

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560312

研究課題名(和文) 超短パルス高電界がん治療法のための高強度バーストパルス列電磁波の生成と効果の研究

研究課題名(英文) The study of the generating and affecting of the high intensity burst pulse electromagnetic wave for the cancer treatment method using the ultra-short pulsed high electric field

研究代表者

南谷 靖史 (Minamitani, Yasushi)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10323172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的はがん治療のための高強度電界を供給するためのナノ秒パルスパワー発生器を使った小型高出力パルス電磁波発生装置の設計である。これまでに開発した装置では1回の動作で数十nsの持続時間を持つバーストパルスを1回しか出力できなかったが、今回磁気スイッチとSOSダイオードを組み合わせることで、1回の動作で最大6回のクラスタバーストパルスを出力することができ、持続時間を3000ns以上にできた。そして高周波バーストパルス高電界印加時のHeLa細胞におけるたんぱく質発現の周波数依存性について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This work focuses on the design of a compact high power pulsed electromagnetic wave generator using a nanosecond pulsed power generator to apply a high-intensity electric field for a cancer treatment. In previous study, since the output voltage waveform of the pulsed power generator was damping oscillation, the duration of the burst pulse was under 100 ns. So the generator uses a magnetic switch instead of the gap switch and uses a SOS diode with current cutoff time of nanoseconds. The cluster pulse has 6 burst pulses that continue for 3000 ns. And the effect of frequency of burst pulse high electric field on HeLa cells has been clarified.

研究分野：パルスパワー工学，バイオエレクトロニクス

科研費の分科・細目：電気電子工学・電力工学・電気機器工学

キーワード：がん治療 アポトーシス 超短パルス高電界 パルス電磁波 SOSダイオード

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国の死因の第一位を占めるのがんである。がんは細胞がDNAの異常によりアポトーシス(異常をきたした細胞が自己の所属する生体を守るために起こす自殺現象)を自発的に行えなくなり、異常細胞が死なずに増殖して発生する。

高等生物の細胞、真核細胞はDNAを含む核質が核膜で覆われていて、さらに核膜と細胞質を細胞膜が覆う二重構造になっている。核膜も細胞膜も電気抵抗が大きく、細胞全体を簡単な電気等価回路で表すと核膜、細胞膜をコンデンサ、核質、細胞質を抵抗で表すことができる。等価回路の細胞に印加する電界の周波数を変化させると細胞膜と核膜にかかる電圧分布が変化する。細胞に印加する電圧は周波数が低い場合にはほとんどが細胞膜にかかるが、電界の周波数を高くすると静電容量の大きな細胞膜にかかる電圧は減少し、核膜に電圧がかかるようになる。さらに周波数を高くすると細胞膜にも核膜にも電圧はかからなくなり、細胞質、核質に大きな電流が流れることで印加電圧が保たれる。このように電界の周波数を変えることで細胞内の電界分布を制御でき、異なる導電率と誘電率を有する細胞内の任意の組織に局所的な電界を印加することが可能になる。ナノ秒幅のパルス電圧は数百MHzの周波数成分を持つ。この超短パルス高電界を細胞に印加すると細胞の核内に直接電界が作用し、細胞にアポトーシス作用を誘発できることがアメリカで確認されている。数十ナノ秒の高電界パルスをマウスの腫瘍に印加して、実際にがんが治癒することも示している。

2. 研究の目的

本研究は超短パルス高電界による非外科がん治療法における電界印加方法について行われた。超短パルス高電界がん治療法とは、がん細胞にナノ秒オーダの高電界(100kV/cm程度)を印加して、細胞にアポトーシス作用を再生させ、手術することなしにがんを治療する方法である。この方法においては、患部に高電界を印加する方法が重要である。一番単純な方法は針電極を患部まで突刺し電界を供給する方法であるが、臓器等の複雑な部位への電界供給は難しい。本研究の目的は、アンテナで放射したパルス電磁波を集束することで治療に必要な高電界を得る超短パルス高電界集束アンテナシステムを構築すること、実際に治療に効果の出る電磁波パルスの電磁波周波数、印加時間等の電氣的印加条件を細胞への照射実験を行うことで明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 高強度高周波パルス電磁波電界の振動持続時間を現状の10nsから500nsに延ばすことができる高強度高周波バーストパルス電磁波発生装置の研究を行う。その方法と

