

高電圧極短パルスと 低電圧長パルスの組み合わせ による遺伝子導入技術

有明工業高等専門学校

創造工学科 教授 河野晋

2019年12月12日

背景

- 遺伝子などの物質を受精卵や細胞に導入する技術には物理的方法、化学的方法、生物学的方法があるが、導入率・生存率・実験効率(時間効率)・費用・実験者に求められる熟練度などに関して各方法には一長一短がある。
- これらの短所を改善し、技術向上することは、遺伝子導入の研究や胚細胞に対する化学物質の影響調査をおこなう上で大変有用なことである。

細胞内への遺伝子導入ができると・・・

- ・遺伝子機能の調査
- ・発現機序の調査
- ・遺伝子組み換え技術による有益な物質の生産

等・・・

代表的な導入方法

[ウィルスベクター]

・・・アデノウィルス、レトロウィルスなど

[非ウィルスベクター]

・・・リボフェクション、リン酸カルシウム法、超音波法

マイクロインジェクション法、

エレクトロポレーション法～電気パルスを使用する方法

従来技術とその問題点1

[ウィルスベクター]

- ○ 確実性がある
- × 対象細胞のガン化が懸念

[マイクロインジェクション]

- ○ 確実性がある
- × 高額な専用の装置が必要
- × サンプル1個を得るのに必要な時間が長い
- × 操作者に高度な技術(熟練)が必要

従来技術とその問題点2

[従来のエレクトロポレーション法]

- ○ 簡便でスピーディーな導入実験が可能
- × 導入効率・生存率が低い

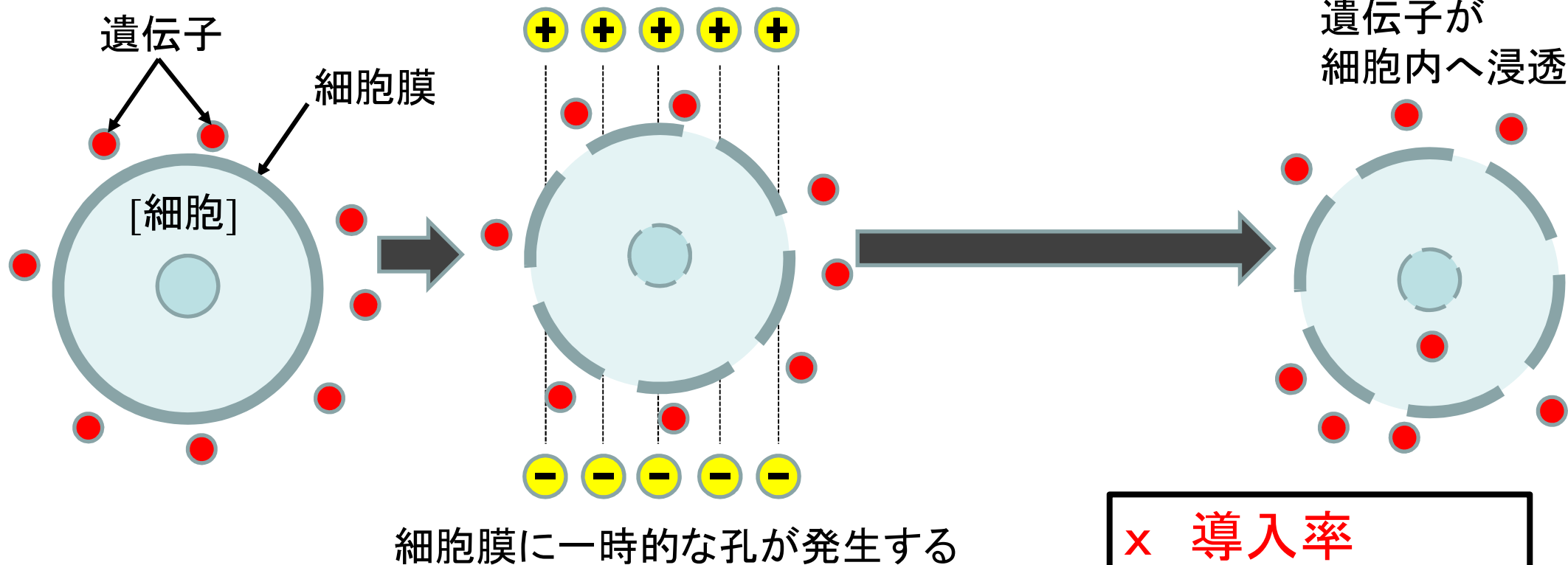
[最近のマルチパルスエレクトロポレーション法]

- ○ 細胞によっては、高い導入効率・生存率
- × 細胞によっては、依然、低い導入効率・生存率
- × パルス条件の設定が実験者だけでは難しい

エレクトロポレーション法 (EP法) 1

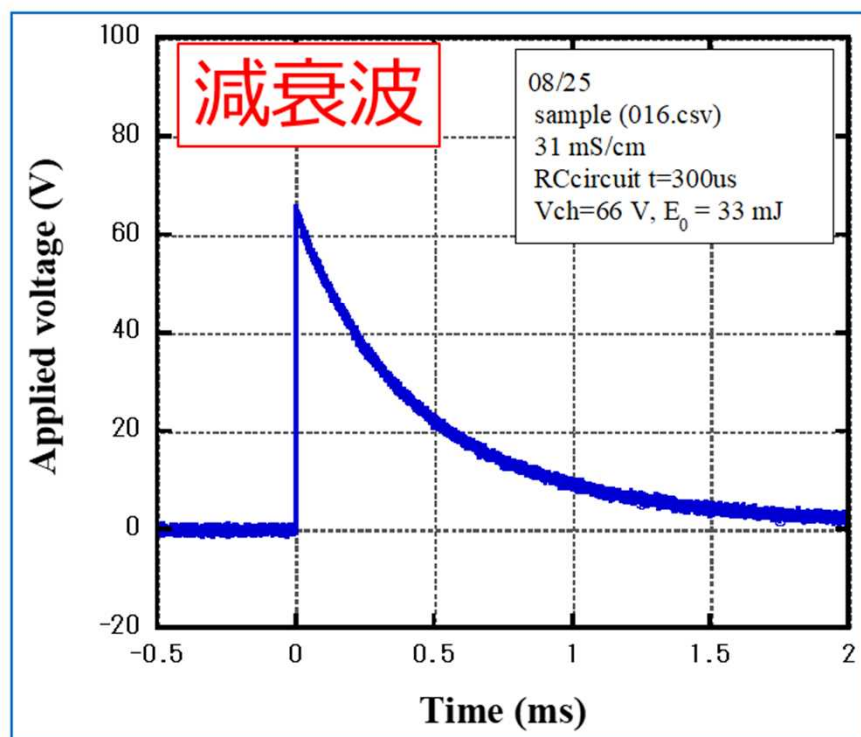
(シングルパルス)

