

強電界パルスを印加した動物細胞内のCa²⁺イオンの挙動とその制御

永久智浩* 大西伸明** 本田一帆*** 趙セイエン*** 勝木淳
(熊本大学 *工学部 **大学院自然科学研究科 ***パルスパワー科学研究所)

1 はじめに

細胞にパルス高電界 (PEF) を印加すると非熱的な作用を細胞へ与えることができる. ある条件で PEF を動物細胞に印加すると, 二次的な細胞応答のメッセンジャーとして知られるカルシウムイオン (Ca²⁺) の細胞内濃度が即時に上昇し^[1], 微小な濃度変化が多様な生体反応を誘起する. PEF によって細胞内 Ca²⁺濃度を制御し, 細胞死もしくは活性を促す研究が行われているが, 細胞内挙動は瞬間的であり, 機構はよくわかっていないため, 細胞応答を制御するために Ca²⁺挙動機構を理解する必要がある.

本研究では, ヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa) を用い, パルス条件の異なる PEF により誘導される細胞内 Ca²⁺挙動を調べた.

2 実験装置及び方法

2.1 パルス発生装置

本実験ではパルス幅の異なる 10 μ s と 20 ns のパルスを用いた.

2.1.1 μ sPEF 発生装置

10 μ s パルスは, 所定の電圧に充電したコンデンサ (1 mF) を IGBT のチョッピングによって出力した.

2.1.2 nsPEF 発生装置

20 ns パルスは, 同軸ケーブルを所定の電圧に充電し, 負荷との間に置いた機械スイッチをによって出力した.

2.2 マイクロギャップ電極と顕微鏡システム

パルス印加時の細胞の様子を観察するため, 顕微鏡下で電極間隔を数十 μ s まで調整可能なマイクロギャップ電極を採用. 最大 100 kV/cm の電界を印加可能. 顕微鏡は蛍光撮影が可能である.

2.3 対象細胞

本実験ではヒト子宮頸がん由来細胞 HeLa 細胞を用いた. 培地には, D-MEM に FBS を 10% とペニシリン及びブストラプトマイシンを 1% 加えたものを使用した.

3 実験結果及び考察

3.1 細胞内 Ca²⁺の高速顕微鏡観察(10 μ s)

時間幅が 10 μ s の単極性強電界パルスを印加した直後の細胞内 Ca イオン濃度変化の分布を図 1(a)に示す. この画像は印加前の蛍光像との差分である. 印加時における細胞外液には Ca²⁺が含まれる. 結果から, パルス印加直後に細胞内 Ca²⁺濃度は瞬時に上昇し. パルス幅 10

μ s の場合, 電界に沿った方向の細胞の縁部から Ca²⁺が出現している. これは, 電界による細胞内 Ca イオンの流動と細胞外からの膜を通した流入によるものと考えられる.

3.2 細胞内 Ca²⁺の高速顕微鏡観察(20 ns)

時間幅が 20ns の場合の顕微鏡写真を図 1(b)に示す. 10 μ s と同様に印加前の蛍光像との差分である. この場合は, 細胞内部の核周辺に Ca²⁺が現れている. これは細胞内 Ca²⁺貯蔵庫である小胞体からの放出であることが, 別実験によって明らかとなっている^[4]. 20ns のパルスは周波数が最大 100MHz にも及ぶため電界が小胞体の Ca²⁺チャネルを刺激したためと考えられる.

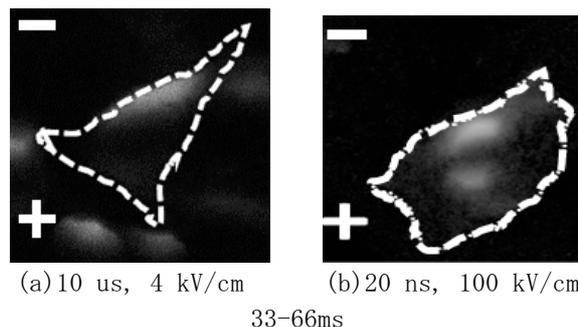


図 1. パルス印加時の Ca²⁺濃度変化分布

4 まとめ

本研究では, 高速蛍光顕微鏡システムを用い, パルス高電界による動物細胞の Ca²⁺挙動についてパルス条件への依存性を調べた. その結果, パルス条件の違いによって細胞内 Ca²⁺挙動が大きく変化することが明らかとなった.

参考文献

- [1] P. Thomas Vernier, Biochemical and Biophysical Research Communications 310 (2003) 286-295
- [2] I. Semenov, S. Xiao, Cell Calcium, Vol. 54, pp.145-150 (2013)