

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13708

研究課題名(和文) 超高感度細胞センサアレイによる極微量異種プラズマ刺激同時計測の挑戦

研究課題名(英文) Challenge to simultaneous measuring of infinitesimal heterogeneous plasma stimuli using ultrasensitive cell-based sensor array

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧非平衡プラズマによる細胞への遺伝子導入等の細胞活動に作用する極微量のプラズマ刺激の時空間分布を測定できる『超高感度細胞センサアレイ』の作製に挑戦した。大気圧プラズマジェットおよび液中マイクロプラズマを照射した溶液中に生成される極微量の活性種による酸化刺激、荷電粒子による電気刺激、衝撃波による圧力刺激の2次元分布を計測した。さらに、各々の刺激に個別に反応するチャンネルを有する細胞をアレイ状に配置し、細胞内のカルシウムイオン濃度および遺伝子模擬蛍光分子濃度に比例する蛍光強度の2次元分布を計測することで、酸化刺激、電気刺激、圧力刺激に対するセンサアレイとして動作することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ医療応用において、現在の最重要課題である、細胞活動に作用するプラズマ照射溶液中の酸化、電気、圧力、温度等の極微量の刺激情報を得るために、細胞自体をセンサとして使うところに本研究の学術的意義がある。本研究において、細胞センサをアレイ化することで、空間分布を同時に測定することが可能となり、プラズマ照射溶液中の極微量の各種刺激の時空間分布が明らかになることで、プラズマ医療における細胞活動・生体機能へのプラズマ作用機序の解明に繋がるものであり、プラズマ医療機器の実用化に重要な役割を果たし、その社会的意義は大きいものである。

研究成果の概要(英文)：We have challenged to create “ultrasensitive cell-based sensor array” which can detect the temporal-spatial distribution of infinitesimal heterogeneous stimuli generated by the atmospheric pressure non-equilibrium plasmas. We measured the 2-dimensional distribution of oxidation stimulus (reactive species), electric stimulus (charged particles), pressure stimulus (shock wave) which were generated in the solution irradiated with atmospheric pressure plasma jet or in-liquid micro plasma. Furthermore, we arrayed the cells which have overexpressing channels responding with each stimulus, and measured the 2-dimensional distribution of fluorescence intensity proportional to the concentration of calcium ion or gene-simulated fluorescent molecule in the cells. As a result, we have demonstrated that the cells can act as the sensor arrays for oxidation stimulus, electric stimulus, and pressure stimulus.

研究分野：プラズマ科学

キーワード：プラズマ医療 細胞センサ 極微量刺激計測 異種プラズマ刺激 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

現在、大気圧非平衡プラズマを用いた創傷治癒、がん治療、血液凝固、遺伝子導入等が、プラズマ医療応用研究として進められている。この中でも、iPS 細胞作製や遺伝子治療に必須の技術である遺伝子導入については、従来の電界のみを用いる手法に比べて、低侵襲で高効率の導入が可能であることが報告され、プラズマ中の活性種による酸化刺激、荷電粒子による電気刺激、衝撃波による圧力刺激等が作用していると考えられている(図1)。しかしながら、現状ではそれらの刺激が重畳しており、各々の遺伝子導入に対する効果が区別できていない。さらに、数秒のプラズマ照射により、細胞内へのカルシウムイオン流入がトリガとなって遺伝子が導入されることが分かっているが、このときの溶液中の活性種(OH、O₂等)の濃度が極めて低濃度であり、高感度測定が可能である電子スピン共鳴装置(測定限界濃度: 10⁻⁸ mol/L)を用いても測定できず、遺伝子導入に寄与する活性種の特定が困難であり、詳細な遺伝子導入の機序は未だ明らかになっていない。

