

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：81406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05965・19K21119

研究課題名(和文)電界攪拌技術を適応した医療応用向け新規電気穿孔法の開発

研究課題名(英文)Development of the new electroporation method for medical applications by electric field mixing technology

研究代表者

大久保 義真 (OKUBO, YOSHINOBU)

秋田県産業技術センター・先進プロセス開発部・研究員

研究者番号：30826532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、我々秋田県産業技術センターでは、電界を用いることで、攪拌子などを用いずに非接触で液滴を3次元的に攪拌する技術である、電界攪拌技術の開発を行ってきた。本研究において、本技術を生きた状態のヒト培養細胞への物質取り込み時に適応したところ、拡散による取り込みに比べ、2倍程度の効率で物質の取り込みが行われることが観察された。本技術の適応により、ヒト培養細胞の細胞膜を拡散によっても透過し得る物質では、その取り込み効率を大幅に向上させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、電界攪拌技術を生きた状態のヒト培養細胞への物質取り込み時に適応したところ、拡散による取り込みに比べ、2倍程度の効率で物質の取り込みが行われることが観察された。ヒト培養細胞において、非接触でかつ化学物質を用いず、さらに細胞にダメージをほとんど与えない物質導入系は画期的なものである。本研究により確立された手法による取り込み効率向上という結果は、たとえば、ガン細胞への効率的な抗がん剤などの物質導入手法であったり、不妊治療時の卵子への精子遺伝子の導入など、広義の応用を可能とするものである。

研究成果の概要(英文)：Until now, we have been developing electric field mixing technology, which is a technology for stirring droplets three-dimensionally without using a stirrer by using an electric field without using a stirrer.

In this study, it was observed that when the present technology was applied to the uptake of a substance into a human cultured cell in a living state, the uptake of the substance was about twice as efficient as the uptake by diffusion.

It was suggested that the application of the present technology can significantly improve the uptake efficiency of a substance that can penetrate the cell membrane of human cultured cells even by diffusion.

研究分野：生化学

キーワード：電界攪拌技術 細胞工学 生化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子生物学や生化学において、ヒト細胞やその他動物・植物細胞に対して、遺伝子の本体である DNA や、その転写産物である RNA、あるいは翻訳後のタンパク質を導入する実験手法は、様々な生命現象を理解する上で必要不可欠である。例えば、DNA を導入する手法は、新たな形質を細胞や個体に持たせることができるため、遺伝子治療に応用されている。断片化した短い RNA を細胞へ導入する手法は、RNA 干渉法と呼ばれる細胞内タンパク質を顕著に減らす実験に用いられ、その後の細胞を調べることで、タンパク質の機能を知る手がかりとなる。タンパク質を細胞へ導入する手法は、がんの免疫療法の際に、樹状細胞へ抗原タンパク質を取り込ませ、獲得免疫を得るために用いられている。

したがって、生命科学の基礎研究を進める上でも、その知見を個別化医療などの医療に応用する上でも、遺伝子や RNA、タンパク質を細胞への導入を安価に簡便に、そして安全に行う方法の確立をすることは極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

これまでに、所属する秋田県産業技術センターにおいては、電界攪拌技術を開発してきた。この電界攪拌技術は、液滴を空気の層をもうけて電極間におき、電圧のオンオフを繰り返すことで、液滴自体には電流を流さずに、液滴を上下に動かし、それと連動した内部の物質を攪拌する技術である。この技術は特許化、論文化されており、さらには医療分野にも応用されている。電界攪拌技術はこれまで、タンパク質同士の反応である抗原-抗体反応に応用され、その反応時間をこれまでの 153 分から 19 分と大幅に短縮することを可能にしてきた。この電界攪拌技術を利用した機械はすでに製品化され、さらに上市を行なっている。

本研究では、この電界攪拌技術と細胞への物質導入方法の一つである電気穿孔法を組み合わせることにより、低毒性、高効率な新規電気穿孔法の確立をすることを目的とした。電気穿孔法は、数ミリ秒オーダーの電気パルス細胞に与えることで、細胞膜に一時的に穴を開ける方法である。簡単なシステムで高効率な導入が可能であるが、電気パルスの刺激により、系に含まれる細胞の生存率が低下することが示唆されている。

