

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6432945号
(P6432945)

(45) 発行日 平成30年12月5日 (2018. 12. 5)

(24) 登録日 平成30年11月16日 (2018. 11. 16)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 15/87 (2006. 01)	C 1 2 N 15/87 Z

請求項の数 5 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2015-524002 (P2015-524002)	(73) 特許権者	504157024
(86) (22) 出願日	平成26年6月18日 (2014. 6. 18)		国立大学法人東北大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/066185		宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02014/208425	(74) 代理人	100095359
(87) 国際公開日	平成26年12月31日 (2014. 12. 31)		弁理士 須田 篤
審査請求日	平成29年3月24日 (2017. 3. 24)	(74) 代理人	100143834
(31) 優先権主張番号	特願2013-133517 (P2013-133517)		弁理士 楠 修二
(32) 優先日	平成25年6月26日 (2013. 6. 26)	(72) 発明者	金子 俊郎
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		日本国宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
特許法第30条第2項適用 8th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology (開催日: 2013年12月20日~22日) にて発表		(72) 発明者	佐々木 渉太
			日本国宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子導入装置および遺伝子導入方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液を収納する収納容器と、
前記収納容器の上方に配置された一方の電極と、
前記収納容器の外側面を円周方向に沿って少なくとも1周するよう前記収納容器の外側面に取り付けられた他方の電極と、

前記一方の電極から前記他方の電極に向かって、プラズマ原料を供給するプラズマ原料供給手段と、

前記プラズマ原料が供給された各電極間でプラズマを発生させるよう、各電極間に電圧を印加する電源部とを有し、

前記収納容器は、収納された前記遺伝子分散溶液に、発生した前記プラズマが直接当たると配置されていることを

特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項2】

前記一方の電極は筒状を成しており、

前記プラズマ原料供給手段は、前記一方の電極の内部を通して、各電極の間に前記プラズマ原料を供給可能に構成されていることを

特徴とする請求項1記載の遺伝子導入装置。

【請求項3】

前記プラズマ原料は水を含んでいることを特徴とする請求項1または2記載の遺伝子導

入装置。

【請求項4】

遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液を収納する収納容器の上方に配置された一方の電極から、前記収納容器の外側面を円周方向に沿って少なくとも1周するように前記収納容器の外側面に取り付けられた他方の電極に向かってプラズマ原料を供給しつつ、各電極間に電圧を印加してプラズマを発生させ、前記遺伝子分散溶液に前記プラズマを直接当てることにより、前記細胞に前記遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入方法。

【請求項5】

前記プラズマ原料は水を含んでいることを特徴とする請求項4記載の遺伝子導入方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プラズマを利用した遺伝子導入装置および遺伝子導入方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子治療の研究やiPS細胞の作製などに、細胞に遺伝子を導入する遺伝子導入技術が用いられている。例えば、遺伝子治療の研究では、がんやHIV、単一遺伝子病、C型肝炎などを治療するために、患者から抽出した細胞に、正常な遺伝子や治療用の遺伝子を導入し、それをワクチンとして患者に投与する技術の開発が進められている。また、iPS細胞については、患者から抽出した体細胞に、複数の遺伝子を導入することによりiPS細胞が作製されている。

20

【0003】

従来の遺伝子導入方法として、リポソーム法などの化学的手法や、エレクトロポレーション法などの物理学的手法、ウイルス法などの生物学的手法が用いられている。しかし、リポソーム法では、適用できる細胞が限られており、導入効率も低いという問題があった。また、エレクトロポレーション法では、導入効率は高いが、細胞が死にやすく、生存率が低いという問題があった。また、ウイルス法では、使用するウイルスにより、細胞が病気に感染する危険性があるという問題があった。

30

【0004】

そこで、これらの問題を解決するため、細胞を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する遺伝子を細胞内に導入する方法が開発されている（例えば、特許文献1、2、非特許文献1参照）。この方法では、細胞にプラズマを照射することにより、プラズマ中に存在するラジカル作用により、脂質過酸化反応で細胞膜に小孔を開けるとともに、細胞の表面に電界を発生させて、その電界により小孔から細胞内に遺伝子を押し込むものと考えられる。この方法によれば、病気感染の危険性がなく、導入効率も目視で最大60～70%、FACS（fluorescence activated cell sorting）による検討で最大25～30%程度と高くなっている。

【0005】

40

しかし、特許文献1、2および非特許文献1に記載の低温ガスプラズマを利用した遺伝子導入方法によれば、比較的高い導入効率を得られているが、照射したプラズマにより細胞に障害が発生しやすく、細胞の生存率が高いとは言いがたいという問題があった。そこで、低温ガスプラズマの照射による細胞の生存率を高めるために、プラズマを照射する液体培地に、細胞の障害を防止するためのタンパク質から成る障害防止成分を含有した遺伝子導入方法が開発されている（例えば、特許文献3参照）。この方法では、先端に向かってテーパ状に細くなるよう形成された細長いガラス管の側面に、所定の間隔をあけて1対の電極を設けたプラズマ発生装置を用い、ガラス管の上部からプラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極間に電圧を印加して低温プラズマを発生させ、ガラス管の先端から、細胞および遺伝子が入った液体培地に向かってプラズマを噴射させることにより、細胞内

50

に遺伝子を導入することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開WO02/064767号

【特許文献2】国際公開WO2004/015101号

【特許文献3】国際公開WO2011/148996号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Y. Ogawa, N. Morikawa, A. Ohkubo-Suzuki, et al., “An epoch-making application of discharge plasma phenomenon to gene-transfer”, Biotechnol. Bioeng., 30 December 2005, Volume 92, Issue 7, p.865-870 10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

特許文献3に記載の低温ガスプラズマを利用した遺伝子導入方法によれば、比較的高い導入効率が得られるが、稀少遺伝子を利用する場合や体内細胞への導入を考慮した場合、さらに高い導入効率で、遺伝子を細胞に導入できる方法の開発が望まれている。

【0009】

本発明は、このような課題に着目してなされたもので、より高い導入効率で遺伝子を細胞に導入することができる遺伝子導入装置および遺伝子導入方法を提供することを目的とする。 20

