細胞培養液中におけるプラズマ生成法の開発と HeLa 細胞への照射

Development of a plasma generation method in a culture medium and plasma irradiation to HeLa cells

佐藤佑介・東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻

Yusuke Sato, Department of Bioengineering and Robotics, Graduate school of Engineering, Tohoku University

佐藤岳彦・東北大学流体科学研究所

吉野大輔・東北大学流体科学研究所

Takehiko Sato, Institute of Fluid Science, Tohoku University

Daisuke Yoshino, Institute of Fluid Science, Tohoku University

Key Words: Underwater plasma, Electrical conductivity, cell culture medium, HeLa cell

1. 緒言

プラズマは気体の一部が電離した状態であり、一般に電極間に高電圧を印加することにより生成される。プラズマの生成により発生する活性化学種、電界、光、熱などは材料の表面加工、汚染物質の浄化、医療機器の滅菌などの様々な分野へ応用されている。近年、細胞にプラズマを照射することで細胞の活性・不活性化を制御する技術の研究開発が進められている。特に、がん細胞にプラズマを照射することで細胞死の誘導や、増殖を阻害する研究が報告がされており[1, 2], 新たながん治療法として期待されている。これまでの先行研究では、主に気相中で生成したプラズマをがん細胞に照射する手法が用いられてきた[2]。しかし、この手法では照射対象が空気に露出していなければならない、照射対象が液体に覆われている場合はプラズマの効果が小さくなることが考えられる。より効果的にプラズマ照射を行うためには、細胞近傍でプラズマを生成する必要がある。

プラズマは液中においても生成することが可能で、これまでも様々な研究が行われてきた。例えば、変圧器や放電加工における液中放電の研究は数多くある [3, 4]。近年では、超純水や、生理食塩水などの電気伝導率の高い溶液中でのプラズマに関する研究も行われている。しかし、細胞の生存に必要なアミノ酸やビタミンなどが混合した細胞培養液中におけるプラズマの生成は報告されていない。また、水中プラズマの細胞への照射に関する研究も報告されていない。

そこで本研究では、水中プラズマを利用したがん治療技術の開発を目指し、細胞培養液中においてプラズマを生成する方法の開発とプラズマ種の分光解析、がん細胞への照射実験を行った。

2. 実験方法

2-1 細胞培養液中におけるプラズマの生成

プラズマは放電により生成した。図 1(a)に実験装置の概要を示す。放電装置は、直流電源、セラミックコンデンサ、MOS-FET スイッチから構成されパルス電圧を生成する。本実験では、パルス幅を 22.5 μ s の正電圧パルス波形を信号として用い、印加する電圧を任意に変更しプラズマを生成した。

図 1(b)にプラズマの生成に用いた電極構造を示す。電極には直径 0.3 mm の白金線を用いた。電界を集中させ放電に必要な電圧を低下させるために、白金線の周囲をガラスで被覆し絶縁し、先端面のみを露出させた。接地電極は内径 3 mm、外径 4 mm の円筒形上のプラスチックにアルミニウム製のテープを接着したものを用いた。接地電極に白金電極を挿入し電圧を印加した。接地電極は、白金電極先端より上方 1.5 mm

に位置している。

放電によるプラズマの生成を、デジタルカメラ(Nikon, D4)を用いて可視化した。一般に、プラズマの生成は観測する電流にパルス波形として現れるが、本実験ではプラズマが生成しても電流波形にパルス波形は観測されなかった。そのため、プラズマの生成はカメラを用いた可視化により判断した。

Fig.1 A schematic diagram of experimental setup (a) and the electrode configuration (b).

