J. Inst. Electrostat. Jpn. 論 文

高電圧パルス電界処理による 線虫*Caenorhabditis elegans*の不活性化

谷野 孝徳, 岡田 拓也, 大嶋 孝之*.1

(2013年9月10日受付;2013年12月20日受理)

Inactivation of *Caenorhabditis elegans* with Pulsed Electric Field Treatment Takanori TANINO, Takuya OKADA and Takayuki OHSHIMA^{*,1}

(Received September 10, 2013; Accepted December 20, 2013)

Inactivation of *Caenorhabditis elegans* in pulsed electric field (PEF) was studied. Experimental results and electric field strength simulation in the treatment chamber indicated that *C. elegans* could be inactivated in the electric field strength of 1 kV/cm. Because general bacterial cells can be inactivated in the field strength of 10 kV/cm, nematode seems to be very sensitive toward PEF. We also compared the inactivating efficiency of the egg, larva, and adult *C. elegans* with PEF treatment. The egg was most sensitive to PEF treatment, more than 90% of the *C. elegans* egg was inactivated after 4.0 kV and 2 sec of PEF treatment. Although the larva, and adult *C. elegans* was resistant to PEF treatment, the survival ratio 1 day after PEF decreased than that just after PEF treatment. Fluorescence microscopic analysis of fluorescently-stained *C. elegans* after PEF treatment showed that the head, tail, epidermis and muscle of *C. elegans* tend to be damaged by PEF treatment. And it was suggested that inactivation measurement method based on ATP content could be partially applied to inactivation measurement of *C. elegans*.

1. はじめに

近年、生物への静電気技術の応用が注目され、様々な 基礎研究・応用研究が行われている。その応用例として 最も盛んな例の一つがパルス電界 (PEF: Pulsed Electric Field) による微生物の殺菌技術である. 微生物に対す る PEF 不活化技術は、極短時間の電界の印加により微 生物細胞膜の不可逆的な破壊を引き起こし、細胞内容物 を漏出させることで微生物を殺菌する技術であり、これ までの研究成果により大腸菌など単細胞微生物について は膜破壊の詳細なモデルが確立されている¹⁾. PEF 不活 性化技術は非加熱かつ薬剤を使用しない殺菌法であり, この特徴を利用し、加熱による風味や有用成分の変質を 防ぐことで製品品質ならびに付加価値の向上を目指し, 食品製造分野における活発な研究が行われている²⁴. また、殺菌に留まらず致死強度以下の PEF に対し微生 物細胞が示す生物学的応答などについても研究がなされ はじめている.一例として我々は酵母細胞を用いた研究 により, 致死強度以下の PEF ストレスは酵母細胞に酸 化ストレス応答遺伝子群の発現を誘導することを明らか

 $\mathbf{t} = \mathbf{r} - \mathbf{r} - \mathbf{k}$: pulsed electric field, inactivation, Caenorhabditis elegans

* 群馬大学理工学研究院

(〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1) Faculty of Science and Technology, Gunma University 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu city, Gunma, 376-8515, Japan

¹ tohshima@gunma-u.ac.jp

としている⁵⁾. しかしながら,多細胞生物に対し PEF が 及ぼす影響についての研究例はあまり報告されておら ず,不明な点が多い. そこで,本研究では PEF 処理が 多細胞生物に与える影響を明らかとするための取り組み として,多細胞生物研究のモデル生物に広く使われ,培 養や観察が容易である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用い て, PEF による不活性化に着目し検討を行った.

線虫 C. elegans は 99.9%雌雄同体であり、成虫の体細 胞数は 959 個であるにもかかわらず神経、筋肉、消化管、 表皮、生殖巣といった組織、器官をもつ[®]. このことは、 遺伝的背景が均一な対象に対し詳細な器官別の解析を行 う上で役立つ. また、卵、幼虫、成虫からなるライフサ イクルを有し、約2日半で4回の脱皮を繰り返して成虫 へと成長する. 線虫に対する電気的刺激の例としては P. Rezai ら[®]が微弱パルス状電流による刺激に関して検討 している. また、鈴木ら[®]は GFP 組換え線虫に対して プラズマジェット照射を行い、GFP 発現の変化を観察し ている. これらとは異なり、本研究では線虫 C. elegans の PEF による不活性化に着目する上で、これら異なる ライフサイクル中にある線虫の感受性の違いに着目して 調査を行った.

