

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24108004

研究課題名(和文) ナノプラズマ制御技術の創成と局所照射による生体機能制御

研究課題名(英文) Construction of nano-plasma control technique and biological function control by localized plasma irradiation

研究代表者

金子 俊郎 (KANEKO, Toshiro)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：30312599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 73,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高効率・低侵襲に遺伝子・薬剤を細胞内に導入する手法の開発を目的として、液中で微小プラズマを生成・制御する技術を創製し、プラズマ局所照射により生体機能を制御する実験を行った。まず、曲率半径を数100 nmで制御した極細電極に高電圧パルスを印加することで、微小プラズマを生成することに成功し、薬剤及び遺伝子を導入する効果を持つことを実証した。また、プラズマの作用を分離した実験を通して、プラズマ生成に由来する短寿命活性種が薬剤導入に寄与することを示した。さらに、プラズマ照射が液中に生成した短寿命活性種が、細胞膜上のイオンチャネルを介した薬物輸送を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a highly efficient and minimally invasive drug delivery method, the applications of plasmas generated in liquid to control of biological response have been proposed. In the beginning, it has been experimentally verified that micro-scale plasma was generated by applying a pulse voltage to coaxial type thin electrode and had the capability to enhance the cellular uptake of drugs and genes. Next, investigation of effects of separated plasma-derived stimuli on drug uptake showed that plasma-produced short-lived reactive species contribute to the drug uptake. Furthermore, it is clarified that relatively short-lived reactive species (i.e., deactivated within approximately 10 min) in plasma-irradiated saline induced physiologically relevant calcium ion influx through ion channel on cell membrane, which triggers activation of gene and drug uptake.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：ナノプラズマ 短寿命活性種 遺伝子導入 生体機能制御 局所プラズマ照射

1. 研究開始当初の背景

細胞への遺伝子導入は、医学・生物学の中心テーマである遺伝子機能解析やiPS細胞作製等に欠かせない必須の技術であるが、従来法においては低い細胞生存率や装置が高価である等の課題が存在していた。

これに対して、大気圧非平衡(低温)プラズマを細胞へ照射する手法は、治療用の遺伝子や抗がん剤等の薬剤分子を、細胞損傷を抑え高効率に細胞内に導入できる可能性が報告され、新たな薬剤分子導入技術として期待されているが、導入機構が不明であることから実用化には至っていない。従って、低侵襲で高効率に薬剤分子を細胞に導入する手法を実現するためには、薬剤分子が細胞膜を透過する機構、すなわち細胞膜輸送機序を解明する必要がある。

また、低侵襲で細胞内へ薬剤分子を導入する手法として、ナノサイズのプラズマを生成し、局所的に細胞膜へ照射することで、細胞膜輸送を制御し、薬剤分子を細胞質内へ効率よく、しかも他の部位への副作用を抑制して導入可能であることが提案されているが、ナノプラズマを生成・照射することにより生体機能を制御する研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、カーボンナノチューブ(CNT)等の極細電極先端にナノサイズのプラズマを生成・制御する技術を創製し、ナノプラズマ局所照射により生体機能を制御することで、高効率・低侵襲で薬剤分子を細胞内に導入する新しい遺伝子・薬剤導入による治療技術を開発する。

その実現のために、第一に、薬剤分子の細胞内への導入に必須の、極細電極先端でのナノプラズマ生成技術の開発を行う。第二に、薬剤分子のCNTへの内包・輸送・放出技術の開発を行う。第三に、病変部位に輸送された薬剤分子を細胞内に導入するため、細胞膜近傍においてナノプラズマを生成することで、細胞膜との相互作用により薬剤分子を導

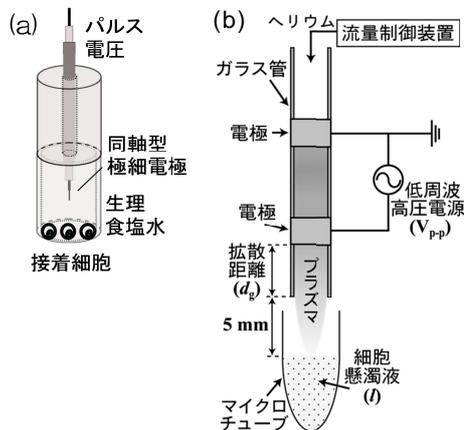


図1: (a)液相中ナノプラズマ生成装置, (b) 拡散型大気圧プラズマジェット装置.