してSOSダイオードおよび磁気スイッチをLC回路に組み合わせることでバーストパルスを連続的にクラスタ状で出力できるクラスタバーストパルス発生装置を構築する。

(2) 高周波バーストパルス高電界発生装置によるHela細胞へのパルス周波数の影響を調査した。Hela細胞への影響はPI染色法による細胞死からアポトーシスの有無と細胞内たんぱく質の動きをPCR法により解析することで、アポトーシスの徴候とアポトーシスに至る経路を考察した。

4. 研究成果

(1) LC回路によるクラスタバーストパルス発生装置の開発

装置概要

これまで電磁波電界発生に使用してきたギャップスイッチLC反転回路装置は1回のコンデンサの充電でバーストパルス電圧を1回しか出力することができず、振動時間も短いえず減衰してしまうという問題点があった。そこでSOSダイオードおよび磁気スイッチをLC回路に組み合わせることでバーストパルスを連続的にクラスタ状で出力できるクラスタバーストパルス発生装置を考えた。この装置は1回の充電でバーストパルスを数回連続して出力することが可能である。

この回路を図1に示す。点線内のL1, C1がLC振動回路である。この回路の動作原理は、まず高電圧電源からC0を充電し、トリガギャップスイッチを動作させることによりパルストランスの1次巻線に電圧を印加する。トランスは1次側2巻、2次側8巻としたフェライトコアトランスを用いている。パルストランスにより昇圧された電圧は、SOSダイオードとL1を通してコンデンサC1に充電される。C1の充電電圧によりフェライトコアで構成された磁気スイッチMS1の急激な飽和が起こる。これにより磁気スイッチが動作し導通することにより、SOSダイオードに急激な逆方向電流を流し始め、L1に電流が流れエネルギーが蓄えられる。この電流はダイオードの少数キャリアが消滅するまで流れ続け、少数キャリアが消滅した時に急激な電流遮断が起きる。この急激に流れる電流を、SOSダイオードが遮断することによってLC振動回路が他の回路から切り離され、破線部分のLC回路で振動が起こり、バーストパルスが出力される。この回路ではLC回路内にギャップスイッチがないため、ギャップスイッチの抵抗成分による振動減衰がなくバースト時間を長くできる。このとき1次コンデンサC0には多くのエネルギーが残った状態でMS1が飽和しているのでC0からトランスを経由してMS1を通る回路は動作を続ける。そして振動周期によって電流が反転すると磁気スイッチはリセットされ初めの状態に戻る。これにより再びC0に残ったエネルギーで2次側コンデンサC1を充電できるので、これ

を利用して再度振動パルスが出力され、クラスタバーストパルスが形成される。このクラスタバーストパルスは C_0 のエネルギーが少なくなるまで続く。

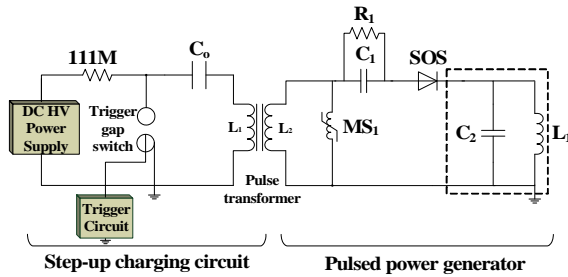


図1 クラスタバーストパルス発生回路図

実験結果および考察

2次側コンデンサと SOS ダイオードに流れる電流波形を図2に、LC回路の出力を出力電圧とし、その出力波形を図3に、周波数成分を図4に示す。このとき、1次側のコンデンサ C_0 は 5100pF であり、2次側のコンデンサ C_1 は 455pF である。磁気スイッチ MS_1 については、フェライトコア(HF70T31:8:19)を5個に導線を2回巻き(Lの長さ:150mm)のものを使用している。SOS ダイオード(STTH12010TV:1kV 耐圧)は40個直列にして40kV耐圧としている。抵抗 R_1 は SOS ダイオ

