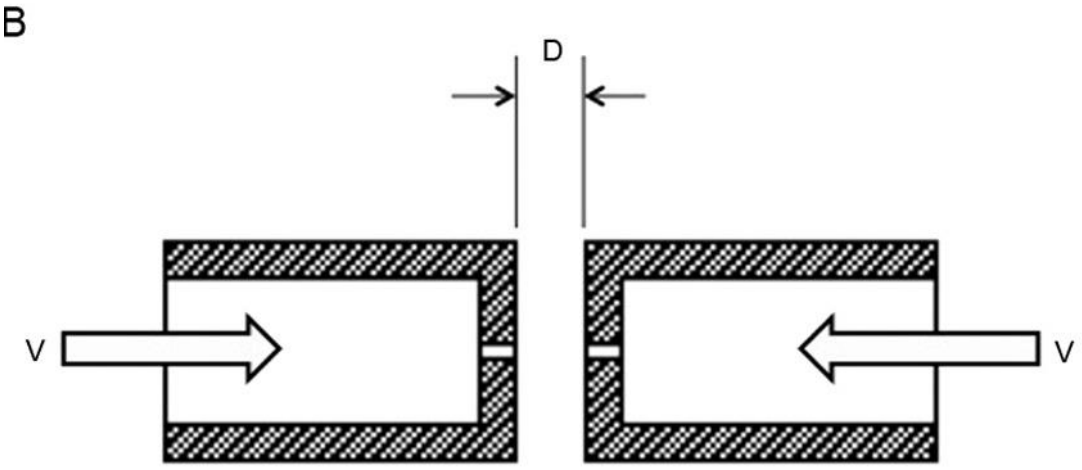


Figure 1. ΣPM-5 nanobubble generator. (A) Schematic representation of ΣPM-5. Water was pumped into the pressure tank where water and oxygen were mixed at 0.4 MPa. The oxygenated water was then pushed out through the small holes in the nozzle. (B) The schematic representation of the nozzle. Two small holes were placed horizontally in the nozzle. The pressurized and oxygenated water pushed out from these holes will collide to create the nanobubbles.

図 1.　ΣPM-5 ナノバブル発生器。　（A）ΣPM-5 の模式図。 水と酸素を 0.4MPa で混合した圧力タンクに水をポンプで注入した。 次いで、酸素化された水をノズルの小さな孔を通して押し出した。　（B）ノズルの模式図。 2 つの小さな孔をノズル内に水平に配置した。 これらの孔から押し出された加圧され酸素を含む水が衝突して、ナノバブルを生成する。

Clonogenic assay under normoxic and hypoxic conditions. The cells plated into 6-well plates with RPMI-1640 normal medium and incubated at 37˚C in humidified 5% CO2 for 24 h. Follwing a medium change, using the medium with or without oxygen nanobubble, the hypoxic plates were directly incubated under hypoxic conditions (1% O2). After 24 h, the cells were irradiated at various doses (0, 2, 6, 10, and 14 Gy). After 72 h, the medium was changed to normal RPMI-1640 medium and the cells were monitored every 3 days until colonies were visible. The plates were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and the colonies were fixed with 99.5% ethanol and stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The colonies counted up to at least 50 cells after staining. The survival fraction (SF) was calculated as the mean (number of colonies counted/number of cells plated)/plating efficiency.

正常酸素状態および低酸素状態下でのクローン原性測定。細胞を RPMI-1640 正常培地で 6 ウェルプレートにプレーティングし､加湿 5％CO 2 中で 37℃で 24 時間培養した。培地を交換し、酸素ナノバブルの有無にかかわらず培地を用いて、低酸素プレートを低酸素条件下（1％O 2）で直接培養した。 24 時間後、細胞を種々の線量（0,2,6,10 および 14Gy）で照射した。 72 時間後、培地を正常 RPMI-1640 培地に交換し、コロニーが見えるようになるまで細胞を 3 日毎にモニターした。 プレートをリン酸緩衝食塩水（PBS）ですすぎ、コロニーを 99.5％エタノールで固定し、0.5％クリスタルバイオレット（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）で染色した。 コロニーは、染色後少なくとも 50 細胞まで計数した。 生存率（SF）は、平均（計数したコロニー数/プレートされた細胞数）/メッキ効率として計算した。

Statistical analysis.

For continuous variables, the data are expressed as the means ± standard deviation. Cell viability between the treatment groups was analyzed using JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA). A Student's t-test was used to compare the oxygen nanobubble group with the control group. A probability P-value <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

統計分析

連続変数の場合、データは平均±標準偏差として表される。 処置群間の細胞生存率を、JMP ソフトウェア（SAS Institute、Cary、NC、USA）を用いて分析した。 平均値比較検定を用いて酸素ナノバブル群と対照群とを比較した。 確率 P 値<0.05 は、統計的に有意な差を示すと考えられた。

Result

Characterization of ΣPM-5.

The schematic representation of ΣPM-5 is shown in Fig. 1A. The oxygen was mixed with the water in the pressurized tank at 0.4 MPa. The oxygenated water was then pumped out from the small hole (diameter, 0.3-0.6 mm) in the nozzle (Fig. 1B). The velocity of water through the hole was calculated based on the flow rate measurement (Fig. 2A).

The high velocity water through the small hole will collide with the water from the other small hole placed horizontally. The energy of water collision was calculated as follows: 1/2 mV2 + 1/2 mV2 = mV2 (m, mass). The impact force was then calculated as follows: F = mV2/½ D (D, distance between the small hole). The collision energy force with the distance adjusted at 2 mm is shown in Fig. 2B.