電気パルスを印加すると

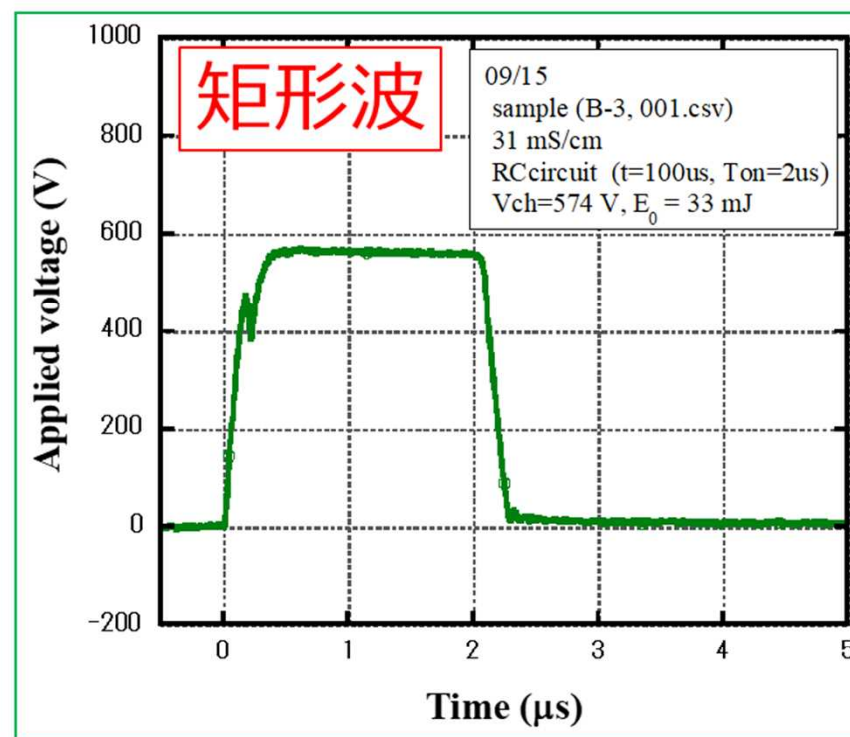


× 導入率
はあまり良くない

(従来)電圧波形



ミリ秒
(1 0 0 0 分の 1 秒)

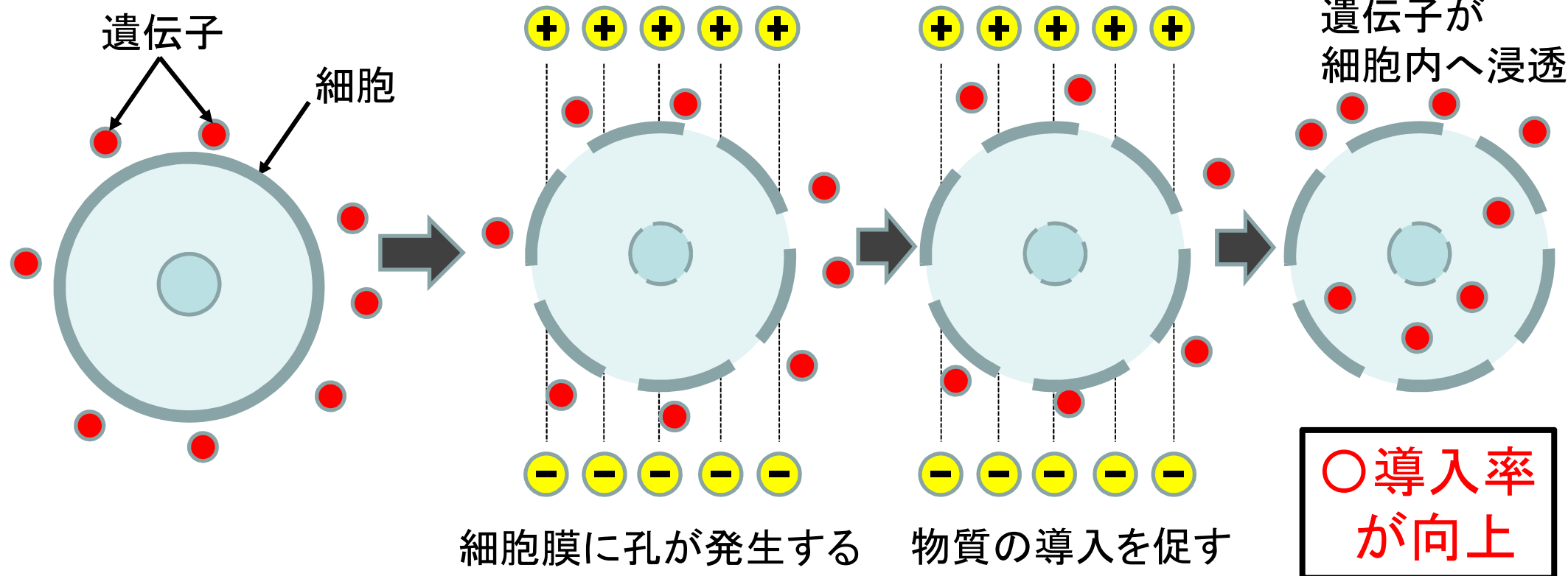
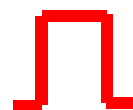


マイクロ秒
(1 0 0 万 分の 1 秒)