実験方法・手順

2.1 線虫C. elegansの調整

NGM 寒天培地を作成し,下記の手順で線虫を培養した.NGM 寒天培地の調製法は,1Lの蒸留水に NaCl 3 g,

Bacto pepton 2.5 g, Agar 17 g を加えオートクレーブ後, 別滅菌したコレステロール液(5 mg/mL)1 mL, 1 M CaCl₂ 0.5 mL, 1 M MgSO₄1 mL, 1 M phosphate buffer (pH 6.0) 25 mL を追加し, クリーンベンチ内で分注, 固化さ せた⁶⁰. ここに餌となる大腸菌(OP50 株)を37℃, 24 h 培養した後に, 線虫 *C. elegans* 細胞を白金耳で接種し, 増殖させた, *C. elegans* 細胞の培養温度は20℃で行った.

線虫は卵,幼虫,成虫の三種類を使用した.まず,卵 の分離は以下の手順で行った.線虫を培養している NGM プレートに K 培地(53 mM NaCl, 32 mM KCl)1 ml を注 いで卵,線虫を K 培地中に懸濁し,エッペンチューブに 移した.これを遠心(3000×g,3 min)にかけ,上清をピ ペットで除き,ブリーチ液(2% NaClO,0.1 M KOH)1 mlを入れて混ぜ,室温で2分間インキュベートした.イ ンキュベート後すぐに遠心(3000×g,2 min)し,K培 地1 mlを用いて沈殿物を2度洗浄した.洗浄後に上清を 除き,残った沈殿物から卵を採取した.この操作は,ブ リーチ液に対して孵化した線虫は耐性が無く溶けてしま うが,卵には殻があるため耐性があり溶けずに残るとい う性質を利用して卵だけを採取することが可能である.

また,幼虫は卵から孵化した後半日後の個体,成虫は 孵化した後3日後の個体とした.上記以外の線虫のハン ドリングの多くは線虫ラボマニュアル(三谷昌平著)⁶ を参考とした.

2.2 パルス電源および処理装置

パルス電源としてはロータリースパークギャップ型パ ルス発生装置(RSG電源)を用いた⁹.本実験で電界強 度と線虫の不活性化の関係を調査するために使用した実 験装置の概略図を Fig. 1 に示す. 直径 50 mm のシャー レに厚さ 2 mm のシリコーンを取り付け,シリコーンの 中心に 10 mm × 10 mm の正方形の穴を開けた. その穴 に厚さ 2 mm の 2% 寒天プレートをはめ込んだ. 線虫は



Fig. 1 Schematic of treatment chamber

この寒天上に接種し、処理前後を顕微鏡で観察した.シャーレの側面に小さな穴を2つ開け、その穴から直径1 mmのステンレス針電極を1本ずつ差し込んだ.ステン レス針電極は、シリコーンの厚みの中間部分から正方形 の穴の側面まで貫通させてある.また、シリコーンの正 方形の穴と寒天の大きさを20mm×20mmにした装置も 用意した.

また, 卵, 幼虫, 成虫の PEF に対する感受性の違い を調査するために, 均一な電界が印加されるように設計 した実験装置の概略図を Fig. 2 に示す. 上記と同様のシ ャーレとシリコーンを用い, シリコーンの中心に 34 mm ×34 mm の正方形の穴を開け, 2%寒天プレートをはめ 込んだ. 先端をシリコーンで皮膜した直径 1 mm のステ ンレス針電極を, 対辺上に 1 本ずつ差し込んだ.



Fig. 2 Schematic of treatment chamber to apply uniform electric field

2.3 電界シミュレータによる解析

実験装置に印加される電界強度を 2 次元有限要素法解 析ソフト (Maxwell 2D, Ansoft Corp., USA) を用いてシ ミュレーションを行った.

2.4 線虫細胞の染色

生細胞と死細胞を染色して明確に観察するため、セル ステイン細胞二重染色キット(同仁化学研究所)を使用 した.また,染色プロトコールは付属の説明書通りに行い、 490 nm フィルターで励起した顕微鏡像を写真撮影した. 本キットは Calsein により生細胞を黄緑色に Propidium Iodide (PI)により死細胞を赤色に染め分けることができ、 蛍光顕微鏡観察によりその分布を観察することが可能と なる. Calsein 溶液ならびに PI 溶液を 10 µM に調整し、 PEF を印加した線虫に滴下し、蛍光顕微鏡観察を行った.

