



プロジェクトレビュー プラズマバイオ融合科学への新展開

5. パルス高電界の生体作用と先端的医療応用

勝木 淳, 矢野正彦¹⁾, 光武和典¹⁾, 諸富桂子, 安部恵祐¹⁾, 矢野憲一, 秋山秀典¹⁾
 熊本大学バイオエレクトリクス研究センター, ¹⁾熊本大学大学院自然科学研究科

(原稿受付: 2011年8月18日)

Keywords:

bioelectrics, PEF, electroporation, stress response, apoptosis, cancer treatment, platelet activation

5.1 はじめに

電気ショックの生体作用に関する議論の発端は18世紀のファラデーの時代に遡る[1]。その後、19世紀末に犬の心室細動を電気ショックによって停止させる実験が行われた。1947年には初めて人体に電気ショックが使用され、今日の自動除細動装置、いわゆるAED (Automated External Defibrillator) につながっている。その他、今日では精神疾患の治療法としても利用されている。これら従来の電気ショックは神経刺激に基づいており、生体に不可逆的な変化を与えるものではない。このため、瞬時電力は除細動で用いられる比較的強い電気ショックでも高々1kW程度である。一方、時間幅1μs以下でかつ瞬時電力1MW以上の、いわゆるパルスパワーは、1960年頃から非加熱電界殺菌[2]やエレクトロポレーション[3]のように、細胞膜の構造を強制的に変化させるための手段として用いられてきた。21世紀に入り、パルスパワー発生装置の高性能化と生体分析技術の飛躍的な進歩によって、パルスパワーの生物応用が新しい展開を見せている。パルスパワーは、誘電物質の集合体である生体内において強力な電磁力として細胞を構成する部位に作用し、その構造・機能の変化をもたらす。さらに、ストレス応答などの二次的な生体反応を誘導する。しかも、パルスパワーの適用条件を調節してストレスを変化させることによって、多様な生体応答を引き出すことが可能である。このような物理ストレスで誘導される生体反応は、がん治療[4,5]や創傷治療[6]などの医療応用のほか、美容分野への応用も検討されている。パルスパワーの対象は動物細胞にとどまらず、植物の発芽促進や成長制御[7-9]、品種改良[10]のための物理刺激としても利用されている。このパルスパワーを生物に利用する分野をバイオエレクトリクス (Bioelectrics) と呼び、2004年以降単独で毎年国際会議が開催されるほど活発である。本章では、パルス高電界の生体作用と医療分野への応用に絞って最新の研究を紹介し、今後の展開についてもふれる。

5.2 パルス高電界の生体への物理作用

5.2.1 パルス電界の生体一次作用

細胞は、核、小胞体、ミトコンドリア、などのオルガネラ、核酸やタンパク質といった巨大生体分子、アミノ酸などの低分子、金属イオン、それに媒質としての水分子から成る。これらはみな誘電物質であるがゆえ、強電界下では電氣的・機械的なストレスを受ける。さらに、構造、分極、電気抵抗、粘性などの違いから、それぞれが受けるストレスは異なる。強電界の生体作用を考える上で2つの重要なメカニズムがある。最も重要なのは約8nmと薄く物質の透過性を能動的に制御する生体膜の存在である。生体膜は受動的な荷電粒子の流れを遮断するので、細胞内外の電界・電流分布に及ぼす影響は極めて大きい。外部電界に対する細胞膜の役割を理解するために、図1のような細胞単純モデルに狭帯域の交流電界を印加した場合の電界分布を

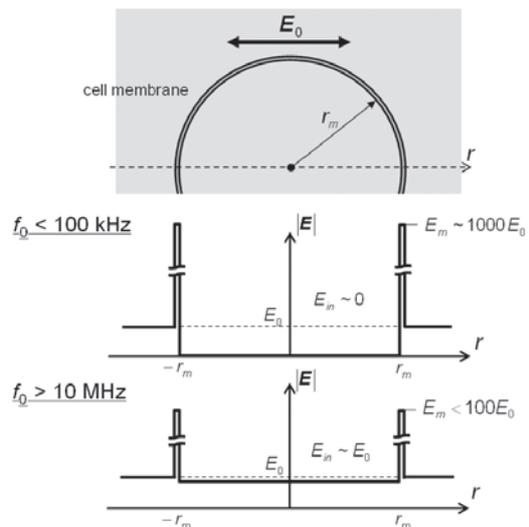


図1 生体細胞の単純モデルおよび外部交流電界下の電界分布 (模式図)。 E_0 , E_m , E_{in} はそれぞれ印加電界, 細胞膜上および細胞内部の電界。 r_m は細胞の半径, f_0 は外部電界の周波数。

