

論 文

高電圧パルスによるイースト菌の破壊

速水光浩*, 天満孝昌*, 水野彰*

(1989年4月6日受理)

Destruction of Yeast Cells by Pulsed High Voltage Application

M. HAYAMIZU,* T. TENMA* and A. MIZUNO*

(Received April 6, 1989)

Yeast cells were destroyed by pulsed high voltage application to the cell suspension, and they were observed using an electron microscope. Many of destroyed cells have rough surface, and a small portion of the destroyed cell was observed to have a pinhole. The cell destruction may be caused by the electrical breakdown of the membrane. Since the electrical destruction of cells can be made at low temperature, it may be used as a sterilization process for special purposes to eliminate damages to proteins or enzymes contained in liquid. In order to conduct a continuous sterilization, a new type electrode system was developed. An insulator having a small hole was inserted between plate-plate electrode to form a high electric field region at the hole. The experimental results indicated that the survivability of the cells in 1% NaCl solution decreased to 0.02 at the energy input of 36 cal/cm³. A coaxial type needle electrode system was also tested for the destruction of tissues locally around the tip of the electrode.

1. はじめに

細胞の懸濁液に高電圧パルスまたはショックウェーブを印加すると細胞が破壊できる¹⁾。高電圧パルスを印加した時は、細胞膜に電荷が蓄積し膜が圧縮されて穴が開き非可逆的な破壊に至ると考えられている^{2,3)}。また膜に電流が流れる際に破壊するとも考えられている。ショックウェーブでは、その機械的破壊により細胞膜あるいは細胞質が破壊される可能性があると考えられる。

電気的な細胞破壊法は試料温度の上昇が少なく、試料中のタンパク等の変性を抑制しつつ殺菌できる可能性を有しており、血しょう中のウイルスの破壊等にも有効であろうと思われる。また佐藤⁴⁾らが指摘しているように、電気的にシールドした内側の菌は破壊されないのでバイオリアクタにおいて発泡ガラス等に保持した有益な菌は残し、リアクタ内部の菌のコントロールを行なうためにも有効であろうと思われる。

本研究においては、電気的細胞破壊のメカニズムを知るために高電圧パルスあるいはショックウェーブ印加時の細胞破壊状態を電子顕微鏡を用いて調べた。そして溶

液の連続殺菌処理に有効な電界集中型電極を考案し、その殺菌特性を実験的に調べた。また組織細胞の局所的な破壊を行なうことを目的とする同軸状針電極を考案し、その細胞破壊特性を調べた。

2. 高電圧パルスおよびショックウェーブによる 液体中の細胞破壊

高電圧パルスあるいは水中火花放電のショックウェーブによる細胞破壊特性は文献 1) に詳しく、イースト菌の生存率は単位体積当たりに投入されたエネルギーの増加に伴い、指数関数的に減少することが報告されている。しかし電極形状により、細胞破壊のエネルギー効率が異なる可能性があるため、本実験に使用した電極における細胞破壊特性を電子顕微鏡観測を行なう前に調べた。

2.1 実験装置

(1) パルス高電圧電源

実験に使用したパルス高電圧電源を図 1 に示す。直流高電圧電源により、 $C_0=9000 \text{ pF}$ のセラミックコンデンサを充電し、ロータリースパークギャップにより充電されたコンデンサと負荷を接続しパルス高電圧を発生させる。抵抗負荷（電気抵抗 R_L ）の場合にはパルス電圧は立ち上った後指数関数的に時定数 $C_0 R_L$ で減衰する。実験には正極性のパルス電圧を用い、パルス周波数は 10 Hz とした。

キーワード：電気殺菌、細胞破壊法、パルス高電圧、細胞融合、殺菌

* 豊橋技術科学大学電気電子工学系 (440 豊橋市天伯町)
Department of Electrical and Electronic Engineering,
Toyohashi University of Technology,
Tenpaku-cho, Toyohashi, 440 Japan

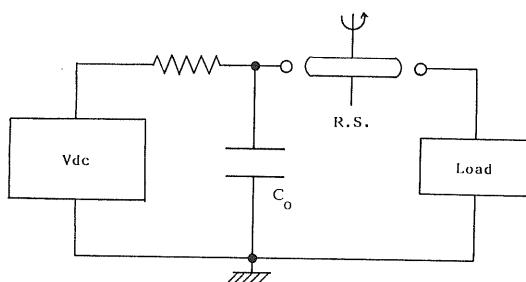


図 1 パルス電源

Fig. 1 Pulsed high-voltage generator.

V_{de} : dc high-voltage source, C_0 : ceramic capacitor, R.S.: rotary spark gap.

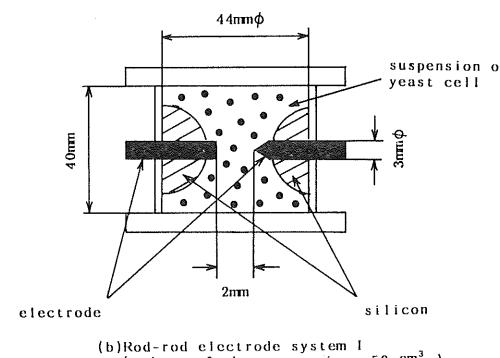
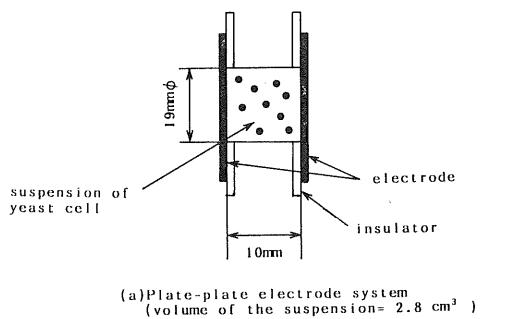


図 2 細胞破壊用電極系

Fig. 2 Electrode systems.