結果

ΣPM-5 の特性評価

ΣPM-5 の略図を図 1A に示す。 加圧タンク内の水と酸素を 0.4MPa で混合した。 次いで、酸素化された水をノズル（図 1B）の小さな孔（直径 0.3～0.6mm）から汲み出した。 孔を通る水の速度は、流量測定に基づいて計算された（図 2A）。

小さな孔を通る高速の水は、水平に置かれた他の小さな孔からの水と衝突する。 水衝突のエネルギーは、次のように計算された : 1/2 mV2 + 1 / 2mV2 = mV2（m、質量）。 次

に、衝撃力を以下のように計算した：F = mV2 / 1 / 2D（D、小孔間の距離）。 2mm に調整した距離の衝突エネルギー力を図 2B に示す

Characterization of nanobubbles.

The oxygen nanobubble-containing water was created by ΣPM-5 from pure water and oxygen. The nanobubble water was then diluted to 1:100 and embedded in amorphous ice. The samples were then observed using a cryo-transmission electron microscope. Pure water was used as the control. As shown in Fig. 3A, no particles appeared in amorphous ice prepared from pure water. As shown in Fig. 3B, the amorphous ice prepared from the oxygen nanobubble-containing water contained oxygen nanobubbles. In the area encircled by red broken lines, a dark contrast originating from the isolated nanobubbles was observed. The mean size was approximately 2-3 nm in diameter. On the other hand, in the area encircled by yellow broken lines, a necklace-like dark contrast originating from linear arrangement of nanobubbles was recognized. This result indicated that the nanobubbles partly aggregated. The volume of amorphous ice used for measurement was 1.8x10-14 ml (300x300x200 nm thickness) and contained around 360 bubbles inside. Since the nanobubble water sample was diluted 100-fold, the particle number of oxygen nanobubbles was calculated to be 2x1018 particles/ml.

ナノバブルの特性評価

酸素ナノバブル含有水は、純水と酸素から ΣPM-5 によって生成された。次いでナノバブル水を 1：100 に希釈し、非晶質氷に包埋した。次いで、試料をクライオ電子顕微鏡によって観察した。コントロールとして純水を使用した。図 3A に示すように、純水から調製した非晶質氷中には粒子は現れなかった。図 3（b）に示すように、酸素ナノバブル含有水から調製された非晶質氷には、酸素ナノバブルが含まれていた。赤い破線で囲んだ領域では、分離したナノバブルに由来する暗いコントラストが観察された。平均サイズは直径約 2〜3 nm であった。一方、黄色の破線で囲んだ領域では、ナノバブルの線状配列に由来するネックレス状の暗コントラストが認められた。この結果は、ナノバブルが部分的に凝集していることを示した。測定に使用した非晶質氷の体積は、1.8×10-14 ml（300×300×200 nm の厚さ）であり、内部には約 360 個のバブルを含んでいた。ナノバブル水試料を 100 倍希釈したので、酸素ナノバブルの粒子数は 2×10 18 個/ ml と算出された。

（訳者注）クライオ型電子顕微鏡：生体内の構造を生のまま極低温で観察可能にした透過型電子顕微鏡。開発者は 2017 年にノーベル化学賞を受賞。

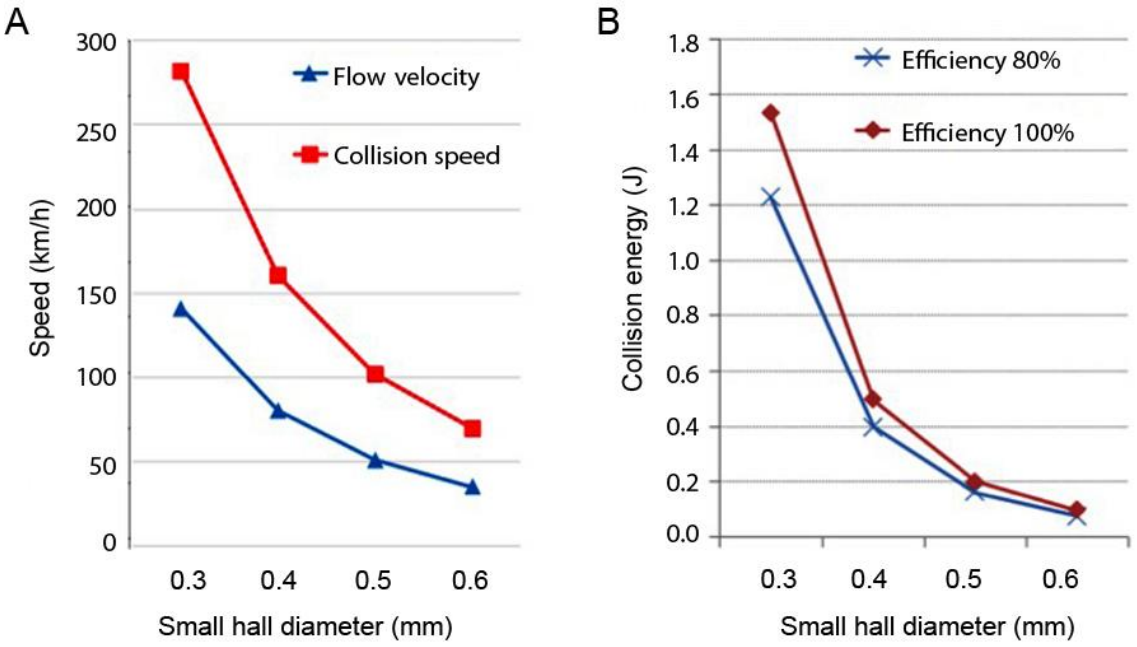


Figure 2. Speed and energy of water in the ΣPM-5 nozzle. (A) The calculated speed of water collision based on the diameter of the small holes in the nozzle. Flow velocity through the small holes (blue) and the collision speed of water in the nozzle (red) are shown. (B) The calculated collision energies of water in the nozzle are shown.