2.5 線虫ATP量の測定

ATP(アデノシン三リン酸)は生物内で用いられるエ

ネルギー保存および利用に関与するヌクレオチドであり、「生体のエネルギー通貨」も呼ばれている. 生物体の活動に伴い生産されるため、細胞の生死の判定や菌体数の定量評価に用いることもできる.

PEF印加による線虫内の ATP 量の変化を, ルシフェー ル HS セット(キッコーマン)を用いて測定した. PEFを 印加した線虫を1 mL の蒸留水に懸濁後, ATP 消去試薬 0.1 mL を加え撹拌した. このうち 0.1 mL を測定用チュー ブに分注し 30 min 反応させ, 遊離の ATP を消去した. 次に,線虫内から ATP を抽出するため ATP 抽出液を 0.1 mL 加え, 20 sec 後に発光試薬 0.1 mL を加え, ルミテス ターC-110(キッコーマン)を用いて ATP 量に依存して 発生する発光量(RLU: Relative Light Unit)を測定した. 測定後,測定液中に含まれる線虫数を測定し,線虫数で RLU 値を除することで平均 RLU 値を求めた. 同様の実 験は 5 回行い,数値の妥当性を確認した.

3. 実験結果および考察

3.1 線虫不活性化に要するPEF電界強度

成虫の線虫に対して Fig. 1 に示した 10 mm×10 mmの 処理面積を有する実験装置を用い,電極間距離 10 mm, 周波数 50 Hz,印加電圧 4.0 kV にて 2 sec の PEF 処理を 行い線虫への影響を調査した.この印加時間ではオーミ ックヒーティングによる顕著な温度上昇は認められない ので,電界効果を検討できると考えた.実験は寒天プレ ートを5×5に25分割して,それぞれの位置について 線虫の不活性化を確認した.線虫の不活性化は,PEF 印 加後に顕微鏡観察により線虫の動きがあるかどうかで確 認した.3回実験したうちの典型的な実験結果を Fig. 3 に示す.

図中の×印が記載されていない位置は、その位置にいた線虫が PEF 印加後に動かずに不活性化したことを表す. 寒天プレート上の大部分において線虫の不活性化が確認された. この結果より、PEF 処理により成虫の線虫を不活性化できることが確認された. しかしながら、寒



Fig. 3 Survival point of *C. elegans* on 10×10 mm agar plate after PEF treatment

天プレート端では線虫が不活性化されない領域が確認され、線虫の不活性化に最低限必要となる PEF 電界強度の閾値が実験で印加した電界強度付近に存在するものと 推測される.

そこで、次に 20 mm × 20 mm の処理面積を有する実 験装置を用い電極間距離を 20 mm とし、同条件にて PEF処理が線虫の不活性化に与える影響を調査した(Fig. 4).同様の実験は 3 回行い、典型的な実験結果を Fig. 4 に示している.線虫の不活性化は電極が対向する寒天プ レートの中心付近のみの狭い領域のみであることが確認 された.これは同じ印加電圧条件で電極間距離が長くな ったことで処理面積中では電界強度が弱くなる領域が増 加し、いっそう電界強度による不活性化の有無が明瞭と なったと考えられる.



Fig. 4 Survival point of *C. elegans* on 20×20 mm agar plate after PEF treatment

線虫の不活性化に必要となる電界強度の閾値を推定す るため、電界シミュレータを用い 10 mm × 10 mm なら びに 20 mm × 20 mm の処理面積を有する実験装置の電 極間に 4.0 kV の電圧を印加した際に生じる電界強度分 布のシミュレーションを行った結果をそれぞれ Fig. 5, Fig. 6 に示す.

