

ナノ秒パルス電場誘起細胞機能変化と蛍光寿命イメージング分光

(北大電子研) Kamlesh Awasthi・中林 孝和・本間 将人・太田 信廣

Monitoring Response of Cells to Nanosecond Pulsed Electric Fields with Fluorescence Lifetime Microscopy

(RIES, Hokkaido Univ.) K. Awasthi, T. Nakabayashi, M. Honma, N. Ohta

【序】 細胞内には実験室系では達成することができないような強い局所電場が存在することが指摘されている。また、細胞への電場印加は電気穿孔法(Electroporation)として広く用いられており、外部電場により細胞膜に可逆的な細孔を空け、細胞内に遺伝子や薬剤を導入できることが知られている。一方、ナノ秒、ピコ秒の非常に短いパルス幅の電場を細胞に印加することにより、細胞膜を傷つけることなく、細胞内部の状態を変化させられることが指摘されている[1-3]。したがって、細胞内外の電場を組み合わせることにより細胞内のダイナミクスや機能の制御が可能であり、様々な応用も可能と考えている。本研究では、蛍光寿命イメージングシステムにマイクロ電極チャンバーを組み合わせ、細胞へのナノ秒パルス電場効果を単一細胞レベルで調べる実験を行った。楕円形金電極間で培養したHeLa細胞にナノ秒パルス電場を印加し、プログラム化された細胞死であるアポトーシスを誘起することができることを示すことができた。

【実験】 製作した楕円形金電極のパターンとそのイメージ像をFig. 1に示す。細胞の電極チャンバーとして、カバーガラス上に楕円形金電極を作成している。約0.1 mmの金電極の間隙で細胞を培養し、細胞の外部電場による変化について、倒立型の蛍光寿命

イメージングシステムを用いて観測する。40 Vの電圧で約 4 MV m^{-1} の電場を試料に印加することができる。電極の高さは、約0.02 mmである。ナノ秒パルス電場の印加は、自作のパルス電場発生装置を用い、繰り返し周波数1 kHz、パルス幅は約50 nsである。細胞は蛍光タンパク質(EGFP)が発現した付着細胞であるHeLa細胞を用いた。Fig. 2に0.1 mmの金電極の間隙内で培養されたHeLa細胞の明視野画像を示す。上下の金

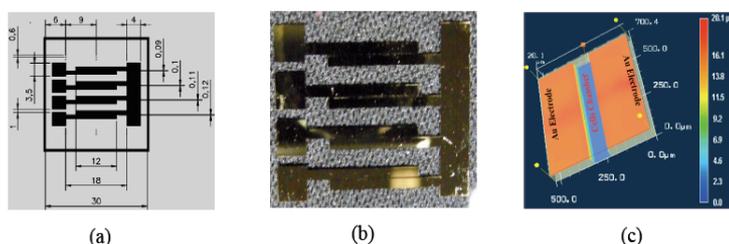


Fig. 1 (a) Design of the electrode microchamber. (b) Top view of the four-channel Au electrodes constructed on a cover glass. (c) 3D-image of the electrode.

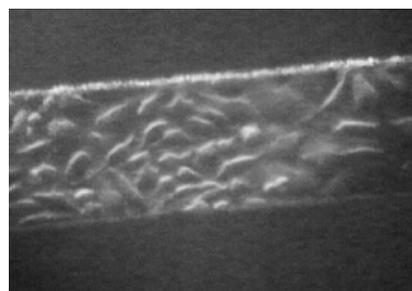


Fig. 2 Image of HeLa cells in spacing of the constructed Au electrodes.

