

リポソームを用いたプラズマ処理水による細胞内酸化ストレスの評価

Evaluation of intracellular oxidative stress by plasma-treated water

using liposome as an artificial cell

○寺脇 大紘¹、吉澤 俊祐²、白木賢太郎²、横山 高史¹、井川聡³、北野勝久¹

(阪大工¹、筑波大学数理²、大阪産業技術研究所³)

○Tomohiro Terawaki¹, Shunsuke Yoshizawa², Kentaro Shiraki²,

Takashi Yokoyama¹, Satoshi Ikawa³, Katsuhisa Kitano¹

(Eng. Osaka Univ.¹, Tsukuba Univ.², ORIST³)

E-mail: terawaki@plasmabio.com

大気圧低温プラズマを利用した様々な医療応用が進められており、我々はプラズマ処理水 (PTW: plasma-treated water) を用いた殺菌・消毒の研究を進めている。PTW は、pH 4.8 以下で、中性環境下と比較して劇的に殺菌力が劇的に向上することが知られており (低 pH 法)、この効果は $O_2\cdot$ と $HOO\cdot$ の酸解離平衡に起因していると考えている [1]。酸性下では $HOO\cdot$ 濃度が上昇する方向に平衡が傾き、この電氣的に中性な $HOO\cdot$ は細胞膜を容易に透過し、細胞内へ酸化ストレスを与えることで殺菌が進行する。PTW による殺菌効果を定量化するためには、細胞内酸化ストレスの評価が非常に重要となる。これまで、人工細胞として用いたミセルによる実験から、細胞外の $HOO\cdot$ 濃度と細胞内酸化ストレスが相関 (比例) していることが示されている [2]。本研究では、ミセルとは異なり脂質二重層膜内に内水層を持つリポソームを人工細胞として用い、内水層に活性酸素を検出する水溶性試薬を内包させておくことで、PTW による細胞内酸化ストレスを反応速度論に基づき評価することを試みた。Bangham 法により試薬内包リポソームを作成した。速度論的な評価を行うためには、粒径の制御は重要であり、エクストルージョンにより粒径を均一 (200nm) に揃えた (Fig. 1)。リポソーム合成時に使用した試薬は外水相にも混入しているため、ゲル濾過クロマトグラフィーによって試薬内包リポソームのみを取り出した。今回、活性酸素測定用の試薬として、残留塩素の測定で用いられる発色試薬である DPD (N,N-Diethyl-p-phenylenediamine) を用いた。DPD 内包リポソームと pH3.5、6.5 に調整した PTW を混合し、リポソーム中に存在する試薬の発色を分光光度計により測定した。pH の違いにより、リポソーム内 DPD 溶液の発色速度に違いが見られ、pH3.5 に調整した方が pH6.5 よりも発色速度が速くなっていた。pH の違いにより外水相の $HOO\cdot$ 濃度が変化したことで、膜を透過してリポソーム内へ浸透する速度の違いだと考えられる。今後、細胞内酸化ストレスをもたらしている活性酸素種の同定、定量化を行っていく予定である。

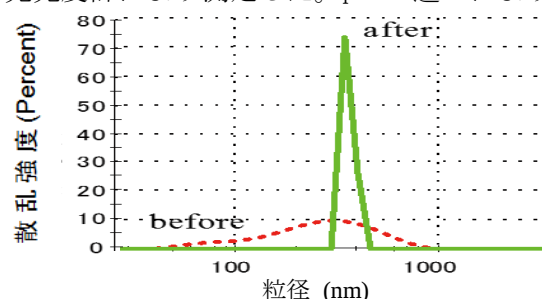


Fig.1 調整前後におけるリポソームの粒径

[1] S. Ikawa, Plasma Process. Polym., 7, 33 (2010). 特許第 4408957 号.

[2] E. Takai, S. Ikawa, K. Kitano, J. Kuwabara, K. Shiraki, J. Phys. D: Appl. Phys. 46, 295402 (2013).