

大気圧プラズマ照射によって生じる細胞内 DNA 損傷の解析

Damage of intracellular DNA induced by atmospheric pressure plasma irradiation

○ 栗田 弘史、内橋 義人、宮本 潤一郎、高島 和則 (豊橋技科大)

○ Hirofumi Kurita, Yoshito Uchihashi, Junichiro Miyamoto, Kazunori Takashima
(Toyohashi Univ. of Tech.)

E-mail: kurita@ens.tut.ac.jp

大気圧低温プラズマは高い化学反応性を持つさまざまな活性酸素種・活性窒素種 (RONS: Reactive Oxygen and Nitrogen Species) を気相・液相に生成できる。RONS は DNA などの生体分子に酸化ストレスを与えることがあり、なかでも DNA 損傷はアポトーシスを誘導することが知られている。従ってプラズマ照射によって生じる DNA 損傷の解析は、がん治療などプラズマ医療応用に関連する細胞応答の解明に寄与すると考えられる。

我々はこれまでに Molecular beacon (MB) を利用した DNA 鎖切断迅速検出方法を開発している。MB は単鎖 DNA の両末端が蛍光色素と消光物質でそれぞれ修飾されており、かつ 2 重らせん構造によってこれらが近接するように設計されている。MB に DNA 切断が生じると近接していた修飾物質が分離し、DNA 損傷を反映した蛍光増大が生じる。これまでに MB 溶液や MB を内包したベシクルにプラズマ照射してその有用性を実証してきた^[1, 2]。本研究ではヒト由来の培養細胞に MB を人為的に導入し、プラズマ照射によって生じる細胞内 DNA 損傷の検出を試みた。

まず、ヒト肺がん由来培養細胞株である A549 細胞に MB を導入し、24 時間培養した後トリプシン処理を行い、 2.5×10^4 cells/mL となるように無血清培地に懸濁した。この懸濁液 1.0 mL を 24 穴プレートに入れてヘリウムプラズマジェットを 3 分間照射し、照射後の細胞懸濁液を即座にフローサイトメーターで測定した。また、RONS 反応性蛍光プローブ (CM-H₂DCFDA) を導入した細胞に対して同様の実験を行い、プラズマ照射後の細胞内 RONS レベルを測定した。

さらに、既存法であるコメットアッセイによりゲノム DNA 損傷を解析した。プラズマ照射後の細胞を即座に低融点アガロースに包埋し、細胞を溶解して電気泳動に供し、その後 DNA を染色して蛍光像を取得した。

Fig. 1 にフローサイトメトリー解析の結果を示す。MB を導入していない細胞ではプラズマ照射前後で蛍光強度に変化が生じなかったが、MB を導入してプラズマ照射した細胞では蛍光増大が認められた。同様の実験を RONS 反応性蛍光プローブを用いて行ったところ、プラズマ照射によって細胞内 RONS レベルが上昇した。また、コメットアッセイの結果、プラズマ照射によるゲノム DNA の損傷が有意に認められた。以上の結果から、MB を導入してプラズマ照射した細胞で認められた蛍光増大は DNA 損傷によるものであると考えられ、プラズマ照射中に生じた細胞内 DNA 損傷の迅速検出に成功したことを示唆している。

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

[2] E. Szili, *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. **50**, 274001 (2017)

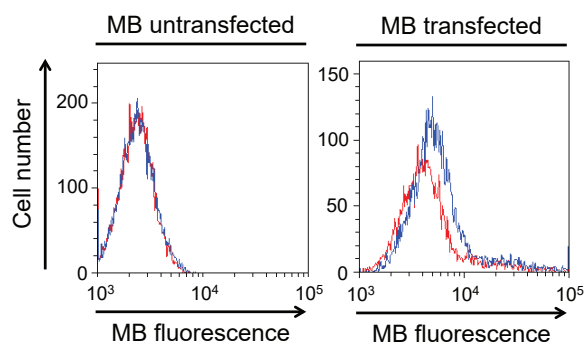


Fig. 1. Flow cytometric analysis of A549 cells, (red) before plasma irradiation, (blue) after plasma irradiation.