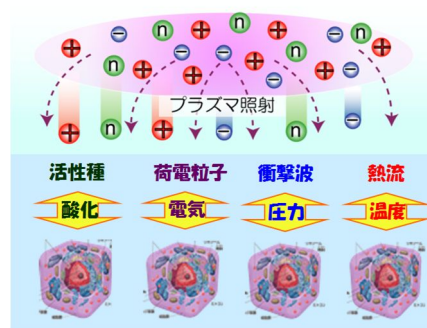


図1: プラズマからの異種刺激による細胞活動の反応。

従って本研究では、発想を逆転させ、この極微量の活性種に反応する細胞自体をセンサとして利用することで、超高感度の活性種計測が可能になるとの着想に至った。さらに、これまでの研究成果により、プラズマ照射によるカルシウムイオン流入は細胞膜に存在するイオンチャネルの活性化によるものであることが分かっており、このイオンチャネルは活性種のみではなく、電気、圧力、温度等の刺激にも個別に反応してカルシウムイオンを流入させる働きがあることが報告されている。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに本研究では、大気圧非平衡プラズマによる細胞への遺伝子導入や血液凝固等の細胞活動に作用する極微量のプラズマ刺激の時空間分布を測定できる『超高感度細胞センサアレイ』の作製に挑戦する。プラズマ照射溶液中に生成される極微量の活性種による酸化刺激、荷電粒子による電気刺激、衝撃波による圧力刺激に個別に反応するイオンチャネルを有する細胞をアレイ状に配置し、各々の刺激量に比例して細胞内に流入するイオン量を異なる波長の蛍光強度として計測することで、複数の異種プラズマ刺激を同時計測できる画期的な手法を開発し、プラズマ医療応用研究の現在の最大の課題であるプラズマ照射による細胞活動反応の機序解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、第一に大気圧非平衡プラズマ(プラズマジェット[図2(a)]および液中マイクロプラズマ[図2(b)])で生成される活性種、荷電粒子、衝撃波を制御し、それらに起因する酸化刺激、電気刺激、圧力刺激の異種刺激を加えた細胞の反応を細胞内に流入したイオンまたは遺伝子模擬蛍光分子の量に相当する蛍光強度で測定することで、各々の刺激強度に対する細胞感受性の校正曲線を作成する。

本研究でのプラズマ照射方法は2通りであり、一つは細胞を満たす溶液に対してプラズマを直接照射する方式(直接照射)であり、もう一つがプラズマ照射した溶液を一定時間経過した後に細胞に滴下する間接的な方法(間接照射)である。このときのプラズマ照射後から細胞に滴下するまでの時間を「保持時間」と定義する。

第二に、各々の刺激に反応するイオンチャネルを有する細胞をアレイ状に配置し、2次元的に計測することで、プラズマ照射により溶液中に生成される極微量の異種刺激の空間分布を同時測定できることを実証する。

第三に、各々の異種刺激に反応する細胞センサの高感度化および高選択化に向けた実験を行い、大気圧プラズマ生成装置における遺伝子導入に寄与するプラズマ刺激を同定するとともに、導入機序を解明する。

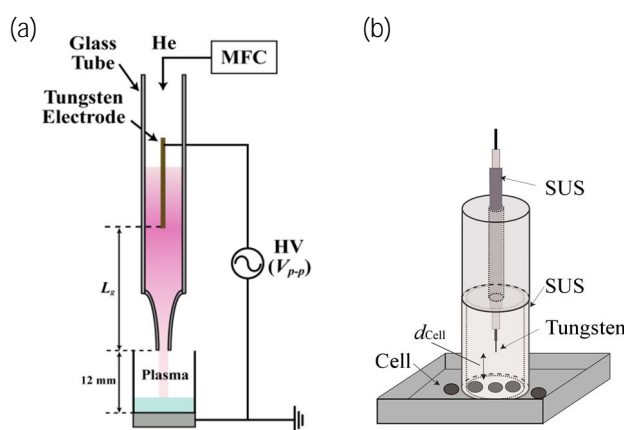


図2: (a)大気圧プラズマジェット生成装置と(b)液中マイクロプラズマ生成装置。

4. 研究成果

- (1) 酸化刺激（活性種）、電気刺激（荷電粒子）、圧力刺激（衝撃波）を生成できる 2 種類の大気圧非平衡プラズマ生成装置（大気圧プラズマジェット生成装置と液中マイクロプラズマ生成装置）を作製し、各々の刺激を計測するとともに細胞（マウス線維芽細胞 3T3L1 またはヒト乳がん細胞 MCF-7）に対する作用を観測した。