入する手法を確立する。さらに、ナノプラズマ照射による細胞反応活性化等の生体機能制御技術を確立する。

最終的には、薬剤分子(遺伝子,抗がん剤)の高効率細胞内導入法確立に向けて、プラズマ照射による細胞膜輸送機序の解明と安全性評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

図1に実験装置図を示す。液相中ナノプラズマ生成装置(図1(a))では、高電圧パルス電圧が極細電極先端に印加され、液相中でマイクロスケールのプラズマが生成される。一方、プラズマ照射による細胞膜輸送機序の解明には、拡散型大気圧プラズマジェット装置(図1(b))を用いる。これらの装置で生成されたプラズマを、薬剤模擬蛍光物質 YOYO-1 (分子量 1300 程度)をあらかじめ混合した細胞溶液に対して様々な条件下で照射する。この際、細胞溶液に対してプラズマが直接照射される方式(直接照射)とリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にプラズマ照射した溶液を用いて細胞に滴下する間接的な方法(間接照射)の2通りでYOYO-1導入効率( $\eta$ )及び細胞生存率(Cell Viability)を評価した。非膜透過性蛍光物質であるYOYO-1は細胞内導入に伴い、DNAと選択的に結合し緑色蛍光強度が増加する。プラズマ処理後、生存率判定試薬LIVE/DEAD Stainを使用し、死細胞のみ赤色蛍光強度が増加する。

4. 研究成果

第一に、純水および生理食塩水で満たした石英セル内に、先端曲率半径を数100nmに制御した金属極細電極を挿入し、ナノプラズマ生成を行った。電極先端曲率半径を小さくすることで、放電開始電圧を、生体内でも安全に使用できる500V以下に低下できることを明らかにした。また、生理食塩水中での放電の様子を観測し、直径が数マイクロメートル程度の円柱状気泡内放電が生じていることを明らかにした。

第二に、遺伝子等の薬剤分子のCNTへの挿入・放出実験を行った。内直径の比較的太

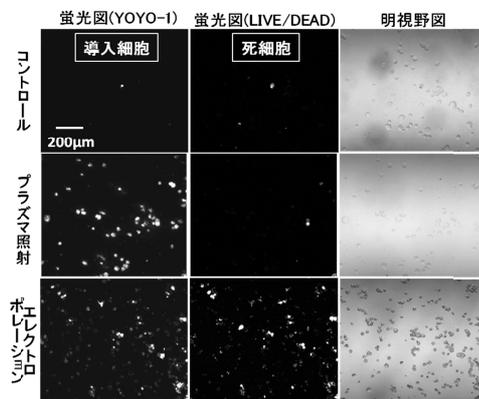


図2: 導入効率・生存率におけるプラズマ照射とエレクトロポレーションの比較.

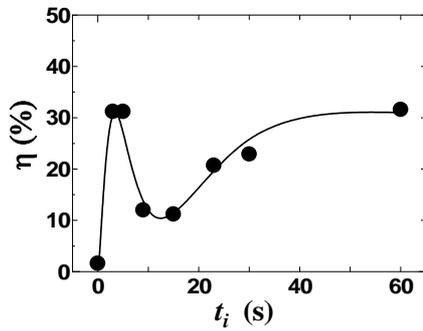


図 3：直接照射における導入効率の照射時間依存性. ( $V_{p-p} = 7.8$  kV,  $d_g = 73$  mm,  $t_r = 30$  s)

い二層 CNT を基板に塗布し, DNA 水溶液の電位に対して正電位を基板に印加することで, 100 塩基までの DNA を二層 CNT 内に挿入することに成功し, さらに逆極性の負電位を印加することで DNA を二層 CNT から放出できることも実証した.

第三に, プラズマ照射による細胞膜輸送機序解明を目指した実験を行った. 図 2 にプラズマ照射・エレクトロポレーション後に観察された蛍光図・明視野図を示す. この結果から, 現在, 薬剤導入法として最も良く使用されるエレクトロポレーション法と比較しても同等の導入量, 効率で有るとともに非常に高い生存率であることが分かる.

