Electroporation による高分子の細胞膜透過促進*
(HepG2 を用いた高分子の細胞膜透過係数の測定)白 樫 了^{*1}, 酒 井 康 行^{*1}**Enhancement of Membrane Permeability to
Macromolecules by Electroporation
(Measurement of Membrane Permeability of HepG2)**Ryo SHIRAKASHI^{*2} and Yasuyuki SAKAI^{*2} Institute of Industrial Science, The University of Tokyo,
4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8505 Japan

Vitrification is one of the ideal methods for cryopreserving cells and tissues. Most of the vitrifying solutions of low toxicity and high vitrifying ability are macromolecules, which do not permeate cell membranes. In the present study, enhancement of membrane permeability by electroporation is discussed. Membrane permeability of human hepatomas (HepG2 cells) to several macromolecules (600-70 000 Da) was measured with laser confocal fluorescent microscopy (LCMS). It was found that under the experimental condition, the membrane permeability of HepG2 to the given molecules is as large as 10^{-8} m/sec, and the membrane permeability scarcely affected by the strength of electric field.

Key Words: Bioengineering, Biological Tissue, Membrane Permeability, Electroporation, Macromolecule, Vitrification, Cryopreservation

1. 緒 言

機能を維持させたまま、細胞やより体積の大きい生体組織を長期保存する需要は、遺伝子工学や生体組織工学を応用した医療行為の進展により拡大し続けている。現在一般的に行われている凍結保存法は、凍結時に対象の内外に生成する氷による致命的な損傷(凍害)をできるだけ抑える必要から、凍結過程の冷却速度を制御している。また、一方では、氷の生成を抑えるため、氷核生成が起きにくい凍害防御剤を適切に選択して、対象の支持液として利用する方法が行われている。この方法は、氷核生成を完全に抑える水溶液(ガラス化水溶液)を凍結の前処理として生体に浸透させることで、冷却速度に関わり無く凍害が回避できる点で優れており、特に大型の生体組織の保存に有効であると考えられている。多くの研究者達^{(1),(2)}が、最適なガラス化水溶液の組成や、簡便な生体への浸透方法^{(3),(4)}の開発を目指している。しかしながら、ガラス化水溶液には、細胞膜透過性が高いこと、生化学毒性が低いこと、ガラス化しやすいこと、といった一般的には両立し難い条件がもとめられているため、未だに決定的な成果は得られていない。特に、高い細胞膜透過性と高

いガラス化能力は、相反する性質であり、ふつう細胞膜透過性が高い分子は、疎水性の低分子であるが、高いガラス化能力を持つ分子は、高粘度、高分子、親水性である。細胞膜透過性を制御することで、任意の分子を細胞内に導入可能にすることは、この様な相反する拘束を克服する方法として有効な方法の一つであると考えられる。Tonerら^{(5),(6)}は、遺伝子操作したバクテラ(Staphylococcus-aureus a-toxin: H5)を繊維芽細胞(3T3)に導入することで、通常は細胞膜を透過しないスクロースの膜透過係数を 28.55×10^{-10} m/sec⁽⁶⁾にすることに成功し、細胞膜透過性が制御可能であることを示している。しかしながら、対象としている分子が二または三糖類に限られており、その分子量は、せいぜい1000Da程度である。また、バクテラを使用することは、新たに細胞にあわせたバクテラの適切な選定という障害が生じることから、必ずしも簡便な手法とは言いがたい。

本研究では、任意の細胞群にできるだけ分子量が大きく、生体融合性が高い分子を、簡便な非破壊的方法で導入することで、細胞内核生成を抑え、完全なガラス化を実現することを最終的な目的とした。Electroporation(電気穿孔)は、細胞膜を可逆的に電気絶縁破壊することで、膜の透過性を格段に上げる方法で

* 原稿受付 2000 年 12 月 5 日。

^{*1} 正員、東京大学生産技術研究所(〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1)。

E-mail: aa 21150@iis.u-tokyo.ac.jp

あり、DNA(分子量約10万以上)の動物細胞内への導入等に用いられている。この方法は、細胞に対して生物的・化学的な操作を加えない点、対象全体を一度に操作できる点、透過できる分子量が大きい点といった利点があり、上記の目的に適していると考えられる。但し、植物細胞については、細胞膜より電気絶縁破壊しにくい細胞壁が存在する為、通常は有効に働かない。高分子やDNAの動物細胞内の導入に関する定量的な扱いは、株細胞、正常細胞を問わず、従来の研究^{(7),(8),(9)}でもなされているが、細胞膜透過係数といった速度論的な定量化や、導入する分子の分子量と細胞膜透過係数の関係といった凍結保存における前処理の設計で不可欠な要素の考察が不足している。本研究では、ヒトのガン細胞由来肝細胞(HepG2)をもちいて、種々の分子量(668~70,000Da)の高分子の細胞膜透過係数を測定し、凍結保存における前処理に応用する際の指針を得た。

