

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670887

研究課題名(和文) 微小電極を用いたマイクロ不可逆エレクトロポレーションの確立と歯周病治療への応用

研究課題名(英文) Feasible Study on Micro-Irreversible Electroporation for Treatment of Periodontal Diseases by Using Miniature Electrodes

研究代表者

藏田 耕作 (Kurata, Kosaku)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00368870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、電極の幾何学形状やパルス印加条件を微小化したマイクロ不可逆エレクトロポレーション(マイクロIRE)を新たに提案することにある。まず数値シミュレーションによって電極の幾何形状が細胞壊死領域に与える影響を評価した。次に実際に微小櫛形電極を作製し、細胞を分散させた生体擬似組織に対してパルス印加を行った。その結果、本手法によってIREの低電圧化を図れること、組織表層の細胞を壊死させるのに有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed a new contact irreversible electroporation (IRE) by using comb-shaped miniature electrodes. Prior to experiments, electric fields generated by comb-shaped electrodes were evaluated by finite element analysis (FEA). FEA showed that ablation depth was positively correlated with the applied potential and negatively dependent on the ratio of the gap between the electrodes to the anode width. In the experiments, the comb-shaped electrode with the optimal geometry was fabricated by photolithography process. Tissue phantom containing NIH3T3 cells in agarose gel was contacted on the electrode and subjected to the electric pulses. Fluorescent microscopic observation showed that the cells located at a depth less than several tens micrometers from the surface were necrotized by IRE. These results show that the present method is applicable to ablate the outermost surface layer of targeted tissues by application of electric pulses lower than 50 V.

研究分野：生体工学，生体熱工学

キーワード：歯学 歯周病 不可逆エレクトロポレーション 微小電極 膜破壊

1. 研究開始当初の背景

エレクトロポレーションは、生体膜に対して電界パルスを印加して膜穿孔を生じさせる技術である。可逆的な膜穿孔は遺伝子や抗癌剤の細胞内導入のために利用される一方、不可逆的な膜穿孔である不可逆エレクトロポレーション(IRE; irreversible electroporation)は、細胞壊死を招く好ましくない副次的影響と考えられてきた。ところが近年、この IRE を腫瘍のアブレーションに応用することが提案され、低侵襲的治療法として注目を集めている^[1]。

IRE では、標的とする生体組織内に細い金属電極を刺入して、大きさが数 kV/cm、幅が数～数百マイクロ秒の電界パルスを繰り返し印加する。細胞膜に約 1V 以上の電荷が充電されると膜破壊が生じ、その結果、組織は熱的な影響を被ることなく壊死する^[2]。ところが、非常に高電圧のパルスであるために、一般的に全身麻酔下で施術せざるを得ない。すなわち、IRE の低侵襲性を十分に活かすことができていない。

IRE の電圧を下げる方策の 1 つは、電極間距離をミクロンオーダーまで小さくすることである。現在の数 kV/cm という電圧条件は、電極間距離 10 μ m では数 V の電位印加で間に合うことになる。

電極と電圧を微小したマイクロ IRE では、細胞膜破壊を生じさせるのに十分な強度の電界が得られる範囲もごく小さくなり、電極表面に近い領域に限定されると予想される。そこでこのマイクロ IRE が効果を発揮できる有望な分野として、歯周病治療への応用を提案する。微小電極は歯周ポケットへの挿入に適しており、IRE によって歯周細菌の壊死やプラーク除去が期待できるからである。さらに、歯根の封鎖性を失った歯肉縁下の上皮組織をマイクロ IRE で壊死させ、封鎖性を発揮できる新生組織の形成を導くことが可能になるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、電極の幾何学形状やパルス印加条件を微小化したマイクロ IRE を新たに提案し、これを歯周病治療に応用することである。そのために、以下の 2 点を目的として研究を行った。

- (1) マイクロ IRE で発生できる電場の数値シミュレーションを確立すること。
- (2) 上記の電場が細胞に与える影響を実験的に明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 電場の数値シミュレーション

図 1 に示すように楕形電極(電極幅 w 、電極間隙 l)を生体組織(導電率 σ_t)に接触させ、電極間に電位差 V が印加される場合を考える。生体組織の縦断面を解析領域と定義すると、