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記目的を達成するために、本発明に係る遺伝子導入装置は、遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液を収納する収納容器と、前記収納容器の上方に配置された一方の電極と、前記収納容器の外側面を円周方向に沿って少なくとも1周するよう前記収納容器の外側面に取り付けられた他方の電極と、前記一方の電極から前記他方の電極に向かって、プラズマ原料を供給するプラズマ原料供給手段と、前記プラズマ原料が供給された各電極間でプラズマを発生させるよう、各電極間に電圧を印加する電源部とを有し、前記収納容器は、収納された前記遺伝子分散溶液に、発生した前記プラズマが直接当たるよう配置されていることを特徴とする。 30

【0011】

また、本発明に係る遺伝子導入方法は、遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液を収納する収納容器の上方に配置された一方の電極から、前記収納容器の外側面を円周方向に沿って少なくとも1周するよう前記収納容器の外側面に取り付けられた他方の電極に向かってプラズマ原料を供給しつつ、各電極間に電圧を印加してプラズマを発生させ、前記遺伝子分散溶液に前記プラズマを直接当てることにより、前記細胞に前記遺伝子を導入することを特徴とする。 40

【0012】

本発明に係る遺伝子導入装置および遺伝子導入方法は、遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液にプラズマを直接当てることにより、その細胞に遺伝子を導入することができる。特に、遺伝子分散溶液を各電極の間に配置していることにより、遺伝子導入効率を高めることができる。このため、稀少遺伝子を導入するのに好適に使用することができる。

【0013】

本発明に係る遺伝子導入装置および遺伝子導入方法は、プラズマを利用するため、エレクトロポレーション法と比べて細胞の生存率が高く、ウイルスによる病気の感染の危険性 50

もない。また、本発明に係る遺伝子導入装置および遺伝子導入方法は、様々な細胞に遺伝子を導入することができる。遺伝子を導入する細胞は、いかなるものであってもよく、例えば、H e L a細胞、繊維芽細胞、神経芽細胞、乳がん細胞などを利用することができる。

【0014】

使用するプラズマは、細胞を傷つけないよう低温プラズマから成ることが好ましい。また、プラズマを発生する装置は、密閉型であっても、開放型であってもよいが、体内細胞への導入を考慮すると、開放型であることが好ましい。プラズマ原料は、生成ガスとしてヘリウム、アルゴン、窒素、酸素、二酸化炭素、空気など、いかなるものを含んでいてもよい。

10

【0015】

本発明に係る遺伝子導入装置で、前記一方の電極は筒状を成しており、前記プラズマ原料供給手段は、前記一方の電極の内部を通して、各電極の間に前記プラズマ原料を供給可能に構成されていることが好ましい。この場合、一方の電極から他方の電極に向かって供給されるプラズマ原料から発生するプラズマを、電氣的に加速して効率的に遺伝子分散溶液に当てることができ、遺伝子導入効率をさらに高めることができる。

【0016】

本発明に係る遺伝子導入装置で、前記細胞は接着細胞から成り、前記収納容器の底面から、前記収納容器に収納された前記遺伝子分散溶液の表面までの高さを調整可能に構成されていてもよい。この場合、収納容器の底面から遺伝子分散溶液の表面までの高さを調整することにより、接着細胞（b o u n d c e l l）に対して、遺伝子導入効率を高めることができる。特に高い遺伝子導入効率を得るために、本発明に係る遺伝子導入装置で、前記細胞は接着細胞から成り、前記収納容器は、底面から前記遺伝子分散溶液の表面までの高さが1.5mm以下で、前記底面に存在する前記細胞が前記遺伝子分散溶液の表面に露出しないよう、前記遺伝子分散溶液を収納可能に設けられていることが好ましい。また、本発明に係る遺伝子導入方法で、前記細胞は接着細胞から成り、前記収納容器の底面から前記遺伝子分散溶液の表面までの高さが1.5mm以下で、前記底面に存在する前記細胞が前記遺伝子分散溶液の表面に露出しないよう、前記遺伝子分散溶液を前記収納容器に収納することが好ましい。

20

30

【0017】

本発明に係る遺伝子導入装置および遺伝子導入方法で、前記プラズマ原料は水を含んでいることが好ましい。この場合、プラズマ中にヒドロキシルラジカル（OHラジカル）が生成されるため、そのヒドロキシルラジカル作用により細胞への遺伝子の導入が促進され、高い遺伝子導入効率を得ることができる。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、より高い導入効率で遺伝子を細胞に導入することができる遺伝子導入装置および遺伝子導入方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0019】

【図1】本発明の実施の形態の遺伝子導入装置の一例を示す概略側面図である。

【図2】本発明に関し、プラズマを利用した遺伝子導入試験の試験装置の一例を示す概略側面図である。

【図3】図2に示す試験装置による、蛍光物質としてY O Y O - 1を使用したときの遺伝子導入試験の結果を示す（a）コントロールの蛍光、（b）コントロールの明視野、（c）プラズマを利用したときの蛍光、（d）プラズマを利用したときの明視野、（e）エレクトロポレーション法による蛍光、（f）エレクトロポレーション法による明視野の顕微鏡写真である。

【図4】図2に示す試験装置による、蛍光物質としてL I V E / D E A D S t a i nを

50

使用したときの遺伝子導入試験の結果を示す (a) コントロールの蛍光、(b) コントロールの明視野、(c) プラズマを利用したときの蛍光、(d) プラズマを利用したときの明視野、(e) エレクトロポレーション法による蛍光、(f) エレクトロポレーション法による明視野の顕微鏡写真である。

【図5】図2に示す試験装置による、プラズマを利用した遺伝子導入試験結果の、(a) 導入効率 (η) とプラズマ照射時間 (t_d) との関係を示すグラフ、(b) 生存率 (Cell Viability) とプラズマ照射時間 (t_d) との関係を示すグラフである。

【図6】本発明に関し、プラズマ原料に水を含んだときの遺伝子導入試験の試験装置の一例を示す概略側面図である。

【図7】図6に示す試験装置による、プラズマ原料に水を含んだときの遺伝子導入試験の結果を示す、(a) 蛍光物質としてYOYO-1を使用したときの蛍光、(b) 蛍光物質としてLIVE/DEAD Stainを使用したときの蛍光、(c) 明視野の顕微鏡写真である。

【図8】本発明に関し、プラズマ発生域からの遺伝子分散溶液までの距離を変えたときの遺伝子導入試験結果の、(a) 導入効率 (η) と印加電圧 (V_{p-p}) との関係を示すグラフ、(b) 生存率 (Cell Viability) と印加電圧 (V_{p-p}) との関係を示すグラフである。