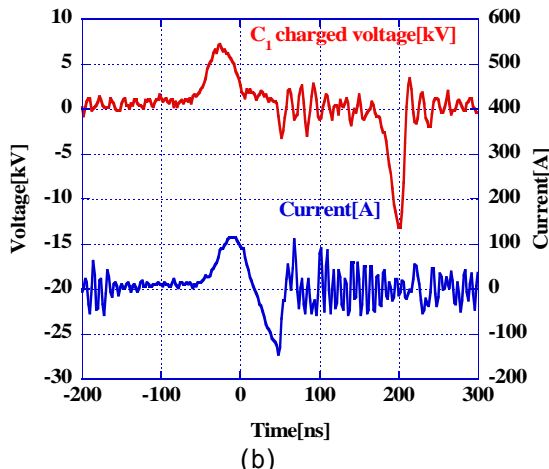
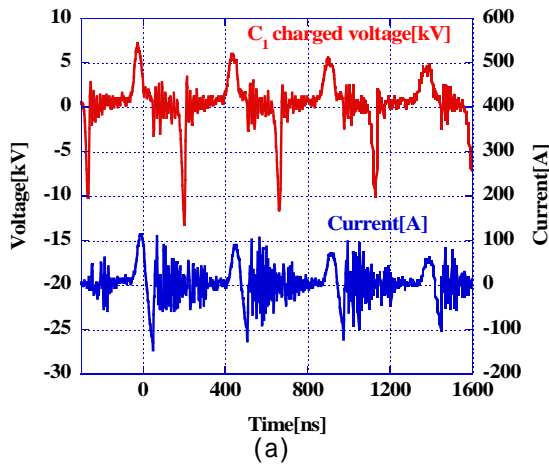
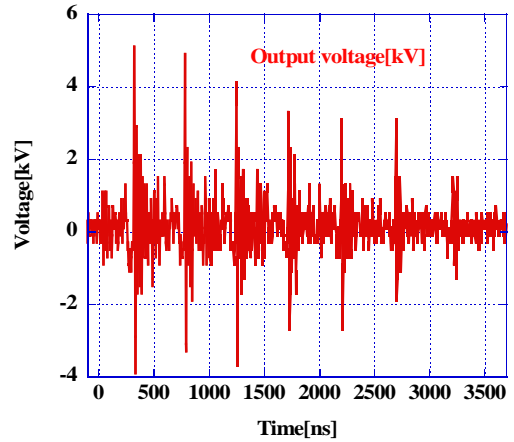
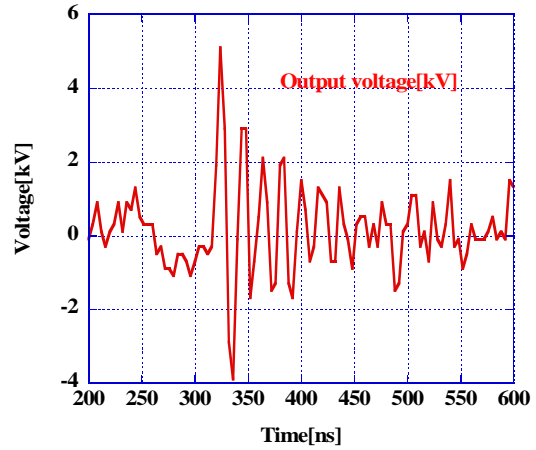


図2 コンデンサ充電波形と電流波形



(a)



(b)

図3 出力波形

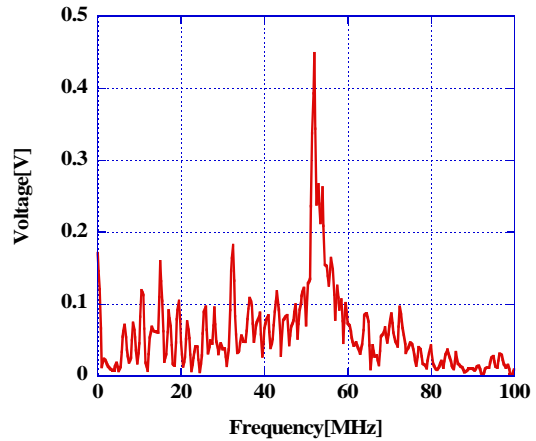


図4 周波数成分

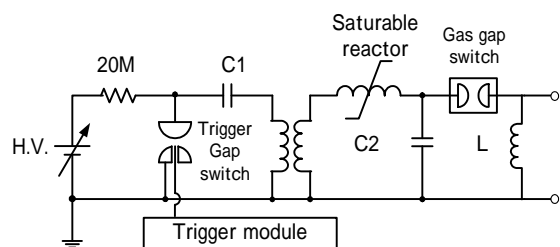
ード遮断時に C_1 に残った電荷を消費するためのもの、 $1\text{k}\Omega$ を接続している。破線部分の LC 回路の C_2 は極板面積 2mm^2 で極板間隔 2mm のエレクトロポレーション用キュベットに導電率 $2\mu\text{S}$ のイオン交換水を入れ、コンデンサ容量を 71pF としている。インダクタンス L はコイルを4回巻にしたものを取り付けている。図2からコンデンサ C_1 の充電電圧は 7.09kV であり、繰り返し充電されていることが分かる。電流最大値は -146A となった。これにより、図3のように出力電圧は 5.18kV

