

論文

出芽酵母への大気圧低温プラズマ曝露における DNA 損傷の検出

山口 広輝*, 安田 八郎*, 沢 俊彦*, 栗田 弘史*, 高島 和則*, 水野 彰*,¹

(2010年9月14日受付; 2010年12月3日受理)

Detection of DNA Damages in *Saccharomyces cerevisiae* Caused by Non-thermal Atmospheric Pressure PlasmasHiroki YAMAGUCHI,* Hachiro YASUDA,* Toshihiko EKI,* Hirofumi KURITA,* Kazunori TAKASHIMA* and Akira MIZUNO*,¹

(Received September 14, 2010; Accepted December 3, 2010)

Non-thermal atmospheric pressure plasmas have been recently applied in biomedical field. So far, the influence of the plasma treatment to living cells and organs is still unknown. In this study, we have monitored DNA damage in yeast cells exposed to argon plasma torch. We have used the yeast-based genotoxicity assay system, which is based on the transcriptional induction of a *Saccharomyces cerevisiae* with a *RNR2-lacZ* reporter plasmid in response to DNA damaging agents and agents that interfere with DNA synthesis. As well as an alkylating agent or UV radiation, argon plasma torch treatment induced the high levels of *RNR2-lacZ* expression. These strongly suggest that non-thermal atmospheric pressure plasmas treatment could cause genotoxic effects via cellular DNA damages.

1. はじめに

近年、生物・生態への関心の高さも相まって、プラズマや放電を利用した新しい殺菌・医療技術の開発・実用化が検討されている。イオンと電子からなる混合気体であるプラズマは高い化学反応性を持っている。その中でも、大気圧低温プラズマに大きな注目が集まっており、放電機構と応用に関する研究が盛んに進められている¹⁾。大気圧低温プラズマの一種として、プラズマトーチが挙げられる。プラズマトーチは被照射物に対して熱負荷をかけずに、化学的に活性なラジカルによるプラズマプロセスを行うことが可能である。また、任意の対象物表面に非接触で曝露でき、局所的なプラズマプロセスが可能であることから、身体表面の疾患治療や虫歯治療などの医療分野への応用研究が注目されている^{2,3)}。

本研究では、アルゴンガスを媒体とするアルゴンプラズマトーチ発生装置を作製し、アルゴンプラズマトーチ曝露による出芽酵母の単位面積当たりの領域別殺菌実験及び 96 穴プレートを用いた液中殺菌実験を行った。続いて、DNA 修復遺伝子発現に基づいた DNA 損傷検出法を用いて、アルゴン

プラズマトーチの曝露による DNA 損傷の検出を行った。また、対照として紫外線、代表的な DNA アルキル化剤である MMS (Methyl methanesulfonate) への曝露による DNA 損傷の検出及び熱ショックによるストレス応答の検出を行った。

2. 出芽酵母を用いる DNA 損傷検出のメカニズム

図 1 に遺伝子組換え酵母を用いた DNA 損傷検出のメカニズムを示す。4 つのサブユニットで構成されるリボヌクレオチドレダクターゼ(ribonucleotide reductase; RNR)は DNA の前駆体合成の際に重要な働きをする酵素であり、DNA 合成において主要な役割を果たす。RNR の活性は細胞周期及び DNA 損傷チェックポイント機構により高度に制御され、細胞内のデオキシリボヌクレオチド濃度を最適に保つことにより、遺伝的忠実性の保持に不可欠な役割を果たしている。生物は DNA に損傷が加わり修復が必要になると、これらの DNA 修復遺伝子が活性化され、修復タンパク質の量が増大し、修復が開始される。一方、熱ショックタンパク質(heat shock proteins; HSPs)は熱などの環境ストレスに応答して発現されるタンパク質である。HSP は熱以外に一般ストレス応答にも関与し、熱及び浸透圧や酸化ストレスのような一般的なストレスにより発現する。HSP は DNA 修復タンパク質ではないが、プラズマによる細胞損傷 (DNA 損傷を含む) に反応することが期待される。

本研究で用いる DNA 損傷検出法は DNA 損傷に応答することが知られているリボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニットをコードする遺伝子である *RNR2* のプロモーターを、

キーワード: 大気圧低温プラズマ, DNA 損傷, 出芽酵母, 殺菌, β -galactosidase assay

* 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 (441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1)

Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology, 1-1 Hibarigaoka Tempaku-cho, Toyohashi 441-8580, Japan

