

## 細胞にナノ秒パルス電場を与えると何が起こるか

<sup>1</sup>台湾国立交通大学・応用化学系, <sup>2</sup>東北大院・薬  
○太田信廣<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>1</sup>, 中林孝和<sup>2</sup>

**What happens in live cells with application of  
nanosecond pulsed electric field?**

○Nobuhiro Ohta<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>1</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Department of Applied Chemistry and Institute of Molecular Science,  
National Chiao Tung University, Taiwan*  
<sup>2</sup>*Department of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Japan*

**【Abstract】** Effects of nanosecond pulsed electric field (nsPEF) on dynamics and function of live cells have been examined with fluorescence intensity and lifetime microscopy by detecting autofluorescence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Morphological change as well as the change in fluorescence lifetime of NADH have been observed after application of nsPEF having a pulsed width of 10 - 50 ns and a strength of 0 – 45 kV cm<sup>-1</sup>, indicating that apoptosis was induced by nsPEF. Apoptosis induced by nsPEF has been confirmed by comparing the autofluorescence lifetime of NADH after application of nsPEF and the lifetime of NADH obtained after addition of apoptosis inducer (chemicals). It is shown that the measurement of fluorescence lifetime image (FLIM) provides a sensitive and noninvasive detection of the progress of apoptosis induced by application of nsPEFs. It is also shown that autofluorescence lifetime of NADH is different from each other between normal and cancer cells and that the effects of nsPEF on normal and cancer cells are different from each other.

**【序】** 演者らは、これまで、「光」と「電場」をキーワードとして、分子の回転運動や光誘起電子移動反応等のダイナミクスを電場により制御できることを示してきた。そのことは分子集合体である生体における機能やダイナミクスを電場により制御できることを示唆している。ところで、細胞への電場効果として既に **electroporation** として良く知られているものがある。これは細胞に電場を作用していくと、細胞膜表面に電荷が蓄積され、そして膜の反対側には対イオンが蓄積し、膜内の電場勾配が発生し、ついには放電が起こり、膜表面に穴があき、膜内外の浸透性が変化する。このことを利用して、ドラッグデリバリーや遺伝子デリバリーが可能となる。ところで、細胞の状態は等価回路で置き換えることができ[1]、細胞膜における電荷の充電時間を計算してみると 100~200 ナノ秒と予測される。したがって、もし作用する電場のパルス時間幅がこの充電時間よりもはるかに小さい場合は、蓄積が起こる前にパルス電場は細胞内に深く浸透し、細胞内のダイナミクスや機能に影響を与えることが予想される。本研究では生細胞に nsPEF を作用させた時の変化を蛍光顕微分光法により調べた。

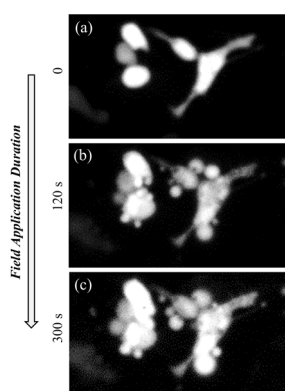
**【方法 (実験・理論)】**

楕型のマイクロ電極 (電極間隔が 100 μm, 深さが 20 μm) を UV-フォトリソグラフィ

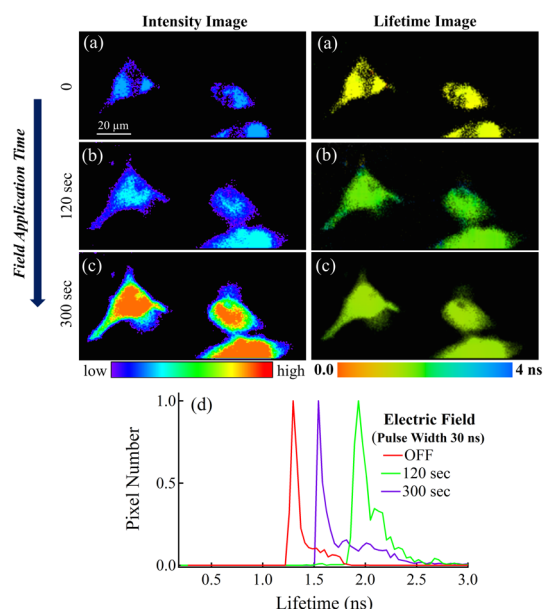
一法にて作成し、この電極間に細胞が入るように培養した [2]。用いた nsPEF のパルス幅は 10、20、30、50 ns であり、印加電場の最大は  $45 \text{ kV cm}^{-1}$  であった。対象とした細胞の一つは HeLa 細胞である。またラット胎児由来の正常細胞と癌細胞を用いた比較も行った。検出に用いた蛍光寿命顕微分光は、フェムト秒チタンサファイアレーザー、時間相関単一光子計数法に基づく蛍光寿命計、および共焦点蛍光顕微鏡を組み合わせた装置を用いて行った。

### 【結果・考察】

緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を発現させた HeLa 細胞に nsPEF を作用させると、細胞にもよるが細胞形状の変化 (Fig. 1)、PS 反転、アポトーシス誘導物質をいれた際と同様の EGFP 蛍光寿命の変化、が見られ nsPEF によりアポトーシスが誘導されることがわかる [2]。自家蛍光観測により、細胞内への影響を最小限にすることができることから [3]、NADH 自家蛍光の観測に基づいて、nsPEF 効果を調べた。その一例を Fig. 2 に示す [4]。細胞のモルフオロジーの変化およびアポトーシス誘導物質を導入した際に見られると同様の NADH 蛍光寿命の変化が見られ、これらは電場のパルス幅に依存する。また、正常細胞と癌細胞の NADH の蛍光寿命が観測でき [5]、その nsPEF 効果を調べると、強い電場ではいずれも nsPEF によりアポトーシスを示すが、弱い電場では癌細胞のみがアポトーシスを示すことがわかり、nsPEF を用いた drug free cancer therapy の可能性が示唆される [6]。



**Fig. 1.** Structural change induced by electric field in EGFP-expressing HeLa Cells. Fluorescence intensity image of EGFP as a function of application duration of applied electric field.



**Fig. 2.** Autofluorescence intensity images (left) and the corresponding lifetime images (right) of NADH in HeLa cells, observed before and after the application of electric field with the application time of 120 and 300 s, respectively (from top to bottom). The pulse width of the electric field was 30 ns. The histograms of the autofluorescence lifetime of the images of (a), (b) and (c) are shown in (d).

### 【参考文献】

- [1] K. H. Schoenbach, R. P. Joshi, J. F. Kolb, N. Chen, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, S. J. Beebe, *Proc. IEEE*, **92**, 1122 (2004).
- [2] K. Awasthi, T. Nakabayashi and N. Ohta, *J. Phys. Chem. B* **116**, 11195 (2012).
- [3] N. Ohta and T. Nakabayashi, in *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism, Biology, Techniques, and Applications* (eds. Ghukasyan, V. V. & Heikal, A. A.) pp. 41-64 (CRC Press, 2014).
- [4] K. Awasthi, T. Nakabayashi and N. Ohta, *ACS Omega* **1**, 396 (2016).
- [5] K. Awasthi, D. Moriya, T. Nakabayashi, L. Li and N. Ohta, *J. Photochem. Photobiol. B* **165**, 256 (2016).
- [6] K. Awasthi, T. Nakabayashi, L. Li and N. Ohta, *ACS Omega* **2**, 2916 (2017).