P-116

低電圧マイクロプラズマによる小腸上皮正常細胞に対する影響

静岡大学

横山 諒　MUSTAFA, F. 奥山智弘 YAHAYA, A. G.　KRISTOF, J.　BLAJAN, G. M.　清水一男

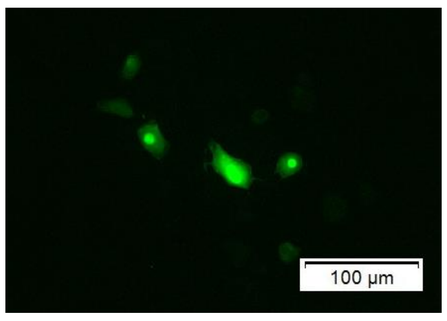
近年、高分子薬の上皮細胞への導入手法として、大気圧低温プラズマを用いた薬物導入について検討されている。本研究では装置の小型化を念頭におき、従来のプラズマジェットとは異なり、大気雰囲気下において低電圧かつ、広範囲への照射が可能なフィルム型電極による検討を行った。本発表では正常細胞への薬物導入を検討する前段階として、色素等を用いて小腸上皮正常細胞への影響について調査したので報告する。

目的

プラズマによる細胞への薬物導入を検討する前段階として、プラズマの照射時間や周波数を変化させたときの細胞数の経時変化を計測する

↓

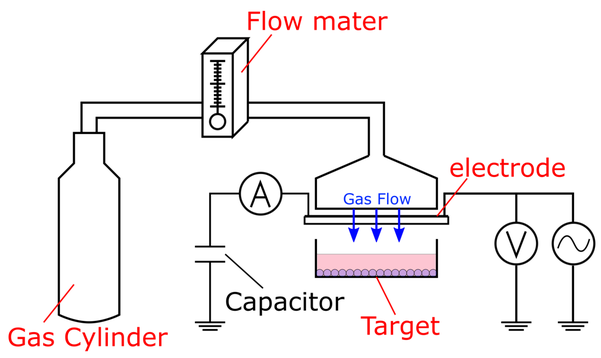
照射条件の最適化を図る



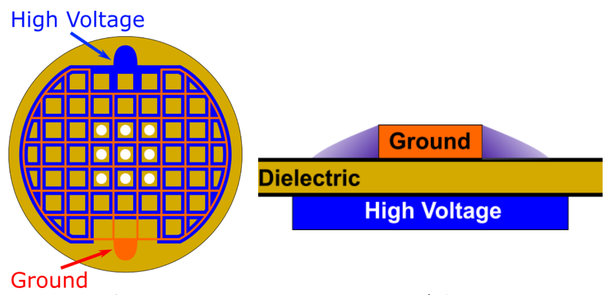
蛍光試薬(YOYO-1)の細胞内導入の様子

$V_{0\text{-}P}$ = 940 [V], Frequency = 10kHz で60秒間プラズマ照射後蛍光観察した。この時細胞の生存率は98％を保っていた。

