

## ナノ秒パルス電場の印加による細胞内 イオン濃度の変化の計測

<sup>1</sup>東北大院薬, <sup>2</sup>国立交通大学

○堀井湧介<sup>1</sup>, 平松弘嗣<sup>2</sup>, 梶本 真司<sup>1</sup>, 中林 孝和<sup>1</sup>

### Measurements of Changes in Intracellular Ion Concentrations with the Application of Nanosecond Pulsed Electric Fields

○Yusuke Horii<sup>1</sup>, Hirotsugu Hiramatsu<sup>2</sup>, Shinji Kajimoto<sup>1</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

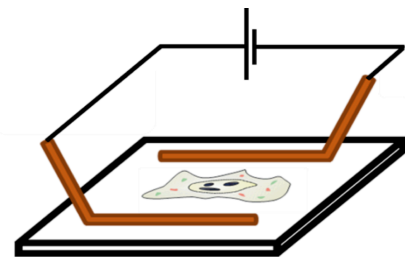
<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, National Chia Tung University, Taiwan

**【Abstract】** Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) are expected to be applicable to pharmacy and medicine because nsPEFs induce changes in intracellular environments without significant damage of cell membranes. However, the mechanism of nsPEFs-induced changes in intracellular environments still remains unclear. In the present study, we have constructed the electrodes for applying nsPEFs to cultured cells and investigated the change in intracellular ion concentrations due to nsPEFs by spectroscopic techniques. Application to 1000 pulses induced cell deaths and intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  increased by the influx of extracellular  $Ca^{2+}$  through the damage of cell membranes. Application to 10 pulses also induced the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  without the change in cell shape, which comes from the generation of transient nanopores in cell membrane. The dynamics of generation of nanopores was discussed on the basis of obtained results.

**【序】**近年、メカノバイオロジーの医学・薬学研究への応用が注目を集めている。メカノバイオロジーの応用として、物理的刺激による細胞や生体の変化があり、低温プラズマ、パルス電場、微弱電流、そしてナノサイズの力学的摂動などの物理的刺激に対するがん細胞の選択的死滅などの研究が進められている。しかし、その治癒現象の機構の多くは不明であり、実際に応用するためには、メカノバイオロジーの生体応答の機構解明が必須である。現在、主に生化学的手法を用いて機構の解明が進められており、物理的刺激に応答するチャネルなどが調べられている。しかし、生化学的な立場のみではなく、「膜やタンパク質の化学構造が物理的刺激によってどのように変化するのか」「物理的刺激によって細胞内の様々なイオン濃度や膜の流動性などの物理パラメーターはどのように変化するのか」など、構造化学・物理化学の立場から検討することも、生体応答機構の理解において極めて重要であると考えられる。

本研究では、メカノバイオロジーとしてナノ秒パルス電場(nsPEFs)を用い、電場印加による細胞応答機構を検討した。ナノ秒などの非常に短いパルス電場を細胞に印加することによって、細胞膜を損傷させることなく、イオン濃度の変化やアポトーシスを効果的に誘起できることが報告されている<sup>1-3</sup>。本研究では、細胞に nsPEFs を印加する電極を作成し、蛍光およびラマン顕微分光などを用いて細胞内応答機構を検討した。

**【実験】** 細胞に電場を印加する微小電極は、 $\phi$



**Fig. 1.** Schematic image of the application of nsPEFs to cultured cell.

50  $\mu\text{m}$  のタングステンワイヤー（金メッキ）を銅棒（ $\phi 2$ 、）にハンダ付けすることで作成した（Fig. 1）<sup>4</sup>。この電極を XYZ 微調ステージに取り付け、顕微鏡の明視野で細胞を選択して電場印加測定を行った。ナノ秒パルス電場の印加は、現有装置(Avtech)を用い、パルス幅 8 ns、6~8  $\text{MV m}^{-1}$  の矩形波パルス電場を 2 kHz の繰り返し周波数で印加している。