【図9】本発明に関し、プラズマ発生域からの遺伝子分散溶液までの距離を変えたときの遺伝子導入試験結果の、(a) 長拡散型、(b) 短拡散型の、導入効率 (η) とプラズマ照射時間 (t_d) との関係を示すグラフである。

【図10】図1に示す試験装置による遺伝子導入試験の結果を示す (a) 蛍光物質としてYOYO-1を使用したときの蛍光、(b) 蛍光物質としてLIVE/DEAD Stainを使用したときの蛍光、(c) 明視野の顕微鏡写真である。

【図11】図1に示す遺伝子導入装置による遺伝子導入試験結果の、様々な印加電圧 (V_{p-p}) における (a) 導入効率 (η) とプラズマ照射時間 (t_d) との関係を示すグラフ、(b) 生存率 (Cell Viability) とプラズマ照射時間 (t_d) との関係を示すグラフである。

【図12】図1に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置による遺伝子導入試験の結果を示す (a) コントロールの明視野、(b) コントロールの蛍光、(c) プラズマを照射したときの明視野、(d) プラズマを照射したときの蛍光の顕微鏡写真である。

【図13】本発明の実施の形態の遺伝子導入装置の、接着細胞に遺伝子を導入するための変形例を示す概略側面図である。

【図14】図13に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置による、蛍光物質としてYOYO-1を使用したときの遺伝子導入試験の結果を示す (a) 収納容器の底面から遺伝子分散溶液の表面までの高さ $h = 1.28 \text{ mm}$ のときの明視野、(b) $h = 1.28 \text{ mm}$ のときの蛍光、(c) $h = 3.84 \text{ mm}$ のときの明視野、(d) $h = 3.84 \text{ mm}$ のときの蛍光、(e) $h = 6.40 \text{ mm}$ のときの明視野、(f) $h = 6.40 \text{ mm}$ のときの蛍光の顕微鏡写真である。

【図15】図13に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置による遺伝子導入試験の結果を示す (a) プラズマを照射したときの明視野、(b) プラズマを照射したときの蛍光の顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、図面にに基づき、本発明の実施の形態について説明する。

図1は、本発明の実施の形態の遺伝子導入装置の一例を示している。

図1に示すように、遺伝子導入装置10は、ガラス管11と収納容器12と1対の電極13a、13bとプラズマ原料供給手段（図示せず）と電源部14とを有している。

【0021】

ガラス管11は、上下方向に伸びるよう配置され、下端部が徐々に細くなるようテーパ状に形成されている。収納容器12は、ガラス管11の下方に、ガラス管11の下端か

10

20

30

40

50

ら所定の間隔を開けて配置されている。収納容器 1 2 は、ガラス管 1 1 の側の上部が開口しており、内部に、遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液 1 5 を収納するよう構成されている。

【0022】

1 対の電極 1 3 a, 1 3 b のうち一方の電極 1 3 a は、ステンレス製で筒状を成し、ガラス管 1 1 の内部上方に、上下方向に伸びるよう配置されている。他方の電極 1 3 b は、銅線から成り、収納容器 1 2 の下部外側面に巻き付けられている。

【0023】

プラズマ原料供給手段は、筒状の一方の電極 1 3 a の内部を通して、各電極 1 3 a, 1 3 b の間にプラズマ原料を供給可能に構成されている。また、プラズマ原料供給手段は、一方の電極 1 3 a から他方の電極 1 3 b に向かって、プラズマ原料を噴射して供給するようになっている。

10

【0024】

電源部 1 4 は、各電極 1 3 a, 1 3 b に接続され、プラズマ原料が供給された各電極 1 3 a, 1 3 b の間で低温プラズマを発生させるよう、各電極 1 3 a, 1 3 b 間に電圧を印加可能に構成されている。これにより、遺伝子導入装置 1 0 は、発生したプラズマが、収納容器 1 2 に収納された遺伝子分散溶液 1 5 に直接当たるようになっている。

【0025】

なお、図 1 に示す具体的な一例では、ガラス管 1 1 は、内径が 8 mm、下端の内径が 2 mm、一方の電極 1 3 a は、内径が 2 mm、長さが 20 mm、一方の電極 1 3 a の下端からガラス管 1 1 の下端までは、58 mm である。また、ガラス管 1 1 の下端から収納容器 1 2 の底面までは、12 mm である。

20

【0026】

本発明の実施の形態の遺伝子導入方法は、遺伝子導入装置 1 0 により好適に実施することができる。本発明の実施の形態の遺伝子導入方法では、まず、遺伝子とその遺伝子を導入する細胞とを含む遺伝子分散溶液 1 5 を、他方の電極 1 3 b が取り付けられた収納容器 1 2 に収納する。プラズマ原料供給手段により、一方の電極 1 3 a から他方の電極 1 3 b に向かってプラズマ原料を供給しつつ、電源部 1 4 で各電極 1 3 a, 1 3 b 間に電圧を印加して低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液 1 5 にプラズマを直接当てる。

【0027】

本発明の実施の形態の遺伝子導入装置 1 0 および遺伝子導入方法は、遺伝子分散溶液 1 5 にプラズマを直接当てることにより、その細胞に遺伝子を導入することができる。特に、遺伝子分散溶液 1 5 が各電極 1 3 a, 1 3 b の間に配置され、プラズマが電氣的に加速され効率的に遺伝子分散溶液 1 5 に当たるため、遺伝子導入効率をより高めることができる。このため、稀少遺伝子を導入するのに好適に使用することができる。

30

【0028】

本発明の実施の形態の遺伝子導入装置 1 0 および遺伝子導入方法は、プラズマを利用するため、エレクトロポレーション法と比べて細胞の生存率が高く、ウイルスによる病気の感染の危険性もない。また、本発明の実施の形態の遺伝子導入装置 1 0 および遺伝子導入方法は、様々な細胞に遺伝子を導入することができる。低温プラズマを使用するため、細胞を傷つけず、細胞の生存率を高めることができる。

40

【0029】

以下に、比較例として、図 2 に示す試験装置を用いて、プラズマを利用した遺伝子導入技術についての試験を行った。なお、以下の比較例で使用方法および装置は、特許文献 3 に記載のものとはほぼ同じ方法および装置である。

【0030】

[プラズマを利用した遺伝子導入試験－比較例]

