



## 小特集 プラズマが誘導する生体応答とそのバイオ・医療応用

# 2. プラズマ処理水への暴露による HeLa 細胞の活性化・不活化応答

## 2. Activation and Inactivation Responses of HeLa Cells by Exposure to Plasma-Mediated Culture Media

佐藤 岳彦<sup>1)</sup>, 横山 茉代<sup>1)</sup>, 城倉 浩平<sup>2)</sup>

SATO Takehiko<sup>1)</sup>, YOKOYAMA Mayo<sup>1)</sup> and JOHKURA Kohei<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東北大学流体科学研究所, <sup>2)</sup>信州大学医学部

(原稿受付: 2015年7月1日)

プラズマを水面上に形成すると、過酸化水素や亜硝酸、硝酸などが水中に生成され、放電時間とともに濃度が増加する。そこで、これらの化学種が細胞へ与える影響について検証した。特に、プラズマ照射時に生成された過酸化水素濃度と同等の過酸化水素濃度を有する培養液を準備し、細胞応答について検討した。これより、プラズマが細胞障害を生じさせる場合、その主因となる化学種が過酸化水素であることを明らかにした。一方、細胞障害が生じない濃度であれば、同濃度の過酸化水素とは異なるプラズマ特有の遺伝子応答が誘導されることを、網羅的遺伝子解析により示した。

### Keywords:

plasma-mediated, hydrogen peroxide, culture medium, gene expression analysis, cell viability

## 2.1 はじめに

### 2.1.1 背景

近年、プラズマが生成する反応性化学種や光、熱、電界、衝撃波を利用したバイオ・医療応用の研究が急速に発展してきている[1, 2]。これは、生体が熱的な損傷を受けない程度に低温で生成できること、安全で簡便かつ低コストで生成できることなどに加え、生体に対してプラズマ特有の効果があることが認識され始めているためと考えられる。特に、現在進められている科研費の新学術領域「プラズマ医療科学の創成」(代表 堀勝)では、低温止血[3]、幹細胞の分化誘導法[4]、高効率遺伝子導入法[5]、がん細胞へのアポトーシス誘導法[6]、火傷の治療効果促進など[7]、多くの成果が報告されている。また、米国やドイツ、韓国などでも実用化に向けた研究が精力的に進められている。

例えば、ドイツのマックスプランク研究所の研究グループでは、慢性創傷の治療装置を開発し、長年に渡る臨床試験で成果を挙げ実用化に成功している。この研究では、雑菌の殺滅だけでなく細胞の活性化効果もあることが報告され、プラズマ特有の効果が明らかになりつつある[8]。具体的には、慢性創傷の治療や組織の損傷・回復に関係するサイトカインやコラーゲン、筋繊維芽細胞の産生に係わる遺伝子の発現などが確認されている。また、プラズマ照射により、DNAの損傷、細胞周期の阻害、接着性や遊走性の促進・抑制などが起こることが報告されている[7]。

このように、プラズマの様々な物理刺激を利用したバイ

オ医療応用の研究が進められているが、プラズマのどのような化学種が細胞に対してどのように効果を与えるのか、そのプロセスは大変複雑で、未だ十分には解明されていない。特に、細胞や細菌は水分に覆われていることが多いため、水分を介したプラズマの効果の輸送を明らかにする必要がある。すなわち、プラズマ-液体-生体系では、気中で生成された化学種がどのように反応し変化・消失していくのか、またどのように水中に溶解し細胞まで輸送されるのか、輸送された化学刺激がどのように細胞に影響を与えるのかなどを解明することは、プラズマ医療の研究において課題となっている。

### 2.1.2 大気中のプラズマ生成化学種の輸送

図1にプラズマ医療で利用されているプラズマ発生方法の代表的な例を示す。(a)-(c)に示すように、アルゴンやヘリウムガスで生成したプラズマを大気中に噴出させ対象に間接照射する方法と、(d), (e)に示すように大気中でプラズマを対象物上で生成し直接照射する方法が一般的に用いられている。(a)-(c)は希ガスを利用することで、高濃度の窒素酸化物やオゾンの生成を抑え、開放空間においても比較的 안전한利用が可能である。また、低温で生成が可能のため、幅広く利用されている。一方、(d), (e)は、ガスを供給する必要がないため利便性が高く、低コストでプラズマを発生できる。また、直接照射するためプラズマの効果をより高めることが可能である。一方、窒素酸化物やオゾンなどが比較的高い濃度で発生するため、その