図 2.　ΣPM-5 ノズル内の水の速度とエネルギー　（A）ノズルの小さな孔の直径に基づいて計算された水の衝突速度。 小孔を通る流速（青色）とノズル内の水の衝突速度（赤色）が示されている。　（B）ノズル内での水の計算された衝突エネルギーを示す。

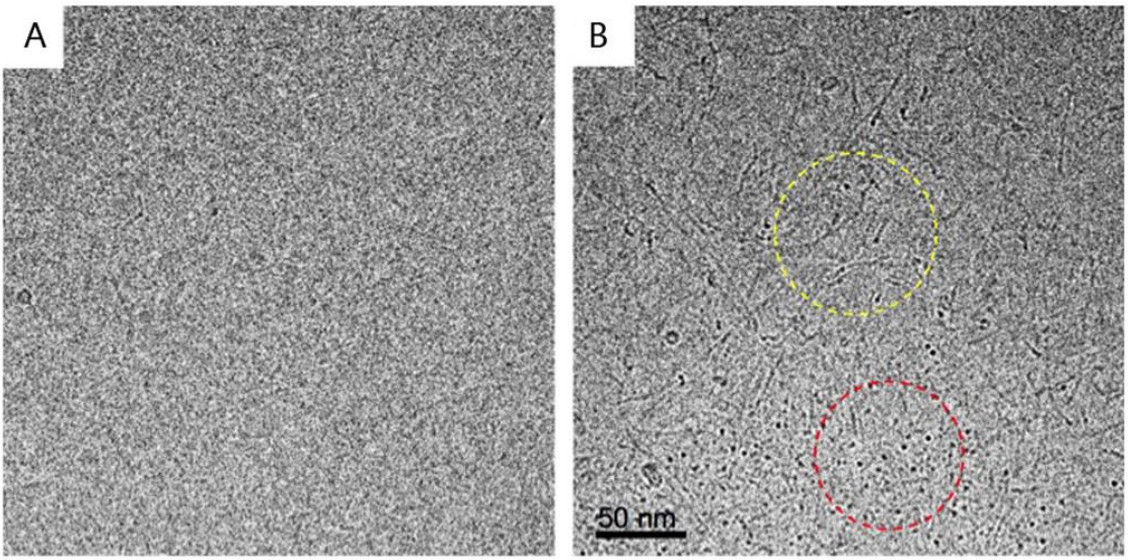


Figure 3. Characterization of nanobubbles produced by the ΣPM-5 device. (A) Representative image of amorphous ice prepared from pure water by cryo-transmission electron microscopy. No contrast from nanobubbles appears in the image. (B) Representative image of oxygen nanobubble water. Nanobubbles are visible as darker spots in the image. The area encircled in red highlights isolated nanobubbles, and the area encircled in yellow highlights linear arrangement of nanobubbles. Scale bar, 50 nm.

図 3.　ΣPM-5 デバイスによって生成されたナノバブルの特性。　（A）クライオ電子顕微鏡による純水から調製した非晶質氷の代表的な画像。 ナノバブルとの対比は画像には現れていない。　（B）酸素ナノバブル水の代表画像。 ナノバブルは、画像内に、より暗いスポットとして見える。 赤色で囲まれた領域は、分離されたナノバブルを強調表示し、黄色で囲まれた領域は、ナノバブルの線状配列を強調している。

Oxygen nanobubble medium suppresses hypoxia-induced HIF-1α expression. The overexpression of HIF-1α correlates with the resistance of cells to radiation (21,22). We thus examined whether treatment with oxygen nanobubble medium can overcome the hypoxia-induced resistance of human cancer cells to radiation. The EBC-1 and MDA-MB-231 cells were pre-incubated in medium with or without oxygen nanobubbles for 24 h, and were then analyzed for HIF-1α expression after 6 and 24 h of exposure to hypoxic conditions. We found that the oxygen nanobubble water clearly suppressed hypoxia-induced HIF-1α expression in the EBC-1 and MDA-MB-231 cells (Fig. 4A). We validated that this hypoxic condition induced the resistance of both the EBC-1 and MDA-MB231 cells to radiation (Fig. 4B).

酸素ナノバブル媒体は、低酸素誘導性 HIF-1α 発現を抑制する。 HIF-1α の過剰発現は、放射線に対する細胞の抵抗性と相関する（21,22）。 本発明者らは、酸素ナノバブル媒体を用いた治療が、ヒト癌細胞の低酸素誘発性放射線耐性を克服できるか否かを検討した。 EBC-1 および MDA-MB-231 細胞を、酸素ナノバブルの有無にかかわらず、24 時間、培地中でプレ培養し、低酸素条件に 6 時間および 24 時間曝露した後、HIF-1α 発現について分析した。 **我々は、シグマテクノロジー社のΣＰM-５で作製した平均ナノバブル径３nm の界面活性剤等の不純物を含まない酸素ナノバブル水が、EBC-1 肺癌細胞および MDA-MB-231 乳癌細胞における低酸素誘導 HIF-1α 発現を明らかに抑制したことを見出した（図 4A）。** 本発明者らは、この低酸素状態が EBC-1 および MDA-MB231 細胞の放射線に対する抵抗性を誘導することを立証した（図 4B）。

Oxygen nanobubble medium alters cancer cell viability upon exposure to hypoxic conditions and radiation treatment.

We treated the EBC-1 and MDA-MB-231 cells with radiation at doses of 0, 2, 6, 10, and 14 Gy to examine their sensitivities to radiation under both normoxic and hypoxic conditions (Fig. 5). Under hypoxic conditions, we demonstrated that our oxygen nanobubble medium enhanced the sensitivity of the EBC-1 cells to radiation compared to the normal medium at 2, 6, 10, and 14 Gy doses of radiation. as evidenced by a decreased cell viability upon oxygen nanobubble treatment (Fig. 5A, left panel). This effect was not significant in the MDA-MB-231 cells; however, we observed a similar tendency in these cells as in the EBC-1 cells (Fig. 5A, right panel). On the other hand, colony formation assay revealed that the oxygen nanobubble medium significantly suppressed the hypoxia-induced resistance of both the EBC-1 and MDA-MB231 cells to radiation compared to the normal medium at 2, 6, 10, and 14 Gy doses of radiation (Fig. 5B).