電極の間に多数の細胞が付着していることがわかる。蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点蛍光顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした[4]。励起波長と蛍光波長は、それぞれ440 nmと515-560 nmである。

【結果】 Fig. 3に単一HeLa細胞のナノ秒パルス電場効果の一例を示す。(A)が電場印加前、(B)が 4 MV m^{-1} のパルス電場を1kHzで60秒間印加した後に測定した画像である。左がHeLa細胞内のEGFPの蛍光強度画像、右が対応する蛍光寿命画像であり、電場印加前と印加後の蛍光寿命のヒストグラムをFig. 3Cに示す。電場を印加することによって、アポトーシス特有の構造が観測される (Fig. 3B)。さらに外部電場によりEGFPの蛍光寿命が短くなる。印加前が約2.3 nsであるのに対し、印加後は約2.1 nsとなった。外部電場が無いときには、蛍光強度および蛍光寿命画像共に時間変化がないことから、ナノ秒パルス電場によってアポトーシスを誘起できたことがわかる。細胞にアポトーシスを起こすためには、アポトーシス誘導試薬を細胞に導入する方法が一般に用いられる[5]。本結果は、ナノ秒パルス電場を用いることにより、試薬を必要とせずに短時間でアポトーシスを誘起できることを示している。

EGFPはポリペプチド鎖の円筒の内部に、発色団が存在する構造を持つ。パルス電場の印加によりアポトーシスが誘起され、発色団周囲の環境の変化に伴ってEGFP発色団周囲の局所電場が変化し、発光状態の無輻射緩和速度が増加すると考えている[5]。EGFPが発現したHeLa細胞の蛍光寿命ヒストグラムについて、印加パルス電場数依存性の結果をFig. 4に示す。5から20パルスの印加でも蛍光寿命ヒストグラムに変化が観測される。アポトーシス特有の細胞の形態像の変化は、20パルス程度では全く観測されないことから、EGFPの蛍光寿命を用いることによって、アポトーシスの初期過程を高感度に検出できることを示唆している。

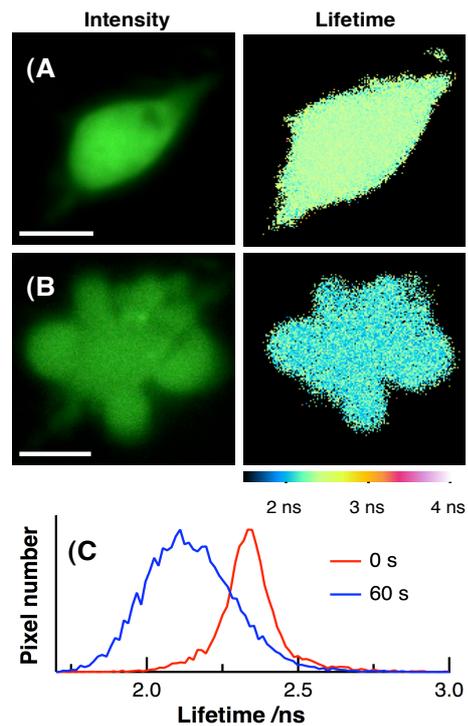


Fig. 3 Fluorescence intensity images (left) and fluorescence lifetime images (right) of a HeLa cell expressing EGFP before (A) and after (B) application of nanosecond pulsed electric fields. The histograms of the fluorescence lifetime of the images of (A) and (B) are shown in (C). Scale bars are 20 μm .

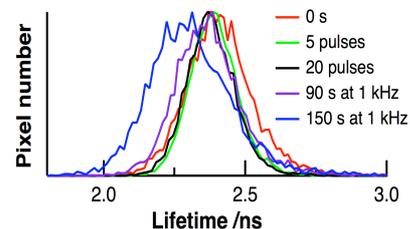


Fig. 4 The histograms of the fluorescence lifetime of HeLa cells expressing EGFP before and after application of five and twenty nanosecond pulses of 4 MV m^{-1} . The histograms of the same cells after application of 4 MV m^{-1} at 1 kHz for 90 s and 150 s are also shown in this figure.

- [1] Y. Sun, et al. **IEEE Trans. Nanobiosci.** 4 (2005) 277.
- [2] K. H. Schoenbach, et al. **IEEE Trans. Plasma Sci.** 36 (2008) 414.
- [3] L. Tang, et al. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 390 (2009) 1098.
- [4] N. Ohta, et al. **SPIE**, 7190 (2009) 71900R1.
- [5] T. Ito, et al. **Photochem. Photobiol. Sci.** 8 (2009) 763.