【結果・考察】 製作した微小電極を用いて、培養状態にある HeLa 細胞に nsPEFs を印加し、細胞状態の電場効果を検討した。Fig. 2 に nsPEF を 1000 パルスを加えた場合と 10 パルスを加えた場合の例を示す。パルス数が多い場合は、細胞は速やかに細胞死を示し、 $\text{Ca}^{2+}$  検出試薬を用いると、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度増加が観測された。細胞死に伴う膜損傷によって、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入したことが原因であると考えられる。しかし、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度増加は、パルス数が少なく、細胞形状が全く変化しない場合でも観測された。培地に  $\text{Ca}^{2+}$  を除去するキレート剤を導入すると蛍光強度が大きく減少することから、同様に培地に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入によることがわかる。ナノ秒パルス電場の印加によって、細胞膜に過渡的な穴(ナノポア)が生じることが流入の原因であると考えられる。

ナノ秒パルス電場の印加に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  検出色素の時間変化を Fig. 3 に示す。蛍光強度の時間変化は細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度の時間変化を表している。1000 パルスを加えた場合では、秒以下の速度で立ち上がり、数百秒の時定数で減衰する。パルス電場の印加に伴う膜損傷による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と膜チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  の放出による減衰に対応できると考えられる。一方、10 パルスを加えた場合では、蛍光強度に立ち上がりが観測され、その後、減少する。細胞膜に穴が形成されると、その流入速度は本時間分解能以下であると考えられることから、観測された立ち上がりの原因は、細胞膜にて形成されるナノポアの成長過程を観測していると考えている。蛍光の時間変化について、電場強度およびパルス数依存性などから詳細を検討している。

【参考文献】

- [1] K. Zhang, J. Guo, Z. Ge, J. Zhang, *Sci. Rep.* **4**, 5836 (2014).
- [2] K. Awasthi, T. Nakabayashi, N. Ohta, *ACS OMEGA* **1**, 396 (2016).
- [3] K. Awasthi, T. Nakabayashi, L. Li, N. Ohta, *ACS OMEGA* **2**, 2916 (2017).
- [4] 堀井, 平松, 中林, 第54回日本生物物理学会, 2Pos193 (2016).

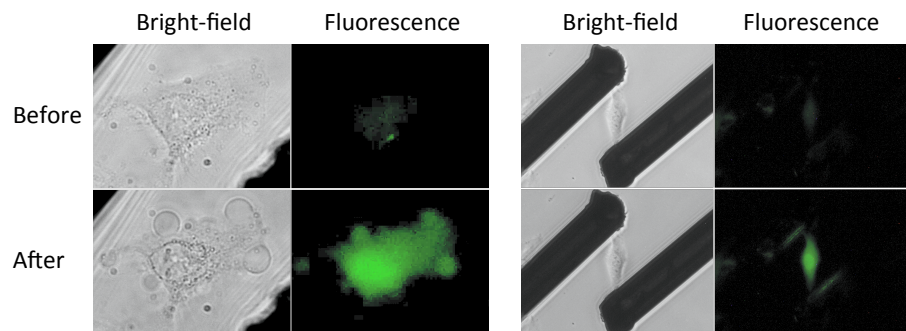


Fig. 2. Representative results of bright-field and fluorescence images of a single HeLa cell before and after the application of nsPEFs; (left) 1000 pulses, (right) 10 pulses.

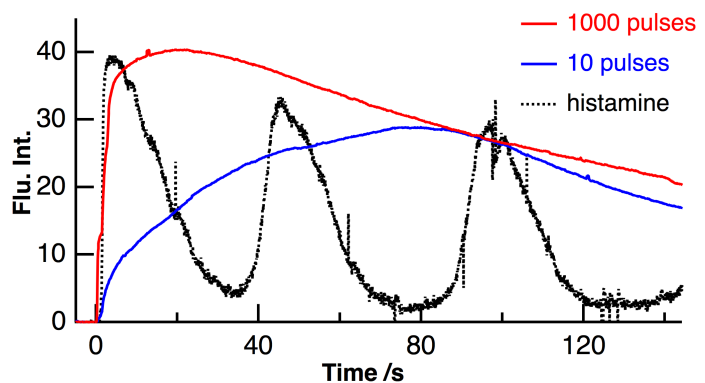


Fig. 3. Time courses of fluorescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye (Fluo-4) in a HeLa cell after the application of nsPEFs; (red) 1000 pulses, (blue) 10 pulses. Time course of fluorescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye after histamine stimulation is also shown for comparison (black, intensity is normalized).