酸素ナノバブル媒体は、低酸素状態への暴露および放射線治療時の癌細胞の生存率を変化させる。

正常酸素状態と低酸素状態の両方で放射線に対する感受性を調べるために、0,2,6,10 および 14Gy の線量で EBC-1 および MDA-MB-231 細胞を処理した（図 5）。低酸素条件下で、本発明者らは、酸素ナノバブル媒体が、放射線の 2,6,10 および 14Gy 線量で正常培地と比較して放射線に対する EBC-1 細胞の感受性を増強したことを示した。酸素ナノバブル処理時の細胞生存率の低下によって証明される（図 5A、左パネル）。この効果は、MDA-MB-231 細胞では有意ではなかった。しかし、我々は、EBC-1 細胞におけるのと同様の傾向を観察した（図 5A、右パネル）。一方、コロニー形成測定は、酸素ナノバブル媒体が、2,6,10 および 14Gy 線量での正常培地と比較して、EBC-1 および MDA-MB231 細胞の低酸素誘発耐性を放射線に対して有意に抑制したことを明らかにした（図 5B）。

Normoxic application of oxygen nanobubble medium does not affect the survival or radiosensitivity of lung cancer, breast cancer, or non-cancer cell *lines.*

The viability of the EBC-1 lung cancer, MDA-MB-231 breast cancer and non-cancerous

酸素ナノバブル媒体の無毒性の適用は、肺癌、乳癌、または非癌細胞系の生存または放射線感受性に影響しない。

EBC-1 肺癌、MDA-MB-231 乳癌および非癌性乳癌の生存率。

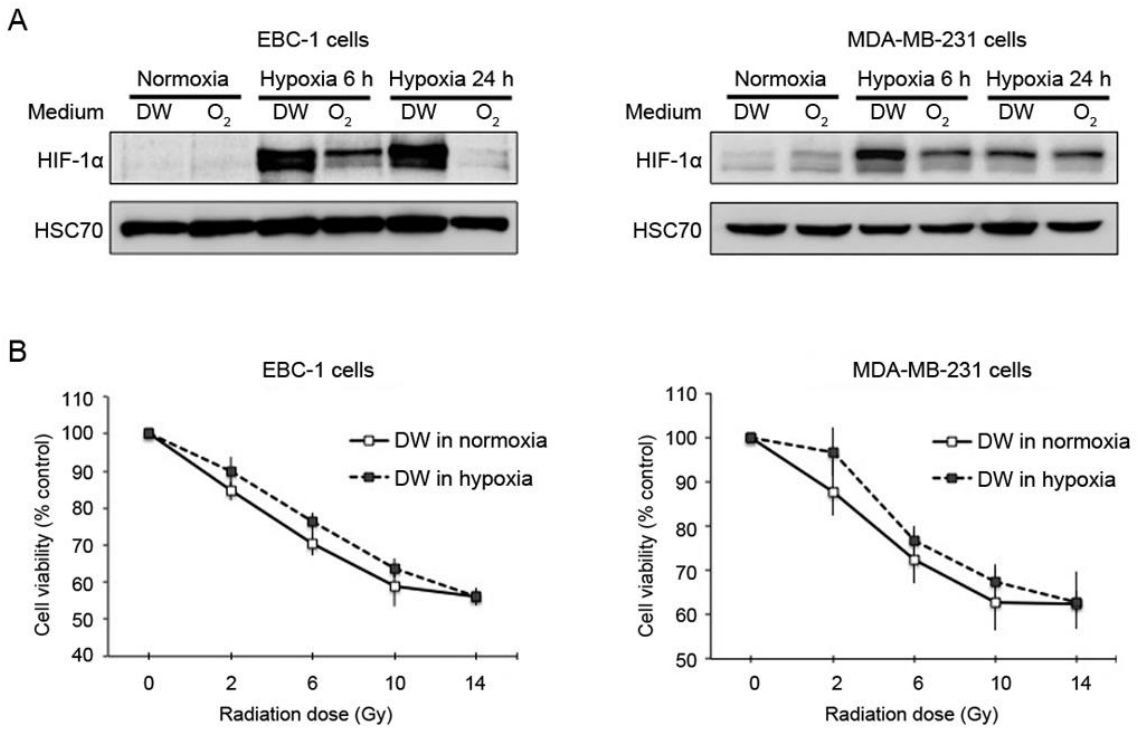


Figure 4. Oxygen nanobubble water suppresses HIF-1α accumulation in hypoxic cancer cells. (A) HIF-1α and HSC70 protein expression in the EBC-1 lung cancer cell line and MDA-MB-231 breast cancer cell line was evaluated by western blot analysis after 6 and 24 h of exposure ot hypoxia. Oxygen nanobubble medium clearly suppressed HIF-1α induction under hypoxic conditions. (B) Hypoxia-induced radiation resistance was validated in both the EBC-1 and MDA-MB-231 cells. DW, normal medium; O2, oxygen nanobubble medium.

図 4. **酸素ナノバブル水は、低酸素癌細胞における HIF-1α の蓄積を抑制する。** （A）EBC-1 肺癌細胞株および MDA-MB-231 乳癌細胞株における HIF-1α および HSC70 タンパク質発現を、低酸素暴露の 6 時間および 24 時間後にウエスタンブロット分析によって評価した。酸素ナノバブル媒体は、低酸素条件下で HIF-1α 誘導を明らかに抑制した。（B）低酸素誘発放射線耐性は、EBC-1 および MDA-MB-231 細胞の両方で確認された。DW、正常培地; O2、酸素ナノバブル媒体。