実験方法



実験回路構成

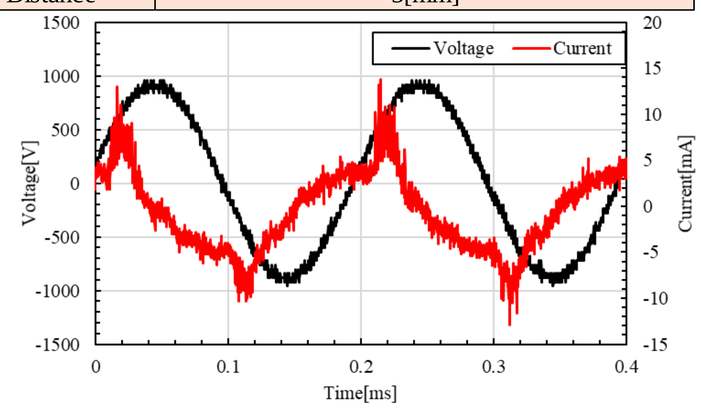


(a)上面　(b)断面

使用電極

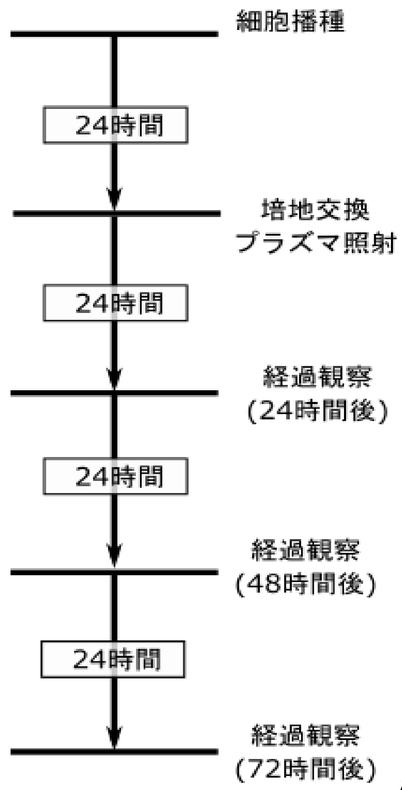
実験条件

Cell name	RCB0993 : ICE6
Cell characteristics	Rat small intestinal epithelial cell line
Culture form	Adherent cells
Culture medium	DMEM (low glucose) + 5% FBS + 4μg/ml Insulin +Penicillin-Streptomycin Solution 100mg/ml
fluorescent dye	5μM YOYO-1
Medium volume	3ml
Air Flow	2[L/min]
Treatment time	0 - 120[s]
Frequency	0.5 - 10[kHz]
Voltage	940[$V_{0\text{-}P}$]
Distance	5[mm]

