

# 細胞内物質導入とその場観察デバイスの開発

東京大学工学部機械工学科 鷲津・小穴研究室 03130208 武井裕樹 指導教官：鷲津正夫教授

## 1.背景と目的

現在再生医療研究において、ウイルスを用いずに遺伝子を導入する安全性の高い技術が開発されている。そのうちの一つに、プラスミドと呼ばれる環状 DNA をベクターとして細胞内に遺伝子を導入する方法がある。

この方法にはオンチップエレクトロポレーションという技術が用いられることが多い。エレクトロポレーションとは、細胞懸濁液に対し電圧を印加することにより細胞膜の一部を可逆的に破壊し、そこから、電気泳動で遺伝子を導入する技術である。しかし、細胞膜にかかる電圧が細胞粒径に依存するため、一定の大きさの細胞にしかプラスミドを導入することが出来ず収率が悪いという欠点がある。

当研究室では電界集中を利用したエレクトロポレーションを採用している。オリフィスという微小な穴の空いた絶縁薄膜を電極間に設置することでオリフィス近傍に大きな電圧降下を起し、電極に印加した電圧をそのままオリフィス直上の細胞膜に印加することができる。これにより、細胞の大きさに依存することなく、低電圧で高収率なエレクトロポレーションを実現している。

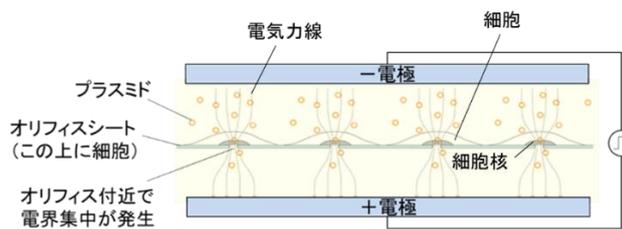


Fig.1 電界集中を用いたエレクトロポレーション

これまでは、電極に銀-塩化銀電極を使用していたために、パルス印加前後で同じ細胞を観察することができず、細胞内物質導入に関する詳細な考察が行えずにいた。そこで本研究では、光が透過可能な電極としてメッシュ電極を作製し、それを用いて、細胞内にプラスミドを導入できる、その場観察が可能なエレクトロポレーションデバイスの開発を目指す。

## 2.方法

銀塩化銀でメッシュ電極を作製するには特別な機械を要するため、既存の白金メッシュを利用して、電着により白金黒メッシュ電極を作製した。作製した電極に関してインピーダンス測定を行ったところ、白金黒電極は電極界面での分極のため、銀塩化銀電極に比べ電圧降下があるということが判明した。そこで、プラスミドの泳動距離により評価を行った。その結果、白金黒メッシュ電極は銀-塩化銀電極の半分以下のプラスミドしか細胞まで泳動できていないことがわかった。白金黒メッシュ電

極で十分な結果を得るためには、印加電圧を 3V から 5V にあげればよいと予想された。

次に、作製した白金黒メッシュ電極を用いて細胞膜穿孔の有無を確認する実験を行った。結果として、オリフィスと細胞とメッシュの位置関係を見ながら、細胞膜穿孔が生じた細胞の核が YO-PRO と呼ばれる膜非透過性試薬により染色される様子をその場観察できた。

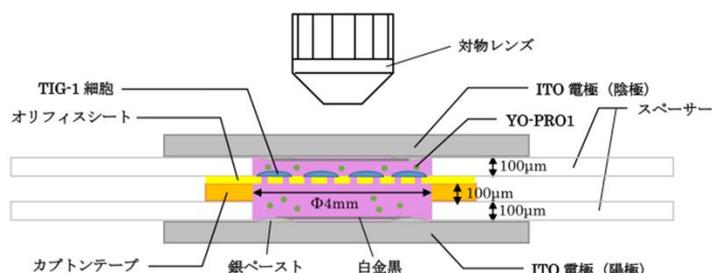


Fig.2 実験デバイス

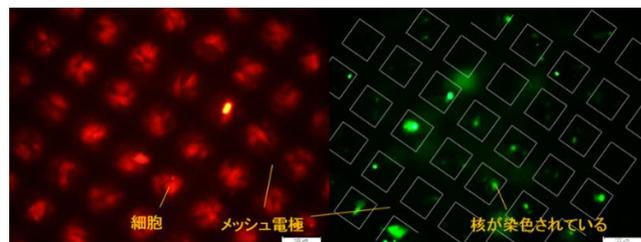


Fig.3 その場観察した様子 (左) 生細胞 (右) 核の染色

また、白金黒メッシュ電極を用いてプラスミドを導入する実験を行った。インピーダンス測定の結果のとおり、銀塩化銀電極で 3V のパルス印加したものと白金黒メッシュ電極で 5V のパルス印加したもので、同程度のプラスミド発現が確認された。

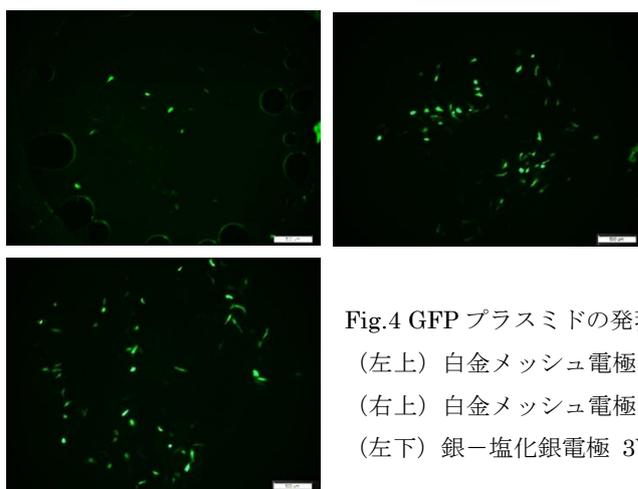


Fig.4 GFP プラスミドの発現

(左上) 白金メッシュ電極 3V  
(右上) 白金メッシュ電極 5V  
(左下) 銀-塩化銀電極 3V

## 3.結論

以上から、細胞をその場観察しながらエレクトロポレーションを行える電極を作製でき、これを用いてプラスミドを導入することが出来たといえる。