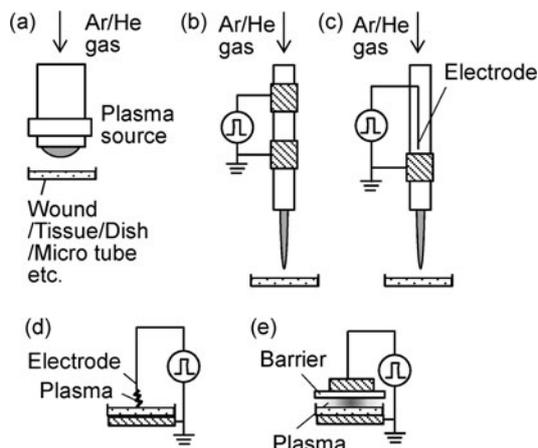


図1 プラズマ医療で利用されているプラズマ発生方法。

対策が必要となる。

著者らは、利便性や低コストを念頭に (d) タイプのプラズマ発生方法を利用してきた。図2の化学種輸送の模式図に示すように、プラズマは空気中で生成されるため、窒素、酸素、水蒸気などが解離・反応し、反応性の高いヒドロキシ (OH) ラジカルや酸素 (O) ラジカル、窒素 (N) ラジカルなどから、一酸化窒素 (NO)、二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>)、オゾン (O<sub>3</sub>)、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) などを生成する。また、気中に生成された化学種は水に溶解すると短時間でより安定な亜硝酸 (HNO<sub>2</sub>)、硝酸 (HNO<sub>3</sub>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などに変化する。そのため、液中の細胞に対しては、安定な化学種による細胞への影響を知ることが重要である。

2.1.3 プラズマが生成する安定な化学種の細胞への影響

プラズマには、細菌を殺滅する効果があることが知られているが、動物細胞においても同様に殺滅作用を有する。そこで、プラズマを発生させた時に水中に生成される溶存化学種について調べた。図3にガラスセルに満たされた純水1.6 mLの水面上1 mmに設置した針電極に電圧7.5 kV<sub>op</sub>, 5 kHzの矩形波を印加し、水面との間にプラズマを発生させた時の溶存化学種濃度の時間変化を示す。空気プラズマ流が生成する主たる安定な化学種は、HNO<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> であり、HNO<sub>3</sub> についても HNO<sub>2</sub> と活性酸素との反応から生成されることが知られている。そこで、HNO<sub>2</sub> および HNO<sub>3</sub>

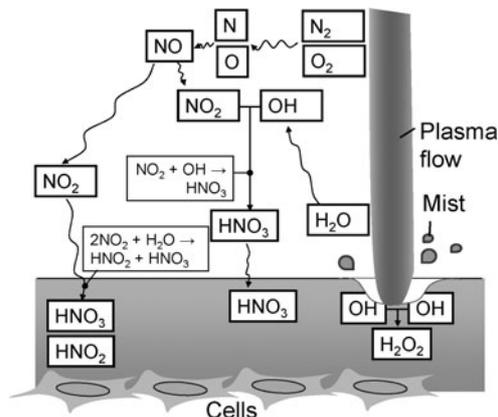


図2 大気中に生成したプラズマ流の化学種輸送の模式図。

を添加した培養液で細胞を48時間培養させたときの HeLa 細胞の生存率を図4に示す。なお、各濃度につきサンプル数は18個でエラーバーは標準誤差である。HNO<sub>2</sub> は 2.5 mM (118 mg/L), HNO<sub>3</sub> は 5 mM (315 mg/L) の濃度まで細胞不活化作用はみられない。図3より HNO<sub>2</sub> は、60 s のプラズマ照射により 8 mg/L 生成されていることから、HNO<sub>2</sub> は細胞に障害を与える主因子ではない。同様に、HNO<sub>3</sub> による影響も小さいと考えられる。これらの予備実験により、細胞の成長を阻害する因子として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に着目し、プラズマ照射した培養液と、その培養液に生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を同濃度で調製した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養液との違いを検証することで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の効果を明らかにした。さらに、その濃度が高い場合と低い場合で、プラズマの効果と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の効果が異なることを明らかにした内容について報告する。

