

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 狭帯域パルス高電界に対する動物細胞の応答解析とその制御に関する研究  
(Response of Mammalian Cells to Narrowband Pulsed Electric Fields and Its Control)

熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学 専攻 衝撃エネルギー科学 講座  
( 主任指導 勝木 淳 教授 )

論文提出者 矢野 正彦  
(by Masahiko Yano )

主論文要旨

本論文は、重大な加熱を伴わない  $1 \text{ kV/cm}$  を超えるパルス高電界に対する培養動物細胞の生体応答として、細胞増殖の活性および細胞内 DNA の断片化現象を形態学および生化学的解析によって、高電界の非熱的な一次生体作用とそれを切っ掛けに誘導される二次的生体反応について議論している。本研究の特徴は、パルス発生源として狭周波数帯域のバースト正弦波高電界発生装置を用いることにあり、これは、従来の単極性矩形波パルス電界を用いた研究に比べて、電界パラメータ（電界強度、周波数）と生体応答の因果関係の理解を容易にする。逆に、生体応答の制御可能性という点でも優位である。本論文は、まず、細胞増殖の活性解析から、パルス高電界がアポトーシスなど細胞の不活化プロセスを促進するという従来の知見に加え、交流周波数やエネルギー等の印加する電界の条件次第で細胞増殖の活性が高まることを明らかにした。また、DNA への影響解析では、パルス電界の条件によって細胞内 DNA が二次的生体作用で断片化することが明らかとなった。

第 1 章では、まず、本論文の背景としてパルスパワー技術とその生体応用分野であるバイオエレクトリクス of 歴史的経緯と過去に行われた顕著な研究例と現状の課題等について触れる。これに基づき、本研究の着手に至った経緯、狙い、そして今後の展望や課題について述べる。最後に本論文の構成と各章の概要を示す。

第 2 章では高電界の生体作用の基本的な考え方を述べ、交流電界下の細胞内外電界分布計算および実際の動物細胞の応答を示しながら考え方の妥当性を検証した。電気的な対象としての細胞は多様な誘電物質の集合体と見なせる。特に、細胞膜は誘電膜と見なされ、外部電界の周波数に伴って膜のインピーダンスが変わるため、結果的に細胞内外の電界分布が大きく変わる。交流電界下の生体細胞の構成要素に対する電界分布を把握するために、単純化した真核細胞モデルの電界分布を、円筒座標系の二次元有限要素法を用いて計算した。1 MHz 以下では、細胞膜によって外部電流が遮断されるため内部電界は小さく、膜上の電界は外部電界の 1000 倍に達する。周波数の増加とともに膜上の電界が減少すると同時に、細胞内部の電界が高まり、10 MHz を超えると内部電界は

外部と同程度になる。実際に、バースト正弦波高電界を HeLa 細胞と CHO 細胞に印加すると、いずれの場合も 1 MHz 以下の周波数において、細胞膜へのストレスに起因するブルブが形成された。10 MHz 以上では膜構造に変化は見られなかった。このことから、少なくとも 100 MHz 以下の周波数範囲において、電界計算が妥当であるといえる。また、膜構造やタンパク質などの生体内分子への電界の直接作用を、分子同士または分子内の結合エネルギーをもとに考察した。その結果、数 kV/cm 以上の電界は生体分子に直接ストレスを与えることがわかり、電界分布の計算と併せて、3 MHz 以下の周波数において生体分子の構造または機能に影響が現れる可能性があることがわかった。

第 3 章では、パルス電界印加後の細胞増殖の活性の変化、およびこれに伴う増殖に関連する生体内反応について述べている。バースト正弦波高電界を用い、細胞増殖の活性における電界周波数および印加回数への依存性を調べた。細胞増殖活性の測定には市販の自動細胞数測定装置を用いた。培養プレートに張り巡らされた微細電極への細胞の付着状態によって電極のインピーダンスが変化することを利用したものである。パルス電界を 30 回印加した場合、コントロールに比べて細胞増殖の活性が増大し、特に周波数 3 MHz で著しい活性化が見られた。印加回数 100 回では細胞増殖の活性化は見られず、1 MHz 以下で著しく活性が低下した。この場合、生化学的手法によりほとんどの細胞が死んでいることを確認している。電界分布計算に基づいて膜電界と細胞増殖の活性の因果関係について議論し、細胞膜に適度なストレスがかかるような条件において増殖活性が高まっていることを示した。

第 4 章では、パルス電界の細胞内 DNA、およびアポトーシスで重要な役割を果たすタンパク質カスパーゼ 3 の活性への影響について議論している。DNA 損傷度は電界パラメータに依存し、電界強度 200 kV/m では周波数 300 kHz で、電界強度 300 kV/m では周波数 1 MHz 以下で DNA 損傷が見られた。特に電界強度 300 kV/m、周波数 300 kHz の条件で DNA 損傷が著しかった。これらの DNA 損傷はパルス印加後の培養時間とともに増大していった。アポトーシス実行因子であるカスパーゼ 3 は電界印加直後に一部の細胞で活性化しており、時間の経過とともに同様の細胞が増えた。電界印加 30 分後でもヨウ化プロピジウムに核酸が染まらないことから、膜構造は維持されていることがわかる。これらの細胞は電界印加 1 時間後で細胞死を示した。これらの結果は、細胞死が通常のアポトーシスとは異なる反応経路によって起こっている可能性を示唆し、メカニズム解明が必要不可欠ではある。いずれにしても、バースト交流電界は新しい生体刺激であるといえる。

第 5 章で博士論文の総括を行い、研究を通じて得られた主要な成果と将来の展望について述べた。