(2) 電極系

図 2 に示す電極系を用いて実験を行なった。電極材質はアルミニウムである。

(a) 平行平板電極系

溶液の封入容器は、内径 19 mm、長さ 10 mm、容積 2.8 cm³ の塩化ビニル製の円筒を用いた。平行平板電極を 10 mm の間隔で設置した。細胞にパルス電流を流すことにより破壊を行なうための電極系であり、水中火花放電の発生しない電圧条件で使用する。

(b) 棒対棒電極系

圧力容器として内径 44 mm、高さ 40 mm、厚さ 5

mm の円筒形塩化ビニル製容器を用い、上下は厚さ 12 mm の円板とした。内容量は 50 cm³ である。中央部に直径 3 mm の棒電極を電極間隔 2.0 mm で対向させた。一方の棒電極先端は垂直な平面であり、他方は先端部が 90° の円錐形である。電極間に水中火花放電を発生させ、それに伴うショックウェーブおよび紫外線により細胞破壊を行なう電極系である。

2.2 実験方法

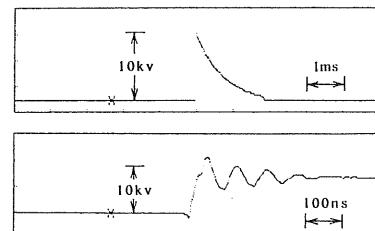
イースト菌 (*S. Cerevisiae*) を用いた。純水および NaCl 溶液に濃度 $1 \sim 2 \times 10^4$ 個/cm³ で浮遊させ試料とした。試料は気泡の無いように電極内に封入した。試料 1 cm³ 当りの投入エネルギー W に対するイースト菌の生存率 S を測定した。 W は次式により、コンデンサ容量 C_0 およびその充電電圧 V_0 より計算により求めた。

$$W = \frac{1}{2} C_0 V_0^2 \times N \times 0.24 \times \frac{1}{V} (\text{cal/cm}^3)$$

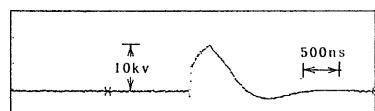
ただし、 N : パルス印加数、 V : 試料容積である。

平行平板電極系に純水を封入し、 $V_0=10$ kV でパルス電圧を印加した場合の波形を図 3-(a) に示す。パルス電圧の立ち上がりは、約 40 ns であり、12 kV までオーバーシュートし、300 ns 程度の間減衰振動が発生している。その後パルス電圧は指数関数的に減衰する。

図 3-(b) は、 $V_0=10$ kV として 1% NaCl 溶液を用いた場合のパルス波形である。立ち上がりが 2 段になっており、最初の立ち上がりは約 30 ns、その後振動が 300



(a) Deionized water



(b) One-percent NaCl solution

図 3 パルス電圧波形

Fig. 3 Pulsed voltage wave forms using the plate-plate electrode system.

ns 程度の間発生し、徐々に電圧が 10 kV まで上昇する。その後 500 ns 程度で電圧は減衰している。平行平板電極系では水中火花放電が発生しないように留意して $V_0=7\sim14$ kV の範囲で実験を行なった。

棒対棒電極系では、水中火花放電を発生させるためにパルス電圧のピーク値が高い必要があったので、 $V_0=20$ kV にて実験を行なった。

試料の作成および培地への塗布操作はすべて自然落下細菌のないクリーンベンチ内で行なった。本実験では以下の培養法により生存率を求めた。

細胞を培養するための培地（麦芽寒天培地）は 121°C で 20 分間殺菌し無菌シャーレ（200°C で 30 分殺菌）内で硬化させた。電圧印加後の細胞を含む溶液から 10 μ l 採取し培地上に薄く塗布した後、35°C に保温した。一定温度に保つことにより細胞は分裂を起こしながら増殖し細胞群（コロニー）を形成する。35°C において約 48 時間でコロニーは肉眼で確認できる大きさとなり、発生したコロニー数を、採取した 10 μ l の溶液に含まれる生細胞数として測定した。採取した溶液は培地上にごく薄く塗布するため、培地上の細胞は同一地点上で重なっていないと仮定した。生存率は発生したコロニー数の比により求めた。

2.3 生存率測定結果

図 4 に平行平板電極系を用いた時の 1 cm^3 当りの投入エネルギー W に対するイースト菌の生存率 S を示す。

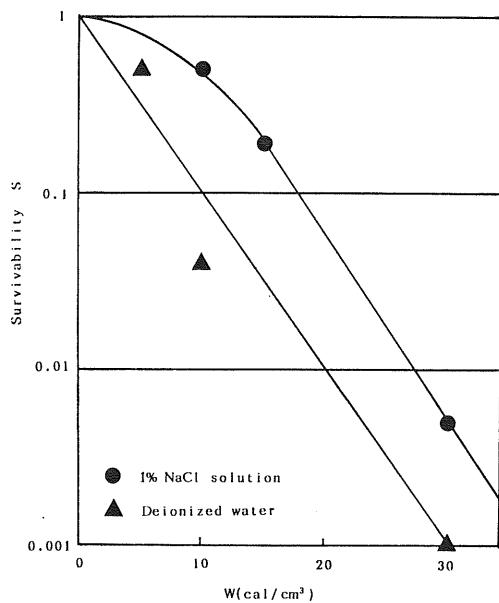


図 4 平行平板電極系でのイースト菌生存率

Fig. 4 Survivability of yeast cells using the plate-plate electrode system.