図 3 に直接照射における導入効率 ( $\eta$ ) の照射時間 ( $t_i$ ) 依存性を示す. 照射時間を長くしていくと 10 秒以内に導入効率が極大を持ち, さらに長い照射により再び効率が上昇するという特異的な振る舞いをする事が明らかとなった. 短時間領域における導入効率のピークは, 細胞内導入する上で適切なストレス量が存在することを示唆している.

図 4 に間接照射における導入効率 ( $\eta$ ) の保持時間 ( $t_r$ ) 依存性を示す. 保持時間は PBS にプラズマを照射してから細胞に滴下するまでの時間と定義する. 保持時間増加に伴い導入効率の減少が観測され, 数分の寿命を持つ短寿命活性種が導入に大きく寄与したことを示している. また, 1 時間以上保持しても効果が残っており, これは長寿命活性種の寄与である.

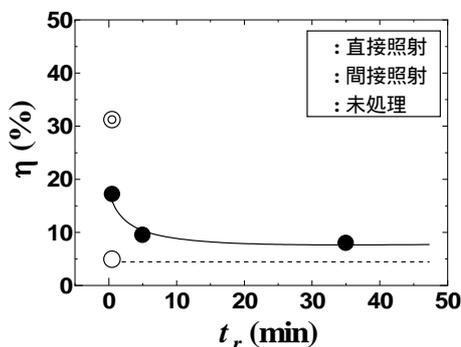


図 4：間接照射における導入効率の保持時間依存性. ( $V_{p-p} = 7.8$  kV,  $t_i = 5$  s,  $d_g = 73$  mm)

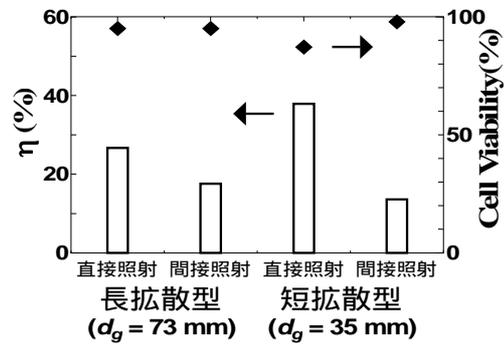


図 5：各分散距離, 直接・間接照射における導入効率・生存率. ( $V_{p-p} = 7.8$  kV,  $t_i = 5$  s)

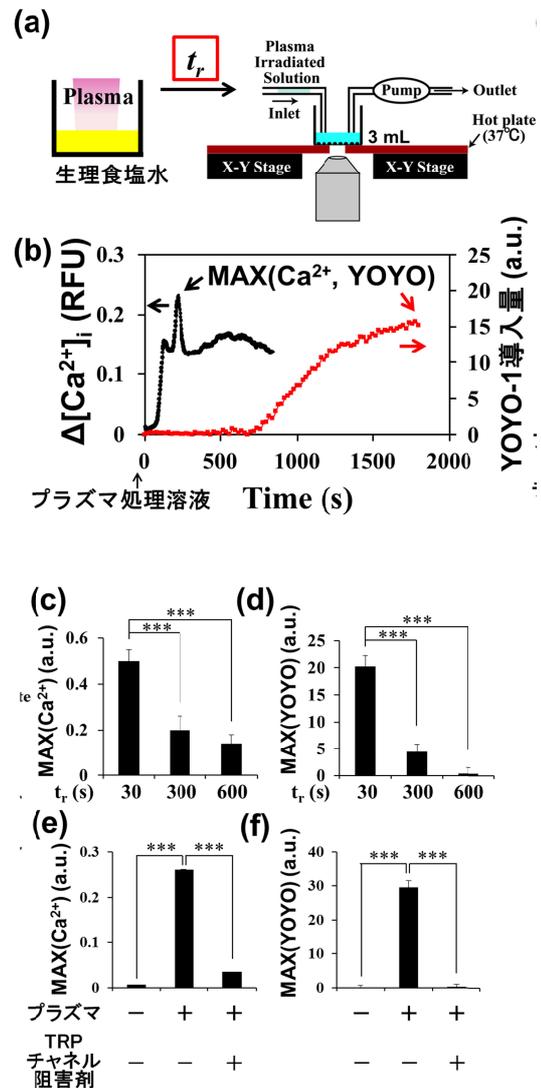


図 6：プラズマ照射生理食塩水添加後の細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) と YOYO-1 導入量のライブイメージング測定. (a) 実験系概略. (b) 典型的な  $[Ca^{2+}]_i$  と YOYO-1 導入量の時間推移. (c), (e)  $[Ca^{2+}]_i$  上昇量と (d), (f) YOYO-1 導入量に対する (c), (d) 保持時間と (e), (f) TRP チャンネル阻害剤の効果. \*\*\* $p < 0.001$ .

