29p-B7-4

水酸基ラジカル制御プラズマ生成と遺伝子導入への応用

Generation of Hydroxyl Radical Controlled Plasma and Application to Gene Transfection

東北大院工　○金子俊郎，佐々木渉太，小西秀明，石田裕康，神崎展

Dept. of Electronic Eng., Tohoku Univ.,

°Toshiro Kaneko, Shota Sasaki, Hideaki Konishi, Hiroyasu Ishida, Makoto Kanzaki

E-mail: kaneko@m.tohoku.ac.jp

遺伝子導入は先天性の遺伝子疾患のみならず，がん，エイズ，C 型肝炎等の治療法として期待されており，さらには人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を作成する技術としても，盛んに研究が行われている．これまでに，生物学的手法であるウィルス法をはじめとして，化学的手法であるリポソーム法，物理的手法であるエレクトロポレーション法，ソノポレーション法，パーティクルガン法等の様々な手法が開発されているが，安全性（副作用）の問題や導入効率・細胞生存率の低さなどから，新たな低侵襲・高効率遺伝子導入手法の開発が求められている．近年，安価な設備を用いて細胞内へ遺伝子を導入する方法としてプラズマ照射の利用が報告されているが[1, 2]，導入効率が低く，導入メカニズムも解明されていないため，実用化に至っていない．そこで本研究では，プラズマ中の活性酸素種，特に水酸基ラジカル（OH ラジカル）に注目し，これと細胞膜との相互作用が遺伝子導入に大きく寄与していると考え，OH ラジカルの生成量を制御したプラズマを発生させ，遺伝子導入に対する効果について調べたので，その結果を報告する．

実験は，ヘリウムを原料ガスとしたプラズマジェット（周波数 f = 10~20 kHz, 電圧 V_{pp} = 5~20 kV）に，シリンジポンプにより微量の水を導入して行った．はじめに，水導入による OH ラジカルの生成について調べた. 水導入量 Q (μL/min)を変化させ, 放電部の発光スペクトルを発光分光分析 (OES) 装置により観測したところ，1 μL/min 以下の僅かな水の導入によって，OH ラジカルのピーク強度 I_{OH} (309 nm)とヘリウムのピーク強度 I_{He} (706 nm) の比 I_{OH} / I_{He} が急激に増加することが観測された．

この OH ラジカルを含む水導入プラズマを，マウス繊維芽細胞（3T3L1 細胞）と遺伝子を模擬する蛍光物質（YOYO-1）を混合させたリン酸緩衝生理食塩水に照射して，YOYO-1 の細胞内での蛍光を測定することで細胞への導入効率を算出した．その結果，10 秒以内の短いプラズマ照射時間で細胞への導入効率が極大（~30%）となり，さらに照射時間を増加させることで導入効率がより向上することが明らかとなった．このとき，生存率は 90%を越えており，プラズマを用いることで低侵襲の遺伝子導入が可能となった．

講演では，これらの結果に加え，OH ラジカルの密度を制御したプラズマ照射を行い，細胞内への導入効率を様々な条件下で評価した結果も合わせて報告する．

[1] Y. Ogawa, N. Morikawa, A. Ohkubo, S Miyoshi, H. Arakawa, Y. Kita, and S. Nishimura: Biotech. Bioeng. **92** (2005) 865.

[2] Y. Sakai, V. Khajoee, Y. Ogawa, K. Kusuhara, Y Katayama, and T Hara: J. Biotech. **121** (2006) 299.

© 2013 年　応用物理学会