となりバーストパルス波形はクラスタで6回出力させることができた。このときのクラスタバーストパルスの繰り返しは2Mppsであった。また、このときの周波数成分は図4から50MHzであった。このように飛び飛びの出力であるが目標の持続時間500nsを大きく上回る持続時間3000ns以上を実現できた。

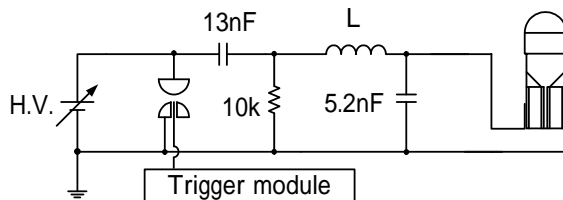
(2) 高周波バーストパルス高電界発生装置によるHeLa細胞へのパルス周波数の影響

実験回路

実験には図5に示すギャップスイッチLC振動回路装置と本課題で開発したクラスタバーストパルス発生装置を用いた。電界の印加にはエレクトロポレーション用の電極間が2mmであるキュベットを用いた。



(a) 6.5 ~ 180MHz



(b) 1MHz

図5 ギャップスイッチLC振動バーストパルス発生装置

図5の回路を用いた実験では波形ごとのエネルギーを算出しキュベットに印加されるエネルギーを約25Jとなるように統一した。電界強度は40kV/cmと一定にして実験をおこなった。クラスタバーストパルス発生装置ではキュベットに印加されるエネルギーを約20J、電界強度8kV/cmで行った。

実験結果

図5の回路を用いた場合の2時間後と24時間後の周波数別PI染色率のグラフを図6に示す。図6から、周波数1MHzのとき2時間後では91.1%と高い染色率であることが分かる。しかし、他の周波数においては電界を印加しない細胞Sham controlとほぼ変わらない結果となり細胞に影響を与えることができなかった。1MHzでは細胞膜に電界ストレスを与えることで細胞の生死に影響したと考えられる。また、この1MHzと6MHzの結果の違いは、正常な細胞とがん細胞を区別して

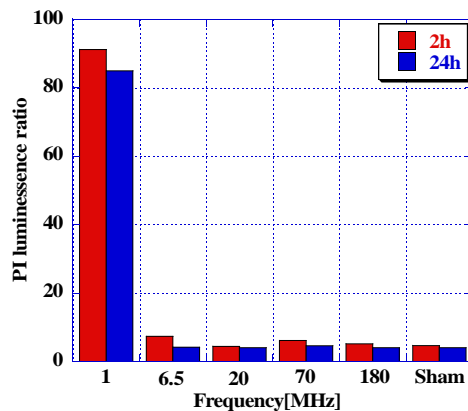


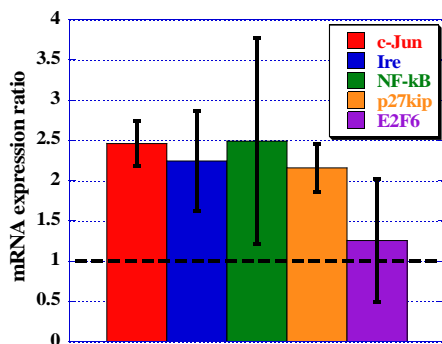
図6 ギャップスイッチLC振動バーストパルス発生装置による電界印加時のHe-La細胞のPI染色率

パルスを印加できる可能性を示している。正常な細胞とがん細胞のパルス電界に対する周波数特性が左右にずれているのであれば、がん細胞のみに影響を与えることができる。しかし、この細胞死はアポトーシスなのかネクローシスなのかについては、PI染色の結果だけでは単純には判断ができないのでPCR法でさらに現象を考察する。

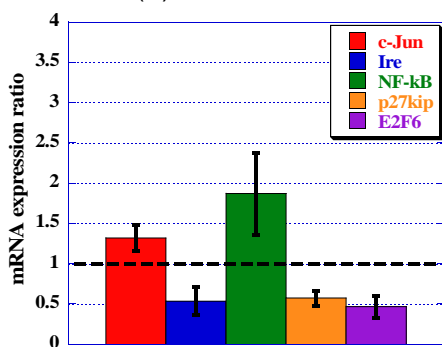
図5の回路を用いてPCR法をおこなう周波数はPI染色と同様に1MHz~180MHzのバーストパルスを印加したものである。アポトーシスや細胞の増殖などに関わる遺伝子を測定することで、実際にどのたんぱく質に影響を与えているのかを観測し、アポトーシスまでの経路やどのたんぱく質が細胞の生死に影響しているのかを考察した。各周波数においてmRNA発現量を測定することで間接的に調べた。また、2時間後と6時間後のPCR法の結果と比較をおこなった。

