

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K05731

研究課題名(和文) マイクロプラズマ遺伝子導入法における周波数の最適化

研究課題名(英文) Optimization of frequency in gene transfection by discharge plasma, we investigate

研究代表者

前原 常弘 (Maehara, Tsunehiro)

愛媛大学・理工学研究科(理学系)・教授

研究者番号：40274302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ遺伝子導入法において、十分な検討がなされていなかった周波数に対する依存性を研究した。まず、500kHz、1MHz、13MHz帯域での小型整合回路の開発を行い、マイクロプラズマの発生に成功した。これを用いて、遺伝子導入の周波数依存性を調べたところ、明確な依存性が見られた。しかしながら、最適化には至っていない。これらの研究の応用として、メダカ魚卵への蛍光分子導入を試みた。水中プラズマによる導入が示唆されており、今後の展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞などの万能細胞への期待が高まる中、その出発点となる遺伝子導入技術は重要である。現在、いくつかの方法があるが、それぞれに一長一短がある。プラズマ遺伝子導入法は新しい簡便な方法として注目を集めており、プラズマを発生させる周波数の影響が大きいことを示したことは今後の発展の基礎をなす。また、メダカ魚卵への分子導入だが、メダカは脊椎動物のモデル生物として確立されており、簡便な分子導入法の開発は意義深い。

研究成果の概要(英文)：In gene transfection by discharge plasma, we investigate dependence on frequency. First, compact matching box was developed for 500kHz, 1MHz and 13MHz, and micro-plasma was successfully generated. We obtained obvious dependence on frequency. However, we cannot clarify the optimized frequency. As an application of these studies, we attempt to injection of fluorescent dye to killifish roe. Pictures of juvenile suggest that dye was successfully injected. This shows that further development is expected.

研究分野：プラズマ科学

キーワード：マイクロプラズマ 遺伝子導入 周波数 魚卵

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞などの万能細胞への期待が高まる中、その出発点となる遺伝子導入技術は重要である。現在、いくつかの方法があるが、それぞれに一長一短がある。一方、プラズマ遺伝子導入とは、放電プラズマを細胞に照射することで、外部より細胞内に遺伝子を導入する技術であり、2002 年に佐藤らによって発案された[1]。以来、分担研究者(神野・本村)らは極細電極(外径 70 μm)を用いてマイクロプラズマを作り、プラズマの空間的な揺らぎを抑えることで遺伝子導入効率を安定化し、照射領域を局限化することで細胞の死滅をほぼゼロに近づけることに成功している[2]。他の研究機関によるプラズマ遺伝子導入の報告は東北大学のグループ[3]などに限られている。ただし、pCX-EGFP 断片のように導入効率の低い DNA (~3%) [4]や血球を代表とする浮遊細胞のような導入効率の低い細胞など苦手な対象の克服が求められている。なお、これまでに主に利用している周波数は 20kHz であり、他の周波数での試みは必須である。これに対し、研究代表者はこれまでに「高周波磁場による癌温熱療法」に携わっており、100kHz ~ 1MHz 帯域の高周波電源を多数所有し、この帯域での回路の取り扱いに精通している。

2. 研究の目的

プラズマ遺伝子導入法とは、放電プラズマを細胞に照射することで、外部より細胞内に遺伝子を導入する技術である。既に、マイクロプラズマの利用が適していることが明らかとなっているが、導入効率の低い DNA や細胞などが存在し、実用化に向けて対象の拡大が必須である。このような状況下で新たなブレイクスルーを求め、従来、不十分であった周波数の依存性を明らかにし、最適周波数を得ることを目的としている。また、魚卵への蛍光分子導入などへも取り組み、プラズマによる遺伝子導入の潜在能力を明らかにする。

3. 研究の方法

各周波数に対応した共振・整合回路を開発した後、電極構造を最適化してマイクロプラズマの安定化を目指す。その後、分光計測にも取り組み、プラズマの状態把握に努める。さらに、遺伝子導入の実験へと移る。基礎的な実験として、マウスの繊維芽細胞(L-929)に、GFP(蛍光タンパク)を発現させる環状 DNA(プラスミド)を用いる。蛍光観察による導入細胞数の確認の他、照射前後の観察から生存率を求める。その他、水中プラズマの生物への利用も試みる。