これら Fig. 5, Fig. 6 のシミュレーションの結果は電極 平面上のシミュレーション結果で、実際の実験系では線 虫は電極平面上から約 1 mm 上方に位置している.した がって、線虫が暴露されている電界強度はシミュレーシ ョンが示す値よりも小さいが、最大値の目安とすること ができる.シミュレーションの結果から電極が接してい る部分および電極を結ぶ直線上の部分、つまり寒天プレ ートの中心付近の電界強度が強く、そこから離れるにつ れて電界強度が弱まっていることが確認できる.それぞ れを Fig. 3, Fig. 4 に示した線虫が不活性化された領域 と照らし合わせてみると、10 mm × 10 mm ならびに 20 mm × 20 mm の処理面積を有する実験装置どちらにお いても、およそ電界強度 1.0 kV/cm 以上の領域で線虫が 不活性化したことが確認できる.



Fig. 5 Electric field strength simulation of 4 kV PEF treatment on 10×10 mm agar plate



Fig. 6 Electric field strength simulation of 4 kV PEF treatment on 20×20 mm agar plate

前述のようにシミュレーションによる電界強度は実際 に線虫が暴露されている電界強度よりも高い値を示して いると考えられる.したがって,電界強度1.0 kV/cmよ りも低い電界強度で線虫の不活性化効果があることは間 違いないと考えられる.パルス殺菌に関しては多くの知 見があり,バクテリアの懸濁系に均一パルス電界を印加 した場合には,不活性化に必要な電界強度は10 kV/cm 程度であることから¹⁰,線虫はバクテリアに比べ PEF に対し非常に感受性が高いことが確認された.

3.2 線虫成長段階のPEF感受性への影響

成虫の PEF に対する感受性が卵,幼虫,成虫それぞれの成長段階により異なるか調査した.線虫の卵は顕微 鏡観察により卵中の線虫が透けて見えるため幼虫,成虫 と同様動きの有無により生死を判断可能である.実験装 置として寒天プレート上の多くの領域に均一な電界を印 加できるように Fig. 2 に示した装置を用い対象の線虫を 中央付近に置いて PEF を印加した.中央付近の電界強 度は Fig. 5 と同様のシミュレートを行い,中央付近に均 一な電界強度領域があることを確認した.線虫が不活性 化することが明らかとなった電界強度である約 1.0 kV/ cm となるよう 4 kV の PEF (電界強度 1.1 kV/cm)を 2 sec 印加し,印加直後と印加 1 日後の線虫の不活性化を



Fig. 7 Fluorescent microscopy of fluorescently- stained C. elegans with native (a) and 70% ethanol treatment (b)



Fig. 8 Fluorescent microscopy of fluorescently- stained C. elegans

調べた結果を Table 1 に示す. また, 電界強度により線 虫の不活性化の様子が異なるかを調べるため電界強度 2.0 kV/cm となるよう 6.8 kV の PEF を印加し同様に線虫 の不活性化を調べた (Table 1).

電界強度 1.1 kV/cm および 2.0 kV/cm の両結果より,

Table 1 Inactivation ratios of C. elegans after PEF treatment of 2 sec

Electric field strength (Applied voltage)	<i>C.elegans</i> form	Measurement time	Inactivation ratio
1.1 kV/cm (4.0 kV)	egg	just after PEF	93.3%
		1 day after PEF	95.6%
	larva	just after PEF	51.9%
		1 day after PEF	77.4%
	adult	just after PEF	29.5%
		1 day after PEF	64.9%
2.0 kV/cm (6.8 kV)	egg	just after PEF	95.4%
		1 day after PEF	95.6%
	larva	just after PEF	81.6%
		1 day after PEF	85.8%
	adult	just after PEF	81.4%
		1 day after PEF	83.4%