¹ mizuno@ens.tut.ac.jp

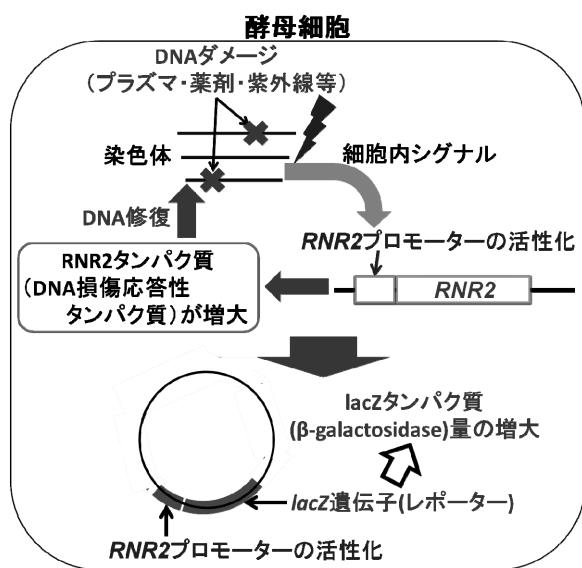


図1 DNA損傷の検出メカニズム

Fig. 1 Reporter assay system for detection of DNA damage.

レポーター遺伝子 (*lacZ*) の上流に結合したレポータープラスミドを作成し、出芽酵母に導入し、DNA 損傷性物質への曝露によって酵母内に生じた DNA 損傷をレポーター遺伝子 (*lacZ*) の発現量に基づいて定量的に検出するものである。

レポーター遺伝子(*lacZ*)は遺伝子産物として β -galactosidase (β -gal) をコードしており, o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) の添加によって生じる o-nitrophenol (ONP) を比色測定する β -gal assay を用いて DNA 損傷を検出する。

以上の遺伝子組換え酵母を用いた DNA 損傷検出法は、MMS をはじめとする変異原性物質による DNA 損傷を高感度に検出する方法として確立されている^{4,5)}。

3. 実験

3.1 実験装置

アルゴンプラズマトーチ発生装置は、主に放電部であるガラス管と、ガス導入部である T 字管で構成される⁶⁾。ガラス管（外径7 mm, 内径5 mm）の管軸にガラス管（外径2 mm, 内径1 mm）に通したステンレスワイヤ（φ=0.3 mm）を高電圧印加電極とした。装置下流部外壁にはステンレスメッシュを設置し、接地電極とした。大気圧下にて高電圧を印加した場合、装置先端部分において、バリア放電が発生する仕組みとなっている。本装置にアルゴンガスを投入することにより、装置先端からプラズマトーチが発生する構造となっている。

図2にアルゴンプラズマトーチ曝露実験の実験構成図を示す。キャリアガスとしてアルゴンを用いた。アルゴンガス流量は流量計にて 2.0 L/min に調整し、アルゴンプラズマトーチ発生装置に流入させた。

電源にはパルス電源（電子制御国際 実験機9号改）を用

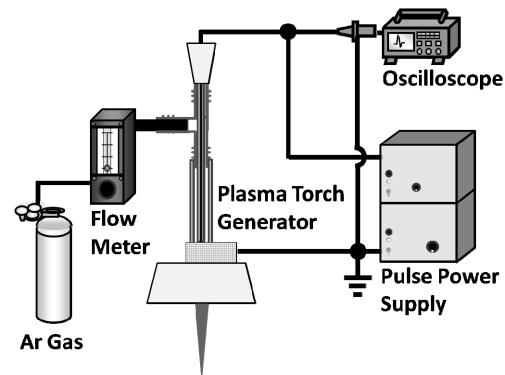


図2 アルゴンプラズマトーチ曝露実験構成図

Fig. 2 Schematic of the experimental set-up.

