

大気圧低温プラズマ照射によって生じる DNA 損傷の解析と活性種の同定

Analysis of DNA damage and production of reactive species induced by exposure to atmospheric pressure plasma

○宮近 沙希, 栗田 弘史, 上原 一馬, 安田 八郎, 高島 和則, 水野 彰 (豊橋技科大)

○Saki Miyachika, Hirofumi Kurita, Kazuma Uehara, Hachiro Yasuda,
Kazunori Takashima, and Akira Mizuno (Toyohashi Univ. of Tech.)

E-mail: s133453@edu.imc.tut.ac.jp

近年、プラズマ照射により水溶液中に生成する活性酸素種・活性窒素種 (RONS) がプラズマ医療応用において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。このことから、短寿命活性種の生成と生体分子損傷の関係がプラズマ医療応用において重要な知見になると考え、本研究ではプラズマ照射による DNA 損傷に着目した。水溶液中に生成する RONS 計測には電子スピン共鳴、蛍光プローブ、紫外線吸収などの方法が有効である。本研究では、電子スピン共鳴とスピントラッピング法を組み合わせることで溶液中 RONS の同定を試みた。一方、DNA 損傷は 5'末端を蛍光物質で、3'末端を消光物質で修飾した、ステムループ構造をとりうるオリゴヌクレオチド (Molecular beacon: MB) を利用した方法により評価した^[1]。酸化ストレスなどにより MB のステム部分が切断されると、それまで近接していた蛍光物質と消光物質が分離し、DNA 損傷を反映した蛍光増大が生じる。本研究では、電子スピン共鳴と MB による蛍光増大の結果を比較し、溶液中 RONS 生成と DNA 損傷の関係を解明できると考えた。

40 塩基の MB は 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、95°C、3 分間加熱した後ゆっくりと室温まで下げてステムループ構造を形成させた。この溶液 400 μ L を 24 穴プレートに分注して大気圧低温アルゴンプラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間で照射し、照射後の溶液の蛍光強度を測定した。同様の実験を、スピントラップ剤を溶解したリン酸ナトリウム緩衝液に対して行い ESR 測定を行った。

ESR 測定の結果、ヒドロキシルラジカル (\cdot OH) とスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 由来のスペクトルを検出した。これらのスペクトル強度は照射時間依存的に増大した (Fig. 1)。MB を用いた実験の結果、DNA 切断に由来する蛍光強度の増大においても同様の傾向を示した。溶液中 RONS が DNA 損傷に関わっていることが示唆された。

[1] H. Kurita, *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **107**, 263702 (2015)

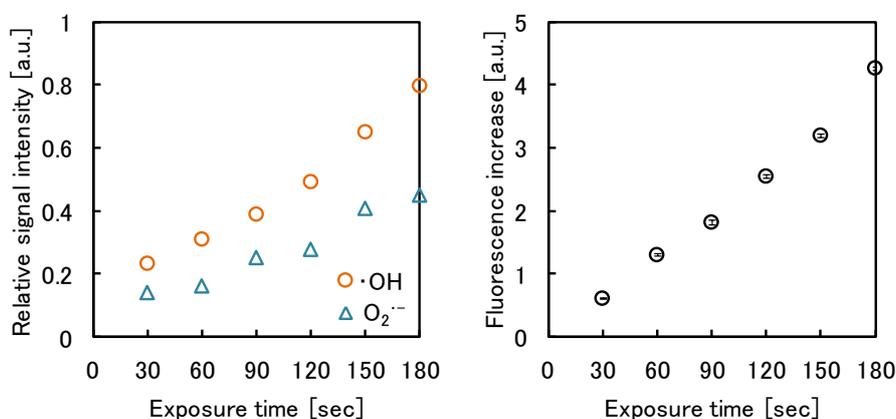


Fig. 1. (left) Relative signal intensities of the ESR spectra. The relative signal intensities were calculated using a manganese marker as an internal standard. (right) Fluorescence increase of MB plotted as a function of exposure time.