プラズマを利用した遺伝子導入技術の導入効率等を調べるための試験を行った。図 2 に示すように、試験装置は、上下方向の伸びるよう配置されたガラス管 2 1 の側面に、所定の間隔をあけて、銅製の 1 対の電極 2 3 a, 2 3 b を設けている。また、下端部がテーパ

50

一状に形成されたガラス管 2 1 の下方に、遺伝子分散溶液 2 5 を収納した容器 2 2 を設置している。試験装置では、ガラス管 2 1 の内径を 8 mm、ガラス管 2 1 の下端の内径を 2 mm とした。また、各電極 2 3 a, 2 3 b の間隔を 3 3 mm、下方の電極 2 3 b からガラス管 2 1 の下端までを 7 3 mm、ガラス管 2 1 の下端から遺伝子分散溶液 2 5 の表面までを 5 mm とした。

【0031】

試験に使用した細胞は、マウス繊維芽細胞の 3 T 3 L 1 細胞（浮遊状態）である。また、試験では、遺伝子の代わりに、蛍光物質を使用した。使用した蛍光物質は、細胞中の DNA に付着すると発光する YOYO-1 と、細胞が死ぬと発光する LIVE/DEAD Stain の 2 種類である。

10

【0032】

試験では、ガラス管 2 1 の上部からプラズマ原料のヘリウムガスを注入し、電源 2 4 により各電極 2 3 a, 2 3 b 間に 10 kHz の電圧を印加して、各電極 2 3 a, 2 3 b の間で低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液 2 5 に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後の細胞の蛍光を観察し、遺伝子の導入効率および細胞の生存率を求めた。なお、印加電圧は 6.8 ~ 12.5 kV、プラズマ照射時間は 1 ~ 60 秒、ヘリウムガスの流量は 3.0 slm、遺伝子分散溶液 2 5 の量は 10 ~ 150 μ L である。

【0033】

蛍光物質として、YOYO-1 を使用した結果の一例を図 3 に、LIVE/DEAD Stain を使用した結果の一例を図 4 に示す。図 3 および図 4 は、印加電圧が 7.8 kV、プラズマ照射時間が 5 秒、遺伝子分散溶液 2 5 の量が 100 μ L のときの結果である。なお、図 3 および図 4 中には、比較のため、同じ条件で、プラズマを照射しないときの結果（以下、「コントロール」という）および、エレクトロポレーション法による結果も示す。

20

【0034】

図 3 に示すように、コントロールでは、蛍光がほとんど認められず、ほとんど遺伝子が導入されていないのに対し、プラズマ照射によるもの、およびエレクトロポレーション法によるものは、多くの細胞に蛍光が認められ、遺伝子が導入されていることが確認された。また、図 4 に示すように、プラズマ照射によるものは、蛍光がほとんど認められないため、遺伝子が導入された細胞がほとんど死んでおらず、生存率が高いことが確認された。これに対し、エレクトロポレーション法によるものは、多くの細胞に蛍光が認められ、図 3 と比較することにより、遺伝子が導入された細胞のほとんどが死んでいることが確認された。また、コントロールでは、蛍光がほとんど認められないが、これは図 3 にしめすように、遺伝子がほとんど導入されていないためであると考えられる。

30

【0035】

図 3 および図 4 の結果から、生存率を考慮した導入効率は、コントロールが 2.56 %、プラズマ照射によるものが 21.1 %、エレクトロポレーション法によるものがほぼ 0 % であった。以上より、プラズマ照射を利用した遺伝子導入方法は、生存率および導入効率が高いといえる。

【0036】

次に、導入効率 (η) および生存率 (Cell Viability) と、プラズマ照射時間 (t_d) との関係性を調べ、その結果を図 5 に示す。なお、図 5 は、印加電圧が 7.8 kV、遺伝子分散溶液 2 5 の量（図 5 中、I と表示）が 100 μ L および 150 μ L のときの結果である。図 5 (a) に示すように、導入効率は、照射時間が 3 ~ 5 秒のときと、20 秒以上のときに、30 % 以上と高くなることが確認された。また、図 5 (b) に示すように、生存率は、照射時間にかかわらずほぼ 90 % 以上と、高い値を示すことが確認された。これらの結果から、プラズマ照射を利用した遺伝子導入方法は、常に生存率が高く、照射時間を調整することにより、導入効率を高めることができるといえる。

40

【0037】

[プラズマ原料に水を含んだときの遺伝子導入試験一比較例]

50

プラズマ原料に水を含んだときの導入効率等を調べるための試験を行った。試験に使用した装置を、図6に示す。図6に示すように、試験装置は、上下方向の伸びるよう配置されたガラス管31の内部上方に、ステンレス製の円筒状の電極33aを設け、その電極33aの下方のガラス管31の側面に銅線の電極33bが巻き付けられている。また、下端部がテーパ状に形成されたガラス管31の下方に、遺伝子分散溶液35を収納した容器32を設置している。試験装置では、ガラス管31の内径を8mm、ガラス管31の下端の内径を2mmとした。また、円筒状の電極33aの長さを20mm、各電極33a、33b間隔を13mm、下方の電極33bからガラス管31の下端までを32mm、ガラス管31の下端から遺伝子分散溶液35の表面までを5mmとした。

【0038】

試験に使用した細胞は、3T3L1細胞（浮遊状態）である。また、試験では、遺伝子の代わりに、YOYO-1と、LIVE/DEAD Stainの2種類の蛍光物質を使用した。試験では、上方の電極33aの内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスと水とを注入し、電源34により各電極33a、33b間に10kHzの電圧を印加して、各電極33a、33bの間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液35に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後の細胞の蛍光を観察し、遺伝子の導入効率および細胞の生存率を求めた。なお、印加電圧は7.8kV、プラズマ照射時間は5秒、ヘリウムガスの流量は1.0slm、遺伝子分散溶液35の量は100μL、水の導入量は2.11μL/minである。

【0039】

試験結果を、図7に示す。図7(a)に示すように、YOYO-1の場合には、多くの細胞に蛍光が認められ、遺伝子が導入されていることが確認された。また、図7(b)に示すように、LIVE/DEAD Stainの場合には、蛍光がほとんど認められないため、遺伝子が導入された細胞がほとんど死んでおらず、生存率が高いことが確認された。このときの生存率は96.6%、導入効率は12.9%であった。このように、プラズマ原料中に水を含むときには、プラズマ中にヒドロキシルラジカル(OHラジカル)が生成されるため、そのヒドロキシルラジカル作用により細胞への遺伝子の導入が促進され、高い遺伝子導入効率を得ることができると考えられる。