いた。YPD 寒天培地上における単位面積当たりの領域別殺菌実験では印加電圧 12.0 kV_{0-P}, 周波数 2.5 kHz とし、アルゴンプラズマトーチ発生装置の先端とメンブレンフィルタ中央上部との距離を 20 mm とした。96 穴プレートを用いた液中殺菌実験では、印加電圧 10.0 kV_{0-P}, 周波数 3.0 kHz とし、アルゴンプラズマトーチ発生装置の先端と菌液の液面との距離を 30 mm とした。アルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷検出実験では、印加電圧 8.0 kV_{0-P}, 周波数 3.5 kHz とし、アルゴンプラズマトーチ発生装置の先端と菌液の液面との距離を 25 mm とした。96 穴プレートを用いた実験ではアルゴンプラズマトーチが 1 ウェル内に伸入するように印加電圧を下げ、周波数を調節して実験を行った。

3.2 発光分光計測、温度測定及び pH 測定結果

DNA の紫外線吸収による損傷として高い殺菌効果が認められている UV-C region は200–280 nm 領域であり、特に紫外線による代表的な DNA 損傷であるピリミジンダイマーは 260 nm 付近にスペクトルが観測され、殺菌灯はこの波長の紫外線が強く観測される。また、活性種のうち最も強力な酸化力を有する OH ラジカルが発生すると、309 nm 付近にスペクトルが観測される⁷⁾。

作成したアルゴンプラズマトーチ発生装置先端部分と分光計測用光ファイバーヘッド (USB4000p Ocean Optics) の間 40 mm の位置に厚さ 5 mm の石英ガラスを設置、照射下部から垂直に採光して発光分光計測を行った。図3に本実験で用いたアルゴンプラズマトーチの発光スペクトルを示す。

図3より309 nm 付近に OH ラジカルのスペクトルが観測された。アルゴンプラズマトーチで OH ラジカルのスペクトルが観測された要因として、空気中の酸素と水蒸気成分が解離した OH ラジカルが観測されたためであると考えられる⁸⁾。UV-C region ではピークがほとんど観測されなかったことから本実験にて使用したアルゴンプラズマトーチでは紫外線による DNA 損傷は殆ど生じないと考えられる。

また、アルゴンプラズマトーチを曝露した寒天培地表面温

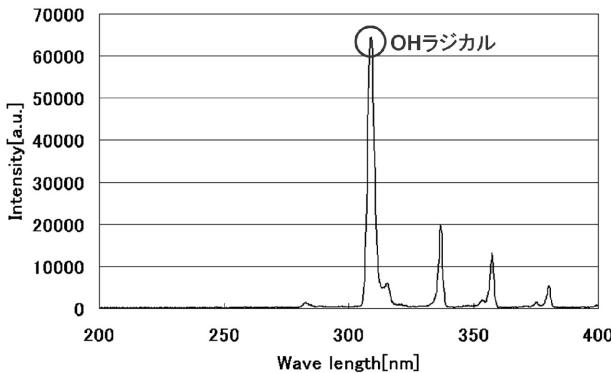


図3 発光分光計測結果

Fig. 3 Emission Spectrum of the argon plasma torch.

度を赤外温度計で測定した結果、温度上昇は全く認められず、検出開始温度より1-2°C低くなかった。これはアルゴンガスの噴きつけによる寒天培地表面水分の蒸発における気化熱の吸収が原因と考えられる。

アルゴンプラズマトーチを曝露した培地のpHをpH試験紙で測定した結果、pHの変化はほとんど観察されなかった。よって、アルゴンプラズマトーチ曝露によるpHの変化でのDNA損傷はほとんど生じないと考えられる。

3.3 アルゴンプラズマトーチ曝露による出芽酵母の殺菌実験

アルゴンプラズマトーチ曝露による出芽酵母の生存率への影響を検証するために、YPD寒天培地を領域分けし、各領域内の単位面積当たりの残存生菌数の観察を行った。処理検体として希釈調製された出芽酵母DF5(YEp365)を用いた。約1,000個の出芽酵母を滅菌水100mLに懸濁し、減圧濾過法を用いてメンブレンフィルタ(ADVANTEC Cellulose Acetate, ポアサイズ0.45μm, φ90mm)上に菌の捕集を行った。菌を捕集したメンブレンフィルタをYPD寒天培地表面に設置し、メンブレンフィルタの中心上部からアルゴンプラズマトーチを曝露した。曝露時間は0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640secとした。曝露後、30°Cに設定されたインキュベーター内にて48時間培養後、生菌数の検出及び観察を行った。メンブレンフィルタの中心地点より半径10mmの領域を①、半径10mmと20mmの間の領域を②、半径20mmと30mmの間の領域を③、半径30mmと40mmの間の領域を④とし、①-④の領域における単位面積当たりの生菌数を算出した。