純水および 1% NaCl 溶液での結果をあわせて示す。両者とも $V_0=10$ kV である。純水のほうが S の低下が大きい。 $W=10 \text{ cal/cm}^3$ において純水では $S=0.04$ 、1% NaCl 溶液では $S=0.5$ 、 $W=30 \text{ cal/cm}^3$ において純水では $S=0.001$ 、1% NaCl 溶液では $S=0.05$ であった。溶液の単位体積当たりへの投入電力が $W=30 \text{ cal/cm}^3$ において溶液の温度上昇は 30°C のはずであるが実際に容器への放熱等のため 10°C 程度であった。

図 5 に 1% NaCl 溶液を用い投入エネルギーを同一として電圧値を変えた場合の S の比較を示す。 $W=30 \text{ cal/cm}^3$ である。 $V_0=7$ kV、パルス数 $N=1600$ 回の場合 $S=0.03$ であった。 $V_0=10$ kV、 $N=780$ 回の場合には $S=0.005$ であった。この結果は同一投入エネルギーにおいても、電界強度が高いほど生存率が低くなることを示している。

図 6 に棒対棒電極系を用いた時の生存率 S を示す。 0.28 cal/cm^3 において S が、0.01 まで低下した。

2.4 棒対棒電極系における紫外線の寄与

棒対棒電極系では水中火花放電に伴い、ショックウェーブとともに紫外線が発生しており、紫外線による破壊効果も無視できないのではないかと考えられる。そのため図 7 に示す装置により紫外線の効果を調べた。これは図 2 に示す棒対電極系の上部密閉板に直径 20 mm の穴をあけ、ここに内径 17 mm のアクリルチューブをさし込んだものである。アクリルチューブの先端部には厚さ

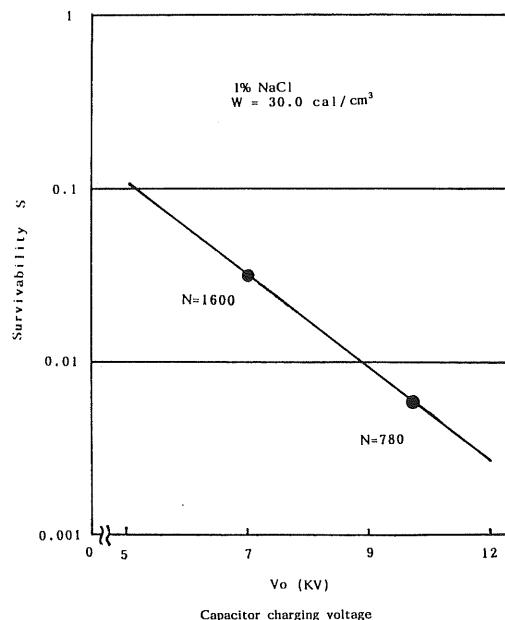


図 5 イースト菌生存率の電圧依存性

Fig. 5 Survivability of yeast cells using the plate-electrode system.

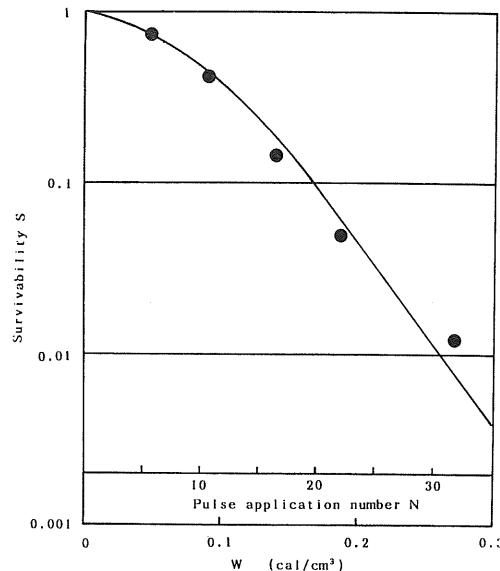


図 6 棒対棒電極系でのイースト菌生存率
Fig. 6 Survivability of yeast cells using the rod-rod electrode system.

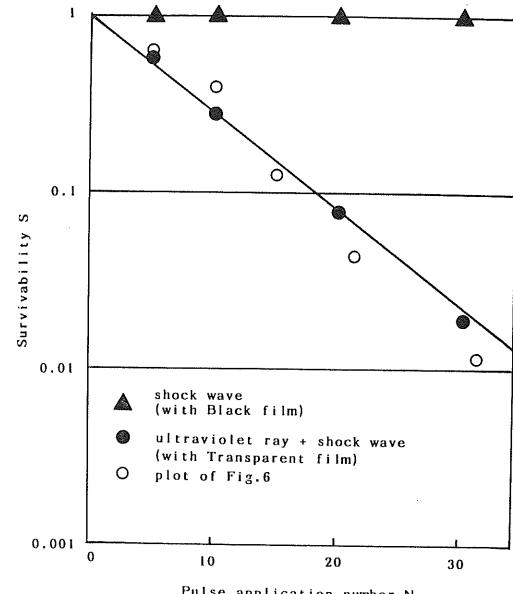


図 8 棒対棒電極系における紫外線の効果
Fig. 8 Survivability of yeast cells using the rod-rod electrode system II.

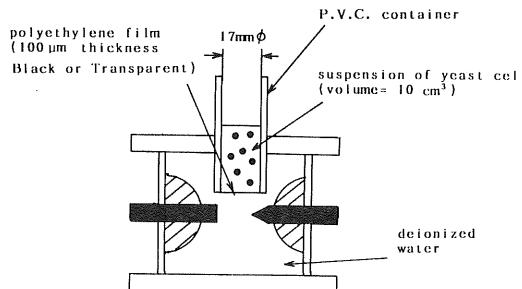


図 7 紫外光の効果測定用電極系
Fig. 7 Rod-rod electrode system II to test the effect of ultraviolet ray.

