

遺伝子導入効率に対する大気圧プラズマ照射距離の影響 Effects of Irradiation Distance of Atmospheric Pressure Plasma on Gene Transfection Efficiency

佐々木 渉太, 神崎 展, 金子 俊郎
Shota SASAKI, Makoto KANZAKI, Toshiro KANEKO

東北大院工
Dept. of Electronic Eng., Tohoku Univ.

遺伝子導入は、細胞内現象の解析や iPS 細胞作製等の遺伝子操作に重要な役割を果たしている。また、先天性の遺伝子疾患のみならず、癌やエイズ等の治療法として期待されている遺伝子治療実現において、低侵襲・高効率遺伝子導入法の開発が急務の課題となっている。しかし、これまでに開発されてきたエレクトロポレーション法といった非ウイルス遺伝子導入法は、細胞生存率が低い等の問題克服が困難なため、新たな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]、導入効率は低く、導入メカニズムも解明されていないことから、実用化に至っていない。筆者らは、プラズマの物理的作用と化学的作用が遺伝子導入に大きく寄与していると考え、それらを制御した大気圧プラズマを生細胞へと照射し、遺伝子導入に対する効果及び細胞生存率を評価したので、その結果を報告する。

実験は、図 1 に示すように大気圧プラズマジェットを用いて行った。図 1 において、照射距離 ($d_g + d_{air}$) は下部電極とガラス管先端までの距離 (d_g) と先端から細胞懸濁液までの距離 (d_{air}) で定義される。ヘリウムを原料ガスとし、周波数 $f \approx 10$ kHz, 電圧 $V_{pp} \approx 10$ kV の低周波電源を用いて放電させ、遺伝子を模擬した蛍光物質をあらかじめ混合した細胞懸濁液に対して様々な条件下で照射を行った。この際、生細胞に対してプラズマが直接照射される方式 (DPI: Direct Plasma Irradiation) とリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にプラズマ照射した処理水を用いて細胞を懸濁する間接的な方法 (PTW: Plasma Treated Water) の 2 通りでプラズマの遺伝子導入効率 (η) 及び生存率に対する効果を評価した。

図 2 に遺伝子導入効率の照射時間 (t_d)、処理時間 (t_p) 依存性を示す。照射時間は生細胞に対してプラズマが直接照射された時間であり、処理時間は PBS に対してプラズマ照射された時間である。遺伝子導入効率は、プラズマ照射時間に強く依存することが観測された。また、プラズマが直接照射される場合、図 2(a) で示されるように、照射距離によってその特性が大きく変化していることが分かる。一方で、プラズマの効果を間接的に与えた場合、その特性はあまり変化していない。このことは、プラズマによって生成された活性種だけではなく、直接照射されたときのみ生じる電界や PBS の電位変化等も遺伝子導入の要因である可能性が非常に高いことを示している。

講演では、これらの結果に加え、導入効率・細胞生存率を様々な条件下で評価した結果も合わせて報告する。

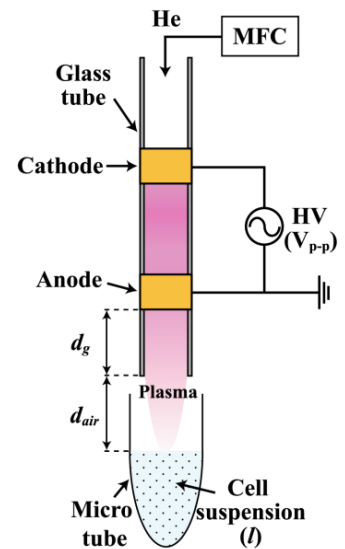


図 1. 装置の概略図

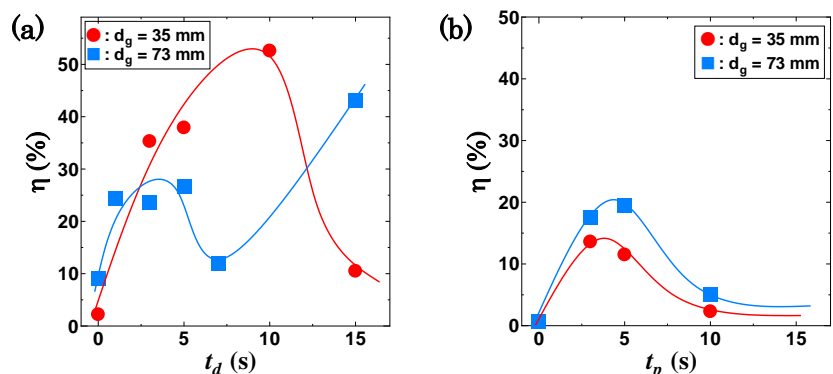


図 2. 各照射距離における遺伝子導入効率の照射時間 (t_d)、処理時間 (t_p) 依存性, $V_{pp} = 7.8$ kV, $d_{air} = 5$ mm, $I = 100 \mu$ L.