大気圧非平衡プラズマを HEPES 緩衝生理食塩水（HBS）に照射した際に生成される活性種を測定した。このとき、液中には数 10 を超える化学的活性種が生成されることが数値計算で予測されており、従来の活性種の検出プローブは多くが非選択的であるため、支配的に生成されている活性種を同定できないという問題があった。そこで、本研究では水酸基(OH)ラジカル・過酸化亜硝酸・次亜塩素酸のみを検出でき、かつそれぞれの感度が異なる二種類の化学プローブ APF 及び HPF を組み合わせて用いることにより、大気圧非平衡プラズマの直接照射の場合には、支配的に生成される活性種が OH ラジカルであることを明らかにした。

大気圧非平衡プラズマの間接照射により、OH ラジカルの液中生成量の保持時間依存性を測定した結果、液中マイクロプラズマの方が大気圧プラズマジェットよりも多量の OH ラジカルを生成でき、かつ液中で比較的長時間存在していることを明らかにした（図 3）。さらに、細胞応答（細胞へのカルシウムイオンまたは遺伝子模擬蛍光分子の流入に起因する細胞の蛍光強度）の保持時間依存性を観測した結果、酸化刺激としての OH ラジカルの存在量に比例して蛍光強度が強くなることを明らかにした。

大気圧非平衡プラズマ照射により液中底部に形成される電界をポッケルスセルを用いて計測した。その結果、プラズマを照射することで液中の電位が上昇し、底部のガラス容器との間で電界が形成されており、細胞に電気刺激が印加されていることを明らかにした。

大気圧非平衡プラズマの直接照射により液中底部に到達する衝撃波による圧力刺激による細胞応答を観測した。その結果、プラズマ照射時間（プラズマ生成パルス数）の増加とともに蛍光強度が増大することが分かった。

以上の結果から、大気圧プラズマジェットと液中マイクロプラズマを照射した際の細胞内カルシウムイオン濃度および遺伝子模擬蛍光分子濃度を計測することで、酸化刺激、電気刺激、圧力刺激に対する細胞感受性の特性曲線を作成した。

- (2) 大気圧非平衡プラズマにより生成される各種刺激の 2 次元分布を計測するとともに、種々の異種刺激に反応するイオンチャンネルを有する複数の細胞をアレイ状に並べて、そのイオンチャンネルで流入するカルシウムイオンまたは遺伝子模擬蛍光分子の量に比例する細胞の蛍光強度を計測することで、異種プラズマ刺激の空間分布と細胞への作用を観測する実験を行った。

大気圧非平衡プラズマを用いて、それらのプラズマをテレフタル酸（TA）ゲルに照射することで、短寿命活性種である OH ラジカルの空間分布を測定した。このとき、テレフタル酸ゲル上に HEPES 緩衝溶液を導入し、その液厚みを変化させることで、短寿命活性種の液中浸透率と

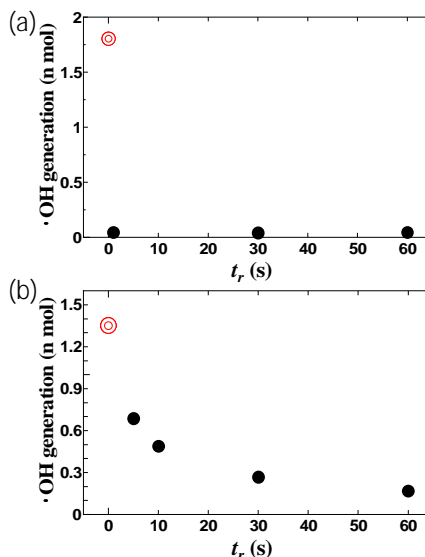


図 3: OH ラジカルの液中生成量の保持時間 t_r 依存性. (a)大気圧プラズマジェット, (b)液中マイクロプラズマ.