これまでの一般的な電気穿孔法は、浮遊状態の培養細胞へ電気パルスを加えることで行われてきた。本研究では、浮遊状態にした細胞と目的導入産物を、電界攪拌により混和した直後に、電気パルスを細胞に加える技術を開発することで、今までの系とは異なる独創的な手法の確立を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、始めに電界攪拌技術をヒトの培養細胞である HeLa 細胞に対して、生存率を低下させずに施すことができるかの検討を行った。電界攪拌技術は、これまでヒトの組織検体において使用されていたが、生きた細胞に施されたことはなかった。本研究における、電界攪拌技術のヒト培養細胞への適応により得られる知見は、これまでにないものとなった。

次に、電界攪拌技術を用い物質の取り込み効率の変化が起こるか否かの検討を行った。これは、ヒト培養細胞と、核染色試薬である Hoechst33342 との混合液を電界攪拌技術により攪拌を行い、培養細胞の核の染色効率が向上するかを検討したものである。以上のヒト培養細胞という材料と、電界攪拌技術や核染色などの手法を用いることで研究を進めた。

4. 研究成果

これまで、我々秋田県産業技術センターでは、電界を用いることで、攪拌子などを用いずに非接触で液滴を 3 次元的に攪拌する技術である、電界攪拌技術の開発を行ってきた。本技術はこれまでに、がん手術における術中診断用免疫染色法に応用され、免疫染色における抗原抗体反応を迅速化することで、その診断に要する時間の大幅な短縮を可能とし、術後の生活の質の向上に貢献してきた。本研究ではこれまで DNA などの細胞への導入に用いられてきた、ごく短時間の電気刺激を細胞に与えることにより細胞膜に微細な穿孔をし、外部の物質を導入する方法である電気穿孔法(エレクトロポレーション)と、これまで開発してきた電界攪拌技術を組み合わせることで、新たな高効率細胞導入法の技術確立に向けた、技術の開発をすることを目的とした。

研究成果 1

研究成果の一つ目として、電界攪拌技術をヒト培養細胞に施した際の生存率の測定を行い、ヒト培養細胞において、生存率の顕著な低下が見られないことを明らかにした。

本研究においては、これまで誰も行なっていなかった、電界攪拌技術の生きたヒト培養細胞への応用を行なってきた。本研究のモデル細胞として汎用のヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて実験を行なっている。HeLa 細胞はヒト女性の子宮頸がんを由来とする細胞であり、湿度、温度、二酸化炭素濃度などを整えるため



上部からの図



側面からの図

図 1 細胞含有液滴の作成

のインキュベーター及び、細胞への安定な養分供給をするための、グルコースを含む液体培地を用いることで、細胞の培養を行なった。接着状態の HeLa 細胞に対して、トリプシンによる酵素処理を施すことで、浮遊状態とし、その状態の HeLa 細胞に対して、電界攪拌を行なった。電界攪拌は直径 27 ミリの穴の中に 1.5ml の細胞を含む培地を滴下し、図 1 で示すような液滴を形成した上で施している。

図 1 の液滴状とし、電極間距離 9.60mm、電圧 4.5kV、周波数 18Hz として、電界攪拌を 5 分、30 分と施した。その後、再びシャーレに細胞をまき接着状態とした。翌日、接着した細胞に対して、トリプシン処理後、死細胞染色薬であるトリパンブルー染色薬を用いて、死細胞の有無を測定した。

顕微鏡下における観察においては、図 2 上部で観察された通り、電界攪拌を施した細胞と、施していない細胞いずれも同じように接着し、形状の変化や、死細胞である浮遊したままの細胞の顕著な増加は認められなかった。顕微鏡下での観察後、トリプシン処理を施し、トリパンブルーによる染色をし、血球計算盤による死細胞の計測を行なった。その結果、図 2 下部で示す様に、電界攪拌を施さない細胞、施した細胞、いずれの条件においても死細胞率は 5%以下におさまり、いずれも条件も細胞に対して、大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

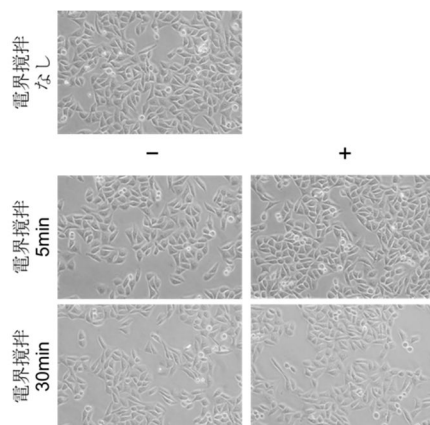
この結果より、電界攪拌技術を生きた状態のヒト培養細胞に施したとしても、死細胞率の増加は見られず、細胞に対して、死を惹起するほどの影響がないことが考えられた。