【0040】

〔プラズマ発生域からの距離と導入効率との関係—比較例〕

プラズマ発生域から遺伝子分散溶液までの距離と導入効率との関係を調べるための試験を行った。試験に使用した装置は、図2に示す装置であり、下方の電極23bからガラス管21の下端までを73mmとしたもの（以下、「長拡散型」という）と、下方の電極23bからガラス管21の下端までを35mmとしたもの（以下、「短拡散型」という）について試験を行った。試験に使用した細胞は、3T3L1細胞（浮遊状態）である。また、試験では、遺伝子の代わりに、YOYO-1と、LIVE/DEAD Stainの2種類の蛍光物質を使用した。

【0041】

試験では、ガラス管21の上部からプラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極23a、23b間に10kHzの電圧を印加して、各電極23a、23bの間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液25に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後の細胞の蛍光を観察し、遺伝子の導入効率および細胞の生存率を求めた。なお、印加電圧は6.0~12.5kV、プラズマ照射時間は1~15秒、ヘリウムガスの流量は3.0slm、遺伝子分散溶液15の量は100μLである。

【0042】

印加電圧($V_p - p$)を変化させたときの導入効率(η)および生存率(Cell Viability)の変化を、図8に示す。なお、このときのプラズマ照射時間は5秒である。また、プラズマ照射時間(t_d)を変化させたときの導入効率(η)の変化を、図9に示す。なお、このときの印加電圧は、7.8kVである。また、図9には、比較のため、プラズマを水に照射してプラズマ処理水を作製し、そのプラズマ処理水を遺伝子分散

溶液に注ぐことで遺伝子導入を行ったときの結果（図9中の「処理水」）も示している。

【0043】

図8（a）に示すように、導入効率は、印加電圧が8 kV付近で最も高くなることが確認された。また、図8（b）に示すように、生存率は、長拡散型でも短拡散型でも常に90%以上と高くなっていることが確認された。また、図9に示すように、導入効率は、長拡散型でプラズマ照射時間が1～5秒のとき、短拡散型でプラズマ照射時間が3～10秒のとき高くなることが確認された。また、図8（a）および図9に示すように、印加電圧およびプラズマ照射時間にかかわらず、短拡散型の方が、長拡散型よりも常に導入効率が高いことも確認された。これらの結果から、プラズマ発生域から遺伝子分散溶液25までの距離を短くするほど、導入効率が高くなるものと推定される。

10

【0044】

なお、図9に示すように、プラズマを直接遺伝子分散溶液に照射する場合と比べると導入効率は低くなっているが、プラズマ処理水を利用しても、遺伝子導入可能であることが確認された。プラズマ処理水で遺伝子導入できるのは、プラズマ処理水の中に生成された活性酸素種の作用によるものと考えられる。

【0045】

以上の比較例の試験結果を参考にして、以下に本発明の実施の形態の遺伝子導入装置10による試験を行った。

【実施例1】

【0046】

20

図1に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置10を使用して、遺伝子導入試験を行った。使用した細胞は、マウス繊維芽細胞の3T3L1細胞（浮遊状態）である。また、試験では、遺伝子の代わりに、蛍光物質を使用した。使用した蛍光物質は、細胞中のDNAに付着すると発光するYOYO-1と、細胞が死ぬと発光するLIVE/DEAD Stainの2種類である。また、電極13aにはタングステン製のものをを用い、電極13bには銅製のものをを用いた。

【0047】

試験では、上方の電極13aの内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極13a、13b間に10 kHzの電圧を印加して、各電極13a、13bの間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液15に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後、細胞の蛍光を観察した。なお、印加電圧は7.8 kV、プラズマ照射時間は5秒、ヘリウムガスの流量は3.0 slm、遺伝子分散溶液15の量は100 μLである。これらの試験条件は、図3および図4のものと同一である。

30

【0048】

蛍光物質として、YOYO-1を使用した結果、および、LIVE/DEAD Stainを使用した結果を、それぞれ図10（a）および（b）に示す。試験の結果、図10（a）に示すように、多くの細胞にYOYO-1の蛍光が認められ、遺伝子が導入されていることが確認された。また、図10（b）に示すように、LIVE/DEAD Stainの蛍光がほとんど認められないため、遺伝子が導入された細胞がほとんど死んでおらず、生存率が高いことが確認された。これらの結果を、図2の装置を用いてほぼ同じ条件で行われた、図3（c）および図4（c）の試験結果と比較すると、導入された細胞の生存率はほとんど同じであるが、図1の装置を利用した方が、より高い導入効率で遺伝子を細胞に導入できることがわかる。

40

【実施例2】

【0049】

図8および図9の結果から、プラズマ発生域から遺伝子分散溶液までの距離を短くすればするほど、導入効率が高くなると考えられる。このことを調べるため、図1に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置10による試験を行った。遺伝子導入装置10は、プラズマ発生域から遺伝子分散溶液15までの距離を、実質的にゼロにしたものと考えられる。試験に使用した細胞は、3T3L1細胞（浮遊状態）である。また、試験では、遺伝子

50

の代わりに、Y O Y O - 1 と、L I V E / D E A D S t a i n の 2 種類 の 蛍 光 物 質 を 使用した。

【0050】

試験では、上方の電極13aの内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極13a、13b間に10kHzの電圧を印加して、各電極13a、13bの間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液15に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後の細胞の蛍光を観察し、遺伝子の導入効率および細胞の生存率を求めた。なお、印加電圧は7.8kV、8.7kV、11.6kV、プラズマ照射時間は0～30秒、ヘリウムガスの流量は3.0slm、遺伝子分散溶液15の量は100μLである。

【0051】

プラズマ照射時間(t_d)を変化させたときの導入効率(η)および生存率(Cell Viability)の変化を調べ、図11に示す。図11(a)に示すように、プラズマ照射時間が5秒以上のとき、導入効率が高くなることが確認された。特に、印加電圧が11.6kVのとき、55%以上の非常に高い導入効率が見られていることが確認された。また、図11(b)に示すように、生存率は、プラズマ照射時間および印加電圧にかかわらず、常に90%程度より高くなっていることが確認された。この結果から、遺伝子導入装置10によれば、より高い導入効率で遺伝子を細胞に導入することができるといえる。