5. Biological Effects of Intense Pulsed Electric Fields and Their Advanced Medical Applications

KATSUKI Sunao, YANO Masahiko, MITSUTAKE Kazunori, MOROTOMI-YANO Keiko, ABE Keisuke, YANO Ken-ichi and AKIYAMA Hidenori

corresponding author's e-mail: katsuki@cs.kumamoto-u.ac.jp

考える。相対的な関係から、細胞膜は絶縁膜、細胞内部および外部は導電性媒体とみなせる。細胞の直径を $15 \mu\text{m}$ 、細胞膜の静電容量を $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、細胞内および懸濁液の導電率を $100 \Omega\text{cm}$ として電界を計算すると[11]、周波数 100kHz 程度以下では細胞膜上の電界は外部電界の約1000倍に達する。このとき、細胞内電界はほとんどゼロである。周波数を大きくすると膜のインピーダンスが小さくなって細胞内部に電流が流れこむようになり、 10MHz を超えると細胞内電界は外部と同程度になる。図2は、振幅 $3 \text{kV}/\text{cm}$ 、持続時間 $200 \mu\text{s}$ のバースト交流電界に曝したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の顕微鏡写真である[12]。周波数 300kHz の場合、細胞膜が壊れて内部物質が漏れ出している。一方、 10MHz では一見膜の損壊は見られないが、コントロールと比べると内部構造が際立って見える。さらに 100MHz の場合、細胞膜は壊れないまま一部の細胞が膨潤化しており、明らかにコントロールとは異なる細胞内反応が起こっていると推察される。以上の議論では細胞膜について述べたが、同様の膜で覆われる核、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内オルガネラでも、周波数領域は異なるものの同様の現象が起こると考えられる。

2番目の生体作用は核酸やタンパク質などの生体高分子への物理ストレスである。生体分子は概して負に帯電し、しかも分子中で電荷が局在しているため、強電界下では結合した分子間や分子内ユニット間に静電的な強いストレスが生じる。このストレスは、条件によっては分子構造の変化をもたらす。鷺津ら[13]や金子ら[14]が $1 \text{kV}/\text{cm}$ 程度の高周波電界を用いて液中でDNA伸縮の操作を行っていることや、Schoenbachらがパルス電界によってアルツハイマー病の原因物質と見られている β アミロイドファイバーを粉砕している[15]こと等から、強電界が生体分子にとって重大なストレスとなることがわかる。さらに、分子それぞれの外部電界に対する応答時間 (誘電緩和時間) が異なることから、特定周波数の振動電界を与えることによって

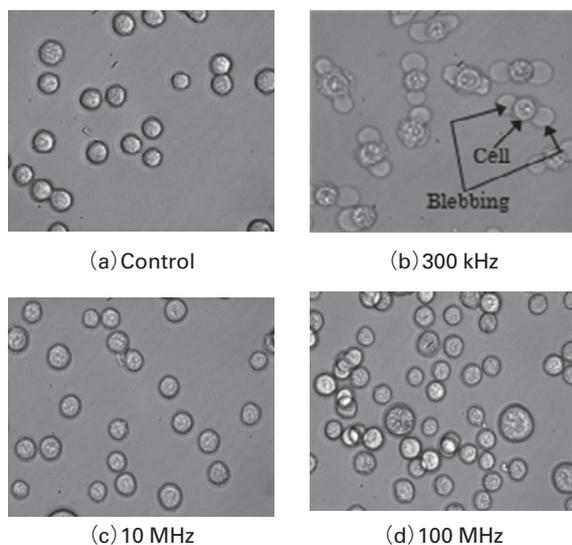


図2 バースト交流電界 ($3 \text{kV}/\text{cm}$, $200 \mu\text{s}$) を印加したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の顕微鏡写真[12] (パルス印加10分後に撮影。細胞の直径は約 $15 \mu\text{m}$)。