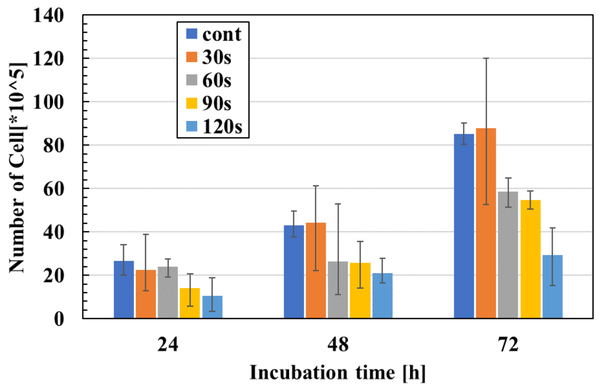


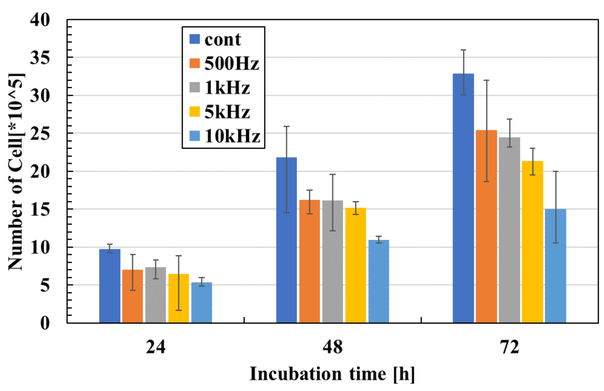
印加電圧・電流

細胞培養フロー



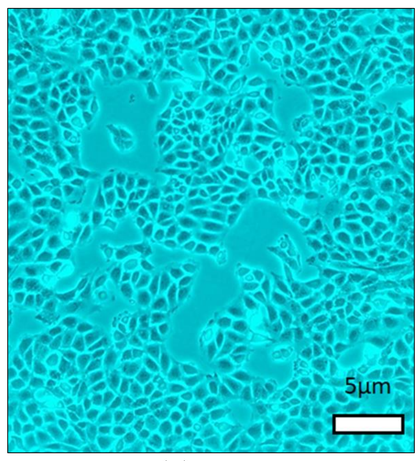
実験結果

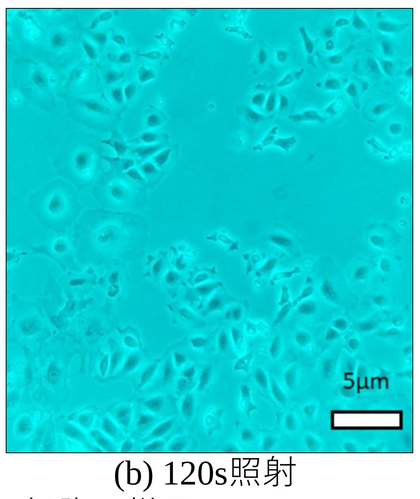




(a)照射時間による変化(Frequency = 10kHz)　(b)周波数による変化(Treatment time = 60s)

各条件での細胞数の変化



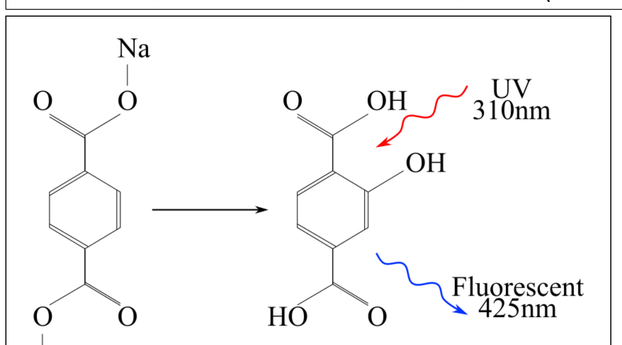


(a)cont　(b) 120s照射

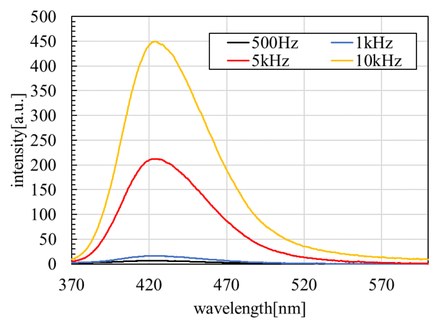
72時間時点での細胞の様子

テレフタル酸二ナトリウム(NaTA)を用いたOHラジカルの測定

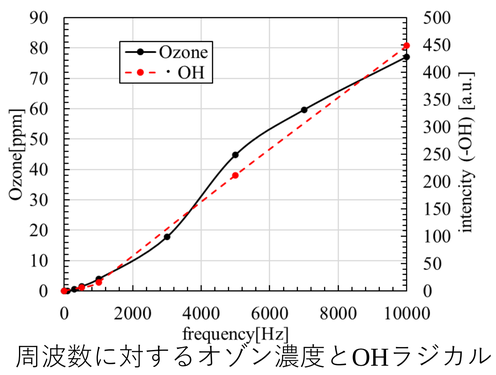
NaTA(東京化成工業株式会社)を用いて、プラズマ照射後の溶液中のOHラジカルの計測を行った。0.2mMの溶液5mlに照射した後、蛍光分光器(FP-8600;日本分光)を用いて蛍光強度を計測した。