エレクトロポレーション法（EP法） 2

（マルチパルス）

役割の異なる電気パルスを印加すると

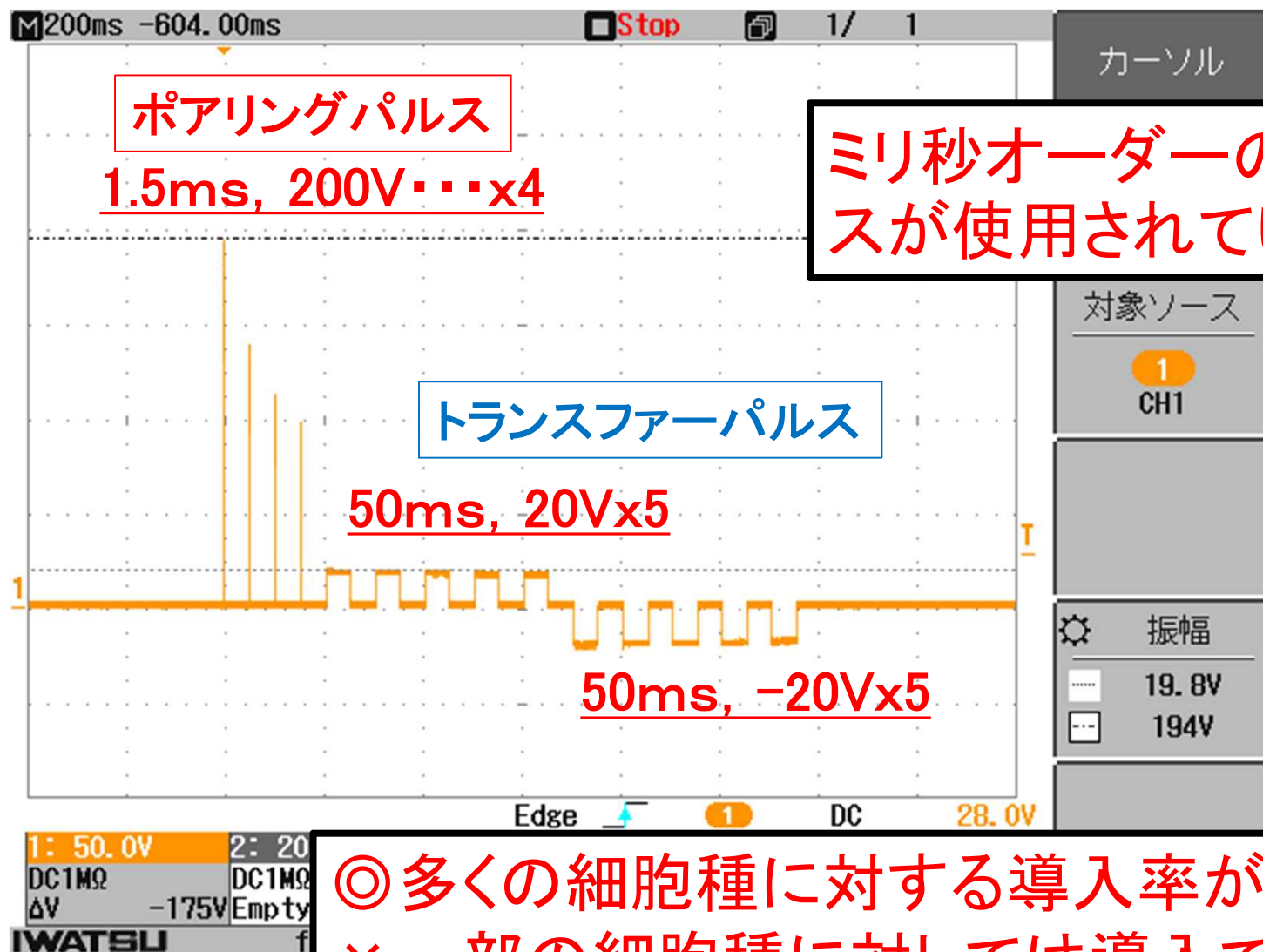


ポアリングパルス

トランスファーパルス

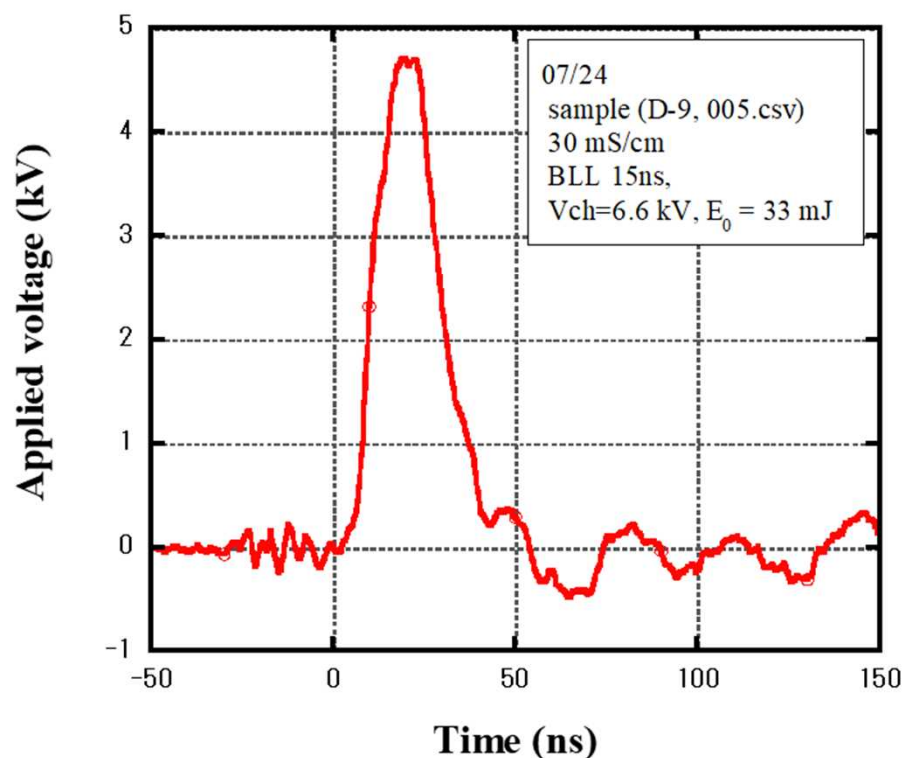
○導入率
が向上

(従来)マルチパルスEPの例

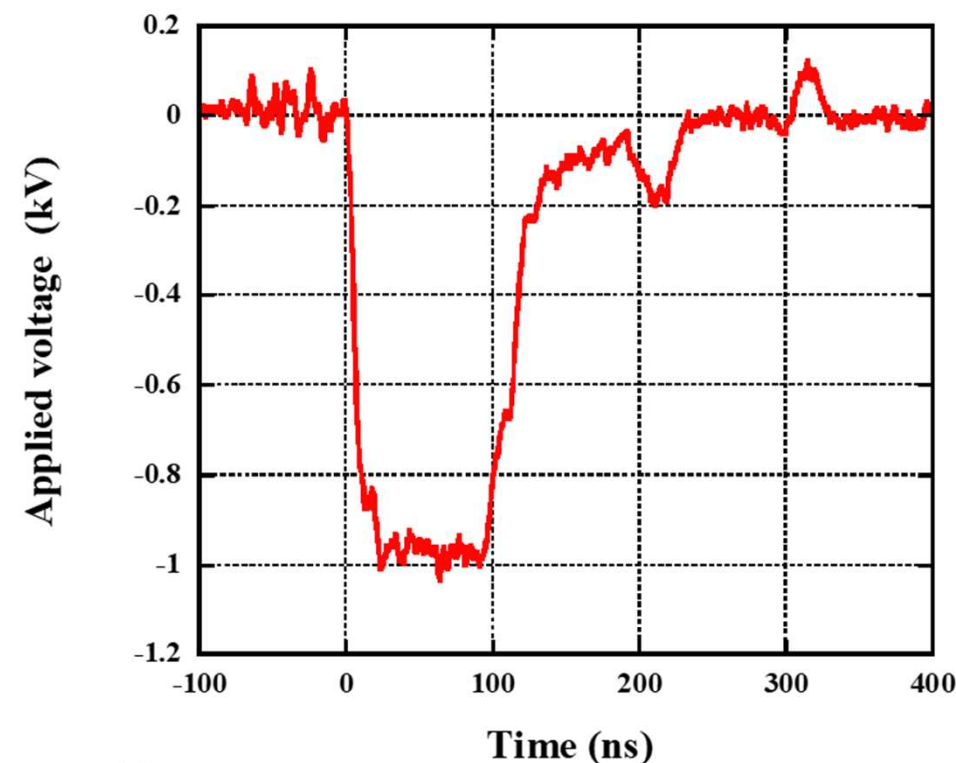


