

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08203

研究課題名(和文) 大気圧プラズマによる活性酸素生成および生体成分への作用に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on the generation of reactive oxygen species in water and their effects on biological constituents by the irradiation of cold atmospheric pressure plasma

研究代表者

安西 和紀 (Anzai, Kazunori)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70128643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマ(以下プラズマ)の生体試料照射の応用が大きな関心を持たれているので、プラズマを水に照射した時に生じる各種活性酸素種を時間や照射距離等の条件を変えて定量した。その結果、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドラジカル、水素ラジカル、過酸化水素、一重項酸素、二酸化窒素イオン等が生成していることが確認された。これらの生成は照射距離に依存して変化し、距離が遠くなると過酸化水素が主な活性種であることが明らかになった。また、プラズマ照射による膜脂質の過酸化を調べた結果、照射によりリポソーム膜の過酸化が起こり、脂質ラジカルの生成を経てチオバルビツール酸反応生成物が生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、大気圧低温プラズマ(以下プラズマ)の医療への応用が注目を浴びており、多くの研究成果が発表されているが、その基礎となるメカニズムの研究は遅れている。今回、水へのプラズマの照射が活性酸素種を生成し、それは放射線とは違って照射距離に依存してかつ表面の反応であるという基礎的な知見が得られた。この知見を基盤として、医療へのプラズマの新たな応用を考えることができるとともに、医療以外の応用にも役立てることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Because application of cold atmospheric pressure plasma (CAPP) to biological samples have taken large attentions, it is important to examine the effects of various CAPP parameters on the generation of reactive species. We investigated the generation of reactive species in water by CAPP irradiation by changing the parameters: irradiation time, sample volume, and irradiation distance between the sample surface and plasma jet tip. It was confirmed that hydroxyl radical, superoxide radical, hydrogen radical, hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen, NO₂⁻ are formed by the irradiation of CAPP, and that the generation depends on the irradiation distance. It was found that H₂O₂ is the major species formed by long distance irradiation. Irradiation by CAPP of liposomes caused TBARS in addition to lipid radical, suggesting that the peroxidation of liposomal lipids occurred via lipid radical caused by the reactive species produced by CAPP.

研究分野：物理系薬学

キーワード：大気圧低温プラズマ 活性酸素種 ヒドロキシルラジカル スーパーオキシドラジカル 一重項酸素 過酸化水素 脂質過酸化 ESR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラズマとは、気体に更にエネルギーが加わることにより、電子が原子核から離れてバラバラになった状態であり、核融合や半導体デバイスの製造等の応用に向けた物理・工学的な研究が行われてきていた。最近になって、大気圧・常温の条件下で、プラズマを発生させ制御する技術が確立し、このプラズマ(大気圧プラズマ)を医療分野や農業分野へ応用していこうという大きな研究の流れが始まっていた。

キノコにプラズマを照射すると対照に比べてキノコの発生量が多くなるという現象や、金魚を飼育している水にプラズマを照射すると金魚の成長が早まるという現象が報告されており、これらの現象から、プラズマには生物の成長を促進する作用があると予想されていた。最近の大気圧プラズマ技術の発展により、生体に直接大気圧プラズマを照射することが可能になったことから、医療分野において、大気圧プラズマを創傷の治療に応用しようという研究が盛んに行われていた。さらにその応用として、がんの外科手術時に大気圧プラズマを使用しようとする研究も行われはじめていた。また、プラズマが有する殺菌作用を応用して、無農薬農業を実現しようとする研究もある。このような生体に対するプラズマの様々な作用については、種々のメカニズムが提唱されているが、詳細についてはまだまだ不明な点が多かった。