また、アルゴンプラズマトーチ曝露による溶液中の出芽酵母の生存率への影響を検証するために、96穴プレートの1ウェル内における液中殺菌実験を行った。 1.0×10^7 CFU/mLに調整した出芽酵母DF5(YEp365-RNR2-lacZ)を96穴プレートの1ウェル内に100μL(菌液深さは約3mm)

滴下し、アルゴンプラズマトーチを曝露した。曝露時間は0, 60, 120, 240, 480, 960secとした。曝露後、菌液の回収及び希釈を行い、YPD寒天培地上に塗布した。塗布した培地を室温にて48時間培養後、生菌数を算出し、生存率を求めた。

3.4 遺伝子組換え酵母におけるDNA損傷及びストレス応答の検出

3.4.1 使用した出芽酵母株

本実験では、DNA修復遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子(*lacZ*)の上流に結合したレポータープラスミドを出芽酵母に導入し、DNA損傷性物質への曝露によるレポーター遺伝子の発現量の増大に基づいてDNA損傷の検出を行った。本研究では、*RNR2*, *HSP26*の2種類のプロモーター領域を用いたレポータープラスミドを出芽酵母株DF5に導入したDF5(YEp365-*RNR2-lacZ*), DF5(YEp365-*HSP26-lacZ*)と、プロモーターレスレポータープラスミドを有するDF5(YEp365)の計3種類の形質転換株を用いた。

レポータープラスミドは酵母2μmプラスミド由来のYEp365ベクターに*RNR2*と*HSP26*の各遺伝子の上流域をそれぞれPCRで增幅してクローニングを行った。

3.4.2 アルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷検出

3種類の出芽酵母形質転換株をYPD培地中で12-16時間、30°Cで振とう培養した。培養した菌液をYPD培地で2倍に希釈し、希釈した菌液1容量に対して5容量のロイシン欠損選択培地を加え、30°Cで2時間振とう培養したものを前培養液とした。96穴プレートの1ウェルにこの前培養液100μLを滴下し、アルゴンプラズマトーチを0, 60, 120, 240, 480, 960sec曝露した。曝露後、β-galの発現と蓄積を行うため30°Cで6時間振とう培養した(2, 4, 6時間培養して実験を行った結果、6時間でβ-gal活性が顕著に上昇したため、6時間で実験を行った)。その後、各ウェルについて波長590nmでの吸光度(OD₅₉₀)を検出し、培養後の上記菌液を新しいウェルに20μL移し、以下に示すβ-gal assayによりβ-gal活性の比活性値を算出した。

Y-PER(Yeast Protein Extraction Reagent)とONPG溶液(ONPG 1.1mg/mL in Z buffer)の混合液(Y-PER:ONPG溶液=35:85, w/v)を1ウェル当たり120μL加え、よく混合させた。混合開始時間を反応開始とし、20分間反応させ、反応後の溶液に56μLの1M炭酸ナトリウムを加え、反応を停止した。反応終了後の各ウェルにおける波長405nm, 590nmでの吸光度(A₄₀₅, A₅₉₀)を測定し、検出したOD₅₉₀, A₄₀₅, A₅₉₀により以下に示す式を用いて、1細胞当たりのβ-gal活性の比活性値を算出した。

$$\beta\text{-gal activity} = (A_{405} - 1.18 \cdot A_{590}) / OD_{590}$$

ここで、 A_{405} は酵素活性のレベルを示す指標である。 A_{590} は各ウェル中に残存する細胞片による散乱影響の程度を示す指標である。 OD_{590} は細胞密度である。

曝露菌株による β -gal活性を未処理菌株での β -gal活性で除した値をfold induction（誘導倍数）とし、グラフにプロットした⁵⁾。3種類の出芽酵母株でそれぞれ3回の実験を行い、fold inductionの平均値と標準偏差を算出した。

3.4.3 MMS曝露によるDNA損傷検出

96穴プレートの1ウェルに前培養液90 μ Lを滴下し、DNAアルキル化剤であるMMSを最終濃度が0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%となるように、滅菌水で0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0%の濃度で希釈したMMS溶液を10 μ L加え、6時間反応させて、 β -gal assayによりDNA損傷の検出を行った。3種類の出芽酵母株でそれぞれ3回の実験を行い、fold inductionの平均値と標準偏差を算出した。