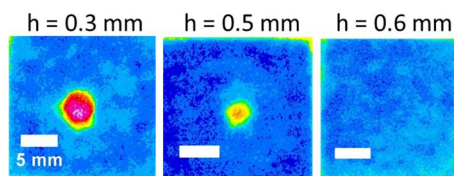


図 4: TA ゲルの蛍光強度 2 次元分布の液厚み h 依存性.

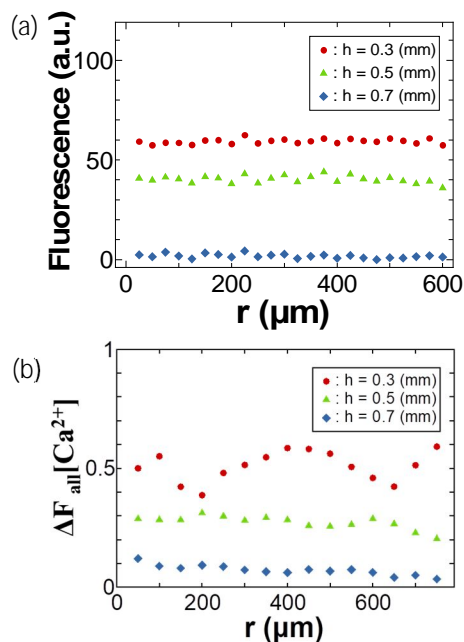


図 5:(a) TA ゲルの蛍光強度および(b)細胞内カルシウムイオン濃度増加量 ΔF_{all} の半径方向分布の液厚み h 依存性.

径方向への拡散を計測した。大気圧プラズマジェットの場合、プラズマ照射領域直下から径方向外側に向けて OH ラジカル濃度が減少することを観測し、液厚みが増すことでテレフタル酸ゲルに到達する OH ラジカル量が減少することを明らかにした(図 4)。さらに、同じ条件で細胞応答を観測したところ、液厚みを 0.7mm まで増加させた場合に、テレフタル酸ゲルでは OH ラジカルが計測できなかったのに対して[図 5(a)]、細胞応答では遺伝子模擬蛍光分子流入に伴う蛍光が観測され[図 5(b)]、センサとしての細胞の感受性が高いことを実証した。

大気圧非平衡プラズマにより液中底部に形成される電界をポッケルスセンサにより計測し、電気刺激としての電界の 2 次元空間分布を計測した。また、液中マイクロプラズマ生成装置において、電極形状を工夫することでプラズマを生成させずに電流のみを細胞に印加したところ、電気刺激としての電流密度に比例して蛍光強度が変化することを明らかにした。液中マイクロプラズマにおいて細胞応答を観測した結果、電極直下の圧力刺激が最大の位置から周辺に向けて蛍光強度が次第に減少することが観測され、また、活性種のスカベンジャーを添加した場合にも同様の結果が観測されたことから、細胞によって圧力刺激の 2 次元分布を計測できることを示した。

以上の結果、大気圧プラズマジェットと液中マイクロプラズマを照射した際の細胞内のカルシウムイオン濃度および遺伝子模擬蛍光分子濃度に比例する蛍光強度の 2 次元分布を計測することで、酸化刺激、電気刺激、圧力刺激に対するセンサアレイとして動作することを実証した。

- (3) これまでの活性種による酸化刺激、電界・電流による電気刺激、衝撃波等による圧力刺激に対する細胞応答の高感度化および高選択化に向けた実験を行った。

種々の酸化刺激に反応するイオンチャネルを有する細胞を得るため、TRPV1、TRPV2、TRPA1 チャネルを人工的に強制発現させた細胞を作製した。その結果、TRPV1 では OH ラジカルの感度が、TRPA1 では過酸化水素の感度が上昇することが分かった。すなわち、酸化刺激センサにおいて異なる活性種を選択的に計測できることを示した。

圧力刺激に感受性を持つチャネルである PIEZO1 を選択的に阻害する試薬を用いることで、細胞の蛍光強度が減少することを明らかにした。一方で、活性酸素種のスカベンジャーの導入では細胞の蛍光強度の減少は観測されなかった。従って、PIEZO1 チャネルを有する細胞は酸化刺激には反応しないことが分かり、PIEZO1 を強制発現させた細胞により圧力刺激センサの高選択化が可能であることを示した。