◎多くの細胞種に対する導入率が向上
×一部の細胞種に対しては導入できず

(新)ナノ秒高電圧パルス



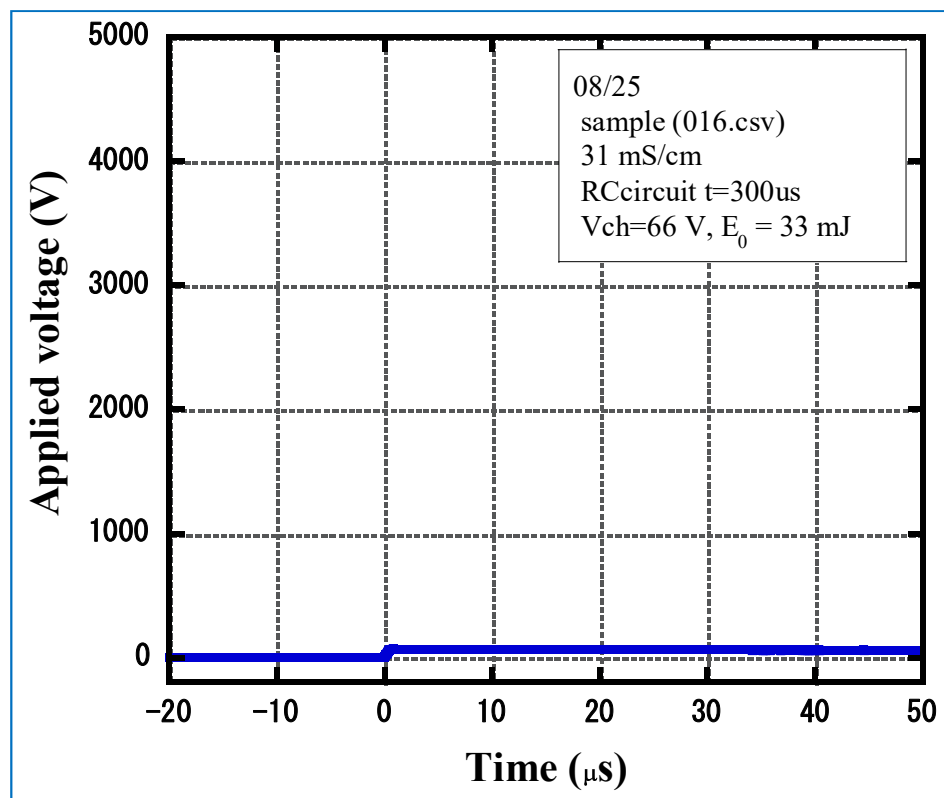
正極性パルス



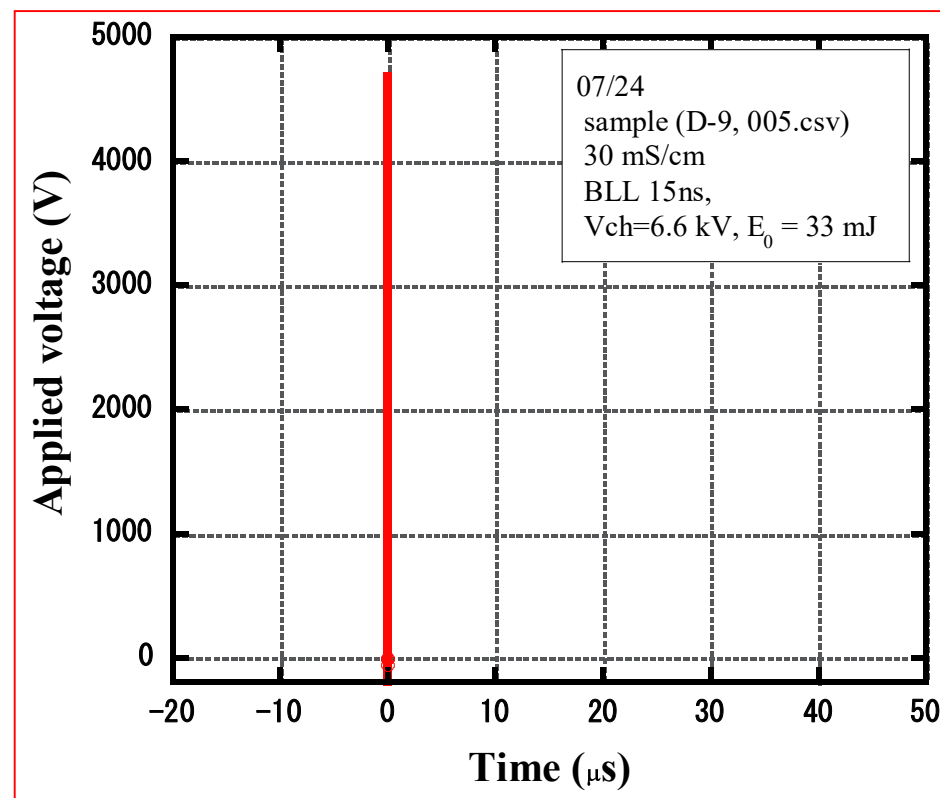
ナノ秒
(10億分の1秒) 負極性パルス

低電圧長パルスと高電圧極短パルスとの比較

低電圧長パルス
(マイクロ秒, ミリ秒)