部位選択的にストレスを付与することが可能である。

5.2.2 細胞内ストレス反応

外部から与えられた化学または物理ストレスは細胞に何らかの構造変化をもたらす。この変化をきっかけに、生存および細胞死を導く様々なタンパク質の連鎖反応 (シグナル伝達) が起動する。結局、細胞の生死は生存シグナルと細胞死シグナルのバランスによって決定される。したがって、ストレスの種類や強さを適当に調節することによって、細胞を死に導くことができ、逆に、生存シグナルを優位にして細胞を活性化させることも可能である。

パルス電界の電界強度または印加回数がある程度以上にすると、動物細胞に自発的な細胞死 (アポトーシス: apoptosis) を引き起こす。アポトーシスとは生物個体をより良い状態に保つために引き起こされる能動的な細胞死であり、古い細胞や傷ついた細胞などの個体にとって不要な細胞は生体内で常にアポトーシスによって取り除かれている。しかし、多くのがん細胞は一部のタンパク質が機能せずアポトーシスが起こりにくい状態にある。アポトーシスは、化学物質の他、紫外線、放射線などの物理刺激によって誘導されることは知られており、2003年以降パルス電界によっても様々な動物細胞にアポトーシスが誘導されることがわかってきた。特に時間幅が 100ns 以下のナノ秒パルス電界 (nsPEF) の印加後に、ミトコンドリアの膜透過性亢進とチトクロームCの放出、カスパーゼと称するタンパク質分解酵素の活性化、小胞体からのカルシウム放出など、アポトーシスに関連する反応が様々な細胞で検出されている[16]。図3(a),(b)は、それぞれ適当な条件のパルス電界を印加したHeLa細胞の顕微鏡写真、およびアポトーシス特有のDNA断片化現象を蛍光分子プローブ (TUNEL法) によって検出した結果である。蛍光分子の蛍光輝度が強いほど細胞内DNAの断片化が進んでいること

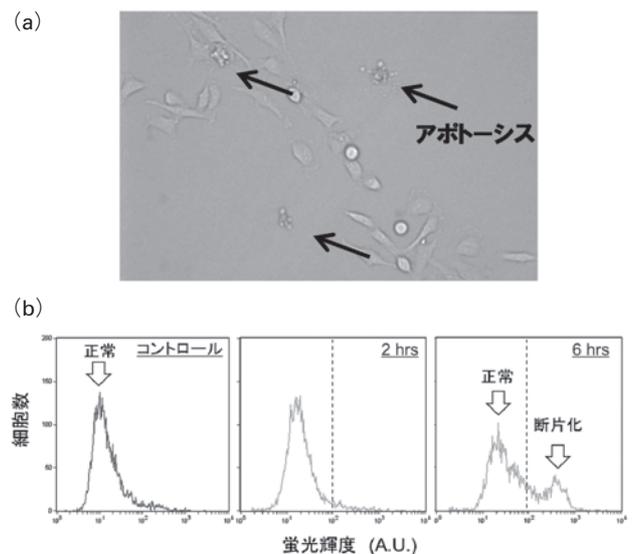


図3 ナノ秒パルス高電界 ($12.5 \text{kV}/\text{cm}$, 100ns , 100回) によるHeLa細胞へのアポトーシス誘導。(a)パルス電界によってアポトーシスを起こしたHeLa細胞。(b)アポトーシス様DNA断片化を検出する蛍光分子プローブの対蛍光輝度ヒストグラム。(左からコントロール、パルス印加2および6時間後の細胞)。

を示す。さらに、6時間程度でゆっくりと反応が進んでいることもアポトーシスであることを裏付ける。筆者らは、nsPEFによって誘導されるアポトーシスメカニズムの解明に注力している。パルス印加後、細胞膜や小胞体に関連する遺伝子発現の増加や、パルスによって細胞膜に生じた小孔（ナノポア）から流入したカルシウムイオンが細胞膜近傍のアポトーシス関連タンパク質を活性化していること等を突き止めており（図4）、メカニズムの全貌が明らかになりつつある[17, 18]。

5.2.3 過渡的温熱作用

パルスとはいえ生体に電界を印加すると生体内で少なからずジュール熱が発生する。パルスの繰り返し速度を大きくするなどして積極的にジュール加熱すると、ミリ秒から秒単位の間に数10℃の温度変化を生体を与えることができる。従来は、パルス電界の非熱作用の研究が進められてきたが、温熱療法で用いられる43~45℃を数10分間維持するような温度履歴とは異なり、パルス電界で実現可能な急峻な温度履歴が新しい生体ストレスとして注目されている。この過渡的温熱作用と電界の組み合わせによって、がん細胞に効率的にアポトーシスを誘導できることが示されている[19]。