（訳者注）**ウエスタンブロット(Western Blot)**とは，抗体を用いて特定のタンパク質の存在を検出する手法。

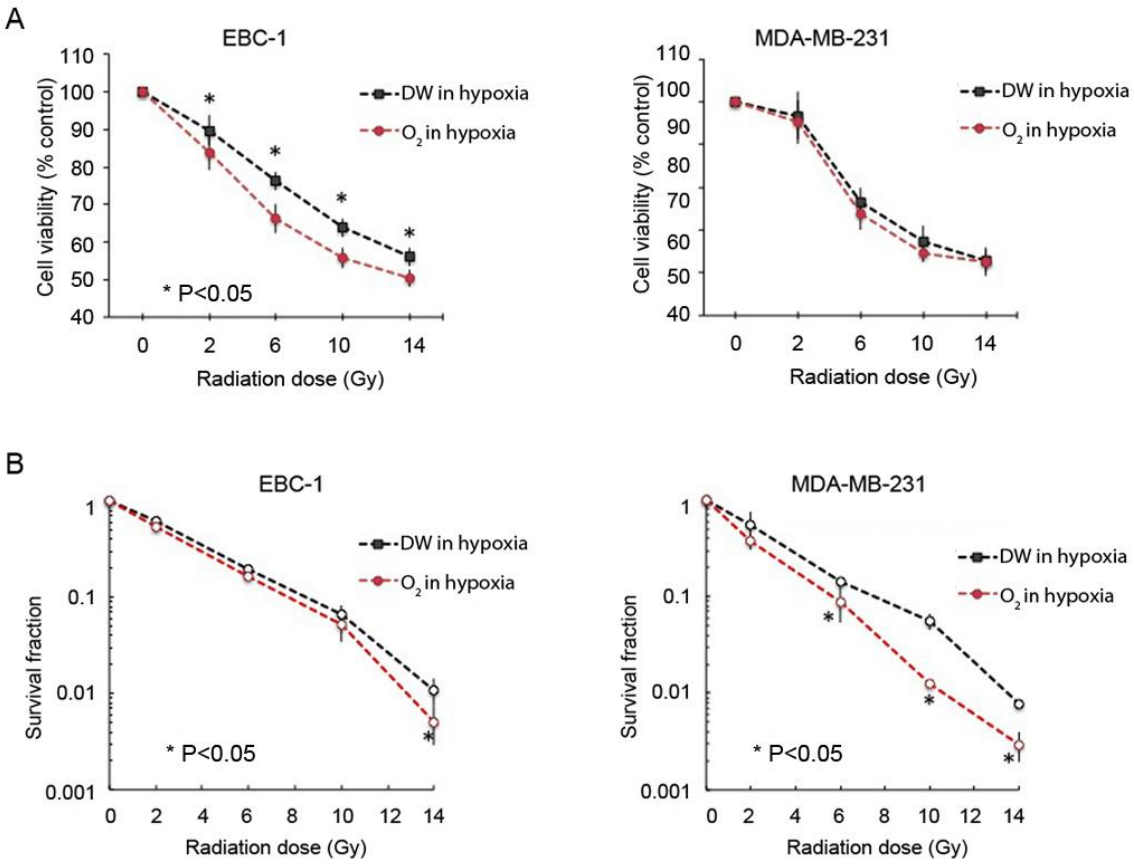


Figure 5. Oxygen nanobubble medium reverses hypoxia-induced radiation resistance in EBC-1 lung cancer and MDA-MB-231 breast cancer cells. (A) Cell viability assay showed that oxygen nanobubble medium suppressed hypoxia-induced radiation resistance in EBC-1 cells. A similar effect was observed with the MDA-MB-231 cells, although this was not significant; however, a similar tendency was validated. (B) Clonogenic assay revealed that oxygen nanobubble medium suppressed the hypoxia-induced resistance of EBC-1 and MDA-MB-231 cells to radiation. DW, normal medium; O2, oxygen nanobubble medium.

図 5.　酸素ナノバブル培地は、EBC-1 肺癌および MDA-MB-231 乳癌細胞における低酸素誘発放射線耐性を逆転させる。（A）細胞生存率測定は、酸素ナノバブル媒体が EBC-1 細胞における低酸素誘導性放射線耐性を抑制したことを示した。 MDA-MB-231 細胞でも同様の効果が認められたが、有意ではなかった。 しかし、同様の傾向が確認された。（B）クローン化測定は、酸素ナノバブル媒体が EBC-1 および MDA-MB-231 細胞の低酸素誘発耐性を放射線に抑制することを明らかにした。 DW、正常培地; O2、酸素ナノバブル媒体。

BEAS-2B bronchial cells was not affected by treatment with oxygen nanobubble medium under normoxic conditions (Fig. 6A). Furthermore, the sensitivity of the EBC-1, MDA-MB231 and BEAS-2B cells to radiation was not affected by oxygen nanobubble treatment under normoxic conditions (Fig. 6B).