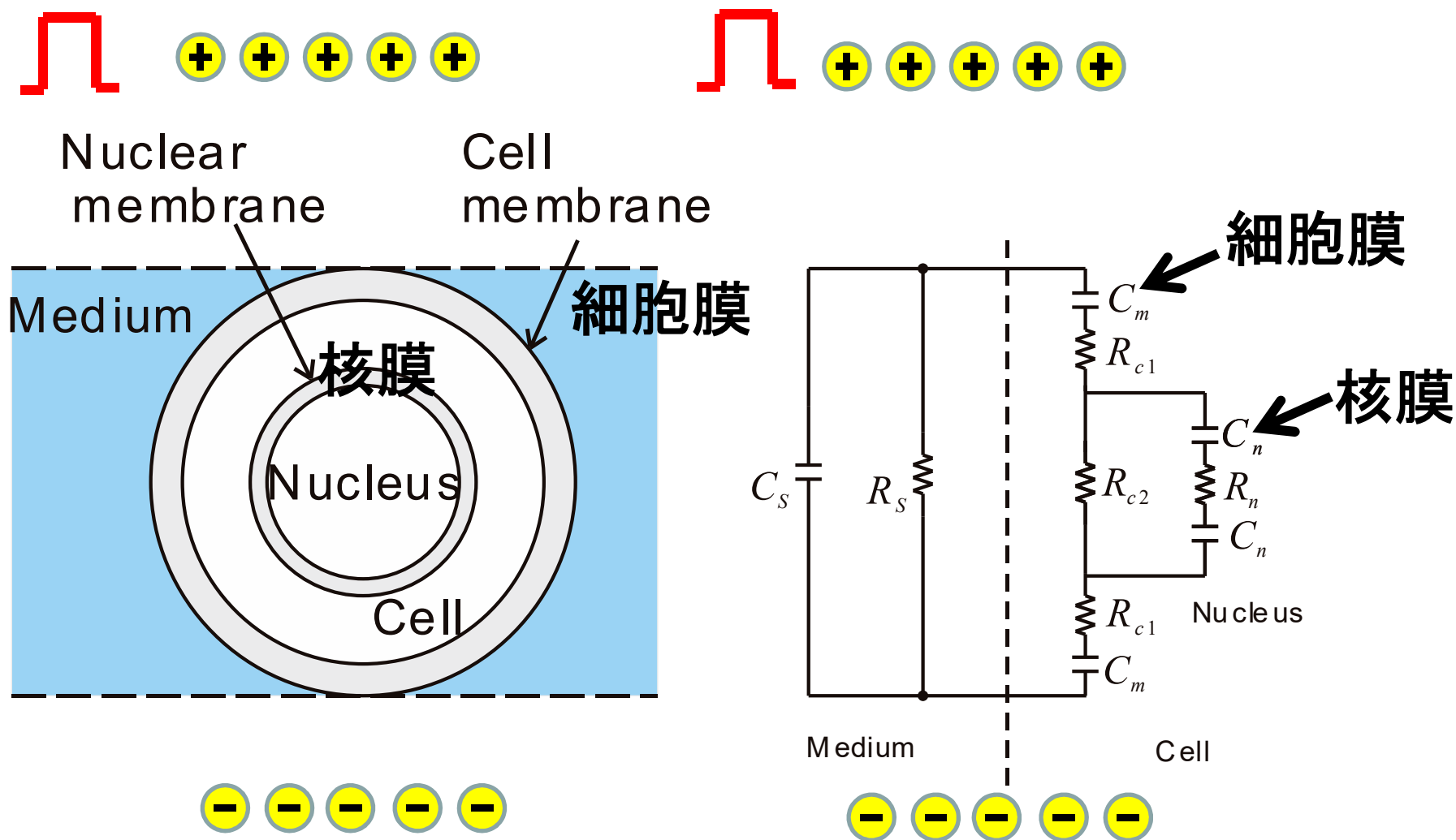


高電圧極短パルス
(ナノ秒-パルスパワー領域)



(同一負荷 $20\ \Omega$, 同一エネルギー 33mJ で比較)

細胞の電気等価回路



細胞膜が1Vに充電されると孔があく

電圧パルスの細胞膜と核膜への影響

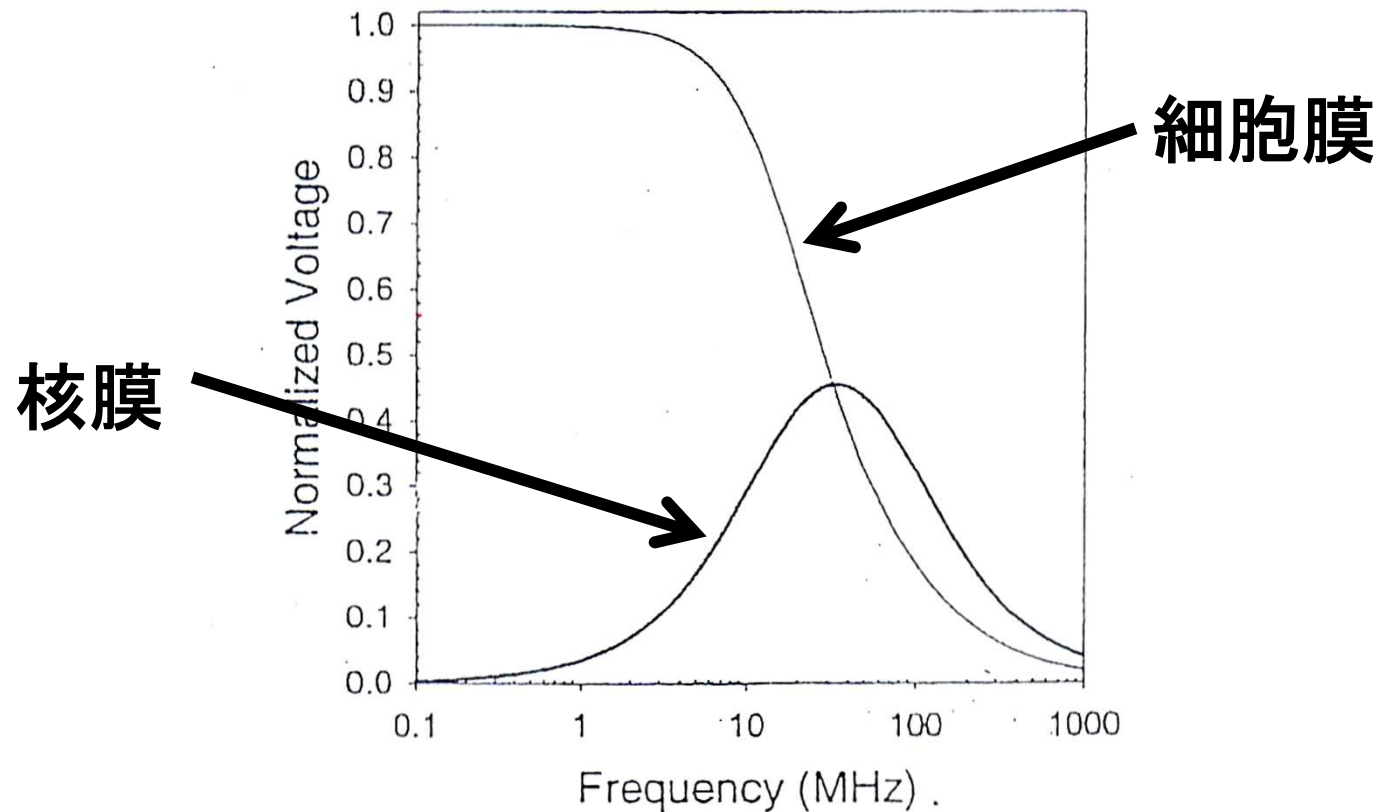


Fig. 6. Normalized voltages across the outer membrane (thin line) and across the nuclear membrane (bold line) versus frequency for a cell with cell dimensions of $10\ \mu\text{m}$ and nuclear dimensions of $5\ \mu\text{m}$.