【実施例3】

【0052】

図1に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置10を使用して、細胞に遺伝子を導入する試験を行った。使用した細胞は、ヒトの乳癌細胞由来のMCF-7細胞(浮遊状態)である。また、使用した遺伝子は、蛍光色素Cy5で標識されたds-siRNAである。また、電極13aにはタングステン製のものを、電極13bには銅製のものをを用いた。

【0053】

試験では、上方の電極13aの内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極13a、13b間に10kHzの電圧を印加して、各電極13a、13bの間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液15に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ噴射後の細胞の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、同じ条件でプラズマを照射しないときの結果(以下、「コントロール」という)との比較を行った。なお、印加電圧は11.6kV、プラズマ照射時間は1秒、ヘリウムガスの流量は1.5slm、遺伝子分散溶液15の量は100μL、遺伝子分散溶液15中の遺伝子の濃度は10μMである。

【0054】

試験結果を、図12に示す。図12(b)に示すように、コントロールでは、細胞中に蛍光が認められず、遺伝子が導入されていないのに対し、図12(d)に示すように、プラズマ照射を行ったものは、細胞中に蛍光が認められ、遺伝子が導入されていることが確認された。

【0055】

[接着細胞に対する遺伝子導入装置および遺伝子導入方法]

浮遊状態ではなく接着状態の細胞を使用する場合、遺伝子分散溶液15を収納容器12に入れると、遺伝子分散溶液15中の接着細胞が収納容器12の底面に存在する。このため、図13に示すように、遺伝子導入装置10は、収納容器12が所定の深さを有しており、収納容器12の底面から、収納容器12に収納された遺伝子分散溶液15の表面までの高さを調整可能になっていることが好ましい。図13に示す一例では、収納容器12は底を有する円柱状で、深さによらず同じ内径を有し、電極13bは環状を成し、収納容器12の外側面を円周方向に沿って1周するよう取り付けられている。

【実施例4】

【0056】

接着細胞を使用する場合、照射されたプラズマにより遺伝子分散溶液15の表面に形成

10

20

30

40

50

された電界が、収納容器 12 の底面に存在する接着細胞まで届く必要がある。また、遺伝子分散溶液 15 の表面から接着細胞が露出すると、プラズマが接着細胞に直接当たるため、接着細胞が死んでしまう。このため、これらを考慮して、収納容器 12 の底面から遺伝子分散溶液 15 の表面までの高さを調整する必要がある。そこで、図 13 に示す遺伝子導入装置 10 を使用して、収納容器 12 の底面から遺伝子分散溶液 15 の表面までの高さ h を変化させて、導入効率を調べる試験を行った。

【0057】

試験に使用した細胞は、マウス繊維芽細胞由来の 3T3L1 細胞（接着状態）である。また、試験では、遺伝子の代わりに、蛍光物質の YOYO-1 を使用した。試験では、上方の電極 13a の内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極 13a, 13b 間に 10 kHz の電圧を印加して、各電極 13a, 13b の間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液 15 に向かってプラズマを噴射させた。 $h = 1.28\text{ mm}$ 、 3.84 mm 、 6.40 mm としたときの、プラズマ噴射後の細胞の蛍光をそれぞれ共焦点レーザー顕微鏡で観察した。なお、印加電圧は 8.7 kV 、プラズマ照射時間は 1 秒、ヘリウムガスの流量は 1.0 slm 、遺伝子分散溶液 15 中の YOYO-1 の濃度は $5\text{ }\mu\text{M}$ 、試験前日の細胞密度は $1 \times 10^5\text{ cells/dish}$ である。

【0058】

試験結果を、図 14 に示す。図 14 (a) および (b) に示すように、 $h = 1.28\text{ mm}$ のとき、多くの細胞に蛍光が認められ、YOYO-1 が導入されていることが確認された。これに対し、図 14 (c) 乃至 (f) に示すように、 $h = 3.84\text{ mm}$ および 6.40 mm のときには、蛍光がほとんど認められず、ほとんど YOYO-1 が導入されていないことが確認された。これは、 $h = 3.84\text{ mm}$ および 6.40 mm のときには、照射されたプラズマにより遺伝子分散溶液 15 の表面に形成された電界が、収納容器 12 の底面に存在する接着細胞まで届いていないためであると考えられる。

【0059】

以上の試験の結果から、収納容器 12 の底面から遺伝子分散溶液 15 の表面までの高さを調整することにより、接着細胞に対して、遺伝子導入効率を高めることができるといえる。特に、底面に存在する細胞が遺伝子分散溶液 15 の表面に露出せず、収納容器 12 の底面から遺伝子分散溶液 15 の表面までの高さが 1.5 mm 以下のとき、高い遺伝子導入効率を得られるといえる。

【実施例 5】

【0060】

図 13 に示す本発明の実施の形態の遺伝子導入装置 10 を使用して、接着細胞に遺伝子を導入する試験を行った。使用した細胞は、マウス繊維芽細胞由来の 3T3L1 細胞（接着状態）である。また、使用した遺伝子は、緑色蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子を含むプラスミド DNA (pAcGFP1-C1) である。

【0061】

試験では、上方の電極 13a の内部を通して、プラズマ原料のヘリウムガスを注入し、各電極 13a, 13b 間に 10 kHz の電圧を印加して、各電極 13a, 13b の間に低温プラズマを発生させ、遺伝子分散溶液 15 に向かってプラズマを噴射させた。プラズマ照射中の装置周辺の温度を $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $h = 1.28\text{ mm}$ とし、プラズマ噴射後、48 時間の培養を経た細胞の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。なお、印加電圧は 5.0 kV 、プラズマ照射時間は 1 秒、ヘリウムガスの流量は 3.0 slm 、遺伝子分散溶液 15 の量は $100\text{ }\mu\text{L}$ 、遺伝子分散溶液 15 中の遺伝子の量は $50\text{ }\mu\text{g}$ 、試験前日の細胞密度は $2 \times 10^5\text{ cells/dish}$ である。