線虫は卵、幼虫、成虫の順に PEF に対する感受性が高く、 電界強度 1.1 kV/cmの PEF 印加直後にそれぞれ 93.3%, 51.9%、29.5%が不活性化されることが明らかとなった。 つまり、電界強度 1.1 kV/cm では卵はほぼ完全に不活性 化できるが、幼虫、成虫は不活性化しにくいことが確認 できた. 一方で電界強度 2.0 kV/cm の PEF 処理において は卵、幼虫、成虫の PEF 印加直後の不活性化率はそれ ぞれ 95.4%, 81.6%, 81.4% であり, 電界強度 2 kV/cm では幼虫,成虫に対しても PEF は十分に不活性化効果 を有することが確認された. また, 電界強度 1.1 kV/cm の PEF 印加1日後に線虫の不活性化率の変化を確認し たところ卵、幼虫、成虫それぞれにおいて不活性化率の 増加が確認された。中でも成虫は不活性化率が64.9%で あり、増加の割合が最も大きく PEF 印加直後の2倍以 上の不活性化が確認された、この結果より、電界強度 1.1 kV/cm では幼虫・成虫は卵とは異なり即座に不活性 化される個体は少ないものの、不活性化されなかった個 体のうち多くは致死性の損傷を受けて時間とともに不活 性化されるものと考えられる. 電界強度 2.0 kV/cm にお いても、PEF印加1日後には全ての成長段階の線虫にお いて不活性化率の増加が確認されたが、増加の割合は小 さい. これは電界強度 2.0 kV/cm においては線虫が損傷 を受ける場合には即座の不活性化につながるような損傷 を受けるためだと考えられる.

3.3 蛍光染色を用いたPEF処理で損傷を受ける線虫 細胞分布の可視化

2.4 で述べた方法により線虫を観察したところ, 無処理で は Fig. 7(a)のように全体が黄緑色に観察された. 一方, 線 虫に 70%エタノールを数滴たらし, 5 分ほど放置した後に 染色したものは,赤く染色された像が観察できた(Fig. 7(b)).

PEF 処理により線虫がどのように損傷を受けるのか, つまり線虫のどのような部分が PEF により細胞死を引 き起こすのかを, 蛍光染色にて生細胞と死細胞をそれぞ れ黄緑色,赤色に染め分けた上で蛍光顕微鏡観察を行い 確認した. この実験では Fig. 2 の実験装置の中央付近に 線虫を置き, PEF を印加した.予想電界強度 1.1 kV/cm および 2.0 kV/cm にて PEF 処理後に蛍光染色を行った各 成長段階の線虫の蛍光顕微鏡写真を Fig. 8 に示す.

電界強度 2.0 kV/cm にて PEF 処理を行った場合には, どの成長段階の線虫においても死細胞を示す赤色蛍光が 強く確認され,線虫の表層の大部分の細胞が損傷を受け ていることが確認される.一方で,電界強度 1.1 kV/cm にて PEF 処理を行った場合には,全ての成長段階の線 虫において生細胞の存在を示す黄緑色の発色が部分的に 確認され,表層には損傷を受けていない細胞が多く存在 することが確認される.中でも成虫では損傷を受けず生 細胞として残存している細胞が多いことが確認された. 卵では死細胞の存在を示す赤色蛍光が幼虫,成虫に比べ 強く確認される.幼虫,成虫の線虫では個体の表層に赤 色蛍光による死細胞の分布が確認されることから,PEF 処理により線虫の表皮,表層近くの筋肉が損傷を受ける ことが考えられる.また,線虫の両端部分にも死細胞の 分布が確認されることから,線虫の尾部ならびに神経細 胞や神経線維が密集する咽頭付近もPEFにより損傷を 受けることが確認された.これらの結果より,電界強度 1.1 kV/cmにてPEF 処理を行った場合に印加1日後に線 虫の不活性化率が増加するのは,線虫の運動機能や摂食 機能が損傷を受けるため生命機能を維持することが困難 になるためであることが示唆される.

3.4 PEFが線虫内ATP量に及ぼす影響

これまでの実験では線虫の不活性化は PEF 印加後に 顕微鏡観察により線虫の動きがあるかどうかで確認し た、しかしながら、顕微鏡観察による確認では種々の検 討などを行うために必要となる多量のサンプルに対し不 活性化をハイスループットに解析することは困難であ る. そこで、バクテリアの不活性化をハイスループット に評価するための手法として利用される対象生物内の ATP 量に着目した不活性化評価手法が線虫にも適応可能 かどうかを調べた. ATP は生体内の生体活動の指標とな る物質で、ATP 量を測定することで純粋培養における細 胞数を計測する方法もある(ルシフェール HS セット(キ ッコーマン)).用いた手法としては ATP 存在量に比例 して発色する蛍光の発光量を測定する手法を試みた.こ の実験では Fig. 2 の実験装置の中央付近に線虫を置き, PEF を印加した. 予想電界強度 1.1 kV/cm および 2.0 kV/ cm にて PEF 処理を行った線虫を用い発光量を測定した 結果を Table 2 に示す.