5.2.4 細胞活性化

5.2.2節で述べたように、パルス電界の条件によっては細胞を活性化させることも可能である[12]。図5は、培養しながら細胞数を自動計測する装置（xCELLigence）を用いて得たHela細胞の細胞増殖曲線であり、適度な強さのバースト交流電界への暴露によって細胞の増殖速度が大きくなる例である。パラメータは交流電界の周波数である。繰り返しパルスのインターバルは十分長いので、処理時の温度上昇は高々7℃であり、温熱作用は無視できる。パルス印加した細胞の増殖速度はコントロールに比べて概ね大きいことがわかる。特筆すべきは増殖速度が周波数3MHzで極大になることである。電界分布計算[11]から、死に至らしめない程度の適度な電界が細胞膜に生じたときに増殖が活発になる傾向がある。最近の遺伝子解析から、パルス電界印加によって細胞周期に関わる遺伝子の発現量が変化するなど、メカニズム解明のための情報が集まりつつある。

5.3 医療・健康分野への応用

5.3.1 がん治療

前節で述べたように、ナノ秒パルス高電界（nsPEF）を用いると薬剤を用いずにがん細胞にアポトーシスを誘導することができる。図6は、マウスの脚で成長させたメラノーマ（Melanoma, 悪性黒色腫）をクリップ式の電極で挟んでnsPEF処理（40 kV/cm, 300 ns, 100回）を定期的に繰り返した場合の患部の回復状況を示したものである[4]。左列は患部背後から照射した光の透過光、右列は表面の様子である。この場合、日数の経過とともにがんが縮小し結果的に65日で完治している。メラノーマに対しては臨床実験も進んでいる[20]。このように、nsPEFは一部のがんに対して、培養細胞と組織のいずれに対しても不

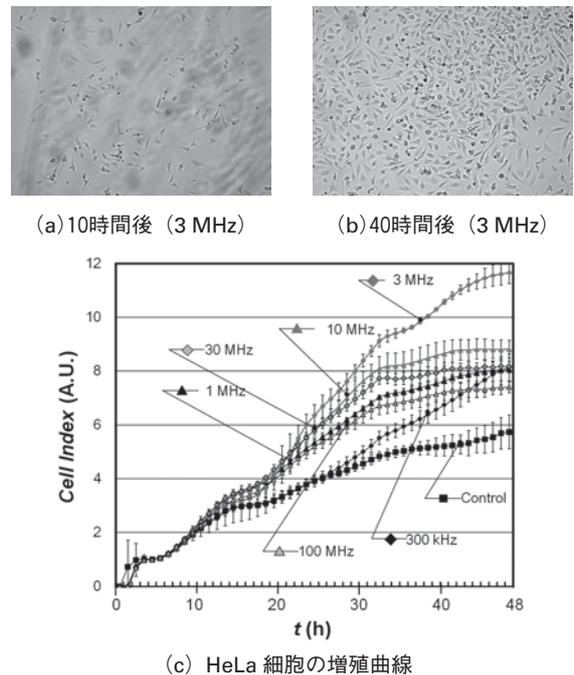


図5 適度なバースト交流電界を印加した細胞の顕微鏡写真と増殖曲線（t=4hの細胞数で正規化）。バースト交流電界は、振幅3 kV/cm, 持続時間200 μs, 印加回数30回を一定とし、周波数を0.3-100 MHzの範囲で変化させた。

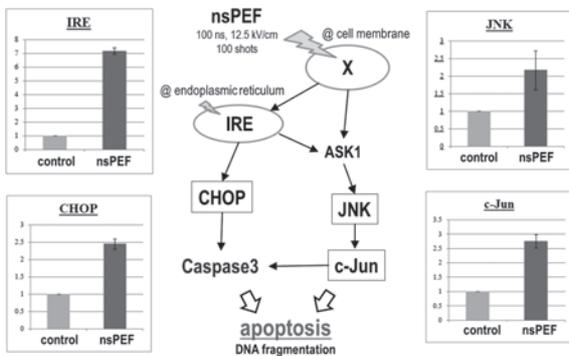


図4 nsPEF印加後のアポトーシス関連遺伝子の発現解析結果とアポトーシス関連シグナル経路。IRE, CHOP, JNK, c-Jun, caspase3, X(未特定)はタンパク質。棒グラフは各タンパク質をコードする遺伝子の発現量（左がコントロール, 右がパルス印加2時間後）。

