

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：22604  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23656202  
 研究課題名（和文） 局所ナノパルス電界場における酵母細胞の動態変化および遺伝子発現の検証  
 研究課題名（英文） Investigation of kinetic change and gene expression of yeast cells in local nanosecond pulsed electric field  
 研究代表者  
 内田 諭（UCHIDA SATOSHI）  
 首都大学東京・理工学研究科・准教授  
 研究者番号：90305417

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、マイクロリアクタ内に精密配置した酵母細胞にナノパルス電界を印加して、その動態変化を計測するとともに、細胞モデル解析及び増幅遺伝子評価から局所瞬時電界と遺伝子発現の相関を検証するものである。

主要な成果として、波形の精密制御が可能なパルス電源の開発に成功した。また、標準粒子を用いて分散配列条件やパルス幅の可変限界を特定した。ストレス変化による膜損傷状態及び呼吸活性を核酸染色応答によって分類した。さらに細胞数値モデルを用いて、膜変性による電気特性の変動を定量化し、PCR法による主要因遺伝子を検証した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we tried to apply a nanosecond pulsed electric field to the yeast cells precisely arranged in the micro-reactor and to measure their behavior variation. We also verified the correlation between gene expression and local instantaneous field on the basis of both analyses of gene amplification and cell model.

As a major achievement, the pulse power supply with precise control of the waveform was developed successfully. In addition, we identified the variable range of pulse width and the optimum condition for dispersion and sequence of standard particles. The dependence of membrane damage degree and respiratory activity on stress change was classified by nucleic acid staining state. Moreover, the variation of electrical properties due to membrane modification to was quantified using numerical model of cell structure, and the main factor gene was verified by polymerase chain reaction analysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学 電力工学・電力変換・電気機器

キーワード：ナノパルス、酵母、マイクロリアクタ、細胞数値モデル、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

現在、様々な生物種の遺伝子解析が精力的に進められており、遺伝子組み換えによる新品種の創成や病的因子の改変による遺伝子治療への道が開かれつつある。しかしながら、

現行の遺伝子発現法は、薬品やウイルスによる生化学的操作が主体であり、発現精度や安全性に問題がある。

一方、生体への時間的残存効果が少ない物理作用の一つとしてパルス電界印加があり、

細胞膜の穿孔による遺伝子導入や殺菌に應用されている。最近になって、細胞にナノパルス電界を印加すると、細胞質内への直接作用により、アポトーシスが誘起されるという報告があった。ただし、使用されるパルスパワー電源には電圧制御の不安定性があり、その発現機構も十分には特定されていない。

これまで申請者は、マイクロ反応場を利用した生体に対する安定なパルス電界印加技術について研究してきた。そこで、マイクロギャップ(100  $\mu\text{m}$ )とパルス電源(電圧 200 V、パルス幅 100  $\mu\text{s}$ )を用いてエネルギー効率が従来の 10 倍以上となる効果的殺菌に成功した。また、大腸菌に対してサブマイクロオーダーのパルス電界印加による非膜損傷な不活性化を確認している。

上記に示した背景と結果から、申請者は高精度な電圧波形制御が可能な半導体ナノパルス電源を開発し、マイクロリアクタ内の酵母細胞にパルス印加処理を行うことによって、局所瞬時電界と細胞動態変化・遺伝子発現の相関をより明確にできると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロリアクタ内に精密配置した酵母細胞にナノパルス電界を印加して、その動態変化を計測するとともに、細胞モデル解析及び増幅遺伝子評価から局所瞬時電界と遺伝子発現の相関を検証するものである。

## 3. 研究の方法

本研究では、要素技術の確立(平成 23 年度)から、ナノパルス実験での検証(平成 24 年度)に至る一連の工程に対して、【課題 1 パルス電源製作】(ナノパルス電源装置の設計・製作)、【課題 2 印加試験・動態計測】(酵母細胞に対するパルス電界印加試験及び細胞動態変化の染色計数計測)及び【課題

3 モデル解析・発現評価】(細胞数値モデルの構築、電界照射量の数値解析及び遺伝子発現の PCR 評価)における各目標を達成するとともに、課題間の密接な連携によって研究全体を推進した。具体的な研究方法を以下に示す。

【課題 1 パルス電源製作】半導体スイッチを用いて、最大電圧振幅 300 V、最小パルス幅 50 ns のナノパルス電源を開発する。さらに、配線損失を低減するため、リアクタ端子部と統合した一体構造に改良する。

【課題 2 印加試験・動態計測】泳動操作と電界印加が可能なマイクロリアクタを製作する。【課題 1】のナノパルス電源と併用して、酵母細胞に対する印加試験を行うとともに、フローサイトメーターを用いて、諸パルス印加条件に対する細胞動態(不活性化、膜損傷)変化を精査する。

【課題 3 モデル解析・発現評価】リアクタ内電界分布や細胞数値モデルを用いて、ナノパルス電界印加による細胞内への誘導電界解析を行う。また、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)解析の結果と合わせて、局所瞬時電界と遺伝子発現の相関を整理する。

なお、本研究の遂行は、申請課題における電氣的要素の多様性を鑑み、研究代表者(首都大学東京・内田)、2名の研究分担者(同大学・和田及び鈴木)及び1名の研究協力者(同大学非常勤職員・高瀬亜希)で行った。内田は研究全般を統括するとともに、高電圧及び静電気学の専門的知見を活かして、【課題 2 印加試験・動態計測】を行った。和田はパワーエレクトロニクスを専門としており、【課題 1 パルス電源製作】を担当した。生体電磁気学を専門とする鈴木が、【課題 3 モデル解析・発現評価】を担当した。高瀬は、微生物学を専門とする技術補佐員であり、本

