

大気圧プラズマ照射による細胞膜脆弱性の変化と細胞内物質導入への利用

矢野哲也¹, 佐藤陵介², 杉本尚哉¹, 齋藤敬¹, 須藤誠一¹¹ 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科² 秋田県立大学大学院システム科学技術研究科機械知能システム学専攻

プラズマは材料プロセスや半導体プロセスなどの産業分野で利用されている。これらのプロセスはプラズマにより生成される熱や光、反応性化学種を用いるものである。近年、大気圧で低温のプラズマを生成する研究が進展し、これを用いた医療器具等の滅菌や外科、歯科分野の治療に関する研究が盛んに行われ、注目を集めている。プラズマの照射により細胞膜を損傷させ、細胞内への物質導入が試みられているが、その詳細な過程はまだ明らかにされておらず、試行錯誤して最適な条件を見つける必要がある状況である。本研究では、はじめにプラズマ照射による液体温度の上昇が細胞膜変性を引き起こすものではないことを確認した。次に、プラズマ照射によるブタ赤血球の細胞膜損傷度の変化を光学的手法により調べ、比較的短時間（40 s, 60 s）の照射で膜損傷が進むことを確認した。また、蛍光色素を添加した PC12 細胞浮遊液へプラズマを照射し、分子量 807 の蛍光色素の細胞内への導入が可能であることを確認した。

キーワード：大気圧低温プラズマ、物質導入、細胞膜、蛍光、赤血球

遺伝子をはじめとする物質を細胞に導入する技術は、生物学的、物理的または化学的手法に分類され、現在、ウィルスを用いた生物学的方法が広く利用されている。物理的手法には電界を利用したエレクトロポレーション、超音波を利用したソノポレーションがあり、特にエレクトロポレーションは広く普及している。化学的手法としては、光化学反応を利用した細胞穿孔法が開発され（Saito et al., 2002）、実用化研究が進められている。いずれの方法についても、大量の細胞を処理でき、高い物質導入効率と同時に高い細胞生存率を確保することが求められる。

近年、プラズマ照射により細胞内に物質を導入する技術の開発が行われており、浮遊細胞および接着性細胞に対する大気圧プラズマ照射により物質導入に成功したと報告されている（金子ら, 2013; Connolly et al., 2010）。プラズマの医療分野への応用は滅菌技術が先行しており、大気圧プラズマ流によ

る滅菌の原理についても明らかにされつつある。大腸菌へのプラズマ照射により細胞液の漏出や細胞膜の損傷が確認されている（Sato et al., 2007）。これは、プラズマにより励起され生成された反応性化学種による化学エッジングで細胞膜に損傷を与えた結果と考えられている。細胞膜の損傷が可逆的なものであれば、膜面の小孔は数十秒程度で修復されることから（Steinhardt et al., 1994）、細胞を生存維持しながら物質を導入できるであろう。しかしながら、より分子量の大きな物質を導入するためにプラズマのエネルギーを増加させると細胞膜に不可逆的な損傷を与えてしまい、細胞を死滅させてしまう。したがって、細胞種や導入物質の種類に応じて適切なプラズマ照射条件を見つける必要がある。

本研究では、プラズマ照射に伴う細胞膜の性状の変化を調べるために、赤血球浮遊液に大気圧プラズマを照射し、照射時間による赤血球膜の脆弱性の変

化を調べた。また、プラズマ照射による PC12 細胞内への分子量 807 の蛍光分子の導入率について調べた。

実験装置および方法

大気圧プラズマ発生装置

本研究で用いたプラズマ発生装置は図 1(a)の概略図に示すとおり、ガラス製ノズル、高電圧電源および原料ガスからなる。電極構造は、高電圧電極のみから構成される簡単な構造であり、低周波高電圧を印加することにより、ガラス管から流出するヘリウムガス流束を通じて遠方接地電極に向けて放電が生じる。生成されるプラズマジェットの写真を図 1(b)に示す。

プラズマ照射による液体温度の変化

実験装置の概略図を図 2 に示す。容量 50 mL のビーカーに 20 mL の PBS を入れ、プラズマ発生装置のノズルから噴出するプラズマを液面中央に照射した。ノズルと液面との間の距離を $d = 25$ mm、ヘリウムガス流量を $Q = 15$ NL/min とした。温度測定プローブ (9619-10D, Horiba) を底面から 6.5mm の位置に設置し、プラズマ照射中の液体温度を測定した。