3.4.4 紫外線曝露によるDNA損傷検出

紫外線の曝露には260 nm付近に発行スペクトルが観測される殺菌灯(20 W)を使用し、紫外線ランプとサンプルとの距離を20 cmとした。96穴プレートの1ウェルに前培養液100 μ Lを滴下し、紫外線を0, 60, 120, 240, 480, 960 sec曝露後、6時間培養し、 β -gal assayによりDNA損傷の検出を行った。3種類の出芽酵母株でそれぞれ3回の実験を行い、fold inductionの平均値と標準偏差を算出した。

3.4.5 熱ショックによるストレス応答検出

前培養液を0.6 mLチューブに分注し、40°Cに設定したアリミバスにて15, 30, 60 min静置し、熱ショックを加えた後、96穴プレート1ウェルに熱ショック後の菌液を100 μ L滴下し、6時間培養後、 β -gal assayによりDNAへのストレス応答の検出を行った。3種類の出芽酵母株でそれぞれ3回の実験を行い、fold inductionの平均値と標準偏差を算出した。

4. 実験結果及び考察

4.1 アルゴンプラズマトーチ曝露による出芽酵母の殺菌実験

アルゴンプラズマトーチを出芽酵母に曝露した場合における殺菌効果の検証を行った。図4にアルゴンプラズマトーチ曝露時間80 secにおけるYPD寒天培地の観察写真を、図5に領域別殺菌実験結果を、図6に液中殺菌実験結果を示す。

図4, 5よりアルゴンプラズマトーチの曝露時間経過に伴い、曝露部分を中心とし、放射状に殺菌効果が進展することが分かった。また、殺菌効果は曝露部分に近づくにつれ上昇し、曝露部分(中心領域①)の領域においては曝露時間320 secにおいて殺菌率は100%となった。

アルゴンプラズマトーチ曝露による殺菌のメカニズムとして曝露部分における荷電粒子の菌体への衝突による物理

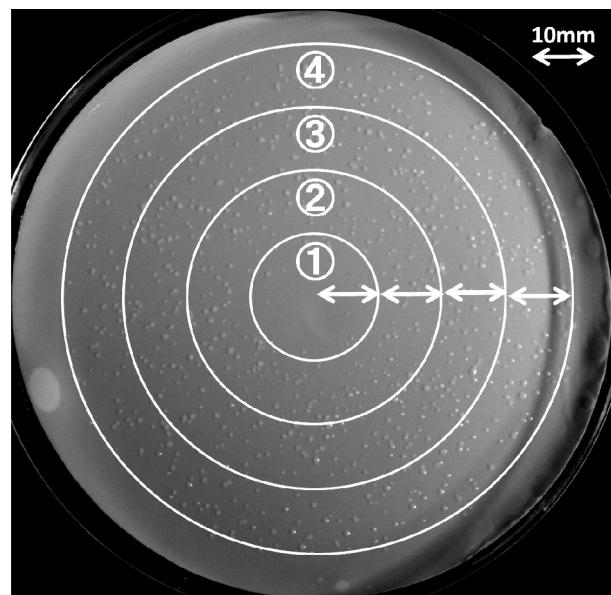


図4 領域別殺菌観察写真

Fig. 4 Photograph of Petri dish showing the effects of the argon plasma torch on *S.cerevisiae*.

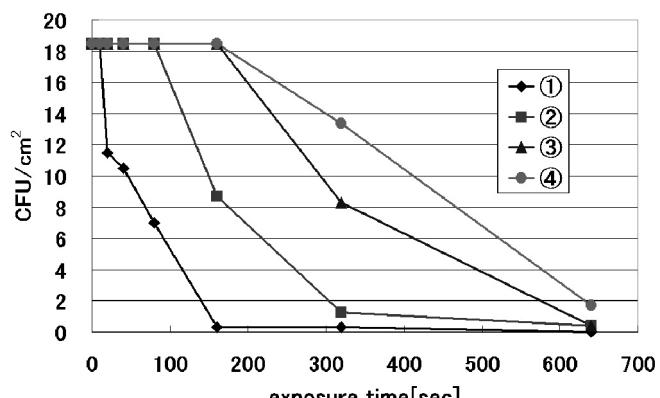


図5 領域別殺菌実験結果(①~④は図4を参照)

Fig. 5 Survival curves of *S.cerevisiae* according to the range on membrane filter which exposed the argon plasma torch.