100 μm のポリエチレン膜を取りつけた。ポリエチレン膜は透明なものと、黒色の不透明なものを用いて比較した。アクリルチューブ内に試料溶液を入れた。その上部は大気圧で開放している。アクリルチューブ先端を棒対棒電極の中心から 1~2 mm の位置においた。

図 8 にイースト菌生存率とパルス印加数の関係を示す。 $V_0=20 \text{ kV}$, $C_0=9000 \text{ pF}$ の値は図 5 の場合と同様である。しかし試料体積が異なるので、パルス印加数を横軸にとって図 5 の場合との比較を行なった。その結果、紫外線をしゃへいする黒色不透明ポリエチレン膜を使用した場合の S の低下は認められなかった。透明膜を用いた場合には S の低下は著しく、図 6 の結果とほぼ同程度となった。このことは棒対棒電極系でのイースト菌

の破壊には、紫外線の寄与がきわめて大きいことを示している。ただし容器を完全に密閉した場合には、試料圧力の上昇が図 7 の場合より大きいはずであり、ショックウェーブの機械的な力の寄与もあり得るとは思われる。

3. イースト菌破壊状態の観察

3.1 観察用試料の作製

平行平板電極系および棒対棒電極系により破壊されたイースト菌の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。イースト菌を SEM で観察するためには、イースト菌を固定、乾燥する操作が必要である。電子線による損傷をできるだけ防ぎ、変形させないよう観察を行なうために以下の処理を文献 5) を参考にして行なった。試料の作製手順は、菌の固定、脱水、乾燥、コーティングの順である。

固定は以下の操作によった。(i) 試験管に試料、グルタルアルデヒド固定液をそれぞれ 2~4 ml 入れ 4°C で 1.5 時間浸漬する。(ii) 遠心操作により試料を下に沈殿させ、ピペットで上澄みをとる(遠心時間: 約 5 分、回転数: 4000 rpm)。(iii) リン酸緩衝液を試験管に 2~4 ml 入れ、遠心操作を行なうことにより洗浄する。これを 3 回行なう。(iv) オスマニウム酸を 2~4 ml 入れ 4°C で 1.5 時間浸漬する。(v) 再度(i)の操作を行なうことにより固定を終了する。

脱水はアセトンを用いて行なった。50, 70, 80, 85,

90, 95, 99.8% 濃度のアセトンを順番に用いて 4000 rpm で 10~15 分間遠心分離操作を行ないながら脱水した。

乾燥には、臨界点乾燥法が最もよいとされているが、装置の都合上、緩慢乾燥法を用いた。脱水操作を終えた試料を数 mm 角のシリコンウェハ上に滴下し、密閉された容器の中で 30~40°C に保ちながら約 5 時間、乾燥させた。

最後に電子ビームによる帶電を防ぐために導電性膜のコーティングを行なった。シリコンウェハ上で乾燥させた試料をスパッタを用いて、Pt を約 10 nm 厚でコーティングした。

3.2 観察結果

(1) 正常イースト菌

図 9 は、正常なイースト菌の写真である。橢円形をしており長さは 3~7 μm 程度である。表面は滑らかである。となりあう細胞の接触点どうしが橋渡しされくっついているように見える。これは観察用試料作製時に発生したのではないかと思われる。

(2) 平行平板電極系での破壊

図 10 は、図 2-(a) に示す平行平板電極系を用い純水中に浮遊させたイースト菌を破壊した場合の写真である。コンデンサ充電電圧 V_0 は 14 kV であり、この時のパルス半値幅は約 250 μs であった。単位体積当りの投入エネルギー $W=30 \text{ cal/cm}^3$ において試料を作製し観察した。この条件での生存率 S は、約 0.001 であり視野内のほとんどのイースト菌は破壊されているはずである。またこの条件での溶液の最高温度は、計算上 50°C

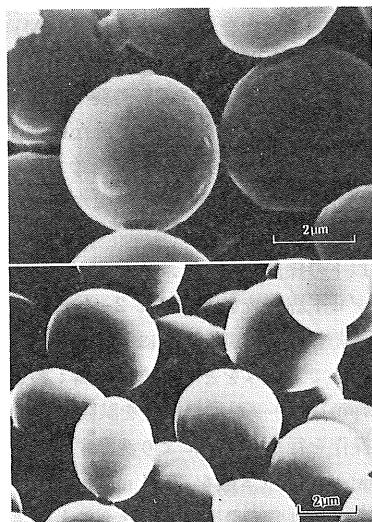


図 9 正常イースト菌の電子顕微鏡写真
Fig. 9 Yeast cells.

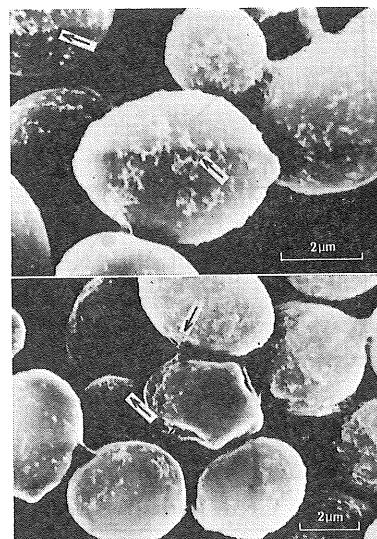


図 10 平行平板電極系で破壊されたイースト菌

Fig. 10 Destroyed yeast cells using the plate-plate electrode system.

$$(V_0=14 \text{ kV}, W=30.0 \text{ cal/cm}^3, S=0.001)$$

以下であり実際には約 35°C であった。この場合には熱破壊の寄与は無視できる程度と思われる。ごくまれに(数百個に 1 個程度) 変形したものもみられたが大部分のイースト菌は、橢円形状をとどめている。しかし表面が、非常に粗くなっている様子が見られる。これは、0.1 μm 程度の破片が多数付着しているようにも見受けられる。破片が付着して盛り上がりの中心部に 0.1 μm 程度の直径のクレータのような穴が存在している様子が見られる。このクレータのいくつかは写真に矢印で示す。このクレータはイースト菌に瞬間にパルス電流が流れたことによる破壊の跡で、菌表面に付着している破片はこの穴から放出されたものであるかもしれない。しかしクレータが明らかに表面にあいた穴であるかどうかは写真観察結果からは不明である。