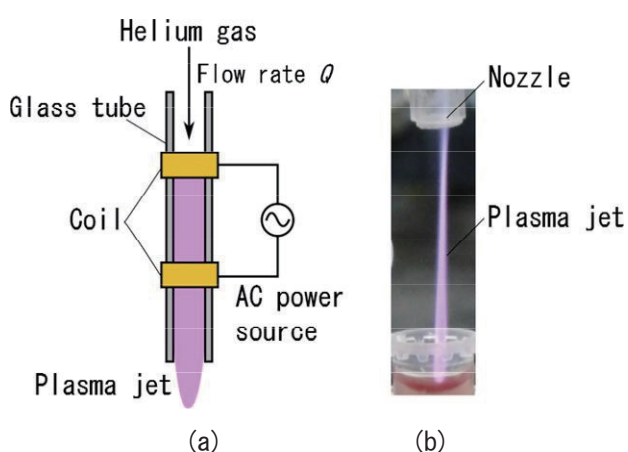


図 1 プラズマ発生装置の概略図およびプラズマジェット

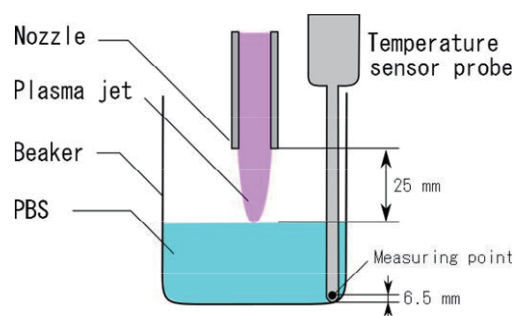


図 2 プラズマ照射中の PBS の温度測定に用いた実験装置の概略図

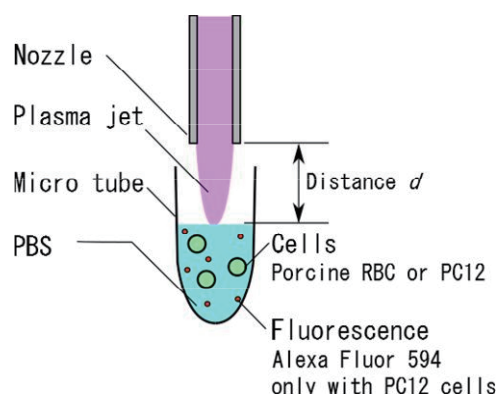


図 3 細胞浮遊液へのプラズマ照射に用いた実験装置の概略図

プラズマ照射による赤血球膜脆弱性の変化

試験用の血液試料にはブタ血液を用いた。採血後直ちにクエン酸添加により抗凝固処理され、冷蔵状態で 1 日間、輸送、保存されたブタ血液から遠心分離して採取した赤血球 3.0 μ L をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1.5 mL に添加し、赤血球液を調整した。この赤血球液をマイクロチューブに入れ、その液面に、プラズマ発生装置のノズルから噴出するプラズマジェットを照射した。実験装置の概略図を図 3 に示す。ノズルと液面との距離を $d = 25$ mm、ヘリウムガス流量を $Q = 15$ NL/min 一定とし、照射時間を $T_i = 20$ s, 40 s, 60 s と変化させた。プラズマを照射した赤血球液をピペット操作により攪拌後、0.75 mL をキュベット (光路長 10 mm) に分注し、そこに蒸留水 0.75 mL を追加注入して赤血球を低張曝露し、膨潤、崩壊させた。キュベットにレーザダイオードからの光を入射し、赤血球液の出射光パワーをフォトダイオードで連続測定し、赤血球の膨潤、崩壊に

ともなう透過率の時間変化を調べた。膜脆弱性が高いほど崩壊までの時間が短く、透過率の変化が速い (Yano et al., 2013)。

プラズマ照射による細胞への物質導入

試験用の細胞にはラットの副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 を用いた。PC12 細胞を PBS に分散し、細胞密度を 2×10^6 cells/mL に調整した細胞浮遊液 0.5 mL を容量 1.0 mL の樹脂製凍結保存管に蛍光分子 (Alexa Fluor 594 dye, Thermo Fisher Scientific K.K., 分子量 806.94, 最大励起波長 590 nm, 最大発光波長 617 nm) とともに入れ、その液面に、プラズマ発生装置のノズルから噴出するプラズマジェットを照射した。実験装置系は前節の実験と同様であり、図 3 のとおりである。ヘリウムガス流量を $Q = 15$ NL/min 一定とし、プラズマ放電が安定して発生するようにガラス管出口と液面までの距離を $d = 35$ mm とした。プラズマ照射後、細胞を PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察し、可視光像から細胞数を、蛍光像から蛍光分子を取り込んだ細胞数をカウントし、物質導入率を算出した。ここでは、プラズマ照射時間 $T_i = 30$ s, 60 s, 120 s の各条件で実験を行った。