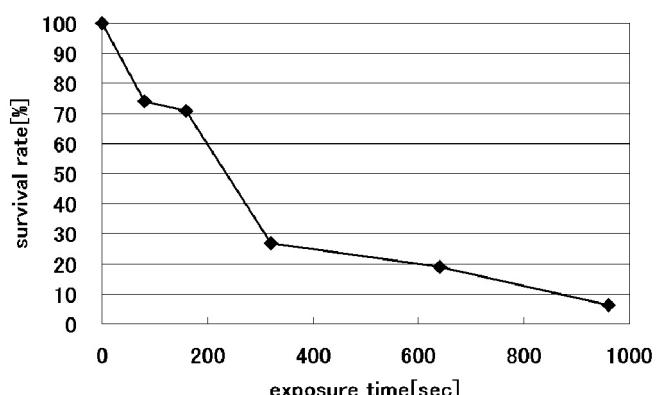


図6 液中殺菌実験結果

Fig. 6 Survival curves of *S.cerevisiae* in one hole of 96-well plate which exposed the argon plasma torch.

的破壊及び寒天培地上の水分を吸収したメンブレンフィルタへの曝露によって生成した活性種による化学的破壊が行われていると考えられる。また、アルゴンガスがメンブレンフィルタ表面に衝突し、表面全体に広がりを見せていていることからアルゴンガス流に伴って曝露が寒天培地表面全体に広がり、活性種が全体で生成されると考えられる。更に液層で生成された活性種が拡散することで殺菌効果を放射状に伸張させると考えられる⁹⁾。

また、図6より溶液中の出芽酵母に曝露した場合、曝露時間960 secにおいて約95%の殺菌効果を確認した。殺菌要因として、アルゴンプラズマトーチを溶液中に曝露することで生成された活性種による化学的破壊により、殺菌が行われたと考えられる。

4.2 遺伝子組換え酵母におけるDNA損傷及びストレス応答の検出

4.2.1 アルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷検出

アルゴンプラズマトーチ曝露による β -gal活性の発現誘導を図7に示す。

図7よりDF5(YEp365-RNR2-lacZ)において曝露時間に依存した β -gal活性の増大が確認された。曝露時間960 secにおいて最大の活性の増大が確認され、約18.5倍の β -gal活性の増大が確認された。*RNR2*遺伝子プロモーターを有する株にて特異的に活性が増大していることから、アルゴンプラズマトーチ曝露によりDNA損傷が生じ、*RNR2*の転写活性が上昇してDNA修復が行われたと考えられる。

DF5(YEp365)では活性の増大がほとんど観察されなかったことから、 β -gal活性の増大はアルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷に応答して*lacZ*の発現が誘導された結果であると考えられる。また、DF5(YEp365-HSP26-lacZ)では活性の著しい上昇が確認されなかつたことから、アルゴンプラズマ

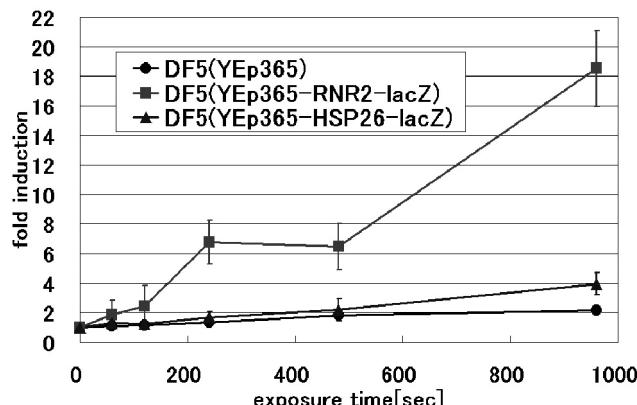


図7 アルゴンプラズマトーチ曝露による β -gal活性の発現誘導

Fig. 7 Induction of β -gal activity by argon plasma torch.
Yeast strain used DF5 cells with YEp365-RNR2-lacZ (filled square), YEp365-HSP26-lacZ (filled triangle) and YEp365 (filled circle).