図5に各拡散距離、直接・間接照射における導入効率・生存率を示す。直接照射は間接照射よりも高い導入効率をもたらしており、PBS中の生成物以外の導入因子があることが示唆される。これらを直接照射因子と総称し、電界等の電氣的負荷や対流、衝撃波等の力学的ストレスがこれに含まれる。さらに、図5が示すように、プラズマジェット装置の拡散距離を短くすることで、直接照射因子の効果のみが増大され、より高い導入効率を実現できることが分かった。

以上より、プラズマが照射された際、直接照射因子、短寿命生成物、長寿命生成物の3つの導入因子が、複合的に高分子導入を促進し、直接照射因子はプラズマの拡散距離を短くするとその効果を強めることが明らかとなった。

これまで、プラズマ照射後の細胞内導入効率について詳述したが、同時に細胞生存率も全てのサンプルで測定を行った。エレクトロポレーション法がおよそ50%程度であったのに対して、図5が示すように60秒以下のプラズマ照射では80%以上を維持していた。また、プラズマ照射後に培養した細胞の増殖率を評価したところ、未処理と比較して著しく減少することはなかった。

作用因子を活性種のみに限定した間接照射法を採用し、プラズマ処理溶液添加後の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )・薬剤(YOYO-1)導入量をライブイメージング測定した(図6)。 $Ca^{2+}$ 応答は添加後すぐに見られた一方で、薬剤導入は10分後に開始する遅い膜輸送であった。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇量・薬剤導入量のどちらも、保持時間が長くなるにつれて、有意に減少し[図6(c),(d)]、どちらの応答もイオンチャネル(TRPチャネル)阻害剤ルテニウムレッドによって、ほぼ完全に抑制された[図6(e),(f)]。これらの結果より、プラズマ間接照射による薬剤輸送は、数分程度の寿命を持つ活性種によって引き起こされた、TRPチャネルが介在する細胞膜輸送であることを実験的に示した。

最終的に生体内で使用する際に問題になる安全性について検証した。プラズマを照射した卵細胞および精子を用いて受精させ成長させたところ、有意な異常は観測されなかった。また、プラズマを照射した細胞の生存率及び突然変異頻度を調べたところ有意な差は観測されず、細胞に対するプラズマ照射の安全性を検証できた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計46件)

T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, and M. Kanzaki: Gas liquid interfacial plasmas producing reactive species for cell membrane permeabilization, *Journal of Clinical Biochemistry and*

*Nutrition*, 査読有, Vol. 60, No. 1, pp. 3-11, 2017.

DOI:10.3164/jcbrn.16-73

S. Sasaki, R. Honda, Y. Hokari, K. Takashima, M. Kanzaki, and T. Kaneko: Characterization of plasma-induced cell membrane permeabilization: focus on OH radical distribution, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 査読有, Vol. 49, No. 33, pp. 334002-1-8, 2016.

DOI:10.1088/0022-3727/49/33/334002

S. Sasaki, M. Kanzaki, Y. Hokari, K. Tominami, T. Mokudai, H. Kanetaka, and T. Kaneko: Roles of charged particles and reactive species on cell membrane permeabilization induced by atmospheric-pressure plasma irradiation, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 55, No. 7S2, pp. 07LG04-1-5, 2016.

DOI:10.7567/JJAP.55.07LG04

S. Sasaki, M. Kanzaki, and T. Kaneko: Calcium influx through TRP channels induced by short-lived reactive species in plasma-irradiated solution, *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 6, pp. 25728-1-11, 2016.

DOI:10.1038/srep25728

K. Tominami, H. Kanetaka, T. Kudo, S. Sasaki, and T. Kaneko: Apoptotic Effects on Cultured Cells of Atmospheric-Pressure Plasma Produced Using Various Gases, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 55, No. 1S, pp. 01AF03-1-6, 2015.