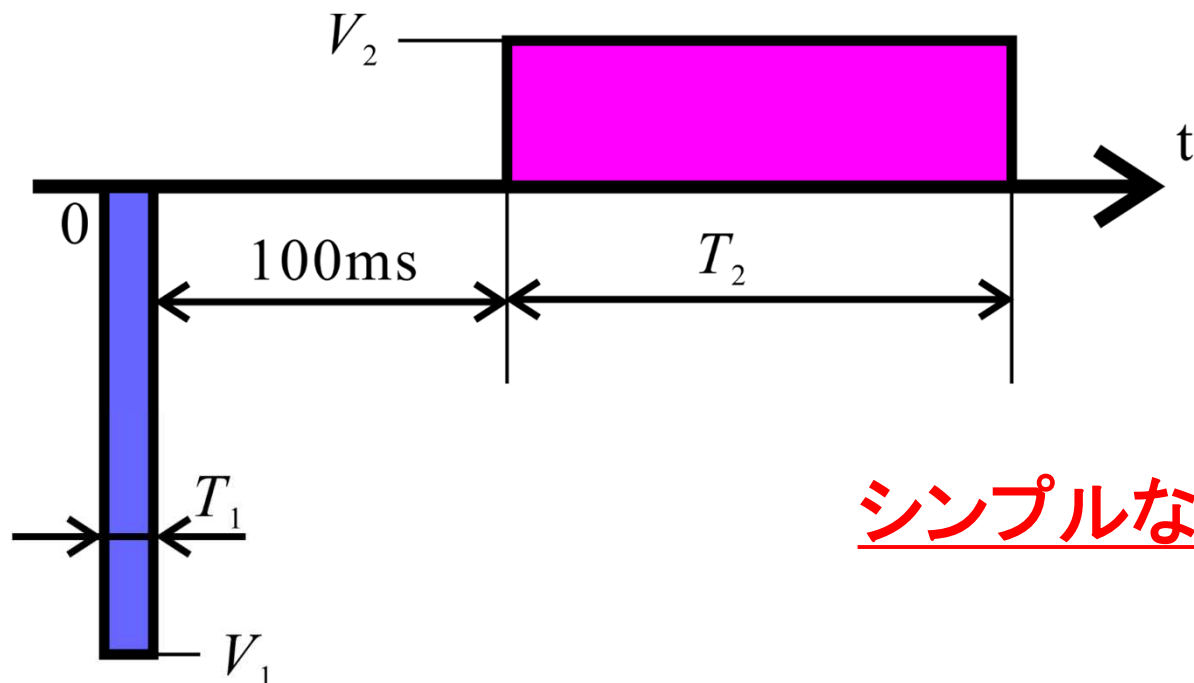
出典: IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE, VOL. 30, NO.1, Bioelectrics-New Applications for Pulsed Power Technology. Karl H. Schoenbach et al.

- ・マイクロ秒以上のパルスは細胞膜に影響あり。
- ・ナノ秒パルスになると核膜にも影響があらわれはじめる！？

新技術の特徴・従来技術との比較

- ① [ポアリングパルス]にナノ秒高電圧パルス
- ② [トランスファーパルス]に低電圧長パルス
(非常に広範囲なパルス幅・電圧の出力が可能)
- ③ ①と②を組み合わせたシンプルな2パルスEP
- ④ 使いやすく高電圧でも放電しない構造のキューベット

(提案する)マルチパルス



シンプルな2パルスEP

[P.P.]

[ポアリングパルス]
ナノ秒高電圧パルス

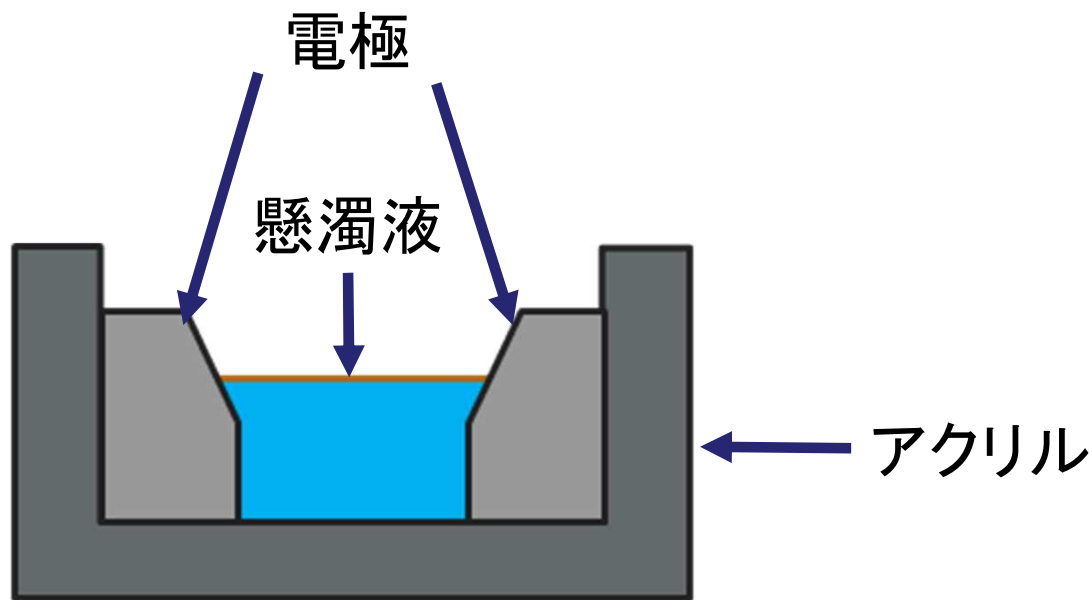
[T.P.]

[トランスファーパルス]
低電圧長パルス

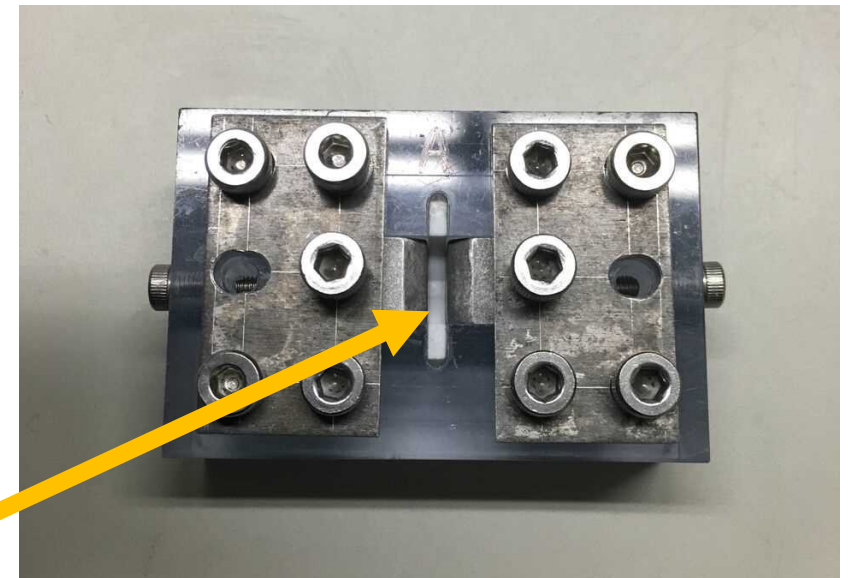
(非常に広範囲なパルス
幅・電圧の出力が可能)

新キューベット

キューベット：電気パルスを印加する際、使用する電極付き水容器。
電極間に細胞と培地を混合した懸濁液を入れてパルスを印加する。



キューベット(負荷)

