

大気圧プラズマによる細胞膜形状変化と遺伝子導入の相関

Analysis of non-thermal atmospheric pressure plasma effects on cell membrane and its contribution in gene transfection

名城大¹, 大阪医科薬科大², 北崎 竜也¹, 小林 未明², 朝日 通雄², ○熊谷 慎也¹

Meijo Univ.¹, Osaka Med. Pharm. Univ.², T. Kitazaki¹, M. Kobayashi², M. Asahi², ○S. Kumagai¹

E-mail: skumagai@meijo-u.ac.jp

【はじめに】非熱平衡大気圧プラズマは生物学や医療の分野への応用に向けて活発に研究されている。その一例として、物質導入がある。プラズマを細胞に照射することで、高効率で遺伝子やタンパク質を導入できることが報告されているが[1-3]、導入機序には不明な点が多くある。導入機序の解明には、目的の物質が細胞内に導入される過程を明らかにする必要がある。我々はこれまでに走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、プラズマを照射した際に細胞膜に形成される孔構造を観察し、物質導入との相関を検討してきた[4]。本研究では、プラズマの照射強度と細胞の増殖率との相関から遺伝子導入に適した条件を明らかにし、緑色蛍光たんぱく質 (GFP) をコードしたプラスミドの導入を試みたので報告する。

【実験】マウス線維芽細胞 L929 を培養し、プラズマ照射にはジェット型装置を用いた (He ガス 2 slm, 10 kV, 9 kHz)。プラズマ未照射、プラズマ照射 13 秒、そして、プラズマ照射 50 秒の 3 試料をインキュベートし、増殖率を評価した。合わせて、これら 3 試料の表面形状を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。続いて、プラズマ照射後の細胞試料に対して GFP をコードしたプラスミド溶液を滴下し、24 時間インキュベートした。その後、蛍光顕微鏡で細胞観察を行った。

【結果および考察】プラズマ未照射の細胞は 24 時間で 2 倍の増殖率を示した。照射 13 秒の細胞では、SEM で細胞膜に孔状の構造が観察されており、48 時間インキュベート後から増殖し始め、プラズマ未照射と同様の 2 倍の増加率に到達した。一方、照射 50 秒では細胞数が減り続けた。

続くプラスミド導入実験では、プラズマ照射 13 秒の条件で GFP に由来する緑色蛍光を観測した (Fig. 1)。プラズ

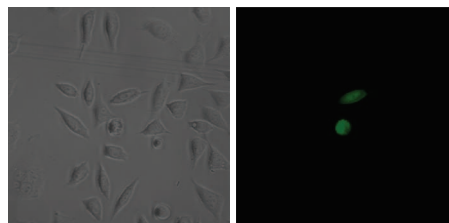


Fig. 1 Micrographs of L929 cells by (a) phase contrast and (b) fluorescence microscopies.

マ未照射の細胞では緑色蛍光が観測されなかったことから、プラズマ照射で細胞膜表面に形成される孔構造が、プラスミド導入に関与していると考えられる。また、プラズマ照射 50 秒の条件では、細胞に過度なダメージが入り、発現しなかったと考えられる。

【謝辞】本研究は、科研費 (19H04457)、上原記念生命科学財団、プラズマバイオコンソーシアムプロジェクト (01222009 及び 01223008) の助成を受けたものである。

【参考文献】 [1] Ogawa et al., *Biotechnol. Bioeng.* **92**, pp. 865-870, (2005). [2] Yanagawa et al., *PLoS One*. **12**, 2, (2017). [3] Hiramatsu et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* **58**, SEEG05, (2019). [4] Kitazaki et al., 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会, 13a-N107-9, (2021)