

哺乳類細胞における大気圧低温プラズマ照射に対する 応答機構の解明

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科応用化学・生命工学系

栗田 弘史

1. はじめに

大気圧低温プラズマは、反応性に富んだ粒子（イオン、ラジカル、電子、光子）を大気圧下で生成でき、その際に温度上昇をほとんど伴わないため、細胞や生体に直接照射することが可能である。このことから、プラズマ照射の創傷治癒・低侵襲止血への有効性や抗腫瘍効果を示す報告が相次ぎ、医療応用に関する研究が急速に進展している。特に、がん細胞へのプラズマ照射が自発的な細胞死であるアポトーシスを誘導することが注目されており、副作用の少ない新規ながん治療技術として期待されている。このことから、臨床を強く指向した研究が注目されているが、そのメカニズムの全容解明には至っていない。また、安全性の担保も重要な課題であり、例えば、プラズマ照射が誘発する DNA 損傷は、アポトーシス誘導に関与する一方で、遺伝毒性・変異原性にもなり得る。安全・安心な医療技術として確立するためには、現象のさらなる理解をもたらす分子レベル・細胞レベルの基礎研究が必要不可欠である。

2. プラズマ照射が誘発する細胞応答機構

現在広く受け入れられている大気圧低温プラズマ照射の生物学的作用の機序として、プラズマ照射によって細胞や組織の周辺に生成された活性種や反応生成物が細胞や生体分子に作用していると考えられている。すなわち、酸化ストレスが細胞や組織に誘発され、その程度に応じて様々な細胞応答を示す。また、照射方法は2種類に大別され、様々な方法で発生させた大気圧プラズマを直接作用させる直接照射と、あらかじめプラズマを照射した溶液を作用させる間接照射がある。いずれの照射形態においても、プラズマ照射によって気相に生成した活性種などと細胞を取り囲む水溶液の液面付近での反応や、気相で生成した安定な物質の液相への移行を経て溶液中に生成した活性種が生物学的作用を示す点で共通している。直接照射の場合には、プラズマと対象物との界面付近で局所的に生成した活性種が形成する特異な反応場が重要な役割を果たし、寿命の短い活性種が深部で作用することはほとんどないが、気液界面から細胞までの距離がごく短い場合には短寿命活性種の寄与も無視できないと考えられる。また、界面からの距離によって活性種の濃度分布が大きく異なる。一方、間接照射の場合には、酸化力が強く寿命の短い活性種の寄与はほとんどなく、過酸化水素など比較的安定な分子が細胞や生体分子に作用し、溶液中で均一に溶解しているため試薬のように扱うことができる。筆者らはこれまでに、プラズマ照射が細胞内の酸化ストレスレベルを上昇させ、ゲノム DNA に酸化的損傷を誘発することなどを報告しており^{1,2)}、さまざまな生体分子損傷が遺伝子発現変化などを経てアポトーシス誘導などより高次な生命現象を示すと考えられる。

3. パルス高電界の併用による細胞死の増強から見る細胞応答機構

プラズマ医療応用分野の進展により、様々な分子機構が明らかになる一方で、プラズマ照射だけでなく、抗がん剤など他の要素と組み合わせることでさらなる効果を得ようとする取り組みもなされている。本研究では、パルス高電界 (Pulsed electric field : PEF) に注目した。ミリ秒以下のごく短い時間だけ数 kV/cm の電場を細胞に対して印加しすると、細胞膜に穿孔が生じる。この現象は電気穿孔 (エレクトロポレーション : EP) と呼ばれ、細胞膜が自己修復可能な可逆的 EP は、遺伝子などの外来分子を細胞に人為的に導入する物理的手法として、細胞膜を修復不能にする非可逆的 EP は、食品加工プロセスにおける非加熱殺菌やがん治療に応用される。この現象が約 40 年前に初めて報告されて以来、電場による細胞膜穿孔メカニズムや外来分子導入メカニズムは実験・理論の両面から研究されており、電場強度・パルス幅・パルス回数などの電気的パラメータを様々な細胞種や用途に応じて制御することで利用される。

先行研究では、大気圧プラズマ照射とナノ秒パルス高電界 (nsPEF) を組み合わせると、それぞれ単独での処理と比較して細胞生存率が顕著に低下することが報告されている³⁻⁵⁾。しかし、そのメカニズムについては十分言及されていない。本研究では、プラズマ照射によって細胞の周囲に生成した活性酸素種の膜透過が、PEF 印加に伴う孔形成により促進し、細胞死を増強すると考え、実験的に検証した。