(3) 棒対棒電極系での破壊

図 11 は、図 2-(b) に示す棒対棒電極を用い、純水中に浮遊させたイースト菌を破壊した場合の写真である。コンデンサ充電電圧は 20 kV として電極間で水中火花放電をおこしショックウェーブを発生させた。単位体積当りの当入エネルギー $W=1 \text{ cal/cm}^3$ において試料を作製し観察した。この条件での生存率は 10^{-6} であり視野内のイースト菌はほとんど破壊されているはずである。しかし大部分のイースト菌は原形をとどめており、表面も滑らかであり正常なイースト菌との区別がつかないことが観察された。ただし数百個に 1 個の割合で図 11 に

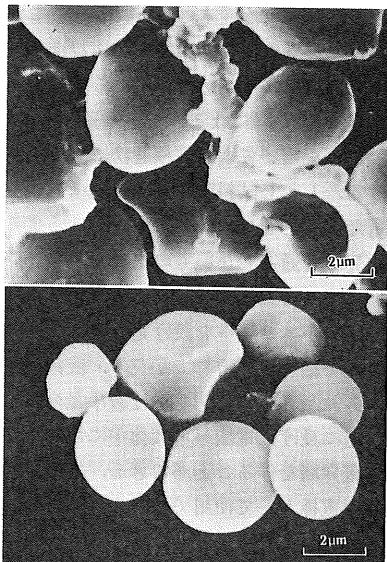


図 11 棒対棒電極系で破壊されたイースト菌
Fig. 11 Destroyed yeast cells using the rod-rod electrode system.
($V_0=20$ kV, $W=1.0$ cal/cm 3 , $S<10^{-3}$)

示すように完全に裂かれた状態のものが見られ、また同程度の割合で押されたように変形したものも見られた。大部分のイースト菌は外見からは破壊されているかどうかの判断ができない。水中火花放電により、パルス的に強い紫外線が発生しており、この殺菌への寄与がきわめて高いことが実験的に示されている。本観察試料では 100 回パルス的に紫外線照射を受けておりこれにより破壊されている可能性がきわめて高いと考えられる。しかし、ショックウェーブにより表面は変形せず、内部の細胞質が破壊された可能性も考えられる。

(4) 電界集中型電極系での破壊

後述の電界集中型電極を用い、0.1% NaCl 中に浮遊させたイースト菌を破壊した場合の写真を図 12 に示す。コンデンサ充電電圧 V_0 は 10 kV であり、この時のパルス半値幅は約 25 μ s であった。電界集中部の電界強度は 16.4 kV/cm である。(a) $W=12$ cal/cm 3 , $S=0.13$ および (b) $W=36.0$ cal/cm 3 , $S=0.03$ において観察を行なった。表面に大きなくぼみができるイースト菌が 100~200 個に 1 個程度の頻度で観察された。くぼみの直径は 0.2~0.5 μ m 程度であり、貫通した穴であるかどうかは、判断できない。貫通しているとしたら菌を流れたパルス電流が集中した点であると考えられる。このくぼみは押されてできたようでもある。電界中ではマックスウェル応力が働いているが、菌の機械的強度が不明なので機械的な力により、このくぼみが発生したかどうかは不明である。

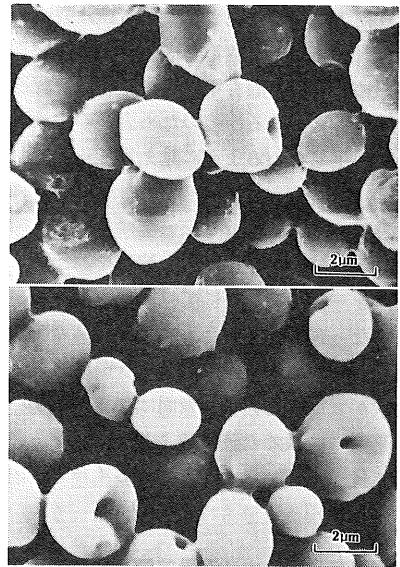


図 12 電界集中型電極系で破壊されたイースト菌
Fig. 12 Destroyed yeast cells using the converged E-field type electrode system.
(a) $E_{\max}=16.4$ kV/cm, $W=36.0$ cal/cm 3
(b) $E_{\max}=16.4$ kV/cm, $W=12.0$ cal/cm 3

(5) 同軸状針電極系での破壊

後述の同軸状針電極を用いた実験において $V_0=12$ kV, $N=100$ におけるゲル中のイースト菌の破壊状況を示す。針電極を中心として直径 5 mm の範囲のゲルに付着させたイースト菌を固定、乾燥して顕微鏡試料を作成して観察した。図 13 に写真を示す。イースト菌表面

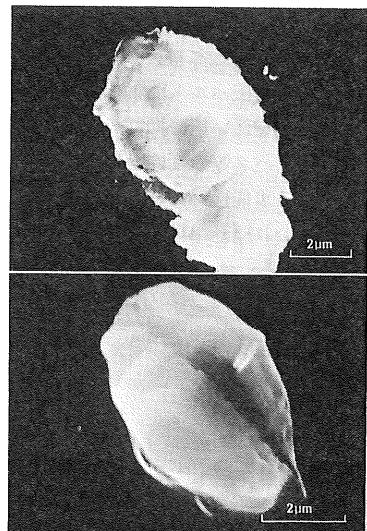


図 13 同軸状針電極系で破壊されたイースト菌
Fig. 13 Destroyed yeast cell using the coaxial type needle electrode system.
($V_0=12$ kV, $N=100$ pulse)

がえぐられたようになったもの、あるいは裂けたものも見られる。針電極近傍は強電界域でありかつゲルの電気抵抗が低いので細胞表面を電流が集中して流れる可能性があるものと考えられる。そのため表面の電流路に沿って破壊の跡が生じているように見えるイースト菌も観察された。