2.2 実験方法

図5に示すように、プラズマを培養液に照射すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が概ね一次関数的に増大する。予備試験により、細胞に障害を与えるプラズマ照射時間として 210 s、細胞に障害を与えないプラズマ照射時間として 40 s を条件として抽出した。このときの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度はそれぞれ 304 μM と 51 μM であるため、通常の培養液に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を同濃度添加した培養液を作製し比較した。

図6に実験装置の概要と検証の手順を示す。細胞は、ヒ

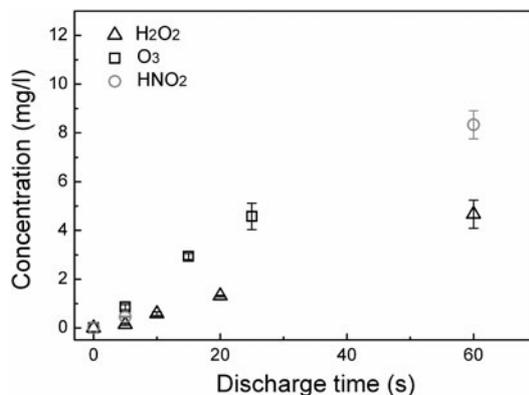


図3 針電極一水面放電における溶存化学種濃度の時間変化[9]。

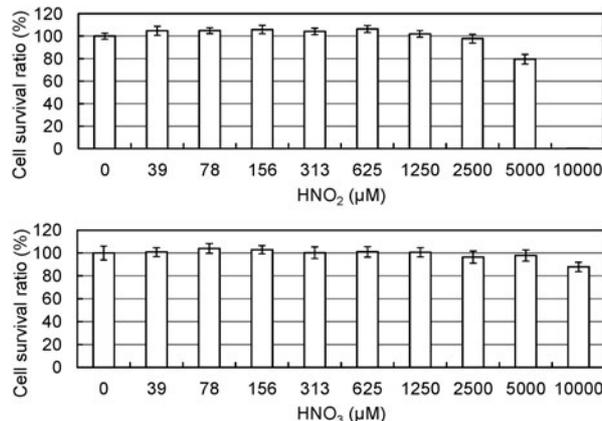


図4 培養液中の亜硝酸および硝酸の濃度に対する細胞生存率。

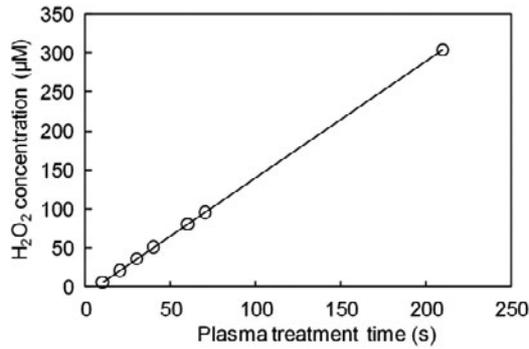


図5 プラズマ照射時間に対する過酸化水素濃度の変化[10].

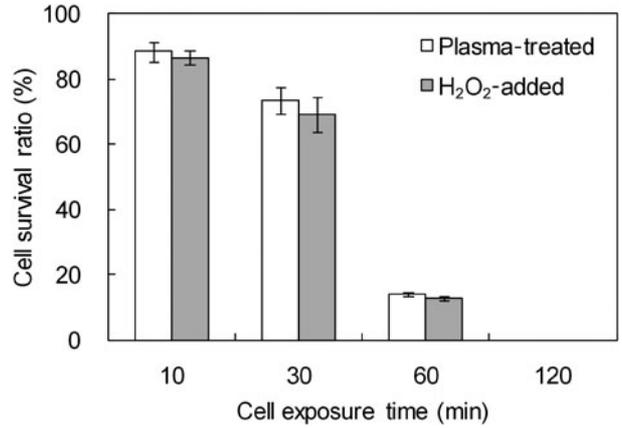


図7 プラズマ照射培養液と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培養液への暴露時間に対する細胞生存率の比較[10].