3.1 実験方法

本研究では、ヒト子宮頸がん由来培養細胞株である HeLa 細胞を用い、リン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) に懸濁して細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液 300 μ L を 96 ウェルプレートに入れ、アルゴンプラズマジェット (Ar-APPJ) を照射した。このとき、印加電圧 18 kV_{p-p}、周波数 17 kHz、Ar ガス流量 0.7 L/min、APPJ 照射口から液面までの距離 10 mm、照射時間を 5 分とした。また、対照として Ar ガスを同じ時間照射した試料も用意した。Ar-APPJ 照射の様子を図 1 に示す。

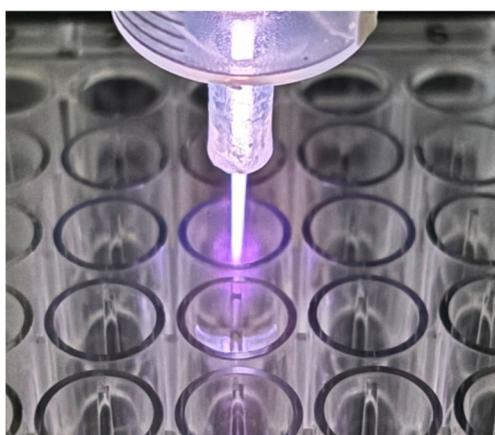


図 1 . Ar-APPJ 照射の様子

Ar-APPJ または Ar ガスを照射した後、細胞懸濁液 150 μ L をキュベット電極 (電極間距離 2 mm) に入れ、エレクトロポレーターを用いて正極性矩形波パルス (最大電圧 200 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 50 ms、パルス回数 2 回) を印加し、処理後の細胞を培地 (DMEM/FBS/PS) に回収して 24 時間培養した後、細胞生存率を測定した。

細胞内活性種レベルの測定では、RONS 反応性蛍光色素である CM-H₂DCFDA を負荷した細胞を D-PBS に懸濁して Ar-APPJ 照射および PEF 印加を行い、フローサイトメーターで細胞内活性酸素レベル変化を測定した。

PEF 印加に伴う孔形成を確認するため、カルセイン漏出を指標とした細胞膜損傷も測定した。細胞をカルセイン-AM で染色し、同様の処理を行った後、フローサイトメーターでカルセインの細胞外への漏出を測定した。

さらに、プラズマ照射が誘発する脂質過酸化を検出した。過酸化脂質検出色素 Liperfluo で細胞を前処理し、同様の処理を行った後、フローサイトメーターで蛍光強度変化を測定した。

3. 2 実験結果および考察

図 2 に Ar-APPJ 照射および PEF 印加から 24 時間後に細胞生存率を測定したところ、非処理 (Ar ガス照射) 群は $94.0 \pm 0.4\%$ 、PEF 印加のみの場合 $79.5 \pm 4.3\%$ 、Ar-APPJ 照射のみの場合 $66.6 \pm 14\%$ であったのに対し、Ar-APPJ 照射と PEF 印加を併用した場合に $29 \pm 19\%$ となり、それぞれ単独と比較して細胞死を有意に増強させることが示された。

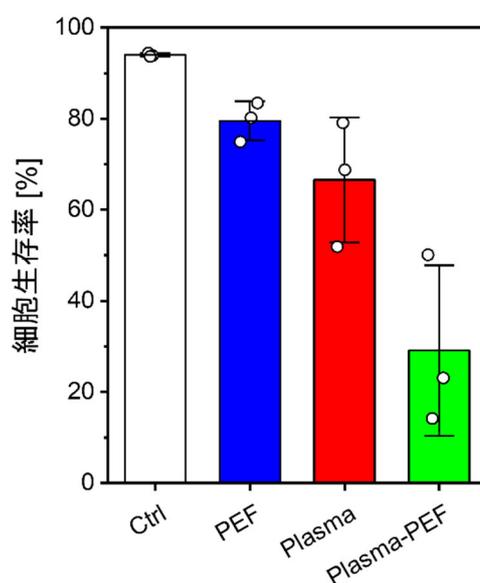


図 2. 処理から 24 時間後の細胞生存率

図 3 に細胞内活性種レベル変化を測定した結果を示す。非処理群と比較し、PEF 印加のみの場合は蛍光強度に変化が認められず、Ar-APPJ 照射により活性種レベルが有意に上昇し、Ar-APPJ 照射と PEF 印加を併用した場合に活性種レベル上昇の増強が認められた。