主な記号

- a: 細胞半径またはシェル内半径
- b: 細胞半径またはシェル外半径 ($\sim a$)
- $C(r,t)$: 位置 r , 時間 t における高分子濃度
- C_m : 細胞膜電気容量 $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- C_{in} : 細胞内高分子平均濃度
- C_o : 細胞外高分子濃度
- D_{out} : 細胞(シェル)外の高分子の拡散係数
- D_m : 細胞(シェル)膜内の高分子の拡散係数
- D_{in} : 細胞(シェル)内の高分子の拡散係数
- E : 電界強度
- E_{cri} : 細胞膜電気絶縁電界強度
- I_1 : 初期細胞内平均蛍光強度
- I_2 : 無限時間後(飽和後)の細胞内平均蛍光強度
- $I(t)$: 細胞内平均蛍光強度
- P : 有効細胞膜透過係数
- P_{ele} : 絶縁破壊した領域の細胞膜透過係数
- Q_i : 細胞(シェル)膜を透過した高分子の累積モル量
- T : 細胞膜回復時間
- T_p : パルス間隔
- V_m : 細胞膜電位 $\sim 200\text{mV}$
- V_{cri} : 電気絶縁細胞膜電位
- t : 時間
- δ : パルス電界の印加時間
- θ : 電気絶縁破壊が起きる領域の角度
- ρ_i : 細胞内導電率 $\sim 100 \Omega\text{cm}$
- ρ_o : 細胞外導電率
- τ : 細胞膜帯電緩和時間

Fig.1. The schematics of electroporation

Macromolecules	Wave length (nm)		Molecular Weight	Concentration (mM)
	Abs.	Em.		
Dextran 70000	492	518	70,000	0.1
Dextran 10000	492	518	10,000	0.1
Propidium iodide	535	617	668.4	0.015

Table 1 Contents and the fluorescent property of macromolecule solutions. Dextran 70000 (D-7172), Dextran 10000 (D-7170), Propidium iodide (P-1304).

2. 実験方法

2.1 Electroporation-測定に用いる細胞懸濁液の準備

10vol%のウシの血清(Fetal Bovine Serum: FBS)-培養液(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM)で培養したHepG2を30mM KCl水溶液に懸濁しすることで導電率を調整した。この懸濁液は、通常の1/5倍程度の低浸透圧であるが、次節で述べるように、細胞径を大きくし、球形に近い形にすることで、細胞膜の絶縁破壊がより低い電圧で起きやすくなることができると細胞膜透過係数の測定にとっては有効である。10 μl の懸濁液と表1に示す3種類の蛍光色素(Molecular Probe, U.S.A.)でラベルした高分子(デキストランまたはPropidium Iodide: PI)溶液10 μl を、それぞれマイクロピペットで取り出し、マイクロチューブ内で混合し、測定用細胞懸濁液とした。なお、デキストランは糖類の一種で、低分子量のものは非膜透過性の凍害防御剤として用いられることで知られている。

2.2 Electroporationのパラメータの設定

Electroporationの一般的な概念は、詳しくは文献⁽¹⁰⁾, ⁽¹¹⁾にあるので、ここでは簡潔にelectroporationの設計について示す。Electroporationの操作パラメータは、印加パルス電界強度 E , 印加パルス長さ δ と印加パルスの時間間隔 T_p である。図1に現象の概念図を示す。直

(a) Experimental apparatus

(b) Electric Pulse generator

Fig. 2. The setup for measuring the membrane permeability after the electroporation. (a): the apparatus for confocal laser microscopy of electroporated cells. (b): the fast high voltage pulse generator. HTS: Fast High voltage Transistor Switch (max:12kV, 3MHz), HV: High Voltage DC power source (max: 30kV), R_p : 200 Ω (variable), C_p : 800pF (7kV), R_s : 200 Ω (variable), C_L : 700pF (5kV), C_B : 1 μ F (12kV), R_L : Load of wire Electrodes

径 $2a$ の細胞で、領域 θ だけ絶縁破壊を起こさせるに必要な電界強度 E は、次式で表せる⁽¹⁰⁾.