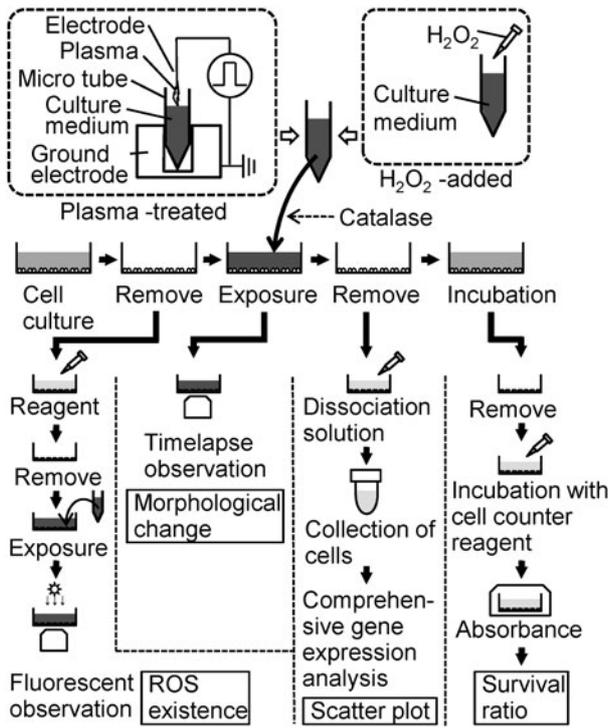


図6 実験装置と検証手順[10].

ト子宮頸部癌 (HeLa) 細胞 (東北大・加齢研より譲渡) を使用した。細胞培養液は, MEM 培地 (SIGMA) に, 10% 新生仔ウシ血清 (GIBCO) と, Penicillin (100 IU/ml)-Streptomycin (100 μg/ml) (GIBCO) を添加した培養液を使用した。なお, 実験手順の詳細は, 参考文献[10, 11]を参照願いたい。弱い刺激 (40 s) の場合は, 細胞生存率はフローサイトメーターを利用した。

図6に示すようにプラズマ発生用電極は, φ0.3 mm の白金線を用い, 先端部を培養液表面から1.5 mm の位置に設置した。培養液は1.5 ml のマイクロチューブに注入し, チューブをアルミ製の接地電極中に挿入した。電圧は, 針電極に+7.5 kV, 5 kHz, Duty 比4%の矩形波を印加した。消費電力は, 7.1 W である。

### 2.3 実験結果

#### 2.3.1 プラズマ照射時間210sの場合(強い刺激の場合) [10]

図7にプラズマ照射培養液と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培養液に暴露した時の, 異なる暴露時間に対する細胞数の変化を示す。細

胞数は通常の培養液 (コントロール) の細胞数で正規化した。暴露時間は10, 30, 60, 120 min とした。コントロールでは, 細胞生存率は概ね一定であるのに対し, プラズマ照射培養液と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培養液では, 暴露時間が長くなると共に減少し, 120 min では細胞は死滅することが明らかになった。また, プラズマ照射培養液と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養液では, 概ね同じ傾向を示すことが示された。

図8に細胞の形状観察結果を示す。(a)コントロールでは, 細胞は活発に移動や分裂を行う。一方, (b)プラズマ照射培養液や(c)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養液に暴露した細胞は, 移動や分裂を行わず, 3時間後には収縮を始め, 5時間後には細胞膜の水泡様変化 (blebbing) が出現し, 最終的に細胞質が水泡内に漏出し円形的水泡を形成する。このように, 細胞の不活性化は照射培養液暴露直後から観察されると同時