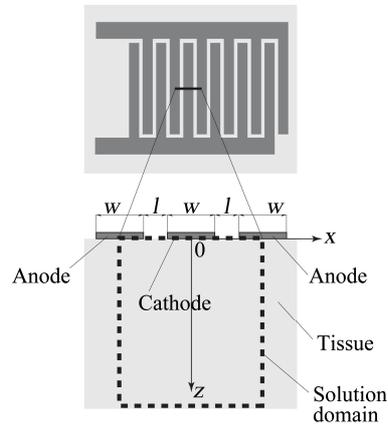


図 1 微小楕形電極の模式図と解析モデル。

電位 ϕ の分布は次の電界方程式で表される。

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(\sigma_t \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\sigma_t \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) = 0$$

これを $X = x/w$ 、 $Z = z/w$ 、 $\Sigma = \sigma_t / \sigma_t$ 、 $\Phi = \phi / (V/2)$ の無次元数を用いて無次元化すると、

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial Z^2} = 0$$

である。境界条件は、陽極が接する面で $\Phi = 1$ ($\phi = V/2$)、陰極が接する面で $\Phi = -1$ ($\phi = -V/2$)、解析領域の左右端で $\partial \Phi / \partial X = 0$ ($\partial \phi / \partial x = 0$, 対称条件)、その他の解析領域外縁で $\Phi = 0$ ($\phi = 0$) とした。電極幅と電極間隙の比が電界分布に与える影響を調べるため、 $L = l/w = 0.25, 0.5, 1, 1.5$ の 4 つの解析モデルを作成した。長方形メッシュにて要素分割し(10~20 万要素)、有限要素解析プログラム Marc/Mentat (MSC software) を用いて解析した。

(2) MEMS 電極の製作

数値シミュレーションの結果をもとに、電極幅 200 μ m、電極間距離 50 μ m のパターンを有する微小楕形電極を作製した。ガラス基板にフォトマスクを密着させて露光、現像し、真空蒸着法にて膜厚 8nm のチタン薄膜、さらにその上に膜厚 40nm の白金薄膜を成膜した。その後、リフトオフ工程で楕形パターンを作製した。

(3) 生体擬似組織を用いたマイクロ IRE 実験

本実験では、NIH3T3 細胞を分散培養したアガロースゲルを生体擬似組織として用いた。まず、2.5 wt% 低融点アガロース溶液 (SeaPlaque Agarose, Lonza)、10 倍濃縮 α -MEM、再構成バッファー (2.2g NaHCO₃ in 100 ml of 0.05N NaOH, 200 mM HEPES) を体積比 8:1:1 で混合してアガロースゾルを調製した。これに NIH3T3 細胞を密度 4 \times 10⁵ cells/ml となるように混合した。これをプラスチックトレイに流し込み、4 で 20 分間静置してゲル化させた。その後、37 に保ったイ

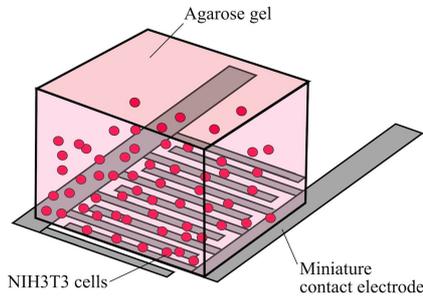


図2 生体擬似組織に対する IRE 実験の模式図。

ンキュベーター内に 20 分以上静置して IRE 実験に用いた。

図2に示すように、5 mm×3 mm の大きさにカットした生体擬似組織を電極上に載せ、エレクトロポレータ (ECM830, Harvard Apparatus) によって電界パルスを印加した。印加条件は、電圧 30, 40, 50 V, パルス幅 10, 100 μs, パルス間隔 100 ms, 印加回数 60, 90 回とした。

パルス印加後、生体擬似組織を 10 μg/ml ヨウ化プロビジウム (PI) および 2 μg/ml calcein AM にて染色し、死細胞と生細胞の判別を行った。電極との接触面および断面を蛍光顕微鏡 (E600FN, Nikon) とデジタルマイクロスコープ (VHX-1000, Keyence) を用いて観察、撮像した。