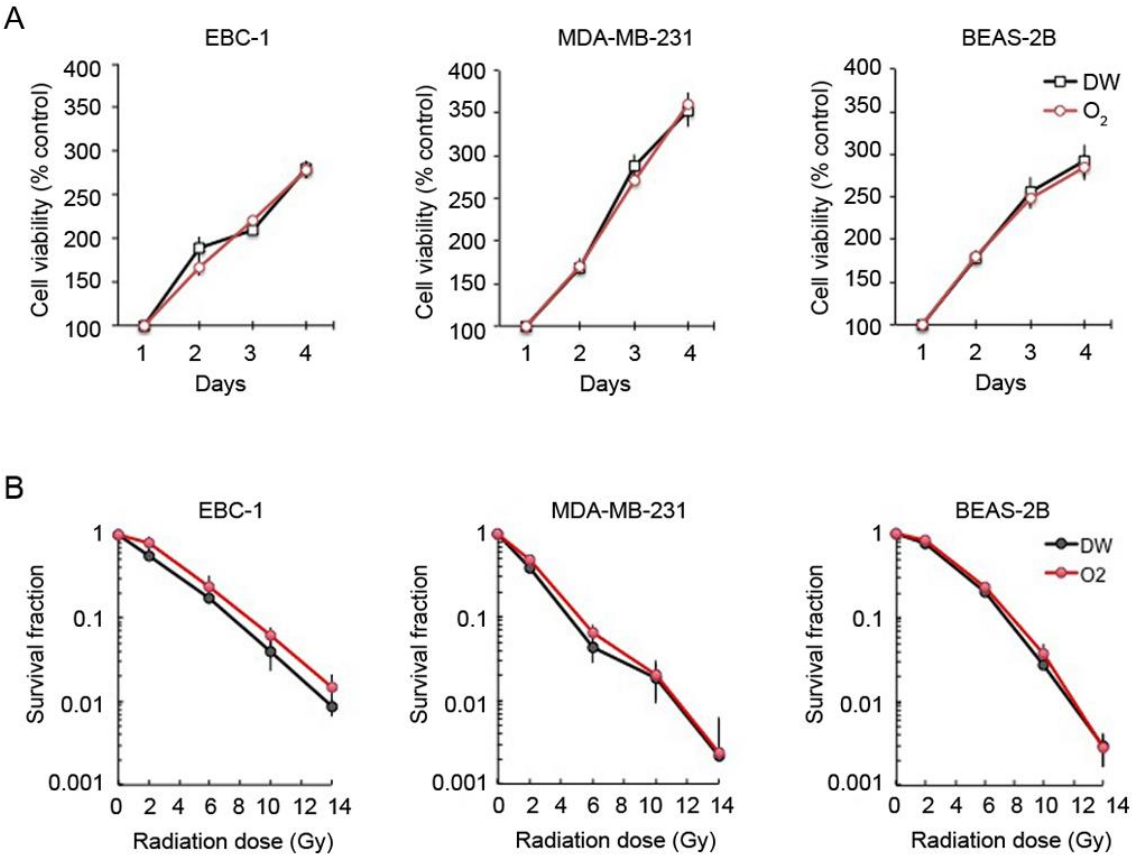


Figure 6. Oxygen nanobubble medium treatment under normoxic conditions is non-toxic to cancer and non-cancer cell lines. (A) CCK8 assay revealed that oxygen nanobubble medium did not reduce the viability of EBC-1 lung cancer, MDA-MB-231 breast cancer, or non-cancerous BEAS-2B bronchial cells compared to normal medium. (B) Clonogenic assay revealed that oxygen nanobubble medium did not affect the radiation sensitivity of EBC-1, MDA-MB-231, or BEAS-2B cells compared to normal medium.

図 6. 正常酸素状態下での酸素ナノバブル媒体処理は、癌細胞および非癌細胞株に対して無毒である。 （A）CCK8 測定は、酸素ナノバブル媒体が、正常培地と比較して、EBC-1 肺癌、MDA-MB-231 乳癌、または非癌性 BEAS-2B 気管支細胞の生存率を低下させないことを明らかにした。 （B）クローン化測定は、酸素ナノバブル媒体が、正

常培地と比較して、EBC-1、MDA-MB-231 または BEAS-2B 細胞の放射線感受性に影響しないことを明らかにした。

Discussion

In this study, we produced oxygen nanobubble water at a single nanometer size using the nanobubble water preparation device, ΣPM-5. The characterization of the oxygen nanobubbles using a cryo-transmission electron microscope verified that the nanobubbles were at the single-nanometer range. Moreover, the results of *in vitro* experiments demonstrated that the oxygen nanobubble water significantly enhanced the the sensitivity of human lung cancer and breast cancer cell lines to radiation under hypoxic conditions via the suppression of HIF-1α expression.

討論

本研究では、ナノバブル水製造装置 ΣPM-5 を用いて、単一ナノメートルサイズの酸素ナノバブル水を製造した。 クライオ電子顕微鏡を用いて、酸素ナノバブルが単一ナノメートル範囲にあることがわかった。 さらに、(細胞培養)ウエルプレート実験の結果、酸素ナノバブル水が、HIF-1α 発現の抑制を介して低酸素条件下でのヒト肺癌および乳癌細胞株の放射線に対する感受性を有意に増強したことが実証された。

Nanobubble water refers to a liquid containing small bubbles typically with <200 nm in diameter (26). Unlike larger sized microbubbles which disappear relatively quickly, nanobubbles remain stable in water for a long period of time (28). Khier *et al* utilized oxygen gas filled particles to efficiently oxygenate human blood ex vivo without complement activation or hemolysis (29). Recently, Owen *et al* reported the delivery of oxygen through the oral administration of oxygen nanobubbles (25). Both research groups utilized lipid or surfactant to create and stabilize oxygen nanobubbles in a 50-200 nm range. In this study, we reported a newly developed method to create oxygen containing nanobubbles in the single-nanometer range. By utilizing a novel water hammer method, in which the pressurized oxygen saturated water collides in a high velocity, we produced oxygen-containing nanobubble water without any additives. The results from cryo-transmission electron microscopy measurement revealed stable oxygen nanobubbles in the single-nanometer range. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the creation and characterization of single nanometer-sized nanobubbles.

ナノバブル水は、典型的には<200nm の直径（26）の小さなバブルを含む液体を指す。

比較的速く消滅するより大きなサイズの微小バブルとは異なり、ナノバブルは長期間水中で安定している（28）。 Khier らは、酸素ガス充填粒子を利用して、補体の活性化または溶血を伴わずに生体外でヒトの血液を効率的に酸素化する（29）。最近、Owen らは、酸素ナノバブルの経口投与による酸素の送達を報告した（25）。両方の研究グループは、脂質または界面活性剤を利用して、酸素ナノバブルを 50～200nm の範囲で作り安定させた。本研究では、単一ナノメートルの範囲でナノバブルを含む酸素を生成する新しく開発された方法を報告した。加圧された酸素飽和水が高速で衝突する新しいウォーターハンマー法を利用して、無添加の酸素含有ナノバブル水を製造した。クライオ電子顕微鏡測定の結果は、単一ナノメートル範囲で安定した酸素ナノバブルを示した。私たちの知る限りでは、ナノメートルサイズの単一ナノバブル生成と特性を示す最初の研究である。