$$V_{crit} = 1.5 E a \cos\theta \pm V_m \quad (1)$$

但し、 V_{crit} は絶縁破壊膜電位であり、細胞の種類によらず1Vである。また、細胞膜が帯電し、絶縁電圧まで達する緩和時間 τ は、

$$\tau = a C_m (\rho_i + 0.5 \rho_e) \quad (2)$$

の様に表すことができる⁽¹⁰⁾。絶縁破壊した細胞膜が元の状態に戻るまでの復元時間 T は、細胞支持液の温度に大きく依存しており、温度が低いほど回復に時間がかかる。膜の相転移温度を考えると、最低でも4℃以上の温度に細胞支持液の温度を保つ必要がある。この場合、30分あれば細胞膜は回復していることが実験的に知られている⁽¹⁰⁾。

本実験では、絶縁破壊膜に必要な最低電界強度を、式(1)に $a=20\mu\text{m}$, $\theta=0^\circ$ を代入して求めた値(約270V/cm)として、印加電界強度をこの値より徐々に高めていった。印加したパルス長さは、式(2)より、 $\tau=0.35\sim0.7\mu\text{sec}$ と求められるので、 $\delta=6\mu\text{sec}$ とした。また、絶縁破壊の影響を調べるため、印加パルスは1回とした。但し、式(2)で用いられる C_m や ρ_i は細胞固有の値であり、細胞の種類に依らずほぼ一定である⁽¹⁰⁾。また、 ρ_e の値は今回の実験の場合は、15mM KCl水溶液(30mMの2倍希釈)の500 Ωcm の値を用いた。印加パルス長さ δ は τ の10倍程度は必要であるが、1msecを超えると細胞支持液が極端に加熱するため、細胞死に至る可能性が高くなる。

2.3 Electroporation後の細胞膜透過係数の測定

図2にElectroporationに用いる電場印加装置の概略図とパルス発生回路を示した。実験は2.1で用意した20 μl の細胞懸濁液を図2(a)に示すステンレスワイヤー電極の間に滴下、厚さ0.1mmのカバーガラスで挟み込み、レーザー共焦点蛍光顕微鏡(LCMS) (Fluoview BX50WI-FLA-FVX, Olympus, Japan)で予め細胞の中心部分を通る水平断面を観察出来るように設定しておく。ついで、図2(b)の高速高電圧トランジスタスイッチ(HTS121, Behlke, Germany)と直流高圧電源(30P300, Spellman, U.S.A.)で発生させた高電圧パルスを電極に印加して、約21分間40秒おきに蛍光画像を撮影する。なお、パルス波形と電圧は、10kVまで測定できる高電圧プローブ(PVM-11, North Star Research Corporation, U.S.A.)をつうじて、分解能10nsecの高速オシロスコープ(DL2200, Yokogawa, Japan)で確認した。また、実験は室温(25℃)でおこなった。

3. 細胞膜透過係数の算出法と実験結果

3.1 細胞膜透過係数の算出

図3にelectroporation後の典型的なLCMS連続画像を示す。最初は高分子が細胞内に侵入しないため、細胞は黒く見えるが、徐々に蛍光でラベルされた高分子が細胞内に侵入するにつれ明るくなってきた。Electroporation直後の図3の0secの画像は、明暗から細胞の輪郭が明確にわかるので、0secの画像より細胞の体積と半径を測定し、細胞内の蛍光強度の平均値の時間変化をプロットした。その典型的な例を図4(a)に示す。図4(a)を模式化した図4(b)によれば、electroporation後しばらく時間が経過してから細胞内の高分子濃度がほぼ時間に比例して上昇をはじめて(first stage)、やがてある一定値 I_2 で飽和することがわかった。図4(a)の $I(t)=I_1$ の期間は、高

Fig. 3. Laser confocal microscopic images of the Hep G2-cell suspension supplemented with dextran-10,000Da. The times indicated are the period after the electroporation ($E=4.8\text{ kV/cm}$, $T=6\mu\text{sec}$).

Fig. 4. The history of intracellular concentration of macromolecule. (a) Mean value of intracellular fluorescent intensity (Dextran-10,000Da, 4.8 kV/cm , $T=6\mu\text{sec}$). (b) Simplified history of intracellular fluorescent intensity. (c) Modelling the history of intracellular concentration of macromolecule.

分子は細胞内外に比べて拡散しにくい細胞膜内を透過中であると考えられる。図4(a)の様な状況は、図5で示すような、物質が球状のシェルの外から中へ拡散していく解析結果と同様の挙動を示す。即ち、高分子の細胞内への拡散では、次式の様な条件、

$$C(r < a, 0) = 0, \quad C(r = a, t) = C_2 = \text{const.} \quad (3)$$

Fig. 5. The schematics of diffusion through spherical wall.