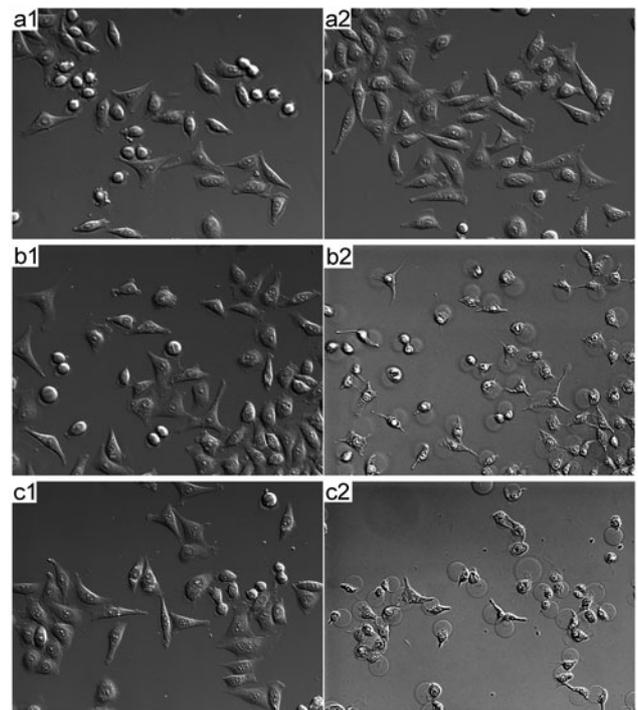


図8 細胞形状の時間変化[10]. (a)コントロール, (b)プラズマ照射培養液, (c)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培養液, 1は暴露前, 2は13時間経過後の様子。スケールバーは40 μm.

に、プラズマと過酸化水素では同じ過程を経て細胞死に至る。

ここで、過酸化水素の影響を明らかにするために、過酸化水素を分解する酵素であるカタラーゼをプラズマ照射培養液と  $H_2O_2$  添加培養液に添加し、細胞生存率を計測した。図9にその結果を示す。プラズマ照射培養液の場合の方が、コントロールに対しわずかに減少がみられるものの、いずれの場合も概ねコントロールと同レベルまで回復した。これより、過酸化水素による細胞障害が細胞の生存率低下の主因であることが示された。

図10にコントロールとプラズマ照射培養液、 $H_2O_2$  添加培養液に対する遺伝子発現強度のスクアッタープロットを示す。これは、網羅的遺伝子発現解析 (Whole Human Genome Microarray Kit, Agilent Technologies) により得られた結果をまとめたものである。この解析は、一度にヒト遺伝子の発現応答を得ることが可能であり、異なる条件の細胞群を比較することで遺伝子発現の全体的な変化を把握することが可能である。横軸と縦軸の値は大きくなるほど遺伝子の発現強度が大きいことを示している。各点は、同じ遺伝子の発現強度を横軸と縦軸の条件においてプロットしたものであり、対角線上にある場合は、各条件間に変化はみられないことを意味するが、対角線からずれる場合

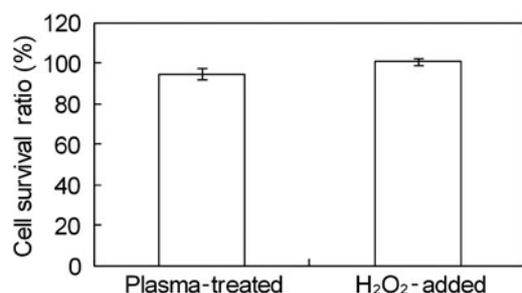


図9 細胞生存率へのカタラーゼ添加の効果[10].