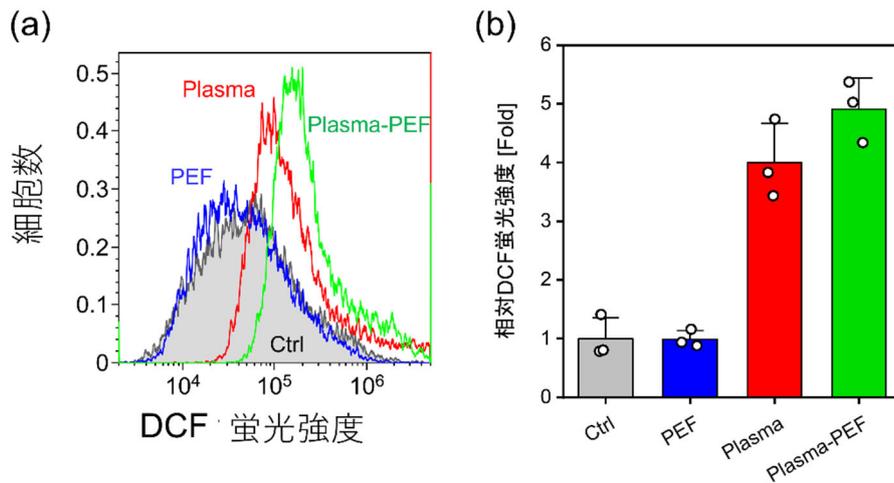


図3. 細胞内活性種レベル変化の測定 (a) フローサイトメトリーヒストグラム (b) 非処理群からの相対的な活性酸素レベルの変化

図4にカルセイン漏出を指標として細胞膜損傷を測定した結果を示す。非処理群と比較し、Ar-APPJ照射のみの場合はカルセイン蛍光強度低下が認められず、PEF印加により蛍光強度の低下が生じ、Ar-APPJ照射とPEF印加を併用することでさらに低下した。

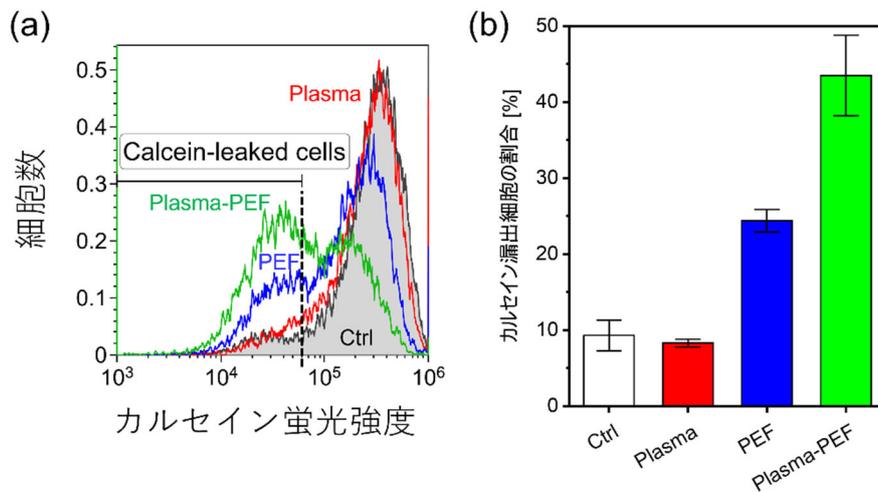


図4. カルセイン漏出を指標とした細胞膜損傷の測定 (a) フローサイトメトリーヒストグラム (b) カルセイン漏出が認められた細胞の割合

図5に脂質過酸化を測定した結果を示す。細胞内活性酸素レベル測定と同様に、非処理群と比較し、PEF印加のみの場合は蛍光増大が認められず、Ar-APPJ照射により蛍光強度の増大が生じた。