2. 研究の目的

プラズマは、原子核と電子がバラバラになった状態であるので、それ自身がフリーラジカルと考えられる。また、プラズマが照射された水や生体にも活性酸素・フリーラジカルが生成すると考えられる。したがって、プラズマの生体成分への作用メカニズムの一つに、様々な活性酸素種の生成が考えられている。しかしながら、どのような活性酸素種がどの程度生成しているか、また、それらの作用は、化学的あるいは放射線や超音波などで水に生じる活性酸素種と比較してどのような差があるか等については明確になっていない。申請者はこれまで、放射線等により発生する活性酸素・フリーラジカルが生体障害をもたらす機構について、分子レベルから丸ごとの動物のレベルまでの様々なレベルで研究してきた。また、そのような活性酸素・フリーラジカルによる障害を防御する化合物について研究してきた。そこで、申請者のこれまでの経験と技術を十分に活用することにより、プラズマという新しい物理手法による、活性酸素生成を通じた生体作用のメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) プラズマの照射

純ヘリウムをプラズマガス種として流量は3~5 L/minで用い、市販の大気圧低温プラズマ発生装置(PN-110TPG・TPN20、NUグローバル(株))を用いてプラズマを発生させた。酸素混合実験においては、ガス混合装置(CUBE GM2、エフコン(株))を用いてヘリウムガスに最大5%までの酸素ガスを混合して使用した。照射容器としては、外径23 mm、内径20 mmのガラス製円筒容器を用いた(写真を参照)。



(2) ESR 測定

プラズマを照射した試料を水溶液用フラットセルに入れ、室温にて日本電子の JES-FA100 を用いて ESR スペクトルを測定した。

(3) 過酸化水素(H₂O₂)の定量

H₂O₂濃度は、フェノール、4-アミノアンチピリン、西洋わさびペルオキシダーゼを用いた比色定量法で測定した。

(4) 酸化種量の測定

フリッケ線量計溶液を用いて、水へのプラズマ照射による Fe²⁺から Fe³⁺への変化を 304 nm における吸光度から測定した。

(5) リポソーム脂質の過酸化の測定

リン脂質として卵黄ホスファチジルコリン(eggPC)を用いて、逆相蒸発法により一枚膜巨大リポソーム(LUV)を調製した。リポソーム懸濁液にプラズマを照射して、生成する脂肪酸分解生成物をチオバルビツール酸法を用いて測定した。また、中間体の共役ジエンの量を、クロロホルム-メタノール混液で LUV から抽出した脂質をヘキサンで再溶解して、その紫外領域(231 nm)の吸光度から測定した。さらに、中間体として生じると考えられる脂質ラジカルを、2,2,6-trimethyl-4-(4-nitrobenzo(1,2,5)oxadiazol-7-ylamino)-6-pentylpiperidin-1-oxyl (NBD-pen)の蛍光強度増大から測定した。

4. 研究成果

(1) 水へのプラズマ照射による各種活性酸素種生成

安定ラジカルの 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPOL)水溶液にプラズマを照射すると、照射時間に依存して ESR シグナル強度が減少した。照射時間を固定して、照射ノズルの先端から水面までの距離を変えてシグナル強度の減少を測定したところ、距離が 2.5 cm を越えるとシグナル減少がほとんど起こらなかった。

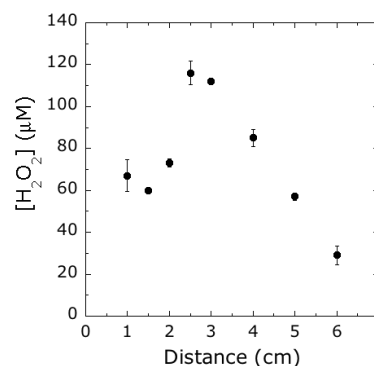
スピントラップ剤の 5,5-Dimethyl-1-pyrroline 1-oxide (DMPO) 溶液にプラズマを照射して、生成する DMPO アダクトの ESR スペクトルを測定した。その結果、プラズマ照射により DMPO-OH のシグナルが観察され、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) が生成していることが確認された。DMPO-OH シグナル強度は照射時間に依存して増大したが、照射時間が 40 s 以上になると一定値になった。照射時間を固定して照射距離を変えると、照射距離が 3 cm 以上になると DMPO-OH の ESR シグナルは観察されなかった。照射距離が 1 cm 未満の時、DMPO-OH シグナルに加えて DMPO-H シグナルが観察され、水素ラジカル ($\cdot\text{H}$) も生成していることが明らかになった (右図)。