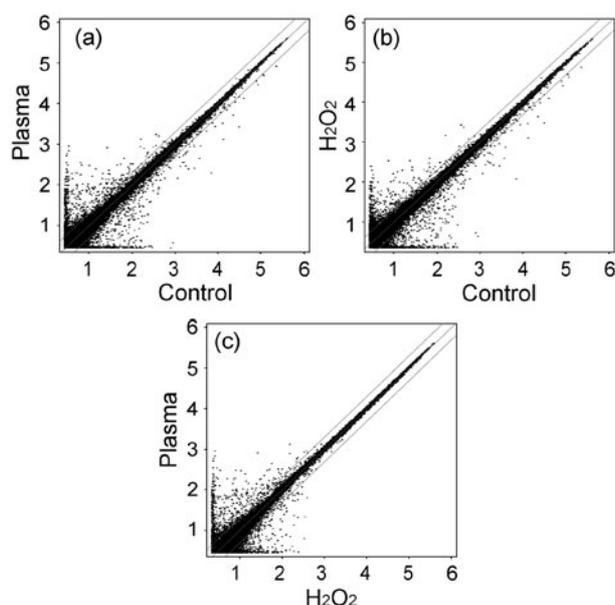


図10 コントロールとプラズマ照射培養液、 $H_2O_2$  添加培養液に対する遺伝子発現強度のスクアッタープロット[10].

は、横軸と縦軸の条件によって遺伝子発現強度が異なることを意味する。図10の結果より、コントロールに対するプラズマ照射培養液と  $H_2O_2$  添加培養液の遺伝子発現は発現強度が大きい領域で減少し、細胞の遺伝子応答が低減していることが示されている。一方、プラズマ照射培養液と  $H_2O_2$  添加培養液への暴露に対する細胞の遺伝子発現応答は、発現強度が高い領域で、全ての遺伝子発現が対角線上に位置していることから、遺伝子応答はほぼ一致していることが示された[10].

これらの結果より、プラズマ流が生成する安定化学種において、 $H_2O_2$  が主たる細胞毒性を発現する因子になっていることが明らかになった。

### 2.3.2 プラズマ照射時間40 sの場合 (弱い刺激の場合)[11]

図11にコントロール、プラズマ照射培養液、 $H_2O_2$  添加培養液に暴露した時の細胞数の変化を示す。暴露時間が1時間の場合、どの条件においても細胞数に変化はみられなかった。暴露時間が48時間の場合と1時間暴露後48時間通常培養液で培養した場合は、プラズマ照射培養液の場合にわずかに細胞生存率の減少がみられたが、生存率は90%以上であり、細胞障害はほとんどみられない。

図12にプラズマ照射培養液と  $H_2O_2$  添加培養液に暴露した細胞の DNA マイクロアレイ解析によるヒートマップを示す。プラズマ、 $H_2O_2$  いずれも4サンプルで、コントロールで規格化されている。赤色はコントロールに対して遺伝子発現強度が増加していることを、青色は減少していることを示す。各ラインが各遺伝子プローブに該当する。プラ

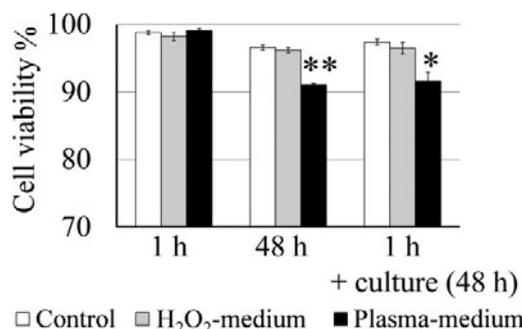


図11 コントロール、プラズマ照射培養液、過酸化水素添加培養液における細胞生存率[11].

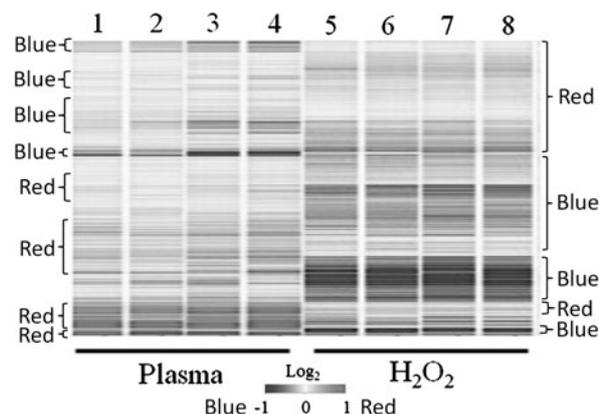


図12 網羅的遺伝子発現解析によるヒートマップ[11].