4. 研究成果

(1) 電場の数値シミュレーション

有限要素解析によって求めた無次元電界分布を図3に示す。電界は電極エッジ部で最も大きく、そこから離れるにつれて小さくなった。陰極中央、陰極エッジ、電極間隙中央における無次元電界の深さ方向分布を図4に示す。いずれも Z が大きくなる (深くなる) ほど無次元電界は減少したが、4つの解析モデルを比較して無次元電界がより大きくなるのは、 $Z < 0.75$ の浅い領域では L が小さいとき、 $Z > 0.75$ の深い領域では L が大きいときであった。

細胞膜内外の電位差が 1 V 以上 ($\Delta V_{\text{mem,cr}} \geq 1$) のときに不可逆的膜穿孔が生じると仮定すると、細胞破壊に必要なのは細胞1個あたりに 2 V の電位差である。細胞を直径 $d_{\text{cell}} = 16 \mu\text{m}$ (アガロースゲル中に分散培養した NIH3T3 細胞の実測直径) の球体と仮定し、電極幅 $w = 100 \mu\text{m}$, 印加電圧 $V = 20 \text{ V}$ とすると、細胞膜破壊に必要な無次元電界は、

$$|\nabla \phi_{\text{cr}}| = \frac{2 \cdot \Delta V_{\text{mem,cr}}}{V/2} \times \frac{w}{d_{\text{cell}}}$$

より 1.25 である。これは、図3の破線より上の領域で IRE が実現されることを示している。 $L = 0.25, 0.5$ の場合、生体組織の表面すべてに壊死領域が及んでいるが、 $L = 1, 1.5$ では電極直下や電極間隙において細胞壊死が起こらない領域が生じる。

電界が最も大きかった電極エッジ部

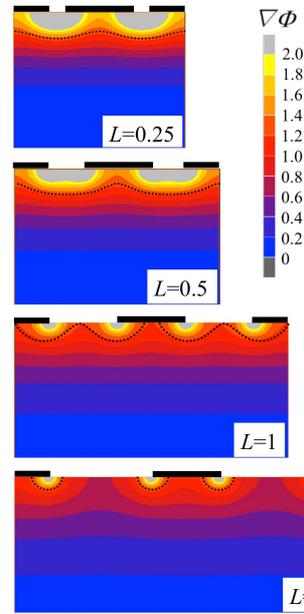


図3 無次元電界分布。

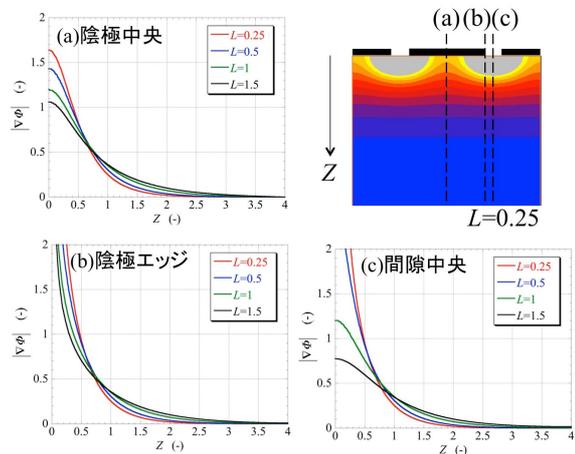


図4 無次元電界分布の深さ方向分布。

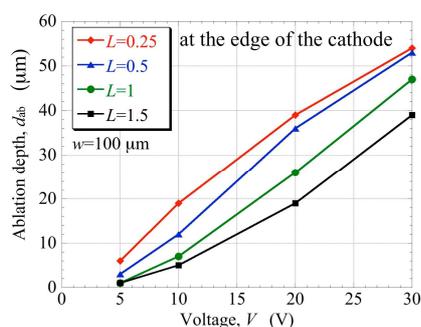


図5 印加電圧と細胞壊死深さの関係 (電極幾何学形状 L の影響)。

($Z = 0.5$) における印加電圧 V と細胞壊死深さ d_{ab} の関係を図5に示す。細胞壊死深さは電圧依存的に増加した。印加電圧が等しいとき、電極間隙が小さいほど細胞壊死領域は深かった。次に、細胞壊死深さが最も大きい $L = 0.25$ の解析モデルにおいて、電極幅 w に応じた印加電圧 V と細胞壊死深さ d_{ab} の関係を図6に示す。印加電圧 30 V では、幅 200 μm の電極を用いたときに最大壊死深さ 60 μm を

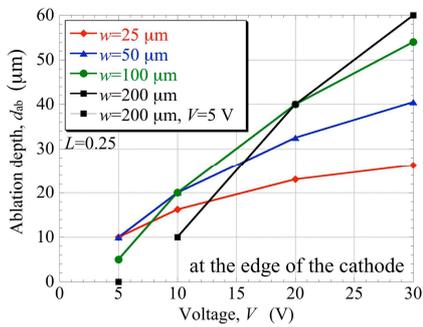


図6 印加電圧と細胞壊死深さの関係 (電極幅 w の影響).