上と同様に DMPO 溶液を用い、 $\cdot\text{OH}$ と反応して DMPO-OH シグナルの強度を殆ど見えなくするような濃度で DMSO を添加した溶液条件でプラズマを照射すると、スーパーオキシドラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) の DMPO アダクトの ESR スペクトルが観察され、 $\cdot\text{O}_2^-$ が生成していることが明らかになった。

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 検出試薬の 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol (TEMP-OH) 水溶液にプラズマを照射すると、TEMP-OH とが反応して生成する TEMPOL の ESR シグナルが観察された。すなわち、プラズマ照射によって $^1\text{O}_2$ が生成していることが確認された。

フリッケ線量計溶液にプラズマを照射して、 Fe^{2+} の酸化を調べた。その結果、照射時間に比例して Fe^{3+} が生成した。フリッケ線量計溶液量を 0.2~1.0 mL で変化させてプラズマを照射し、試料から 0.15 mL を抜き取って水で 2.4 mL まで希釈して吸光度変化を調べたところ、試料溶液量が大きいほど吸光度変化は少なく、溶液量が 1.0 mL の時は 0.2 mL の時の約 1/5 であった。放射線照射と同様に生成した酸化種が溶液全体を均一に酸化していると仮定すると、溶液量依存性はないと考えられる。従って、この結果は酸化種が溶液表面に多く生成していることを示唆する。照射時間を固定して照射距離を変えると、1~2 cm のところにピークが存在し、それ以上の距離で吸光度変化は減少したが、3 cm を越えて 6 cm でもピーク値の 1/3 程度の変化があった。



プラズマ照射後の水中に過酸化水素 (H_2O_2) が生成しているかどうかを呈色法で定量した結果、照射時間にほぼ比例して H_2O_2 ができていることがわかった。照射時間を固定して照射距離を変えると、2~3 cm で最大の H_2O_2 が生成し、その後徐々に生成量が減少していた。しかし、6 cm の照射でもピーク値の 1/6 程度の H_2O_2 が生成していた (右図)。

フリッケ線量計溶液の吸光度が H_2O_2 で変化するかどうかを確認した。その結果、 H_2O_2 濃度に比例して吸光度が増大することがわかった。データのうちの H_2O_2 の寄与を見積もると、照射距離が 3 cm 以上における吸光度変化のかなりの割合が H_2O_2 によるものとわかった。

呈色法により NO_2^- を測定したところ、プラズマ照射によって照射時間に依存して NO_2^- が生成していることが明らかになった。

(2) プラズマ照射による脂質過酸化

プラズマ照射によるリポソーム膜脂質の過酸化を調べた。

EggPC LUV 懸濁液にプラズマを照射して上静を TBA 反応にかけると、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) の量が照射時間に依存して上昇した。すなわち、プラズマ照射によってリポソーム膜脂質が酸化され、リン脂質の脂肪酸鎖からアルデヒド類が遊離してきたことがわかる。照射時間を固定して照射距離を 0.7 cm から 5.0 cm まで変えて測定したところ、0.7 cm の場合が最も TBARS 量が大きく、距離が増大するにつれて TBARS 量が急速に減少し、3 cm 以上では TBARS 量がほぼゼロであった。

共役ジエン法で反応中間体の共役ジエンを測定したが、有意な上昇は観察されなかった。一方、NBD-pen を用いた脂質ラジカルの測定では、プラズマ照射によって脂質膜中に脂質ラジカルが生成していることが確認された。

(3) プラズマ照射におけるヘリウムガスの流量の影響

プラズマ発生装置の仕様によると、ヘリウムガスの流量は 3~5 L/min とするように指定されていた。そこで、流量を変えることにより、フリッケ線量計溶液の吸光度変化、TEMPOL 水溶液の ESR シグナル強度減少、DMPO スピントラップ剤水溶液からの DMPO-OH 付加体の生成量、水中での過酸化水素生成量、eggPC LUV の脂質過酸化の程度、を測定した。流量は 3、4、5 L/min の 3 種類とした。