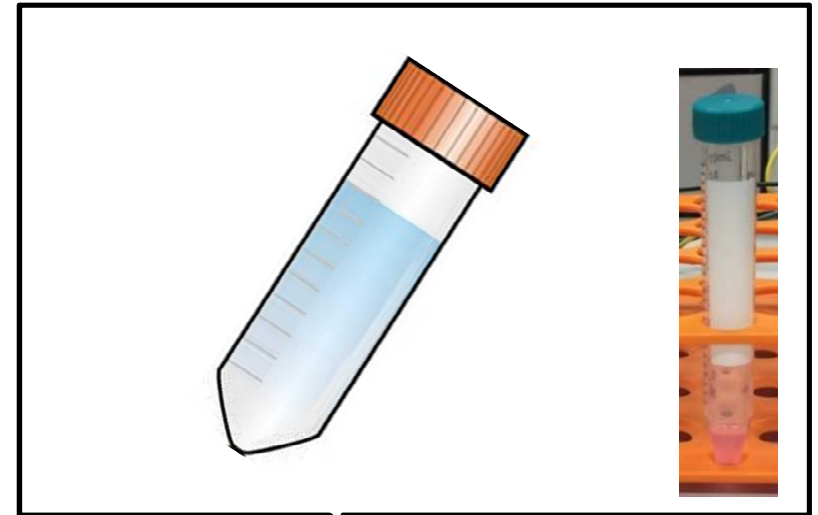
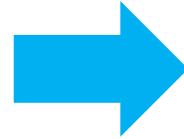


キューベット外観

従来品に比べて

- ・懸濁液の出し入れがしやすく、
- ・高電圧による放電が発生しにくい 構造

導入実験 ～対象細胞、懸濁液



[細胞]

- ・HL-60細胞(白血病細胞株)

[懸濁液]

- ・培地RPMI1640
- ・GFPベクター70 $\mu\text{g/ml}$
- ・細胞密度 約 $5 \times 10^6 \text{mm}^3$

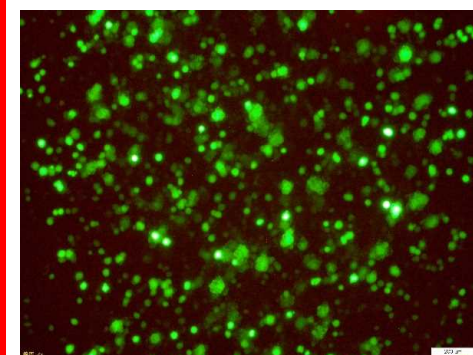
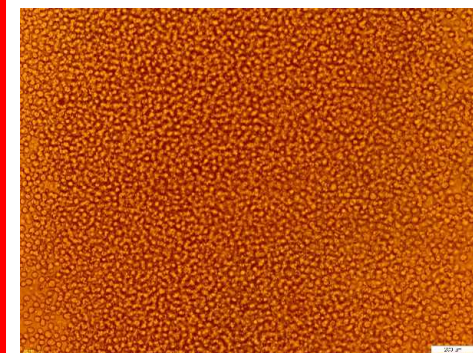
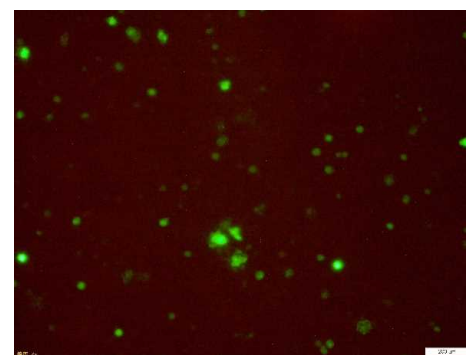
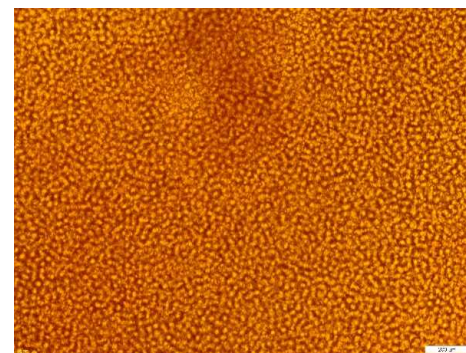
実験結果1 ～ P.P.による比較

パルス条件

P.P.	T1, V1	Energy
a	100us, -100V	25 mJ
b	100us, -140V	49 mJ
c	200ns, -2kV	20 mJ

+

T.P.	T2, V2	Energy
a	50ms, +90V	10.1 J
b		
c		



a

マイクロ秒パルス

b

マイクロ秒パルス

c

ナノ秒パルス

実験1日後に観察

(上: 明視野, 下: 蛍光)

実験結果2 (T.P.による比較)