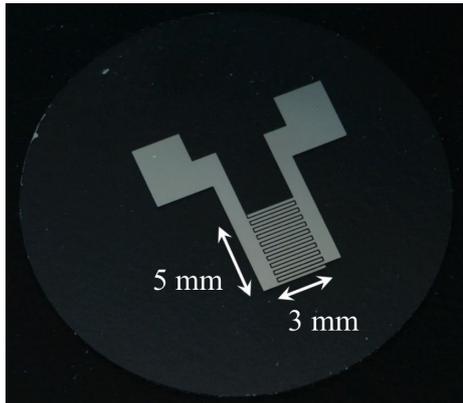


図7 作成した微小櫛形電極.

得た. しかしながら, この電極は印加電圧が 20 V 以下になると他の電極よりも壊死深さが小さくなり, 5 V では壊死領域が全く得られなかった. これは上式より, 電極幅 w が大きくなる, あるいは印加電圧 V が小さくなると, 細胞膜破壊に必要な無次元電界の値が大きくなるからである.

(2) 生体擬似組織を用いたマイクロ IRE 実験

数値シミュレーションの結果をもとに, 印加電圧 30 V で最も深い壊死領域が得られる電極幅 200 μm , 電極間距離 50 μm の微小櫛形電極を作製した. その写真を図 7 に示す.

生体擬似組織に対してパルス印加を行った後, 細胞をヨウ化プロピジウム (PI) および 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calcein AM にて染色し, 死細胞と生細胞の判別を行った. パルス幅 10 μs , パルス間隔 100 ms, 印加回数 60 回の条件で電圧 30, 40, 50 V をそれぞれ印加した後の縦断面における細胞生存の蛍光顕微鏡画像を図 8 に示す. 電圧印加を施さなかった対照群では試料全域に緑色蛍光を発する細胞が分布し, 赤色蛍光を発する死細胞は認められなかった. 電圧印加を行うと, 電極が接していた試料表層で死細胞が観察された. 印加回数を 90 回に増やして実験した結果を図 9 に示す. 同様に電圧印加によって試料表層で細胞死が引き起こされることが明らかになった. 死細胞が認められたのは最表層の深さ 20~30 μm の領域のみであった. 次に, 電圧 30 V, パルス間隔 100 ms, 印加回数 60 回の条件で, パルス幅を 10 μs または 100 μs にしたときの結

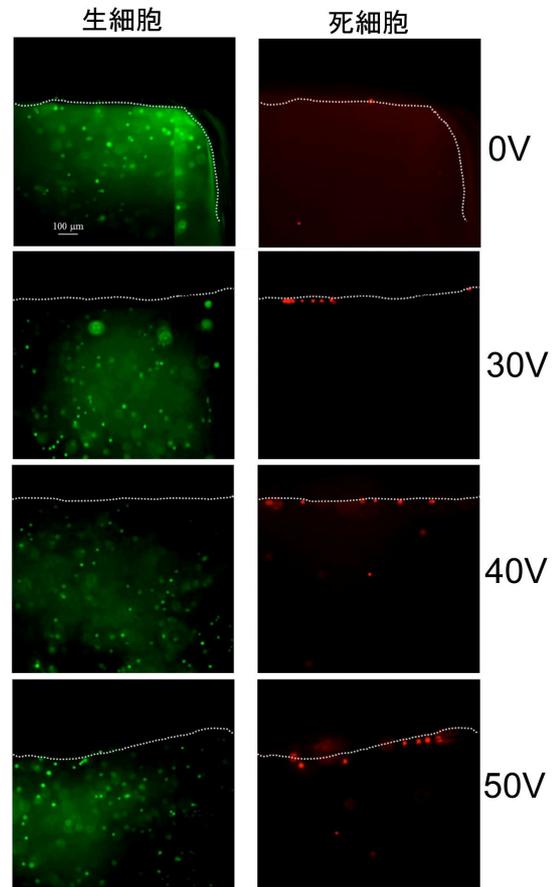


図8 印加後の生体擬似組織の縦断面画像 (パルス幅 10 μs , 間隔 100 ms, 60 回印加).