トーチ曝露による細胞ダメージやストレスは*HSP26*遺伝子の発現にあまり影響しないものと考えられる。

また、アルゴンプラズマトーチ発生により生じた紫外線がDNA損傷の原因となるかを検討するため、カバーガラスで96穴プレートのウェルを遮蔽し、アルゴンプラズマトーチがウェル内部に伸入しないよう遮蔽した状態で、同様の実験を行った。その結果、*RNR2*遺伝子プロモーターを有する株の活性の上昇は全く見られなかった。よって、アルゴンプラズマトーチの発生により生じた紫外線でのDNAへの損傷はないと考えられる。

以上の結果から、アルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷の増大の原因として、液中に照射した際にOHラジカル等の活性種の生成によるDNAの切断や酸化作用による塩基の化学修飾が考えられる。

4.2.2 MMS曝露によるDNA損傷検出

MMS曝露による β -gal活性の発現誘導を図8に示す。

DF5 (YPEp365-RNR2-lacZ)においてMMS処理により、 β -gal活性の著しい上昇が認められた。特にMMS濃度0.01%において最大の β -gal活性レベルが観察され、約17.5倍の活性上昇が確認された。*RNR2*遺伝子プロモーターがアルキル化によるDNA損傷を特異的に検出すると考えられる。

*RNR2*遺伝子プロモーターを有するDNA損傷検出システムにおいて、大気圧低温プラズマと変異原性の強いMMSが同様の効果を示した。これまで低温プラズマによるDNAの物理的切断や生理活性の低下等を報告してきたが^{10,11)}、本研究によりアルゴンプラズマトーチの曝露によりDNA損傷が生じていることが明確に示された。

DF5(YPEp365-HSP26-lacZ)やDF5(YPEp365)ではアルゴンプラズマトーチを曝露した場合と同様、MMS処理に対し顕著な活性上昇は認められなかった。

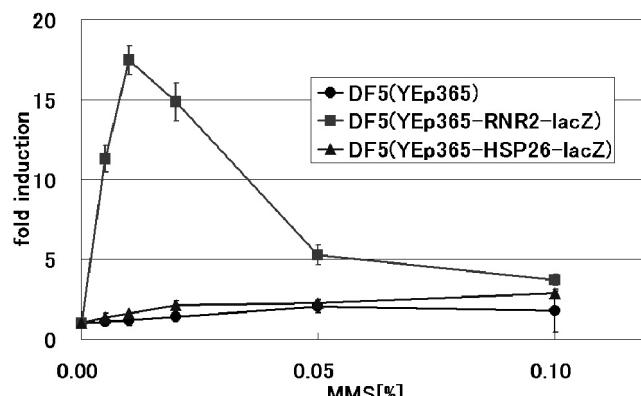


図8 MMS曝露による β -gal活性の発現誘導

Fig. 8 Induction of β -gal activity by MMS.
Yeast strain used DF5 cells with YEp365-RNR2-lacZ (filled square), YEp365-HSP26-lacZ (filled triangle) and YEp365 (filled circle).

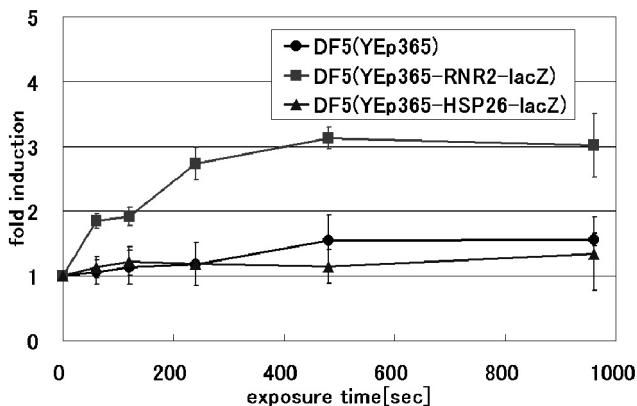


図9 紫外線曝露によるβ-gal活性の発現誘導

Fig. 9 Induction of β-gal activity by UV light.

Yeast strain used DF5 cells with YEp365-RNR2-lacZ (filled square), YEp365-HSP26-lacZ (filled triangle) and YEp365 (filled circle).

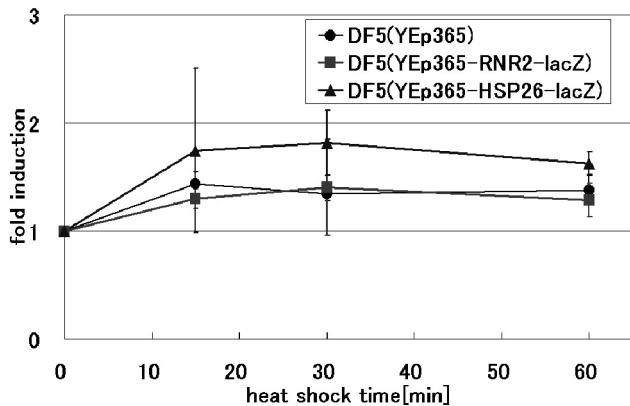


図10 热ショックによるβ-gal活性の発現誘導

Fig. 10 Induction of β-gal activity by heat shock.