(6) 加熱による破壊

イースト菌を純水に浮遊させた溶液を約 50 cm^3 ビーカに入れ、オートクレーブにて 121°C 、5分間高温にして殺菌を行なった。この場合のイースト菌の破壊された様子を図 14 に示す。正常なイースト菌に比べ、ややその橢円形状が変形している。表面はほぼ滑らかであるが、平行平板電極系での破壊時より大きい寸法の破片が少量表面に付着しているように見えるイースト菌も観察された。

4. 高電界領域を有する不平等電界型電極系による イースト菌の破壊

2章で行なった結果において、平行平板電極系を用いた高電圧パルスによるイースト菌の破壊特性は単位体積当たりのエネルギー投入量 W が同一でもパルス電圧のピーク値が高いほど、その生存率が低下する結果が得られた。また文献 1)において、平行平板電極系と線対円筒電極系とのイースト菌生存率を比較したところ、同じ W において後者のほうが生存率の低下が著しいことが報告されている。これは線電極近傍の電界集中領域において効率よくイースト菌が破壊されており、その領域の電極系容積全体に占める割合が小さいにもかかわらず、電極系全体のエネルギー効率向上に寄与していることを示していると考えられる。高電圧パルスによる微生物の破壊方法は、試料の温度上昇を低い値に抑制できる特徴を有しており、試料中のタンパク等の変性を抑制しながら殺菌を行なうことができる可能性があるものと考えられる。

また針電極を用いれば、組織内に局所的に存在する悪

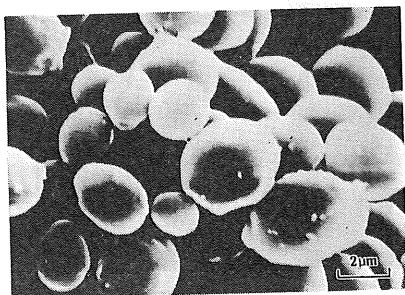


図 14 加熱により破壊されたイースト菌

Fig. 14 Destruction using autoclave.
($T=121^{\circ}\text{C}$. for 5 min)

性組織を破壊できる可能性も考えられる。そこで以下の2種類の電極系を考案し、その細胞破壊特性を実験的に調べた。

4.1 電界集中型電極によるイースト菌の破壊

線対円筒電極を用いても線電極近傍に高電界域を作ることができる。しかし試料溶液を連続的に電極内を流して殺菌を行なうことを目的とする場合には、よくかく拌しても強電界域を通過しないものが存在するという欠点を有している。一方鷲津らは、流体集積回路を用いた細胞融合装置に微小スリットを設け電流集中部を作り、ここに誘電泳動で細胞を保持している⁶⁾。液体中に絶縁物で仕切りを入れ、スリットあるいは微小径の穴を設け、絶縁板の両側に設けた電極から液体中に電流を流すことにより、高電界域作ることができる。このような電極系は、殺菌用電極として使用できるものと考えられる。特にこの電極系では、液体を必ずスリット中の高電界域を通過させることができるので殺菌効率を高くすることが可能であろうと考えられる。そこで以下に示す電界集中型電極を作製し、そのイースト菌破壊特性を実験的に調べた。

4.1.1 電 極 系

図 15 に電界集中型電極系を示す。アルミニウム電極(直系 $40 \text{ mm}\phi$) がとりつけられた塩化ビニル製の平板(厚さ 17 mm, 直径 $200 \text{ mm}\phi$) を 2 枚用いることにより平行平板電極(間隔 25 mm) とし、その間に直径 $10 \text{ mm}\phi$ または $3 \text{ mm}\phi$ 、長さ 6 mm の穴(電界集中部)を有する塩化ビニル製の絶縁板を設置した。また電極の中心には直径 $3 \text{ mm}\phi$ の穴があけられており、そこから試料(1% NaCl イースト菌懸濁液)が流れている。

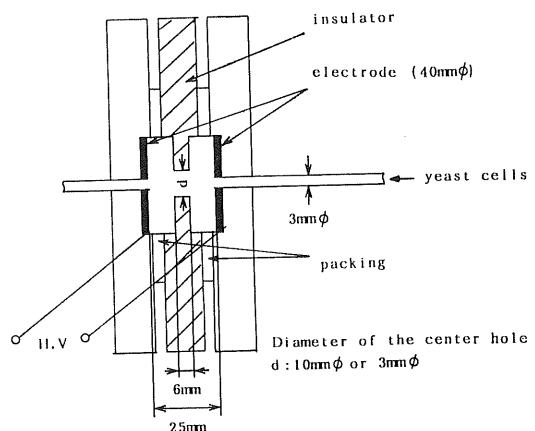


図 15 雷界集中型電極系

Fig. 15 Converged E-field type electrode system.

4.1.2 実験方法

本実験においては比較のため電極間に挿入されている絶縁板の穴の直径が $10\text{ mm}\phi$ と $3\text{ mm}\phi$ の2種類を用いた。また試料の塩濃度を1%とし生理食塩水と同程度にした。約 50 cm^3 の試料を圧力容器に封入し、1気圧の N_2 ガスを加圧することによって、流量 $V_{\text{fl}}=0.09\text{ cm}^3/\text{s}$ の試料を電極内に流した。パルス周波数 $f=5, 10, 30\text{ Hz}$ の高電圧パルス（充電電圧 $V_0=10\text{ kV}$ 、充電コンデンサ容量 $C_0=9000\text{ pF}$ ）を印加した。パルス周波数の調整はロータリースパークギャップのロータの回転数の制御により行なった。パルス半値幅は、 $10\text{ mm}\phi$ のもので $1\mu\text{s}$ 、 $3\text{ mm}\phi$ のもので $2.5\mu\text{s}$ となった。単位体積当りのエネルギー投入量 W に対する細胞の生存率を測定した。生存率の測定には、1章と同様に培養法を用いた。 W は次式で計算した。

$$W = \frac{1}{2} C_0 V_0^2 \times f \times 0.24 \times \frac{1}{V_{\text{fl}}} (\text{cal}/\text{cm}^3)$$