細胞センサアレイで計測した異種プラズマ刺激の強度と遺伝子導入への効果を比較するため、上述したチャネルを有する各種刺激への応答選択性を有した細胞で遺伝子模擬蛍光分子の導入量を測定した。プラズマ生成電力、照射距離、照射時間を制御することで、大気圧プラズマジェットでは電気刺激存在下での OH ラジカルによる酸化刺激が、液中マイクロプラズマでは衝撃波等による圧力刺激が遺伝子導入の主要因子であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Y. Kimura, K. Takashima, S. Sasaki, T. Kaneko: Investigation on dinitrogen pentoxide roles on air plasma effluent exposure to liquid water solution, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 査読有, Vol.52, No.6, pp.064003-1-10, 2019.

DOI:10.1088/1361-6463/aaf15a

R. Kumagai, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, T. Nakajima, and T. Sato: Propagation and branching process of negative streamers in water, *Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol.124, No.16, pp.163301-1-7, 2018.

DOI:10.1063/1.5025376

S. E Hanbal, K. Takashima, S. Miyashita, S. Ando, K. Ito, M. M Elsharkawy, T. Kaneko, and H. Takahashi: Atmospheric-pressure plasma irradiation can disrupt tobacco mosaic virus particles and RNAs to inactivate their infectivity, *Archives of Virology*, 査読有, Vol.163, No.10, pp.2835-2840, 2018.

DOI:10.1007/s00705-018-3909-4

T. Kaneko, S. Sasaki, R. Honda, T. Sato, and M. Kanzaki: Control of Cell Function Using Gas-Liquid Interfacial Plasmas, *Vacuum and Surface Science*, 査読有, Vol.61, No.3, pp.143-149, 2018.

DOI:10.1380/vss.61.143

T. Kaneko and R. Hatakeyama: Controlled gas-liquid interfacial plasmas for synthesis of nano-bio-carbon conjugate materials, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol.57, No.1, pp.0102A6-1-13, 2018.

DOI:10.7567/JJAP.57.0102A6

S. Sasaki, Y. Hokari, A. Kumada, M. Kanzaki, and T. Kaneko: Direct plasma stimuli including electrostimulation and OH radical induce transient increase in intracellular Ca²⁺ and uptake of a middle-size membrane-impermeable molecule, *Plasma Processes and Polymers*, 査読有, Vol.15, No.1, pp.e1700077-1-9, 2018.

DOI:10.1002/ppap.201700077

K. Tominami, H. Kanetaka, S. Sasaki, T. Mokudai, T. Kaneko, and Y. Niwano: Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation, *PLOS ONE*, 査読有, Vol.12, No.7, pp.e0180507-1-15, 2017.

DOI:10.1371/journal.pone.0180507

K. Takashima and T. Kaneko: Ozone and dinitrogen monoxide production in atmospheric pressure air dielectric barrier discharge plasma effluent generated by nanosecond pulse superimposed alternating current voltage, *Plasma Sources Science and Technology*, 査読有, Vol.26, No.6, pp.065018-1-11, 2017.

DOI:10.1088/1361-6595/aa7082

A. Ochi, H. Konishi, S. Ando, K. Sato, K. Yokoyama, S. Tsushima, S. Yoshida, T. Morikawa, T. Kaneko, and H. Takahashi: Management of bakanae and bacterial seedling blight diseases in nurseries by irradiating rice seeds with atmospheric plasma, *Plant Pathology*, 査読有, Vol.66, No.1, pp.67-76, 2017.

DOI:10.1111/ppa.12555

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

[学会発表](計 93 件)

金子 俊郎: 気液界面プラズマの物理・化学と材料・生物への展開 (Plenary), 第 36 回 プラズマプロセッシング研究会/第 31 回 プラズマ材料科学シンポジウム, 2019.

T. Kaneko: Short-Lived Reactive Species Enhancing Cell Membrane Transport in Gas-Liquid Interfacial Plasmas (Keynote), 第 28 回 日本 MRS 年次大会, 2018.

