

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13921

研究課題名(和文) ナノ秒電界穿孔と薬剤液滴の帯電ジェット化による低損傷高効率薬剤注入システム

研究課題名(英文) Innovative rapid processing for persistent wastewater using a gas-liquid plasma reactor

研究代表者

安岡 康一 (YASUOKA, Koichi)

東京工業大学・工学院・教授

研究者番号：00272675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物皮下組織への薬液投与や遺伝子導入など、細胞膜を介した薬液導入技術の研究開発が進んでいる。本研究では同軸2重円筒構造のブルームライン線路を使用してピーク電圧10 kV、半値幅8 nsのナノパルス電圧を発生させ、20 kV/cm以上の電界による細胞壁穿孔と薬液導入研究を実施した。大腸菌(ATCC25922)懸濁液にヨウ化プロピジウムおよび蛍光色素SYTO9を加えて、ナノ秒パルス電圧を印加した。ナノ秒パルス電界は大腸菌の生残率100%の状態でも薬液導入を可能にし、周波数条件、印加電圧時間を制御することで、薬液導入率40%以上を達成可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Electropermeabilization or electroporation of the membranes can induce reversible defects of the membrane to allow direct access of external molecules into the cell. We examined the effectiveness of 8 ns full width at half maximum electric pulse with a field strength over 20 kV/cm on the permeabilization of Escherichia coli (E. coli) using a fluorescent microscope and two different stains. Nanosecond electric pulses successively permeabilized E. coli cells without damaging the living cells. The uptake ratio of propidium iodide (PI) dye was a function of pulse frequency and the ratio increased over time up to 40%. Cell viability was nearly 100% under different treating conditions.

研究分野：高電圧プラズマ工学

キーワード：ナノ秒パルス 電界穿孔 大腸菌 生残率

### 1. 研究開始当初の背景

生物皮下組織への薬剤投与や動植物細胞の形質転換およびDNA注入など、細胞膜を介した薬剤注入は多岐にわたる。従来から用いられている注射針方式は針先を生体深部へ到達させるにつれて細胞の損傷が増し、生体の痛みも増す。これに対して電気穿孔法では、細胞膜を挟んで強電界  $E$  ( $>kV/cm$ ) を加えると細胞内部の正負イオンが電界方向に分離し、逆極性のイオンが作る圧縮応力により膜破壊が発生して薬剤の注入が可能になる。通常細胞壁の破壊を防止するためマイクロ秒のパルス電界が使用されるが、さらに損傷が少ないと期待されるナノ秒電界による電解穿孔および薬液中効果については、これまで明らかになってこなかった。

### 2. 研究の目的

細胞膜の損傷を最小化し、生体・細胞への影響を極小化するため、注射針先端の極細径化や電界により膜を破壊する電気穿孔法(エレクトロポレーション)などが開発されたが、依然として細胞膜破壊は存在し、また細胞内部への効率的な薬剤注入法は確立されていない。本研究ではナノ秒パルス強電界により細胞膜の穿孔面積を極小化し、細胞の自己修復時間の極小化により膜損傷の影響を低減して、薬剤を細胞内部へ導入する可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

図1にナノ秒パルス発生回路を示す。ブルームライン回路はフライバックコンバータで充電し、ギャップスイッチの絶縁耐圧を超えた時点で、ブルームライン線路からナノ秒パルスが発生する。ブルームライン線路は同軸二重円筒構造で、中央導体、内部導体、外部導体の長さはそれぞれ1.2 m, 0.8 m, 1.0 mであり、外径はそれぞれ20 mm, 50.8 mm, 127 mmとした。線路の特性インピーダンスは108  $\Omega$ となった。

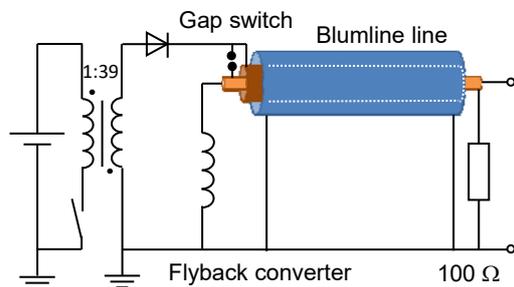


図1 ナノ秒パルス発生回路

図2は大腸菌懸濁液にパルス電界を加える電極部で、ステンレス製の球電極と平板電極で構成した。球電極の直径は32 mm, 平板電極との間隔は2.6 mmとした。この間に大腸菌懸濁液を入れたが、液高さは2.6 mm, 直径は約5 mm, 体積50  $\mu L$ の円柱になるように調整した。この場合大腸菌にかかる最大

電界は27 kV/cmとなった。

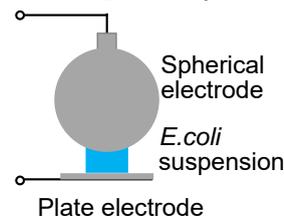


図2 電極部

薬液の導入対象として大腸菌(ATCC25922)を用いた。培養した大腸菌を8.5 mg/LのNaCl濃度の生理食塩水に懸濁した。ナノ秒パルス電界印加後は懸濁液を寒天培地に塗って37°Cで培養し、コロニーカウント法を用いて生残率を測定した。またPI(propidium iodide)とSYTO9の2種類の蛍光染色液を用いて実験を行った。このうちPIは死亡した細胞および電界穿孔で穴があいた細胞のみ取り込まれる。またSYTO9は死亡や穿孔にかかわらず細胞に取り込まれる性質がある。両薬液がとりこまれた細胞数を比較して染色率を計算した。