Table 2 ATP content measurement of	f <i>C</i> .	elegans
---	--------------	---------

Electric field strength (Applied voltage)	C. elegans form	Average RLU	Average RLU decrease ratio
control (0 kV)	egg	3.1	_
	larva	24.6	_
	adult	29.5	_
1.1 kV/cm (4.0 kV)	egg	0.47	84.8%
	larva	14.7	41.4%
	adult	17.5	40.1%
2.0 kV/cm (6.8 kV)	egg	0.21	93.2%
	larva	3.6	85.7%
	adult	6.3	78.6%

PEFの印加により平均 RLU 値の減少が確認され, PEF 感受性の高い卵では大きな減少が確認された.平均 RLU 値の減少率を Table 1 で示した不活性化率と比較す るとおおよそその傾向は一致しているが,致死性の傷害 を受けながらも完全には不活性化していない個体の多い 電界強度 1.1 kV/cm の PEF 処理においては 10%以上の 差異があり,不活性化の評価法として用いることは難し いと考えられる.一方で PEF 印加直後に線虫の不活性 化が確認される電界強度 2.0 kV/cm での PEF 処理では, ATP 量を指標として線虫の不活性化を判断することが可 能であることが示唆された.この実験では線虫生死の判 別の簡素化を考えた系であるが,やはり顕微鏡による直 接観察に置き換えることは難しいと考えられる.

4. 結言

PEF が多細胞生物に与える影響を明らかとするためモデル生物として線虫 C. elegans を用い,不活性化に着目し卵,幼虫,成虫の異なる成長段階への PEF 処理を行い,以下の結果を得た.

- (1) PEF 処理により線虫は不活性化可能であり,不活 性化に必要となる電界強度はおよそ 1.0 kV/cm で あった.また,この値は一般的なバクテリアを不 活性化するために必要となる電界強度 10 kV/cm に比べて小さく,線虫は PEF への感受性が高い ことが明らかとなった.
- (2) 線虫の成長段階別の PEF 感受性は卵,幼虫,成 虫の順に高かった.卵は電界強度 1.1 kV/cm で 92 %以上が不活性化され非常に PEF 感受性が高い ことが明らかとなった.
- (3) PEF 印加後しばらくして不活性化される線虫が存 在することが明らかとなり、成虫ではその傾向が 強く印加1日後の不活性化率は印加直後の2倍に 増加することが明らかとなった.

- (4) 蛍光染色の結果から, PEF により線虫の表皮, 筋 肉, 咽頭部, 尾部に損傷が生じやすいことが明ら かとなった.
- (5) バクテリアの不活性化評価手法として用いられる ATP を指標とした測定法は、PEF 印加直後に不活 性化が見られる強い電界強度での PEF 処理では、 線虫の不活性化評価手法として応用可能であるこ とが示唆された。

参考文献

- 1) J.C. Weaver and Y.A. Chizmadzhev: Bioenerg., 41 (1996) 135
- K. Hung, H. Tain, L. Gai and J. Wang: J. Food Eng. 111 (2012) 191
- 3) K. Huang and J. Wang: J. Food Eng. 95 (2009) 227
- S.F. Aguilar-Rosas, M.L. Ballinas-Casarrubias, G.V. Nevarez-Moorilion, O. Martin-Belloso and E. Ortega-Rivas: J. Food Eng. 83 (2007) 41
- T. Tanino, S. Sato, M. Oshige and T. Ohshima: J. Electrostat.
 70 (2012) 212
- 6) 三谷昌平:線虫ラボマニュアル、シュプリンガー・ジャ パン (2003)
- P. Rezai, S. Salam, P. R. Selvaganapathy and B. P. Gupta : Biomicrofluidics, 5 (2011) 044116
- 8) 鈴木亜美,安田八郎,浴 俊彦,栗田弘史,高島和則, 水野 彰:静電気講演論文集'10 (2010) 165
- T. Ohshima, K. Sato, H. Terauchi and M. Sato : *J. Electrostatics*, 42 (1997) 159
- M. Sato, K. Tokita, M. Sadakata, T. Sakai and K. Nakanishi : Int. Chem. Eng. 30 (1990) 695