細胞に影響を与えることができた1MHzにおける実験結果を図7に示す。1MHzの2時間後において、アポトーシスを誘導する遺伝子c-Jun, Irfおよびp27kipの発現と抑制する遺伝子NF-kBが発現している。これらのことから、アポトーシス抑制の遺伝子も発現しているが全体的にはアポトーシス誘導が強い結果となっている。6時間後においては各遺伝子の発現が終了したのか全体的に低いNF-kBが発現している。これによって図6の1MHzにおいて、24時間後の染色率が少し減少していると考えられる。この結果から1MHzではアポトーシスが起きている可能性が高い。

図8, 9に示す2時間後の70MHzと6時間後の180MHzにおいては、バーストパルスを印加することで細胞内部に何らかの影響を与えることができ、アポトーシスを誘導するc-jun, p27kipの発現が見られる。70MHzでは全体的に遺伝子の発現がみられ細胞内部に影響を与えていることが分かる。しかしPI染色の結果から細胞の生死には影響を及ぼ



(a)2 時間後



(b)6 時間後

図 7 1MHz のバーストパルス電界を印加した場合の mRNA の発現割合

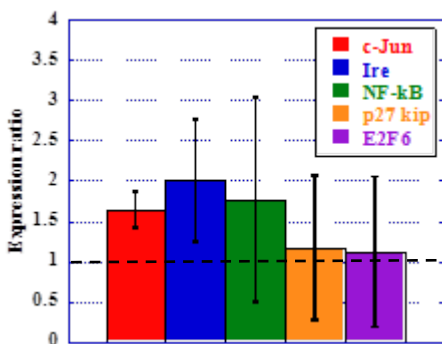


図 8 70MHz のバーストパルス電界を印加した場合の 2 時間後の mRNA の発現割合

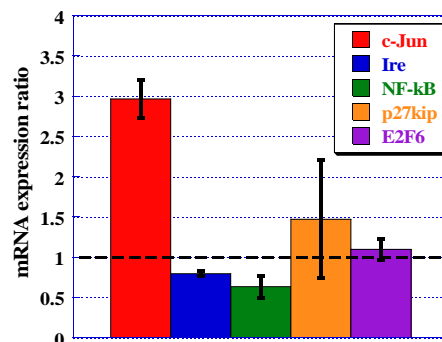


図 9 180MHz のバーストパルス電界を印加した場合の 6 時間後の mRNA の発現割合

せなかった。180MHz において Ire の発現は測定できなかったが、これはサンプルが 6 時間後であり Ire の発現は速いので反応が終了していたためであると考えられる。また、がん化を促進する NF-kB の発現は減少し、E2F6 には影響は表れなかった。しかし PI 染色の結果から細胞の生死に影響させるまでには至っていない。また、他の周波数においては遺伝子の発現はなく、影響を与えられなかった。

次に本課題で開発したクラスタバーストパルスパルスにおける 2 時間と 24 時間後の PI 染色率の変化を図 10 に示す。電界を印加していない状態の細胞の染色率 Sham control (13.8%)を 1 とした場合の比で表わしている。

印加 2 時間後、PI 染色率はほぼ変化していない。しかし 24 時間後では、Sham control の倍以上の PI 染色率となった。またバーストパルスの 180MHz では 2 時間後 と 24 時間後の染色率は変わらないが、今回の結果では 2 時間後より 24 時間後の方が Sham control に対する割合が増加している。よって、クラスタバーストパルスでは細胞膜破壊による染色ではなく、電界を内部に印加することでアポトーシスを誘導させることができ、染色されたと考えられる。印加回数の増加とともに染色率が増加する傾向も見られた。バーストパルスの 180MHz と比べると最大電界強度は低いが、バーストパルスが数回出力されているため電界に曝される時間が長くなっている。このことから、180MHz のバーストパルスを数回連続して印加することで細胞の内部に何らかの影響を与えることができたと推測できる。以上のことから、高周波数であることに加え振動時間を増やし、1 回の出力で与えるエネルギーを大きくすることがアポトーシス誘導に重要になっていると考えられる。