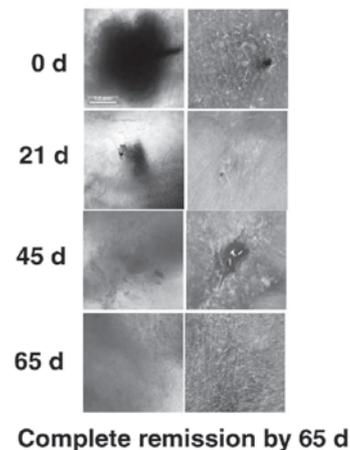


図6 nsPEFによるマウスメラノーマ(M116)の治療[4]。nsPEF処理（40 kV/cm, 300 ns, 100回）を0, 1, 2, 21, 22および23日目に実施。左列は患部の透視像, 右列は表面の様子である。

活化効果があることが確認されている。現在、他種のがんに対する効果が調べられている。

パルス高電界の細胞膜穿孔作用をドラッグデリバリー (Drug Delivery) として利用することも可能である。抗癌剤を患部に経皮投与した直後に電極をあててエレクトロポレーションを施すと薬剤は即座に患部の細胞で吸収されて効果を発揮する。この治療法を電気化学療法 (Electrochemotherapy, ECT) と呼び、欧米で臨床研究が進められている [5, 21]。

身体の深部のがんに対してパルス電界を使えるようにするために、2つの電界印加方式が検討されている。1つ目は内視鏡手術で用いられるような器具に電極を取り付けるなどして、体内に電極を持ち込んで電界を患部に直接印加する方法である。2つ目は、体外で発生させたパルス電磁エネルギーを電磁反射鏡等によって非侵襲的に体内患部に収束させる方法である。図7は回転楕円体反射鏡の第1焦点 ($z=0.15$ m) 付近に設置したアンテナから放射された800 MHzのパルス電磁波が第2焦点 ($z=0.4$ m) 付近に収束する様子を表している (シミュレーション)。電磁波の整合性のため、システムは体内と同等の誘電率の液体中に設置される。皮下脂肪による電磁エネルギーの吸収や臓器等の体内組織の電磁特性を考慮した高度なアンテナ設計が要求される。

5.3.2 創傷治療

nsPEFは出血を伴う創傷の治療にも効果がある。創傷治療とは、血小板を活性化させ生体本来の機能によって傷口を塞ぐことである。血小板は、通常の血液の中では滑らかな表面であるが、出血時には刺激物質により多数の長い突起を出し金平糖のような形になる (図8)。同時に新たに細胞膜上に細胞接着因子が発現し凝集する。血小板は血管内皮に接着・凝集して傷口を塞ぎ、一次止血栓を形成する。その後、血小板から各種凝固因子が放出されて、血液にあるフィブリンが凝固し、二次止血栓が形成されて止血が完了する。nsPEFは血小板を活性化させる作用があることがわかってきた。カルシウムは血小板の活性に関わる作用物質であり、nsPEFによって細胞膜に形成されるナノポアを通して外部から、または小胞体からカルシウムを放出させる [6]。血小板に限らず皮膚組織に対しても5.2.4節で述べた活性化作用があり、複合的な作用によって治療が促進されると考えられる。

5.4 まとめと今後の展望

パルスパワーはユニークな新規生物刺激法であり、その一形態であるパルス高電界の生体作用と医療応用の一部を紹介した。その他にも細胞分化制御などの試みが行われている。医療応用研究は、国際的な枠組みの中で、メカニズム解明・制御をめざした基礎研究と臨床などの応用の2つの方向があり、国内では前者、欧米では主に後者が進められている。医療応用を進めるためには医薬系研究者と産業界を巻き込んだ体制が不可欠である。そのために、着実な研究成果に基づくバイオエレクトロニクスを医薬業界に訴え続けることが肝要である。

