

強電界パルスを用いた細胞内イオン輸送制御 Controlling Intracellular Ion Mobilization Using Intense Electrical Pulses

勝木 淳, 大西伸明
Katsuki, Sunao, Ohnishi, Nobuaki

熊本大学 パルスパワー科学研究所
Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto University

はじめに

生体を強い電界にさらすとジュール加熱や誘電損によって温度が上昇するが、電界の作用時間を極めて短くすると、温度はほとんど上昇せず静電気力に基づく非熱的作用が顕著になる。この強い作用は、細胞とその構成体に可逆的また不可逆的な構造的、機能的または環境の変化を与える。さらに、場合によってこの変化をきっかけとして、ストレス応答やプログラム死、増殖活性化などの多様な生理現象が誘引される。パルス強電界の非熱的作用をがん治療などの医療や農業・食品分野に利用する試みが日米欧で盛んに進められており、この分野を総じてバイオエレクトリクスと呼ぶ。

強電界パルスの直接的な生体への非加熱作用として、膜への電界集中、イオンの駆動、タンパク質や核酸への静電的ストレスである。場合によってはジュール加熱による急激な温度変化を与えることもできる。細胞は誘電物質の集合体であるため、物理作用はパルス波形や電界強度に依存する。本報告では、上述の非加熱的作用によって生じる過渡的なイオン輸送とその外部条件依存について述べる。

実験条件および方法

細胞にはヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa, ATCC CCL-2) を用いた。細胞は FBS とペニシリンを加えた DMEM 培地中において 5%CO₂, 37°C でインキュベートした。本研究では Ca²⁺ を観察する。理由は、Ca²⁺ はセカンドメッセンジャーとして様々な生体応答の初期段階で極めて重要なはたらきがあること、さらに、Ca²⁺ 検出試薬 Fluo 8 の応答が高速かつ感度が高いこと、の 2 つである。Ca²⁺ 検出のプロトコルは次の通り。まず Fluo 8 を培地に添加して 30 分間インキュベート

し、細胞内に取り込ませる。その後、細胞を洗浄して試薬を含まない培地に入れ替える。こうして、細胞内だけに Fluo 8 が存在する状態となる。

図 1 は、顕微鏡下のガラス底皿中央に置いた Pt 製のマイクロギャップ電極である。電極先端の厚みは 200 μm 、対向部分の長さは約 1 mm であり、間隔は 50 μm まで短縮できる。この電極に図 2 に示すパルス幅 20 ns, 500 ns, 10 μs の 3 種類の電圧を印加し、高電界の空間を形成する。20 ns 用のパルス電源は伝送線路と放電スイッチで構成