なお電界印加後の懸濁液はプレパラート上で蛍光顕微鏡(Olympus製, IX73)を使って蛍光染色観察した。SYTO9は励起波長480 nmで蛍光波長500 nm, PIは励起波長490 nmで蛍光波長635 nmである。なお、蛍光観察は800倍で行い、デジタルカメラで撮影した後に画像処理ソフトを用いて染色細胞数を計測した。

生残率測定は大腸菌濃度  $5 \times 10^3$  CFU/mLで、ブルームライン線路の充電電圧10 kVで行った。生残率はパルス電界印加後に生存する大腸菌数  $N_s$  で初期の大腸菌数を除して求めた。

### 4. 研究成果

図3に大腸菌懸濁液がある場合とない場合のパルス電圧波形を示す。懸濁液があると負荷インピーダンスが低下するため出力電圧ピーク値は低下する。第一半波のパルス半値幅は約8 nsとなった。

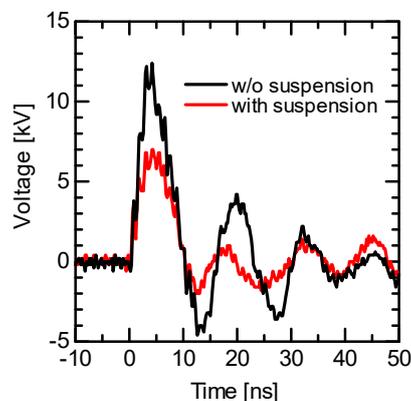


図3 パルス電圧波形

図4は周波数100 Hzの条件で電界印加時

間を 10, 30, 60 s と変化させた場合の生残率を示す。これよりパルス電圧の印加によって大腸菌の生残率が低下することは見られなかった。

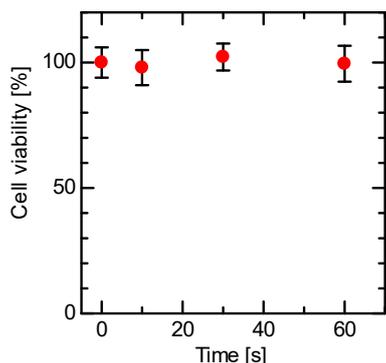


図4 パルス電圧印加時間と生残率の関係

次に電界印加時間を 10 s 一定として、パルス電圧の繰り返し周波数を 10, 50, 100 Hz と変化させたときの生残率を図5に示す。この場合もパルス電圧印加の影響は小さく、ナノ秒パルス電圧印加によって大腸菌が死滅する可能性は非常に低いことが分かった。

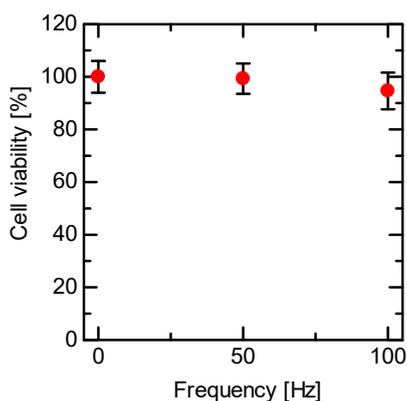


図5 周波数変化と生残率の関係

蛍光顕微鏡による観察例を図6に示す。この場合は大腸菌懸濁液の温度を上げて大腸菌がほぼ死滅した状態で測定した。図6(上)が SYTO9 による染色, 図6(下)が PI による染色例である。大腸菌は高温で死滅しているため細胞壁は損傷を受け, この結果 PI によって染色されていることが分かる。

図7に 7 kV 充電で 50 Hz のパルス電界を 10 秒間印加した場合に, 図7(上)に SYTO9, 図7(下)に PI による染色結果を示す。SYTO9 による染色は明瞭であるが, PI 染色による蛍光強度は明らかに低下し, 一部の細菌が染色されていることが分かる。これはナノ秒パルス電圧の印加後も細胞死滅していないが, 電界穿孔によって薬液導入が行われた結果を示していると考えられる。

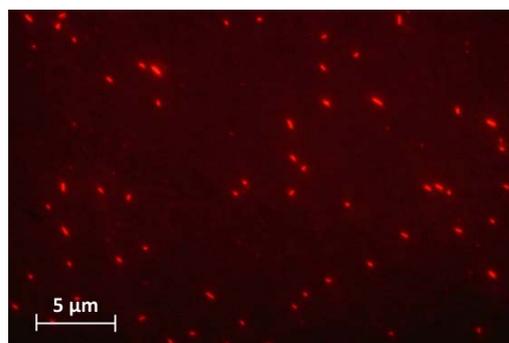
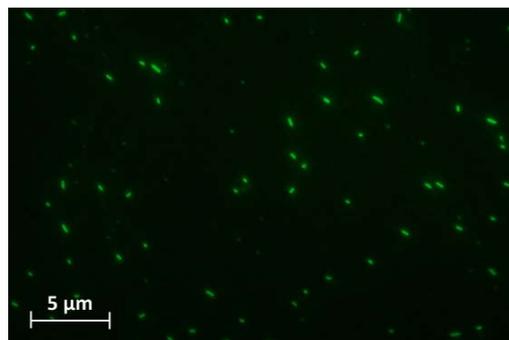


