

大気圧プラズマによる活性酸素生成と細胞応答

Reactive Oxygen Species Induced by Atmospheric Plasma and Cellular Response

○近藤 隆¹、内山 英史^{1,2}、趙 慶利¹、田淵 圭章³、竹田 圭吾、石川 健治、堀 勝

(1. 富山大・医、2. 立山マシン、3. 富山大・遺伝子、4. 名大・ナノプラズマ)

○Takashi Kondo¹, Hidefumi Uchiyama^{1,2}, Zhao Qing-Li¹, Yoshiaki Tabuchi³, Keigo Takeda⁴, Kenji

Ishikawa⁴, Masaru Hori⁴ (1. Univ. of Toyama, Sch. of Med., 2. Tateyama Machine Co., 3. Univ. of

Toyama, Gene Ctr., 4. Nagoya Univ.)

E-mail: kondot@med.u-toyama.ac.jp

低温・大気圧プラズマの医療応用には、相互作用の本質を決定する「プラズマで生成される活性な粒子と生体との反応」をプラズマ照射側と生体側の両立場で分子レベルから捉えて、プラズマの生体への影響を解明し、相互作用を定量的に評価することが不可欠である。そこで、プラズマと細胞との相互作用について、気相・液相・細胞の各水準で生成する活性種を検討し、その定量的評価を実施した。水溶液中に生成する活性種について各種スピン捕捉剤を用いて EPR-スピン捕捉法で調べ、細胞内活性種の測定には蛍光試薬 (DAF-2, HE, DCFH, HPF, APF) を用いフローサイトメトリーで調べた。アポトーシス測定には Annexin V-FITC, PI 法を細胞死測定には CCK-8 法、網羅的遺伝子発現解析には GeneChip 法を用いた。以下に 1) 液相で生じる活性種、2) 細胞内活性種、3) 遺伝子応答について検討し、その得られた結果について述べる。

Ar プラズマにより水中に生成する主な活性酸素種は $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $\cdot\text{H}$ であった。プラズマによる $\cdot\text{OH}$ 生成に与える希ガスの影響は先行研究による超音波のそれと、微妙に異なった。非揮発性溶質を含む水溶液での反応は通常の $\cdot\text{OH}$ による付加反応や水素引き抜きによるもので、熱分解で生じるラジカル等は生成しなかった。一方、DMSO を用いると高濃度では超音波で熱分解によると思われる $\text{SO}_3^{\cdot-}$ がプラズマ照射でも認められた。この機構については、さらに検討が必要である。

Ar プラズマによる水中での $\cdot\text{OH}$ 生成量を同一生物学的効果 (15%アポトーシス生成条件) で X 線のそれと比較すると約 30 倍多かった。活性酸素検出用蛍光色素 5 種類の結果の比較したところ、プラズマ照射により、細胞内に生成する活性種は $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , OCl^- , および僅かな $\text{O}_2^{\cdot-}$ と思われる。尚、水溶液中に亜硝酸塩の生成が認められるので、細胞内にも存在すると思われる。

Ar プラズマ照射条件における N_2 の影響を調べるため 5%を添加したところ、Ar プラズマで生成する $\cdot\text{OH}$ ラジカル量は約半分となった。また、 N_2 添加により、プラズマで誘発される細胞致死効果は、短時間照射ではほぼ抑制された。Ar および $\text{Ar}+\text{N}_2$ プラズマの細胞への照射の影響を網羅的遺伝子発現解析法で調べたところ、アポトーシスの誘導遺伝子ネットワーク 15 遺伝子の中で 4 遺伝子の発現が、アポトーシスが誘導されない $\text{Ar}+\text{N}_2$ プラズマ群では認められなかった。一方、アポトーシスの抑制遺伝子ネットワーク 18 遺伝子の中で 6 遺伝子の発現が、アポトーシスが誘導される Ar プラズマ群では認められなかった。