Fig. 6. Single electric pulse applied to the cell suspension.

Fig. 7. Membrane permeability of Hep G2 to macromolecules. Circles denote dextran-70,000Da, square: dextran-10,000Da and triangle: propidium iodide.

$$D_m \ll D_{in}, D_{out} \quad (4)$$

が成立することから、細胞内の初期の高分子濃度 $C(r < a, t)$ は0であり、その後の細胞内の高分子濃度は、細胞膜を透過した累積モル数 Q_t であらわされる(図5)。ま

た、細胞内の濃度が上昇する過程は、式(5)の様に解析解の近似により表すことができる⁽¹²⁾。

$$\frac{Q_i}{4\pi ab(b-a)C_2} = \frac{D_m}{(b-a)^2} t - \frac{1}{6}, \quad \left(\frac{(b-a)^2}{6D_m} < t\right) \quad (5)$$

細胞膜透過係数は、式(5)を用いて算出される。即ち、式(6)より Q_i を $I(t)$ の関数として、式(7)の様に表現出来る。

$$Q_i = \frac{4\pi}{3} b^3 C_{in} \lim_{t \rightarrow \infty} C_{in} = C_2 \quad (6)$$

$$\frac{b^2 C_{in}}{3a C_2} = \frac{D_m}{b-a} t - \frac{b-a}{6} \quad (7)$$

ここで、 $I(t)$ と C_{in} が線形関係にあることと、細胞膜の厚さ $(b-a)$ が細胞半径に対して十分小さいことを考慮すると、式(7)は式(8)の様に記述できる。(図4(c))

$$\frac{C_{in}}{C_2} = \frac{I(t) - I_1}{I_2 - I_1}, \quad P = \frac{D_m}{b-a} \quad (8)$$

細胞半径 $a(=b)$ は、細胞の断面積から球を仮定してもとめているが、図3に示すように低浸透圧であるため初期形状は球と仮定できる。また、 $I_1, I_2, I(t)$ は蛍光強度の値から測定でき、図4(c)に示す様に蛍光輝度の増加率より細胞膜透過率 P がわかる。式(8)では膜を通した拡散は細胞の全表面として計算されているので、 Q_i の濃度増加率は見かけの細胞膜透過係数(有効細胞膜透過係数) P と等しい。

3.2 HepG2の細胞膜透過係数の測定結果

図6に実験で印加したパルス電圧の例をしめした。パルスの終端に若干の緩和時間があるものの、ほぼ矩形波が印加されていることがわかる。種々の電界強度による細胞膜透過率を図7にしめした。図中の一つの点が一つの細胞の測定データに相当する。また、図中の垂直線(critical electric field of electroporation)で示す電界強度以下では、ほとんどの細胞で細胞内への高分子の拡散は観察されなかった。細胞膜透過係数の分子量依存性を図8に示した。図中の100Da以下の低分子の膜透過係数は、既存⁽¹³⁾の内皮細胞や赤血球のジメチルスルフォキシド、エチレングリコール、グリセリンに対する膜透過係数のデータを示している。

4. 考 察

図3からも明らかな様に、electroporationにより高分子は確実に細胞内へと拡散している。また、図7から細胞膜透過係数は、電界強度にはあまり強くは依存しないこともわかった。ところで、測定で求めた有効細胞膜透過係数 P は、electroporationにより絶縁破壊して膜透過性が上がった領域の面積に比例すると考えられる。絶縁破壊された細胞膜の面積と印加電界強度の関

Fig. 8. The effect of molecular weight on membrane permeability. Black circles and black squares denote erythrocytes and endothelial cells without the electroporation respectively⁽¹³⁾, and white circles denote Hep G2 after the electroporation.

Fig. 9. The effect of strength of electric field on the ratio of the measured effective membrane permeability to the membrane permeability of electroporated area. Where black circles: $a=10\mu\text{m}$, $V_m=200\text{mV}$, black squares: $a=10\mu\text{m}$, $V_m=-200\text{mV}$, white circles: $a=20\mu\text{m}$, $V_m=200\text{mV}$, white squares: $a=20\mu\text{m}$, $V_m=-200\text{mV}$.