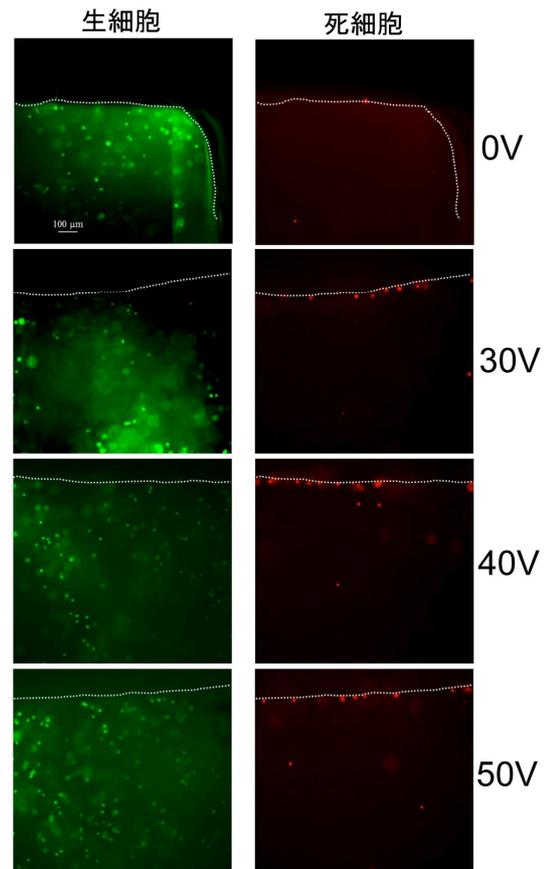


図9 印加後の生体擬似組織の縦断面画像 (パルス幅 10 μs , 間隔 100 ms, 90 回印加).

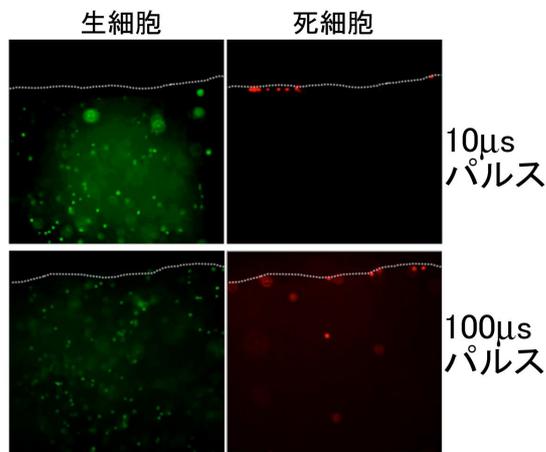


図 10 印加後の生体擬似組織の縦断面画像
(電圧 30 V, 間隔 100 ms, 60 回印加)。

果を図 10 に示す。パルス幅 10 μ s では死細胞が試料表面に認められるだけであったのに対し, 100 μ s では死細胞の数が増し, より深い領域にまで及ぶようになった。

電界パルスの安全性は, 生体に流れた電流の大きさ, 時間, 経路によって決まる。一般的に, 電流が 1 mA になると知覚され, 20 mA で筋の痙攣, 50 mA の通電 2 秒以上で心室細動が生じると言われている^{[3][4]}。人体内部の四肢間の電気抵抗 (約 500 Ω) と湿潤な皮膚の電気抵抗を合わせて約 2 k Ω の電気抵抗を考慮し, 各国の安全基準や過去の研究では人体に危険とならない安全電圧を 50 V 以下あるいは 25 V 以下と定めている。本研究で検討した微小表面電極による IRE では, 通電範囲が体表に限られるために心機能に悪影響を与える危険性は極めて小さいと思われる。また, 安全電圧範囲内の 30 V 以下の電圧を極短時間印加する IRE を想定しており, 無麻酔での施術が可能である。