Yeast strain used DF5 cells with YEp365-RNR2-lacZ (filled square), YEp365-HSP26-lacZ (filled triangle) and YEp365 (filled circle).

4.2.3 紫外線曝露によるDNA損傷の検出

紫外線曝露によるβ-gal活性の発現誘導を図9に示す。

DF5(YPEp365-RNR2-lacZ)において曝露時間に依存した明らかなβ-gal活性の増大が確認された。曝露時間960 secにおいて、最大で約3.0倍のβ-gal活性の増大が確認されたが、DF5(YPEp365), DF5(YPEp365-HSP26-lacZ)では紫外線曝露による顕著な活性上昇は認められなかった。

高い殺菌効果が認められているUV-C領域のスペクトルが観測される殺菌灯では、アルゴンプラズマトーチ曝露ほど活性の上昇が見られなかったことから、アルゴンプラズマトーチ曝露によるDNA損傷の主な要因は紫外線ではなく、OHラジカル等の活性種によるものであると考えられる。

4.2.4 热ショックによるストレス応答の検出

热ショックによるβ-gal活性の発現誘導を図10に示す。

図10よりDF5(YPEp365-HSP26-lacZ)において熱ショックに対し、β-gal活性の上昇がわずかながら確認されたのに対し、DF5(YPEp365), DF5(YPEp365-RNR2-lacZ)においては、熱ショックに対し、β-gal活性の著しい上昇は認められなかつた。この結果から本実験系で観察されたアルゴンプラズマトーチ曝露によるβ-gal活性の上昇は、熱などの一般的なストレス応答によるものではないと考えられる。

5. まとめ

- (1) 発光分光計測及び温度測定結果より、本実験で用いたアルゴンプラズマトーチでは紫外線や熱によるDNA損傷はほとんど生じなかつたと考えられる。
- (2) 寒天培地上における領域別での出芽酵母の殺菌効果は曝露部分にて最も高い殺菌効果を示し、時間経過に伴い曝露部分から放射状に殺菌効果が伸展した。溶液表面をアルゴンプラズマトーチに曝露することで、液中での出芽酵母の殺菌効果が認められた。
- (3) 酵母を用いるDNA損傷検出システムはDNA損傷を高感度に検出するものであり、アルゴンプラズマトーチの出芽酵母への曝露はMMSや紫外線の曝露と同様に高いDNA損傷を引き起こすことを示した。すなわち、致死量に満たないアルゴンプラズマトーチの曝露でもDNAの損傷は起つており、それに伴い、変異原性(突然変異の誘発や発癌性)が誘起される可能性が示唆された。
- (4) アルゴンプラズマトーチにより生成された活性種が細胞膜やタンパク質等の生体構成物質に損傷を加え¹⁰⁾、さらに内部に侵入した活性種によりDNAに損傷が加わると考えられる。これらの損傷が複合的に作用して細胞の不活化に至ると考えられる。

参考文献

- 1) M. Laroussi: Plasma Process. Polym., **2** (2005) 391
- 2) G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets and A. Fridman: Plasma Process. Polym., **5** (2008) 503
- 3) B. Liu, D. Drake and E. Stoffels: IEEE Trans. Plasma Sci., **34** (2006) 1317
- 4) X. Jia, Y. Zhu and W. Xiao: Mut Res., **519** (2002) 83
- 5) K. Ichikawa and T. Eki: J. Biochem., **139** (2006) 105
- 6) 北野勝久, 浜口智志: 応用物理, **77** (2008) 383
- 7) 佐藤圭輔, 安岡康一, 石井彰三: IEEJ Trans. FM, **128**, 6 (2008) 401
- 8) 井川聰, 北野勝久, 谷篤志, 大西直文, 浜口智志: 電気学会 プラズマ研究会, p.23 (2009)
- 9) 柴原大輝, 安田八郎, 藤井直斗, 栗田弘史, 高島和則, 水野彰: 静電気学会誌, **34** (2010) 2
- 10) H. Yasuda, M. Hashimoto, M.M. Rahman, K. Takashima and A. Mizuno: Plasma Process. Polym., **5** (2008) 615
- 11) H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno: Plasma Process. Polym., **7** (2010) 301