係は、式(1)の θ から求められる。ここで、絶縁破壊した細胞膜の膜透過係数 P_{ele} と測定で求めた有効細胞膜透過係数 P の関係は、式(2)を考慮して次式の様に記述される。

$$P = P_{ele} \frac{4\pi a^2(1 - \cos\theta)}{4\pi a^2} = P_{ele}(1 - \cos\theta) = P_{ele} \left(1 - \frac{V_{cri} \pm V_m}{1.5 E a}\right) \quad (9)$$

式(9)によれば、 P_{ele} は一定値であるが、 P は電界強度の関数となる。絶縁破壊膜電位 V_{cri} は細胞に依らずほぼ1Vなので、今回の測定の条件である $a=10\sim 20\mu\text{m}$, $V_m=-200\text{mV}$ として、 P/P_{ele} の電界強度依存性を図9に示した。図中のエラーバーは、相対誤差60%を示す。これは測定における値のばらつきの程度(図7)とほぼ等し

い、図9によれば P/P_{ele} は、電界強度に依らずほぼ一定値を示すが、電界強度が小さくなると1kV/cm程度の間に急激に低くなっている。この傾向は図7の実験結果とよく一致している。しかしながら、細胞膜の絶縁破壊に必要な最低電界強度は、実験の方が約2kV/cm程度たかい。これは、パルスの印加時間が実際には十分ではなかったため、実際に細胞膜に印加された電圧が、測定された電界強度から計算された値より低くなっていることが原因と思われる。

図8から、今回測定に用いた分子量の範囲では、細胞膜透過係数の差はあまり見られなかった。しかしながら、分子量70,000Da(デキストラン)の場合はわずかに膜透過係数が下がってきており、これ以上の分子量では透過性が落ちることが考えられる。結局、electroporationにより、細胞膜透過係数は70,000Da以下の高分子に対して約 10^{-8} m/sec程度の値となる。この値は、electroporationを行わない細胞の100Da程度の分子量に分子に対する膜透過係数に等しい。

5. ま と め

HepG2 を例にとり、electroporation による細胞膜透過係数の促進効果をしらべ、膜透過係数の測定を種々の分子量の高分子についておこなった。結果、700Da以上では、分子量による膜透過性の差はほとんどなく、通常は膜を透過しない70,000Da程度の高分子が、 10^{-8} m/sec程度の膜透過率で膜透過しうることが分かった。また、70,000Da以上の高分子では膜透過係数が低下する可能性があることが示唆された。

文 献

- (1) Shaw, J. M., Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., and Trounson, A.O., 1997, "Vitrification Properties of Solutions of Ethylene Glycol in Saline Containing PVP, Ficoll, or Dextran," *Cryobiology*, **35**, pp. 219-229.
- (2) Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., and Meryman, H.T., 1984, "Vitrification as an Approach to Cryopreservation," *Cryobiology*, **21**, pp. 407-426.
- (3) Fahy, G.M., 1995, "Computer controlled cryoprotectant perfusion apparatus," U.S. Patent No. 5472876.
- (4) Levin, R.L. and Miller, T.W., 1981, "An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: Isolated Cells," *Cryobiology*, **18**, pp. 32-48.
- (5) Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., and Toner, M., 2000, "Protective effect of intracellular trehalose on survival of cryopreserved mammalian cells," *Proceedings of Cryobiology 2000 in Boston*.
- (6) Russo, M.J., Bayley, H., and Toner, M., 1996, "Introduction of sucrose into living cells using a switchable engineered pore," *Cryobiology*, **33**, pp. 637.
- (7) Bliss, J.G., Harrison, G.I., Mourant, J.R., Powell, K.T., and Weaver, J.C., 1988, "Electroporation: the population distribution of macromolecular uptake and shape changes in red blood cells following a single 50 μ s square wave pulse," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **20**, pp. 57-71.
- (8) Liang, H., Purucker, W.J., Stenger, D.A., Kubiniec, R.T., and Hui, S.W., 1988, "Uptake of fluorescence-labeled dextrans by 10T 1/2 fibroblasts following permeation by rectangular and exponential-decay electric field pulses," *BioTechniques*, **6**, pp. 550-560.
- (9) Gift, A.E. and Weaver, J.C., 2000, "Simultaneous quantitative determination of electroporative molecular uptake and subsequent cell survival using gel microdrops and flow cytometry," *Cytometry*, **39**, pp. 243-249.
- (10) Zimmermann, U., and Neil, G.A., 1996, "Electromanipulation of Cells," CRC Press, Florida, pp. 4-30.
- (11) Zimmermann, U., 1986, "Electrical breakdown, electroporation, permeabilization and electrofusion," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **105**, pp. 175-256.
- (12) Crank, J., 1970, "The mathematics of diffusion," Oxford Univ. Press, London, pp. 95-96.
- (13) McGrath, J.J., and Diller, K.R., 1988, "Low temperature biotechnology: emerging applications and engineering contributions," ASME, New York, pp.323-330.