本研究の結果, 微小電極を用いることによって IRE の低電圧化を図れることが明らかになった。電極と接触する試料表面に分布する細胞が IRE によって細胞死を生じていることが確認できた。壊死深さは数十 μ m であり, 数値解析の結果と同じオーダーであった。しかしながら, これは表皮の厚さ (60~200 μ m)^[5] に満たないので, 皮膚表面を施術対象にするには壊死深さを大きくするための何らかの工夫が必要である。表皮が特に薄い顔面, 腸管や口腔内表面を覆う上皮細胞層などが施術対象となれば, 実用の可能性があると考えられる。

< 引用文献 >

- [1] Garcia, P.A. et al., Biomed Eng Online, Vol.10, No.34 (2011).
- [2] Zimmermann, U. and Neil, G.A., Electromanipulation of Cells, first ed., CRC Press Inc., (1996).
- [3] Koumbourlis, A.C., Crit Care Med, Vol.30,

No.11, Suppl (2002), pp.S424-S430.

- [4] Bernstein, T., Ann NY Acad Sci, Vol.720 (1994), pp.1-10
- [5] Laurent, A. et al., Vaccine, Vol.25 (2007), pp.6423-6430.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Hiroshi Takamatsu, Kosaku Kurata, Engineering approach to irreversible electroporation, Proceedings of the 15th International Heat Transfer Conference, IHTC15-KN05 (18 pages), 2014. (査読有り)
- (2) Kosaku Kurata, Seiji Nomura, Hiroshi Takamatsu, Three-dimensional analysis of irreversible electroporation: Estimation of thermal and non-thermal damage, International Journal of Heat and Mass Transfer, 72, pp.66-74, 2014. (査読有り), DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2013.12.065
- (3) Kosaku Kurata, Ryo Ueno, Masahiro Matsushita, Takanobu Fukunaga, Hiroshi Takamatsu, Experimental and Analytical Studies on Contact Irreversible Electroporation for Superficial Tumor Treatment, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 8(4), pp. 306-318, 2013. (査読有り), DOI: 10.1299/jbse.8.306

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 佐藤学, 藏田耕作, 福永鷹信, 高松洋, Study on contact irreversible electroporation using miniature electrode, 第 3 回バイオメカニクス研究センター & エレクトロニクス実装学会九州支部合同研究会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 2015 年 2 月 6 日。
- (2) 藏田耕作, 佐藤学, 福永鷹信, 高松洋, 微小表面電極による接触式不可逆エレクトロポレーションの低電圧化に関する研究, 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), 2015 年 1 月 10 日。
- (3) Kosaku Kurata, Hiroshu Takamatsu, Numerical and Experimental Studies on Irreversible Electroporation for Tumor Treatment, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 志摩観光ホテルクラシック (三重県・志摩市), 2014 年 9 月 4 日。
- (4) 藏田耕作, 松下将大, 福永鷹信, 高松洋, 不可逆エレクトロポレーションが生体組織の電気的特性に与える影響, 第 51 回日本伝熱シンポジウム, アクティシティ浜松 (静岡県・浜松市), 2014 年 5 月 21 日。
- (5) 藏田耕作, 福永鷹信, 高松洋, エレクトロポレーションにおける瞬間的温度上昇

- の計測と熱的損傷の評価法,第2回バイオメカニクス研究センター&エレクトロニクス実装学会九州支部合同研究会,九州大学(福岡県・福岡市),2014年2月4日.
- (6) 野村征爾,藏田耕作,高松洋,不可逆エレクトロポレーションにおける生体組織の損傷シミュレーション,生体医工学シンポジウム 2013,九州大学(福岡県・福岡市),2013年9月21日.
- (7) Kosaku Kurata, Ryo Ueno, Masahiro Matsushita, Takanobu Fukunaga, Hiroshi Takamatsu, Experimental and Analytical Studies on Contact Irreversible Electroporation for Superficial Tumor Treatment, The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, ソウル(韓国),2013年8月29日.
- (8) 上野涼,松下将大,藏田耕作,福永鷹信,高松洋,表在性腫瘍の治療を目指した接触式不可逆エレクトロポレーション,第50回日本伝熱シンポジウム,ウェスティンホテル仙台(宮城県・仙台市),2013年5月30日.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.mech.kyushu-u.ac.jp/~hmt/HMT_lb.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藏田 耕作 (KURATA, Kosaku)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 00368870

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 50304697

森山 泰子 (MORIYAMA, Yasuko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号: 50452769