

(第3号様式)(Form No. 3)

学位論文要旨 Dissertation Summary

氏名 (Name) 木戸 祐吾

論文名: プラズマ照射による細胞への遺伝子導入現象の等価回路網解析と高周波化
(Dissertation Title) Equivalent Circuit Analysis and High Frequency Operation of Plasma Gene Transfection

遺伝子導入とは細胞内に任意の遺伝子を人為的に導入して新しい遺伝形質をもつ細胞や、それらの細胞由来の個体を作製する技術であり、医療分野、創薬分野、農水産分野などへの応用が期待されている。これまでに、さまざまな種類の遺伝子導入法が実用化されており、それらはウイルスベクター法を代表とする生物学的手法、エレクトロポレーションを代表とする物理的手法及びリポフェクションに代表される化学的手法に大別される。これらの手法には安全性の問題や、細胞障害性が高く導入効率が低い、試薬コストが高いなど固有の問題があるため研究用には用いることはできても、実際の医療などに用いることは困難である。そのため、これらの問題を解決した安全で低侵襲、高効率な遺伝子導入法が切望されている。プラズマ遺伝子・分子導入法はそれらの問題を解決出来る手法として期待されているが、現在までその導入機序の解明に至った報告例はない。本論文ではプラズマ遺伝子・分子導入において、プラズマが標的細胞にもたらす作用要因の中の電氣的要因に着目し、実験と数値解析により電界、電流、電荷の3つの要因の内、主要因はなにかを特定を試みた。

最初に有限要素法を用いて細胞のないモデルを構築して電界・電流密度分布を求め、遺伝子導入効率の実測データとの比較を行った。これにより、電氣的要因がどのように導入機序に作用しているかを明らかにした上で、細胞を組み込んだ等価回路網モデルを構築することで細胞を含めた計算を可能にした。このモデルを用いて電荷、電界、電流密度の切り分けを行い、導入に作用する主要因を推測した。その結果、電界のプラズマによる効果は通常の細胞活動における膜電位変化と同等程度で膜破壊電圧より低い一方、電流密度は通常の膜電流よりも2~3桁高いことが分かった。このことより電流密度がプラズマ遺伝子導入の主要因として寄与していると結論付けた。

この結果を受けて、最適な電流密度を高速に再現できる遺伝子導入装置の具現化を行った。電源の小型化・低コスト化のために、電源周波数を従来の20 kHzから2 MHzに変更

すべく、回路モデルを用いて高周波(2 MHz)電源を使用した際の細胞への最適な電流密度を計算し、これを踏まえて2 MHz電源を用いた遺伝子導入を実施した。装置に必要な技術課題として細胞にプラズマを照射する際の電極位置と電源出力を精細に計測・分析し超高速フィードバックをかけ制御を高精度に行う必要があり、これをFPGA(Field Programmable Gate Array)を活用することで、高速・高分解能な信号処理技術の確立を目指した。アナログ信号をデジタル信号に変換するデバイスであるADコンバータ(一秒間に二億五千万回のアナログ-デジタル変換が可能)とFPGA内でのシストリックアレイ型デジタル信号処理を組み合わせることで、処理遅延1 μs 以下と出力値の誤差2 %以下を実現するコントロール技術を開発した。また電極位置の精細な制御のため、電極が細胞液上面に接触した瞬間の電圧降下をフィードバックし位置を読み取る仕組みを開発し実装した。これにより標準細胞に対するプラズマ照射を試行した結果、安定した電圧波形を出力できることを確認した。

残された課題として、2 MHzを使用したプラズマ照射においては細胞表面を這うように放電集中して進展するという現象がしばしば発生した。これは20 kHz電源では起きていない現象である。また、細胞を観察した結果、集中した放電路に沿って細胞が死滅していることが確認された。そのため、対向電極をピン形状に変えて鉛直方向の放電進展を促進し、細胞表面での集中的な放電路の形成を防止する工夫を加えることで細胞死を低減するなどの効果を得ることができた。しかし、細胞死を十分に低減できたとは言い難く、細胞表面での集中的な放電路形成のさらなる抑制が電気面での技術課題として存在することが明らかになった。