4.1.3 実験結果

図16に単位体積当りのエネルギー投入量 W に対する生存率 S を示す。 W が 36 cal/cm^3 の場合に、穴の直径が $10\text{ mm}\phi$ のもので、生存率 S は約0.2となり、 $3\text{ mm}\phi$ のものでは、0.02となっている。これは $10\text{ mm}\phi$ のものより、電界が絞り込まれ、より高い電界を形成できるためであろうと思われる。本電極系の抵抗は、絶縁板内の電界集中部の抵抗 R_1 （長さ $l=6\text{ mm}$ 、直径 $d=3\text{ mm}\phi$ または $10\text{ mm}\phi$ の円筒体積の抵抗）と、その両

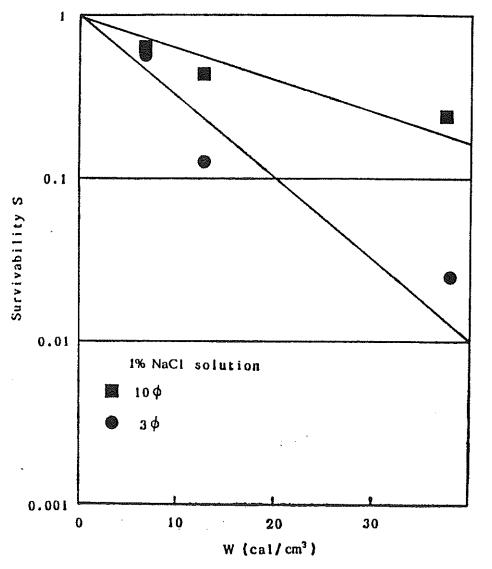


図16 電界集中型電極系でのイースト菌生存率

Fig. 16 Survivability of yeast cells using the converged E-field type electrode system.

側の体積の抵抗 R_2 （長さ $L=9.5\text{ mm}$ 、直径 $D=40\text{ mm}\phi$ の円筒体積の抵抗）との直列接続 ($R_2+R_1+R_2$) と近似的に考えられる。 $d=3\text{ mm}\phi$ の穴を用いた場合

$$R_1 : R_2 = \rho \cdot \frac{l}{\pi \cdot (d/2)^2} : \rho \cdot \frac{L}{\pi \cdot (D/2)^2} = 112:1, d=6\text{ mm}\phi$$

の穴の場合 $R_1 : R_2 = 10:1$ である。ただし ρ =溶液の抵抗率である。パルス電圧を V とすると R_1 の電圧分担は $VR_1/(R_2+R_1+R_2)$ であり、電界集中部の電界強度、 E_c はこの値を l で割った値で近似できる。 $V=10\text{ kV}$ の場合 $d=3\text{ mm}\phi$ では $E_c=16.4\text{ kV/cm}$ 、 $d=10\text{ mm}\phi$ では $E_c=13.9\text{ kV/cm}$ である。

また、1章の平行平板電極を用いた場合のパルス半値幅は、1% NaCl 溶液において約 500 ns となつたのに対し、この電極系（絶縁板穴直径 $3\text{ mm}\phi$ ）ではその負荷抵抗が大きいため $2.5\mu\text{s}$ となり高い導電率の溶液でもパルス幅が長くなつた。

4.2 同軸状針電極を用いた局所細胞破壊

同軸状針電極に高電圧パルスを印加することにより針近傍において高電界を形成することができる。これを利用してゲル中における局所細胞破壊を試みた。

4.2.1 電極系

電極には図17のような同軸状針電極系を使用した。中心導体に直径 0.2 mm のステンレス線、絶縁部には外径 1.5 mm のテフロンチューブ、外部被覆にアルミテープを用い接地した。

4.2.2 実験方法

図18のようにイースト菌濃度約 2×10^4 個/ cm^3 の懸濁液（純水中）を麦芽寒天培地上に均一に塗布し、その上に別の麦芽寒天培地を乗せ層状にした。麦芽寒天培地の中に同図に示すように電極先端部を挿入し高電圧パルスを印加した。電源は、直流高電圧電源によりセラミックコンデンサを充電し、真空リレースイッチによってコンデンサと負荷を接続するものである。コンデンサ容量 $C_0=2700\text{ pF}$ 、充電電圧 $V_0=12\text{ kV}$ とした。パルス半値幅は約 $8\mu\text{s}$ となつた。パルス印加数を $0\sim100$ 回に変化させ、針電極を中心とした直径 5 mm の範囲のイースト菌の生存率を培養法を用いて測定した。

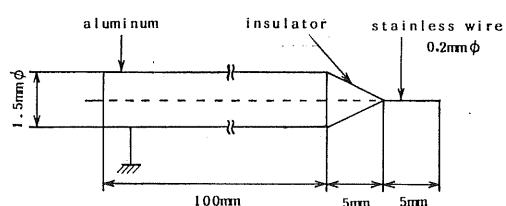


図17 同軸状針電極系

Fig. 17 Coaxial type needle electrode system.

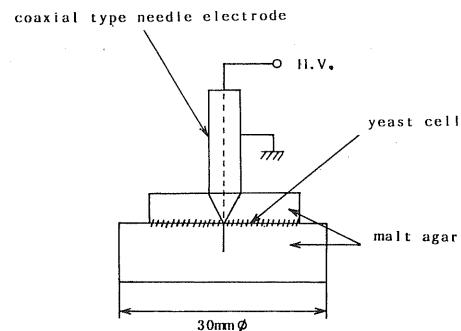


図 18 同軸状針電極系による寒天培地中のイースト菌の破壊

Fig. 18 Destruction yeast cells using the coaxial type needle electrode system.