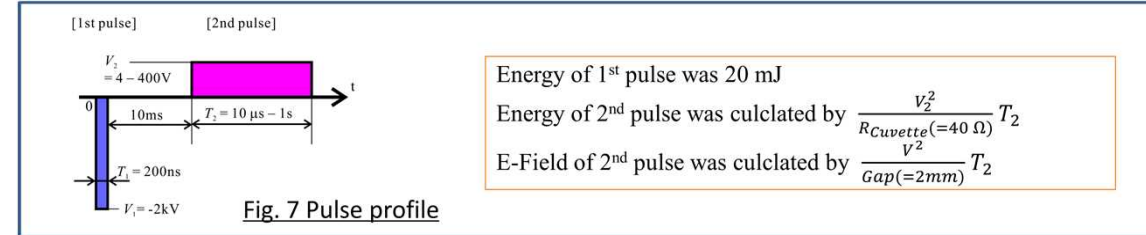
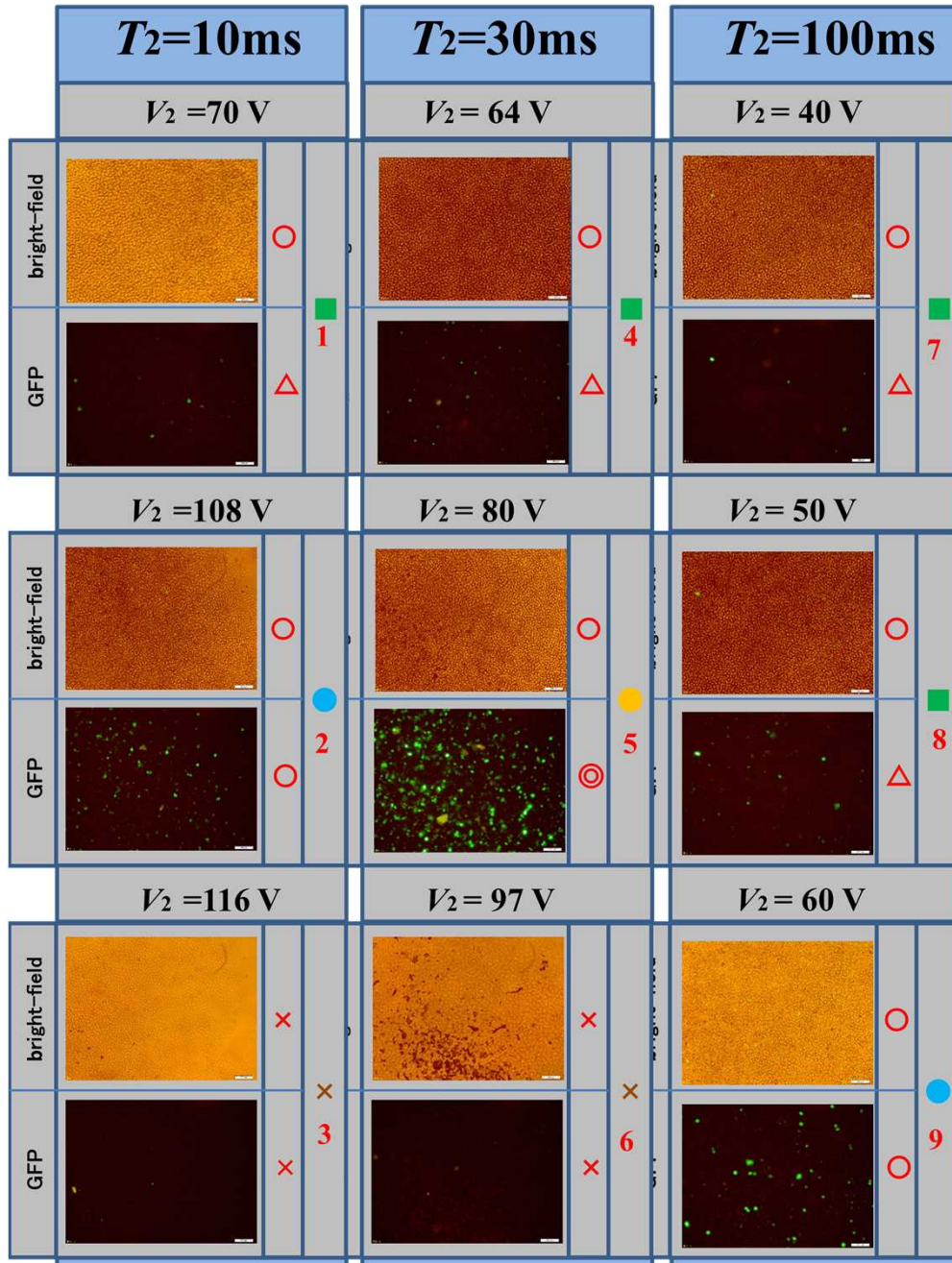
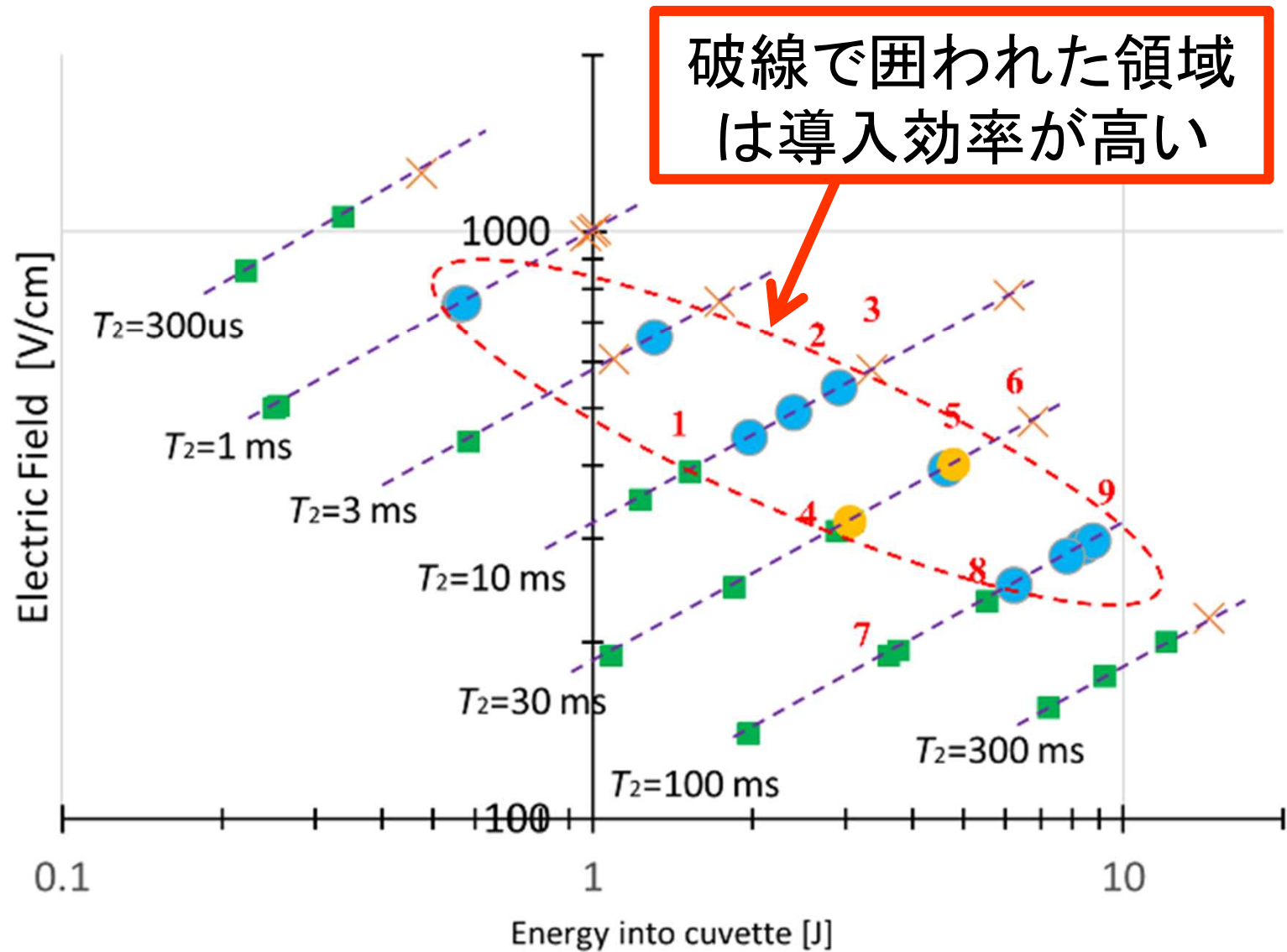


Table.1 Evaluation

By bright field image		By GFP image		By both image	
Cell normality	sym bol	Cell with GFP expression	sym bol	Efficiency of transformation	sym bol
Good	○	So many	◎	Better	●
		Many	○	Good	●
		Few or none	△	No effect	■
Bad	×	Few or none	×	Too much damage	×

(上:蛍光, 下:明視野)

実験結果2(つづき)



By both image	
Efficiency of transformation	symbol
Better	●
Good	●
No effect	■
Too much damage	×

想定される用途

- これまでに導入が困難であった細胞に対する遺伝子導入が可能となる。
- 現状よりも高効率な遺伝子導入技術として確立できれば、医学、薬学、農学、生物学など幅広い分野において基礎から応用まで利用される。

実用化に向けた課題

- 現在、一部の細胞に対する最適なパルス条件の調査ができている。
- 今後、ほかの細胞についても実験を行い、本技術が適用可能であるかについての調査が必要である。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞への物質導入装置,
および細胞への物質導入方法
- 出願番号 : 特願2019-14689
- 出願人 : 独立行政法人国立高等専
門学校機構
- 発明者 : 河野晋、富永伸明

お問い合わせ先

有明工業高等専門学校

創造工学科 河野 晋

TEL 0944-53-8712

FAX 0944-53-8712

e-mail kohno@ariake-nct.ac.jp

同 総務課総務企画係

TEL 0944-53-8665

FAX 0944-53-1361

e-mail sousou-staff@ml.ariake-nct.ac.jp