Resistance to radiation causes serious complications for patients with lung cancer. This resistance has been reported to be induced by several pathways, including those associated with hypoxia, tyrosine kinase receptors, AKT serine/threonine kinases, DNA damage repair, developmental pathways, adhesion pathways and inflammation (30,31). The decreased oxygen concentration, and subsequent increase in HIF-1α activity, is known to be associated with resistance to radiation, cell survival, angiogenesis and the proliferative activity of cancer cells (32-34). Therefore, in this study, we focused on the use of oxygen nanobubbles as a method to reoxygenate hypoxic cells and downregulate HIF-1α activity. Several downstream targets of HIF, such as mediators of angiogenesis, including vascular endothelial growth factor (VEGF), cell survival regulators including insulin-like growth factor (IGF)-related factors, and cell proliferation regulators, such as c-MYC and insulin-like growth factor 2 (IGF2), are strongly associated with resistance to radiation and cancer aggressiveness under hypoxic conditions (35). In this study, we demonstrated the ability of our oxygen nanobubble preparation to significantly reduce HIF-1α activity under hypoxic conditions; therefore, it may also modulate several of the important downstream mediators of radiation resistance and malignancy previously described.

放射線に対する耐性は、肺癌患者にとって重大な合併症を引き起こす。この抵抗性は、低酸素症、チロシンキナーゼ受容体、AKT セリン/スレオニンキナーゼ、DNA 損傷修復、発生経路、接着経路および炎症に関連する経路を含むいくつかの経路によって誘導されることが報告されている（30,31）。減少した酸素濃度およびそれに続く HIF-1α 活性の増加は、放射線、細胞生存、血管新生および癌細胞の増殖活性（32～34）に対する耐性と関連することが知られている。したがって、本研究では、低酸素細胞を再酸素化し、

HIF-1α 活性を下方制御する方法として、酸素ナノバブルの使用に焦点を当てた。血管内皮増殖因子（VEGF）を含む血管新生のメディエーター、インスリン様増殖因子（IGF）関連因子を含む細胞生存調節因子、および c-MYC およびインスリン様増殖因子などの細胞増殖調節因子のような HIF のいくつかの下流標的は、 （IGF2）は、低酸素状態下での放射線耐性および癌の攻撃性と強く関連している（35）。この研究では、酸素ナノバブル調製物が低酸素条件下で HIF-1α 活性を有意に低下させる能力を実証した。したがって、これはまた、以前に記載された放射線耐性および悪性腫瘍の重要な下流メディエーターのいくつかを調節し得る。

（訳者注）細胞の低酸素状態化によって低酸素誘導因子 HIF-1α が発現すると、①癌細胞から血管への新生血管を造りだす血管内増殖因子 VEGF を誘導され、また②アポトーシス耐性（弱った細胞を自殺させるミトコンドリアからの信号を阻害）が生じ、癌細胞が増殖する。

This study utilized our oxygen nanobubble water as a modulator of radiation sensitivity under hypoxic conditions. This nanobubble water included only water and single nano-meter-range oxygen bubbles, with an average size of 2-3 nm, without any chemical compounds. Small size bubbles have some advantages, including high stability and high oxygen occupancy compared to larger ones. On the other hand, the continuous administration of a high oxygen concentration is known to induce oxygen toxicity due to the production of reactive oxygen species (36,37). However, our nanobubble water did not affect the viability of human lung cancer, breast cancer, or non-cancerous bronchial cells under normoxic conditions. Additionally, the O2 concentration-measuring devices demonstrated that the low oxygen concentration of our experimental hypoxia bags was not altered by the oxygen nanobubble medium during exposure to hypoxia. Therefore, our data suggests that our nanobubble water functions to modulate intracellular hypoxia in cancer cells via the suppression of hypoxia-induced HIF-1α expression in spite of continuous hypoxic culture conditions.

この研究では、酸素ナノバブル水を低酸素条件下の放射線感受性のモジュレータとして利用しました。このナノバブルの水は、化学物質を一切含まず、水と、平均サイズが 2～3nm の単一ナノメートル範囲の酸素バブルのみを含んでいた。小さなサイズのバブルは、より大きなものと比較して高い安定性および高い酸素占有率を含むいくつかの利点がある。他方、高酸素濃度の連続投与は、活性酸素種の生成により酸素毒性を誘発することが知られている（36,37）。しかし、私たちのナノバブル水は、正常酸素状態のヒト肺癌、乳癌、または非癌性気管支細胞の生存率に影響を与えませんでした。さらに、O2 濃度測定装置は、我々の実験的低酸素袋の低酸素濃度が低酸素曝露中の酸素ナノバ

ブル媒体によって変化しないことを示した。したがって、本発明者らのデータは、我々のナノバブル水が、連続的な低酸素培養条件にもかかわらず、低酸素誘導因子 HIF-1α 発現の抑制を介して癌細胞における細胞内低酸素症を調節するように機能することを示唆する。

Neo-adjuvant radiation and chemoradiotherapy (CRT) have been considered as effective therapeutic tools to accomplish radical resection and down-staging in patients with lung cancer (38,39). Complete response is estimated as 14-40% by CRT (40,41); on the other hand, patients with lung cancer that develop disease refractory to these therapies often have poor outcomes (42). Radiation is known to cause severe side-effects, including lethal radiation fibrosis. However, modern radiation methodologies (including proton beam, heavy ion, stereotactic ablative body and intensity-modulated radiotherapies) are able to deliver precisely focused radiation to protect surrounding non-cancerous tissues, and effectively target refractory-prone hypoxic areas of tumors (43-45). Our data demonstrated that oxygen nanobubbles enhanced the sensitivity of human lung cancer cells and breast cancer cells to radiation under hypoxic conditions. In this study, we validated the efficacy of our oxygen nanobubble, across multiple tumor types, against radiation resistance and HIF-1α accumulation under hypoxic conditions. Therefore, oxygen nanobubble water may serve as a sensitizing adjuvant when administered in combination with low dose radiation, which may enhance the efficacy of treatment, without increasing toxicity, in cancer patients.