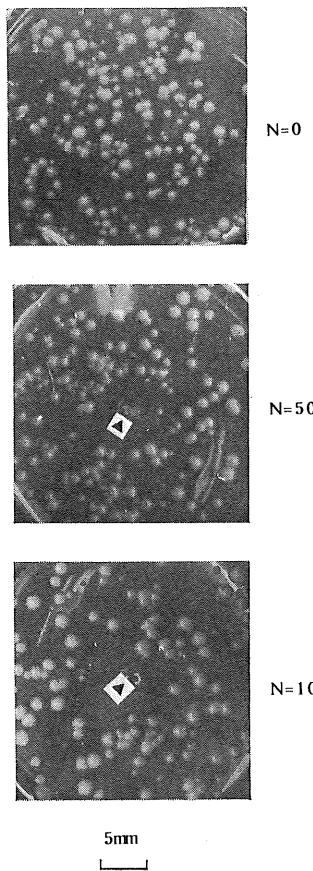


図 19 同軸状針電極先端部付近のコロニー発生状況

Fig. 19 Colony of yeast cells using the coaxial type needle electrode.

Position of the needle electrode: center of the photographs (Arrow).

$V_0=12\text{ kV}$, $C_0=2,700\text{ pF}$, N : pulse application number.

4.2.3 実験結果

図 19 に培養後発生したコロニーの写真を示す。また図 20 にパルス印加回数に対する細胞の生存率を示した。生存率がほぼ指数関数的に減衰し、パルス印加回数が 100 回において生存率は約 0.03 に低下した。

同軸状針電極により、ゲル中で局所的な細胞破壊を行なえることが確認できた。

5. 結論

高電圧パルス印加による電気的細胞破壊法を用いてイースト菌の破壊を行ない、その破壊状態を電子顕微鏡により観察した。水中火花放電によるショックウェーブでの破壊状態もあわせて調べた。単位体積当たりの投入エネルギー W が同一でも電界強度が高いほうが破壊効果が大きいので、液体の連続殺菌処理のために穴あき絶縁板を用いた電界集中型電極を、また組織内の局所的な破壊のために同軸状針電極を考案し、それらの細胞破壊特性を実験的に調べた。その結果以下の結論が得られた。

(1) 平行平板電極系で 14 kV/cm において破壊されたイースト菌の表面には $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 程度の小さな破片が多数付着しており、その盛り上がりの中心部にはクレータ状のくぼみが見られた。これは微小な穴である可能性もある。電界集中型電極系で 16.4 kV/cm において破壊されたイースト菌には、上記の小さな破片の付着の他、直

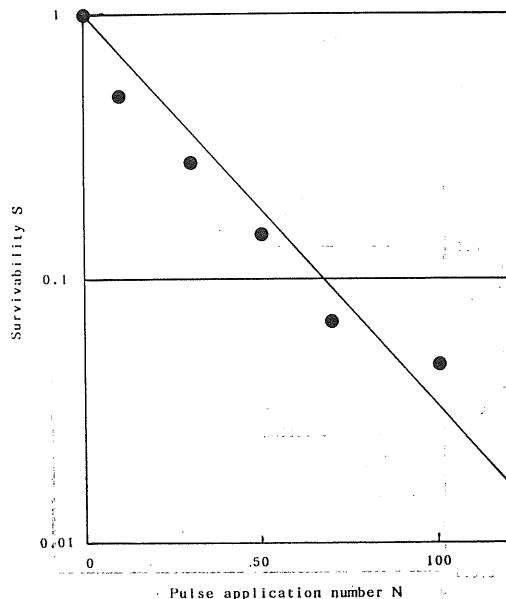


図 20 同軸状針電極先端部の直徑 5 mm の円内のイースト菌生存率

Fig. 20 Survivability of yeast cells within 2.5 mm distance from the center of the coaxial type needle electrode.

径 $0.5 \mu\text{m}$ 程度の大きなくぼみが 1 個存在するものが観察された。さらに電界強度の高い同軸状針電極系で破壊した場合には表面が裂けたようなものも観察された。

(2) 電界集中型電極系により、1% NaCl 溶液中のイースト菌を破壊した結果 $W=36 \text{ cal/cm}^3$ において、生存率 $S=0.02$ 程度の破壊を行なうことができた。

(3) 同軸状針電極系により、ゲル中のイースト菌を破壊したところ、印加パルス数 100 回で針電極を中心とした直径 5 mm の範囲のイースト菌の生存率は、約 0.03 に低下した。

電気的細胞破壊法は、試料の温度上昇を抑えられる点に特徴を有する。このため試料中のタンパクの変性が起きにくい可能性が高いと思われるが、この点に関しては今後の研究課題である。また微生物の種類により破壊効果が異なるはずであり、またウイルスのように小さな粒子ではその両端に印加される電圧値が小さくなり、破壊効率が低下する可能性も考えられる。対象により必要な破壊条件を求めることも今後の研究課題である。同軸状針電極を用いることにより、局所的な破壊を行なうこと

ができるが、これを実際に生体等で行なうためには、感電によるダメージを防止する必要がある。多く使用されている電気メスの安全範囲が参考にできるが、パルス電圧に対する安全性の確保が可能であるかどうかも今後の課題である。

本研究に対し有益な御討論・御助言を賜わった三菱重工業株式会社高砂研究所 松本陽一氏に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) A. Mizuno and Y. Hori : IEEE Trans. Ind. Appl., 24 (1988) 387
- 2) U. Zimmermann, P. Scheurich, G. Pilwat and R. Benz : Angew. Chem. Int. Ed. Engi., 20 (1981) 325
- 3) J.H. Sale, and W.A. Hamilton : Biochim. Biophys. Acta, 148 (1967) 789
- 4) 佐藤正之：静電気学会，電界応用機器研究委員会，資料 EFA-26 (1988)
- 5) 鈴木昭男：電子顕微鏡観察法，丸善 (1982)
- 6) S. Masuda, M. Washizu and T. Nanba : Conf. Rec. of IEEE/IAS Annual Meeting, p.1549 (1987)