T. Akazawa: Map Acquisition of Plasma-Generated OH Radical Supply Using Sensors Made from Terephthalic Acid and Cells, 第 28 回 日本 MRS 年次大会, 2018.

T. Kaneko: Development of Gas-Liquid Interfacial Plasma Devices for Medical and Agricultural Applications (招待講演), The 5th Taiwan-Japan Plasma Life Science and Technology, 2018.

金子 俊郎: 新技術大気圧プラズマイオンの生物効果と未来への展望 (招待講演), 第 18 回 マイナスイオン応用フォーラム, 2018.

S. Sasaki: Continuous release of short-lived species induced by plasma irradiation and its application in drug delivery, 2nd Asia-Pacific Conference on Plasma Physics, 2018.

金子 俊郎: 気液界面プラズマ生成複合刺激による細胞膜輸送促進の機構解明 (招待講演), 第 40 回日本光医学・光生物学会, 2018.

T. Kaneko: Cell Membrane Transport Activated by Gas-Liquid Interfacial Plasmas for Future-Oriented Gene/Drug Transfer Device (Plenary), 7th International Conference on Plasma Medicine (ICPM7), 2018.

T. Kaneko: Gas-Liquid Interfacial Plasmas for Medical and Agricultural Applications (招待講演), The 6th International Workshop and the 5th International Mini Workshop on Solution Plasma and Molecular Technology, 2018.

T. Kaneko: Gas-Liquid Interfacial Plasmas for Structure-Controlled Nano-Material Synthesis and Cellular-Function Control (招待講演), 10th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology, 2017.

T. Kaneko: Multiple Stimuli of Gas-Liquid Interfacial Plasmas Enhancing Drug Transfer into Cells (招待講演), The 10th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing, 2017.

T. Kaneko: Gas-Liquid Interfacial Plasmas Enhancing Gene Transfer by Controlling

Behavior of Reactive Species (招待講演), 1st Asia-Pacific Conference on Plasma Physics, 2017.

金子 俊郎: 気液界面プラズマが拓く未来 材料科学・生命科学への展開 (招待講演), プラズマ材料科学 第153委員会 30周年記念講演会, 2017.

T. Kaneko: Gas-liquid interfacial plasmas for novel gene transfer systems (招待講演), The International Conference on Phenomena in Ionized Gases (ICPIG), 2017.

T. Kaneko: Gas-liquid interfacial plasmas for enhancing gene transfer into living cells (招待講演), The 44th European Physical Society Conference on Plasma Physics, 2017.

金子 俊郎: 大気圧低温プラズマによるTRPチャンネル活性化と遺伝子導入 (招待講演), 日本薬学会第137年会, 2017.

T. Kaneko: Plasma Gene Transfection: Effects of Plasma Stimuli on Cell Membrane Permeabilization (Keynote), 第26回 日本MRS年次大会, 2016.

T. Kaneko: Gas-Liquid Interfacial Atmospheric Pressure Plasmas for Medical Applications (Plenary), The 3rd Taiwan-Japan Workshop on Plasma Life Science and Technology, 2016.

[図書](計4件)

T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, M. Kanzaki, M. Tachikawa, H. Kanetaka, T. Sato, M.G. Kong: Cell Membrane Transport Enhanced by Plasma Activated Channel and Transporter, 「Plasma Medical Science」, Elsevier, pp.178-190 (全458頁), 2018.

金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎 展: 細胞膜輸送に対するプラズマ刺激の効果, 「プラズマ産業応用技術 - 表面処理から環境, 医療, バイオ, 農業用途まで - 」, シーエムシー出版, pp.296-303 (全321頁), 2017.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 遺伝子または薬剤導入方法, および, 遺伝子または薬剤導入剤

発明者: 金子 俊郎, 佐々木 渉太

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-170350

出願年: 2017年

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

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

機関リポジトリ

<https://tohoku.repo.nii.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 神崎 展

ローマ字氏名: (KANZAKI, makoto)

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院医工学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 10272262

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 佐々木 渉太

ローマ字氏名: (SASAKI, shota)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。