図6 蛍光写真例: (上) SYTO9, (下) PI

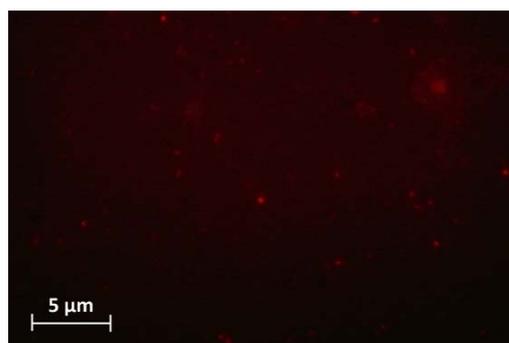
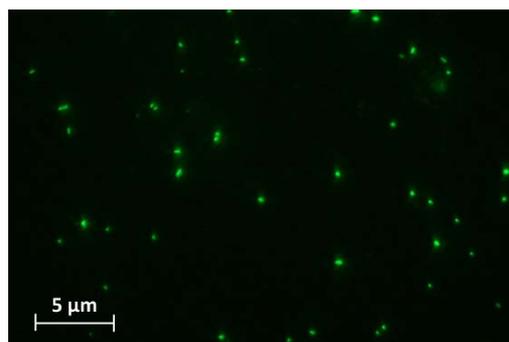


図7 ナノ秒パルス電圧印加後の SYTO9 染色結果 (上) と PI 染色結果 (下)

繰り返し周波数 100 Hz の場合の導入率とパルス電圧印加時間の関係を図8に示す。導入率は時間経過とともに上昇し, 次第に飽和傾向がみられる。60 秒のパルス電圧印加で 47% の薬液導入が実現した。

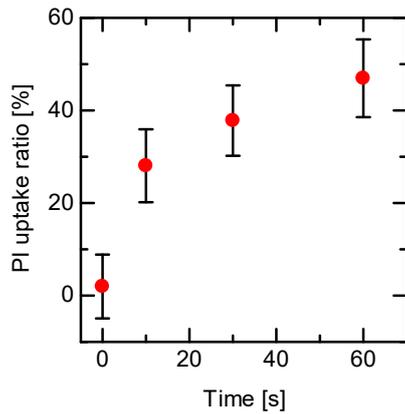


図8 導入率とパルス電圧印加時間の関係

次に周波数を変化させた場合の導入率変化を図9に示す。50 Hzでは約40%だったのに対して100 Hzでは25%程度にまで低下した。細胞壁の再生時間が10  $\mu$ s以下であるとすると、パルス間の電圧休止時間は十分長いと考えられるため、局所的な温度上昇が影響したものと考えられる。

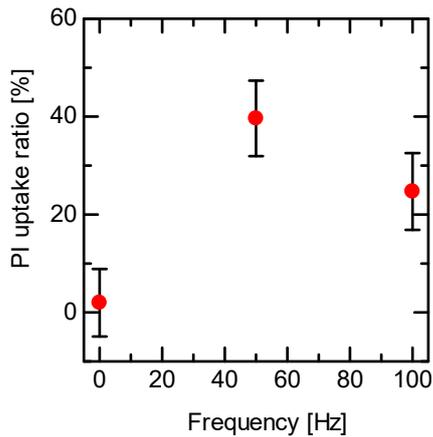


図9 導入率と周波数の関係

以上より、ナノ秒パルス電圧印加によって細胞壁を電界穿孔し薬液導入することに成功した。ナノ秒パルス電圧は細胞を死滅させることなく、細胞壁を電界穿孔して薬液注入が可能である可能性を見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

1. Y. Kamiya, K. Yasuoka, Cell membrane perforation of e.-coli by high-voltage nanosecond electric pulses, Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications on Plasma Technology

PSPT-9, 2015 (長崎, 日本)

2. 中山恭太郎, 神谷佑, 安岡康一, ナノ秒パルス電界を用いた大腸菌への薬液導入, 第17回静電気学会春期講演会, 2016 (東京, 日本)
3. K. Nakayama, Y. Kamiya, and K. Yasuoka, Comparison of nanosecond plasma and an electric field for cell membrane permeabilization, International Conference on Gas Discharges and Their Applications, 2016 (名古屋, 日本)
4. K. Yasuoka, K. Nakayama, Y. Kamiya, T. Honto, R. Suganuma, Cell membrane permeabilization by nanosecond electric pulses, Int. Conf. Electrostatic Precipitation, 2016 (Wroclaw, Poland)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安岡 康一 (YASUOKA, Koichi)

東京工業大学・工学院・教授

研究者番号: 00272675