NaTAの反応と蛍光

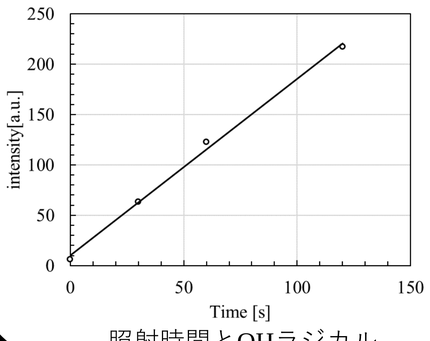


蛍光分光の結果



周波数に対するオゾン濃度とOHラジカル

液中のOHラジカルはオゾン濃度に相関があることから,本実験で用いた乾燥空気を用いて放電する機構ではオゾンがOH生成に大きくかかわっていると考えられる。



照射時間とOHラジカル

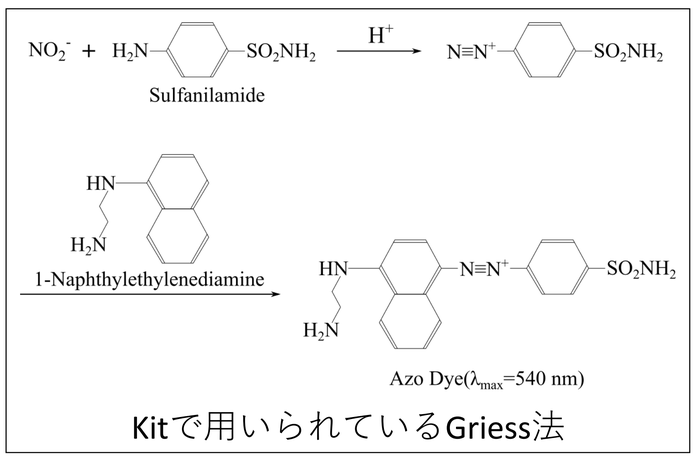
OHラジカルの生成過程

$$H_2O + e \rightarrow OH + H + e \cdots (1)$$
$$O(^1D) + H_2O \rightarrow OH + OH \cdots (2)$$
$$O_3^- + H_2O \rightarrow OH + OH\text{-} + O_2 \cdots (3)$$
$$O_3 + H_2O \xrightarrow{h\nu} H_2O_2 + O_3 \cdots (4)$$
$$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2 \cdot OH \cdots (5)$$
$$O_3 \xrightarrow{h\nu} O(^1D) + O_2 \cdots (6)$$
$$O_3 + O_2^- \rightarrow O_3^- + O_2 \cdots (7)$$

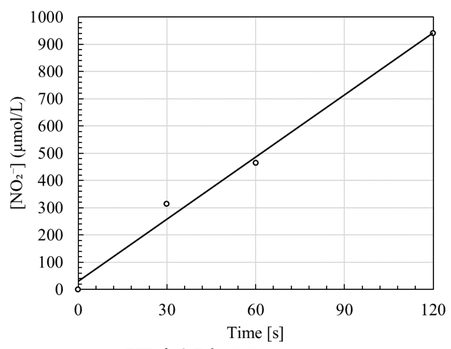
NO2 Assay Kit-C IIを用いたNO_2^-の測定

NO_2 / NO_3 Assay Kit –C II(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit~ (株式会社同仁化学研究所)を用いて、プラズマ照射後の溶液中のNO_2^-の計測を行った。

蒸留水5mlにプラズマ照射した後,透過光測定により評価した。

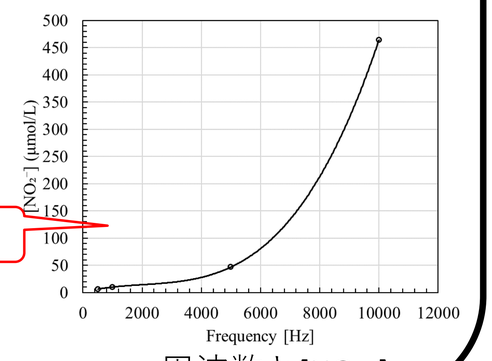


Kitで用いられているGriess法



照射時間と$[NO_2^-]$

5kHzから10kHzにかけて急激に上昇している。



周波数と$[NO_2^-]$

結論

①プラズマ照射により細胞生存率が98％以上で分子量1270の蛍光試薬(YOYO-1)の細胞内導入が認められた。

②正常細胞にプラズマを長時間または高周波で照射することにより細胞数が減少する傾向が認められた。

③液中のOHラジカルおよびNO_2^-は、照射時間と周波数に比例して増加することが認められた。