実験結果および考察

プラズマ照射による液体温度の変化

プラズマ照射による PBS の温度変化を図 4 に示す。ヘリウムガスの供給を開始した後、コイルに電圧を印可した時刻を $t = 0$ s としている。 $t = 120$ s までの温度上昇は 1°C 以内であった。プラズマ照射開始直後の温度低下は、原料ガスの温度が液体の初期温度より低かったことによる。

プラズマ照射による赤血球膜脆弱性の変化

プラズマ照射した赤血球液に蒸留水を添加することにより赤血球を低張曝露すると、試料液の透過率は急増、漸増期を経て定常に達する傾向を示した。この透過率の変化速度を表す時定数 t_c を算出した。プラズマ照射時間 T_i による時定数 t_c の変化を図 5 に示す。時定数 t_c はプラズマ照射時間 $T_i = 40$ s, 60 s で照射なし ($T_i = 0$ s) にくらべ短縮し、赤血球膜の

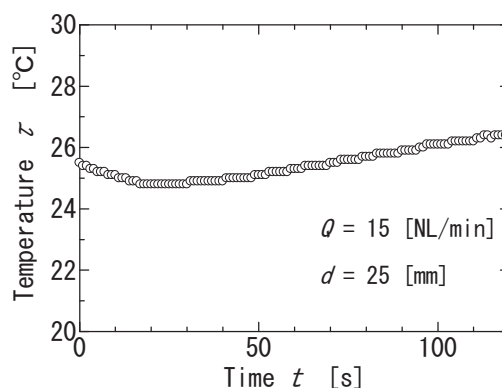


図 4 プラズマ照射中の PBS の温度変化

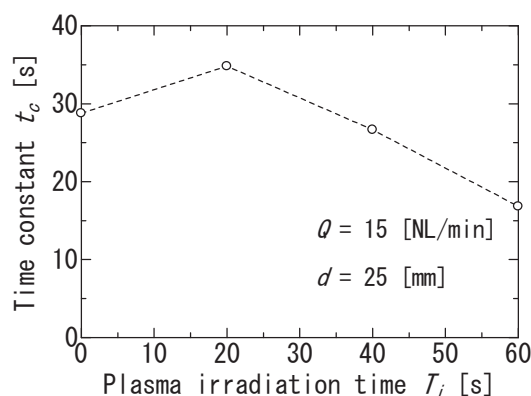


図 5 プラズマ照射による赤血球脆弱性の変化 (試料液の光透過率の変化速度を表す時定数)

脆弱性が増していることが示唆された。 $T_i = 20$ s において時定数 t_c が長くなったのは、試料中の赤血球は加齢度の異なるものが含まれており、プラズマ照射によって膜脆弱性の高い加齢赤血球が早期に損傷し、不可逆的な崩壊に至り、結果として試料中の赤血球の平均的な脆弱性が低下したためではないかと考えられるが、正確な理由は現時点では不明である。

プラズマ照射による細胞への物質導入

プラズマを照射した PC12 細胞浮遊液から回収、洗浄した細胞の顕微鏡観察した結果を図 6 に示す。可視光像および蛍光像を比較することにより、細胞内に蛍光が取り込まれていることが確認できる。プラズマ照射による細胞内への物質導入率 η を表 1 にまとめた。照射時間 $T_i = 30$ s において $\eta = 25.0\%$ 、 $T_i = 30$ s において $\eta = 27.8\%$ であった。照射時間 $T_i = 120$ s では、細胞の凝集塊が大量に生じており、細胞の計数が不可能であった。

大気圧低温プラズマ照射による細胞内への蛍光分

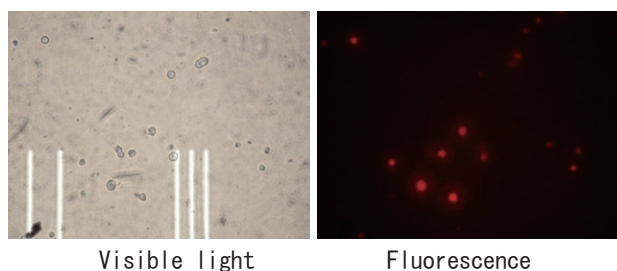


図6 プラズマ照射後のPC12細胞の顕微鏡像（プラズマ照射時間 60 s）

表1 プラズマ照射によるPC12細胞内への蛍光物質導入率

Plasma irradiation time T_i [s]	Transfer rate η
30	25.0%
60	27.8%
120	(uncountable)