【0062】

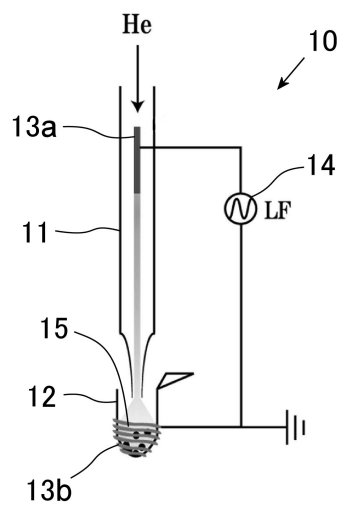
試験結果を、図 15 に示す。図 15 に示すように、プラズマ照射により、細胞中に蛍光が認められ、遺伝子が導入され、さらにその遺伝子が機能していることが確認された。

【符号の説明】

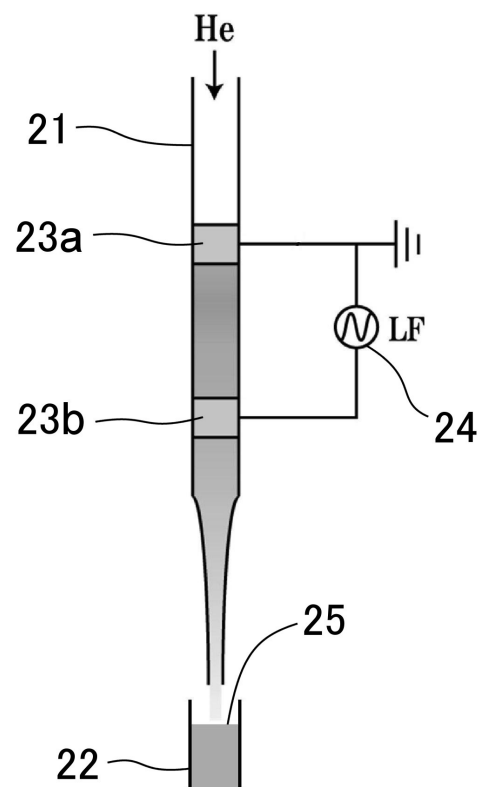
【0063】

- 10 遺伝子導入装置
- 11 ガラス管
- 12 収納容器
- 13 a, 13 b 電極
- 14 電源部
- 15 遺伝子分散溶液

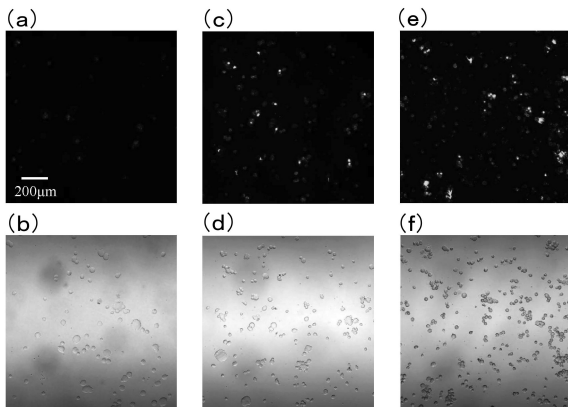
【図 1】



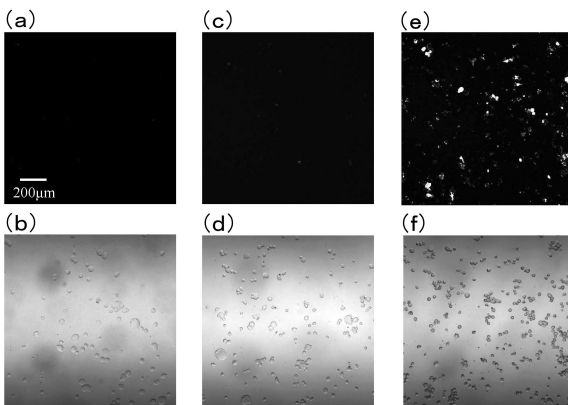
【図 2】



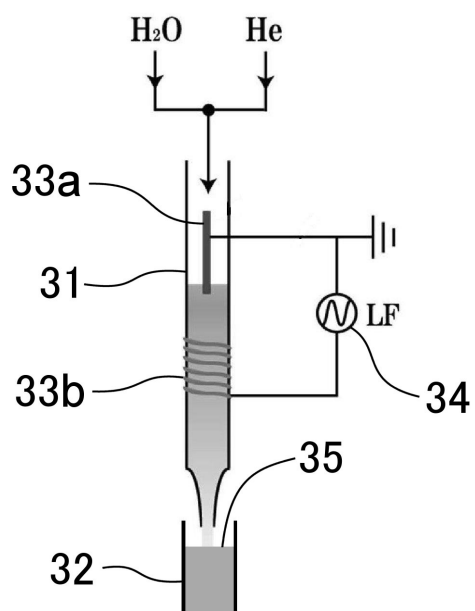
【図 3】



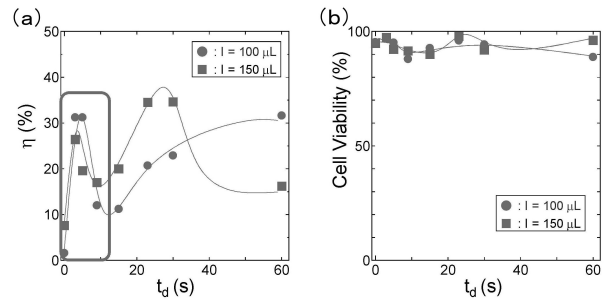
【図 4】



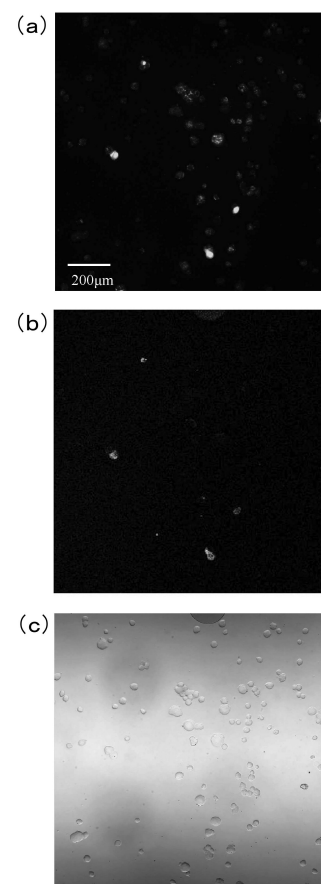
【図 6】



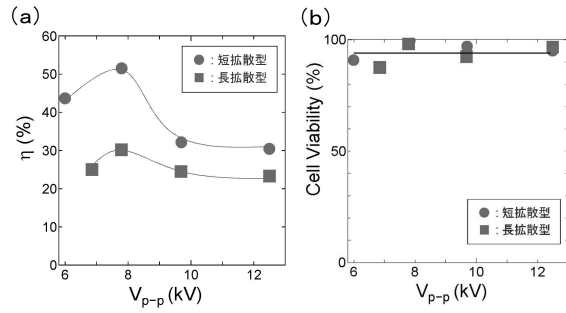
【図 5】



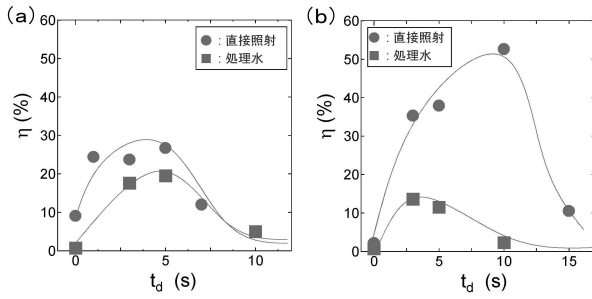
【図 7】



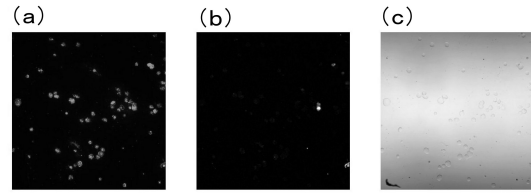
【図 8】



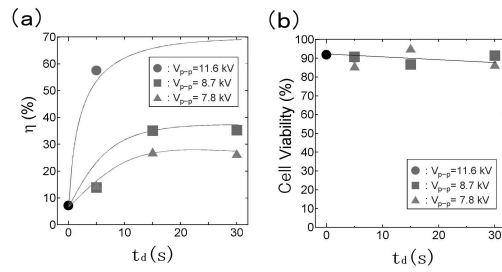
【図 9】



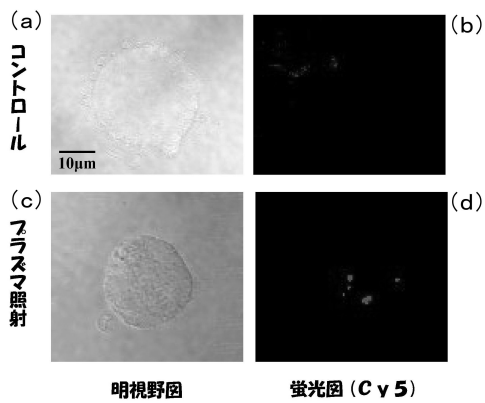
【図 10】



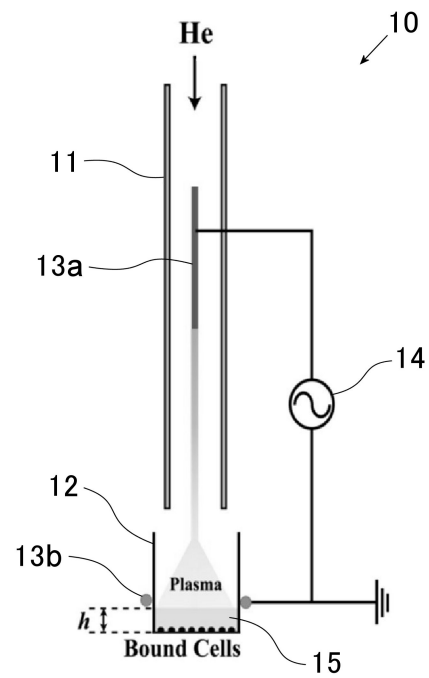
【図 11】



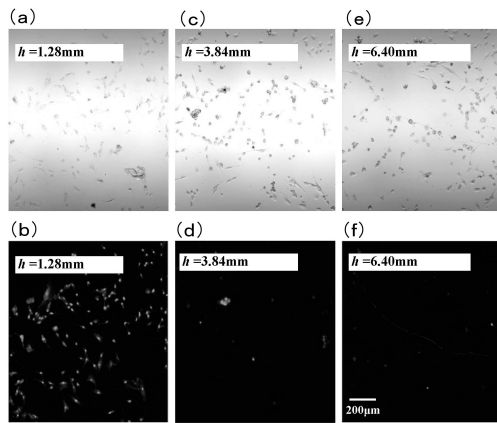
【図 12】



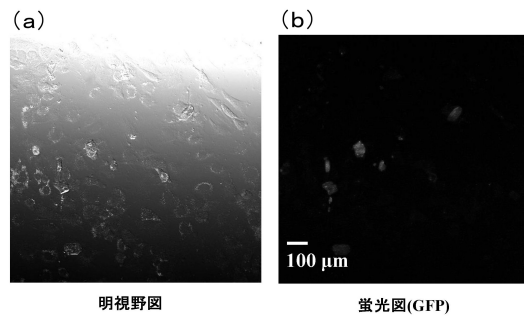
【図 13】



【図 1 4】



【図 1 5】



フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) (開催日:2014年5月18日~23日) にて発表