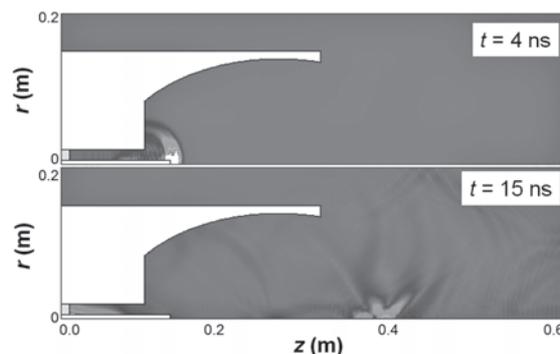


図7 非侵襲的体内パルス電磁エネルギー照射システムの水中心電磁波伝搬シミュレーション (800 MHz, 10 ns パースト)。



(a) 不活状態

(b) 活性化状態

図8 nsPEF電界による血小板の活性化 [6]。

本章では医療分野に限定し述べたが、パルスパワーの物理刺激は、食品、農業、漁業、環境など、生物に関わるあらゆる分野で利用できる。現在、農業応用が最も進んでおり、パルスパワーの利用価値が広く認知されるようになった。他分野においても大きな可能性を秘めており、今後の展開が楽しみである。

参考文献

- [1] R. Becker, G. Selden, *The Body Electric* (William Morrow New York, 1987).
- [2] A. Sale and J. Hamilton: *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 789 (1967).
- [3] E. Neumann and K. Rosenheck: *J. Membrane Biol.* **10**, 279 (1972).
- [4] R. Nuccitelli, U. Pliquett, N. Chen, W. Ford, R.J. Swanson, S.J. Beebe, J.F. Kolb and K.H. Schoenbach, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **343**, 351 (2006).
- [5] S.B. Dev, D.P. Rabussay, G. Widera and G.A. Hofmann, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**, 206 (2000).
- [6] S.J. Beebe, P.F. Blackmore, J. White, R.P. Joshi and K.H. Schoenbach, *Physiol. Meas.* **25**, 1077 (2004).
- [7] S. Tsukamoto, T. Maeda, M. Ikeda and H. Akiyama, *Proc. 14th IEEE Int. Pulsed Power Conf.*, 2003, **2**, 1116 (2003).
- [8] K. Takaki, K. Kanetsawa, N. Yamazaki, S. Mukaigawa, T. Fujiwara, K. Takahashi, K. Yamasita and K. Nagane, *Proc. 16th IEEE Int. Pulsed Power Conf.*, 2007, **2**, 1253 (2007).
- [9] C.J. Eing, S. Bonnet, M. Pacher, H. Puchta and W. Frey, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat.* **16**, 1322 (2009).
- [10] D. Wang, X. Lin, K. Hirayama, Z. Li, O. Takeshi, W. Zhang, T. Namihira, S. Katsuki, H. Takano, S. Takio and H. Akiyama, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **38**, 39 (2010).
- [11] N. Nomura, M. Yano, S. Katsuki, H. Akiyama, K. Abe and S-I. Abe, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat.* **16**, 1288

- (2008)
- [12] M. Yano, K. Abe, H. Akiyama, S. Katsuki, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. *in print* (2011).
- [13] M. Washizu and O. Kurosawa, IEEE Trans. Industry Applications **26**, 1165 (1990).
- [14] Y.F. Li, T. Kaneko and R. Hatakeyama, Small **6**, 729 (2010).
- [15] K.H. Schoenbach, A. Munyanyi, Y. Sun, L.H. Greene, R.P. Joshi, J.T. Camp and J.C. Collin, Proc. 2011 Int. Bioelectrics Symp. 12 (2011).
- [16] K.H. Schoenbach *et al.*, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. **14**, 1088 (2007).
- [17] K. Morotomi-Yano, Y. Uemura, S. Katsuki, H. Akiyama and K-I. Yano, Biochem. Biophys. Res. Comm. **408**, 471 (2011).
- [18] M. Yano, M. Yano, K. Abe, S. Katsuki and H. Akiyama, Proc. 18th IEEE Int. Pulsed Power Conf., 2011, *in print* (2007).
- [19] S. Katsuki, K. Mitsutake, M. Yano, H. Akiyama, T. Slauto and H. Kai, IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insulat. **17**, 678 (2010).
- [20] R. Heller, K.H. Schoenbach, J.F. Kolb, S. Xiao, S.J. Beebe, M. Malik, B. Hargrave and L. Heller, Proc. 2011 Int. Bioelectrics Symp. 5 (2011).
- [21] G. Sersa, I. Edhemovic, E. Brecej, D. Miklavcic, B. Kos, A. Zupanic, B. Mali and J. Tomaz, Proc. 2011 Bioelectrics Symp. 15 (2011).