

大気圧プラズマ照射とパルス高電界の併用による細胞死の増強 Synergistic effects of cold atmospheric pressure plasma irradiation and pulsed electric fields on cytotoxicity of HeLa cells

豊橋技科大 北嶋 侃, 牧原 孝佑, ○栗田 弘史

Toyohashi Univ. of Tech. Nao Kitajima, Kosuke Makihara, and ○Hirofumi Kurita

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

大気圧低温プラズマは、反応性の高い活性種を常温・常圧で生成でき、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。近年、殺菌、がん治療、創傷処置、止血など、医療への応用が期待されており、これらの作用は、プラズマ照射によって気相・液相に生成した活性酸素種・活性窒素種 (RONS) が、核酸やタンパク質などの細胞内生体分子に酸化ストレスを誘発することで生じるものと考えられている。

パルス高電界 (PEF) は、細胞膜に孔形成が可能で、細胞膜透過性の低い物質を細胞内に人為的に導入する技術として広く用いられている。また、カルシウムイオン導入やナノ秒パルス高電界 (nsPEF) によるがん細胞殺滅に関する研究も広まっており、がん治療への応用も可能であると考えられている。

Oshin らは、大気圧プラズマ照射と 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を報告している。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 (E. Oshin, *et al.*, 2024, *Sci. Rep.*, **14**, 885)。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 RONS 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。

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 μL 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 10 kV_{0-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。その後、細胞懸濁液 150 μL をキュベット電極 (電極間距離 2 mm) に入れ、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) を印加した。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。また、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 RONS レベル変化を測定した。さらに、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。

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、細胞死を増強させることが示された。Fig. 1(a) に細胞内 RONS 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 RONS レベルが上昇し、Ar-APPJ 照射と PEF 印加を併用した場合に RONS レベル上昇の増強が認められた。Fig. 1(b) にカルセイン蛍光強度の測定結果を示す。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。以上のことから、Ar-APPJ 照射と PEF 印加の併用による細胞死の増強には、RONS 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。

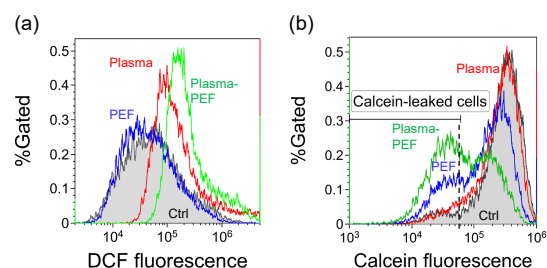


Fig. 1. Flow cytometry analysis of (a) intracellular RONS level and (b) calcein leakage.