

19p-C2-18

誘電体バリア放電処理した脂質二重膜に現れる欠陥の蛍光顕微鏡観察

Fluorescence microscopy observation of defect on lipid bilayer membrane
treated by dielectric barrier discharge豊技大電気・電子情報¹, 豊技大 EIIRIS²○加藤 諒¹, 須田 善行¹, 田上 英人¹, 滝川 浩史¹, 手老 龍吾²Dept. of Electrical and Electronic Information Eng.¹, EIIRIS², Toyohashi Univ. of Technol.○Ryo Kato¹, Yoshiyuki Suda¹, Hideto Tanoue¹, Hirofumi Takikawa¹, Ryugo Tero²

E-mail: kato@arc.ee.tut.ac.jp

1. はじめに

大気圧プラズマを医療に応用したプラズマ医療では、その非接触で治療できるという特徴を活かして、血液凝固や皮膚の消毒・殺菌などへの応用研究が進められている⁽¹⁾⁽²⁾。それと同時に、プラズマが細胞に及ぼす影響やメカニズムの基礎的な検討を行った研究も進められているが、プラズマと界面を形成する細胞表面に対するプラズマの影響を検討した研究は少ない。以上の背景から、細胞膜の主要成分である脂質二重膜に誘電体バリア放電 (DBD) 処理を施し、その挙動を詳細に観察することで、プラズマと細胞膜の相互関係を解明することを本研究の目的とした。

両親媒性分子 (親水部位と疎水部位とを有する分子) である脂質分子は水中に存在すると球状の二重膜構造 (ベシクル) を自己形成する。さらにベシクルを親水基板上に滴下すると平面脂質膜が自発的に形成される。この現象を利用した脂質二重膜形成法をベシクル融合法という⁽³⁾。この方法で形成した脂質二重膜に対して平行平板電極型 DBD 装置によるプラズマ処理を施し、蛍光顕微鏡による観察を行った。

2. 実験条件

本研究の実験系は既に報告した通りである⁽⁴⁾。DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) と蛍光色素ラベル脂質 (rhodamine B-dioleoylphosphatidylethanolamine, Rb-DOPE) を脂質分子として選択し、DOPC/クロロホルム溶液と Rb-DOPE の混合液 (100 : 1) から溶媒を除去し、脂質フィルムを作製した。ここに緩衝溶液を加えて 1 時間震盪させることで、多層ベシクル懸濁液を得た。さらに凍結・解凍と濾過を数回組み合わせて単層ベシクル懸濁液を調製した。

プラズマ処理用に窪みを付けた石英基板を用意した。この窪みの中にまず緩衝液と脂質二重膜展開用の SiO₂/Si 基板を入れた。濃度調節した単層ベシクル懸濁液 (ベシクル懸濁液 50 μ L と緩衝液 350 μ L の混合液) を用意し、石英基板の窪みに滴下して、45°C 以上の温度で 1 時間静置した。その後、緩衝液で液相を置換し、余剰のベシクルを取り除いた。なお、緩衝液表面から脂質二重膜表面への深さはおよそ 0.47 mm である。

プラズマ処理条件は供給ガス : Ar, 電極間ギャップ : 1.5 mm, 印加電圧 : 15 kV, 入射電力 : 300 W, 周波数 : 15 kHz とした。DBD 型大気圧プラズマ装置の両電極は冷却水循環装置により -5°C に冷却した。プラズマ照射は 120 s 行い、プラズマ処理後の脂質二重膜を蛍光顕微鏡で観察した。

3. 実験結果

Fig.1 にプラズマ照射前後の脂質二重膜の蛍光顕微鏡画像を示す。プラズマを照射することによって脂質二重膜の欠陥数が明らかに増加したことが分かる。今回のプラズマ照射条件では、膜全体の 32% の領域に斑模様状の欠陥が形成された。脂質二重膜は側方拡散性という脂質分子の流動性を持つが、プラズマ照射によって形成された欠陥と側方拡散性との関係を蛍光退色回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) と呼ばれる手法を用いて調べた。この手法は、励起光

照射により、脂質二重膜に蛍光退色領域を作り出す。脂質二重膜が側方拡散性を有していれば、蛍光退色した脂質分子と退色した領域外の脂質分子とが入れ替わり、蛍光退色が回復する。Fig.2 にプラズマ照射前後の脂質二重膜の FRAP 画像を示す。プラズマ照射していない脂質二重膜では、蛍光退色後 300 s 経過すると、蛍光退色が回復した。しかし、プラズマ照射した脂質二重膜では、蛍光退色後 3000 s 経過しても蛍光退色は回復しなかった。従って、脂質二重膜の欠陥は側方拡散性を阻害することがわかった。

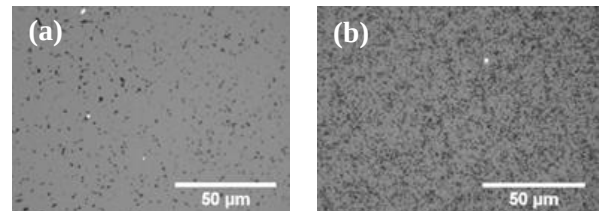


Fig. 1 Fluorescence microscope (Olympus BX51W1) images of SiO₂/Si surfaces (a) before and (b) after the plasma irradiation Scale bars correspond to 20 μ m.

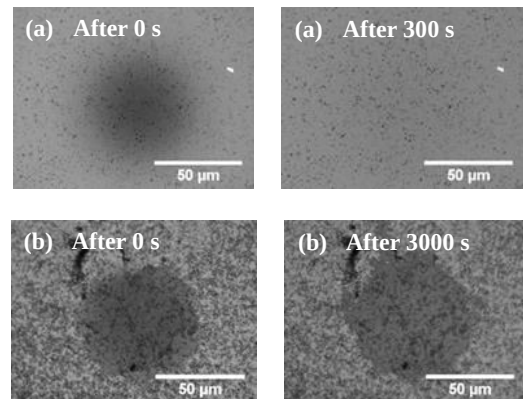


Fig. 2 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of (a) without and (b) with plasma irradiation after excitation light irradiation. Scale bars correspond to 20 μ m.

謝辞 本研究の一部は、豊橋技術科学大学 EIIRIS プロジェクト、独立行政法人日本学術振興会拠点大学交流事業、JSPS 科研費 24360108, 25630110 ならびに MEXT 科研費 24110708 を受けて行なわれた。

文献

- (1) Y. Zhao, A. Ogino, M. Nagatsu : Applied Physics Letters: 98 (2011) 191501
- (2) S. Y. Moon, D. B. Kim, B. Gweon, W. Choe, H. P. Song, C. Jo: Thin Solid Films 517 (2009) 4272
- (3) R. Tero: Materials 5 (2012) 2658
- (4) R. Kato, Y. Suda, H. Tanoue, H. Takikawa, R. Tero: 第 30 回プラズマプロセス研究会, A3-04, 2013 年 1 月 21-23 日, アクトシティ浜松