DOI:10.7567/JJAP.55.01AF03

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, S. Horiuchi, R. Honda, and M. Kanzaki: Improvement of Cell Membrane Permeability Using a Cell-Solution Electrode for Generating Atmospheric-Pressure Plasma, *Biointerphases*, 査読有, Vol. 10, No. 2, pp. 029521-1-6, 2015.

DOI:10.1116/1.4921278

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Initiation Process and Propagation Mechanism of Positive Streamer Discharge in Water, *Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 116, No. 21, pp. 213301-1-12, 2014.

DOI:10.1063/1.4902862

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Highly Temporal Visualization of Generation Process of Underwater Secondary Streamer From Developed Primary Streamer, *IEEE Transactions on*

Plasma Science, 査読有, Vol. 42, No. 10, pp. 2398-2399, 2014.

DOI:10.1109/TPS.2014.2325937

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Fast Propagation of an Underwater Secondary Streamer by the Appearance of a Continuous Component in the Discharge Current, *Europhysics Letters*, 査読有, Vol. 105, No. 1, pp. 15003-1-5, 2014.

DOI:10.1209/0295-5075/105/15003

S. Sasaki, M. Kanzaki, and T. Kaneko: Highly Efficient and Minimally Invasive Transfection Using Time-Controlled Irradiation of Atmospheric-Pressure Plasma, *Applied Physics Express*, 査読有, Vol. 7, No. 2, pp. 026202-1-4, 2014.

DOI:10.7567/APEX.7.026202

Q. Chen, T. Kaneko, N. Matsuda, and R. Hatakeyama: Potential Structure of Discharge Plasma inside Liquid Directly Measured by an Electrostatic Probe, *Applied Physics Letters*, 査読有, Vol. 102, No. 24, pp. 244105-1-4, 2013.

DOI:10.1063/1.4812199

T. Kaneko and R. Hatakeyama: Creation of Nanoparticle-Nanotube Conjugates for Life-Science Application Using Gas-Liquid Interfacial Plasmas, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 51, No. 11, pp. 11PJ03-1-6, 2012.

DOI:10.1143/JJAP.51.11PJ03

T. Kaneko, S. Takahashi, and R. Hatakeyama: Control of Nanoparticle Synthesis Using Physical and Chemical Dynamics of Gas-Liquid Interfacial Non-Equilibrium Plasmas, *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 査読有, Vol. 54, No. 12, pp. 124027-1-6, 2012.

DOI:10.1088/0741-3335/54/12/124027

[学会発表](計 298 件)

金子 俊郎, 佐々木 渉太, 鄭 悦星, 神崎 展: 大気圧低温プラズマによる TRP チャネル活性化と遺伝子導入 (招待講演), 日本薬学会第 137 年会, 仙台国際センター (宮城県, 仙台市), 2017.3.25.

T. Kaneko, M. Jinno, T. Sato, S. Sasaki, M. Kanzaki, M. Tachikawa, H. Kanetaka, Y. Ikeda, H. Motomura, S. Satoh: Plasma Gene Transfection: Enhancement of Cell Membrane Permeability without Damage Using Gas-Liquid Interfacial Micro-Scale Plasmas (Invited), *International Conference on Plasma Medical Science Innovation 2017*, Nagoya University

(Nagoya, Japan), 2017.2.27.

T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, H. Kanetaka, M. Tachikawa, and M. Kanzaki: Plasma Gene Transfection: Effects of Plasma Stimuli on Cell Membrane Permeabilization (Keynote), 第 26 回 日本 MRS 年次大会, 横浜開港記念会館 (神奈川県, 横浜市), 2016.12.21.

T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, H. Kanetaka, M. Tachikawa, and M. Kanzaki: Gas-Liquid Interfacial Atmospheric Pressure Plasmas for Medical Applications (Plenary), *The 3rd Taiwan-Japan Workshop on Plasma Life Science and Technology*, Ming Chi University of Technology (New Taipei City, Taiwan), 2016.12.16.

T. Sato, H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya and T. Kaneko: Initiation and propagation processes of underwater streamers (Invited), *The 9th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology*, Nagasaki University (Nagasaki, Japan), 2015.12.13.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, and M. Kanzaki: Plasma Stimuli for Enhancement of Cell Membrane Permeability (Keynote), *The 12th International Conference on Flow Dynamics*, Sendai International Center (Sendai, Japan), 2015.10.29.