子の導入が確認された。プラズマ照射により細胞膜に損傷が生じ、膜面の小孔から分子が入り込んだ後に、膜の自己修復が起こったと考えられる。

プラズマ照射による液体温度の上昇は、液量 20 mL で 1°C であった。液量 0.5 mL でも照射時間 $T_i = 60$ s までは細胞膜の損傷を引き起こす程度ではないことから、空気中の酸素や水がプラズマにより励起されて生じた反応性化学種が細胞膜中の脂質から電子を奪う脂質過酸化反応によって細胞膜の損傷が生じたと考えられる。プラズマ照射時間 $T_i = 120$ s で生じた PC12 細胞の凝集塊は熱作用によるものと考えられる。

本実験で用いた装置系では、対象細胞が分散した液体の界面にプラズマを照射しており、液体がイオンや電子などの活性化学種を吸収し、細胞まで活性種が届きにくい。液中で拡散できる長寿命の活性種を生成できればより高い効率で物質導入できる可能性がある。

結 論

大気圧低温プラズマを PC12 細胞浮遊液に照射することにより細胞内への物質導入が可能であること

が示された。液温上昇の小さい短時間のプラズマ照射で細胞膜の脆弱性が高まることが確認されたことから、細胞膜の損傷は熱によるものではなく、脂質過酸化反応によるものと示唆され、この損傷による膜面の小孔を通して細胞内へ物質が導入されたと考えられる。

謝 辞

本研究は秋田県立大学平成 26 年度学長プロジェクト研究費若手・スタートアップ奨励研究によって行われた。実験の実施にあたり、人間支援メカトロニクスグループの秋山幸宏氏、今野直人氏、宇沼尚悟氏に協力いただいた。ここに記し謝意を表す。

文 献

- 金子俊郎, 佐々木渉太, 小西秀明, 石田裕康, 神崎展 (2013). 「放電プラズマ中ラジカル照射による低侵襲遺伝子導入法の開発」『電子情報通信学会技術研究報告. OME, 有機エレクトロニクス』 113 (18), 75-79.
- Saito, T.K., Muguruma, H. & Mabuchi K. (2002). Photodynamic assistance increases the efficiency of the process of microinjection in animal cells. *Biotechnology Letters*, 24, 309-314.
- Sato, T., Miyahara, T., Doi, A., Ochiai, S., Uyama, T. & Nakatani, T. (2006) Sterilization mechanism for Escherichia coli by plasma flow at atmospheric pressure. *Applied Physics Letters*, 89, 073902.
- Steinhardt, R.A., Bi, G. & Alderton, J.M. (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanics similar to neurotransmitter release. *Science*, 236, 390-393.
- Yano, T., Sakota, D., Sudo, S. & Mitamura, Y. (2013). A simple optical method for assessing RBC damage. IEEE EMBC 2013 Short Papers No.3259.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Fragility Change of a Cell Membrane by Atmospheric Plasma Jet Irradiation and its Application to Molecular Delivery

Tetsuya Yano¹, Ryosuke Sato², Masaya Sugimoto¹, Takashi K. Saito¹, Seiichi Sudo¹

¹ *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University*

² *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Graduate School of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University*

In recent years, many studies have been conducted on the applications of atmospheric pressure, low temperature plasma to the sterilization of medical devices and to the surgical treatment. Furthermore, its application to molecular delivery to cells has been tested. However, the details of this process has yet to be defined and a trial-and-error method is required to identify appropriate conditions for molecular delivery. In this study, first, the temperature of a liquid irradiated with the plasma jet was measured. Second, the change in the fragility of the porcine red blood cells caused by plasma irradiation was assessed using an optical method. Third, the delivery of fluorescent molecules to cells by plasma irradiation was investigated. The temperature increase was small and we confirmed that the thermal effect on the cells was negligible. The fragility of the porcine red blood cells increased when the plasma irradiation time was relatively short (i.e., 40 s or 60 s). The delivery of fluorescent molecules with a molecular weight of 807 to PC12 cells was confirmed.

Keywords: Atmospheric pressure plasma jet, molecular delivery, cell membrane, fluorescent, red blood cell