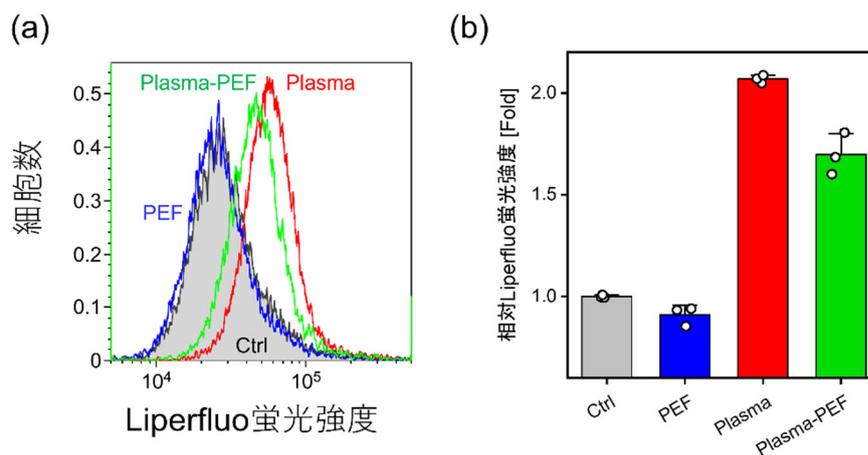


図 5. 脂質過酸化の測定 (a) フローサイトメトリーヒストグラム (b) 非処理群からの相対的な蛍光強度の変化

図 2 に示した、処理から 24 時間後の細胞生存率測定の結果から、Ar-APPJ 照射および PEF 印加それぞれ単独の処理では 50%を下回るような顕著な細胞生存低下は認められず、両者を組み合わせた場合に生存率が大きく低下した。このことは、今回設定した処理条件が、これに続く実験で示す細胞死増強メカニズムの解析に好適であることを示している。

図 3 では、Ar-APPJ 照射による細胞内活性酸素レベルの増大と、PEF 印加によるその増強が示された。また、図 4 では、PEF 印加によりカルセイン漏出が認められたことから、孔形成が示唆される。これらのことから、プラズマ照射によって細胞の周囲に生成した活性酸素種の膜透過が、PEF 印加に伴う孔形成により促進し、細胞死を増強したと考えられる。一方、Ar-APPJ 単独処理群ではカルセイン漏出が認められなかったことから、APPJ 照射はカルセイン漏出を生じるような細孔を形成しないことが考えられる。従って、APPJ 照射単独処理で認められた細胞内活性酸素レベル上昇と溶液中活性酸素生成との因果関係に、孔形成に伴う膜透過は関与しないことが考えられる。

また、図 4 では、Ar-APPJ 照射と PEF 印加を併用した場合に、Ar-APPJ 照射群と比較してカルセイン漏出が認められた細胞の割合が有意に増加した。このことは、Ar-APPJ 照射が PEF 印加による膜損傷を増強していることを示唆している。また、図 5 の結果は、Ar-APPJ 照射が細胞膜に過酸化脂質を生成することを示唆している。過酸化脂質は膜の流動性を低下させるため、PEF 印加に伴う膜損傷を増強することが知られている。また、膜損傷は細胞内の低分子量物質やイオンの流出を誘発し、細胞にダメージを与えると考えられる。従って、Ar-APPJ 照射と PEF 印加の併用による細胞死の増強には、活性種の膜透過だけでなく細胞膜損傷の増強が関与していると推察される。

4. まとめ

本研究では、Ar-APPJ 照射と PEF 印加の併用による細胞死増強とそのメカニズムの解析を通じ、プラズマ照射が誘発する細胞応答機構をこれまでと異なる側面から明らかにした。プラズマ照射によって細胞の周囲に生成した活性酸素種の膜透過が、PEF 印加に伴う孔形成により促進し、細胞死を増強することが示唆された。このとき、プラズマ照射単独では細胞膜

に孔形成を誘発しないことが考えられる。また、プラズマ照射は脂質過酸化を誘発し、PEF印加による細胞膜損傷を増強することが明らかになった。プラズマ照射と他の要素を組み合わせることで、相乗効果が得られることが示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Kurita, H.; Haruta, N.; Uchihashi, Y.; Seto, T.; Takashima, K. Strand breaks and chemical modification of intracellular DNA induced by cold atmospheric pressure plasma irradiation. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0232724.
- 2) Arai, S.; Bidbayasakh, K.; Fukuda, A.; Takashima, K.; Kurita, H. Oxidative modification in nuclear and mitochondrial DNA and its removal in A549 human lung cancer cells exposed to cold atmospheric-pressure plasma. *Japanese Journal of Applied Physics* **2022**, *61*, 096003.
- 3) Chung, T.H.; Stancampiano, A.; Sklias, K.; Gazeli, K.; Andre, F.M.; Dozias, S.; Douat, C.; Pouvesle, J.M.; Santos Sousa, J.; Robert, E.; et al. Cell Electroporabilisation Enhancement by Non-Thermal-Plasma-Treated PBS. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 219.
- 4) Wolff, C.M.; Kolb, J.F.; Bekeschus, S. Combined In Vitro Toxicity and Immunogenicity of Cold Plasma and Pulsed Electric Fields. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3084.
- 5) Oshin, E.A.; Minhas, Z.; Biancatelli, R.; Catravas, J.D.; Heller, R.; Guo, S.; Jiang, C. Synergistic effects of nanosecond pulsed plasma and electric field on inactivation of pancreatic cancer cells in vitro. *Scientific Reports* **2024**, *14*, 885.
- 6) Kitajima, N.; Makihara, K.; Kurita, H. On the synergistic effects of cold atmospheric pressure plasma irradiation and electroporation on cytotoxicity of HeLa cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, *26*, 1093.