S. Sasaki, Y. Hokari, M. Kanzaki and T. Kaneko: Spatially-Selective Membrane Permeabilization Induced by Cell-Solution Electrode Atmospheric Pressure Plasma Irradiation, *9th International Conference on Reactive Plasmas*, Hawaii convention Center (Hawaii, USA), 2015.10.14.

金子 俊郎, 佐々木 渉太, 保苅 雄太郎, 神崎 展: 非平衡大気圧プラズマ刺激による新作用機序遺伝子導入 (招待講演), 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会 シンポジウム, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市), 2015.9.14.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, and M. Kanzaki: Spatially Localized Transfection Using Controlled Plasma Irradiation to Solution Containing Living Cells (Invited), *3rd International Workshop on Solution Plasma and Molecular Technologies*, Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand), 2015.5.8.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki: Physical and Chemical Effects of Non-Equilibrium Plasma Irradiation on Enhancement of Transfection Efficiency

(Invited) , The 75th IUVESTA Workshop on Sheath Phenomena in Plasma Processing of Advanced Materials , Hotel Krvavec (Cerklje, Slovenia) , 2015.1.22.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki : Minimally-Invasive and Highly-Efficient Gene Transfection Based on Plasma Enhanced Cellular Activity (Invited) , 2014 MRS Fall Meeting & Exhibit , Hynes Convention Center (Boston, USA) , 2014.12.4.

T. Kaneko : Minimally-Invasive Gene Transfection by Chemical and Physical Interaction of Atmospheric Pressure Plasma Flow (Invited) , 67th Annual Gaseous Electronics Conference , Raleigh Convention Center (Raleigh, USA) , 2014.11.4.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki : Physical and Chemical Effects of Helium Plasma Jet on Gene Transfection Efficiency (Invited) , The 5th International Symposium on Plasma Nanoscience , Melia Costa Del Sol Hotel (Malaga, Spain) , 2014.9.30.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki : Direct Irradiation of Non-Equilibrium Plasma on Living Cell for Highly-Efficient and Minimally-Invasive Gene Transfection (Invited) , The 8th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology , National Chiao Tung University (Hsinchu, Taiwan) , 2013.12.21.

T. Kaneko : Plasma Structure Control and New-Concept Plasma Process for Novel Nano-Bio Materials (Invited) ,The 12th Asia Pacific Physics Conference , Makuhari Messe (Chiba, Japan) , 2013.7.15.

#### [ 図書 ] ( 計 4 件 )

T. Kaneko, S. Takahashi, and R. Hatakeyama: Plasma Process on Ionic Liquid Substrate for Morphology Controlled Nanoparticles, [Ionic Liquids - New Aspects for the Future], edited by Jun-ichi Kadokawa, InTech, pp. 617-631 (Total 695P), 2013.

#### [ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 5 件 )

名称 : 体内用プラズマ発生装置, 遺伝子導入装置, 薬剤導入装置および内視鏡  
発明者 : 金子俊郎, 佐々木渉太, 佐藤岳彦  
権利者 : 国立大学法人東北大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2015-069729

出願年月日 : 2015.3.30

国内外の別 : 国内

名称 : 遺伝子導入装置および遺伝子導入方法

発明者 : 金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎展, 加藤俊顕

権利者 : 国立大学法人東北大学

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2014/66185

出願年月日 : 2014.6.18

国内外の別 : 国際

取得状況 ( 計 1 件 )

名称 : 病原菌および害虫の駆除装置

発明者 : 金子俊郎, 加藤俊顕

権利者 : 国立大学法人東北大学

種類 : 特許

番号 : 特許第 5909831 号

取得年月日 : 2016.4.8

国内外の別 : 国内

[ その他 ]

ホームページ

<http://www.plasma.ecei.tohoku.ac.jp>

機関リポジトリ

<http://ir.library.tohoku.ac.jp/>

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

金子 俊郎 ( KANEKO, Toshiro )

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 30312599

##### (2) 研究分担者

佐藤 岳彦 ( SATO, Takehiko )

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号 : 10302225

加藤 俊顕 ( KATO, Toshiaki )

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 20502082

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

神崎 展 ( KANZAKI, Makoto )

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

立川 正憲 ( TACHIKAWA, Masanori )

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

金高 弘恭 ( KANETAKA, Hiroyasu )

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

高島 圭介 ( TAKASHIMA, Keisuke )

東北大学・大学院工学研究科・助教