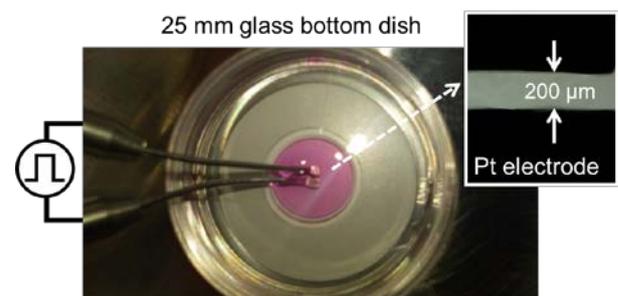


図 1 細胞内イオン観察用マイクロギャップ電極

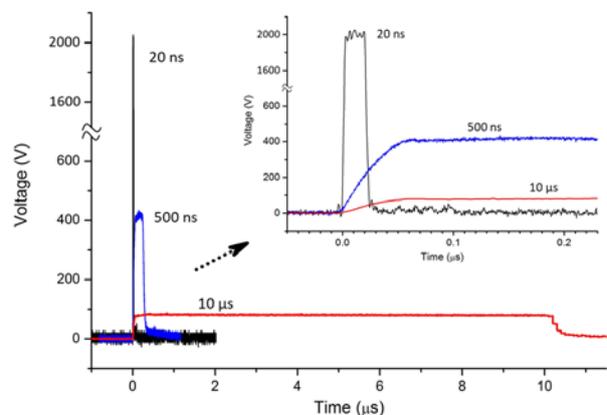


図 2 マイクロギャップ電極に印加するパルス幅 20 ns, 500 ns および 10 μs の電圧波形

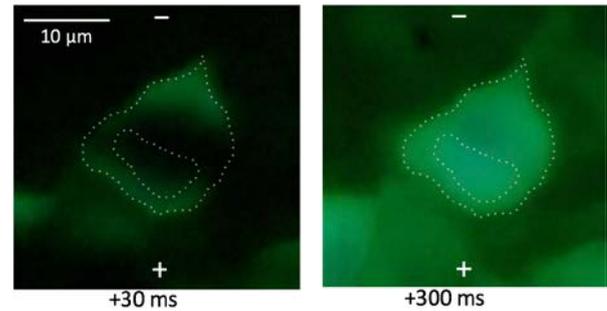
し、500 ns と 10 μ s のパルスは、Behlke 社のパワー-MOSFET モジュールを用いて切り出した。なお、本研究において細胞に印加するパルスは 1 回である。パルスの細胞への作用および二次的な生理現象は蓄積されるため、パルスを受けた細胞はフレッシュ細胞とは異なると考えられるためである。

実験結果及び考察

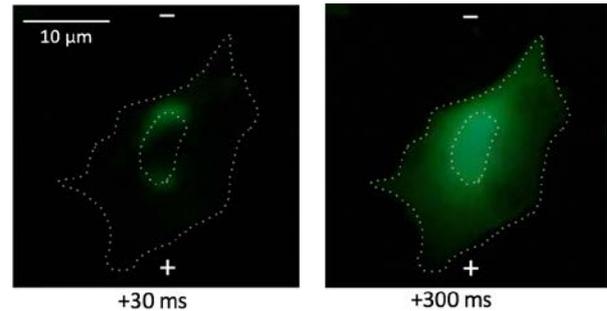
Ca イオン (Ca^{2+}) はセカンドメッセンジャーと呼ばれ、様々な生体反応のトリガー因子としての役割がある。そのため、細胞内の濃度は細胞外の 1 万分の 1 と低く抑えられており、わずかな濃度変化が様々な生体反応を惹起する。パルスを印加した動物細胞に見られる様々な生理現象の上流では Ca^{2+} 濃度の過度な上昇が生じていることが多い。

図 3 は、時間幅が 10 μ s と 20 ns の 2 種類の単極性強電界パルスを 1 回印加した直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の分布である。ここで、パルス毎の電界強度が異なることに注意されたい。10 μ s では 4 kV/cm, 20 ns では 100 kV/cm である。これらは、それぞれのパルス幅において Ca^{2+} 濃度変化が顕著になる最小値である。結果的に、各パルス間で電極間に入る電気エネルギーがほぼ等しくなった。いずれのパルスにおいても印加直後に Ca^{2+} 濃度が瞬時に上昇する。しかしながら、その出現箇所やその後の挙動はパルス間で異なる。

パルス幅 10 μ s の場合、電界に沿った方向の細胞の縁部から Ca^{2+} が出現している。これは、電界による細胞内 Ca^{2+} の流動と細胞外からの膜を通じた流入によるものである。この後、約 300 ms の間に細胞内全体に広がる。一連の現象は、いわゆるエレクトロポレーションとその後の拡散として理解できる。一方、20 ns パルスの場合、 Ca^{2+} は核近傍の電界方向のみから出現し、これが約 300 ms の間に核を覆うように広がる。実際は、細胞内 Ca 貯蔵庫である小胞体からの放出であることが、別実験によって明らかとなっている。また、この場合においても Ca 濃度上昇が必須である。20 ns パルスの周波数帯域は 100 MHz に及ぶので、細胞内に入った強電界が小胞体の Ca^{2+} チャネル IP_3 レセプターなどを刺激する。20 ns の場合は、 Ca^{2+} 濃度上昇とイオンチャネル刺激の両方が揃ったときに起こっている。



(a) 10 μ s, 4 kV/cm



(b) 20 ns, 100 kV/cm

図 3 強電界パルス印加直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (HeLa 細胞. Ca^{2+} 検出薬 Fluo-8. 明るさ (緑) は細胞内 Ca^{2+} 濃度. 点線は細胞および核の輪郭. 数字はパルス印加後の経過時間. 電界は上向き.)

結言

本論文では、強電界パルスの印加直後に細胞内で起こる Ca^{2+} 濃度上昇について述べ、パルス幅に依存する 2 つのメカニズムを提案した。10 μ s の場合は膜を介した外部からの流入である。一方の 20 ns の場合は、小胞体の膜タンパクの刺激によって小胞体から放出される。このように、生理メカニズムである細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を強電界パルスという物理刺激によって誘引することができた。しかも異なる 2 つのメカニズムを操作因子である電界のパルス幅と強度で誘引した。このことは、他の細胞内の様々な生理機能を制御できる可能性を示すものである。

なお、本研究は科学研究費 (17H03220) のもとで実施した。