ズマと  $H_2O_2$  では、異なる遺伝子発現パターンが示されている。抽出された8024の遺伝子プローブにおいて、プラズマにおいては、発現強度 1.5 up が457プローブ、1.5 down が30プローブ、 $H_2O_2$  においては、1.5 up 増加が224プローブ、1.5 down が907プローブと  $H_2O_2$  の方が発現が低下する遺伝子が多いことが示されている。

図13に遺伝子オントロジー解析により得られたバイオリジカルプロセスを示す。ここで、遺伝子オントロジーとは、遺伝子の機能を階層化して分類・整理し、機能的に関連する遺伝子群を抽出し、biological process (生物学的プロセス)、cellular component (細胞の構成要素)、molecular function (分子機能) の3つ視点から生体応答を理解する手法である。これより、代謝、再生産、免疫、刺激応答、レギュレーションなど、抽出された多くの項目において、プラズマ照射培養液に暴露した方が、 $H_2O_2$  添加培養液に暴露した場合よりも遺伝子群の応答が大きくなっていることが示されている。

これらの結果は、細胞障害が起きない範囲のプラズマの刺激には、 $H_2O_2$  とは異なるプラズマ特有の細胞応答を誘導する効果があることを示している。

## 2.4 まとめ

本研究では、細胞障害が現れる強いプラズマ刺激の場合は、プラズマにより生成された  $H_2O_2$  が刺激の主因となるが、細胞障害が現れない程度の弱いプラズマ刺激では、 $H_2O_2$  とは異なるプラズマ特有の細胞応答機構が存在することを明らかにした。

本研究は、科研費 (21246032, 24246034) ならびに東北大流体研の支援を得た。また、東北大流体研中嶋智樹技術専門職員に実験支援を得た。ここに謝意を表す。

## Biological process

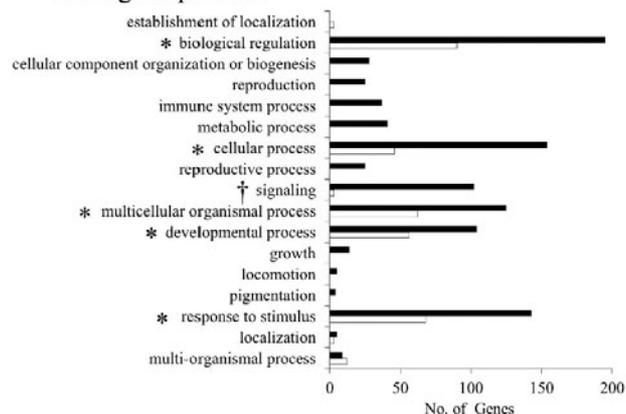


図13 1.5 up 遺伝子に対する遺伝子オントロジー解析によるバイオリジカルプロセス[11].

## 参考文献

- [ 1 ] M.Laroussi *et al.*, *Plasma Medicine* (Cambridge University Press, 2012).
- [ 2 ] A. Fridman and G. Friedman, *Plasma Medicine* (Wiley, 2013).
- [ 3 ] Y. Ikehara *et al.*, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **26**, 555 (2013).
- [ 4 ] T. Miura *et al.*, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47**, 445402 (2014).
- [ 5 ] S. Sasaki *et al.*, *Appl. Phys. Express* **7**, 026202 (2014).
- [ 6 ] S. Iseki *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **100**, 113702 (2012).
- [ 7 ] B. Haertel *et al.*, *Biomol. Ther.* **22**, 477 (2014).
- [ 8 ] S. Arndt *et al.*, *Plos One* **8**, e79325 (2013).
- [ 9 ] T. Shimizu *et al.*, *New J. Phys.* **13**, 053025 (2011).
- [ 10 ] T. Sato *et al.*, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 372001 (2011).
- [ 11 ] M. Yokoyama *et al.*, *BBRC* **450**, 1266 (2014).