研究で使用する酵母の調整管理及び発現遺伝子の PCR 同定を支援した。

#### 4. 研究成果

平成 23 年度は要素技術の確立を主目的として、(1) 回路パラメータ計測とナノパルス発生回路の設計、(2) 半導体ナノパルス電源の試作評価、(3) マイクロリアクタの設計・試作及び印加試験、(4) 細胞数値モデルの構築及び細胞電気定数の導出を行った。

(1) に関しては、模擬負荷におけるインピーダンス及び位相角を確認し、論理回路ゲートアレイを利用したナノパルス発生回路を設計した。(2) に関しては、(1) で得られたデータを元に、波形の精密制御が可能なパルス電源（最大電圧振幅 100 V、最小パルス幅 80 ns）の開発に成功した。(3) に関しては、ギャップ 200  $\mu\text{m}$  の耐圧処理リアクタを新たに作成し、印加試験を実施した。(4) に関しては、大腸菌及び酵母に対する細胞数値モデルを構築し、電圧振幅に対応した定常静電界分布を導出した。また、交流インピーダンス計測を行い、パルス幅に対する動態変化とインピーダンスの相関を定量的に示した。

平成24年度は、前年度に得られた基本的知見と試作したナノパルス印加装置を用いて、パルス印加による細胞動態変化の実証試験と特性評価を遂行するため、(1) リアクタ端子間と結合した一体型電源への改造、(2) 標準粒子に対する泳動配列及びパルス印加試験と装置の性能評価、(3) パルス印加条件に対する染色酵母細胞の動態観察、(4) 遺伝子解析と数値解析の比較による局所瞬時電界と遺伝子発現の相関検証、を行った。

(1) に関しては、ブスバー構造を有するリアクタを用いて負荷変動を低減し、パルス印加試験の再現性を向上させた。(2) に関

しては、(1) で試作した電源系において、ポリスチレン蛍光粒子やコロイド状金属ナノ粒子などを用い、誘電泳動による分散配列条件を精査した。また、パルス幅の可変限界を特定した。(3) に関しては、ストレス変化による膜損傷状態及び呼吸活性を核酸染色応答によって分類した。(4) に関しては、細胞数値モデルを用いて、膜変性による電気特性の変動を定量化し、PCR法による主要因遺伝子を検証した。

以上、2 年間の研究活動を通して、本研究費を効果的に活用し、当初設定した研究計画をほぼ遂行することができたと言える。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) S. Uchida, R. Nakao, C. Asai, T. Jin, Y. Shiine and H. Nishikawa, “Optical Counting of Trapped Bacteria in Dielectrophoretic Microdevice with Pillar Array,” *Intelligent Automation and Soft Computing*, Vol. 18, pp. 165-176 (2012)

(2) T. Enjoji, S. Uchida and F. Tochikubo, “Fundamental Studies of Dielectric Characteristics of Heat-injured *S. cerevisiae* Using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method,” *Intelligent Automation and Soft Computing*, Vol. 18, pp. 153-164 (2012)

(3) 和田圭二, 工藤将史, 内田 諭, 「パルス電界と誘電泳動を用いたマイクロ殺菌システム用電源装置」, 電気学会論文誌D (産業応用部門誌), Vol. 131, pp. 1451-1456 (2011)

[学会発表] (計 9 件)

(1) 浅井千尋, 時田寛也, 内田 諭, 寺島大貴, 西川宏之, 「ピラー構造誘電泳動デバイスを用いた菌捕集量の流量依存性及びピラー配置依存性の検証」, 春季第60回応用物理学関係連合講演会, 2013年03月27日～2013年03月30日 厚木, 日本

(2) 高澤晋, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「加温処理酵母における誘電泳動速度の周波数依存性」, 平成25年電気学会全国大会, 2013年03月20日～2013年03月22日, 名古屋, 日本

(3) 手嶋祐太, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「誘電泳動による微粒子凝集のシミュレーション」, 平成25年電気学会全国大会, 2013年03月20日～2013年03月22日, 名古屋, 日本

(4) C. Asai, H. Tokita, T. Enjoji, S. Uchida, D. Terajima, H. Nishikawa, “Effect of Pillar Structure in Dielectrophoretic Device on Trapping Characteristic of Microorganisms,” SETAC Asia Pacific 2012 Meeting, 2012年09月24日～2012年09月27日, 熊本, 日本

(5) 山崎 伸, 速水幸介, 白井直機, 内田 諭, 朽久保 文嘉, 「粉末銀ナノ粒子の分散処理と泳動捕集量の測定」, 静電気学会, 2012年09月13日～2012年09月14日, 八戸, 日本

(6) 高瀬亜希, 圓城寺隆治, 内田 諭, 「泳動濃縮および画像解析を併用した飲料混入菌の定量計測」, 日本防菌防黴学会第39回年次大会, 2012年09月11日～2012年09月12日, 品川, 日本

(7) S. Uchida, R. Kato, N. Shirai and F. Tochikubo, “Metabolic control of

microorganisms using pulsed electric field in microgap,” 9th International Bioelectrics Symposium, 2012年09月04日～2012年09月08日, 熊本, 日本

(8) R. Kato, N. Shirai, S. Uchida and F. Tochikubo, “METABOLIC CONTROL OF ESCHERICHIA COLI USING NANOSECOND PULSED ELECTRIC FIELD IN MICRO-GAP REACTOR,” International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 7 Sep. 2011, Sapporo, Japan

(9) 加藤諒祐, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「微小ギャップリアクタ内でのナノ秒パルス電界を用いた微生物の代謝制御」, 電気学会パルスパワー・放電合同研究会, 2011年10月22日, 習志野, 日本

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 諭  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号：90305417

### (2) 研究分担者

和田圭二  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号：00326018

鈴木敬久  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号：30336515