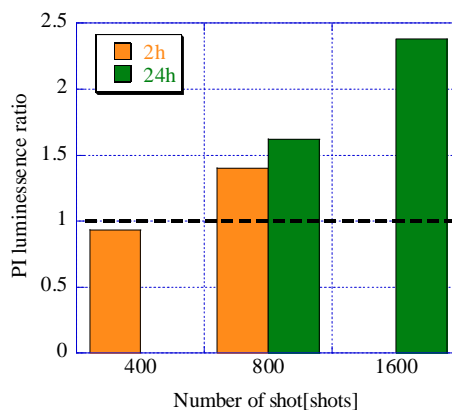


図 10 クラスタバーストパルスによる電界印加時の 2 時間後と 24 時間後の PI 染色率

次に、クラスタバーストパルス 180MHz の PCR 法の結果を図 11 に示す。クラスタバーストパルスの場合、細胞死を誘導するタンパク質 c-Jun および細胞増殖を抑制するタンパク質 p27kip の発現が見られ、またバーストパルスの 180MHz と比較すると細胞増殖を促進させ、がん化を進めるタンパク質 NF- B や E2F6 の発現量が減少している。このことから、細胞内部に影響をあたえてアポトーシスを誘導させている可能性がある。これは PI 染色の結果とも相関が取れている。

今回、180MHz において PCR 法をおこなう時

間がクラスタバーストパルスで2時間、バーストパルスで6時間ということから結果を単純には比較できない。しかし、180MHzのバーストパルスを繰り返し印加することでアポトーシスを誘導する遺伝子の発現およびアポトーシスを抑制する遺伝子の減少をより大きく引き起こすことができ、その結果細胞の生死に影響を与えることができたと考えられる。

これらのことから、持続時間の長い180MHzという高周波において細胞内部に影響を与えることでアポトーシスを誘導させることができる可能性があると考えられ、本課題で開発したクラスタバーストパルスはがん細胞へのアポトーシス誘導に効果があるといえる。

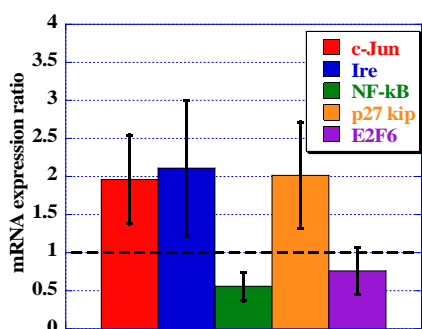


図 11 180MHz のクラスタバーストパルス電界を印加した場合の 2 時間後の mRNA の発現割合

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9件)

Daisuke Matsukubo, Yasushi Minamitani, Development of a High Frequency Cluster Burst Pulse Generator Based on a SOS Diode Using Transmission Line Resonant for Bioelectrics Applications, 2013 IEEE Pulsed Power Conference Record, CD-ROM, (2014), 査読無

Yuichi Abe, Yasushi Minamitani, Development of a RF burst pulse generator using a non-linear transmission line for cancer treatment, Proceedings of the IEEE 2012 Power Modulator Conference, CD-ROM, (2013), 査読有

Takashi Toyooka, Yasushi Minamitani, Development of a Cluster Burst Pulse Generator Based on a SOS Diode Switch for Bioelectrics Applications, Proceedings of the IEEE 2011 Pulsed Power Conference, CD-ROM, (2012), 査読無

[学会発表](計13件)

Yasushi Minamitani, Yoshie Kuramochi, Takashi Toyooka, Kazuki Shinagawa,

Kazunori Mitsutake, Misako Yano, Masaya, Morotomi, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama The dependence of protein expression level in HeLa cells on the frequency of high frequency burst pulse high electric field, 2012 International Bioelectrics Symposium, 2012年9月7日, 熊本市, KKRホテル熊本

Daisuke Matsukubo*, Takashi Toyooka, Yasushi Minamitani, Development of a High Frequency Cluster Burst Pulse Generator Based on a SOS Diode for Cancer Treatment, 2012 International Bioelectrics Symposium, 2012年9月7日, 熊本市, KKRホテル熊本

Yuichi Abe, Yasushi Minamitani, Development of a RF Burst Pulse Generator Using a Nonlinear Transmission Line for Cancer Treatment, 2012 International Bioelectrics Symposium, 2012年9月7日, 熊本市, KKRホテル熊本

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

南谷 靖史 (MINAMITANI, YASUSHI)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号: 10323172