2-2 HeLa 細胞へのプラズマの照射

本実験では、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん由来)にプラズマを照射した。HeLa 細胞は 20 % Fatal bovine serum (Gibco)と 0.1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) を含む DMEM (Gibco) を用いて 5 % CO₂ のインキュベータ内で培養した。直径 35 mm のガラスボトムディッシュ (IWAKI) に HeLa 細胞を播種し、コンフルエント状態まで培養の後プラズマを照射した。図 1(a)に示すように電極先端とディッシュ底面の距離を照射

距離とした。照射時は、Z軸ステージにディッシュを設置した。本実験では、照射距離を1 mmと3 mmに設定しプラズマの照射を行った。照射条件は、印加電圧3 kV、周波数10 Hzとした。プラズマを照射後、インキュベータ内で6時間培養し顕微鏡(Carl Zeiss, Axio Observer D1)で観察した。

3. 実験結果

3-1 細胞培養液中におけるプラズマの生成

図2に印加電圧6 kVにおける発光を示す。白金電極の先端にプラズマによる発光が観察された。発光は半球状に広がっており、印加電圧に比例し大きさが変化した。図3に発光の分光結果を示す。589 nm付近に高い強度の発光が示された。これはNa Iによる発光であると考えられる [5]。K I (766 nm, 769 nm), Ca I (422 nm)などの細胞培養液に含まれる金属イオンの輝線スペクトルも示された [5]。また、超純水中の放電で観察される, H, O, OHのスペクトルも観察された。

3-2 HeLa 細胞へのプラズマの照射

図4にプラズマ照射6時間後の電極直下の位置のHeLa細胞の顕微鏡画像を示す。図4(a)に示すように、照射距離1 mmにおいては、電極直下の細胞は細胞膜が壊れ死滅した。プラズマ照射直後においても細胞膜が壊れ細胞が死滅していたことから、プラズマ生成時に発生する圧力波や熱などの作用により細胞が死滅したと考えられる。図4(b)に示すように、照射距離3 mmにおいては、電極直下の細胞に細胞死は観察されなかった。これらの結果から、本研究で用いた電極、照射条件では照射距離1 mmにおいては、細胞は直ちに死滅し、照射距離3 mmにおいては、細胞が不活化されないことが示された。気相中で生成したプラズマによるがん細胞の細胞死の主要因は、過酸化水素などの活性酸素種による酸化ストレスであると考えられている [6]。本研究で生成したプラズマもOHを生成していることが分光解析の結果から明らかになっている。そのため、がん細胞に細胞死を誘導するためには、印加電圧、照射距離、照射時間などをパラメータとして適切な条件を決定する必要がある。

4. 結言

本研究は、細胞培養液中におけるプラズマの生成方法を開発し、生成したプラズマをHeLa細胞に照射しプラズマが細胞に与える影響を調査した。白金線をガラス被覆した電極に正電圧パルス印加することで、培養液中でプラズマを生成した。生成したプラズマをHeLa細胞に照射し、照射距離によって細胞に与える影響が異なることを示した。

本研究は、科研費の支援を得た。実験遂行において東北大学流体力学研究所中島智樹技術職員の支援を得た。

参考文献

- [1] G. Fridman, *et al.*, *Plasma. Chem. Plasma. Process.*, **27** 2 (2007), 163-176
- [2] S. Arndt, *et al.*, *Experimental Dermatology* **22**, (2013), 284-289
- [3] J.F. Kolb, *et al.*, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** (2008), 234007
- [4] P.T. Eubank, *et al.*, *J. Appl. Phys.* **73** (1993), 7900
- [5] G.R. Harrison, *MIT Wavelength Tables*, John Wiley and Sons Inc., New York, (1939)
- [6] K. Ninomiya, *et al.*, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46** (2013), 425401

Fig. 2 Photograph of plasma emission in the culture medium. Applied voltage: 6 kV.

Scale bar : 1 mm

Fig. 3 Typical time integrated emission spectrum. Applied voltage: 6 kV

Fig.4 Microscopic images of plasma irradiated-cells after 6 h at directly under electrodes. (a) Irradiation distance 1 mm. (b) Irradiation distance 3 mm. Scale bar : 100 μ m