

プラズマ活性培養液 (PAM) 内活性酸素・窒素種の解析

Scavenging effect of reactive oxygen and nitrogen species in the plasma-activated-medium

○倉家尚之¹, 田中宏昌¹, 石川健治¹, 橋爪博司¹, 中村香江², 梶山広明², 吉川史隆², 近藤隆³,
水野正明², 竹田圭吾¹, 近藤博基¹, 関根誠¹, 堀勝¹ (1.名大院工, 2.名大医, 3.富山大)

°Naoyuki Kurake¹, H. Tanaka¹, K. Ishikawa¹, H. Hashizume K. Nakamura², H. Kajiya², F.
Kikkawa², T. Kondo³, M. Mizuno², K. Takeda¹, H. Kondo¹, M. Sekine¹, and M. Hori¹

(1.Nagoya Univ. Eng., 2.Nagoya Univ. Med., 3.Toyama Univ.)

E-mail: kurake.naoyuki@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

研究背景 プラズマ照射培養液 Plasma Activated Medium (PAM)による、正常細胞に影響せず、がん細胞のみ殺傷するという選択毒性が報告されている[1]。現在、PAM が引き起こす選択的抗腫瘍機構の解明が望まれている。PAM 内活性酸素・窒素種 (RONS) が抗腫瘍効果に注目されており、PAM 内に生成した H_2O_2 、 NO_2^- の作用による抗腫瘍効果について報告してきた[2-3]。今回、他の RONS にも着目して、それらの消去剤を用いた解析で PAM 内抗腫瘍成分について評価したので報告する。

実験 6 ウェルプレート(Falcon)内の 3 mL の細胞培養液(DMEM(cat. no. 5796) (Sigma))に Ar 大気圧プラズマ(Ar 2 slm, 60 Hz 9 kV_{p-p})を 5 min 照射することで PAM を作製した。プラズマ噴出孔-液面間距離は 13 mm としたため、プラズマ発光領域は液面に非接触であった。照射後に、 H_2O_2 消去剤であるカタラーゼを 20 mg/L の濃度で添加するなど、消去剤添加の効果を見る試料を作製し、さらに 4 °C で 24 h 保管したものも同様に試料とした。各試料内の H_2O_2 濃度を化学プローブ試薬により定量した。U251SP(glioblastoma)1000 cells を播種し、24 h インキュベート(37°C、5% CO_2)後に、200 μL の試料を培養液として置換後再度培養し、24 h 後の細胞生存率を MTS アッセイ法により測定した。

結果 Fig. 1 に 24 h 培養後の U251SP 細胞生存率を示す。PAM により、ほぼ全ての U251SP 細胞が殺傷された。この PAM 内には $119.7 \pm 6.9 \mu\text{M}$ の細胞を死滅させる濃度の H_2O_2 が生成していた[2]。

カタラーゼ添加後、 $2.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ にまで H_2O_2 が減少し H_2O_2 の影響は除外されたとと言える。しかしながらその細胞生存率は $36.9 \pm 3.8\%$ で、抗腫瘍効果が現れた。さらにその抗腫瘍効果は 4 °C ・ 24 h 保管後も同程度に維持され、長寿命 RONS の生成が示唆された。他の RNOS についても消去剤の効果を調査した。結果を総括し、 H_2O_2 、 NO_2^- などの RNOS ではない、PAM 特有の抗腫瘍成分に着目した更に詳細な解析結果についても議論する。

謝辞 本研究の一部は KAKENHI の支援を受けた。

参考文献

- [1] H. Tanaka *et al.*, Plasma Medicine. 3 (2013) 265.
- [2] 倉家ら、第 62 回応物春 (2015) 13a-A28-6.
- [3] N. Kurake *et al.*, AEPSE2015 (Korea, 2015) P1-11.

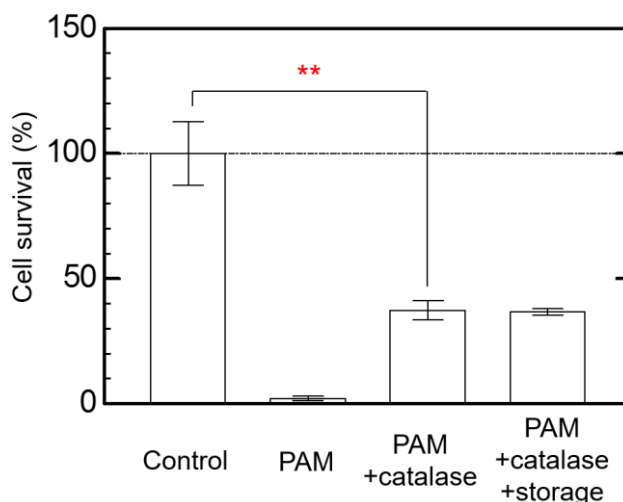


Fig. 1 Cell survivals of U251SP (glioblastoma) after 24 h of incubation with fresh medium (control), PAM, catalase added PAM or 24 h stored catalase added PAM at 4°C.