4. 研究成果

年度ごとに研究成果をまとめる。

1) 2017 年度

・13.56MHz におけるマイクロプラズマ発生の安定化について

これまでに、共振・整合回路を小型化し、電極直上にこれらを配置することで、電源からの同軸ケーブルによる給電を可能とした。今年度は共振・整合回路内のコイルをトロイダル化することで、効率を上げ、より低い入力電力でのプラズマ発生に成功した(図1)。

・電極から離れた位置でのマイクロチャンネルプラズマの発生

2つの電極の間に、絶縁板を設け、2つの槽に分ける。その絶縁板に1つの貫通孔を設け、2つの槽と貫通孔を食塩水で満たす。電極間に13MHzの高周波を加えることで、貫通孔内に水中プラズマを発生させることが可能となる。デューティや入力電力をコントロールすることで、温度上昇もなくプラズマの発生が可能である。

・1MHz および 500kHz 帯でのマイクロプラズマの発生

13MHz 帯と同様の小型共振・整合回路を試作し、プラズマの発生を試みた。インピーダンスは 50 になっており、整合は十分であったが、プラズマの発生を実現することはできなかった。

2) 2018 年度

・1MHz および 500kHz 帯での回路の検討と試作

解析計算と数値計算の両方から、高い昇圧性能 Q を有する回路を検討し、インダクタンスが高



図1 13MHz 帯の共振・整合回路

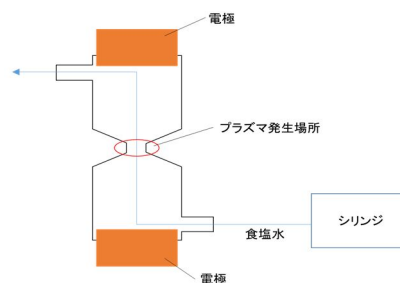


図2 電極から離れた位置でのマイクロチャンネルプラズマの発生装置

いこと、損失が十分小さいことが求められることが明らかとなった。リッツ線・40 μ m \times 660本（外径1.65mm）が入手できたためこれを利用した。この結果、これらの周波数帯域でマイクロプラズマの発生を得た。

・3つの周波数帯域でのプラズマによる遺伝子導入

周波数帯域による結果の違いを明確化した(例えば図3A)。低い周波数(1MHzおよび500kHz)では、プラズマの照射時間が長いほど、導入効率が高くなっており、一方、高い周波数(13.56MHz)では、照射時間が短いほど導入効率が高くなっていることが明らかとなった。周波数の違いがプラズマの物理的な性質の違いを引き起こし、それにより遺伝子導入に影響していることが明らかとなった。しかしながら、最適な周波数の確立には至っていない。