上記 5 つの指標について測定したところ、いずれも 5 L/min で値が小さく、3 L/min と 4 L/min ではほぼ等しい値となった。すなわち、5 L/min で最も活性酸素種の生成が小さいこと

がわかった。従って、ヘリウムの使用が最も少なく効果が最も大きい 3 L/min が実験条件として最適であることがわかった。

(4) プラズマの効果に対する少量の酸素ガスの混合の影響

上述のようにプラズマ照射により、水中に各種活性酸素種が生成することが明らかになったので、少量の酸素ガスをヘリウムガスに混合することにより、フリッケ線量計溶液の吸光度変化、TEMPOL 水溶液の ESR シグナル強度減少、DMPO スピントラップ剤水溶液からの DMPO-OH 付加体の生成量、水中での過酸化水素生成量、eggPC LUV の脂質過酸化の程度といった指標が影響を受けるかどうか調べた。酸化ストレスの観点からは、酸素濃度の増大によってこれらの指標に対する影響が大きくなると予想したが、結果は予想を裏切るものであった。1%以下のごく少量の酸素ガスを混合すると、これらの指標に対する効果は大きく減少した。一方、酸素ガスの濃度をそれ以上に上げると(最大 5%)、再び効果が増大していくことがわかった。このような酸素の 2 相性の効果は興味深い。今後、このメカニズムを安倉化にするとともに、酸素以外のガスでそのような効果が起こるかを調べることが必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Kazunori Anzai, Tamami Aoki, Satoko Koshimizu, Reina Takaya, Kazunori Tsuchida, Tokuko Takajo (2019) Formation of reactive oxygen species by irradiation of cold atmospheric pressure plasma jet to water depends on irradiation distance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **64** (3), 187-193.
- 2) Minako Nyui, Ikuo Nakanishi, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Ken-ichiro Matsumoto (2019) Reactivity of redox sensitive paramagnetic nitroxyl contrast agents with reactive oxygen species. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **64** (1), 13-19.
- 3) Kazunori Anzai, Tamami Aoki, Satoko Koshimizu, Reina Takaya, Kazunori Tsuchida, Tokuko Takajo (2018) Formation of reactive oxygen species by the irradiation of cold atmospheric pressure plasma to water, *Free Radic. Biol. Med.* **120**, S45.
- 4) Megumi Ueno, Shingo Matsumoto, Atsuko Matsumoto, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto, James B. Mitchell, Murali C. Krishna, Kazuori Anzai (2017) Effect of amifostine, a radiation-protecting drug, on oxygen concentration in tissue measured by EPR oximetry and imaging. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **60** (3), 151-155.

[学会発表](計 19 件)