新補助的放射線および化学放射線療法（CRT）は、肺癌患者の根治的切除および下位病期分類に有効な治療手段として考慮されている（38,39）。完全な応答は、CRT（40,41）によって 14-40％と推定される。一方で、これらの療法に対して難治性の疾患を発症する肺癌患者は、しばしば不良な結果をもたらす（42）。放射線は、致命的な放射線線維症を含む重度の副作用を引き起こすことが知られている。しかし、現代の放射線療法（陽子ビーム、重イオン、定位アブレーション・ボディ、強度変調放射線治療を含む）は、周囲の非癌組織を保護するために正確に集中した放射線を送達し、腫瘍の難治性の低酸素領域を効果的に標的とする（45）。我々のデータは、酸素ナノバブルが、低酸素条件下でのヒト肺癌細胞および乳癌細胞の放射線に対する感受性を増強することを実証した。この研究では、低酸素条件下での放射線耐性および HIF-1α 蓄積に対する、複数の腫瘍タイプにわたる我々の酸素ナノバブルの有効性を検証した。したがって、酸素ナノバブル水は、癌患者において、毒性を増加させることなく、治療の有効性を増強することができる低線量放射線と組み合わせて投与する場合、増感補助剤として役立ち得る。

In conclusion, in this study, we developed and characterized pure oxygen nanobubble water, in the single nanometer range, without any additives other than water and oxygen. In our human cancer cell-based experiments, oxygen nanobubble water demonstrated the ability to protect against hypoxia-induced radiation resistance through the suppression of HIF-1α. Our additive-free single nanometer-range oxygen nanobubble water may prove to be a promising modulator against hypoxia/HIF-1α-mediated radiation refractory cancers, although further studies are required in order to test its safety and effectiveness. Future studies are warranted to examine the preventative and therapeutic potential of our nanobubble water in mouse tumor models of radiation resistance. Additionally, an important challenge for future experiments will be to validate the stability of nanobubbles *in vivo*. Recently, Bandhari *et al* demonstrated the ability to detect oxygen nanobubbles via hyperspectral dark-field microscopy in live cells *in vitro* and tumor tissue ex vivo, and via ultrasound imaging of *in vivo* tumors (46,47). Thus, we aim to employ these previously validated techniques for the detection of oxygen nanobubbles in tissue to examine the stability our oxygen nanobubbles *in vivo*. In addition, our *in vitro* experiments were performed in the presence of serum, therefore, the possibility exists that serum-specific cellular responses were elicited. However, we consider that serum may not be a critical factor to evaluate the relationship of hypoxia-induced radiation resistance and radiation sensitizers due to previous studies that have examined this relationship using serum-containing media (48-50). Nevertheless, to rule out any potential artifactual responses in our experiments due to the presence of serum, additional experiments are warranted under serum-free conditions.

結論として、**本研究では、水と酸素以外の添加物を一切含まない、一桁のナノメートルレンジの純粋な酸素ナノバブル水を開発し、その特性を明らかにした。我々のヒトがん細胞ベースの実験では、酸素ナノバブル水は、低酸素誘導因子 HIF-1α の抑制を介して低酸素誘導性の放射線耐性を防御する能力を示した。**我々の添加物を含まない単一ナノメートル範囲の酸素ナノバブル水は、その安全性および有効性を試験するためにさらなる研究が必要とされるが、低酸素/ HIF-1α 媒介性放射線不応性癌に対する有望な調節剤であることが判明する可能性がある。今後の研究では、マウス腫瘍モデルの放射線耐性のナノバブル水の予防的および治療的可能性を調べることが妥当である。さらに、今後の実験で重要な課題は、生体内でのナノバブルの安定性を検証することです。最近、Bandhari らは、試験管内および生体内腫瘍組織の生細胞および生体内腫瘍の超音波画像によって、ハイパースペクトル暗視野顕微鏡法を介して酸素ナノバブルを検出する能

力を実証した(46,47)。したがって、生体内の酸素ナノバブルの安定性を調べるために、組織内の酸素ナノバブルの検出にこれまでに検証されたこれらの技術を用いることを目指しています。さらに、本発明者らの試験管内実験は血清の存在下で行われたので、血清特異的細胞応答が誘発される可能性が存在する。しかし、我々は血清含有培地（48-50）を用いてこの関係を調べた先の研究のために、血清が低酸素誘導性の放射線耐性と放射線増感剤との関係を評価するための重要な因子ではないと考えている。それにもかかわらず、血清の存在に起因する我々の実験における潜在的なアーティファクト応答を除外するために、無血清条件下でさらなる実験が保証される

（訳者注）放射線治療や抗がん剤治療によって、癌細胞内に低酸素誘導因子 HIF-1α が発現し、これが放射線や抗がん剤の効果を阻害する。

Acknowledgements

This study was supported in part by the Japan Society for Promotion of Science (JSPS) Grant-in Aid for Scientific Research (Grant nos. 15K10085 and 22591450). A part of this study was supported by Osaka University Microstructural Characterization Platform as a program of 'Nanotechnology Platform' of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan. The authors are grateful to Mr. M. Nagata and Mr. K. Yoshiura in P.D.C.A. Inc. Japan for opening up new markets.

謝辞

この研究は、一部、日本学術振興協会（JSPS）の科学研究費補助金（助成金 15K10085 および 22591450）によってサポートされた。 本研究の一部は文部科学省「ナノテクノロジープラットフォーム」のプログラムとして、大阪大学微細構造評価プラットフォームの支援を受けて行われた。 執筆者は、新市場を切り開く P.D.C.A の Nagata 氏と Yoshiura 氏に感謝します。

（訳者注）原文中の利益相反などの書誌的事項については、省略しました。

以上