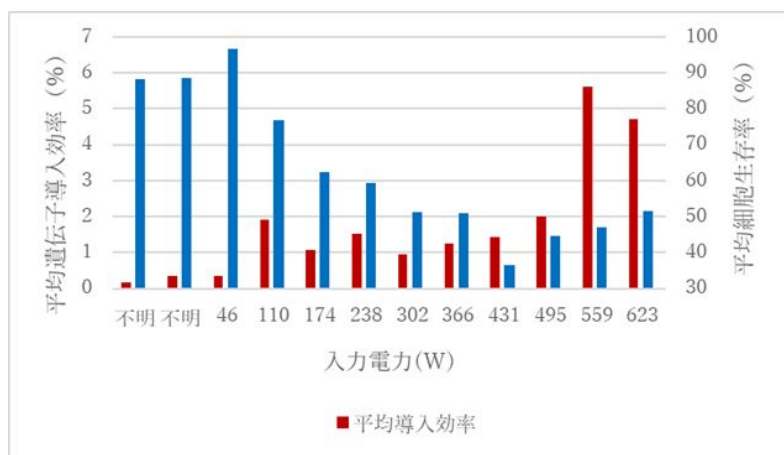


図3 1MHz帯における導入効率と生存率（電力に対する依存性）

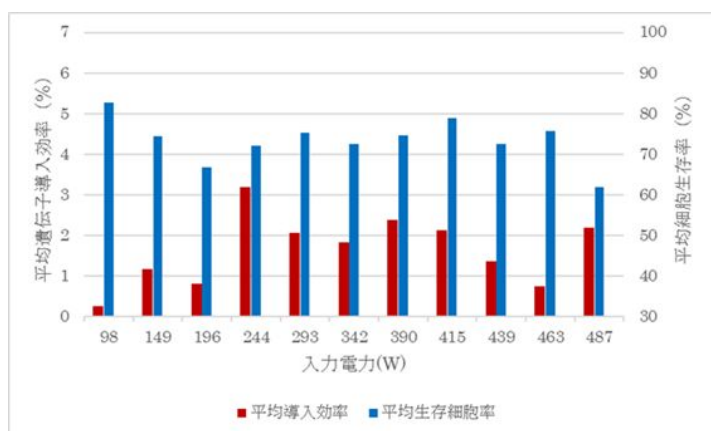


図4 13MHz帯における導入効率と生存率（電力に対する依存性）

3) 2019年度

・メダカ魚卵への応用

遺伝子導入技術の応用の1つとして、魚卵への蛍光分子導入を行った。これまでに、沿面放電を利用してスマ魚卵及び稚魚への蛍光分子導入が確認されているが、スマは産卵期が夏に限定され、ほかの季節では実験することができないため、研究室でも飼育が簡単なメダカでも実験が行われている。しかし、メダカでは卵殻が硬いためか、魚体への蛍光導入への蛍光導入は確認されていない。そこで、沿面放電ではなく水中プラズマを用いてメダカ魚卵へプラズマの照射を行い、蛍光分子の導入を目指した。用いた水中プラズマは、図2のタイプである。このようなプラズマを断続的に発生させる（Dutyを低くする）ことで、魚卵へのダメージが低下し、蛍光分子の導入が期待できる。実際、300Wでの実験において魚体の一部に確認できた（図5）。用いた周波数は13.56MHzである。

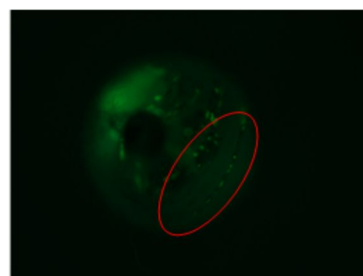


図5 メダカ魚卵への蛍光分子導入

・低い周波数での水中プラズマ発生

上記の結果を受け、他の周波数でも同様の形式での水中プラズマ発生の確認が必要となった。1MHz帯域で、まず、電極上にプラズマを発生させる装置を完成させ、試運転を行った。13.56MHzよりは、プラズマ発生が可能となる水の導電率は限られるが、十分広い範囲で、プラズマ発生が可能となることを示している。入力電力によるOHの分子スペクトルの変化も見ら

れ（13.56MHz では見られていない）異なる性質を持つプラズマが発生していることが示唆されている。

4) 2020 年度

・メダカ魚卵への応用

上述のように、2019 年度に図 2 のタイプ的水中プラズマを用いてメダカ魚卵へプラズマの照射を行い、蛍光分子の導入を目指した。このタイプは十分な液量が必要とされ、装置の構成もやや複雑である。簡単化のため、図 6 のように電極上の発生させる水中プラズマを利用し、実験の効率化を目指した。まず、プラズマを断続的に発生させる（Duty を低くする）ことで、魚卵へのダメージが低下し、蛍光分子の導入が期待できるよう、水中プラズマの断続的な運転（これまでに我々の研究室では経験がない）が可能な装置を試作した。電極として十分細いもの（0.5 と 0.35）を準備し、食塩水における断続運転を試み、電極やその周辺にダメージがないこと十分低い（～数 10W）での安定したプラズマ発生を得た。この結果を受け、メダカ魚卵へのプラズマ照射を行った。しかしながら、十分な回数の実験が行えなかったこともあり、蛍光分子導入は確認されていない（直接、魚卵にプラズマが衝突するためダメージが大きいようである）。

