

主論文の要旨

**Non-thermal plasma prevents progression of
endometriosis in mice**

〔低温プラズマ照射はマウス子宮内膜症の進展を阻止する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

石田 千晴

【緒言】

子宮内膜症とは子宮内膜類似の組織が卵巣・腹膜などの子宮内腔外に存在する疾患で、生殖可能年齢の女性の約 10%に発生する。月経痛や不妊の原因となるだけでなく、卵巣子宮内膜症性嚢胞（チョコレート嚢胞）は卵巣癌のリスクを 4 倍程度上げることが知られている。

子宮内膜症の病変は周囲臓器との癒着や腹膜病変などを伴う散布性病変が多いため、卵巣機能温存手術では病変のみを完全に切除することは難しい。卵巣機能を温存した場合、術後の再発率は 12-30%と高い。

以前より子宮内膜症と鉄の関連についての研究が行われてきている。チョコレート嚢胞の内容液は陳旧性の血液を含み、触媒鉄濃度が高く、触媒鉄による持続的な酸化ストレスに上皮細胞が常に曝露されることが卵巣癌の発生する原因と考えられている。最近では、子宮内膜症組織、特に間質では触媒性 2 価鉄との親和性が高く、上皮細胞から間質細胞へ鉄を移行し、間質細胞が癌化を予防する役割を担っている可能性があることが報告されている。

プラズマとは、固体・液体・気体につづく物質の第 4 の状態である。気体を構成する分子が電離し、陽イオンと電子に分かれて運動している状態で、活性酸素種や活性窒素種を放出する。現在、プラズマが大気圧下で低いガス温度のまま生成できる装置が作成され、プラズマを液体や生体に作用させる試みが多数みられるようになった。低温プラズマ（NTP; Non-thermal plasma）を組織に照射することで、フリーラジカルが生成され、酸化ストレスを細胞に与えることができるという報告がある。また、培養液などにプラズマ照射した液（PAM; plasma-activated medium）にも種々の活性酸素種による効果があることが示されている。また、触媒性 2 価鉄の多い組織や細胞においては Fenton 反応によりヒドロキシルラジカルを生成しやすくなる。

以上より、子宮内膜症病変には多くの鉄が含まれ、また鉄を含む組織に NTP を照射するとヒドロキシルラジカルが発生しやすいため、子宮内膜症病変に NTP を照射する事で酸化ストレスが発生し、子宮内膜症の増殖を抑制できるのではないかという仮説を立てた。

今回我々は、子宮内膜症マウスモデルを作成し、子宮内膜症病変に NTP 照射を行い、どのような影響があるかを調べた。

【対象及び方法】

細胞は、内膜症のない正所性内膜間質細胞・内膜症を有する正所性内膜間質細胞・異所性内膜間質細胞の不死化細胞と Ishikawa 細胞株（高分化型子宮内膜腺癌・上皮細胞の代用）を使用した。これらの細胞をプラズマ照射した培養液（PAM）で 24 時間培養し MTS assay を行った。

次に、子宮内膜症マウスモデルを作成した。7 週齢の BALB/c ドナーマウスの卵巣を摘出し、週 1 回 17 β エストラジオールを投与し、性ホルモン動態を同調させた。2 週間後（9 週齢）に子宮を摘出し細切した。9 週齢のレシピエントマウスの卵巣を摘出

し、腹腔内にドナーマウスの子宮片を注入した。卵巣摘出後は週 1 回 17β エストラジオールを投与し、4 週間後（13 週齢）に開腹して内膜症様病変を確認した。ペン型のプラズマ発生装置（PN-100/120TPG; NU Global Co., Ltd., Nagoya, Japan）で内膜症様病変に NTP を 30 秒間照射し、対照群にはヘリウムを照射した。照射後に閉腹し、さらに 4 週間後（17 週齢）に再開腹して病変の変化をマウスあたりの病変の個数、総表面積および組織学的に評価した。

また、子宮移植 4 週間後（13 週齢）に形成された内膜症病変を摘出し、嚢胞を切開し、嚢胞壁に NTP 照射を行い、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) で免疫染色を行った。

【結果】

120 秒・180 秒間 NTP 照射した培養液での細胞増殖を比較した所、間質細胞より上皮細胞の方が傷害されやすい事がわかった。間質細胞の中では異所性内膜由来が最も傷害されにくい事もわかった (Figure.1)。

子宮内膜症マウスモデルでは、マウスの腹腔内に嚢胞状の子宮内膜症様病変が形成され、ヒト子宮内膜症に類似した組織学的特徴であった。

子宮移植 4 週間後の内膜症病変を摘出し、嚢胞壁に NTP 照射を行うと、8-OHdG が間質細胞よりも上皮細胞で強く染色されていた。NTP 照射群ではヘリウム照射群や照射なしと比較して強く染色されていた (Figure.2)。以上より、NTP 照射で主に上皮細胞が酸化ストレス傷害を受ける事がわかった。

子宮内膜症マウスモデルの病変に NTP 照射し、照射前と照射 4 週間後の病変の数と表面積を評価した。1 匹のマウスあたりの病変の数はヘリウム照射群で 2.3 個から 2.8 個と増加し、NTP 照射群では 2.6 個から 2.5 個と減少したが、有意差は認めなかった。病変の表面積の実測値と照射前後でも表面積の割合で評価すると、照射前と照射後ではヘリウム照射群では 3.7 倍大きくなっていたが、NTP 照射群では大きくなっていなかった (Figure.3)。

組織学的な評価では、内膜症病変の嚢胞壁にどのくらい上皮細胞が残存しているかを嚢胞全体の周囲の距離に対する上皮が存在する嚢胞壁の距離の割合で評価した。ヘリウム照射群でも上皮の減少を認めたが、NTP 照射群ではさらに上皮の減少を認めた。細胞増殖を示す Ki67 陽性の上皮細胞の数をカウントしたところ、ヘリウム照射群よりもプラズマ照射群で有意に減少していた (Figure.4)。

【考察】

プラズマ照射した培養液で内膜上皮細胞・間質細胞を培養すると上皮細胞の方が傷害されやすいことがわかった。

子宮内膜症マウスモデルにおいて、病変にプラズマを照射すると、病変が大きくなるのを抑制した。病変にプラズマを照射すると上皮細胞に DNA 酸化損傷が起こり、上皮細胞の増殖が抑制されていると考えられる。

今回使用したペン型のプラズマ発生装置は照射面積が小さく、病変に対して十分にプラズマを照射できなかった可能性がある。今後、照射面積が大きいプラズマ発生装置が開発されれば、さらなる効果が期待できるかもしれない。

【結語】

子宮内膜症の卵巣機能温存手術では、内膜症病変を完全に除去する事は難しく、手術中に残存した病変に対するプラズマ照射は内膜症の進展や再発を防ぐために有用かもしれない。但し、プラズマ照射の卵巣への影響はまだ不明であり、マウス・ラットの卵巣への影響を調べるなど慎重な検討が必要である。