研究成果 2

研究成果の 2 つ目として、生きたヒト培養細胞の培養液に、核染色試薬である Hoechst33342 を滴下し、電界攪拌を施した結果、核染色効率の上昇が見られた。この結果は、電界攪拌による、外部物質の細胞膜透過性の上昇を示唆するものである。

先ほどと同様に、生きた状態のヒト培養細胞、HeLa 細胞培養液による液滴をシャーレ上で形成し、細胞を接着状態とした。接着状態の確認後、核染色試薬 Hoechst33342 を終濃度 1ng/ml となる様に加え、電界攪拌を、電極間距離 9.60mm、電圧 4.5kV、周波数 18Hz として 5 分行なった。その後、PFA により細胞の固定を行い、蛍光顕微鏡下での観察を行なった。図 3 上部に示す染色の結果、攪拌を行わなかった条件の細胞においては、染色された核の輝度が極めて低くなった。一方で、攪拌を施した条件の細胞では、攪拌を行わなかったものに比べ、極めて輝度が高くなることが観察された。さらに、図 3 下部に示すように、そのいずれの染色像を画像解析による輝度値の定量的な測定を行なったところ、攪拌を行なった核の平均輝度が、攪拌を行わなかった核の平均輝度に比べ、2 倍近く輝度値が上昇することが分かった。これらの結果は、電界攪拌を行うことにより、細胞外に存在する物質を、細胞中に高効率に取り込むことを可能とすることを示唆するものであった。

以上の 2 つの成果から、電界攪拌技術を生きたヒト細胞に施しても、細胞死を惹起する可能性は極めて低く、さらに、Hoechst33342 のような微小な物質であれば、その細胞への取り込み効率を大幅に上昇させ得ることが分かった。これらの結果は、化学的であったり、物理的であったりの細胞に対する負担の大きい手法に頼ることなく、物質を効率的に細胞中へ取り込ませ得る、新たな可能性を示唆するものである。



	生細胞	死細胞	死細胞率
なし	184	8	4.35
5min -	189	2	1.06
5min +	170	1	0.59
30min -	189	3	1.59
30min +	192	3	1.56

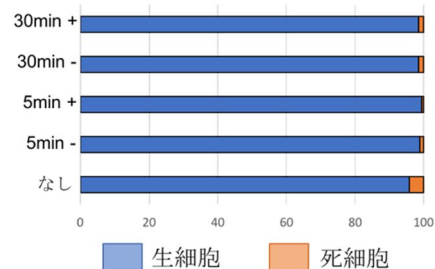


図 2 電界攪拌翌日の細胞

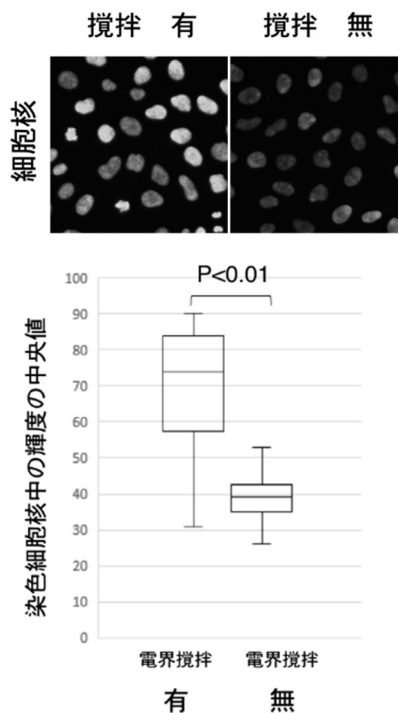


図 3 電界攪拌による核染色効率の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第二報） -電界攪拌のヒト培養細胞実験系における検討-
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第一報） -電界攪拌のヒト培養細胞における検討-
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第二報） -電界攪拌のヒト培養細胞実験系における検討-
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第一報） -電界攪拌のヒト培養細胞における検討-
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 自動免疫染色装置に関する報告
3. 学会等名 2019年度迅速免疫染色研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を適用した新たな迅速酵素反応系の開発(第一報)-ヒト培養細胞系における抗原抗体反応の迅速化の検討-
3. 学会等名 2020年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発(第一報) - 電界攪拌のヒト培養細胞における検討-
3. 学会等名 精密工学会 東北支部学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保義真
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発(第一報) - 電界攪拌のヒト培養細胞における検討-
3. 学会等名 精密工学会 春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----