コロナ禍により十分な研究ができなかったため、期間を 1 年延長した。

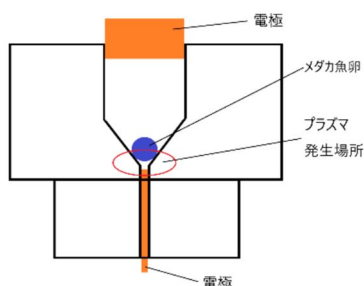


図 6 電極直上型水中プラズマ発生装置

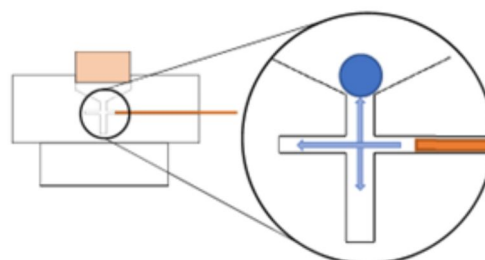


図 7 水平方向型水中プラズマ発生装置

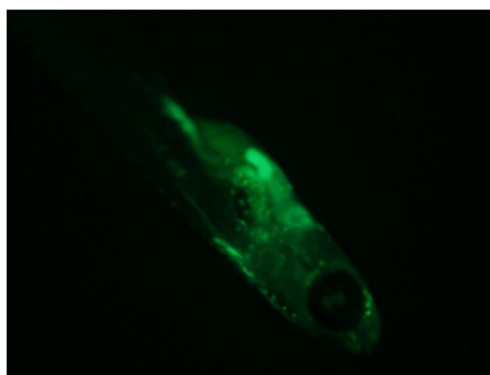


図 8 青色励起光を照射（緑色蛍光）

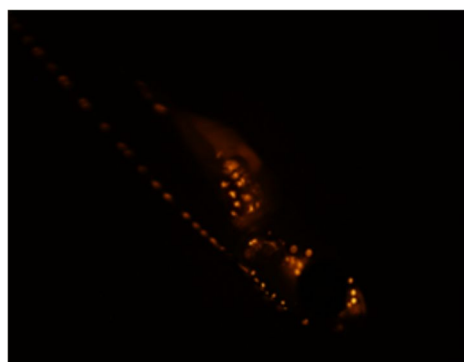


図 9 自家蛍光

5) 2021 年度

・水中プラズマ発生装置の改良

2020 年度は魚卵下部に電極を配し、プラズマが直撃する形状（図 6）だった（魚卵へのダメージが大きい）。そこで、魚卵下部に鉛直方向の小孔を設け、魚卵から数 mm 下部に水平方向にプラズマを発生させる装置を開発した（図 7）。

水中プラズマの断続的な運転が可能であることを確認し、基本的には単発プラズマ発生としている。電極として十分細いもの（0.35）を準備し、食塩水における断続運転を試み、電極やその周辺にダメージがないこと十分低い（～数 10W）での安定したプラズマ発生を得た。

その後、蛍光分子導入を試みた。この結果、数例の魚体への蛍光分子導入が確認され、水中プラズマ利用の可能性を確立することができたと考えている。図 8、9 に典型例を示す。孵化後の発光を示しており、自家蛍光のない部分での蛍光が確認できるため、魚卵内の魚体に蛍光分子が導入されていることが強く示唆される。パラメーターの最適化などなすべき項目は多いが、水中プラズマの応用として興味深い結果を示すことができた。

参考文献

- [1] M. Jinno et al, J. Photopolymer Sci. Technol., 27 (2014) 399
- [2] 三好荘介、佐藤晋他、特許 3585124 号、W02002/064767 (2002)
- [3] T. Kaneko et al, Appl. Phys. Express, 7 (2014) 026202
- [4] 神野雅文、佐藤晋、プラズマ・核融合学会誌 Vol.91, (2015)788

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前原常弘, 上村円香
2. 発表標題 電極から離れた位置での水中プラズマの発生
3. 学会等名 放電研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前原常弘, 上村円香, 松友真哉
2. 発表標題 絶縁管内での水中プラズマの発生機構解明
3. 学会等名 Plasma Conference 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神野 雅文 (Jinno Masafumi) (30274335)	愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授 (16301)	
研究分担者	本村 英樹 (Motomura Hideki) (80332831)	愛媛大学・理工学研究科(工学系)・准教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 久雄 (Kondo Hisao)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関