- 1) 安西和紀、青木珠美、小清水里子、高屋鈴奈、土田和徳、高城徳子、“水への大気圧低温プラズマ照射による活性酸素種生成は照射距離に依存する”、日本薬学会第 139 年会、2019 年
- 2) 高城徳子、土田和徳、安西和紀、“低温大気圧プラズマ照射による一重項酸素生成”、日本薬学会第 139 年会、2019 年
- 3) 安西和紀、塚原悠、塚田光帆、松本遥、塗木勇介、高城徳子、“ラジカルが誘起する溶血に対するビタミン E の抑制効果”、第 30 回ビタミン E 研究会、2019 年
- 4) 小野佑樹、田中寿、尻無清明、安西和紀、原田久志、“CO₂-Ar 雰囲気中における水溶液の超音波反応。CO₂ 濃度と OH ラジカル量の ESR 研究”、USE2018 超音波の応用と基礎に関するシンポジウム、2018 年
- 5) Kazunori Anzai, Ken-ichiro Matsumoto, Ikuo Nakanishi, “Biological Applications of Stable Nitroxide Radicals as Redox Sensitive Compounds”, International Conference of Modern Trends in Natural Sciences and Advanced Technologies in Science Education (ICNS2018) (2018)
- 6) Kazunori Anzai, Tamami Aoki, Satoko Koshimizu, Reina Takaya, Kazunori Tsuchida, Tokuko Takajo, “Formation of reactive oxygen species by the irradiation of cold atmospheric pressure plasma to water”, The 19th biennial meeting for the society for Free Radical Reserch International (SFRRI2018) (2018)
- 7) 安西和紀、松本 遥、塚原 悠、塚田光帆、高城徳子、“フリーラジカルが誘起する赤血球の溶血に対するビタミン E の抑制効果”、第 71 回日本酸化ストレス学会学術集会、2018 年
- 8) 高城徳子、丸山貴史、栗原義暢、土田和徳、安西和紀、“一重項酸素消去活性測定法の検討—ESR を用いた簡易的測定方法—”、日本薬学会第 138 年会、2018 年
- 9) 安西和紀、小清水里子、篠田航、上野健太、福田詩織、垣内香奈、高城徳子、土田和徳、“大気圧低温プラズマによる活性酸素生成とリポソーム膜の過酸化”、日本薬学会第 138 年会、2018 年
- 10) 高城徳子、栗原義暢、丸山貴史、土田和徳、安西和紀、“一重項酸素消去活性系を測定するための基礎的検討”、第 56 回電子スピンスイエンズ学会年会 (SEST2017)、2017 年
- 11) 高城徳子、栗原義暢、丸山貴史、土田和徳、安西和紀、“ESR を用いた一重項酸素消去活

- 性系の確立”、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、2017 年
- 12) 竹安結花子、高城徳子、土田和徳、安西和紀、“鉄を含むいくつかの酸化剤による EggPC リポソームの脂質過酸化の比較”、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、2017 年
 - 13) 土田和徳、青木珠美、小清水里子、高屋鈴奈、高城徳子、安西和紀、“水への大気圧低温プラズマ照射による活性酸素種生成に関する基礎的検討”、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、2017 年
 - 14) 松本謙一郎、上野恵美、乳井美奈子、小川幸大、上林将人、関根絵美子、中西郁夫、安西和紀、小澤敏彦、“放射線により生成する活性酸素種生成量および酸化反応量の定量的評価”、日本薬学会第 137 年会、2017 年
 - 15) 土田和徳、青木珠美、小清水里子、高屋鈴奈、高城徳子、安西和紀、“水への大気圧低温プラズマ照射による活性酸素種生成に関する基礎的検討”、日本薬学会第 137 年会、2017 年
 - 16) 高城徳子、岩瀬弘大、栗原義暢、土田和徳、安西和紀、“ESR を用いた一重項酸素測定法の検討”、日本薬学会第 137 年会、2017 年
 - 17) 竹安結花子、高城徳子、土田和徳、安西和紀、“リポソーム膜の脂質過酸化における Fe²⁺ を含むいくつかの酸化剤の作用機構の違い”、日本薬学会第 137 年会、2017 年
 - 18) 上林将人、小川幸大、岡壽崇、山下正行、有光健治、安井裕之、中西郁夫、松本謙一郎、安西和紀、小澤敏彦、“Anti 型から Gauche 型への熱変換による高感度・多目的スピントラップ G-CYPMPO 合成”日本薬学会第 137 年会、2017 年
 - 19) 上林将人、小川幸大、有光健治、安井裕之、中西郁夫、松本謙一郎、岡壽崇、山下真一、安西和紀、小澤敏彦、“Gauche 型立体構造を有する高純度・高性能スピントラップ G-CYPMPO”、第 55 回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2016)、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：土田 和徳
ローマ字氏名：Tsuchida Kazunori
所属研究機関名：日本薬科大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：50406633

研究分担者氏名：高城 徳子
ローマ字氏名：Takajo Tokuko
所属研究機関名：日本薬科大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：80424068

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。