特許法第30条第2項適用 ウェブサイト(5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5) のホームページ) にて発表(2014年5月15日掲載)

掲載アドレス: <http://icpm5.plasmabio.com/index.html>

(72)発明者 神崎 展

日本国宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 加藤 俊顕

日本国宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第02/064767 (WO, A1)

国際公開第2004/015101 (WO, A1)

国際公開第2011/148996 (WO, A1)

国際公開第2012/086702 (WO, A1)

特開2013-255475 (JP, A)

プラズマプロセッシング研究会プロシーディングス, 2014年 2月 4日, Vol.31, 4A-PM-06
4th International Conference on Plasma Medicine[online], 2012年, [retrieved on 9 September 2014] Retrieved from Internet<URL:<http://icpm4.sciencesconf.org/4983/document>>

第60回応用物理学会春季学術講演会講演予稿集, 2013年 3月11日, p.08-129

第60回応用物理学会春季学術講演会講演予稿集, 2013年 3月11日, p.08-130

J. Biotechnol., 2006年, Vol.121, No.3, pp.299-308

Biotechnol. Bioeng., 2005年, Vol.92, No.7, pp.865-870

電子情報通信学会技術研究報告, 2013年 4月18日, Vol.113, No.18, pp.75-79

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M

C12N 15/

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)

PubMed